

プロトプラスト培養を用いた耐病性植物の作出

古澤 巖*

(1984年6月18日受理)

1. はじめに

耐病性作物の育成のために、これまでいくつかの方法が試みられてきた。その一つは、野生種あるいは他品種がもっている抵抗性遺伝子をいわゆる交雑と選抜によって作物に導入する方法であり、これまで多くの成果が得られてきた。しかし、この際導入すべき有益な遺伝子が常に自然界から無限に供給されるものではないので、新しく抵抗性遺伝子を作り出す必要がある。そのような考え方から、人工的に突然変異を誘導し、新しい抵抗性遺伝子をもった作物を作ることにも試みられた。いずれにしても、有益な遺伝子の供給が基本となっている。最近になって、植物の遺伝子を直接的に変換させること、すなわち、組み換え DNA による新しい植物の作出や細胞培養の過程で生じる変異を利用して、有益な性質をもった作物の選抜・育成が試みられるようになった。前者についてはまだ基礎実験が行われている段階であり、実用面での応用にはまだかなりの時間を要すると思われるが、後者については、ある程度の成果が得られ、いくつかの耐病性作物が作られている (Table 1)。プロトプラスト培養あるいは組織培養を用いた耐病性植物の作出には、次の2条件が揃うことが望ましい。(1)できるだけ多くの変異を獲得するために、単細胞からの個体復元が可能であること、すなわち、本来細胞が潜在的に持っている性質をひきだすことを目標とし、次いで細胞から再生植物に至る過程で起こる変異を利用することである。宿主植物と病原菌との相互反応を詳しく観察すると細胞によって病原菌に対する反応が異なることがしばしば見ることができる。たとえば、ジャガイモと疫病菌 (*Phytophthora infestans*) との関係において、非親和性レースの菌 (ジャガイモ品種を侵せない菌) あるいはその菌糸からの水不

溶性細胞壁成分 (この物質によって宿主細胞死が起り、侵入した菌も死ぬ) に対する反応が細胞によって異なることが知られている^{1,2)}。また、タバコ葉肉プロトプラスト由来のカルスにおける superoxide dismutase の活性にはこれらカルスにまったくストレスを与えなくとも、カルス間に大きな変異がみられる³⁾。これらのことは、同一組織内の細胞間にもいろいろな変異があることを意味する。そして、これらの変異が作物の改良や耐病性育種のための遺伝子源として考えられる。(2) 細胞や組織培養中に生じる変異の中から、目的とする有益な変異をもった細胞のみを選抜するための適当なストレスがあること。耐病性作物を作るためのストレスとして、病原菌の毒素が考えられる。個体レベルで、病原菌に対して抵抗性を示す作物から誘導されたカルスはカルスレベルにおいても病原菌に対し抵抗性を示すことがあり、カルスと個体レベルの病原菌に対する反応が相関していることが知られている⁴⁻⁷⁾。しかし、耐病性作物を作るためには、逆に病原菌に対して抵抗性を示すカルスを選抜することが必要である。この場合、直接カルスに病原菌を接種するよりはむしろ、病原菌が生産する毒素によって耐毒素カルスを選抜の方が望ましい。すなわち病原菌の病原力と相関するこのような毒素の利用は多数の細胞集団の中から病原菌に対し抵抗性を有する細胞のみを選抜するために非常に有効である。以上のべてきたように、これら二つの事柄が満たされた実験系であれば比較的容易に培養細胞系を用いた耐病性植物の育成が可能であると思われる。ここでは、特にタバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) プロトプラストを用いたタバコ赤星病 (*Alternaria alternata* pathotype tobacco) 抵抗性タバコの作出について、われわれの研究室で行った実験⁸⁾ を中心に述べる。

2. プロトプラストの培養

プロトプラストの調製や培養については多くの報告があり、用いた植物の種類や実験者によって、その方法はかなり異なる⁹⁾。当研究室ではタバコプロトプラストの

* Iwao FURUSAWA: Production of Disease Resistant Plant Derived from Protoplasts
京都大学農学部植物病理学研究室 (〒606 京都市左京区北白川)
Faculty of Agriculture, Kyoto University (Sakyo-ku, Kyoto 606)

Table 1. Disease resistant plants obtained by the screening through conventional in vitro procedures.

