

トキソウの組織培養による増殖方法の検討

小林 碧^{*1}・清水毅夫^{*2}・南山泰宏^{*1}

A Study on In Vitro Culture Conditions for *Pogonia japonica* Rchb. f.

Midori KOBAYASHI・Takeo SHIMIZU・Yasuhiro MINAMIYAMA

抄録：トキソウ (*Pogonia japonica* Rchb. f.) はラン科トキソウ属の植物であり、現在は生息数の減少により環境省から準絶滅危惧種に指定されている。そこで、効率的な増殖方法を確立するため、組織培養による検討を行った。地下茎先端（地下茎頂を含む組織）を外植片とした組織培養において、NAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区, NAA0.2 mg/L, BA2 mg/L 添加区で、節が肥大し、地下茎の原基状の突起が観察され、ホルモンフリー区と明らかに異なった形態が認められた。地下茎節間（地下茎頂を含まない組織）の組織培養では多くの個体が褐変・枯死した。植物ホルモンを含む培地での無菌播種では、培養後 137 日目時点で NAA0.2 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区, NAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区, ホルモンフリー区, NAA0.2 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区で種子の発芽を確認した。

キーワード：トキソウ 準絶滅危惧種 組織培養

I. 緒言

ラン科トキソウ属の植物であるトキソウは、日本で北海道から本州中部にかけて自生する地生ランである。多年生の草本で温帯の酸性で日当たりのよい湿地に生息する。国外では東アジアの朝鮮半島から中国まで分布している。地下茎は細く横走り、所々から株ができる。花期は 5 月上旬から 7 月上旬にわたり、薄い紅紫色の花が咲き、秋早くに熟する（前川, 1971）。近年、トキソウは開発による自生地の変化や園芸利用目的の乱獲などによる生息数の急激な減少により、自生する多くの都道府県で絶滅危惧種に、環境省によるレッドリストでは準絶滅危惧（NT）に指定されている（環境省, 2015）。自生するトキソウの乱獲を防ぎ、トキソウを園芸利用するためには、トキソウの効率的な増殖方法の確立が求められている。

ラン科植物の種子は無胚乳種子であり、発芽の際に他から養分を摂取しなければならない。人工増殖するためには、それぞれの種に適した栄養分を含む培地で無菌的に播種する必要がある。ラン科植物は受粉後、受精までの期間が比較的長く普通は数日から 3 か月で、最も遅い種類では 6 ~ 10 か月を要する（長島, 1988）。さらに、ラン科植物の発芽に要する期間は種によって大きく異なり（長島, 1993）、トキソウでは未熟種子の約 3 割が発芽するまでに 180 日程度の日数を要するという報告もあり（松本, 2007）、種子繁殖法は効率的な方法とは言えない。

一方、コチョウランの花茎腋芽培養やシンビジウムの茎頂培養をはじめとし、様々なランで組織培養が行われている（大澤, 1994）。シンビジウムの茎頂培養で誘導されるプロトコーム様体（以

^{*1} 京都教育大学

^{*2} 京都教育大学大学院

下、PLBとする)は、植物ホルモンのオーキシシンまたはサイトカイニンを含む培地での振とう培養により増殖し、プロトコームと同様に幼植物体を形成することができる(坂本, 1992)。PLBによる増殖方法は、茎頂培養や茎頂組織以外の組織培養を用いて、一般的な手段として特に商業的に重要なさまざまな着生ランで実用化されている。しかし、地生ランではPLBによる増殖は未だに困難な種が多く(山本, 2012)、トキソウについても確立されていない。また、ラン科植物において地下茎頂を外植体に用いた組織培養は、シュンラン属やトサカメオトランなど一部の種で行われており(Teixeira da Silva, 2013)、トキソウにおいても100日齢の実生の地下茎頂を外植体に用いて、地下茎由来PLB(以下、RPLBとする)の誘導に成功している(Takahashi・Kondo, 1998)。しかし、植物体の他の部位を外植体とした組織培養はこれまでに報告されていない。

