サンダーソニアの花茎の頂端分裂組織の無菌培養による多芽体の形成

藤田 孝¹・梶川好輝²・西村あずさ²・福井博一²¹雪印乳業株式会社技術企画室 350–1165 埼玉県川越市南台 1–1–2²岐阜大学応用生物科学部 501–1193 岐阜県岐阜市柳戸 1–1**Multiple Bud Formation by Aseptically Terminal Floral Apex Culture of
Sandersonia aurantiaca Hook.**Takashi FUJITA¹, Yoshiteru KAJIKAWA², Azusa NISHIMURA² and Hirokazu FUKUI²¹R&D Planning Dept., Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Kawagoe, Saitama 350–1165²Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido, Gifu 501–1193**Abstract**

In order to establish efficient vegetative micropropagation of *Sandersonia aurantiaca* Hook., the effects of plant growth regulators on morphological changes of the terminal floral apex were investigated. All explants cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with 0 μ M NAA and 3.2 μ M TDZ, 3.2 μ M NAA and 1 μ M TDZ, 3.2 μ M NAA and 3.2 μ M CPPU, or 3.2 μ M NAA and 3.2 μ M TDZ formed multiple buds. The multiple buds consisted of minute adventitious buds, and divided multiple buds proliferated by subculturing on the same component medium. Some multiple buds had elongated shoots, and a miniature tuber was formed at the base of the shoot. These results indicated that *Sandersonia aurantiaca* was rapidly micropropagated by terminal floral apex culture on four media.

Keywords: CPPU, micropropagation, shoot, TDZ, tuber**緒 言**

サンダーソニア (*Sandersonia aurantiaca* Hook.) は、主に切花として利用されるユリ科の球根花きである。その球根の養成は主として実生からの育成によって行われており、効率的な栄養繁殖法は確立されていない。近年、サンダーソニアの黄色の花色変異個体が作出されたが¹⁾、分球による繁殖は増殖率が2倍程度であるのに加えて分球後の腐敗等の原因から、突然変異個体の出現から切花販売までに5年以上を要し、効率的な急速栄養繁殖法の開発が望まれている。

一般に球根植物の大量増殖法として組織培養が用いられ

ており、サンダーソニアでは胚、胚珠、未熟種子、切断種子などを使用した組織培養による大量増殖法が検討されてきている^{2–6)}。著者らも胚珠組織を用いた球根の大量増殖法について検討し⁷⁾、胚珠組織からの多芽体形成を経た効率的な培養法を明らかにした。しかし、これらの種子由来の組織を用いた組織培養はクローンの大量増殖ではないため、突然変異によって生じた花色変異個体や染色体操作などで得られる優良形質個体の増殖には適していない。サンダーソニアにおけるクローン増殖を目的とした組織培養の事例としては、唯一塊茎組織を供試材料とした Finnie and van Staden³⁾ の報告があるが、高濃度の殺菌剤の使用や殺菌剤の長時間処理が不可欠で、殺菌剤の影響や雑菌汚染により貴重な母株を失う恐れがある。

そこで本研究では、サンダーソニアのクローン増殖のための新たな供試組織として花茎の頂端分裂組織に着目し、花茎の頂端分裂組織からの形態形成に及ぼすサイトカイニンの影

2008 年 1 月 15 日受付

2008 年 8 月 25 日受理

Corresponding author: Hirokazu Fukui
(fukui@gifu-u.ac.jp)

響を検討した。

材料および方法

供試植物体として千葉県山武郡芝山町 丸朝園芸農業協同組合産のサンダーソニア切花（切花長は 60 cm で開花した小花が 5～6 輪着生）を 4～5 月に花き市場より購入した。花茎の上部 5 cm 程度を切り取り、中性洗剤で洗浄した後、70%エタノールに 30 秒程度浸漬し、クリーンベンチ内の滅菌水で 3 回すすいだ。実体顕微鏡下で、花茎の先端部から 0.8～1.0 mm の頂端分裂組織を摘出し、培地に置床した。花茎の頂端分裂組織の成長に及ぼす成長調節物質の影響

基本培地として Murashige & Skoog 培地⁸⁾（以下 MS 培地）を用い、成長調節物質、スクロース 6%およびゲルライト 0.2%を添加し、pH 5.7 に調節した。成長調節物質はサイトカイニンとオーキシンを組み合わせる添加した。サイトカイニンとして 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ), N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) の 3 種類を用い（シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社、東京）、各々 0, 1.0, 3.2, 10.0 μM の濃度で添加した。オーキシンは、 α -naphthalene acetic acid (NAA) を 0, 3.2 μM の濃度で添加した。

