

パパイヤ未受精胚珠からの不定胚誘導と植物体再生

徳元正和¹・田部井 豊^{2*}・萱野暁明²・屋 宏典³・岩崎公典³・知念 功³¹ 沖縄県農業試験場 903-0814 那覇市首里崎山町² 農林水産省農業生物資源研究所 305-8602 つくば市³ 琉球大学農学部 903-0213 西原町Adventitious Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Ovules of Unpollinated Ovaries of Papaya (*Carica papaya* L.)Masakazu Tokumoto¹, Yutaka Tabei², Toshiaki Kayano², Hirotsuke Oku³, Hironori Iwasaki³ and Isao Chinen³¹ Okinawa Prefectural Agricultural Experiment Station, Naha, 903-0814² National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, 305-8602³ Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, Nishiharacho, 903-0213

Summary

Ovules were excised from unpollinated papaya ovaries before flowering and imbedded on the culture media containing cytokinin, auxin, and gibberellins. Adventitious embryos were induced only in the culture media with mixed gibberellins and GA₃ in the dark. No embryo was initiated with cytokinin and auxin, whereas the gibberellin mixture (GA₃ >80%, GA₁+GA₄ ≐ 10%, minute amount of GA₂+GA₇), GA₃, and GA₄ individually promoted induction, but GA₁, GA₅, and GA₇ were ineffective.

The adventitious embryos were directly induced from the ovules. However, there were many abnormal embryos with malformed cotyledons. The induced embryos were transferred onto a hormone-free MS medium to regenerate plantlets. Plantlets, derived from embryos with gibberellin mixture, GA₃, and GA₄, and their respective percentages were 18.6, 26.4, and 26.9. The total number of surviving plants after acclimatization was only 44 (7.2%). All acclimated plants were diploid (2n=18), whereas some of the adventitious embryos were heteroploid and tetraploid (4n=36).

RAPD analyses of the regenerated plants using primer RA-1 and RA-47 showed that several had differing banding patterns from those of their parents. Therefore, it is suggested that some of the regenerated plants were induced from haploidic reproductive cells.

Key Words: adventitious embryo, gibberellin, papaya, RAPD, unpollinated ovaries.

緒 言

熱帯アメリカを原産とするパパイヤは熱帯地域の重要な果物であるが、亜熱帯に属する南西諸島でも200年以上前から栽培され(安富, 1994), 未熟果は野菜としても利用されている。国内におけるパパイヤ品種の育成については、組織培養を利用した栄養系統選抜の例はあるが(照屋ら, 1991), 遺伝的固定に長期間を必要とする交雑育種は行われていない。半数体の作出は、短期間の遺伝的固定が可能であるのみでなく遺伝解析や効率的な突然変

異の利用に有効であり、やく培養や未受精胚珠培養により行われ、いくつかの植物で成功している(新関, 1990; Yang・Zhou, 1982)。

これまで、パパイヤの不定胚誘導に関して Fitch・Manshardt (1990) は、受精後の未熟胚からの不定胚誘導を報告し、また、Chenら(1987)は根由来カルスからの不定胚誘導が可能であることを明らかにした。

一方、未受精胚珠からの不定胚誘導に関しては、Button・Bornman (1971) がカンキツで成功して以来、オムギ(San Noeum, 1976), コムギ, タバコ(Zhu・Wu, 1979)等で多くの報告がある。しかし、パパイヤ未受精胚珠からの不定胚誘導の成功例はない。一般に未受精胚珠からの不定胚は胚珠組織から直接誘導されることが多いが(Yang・Zhou, 1982), 不定胚誘導に有効な添加物質の

1998年12月14日 受付. 1999年8月27日 受理.

