



細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた耐病性ナス台木とイチゴの育成

浅尾, 浩史

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2003-09-19

(Date of Publication)

2009-05-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2710

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002710>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた
耐病性ナス台木とイチゴの育成

平成15年8月

神戸大学大学院自然科学研究科

浅尾 浩史

細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた 耐病性ナス台木とイチゴの育成

Production of disease-resistant eggplant rootstock and strawberry
using cell fusion and recombinant DNA technology.

目次

緒論	1
第1編 細胞融合技術を用いた青枯病抵抗性を持つ有用ナス 台木の育成	3
第1章 ナスの栽培品種と台木品種におけるプロトプラスト 培養系の確立	4
第1節 材料および方法	4
第2節 結果	6
第3節 考察	13
第2章 青枯病萎凋誘導物質による細胞選抜	14
第1節 材料および方法	14
第2節 結果	16
第3節 考察	25
第3章 ナス栽培種「千両二号」と台木品種「カレヘン」の 体細胞雑種の作出	27
第1節 材料および方法	27
第2節 結果	29
第3節 考察	35

第4章 体細胞雑種とその後代の特性	36
第1節 材料および方法	36
第2節 結果	36
第3節 考察	41
第2編 遺伝子組換え技術を用いた耐病性イチゴの作出	42
第1章 イチゴの遺伝子組換え技術の開発	43
第1節 材料および方法	43
第2節 結果	45
第3節 考察	54
第2章 イネ由来キチナーゼ遺伝子導入によるうどんこ病抵抗性イチゴの作出	56
第1節 材料および方法	56
第2節 結果	58
第3節 考察	64
第3章 遺伝子組換えイチゴの安全性評価試験	66
第1節 材料および方法	66
第2節 結果	69
第3節 考察	82
第3編 総合考察	84
謝辞	86
引用文献	87
要約	95
Summary	97

緒 論

食糧を安定的に供給し、かつ農家の収益を確保するためには、病気に強くて収穫量が多く、しかも食味の良い品種を栽培することが重要である。育種家はそれらの形質を持つ品種を目標にして、数多くの有用な植物を育成してきたが、伝統的な品種改良技術にも欠点と限界がある。良い形質を持ったものどうしを交配しても必要な遺伝形質のみならず不要な形質も持ち込まれ、特定の遺伝子だけを導入するのは困難な場合がある。そのため、一つの品種を育成するには長い時間と莫大な労力を必要とする。また、交配による雑種は近縁の植物間でしか作出することができず、利用可能な遺伝形質には限界があるため、画期的な新しい品種の育成が制限される場合がある。しかし、培養技術の進歩により、交配できない組み合わせでも細胞融合によって両親からの遺伝子をあわせ持った植物の作出が可能になった。さらに、植物遺伝子工学技術の急速な進歩により、特定の遺伝子を単離し、他の生物に導入することも可能となった。

ポテトとトマトの細胞融合によって作出されたポマト (Melchers *et al.* 1978) は、小さいながら、地上にトマトが、地下部にポテトがなり、通常交配できないものでも細胞融合によってその壁を打破できることが証明された。ナスの場合、栽培ナス (*Solanum melongena*) へ耐病性などの有用形質を導入しようとして、近縁野生種とのプロトプラストによる細胞融合が試みられてきた。その融合相手の植物として、*S. sisymbriifolium* (Gleddie *et al.* 1986b)、*S. khasianum* (Sihachakr *et al.* 1988)、*S. torvum* (Guri and Sink 1988b, Sihachakr *et al.* 1989)、*S. nigrum* (Guri and Sink 1988a)、*S. integrifolium* (Kameya *et al.* 1990)、*S. aethiopicum* (Daunay *et al.* 1993) などの報告例があるが、それらの細胞融合雑種のほとんどが不稔で種子ができず、育種素材としては用いることができなかった。そこで、第1編では、青枯病抵抗性を持つ有用ナス台木の育成を目指して、プロトプラスト培養系における最適条件と青枯病抵抗性細胞の選抜における青枯病萎凋誘導物質の有効性を検討し、それらの技術を総合して細胞融合実験に取り組んだ。

一方、最先端の植物バイオテクノロジーとして 20 世紀の後半から遺伝子組換え技術が注目を浴びてきた。2050 年には世界人口は 100 億人近くになると予想され、かつ、農耕地は塩害、乾燥および土壌流出などで減少している中、食料問題が起こるのは必至である。この問題を解決するには、悪環境でも生育できる植物の開発が重要であり、それには遺伝子組換え技術が有効であると考えられる。1994 年にアメリカで最初に遺伝子組換え植物であるトマト「フレ

「パーセーパー」が商品化された。トマトが成熟する時に合成され果実を軟化させるポリガラクチュロナーゼ遺伝子のアンチセンスをトマトに導入して、ポリガラクチュロナーゼ遺伝子の発現を抑制し、日持ちをよくすることに成功したのである。その後、除草剤耐性大豆などが商品化され、1996年には日本にも遺伝子組換え作物が輸入されるようになった。遺伝子組換え技術は、従来の交配育種と比較して、目的とする遺伝子だけを導入することができることから、育種年限を短縮できるという利点がある。また、種を越えて遺伝子を導入できるので利用できる範囲は非常に広い。そこで、第2編では、耐病性イチゴの作出を目指して、イチゴにおける遺伝子組換え技術を確立し、次いでイネ由来キチナーゼ遺伝子をイチゴへ導入してうどんこ病抵抗性個体の作出を試みた。また、抵抗性が確認された遺伝子組換え体については安全性評価実験を行った。

第1編 細胞融合技術を用いた青枯病抵抗性を持つ 有用ナス台木の育成

ナスは熱帯地域や温帯地域において経済的に重要な作物の一つで、原産地はインドであるといわれている。世界で154万haの栽培面積があり、2,651万トンが収穫されている。また、国別生産量は上位から中国(1,543万トン、81.7万ha)、インド(640万トン、46.0万ha)、トルコ(97万トン、3.7万ha)、エジプト(70万トン、3.1万ha)、日本(45万トン、1.3万ha)の順(FAO, 2002)で、日本は世界第5位とナス栽培の盛んな国である。

ナスの生産は、青枯病によってしばしば大きな被害を受けることがある。土壌病害対策として、耐病性台木を用いた接ぎ木栽培が行なわれているが、近年、その効果もうすれ、青枯病の発生が増加しつつある。土壌中に生息する青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)は、作物の根の傷口から侵入し、導管部で増殖して作物を萎凋させる。この菌は細胞外多糖物質(Exopolysaccharide:EPS)を生産すると報告されており(Dudman 1959, Gowda and Vittal 1980a, Gowda and Vittal 1980b, Husain and Kelman 1958a)、このEPSが青枯病菌による萎凋症状の発現に大きな役割を果たしていると考えられている(Wallis and Truter 1978)。

奈良県農業技術センターは青枯病に対して高度抵抗性を有する「カレヘン」(*Solanum sanitwongsei*)を育成し(峯岸 1991)、平成2年8月に種苗登録(登録番号第2347号)したが、低温期の伸長性が弱く胚軸が細いという欠点を持っていた。そのため接ぎ木時期を合わせるには、穂木より10日程度早く台木「カレヘン」を播種する必要があり、育苗期間の短縮と接ぎ木の省力化が望まれていた。そこで、細胞融合技術を用いた耐病性を持つ有用ナス台木の作出を試みた。

第1章では、細胞融合技術の基礎となるプロトプラスト培養系を確立するために、ナスの栽培品種と台木品種において、プロトプラスト単離条件、コロニー形成率に及ぼすプロトプラスト培養における培地の種類と細胞密度の影響および再分化条件について検討した。第2章では、青枯病萎凋誘導物質で細胞選抜することによって、青枯病抵抗性個体を作成するために、青枯病萎凋誘導物質が種子、胚軸カルスおよびプロトプラストに及ぼす影響と再分化個体の青枯病抵抗性について検討した。第3章では、効率良いプロトプラスト培養系を用

いてナス栽培品種「千両二号」と台木品種「カレヘン」の体細胞雑種の作出を試みた。第4章では、体細胞雑種「ナクロス」とその後代の特性を調べるために、穂木の収量と青枯病抵抗性について検討した。

第1章 ナスの栽培品種と台木品種におけるプロトプラスト培養系の確立

バイオテクノロジーを用いて青枯病抵抗性の穂木や台木を育成する場合、細胞選抜や細胞融合の手法が考えられる。しかし、これらの手法を用いるには安定した培養系、特にプロトプラストからの効率よい再分化系を確立する必要がある。ナス科植物の培養については、Bhatt *et al.* (1981)、Jia *et al.* (1981)、Saxena *et al.* (1981)、Gleddie *et al.* (1986a)、Guri *et al.* (1984) および Nishio *et al.* (1987) の報告があるが、ほとんどが1栽培種についての研究である。そこで、ナスの栽培品種と台木品種において、それら品種の葉肉プロトプラストからの最適培養条件を解明するために、プロトプラスト単離条件、コロニー形成率に及ぼすプロトプラスト培養における培地の種類と細胞密度および再分化条件について検討した。特に、青枯病抵抗性育種素材として有望な「カレヘン」についてはこれまでに培養の事例がなく、安定した培養系を確立すれば、今後育種素材として用いることが可能になると考えた。

第1節 材料および方法

1. 供試材料

栽培品種の「千両二号」(*Solanum melongena* cv. Senryou II) と、台木品種の「カレヘン」(*S. sanitwongsei*)、「トルバム・ビガー」(*S. torvum*)、「ヒラナス」(*S. integrifolium*) および「耐病 VF」(*S. spp.* cv. Taibyou VF) を供試材料として用いた。「千両二号」は日本で広く用いられている栽培品種で果実は卵型をしている。「カレヘン」は高度青枯病抵抗性を有しており、茎にトゲが無い。「トルバム・ビガー」も青枯病には抵抗性を有するが、茎にトゲがあり、接ぎ木時に問題となっている。「ヒラナス」は接ぎ木をした穂木の生育を旺盛にさせる特徴があり、台木として最も多く用いられているが、青枯

病に対してはほとんど抵抗性を示さない。「耐病 VF」は半身萎凋病に強いが、青枯病には抵抗性を示さない。これらの種子を 100 ppm ジベレリンに 1 日浸漬した後、80%アルコールに数秒浸漬し、1%次亜塩素酸ナトリウムで 30 分間殺菌処理を施した。さらに、滅菌水で 3 回洗浄した後、1/2 MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) に播種し、25°C、16 時間照明下で 2~3 週間育成した幼苗を実験に供試した、

2. プロトプラスト単離条件

無菌的に育成した各品種の子葉を Xu *et al.* (1981) らが用いた CPW 塩 (27.2 mg/ℓ KH_2PO_4 、101 mg/ℓ KNO_3 、1,480 mg/ℓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、246 mg/ℓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.16 mg/ℓ KI 、0.025 mg/ℓ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) を含む 0.5 M マニトール (pH5.8) 中で約 1 mm 幅に刻み、酵素液に浸漬して、3 時間振盪 (80 rpm) または 16 時間静置処理を行った。用いた酵素液は、0.3%、0.5%、1%および 2% セルラーゼ R10 (ヤクルト) と 0.06%、0.1%、0.2%および 0.4% マセロザイム R10 (ヤクルト) を組み合わせた CPW 塩と 10 mM MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid) を含む 0.5 M マニトール液 (pH5.8) で、酵素処理は 25°C、暗黒下で行った。各酵素処理区におけるプロトプラストの活性状態を検鏡して、その収量をトーマの血球計算盤で調査した。

3. プロトプラスト培養における培地の種類と細胞密度の検討

単離されたプロトプラストは、ナイロンメッシュ (50 μm) で濾過した後、W5 液 (Menczel *et al.* 1981) で 3 回遠心分離 (100×g、3 分間) によって洗浄し、 $10^4 \sim 10^5$ 個/ℓ の細胞密度に調整後、培養実験に供試した。プロトプラストの培養には、2,4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 0.5 mg/ℓ、ナフタレン酢酸 (NAA) 1 mg/ℓ、カイネチン (KIN) 1 mg/ℓ および 0.5 M マニトール液 (10 mM MES、pH5.8) を含む 1/2 MS 培地 (ただし、プロトプラスト培養時のみ NH_4NO_3 は 200 mg/ℓ に改変)、KM (8P) 培地 (Kao and Michayluk 1975) および CL 培地 (Bidney *et al.* 1983) の 3 種類の培地を用いた。KM (8P) 培地は有機物を多量に含んで非常に栄養分に富んでおり、CL 培地はアンモニア態窒素を含んでいないことをそれぞれ特徴とした培地である。培養 7 日毎に、オーキシンと浸透圧調節剤を含まない培地を等量添加した。培養は 7 日目までは 25°C、暗黒下で行い、それ以後は 25°C、500 lux 条件下で行った。コロニ

一形成に及ぼすプロトプラスト培養における培地の種類および細胞密度の違いの影響をみるために、培養 14 日目に各試験区におけるコロニー形成率(plating efficiency)を調査した。

4. 再分化条件

上記培地で約 1 mm 程度に生育したコロニーを、0.3%ゲルライトを含むカルスグリーン化培地 (C 培地, Shepard and Totten 1977) に移植した。なお、このカルスグリーン化培地は、バレイショのプロトプラスト由来カルスを生育促進させるのに有効であった培地である。2 週間後にグリーン化した小カルスを、さらにインドール酢酸 (IAA) 0.2 mg/ℓ とゼアチン (Zeatin)、2-イソペンチルアデニン (2ip)、6-ベンジルアミノプリン (BA) および KIN を各々 1、3 および 5 mg/ℓ 組み合わせた MS 培地に置床し、25°C、3,000 lux および 16 時間照明下で培養して茎葉分化を図った。さらに、完全な植物体を得るために、分化した茎葉を発根培地 (1/2 MS 培地) へ移植した。

第 2 節 結 果

1. 最適プロトプラスト単離条件

プロトプラストの単離における最適条件を品種ごとに検討したところ (Table 1-1)、「カレヘン」、「ヒラナス」および「耐病 VF」では、低濃度の酵素 (セルラーゼおよびマセロザイム) で 16 時間静置処理した方が、高濃度で 3 時間振盪処理するよりもプロトプラストの収量、状態とも良かった。一方、「トルバム・ビガー」では、短時間振盪処理した方がプロトプラストの状態が良く、他の供試材料と比較して収量も多かった。また、千両二号は酵素濃度や処理方法に係わらずプロトプラストの状態は良好であった。

2. コロニー形成率に及ぼすプロトプラスト培養における培地の種類と細胞密度の影響

5 品種について、コロニー形成率に及ぼすプロトプラスト培養における培地の種類の影響を調査したところ (Table 1-2)、「カレヘン」のプロトプラストは、KM(8p)および 1/2 MS 培地で培養すると、培養 3 日目から分裂を開始し、10 日目には 10 細胞以上のコロニーを形成した。コロニー形成率は KM(8p)培地で

48.7%と高い値を示し、1/2 MS 培地では27.8%であった。「ヒラナス」、「トルバム・ビガー」および「耐病 VF」では、KM(8p)培地と1/2 MS 培地において培養3~5日目で細胞分裂を開始しコロニーを形成したが、「カレヘン」と比較して形成率は低かった。栽培品種の「千両二号」では、KM(8p)培地で6.4%のコロニー形成率を示したのに対して、1/2 MS 培地では第一分裂で停止してコロニー形成には至らず褐変枯死した。CL 培地で培養した場合、すべての供試材料のプロトプラストにおいて細胞分裂さえ観察されなかった。

細胞密度とコロニー形成率との関係を調べたところ (Fig. 1-1)、「カレヘン」、「耐病 VF」、「ヒラナス」および「トルバム・ビガー」では 5×10^4 個/mlの細胞密度で、「千両二号」では 10^5 個/mlの細胞密度でそれぞれ最高のコロニー形成率を示した。特に、「カレヘン」では 5×10^4 個/mlの細胞密度で培養すると、48.7%という高いコロニー形成率を示した。

3. 最適再分化培地

カルスからの茎葉分化に及ぼすサイカイニンの種類と濃度について調査した結果 (Table 1-3)、IAA 0.2 mg/lと Zeatin 1 ~ 5 mg/lを含む MS 培地において、すべての供試材料で茎葉分化が認められた。特に、IAA 0.2 mg/lと Zeatin 5 mg/lを添加した培地において、「カレヘン」は48.6%、「ヒラナス」は53.3%と高い再分化率を示した。一方、「千両二号」の再分化には KIN が有効であった。

Fig. 1-2に、「カレヘン」のプロトプラストを KM(8p)培地により細胞密度 5×10^4 個/mlで培養し、得られたカルスを IAA 0.2 mg/lと Zeatin 5 mg/lを添加した MS 培地で再分化させ、次いで発根培地 (1/2 MS 培地) で完全な植物体に生育させた状態を示した。

Table. 1-1. Effect of enzyme treatment on protoplast yield and activity.

<i>Solanum</i> spp.	Cellulase (%)	Macerozyme (%)	Time (h)	Method	Yield ¹⁾	Activity
<i>S. sanitwongsei</i>	0.3	0.06	16	no shaking	3.0	+++ ²⁾
	0.5	0.1	16	no shaking	3.2	+++
	1.0	0.2	3	shaking	1.2	++
	2.0	0.4	3	shaking	2.0	++
<i>S. integrifolium</i>	0.3	0.06	16	no shaking	2.2	+++
	0.5	0.1	16	no shaking	2.7	+++
	1.0	0.2	3	shaking	0.9	+++
	2.0	0.4	3	shaking	1.4	++
<i>S. torvum</i>	0.3	0.06	16	no shaking	2.6	++
	0.5	0.1	16	no shaking	4.3	++
	1.0	0.2	3	shaking	4.9	+++
	2.0	0.4	3	shaking	6.1	+++
<i>S. spp.</i> cv. Taibyou VF	0.3	0.06	16	no shaking	2.3	+++
	0.5	0.1	16	no shaking	2.6	++
	1.0	0.2	3	shaking	1.3	+
	2.0	0.4	3	shaking	1.6	-
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	0.3	0.06	16	no shaking	2.5	+++
	0.5	0.1	16	no shaking	3.1	+++
	1.0	0.2	3	shaking	1.6	+++
	2.0	0.4	3	shaking	3.2	+++

1) $\times 10^6$ /g leaf

2) Score: -(negative), +(low), ++(high), +++(very high).

Table 1-2. Effect of three media on protoplast culture.

<i>Solanum</i> spp.	Medium	First division (days)	Plating efficiency (%)
<i>S. sanitwongsei</i>	KM(8p)	3	48.7
	1/2MS	3	27.8
	CL	-	0
<i>S. integrifolium</i>	KM(8p)	4	13.4
	1/2MS	4	15.5
	CL	-	0
<i>S. spp.</i> cv. Taibyou VF	KM(8p)	3	25.5
	1/2MS	3	18.0
	CL	-	0
<i>S. torvum</i>	KM(8p)	5	0.5
	1/2MS	5	2.1
	CL	-	0
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	KM(8p)	5	6.4
	1/2MS	5	0
	CL	-	0

The density of protoplasts was 5×10^4 /ml.

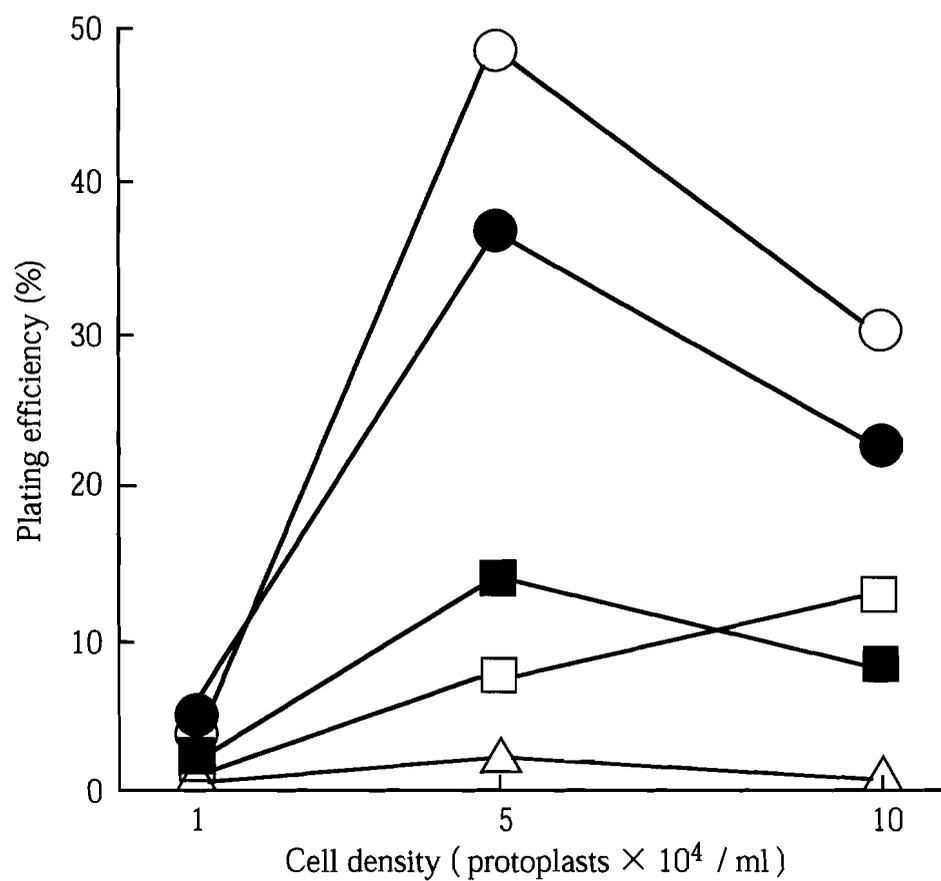


Fig. 1-1. Effect of cell density on protoplast culture. KM(8p) supplemented with 2,4-D 0.5 mg/l, kinetin 1 mg/l and NAA 1 mg/l was used.
 ○, *S. sanitwongsei*; ●, *S. spp. cv. Taibyou VF*; □, *S. melongena cv. Senryou II*; ■, *S. integrifolium*; △, *S. torvum*.

Table 1-3. Effect of cytokinin on shoot regeneration from protoplast derived calli (%).