培地は直径 24 mm、長さ 100 mm の管瓶に 10 ml 分注し、アルミホイルで栓をした後、オートクレーブを用いて 121℃、1.2 kg cm^{-2} の条件下で 15 分間加熱滅菌した。培養条件は、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、3000 lx、16 時間日長とし、12 週間培養した後調査を行った。反復個体数は 11～12 とした。

茎頂培養 12 週間後に初代培養と同組成の培地を用いて継代培養を行った。培養容器は直径 50 mm、長さ 100 mm の培養瓶を用い、これに培地を 40 ml 分注し、半透明のプラスチックキャップをした後、121℃、1.2 kg cm^{-2} の条件下で 15 分間加熱滅菌した。培養組織の継代は、初代培養で形成された培養組織をそのまま取り出して継代培養培地に移植した。培養条件は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、3000 lx、16 時間日長とし、12 週間後に調査を行った。

結 果

花茎から摘出した頂端分裂組織の培養にあたって、予備的に有効塩素 1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて花茎の茎端部を殺菌して培養を行った。しかし、茎端部の花茎が細く未展開の葉原基数が少ないため、次亜塩素酸ナトリウム溶液による頂端分裂組織に対する薬害が激しく、ほとんどの頂端分裂組織が培養初期に枯死した。そこで次亜塩素酸ナトリウム濃度を順次低下させて、頂端分裂組織への薬害およ

び雑菌汚染の影響をみた結果、茎端部を中性洗剤で良く洗浄した後、70%エタノールで 30 秒程度すすぐ方法でも雑菌汚染がほとんど発生せず、培養後に頂端分裂組織の生育が認められた。したがって、本研究では殺菌剤を用いることなく中性洗剤と 70%エタノールで花茎の茎端部を洗浄し、無菌的に頂端分裂組織を摘出して培養した。

花茎の頂端分裂組織の成長に及ぼす成長調節物質の影響

初代培養 12 週後のシュート伸長、多芽体形成、褐変度に及ぼす成長調節物質の影響を Table 1 に示した。Table 1 の上段には各成長調節物質を組み合わせる添加した培地区での形質値を示し、下段にはオーキシン (NAA) とサイトカイニン (BAP, TDZ, CPPU) の分散分析による主要因効果を示した。シュート伸長個体率は、主要因効果において有意とは言えなかったものの、BAP 濃度が高くなるに従って大きくなる傾向を示し、シュートの伸長は BAP の添加によって促進された。特に NAA 3.2 μM と BAP 10.0 μM を組み合わせる培地区では 45.5%と著しく高いシュート伸長個体率を示し、約半数の個体でシュート伸長が認められた。また CPPU では、CPPU 3.2 μM と NAA 3.2 μM とを組み合わせる培地区において 33.3%の個体でシュート伸長が認められた。

多芽体の形成は NAA の添加によって促進され、NAA 3.2 μM の主要因効果に示されるように 34.6%の個体で多芽体の形成が認められた。多芽体の形成に及ぼすサイトカイニンの主要因効果はサイトカイニンの種類によって大きく変化し、BAP では 1.0 μM 添加区で高く、TDZ および CPPU 添加区ではいずれも 3.2 μM 添加区で 55.9%、66.2%と半数以上の個体で多芽体の形成が確認された。各培地区における多芽体の形成率を見ると、NAA 3.2 μM と TDZ 3.2 μM を組み合わせる培地区では 81.8%が多芽体を形成し、同様に NAA 3.2 μM と CPPU 3.2 μM を組み合わせる培地区でも 77.8%の多芽体形成個体率を示した。

培養組織の褐変度についてみると、NAA の添加によって褐変が抑制された。また、BAP の主要因効果では添加した濃度が高くなるに従って明らかに褐変度が低下し、BAP の褐変抑制効果が認められた。TDZ および CPPU では 1.0 μM と 3.2 μM で褐変度が低い値を示した。培地区を個別にみると、NAA 0.0 μM と TDZ 10.0 μM を組み合わせる区と NAA 0.0 μM でサイトカイニン無添加の区ですべての個体が褐変枯死した。また、NAA 3.2 μM と BAP 10.0 μM を組み合わせる区と NAA 3.2 μM と CPPU 3.2 μM を組み合わせる区ではほとんどの個体で褐変が認められなかった。

初代培養 12 週間後の調査形質間の関係をみた結果 (Table 2)、展葉数とシュート伸長個体率との間には高い正の相関が認められ、褐変度と展葉数、シュート伸長個体率および多芽体形成個体率との間には負の相関が認められた。ま

Table 1 Effect of different combination of NAA and cytokinins on morphological changes from terminal floral apex of *S.aurantiaca*.

