

シランの品種育成と F1 品種化を目指したラン科植物の ナフタレン酢酸ナトリウム塩柱頭処理による 還元性雌性配偶子からの半数体と二ゲノム性半数体の誘導

市橋 正一* 伊藤 裕司** 加藤 淳太郎*

*理科教育講座

**卒業生

Breeding of *Bletilla* Hybrids and Haploid Induction via Reduced Female Gamete Parthenogenesis by NAA-Na Treatment to Establish Seedling F1 Cultivars in Orchid

Syoichi ICHIHASHI*, Hiroshi ITO** and Juntaro KATO*

*Department of Science Education, Aichi University of Education, Kariya 448-8542, Japan

**Graduate, Aichi University of Education

Summary

Interspecific hybridization is a common method in orchids breeding, because many orchids have highly interspecific crossability. We succeeded to establish interspecific *Bletilla* hybrids. Although the elite hybrid obtained could propagate vegetatively in vitro, somaclonal variation is a big problem in micropropagation. Seedlings are alternative choice to avoid somaclonal variation but not practical for hybrid cultivars. Establishment of seedling cultivars is expected to provide more advantageous plantlets production. To establish seedling cultivars, use of haploid plant is one of the excellent methods. In seedling varieties, some risks i.e., viral disease, somaclonal mutation, and lower multiplication rate will be reduced. In this study, we investigated to induce haploid and dihaploid plants from female gametes by Naphthalene acetic acid sodium salt (NAA-Na) treatment in diploid *Bletilla* *Brigantes* and tetraploid *Phalaenopsis*, respectively. Unfertilized capsules were produced by treatment of the 2% (w/v) NAA lanoline paste or NAA-Na solution on stigma. Although seeds number harvested was a few, the seeds were cultured on Hyponex medium, containing 3 gL⁻¹ Hyponex (6.5-6-19), 20 gL⁻¹ sucrose and 10 gL⁻¹ agar or on NPCW medium containing 20 gL⁻¹ sucrose and 10 gL⁻¹ agar aseptically. In diploid *Ble. Brigantes*, some seeds developed into seedlings and the ploidy levels were haploid and diploid (doubled haploid). The seedlings acclimatized successfully were all doubled haploid, raised, and flowered. These NAA-Na induced plants produced fertile seeds of both self and cross fertilization. In tetraploid *Phalaenopsis*, the ploidy levels of seedlings which germinated from NAA-Na induced seeds were dihaploid only. These seedling showed poor growth and no acclimatized seedlings was obtained. These results suggest that seedling F1 cultivars might be realistic in *Ble. Brigantes*. To establish seedling F1 cultivar in *Phalaenopsis*, much investigation is required.

緒言

ラン科植物は美しい花を付けるものが多く、我が国のみならず世界の国々で観賞用植物として人気が高く、多くの種類のランが大量に栽培されている。ランの花の改良は、種間あるいは属間交雑により行なわれ

てきたが、それは遠縁交雑が比較的容易というラン科植物の特性によるものである。優れた個体が得られれば、微細繁殖で増殖され新品種として成立するが、微細繁殖法には解決すべき問題点も存在する。微細繁殖では、培養変異が大きな問題であり、その対策も考えられているが、解決すべき問題点も残っている。

著者の一人である市橋は、1987年から、ラン科植物の中では最も栽培の容易なシラン (*Bletilla striata*) の交配育種に取り組んできた。シランは、日本では人気のある庭園植物の一つであるが、花色、花型などは限られているため、花色の幅を広げる目的で中国産黄花種の黄花ショウハッキウ (*Ble. ochracea*) との交雑育種を行い、その増殖方法の検討を行ってきた。その過程で予想外のことであったが、半数体植物が得られた。

