園芸作物のやく培養に関する研究 (第2報)

アスパラガスやくからのカルス誘導について

稲垣 昇・原田 隆・八鍬利郎

(北海道大学農学部)

Studies on the Anther Culture of Horticultural Crops

I. Callus Formation from the Anthers of Asparagus

Noboru INAGAKI, Takashi HARADA and Toshiro YAKUWA

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060

Summary

Effects of growth regulators, sugars, light and pH on callus formation from anthers of *Asparagus officinalis* L. were investigated using Murashige & Skoog's medium to which 0.6% agar was added. The following results were obtained:

1) For cv. 'Mary Washington 500 (MW 500)', the optimal concentrations of growth regulators were 1.0 mg BA/l and 5.0 mg NAA/l, whereas for cv. 'Zuiyo' and 'Grüne Krone', they were 0.5 to 1.0 mg BA/l and 3.0 mg NAA/l. The highest percentages of anthers producing callus were 72, 90, and 86 for 'MW 500', 'Zuiyo' and 'Grüne Krone', respectively. Callus formation was better with NAA than 2, 4-D.

2) Of various sugars and their concentrations tested, the highest callus induction and growth were obtained on the media containing 2% sucrose or glucose. Fructose was less effective than the other two sugars and sorbitol was not effective at all on callus formation.

3) Anthers of 'Zuiyo' developed callus whether they were grown under continuous artificial light (4,000 lx, white fluorescent lamps), 16-hr photoperiod, or under continuous darkness. However, the percentages of anthers which produced callus were inversely proportional to the length of light exposure. Anthers of cv. 'Grüne Krone' cultured under 16-hr light at 10,000, 1,500, and 200 lx, gave the highest percentage of callus formation under the minimum light intensity.

4) Callus was obtained with anthers at all pH levels between 3.5 and 7.5, but 5.5 produced the highest percentage.

緒 言

アスパラガスは雌雄異株植物のため、同一品種内においても表現形質にかなりの個体間変異がみられる。また雌株と雄株とを比較すると、収量や若茎の太さなどの点において雄株が優れた形質を有している。このため遺伝的に均一な雄性品種の育成が望まれる。

第1報に述べたように、筆者らは以上の目的でアスパラガスのやく培養に関する実験を行っているが、本報では、やくからのカルス形成に及ぼす種々の培養条件(生長調節物質、糖濃度、光照度及びpHなど)について検討した結果を報告する。

実験材料及び方法

供試材料として、北海道大学農学部附属農場に栽植されている'Mary Washington 500 (MW 500)', 'Grüne Krone' 及び '瑞洋' のつぼみから取ったやくを用いた。材料の採取は6月上旬から8月上旬の期間に行い、花粉の発育度が花粉一核期に相当する長さ2mmのつぼみを用いた。つぼみの表面殺菌は、前報で報告した殺菌処理に関する実験結果から、70%エチルアルコールで3~5分間浸漬処理を行い、その後滅菌水で数回洗浄した。その後やくを無菌的に取り出し、100ml容三角フラスコに25ml注入した寒天培養基上に5個ずつ置床した。基本培地にはMurashige・Skoog(M・S)の無機塩類に、塩酸チアミン0.1mg/l、ニコチン酸0.5mg/l、塩

酸ピリドキシン 0.5 mg/l, グリシン 2.0 mg/l, ミオイノシトール 100 mg/l 及び寒天 6.0 g/l を添加したものを、糖は実験Ⅱを除きグルコース 20 g/l を添加した。pH は実験Ⅳを除き加圧殺菌前に 5.5 に調整した。培養基の殺菌は 120℃, 1 kg/cm² の条件下で 5 分間行った。培養は 25~27℃, 4,000 lx (白色蛍光灯使用, 以下同様) 16 時間照明 8 時間暗黒下 (実験Ⅲを除く) で行った。やくから形成されたカルスの大きさは次に示す指数で表した。

