



Solanum acaule の葯培養における花粉カルス形成に関わる要因

三十尾, 修司
千葉, 麻由美
上島, 脩志
澤野, 稔

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 20(1):15-22

(Issue Date)

1992-01

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00198223>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00198223>



Solanum acaule の葯培養における 花粉カルス形成に関わる要因

三十尾修司* ・千葉麻由美** ・上 島 脩 志* ・澤 野 稔*

(平成3年8月9日受付)

FACTORS AFFECTING ON THE POLLEN CALLUS FORMATION IN ANTHR CULTURE OF *SOLANUM ACAULE*

Shuji MISOO, Mayumi CHIBA, Osamu KAMIJIMA and Minoru SAWANO

Abstract

Several factors considering to affect on the anther culture response were investigated using 11 clones in *Solanum acaule* and 2 cultivated potatoes.

Most of the pollen calli induced were derived from the anthers that were harvested at early uninucleate or middle uninucleate stages. For the pollen callus formation, cold pre-treatment of buds at 5°C for 2days was considerably effective in *Solanum acaule*. However, more than 2days of cold pre-treatment had a tendency to promote callus formation from anther tissue or filament. Both the frequency of callus formation and the callus shape were apparently different among 4 ecotypes compared in this study. Also, the frequency of callus formation differed among clones derived from self pollinated seeds.

緒 言

高等植物の半数体は、育種学的にはそれを素材として短期間に純系を育成し得ることに重要な意義がある。この半数体の育成法としては、種属間交雑、放射線の利用、遅延受粉、多胚種子の利用、異種細胞質の利用、葯および花粉培養等が開発されてきた。特に、GUHA and MAHESHWARI (1964)¹⁾ が *Datura innoxia* の葯培養による半数体の育成を報告してから、半数体の重要性が再認識された。

バレイショにおける半数体作出法としては、種間交雑による単為生殖の誘発が以前より知られており、‘seed spot’ という遺伝的マーカーの発見ともあいまって花粉親としての *S. phureja* の有用性が認められている^{2,3,5)}。しかしながら、この方法も万能ではなく、適用できる遺伝子型が限られている⁶⁾。

そこで注目されるのが葯培養である。一般にナス科の植物ではタバコや *Datura* のように葯培養での反応性の高い種が多いが、バレイショの属する *Solanum* 属はやや例外

的である。すなわち、栽培バレイショの葯培養による半数体植物の作出は、1973年に初めて報告されたが⁷⁾、その作出率は極めて低いものであった。その後、二倍性半数体を用いて一倍性半数体を得たという報告⁸⁾、反応性の高いクローンの発見とそのクローン間の交雑からの胚状体形成率のさらに高いクローンの育成^{9,10)}等、様々な方面からの研究が進められている。しかし、これらの研究ではいずれも反応する遺伝子型が限られており、この他の栽培種や野生種では結果がまちまちで⁶⁾、半数体を得るための汎用方法には程遠いのが現状である。

S. acaule は各種耐病虫性と耐霜性を有する育種素材として注目されているが、四倍性であり、しかも栽培バレイショとの交雑が極めて困難なことからその利用が制限されている。このため、半数体を作成する試みもなされているが成功例は未だ報告されていない。一方、栽培種については前述のように限られたクローンで成功例があるのみで、日本の栽培品種では未だ報告がない。本研究では、これらの葯培養未成功種における花粉カルスの形成に対する各種条件の影響について基礎的知見を得る目的で行なった。

* 作物育種学研究室

** 現・ピアス株式会社

実験材料および方法

実験材料

本実験に供試した材料は以下のとおりである。

Solanum acaule (S.acl) : acl-C, acl-D, acl-E, および acl-T3, T4, T7, T8, T10, T12, T17, T26 の11の系統。

Solanum tuberosum : 農林1号およびデジマの2品種。

このうち、acl-Cは本講座前教授、松林元一博士がオランダより入手し、本講座で維持しているものであり、acl-D, E, Tは松林博士が1971年に南米アンデスで採取し、本講座で維持しているものである。Tの各系統は元系統の自殖種子に由来する実生系統を種いもで維持しているものである。また、農林1号およびデジマの2品種は長崎県愛野馬鈴薯支場、小村国則氏より分譲を受けて本講座で維持しているものである。

