

液体振とう培養による種苗生産の効率化

高山 眞 策*

(1984年1月10日受理)

1. はじめに

組織培養を利用することにより、従来から行われている挿木、接木、株分け、取木等とは比較にならぬほど大量に種苗を生産できるようになった。この技術の実用性は高く、商業的に利用されるようになってから、すでに十数年を経過している。この間の研究の進展は目覚ましく、現在ではラン、シダ、観賞植物(花卉、観葉植物)、果樹、野菜、林木というような産業上有用な植物が研究の対象とされ¹⁻⁴⁾、すでに商業的に生産されたり、実用的な増殖技術の確立を目指して活発な研究が展開されている。

現在、組織培養で生産されている種苗の数は、全世界で年間6,000万本といわれており⁵⁾、その数はますます増加する傾向にある。しかし、実用化している技術は、その多くが寒天培地上で分化・発育した脇芽や不定芽などを無菌的に分割し、再び寒天培地上に継代して増殖するものであり、培養装置の大型化、自動化よりも、試験管、フラスコ、培養びん等の小型の培養容器の数と人手を増やすことにより大量培養を実現しているのが現状である。著者らは、このような現状を改善するために種々検討してきたが、その過程で、液体振とう培養法が種苗大量生産を実現するための優れた方法であることが明らかになってきた^{6,7)}。

ここでは、主として著者らの実験結果を中心に、液体振とう培養による種苗生産の効率化について述べてみたい。

2. 液体振とう培養による種苗生産

液体振とう培養は、微生物、動植物細胞で広く利用されている培養技術である。この技術は、種苗生産においても有効に利用できることが明らかになってきたが、そ

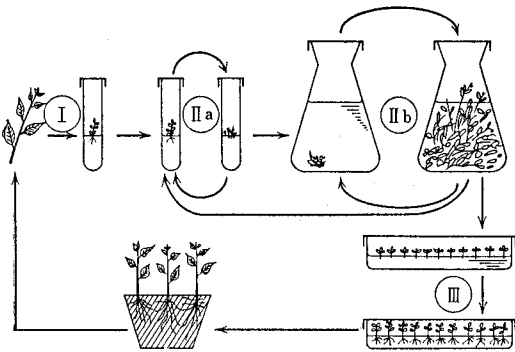
の特徴は以下のとおりである。

- (1) 強制通気攪拌ができるので、酸素供給が良好であり、生育が速い。
- (2) 培地と接触する面積が広く、養分の吸収効率が良い。
- (3) 培養物が常に浮遊しているため、極性が消失し、頂芽優勢現象に支配されることなく、分化した多数の芽を一斉に生育させることができる。
- (4) 移植の手数が少ない。
- (5) 立体的に培養できるので、大量培養へのスケールアップが可能になる。

これらの特徴を効率良く発揮させて大量培養を実現するためには、個々の植物の最適培養条件を明らかにするとともに、基礎的な研究を通してさらに技術を向上させることが必要である。将来は、ジャー、タンクなどの大型の培養槽を用いた種苗大量生産⁸⁾が実現するかもしれないが、現在のところ、本稿の主題である液体振とう培養が効率の上からも技術的にも実用的なものであるといえる。その基本的な考え方を第1図に示した。ステージ I で確立した無菌の植物体を高濃度のサイトカイニンを含む培地に移植して、ステージ II a で多数の芽を分化させる。その大半が数 mm 以下であり、分割して発根培地に移植することは困難である。そこで、ステージ II b において、液体培地に移植して液体振とう培養を行うと、分化した多数の芽が迅速かつ一斉に生育して植物体となる。液体振とう培養の期間は、多くの草本類で3~4週間、球根類では1~3ヵ月程度であり、寒天培養に比べるとかなり速い(第2図)。このようにして分化・生育させた植物体は、球根類の場合には、その多くが直接土壤に移植することができる。草本類の多くは、発根・馴化(ステージ III)させた後に土壤移植した方が活着率が高い。以上のステップのうち、ステージ II a と II b を繰返すと植物体の数が著しく増加する。

