薬培養によって得られたタバコの種類と 半数体の染色体数倍加処理について

田 中 正 雄・中 田 和 男

日本専売公社秦野たばこ試験場

Received August 23, 1968

TOBACCO PLANTS OBTAINED BY ANTHER CULTURE AND THE EXPERIMENT TO GET DIPLOID SEEDS FROM HAPLOIDS

MASAO TANAKA AND KAZUO NAKATA

Hatano Tobacco Experiment Station, Hatano, Kanagawa-ken 257

ABSTRACT

In connection with the experiment previously reported (Nakata and Tanaka 1968), chromosome numbers of 53 adult tobacco plants developed from 3 cultured anthers were studied. Of these 49 were haploid, 3 were diploid, but chromosome constitution of one deformed plant could not be determined. The former two groups were thought to have been derived from developing pollen grains, while the latter one from callus. The young plants grown from calli had deformed leaves and majority of them did not survive so long beyond the incubation period. The haploid tobacco plants were easily distinguished from diploids by their narrower leaves, smaller stomata, shorter stamens, more slender anthers and completely abortive pollen grains. The low frequency of chromosome pairing and other meiotic behaviors of chromosomes were quite similar to those reported by Takenaka and Tanaka (1956).

In a preliminary experiment to obtain homozygous lines of tobacco, 0.4% colchicine in lanoline was smeared on several upper leaf axils of 34 haploid plants immediately after topping. Formation of abundant filled pollen due to chromosome doubling was found for the most part in the anthers of restricted flowers of the axillary cyme, that is, in the terminal flower or in several neighboring flowers on the lateral shoot. Such an appearance might have been brought about by chromosome doubling in restricted cells at the apical part of the primordia. After repeated cutting-back of the shoots and colchicine treatment, diploid seeds were obtained from more than 2/3 of the treated plants. The seedlings grown from diploid seeds were quite uniform with regard to their appearance and growth.

著者らは前報 (Nakata and Tanaka 1968) において、四分子期のタバコの花粉を薬培養すると、培養中に裂開した葯の内部から多数の芽が現われることを報告した。本論文はそれらの芽から得られた成体について形態学的、細胞学的特性を調査し、また半数体の葉腋にコルヒチン进行处理して側枝の花から2倍性種子を得る実験を試み、半数体の育種利用の可能性を検討したものである。

材料および方法

前報 (Nakata and Tanaka 1968) で述べたように、改良 RM-1964 培養基上で葯の内部に出現した芽には根がなかったので、葯のまま約 1 か月間改良ホワイティ氏培養基に移して発根させ、4~5 葉が展開した 9 月 6 日に個々の幼植物に分離し、土壌を満たした素焼鉢に仮植した。これらの幼植物はまずビニールで蔽って室温 25°C、3,500~4,000 ルックスの人工光線下で育て、葉数が 9~10 枚に達した 10 月 20 日に、室温約 25°C の調節温室に移し、天然光線のもとで育てた。植物が開花しはじめた 1 月下旬ごろから、成体について外部形態、気孔の大きさ、花粉稔性、染色体数などの特性を調べた。

気孔の大きさは代表的個体の中位葉の相対応する位置から裏面の表皮を剥ぎとって検鏡し、花粉稔性は裂開した葯の花粉を、酢酸カーミンで染色し、染色度によって内容の充実度を類別した。また成熟第 1 分裂中期における染色体の対合状態および染色体数は、酢酸オルセインを用いたなすりつけ法によって調べた。タバコの成熟分裂は開花のほぼ 8 日前、蕾の中で花筒が急激に伸長しはじめる直前に起るから、花筒の発育状況を観察することによって容易に、またかなりの確にその時期を知ることができる。

半数体から 2 倍性の種子を得る実験では、タバコを心止したのちコルヒチンの 0.4% 水溶液をラノリンに含ませて上位数箇所の葉腋に 1 回だけ塗布した。後述するように、裂開した半数体の葯は内容の空虚な花粉を痕跡程度つけるにすぎないが、倍加した花の葯は内容の充実した淡黄色の花粉を多量につけるから、倍加に成功したかどうか容易に判定することができる。1 回の処理で倍加した花が得られなかった場合は、側枝について再三切り込みとコルヒチン処理を繰り返した。

実験結果

(1) 葯培養によって得られたタバコ植物

培養基上で発生した幼植物には、葉が卵円形で明りょうな中肋、支脈を備え、表裏の別が明らかで、実生の幼植物と同様な外観を呈するものと、葉が細長くねじれ、また先端が扇状に拡がった畸型植物とがある。この畸型

Fig. 1. Young plants grown from callus showing slender, deformed leaves.