S.aclは、種いもを5号ポットに2個ずつ植え、春、秋の栽培適温期にはガラス室内で、夏の不適温期にはファイトロン（昼温20℃、夜温15℃）内で、すべて自然光条件下で栽培した。栽培種は圃場で春作を行なった。

薬培養法

培養前に低温前処理を行なう場合は、供試植物体から薬培養適期にある蕾を採取し、数滴の水を保持させたビーカーに入れてサランラップとアルミ фольで封をし、5℃の冷蔵庫中で2ないし8日間保存した。

培養用に摘出した薬は70%エタノールで10秒、有効塩素2%の次亜塩素酸ソーダで8分間殺菌したのち滅菌水で洗浄し、S.aclについては試験管当たり10薬、栽培種については5薬をカルス誘導培地に置床した。カルス誘導培地には、L-グルタミンを400mg/l加え、ナフタレン酢

酸 (NAA) 1mg/lとイソペンテニルアデニン (2ip) 0.5mg/lを添加した1/2濃度のMS基本培地 (1962)¹¹⁾を用いた。ショ糖濃度は3%、寒天濃度は0.8%とし、pHは5.8に調整した。

実験結果

置床時の花粉の発育段階と薬培養におけるカルス形成との関係をS.acl-T3, 農林1号およびデジマを用いて調べた。まず、実験に先立ってTable 1に示したように花粉の発育段階と蕾の花弁の長さとの関係を調べた。その結果、S.aclと栽培種では、ある発育段階の花粉を含む薬を選ぼうとすれば蕾の大きさがかなり異なることが判った。本研究の実験では、このTableの指標にしたがってIからIIIの各発育段階の薬を供試した。

供試3系統の薬培養の結果はTable 2に示した。S.acl-T3では、カルスを形成した薬の割合はII区が他の区に比べて明らかに高かった。ついで、I区、III区の順であった。カルスの由来は花糸起源が最も多く、II区では10.5%に達した。一方、花粉カルスの形成は、一核初期から一核中期の花粉発育段階のII区にほとんど限られ、形成率は7.3%であった。薬壁カルスの形成率はいずれの区も低く、1%以下であった。II区の培養薬は、置床後約1週間でゆっくりと褐変化が進むとともに薬壁が膨張し、約半数の薬で裂開がおこった。なお、カルス形成もみられず、裂開にも至らなかった薬の割合は、I区が88%、II区が54%、III区が76%であった。栽培2品種のうち、農林1号では花粉カルスは全く認められず、薬壁カルスの形成が若干目立つ程度であった。デジマはさらに反応性が低く、III区で3.8%の薬から花糸カルス形成がみられたのみ

Table 1. Relation between the developmental stage of pollen and the petal length in S. acl-T3, cv. Nohrin No. 1 and cv. Dejima

Developmental stage of pollen	Length (mm) of petal		
	S. acl-T3	Nohrin No.1	Dejima
First meiosis-Tetrad (I)	2.5-3.5	4.5-5.5	4.5-5.5
Early uninucleate-Middele uninucleate (II)	3.5-5.0	5.5-7.0	5.5-6.0
Middle uninucleate-Early binucleate (III)	5.0-6.0	7.0-8.5	6.0-7.5

Table 2. Effect of developmental stage of pollen on the anther culture response

Materials	Developmental stage of pollen ¹⁾	No. of anthers inoculated	No. (%) of ²⁾		
			PC	TC	FC
S. aca-T3	I	100	1 (1.0)	1 (1.0)	5 (5.0)
	II	220	16 (7.3)	2 (0.9)	23 (10.5)
	III	150	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.7)
cv. Nohrin No.1	I	15	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	II	75	0 (0.0)	4 (5.3)	3 (4.0)
	III	70	0 (0.0)	6 (8.6)	1 (1.4)
cv. Dejima	I	15	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	II	75	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	III	80	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.8)

1) For the explanation, see Table 1.

2) PC = pollen callus, TC = anther tissue callus, FC = filament callus.

