

## トマトの病害抵抗性の分子遺伝学

本吉総男\*

(1992年10月6日受理)

## 1. はじめに

トマト (*Lycopersicon esculentum* (L.) Mill.) は重要な野菜であるとともに、遺伝学における実験植物としてよく利用されてきた。トマトの実験植物としての利点は、(1) 交雑および自殖による種子繁殖および挿木による栄養繁殖が容易なこと、(2) 一世代が比較的短期間で、温室があれば四季を通じて栽培が可能なこと、(3) 形態的、生理および生化学的な形質に関する変異が豊富であること、(4) 交雑可能な近縁野生種が多く存在し、それらから導入できる遺伝変異は極めて多様であること、(5) 単純なゲノム構造 (二倍種で染色体数は12対) をもち、単相ゲノム当たりのDNA含量 ( $7.15 \times 10^8$  塩基対)<sup>1)</sup> も比較的少ないこと、(6) 減数分裂の太糸期 (パキテーン期) に染色体の長さやクロモエアの分布によって個々の染色体の識別や染色体上の位置の識別が細胞学的に可能なことなどである。

このような特徴をもつところから、トマトでは非常に多種類の遺伝変異が記載され、それらの遺伝分析が行われ、各種の変異系統、リンケージテスター、転座シリーズ、トリソミックシリーズなどの実験系統が作られた。これらの多くは、多数の近縁野生種系統とともに、カリフォルニア大学デービス校に設立されている Tomato Genetics Resource Center に保存され、世界各地の研究機関で利用されている。トマトにおける形態や生理・生化学的形質に関する遺伝子マーカーや制限断片長多型 (RFLP) マーカーによって構成された遺伝子地図は、パキテーン分析からの知見も加わって、植物の中では、最も完成度の高いものとなった<sup>2)</sup>。果重、可溶性固形成分量および果実のpHのような量的形質 (QTL) の連鎖地図も RFLP マーカーを利用して作成された<sup>3)</sup>。

Fusao MOTOYOSHI\*

Molecular Genetics of Disease Resistance in Tomato.

\* 岡山大学資源生物科学研究所

〒710 倉敷市中央2-20-1

\* Research Institute for Bioresources, Okayama University, Chuo 2-20-1, Kurashiki, 710 Japan

近年遺伝学の優れた実験植物として注目されているシロイヌナズナと対照的に、トマトの実験植物としての有用性は、研究がそのまま食用作物としてのトマトの改良に直結させ得るという点にある。特に、トマトには交雑可能な近縁野生種が多数存在するという特徴は、多様な実用形質、たとえば病害虫耐性や各種の環境に対する適応性などに関する豊富な研究材料を提供している。

トマト属は、特に重要な食用作物であるジャガイモを含むナス属に最も近縁であり、ナス属の中にはトマトと属間雑種ができる種もある。この一群の作物の中で、トマトはそれらを代表する重要な実験植物でもある。

## 2. トマト属野生種と病害抵抗性遺伝子

トマト属野生種には、トマトと容易に交雑させることができる *L. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill., *L. cheesmanii* Riley, *L. chmielewskii* Rick, Kes., Fob. and Holle, *L. parviflorum* Rick, *L. hirsutum* Humb. and Bonpl. *L. pennellii* (Corr.) D'Arcy, およびトマトとは通常交雑が困難で、胚培養などを利用して雑種を作ることができる *L. chilense* Dun および *L. peruvianum* L. がある。いずれも二倍種でトマトと同様12対の染色体をもつ。トマトには病原体によるものと生理的なものを含めて約50の病害が知られているが、それらに対する抵抗性を栽培トマト系統の中から探索するには限度があり、野生種との交雑によりトマトの中に取り入れられたものが多い。それらの病害抵抗性は *L. pimpinellifolium* 由来のものが多いが、*L. hirsutum* および *L. peruvianum* 由来の遺伝子も実用化されている。野生種に由来する著名な病害抵抗性遺伝子を Table 1 にとりまとめた。このほかに、単一の主働遺伝子ではなく、複数の遺伝子によって支配されている抵抗性も野生種から導入されたものがある。このように、多くの野生種由来の抵抗性遺伝子がトマトで利用されているが、それでもまだ野生種に存在するごく一部のものが利用されているにすぎない。*L. chilense* や *L. pennellii* も種々の抵抗性が知られている。*L. peruvianum* も抵抗性遺伝子の宝庫と考えられる。