0: カルス形成なし, 0.1: わずかにカルスを形成, 0.5: やくとはほぼ同じ大きさ, 1.0: ナタネ粒大, 1.5: コメ粒大, 2.0: アズキ粒大, 3.0: ダイズ粒大, 3.0 以上の場合は, ダイズ粒の大きさ (指数 3.0) を基準にして, 指数を定めた (例: 4.0: ダイズ粒の 2 倍, 5.0: ダイズ粒の 3 倍)。なお, カルスの指数と生重との関係は第 1 図に示したとおりである。

実験は次の 4 項目について行った。

実験Ⅰ: サイトカニン及びオーキシンの濃度とカルス形成

'Mary Washington 500 (MW 500)' 'Grüne Krone' 及び在来種である '瑞洋' の 3 品種を用いて次の二つの実験

を行った。

(1) 'MW 500' を用いて, カルスの形成及び生長に及ぼす BA と NAA 及び 2,4-D の影響について比較検討した。すなわち実験区として BA 0.1 及び 1.0 mg/l の各濃度に NAA または 2,4-D 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 及び 10.0 mg/l の各濃度をそれぞれ組み合わせた 10 区を設けた。

(2) 'Grüne Krone' 及び '瑞洋' を用いて, (1) と同様な目的で実験を行った。

実験区として, BA 0.1, 0.5 及び 1.0 mg/l の各濃度区に NAA 0.3 及び 3.0 mg/l の各濃度をそれぞれ組み合わせた 6 区を設けた。

実験Ⅱ: 糖の種類及び濃度とカルス形成

シュクロース, グルコース, フラクトース及びソルビトールの 4 種類の糖を用いて, 各濃度におけるカルスの形成並びに生長を調べた。用いた糖濃度及び生長調節物質は第 1 表のとおりである。品種は 'MW 500' と 'Grüne Krone' を用いた。

また, オートクレーブで 5, 15 及び 30 分間殺菌した場合のシュクロースの加水分解に及ぼす pH の影響についても調べた。

実験Ⅲ: 光とカルス形成

'瑞洋' 及び 'Grüne Krone' の 2 品種を用いて次の二つの実験を行い, 培養時の明暗, 日長及び明期の光照度とカルス形成との関係を調べた。

(1) 明所培養と暗所培養の比較: 完全明期, 16 時間明期 8 時間暗期, 全暗期の三つの区を設定し, カルスの形成及び生長について調べた。明期の照度は 4,000 lx (白色蛍光灯) とした。生長調節物質として BA 1.0 及び NAA 3.0 mg/l を添加し, 品種は '瑞洋' を用いた。

(2) 光照度の影響: 16 時間照明 8 時間暗期として, 明期の光照度を 200, 1,500 及び 10,000 lx の 3 段階に設定し, カルスの形成及び生長について調べた。生長調節物質として BA 0.2 mg/l 及び NAA 0.1 mg/l を添加し, 品種は 'Grüne Krone' を用いた。

実験Ⅳ: pH とカルス形成

培養基の pH を 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 及び 7.5 の 5 段階として培養基 pH とカルス形成との関係を調べた。pH は加圧殺菌前に, 0.1 N-HCl または 0.1 N-NaOH を用いて所定の値に調整した。なお, pH 調整後の加圧殺菌による pH の変化並びに寒天培地の硬さの変化を調べ, その影響を観察した。生長調節物質として BA 1.0, NAA 3.0 mg/l を添加し, 品種は 'MW 500' を用いた。

Fig. 1. Relationship between index of callus growth and fresh weight of callus

I: Bar indicates confidence limit at 95%.

