

작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)의 화사 유래 캘러스로부터 체세포배발생

정재동* · 한중술 · 손재근¹
경북대학교 원예학과, ¹농학과

Somatic Embryogenesis from Filament-Derived Callus of *Paeonia lactiflora* PALL.

Jae Dong CHUNG*, Jeung Sul HARN, and Jae Keun SOHN¹

Department of Horticulture, Kyungpook National University; and ¹Department of Agronomy,
Kyungpook National University, Taegu 702-701. *Corresponding author.

This study was conducted to investigate the possibility of obtaining plantlets via somatic embryogenesis as a means of in vitro mass propagation in *Paeonia lactiflora* Pall.. When cultured on MS medium with 0.5 mg/L 2,4-D, filament explants formed calli. Upon transfer to basal medium, the calli gave rise to somatic embryos at a frequency of 38%. Addition of 3 g/L activated charcoal enhanced the frequency to 60%. Mature embryos pretreated at 5°C for 2 weeks had 37% germination on medium with 0.3 mg/L GA₃. The germinated embryos developed to complete plantlet when cultured on medium with 2 mg/L BA.

Key words: BA, callus induction, 2,4-D, GA₃, plantlet

작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)은 모란과(Paeoniaceae)에 속하는 다년생 초본식물(Wilkins and Halevy, 1985)로 그 뿌리에는 paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin 등이 함유되어 있어 보혈, 진정, 진통, 해열, 통경, 소염, 강장약으로서 냉증, 빈혈, 부인병 등에 약효가 있는 것으로 알려져 있다(Chang et al., 1989). 이러한 약효로 인해 국내에서는 주로 생약용으로 재배되고 있지만 유럽, 북미, 일본 등을 중심으로한 지역에서는 작약꽃을 대상으로 개량 및 재배되고 있다(Byrne and Halevy, 1991; Chang et al., 1989; Heuser and Evensen, 1986; 小西 et al., 1988). 작약의 번식은 주로 분주 및 종자에 의존하는데 분주는 번식의 효율이 낮고 주년생산을 할 수 없으며 종자번식의 경우는 우량계통의 후대분리라는 문제점 뿐 아니라 겹꽃종은 종자형성 자체가 어렵다. 이러한 기존 번식방법의 문제점을 극복하고 우량계통을 대량 유지증식하기 위한 기내번식 방법이 고려되어야 할 것으로 생각되는데 그중 체세포 배발생을 통한 기내번식은 적절한 생산 체계가 확립되면 번식의 양적 효율성이 높을 뿐만 아니라 분화가 양극성으로써 기관분화를 통한 번식보다 용이하게 유식물체를 획득할 수 있을 것으로 보인다. 체세포 배발생에 관해서는 Stewar 등(1958)과 Reinert(1959)가 당근세포의 배양을 통하여 최초로 관찰한

이래 지금까지 40여과의 식물에서 체세포 배발생이 이루어졌다고 보고되어 있으며 거의 모든 피자식물의 배양세포는 배형성능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Harn, 1987). 그러나 작약의 경우 약배양을 통한 반수성 배발생에 관한 보고들은 있으나(Harn and Choi, 1976; Lee, 1982; Lee et al., 1989; Ono and Harashima, 1981; Ono and Harashima, 1983; Sohn and Kim, 1993) 체세포 유래의 배발생에 관한 연구 결과는 찾아보기 어렵다. 본 연구는 작약(*P. lactiflora* Pall.)의 체세포배 획득의 가능성을 밝히고 이 방법을 통한 우량계통의 기내 대량번식에 필요한 기초 자료를 얻고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

의성지방에서 수집한 홑꽃종 작약(*P. lactiflora* Pall.)의 화뢰를 5월 중순경 횡경이 약 1.8 cm에 달했을 때 채취하여 재료로 사용하였다. 살균은 수돗물로 표면의 이물질을 씻은 후 70% EtOH 용액에 넣어 교반하면서 30초간 표면살균한 다음, 멸균수로 3회 수세하였다. 무균상태에서 꽃잎과 약을 제거한 후 화뢰당 100여개의 화사를 절취하여 배양재료로

