

## *Paeonia suffruticosa* Andr. 의 葯培養에 關한 研究\*<sup>1</sup>

金 在 生\*<sup>2</sup>

### Studies on the Anther Culture of *Paeonia suffruticosa* Andr.\*<sup>1</sup>

Jai Saing Kim\*<sup>2</sup>

The anthers of late uninucleate microspore or early binucleate microspore stage of *Paeonia suffruticosa* Andr. (economic tree) were cultured on the modified Murashige and Skoog's medium suppliment with Keinetin, 2.4-D, and NAA for inducing haploid plants.

The results are as follows;

1. Callus were induced from both anther locule and anther wall, where that from anther locule was identified as haploid.
2. Among 2,000 anthers cultured, fourteen haploid callus were developed. These haploid callus were clearly identified to be originated from the microspore in anther locule.
3. Diploid callus were induced only 0.5 percent from the callus of endothelium of anther wall, septium of two neighboring anther locule, parenchyma tissues of connectives and or anther locules.
4. In the anther locule of *Paeonia suffruticosa* Andr. cultured in medium, swollen microspores, polynucleate microspores, multicellular pollen grains, or callus mass was frequently observed. And the haploids were seemed to be caused by the callus originated from the reduced microspore.

半數體植物을 만들기 爲하여 經濟樹種인 *Paeonia suffruticosa* Andr.의 1-2核 小孢子期的 葯을 Kinetine, 2.4-D, 및 NAA 등을 添加한 Murashige and Skoog의 改良培地에 培養하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 培養한 葯에서 Callus가 發生하였는데 이 callus는 葯腔內에서도 생기고 葯壁 組織等에서도 생기지만 葯腔內에서 出現된것만이 半數性callus였다.
2. 培養한 2,000個의 *Paeonia suffruticosa* Andr.의 葯中에서 14個(0.7%)의 半數性 callus가 생겨났는데 이 半數性 callus는 모두 葯腔內部에서 形成되어 葯의 縫合部를 해치고 나온 小孢子起源의 callus라는 것이 明白하였다.
3. 2n callus가 생긴 것은 全體의 0.5% 程度였었는데 이는 主로 葯壁組織의 內被나, 葯腔사이의 隔膜, 葯耳柔組織等에서 생긴 것이었다.
4. 葯腔內의 小孢子는 變化하여 多核小孢子 多細胞體들이 葯腔內에 出現하게 되며 還元 小孢子에서 callus가 생기기 때문에 半數體가 育成되는 것이 틀림이 없었다.

\*<sup>1</sup> Received for publication in July 24, 1974

\*<sup>2</sup> 慶尙大學 Gyeongsang National University

## 緒 言

藥培養에 關한 技術이 充分히 開發되면 自殖性植物의 交雜育成에서는  $F_1$ 世代에 各種因子型의 花粉의 種類數와 同數의 半數體가 生길것이고 이것을 倍加하여 여러 型의 同一團體를 만들어 낼수 있으므로 純系를 短時日에 固定할 수 있어서 育成世代가 大幅 短縮될 수 있을 것이다. 또한 他殖性植物에서는  $F_1$ 種子生産의 母體를 homo狀態로 만들수 있기 때문에 한 優良uniform한  $F_1$ 種자를 만들 수가 있고 自殖劣勢植物에서는 純化하기 爲한 反復自殖을 할 必要가 없으며 因子가 homo인 榮養繁殖植物도 homo狀態로 만들어 hetero에 依한 強勢한 新團體를 만들 수도 있다.

특히 木本植物은 한 世代가 길기 때문에 一般農作物과 같은 一年生植物의 育成方法을 適用하기가 困難했지만 永年木本植物을 藥培養하여 體系적이고 科學的인 育成을 할 수 있게 되면 그의 價値는 더욱 클 것이다. 半數體는 因子가 單 set이기 때문에 突然變異育成에는 實로 많은 利用價値가 있다.