実験結果

実験 I：サイトカイニン及びオーキシンの濃度とカルス形成

(1) 'MW 500' を用いた実験：NAA と 2,4-D を比較した場合、NAA が明らかに 2,4-D よりも優れたカルス形成効果を示し、カルス形成に有効な濃度範囲も広がった。また、BA を 0.1 mg/l 添加した区では、いずれのオーキシン濃度区においてもカルス形成率が低く 2~4% であったが、BA 濃度を 1.0 mg/l まで高めると、オーキシンとして NAA を用いた区でカルス形成率は顕著に高くなった（第2図及び第3図）。

形成されたカルスの生長はいずれの濃度区においても良好で、移植可能な大きさにまで充分生長した。

(2) 'Grüne Krone' 及び '瑞洋' を用いた実験：'Grüne Krone'、'瑞洋' の両品種とも BA 0.5~1.0 mg/l、NAA 3.0 mg/l の濃度で高いカルス形成率を示したが、カルス形成に有効な濃度範囲は '瑞洋' の方が広く、BA 0.1~1.0 mg/l、NAA 0.3~3.0 mg/l のすべての濃度区でカルス形成がみられた（第4図及び第5図）。

Fig. 2. Effect of BA and NAA concentrations of callus formation and callus growth from anthers (incubated 14 weeks at 25~27°C. cv: MW 500).
I: Bar indicates confidence limit at 95%.

Fig. 3. Effect of BA and 2,4-D concentrations on callus formation and callus growth from anthers (incubated 14 weeks at 25~27°C. cv: MW 500).
I: Bar indicates confidence limit at 95%.

Fig. 4. Effect of BA and NAA concentrations on callus formation and callus growth from anthers (incubated 8 weeks at 25~27°C. cv: Grüne Krone).
I: Bar indicates confidence limit at 95%.

Fig. 5. Effect of BA and NAA concentrations on callus formation and callus growth from anthers (incubated 4 weeks at 25~27°C. cv: Zuiyo).

形成されたカルスの生長は両品種とも NAA 濃度の高い区 (NAA 3.0 mg/l) の方が良好であった。

また、'MW 500'、'Grüne Krone' 及び '瑞洋' の3品種のカルス形成率を比較すると、品種間で差がみられ、'瑞洋' が最も高い率を示したが、いずれの品種においても良好なカルス形成率を示す BA 及び NAA の濃度はほぼ同じであると思われた（第2図、第4図及び第5図）。

実験 II：糖の種類及び濃度とカルス形成

糖の種類及び濃度について行った4回の実験結果をまとめると第1表のとおりである。各実験によってカルス形成率に差がみられるが、ソルビトールを除いたシュクロース、グルコース、フラクトースのいずれの糖においてもカルス形成が認められ、特にシュクロースとグルコースは広範囲の濃度で高いカルス形成率を示した。

また、形成されたカルスの生長は、2~4% までは良好であるが、それより高濃度になると抑制される傾向がみられた。したがって、カルス形成に好適な糖濃度は、シュクロース又はグルコースの2%付近と思われた。

Table 1. Effect of sugar concentrations on callus formation and growth.

Sugar (%)	Exp. A		Exp. B		Exp. C		Exp. D	
	Anthers Producing Callus (%) (I)	Callus growth (II)	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
Sucrose	0.5		70 (19/27)	###	—		—	
	1	4 (2/50)	77 (20/26)	###			—	
	2	30 (15/50)	90 (27/30)	##	56 (17/30)	##	83 (25/30)	##
	4	—	55 (11/20)	++	—		83 (25/30)	++
	10	38 (17/50)	—		—		66 (20/30)	+
	20	4.4 (2/45)	—		—		23 (7/30)	±
Glucose	0.5	8.8 (4/45)	—		—			
	1	30 (15/50)	85 (17/20)	###	70 (21/31)	##		
	2	—	81 (21/25)	###	—			
	4	60 (30/50)	81 (21/25)	##	—			
	8	—	66 (14/21)	++	—			
	10	7.5 (3/45)	—					
Fructose	0.5	18 (9/50)	—		—			
	1	8.5 (4/45)	85 (23/27)	###	66 (20/30)	##		
	2	—	45 (9/20)	##	—			
	4	0 (0/50)	54 (13/24)	++	—			
	8	—	0 (0/25)		—			
	10	0 (0/50)			—			
Sorbitol	1		0 (0/30)					
	2		0 (0/30)					
	4		0 (0/30)					
	8		0 (0/30)					
Variety used	MW 500		Grüne Krone		MW 500		MW 500	
Growth regulators used								
BA (mg/l)	0.1		1.0		0.1		1.0	
NAA (mg/l)	1.0		3.0		1.0		1.0	
Length of flower bud used (mm)	2~3		2		2~3		2~3	
light and temperature conditions	16-hr light per day at 25~27°C		16-hr light per day at 25~27°C		Continuous dark at 25~27°C		16-hr light per day at 25~27°C	
Culture periods (weeks)	16		9		16		16	