사용하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 설탕 30 g/L와 Gelrite 2 g/L를 첨가하였고 캘러스 유기를 위해 성장조절제를 첨가하지 않았거나 2,4-D를 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg/L 첨가한 4종의 배지를 사용하였으며 pH는 5.8 (이하 pH 5.8)로 조정하였다. 화사를 치상한 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 암배양 하였으며 유기된 캘러스는 설탕 농도를 20 g/L로 조정된 것 외에는 동일한 조성의 MS배지에 약 60일 간격으로 계대배양하면서 다음 실험재료로 사용하였다.

체세포 배발생을 유도하기 위하여 캘러스를 1차 4주간 계대배양한 후 MS 배지에 Zeatin을 0.2 mg/L 단용 또는 BA 0.1 mg/L와 혼용한 배지 및 성장조절제를 첨가하지 않은 배지 등 3종의 배지를 조제하였다. 87(D) × 15(H) mm 사레에 18 mL의 배지를 분주하여 응고시킨 후 5 mm 크기의 캘러스를 각 배지당 20개씩 5반복 치상하였다. 배양은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 1500 lux 밝기의 백색형광등으로 16시간 명, 8시간 암상태에서 배양하면서 배발생 양상을 해부현미경으로 관찰하였다. 또한 설탕 첨가농도와 활성탄 첨가 유무에 의해 배발생을 향상 가능성을 찾고자 성장조절제를 첨가하지 않고 설탕 첨가농도(20, 30, 40 g/L)를 달리한 것과 활성탄(3 g/L)을 넣거나 넣지 않은 6종의 MS 배지를 조제하여 계대배양 중인 캘러스를 치상하여 배발생 정도를 관찰하였다. 배양중 발생된 배의 생장을 유도하기 위해 1 mm 크기의 모조직이 부착된 상태의 배를 성장조절제를 첨가하지 않고 설탕을 20 g/L 첨가한 MS배지에 발육상별로 이식하였다. 성숙한 배의 발아를 위해서는 GA₃ 0.3 mg/L 첨가배지에 이식하여 5°C 에서 2주간 암상태에서 저온처리한 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 명상태에 두어 배의 발아 양상을 관찰하였다. 발아된 배들은 생장을 위해 BA 2.0 mg/L가 첨가된 MS배지에 이식하였다.

결과 및 고찰

작약의 화사조직을 2,4-D의 첨가농도를 달리한 4종의 배지에 치상하였을 때 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지(이하 MSO)에서는 화사조직이 차츰 갈변하여 캘러스 발생을 관찰할 수 없었으나 2,4-D 0.1, 0.5, 1.0 mg/L를 첨가한 각각의 배지에서는 화사조직이 신장하면서 절단부로부터 반투명한 캘러스가 형성되었다(Figure 1-1~2). 화사조직 치상 60일 후 2,4-D 농도별 캘러스 형성 및 성장정도는 Table 1과 같다. 0.1 mg/L 첨가배지에서는 그 형성률과 생장이 불량한 반면 0.5 mg/L와 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서는 치상된 화사조직 전부에서 캘러스가 형성되었으며 그 성장도 양호한 경향이였다.

Pierik(1987)은 분열조직이 포함되지 않은 절편의 배양에서는 탈분화 과정이 필요하고 캘러스유기를 위한 호르몬 요구에 따라 3가지 그룹으로 나누었으며 Guo와 Gui (1993)는 많은 경우에 있어 탈분화와 체세포 배발생을 위해서는

Table 1. Effect of 2,4-D on callus formation and subsequent growth from filament tissue culture of *P. lactiflora* after 60 days of culture.

2,4-D (mg/L)	Callus formation (%)	Growth response of callus ^a
0.0	0.0	-
0.1	24.9	+
0.5	100.0	++
1.0	100.0	+++

^a symbol : -, poor, ++, good, +++: very good.