ラン科植物は一回の受粉で大量の種子を生産するため、実生繁殖は大量増殖に有効な方法である。品種改良の初期には、実生株も増殖用に有効に利用される。しかしラン科植物の現在の多くの品種は、種間あるいは属間交雑の結果、雑種性の高いものになっている。このような品種の実生個体からは特性の揃った後代は得られない。実生繁殖で、均一な後代を得るには同型接合体が必要とされる。半数体を作成し、それを倍加するのが同型接合体を得るための優れた方法である。同型接合体が得られれば、純系品種、あるいはF1品種の作出は容易であるが、ラン科植物の園芸品種では、4倍体化しているものが多く(市橋ら、2001)、半数体を得られても、同型接合体が必ず得られるわけではない。したがって、半数体植物から育成した同型接合体を、増殖に有効に利用するためには、2倍体系品種の利用が避けられない。

現状の営利生産品種では、実生苗の利用は実際的ではないが、実生品種の利用にはクローン苗にはない優れた点が多く存在する。クローン苗を利用した生産には、培養変異の他に、ウイルスの伝搬、増殖数が限られる、生産コストが高い、クローンの老齢化などの問題がある。しかし実生品種の場合には、これらの問題点は大幅に減ることが期待できるため、本研究では、実生系品種の育成を目指して、効率的な半数体誘導の方法について検討した。

材料と方法

交雑種の育成 交配親のシラン (*Bletilla striat*) と黄花ショウハッキウ (*Ble. ochracea*) は、鉢植えで生育期の4月から11月は50%遮光した屋外の鉢置き場で、自動灌水で管理した。毎年、花後に市販の園芸培養土と3号あるいは3.5号軟質黒ビニールポットを用い、株分けと植え替えを行ったが、それ以外の管理は行わなかった。休眠期は鉢の上に保温のため直接遮光ネットをかけ、灌水は停止した。

自然開花の最盛期はシランでは5月初旬、黄花ショウハッキウでは5月下旬以降で、交配は開花時期の重なるものを用いて行った。また得られた雑種 (F1) 植物を用い、自家交配によって次世代 (F2) を得た。受粉後は、唇弁を取り去りポリネーターによる受粉が

行われないようにした。蒴果が熟し黄色を帯びてきたら、採取し紙封筒で保存し、乾燥種子を年内に播種した(市橋、2006)。培養は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 植物育成用蛍光灯(ホモルックス、NEC)連続照明下(600 lux)で行った。翌年、発根前後の培養実生苗を新しい培地に移植し、翌々年の2~3月に小さな偽球茎を形成した苗を培養容器から取り出し、寄せ植えで管理した。次年度以降は、生育の始まる前に大きさに合わせて単鉢に植え替えた。フラスコ出し後、開花までは4年以上必要としたが、一度開花したものは、毎年開花した。開花後の交配株の管理は、前記の交配親の管理と同様に行った。

単為発生種子の誘導 前述の栽培管理で育てた *Bletilla striat*、*Ble. ochracea* およびその交配種である *Ble. Briganthes* の開花直後の未受粉花の柱頭に、ナフタレン酢酸ナトリウム塩 (NAA-Na) の2%に調整したラノリンペースト、寒天ゲル、あるいは水溶液をそのままあるいは温めて $10 \mu\text{L}$ 程度施用し、ポリネーターによる受粉を避けるため唇弁は除去した。

培地 交配種子の播種培地は、ハイポネックス(6.5-6-19) 2 gL^{-1} 、硝酸アンモニウム 1 gL^{-1} 、MS培地と同量のミオイノシトール、アミノ酸、ビタミンとFe-EDTA、それにシヨ糖 20 gL^{-1} と寒天 8 gL^{-1} を加えた培地を用いた。培地のpHは 5.6 ± 0.1 に調整し、湯煎で寒天を溶かしてから 10 mL ずつエルレンマイヤーフラスコに分注し、アルミホイルで密封し 115°C 、15分間オートクープ殺菌した。

