

培養環境がカランコエ植物体切片のカルス及び 器官形成に及ぼす影響

梁川 正¹⁾・宇野 幸治¹⁾

Effects of Medium Conditions and Light Conditions on Callus and Organ Formation from Explants Excised from *Kalanchoe* Plants

Tadashi YANAGAWA and Koji UNO

抄 録：カランコエ植物体切片を無菌培養して、カルス形成や器官形成に及ぼす培地条件や培養条件などの培養環境の影響について検討した。カルスや器官形成に対する植物生長調節物質添加の効果は認められたほか、培地における無機塩類の処方を変えて培養を試みた結果、無機塩類濃度が高い Murashige and Skoog 処方では培養した切片においてのみ不定芽の形成が認められ、不定根の形成についても、Murashige and Skoog 処方の方が White の処方よりも高率で認められた。光条件について検討したところ、光強度の影響は明らかでなかったが、光質の影響を検討してみると、白色光照射区でのみ不定芽の形成が認められた。

キーワード：カランコエ, *blossfeldiana* 種, 器官形成, 培地環境, 光条件

I . はじめに

鉢花として栽培されているカランコエの *in vitro* 増殖については、Smith ら (1979) がカランコエ属ブロスフェルディアナ種 (*Kalanchoe blossfeldiana*) を用いて、容易に増殖できることを見い出しているが、その後、切片の種類や無機塩の処方、植物生長調節物質の影響について詳しく検討したものはみあたらない。

本研究では、カランコエのこの種を材料として用いて、培地中の無機塩類の処方や添加する植物生長調節物質の種類と濃度がカランコエ植物体切片の器官形成に及ぼす影響について検討するとともに、培養する環境のうち、とくに、光条件に注目して、その影響についても追求した。

II . 材料及び方法

(1) 供試材料

京都教育大学教育学部附属環境教育実践センターの温室で生育させたベンケイソウ科のカランコエ属ブロスフェルディアナ種 (*Kalanchoe blossfeldiana*) のわい性でピンク花系統を用いた (写真 1)。

1) 京都教育大学

(2) 培地の作成

実験には、Murashige and Skoog (1962) 培地または White (1943) 培地を用い、20g/l のショ糖と 8g/l の寒天を加え、必要に応じて植物生長調節物質の α -ナフタレン酢酸 (NAA)、6-ベンジルアデニン (BA) を添加した。培地の pH は水酸化カリウムと塩酸を用いて 5.8 に調整した。培養容器には 200ml のエルレンマイヤーフラスコを用い、培地を 80ml ずつ分注してアルミホイルで密封し、培地の滅菌はオートクレーブで 120℃、1.2 気圧の条件で 15 分間行った。

(3) 培養材料の採取と殺菌

温室栽培株の花芽を持たない頂芽を含む約 10 cm の部分を供試材料とし、水洗した後 70% エタノールに 10 秒間浸漬した。その後、10% さらし粉 (Calcium hypochlorite) 水溶液のろ過液に 20 分間浸漬して殺菌した。この他、硬質試験管で無菌的に育てたカルス由来の不定芽が生長した株 (無菌培養株) の茎をメスで切り取った。

(4) 切片の作成と置床

ペトリ皿上で、殺菌した 10cm の温室栽培株の植物体より、茎の部分からは約 0.5 cm 長の茎の節間切片を、葉の部分からは約 0.5 cm 四方の葉切片を作成した。無菌栽培株からも無殺菌で同様の切片を作成した (第 1 図)。これらの切片は一つのフラスコあたり 4 切片を基部側が培地に突きささるように立てて置床した。置床後すぐにアルミホイルで栓をし、2 重の輪ゴムで密封した。

(5) 光源の設定及び測定

蛍光灯 (40W, NEC 製) にセロファン (オキナ株式会社製) を巻き付けて異なる波長が発せられるようにした。セロファンの透過特性は、紫外可視分光解析システム (DU シリーズ 600, BECKMAN 製) で測定して確認した。また、光合成有効放射強度は携帯式光合成蒸散測定装置 (SBP-H4, 島津製作所製) を用いて測定した。

(6) 培養条件及びその後の調査

培養条件は温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、2,000 ルクス蛍光灯照明、16 時間日長の培養室とした。培養後は約 10 日目ごとに観察を行い、カルス、不定芽及び不定根の形成状況を調査した。光条件を変えて培養した実験では、培養後の観察はできるだけ、安全光である緑色光 (光合成有効放射強度 $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{S}$) 下で行ったが、不定根形成の調査では、白色光下で行った。