Table 2. Effect of growth regulators on somatic embryogenesis from filament-derived callus of *P. lactiflora*.

Growth regulators (mg/L)	Culture period (days)	2,4-D conc. at callus induction		
		0.1	0.5	1.0
Control	60	13.8a	22.4	15.7
	80	17.5	38.0	31.4
Zeatin 0.2	60	6.3	11.5	13.4
	80	7.5	15.8	4.9
BA 0.1 + Zeatin 0.2	60	2.5	5.6	3.4
	80	2.5	6.8	3.4

^a % of somatic embryogenesis.

2,4-D가 필수적인 역할을 담당한다고 했는데 작약의 경우에서도 그들과 같은 경향을 나타내는 것으로 관찰되었다. 한편 현삼 잎조직배양에서와 같은 직접 체세포 배발생(Chae et al., 1993)은 각 처리에서 캘러스 유기배양 전기간에 걸쳐 관찰할 수 없었던 것으로 보아 식물의 종류에 따른 배발생 양상의 차이인 것으로 판단하였다.

각 배지별로 유기증식된 캘러스를 1차 계대배양한 50일 후 체세포배를 유도하기 위해 성장조절제 조성을 달리한 3종의 MS배지에 캘러스를 이식하였을 때 Zeatin 0.2 mg/L와 BA 0.1 mg/L를 혼용한 배지에서는 배양 1주일경부터 대다수의 캘러스가 엷은 연녹색을 띄기 시작한 반면 다른 처리구에서는 서서히 갈변하였다. 그러나 발생률에는 차이가 있으나 모든 배지에서 배양 20일경부터 배발생이 관찰되기 시작하여 배양 25일경 구형, 30일경 심장형, 45일경 어뢰형 배들이 관찰되었다(Figure 1-3~6). 배발생 배지에 이식한 60일과 80일 후 배지별 배발생 양상을 조사하였을 때(Table 2) 전형적인 구형, 심장형, 어뢰형 배를 비롯하여 Lee와 Soh (1993)가 땅두릅에서 보고한 bowling pin 및 horn type과 유사한 기형의 배들이 산재되어 관찰되었는데 이들 모두는 육안으로 식별 가능하였으며 표면이 반들반들한 유백색이었다.

농도를 달리한 2,4-D 배지에서 얻은 캘러스를 몇 종의 배지에 이식하여 배발생을 유도했을 때 그 결과는 Table 2와 같다. Zeatin 0.2 mg/L 단용이나 BA 0.1 mg/L와의 혼용보다 2,4-D 0.5 mg/L 첨가배지에서 유래된 캘러스를 성장조절제를 첨가하지 않은 MSO 배지에 치상했을 때 캘러스로부터

