

総 説

汎用的, 簡便, かつ高効率 *in planta* 形質転換法の開発

小島 峯雄*・Putu Suparthana・野川 優洋

(2006年11月27日受付 2006年12月18日受理)

現在, 普及している植物の一般的形質転換法では *in vitro* 培養系のカルスか組織片に遺伝子が導入される. 遺伝子を導入するには主に *Agrobacterium tumefaciens* 菌仲介法か微粒子銃法 (microparticle bombardment 法) のいずれかが用いられる. 前者の *A. tumefaciens* 菌仲介法が後者の方法より遺伝子を植物ゲノムに再配列をより少なく, より低コピー導入できる点で優れている. しかし, この一般的方法には問題点や短所もある. その主なものを挙げると, 第1は長期間かかることである. 第2は植物細胞の *in vitro* 培養中に体細胞変異がしばしば起こることである. さらに, 植物によっては植物個体の再生が非常に困難であったり, 不可能であることも大きな問題点である. これらの問題点は植物細胞を *in vitro* 培養することに起因するものである. したがって, 植物細胞の *in vitro* 培養の操作を含まない形質転換法, すなわち *in planta* 形質転換法を開発すれば克服できるはずである. 今までに, いくつかの *in planta* 形質転換法が報告されてきたが¹⁻⁵⁾, これらの方法には再現性や, 効率に問題があり, アラビドプシス (シロイヌナズナ) に対する “floral dip” 法という *in planta* 形質転換法以外はほとんど使われていない⁶⁾. しかし, floral dip 法は他の一般的植物には適用できない汎用性のない方法である.

そこで, 我々は汎用性のある一般的 *in planta* 形質転換法の開発をめざし, 研究を行ってきた. 我々の方法の特徴は *A. tumefaciens* を植物のメリステム (分裂組織) に接種する点である. *A. tumefaciens* の接種部位としてメリステムを選ぶ着想はセイロンベンケイソウの (*Kalanchoe pinnata* Lam) の興味ある特性より得られた. この植物の葉身の周縁には多数の切れ込みがあり, その各々の切れ込みの基部には大きな不定芽 (メリステムが含まれる) がある (図1-A). 葉身を茎より切り離し, 湿ったパーミキュライト上に放置すると各不定芽より2~3週間で幼

植物個体が出現してくる. 1個体のセイロンベンケイソウより2枚の葉身 (まったく同じゲノムを持つクローンのはず) を茎より切り取り, 不定芽に針で傷をつけ, *A. tumefaciens* を接種した. 一方の葉身にはソバから取った機能未知遺伝子 (2.5 kb cDNA) を sense 方向にもつ *A. tumefaciens* を接種し, 他方の葉身には同じ cDNA を anti-sense 方向に持つ *A. tumefaciens* を接種した. 接種した葉身をパーミキュライト上でインキュベートし, 幼植物が