그러므로 最近에는 各國의 學界에서도 藥培養에 關한 關心은 漸漸高調되어가고 있고 또한 重要視되고 있다. 따라서 이 技術이 充分히 開發되었을 때 갖어오는 產業的 利得은 極히 革命的이라고 할수 있을 만큼 크다. 片山 根井<sup>17)</sup>의 綜說에 依하면 半數體植物은 高等植物의 42屬 75種以上에서 出現되었다고 報告되고 있는 것과 같이 半數體를 만들어내기 爲한 努力과 方法은 많히 試圖되었었다.

藥培養은 前記한 바와 같이 重要한 意義를 가지고 있지만 이것이 還元小胞子에서 植物體로 誘導하여야 되기때문에 體細胞組織을 利用하는 一般組織培養에서와 같이 容易한 것이 아니라 藥培養에 關한 많은 努力이 있는데도 不拘하고 生길 것은 大部分이 體細胞由來의 것이었고 (C.,<sup>26-28)</sup> 小胞子起源의 半數體育成에 成功된 것은 現在까지 數種類의 植物에 不過하다.

既往에도 成熟花粉을 培養해서 Callus等 多細胞를 誘導한 例가 있다. *Ginkgo biloba*에서<sup>31)</sup> 精細胞, 多核細胞等이 出現하고 callus가 形成되었다든가, *Torreya nucifera*<sup>32)</sup>에서는 callus가, *Taxus brevifolia*<sup>33)</sup>에서는 花粉의 肥大 및 異狀分裂이, *Brassica oleraceae* × *Brassica alcohabra*의  $F_1$ 花粉에서의 callus 形成<sup>14)</sup> 등의 報告가 있지만, 이러한 成熟花粉培養에 依해서 半數體가 誘導되지는 못하였다.

그後 Guha and Maheshwari<sup>3,4)</sup>는 *Datura innoxia*

Mill.의 藥을 培養해서 半數體植物을 育成하는데 成功하였고<sup>19)</sup> 中田·田中<sup>20,21)</sup>는 *Nicotiana tabaccum*에서, 新開·大野는 rice에서, 韓·高<sup>9,12)</sup>는 *Solanum nigrum* L.에서, Kameya and Hinata<sup>15,16)</sup>는 *Brassica*에서 藥培養을 하여 半數體를 얻어 半數性植物을 길러서 다시 培數體植物로 만드는데 成功하였다.

筆者는 前報<sup>18)</sup>에 이어 繼續 木本植物에서의 藥培養에 依해 半數體植物을 誘起시키고자 經濟樹種인 *Paeonia suffruticosa* Andr.에 對한 藥培養을 實施하였던바 小胞子由來의 半數性 callus가 誘起되었고 이를 다시 植物體로 作出할 수 있다는 것이 明確해졌으므로 여기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

材料는 經濟樹種인 *Paeonia subfruticosa* Andr.의 藥을 使用하였다. 培養한 藥은 1973年 5月 開花期를 노렸다가 小胞子の 核이 1-2核性期에 있는 것을 採取하였다.

採取한 花蕾는 70% alcohol에 約 4秒동안 浸漬하였

Table 1. Modified Murashige and Skoog's medium

Component	mg/liter
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00
KNO <sub>3</sub>	1,900.00
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440.00
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
Na <sub>2</sub> -EDTA	74.00
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	55.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.00
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.03
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.60
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.25
Glycine	20.00
Nicotinic Acid	5.00
Pyridoxin-HCl	5.00
Thiamine-HCl	1.00
Inositol	200.00
Sucrose	30,000.00
NAA	1.92
2,4-D	2.00
Kinetine	2.24
Agar	7,000.00

다가 곧 calcium hypochlorite에 10分間 滅菌한다음 無菌室에서 殺菌水를 씻고 殺菌된 petri dish에 alcohol lamp로서 殺菌된 needle을 使用하여 이미 準備하여 두었던 試驗管內의 培養基에 하나하나 정성껏 接種하여 殺菌된 無菌 솜으로서 完全閉合 하였다.

