自家不和合性の認識物質

多くの被子植物には自家不和合性という近親交配を抑制する機構があり、自己と同型の花粉が雌しべ柱頭に付着した場合にその花粉管の伸長、侵入が特異的に抑制される。この型特異性を支配する遺伝子に対応して、特異的糖蛋白が雌しべ柱頭に存在することが最近明らかになった。高等動物における免疫現象とも対比できるこの識別現象に関する知見は、雑種強勢を利用する育種技術にも貢献するであろう。

日向 康吉 Kokichi HINATA
西 尾 剛 Takeshi NISHIO
東北大学農学部植物育種学教室

多くの高等植物には、1つの花の中に雌ずい（雌しべ）と雄ずい（雄しべ）がある。一見すると、その雄ずいの花粉が雌ずいについて種子ができるようであり、事実イネやダイズなどではそのとおりであるが（自家受精）、自然の多くの植物はむしろこれを嫌い、別の個体の花粉で受精するようになっている（他家受精）。このように、自家受精を妨げて他家受精をする機構にはいろいろなものが知られているが、自家不和合性はその典型的なものである。

自家不和合の植物では、ある個体の雌ずいに別の個体の花粉がつくと柱頭上で発芽し、花粉管は花柱内を伸長して受精するが、自分の花粉が雌ずいに受粉しても、発芽しなかったり、あるいは花柱の途中で伸長を停止して受精しない。つまり、受粉後受精に至る間に、花粉と雌ずい（雌しべ）の間で自己の花粉か否かの識別反応が起こり、自己の花粉管の場合はその伸長が抑制される。

自家不和合性は被子植物界に広く見られ、その遺伝様式が複対立遺伝子系で説明されることがわかり、動物の免疫に見られる識別反応とも対比できるので、その認識反応および花粉管伸長抑制機構の解明、この機構の生成・発展と植物進化との関連などについて、多くの興味をひいてきた。

農業生産における品種改良の立場からすると、自家不和合性は自殖種子を得るには不都合なため、これを解消する手法の開発が望まれている。一方、この性質を巧みに利用すると、雑種強勢を利用したF₁育種において雑種種子を容易にしかも確実に得ることができる。この方

法は、わが国ではアブラナ科野菜の育種に利用され、世界をリードしており、この育種法をさらに発展させるための技術改良が求められている。

ハクサイ、キャベツ、ダイコンなどのアブラナ科野菜は、わが国野菜生産の上位に位置する重要野菜であり、筆者らはこれを材料として研究を続けてきた。これらの植物は実験材料としても扱い易いので、自家不和合性に関する知見も最も多く、本稿もこれらを中心にしてとりまとめた。なお、自家不和合性全般については、De Nettancourt⁽¹⁾やHeslop-Harrison⁽²⁾の著書が参考になるであろう。和文のものでは加藤、志佐⁽³⁾によるものや、筆者らの総説^(4,5)を参照していただきたい。

自家不和合性のタイプ

被子植物の自家不和合性には、花の形態との関係、遺伝様式、花粉管の行動などに差異があり、表に示すように大きく3つのタイプに分けられる。

異型花タイプのソバやプリムラなどには、雌ずいが長

自家不和合性のタイプ

異型花	ソバ、プリムラ、レンギョウ、エゾミソハギ、カタバミの類など
同型花	配偶体型……ナシなどバラ科植物、ペチュニアなどナス科植物、アカクロバアなどマメ科植物、ライムギなどイネ科植物
	胞子体型……キャベツなどアブラナ科植物、コスモスなどキク科植物、サツマイモなど

く雌ずいが短い長花柱花をつける個体と、雌ずいが短く雌ずいの長い短花柱花の個体とが、集団中にはほぼ1対1の割合で存在し、同じ花型どうしの交配では不和合で、異なった花型間で受粉したときのみ種子ができる。ソバやレンギョウでは、同じ花型どうしを受粉すると、花粉は発芽して柱頭組織に侵入するが、途中で伸長を停止して受精しない。プリムラの短花柱花×短花柱花では、花粉管が柱頭に侵入できず、その上を這う。長花柱花×長花柱花では、花柱内の花粉管伸長が短花柱花のそれに比べて非常に遅い。遺伝子型は短花柱花が Ss 、長花柱花が ss で示され、両者を交配した後代も Ss と ss が1対1となる。このように、花の型と花粉・雌ずいの認識反応の特異性とは対応しているのが異型花不和合性である。

