

ニンジン培養細胞におけるファイトアレキシンの産生

黒崎 文也

(1985年12月4日 受理)

1. はじめに

高等植物が微生物の侵入を受けた場合、様々な防御反応が誘導されることが知られている。その中でもファイトアレキシンと呼ばれる分子量の比較的小さい抗菌性物質の蓄積(第1図)、リグニン化等による細胞壁の機械的強度の増加、罹病部の拡大を防ぐと考えられている過敏感細胞死等が比較的良好に知られた現象であろう。しかしながら、これら感染植物生理の研究に培養細胞が用いられた例はあまり多くなく、おもに胚軸や塊茎あるいは葉等の分化した細胞が材料として利用されているようである。これにはいくつかの理由が考えられるが、一つは培養細胞の二次代謝能力の制約が問題となると思われる。たとえば防御反応に関与するファイトアレキシンが、培養細胞では最終生成物にまで合成されず、その中間体の段階で停止してしまうため、研究内容が生合成上の比較的初期の酵素レベルの解析等に限られる場合が予測される。また、病原菌と宿主植物のレース間による感受性の違いというような微妙な関係が培養細胞のレベルで再現されているかどうか疑わしいといった点、さらに、感染部位とその近傍の細胞とがそれぞれ担う役割りの違いの分析が困難であること等が考えられる。一方、この研究に培養細胞を用いるメリットとしては、完全な無菌状態が保持されているため、微生物と植物の厳密な相互関係の解析が可能であること、多数の細胞を感染後の生理状態に同時に移行できるため、すべての細胞をいわば同調的に観察しながら防御反応を検討できること等々が挙げられるであろう。本稿では著者らがを行っているニンジン培養細胞でのファイトアレキシン産生の研究を中心にして¹⁾、最近のいくつかの知見を紹介したい。

2. ファイトアレキシン産生の誘導機構

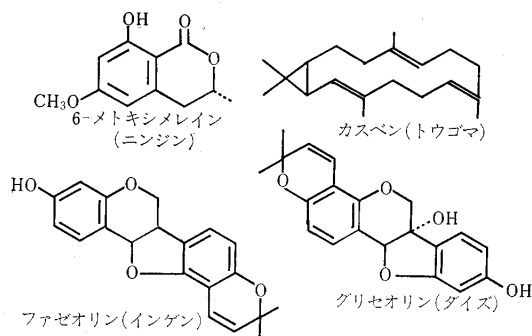
近年豆科植物を中心としてファイトアレキシン生成機構の研究が活発になされ、その結果微生物と宿主植物の相互作用の最初の段階でまずファイトアレキシン誘導物質と考えられるものが形成されることが明らかとなった。この物質をエリシター(elicitor)と呼ぶが、その中でも特に糸状菌の細胞壁から遊離したと考えられる一連のグルカンが高い活性を有することが報告されている^{2,3)}。しかしこれらのエリシターは単一の構造を持つ特定の化合物ではなく、活性を有するいくつかの分子から成っていることが示されている。これら微生物起源のエリシターに加えて、最近著者らを含めいくつかのグループが宿主植物由来のエリシターを報告している⁴⁻⁶⁾。これらのグループはいずれも共通して糸状菌あるいはバクテリア由来の加水分解酵素が宿主植物の細胞壁を分解し、その結果生じた植物の細胞壁断片がエリシターとして作用すると主張している。著者らは当初、豆科植物にファイトアレキシン産生を誘導すると報告されている糸状菌の菌糸壁の部分加水分解物を調製しニンジン培養細胞に添加したがファイトアレキシンである6-メトキシメレインの誘導活性を示さなかった⁷⁾。しかしながら、生きた糸状菌の菌糸を接種し6-メトキシメレインを生成しつつあるニンジン細胞の抽出物が、エリシター活性を示すことを見出した⁸⁾。この活性物質を酵素処理したところ、ペクチナーゼとプロテアーゼ処理で失活し、また一方、ニンジン培養細胞のホモゲネートからこれら加水分解酵素によってエリシターが遊離してくることより、糸状菌の加水分解酵素がニンジン細胞を侵食する際生成する細胞断片がエリシター活性を示すのではないかと推論した(第2図)。この機構は、これらの酵素を培養に直接添加した場合6-メトキシメレイン産生が誘導されること、そして様々な処理に対して糸状菌の酵素活性とエリシター遊離活性が同様の失活パターンを示すことから支持されている⁹⁾。