**Table 1.** トマトにおける近縁野生種に由来する著名な病害抵抗性遺伝子 (Stevens and Rick<sup>4)</sup>, Lukyanenko<sup>5)</sup>, 山川邦夫<sup>6)</sup>による)

抵抗性由来の野生種	病名 (病原体)	抵抗性遺伝子
<i>L. pimpinellifolium</i>	萎ちょう病 ( <i>Fusarium oxysporum</i> race 1)	<i>I</i>
	萎ちょう病 ( <i>Fusarium oxysporum</i> race 2)	<i>I-2</i>
	半身萎ちょう病 ( <i>Verticillium albo-atrum</i> )	<i>Ve</i>
	<i>V. dahliae</i> による萎ちょう病 ( <i>Verticillium dahliae</i> )	<i>Ve</i>
	葉かび病 ( <i>Cladosporium fulvum</i> )	<i>Cf2, Cf3, Cf5, Cf6, Cf7, Cf8, Cf9, Cf10</i>
	褐色根腐病 ( <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> )	<i>Py</i>
	灰色斑点病 ( <i>Stemphylium solani</i> ) 斑葉細菌病 ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> )	<i>Sm</i> <i>Pto</i>
<i>L. hirsutum</i>	葉かび病 ( <i>Cladosporium fulvum</i> )	<i>Cf4</i>
	モザイク病 (Tomato mosaic virus)	<i>Tm-1</i>
<i>L. peruvianum</i>	葉かび病 ( <i>Cladosporium fulvum</i> )	<i>Cf-11</i>
	根こぶ病 ( <i>Meloydogyne incognata</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> )	<i>Mi</i>
	モザイク病 (Tomato mosaic virus)	<i>Tm-2, Tm-2<sup>2</sup></i>

が、トマトとの交雑が容易でないので、開発が特に進んでいるとはいえない。

わが国にもトマトの病害が多数存在し、病害抵抗性品種の育成が常に望まれている。放射線育種場で育成されたトマトの *L. peruvianum* との雑種が種々の病害抵抗性品種の育成に役立ったことは特筆される。この雑種に由来する根腐萎ちょう病 (*Fusarium oxysporum* レース J-3) 抵抗性、TMV 抵抗性 (*Tm-2*)、葉かび病抵抗性の育種過程については山川ら<sup>7,8)</sup>の報告がある。

### 3. TMV 抵抗性情報発現に関する分子生物学

トマト系 TMV は国際的には tomato mosaic virus (ToMV) に分類されているが、慣習的に TMV とよばれることが多い。タバコのモザイク病の主病原である普通系 TMV と近縁である。

トマトの病害抵抗性の中で、抵抗性遺伝子の分子生物学的研究が最も進んでいるのはトマト系の TMV に対する抵抗性である。抵抗性遺伝子としては、*L. hirsutum* 由来の *Tm-1*、*L. peruvianum* 由来の *Tm-2* および *Tm-2<sup>2</sup>* (別名 *Tm-2<sup>a</sup>*) がある<sup>9,10)</sup>。*Tm-1* の抵抗性はトレランス (tolerance) とよばれ、ウイルス増殖はある程度許すが、病徴を生じないとされている。しかし *Tm-1* ホモの個体では、ウイルスの増殖は強く抑制される。*Tm-1* を保有するトマトから分離した葉肉プロ

トプラストに野生型 TMV である L 株を接種した場合、羅病性トマトから分離したプロトプラストに接種したものと比較すると、TMV の増殖は強く抑制されている<sup>11)</sup>。*Tm-1* の発現は培養細胞から分離されたプロトプラストの中でもみられる<sup>12)</sup>。それらのプロトプラストの中での TMV 特異タンパク質 (外被タンパク質, 180 kD, 130 kD, および 30 kD タンパク質) および RNA の生産量を調べると、野生型 TMV である L 株は *Tm-1* ホモ個体ではほとんど完全に抑制され、*Tm-1/+* では完全ではないが非常に強く抑制されていることがわかる。これに対して、L 株を羅病性トマトに由来する培養細胞からのプロトプラストに接種した場合や、*Tm-1* による抵抗性を克服して増殖できる L 株由来の変異株 Lta 1 を *Tm-1* 保有プロトプラストに接種した場合にはそれらのタンパク質や RNA の合成がはっきりと見られる。これらの結果は *Tm-1* 遺伝子産物が RNA の合成に関与するタンパク質 (130 kD および 180 kD タンパク質) と何らかの相互作用を行っていることを想定させる。

