アスパラガスの形態形成に関する研究(第2報)

カルス形成および器官分化におよぼす auxin および
6-benzyladenine の影響

八鍬利郎・原田 隆・嵯峨紘一*・志賀義彦**
(北海道大学農学部)

Studies on the morphogenesis of asparagus

II. Effect of auxins and 6-benzyladenine on callus and organ formation of stem pieces cultured *in vitro*

Toshiro YAKUWA, Takashi HARADA, Koichi SAGA, and Yoshihiko SHIGA
Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido

Summary

Stem pieces 1.0 cm long from the internode of the 1st stem of asparagus seedlings were cultured aseptically on MURASHIGE and SKOOG medium to which auxin (NAA or 2,4-D) and 6-benzyladenine (BA) were added. The cultures were kept in the culture room at 25°C, either in complete darkness or under artificial illumination (40-watt daylight fluorescent Hitachi lamp, 4,000 lux) for 16 hours out of 24 hours. The experimental results are summarized as follows:

1. Good callus growth was obtained on a medium containing both NAA and BA or NAA alone. The optimum concentration of NAA for callus growth shifted, depending upon the presence or absence of BA in the medium. Namely, in the case of absence of BA, callus growth was best at 0.1 mg/l of NAA; but when concentrations of BA were 0.1, 1.0 and 10.0 mg/l, the best callus growth was observed at 1.0 mg/l NAA.

2. In media containing 0 or 0.1 mg/l BA and 0.1 or 1.0 mg/l NAA, root formation was promoted. When BA was omitted from the medium, the

percentage of rooting was highest at 0.1 mg/l NAA; when 0.1 mg/l BA was added, the best root formation occurred at 1.0 mg/l NAA.

3. Vegetative bud and subsequent shoot development occurred well in media containing 0.1 or 1.0 mg/l BA and 0.1 or 1.0 mg/l NAA in dark conditions, but 0.1~10.0 mg/l BA and 0.1 or 1.0 mg/l NAA under light conditions. The optimum concentration of NAA was found to be 1.0 mg/l independent of level of BA.

4. These experiments showed that NAA was more effective than 2,4-D in inducing roots and shoots from callus tissue.

5. Completely normal plants were obtained from callus cultured in a medium containing BA and auxin. The highest yield of plantlets occurred in a medium having 0.1 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA.

6. Differences of the growth of callus and organ formation between observations under light and in the dark were not noticeable, except in the case of shoot development at 10 mg/l BA as mentioned above.

緒 言

前報¹⁾においては、アスパラガスの若茎柔組織の切片を無菌的に培養した場合のカルス形成について述べ、さらに MURASHIGE and SKOOG 培地を用いた場合に適当量の auxin および 6-benzyladenine (BA) の添加によってカルスから根または茎の分化が誘起されることを明らかにした。

1971 年 8 月 27 日受理

本研究の要旨は園芸学会 1970 年度秋季大会において発表

* 現在 弘前大学農学部

** 現在 北海道立中央農業試験場

本報では、カルスからの器官の分化におよぼす生長調節物質の影響をより明確にするため、比較的器官の分化が容易と考えられる実生第1次茎の組織片を用いて実験を行なった。その結果、培地中の BA および auxin の添加量を調節することにより、SKOOG 培地²⁾のタバコにおける実験と同様に、根の分化と茎の分化を区別して誘起できたほか、区によつては同一カルス塊から根と茎とを同時に分化させることもできたので、それらの結果について報告する。

実験材料および方法

培養組織片の作製 アスパラガス (品種メリーワ

シントン 500) の種子を 70% エタノールに 5 分間浸漬したのち、アンチホルミン液 (市販 10% アンチホルミン液 100 ml に水を加えて 1 l とし、Tween 20 を数滴加えた) に約 30 分間浸漬を 2 回繰り返して表面殺菌した。これを滅菌水で水洗後、あらかじめ用意した 100 ml 容三角フラスコ内の寒天培地 (sucrose 20 g/l, 粉末寒天 6 g/l を含んだものを 1 容器当たり 30 ml 入れた) 上に約 30 粒ずつ置床し、25°C 暗所で無菌的に発芽させた。置床後約 2 週間後第 1 次茎が約 5 cm 程度に伸長したので、これを無菌室内で三角フラスコからとり出し、節間部を約 1 cm の長さに切り取って作った組織片を培養に用いた。