これら宿主植物由来のエリシターを精製して化学的構

* Fumiya KUROSAKI: Phytoalexin Production in Cultured Carrot Cells

富山医科薬科大学薬学部微生物化学研究室(〒930-01 富山市杉谷)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University (Sugitani, Toyama 930-01)



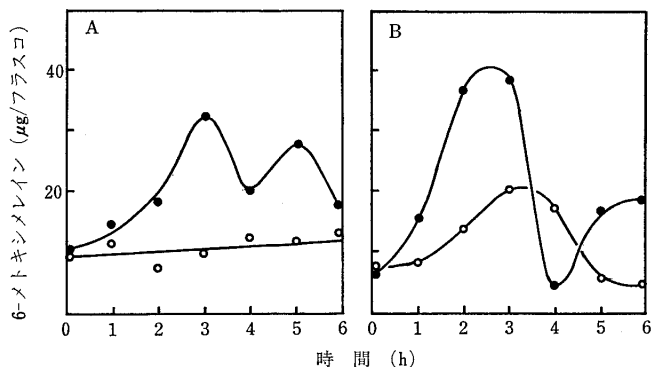
第1図 ファイトアレキシンの構造

造を解明した報告は今のところほとんどない。わずかに Albersheim と West のグループが植物細胞壁やポリガラクトuron酸をそれぞれ酸あるいはペクチナーゼで部分加水分解して、得られた活性物質について知見を得ているのみである。Albersheim ら⁹⁾ はダイズのファイトアレキシンを誘導するいくつかのエリシター活性物質の中にガラクトuron酸が12個結合したオリゴマーが含まれていることを示した。また Jin と West¹⁰⁾ はトウモロコシを材料に用いてガラクトuron酸鎖の長さによってエリシター活性が変化するとしている。この報告によれば、エリシター活性の発現には9分子以上のガラクトuron酸の重合が必要であって、13分子重合したものが最も高い活性を有し、またメチルエステル化によってこの活性が減少する。一方著者らはペクチナーゼ、ペクチンリアーゼを用いてニンジン細胞より調製したエリシターの活性がペクチンエステラーゼ処理によって一部失活することから、ウロン酸が一部メチルエステル化されているものが高い活性を示すと考えている¹¹⁾。この相反する事実は植物種によるエリシターへの感受性の違いに起因するもの

とも、またエリシター活性発現にはウロン酸が適当な程度にエステル化されていることが求められるためとも考えられる。ニンジンのペクチン画分をペクチナーゼによって部分加水分解したところ、酸性度、分子量とも異なる複数のエリシターが得られた¹²⁾。これらを部分精製して酵素処理に対する感受性を調べたところ、いずれもペクチナーゼ処理で失活しプロテアーゼ処理に抵抗したところから、ガラクトuron酸部分を活性発現に必須とすることが示された。一方、トリプシン処理によって生成するエリシターも複数であり、この場合はガラクトuron酸を必須とするものとペプチド部分が必要なものの二種類が生成することが明らかとなった。このようにニンジン細胞由来のエリシターは複数の分子から成っているのみでなく、活性にかかわる分子内構造も特定していない。またニンジンに限らず一般に植物由来のエリシターと宿主植物間の特異性は低く、たとえば市販の柑橘類由来のペクチンからペクチナーゼで得たエリシターはニンジン細胞の6-メトキシメレイン産生を誘導し⁸⁾、また同時にトウモロコシにおいてもそのファイトアレキシシンであるカスベン合成を刺激する⁴⁾。これらの事実は種間特異性が低い雑多な分子がエリシターとして作用することを意味し、エリシターと結合後、ファイトアレキシシン産生という反応を引き起こすために植物細胞内に何らかの特異性の高い生理変化が生じている可能性を示唆していると考えられる。今後、この二次的な反応がこの分野の大きな研究課題の一つになると思われる。