Pathogen	Plant	References
<i>Alternaria alternata</i> pathotype tobacco	<i>Nicotiana tabacum</i>	Thanutong et al. 1983 ⁸⁾
<i>Alternaria solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Mattern et al. 1978 ²³⁾
Fiji disease	<i>Saccharum officinarum</i>	Krishnamurthi 1982 ²⁹⁾
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Behnke 1980 ²⁴⁾
<i>Helminthosporium maydis</i>	<i>Zea mays</i>	Gengenbach, Green 1975 ²¹⁾
<i>Helminthosporium sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Heinz et al. 1977 ²²⁾
<i>Phoma lingam</i>	<i>Brassica napus</i>	Sacristan 1982 ¹⁵⁾
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Behnke 1979 ³⁰⁾ Shepard et al. 1980 ¹⁴⁾
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Carlson 1973 ²⁵⁾ Thanutong et al. 1983 ⁸⁾
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Upadhyya 1978 ²⁶⁾
<i>Sclerospora sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Heinz et al. 1977 ²²⁾
<i>Sclerospora sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Krishnamurthi 1982 ²⁹⁾
Tobacco mosaic virus	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Murakishi, Carlson 1982 ³²⁾
<i>Ustilago scitaminea</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Lui 1981 ³¹⁾
<i>Verticillium albo-atrum</i>	<i>Medicago sativa</i>	Latunde-dada, Lucas 1983 ¹⁶⁾

調製・培養は次のようにして行っている。葉面を70%アルコールと0.1% HgCl₂ で殺菌し、水洗したのち、裏面表皮をはく離し、酵素液(1%セルラーゼ, 0.05% マセロザイムを含む, 0.6 M マンニット, pH 5.8) に浮かべる。酵素液は使用する前にマイレックス GS フィルターで除菌する。28°C で培養2.5時間後、葉組織からのプロトプラスト離脱をよくするため、軽く振盪し、さらに30分間培養する。培養後、組織片を除くため、プロトプラストけん濁液を4層のガーゼで濾過したのち、遠心分離によってプロトプラストを集める。プロトプラストは滅菌した1 mm CaCl₂ を含む0.6 M マンニット溶液で数回遠心分離によって洗浄する。この方法を用いて、タバコのほか、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、コマツナ、トマト等いずれも良好なプロトプラストを得ることができた¹⁰⁾。タバコプロトプラストからの細胞分裂には Nagata and Takebe¹¹⁾ の培地にプロトプラスト(1×10⁴個/ml)をけん濁し、プラスチックシャーレ(直径9 cm)に約5 ml 注入し、パラフィルムで密閉したのち、10 W 蛍光灯下、26°C で培養した。3週間後には多数の細胞集塊が肉眼的に観察できるようになるが、この時期に寒天とともに1×2 cm の大きさに切りとり、Linsmaier and Skoog¹²⁾ の基本培地に2 mg/l の2 mg/l α-naphthalene-acetic acid (NAA) と0.2 mg/l 6-benzyladenoprine (6-BAP) を加えた培地上に移植する。培養は13,000 lux, 26°C で行った。この方法では、3~4週間後には独立した直径1 mm 程度のカルスが寒天上に突出して