Ⅲ．実験結果

実験 1 培地の無機的条件が切片のカルス及び器官形成に及ぼす影響

ランコエ切片の器官形成に及ぼす培地の無機的条件についての実験では、植物生長調節物質の添加処理区は、NAA 1.0 mg/l + BA 1.0 mg/l, NAA 1.0 mg/l + BA 0.5 mg/l, NAA 1.0 mg/l + BA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l のみの 4 種類とした。

温室栽培株から採取した葉切片を培養した結果、カルス形成は NAA 1.0 mg/l のみの添加処理区ではみられず、それ以外の添加処理区では、Murashige and Skoog 培地、White 培地を問わず、ほとんどすべての切片に認められた。しかし、カルスの大きさをみると、Murashige and Skoog 培地では、すべてのカルスが十分大きくなったのに対して、White 培地では、十分に生長せずに大きさが非常に小さいカルスがみられた (写真 2)。次に、不定芽形成についてみると、BA

を添加した Murashige and Skoog 培地において認められたが、White 培地では全く認められなかった。そして、不定根形成をみると、Murashige and Skoog 培地の方が White 培地よりも不定根形成率が高かった（第 1 表）。

温室栽培株から採取した茎の節間切片を培養した結果、カルス形成は茎の節間切片でも NAA 1.0 mg/l のみの添加処理区ではみられず、それ以外の添加処理区では、いずれの培地のすべての切片でカルス形成が認められた。しかし、カルスの大きさをみると、葉切片と同様 Murashige and Skoog 培地ではすべてのカルスが十分生長して大きくなったのに対して、White 培地では、十分に育っていないカルスや非常に小さいカルスがみられた。不定芽形成についてみると、NAA 1.0 mg/l + BA 1.0 mg/l の処理区では、Murashige and Skoog 培地でのみ認められ、NAA 1.0 mg/l + BA 0.5 mg/l の処理区では、White 培地でのみ認められた。不定根形成は BA 濃度の低い処理区においてわずかに認められた。すなわち、NAA 1.0 mg/l + BA 1.0 mg/l 区では全く認められず、NAA 1.0 mg/l + BA 0.1 mg/l 区、NAA 1.0 mg/l のみの処理区では形成率は同様に、NAA 1.0 mg/l + BA 0.5 mg/l の処理区の White 培地で認められた（第 1 表、写真 3）。

無菌的に育てた無菌培養株から採取した葉切片を培養した結果、カルス形成は BA を添加しなかった処理区以外において高率で認められた。しかし、形成されたカルスの大きさをみると Murashige and Skoog 培地では、White 培地の場合よりもカルスが大きく生長した。不定芽形成についてみてみると、Murashige and Skoog 培地でのみ認められた。不定根形成をみると、BA 濃度が低い区において認められた。無菌培養株から採取した茎の節間切片を培養した結果は葉切片の上述の培養結果とほぼ同様であった（第 2 表）。

実験 2 植物生長調節物質が切片のカルス及び器官形成に及ぼす影響

温室栽培株から採取した葉切片を植物生長調節物質の添加条件を変えて培養した結果、カルス形成はいずれの試験区において 100% の形成率を示した。不定芽形成は BA を 0.1 mg/l 添加区では低い値であったが、NAA 1.0 mg/l + BA 1.0 mg/l 添加区、NAA 0.5 mg/l + BA 1.0 mg/l 添加区、NAA 0.5 mg/l + BA 2.0 mg/l を添加した区においては、それぞれ 58.3%、58.3%、66.8% という高い不定芽形成切片率を示した。不定根形成は不定芽形成切片率の低かった NAA 1.0 mg/l + BA 0.1 mg/l 添加区、NAA 1.5 mg/l + BA 0.1 mg/l 添加区、NAA 2.0 mg/l + BA 0.1 mg/l 添加区では、高い形成率を示し、とくに、NAA 2.0 mg/l + BA 0.1 mg/l 添加区では 62.5% と高い形成切片率を示すとともに形成切片当たりの不定根の数も多かった（第 3 表）。

実験 3 波長の異なる光条件がカルス及び器官形成に及ぼす影響

実験 1 の結果を踏まえて、不定芽、不定根またはカルスの得やすい培地条件のもとに、葉の切片及び実験 1 で得られたカルスを、光の波長を異にした条件（青色光、赤色光、近赤外光、白色光、暗黒）で培養して、器官形成に及ぼす影響について検討した。なお、供試した光条件における光合成有効放射強度は、白色光では $5 \sim 8 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{S}$ 、赤色光では $8 \sim 14 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{S}$ 、青色光では $8 \sim 16 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{S}$ 、近赤外光では $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{S}$ 、暗黒では $0 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{S}$ であった。