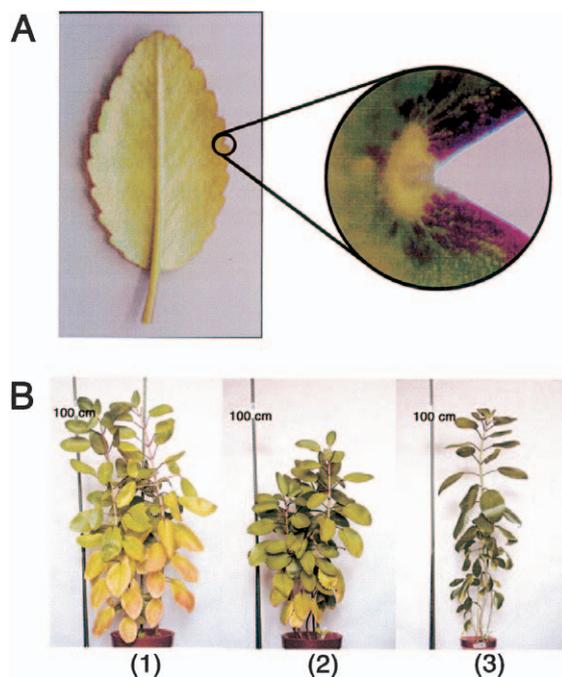


図1. セイロンベンケイソウ (*Kalanchoe pinnata* Lam) の葉身中の不定芽 (A) と *A. tumefaciens* を接種した不定芽より生じた植物個体の外観 (B). B (1) の植物はソバの機能未知の cDNA (2.5 kb) を sense 方向にもつ *A. tumefaciens* (LBA4404 菌) を接種した葉身の不定芽より出現した個体. (2) の植物は (1) と同じ cDNA を anti-sense 方向にもつ *A. tumefaciens* (LBA4404 菌) を接種した葉身の不定芽より出現した個体. (3) は対照区の水で処理した葉身より出現した個体.

*連絡先, 信州大学繊維学部応用生物科学科 (〒386-5876 長野県上田市常田 3-15-1)
TEL. 0268-21-5351 FAX. 0268-21-5352 E-mail: kojima@giptc.shinshu-u.ac.jp

出現したあと、その葉身ごとポットに移し栽培したところ、それぞれの葉身から、お互いに対称的な表現形質を示す個体が出現した。Sense方向のcDNAをもつ*A. tumefaciens*を接種した葉身からは草丈が長く、早く老化する個体が出現し、一方antisense方向のcDNAをもつ*A. tumefaciens*を接種した葉身からは、草丈が短く、老化の遅い個体が出現した(図1-B)。この結果より、*A. tumefaciens*をメリステムに接種すれば形質転換ができることを確信した。

植物のメリステムは分化全能性を保持している組織であり、動物の胚性幹細胞(ES細胞)に匹敵する。セイロンベンケイソウの場合には、不定芽(メリステムを含む)が葉身にもあるが、普通の植物の葉身には不定芽は存在しない。しかし、すべての植物の茎頂、腋芽、根端にはメリステムが存在する。これらのメリステムは頑丈であり、その上植物体の表面近くに存在するので、*A. tumefaciens*の接種も容易にできる。上記のセイロンベンケイソウの葉の不定芽は大きく、かつクローンの材料が多量に得られるなどの種々の利点があるが、種子を取るのが困難であるという致命的欠点があった。そこで、試験植物をソバ(*Fagopyrum esculentum*)に変え、*in planta*形質転換法の開発を試みた。ソバは異形花を持ち、他家受粉し、2~3ヶ月で多数の成熟種子を付ける。ソバの形質転換法を説明する^{7,8)}。殺菌したソバ種子をポットに播種し、子葉が完全に展開するまで育てる。この実生の胚軸の先端の茎頂メリステムの部分に火炎殺菌した針(0.71 mmφ)で3~4ヶ所に刺し傷をつける。この傷を付けた部分に、綿棒を用い*A. tumefaciens*の水懸濁液(約 1.0×10^8 cells/ml)を塗布する。その後、3日間22°Cの、薄暗い環境下に保つ。この22°Cに3日間保つ理由は、植物(ソバ)の生育適温より少し低い温度に保ち、植物の抵抗反応を抑え、*A. tumefaciens*の感染を促進するためである。そのあと、明所で栽培を続け、種子を採る。上記の操作はP-IP室内で非無菌的条件下で行った。

ソバの後、クワ(*Morus alba* L.)、ケナフ(*Hibiscus cannabinus*)、イネ(*Oryza sativa*)、コムギ(*Triticum aestivum* L.)、トウモロコシ(*Zea mays*)、ダイズ(*Glycine max*)でも*in planta*形質転換法の開発を行った⁹⁻¹³⁾。これらの形質転換法は作物により多少の違いはあるが上記のソバの形質転換法と本質的には同じである。ただし、*A. tumefaciens*を接種するメリステムの植物個体内の部位は作物により異なっている。クワは幼植物の腋芽の、ケナフは幼植物の茎頂か腋芽の、イネ、コムギ、トウモロコシは吸水種子の胚の、ダイズは実生の腋芽のメリステムに*A. tumefaciens*を接種した。これらの形質転換において、幼植物のメリステムに*A. tumefaciens*を接種する場合には