本研究では、200～300日齢の植物体より切り出した地下茎と種子を外植体に用いたトキソウの組織培養による増殖方法として、培地に添加する植物ホルモン濃度について検討した。

II. 研究方法

2.1 地下茎の組織培養による増殖方法の検討

園芸店から購入したトキソウと大阪府能勢町に自生するトキソウから種子鞘を採集し、2015年に環境教育実践センターにおいて無菌播種し、育成した200～300日齢の培養植物体を供試した。

基本培地は、Murashige and Skoog(以下、MSとする)培地と無機塩類・ビタミン類の濃度を1/2にした1/2MS培地とし、30 g/Lのショ糖を添加後、pH 5.8に調節した液体培地として硬質試験管(直径18 mm, 長さ140 mm)に10 mLずつ分注した。植物ホルモンは、1-ナフタレン酢酸(以下、NAAとする)と6-ベンジルアデニン(以下、BAとする)を第1表の通り組み合わせ用い、対照区はホルモンフリーとした。

外植体は、培養植物体の地下茎を3～5 mmにメスで切断し、茎頂分裂組織を含む地下茎先端と含まない地下茎節間の2種類に区分して、試験管の培地に1片ずつ植え付けた。培養は、恒温恒湿実験室内で、温度25℃、湿度約50%、光量子束密度 $35\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (白色蛍光ランプ)、16時間日長の条件で行い、回転培養器により2 rpmで回転培養した。調査は培養開始から8週目まで1週間ごとに行い、試験区ごとに生存数、葉および地下茎形成数を調査した。

培養植物の組織観察は以降の手順で行った。6週目の培養植物をFAA液(ホルマリン5 mL, 酢酸5 mL, 50%エタノール90 mLの混合液)で24時間以上固定し、固定した試料を50%エタノールで洗浄した後、70%エタノール、85%エタノール、80%エタノールとブタノールの混合液、90%エタノールとブタノールの混合液、無水エタノールとブタノールの混合液、無水ブタノールの順で脱水し、52℃の恒温器でパラフィン誘導を行ってパラフィンケーキを作成した。マイクローム(RV-240, (株)大和光機工業)で20～25 μm の厚さの切片を作成し、スライドガラスに貼付した後、0.05%トルイジンブルー水溶液で染色した。切片をオイキットで封入し、光学顕微鏡(ECLIPSE Ci/Ni, (株)ニコン)で観察を行った。

第1表 組織培養に用いた基本培地、外植体、植物ホルモンの配合及び植物体

基本培地	外植体	植物ホルモン (mg/L)		供試数	
		NAA	BA		
MS	地下茎節間	0.02	0.02	39	
		0.2	0.02	39	
		0.02	0.2	39	
		0.2	0.2	39	
		0	0	36	
	地下茎先端	0.02	0.02	35	
	1/2MS	地下茎節間	0.02	0.02	14
			0.02	0.2	14
			0.2	2	14
			0	0	14
地下茎先端		0.02	0.02	6	
0.02		0.2	5		
0.2		2	5		
MS	種子	0	0	6	
		0.02	0.02	192	
		0.2	0.02	125	
		0.02	0.2	137	
		0.2	0.2	222	
		0	0	163	