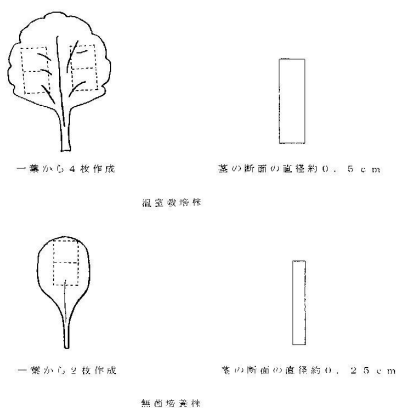
実験に供試した異なる波長の光条件の試験区のすべてにおいて、葉切片にカルスの形成が認められた。また、植物生長調節物質の添加により不定根の形成しやすくなっている試験区では光条件に関係なく不定根の形成がみられた。しかし、赤色光下では不定根の形成率が高く、青色光下では低かった。また、不定芽の形成は白色光下でしか認められなかった（第 4 表）。

葉切片に形成されたカルスの色については、白色光下で培養したカルスは濃い緑色であったが、暗黒下で白くなる黄化現象がみられ、赤色光下と近赤外光下では緑色をあまり帯びないで、緑色が薄く、青色光下では白色光下のものとあまり変わらずに濃い緑色であった（写真 4）。

3 種類のカルス切片を培養した結果、光条件の違いにかかわらず、NAA と BA を添加した White 培地または 2,4-D と Kinetin を添加した MS 培地では不定芽の形成はみられず、NAA と BA を添加した MS 培地では不定芽の形成は白色光下においてのみ認められた（第 5 表）。



