

## 培養細胞における遺伝的変異と育種への応用

大野 清 春\*

(1984年2月6日受理)

植物組織培養は植物の組織・細胞群を生体におけると同様の生理機能と形質発現を保持して培養したり、全能性を失うことなく脱分化状態で永続的に生長させることができる。組織培養技術を生理学、生化学、遺伝学等の研究、あるいは二次代謝産物の生産、育種への応用等に利用して行く上で全能性の制御と培養細胞の生理的・遺伝的安定性の保持は重要な技術的要因である。

培養細胞における遺伝的変異は分子生物学的手法による特定の遺伝子の解析、生化学的手法による酵素、蛋白質、代謝産物の解析、細胞遺伝学的手法による染色体の数や構造変化の解析、復原植物体の遺伝解析等により解明されよう。

近年、培養細胞からの植物体の再分化例は350種を越えている。そして、多数の植物体を効率的に得ることも可能となってきた。その過程において、再分化植物に種々の変異が見い出された(第1表)。生物界における変異には非遺伝的変異と遺伝的変異があり、組織培養による分化個体における変異についても、培養による生理的影響、組織に潜在していた変異の顕在化、および遺伝的変異が含まれよう。

筆者は培養細胞における遺伝的変異の解明のため、多数の再分化植物を得て、その変異の遺伝解析を進めてきた。この手法は労力および年数が必要であるが、遺伝的変異の全体的特徴を明らかにでき、また得られた突然変異体を永続的に維持することができる。ここではイネ培養細胞における遺伝的変異とその育種の意義について述べる。

## 1. カルスにおける染色体変異

培養細胞における染色体の変異は組織培養研究の初期

より知られており、総説も多い<sup>1)</sup>。染色体変異の培地条件による効果や、継代培養による変化を正確に検討するためには、花粉細胞、あるいは半数体プロトプラストなど単細胞クローンを培養の最初に使用するのが適当であろう。イネ(2n=24)の花粉起源カルスにおける染色体数の変異を第1図に示した。2,4-DまたはNAAにより形成されたカルスのいずれもその細胞の染色体数はきわめて大きな変異を示した。半数性細胞は2,4-D培地では34.5%, NAA培地では31.1%にすぎず、2倍性細胞はそれぞれ42.9%, 25.9%と高い頻度で観察された。染色体数50以上の細胞もみられ、確認された最高染色体数は114であった。このような高次の倍数性細胞および異数性細胞はNAA培地で形成されたカルスにやや多くみられた。観察に用いたカルスの分裂回数は20回以下と推定されるが、10から36までの間にある8種の染色体数を持つ細胞から成るカルスがあり、12から114までの間にある15種の染色体数を示す細胞を含むカルスもあった。これは染色体突然変異が高頻度に生じていることを示している。静止期のカルス細胞の核の大きさは、大小さまざまな場合があり、多核の細胞も観察される。多くの異数性細胞の出現は2倍体、4倍体などの細胞での2~4極の不規則な核分裂や不分裂その他の染色体行動の異常とその倍加の繰返しにより出現するものとみられる<sup>2)</sup>。

しかしながら、継代培養によりカルスの染色体数は比較的取れんする。イネ花粉起源の46個のカルスを観察したところ、最初の継代培養時には11個が半数性でなく、2倍性、4倍性あるいは両者混在し、4個のみで半数性が優性であった。19回の継代培養を繰り返したところ、4倍性および6倍性で安定していた系統もあったが、カルス系統により染色体数の様々の変動がみられた。しかし、一般に半数性細胞は減少し、倍加傾向が認められ、最終的には2倍性あるいは4倍性が優性であった<sup>3)</sup>。