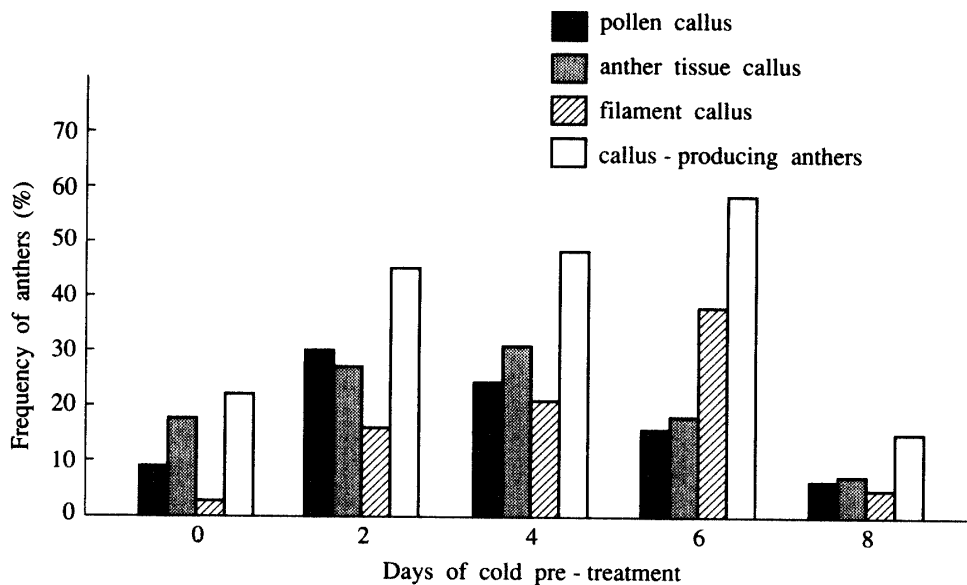


Fig. 1. Effect of cold pre-treatment period on the callus formation in anther culture of S. aca-T3.

であった。

以上の結果から、供試葯の発育段階としては一核初期から一核中期のものが良いことが判ったため、この発育段階の葯を含む蕾を供試して、培養前の低温処理が葯培養に与える影響について検討した。Fig. 1はS. aca-T3の5℃下での蕾の低温前処理の結果を示している。花粉カルス形成率は無処理区で8.8%を示したのに対し、2日間の

低温前処理を施した場合には3倍強の30%に上昇した。4日ないし6日処理区でも無処理区より高い値を示したが、2日処理区には及ばなかった。また8日処理ではかえって形成率が低下した。葯壁カルスの形成率は、低温前処理によってやはり上昇し4日処理区で最も高かった。花糸カルスの形成も低温処理で助長され6日処理区で最高値を示した。これらのカルス形成は、1葯に異な

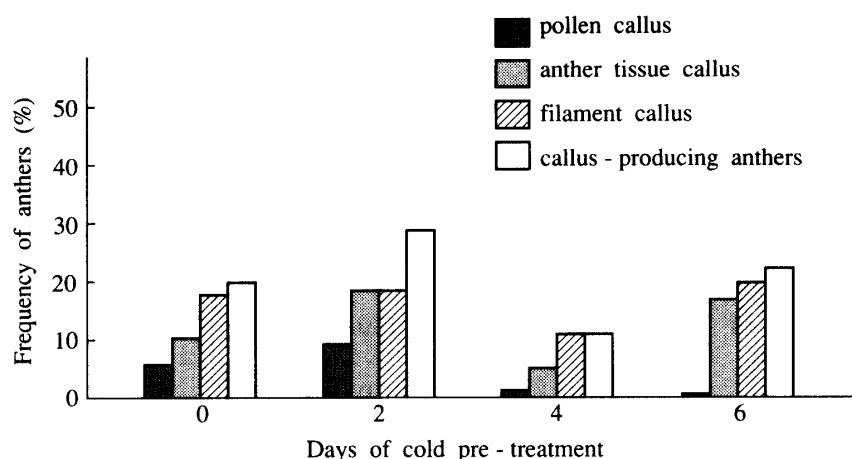


Fig. 2. Effect of cold pre-treatment period on the callus formation in anther culture of cv. Nohrin No. 1.