花の型が同じでありながら自家不和合性を示すものが、同型花不和合性である。一連の複対立遺伝子、 S_1 、 S_2 、 S_3 ……があり、花粉側と雌ずい側に同じ番号の S 遺伝子があるときに不和合となる。この S 遺伝子の形質発現の状態によって配偶体型と胞子体型に分けられる。ナス科やバラ科植物の配偶体型のものでは、たとえば S_1S_2 の個体は S_1S_2 の雌ずいと S_1 および S_2 の花粉をつくる。 S_1S_2 の雌ずいは S_1 花粉でも S_2 花粉でも受精しないが、 S_3 や S_4 の花粉では受精して種子ができる。これらの花粉の特異性は単相（半数体）である配偶体（花粉）の遺伝子型で決定されるので、配偶体型といわれる。これに対し、アブラナ科やキク科植物では花粉の特異性が花粉親（胞子体・複相）の遺伝子型によって決まるので、胞子体型といわれる。配偶体型では四倍体にでもない限り、花粉の S 遺伝子間の相互作用は考えられないが、胞子体型では花粉の特異性決定に S 遺伝子の優劣性に関与する（共優性で2つの S 遺伝子がともに活性を示すことも多い）。たとえば、 S_1S_2 の個体の花粉は、 S_1 が優性のときは S_2 の遺伝子を持っていても S_1 のように振舞う。共優性のときは S_1 と S_2 の両者の働きを持つ。

なお、幾つかの複対立遺伝子系を持つものもある。ライムギなどイネ科植物も配偶体型の不和合性とされるが、この場合には2つの複対立遺伝子系（ S_1 、 S_2 ……と Z_1 、 Z_2 ……）が関与し、2つの系の遺伝子がともに同じときに不和合となる。ラナンキュラスでは3シリーズ⁽⁶⁾、ビートでは4シリーズ⁽⁷⁾の複対立遺伝子系が関与する。

同型花不和合性の場合には、分類上同じ科に含まれる

ものは同じタイプの不和合性を示す。一般的にいうと、配偶体型のものでは花柱内で花粉管の伸長が抑制され、胞子体型のものでは柱頭表面が乳頭状突起細胞となっていて柱頭汁液がないように見え、不和合受粉では花粉が発芽しなかったり、発芽しても花粉管が柱頭内に侵入しない。

これら3つのタイプあるいは植物種の間で、不和合性の機構が同じかどうか、認識機構が似ていてその後の生理的機構が異なるのか、などが一つの興味を中心であるが、もう一つの興味は数多い S 対立遺伝子の特異性がどのように決定されるのかということであろう。配偶体型のレッドクローパーでは1品種中に171種類の S 遺伝子があるという報告もあり⁽⁸⁾、胞子体型のキャベツでは70以上はないであろうが20~30くらいはあると信じられている⁽⁹⁾。

抑 制 物 質

雌ずい側の特異的物質が特定の S 遺伝子型の花粉発芽あるいは花粉管伸長を抑制するという考えは、古くからあった。アブラナ科では建部⁽¹⁰⁾や Ferrari & Wallace⁽¹¹⁾ らが、ベチュニアでは安田⁽¹²⁾や Brewbaker & Majumder⁽¹³⁾ らが、不和合組み合わせの雌ずいを人工培地に入れることによって花粉管の伸長が抑制されることを示した。Ferrari & Wallace の人工培地での発芽実験によると、培地に低い濃度の柱頭浸出液を加えると、和合柱頭浸出液に比べて不和合柱頭浸出液は発芽を抑制する。しかし、浸出液の濃度を高めると和合、不和合の差ははっきりしなくなる。濃度が高いときは浸出液添加の時期が問題となり、吸水後1~2分後に添加すると和合、不和合の差が見られるが、3~4分後に添加するとはっきりしない。RNA 合成阻害剤である cordycepin や蛋白合成阻害剤である cycloheximide を加えたときも浸出液濃度を高めたのと同様の現象が認められるので、彼らは不和合反応には蛋白合成の過程が関与している可能性を考えている。