(c) Callus developing on the surface of the leaf. Figures were drawn after 200 days incubation period ($\times 1$).

植物は基部がカルスに固着し、生育が遅く、葉の縁辺が濃緑色、中間部は淡緑色を呈し、半透明なものが多い (Fig. 1)。またまれには葉の一部が再びカルス化するものもあった。普通の葉を備えた幼植物は仮植の際に相互に分離しやすく、移植後の生育が順調であった。しかし畸型葉を備えた植物はカルスからの分離が困難で、生育が弱く、大多数は培養中に、また仮植後まもなく枯死した。したがって 10 月下旬、調節温室の天然光線のもとに移したときは、ほとんど正常な形態のものばかりになっていた。これらの植物はその後枯死することなく順調に生育し、早いものは 1 月下旬に発蕾期を迎えた。タバコが開花しはじめたとき、3 個の葯から得られた合計 53 株について染色体数を調査したところ、49 株が半数体、3 株が 2 倍体であった。

残りの 1 株は矮性の畸型植物で、染色体数の調査はできなかった (Table 1)。

半数体は実生の 2 倍体に比べると葉数が少なく、早生でわき芽を叢生し、葉が細長く、気孔が小さかった。また花筒が細く、裂片が狭く、先端尖り、おしべはめしべよりも約 15% 短かく、多数の花をつけるが完全に不稔であった (Figs. 2, 3)。Table 2 に示すように、実生および培養葯から生じた 2 倍体では花粉の 95% 以上が充実し、半数体では 99% 以上が空虚であった。半数体の成熟第 1 分裂では花粉母細胞の約 65% に染色体の対合がみられず、24 個の 1 価染色体が観察されたが (Table 3, Fig. 4)、染色体が相互にはなはだしく接近し、基質で接合したと思われるものも若干見られた。しかしこれらの染色体も大多数は核板を作って紡錘糸の方向に並ばず、不規則に配列した。中期以後における染色体の行動は、他の植物の半数体に一般にみられると同様、不規則で機会的に両極に移動した。

Table 1. Chromosome constitution of the tobacco plants obtained by anther culture

Exp. no. of anther	Haploid	Diploid	Deformed plant	Total
1	12	—	1	13
2	23	1	—	24
3	14	2	—	16
Total	49	3	1	53
%	92.5	5.7	1.8	100

Table 2. Pollen fertility of diploid and haploid tobacco plants

Source (Plant No.)	Empty	Partly filled	Filled	Total pollen grains
Diploid { Seed-grown tobacco	1.77%	0.39%	97.84%	2489
No. 28	3.47	1.00	95.53	1900
Haploid No. 23	99.77	0.23	0.00	6095

Table 3. Frequency of bivalent chromosomes in the pollen mother cells of a haploid tobacco plant

	No. of bivalents					Total
	0	1	2	3	4	
No. of PMC	68	22	8	5	2	105
%	64.8	20.9	7.6	4.8	1.9	

培養薬から発生した2倍体は半数体に比べると下～中位葉が丸く、とくに基部の葉幅が広く、腺毛が多く、花がやや大きく、雌、雄ずいがほぼ等長であった。また花粉の95%以上が充実し、自然に着蒴した。成熟第1分裂の中期では24個の2価染色体が観察され、染色体の行動には異常がなかった。

矮性の畸型株は幼茎の基部がカルスから離れなかったため、カルスの一部が附着したまま鉢に移植した。この個体は発育が遅く、移植後80日を経過し、他の半数体が大半開花したところになっても、草丈2cm内外にすぎず、しだいに生育が弱まった。移植後100日を経てようやく1個の蕾が現われ、花筒が伸長しはじめたが、開花に到らないうちに花筒が基部から枯れはじめ、そのあとに単為結実による蒴をつけた (Fig. 5)。この蒴はもちろん無種子であった。この植物の気孔は半数体よりさらに小さかったから、細胞学的調査に成功しておれば、興味ある結果が得られたかもしれない。Table 4は半数体、2倍体および畸型株の気孔の長さを実生株のそれと比較した結果である。