NAA	Cytokinin			Primary culture (12 weeks)			Subculture (12 weeks)		
	BAP	TDZ	4CPPU	Explants elongated shoot (%)	Explants formed multiple buds (%)	Browning*	Explants elongated shoot (%)	Explants formed multiple buds (%)	Browning*
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	5.0
0.0	1.0	0.0	0.0	8.3	0.0	3.5	14.3	0.0	4.6
0.0	3.2	0.0	0.0	18.2	0.0	2.6	0.0	0.0	4.3
0.0	10.0	0.0	0.0	27.3	9.1	1.2	50.0	0.0	3.9
0.0	0.0	1.0	0.0	18.2	9.1	2.9	0.0	42.9	5.0
0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	30.0	3.4	0.0	100.0	1.0
0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	5.0
0.0	0.0	0.0	1.0	8.3	8.3	3.4	0.0	0.0	5.0
0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	54.5	2.8	0.0	80.0	2.0
0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	25.0	4.0	66.7	66.7	2.3
3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.0	5.0
3.2	1.0	0.0	0.0	0.0	63.6	1.5	0.0	0.0	5.0
3.2	3.2	0.0	0.0	11.1	22.2	0.6	14.3	0.0	3.9
3.2	10.0	0.0	0.0	45.5	0.0	0.1	50.0	0.0	1.0
3.2	0.0	1.0	0.0	10.0	50.0	0.6	28.6	100.0	2.0
3.2	0.0	3.2	0.0	0.0	81.8	1.1	11.1	100.0	1.3
3.2	0.0	10.0	0.0	0.0	10.0	3.5	0.0	20.0	4.6
3.2	0.0	0.0	1.0	9.1	18.2	1.3	0.0	37.5	4.1
3.2	0.0	0.0	3.2	33.3	77.8	0.3	44.4	100.0	1.3
3.2	0.0	0.0	10.0	0.0	22.2	3.6	0.0	50.0	3.5
Total average				9.5	24.1	2.5	14.0	34.9	3.5
Effect of principle factor by ANOVA**									
0				8.0 a	13.6 a	3.4 b	13.1 a	29.0 a	3.8 a
3.2				10.9 a	34.6 b	1.7 a	14.8 a	40.8 a	3.2 a
0				0.0 a	0.0 a	4.6 c	0.0 a	0.0 a	5.0 a
1.0				4.2 a	31.8 a	2.5 b	7.1 a	0.0 a	4.8 a
3.2				14.6 a	11.1 a	1.6 ab	7.1 a	0.0 a	4.1 a
10.0				36.4 a	4.5 a	0.6 a	50.0 a	0.0 a	2.4 a
0				0.0 a	0.0 a	4.6 b	0.0 a	0.0 a	5.0 a
1.0				14.1 b	29.5 a	1.8 a	14.3 a	71.4 a	3.5 a
3.2				0.0 a	55.9 a	2.2 a	5.6 a	100.0 a	1.2 a
10.0				0.0 a	5.0 a	4.3 b	0.0 a	10.0 a	4.8 a
0				0.0 a	0.0 a	4.6 b	0.0 a	0.0 a	5.0 a
1.0				8.7 a	13.3 a	2.3 a	0.0 a	18.8 a	4.6 a
3.2				16.7 a	66.2 b	1.6 a	22.2 a	90.0 a	1.7 a
10.0				0.0 a	23.6 a	3.8 b	33.3 a	58.3 a	2.9 a

*: 0=no browning was observed, 1=a part of the explant was slightly brown, 2=a part of the explant was brown, 3=50% of the explant was brown, 4=75% of the explant was brown, 5=the explant was completely brown and died.

** : Effect of principle factor was calculated by average for values on several concentrations in plant growth regulator. Means within a column with the same letter are not significantly different at $p < 0.01$

た、多芽体形成は展葉やシュート伸長との間で相関はみられず、多芽体の形成は独立した形態形成であることが明らかとなった。

初代培養 12 週間後に同じ組成の培地に継代培養し、さらに 12 週間培養した後の形態形成に及ぼす成長調節物質の影響をみると (Table 1)、初代培養でシュート伸長がみられた

培地区では継代培養においても同様にシュートの伸長が継続してみられ、NAA 0.0 μM と CPPU 10.0 μM の培養区を除いて、両培養期間におけるシュート伸長個体率間で高い相関が認められた。

多芽体形成個体率についてみると、初代培養ではわずかに多芽体形成が認められた BAP 添加区では多芽体が全く

Table 2 Correlations between different characters in terminal floral apex cultures of *S. aurantiaca* after 12 weeks of culture.