<i>Solanum</i> spp.	Zeatin (mg/l)					2ip (mg/l)					BA (mg/l)					KIN (mg/l)				
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5		
<i>S. sanitwongsei</i>	28.8	46.3	48.6	1.4	8.6	5.7	7.1	0	2.9	0	13.3	3.3	0	2.9	0	13.3	3.3	3.3		
<i>S. integrifolium</i>	40.0	46.7	53.3	26.6	36.7	20.0	0	3.3	6.7	0	6.7	6.7	0	3.3	0	6.7	6.7	6.7		
<i>S. torvum</i>	3.3	10.0	6.7	0	6.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>S. spp.</i> cv. Taibyou VF	23.3	6.7	6.7	0	5.0	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3		
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	0	10.0	15.0	0	0	0	0	10.0	0	0	0	0	0	10.0	0	40.0	40.0	40.0		

MS medium supplemented with IAA 0.2 mg/l was used.

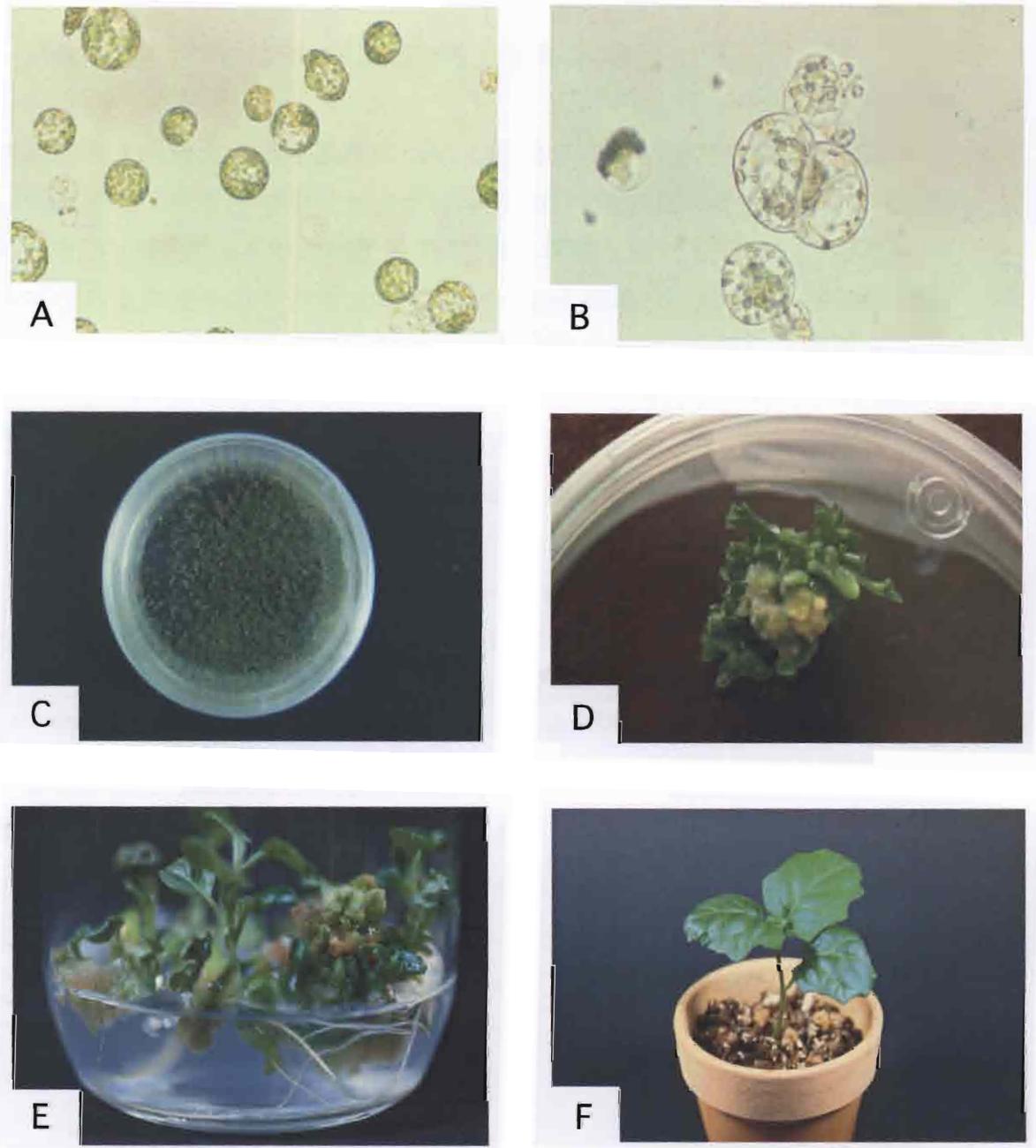


Fig. 1-2. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *S. sanitwongsei*.

A, mesophyll protoplasts; B, first division after 3 days of culture in KM (8p) medium; C, callus formation after 21 days of culture in KM(8p) medium ; D, shoot regeneration on MS medium supplemented with IAA 0.2 mg/ℓ and Zeatin 5 mg/ℓ ; E, root formation on 1/2 MS medium; F, acclimated plant.

第3節 考 察

ナス栽培種1品種と台木4品種について葉肉プロトプラスト培養を試みたところ、低濃度のセルラーゼとマセロザイムで16時間静置処理して得たプロトプラストを 5×10^4 個/mlの細胞密度でKM(8p)培地を用いて培養し、得られたプロトプラスト由来小カルスをカルスグリーン化培地(C培地)、再分化培地(IAAとZeatinを含むMS培地)および発根培地(1/2MS培地)へ移植することによって、約3ヶ月で完全な植物体を得ることができた。ただし、コロニー形成率や茎葉の再分化率は、品種による差が大きかった。これは、Nishio *et al.* (1987) が報告しているように、同じ *Solanum* 属であっても遺伝的な差異がそれらに大きく影響した結果であると考えられるので、さらにそれぞれの品種に対する最適条件を検討する必要がある。しかし、本研究において、多くのナス属植物でプロトプラストからの再分化が可能であり、特に「トルバム・ビガー」を侵す青枯病菌にも抵抗性を示す台木品種「カレヘン」では、コロニー形成率が高く、IAAとZeatinを添加したMS培地で培養すると容易に再分化することが明らかにされたことから、今後の細胞選抜や細胞融合などによる細胞育種にこれらの品種や培養系が有効に利用できると思われる。

第2章 青枯病萎凋誘導物質による細胞選抜

ナス幼苗を用いた研究から、青枯病菌によって見られる萎凋症状に、青枯病菌から分泌する細胞外多糖が大きな役割を果たしていると考えられた（谷川ら1991）。そこで、ナス幼苗を萎凋させる青枯病培養液から抽出した細胞外多糖を青枯病萎凋誘導物質（以下本論文では萎凋誘導物質という）とした。本章では、種子発芽、胚軸カルスの生育、プロトプラストの生存、コロニー形成およびプロトプラスト由来小カルスに及ぼす萎凋誘導物質の影響を調べ、細胞選抜における萎凋誘導物質の有効性を検討した。

第1節 材料および方法

1. 供試材料

栽培品種の「千両二号」と、台木品種の「カレヘン」、「トルバム・ビガー」および「ヒラナス」を供試材料として用いた。

2. 萎凋誘導物質の抽出

萎凋誘導物質の抽出は、Gowda and Vittal (1980a) の方法を一部改変して以下のように行った。1987年に奈良県磯城郡田原本町の青枯病発生圃場の発病株から単離した青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) をTZC培地 (0.5% グルコース、0.5% サッカロース、1% ペプトン、0.1% カザミノ酸、pH7.0) で25℃、5日間振盪培養し、遠心分離 (10,000 rpm、10分間) した後、上澄み液からアルコール沈殿法によって沈殿物を得た。これをセロハンチューブを用いて水に一晩透析し、遠心分離した後、得られた上澄み液を凍結乾燥して萎凋誘導物質とした。なお、萎凋誘導物質は濾過滅菌した後培地に添加した。

3. 種子発芽試験

供試材料の種子を100 ppm ジベレリンに1日浸漬した後、80% エチルアルコールに数秒間浸漬し、次亜塩素酸ナトリウム (1% 有効塩素) 溶液で30分間殺菌処理を施した。さらに、滅菌水で3回洗浄した後、萎凋誘導物質 (0~2,000 ppm) を含んだ1/2 MS培地に各々50粒ずつ播種し、25℃、16時間照明下で培養した。なお、「カレヘン」と「トルバム・ビガー」は播種後21日目に、「ヒ

ラナス」と「千両二号」は14日目に発芽率を調査した。

4. 胚軸カルスの生育

無菌播種して育成した各植物体の胚軸切片を NAA 1 mg/ℓ と BA 1 mg/ℓ を含んだ MS 培地 (3% サッカロース、0.2% ゲルライト、pH5.8) に置床し、胚軸由来カルスを得た。このカルスを 2 mm 角の大きさに切り、萎凋誘導物質 (0~1,000 ppm) を含んだ上記と同じ MS 培地に置床した。各処理区におけるカルスの生育を培養 14 日目と 28 日目に調査し、生育指数 (無処理区を 100 としたときの値) を算出した。

5. プロトプラスト培養系における萎凋誘導物質処理

1) プロトプラストの生存に及ぼす影響

無菌播種して育成した各植物体の子葉を CPW 塩を含む 0.5 M マニトール液中で約 1 mm 幅に刻み、酵素液に浸漬し、25°C、暗黒下で 16 時間静置処理を行ってプロトプラストを単離した。なお、用いた酵素液は、0.3% セルラーゼ R-10、0.06% マセロザイム R-10、10 mM MES (pH5.8) および CPW 塩を含む 0.5 M マニトール液である。単離直後のプロトプラストに、萎凋誘導物質 (0~1,000 ppm) を添加し、これを培養した。培養開始後 4 時間後と 3 日後に最終濃度が 0.01% になるように二酢酸フルオレセイン (fluorescein diacetate: FDA) を加え、蛍光顕微鏡でプロトプラストの発色を観察した。黄色く発色したプロトプラストは生存しているものとし、プロトプラストの生存率を求めた。

2) コロニー形成に及ぼす影響

プロトプラスト培養において、培養直後の培地と培養 1 週間後の培地に萎凋誘導物質 (0~1,000 ppm) を添加して、2 週間後のコロニー形成率と 4 週間後のコロニー数を調査した。なお、プロトプラストの培養には、2,4-D 0.5 mg/ℓ、NAA 1 mg/ℓ、KIN 1 mg/ℓ、0.45 M グルコースおよび 10 mM MES (pH5.8) を含む KM(8p) 培地を用い、 5×10^4 個/mℓ の細胞密度で培養した。培養は 7 日目までは 25°C、暗黒下で行い、それ以後は 25°C、500 lux 条件下で行った。

3) プロトプラスト由来小カルスの生育

「カレヘン」については、プロトプラスト由来小カルス (白色、1 mm) を萎凋誘導物質 (0~1,000 ppm) を添加したカルスグリーン化培地 (C 培地) で 10 日間培養し、カルスの生育を調査した。その後、それらのカルスすべてを IAA 0.2

mg/ℓ と Zeatin 3 mg/ℓ を含む MS 培地（再分化培地）に移植して、20 日後と 30 日後にカルスの生育を調査した。なお、再分化培地には萎凋誘導物質を加えなかった。

6. プロトプラスト由来「カレヘン」の青枯病抵抗性検定

青枯病抵抗性個体を選抜するため、Table 1-4 に示したように、「カレヘン」のプロトプラストおよびそれに由来する小カルスを萎凋誘導物質を含む培地で培養し、植物体を再分化させた。この表において、個体群 I は、カルスグリーン化培地（C 培地）へ 500 ppm の萎凋誘導物質を加えて培養した後に再分化したものである。また、個体群 II は、プロトプラスト培養開始直後の培地および C 培地へ、それぞれ 1,000 ppm および 100 ppm の萎凋誘導物質を加えて培養した後に再分化したものである。個体群 I と II の植物体を順化し、「千両二号」を穂木として接ぎ木をした。それらの苗を 1990 年 6 月 4 日に青枯病汚染圃場に定植し、10 月 1 日に枯死株を調査した。

Table 1-4. The treatment period and concentration of wilt-inducing substances on protoplast culture of *Solanum sanitwongsei*.

The group of plants	Treatment of wilt-inducing substances (ppm)	
	In protoplast culture	In callus culture on the C medium
I	-	500
II	1,000	100

第 2 節 結 果

1. 萎凋誘導物質が種子発芽に及ぼす影響

萎凋誘導物質 1,000 ppm 以下の処理区では、「千両二号」以外の供試材料において 90%以上の発芽率を示し、萎凋誘導物質が種子発芽に及ぼす影響はほとんど認められなかった。「千両二号」では 1,000 ppm 処理区で発芽率は 76%と低かった。2,000 ppm 処理区における発芽率は、「カレヘン」は 56%、「千両二号」は 64%で萎凋誘導物質によって種子発芽が抑制された (Table 1-5)。

2. 萎凋誘導物質が胚軸カルスの生育に及ぼす影響

Fig. 1-3 に 4 品種の胚軸カルスの生育に及ぼす萎凋誘導物質の影響を示した。10 ppm と 100 ppm の処理区では、「トルバム・ビガー」以外の供試材料においてカルス生育指数は 90 以上となり、萎凋誘導物質の影響は認められなかった。1,000 ppm 処理区における培養 28 日目の生育指数は、「カレヘン」(91.2)、「ヒラナス」(86.7)、「千両二号」(71.9)、「トルバム・ビガー」(55.5)の順に低くなっていた。また、1,000 ppm 処理区は、10 ppm と 100 ppm 処理区とは異なって、すべての供試材料において培養 28 日目のカルス生育指数が培養 14 日目の値より小さく、培養期間を長くすることによって萎凋誘導物質の影響が顕著になった。

3. 萎凋誘導物質がプロトプラスト培養系に及ぼす影響

FDA 活性を指標としてプロトプラストの生存率を調べた結果 (Fig. 1-4)、培養開始後 4 時間目ではいずれの供試材料においても萎凋誘導物質の影響は認められなかった。一方、萎凋誘導物質存在下で 3 日間培養すると、100 ppm 処理区で「ヒラナス」と「千両二号」の、また 1,000 ppm 処理区で「トルバム・ビガー」のプロトプラスト生存率が低下し、萎凋誘導物質の影響が認められた。

プロトプラストからコロニー形成への影響を調べたところ (Table 1-6)、「カレヘン」において、萎凋誘導物質はプロトプラスト培養 2 週間後のコロニー形成率と 4 週間後のコロニー形成数に全く影響を与えなかった。一方、「ヒラナス」のプロトプラスト培養においては、培養 1 週間後に萎凋誘導物質を 100 ppm 添加した区で、コントロールと同様のコロニー形成を示したのに対して、培養直後に 100 ppm 添加した区ではコロニー形成率は非常に低く (0.11%)、4 週間後のコロニー数も 1 シャーレあたり平均 60 個であった。なお、1,000 ppm 添加区では、4 週間後にコロニーは認められなかった。また、「千両二号」のプロトプラストに対する萎凋誘導物質の影響は「ヒラナス」と同じ傾向であった。

上記のように、「カレヘン」は、コロニー形成までは萎凋誘導物質の影響を受けなかったが、それ以降の培養段階で萎凋誘導物質の影響を受けるか否かを明らかにするために、萎凋誘導物質を添加したカルスグリーン化培地 (C 培地) で生育を調べた (Table 1-7)。その結果、処理濃度に係わらずプロトプラスト由来小カルスの生育は抑制され、すべてのカルスが褐変した。また、萎凋誘導

物質の添加濃度が高い程カルスの生育抑制程度が大きかった。さらに、再分化培地へ移植すると、褐変化したカルスの半数以上は緑色化したが、C培地への萎凋誘導物質の添加濃度が高い程、再分化培地で緑色化するカルスの割合は低く、カルスの生育も抑制された。

4. プロトプラスト由来「カレヘン」の青枯病菌汚染圃場での検定

「カレヘン」のプロトプラストおよびそれに由来する小カルスの培養培地に萎凋誘導物質を加えて培養し、再分化した個体の抵抗性を1990年10月1日に青枯病菌汚染圃場で検定した。その結果をTable 1-8に示す。「カレヘン」の実生苗に接いだ穂木が100%枯死したのに対し、C培地に500 ppmの萎凋誘導物質を加えて培養した後に得られた個体群 I における穂木の枯死株率は20%であり、また、プロトプラスト培養直後とC培地に萎凋誘導物質をそれぞれ1,000 ppmと100 ppm加えて培養した後に得られた個体群 II における穂木の枯死株率は12.5%であった。いずれの方法でも萎凋誘導物質を処理すれば、青枯病抵抗性個体を得られることがわかった。また、プロトプラスト培養培地とC培地の両方に処理した場合の方が、C培地のみに処理した場合より抵抗性個体をやや高頻度で得られる傾向にあった。なお、「カレヘン」の実生苗に接いだ穂木が100%枯死したのは、用いた青枯病菌汚染圃場の菌密度が非常に高かったためであると判断された。

Table 1-5. Effect of wilt-inducing substances on seed germination.

<i>Solanum</i> spp.	Treatment of wilt-inducing substances (ppm)				
	0	10	100	1,000	2,000
<i>S. sanitwongsei</i>	98	98	98	90	56
<i>S. torvum</i>	100	100	100	98	96
<i>S. integrifolium</i>	100	100	98	98	88
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	92	80	80	76	64

The numerical value shows the rate of germination.

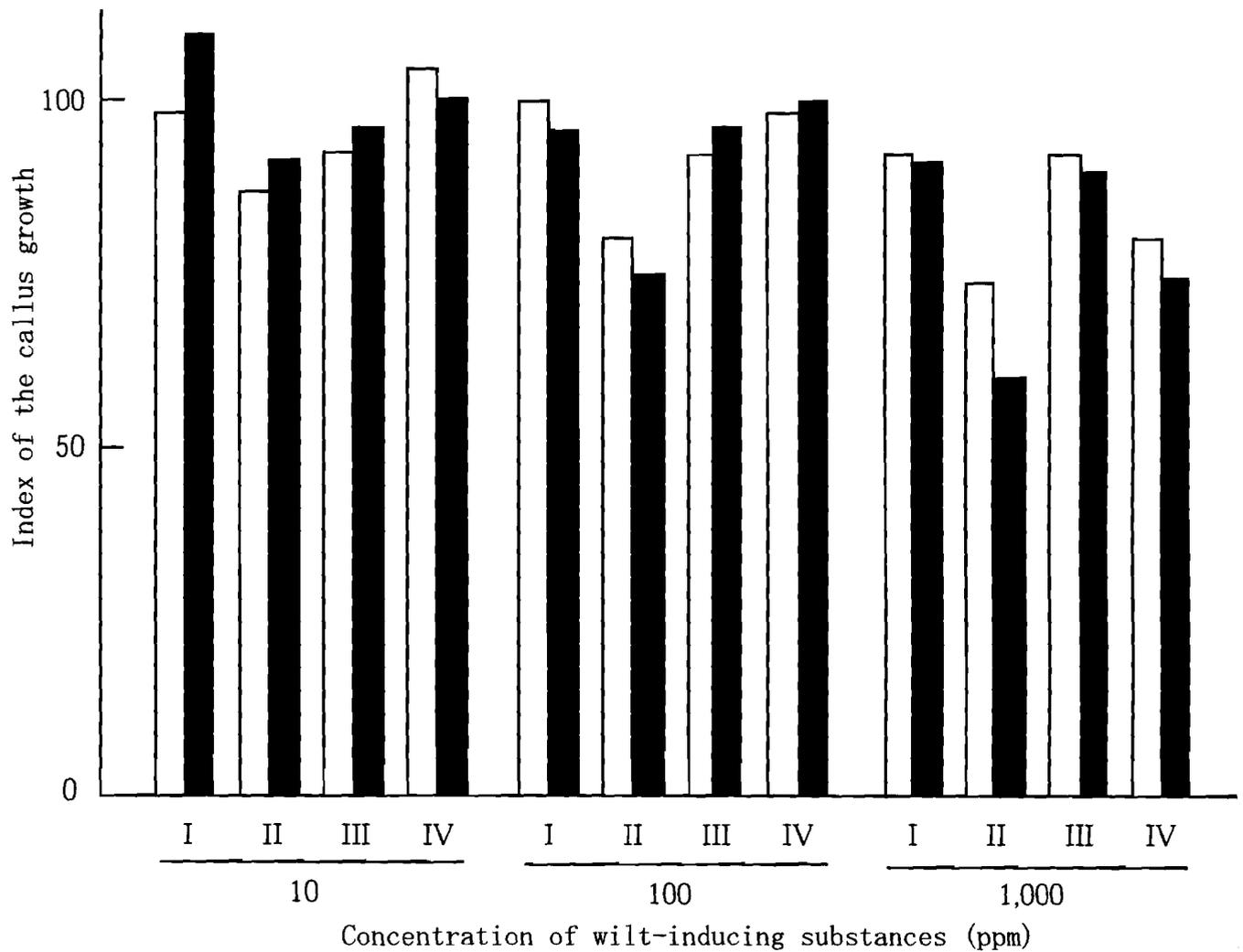


Fig. 1-3. Effect of wilt-inducing substances on hypocotyl calli. I, *S. sanitwongsei*; II, *S. torvum*; III, *S. integrifolium*; IV, *S. melongena* cv. Senryou II. □, 14 days after culture; ■, 28 days after culture. The callus growth index shows the relative value to the control (100).

