



花粉粒の胚形成機構に関する研究：第7報 タバコ葯培養における花粉粒の分裂および幼植物体形成に対する培地内各種糖類の効果

平林, 泰平
三十尾, 修司
上島, 脩志

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 20(2):161-169

(Issue Date)

1993-01-30

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00198240>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00198240>



花粉粒の胚形成機構に関する研究

第7報 タバコ葯培養における花粉粒の分裂および幼植物体形成に対する
培地内各種糖類の効果

平林 泰平*・三十尾 修司**・上島 脩志**

(平成4年8月10日受理)

Studies on the Mechanisms of Pollen Embryogenesis

VII. Effects of Various Saccharides on Pollen Division and Plant Formation in Tobacco Anther Culture

Taihei HIRABAYASHI, Shuji MISOO and Osamu KAMIJIMA

Abstract

Anthers of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) were cultured on agar media containing various saccharides to investigate effects of saccharides on the pollen division and subsequent plant formation.

1. The frequency of plant regeneration, the average number of regenerated plants per anther, and the morphological features of regenerated plants at 9 weeks after inoculation were compared among the media containing 10 kinds of saccharides at 1/10M, and 2 kinds of polysaccharides at 3% to modified TANAKA's medium individually. On the medium containing fructose, glucose, maltose or sucrose, plants were regenerated at a high frequency, and most of them developed with normal growth. Though many plants were obtained from the mannose and raffinose media, they stopped their growth at a very young stage. On the xylose, lactose, dextrin and starch media, the frequencies of plant regeneration were comparatively low, and most of plants showed malformation. No regenerated plant was observed on the arabinose and galactose media.
2. Multinucleate and multicellular pollen grains were induced even on the media where plants could not be formed. Moreover, pollen grains with 3-6 nuclei were observed at comparatively high frequencies on the mannitol medium and at a low frequency on the carbohydrate-free medium after 10 days of culture. From these results, it is suggested that saccharides in a medium possess mainly the function for control of osmotic pressure, whereas they are not essential factors in the early term of culture.
3. The plant regeneration on mannose, maltose, sucrose and raffinose media was compared with each other by changing their concentrations in the medium from 1/128 to 1/4M. The highest frequencies of plant regeneration were obtained at 1/8M in mannose, sucrose and raffinose, and at 1/4M in maltose. The average numbers of plants per anther were highest at 1/16M in maltose and sucrose, and highest at 1/8M in mannose and raffinose. These results indicate that the most favorable concentration of each saccharide for plant regeneration is considerably different.

* 自然科学研究科

** 作物育種学研究室

緒 論

半数体は純系の短期間育成や劣性突然変異の検出に役立つなど育種の利用価値が高い。1964年、GUHAとMAHESHWARI³⁾が*Datura innoxia*の培養薬から花粉起源植物体の再分化に成功して以来、薬培養は半数体の作出に最も有効な手段として期待を持たれるようになり、多くの植物においてこの培養法が試みられてきた。しかし、薬培養による半数体作出の成否はその植物の遺伝的背景に大きく依存しており、多くの植物では未だ再分化に成功していないため、現在のところ、この培養法は育種手段として十分に利用されていない。このため、薬培養による半数性植物の獲得が容易な種であるタバコにおける花粉胚形成機構の解明が、他の植物における薬培養に有用な知見を与えるものとして期待が集められている。

糖は培養細胞への炭素の供給や培地内の浸透圧調節に係わるなど、植物の組織培養において重要な培地成分の一つである。糖を培地に添加する上で重要であるのが糖種の選択である。この場合、蔗糖が最も一般的に用いられており、糖種選択に関するこれまでの報告においても、蔗糖の高い有効性を認めたものが多い^{1,4,6,8,9,12,16)}。しかし、一方で蔗糖以外の糖において、より高い有効性が認められた例もいくつか報告されている^{2,4,5,8,9)}。

本研究では、単糖から多糖まで12種の糖をそれぞれ単

独で培地に添加することにより、これらの糖の幼植物体形成に対する効果を検討した。また、薬培養における種々の糖の役割をより明らかにするため、一部の糖については培養初期における内部花粉粒の分裂状況を調査し、種々の濃度における各糖の幼植物体形成に対する効果について調査した。

材料および方法

日本たばこ産業株式会社より分譲を受けた*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow (2n=48)を供試した。また、これらの栽培は年間を通してガラス室内で行った。

基本培地は、インドール酢酸を除去した1973年の田中の処方¹⁵⁾に基づいて作成した。これに種々の濃度の各種糖類と、0.8%の寒天を加え、pHを5.8に調整した後、50mlの三角フラスコに20mlずつ分注し、120℃で15分間オートクレーブ滅菌を施した。

一核後期ないし二核前期の花粉粒を含む蕾を採取し、70%エタノールで5ないし10秒間、2%アンチホルミンで8ないし10分間の表面殺菌を行った。クリーンベンチ内で薬を取り出した後、1フラスコあたり15薬ずつ置床し、昼間の14時間を蛍光灯により照明(約2,000 lux)した、25±1℃の恒温室内で培養を行った。

薬置床後9週間目まで、1週間ごとに培養器の外から

Table 1. Effects of various saccharides on the plant regeneration in tobacco anther culture (9 weeks after inoculation)

Saccharides (1/10M)	No. of anthers inoculated	Plant regeneration		
		No. of anthers	Frequency (%)	Ave. no. ²⁾ per anther
Arabinose	90	0	0.0	—
Xylose	75	13	17.3	13.2
Fructose	90	50	55.6	11.3
Galactose	90	0	0.0	—
Glucose	75	38	50.7	14.5
Mannose	90	55	61.1	36.5
Lactose	90	27	30.0	11.6
Maltose	75	57	76.0	10.1
Sucrose	90	59	65.6	13.4
Raffinose	60	39	65.0	40.1
Dextrin ¹⁾	90	13	14.4	15.1
Starch ¹⁾	75	2	2.7	26.5

1) : Added at 3% concentration.

