

茨城農総セ
生工研研報
Bull. Ibaraki
Plant Biotech.Inst.
No. 5 2002

BULLETIN
OF THE
PLANT BIOTECHNOLOGY INSTITUTE
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER

NO. 5
March 2002

茨城県農業総合センター 生物工学研究so研究報告

第 5 号

平成 1 4 年 3 月

茨城県農業総合センター
生物工学研究so

茨城県西茨城郡岩間町安居 3 1 6 5 - 1
Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki, 319-0292, Japan

目 次

菌類病に複合抵抗性をもつ組換えキク植物の作成に関する研究

高津康正 1

水稻新品種「ひたち錦」の育成

須賀立夫、飯田幸彦、横田国夫、桐原俊明、西宮智美、高木嘉明、

埴 治雄、奥津喜章 41

サツマイモ品種「ベニアズマ」のウイルスフリー系統「B-27」

横田国夫、飯田幸彦、桐原俊明、榎村英一、須賀立夫 53

食用ハスの中生品種「霞ヶ浦」および早生品種「早霞」（はやか）の

育成とその特性

霞 正一、小松鋭太郎、八城和敏、佐久間文雄、雨ヶ谷洋、江面 浩、

西宮 聡、宮川雄一、飯田伸彦、石塚由之 61

菌類病に複合抵抗性をもつ 組換えキク植物の作成に関する研究

高 津 康 正

目 次

第Ⅰ章 緒 言	1
第Ⅱ章 アグロバクテリウムを用いたキクの効率的な形質転換系の確立	2
第1節 緒 言	2
第2節 材料および方法	2
第3節 結果および考察	3
第Ⅲ章 組換えキク植物における導入遺伝子の不活化に関する検討	7
第1節 緒 言	7
第2節 材料および方法	7
第3節 結果および考察	8
第Ⅳ章 イネ・キチナーゼ遺伝子を用いた灰色かび病抵抗性キク植物の作出	11
第1節 緒 言	11
第2節 材料および方法	12
第3節 結果および考察	14
第Ⅴ章 無菌培養植物を用いたキクの白さび病菌に対する効率的な抵抗性 検定法（プラントボックス法）の確立	19
第1節 緒 言	19
第2節 材料および方法	19
第3節 結果および考察	20
第Ⅵ章 プラントボックス法による白さび病抵抗性組換えキク植物の選抜	23
第1節 緒 言	23
第2節 材料および方法	23
第3節 結果および考察	24

第Ⅶ章 総合考察	28
摘 要	32
謝 辞	33
引用文献	33
Summary	38

目 次

略語一覧

GUS :	β -1,3,-glucuronidase	
IAA :	indole-3-acetic acid	
NAA :	1-naphthaleneacetic acid	
BA :	6-benzyladenine	
MS :	plant culture media by Murashige and Skoog (1962)	
NPT II :	neomycin phosphotransferase II	
EDTA :	ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt	
MUG :	4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide	
MU :	4-methylumbelliferone	
PCR :	polymerase chain reaction	
CaMV :	cauliflower mosaic virus	

第1章 緒言

キク (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) はバラ、カーネーションとともに世界の3大花きの一つとされ、国内においても品目別生産量の第一位を占める重要な花き品目である。本植物はキク科キク属に属する宿根草で、遺伝的には $2n=54$ を中心とする6倍性異数体群であることが明らかにされている(遠藤・稲田1992)。現在の栽培種については、唐時代に中国中部でチョウセンノギク (*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura) とシマカンギク (*C. indicum* L.) が交雑して $2n=27$ の雑種が生じ、染色体数が倍加してその祖先が生じたものと推定されている(川田1989)。日本へは798年ころ伝来したとする説があり、以後、栽培ギク(輪ギク、小ギクなど)として独自の発達を遂げている。一方、欧州へはわが国から1688年にもたらされて改良が進み、スプレーギクとして発達した。スプレーギクは近年、日本へ再度導入され1975年より本格的な栽培が開始されている(岡田1984、樋口1984)。栽培ギクは形態的にも生態的にも極めて多彩な品種分化がみられ、生産の場面においては形態的・生態的特性から輪ギク、小ギクおよび欧州より導入されたスプレーギクに類別されており、それぞれの産地の特徴となっている。茨城県においては花径が6 cm以下の小輪で分枝力の強い小ギクの生産が主流であり、とくに夏場の出荷においては京浜市場の約70%のシェアを占める重要な花き品目の一つである。しかしながら本県の産地においては栽培面での施設化が進んでおらず、ほとんどが露地の季咲き栽培であるためにとくに病害防除には多大な労力を要している。

農産物の生産現場において、病害のコントロールは主に農薬によって行われているのが現状である。しかし単一薬剤を連用するなどの農薬使用は、薬剤耐性菌等の出現を誘発する原因の一つとなっていると考えられ(阿久津1990)、加えて経営上のコスト低減および環境にやさしい農業を確立するためには使用量をなるべく抑えることが求められている。これらのことから将来的には抵抗性品種の導入、生物的防除および薬剤防除等を組み合わせて総合的に病害をコントロールしていくことが望まれる。また露地の小ギク栽培では白さび病をはじめとしたいくつかの病害が、季節や気候条件により単独または重複して発生するために、重要病害である白さび病に対する抵抗性に加えて他の病害にも複合抵抗性をもった品種が望まれる。しかしながら、現在の栽培ギクはわずかな抵抗性品種を除き白さび病抵抗性を有していないことが示されており(山口1981)、また他の

病害については抵抗性の品種間差異等に関する知見に乏しい。さらに数種類の病害に複合抵抗性をもつ育種素材としては野生種にその可能性が考えられる程度であり、従来からの交配育種による白さび病等に対する複合抵抗性品種の育成は非常に困難であるといわざるを得ない。

このようなことから、遺伝子組換え(形質転換)技術を応用して菌類病に複合抵抗性をもつ組換えキク植物の育成を試みた。近年、形質転換技術の発達により、花きの分野でも青いカーネーション(Tanakaら1998)などの組換え植物が作出され、市場で評価を受けている。遺伝子組換えによる育種の利点としては、交配育種では不可能な新形質を付与できること、目的とする形質のみを改良することができること(ワンポイント改良)などが挙げられる。キクにおいてもこれまでに形質転換に関する報告は多く、GUS活性またはカナマイシン耐性をもつ組換えキク植物(De Jongら1994, Fukaiら1995, Ledgerら1991, Pavingerovaら1994, Renouら1993, Wordragenら1992)およびウイルス抵抗性をもつ組換えキク植物(Shermanら1998b)が作出されているが、菌類病に対し抵抗性をもつ組換えキク植物の作出は報告がない。またキクにおいては形質転換効率が低いこと、成功例のある品種およびアグロバクテリウムの系統が限られていること、さらに導入遺伝子の不活化などが問題となっている。このため形質転換を利用して育種を行う場合には効率的な形質転換系の確立および導入遺伝子の安定的な発現が不可欠となる。さらに目的とする形質をもつ組換え系統を効率よく選抜する方法など、いくつかの点に関して検討を行って形質転換法を実用的な育種方法として確立し、有用な組換え植物を獲得していくことが重要である。

本論文は、キクの効率的な形質転換系の確立、導入遺伝子の経時的な発現の状況および形質転換によるイネ・キチナーゼ遺伝子(Nishizawaら1993)のキクへの導入について記述し、キク育種における形質転換法の有用性を明らかにすると同時に、作出した組換え植物の菌類病抵抗性の増強について考察したものである。まず第Ⅱ章でキクの効率的な形質転換系の確立について、次に第Ⅲ章で導入遺伝子の経時的な発現の状況について述べ、第Ⅳ章でイネ・キチナーゼ遺伝子のキクへの導入と、得られた組換え植物の灰色かび病に対する抵抗性の増強について記述した。さらに第Ⅴ章および第Ⅵ章で、キクの重要病害である白さび病に対する効率的な抵抗性検定方法の確立および組換え植物の白さび病に対する抵抗性の増強について記述し、第Ⅶ章において本研究で得られた結果を総合的に考察した。

なお本研究は茨城県農業総合センター生物工学研究所において実施した、バイオテクノロジー試験研究推進事業「キクの細胞培養等を利用した優良品種の育成」(平成4年～13年)の内容をとりまとめたものである。この論文の一部は既に高津ら(1998), Takatsuら(1999)として、ならびにTakatsuら(1998)園学雑67(別1):246, 高津ら(1998)日植病報64:366, 高津ら(1998)育雑48(別2):134, 高津ら(1999)植物細胞分子生物学会大会講要:32, 高津ら(1999)日植病報65:659, 高津ら(1999)茨病虫研報38:6-12, Takatsuら(2000)Plant Biotech. 17:241-245, Takatsuら(2000)Plant Breeding 119:528-530, 高津ら(2000)日植病報66:117, Takatsuら(2000)ACPP Proceedings:245, 高津ら(2000)育種学研究2(別2):107 および高津ら(2001)日植病報67:181として報告した。

第II章 アグロバクテリウムを用いたキクの効率的な形質転換系の確立

第1節 緒言

近年、形質転換技術の進展によってさまざまな新形質をもった植物が育成されつつある。形質転換を応用して育種を行う場合にはいくつかの解決しなければならない問題があるが、まず外植体からの茎葉再分化系の確立が挙げられる。とくにアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を利用した形質転換においてはこのことが必須の要件となる。キクの茎葉再分化系についてはこれまでにいくつかの報告があり特定の品種および系統 (genotype) においては形質転換系も確立されている (間ら1992, De Jongら1995, Fukaiら1995, Ledgerら1991, Renouら1993, Yepesら1995)。しかしながら茎葉再分化能には著しい品種間差異のあることが報告されており (De Jongら1993, 深井ら1987, Kaulら1990, Ledgerら1991, 宮崎ら1976, Renouら1993, 柴田ら1992, Urbanら1994), 効率的な形質転換系の確立のためにはあらかじめ供試品種の再分化能を把握しておく必要がある。また、キクの形質転換においてはこれまでに報告のある品種・系統およびアグロバクテリウムの系統が極めて限られていることが実用上の問題となっている。形質転換効率についても一部の系統で15.6 %という報告もあるが (Fukaiら1995), ほとんどの報告では数%以下に留まっており国内の品種では0.1 %程度とされている (間, 私信)。このようなことから形質転換を育種技術として利用するためには、容易に入手可能な菌株を用いてある程度の形質転換効率を得ることが是非とも必要である。

本章では、まず茨城県内で栽培されている主要な輪ギクおよ

び小ギク (以下キクと略す) 23品種・系統について茎切片からの茎葉再分化能の品種間差異を調査し、高い茎葉再分化能をもつ品種を選抜した。次に選抜培養条件の検討を行い、各種抗生物質がキク品種の茎葉再分化および発根におよぼす影響を調査して適当な選抜圧濃度を決定した。さらに共存培養条件を検討することにより、市販のアグロバクテリウム LBA4404 系統を用いた効率的な形質転換系の確立を試みた。

第2節 材料および方法

実験1. 茎切片培養における茎葉再分化能の品種間差異の検討

形質転換系に用いる外植体としては、これまでに葉片、茎切片、葉柄および小花柄等が用いられてきたが (De Jongら1995, Renouら1993, Fukaiら1995, Urbanら1994), 茎葉再分化率が低いこと、体細胞変異の発生等が問題となっていた。一方, Kaulら (1990) および柴田ら (1992) が確立した茎切片を用いたダイレクトな茎葉再分化系はカルスを経由しないために再分化に要する日数が短く、体細胞変異が起こりにくいという利点がある。著者らは4品種のキクを用いて葉片と茎切片を比較したところ茎切片がより高い再分化能を持つことが明らかとなり (データ省略), これらのことから外植体として茎切片を用いることとした。

茨城県内の産地より収集したキク23品種 (Table 1) を供試して茎切片培養を行った。母本となる無菌培養植物は以下のようにして獲得した。ガラスハウス内で育成したキクの母株より採取した腋芽を含む茎を長さ2 cmに調製して、0.1 %次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間滅菌し、滅菌水で3回洗浄した後、1/2 Murashige-Skoog (1/2 MS) 培地 (Murashige・Skoog 1962) に IAA 0.2 mg · liter⁻¹, ショ糖30 g · liter⁻¹ およびゲルライト3 g · liter⁻¹ を添加した培地上で培養した。発生したシュートをMS培地を40 mlずつ分注したプラントボックス ((株)ベルディ, 愛知) 内で継代培養して茎切片培養に供試した。

茎切片培養は柴田ら (1992) の方法を改変して行った。すなわち無菌培養植物の茎 (節間部) を3 mm長に切断し、さらに縦方向に二分割して茎切片を調製した。MS培地にNAA 2.0 mg · liter⁻¹, BA 0.2 mg · liter⁻¹ またはIAA 2.0 mg · liter⁻¹, BA 0.2 mg · liter⁻¹ およびショ糖30 g · liter⁻¹, ゲルライト3 g · liter⁻¹ を添加した再分化培地 (以下それぞれMNB培地およびMIB培地と略す) を調製し、9 cmシャーレに25 mlずつ分注した。茎切片を、培地に切断面が接するように10～15片ずつ置床

して、25℃、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光条件で16時間日長下で培養した。それぞれ培養開始1か月後に品種ごとの再分化率〔(不定芽形成茎切片数/置床茎切片数) × 100〕を求めた。実験は時期を変えて2回反復した。

実験2. 各種抗生物質を用いた選抜培養条件の検討

抗生物質としてカナマイシン、ハイグロマイシンおよびジェネテシンを選び、それぞれに対するキク品種の感受性程度を調査した。材料には実験1で選抜した比較的高い茎葉再分化能をもつ3品種（‘秀芳の力’、‘ニューサマーイエロー’および‘山彦’）を供試した。各種抗生物質の再分化におよぼす影響を知るためにMNB培地に、カナマイシンを0、7.5、10、15、20 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、ハイグロマイシンを0、2.5、5、7.5、10、15 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ またはジェネテシンを0、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 添加した選抜培地を調製し、9 cmシャーレに25 mlずつ分注した。茎切片を20片ずつ置床して25℃、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、16時間日長下で培養を行った。1か月後に不定芽形成茎切片数を調査して、その数がゼロになる最低濃度を最適な選抜圧濃度と判定した。

また抗生物質が植物体の発根におよぼす影響を知るためにMS培地に、カナマイシンを0、7.5、10、15、20 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、ハイグロマイシンを0、2.5、5、7.5、10、15 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ またはジェネテシンを0、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 添加した選抜培地を調製し、プラントボックスに40 mlずつ分注した。展開葉を2枚つけて下部を切断した無菌植物体を移植して上述の条件で培養を行い、1か月後に発根の有無を確認した。

実験3. 効率的な形質転換方法の検討

マーカー遺伝子としてNPTⅡ遺伝子が組み込まれたプラスミドpBI121を導入した、アグロバクテリウムLBA4404系統（CLONTECH Laboratories, Heidelberg, Germany）を供試した。供試品種は実験2と同様の3品種（‘秀芳の力’、‘ニューサマーイエロー’および‘山彦’）とした。

3. 1. アグロバクテリウム菌液の調製法の検討

LBA4404系統を、カナマイシン50 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加したLuria Broth (LB) 液体培地（Maniatisら1982）で24時間振とう培養した。菌液を滅菌蒸留水（sDW）または液体MNB培地で直接約20倍に希釈し（OD600= 0.1）、茎切片を浸漬した後、2分間減圧処理を行った。また菌液の希釈法として、(1)sDWのみ、(2)sDWにアセトシリンゴン（3’、5’-Dimethoxy-4’-hydroxyacetophenone）100 μM 添加、(3)液体MNB培地にアセト

シリンゴン100 μM 添加、の3区を設け、その効果について試験した。茎切片は感染処理後直ちに、9 cmシャーレに25 mlずつ分注したMNB培地へ切断面が接するように50片ずつ置床した。25℃、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で3日間共存培養した後に、カナマイシン7.5 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ または10 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ および外植体に残存しているアグロバクテリウムを除くためClaforan®（cefotaxime：Nippon Hoechst Marion Roussel, 東京）250 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加したMNB培地（選抜培地）へ移植した。2週間ごとに新しい選抜培地へ継代培養し、1か月後に再分化した不定芽由来のシュート数を調査した。得られた再分化個体はMS培地にカナマイシン10 $\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加した培地（MS選抜培地）上へ移植し、発根の有無を確認した。実験は処理により2～5回反復した。

3. 2. 導入遺伝子の確認

得られた再分化個体のうちMS選抜培地上で発根の認められたものについて、展開葉を5 mm角に調製しLB固形培地上で10日間培養して、アグロバクテリウムによる汚染の有無を確認した。さらに展開葉0.2 gから改変CTAB法（向井・山本1995）によりDNAを抽出し、NPTⅡ遺伝子の3’および5’側の適当な配列からデザインしたプライマー（NS: 5’-ACAAGATGGATTGCACGCAGGT-3’およびNA: 5’-ACTCGTCAAGAAGGCGATAGA A-3’）を用いたPCR-Southern解析を行って、導入遺伝子の検出を試みた。PCR反応液（50 μl ）の組成は、10 mM Tris-HCl（pH8.5）、50 mM KCl、1.5 mM MgCl_2 、200 μM ずつのdATP、dGTP、dCTP、dTTP、0.2 μM ずつのプライマー、100 ngのテンプレートDNAおよび2.5ユニットのAmpliTaQ Gold™ DNAポリメラーゼ（Applied Biosystems Japan Ltd., 東京）とした。PCRの条件は95℃・9分、1サイクルさらに94℃・1分、62℃・2分、72℃・3分、45サイクルとした。Southern解析のプロープには精製したpBI121を鋳型として上記のプライマーを用いて増幅したPCR産物を用いた。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出はDIG DNA Labelling and Detection Kit（Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）により行った。また再分化個体のうち導入遺伝子が確認できなかったものをエスケープと判断した。

第3節 結果および考察

実験1. 茎切片培養における茎葉再分化能の品種間差異の検討

供試した23品種の茎葉再分化能をTable 1に示した。‘精母’等5品種ではMNB、MIBいずれの培地でも全く再分化がみられなかったが、‘クイーンエリザベス’等4品種ではいずれの培地

でも高い再分化率を示し、明らかな品種間差異が認められた。また、比較的再分化能の高い品種として‘精志’、‘秀芳の力’、‘精雲’、‘クイーンエリザベス’、‘菊娘’、‘ニューサマーイエロー’、‘サマーイエロー’、‘桂林’（以上輪ギク）、‘山彦’、‘朝路’および‘あすか’（以上小ギク）の11品種がスクリーニングされた。添加するオーキシンの種類に対する反応は品種により異なるが、MIB培地では再分化率が低い品種でもMNB培地では高まる場合があった。とくに‘秀芳の力’等の4品種ではNAAを用いた場合には51 %以上の再分化率を示すにもかかわらず、IAAを用いると全く再分化がみられなかった。全体としてはオーキシンとしてNAAを用いた場合により多くの品種で再分化率が高まることが明らかとなった。MNB培地において51 %以上の再分化能を示した品種の中から、産地における品種構成等を勘案して‘秀芳の力’、‘ニューサマーイエロー’および‘山彦’の3品種を選び、以後の実験に供試した。

キクでは茎葉再分化能の品種間差異が大きいことが国内外の品種について以前から指摘されており、今回の結果からもその

ことが再確認された。茎切片培養に用いる培地に添加するオーキシンの種類については、いくつかの品種でNAAをIAAに代えると全く再分化がみられなくなった。とくに‘秀芳の力’では、NAAを用いた場合には再分化率が70 %を示すにもかかわらず、IAAを用いると全く再分化がみられなかった。‘秀芳の力’はこれまでの報告ではオーキシンの種類に関係なく約50 %の再分化率を示すとされている（柴田ら1992）。本実験で得られた結果が異なったのは、外植体の種類もしくは培養方法の違いによるものと思われる。すなわち、柴田ら（1992）は外植体としてガラス室内で生育した植物を用いているのに対し、著者らの実験では試験管内で継代培養した植物を用いたことが挙げられる。またIAAを用いるとすべての外植体がカルス化することが観察されたが、植物ホルモンフリーの培地に移植することなく培養を継続したことにより、シュートの再分化が誘導されなかったことも原因のひとつと考えられる。ところで添加する植物ホルモンのバランスについては、オーキシン（IAAまたはNAA）をサイトカイニン（BA）の2～10倍量添加して良い結果を得て

Table 1 Regeneration ability in 23 Japanese cultivars of chrysanthemum as affected by auxin in the stem segment culture medium

Regeneration rate ¹⁾ on MNB ²⁾ medium				
Regeneration rate on MIB ³⁾ medium	0 %	1—20 %	21—50 %	51—100 %
	0 %	Shuho-no-kagami(Y) Seibo Oubai Spot Benigeshiki	Natsukodachi Meisei Shuho-no-chikara(Y) Natsuzukiyo	Seishi Shuho-no-chikara Asaji Seiun
	1—20 %	Momozato	Shuho-yamabuki	Asuka
	21—50 %		Natsuyasumi	
	51—100 %		Summer Yellow Keirin	Queen Elizabeth Kikumusume New Summer Yellow Yamabiko

¹⁾ (No. of stem segments with shoots / Total no. of stem segments) × 100

²⁾ MNB: MS + NAA 2 mg · liter⁻¹ + BA 0.2 mg · liter⁻¹

³⁾ MIB: MS + IAA 2 mg · liter⁻¹ + BA 0.2 mg · liter⁻¹

いる報告があり（間ら1992, De Jongら1995, Urbanら1994）, 逆にBAをIAAまたはNAAの2～10倍量添加するとした報告もある（Fukaiら1995, Kaulら1990, Ledgerら1991, Renouら1993, Yepesら1995）. 一方, オーキシンの種類についてはNAAとIAAの間には大きな差異はみられなかったという報告もあることから（Yepesら1995）, 植物ホルモンに対する反応性は品種・系統によってかなり異なることが推察され, 供試する品種ごとに最適な条件を検討する必要があることが示唆された.

実験2. 各種抗生物質を用いた選抜培養条件の検討

各種抗生物質が不定芽の再分化におよぼす影響をFig. 1に示した. 抗生物質の種類, 濃度に対する反応には差異が認められ, いずれの品種においてもカナマイシンに対する感受性が比較的高い傾向が示された. 一方, 各種抗生物質が発根におよぼす影響を調査したところ, いずれの抗生物質においても不定芽の再分化を抑制できた濃度条件では発根は抑制されず, より高い濃度が必要であることが明らかとなったが, カナマイシンに対す

る感受性が比較的高く15～20 mg・liter⁻¹の濃度で供試品種の発根をほぼ完全に抑えることが示された（データ省略）.

組換え体の選抜においては, 抗生物質の濃度が低いと選抜が不充分となり再分化個体中の非組換え体が多くなり, 逆に高すぎると外植体からの再分化が全体的に抑制される. 本実験の結果はキクは抗生物質に対する感受性が高いという点で従来の報告（De Jongら1994）と一致し, カナマイシンの場合にはキクにおける適当な選抜圧濃度は7.5～10 mg・liter⁻¹となった. これはタバコおよびペチュニア（Horschら1985）の300 mg・liter⁻¹, カーネーション（Luら1991）の100 mg・liter⁻¹と比較すると, かなりの低濃度で再分化が抑制されることになる. 一方, キク培養植物の発根におよぼす影響を調査したところ, カナマイシンでは15～20 mg・liter⁻¹でほぼ完全に発根が抑制されたにもかかわらず, ハイグロマイシンまたはジェネテシンでは10 mg・liter⁻¹または20 mg・liter⁻¹にまで濃度を高めても品種によっては発根が認められ, 発根抑制の効果は低いことが示された. これらのことから, 今後の形質転換実験においては選抜マーカーとしてNPT II 遺伝子（Hoodら1993）を用い, カナマイシンにより組換え体の選抜を行うことが適当であると判断された.

実験3. 効率的な形質転換方法の検討

Table 2に示すように形質転換実験の結果, 多数の再分化個体を得られた. これらをMS選抜培地に移植して発根を確認することで, エスケープと思われる個体がかかり除去された. 選抜培地上で発根のみられた個体についてPCR法により導入遺伝子の確認を試みたところ, 期待された778 bp付近にDNAの増幅断片が得られ, Southern解析によってそれらの断片はNPT II 遺伝子であることが確認された（Fig. 2）.

共存培養に際してのアグロバクテリウム菌液の希釈方法を検討したところ, Table2に示すように菌液をsDWで希釈した場合には, 供試した3品種について再分化シュートが得られたがPCR-Southern解析の結果, NPT II 遺伝子を含む組換え体は得られていないことが明らかとなった. sDWで希釈してアセトシリンゴン100 μMを添加した場合には, いずれの品種でも発根個体を得られたが外植体当たりの形質転換効率は0.88～1.36%に留まった. 菌液を液体MNB培地で希釈してアセトシリンゴン100 μMを添加した場合にもすべての品種で発根個体を得られ, また外植体当たりの形質転換効率は1.33～2.46%にまで向上した. なお, いずれの処理区においても得られた発根個体のアグロバクテリウムによる汚染は認められなかった（データ省略）.

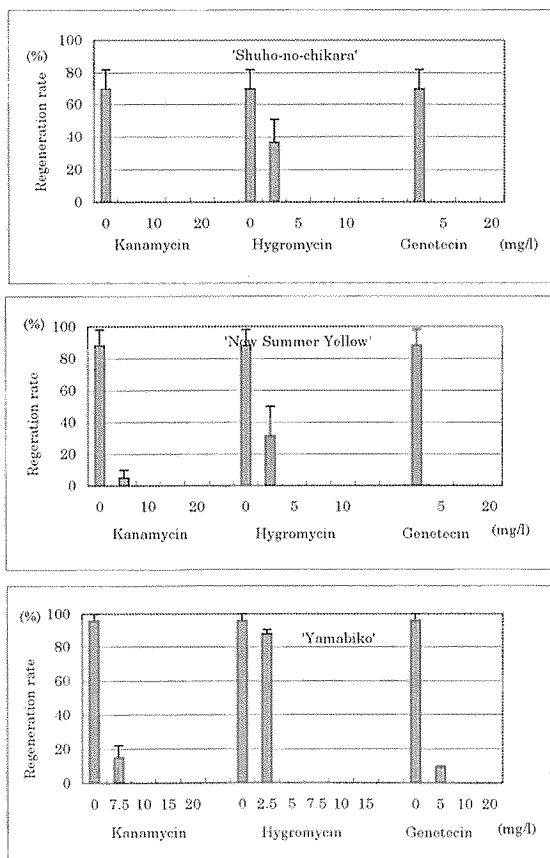


Fig. 1 Suppression of adventitious shoot regeneration from stem segments of three chrysanthemum cultivars ('Shuho-no-chikara', 'New Summer Yellow' and 'Yamabiko') with three antibiotics (kanamycin, hygromycin and genetecin) at different concentrations.

Table 2 Effect of co-cultivation treatments on transformation efficiency in three chrysanthemum cultivars transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404

Treatments ¹⁾	Cultivars	No. of explants	No. of harvested shoots(B)	No. of rooted shoots ²⁾	No. of transgenic ³⁾ shoots(C)	Efficiency (%)	
		(A)				C/A	(B-C)/B ⁴⁾
Distilled water	Shuho-no-chikara	97	1	0	0	0.0	100
	New Summer Yellow	97	8	0	0	0.0	100
	Yamabiko	136	7	0	0	0.0	100
Distilled water + acetosyringone ⁵⁾	Shuho-no-chikara	661	13	11	6	0.90	53.8
	New Summer Yellow	1350	69	19	12	0.88	82.6
	Yamabiko	950	18	17	13	1.36	27.7
Liquid MNB medium + acetosyringone	Shuho-no-chikara	187	26	11	3	1.60	88.4
	New Summer Yellow	75	13	4	1	1.33	92.3
	Yamabiko	203	31	23	5	2.46	83.8

¹⁾ Bacterial suspension was diluted twenty-times with three solutions for co-cultivation.

²⁾ Rooting was confirmed on MS medium containing 10 mg · liter⁻¹ kanamycin.

³⁾ NPT II gene was confirmed by PCR-Southern analysis.

⁴⁾ Rate of non-transgenic (escape) shoots.

⁵⁾ 100 μM.

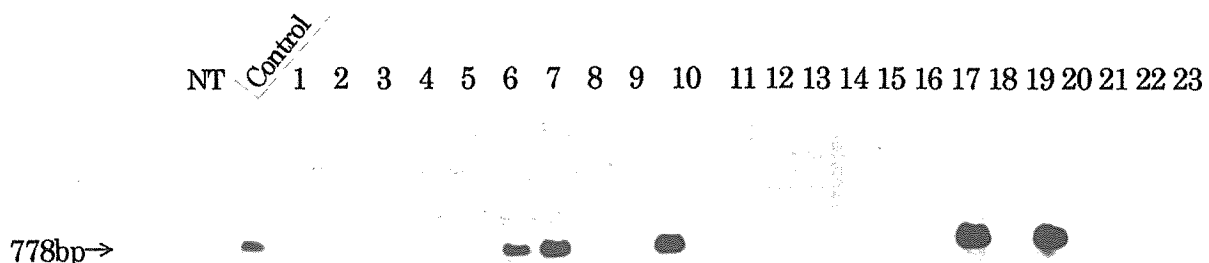


Fig. 2 A gel plate showing the presence of NPT II gene derived by PCR-Southern blot analysis in 23 regenerated chrysanthemum 'Yamabiko'. Explants were co-cultivated with LBA4404 strain diluted twenty times with liquid MNB medium containing 100 μM acetosyringone. Control: purified pBI121 plasmid, NT: non-transgenic plant, 1~23: regenerated plants.

