

ヒノキとサワラの種間雑種および園芸品種のDNA分析

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者	檜崎, 康二 渡辺, 敦史 富田, 啓治
巻/号	78巻2号
掲載ページ	p. 157-161
発行年月	1996年5月

論 文

ヒノキとサワラの種間雑種および園芸品種の DNA 分析*

植崎康二**・渡辺敦史**・富田啓治**・佐々木義則***・白石 進**

植崎康二・渡辺敦史・富田啓治・佐々木義則・白石 進：ヒノキとサワラの種間雑種および園芸品種の DNA 分析 日林誌 78: 157~161, 1996 ヒノキとサワラの自然雑種であるヒノキ精英樹の富士2号と、ヒノキおよびサワラの園芸品種を対象として、核ゲノムの RAPD 分析と葉緑体ゲノムの SSCP 分析を行った。富士2号の RAPD 分析の結果、ヒノキおよびサワラに種特異的な PCR 産物 (バンド) がともに検出され、このクローンは両樹種間の雑種であることが DNA レベルでも確認された。さらに、葉緑体ゲノムの SSCP 分析の結果、富士2号の葉緑体ゲノムはヒノキ型を示し、この自然雑種は花粉親をヒノキ、母親をサワラとする交配組合せによってできたことが明らかとなり、両樹種間の交雑育種における新しい知見が得られた。また、ヒノキとサワラの園芸品種 (5 品種) の分析の結果、それぞれの種に特異的なバンドが出現し、これらがヒノキもしくはサワラの突然変異体であることが確認された。以上の結果から、RAPD 分析や SSCP 分析によって得られる DNA 分子マーカーは、種間雑種における親の交配組合せの決定および突然変異体の由来を調べる上で有用であることが明らかとなった。

キーワード：サワラ、種間雑種、樹種判定、DNA 分類、ヒノキ

NARAZAKI, K., WATANABE, A., TOMITA, K., SASAKI, Y., and SHIRAIISHI, S.: DNA analysis of the interspecific hybrid clones and the horticultural varieties of *Chamaecyparis obtusa* and *C. pisifera*. J. Jpn. For. Soc. 78: 157~161, 1996 RAPD (random amplified polymorphic DNA) and SSCP (single strand conformation polymorphism) analyses were carried out to investigate the nuclear genome composition and chloroplast genome type of a natural hybrid and five horticultural varieties. In RAPD analysis, Fuji-2, a plus tree clone that is a natural hybrid between *C. obtusa* (SIEB. et ZUCC.) Endlicher and *C. pisifera* (SIEB. et ZUCC.) Endlicher, possessed all species-specific bands that were detected in these two species. It was reconfirmed at the DNA molecular level that this clone was an interspecific hybrid between them. SSCP analysis revealed that the chloroplast genome of Fuji-2 was *C. obtusa* type. This suggested that Fuji-2 was bred by crossing between *C. pisifera* as the seed parent and *C. obtusa* as the pollen parent. As no hybrids have ever been bred in this combination (*C. pisifera* × *C. obtusa*), a new possibility was shown in cross breeding of *Chamaecyparis*. In RAPD and SSCP analyses of horticultural varieties, each variety possessed species-specific bands of either *C. obtusa* or *C. pisifera*. The fact supported that they were mutants of *C. obtusa* or *C. pisifera*. From these results, DNA molecular markers such as RAPD and SSCP seem useful to identify the parental species of interspecific hybrid, and also useful to ascertain the origin of mutant.

Key words: *Chamaecyparis obtusa*, *C. pisifera*, classification, DNA systematics, interspecific hybrid

I. はじめに

わが国には、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* (SIEB. et ZUCC.) ENDLICHER) とサワラ (*C. pisifera* (SIEB. et ZUCC.) ENDLICHER) の二つのヒノキ属植物が天然分布しており、特にヒノキは重要な林業用樹種の一つになっている。1954年に開始された精英樹選抜育種事業においても、ヒノキは育種対象樹種の一つとされ、現在までに1,000弱の精英樹クローンが選抜されている(2)。

富士2号は静岡県内でヒノキ精英樹として選抜されたが、球果の形状がサワラに類似しているなどの形態的特徴から、選抜当初よりヒノキとサワラの種間雑種ではないかといわれていた。その後、細胞遺伝学的研究(6)およびアイソザイム研究(7)により、富士2号はヒノキとサワラの種間雑種であり、ヒノキ2ゲノム、サワラ1ゲノムからなる異質三倍体であることが明らかとなった。また、ヒノキおよびサワラには多くの園芸品種が存在しており、外部形態が極めて類似したものが両樹種から数多く見出されている(4, 18)。