NAA-Na処理で得られた単為発生種子の播種には、ハイポネックス(6.5-6-19) 3 gL^{-1} 、シヨ糖 20 gL^{-1} と寒天 8 gL^{-1} を加えた培地を用いた。培地のpHは 5.6 ± 0.1 に調整し、湯煎で寒天を溶かしてから 100 mL ずつエルレンマイヤーフラスコに分注し、 115°C 、15分間オートクープ殺菌後、 $60 \times 15 \text{ mm}$ の滅菌済みプラスチックシャーレに無菌的に 10 mL 程度分注した。NAA-Na処理で得られた発芽実生の移植培地は、シュークロスとゲル化剤以外の有機物と、無機塩の濃度を1/2としたムラシゲ・スクーグ(1/2MS)培地を用いた。

ファレノプシスの単為発生種子の播種には、NPCW培地を用いた(Ichihashi、1992)。

NAA-Na処理で得られた蒴果と種子の殺菌 4ヶ月未満の若い蒴果の表面を70% Et-OHで拭いたあと、有効塩素1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液につけ10分間振盪しながら殺菌し、滅菌水で3回濯いだ。殺菌後、蒴果はメスで切り開き、内部の種子をピンセットで集めて培地上に無菌的に広げた。完熟種子の場合は、交雑種子と同様の方法で播種した(市橋、2006)。

NAA-Na処理で得られた種子の培養 プラスチックシャーレ内の培地に播種し、播種後パラフィルムで封をし、 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 植物育成用蛍光灯(プラントルックス、東芝)連続照明下(200 lux)で培養した。種皮から胚が

飛び出たものを発芽とし、発芽の有無は播種4週間後に実態顕微鏡 (SZ60、オリンパス) で調べた。発芽植物は15週後に25 mm × 118 mmの培養管の1/2MS培地に移植した。良く生育した植物は、翌年の3月に培養容器から取り出し順化して、通常の方法で栽培した。

フローサイトメトリー 幼植物の葉の核の核酸含量を、核酸含量分析計 (Model PA Ploidy Analyser; Partec Co., Munster, Germany) で測定した。おおよそ5 mm²の葉の切片を無菌培養中の苗から取り出し、市橋ら (2001) の方法に準じて調整し測定した。内部標準には *Primula obconica* '685-1' の葉を用いた (Nimura et al., 2006)。

染色体数の調査 健全に伸長中の根端を摘出し、15°Cの2mM 8-Hydroxyquinolineで4時間前処理し、エタノール/酢酸溶液 (3:1 (v/v)) で固定し、4°Cで保存した。固定した根端をおよそ5分間脱塩蒸留水で洗浄し、4.0% (w/v) セルラーゼオノヅカ (Yakult Honsha Co. Ltd. Tokyo, Japan)、1.0% (w/v) ペクトリアーゼ Y-23 (Kyowa Chemical Products Co. Ltd., Osaka, Japan)、pH 4.0の1.0mM EDTA溶液の入った0.5 ml マイチューブ中で37°C1時間細胞を単離した。分離した細胞は、1.0% (v/v) ギムザ溶液 (Merk, Darmstadt, Germany) で染色し、光学顕微鏡 (BH-2、オリンパス) で染色体数を数えた。

結果

交雑種の育成 シランと黄花ショウハッキウの交配では、シランの白、赤、何れを片親に使おうと、また正逆いずれの交雑でも、その後代は赤あるいはピンクの花で、黄色花は出現しなかった。したがって、花卉の花色に関しては、黄色は劣性形質であった。しかし、リップには片親のシランには見られない黄色のものが見られ、これが交配種 (F1) の特徴となっている。これらの交配種は、一見すると似た印象を受けるが、花卉の形質も様々で、反り返り全開するもの、抱え咲きになるもの、コンパクトに咲くもの、花卉がねじれるものなど多様性が増している。F1は地植えであれば、戸外でも十分越冬し、シランには無いピンクの花色があること、リップに黄色がのること等の特徴がある。さらに、F1は雑種強勢を示し、大形強健で分枝し、花期も5月から7月におよび、その園芸的価値は高いと思われた。