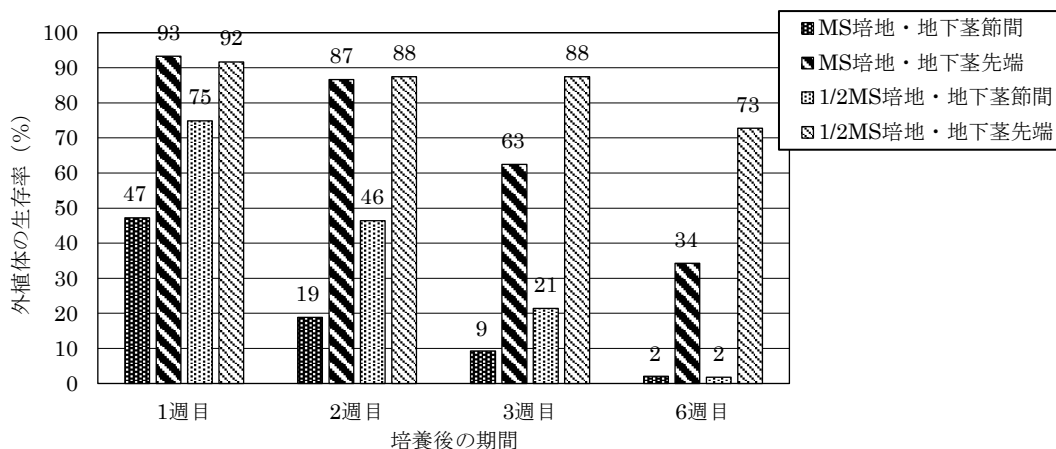
2.2 培地への植物ホルモン添加が種子の発芽に与える影響

2016年5月28日に能勢町の自生地でも人工交配し、7月30日に種子鞘を採集し、その後9月9日まで4℃で冷蔵保存したトキノウの未熟な種子鞘を用いた。種子鞘を70%エタノールで15秒間、有効塩素濃度0.1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間殺菌し、滅菌水で2回洗浄した後、種子鞘の中の種子を綿棒で取り出し、植物ホルモンを添加したMS固形培地（第1表）が入った管ビンに20～30粒ずつ植え付けた。植え付けは9月9日に行い、2.1と同じ条件で静置して培養した。播種後102日目、108日目、117日目、126日目、132日目および137日目に実体顕微鏡（SZ61、（株）OLYMPUS）で観察を行い、種子の様子と発芽数を調査した。

Ⅲ. 結果

3.1 地下茎の組織培養における増殖方法の検討

外植体の多くが培養開始からすぐに切断面から褐変が見られ、1週間後には組織全体が褐変するものも観察された。培養した外植体全体が褐変し、生育が停止したものは枯死したと判断し、基本培地の種類と外植体の部位に分別して生存する外植体の割合の経時的な変化を第1図に示した。生存率の変化の様相は、地下茎節間と地下茎先端で大きく異なった。地下茎節間では、培養



第1図 地下茎の組織培養における生存率の推移

第2表 培養後8週目の各試験区の葉および地下茎形成個体数と平均形成数

基本培地	外植体	植物ホルモン(mg/L)		供試数	生存数	葉		地下茎	
		NAA	BA			個体数	平均形成数 ¹⁾	個体数	平均形成数 ¹⁾
MS	地下茎節間	0.02	0.02	39	1	1	2.0	1	2.0
		0.2	0.02	39	2	1	1.0	0	
		0.02	0.2	39	1	1	1.0	0	
		0.2	0.2	39	0				
		0	0	36	0				
1/2MS	地下茎先端	0.02	0.02	35	12	12	1.8	8	1.0
		0.02	0.02	14	1	1	2.0	1	1.0
		0.02	0.2	14	0				
		0.2	2	14	0				
		0	0	14	0				
1/2MS	地下茎節間	0.02	0.02	6	3	3	1.3	3	1.7
		0.02	0.2	5	4	4	1.3	2	0.5
		0.2	2	5	4	3	1.0	1	0.3
		0	0	6	5	5	1.4	5	1.6

