

ダリアの茎頂培養が生育とウイルス保毒程度に及ぼす影響

仲 照史・藤井祐子・細川宗孝*・中島明子*・浅尾浩史・岡田恵子・前田茂一

Effect of Apical Meristem Culture Propagation of Dahlia(Dahlia ×cultorum) on the Growth and Viruliferous Level

Terufumi NAKA, Yuko FUJII, Munetaka HOSOKAWA*, Akiko NAKAJIMA*, Hiroshi ASAO, Keiko OKADA and Shigeichi MAEDA

Summary

Apical-meristem-cultured Dahlia plantlets were obtained using ordinary methods from a shoot apex with a pair of leaf primordia. The relation between the growth and the viruliferous level of the cutting seedlings from the tip-cultured strains as stock plants was examined. Furthermore, the growth and productivity of these strains were investigated at various ages.

Using RT-PCR and nested-PCR, 22 strains (7 cultivars) of Dahlia were examined in relation to virus pollution. Dahlia mosaic virus (DaMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Cucumber mosaic virus (CMV), Chrysanthemum stunt viroid (CSVd), and Tobacco streak virus (TSV) were detected, respectively, in 92, 100, 68, 73, and 5% of strains.

Cutting seedlings of stem-tip-culture strains had greater numbers and heavier fresh weight of rooting than those of native tuberous root strains. Using RT-PCR, DaMV infection was confirmed from strains which had fewer numbers of rooting.

After several years' reproduction, stem-tip culture strains sprouted earlier and grew more rapidly in early stages of growth than did native tuberous root strains. Furthermore, more cut flowers and higher tuberous root yields were produced from the stem-tip cultured strain.

Results show that it was difficult to obtain complete virus-free strains using ordinary methods of apical meristem culture. However, such strains had superior rooting and initial growth after 4-5 years' reproduction.

Key Words : Dahlia, apical meristem culture, virus-free, rooting

緒言

奈良県は全国有数のダリア産地であり、切り花および球根が生産されている。県内生産現場での増殖は、塊根の分球による栄養繁殖で行われているが、ダリアモザイクウイルス(以後、DaMVと記す)、トマト黄化えそウイルス(以後、TSWVと記す)などのウイルス感染¹⁾による品質および収量の低下が、しばしば問題となっている。

これに対しダリアでは、早くから茎頂培養によるウイルスフリー化^{1,2,3)}が試みられ、有効性が示されている。奈良県農業総合センターでも、江面・本図³⁾の手法に準じた茎頂培養苗由来の原種系統(以後、培養系統と記す)を、2000年から県内産地に供給してきた。これら培養系統は、生産者団体から生育旺盛で生産性が高いと評価されている。

しかし、ダリアの生産はほとんどが露地栽培であり、アブラムシ類やアザミウマ類によるウイルスの再感染^{1,3)}が懸念されている。さらに近年、細川ら²⁾はPCR法によって県内生産圃場のダリアか

らキクわい化ウイロイド(以後、CSVdと記す)保毒個体を確認している。

一方、産地へ配布する培養系統のウイルス検定は栽培試験での目視による無病徴確認で行っているため、管理労力等の負担が大きい。ウイルス検定の方法は、近年cDNAプローブ¹⁶⁾やRT-PCR⁷⁾の利用によって、飛躍的に高精度化されており、ウイルス種によっては茎頂培養を行ってもフリー化率が劣る¹⁾ことが知られている。

そこで、実用上の視点から培養系統のウイルス保毒の状況、発根および生育の状態および産地への配布後4-5年を経過した培養系統の生育について調査した。

材料および方法

実験1. 培養系統のウイルス検定

供試系統は、産地内で品質低下が問題となっていた7品種22系統とした。各品種の苗条を、2004年および2005年の秋に奈

* 京都大学大学院農学研究科

本研究は農林水産研究高度化事業「新規に開発した病原体フリー植物作出系のマニュアル化とその展開(平成17-19年度)」により実施した。

良県宇陀市の現地圃場の栽培株から採取した。

茎頂培養は、江面・本図³⁾の手法に準じて行った。採取した苗条は、70%エタノールに30秒間、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)に15分間浸漬して殺菌した。茎頂は、葉原基を付けて0.5mm以下に切り出し、ベンジルアミノプリン(BA)0.05ppm添加のMS培地(寒天0.8%, pH5.8)に置床した。伸長株は、約2ヶ月後にホルモンフリーの1/2MS発根培地に移植した。以後の継代培養は、ホルモンフリー1/2MS培地を用いて約1ヶ月毎に行った。いずれも培養条件は25°Cで、植物育成用蛍光灯により3000lx、16時間日長とした。