形成されるため、毒素含有選抜培地への移植に便利である。また、カルスの成育も移植しない場合に比べ早いようであった。カルスからの出芽には0.1 mg/l NAA と5 mg/l 6-BAP を、出根には0.1 mg/l NAA と0.5 mg/l 6-BAP を加え、幼植物の育成にはホルモンを添加しなかった。幼植物は殺菌したパーミュキュライトを満たした鉢に移植し、乾燥を防ぐため、ビニール袋を掛けた。完全に根付いたのち、ビニール袋の一部に穴を開け、徐々に湿度を落しながら、自然環境に適応させ、育成した。プロトプラストからの植物再生には使用する培地、ホルモンバランスが重要であるが、供試する植物の成育状態が最も大きな要因になるようである。そして、細胞培養を用いた耐病性作物の作出において、1細胞からの植物個体復原が最も大きな問題点となる。

3. 再生植物の変異

プロトプラストからカルスを経て植物個体に至る過程でいろいろな変異が起こる。そして、その変異のいくつかは遺伝的に後代に伝わることも知られている¹³⁾。タバコプロトプラストから再生された植物の形態的・生理的変異について調べてみた。100個のプロトプラスト由来のカルスから、701個の個体を復元させた結果、約30%が形態的あるいは生理的に親株であるサムスンと異なることがわかった⁹⁾。これらの変異が遺伝的に後代に伝わるかどうかは分からないが、少なくとも、プロトプラスト培養からの再生植物に非常に高率に変異がみられることは確かである。それゆえ、適当なストレスを用いれ

ば、目的とする性質をもった植物個体を選抜することが可能であろう。しかし、これまで突然変異誘発剤やストレスによる選抜を行わずに比較的高率にジャガイモの疫病¹⁴⁾、夏疫病¹⁴⁾、ナタネの根腐病¹⁵⁾、アルファルファの萎ちょう病¹⁶⁾、等に抵抗性の作物が得られていることは興味深い。

4. 耐毒性カルスを選抜

Wheeler and Luke¹⁷⁾ は病原菌毒素に耐性の植物は病原菌に対しても抵抗性であることに注目し、耐病性作物の育種に利用できるのではないかと考えた。彼等は実際 victoria blight 病 (*Helminthosporium victoriae*) 感受性エンバク品種の種子からの抵抗性変異株の選抜に本菌毒素を利用した。エンバク種子 (4.5×10^7 個粒子) を毒素液に浸漬処理し、選抜した結果 973 個体の抵抗性株を得ている。同じような試みは HS-毒素 (*Helminthosporium sacchari*) によるサトウキビ眼点病¹⁸⁾ や PC-毒素 (*Periconia cirinata*) によるモロコシの milo 病¹⁹⁾ についても行われ、ある程度の成果をあげている。すなわち、耐病性作物を得るためには、どのレベルでストレスを処理するかが問題となる。個体レベルで抵抗性である作物は、それら作物から誘導されたカルスにおいても病原菌や毒素に対し耐性であること、逆にカルスレベルで耐性である場合にはそのカルスから得られた再生植物は病原菌に対し抵抗性を示すことが多い。それゆえ、抵抗性植物を得るためには、まず、毒素耐性カルスを得る必要がある。一般的には、毒素存在下で生きのこる細胞株を選抜することによって毒素耐性株を得ている。その際、用いる毒素の濃度が重要であり、濃度が低すぎると“突然変異”株を選抜することができないし、また高すぎると“耐性変異”株も殺してしまうことになる。毒素耐性カルスを選抜するためには、至適毒素濃度(われわれは生存率1~5%を目標にした)をまず設定する必要がある。タバコ赤星病抵抗性タバコ植物をつくるために、本菌の毒素に耐性のカルスを作ることから実験を行った。その際、どのような毒素を用いるかが問題となる。本病の発病に関わる毒素として通常二種類の毒素が存在する。その一つは病原性を決定する宿主特異的毒素²⁰⁾ (本菌毒素の化学構造は未だ不明である) ともう一つは病原性決定には関与しないが、感染後期に菌体から放出され、病斑拡大等に関係する非特異的毒素である。細胞培養による抵抗性育種への毒素利用は前者においては、トウモロコシごま葉枯病²¹⁾、サトウキビ眼点病²²⁾、タバコ赤星病⁹⁾ などがあり、後者の例としては、ジャガイモ疫病¹⁴⁾、ジャガイモ夏疫病²³⁾、ジャガイモ萎ちょう病²⁴⁾、タバコ野火病^{8, 25)}、ジャガイモ葉腐病²⁶⁾などにみられる。しかし、真の抵抗

