

苗条原基法を用いた球根ベゴニアの組織培養*

土井 環¹⁾・谷口研至²⁾・近藤勝彦²⁾・橋本清美¹⁾

Tissue Culture of Tuberos-rooted Begonia by Shoot Primordium Method*

Tamaki Doi¹⁾, Kenji Taniguchi²⁾, Katsuhiko Kondo²⁾, Kiyoshi Hashimoto¹⁾

はじめに

本園では球根ベゴニアの花を一年中観賞できるように順次株を更新し、周年開花栽培を行っている。そのための球根ベゴニアはもっぱら種子繁殖によって得ている。種子繁殖の場合、優良個体の出現率は体験的に10~20%と低いため、育苗の無駄が多い。またせっかく得られた優良個体も、他のベゴニアと異なり栄養繁殖が困難であるため、形質の保存まで行うことができない。優良個体による展示を効率良く、計画的に行うためには、栄養繁殖法の確立が不可欠である。

球根ベゴニアの栄養繁殖については、葉柄を用いた組織培養による繁殖が可能であるという報告がある(今本ら 1984)。しかし、この方法は葉柄断片からカルスを形成させて行うため、優良形質の保存及び増殖効率に問題が残る。そこで、これらの問題点を解決し、より安定した形質保存と大量増殖が可能となる培養系が求められている。

一方、本園ではそれまで大量増殖が不可能とされていたキエビネにおいて、染色体レベルで安定し、しかも増殖率の高い苗条原基法を適用することにより、クローン大量増殖が可能となった(Yamamoto *et al.*1991)。この苗条原基法を用いて、球根ベゴニアの栄養繁殖及びその苗化の可能性を試みた。

材料及び方法

供試材料の球根ベゴニア (tuberos-rooted begonia = *Begonia* × *tuberhybrida* Voss) は広島市植物公園のベゴニア温室で育苗中のスタンドタイプの実生苗(播種後3ヶ月)及び展示中のハンギングタイプの成株(播種後10ヶ月)を使用した。

材料の調整は、成長点の場合は、葉柄を含む莖を約5mmの長さに切り取り、塩化ベンザルコニウム0.1%液に5分間、次亜塩素酸ソーダ1%液に5分間浸漬処理後、70%エチルアルコールに数秒浸漬し、滅菌水で3回洗浄した。以上の方法で殺菌したものの葉腋部から、無菌下で成長点を径約1mmの大きさに摘出した。葉柄の場合は、展示中の成株の若い葉の葉柄を約3cmの長さに切り取り、成長点と同様の方法で殺菌した後、約3mmの長さに輪切りにして用いた。それぞれ、直径3cm、長さ20cmの試験管内の液体培地に植え付けた。培地はMS培地、B5培地及びB5培地の成分を変更したものをを用い、植物ホルモンは、NAA、BAPを添加した。ショ糖はMS培地では3%、B5培地では2%とし、苗化用の培地には寒天を0.9%添加した。培養条件は、液体培地では、22℃、3000~5000luxの連続照明、毎分2回転の回転培養とし、寒天培地では、25℃、1500luxの16時間照明の静置培養とした。

* Contribution from the Hiroshima Botanical Garden No. 48

¹⁾ The Hiroshima Botanical Garden

²⁾ Laboratory of Plant Chromosome and Gene Stock, Faculty of Science, Hiroshima University
Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden, No. 14:51-59, 1992

結果及び考察

1) 材料の検討

材料の検討は、まずクローン増殖に主として用いられる成長点について行った。

播種後3ヶ月のスタンドタイプの実生苗の葉腋から生じた成長点を、MS培地に植え付けたが、1ヶ月後、成長点はすべて枯死した(汚染率6%)。その際、成長点付近は多汁質で、成長点の切り取りが困難であった。さらに当園では、実験に十分な成長点が供給できないという問題点が生じた。

そこで、材料として十分供給でき、かつ前報で組織培養が可能であることが確認されているハンギングタイプの葉柄を用いることとした。

2) 基本培地の検定とホルモン条件

基本培地としてMS、B5培地を検討した。各培地で、植物ホルモンBAP、NAAをそれぞれ0、0.02、0.2、2.0、4.0mg/ℓずつ組み合わせて添加した25通りの試験区を設けた。次にMS培地には、播種後3ヶ月のスタンドタイプの実生苗から約5mm