*現在: 農林水産省農林水産技術会議事務局 100-0013 東京都千代田区

種類は植物種により異なり (Button・Bornman, 1971; Soo・Fujieda, 1988), 個々の植物ホルモンの効果については十分に明らかにされていない。

そこで, 本報告では, パパイア未受精胚珠からの不定胚誘導の条件を明らかにし, 得られた不定胚からの植物体再生と植物体の RAPD 分析を試みた。

材料および方法

供試材料のパパイア (*Carica papaya* L.) は 'ワイマナーロ' とタイ国よりの導入品種 (品種不詳) との交雑株後代 (F3) の雌株を用いた。花卉が開裂していないつぼみ (開花 1~3 日前) を採取し, 花卉を除去した子房を 70% エタノールに約 10 秒間浸漬殺菌後, 滅菌水で 3 回洗浄した。子房を分割し, 内部の胚珠を胎座から取り出し培地に置床した。

不定胚誘導に用いた培地は, ショ糖 3% を添加した Murashige and Skoog (MS) の基本培地に, サイトカニンとして Benzyladenine (BA), Kinetin, Zeatin, 2-isopentenyladenine (2iP) を $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, オーキシンとして Naphthylacetic acid (NAA), Indoleacetic acid (IAA), Indolebutyric acid (IBA), 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) を $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, ジベレリン混合物 (GA_3 80% 以上, $\text{GA}_1 + \text{GA}_4$ 約 10%, $\text{GA}_2 + \text{GA}_7$ 微量) と GA_3 を $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度で加えた。また, サイトカニンとオーキシンの混用区として $\text{BA} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ と NAA, 2, 4-D, IBA のそれぞれ $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を組み合わせた。各種のジベレリンが不定胚誘導に及ぼす影響についての試験では, ジベレリン混合物, GA_1 , GA_3 , GA_4 , GA_5 , GA_7 を $0.1 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度で添加した。培地は pH5.8 に調整後, ゲルライト 0.2% を添加し, 121°C , 15 分間滅菌した。

未受精胚珠は培地に置床後, 27°C , 3,200 lx の 16 時間照明下および, 暗黒条件下で 3 カ月間培養を行った。各処理区の反復は 2 回行った。また, ジベレリンが不定胚誘導に及ぼす影響についての試験は, 27°C , 暗黒下で行った。不定胚形成率は置床胚珠の内, 肥大の見られた胚珠数に対する不定胚形成数の割合で算出した。また, 培養中に胚珠から形成されたカルスについては, ホルモンフリーの MS 培地および $\text{NAA} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加した MS 培地に移植後, 27°C の暗黒条件下で 5 カ月間培養して, 不定胚誘導の有無を確かめた。

2~3 mm まで成長した不定胚はホルモンフリーの MS 培地に置床し, 27°C , 3,200 lx の 16 時間照明下で植物体形成を試みた。葉, 茎, 根を形成した幼植物体はすべて, 市販の育苗用培養土に移植し, ポリプロピレン製のボックス内で約 4 週間順化を行なった。順化の温度・光条件は植物体形成試験に準じた。順化した植物体は温室に移し, 遮光, 多湿条件下に 1 週間置き, その後, 一般の育苗棚で育成した。

染色体観察は不定胚および再生植物体の根端を用い, 酵素解離法 (西林, 1990) で観察した。約 3 mm まで成長した不定胚と順化後約 1 カ月齢の幼植物体の根端を 2 mM 8-ヒドロキシキノリンで 4 時間処理し, エタノール酢酸溶液 (3:1) で固定した。固定した材料を 4% セルラーゼオノズカ RS, 1% ペクトリアーゼ Y-23, 7.5 mM KCl, 7.5 mM EDTA, pH4.0 の酵素液で 37°C , 3 時間処理した。処理後, 組織を蒸留水で洗浄し, スライドガラス上において固定液を滴下して細胞を拡散させた。自然乾燥後, アセトオルセイン液で染色して染色体数を計測した。

RAPD 分析は, 再生植物体から葉切片 5 g を採取し, 液体窒素で凍結後, CTAB 法 (Doyle・Doyle, 1987) により全 DNA を抽出して材料とした。これを TE バッファー (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA) で約 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ になるように溶解してテンプレート DNA にした。プライマーは 10 塩基のオリゴヌクレオチド RA-1 (GTCTGACGGT), RA-11 (CGGTTTAACG), RA-47 (CGGGAACCGA), TAG-1 (ACCAGGCCAA), TAG-2 (GATCGACT), TAG-3 (GTGGCTCTGA) をそれぞれ 20 pM に調整し単独で用いた。PCR 反応液は, 1 μl テンプレート DNA, 2 μl 10 \times バッファー, 1 unit DNA Polymerase (ニッポンジーン), 2 μl のプライマー (最終濃度 1 μM), 2 μl の 2.5 mM dNTP を添加し最終容量を 20 μl とした。PCR の条件は予熱を 92°C で 1 分, 続いて 92°C 1 分 \rightarrow 45°C 1 分 \rightarrow 74°C 2 分を 40 回繰り返す, 最後に 74°C で 5 分間加熱した。PCR 反応液中の 10 μl を用いて 8% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い, 泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色した。