培地の調製と培養 組織片の培養に用いた培地の調製法は前報と同様である。基本培地は MURASHIGE and SKOOG (MS)⁶⁾ 培地を用い、調製後 100 ml 容三角フラスコに 30 ml ずつ分注した。1 容器当たり置床組織片は 2 個 (実験 1) または 3 個 (実験 2) で、25°C 暗所および明所で培養した。明所は白色蛍光灯 (4,000 lux) 使用陽光恒温器を用い、明期は 16 時間とした。

調査 カルスの大きさはアズキ粒大を 1、ダイズ粒大を 2、ソラマメ大を 3 とし、同様の増大率で 4, 5, 6…なる指数を定め表示した。根および茎については肉眼的に確認できたものの数と、そのうち最も長いものの長さを測定した。個体数は各区 8 容器 16 個体または 24 個体である。

実験結果

実験 1 benzyladenine (BA) および α -naphthylacetic acid (NAA) の影響

BA を 0, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l の 4 段階とし、そのおのおのに NAA を 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l の 6 段階を組み合わせた合計 24 区につ

Fig. 1. Effect of BA and NAA concentrations on callus growth. The index was determined at the end of 12th week.

いて培養期間中のカルスの形成、ならびに根および茎の分化と発育状況を調査した結果はつぎのとおりである。

カルスの形成

カルスの形成は早い区で培養開始約 1 週間後から始まり、その後かなり長期間にわたって生長を続けたが、12 週間後には各区ともほぼ生長を停止した。Fig. 1 はこの時期における生長量を図示したもので、暗所と明所とでは大きな差は認められず、いずれの場合にも次のような傾向がみられた。すなわち BA は無添加でも NAA を適量添加した場合カルスは形成され、NAA 0.1 mg/l で最も良い生長を示した。しかし BA を 0.1~10.0 mg/l の範囲で添加すると、NAA 高濃度でのカルスの生長が BA 無添加のときより良好となり、その最大値は NAA 1.0 mg/l でみられた。この場合のカルスの生長量は BA 無添加区より大きかった。なお、明所で形成されるカルスは葉緑素を生じて緑色を呈するが、その着色の程度が区によつて異なり、概して BA 高濃度の区では緑色がうすい傾向が認められた。特に BA 10 mg/l, NAA 1.0 mg/l の区のカルスは葉緑素が少なく、白色に近かった。また、BA, NAA がともに低濃度でカルス形成がほとんど行なわれない区でも、組織片は 20 週間以上の長期にわたって緑色を保つたが、BA 無添加, NAA 10.0 mg/l の区では培養開始後 6 週間を経過したところから褐変する組織片が多かった。

根の分化と発育

カルスからの根の分化はカルスの形成よりかなり遅れて培養開始 5~6 週間後からはじまり、長期間にわたって分化率は徐々に増加した。培養開始 16 週間後におけるカルス塊からの根の分化率は Fig. 2 のとおりで、根の分化を誘起するのに適する BA および NAA の濃度範囲はカルス形成の場合と比べてはるかに狭い。すなわち、20% 以上の個体に発根がみられたのは BA 無添加か 0.1 mg/l の低濃度の区で、NAA が 0.1 か 1.0 mg/l

Fig. 2. Effect of BA and NAA concentrations on root formation from callus (16th week)

Table 1. Effect of BA and NAA concentrations on the growth of root and shoot developed from a callus.

BA	NAA	In dark				Under light			
		Number of roots	Length of roots	Number of shoots	Length of shoots	Number of roots	Length of roots	Number of shoots	Length of shoots
mg/l	mg/l		cm		cm		cm		cm
0	0.01	1.3	0.9	0	—	3.0	2.0	0	—
	0.1	7.4	2.4	0	—	8.1	2.4	1.0	5.0
	1.0	10.5	1.0	1.0	5.0	9.1	1.9	5.0	0.5
0.1	0.1	1.5	0.6	6.0	6.8	3.3	1.3	2.0	0.5
	1.0	8.0	1.6	4.0	7.4	8.6	2.3	3.0	1.3
	10.0	1.0	0.5	0	—	0	—	1.0	0.8
1.0	0	0	—	9.0	3.0	0	—	5.8	4.0
	0.001	0	—	1.0	1.5	0	—	16.0	6.0
	0.01	1.0	1.0	2.3	1.8	0	—	2.0	1.5
	0.1	5.0	1.5	5.0	4.6	0	—	2.0	1.2
	1.0	3.0	1.5	3.4	6.5	3.0	0.6	5.5	5.4
10.0	0	0	—	0	—	0	—	1.5	0.8
	0.001	0	—	0	—	0	—	2.5	0.2
	0.01	0	—	0	—	0	—	1.0	0.5
	0.1	0	—	0	—	0	—	1.8	1.6
	1.0	0	—	2.0	2.0	0	—	3.4	0.8