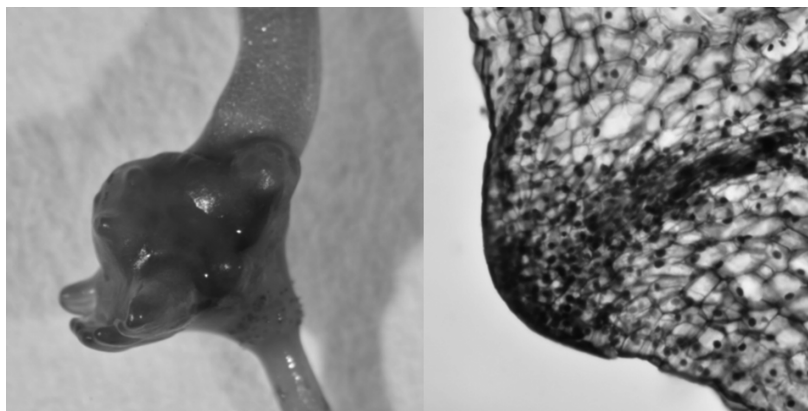
1) 試験区全体の葉あるいは地下茎の形成数/生存数

期間の経過とともに生存率は低下し、培養開始後3週目にはMS培地で9%、1/2MS培地で21%と大きく低下した。MS培地と比較して1/2MS培地では褐変の進行が緩やかであったが、6週目にはMS培地と1/2MS培地のどちらも生存率は2%となった。一方、地下茎先端では、切断面の褐変が見られたが、外植体全体に広がらないものが多く、培養後3週目の生存率はMS培地で63%、1/2MS培地で88%と地下茎節間と比べて高い値であった。

生存した外植体は培養期間の経過とともに葉や地下茎を分枝し生長する個体が観察された。第

2表に培養開始後8週目において各試験区で葉および地下茎を形成した個体数と平均形成数を示す。地下茎形成数は新しく分枝して形成された地下茎の数として計測したが、地下茎節間の培養では茎頂を持たないため、外植体から発生した地下茎を含めて算出した。地下茎節間の培養で、8週目まで生存が見られた試験区は植物ホルモンを添加した4区のみであった。MS培地と1/2MS培地のNAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L添加区では計2個体が生存し、切断面の片側から地下茎が伸長し、葉も観察された。MS培地のNAA0.2 mg/L, BA0.02 mg/L添加区とNAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L添加区では計3個体が生存し、地下茎は伸長せずに外植体が肥大し、切断面から葉のような組織の発生が見られた。一方、地下茎先端の培養では、全ての試験区において生存個体が認められ、生存個体の茎頂から地下茎の伸長と葉または地下茎が観察された。葉はほぼ全ての生存個体で形成されたが、平均形成数はMS培地のNAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L添加区で1.8と最も高かった。地下茎は1/2MS培地のNAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L添加区と植物ホルモンフリー区の全ての生存個体において形成され、平均形成数もそれぞれ1.7と1.6と高かった。これに対して、1/2MS培地のNAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L添加区とNAA0.2 mg/L, BA2 mg/L添加区では、地下茎を形成した個体は生存数の半数以下と少なく、平均形成数もそれぞれ0.5と0.3と低かった。MS培地のNAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L添加区の地下茎の形成は、生存個体の67%で平均形成数が1.0であり、中間的な値であった。

地下茎先端を外植体として1/2MS培地の植物ホルモンフリー区で培養した植物体は、地下茎が細長く伸長し一般的な生長を示したのに対し、NAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L添加区とNAA0.2 mg/L, BA2 mg/L添加区では、地下茎の伸長はあまり見られず、節の肥大や地下茎の原基状の突起が観察された(第2図)。パラフィン切片法により肥大した節の切片を作成し組織を観察したところ、突起の先端付近に分裂細胞と思われる小さい細胞組織が観察された(第2図)。