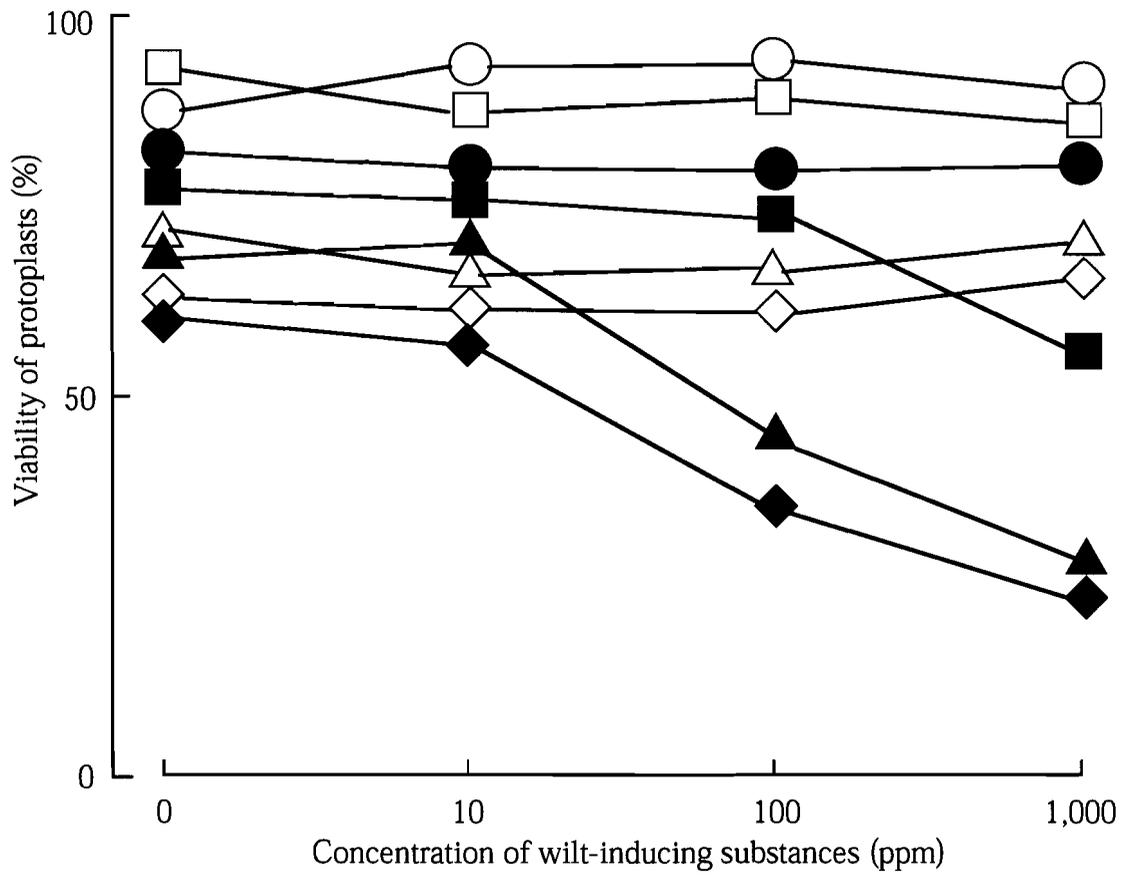


Fig. 1-4. Effect of wilt-inducing substances on viability of protoplasts. ○●, *S. sanitwongsei*; □■, *S. torvum*; △▲, *S. integrifolium*; ◇◆, *S. melongena* cv. Senryou II. ○□△◇, protoplasts viability after the culture of 4 hours; ●■▲◆, protoplasts viability after the culture of 3 days.

Table 1-6. Effect of wilt-inducing substances on protoplast culture.

Treatment of wilt-inducing substances (ppm)	Plating efficiency after 2 weeks (%)			No. of colonies per plate after 4 weeks		
	S. <i>sanitwongsei integrifolium</i>	S. <i>melongena</i> cv. Senryou II	S. <i>sanitwongsei integrifolium</i> cv. Senryou II	S. <i>sanitwongsei integrifolium</i>	S. <i>melongena</i>	S. <i>melongena</i> cv. Senryou II
Just after beginning of culture	After one week					
0	0	40.55	6.73	0.56	500 <	500 < 90
	100	35.42	6.41	0.24	500 <	500 < 72
	1,000	37.80	0.35	0.00	500 <	0 0
100	0	35.05	0.11	0.05	500 <	60 43
	100	39.40	0.03	0.02	500 <	16 3
	1,000	34.07	0.00	0.00	500 <	0 0
1,000	0	37.20	0.01	0.01	500 <	0 1
	100	35.68	0.00	0.00	500 <	0 0
	1,000	36.63	0.00	0.00	500 <	0 0

Table 1-7. Effect of wilt-inducing substances on protoplast derived calli of *Solanum sanitwongsei*.

Treatment of wilt-inducing substances (ppm)	No. of calli examined	Calli on the C medium after 10days				Calli on the regeneration medium after 20 days		Calli on the regeneration medium after 30 days	
		No. of green calli	size (mm)	No. of green calli	size (mm)	No. of green calli	size (mm)	No. of green calli	size (mm)
0	20	20	1.5	20	6.2	20	6.2	20	8.7
10	20	0	1.3	14	2.4	14	2.4	19	5.3
100	20	0	1.4	6	1.4	6	1.4	15	4.2
1,000	20	0	1.2	2	1.4	2	1.4	12	3.0

Table 1-8. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in protoplast derived regenerants of *Solanum sanitwongsei*.

Plant	No. of plants examined	No. of dead plants
Rootstock ¹⁾		
<i>S. sanitwongsei</i>	10	10 (100.0) ²⁾
I ³⁾	5	1 (20.0)
II ⁴⁾	8	1 (12.5)
Seedling without grafting		
<i>S. sanitwongsei</i>	5	0 (0)
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	5	5 (100.0)

1) *S. melongena* cv. Senryou II was grafted on each rootstock.

2) The values within parentheses indicate the percentages of dead plants.

3), 4) See Table 1-4.

第3節 考 察

病原菌が産出する宿主特異的毒素を用いたり、毒素が同定できない場合病原菌の培養濾液を用いて、細胞を選抜し耐病性個体を育成することについては幾つかの報告がある (Husain and Kelman 1958a, Monika 1980)。

ナス青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) については、特定の毒素が関与しているかどうかわかっていないが、青枯病菌が生産する EPS あるいは酵素によって作物の組織が破壊されるとの報告がある (Husain and Kelman 1958b, Schell 1987)。著者らも青枯病菌の培養濾液から抽出したアミノ酸、ガラクトサミンおよび N-アセチルガラクトサミンなどで構成される萎凋誘導物質が、ナス幼苗を萎凋させることを明らかにしており (谷川ら 1991)、今回、この萎凋誘導物質がナスの種子および培養系での選択圧として有効であるかを検討した。青枯病菌の粗毒素 (10 mg/ml) が *S. melongena* の種子発芽を遅延させた報告 (Gowda and Vittal 1980a) があるように、本実験でも 2,000 ppm の萎凋誘導物質処理が「千両二号」と「カレヘン」の種子発芽を抑制した。また、萎凋誘導物質を含んだ培地において「トルバム・ビガー」の胚軸カルスの生育は抑制された。しかし、圃場レベルで青枯病に抵抗性を示す品種が必ずしも萎凋誘導物質に対して耐性を示さなかったことから、種子発芽と胚軸カルス培養時への萎凋誘導物質の添加は青枯病抵抗性個体を選抜するための指標にはならないと考えられる。そこで、プロトプラスト培養系に対する萎凋誘導物質の影響を調べた。その結果、すべての供試材料において、萎凋誘導物質をプロトプラスト培養時に処理した場合、培養開始 4 時間後の生存には影響を与えなかったが、3 日後には「ヒラナス」と「千両二号」で生存率が著しく低下した (Fig. 1-4)。さらに、「ヒラナス」と「千両二号」では、プロトプラスト培養直後に萎凋誘導物質を添加して培養した場合と、培養 1 週間後に添加した場合とでは、前者のコロニー形成が顕著に劣った (Table 1-6)。このことから、萎凋誘導物質はプロトプラストの細胞膜に強くアタックして死に至らしめるような物質ではないが、萎凋誘導物質存在下で長期間培養するとその影響が現れ、コロニー形成率を顕著に抑制するものであると考えられる。一方、「カレヘン」では、萎凋誘導物質存在下でプロトプラストを培養した場合、プロトプラストからのコロニー形成に萎凋誘導物質の影響をほとんど受けなかったが、プロトプラスト由来小カルスは敏感に反応して褐変化し、生育も抑制された。しかし、再分化培地へ移

植することによって褐変化したカルスは緑色化した (Table 1-7)。それらの緑色化したカルスからは、第1章で明らかにしたように高頻度で再分化する能力があると思われる。

「カレヘン」のプロトプラスト培養において、プロトプラスト培養直後の培地とカルスグリーン化培地 (C 培地) に萎凋誘導物質を加え、再分化した個体を台木とし、「千両二号」を接ぎ木して青枯病抵抗性を検定したところ、実生「カレヘン」を台木にした株よりも高度の抵抗性を示した。このことから、この萎凋誘導物質を用いた細胞選抜システムは青枯病抵抗性個体を作成するのに有効であると考えられる。しかし、萎凋誘導物質に対する感受性は、供試材料や処理する細胞の培養時期によって異なることから、細胞選抜時にはそれらを考慮する必要があるだろう。

第3章 ナス栽培品種「千両二号」と台木品種「カレヘン」の体細胞雑種の作出

青枯病に対して高度抵抗性を有する「カレヘン」は、低温伸長性が悪いため、青枯病抵抗性台木としての普及が妨げられている。第2章において、青枯病抵抗性個体を作成するのに、プロトプラスト培養直後の培地とカルスグリーン化培地（C 培地）の両方へ萎凋誘導物質を添加することが有効であることが判明した（浅尾ら 1992）。さらに、プロトプラスト培養直後の培地に 1,000 ppm の萎凋誘導物質を添加すると「千両二号」のプロトプラストはほとんど分裂しないことから、この萎凋誘導物質を添加することにより、抵抗性を有する融合細胞を効率よく選抜できると考えられた。そこで本章では、高度青枯病抵抗性を保持し、かつ低温伸長性の良好な台木品種を作成するために、「カレヘン」と「千両二号」との細胞融合を行い、融合細胞の培養時およびこれに由来する小カルスの培養時に萎凋誘導物質を添加して植物体を再分化させ、得られた体細胞雑種の遺伝特性と生育特性について調査した。

第1節 材料および方法

1. プロトプラストの単離

無菌播種して育成した栽培品種「千両二号」と台木品種「カレヘン」の子葉から、第1章で明らかにした最適条件を用いて以下のようにプロトプラストの単離と調整を行った。すなわち、CPW 塩を含む 0.5 M マニトール液中で子葉を約 1 mm 幅に刻み、酵素液に浸漬し、25°C、暗黒下で 16 時間静置処理を行った。用いた酵素液は、0.3%セルラーゼオノズカ R-10、0.06%マセロザイム R-10、10 mM MES (pH5.8) および CPW 塩を含む 0.5 M マニトール液とした。単離されたプロトプラストは、ナイロンメッシュ (50 μ m) で濾過した後、W5 液で 3 回遠心分離 (100 \times g、3 分間) によって洗浄し、 5×10^4 個/ $m\ell$ の細胞密度に調整後、培養実験に供試した。

2. プロトプラスト融合と培養

「千両二号」と「カレヘン」のプロトプラストを 5:1 の比率で混合した懸濁液 1 $m\ell$ をシャーレ (15 mm \times 60 mm) に入れ、その中に電極 (島津 FTC33 D5)

を設置した。200 V/cm、1 Mhz の交流を 30 秒間流してパールチェーンを作った後、0.75 KV/cm の直流を 20 μ 秒 2 回流してプロトプラストを融合させた。

融合直後に培養液 1 ml をゆっくりと添加した。培養には、2,4-D 0.5 mg/l、NAA 1 mg/l、KIN 1 mg/l、第 2 章で用いた 1,000 ppm の萎凋誘導物質、0.45 M グルコースおよび 10 mM MES (pH5.8) を含む KM(8p)培地を用い、 5×10^4 個/ml の細胞密度で培養した。培養 7 日毎に、オーキシシンと浸透圧調節剤を含まない培地を等量添加した。培養は 7 日目までは 25°C、暗黒下で行い、それ以後は 25°C、500 lux 条件下で行った。約 1 mm 程度に生育したコロニーを 100 ppm の萎凋誘導物質を加えたカルスグリーン化培地 (C 培地) に移植し、2 週間後にグリーン化した小カルスを、IAA 0.2 mg/l と Zeatin 3 mg/l 添加した MS 培地 (再分化培地) に置床して、25°C、3,000 lux、16 時間照明下で培養した。なお、再分化培地に萎凋誘導物質は添加していない。

3. RAPD 解析

融合細胞から再分化した個体と両親間で DNA の多型を調べるため、葉から DNA を Edwards *et al.* (1991) の方法で抽出し、PC-700 (アステック) を用いて PCR (polymerase chain reaction) を行った。PCR は、94°C・30 秒保温の後、変性 94°C・30 秒、アニーリング 60°C・2 分および伸長反応 72°C・3 分を 45 サイクル反復した後、72°C・7 分保温の条件で行った。また、PCR 反応液は、10 mM Tris-HCl (pH8.9)、80 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、0.2 mM dATP、0.2 mM dGTP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dTTP、0.2 μ M primer (RA 12-17:5'-CGTCGGGGAGAA-3')、10 ng template DNA および 0.5 unit Tth DNA polymerase (東洋紡) を用いた。増幅産物は、1 μ g/l エチジウムブロミドを含む 1.5% アガロースゲルで電気泳動することにより分析した。

4. 体細胞雑種の特性調査

根端を室温で 2 時間 8-キノリン飽和溶液で前処理し、25°C で 1 時間固定液 (エチルアルコール:酢酸=3:1) に浸漬した後、37°C で 30 分間酵素液 (4% セルラーゼ RS、0.1% ペクトリアーゼ Y-23、75 mM EDTA、pH5.5) 処理を行った。水洗後、1% オルセインで染色して染色体を観察した。花粉活性は 2% アセトカーミンで染色して調査した。体細胞雑種は青枯病汚染圃場に定植して、青枯病に対して抵抗性を有する個体を選抜した。さらに、選抜した体細胞雑種

から栄養繁殖により増殖した個体を圃場で生育させて、葉、果実、花および種子についての特性を調査した。調査は、両親および体細胞雑種のいずれも5個体を用いて行った。

第2節 結 果

1. プロトプラスト融合細胞からの再分化

「千両二号」と「カレヘン」とのプロトプラスト融合細胞 (Fig. 1-5, A) は、培養4日後に分裂を開始し、2週間後にはコロニーを形成した (Fig. 1-5, B)。培養6週間後に、形成された小さなカルスを再分化培地に移植すると、2~3週間後には緑色シュートが再分化した (Fig. 1-5, C)。融合処理して得られた120個体のうち8個体 (6.7%) が形態上、体細胞雑種と判定された。これら体細胞雑種と考えられる個体を青枯病汚染圃場に定植した結果、1個体が青枯病に対して高度な抵抗性を示した。

2. 体細胞雑種の特性

両親および青枯病抵抗性を示す体細胞雑種からの栄養繁殖個体の特性をTable 1-9にまとめた。体細胞雑種の草型 (Fig. 1-6, A)、葉形 (Fig. 1-6, B)、花の大きさと色 (Fig. 1-6, C) および果実の形と色 (Fig. 1-6, D) はいずれも両親の中間を示した。特に、体細胞雑種の果実は未熟な時は「千両二号」と同様の黒色であるが、熟すると「カレヘン」と同様の橙色になった。花粉稔性は両親が90%以上であったのに対して、体細胞雑種はこれよりやや劣る82.3%であったが、正常に着果して種子も実った。体細胞雑種の染色体数は、両親の染色体をあわせ持つ48本 ($2n=4x$) であり (Fig. 1-7)、さらに、体細胞雑種の自殖第1代 (S1) の染色体数も48本であった。RA 12-17プライマーを用いたRAPD分析の結果、両親である「千両二号」と「カレヘン」は異なるバンドパターンを示し、体細胞雑種および体細胞雑種S1は両親のバンドをあわせ持っていた (Fig. 1-8)。

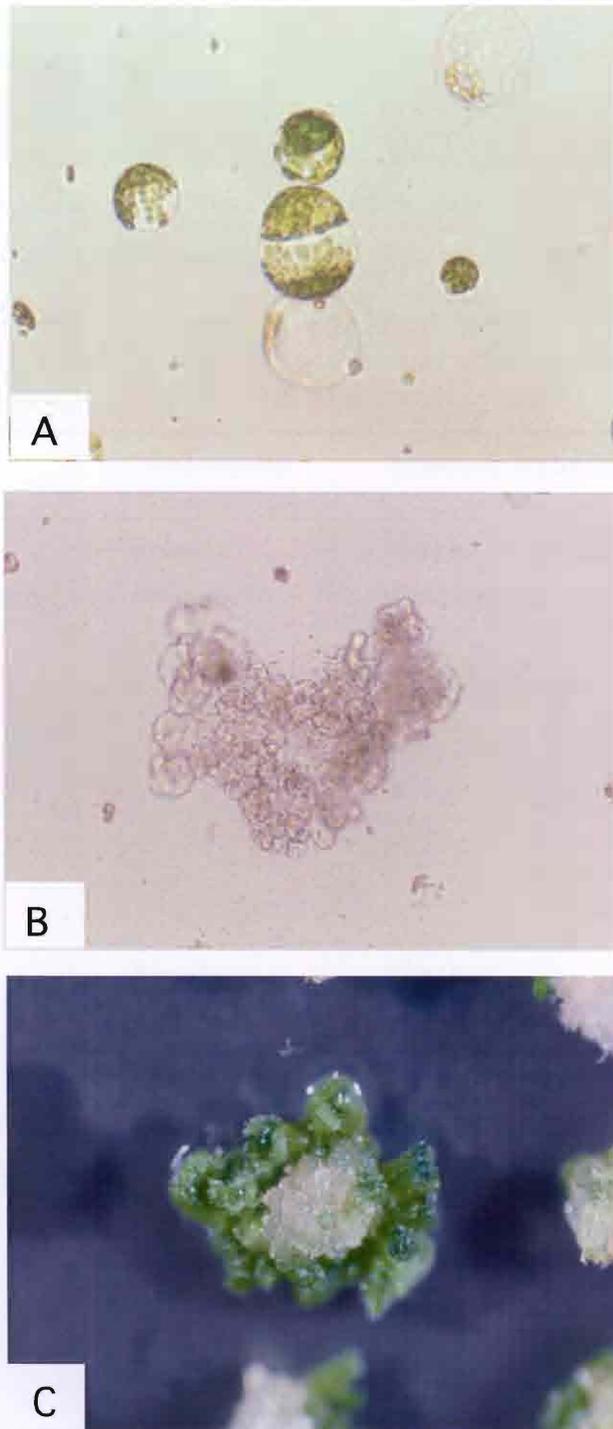


Fig. 1-5. The electrofusion and culture of protoplasts. A, electrofusion of protoplasts; B, colony formation after 2 weeks of culture; C, shoots regeneration after 8 weeks of culture.

Table 1-9. Morphological characteristics and chromosome numbers of the parental species and the somatic hybrid.

	<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	Somatic hybrid	<i>S. sanitwongsei</i>
Leaf shape	Lobed	Slightly divided	Deeply divided
Anthocyanin on stem	Present	Minimal amount	Absent
Flowering	Solitary flower	Cyme (4-7 flowers)	Cyme (4-7 flowers)
Flower diameter (cm)	5.0	4.2	2.6
Fruit size (cm)			
height	13.0	2.9	1.0
width	5.0	2.7	1.1
Fruit color			
immatured	Black	Black	Green
matured	Yellow	Orange	Orange
Seed number per fruit	300<	133	53
Pollen viability (%)	98.0	82.3	93.7
Chromosome number	24	48	24

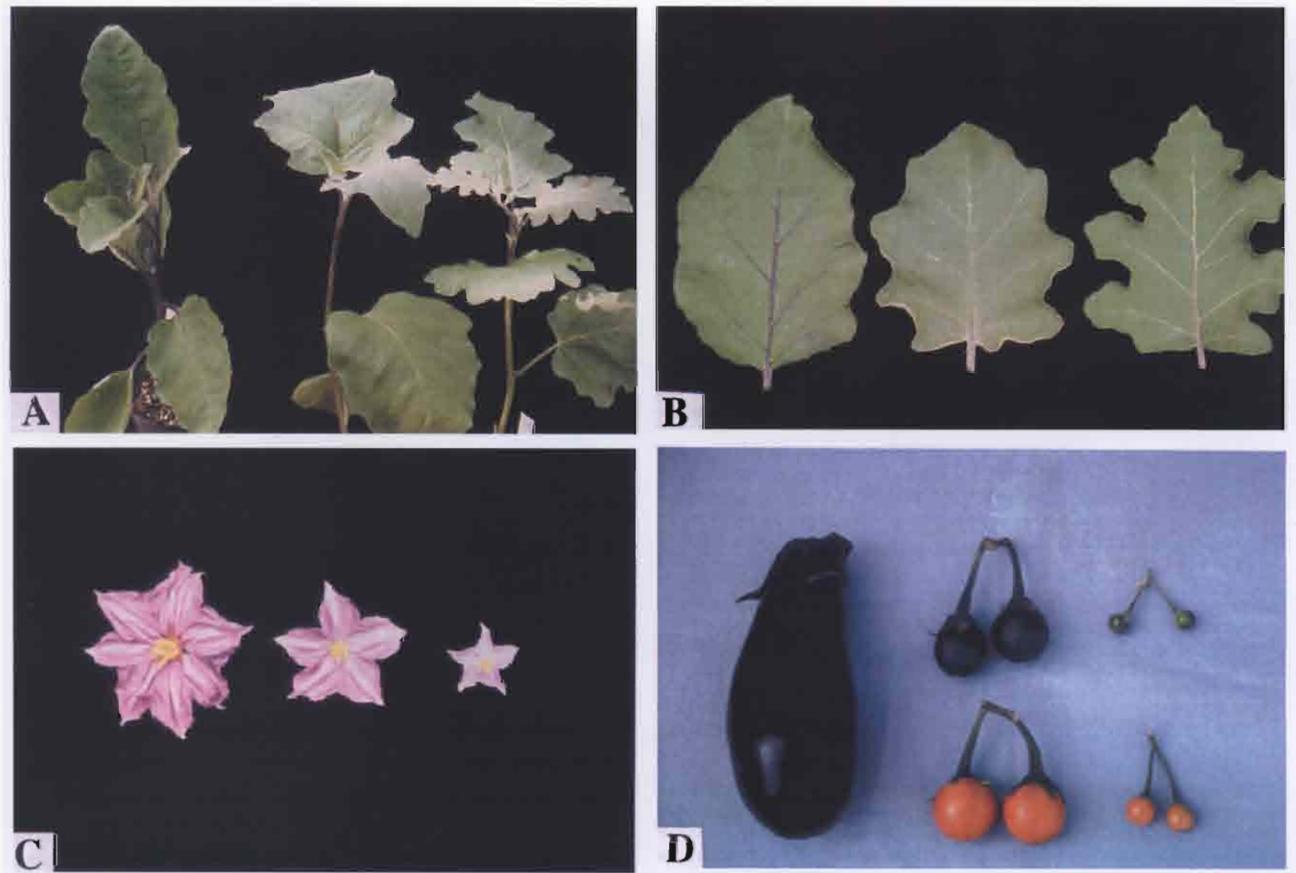


Fig. 1-6. Characteristics of plant morphology of *S. melongena* cv. Senryou II (left), the somatic hybrid (center) and *S. sanitwongsei* (right). A, plant morphology; B, leaf shape; C, flower shape; D, shape of immature fruit (upper) and mature fruit (lower).