Golynskaya らは、異型花不和合性を示すプリムラを用いてレクチンの関与を示唆している。短花柱花では柱頭抽出液の赤血球凝集能が高く、長花柱花では花柱抽出液のそれが高い。それぞれの抽出液を加えた人工培地の実験では、同型の花粉管の伸長を抑制する。しかし、赤血球を加えてレクチンを吸収するとそれぞれの効果が下

がるので、彼らはレクチンが不和合組み合わせの花粉管伸長を抑制すると考えた。ゲル濾過の実験から2つの型のレクチンの分子量は異なるという⁽¹⁴⁾。

このような実験は古くから試みられているが、なかなか進展していない。その理由の1つに人工培地上の花粉発芽には種によって難易があり、花粉が発芽しにくいものでは花粉発芽を指標にして物質を単離することが困難なことをあげることができよう。第2の理由としては、筆者らの経験では、和合、不和合の差が振れ易いことがある。たとえば、t検定を行なうとPの値が10~30%程度になることが多い。恐らく、人工培地が不完全なものと、雌ずいには花粉発芽を促進する物質と抑制する物質の両者が含まれ、単純な抽出では明瞭な結果が得られにくいのではないかと想像している。柱頭抽出物を何らかの方法で分画してみる必要があろう。

配偶体型のペチュニアを使った Donk の実験では、自家受粉した S_2 の花柱からとった蛋白質を柱頭に処理すると、 S_2 の花粉管伸長が抑えられる。 S_3 についても同様な結果が得られるので、S遺伝子に特異的な認識蛋白質は未受粉の花柱には存在せず、受粉することによって合成されたと考えている。受粉花柱からRNAをとり出してカエルの卵に注入してもこのポリペプチドが合成され、分子量が11,000と6,000のサブユニットから成るという^(15,16)。

花粉と柱頭の認識反応

孢子体型と配偶体型の違いは、S遺伝子の働きが複相のときに発現するのか単相のときに発現するのかの差である。Brewbaker⁽¹⁷⁾やPandey⁽¹⁸⁾は、この差をS遺伝子が働いて特異物質をつくる時期が減数分裂の前か後かの違いによると説明した。最近、Heslop-Harrison, Knox, Dickinson, Lewis らは孢子体型の各種の植物を調べ、葯のタペート細胞*で認識物質がつくられるので孢子体型になるという仮説を提案した。花粉の生長過程を電顕で調べると、葯の裂開数十時間前にタペート細胞(孢子体の遺伝子組成を持つ)から花粉外壁(exine)のくぼみにpollenkitと呼ばれる物質の移動するのが認められる。この物質は蛋白染色の試薬で染まり、分子量10,000~

25,000の蛋白質あるいは糖蛋白質を含むと推定され、受粉時に柱頭乳頭細胞表面に移動する。不和合受粉では花粉管の接した乳頭細胞にカロース**が形成されるのが観察されるが、和合組み合わせの際にはそれが見られない。不和合組み合わせの花粉からとった上記外壁物質を乳頭細胞につけるとカロース形成を誘導するが、和合組み合わせではそれがない。また、未受粉の乳頭細胞クチクラ層の外側には蛋白質の層(pellicle)が認められる。これらの事実をつなぎ合わせると、認識物質は、はじめタペート細胞で形成され、花粉外壁に移行して受粉時に柱頭のpellicleとの間で認識反応を起こし、不和合組み合わせのときには乳頭細胞にカロースを形成して花粉管の侵入を抑制するということになる^(2,19~27)。

この仮説は孢子体型の不和合性を巧みに説明しており、生理学的観察から導かれた最も有力な考え方であろう。この考えが仮説の域を脱するためには、柱頭にカロースができることと不和合花粉の行動との生理・生化学的関連性を明確にし、花粉外壁蛋白質とS遺伝子との関係を明らかにすることが必要である。さらに、pellicleについてもS遺伝子との特異的関係、認識機構への関与の実証、次項に述べる柱頭の特異的糖蛋白質との関連を明確にする必要があろう。