本研究では、細胞遺伝学的手法等によってヒノキとサワラの種間雑種であることが立証されている富士2号について、核ゲノムの RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析(19)を用いて再検証を行った。また、葉緑体ゲノムの SSCP (single strand conformation polymorphism) 分析(12)を行い、そのゲノム型を決定することにより、富士2号の親の交配組合せを決定した。また、数種の園芸品種についても核ゲノムの RAPD 分析と葉緑体ゲノムの SSCP 分析を用いてゲノム組成を比較・検討した。

II. 材料と方法

供試材料としては、表-1に示すヒノキ6個体、同園芸品種1個体、サワラ1個体、同園芸品種4個体、両樹種間の自然雑種とされるヒノキ精英樹の富士2号、および人工交配(ヒノキ×サワラ)によって作出された個体(林木育種センター九州育種場保有)の計14個体を用いた。また、DNA分子マーカーの種内変異を調査し、マーカーの樹種識別能を評価するために、ヒノキ39個体(林木育種セン

* 本研究の一部は第50回日本林学会九州支部大会および第106回日本林学会大会で口頭発表した。

** 九州大学農学部 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-81

*** 大分県林業試験場 Ooita Pref. For. Res. Inst., Oita 877-13

表-1. 供試個体概要

Descriptions of samples used in this study.

サンプル番号 Sample No.	サンプル名 Name of sample	備考 Remarks
ヒノキ (<i>C. obtusa</i>)		
1	三次4号	ヒノキ精英樹 (三倍体 (14))
2	三光ヒノキ	(四倍体 (15))
3	始良46号	ヒノキ精英樹
4	大分7号	ヒノキ精英樹
5	東白杵3号	ヒノキ精英樹
6	阿蘇11号	ヒノキ精英樹
7	スイリュウヒバ	園芸品種
種間雑種 (natural/artificial hybrid)		
8	人工雑種?	人工交配 (ヒノキ×サワラ)
9	富士2号	ヒノキ精英樹 (三倍体:ヒノキ2ゲノム +サワラ1ゲノム (6))
サワラ (<i>C. pisifera</i>)		
10	実生個体	
11	ヒヨクヒバ	園芸品種
12	シノブヒバ	園芸品種
13	シノブヒバ	園芸品種
14	ヒムロ	園芸品種

表-2. プライマーの塩基配列

Sequences of primers for RAPD analysis.

プライマー Primer	塩基配列 (5'-3') Sequence
A-08	GTGACG TAGG
E-08	TCACCACGGT
L-12	GGGCGG TACT
P-06	GTGGGCTGAC
R-06	GTCTACGGCA
U-06	ACCTTTGCGG
W-15	ACACCGGAAC
FB-3	CCTGGCGAGC

ター九州育種場保有の20精英樹クローンおよび大分県林業試験場保有の19精英樹クローン)とサワラ40個体(森林総合研究所九州支所構内の6個体および信州大学農学部構内の34個体,いずれも実生由来)を使用した。

全DNA抽出は,成葉約100mgからCTAB法(8)を改良した方法で行った(16)。抽出した全DNAはELU-QUIK™ DNA精製キット(米国Schleicher & Schuell社)を用いて精製し,PCRの鋳型DNAとして用いた。

RAPD分析は,表-2に示す8種類のプライマー(FB-3はDNAシンセサイザー(米国パーキンエルマー社,ABI 391)で合成,他は米国オペロン社の市販品)を用いて行った。PCR反応は,反応溶液組成の鋳型DNA濃度を1ng/μlとし,サーモサイクラーの変性(93°C,5秒)・アニーリング(36°C,5秒)・伸長(72°C,15秒)条件およびサイクル数(60サイクル)を変更した以外は,白石ら(16)の方法に従った。得られたPCR産物は,1%アガロースゲルを用いて電気泳動した後,エチジウムブロマイドで染色し,302nmUVトランスイルミネーター上でDNA多型を検出