結 果

パパイア未受精胚珠を各種ホルモンを含む MS 培地に置床し, 照明および暗黒条件下で培養すると, 7 日目頃からホルモン無添加を除く培地で胚珠の肥大が見られた。暗黒条件下のジベレリン混合物および GA_3 を含む培地において, 50 日目頃から不定胚の形成が確認された。このような不定胚の形成は約 40 日間続いた (第 1 表)。置床時に大きさが約 1 mm であった胚珠は 3~4 mm まで肥大し, その一部からカルスを経由することはなく不定胚が直接形成された (第 1 図, A)。また, 肥大した胚珠の内部から細胞塊が突出し, そこに不定胚が形成され (第 1 図, B), さらに二次的な不定胚が多数発生するのも見られた (第 1 図, C)。形成された不定胚は球状期, ハート状期を経て, 子葉期に発達したが, 奇形子葉をもつ異常胚も数多く認められた (第 1 図, D)。一方, 照明条件下では不定胚の形成は認められなかった。また, BA, Kinetin, Zeatin, 2iP, NAA, IAA, IBA, 2, 4-D を添加した培地では, いずれの条件下においても不定胚の形成は認められなかった。

NAA および 2, 4-D を含む培地では胚珠からカルスが

Table 1. Effect of hormones and lighting conditions on adventitious embryos derived from ovules excised from unpollinated papaya ovaries and grown *in vitro*.

Hormones	concn. (mg · liter ⁻¹)	No. of adventitious embryos	
		Light	Dark
BA	1	0	0
Kinetin	1	0	0
Zeatin	1	0	0
2ip	1	0	0
GA-mixture	1	0	7 ^z /129 ^y (5.4) ^x
GA ₃	1	0	9/266 (3.4)
NAA	2	0 ^w	0 ^w
IAA	2	0	0
IBA	2	0	0
2,4-D	2	0 ^w	0 ^w
BA+	0.2		
NAA	2	0 ^w	0 ^w
BA+	0.2		
2,4-D	2	0 ^w	0 ^w
BA+	0.2		
IBA	2	0	0
0		0	0

The unpollinated ovules were cultured on MS medium at 27 °C for 90 days.

^z Adventitious embryos formed.

^y Enlarged ovules after culturing.

^x Values in the parenthesis are the percentage of enlarged ovules.

^w Callus formation.

誘導されたが、このカルスをホルモンフリーのMS培地およびNAA (0.1 mg · liter⁻¹) 添加のMS培地に移植しても不定胚の形成は認められなかった。また、BA, Kinetin, Zeatin, 2iPを含む培地では、培養初期にほとんどの培地で胚珠の肥大が認められたが、約1カ月後にすべての胚珠は褐変し、その後の肥大は見られなかった。

次に6種のジベレリンを添加したMS培地で、未受精胚珠を暗黒条件下で培養すると、ジベレリン混合物、GA₃、GA₄添加培地で不定胚の形成が見られた(第2表)。不定胚形成率はGA₃ (2 mg · liter⁻¹) が最も高く、以下GA₄ (2 mg · liter⁻¹)、ジベレリン混合物 (1 mg · liter⁻¹) の順に高かった。一方、GA₁、GA₅、GA₇添加培地では不定胚の形成は見られなかった。

大きさ3~4 mmまで成長した不定胚をホルモンフリーのMS培地に置床し、植物体再生を試みた(第3表)。その結果、ジベレリン混合物よりも、GA₃ およびGA₄ で誘導した不定胚の方が植物体再生率は高く、ほぼ同率であった。GA₃ で誘導した不定胚からは形態的に正常な植物体が高率で発生したが、ジベレリン混合物では低く、GA₄ では更に低かった。特にGA₄ で誘導した不定胚からは異常な形態の植物体が多数生じた(第1図, E)。得られた植物体はすべて培養土に移植し順化を試みた。その結