まったく除菌操作は行っていない。吸水種子中のメリステムに*A. tumefaciens*を接種する場合には、抗生物質のcefotaximeを用いた除菌操作が組み込まれているが、この操作だけで*A. tumefaciens*が除菌されているとは考えにくい。しかし、形質転換に用いた*A. tumefaciens*は当代(T_0)の成熟植物の段階で、すでに次世代のための生殖細胞(卵と精子)を分化する茎頂で、まったく検出されなくなる。*A. tumefaciens*はもともと、種々の植物にクラウンゴール病(根頭癌腫病)を引き起こす病原菌であるが、決して強い病原性菌ではない。ポットで育てたカラコンコエなどの植物の茎や葉に*A. tumefaciens*を有傷接種すると、ゴール(癌腫)は接種部位だけに現れ、他の部位に転移することは決してない。このように自然状態に近い環境下で生育した植物は強い抵抗力をもち、*A. tumefaciens*を局所に封じ込め、最終的に除去できるようである。これに対して*in vitro*培養系の細胞を*A. tumefaciens*と共培養した時は*A. tumefaciens*を除去するのはなかなか困難である。実際に、我々の方法で形質転換した作物(T_0 と T_1 世代)の成熟個体の茎頂で*A. tumefaciens*が検出されないことは2つの実験で確認された。1つの実験はポット中で非無菌的に栽培した個体の茎頂を切りとり、滅菌水と共に磨砕し、形質転換に用いた*A. tumefaciens*が生育できるカナマイシン、リファンピシンなどの抗生物質の入ったLB培地に塗布し、培養した。すべてのサンプルでまったくコロニーが出現しなかった。第2の実験は茎頂よりDNAを抽出し、そのDNAをテンプレートに使用してPCRを行った。T-DNA領域内の遺伝子のPCR産物は検出されたが、他方Ti-plasmidまたはhelper plasmidの*vir*領域の遺伝子のPCR産物は検出されなかった。

自明のことであるが、上述の*in planta*形質転換法で形質転換した作物の T_0 世代はキメラ植物である。茎頂や腋芽や吸水種子中のメリステム中ではすでに多くの器官や原基が分化している。我々の方法ではこのような状態の組織に針で傷をつけて、*A. tumefaciens*を接種するので、鞭毛をもち運動能のある*A. tumefaciens*は細胞間隙を移動し、種々の器官や原基の細胞に遺伝子を導入するはずである。メリステム中ですでに分化を開始しているこれらの器官や原基の運命はすでに決定されていて、成熟個体(T_0 世代)の下部(基部)の組織になる。したがって、これらの細胞に導入された遺伝子は当代(T_0)の植物体の下部(基部)組織細胞の染色体中だけに存在し、決して次世代(T_1)に受け継がれることはないはずである。一方、*A. tumefaciens*を接種した時点のメリステム中でまだ分化を開始していない始原細胞の染色体に導入された遺伝子の運命は上記の場合とは異なる。これらの始原細胞の中には将来、成熟植物の茎頂のメリステムになり、