した。

また,SSCP分析は,葉緑体DNA上に存在する*rbcL*遺伝子の一部領域(約450bps)を対象として行った。DNAサンプルは,新たに設計・合成された2種類のプライマー(5'-GTCGGATTCAAAGCTGGTGT-3',5'-CTTTCTACTTGGATACCATGAG-3')を用い,PCRにより調製した。PCR反応は白石ら(16)の方法に従った。得られたPCR増幅産物(10μl)は,1×TBE(13)(11μl),1M水酸化メチル水銀水溶液(1μl)と混合し,94°Cで5分間熱変性を行った後,氷中で急速冷却した。電気泳動は,10%ポリアクリルアミドゲルを用い,10°C,250Vの条件で16時間行った(3)。泳動後エチジウムブロマイドで染色し,トランスイルミネーター上で検出した。

III. 結果と考察

1. ヒノキとサワラにおける種特異的なDNA分子マーカーのスクリーニングとその樹種識別能の評価

本研究で用いたRAPD法は,迅速かつ簡便に種間もしくは種内(個体間)の核DNA上の変異をとらえることができる。核DNAは両性遺伝するため,ヒノキおよびサワラの樹種識別はもとより,両樹種間の雑種判定が可能である。そこで80種類のプライマーを用いて,ヒノキ(No.3~6)およびサワラ(No.10)に特異的と思われるマーカーのスクリーニングを行った。その結果,表-2に示す8種類のプライマーで増幅される16個のDNA分子マーカー(バンド)が得られた(図-1,表-3)。このうち,プライマーA-08(500bp),P-06(580bp),R-06(700bp),U-06(720bp),W-15(430bp,840bp),Z-03(740bp,850bp)で観察された8バンドはヒノキに,E-08(900bp),L-12(1,000bp),P-06(420bp),R-06(680bp),U-06(1,350bp),W-15(960bp),Z-03(520bp,1,100bp)の8バンドはサワラに特異的に出現した。

一方,葉緑体DNA上に存在する*rbcL*遺伝子のSSCP分析の結果(図-2),ヒノキ(No.2~6)とサワラ(No.10)の泳動像には明瞭な違いが認められ,両樹種間のDNA塩基配列に塩基置換のあることが明らかとなった。

ヒノキ,サワラに特異的であると思われるこれらのDNA分子マーカーの両樹種における保有頻度を明らかにすることによって,個々のマーカーの樹種識別能を評価することができる。そこで,供試材料として新たにヒノキ39個体,サワラ40個体を加え,これらの各マーカーの両樹種における保有頻度を調査した。先に述べたヒノキ4個体,サワラ1個体を加えた,ヒノキ43個体,サワラ41個体中の各マーカーの出現頻度は表-4のとおりである。

前述のヒノキに特異的であった8マーカーのうち,A-08/500bp,P-06/580bp,U-06/720bp,Z-03/740bpの4マーカーは,ヒノキの全供試個体が保有していたが,サワラでは全く出現しなかった。逆に,サワラ特異的とされたもののうち,E-08/900bp,L-12/1,000bp,P-06/420bp,U-06/1,350bp,W-15/960bp,Z-03/1,100bpの6マーカー