キクではこれまでに、異なるアグロバクテリウム系統を用いた形質転換がいくつか報告されている。その中で、アグロバクテリウム LBA4404 系統を用いて組換え体を得た例はシマカンギク (*Chrysanthemum indicum*) におけるものが唯一で (Ledger ら 1991)、栽培ギク (*D. grandiflorum*) では再分化シュートは得られるものの組換え体を得るには至っていない (De Jong ら 1993,

1994, Ledger ら 1991, Lowe ら 1993, Urban ら 1994)。本実験では共存培養時に菌液を液体再分化培地で希釈することおよびアセトシリノンを 100 μM 添加することにより、LBA4404 系統を用いて従来の知見よりも比較的高い効率で組換え体を得ることができた。

キクは抗生物質に対する感受性が高いことから、アグロバク

テリウムの感染に際し抗生物質の外植体に対する影響を減ずるためにMS液体培地、液体再分化培地、蒸留水等を用いて菌液を希釈する方法が検討されており（間ら1992, De Jongら1995, Fukaiら1995, Renouら1993, Urbanら1994）、本実験でもこれらの報告に従って菌液を希釈した。菌液を単にsDWで希釈した場合には、再分化個体はすべてエスケープと判断され、アセトシリンゴンを添加することではじめて組換え体が得られた。またsDWに代えて液体再分化培地で希釈しアセトシリンゴンを添加することで形質転換効率はさらに向上した。共存培養時におけるアセトシリンゴンの添加はすでにアグロバクテリウムLBA4404系統およびAGL0系統で試みられている（De Jongら1994, Fukaiら1995）。De Jongら（1994）は本実験と同様に、アセトシリンゴンを100 μ M添加した培地においてLBA4404系統を用いて実験を行っているが組換え体を得るには至っていない。アセトシリンゴンはアグロバクテリウムの有するTiプラスミド上の病原性に関与する部位（vir領域）の遺伝子を活性化する原因物質と考えられている（駒嶺ら1990）。一方、LBA4404系統はキクに対する感染力が比較的弱いことが示唆されており（Urbanら1994, Wordragenら1991）、これらのことからLBA4404系統を用いてキクの形質転換を行う際にはアセトシリンゴンの添加が不可欠であると思われる。また、アセトシリンゴンを添加し、より強い感染力をもつアグロバクテリウムの系統を供試するならば形質転換効率がさらに向上する可能性がある。

本実験では、液体再分化培地でアグロバクテリウムの菌液を希釈し、キク茎切片と共存培養した場合に、最も高い形質転換効率が得られた（Table 2）。しかし、一方でエスケープの割合も80～90%に上り、その後の再分化個体の管理等が煩雑になる傾向があった。以上のことから、今後の実験では共存培養にあたりアグロバクテリウム菌液をsDWで希釈し、100 μ Mのアセトシリンゴンを添加することが適当であると判断した。

第Ⅲ章 組換えキク植物における導入遺伝子の不活化に関する検討

第1節 緒言

過去10年間にキクの形質転換に関しては多くの報告がなされ（De Jongら1995, Fukaiら1995, Ledgerら1991, Pavingerovaら1994, Renouら1993, Shermanら1998a, 高津ら1998, Urbanら1994, Wordragenら1992, ）、実用的な形質を持つ組換え植物の

作出も報告されている（Shermanら1998b）。一方、近年になって導入遺伝子の不活化現象（サイレンシング）がいくつかの組換え植物で観察されている（Finnegan・McElroy 1994, Meyer 1995, Vaucheretら1998）。キクにおいても、作出した組換え体において導入遺伝子の発現がみられない場合があることが観察されており（De Jongら1994, Renouら1993, Shermanら1998a, Urbanら1994）、また導入遺伝子の発現レベルは組換え系統により非常に差があることが報告されている（Shermanら1998b）。さらにタバコの例（Palauquiら1996）では導入した遺伝子が当初は発現しているにもかかわらず、成育に伴って次第に発現がみられなくなることが報告されているが、このタイプの不活化現象についてはキクではほとんど知見がない。形質転換を利用した育種では導入遺伝子が安定的に発現することが不可欠であり、あらかじめこれらの現象について検討しておくことが必要である。

本章では形質転換をキクの実用的な育種技術として確立するために、第Ⅱ章において使用したLBA4404系統よりも感染力の強いアグロバクテリウム系統を用いて、タイプの異なるキク（小ギクおよび輪ギク）の形質転換を試み、用いるアグロバクテリウムの系統が形質転換効率におよぼす影響について検討した。また実験で得られた形質転換体のGUS活性を経時的に観察することにより、キクにおける導入遺伝子の不活化現象について調査した。

第2節 材料および方法

実験1. アグロバクテリウムの系統の違いによる形質転換効率の比較

1. 1. 形質転換実験

供試するキク品種には、第Ⅱ章で選抜された比較的高い再分化能をもつ‘山彦’（小ギク）および‘ニューサマーイエロー’（輪ギク）を用いた。外植体を採取するための母本となる無菌培養植物は、第Ⅱ章第2節と同様にして獲得した。プラスミドpBI121をFreeze thaw method（Gynheungら1988）により、アグロバクテリウムC58C1系統 {C58C1Rif^r(pGV2260), Deblaereら1985}, MP90系統 {C58C1Rif^r (pMP90), Koncz・Schell 1986} およびLBA4404系統に導入した。形質転換実験は第Ⅱ章で述べた形質転換系を若干改変して行った。すなわち、アグロバクテリウムC58C1, MP90またはLBA4404系統をカナマイシン50 mg・liter⁻¹を添加したLB液体培地で24時間振とう培養した。菌液を滅菌蒸留水で希釈し（OD600= 0.1）アセトシリンゴン100

μM を添加した。外植体として用いる茎切片を菌液に浸漬した後、2分間減圧処理を行った。茎切片は感染処理後直ちに、9 cmシャーレに25 mlずつ分注したMIB培地へ切断面が接するように50片ずつ置床した。25℃、 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、16時間日長で2日間共存培養した後に、MIB培地にカナマイシン $10\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ およびClaforan[®] $250\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した選抜培地へ移植した。2週間ごとに新しい選抜培地へ継代培養し、45日後に再分化した不定芽由来のシュート数を調査した。得られた再分化個体をMS培地にカナマイシン $10\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した培地（MS選抜培地）上へ移植し発根の有無を確認した。培養は25℃、 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、16時間日長の条件で行い、実験は2回反復した。

1. 2. 導入遺伝子の確認

得られた再分化個体のうち選抜培地上で発根が認められたものについて、展開葉1枚を5 mm角に調製しLB固形培地上で10日間培養して、アグロバクテリウムによる汚染の有無を確認した。次いで展開葉0.2 gからNucleon[™] PHYTOPURE（Amersham Pharmacia biotech, Bouckinghamshire, England）によりDNAを抽出し、GUS特異的プライマー（GUS1: 5' - CAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAA-3' およびGUS2: 5' - CATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGGTT-3'）およびプローブを用いたPCR-Southern解析により、導入遺伝子の検出を試みた。PCR反応液（50 μl ）の構成は第Ⅱ章第2節で述べたものと同様とした。PCRの条件は95℃・9分、1サイクルさらに94℃・1分、62℃・2分、72℃・1分、40サイクルおよび72℃・5分、1サイクルとした。Southern解析のプローブには精製したpBI121を鋳型として上記のプライマーを用いて増幅したPCR産物を用いた。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出はDIG DNA Labeling and Detection Kitにより行った。

実験2. 組換えキク植物における導入遺伝子の不活化に関する検討

キクの育成に伴うGUS遺伝子の発現の変化を知るために、実験1で得られた組換えキク系統を2か月毎に一回継代培養することで維持し、(1)組換え体の再分化直後（アグロバクテリウムの接種2か月後）、(2)接種6か月後、(3)接種12か月後、の異なる時期にGUS活性を調査した。GUS活性はJefferson（1987）の方法を若干改変して測定した。すなわち、内生のGUS活性を抑えるために20 %（W/V）メチルアルコールを添加した（Kosugiら1990）抽出緩衝液（50 mMリン酸ナトリウム、10 mMメルカ

プトエタノール、10 mM EDTA、0.1 % N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム）を用いて、継代培養した無菌培養植物の展開した第二葉からタンパク質を抽出した。MUGを基質として葉の抽出物と37℃で60分間反応させ、生成したMUの量を蛍光分光光度計で定量的に測定してGUS活性を推定した。抽出物中のタンパク質含量の測定はProtein assay kit（Bio-Rad Laboratories, California, USA）により行った。

第3節 結果および考察

実験1. アグロバクテリウムの系統の違いによる形質転換効率の比較

形質転換実験の結果をTable 3に示す。‘山彦’では合計で1,071の外植体を用いて選抜培地上で育成する59の発根個体が得られたが、PCR-Southern解析の結果、導入遺伝子が確認された個体は12に留まった（Fig. 3）。C58C1、MP90およびLBA4404系統を用いた形質転換効率 $[(\text{組換え体数}/\text{外植体数}) \times 100]$ は、それぞれ0.81 %、1.64 %および0.89 %であった。また‘ニューサマーイエロー’では合計で837の外植体を用いて選抜培地上で育成する30の発根個体が得られたが、導入遺伝子が確認された個体は16に留まった。C58C1、MP90およびLBA4404系統を用いた形質転換効率は、それぞれ3.09 %、1.84 %および0.73 %であった。‘山彦’および‘ニューサマーイエロー’においては、供試したアグロバクテリウム系統の間で形質転換効率に有意な差異は認められなかった。

Wordragenら（1991）はキクに対する野生型アグロバクテリウムの感染性を検討し、ノバリン産生型の野生型C58系統（C58C1系統およびMP90系統の親系統）は、オクトピン産生型の野生型Ach5系統（LBA4404系統の親系統）よりも高い感染性をもつこと、およびオピンのタイプと感染力とは相関することを報告している。しかしながら、本実験で用いたキク品種においては供試した3種類のアグロバクテリウムの系統間で形質転換効率に有意な差は認められなかった。さらにオクトピン型のpGV2260とノバリン型のpMP90の2種類のヘルパープラスミドの間にも有意な差異は認められなかった。これらのことから少なくとも今回用いた2品種については、アグロバクテリウム系統の種類が形質転換効率におよぼす影響は大きくないものと考えられた。

Table 3 Cultivar/ bacterial strain combinations affecting the efficiencies in genetic transformation of chrysanthemum

Chrysanthemum cultivar	Bacterial strain ¹⁾	No. of inoculated explants	No. of putative trans-formants	No. of transgenic lines ²⁾	No. of GUS-positive lines ³⁾			Efficiency (%) ⁴⁾				
					2 m	6 m	12 m	(B/A)	(C/A)	(C/B)	(D/C)	(E/D)
Yamabiko	C58C1	368	21	3	1	1	1	0.81a	0.27ab	33.3	100.0	100.0
	MP90	366	30	6	3	1	1	1.64a	0.82ab	50.0	33.3	100.0
	LBA4404	337	8	3	0	0	0	0.89a	0.0 b	0.0	0.0	0.0
		1,071	59	12	4	2	2	1.12	0.37	33.3	50.0	100.0
New Summer Yellow	C58C1	291	13	9	5	2	1	3.09a	1.72a	55.6	40.0	50.0
	MP90	272	10	5	5	5	3	1.84a	1.84a	100.0	100.0	60.0
	LBA4404	274	7	2	0	0	0	0.73a	0.0 b	0.0	0.0	0.0
		837	30	16	10	7	4	1.91	1.20	62.5	70.0	57.1

¹⁾ C58C1: *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1Rif^R (pGV2260), MP90: *A. tumefaciens* strain C58C1Rif^R (pMP90)

²⁾ β -glucuronidase (GUS) gene was detected by PCR-Southern analysis.

³⁾ Transgenic lines showing GUS activity 2 months (2 m), 6 months (6 m) and 12 months (12 m) after inoculation.

⁴⁾ The same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.

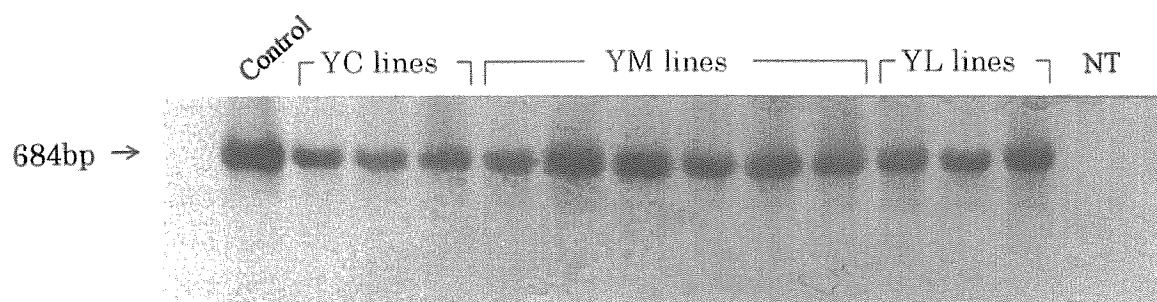


Fig. 3 PCR-Southern blot analysis of transgenic chrysanthemum 'Yamabiko'. Three YC lines, 6 YM lines and 3 YL lines were transformed with *A. tumefaciens* strain C58C1, MP90 and LBA4404, respectively. Control: positive control from pB1121, NT: non-transgenic plant, C58C1: C58C1Rif^R (pGV2260), MP90: C58C1Rif^R (pMP90).

実験2. 組換えキク植物における導入遺伝子の不活化に関する検討

獲得した組換え系統におけるGUS活性のレベル、およびGUS活性を示す個体の割合の経時的变化をFig. 4およびTable 3に示

す。組換え体の再分化直後（アグロバクテリウムの接種2か月後）のGUS活性のレベルはこれまでの報告（Pavingerovaら1994, Shermanら1998a, Urbanら1994）とはほぼ一致したが、組換え系統によりその発現量には大きな差異が認められた（30～250

$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg protein})^{-1}$ 。またLBA4404系統を用いた場合には、PCR-Southern解析により導入遺伝子の存在が確認された組換え体が得られたにもかかわらず、GUS活性を示すものは得られなかった。接種2か月後においてGUS活性を示す組換え系統 [GUS陽性 (2か月) 系統] の割合は、‘山彦’では33.3～50.0 %、‘ニューサマーイエロー’では55.6～100.0 %であった。GUS陽性 (2か月) 系統の獲得効率 [(GUS活性を示した組換え体数/外植体数) × 100] には両品種において、C58C1系統とMP90系統の間で有意な差異は認められなかった。

アグロバクテリウムの接種6か月後においてGUS活性を示す組換え系統 [GUS陽性 (6か月) 系統] の割合は、C58C1またはMP90系統を用いた形質転換において、‘山彦’の組換え系統ではそれぞれ100.0 %および33.3 %となった。一方、‘ニューサマーイエロー’ではそれぞれ40.0 %および100.0 %であった (Table 3)。それ以外の組換え系統では、接種2か月後においては比較的高いGUS活性を示していたにもかかわらず、そのレベルはほとんどゼロにまで低下した (Fig. 4)。接種12か月後には、

GUSの発現はC58C1またはMP90系統で形質転換した‘山彦’のGUS陽性 (6か月) 系統の100.0 %および100.0 %でそれぞれ観察された。一方、‘ニューサマーイエロー’ではGUS陽性 (6か月) 系統の50.0 %および60.0 %で観察された。しかしながら、GUS活性はYC14系統を除きほとんどの組換え系統で非常に低いレベルまで低下した。

形質転換を利用した育種のためには導入遺伝子の安定した発現が不可欠であるが、これまでもキクの組換え植物において、導入遺伝子の存在は確認されているにもかかわらずその発現がみられない場合があることが報告されている (De Jongら1994, Renouら1993, Shermanら1998a, Urbanら1994)。本実験でも再分化直後 (アグロバクテリウムの感染2か月後) の時点でGUS活性を示さない組換え系統がみられた。この原因は不明であるが、導入遺伝子が完全なT-DNA領域を欠いていること、またはメチル化等による転写時の不活化現象などが考えられる。一方、組換え植物の成育に伴って次第に導入遺伝子の発現がみられなくなる現象に関してはキクにおいてこれまで知見がなかった

が、本実験においてアグロバクテリウムの感染6か月後から12か月後まで継代培養した組換え体のGUS活性を調査したところ、そのレベルが次第に低下する現象が認められた。

導入遺伝子の不活化現象 (ジーンサイレンシング) はこれまでにいくつかの植物種で観察され、転写時または転写後におけるサイレンシングについていくつかのモデルが提唱されている (Vaucheretら1998)。すなわち導入遺伝子の単一または複数のコピーが高度にメチル化されたゲノム配列の近傍にインテグレートされた場合には、転写時のサイレンシングがおこる場合がある (位置効果)。また導入遺伝子のDNA組成と宿主のゲノム配列の間に大きな相

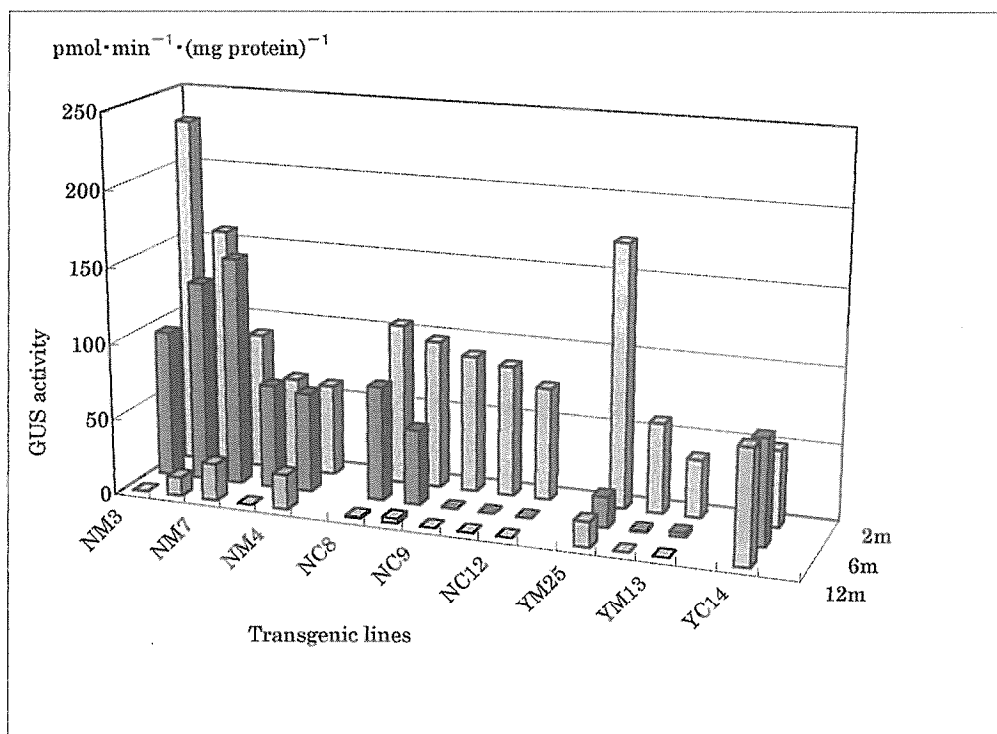


Fig. 4 GUS activities in different transgenic lines 2 months (2 m), 6 months (6 m) and 12 months (12 m) after inoculation of bacteria. Five NM lines and 5 NC lines are ‘New Summer Yellow’ transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain MP90 and C58C1, and 3 YM lines and YC14 line are ‘Yamabiko’ transformed with strain MP90 and C58C1, respectively.

違がある場合には、導入遺伝子の特異的なメチル化が引き起こされ、外来遺伝子を不活化することも示唆されている。一方、転写後のサイレンシングは転写が起こっているにもかかわらずRNAの集積がみられない現象として定義される。これは主として導入遺伝子由来のRNAの過剰生産と特異的な分解により起こることが示唆されている（RNA閾値モデル）。Aida・Shibata（1998）は *Torenia fournieri* において成育に伴うサイレンシングを観察しており、また当初のGUS活性のレベルがサイレンシングの起こるタイミングと関連していること、ホモの植物ではヘテロの植物と比べよりすみやかにサイレンシングが起こることを報告している。また彼らは *Torenia fournieri* の場合、導入遺伝子の不活化をRNA閾値モデルで説明することが適当であるとしている。キクにおけるGUS活性のレベルはpBI121を用いて形質転換したタバコの1/10（Daubら1994）、また *Kalancoe blossfelina*（Aida・Shibata 1996）と比較すると1/100であった。キクでは組換え系統を獲得した当初（接種2か月後）のGUS活性がかなり低く、またGUS陽性（2か月）系統の50.0 %（‘山彦’）および70.0 %（‘ニューサマーイエロー’）は、6か月後においても依然としてGUS活性を示していた。このことはキクにおいてはサイレンシングが比較的ゆるやかに起こることを示している。RNA閾値モデルに従えば今回の観察から、キクにおいて推定上の閾値を越える導入遺伝子由来のRNAを生産するには比較的長い時間が必要であることが示唆される。しかしながら最近では成育に伴い新たにDNAのメチル化が進み、このことが導入遺伝子のサイレンシングに関与することがタバコで報告されていることから（Sonoda・Nishiguchi 2000）、キクにおける成育に伴う導入遺伝子のサイレンシングに関しても今後さらなる研究が必要である。

本実験ではほとんどの組換え系統で、接種12か月後にはGUS活性が非常に低下したが、小ギクの系統であるYC14では比較的低いレベルではあるが長期間にわたり安定的なGUS発現がみられた。Shermanら（1998a）はキクで安定的なGUS発現個体が獲得できるかどうかは主に品種によって決まることを報告している。キクにおいては先に述べたように形態的、生態的にも多様な品種分化がみられ、また倍数性が6倍体と高く、しかも異数体が普遍的に存在するなど遺伝的にも複雑であることが明らかにされている（遠藤・稲田1992）。このことから、キク品種の遺伝的なバックグラウンドの違いが導入遺伝子の不活化に影響を与えている可能性も考えられる。さらに本実験においては茎切片培養を用いた再分化系により不定芽由来の組換え植物を

獲得して供試しているため、得られた組換え植物が形質転換細胞と通常の細胞で構成されたキメラ（chimera）である可能性もある。これらの点に関しては今後さらに検討を加えていきたい。以上のように、アグロバクテリウム C58C1、MP90 および LBA4404 系統を用いた形質転換実験の結果、供試した‘山彦’および‘ニューサマーイエロー’とともに組換え体が得られた。しかしながら LBA4404 系統を用いて得られた組換え体では GUS 遺伝子の導入が確認されているにもかかわらず、獲得直後からその発現がみられないという導入遺伝子の不活化現象が観察された。このことから今後の形質転換実験においては C58C1 または MP90 系統を用いることが適当であると判断された。さらにこれまでの知見から、キクにおいては CaMV35S プロモータの発現がタバコや *Kalancoe blossfelina* と比べて低いことが推察され、キクの形質転換による実用形質の導入にあたっては、より高発現となるように改良したプロモータの利用が必要であることが示唆された。

第IV章 イネ・キチナーゼ遺伝子導入による灰色かび病抵抗性キク植物の作出

第1節 緒言

植物は病原菌類の感染に対し異なったタンパク質をコードする多くの遺伝子を発現して反応するが、それらのタンパク質は防御に役立っていると考えられ（Legrandら1987、大橋1990）、またいくつかの研究でこれらのタンパク質遺伝子を導入した組換え植物において菌類病抵抗性が増強されたことが報告されている（Brogieら1991、Zhuら1994、Linら1995）。これらの中で最近注目されているのがキチナーゼである（Collingeら1993）。キチナーゼは *in vitro* で多くの糸状菌の生育を抑えることが知られているが、これは菌糸の先端が溶解されることによると考えられている（Brogieら1991）。また病原菌の攻撃を受けたタバコでキチナーゼのプロモータが活性化されることも報告されていることから（Robyら1990）、キチナーゼは病原菌の攻撃に対する植物の防御反応にも関与していると考えられている。ここではまずキチナーゼの作用について述べることにする。

1. 溶菌作用（直接的作用）

主要な植物病原菌類（卵菌類を除く）はキチンを細胞壁の構成成分として含んでいる（Hawksworthら1983）。溶菌酵素であるキチナーゼは、病原菌類に対して菌糸の細胞壁を溶解してその生育を阻害する作用をもつものと思われる。ところで生育中の菌糸の先端ではキチンや β -1,3グルカン等の細胞壁の構成成

分が盛んに合成されており、未成熟 (immature) な状態で外界に曝されている。一方、先端部から離れた成熟した (mature) 細胞壁は多糖類やタンパクの層によって覆われていることが報告されている (Wessels 1988)。先端部における発生初期のキチン鎖はキチナーゼによる加水分解をより受けやすいものと予想され、実際にキチナーゼを処理することによって菌糸の先端部が膨潤したり溶解したりすることが観察されている (Ordentlich ら 1988)。このようにキチナーゼは菌糸先端の細胞壁を溶解することによって、病原菌の侵入を防御する直接的な作用をもつものと考えられる。

2. 植物の防御反応の活性化 (間接的作用)

病原菌の感染に対する植物の防御応答は、病原菌が侵入するときに生じる感染シグナル物質 (エリシター) を感知し、これを異物の侵入として認識することから始まると考えられている (古賀 1994, 鈴木・進士 1998)。すなわち植物体内にあるキチナーゼは侵入してくる菌糸の細胞壁を分解し、その結果キチンオリゴ糖を産生する。この分解産物がエリシターとしてはたらき、植物はこれを異種物質と認識して防御遺伝子を発現させるというシステムである (進士 1992)。一方キチナーゼ遺伝子も防御遺伝子の一種であると考えられ、植物が病原菌の感染を受けた時に誘導される他の PR (pathogenesis-related) タンパク質によってその誘導が制御されるという報告がある (Rasmussen ら 1992)。これらのことからキチナーゼには、病原菌の感染に対し植物が本来もっている防御応答反応を活性化する間接的な作用もあるものと考えられる。

宿主の防御反応における本酵素の正確な役割については不明な点も多いが、実際にキチナーゼの発現レベルを高めた組換え植物で病原菌に対する抵抗性が高まったことが報告されており (Brogie ら 1991)、キチナーゼ遺伝子を利用した実用的な病害抵抗性品種の育成に期待がもたれている。とくにイネ・キチナーゼ遺伝子 (cDNA クローン: RCC2, Nishizawa ら 1993) は、イチゴ (Asao ら 1997)、キュウリ (Tabei ら 1998)、トルコキキョウ (丸田 ら 1998)、トマト (佐々木 ら 1998)、イネ (Nishizawa ら 1999)、ブドウ (Yamamoto ら 2000) およびタバコ (Akutsu ら submitted) などの多くの植物において菌類病に対する抵抗性を増強したことが報告されている。また対象病害も、イチゴうどんこ病 (*Sphaerotheca humuli*)、キュウリ灰色かび病 (*Botrytis cinerea*)、トルコキキョウ灰色かび病 (*Botrytis cinerea*)、トマト葉かび病 (*Cladosporium fulvum*)、イネいもち病 (*Magnaporthe grisea*)、ブドウうどんこ病 (*Uncinula necator*) およびタバコウ

どんこ病 (*Erysiphe cichoracearum*) など、複数の種類の病原菌に対し効果を有することが明らかとなっている。

キク灰色かび病は *Botrytis cinerea* Persoon により引き起こされる病害で、低温多湿の条件下では病斑上に形成される多数の分生子が周辺に飛散して蔓延し、被害をおよぼす。発生は葉および花で、はじめは褐色の不明瞭な病斑であるが、やがて水浸状に腐敗し外部に菌糸が蔓延する。菌の発育適温は 20~25℃、分生子 (卵形、単胞、8~18×5~9 μm) の形成適温は 25℃ 前後である (森田 1988)。本菌の寄生範囲はきわめて広く、他作物上で形成された分生子が飛散して感染を起こす場合もあることが知られている (堀田 1997)。キクにおいてはこれまで本菌に対する抵抗性品種はみいだされていない。また農薬による防除についても今のところ試験例がなく、キクで本菌に登録のある薬剤がない。

これらのことから、本章ではキクに灰色かび病抵抗性を付与することを目的として、第 II 章で述べた効率的な形質転換系によりイネ・キチナーゼ遺伝子 (RCC2) をキクに導入した。形質転換にあたっては、第 III 章で述べた導入遺伝子の発現量が低下する現象を考慮して、CaMV35S プロモータを改変した高発現プロモータを利用することとし、あわせて共存培養時の温度条件が形質転換効率におよぼす影響について検討した。次に、キチナーゼの産生が認められた組換えキク系統について灰色かび病菌を用いた接種試験を行い、本病害に抵抗性を示す系統を選抜した。さらに選抜されたこれらの系統について葉における灰色かび病菌の感染行動を観察し、病害抵抗性との関連について検討した。

第2節 材料および方法

実験 1. イネ・キチナーゼ遺伝子を導入した組換えキク植物の作出

供試品種は比較的高い再分化能をもち、第 III 章において導入遺伝子の不活化が比較的起こりにくいと判断された小ギク '山彦' を用いた。外植体を採取するための母本となる無菌培養植物は、第 II 章第 2 節と同様にして獲得した。また形質転換に用いるアグロバクテリウムの系統は第 III 章の結果から C58C1 系統および MP90 系統とした。

プロモータは、エンハンサー領域 (-290bp から -90bp) を 4 反復連結して高発現とした改変 CaMV35S プロモータ (PEN4) を、独立行政法人 (前農水省) 農業生物資源研究所廣近洋彦博士より分譲頂いて RCC2 に連結した。以上のコンストラクトを

pBI121のCaMV35SプロモータおよびGUS遺伝子と置き換えて構築したベクターを、同農業生物資源研究所西澤洋子博士から分譲頂いて供試した。改変ベクターはFreeze thaw method (Gynheungら1988)によりアグロバクテリウムC58C1系統およびMP90系統に導入した。

1. 1. 形質転換実験

第Ⅱ章で述べた形質転換系を若干改変した方法を用いてキクの形質転換を行った。すなわちアグロバクテリウムC58C1系統およびMP90系統を、カナマイシン $50\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加したLB液体培地で24時間振とう培養した。菌液を滅菌蒸留水で希釈し(OD₆₀₀=0.1)アセトシリンゴン $100\text{ }\mu\text{M}$ を添加した。茎切片を浸漬した後、2分間減圧処理を行った。茎切片は感染処理後直ちに、9 cmシャーレに25 mlずつ分注したMNB培地へ切断面が接するように50片ずつ置床した。共存培養温度は22℃、25℃または28℃の3段階とし温度が形質転換効率におよぼす影響について調査した。2日間共存培養した後に、MNB培地にカナマイシン $10\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ およびClaforan® $250\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した選抜培地へ移植した。2週間ごとに新しい培地へ継代培養し、1か月後に再分化した不定芽由来のシュート数を調査した。得られた再分化個体はMS培地にカナマイシン $10\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した培地(MS選抜培地)上へ移植し発根の有無を確認した。培養は25℃、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、16時間日長の条件で行い、実験は2回反復した。

1. 2. 導入遺伝子の確認

得られた再分化個体のうち選抜培地上で発根が認められたものについて、展開葉を5 mm角に調製しLB固形培地上で10日間培養して、アグロバクテリウムによる汚染の有無を確認した。さらに展開葉0.2 gからNucleon™ PHYTOPUREによりDNAを抽出し、RCC2特異的プライマー(5'-AGAGGCCGTTCAACAGCGGCTCGTCGGTTGGGT-3'および5'-GTATAATTGCGGGACTCTAATC-3')およびプローブを用いたPCR-Southern解析により導入遺伝子の検出を試みた。PCR反応液(50 μl)の構成は第Ⅱ章第2節で述べたものと同様とした。PCRの条件は95℃・9分、1サイクルさらに94℃・1分、55℃・2分、72℃・1分、35サイクルとした。Southern解析のプローブには精製した改変pBI121を鋳型として上記のプライマーを用いて増幅したPCR産物を用いた。ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出はDIG DNA Labeling and Detection Kitにより行った。

実験2. 組換えキク植物におけるキチナーゼの産生

実験1により得られた16系統の組換え体および非組換え体を供試した。キチナーゼの産生は、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)により調査した。すなわち、アグロバクテリウムの接種2か月後の組換えキク系統の完全に展開した上位第二葉を用い、50倍量の100 mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)を加え氷上にて乳鉢で磨砕した。25,000 rpm (4℃)で1時間遠心した後、水層を採り100 mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で100倍に希釈したものを抗原として用いた。ELISAはイネ・キチナーゼに対するポリクローナル抗体(茨城大学農学部阿久津克己博士より分譲)および二次抗体(TAGOIMMUNOLOGICALSTM)を用いてTabeiら(1998)の方法に従って行った。各組換えキク系統における吸光度(OD₄₀₅)はマイクロプレートオوترリーダー(IMMUNO-MINI/NJ2300, 日本インターメッド, 東京)で測定し、緩衝液のみの値を差し引いた後、非組換え体における値と比較してその値(Relative value: RV)を示した。

実験3. 灰色かび病菌に対し抵抗性を示す組換えキク植物の選抜

実験2により得られた、キチナーゼを産生する11系統の組換え体および非組換え体(コントロール)を供試した。接種源には*B. cinerea* 茨園930217株を茨城県農業総合センター園芸研究所富田恭範主任研究員より分譲頂いて供試した。接種試験は角型プラスチックシャーレ内で、滅菌水を含ませたる紙の上に並べた培養植物の切り葉3枚ずつを用いて行った。およそ 1×10^6 個・ ml^{-1} に調製した胞子懸濁液、2.5 %グルコースおよび100 mM イノシンを含む直径約2 mmの1.0 %寒天片をそれぞれの葉面に2片ずつ置き、20℃、暗条件で接種した。接種後7日目に病徴を観察した。組換え系統の灰色かび病菌に対する感受性は、病徴を観察により4段階(1:無病徴, 2:ごくわずかな病徴, 3:中程度の病徴, 4:激しい病徴)に分けて評価した。実験は3回反復した。

実験4. 組換えキク植物における灰色かび病菌の感染行動の観察

実験3において、灰色かび病菌に比較的強い抵抗性を示すものとして選抜されたY12, Y61, Y97系統、および‘山彦’の非組換え体を供試した。培養植物の切り葉に実験3と同様にして調製した灰色かび病菌の胞子懸濁液(寒天を含まない)を5 μl

づつ接種した。接種1, 3および5日後の葉をファーナー液（エタノール：酢酸＝3：1）により固定した後、0.5 %メチルブルー溶液で染色して光学顕微鏡（BH2, オリンパス, 東京）で分生子の発芽, 付着器の形成および感染等について観察した。組換え系統と非組換え体について分生子の発芽率 $\{(\text{発芽した分生子数} / \text{総分生子数}) \times 100\}$, 付着器形成率 $\{(\text{付着器形成分生子数} / \text{総分生子数}) \times 100\}$ および感染に対する宿主の反応, 侵入菌糸の伸長等をそれぞれ比較した。

第3節 結果および考察

実験1. イネ・キチナーゼ遺伝子を導入した組換えキク植物の作出

3,231の外植体を用いた形質転換実験の結果, 選抜培地上で成育する合計113の発根個体が得られたがPCR-Southern解析によ

りRCC2の導入が確認できた個体は16に留まった（Table 4, Fig. 5）。形質転換効率はアグロバクテリウムの種類と共存培養温度を組み合わせた処理区の間で有意な差異が認められ, C58C1系統およびMP90系統ともに25℃でそれぞれ0.84%および0.82%と最も高い値を示した（Table 4）。このことから両系統とキクの共存培養温度は25℃が適当であることが示された。一方, 25℃におけるC58C1系統およびMP90系統の形質転換効率には有意な差異は認められなかった。得られた組換え体の16系統はMS選抜培地上で継代培養し, 実験2に供試した。

Dillenら（1997）は本実験と同じアグロバクテリウムの系統（C58C1およびMP90）を用いて, テバリービーン（*Phaseolus acutifolius*）の形質転換における共存培養温度について検討した。15℃, 19℃, 22℃, 25℃, 27℃または29℃で実験を行ったところ, 用いたアグロバクテリウムの系統にかかわらず22℃が

Table 4 Effects of temperature and *Agrobacterium tumefaciens* strains on transformation efficiency in chrysanthemum ‘Yamabiko’

Strain ¹⁾	Temp. (°C)	No. of explants (A)	No. of regenerated shoots	No. of rooted shoots ²⁾	No. of transgenic plants ³⁾ (B)	No. of ELISA(+) plants ⁴⁾ (C)	Efficiency ⁵⁾ (%) (B/A)	(C/A)
C58C1	22	585	39	18	2	1	0.34 bc	0.17 b
	25	598	44	20	5	3	0.84a	0.50ab
	28	419	23	9	0	0	0.0 c	0.0 b
MP90	22	608	35	23	1	0	0.16 c	0.0 b
	25	609	34	19	5	5	0.82a	0.82a
	28	412	31	24	3	2	0.73ab	0.49ab
Total		3,231	206	113	16	11	0.49	0.34

¹⁾ C58C1: C58C1Rif^R(pGV2260), MP90: C58C1Rif^R(pMP90).