なお、大量培養を行う目的でジャー・フェーメンターを利用する試みがベゴニア⁹⁾とユリ¹⁰⁾で報告されている。

* Sinsaku TAKAYAMA: Mass Propagation of Plants through Shake Culture Techniques
協和発酵工業(株)・生物研究所(〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町 4041)
Research Laboratories for Biological Sciences(4041 Ami, Inasiki-gun, Ibaraki-ken, 300-03, Japan)



第1図 液体振とう培養による種苗大量増殖技術の体系

I : 無菌培養系の確立, II a : 高濃度サイトカイニンによる多数の芽の分化, II b : 分化した多数の芽の液体振とう培養による急速生育, III : 発根・馴化.

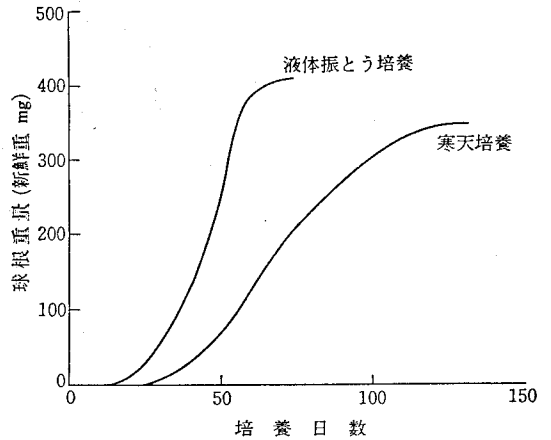
しかし、培養物の移植、回収、通気攪拌、馴化、土壌への移植等の技術についてさらに検討を要するばかりでなく、培養工学的特性も不明な点が多いので、その実用化に当っては今後多くの問題が解明されなければならない。

3. 液体振とう培養による種苗生産の実際

(1) ベゴニア

ベゴニアは中南米、アジア、アフリカの熱帯、亜熱帯地方の原産¹¹⁾であり、園芸上重要な種類を含め全世界に約2,000種が分布している¹²⁾。これらの多くは、挿木、葉挿し、茎頂挿し、株分けで容易に増殖することができる。特に、葉の分化能が高いことが特徴的であり、*Begonia hispida*¹³⁻¹⁵⁾ や *Begonia rex*¹⁶⁾ では、植物体上の葉の表面に葉状の植物体を分化させることができるほどである。このように、ベゴニアは増殖しやすい植物であるが、新品種を急速に増殖して商業生産する場合には、従来の方法では不十分である。また、ベゴニアはウイルス病¹⁷⁻²⁰⁾、疫病^{21, 22)}、ウドンコ病²³⁻²⁸⁾、ネマトーダ^{12, 25)}等に侵されていることが多く、従来の方法で増殖された植物は品質が必ずしも良くないので、組織培養で健全な植物体を大量に増殖することが望まれている。

ベゴニアの組織培養に関する研究は、近年わが国でも鉢花としての需要が急速に増大している *Begonia* × *hiemalis* に関するもの^{9, 29-41)}を中心に、園芸上重要ないくつかの種類で報告されている⁴²⁻⁵²⁾。そのほとんどが寒天培地のみを用いたものであり、その増殖率は最もよく研究されている *B.* × *hiemalis* の場合、55日間で50~200個体³⁵⁾あるいは16週間(112日間)で500個体³⁷⁾であるという。これに対して、液体振とう培養を利用すると、増