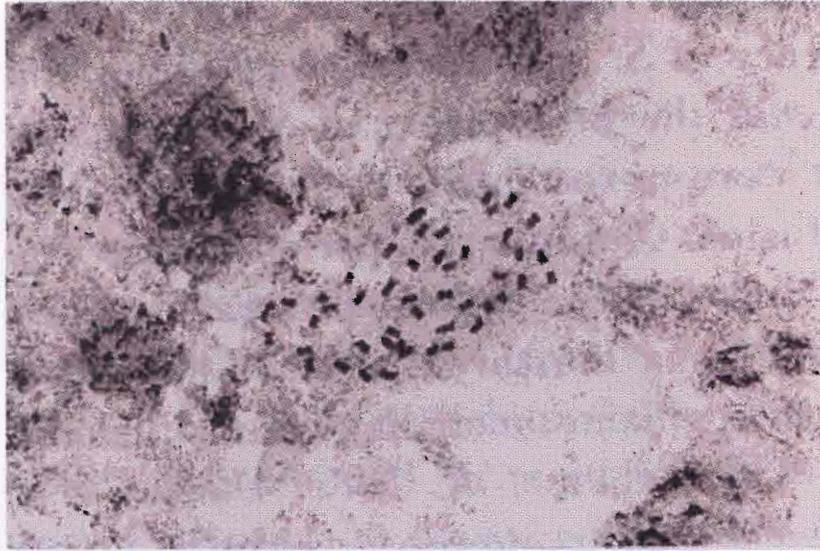


Fig. 1-7. Chromosomes in a root-tip cell of the somatic hybrid ($2n=48$).

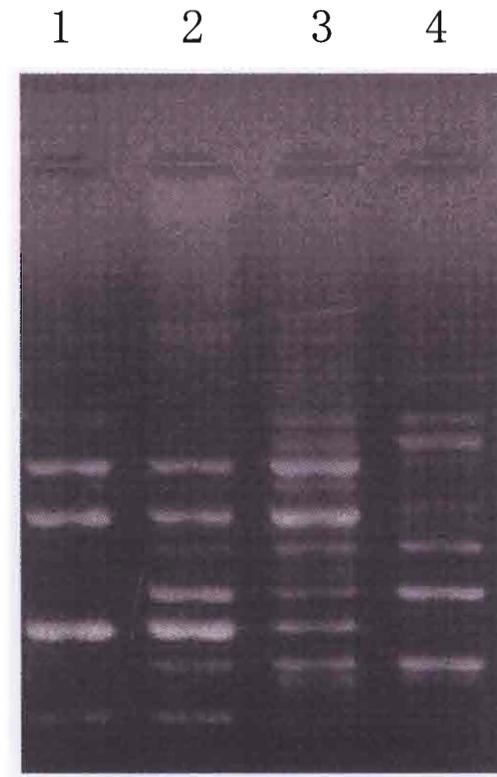


Fig. 1-8. Screening of somatic hybrids by RAPD markers. 1, *S. sanitwongsei*; 2, the somatic hybrid; 3, S1 plant; 4, *S. melongena* cv. Senryou II.

第3節 考 察

効率よく青枯病抵抗性を有する体細胞雑種を作出するために、1,000 ppmの萎凋誘導物質をプロトプラスト培養液に添加した。1,000 ppmの萎凋誘導物質の培地への添加によって「千両二号」のプロトプラストはほとんど分裂しないことから（浅尾ら 1992）、再分化個体は体細胞雑種であるか「カレヘン」のプロトプラストから由来したものであると考えられる。「カレヘン」のコロニー形成率は「千両二号」に比べて非常に高かったことから、「カレヘン」と「千両二号」の細胞融合時のプロトプラスト混合比を1:5にして融合処理を行った。同様な実験はGuri and Sink (1988a, 1988b)によっても報告されている。また、ナスの細胞融合に関しては、電氣的細胞融合 (Sihachakr *et al.* 1988, Sihachakr *et al.* 1989, Daunay *et al.* 1993)、ポリエチレングリコール処理法 (Gleddie *et al.* 1985, Gleddie *et al.* 1986b, Guri and Sink 1988a, Guri and Sink 1988b) およびデキストラン処理法 (Kameya *et al.* 1990) が報告されている。その中で、稔性ある細胞融合雑種の作出に成功しているのは、Kameya *et al.* (1990) の *S. melongena* と *S. integrifolium*、および Daunay *et al.* (1993) の *S. melongena* と *S. aethiopicum* であるが、その他の体細胞雑種は不稔性を示した。

予備試験で「千両二号」と「カレヘン」との交配を行ったところ、わずかに果実は得られたが、種子はすべてしいなであった。しかし、本研究で行った電氣的細胞融合によって得られた体細胞雑種のうち青枯病汚染圃場で生き残った1個体については、染色体数が両親の染色体をあわせ持った48本で、種子稔性は良好であった。また、その体細胞雑種自殖第1代の染色体数も48本で稔性も維持されていた。これらのことから青枯病に対する耐病性個体の育成においてこの体細胞雑種は有効であると考えられる。

第4章 体細胞雑種とその後代の特性

第3章で、「カレヘン」と「千両二号」との細胞融合を行って得た体細胞雑種において、草型、葉形、花および果実特性は両親の中間を示し、さらに両親の染色体をあわせ持っていることが判明した (Asao et al. 1994)。そこで本章では、この体細胞雑種が青枯病抵抗性台木として利用できるか否かを判定するため、体細胞雑種自殖第1代 (以下これを体細胞雑種 S1 という) の種子発芽率と胚軸径、接ぎ木した時の穂木の収量と青枯病抵抗性について検討した。

第1節 材料および方法

1. 体細胞雑種自殖第1代 (体細胞雑種 S1) の種子発芽率と胚軸径

「千両二号」と「カレヘン」の体細胞雑種を自殖し、得られた種子 (S1) を 100 mg/ℓ ジベレリンに1日間浸漬後、128穴セルトレイに1粒ずつ播種した。また、対照として、「千両二号」、「カレヘン」および「ヒラナス」を同様に播種した。20℃と25℃に設定した培養器 (5,000 lux) で生育させ、播種13日後に発芽率を、播種18日後に胚軸径を測定した。

2. 収量調査

体細胞雑種 S1、「カレヘン」および「ヒラナス」に「千両二号」を接ぎ木して、1993年5月10日に圃場へ畝間2 m、株間0.6 mで定植した。同年7月から10月までの収量を1区20株で2反復の実験区で調査した。

3. 青枯病抵抗性検定

体細胞雑種およびその自殖後代 (S1~S5) に「千両二号」を接ぎ木し、青枯病菌汚染圃場へ定植して、1992年から1997年までの6年間において青枯病に対する抵抗性を調査した。なお、対照として、「カレヘン」と「ヒラナス」に「千両二号」を接ぎ木した苗および「千両二号」自根苗を供試した。

第2節 結 果

1. 生育温度が種子発芽率と胚軸径に及ぼす影響

各品種の発芽率を調査した結果 (Table 1-10)、「カレヘン」の発芽率は、20℃におい 12.5%で、低温における発芽が非常に悪いのに対して、体細胞雑種 S1 の発芽率は、20℃において 71.3%で「カレヘン」と比較して良好な発芽が観察された。一方、「ヒラナス」と「千両二号」は温度にかかわらず高い発芽率 (80%以上) を示した。また、各品種の胚軸径を測定したところ (Table 1-10)、各温度設定区において、体細胞雑種 S1 の胚軸径は「ヒラナス」や「千両二号」と同じ程度であったが、「カレヘン」の胚軸径は他の 3 品種と比較して 30%~40%小さい値で有意に細かった。

2. 穂木「千両二号」の収量に及ぼす台木の影響

穂木である「千両二号」の収量に及ぼす台木の影響を調査した結果 (Fig. 1-9)、「カレヘン」台、体細胞雑種 S1 台、「ヒラナス」台の順に収量は高かったが、有意な差は認められなかった。体細胞雑種 S1 台の初期 (7 月) 収量は他の 2 品種を台木にした時と比較して良好であったが、後期 (10 月) の収量が少なくなった。

3. 体細胞雑種と体細胞雑種後代の青枯病抵抗性

1992 年から 1997 年の 6 年間、青枯病菌汚染圃場において青枯病抵抗性について検定した結果は Table 1-11 に示した通りである。「ヒラナス」に「千両二号」を接ぎ木した苗と「千両二号」自根苗は定植 45 日以内に 100%枯死したのに対して、「カレヘン」、体細胞雑種および体細胞雑種後代 (S1~S5) に「千両二号」を接ぎ木した苗の中には、青枯病に対して抵抗性を示すものが観察され、枯死してもその病徴の現る時期は遅延した。また、体細胞雑種台 (1992 年) と S1 台 (1993 年) は、「カレヘン」台と同程度の青枯病抵抗性を示したが、S2 台 (1994 年) から S5 台 (1997 年) は明らかに「カレヘン」台よりも強い青枯病抵抗性を示した。

Table 1-10. Effect of temperature on the seed germination and the diameter of the hypocotyl.

Plant	Germination ¹⁾ (%)		Diameter of the hypocotyl ²⁾ (mm)	
	20°C	25°C	20°C	25°C
S1 plant ³⁾	71.3	76.6	0.94±0.09	1.09±0.10
<i>S. sanitwongsei</i>	12.5	71.9	0.58±0.06	0.79±0.08
<i>S. integrifolium</i>	98.4	100.0	0.97±0.10	1.14±0.11
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	82.8	96.9	0.95±0.09	1.18±0.12

1) 13 days after seeding. Values are the percentages of germination from 256 seeds.

2) 18 days after seeding. Values are the means ±SD from fifty plants.

3) Offspring from the self-pollinated fertile hybrid plant.



Fig. 1-9. Fruit yield of *S. melongena* cv. Senryou II grafted on S1 plants, *S. sanitwongsei* and *S. integrifolium*.

Table 1-11. Resistance of eggplants on the soil contaminated with *Ralstonia solanacearum*.

Plant	Mortality (%) ⁴⁾					
	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Rootstock ¹⁾						
Somatic hybrids and its progeny ²⁾	22.2	12.5	29.2	21.4	43.8	37.5
<i>S. sanitwongsei</i>	22.2	12.5	58.3	57.1	77.8	81.2
<i>S. integrifolium</i>	100.0	81.3	100.0	100.0	100.0	100.0
Seedling without grafting ³⁾						
<i>S. melongena</i> cv. Senryou II	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

1) *S. melongena* cv. Senryou II was grafted on each rootstock.

2) 1992: somatic hybrid, 1993: S1 plants (offspring from the self-pollinated fertile hybrid plant), 1994: S2 plants, 1995: S3 plants, 1996: S4 plants, 1997: S5 plants.

3) Mortality was scored at 70 days after trasplanting.

第3節 考 察

奈良県農業技術センターで育成された「カレヘン」は高度青枯病抵抗性を示すが、他の台木と比較して低温時期の種子発芽や伸長が劣るという欠点を持っている。「カレヘン」を片親とする体細胞雑種はこの欠点を克服し、低温での発芽率は高く、その後の生育も良かった。さらに、胚軸径も生育旺盛な「ヒラナス」に若干劣るが、「カレヘン」と比較すると十分太く、接ぎ木作業は容易に行うことができた。また、体細胞雑種 S1 を台木とし、「千両二号」を穂木として接ぎ木したときの個体当たり収量は、「ヒラナス」および「カレヘン」を台木としたときと比較して遜色なかった。さらに、青枯病汚染土壌において、体細胞雑種 S1 台は「カレヘン」台と同程度の青枯病抵抗性を示し、台木として有望であると考えられた。

そこで、この体細胞雑種を 1994 年 10 月 31 日に「バイオカレヘン（仮称）」で登録出願し、1997 年 12 月 18 日に品種名「ナクロス」として登録した（登録番号第 5970）。「ナクロス」は、夏秋作型産地の青枯病発生頻度の高い地域で台木としての普及が期待できる。特に、「ヒラナス」を台木として用いている地域において、青枯病が多発する圃場で「ナクロス」は台木として有望である。ただし、水田後など地下水位の高い圃場では生育が悪くなるので、栽培圃場を吟味し、高地で輪作がしにくい地域で栽培すれば「ナクロス」の特性を最大限に発揮させることができると考えられる。

第2編 遺伝子組換え技術を用いた耐病性イチゴの作出

イチゴ (*Fragaria* × *Ananassa* Duch) はバラ科の植物で温帯地域において広く分布しており、北米とチリ中南部原産の二種が自然交雑して現在の品種になったと言われている。世界で 20.7 万 ha の栽培面積があり、324 万トンが収穫されている。また、国別生産量は上位からアメリカ (89.4 万トン、1.93 万 ha)、スペイン (32.9 万トン、0.78 万 ha)、日本 (21.0 万トン、0.74 万 ha)、韓国 (18.5 万トン、0.76 万 ha)、ポーランド (15.5 万トン、3.89 万 ha) の順 (FAO, 2002) で、日本は世界第3位とイチゴ栽培の盛んな国である。

イチゴの品種改良は、伝統的な交配育種によって進められ、多数の品種が生み出されてきた。その中でも、「とよのか」、「女峰」および「宝交早生」は日本を代表する品種である。それらの品種は良味で市場からの評価も高いが、「とよのか」はうどんこ病 (*Sphaerotheca aphans*) に、「女峰」は炭疽病 (*Colletotrichum acutatum*) に、「宝交早生」は萎黄病 (*Fusarium oxysporum*) に対してそれぞれ罹病性である。特に「とよのか」は栽培面積も多く、西日本での消費は圧倒的に多い。しかし、うどんこ病に弱いことから、農薬散布に対する農家の負担が大きくなっている。さらに、良味と病害に対する罹病性との間に相関がみられることが多いが、育種現場では市場性を加味して良味や輸送性および果実の形を重点に選抜が行われているため、病害防除については栽培農家の薬剤散布に頼らざるをえない状況である。これらのことから、良味性と病害抵抗性をあわせ持った品種を効率的に育成することが望まれ、そのためには目的遺伝子だけを付与することができる遺伝子組換え技術をイチゴの育種へ応用することは、非常に有効であると考えられる。特に、イチゴはランナーで苗を増殖する栄養繁殖性植物であるので、遺伝子組換えで有望な個体が選抜できれば、それを増殖して直ちに品種にできる利点もある。また、イチゴの葉片と葉柄片から効率良い再分化系を確立したことから、イチゴへの遺伝子導入法として、それらイチゴ組織へ *Agrobacterium tumefaciens* を感染させて遺伝子を導入する手法 (Gasser and Fraley 1989) が有望であると考えられる。

そこで本編の第1章では、イチゴ主要品種への遺伝子導入における最適条件を解明するとともに、導入された遺伝子が組換え体から生じたランナーにおいても安定的に発現するかを *GUS* 遺伝子を用いて検討した。第2章では、病害抵

抗性を獲得するのに有望であると考えられるイネ由来キチナーゼ遺伝子を導入して、うどんこ病抵抗性を検定した。第3章では、うどんこ病抵抗性を示した組換えイチゴの環境に対する安全性評価試験を行った。

第1章 イチゴの遺伝子組換え技術の開発

イチゴへ有用遺伝子を導入して実用的な植物を選抜するには、多数の遺伝子組換え体を作成しなければならない。それには、遺伝子導入における最適条件を解明し、作出した遺伝子組換え体の遺伝的安定性を確認する必要がある。

そこで、本章では遺伝子導入した個体を選抜するために必要なカナマイシンの濃度、アグロバクテリウム懸濁液への浸漬時間および遺伝子組換え体における導入遺伝子の発現程度について検討した。

第1節 材料および方法

1. 供試材料

無菌的に大量増殖（藤本ら，1987）した「女峰」、「とよのか」および「宝交早生」の葉片と葉柄片をカルス形成液体培地（MS培地にBA 2 mg/ℓ、2,4-D 0.2 mg/ℓおよび3% ショ糖を添加し、pH5.8に調整）に1日間振盪しながら浸漬（100 rpm、25℃、暗黒下）して供試材料とした。*Agrobacterium tumefaciens* は、カナマイシン抵抗性遺伝子（*NPT II*）とβ-グルクロニダーゼ遺伝子（*GUS*）を有するpBI121（Jefferson 1987）を含むLBA4404を用いた。なお、*GUS* 遺伝子上流にはCaMV35Sプロモーターが連結されている。

2. 抗生物質のカルス形成に対する影響の検討

カナマイシンを10、30、50、70 および100 mg/ℓあるいはカルベニシリンを100、500 および1,000 mg/ℓ添加したカルス形成培地（0.2% ゲルライト）に、上記の浸漬処理を施した各種イチゴの葉片と葉柄片を置床し、60日後のカルス形成について調査した。

3. 遺伝子組換えカルスと不定芽の選抜

50 mg/ℓ カナマイシンを添加した YEB 培地 (1 g/ℓ イーストエキス、5 g/ℓ 肉エキス、5 g/ℓ ペプトン、5 g/ℓ ショ糖、0.5 g/ℓ MgSO₄、pH7.0) で一晩振盪培養 (100 rpm、28°C) した *A. tumefaciens* の菌液を YEB 培地で 1/10 に希釈した液に、イチゴ外植片を 10~30 分間浸して接種し、カルス形成培地で 2 日間共存培養した。その後、除菌のために 100 mg/ℓ カルベニシリンと遺伝子組換えカルスの選抜のために 50 mg/ℓ カナマイシンを添加したカルス形成培地に移植し、培養 60 日後にカルス形成について調査した。次に、形成したカルスを前記抗生物質を含んだ再分化培地 (カルス形成培地から 2, 4-D を除く) に移植して 30 日間培養後、不定芽形成について調査した。

4. 遺伝子組換え体の確認

茎葉分化した個体を 50 mg/ℓ カナマイシンを含む 1/2 MS 培地に移植し、発根個体を得た。GUS 活性の組織局在性を調べるため、再分化個体の葉、葉柄および根の切片を、X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid) で一晩染色してアルコールで脱色後 (Kosugi *et al.* 1990)、青色の染色度で GUS 活性を評価した。次に、GUS 活性の存在が確認された再分化個体 (「とよのか」からの 2 個体と「女峰」からの 2 個体) を鉢上げし、ランナーを出させ、親株および第 1 次ランナーから第 6 次ランナーにおける組織 (根、葉位別の葉と葉柄) の GUS 活性を上記の方法で評価した。また、果実の部位別 GUS 活性も同様にして評価した。

5. 導入 NPT II 遺伝子の確認

再分化した個体の葉から Edwards *et al.* (1991) の簡便法により DNA を抽出した。ただし、DNA 抽出時の褐変を防ぐため、抽出緩衝液に 25 mM のジチオスレイトールを添加した。得られた DNA は 10~30 ng を鋳型として、NPT II 遺伝子の翻訳領域の 5'末端部の塩基配列 (5'-CAAGATGGATTGCACGCAGGTTCT-3') と 3'末端部の相補的配列 (5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGGCG-3') を持つプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) を用いて、94°C・30 秒保温の後、変性 94°C・30 秒、アニーリング 60°C・2 分および伸長反応 72°C・3 分を 45 サイクル反復した後、72°C・7 分保温の条件で行った。増幅産物は、1 μg/ℓ エチジウムブロミドを含む 1.5%アガロースゲルで電気泳動することにより分析した。

第2節 結 果

1. 遺伝子組換え体の選抜に用いる抗生物質の濃度

得られた遺伝子組換え体を効率良く選抜するために、葉片および葉柄片からのカルス形成率に対する抗生物質の濃度の影響を検討した。その結果 (Table 2-1)、カナマイシンを 50 mg/ℓ 以上添加した培地では、いずれの品種においてもカルス形成は認められなかった。また、供試した品種の中では、「とよのか」が最もカナマイシンの影響を受けてカルス形成率が低く、特に、カナマイシンを 30 mg/ℓ 添加した培地でも葉片からのカルス形成は全く認められなかった。一方、カルベニシリンはカルス形成率には全く影響を及ぼさなかったが、1,000 mg/ℓ 添加区のカルスの生育はすべての品種で若干劣った (データ省略)。

2. 遺伝子組換えカルスと不定芽の形成

アグロバクテリウム懸濁液への浸漬時間が、選抜培地上での葉片および葉柄片からのカルス形成と不定芽形成に及ぼす影響を調べた。その結果 (Table 2-2)、カルス形成は3品種のうち「女峰」が最も効率良く、葉片および葉柄片のいずれにおいても置床した外植片の20%以上からカルスが得られた。一方、他の2品種では置床した外植片のうちカルスが得られたのは10%以下であった。「女峰」のカルス形成率は葉片の方が葉柄片よりも高く、置床した葉片の33.6%からカルスが得られた。置床した外植片あたりの再分化不定芽数も「女峰」が多かったが、「とよのか」と「宝交早生」からも低率ながら不定芽が得られた。菌懸濁液への浸漬時間のカルス形成と不定芽形成に及ぼす影響については、品種に共通した一定の傾向は認められなかったが、「女峰」の葉柄および葉柄片からの不定芽形成数は20分間で最も多かった。

3. GUS 活性による発現組織の観察

GUS 遺伝子を導入した遺伝子組換え体 (Fig. 2-1) のどの組織で GUS 遺伝子が発現しているかを調べるため、各組織を X-Gluc 染色し、青色の染色度で GUS 活性を評価した。Fig. 2-2 には、「とよのか」でみられた結果を示す。これによると、ほとんどの組織で GUS 活性が確認され、特に、葉では葉脈、葉柄では維管束、根では生長点付近において高い活性が認められた。この様子は他の2品種についても同様であった。

遺伝子組換え体の親株とそのランナーから増殖した「とよのか」と「女峰」の苗において、葉身、葉柄および根の GUS 活性を調査した。Table 2-3 には、「とよのか」で得られた結果を示した。親株と第 1 次ランナーでは、新生第 1 葉の葉身と葉柄および新生第 2 葉の葉柄以外において GUS 活性が認められた。また、第 2 次ランナーから第 6 次ランナーではいずれの葉位の葉身でも GUS 活性が認められ、遺伝子組換え体のランナー増殖苗において安定的に遺伝子が発現していることが確認できた。一方、果実においては (Table 2-4)、果肉、果皮および種子において GUS 活性が認められたが、果皮の GUS 活性は弱く、開花 60 日目の果実でかすかに認められる程度であった。「女峰」のランナーと果実についても上記と同様の結果が得られた。

4. PCR による *NPT II* 遺伝子の導入確認

遺伝子組換え体から単離した DNA を鋳型にして、*NPT II* 遺伝子の翻訳領域の 5'末端部の塩基配列と 3'末端部の相補的配列を持つプライマーを用いて PCR を行った。その結果 (Fig. 2-3)、pBI121 を鋳型にした場合と同様に 783bp の DNA 断片が増幅され、これらの再分化個体が *NPT II* 遺伝子を持つ遺伝子組換え体であることが確認できた。

Table 2-1. Effect of the kanamycin on the callus formation.