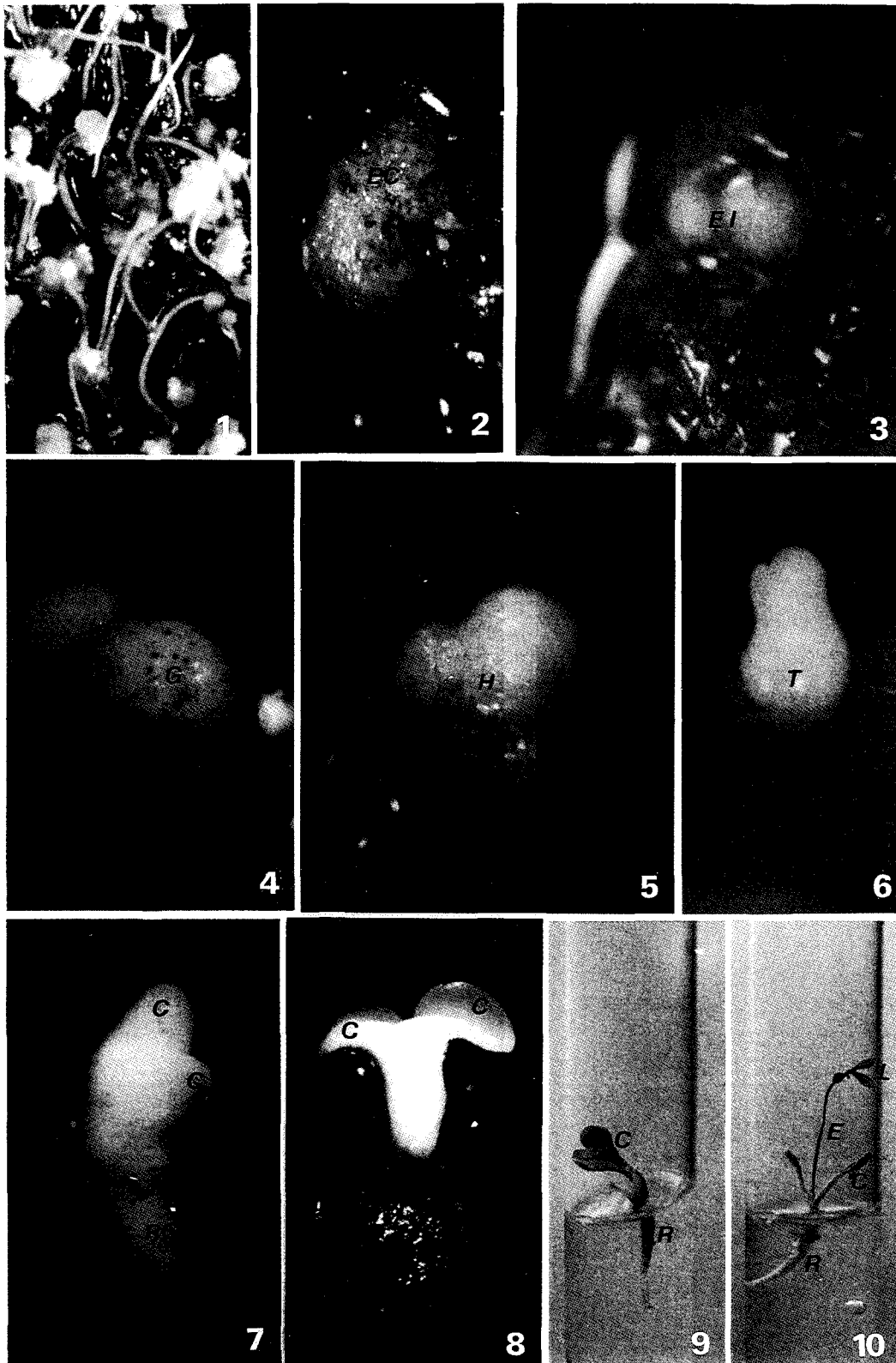


Figure 1. Somatic embryogenesis from filament-derived callus of *P. lactiflora* Pall.

1: Callus from filament tissue - 60 days after culture; 2: Embryogenic callus; 3: Embryo initials from EC - 20 days after embryo induction culture; 4: Globular embryo - 25 days after culture; 5: Heart-shaped embryo - 30 days after culture; 6: Torpedo-shaped embryo - 45 days after culture; 7: Cotyledon-like structure and radicle - 55 days after culture; 8: Mature embryo of which cotyledons are developed - 15 days after transplanting for development; 9: Germinated embryo having been pretreated in 5°C chilling air condition for 2 weeks in the medium with 0.3 mg/L GA₃; 10: Growing embryo in the medium with 2.0 mg/L BA.