²⁾ Rooted shoots on MS+kanamycin 10 mg/l.

³⁾ RCC2 gene was detected by PCR-Southern analysis.

⁴⁾ RCC2 protein was detected by ELISA.

⁵⁾ The same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Experiment was replicated two times, and data was indicated totally.

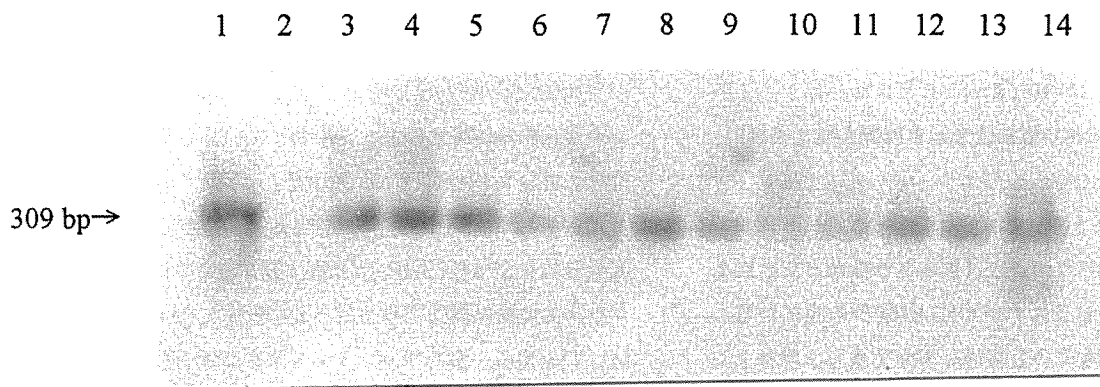


Fig. 5 Amplification of rice chitinase gene fragment confirmed by PCR-Southern blot analysis in transgenic chrysanthemum. Lane 1 and 14: pBI121-RCC2 plasmid, Lane 2: non-transgenic plant, Lane 3-13: transgenic lines.

最適であることが明らかとなり、このことから適当な温度条件を選ぶことで形質転換効率が向上する可能性があることを指摘している。キクについて同様に温度条件を検討したところ、25℃で最も高い形質転換効率が得られた。P. acutifoliusとキクで適当な温度条件に差異が見られたのは、供試した植物種にとっての好適な温度の違いまたはアグロバクテリウムと植物の親和性の違い等によるものと考えられるが詳細は今後検討を要する。ところでC58C1系統を用いた場合には28℃で全く組換え体が得られなかった。これは28℃では同系統が非常に旺盛に生育して抗生物質による除菌が完全に行われなかったため、枯死する外植体が多くなり相対的に再分化個体数が少なくなったためと考えられる。

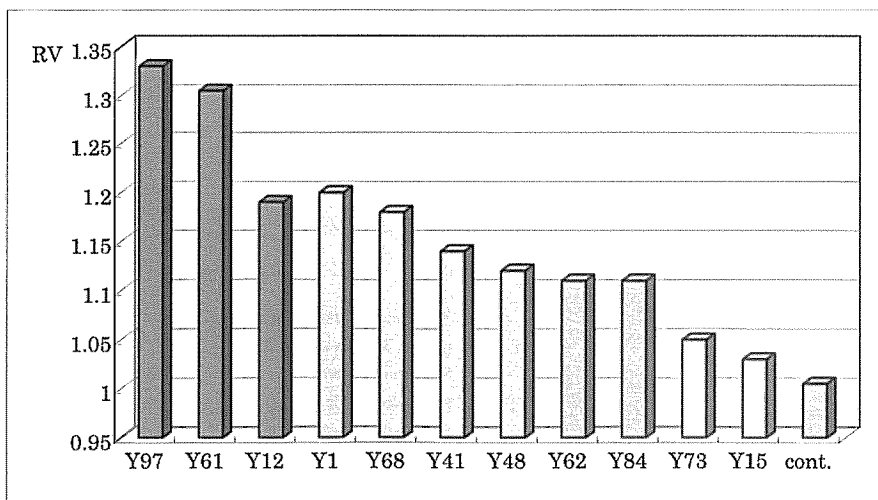
実験2. 組換えキク植物におけるキチナーゼの産生

16系統の組換え体のうち、非組換え体と比べて高いキチナー

ゼの産生を示した系統は11で、残り5系統は非組換え体と同レベルに留まった。キチナーゼ産生系統の割合 $[(\text{キチナーゼ産生系統数} / \text{外植体数}) \times 100]$ は、MP90系統を用いて25℃で形質転換を行った場合に0.82%と最も高い値となり、またこの組合せによる処理区で得られた組換え系統のすべてでキチナーゼの産生が認められた (Table 4)。一方、選抜された11系統の形質転換体の中でキチナーゼの産生量を比較したところ、Fig. 6に示すように系統間で差異が認められることが明らかとなった。16系統の組換え体のうち5系統では、導入したRCC2の存在が確認されたにもかかわらずキチナーゼの産生が認められなかった。今回のELISA実験にはイネ・キチナーゼのポリクローナル抗体を一次抗体として使用したため、キクの内生のキチナーゼとRCC2の転写産物を厳密に区別することは難しい。しかしながらこれら5系統では吸光度 (OD405) は非組換え体と比べてもやや低い値となり、少なくとも導入遺伝子由来のキチナーゼ

は産生されていないことが示唆された。このように導入遺伝子の存在が確認されたにもかかわらず、その発現が認められなかつ

Fig. 6 Comparison of the amounts of RCC2 products detected by ELISA among 11 transgenic chrysanthemum lines. The absorbance was compared with that of the control (non-transgenic plant) and indicated as a relative value (RV). The higher-resistant group (Y12, Y61 and Y97) showed higher protein production and the non-resistant group (Y15 and Y73) showed lower protein production. The other moderate-resistant lines (Y1, Y41, Y48, Y62, Y68 and Y84) showed intermediate protein production. cont.: non-transgenic plant.



たことの原因は不明であるが、第Ⅲ章で述べた導入遺伝子の不活化現象等が関わっているものと考えられる。これら5系統の組換え体は以後の実験には供試しないこととした。

実験3. 灰色かび病菌に対し抵抗性を示す組換えキク植物の選抜

接種試験の結果はTable 5に示すとおりである。供試した11系統の中では無病徴と評価された系統は見出されなかった。Y12, Y61およびY97の3系統はごくわずかな病徴を示すに留まり (Fig. 7), その病徴は接種10日を経過してもそれ以上進展しなかった。Y1, Y41, Y48, Y62, Y68およびY84の6系統は中程度の病徴を示したが、病徴の進展はコントロールと比較してゆ

るやかであった。残る2系統 (Y15およびY73) はコントロールと同様の激しい病徴を示し、灰色かび病菌に対する抵抗性は認められなかった。

接種試験の結果をELISAの結果と比較すると、比較的強い抵抗性を示した3系統 (Y12, Y61およびY97) は、コントロールと比較して高いキチナーゼの産生量を示した。一方、抵抗性の認められなかった2系統 (Y15およびY73) ではコントロールよりわずかに高い程度であった。また中程度の病徴を示した6系統 (Y1, Y41, Y48, Y62, Y68およびY84) では、キチナーゼの産生量はその中間の値を示す傾向にあった (Fig. 6)。

以上のように、組換え系統における灰色かび病菌に対する抵

Table 5 Susceptibility of transgenic chrysanthemum Yamabiko lines expressing a rice chitinase gene (RCC2) to *Botrytis cinerea* infection

Bacterial strain	Temp. (°C)	No. of obtained lines ²⁾	Susceptibility of transgenic lines ¹⁾			
			1	2	3	4
C58C1	22	1			Y41	
	25	3		Y12	Y1, Y48	
	28	0				
MP90	22	0				
	25	5		Y61, Y97	Y62, Y84	Y73
	28	2			Y68	Y15

¹⁾ Susceptibility to gray mold infection of transgenic plants was visually categorized into four classes (1: no symptom, 2: very slight symptoms, 3: moderate symptoms, 4: severe symptoms).

Non-transgenic plant was categorized into class 4.

²⁾ RCC2 gene and RCC2 protein were detected by PCR-Southern analysis and ELISA, respectively.



Fig. 7 Resistance of transgenic chrysanthemum plant against *Botrytis cinerea* infection. Symptoms shown by transgenic chrysanthemum expressing a rice chitinase gene (A) were compared with symptoms shown by non-transgenic plant (B), 7 days after artificial inoculation.

抗性の増強とキチナーゼの産生量は相関する傾向が認められた。これまでにRCC2を導入したイチゴ（Asaoら1997）およびキュウリ（Tabeiら1998）において、病原菌に対し抵抗性を示す組換え植物はコントロールに比べて高いキチナーゼの産生量を示すことが報告されている。これらのことから得られた3系統の組換えキク植物の灰色かび病菌に対する抵抗性の増強は、主としてキチナーゼの産生量の増大によることが示唆された。一方、Y12系統はY1およびY68系統と比べて灰色かび病菌に対しより強い抵抗性を示したが、キチナーゼの産生量はY1およびY68系統と同様のレベルであった。このようにキチナーゼの産生量と抵抗性の増強は完全には一致しない場合もあり、キチナーゼの植物体内における機能については今後さらに検討を要することが示唆された。

実験4. 組換えキク植物における灰色かび病菌の感染行動の観察

接種1日後に灰色かび病菌の感染行動を観察したところ、分生子の発芽率および付着器形成率は、抵抗性系統（Y12, Y61およびY97）と非組換え体の間でそれぞれ93.8～95.0 %および45.6～50.9 %となり、有意な差異は認められなかった（Table 6）。接種3日後には非組換え体の病斑はすみやかに拡大し水浸状に激しく侵されたが、上記3系統の組換え体はごくわずかな褐変症状を示すにとどまり、接種5日後においてもその症状は拡大しなかった。接種3日後の組換え体における灰色かび病菌の感染および宿主の反応を観察したところ、菌糸の感染を受けた表皮細胞が特異的に褐変したり（Fig. 8）、葉肉組織内に侵入した菌糸の伸長が抑制される現象が観察された。一方、非組換え体では表皮細胞の明瞭な褐変や侵入菌糸の伸長抑制等の現象はみられなかった（データ省略）。

ある病原菌に抵抗性あるいは不親和関係にある感染宿主細胞が、原形質の顆粒化、細胞の褐変などをともなって急速に反応することを過敏感現象といい、このような細胞では侵入菌糸の成長は停止するか、またはきわめて遅いとされている（西村1984）。本実験の結果、抵抗性を示す組換え系統においては病原菌の感染を受けた表皮細胞が褐変したり、葉肉組織に侵入した菌糸の伸長が抑制されることが示された。これらは上述の過敏感現象と非常に近い現象であると考えられる。また組換え体で特異的に観察され、非組換え体では観察されなかったことから、これらの現象は導入したRCC2の作用により引き起こされた可能性が強く示唆される。第1節においても述べたようにキチナーゼには病原菌に対する直接的な作用に加え、植物が本

来持っている防御応答反応を活性化するような間接的な作用もあることが示唆されている。実際にTabeiら（1998）はRCC2を導入した組換えキュウリ植物において、灰色かび病菌の菌糸伸長が1～2細胞に侵入した段階で抑制される場合があることを報告しており、キチナーゼの発現が植物の防御システムを活性化したためではないかと考察している。本実験では抵抗性系統と非組換え体の間で、接種した灰色かび病菌の分生子の発芽率および付着器形成率には差異はみられなかったが、感染に対する宿主細胞の反応には違いがみられ、最終的に病害抵抗性に明らかな差異が認められた。これらのことから本節において観察された組換え系統における病害抵抗性の増強は、主として産生されたキチナーゼによる宿主細胞における過敏感反応の誘導とともに、キチナーゼの溶菌作用により侵入菌糸の伸長が抑制されたことによることが示唆された。

以上のように、本章における実験により灰色かび病菌に比較的強い抵抗性を示す3系統（Y12, Y61およびY97）およびY84を含む中程度の抵抗性を示す6系統の組換えキク植物が得られた。現在、キクにおいては灰色かび病に対する抵抗性品種はみだされておらず、また本病の防除に登録のある薬剤がないため、有効な防除法がないのが現状である。今回選抜された組換えキク系統は、本病害に対する抵抗性系統としての利用が期待されるとともに交配育種の素材としても有望であると考えられる。

Table 6 Infection behavior of *Botrytis cinerea* on transgenic chrysanthemum plants expressing a rice chitinase gene (RCC2)

Transgenic lines	Germination rate of conidia ¹⁾ (%, mean $\pm$ SD)	Formation rate of appressoria ²⁾ (%, mean $\pm$ SD)
Y12	94.5 $\pm$ 4.2	45.6 $\pm$ 4.9
Y61	93.8 $\pm$ 4.7	47.3 $\pm$ 3.0
Y97	94.1 $\pm$ 5.2	47.6 $\pm$ 6.1
Control ³⁾	95.0 $\pm$ 5.3	50.9 $\pm$ 7.7

¹⁾ (No. of germinated conidia / No. of inoculated conidia) $\times$ 100.

²⁾ (No. of conidia forming appressorium / No. of inoculated conidia) $\times$ 100.

Germination and appressorium formation were counted 3 days after inoculation.

³⁾ Non-transgenic plant.

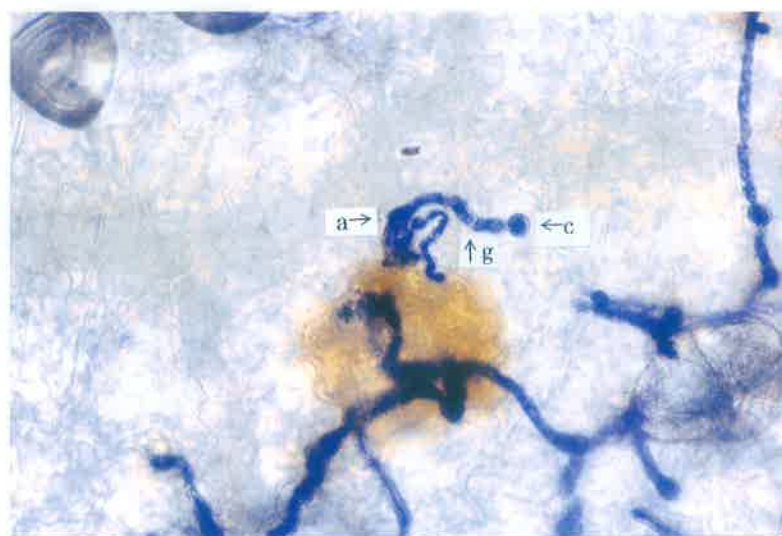
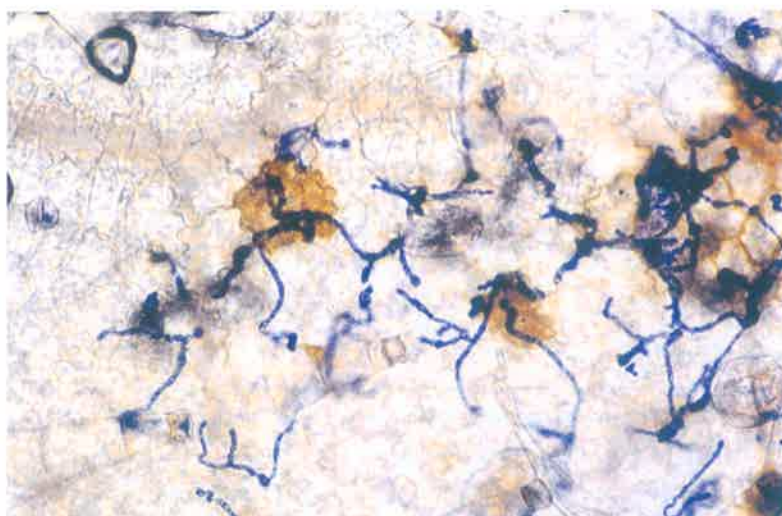


Fig. 8 Epidermal cells of leaves infected by *Botrytis cinerea* showed brownig that might be caused by hypersensitive reaction on transgenic chrysanthemum expressing a rice chitinase gene (RCC2) 3 days afte inoculation. The inoculated leaf was fixed in Farmar fluid (C2H5OH :CH3COOH = 3:1) and stained by 0.5 % methylblue solution. a: appressorium, c: conidium, g: germ tube.

第Ⅴ章 無菌培養植物を用いたキクの白さび病菌に対する効率的な抵抗性検定法（プラントボックス法）の確立

第1節 緒 言

キク白さび病は、担子菌亜門に属する *Puccinia horiana* P. Hennings により引き起こされるキクの重要病害であり、切り花の品質を低下させることで生産現場において深刻な被害をおよぼす。その生活環は他のさび菌で知られている柄胞子、さび胞子、夏胞子の各世代を欠き、冬胞子世代のみである（河野ら1974）。冬胞子（しゃもじ形、隔膜あり、 $30\sim40\times12\sim17\mu\text{m}$ ）が発芽して形成された前菌糸上に、担子胞子（単胞、球形、 $13\sim15\times8\sim10\mu\text{m}$ ）が形成される。この担子胞子がキク属植物に寄生し、さらに冬胞子世代を同種の宿主上で形成し宿主交代は行わない（内田1997）。病斑は冬胞子層の塊り（冬胞子堆）である。発芽適温は冬胞子が $18\sim28^\circ\text{C}$ 、担子胞子が $12\sim22^\circ\text{C}$ であり、担子胞子は暗黒条件下でのみ形成される（森田1988）。日本におけるキク白さび病の発生は春から初夏にかけて（6月～7月）と秋（9月～11月）にピークを迎え、夏場の高温期には休眠に入り発生が少なくなることが知られている（森田1988、山口1981、内田1997）。

本病害の防除は従来 oxycarboxine 剤（商品名プラントボックス）により効果的になされてきたが、1975年に本剤に対する耐性菌の出現が報告され（我孫子ら1975）、それ以来各地の生産圃場において耐性菌の出現が問題となっている（飯島1976）。また今日栽培されているキク品種のうち抵抗性品種は2～3割程度であり、ほとんどが白さび病に対し抵抗性を有していない（山口1981）。一方、De Jong・Rademaker（1986）は白さび病に対するキクの抵抗性は1または2個の優性遺伝子により支配されることを示唆している。このことから品種育成の過程では白さび病に対し抵抗性を持つものを交配親として用いることが重要となり、抵抗性品種の効率的な検定方法の確立が求められる。白さび病菌は絶対寄生菌であるために、接種試験による抵抗性検定のためには接種源となる冬胞子堆を植物体上で維持することが必要となる。しかしながら宿主での保存法は他の病原菌などによるコンタミネーションの危険があり、保存菌株は隔離した植物体上で維持するなど細心の注意が必要である（大畑1995）。また、キクの白さび病抵抗性は従来圃場レベルで検定されてきたが、圃場試験には広い面積と労力を要する。このことから山口（1981）は実生苗を用いた効率的な接種試験方法を

開発し、キクの白さび病抵抗性を若い植物を用いて温室内で検定することが可能であることを示した。しかしながら、この方法においても接種試験の規模が大きくなった場合には、環境条件（温度および湿度）を最適に維持するためにさらに改良を必要とする点も多い。さらに接種試験の時期が春と秋に限られることが効率を下げる要因となっている。加えて本邦においてはキク白さび病菌における系統（レース）の存在が示唆されており（山口1981、工藤・岡村1998）、正確なキクの白さび病抵抗性検定のためにはレースについても注意を払う必要がある。このように白さび病抵抗性の評価はさまざまな要因により制限を受けており、より簡便で効率的な方法が求められている。

病害抵抗性育種の第一歩は抵抗性検定法の確立にあるといっても過言ではない。本章ではキクの白さび病抵抗性を評価するために、培養容器（プラントボックス）内で成育する無菌培養植物体上で病原菌を培養、維持する方法について検討した。次に本方法をキクの白さび病菌に対する抵抗性検定に利用するために、プラントボックス内における感受性の品種間差異の検定、および通常の栽培における感受性との比較を行い、効率的な検定法の確立を試みた。

第2節 材料および方法

実験1. 無菌培養植物を用いたキク白さび病菌の培養

第Ⅱ章第2節と同様にして育成した8～10葉期の‘サマーイエロー’、‘秀芳の力’（輪ギク）、‘山彦’および‘あすか’（小ギク）の無菌培養植物を用いた。接種源として用いる白さび病菌の冬胞子堆は当研究所の栽培圃場からサンプリングした。無菌培養植物に対する白さび病菌の接種は大石ら（2000）の方法を改変して行った。すなわち1～2の冬胞子堆を形成した罹病葉を5 mm角に調製して、表面殺菌することなく、滅菌蒸留水により植物を無菌培養中のプラントボックスの蓋に貼り付けた（Fig. 9）。温度条件は 20°C とし最初の5日間は暗黒条件において、接種源とした罹病葉における冬胞子の発芽と担子胞子の形成、および無菌培養植物の葉上に自然落下した担子胞子の発芽ならびに感染を促し、その後 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、16時間日長の光条件で培養した（以下プラントボックス法と称する）。

プラントボックス内における本菌の感染過程を観察するために、まず接種2日後に光学顕微鏡で接種源とした罹病葉における冬胞子の発芽および担子胞子の形成を確認した。さらに無菌培養植物の葉上における本菌の感染行動を観察するために、接種3日後に走査型電子顕微鏡（SEM；JSM5400LV、日本電子、



Fig. 9 This figure shows inoculation method of *Puccinia horiana* to chrysanthemum growing in a plant box. The telium-forming leaf (white arrow) with no-surface sterilization was prepared as a 5 mm square containing 1 to 2 telium and put on the ceiling of a plant box with sterilized distilled water.

東京)を用いて接種葉における担子胞子の発芽, 感染を観察した。接種葉は5 mm角に調製し, 2.5 %グルタルアルデヒド溶液で2時間固定したのち50~100 %のエタノールで段階的に脱水し, 次に26~30 °Cに保温した2-メチル-2-プロパノールに12時間浸漬してエタノールと置換した。さらに凍結乾燥装置(JFD-300, 日本電子, 東京)で6時間処理してSEM用の試料を作製した。

また接種後, 冬胞子堆を形成した葉について, それを接種源として再度新たな無菌培養植物への接種を試みた。

実験2. プラントボックス法による, キクの白さび病菌に対する感受性の品種間差異の検定

茨城県内で栽培されているキク11品種 (Table 7) および1系統 (PP213: 茨城県農業総合センター園芸研究所本図竹司博士より分譲) を供試し, 第II章第2節と同様にして8~10葉期の無菌培養植物を育成した。当研究所の栽培圃場からサンプリングした白さび病菌の冬胞子堆を接種源として, プラントボックス法により無菌培養植物へ接種した。接種21日後にキク品種・

系統の白さび病菌に対する感受性を山口 (1981) の方法を若干改変して調査した。すなわち感受性の程度を (0: 無病徴, 1: わずかな退緑斑点がみられる, 2: いくつかの冬胞子堆がみられる, 3: 葉面積の25 %以下が冬胞子堆で覆われる, 4: 葉面積の25~50 %が冬胞子堆で覆われる, 5: 葉面積の50 %以上が冬胞子堆で覆われる) の6段階に分けて評価した。次に各評点に対する発病葉数 ($n_0 \sim n_5$) から発病度を算出した [発病度: $\{(0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4 + 5 \times n_5) / 5 \times (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5)\} \times 100$]。各品種5個体の無菌培養植物を供試し, 実験は3回繰り返した。

一方これら12品種・系統を温室で栽培し, 発病株を混植することによって自然感染により白さび病を接種した (温室内接種)。実験期間中は人為的な温度, 日長の調節は行わず, 殺菌剤および殺虫剤の散布も行わなかった。温室内接種においても上に述べた方法で各品種の白さび病菌に対する感受性を評価した。各キク品種・系統のプラントボックス内における白さび病菌に対する発病度と温室における発病度を比較して, プラントボックス法による早期選抜の有用性を検討した。

第3節 結果および考察

実験1. 無菌培養植物を用いたキク白さび病菌の培養

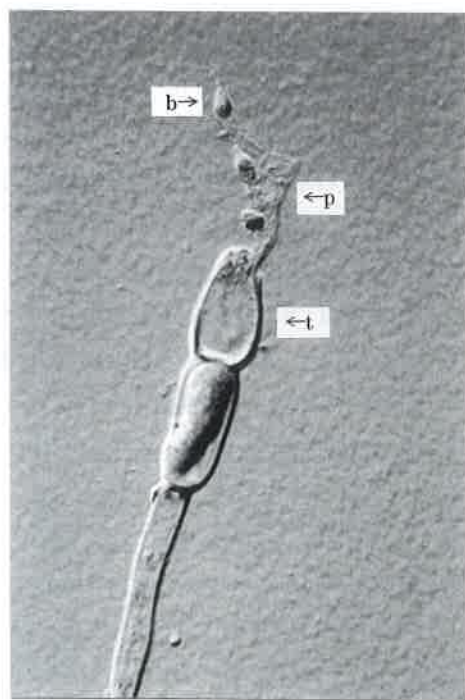
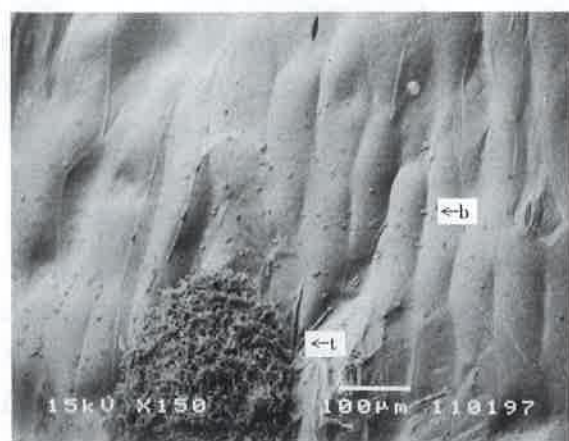
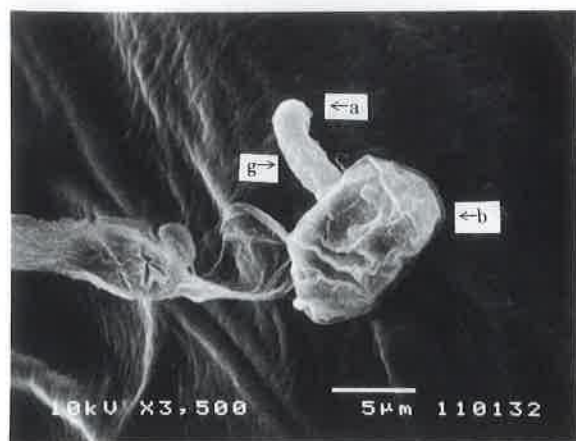


Fig.10 Basidiospores formed from a teliospore of *Puccinia horiana* in a plant box 2 days after incubation at 20 °C in the dark. b: basidiospore, p: promycelium, t: teliospore.



A



B

Fig.11 Dispersed basidiospores of *Puccinia horiana* on a leaflet of chrysanthemum plant growing in a plant box (A). Basidiospores germinated rapidly on a leaflet and infected directly through epidermal cell wall (B).

a: appressorium, b: basidiospore, g: germ tube, t: telium.

プラントボックスの蓋に貼り付けた罹病葉上の冬胞子はすみやかに発芽し、担子胞子を形成した (Fig. 10). 担子胞子が飛散、自然落下して無菌培養植物に感染することにより (Fig. 11), 接種14日後には無菌培養植物の葉裏に冬胞子堆の形成が肉眼で確認された (Fig. 12). 形成された冬胞子堆を接種源として約1か月後に再度、新たな無菌培養植物に同様の方法で接種を行ったところ冬胞子堆の形成がみられた. このことからプラントボックス内で無菌培養された植物体上に形成された冬胞子堆は、少なくとも約1か月間は病原性を保っていることが示された. このようにして約1か月に一度、形成された冬胞子堆を接種源として新たな無菌培養植物に接種することにより、病原性を保持した冬胞子堆を無菌培養植物体上で少なくとも1年間維持することが可能であった.



Fig.12 Developed telia of *Puccinia horiana* on the leaves of chrysanthemum plantlet growing in a plant box, within 14 days after inoculation.