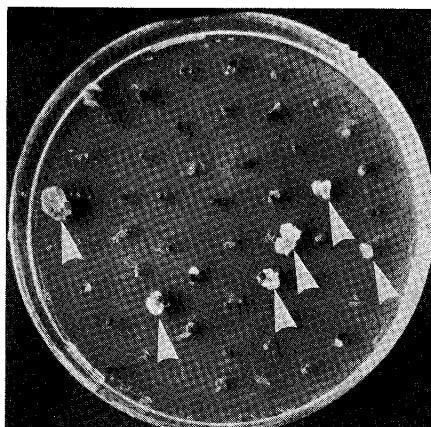


Fig. 1. Tobacco calluses after 4 weeks cultured on toxin containing medium. Most of the calluses turned brown and died. Arrows indicate growing calluses.

性作物を作るためには宿主特異的毒素耐性の作物を作る必要がある。タバコ赤星病抵抗性のタバコ植物を作出するためには、まず宿主特異的毒素画分を抽出する必要がある。本菌培養濾液を酸性下で酢酸エチルで抽出すると本菌の非特異的毒素である tenuazonic acid は酢酸エチル画分に移り、宿主特異的毒素は水層に残る⁹⁾。培養濾液 5 l を最終的に 50 ml に濃縮し、耐毒素カルス選抜に用いた。タバコプロトプラスト由来のカルス成長に毒性効果を示す最も低い濃度は、0.025% (v/v) であり、3%以上になるとカルスの成育は完全に停止した。耐毒素カルスの選抜には 0.7% の濃度を用いた。大部分のカルスは、3~4週間以内に茶褐色に変色し、死んだ (Fig. 1)。700 個のカルスを毒素を含む培地で 2 回選抜し、最終的に 5 個の毒素耐性カルスを得ることができた。これらカルスは毒素を含まない培地に数回移植しても、その性質を失うことはなかった。毒素耐性カルスを選抜すること自体は容易であり、同じような方法で種々の物質に対する耐性カルスが多数得られているが、育種を目的とする研究では、それらカルスからの再生能力が問題であり、選抜過程の中で十分その能力を保持していることを確かめながら選抜することが大切である。

5. 再生植物の耐病性

in vitro 培養系を利用して、耐病性作物を得るには毒素に耐性のカルスから再生された植物の抵抗性検定、すなわち、抵抗性発現を病原体の接種や病原毒素処理によって判別することが最も重要な仕事の一つである。病原菌の毒素と発病とは密接に関係しているが、毒素耐性のカルスからの再生植物が必ずしも抵抗性を示すとは限ら

Table 2. Variations in morphological characteristics and responses to *A. alternata* pathotype tobacco among plants regenerated from individual toxin-resistant calluses.

Isolation No. of original callus	No. regenerated plants	Morphological type	Disease reaction ^a		
			R	I	S
48	10	3	3	5	2
458	5	3, 4	2	1	2
496	5	12	—	—	5
500	3	13	—	1	2

^a R=resistant, I=intermediate, S=susceptible.

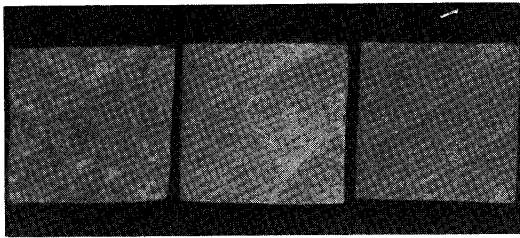


Fig. 2. Response to *Alternaria alternata* pathotype tobacco on cut leaves of tobacco. The leaf of susceptible plant (Samsun) is covered with expanded necrotic flecks (left); intermediate (middle); resistant (right).