Kanamycin (mg/l)	cv. Nyohou		cv. Toyonoka		cv. Houkouwase	
	Leaf discs	Petioles	Leaf discs	Petioles	Leaf discs	Petioles
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	80.0	82.5	24.4	60.0	66.0	94.0
30	6.7	5.0	0.0	2.2	8.0	4.0
50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
70	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

The values indicate the percentages of the callus formation.

Table 2-2. Formation of the callus and shoot from explants co-cultured with *Agrobacterium* on the antibiotic-selection medium.

Immersing period (min)	Leaf discs				Petioles			
	No. of explants examined	Percentage of explant forming callus	Percentage of explant forming callus with shoots	No. of shoots regenerated	No. of explants examined	Percentage of explant forming callus	Percentage of explant forming callus with shoots	No. of shoots regenerated
cv. Nyohou								
10	89	28.1	10.1	41	130	25.4	0	0
20	163	37.4	13.5	83	212	22.6	1.4	20
30	111	32.4	3.6	21	135	25.2	0	0
Total	363	33.6	9.6	145	477	24.1	0.6	20
cv. Toyonoka								
10	429	4.0	0.7	3	241	8.7	2.1	5
20	280	5.0	0.4	1	179	9.5	2.2	4
30	366	3.3	0.5	2	169	5.3	1.8	3
Total	1075	4.0	0.6	6	589	8.0	2.0	12
cv. Houkouwase								
10	50	0	0	0	50	6.0	0	0
20	50	0	0	0	50	4.0	6.0	14
30	50	18.0	6.0	5	50	6.0	0	0
Total	150	6.0	2.0	5	150	5.3	2.0	14

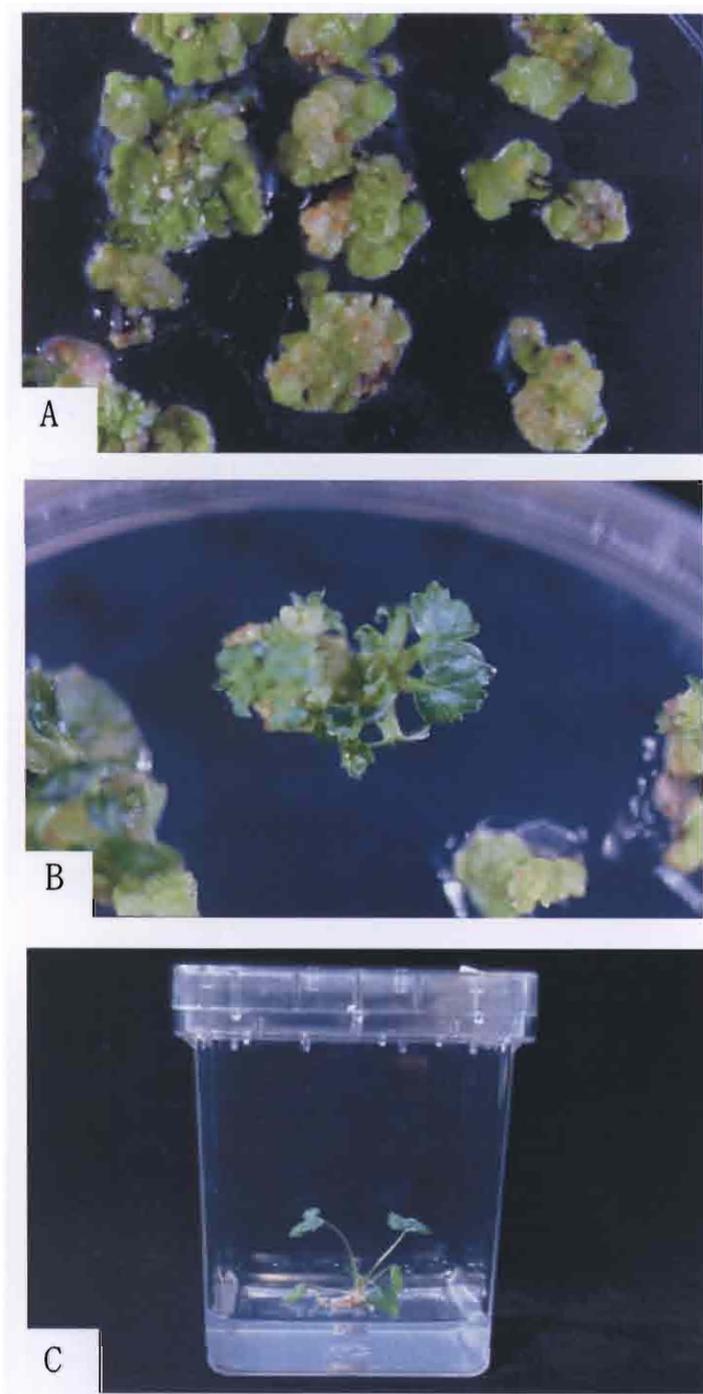


Fig. 2-1. Production of the transgenic strawberry (cv. Toyonoka). A, callus formation; B, shoot regeneration; C, plant regeneration.

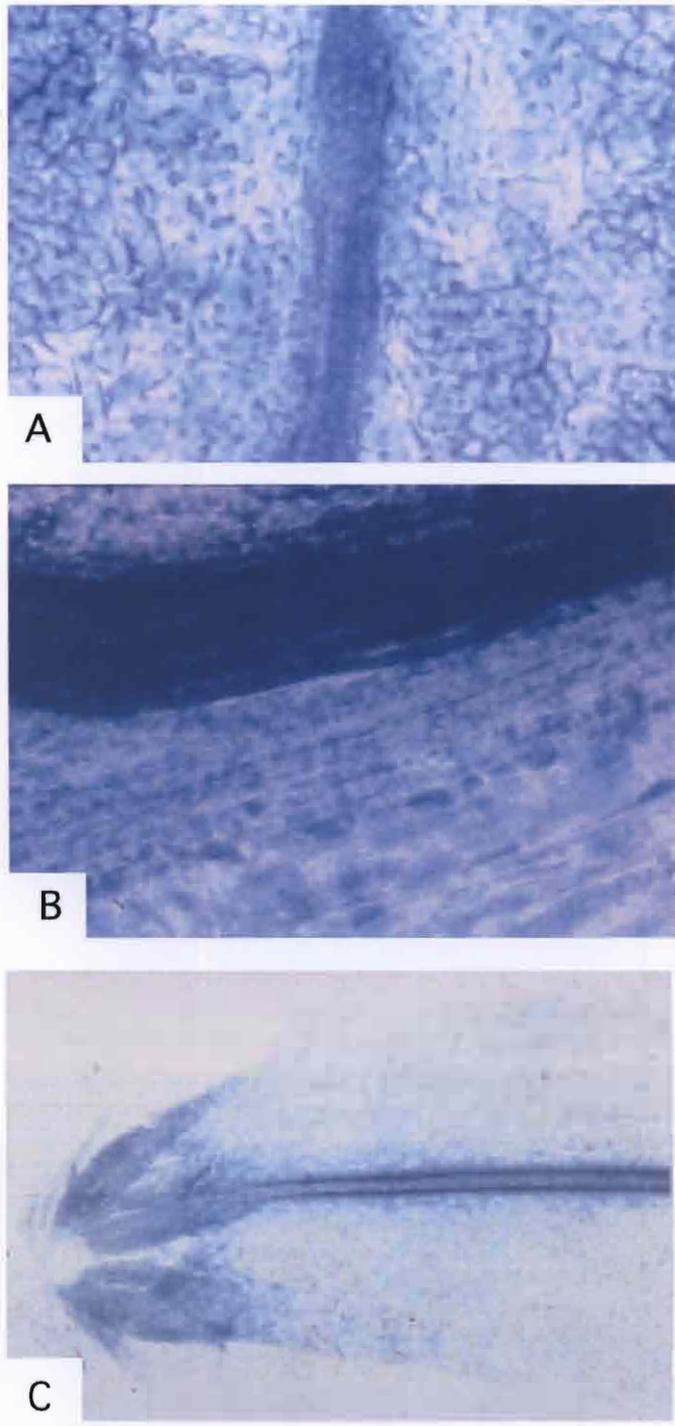


Fig. 2-2. Histochemical staining for GUS activity in transformed strawberry (cv. Toyonoka). A, leaf; B, petiole; C, root apex.

Table 2-3. β -glucuronidase activity in the leaf position and root of the transgenic plant of strawberry cv. Toyonoka.

Plant	Sample	Leaf position (New \longleftrightarrow Old)							Root
		1 ¹⁾	2	3	4	5	6	7	
Mother plant	Leaf	- ²⁾	++	++	++	++	+++	+++	+
	Petiole	-	-	+	+	+	+	++	
Primary runner plant	Leaf	-	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	Petiole	-	-	+	+	+	++	++	
Secondary runner plant	Leaf	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	Petiole	-	-	+	+	+	++	++	
Third runner plant	Leaf	+	++	++	++				+++
	Petiole	-	+	+	+				
Fourth runner plant	Leaf	+	++	++	++				+++
	Petiole	-	+	+	+				
Fifth runner plant	Leaf	+	++	++					+++
	Petiole	+	++	++					
Sixth runner plant	Leaf	+	+						no rooting
	Petiole	+	++						

1) The leaves were numbered from young one to old ones in each runner plant.

2) Score for relative intensity of blue colour after staining with X-Gluc.

-: negative, +: low, ++: high, +++: very high.

Table 2-4. β -glucuronidase activity of the fruit of each stage in transformed strawberry (cv. Toyonoka).

Days after the flowering	0	15	30	45	50	60
Center of the sarcocarp	\pm ¹⁾	+	+	++	+++	+++
Whole sarcocarp	-	\pm	\pm	+	++	++
Pericarp	-	-	-	-	-	\pm

1) Score for relative intensity of blue colour after staining with X-Gluc.
 -: negative, \pm : very low, +: low, ++: high, +++: very high.

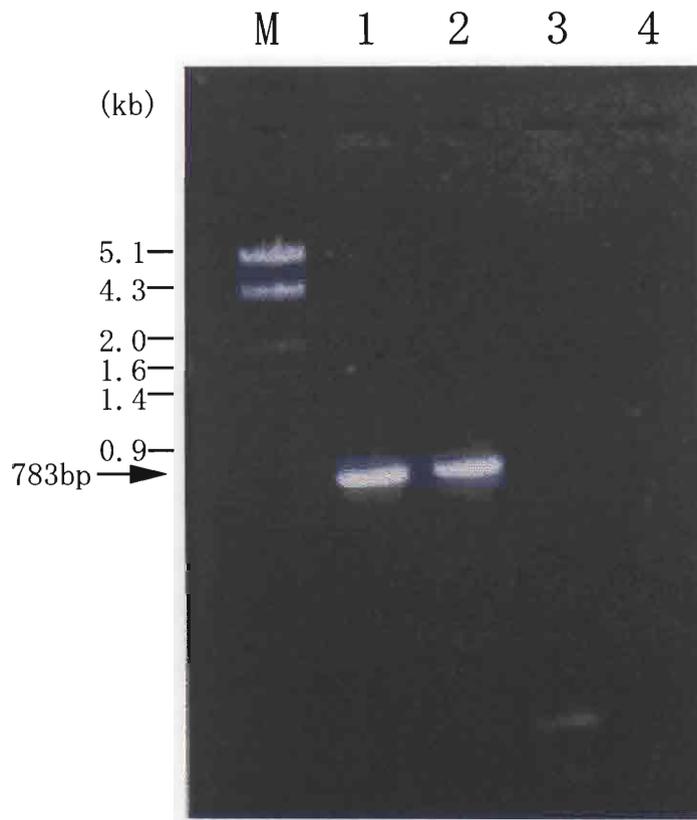
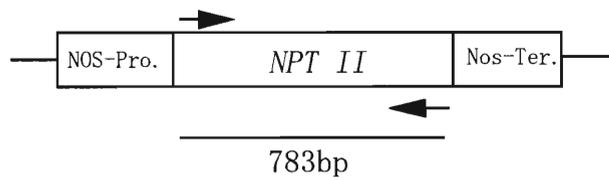


Fig. 2-3. Amplification of *NPT II* gene fragment in transformed strawberry (cv. Toyonoka) by PCR. 1 and 2, transformant; 3 and 4, non-transformant; M, marker gene.



Arrows show the position of the primer.

第3節 考 察

イチゴの組織培養では、培地に置床した外植片の褐変が問題になることが多く、それを回避するために、外植片として若い未展開葉を用いたり (Nehra *et al.* 1990a, Nehra *et al.* 1991b)、培地のオーキシン濃度を下げたりして (Toyoda *et al.* 1990) 褐変を抑制してきた。著者らは、試験管内で大量増殖したイチゴ (藤本ら 1987) の外植片をカルス誘導培地に 1 日間浸漬処理することによって褐変を抑制し、安定的なカルス誘導と再分化系を確立した (荒井・浅尾 1993)。この培養系において外植片の褐変が抑えられたのは、褐変の主因と考えられるフェノール物質が浸漬処理によって洗い流されたためであろう。この培養系を用いることによって再現性のあるイチゴへの遺伝子導入が可能となった。

供試したイチゴ外植片のカナマイシンに対する感受性は高く、50 mg/ℓ の添加で、葉片と葉柄片からのカルス化は認められず、この濃度で遺伝子組換え体を効率良く選抜できることが判明した。遺伝子導入後の不定芽をカナマイシンを添加した発根培地に置床すると非常に発根しにくかった。これはカナマイシンに対するイチゴの根の感受性が他の組織に比べて高いことが原因であると考えられる。カナマイシン存在下でイチゴの不定芽の発根能力が弱くなることについては、Nehra *et al.* (1990b) も同様な報告をしている。葉脈、維管束および根の生長点で高い GUS 活性が認められた。これは、用いた CaMV35S プロモーターは遺伝子を構成的に発現させるが、活発に細胞分裂が行われている部分で特に発現を強くさせるという組織特異性を持つためであり (Jefferson *et al.* 1987, Terada and Shimamoto 1990)、また細胞周期に依存している (Nagata *et al.* 1987) ためであると考えられる。GUS 活性を調査した個体の中に、根には GUS 活性があるが葉柄には活性が無い個体や、葉柄組織で GUS 活性が一様には見られず、一部の細胞だけで活性が観察されキメラと判定される個体があった。このように、得られた遺伝子組換え体の GUS 活性の強さと発現部位には個体間差があった。これは、Araki *et al.* (1989) や Stiekema *et al.* (1988) が報告しているように、導入遺伝子の位置効果やコピー数の違いによるものであると考えられる。これまでに *A. tumefaciens* を用いたイチゴへの遺伝子導入の報告 (James *et al.* 1990, Nehra *et al.* 1990b, Nehra *et al.* 1990c) はあるが、日本の品種において成功したのは本研究が初めてであり、有用遺伝子の導入に向けて有効な手段になるであろう。

遺伝子組換え体から増殖した第1次ランナーから第6次ランナーにおいて、安定的にGUS活性が認められた結果は、遺伝子導入による有用個体の作出が可能であることを示す。また、病害抵抗性に関与する遺伝子等の有用遺伝子を導入して育種する場合、多くの遺伝子組換え体を作成して、その中から発現量の高い個体を選抜する必要がある。このためには、効率良い遺伝子組換え系が必須であり、ここで述べた手法は広く利用できると思われる。

第2章 イネ由来キチナーゼ遺伝子導入によるうどんこ病抵抗性イチゴの作出

高等植物はその構成成分としてキチンを持たないにもかかわらず、キチンを分解する酵素であるキチナーゼを産生する。このキチナーゼの産生は病原菌の感染や傷害に加え、植物ホルモンのエチレンや化学物質のサリチル酸などによっても誘導される。これらのキチナーゼは植物の過敏感反応に伴って作られるPR (pathogenesis related) タンパク質 (感染特異的タンパク質) の一つであることが明らかにされている。さらにキチナーゼは、多くの植物病原菌の細胞壁の構成成分であるキチンを溶解して直接菌類の生育を阻害すると同時に、このように低分子化された菌体細胞壁のキチンオリゴマーが、ファイトアレキシンの産生やプロテアーゼインヒビターの合成など、一連の防御反応を誘導する。

このように、植物の生体防御において、重要な役割を果たしていると考えられるキチナーゼ遺伝子をイチゴへ導入することによってうどんこ病抵抗性個体の作出が可能であるかを検討した。なお、本章では、「女峰」と比較して再分化率は低い西日本での栽培面積が最も大きい「とよのか」に、うどんこ病抵抗性を付与することを試みた。

第1節 材料および方法

1. イチゴへのキチナーゼ遺伝子の導入

無菌的に大量増殖した「とよのか」の葉片と葉柄片をカルス形成液体培地 (MS 培地に3% ショ糖、BA 2 mg/ℓ および 2,4-D 0.2 mg/ℓ を添加し、pH5.8 に調整) に1日間振盪しながら浸漬し、供試材料とした。一方、Nishizawa and Hibi (1991)が単離したイネ由来キチナーゼ遺伝子 (RCC2) を GUS 遺伝子を除去したバイナリーベクターpBI121中のCaMV 35S プロモーターの下流に連結し (Fig. 2-4)、これを *A. tumefaciens* LBA4404 株に導入した菌を用意した。

外植片は 50 mg/ℓ カナマイシンを添加した YEB 培地で一晩振盪培養した *A. tumefaciens* の 1/10 希釈液に 20 分間浸して接種し、カルス形成培地 (0.2% ゲルライト) で2日間培養した。その後、除菌のために 100 mg/ℓ カルベニシリンと遺伝子組換えカルスの選抜のために 50 mg/ℓ カナマイシンを添加したカルス形成培地に移植した。

次に、形成したカルスを前記抗生物質を含んだ再分化培地（カルス形成培地から 2, 4-D を除いたもの）に移植して不定芽を形成させた。

2. 導入 *RCC2* 遺伝子の確認

再分化した個体の葉から Edwards *et al.* (1991) の簡便法により DNA を抽出した。ただし、DNA 抽出時の褐変を防ぐため、抽出緩衝液に 25 mM のジチオスレイトールを添加した。得られた DNA は 10~30 ng を鋳型として、*RCC2* 遺伝子の翻訳領域の 5'末端部の塩基配列 (5'-TGGATCCAGCGGCTCGTCGGTTG-3') と NOS ターミネーターの相補的配列 (5'-GTATAATTGCGGGACTCTAAT-3') を持つプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) を用いて、94°C・30 秒保温の後、変性 94°C・30 秒、アニーリング 60°C・2 分、伸長反応 72°C・3 分を 45 サイクル反復した後、72°C・7 分保温の条件で行った。増幅産物は、1 μ g/ ℓ エチジウムブロミドを含む 1.2%アガロースゲルで電気泳動することにより分析した。また、泳動した DNA はナイロンメンブレンへトランスファーし、³²P でラベルした pBI121-*RCC2* の 300 bp DNA 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

3. キチナーゼ活性の測定

遺伝子組換え体の新鮮葉 0.5 g を緩衝液 (0.02 M citric acid, 0.04 M Na₂HPO₄, pH6.8) で摩砕し、遠心分離後 (15,000 rpm, 15 分間, 4°C) の上清を同じ緩衝液で一晩透析して粗タンパク質とした。キチナーゼ活性を測定するため、20 mg carboxymethyl chitin (Ichimaru Pharcos) を含む 2 ml 緩衝液 (0.05 M citric acid, 0.1 M Na₂HPO₄, pH6.8) と 1 ml 粗タンパク質を 1 時間 (37°C) 反応させ、1 ml trichloroacetic acid で反応を止めた。不溶な基質と変性タンパク質を遠心分離 (15,000 rpm, 15 分間, 4°C) で除いた反応液をシャーレス変法試薬 (Imoto and Yagishita 1971) と反応させ、420 nm の吸光度で *N*-アセチル-D-グルコサミン量を測定した。なお、酵素 1 単位は 37°C で 1 分間に 1 μ mol の *N*-アセチル-D-グルコサミンに相当する還元力を遊離させる量とした。

4. うどんこ病抵抗性検定

閉鎖系温室内で育成した遺伝子組換え体と非組換え体とうどんこ病菌の孢子 (10⁵個/ml) を接種し、30 日後に各個体の葉における病徴発現の程度を葉の全面積に対する病叢面積の割合を調査することによって算出した。

第2節 結 果

1. キチナーゼ遺伝子導入個体の作出

アグロバクテリウム法によるキチナーゼ遺伝子導入実験を試みた結果 (Table 2-5)、葉片 4,000 個から 246 個 (6.2%) のカルスが、葉柄片 4,128 個から 298 個 (7.2%) のカルスがそれぞれ形成された。形成された 544 個 (6.7%) のカルスを再分化培地へ移すと 10 週間以内に 123 個 (1.5%) の植物体が得られた。

2. 導入遺伝子の確認

遺伝子組換え体から単離した DNA を鋳型にして、キチナーゼ遺伝子の翻訳領域の 5'末端部の塩基配列と NOS ターミネーターの相補的配列を持つプライマーを用いて PCR を行った。その結果、pBI121-RCC2 を鋳型にした場合と同様に、遺伝子組換え体からは 300 bp の DNA 断片が増幅された (Fig. 2-5)。また、pBI121-RCC2 の 300 bp DNA 断片をプローブとしたサザン解析によって、PCR で増幅されたバンドが確かに導入したキチナーゼ遺伝子であったことから、これらの再分化個体がキチナーゼ遺伝子を持つ遺伝子組換え体であることが確認できた。

3. うどんこ病抵抗性個体の作出

遺伝子組換え体と非組換え体におけるキチナーゼ活性とうどんこ病に対する抵抗性を調査した結果 (Table 2-6)、キチナーゼ活性は、非組換え体の平均が 13.8 mU/g であるのに対して、遺伝子組換え体の平均は 44.0 mU/g と約 3 倍の値を示した。また、閉鎖系温室内において行ったうどんこ病菌接種試験の結果 (Fig. 2-6)、病叢面積率の平均は遺伝子組換え体が 22.0% であるのに対して、非組換え体は 40.0% であり、キチナーゼ遺伝子を導入したイチゴの方が有意にうどんこ病菌の病叢面積が小さかった。

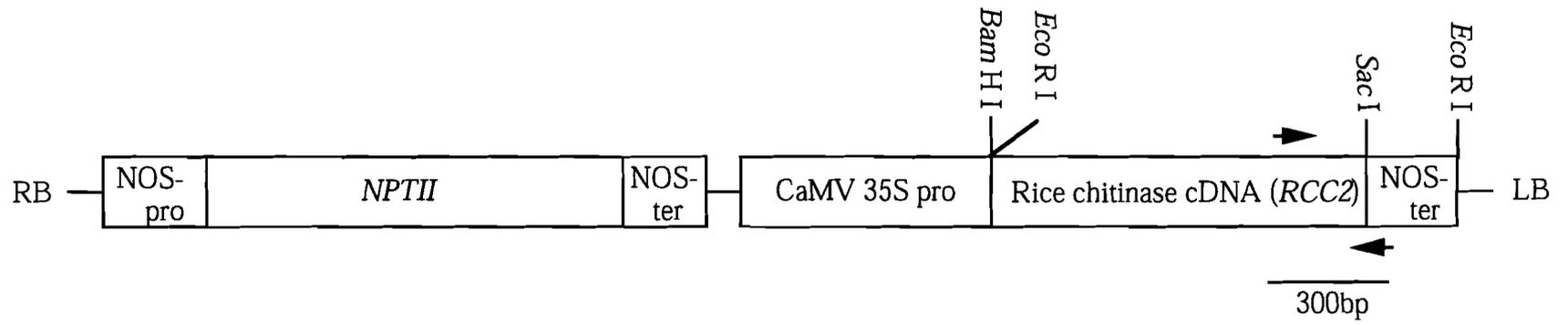


Fig. 2-4. Structure of T-DNA region in pBI121-RCC2. Arrows show the position of the primer.