F1個体の、自家交配による次世代交配 (F2) では、花色の幅は大幅に広がり、紅、ピンク、黄色、黄色と赤色の混色、純白が出現し、純白でリップだけが黄色あるいは赤に黄色が混じり目立つものなど、花色の組み合わせが増大した。また花型も親に似たものの他、弁の長いもの、花卉の細いもの、花の大きい物、唇弁の形の違いなどが見られ、花色と花型の組み合わせは

多種多様なものが出現した。しかしF2世代の樹勢に関しては、F1世代の強勢は見られず、葉、花茎が弱く折れやすいもの、簡単に葉焼けするものなど、庭園植物としては不適當なものも見られた (Fig. 1)。

未受粉花へのNAA-Na施用による果実の発達 NAA-Naの2%ラノリンペーストを一回10 μL、柱頭に施用したものでは、着果率は高くはなかったが、未受粉でも着果が見られた、果実の肥大の程度は自家受粉の物に比べ劣った (Table 1)。自家受粉果での有胚率は1.5%~84.3%で、3倍体個体で低かった。胚のある種子の発芽率は2倍体では80%以上であったが、3倍体個体の'H5-2'、'H5-FD'、'H6-O'ではそれぞれ52.0、11.3、91.3%であった。NAA-Na施用により形成された種子の有胚率は0~1.49%で、発芽率は非常に低かったが、発芽種子、実生を得ることができた (Table 2)。

単為発生個体のその後の生育とフローサイトメトリー分析 NAA-Na処理で単為発生的に得られた種子の発芽までの日数は、受粉による種子の場合と違いはなかった。しかしその後の生育は単為発生によるもので劣った (Fig. 2)。また、フローサイトメトリー分析では、単為発生の個体の核DNA含量は *Ble. Briganthes* 'H5-11'の自家受粉実生のおおよそ半分であった (Fig. 3)。単為発生の個体の中で1/2MS培地に移植後に生育が旺盛になるものが見られた。

移植後も生育を継続した実生についてフローサイトメトリー分析を行った (Table 3)。24個体の親植物から得られた31個体の単為発生実生の倍数性の内訳は、16個体が半数性 (X)、12個体が2倍性 (2X)、3個体が4倍性 (4X) であった。NAA-Na処理によって得られた実生個体のうち、うまく順化して鉢栽培に移せたもの8個体はすべて2倍体で、開花を確認できた (Fig. 4)。これらの自家交配あるいは他家交配による次世代も作出できた。

シラン以外へのNAA-Na施用の検討 NAA-Na溶液処理による単為発生種子形成の可能性の検討を、ファレノプシスで行った所、4倍体ファレノプシスでは二ゲノム性半数体が得られたが、その生育は緩慢で、順化して鉢植えにできた植物体はまだ得られていない。*Disa*属交配種では、NAA-Na溶液処理によって有胚種子が容易に形成されたが、発芽する種子の割合は極めて低く、植出し可能な実生は得られていない。サギソウも *Disa*と同様にNAA-Na溶液処理によって胚を持った種子を形成するが、種子の発芽は現在まだ確認されていない。



Fig. 1. Descendants of *Ble. ochracea* and *Ble. striata* crossing. A, B, C; Left row shows combination of parent species. Right pictures in the same line show the descendants.
 D, E, F; Left row indicate F1 plants and right pictures shows the descendants of self-crossing.
 Bars in photos indicate 1 cm.

Table 1. Chromosome Number, Ploidy Levels and Capsule set in *Bletilla*.