プラントボックス内は100 %近い相対湿度に保たれており、また容器を培養室内に置くことにより最適な温度条件および光条件を保つことが可能となり、冬胞子および担子胞子の発芽に相当であると考えられる (Firman・Martin 1968, 内田1997). De Jong・Rademaker (1986) は3~4葉期の苗を用いた試験において、白さび病の病徴は接種後10日間で現れることを報告しているが、今回の結果もほぼ同様の発病状況を示した. このようにプラントボックス内で白さび病の病徴を再現できることが示され、また病原性のある冬胞子堆を接種源として新たな無菌培養植物を用いて継代培養することにより年間を通して接種試験が可能となった. ところで、接種源としては圃場から採取した冬胞子堆を表面殺菌せずに用いるために、当初は培養容器内の培地上に雑菌による汚染が見られた. しかし上述のように新たな無菌培養植物を用いて2~3回の継代培養を経るに従って雑菌による汚染はほとんど見られなくなり、白さび病菌のみを培養して維持することができることが明らかとなった.

実験2. プラントボックス法による、キクの白さび病菌に対する感受性の品種間差異の検定

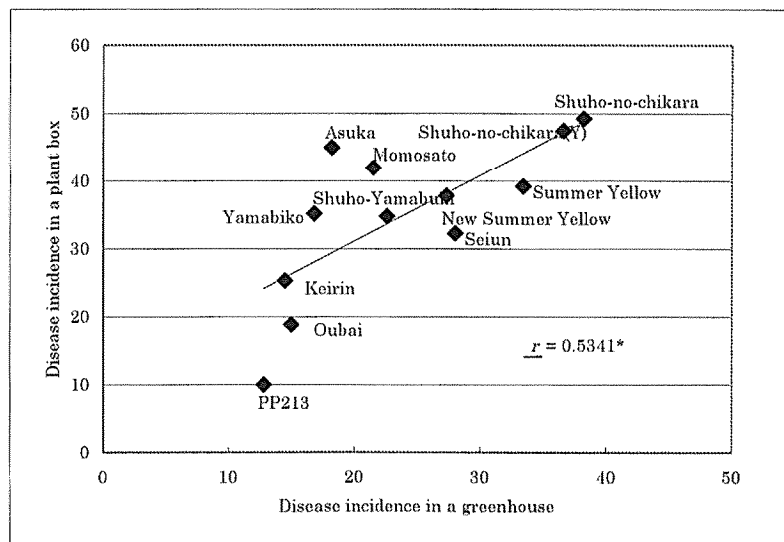
プラントボックスの蓋に貼り付けた罹病葉片上の冬胞子はすみやかに発芽し担子胞子を形成した. 担子胞子が葉上に飛散し感染することにより接種後14日以内に無菌培養植物の葉裏に冬

胞子堆が形成された。無菌培養植物における発病度には各品種で差異が認められ、PP213、‘黄梅’および‘桂林’は他の品種と比較して発病度が低い傾向が見られた（Table 7）。一方、温室においても白さび病が多発しすべての品種・系統で冬胞子堆

Table 7 Difference of sensitivity to *Puccinia horiana* among cultivars of chrysanthemum

Cultivars	Disease incidence ¹⁾ (mean±SD)
PP213	10.0± 2.1
Oubai	18.9±11.6
Keirin	25.3± 1.9
Seiun	32.3± 5.2
Shuho-Yamabuki	34.8± 7.3
Yamabiko	35.2± 0.5
New Summer Yellow	37.8± 3.8
Summer Yellow	39.2± 8.3
Momosato	42.0± 7.2
Asuka	45.0± 7.1
Shuho-no-chikara(Yellow)	47.5± 3.5
Shuho-no-chikara	49.3± 1.7

¹⁾The susceptibility to white rust infection was categorized into 6 classes (0: no symptom, 1: few chlorotic spots, 2: some telia, 3: less than 25 % area of leaflet surface covered with telia, 4: 25 % - 50 % area of leaflet surface infected, 5: more than 50 % area of leaflet surface infected).
Disease incidence was calculated as follows; $\{(0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4 + 5 \times n_5) / 5 \times (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5)\} \times 100$.



の形成が見られた。その中でPP213、‘山彦’および‘桂林’は他の品種と比較して発病度が低い傾向が見られた。各品種の無菌培養植物における発病度と温室における発病度の間には、Fig. 13に示すとおり有意な正の相関 ($r=0.731$, $P \leq 0.05$) が認められた。

山口（1981）はキク品種の白さび病菌に対する感受性を幼苗の段階で評価できることを示し、また幼苗期と開花期における白さび病菌に対する感受性には高い相関関係があることを報告している。我々の結果もこの報告と一致し、プラントボックス法が実際の栽培条件におけるキクの白さび病に対する感受性の評価に有効であることが示された。

各品種・系統とも温室内における発病度と比較してプラントボックス内ではより高い発病度を示す傾向が認められた（Fig. 13）。とくに‘山彦’、‘あすか’および‘桃里’は温室内の自然感染条件では中程度の発病度を示すに留まったが、プラントボックス内では高い発病度を示した。プラントボックスを用いた評価法では、容器内が白さび病菌の感染に適当な温度および湿度条件に保たれ、また高い接種圧のかかる条件となるためより多くの冬胞子堆が形成されたものと考えられる。一方、‘黄梅’は温室内では中程度の発病度を示したがプラントボックス内では比較的低い発病度を示すに留まった。これはプラントボックス法で用いた白さび病菌が‘黄梅’には不親和性のレースであった可能性に加え、‘黄梅’は無菌培養条件での生育が比較的遅く小型で堅い葉をつけることから、このことが低い発病度の原因となったと考えられる。このように人工培地上の培養にあまり適さない品種については今後培養条件などを改良するとともに、供試する白さび病菌のレース分化についても検討を

行うことによって、より正確な評価を行うことができるものと思われる。

以上のように本法は、簡便で少ないスペースで実施可能なこと、また年間を通して実施可能であることからキクの白さび病菌に対する感受性を評価するのに有効な方法であると考えられる。

Fig. 13 Comparison of disease incidence between chrysanthemum plantlets growing in a plant box (plant box evaluation) and plantlets growing in a greenhouse (greenhouse evaluation). Twelve cultivars of chrysanthemum were used in the inoculation test, and the susceptibility to white rust (*Puccinia horiana*) infection was evaluated by the method of Yamaguchi (1981) 14 days after inoculation. Disease incidence was calculated using criteria for rating in his method.

第VI章 プラントボックス法による白さび病抵抗性組換えキク植物の選抜

第1節 緒言

白さび病は切り花の品質低下を招くキクの重要病害であり生産現場では防除のために多大な労力を要している。一方、本病害に卓効を示すoxycarboxine剤に対する耐性菌の出現（我孫子ら1975）もみられ、今後は薬剤防除のみならず抵抗性品種の導入等により総合的に病害をコントロールしていくことが望まれる。これまでにキクの白さび病抵抗性については、野生種に対する寄生性、栽培ギクにおける抵抗性の品種間差異等に関する報告が主に国内の品種について山口（1981）によりなされている。その結果、野生種の中に白さび病菌の接種に対し病徴を示さない完全な抵抗性のものがみだされ、栽培ギクにおいても2～3割の品種は不完全ながらも抵抗性をもつものと判断された。一方、De Jong・Rademaker（1986）は海外（主としてオランダ）のキクについて検討し、オランダで育成されたスプレーギクの中には白さび病菌の接種に対し病徴を示さない完全な抵抗性の品種があることを報告している。しかしながら現在の栽培ギクは輪ギク、小ギク、スプレーギクと形態的、生態的に独自の発達を遂げており、生産の現場においても明確に類別されている。そのため、完全抵抗性の素材として野生種またはスプレーギクを用いた交配育種による白さび病抵抗性品種の育成には、交雑親和性の確認、不良性質の戻し交雑による除去など解決すべき課題が多く、また白さび病菌のレースの変動により現在の抵抗性品種が罹病化する場合があることも示唆されている（山口1981）。さらに茨城県の小ギクの主要作型である露地の季咲き栽培では、白さび病を含むいくつかの病害が季節や気候条件により単独または重複して発生するために、重要病害である白さび病に対する抵抗性に加えて他の病害にも複合抵抗性をもった品種が望まれる。しかしながらそのような特性をもった育種素材は乏しく、従来からの交配育種による抵抗性品種の育成は困難であるといわざるを得ない。ところで第IV章で述べたように、キチナーゼは直接的または間接的な作用により植物に菌類病抵抗性を付与することが知られている。このことから第IV章で選抜した灰色かび病菌に対し抵抗性を示す形質転換体は、他の菌類病に対しても抵抗性をもつことが期待される。

本章では、白さび病を含む複数の病害に対し複合抵抗性をもつ品種の育成をねらいとして、第IV章で選抜した灰色かび病菌に対し抵抗性を示す組換えキク系統について、第V章において

確立した効率的な抵抗性検定方法（プラントボックス法）を用いて、白さび病菌に対する抵抗性検定を行った。また組換えキク植物の白さび病菌に対する抵抗性のメカニズムを知る目的で、白さび病菌に対し抵抗性を示す系統と示さない系統において、キチナーゼの産生量を経時的に測定するとともに白さび病菌の感染行動について観察し、病害抵抗性との関連について検討した。

第2節 材料および方法

実験1. 白さび病抵抗性を示す組換えキク植物の選抜

第IV章で述べた実験により得られた、‘山彦’のキチナーゼを産生する11系統の組換え体および非組換え体を供試した。これら11系統は第IV章で述べた灰色かび病菌を用いた接種試験に用いたものと同じ系統である。またこれらの組換え系統は獲得した後、カナマイシン $10\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ およびゲルライト $3\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ を含むMS培地を40 mlずつ分注したプラントボックス内で、2～3か月に一度植え継ぐことにより2年6か月の間、継代培養したものである。

第V章で述べたプラントボックス法により、これら11系統の組換え体および非組換え体に対し白さび病菌の接種試験を行った。接種源として用いた白さび病菌は、第V章第2節で述べた方法で獲得した後、プラントボックス内で育成する非組換え体の‘山彦’において単一の冬胞子堆を用いた継代培養を3回以上繰り返したものである。接種後5日間は 20°C 暗黒条件で、冬胞子からの担子胞子形成ならびにその発芽および感染を促し、その後 $50\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、16時間日長条件で培養した。接種21日後に組換え系統の白さび病菌に対する感受性を第V章第2節で述べた方法に従い調査して、白さび病菌に対し抵抗性を示す系統を選抜した。各系統5個体を供試し、実験は3回繰り返した。

実験2. 組換えキク系統におけるキチナーゼ産生量の経時的変化

実験1により選抜された白さび病菌に対し抵抗性をもつ3系統（Y61、Y84およびY97）、第IV章において灰色かび病菌に対し抵抗性をもつと判定されたが実験1では白さび病菌に対しては抵抗性を示さなかったY12系統、および‘山彦’の非組換え体について、キチナーゼの産生量を組換え体獲得当初（アグロバクテリウムの接種6か月後）、1年後、2年後および2年6か月後にELISAにより測定した。ELISAは第IV章第2節で述べた方法に

より行った。

また、上記4系統の組換え体および非組換え体について、改めてプラントボックス法により白さび病菌を接種した。接種14日後に冬孢子堆が形成された葉を採取し、同様にしてELISAによる測定を行い病原菌の感染時におけるキチナーゼ産生量の変化を比較した。

実験3. 組換えキク植物における白さび病菌の感染行動の観察

実験2と同様の組換え系統および非組換え体を供試した。プラントボックス法により白さび病菌を接種し、接種3日後の葉面における担子胞子の感染行動をSEMにより観察した。さらに接種12日後の葉を用いて葉肉組織における本菌の感染過程を観察した。SEM用の試料は、接種葉を2.5 %グルタルアルデヒ

ド溶液で2時間固定したのち、葉の縦断面に沿って2~3 mm幅に細断したものを、第V章第2節で述べた方法に従って処理して作製した。

第3節 結果および考察

実験1. 白さび病抵抗性を示す組換えキク植物の選抜

供試した組換え系統の白さび病菌に対する感受性には明らかな系統間差異が認められた。11系統の組換え系統のうち8系統(Y1, Y12, Y15, Y41, Y48, Y62, Y68およびY73)は非組換え体と同等の発病度を示し、これらの系統では白さび病菌に対する抵抗性は認められなかった。一方、Y61, Y84およびY97の3系統は非組換え体に比べ有意に低い発病度を示し、これらの系統は白さび病菌に対する中程度の抵抗性を有するものと判断された(Table 8, Fig. 14)。

キク品種の白さび病菌に対する抵抗性に関してはこれまでにいくつかの報告(De Jong・Rademaker 1986, 山口1981)があるが、彼らはいずれもキク品種の白さび病菌に対する抵抗性を、冬孢子堆形成の有無とその形成量により肉眼的に判定している。今回の実験においてもこれらの報告に従い、組換え系統の白さび病抵抗性を冬孢子堆の形成量をもとに算出した発病度で判定した。白さび病菌を用いた接種試験の結果、非組換え体に比べ発病度が有意に低下した組換え系統が得られ、とくにY84系統は非組換え体と比べ発病度がほぼ半減した。プラントボックス内は高湿度条件に保たれ、白さび病菌の冬孢子からの担子胞子形成および担子胞子の感染に最適の条件であると考えられる(Firman・Martin, 1968)。そのため非組換え体の‘山彦’においては温室における発病度 16.8 ± 2.91 に対し、プラントボックス内では 35.2 ± 0.49 とより高い値が示されている(Fig. 13)。このことから、プラントボックス内であっても 15.5 ± 0.71 と低い発病度を示すに留まったY84系統は、温室の条件では比較的強い抵抗性を示すものと期待される。

Table 8 Susceptibility to *Puccinia horiana* infection among transgenic chrysanthemum lines harboring a rice chitinase gene (RCC2)

Susceptibility of transgenic lines ¹⁾			
1	2	3	4
none	none	Y61, Y84, Y97	Y1, Y12, Y15, Y41, Y48, Y62, Y68, Y73, non-transgenic plant

¹⁾ Susceptibility to white rust infection of transgenic plants was categorized into 4 classes according to a disease incidence which was calculated using criteria for rating in the method of Yamaguchi (1981).

1: no-symptom, 2: very slight symptoms, 3: moderate symptoms, 4: severe symptoms as same as non-transgenic plant.

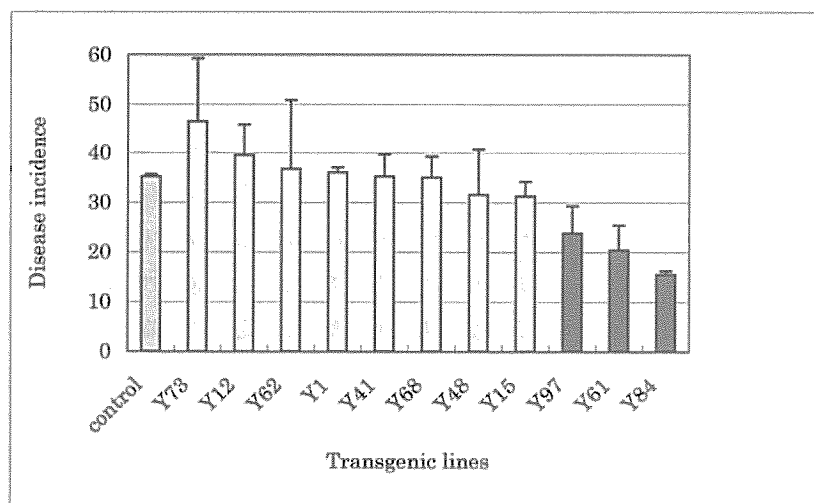


Fig. 14 Comparison of disease incidence among transgenic chrysanthemum lines harbouring a rice chitinase gene (RCC2) in a plant box evaluation. control: non-transgenic plant.

ところで組換え系統の白さび病抵抗性検定の結果と、第Ⅳ章で得られた灰色かび病菌に対する抵抗性検定の結果を比較すると、両病原菌に対する抵抗性には違いがみられた (Table 9)。第Ⅳ章で述べたように、灰色かび病菌に対してはY12, Y61およびY97の3系統が比較的強い抵抗性を示した。またこれまでに述べたように白さび病菌に対しては、Y61, Y84およびY97の3系統が中程度の抵抗性を示した。Y12系統は灰色かび病菌には比較的強い抵抗性を示したが、白さび病菌にはまったく抵抗性を示さなかった。

Table 9 Comparison of susceptibility to *Botrytis cinerea* and *Puccinia horiana* infection among transgenic chrysanthemum plants harboring a rice chitinase gene (RCC2)

Evaluation of susceptibility to <i>B. cinerea</i>	Susceptibility ¹⁾	Evaluation of susceptibility to <i>P. horiana</i>
none	1	none
Y12, Y61, Y97	2	none
Y1, Y41, Y48, Y62, Y68, Y84	3	Y61, Y84, Y97
Y15, Y73, non-transgenic plant	4	Y1, Y12, Y15, Y41, Y48, Y62, Y68, Y73, non-transgenic plant

¹⁾ Susceptibility to *B. cinerea* infection of transgenic plants was visually categorized into 4 classes. And susceptibility to *P. horiana* infection of transgenic plants was categorized into 4 classes according to a disease incidence which was calculated using criteria for rating in the method of Yamaguchi (1981).

1: no-symptom, 2: very slight symptoms, 3: moderate symptoms, 4: severe symptoms as same as non-transgenic plant.

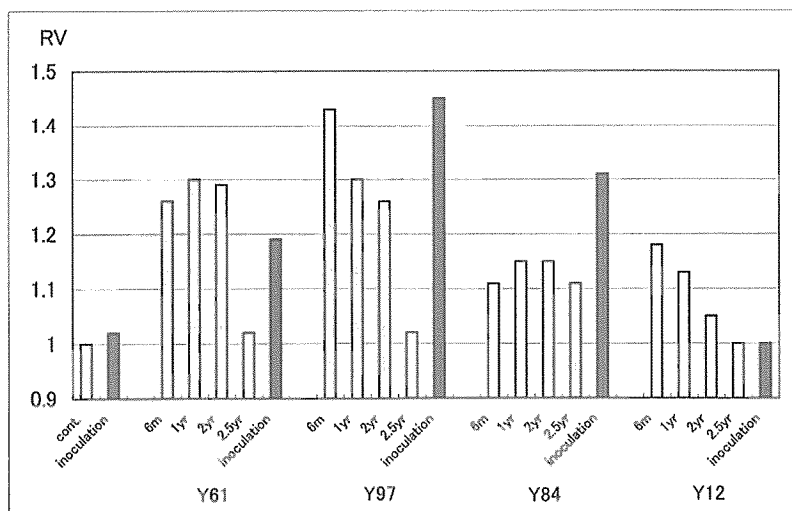


Fig. 15 Comparison of the amount of chitinase production among 4 transgenic chrysanthemum lines (Y61, Y97, Y84 and Y12) at 6 months, 1 year, 2 years and 2.5 years after transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. In addition, this figure shows that the amount of chitinase production increased again to higher levels in Y61, Y97 and Y84, after inoculation of *Puccinia horiana*. However, chitinase production did not increase again in Y12. The absorbance (405 nm) in ELISA was compared with that of the control (non-transgenic plant), and indicated as a relative value (RV).
cont.: non-transgenic plant, inoculation: Inoculation of *P. horiana* carried out 2.5 years after transformation.

以上のように本実験の結果、白さび病菌に抵抗性を示す組換えキク系統が得られた。一方、各系統における白さび病菌と灰色かび病菌に対する抵抗性の程度に違いがみられたことから、次に実験2および実験3において組換え系統のキチナーゼ産生量の経時的变化および白さび病菌の感染行動について調べ、病害抵抗性との関連について検討した。

実験2. 組換えキク系統におけるキチナーゼ産生量の経時的变化

Y12, Y61およびY97の3系統では、組換え体獲得当初 (アグロバクテリウムの接種6か月後) には非組換え体に比べ高いキチナーゼの産生を示したが、年数を経るに従ってその産生量は低下し2年6か月後には、非組換え体と同等のレベルにまで低下した。これは第Ⅲ章で述べたものと同様、なんらかの原因により導入遺伝子の発現が抑制されたためであると推察される。一方、Y84系統は6か月後の産生量はさほど高くなかったものの、2年6か月後にもその産生量は低下しなかった (Fig. 15)。

次に、各組換え系統および非組換え体における白さび病菌感染後のキチナーゼの産生量を調べたところ、Y61, Y84およびY97の3系統では低下していた産生量が、病原菌の感染ののち再び増大することが明らかとなった。一方、非組換え体では若干の増大がみられるに留まり、またY12系統では病原菌の感染によるキチナーゼ

の産生量の増大はまったくみられなかった (Fig. 15). これらのことから、上記3系統の白さび病菌に対する抵抗性の増強は主としてキチナーゼの産生量の増大によることが示唆された。

以上のように、キチナーゼの産生量が低下した組換え系統においても、白さび病菌を接種すると再びその産生量が増大する場合があることが観察された。第IV章で述べたように、PRタンパク質であるキチナーゼには、溶菌作用のような直接的作用のほかに、宿主の防御反応を活性化するような間接的な作用もあることが知られている。このことから、量的には減少するが宿主細胞内で産生されたキチナーゼが、病原菌の感染に対する宿主の応答反応に何らかの影響を与えたということも考えられる。しかしながら、今回観察されたキチナーゼ産生量の経時的な減少および病原菌の感染による産生量の増大などの現象については、キクにおける導入遺伝子の不活化現象の原因の解明とあわせて、今後さらなる研究が必要である。

実験3. 組換えキク植物における白さび病菌の感染行動の観察

白さび病菌の担子胞子の葉面における発芽率および感染率には、抵抗性系統 (Y61, Y84およびY97)と非組換え体で差異が認められなかった (Table 10). また感染様式についても差がみられず、抵抗性系統においても非組換え体と同様に発芽管の伸長と付着器形成による角皮感染が認められた。さらに葉肉組織の細胞間隙においても両者の間ではほぼ同様の菌糸伸長が観察され、菌糸は接種12日後には海綿状組織下部に達していた。この時期には、非組換え体および白さび病に対し抵抗性を示さない

Table 10 Infection behavior of *Puccinia horiana* on transgenic chrysanthemum lines expressing a rice chitinase gene (RCC2)

Lines	Germination rate of basidiospore ¹⁾ (% , mean ± SD)	Cuticular penetration rate ²⁾ (% , mean ± SD)
Y61	79.1 ± 4.1	42.0 ± 2.5
Y84	77.9 ± 3.2	41.1 ± 1.3
Y97	77.3 ± 5.8	43.0 ± 2.2
Control ³⁾	77.9 ± 3.7	42.0 ± 2.2

¹⁾ (No. of germinated basidiospore / No. of inoculated basidiospore) × 100.
²⁾ (No. of basidiospore germinated and hyphae penetrated into leaf / No. of inoculated basidiospore) × 100. Germination and cuticular penetration were counted 3 days after inoculation.
³⁾ Non-transgenic plant.

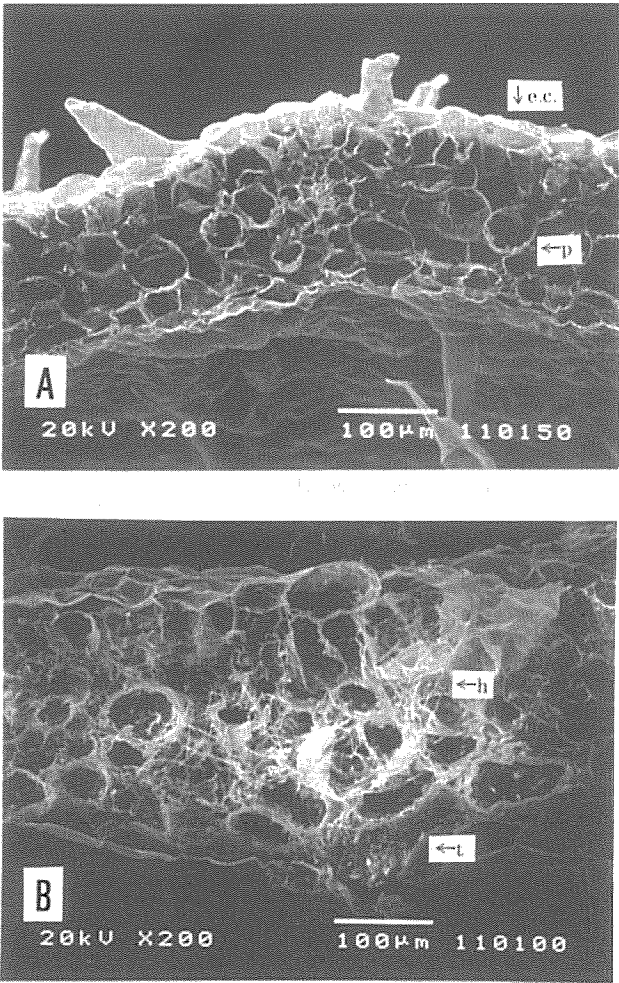


Fig.16 Elongation of hypha of *Puccinia horiana*. in the leaf tissue of non-transgenic chrysanthemum plant. Twelve days after inoculation, infection hypha elongated in intercellular space of parenchyma and telium formation was observed. Infected leaves were fixed in 2.5 % glutaraldehyde for 2 hours and dehydrated by 50 % to 100 % of ethanol. Samples for SEM observation were prepared by frozen-dehydration method. A: control (non-infected plant), B: non-transgenic chrysanthemum plant. e.c.: epidermal cells, h: hypha, p: parenchima cells, t: telium.

Y12系統では、海綿状組織下部においていくつかの細胞が崩壊し、内部に菌糸が蔓延していることが観察された (Fig. 16). また組織下部に密になった菌糸群が認められ葉裏には冬胞子堆が形成された。一方、抵抗性を示したY61, Y84およびY97系統では、非組換え体と同様に葉肉組織に菌糸が蔓延した状態においても、冬胞子堆が形成されない場合があることが観察された (Fig. 17). この時期には海綿状組織下部においていくつかの細胞が崩壊していることが観察されたが、菌糸の量は比較的に少ないことが明らかとなった。また、このように白さび病菌の感染、葉肉組織内の菌糸伸長には、抵抗性系統と非組換え体で差異が認められなかったにもかかわらず、冬胞子堆形成量には明らか

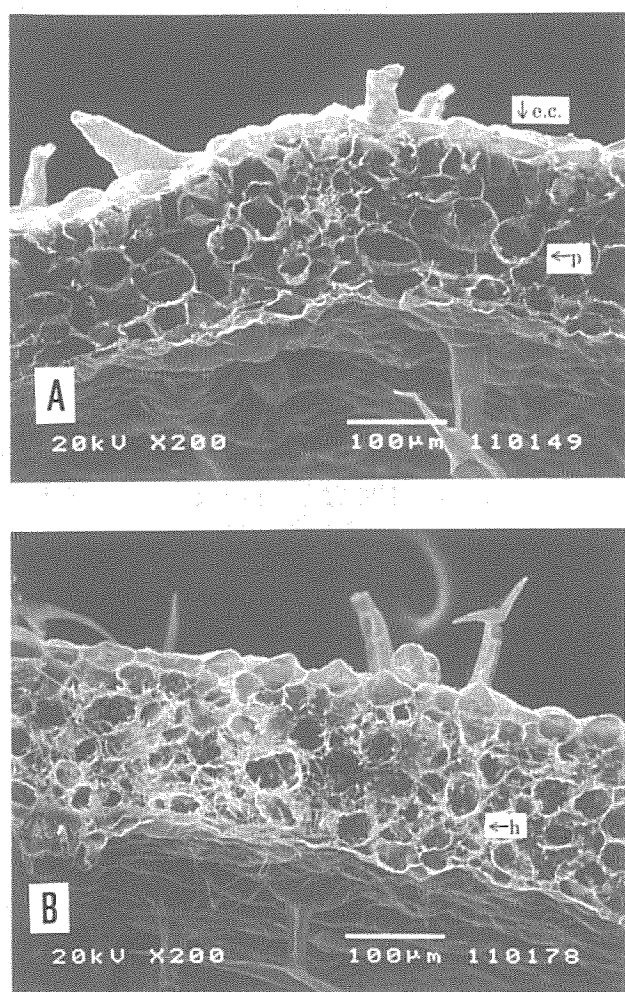
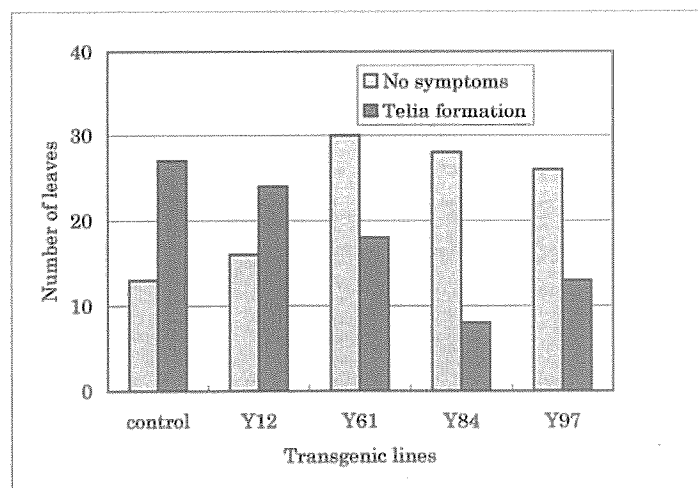


Fig. 17 Spread of infection hypha of *Puccinia horiana* in leaf spongy tissue of transgenic chrysanthemum line Y84, 12 days after inoculation (B). Although degradation of parenchyma cells were observed, telia were not formed on this leaf. Infected leaves were fixed in 2.5 % glutaraldehyde for 2 hours and dehydrated by 50 % to 100 % of ethanol. Samples for SEM observation were prepared by frozen-dehydration method. A: control (non-infected plant), B: Y84. h: hypha, p: parenchyma cells.



な差異がみられた (Fig. 18). 白さび病菌の感染過程の観察結果から担子胞子の感染および葉肉組織内の菌糸伸長には、Y61, Y84, Y97系統, Y12系統および非組換え体の間で差異は認められなかった。このことは感染および菌糸伸長の段階では、宿主の抵抗性の発現がほとんどみられないことを示している。白さび病菌は絶対寄生菌であり、表皮細胞への侵入にあたっては侵入菌糸全体が寄主原形質膜と思われる膜構造によって取り囲まれ、侵入を受けた表皮細胞にも著しい変性はみられないとされ、さらに菌糸はところどころで柵状組織の細胞内に侵入しつつ主に細胞間隙を伸長して海綿状組織へと到達するが、細胞内へ侵入した菌糸は寄主原形質膜と思われる膜構造により取り囲まれ、侵入を受けた細胞ではとくに著しい変性がみられないとされている (河野ら1980)。これらのことから、菌糸伸長の段階では菌糸と宿主の細胞質との直接的な接触はごくわずかであると考えられる。一方、病斑形成の時期には海綿状組織の下部に密になった菌体群が認められ、冬胞子堆はこの菌体群から生じることが報告されている (河野ら1980)。今回導入したRCC2の転写産物は、キュウリ (岸本ら1998) およびトマト (佐々木ら1999) において細胞内局在性を示すことが報告されており、キクにおいてもRCC2の転写産物は同様の局在性を示すと推測される。このため細胞間隙を伸長する白さび病菌の侵入菌糸との接触はわずかであると考えられ、このことが抵抗性系統と非組換え体で白さび病菌の感染および菌糸伸長に差異がみられなかったことの原因の一つであると思われる。一方、このように白さび病菌の感染、葉肉組織内の菌糸伸長には差異がなかったにもかかわらず、冬胞子堆形成量には明らかな差が認められた。抵抗性系統では海綿状組織内に菌糸が蔓延し、いくつかの細胞の崩壊が観察されながら冬胞子堆の形成がみられない場合があった。これは冬胞子堆形成に先だって細胞の崩壊がおり、これにより細胞内に局在していたキチナーゼが流出して直接的な作用により菌糸の成育阻害を引き起こし、このことが最終的に冬胞子堆形成量の減少に結びついたものと推察される。しかしながらこれらの現象については今後、白さび病菌の冬胞子堆形成のメカニズムおよびキクにおけるキチナーゼの作用機作の解明等、さらなる研究が必要であると考えられる。

以上のように、本実験により白さび病菌に対し抵抗性をもつ

Fig.18 Comparison of number of leaves which showed large amount of telia among transgenic lines inoculated with *Puccinia horiana* in a plant box. Resistant lines (Y61, Y84 and Y97) had fewer numbers of leaves showing telia formation, compared with Y12 or control (non-transgenic plant). No symptoms: leaves showed no symptom. Telia formation: more than 25 % area of leaflet surface covered with telia.