배양 60일 후 22.4%, 80일 후 38.0%로 가장 높은 배발생률을 보였다. 이는 당근의 체세포배발생 전과정에 걸쳐 저농도의 Zeatin이 촉진적 효과를 나타낸다고 한 보고 (Kawahara and Komamine, 1991)와 일치하지 않은 결과이며 작약의 화사조직 유래의 캘러스로부터 체세포 배발생의 경우 저농도 Zeatin의 배발생 촉진효과를 인정할 수 없으며 오히려 성장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서 배발생률이 높았다. 한편 당근의 경우, BA를 첨가함으로써 배발생이 억제되었다고 하였는데 (Fujimura and Komamine, 1979) 그 원인은 배지내 시토키닌류를 첨가함으로써 내생 시토키닌 수준이 증가하는데 기인하는 것이라고 했다 (Doods and Roberts, 1985). 본 실험의 경우 시토키닌류 첨가 배지에서 배발생이 감소한 것은 작약 캘러스로부터 배발생을 유기할 수 있는 시토키닌 수준이 과도한데 기인했을 수도 있을 것이고 식물의 종류에 따른 성장조절제의 구도의 차이일 것으로 추정된다.

배지내 설탕 첨가농도와 활성탄 첨가 유무를 달리한 6종의 배지에 캘러스를 이식하여 배양 40, 50, 60일후 배발생 정도를 관찰하였는데 그 결과는 Table 3과 같다. 설탕 농도에 관계없이 활성탄을 3 g/L 첨가하였을 때 배발생률이 높았고 활성탄 첨가시 설탕 첨가농도가 높아짐에 따라 배발생률이 낮아지는 경향이였다. 배발생률에 있어 2,4-D 0.5 mg/L 첨가배지에서 배양한 캘러스를 설탕 농도는 동일하게 20 g/L로 하고 활성탄을 3 g/L 첨가한 배지로 이식했을 때 배양 60일 후 60.0% 배발생이 이루어졌고 캘러스당 1.8개의 체세포배가 유기되어 배발생률을 향상시킬 수 있었다.

활성탄의 정확한 효과는 알려져 있지 않으나 일반적으로 배지내 유·무기물을 흡착하는 것으로 알려져 있는데 (Pierik, 1987) 당근의 경우 오옥신 제거에 실패했을 때 활성탄을 첨가함으로써 성공적으로 배발생을 유도할 수 있었다고 했으며 (Drew, 1979; Fridborg and Eriksson, 1975) 또다른 가능성으로 고압증기멸균시 발생된 설탕의 분해산물로서 배발생에 억제적으로 작용하는 5-(hydroxymethyl)-2-furfural의 흡착 가능성을 제안했는데 (Weatherhead et al., 1978) 본 실험의 경우도 2,4-D 존재하에 계대배양 되어온 캘러스로부터 배발생에 필수적인 오옥신의 제거 혹은 감소시킴으로써 배발생에 유리하게 영향을 미쳤거나, 배발생에 억제물질로 작용하는 설탕의 분해산물을 흡착하는데 활성탄이 중요한 역할을 한 것으로 생각된다.

이상의 실험에서 유기된 배들의 이식 적정시기를 구명하기 위해 총 86개의 배를 발육상별로 MSO에 이식하였을 때 배의 발육정도를 보면 Table 4와 같다. 어퇴형 배를 이식했을 경우 배의 증식율이 1.4배로 가장 높았으며 또한 성숙배로의 발육이 양호한 경향이였다.

기 발생된 성숙배는 유백색의 자엽이 전개된 형태 (Figure 1-7~8)로 이들의 발아를 위해 GA₃가 0.3 mg/L 첨가된 MS 배지에 이식하여 5°C에서 2주간 암상태로 전처리한 후 25

Table 3. Effect of sucrose and activated charcoal on somatic embryogenesis from filament-derived callus of *P. lactiflora*.