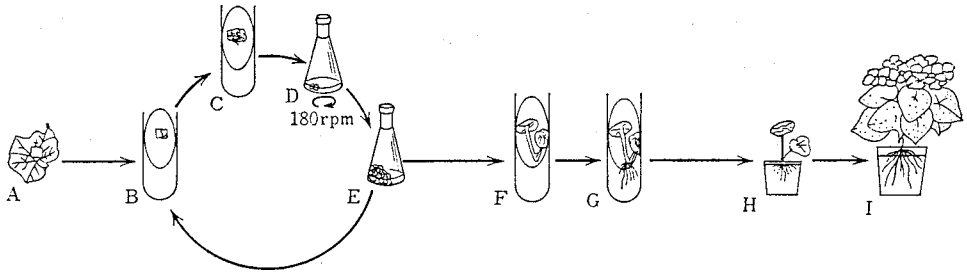


第2図 ヤマユリ球根の生育に対する培養方法の影響

殖率が著しく高まり、理論的には年間 10^{14} という高い数字になる²⁹⁾。第3図にその概略を示した。すなわち、ベゴニアの若い葉(A)の切片(B)をサイトカイニンを添加した寒天培地上で培養する^{9, 29)}ことにより、その表面に多数の芽を分化させる(C)。培養温度は20~25°Cが適しているが、母植物の栽培温度によって培養適温が異なる³²⁾という報告があるので、培養の材料については十分注意を払う必要がある。このようにして葉の表面に分化した芽は、多くの場合、葉状の原基^{14, 16)}であり、生育が遅く、このまま土壌移植できる植物にまで育てるのは容易ではない。しかし、液体振とう培養(D, E)した場合には、芽の生育が著しく促進される。なお、植物体の増殖過程はリサイクル系として確立することができる(B, C, D, E)ので、増殖率を著しく高めることができる。液体振とう培養で生育させた植物体は、分割して発根培地に移植(F)し、発根・馴化(G)すると土壌移植が容易である。開花した植物体の形質はよく揃っており、変異発生も従来の増殖法と変るものではない^{29, 30, 32)}。また、病害のない健全な植物であるために、花数、花径、生産性、球径等が優れていた¹⁸⁾。

(2) セントポーリア、グロキシニア

イワタバコ科の植物は、葉挿しや茎挿しで増殖されている^{53, 54)}が、セントポーリアやグロキシニアのように需要の多い種類を中心に組織培養による大量増殖が検討されている⁵⁵⁻⁶⁸⁾。その増殖率は、たとえばエписシア(*Episcia* sp.)の場合、1平方メートルの空間で年間80万株を作ることができる⁶⁸⁾というほどであり、非常に効率がよい。これでも寒天培地のみで増殖した場合には、分割、移植に多大の労力を要することになり、スケールメリットを得ることが困難である。筆者らは、これらの植



第3図 液体振とう培養法を用いたペゴニアの急速増殖技術 (Takayama and Misawa, 1982²⁹⁾より).
 A: 母植物の若い葉, B: 葉切片の培養, C: 葉切片の表面に多数の芽を分化させる, D, E: 分化した芽を液体振とう培養で急速に生育させる, F, G: 分化, 生育した植物体の発根, 馴化, H, I: 土壌栽培による開花.

物のうち、セントポーリアとグロキシニアについて液体振とう培養の利用を試みた結果、寒天培養に比べ著しい生育促進効果を観察し、大量増殖体系を確立したが、これは第3図に示したペゴニアの増殖体系と完全に同一のものとなった^{7,69)}。培養諸条件および培養特性もほぼ同じであったが、土壌への移植はむしろ容易であり、発根培地を経由せず直接土壌へ移植することも可能であった。開花した植物は、ペゴニアと同様に健全であり、変異もほとんど見られなかった。