このことは、*Tm-1* 克服型 TMV 株 Lta 1 の RNA 塩基配列を解析することによってさらに確かめられた<sup>13)</sup>。Lta 1 は 130 kD と 180 kD タンパク質遺伝子の共通領域 (180 kD は 130 kD のリードスルーによる産物である) に L と異なる 2 つの重要な置換があり、この置換によ

って両タンパク質内の Gln-979 が Glu に、His-984 が Tyr に変化していることが明らかになった。

*Tm-1* とは対照的に、*Tm-2* および *Tm-2<sup>2</sup>* は、プロトプラストの中では野生型 TMV の増殖を抑制しない<sup>11,14)</sup>。*Tm-2* および *Tm-2<sup>2</sup>* 遺伝子は *L. peruvianum* に由来するものであるが、少なくとも *Tm-2<sup>2</sup>* の供給源である *L. peruvianum* 系統の中には、プロトプラスト内で働く TMV 抵抗性遺伝子は存在しない<sup>14)</sup>。

プロトプラストでの実験から、これらの遺伝子の発現は、最初細胞間の相互作用と関連するのではないかと考えられた。しかし、その後 *Tm-2* 遺伝子による抵抗性作用を克服して増殖することのできる L 株由来の TMV 変異体 Ltbl の 30 kD タンパク質遺伝子領域の塩基配列から、L 株における 30 kD タンパク質の Cys-68 が Ltbl 株では Phe に、Glu-133 が Lys に変わっていることが示され<sup>15)</sup>、*Tm-2* 遺伝子産物は、このタンパク質との相互作用に関連があることが示唆された。

先に、高温 (32°C) では細胞間移行が抑制されている L 株由来の突然変異体 Lsl の 30 kD タンパク質のペプチド分析<sup>16)</sup> および同タンパク質遺伝子の塩基配列の分析<sup>17)</sup> から、30 kD タンパク質は細胞間移行に関与することが推定され、このことは 30 kD タンパク質遺伝子を導入したトランスジェニックタバコでの感染実験によっても確かめられた<sup>18)</sup>。また免疫化学的な顕微観察では 30 kD タンパク質は細胞間連絡に多く検出されている<sup>19)</sup>。

このような 30 kD タンパク質の特性と、*Tm-2* を保有するトマトにおける野生型および変異 TMV の挙動から *Tm-2* 産物は、TMV の細胞間移行に関与する 30 kD タンパク質の働きを直接または間接的に抑制するものと考えられている。

#### 4. 抵抗性遺伝子のマッピングとクローニングへのアプローチ

最近、各種抵抗性遺伝子をクローニングする目的をもって、RFLP マーカーとそれらの遺伝子を含む精密なマップの作成が試みられている。Segal ら<sup>20)</sup>の研究では、フザリウム抵抗性遺伝子 *I<sub>2</sub>* の座位は第 11 染色体に存在し、RFLP マーカー TG105 と TG36 との中間にあり、TG105 から、0.4 cM (センチモルガン)、TG36 から 4.1 cM の位置にある。TG105 の外側には TG26 が存在し、TG105 と TG26 との間には地図上の距離が 4.1 cM、物理的には 175 kb (キロベース) であり、したがって 1 cM 当たりの DNA の長さは、約 43 kb と推定され、トマトのゲノム全体のマップの長さ (約 1300 cM) と単相ゲノム DNA 量 (7.15×10<sup>8</sup> bp) から推定されている平均値 (550 kb/cM) と比較すると極めて短い。残念なが

ら TG105 と *I<sub>2</sub>* の間の物理的な長さは実測されていないが、同じく 1 cM 当たり 43 kb と仮定すれば、TG105 を起点とする約 17 kb のウォーキングによって *I<sub>2</sub>* に到達すると推定される。

TMV 抵抗性遺伝子 *Tm-2<sup>2</sup>* に対しては緊密に連鎖した 3 つの RFLP マーカー TG79、TG207 および TG291 が、また *P. syringe* pv. *tomato* 抵抗性遺伝子 *Pto* にも同様に TG475 が見出されている<sup>21)</sup>。これらの RFLP マーカーは、トマトゲノム DNA の酵母人工染色体 (YAC) クローンの中にも見出されており、ウォーキングによってこれら抵抗性遺伝子の単離の手掛りになると考えられている。