ウイルス検定は、RT-PCRおよびnested-PCRによりDaMV, TSWV, キュウリモザイクウイルス(以後、CMVと記す)、タバコ条斑ウイルス(以後、TSV記す)およびCSVdについて行った。2006年春にTRIzol(Incitorogen, USA)を用いてTotalRNAを抽出した。第1表に示したプライマーを用いて、Hosokawaら⁹⁾の手法によりRT-PCRおよびnested-PCRを行った。いずれも1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

実験2. 挿し芽育苗時における培養系統の発根および生育

‘モナコ’, ‘プリンセスマサコ’および‘ソフトムード’の培養6系統と在来球7系統を供試した。1茎頂もしくは1塊根に由来する各親株系統から、2006年7月16日に展開葉2対を付けた挿し穂を採取した。挿し穂は展開葉1対を残して9-10cmに調製し、市販育苗用土(Metro mix, #350)を詰めた128穴セルトレイに挿し芽した。挿し芽後は間欠ミスト散水下で管理した。8月7日に茎長、節数、地上部新鮮重、根数、根重(新鮮重)および最大根長を調査した。親株養成および挿し芽育苗はいずれも、75W白熱灯により22:00-翌2:00の暗期中断条件とした無加温ガラス温室内で行った。なお、各親株系統は2006年4月に、培養苗もし

くは在来球を温室内で鉢上げし、挿し芽によって適宜増殖しておいた。

‘ソフトムード’については、1回目で用いたM1系統が検定の結果、ウイルスの複合保毒系統であったため、TSV保毒のみのM3系統を用いて9月4日に採穂および挿し芽、9月27日に調査する再実験を行った。これらの実験に用いた各系統については、実験1同様のPCR法によりウイルス検定を行った。

実験3. 産地配布から4-5年経過した培養系統の生育

産地配布後、5世代目の‘神秘の輝き’および4世代目の‘祝杯’について、2006年に現地調査を行った。両品種とも前年まで、塊根を5-6月に露地に植え、夏秋期に採花し、11月に堀上げて分球する栽培を毎年繰り返していたものである。

‘神秘の輝き’については、培養系統738球および在来球系統510球を2006年4月15日に同一圃場へ定植し、5月30日に摘心する7月出荷作型とした。施肥は、有機配合肥料により、N-P-K各成分量を2.6-3.0-1.7kg/aとした。

‘祝杯’については培養系統1,286球および在来球系統1,882球を2006年5月29日に同一圃場へ定植し、7月29日に摘心する9月出荷作型とした。施肥は、鶏糞および蒸製骨粉によりN-P-K各成分量を1.0-2.5-0.5kg/aとした。両品種とも栽植様式は、畝幅140cm、条間25cm、株間25cmの2条植えとした。

約3週間毎の6月8日、6月28日、7月25日、8月15日、9月8日および10月4日に分枝数、最大分枝長、分枝節数、最大葉身長、花芽径、欠株率およびモザイク等のウイルス病徴を各区、連続40株について調査した。また各区から生育良好株と生育不良株を各5株選び、11月15日に掘り上げて、塊根数およびクラウンを含む塊根新鮮重を調査した。切り花収量については、全期間の各区の出荷本数を記録した。

第1表 ウイルスおよびウイロイド検定に用いたプライマー
Table1. The Primers used in PCR detection of the virus and viroid