3. ファイトアレキシシンの毒性と代謝

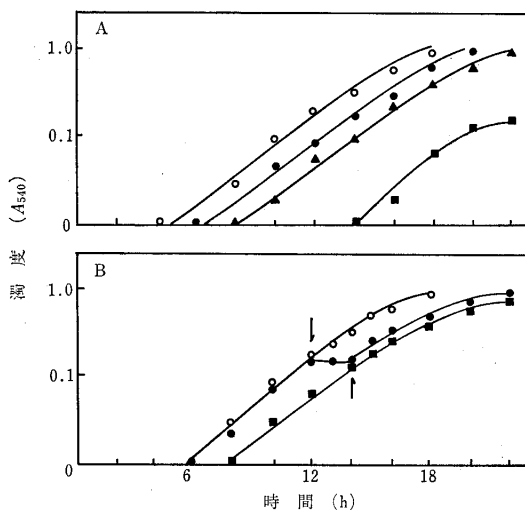
微生物に対するファイトアレキシシンの生長阻害作用については数多くの研究があるが、多くのファイトアレキシシンは 10^{-3} ~ 10^{-5} M の濃度で微生物の増殖を阻害し抗菌性物質としてはあまり高い活性を示さない。しかしな



第2図 ニンジン細胞ホモゲネートよりのエリシター活性物質の遊離
ニンジン細胞ホモゲネートを酵素処理し、分解産物を経時的に取ってニンジン細胞の培養に添加、24時間後に6-メトキシメレイン量を定量した。A: ○ セルラーゼ, ● ペクチナーゼ。B: ○ トリプシン, ● プロナーゼE。

がら感染部位においては、微生物の生長を阻害するのに十分な量が蓄積されると考えられている。一方、微生物はファイトアレキシンに対して何らかの抵抗性を獲得して感染を成立させるものと思われる。最も一般的なのは微生物がファイトアレキシンを代謝して毒性の低い誘導体に変換するという場合であろう。代謝の形式としては、ファイトアレキシン分子への水酸基の導入¹³⁾、メトキシ基の水酸基への開裂¹⁴⁾、また環状構造の開裂¹⁵⁾等が挙げられる。6-メトキシメレインの場合、糸状菌の胞子の発芽や酵母、バクテリアの生長を阻害するが低濃度ではいずれも誘導期の延長にとどまり、いったん発芽や生長が始まるとその速度はコントロールと同等であった¹⁶⁾。しかし、高濃度の6-メトキシメレインを用いると微生物の生長は不可逆的に抑制され菌数も低下することが確認されている。また前もって低濃度の6-メトキシメレインで処理した酵母の生長途中で再びこの化合物を与えると、二度目の処理では阻害活性が見られなくなった(第3図)。これより、最初の6-メトキシメレイン処理によって酵母に何らかの抵抗性が誘導され、二度目の処理では効果が表れなかったものと考えられる。しかし放射性の6-メトキシメレインを調製してこれら糸状菌や酵母に与えたところ、その代謝物に相当するものが検出されなかったことから、ファイトアレキシンの分解を伴わない何らかの抵抗性を微生物が獲得したことが示された。この場合の機構は明らかではないが、同様のケースが Heuvel¹⁷⁾、Yoshikawa¹⁸⁾、Denny¹⁹⁾ らによってイソフラボノイド型ファイトアレキシンにつき報告されている。

一方、ファイトアレキシンがその宿主植物に対しても毒性を示す例^{20,21)}が知られているが、6-メトキシメレインの場合もニンジン細胞の分裂を阻害し、培養中の生細胞数を減少させることが明らかとなっている²²⁾。同時に6-メトキシメレインが、その宿主であるニンジン細胞によって O-グルコシル化や脱メチル化等によって代謝無毒化されることが示されている。その他、インゲン²³⁾やサツマイモ²⁴⁾等でもファイトアレキシンが代謝されることが確認されている。これらの現象は、微生物の侵入に対抗して生成されたファイトアレキシンが同時に植物毒でもあり、過剰に産生されたものからの自己防御のため宿主植物が代謝すると理解されているようである。いずれにしろ植物細胞が毒性物質といかにして共存しているのかという疑問に一つの示唆を与えるものと考えられる。また感染植物の系においてファイトアレキシンの量を決定するのは単に生合成系の賦活のみでなく、宿主植物と微生物の代謝能の有無が大きな要因であることが想