ない。それゆえ、再生植物が抵抗性であるかどうかの検定方法を確立する必要がある。多数の試料を同時に検定するために、タバコ赤星病菌に対する抵抗性検定は再生植物の切葉 (2×2 cm) を用いて行った。切葉に均一に孢子けん濁液 (10⁶ 個孢子/ml) をふん霧接種し、28°C、10,000 lux 下の湿室に48時間置いた。罹病度は接種葉片 (1 cm²) に現われるえ死斑の数と大きさを顕微鏡下で測定し、3段階に分けた。え死斑が50個以上現われたものを罹病性とし、11~50個/cm² を中度抵抗性、0~10個/cm² を抵抗性とした (Fig. 2)。このような基準のもとに1回目の毒素を含む選抜培地で生き残った36個のカルスから再生した695個体のうちほとんどが罹病性であり、わずかに10.6%が中度抵抗性であった。しかし、選抜培地を2回通過して生き残ったカルスから再生された個体のうち、21.7%が抵抗性であった。すなわち、毒素含有培地を通過することによって抵抗性がより強く獲得されていることが分かる。しかし、各毒素耐性カルスから再生された植物の中にも形態的変異や病原菌に対する反応が異なることが観察された (Table 2)。このことは、カルスから植物個体に至る過程においても変異が起きていること、また個体レベルでの選抜が必要であることを示している。毒素を含む選抜培地を2回通過した5個

のカルスのうち、4個は植物個体への再生能力を持っていた。分離番号 No. 48のカルスから再生されたタバコ植物はタバコ赤星病菌に対して強い抵抗性を示し、体細胞の染色体数が親株のサムスンと同じ 2n=48 であったこと、また、自家受粉によって多数の種子を採集することができたことから、本株を後代の抵抗性検定に用いた。

6. 後代の抵抗性

新しい抵抗性遺伝子を持った作物に改良するためには育種のプログラムに入る前に抵抗性を持った再生植物の遺伝的性質を知っておく必要がある。そのためには抵抗性である再生植物の後代の評価と、その後の選抜をくり返し新しい親株として価値あるものかどうかを決定する必要がある。すなわち、その植物が抵抗性であるかどうかは、後代の検定によって決まり、安定な抵抗性は交雑によって得ることができる。細胞や組織培養を組み入れた育種プログラムはより効果的に利用できると思われるが、主要な作物で抵抗性が導入できたものは少ない。ここではタバコ赤星病に対する後代の抵抗性遺伝の分析結果について述べる。幸いにも毒素耐性カルス (No. 48) からのタバコ再生植物 (R₀ 植物と呼ぶ) の中に本菌に強い抵抗性を示し、自家受粉によって多数の種子を作るものがあつた。これら植物を R₁ とし、R₂, R₃, R₄ は R₁, R₂, R₃ 個体群の中から、本病に強い抵抗性を示す個体を数個選び、自家受粉によって得たものである。

Table 3 は R₁ 世代での選抜結果の一部を示す。検定には 1 cm² 当りの病斑数、病斑の直径、宿主特異的毒素に対する反応 (肉眼的に軽微なものから最も激しいものの6段階に分けた) を調べ、抵抗性の度合を表わした。毒素に対する反応と病原菌に対する反応がよく一致していることが分かる。R₁ 世代においては9.3%がタバコ赤星病菌に抵抗性を示し、R₂, R₃ 世代ではそれぞれ38.9%, 56.7%であった。R₃ 世代の6個体を選び、それらの R₄ 世代の抵抗性は62%、中度抵抗性は25%、罹病性は13%であった。しかし、その内の1個体の子孫はすべてが抵

Table 3. Response of R_1 progenies to infection with *A. alternata* pathotype tobacco.