	Explants elongated shoot (%)	Explants formed multiple buds (%)	Browning
Number of leaves	0.752**	0.299	-0.870**
Explants elongated shoot (%)	—	-0.086	-0.642**
Explants formed multiple buds (%)	—	—	-0.504*

** : significantly different at $P=0.01$ * : significantly different at $P=0.05$ **Fig. 1** Multiple buds formed after subculture for 12 weeks following primary culture for 12 weeks.A: NAA 3.2 μ M + TDZ 1.0 μ MB: NAA 3.2 μ M + CPPU 1.0 μ MC: NAA 3.2 μ M + CPPU 3.2 μ MD: NAA 3.2 μ M + CPPU 3.2 μ M

b: bulb

mb: multiple buds

s: shoot

みられなくなったのに対して、TDZ や CPPU 添加区では継代培養によって多芽体の形成個体率が高くなり、TDZ および CPPU の多芽体形成促進効果が認められた。なかでも NAA 3.2 μ M を同時に添加した区では多芽体の形成が著しく促進された。培地を個別にみると、NAA 0.0 μ M と TDZ 3.2 μ M、NAA 3.2 μ M と TDZ 1.0 μ M、NAA 3.2 μ M と TDZ 3.2 μ M、NAA 3.2 μ M と CPPU 3.2 μ M を組み合わせた区では

すべての個体で多芽体が形成された。

継代培養 12 週間後の組織の褐変は、サイトカイニン無添加区および NAA 0.0 μ M と TDZ 1.0 μ M、NAA 0.0 μ M と TDZ 10.0 μ M、NAA 0.0 μ M と CPPU 1.0 μ M、NAA 3.2 μ M と BAP 1.0 μ M を組み合わせた区ですべての個体が褐変枯死した。TDZ と CPPU についてみると、3.2 μ M 区において褐変度が低い傾向があり、特に NAA 3.2 μ M を同時に添加した場合には褐変がわずかであった。

継代培養 12 週間後に形成された多芽体を Fig. 1 に示した。形成された多芽体は初代培養において肥大した茎頂組織から形成され、新たな不定芽を次々と形成しながら組織が肥大し、多芽体を形成した。多芽体からはシュートの伸長がみられるとともに、伸長したシュートの基部には子球の形成が観察された。多芽体のなかには多数の微細な不定芽によって構成されているものから、多数のシュートの伸長を伴うものまであり、微細な不定芽によって構成されている多芽体はそれを分割することで、多芽体が増殖した。また子球を形成したものについては、多芽体から子球を分割することで培養器から取り出して容易に栽培することが可能であった。

考 察

サンダーソニアの通常の栄養繁殖では、1 作につき 1 個の塊茎から 2 個体分の塊茎しか形成されない。このような増殖効率の低い作物に関しては、組織培養技術を利用したクローン増殖が試みられており、チューリップ⁹⁾、スイセン¹⁰⁾、グロリオサ^{11, 12)}、ギミア・リリー¹³⁾などの報告がある。一般に、クローン増殖は遺伝的安定性の高い茎頂成長点を用いた茎頂培養が行われており、茎端部や腋芽に茎頂成長点を持つ栄養成長器官のシュートが供試材料として用いられている。しかし、サンダーソニアは栄養成長器官としてのシュートを持たず、厳密な意味での茎頂成長点は球根から伸長した花茎の基部に形成される二又状の球根の先端のみに存在し、Finnie and van Staden³⁾はこの茎頂成長点を用いて培養を行っている。しかし、球根先端部の茎頂成長点は地下部で形成されるため、殺菌が極めて困難である。

サンダーソニアの花茎は生殖器官であり、花茎の先端の頂端分裂組織が新たな葉原基を分化しながら伸長し、その葉液部に小花を形成する。花茎の頂端分裂組織は厳密な意味での茎頂成長点ではないものの、無限伸長を行うことから、栄養成長器官の茎頂成長点に近い細胞分裂能力を持つと考え、切花として出荷されている花茎を供試材料として培養を行った。花茎の頂端分裂組織を用いたクローン増殖の事例としてはバナナの報告¹⁴⁾があるが、これ以外では事例はない。本研究結果は栄養成長器官としてのシュートを形成しない宿