Species or hybrids		Chromosome number $2X=z^z$	Flowcytometry		Number of capsules set / treatment	
			relative DNA content	estimated ploidy level	self cross	NAA-Na application ^y
<i>Ble. striate</i>	'Red'	32	100	2C	2/2	8/8
<i>Ble. striate</i>	'White'	32	99	2C	2/2	3/6
<i>Ble. ocracea</i>		32	114	2C	2/2	0/12
	'H4-3'		105	2C	2/2	1/4
	'H4-4'		102	2C	1/2	1/5
	'H4-5'		100	2C	1/2	1/7
	'H4-6'		101	2C	1/2	0/9
	'H4-7'		105	2C	1/2	1/5
	'H4-8'		104	2C	2/2	0/5
	'H4-9'		104	2C	1/2	5/5
<i>Bletilla</i>	'H4-10'		102	2C	2/2	0/5
Briganthes	'H5-1'		98	2C	0/2	1/5
	'H5-2'	48	149	3C	1/2	3/5
	'H5-3T'		99	2C	1/2	3/5
	'H5-3N'	48	156	3C	0/2	4/5
	'H5-4'		101	2C	2/2	1/5
	'H5-5W'		98	2C	2/2	2/8
	'H5-5R'		99	2C	0/2	2/5
	'H5-6'	48	168	3C	1/2	0/4
	'H5-7N'		98	2C	2/2	0/5
	'H5-7W'		101	2C	2/2	4/5
	'H5-8'		101	2C	1/2	0/5
	'H5-9'		99	2C	2/2	1/5
	'H5-10'		100	2C	1/2	2/5
	'H5-11T'		100	2C	2/2	6/8
	'H5-11N'	32	100	2C	2/2	8/8
	'H5-11LT'		101	2C	2/2	3/5
	'H5-FD'	48	168	3C	1/2	4/5
<i>Bletilla</i>	'H6-2'		98	2C	1/2	2/5
Briganthes	'H6-3'		98	2C	1/2	2/5
	'H6-4'		102	2C	2/2	3/5
	'H6-5'		100	2C	2/2	5/5
	'H6-6'		106	2C	2/2	0/5
	'H6-8'		105	2C	2/2	3/5
	'H6-O'	48	155	3C	2/2	2/5
	'No 4 N'		95	2C	0/2	2/5
	'No 4 T'		100	2C	1/2	0/5
	'No 4'		103	2C	1/2	2/5
38					53/76 (69.7%)	85/214 (39.7%)

^zChromosome number of the all plants was not checked.^yTwo percent NAA-Na lanolin paest (400 mg/20 g) was applied 10 uL by a finn pipet on unpolinated stigma once.

Table 2. Effects of NAA-Na Treatment on Parthenogenetic Capsule set, Seed Production, and Seed Germination.^z

Species and hybrids		Number of seed sown	Percent of			
			seeds with embryo	germination per seeds number with embryo	germination per total seeds number sown ^y	
<i>striata</i>	'Red'	3367	0.39	7.7	0.03	
<i>striata</i>	'White'	3651	0.41	0.0	0.00	
<i>ochracea</i>	<i>ochracea</i>	4463	0.38	33.3	0.00	
<i>Bletilla</i>	'H4-3'	4218	0	0.0	0.00	
	'H4-4'	3913	0.46	27.8	0.13	
	'H4-5'	3318	0	0.0	0.00	
	'H4-6'	3525	0	0.0	0.00	
	'H4-7'	3963	0.35	14.3	0.05	
	'H4-8'	3725	0.03	0.0	0.00	
	'H4-9'	3351	0.18	16.7	0.03	
	'H4-10'	4625	0	0.0	0.00	
	'H5-1'	4675	0.06	33.3	0.02	
	'H5-2'	5052	0	0.0	0.00	
	'H5-3T'	4725	0	0.0	0.00	
	'H5-3N'	4475	0.42	0.0	0.00	
	'H5-4'	3004	0	0.0	0.00	
	'H5-5W'	5325	0	0.0	0.00	
	'H5-5R'	3488	0.23	12.5	0.03	
	'H5-6'	3964	0	0.0	0.00	
	'H5-7N'	4475	0.20	0.0	0.00	
	Briganthes	'H5-7W'	2357	0.25	0.0	0.00
		'H5-8'	3825	0	0.0	0.00
		'H5-9'	4501	0	0.0	0.00
		'H5-10'	3956	0	0.0	0.00
		'H5-11T'	4552	0	0.0	0.00
		'H5-11N'	3638	0.30	54.5	0.16
		'H5-11LT'	3725	0.16	16.7	0.03
		'H5-FD'	4250	0	0.0	0.00
		'H6-2'	4223	0	0.0	0.00
		'H6-3'	4112	0	0.0	0.00
		'H6-4'	3966	0	0.0	0.00
		'H6-5'	3575	0	0.0	0.00
		'H6-6'	4885	0	0.0	0.00
		'H6-8'	3956	0	0.0	0.00
		'H6-O'	3601	0	0.0	0.00
	'No 4 N'	4833	0.08	25.0	0.02	
	'No 4 T'	4641	0	0.0	0.00	
	'No 4'	2855	0	0.0	0.00	