柱頭の特異的蛋白質

自家不和合性の遺伝様式がS複対立遺伝子系によって説明されるので、S遺伝子に特異的な物質を見だし、この物質から不和合性の機構を探ろうという試みも数多い。配偶体型のオオマツヨイグサやペチュニアでは花粉にS遺伝子に特異的な抗原があることが見いだされたが^(28,29)、その後の研究は進展していないようである。孢子体型のキャベツではNasrallah & Wallace^(30,31)によって柱頭にS遺伝子特異抗原があることが明らかにされ、多くの研究者により追試、確認された^(32~34)。筆者らは、等電点電気泳動でアブラナ科野菜の柱頭にS遺伝子に特異的な糧蛋白質を見いだしたが、これは前述の免疫学的手法を使って明らかにされたS特異抗原にあたるものと考えている。これまでに、*Brassica oleracea* (キャベツの類)では7つ、*B. campestris* (ハクサイの類)では4つ、*Raphanus sativus* (ダイコン)では2つのS遺伝子について、それぞれに特異的な糖蛋白質を確認している(図1)。この糖蛋白質は雌ずいの柱頭にのみ

* 葯壁の最も内側(花粉側)にある細胞層で、花粉形成に関与する。

** 師管の師板や花粉管に見られる、アニリンブルーに染まる物質で、 β -1,3結合したグルコース重合体といわれる。

図1 *B. oleracea* の S_{13} - S_{39} F_2 (a) と *R. sativus* の S 遺伝子分離系統(b)について、各6個体の S 遺伝子型を推定する模式図(上)と各個体柱頭糖蛋白質の分析(下)

たとえば、 S_{13} - S_{39} の F_2 の各個体は S_{13} ホモか S_{39} ホモかあるいは $S_{13}S_{39}$ ヘテロかのいずれかである。各個体間で総当たり交配を行なって花粉が柱頭に侵入するか(+)；和合)しないか(-；不和合)を観察すると、上段のようになる。 $S_{13}S_{13}$ の柱頭は S_{13} を持った個体からの花粉では不和合であり、 $S_{39}S_{39}$ からの花粉で交配すると和合となる。逆に、 $S_{39}S_{39}$ は S_{39} を持った個体からの花粉では不和合、 $S_{13}S_{13}$ の花粉では和合となる。 $S_{13}S_{39}$ の個体起源の花粉は、 S_{13} と S_{39} の両者の性質を示す共優性と考えられる。 $S_{13}S_{39}$ の柱頭は $S_{13}S_{13}$ の花粉でのみ和合となるので柱頭では S_{39} が優性で、 S_{39} の性質を示していると理解される。(b) の *R. sativus* では S_1 と S_2 が花粉でも柱頭でも共優性として働き、両者の性質を示すので S_1S_2 ヘテロの個体はどの交配でも不和合となる。このような総当たり交配の結果から、各個体の S 遺伝子型が推定される。各個体の柱頭をセルロースアセテート等電点電気泳動後、Con A-パーオキシダーゼ染色を行なったのが下段であり、矢印で示したバンドがそれぞれの S 遺伝子に伴って遺伝する。いくつかの S 遺伝子についてはまだ特異バンドが同定されていないものもあり、*R. sativus* の S_1 も未発見である。本方法はさらに改良する必要があるが、この方法を用いることにより S 遺伝子型が推定され、 S 遺伝子同定のための交配範囲は著しく狭められる^(40,41)。

存在し、花柱や子房、その他の栄養器官には見られない。また、蕾から開花に至る間に柱頭に急激に増加する。このことはアブラナ科植物の自家不和合性が柱頭上での阻害であること、蕾の段階では不和合性を示さず、開花時にはじめて不和合性を示すこととよく対応する⁽³⁵⁻³⁷⁾。

