

利用微扦插與不定芽誘導進行粗肋草 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 微體繁殖之研究

黃柄龍¹ 廖麗貞²

摘要

粗肋草雖然可以採用分株或扦插等方式繁殖，但低繁殖率及嚴重的內生菌污染，使粗肋草被列為是難以藉由組織培養繁殖的植物之一。本研究首度利用 stem cuttings-lateral shoots-lateral buds 之二次芽培養方式以獲得培植體，並誘導叢生芽和不定芽之形成。明顯地，TDZ 容易誘導培植體形成透明顆粒狀細胞群並包覆芽體，不適合用於芽體之增殖培養。1/3MS 基礎培養基添加 3.0 mg l⁻¹ BA，可有效促進莖頂及莖節微扦插形成之叢生芽數，分別為 2.44 及 1.60 個；並可促進芽體的生長，培養 8 週可增加芽體長度約 1.72 cm。同樣地，培養基中單獨添加 3.0 mg l⁻¹ BA，可誘導莖節切片培植體形成較多的不定芽，達 4.5 個，但組合 NAA 則減少不定芽之形成。芽體可逐漸抽長並形成植株，且不需複雜的馴化過程，即可於移植至試管外種植，不過，芽體初期的生長速度緩慢。

關鍵語：粗肋草、微體繁殖、微扦插、叢生芽、不定芽

前言

粗肋草(*Aglaonema* spp.)為原產於亞洲東南部地區之天南星科(Araceae)多年生草本植物，分布範圍極廣，自印度東北部、中國南部、印尼及新幾內亞等地均有其分布⁽⁵⁾。因其耐旱及耐陰性強，並具有豐富的葉斑顏色變化等特性，已成為許多亞洲國家廣泛栽培的室內觀葉植物^(13, 19, 20, 21, 37)，且美國佛羅里達亦有商業化栽培⁽¹⁴⁾。在臺灣，粗肋草年產值約 1 億元臺幣，是為一項重要的觀賞植物產業。

粗肋草可以分株、扦插與種子播種等方式繁殖⁽⁵⁾。分株繁殖方式所獲得的種苗數量太少；而種子繁殖所需的時間長，由種子萌芽至成株約需二年半時間，除育種外，一般很少採用；目前大多以頂芽及帶側芽的莖段扦插作為商業生產的主要繁殖方式⁽³⁹⁾，但增殖倍率低，遂成為另一項待解決之問題。組織培養為提高種苗生產效率的有利工具，但是許多天南星科植物，包括粗肋草(*Aglaonema*)⁽¹⁵⁾、火鶴花(*Anthurium*)⁽²⁵⁾、黛粉葉(*Dieffenbachia*)⁽⁶⁾、蔓綠

¹ 行政院農業委員會高雄區農業改良場 副研究員

² 國立高雄師範大學生物科技系 教授

絨(*Philodendron*)⁽¹⁷⁾及海芋(*Zantedeschia*)⁽²⁴⁾等維管束組織內，內生菌污染嚴重，限制了微體繁殖的進行，也使得有關粗肋草組織培養增殖的報告極少。雖然 Zenkteler 等人(1997)⁽⁴¹⁾曾以 gentamycin、streptomycin 和 carbenicillin 等抗生素及 sulphaguanidine 灌注黛粉葉；Chen 和 Yeh (2007)⁽¹⁵⁾也於培養基中添加高濃度的 streptomycin，企圖抑制白馬粗肋草(*Aglaonema* 'White Tip')的污染率，惟處理後所有培植體皆呈現毒害或褐化現象，顯示以化學藥劑處理並非適當。而將植株缺水處理 2 個月，雖然可降低初始(initial)培植體的污染率⁽¹⁵⁾，但亦存在植株萎凋的風險。而利用花序培養⁽²⁾，其再生能力亦受花序成熟度⁽⁷⁾、培植體大小⁽⁴⁾和使用部位在培養基中的擺放方向⁽¹²⁾等之影響。

因此，本研究以粗肋草 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 莖段扦插形成的側芽株為材料，建立一個簡單且對培植體傷害小的組織培養技術，以獲得無病原菌的芽體；並誘導形成叢生芽和不定芽，以解決莖段扦插低增殖率問題，建立一個有效率的微體繁殖方法。

材料與方法

一、試驗材料與滅菌處理

本研究係以栽培於行政院農業委員會高雄區農業改良場溫網室之粗肋草 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 為材料。取健康的莖段，扦插於 BVB #7A substrate (BVB Co, De Lier, Netherlands)，莖段上的芽需露出栽培介質表面，並注意栽培期間之管理，確保側芽(lateral bud)免於栽培介質及灌溉水污染。待側芽株(lateral shoots)萌發，逐層剝除植株葉片，使頂芽(apical bud)和側芽(lateral bud)裸露，並以自來水洗淨後，以 0.5% 次氯酸鈉 (NaOCl) (Clorox; Clorox Co, Oakland, CA) 溶液，每 100 ml 並加入 2 滴展著劑 Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)，以超音波振盪 15 分鐘進行表面消毒，再以無菌水沖洗 3 次，每次 3 分鐘。切取帶頂芽或側芽的莖節組織，並去除受滅菌劑傷害的組織，作為培植體。