^z Aqueous 2% NAA-Na solution was applied once on unpolinated stigma in 2002.^y Germination rate after 4 weeks culture.

Table 3. Ploidy Levels of Seedlings induced by NAA-Na application Parthenogenetically.

Origin	plant number	NAA-Na treatment		Estimated		
		application methods	concentration (%)	Relative DNA content ^z	ploidy level	
<i>striata</i>	1	liquid	2	100.0	X	
	2	liquid	2	96.3	X	
	3	liquid	2	96.3	X	
	<i>ochracea</i>	4	liquid	1	114.8	X
		5	liquid	2	107.4	X
		6	liquid	2	111.1	X
	'H4-4'	7	liquid	2	114.8	X
		8	liquid	2	114.8	X
		9	liquid	3	96.3	X
	'H4-7'	10	agar	1	111.1	X
		11	agar	1	188.9	2X
	'H5-5R'	12	liquid	1	103.7	X
		13	liquid	1	107.4	X
		14	liquid	1	107.4	X
		15	lanolin	2	81.5	X
	<i>Bletilla</i>	16	lanolin	2	218.5	2X
				222.2	2X	
Briganthes	17	lanolin	2	100.0	X	
				211.1	2X	
				385.2	4X	
	18	lanolin	2	385.2	4X	
				392.6	4X	
	'H5-11N'	19	lanolin	2	81.5	X
					200.0	2X
					174.1	2X
	20	lanolin	2	200.0	2X	
				200.0	2X	
	21	lanolin	2	203.7	2X	
	22	lanolin	2	203.7	2X	
23	lanolin	2	207.4	2X		
24	self cross	-	203.7	2X		

^zRelative DNA contents based on the value of plant No.1 as 100.

考察

外来遺伝子導入による育種法は、限られた特定の形質を改善するには優れた方法で、ラン科植物の花の育種に置いても実用的な段階になってきた (Mii and Chin, 2010)。しかし、外来遺伝子導入ですべてが解決するわけではなく、従来の交雑育種技術も相変わらず必要である。伝統的な交雑育種法は、交雑可能な植物に必要な形質が存在すれば、だれもが簡単に取り組める方法である。今回目指した、花色の変異の幅の拡大は、従来技術で比較的に取組む課題であり、目標の一部は達成されたと考えられる。しかし、育種の成果を有効に活用するには、新品種を大量に増殖する手段が必要である。

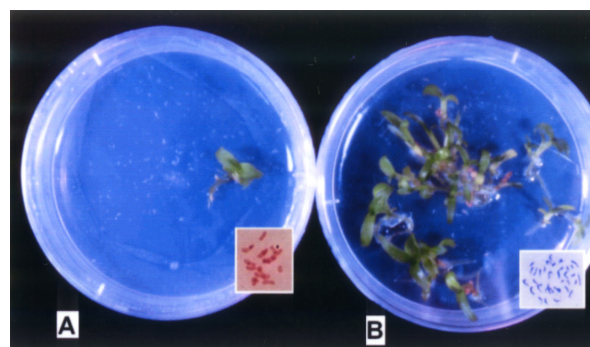


Fig. 2. Seedlings in 60 mm plastic dishes 127 days after sowing and the chromosomes in the root tip. A; Plant induced parthenogenetically by NAA-Na. The chromosome number was 16. B; Plant derived from self-crossing seeds. The chromosome number was 32.