根性切花などに広く適用できると考える。

一般に茎頂培養を行う場合には、茎頂成長点の *in vitro* への導入にあたって次亜塩素酸ナトリウム溶液などの殺菌剤を用いた表面殺菌が不可欠である。しかし、サンダーソニアは花茎が細く、殺菌剤の葉害が顕著に発生し、頂端分裂組織の培養が困難であった。そこで、次亜塩素酸ナトリウムの濃度を低下させて頂端分裂組織の摘出および培地への置床を試みた結果、殺菌剤を使用することなく適切な洗浄操作を経ることによって無殺菌で頂端分裂組織が摘出でき、培養が可能であった。これは、頂端分裂組織の周辺が新たに分化した葉原基で覆われているため無菌状態が維持されていることによるもので、サンダーソニアのような花茎が細い植物においては次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌を行うことなく頂端分裂組織の培養が可能であることが示唆され、本研究における培養前の処理は同様な形態を持つ植物においても適用できると考える。

サンダーソニアの花茎の頂端分裂組織からの *in vitro* での形態形成に及ぼす成長調節物質の影響を検討した結果、多芽体の形成は CPPU と TDZ の培地への添加によって促進され、BAP を添加した区では認められなかった。CPPU と TDZ は尿素系サイトカイニンに属し、BAP などのアデニン系サイトカイニンより高い苗条形成活性を示すといわれており¹⁵⁾、本研究においても TDZ 3.2 μM を添加した区では、NAA の添加の有無にかかわらず、継代培養 12 週間後にはすべての個体で多芽体が形成され、CPPU 3.2 μM 添加区においても著しく高い多芽体形成率を示した。尿素系サイトカイニンがプリン系サイトカイニンに比べて高い不定芽形成を示し、多芽体の形成を促進した事例としては、*Mesembryanthemum crystallinum*¹⁶⁾、*Paspalum scrobiculatum*¹⁷⁾、*Phaseolus angularis*¹⁸⁾ などがある。本研究における多芽体形成率と褐変度を比較すると、両者の間に高い負の相関がみられ ($R^2 = 0.57$) た。TDZ や CPPU の培地への添加によって多芽体の形成や増殖が促され、このことが組織の褐変を抑制したものと考える。

サンダーソニアと比較的近縁な植物にグロリオーサがあり、Finnie and van Staden³⁾ はサンダーソニアとグロリオーサの組織培養における反応は非常に類似していると報告している。グロリオーサの茎頂培養については Sivakumar and Krishnamurthy¹²⁾ の報告や島崎ら¹⁹⁾ の報告があり、Sivakumar and Krishnamurthy¹²⁾ は、Zip と kinetin を同時に添加することによって成長の速い多芽体が形成されたと報告している。また、島崎ら¹⁹⁾ は開花株側枝の茎頂組織の培養を行い、BAP に比べて TDZ は生存個体率が高く、シュート形成率や塊茎形成率も高かったと報告している。本研究で明らかとなった培養条件は、サンダーソニアのみならずグロリ

オーサの大量増殖法の開発にも有益な知見を与えると考える。

本研究の 12 週間の継代培養の結果、NAA 0.0 μM と TDZ 3.2 μM 、NAA 3.2 μM と TDZ 1.0 μM 、NAA 3.2 μM と TDZ 3.2 μM 、NAA 3.2 μM と CPPU 3.2 μM を組み合わせた 4 培地区においてすべての個体で多芽体が形成され、なかでも NAA 3.2 μM と TDZ 3.2 μM および CPPU 3.2 μM を組み合わせた培地区では褐変度も低かったことから、サンダーソニアの花茎の頂端分裂組織をこれらの培地区で培養することによって、これまで困難とされたサンダーソニアのクローン増殖が可能となると判断した。

摘 要

サンダーソニアのクローン増殖を目的として、生殖成長器官である花茎の頂端分裂組織からの形態形成に及ぼすサイトカイニンの影響を検討した。NAA とサイトカイニン (BAP, TDZ, あるいは CPPU) を組み合わせて添加した培地で培養した結果、NAA 0.0 μM と TDZ 3.2 μM 、NAA 3.2 μM と TDZ 1.0 μM 、NAA 3.2 μM と TDZ 3.2 μM 、NAA 3.2 μM と CPPU 3.2 μM を組み合わせた 4 培地区において、供試したすべての花茎の頂端分裂組織から多芽体が形成された。多芽体のなかには多数の微細な不定芽によって構成されているものがあり、それを分割することで、多芽体が増殖した。多芽体からはシュートの伸長がみられるとともに、伸長したシュートの基部には子球の形成が観察されたことから、サンダーソニアの花茎の頂端分裂組織をこれらの培地区で培養することによって、サンダーソニアのクローン増殖が可能となると判断された。