培養基는 亦是 Modified Murashige and Skoog's Medium을 基本培池로 하고 여기에 生長 促進物質로서 2,4-D, NAA等을 適宜 組合하여 만들었고 여기에 sucrose와 agar를 添加한 後 pH가 6이되게 調整한 것을 使用하였다 (Table 1참조).

接種한 藥은 25°C內外의 black chamber內에서 培養하였으며 培地는 前例대로 1個月마다 갈아주었고 培養 試驗管은 每日같이 發育過程 및 變化狀態를 檢鏡하였으며 培養中の 小孢子 및 藥組織의 變化等을 觀察하기 爲하여 培養되어가고 있는 藥을 一定한 間隔으로 切

Table 2. Process of paraffin method.

1. Materials
2. Fixation
3. Water washing
4. 30% alcohol, 30 min.
5. 50% alcohol, 30 min.
6. 70% alcohol, 30 min.
7. 80% alcohol, 30 min.
8. 90% alcohol, 30 min.
9. 95% alcohol, 30 min.
10. 98% alcohol, 30 min.
11. Xylol I, 30 min.
12. Xylol II, 30 min.
13. Xylol soft paraffin I 2h.
14. Xylol soft paraffin II 2h.
15. Hard paraffin I 1h.
16. Hard paraffin II 2h.

Table 3. Process of Microtoming Method

1. Materials
2. Dry in oven 37°C 48h.
3. Xylol I, 30 min.
4. Xylol II, 20 min.
5. Alcohol I, 10 min.
6. Alcohol II, 10 min.
7. 95% alcohol, 10 min.
8. 90% alcohol, 10 min.
9. 80% alcohol, 10 min.

10. 10% alcohol, 10 min.
11. Washing, 30 min.
12. Iron alum liquid 30 min.
13. Washing 10-30 min.
14. Haematoxin 30 min.
15. Washing 10-30 min.
16. Iron alum destaining
17. 70% alcohol, 1 min.
18. 80% alcohol, 10 min.
20. 95% alcohol, 10 min.
21. 100% alcohol I, 10 min.
22. 100% alcohol II, 10 min.
23. Car-Xylol, 2 min.
24. Phenol xylol, 20 min.
25. Xylol I, 30 min.
26. Xylol II, 30 min.

斷하여 paraffin method (Table 2)와 microtoming method (Table 3)에 의하여 標本을 만들어 檢鏡하였다.

## 結果 및 考察

培養中에 있어서의 藥과 小孢子的 變化狀態를 보면 接種培養된 藥은 7일이되면 褐色으로 變하기 始作하여 36일이 되면 大部分의 藥은 褐黑色으로 變化한다. 其中에서는 間或 長時日이 되어도 變色이 되지 않는 藥도 있지만 이와 같은 變色有無에는 關係없이 死滅되지는 않는다. 그러나 callus가 形成되는 것은 變化가 있는 藥에서만 찾아 볼 수 있고 變化가 없는 藥에서는 2倍性 callus가 形成되기도 하는데 이와같은 2倍性 callus는 大概가 filament가 붙은 部分에서나 filament의 縫合線이나 藥隔等에서 나온다. 黑褐色으로 變換한 藥은 마치 삶아놓은 光澤 있는 麥粒 크기만한 模樣으로 오목 불룩하게 커지며 當初 接種時의 크기에 比하면 約 3倍程度의 callus塊로 肥大되는데 이와같이 肥大되는 理由는 callus가 이와같은 肥大部位에서 形成되기 때문이라고 生覺되었다. Haploid callus는 많은 培養藥中에서 黑色으로 變化된 藥에서 많이 나오게 되며 藥壁組織의 內被나 藥腔사이의 隔膜 또는 filament가 附着된 藥耳柔組織等의 部分에서는 2倍性 callus가 生가는 것이 特徵이었다.