の濃度に限られている。また暗所、明所ともに BA 無添加の場合は NAA 0.1 mg/l で発根率は最大となり、BA 0.1 mg/l 添加区では NAA がさらに高濃度の 1.0 mg/l で最大となつている。根を分化した個体についての 1 個体当たり平均根数と平均根長（それぞれの個体の最長根の長さの平均値）は Table 1 のとおりで、暗所、明所ともに発根率の高い BA 無添加、NAA 0.1~1.0 mg/l および BA 0.1 mg/l、NAA 1.0 mg/l で根数、根長が概して大きかつた。

なおカルスから分化する根にはつぎのような性状のものがみられた。

突起状短根 (Type A) カルス塊の表面（寒天培地に接していない部分）に多数分化する半透明、突起状の細根で、正常に発育するものは少なく、長いものでも 0.5~1.0 cm で伸長を停止する。Plate I-1 に示すのはこの種の根で、BA 無添加の区で多くみられ、BA 0.1 mg/l の区でもかなり生じた。

半透明状長根 (Type B) A の場合と同じくカルス塊の表面から分化する半透明状の根であるが、発根数は概して少なく、A よりよく発育し、寒天培地中に伸長して後には正常の根になる場合もある。Plate I-2 はこの種の根を示すが、BA 無添加区に多く、BA 0.1 mg/l 区にも生じた。

貯蔵根状太根 (Type C) カルス塊の底部から寒天培地中に伸長する根で、一見貯蔵根のように太く、直径 2~3 mm 程度のものがある (Plate I-3)。この種の根は BA 0.1 mg/l の区で見られた。1~2 cm で伸長を停

止する場合が多いが、よく発達することもある。

正常根 (Type D) C と同様に培地中に伸長するが、正常の吸収根のように分岐し、よく伸長する根である (Plate I-4)。1 個の植物体として独立させるにはこの種の根が最も適している。本実験では BA 0.1 mg/l 区にこの種の発根が多かつた。

以上は便宜上の分類で、実際には中間的性状を示すものもあり、また同一カルス塊から 2 種類以上の根が分化する場合も多い。

なお本実験で観察された根はすべてカルスから分化したもので、置床した組織片から直接分化する根は認められなかつた。

茎の分化と発育

カルスがかなり生長した培養開始 5~6 週間後ころからカルス塊の表面の 1 ないし数箇所に茎の原基（白色または緑色の小突起）が認められ、ここからやがて茎が分化した。茎の分化率も根の場合と同様に長期間にわたつて徐々に増加したが、培養開始 16 週間後における茎の分化率は Fig. 3 のとおりである。BA 無添加の区では茎はほとんど分化しないが、BA が添加され NAA の濃度が 0.1 および 1.0 mg/l の区では茎がよく分化した (Plate I-5)。分化率のピークは BA 濃度に関係なく NAA 1.0 mg/l でみられた。また NAA 無添加では、根の分化がまつたくみられなかつたが茎の分化は 20% 以下の低率ではあつたが認められた。茎を分化したカルス塊についての 1 個体当たり平均茎数と茎長は Table 1 のとおりで、いずれも一定の傾向は認められなかつた。なお BA

Fig. 3. Effect of BA and NAA concentrations on shoot formation from callus (16th week)

10 mg/l では明所のみで BA 0.1 および 1.0 mg/l と同程度の茎の分化がみられたが、これが光の影響であるか否かについては再度試験を繰り返し検討してみたい。

分化した茎は正常な若茎として順調に発育するもののほか、半透明のもの、異常に細いものや太いもの、葉の分化が正常でないものなどの異常茎が認められた。これらの異常茎は伸長が途中で停止する場合が多い。また鱗片状の突起が分化したのみで茎にまで発育しないものもあつた。異常に太く半透明で正常に発育しない型の茎は BA の高濃度 (10 mg/l) 区にみられ、その他の異常茎はごくわずかであるが各区に分散してみられた。