Table 4. Comparison of stomatal length among diploid, haploid and deformed plants

Source [Plant No.]	Length of stomata (μ)									Total	Average length of stomata
	14.3	17.9	21.4	25.0	28.6	32.1	35.7	39.3	42.8		
Diploid { Seed-grown tobacco					7	8	26	38	4	83	36.7±3.7
No. 28				3	4	7	35	23	5	77	36.1±3.9
Haploid No. 23		1	17	26	21	9	1	1		76	26.2±4.0
Deformed plant No. 9'	21	48	29	4						102	18.4±2.8

- Fig. 2. A haploid tobacco plant derived from cultured anther ($\times 1/7$).
- Fig. 3. Flower shape of haploid (left) and diploid (right) tobacco ($\times 1$).
- Fig. 4. Meiotic cells of haploid tobacco showing 24 univalent chromosomes ($\times 360$).
- Fig. 5. A dwarf, deformed plant with a parthenocarpic capsule ($\times 1$).
- Fig. 6. A part of the axillary cyme showing haploid flowers and two capsules developed from doubled flowers ($\times 4/5$).
- Fig. 7. A part of the flower which appeared after the colchicine treatment, showing two long stamens with abundant filled pollen (diploid) and three short ones with aborted pollen (haploid) ($\times 3/2$).

(2) 半数体のコルヒチン処理

心止した半数体の葉腋にコルヒチンを処理した場合、薬剤の効果が十分ならば、すべての花を含む側枝全体の組織の染色体数が倍加し、おしべは充実した多量の花粉をつけるはずである。しかし今回の実験ではこのような例が少なく、多くは側枝の頂花またはその周囲の数花だけ倍加し、その後に関く花は半数性を示した例が多かった。すなわち倍加した花が得られた 24 株の中、側枝上の花が全部倍加した例は 2 例にすぎず、頂花周辺の花が 13 例、頂花だけの場合が 9 例で、花枝の末端部に倍加した花が出現した例はみられなかった。また個々の花についてみると、側枝全部の花が倍加した場合は 5 本のおしべが全部倍加したが、その他では 1~4 本のおしべだけ、また 1 個の葯の一部分だけ倍加し、時には畸型化した葯またはおしべが花筒に附着した例も少なくなかった。Fig. 7 は一花中 2 本のおしべだけが倍加した例で、倍加したおしべは 2 倍体のおしべと同様に長くなり、多量の花粉をつけるが、倍加しなかった 3 本は短かく、花粉の量が痕跡的であるなど、半数性の特徴を備えている。おしべが 1 本でも倍加した花は、自殖させると容易に着蒴し、数は少なかったが、倍加したおしべの存在する側の胎座上に種子を生じた。このような現象は倍加した組織が、側枝中にキメラ状に存在するために起るのであろう。

現在供試した 34 株中 24 株 (約 70%) の花を倍加させることに成功している。最終的には 80% くらいの倍加が可能であろう。倍加して得た種子を苗床に蒔いて次代を観察したが、異常株は出現せず、苗の形態および生育はきわめて均一であった。

論 議

(1) 薬培養によって出現する植物

薬培養によって出現した芽には发育中の花粉から発生したものと、幼胚の基部に起源をもつカルスから二次的に生じたものの 2 種がある (Nakata and Tanaka 1968)。この両者は培養中胚状体が発生しはじめた時期には組織学的に識別できるが、葉が展開したのちは識別困難になる。さきに述べたように、葯から発生した幼植物を土壌に移植する際、たがいに離れやすいものと、幼植物の基部がカルスに固着し、分離困難なものがあった。おそらく前者は四分子期の花粉に由来し、後者の大多数はカルスの分裂組織から不定胚として発生した (Nakata and Tanaka 1968) ものと思われる。半数体はすべて正常な葉型を備え、離れやすかったから、花粉に由来したものであろう。なお胚状体発達過程の花粉が培養中に分裂して数個の胚状体を形成する現象はまだ観察されていないので、おのおのの半数体は 1 個ずつの花粉に由来したものと推定される。半数体の形態、花粉粘性、染色体の対合状態、行動などは Takenaka and Tanaka (1956) によって報告されたものと同様であった。培養中に発生した 2 倍体は、四分子期直後の花粉が核分裂を開始する際、復旧核の形成 (restitution) によって 2 倍性となり、その後正常な細胞分裂が続けられたために生じたと考えられるが、葯組織等の他の起源も考えられる。