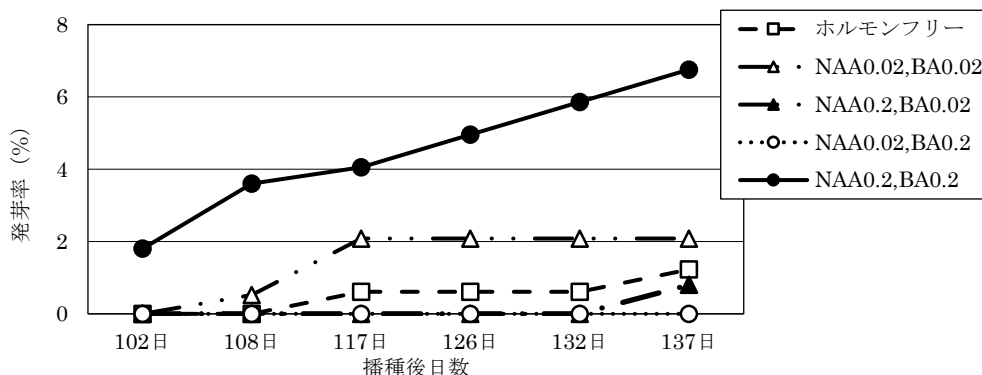


第2図 植物ホルモン添加区で観察された肥大した地下茎の節と突起部切片の顕微鏡写真

3.2 培地への植物ホルモン添加が種子の発芽に与える影響

無菌播種後約3か月が経過した頃から種子が膨らみ始め、培養後102日目にNAA0.2 mg/L, BA0.2 mg/L添加区において緑色のプロトコームの発芽を観察した。胚が膨らみ発芽の兆候が見られた種子を胚肥大種子、種皮が裂け緑色のプロトコームが観察された種子を発芽種子として、

各試験区の発芽率の推移を第3図に、無菌播種後137日目における各試験区の胚肥大種子数と発芽種子数を第3表に示した。NAA0.2 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区において最初の発芽種子を観察して以降、NAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区, ホルモンフリー区, NAA0.2 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区の順に発芽種子を観察したが, 137日目までにNAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区では発芽が認められなかった。また, NAA0.2 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区では, 発芽開始が早かったことに加え, その後の発芽種子数も経時的に増加し, 無菌播種後137日目の発芽率は6.8%と他の区よりも高い値となった。NAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区と植物ホルモンフリー区では, 最初の発芽種子を観察して以降, 発芽種子数の大きな増加はなく, 発芽率がそれぞれ2.1%と1.2%と低い値であった。一方で, 発芽種子数に発芽の兆候が見られる胚拡大種子数を加えた合計数は, NAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区と植物ホルモンフリー区で26%, NAA0.2 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区とNAA0.2 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区で34%, 無菌播種後137日目では種子の発芽がみられないNAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区においても31%と, 試験区間で大きな差異はみられなかった。



第3図 植物ホルモン濃度の異なる培地に無菌播種したトキソウの発芽率の推移

第3表 植物ホルモン濃度の異なる培地に無菌播種したトキソウの胚肥大および発芽種子数 (播種後137日目)

植物ホルモン (mg/L)		供試数	胚肥大種子数 ¹⁾	発芽種子数 ¹⁾	胚肥大種子と発芽種子の合計数 ¹⁾
NAA	BA				
0.02	0.02	192	45 (23)	4 (2.1)	49 (26)
0.2	0.02	125	42 (34)	1 (0.8)	43 (34)
0.02	0.2	137	42 (31)	0 (0.0)	42 (31)
0.2	0.2	222	60 (27)	15 (6.8)	75 (34)
0	0	163	41 (25)	2 (1.2)	43 (26)

1) 括弧内は供試数に対する割合 (%) を示す

IV. 考 察

Takahashi・Kondo (1998) は, トキソウの100日齢の実生の幼株より切り出した地下茎頂を外植体として培養することにより, RPLBの誘導に成功している。本研究において, 植物材料は

200 ~ 300 日齢でやや成株ではあるが、Takahashi・Kondo (1998) と同様の結果を期待して、NAA0.02 mg/L と BA0.02 mg/L を添加した MS 培地で茎頂を含む地下茎先端の培養を行った。しかし、供試した外植体の 66% が褐変・枯死し、生存した外植体は半数以下であった。さらに、生存した個体も葉や地下茎は形成したが、RPLB のような組織の形成はみられなかった。外植体が褐変した理由は明らかではないが、供試した外植体数が少ないものの、1/2MS 培地では枯死した個体が 30% 以下であったことから、塩類濃度が高かったことが原因のひとつであると考えられる。対照とした 1/2MS 培地の植物ホルモンフリー区では、外植体の地下茎頂が細長く伸長し、複数の葉や地下茎を形成しながら通常の生育の様子が観察された。NAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区でも対照区とほぼ同様の生育を示したことから、添加した植物ホルモンの影響をあまり受けていないと考えられる。これに対して、植物ホルモン濃度の高い 1/2MS 培地の NAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区と NAA0.2 mg/L, BA2 mg/L 添加区では、節の肥大や地下茎の原基状の突起が観察された。組織断面の顕微鏡観察を行ったところ、節の近くにある突起は分裂組織であると考えられた。NAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区よりも NAA0.2 mg/L, BA2 mg/L 添加区において、節の肥大の程度と地下茎の原基状の突起の数が多かったことから、本研究では日齢の進んだ植物体を供試したため、植物ホルモンに対する感受性が低下しており、植物ホルモンの濃度をより高くすることで、日齢の進んだ植物体を用いても RPLB を誘導できる可能性が示された。