2) : Average number of plants per anther which regenerated plants.

観察を行い、植物体再分化葯数を調査した。また、培養9週間目には葯を取り出して最終的な再分化葯数および再分化植物体数を調査した。一方、葯内花粉粒の分裂状況は、置床後10および20日目に、葯中の花粉粒をアセトカーミンで染色し、光学顕微鏡下で調査を行った。

実験結果

1. 各種糖類培地の幼植物体形成に対する効果

12種の糖を1/10M（デキストリンおよび可溶性澱粉は3%）濃度で培地に添加し、培養9週間目における幼植物体形成に対する効果を検討したところ、それぞれの糖培地間で植物体再分化率、1葯あたり再分化植物体数、および再分化植物の形状に差がみられた。

植物体再分化率は麦芽糖添加培地において最も高く、76.0%を示した。蔗糖など5種の糖培地でも50%以上の高い値となったが、キシロース、乳糖、デキストリン、および澱粉では比較的低い値であった（Table 1）。また、アラビノースおよびガラクトース培地では全く植物体形成が認められなかった（Table 1およびFig. 3 b）。

1葯あたりの再分化植物体数は、蔗糖培地において13.4となり、キシロース、ブドウ糖など6種の培地でもこれとほぼ同等の値を示した。しかし、マンノースおよびラフィノース培地ではそれぞれ36.5、40.1となり、蔗糖培地の3倍前後の値となった。

再分化植物体は、蔗糖培地から得られたものが最も正常な葉を形成し、発根も良好であった（Fig. 3 d）。果糖、ブドウ糖、および麦芽糖の場合も正常な葉となり、蔗糖に次いで良好な発根を示した（Fig. 3 aおよびc）。しかしながら、マンノースおよびラフィノース培地では幼植物体形成直後、シュート長10mm前後の時点で発育を停止する傾向がみられ、発根もほとんど観察されなかった（Fig. 3 e）。また、キシロース、乳糖、および澱粉培地では葉が水浸状になり、生育が遅れ、発根は認められなかった。デキストリン培地では発根はわずかに認

められたものの、前述の3培地と同様に再分化植物体はいずれも典型的な水浸状葉を呈していた（Fig. 3 f）。

2. 各種糖類およびマンニトール培地の花粉粒分裂に対する効果

まず、実験1において再分化植物体が全く得られなかったガラクトース培地と、良好な再分化が認められた蔗糖培地を用い、置床後20日目の花粉粒の分裂状況を1葯あたり500粒以上、1区あたり22葯について観察したところ、蔗糖培地の約1/2ではあったが、ガラクトース培地上でも花粉粒の分裂が行われていることが判明した（Table 2）。さらに、多核化花粉粒を生じた葯の割合では蔗糖培地よりも高い値を示した。これらの多核化花粉粒には、蔗糖培地の場合と同様に球状胚様体に発育したもので認められた。

次に、Fig. 1に示した6種の糖類培地、マンニトール培地、および炭水化物無添加培地について同様の実験を行った。ただし、観察は培養10日目および20日目に1葯あたり1,000粒以上、1区あたり30葯について行った。その結果、培養10日目にはすべての培地において多核化花粉粒が観察された（Fig. 1 a）。これらの出現頻度はマンノース、麦芽糖、およびラフィノース培地において最も高く、これに次いでアラビノース、蔗糖培地で高い値を示した。マンニトール培地でもブドウ糖培地と同程度の多核化花粉粒が観察されたが、炭水化物無添加培地では比較的低頻度にとどまった。また、すべての培地において、培養10日目における多核化花粉粒のほとんどが3-6核性のものであった。これらの分裂様式を生殖核分裂型（nG+V型）、栄養核様均等分裂型（nV型）、および栄養核分裂型（G+nV型）に分類したが、いずれの培地においてもそれらの比率はほぼ等しかった。

一方、培養20日目には炭水化物無添加培地を除く全ての培地において、7核以上に分裂した花粉粒が観察された（Fig. 1 bおよび4）。これらの出現頻度はアラビノースおよびマンニトール培地では極めて低く、いずれ

Table 2. Effects of galactose and sucrose on the pollen division in tobacco anther culture (20 days after inoculation)

Saccharides (1/10M)	Freq.(%) of viable pollen grains with			Freq.(%) of degenerated pollen grains	Freq.(%) of* embryogenic anther
	1 nucleus or 2 nuclei	3-6 nuclei	7 or more nuclei		
Galactose	2.5	0.1	0.1	97.3	54.5
Sucrose	4.4	0.2	0.2	95.2	36.4

* embryogenic anther : Anthers including pollen grains with 3 or more nuclei.