*Tm-1* は *L. hirsutum* から栽培トマトに導入されたものであり、第 2 染色体に存在する。Levesque ら<sup>22)</sup>は、*Tm-1* を有する栽培トマト一系統のリボソーム遺伝子中に見出される短いスペーサーが、*Tm-1* を有しない系統には存在しないことを示した。しかしそれ以上の詳細な分析は示されていない。

根こぶセンチュウの抵抗性遺伝子 *Mi* と酸性ホスファターゼ-1 アロザイム遺伝子 *Asp-1* とは緊密に連鎖しており、両遺伝子とも *L. peruvianum* 由来である。*Mi* へのウォーキングの手掛りとするため、*Asp-1* の一部の配列 (2.4 kb) が PCR 法によって増幅され、クローニングされている<sup>23)</sup>。

#### 5. トマトの形質転換系

ウォーキングまたは他の方法によって推定上の病害抵抗性遺伝子をクローニングした後、次に必要なのは、それが真の病害抵抗性遺伝子かどうかを確かめることである。これには、トマトに外来遺伝子を導入して発現させる技術、すなわち、形質転換技術が必要である。一般に、植物間で共通に働く遺伝子の機能を解析するために、タバコの形質転換系を利用することが多いが、トマトの病害抵抗性遺伝子の機能は、どうしてもトマトを使って解析せねばならない。

トマトの形質転換には、アグロバクテリウムと葉切片との共存培養による方法<sup>24,25)</sup>が最も有効とされる。これにより、種々の実用的な形質を導入した形質転換トマトが作られた。例えば、鱗翅目害虫耐性<sup>26)</sup>、ウイルス抵抗性<sup>27-29)</sup>などである。また、ポリガラクトソナーゼ mRNA のアンチセンス RNA を発現するキメラ遺伝子をトマトに導入して、果実におけるこの酵素の生産を抑制し<sup>30,31)</sup>、過熟を防ぎ、商品価値を高めようとする試みがある。

このように、アグロバクテリウムによる栽培トマトの形質転換系は応用面ではすでに確立された技術とされて

いるが、形質転換個体を得る効率はタバコを材料とする場合と比べると非常に低く、実験植物としてのトマトには、タバコ並みの形質転換能力を付与することが望ましい。トマトにおける形質転換個体を得る効率の低さは、一度形成されたカルスからの個体再生率の低さにもよるが、葉切片での形質転換能力そのものも低いのかも知れない。

培養組織やプロトプラストからの個体再生能力は栽培トマトよりもある近縁野生種のほうがはるかに高い。この特性は遺伝するものであり、栽培トマトとそれらの野生種との雑種もこの特性をもつ<sup>32,33)</sup>。野生種のなかでも、*L. peruvianum* は培養組織やプロトプラストからの個体再生能力が高い<sup>34-36)</sup>。しかし、*L. peruvianum* は自家不和合性があり、胚培養で得られる栽培トマトとの雑種第1代 (F<sub>1</sub>) も自家不和合である。この F<sub>1</sub> 植物の花粉を使って栽培トマトへ戻し交雑した場合、果実ではできる(逆の交雑は不能である)が、種子はできにくく、果実の中に僅かに存在する種子は発芽しにくい。しかし、それらの種子の極く一部は発芽し、それによって若干の個体は得られる。栽培トマトへの戻し交雑は、世代を重ねるに従い、次第に容易になる。

Koornneefら<sup>33)</sup>は、*L. peruvianum* のゲノムの一部を有する栽培トマトが高い再生能をもち、アグロバクテリアウム法および直接導入法で形質転換植物が効率よく得られたことを報告している。彼らはまた、*L. peruvianum* に由来する高再生能は、二つの遺伝子 (*Rg1*, *Rg2*) によって制御されているとしている<sup>37)</sup>。

筆者らは、*L. peruvianum* と栽培トマトの交雑によって得られた F<sub>1</sub> をもとに、戻し交雑および自殖後、個体ごとにアグロバクテリアウムと葉切片との共存培養法<sup>38)</sup>によってカナマイシン耐性遺伝子 (*NPT II* 遺伝子) の導入を行ない、形質転換能の高い個体を選抜した<sup>39)</sup>。現在、栽培種への戻し交雑を3回行ない、外観上栽培種と変わらず、形質転換能の高い系統を得ている。この系統は自殖も栽培種への交雑も容易なので、高形質転換能をもつ実験トマト系統としての育成が可能と考えている。