Degrees of callus growth ±: a trace, +: poor growth, ++: fair growth, ##: good growth, ###: excellent growth.

なお、オートクレーブによる加圧殺菌中のシュクロースの加水分解に及ぼす pH の影響は第 6 図のとおりで、シュクロースは加圧殺菌によって一部加水分解され、その傾向は加圧殺菌の時間が長いほど、また pH が酸性に近いほど大きいことが認められた。

実験 III: 光とカルス形成

(1) 明所と暗所の比較: 第 7 図に示したように、各区とも高いカルス形成率を示したが、なかでも全暗期で最も形成率が高く、次いで 16 時間照明、連続照明の順であった。またカルスの生長は各区とも大きな差は認め

られないが、連続照明の区でやや劣った。

カルスの性状は区によって異なり、連続照明の区では緑色の堅くち密なカルスのほかに、赤褐色の堅くち密なカルスや緑色と赤褐色のカルスが混在したものなどが認められた。16 時間照明の区では緑色の堅くち密なカルスが多くを占め、一部で黄褐色のカルスと緑色のカルスが混在していた。全暗期の区では黄白色で柔らかく、水分に富んだカルスがみられた。

(2) 光照度の影響: 第 8 図に示したように 200 lx 照明下で最も高いカルス形成率を示し、次いで 1500 lx、

Fig. 6. Effect of pH on hydrolysis of sucrose during autoclaving.

Fig. 7. Effect of light on callus formation and callus growth from anthers (incubated 8 weeks at 25~27°C, cv: Zuiyo).

I: Bar indicates confidence limit at 95%.

Fig. 8. Effect of light intensity on callus formation and callus growth from anthers (incubated 11 weeks at 25~27°C, cv: Grüne Krone).

I: Bar indicates confidence limit at 95%.

10,000 lx の順であった。またカルの生長はいずれの区においても良好であった。カルの性状は区によって異なり、光が強い区では緑色の堅くち密なカルが多く、光が弱くなるにしたがって淡黄色の水分の多い柔らかいカルスが認められた。

(1) 及び (2) から、いずれの光条件下でもカル形成能をもつことが認められたが、カルの誘導は強い光条件下で抑制されるものと考えられた。またカルの生長

Fig. 9. Change of pH in MS agar medium by autoclaving (120°C, 1 kg/cm², 15 min).

Fig. 10. Effect of pH on callus formation from anthers (incubated 4 weeks at 25~27°C).