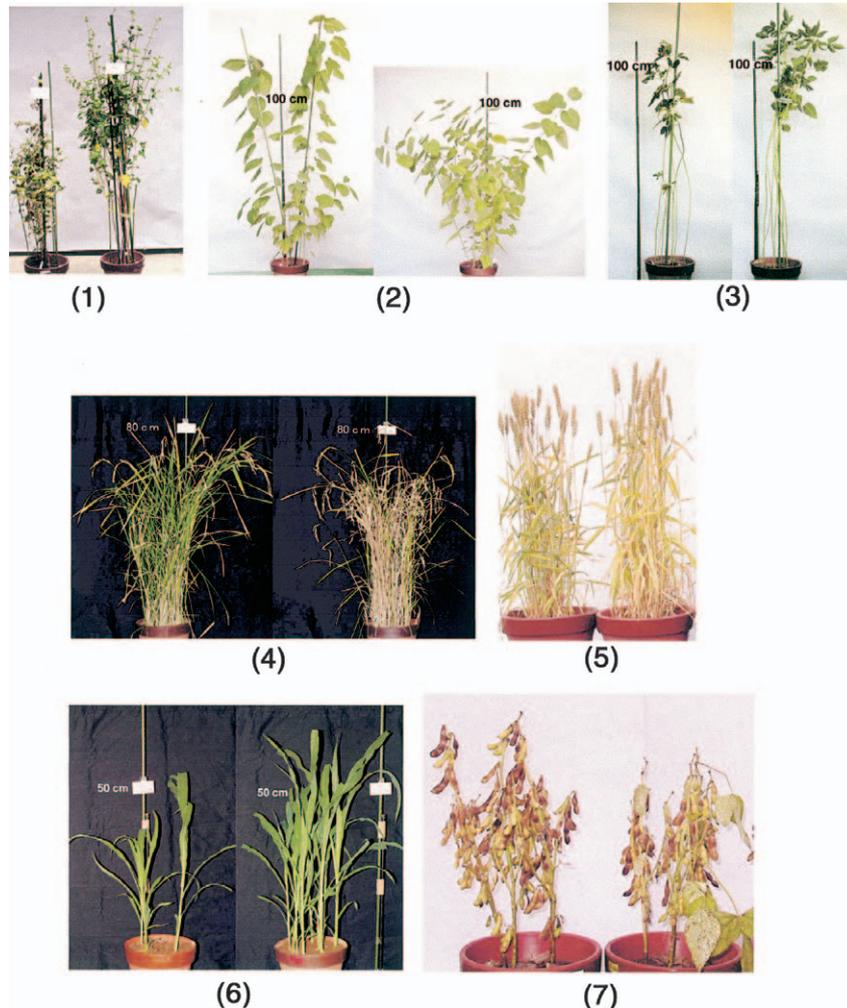


図2. 種々の作物の形質転換個体の表現形質. それぞれのパネルで左側の個体は対照の非形質転換個体で、右側の個体は形質転換個体である. (1) イネ MADS box gene (Acc. No. AB00325) を持つ *A. tumefaciens* (LBA4404 菌) で形質転換したソバ (*Fagopyrum esculentum*, T₄ 世代), (2) *A. tumefaciens* (M-21 菌, 以後 M-21 菌と略記) で形質転換したクワ (*Morus alba*, T₀ 個体の茎頂を挿し木で殖やした次世代個体), (3) M-21 菌で形質転換したケナフ (*Hibiscus cannabinus*, T₁ 世代), (4) *A. tumefaciens* (LBA4404, pIG121-Hm) 菌で形質転換したイネ (*Oryza sativa*, T₁ 世代), (5) M-21 菌で形質転換したコムギ (*Triticum aestivum*, T₀ 世代), (6) *A. tumefaciens* (LBA4404, pIG121-Hm) 菌で形質転換したトウモロコシ (*Zea mays*, T₁ 世代), (7) M-21 菌で形質転換したダイズ (*Glycine max*, T₁ 世代).

次世代のための生殖細胞すなわち、卵と精子（花粉）を分化する細胞が含まれているはずである。この導入遺伝子をもつメリステムによりつくられる卵と精子のゲノムにも導入遺伝子が含まれ、その生殖細胞が受精して生じる次世代（T₁）の植物体を構成するすべての細胞の染色体には導入遺伝子が含まれる。ゆえに、我々の方法で形質転換された T₁ 世代以降の個体はキメラではなく真の形質転換植物になるはずである。

上述のように、我々の形質転換法では T₀ 世代の個体はキメラ植物であるが、T₀ 世代の成熟個体の多くがすでに、対照区の非形質転換植物とは明らかに違う表現形質を示すことがしばしば観察される。これは植物の個体全体の表現形質は主に茎頂のメリステムによって支配さ