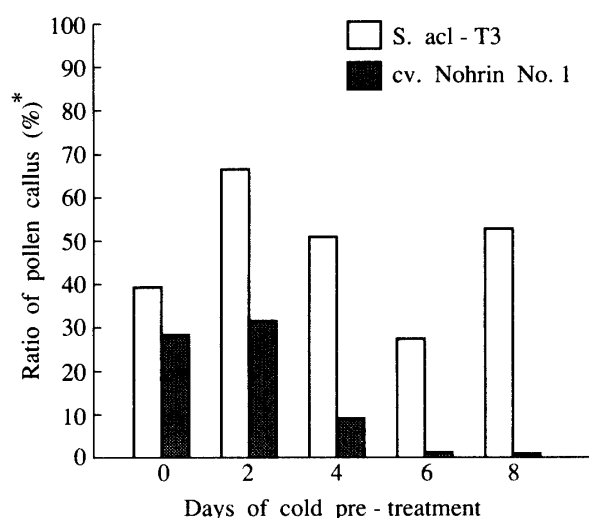


Fig. 3. Ratio of pollen callus formation in the anthers cultured after different days of cold pre-treatment.

*Ratio of pollen callus = (anthers producing pollen callus / callus-producing anthers) × 100.

る起源のものが同時におこる場合が多かった。置床薬に対するいずれかのカルスを形成した薬の場合は、無処理区が22.5%だったのに対して、2ないし6日処理区ではこれが顕著に高まり6日区で58%に達した。Fig. 2に農林1号の結果を示した。本品種は前実験では花粉カルスが全く認められなかったのに対し、本実験では低頻度ながら無処理区でも形成され、2日処理区では無処理区の約2倍の9.2%の薬で認められた。しかし、低温前処理期間がこれよりも長いとかえって阻害的であった。他のカルスの形成に対する低温前処理の効果はS. acl-T3ほど顕著ではなかった。また、S. acl-T3と比べると、異なる起源のカルスの形成が同一の薬に集中する傾向にあった。

Fig. 3は両種におけるカルスを形成した薬に占める花粉カルスを形成した薬の割合を示したものである。S. acl-T3では全体に低温処理区でこの割合が高い傾向を示し、2

日処理区では66.9%の高率を示した。農林1号では無処理もしくは2日処理区で比較的高く、4日以上処理区ではほとんど花粉カルスが生じないことを示した。

次に、栽培種よりもS. aclの方が花粉カルス形成率が高いことから、この野生種の数系統を用いて栽培条件の違いとの関連を調査検討した。材料は一核期の花粉を含む薬のみを採取し、5℃、2ないし4日の低温処理を施して薬培養に供試した (Table 3)。供試したacl-C, D, E, Tの各系統のカルス形成能には顕著な差異が認められた。花粉カルス形成率が最も高かったのはacl-Cで、平均で26%夏作では38.8%の値を示した。次いで、acl-T系統群が高く、T 8が16.2%、T 4が11.5%、T 3が11.0%で続いた。T7, T10, T12, T17の各系統はほぼ同程度で7.3-4.7%の値を示した。T 26系統のみ例外的に極端に低かった。また、acl-D系統は7.6%を示したが、acl-E系統では花

Table 3. Differences of response in anther culture of various genotypes of *S. acaule*