Tobacco cultivar or isolate No.	No. lesions per cm ² leaf	Diameter of lesion (mm)	Response to AT-toxin
Burley 21	92 ^a	0.18 ^b	6 ^c
Samsun	90	0.23	5
50	92	0.20	3
90	73	0.15	2
501	90	0.15	4
504	6	0.01	1
512	53	0.11	4
513	60	0.15	3
516	30	0.05	2
519	31	0.06	3
526	78	0.15	4
612	52	0.15	5

^a The detached leaves of each plant were sprayed with spore suspension (5×10^5 spores/ml) and incubated in a moist chamber at 23°C. Number of lesions appeared was calculated 48 hr after inoculation.

^b The data were based on the mean of approximately 20 lesions. Diameter of lesions was measured 48 hr after inoculation.

^c A drop of AT-toxin solution was placed on the wound made with a razor in the center of each leaf. Response to the toxin was observed 4 days after treatment and rated: 1=very light; 2=light; 3=moderate, with slight necrosis; 4=severe, with vein necrosis; 5=very severe, with vein necrosis and widespread yellowsis; and 6=severest.

Table 4. Response of progenies of 48R plant to infection with *A. alternata* pathotype tobacco.

Generation	No. plants tested	Reaction to pathogen ^a			% resistance
		R	I	S	
R_1	461	43	81	347	9.3
R_2	118	46	11	61	38.9
R_3	86	49	18	19	56.7
R_4	138	85	34	19	61.6

^a R=resistant, I=intermediate, S=susceptible.

抗性であった。このように自家受粉と選抜をくり返し行うことにより明らかに抵抗性個体の出現率が増加していることが分かった。しかし、現在はごく限られた実験室内での検定であり、また、検定数も少ないことから、本菌に抵抗性の遺伝子をもった新しい親株タバコが作られたとはいい難いが、このような方法によって新しい抵抗性遺伝子の固定が可能であると思われる。

7. おわりに

細胞培養の技術の発達に伴い多数の細胞の中から目的とする性質をもった細胞のみを選抜し、植物体まで還元させること、すなわち感受性の栽培品種の培養細胞から病害抵抗性品種を作りだすことが可能となった。その場合選抜に用いるストレスによって、病害抵抗性をどのレ

ベルでとらえるかが問題となる。宿主特異的毒素は病原性を決定する因子であると考えられており、宿主特異的毒素を産生するかしないかで、その菌が作物を侵せるかどうかが決まる。逆に、宿主特異的毒素に植物細胞が反応するかしないかで罹病性になるか抵抗性になるかが決まる²⁷⁾。それゆえ、宿主特異的毒素に抵抗性の植物を作ることは抵抗性植物の作成に結びつく。しかし、現在まで宿主特異的毒素が見つかった病原菌は *Alternaria*, *Helminthosporium* 属が主で、十数種と少なく²⁸⁾、今後の発見に待たれる。一方、発病の後期の病斑拡大に関わる毒素はほとんどの菌で確認され、これらもストレスの一つになると考えられる。発病に至る過程は非常に複雑な代謝がからみ、また、病害防除の面から考えると農薬、

栽培法, 栽培品種などいろいろなものが関係しており, どれか一つだけで完全な病害防除を期待できるものではない。病斑拡大阻止は発病の面からみると意味のないものかもしれないが2次的な病害拡大阻止や作物としての商品価値の面からみると重要な育種要因となるかもしれない。病害防除において, 農薬がしめる位置は大きい, 細菌病, ウイルス病, 土壌病については対応しかねている現状である。細胞培養による抵抗性作物の育種法はこれらの問題解決に大きな可能性を提供してくれるかもしれない。