二、基礎培養基與培養條件

基礎培養基組成以大量鹽類濃度減為 1/3 之 MS 培養基(Murashige and Skoog, 1962)⁽³¹⁾為主，其他添加有機物包括 0.4 mg l⁻¹ Thiamine · HCl、0.5 mg l⁻¹ Pyridoxine · HCl、0.5 mg l⁻¹ Nicotinic acid、2.0 mg l⁻¹ Glycine 及 100 mg l⁻¹ myo-Inositol，另添加 3% sucrose，並以 0.8% agar (Merck) 作為固體凝膠劑，滅菌前 pH 值調至 5.7-5.8，並以 121°C，1.2 kg cm⁻²，滅菌 20 分鐘。培養環境溫度 25 ± 2°C。照光培養採 16 小時光週明期(光強度 50 μmol m⁻²s⁻¹，日光燈管 FL-30 D/29, 40W，東亞，中國電器股份有限公司)，暗期為 8 小時。

三、頂芽及側芽之初代培養

將頂芽和側芽培植體，培養於上述基礎培養基添加不同濃度 6-Benzyladenine (BA, 1.0, 3.0, 5.0 mg l⁻¹) 或 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea (TDZ, 0.1, 0.5, 1.0 mg l⁻¹) 等植物生長調節劑，並以未添加任何生長調節劑的處理為對照，進行初始培養。每處理 3 重複，每重複分別培養 3 個頂芽或 5 個側芽培植體。於培養 8 週後，調查每一培植體形成之芽數和芽長度及誘導產生的不定根數和不定根長度等。

四、微扦插對誘導叢生芽(multiple shoot)及芽體生長之影響

頂芽及側芽培養衍生之植株，切取長度約 5 mm 之莖頂組織(shoot tip cutting)及帶有一個節之莖節組織(single-node stem cutting)，微扦插於添加不同濃度 BA (1.0, 3.0, 5.0 mg l⁻¹) 與 α -Naphthaleneacetic acid (NAA, 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg l⁻¹) 組合之基礎培養基。每處理 3 重複，每重複分別培養 3 個莖頂(shoot apex) 或 5 個莖節(stem node)培植體。培養 8 週後，調查莖頂或莖節培植體誘導之叢生芽數。並於測量每一芽長度後，將其切下，逢機移植至上述 BA 與 NAA 組合之培養基，每處理 3 重複，每重複培養 3 個芽，並分別於培養 4 週及 8 週時調查參試芽體之長度增加量。

五、幼莖切片(stem discs)不定芽之誘導

將衍生植株之基部幼莖，橫切成厚度約 1-2 mm 之莖節切片作為培植體，接種至上述相同培養基，每一處理 3 個重複，每個重複培養 5 個莖節切片培植體。培養 4 週後，調查形成之不定芽(adventitious bud)數目。不定芽係指於隆起的培植體表面，所形成之淡黃色芽原體(bud primordia)。

六、組織切片及電子顯微鏡觀察

利用植物組織切片(石蠟切片)觀察培植體之內部構造，可明瞭不定芽之形成過程及估算不定芽之分化頻度。植物組織切片技術係修改自 Yilun 等人之方法⁽⁴⁰⁾，其步驟如下：癒合組織以 FAA 固定液[5% formalin, 5% acetic acid, 50% ethanol (v/v)]，配合真空抽氣 30 分鐘(5-10 psi)，固定至少 12 小時；接著以 50% 乙醇清洗 3 次，再利用三級丁醇(t-butanol)與乙醇一系列混合液[20, 35, 55, 75, 100% (v/v)]進行組織脫水，分別處理 2h, 2h, 2h, 17h 及隔夜；之後於 55-58°C 烘箱內操作，進行滲蠟(Fisher Scientific Co.)，滲蠟至少隔夜，待 t-butanol 完全揮發，更換一次新蠟；繼續滲蠟 3 天後進行埋蠟；切片厚度 8-10 μ m，並以 xylene-ethanol 系列溶液進行脫蠟；組織切片以 0.5% Safranin O 及 0.5% Fast-green 染色後，以 Merck Entellen 膠封片，並於光學顯微鏡下觀察及照相紀錄。電子顯微鏡觀察時，將帶有不定芽原體之癒合組織以液態氮浸泡，待氣化後，以 Hitachi TM-1000 桌上型電子顯微鏡於 15 kV 加速電壓條件下，

進行觀察及照相紀錄。

七、統計分析

各處理均經過3重複以上試驗,所得數據使用 SAS 軟體(SAS Institute Inc., Cary, NC)進行 GLM 變異數分析($\alpha= 0.05$),並以 LSD (Least significant difference)方法統計其差異性。