第3図 酵母 (*Bullera alba*) の生長に対する6-メトキシメレインの効果

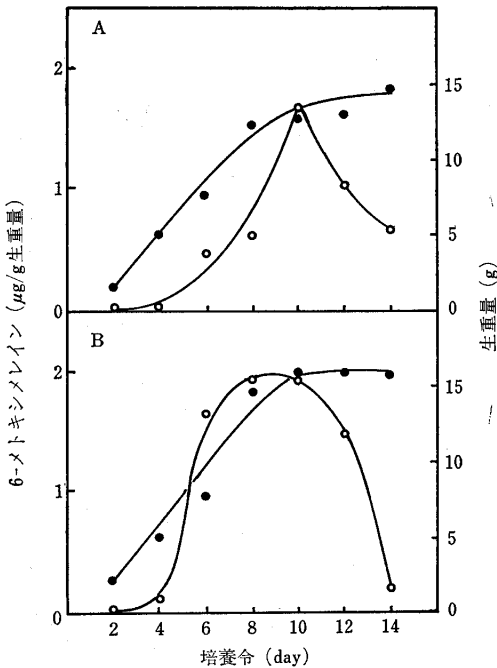
A : 0 (○), 0.1 (●), 0.5 (▲), 1.0 (■) mM の6-メトキシメレイン添加時の *B. alba* の生長. B : 生長途中での6-メトキシメレイン添加の効果, ○ コントロール, ● 6-メトキシメレインで前処理せず矢印の時点で0.2 mMを加えた場合, ■ 0.2 mMの6-メトキシメレインを最初に加えて、さらに矢印の時点で加えた場合.

像される。

4. 培養細胞でのファイトアレキシンの生成

冒頭に述べたとおりファイトアレキシン産生をはじめとする感染植物の防御反応を培養細胞を用いて研究した例は多くない。しかしファイトアレキシンの蓄積のような誘導される特殊な二次代謝が、他の通常の二次代謝のように培養細胞の生理条件の変化によって影響を受けるかどうかは興味のある問題である。

ニンジン細胞におけるファイトアレキシン産生は培養齢によって著しく変動した²⁵⁾。ニンジンペクチナーゼで部分加水分解して得たエリシターをニンジンの培養液に加えた場合細胞分裂の盛んな対数期初期にはほとんど6-メトキシメレインが生成しない。生成活性は培養6日目ごろから現われ、定常期初期の10日めにピークに至り以後やや減少した。一方、酵素を培養中に直接添加した場合は対数期中期にすでに高い活性が認められ定常期初期まで継続して、その後大きく減少した(第4図)。これらのパターンは加水分解酵素としてトリプシンを用いた場合も同様であった。誘導方法によるこれらファイトアレキシン生成の違いは、培養齢による生成活性の相違の他に有効なエリシターの形成能の変化が加わることに



第4図 6-メトキシメレイン産生の培養齢による変動

A: ペクチナーゼによるニンジン細胞の部分加水分解物を、様々な培養齢にあるニンジンに加え24時間後に6-メトキシメレインを定量した。B: ペクチナーゼを直接培養に添加した場合。●: 生重量(g), ○: 6-メトキシメレイン(μg/g 生重量)

より生じると思われる。すなわち、酵素による部分加水分解物をエリシターとして加えた場合は生成する6-メトキシメレイン量はそのまま細胞の生成活性を反映しているが、酵素の直接添加によって誘導する場合は、ニンジン細胞の加水分解によってエリシターが生じ、それが再びニンジンに認識されるという、少なくとも二つの段階が必要と考えられるからである。実際、培養齢の異なる細胞からペクチナーゼ、あるいはトリプシンでエリシターを調製したところ、6～8日めの細胞が最も活性の高いエリシターを遊離することが明らかとなった。これに対して分裂の盛んな対数期前期や定常期の細胞から得たエリシターの活性は概して低かった。前述のようにニンジン細胞のエリシターの起源としては細胞壁のペクチン質が考えられるが、培養齢によってエリシター形成能に差があるのは培養経過に付随して起こるペクチン質の変化を反映しているのではないかと考えられる。Asamizuら^{26, 27)}によれば、対数期初期はニンジン細胞の分裂活性が高く、一方細胞壁の生合成活性は低く抑えられている。