引用文献

- 1) Nielsen KM, Lewis DH, Morgan ER. Characterization of carotenoid pigments and their biosynthesis in two yellow flowered lines of *Sandersonia aurantiaca* (Hook.). *Euphytica* 130: 25–34. 2003.
- 2) Finnie JF, van Staden J. *In vitro* propagation of *Sandersonia* and *Gloriosa*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 19: 151–158. 1989.
- 3) Finnie JF, van Staden J. *Sandersonia aurantiaca* Hook. (Christmas Bells): Micropropagation and *in vitro* production of colchitine. In: *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 37. Medicinal and aromatic plants 9, ed. Bajaj YPS. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 355–369. 1996.
- 4) 服部澄子, 福井博一, 中村三夫. サンダーソニアの胚培養及び培養中の子球の生育様式について. *園芸要旨*. 61 (別 2): 468–469. 1992.
- 5) 居城幸夫, 永井愛, 尾形亮輔. サンダーソニアの胚培養における光条件とショ糖濃度の影響と、継代後の子球形

- 成に及ぼすポリエチレングリコール (PEG) の影響. 園学要旨. 66 (別 1): 508–509. 1997.
- 6) 澤 完, 小林加奈. サンダーソニア切断種子, 未熟種子, 並びに, 胚培養について. 園学要旨. 60 (別 2): 520–521. 1991.
 - 7) 藤田 孝, 杉村謙一郎, 門脇知子, 畑本 均, 高橋哲也, 久保木篤, 大川恵子, 不破規智, 桜井聡子, 福井博一. サンダーソニアの胚珠培養による多芽体の形成. 植物環境工学 18: 123–129. 2006.
 - 8) Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497. 1962.
 - 9) Podwyszynska M. Improvement of bulb formation in micropropagated tulips by treatment with NAA and paclobutrazol or ancymidole. *Acta Horticulturae* 725: 679–684. 2006.
 - 10) Sharma YD, Kanwar SB. Studies on micropropagation of tulips and daffodils. *Acta Horticulturae* 624: 535–540. 2003.
 - 11) Jadhav SY, Hegde BA. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gloriosa* L. *Indian Journal of Experimental Biology* 39: 943–946. 2001.
 - 12) Sivakumar G, Krishnamurthy KV. Micropropagation of *Gloriosa superba* L., an endangered species of Asia and Africa. *Curr. Sci.* 78: 30–32. 2000.
 - 13) Dimech AM, Cross R, Ford R, Taylor WJ. Micropropagation of Gynea Lily (*Doryanthes excelsa* Corrêa) from New South Wales, Australia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 88: 157–165. 2007.
 - 14) Cronauer SS, Krikorian AD. Reinitiation of vegetative growth from aseptically cultured terminal floral apex of banana. *Amer. J. Bot.* 72: 1598–1601. 1985.
 - 15) 黒崎文也, 首藤紘一, 岡本敏彦, 磯谷 遙. 尿素系サイトカイニンとアデニン系サイトカイニンの作用点について. 植物化学調節研究会研究発表記録集 No. 昭和 55 年度 (19801003) 31–32. 1980.
 - 16) Sunagawa H, Agarie S, Umemoto M, Makishi Y, Nose A. Effect of urea-type cytokinins on the adventitious shoots regeneration from cotyledonary node explant in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Prod. Sci.* 10: 47–56. 2007.
 - 17) Rashid VA. Induction of multiple shoots by thidiazuron from caryopsis cultures of minor millet (*Paspalum scrobiculatum* L.) and its effect on the regeneration of embryogenic callus cultures. *Plant Cell Rep.* 21: 9–13 2002.
 - 18) Mohamed SV, Sung JM, Jeng TL, Wang CS. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 86: 187–199. 2006.
 - 19) 島崎一彦, 鈴木 悟, 福元康文. グロリオサ (*Gloriosa superba*) の開花中の株から採取した側枝の茎頂および茎切片の in vitro での器官形成に及ぼすチジアズロン (TDZ) の影響. 生物環境調節. 38: 207–210. 2000.