果、ジベレリン混合物、GA₃、GA₄ で誘導した不定胚から発生した植物体の順化率は、GA₃、GA₄ はほぼ同率であったがジベレリン混合物はそれより低かった。茎葉および根の形態が異常な再生植物体は、順化の過程ですべて枯死した。しかし、茎葉が奇形にも関わらず根の発達した再生植物体では、順化の過程で新たに茎葉の発達がみられ、その後は正常個体とほぼ同様に成長するのも見られた。このような個体はGA₄ で誘導された不定胚由来の植物体に多く見られた。不定胚から順化までの生存率は、GA₃、GA₄ を用いた場合には同率で高く、ジベレリン混合物の約2倍であった。順化した植物体は鉢上げし、温室内で育成した(第1図, F)。

約3 mmまで成長した不定胚と、順化した再生植物体の根端の染色体を観察した(第2図)。不定胚23個体内、17個体は二倍体(第2図, A)、1個体は四倍体(第2図, B)、3個体は異数体(染色体数=23, 33, 34)で、残り2個体については確認できなかった。また、再生植物体16個体はすべて2倍体(第2図, C)であった。不定胚および再生植物体のいずれにおいても半数体は確認できなかった。

再生植物体のRAPD分析の結果を第3図に示した。供試プライマーによるPCR産物において、親株(Lane 1)と再生植物体(Lane 2~9)およびワイマナーロ(Lane 10)との間に多数の共通バンドが見られた。しかし、RA-1を使用したPCR産物において、270 bpではLane 1にはあるがLane 2とLane 10で欠落したバンド、150 bpではLane 2, 3, 4, 5とLane 10で欠落したバンドが確認された。また、RA-47においては280 bpでLane 2のみに欠落したバンドが認められた。

考 察

これまで、未受精胚珠からの不定胚誘導には、カンキツでは酵母抽出液とアデニン(Button・Bornman, 1971)、オオムギでは2, 4-D(San Noeum, 1976)、コムギではNAAとKinetinの組み合わせの添加培地が有効であり(Zhu・Wu, 1979)、ニホンカボチャおよびニラではホルモンフリー培地が適すると報告され(Soo・Fujieda, 1988; Kojima・Kawaguchi, 1989)、添加物質の有効性は植物種によって異なっている。

本実験において、パパイヤ未受精胚珠からの不定胚誘導には、各種植物ホルモンのうち、ジベレリンの添加のみが有効であることが示された。また、供試したジベレリンのうちではGA₃の効果が最も高いことが明らかになった。

不定胚誘導におけるジベレリンの関与について、Kochbaら(1978)はミカン胚珠由来カルスからの不定胚形成はABAにより促進され、GA₃により阻害されると報告している。しかし、コナラ、ボダイジュの胚由来カルスではGA₃は不定胚誘導を促進することが示されてい