検定対象	プライマー名	配列	手法	産物のサイズ (bp)
DaMV	DMV-R1345	5'ACTTCCTGGTATGAGACTCA3'	RT-PCR	402
	DMV-F944	5'AAAAGAGGCTACCATACCC3'		
	DMV-R1321	5'CATAGTTGGCCTTCTTCAGAG3'	nested-PCR	260
	DMV-F1062	5'ACAAAGGTGCTGTAACCCAGT3'		
TSWV	TSWV-A	5'CCTTCCTGTTCTGCTTCAACTG3'	RT-PCR	457
	TSWV-B	5'TCTGCCCACTATACCAAAACC3'		
	TSWV-R371	5'CTGCTTCTCACTGTTTCC3'	nested-PCR	302
	TSWV-F70	5'GTCAGGGGACAATAACTG3'		
CMV	CMV-R538	5'CCGAAGATCGTACAACAAT3'	RT-PCR	322
	CMV-F217	5'AAACCTGGATACAGGTTCACT3'		
	CMV-R513	5'GTTAGCTTGGACTCCAGATG3'	nested-PCR	274
	CMV-F240	5'TATTACCCATAAGCCACCACA3'		
TSV	TSV-R473	5'CCTGTTACTCCATCAACCAT3'	RT-PCR	343
	TSV-F131	5'CCCAATAACCCGTGAACACT3'		
	TSV-R418	5'AGAGGGGAAAACCTTCGTCTC3'	nested-PCR	202
	TSV-F211	5'GTTTACCGAGTACCGATTCCA3'		
CSVd	CS1	5'AGGATTACTCCTGTCTCGCA 3'	RT-PCR	252
	CS2	5'CAACTGAAGCTTCAACGCCCTT 3'		
	CSVd-NR	5'AGTGGGTCTCTAAGCCCAA 3'	nested-PCR	204
	CSVd-NF	5'CCAATCTTCTTAGCACCG 3'		

結果

実験1. 培養系統のウイルス検定

ウイルスおよびウイロイドの検定は、RT-PCRでウイルス保毒が検出された場合を高保毒、RT-PCRで検出されずnested-PCRで検出された場合を低保毒、いずれによっても検出されなかった場合をウイルスフリーとして集計した。各培養系統のうちDaMV, TSWV, CMV, TSVおよびCSVdの検出された系統数およびウイルス・ウイロイド種ごとの非保毒率を第2表に示した。ウイルス種によって非保毒率に大きな差が見られた。DaMVおよびTSWVについては、82および100%と高い非保毒率が得られた。一方、CMVおよびCSVdの非保毒率は、それぞれ68および73%とやや低くなったものの高保毒系統はなかった。これらに対し、TSVは14系統が高保毒であり、ウイルスフリーは1系統(非保毒率5%)の

みであった。

実験2. 挿し芽育苗時における培養系統の発根および生育

在来球系統および培養系統の親株群から挿し芽した苗の発根、初期生育およびウイルス検定結果を第3表に示した。培養系統は、'モナコ' B1系統の節数、'モナコ' B8系統と'ソフトムード' B3系統の地上部新鮮重を除き、節数および地上部新鮮重が在来球系統より大きくなった。また、'プリンセスマサコ' B3系統と'モナコ' B8系統の根数を除き、培養系統の根数、根重および最大根長は、在来球系統より大きかった。供試した培養系統は、全てTSVを保毒し、生育が劣った'ソフトムード' M1系統はDaMV、CMVおよびCSVdを複合保毒していた。一方、在来球系統は全て複合保毒していたが、相対的に生育良好であった'プリンセスマサコ' B3系統は、DaMV感染が見られなかった。

実験3. 産地配布から4〜5年経過した培養系統の生育

培養系統の萌芽は在来球系統よりも早く、摘心前調査時の萌芽株率は各々、'神秘の輝き'で90%および82.5%、'祝杯'で92.5%および62.5%であった。分枝伸長期および発蕾期の生育と切り花収量を第4表に示した。培養系統の分枝長、葉身長、分枝節数および株当たり分枝数は、両品種とも在来球系統より大きかった。また、培養系統の欠株率は、在来球系統と比べて'神秘の輝き'で同等、'祝杯'で少なかった。その結果、培養系統の定植球当たり切り花本数は、在来球系統の143〜147%となった。