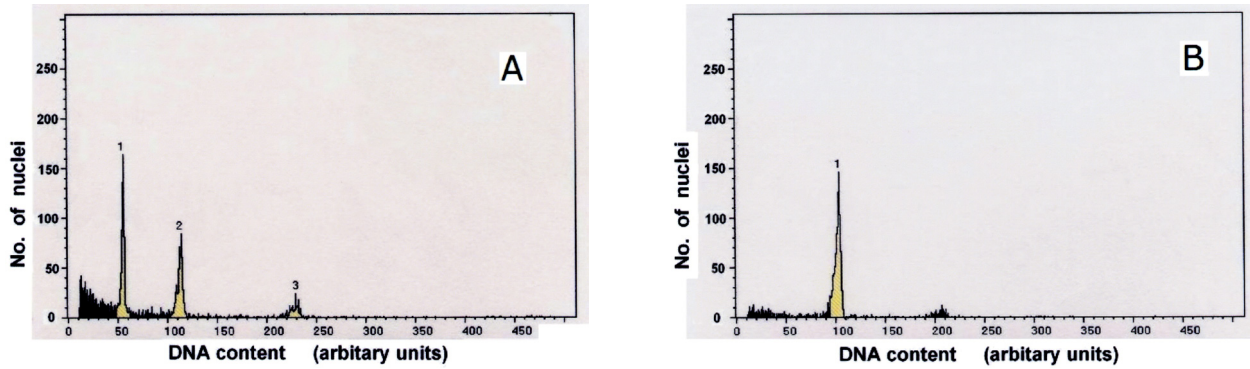


Fig. 3. Flow-cytometric profiles of DNA contents. A; Plant induced parthenogenetically by NAA-Na. B; Plant derived from self-crossing seed.