れ、下部（基部）の器官や組織の寄与は少ないためであろう。

形質転換の成否を種々の手段で確認するために、4 種類の *A. tumefaciens* を用いて形質転換を行った。第 1 の *A. tumefaciens* は我々が Tn5- 突然変異法で作出した変異菌 (M-21 菌) である¹⁴⁾。本菌中の Ti-plasmid 中の T-DNA 領域にあるオーキシン合成酵素遺伝子 (*iaaM*) は Tn5 の挿入により破壊されているが、サイトカイニン合成酵素遺伝子など他の遺伝子はすべて健全である。本菌は自身の Ti-plasmid 中の T-DNA も本菌中に導入された binary vector 中の T-DNA も植物ゲノムへ挿入する能力は保持しているが、ゴール（癌腫）を誘導する能力は失っている。本菌で形質転換された植物はホルモンバランスが崩れ、

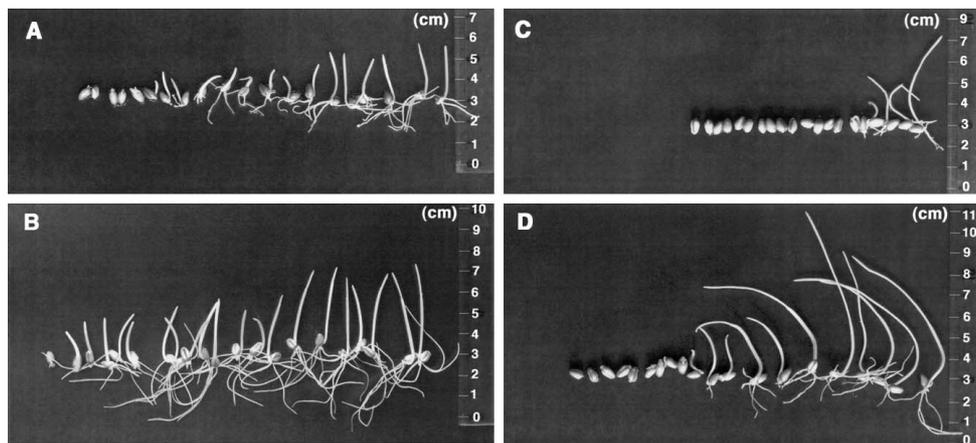


図3. *A. tumefaciens* (LBA4404, pIG121-Hm) 菌で形質転換したコムギ (*Triticum aestivum*, T₁世代) の発芽試験におけるハイグロマイシン耐性能の獲得¹²⁾. (A) 形質転換種子のハイグロマイシン (30ppm) 水溶液中での発芽, (B) 形質転換種子の水溶液中での発芽, (C) 非形質転換種子のハイグロマイシン (30ppm) 水溶液中での発芽, (D) 非形質転換種子の水溶液中での発芽.

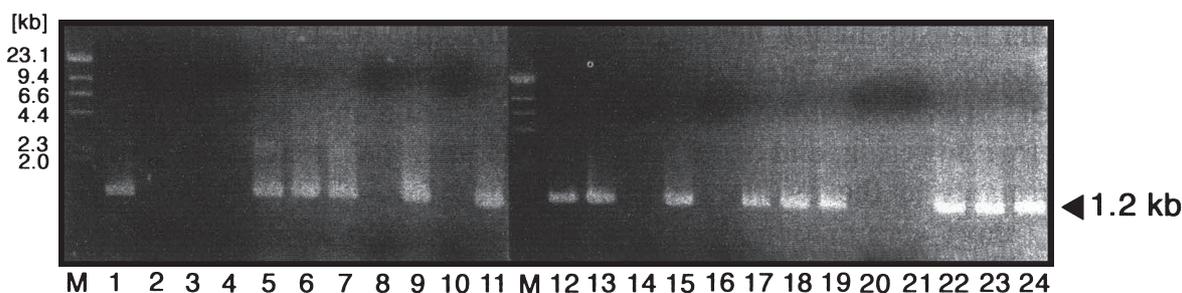
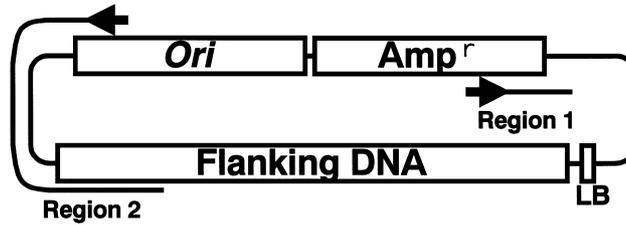