接種後 40日前後가 되면 callus는 黑褐色으로 더욱더 커지며 (Fig. 3), 藥의 縫合線이 터지고 그 內部에서 淡黃色의 callus가 터져나왔었다 (Fig. 2). 그리하여 外部에 나온 이 callus는 約 1週日程度에 2倍程度의 callus塊로

## Explanation of Figures



Fig. 1. Multinucleate microspores  
n: Nucleus

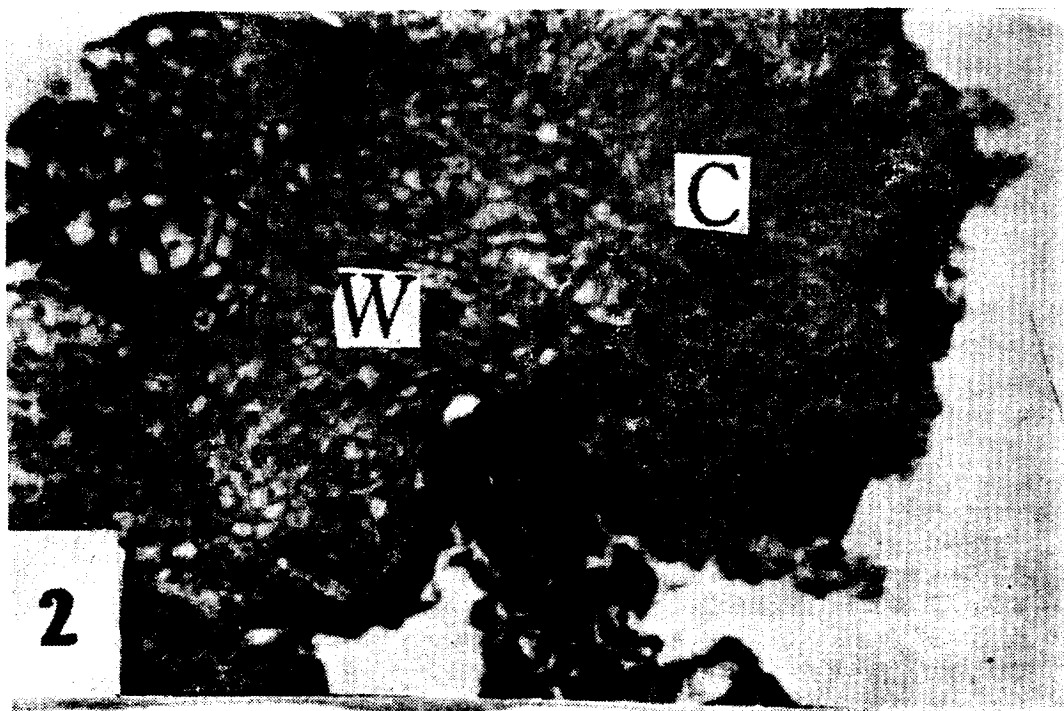


Fig. 2. Callus (C) originated from microspore emerges out of the anther slip  
W: anther wall