結果

一、不同濃度 BA 與 TDZ 對初代培養之芽體及不定根誘導之影響

頂芽和側芽培植體,培養在含 BA 或 TDZ 的培養基,可誘導芽體之增殖(圖 1A),但增殖率並不高。頂芽培植體培養於添加 BA 的培養基,其形成的芽體數均較添加 TDZ 的培養基為高,其中,以含 3.0 mg l^{-1} BA 的處理所形成的芽體最多,為 2.44 個;側芽培植體,其形成的芽數均較頂芽培植體少,雖然添加 1.0 mg l^{-1} TDZ 的培養基具有較多由側芽衍生的芽體(1.33),不過,與其他處理間的差異不大。而在芽體長度方面,仍以頂芽培植體培養於含 3.0 mg l^{-1} BA 的培養基,其平均長度最大,達 0.85 cm;側芽培植體則培養在低濃度的 TDZ 對芽體的生長則有較佳的表現(圖 1B)。但培養在含 TDZ 的培養基誘導產生的芽體,常出現形態不正常,並於培植體表面增生透明顆粒狀的細胞包覆芽體(圖 2A),不利生長。

低濃度的 BA 或 TDZ 較容易誘導頂芽培植體產生不定根,以 0.1 mg l^{-1} TDZ 及 1.0 mg l^{-1} BA 誘導產生的不定根數較多,平均分別產生 0.89 及 0.67 條不定根,且其誘導率幾乎隨 cytokinin 濃度的增加而下降;側芽培植體的不定根誘導率極低,各處理間並無顯著差異,同樣只有 1.0 mg l^{-1} BA 及 0.1 mg l^{-1} TDZ 的處理可產生少數的不定根(圖 1C)。不定根的長度亦有類似的結果, 1.0 mg l^{-1} BA 及 0.1 mg l^{-1} TDZ 誘導產生的不定根長度最長,平均分別為 0.88 及 0.73 cm,長度亦隨 cytokinins 濃度的增加而呈現下降的趨勢(圖 1D)。

二、不同濃度 BA 與 NAA 對莖頂(shoot apex)及莖節(stem node)微扦插及芽體生長之影響

表 1 說明 BA 和 NAA 對微扦插之叢生芽誘導及芽體生長的影響。於 8 週培養期間, $0-1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA 對莖頂培植體誘導的芽體數大致隨濃度上升而減少,但隨 BA 濃度上升而增加,但對莖節培植體則無明顯的相關性。各處理間以只含 $3.0-5.0 \text{ mg l}^{-1}$ BA 的培養基對莖頂及莖節可誘導產生最多之芽體數,分別為 2.44 及 1.60 個。而在芽體生長方面也有相同趨勢,培養基添加 5.0 mg l^{-1} BA 時可提高較多的長度增加量;但在相同的 BA 濃度中,卻隨著添加 NAA 濃度的上升而降低;8 週的芽體最大生長量為 1.72-1.81 cm。