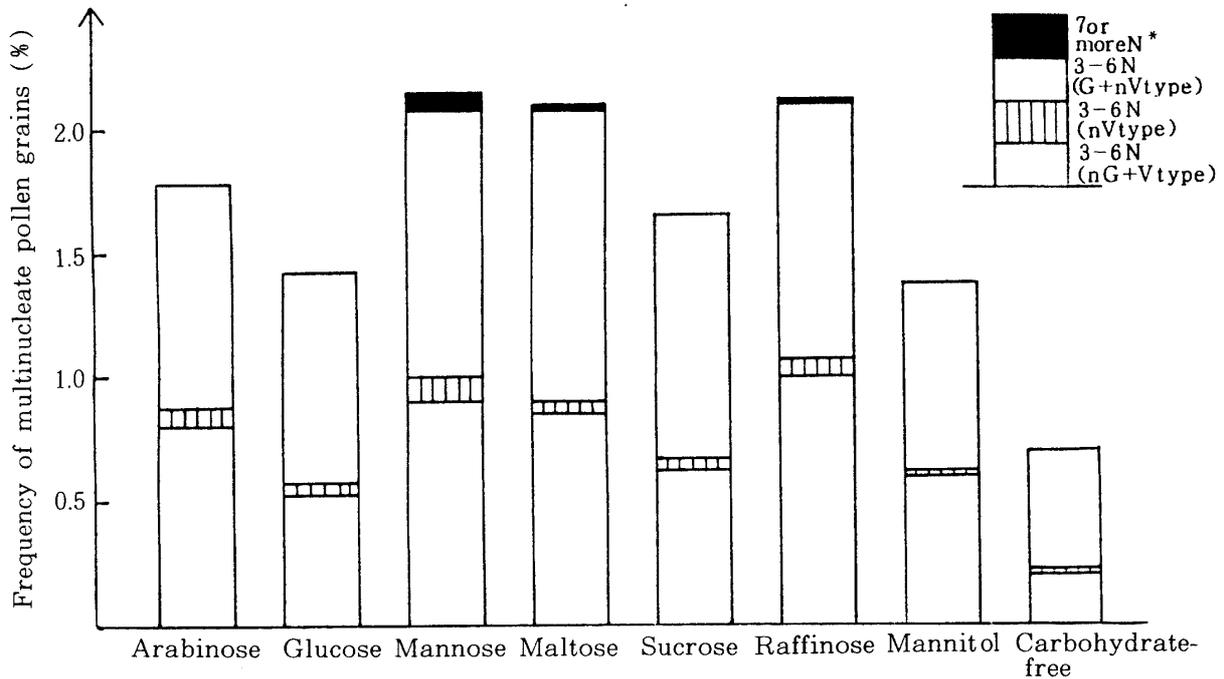


Fig. 1 a. Effects of various saccharides and mannitol at 1/10M concentration on the induction of multinucleate pollen grains in tobacco anther culture (10 days after inoculation).
*N : Nucleus, G : Generative nucleus, V : Vegetative nucleus.

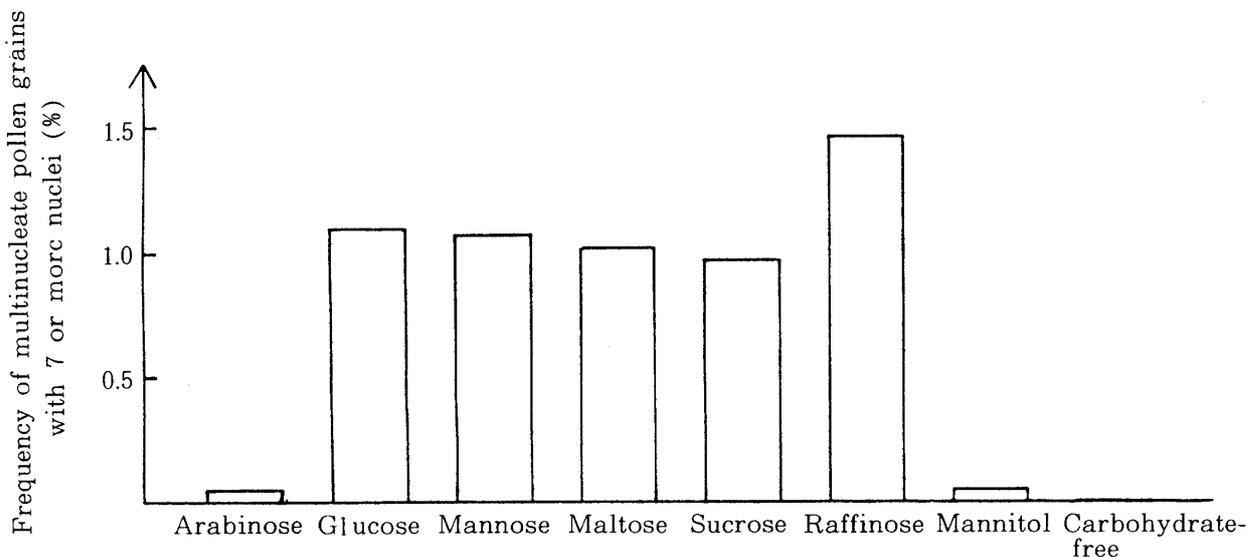


Fig. 1 b. Effects of various saccharides and mannitol at 1/10M concentration on the induction of multinucleate pollen grains with 7 or more nuclei in tobacco anther culture (20 days after inoculation).