## 6. おわりに

最初に指摘したように、トマトにおける病害抵抗性遺伝子の多くは、近縁野生種から導入されたものであり、優性単因子として遺伝するものがかなり多く、それらは分子遺伝学研究に好適な対象である。それらの遺伝子の近傍の DNA はおそらくそれに付随して、野生種から入ってきたものであり、その配列の中に栽培種に存在しない配列が見つければ、抵抗性遺伝子に連鎖するマーカーとして利用でき、場合によってはウォーキングの起点と

することができるであろう。ただし、ウォーキングによる遺伝子への到達を確実にするためには、互いに緊密に連鎖する二つのマーカーの一つが目標とする遺伝子の一方の側に、他の一つが別の側に位置し、これら二つのマーカー間の物理的な長さが実測されていることが望ましい。これによって、ウォーキングの見通しが可能になる。一般には、野生種から栽培種に導入された遺伝子の周辺は広い領域にわたって、野生種由来のものであり、これらの領域のあるものは栽培種の相同領域との間で組換えを起こす頻度が極めて低い場合がある。このような領域に存在するマーカーは、実際には当の遺伝子から物理的にかなり隔たった位置に存在しても、組換えが起こりにくい(リンケージ ドラッグ)ため、連鎖地図上は接近している。このような場合は、目標とする遺伝子へのウォーキングは困難であろう。

遺伝子の産物が特定できる場合、目的とする遺伝子のクローニングは合成 DNA プローブを使うことによって、ウォーキングよりはるかに有利になる。しかし、抵抗性遺伝子の産物を同定することはいずれの場合もまだ成功していない。宿主・病原間の相互作用の分子レベルでの研究が進み、病害抵抗遺伝子の産物が特定できるならば、クローニングの手掛りはウォーキングの場合よりも、一般にはより確実なものになるであろう。TMV 抵抗性に関しては、その発現の機構についての分子生物学的研究が進んでいるが、遺伝子産物を把えるまでには至っていない。筆者は現在のところ、両方からのアプローチが必要と考えている。

最後に、トマトの病害抵抗性に関する分子遺伝学を完結するために、タバコの形質転換系に匹敵する、効率のよいトマト形質転換系を整えておくことの重要性を再度強調しておきたい。

## 文 献

- 1) Young, N. D., S. D. Tanksley, 1980. *Theor. Appl. Genet.*, **77** : 353-359.
- 2) Tanksley, S. D., M. A. Mutschler, 1990. In "Genetic Maps" (ed. by O'Brien, S. J.), p. 6. 3-6. 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 3) Paterson, A. H., S. Damon, J. D. Hewitt, D. Zamir, H. D. Rabinowitch, S. E. Lincoln, E. S. Lander, S. D. Tanksley, 1991. *Genetics*, **127** : 181-197.
- 4) Stevens, M. A., C. M. Rick, 1986. In "The Tomato Crop" (ed. by Atherton, J., G. Rudich), p. 35-109. Chapman and Hall, New York.
- 5) Lukyanenko, A. N., 1991. In "Genetic Improvement of Tomato" (ed. by Kalloo, G.), p. 99-119.
- 6) 山川邦夫, 1978. 野菜/抵抗性品種とその利用, 全国農村教育協会, 東京.
- 7) 山川邦夫, 安井秀夫, 望月龍也, 飛驒健一, 小餅昭二,