(3) カーネーション, キク

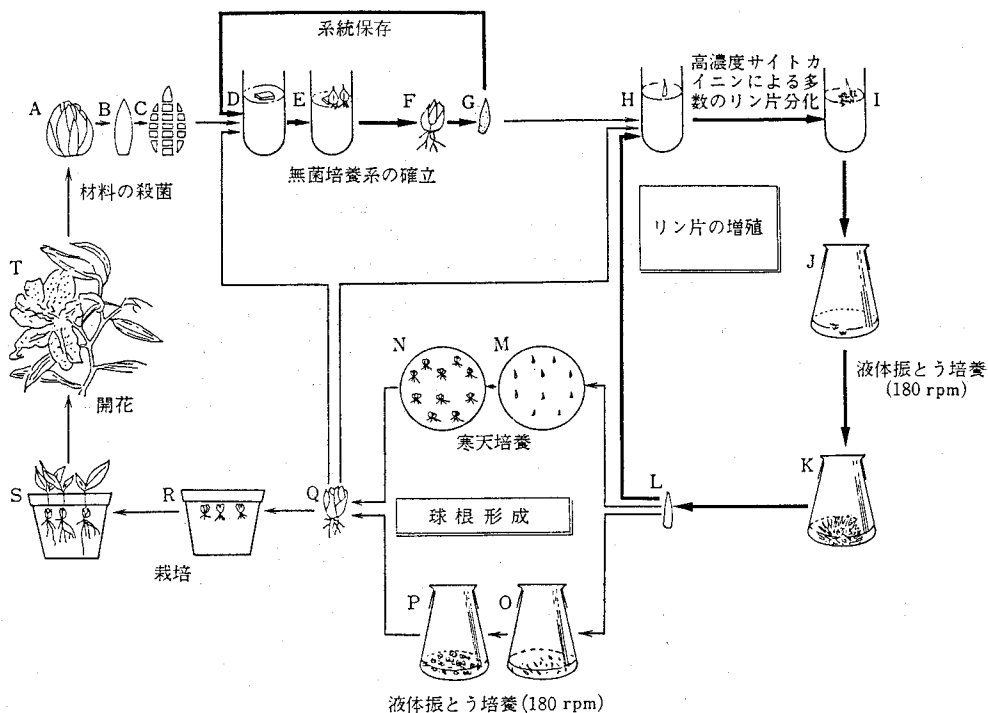
カーネーション, キクともにウイルスによる品質の低下が著しいため、茎頂培養によるウイルス・フリー化について数多くの研究がなされており⁷⁰⁻⁷³⁾、栄養繁殖に関する研究も数十件に達している (文献省略)。ウイルス・フリー化技術はすでに確立され、実用的に利用されているが、フリー化された植物を土壌に移植して育成し、挿木で増殖して利用しているのが現状である。Earle と Langhans^{70,74)} はキク, カーネーションの液体振とう培養による種苗の増殖について報告しており、大量増殖法として注目されている。しかし、彼らの報告に基づいて培養を行うと、作出された植物体は膨潤状態のものが多くなり、土壌活着が困難である。著者ら⁷⁵⁾は、この点の改良を中心に培養条件の検討を進めた結果、1/3に希釈したMS培地にシュークロース 30 g/l を添加して培養を行うことにより、1カ月で約18倍に分枝させることができ、かつ分枝した苗条をシュークロース 10 g/l を含むMS寒天培地に移植して5,000 lux で培養することにより土壌移植が非常に容易になった。この手法で増殖したカーネーション5品種を栽培し開花させたと、ウイルスの汚染は見られず、花も良品質であった。変異もほとんど発生せず、「ダークGT」という品種で1個体の花色変異が認められただけであった^{7,75)}。なお、カーネーション, キクともに組織培養で増殖した個体には変異発

生が多いといわれているので、実用化に際しては詳細な検討が必要であろう。

(4) ユリ

ユリ属植物にはテッポウユリ, カノコユリ, スカシユリ, ヤマユリなど園芸上重要な種類が多く、わが国における球根生産は年間1億球に達している。しかし、広く利用されているリン片挿しの増殖率が低いために新品種の増殖・普及に長年月を要するばかりでなく、ウイルスの感染によって著しい品質の低下をきたし、球根生産に大きな損害を及ぼすようになってきた。このため、茎頂培養によるウイルス・フリー化⁷⁶⁻⁷⁹⁾や、組織培養による増殖について検討されてきた。組織培養による増殖法は、小球根のリン片を分割して新しい培地に移植して球根を形成させる方法^{76,80-89)}と、カルスを誘導して増殖し、球根を再分化させる方法^{84,90,91)}とに大別される。前者は、球根が確実に分化し、しかも変異もほとんど見られないので優れた方法であるが、寒天培地上で増殖しているために増殖効率は必ずしも高くない。また、後者は、液体培養を利用してカルス細胞を大量に増殖できる利点を有しており、しかも再分化した植物体の変異発生がほとんどないと報告されている^{84,91)}。しかし、多くの植物でカルスの継代に伴う分化能の低下や、再分化植物の変異発生の増加⁹²⁾が知られているので、ユリの場合にもこれらの点に関する詳細な検討が必要であろう。