## 2. 再分化個体におけるゲノム突然変異

培養細胞において種々の倍数性や異数性あるいは染色

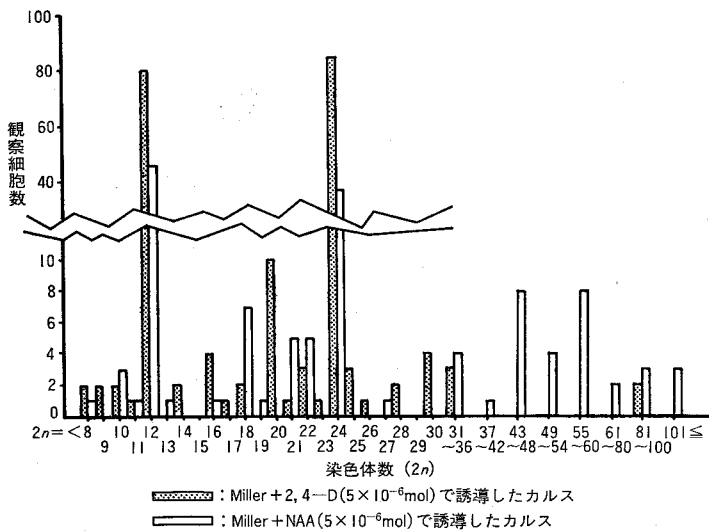
\* Kiyoharu OONO: Genetic Variability in Cultured Cells and Their Use for Breeding

農業生物資源研究所細胞情報研究室(〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)

Laboratory of Cell Genetics, National Institute of Agrobiological Resources (2-1-2, Kannondai, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305)

第1表 組織培養による再分化個体にみられた変異

	材料の起源	個体数	変異した形質	文献
<i>Ananas comosus</i>	幼少果実, えい芽等	448	とげ, 葉色, ろう質の分泌等	Wakasa (1979) <sup>15)</sup>
<i>Chrysanthemum mori-folium</i>	茎	282	染色体数, 花色	Miyazaki, Tashiro (1978) <sup>16)</sup>
<i>Haworthia setata</i>	花芽	388	染色体数と対合, 葉形, 葉色, エステラーゼ等	Ogihara (1981) <sup>17)</sup>
<i>Pelargonium spp.</i>	茎, 根等	522	器官の大きさ, 形態, 精油成分	Skirvin, Janick (1976) <sup>18)</sup>
<i>Solanum tuberosum</i>	葉肉プロトプラスト	>10,000	塊茎の形, 収量, 成熟期, 形態, 耐病性等	Shepard et al. (1980) <sup>19)</sup>
"	葉肉プロトプラスト等	405	塊茎の形, 染色体数	Wenzel et al. (1979) <sup>20)</sup>
<i>Saccharum officinarum</i>	振とう培養細胞等	568	耐病性, 糖収量等	Heinz et al. (1977) <sup>21)</sup>
"	茎頂カルス等	417	糖収量, 茎数, 形態等	Liu, Chen (1978) <sup>22)</sup>
"	茎基部カルス	102	耐病性	Larkin, Scowcroft (1981) <sup>13)</sup>
<i>Hordeum vulgare</i> × <i>H. jubatum</i>	3 倍体の雑種胚	43	アイソザイムの差異, 形態, 染色体等	Orton (1980) <sup>23)</sup>
<i>Lolium multiflorum</i> × <i>L. perenne</i>	3 倍体の雑種胚	>2,000	染色体数と対合, 形態, 生育活性等	Ahloowalia (1978) <sup>24)</sup>
<i>Lycopersicon esculentum</i>	葉	230	雄性不稔, 果実の色, 葉緑, 形態等	Evans, Sharp (1983) <sup>12)</sup>
<i>Lycopersicon peruvianum</i>	3 倍体の茎	64	2, 3, 6 倍体, 細胞質キメラ	Ancora, Sree Ramulu (1981) <sup>25)</sup>
<i>Nicotiana tabacum</i>	花粉	46	収量, 開花期, 形態アルカロイド	Burk, Matzinger (1976) <sup>26)</sup>
<i>Oryza sativa</i>	単一の花粉	19	草丈, 穂長, 粒密度等	Oono (1975) <sup>3)</sup>
"	純系の種子	1,121	出穂日, 草丈, 形態, 葉緑, 種子稔性等	Oono (1978) <sup>9)</sup>
<i>Zea mays</i>	雑種胚	85	草丈, 茎数等	Green (1977) <sup>27)</sup>