Clone	Season of cultivation	No. of anthers inoculated	No. (%) of ¹⁾			
			PC	TC	FC	CA
acl - C	spring	170	34 (20.0)	31 (18.2)	31 (18.2)	70 (41.2)
	summer	80	31 (38.8)	27 (33.2)	20 (25.0)	53 (66.3)
	Total	250	65 (26.0)	58 (23.2)	51 (20.4)	123 (49.2)
acl - D	spring	260	12 (4.6)	16 (6.2)	6 (2.3)	23 (8.8)
	summer	90	7 (7.8)	8 (8.9)	2 (2.2)	10 (11.1)
	Total	350	19 (7.6)	24 (9.6)	8 (3.2)	33 (13.2)
acl - E	spring	50	0 (0.0)	3 (6.0)	0 (0.0)	3 (6.0)
	summer	50	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Total	100	0 (0.0)	3 (3.0)	0 (0.0)	3 (3.3)
acl - T3	spring	270	22 (8.1)	25 (9.3)	35 (13.0)	65 (24.1)
	autumn	130	22 (16.9)	16 (12.3)	27 (20.8)	43 (33.1)
	Total	400	44 (11.0)	41 (10.3)	62 (15.5)	108 (27.0)
acl - T4	spring	240	21 (8.8)	35 (14.6)	15 (6.3)	52 (21.7)
	autumn	210	25 (11.9)	24 (11.4)	41 (19.5)	68 (32.4)
	Total	450	46 (11.5)	59 (14.8)	56 (14.0)	120 (30.0)
acl - T8	spring	250	29 (11.6)	23 (9.2)	40 (16.0)	69 (27.6)
	autumn	330	65 (19.7)	35 (10.6)	100 (30.3)	144 (43.6)
	Total	580	94 (16.2)	58 (10.0)	140 (24.1)	213 (36.7)
acl - T7	spring	160	11 (6.9)	25 (15.6)	2 (1.3)	31 (19.4)
acl - T10	spring	180	9 (5.0)	26 (14.4)	2 (1.1)	30 (16.7)
acl - T12	spring	170	8 (4.7)	51 (30.0)	6 (3.5)	55 (32.4)
acl - T17	spring	160	7 (4.8)	31 (19.4)	2 (1.3)	33 (20.6)
acl - T26	spring	140	1 (0.7)	3 (2.1)	0 (0.0)	3 (2.1)

1) PC = pollen callus, TC = anther tissue callus, FC = filament callus, CA = callus - producing anthers.

粉カルスの形成は全くみられなかった。

全体的にみて、花粉以外のカルス形成率の高い系統で花粉カルス形成率も高い傾向にあった。acl-Cでは、カルス形成が早く、置床後1週間目から可視的カルスが認められ、2、3週間で旺盛に増殖した (Fig.4-a)。カルスは白色で、柔らかく壊れやすい形状を呈した。acl-T3では、

カルスは2、3週間で形成され、増殖はacl-Cについて旺盛であった。カルスの形状は、緑色でやや固いものであった (Fig. 4-a)。acl-Dのカルスは増殖が遅く、形状は密につまった固いものであった (Fig. 4-a)。acl-Eではカルス形成がさらに貧弱で濃緑色で非常に固いものであった。