生化学研究室に指導と援助を仰いで、*B. campestris* の S_7 ホモ系統の柱頭粗抽出液からセファデックス G-200, Con A-セファロースクロマトグラフィー、蔗糖密度勾配等電点電気泳動を組み合わせる単離した特異糖蛋白質は、等電点が pH 5.7, SDS 電気泳動による推定分子量は 57,000, 蛋白：糖の比が 1 : 1.2, 構成アミノ酸はセリン、グルタミン酸、グリシンが比較的多い⁽³⁸⁾(図

2)。アブラナ科植物においては、柱頭に何種類かの糖蛋白質が存在し、そのうちのあるものは S 遺伝子と行動を共にする。この S 遺伝子特異蛋白質は、それぞれの S 遺伝子により異なった等電点を持つといえる。糖蛋白質のどのような構造変化によって等電点が変わるのか、これが認識反応にどのように関与しているのかは興味ある課題であり、現在他の S 遺伝子の糖蛋白質の単離を急いでいるところである。最も困難な問題は、この糖蛋白質の所在が柱頭に限られていることであり、1個の柱頭に 0.2 μ g 含まれていて収率が 50% とすると、1万個の柱頭からとれる量が約 1 mg しかないという点である。

自家不和合性の性質から考えて、花粉側にも S 遺伝子

図2 *B. campestris* の S_7 特異蛋白質の単離

(a) アクリルアミド等電点電気泳動の結果で、いずれもタマジブルー染色。下は柱頭粗抽出液の泳動結果で、図1に示した方法により矢印の蛋白質が S_7 特異蛋白質であることがわかっていて、上は精製後の溶液を泳動したもので、 S_7 特異蛋白質が単離されたことを示す。この場合には試料ゲル中には残渣が残らない。

(b) 柱頭粗抽出液をセファデックス G-200, Con A-セファロースクロマトグラフィーで分画した後、蔗糖密度勾配等電点電気泳動によって分離した際の各フラクションの 280nm における吸光度 (実線) とその pH (点線) を示す。 S_7 特異糖蛋白質の等電点は pH 5.7 と推定された。

なお、(a) に示した粗抽出液の電気泳動のバンドと (b) のピークとはよく対応しているため、粗抽出液のアルカリ側蛋白質の多くは Con A と反応すると考えられる⁽³⁸⁾。

に特異的な物質が存在するはずであるが、アブラナ科植物の花粉では免疫学的手法でも電気泳動法でもこのような物質はまだ検出されていない。筆者らは尿素と Triton X-100, メルカプトエタノールを含む溶液で花粉から蛋白質を抽出し、尿素と Triton X-100 を含むアクリルアミドゲルによる等電点電気泳動や、クロロホルム-メタノールでプロテオリビドを抽出し、0.9 N 酢酸と尿素を含むアクリルアミドゲル電気泳動などを試みたが、いずれにおいても S 遺伝子の特異性は見られなかった。花粉の側の特異性はこれらの方法では検出できないのかもしれない。柱頭の特異糖蛋白質がもっと多量に得られれば、それを使った実験も可能であろう。

不和合性の利用と S 遺伝子特異蛋白質

作物を異品種または異系統間で交雑すると、その F_1 は雑種強勢により、両親よりも旺盛な生育を示し、生産

力の高いことが多い。その他に、この方法をとると、品種の均一性が得られて栽培・収穫・流通が省力化されるし、また品種の保護の面からも好適といえる。 F_1 育種を遂行するには、労力をかけずに大量の交雑 F_1 種子を生産する方法が必要で、キャベツやハクサイでは自家不和合性を利用して採種されている。つまり、 S_1 ホモの系統と S_2 ホモの系統を 1 列ずつ交互に植え、近くに同種の植物を植えないようにして花粉の混入を防ぐと、 S_1 系統はすべて S_2 系統からの花粉で種子をつけ、 S_2 系統は S_1 花粉で種子をつける。したがって、この圃場で得られる種子はすべて S_1 と S_2 の間の F_1 雑種である。ただし、この育種法では、まず自家受粉を重ねながら、優良で自家不和合性が強く、しかも S 遺伝子の異なるいくつかの系統を育成しなければならない。