以上の背景を考慮した上で、著者らは前者のリン片培養法を基本とし、培養効率を高めるために液体振とう培養法の有効利用を検討した結果、第4図に示すようなユリの大量培養技術を確立した^{93,94)}。この手法では、まず、無菌系として確立した子球(F)のリン片(G)を、高濃度のサイトカイニンを含む培地に移植する(H)ことにより、多数の不定リン片(I)を分化させることができた⁹³⁾。この手法で分化したリン片の数は、ヤマユリ, テッポウユリが約200枚, カノコユリは約50枚であり、その



第4図 液体振とう培養を用いたユリの急速増殖技術 (Takayama and Misawa, 1983⁹⁴).

大半が数 mm 以下の原基状リン片であった。このリン片塊を液体振とう培養すると個々のリン片が効率よく肥大する (J, K)。このようにして肥大したリン片を分離 (L) して、寒天培養 (M, N) あるいは液体振とう培養 (O, P) で新しい球根 (Q) を形成することができた。液体振とう培養で球根を形成させる場合 (O, P)、培地が適当でないとカルス化、組織の膨潤、球根の形態異常などが発生する。しかし、適正培地では、正常な球根を寒天培地の半分の期間で形成させることができる (第2図)。この傾向は、小型の培養槽でも観察されている¹⁰⁾。以上のようにして形成された球根は、多くの場合休眠しているの、低温 (4°C) 処理により休眠を打破し⁹⁵⁾、適正な条件で栽培育成 (R, S) することにより開花 (T) させることができる。著者らの経験では、テッポウユリ、新テッポウユリは栽培当年に、ヤマユリ、カノコユリの場合は2~3年で開花させることができた。これらの花の形質は非常によく揃っており、変異の発生も認めていない⁹⁵⁾。

4. 大量培養へのアプローチと今後の課題

液体振とう培養は、現在、レップロ型あるいはロータリー型の振とう培養機を用いて行われているが、培養物に対する物理的ストレスが少いという点でロータリー型

が優れている。振とう培養に用いるフラスコは 2l 容まで用いることができる。最近、Harris および Mason⁹⁶⁾ は、50および 125 ml のフラスコ用と 455および 900 ml のびん用の2種類のシーソー型培養機を開発し、寒天培養で90日かかるブドウの培養を28日で達成しており、さらに、同様な結果を *Archostaphylos*⁹⁶⁾, *Fuchsia*⁹⁷⁾, *Ame-lanchier*⁹⁶⁾, *Nicotiana*⁹⁶⁾ で報告している。Staba を中心としたグループは、アルカロイドなどの二次代謝物質生産の手段として、液体培養による *Catharanthus*⁹⁸⁾, *Digitalis*^{98, 100)}, *Dioscorea*¹⁰¹⁾ の器官培養を報告しているが、いずれも著しい生育および二次代謝物質生産の促進を観察している。将来は、ジャー・フェーマンターやタンク等を用いた器官大量培養による二次代謝物質生産も実現させたいものである。

ジャー・フェーマンターを用いた種苗大量生産の試みは、すでに述べたようにペゴニア⁹⁾ とユリ¹⁰⁾ でなされているが、容器が大型化するほど器官培養は難しくなるので、大型容器による大量培養を実現するためには、特に、培養工学的な点を中心に基礎的な面から問題解決を図っていく必要がある。なお、大量培養の1つの目安として、Durzan の試算によれば、100l の培養で7,200万本の植物 (苗圃面積100,000エーカー分に相当) を作出で