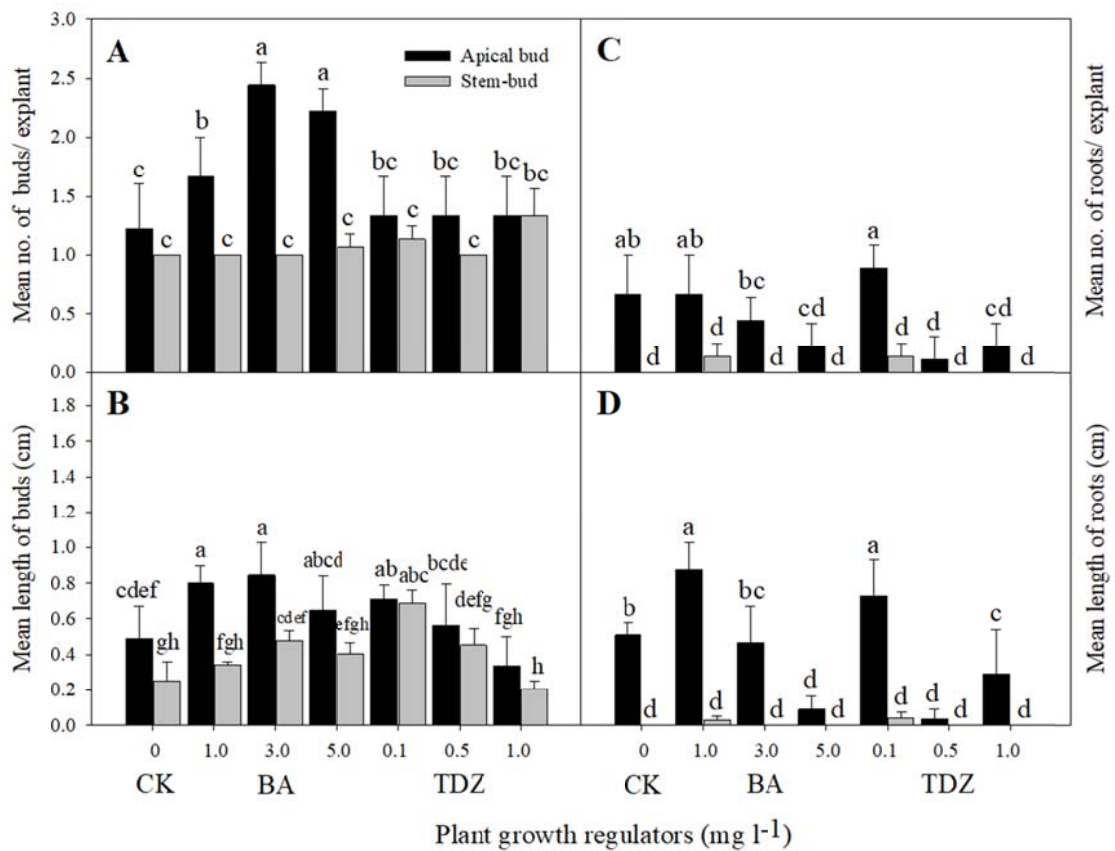


圖 1. 不同濃度 BA 與 TDZ 組合對粗肋草 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 頂芽及側芽培植體之芽體及不定根誘導之影響 (A) 單一培植體增殖的芽數 (B) 平均芽體長度 (C) 單一培植體發育的根數 (D) 不定根長度

Fig. 1. Effect of different concentrations of BA and TDZ on primary bud and adventitious root induction from the initial culture of the apical bud and stem-bud explants of *Aglaonema* 'Lady Valentine'. (A) Number of proliferated buds per explant. (B) Mean length of induced buds. (C) Number of developing adventitious roots per explant. (D) Mean length of adventitious roots

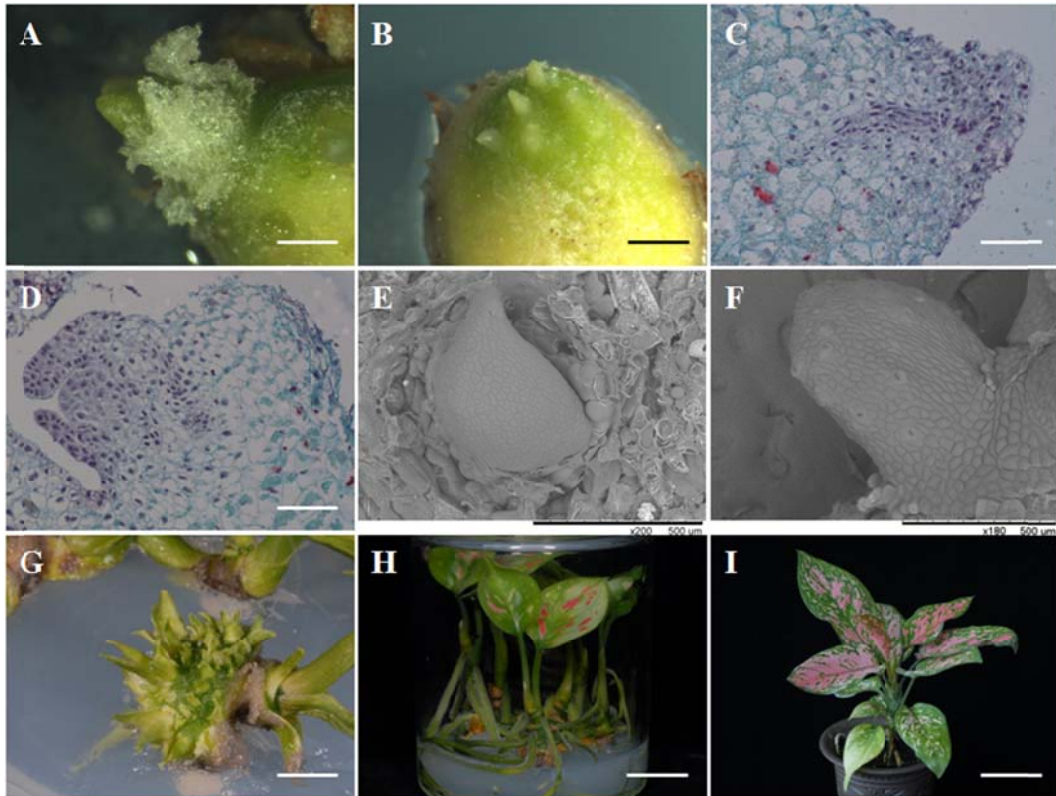


圖 2. 粗肋草 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 芽體培養、不定芽誘導與植株再生之情形 (A) 1/3MS 基礎培養基添加 1.0 mg l^{-1} TDZ 產生透明顆粒狀細胞包覆側芽培植體 (Bar 1.3 mm) (B) 1/3MS 基礎培養基添加 3.0 mg l^{-1} BA 誘導莖節切片培植體產生不定芽原體 (Bar 3.7 mm) (C-D) 組織切片觀察，不定芽原體為由一群分裂能力旺盛之細胞群突起形成 (Bar 0.14 mm) (E-F) SEM 觀察，不定芽原體形成 (G) 不定芽原體以 1/3MS 基礎培養基添加 3.0 mg l^{-1} BA 培養，可萌發形成多數的不定芽 (Bar 7 mm) (H) 不定芽體發育形成植株 (Bar 21 mm) (I) 組織培養產生的植株可正常發育 (Bar 50 mm)