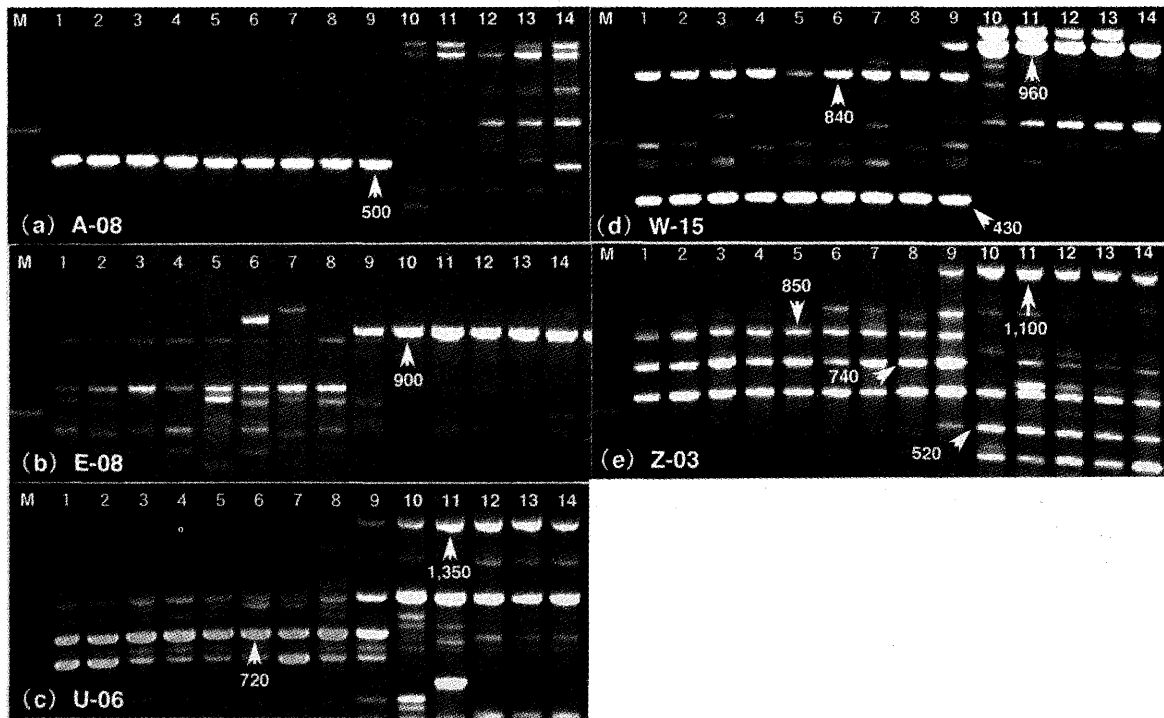


図-1. RAPD 分析の結果 (一部)
Electrophoresis patterns in RAPD analysis.
各レーン番号は表-1 のサンプル番号に対応。

表-3. 供試各個体の葉緑体ゲノム型と核ゲノム構成
Chloroplast genome type and nuclear genome composition.

サンプル番号 Sample No.	サンプル名 Sample name	葉緑体ゲノム型* Chloroplast geome type	核ゲノム組成 (各プライマーによる増幅結果)** Nuclear genome composition															
			A-08		E-08		L-12		P-06		R-06		U-06		W-15		Z-03	
			500	900	1000	420	580	680	700	720	1350	430	840	960	520	740	850	1100
1	(ヒノキ) 三次4号	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
2	(ヒノキ) 三光ヒノキ	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
3	(ヒノキ) 始良46号	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
4	(ヒノキ) 大分7号	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
5	(ヒノキ) 東白杵3号	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
6	(ヒノキ) 阿蘇11号	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
7	(ヒノキ) スイリュウヒバ	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
8	(雑種) 人工雑種?	O	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
9	(雑種) 富士2号	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10	(サワラ) 実生個体	P	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	
11	(サワラ) ヒヨクヒバ	P	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	
12	(サワラ) シノブヒバ	P	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	
13	(サワラ) シノブヒバ	P	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	
14	(サワラ) ヒムロ	P	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	

*O, ヒノキ型 (*C. obtusa* type); P, サワラ型 (*C. pisifera* type). **+, バンド保有 (Detected); -, バンド非保有 (Not detected).

は、サワラの全個体で観察されたが、ヒノキでは全く確認できなかった。W-15/430 bp, W-15/840 bp の 2 マーカーのヒノキでの出現頻度、および、R-06/680 bp, Z-03/520 bp の 2 マーカーのサワラでの出現頻度は、ともに 90% 以上であり、それぞれ、ヒノキ、サワラにおける種特異性の高いマーカーであることが確認できた。以上述べた 14 個のマーカーは、種特異性が高く、これらのうちから数個のマ-

カーを併用することにより、信頼性の高い樹種・雑種鑑定が可能である。一方、R-06/700 bp, Z-03/850 bp のバンドは、ヒノキに極めて高い頻度で保有されていることは確認されたが、サワラでも、ほぼ同じ DNA 長の PCR 産物 (バンド) が、低頻度ではあるが検出された。このため、これらの 2 マーカーについては、この点に留意の上、樹種鑑定等に利用する必要がある。一方、葉緑体ゲノム型判定のた

表-4. 各マーカーのヒノキおよびサワラにおける保有頻度 (%)

Frequency of each marker in *C. obtusa* and *C. pisifera* respectively.