第1図 花粉起源カルス細胞の染色体数

材料: 薬培養 50~55 日で誘導された Arborio × Loctjan カルス

観察したカルスは 22 個, 観察した細胞数は 343 細胞

体異常が培養過程で生じている。したがって, 倍数体, 異数体の復元の可能性は容易に推定され, 実際に報告例も多い<sup>5)</sup>。イネ薬培養カルスからの再分化個体中には倍

数体が多数出現し, 半数体 (42%), 2倍体 (46%), 3倍体 (8%), 4倍体 (1%), 異数体 (3%) が見い出された<sup>3)</sup>。あるいは5倍体の作出例もある。中国・遺伝研究

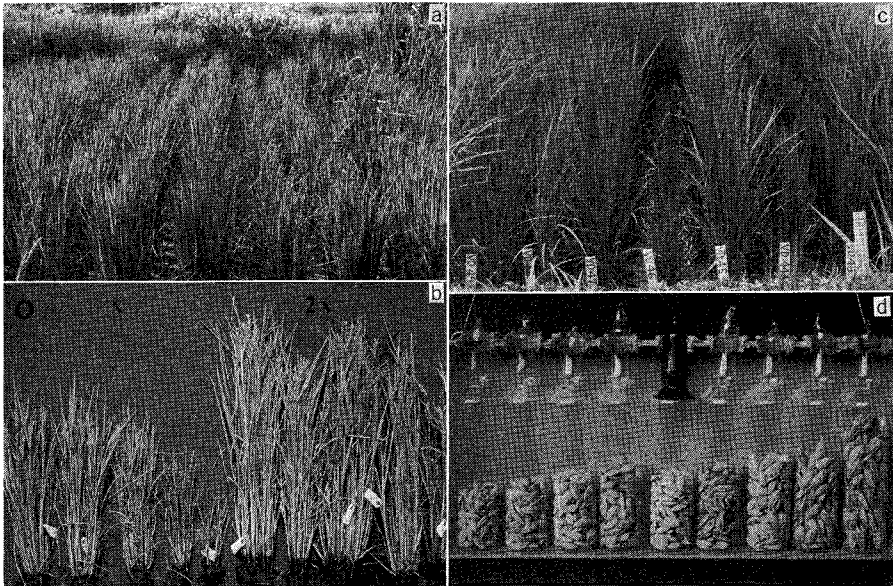
所3室2組(1976)<sup>9)</sup>も同様の結果を得ており、再分化植物中60%は2倍体、35%が半数体、5%が3倍体、4倍体、異数体であった。2倍体が半数体に対し、また、2倍体や半数体が異数体に対し、優位に立つことを示すものであろう。しかしながら、これは異数体が分化し得ないということではない。タバコの3倍体の葯培養では、染色体数26から41までの415個体の異数体が得られている<sup>7)</sup>。

### 3. 半数性カルスよりの分化個体間での変異

カルス形成時の観察と、遺伝的マーカーにより確認した花粉1個に由来するカルスから得た多数の再分化個体での形質の差異を調べた。1個のカルスから30個以上を分化させ、そのうち19個体を個体別にポットに移植し育成した。2個体は生長しなかったが、1個体は2倍体 $A_1(2x)$ で残りの16個体は半数体 $A_1(x)$ であった。これら $A_1(x)$ を圃場に株分けして植えたところ、草丈、穂長、着粒密度に差がみられた(第2図a)。また $A_1(x)$ の生育中に自然倍加した2個体の後代 $A_2$ 系統と2倍体として得られた個体の $A_2$ 系統とを育成したところ、草丈、穂長に関して分離し、系統内個体は2群に分かれた。また系統間でもこれらの形質に差があり、 $A_1$ 半数体において草丈の大きなものは、その倍加系統の後代の草丈も高い例がみられた。半数体においても識別できる遺伝的変異