Fig. 2. *In vitro* propagation of *Aglaonema* 'Lady Valentine' via bud and stem section explants culture. (A) Excess transparent granular cells grown on 1/3MS basal medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} TDZ cover the bud. Bar 1.3 mm. (B) Adventitious bud primordia formation after culture in 1/3MS basal medium with 3.0 mg l^{-1} BA. Bar 3.7 mm. (C-D) Histological sections showing cells in differentiation and formation of bud primordia. Bar 0.14 mm. (E-F) SEM images showing the bud primordia emerged from the surface of explants. (G) Numerous adventitious shoots developing into maturity after culture in 1/3MS basal medium with 3.0 mg l^{-1} BA. Bar 7 mm. (H) Shoots developed into plantlets. Bar 21 mm. (I) The plantlet cultivated in greenhouse grows normally. Bar 50 mm

表 1. 不同濃度 BA 與 NAA 組合對粗肋草 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 不定芽誘導及長度增加之影響Table 1. Effect of combinations of BA and NAA on multiple shoots induction and growth from *Aglaonema* 'Lady Valentine' micro cuttings culture

Plant growth regulators (mg l ⁻¹)		Mean no. of shoots		Shoot length increase (cm)	
BA	NAA	Explant		Culture period (weeks)	
		Shoot apex	Stem node	4	8
1	0	2.11 a,b	1.47 a,b	0.45 b,c,d	1.18 d
1	0.1	1.78 a,b	1.33 a,b,c,d	0.53 a,b,c	1.38 b,c
1	0.5	1.67 a,b	1.33 a,b,c,d	0.19 e,f	0.50 g
1	1	1.67 a,b	1.20 b,c,d	0.35 c,d,e	0.86 e
3	0	2.44 a	1.60 a	0.64 a,b	1.72 a
3	0.1	2.34 a,b	1.60 a	0.63 a,b	1.54 b
3	0.5	1.67 a,b	1.11 c,d	0.13 f	0.45 g
3	1	1.56 b	1.40 a,b,c	0.26 d,e,f	0.68 f
5	0	2.33 a,b	1.60 a	0.69 a	1.81 a
5	0.1	2.22 a,b	1.33 a,b,c,d	0.63 a,b	1.72 a
5	0.5	2.11 a,b	1.07 d	0.57 a,b	1.35 c,d
5	1	1.56 b	1.07 d	0.60 a,b	1.42 b,c

Data are given as the mean of three replicates; each replicate consisted of three or five explants. Means followed by the same letter within columns are not significantly different from each other at the 5% level, as determined by least significant difference test

三、不同濃度 BA 與 NAA 對幼莖切片(stem discs)培植體誘導不定芽之影響

幼莖切片培植體培養於添加不同濃度 BA 與 NAA 之培養基，可於培植體表面形成類似癒合組織緻密的綠色隆起組織，並逐漸分化產生淡黃色之不定芽原體(圖 2B)。由組織切片及 SEM 觀察其分化過程組織的變化發現，該組織於培養初期由一群具分裂能力旺盛之細胞群形成類似分生組織(meristemoids)的結構，隨著培養時間的增加，分生組織突起，分化成芽原體(圖 2C-F)。不定芽的形成受外加的植物生長調節劑影響，其中，以單獨添加 3.0 mg l⁻¹ BA 的處理可形成較多的不定芽，平均可達 4.5 個(圖 3)，單一培植體甚至可形成 20 個以上之不定芽體(圖 2G)；而添加 5.0 mg l⁻¹ BA 之處理，不僅誘導的不定芽數較少外，亦容易由培植體的切割處或周圍產生較多透明顆粒狀的分裂細胞團，包覆並阻礙不定芽原體的生長。於各種 BA 濃度組合中添加不同濃度的 NAA，隨 NAA 濃度的增加對芽體發生率具有抑制的趨勢，因而添加 1.0 mg l⁻¹ NAA 的處理均無不定芽之形成(圖 3)。