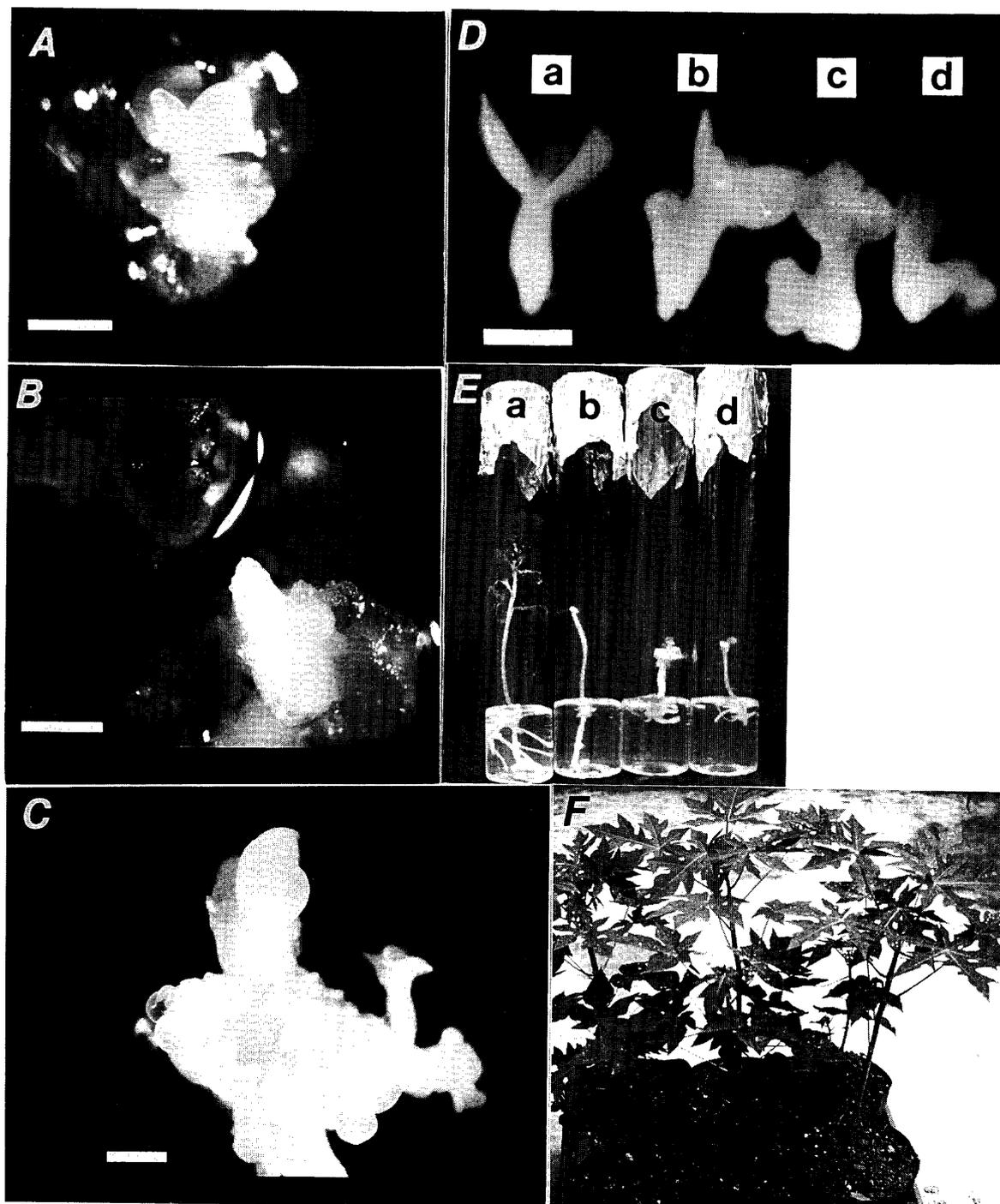


Fig 1. Photographs of adventitious embryos and regenerated plants from ovules excised from unpollinated ovaries of papaya and cultured *in vitro* (Bar = 1mm).

A: Adventitious embryo.

B: Adventitious embryo generated from cultured ovules.

C: Aggregated adventitious embryos produced from one embryo.

D: Embryo with normal and abnormal morphologies.

a: Embryo with normal morphology.

b~d: Embryo with abnormal morphology.

E: Plantlet formation.

a: Normally developed shoot and roots.

b: Abnormally developed shoot.

c and d: Abnormally developed shoot and roots.

F: Acclimated plants in pots.

Table 2. Effect of gibberellins on adventitious embryo formation from ovules excised from unpollinated papaya ovaries and cultured *in vitro*.