図4. *A. tumefaciens* (LBA4404, pBI121) 菌で形質転換したソバ (*Fagopyrum esculentum*, T₁世代) のゲノム中の導入遺伝子 (*GUS* 遺伝子) のPCRによる検出⁷⁾. 実生より抽出したゲノムDNAを用い, *GUS* 遺伝子中の1.2 kb DNA断片が増幅されるプライマーを用いPCRを行った. Lane 1, pBI121 binary vector; lane 2-4, 非形質転換個体; lane 5-24, 形質転換処理個体のT₁種子. 1.2 kb増幅DNA断片ができなかったサンプルは形質転換されなかったT₁個体である.

表現形質の顕著な変化が起こることが予想される. 表現形質の変化は本菌だけでなく, 他の*A. tumefaciens*で形質転換したときにも起こりうる. 導入遺伝子の機能の直接的な反映の場合もあるし, 導入遺伝子の挿入により内在遺伝子が破壊されるために引き起こされることもある. 第2の*A. tumefaciens*はplasmid rescue用に改変したbinary vectorをもつ*A. tumefaciens* (LBA4404 菌)である. 本binary vectorのT-DNAにはpBluescriptプラスミド中のアンピシリン耐性遺伝子と複製開始点 (*ori*) を含むDNA断片が挿入してある. 本菌により形質転換された植物のゲノムDNAからは下記の実験操作により植物ゲノムに挿入された遺伝子 (T-DNA) とそれに隣接する植物ゲノムDNA断片が連結された形で含まれるプラスミドが回収されてくるはずである. まずT₁世代以降の形質転換植物よりゲノムDNAを抽出し, T-DNA領域中のアンピシリン耐性遺伝子と複製開始点を含むDNA断片領域を切断しない制限酵素 (たとえば *Hind*III) で消化する. 消

化したDNA断片を自己環状化 (self-ligation) し, 大腸菌に形質転換し, アンピシリンを含む培地上に播き, 培養する. 培地上にコロニーを形成した大腸菌より, プラスミドを回収し, その構造を調べる. そのプラスミドが上記の構造をもっていれば, 遺伝子 (T-DNA) が形質転換体のゲノムに挿入されていることの直接的な証拠になる. 第3の*A. tumefaciens*はイントロンを持つレポーター遺伝子 (β -glucuronidase gene, *GUS* gene) とハイグロマイシン耐性遺伝子をT-DNA領域に持つbinary vector (pIG121-Hm, 名大・中村研三教授より恵与) を保有するLBA4404菌である. 本菌で形質転換すると*GUS* 遺伝子の発現やハイグロマイシン耐性能の獲得で形質転換が確認できる. 第4の*A. tumefaciens*はイントロンを持たない*GUS* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子をT-DNAにもつbinary vector pBI121を保有するLBA4404菌である.

上記の4種の*A. tumefaciens*を使い, 種々の作物を *in planta* 形質転換し, それぞれの作物について, 下記の実



Region 1

Upper sequence: sequence of region 1

Bottom sequence: sequence of corresponding region of binary vector

```

28  GGGGGGCTNCNGGCGTTCGNGGNGTCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGC
    |||
2281 CCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACAGC-TCC
    |||
    88  GGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGC
    |||
2340 GGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGC
    |||
    148 TCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGTCAGAAGTAAAGTTGGCCGACGTGTTACTACTCATGGTT
    |||
2400 TCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGTCAGAAGTAAAGTTGGCCGACGTGTTACTACTCATGGTT
    |||
    208 ATGGCAGCACTGCATAAATCTCTACTGTCATGCCATCCGTAAGAT-TTTTTTGTGACT
    |||
2460 ATGGCAGCACTGCATAAATCTCTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
    |||
    267 GGTGAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGC
    |||
2520 GGTGAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGC
    |||