幼植物の再生

Fig. 2 および Fig. 3 からわかるように、根および茎の分化率がともに高かつたのは BA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l の区で、この区には一つのカルス塊に両器官を分化したものがかなりみられた (Plate I-6)。これらのカルス塊は生長調節物質を含まない MS 培地 (sucrose 20 g/l および寒天 6 g/l を含む) に移植して 25°C, 明所で発育を促したのち、糖を含まない培養液で水耕を行なうか、培養土を入れその上にバーミキュライトを入れた鉢に移植して生育させているが、現在旺盛な発育を続けている (Plate II-7, 8)。なお、これら幼植物の染色体についての観察結果は後報で報告する予定である。

実験2 BA および 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) の影響

本実験では BA と 2,4-D とを種々の濃度で同時に添加した場合の影響を検討した。濃度の組み合わせは実験 1 と同じ 24 区である。

カルスの形成

Fig. 4 はカルスの生長がほとんど停止した時期 (13 週間後) における生長量を示したもので、BA 無添加の場

Fig. 4. Effect of BA and 2,4-D concentrations on callus growth. The index was determined at the end of 13th week.

合の生長量のピークは 2,4-D 0.1 mg/l でみられ、BA を 0.1~10.0 mg/l 添加した区では 2,4-D 1.0 mg/l でピークがみられる。これは NAA の場合と全く同じ傾向である。ただし、全般的に NAA の場合に比べてカルスの生長は劣り、各 BA 濃度におけるカルス最大生長量の差も小さい。2,4-D を用いた培地で生長したカルス塊は NAA の場合に比べて外観上表面の凹凸が少なく平滑で、緻密であつた。また明所で生長したカルスは NAA の場合より濃緑色になる傾向が認められた。

なお、NAA の場合と同じく、カルスの生長については明所と暗所との差はほとんど認められなかつた。

器官の分化

根および茎の分化は培養開始 10 週間後頃から始まつたが、auxin として NAA を用いた実験 1 に比べて概して分化率は低かつた。

17 週間後における根の分化率は Fig. 5 のとおりで、根の分化は BA 無添加および 0.1 mg/l で誘起され、無

Fig. 5. Effect of BA and 2,4-D concentrations on root formation from callus (17th week)

Table 2. Effect of BA and 2,4-D concentrations on the growth of root and shoot developed from a callus.

BA	2,4-D	In dark				Under light			
		Number of roots	Length of roots	Number of shoots	Length of shoots	Number of roots	Length of roots	Number of shoots	Length of shoots
mg/l	mg/l		cm		cm		cm		cm
0	0.1	5.5	0.9	0	—	7.7	1.0	0	—
	1.0	3.0	0.2	0	—	3.0	0.5	0	—
0.1	0.1	4.5	0.4	1.5	2.0	4.2	0.5	0	—
	1.0	2.2	0.8	2.5	1.8	3.9	0.4	1.5	1.0
1.0	0	0	—	1.0	1.0	0	—	0	—
	0.001	0	—	3.0	0.5	0	—	0	—
	0.01	0	—	0	—	0	—	0	—
	0.1	0	—	0	—	0	—	1.0	0.8
	1.0	0	—	1.0	0.7	0	—	1.0	1.3

Fig. 6. Effect of BA and 2,4-D concentrations on shoot formation from callus (17th week)

添加区での分化率のピークは 2,4-D 0.1 mg/l でみられ、BA 0.1 mg/l 区では 2,4-D 1.0 mg/l でピークとなった。なお、BA 無添加で分化した根には前項でのべたと同じように半透明の根が多かった。

茎の分化は Fig. 6 に示すように BA 0.1 および 1.0 mg/l でみられたが、分化率は NAA の場合に比べてかなり低い。したがって、NAA の場合は明瞭ではないが、ピークは 2,4-D 1.0 mg/l でみられるようである。

なお、器官を分化したカルス塊についての 1 個体当たり平均分化数と長さは Table 2 のとおりで、NAA の場合と比較してとくに変わった点は認められない。

考 察

1958 年 STEWARD ら⁹⁻¹¹⁾はニンジン形成層起源カルスから幼植物の誘導に成功したが、この場合は培地に coconut milk を加えている。その後 SKOOG ら^{4,8)}は天然物を使用せずに完全な合成培地を用いてタバコの柔組織からカルスをつくり、さらにカルスから器官誘導に成功した。この研究で特に興味あることは、生長調節物質

(kinetin と IAA) の量を変えることによって葉器官と根器官をはつきり区別して誘導できた点である。最近の報告によると種々の植物でカルスから器官を再分化させることに成功しているが coconut milk などの天然物を使用しない場合は cytokinin と auxin が用いられており、その量比が器官の発生分化に関係している場合が多いようである^{1,2,3,5,6,7,15,16,17)}。