一方、地下茎節間の組織培養では、外植体の生存率が極めて低く、培養後 8 週目にはほぼ全てが褐変し枯死した。長谷川 (1987) は、イッケイキュウカの節間を用いて培養したところ、40 個体中 2 個体だけが生存し、生存した 2 個体も生長あるいは発達をしなかったと述べている。一方、トサカメオトランの 4 週齢の地下茎の節間を外植体に用いた組織培養では、BA を添加した MS 培地によりシュートを形成したが、フェノール化合物の放出により活性炭を含む培地への継代培養を行っている (Sheelavantmath ら, 2000)。ラン科植物の微細繁殖では組織が受傷すると、多くのフェノール様物質を含む二次代謝物が切断面から浸出し、培養植物体の生存率を低下させることが報告 (Mitsukuri ら, 2009) されており、本研究においても、外植体の切断面から褐変し始めたことから、フェノール様物質の浸出により枯死した可能性もある。本研究では 4 個体の地下茎節間から地下茎や葉の形成が見られた。MS 培地と 1/2MS 培地の NAA0.02 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区では、切断面の片側から地下茎の伸長があり、その後は茎頂を含む地下茎先端の植物ホルモンフリー区と同様の生育を示した。MS 培地の NAA0.2 mg/L, BA0.02 mg/L 添加区と NAA0.02 mg/L, BA0.2 mg/L 添加区では、切断面から複数の葉のような組織の形成が見られたが、RPLB とは異なった。Sheelavantmath ら (2000) の研究では、外植体に用いた地下茎節間の表面に緑色の小さな突起が出現し、この突起がシュートへと発達したと述べている。これに対して、本研究では地下茎節間の表面ではなく切断面から葉や地下茎が形成された。さらに、長谷川 (1987) はイッケイキュウカの地下茎を用いた組織培養において、シュートあるいは地下茎が発生する位置は分裂組織のみに限られると述べている。したがって、本研究においても地下茎節間から葉や地下茎が発生した個体は、植え付ける外植体に偶然分裂組織が含まれていたのかもしれない。しかし、地下茎先端を用いた実験では、日齢の進んだ植物体では植物ホルモンに対する感受性が低い可能性も示されており、活性炭の培地への添加によるフェノール物質の除去や

高濃度の植物ホルモンの組み合わせなど、検討の余地も残されている。

トキソウは無菌播種後の植物体の生長も緩慢なため、地下茎節間では多くの外植体を得ることが困難であり、高い培養効率が求められる。一方で、ひとつの種子鞘に多くの種子を生産するため、種子を外植体とした組織培養が可能であれば効率的である。トキソウの無菌播種については、高橋（2015）や松本（2007）によって種子の熟度や培地の種類が発芽率に及ぼす影響について研究されている。しかし、植物ホルモンを添加した培地への無菌播種は行われていない。高橋（2015）は、ヤマトトキソウの未熟種子を用いて、数種の植物ホルモンを添加した培地に無菌播種を行ったが、発芽率の向上は認められていない。本研究では、NAAとBAを添加した培地に交配から約60日目の未熟種子を無菌播種したところ、ホルモンフリー区、NAA0.02 mg/L、BA0.02 mg/L添加区、NAA0.2 mg/L、BA0.02 mg/L添加区およびNAA0.2 mg/L、BA0.2 mg/L添加区において発芽が認められた。播種後137日目でも最も発芽率が高かった試験区は植物ホルモン濃度の高いNAA0.2 mg/L、BA0.2 mg/L添加区であった。Godoら（2010）はラン科植物のサルメンエビネの完熟種子の無菌播種においてNAAとBAの両物質が発芽促進効果があることを、Rasmussen（1995）は陸生ラン科植物の発芽促進にNAAよりBAが効果的であることを報告している。本研究ではNAAとBAのどちらの効果かは明らかではないが、トキソウの未熟種子の無菌播種において、これらの植物ホルモンによる発芽促進効果があることが示唆された。