も0.05%であったが、ブドウ糖、マンノース、麦芽糖、および蔗糖培地では1%前後であった。また、ラフィノース培地では1.47%の花粉粒が7核以上に分裂していた。高頻度で7核以上の分裂粒が認められた5種の培地では、花粉壁を突き破り始めたものや (Fig. 4 e)、球状胚様体にまで発達したもの (Fig. 4 f) も観察された。

3. 植物体形成に対する各種糖類の濃度の効果

マンノース、蔗糖、麦芽糖、およびラフィノースを1/128-1/4 M濃度で培地に添加し、植物体形成に対する効果を比較した。なお、本実験では1実験区につき150から180蒴を置床した。

ラフィノース1/128M添加培地を除くすべての培地から植物体の再分化が認められたが、マンノース添加培地では、全濃度培地において他の糖培地より植物体再分

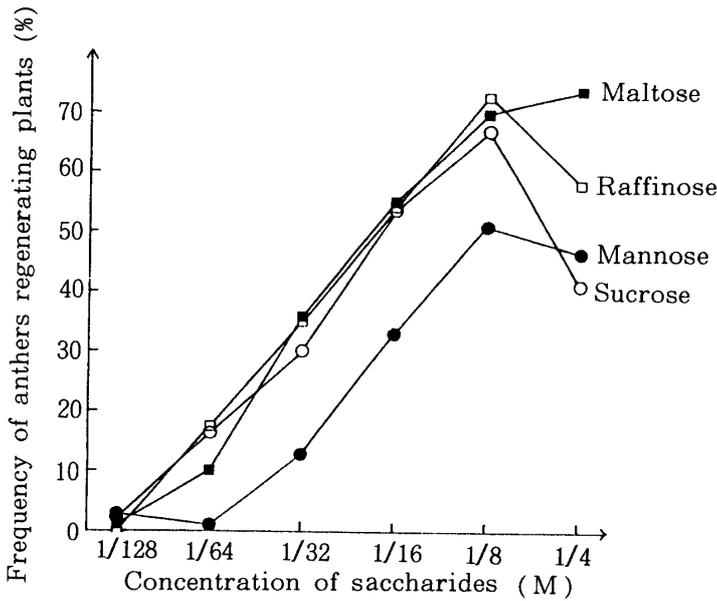


Fig. 2 a. Effects of four kinds of saccharides at various concentrations on the plant regeneration in tobacco anther culture (9 weeks after inoculation).

化率がやや低くなった (Fig. 2 a)。再分化はいずれの糖においても $1/8$ M 添加時に最も早く観察され (置床後 4 週間目より)、培養 9 週間目における植物体再分化率も、麦芽糖を除く 3 種類の糖では、この濃度において最も高い値となった。

1 葯あたりの再分化植物体数は、麦芽糖および蔗糖では $1/16$ M 添加培地において最も高い値を示し、それぞれ 15.5、13.0 となった (Fig. 2 b)。一方、マンノースおよびラフィノースでは $1/8$ M 添加時に最も多くの植物体が観察され、それぞれ 18.9、41.2 を示した。しかし、この 2 種類の糖では、その他の濃度における再分化植物体数が比較的 low、特に、マンノースでは $1/32$ M 以下、ラフィノースでは $1/64$ M 以下の濃度において、蔗糖培地より低い値となった。

再分化植物は麦芽糖および蔗糖を $1/8$ および $1/16$ M 添加したときに正常な形状を示したが、 $1/32$ M 以下の濃度で添加したときには水浸状葉を有するものが高頻度で出現した。また、マンノースおよびラフィノースの場合では、いずれの濃度においても再分化植物の発育がシュート長 10 mm 程度で停止した。

考 察

植物の組織培養において培地に添加する糖種の影響に関する研究はこれまでも多くなされておられ、*Datura* の胚培養ではブドウ糖や果糖より蔗糖が有効であり¹⁵⁾、*Glycine* および *Vicia* のプロトプラストの分裂に対してはブドウ糖が、*Bromus* では蔗糖がより効果的であるこ