組換えキク系統が得られた。作出された抵抗性系統は完全な抵抗性ではないものの、冬孢子堆形成量の減少により圃場における感染源および越冬源の減少をもたらし、病害防除のための労力軽減につながるものと期待される。

第VII章 総合考察

形質転換を利用した育種を行う場合には、効率的な形質転換系の確立および導入遺伝子の安定的な発現が不可欠である。また目的とする形質をもつ個体を効率的に選抜するために有効な選抜、検定方法の確立が必要である。本研究ではキクの形質転換に関する種々の技術開発を行いながら、実用的な遺伝子であるキチナーゼ遺伝子を導入した組換えキク植物を作出し、菌類病に対する抵抗性を評価した。

まず、茎葉再分化能の高いキク品種のスクリーニングおよびアグロバクテリウムLBA4404株を利用した効率的な形質転換法の確立を試みた。外植体として用いた茎切片は葉片に比べて再分化能が高いこと、取扱いが簡便なことおよび再分化の過程でカルスを経由しないために要する日数が短く、体細胞変異が起こりにくいという利点がある (Kaulら1990)。これらの点は大量の外植体を供試して再分化個体のある程度確保し、その中から有用なものを選抜するという育種作業を効率的に行う上で非常に重要である。茎切片培養の結果、比較的高い茎葉再分化能をもった11品種がスクリーニングされ、そのうち3品種について各種抗生物質の適当な選抜圧濃度を調査したところ、抗生物質に対する感受性は全体的に高かった。ところでLBA4404系統はキクに対する感染力が比較的弱いことが示唆されており (Urbanら1994, Wordragenら1991)、これまで栽培ギクにおいては組換え植物を得るには至っていなかったが、本実験では共存培養時にアセトシリシリンゴンを添加することにより組換え植物が得られた。このことからLBA4404系統を用いた場合でも形質転換が可能であることが示され、さらに形質転換効率も‘山彦’では2.46%にまで向上した。また‘秀芳の力’においても1.60%にまで向上したが、この品種では従来、形質転換効率は0.1%程度とされていたことを考えると10倍以上の効率を得られた。ここに至り、容易に入手可能なアグロバクテリウム系統を用いてある程度の形質転換効率を得るという当初の目的はほぼ達せられ、効率的な形質転換系が確立されたものと、この時点では考えられた。

次に、さらなる形質転換効率の向上を図りつつ導入遺伝子を安定的に発現する組換え植物を獲得するために、より強い感染

力をもつアグロバクテリウムの系統を用いて形質転換実験を行った。その結果、供試した‘山彦’および‘ニューサマーイエロー’とともに組換え体を得られたが、供試したアグロバクテリウムC58C1、MP90およびLBA4404系統の間には形質転換効率に有意な差異は認められなかった。しかしながらLBA4404系統を用いて得られた組換え系統では、GUS遺伝子の導入が確認されているにもかかわらず、獲得直後からその発現がみられないという導入遺伝子の不活化現象が観察された。Urbanら (1994) も同様の現象を観察しており、キクの形質転換実験でLBA4404系統を用いた場合には導入遺伝子の発現個体を得られなかったとしている。この不活化現象の原因は今のところ不明であるが、形質転換を利用したキクの育種のためには重大な障害となる。以上のことから、今後の形質転換実験においてはC58C1またはMP90系統を用いることが適当であると判断された。

一方、C58C1またはMP90系統を用いた場合においても、当初GUS活性を示していた組換え系統において、成育に伴って次第にそのレベルが低下する現象が観察された。例えば‘ニューサマーイエロー’では、C58C1系統は3.09%と最も高い形質転換効率を示したが、最終的には得られた5系統の発現系統のうち4系統 (80.0%) でGUS活性がほとんどゼロにまで低下した。これらのことから今後キクの形質転換実験においては、単に形質転換効率のみならず、安定的に導入遺伝子を発現する個体がどれだけ得られたかということにも注意を払うことが重要であると考えられる。また、組換え系統のGUS活性のレベルは他のキクの報告とほぼ同様であったが、pBI121を用いて形質転換を行ったタバコの1/10 (Daubら1994)、*Kalancoe blossfeldina*の1/100 (Aida・Shibata 1996) であった。さらにWordragenら (1992) はCaMV35SプロモータでドライブされるGUS遺伝子の発現の時期が、キクではタバコに比べ遅いことを報告している (タバコでは接種2日後、キクでは接種5日後)。これらの観察から、キクにおいてはCaMV35Sプロモータの発現がタバコや*Kalancoe blossfeldina*と比べて低いことが推察され、キクの形質転換による実用形質の導入にあたっては、より高発現となるように改良したプロモータの利用が必要であることが示唆された。

ところでキクは栄養繁殖性植物であり培養個体の維持は、クローン個体を継代培養することにより行われる。ごく最近、キクの培養の過程で導入遺伝子の脱落が起こる場合があることが報告された (工藤ら2000)。現在までのところ、培養個体の成

育の過程で導入遺伝子の不活化や脱落が起こる原因については明らかでない。一方で本実験の結果得られたYC14系統（小ギク‘山彦’の組換え系統）のように、長期間にわたり導入遺伝子の発現がみられる系統もあることが示されている。現在の技術では外来遺伝子の導入位置およびコピー数をコントロールすることは不可能であり、不活化したゲノム配列の近傍に挿入された外来遺伝子や複数のコピーが導入された外来遺伝子は、より不活化を起こしやすいものと考えられる（Vaucheretら1998）。このことから実際の育種の場面では、多数の組換え系統を得て、その中から導入遺伝子の安定的な発現のみられる系統を選ぶことが必要となる。塚原ら（1998）はスプレーギクにおいて20,000の外植体を用いて形質転換を行い82個体の組換え体を得て（外植体当たりの形質転換効率0.41%）、その中から選抜した数系統の優良系統においては導入遺伝子の不活化現象はまったく見られないことを報告しており、この方法が当面、不活化現象を回避するための最も確実な方法であると考えられる。いずれにしても、導入遺伝子の発現に影響を与えているメカニズムについては今後検討が必要であるが、形質転換を実際のキクの育種に利用していく場合には注意を要する点であると考えられる。

次に、これまでの実験結果を踏まえキクへの実用形質の導入を試みた。形質転換実験にあたり、共存培養時の温度が形質転換効率におよぼす影響について調査したが、結果としてC58C1系統、MP90系統ともに従来どおり25℃で共存培養を行うことで最も高い形質転換効率を得られることが示された。さらに導入遺伝子の存在が確認されているにもかかわらずキチナーゼの産生が見られない系統（転写時の不活化現象と考えられる）の発生率は、両系統とも25℃で最も低くなった。これらのことから、アグロバクテリウムC58C1系統およびMP90系統を用いたキクの形質転換にあたっては、25℃で共存培養を行うことで最も効率よく導入遺伝子の発現個体を得られることが明らかとなった。

次いでイネ・キチナーゼ遺伝子を導入した組換えキク系統を作出し、灰色かび病菌に対する抵抗性を検定した。3,231の外植体を用いた形質転換の結果、16の組換え体を得られたが（外植体当たりの形質転換効率0.49%）、キチナーゼの産生がみられた個体は11に留まった。他の5個体ではキチナーゼの産生がみられず、これらの個体では獲得当初から導入遺伝子の不活化現象が現れたものと考えられる。また、各組換え系統におけるキチナーゼの産生量を比較したところ系統間差異がみられること

が明らかとなり、またその産生量はRCC2を導入したキュウリ（Tabeiら1998）などと比べ全体的に低かった。これらの結果は、GUS遺伝子を導入した組換え体における遺伝子発現と同様の傾向を示した。先に述べたように、組換えキク植物においてはCaMV35Sプロモータの発現が他の植物と比べ低い傾向にあるが、今回はCaMV35Sプロモータと比べ高発現とされるPEN4プロモータを用いたにもかかわらず、このような結果となった。組換えキク植物における導入遺伝子の発現に関しては今後、不活化現象などその発現を抑制する原因についてさらなる検討を行い、その発現量を高めていくことが必要であると考えられる。

得られた11系統の組換え植物について灰色かび病菌を用いた接種試験を行ったところ、抵抗性にも組換え系統の間で差異が見られ、比較的強い抵抗性を示すものは3系統（Y12、Y61およびY97）に留まった。抵抗性系統ではキチナーゼの産生量も比較的多く、また抵抗性を示さなかった系統では非組換え体と同等程度のキチナーゼの産生量に留まったことから、抵抗性の増強は主としてRCC2の発現によることが示唆された。しかしながら、キチナーゼの産生量はさほど多くなくとも抵抗性の増強を示す系統（Y12）もあることが示された。組換え植物における灰色かび病菌の感染行動の観察から、今回の病害抵抗性の増強は主として産生されたキチナーゼの溶菌作用による侵入菌糸の伸長抑制とともに、宿主細胞において防御応答反応が誘導されたことによることが示唆された。キチナーゼ遺伝子を耐病性育種に利用するためにはキチナーゼの植物の防御反応に関する作用について一層の理解が必要であり、今後この分野におけるさらなる研究の進展が期待されることである。

白さび病はキクの重要病害であり抵抗性をもった品種の育成が求められている。本実験の結果、プラントボックス法によりキクの白さび病菌に対する抵抗性検定が可能であることが示された。本法は、無菌培養植物体上で白さび病菌を継代培養しておくことで年間を通して実施可能なこと、本菌の感染に最適な条件が容易に再現できること、および小面積で大量の個体を扱えることなどから非常に効率的である。近年、植物の形質転換技術は飛躍的な進歩を遂げ、従来型の交配育種とは別なアプローチとして育種に利用されつつあり、これまでに耐病性をもつ組換えキク植物の作出も報告されている（Shermanら1998b, Takatsuら1999）。しかしながら組換え植物の一般圃場における栽培はその安全性評価が終了するまでは非常に制限されており、耐病性等の特性について十分な調査ができない場合も多い。このようなことから本法は、とくに組換え植物の耐病性検定を

行う際に非常に有効であると考えられ、無菌培養植物の段階で一次スクリーニングを行うことで育種効率が飛躍的に高まることが期待される。

ところでキク白さび病菌にはいくつかのレースの存在が示唆されている。山口（1981）は40品種のキクを用いて病原性の異なる6種類のレースを見出し、また最近では工藤・岡村（1998）がスプレーギクにおける判別品種を設定して本邦には少なくとも6種類のレースが存在することを示しており、いずれも白さび病菌における病原性の分化を示唆している。本実験においても、当初は同一のキク植物から得た病原菌であってもプラントボックス法で小ギク‘山彦’を用いて無菌的に継代培養を行ったものは、輪ギク‘サマーイエロー’にはごくわずかな冬胞子堆しか形成しなくなる現象が認められた。このことは同一品種で継代培養することにより、当初混在していたものの中から特定のレースを分離できる可能性を示唆している。今後、供試する白さび病菌のレースおよび同一の品種で継代培養した場合のレース分化等についてもさらに検討する必要がある。

次いで、プラントボックス法により第Ⅳ章で獲得したイネ・キチナーゼ遺伝子を導入した組換え系統をスクリーニングし、白さび病菌に抵抗性を示す系統を選抜した。しかしながら、11系統の組換え体のうち抵抗性を示すものは3系統（Y61、Y84およびY97）で、またそれらは冬胞子堆の形成量の減少をともなう中程度の抵抗性を示すに留まり、第Ⅳ章で述べた灰色かび病菌に対するような比較的強い抵抗性を示す系統は得られなかった。また灰色かび病菌に抵抗性を示したY12系統は白さび病菌に対してはまったく抵抗性を示さなかった。

この原因を探るために、まず組換えキク系統におけるキチナーゼの産生量を経時的に調査したところ、成育にともなって次第にその産生量が低下する現象が認められた。これは第Ⅲ章で述べた成育にともなう導入遺伝子の不活化現象と関連し、何らかの原因によりキチナーゼの産生が抑制された結果であると推察された。しかしながら、白さび病菌に抵抗性を示した組換え系統（Y61、Y84およびY97）では、低下したキチナーゼの産生量が病原菌を接種した後に再び増大する現象が認められた。一方、抵抗性を示さなかったY12系統ではこのような現象は観察されなかったことから、今回観察された抵抗性の増強は主としてキチナーゼの作用によることが示唆された。

キクの白さび病菌に対する抵抗性は、これまで冬胞子堆の形成量の違いにより判定されてきた（山口1981、De Jong・Rademaker 1986）。河野ら（1980）は接種に対して、(1)冬胞子

堆の形成が認められない高度抵抗性、(2)冬胞子堆を一葉あたり数個程度形成する不完全抵抗性、および(3)冬胞子堆を葉の全面にわたり形成する感受性を示す品種を用いて、白さび病菌の感染過程を観察した。その結果、高度抵抗性の品種では表皮細胞内への侵入菌糸が認められるのみで、柵状および海綿状組織内ではまったく認められなかった。一方、不完全抵抗性品種と感受性品種においては、いずれも柵状および海綿状組織内に侵入菌糸が認められ葉肉組織内における菌の感染過程には違いがみられず、冬胞子堆形成量にのみ違いが認められた。このことから河野ら（1981）は、白さび病菌が菌糸伸長から冬胞子堆形成に移行する過程で発現する宿主の抵抗性反応の存在を示唆している。今回の実験においても、抵抗性系統と非組換え体では侵入菌糸の感染過程では違いがみられず、白さび病菌に対する抵抗性は冬胞子堆形成量の減少というかたちで現れた。また冬胞子堆形成に先だって細胞の崩壊がおこることが示唆された。これらのことから今回の組換えキク植物における抵抗性の増強は、菌糸伸長から冬胞子堆形成に移行する過程における細胞の崩壊により流出したキチナーゼの作用によるものと考えられるが、今後キチナーゼの植物体内におけるはたらきを含め、さらに検討する必要があるものと思われる。また、細胞外分泌型のイネ・キチナーゼをコードする遺伝子（ゲノミッククローン：RCG 3、Nishizawaら、1993）を用いて細胞間隙における侵入菌糸の伸長を阻害することで、白さび病菌に対しさらに抵抗性を増強できる可能性も残されている。

抵抗性を示す組換えキク植物における灰色かび病菌と白さび病菌の感染行動を観察したところ、分生子または担子胞子の発芽および感染はいずれも抑制されなかったが、葉肉組織内の菌糸伸長の段階で抵抗性反応に違いが現れることが示された。すなわち、腐生性が強いとされる灰色かび病菌においては、表皮細胞内に侵入した菌糸はRCC2の転写産物（キチナーゼ）と直接接触し、溶菌作用を受けるとともに菌体の分解産物がエリシターとして働いて（進士1992）宿主の防御応答反応が誘導されたと推察され、実際に比較的早い段階で感染が抑えられることが示された。一方、絶対寄生菌である白さび病菌においては、表皮細胞内への侵入および細胞間隙における菌糸伸長の段階では、菌糸と細胞内に局在するキチナーゼとの接触はごくわずかであると考えられる。しかしながら病斑形成に移行する過程においては細胞の崩壊がおこり、流出したキチナーゼが菌糸の成育阻害を引き起こし冬胞子堆形成が抑制されたものと推察される（Fig. 19）。このように病原菌の感染様式の違いにより組換え

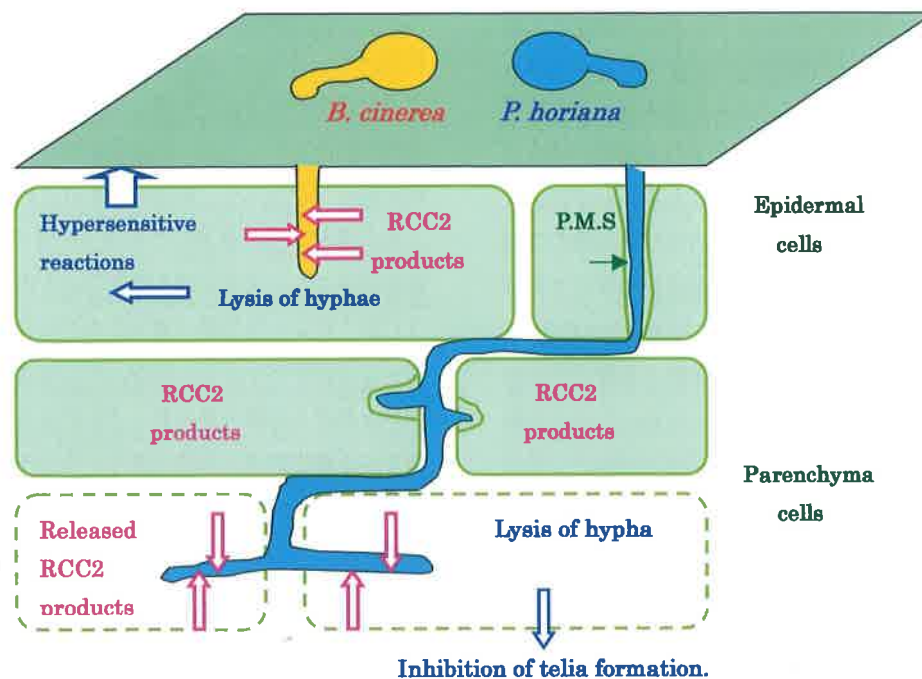


Fig. 19 Schematic presentation of the infection process of *Botrytis cinerea* and *Puccinia horiana* in transgenic chrysanthemum plant. Infection hyphae of *B. cinerea* might be degraded by RCC2 products, and fungal elicitors released (Shinshi, 1992). Fungal elicitors might induce defence reactions of the host including hypersensitive reactions. Infection hyphae of *P. horiana* did not contact with components of epidermal cell, because hyphae was surrounded by plasma membrane-like structure (Kohno et al., 1980). Hyphae elongated in intercellular spaces, and also did not contact with components of parenchyma cells. Just before telia formation, parenchyma cells were broken, and released RCC2 products might inhibit growth of hypha and telia formation. P. M. S: plasma membrane-like structure.

キク植物の抵抗性反応に違いがあることが示唆されたことは興味深い。また、このことは本実験において灰色かび病菌に対しては比較的強い抵抗性を示す組換え系統が得られたにもかかわらず、白さび病菌に対しては中程度の抵抗性を示す系統が得られるに留まったことにも関連しているものと思われる。

以上のように、本研究の結果灰色かび病菌と白さび病菌に対し複合抵抗性をもつ組換えキク植物が得られた。作出された抵抗性系統は完全な抵抗性ではないものの、病斑形成量の減少により圃場における感染源および越冬源の減少をもたらし、病害防除のための労力の軽減につながるものと期待される。また、形質転換により導入した抵抗性遺伝子は優性遺伝すると考えられるので、今回得られた組換え系統は抵抗性品種として利用するとともに、交配育種のための素材としても有望であると考えられる。今後は、白さび病と灰色かび病以外の菌類病に対する抵抗性についても検討するとともに、組換え植物の環境に対す

る安全性の評価等を行った上で新品種育成のために活用していきたい。

摘 要

キクは茨城県の主要な花き品目であるが、露地栽培が主であるために生産の現場では病害虫防除のために多大な労力を要しているのが現状である。対策のひとつとして抵抗性品種の導入が挙げられるが、実用的には重要病害である白さび病に加えて他の病害にも抵抗性をもつことが望まれる。しかしながら素材に乏しいことから従来の交配育種による複合抵抗性品種の育成は非常に困難である。一方、植物の形質転換は近年新たな育種技術として注目を集めており、病害抵抗性の増強、花色の変化、日持ち性の改良などさまざまな形質をもつ組換え植物が作出されている。本論文では、アグロバクテリウムを用いたキクの形質転換について、形質転換効率の向上および導入遺伝子の安定性などを検討し、形質転換を実用的な育種技術として確立した。また、植物に病害抵抗性を付与するとされるイネ・キチナーゼ遺伝子(RCC2)を導入した組換えキク植物を作出し、菌類病に対する抵抗性を検討した。とくに白さび病菌については、無菌培養植物を用いた効率的な検定方法を確立することにより抵抗性個体の選抜を試みた。これらの研究の結果、以下に要約するような成果が得られた。

1. アグロバクテリウムを用いたキクの効率的な形質転換系の確立

キクでは茎葉再分化能の品種間差およびアグロバクテリウムとの親和性の違いが著しく、これまでに海外を中心に報告されている形質転換の成功例は、ごく一部の品種およびアグロバクテリウムの系統を用いたものに限られている。そこで国内産キクを用いた実用的な形質転換系を確立するために茎葉再分化能の調査および市販のアグロバクテリウムLBA4404系統を用いた形質転換実験を行った。主要な23品種・系統のキクについて茎切片培養を試みたところ不定芽形成率には著しい品種間差があることが認められたが、比較的高い不定芽形成率を示す11品種がスクリーニングされた。その中の3品種(‘秀芳の力’、‘ニューサマーイエロー’および‘山彦’)についてアグロバクテリウムLBA4404系統を用いて形質転換実験を試みたところ、共存培養時にアセトシリンゴンを100 μ M添加することにより、NPT II 遺伝子を有する形質転換体が最高2.46 %の効率で得られた。

2. 組換えキク植物における導入遺伝子の不活化に関する検討

形質転換法による育種のためには、導入遺伝子の安定的な発現が不可欠である。アグロバクテリウムC58C1、MP90および

LBA4404系統を用いた形質転換実験の結果、いずれの菌系統においてもGUS遺伝子が導入された組換え体が得られたが、GUS活性はタバコの1/10程度と低かった。また、一部に導入遺伝子の存在が確認されているにもかかわらずその発現がみられない場合があった。次に、組換え系統におけるGUSの発現を経時的に調査したところ、獲得直後には比較的高いGUS活性を示していた系統でも、成育にともなってそのレベルが低下し、1年後にはほとんどゼロに近くなることが明らかとなった。このようにキクにおいては導入遺伝子の不活化現象が非常に起こりやすいことが明らかとなったが、中には長期間にわたり発現がみられる組換え系統も得られることが示された。実際の育種の場面では多数の組換え系統を得て、その中から導入遺伝子の安定的な発現がみられる系統を選ぶことが必要であり、またこの方法が当面、不活化現象を回避するための最も確実な方法であると考えられる。

3. イネ・キチナーゼ遺伝子導入による灰色かび病抵抗性キク植物の作出

アグロバクテリウムC58C1およびMP90系統を用いた形質転換により、小ギク‘山彦’にRCC2を導入した組換えキク植物を作出した。外植体当たりの形質転換効率は0.49%で16の組換え系統が得られたが、導入遺伝子を発現する系統は11に留まった。またキチナーゼの産生量には組換え系統の間で差異が認められた。一方、灰色かび病菌を用いた接種試験の結果、本病菌に対する抵抗性にも組換え系統の間で差異がみられた。抵抗性とキチナーゼの産生量はほぼ相関しており、組換え系統における抵抗性の増強は主としてキチナーゼ産生量の増大によることが示唆された。本実験の結果、灰色かび病菌に対し比較的高い抵抗性を示す3系統(Y12、Y61およびY97)およびY84を含む中程度の抵抗性を示す3系統の組換え植物が得られた。

4. 無菌培養植物を用いたキクの白さび病菌に対する効率的な抵抗性検定法の確立

培養容器内で成育する無菌培養植物に白さび病菌を接種し(プラントボックス法)、絶対寄生菌である本病菌を継代培養で育てることを示した。また12品種・系統のキクを用いて白さび病菌に対する抵抗性検定を行ったところ、抵抗性の品種間差異を検出できることが示され、また無菌植物における白さび病に対する感受性と実際の圃場(温室)における感受性には正の相関($r=0.731^*$)が認められた。以上のことから、プラントボックス法はキクの白さび病菌に対する抵抗性検定に有効であることが示された。本法は年間を通して実施可能なこと、小面積で大量

の個体を省力的に扱えることなどから非常に効率的であると考えられる。

5. プラントボックス法による白さび病抵抗性組換えキク植物の選抜

イネ・キチナーゼ遺伝子を導入した11の組換えキク系統について、プラントボックス法により抵抗性検定を行ったところ、白さび病菌に対し抵抗性を示す3系統（Y61, Y84およびY97）が選抜された。しかしながらこれらの組換え系統は冬孢子堆の形成量の減少をとまなう中程度の抵抗性を示すに留まり、灰色かび病菌に対するような比較的強い抵抗性を示す系統は得られなかった。また灰色かび病菌には抵抗性を示したY12系統は白さび病菌に対しては抵抗性を示さなかった。これらのうち抵抗性を示す3系統の組換え体についてキチナーゼの産生量を調査したところ、成育にとまって次第にその産生量は低下するが、病原菌の接種により再びその検出量が増大する現象が認められた。一方、Y12系統では成育にとまって産生量はほぼゼロにまで低下し、病原菌の接種によっても増大しなかった。これらのことから、上記3系統の抵抗性の増強は主としてキチナーゼ産生量の増大によることが示唆された。また抵抗性系統では葉肉組織内の白さび病菌の菌糸量が比較的少ないことが観察され、このことが冬孢子堆形成量の減少に関係していることが推察される。これら3系統は灰色かび病菌に対しても抵抗性を示すことが確認されており、本研究の結果、白さび病菌と灰色かび病菌に対し複合抵抗性をもつ組換えキク植物が作出された。

謝 辞

本論文を取りまとめるにあたり、茨城大学教授阿久津克己博士、宇都宮大学教授奥田誠一博士、茨城大学教授丹羽勝博士、東京農工大学教授寺岡徹博士ならびに宇都宮大学教授夏秋知英博士には終始懇篤な御校閲と貴重な御教示を頂いた。

また、本研究を行うにあたり、茨城県農業総合センター生物工学研究所長岡成美博士、前同所長（現筑波大学教授）西村繁夫博士、元同所長（現北海道大学教授）大澤勝次博士、同果樹花き育種研究室長林幹夫博士、前同室長（現同園芸研究所果樹研究室長）佐久間文雄博士、同園芸研究所花き研究室長本図竹司博士、独立行政法人農業技術研究機構花き研究所柴田道夫博士、同間竜太郎博士、同農業生物資源研究所西澤洋子博士および東京大学大学院農学生命科学研究科日比忠明博士には終始御指導と御鞭撻を賜り、本論文を取りまとめるにあたっての有益なる御教示を頂いた。

本研究に関する実験に関しては、茨城県農業総合センター生物工学研究所果樹・花き育種研究室の霞正一博士、眞部徹主任および臨時職員各位、同園芸研究所富田恭範主任研究員、また中島雅己博士、岸本久太郎博士をはじめとする茨城大学農学部植物生体防御学研究室の各位、愛知県農業総合試験場花き研究所大石一史博士、茨城県農業総合センター生物工学研究所河又仁主任研究員ならびに同成澤才彦博士に多くの御援助を頂いた。

さらに、茨城県農業総合センター大森仁一専門技術員、同センター土浦地域農業改良普及センター下田久課長、同センター鉾田地域農業改良普及センター砂川秀典専門員、同笠間地域農業改良普及センター皆川剛専門員、同センター山間特産指導所友常秀彦主任研究員、同センター生物工学研究所元嘱託職員井上栄一博士、同森中洋一博士、同山田哲也博士、同青木隆治氏、茨城県農林水産部農政企画課矢島めぐみ主任、香川大学助教授深井誠一博士、筑波大学助教授江面浩博士、同講師半田高博士、独立行政法人中央農業総合研究センター津田新哉博士、キリンビール株式会社植物開発研究所戸栗敏博博士、同工藤博司博士、三重県科学技術振興センター河野満博士には研究推進の上でご援助を頂いた。

これらの方々には、心からの感謝を捧げる次第である。

引用文献

- 我孫子和雄・岸国平・芳岡昭夫（1975）オキシカルボキシンに対し耐性を示す *Puccinia horiana* P. Hennings の分離。日植病報41：100。
- Aida, R. and M. Shibata (1996) Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgene silencing. Plant Sci. 121：175-185.
- Aida, R. and M. Shibata (1998) Developmentally Regulated Transgene Silencing in *Torenia*. Breed. Sci. 48：36-69.
- 間竜太郎・田部井豊・平井正志・柴田道夫（1992）アグロバクテリウムを用いたキク形質転換体の作出。育雑42（別2）：270-271。
- Akutsu, K., Y. Nishizawa, K. Kondo, S. Kaneko, N. Kikuchi, S. Kitade, Y. Yamaya, and T. Hibi. Expression of rice chitinase in transgenic tobacco plants enhances resistance to the powdery mildew. (submitted)
- 阿久津克己（1990）灰色かび病菌の薬剤耐性出現機構。植物防疫44：398-401。

- Asao, H., Y. Nishizawa, S. Arai, T. Sato, M. Hirai, K. Yoshida, A. Shinmyo, T. Hibi (1997) Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca fumuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. *Plant Biotech.* 14 : 145-149.
- Brogli, K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C. J. Mauvais, R. Brogli (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254 : 1194-1197.
- Bush, A.L. and S. Pueppke (1991) Cultivar-strain specificity between *Chrysanthemum morifolium* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39 : 309-323.
- Collinge, D.B., K. M. Kragh, J. D. Mikkelsen, K. K. Nielsen, U. Rasmussen, K. Vad (1993) Plant chitinases. *Plant Journal* 3 : 31-40.
- Daub, M. E., A. E. Jenks, L. A. Urban, S. C. Brintle (1994) Transformation frequency and foreign gene expression in burley and flue-cured cultivars of tobacco. *Tob. Sci.* 38 : 51-54.
- Deblaere, R., B. Bytebier, H. De Greve, F. Deboeck, J. Schell, M. Van Montagu, J. Leemans (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids. Res.* 13 : 4777-4788.
- De Jong, J. and W. Rademaker (1986) The reaction of *Chrysanthemum* cultivars to *Puccinia horiana* and the inheritance of resistance. *Euphytica* 35 : 945-952.
- De Jong, J., W. Rademaker and M. F. Wordragen (1993) Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 32 : 263-270.
- De Jong, J., M. M. J. Mertens and W. Rademaker (1994) Stable expression of the GUS reporter gene in chrysanthemum depends on binary plasmid T-DNA. *Plant Cell Rep.* 14 : 59-64.
- De Jong, J., W. Rademaker and K. Ohishi (1995) *Agrobacterium*-mediated Transformation of chrysanthemum. *Plant Tissue Cul. and Biotech.* 1 : 38-42.
- Dillen, W., J. De Clercq, J. Kapila, M. Zambre, M. V. Montagu and G. Angenon (1997) The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. *Plant J.* 12 : 1459-1463.
- 遠藤元庸・稲田委久子 (1992) 栽培ギクの核型について. *園学雑誌* 61 : 413-420.
- Finnegan, J. and D. McElroy (1994) Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio/Technology* 12 : 883-888.
- Firman I. D. and P. H. Martin (1968) White rust of *Chrysanthemum*. *Ann. Appl. Biol.* 62 : 429-442.
- Fukai, S., J. De Jong and W. Rademaker (1995) Efficient genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) using stem segments. *Breed. Sci.* 45 : 179-184.
- 深井誠一・陳忠英・大江正温 (1987) キクの葉片培養におけるシュート形成に関する品種間差異. *大阪農技セ研報* 24 : 55-58.
- Gynheung, An, P. R. Ebert, A. Mitra and S. B. Ha (1988) Binary vectors. In: *Plant Molecular Biology Manual A3*. p. 1-19. Kluwer Academic publishers, Belgium.
- Hawksworth D. L., B. C. Sutton and G. C. Ainsworth (1983) *Dictionary of the Fungi* (Seventh edition). Commonwealth Agricultural Bureaux, UK, p. 70.
- Hood, E. E., S. B. Gelvin, L. S. Melchers and A. Hoekema (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2 : 208-218.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hofmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227 : 1229-1231.
- 堀田治邦 (1997) キク灰色かび病. *花卉病害虫診断防除編*. 農山漁村文化協会, 東京. p.483-484.
- 飯嶋勉 (1976) 東京都におけるオキシカルボキシン耐性キク白さび病菌の発生. *東京都農試研報* 10 : 31-41.
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rpt.* 5 : 387-405.
- Kaul, V., R. M. Miller, J. F. Hutchinson and D. Richards (1990) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 21 : 21-30.
- 岸本久太郎・佐々木史生・佐々木アエニ・中島雅己・西澤洋子・田部井豊・日比忠明・阿久津克己 (1998) 灰色かび病抵抗性組換えキュウリ自殖後代植物における導入イネ・キチナーゼ遺伝子発現とそのCell Scan画像解析. *日植病報* 64 : 346.
- 川田穰一 (1989) キク. *植物遺伝資源集成* (松尾孝嶺監修). 講談社サイエンティフィク, 東京. p. 1046-1051.