写真 1 供試したカラコエの開花時の状態



第 1 図 切片の作成

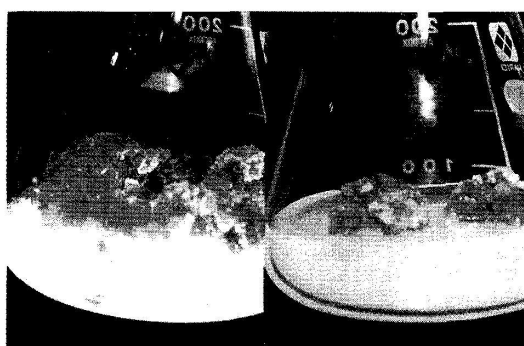


写真 2 葉切片に形成されたカルス



写真 3 Murashige and Skoug 培地で培養した茎節間切片における不定芽と不定根形成

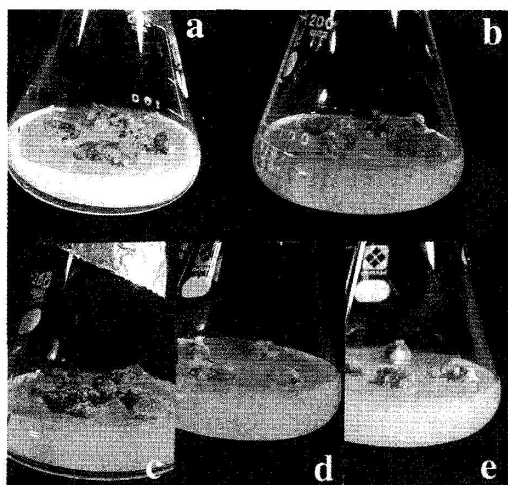


写真 4 異なる光条件下でのカルス形成
a. 白色光, b. 赤色光, c. 青色光,
d. 近赤外光, e. 暗黒

第1表 培地の無機質の条件が温室栽培株から採取した葉及び茎節間切片の器官形成に及ぼす影響

無機質の条件	NAA 濃度 (mg/l)	BA 濃度 (mg/l)	切片の種類	供試切片数	枯死切片数	生存切片数	カルス形成切片数 (%) *	カルスの大きさ 大 中 小			不定芽形成切片数 (%) *	不定根形成切片数 (%) *
MS**	1.0	1.0	葉	12	0	12	12 (100)	12	0	0	10 (83)	2 (17)
White	1.0	1.0	葉	12	0	12	12 (100)	6	4	2	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.5	葉	12	0	12	12 (100)	12	0	0	8 (67)	4 (33)
White	1.0	0.5	葉	12	0	12	12 (100)	9	3	0	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.1	葉	12	1	12	12 (100)	12	0	0	6 (50)	6 (50)
White	1.0	0.1	葉	12	0	11	11 (92)	9	2	0	0 (0)	1 (8)
MS	1.0	0	葉	12	6	6	0 (0)	—	—	—	0 (0)	1 (8)
White	1.0	0	葉	12	5	7	0 (0)	—	—	—	0 (0)	1 (8)
MS	1.0	1.0	茎	8	0	8	8 (100)	8	0	0	2 (25)	0 (0)
White	1.0	1.0	茎	8	0	8	8 (100)	4	0	4	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.5	茎	8	0	8	8 (100)	8	0	0	1 (13)	1 (13)
White	1.0	0.5	茎	8	0	8	8 (100)	6	2	0	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.1	茎	8	0	8	8 (100)	8	0	0	0 (0)	2 (25)
White	1.0	0.1	茎	8	0	8	8 (100)	6	2	0	0 (0)	2 (25)
MS	1.0	0	茎	8	0	8	0 (0)	—	—	—	0 (0)	2 (25)
White	1.0	0	茎	8	1	7	0 (0)	—	—	—	0 (0)	2 (25)

培養後 60 日目の結果

* 供試切片に対する形成切片の割合

**MS:Murashige and Skoog(1962) 培地、White(1943) 培地

第2表 培地の無機質の条件が無菌培養株から採取した葉及び茎節間切片の器官形成に及ぼす影響

無機質の条件	NAA 濃度 (mg/l)	BA 濃度 (mg/l)	切片の種類	供試切片数	枯死切片数	生存切片数	カルス形成切片数 (%) *	カルスの大きさ 大 中 小			不定芽形成切片数 (%) *	不定根形成切片数 (%) *
MS**	1.0	1.0	葉	12	0	12	12 (100)	12	0	0	10 (83)	0 (0)
White	1.0	1.0	葉	12	0	12	12 (100)	5	5	2	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.5	葉	8	1	7	7 (88)	7	0	0	7 (88)	0 (0)
White	1.0	0.5	葉	12	0	12	12 (100)	7	5	0	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.1	葉	12	1	11	11 (92)	11	0	0	8 (67)	5 (42)
White	1.0	0.1	葉	12	0	12	12 (100)	8	4	0	0 (0)	5 (42)
MS	1.0	0	葉	12	0	12	0 (0)	—	—	—	1 (8)	4 (33)
White	1.0	0	葉	12	5	7	0 (0)	—	—	—	0 (0)	2 (17)
MS	1.0	1.0	茎	8	0	8	8 (100)	8	0	0	2 (25)	0 (0)
White	1.0	1.0	茎	8	0	8	8 (100)	4	1	3	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.5	茎	8	0	8	8 (100)	8	0	0	1 (13)	1 (13)
White	1.0	0.5	茎	8	0	8	8 (100)	6	2	0	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0.1	茎	8	1	7	7 (88)	7	0	0	1 (13)	0 (0)
White	1.0	0.1	茎	8	0	8	8 (100)	7	0	0	0 (0)	0 (0)
MS	1.0	0	茎	7	0	7	0 (0)	—	—	—	1 (14)	2 (25)
White	1.0	0	茎	8	0	8	0 (0)	—	—	—	0 (0)	0 (0)

培養後 60 日目の結果

* 供試切片に対する形成切片の割合

**MS:Murashige and Skoog(1962) 培地、White(1943) 培地

第3表 植物生長調節物質が温室栽培株から採取した茎節間切片の器官形成に及ぼす影響

NAA 濃度 (mg/l)	BA 濃度 (mg/l)	供試切片数	枯死切片数	生存切片数	カルス形成切片数 (%) *	不定芽形成切片数 (%) *	不定芽数 (形成切片当たり不定芽数)	不定根形成切片数 (%) *	不定根数 (形成切片当たり不定根数)
1.0	0.1	12	0	12	12 (100)	3 (25)	4 (1.3)	7 (58)	30 (4.3)
1.5	0.1	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	7 (58)	24 (3.4)
2.0	0.1	8	0	8	8 (100)	0 (0)	0 (—)	5 (63)	27 (5.4)
1.0	1.0	12	0	12	12 (100)	7 (58)	10 (1.4)	2 (17)	3 (1.5)
0.5	1.0	12	0	12	12 (100)	7 (58)	11 (1.6)	0 (0)	0 (—)
0.5	2.0	12	0	12	12 (100)	8 (67)	9 (1.1)	0 (0)	0 (—)