DNA 分子マーカー Marker		ヒノキ <i>C. obtusa</i>	サワラ <i>C. pisifera</i>
核 DNA Nuclear DNA			
A-08	500	100	0
E-08	900	0	100
L-12	1000	0	100
P-06	420	0	100
	580	100	0
R-06	680	0	98
	700	98	10
U-06	720	100	0
	1350	0	100
W-15	430	91	0
	840	91	0
	960	0	100
Z-03	520	0	98
	740	100	0
	850	100	2
	1100	0	100
葉緑体 DNA Chloroplast DNA			
		ヒノキ型*	0
		サワラ型**	100

* 図-2 の No. 3~6 の泳動型 (*C. obtusa* type: same electrophoresis type as No. 3-6 in Fig. 2). ** 図-2 の No. 10 の泳動型 (*C. pisifera* type: same electrophoresis type as No. 10 in Fig. 2).

めの SSCP マーカーは、供試全個体において、それぞれの樹種に特異的な泳動型を示し、種内変異は全く認められなかった。

2. 種間雑種とされている個体の DNA 分析

RAPD 分析により検出されたヒノキおよびサワラの種特異的なバンドは、富士 2 号 (No. 9) ではともに検出された (図-1, 表-3)。このことより、富士 2 号はヒノキとサワラの両方のゲノムを保有しており、種間雑種個体であることが確認された。一方、ヒノキ×サワラの人工交配によって作出された個体 (No. 8) では、ヒノキ特異的なバンドは出現したが、サワラ特異的なバンドは出現せず、この個体をヒノキとサワラの雑種とする証拠は得られなかった。

また、富士 2 号 (No. 9) において出現したサワラ特異的なバンドの濃度は、サワラ (No. 10) およびその園芸品種 (No. 11~14) におけるものよりも薄かった (図-1)。これは富士 2 号のゲノム組成がヒノキ 2 ゲノム、サワラ 1 ゲノムである (6) ことに起因しているものと考えられる。

針葉樹において、葉緑体 DNA は父性遺伝するとされている (9, 10)。また、近藤ら (5) は、ヒノキとサワラ間の人工交配家系を用いて葉緑体 DNA が父性遺伝することを報告している。この現象を利用し、種間雑種個体の葉緑体ゲノム型を調べることにより、花粉親 (父親) および母親となった樹種を決定することが可能である。そこで、富士

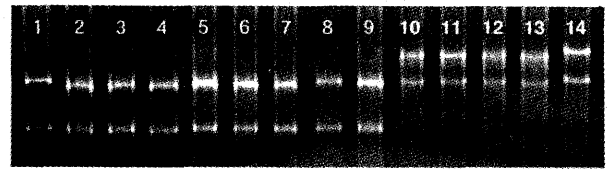


図-2. 葉緑体 DNA (*rbcL* 遺伝子の一部) の SSCP 分析結果

Electrophoresis patterns of *rbcL* gene in SSCP analysis.

各レーン番号は表-1 のサンプル番号に対応。

2 号の葉緑体ゲノム上の *rbcL* 遺伝子の一部をコードしている DNA 領域の SSCP 分析を行った。SSCP 分析は、塩基配列上の一塩基の違いをも検出できる分析法であり、これまで父性遺伝の検証に利用されてきたザザンハイブリッド法 (17) よりもはるかに簡便である。

SSCP 分析の結果、図-2 に示すように富士 2 号 (No. 9) のバンドはヒノキ (No. 1~6) と同じ移動度を示し、富士 2 号の葉緑体ゲノムはヒノキに由来していることが明らかとなった。したがって、葉緑体 DNA が父性遺伝することを考慮すると、富士 2 号の父親はヒノキ、母親はサワラとなる。前田 (6) は、富士 2 号の花粉親はサワラ、母親はヒノキであると推察したが、本研究ではこの予測とは異なる結果となった。

本研究により、富士 2 号がヒノキとサワラ間の自然雑種であることが DNA レベルにおいても確認された。このことから、RAPD 分析によって得られる DNA 分子マーカーが種間雑種個体の判別に有効な方法であることが示された。また、*rbcL* 遺伝子の SSCP 分析により、富士 2 号の葉緑体ゲノムはヒノキに由来しており、このクローンはサワラ×ヒノキの交配組合せ、すなわちサワラ卵細胞 (n) とヒノキ倍加花粉 (2n) の受精によってできた自然雑種 (3n) であることが判明した。これまでに人工交配によって作出された両種間の雑種 (雑種であることが何らかの方法で確認されたもの) はすべてヒノキ×サワラの交配組合せによって得られたものである (1, 6, 11)。今回、サワラ×ヒノキの交配組合せによる種間雑種の存在が明らかにされたことから、今後、ヒノキとサワラの交雑育種を進める上での新しい展開の可能性が示された。