- 河野満・西村富生・石崎寛・久能均（1974）さび病菌の細胞学的研究（Ⅰ）キク白さび病菌の冬胞子の発芽と核の行動について。三重大農学報47：1-9.
- 河野満・石崎寛・久能均（1980）さび病菌の細胞学的研究（Ⅶ）抵抗性の異なる栽培ギク3品種へのキク白さび病菌の感染。三重大農学報61：1-9.
- 古賀大三（1994）植物キチナーゼと生体防御。化学と生物32：712-722.
- 駒嶺穆（1990）植物バイオテクノロジー事典（駒嶺穆ほか編）。朝倉書店，東京。p. 3-6.
- Koncz, C. and J. Schell（1986）The promoter of T1-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. 204：383-396.
- 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.
- 工藤博司・岡村正愛（1998）本邦におけるキク白さび病菌の病原性の分化について。日植病報64：436.
- 工藤真治・柴田直子・千葉貴子・菅野善明・鈴木正彦（2000）アグロバクテリウムによるキクの形質転換における初期感染条件の検討。園学雑69(別1)：316.
- Ledger, S. E., S. C. Deroles and N. K. Given（1991）Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Cell Rep. 10：195-199.
- Legrand, M., S. Kauffman, P. Geoffroy and B. Fritig（1987）Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84：6750-6754.
- Lin W., C. S. Anuratha, K. Datta, I. Potrykus, S. Muthukrishnan and S. K. Datta（1995）Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. Bio/Technology 13：686-691.
- Lowe, J. M., M. R. Davey, J. B. Power and K. S. Blundy（1993）A study of some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 33：171-180.
- Lu, C.-Y., G. Nugent, T. Wardley-Richardson, S. F. Chandler, R. Young and M. J. Dalling（1991）*Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Bio/Technology 9：864-868.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook（1982）Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- 丸田一成・宮坂幸弘・西澤洋子・小林隆（1998）イネ・キチナーゼ遺伝子導入トルコキキョウの作出と灰色かび病抵抗性検定。育種48(別1)：189.
- Meyer, P.（1995）Variation of transgene expression in plants. Euphytica 85：359-366.
- 宮崎貞巳・田代洋丞・島田恒治（1976）キクの組織培養（第1報）。佐賀大農学40：31-44.
- 森田儔（1988）キク灰色かび病。キク白さび病。作物病害事典（岸国平編）。全国農村教育協会，東京。p. 540-544.
- 向井譲・山本直樹（1995）植物のPCR実験プロトコル（島本功ほか監修）。秀潤社，東京。p. 54-56.
- Murashige, T. and F. Skoog（1962）A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15：473-497.
- 西村正暘（1984）病原性と抵抗性。最新植物病理学概論（平井篤造ほか共著）。養賢堂，東京。p. 161-169.
- 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.
- Nishizawa, Y., Z. Nishio, K. Nakazono, M. Soma, E. Nakajima, M. Ugaki and T. Hibi（1999）Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. Theor. Appl. Genet. 99：383-390.
- 大橋祐子（1990）感染特異的(P R)タンパク質遺伝子の発現調節。化学と生物28：316-326.
- 大石一史・奥村義秀・森岡公一（2000）培養容器内のキクを用いた白さび病菌の培養。園学雑69：767-769.
- 岡田正順（1986）キク。花卉園芸の事典（阿部定夫ほか編）。朝倉書店，東京。p. 114-120.
- 大畑貫一（1995）保存法。作物病原菌研究技法の基礎（大畑貫一ほか編）。日本植物防疫協会，東京。p. 9-11.
- Ordentlich, A., T. Elad and I. Chet（1988）The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 78：84-88.
- Palauqui, J. C., T. Elmayan, F. Dorihaç de Borne, P. Crete, C. Charles and H. Vaucheret（1996）Frequencies, timing and spatial

- patterns of co-suppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* 112 : 1447-1456.
- Pavingerova, D., J. Dostal, R. Biskova and V. Benetka (1994) Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Sci.* 97 : 95-101.
- Rasmussen, U., H. Giese and J. D. Mikkelsen (1992) Induction and purification of chitinase in *Brassica napus* L. spp. *oleifera* infected with *Phoma lingam*. *Planta* 187 : 328-334.
- Renou, J. P., P. Brochard and R. Jalouzot (1993) Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. *Plant Sci.* 89 : 185-197.
- Roby, D., K. Broglie, R. Cressman, P. Biddle, I. Chet and R. Broglie (1990) Activation of a bean chitinase promotor in transgenic tobacco plants by phytopathogenic fungi. *Plant Cell* 2 : 999-1007.
- 佐々木史生・岸本久太郎・佐々木アエニ・中島雅己・佐藤隆穂・西澤洋子・日比忠明・阿久津克己 (1998) イネ・キチナーゼ遺伝子を導入した組換えトマト自殖後代 (R1) における菌類病抵抗性の増強. *日植病報* 64 : 346.
- 佐々木史生・岸本久太郎・佐々木アエニ・岡本直子・高津顕一・中島雅己・佐藤隆穂・西澤洋子・日比忠明・阿久津克己 (1999) イネ・キチナーゼ遺伝子を導入した組換えトマト植物におけるキチナーゼの細胞内局在性. *日植病報* 65 : 339-340.
- Sherman, J.M., J. W. Moyer and M. E. Daub (1998a) A regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation system for genetically diverse *Chrysanthemum* cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 : 189-194.
- Sherman, J.M., J. W. Moyer and M. E. Daub (1998b) Tomato spotted wilt virus resistance in chrysanthemum expressing the viral nucleocapsid Gene. *Plant Disease* 82 : 407-414.
- 柴田道夫・間竜太郎・池田 広・清水明美 (1992) キクの茎切片からの不定芽形成能の品種・種間差. *育種* 42(別2) : 556-557.
- 進士秀明 (1992) 植物の生体防御関連遺伝子とその発現制御. *蛋白質核酸酵素* 37 : 1222-1227.
- Sonoda, S. and M. Nishiguchi (2000) Delayed activation of post-transcriptional gene silencing and de novo transgene methylation in plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus. *Plant Sci.* 156 : 137-144.
- Suzuki, K. and H. Shinshi (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* 7 : 639-647.
- 鈴木馨・進士秀明 (1998) エリシターとエチレンによるキチナーゼ遺伝子発現制御. *植物の化学調節* 33 : 44-54.
- Tabei, Y., S. Kitade, Y. Nishizawa, N. Kikuchi, T. Kayano, T. Hibi and K. Akutsu (1998) Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Rep.* 17 : 159-164.
- 高津康正・友常秀彦・霞正一・佐久間文雄 (1998) 国内産キク品種における茎葉再分化能の差異と効率的な形質転換系の確立. *園学雑* 67 : 958-964.
- Takatsu, Y., Y. Nishizawa, T. Hibi and K. Akutsu (1999) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Sci. Hort.* 82 : 113-123.
- Tanaka, Y., S. Tsuda and T. Kusumi (1998) Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol.* 39 : 1119-1126.
- 塚原正義・吉岡正陽・小川俊也・柿谷誠・戸栗敏博 (1998) 二本鎖RNA分解酵素遺伝子 (pac1) を導入したキクの作成. *育種* 48 : 191.
- 内田勉 (1997) キク白さび病. *花卉病害虫診断防除編*. 農産漁村文化協会, 東京. p. 473-476.
- Urban, L. A., J. M. Sherman, J. W. Moyer and M. E. Daub (1994) High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Sci.* 98 : 69-79.
- Vaucheret, H., C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, D. Godon, J. B. Morel, P. Mourrain, J. C. Palauqui and S. Vernhettes (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* 16 : 651-659.
- Wessels, J. G. H. (1988) A steady state model for apical hyphal growth in fungi. *Acta Bot. Neerl.* 37 : 3-16.
- Wordragen, M. F., J. De Jong, H. B. M. Huitema and H. J. M. Dons (1991) Genetic transformation of chrysanthemum using wild type *Agrobacterium* strains; strain and cultivar specificity. *Plant Cell Rep.* 9 : 505-508.
- Wordragen, M. F., J. De Jong, M. J. Schornagel and H. J. M. Dons

- (1992) Rapid screening for host-bacterium interactions in *Agrobacterium*-mediated gene transfer to chrysanthemum, by using the GUS-intron gene. *Plant Sci.* 81 : 207-214.
- 山口隆 (1981) キクの白さび病抵抗性育種に関する研究. 育雑 31 : 121-132.
- Yamamoto, T., H. Iketani, H. Ieki, Y. Nishizawa, K. Notsuka, T. Hibi, T. Hayashi and N. Matsuta (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* 19 : 639-646.
- Yepes, L. M., V. Mittak, S. Z. Pang, C. Gonsalves, J. L. Slightom and D. Gonsalves. (1995) Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted wilt virus. *Plant Cell Rep.* 14 : 694-698.
- 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.

Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura)
expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to fungal diseases

Yasumasa Takatsu

Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center

Ago, Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 309-0292, Japan

Summary

1. Improved protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of chrysanthemum.

Stem segments of 23 chrysanthemum cultivars were cultivated on MS medium containing NAA 2.0 mg · liter⁻¹ and BA 0.2 mg · liter⁻¹ (regeneration medium). Among 11 cultivars which showed high adventitious shoot regeneration potentials, three cultivars, 'Shuho-no-chikara', 'New Summer Yellow' and 'Yamabiko' which were selected for transformation experiments. The stem segment explants were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 containing pBI121 plasmid at 25 °C for 3 days. After co-cultivation, the explants were placed on regeneration medium containing 7.5 to 10.0 mg · liter⁻¹ kanamycin. The presence of the NPT II gene in the regenerated plants was confirmed by PCR-Southern analysis. The transformation efficiency increased to 2.46 % when the *Agrobacterium* suspension was diluted with a liquid regeneration medium containing 100 µM acetosyringone.

2. Transgene inactivation in *Agrobacterium*-mediated chrysanthemum transformants.

To compare transformation frequency and to investigate the developmental alterations in transgene expression, two cut-flower chrysanthemums 'Yamabiko' (spray-type) and 'New Summer Yellow' (standard-type) were transformed with three disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains C58C1, MP90 and LBA4404, all of which harboring the pBI121 plasmid. No conspicuous difference was observed in transformation efficiency among cultivar/bacterial strain combinations. GUS activity levels in transformants were fairly low and varied among the different transgenic lines, ranging from 30 to 250 pmol · min⁻¹ · (mg protein)⁻¹. GUS expression was not observed in the lines transformed with strain LBA4404. The alterations of GUS activity levels were examined for a long term, and it was observed that GUS activities reduced to zero level in most of transgenic lines 12 months after the inoculation of bacteria, except for YC14 (transgenic 'Yamabiko' line).

3. Transgenic chrysanthemum expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to *Botrytis cinerea*.

Transformation of spray-type chrysanthemum 'Yamabiko' was performed using *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 and MP90 harboring a rice chitinase gene (cDNA clone named: RCC2). Eleven transgenic lines expressing the RCC2 gene were obtained. These lines showed enhanced resistance to *B. cinerea*, although the levels of resistance varied among the transgenic lines. Three higher resistance lines, Y12, Y61 and Y97, showed very slight symptoms against *B. cinerea* infection and the symptoms did not spread even if the incubation period was extended. In these three lines, a higher production of RCC2 protein was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared with non-transgenic plants. These results suggest that the RCC2 gene can be a useful tool to improve the resistance to *B. cinerea* in chrysanthemum.

4. Use of chrysanthemum plantlets grown *in vitro* to test cultivar susceptibility to *Puccinia horiana*.

An efficient incubation system for *P. horiana* was established using plantlets of chrysanthemum growing *in vitro*. The inside conditions of a culture vessel (plant box) were maintained at a humidity of 90 % to 100 % and optimum temperature of 20 °C to 25 °C, for enhancing the germination of teliospores and basidiospores of the pathogen. Telia were maintained continuously on plants in the plant box, and the telia were used as an inoculum for infection experiments throughout the year allowing differences in susceptibility to white rust among chrysanthemum cultivars to be detected. Susceptibility to *P. horiana* evaluated in the plant box showed a good correlation ($r = 0.731$) with the rating of sporulation on plants grown in a greenhouse. The method described here (plant box method) is a simple, space saving inoculation system to evaluate the susceptibility of chrysanthemum plants to *P. horiana*.

5. Transgenic chrysanthemum plants expressing a rice chitinase gene showed enhanced resistance to *Puccinia horiana*.

Eleven transgenic lines expressing the RCC2 gene were used for the experiments. These are the same as the lines which showed enhanced resistance to *B. cinerea*. Susceptibility of inoculated plants against *P. horiana* was evaluated by plant box method. Telia formation was observed in all

transgenic lines, however, three lines (Y61, Y84 and Y97) showed the significantly lower disease incidence compared with non-transgenic plants. In these three lines, a higher production of RCC2 protein was detected by ELISA compared with non-transgenic plants. Although Y12 line showed enhanced resistance to *B. cinerea*, this line did not show resistance against *P. horiana*. In Y12 line, production of RCC2 protein was not detected in this experiment, and it might be caused by the developmental transgene inactivation.

These three lines (Y61, Y84 and Y97) showed enhanced resistance to *B. cinerea* as well. These results suggested that constitutive expression of chitinase in the transgenic chrysanthemum plants was responsible for the enhancement of combined resistance to *B. cinerea* and *P. horiana*.

Key words : *Botrytis cinerea*, chrysanthemum, chitinase, disease-resistance, *Puccinia horiana*, RCC2, transgene-inactivation, transgenic plant,

水稻新品種「ひたち錦」の育成

須賀立夫¹⁾・飯田幸彦・横田国夫・桐原俊明・西宮智美
高木嘉明¹⁾・塙 治雄²⁾・奥津喜章³⁾

ひたち錦は中・晩生の良質な酒造用品種の育成を目標として、1991年度に茨城県農業試験場において岐系89号を母、月の光を父として人工交配を行い、以来1992年7月まで同場で、それ以降は茨城県農業総合センター生物工学研究所において選抜と固定を進めてきた酒造用品種である。本品種は、出穂期・成熟期が関東地方の晩生の早にあたる。長稈だが、稈が太く強稈のため耐倒伏性は優れる。いもち病抵抗性は美山錦、山田錦より明らかに強く、強である。また、紋枯病の発生は両品種より少なく、縞葉枯病には両親と同様に抵抗性を有する。穂発芽性は難である。収量は美山錦、日本晴と同等で山田錦よりも明らかに多く、酒米としては多収である。玄米千粒重は25 gと大粒である。心白粒の発現率は両品種より高く、心白の大きさは小～中のものが多く、酒米としての玄米品質は美山錦、山田錦より明らかに優れ上・下である。醸造特性が良く、透明感が高くすっきりした美味しい日本酒ができる。

農業研究所の奨励品種決定調査においても上記の特性が認められ、本県産酒米の生産安定と日本酒の品質向上を図るために2001年度から奨励品種に採用された。

キーワード：スイトウ、ヒンシュ、シュゾウコウテキマイ、キョウカン、タイビョウセイ
ヒタチニシキ

I 緒 言

茨城県内には約60社の酒造会社があり、それぞれ特色ある日本酒を製造している。しかし、近年清酒の消費量が減少傾向にあるため、酒造業界から、茨城米で本県独自ブランドの日本酒を造り、本県産日本酒のイメージアップと販売の拡大を図りたいとの声が強くなっていた。

一方、茨城県における酒造好適米の生産量は、本県の酒米需要量の1割程度を満たすに過ぎない。これは、本県で栽培されている美山錦などの酒造好適米が、熟期や耐倒伏性など栽培性と品質に難点をもつことによる。このため、生産・実需の両サイドから、本県に適し、高品質で栽培しやすい酒造好適米品種の育成が強く要望されるようになった。

2000年に本県で育成したひたち錦は、出穂期・成熟期が関東地方の晩生の早にあたり、耐倒伏性が優れる、いもち病抵抗性が強い、紋枯病の発生が少ない、縞葉枯病の抵抗性をもつ、穂発芽性が難であるなど優れた栽培特性を有する。ま

た、収量は美山錦、日本晴と同等で山田錦よりも明らかに多く、酒米としては多収である。玄米千粒重は25 gと大粒で、心白粒の発現率が高く、酒米としての玄米品質が優れ、醸造特性が良く、透明感が高くすっきりした美味しい日本酒ができる。

以上のことからひたち錦は、本県産酒米の安定生産と日本酒の品質向上を図るために2001年度から奨励品種に採用された。

II 育種目標

栽培性の優れる、高品質な酒造好適米を育種の目的とした。

III 育成経過

ひたち錦の系譜を図1に、育成経過を図2に示す。

1991年に大粒で心白の発現がよい岐系89号を母、倒伏に強

1) 現 茨城県農業総合センター農業研究所
2) 元 茨城県農業試験場
3) 故人

1997年にF₆で生産力検定予備試験に供試し、収量・品質

栽培特性、醸造特性がともに優れることから、2000年6月「ひたち錦」の品種名で種苗法に基づく品種登録を出願し、2001年4月に茨城県の奨励品種として採用された。

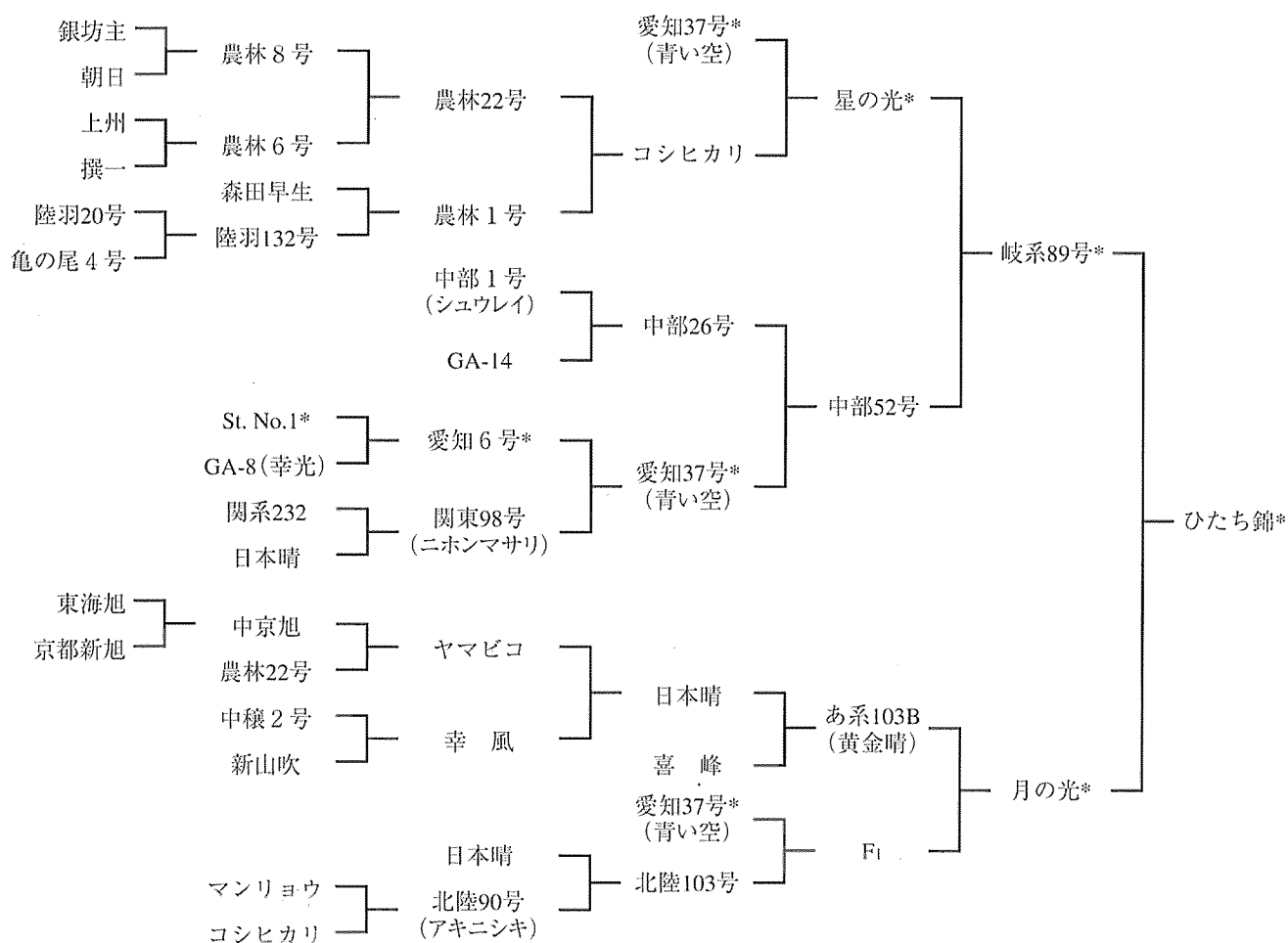


図1 ひたち錦の育成系譜

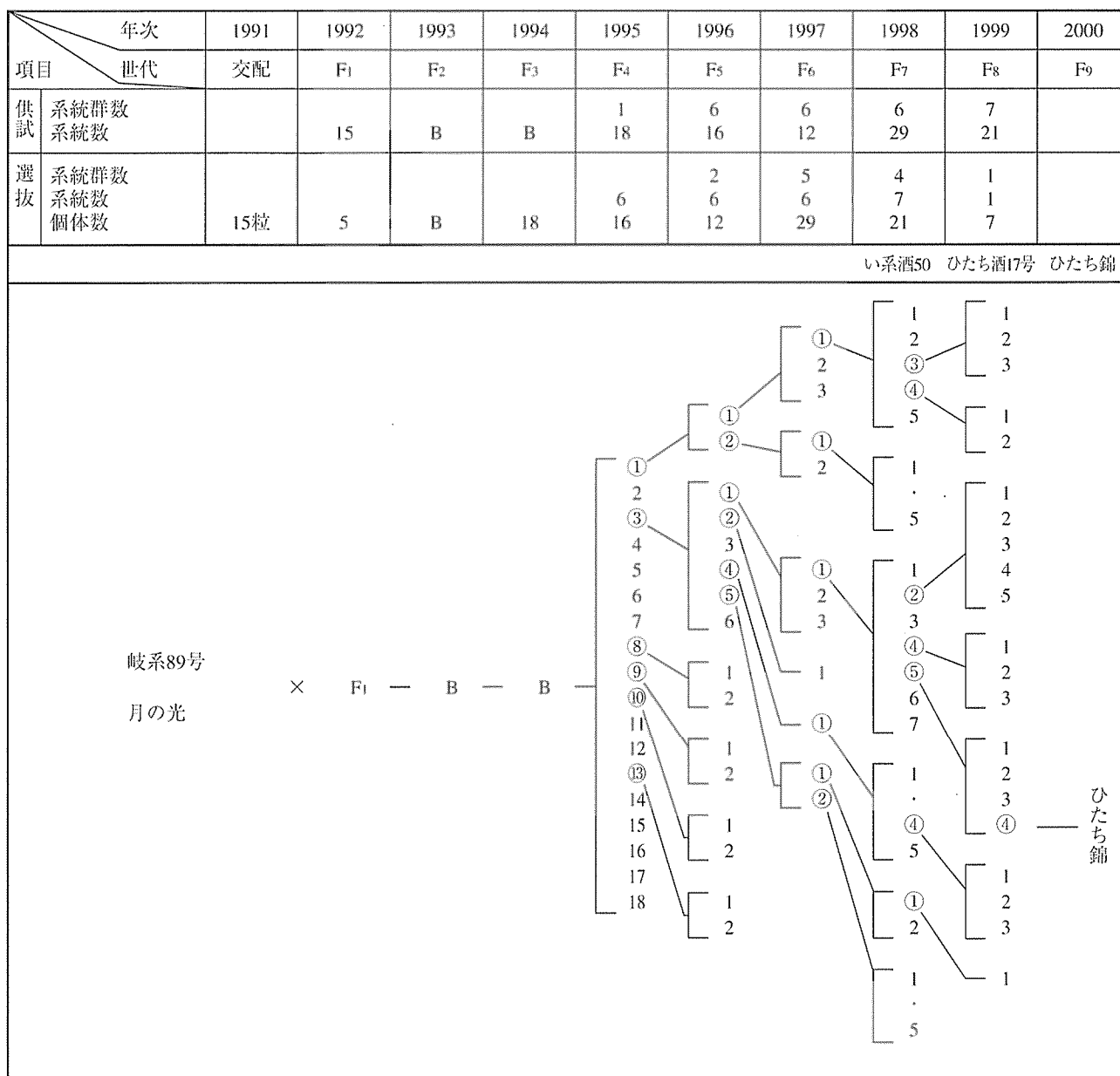


図2 ひたち錦の育成経過

IV 特性概要

1. 一般特性

(1) 形態的特性

ひたち錦の稈長はコシヒカリより2 cm程度短く、美山錦より5 cm、山田錦よりも30 cm短い。また、強稈のため耐倒伏性は強い。穂長はコシヒカリより長い長穂で、美山錦、山田錦よりも長い。穂数は美山錦より多く、コシヒカリ、山田錦より少ないやや少で、草型は偏穂重型である。成熟期の草状は立ち型である。短い芒が稀にあり、ふ先色は黄白、粒着は

やや粗である(表1、表2、図3、図4)。

(2) 生態的特性

出穂期・成熟期はコシヒカリよりそれぞれ5日・8日程度遅く、日本晴より4日程度早い茨城県の晩生の早である。また美山錦より14日、若水よりも2日出穂期・成熟期が遅く、山田錦よりも出穂期が12日、成熟期が15日早い。いもち病抵抗性はコシヒカリ、美山錦、山田錦より明らかに強く、葉いもち抵抗性・穂いもち抵抗性ともに強である。紋枯れ病の発

表1 特性調査成績

品 種 名	草型	稈		芒		ふ 先 色	粒着 密度	脱粒 難易	玄米	
		細太	剛柔	多少	長短				形状	大小
ひたち錦	偏穂重	やや太	やや剛	稀	短	黄白	やや粗	難	中	大
(対照)美山錦	偏穂重	やや太	中	無	—	黄白	中	難	中	大
(対照)若水	偏穂重	やや太	やや剛	やや少	やや短	黄白	やや密	難	中	大
(対照)山田錦	中間	中	中	無	—	黄白	中	やや易	中	大
(標準)コシヒカリ	中間	中	やや柔	稀	短	黄白	中	難	中	中
(比較)日本晴	偏穂数	中	中	少	短	黄白	中	難	中	中

表2 生育調査成績

品 種 名	年次	出穂期 (月日)	成熟期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	倒伏 程度	被 害		
								葉い もち	穂い もち	紋枯 病
ひたち錦	1997	8. 8	9.22	92	20.6	345	0.4	—	0.7	0.5
	1998	8. 8	9.17	77	20.7	311	1.0	0.7	0.0	1.7
	1999	8. 6	9.11	84	20.4	313	0.0	0.3	0.2	0.6
	平均	8. 7	9.17	84	20.6	323	0.5	0.5	0.3	0.9
(対照)美山錦		7.23	8.28	89	19.7	305	1.6	0.5	0.8	1.6
(対照)若水	1999	8. 4	9. 9	79	20.3	318	1.3	1.3	2.2	2.4
(対照)山田錦		8.18	9.26	114	18.9	335	3.2	1.8	2.3	1.3
(標準)コシヒカリ	1997	8. 3	9.12	89	19.1	360	2.0	—	2.0	1.7
	1998	8. 3	9.12	85	19.2	337	2.5	1.8	2.7	4.0
	1999	7.30	9. 2	85	20.2	347	1.6	1.7	2.2	1.7
	平均	8. 2	9. 9	86	19.5	348	2.0	1.8	2.3	2.5
(比較)日本晴	1997	8.13	9.25	81	20.8	345	0.5	—	1.0	0.3
	1998	8.11	9.23	75	20.1	335	0.8	0.3	0.5	2.5
	1999	8. 9	9.14	78	20.0	341	0.2	0.5	0.5	0.7
	平均	8.11	9.21	78	20.3	340	0.5	0.4	0.7	1.2

注) 倒伏程度・葉いもち・穂いもち・紋枯病は0：無～5：甚の6段階評価。

生が美山錦、山田錦より少なく、縞葉枯病抵抗性を有する。穂発芽性はコシヒカリ並の難で、山田錦よりも明らかに穂発芽しにくい。熟色が優れ、脱粒性は難である。(表1、表2)。

(3) 収量および玄米品質

収量は日本晴並であり、酒米としては多収である。玄米千粒重は若水、山田錦よりもやや小さいが、美山錦よりやや大きく、玄米の大きさは大で、形状は中である。玄米の粒厚は美山錦、若水、山田錦より明らかに厚い(表3、表4)。心白粒の発現率が高く、心白の大きさは小～中のものが多くてまとまりがよい。腹白・乳白が少なく、酒米としての玄米品質は3品種より明らかに優れ上の下に分類される(表6)。

2. 玄米特性および醸造特性

(1) 玄米形状

ひたち錦の粒厚2.0 mm以上の玄米重量は美山錦よりも3.7%、若水よりも4.9%、山田錦よりも9.3%多く、粒厚は3品種より厚い(表4)。ひたち錦の玄米の長さは山田錦と同程度である。幅は他品種より短い、長さ／幅比、長さ×幅はともに美山錦より大きく、粒大は大で、粒形は中である(表5)。