が脱分化・再分化過程で生じていることを示している<sup>9)</sup>。

次に半数体組織における遺伝的変異を量的に解析するため、“日本晴”の自然半数体1個体の成長点部位からカルスを誘導し、そのカルスより植物体 $D_1$ を多数分化させ、次代 $D_2$ および三代 $D_3$ における遺伝的変異について解析した<sup>9)</sup>。200個体以上を分化させたが、育成した155個体中74個体は半数体 $D_1(x)$ 、80個体は2倍体 $D_1(2x)$ 、1個体は4倍体 $D_1(4x)$ であった。この出現率は葯培養による出現率に近い値である。半数体、2倍体とも農業形質は大きく変化していた(第2図b)。76個体の $D_1(2x)$ における突然変異の出現を $D_2$ 、 $D_3$ 系統の解析から推定してみると種子稔性、出穂期、草丈の3形質とも変異しているものが77.9%も含まれていた。さらに、事実上100%の個体で調査形質のいずれかがホモまたはヘテロに変異していた。培養期間が長期におよんだことから、培養期間中の倍加の時期を推定するのは困難であり、半数性組織が突然変異を受けやすいということはいえないが、突然変異形質が固定しているものは半数性細胞の時期の突然変異であるといえよう。また、草丈、種子稔性等が $D_2$ 、 $D_3$ 系統において対照より低下するものが多く、 $D_2$ 集団全体としては平均値が有意に低下した。これは集団としての劣化を示しているよう。



第2図 再分化個体およびその後代における形質変異

a : 単一花粉より得た植物体 $A_1(x)$ の株分け系統にみられる形質の差異, b : 半数体より得られた植物体4個体の半数体 $D_1(x)$ と4個体の2倍体 $D_1(2x)$ にみられる形質の差異。左側2個体は低稔性, ○は母植物の半数体, c : 種子カルスより得られた突然変異系統( $D_3$ )にみられる形質の差異, d : 種子カルスより得られた種子( $D_3$ )の重量および大きさの差異

#### 4. 2倍性組織を利用した突然変異の解析

培養細胞における農業形質の突然変異の頻度を明らかにするため、農林8号の自然半数体由来する遺伝的にホモな75粒の種子カルスより1,121個体の植物体を得て、当代(D<sub>1</sub>)およびその後代(D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>)での変異を分析した<sup>9)</sup>。1,121個体のうち83個体(7.4%)はアルビノであった。約800個体の成熟個体D<sub>1</sub>について、出穂期、草丈、形態、種子稔性について調査した。通常イネ品種の種子稔性は80%以上であるが、D<sub>1</sub>において種子稔性が80%以下に低下した個体の頻度は58.7%、その内種子稔性が40%以下にまで低下したものは18.2%であった。葉緑体変異も出現し、供試438 D<sub>2</sub>系統中34系統で葉緑体突然変異がみられ、突然変異率は8.4%とX線やγ線の種子処理よりやや低いが高頻度で突然変異が生じている。出穂日に関して早生、晩生両方向の変異が誘発されており、14日早生、あるいは14日以上晩生変異個体が得られた。草丈については、D<sub>2</sub>集団は草丈の低い方へ偏り、短稈突然変異が多く誘発されていると考えられた。一方、このD<sub>2</sub>集団ではないが20%長稈となった突然変異体も得られている。D<sub>2</sub>で分離して出現した変異体の一部についてはD<sub>3</sub>や対照品種との交雑実験によるF<sub>2</sub>分離比で検定し、劣性の遺伝子突然変異であることが明らかにされた(第2図c)。分離して出現した変異をまとめた結果を第2表に示した。調査形質について正常なD<sub>2</sub>系統は28.1%のみであり、また、28.0%は2つ以上の変異が重複して誘発されている。これらの変異の出現率はきわめて高いといえ、平均して分化個体D<sub>1</sub>の1個体あたり1.1の変異が誘発されていることになる。培養の過程で同一細胞内および同一カルス内でつぎつぎと変異が誘発されており、培養期間および変異体の出現頻度から細胞分裂当りの5農業形質の変異の頻度を推定してみると3~7%/細胞/細胞分裂と極めて高い値となる。この事は他の解析していない生理・生化学的形質等にも高頻度の突然変異が誘発されていると考えることが自然であろう。

すなわち、イネの培養細胞における突然変異は直ちに育種的利用を考えられるほどに高頻度といえる。なお、育種的にみれば、培養細胞を利用した生殖質の保存技術の確立も重要であり、変異発生機構の解明と制御が必要であろう。