対数期中期から後期にかけて分裂頻度が低下するとともに壁の合成が活発になる。培養初期の細胞壁のペクチン質はエステル化の程度の高い高分子から成っているが、次第に低分子のポリウロン酸複合体が形成され、定常期に入ると高い酸性度を示すポリウロン酸が主成分となってくる。この現象はペクチンエステラーゼによってエリシターが不活性化されるという前出の事実とよく一致し、ウロン酸のエステル化の程度の低い時期に調製したエリシターは高い活性を示さないと考えられる。

Hargreaves と Selby²⁸⁾ は、インゲンの懸濁培養において、その胚軸の抽出物をエリシターとしてファイトアレキシンであるファゼオリンを誘導している。この場合は、通常植物培養細胞では二次代謝能が現われにくいと考えられる誘導期から対数期初期にかけてファゼオリンが蓄積している。また時間的経過を調べた実験でも宿主細胞に毒性を示すファゼオリンが多く含まれる間は細胞の分裂が停止しており、この化合物が代謝され無毒化されると培養中の細胞の生重量が増加するとしている。

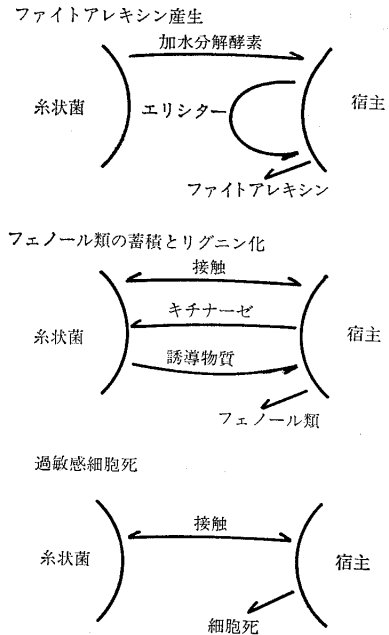
培養齢と同様、培地中に添加される植物生長調節物質も植物細胞の二次代謝能に大きな影響を及ぼすことが知られている。著者らの用いているニンジン細胞は通常1 ppmの2,4-D存在下で培養しているが、これを1 ppm IAAにしたところ、部分加水分解物添加でも酵素の直接添加でも6-メトキシメレインの生成は確認できなかった。しかし IAA 中で培養したニンジン細胞の部分加水分解物を2,4-Dで培養したニンジンに与えると6-メトキシメレイン産生が観察されたことから、IAAをオーキシンとして加え培養した細胞は誘導活性のあるエリシターを遊離することはできるがファイトアレキシンの生成活性がきわめて低いと考えられる。これらの結果は培地中からオーキシンを除いて培養した細胞においても同様であった。天然型オーキシンとされているIAAを用いた場合にファイトアレキシン産生がみられない理由は、今のところ不明であるが、この培養系でIAAが非常に分解されやすいということがあるいは一因かもしれない。

これとは反対に、Dixon と Fuller²⁹⁾ はインゲンの培養細胞を用い、高濃度の2,4-D存在下ファイトアレキシンのファゼオリンの生成が阻害されるとしている。これとは逆に、ジベレリン、アブサイシン酸はファゼオリンの生成を促進した。Bailey²⁹⁾ は同様にエンドウのカルスを用いて2,4-Dがピサチンの生成を抑制すると報告している。いずれにしろ、ファイトアレキシン産生という誘導される二次代謝も他の一般の二次代謝と同様、培養齢や生長調節物質に大きく影響されるようである。

5. 他の防御反応の誘導

ここまで植物の防御反応のうちファイトアレキシン産生について述べてきたが、他にも一連のフェノール性化合物の生成と、それに続く植物細胞壁のリグニン化、過敏感細胞死等は防御機構の中で重要な役割りを担っている。感染植物細胞においては、これらの様々な反応が同時に進行していくことから、個々の反応の機構の解析や誘導物質の検索は困難であった。