1987. 野菜茶試研報, A. 1 : 1-37.
- 8) 山川邦夫, 国安克人, 望月英雄, 西尾 剛, 飛驒健一, 1988. 野菜茶試研報, A. 2 : 1-27.
- 9) Pelham, J., 1966. *Euphytica*, **15** : 258-267.
- 10) Pelham, J., 1972. *Ann. Appl. Biol.*, **71** : 219-228.
- 11) Motoyoshi, F., N. Oshima, 1977. *J. Gen. Virol.*, **34** : 499-506.
- 12) Watanabe, Y., N. Kishibayashi, F. Motoyoshi, Y. Okada, 1987. *Virology*, **161** : 527-532.
- 13) Meshi, T., F. Motoyoshi, A. Adachi, Y. Watanabe, N. Takamatsu, Y. Okada, 1988. *EMBO J.*, **7** : 1575-1581.
- 14) Motoyoshi, F., N. Oshima, 1975. *J. Gen. Virol.*, **29** : 81-91.
- 15) Meshi, T., F. Motoyoshi, T. Maeda, S. Yoshiwoka, H. Watanabe, Y. Okada, 1989. *Plant Cell*, **1** : 515-522.
- 16) Leonard, D. A., M. Zaitlin, 1982. *Virology*, **117** : 416-424.
- 17) Ohno, T., N. Takamatsu, T. Meshi, Y. Okada, M. Nishiguchi, Y. Kiho, 1982. *Virology*, **131** : 255-258.
- 18) Deom, C. M., M. J. Oliver, R. N. Beachy, 1987. *Science*, **237** : 389-394.
- 19) Tomenius, K., D. Clapham, T. Meshi, 1987. *Virology*, **160** : 363-371.
- 20) Segal, G., M. Sarfatti, M. A. Schaffer, N. Ori, D. Zamir, R. Fluhr, 1992. *Mol. Gen. Genet.*, **231** : 179-185.
- 21) Martin, G. B., M. W. Ganal, S. D. Tanksley, 1992. *Mol. Gen. Genet.*, **233** : 25-32.
- 22) Levesque, H., F. Vedel, C. Mathieu, A. G. L. de Courcel, 1990. *Theor. Appl. Genet.*, **80** : 602-608.
- 23) Aarts, J. M., J. G. J. Hontelez, P. Fischer, R. Verkerk, A. van Kammen, P. Zabel, 1991. *Plant Mol. Biol.*, **16** : 647-661.
- 24) Horsch, R. B., J. E. Fry, N. Hoffmann, M. Wallroth, D. Eichholtz, S. G. Rogers, R. T. Fraley, 1985. *Science*, **223** : 496-498.
- 25) McCormick, S., J. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch, R. Fraley, 1986. *Plant Cell Rep.*, **5** : 81-84.
- 26) Delannay, X., B. J. LaVallee, R. K. Proksch, R. L. Fucks, S. R. Sims, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, R. B. Dodson, J. J. Augustine, J. G. Layton, D. A. Fischhoff, 1989. *Bio/Technology*, **7** : 1265-1269.
- 27) Tumer, N. T., K. M. O'Connell, R. S. Nelson, P. R. Sanders, R. N. Beachy, R. T. Fraley, D. M. Shah, 1987. *EMBO J.*, **6** : 1181-1188.
- 28) Nelson, R. S., S. M. McCormick, X. Delannay, P. Dube, J. Layton, E. J. Anderson, M. Kaniewska, R. K. Proksch, R. B. Horsch, S. G. Rogers, R. T. Fraley, R. N. Beachy, 1988. *Bio/Technology*, **6** : 403-409.
- 29) Motoyoshi, F., *In Vitro Plant Cellular and Developmental Biology* (in press).
- 30) Sheehy, R. E., M. Kramer, W. R. Hiatt, 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85** : 8805-8809.
- 31) Smith, C. J. S., C. F. Watson, J. Ray, C. R. Bird, M. P. C. Morris, W. Schuh, D. Grierson, 1988. *Nature*, **334** : 724-726.
- 32) Chyi, Y.-S., G. C. Phillips, 1987. *Plant Cell Rep.*, **6** : 105-108.
- 33) Koornneef, M., C. Hanhart, M. Jongsma, I. Toma, R. Weide, P. Zabel, J. Hille, 1986. *Plant Science*, **45** : 201-208.
- 34) Locy, R. D., 1983. *Can. J. Bot.*, **61** : 1072-1079.
- 35) Mühlbach, H. P., 1980. *Planta*, **148** : 89-96.
- 36) Imanishi, S., I. Hiura, 1983. *Japan. J. Breed.*, **33** : 359-368.
- 37) Koornneef, M., C. J. Hanhart, L. Martinelli, 1987. *Theor. Appl. Genet.*, **74** : 633-641.
- 38) 本吉総男, 宇垣正志, 1991. 現代化学・増刊20「植物バイオテクノロジーII」p. 153-161.
- 39) Motoyoshi, F., M. Murata, 1991. *Japan. J. Genet.*, **66** : 760 (Abstract).