塊根数および塊根重を第1図に示した。塊根数と塊根重は同じ傾向を示し、'神秘の輝き'では培養系統で地上部の生育が良いほど大きくなった。しかし、'祝杯'では、在来球系統と培養系統の間に明確な差は見られなかった。

第2表 ダリア茎頂培養系統のウイルス・ウイロイド検定結果
Table2. The result of Virus (Viroid) test of apical meristem culture strains by RT-PCR and nested-PCR

品種	検定系統数	ウイルス・ウイロイド 保毒系統数 ^z				
		DaMV	TSWV ^y	CMV	TSV	CSVd
プリンセス・マサコ	6	1(1) ^x	0	3(0)	6(6)	4(0)
モナコ	2	0	0	0	2(0)	0
朱光	2	0	0	0	2(2)	0
新世界	2	0	0	0	2(0)	0
あずま紅	3	0	0	0	3(0)	0
ジャパニーズ・ビショップ	1	0	0	0	1(1)	0
ソフトムード	6	3(1)	0	4(0)	5(5)	2(0)
計	22	4(2)	0	7(0)	21(14)	6(0)
非保毒率 ^w		82%	100%	68%	5%	73%

z) RT-PCRで検出された場合を高保毒、nested PCRでのみ検出された場合を低保毒とした。
y) TSWVについてはウイルスが局在するため検出感度が低い可能性がある。
x) 括弧内は、全保毒系統数のうちRT-PCRで検出された高保毒系統数を示す。
w) 非保毒率はnested-PCRによっても検出されなかった系統をフリーとして、全系統数で除して求めた。

第3表 在来球および茎頂培養株から挿し芽増殖した苗の初期生育
Table3. Rooting and initial growth of rooted cuttings of native tuberous root strains and apical meristem culture strains

品種	系統	系統 No	地上部			地下部			ウイルス検定結果 ^z					供試数
			茎長 (mm)	節数 (節)	地上部新鮮重 (g)	根数 (本)	地下部新鮮重 (g)	最大根長 (mm)	DaMV	TSWV	TSV	CMV	CSVd	
プリンセスマサコ	在来球系統	B1	74	1.67	3.29	0.00	0.00	0	++	-	++	nd ^y	+	3
		B3	138	2.00	2.25	6.00	0.48	118	-	-	+	nd	+	1
		B4	136	2.00	2.34	0.00	0.00	0	++	-	+	nd	+	1
	在来球系統計		99	1.80	2.89	1.20	0.10	24						5
	茎頂培養系統	M5	132	2.80	8.34	4.60	0.87	159	++	-	++	+	+	5
M7		112	2.33	5.52	5.67	0.91	145	-	-	++	-	+	3	
茎頂培養系統計		124	2.63	7.29	5.00	0.88	154						8	
モナコ	在来球系統	B1	176	4.00	2.19	4.50	0.79	150	++	-	++	nd	+	2
		B6	116	3.00	3.42	2.00	0.23	66	++	-	-	nd	+	3
		B8	131	3.00	3.85	6.00	0.64	102	++	-	++	nd	+	3
	在来球系統計		137	3.25	3.27	4.13	0.52	101						8
	茎頂培養系統	M1	158	3.67	3.60	5.67	1.17	156	-	-	+	-	-	3
M5		207	4.00	2.44	4.33	1.02	145	-	-	+	-	-	3	
茎頂培養系統計		183	3.83	3.02	5.00	1.10	151						6	
ソフトムード (1回目)	在来球系統	B3	127	2.17	5.71	3.50	0.53	74	++	-	-	nd	+	6
	茎頂培養系統	M1	216	3.13	2.24	7.25	0.63	107	+	-	++	+	+	8
ソフトムード (2回目)	在来球系統	B3	108	1.67	2.43	4.50	0.38	108	++	-	-	nd	+	6
	茎頂培養系統	M3	207	3.33	7.10	16.00	1.97	130	-	-	++	-	-	6