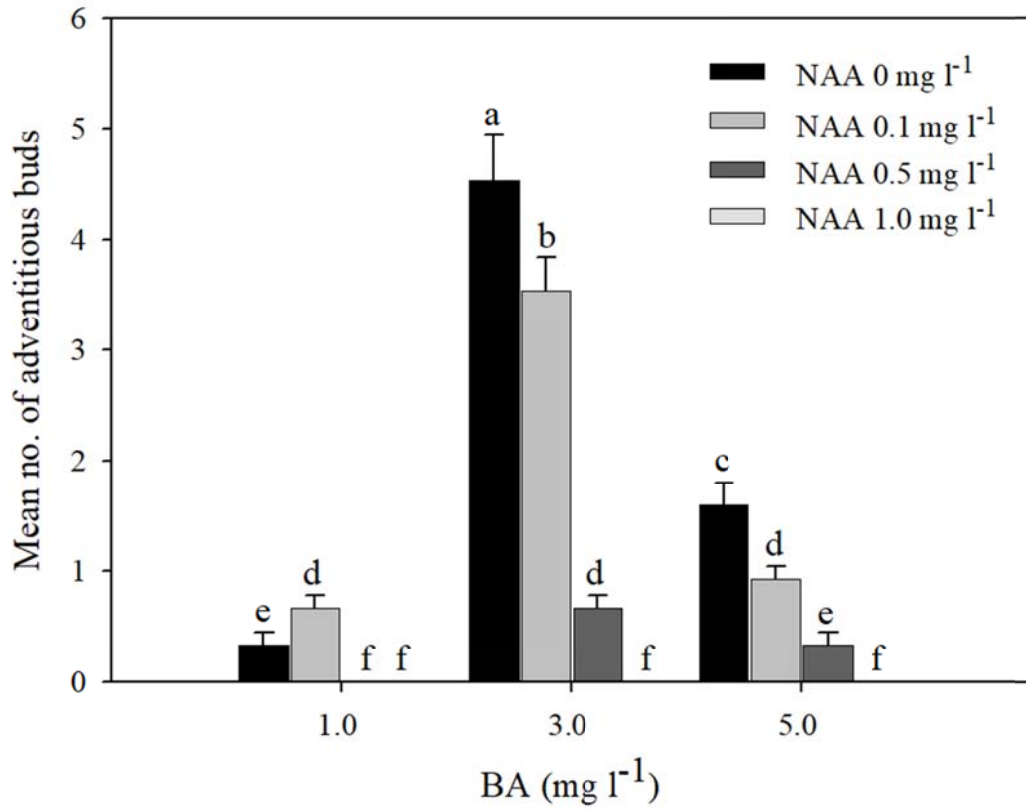


圖 3. 不同濃度 BA 與 NAA 組合對粗肋草 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 莖節切片培植體之不定芽誘導之影響

Fig. 3. Effect of combinations of BA and NAA supplemented to 1/3-strength (1/3) MS basal medium on adventitious bud induction of *Aglaonema* 'Lady Valentine' stem section explants

四、植株形成

獲得的叢生芽或不定芽，在原培養基中培養，可逐漸抽長並形成植株，但芽體初期的生長緩慢，約需 6-7 個月以上，才能成長至適合試管外種植之組培苗大小(圖 2H)。組培苗不需複雜的馴化過程，即可移植至試管外種植，並可正常發育形成成熟的植株(圖 2I)。

討論

內生菌污染問題為限制天南星科植物微體繁殖成功的主要原因之一。目前已知感染粗肋草的內生病原菌有 *Burkholderia gladioli* ⁽³⁾、*Erwinia chrysanthemi* ⁽¹⁰⁾ 及 *Xanthomonas campestris* ⁽¹¹⁾ 等，致使粗肋草組織培養系統未能有效建立。然而本研究發現，以地上部之粗肋草莖節萌發的側芽株中之腋

芽為培植體，即利用「stem cuttings-lateral shoots-lateral buds」之二次芽生長的方式，並避免頂端澆灌(top irrigation)⁽³⁰⁾，即能有效減低病原菌的污染並再生芽體，不需經化學藥劑傷害的處理，大大增加培養的成功率，這也和 Debergh 及 Maene (1981)⁽¹⁶⁾的黛粉葉研究結果相同，認為提供乾淨的環境可得到較健康的母株(explant stock)及確保培養的成功。經由本試驗建立的培養方式而獲得的分蘖側芽，在超過 2 年的增殖和培養過程中，亦均無細菌或真菌等微生物感染發生，顯示此法確實可獲得無病原的健康組培苗。

BA 處理對 *Aglaonema* 'White Tip' 莖頂培植體誘導的芽體數會隨處理濃度上升而增加⁽²⁾，但單獨添加高濃度的 BA 或 TDZ 在 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 之頂芽或側芽培植體之初代培養，芽體增殖率並未明顯增加，且各處理增殖的芽體數少，顯示不同的品種可能產生不同的培養結果。而低濃度的 cytokinin 較易誘導芽體產生不定根，並促進不定根的生長，Tyburski 和 Tretyn (2004)⁽³⁴⁾也認為，內源性 auxin 含量的增加，可促進新根的產生，因此當添加最低濃度的 BA 或 TDZ 時，即能達到較大的 auxin/cytokinin 比例，因而產生較多的不定根。

雖然 TDZ 同樣具有誘導器官形成的效果，但 TDZ 誘導產生的芽體較小，易捲曲，及形成叢生狀和玻璃質化⁽²²⁾，容易導致畸形的形態發生現象，成為 TDZ 使用上的限制⁽⁸⁾，本研究也觀察到上述現象，為捨棄 TDZ 處理之主要原因。而單獨添加 BA 較添加其他 cytokinins 可誘導較多芽體的結果，同樣也發生在 *Aloe arborescens* 的培養上⁽¹³⁾。