きるという²⁾ほどであり、大量培養の利点は計り知れないものがある。

以上のように、液体培養を利用した種苗大量生産技術は現在なお研究段階にあるが、培養技術の問題だけでなく植物の生理的あるいは種特異性も大きな問題である。たとえば、エイジの進んだ組織の分化能は著しく低下していることが多く、しかも、その回復の手段は見出されていない。また、針葉樹の分化や液体培養は困難なものが多い。このほか、土壌移植の技術も今後の大きな課題として残されている。現在、組織培養で作出した小さな苗を、実際に圃場で利用できるまでに育てるのに、多くの人手、場所、時間を必要としている。今後、この点に関し、植物工場的な技術の導入も含めて解決がなされ、本当の意味での種苗大量生産技術が確立されることが期待される。

文 献

- 1) Conger, B.V. (ed.), 1981. Cloning Agricultural Plants via in vitro Technique. p. 1-273, CRC Press, Ohio.
- 2) Murashige, T., 1974. Ann. Rev. Plant Physiol., **25** : 135-166.
- 3) Holdgate, D.P., 1977. In "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture" (ed. by Reinert, J., Y.P.S. Bajaj), p. 18-43, Springer Verlag, Berlin.
- 4) Vasil, I.K., V. Vasil, 1980. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A : 145-174.
- 5) Aynsley, J., D. Diotz, G.H. Kidd, 1983. Biotechnology, **4** : 166-169.
- 6) 高山眞策, 1983. 遺伝, **37**(11) : 20-26.
- 7) Takayama, S., Misawa, M., 1982. In "Plant Tissue Culture 1982," p. 681-682, Maruzen, Tokyo.
- 8) C. & EN. June 4, p. 26. (1979).
- 9) Takayama, S., Misawa, M., 1981. Plant Cell Physiol., **22** : 461-467.
- 10) 三沢正愛, 高山眞策, 1980. 公開特許公報, 昭55-15734.
- 11) Willis, J.C., 1973. "A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns (8th ed.)," Cambridge University Press, London.
- 12) 井上頼数(編), 1982. 最新園芸大辞典 第2巻, p. 1-227, 誠文堂新光社, 東京.
- 13) Maier, U., R. Sattler, 1977. Can. J. Bot., **55** : 264-280.
- 14) Sattler, R., U. Maiyer, 1977. Can. J. Bot., **55** : 411-425.
- 15) Lieu, S.M., R. Sattler, 1976. Can. J. Bot., **54** : 2108-2121.
- 16) Chlyah-Arnason, A., M. Tran Thanh Van, 1968. Nature, **218** : 493.
- 17) Welvaert, W., G. Samyn, 1978. Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. Gent., **43** : 1051-1062.
- 18) Welvaert, W., G. Samyn., E. Van Wymersch, 1980. Acta Hortic., **110** : 253-257.
- 19) Semal, J., 1958. Nature, **182** : 1688.
- 20) Loackhart, B.E.L., J.A. Betzold, 1982. Plant Des., **66** : 72-73.
- 21) Rattinck, H., 1981. Neth. J. Plant Pathol., **87** : 83-90.
- 22) Kroeber, H., 1981. Phytopathol. Z., **102** : 219-231.
- 23) Nagi, G.S., 1975. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung., **10** : 377-388.
- 24) Digat, B., H. Vidalie, 1975. Oepinciristes Horticulteurs Maraichers., **162** : 13-22.
- 25) Quinn, J.A., C.C. Powell, Jr., 1979. Phytopathology, **69** : 1043.
- 26) Quinn, J.A., C.C. Powell, Jr., 1981. Phytopathology, **71** : 251.
- 27) Quinn, J. A., C.C. Powell, Jr., 1982. Phytopathology, **72** : 480-484.
- 28) Larson, R.A., 1980. In "Introduction to Floriculture" (ed. by Larson, R.A.), p. 359-408, Academic Press, New York.
- 29) Takayama, S., M. Misawa, 1982. Sci. Hortic., **16** : 65-75.
- 30) Bigot, C., 1981. Agronomie, **1** : 433-440.
- 31) Appelgren, M., 1977. Acta Hortic. **64** : 31-38.
- 32) Appelgren, M., 1977. Ph. D. Thesis. p. 1-63.
- 33) Reuther, G., 1980. Gb+Gw. **80** : 876-881.
- 34) Reuther, G., Bhandari, N.N., 1981. Gartenbauwissenschaft, **46** : 241-249.
- 35) Welander, T., 1977. Physiol. Plant., **41** : 142-145.
- 36) Welander, T., 1979. Swed. J. Agric. Res., **9** : 163-168.
- 37) Mikkelsen, E.P., K.C. Sink, Jr., 1978. Hort-Science, **13** : 242-244.
- 38) Mikkelsen, E.P., K.C. Sink, Jr., 1978. Sci. Hortic., **8** : 179-192.
- 39) Hanning, D.W., R.W. Langhans, 1974. Hort-Science, **9** : 271.
- 40) Roest, S., 1977. Acta Hortic., **78** : 349-359.
- 41) Roest, S., M.A.E. Van Bakel, G.S. Bokelmann, C. Broertjes, 1981. Euphytica, **30** : 381-388.
- 42) Fannesbech, M., 1974. Physiol. Plant., **32** : 49-54.
- 43) Fannesbech, M., 1974. Physiol. Plant., **32** : 282-286.
- 44) Heide, O.M., 1965. Physiol. Plant., **18** : 891-920.
- 45) Arora, Y.K., S. Nakao, T. Nakajima, 1970. Jpn. J. Breed., **20** : 275-281.
- 46) Shigematsu, H., K. Matsubara, 1972. J. Jpn. Soc. Hort. Sci., **41** : 196-200.
- 47) 中山昌明, 坂田智子, 向江一裕, 1981. 第12回