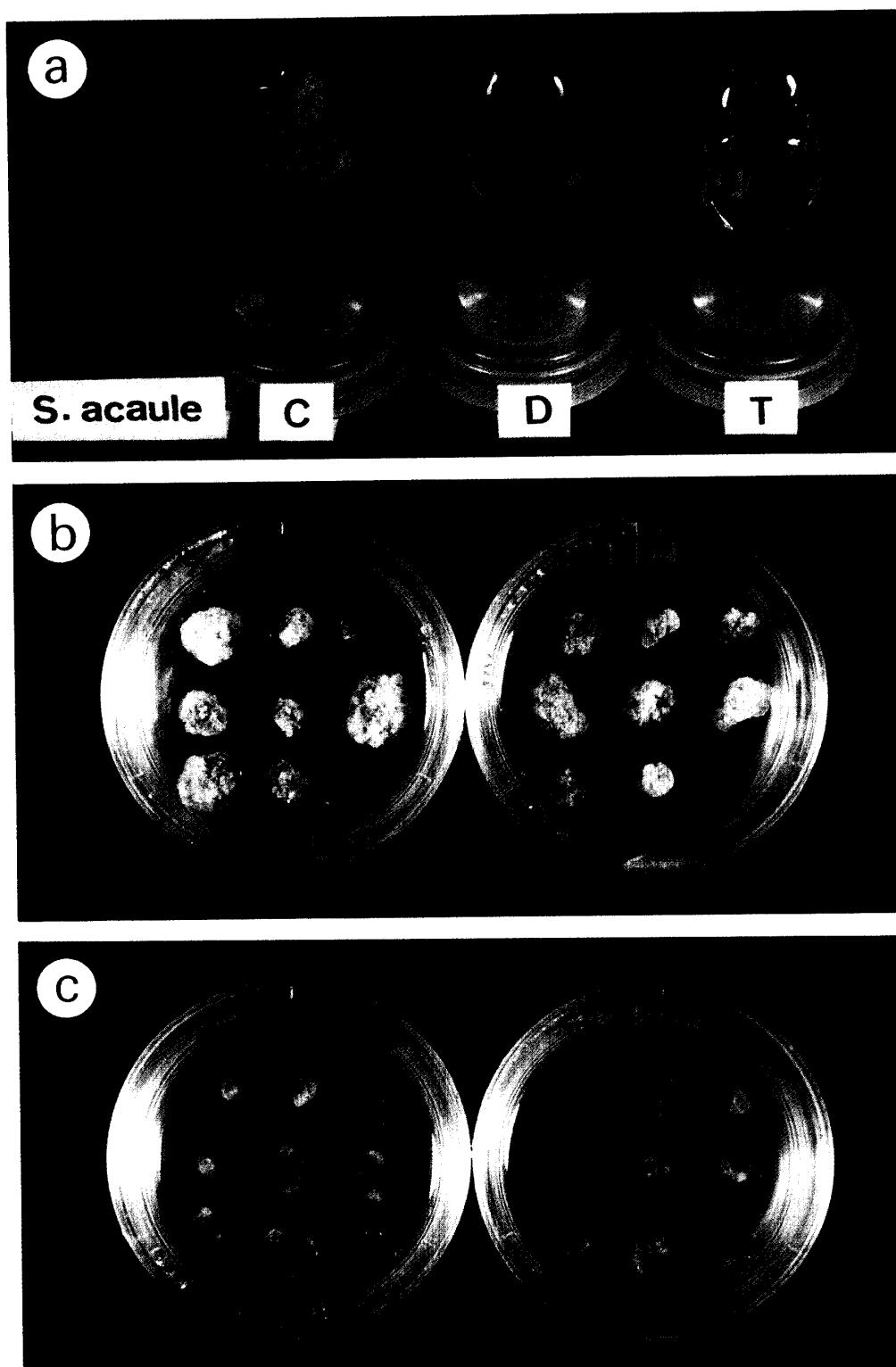


Fig. 4. Callus formation in anther culture of *S. acl* - C, D and T3.

- a : Callus formation on the anther culture medium (21 days after inoculation);
- b : Pollen calli of *S. acl* - C cultured on the regeneration medium (30 days after transplanting);
- c : Pollen calli of *S. acl* - T cultured on the regeneration medium (30 days after transplanting).

同一系統内においても、栽培環境によってカルス形成能に明らかな差が認められた。acl-C、Dの系統は春作（ガラス室）と夏作（ファイトロン）材料を用いたが、いずれも夏作の方が形成率が高かった。さらに、T3、T4、T8、の各系統は春作（ガラス室）と秋作（ガラス室）材料を用いたが、いずれも秋作材料の結果が高い傾向を示した。

本実験で得られた花粉カルスが2-3mm大に達した時点で、再分化を促す目的で1/2MS基本培地にゼアチン1mg/l、ジベレリン酸0.1mg/lを添加した培地、あるいはこれにIAA0.1mg/lを添加した培地に移植した。acl-Cのカルスはこの培地上でも旺盛な増殖を示した（Fig. 4-b）が、ある程度の大きさになると分裂を停止し、培地との接触部から徐々に褐変した。acl-Dのカルスは本培地上でも最も増殖が遅く、やはりゆっくりと黄化、褐変した。acl-Tのカルスは長期間緑色を維持しながらより緻密な形状に変化したが、グリーンスポットの形成までには至らなかった（Fig. 4-c）。花粉カルスは、この他にも植物生長調節物質の組合せをかえた培地、二層培養¹²⁾、バレイショ体細胞カルスによる看護培養等試みたが、現在までのところいずれも器官形成には至っていない。