文 献

- 1) Doke, N., N. Furuichi, 1982. *Physiol. Plant Pathol.*, **21** : 23-30.
- 2) Doke, N., 1982. *Physiol. Plant Pathol.*, **21** : 85-95.
- 3) Furusawa, I., K. Tanaka, P. Thanutong, A. Mizuguchi, M. Yazaki, K. Asada, 1984. *Plant Cell Physiol.*, **25** (in press).
- 4) Ingram, D.S., N. Robertson, 1965. *J. Gen. Microbiol.*, **40** : 431-437.
- 5) Warren, R.S., D.F. Routley, 1970. *J. Am. Soc. Sci.*, **95** : 266-269.
- 6) Helgeson, J.P., J.D. Kemp, G.T. Haberlach, D.P. Maxwell, 1972. *Phytopathology*, **62** : 1439-1443.
- 7) Helgeson, J.P., G.T. Haberlach, C.D. Upper, 1976. *Phytopathology*, **66** : 91-96.
- 8) Thanutong, P., I. Furusawa, M. Yamamoto, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, **66** : 209-215.
- 9) Evans, D.A., J.E. Bravo, 1983, In "Plant Protoplasts" (ed. by Giles, K.L.), p. 33-51, Academic Press, New York.
- 10) Okuno, T., I. Furusawa, 1977. *Plant Cell Physiol.*, **18** : 1357-1362.
- 11) Nagata, T., I. Takebe, 1970. *Planta*, **99** : 12-22.
- 12) Linsmaier, M.E., F. Skoog, 1974. *Physiol. Plant*, **18** : 100-127.
- 13) Scowcroft, W.R., P.J. Larkin, R.I.S. Brettell, 1983. In "Use of Tissue Culture and Protoplasts in Plant Pathology" (eds. by Helgeson, J.P., B.J. Deverall), p. 139-162. Academic Press, Australia.
- 14) Shepard, F.J., D. Bidney, E. Shakin, 1980. *Science*, **208** : 17-24.
- 15) Sacristan, M.D. 1982. *Theor. Appl. Genet.*, **61** : 193-200.
- 16) Latunde-dada, A.D., T.A. Lucas, 1983. *Plant Sci. Lett.*, **32** : 205-211.
- 17) Wheeler, H.E., H.H. Luke, 1955. *Science*, **123** : 1229.
- 18) Byther, R.S., G.W. Steinev, 1972. *Phytopathology*, **62** : 466-470.
- 19) Schertz, K.F., Y.P. Tai, 1969. *Crop Sci.*, **9** : 621-624.
- 20) 児玉基一郎, 西村正暘, 甲元啓介, 1984. 日本植物病理学会報 (講要), **50**(3) : 410.
- 21) Gengenbach, B.C., C.E. Green, 1975. *Crop Sci.*, **15** : 645-649.
- 22) Heinz, D.J., Krishnamurthi, L.G. Nichell, A. Maretzki, 1977. In "Plant Cell, Tissue and Organ Culture" (ed. by Reinert, J., Y.P.S. Bajaj), p. 3-17, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 23) Mattern, U., G. Strobel, J. Shepard, 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75** : 4935-4939.
- 24) Behnke, M. 1980. *Z. Pflanzenzuechtung*, **85** : 254-258.
- 25) Carlson, P.S. 1973. *Science*, **180** : 1366-1368.
- 26) Upadhyya, M.D. 1978. *Z. Pflanzenzuechtung*, **82** : 1-30.
- 27) 西村正暘, 1978. 植物病理化学最近の進歩, p. 139-147. 植物病理化学最近の進歩刊行会, 名古屋.
- 28) Kono, Y., H.W. Knoche, J.M. Daly, 1981. In "Toxin in Plant Disease" (ed. by Durbin, R.D.), p. 221-253, Academic Press, New York.
- 29) Krishnamurthi, M. 1982. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 769-770.
- 30) Behnke, M. 1979. *Theor. Appl. Genet.*, **55** : 69-71.
- 31) Lui, M.C. 1981. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Thorpe, T.A.), p. 299, Academic Press, New York.
- 32) Murakishi, H.H., P.S. Carlson, 1982. *Plant Cell Rep.*, **1** : 94-97.