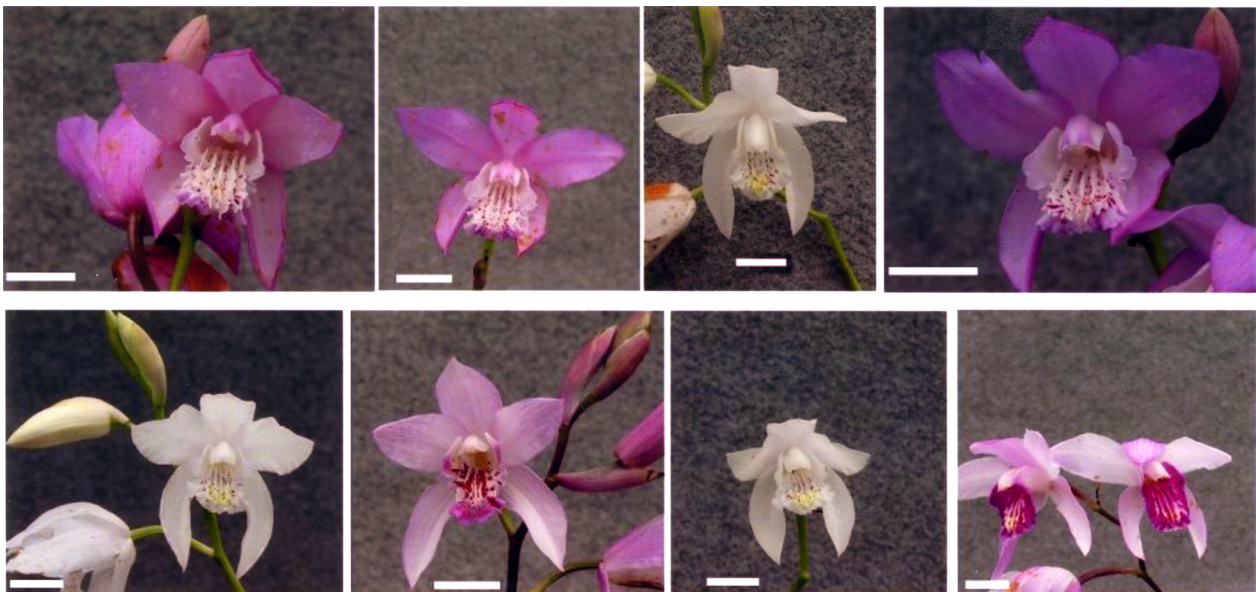


Fig. 4. Flowers bloomed on plants which were derived from seeds induced parthenogenetically by NAA-Na treatments. Ploidy levels of all plants were doubled haploid (2X) and bars in photos indicate 1 cm.

ラン科植物では、種子繁殖法で容易に大量に増殖できるものが多く、個体数の増殖は比較的容易である。しかし、育種の進んだ営利品種は雑種性が高く、種子繁殖での増殖には適さないため、その増殖は主に栄養繁殖法に依存している。特に微細繁殖法は、雑種性の高いラン科植物の効率的な増殖のために必要不可欠な手段であるが、解決しなければならない問題もいくつか存在している。しかし、栄養繁殖法における問題点の多くは、種子繁殖法では問題にならない。したがって、増殖の種子繁殖化は微細繁殖法の代替技術となる可能性がある。そのためには、品種の純系化は必要不可欠である。今までの所、ラン科植物で純系個体を作成する有効な方法は知られていなかったが、本研究で示されたように、ラン科植物においても半数体の作成は可能であり、さらに特別な処理を行わなくても同型接合体が得られることが示された。これは、ラン科植物の増殖法の開発において画期的な出来事であり、ランのF1品種作出の第一歩である。

しかし、実生品種開発のためには、解決しなければならない大きな問題が存在する。半数体誘導効率の低さは第一に解決しなければならない問題である。また、現状の4倍体品種の利用と普及も大きな問題である。4倍体品種からは2ゲノム性半数体が得られ、これからは純系個体は得られない。種子繁殖系品種を確立するためには、2倍体での育種が前提であり、4倍体品種主体の現行の品種においては、種子繁殖の可能な純系個体は得られない。このように、解決しなければならない課題は大きいですが、実生系品種の開発には大きな可能性と有効性が存在している。

謝辞 デイサの株を分けて頂いた、ジェイズデイサフラワーズの城真一郎さんに感謝いたします。

引用文献

Ichihashi, S. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the

- culture of lateral buds from young flower stalks. *Lindleyana* 7(4): 208–215.
- 市橋正一・伊藤裕司・小栗達也・加藤淳太郎. 2001. フローサイトメーターによるラン科植物の倍数性調査. 愛知教育大学研究報告, 自然科学編. 50 : 39–45.
- 市橋正一. 2006. ファレノプシスの無菌培養. ②殺菌. 市橋・三位編著. ファレノプシス. P.113–114. 誠文堂新光社. 東京.
- Mii, M. and D.P. Chin. 2010. Genetic transformation of orchid. *Acta Hort.* 878: 461–465.
- Mori, G., K. Yamaoka, and H. Imanishi. 1989. Studies on the possibility of inducing apomixes in some orchids. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 58 (Suppl. 2): 536–537. (In Japanese).
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nimura, M., J. Kato, M. Mii, and T. Katoh. 2006. Amphidiploids produced by natural chromosome-doubling in inter-specific hybrids between *Dianthus x isensis* Hirahata et Kitam. And *D. japonicus* Thunb. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 81(1): 72–77.

(2012年9月18日受理)