の長さに切り取った葉柄を含む茎の断片(葉腋の成長点は摘出済み)を、B5培地には、播種後10ヶ月のハンギングタイプの成株の葉柄を約3mmの長さに輪切りにしたものを、それぞれ植え付けた。これらの結果はTable 1, 2の通りであった。汚染数調査は植え付け約1ヶ月後に、形態調査は約2ヶ月後にを行った。

MS培地では、汚染率〔汚染率=(汚染数/着床数)×100〕が70%と高かったが、これは葉腋の部分を植え付けたためと考えられた。生存率〔生存率=生存数/(着床数-汚染数)×100〕は53%であった。25区のうちMS-9、12、14、16、17、18、23の7区で以下の形態が観察された。14では、径2cm程度の大きさのカルスの塊と苗条の混生体が、16では径2cm程度のカルスの塊と数枚の小葉の混生体が得られた。これらの2区が最も成長が速かった。9、17、18、23では径1~1.5cm程度の大きさで多少茶色がかったカルスとなり、部分的に小葉を生じるものもあった。12では、緑色と白色のカルスと多数の小葉の混生体が観察された。

Table 1. Results of stem and petiole culture of tuberous-rooted begonia (immature plant of stand-type) in MS medium modified by the combinations of NAA and BA

NAA \ BAP	BAP				
	0	0.02	0.2	2.0	4.0 (mg/ℓ)
0	1 ¹⁾ c ²⁾ 2 ³⁾	6 D 1	11 c 2	16 C+L1	21 D 1
		c 1		c 1	c 1
0.02	2 D 1	7 D 1	12 C+L1	17 C 1	22 c 2
	c 1	c 1	c 1	C+L1	
0.2	3 D 1	8 c 2	13 c 2	18 C+L1	23 C 1
	c 1			C 1	c 1
2.0	4 c 2	9 C 1	14 C+Sh1	19 c 2	24 c 2
		c 1	D 1		
4.0	5 c 2	10 c 2	15 D 1	20 c 2	25 c 2
			c 1		

1) Treatment No.

2) Growth response after two months of culture. C: calli, L: differentiation of small leaves, Sh: shoots, D: death, c: contamination

3) Number of pieces of petiole explanted

Table 2. Results of petiole culture of tuberous-rooted begonia (mature plant of hanging-type) in B5 medium modified by the combinations of NAA and BA

NAA \ BAP	0		0.02		0.2		2.0		4.0 (mg/ℓ)	
	0	1 ¹⁾	D ²⁾ 2 ³⁾	6	D 2	11	D 2	16	D 2	21
0.02	2	D 2	7	P 2	12	SP+L1 D 1	17	C 2	22	C 2
0.2	3	D 2	8	C+R1 C+L+R1	13	D 1 c 1	18	SP 1 C 1	23	C 1 C+L1
2.0	4	D 1 c 1	9	D 2	14	C+R1 D 1	19	D 2	24	D 1 c 1
4.0	5	D 1 c 1	10	D 2	15	D 2	20	D 2	25	D 1 c 1

1) Refer to Table 1.

2) P: plantlet, SP: shoot primordia, R: differentiation of roots, refer to Table 1. for explanation of the other symbols

3) Refer to Table 1.

B5培地での、1ヶ月後の汚染率は12%でMS培地における汚染率よりも低かった。しかし、生存率も同様に29%と低かった。25区のうちB5-7で植物体が、8, 14, 17, 18, 22, 23で黄緑色で表面がげばだったカルスが得られた。このうち、8, 23では小葉が、8, 14では長さ1cm程度の根が混生していた。B5-12 (BAP 0.2mg/ℓ + NAA 0.02mg/ℓ), B5-18 (BAP 2.0mg/ℓ + NAA 0.2mg/ℓ) で苗条原基集塊が得られた。12では、緑色の小粒が集まり径1.5cm程度の大きさとなり、小葉も生じていた。18では、一つ一つの小粒は12より大きく、径1.5~2mm位で、増殖するに従って5~6粒が集まった小集塊として多数に分かれていった。小粒の色は黄緑色で12より多少薄く、水浸状であった。