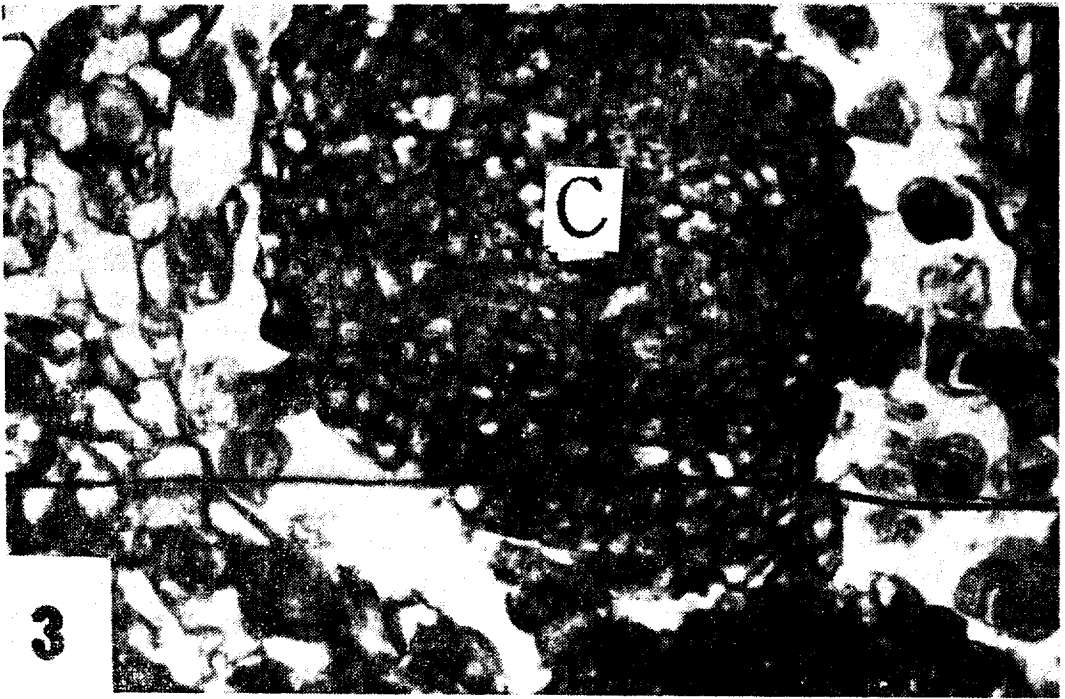


Fig. 3. Large callus mass (C) inside anther locule

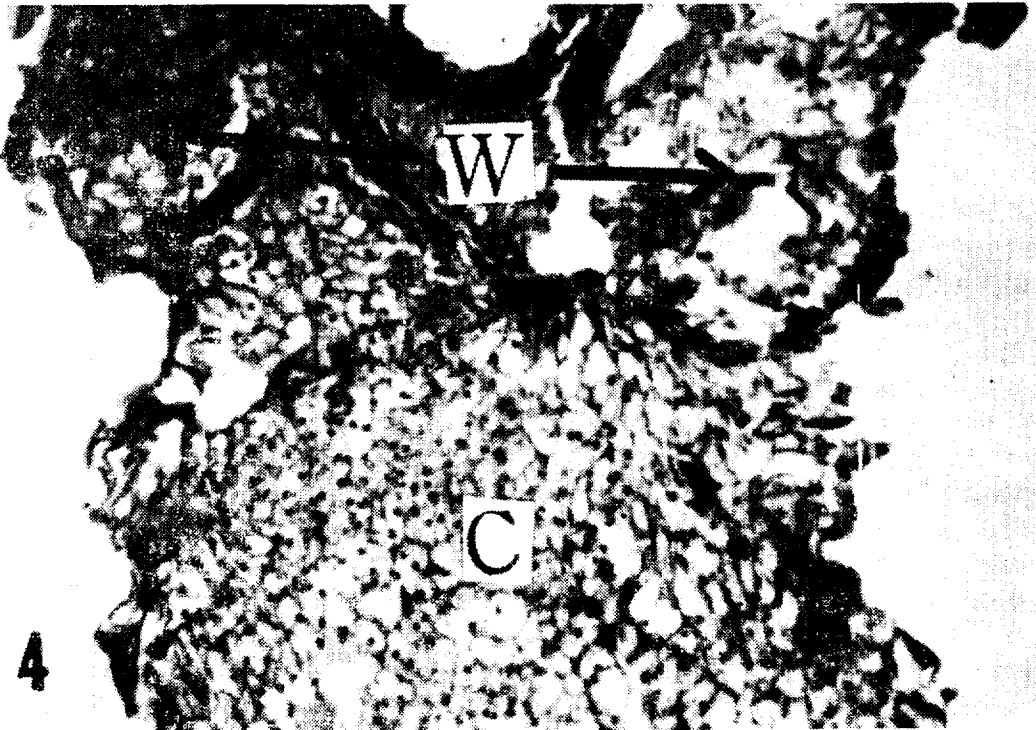


Fig. 4. Somatic callus (C) arising from anther wall (W)

急速度로 成長하였는데 이 callus는 葯腔에서 容易하게 分離되었고 callus가 터져나온 자리는 筆者가 既히 報告한 바 있는 *Prunus armeniaca* var. *ansu* Max.<sup>18)</sup>에서 터져나온 小孢子起源의 半數性 callus를 誘起시킨 empty locule과 꼭 같았었고 callus의 模樣도 꼭 이와 相似하였다.