```

Region 2

Upper sequence: sequence of region 2

Bottom sequence: sequence of wheat genomic DNA (9640.t02666| retrotransposon protein, TIGR wheat genome BLAST searver)

```

387 CTTTGAGAGTCAGTGGGCGCCCTCCGATGTAACGGAGGAGAACCTGAAGGAGATGGTGGC
    |||
27  CTTTGAGAGTCAGTGGGCGCCCTCCGATGTAACGGAGGAGAACCTGAAGGAGATGGTGGC
    |||
    327 GCACGGTATTCTTCCGGCAAAAGAGATCATTGTGTGGCGTCCAGCATGCGGCAAGCATT
    |||
87  GCGCGCGTCTTCCAGCAAAGGAGATCATTGGTGGCGTCCAGCATGCGGTAAGCATT
    |||
    267 CCCAACCCCTGACACACATGAGGTCATGGTATTTTCTATTCTTCTATGGCGGTTTTTC
    |||
147 TCCGACCCCGGACACACAGAGTTCATGGTATTTTCTATTCTTCTATGGCGGATTTTC
    |||
    207 TCTTCCAACCTCAAGCTTCGTCGGGGGAATTTGGACTTCTATAGC-TCACCT-GCATAA
    |||
207 TCTTCCAACCTAAAGATTCTTCCAGGGGATATTAGAGTCTATGGGATAGTTTGTGATCA
    |||
    149 TCACTAGT-GAATTC
    |||
267 CCTAAACTCGAATTC
    |||

```

図5. Plasmid rescue用binary vector (pBI-res2) を保有する *A. tumefaciens* (LBA4404) 菌で形質転換したコムギ (*Triticum aestivum*, T₁ 世代) のゲノム DNA より回収されたプラスミドの構造¹²⁾。上の図は回収されたプラスミドの塩基配列から推定された構造。下の図はプラスミド中の region 1 と region 2 の配列とそれぞれに対応する DNA の配列との alignment である。Region 1 は binary vector 中の対応する配列と同一性を示し、region 2 はコムギのゲノム DNA (Acc. No. 9640.t02666, retrotransposon protein) と同一性を示す。

験的根拠により形質転換が起きていることを確認した。第1の根拠は肉眼で識別できる表現形質の変化が現れ、次世代へ遺伝したことである (図2)。第2は種子 (T₁) の発芽試験におけるハイグロマイシン耐性能の獲得である (図3)。第3は *GUS* 遺伝子発現陽性植物個体の検出である (図4)。最後の根拠は導入遺伝子 (T-DNA) と隣接する作物のゲノム DNA が連結した構造をもつプラスミドの回収である (図5)。これらの実験結果をもとに形質転換効率を算出したところ、ほとんどの作物で数十%の値が得られた。この形質転換効率は、従来の *in vitro* 培養系植物細胞を用いる一般的な形質転換法の効率と比べると異常に高い値である。しかし、後述の根拠と理由から、この効率は決して異常ではなく合理的な値であると考えている。本研究で使用した M-21 変異菌の親株である *A. tumefaciens* (A-208 菌) をカランコエ (*Kalanchoe daigremontiana*) の葉や茎に爪楊枝で傷をつけ、接種し、ポット中で栽培を続けると、すべて (100%) の接種部位でゴール (癌腫) が形成される¹⁵⁾。ゴール形成は *A. tumefaciens* の内在 Ti-plasmid の T-DNA 領域の遺伝子群