Gibberellin	concn. (mg · liter ⁻¹)	No. of grown ovules ^z	No. of ovules forming embryos	% of ovules forming embryos ^y
GA-mixed	0.1	220	1	0.5*
	0.5	346	18	5.2*
	1.0	143	9	6.3*
	2.0	124	3	2.4*
	5.0	436	3	0.7*
GA ₁	0.1	281	0	0
	0.5	311	0	0
	1.0	235	0	0
	2.0	196	0	0
	5.0	328	0	0
GA ₃	0.1	481	5	1.0*
	0.5	245	4	1.6*
	1.0	181	4	2.2*
	2.0	342	47	13.7*
	5.0	254	9	3.5*
GA ₄	0.1	326	0	0
	0.5	382	21	5.5*
	1.0	357	10	2.8*
	2.0	151	18	11.9*
	5.0	297	0	0
GA ₅	0.1	183	0	0
	0.5	327	0	0
	1.0	282	0	0
	2.0	322	0	0
	5.0	246	0	0
GA ₇	0.1	195	0	0
	0.5	266	0	0
	1.0	389	0	0
	2.0	405	0	0
	5.0	186	0	0

Ovules from unpollinated ovaries were excised and cultured *in vitro*.

^z The enlarged ovules were measured after three months cultivation.

^y Significant difference at $p = 0.05$ (*) by χ^2 -test.

Table 3. Regeneration of plantlet from adventitious embryos derived from ovules of unpollinated ovaries of papaya and cultured *in vitro*.

GA used for embryo induction	No. of embryos cultured	No. of plants regenerated	No. of normal plantlets	No. of plants acclimatized	% of plants survived
GA-mixed	221	41 (18.6) ^z	16 (39) ^y	10 (24.4) ^x	4.5
GA ₃	159	42 (26.4)	32 (76)	14 (33.3)	8.8
GA ₄	227	61 (26.9)	7 (11)	20 (32.8)	8.8

^z Values in the parenthesis show the percentage of cultured embryos.

^{y,x} Values in the parenthesis show the percentage of regenerated plants.

る (神阪・宮本, 1994), また, パパイアの根由来のカルスからの不定胚誘導においても GA₃ が同様の効果をもつことが認められている (Chenら, 1987). 本実験の結果を合わせて考えると, ジベレリンはパパイア組織からの不定胚誘導に促進的な働きを持つが, ジベレリンの種類により, その効果に大きな違いがあるものとみられた.

これまで不定胚は, コムギ, タバコでは照明下で, オムギ, イネ, ガーベラでは照明と暗黒の両条件下で誘導されており (Yang・Zhou, 1982), 種によって不定胚形成の光条件は異なっている. Fitch・Manshardt (1990) はパパイア未熟胚からの不定胚誘導を暗黒培養で行ったが, 本試験においても暗黒条件下でのみ不定胚が形成された

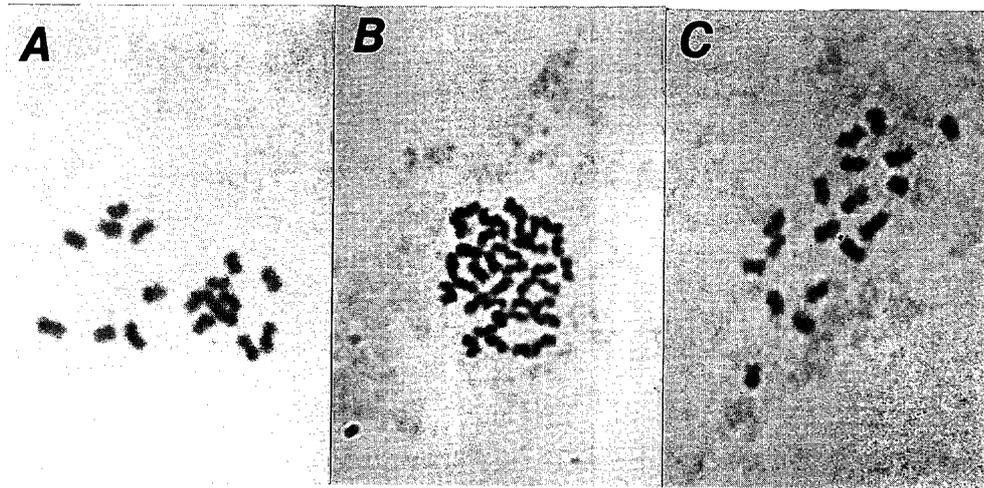


Fig. 2. Photomicrographs of chromosomes from adventitious embryos and regenerated plantlets derived from ovules excised from unpollinated ovaries of papaya and cultured *in vitro*.

A: Adventitious embryo (2n=18).

B: Adventitious embryo (4n=36).