이와같이 葯의 縫合線은 헤치고 葯內部에서 나오는 半數性 callus(Fig. 2)는 接種한 2,000個의 葯에서 14가 나와서 0.7%에 該當되었고, 2倍性 callus는 2,000個의 葯에서 10個가 나타나서 0.5%여서 n callus의 率이 높은 편이었다(Table 4).

Callus의 形態를 보면 半數性 callus와 2倍性 callus는 各各 色같이 差異가 있었다. 半數性 callus는 生育狀態가 좋은 것은 淡黃色이 있었고 成長이 不良한 것은 褐赤色이였으며 2倍性 callus는 白色인 것과 赤褐色으로 變하는 것이 있었는데 이중 赤褐色으로 變한 것이 더욱 成長이 빨랐었다. 또한 medium의 條件에 따라서도 生

Table 4. Induction of callus from n and 2n callus.

Species of Callus	No. of inoculated anthers	Callus No. of induced	%
2n callus	2,000	14	0.7
n callus	2,000	10	0.5

育의 程度에 差異가 있었는데 當初에 使用한 medium에서는 callus가 旺盛하게 生長하였었는데 새 medium을 갈아주어보면 漸次 나빠져서 어떤 anther는 生長이 靜止되어 버리는 것도 若干 있었다. 그리고 生育이 繼續되는 callus는 callus의 表面이 白色의 진주와 같이 光澤이 있었으며 生育이 靜止된 callus는 光澤이 없이 赤褐色이나 黑褐色으로 變化되어 버렸었다. 이와같은 callus의 變化現象은 *Solanum nigrum* L.<sup>12)</sup>에서나 *Prunus armeniaca* var. *ansu* Max.<sup>18)</sup>에서와 꼭같은 現象이 있었다.

小孢子 및 葯壁組織의 變化狀態를 보면 接種培養當時 1—2 核期에는 表皮와 內被葯茸柔組織, 葯隔等이 뚜렷하게 區別되었었는데 培養後 1週일이 되면 小孢子들 中에는 cell이 크고 cytoplasm이 두터운 豐富한 것이 생기게 되며 13일이 되면 더욱 明瞭하게 나타나며 몇 개의 小孢자를 除外한 나머지는 dwarfing 되기도 하고 cytoplasm이 없어지기도 하여 葯壁組織의 中層部位가 漸漸 消失되었었다.

Callus化하는 小孢子는 처음에는 形態가 커지면서 濃厚한 cytoplasm이 가득차 있었고 培養 21일이 되었을 때의 小孢자의 狀態는 2—4의 細胞體小孢子나 小孢子膜에서 생겨난 多細胞體로 變化되었었다(Fig 1). 이때 葯