高橋（2015）は交配後60日の未熟種子では播種後90日目に半数以上の種子の発芽を確認しており、松本（2007）は未熟種子の無菌播種において約3割の種子の発芽に180日程度の日数を要している。発芽に要する期間に両者の間で大きな差異があるが、自然に自生する植物であるため、植物体の遺伝的な違いや生育環境の違いによる影響が考えられる。本研究では播種後137日目の観察結果で植物ホルモンフリー区においても1.2%の発芽率であることから、今後発芽数が増加するものと思われる。発芽種子数に胚拡大種子数を加えた合計数は、試験区間で大きな差異がないことから、植物ホルモンは発芽率に影響を与えるのではなく、発芽促進に効果がある可能性が高い。播種後137日目では発芽種子数が少ないことに加えて、発芽した種子のプロトコームからもまだ仮根等は発生しておらず、プロトコームへの植物ホルモンの影響も含めて今後の観察を継続する必要がある。

引用・参考文献

- Godo, T, M. Komori, E. Nakaoki, T. Yukawa and K. Miyoshi. 2010. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant.* 46: 323-328.
- 長谷川 暁、1987、東洋系シンビジウムの繁殖に関する研究、香川大学農学部紀要、50: 1-108.
- 環境省、2015、第4次レッドリスト「植物I（維管束植物）」〈分類順〉、p.44、〈<http://www.env.go.jp/press/101457.html>〉.
- 前川 文夫、1971、原色日本のラン：日本ラン科植物図譜、p.231、誠文堂新光社、東京.
- 松本 達夫、2007、加須市「浮野」に自生するトキソウの採種時期が発芽に及ぼす影響、埼玉県農林総合研究センター研究報告、7: 91-92.

- Mitsukuri, K., G. Mori, M. Johkan, K. Mishiba, T. Morikawa and M. Oda. 2009. Effects of explant source and dark-preconditioning on adventitious bud formation in *Neofinetia falcata* H. H. Hu *in vitro*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 252-256.
- 長島時子、1993、ラン科植物の胚発生過程と発芽との関係に関する研究、園学雑、62: 581-594.
- 長島時子、1988、ランの種子形成と未熟種子の発芽能力、p.18、加古舜治編著、図解ランのバイオ技術 ミクロ繁殖・実生・交配育種、誠文堂新光社、東京。
- 大澤勝次、1994、植物バイオテクの基礎知識、p.115、農文協、東京。
- Rasmussen H. N. 1995. Terrestrial Orchids : from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge.
- 坂本立弥、1992、ランの組織培養、p.30-51、古川仁朗編著、増補 / 図解組織培養入門、誠文堂新光社、東京。
- Sheelavantmath. S. S., H.N. Murthy, A.N. Pyati, H.G. Ashok Kumar and B.V. Ravishankar. 2000. In vitro propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60: 151-154
- Takahashi, C. and K. Kondo. 1998. Induction of adventitious shoots, rhizome-Derived protocorm-like bodies and abnormal shoot-tip aggregations from rhizome segments of *Pogonia japonica*. Lindleya 13: 284-291.
- 高橋知佐子、2015、Micropropagation and genetic relationships among three species of *Pogonia* (Orchidaceae)、東京農業大学大学院農学研究科学学位論文。
- Teixeira da Silva J. A. 2013. Orchids: Advances in Tissue Culture, Genetics, Phytochemistry and Transgenic Biotechnology. Floriculture and Ornamental Biotechnology. 7: 1-52.
- 山本昌生、2012、グロリオサとエビネにおける組織培養苗生産方法の確立と実用化、千葉大学大学院自然科学研究科学学位論文。