考 察

1. 薬供与植物体の生育環境および生理的条件

薬培養を行なうにあたって、良好な材料を得ることが重要なことは言うまでもない。そのためには、薬を採取する植物体の生育環境が重要であると考えられている^{13, 14)}。本研究においても、供与植物体の栽培条件が変わることによって置床薬の反応やカルス形成率に差異が認められた（Table 3）。すなわち、ガラス室での春作とファイトロンでの夏作との比較において、いずれの供試材料でも後者の方がカルス形成率が高かった。栽培バレイショの薬培養で、異なる季節に栽培された材料間でその反応性に顕著な差異が生じたとする報告がある⁷⁾。また、OUYANGら（1987）¹⁵⁾は、供与植物体の栽培温度が薬培養の成否に大きく影響すると述べている。本研究で用いたファイトロンで栽培したS. aclの植物体は生育が旺盛で葉色も濃緑色を呈していた。おそらく、この種の栽培適温に近い条件であったものと思われる。これに対して春作のガラス室の温度条件は変動が激しく時折高温にさらされたことが悪影響を及ぼしたものと思われる。

一方、同一の植物体においても、その成熟度によって薬培養の反応に影響を与えるものと思われる。着花期間の初期と後期において、蕾の形態が異なることは、よく経験されることである。多くの種で、この初期の蕾の薬

がより反応性が高いとされている¹⁶⁾。本研究でS. acl-T26のカルス形成率が極端に低かったのは、植物体の成熟度がかなり進んでおり、着花期間の終期の蕾を用いたためと考えられる。

2. 花粉の発育段階の影響

花粉の発育段階は薬培養における花粉分裂の反応性にとって重要な要因の一つである。多くの植物で最も有効な発育段階として一核期から花粉有糸核分裂期直後までが一般的にあげられており⁶⁾、Solanum 属でも通常この時期のものが用いられている^{8, 16-19)}。これに対して、JOHANSSON（1986）²⁰⁾は、四分子期から一核期の発育段階を採用している。本研究で供試したacl-T3系統では、一核期初期から一核期中期で最も反応性の高いことが明らかになり、一般的に利用されている発育段階を支持する結果となった。

3. 蕾の低温前処理の効果

これまでの薬培養の研究から、花粉起源の分裂細胞の収量を上げるためには供試材料に温度処理などの刺激を与えるのが有効であることが知られている。本研究では以前からバレイショで報告のある、蕾の低温前処理の効果を検討した。その結果、供試したS. acl-Tおよび農林1号に関するかぎり、最適低温前処理はいずれも5℃の条件で2日間（ただし、そのピークは2-4日の間にある）であった。栽培種についてWENZELら（1984）²¹⁾は6℃、2日間を最適とし、JOHANSSON（1986）¹²⁾は7℃、3日間をあげている。これらは本研究で得られた結果とほぼ一致している。本研究で最適であった5℃、2日間の処理は、カルス形成率全体を高めたばかりでなく、その内の花粉カルスが占める割合をも高めた。体細胞に由来する二倍性のカルスは増殖が速く、花粉に由来する半数性カルスの増殖を妨げる場合もしばしばみられ、薬培養で花粉カルス形成を誘導する場合に回避しがたい問題となっている。本研究の結果は、適切な低温前処理を施すことによって、ある程度体細胞起源のカルスの出現を抑えられる可能性を示唆している。

4. 遺伝子型による相違

Solanum 属の薬培養において、遺伝子型が培養反応に影響することがすでに知られている^{6, 8-10, 18, 22, 23)}。本研究ではS. acl種の生態型であるC、D、EおよびT間で培養反応を比較したが、花粉およびその他のカルスの形成に対して顕著な差異が認められた。今後、この系統で半数体獲得をねらうならば、acl-Cあるいはacl-Tの利用が有望視されよう。acl-Tの自殖種子由来系統間では、T26系統の例外を除き大きな差異は認められなかった。S. aclは本来自殖性であり、これらの系統間の遺伝子型の差異が微

小であることを窺わせる結果となった。入倉⁶⁾は、*Solanum*属の46種、118クローンを用いて葯培養を行ない、11種から半数体を得た。その過程でオーキシシン、サイトカイニンの種類と濃度、基本培地に対する遺伝子型による反応の差異を検討し、ある特定の培地において系統間差がみられたとしても、培地の変更によってカルス形成率が改善できることを示した。本研究で供試した系統も、少なくとも花粉カルスの形成が可能であるので、培養法の検討によって半数体作出への道も開かれるのではないかと期待される。