著者らはニンジン細胞のファイトアレキシン産生の誘導機構を研究する際に、熱処理した糸状菌の菌糸をニンジン細胞と接触させると6-メトキシメレインの生成が起こらずかわりに細胞が褐変することを見出した⁶⁾。これは熱安定な菌糸構成成分とニンジン細胞との相互作用によって宿主細胞中にフェノール性化合物が蓄積した可能性を示唆している。その後、この誘導物質の本体は糸状菌の菌糸壁中にあり、また、培養細胞中に *p*-ハイドロキシ安息香酸、カフェー酸、フェルラ酸等が蓄積して引き続きリグニン化が起きていることが確認された³⁰⁾。この反応の機構を解明するべく行った実験で、不溶性の菌糸細胞壁とニンジン細胞が接触することにより、ニンジン中に熱不安定な因子が誘導されること、この因子と菌糸細胞壁がたがい作用して可溶性の分子が生じ、これがフェノールの蓄積を誘導することが明らかとなった。また一方、この可溶性の誘導物質を様々な酵素で加水分解したところ、キチナーゼ処理で失活することが示された。さらに不溶性の菌糸細胞壁を市販のキチナーゼで部分加水分解して得た可溶物がフェノール化合物の蓄積を誘導すること、また菌糸壁と接触したニンジン細胞中にキチナーゼ活性が誘導される等の事実も併せて観察された。これら一連の結果から、ニンジン培養細胞におけるフェノール性化合物の蓄積とリグニン化は、糸状菌菌糸の細胞壁とニンジン細胞が接触してニンジン中にキチナーゼが誘導され、これが菌糸壁を加水分解して誘導活性を有する可溶性のフラグメントを生じ、次いで生成系が活性化されるのであろうと推察される。現在、著者らの研究室でこの機構を確認するべく研究を継続している。エチレン処理³¹⁾や病原菌の感染³²⁾によって植物中にキチナーゼが誘導されることは以前から知られているが、高等植物は原則としてキチンを構成成分として持たないことから、このキチナーゼの生理的な役割りには多くの疑問が投げかけられていた。現在では侵入する病原菌の細胞壁を加水分解する防御酵素であろうと考えられているようである。しかしここで述べた仮説が正しいならば、キチナーゼは単なる外敵の分解酵素にとどまらず、フェノール性化合物の代謝活性化や細胞のリグニン



第5図 ニンジン培養細胞における防御反応誘導機構の模式図

ファイトアレキシン産生は、糸状菌の加水分解酵素によって宿主がエリシターを遊離し開始される。フェノール類の蓄積は、糸状菌と接触した宿主中にキチナーゼが誘導され菌糸壁より誘導物質が遊離する。また過敏感細胞死には、糸状菌菌糸と宿主とが直接接触することが要求される。

化にも深く関与していることになる。

不溶性の菌糸壁と接触したニンジン細胞には誘導期のない速やかな死が観察される³⁰⁾。この現象はいわゆる過敏感細胞死に対応するものと考えられるが、可溶性のフェノール類誘導物質を加えた場合にはこの速やかな細胞死は認められなかった。現在のところ、著者らは過敏感細胞死を誘導するには植物細胞と不溶性菌糸壁との直接の接触が必要であると考えている。さきの結果と考え合わせると、これはファイトアレキシン産生、フェノール性化合物の蓄積、過敏感細胞死は、別個の物質によって誘導されるそれぞれ独立した防御機構であることを示唆している(第5図)。Köhleら³³⁾はダイズの懸濁培養を用いてファイトアレキシン産生のエリシターがリグニンの生合成をも刺激することを報告している。この例にみられるように、さきの三つの防御反応をそれぞれ区別して再現することは困難であった。その理由の一つとして、6-メトキシメレインは酢酸-マロン酸経路で合成されることが Stoessl と Stothers³⁴⁾ によって明らかにされてい

るが、従来のファイトアレキシンの研究は多くのものが桂皮酸経路を経て合成されるイソフラボノイド化合物を対象として行われている。このためファイトアレキシンの生合成経路がもう一つの防御反応であるフェノール化合物生成の経路と重複する部分が多く、このように別々の機構を通して活性化されることが指摘できなかったと考えられる。

6. おわりに

感染植物細胞の防御反応の研究は、単に細胞生理学的見地からではなく、植物の潜在的二次代謝能の発現の機構を知る上でも興味深いモデルを提供していると思われる。また適当な誘導物質を添加することによって、培養系に移すことによりしばしば抑制される植物の二次代謝能を引き出すことも可能となるかもしれない。