3) ハンギングタイプの花色と苗条原基誘導

ハンギングタイプの花色は5系統 (ホワイト, イエロー, オレンジ, ピンク, レッド) に大別できる。それぞれの株の葉柄を用いて、苗条原基の誘導を試みた。培地は先述の基本培地の検定で苗条原基が得られたB5-12, B5-18で行った。結果はTable

3の通りであった。汚染数調査は、植え付け約1ヶ月後に、形態調査は、約2ヶ月後に行った。

ホワイト系：B5-12では、小さな細い葉が多数出ていたもの (多芽体) と、褐変したカルスと小葉の混生体を得られた。それ以外は、植え付けた状態のまま、その後透明になって枯死した。また多芽体を含め葉を生じたものも、最終的には枯死した。B5-18では、細胞増殖が見られず、最終的にはすべて透明となり枯死した。

イエロー系：B5-12では、苗条原基集塊、葉柄断片の側面から多数の小葉を生じ、さらに切断面から白色の苗条原基を生じた混生体、径1cm程度に肥大し、表面がげばだち、こぶ状になったカルス、カルスと小数の葉からなる混生体、多芽体の5つの形態を示す培養物が得られた。これらはそれ以後わずかに増殖したが、すべて汚染された。B5-18では、径1cm程度に肥大し、薄い黄緑色の苗条原基集塊が生じた。しかしこれらはその後あまり増殖せず、4ヶ月後にはすべて枯死した。また径1cm程度の大きさに細胞が増殖後枯死したものも見られた。

オレンジ系：B5-12では、径1cm程度に肥大し、表面がけばだち、こぶ状になっていたカルス、及び多芽体が得られた。カルスはその後汚染されたが、多芽体は速い成長を示した。B5-18では、5mm程度に細胞が増殖後枯死したもの以外は汚染されており、形態を観察することができなかった。

ピンク系：B5-12では、3cm程度に成長した植物体得られた。また径1cm程度の大きさの苗条原基集塊が得られたが、その後すべて汚染された。B5-18では苗条原基集塊、苗条原基と小葉の混生体、多芽体得られた。苗条原基の形態は葉柄断片の側面に生じたり、ドーナツ状につながり、イエロー系で得られた苗条原基より増殖が速く、粒は小さかった。

レッド系：B5-12では、径1.2cm程度に肥大し、茶色があったカルスと、径1.5cm程度の大きさの多

芽体得られた。カルスはその後枯死した。B5-18では、径7mm程度に肥大したカルスが得られた。表面はけばだち、こぶ状であったが、形態的に苗条原基を生じる可能性があると考えられた。しかし4か月後には枯死した。

以上のように使用した5系統のうち苗条原基が誘導されたのは、イエロー系とピンク系で、その後順調に増殖し、苗条原基として維持できたのは、ピンク系であった。反対に最も苗条原基に誘導しにくいと思われたのはホワイト系であった。また2種類のホルモン条件による培養形態の差について見ると、B5-12では苗条原基、カルス、葉に分化し、そのうち葉に分化したものが勢い良く成長し、ピンク系では、植物体にまで成長した。B5-18では、主に苗条原基とカルスが得られたが、B5-12のように葉の分化は顕著でなかった。

Table 3. Results of petiole culture provided from five strains of tuberous-rooted begonia with different flower color in B5 medium

Flower color of the strain providing petioles	Type of the cultures in B5-12 medium ¹⁾	Type of the cultures in B5-18 medium ²⁾
White	C ³⁾ +L 1 ⁴⁾ L 1 NG 4	NG 3 D 3
Yellow	SP 1 SP+L 2 C 1 C+L 1 L 1	SP 4 D 1 c 1
Orange	C 1 L 3 c 2	C 2 c 4
Pink	SP 1 P 4 c 1	SP 3 SP+L 1 L 1 c 1
Red	C 4 L 1 c 1	C 6

¹⁾ B5-12=B5 medium supplemented with 0.2 mg/ℓ BAP+0.02mg/ℓ NAA

²⁾ B5-18=B5 medium supplemented with 2.0 mg/ℓ BAP+0.2mg/ℓ NAA

³⁾ NG: no growth, refer Table 2. for explanation of the other symbols

⁴⁾ Refer to Table 1.