植物の栄養体の一部から次代の植物が分化した例として、*Asparagus* (Wilmar and Hellendoorn 1968)、*Cichorium* (Vasil and Hildebrandt 1966 a), *Daucus* (Steward *et al.* 1958, 1964; Mitra *et al.* 1960; Halperin 1964; Halperin and Wetherell 1964), *Nicotiana* (Skoog 1944; Skoog and Tsui 1948; Sterling 1951; Vasil and Hildebrandt 1965 a, b; Nishiyama and Taira 1966; Tabata *et al.* 1968), *Oryza* (Maeda 1968), *Petroselinum* (Vasil and Hildebrandt 1966 b), *Ranunculus* (Konar and Nataraja 1965) などが知られている。これらの例では栄養体の組織からまずカルスが発生し、カルスの細胞から胚状体および幼植物が分化した。栄養体から発生したカルス細胞の染色体数は、*Crepis* の葉 (Reinert and Küster 1966) や *Medicago* の苗 (Clements 1964) に由来するカルスのように $2n$ で揃っている場合もあったが、*Daucus* の根 (Mitra *et al.* 1960), *Nicotiana* のずい (Shamina *et al.* 1966; Nishiyama and Taira 1966, Murashige and Nakano 1967; Shimada and Tabata 1967), *Pisum* の根 (Torrey 1959, 1967), *Picea* の腫瘍組織 (DeTorok and White 1966) などに由来するカルスでは、 $2n$ 、時には n から $8n$ 、またはそれ以上まで、植物の種類によってさまざまな染色体数の細胞があらわれ、異数性も多数観察された。またカルス細胞の染色体数は継代培養中に変化し、 $2n$ が減少して異数性の細胞が増加する (Murashige and Nakano 1967)。栄養体の組織から発生したカルスに倍数性の細胞が多数出現する理由の一つは培養基に含まれる酵母抽出液、カイネチン等の物質 (Torrey 1959, 1961) の影響により、他は培養に用いられた組織中に種々の染色体数の細胞が混在すること、すなわち体細胞倍数性 (polysomatism) (d'Amato 1952; Partanen 1959, 1963, 1965) によると考えられる。一方カルス細胞から発生し

た植物 (restored plant) の染色体数は *Asparagus* では $2n$ と少数の $4n$ (Wilmar and Hellendoorn 1968), *Nicotiana* では $2n$, $4n$, $2n+1$ および $4n+1$ (Nishiyama and Taira 1966; Murashige and Nakano 1966; Tabata *et al.* 1968) であった. カルス細胞に比べるとカルスから得られた植物の染色体数が少ない側に片寄り, また異数体の出現率も低いのは, 倍数性の高い細胞ほど分化全能性 (totipotency) が弱く, また異数性の細胞はゲノムが完全でないために個体にまで生長しにくい (Murashige and Nakano 1967; Torrey 1967) からであろう.

生殖細胞から次代の植物が得られた例として *Datura* (Guha and Maheshwari 1966) および *Oryza* (Niizeki and Oono 1968) の成熟期の花粉, *Nicotiana* (Nakata and Tanaka 1968) の四分子期の花粉があげられる. *Oryza* では培養中によく発達した半数性のカルスが現われ, これから半数性の芽が分化した, *Datura* でも花粉からカルスに類似した不定形の細胞集塊が現われ, それから半数性の胚状体が形成された. 成熟花粉は系統発生的には退化した前葉体に相当し, 分化した構造体である. したがって栄養体組織を培養する場合と同様, 胚状体が発生するためには細胞が脱分化しなければならない. そのために多くの場合カルスを経由するのであろう.

Nicotiana について著者らが行った実験では, 胚状体から二次的に発生したと推定されるカルスからも, 四分子期の花粉からも胚状体を得られたが, 基部がカルスに固着し, カルスから発生したと推定された幼植物はほとんど畸型で, その大多数は培養期間中に, また土壤に移植した直後に枯死し, わずか 1 株だけ開花期を過ぎても生存したにすぎなかった, これに反し, 四分子期の花粉から発生したと思われる分離容易な植物は順調に發育を続け, 開花期を迎えた. 四分子期および 1 核期の花粉は, シダ等の植物の無性胞子に相当する未分化の細胞であるから, 半数性のまま直接胚状体に分化する可能性が考えられる.