Sucrose (mg/L)	Activated charcoal (g/L)	Culture period (days)	2,4-D conc. at callus induction		
			0	0.5	1.0
20	0	40	0.0 ^a (0.0) ^b	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		50	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		60	1.7 (1.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
	3	40	10.0 (1.3)	17.5 (1.1)	6.3 (1.0)
		50	15.0 (1.9)	36.7 (1.6)	12.5 (1.2)
		60	15.0 (2.2)	60.0 (1.8)	17.5 (1.6)
30	0	40	1.7 (1.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		50	1.7 (2.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
		60	8.3 (1.6)	1.7 (1.0)	0.0 (0.0)
	3	40	10.0 (1.2)	18.8 (1.2)	6.3 (1.2)
		50	11.7 (1.3)	23.8 (1.4)	11.3 (1.1)
		60	13.3 (1.4)	37.5 (1.7)	15.0 (1.4)
40	0	40	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (1.0)
		50	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.3 (1.0)
		60	1.7 (1.0)	0.0 (0.0)	1.3 (1.0)
	3	40	1.7 (1.0)	3.3 (1.0)	1.7 (1.0)
		50	3.3 (1.0)	10.0 (1.0)	1.7 (1.0)
		60	5.0 (0.8)	11.7 (1.4)	5.0 (1.0)

^a % of somatic embryogenesis.

^b means embryo numbers a callus clump.

Table 4. Effect of embryo^a developmental stage before transplanting on the embryo multiplication and development.

Stage at transplanting	Number of embryo transferred	Embryo types after subculture					
		Globular	Heart	Torpedo	W~U	Mature	Total
Globular	55	7(12.3 ^b)	3(5.3)	14(24.6)	25(43.9)	8(14.0)	57(1.0 ^c)
Heart	16	1(4.5)	0(0.0)	5(22.7)	10(45.5)	6(27.3)	22(1.4)
Torpedo	13	1(5.6)	0(0.0)	3(16.7)	9(50.0)	5(27.8)	18(1.4)
W~U ^d	2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)	1(0.5)

^a Embryo adhere to 1 mm mother tissue, ^b % of embryo against total multiplied, ^c Multiplication rate of embryo, ^d Walking stick ~ Inverted U shape.

± 2°C, 명상태에 배양하였을 때 약 1개월 후 37.0%의 배가 발아하였다 (Figure 1-9). 발아된 배들을 BA 2.0 mg/L가 첨가된 MS 배지로 이식함으로써 지속적인 성장을 시킬 수 있었다 (Figure 1-10).

적 요

작약(*P. lactiflora* Pall.)의 화사조직을 배양하여 체세포배의 획득 가능성을 밝히고 유묘의 대량번식에 필요한 기초 자료를 얻고자 본 실험을 수행하였다. 5월 중순경 채취한 화뢰로부터 화사조직을 절취하여 2,4-D 농도를 달리한 4종의 MS배지에 치상하였을 때 2,4-D 1.0 mg/L, 0.5 mg/L, 0.1

mg/L 첨가한 배지 순으로 캘러스의 형성과 생장이 양호하였고 성장조절제를 첨가하지 않은 배지에서는 화사조직이 갈변하여 캘러스 발생을 관찰할 수 없었으며 이들 캘러스를 설탕만 20 g/L로 줄인 동일한 성장조절제 조성의 배지에서 계대배양했을 때 증식이 양호하였다. 체세포배 유기를 위해 5 mm 크기의 캘러스를 3종의 배지에 이식했을 때 2,4-D 0.5 mg/L 첨가배지에서 얻은 캘러스를 성장조절제를 첨가하지 않은 배지에서 배양했을 때 배양 80일 후 38.0%의 가장 높은 배발생률을 나타내었다. 또한 설탕 첨가농도와 활성탄 첨가유무를 달리한 6종의 성장조절제 무첨가 배지에 계대배양 중인 캘러스를 배양했을 때 2,4-D 0.5 mg/L 첨가배지에서 유기증식된 캘러스를 설탕 농도는 20 g/L로 동일하고 활성탄을 3 g/L 첨가한 배지에서 배양 60일 후 60.0%로 가장 높은 배발생률을 나타내어 배발생률을 향상시킬 수 있었다. 발생된 배들의 이식 적정시기를 구명하기 위해 발육상별로 성장조절제를 첨가하지 않은 배지에 이식했을 때 부착된 모조적으로부터 다수의 배가 유기되었는데 어뢰형 배를 이식했을 경우 배의 증식률이 1.4배로 가장 높았으며 성숙배로의 발육도 양호하였다. 유백색의 자엽이 전개된 배들은 GA₃ 0.3 mg/L가 첨가된 배지에 이식하여 5°C에서 2주간 암상태로 전처리 했을 때 배양 1개월 후 37.0%의 배가 발아하였으며 발아된 배들을 BA 2.0 mg/L 첨가배지로 이식함으로써 유식물체로 성장하였다.