Table 4. Results of petiole culture in combinations of different concentrations of macro, micro and organic elements in B5-18 medium¹⁾

Medium No.	Concentration and combination (ratio to the original medium)			Fe-EDTA	Type of the cultures	
	Macro elements	Micro elements	Organic elements		After two months of culture	After five months of culture
1	1	1	1	1	SP ²⁾	SP ₁
2	1	1	1/2		SP	D
					SP	SP ₂
3	1	1	1/4		SP	c
					SP	SP ₂
4	1	1/2	1		SP	D
					c	SP ₂
5	1	1/2	1/2		SP	D
					D	SP ₁
6	1	1/2	1/4		SP	D
					SP	SP ₂
7	1	1/4	1		NG	D
					SP	SP ₁
8	1	1/4	1/2		SP	D
					NG	D
9	1	1/4	1/4		D	SP ₂
					SP	D
10	1/2	1	1		NG	SP ₁
					SP	D
11	1/2	1	1/2		D	SP ₁
					SP	D
12	1/2	1	1/4		SP	SP ₁
					SP	D
13	1/2	1/2	1		SP	SP ₂
					NG	D
14	1/2	1/2	1/2		SP	SP ₁
					NG	D
15	1/2	1/2	1/4	SP	SP ₁	
				SP	D	
16	1/2	1/4	1	SP	SP ₂	
				NG	D	
17	1/2	1/4	1/2	SP	SP ₂	
				D	SP ₁	
18	1/2	1/4	1/4	SP	SP ₁	
				D	D	
19	1/4	1	1	NG	D	
				D	D	
20	1/4	1	1/2	D	D	
				D	D	
21	1/4	1	1/4	D	D	
				D	D	
22	1/4	1/2	1	D	D	
				D	D	
23	1/4	1/2	1/2	D	D	
				c	D	
24	1/4	1/2	1/4	D	D	
				e	D	
25	1/4	1/4	1	D	D	
				e	D	
26	1/4	1/4	1/2	D	D	
				e	D	
27	1/4	1/4	1/4	D	D	
				c	D	

All petioles were provided from the pink-flower strain. Two pieces of petiole were used in each medium.

- 1) Refer to Table 3 for explanation of B5-18 medium.
- 2) Growth response after two and five months of culture, SP : shoot primordia (SP₁ : good proliferation SP₂ : less proliferation), NG : no growth, D : death, c : contamination

これらのことから、B5-18に、ピンク系の株の葉柄断片を植え付けた場合に最も効率良く苗条原基が誘導されると思われた。しかしピンク系から誘導された苗条原基も、継代するに従って、水浸状となり、粒も均一にそろわなくなってきた。

4) B5培地の各要素の検定

より安定な苗条原基を誘導するため、植物ホルモンはB5-18 (BAP 2.0mg/l + NAA 0.2mg/l を添加) に固定し、材料は花色がピンク系の株の葉柄を用いて、B5基本培地における各要素の検討を行った。

B5培地の成分をマクロ要素 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2)、ミクロ要素 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KI), 有機微量元素 (ニコチン酸, チアミン HCl, ピリドキシン HCl, ミオイノシトール) と、Fe-EDTA に分け、Fe-EDTA の濃度のみ等倍で、その他の各要素の濃度はそれぞれ 1, 1/2, 1/4倍として組み合わせた27区の培地で検定した。この結果は Table 4 の通りであった。

2ヶ月後の培養形態は、苗条原基集塊、植え付けた状態からほとんど細胞が増殖しなかったもの及び枯死したものと、3タイプに分けることができた。

苗条原基集塊は、培地No. 1～8区及びNo. 10～18区で得られた。No. 1～4区では、葉柄の側面から黄緑色の小粒が生じ、切断面からは、白色の細胞が増殖した後白色小粒を生じた。これらの区では、苗条原基誘導初期において成長が速かった。その他の区では、まず、葉柄全体が次第に白色になり、その後切断面にのみ白色小粒を生じ、その後増殖していった。誘導初期の成長は緩慢であった。