Table 2-5. Formation of the callus and shoot from explants co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens* on the selection medium.

Explant	No. of explants examined	No. of explants formed calli	No. of explants regenerated shoots
Leaf discs	4,000	246 (6.2) ¹⁾	36 (0.9)
Petioles	4,128	298 (7.2)	87 (2.1)
Total	8,128	544 (6.7)	123 (1.5)

1) The values within parentheses indicate the percentages of explants examined.

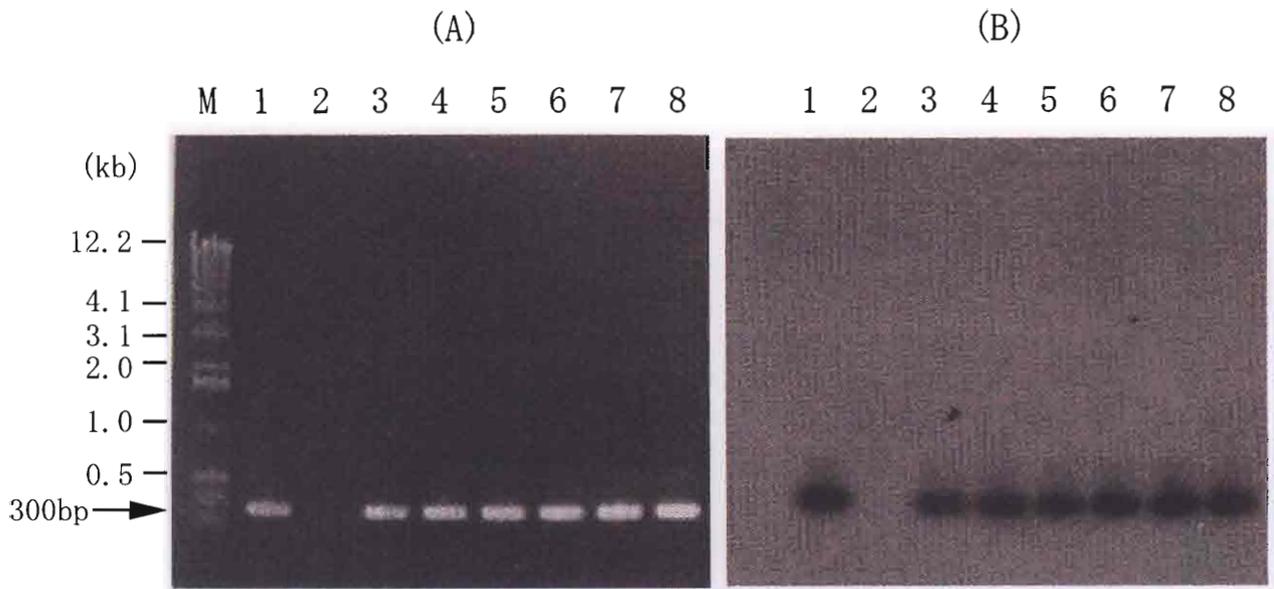


Fig. 2-5. Amplification of rice chitinase gene fragment by PCR (A) and Southern hybridization analysis (B) in transgenic strawberry. Lane 1, amplification of the 300bp fragment from pBI121-RCC2 plasmid; lane 2, control (non-transgenic plant); lane 3-8, independent transgenic plants; lane M, DNA 1 kb ladder.

Table 2-6. Chitinase activity in transformant leaves and disease development of *Sphaerotheca aphanis*.

Plant	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine (mU/g fresh weight)	Disease development (lesion area/leaf, %)
Transgenic plants	44.0±9.4	22.0±3.6
Control plants	13.8±1.8	40.0±5.2

Values represent the means ±SD from twenty-five determinations.

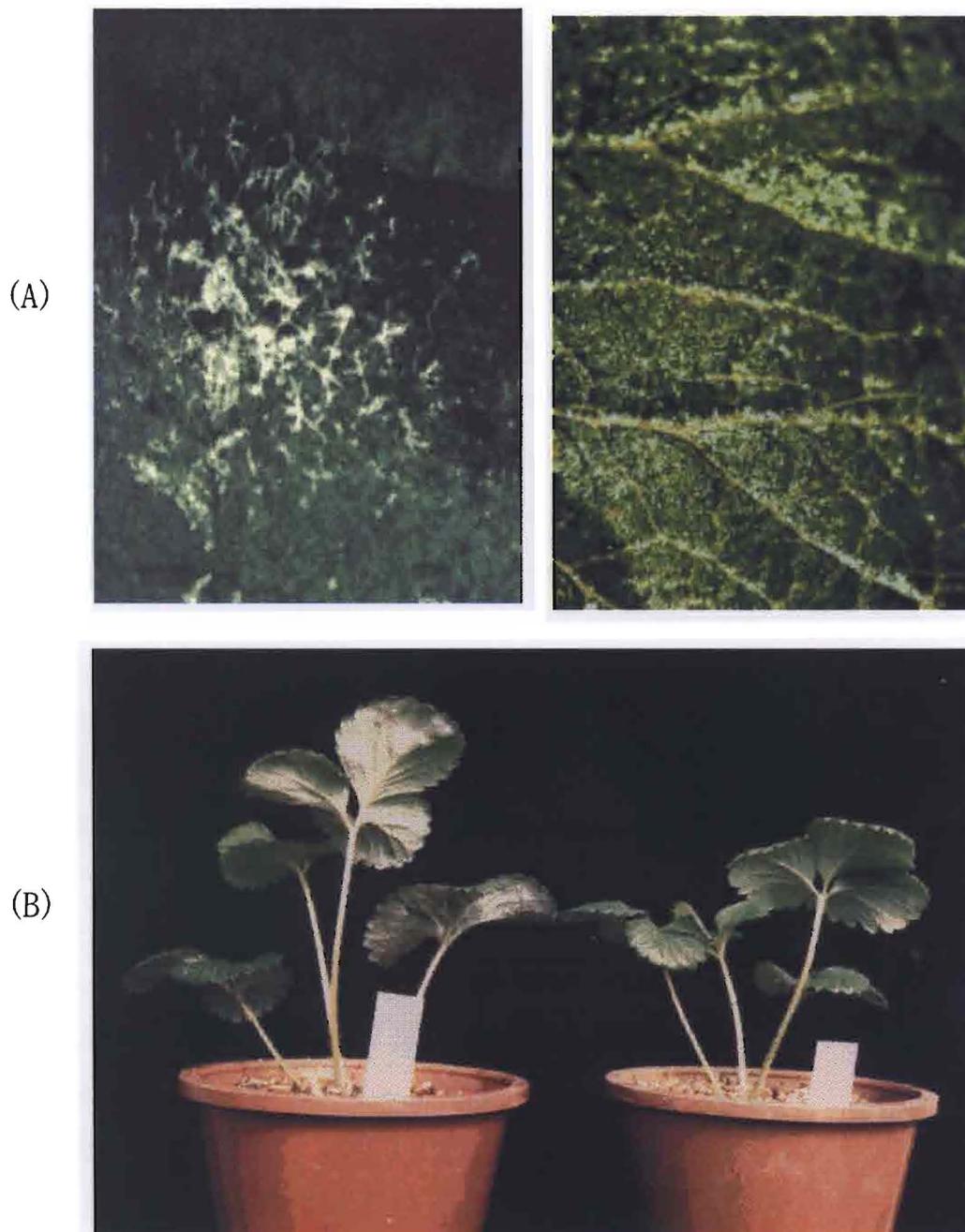


Fig. 2-6. Resistance of the transgenic strawberry against *Sphaerotheca aphans*. Comparison of control plant (left) and transgenic plant (right). Ten days after inoculation (A) and thirty days after inoculation (B).

第3節 考 察

キチナーゼは、多くの植物病原菌における細胞壁の主構成成分であるキチンの加水分解を触媒する (Bartnicki-Garcia 1968)。植物はさまざまな病原菌に感染された時にキチナーゼを活性化する (Mauch *et al.* 1988) ことから、キチナーゼの誘導は植物の防御機構の一つであるとされてきた (Boller 1988)。このように、キチナーゼのような溶菌酵素は植物の病原菌からの攻撃に対する自己防御機構の一つであり、植物の病原菌に対する抵抗性を増強させるには、これらの溶菌酵素の活性を人為的に高めることが有効であると考えられる。そこで、イネ由来キチナーゼ遺伝子 (Nishizawa and Hibi 1991, Nishizawa *et al.* 1993) をイチゴへ導入して、うどんこ病に対する抵抗性個体の作出を試みた。

Brogie *et al.* (1991) はインゲンマメのキチナーゼ遺伝子をタバコへ導入して、葉腐病抵抗性個体を作成し、西澤ら (1992) はイネのキチナーゼ遺伝子をタバコに導入して、うどんこ病抵抗性個体を作成した。Zhu *et al.* (1994) はイネのキチナーゼ遺伝子とアルファルファのグルカナーゼ遺伝子をタバコに導入して、白星病抵抗性個体を作成した。また、Lin *et al.* (1995) はイネ (日本型) のキチナーゼ遺伝子をイネのインディカ品種に導入して、紋枯病抵抗性個体を作成した。このように、キチナーゼ遺伝子のような植物の溶菌酵素遺伝子を植物に導入することによって菌類病に強い植物を作成したという報告が増えてきているが、本研究から、イチゴの菌類病抵抗性植物を育種するうえで、キチナーゼ遺伝子を用いた遺伝子組換え技術が有効であることが証明された。したがって、植物へのキチナーゼ遺伝子やグルカナーゼ遺伝子の導入は、キチンや β -1,3-グルカンが細胞壁の主要骨格である病原菌類の防除には有効であると考えられる。また、イチゴうどんこ病菌である *Sphaerotheca aphans* の吸器細胞壁の主要骨格がキチンであるという Ikeda *et al.* (1991) の報告は、本研究を支持するものである。

ここ数年、いくつかの病害抵抗性遺伝子が新たに単離されていることから、耐病性植物の育成において遺伝子組換え技術はさらに有効な手段になるであろう。現在までに、*Pto* (Martin *et al.* 1993)、*RPS2* (Bent *et al.* 1994)、*RPM1* (Grant *et al.* 1995)、*N* (Whitham *et al.* 1994)、*Cf-9* (Jones *et al.* 1994)、*Xa21* (Song *et al.* 1995) などの抵抗性遺伝子の単離が報告されている。*Pto*

を除く他の抵抗性遺伝子にはロイシンリッチリピート(LRRs)構造が共通して存在しており、*Xa21* と *Pto* の遺伝子産物はプロテインキナーゼをコードしている。これら抵抗性遺伝子が共通に持つ構造を基にして様々な抵抗性遺伝子の単離が期待できる。今後、分子生物学的解析の発展により、植物細胞における病原菌の認識機構やシグナル伝達機構の詳細が明らかにされるとともに、それらの知見を応用した病害抵抗性遺伝子組換え植物の作出がさらに盛んになることが望まれる。

第3章 遺伝子組換えイチゴの安全性評価試験

第1章において、効率よいイチゴの遺伝子組換え技術を確立した（浅尾ら1994）。また第2章において、アグロバクテリウム感染法を用いて、イネ由来キチナーゼ遺伝子（*RCC2*）をイチゴ「とよのか」へ導入し、うどんこ病抵抗性個体を選抜した（Asao *et al.* 1997）。しかし、遺伝子の導入によって環境に悪影響を及ぼすような予期せぬ特性が現れる可能性も考えられることから、遺伝子組換え植物を野外で栽培するには生態系に及ぼす影響を評価しておくことが必要である。組換え体の環境に対する安全性評価は、閉鎖系温室と非閉鎖系温室においては文部科学省の「組換えDNA実験指針」（http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/dna.htm）に従って、また隔離圃場と一般圃場においては農林水産省の「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」（<http://www.s.affrc.go.jp/docs/sentan/guide/guide.htm>）に従って行われている。

そこで本章では、うどんこ病抵抗性を獲得した遺伝子組換えイチゴの閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場における環境に対する安全性評価試験を上記指針に従って行った。

第1節 材料および方法

1. 供試材料

前章において閉鎖系温室でうどんこ病抵抗性検定を行った25個体の遺伝子組換え体のうち、キチナーゼ遺伝子の導入が確認されており、最も強い抵抗性を示す1個体（C-5）を選抜した。以下の安全性評価試験には、C-5およびもとの品種「とよのか」を栄養繁殖した個体群（以下それらを遺伝子組換えイチゴおよび非組換えイチゴという）を供試した。

2. 安全性評価試験の実施環境

遺伝子組換えイチゴの環境に対する安全性評価試験は、奈良県農業技術センター内の閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場で行った。閉鎖系温室は、天窓、側窓および入口をすべて閉めた状態で、温度コントロールのため空調を設備して、排水は直接一般排水口に流入しないようにし、床はコンクリート敷

として、前室にはオートクレーブを設置した。非閉鎖系温室の閉鎖系温室との相違は、窓と入口は閉めた状態ではあるが、天井と側面は昆虫侵入防止のためのメッシュ網を張っていることと、空調設備を装備していない点である。隔離圃場は、遺伝子組換え植物の栽培を行うために一般環境を模した一定の区画された圃場で、遺伝子組換え植物が自然に増殖することを防止するとともに、花粉等が圃場外の植物に影響を与えないようにフェンスで囲まれている。また、隔離圃場内には焼却炉、物置小屋および洗い場を設置して、隔離圃場外へ種苗や土等が拡散しないように措置した。

3. 導入キチナーゼ遺伝子の発現解析

遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴの葉からタンパク質を抽出し、ラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。この時、ゲルにキチナーゼの基質であるグリコールキチン (0.02%) を添加してタンパク質を泳動後、1% Triton X-100 を含む 10 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.0) で SDS を除去しながら酵素反応をさせた。反応後、ゲルを 0.01%フルオスチンを含む 100 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH8.9) で蛍光染色してキチナーゼの活性バンドを観察した。なお、同じサンプルを同時に 2 枚 SDS-PAGE を行った後、分子量マーカーを含むゲルを CBB (Coomassie brilliant blue) 染色し、他方のゲルで検出したキチナーゼの活性バンドの分子量を推定した。上記キチナーゼ活性の測定は、平野 (1991) の方法に従って行った。

4. 根からの分泌物と茎葉から放出される揮発性物質の分析

培養器内で発根しつつある遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴをペーパーブリッジ法で支持し、根を蒸留水 10 ml に浸漬した。移植 14 日後に蒸留水を採取し、溶媒分画後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で根からの分泌物を分析した。試料注入量は、抽出した酸性酢酸エチル区の 1/10 量 (20 μ l) とし、カラムは東ソー-TSK-GEL ODS-80TM CRT を用いた。溶媒 A はアセトニトリル/水/酢酸=10/89/1 (V/V)、溶媒 B はアセトニトリルとし、溶出流速は 0.5 ml/min、グラジエントは溶媒 B の直線濃度勾配 (0→100%) : 20 分で行った。検出器 SPD-10A (島津製作所) で 280 nm の紫外吸光を測定した。

大気中に放出される揮発性物質を分析するため、3 枚の複葉が展開している遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴを 1/2 MS 培地へ移植し、クリーンベンチ内で 1 時間開栓した後密栓した。密栓後 21 日目に気相 2.5 ml を採取し、ガスクロマトグラフィー (GC : G-2800、柳本製作所) で気体成分を分析した。カラムは PORAPAK Q (50/80) 3×2.1 mm

を用い、ヘリウムをキャリアガスとし 50 ml/min で流した。カラム槽温度は 100°C で 2 分間保持した後に 4°C/min で 10 分間昇温させた。試料気化室温度は 210°C とし、水素炎イオン化検出器 (flame ionization detector : FID) で検出した。

5. 花粉特性

非閉鎖系温室内で育成した遺伝子組換えイチゴの葯から花粉を採取し、アセトカーミン液で染色して正常花粉率を調査した。次に、植物体から 0~150 cm の距離の所に花粉発芽用培地 (1/2 MS 培地、10% ショ糖、0.2% ゲルライト、pH5.8) を置き、植物体に扇風機で風を送って (4 m/sec)、6 時間放置後培地に付着した花粉を調査した。

6. 土壌

遺伝子組換えイチゴの栽培土壌における微生物相と後作に及ぼす影響について調べた。非閉鎖系温室内でイチゴを育苗用土に 1 ヶ月間栽培した根圏土壌 30 g を、殺菌水 270 ml と共に 500 ml 容の三角フラスコ内で 10 分間よく振盪したのち、殺菌水で希釈して寒天平板上に塗布し、乾土 1 g あたりの糸状菌、細菌および放線菌のコロニー数を計測した。次に、遺伝子組換えイチゴおよび非組換えイチゴをそれぞれ 1 年間栽培した土壌に、二十日大根 (品種 : コメット) とハウレンソウ (品種 : まほろば) を播種し、30 日後の二十日大根と 45 日後のハウレンソウの生育量を調べた。

7. 生育特性

隔離圃場内のパイプハウスにおいて促成作型で栽培した。遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴとも、1 区 18 株で 4 区 72 株を 1998 年 9 月 22 日に畦幅 1.2 m、株間 0.25 m (千鳥植え) で定植した。なお、遺伝子組換えイチゴ個体 (C-5) は、ランナー増殖して供試した。以後、10 月 22 日にビニール被覆、10 月 26 日にマルチがけ、11 月 2 日に 1 回目の GA (5 ppm) 処理、11 月 5 日にミツバチ搬入、11 月 10 日に 2 回目の GA (5 ppm) 処理および 11 月 19 日に内張りのビニール被覆の作業を行った。なお、N 成分で 10 a あたり元肥 (IB 化成, 三菱化学) は 12 kg、追肥 (IB 化成) は 10 月 13 日に 4 kg と 12 月 25 日に 4 kg を施肥し、その後は液肥 (ハイポネックス、ハイポネックスジャパン) を適宜施した。果実収量 (個体当たり収穫個数) は、1998 年 12 月から翌年 3 月にか

けて調査した。また、1998年12月25日と1999年1月9日に、遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴの各25個の果実糖度を調べた。さらに、1999年1月27日に各25個体において、草丈、最大葉の大きさおよび葉数を調べた。

8. ミツバチの訪花

ミツバチの訪花頻度を調べるため、1998年11月26日の13:20~14:20までの1時間と1999年1月27日の10:20~11:20までの1時間に、花（花びらが散っていない花）にとまるミツバチの回数を調べた。

9. アグロバクテリウムの残存性

遺伝子導入に用いたアグロバクテリウムの残存性を、遺伝子組換えイチゴの茎葉表面、根部および茎葉組織内について調べた。茎葉部、根部および乳鉢で摩砕した茎葉組織に、各供試材料の20倍量の滅菌水を加えて2時間振盪した後、上清をYEB培地と50 mg/ℓカナマイシンを含むYEB培地に塗布し28℃で5日間培養した。

10. うどんこ病抵抗性の確認

遺伝子組換えイチゴおよび非組換えイチゴの各18個体に番号を付け、1999年5月21日に中央6個体の新生第1葉、第2葉および第3葉に 10^5 個/mℓのうどんこ病菌の胞子を接種し、接種7日後にすべての個体の新生第1葉から第3葉の小葉における発病程度を、葉の全面積に対する病叢面積の割合を調査することによって算出した。

第2節 結 果

1. 遺伝子組換えイチゴのキチナーゼ活性

葉から抽出したタンパク質を電気泳動し、活性染色後キチナーゼ活性を示すバンドを検出した (Fig. 2-7)。遺伝子導入の有無に係わらず、イチゴの内生キチナーゼと考えられるバンドが30 kD付近に見られた。遺伝子組換えイチゴだけに40 kD付近にイネ由来キチナーゼタンパク質と同様の大きさの位置に活性バンドが検出された。この結果から導入遺伝子がタンパク質に翻訳され、キチナーゼ活性を持っていることが確認できた。

2. 根からの分泌物と茎葉から放出される揮発性物質の分析

遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴの根からの分泌物を HPLC で分析した結果 (Fig. 2-8) および茎葉からの揮発性物質を GC で分析した結果 (Fig. 2-9) のいずれにおいても、両者の間で検出ピークの位置、形状に大きな差異は認められなかった。両分析において、ピークの高さに若干の違いが認められることはあったが、これは個体間差であると考えられた。

3. 正常花粉率と花粉の飛散距離

アセトカーミン染色法による花粉の染色を指標として算出した正常花粉率は、遺伝子組換えイチゴが 80.6% で非組換えイチゴが 79.8% と有意な差は無かった (Table 2-7)。なお、花粉の発芽率にも差が認められなかったことから (データ省略)、導入遺伝子による花粉稔性への影響は無いものと判断された。

また、遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴにおいて、植物体から 50 cm 以上の花粉の飛散は見られず (Table 2-8)、両者の花粉飛散距離には差は見られなかった。

4. 土壌の微生物量

遺伝子組換えイチゴおよび非組換えイチゴを栽培した土壌の間で、糸状菌、細菌および放線菌のコロニー数に大きな差異は認められず (Table 2-9)、遺伝子組換えイチゴの栽培による土壌中の微生物相への影響は無いと判断した。

5. 遺伝子組換えイチゴ栽培土壌が後作に及ぼす影響

遺伝子組換えイチゴおよび非組換えイチゴをそれぞれ 1 年間栽培した土壌で生育させた二十日大根とホウレンソウの草丈、葉数および葉身長を調べたところ (Table 2-10)、いずれの形質も土壌間で差異は認められなかった。この結果より、遺伝子組換えイチゴの栽培土壌は二十日大根とホウレンソウの生育に対して影響を及ぼさないと判断した。

6. 生育特性

収量 (Fig. 2-10)、時期別糖度 (Table 2-11)、生育 (草丈, 最大葉, 葉数) (Table 2-12) において遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴに差異が認められなかったことから、導入した遺伝子の生育に及ぼす影響はないと判断した。

7. ミツバチの訪花頻度

ミツバチの1花当たりの訪花回数は調査日や時間帯に係わらず、遺伝子組換えイチゴと非組換えイチゴに有意な差は認められなかった (Table 2-13)。

8. アグロバクテリウムの残存性

遺伝子組換えイチゴの茎葉表面、根部および茎葉組織内のいずれからもアグロバクテリウムは検出されなかった (Table 2-14)。

9. うどんこ病抵抗性

うどんこ病菌を Fig. 2-11 に示した No. 7 から No. 12 の個体に接種した結果、接種7日後の発病程度は遺伝子組換えイチゴの方が非組換えイチゴと比較して小さく、隣接した株への病斑の広がり方も少なかった (Fig. 2-12)。この結果は、閉鎖系温室でキチナーゼ遺伝子導入イチゴが示したうどんこ病抵抗性が、圃場栽培においても維持されていることを示している。

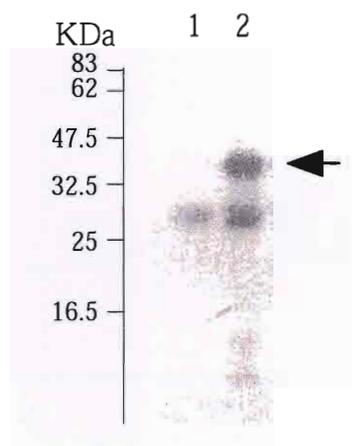


Fig. 2-7. Chitinase activity of a non-transgenic strawberry (1) and a transgenic strawberry (2). An arrow shows a rice chitinase.