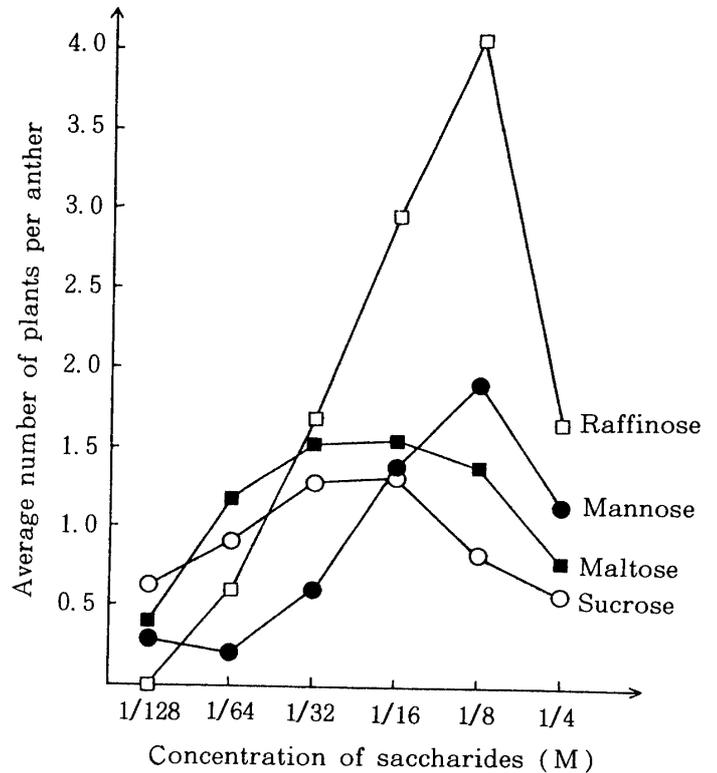


Fig. 2 b. Effects of four kinds of saccharides at various concentrations on the average number of plants per anther in tobacco anther culture (9 weeks after inoculation).

とが認められている⁸⁾。また、カカオの体細胞胚形成においては、接合子胚の発達に必要とされる脂肪酸、アントシアニンおよびアルカロイドが蔗糖を用いたときに最も多く蓄積されることが知られている⁶⁾。一方、葯培養では、イネの花粉起源カルの形成に対して、9 種の糖添加培地および無添加培地では有効性に差がみられ、蔗糖およびブドウ糖がより効果的であると報告されている¹²⁾。また、タバコでは、同モル濃度条件では蔗糖とブドウ糖はほぼ同等の植物体形成率を示すが、果糖ではやや低下することが認められている⁹⁾。

本試験で用いた 12 種の糖においても、培養 9 週間目における植物体再分化に対する効果に差が認められ、これらを 4 グループに大別することができた。すなわち、再分化を高頻度で誘起し、再分化植物の多くを正常に発育させるもの (果糖、ブドウ糖、麦芽糖、および蔗糖)、再分化を高頻度で誘起し、1 葯あたりの再分化数も非常に多いものの、植物体の発育を極めて若い時期に停止させるもの (マンノースおよびラフィノース)、奇形植物体ばかりを低頻度で形成させるもの (キシロース、乳糖、デキストリン、および澱粉)、および植物体を全く再分化させないもの (アラビノースおよびガラクトース) であった。次に、蔗糖培地および実験 1 において再分化が

全く認められなかったガラクトース培地について、置床20日目における葯内花粉粒の分裂状況を調査したところ、蔗糖に比べて低頻度であるものの、ガラクトース培地においても明らかに多細胞化した7核以上の分裂粒が確認された。よって、6種の糖添加培地、植物体内で代謝されないマンニトールを添加した培地、およびこれまでも幼植物体形成に対し全く有効性を持たないことが知られている^{9,11)}炭水化物無添加培地について同様の花粉粒観察を行ったわけである。また、実験3では実験1および2の結果、蔗糖以上の有効性を持つ可能性が示唆された3種の糖について、それらの効果をより明らかにするため、種々の濃度で培地に添加し、植物体の再分化状況を調査した。

まず、培養10日目における花粉粒分裂状況の調査の結果、マンニトール培地では比較的高頻度で、また炭水化物無添加培地でも低頻度ながら多核化花粉粒が生じた。タバコの葯培養では、主にG+nV型の多核化花粉粒がさらに分裂、発達し、胚様体に至ることが知られている¹⁰⁾、これらの2種の培地と糖添加培地との間では、この時点で3-6核性多核化花粉粒の分裂様式に差が認められていない。にもかかわらず、この2種の培地では、20日目における7核以上の分裂粒の出現は極めて抑制されていた。よってこれらのことから、糖は培養のごく初期には必ずしも必須ではなく、この時期の主に浸透圧調節に関与していること、また、それに引き続いて炭素源として利用され始めることが示唆される。

次に、実験1において植物体形成に対して全く効果のみられなかった糖添加培地のうち、アラビノース培地では、培養10日目では蔗糖とほぼ同頻度の多核化花粉粒が出現したが、20日目における7核以上の花粉粒の出現頻度はマンニトールと同等の0.05%であった。このことから、この糖は炭素源としての有効性をほとんどもたないものと思われる。これに対しガラクトース培地では、培養20日目において蔗糖培地の約1/2の頻度で7核以上に分裂した花粉粒が出現し、球状胚様体も観察されている。この2つの試験に共通して用いた蔗糖培地の多核化花粉粒出現頻度に大きな差が生じたため、2種の糖の効果を直接比較することはできないが、ガラクトースはアラビノースより有効性が高いことも考えられる。ブドウ糖および麦芽糖は、実験1において蔗糖と同様、正常植物体を高頻度で形成した糖である。この2種の糖培地では、20日目における7核以上の分裂粒頻度は蔗糖に非常に近い値を示した。また、麦芽糖では実験3における再分化率もすべての濃度において蔗糖とほぼ同じ値を示している。このことから、この2種の糖は、全培養期間を