は光の影響を強く受けることはなく良好な生長を示したが、カルスの性状は照度によって異なり、光の影響を強く受けることが認められた。

実験 IV : pH とカルス形成

加圧殺菌前に調整した pH は、その後の加圧殺菌処理によって第 9 図に示すように変化した。一般に酸性側に調整した pH は上がり、塩基性側に調整した pH は下がる傾向にあった。また、pH を酸性側に調整した場合、寒天培地は柔らかくなり、塩基性側に調整した場合は硬くなる傾向にあった。カルス形成と pH との関係をみると、第 10 図に示したように、従来組織培養に用いられている pH 5.5 の付近で最もカルス形成率が高く、pH が酸性または塩基性側に傾くにつれて低下した。しかし各 pH の区でカルス形成が認められているので、アスパラガスのやく培養の場合、カルス形成に適する pH の範囲はかなり広いものと考えられた。

考 察

第 1 報(16)において、オーキシンはアスパラガスのやくからのカルス誘導に必須であること、及びサイトカニンは必須ではないが、適度に添加することによってカルス形成率を高めることができることを述べた。これらの結果はすべて 'MW 500' を用いた成績であるので、他品種も含めてカルス形成に好適な生長調節物質の種類と濃度を知る目的で実験 I を行った。その結果、'瑞洋' 及び 'Grüne Krone' においても、'MW 500' 同様、サイトカニンとオーキシンの添加された培地で高いカルス形成率が認められ、カルス形成に好適なサイトカニン及

びオーキシンの濃度範囲もほぼ同じであった。すなわち、'MW 500' は BA 1.0 mg/l, NAA 5.0 mg/l, '瑞洋' 及び 'Grüne Krone' は BA 0.5~1.0 mg/l, NAA 3.0 mg/l においてカルス形成率が高かった。次にオーキシンの NAA と 2,4-D とを比較すると、カルス形成率では NAA がはるかに高い値を示し、アスパラガスのやく培養に用いるオーキシンとしては NAA のほうが適すると考えられる。Pelletier ら(11)はやく内の花粉の培養初期における分裂には 2,4-D が重要な役割を果たしているとしているが、2,4-D を用いた場合のカルス形成率は品種によって差があり、1~20% と低い。また使用した品種も本実験の場合とは異なるため、この結果の違いについては更に検討を要する(2,3,12)。また、高濃度のサイトカニン及びオーキシンはカルス細胞の染色体数を変異させ、カルス細胞の倍数化及び異数化を誘起する傾向が強いことが Cateland らのアスパラガスのやくを用いた実験(1)や Niizeki らのタバコのやくを用いた実験(10)で報告されているので、これらの点についても今後検討することが必要である(14)。

実験 II で検討した糖については、従来使用されてきたシュクロースのほかにグルコースが良好な結果を示し、その適濃度の範囲もシュクロースよりやや広い傾向が認められた。またシュクロースはオートクレブによる加圧殺菌によって一部加水分解され(4)、その傾向は pH が酸性に近いほど大きいことからカルス形成に及ぼす培地組成や pH などの影響について検討する場合、炭素源としてはグルコースの方が適当であると思われる。本実験で用いた 4 種類の糖類(シュクロース、グルコース、フラクトース及びソルビトール)において、ソルビトールはカルス誘導に関しては全く炭素源としての効果を示さなかったが、筆者らは別の実験において、カルスの生長に関してはソルビトールが炭素源として利用されることを確認している(未発表)。またこれらの糖以外でも、植物によって有効に利用できる炭素源があり、スイバのウイルス腫瘍のカルスの生長には可溶性デンプンが、ヤチダモのカルス生長にはマンニトールが有効との報告(6,9)があり、植物によって糖類の代謝機構に違いがあるものと思われる。また筆者らの報告(15)によると、アスパラガスの若茎からのカルスの生体重量はシュクロース 1% で最高となり、糖濃度の上昇とともに生体重量は減少するが、乾物重量はほとんど変化が認められなかったことから、糖の効果としては炭素源としての効果のほかに、カルスの生長に対する浸透圧の影響(13)が考えられる。