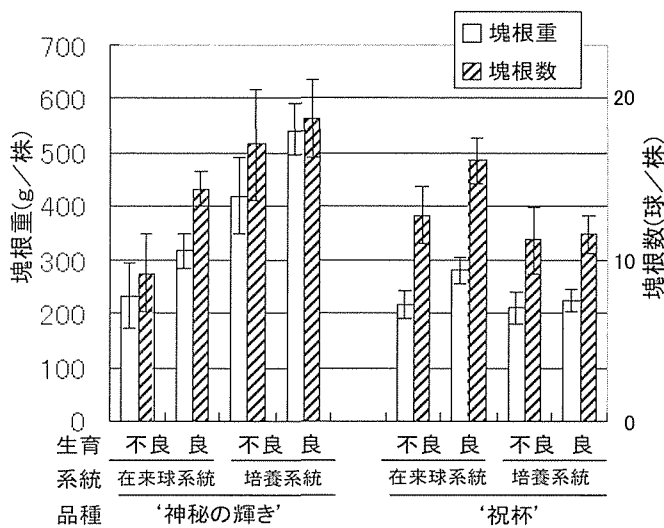
z) RT-PCRで検出された場合を高保毒(++), nested PCRでのみ検出された場合を低保毒(+), いずれによっても検出されなかった場合をフリー(-)とした。
y) ndは、検定を行っていないことを示す。

第4表 在来球系統と茎頂培養系統の生育および切り花収量

Table4. Growth and cut flower harvest of native tuberous root strains and apical meristem culture strains

調査時期 ^z	分枝伸長始期調査			発らい期調査					収穫期調査		
	調査項目	分枝長 ^y (cm)	葉身長 ^x (cm)	節数 (節)	分枝長 (cm)	葉身長 (cm)	節数 (節)	分枝数 (本/株)	欠株率	定植球 あたり 切り花 本数	平均 採花日 本数
神秘の輝き(5世代目・夏切り作型)											
在来球系統	6.8	—	1.6	42.5	19.4	4.7	3.76	10%	1.23	— ^w	
茎頂培養系統	16.2	—	2.8	70.1	25.2	5.8	4.49	10%	1.81	—	
祝杯(4世代目・秋切り作型)											
在来球系統	15.8	7.7	2.8	46.3	11.6	7.0	3.13	23%	2.01	10/11	
茎頂培養系統	22.1	9.6	3.1	64.5	13.6	8.1	4.22	10%	2.88	10/8	

z) '神秘の輝き'の分枝伸長始期および発蕾期の調査は、6月8日(摘心後10日後)および6月28日(摘心後30日後)に行った。
 '祝杯'の分枝伸長始期および発蕾期の調査は、8月15日(摘心後21日後)および9月8日(摘心後45日後)に行った。
 y)分枝長は、株毎に最も良く伸長した苗条について調査した。
 x)葉身長は、分枝上位の完全展開葉で測定した。
 w) '神秘の輝き'採花日の調査データなし。



第1図 在来球系統と培養系統の株あたり塊根重および塊根数
 Fig1 The number and fresh weight of tuberous roots produced from native tuberous root strains and apical meristem culture strains at harvest

考 察

実験1では、葉原基1対を付けた0.5mm未満の茎頂培養系統の60%以上がDaMV, TSWV, CMVおよびCSVdの非保毒系統であった。一方、TSVは1系統を除いて保毒しており、常法によるフリー化が非常に困難であることが明らかとなった。この結果はDaMV, TSWV, CMVおよびTSVのフリー化率を82.3, 63.8, 87.1および37.5%としたAlbouyら⁹⁾の報告と一致した。本実験では、茎頂培養前のウイルス検定を実施していなかったため、厳密なフリー化率とは言えない。しかし、現地由来株の約90%にDaMV

およびTSWVが、約80%にCSVdが感染していたこと⁷⁾、ならびに産地で生産性低下が著しく問題となっていた品種を本実験に供試していたことを考え併せると、DaMV, TSWVおよびCSVdについては、常法である本実験の茎頂培養法がフリー化に有効であったと考えられた。