カルスを長期間培養すると異数性の細胞が増加する (Murashige and Nakano 1967). したがって栄養体組織や成熟花粉など, カルスを経由して胚状体を得られる場合は, 未熟花粉から直接これが分化する場合に比べ, 胚状体出現の能率がわるいと考えられる. 著者らの行った実験で 3 個の葯から 50 株に近い半数体がかなり能率よく得られたのは, 以上の理由によるのであろう.

(2) 半数体のコルヒチン処理

葯培養の成功によって半数体利用による育種が実用化できるかどうか知る目的で, 半数体の染色体数倍加がどの程度可能であるかを検討した. 染色体数倍加方法として心止後の葉腋にコルヒチンを処理して 2 倍性種子を得る方法を用いた. この処理法は葉害によって欠損株が生じる心配がなく, 一株について数箇所ずつ処理することができ, また側枝の倍加が 1 回目の処理によって失敗しても, 数回にわたって刈り込みを行ない, 薬剤処理を繰り返すことができる点で, 幼苗処理に比し, はるかにすぐれている. しかし今回の実験では, 側枝上の全部の花が倍加した例が少なく, 花枝の頂花を中心とした 1~数花だけが倍加し, その後に開く花は半数性のままの場合が多かった. コルヒチンを処理しなかった半数体では 2 倍性の花はまったく現われなかった. したがってこの現象は 2 倍性の細胞が最初からキメラ状に存在していたことによるのではないと思われる. おそらく葉腋の生長点が腺毛を密生した数枚の嫩葉で蔽われているため, 薬液が生長点まで浸透しにくく, その頂端に近い一部の細胞だけが倍加しやすいこと, およびタバコは集散 (有限) 花序をつける関係で, 生長点の頂端部の細胞は頂花またはその周辺の花に分化するために起るのであろう. タバコのように有限花序をつける植物の葉腋処理では, 倍加した花が以上のような形で出現しやすいと考えられる.

現在までに処理の対象に用いた 34 株の 2/3 以上から 2 倍性種子を得ることができた. したがっていま一步, 処理法に関する研究を押し進めると, 半数体利用による育種が実用化できると考えられる.

摘

要

1. 前報において, タバコの葯を組織培養すると, カルスおよび四分子期の花粉から芽が分化することを報告した. カルスから発生した芽はたいい細長い半透明の葉を備えた矮性の畸型植物で, 大多数は移植前後に枯死した. 四分子期の花粉から発生したと推定される芽は順調に發育して開花期に達した.
2. 3 個の葯から発生した成体 53 株について染色体数を調査した結果, 49 株が半数体, 3 株が 2 倍体であった. 残りの 1 株はカルスから発生したと思われる矮性の畸型植物で, 染色体数の調査はできなかった.
3. 半数体のタバコに心止を行ない, 葉腋にコルヒチンを処理したところ, 染色体数の倍加した花はたいい側枝の頂花または頂花とその周辺の数花に現われ, その後に咲く花は半数性を示した. 供試した 34 株中の 24 株