が植物ゲノムに挿入されることによって引き起こされる“形質転換”であることが明らかにされている。この系において、このように効率よく形質転換が起きる原因はいろいろ考えられる。一般的 *in vitro* 形質転換法ではオーキシンとサイトカイニンの2つのホルモンが任意の濃度で培地に加えられているが、上述の自然状態に近い条件下 (ポット栽培) で育ったカランコエ中では2つのホルモン (それ以外に未知の生理活性物質も含まれるかもしれない) が最適濃度で、最適時期に、最適な組み合わせで供給されるのかもしれない。あるいは、自然環境下で生育した植物の細胞は頑強で、*in vitro* で培養された細胞よりも感染やストレスに対して強い抵抗性をもち、より高い分化能をもっているかもしれない。あるいは、*A. tumefaciens* を接種する時に植物に付ける傷に特別な意義や役割があるかもしれない。傷を受けた植物組織ではその傷を治し、組織を再生するために細胞分裂の活性化が起こるはずである。細胞分裂のためには染色体の複製がおき、その過程で外来遺伝子が染色体に挿入されやすい状態が生ずるかもしれない。また、傷害を受けた組織では、抵抗反応として、フェノール化合物の合成、蓄積

もおこる。これらのフェノール化合物の多くがアセトシリンゴンと同じように *A. tumefaciens* 中の Ti-plasmid や helper plasmid の *vir*-領域中の遺伝子の発現を誘導する活性があることが知られている¹⁶⁾。

我々の *in planta* 形質転換法は上記のポット栽培したカラコエに *A. tumefaciens* を有傷接種する系を模倣している。我々の形質転換法を要約すれば、植物のメリステムに傷をつけ、*A. tumefaciens* を接種し、ポット中で育てただけである。たぶんこの自然状態に近い環境下の *A. tumefaciens* の感染機構を模倣していることが形質転換効率が異常に高い理由であろうと推測している。

上述のように、我々は汎用性があり簡便かつ高効率の *in planta* 形質転換法を開発することができた。特別な *A. tumefaciens* 菌を使う必要はなく、一般的に広く使われている LBA4404 菌で十分であった。また、この方法で従来形質転換が困難であった木本作物のクワや、単子葉作物のイネ、コムギ、トウモロコシも効率よく形質転換できた^{9,11-13)}。さらに重要作物であるダイズとソバ、近年繊維作物として注目されているケナフも高効率で形質転換できることを示した^{7,8,10)}。

しかし、植物の形質転換には、*in planta* 法を用いるにせよ、*in vitro* 細胞培養法を用いるにせよ、あるいは *A. tumefaciens* 菌仲介法を用いるにせよ、微粒子銃法を用いるにせよ、重大でかつ本質的な問題が未解決のまま残されている。それは導入遺伝子が染色体上の指定された部位でなく、無作為な部位に挿入され、さらに導入遺伝子の数も制御できないことである。あたかも制御の効かな

いロケットを植物細胞に向かって闇雲に打ち込んでいる状況である。この問題を解決するためには、実用可能な遺伝子標的法を植物の系でも開発することが急務である。

文 献

- 1) Chee, P. P. *et al.*: *Plant Physiol.*, **91**, 1212–1218 (1989).
- 2) Hu, C. Y. and Wang, L.: *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, **35**, 417–420 (1999).
- 3) Zhou, G. Y. *et al.*: *Method Enzymol.*, **101**, 433–481 (1983).
- 4) Chowrira, G. M. *et al.*: *Mol. Biotechnol.*, **3**, 17–23 (1995).
- 5) Touraev, A.: *Plant J.*, **12**, 949–956 (1997).
- 6) Bent, A. F.: *Plant Physiol.*, **124**, 1540–1547 (2000).
- 7) Kojima, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 845–847 (2000).
- 8) Kojima, M. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **17**, 35–42 (2000).
- 9) Ping, L. X. *et al.*: *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **72**, 177–184 (2003).
- 10) Kojima, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 136–139 (2004).
- 11) Supartana, P. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 391–397 (2005).
- 12) Supartana, P. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 162–170 (2006).
- 13) Kojima, M. *et al.*: *In Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Advances and Topical Issues*, volume II, (Jaime A. Teixeira da Silva) p.41–48, Global Science Books Ltd. UK (2006).
- 14) Majumder, P. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 328–331 (2000).
- 15) Majumder, P. *et al.*: *J. Gen. Plant Pathol.*, **67**, 124–133 (2001).
- 16) Bolton, G. W. *et al.*: *Science*, **232**, 983–985 (1986).