培養細胞において、ミトコンドリアDNAに突然変異が誘発されることが報告されている<sup>10,11)</sup>。イネ再分化個体においても多数の雄性不稔突然変異体を得られた。その多くは核遺伝子の突然変異であったが、2,3の細胞質因子による雄性不稔とみられる系統も分離されている。

第2表 イネカルスより分化した個体の次代D<sub>2</sub>系統に観察された突然変異

変異した形質	系統数	%
正常	214	28.1
倍数性(4x)	12	1.6
種子稔性(F)	273	35.8
草丈(Ht)	19	2.5
出穂日(Hd)	3	0.4
形態(M)	1	0.1
葉緑変異(C)	27	3.5
F, Ht	74	9.7
F, Hd	14	1.8
F, M	7	0.9
F, C	59	7.7
Ht, C	3	0.4
Hd, C	1	0.1
M, C	1	0.1
F, Ht, Hd	11	1.4
F, Ht, M	2	0.3
F, Ht, C	27	3.5
F, Hd, C	2	0.3
F, M, C	1	0.1
F, Ht, Hd, M	1	0.1
F, Ht, Hd, C	9	1.2
F, Ht, M, C	1	0.1
合計	762	100

核遺伝子による雄性不稔を含めた遺伝子突然変異が培養細胞からの復原個体において出現することはトマトにおいても報告されている<sup>12)</sup>。

培養細胞における遺伝子突然変異等の誘発の原因として考えられることは、①脱分化・再分化の過程が遺伝的に不安定、②2,4-Dなどの植物ホルモンが突然変異誘発原として働く、③他の培地成分等が培養に不适当であることが考えられる。2,4-Dによる突然変異誘発効果は種子処理では効果はほとんど認められず、また、培地の無機塩などの濃度も決定的原因になるほどの変異の増減は認められなかった。そこで筆者は、脱分化状態が遺伝的に不安定であると結論づけている。では、なぜ脱分化状態が高頻度の染色体あるいは遺伝子突然変異等が誘発されるか、その機構や防止策、また、遺伝子型による差異があるとすればその差異は何か、これらは今後の研究課題であろう。

#### 5. 培養条件による遺伝的変異の差異

優性の突然変異は分化当代D<sub>1</sub>でも発現するが、劣性突然変異は次代D<sub>2</sub>で初めて分離して発現する。そこで、D<sub>2</sub>集団における分散の大きさの比較により、遺伝的変異誘発の効果を比較できよう。

種々のカルス誘導培地を検討したが、たとえばYE添

第3表 “ホモ” 突然変異の正逆交雑による解析 (未発表)

系統または雑種	推定される遺伝子型	自殖または F <sub>2</sub> の個体数	自殖または F <sub>2</sub> の草丈
9SAE37 (“ホモ” 突然変異系統)	$s^*/s^*$	33	62.3±2.8 (cm)
日本晴	+/+	23	87.6±3.4
9S103 (劣性遺伝子突然変異系統, D <sub>3</sub> )	$nl/nl$	18	56.7±3.2
9SAE37×日本晴	$s^*/+$	227	87.7±5.6
日本晴×9SAE37	+/ $s^*$	321	88.0±5.9
9S103×9SAE37	$nl/+$ , +/ $s^*$	{ 104 31	89.8±5.8 (+/ $s^*$ , +/+) 51.5±5.6 ( $nl/nl$ )

(分離比 3 : 1,  $p > 0.5$ )

加培地では農業形質 5 形質の分散の積は, YE 無添加培地に比べて 1.8 倍, カルス—再分化を経ない対照と比べると 123 倍も増大した。また, 再分化培地の差異による変異について検討したが, 糖の濃度による差異はほとんど認められなかった。しかし, BA 濃度の増大に伴って分散積は増大し, 低濃度の BA に比較すると高濃度の BA での変異は 24 倍と増大した。各種の化学物質の効果についても検討を加えた。たとえば, カフェイン添加では 5 形質の分散積の値は無添加の対照に比較し 5.5 倍, BUdR 添加で 1.3 倍の増加と差異は小さかった。通常添加物により変異は増大したが種々の培養条件により変異を減少せうる例も認められた。