C: Regenerated plant (2n=18).

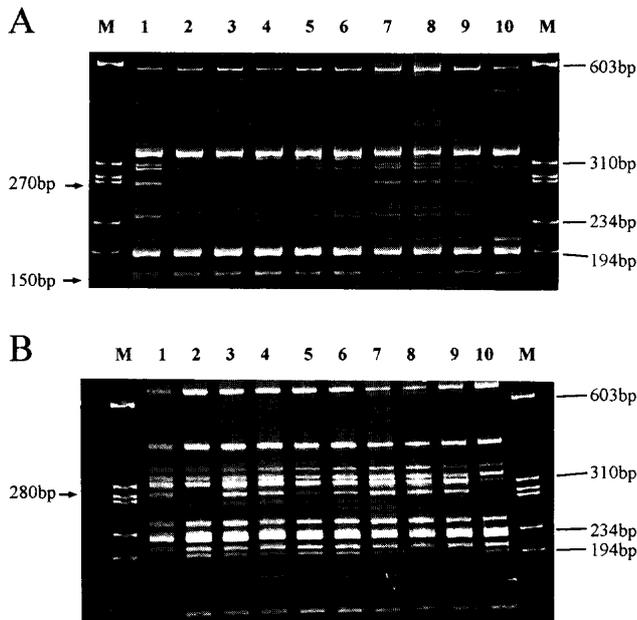


Fig. 3. Gel plates showing banding patterns of RAPD analysis with the primer RA-1(A) and RA-47(B).

Lane 1: Parental strain., Lane 2-9: Regenerated Plants., Lane 10: Waimanalo., Lane M: Hae III digested ϕ X174.

ことから、パパイヤ組織からの不定胚誘導には暗黒条件が適していると考えられた。

一般に誘導された不定胚からの植物体再生は困難な場合も多く、ニホンカボチャにおいては、二次胚や奇形子葉をつけた異常胚が多く誘導され、再生植物体の獲得率は極めて低いことが報告されている (Soo・Fujieda, 1988)。本実験でも多くの異常胚が見られ、不定胚からの植物体再生率も低かった。不定胚からの植物体再生が困難な原因として西村ら (1991) は、不定胚の形態的あるいは生理的異常の多発と、休眠の存在をあげている。

本実験では調査した不定胚の多く、また再生植物体の

すべてが二倍体であり、未受精胚珠を用いたにもかかわらず半数体を見出すことは出来なかった。一方、カンキツのやく培養においては、花粉から直接胚様体が形成され植物体へと発達するが、得られた植物体のほとんどが二倍体であったことが報告されている (日高, 1990)。このような倍加は、花粉から胚様体を形成する極初期の段階で起こる核融合などが原因の一つと考えられると報告されている (Hidaka・Omura, 1989)。また、培養中の植物細胞では様々な倍数性の細胞が出現するが、再分化は二倍体の細胞において選択的に行われることが報告されている (Krikorianら, 1983; Mokら, 1976)。

再生植物体の RAPD 分析において、親株とは異なるバンディングパターンを示す個体も確認された。これらの多型は、再生植物体のゲノミック DNA が親株と同一でないことを示唆する。供試した再生植物体の茎葉に形態的変異は認められなかったことから、RAPD 多型が変異によるものとは考えにくい。これらの結果は、パパイヤ未受精胚珠培養で得られた再生植物体の一部は半数性の生殖細胞起源であることを示唆している。この点については、今後再生植物体の形態的特性や他の固定種との交雑後代を調べ、さらに検討する必要がある。

摘 要

開花前の子房から胚珠を摘出し各種のサイトカイニン、オーキシン、ジベレリンを含む培地で培養を行った結果、ジベレリン混合物 (GA_3 80% 以上, $GA_1 + GA_4$ 約 10%, $GA_2 + GA_7$ 微量) および GA_3 を含む培地の暗黒培養で不定胚誘導が認められた。サイトカイニンおよびオーキシンを含む培地では不定胚誘導は見られなかった。また、各種のジベレリンを含む培地で未受精胚珠を暗黒培養すると、ジベレリン混合物, GA_3 , GA_4 で不定胚誘導が見ら