本実験では cytokinin (BA) と auxin (NAA または 2,4-D) を種々の割合で添加した MS 培地を用いて培養することにより、実生第 1 次茎の切片からカルスを誘導し、やがてカルスから器官の分化を誘起し得た。そして BA および auxin の添加量を変えることにより、SKOOG らのタバコにおける実験と同様に根と茎をはつきり区別して誘導できたほか、区によつては同一カルス塊から根と茎とを同時に分化させることもできた。

まず個々の生長調節物質について器官の分化を誘起するに好適な濃度範囲を見ると、BA は 0.1 mg/l 以下で根、0.1 mg/l 以上で茎の分化を誘起するのに有効であった。そしてこの好適濃度範囲は BA とともに添加した auxin の種類や、培養時の明暗には影響されなかつた。

auxin の濃度については、NAA, 2,4-D はともに 0.1~1.0 mg/l で根および茎の分化を誘起するのに有効であった。すなわち、auxin では根の分化に好適な濃度と、茎の分化に好適な濃度とが同じ範囲内にあり、この濃度はカルスの生長にも好適であった。以上は BA および auxin を個々に見た場合の好適濃度範囲であるが、根の分化についてはカルス形成の場合¹⁶⁾と同様につぎのような相互作用が認められた。すなわち、実験 1 において、根の分化に対する NAA の最適濃度は BA 無添加の場合に 0.1 mg/l であったが、BA 0.1 mg/l では、これより高濃度の 1.0 mg/l であった。このように BA の濃度によつて NAA の発根最適濃度が異なることは、根の

分化に cytokinin と auxin が何らかの相互作用をもつものと考えられ興味深い。これに対して茎の分化の場合は BA の濃度が 0.1~10.0 mg/l の範囲内で変わつても NAA の最適濃度は常に 1.0 mg/l であつた。2,4-D を用いた実験 2 においても前と同様のことが認められた。

アスパラガスは普通種子による繁殖が行なわれているが、若茎の形質、収量に個体差が著しい。この欠点を除くため、遺伝的に同じ性質をもつた株を増殖することを目的とした栄養繁殖の研究がいくつか報告されている。

TAKATORI ら^{13,14)}はこの目的で若茎を 3~5 mm の厚さに輪切りにした切片を用い、NAA 0.5 ppm および coconut milk 15% を含む MS 培地でカルスを誘導し、これを前記培地に 50 ppm の硫酸アデニンを添加した培地へ移植して幼植物を分化させることに成功している。また WILMAR ら¹⁵⁾は無菌的に発芽させた実生の hypocotyl を LINSMAIER and SKOOG の培地で照明下において培養して誘導したカルスから幼植物を得ることに成功している。この場合、kinetin 0.315 mg/l と 2,4-D 1 mg/l でカルスの生長が最も速かで、まれに器官分化が起こつた。また生長調節物質を添加しなかつた場合に茎の分化が著しかつたという。しかし両報告とも器官の分化率についての記載はみられない。

本実験では auxin として NAA を用いた実験 1 で、BA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l の区に根と茎の両方を分化したカルス塊が最も多かつた。この区における根の分化率は 80~100% であつたが、茎の分化率が概して低く 50% 前後であつた。したがつて幼植物の分化率をさらに高めるには茎の分化率を高めることが重要な条件となる。このためには基本培地の組成、生長調節物質の種類および添加量など検討すべきことが多いが、移植も幼植物の分化率を高める有効な手段の一つと考えられる。従来カルスから幼植物の再分化に成功している例の多くはカルス誘導後器官分化用培地に移植を行なつており、筆者らの実験（未発表）においても移植を行なつた場合、茎の分化率が概して高く 70% 程度に達した区があり、また硫酸アデニンの効果も認められている。カルスの移植については、今後さらに研究を進めたいと思うが移植そのものの意義、移植の時期、器官分化用培地の組成など検討しなければならない問題点が多い。

摘 要

アスパラガス実生の第 1 次茎からとつた長さ約 1 cm の組織片を MS 培地で培養し、培地に添加した 6-benzyladenine (BA) および auxin (NAA または 2,4-D) がカルスの形成と器官分化におよぼす影響について調査し