通じて蔗糖とほぼ同等の有効性を持つものと考えられる。また、実験1において、多数の植物体を形成したにもかかわらず、それらの発育を早期に停止させたマンノースおよびラフィノース培地では、いずれも培養10日目における多核化花粉粒の出現頻度が蔗糖よりやや高く、ラフィノース培地では20日目の7核以上の分裂粒頻度も蔗糖培地より高い値を示した。このことから、この2種の糖培地、特にラフィノース培地では、分裂粒数あるいは再分化数が多く、栄養分競合が生じたことが原因で、再分化個体が発育停止に至ったとも考えられる。しかし、実験3ではこの2糖とも、蔗糖より再分化植物体数が少なかった濃度においても植物体の発育停止を誘起している。よって、この現象はむしろ、早く再分化した植物体の発育が何らかの原因で抑制され、養分吸収能力が低下したために、他の分裂粒あるいは胚状体からの植物体形成が増加したと考えるのが妥当であると思われる。

三十尾と松林⁹⁾は、果糖、ブドウ糖、および蔗糖をタバコ葯培養に用いたところ、いずれの糖においても植物体形成率は1/8Mで、1葯あたりの再分化植物体数は1/16Mでより高い値を示すことを認め、植物体形成は糖のモル濃度によって強く支配されるものと推察している。今回我々は、4種の糖の1/128から1/4M濃度における植物体再分化に対する効果を検討したが、植物体再分化率については3種の糖において1/8Mでより高い値を示したものの、麦芽糖では1/4M濃度において1/8Mより若干高い値が得られた。また、1葯あたりの再分化数では、麦芽糖および蔗糖では1/16Mが最も有効であったにもかかわらず、マンノースおよびラフィノースでは明らかに1/8Mにおいてより高い値が得られている。果糖およびブドウ糖はいずれも蔗糖を構成する単糖であり、実験1および2においても蔗糖とほぼ同様の効果を持つことが確認されている。これに対し、特にマンノースおよびラフィノースの場合、蔗糖とはその有効性に差がある点で非常に興味を持たれる。今後、さらに多くの糖について種々の濃度における植物体の再分化や花粉粒の分裂に対する効果について検討する必要があるものと思われる。

本研究において最終的に高頻度で正常植物体を再分化することができたのはブドウ糖、果糖、およびこの2種の単糖のみで構成される蔗糖と麦芽糖のみに限られた。ガラクトース、およびガラクトースより合成される乳糖やラフィノースは、カンキツの体細胞胚形成⁵⁾や花粉胚形成²⁾などにおいて蔗糖より高い有効性が認められているが、本研究では程度の差はあるにしても、いずれの糖においても正常植物体の再分化には至らなかった。また、