次に実験 III の結果から、光の影響をみると、4,000 lx 程度の光照度の場合、明所でも暗所でもかなり高いカルス

形成率がみられたが、強光下（10,000 lx）ではカルス形成が抑制され、弱光下（200 lx）で高いカルス形成率を示したことから、強光はカルス形成にある程度抑制的に働くものと考えられる。また光の影響はカルスの生長には大きく現れなかったが、カルスの性状には、明りょうな違いをもたらした。本実験においては、光と温度との関係について特に考慮しなかったが、照明による組織温度の上昇がカルスの生長に影響することの報告(8)もあるので、今後これらの点について検討することが必要と思われる。また光質によってカルス形成に違いがみられるとの報告があり、ナシのやく培養においては赤色光及び黄色光でカルス形成率が高く、白色光及び青色光ではカルス形成率が低かったとする報告もある(5)。今後これらの点についても検討を要する。

実験Ⅳの結果からカルス形成に及ぼす pH の影響をみると、アスパラガスにおいては pH の適応範囲が広く、pH 3.5～7.5 の範囲でカルス形成が認められ、カルス形成率が最も高かったのは pH 5.5 であった。なお、カルス形成及び生長に及ぼす pH の影響は、pH の直接的な影響のほか、pH により寒天培地の硬さに差がみられる（酸性側では柔らかくなり、塩基性側では硬くなる傾向がある）こと、また pH が極端に高い値または低い値である場合、培地中に沈殿などを生じ、培地成分の変化がみられることなどによる間接的なものも考えられる。Nickell らは pH によって利用される窒素の形態に違いがみられるとし、特に硝酸態窒素の吸収利用が酸性側（pH 3.5～5）では促進されるが、塩基性側（pH 8）では低下すると報告している(9)。また pH が加圧殺菌により変動する傾向には基本培地の組成によって違いがみられ、川田らは White の培地では pH 4～6 ではほとんど変動はないが、pH 7～8 では 0.2 くらい低下すると報告している(7)。筆者らの用いた MS 培地での実験と比較すると、pH の変動に違いがみられることから、今後培地内成分の変化と pH の変動との関係を検討することが必要と思われる。

本研究においては、やくからのカルス形成に及ぼす種々の培養条件について検討したが、目的とするやく内の花粉からのみ確実にカルスを形成させるに十分な培養条件を確立するまでには至らなかった。しかし、明らかに花粉起源と認められるカルスも形成されているので、今後さらに培養条件及び培養方法を検討することによって目的を達成することが可能であると考えられる。

摘 要

アスパラガスのやくからのカルス形成及び生長に及ぼす生長調節物質、糖、光及び pH の影響について検討し

た。結果の概要は次の通りである。

(1) サイトカイニン及びオーキシンの濃度とカルス形成

‘Mary Washington 500’を用いた実験では BA 1.0 mg/l, NAA 5.0 mg/l の濃度区で最も高いカルス形成率を示した。2,4-D は NAA と比べてカルス形成能が劣った。また‘瑞洋’と‘Grüne Krone’は BA 0.5～1.0 mg/l, NAA 3.0 mg/l で高いカルス形成率を示した。3 品種のそれぞれにおけるカルス形成率の最高値は、‘MW 500’ 72%, ‘瑞洋’ 90%, ‘Grüne Krone’ 82% であった。

(2) 糖濃度とカルス形成

シュクロース、グルコース、フラクトース及びソルビトールの4種類の糖を用いて糖濃度を変えて数回の実験を行ったところ、シュクロース、グルコース、フラクトースでカルス形成がみられたが、ソルビトールではいずれの濃度区においてもカルス形成は認められなかった。カルス形成及びカルスの生長はシュクロース及びグルコースの2%付近で良好であった。フラクトースはシュクロース、グルコースに比べカルス形成がやや劣った。

(3) 光とカルス形成

‘瑞洋’を用いて 4,000 lx（白色蛍光灯）連続照明、4,000 lx（白色蛍光灯）16 時間照明及び全暗期の条件下で培養を行った結果、各区とも高いカルス形成率を示したが、なかでも全暗期が最も高いカルス形成率を示し、次いで 4,000 lx 16 時間照明、4,000 lx 連続照明の順であった。