3. 園芸品種の DNA 分析

RAPD 分析において、ヒノキの園芸品種であるスイリュウヒバ (No. 7) は、図-1 および表-3 から明らかなようにヒノキの種特異的なバンドをすべて保有していた。また、サワラの園芸品種であるヒヨクヒバ (No. 11)、シノブヒバ (No. 12, 13)、ヒムロ (No. 14) も同様に、サワラの種特異的なバンドを保有していた。

また SSCP 分析 (図-2) において、スイリュウヒバ (No. 7) はヒノキ型、ヒヨクヒバ (No. 11)、シノブヒバ (No. 12, 13)、ヒムロ (No. 14) はサワラ型の葉緑体ゲノムを保有していた。葉緑体ゲノム型から判定された各園芸品種の樹種

名は, RAPD 分析による核ゲノムの結果とも一致し (表-3), これらの園芸品種はそれぞれヒノキまたはサワラの突然変異体であることが裏付けられた。

ヒノキとサワラの園芸品種群の中には, スイリュウヒバとヒヨクヒバのように形態が類似した品種が多数存在し, 識別が困難な場合もある。今後, 今回使用した DNA 分子マーカーを用いることにより園芸品種の分類, 同定を簡便に行うことが可能となった。

本研究で使用した実験材料の一部は, 信州大学農学部の川崎圭造助教授, 林木育種センター九州育種場の戸田忠雄室長および森林総合研究所九州支所の谷口 実室長から提供していただいた。ここに深く感謝いたします。

引用文献

- (1) FUKUHARA, N. (1978) Meiotic observation in the pollen mother cell of interspecific hybrid between *Chamaecyparis obtusa* and *C. pisifera*. J. Jpn. For. Soc. 60: 437-441.
- (2) 古越隆信 (1987) 精英樹選抜育種事業. (林木育種事業三十年の歩み. 林野庁監修, 208 pp, 林木育種協会, 東京). 37-47.
- (3) HONGYO, T., BUZARD, G.S., CALVERT, R. J., and WEGHORST, C. M. (1993) 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. Nucl. Acids Res. 21: 3637-3642.
- (4) 近藤禎二 (1984) ヒノキの幼形葉突然変異. 農水省農業生物資源研究所放射線育種場テクニカルニュース No. 26.
- (5) 近藤禎二・岡村政則・津村義彦・河原孝行 (1994) ヒノキ属種間雑種における葉緑体 DNA およびミトコンドリア DNA の遺伝様式. 育種学雑誌 44 (別冊 1号): 230.
- (6) 前田武彦 (1982) ヒノキとサワラの種間交雑におけるガンマ線照射の影響に関する研究. 放射線育種場研究報告 5: 45-61.
- (7) 松田 清・宮崎安貞・宮島 寛 (1977) 富士 2 号の倍数性と雑種性に関する研究. 88 回日林論: 187-189.
- (8) MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant. Nucl. Acids Res. 8: 4321-4325.
- (9) NEALE, D. B. and SEDEROFF, R. R. (1989) Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. Theor. Appl. Genet. 77: 212-216.
- (10) NEALE, D. B., WHEELER, N. C., and ALLARD, R. W. (1986) Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir. Can. J. For. Res. 16: 1152-1154.
- (11) 大黒 正・岡村政則 (1987) ヒノキ属の種間雑種 (ヒノキ×サワラおよびローソンヒノキ) の形態および細胞学的研究. 林育研報 5: 59-87.
- (12) ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K., and SEKIYA, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766-2770.
- (13) SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.). 605 pp, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- (14) 佐々木義則 (1982) 有用樹種の細胞遺伝学的研究 (VII) スギおよびヒノキの精英樹にみられる三倍体. 大分県林業試験場研究時報 5: 5-13.
- (15) 佐々木義則 (1986) スギ・ヒノキの核型に関する研究—スギ・ヒノキなどの自然突然変異体の細胞遺伝学的研究—. 大分県林業試験場研究時報 12: 5-12.
- (16) 白石 進・渡辺敦史 (1995) *rbcL* 遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. 日林誌 77: 429-436.
- (17) SOUTHERN, E. M. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- (18) 上原敬二 (1977) 樹木大図説 I. 有明書房, 東京. 405-427.
- (19) WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., and TINGEY, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.

(1996年1月31日受理)