- 長野県園芸研究会研究発表要旨, p. 35-36.
- 49) Ringe, F., 1972. *Experientia*, **28** : 234-235.
 - 50) Ringe, F., 1972. *Z. Pflanzenphysiol.*, **67** : 45-57.
 - 51) Berghoef, J., J. Bruinsma, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, **94** : 345-357.
 - 52) Berghoef, J., J. Bruinsma, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, **94** : 407-416.
 - 53) Kimmins, R.K., 1980. In "Introduction to Floriculture" (ed. by Larson, R.A.), p. 287-300, Academic Press, New York.
 - 54) Henting, W.U. Von, 1976. *Acta Hort.*, **64** : 55-63.
 - 55) Grunewaldt, J., 1977. *Gartenbauwissenschaft*, **42** : 171-175.
 - 56) Piechowiak, J., J. Sacalia, 1977. *HortScience*, **12** : 394.
 - 57) Bilkey, P.C., E.C. Cocking, 1981. *HortScience*, **16** : 643-644.
 - 58) Jacob, M., G. Dence, M. Coumans, 1980. *Meded. Fac. Landbouwet. Rijksuniv. Gent.*, **45** : 335-344.
 - 59) Harney, P.M., A. Knap, 1979. *Can. J. Plant Sci.*, **59** : 263-266.
 - 60) Bilkey, P.C., B.H. McCown, A.C. Hildbrandt, 1978. *HortScience*, **13** : 37-38.
 - 61) Jungnickel, F., 1977. *Biol. Zentralbl.*, **96** : 335-344.
 - 62) Kioke, r. C., 1977. *HortScience*, **12** : 549.
 - 63) Johnson, B.B., 1978. *HortScience*, **13** : 149-150.
 - 64) Johnson, B.B., E.D. Mitchell, Jr., 1977. *Plant Physiol.*, **59** (Suppl.) : 62.
 - 65) Haramaki, C., 1971. *Int. Plant. Prop. Soc. Proc.*, **21** : 442-448.
 - 66) Raman, K., 1977. *Z. Pflanzenphysiol.*, **83** : 411-418.
 - 67) Appलगren, M., O.M. Heide, 1972. *Physiol. Plant.*, **27** : 417-423.
 - 68) Bilkey, P.C., B.H. McCown, 1979. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **104** : 109-114.
 - 69) Takayama, S., M. Misawa, Y. Takashige, H. Tsumori, in preparation.
 - 70) Earle, E.D., R.W. Langhans, 1975. *HortScience*, **10** : 608-610.
 - 71) Hong, Y.P., K.W. Kim, 1979. *Hortic. Agric. Eng.*, **21** : 61-66.
 - 72) Gregorini, G., B. Lercari, 1977. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.*, **61** : 224-227.
 - 73) Lee, J.K., K.Y. Paek, C.K. Chun, 1979. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* **20** : 192-199.
 - 74) Earle, E.D., R.W. Langhans, 1974. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **99** : 128-132.