壁의 組織細胞와 中層은 거이 消失되고 內被와 表皮만 남는다. 培養 30日以後가 되면 多細胞는 分裂이 계속되며 比較的 同等한 細胞와 分化가 되지않은 組織으로 된 ring form을한 小體로 變化되는데 池內에는 이와같은 것이 여러개 생기게 된다. 그後 이것들은 더욱 長하여 葯壁을 헤치고 튀어 나오는데 그 模樣도 變함이 없고 組織도 別로 分化되지 않으며 葯의 縫合線을 뚫고 나오게 된다. 이와같은 生育狀態는 胚囊內의 受精卵細胞가 分裂되어서 어린 幼胚로 發達된 것이라고 생각되었었다. 그러므로 embryoid나 callus塊라고 明確히 決定짓기가 힘들 程度였었다. 그後 培養 52일이 되면 白色이거나 淡黃色을 띤 찬란하게 빛이나는 callus가 縫合線밖으로 나오게 되는데(Fig. 2) 이때 葯壁組織은 表皮만 남게 되고 內被組織과 中層等을 完全히 없애 버린다. 빛나는 callus塊를 똑같은 組成方法에 의한 medium에 移植해보면 callus는 잘 育成되여간다. 따라서 *Solanum nigrum* L.<sup>12)</sup>나 *Datura innoxia*<sup>20)</sup>, *Nicotiana tabacum*<sup>8)</sup>, *Prunus armeniaca* var. *ansu* Max.<sup>18)</sup> 등은 小孢子가 直接 半數性 embryoid로 發達되었기 때문에 *Paeonia suffruticosa* Andr.도 embryoid로 잘 發達되어 分化한 細胞塊로 發達된 callus를 끊어보면 染色體도 5로 나타났기 때문에 半數性 callus가 明白하다고 生覺하며 이것이 小孢子分裂初期에는 原胚形成初期와 相似한 模樣을 하였고(Fig. 1), 그後에도 ring form의 小體들이 發見되었었다. 따라서 *Paeonia suffruticosa* Andr.도 또한 틀림없이 *Solanum nigrum* L.<sup>12)</sup>와 *Nicotiana tabacum*<sup>7)</sup> 등과 마찬가지로 embryoid를 形成하게 되지만 medium에 많이 添加된 auxin이나 特히 2.4-D때문에 callus化되는 것이라고 생각된다. 이와같은 點에서 이때는 小孢子는 變化되어 embryoid를 形成하지 않고 callus를 形成하는 것이라고 生覺하는 것이 옳은 것이라고 生覺되었었다.

Medium에서 培養되고 있는 callus는 細胞分裂이 旺盛해져서 遊離單細胞의 group을 이루게 되며 이와 같은 細胞들의 模樣은 ring form, eggform, anther form 등 多樣한 편이며 細胞의 分化도 小孢子가 花粉으로 分化되는 것과 같았다.

*Paeonia suffruticosa* Andr.에나 半數性 callus가 發生된 것은 0.7%로서 2倍性 callus의 發生率보다 많기 때문에 *Solanum nigrum* L.<sup>12)</sup>나 cucumber의 diploidal liquid callus<sup>6)</sup> 遊離單細胞의 報告와 類似히 一置되었었다. 따라서 *Paeonia suffruticosa* Andr.에서도 半數性 callus에서도 幼植物이 透導되는 것은 明白하다고 生覺한다. 2倍性가 callus가 發生하는 것은 培養 15日頃前

後가 되면 藥壁組織에서 callus가 생기는데 이는 內被와 花系, 表皮 등의 區別없이 나타나게 되고(Fig. 4)小孢子에서 haploid callus가 形成된 約壁은 完全하다(Fig. 2), 또한 藥壁에서 callus가 形成된 約壁도 同一하게 分化되었었다(Fig. 4).

以上에서 還元小孢자를 培養하고 變化시키는 것이 極히 어려운데 比해 經濟的 價値가 높다고 認定되는 Paeonia suffruticosa Andr.의 藥培養에서 小孢子起源의 確實한 haploid callus를 誘起시키는데 거들 成功된 것은 今後 木本植物의 藥培養技術에는 勿論 林業發展에도 功獻이 되리라고 生覺한다.