マクロ要素が1/4倍のNo. 19～27区では、葉柄が白色から透明になり、細胞増殖が見られないまま枯死した。

さらに苗条原基集塊が得られた区で、植え付け5ヶ月後の形態を調査した。No. 1, 6, 8, 11, 12, 14, 15, 18区で得られた苗条原基は活発な増殖を示した (SP₁)。特に、No. 1, 11, 12, 14, 15, 18区で速かった。No. 2, 3, 4, 7, 10, 13, 16, 17区で得られた苗条原基は植え付け2ヶ月後の状態からわずかに増殖が見られたが、集塊の半分以上が褐変していた (SP₂)。

Table 5. Characteristics of shoot primordia (SP₁) of Tuberous-rooted begonia subcultured in different media for more than five months¹⁾

Medium No.	Characteristics
1 ²⁾	heterogeneous tissues consisted of shoot primordia, calli and small leaves
6	
6	
11	relatively stable shoot primordia
12	
14	
15	
18	

¹⁾ Refer to Table 4. for explanation of SP₁

²⁾ Refer to Table 4.

5) 継代

5ヶ月以降の継代は、Table 4で活発な増殖を示したNo. 1, 6, 8, 11, 12, 14, 15, 18区で得られた苗条原基集塊 (SP₁) のみで行った。

継代するに従って、苗条原基の他にカルスや小葉を新たに分化し、混生体となった。これらの特徴をTable 5に示した。

No. 1, 6, 8区では、苗条原基よりも、カルス、小葉が多く見られ、苗条原基の形態は不均一であった (Fig. 1, A)。No. 11, 12, 14, 15, 18区では、No. 1, 6, 8に比べて苗条原基が多く見られ、その形態は比較的均質であった。特にNo. 12の培地で得られた苗条原基が最も均質で安定していた (Fig. 1, B)。

これらのことから、マクロ要素の濃度が1倍の培地では、カルスや小葉を分化しやすく、1/2倍の培地では、比較的安定した苗条原基集塊として維持できることがわかった。

6) 苗化

No. 1, 6, 8, 11, 12, 14, 15, 18区で得られた苗条原基、または苗条原基を含む混生体を、B5の基本培地にNAAを0, 0.02mg/lとBAPを0, 0.02, 0.2mg/lを組み合わせた6区の寒天培地に移植した。それぞれの苗化状態は以下の通りであった。

No. 1 : ホルモン無添加の寒天培地では、ほとんど増殖が見られなかったが、その他の寒天培地では、1ヶ月後には、カルス等が径1~1.5cm程度の大きさまで増殖し、そこから多くの苗条が分化した (Fig. 2, A)。さらに2ヶ月後には発根が見られた。特にNAAを0.02mg/lのみ添加した寒天培地、及びBAP 0.02mg/l + NAA 0.02mg/lを添加した寒天培地で、苗化が良好であった。

No. 6 : 2ヶ月後にNAAを0.02mg/l添加した3区の寒天培地で苗化が見られた。NAA無添加の3区では、ほとんど増殖せず枯死したり、苗条は分化するが発根が見られなかった。