(3) 心白の大きさおよび発現率

ひたち錦の心白粒発現率は美山錦、山田錦より高い。心白の大きさは小～中が約半数を占め、非常にまとまりが良い。腹白の発生は他3品種より少ない(表6)。

(4) 酒造特性試験成績(茨城県工業技術センター発酵



図3 ひたち錦の稲株

左：ひたち錦

中：美山錦

右：山田錦



図4 ひたち錦の成熟期草穂状

表3 収量および品質調査成績

品 種 名	年次	玄米重 (Kg/a)	対標準 比 率 (%)	玄 米 千粒重 (g)	玄 米 品 質					評 価
					総合	心白	腹白	乳白	光沢	
ひたち錦	1997	(76.0)	91	25.7	4.0	—	—	—	—	◎
	1998	47.6	92	26.3	3.7	—	—	—	—	◎
	1999	57.7	92	25.5	3.2	5.0	0.7	0.7	1.8	◎
	平均	52.7	92	25.8	3.6	—	—	—	—	
(対照)美山錦	1999	58.1	93	24.9	5.7	4.2	3.8	1.7	4.0	
(対照)若水		55.6	89	26.6	5.0	5.0	1.8	0.5	3.5	
(対照)山田錦		54.5	87	26.1	5.0	4.0	3.0	0.7	3.3	
(標準)コシヒカリ	1997	(83.5)	(100)	22.6 *	5.0	—	—	—	—	
	1998	51.9	(100)	21.5 *	5.0	—	—	—	—	
	1999	62.6	(100)	22.3 *	5.0	1.2	0.7	1.5	3.0	
	平均	57.2	(100)	22.1 *	5.0	—	—	—	—	
(比較)日本晴	1997	(83.6)	100	22.0 *	5.3	—	—	—	—	
	1998	50.4	97	23.0 *	5.5	—	—	—	—	
	1999	56.0	89	22.5 *	4.7	0.7	1.2	0.8	2.7	
	平均	53.2	93	22.5 *	5.1	—	—	—	—	

注) 玄米重1997年()は初重、平均は1998～1999年の平均。
 玄米千粒重のひたち錦、美山錦、若水、山田錦は2.0mm、*印は1.8mmで篩った数値。
 玄米品質の総合は1：上上～9：下下の9段階評価。
 腹白・心白・乳白は0：無～5：甚の6段階評価。
 光沢は1：良～5：不良の5段階評価。

付表 耕種概要

年次	育苗様式	移植期 (月日)	栽植密度	窒素施肥量(Kg/a)	
				基肥	追肥
1997	中苗ミル式ポット育苗	5.15	33cm×16cm	0.7	0.3
1998	〃	5.15	〃	0.7	0.4
1999	〃	5.17	〃	0.7	0.3

表4 玄米の粒厚分布 (1999年)

品 種 名	篩目	粒 厚 分 布 (重量%)						累 計	
		2.2mm 以上	2.1mm 以上	2.0mm 以上	1.9mm 以上	1.8mm 以上	1.7mm 以上	2.1mm 以上計	2.0mm 以上計
ひたち錦		32.1	51.6	13.0	2.6	0.7	0.0	83.7	96.7
(対照)美山錦		25.7	44.5	22.8	5.2	1.6	0.2	70.2	93.0
(対照)若 水		30.0	42.3	19.5	6.1	2.0	0.1	72.3	91.8
(対照)山田錦		8.4	45.4	33.6	9.8	2.6	0.2	53.8	87.4

注) 生産力検定試験の材料。玄米200gを5分間、縦目段篩、3反復の成績。

表5 玄米の形状 (1999年)

品 種 名	長さ (mm)	幅 (mm)	厚さ (mm)	長さ／幅	長さ×幅
ひたち錦	5.36	3.03	2.20	1.77	16.24
(対照)美山錦	5.21	3.10	2.17	1.68	16.15
(対照)若 水	5.27	3.27	2.21	1.61	17.23
(対照)山田錦	5.33	3.20	2.17	1.67	17.06

注) 粒厚2.0mm以上の玄米を1区50粒で3区調査。

表6 心白の大きさおよび発現率 (1999年)

品 種 名	心白粒 発現率 (%)	心白の大きさ(%)				心白率 (%)	腹白 (%)
		無	小	中	大		
ひたち錦	88.0	12.0	48.3	30.7	9.0	52.9	14.0
(対照)美山錦	80.0	20.0	21.7	26.8	31.5	61.6	71.3
(対照)若 水	97.2	2.8	2.7	8.8	85.7	93.8	30.8
(対照)山田錦	66.3	33.7	26.2	22.7	17.5	46.1	42.8

注) 玄米200粒調査。

心白率(%)=(5大+4中+3小)／5n×100

式の大・中・小にはそれぞれの粒数、nは調査粒数を代入して算出する。

食品部)

酒造用米としての特性は、70%精米時の精米歩合・無効精米歩合が山田錦と同程度で、砕米率はわずかであるが少ない。精米の吸水性は山田錦と同等であり、蒸米吸水率はやや高い。消化性はBrix、F-N値とも山田錦並である。粗タンパ

ク質含量も山田錦並で、美山錦、若水よりも低い。カリウム含量は山田錦より多く、美山錦、若水より少ない(表7)。

酒造会社における試験醸造では、見た目が透明で、味がすっきりしていて少し甘みのある非常に良い日本酒ができた。

表7 酒造特性試験成績(1999年、茨城県工業技術センター発酵食品部)

品 種 名	玄 米 千粒重 (g)	玄米 水分 (%)	精米歩合			砕米率 (%)	白米水分 (%)
			見かけ (%)	真 (%)	無効 (%)		
ひたち錦	25.4	13.8	69	72	3	1.8	13.8
(対照)美山錦	25.5	13.8	69	73	4	1.6	13.6
(対照)若 水	26.3	13.8	71	73	2	2.7	13.8
(対照)山田錦	25.5	13.8	69	72	3	2.2	13.7

品 種 名	吸水性		蒸米 吸水率 (%)	消化性		粗タンパク質 (%/Dry)	カリウム (ppm/Dry)
	20分 (%)	120分 (%)		Brix	F-N		
ひたち錦	29.0	37.7	35.0	8.6	0.8	5.03	370
(対照)美山錦	26.3	32.4	31.5	8.9	0.9	5.57	441
(対照)若 水	27.3	35.5	31.8	10.2	1.0	5.49	505
(対照)山田錦	28.6	37.7	33.7	8.4	0.8	5.06	248

注) 1. 吸水性 : 20分間と120分間浸せきした時の吸水率。
蒸米吸水率: 一定の条件下で浸せきさせた米が蒸し上がった時の吸水率。
Brix : 蒸米がもろみの中でどれだけ糖分を排出しやすいか、あるいはデンプンの分解を受けやすいかを示す。
F-N(フォルモール窒素): もろみ中で原料米から出るアミノ酸、その他雑味成分に関与。
2. 酒造好適米は吸水性が大きく、F-N値、粗タンパク質含有率が低いものが良いとされる。

3. 特性検定試験

(1) いもち病抵抗性

ひたち錦の葉いもち抵抗性はコシヒカリ、日本晴より明らかに強い、強である(表8)。穂いもち抵抗性はコシヒカリより明らかに強く、日本晴より強い強である(表9)。いもち病抵抗性判別3菌系接種によるひたち錦のいもち病真性抵抗性遺伝子型はPiaと推定される(表10)。

表8 葉いもち抵抗性試験成績

品 種 名	推 定 遺伝子型	試 験 年 次				評価
		1997	1998	1999	平均	
ひたち錦	Pia	5.5	6.5	5.5	5.8	強
(比較)コシヒカリ	+	7.6	8.0	7.5	7.7	弱
(比較)日本晴	+	6.3	6.4	6.0	6.2	やや強
(指標)黄金錦	+	4.1	5.2	5.4	4.9	強
(指標)ヤマビコ	Pia	5.0	5.5	5.9	5.5	強
(指標)トドロキワセ	Pii	6.4	6.9	7.3	6.9	やや弱
(指標)タツミモチ	Pik	2.4	3.8	4.5	3.6	強

注) 畑晩播多窒素法、自然発病による。
数値は発病程度 0:無発病~10:全茎葉枯死の11段階評価。

表9 穂いもち抵抗性試験成績

品 種 名	推 定 遺伝子型	試 験 年 次			評価
		1998	1999	平均	
ひたち錦	Pia	0.5	0.1	0.3	強
(比較)コシヒカリ	+	5.2	4.1	4.7	弱
(比較)日本晴	+	1.0	1.0	1.0	強
(指標)黄金錦	+	0.7	0.5	0.6	強
(指標)ヤマビコ	Pia	0.8	0.5	0.7	強
(指標)トドロキワセ	Pii	1.9	3.3	2.6	中
(指標)タツミモチ	Pik	3.5	1.3	2.4	やや弱

注) 水田圃場での検定。寒冷紗による遮光、多窒素施肥による自然発病。
数値は発病程度 0:無発病~10:全穂罹病の11段階評価。

表10 判別用3菌系接種の反応型による
いもち病抵抗性遺伝子型の推定

品 種 名	反 応 型			推 定 遺伝子型
	稲86-137 (007)	TH68-126 (033)	TH68-140 (035)	
ひたち錦	M S	S	R	Pia
農林29号	S	S	S	+
愛知旭	S	S	R	Pia
トドロキワセ	S	R	S	Pii
クサブエ	R ^h	S	S	Pik

注) 判別用3菌系の注射接種(2万個/ml)による。
R:抵抗性反応、S:罹病性反応、M:中間反応。

(2) 穂発芽性

ひたち錦の穂発芽性は山田錦より明らかに小さく、コシヒカリに近い難である(表11)。

(3) 縞葉枯病抵抗性(農林水産省中国農業試験場稲育種研究室)

ひたち錦は縞葉枯病抵抗性を有する(表12)。

表11 穂発芽性検定試験成績

品 種 名	試 験 年 次			評 価
	1998	1999	平均	
ひたち錦	16	17	13	難
(対照)美山錦	—	6	—	極難～難
(対照)若水	—	4	—	極難
(対照)山田錦	—	50	—	中～やや易
(標準)コシヒカリ	37	5	18	難
(比較)日本晴	33	31	26	やや難

注) 出穂60日後に採穂して、3～5℃に28日間保存後発芽試験に供試。
水温27～29℃で24時間吸水させた後、水をきり、
気温27～29℃相対湿度100%の恒温恒湿槽内に置き、
約96時間後に調査。
数値は穂発芽率(%)。

表12 縞葉枯病抵抗性検定試験成績
(1999年、農林水産省中国農業試験場稲育種研究室)

品 種 名	発病 指数	杜稲 対比	判 定
ひたち錦	1.3	1.9	R
(比較)農林8号	89.3	126.4	S
(比較)St-No.1	9.3	13.2	R
(比較)杜稲	70.7	100.0	S

注) 幼苗(約1.5葉)30個体当たりヒメトビウンカ保毒虫7～8頭/個体を2日間放育して接種し、20～25日後に調査。
判定は発病指数比(杜稲を100)によって判定。
R : 発病指数 0～29
M : “ 30～59
S : “ 60以上

V 奨励品種決定調査結果および採用の理由

農業研究所の奨励品種決定調査(表13)および現地調査(表14)の結果から、ひたち錦は茨城県内での栽培に適応した品種といえる。

本県の酒造好適米の認定品種である美山錦は、熟期や耐倒伏性など栽培性に欠点がある。ひたち錦は美山錦より出穂期・成熟期が14日遅い晩生である。耐倒伏性に優れる。いもち病に強く、穂発芽性が難である。大粒で心白の発現率が高い。美山錦よりも玄米の品質が優れタンパク質含量が少ない。

試験醸造では、透明で味がすっきりしていて少し甘みのあ

る非常に良い日本酒ができる。

以上のことから、本品種の奨励品種採用により、本県における酒造好適米の生産拡大と質的な向上を図る。

表13 茨城県農業総合センター農業研究所 作物研究室（水戸市）における試験成績

	品 種 名	試験 年次	出穂期 (月日)	成熟期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	玄米重 (Kg/a)	対標準 比 率 (%)	玄 米 千粒重 (g)	一穂 粒数	登熟 歩合 (%)	玄米 品質	白米 粗タンパク 含有率(%)	倒伏 程度	病害の程度		
																葉いもち	穂いもち	紋枯病
標 肥	ひたち錦	1998	8. 8	9.16	85	20.6	345	60.5	105	25.4	—	—	4.0	6.8	0.0	2.0	1.0	2.0
		1999	8. 3	9. 7	81	21.1	349	59.1	99	26.1	74	93	4.0	6.4	0.0	1.5	1.0	2.0
		2000	8. 2	9.14	84	20.8	349	73.8	108	25.4	85	90	4.3	5.7	0.0	0.7	0.5	2.5
		平均	8. 4	9.12	83	20.8	348	64.5	104	25.6	79	92	4.1	6.3	0.0	1.4	0.8	2.2
	(標準) 美山錦	1998	7.24	9. 1	89	18.5	327	57.8	(100)	24.9	—	—	5.3	7.3	0.0	2.0	3.0	2.0
		1999	7.22	8.30	87	19.1	334	59.6	(100)	23.7	82	90	5.5	7.4	1.0	1.0	1.0	3.0
		2000	7.18	8.26	92	19.9	345	68.5	(100)	23.9	92	69	5.3	6.6	0.5	1.3	1.8	2.8
		平均	7.21	8.29	89	19.2	335	62.0	(100)	24.2	87	80	5.4	7.1	0.5	1.4	1.9	2.6
	(参考) 若水	1999	8. 3	9. 7	77	20.0	342	55.6	93	27.1	73	90	6.0	7.5	0.0	1.5	1.5	2.0
		2000	8. 2	9.13	77	20.6	371	68.8	100	26.1	76	86	5.8	6.5	0.0	1.2	1.5	3.0
		平均	8. 2	9.10	77	20.3	357	62.2	97	26.6	75	88	5.9	7.0	0.0	1.3	1.5	2.5
多 肥	ひたち錦	1999	8. 5	9. 9	88	20.8	396	62.6	94	24.9	79	92	4.5	—	0.0	1.0	1.0	1.5
		2000	8. 1	9.14	83	21.2	342	75.2	120	25.3	75	93	4.5	5.7	0.0	1.3	1.0	2.5
		平均	8. 3	9.11	86	21.0	369	68.9	106	25.1	77	92	4.5	5.7	0.0	1.2	1.0	2.0
	(標準) 美山錦	1999	7.22	8.31	92	19.0	371	66.6	(100)	22.9	89	88	5.8	—	1.0	1.0	1.0	2.5
		2000	7.19	8.27	97	19.7	380	62.8	(100)	22.6	100	47	5.8	7.1	0.3	1.0	2.5	2.0
		平均	7.20	8.29	94	19.3	376	64.7	(100)	22.8	95	68	5.8	7.1	0.7	1.0	1.8	2.3
	(参考) 若水	1999	8. 5	9. 8	83	19.8	402	57.1	86	25.9	70	86	6.0	—	0.0	1.0	2.0	2.0
		2000	8. 2	9.14	81	20.6	404	67.0	107	25.1	77	69	5.8	6.6	0.0	2.0	2.0	2.5
		平均	8. 3	9.11	82	20.2	403	62.1	96	25.5	74	78	5.9	6.6	0.0	1.5	2.0	2.3

注) 玄米品質は1:上上～9:下下の9段階評価。倒伏病害の程度は0:無～5:甚の6段階評価

表14 奨励品種決定調査 現地調査

	品 種 名	試験 年次	出穂期 (月日)	成熟期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	玄米重 (Kg/a)	対標準 比 率 (%)	玄 米 千粒重 (g)	一穂 粒数	登熟 歩合 (%)	玄米 品質	白米 粗タンパク 含有率(%)	倒伏 程度	病害の程度		
																葉いもち	穂いもち	紋枯病
緒川村	ひたち錦	1999	—	—	95	19.4	410	53.3	81	24.4	—	—	5.0	—	—	—	—	—
		2000	—	—	89	18.8	349	66.8	99	24.1	78	92	4.8	6.4	0.0	—	0.0	1.5
		平均	—	—	92	19.1	379	60.0	90	24.2	78	92	4.9	6.4	0.0	—	0.0	1.5
	(標準) 美山錦	1999	—	—	96	20.0	332	65.6	(100)	23.3	—	—	5.5	—	—	—	—	—
		2000	—	—	97	20.5	302	67.2	(100)	23.1	112	82	5.0	6.8	2.8	—	1.5	2.0
		平均	—	—	97	20.3	317	66.4	(100)	23.2	112	82	5.3	6.8	2.8	—	1.5	2.0
茨城町	ひたち錦	1999	8.11	9.13	83	16.7	579	56.4	107	21.6	—	—	6.5	—	—	—	—	—
		2000	8.10	9.13	100	20.2	496	63.4	105	22.5	79	73	5.5	6.8	0.0	—	0.0	1.0
		平均	8.10	9.13	91	18.5	538	59.9	106	22.1	79	73	6.0	6.8	0.0	—	0.0	1.0
	(標準) 美山錦	1999	7.25	8.26	93	18.5	523	52.8	(100)	21.3	—	—	6.0	—	—	—	—	—
		2000	7.21	8.23	104	19.4	503	60.1	(100)	21.1	82	61	6.0	7.9	3.8	—	0.8	2.0
		平均	7.23	8.24	99	19.0	513	56.5	(100)	21.2	82	61	6.0	7.9	3.8	—	0.8	2.0
常陸 太田市	ひたち錦	2000	—	—	90	19.7	453	85.3	131	25.3	74	91	5.0	6.2	0.0	—	1.0	1.0
	(標準)美山錦	—	—	—	94	18.8	380	65.2	(100)	23.3	78	78	5.0	7.0	0.0	—	1.0	1.0

注) 玄米品質は1:上上～9:下下の9段階評価。倒伏病害の程度は0:無～5:甚の6段階評価

表13、表14—付表 耕種概要

場 所 土壌条件	年次	移植日	苗質	移植法	栽植密度 (株/m ²)	施肥 条件	施 肥 量(kg/a)			反復	備 考
							N	P ₂ O ₅	K ₂ O		
農業研究所作物研究室 表層腐食質多湿黒ボク土	1998	5月6日	稚苗	機械植	22.2	標肥	0.6+0.3	0.6	0.6+0.3	2	県育成系統適応性検定試験
	1999	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	3	本調査
	2000	5月8日	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
	1999	5月6日	稚苗	機械植	22.2	多肥	0.9+0.3	0.9	0.9+0.3	2	本調査
緒川村 細粒灰色低地土灰色系	1999	5月18日	稚苗	手植え	22.2	標肥	0.5+0.2	0.7	0.5+0.2	2	現地調査
	2000	5月19日	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
茨城町 表層腐食質多湿黒ボク土	1999	5月初旬	稚苗	手植え	22.2	標肥	0.6+0.2	0.6	0.6+0.2	2	現地調査
	2000	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
常陸太田市 細粒灰色低地土灰色系	2000	5月9日	稚苗	手植え	22.2	標肥	0.6+0.2	0.6	0.6+0.2	2	現地調査

VI 命名の由来

茨城県初の酒造好適米であることから、ひたち錦と命名された。

VII 育成従事者

ひたち錦の育成に従事した研究員と従事期間は図5のとおりである。

氏 名	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	備 考
	交配	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	
須賀 立夫	○									現農業研究所 現在員 現在員（1996まで兼務） 現在員 現在員（兼務） 現農業研究所 元農業試験場 元農業研究所
飯田 幸彦				○						
横田 国夫		○								
桐原 俊明			○							
西宮 智美		○								
高木 嘉明	○	○								
埜 治雄	○	○								
奥津 喜章		○								

1992年7月14日まで：茨城県農業試験場 育種部

1992年7月15日以降：茨城県農業総合センター 生物工学研究所 普通作育種研究室

図5 育成従事者

VIII 栽培上の留意点

酒造りでは、原料の米のタンパク質含量が高いと、出来上がった日本酒に雑味が生じ味を低下させる。そのため、玄米のタンパク質含量を高める多肥栽培を避け、高品質な酒米を生産するよう心がける。

また、熟期がコシヒカリより遅いため、品質を低下させないように成熟期まで十分な用水を確保する必要がある。

IX 謝 辞

本品種の育成については系統適応性検定試験、奨励品種決定調査、現地試験等で農業研究所、現地担当農家など稲作関係者から、酒造適性分析および試験醸造では工業技術センター発酵食品部と酒造組合・酒造会社から多大の御協力と御支援を受けた。奨励品種採用および品種登録に当たっては、茨城県農林水産部農政企画課技術普及室、農産課および園芸流通課、関係各位にご尽力を頂いた。育成試験の遂行に当たっては歴代の農業試験場長・同育種部長および生物工学研究所長・農業研究所長(1992年以降)のご支援を頂いた。また、圃場管理や調査等では笹島正光、宮崎輝男、須能健一の各氏をはじめ農業試験場管理部および農業研究所庶務部(1992年以降)職員の労を多とした。ここに記して、これら関係者各位に謝意を表する次第である。

Breeding of a New Rice Cultivar for Sake-Brewing ‘Hitachinishiki’

Ritsuo Suga¹⁾, Yukihiro Iida, Kunio Yokota, Toshiaki Kiriwara, Satomi Nishimiya,

Yoshiaki Takagi¹⁾, Haruo Hanawa²⁾ and Yoshiaki Okutsu³⁾

Plant Biotechnology Institute,

Ibaraki Agricultural Center, Kamikunii 3402, Mito, Ibaraki 311-4203, Japan

1)Agricultural Research Institute, Ibaraki Agricultural Center, Kamikunii 3402, Mito, Ibaraki 311-4203, Japan

2)Yata 883-2, Mito, Ibaraki 310-0825, Japan

3)Deceased

Summary

For sake-brewing, a new non-glutinous rice cultivar ‘Hitachinishiki’ was developed at the Plant Biotechnology Institute in 1999.

‘Hitachinishiki’ was selected from the progeny of a cross between ‘Gikei 89’ and ‘Tsukinohikari’ in 1991 by a mass pedigree method. A promising line was selected, and originally named ‘Ikei-sake 50’ in the F₇ generation and then ‘Hitachi-sake 17’ in the F₈ generation which was subjected to yield and adaptability trials at the Agricultural Research Institute. ‘Hitachi-sake 17’ was finally named ‘Hitachinishiki’ in 2000 and has been applied for the national plant registration. ‘Hitachinishiki’ was adopted as a recommended variety in Ibaraki prefectural area.

It is characterized by superior grain quality, strong culm, high yield, and rice blast and rice stripe virus resistance. The kernel size is large, and the thousand kernel weight is over 25g. The white-core kernel occurred at a high rate. The ‘sake’ brewed by ‘Hitachinishiki’ has a good taste.

Key words : rice, new variety, Sake-brewing, strong culm, disease resistance, Hitachinishiki

サツマイモ品種「ベニアズマ」のウイルスフリー系統「B-27」

横田国夫、飯田幸彦、桐原俊明、檜村英一¹⁾、須賀立夫²⁾

サツマイモ品種「ベニアズマ」のウイルスフリー系統「B-27」は、1991年に茨城県農業試験場育種部（1992年7月から生物工学研究所普通作育種研究室）において、「ベニアズマ」の茎頂培養により得られた30個体の中から選抜した変異系統より育成した青果用の普通掘り系統である。1999年から一般栽培され、2000年は本県サツマイモ面積の約39%を占めた。本系統は原品種の「ベニアズマ」に比べて1株当たりのイモ数が多いこと、挿苗から掘り取りまでの期間が長くなっても極端な大イモにならないこと、イモの形状が短く揃いが良いことが大きな特徴である。その他の特性は原品種「ベニアズマ」と同等である。

キーワード：カンショ、サツマイモ、ベニアズマ、ウイルスフリー、ケイチョウバイヨウ、B-27

I. 緒 言

本県のサツマイモ作付け面積は7,560ha（2000年）であり、うち青果用サツマイモが約80%を占め、そのほとんどに「ベニアズマ」が栽培されている。青果用サツマイモにおいてはイモの形状や皮色の良否が価格に大きく影響するが、近年、サツマイモの成長点近傍を切り出して培養（茎頂培養）することによって、サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統により塊根表面に発生する帯状粗皮症が改善されること（新海ら1980、宇杉ら1990、長田1990）、イモの外観品質（イモ皮色および肌の滑らかさ）が良くなり収量が増加することが明らかにされた（泉沢・石原1996）。このため、茨城県では1986年から茎頂培養によるサツマイモのウイルスフリー化技術の開発にとりくみ、「ベニアズマ」については、1989年にウイルスフリー化していないイモに比べてイモの肥大性と皮色が良いウイルスフリー系統「88-116」を育成し普及に移した。本系統は、茨城県経済連園芸種苗増殖センターを通じてサツマイモ農家に配付され、おおむね良い評価を受けていたが、1991年ごろから挿苗から掘り取りまでの期間（以下在圃期間）が長いと長イモ、曲がりイモおよび大イモが発生しやすいことが指摘されるようになった。

そこで「88-116」とは別のウイルスフリー系統である「88-124」をもとに茎頂培養を行い、1株当たりのイモ数が多く、

在圃期間が長くなってもイモの形状が短く揃いが良いウイルスフリー系統「B-27」を育成した。本系統は1999年から農家による一般栽培が開始され、2000年には本県サツマイモ面積の約39%にまで栽培が拡大した。ここでは「ベニアズマ」のウイルスフリー系統である「B-27」の育成経過と特性について報告する。

II. 育種目標

ウイルスフリー系統「88-116」は、在圃期間が長いと長イモ、曲がりイモや大イモなど形状が劣るイモの発生が顕著になるため、「ベニアズマ」を基にイモの皮色および形状・揃いが良く、良食味のウイルスフリー系統を育成しようとした。

サツマイモでは従来から種イモを経由することで遺伝的な変異が生じやすいとされてきたが、Villordon and Labonte（1995）は、アメリカ8州で栽培されているサツマイモ品種「Jewel」について調べ、種イモを通して増殖した結果その全てに遺伝的な変異が生じていることを明らかにした。そこで、この現象を利用して種イモによる優良株選抜を繰り返すことによって遺伝的な変異を拡大した「ベニアズマ」のウイルスフリー系統である「88-124」を茎頂培養し、その中から目的形質を備えた系統を選抜しようとした。

1) 茨城県農業総合センター農業研究所

Ⅲ. 育成経過ならびにその概要

「B-27」の育成経過を図1に示す。以下年次をおってその概略を説明する。

1991年に、茨城県農業試験場内畑圃場で種イモ採苗により3年間栽培した「ベニアズマ」のウイルスフリー系統「88-124」から、イモの形状・揃い等の外観品質および1株当たりのイモの重量など生産力の優れる14株を選抜した。種イモから萌芽した71莖頂を切り出し、定法に従って培養し、切り出した莖頂毎に系統(B-1からB-71)とした。

1992年に、莖頂培養した71個体から再生した個体のうち、30系統を試験管内の草勢等で選び、節培養により試験管内で無菌的に増殖を行った。それぞれを順化後 *Ipomoea setosa* を台木とする接ぎ木によるウイルス検定を行い、ウイルスフリー12系統を得た。以降、ウイルスフリーを確認した12系統は節培養により試験管内で無菌的に継代を行い以降の試験に供試した。

1993年に、ウイルスフリーを確認した12系統を順化後、畑圃場で1系統当たり4株栽培し挿苗156日後に掘り取ったところ、表1に示すように、系統間にイモの大きさ、形状、揃いなどの差異が見られたので、この中からイモの大きさ、形状、揃いなど主に外観品質が優れた4系統を選抜した。

1994年に、前年選抜した4系統を順化後、畑圃場で1系統当たり12株栽培し挿苗148日後に掘り取り、イモの大きさ、形状、揃いなどの外観品質と収量性が優れた1系統(「B-27」)を選抜した。「B-27」は、1995年から農業研究所内畑圃場で収量試験に、1997年からは茨城県ひたちなか市、大洗町、旭村、麻生町、牛久市の現地畑圃場で収量試験に供試した。各試験の耕種概要を付表1、2に示した。この結果「B-27」は、「88-124」や「88-116」と比べて、イモの形状・揃いが良いことを確認したので、1998年に茨城県経済連園芸種苗増殖センターに対し無菌苗を供給し、1999年から一般栽培が開始された。

年次	平成3年 1991	4 92	5 93	6 94	7 95	8 96	9 97	10 98	11 99
育成経過	母本選抜 莖頂培養	ウイルス検定	系統選抜	系統選抜	←	生産力検定試験 ←現地適応性試験→	→	一栽培開始	
供試系統数 選抜系統数	71 30	30 12	12 4	4 1	1	1	1	1	1
選抜系統	B-1 B-23 — B-23 — B-23 B-24 — B-24 B-27 — B-27 — B-27 — B-27 — B-27 — B-27 — B-27 — B-27 — B-27 B-31 — B-31 — B-31 — B-31 B-36 — B-36 B-37 — B-37 — B-37 B-39 — B-39 — B-39 B-40 — B-40 — B-40 B-41 — B-41 B-42 — B-42 B-43 — B-43 B-44 — B-44 B-46 — B-46 — B-46 — B-46 B-50 — B-50 — B-50 B-51 — B-51 B-52 — B-52 B-53 — B-53 B-54 — B-54 — B-54 B-55 — B-55 — B-55 B-57 — B-57 B-59 — B-59 — B-59 B-60 — B-60 — B-60 — B-60 B-62 — B-62 B-63 — B-63 B-64 — B-64 B-65 — B-65 B-68 — B-68 B-69 — B-69 B-70 — B-70 B-71 — B-71								
	88-124								

図1 ベニアズマウイルスフリー系統「B-27」の育成経過

表1 ベニアズマウイルスフリー12系統のイモの重量・形状(1993年)

系統名	上イモ 重 (g/4株)	上イモ 1個重 (g)	1株上 イモ個数	イモ形状
B-23	1788	298	1.5	紡錘
B-27	2482	276	2.3	長紡錘・紡錘・円筒
B-31	2128	304	1.8	長紡錘
B-37	1504	301	1.3	長紡錘・紡錘
B-39	1755	219	2.0	長紡錘・紡錘
B-40	1456	243	1.5	紡錘
B-46	2396	240	2.5	長紡錘・紡錘
B-50	2241	249	2.3	長紡錘
B-54	1925	214	2.3	長紡錘・紡錘・円筒
B-55	2154	239	2.3	長紡錘・紡錘・円筒
B-59	2223	202	2.8	長紡錘・紡錘・円筒
B-60	2306	256	2.3	長紡錘
平均	2030	253	2.1	
分散	106046	1102	0.19	
標準偏差	340	35	0.46	
88-124	2132	211	2.5	長紡錘
88-116	2444	218	2.8	長紡錘

注) 上イモは50g以上のイモ。以下同様。

IV. 特性概要

1. 収量およびイモの形状

表2に示すように、イモの形状は、非ウイルスフリーベニアズマ（以下非フリー）に比べて長径比は小さく短い。また、曲

表2 ベニアズマウイルスフリー系統「B-27」のイモの形状（2001年）

系統名	M・2L品の 長径比 (長さ/幅)	形状不良イモの割合			
		条溝 (%)	曲がり (%)	くびれ (%)	尻こけ (%)
B-27	3.2	0.6	3.8	3.9	0.0
(比較)ベニアズマ非フリー	5.0	4.0	24.7	25.1	1.9
(標準)88-116	3.1	0.6	6.2	8.9	8.4

注) 規格のMは200～350g、Lは350～500g、2Lは500～700gのイモ

表3 ベニアズマウイルスフリー系統「B-27」の収量（普通掘り）

系統名	試験年	上イモ重 (Kg/a)	上イモ重 対標比 (%)	上イモ 1個重 (g)	M・L イモ重 (Kg/a)	1株上イモ 個数
B-27	1996	346	102	216	186	4.0
	1997	302	94	217	198	3.5
	1998	266	99	192	141	3.5
	平均	305	98	208	175	3.7
(標準)88-116	1996	339	100	253	113	3.4
	1997	322	100	273	174	2.9
	1998	269	100	253	151	2.7
	平均	310	100	260	146	3.0
(比較)ベニアズマ非フリー	1996	269	79	246	144	2.7
	1997	288	90	280	177	2.6
	1998	264	98	243	139	2.7
	平均	274	88	256	153	2.7