から2倍性種子が得られた。

引用文献

- d'Amato, F., 1952 Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. *Caryologia* **4**: 311-358.
- Clements, W. M., 1964 Stability of chromosome numbers in tissue cultures of alfalfa *Medicago sativa*. *Am. J. Botany* **51**: 670.
- DeTorok, D., and P. R. White, 1960 Cytological instability in tumors of *Picea glauca*. *Science* **131**: 730-732.
- Guha, S., and S. C. Maheshwari, 1966 Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* **212**: 97-98.
- Halperin, W., 1964 Morphogenetic studies with partially synchronized cultures of carrot embryos. *Science* **146**: 408-410.
- Halperin, W., and D. F. Wetherell, 1964 Adventitive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *Am. J. Botany* **51**: 274-283.
- Konar, R. N., 1965 Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from the stem epidermis. *Phytomorphology* **15**: 132-137.
- Maeda, E., 1968 Subculture and organ formation in the callus derived from rice embryos in vitro. (in Japanese). *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* **37**: 51-58.
- Mitra, J., M. O. Mapes, and F. C. Steward, 1960 Growth and organized development of cultured cells, IV. The behavior of the nucleus. *Am. J. Botany* **47**: 357-368.
- Murashige, T., and R. Nakano, 1966 Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *J. Heredity* **57**: 115-118.
- Murashige, T., and R. Nakano, 1967 Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Am. J. Botany* **54**: 963-970.
- Nakata, K., and M. Tanaka, 1968 Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco. (in Japanese). *Japan. J. Genetics* **43**: 65-71.
- Niizeki, H., and K. Oono, 1968 Induction of haploid plant by anther culture in rice. (in Japanese). *Nogyogijutsu* **23**: 327-328.
- Nishiyama, I., and T. Taira, 1966 The effect of kinetin and indoleacetic acid on callus growth and organ formation in two species of *Nicotiana*. *Japan. J. Genetics* **41**: 357-366.
- Partanen, C. R., 1959 Quantitative chromosomal changes and differentiation in plants, p. 21-35. *In* D. Rudnick [ed.], *Developmental cytology*. Ronald Press, New York.
- Partanen, C. R., 1963 Plant tissue culture in relation to developmental cytology. *Intern. Rev. Cytol.* **15**: 215-243.
- Partanen, C. R., 1965 On the chromosomal basis for cellular differentiation. *Am. J. Botany* **52**: 204-209.
- Reinert, J. and H. J. Küster, 1966 Diploide, chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Wallr. *Z. Pflanzenphysiol.* **54**: 213-222.
- Shamina, Z. B., R. G. Butenko, and V. A. Tarasov, 1966 Tsitologicheskoe izuchenie kul'tury tkani tabaka. *Genetika* **1**: 70-76.
- Shimada, T., and M. Tabata, 1967 Chromosome numbers in cultured pith tissue of tobacco. *Japan. J. Genetics* **42**: 195-201.
- Skoog, F., 1944 Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Am. J. Botany* **31**: 19-24.
- Skoog, F., and C. Tsui, 1948 Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *Am. J. Botany* **35**: 782-786.
- Sterling, C., 1951 Origin of buds in tobacco segments cultured *in vitro*. *Am. J. Botany* **38**: 761-767.

- Steward, F. C., M. O. Mapes, and K. Mears, 1958 Growth and organized development of cultured cells, II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Botany* **45**: 705-708.
- Steward, F. C., M. O. Mapes, A. E. Kent, and R. D. Holsten, 1964 Growth and development of cultured plant cells. *Science* **143**: 20-26.
- Tabata, M., H. Yamamoto, and N. Hiraoka, 1968 Chromosome constitution and nicotine formation of mature plants derived from cultured pith of tobacco. *Japan. J. Genetics* **43**: 319-322.
- Takenaka, Y., and M. Tanaka, 1956 Cytogenetic studies in *Nicotiana*, XIII. Haploid plant of *Nicotiana tabacum*. (in Japanese). *Bot. Mag., Tokyo* **69**: 193-198.
- Torrey, J. G., 1959 Experimental modification of development in the root, p. 189-222. *In* D. Rudnick [ed.], *Cell, organism and milieu*. Ronald Press, New York.
- Torrey, J. G., 1961 Kinetin as trigger for mitosis in mature endomitotic plant cells. *Exptl. Cell Res.* **23**: 281-299.
- Torrey, J. G., 1967 Morphogenesis in relation to chromosome constitution in long-term plant tissue cultures. *Physiol. Plant.* **20**: 265-275.
- Tulecke, W., 1959 The pollen cultures of C. D. LaRue: A tissue from the pollen of *Taxus*. *Bull. Torrey Botan. Club* **86**: 283-289.
- Vasil, I. K., and A. C. Hildebrandt, 1965a Growth and tissue formation from single isolated tobacco cells in microculture. *Science* **147**: 1454-1455.
- Vasil, I. K., and A. C. Hildebrandt, 1965b Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microculture. *Science* **150**: 889-892.
- Vasil, I. K., and A. C. Hildebrandt, 1966a Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures, I. *Cichorium endivia*. *Am. J. Botany* **53**: 860-869.
- Vasil, I. K., and A. C. Hildebrandt, 1966b Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures, II. *Petroselinum hortense*. *Am. J. Botany* **53**: 869-874.
- Wilmar, C., and M. Hellendoorn, 1968 Growth and morphogenesis of *Asparagus* cells cultured *in vitro*. *Nature* **217**: 369-370.