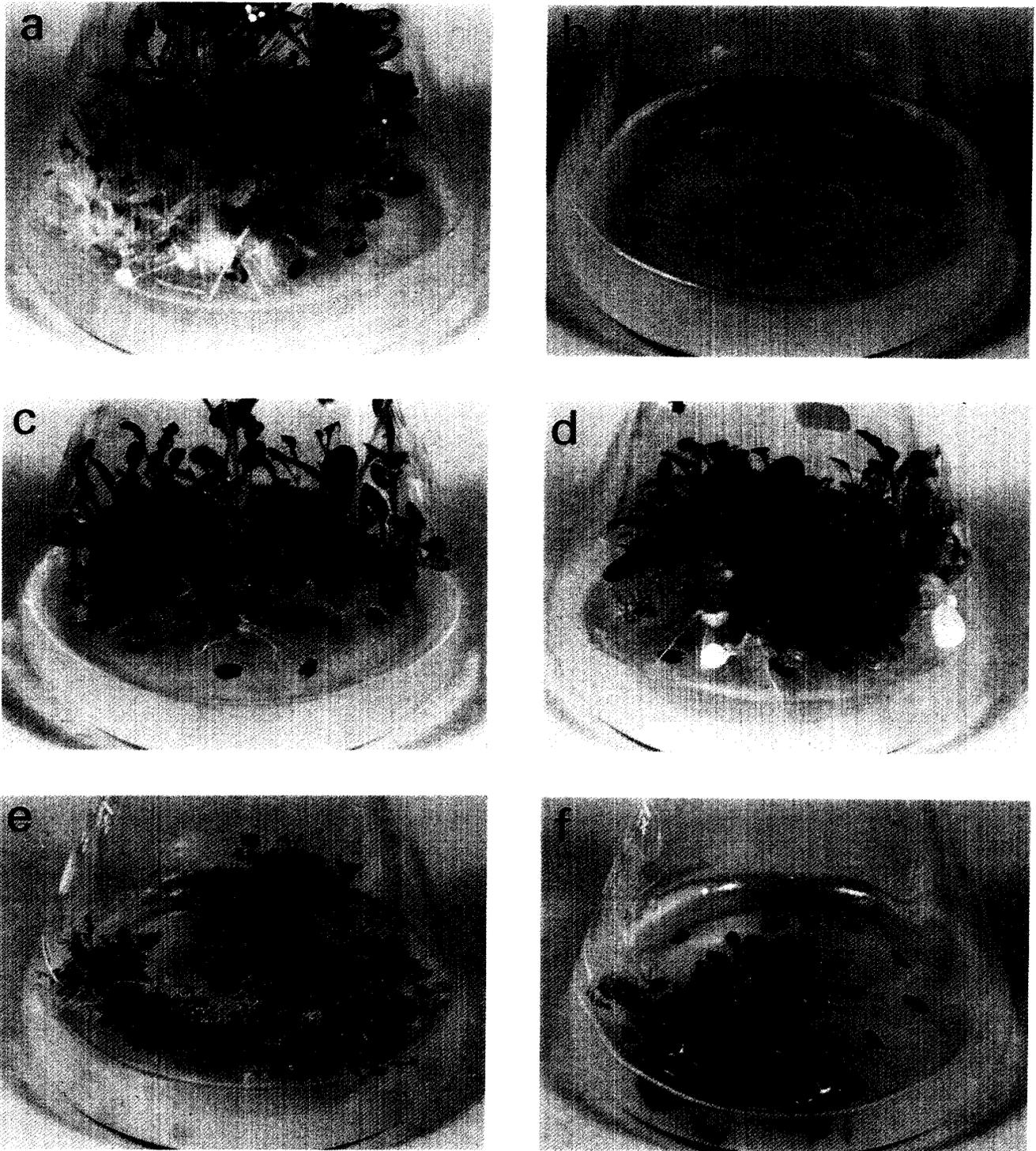


Fig. 3. Regenerated plants in tobacco anther culture as affected by various saccharides after 9 weeks of culture.

Fructose (a), galactose (b), glucose (c), sucrose (d), and raffinose (e), were added at 1/10M concentration, and dextrin (f) at 3% concentration.

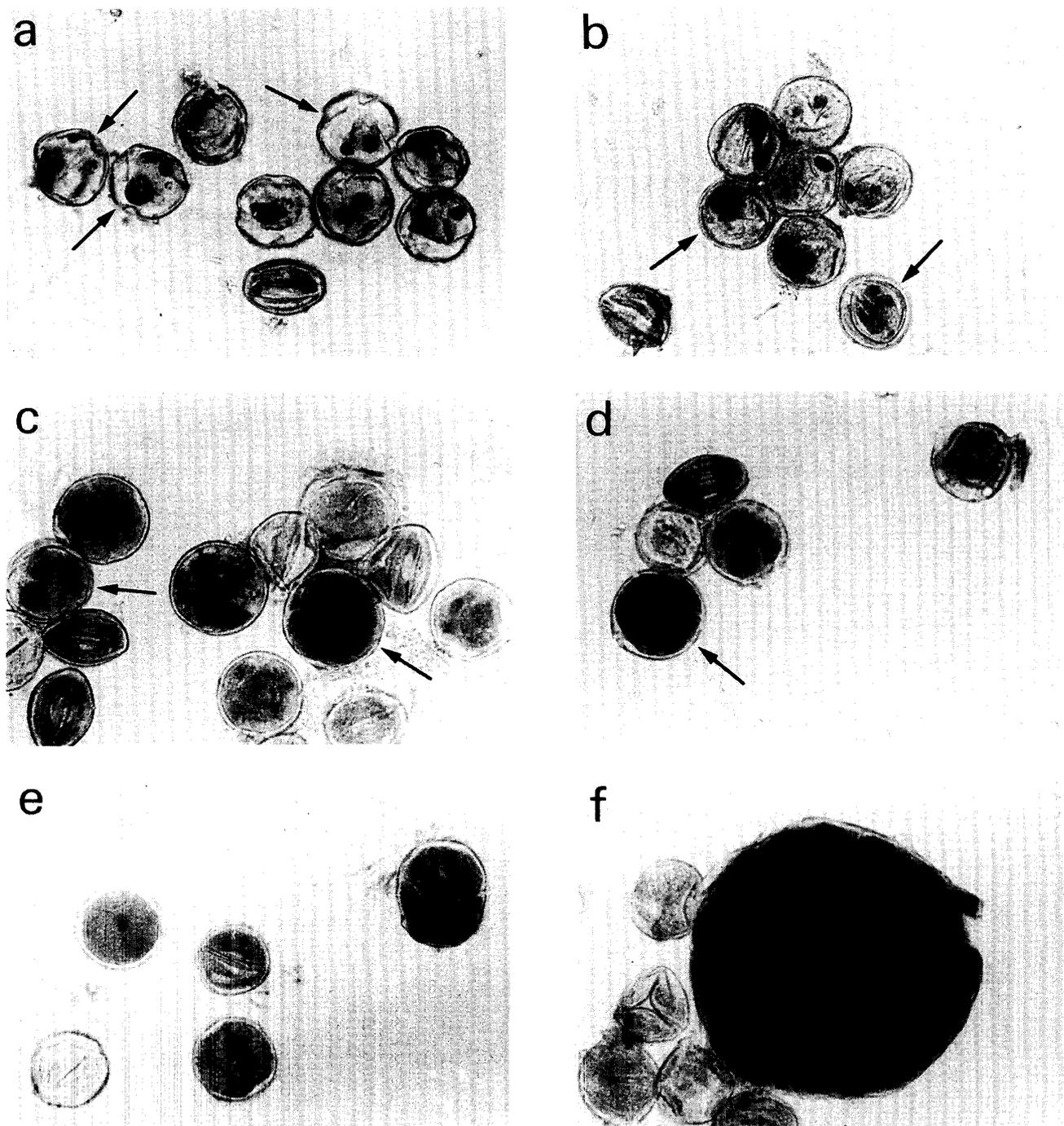


Fig. 4. Developmental features of pollen grains cultured on the media containing various saccharides in tobacco anther culture (*ca.* $\times 200$, 20 days after inoculation).
 a and b : Multinucleate pollen grains with 3-4 nuclei (indicated by arrows) on the carbohydrate-free (a) and arabinose (b) media. c and b : Further developed multinucleate grains on the maltose (c) and sucrose (d) media. Some of them have formed visible septa (indicated by arrows). e : A multicellular grain on the raffinose medium. The cell clump is getting out from the bursted exine. f : Globular embryoid on the glucose medium.