不同濃度組合之 BA 與 NAA 對莖頂及莖節培植體微扦插誘導的芽體數，大致隨 BA 濃度上升而增加，但隨 NAA 濃度的增加而下降，Yam 等人(1990)⁽³⁸⁾也認為培養基內添加 auxin 可能會抑制同為天南星科的芋之芽體萌發，間接影響芽體之誘導。然而，在芽體的生長方面卻也存在相同趨勢，長度增加量同樣隨 BA 與 NAA 濃度的上升而增加或減少，推測其原因除了受外加的植物生長調節劑影響外，可能也受內源的 auxin 及 cytokinin 之含量所調控⁽⁹⁾。雖然濃度過高的 cytokinin 會抑制節間的伸長⁽¹⁸⁾，但由添加 5.0 mg l⁻¹ BA 可提高較多的長度增加量來看，cytokinin 並未過量；而高濃度的 auxin 會增加乙烯的產生，因而表現出抑制效果的生理反應⁽²³⁾，由高濃度 NAA 增加較少的芽體長度推測，也許 *Aglaonema* 'Lady Valentine' 的內源性 auxin 的含量較高，致使外加 NAA 即能對芽體的生長呈現過量的反應，因而減緩生長。

黃(2008)⁽²⁾也認為，*Aglaonema* 'White Tip' 之內源 auxin 的含量可能很高，使得花序衍生的癒合組織培養於未添加 auxin 的培養基，可產生較高的芽體萌發率，添加 auxin 反而抵銷 cytokinin 之效應，降低其萌芽率。也許，本研

究單獨添加 BA 較 BA 組合 NAA 可誘導較多不定芽體數之結果，正是此原因所致。

粗肋草芽體培養時，初期生長緩慢，從開始培養到微扞插苗生產約需 6-7 個月時間⁽¹⁾。Litz 和 Conover (1977)⁽²⁷⁾ 也曾指出，部分天南星科植物的生長遲滯期長，增殖速率緩慢，亦可能是限制微體繁殖技術發展的原因之一。而 auxin 和 cytokinin 一起調節細胞分裂⁽²⁸⁾，若內源性 auxin 含量過高，亦可能影響 cytokinin 對有絲分裂的調控，進而影響芽的生長。雖然，GA₃ 可成功促進許多作物之芽體伸長^(26, 33, 36)，但在 GA₃ 存在下所形成的芽體，容易產生白化⁽²⁹⁾，及葉片小、不易發根⁽³²⁾ 等不正常現象。因此，若以 auxin 極性運輸抑制劑 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA)，或是競爭 auxin receptors 的 anti-auxin 化合物 *p*-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB) 處理，以減少內源性 auxin 的含量或是干擾它的作用，提高 cytokinin/auxin 的比例，或許能增加芽體誘導及促進生長的效果。

參考文獻

1. 陳葦玲. 2006. 粗肋草之瓶內芽體增殖及其出瓶後生理. 臺灣大學園藝學研究所學位論文.
2. 黃筱煒. 2008. 粗肋草花序培養、不定芽再生繁殖及瓶內馴化. 臺灣大學園藝學研究所學位論文.
3. Alippi, A. M. and A. C. López. 2009. First report of leaf spot of *Dieffenbachia picta* and *Aglaonema commutatum* caused by *Burkholderia gladioli* in Argentina. *Plant Dis.* 93:550.
4. Beck, M. J. and N. D. Camper. 1991. Shoot regeneration from petunia leaf discs as a function of explant size, configuration and benzyladenine exposure. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26:101-106.
5. Brown, B. F. 2001. The amazing *Aglaonema*, Houseplant to the world. Valkaria Tropical Gardens, Valkaria, FL.
6. Brunner, I., A. Echegaray, and A. Rubluo. 1995. Isolation and characterization of bacterial contaminants from *Dieffenbachia amoena* Bull, *Anthurium andreanum* Linden and *Spathiphyllum* sp. Schott cultured *in vitro*. *Sci. Hortic.* 62:103-111.
7. Caswell, K. L., N. L. Leung, and R. N. Chibbar. 2000. An efficient method for *in vitro* regeneration from immature inflorescence explants of Canadian wheat cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60:69-73.