 - 75) 高山眞策, 三沢正愛, 松川時晴, 小林泰生, 1982. 園芸学会昭和57年春季大会研究発表要旨.
 - 76) Sheridan, W.F., 1968. *Planta*, **82** : 189-192.
 - 77) Allen, T.C., K. Fernald, 1972. *Lily Yb., N. Am. Lily Soc.*, **25** : 53-55.
 - 78) Allen, T.C., 1974. *Lilies 1974 and other Liliaceae*. p. 3-10.
 - 79) Allen, T.C., R.G. Linderman, 1976. *Acta Hort.*, **59** : 37-38.
 - 80) Anderson, W.C., 1977. *In Vitro*, **13** : 145.
 - 81) Riviere, Mme. S., 1968. *C.R. Acad. Sci., Ser. D.*, **267** : 1439-1441.
 - 82) Robb, S.M., 1957. *J. Epx. Bot.*, **8** : 348-362.
 - 83) Sharpe, W.R., R.S. Raskin, H.E. Sommer, 1971. *Phytomorphology*, **21** : 334-337.
 - 84) Simmonds, J.A., Cumming, B.G., 1976. *Sci. Hort.*, **5** : 161-170.
 - 85) Aartrijk, J. Van., G.J.S. Blom-Barnhoorn, 1981. *Sci. Hort.*, **14** : 261-268.
 - 86) Novak, F.J., E. Petru, 1980. *Sci. Hort.*, **14** : 191-199.
 - 87) Takayama, S., M. Misawa, 1979. *Physiol. Plant.*, **46** : 184-190.
 - 88) Takayama, S., M. Misawa, 1980. *Physiol. Plant.*, **48** : 121-125.
 - 89) Takayama, S., M. Misawa, 1982. *Plant Cell Physiol.*, **23** : 67-74.
 - 90) Stimart, D.P., P.D. Ascher, J.S. Zagorski, 1980. *HortScience*, **15** : 313-315.
 - 91) Benicci, A., 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, **82** : 349-353.
 - 92) D'Amato, F., 1977. In "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture" (ed. by Reinhart, J., Y.P.S. Bajaj), p. 343-357, Springer Verlag, Berlin.
 - 93) Takayama, S., M. Misawa, 1983. *Can. J. Bot.*, **61** : 224-228.
 - 94) Takayama, S., M. Misawa, 1983. *Sci. Hort.*, **18** : 353-362.
 - 95) Takayama, S., M. Misawa, Y. Takashige, H. Tsumori, K. Ohkawa, 1982. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **107** : 830-834.
 - 96) Robert, E.H., E.B. Mason, 1983. *Can. J. Plant Sci.*, **63** : 311-316.
 - 97) Stevenson, J.H., K.E. Harris, 1980. *Can. J. Bot.*, **58** : 2190-2192.
 - 98) Krueger, R.J., D.P. Carew, J.H. Lui, J. Staba, 1982. *Planta Med.*, **45** : 56-57.
 - 99) Lui, J.H., E.J. Staba, 1979. *Phytochemistry*, **18** : 1913-1916.
 - 100) Lui, J.H., E.J. Staba, 1979. *J. Nat. Products*, **42** : 682.
 - 101) Heble, M.R., J. Staba, 1980. *Planta Med. Suppl.*, p. 120-123.