れたが, GA₁, GA₅, GA₇ 添加培地では不定胚誘導は認められなかった。

不定胚は胚珠から直接誘導され, 奇形子葉をつけた異常胚も数多く認められた。誘導された不定胚をホルモンフリーの MS 培地に置床し植物体再生を試みた結果, ジベレリン混合物で誘導した不定胚から 18.6%, GA₃ および GA₄ で誘導した不定胚からはそれぞれ 26.4%, 26.9% とほぼ同率で植物体が再生された。置床した不定胚の内, 順化まで至った植物体は全処理区の合計で 44 個体 (7.2%) であった。誘導した一部の不定胚では四倍体 (4n=36) および異数体も確認されたが, 順化した再生植物体はすべて二倍体 (2n=18) であった。また, 再生植物体の RAPD 分析を行った結果, プライマー RA-1, RA-47 を用いた場合, 親株とは異なるバンディングパターンを示す個体も確認された。従って, 再生植物体の一部は, 半数性の生殖細胞起源であると推察された。

謝辞 本研究の実施にあたり, 材料を提供していただいた沖縄県農業試験場名護支場の安富徳光氏に深謝します。

引用文献

- Button, J. and C. H. Bornman. 1971. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro*. J. S. Afr. Bot. 37: 127-134.
- Chen, M. H., P. J. Wang and E. Maeda. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. Plant Cell Repts. 6: 348-351.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bul. 19: 11-15.
- Fitch, M. M. M. and R. M. Manshardt. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Repts 9: 320-324.
- 日高哲志. 1990. カンキツの薬培養. p. 26-31. 農耕と園芸編集部編. バイオホルティ 2. 誠文堂新光社. 東京.
- Hidaka, T. and Omura, M. 1989. Origin and development of embryoids from microspores in anther culture of citrus. Japan. J. Breed. 39: 169-178.
- 神阪誠一郎・宮本健助. 1994. ジベレリン. 生理作用. 細胞レベル. p. 148-213. 高橋信孝・増田芳雄 共編. 植物ホルモ
- ン・ハンドブック 上. 培風館. 東京.
- Kochba, J., P. Spiegel-Roy, H. Neumann and S. Saad. 1978. Stimulation of embryogenesis in citrus ovular callus by ABA, ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA₃. Zeit Pflanzenphysiol. 89: 427-432.
- Kojima, A. and T. Kawaguchi. 1989. Apomictic nature of chinese chive detected in unpollinated ovule culture. Japan. J. Breed. 39: 449-456.
- Krikorian, A. D., S. A. O'Connor and M. S. Fitter. 1983. Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. p. 541-581. In: D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada (eds.). Hand book of plant cell culture. Macmillan, New York.
- Mok, M. C., W. H. Gabelman and F. Skoog. 1976. Carotenoid synthesis in tissue culture of *Daucus carota*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101: 442-449.
- 新関宏夫. 1990. 薬・花粉培養. p. 217-260. 原田 宏・駒嶺 穆共編. 植物組織培養. 理工学社. 東京.
- 西林双龍. 1990. 培養細胞と再生植物の染色体観察法. 植物組織培養. 7: 127-129.
- 西村繁夫・斉藤猛雄・山口真美子. 1991. 不定胚形成の現状と誘導技術. p. 9-15. 農耕と園芸編集部編. バイオホルティ 5. 誠文堂新光社. 東京.
- San Noeum, L. H. 1976. Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* non fecondes. Ann. Amelior Plantes 26: 751-754.
- Soo, N. K. and K. Fujieda. 1988. Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57: 34-42.
- 照屋林宏・新垣恒次・広瀬和栄. 1991. わい性パパイヤ 'ワンダー・ドワーフ' の品種特性. 園学雑. 66(別 2): 56-57.
- 安富徳光. 1994. パパイア. p. 56-83. 特産のくだもの—マンゴー・パパイヤ. 果樹種苗協会. 東京.
- Yang, H. Y and C. Zhou. 1982. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. Theor. Appl. Genet. 63: 97-104.
- Zhu, Z. C. and H. S. Wu. 1979. *In vitro* induction of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. Acta Genet. Sin. 6: 181-183.