実験2から、培養系統を親株として挿し芽することで、発根および地下部の発達が良好となることが明らかとなった。小西・稲葉⁸⁾は、ダリア抑制栽培のため育苗条件を検討し、大きな挿し穂ほど根数が多くなるものの発根率には影響しない、としている。本実験では、在来球系統の方がむしろ、茎径の大きい挿し穂が混在していた。しかし、在来球系統の'プリンセスマサコ' B1, B4系統は発根せず、他の在来球系統も地下部新鮮重は培養系統より小さかった。

地上部の新鮮重および節数は、ミスト灌水下での管理のため挿し穂の大きかった'ソフトムード' B3系統の一部個体で大きくなる場合があったものの、全体としては、地下部の発達が良いほど良好となる傾向が見られた。これは、速やかな不定根の発生および発達が地上部の生育を促進したものと推察された。

イチゴはウイルスの重複感染によって草勢が著しく低下する⁹⁾。また、キクはCSVd感染によって挿し穂の発根が不良となり、その後の生育も悪くなる¹⁰⁾が、CSVd低保毒株(nested-PCRのみで検出)とフリー株では生育および開花に有意差が見られない⁹⁾。本実験における発根の良否とウイルス濃度との関連について見ると、高濃度のDaMVとCSVdを複合感染している系統は発根が劣ること、TSV高保毒が発根および初期生育に与える影響は大きくないこと、が示唆された。

実験3では、産地内で4-5年を経過しウイルスの再感染が懸念される状況においても、培養系統は萌芽が早く、初期生育が旺盛であった。切り花収量も在来球系統に比べて143-147%となった。江面・本図⁹⁾は、'祝杯'の茎頂培養によって在来球根と

比べて165～185%の切り花収量が得られたと報告している。本実験の結果は、それよりも劣るものの同様の傾向が示されたものと考えられる。

茎頂培養由来の球根で萌芽が早く、初期生育が旺盛となる現象はヤマノイモ¹¹⁾でも報告されている。ダリア球根の生育は、塊根につながったクラウンの定芽が伸長し、その基部周辺から不定根が発生し塊根となる⁹⁾。本実験では発根調査を行っていないため断定はできないが、実験2での不定根発生の結果と併せて考えると、培養系統では初期の発根が旺盛で、その結果として萌芽・生育が進んだのではないかと推察された。

また、森下^{12,13)}はサトイモの組織培養系統のウイルス再汚染について検討し、特に1年目は激しく病徴が見られ健全培養系統の44%まで減収したにもかかわらず、再感染株後代は2年目で病徴が少なくなり収量も同87%に回復したことを報告し、その原因をウイルスの干渉作用¹³⁾と考察している。また、サトイモ茎頂培養苗の中には、再感染によっても収量が減少しない系統が存在する¹⁴⁾。本報でも分枝伸長期には、感染の判断に迷う軽いモザイクや葉の波打ち症状を含めると、何らかのウイルス病徴は培養系統でも多く観察され、再感染の進行が示唆された。その一方で、切り花および塊根の生産性は、比較的高く維持されており、サトイモ同様、ウイルスの干渉作用や系統間差がこの理由として考えられる。

奈良県ではイチゴウイルスフリー株の3年間連年配布によって、配布前に87.5%(ほとんどが重複感染)であった県内産地の感染株率を、24.0%(重複感染株率8.5%)まで低下させた⁹⁾。イチゴ等の野菜類と異なり、花きでは品種数の多さが産地の競争力となる。本県ダリア産地でも営利栽培品種は、少なくとも200品種以上である。これらを毎年、茎頂培養、増殖、検定、順化後に配布という手順をふむのは煩雑さが否めない。しかし、実験3のように4～5年を1サイクルとして、受益面積の大きい品種から培養系統の利用を進めてゆけば、再感染リスクを最小化しつつ、産地全体の生産性を飛躍的に向上できる可能性があると考えられる。