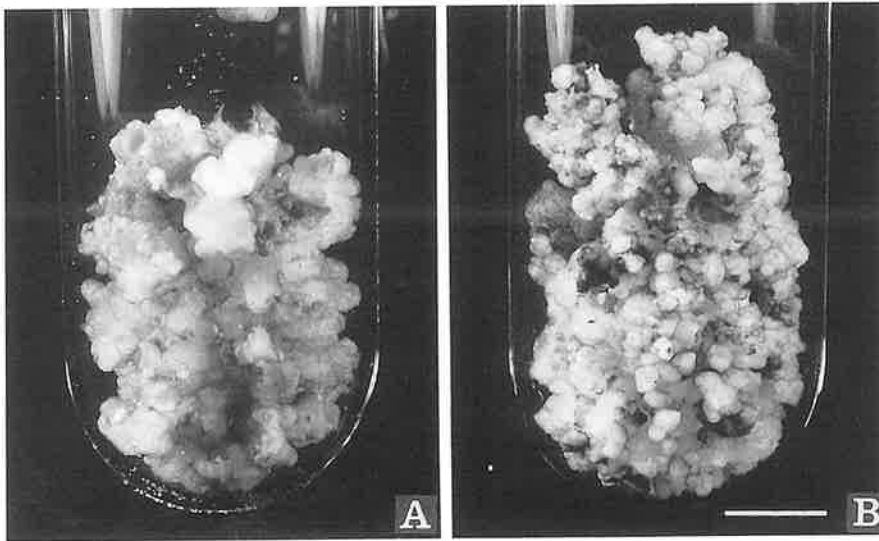


Fig. 1. Two types of cultures induced from pieces of petiole of tuberous-rooted begonia in modified B5-18 medium (see Table 5). A, Heterogeneous tissues consisted of calli, small leaves and small amount of shoot primordia in No. 1 of B5-18 medium. B, Relatively homogeneous shoot primordia induced in No. 12 of B5-18 medium. Scale bar=1 cm for A and B.

No. 8 : カルス等が増殖, 葉が分化したが, 発根には至らなかった。

No. 11, 12, 14 : 植え付け1ヶ月後までは, 褐変する部分もかなりあるが, わずかに増殖し続け, No. 12, 14は苗条の分化も見られた (Fig. 2, B)。しかしその後はほとんど変化なく, 枯死するものが多かった。

2ヶ月後に幼植物が得られたのは, No. 12では, B5の基本培地に, BAPのみ0.2mg/ℓ添加した寒天培地, No. 14では, B5の基本培地にBAPのみ0.02mg/ℓ添加した寒天培地であった。

No. 15, 18 : 寒天上で苗条原基, カルスが盛んに

増殖し, 葉, 根はほとんど分化しなかった (Fig. 2, C)。

以上のように, 形態的に比較的安定な苗条原基 (No. 12, 14) より小葉などとの混生率の高い方 (No. 1, 6) が植物体への分化率が高く, 成長も速かった。特にNo. 1をNAA 0.02mg/ℓのみ, またはBAP 0.02mg/ℓ + NAA 0.02mg/ℓ添加した2区に植え付けた条件において, 最も良い結果が得られた。