た。培養は 25°C, 暗所および明所で行なつた。

1. カルスの良好な生長は NAA と BA の両方が添加されたとき、または NAA 単用のときにみとめられた。この場合、カルス生長のための NAA の最適濃度は、培地に BA が添加されているか否かによつて異なり、BA 無添加の場合は 0.1 mg/l, BA を 0.1~10.0 mg/l の範囲で添加した場合は 1.0 mg/l でカルスの生長は最もよかつた。

2. 根は BA 低濃度 (0, 0.1 mg/l), NAA 0.1 および 1.0 mg/l でよく分化した。根の分化率は BA 無添加の場合は NAA 0.1 mg/l で最も高く、BA 0.1 mg/l の場合は NAA 1.0 mg/l で最高であつた。

3. 茎は暗所では BA と NAA がともに 0.1 および 1.0 mg/l の区でよく分化したが、明所では 0.1~10.0 mg/l BA と 0.1 および 1.0 mg/l NAA の範囲でよく分化した。NAA の最適濃度は BA の濃度にかかわらず 1.0 mg/l であつた。

4. 本試験においては auxin として NAA を用いた方が、2,4-D の場合より根および茎の分化率が高かつた。

5. 一つのカルスから根および茎の両方を分化し、幼植物の再分化率の最も高かつたのは BA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l の区であつた。

6. 明所と暗所で培養した結果の比較では 3. にのべたように明所でのみ BA 10 mg/l の区にも茎の分化がみられたほかは、カルスの生長、器官の分化に大きな差は認められなかつた。

謝 辞 本実験に関し懇切な指導と助言をいただいた北海道大学農学部果樹・そ菜園芸学講座田村 勉教授ならびに同作物生理学講座岡沢養三助教授に厚くお礼を申し上げる。また実験遂行にあたり嘉見史恵、斎藤 嗣両嬢の助力を得たことを付記し謝意を表する。

引 用 文 献

1. HAMZI, H. Q., and F. SKOOG. 1964. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. 51: 76—83.
2. KATO, Y. 1964. Cytologia. 29: 79—85.
3. ————. 1965. Ibid. 30: 67—74.
4. LEE, T. T., and F. SKOOG. 1965. Physiol. Plant. 18: 386—402.
5. LINSMAIER, E. M., and F. SKOOG. 1965. Ibid. 18: 100—127.
6. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. Ibid. 15: 473—497.
7. 西 貞夫・大沢勝次・豊田 努. 1970. 育学雑. 20. 別冊 2: 58—59.
8. SKOOG, F., and C. O. MILLER. 1957. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118—131.
9. STEWARD, F. C., M. O. MAPES and K. MEARS. 1958. Amer. J. Bot. 45: 693—703.
10. ————, ————, and ————. 1958. Ibid.

Plate I

Plate II

Plate I

1. Proliferation of callus tissue and formation of root belonging to type A. Stem pieces were cultured on MS medium with 1.0 mg/l of NAA.
2. Formation of root belonging to type B. Stem pieces were cultured on MS medium with 0.1 mg/l of NAA.
3. Formation of root belonging to type C. Stem pieces were cultured on MS medium with 0.1 mg/l of BA and 1.0 mg/l of NAA.
4. Formation of root belonging to type D. Stem pieces were cultured on MS medium with 0.1 mg/l of BA and 1.0 mg/l of NAA.
5. Vegetative shoot development from callus. Stem pieces were cultured on MS medium with 1.0 mg/l of BA and 0.1 mg/l of NAA.
6. Callus with both elongated shoots and roots. Stem pieces were cultured on MS medium with 0.1 mg/l of BA and 1.0 mg/l of NAA.

Plate II

7. Young asparagus plantlet grown from callus tissue.
8. A five-month-old asparagus plant propagated through tissue culture.

- 45 : 705—708.
11. ———, ——— and ———. 1958. Ibid. 45 : 709—713.
 12. ———, ———, A. E. KENT, and R. D. HOLSTEN. 1964. Science 143 : 20—27.
 13. TAKATORI, F. H., T. MURASHIGE and J. I. STILLMAN. 1967. Calif. Agr. 21 (8) : 8—9.
 14. ———, ———, and ———. 1968. Hort Sci. 3 (1) : 20—22.
 15. WILMAR, C., and M. HELLENDORRN. 1968. Nature 217 : 369—370.
 16. 八鍬利郎・原田 隆・嵯峨紘一・志賀義彦. 1971. 園学雑. 40 : 230—236
 17. 山田康之. 1966. 生物物理 6 : 23—31.