培養後 60 日目の結果

* 供試切片に対する形成切片の割合

第 4 表 波長の異なる光条件が葉切片の器官形成に及ぼす影響

光条件	NAA	BA 濃度 (mg/l)	供 試 切片数	枯 死 切片数	生 存 切片数	カルス形成 切片数 (%) *	不定芽形成 切片数 (%) *	不定芽数 (形成切片当た り不定芽数)	不定根形成 切片数 (%) *	不定根数 (形成切片当た り不定根数)
白色光	1.0	0.1	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	6 (50)	6 (1.0)
	0.5	2.0	12	0	12	12 (100)	4 (33)	5 (13)	0 (0)	0 (—)
赤色光	1.0	0.1	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	9 (75)	16 (1.8)
	0.5	2.0	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	0 (0)	0 (—)
青色光	1.0	0.1	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	1 (8)	1 (1.0)
	0.5	2.0	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	0 (0)	0 (—)
近赤外光	1.0	0.1	12	0	11	11 (100)	0 (0)	0 (—)	2 (18)	2 (1.0)
	0.5	2.0	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	0 (0)	0 (—)
暗黒	1.0	0.1	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	6 (50)	13 (2.2)
	0.5	2.0	12	0	12	12 (100)	0 (0)	0 (—)	0 (0)	0 (—)

培養後 60 日目の結果

* 供試切片に対する形成切片の割合

第 5 表 波長の異なる光条件がカルス切片の器官形成に及ぼす影響

光条件	カルスを培養した培地	供 試 切片数	枯 死 切片数	生 存 切片数	不定芽形成 切片数 (%) *	不定芽数 (形成切片当た り不定芽数)
白色光	MS+NAA, BA	12	0	12	3 (25)	9 (3.0)
	White+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	MS+2,4-D, Kinetin	12	0	12	0 (0)	0 (—)
赤色光	MS+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	White+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	MS+2,4-D, Kinetin	12	0	12	0 (0)	0 (—)
青色光	MS+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	White+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	MS+2,4-D, Kinetin	12	0	12	0 (0)	0 (—)
近赤外光	MS+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	White+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	MS+2,4-D, Kinetin	12	0	12	0 (0)	0 (—)
暗黒	MS+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	White+NAA, BA	12	0	12	0 (0)	0 (—)
	MS+2,4-D, Kinetin	12	0	12	0 (0)	0 (—)

培養後 60 日目の結果

* 供試切片に対する形成切片の割合

IV . 考察

in vitro で培養した植物体切片の器官形成に及ぼす培養環境のうち、培地に関しては、培地に添加する植物生長調節物質の影響について、Skoog ら (1957) の研究以来、植物生長調節物質の効果を示した報告が多くみられる。例えば、葉切片の培養において、植物生長調節物質の影響について検討した報告では、キク (深井ら 1986) やメロン (豊田ら 1987)、ガーベラ (Reynold ら 1993) などで見られ、BA や NAA などの植物生長調節物質のカルス及び器官形成に対する添加効果が示されている。カラコエ切片の培養でも、他の植物と同様に添加効果がみられ、NAA / BA の比率が大きければ不定根を形成し、NAA / BA の比率が小さければ不定芽を分化することがわかった。

その他の培地成分として、糖と無機塩類の処方があるが、これらの条件の検討は多くの植物種について必ずしも十分ではない。深井 (1986) はキクの葉切片培養において器官形成に及ぼす糖の影響を検討している。本実験では、糖については一定条件として、無機塩類の処方を変

えて培養を試みた結果、無機塩類濃度が高い Murashige and Skoog 培地で培養した切片において不定芽の形成が認められ、White 培地で培養したものでは不定芽の形成は全く認められなかった。不定根の形成についても、Murashige and Skoog 培地の方が White 培地よりも形成能が高いように考えられた。