開花前の雌ずいに受粉することを蕾受粉といい、この時期には自家不和合性を示さないで、これによって自殖種子が得られる。育種に利用されているのもほとんどこの方法であるが、花を 1 つ 1 つ手で交配しなければならないので多大の労力がかかる。何か薬品で処理して、あとは隔離した所で訪花昆虫を利用して自殖種子がとれば労力が省ける。中西、日向⁽³⁹⁾ は、 CO_2 ガスを 4% の濃度で与えることにより自家不和合性が克服できることを見だし、実際に利用されている。

F_1 育種には $A \times B$ の単交配や $(A \times B) \times (C \times D)$ の四元交配などがあり、種子の均一性では単交配のほうが、種子の生産量では四元交配のほうが優れている。四元交配の場合には 4 つの異なる S 遺伝子が必要で、その遺伝子型のチェックが必要である。普通は、交配してできた種子数を数えたり、受粉後の花粉管の状態を検鏡して調べるが、環境条件によって振れ易く、多数の反復が必要である。また、1 回の交雑により 2 個体間の S 遺伝子についての相同性しかわからない。そこで、筆者らは前項に述べた S 特異糖蛋白質をこのチェックに使う方法を考え、その簡易検出法を工夫した。アクリルアミドゲルを使う方法では手数がかかり、1 回の分析に多くの柱頭が必要なので、セルロースアセタートの等電点電気泳動を行ない、FITC-Con A (フルオレサインイソチオシアネートを結合させたコンカナバリン A)、あるいは Con A-パーオキシダーゼ法で検出すると、多数個体を 1 枚のシートで 4 時間で分析検定できる。しかも、多くの場合は各個体 1 ~ 3 個の柱頭で充分であった。具体的に

は、キャリアアンフォライトを浸み込ませたセパラックス EF の上に柱頭を並べ、ガラス棒で押し潰して電気泳動を行なう。泳動後、トリクロロ酢酸で固定し、FITC-Con A を反応させて UV 下で観察するか、固定後 Con A を反応させ、さらに Con A に西洋ワサビペーオキシダーゼを結合させてペーオキシダーゼ活性を検出する。FITC-Con A 法に比べ、Con A-ペーオキシダーゼ法のほうが若干手数がかかるが感度が高く、バンドパターンを保存することができるので、今ではほとんど後者のほうを使っている^(40,41)(図 1)。

この方法により、S 遺伝子の識別は、その認識反応特異性という目に見えないものから、バンドの移動度という目に見えるものにおきかえることができ、交配しなくても S 遺伝子の相同性が推定できる。実際の育種では、その他のいろいろな要因も関係するので、最終的に交雑してチェックすることが必要であろうが、S 遺伝子をバンドの移動度で記載しておくことにより、検定交配の範囲は大幅に縮小する。また、自家不和合性を研究する場合、これまでは各研究者それぞれ独自に $S_1 \cdot S_2 \cdots$ という番号を付しており、それぞれの番号間には何らの統一もなかった。S 遺伝子をその特異蛋白質の等電点で記載することにより、ある程度までその異同を推定できるので、研究者間の情報交換にも役立つものと考えている。