#### 6. 同型接合体の突然変異

高頻度の遺伝子突然変異等の出現を述べてきたが, 種々の培養条件, たとえば, NaCl, S-aminoethylcystein (SAEC) を含んだ培地等から復原した植物体の中で変異形質が分化当代 D<sub>1</sub> で出現し, その形質が固定している例が見い出された。その場合 1 粒の種子起源の分化植物の中で正常型も同時に得られている (これらは薬剤による選抜の結果ではないと考えている)。

この現象には, 優性突然変異あるいは細胞質突然変異等が考えられ, 対照との交雑実験により, その原因は明らかにされる。第 3 表には SAEC により得られた変異についての交雑実験の一例を示した。この結果明らかになった事は, 自殖によれば固定し安定した形質として遺伝したが, 正逆交雑では F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> とも変異形質は出現しなかった。このような現象はメンデル遺伝学等により説明されない。このようなホモで見い出された草丈の極めて短い形質の出現頻度は約 10<sup>-2</sup> であった (D<sub>1</sub> 3,000 個体, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> 60,000 個体以上の解析による)。この値は特定の対立遺伝子座で 2 重に突然変異が起ることによるとすれば, それは 10<sup>-1</sup> の頻度で起こることが必要となるほど高頻度である。

筆者はこの正常型との交雑により遺伝しない同型接合体の突然変異の原因については, 脱分化状態のときに引

き起こされた一部遺伝子の発現の抑制 gene inactivation によるのではないかと考えている。すなわち脱分化した培養細胞系は, たとえばイネなどの単子葉植物では双子葉植物とは異って通常, 葉緑体が合成されず, 白黄色のカルスとなっている。このような遺伝子群の不活性化は脱分化状態では極めて高頻度に生ずるが, 再分化の過程で抑制が解除される。しかしながら, 同一の遺伝子座に起こった遺伝子の不活性化がときには再分化後も解除されず, 形質としてホモとなったため容易に見い出された結果と考えられる。現象の普遍性については現在推定するしかないが, 単に草丈に関する形質に限定されるとは考えられず, その場合に培養過程においては種々の突然変異に匹敵するほどの高頻度に起こる現象とも考えられる。

遺伝子の発現の調節の一方法としてメチル化等によることが知られているが, 脱分化状態における遺伝子の inactivation の解明は興味あるものと考えている。筆者はイネの葯培養において高頻度のアルビノの出現 (10~100%) の主要な原因はクロロプラストおよび核の遺伝子の突然変異であり, 関連する遺伝子数が多数のため高頻度になるものと考えていたが, 葉緑素形成等に関連した遺伝子の不活性化について検討する必要性を感じている。

ここで短稈形質, すなわち, 脱分化—再分化という培養環境下で誘導された短稈形質が有性生殖を経るにもかかわらず遺伝するという事は極めて興味深いことである。遺伝子の不活性化の機構など脱分化現象の解明が必要である。

#### 7. 体細胞突然変異の育種の利用

以上に示したように, 脱分化させたイネ培養細胞は遺伝的には極めて不安定であり, 再分化個体は正常なもの他に何らかの突然変異が誘発されているものも多い。多くの種の培養細胞における染色体変異や<sup>1,2)</sup>somaclonal variation の出現<sup>13)</sup>から, 遺伝的不安定性は培養細胞の一般的特徴と考える。

ところで、培養細胞を用いた試験管育種技術は、変異の拡大、選抜、固定等を細胞レベルで行うことにより、既存の個体レベルでの育種システムよりも効率的に、①変異の幅を拡大したり、②有用形質を選抜したり、③遺伝形質の固定を短期間に行いうることにより成立する技術である<sup>9)</sup>。培養細胞における体細胞突然変異はゲノム、染色体、遺伝子および細胞質のすべてのレベルでおき、放射線や化学突然変異誘発原単独のスペクトラムより広い変異であるといえる。そして、遺伝子突然変異により、農業上有用な特性も多数出現する(第2図d)。したがって、体細胞突然変異は育種的にみて新しい突然変異誘発手段といえる。この突然変異の頻度は、培地条件を変えることにより、増減できる可能性もみられている。