사사 - 이 논문은 1992년부터 1994년에 걸쳐 농촌진흥청 특정연구과제 연구비에 의해 수행된 것임.

인 용 문 헌

- Byrne TG, Halevy AH (1986) Forcing herbaceous peonies. J Amer Soc Hort Sci 111: 379-383
- Chae YA, Park SU, Kim HH (1993) Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf tissues in *Scrophularia buergeriana* M.. Korean J Plant Tissue Culture 20: 125-128
- Chang KW, Kim SY, Seo GS, Kim PJ, Lee HD (1989) Effect of fertilizer applications on the morphology and the pharmaceutical components of *Paeonia albiflora* Palls. J Korean Soc Soil Sci Fert 22: 315-322
- Doods JH, Roberts LW (1985) Experiments in plant tissue culture, Cambridge university, New York
- Drew RLK (1979) Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Dacus carota* L.). Ann Bot 44: 387-389
- Fridborg G, Eriksson T (1975) Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell culture. Physiol Plant 34: 306-308
- Fujimura T, Komamine A (1979) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Physiol 64: 162-164
- Guo (Kuo) Z, Gui Y (1993) Plant somatic embryogenesis and artificial seeds. In WY Soh, JR Liu, A Komamine, eds, Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants. Korean J Plant Tissue Culture, Taejon, pp 150-159
- Harn C. (1987) Somatic embryogenesis and its use in the plant breeding. The Korean society of plant tissue culture, Suweon
- Harn C, Choi KT (1976) Studies on the anther culture of cultivated *Paeonia albiflora*. Korean J Plant Tissue Culture 4: 9-13
- Heuser CW, Evensen KB (1986) Cut flower longevity of peony. J Amer Soc Hort Sci 111: 896-899
- Kawahara R, Komamine A (1991) Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot. Korean J Plant Tissue Culture 18: 339-344
- Lee BK, Eun JS, Ko JA, Kang NJ (1989) Effects of pollen dimorphism and plant growth regulators in anther culture of *Paeonia albiflora*. Korean J Plant Tissue Culture 16: 105-114
- Lee KS, Soh WY (1993) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thumb.. Korean J Plant Tissue Culture 20: 77-83
- Lee MS (1982) Effect of low temperature treatment to floral bud on the anther culture of *Paeonia*. Korean J Plant Tissue Culture 9: 1-6
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Ono K, Harashima S (1981) Induction of haploid callus from isolated microspores of paeony *in vitro*. Plant Cell Physiol 22: 337-341
- Ono K, Harashima S (1983) Growth characteristics and chromosomal behavior of cell suspension lines established from pollen callus of paeony. Jpn J Genet 58: 209-218
- Pierik RLM (1987) *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht
- Reinert J (1959) Ueber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventiveembryonen an gewebeulturen aus karotten. Planta 53: 318-333
- Sohn JK, Kim YH (1993) Effect of plant growth regulators on callus and embryos formation in anther culture of *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tissue Culture 20: 255-259
- Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am J Bot 45: 705-708
- Weatherhead MA, Bordon J, Henshaw GG (1978) Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. Z. Pflanzenphysiol 89: 141-7
- Wilkins HF, Halevy AH (1985) *Paeonia*. In AH Halevy, ed. CRC Handbook of Flowering, Vol 4. CRC press, Boca Raton, pp 2-4
- 小西國義, 今西英雄, 五井正憲 (1988) 花卉の開花調節. 養賢堂, 東京