摘 要

- 1) 耐霜性および各種耐病虫性を有するバレイショ野生種 *S. acaule* の11系統および栽培種2種を用い、葯培養過程に影響を及ぼすと考えられる2、3の要因について検討を加えた。
- 2) 花粉の発育段階が葯培養に及ぼす影響を調査した結果、花粉カルスが形成されたのは一核期初期～一核期中期の花粉を含む葯にはほぼ限られた。
- 3) 培養前の蕾に対する低温前処理の効果を調査した結果花粉カルスの形成には5℃の下で2日間処理を行なうのが最適であった。2日以上低温前処理は、葯壁や花糸カルスの形成を増長する傾向がみられた。
- 4) *S. acaule* の11系統を用い、葯培養におけるカルス形成率を系統間で比較した。acl-C, D, E, Tの生態型間にはカルス形成率およびカルスの形態に著しい差異が認められた。また、acl-Tの自殖種子後代の系統間でもカルス形成率が若干異なった。

引用文献

- 1) GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI : *Nature*, 204, 497, 1964.
- 2) HOUGHAS, R. W., S. J. PELOQUIN and A. C. GABERT : *Crop Sci.*, 4, 593-595, 1964.
- 3) HERMSEN, J. G. Th. and J. VERDENIUS : *Euphytica*, 22, 244-259, 1973.
- 4) BREUKELN, E. W. M., M. S. RAMANNA and J. G. Th. HERMSEN : *Euphytica*, 24, 567-574, 1975.
- 5) BREUKELN, E. W. M., M. S. RAMANNA and J. G. Th. HERMSEN : *Euphytica*, 26, 263-271, 1977.
- 6) 入倉幸雄 : 北海道農業試験場研究報告, 112, 1-74, 1975.
- 7) DUNWELL, J. M. and N. SUNDERLAND : *Euphytica*, 22, 317-323, 1973.
- 8) FOROUGH-WEHR, B., H. M. WILSON, G. MIX and H. GAUL : *Euphytica*, 26, 361-367, 1977.
- 9) SOPORY, S. K. and P. G. ROGAN : *Z. Pflanzenphysiol.*, 80, 77-80, 1976.
- 10) JACOBSEN, E. and S. K. SOPORY : *Theor. Appl. Genet.*, 52, 119-123, 1978.
- 11) MURASHIGE, T. and F. SKOOG : *Physiol. Plant.*, 15, 473-497, 1962.
- 12) JOHANSSON, L. : *Potato Res.*, 29, 179-190, 1986.
- 13) ENGVILD, K. C., I. LINDE-LAURSEN and A. LUNDQUIST : *Hereditas*, 72, 331-332, 1972.
- 14) FOROUGH-WEHR, B., G. MIX, H. GAUL and H. M. WILSON : *Z. Pflanzenzuchtg.*, 77, 198-204, 1976.
- 15) OUYANG, J. W., D. G. HE, G. H. FENG and S. E. JIA : *Plant Sci.*, 49, 145-148, 1987.
- 16) DUNWELL, J. M. : In *Biotechnology in Plant Science*, Edited by ZAITLIN *et al.*, Academic Press, Orlando, 49-76, 1985.
- 17) IRIKURA, Y. : *Potato Res.*, 18, 133-140, 1975.
- 18) MIX, G. : *Potato Res.*, 26, 63-67, 1983.
- 19) SOPORY, S. K. and Y. P. S. BAJAJ : In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 3, Springer-Verlag, Berlin, 89-105, 1987.
- 20) JOHANSSON, L., B. ANDERSSON and T. ERIKSSON : *Physiol. Plant.*, 54, 24-30, 1982.
- 21) WENZEL, G. and B. FOROUGH-WEHR : In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Edited by I. K. VASIL, Academic Press, New York, 293-301, 1984.
- 22) SIMON, P. W. and S. J. PELOQUIN : *Theor. Appl. Genet.*, 50, 53-56, 1977.
- 23) SOPORY, S. K. and B. M. TAN : *Z. Pflanzenzuchtg.*, 82, 31-35, 1979.