8. Chang, H. S., D. Chakrabarty, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39:129-134.
9. Charrière, F., B. Sotta, É. Miginiac, and G. Hahne. 1999. Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiol. Biochem.* 37:751-757.
10. Chao, Y. C., C. T. Feng, and W. C. Ho. 2006. First report of *Aglaonema* bacterial blight caused by *Erwinia chrysanthemi* in Taiwan. *Plant Dis.* 90:1358.
11. Chase, A. R., R. E. Stall, N. C. Hodge, and J. B. Jones. 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological, and fatty acid analyses. *Phytopathology* 82:754-759.
12. Chen, J. and M. Ziv. 2005. The effects of storage condition on starch metabolism and regeneration potentials of twin-scales and inflorescences stem explants of *Narcissus tazetta*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:816-821.
13. Chen, J., P. S. Devanand, D. J. Norman, R. J. Henny, and C. C. T. Chao. 2004. Genetic relationships of *Aglaonema* species and cultivars inferred from AFLP markers. *Ann. Bot.* 93:157-166.
14. Chen, J., R. J. Henny, and D. B. McConnell. 2002. Development of new foliage plant cultivars. In: Janick, J. and A. Whipkey, eds. *Trends in new crops and new uses*. Timber Press, Inc., Portland, OR. pp 466-472.
15. Chen, W. L. and D. M. Yeh. 2007. Elimination of *in vitro* contamination, shoot multiplication, and *ex vitro* rooting of *Aglaonema*. *HortScience* 42:629-632.
16. Debergh, P. C. and L. J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hortic.* 14:335-345.
17. Fisse, J. A. and J. Pera. 1987. Endogenous bacteria elimination in ornamental explant. *Acta Hort.* 236:88-93.
18. Gurriarán, M. J., M. A. Revilla, and R. S. Tamés. 1999. Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupinus* L. (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget. *Plant Cell Rep.* 18:1007-1011.

19. Henny, R. J. 1986. Single locus, multiallelic inheritance of foliar variegation in *Aglaonema*. J. Hered. 77:214-215.
20. Henny, R. J. 1989. Development, testing and release of new ornamental aroid cultivars. Acta Hort. 252:71-76.
21. Henny, R. J. 1992. Inheritance of the foliar variegation pattern from *Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth 'Ernesto's Favorite'. HortScience 27:274.
22. Huetteman, A. C. and J. E. Preece. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33:105-119.
23. Kieber, J. 2006. Ethylene. In: Taiz, L. and E. Zeiger, eds. Plant physiology, 4th edition. Sinauer Associates, Sunderland, pp 571-591.
24. Kritzinger, E. M., R. J. Vuuren, B. Woodward, I. H. Rong, M. H. Spreeth, and M. M. Slabbert. 1997. Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics. Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation 161-167.
25. Kunisaki, J. T. 1980. *In vitro* propagation of *Anthurium andreaeanum* Lind. HortScience 15:508-509.
26. Little, C. H. A. and J. E. Macdonald. 2003. Effects of exogenous gibberellin and auxin on shoot elongation and vegetative bud development in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Picea glauca*. Tree Physiol. 23:73-83.
27. Litz, R. E. and R. A. Conover. 1977. Tissue culture propagation of some foliage plant. Proc. Fla. State Hort. Soc. 90:301-303.
28. Machakova, I., E. Zazimalova, and E. F. George. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: George, E. F., M. A. Hall, and G. -J. De Klerk (eds) Plant propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht, pp. 175-204.
29. Moshkov, I. E., G. V. Novikova, M. A. Hall, and E. F. George. 2008. Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds. In: George, E. F., M. A. Hall, and G. -J. De Klerk (eds) Plant propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht, pp. 227-281.
30. Moutia, M. and A. Dookun. 1999. Evaluation of surface sterilization and hot water treatments on bacterial contaminants in bud culture of sugarcane. Expl. Agric. 35:265-274.

31. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
32. Reuveni, O., D.R. Shlesinger, and U. Lavi. 1990. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20:41-46.
33. Rood, S. B., R. Mandel, and R. P. Pharis. 1989. Endogenous gibberellins and shoot growth and development in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 89:269-273.
34. Tyburski, J. and A. Tretyn. 2004. The role of light and polar auxin transport in root regeneration from hypocotyls of tomato seedling cuttings. *Plant Growth Reg.* 42:39-48.
35. Velcheva, M., Z. Faltin, A. Vardi, Y. Eshdat, and A. Perl. 2005. Regeneration of *Aloe arborescens* via somatic organogenesis from young inflorescences. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 83:293-301.
36. Voesenek, L. A. C. J., J. H. G. M. Rijnders, A. J. M. Peeters, H. M. van de Steeg, and H. de Kroon. 2004. Plant hormones regulate fast shoot elongation under water: from genes to communities. *Ecology* 85:16-27.
37. Wannakrairoj, S. and P. Linla. 2008. Inheritance of petiole colors in *Aglaonema*. *Acta Hort.* 788:103-106.
38. Yam, T. W., E. L. Webb, and J. Arditti. 1990. Callus formation and plantlet development from axillary buds of taro. *Planta* 180:458-460.
39. Yeh, D. M., W. J. Yang, F. C. Chang, M. C. Chung, W. L. Chen, and H. W. Huang. 2007. Breeding and micropropagation of *Aglaonema*. *Acta Hort.* 755:93-98.
40. Yilun, M., V. K. Sawhney, and T. A. Steeves. 1993. Staining of paraffin embedded plant material in safranin and fast green without prior removal of the paraffin. *Can. J. Bot.* 71:996-999.
41. Zenkteler, E., K. Wlodarczak, and M. Klosowska. 1997. The application of antibiotics and sulphonamide for eliminating *Bacillus cereus* during the micropropagation of infected *Dieffenbachia picta* Schott. In: Casselts, A. C., ed. *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*. Springer, New York, pp 183-191.