謝 辞

本実験を行うにあたり、現地調査に御協力いただくと共に、貴重な御示唆をいただいた榛原花き組合の福田遵裕組合長ならびに樋口重範氏に深謝いたします。

摘 要

ウイルス汚染が問題となっているダリア品種の葉原基1対を付けた茎頂から培養苗を得た。この茎頂培養苗を母株とした挿し

芽苗の生育とウイルス感染の関連性、ならびに球根後代の生育および生産性について検討した。

7品種22系統の培養系統について、RT-PCRおよびnested-PCRによるウイルス検定を実施した。DaMV, TSWV, CMV, CSVdおよびTSVの非保毒率は各々、82, 100, 68, 73および5%であった。茎頂培養由来の挿し芽苗は、在来球由来の挿し芽苗に比べて、発根数および地下部新鮮重が大きくなった。発根の劣る系統では、RT-PCRによってDaMV感染が確認された。茎頂培養苗由来の球根は、4～5年の球根繁殖を経過した後も、在来球と比較して萌芽が早く、初期生育が良好となり、切り花および塊根収量も多かった。

これらから、葉原基を付けたダリア茎頂培養では完全なウイルスフリー化は難しいが、少なくとも4～5年間に亘って在来球より発根、生育および生産性に優れる個体群が得られるものと考えられる。

引用文献

1. Albouy, J.・M. Lemattre・W. C. Wang・A. Amevel. 1992. Production of pathogen-tested Dahlia in France. *Acta Hort.* 325:781-786.
2. 青葉 高・渡部俊三・斎藤智恵子. 1960. ダリア塊根の形成肥大に関する研究(第1報)塊根の形成肥大時期について. *園学雑.* 29(3):247-252.
3. 江面 浩・本岡竹司. 1990. ダリヤウイルスフリー株の組織培養による大量増殖. *茨城園試研報.* 15:64-69.
4. 藤野守弘. 1997. 農業技術体系花き編(5)育種・苗生産・バイオ活用. 農山漁村文化協会. 東京. :439-440.
5. 細川宗孝・植田恵美・大石一史・矢澤 進. 2003. キクスタントウイルスの感染によるキク'ピアド'の非開花条件下での花成反応. *園学雑.* 72(別2):447.
6. Hosokawa M.・A. Otake・K. Oishi・E. Ueda・T. Hayashi・S. Yazawa. 2004. Elimination of chrysanthemum stunt Viroid from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem dome attached to a root tip. *Plant Cell Reports.* 22:859-863.
7. 細川宗孝・中島明子・前田茂一・矢澤 進. 2006. ダリアにおけるキクわい化ウイルスの感染. *園学雑.* 75(別1):409.
8. 小島博文・杉浦哲也・峯岸正好. 1981. 奈良県におけるアブラムシ伝搬性イチゴウイルス病の発生とその防除対策. *奈良農試研報.* 12:94-106.
9. 小西国義・稲葉久仁雄. 1966. ダリアの促成および抑制栽培に関する研究(第6報)開化に関係するいくつかの要因について. *園学雑.* 35(4):422-428.

10. 楠 幹生・松本由利子. 2006. キクわい化病の発生生態と診断. 植物防疫. 60(10):457-465.
 11. 松澤 光・松本英紀. 2004. 茎頂培養によるヤマノイモ (*Dioscorea opposita*)のウイルスフリー株の育成及びその特性. 愛媛農試研報. 31:55-61.
 12. 森下正博・山田貴義. 1981. サトイモの組織培養に関する研究(2)ウイルスの感染による生産力の変動. 大阪農技セ研報. 18: 19-26.
 13. ———・—————. 1984. サトイモの組織培養に関する研究(3)ウイルスフリー株の生産力. 大阪農技セ研報. 21: 11-16.
 14. 長田龍太郎・後藤義昭. 1989. サトイモウイルスフリー苗作成技術の開発. 宮崎総農試研報. 23:1-12.
 15. 土崎常男・栃原比呂志・亀谷満朗・柳瀬春男. 1993. ダリア. 原色作物ウイルス病事典. 全国農村教育協会. 東京 :553-556.
 16. Wang W.C.・Tronchet M.・Larroque N.・Dorion N.・Albouy J.1988. Production of virus-free Dahlia by : Meristem-culture and virus detection through cDNA probes and ELISA. Acta Hort. 234:421-428.
-