本稿をまとめるにあたり種々の示唆をいただいた西荒介教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 西 荒介, 黒崎文也, 1985. バイオテクノロジー, p. 551-557, 学会出版センター, 東京.
- 2) Ayers, A.R., B. Valent, J. Ebel, P. Albersheim, 1976. *Plant Physiol.*, **57**: 760-765.
- 3) Yoshikawa, M., M. Matama, H. Masago, 1981. *Plant Physiol.*, **67**: 1032-1035.
- 4) Bruce, R.J., C.A. West, 1982. *Plant Physiol.*, **69**: 1181-1188.
- 5) Davis, K.R., G.D. Lyon, A.G. Darvill, P. Albersheim, 1984. *Plant Physiol.*, **74**: 52-60.
- 6) Kurosaki, F., A. Nishi, 1984. *Physiol. Plant Pathol.*, **24**: 169-174.
- 7) Kurosaki, F., A. Nishi, 1983. *Phytochemistry*, **22**: 669-672.
- 8) Amin, M., F. Kurosaki, A. Nishi, 1986. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 771-777.
- 9) Nothnagel, E.A., M. McNeil, P. Albersheim, A. Dell, 1983. *Plant Physiol.*, **71**: 916-926.
- 10) Jin, D.F., C.A. West, 1984. *Plant Physiol.*, **74**: 989-992.
- 11) Kurosaki, F., Y. Tsurusawa, A. Nishi, 1985. *Phytochemistry*, **24**: 1479-1480.
- 12) Kurosaki, F., Y. Tsurusawa, A. Nishi, 1985. *Physiol. Plant Pathol.*, **27**: 209-217.
- 13) VanEtten, H.D., D.A. Smith, 1975. *Physiol. Plant Pathol.*, **5**: 225-237.
- 14) VanEtten, H.D., S.G. Pueppke, T.C. Kelsey, 1975. *Phytochemistry*, **14**: 1103-1105.
- 15) Denny, T.P., H.D. VanEtten, 1982. *Phytochemistry*, **21**: 1023-1028.
- 16) Kurosaki, F., I. Sakurai, A. Nishi, 1984. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**: 43-52.
- 17) Heuvel, J. van den, H.D. VanEtten, 1973. *Physiol. Plant Pathol.*, **3**: 327-339.
- 18) Yoshikawa, M., K. Yamauchi, H. Masago, 1979. *Physiol. Plant Pathol.*, **14**: 157-169.
- 19) Denny, T.P., H.D. VanEtten, 1981. *Phytopathology*, **71**: 213.
- 20) Skipp, R.A., C. Selby, J.A. Bailey, 1977. *Physiol. Plant Pathol.*, **10**: 221-227.
- 21) Shiraiishi, T., H. Oku, M. Isono, S. Ouchi, 1975. *Plant Cell Physiol.*, **16**: 939-942.
- 22) Kurosaki, F., K. Matsui, A. Nishi, 1984. *Physiol. Plant Pathol.*, **25**: 313-322.
- 23) Hargreaves, J.A., C. Selby, 1978. *Phytochemistry*, **17**: 1099-1102.
- 24) Oba, K., K. Oga, I. Uritani, 1982. *Phytochemistry*, **21**: 1921-1925.
- 25) Kurosaki, F., K. Futamura, A. Nishi, 1985. *Plant Cell Physiol.*, **26**: 693-700.
- 26) Asamizu, T., A. Nishi, 1979. *Planta*, **145**: 49-54.
- 27) Asamizu, T., N. Nakayama, A. Nishi, 1984. *Planta*, **160**: 469-473.
- 28) Dixon, R.A., K.W. Fuller, 1978. *Physiol. Plant Pathol.*, **12**: 279-288.
- 29) Bailey, J.A., 1970. *J. Gen. Microbiol.*, **61**: 409-415.
- 30) Kurosaki, F., M. Amin, A. Nishi, 1986. *Physiol. Plant Pathol.* (in press)
- 31) Boller, T., A. Gehri, F. Mauch, U. Vögeli, 1983. *Planta*, **157**: 22-31.
- 32) Pegg, G.F., D.H. Young, 1981. *Physiol. Plant Pathol.*, **19**: 371-382.
- 33) Köhle, H., H. David, H. Kauss, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **33**: 221-230.
- 34) Stoessl, A., J.B. Stothers, 1978. *Can. J. Bot.*, **56**: 2589-2593.