細胞レベルにおいて突然変異体や種々の特性を選抜した例は多い<sup>14)</sup>。細胞レベルにおける選抜は培養条件の制御および大量の細胞集団を扱えることが特徴であるが、さらに強調すべきことは体細胞突然変異と関連して、反復した突然変異の誘発と選抜圧の適用が可能な点である。細胞選抜では、生合成系の解明された代謝系の突然変異体等の選抜の可能性が高い。一方、草丈、形態、収量性等細胞レベルでの選抜が困難とみられるものも多い。細胞レベルと個体との形質発現等の差異について研究を進める必要があろう。葯・花粉培養による半数体の作出は種子植物において遺伝的固定を図る理想的な方法といえ、実用品種育成の例も多い。この場合にも体細胞突然変異の影響はあるわけで、半数性細胞の時の突然変異の利用と、突然変異防止を合せて進める必要があろう。

## 文 献

- 1) Sunderland, N., 1977. In "Plant Cell and Tissue Culture" (ed. by Street, H.E.), p. 177-206, University of California Press, Los Angeles.
- 2) Bayliss, M.W., 1980. *Int. Rev. Cytol.*, **11 A** : 113-143.
- 3) 大野青春, 1975. 農技研報告, D26 : 139-222.
- 4) Chen, C.-C. and C.-M. Chen, 1980. *Can. J. Genet. Cytol.*, **22** : 607-614.
- 5) D'Amato, F., 1977. In "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture" (ed. by Reinert, J., Y.P.S. Bajaj) p. 343-357, Springer-Verlag, Berlin.
- 6) Institute of Genetics, 302 Research Group, Academia Sinica, 1976. *Acta Genet. Sinica*, **3** : 277-285.
- 7) Niizeki, M., 1977. *J. Facult. Agric. Hokkaido Univ.*, **58** : 344-466.
- 8) Oono, K., 1983. In "Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement," p. 95-104, Science Press, Beijing.
- 9) Oono, K., 1978. *Trop. Agric. Res. Series*, **11** : 109-123.
- 10) Gengenbach, B.G., J.A. Connelly, D.R. Pring, M.F. Conde, 1981. *Theor. Appl. Genet.*, **59** : 161-167.
- 11) Kembel, R.J., R.B. Flavel, R.I.S. Brettell, 1982. *Theor. Appl. Genet.*, **62** : 213-217.
- 12) Evans, D.A., W.R. Sharp, 1983. *Science*, **221** : 949-951.
- 13) Larkin, P.J., W.R. Scowcroft, 1981. *Theor. Appl. Genet.*, **60** : 197-214.
- 14) 大野青春, 1984. 新農業システム総合技術(高辻, 橋本, 三沢編), R & D プランニング, 東京, p. 104-129.
- 15) Wakasa, K. 1979. *Jpn. J. Breed.*, **29** : 13-22.
- 16) 宮崎貞己, 田代洋丞, 1978. 佐大農叢, **44** : 13-31.
- 17) Ogihara, Y., 1981. *Theor. Appl. Genet.*, **60** : 353-363.
- 18) Skirvin, R.M., J. Janick, 1976. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **101** : 281-290.
- 19) Shepard, J.F., D. Bedney, E. Shahin, 1980. *Science*, **28** : 17-24.
- 20) Wenzel, G., O. Schieder, T. Przewozny, S.K. Sopory, G. Melchers, 1979. *Theor. Appl. Genet.*, **55** : 49-55.
- 21) Heinz, D.J., M. Krishnamurthi, L.G. Nickell, A. Maretzki, 1977. In "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture" (ed. by Reinert, J., Y.P.S. Bajaj), p. 3-17, Springer, Berlin.
- 22) Liu, M.-C., W.-H. Chen, 1978. *Euphytica*, **27** : 273-382.
- 23) Orton, T.J., 1980. *Theor. Appl. Genet.*, **56** : 101-112.
- 24) Ahloowalia, B.S., 1977. *Farm Food Res.*, **8** : 120-122.
- 25) Ancora, G., K. Sree Ramulu, 1981. *Plant Sci. Lett.*, **22** : 197-204.
- 26) Burk, L.F., D.F. Matzinger, 1976. *J. Hered.*, **67** : 381-384.
- 27) Green, G.E., 1977. *Hortscience*, **12** : 7-10.