文 献

- 1) D. de Nettancourt : "Incompatibility in Angiosperms", Springer-Verlag, Berlin, 1977, p. 230.
- 2) J. Heslop-Harrison : *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 202, 73 (1978).
- 3) 加藤幸雄, 志佐 誠 : "新・植物生殖生理学", 誠文堂新光社, 1975.
- 4) 日向康吉 : '不和合性', "生理形質と量的生質", 木原 均, 高橋隆平編, 裳華房, 1976, p. 30.
- 5) 日向康吉, 西尾 剛 : "自家不和合性, その機構と制御", 日本育種学会編, 育種学最近の進歩第 20 集, 啓学出版, 1979 (印刷中).
- 6) U. Østerbye : *Hereditas*, 80, 91 (1975).
- 7) A. Lundqvist, U. Østerbye, K. Larsen & Linde-Laurson : *ibid.*, 74, 161 (1973).
- 8) A. J. Bateman : *Nature*, 160, 337 (1947).
- 9) D. J. Ockendon : *Heredity*, 33, 159 (1979).
- 10) 建部民雄 : 園芸雑, 16, 106 (1945).
- 11) T. E. Ferrari & D. H. Wallace : *Theor. Appl. Genet.*, 48, 243 (1976).
- 12) 安田貞雄 : "高等植物生殖生理学", 養賢堂, 1947, p. 582.
- 13) J. L. Brewbaker & S. K. Majumder : *Am. J. Bot.*, 48, 457 (1961).
- 14) E. L. Golynskaya, N. Bashkirova & N. N. Tomchuk : *Soviet Plant Physiol.*, 23, 69 (1976).
- 15) J. A. W. M. van der Donk : *Molec. gen. Genet.*, 131, 1 (1974).
- 16) J. A. W. M. van der Donk : *ibid.*, 141, 305 (1975).
- 17) J. L. Brewbaker : *J. Hered.*, 48, 271 (1957).
- 18) K. K. Pandey : *Evolution*, 14, 98 (1960).
- 19) J. Heslop-Harrison : *Nature*, 218, 90 (1968).
- 20) J. Heslop-Harrison, R. B. Knox & Y. Heslop-Harrison : *Theor. Appl. Genet.*, 44, 133 (1974).
- 21) O. Mattsson, R. B. Knox, J. Heslop-Harrison & Y. Heslop-Harrison : *Nature*, 247, 298 (1974).
- 22) J. Heslop-Harrison, R. B. Knox, Y. Heslop-Harrison & O. Mattsson : 'Pollen-wall proteins : emission and role in incompatibility responses', in "Biology of the Male Gamete", ed. by J. G. Duckett and P. A. Racey, 1975, p. 189.
- 23) R. B. Knox, J. Heslop-Harrison & Y. Heslop-Harrison : 'Pollen-wall proteins : localization and characterization of gametophytic and sporophytic fractions', *ibid.*, 1975, p. 177.
- 24) J. Heslop-Harrison, Y. Heslop-Harrison & J. Barber : *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 188, 287 (1975).
- 25) J. Heslop-Harrison : *ibid.*, 190, 275 (1975).
- 26) H. G. Dickinson & D. Lewis : 'Interaction between the pollen grain coating and the stigmatic surface during compatible and incompatible intraspecific pollinations in *Raphanus*' in "Biology of the Male Gamete", ed. by J. G. Duckett and P. A. Racey, 1975, p. 165.
- 27) K. R. Shivanna, Y. Heslop-Harrison & J. Heslop-Harrison : *Acta Bot. Neerl.*, 27, 107 (1978).
- 28) D. Lewis, S. Burrage & D. Walls : *J. Exp. Bot.*, 18, 371 (1967).
- 29) H. F. Linskens : *Z. Bot.*, 48, 126 (1960).
- 30) M. E. Nasrallah, J. T. Barber & D. H. Wallace : *Heredity*, 25, 23 (1970).
- 31) M. E. Nasrallah, D. H. Wallace & R. M. Savo : *Genet. Res.*, 20, 151 (1972).
- 32) M. Sedgley : *Heredity*, 33, 412 (1974).
- 33) V. Kucěra & J. Polák : *Biol. Plant.*, 17, 50 (1975).
- 34) P. K. Sareen & S. N. Kakar : *Z. Pflanzenzücht.*, 79, 324 (1977).
- 35) T. Nishio & K. Hinata : *Heredity*, 38, 391 (1977).
- 36) T. Nishio & K. Hinata : *Japan. J. Genet.*, 53, 27 (1978).
- 37) K. Hinata & T. Nishio : *Heredity*, 41, 93 (1978).
- 38) T. Nishio & K. Hinata : *Japan. J. Genet.*, 54, 307 (1979).
- 39) T. Nakanishi & K. Hinata : *Plant Cell Physiol.*, 14, 873 (1973).
- 40) 西尾 剛, 日向康吉 : 育種, 29, 別冊 1, 242 (1979).
- 41) 日向康吉, 西尾 剛 : 育種, 29, 別冊 2, 110 (1979).