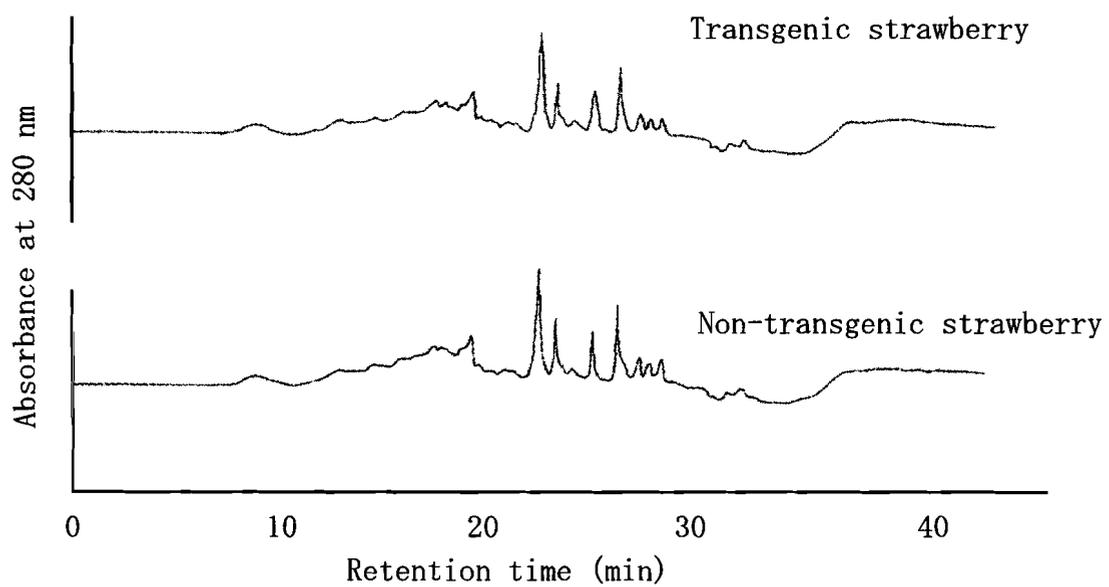


Fig. 2-8. Result of HPLC analysis of compounds released from root.

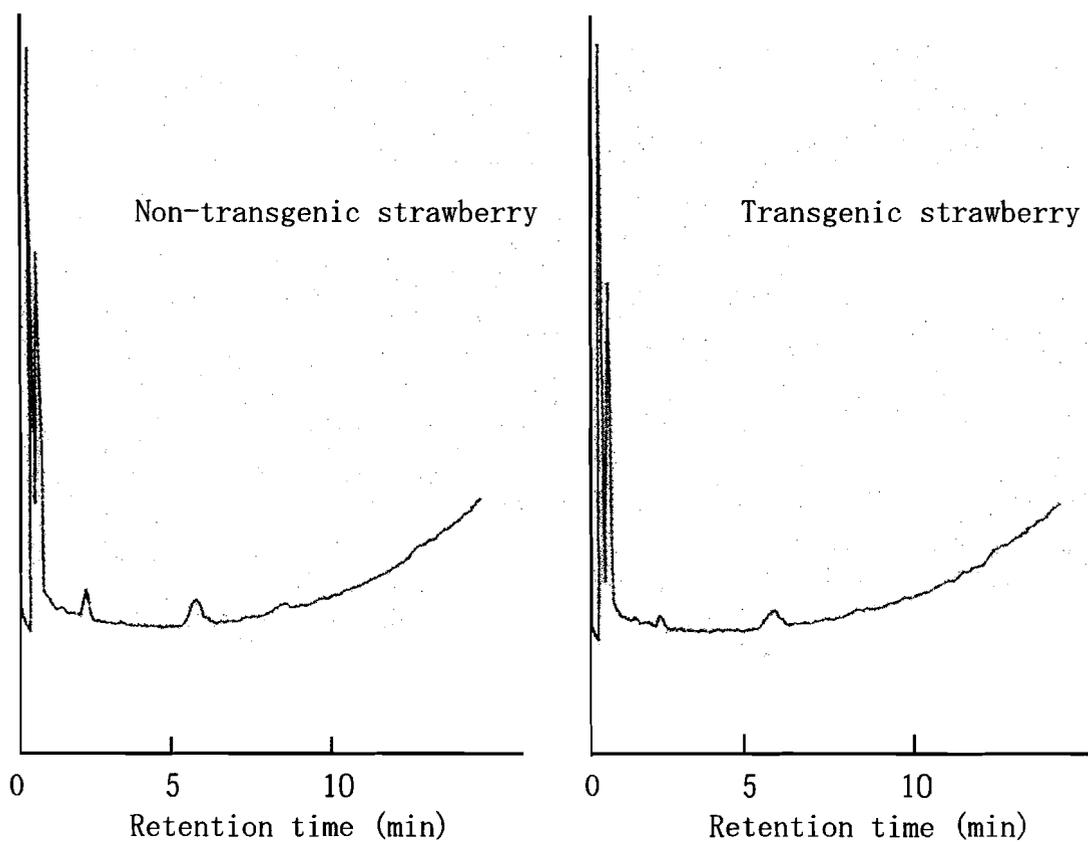


Fig. 2-9. Results of GC analysis of volatile compounds.

Table 2-7. Percentage of the normal pollen.

Plant	Normal pollen (%)
Transgenic strawberry	80.6±7.5
Non-transgenic strawberry	79.0±6.8

Values are the means ±SD from twenty flowers.

Table 2-8. Pollen dispersal by artificial wind.

Distance from plant (cm)	No. of pollen trapped at pollen germination medium	
	Transgenic strawberry	Non-transgenic strawberry
0	4	2
10	0	1
20	3	1
30	4	10
40	4	4
50	0	0
60	0	0
70	0	0
80	0	0
90	0	0
100	0	0
120	0	0
150	0	0

Table 2-9. Number of microorganisms in the soil cultivated transgenic and non-transgenic strawberry.

Soil	No. of microorganisms (CFU / g)		
	Fungi	Bacteria	Actinomycetes
Cultivated with transgenic strawberry	5.6×10^5	1.7×10^7	7.5×10^5
Cultivated with non-transgenic strawberry	7.9×10^5	7.5×10^6	2.6×10^5

Table 2-10. Influence of soil precultivated with transgenic strawberry on growth of radish and spinach.

Material prepared from	Succeeding crop	Plant height (cm)	No. of leaves	Leaf length (cm)
Transgenic strawberry	Radish	18.5 ± 1.7	7.5 ± 1.4	6.1 ± 0.5
	Spinach	13.2 ± 1.2	7.4 ± 1.8	7.2 ± 0.6
Non-transgenic strawberry	Radish	18.0 ± 1.5	7.4 ± 1.7	6.0 ± 0.5
	Spinach	13.5 ± 1.3	8.2 ± 1.9	7.3 ± 0.7

Values are the means \pm SD from twenty plants.

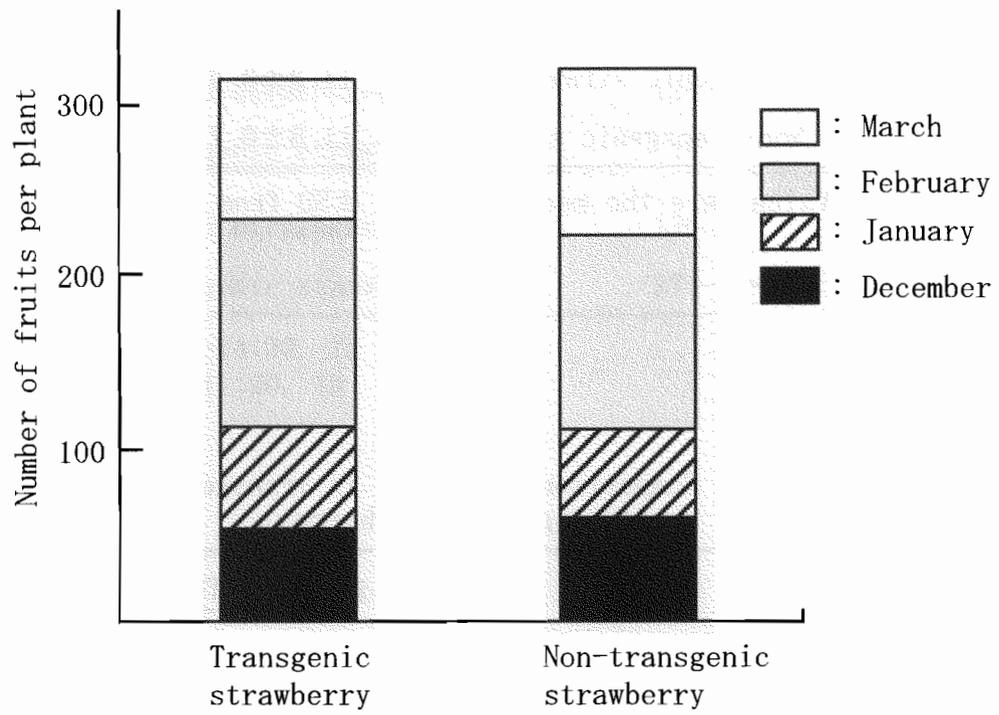


Fig. 2-10. Fruits yield of transgenic strawberries and non-transgenic strawberries.

Table 2-11. Degree of sugar in fruits.

Plant	1998. 12. 25	1999. 1. 9
Transgenic strawberry	11.2±0.6	10.9±0.5
Non-transgenic strawberry	11.8±0.7	11.1±0.7

Values are the means of brix ±SD from twenty fruits.

Table 2-12. Comparison of growth in transgenic strawberry and non-transgenic strawberry.

Plant	Plant height (cm)	The largest leaf		No. of leaves
		Length (cm)	Width (cm)	
Transgenic strawberry	20.9±2.1	9.0±0.9	9.1±0.8	10.1±2.0
Non-transgenic strawberry	22.0±1.8	9.8±0.8	9.2±0.7	10.9±2.4

Values are the means ±SD from twenty plants.

Table 2-13. Frequency of bees visiting flower.

Experiment ¹⁾	Plant	No. of flower	Visited frequency	Visited frequency per flower
1	Transgenic strawberry	19	125	6.6
	Non-transgenic strawberry	9	48	5.3
2	Transgenic strawberry	20	186	9.3
	Non-transgenic strawberry	31	274	8.8

1) 1 : 1998. 11. 26, 13:20~14:20, 1h

2 : 1999. 1. 27, 10:20~11:20, 1h

Table 2-14. Detection of residual *Agrobacterium tumefaciens* used as a vector.

Sample	Detection of microorganism	
	Transgenic strawberry	Non-transgenic strawberry
Surface of plant	- ¹⁾	-
In plant body	-	-
Root	-	-

1) Not detected.

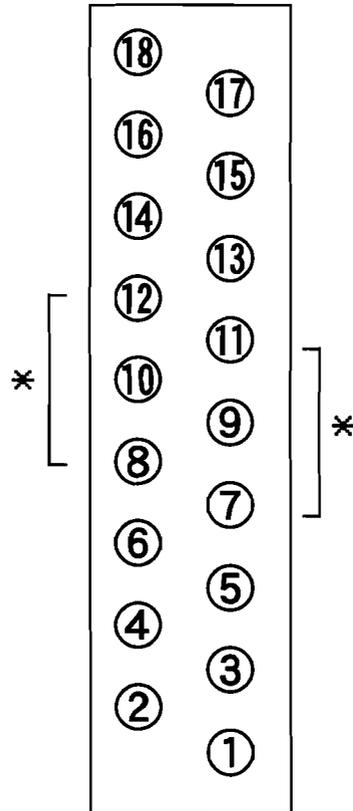


Fig. 2-11. Number of strawberry. *Sphaerotheca aphanis* were inoculated onto leaves of transgenic strawberries and non-transgenic strawberries (⑦~⑫).

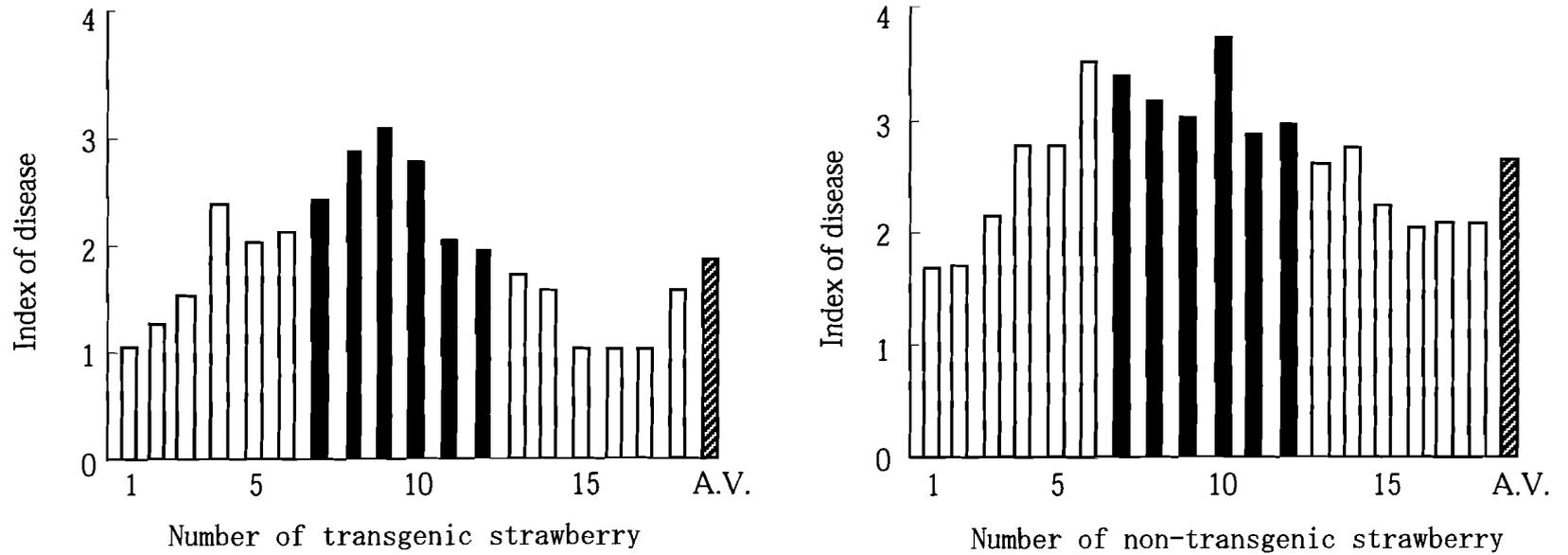


Fig. 2-12 . Disease severity of *Sphaerotheca aphanis* in transgenic strawberry and non-transgenic strawberry on 7 days after inoculation. ■ : inoculated plants. Index of disease shows the lesion area of *S. aphanis*, that is, index 0: no disease, $0 < \text{index } 1 < 10\%$, $10\% \leq \text{index } 2 < 25\%$, $25\% \leq \text{index } 3 < 50\%$, $50\% \leq \text{index } 4$.

第3節 考 察

これまで日本における遺伝子組換え植物の環境に対する安全性評価試験については、CMV 外被タンパク質遺伝子を導入した組換えメロン（田部井ら 1994a, 田部井ら 1994b）、16kDa アルブミンに対するアンチセンス遺伝子を導入した組換えイネ（多田ら 1996, 多田ら 1997）およびパパイヤリングスポット外被タンパク質遺伝子を導入した組換えパパイヤ（小森ら 2002）などが報告されている。本研究では、イネ由来キチナーゼ遺伝子を導入したうどんこ病抵抗性イチゴの安全性評価を行った。評価に先立って、閉鎖系温室でキチナーゼ遺伝子導入イチゴをランナー増殖させ、慣行の促成栽培を行って病害抵抗性を検定し、うどんこ病抵抗性を示すことを再確認した。このような遺伝子組換え植物を実用化するには、環境に対する安全性評価を行う必要があり、幾つかの項目において評価試験を行った。遺伝子組換えイチゴの花粉は正常でかつ風によって飛散する距離にも差異がなかったことから、導入遺伝子は生殖細胞に影響を与えなかったと判断できる。また、遺伝子組換えイチゴの栽培土壌における微生物相（糸状菌，細菌，放線菌）は非組換えイチゴの栽培土壌と差異が無く、栽培土壌が後作（二十日大根、ホウレンソウ）の生育に対して影響を与えなかった。これは、HPLC 分析と GC 分析において遺伝子導入によって新たな根からの分泌物や茎葉からの揮発性物質が検出されなかったことを裏付ける結果と考えられる。遺伝子組換えイチゴの茎葉表面、根部および茎葉組織内からアグロバクテリウムが検出されなかったことは、遺伝子導入時に用いたキチナーゼ遺伝子とカナマイシン抵抗性遺伝子を持ったアグロバクテリウムが環境へ放出されていないことを示している。

以上のように、閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場における安全性評価試験を行った結果、遺伝子組換えイチゴはうどんこ病抵抗性が高まった以外に非組換えイチゴとの差異は認められなかった。よって、遺伝子組換えイチゴの栽培が環境に与える影響は、非組換えイチゴを栽培したときの影響と同等であると結論付けた。なお、非閉鎖系温室における安全性評価試験の概要を記した安全性評価実験等中間報告書を文部科学省へ提出し、1997 年 9 月に受理され、隔離圃場試験への移行が承認された。また、隔離圃場での試験を遂行するために農林水産省へ提出した組換え植物利用計画は、「農林水産分野等における組換え体利用のための指針」に適合していることが 1998 年 4 月に確認され

た。

今後、本遺伝子組換えイチゴを実用化するためには、厚生労働省の「食品衛生法」に基づく「食品，添加物等の規格基準」(<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/enzen/enzen.html>) に従って、食品としての安全性評価が必要である。これにもとづき、薬事・食品衛生審議会において、導入遺伝子の安全性、導入遺伝子産物の毒性の有無、導入遺伝子の間接的作用による有害物質産生の有無、アレルギー誘発性の有無および遺伝子導入による成分の重大な変化の有無などの項目において食品としての安全性が審査され、問題がなければ商業的栽培が可能になる。すなわち、イチゴのような食品として利用する作物の遺伝子組換え植物を実用化するには、環境に対する安全性評価と食品としての安全性評価が必要であるが、本研究はそのうち環境に対する安全性を評価したものであり、この遺伝子組換えイチゴの実用化に向けて一歩前進したと考えられる。

第3編 総合考察

植物は移動できないため、普段からさまざまなストレスにさらされながら一生を終える。そのため、本来植物が有する生産力を最大限に発揮できずにいる。それらストレスには病害虫からの攻撃、高温や低温などの悪環境および塩や重金属などの悪土壌条件がある。狭い土地で集約的農業を特色とする日本の農業において、病原菌感染による収穫量の低下はしばしば問題となっている。また、最近特に食の安全性に関心が高まり、減農薬栽培が消費者からも望まれるようになってきた。奈良県だけでなく日本でも栽培面積の多いナスとイチゴにおいて、耐病性品種による農薬散布回数が少なくすむ省力栽培が農家から望まれており、消費者も減農薬栽培による安全な作物の供給を期待している。本研究においては、ナス台木とイチゴの耐病性個体の育成を目指し、細胞融合技術と遺伝子組換え技術を駆使して目的とする個体を作成した。