7) 植え出し

1~2 cmに成長した幼植物をフラスコから出し, 赤玉土 (中, 小粒等量混合) : ピートモス : 腐葉土

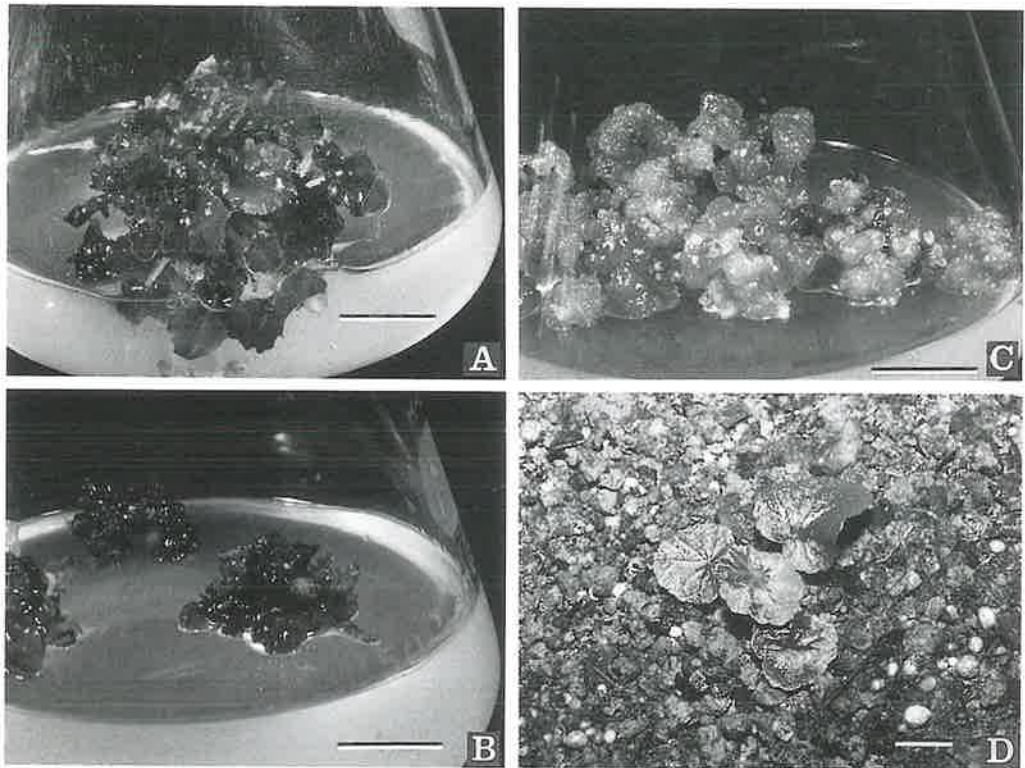


Fig. 2. Plantlets formation one month after transplanting onto agar plate of B5 basal medium. A, Vigorously growing shoots regenerated from the cultures induced in No. 1 of B5-18 medium (see Table 5). B, Slowly growing shoots regenerated from small live parts of cultures induced in No. 12 of B5-18 medium. Most of the other parts of cultures were dead. C, Shoot primordia and calli proliferated from the cultures induced in No. 18 of B5-18 medium. D, Plantlets in acclimatization. Scale bars=1 cm.

：フオーライト＝8：5：5：2の割合で混合した用土に植え付けた。約1ヶ月間はガラス板をかけ、新聞紙で遮光して、徐々にベゴニア温室の環境（室温18～25℃，遮光率50％）にならすようにした（Fig. 2, D）。以後は比較的容易に開花株まで成長した。

以上のように、球根ベゴニアにおいて、葉柄からの苗条原基誘導，維持増殖，苗化へと至るクローン増殖と再分化系が得られた。従来メリクローン法と同様に形質保存の可能性が示唆された。

今後は、濃度を含めた苗化の条件をさらに検討し、より効率のよい増殖系を確率する必要があると考えられる。

摘 要

1. 苗条原基法の適用により、球根ベゴニアのハンギングタイプにおいて、葉柄を利用したクローン大量増殖と再分化系が確立された。
2. 苗条原基は、B5基本培地のマクロ要素の濃度を1/2倍に、有機微量要素の濃度を1/4倍にした培地に、植物ホルモンとしてBAP 2.0mg/l + NAA 0.2mg/lを添加した条件において最も安定したものが得られた。
花色により大別された5系統の球根ベゴニアのうち、苗条原基は、ピンクの株の葉柄から最も効率良く誘導された。
3. 苗化は、B5基本培地に植物ホルモンとしてBAP 2.0mg/l + NAA 0.2mg/lを添加した条件で誘導した苗条原基、小葉、カルスの混生体を、B5基本培地にNAA 0.02mg/l、またはBAP 0.02mg/l + NAA 0.02mg/lを添加した寒天培地に移植したものが最も効率良かった。

謝 辞

本研究は、広島市植物公園の方々の協力で行なわれました。ここに厚くお礼申し上げます。

Summary

1. A system of clonal mass-propagation and regeneration was established using tuberous-rooted begonia (hanging-type) by tissue-cultured shoot primordium method.
2. The most stable shoot primordia were obtained in modified B5 medium which reduced the concentrations of macro and organic elements to a half and a quarter respectively, supplemented with 2.0mg/l BAP + 0.2mg/l NAA.
Among the five strains of tuberous-rooted begonia roughly classified by flower color, shoot primordia were most efficiently induced using the petioles of the pink-flower strain.
3. Plantlets were most efficiently regenerated when the shoot primordia with small leaves and calli induced in B5 basal medium with 2.0 mg/l BAP + 0.2mg/l NAA were transplanted onto the agar plate of B5 basal medium with 0.02 mg/l NAA or 0.02 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA.

参 考 文 献

- 今本 忠・山本昌夫・石田源次郎 1984. 球根ベゴニアの組織培養。広島市植物公園紀要 7：36-40.
- Yamamoto, M., Taniguchi, K., Tanaka, R., Kondo, K. and Hashimoto, K., 1991. Studies on Clonal Mass-Propagation of *Calanthe sieboldii* by Using Tissue-Cultured Shoot Primordium Method. Bull. Hiroshima Bot. Gard. 13: 1-15.