また‘Grüne Krone’を用いて、10,000 lx, 1,500 lx 及び 200 lx の3照度区（各区とも 16 時間照明）を設けて培養を行った結果、200 lx の区が最も高いカルス形成率を示し、次いで 1,500 lx, 10,000 lx の順で、光照度の高い区ほどカルス形成が劣った。

(4) pH とカルス形成

‘MW 500’を用いて pH を 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 及び 7.5 に調整した区を設けて培養を行った結果、いずれの pH 区でもカルス形成が認められ、最も高いカルス形成率を示したのは、pH 5.5 の区であった。

引用文献

1. CATELAND, B. et A. LAMBERT. 1973. L'androgenese in vitro par culture d'*Asparagus officinalis* L. II. Les problemes de polyploide. Eucarpia 4^e reunion sur la selection de l'Asperge, Versailles : 183—191.
2. DORÉ, C., 1973. Androgenese in vitro par culture d'antheres d'*Asparagus officinalis*. Etat actuel des recherches. Eucarpia 4^e reunion sur la selection de l'Asperge, Versailles : 173—181.

3. DORÉ, C. 1974. Production de plantes homozygotes males et femelles a partir d'antheres d'Asperge. C. R. Acad. Sci., Paris, serie D, 278 : 2135—2138.
4. 江島信昭・笹平 守・平田洋子. 1966. 梅ぼし飴の品質に関する研究(第1報). ショ糖溶液の加熱分解生成物質について. 日食工業誌. 13(6) : 219—224.
5. 飯塚宗夫・小崎 格. 1971. 果樹の葯培養. 葯培養シンポジウム講演要旨 : 26—27.
6. WOLTER, K. E. and F. SKOOG. 1966. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. Amer. J. Bot. 53(3) : 263—269.
7. 川田信一郎・石原愛也・角田昌一. 1967. 水稻種子根の培養における培地の組成について. 日作紀. 36 : 68—74.
8. LUIGE de CAPITE, 1955. Action of light and temperature on growth of plant tissue culture in vitro. Amer. J. Bot. 42 : 869—873.
9. NICKELL, L. G. and P. R. BURKHOLDER. 1950. Atypical Growth of Plants. II. Growth in vitro of virus tumors of *Rumex* in relation to temperature, pH and various sources of nitrogen, carbon, and sulfur. Amer. J. Bot. 37 : 538—547.
10. NIIZEKI, M., F. KITA and M. TAKAHASHI. 1978. Environmental and genetical effect of the chromosomal variation in callus of *Nicotiana* species. Japanese J. Breed., 28(4) : 304—310.
11. PELLETIER, G., C. RAQUIN et G. SIMON, 1972. La culture in vitro d'antheres d'Asperge (*Asparagus officinalis*). C. R. Acad. Sci., t 274 (6) : 848—851.
12. RAQUIN, C., 1973. Etude de l'androgenese in vitro chez *Petunia hybrida* et *Asparagus officinalis*. Bull. Soc. Bot. Fr., Mem. Coll. Morphologie : 269—274.
13. STRAUS, J. and C. P. LA RUE, 1954. Maize endosperm tissue growth in vitro. I. Culture requirements. Amer. J. Bot. 41 : 687—693.
14. 常脇恒一郎. 1975. 植物カルスにおける染色体変異. 組織培養 I (3) : 132—137.
15. 八畝利郎・原田 隆・嵯峨紘一・志賀義彦. 1971. アスパラガスの形態形成に関する研究(第1報). 組織培養法による若茎柔組織からのカルス形成. 園学雑. 40(3) : 230—236.
16. 八畝利郎・原田 隆・稲垣 昇・志賀義彦. 1972. 園芸作物のやく培養に関する研究(第1報). アスパラガスのやく培養におけるカルスの誘導と器官分化. 園学雑. 41(3) : 272—280.