ナスにおいては通常耐病性台木に栽培品種を接ぎ木した苗が用いられているが、最近台木の効果も薄れて青枯病の発生が増加し、高度な耐病性台木の育成が望まれている。1990年に奈良県農業技術センターで育成された「カレヘン」は高度青枯病抵抗性を有していたが、低温伸長性が悪く、春先に行う接ぎ木作業に手間がかかり、普及させるにはこの点を改善する必要があった。そこで、「カレヘン」と同程度以上の青枯病抵抗性を持ち低温伸長性を有する個体を育種目標にして、「カレヘン」とナス栽培品種「千両二号」との細胞融合を行った。得られた体細胞雑種は両親の染色体をあわせ持ち、草型、花および果実などの表現型も中間の形態を示し、しかも「カレヘン」と同程度の青枯病抵抗性を有していた。また、従来の体細胞雑種の多くが不稔で種子が形成されないのに対して、本研究で作出された体細胞雑種は稔性があり種子も多数形成された。さらに、その自殖後代は低温伸長性も獲得しており、胚軸も太いことから、「カレヘン」の接ぎ木の手間がかかるという欠点も改善されていた (Asao *et al.* 2001)。そこで、この体細胞雑種を「ナクロス」と命名して1997年に種苗登録した。1978年 (Melchers *et al.*) に体細胞雑種であるポマトが作出されて以来、さまざまな組み合わせで細胞融合が行われてきたが、体細胞雑種の後代が染色体の脱落などで不安定になることが多く、得られた体細胞雑種が品種となったものは少ない。本研究で育成した「ナクロス」は、品種として登録した数

少ない体細胞雑種の一つであり、今後の普及が期待できる。

一方、植物分子生物学の進歩によって、植物の育種や二次代謝産物生産に遺伝子組換え技術を導入することが可能になった。実際、遺伝子工学によって病害抵抗性遺伝子を導入した耐病虫性植物や、アンチセンス RNA によって目的遺伝子の翻訳を抑制した植物などの作出が盛んに行われている。また、地球規模で議論されている環境破壊や食糧不足の問題解決に貢献するような植物を分子育種する研究も活発に行われている。タバコやシロイヌナズナなどの実験植物においては、多くの基礎的研究が行われているが、イチゴなどの栽培植物における遺伝子組換え実験は少ない。そこで、イチゴやナスへの有用遺伝子の導入実験を進めてきた（浅尾ら 2000）。特にイチゴについては、独自の培養系を用いて（荒井・浅尾 1993）、日本の品種で初めて *Agrobacterium tumefaciens* を介した遺伝子の導入に成功し（浅尾ら 1994）、うどんこ病抵抗性を示したイネ由来キチナーゼ遺伝子導入イチゴ（Asao et al. 1997）の環境に対する安全性評価試験を行った（浅尾ら 2003）。日本で最も栽培面積の大きいイチゴ「とよのか」の欠点であるうどんこ病に対して罹病性であるという形質を改善するのに、キチナーゼ遺伝子の導入が有効であることを本研究は示しており、将来遺伝子組換え技術はイチゴ育種の一手法になると考えられる。しかし、遺伝子組換え作物の作出技術にも改善すべき課題が残されている。その一つは、導入遺伝子を効率よく発現させるシステムの整備である。導入遺伝子を時期、部位特異的に発現させることができれば、植物の負担も少なくすむし、消費者に対するパブリックアクセプタンスにも役立つ。以前からキュウリのアスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子のプロモーターに注目し、傷害誘導性に係わるシス因子の同定とそれに結合する転写因子について解明してきた（Asao et al. 2003）。今後、このプロモーターを含めいろいろなシステムをイチゴへ適用することにより、実用的な遺伝子組換えイチゴの育成を目指したい。

以上、本研究では、細胞融合技術を用いて青枯病抵抗性ナス台木「ナクロス」を育成し、遺伝子組換え技術を用いてうどんこ病抵抗性イチゴを育成した。これらは、バイオテクノロジー技術が育種の一手法として有効であることを示すもので、従来の交配育種を補完する技術として将来的に有効利用されることを期待したい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご助言を賜りました奈良県農業技術センター高原振興センターの荒井 滋所長に謹んで感謝の意を表します。

論文作成に際し適切な御助言を頂いた神戸大学の上島脩志教授、安田武司教授、中村千春教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の共同研究者としてイネ由来キチナーゼ遺伝子を分譲していただき御指導賜りました東京大学の日比忠明教授と生物資源研究所の西澤洋子博士、青枯病萎凋誘導物質の単離に御助言を頂いた奈良県農業技術センターの谷川元一博士、細胞融合実験について適切な御助言を頂いた京都府立大学の平井正志教授に厚く御礼申し上げます。

分子生物学的解析において適切な御助言と御指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学の新名惇彦教授、吉田和哉助教授、関根政実博士、加藤 晃博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、いろいろとお世話になりました奈良県農業技術センターの都築正男氏をはじめとする皆様に心より感謝致します。

引用文献

- 荒井 滋, 浅尾浩史 (1993) イチゴ葉組織からのカルス誘導と植物体再生. 奈良農試研報. 24:19-24.
- Araki, T., H. Hirano, S. Naito and Y. Komeda (1989) Introduction of foreign genes into *Pharabits nil* calli using a vector derived from *Agrobacterium* pTi. Plant Cell Rep. 8:259-262.
- 浅尾浩史, 谷川元一, 荒井 滋, 小嶋博文 (1989) 栽培ナスおよび近縁野生種の葉肉プロトプラストからの植物体再生. 奈良農試研報. 20:73-78.
- 浅尾浩史, 谷川元一, 岡山健夫, 荒井 滋 (1992) 青枯病萎凋誘導物質を用いた細胞選抜法による耐病性ナス科個体の作出. 奈良農試研報. 23:7-12.
- 浅尾浩史, 荒井 滋, 佐藤隆徳, 平井正志, 日比忠明 (1994) *Agrobacterium tumefaciens* によるイチゴ形質転換体の作出. 植物組織培養. 11(1):19-25.
- 浅尾浩史, 都築正男, 西澤洋子, 荒井 滋 (2000) イチゴおよびナス科植物の耐病虫性育種. 生物工学会誌. 78(8):321-324.
- 浅尾浩史, 荒井 滋, 西澤洋子 (2003) イネ由来キチナーゼ遺伝子を導入したイチゴの安全性評価. 生物工学会誌. 81(2):57-63.
- Asao, H., S. Arai, T. Sato and M. Hirai (1994) Characteristic of a somatic hybrid between *Solanum melongena* L. and *Solanum sanitwongsei* Crib. Breed. Sci. 44:301-305.
- Asao, H., Y. Nishizawa, S. Arai, T. Sato, M. Hirai, K. Yoshida, A. Shinmyo and T. Hibi (1997) Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. Plant Biotech. 14(3):145-149.
- Asao, H., S. Arai and M. Hirai (2001) Somatic hybridization between *Solanum melongena* L. (Eggplant) and *Solanum sanitwongsei* Craib. Biotech. Agri. Forestry. 49:233-244.
- Asao, H., K. Yoshida, Y. Nishi and A. Shinmyo (2003) Wound-responsive *cis*-element in the 5'-upstream region of cucumber ascorbate oxidase gene. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(2):271-277.
- Bartnicki-Garcia, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and

- taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:87-108.
- Bent, A. F., B. N. Kunkel, D. Dahlbeck, K. L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leung and B. J. Staskawicz (1994) RPS2 of *arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*. 265:1856-1859.
- Bhatt, D. P. and G. Fassuliotis (1981) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:81-89.
- Bidney, D. L., J. F. Shepard and E. Kaleikau (1983) Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Brassica oleracea*. *Protoplasma*. 117:89-92.
- Boller, T. (1988) Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. *Oxford Surveys Plant Mol. Cell. Biol.* 5:145-174.
- Broglie, K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, P. Knowlton, C. J. Mauvais and R. Broglie (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*. 254:1194-1197.
- Dudman, W. F. (1959) Comparison of slime from tomato and banana strains *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*. 184:1969-1970.
- Daunay, M. C., M. H. Chaput, D. Sihachakr, M. Allot, F. Vedel and G. Ducreux (1993) Production and characterization of fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Theor. Appl. Genet.* 85:841-850.
- Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19(6):1349.
- FAO (2002) FAO FAOSTAT.
- 藤本まなみ, 浅尾浩史, 小島博文, 小玉孝司 (1987) 茎頂部の腋芽増殖によるイチゴの効率的な大量増殖. *奈良農試研報*. 18:66-71.
- Gasser, C. S. and R. T. Fraley (1989) Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*. 244:1293-1299.
- Gleddie, S., G. Fassuliotis, W. A. Keller and G. Setterfield (1985) Somatic hybridization as a potential method of transferring nematode and mite

- resistance into eggplant. *Z. pflanzenzuchtg.* 94:352-355.
- Gleddie, S., W. A. Keller and G. Setterfield (1986a) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena* L. *Can. J. Bot.* 64:335-361.
- Gleddie, S., W. A. Keller and G. Setterfield (1986b) Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. *Theor. Appl. Genet.* 71:613-621.
- Gowda, S. S. and R. P. Vittal (1980a) Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopath. Z.* 98:68-75.
- Gowda, S. S. and R. P. Vittal (1980b) Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum* II. *Phytopath. Z.* 98:76-81.
- Grant, M. R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattler, R. W. Innes and J. L. Dangl (1995) Structure of the arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science.* 269:843-846.
- Guri, A. and S. Izhar (1984) Improved efficiency of plant regeneration from protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Rep.* 3:247-249.
- Guri, A. and K. C. Sink (1988a) Organelle composition in somatic hybrids between an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* and *Solanum melongena*. *Plant Science* 58:51-58.
- Guri, A. and K. C. Sink (1988b) Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. *Theor. Appl. Genet.* 76:490-496.
- 平野茂博 (1991) キチナーゼ活性の測定法. キチン、キトサン実験マニュアル. :105-129.
- Husain, A. and A. Kelman (1958a) Relation slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 48:155-165.
- Husain, A. and A. Kelman (1958b) The role of pectin and cellulolytic enzymes in pathogene by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 48:377-386.
- Ikeda, S., H. Toyoda, K. Yoshida, K. Koreeda, K. Chatani and S. Ouchi (1992)

- Digestion of haustoria of *Sphaerotheca* powdery mildew fungi by an exogenous chitinase. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 58:780-783.
- Imoto, T. and K. Yagishita (1971) A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.* 35:1154-1156.
- James, D. J., A. J. Passey and D. J. Barbara (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria* × *Ananassa* Duch.) using disarmed binary vector. *Plant Sci.* 69:79-94.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan (1987) GUS fusion: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Jia, J. and I. Potrykus (1981) Mesophyll protoplasts from *Solanum melongena* var. depressum barley regenerate to fertile plant. *Plant Cell Rep.* 1:71-72.
- Jones, D. A., C. M. Thomas, K. E. Hammond-Kosack, P. J. Balint-Kurti and J. D. Jones (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science.* 266:789-793.
- Kameya, T., N. Miyazawa and S. Toki (1990) Production of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. integrifolium* Poir. *Japan. J. Breed.* 40:429-434.
- Kao, K. N. and M. R. Michayluk (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cell and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126:105-110.
- 小森貞男, 深町 浩, 真岡哲夫, 日高哲志, 小川一紀 (2002) パパイアリングスポットウイルス外被タンパク遺伝子を導入した組換えパパイアの隔離圃場における環境に対する安全性評価. *育種学研究.* 4:137-145.
- Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima and Y. Arai (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci.* 70:133-140.
- Lin, W., C. S. Anuratha, K. Datta, I. Potrykus, S. Muthukrishnan and K. Datta (1995) Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology.* 13:686-691.

- Mauch, F., B. Mauch-Mani and T. Boller (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88:936-942.
- Martin, G. B., S. H. Brommonschenkel, J. Chunwongse, A. Frary, M. W. Ganai, R. Spivey, T. Wu, E. D. Earle and S. D. Tanksley (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science.* 262:1432-1436.
- Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43:203-218.
- Menczel, L., I. Nagy, Z. R. Kizz and P. Maliga (1981) Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana* : correlation of resistance to *N. tabacum* plastid. *Theor. Appl. Genet.* 59:191-195.
- 峯岸正好, 内藤 潔, 印田晴久, 野村寿志, 宮本重信 (1991) ナス青枯病抵抗性台木「カレヘン」の育成. 近畿中国農研. 81:16-20.
- Monika, B. (1980) Selection of dihaploid potato callus for resistance to culture filtrate of *Fusarium oxysporum*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 85:254-258.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nagata, T., Okada K., Kawazu K. and T. Takebe (1987) Cauliflower mosaic virus 35S promoter directs S phase specific expression in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 207:242-244.
- Nehra, N. S., C. Stushnoff and K. K. Kartha (1990a) Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria* \times *ananassa*). *Plant Sci.* 66:119-126.
- Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. S. S. Dalta, W. L. Croby and C. Stushnoff (1990b) *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 9:10-13.
- Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. S. S. Dalta, W. L. Croby and

- C. Stushnoff (1990c) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep.* 9:293-298.
- Nishio, T., T. Sato and K. Takayanagi (1987) Efficient plant regeneration from hypocotyls protoplasts in eggplant (*Solanum melongena* L. and *Solanum insanum* L.). *Japan. J. Breed.* 37:389-396.
- 西澤洋子、阿久津克己、日比忠明 (1992) 植物溶菌酵素遺伝子の導入による菌類病抵抗性植物の作出. *植物防疫.* 46(13):500-506.
- Nishizawa, Y. and T. Hibi (1991) Rice chitinase gene: cDNA cloning and stress-induced expression. *Plant Sci.* 76:211-218.
- Nishizawa, Y., N. Kishimoto, A. Saito and T. Hibi (1993) Sequence variation, differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes. *Mol. Gen. Genet.* 241:1-10.
- Saxena, P. K., R. Gill, A. Rashid and S. C. Mheshwari (1981) Plantlet formation from isolated protoplasts of *Solanum melongena* L. *Protoplasma.* 106:355-359.
- Schell, M. (1987) Purification and characterization of an endoglucanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2237-2241.
- Shepard, J. F and R. E. Totten (1977) Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiol.* 60:313-316.
- Sihachakr, D., R. Haicour, I. Serraf, E. Barrientos, C. Herbreteau, G. Ducreux, L. Rossignol and V. Souvannavong (1988) Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B.Clark. *Plant Science.* 57:215-223.
- Sihachakr, D., R. Haicour, M. H. Chaput, E. Barrientos, G. Ducreux and L. Rossignol (1989) Somatic hybrid plants produced by electrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* Sw. *Theor. Appl. Genet.* 77:1-6.
- Stiekema, W. J., F. Heidekamp, J. D. Louwerse, H. A. Verhoeven and P. Dijkhuis (1988) Introduction of foreign genes into potato cultivar Bintje using an *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 7:47-50.
- Song, W. Y., G. L. Wang, L. L. Chen, H. S. Kim, L. Y. Pi, T. Holsten, J.

- Gardner, B. Wang, W. X. Zhai and L. H. Zhu (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*. 270:1804-1806.
- 田部井 豊, 大澤勝次, 西村繁夫, 花田 薫, 吉岡啓子, 藤沢一郎, 中島皐介 (1994a) CMV外被タンパク質遺伝子を導入した組換えメロンの閉鎖系温室及び非閉鎖系温室における環境に対する安全性評価(I). *Breed. Sci.* 44:101-105.
- 田部井 豊, 大澤勝次, 西村繁夫, 渡辺紳一郎, 土屋健一, 吉岡啓子, 藤沢一郎, 中島皐介 (1994b) CMV外被タンパク質遺伝子を導入した組換えメロンの閉鎖系温室及び非閉鎖系温室における環境に対する安全性評価(II). *Breed. Sci.* 44:207-211.
- 多田雄一, 山田 実, 澤田倫平, 佐本史郎, 松田 幹, 安達貴弘, 中村 良, 高橋正昌, 藤村達人, 島田浩章 (1996) 16 Kda アルブミンに対するアンチセンス遺伝子を導入した組換えイネの環境に対する安全性評価 (I) . *Breed. Sci.* 46:403-407.
- 多田雄一, 原田二郎, 松村 雄, 山田 実, 松田 幹, 安達貴弘, 中村 良, 高橋正昌, 藤村達人, 島田浩章 (1997) 16 Kda アルブミンに対するアンチセンス遺伝子を導入した組換えイネの環境に対する安全性評価 (II) . *Breed. Sci.* 47:77-81.
- 谷川元一, 浅尾浩史, 岡山健夫 (1991) ナス科青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) が生産する細胞外多糖物質の萎凋誘導活性と構成成分. *奈良農試研報*. 22:23-27.
- Terada, R. K. and K. Shimamoto (1990) Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* 220:389-392.
- Toyoda, H., K. Horikoshi, K. Inaba and S. Ouchi (1990) Plant regeneration of callus tissues induced from leaf explants of strawberry. *Plant Tissue Cult. Lett.* 7(1):38-41.
- Wallis, F. M. and S. J. Truter (1978) Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum* with emphasis on ultrastructure. *Physiol. Plant Pathol.* 13:307-317.
- Whitham, S., S. P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr and B. Baker (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N:

similarity to toll and the interleukin-1 receptor. Cell. 78:1101-1115.

Xu, Z. H., Davey M. R. and E. C. Cooking (1981) Isolation and sustained division of *Phaseolous aureus* (mung bean) root protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 104:289-298.

Zhu, Q., E. A. Maher, S. Masoud, R. A. Dixon and C. J. Lamb (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Bio/Technology. 12:807-812.

要 約

育種家は交配を繰り返しながら人間にとって都合のいい有用な形質を持った作物を育成してきた。しかし、このような伝統的な品種改良技術にも限界がある。この限界を打破する技術として、交配のできない組み合わせでも両親の遺伝子をあわせ持った植物の作出が可能な細胞融合法や特定の遺伝子を導入することができる遺伝子組換え技術が有効である。そこで、耐病性を有するナス台木とイチゴの作出を育種目標にして、細胞融合および遺伝子組換え技術を用いた研究を行った。

第1編では、細胞融合技術を用いた青枯病抵抗性を持つ有用ナス台木の育成を育種目標に実験を行った。まず、ナスの栽培品種と台木品種において、プロトプラスト単離条件、コロニー形成率に及ぼすプロトプラスト培養における培地の種類と細胞密度の影響および再分化の最適条件を決定した。また、青枯病萎凋誘導物質の培養過程での添加が耐病性個体の選抜に有効であることを解明した。ナス栽培品種「千両二号」と台木品種「カレヘン」の融合細胞を青枯病萎凋誘導物質を添加した培地で培養することにより、耐病性を有する体細胞雑種が作出された。体細胞雑種は、形態的には両親の中間を示し、染色体数は両親の染色体をあわせ持った48本で、種子稔性は良好であり、しかも青枯病に対して抵抗性を示した。そこで、この体細胞雑種はナスの青枯病抵抗性台木として普及が期待できることから、1997年に「ナクロス」として種苗登録した。

第2編では、遺伝子組換え技術を用いた耐病性イチゴの作出を育種目標に実験を行った。良味性と病害抵抗性をあわせ持った品種を効率的に育成するには、目的とする遺伝子を付与することができる遺伝子組換え技術のイチゴへの応用は有効であると考えられる。また、イチゴはランナーで増殖する栄養繁殖性植物であることから、遺伝子組換えで有望な個体を選抜できれば、それを増殖して直ちに品種にできる利点がある。まず、イチゴ主要品種への遺伝子導入における最適条件を解明し、導入されたレポーター遺伝子 (*GUS* 遺伝子) がランナーにおいても発現することを確認した。次に、病害抵抗性を獲得するのに有望であると考えられるイネ由来キチナーゼ遺伝子をイチゴ「とよのか」へ導入して、うどんこ病抵抗性個体を選抜した。そして、このうどんこ病抵抗性を示したイチゴについて閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場において環境に対する安全性評価試験を行ったところ、うどんこ病抵抗性が高まった以外に非組

換えイチゴとの差異は認められなかった。よって、遺伝子組換えイチゴの栽培が環境に与える影響は、非組換えイチゴを栽培したときの影響と同等であると結論付けた。

第3編では、総合考察を行った。本研究で用いた細胞融合技術や遺伝子組換え技術が、従来の交配育種を補完する技術として将来的に有望であることを言及するとともに、遺伝子組換え技術の改善すべき課題について述べた。

Summary

Breeders have produced crops with excellent characteristics that are convenient to human beings through crossing. However, such conventional breeding has its limit. We note a technique to exceed that limit: a cell fusion method to produce plants with genes of both parents which otherwise could not be crossed, along with recombinant DNA to introduce specific genes. Then, we use cell fusion and recombinant DNA technologies to study breeding for producing disease-resistant eggplant rootstocks and strawberries.

The first chapter explains our experiments performed by means of a cell fusion technique for breeding. Their purpose is production of utility eggplant rootstocks with wilt disease resistance. Regarding eggplant cultivated species, *Solanum melongena* cv. Senryou II, and the rootstock, “Karehen” (*Solanum sanitwongsei*), we determined: optimum conditions for protoplast isolation, the protoplast culture medium and cell density affecting colony formation, and optimum conditions for redifferentiation. In addition, we clarified that adding wilt-inducing substances during protoplast culture was effective for selecting disease-resistant plants. Fusion cells of *Solanum melongena* cv. Senryou II and *Solanum sanitwongsei* were cultured in a medium supplemented with wilt-inducing substances to produce a somatic hybrid with disease resistance. The somatic hybrid was morphologically proven to be an intermediate form of its parents, with 48 chromosomes from parents, and fertility. Moreover, this plant showed disease resistance. Subsequently, the somatic hybrid was registered in 1997 as “Nakuros” because this plant was expected to spread as an eggplant wilt-disease resistant rootstock.

The second chapter describes experiments we conducted for the breeding purpose of producing disease-resistant strawberries using recombinant DNA. It is considered more effective to apply recombinant DNA technology to strawberries that allows targeted gene introduction. Thereby, varieties that have good taste and disease resistance could be produced efficiently. Moreover, strawberries offer the merit that another variety can be made quickly by selecting promising plants through recombinant DNA because strawberries propagate vegetatively and by runners. First, we elucidated an optimum condition in genetic introduction to the strawberries' major cultivars; we confirmed that the introduced reporter gene (the *GUS* gene) appeared in

the runner. Second, we selected the powdery-mildew resistant strawberry from “Toyonoka” successfully by introducing rice-derived chitinase genes, which are considered to provide disease resistance. Ultimately, environmental safety assessment tests for powdery-mildew strawberries in a closed green house, in an unclosed green house, and at isolated farms indicated no other difference from transgenic strawberries than their evaluated powdery-mildew resistance. Therefore, we concluded that transgenic strawberries have the same effect on the environment as non-transgenic strawberries.

The third chapter offers general discussion addressing cell fusion and recombinant DNA technology as promising technologies to complement conventional breeding. We describe problems that hinder improvement of relevant recombinant DNA technology.