アラビノースおよびキシロースでも正常植物体を得られなかった。この2種の糖はいずれも5単糖である点で一致している。一方、デキストリンおよび澱粉の場合はブドウ糖のみで構成されているものの、いずれも高分子多糖類として他の糖と分類することができる。ただし、この2種の糖培地ではモル濃度が他の糖よりも極めて低くなっており、実際、これらの培地における再分化個体の形状は蔗糖や麦芽糖を低濃度で添加したときのものと同様であった。よって、この2種の糖についてはより高濃度条件あるいはマンニトールとの組合せ添加条件下等で追試を行う必要がある。糖は、その種類により、培養組織への吸収性^{7,14)}や組織内における移動性^{7,14)}、代謝性¹⁶⁾などが異なる。また、細胞内での蓄積等により、オーキシン生合成の制御¹³⁾、特定酵素の過剰生産¹⁾等を引き起すことも知られている。本研究において生じた各種糖類の有効性の違いも、これらのいずれかに関連して生じた可能性が高い。今後、これらの原因を生化学的レベルから解明していくことが重要であると思われる。

摘 要

タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow, $2n=48$) の葯培養における培地内各種糖類の有効性について検討した。

- 12種の糖を1/10M (うち2種は3%) 濃度で培地に添加したところ、植物体再分化に対して各培地間で顕著な差が認められた。果糖、ブドウ糖、麦芽糖、および蔗糖培地では高頻度で再分化が認められ、その多くが正常な発育を示した。マンノースおよびラフィノース培地では再分化率が高く、再分化個体数も非常に多かったが、植物体の発育が不良であった。キシロース、乳糖、デキストリン、および澱粉培地では再分化率が低く、再分化個体の多くが奇形を示した。一方、アラビノースおよびガラクトース培地では全く再分化が認められなかった。
- 7種の糖、マンニトール、および炭水化物無添加培地について花粉粒の分裂状況を調査したところ、培養20日目にはガラクトース培地でも比較的低頻度ながら、ラフィノース培地では高頻度で7核以上の分裂花粉粒が観察された。また、培養10日目の3-6核性の分裂粒はマンニトール培地では比較的高頻度で、炭水化物無添加培地でも低頻度ながら観察された。このことから、培養のごく初期には糖類は必須ではなく、主に浸透圧調節に関与していることが示唆される。
- マンノース、麦芽糖、蔗糖、およびラフィノースを

1/128-1/4Mの濃度で培地に添加したところ、再分化率は3種の糖では1/8M添加時に最も高い値を示したが、麦芽糖では1/4Mでより高い値となった。また、再分化植物体数は麦芽糖および蔗糖では1/16Mで、マンノースおよびラフィノースでは1/8Mで最も多くなった。このことから、植物体再分化に対してより有効的なモル濃度が、糖により異なる可能性が示唆される。

引用文献

- 1) ANKER, L.: *Acta Bot. Neerl.*, **23**, 705-714, 1974.
- 2) 陳 力耕・日高哲志・大村三男: 園学要旨, 昭63春, 16-17, 1988.
- 3) GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI: *Nature*, **204**, 497, 1964.
- 4) HILDEBRANDT, A. C. and A. J. RIKER: *Ame. J. Bot.*, **36**, 74-85, 1949.
- 5) KOCHBA, J., P. SPIEGEL-ROY, S. SAND and H. NEUMANN: *Naturwissenschaften*, **65**, 261, 1977.
- 6) KONONOWICZ, A. K. and J. JANICK: *Physiol. Plant.*, **61**, 155-162, 1984.
- 7) LIN, W., M. R. SCHMITT, W. D. HITZ and R. T. GIAQUINTA: *Plant Physiol.*, **75**, 936-940, 1984.
- 8) MICHAYLUC, M. R. and K. N. KAO: *Z. Pflanzenphysiol.* **75**, 181-185, 1975.
- 9) 三十尾修司・松林元一: 神大農研報, **13**, 19-28, 1978.
- 10) MISOO, S., K. YOSHIDA and M. MATSUBAYASHI: *Sci. Rept. Fac. Agr. Kobe Univ.*, **13**, 193-202, 1979.
- 11) NITSCH, J. P.: *Phytomorph.*, **19**, 387-404, 1969.
- 12) 大野清春: 農技研報D, **26**, 139-222, 1975.
- 13) ROBERTS, R. M., A. HEISHMAN and C. WICKLIN: *Plant Physiol.*, **48**, 36-42, 1971.
- 14) SCHMITT, M. R., W. D. HITZ, W. LIN and R. T. GIAQUINTA: *Plant Physiol.*, **75**, 941-946, 1984.
- 15) 田中正雄: 育雑, **23**, 171-174, 1973.
- 16) VAN OVERBEEK, J., M. E. CONKLIN and A. F. BLAKESLEE: *Ame. J. Bot.*, **31**, 219-224, 1944.