### 引用 文 獻

1. 尾立初雄 田淵公清, 1970. 園藝植物의 약培養により生じたカルスの起源. 日本園藝學會 秋季發表要旨 224-225.
2. Devreux M., 1970. New possibilities for the *in Vitro* cultivation of plant cells. Eurospectra 9(4): 106-110.
3. Guha, S. and S.C. Maheshwari, 1964. *In vitro* Production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204(57): 497.
4. \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_, 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in Vitro*. Nature 212(5057): 97-98.
5. 韓昶烈, 1969. 藥培養에 관한 研究. 韓國作物學會誌 7: 161-165.
6. \_\_\_\_\_, 高英瑞·鄭德教·金秉煥, 1969. 菜蕪의 藥培養에 관한 研究. (1) 오이의 2배性 粘液性 callus 韓國園藝學會誌 6: 25-27
7. \_\_\_\_\_, 1969. 벼의 藥培養에 관한 研究. 韓國育種學會誌 1: 1-12.
8. \_\_\_\_\_, 高英瑞·金文子, 1970. *Nicotiana tabacum*의 藥培養에 관한 研究. 韓國作物學會誌 8: 117-120.
9. \_\_\_\_\_, 1970. *Solanum nigrum* L.의 藥培養에 관한 研究. 韓國育種學會誌 2: 29-36.
10. \_\_\_\_\_, 黃貞姬, 1970. 벼의 藥培養에 관한 研究—Haploid callus의 發生 및 分化에 關하여. 護天李容夏教授 記念論文集 71-74.
11. \_\_\_\_\_, 1970. 벼의 藥培養에 관한 研究 2. 分化培地에 移植된 haploid callus의 發生 및 分化. 韓國植物學會誌 13(3): 17-19.
12. Harn C., 1971. Studies on anther culture in *Solanum nigrum* L. SABRAO News letter, 3(1): 39-42.
13. 韓昶烈·金文子, 1972. *Prunus armeniaca*의 藥培養에 관한 研究. 韓國育種學會誌 4: 1-5.
14. 龜谷壽昭, 1967. 花粉かちのカルス形成(豫報). 育種 17刷 2: 107.
15. \_\_\_\_\_, 日向康吉, 1970. *Brassica*의 花粉かち의 半數體育成. 日本植物學會誌 20: 14-19.
16. Kameya, T. and Hinata, 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan. J. Breeding, 20(2): 82-87.
17. 片山義男·根井正利, 1964. 植物의 半數性에 關する 研究 宮崎大學農學部 育種學研究室報告. 2: 1-78.
18. 金在生, 1971. 木本植物의 藥培養에 關한 研究. 韓國林學會誌 13: 23-39.
19. 村上寬一, 1967. 藥培養で 半數體をつくる. 農業及び園藝 42(6): 971-972.
20. 中田和男·田中正雄, 1968. 藥의 組織培養による 花粉かち의 タバコ幼植物의 分化. 日本遺傳學會誌 43(1): 65-71.
21. \_\_\_\_\_, 1968. 花粉의 組織培養による タバコ半數體의 育成. 農業及園藝 43: 685-686.
22. Nizeki, H. and K. Oono, 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. 23(7): 27-28.
23. 新關宏夫·大野青春, 1968. 藥培養による イネ半數體의 育成. 農業技術 23(7): 27-28.
24. Nishi, T. and S. Mitsuoka, 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. Japar. J. Genetics, 44(6): 341-346.
25. Nitsch, J.P. and C. Nitsh, 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 1963: 8-87.
26. 西 貞夫·豊田 努·大澤勝次, 1970. 약培養の 利用に 關する 研究 日本園藝學會 春季研究發表要旨: 166-167.
27. \_\_\_\_\_, 1970. アブラナ科 菜の 약培養に 關する 研究. 日本園藝試驗場 研究年報: 2-11.
28. \_\_\_\_\_, 1970. パラ科 菜の 약培養に 關する 研究. 日本園藝試驗場 研究年報: 12-16.
29. Sunderland, N. and F.M. Wicks, 1969. Cultivation

- of haploid plants from tobacco pollen. *Nature* 224 : 1227—1229.
30. 田中正雄・中田和男, 1969. 蒴培養によつて得られたタバコの種類と半数體の染色體數増加處理について. *日本遺傳學會誌* 44 : 47—54.
31. Tulecke, W., 1957. The pollen of *Ginkgo biloba* *in vitro* culture and tissue formation. *Amer. Jour. Bot.* 44 : 602—608.
32. \_\_\_\_\_ and N. Schgal, 1963. Cell proliferation from pollen of *Torreya nucifera*. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 22 : 153—163.
33. Tulecke, W., 1959. The Pollen Culture of C.D. La Rue: A tissue from the pollen of *Taxus*. *Bull. Torrey Bot. Club*, 86 : 283—289.