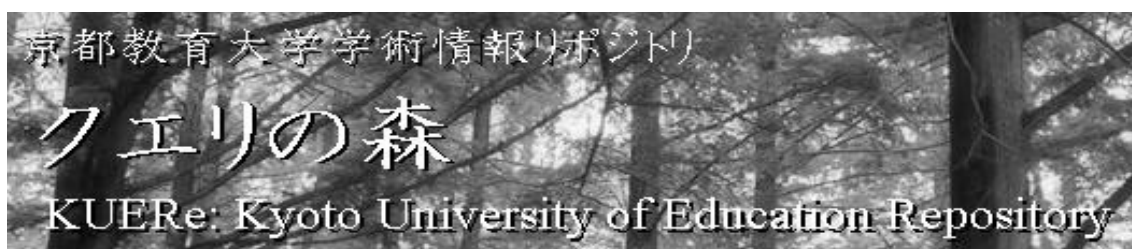
培養環境のうち、光条件を検討した報告では、光強度が増加すれば培養する植物体の生長量が増加することが認められており、シンビジウムではそのシミュレーション結果が報告されている (Nie ら 1996)。本実験では、2 から $16 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{S}$ という低い値での比較であったので、光強度の影響は明確に現れず、光質の影響が大きく示された。光質の影響については培養する植物の生長および形態に影響するという報告がみられるだけである。すなわち、白色蛍光灯と赤色および遠赤色発光ダイオードとを組み合わせで培養したジャガイモ植物体の生長が Miyashita ら (1995) により報告され、照射光に含まれる遠赤光に対する赤色光の比を大きくすると植物体の草丈は短くなるなどという現象が観察されている。本実験に供試した異なる波長の光条件の試験区のすべてにおいて、葉切片にカルスの形成を認めた。また、光条件に関係なく不定根の形成がみられた。しかし、赤色光下では不定根の形成率が高く、青色光下では低かった。これは赤色光と青色光で光合成有効放射強度が青色光の方がやや上回っていることによる単なる生育量の違いではないと考えられる。葉切片、カルス切片とも不定芽の形成は白色光下でしかみられなかった。これも白色光が赤色光、青色光に比べると光合成有効放射強度がかなり少ないことから生育量の違いではなく、波長条件そのものが形成に影響を及ぼしているためとみられる。このような例はこれまで報告がなく、他の植物について今後検討していきたい。

以上のように、カランコエ植物体切片の培養は簡単で、切片における器官形成やその生育も早く、与えた条件に対して明確な結果が得られるので学校での学習教材として有効であると考えられる。Yanagawa ら (1995, 1998) がランやキクなどの無菌培養を、オートクレーブやクリーンベンチを使用せずに簡便に実施できる方法を確立しており、カランコエ切片の培養にも応用してみたところ、上記の実験設備を使わずに簡便に無菌培養できることを確認したが、その内容については別に述べることにしたい。

V. 引用文献

1. Smith, R. H. and A. E. Nightingale. 1979. In vitro propagation of kakanchoe. HortScience 14(1):20.
2. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
3. White, P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. The jacques cattel press, Lancaster, Pennsylvania.
4. Skoog, F. and C. O. Miller. 1957. Symp. Soc. Exp. Biol. no. 11. The biological action of growth substances :118-131.
5. 深井誠一・大江正温. 1986. キクの葉および茎片培養における器官形成におよぼす植物生長調節物質の影響. 大阪農林技術センター研究報告 23:25-31.
6. 豊田秀吉・茶谷和行・清水邦彦・前田和彦・竹林晃男・宋 英凱・大内成志. 1987. メロン葉外植片からのカルス誘導とその植物体再生. 植物組織培養 4(1):8-12.
7. Reynoird, J. P., D. Chriqui, M. Noin, S. Brown and D. Marie. 1993. Plant regeneration from in vitro leaf culture of

- several gerbera species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33:203-210.
8. 深井誠一. 1986. キクの葉片培養におけるカルスの生長と器官形成におよぼす糖の影響. *植物組織培養* 3(2):71-77.
 9. Niu, G., T. Kozai and Y. Kitaya. 1996. Simulation of the time courses of CO₂ concentration in the culture vessel and net photosynthetic rate of *Cymbidium* plantlets. *Transaction of the ASAE*. 39:1567-1573.
 10. Miyashita, Y., Y. Kitaya and T. Kozai. 1995. Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets in vitro using light emitting diode as a light source for micropropagation. *Acta. Hort.* 393:189-194.
 11. Yanagawa, T., M. Nagai, T. Ogino and R. Maeguchi. 1995. Application of disinfectants to orchids seeds, plantlets and media as a means to prevent in vitro contamination. *Lindleyana* 10(1):33-36.
 12. Yanagawa, T., X. Chen and S. Usui. 1998. Simple micropropagation using direct application of chlorine disinfectants for orchids. *Abstracts XXV International Horticultural Congress*. pp.417-418.



この文献は、国立情報学研究所において電子化されたものを、本学でテキスト加工したものです。