注) 1996年：規格のMは200～300g、Lは300～450g
1997、1998年：Mは200～350g、Lは300～500g

がり、くびれ、尻こけの形状不良イモが明らかに少なく、短紡錘形で揃いが良い。「88-116」と比べても曲がり、くびれ、尻こけが少なく、イモの形状は揃いがよい。イモの皮色は、非フリーや「88-116」および「88-124」に比べ紫色がやや強い（図2、3）。

表3に示すように、普通掘りでの上イモ収量は、非フリーより明らかに多く「88-116」と同程度で、1個当たりのイモ重は小さく、1株当たりのイモ数が多い。図3、4に示すように、規格別の上いもの収量は2L・3Lクラスの大イモの割合は少なく、商品性の高いM・Lクラスのイモの割合が多い。表4に示すように、早掘りでの収量は「88-116」に比べて少なく、1株上イモ個数は同程度で1個当たりのイモ重が小さい。

現地圃場での栽培では、「88-116」に比べ、上イモ1個重がやや小さく収量性が劣ったが、イモの形状・揃い・A品率が優れ、ほとんどの地域で総合的にはおおむね良好との評価であった（表5）。

表4 ベニアズマウイルスフリー系統「B-27」の収量（1997年、早掘り）

系統名	上イモ重 (Kg/a)	上イモ重 対標比 (%)	上イモ 1個重 (g)	M・L イモ重 (Kg/a)	1株上イモ 個数
B-27	100	86	115	36	2.2
(標準)88-116	116	100	134	55	2.2

注) 規格のMは150～250g、Lは250～350gのイモ

表5 ベニアズマウイルスフリー系統「B-27」の現地における収量

系統名	試験場	試験年	上イモ重 (Kg/a)	上イモ重 対標比 (%)	上イモ 1個重 (g)	1株上 イモ個数 (%)	M・L率 (個)	A品率 (%)	挿苗後 日数 (日)
B-27	ひたちなか市	1998	220	113	239	2.8	-	43	131
			195	100	279	2.3	-	30	
B-27	大洗町	1997	281	109	215	3.4	48	59	129
		1998	242	126	223	3.0	51	53	143
88-116		1997	257	100	202	3.2	77	46	129
		1998	192	100	213	2.5	44	57	143
B-27	旭村	1997	305	90	272	3.0	57	58	135
		1998	253	87	209	3.0	44	54	
88-116		1997	340	100	257	3.5	38	38	135
		1998	290	100	238	3.0	48	30	
B-27	麻生町	1997	327	85	287	3.8	-	82	130
		1998	212	94	201	2.9	48	67	138
88-116		1997	384	100	297	4.3	-	95	130
		1998	225	100	228	2.7	47	53	138
B-27	牛久市	1998	349	100	271	3.4	52	73	150
			348	100	400	2.3	41	39	

注) 1998年の大洗町は3圃場平均値、麻生町は4圃場平均値
上イモは50g以上のイモ
規格のMは200～350g、Lは350～500gのイモ

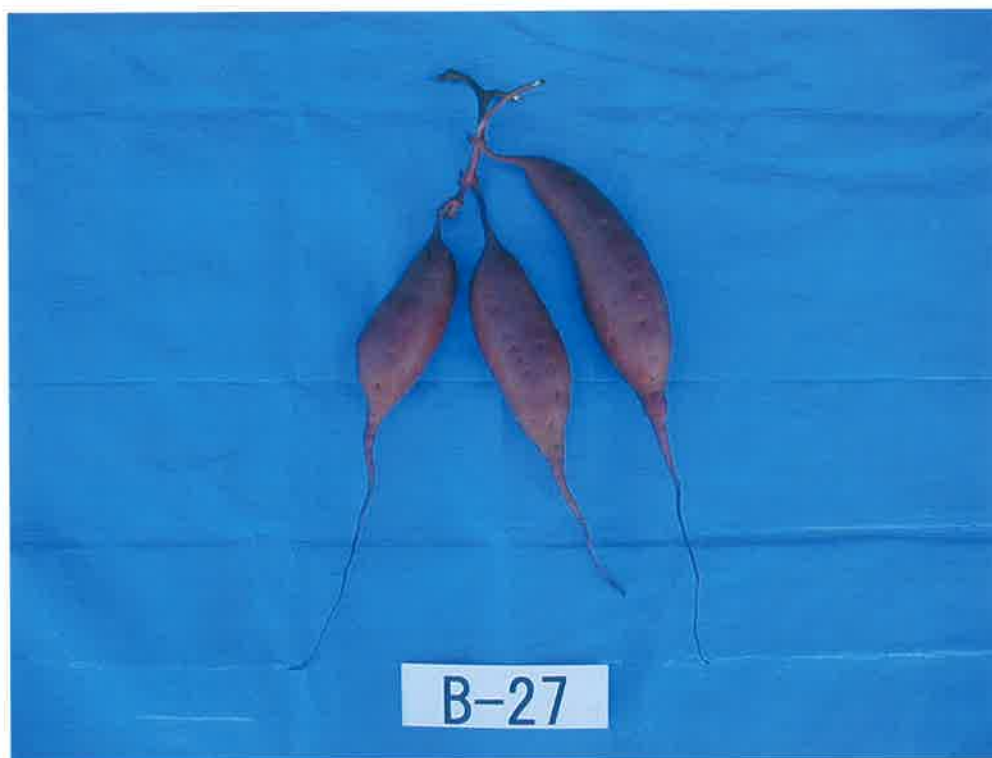


図2 ペニアズマウイルスフリー系統「B-27」の地下部



図3 ペニアズマウイルスフリー系統「B-27」と「88-116」の比較

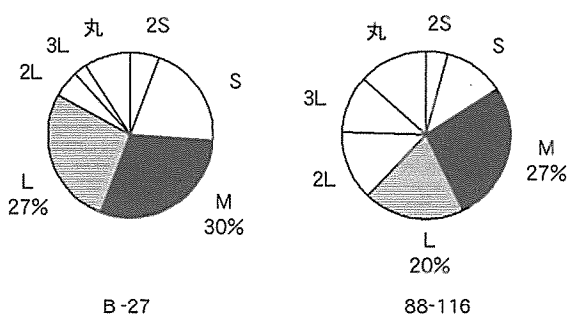


図4 ペニアズマウイルスフリー系統「B-27」の規格別収量構成比（1996～1998年平均値）

注) 1996年：規格の2Sは50～100g、Sは100～200g、Mは200～300g、Lは300～450g、2Lは450～600g、3Lは600g以上のイモ
1997、98年：規格の2Sは50～100g、Sは100～200g、Mは200～350g、Lは350～500g、2Lは500～700g、3Lは700g以上のイモ

2. 食味

表6に示すように普通掘りでの掘り取り直後の蒸しイモの食味は、「88-116」に比べ、1996年は甘味がやや少なく粘質で総合評価はやや劣り、1997年は甘味がやや優れ、粘質だが総合評価は同等であった。また、1998年は甘味がやや劣ったが、肉色は優れ総合評価は同等であるなど年次による変動はあったがおむね同等に判定された。

一方、早掘りでは、「88-116」に比べ肉色と甘味がやや劣り、総合評価はわずかに劣った。

以上を総合した食味評価は、肉質はやや粘質で甘味はやや劣る傾向にあるが、良食味とされる「88-116」および非フリーと同等で優れるとみられる。

表6 ペニアズマウイルスフリー系統「B-27」の食味

系 統 名	食味試験 時期 (年月)	供 試 材 料	食 味 項 目			
			総合 評価	肉色	甘味	肉質
B-27	1996.11	普通掘直後	-0.57	-0.29	-0.57	-1.14
非フリー		普通掘直後	-1.29	-0.57	-1.57	+0.71
B-27	1997.8	早掘直後	-0.27	-0.73	-0.36	+0.00
B-27	1997.10	普通掘直後	+0.14	-0.57	+0.57	-0.86
非フリー		普通掘直後	+0.29	+0.71	-0.14	+1.00
B-27	1998.10	普通掘直後	+0.00	+1.25	-0.42	+0.08
非フリー		普通掘直後	-0.08	+0.00	+0.17	+0.42

注) 食味試験方法：基準(0)は「88-116」。同程度の大きさのイモを1処理3本蒸し器で40分程度蒸したのち、食味の評価は基準を0とし、下表により11段階に各付けし、その合計値をバネラー数で割った数値である。バネラーは生物工学研究所および農業研究所職員15名程度。

項 目	-5	0	5
総合評価	不良	基準	良
肉 色	不良	基準	良
甘 味	不良	基準	良
肉 質	粘質	基準	粉質

3. 貯蔵性

表7に示すように貯蔵中の重量の減少および貯蔵後の食味は非フリーと同程度であり、貯蔵性は良好とみられる。

普通掘りの貯蔵後の食味における肉質は、非フリーに比べて貯蔵日数196日ではやや粘質であったが、貯蔵日数116および337日では粉質であった。甘味は貯蔵日数116日および196日では劣ったが337日は優れ、総合評価も同様の傾向が見られた。

以上を総合した貯蔵後の食味評価は、肉質はおおむね粉質で甘味はやや劣る傾向にあるが、貯蔵期間が長くなるにつれて非フリーと同等か良好と判断できる。

表7 ペニアズマウイルスフリー系統「B-27」の貯蔵性と貯蔵後の食味

系統名	貯蔵 日数 (日)	貯蔵後		食 味 項 目			
		重量 (%)	個数 (%)	総合 評価	肉色	甘味	肉質
B-27	116	90	98	-0.55	-0.67	-0.58	0.55
非フリー	116	90	92	0	0	0	-
B-27	196	81	85	-0.22	1.05	-0.72	-0.28
非フリー	196	83	79	0	0	0	-
B-27	337	73	75	0.47	-0.05	0.47	0.53
非フリー	337	73	71	0	0	0	-

注) 貯蔵後重量(%)：貯蔵後の腐敗したイモを除いた重量／貯蔵開始時のイモ重量×100
貯蔵後個数(%)：貯蔵後の腐敗したイモを除いた個数／貯蔵開始時のイモ個数×100
貯蔵方法：2000年栽培、2000年～2001年貯蔵。
処理方法：2000年栽培、2000年～2001年貯蔵。
食味試験方法：基準(0)は非フリー。

付表1 耕種概要

年次	挿苗期 (月日)	掘り取り (月日)	挿苗後 日 数	試験区制	備 考
1991	5.31	10.24	146	64株2区	母本選抜
1993	6.7	10.26	141	4株1区	系統選抜 (表1)
1994	5.23	10.18	141	16株1区	系統選抜
1995	6.5	10.16	133	16株2区	生産力検定試験
1996	6.17	10.28	133	32株3区	生産力検定試験 (表3,6)
1997	5.29	8.25	88	32株2区	生産力検定試験 (表4)
	5.29	10.20	144	32株2区	生産力検定試験 (表3,6)
1998	6.5	10.21	138	64株2区	生産力検定試験 (表3,6)
2000	5.27	10.2	132	64株2区	貯蔵試験 (表7)
2001	5.24			64株2区	イモの形状調査 (表2)

注) 試験場所：茨城県農業総合センター農業研究所畑圃場（水戸市）
土壌型：表層腐植質黒土
供試材料：「B-27」、「88-116」、「88-124」；ペニアズマウイルスフリー系統
非フリー：茨城県作物研究所保存ペニアズマ（非ウイルスフリー）
苗質：ペニアズマウイルスフリー系統は試験管内の無菌苗を順化、
非フリーは種イモからの萌芽苗、いずれも7節7葉苗
栽植密度：400株/アール、畦幅100cm、株間25cm、黒マルチ栽培
施肥量（Kg/a）：N：P₂O₅：K₂O：=0.1：1.2：1.0

V. 適応地域、普及の状況

1999年に「B-27」が一般栽培に移されてから、県育成系統の栽培面積が増加し、これに伴ってウイルスフリー苗の普及面積も増加した（2000年の普及率は79%）。「B-27」は茨城県内全域に適応し、2000年には、茨城県のサツマイモ栽培面積7,560haのうち39%、2,942haに達した。

付表2 耕種概要(表5)

試験地	年次	栽植密度 (株/a)	施肥量 (N-P ₂ O ₅ -K ₂ O Kg/a)	挿苗期 (月日)	掘り取り (月日)	挿苗後 日数	担当普及センター
ひたちなか市 大洗町	1998	3246	1-20-10	5.23	10.1	131	常陸太田地域
	1997	3846	3-13-10	5.26	10.2	129	水戸地域
	1998	3571	3-27-10	5.20	10.2	135	
		3571	4-16-8	5.20	10.5	138	
		3704	2-17-6	5.18	10.5	140	
旭村	1997	3730	3-10-10	5.25	10.13	141	鉾田地域
	1998	3898	3-10-10	5.24	10.14	143	
麻生町	1997	3000	2-4-6	5.24	10.2	130	麻生地域
	1998	3968	3-15-12	5.23	10.9	139	
		3584	4-18-10	5.23	10.9	139	
		3509	2-10-6	5.24	10.9	138	
		3704	2-17-10	5.25	10.9	137	
牛久市	1998	3787	3-24-15	5.22	10.19	150	江戸崎地域

注) 苗質: 7節7葉苗

本試験は地域に適合するウイルスフリー系統の選抜および系統比較を行う目的で、普及センターの事業として実施。本研究から試験管内の無菌苗を順化して提供、試験および調査は各普及センターが実施した。

VI. 栽培上の注意

「B-27」はイモの肥大が遅く、積算気温が不足すると小イモになるので、挿苗から掘り取りまでの期間を充分にとることが必要で、早掘りには適さない。イモ数が多く、イモの形状・揃いが良く、在圃期間が長くなっても極端な大イモにならないこと、貯蔵性が良いことから、普通掘りによる貯蔵に適している。

長田龍太郎, 1990, 宮崎総農試報, 25: 77~90

新海昭ら, 1980, 日植病報, 46(1): 67

宇杉富雄ら, 1990, 日植病報, 56(3): 423

謝 辞

育成試験の遂行に当たっては歴代の農業試験場長・同育種部長および生物工学研究所長(1992年以降)・農業研究所長(同)のご支援を頂いた。また、圃場管理や調査等では笹島正光、宮崎輝男、須能健一の各氏をはじめ農業試験場管理部および農業研究所庶務課(1992年以降)職員の労を多とした。系統適応性検定試験の実施にあたっては、茨城県農業総合センター、茨城県農林水産部農業技術課(1999年4月同農政企画課技術普及室に改組)および園芸流通課、常陸太田地域、水戸地域、鉾田地域、麻生地域、江戸崎地域農業改良普及センターの関係各位のご尽力を頂いた。また、「B-27」ウイルスフリー苗の増殖は茨城県経済連園芸種苗増殖センターがあたった。以上の方々に対し、心から感謝の意を表する次第である。

参 考 文 献

Arthur Q. Villordon and Don R. Labonte, 1995, J. Amer. Hort. Sci. 120(5): 734~740

泉沢直・石原正敏, 1996, 茨城県農研報, 3: 13~21

Virus-free Line “B-27” derived from a Variety of Sweet Potato ” Beniazuma”

Kunio Yokota, Yukihiro Iida, Toshiaki Kirihara, Eiichi Kashimura* and Ritsuo Suga*

Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago, Iwama, Ibaraki, 319-0292

* Agricultural Institute, Ibaraki Agricultural Center, Kamikunii, Mito, Ibaraki, 311-4203

Summary

In 1998, Plant Biotechnology Institute released a virus-free line “B-27” derived from a variety of sweet potato “Beniazuma” (*Ipomoea batatas*(L.)Lam.). “B-27” was selected among 30 individuals obtained by shoot tip culture of “Beniazuma” in 1992 and evaluated for yield and tuber-quality during 1993-1997. The number of tubers of “B-27” per plant is larger than that of Beniazuma; but these tubers do not become too big if they are grown for a long period from planting to harvesting. Other properties of “B-27” are the same of Beniazuma. “B-27” was cultivated in a large area of Ibaraki Prefecture (2,492 ha) equivalent to 39% of the total growing area of sweet potato in the prefecture (7,560 ha), in 2000.

Key words: sweet potato, *Ipomoea batatas*, Beniazuma, virus-free, shoot tip culture, B-27

食用ハスの中生品種‘霞ヶ浦’および早生品種‘早霞’（はやか）の 育成とその特性

霞正一，小松鋭太郎¹⁾，八城和敏，佐久間文雄²⁾，雨ヶ谷洋³⁾，江面浩⁴⁾，
西宮聡⁵⁾，宮川雄一⁶⁾，飯田伸彦⁶⁾，石塚由之¹⁾

中生品種‘霞ヶ浦’を晩生品種‘中国’の栄養系選抜により，また早生品種‘早霞’を早生品種‘極早生’の自然交雑実生より育成した。‘霞ヶ浦’は‘中国’よりやや早い中生で，レンコンの節間長が短い。また，レンコンが形成される土壤中の深さは中晩生品種としては浅い。腐敗病には‘天王’より強く，‘中国’と同程度の抵抗性である。‘早霞’は‘天王’と比較して，極早生で，レンコンの長さが短く，節数が多い。レンコンの表皮の色は淡く，肉のかたさがやや軟らかい。腐敗病には‘天王’より強い。

キーワード：食用ハス，レンコン，霞ヶ浦，早霞，品種，育種

1. 緒 言

茨城県のレンコンは，1999年において栽培面積1,640 ha，生産量28,800 t，粗生産額78億円で全国の34%を占め全国第1位である（茨城県，2001）。主な産地は霞ヶ浦湖岸地帯で地域特産物として最も重要な野菜の一つとなっている。

県内の主要品種は，1985年頃までは晩生の‘中国’および早生の‘天王’であった。‘中国’は，1935年頃に霞ヶ浦湖岸地帯に導入され，その後普及して栽培面積の約8割を占めていた。残りの2割は，導入年代不詳の‘天王’やその他の在来品種が栽培されていた（塚原，1975）。しかし，1985年頃から品種に対する農家の関心が高まり，‘金澄’，‘エノモト’，‘ザラッパ’，‘湖北の光’などの早生品種や‘霞寿’などの中晩生品種が農家，レンコン問屋により育成または導入され，現在では30品種程度が栽培されている（茨城県れんこん振興対策協議会，1997；太田，私信）。レンコン栽培は土壌条件に強く制限されるため，適地である霞ヶ浦湖岸地帯のレンコン農家の経営は安定し，他作物と比べて後継者も多かった（太田，私信）。

ところが，近年国際化にともない中華人民共和国などから低価格の輸入レンコンが増加し，農家経営を圧迫している。この打開策の一つとして，多収，省力的栽培が可能で消費者ニーズにあった高品質な品種の育成が求められている。

本県では1987年に食味の優れた中生品種‘霞ヶ浦’，1994年に腐敗病に強い早生品種‘早霞’をそれぞれ育成し，品種登録した。その後，現地において栽培試験を実施し，これらの品種を普及させるための留意すべき栽培特性などを明らかにした。そこで，これら2品種の育成経過，品種特性および栽培特性を報告する。

なお，本稿においてハスの地下根茎のうち肥大した可食部位である肥大茎を「レンコン」とし，このレンコンを形成する植物を「食用ハス」と呼ぶことにする。

II. 中生品種‘霞ヶ浦’

1. 育成経過

育成にあたり，①レンコンが3節以上あること，②各節間が短いこと，③腐敗病抵抗性であることを育種目標とした。1981年に県内各地に栽培されている‘中国’よりレンコンが3節以上で，各節間が短い3系統を選定した。1982～1986年にかけて，さらにそのなかから育種目標に合った個体を選抜した。1984年は豊作年のため，1985年4月の種レンコンの調査ではレンコンが4節以上で重くまた孫レンコン数も多かった。しかし平年の気象条件下では，レンコンが3節以上となり，節間が短くなる傾向が認められた。さらに1985年の生育状況をみて，1986年

1) 故人
2) 現 茨城県農業総合センター園芸研究所
3) 退職
4) 現 筑波大学遺伝子実験センター

5) 現 茨城県農業総合センター大宮地域農業改良普及センター
6) 現 茨城県病害虫防除所

3月「霞ヶ浦」と命名し品種登録を出願し、1987年8月7日に登録された（農林水産省品種登録 第1401号）。

2. 品種特性

1984年阿見町廻戸の現地試験圃場において「中国」および「天王」を対照品種として、それぞれ200㎡ずつ栽培し特性を調査した。また一部形質についてはその後も調査を続けた。葉の大きさはやや大(50～69 cm)、葉の凹みはやや浅である。葉柄長はやや長(100～149 cm)、葉柄のとげの多少は中、とげの着色は無である。花の大きさは大、花弁の地色は白、花弁のアントシアンの濃淡は淡、アントシアンの分布はつま紅である。花弁の形は中型、花弁先端の形はやや丸、花たくの形は倒つり鐘状である。地下根茎の分岐数は少、地下根茎の節間長は中、レンコンの肩張りは極強、レンコンの太さはやや大、レンコンの長さはやや短、レンコンの屈曲は無、レンコンの節数は3～4である。分岐レンコンの肥大の程度はやや、レンコンの肉のかたさはやや軟、レンコンの肉の厚さは中である。開花の早晩および根茎肥大の早晩はやや晩、地下根茎の深さは中、腐敗病抵抗性は高である（図1、2、表1）。

「霞ヶ浦」の特徴は「中国」よりやや早い中生で、レンコンの節間長が短いことである。また、レンコンの土壌中の深さは中晩生品種では浅い。腐敗病に対し、「天王」より強く、「中国」と同程度の抵抗性である（表1）。

3. 栽培特性

「霞ヶ浦」と「中国」を1990～1992年の3年間にわたり、阿見町廻戸の現地試験圃場1ヶ所で露地栽培し、特性を比較した。試験規模は2品種ともに約100㎡であった。栽培管理は本県野菜栽培基準（茨城県農林水産部、1990）に準じて行った。調査は、立葉出葉期、開花期、レンコンの肥大が完了する時期（収穫が始められる時期）、レンコンの特性（ここでは、地下根茎の主茎の先端に生じるレンコンである「親レンコン」を意味し、分岐レンコンである「子レンコン」、孫レンコンを除いた（大賀、1937）、以下同じ）、10 a 当たり換算収量（「親レンコン」、 「子レンコン」および「孫レンコン」の合計、以下同じ）および食味について行った。なお、10 a 当たり換算収量は出荷用に調整していない状態であり、調整した場合10～20%程度減量すると考えられる。食味調査は材料および調理方法を同一条件とし、輪切りの天ぷらにしたものを14名で外観、歯ごたえ、総合評価により5段階で評価した。

表1. 食用ハス「霞ヶ浦」の特性表¹⁾

特性項目	霞ヶ浦	中国	天王
葉の大きさ	やや大(55cm)	大	やや大
葉の凹み	やや浅	中	深
葉縁の波	中	中	やや大
葉柄長	やや長(129cm)	長	長
柄のとげ	中	中	多
葉柄のとげの着色	無	無	有
花の大きさ	大	大	大
花茎長	やや長(120cm)	やや長	やや長
花弁の地色	白	白	白
花弁のアントシアンの濃淡	有	有	有
花弁のアントシアンの分布	淡	淡	中
花弁の条線の程度	つま紅	つま紅	全面
花弁の形	明瞭	明瞭	明瞭
花弁先端の形	中	中	中
完全花弁数	やや丸	やや丸	丸
花たくの形	中(17.2枚)	中(17.9枚)	中(21.3枚)
地下根茎の分岐数	倒つり鐘	倒つり鐘	倒つり鐘
地下根茎の節間長	少	少	やや多
肥大茎の肩張り	中	中	中
肥大茎の太さ	極強	極強	強
肥大茎の長さ	やや大	大	やや大
肥大茎の屈曲	やや短	中	やや短
肥大茎の節数	無	無	無
分岐肥大茎の肥大程度	3-4	3-4	3-4
肥大茎断面の形	やや高	中	中
肥大茎表皮の色	扁円	扁円	やや扁円
肥大茎表皮の皮点	極淡	極淡	中
肥大茎の肉のかたさ	やや少	少	多
肥大茎の肉の厚さ	やや軟	やや軟	硬
萌芽の早晩	中	中	中
開花の早晩	やや晩	晩	早
根茎肥大の早晩	やや晩	晩	早
地下根茎の深さ	やや晩	晩	早
腐敗病抵抗性	中	中	中
	高	高	低

¹⁾1984年阿見町で調査し、その後の再調査で一部修正した。

「霞ヶ浦」の露地栽培における生育およびレンコンの特性を表2に示した。「霞ヶ浦」の生育特性は次の通りである。つまり、立葉出葉日は、5月22日で「中国」より3日早かった。開花始めは、7月22日で「中国」より9日間早かった。開花終わりは、8月22日で「中国」より7日間早かった。レンコンの肥大が完了する時期は9月下旬～10月中旬であったのに対し、「中国」は10月中旬～11月上旬となり、「霞ヶ浦」が2週間程度早かった。

「霞ヶ浦」のレンコンの特性は次の通りである。節数は3.4本で「中国」の3.3本とほぼ同じであった。節間長は「中国」とほぼ同じか、やや短かった。レンコンの重量は2.3kgで、「中国」の2.2kgとほぼ同じであった。

10 a 当たり換算収量は「霞ヶ浦」が約2.7tで「中国」の約2.9tとほぼ同じかやや少なかった。

食味は総合評価の項目でみると「霞ヶ浦」が3.1で「中国」の3.4とほぼ同じかやや低かった。これは、食味調査した4月に

表2. ‘霞ヶ浦’の露地栽培における生育およびレンコンの特性

		立業 出業日	開花期		節数 ¹⁾	節 間 長 (cm) ¹⁾					重さ ¹⁾ (kg)	10a当たり ²⁾ 換算収量(kg)	レンコンの 肥大完了期	レンコン の深さ
			始め	終わり		1	2	3	4	5				
霞ヶ浦	1990年	5.25	7.20	8.18	3.5	11.5	15.6	20.3	25.3	27.4	2.5	2954	-	-
	1991年	5.20	7.20	8.20	3.3	12.9	18.1	23.2	25.0	21.3	2.2	2750	-	-
	1992年	5.20	7.25	8.28	3.4	12.2	16.0	23.1	31.2	28.7	2.2	2465	-	-
	平 均	5.22	7.22	8.22	3.4	12.2	16.6	22.2	27.2	25.8	2.3	2723	9下～10中	中～やや深
中 国	1990年	5.25	8. 2	8.25	3.4	12.2	16.6	21.4	23.6	32.0	2.4	3154	-	-
	1991年	5.25	7.25	8.25	3.3	13.0	18.9	24.7	26.3	27.6	2.1	2557	-	-
	1992年	5.25	8. 5	9. 5	3.3	12.2	16.2	25.7	34.3	-	2.0	2847	-	-
	平 均	5.25	7.31	8.29	3.3	12.5	17.2	23.9	28.1	29.8	2.2	2853	10中～11上	やや深

¹⁾ 節数, 節間長, 重さは親レンコンの測定値である。

²⁾ 出荷用の調整を行わないで親レンコン, 子レンコン, 孫レンコンの合計から収量を算出した。

定植日: 1990年産; 1990年4月7日 収穫調査: 1990年産; 1991年4月7日
 1991年産; 1991年4月8日 1991年産; 1992年4月13日
 1992年産; 1992年4月14日 1992年産; 1993年4月15日

において中生の‘霞ヶ浦’よりも, 晩生の‘中国’の方が品質が維持されたため, 年内の調査では差がないと考えられる(表3)。

観察の結果, 腐敗病は‘霞ヶ浦’, ‘中国’ともにほとんど発生しなかった。

表3. ‘霞ヶ浦’の食味

	外 観	歯ごたえ	総合評価
霞ヶ浦	3.0	3.2	3.1
中 国	3.8	3.0	3.4

被験者数: 14名, 5段階評価法で数値が大きいほど優良となる。
 但し, 歯ごたえは3が最も良い。
 1990年産を1991年4月8日収穫し
 2日後に第3節を天ぷらにし食味調査。

以上の栽培試験結果から, ‘霞ヶ浦’の特性は‘中国’と類似し, 栽培方法は‘中国’に準じて行えば良いことが明らかとなった。

栽培上の留意点は次の通りである。一つには収穫期を10月中旬～12月下旬することが望ましい。これは晩生品種の‘中国’と異なり, 中生品種‘霞ヶ浦’を1月以降に収穫する場合, レンコンの第3～4節間がもろくなる現象, いわゆる「すね上がり」が生じるためである。二つは‘霞ヶ浦’はレンコンを形成する深さが, 中晩生品種としては‘中国’などよりやや浅いので, かご車輪を使った柄刈り作業では分岐レンコン(「子レンコン」, 「孫レンコン」)を傷める可能性があるため作業上注意が必要である。三つには‘霞ヶ浦’は気象・土壌条件によりレンコンの形状が変化しやすいので, 種レンコンには, 品種特性を維持するため, 形状等の優れたものを厳選し用いる。

Ⅲ. 早生品種 ‘早霞’

1. 育成経過

早生品種‘天王’は腐敗病に弱く, 品質がやや劣ることから,

腐敗病抵抗性で, 品質の優れた品種が求められていた。そこで, 1984年に本県在来の早生品種通称‘極早生’の自然交雑種子を30粒採取した。1985～1987年に実生を養成しながら, レンコンの形状などの特性が優れた1系統を選抜した。さらに, 1988～1990年に, レンコンの形状, 耐病性などを中心に栄養系選抜を行った。1991年に, 育種目標にかなった品種が育成できたので‘天王’, ‘中国’を対照品種に用い特性を調査した。1992年3月に, 品種登録を出願し, 1994年8月22日に登録された(農林水産省品種登録 第4059号)。

2. 品種特性

1991年出島村(現, 霞ヶ浦町)戸崎の現地試験圃場において‘天王’および‘中国’を対照品種として, それぞれ200㎡ずつ栽培し, 特性を調査した。また, 一部形質についてはその後も調査を続けた。葉の大きさは大(70cm以上), 葉柄長はやや長(100～149cm), 葉柄のとげは中, とげの着色は無, 花卉の地色は白, アントシアニンは無, 条線の程度は中である。地下根茎の分岐数はやや小, レンコンの肩張りは極々強, 太さはやや大, 長さは短, 屈曲は無, 節数は4～5, 分岐レンコンの肥大程度はやや高, レンコンの表皮の色は淡, 皮点是中, レンコンの肉のかたさはやや硬, 厚さはやや厚である。萌芽の早晩は中, 開花の早晩は早, 根茎肥大の早晩は極早, 地下根茎の深さは浅, 腐敗病抵抗性は中である(図1, 2, 表4)。

‘早霞’の特徴は従来の‘天王’と比較して, 10日間程度早い極早生であること, レンコンの長さが短いこと, 節数が多いこと, 表皮の色が淡いこと, レンコンの肉のかたさがやや軟らかいこと, さらに腐敗病に強いことがあげられる(表4)。

表4. 食用ハス‘早霞’の特性表¹⁾

特性項目	早霞	天王	中国
葉の大きさ	大(86cm)	やや大(68cm)	大(86cm)
葉の凹み	深	深	浅
葉縁の波	やや多	中	中
葉柄長	やや長(116cm)	やや長(108cm)	極長(205cm)
柄のとげ	中	やや多	中
葉柄のとげの着色	無	有	無
花の大きさ	大	大	大
花茎長	やや長(127cm)	やや長(127cm)	やや長(148cm)
花卉の地色	白	白	白
花卉のアントシアン	無	有	有
花卉のアントシアンの濃淡	無	中	淡
花卉のアントシアンの分布	無	全面	つま紅
花卉の条線の程度	中	明瞭	明瞭
花卉の形	中	中	中
花卉先端の形	やや丸	丸	やや丸
完全花卉数	中(19.2枚)	中(21.8枚)	中(18.8枚)
花たくの形	倒つり鐘	倒つり鐘	倒つり鐘
地下根茎の分岐数	やや少	やや多	少
地下根茎の節間長	中	中	中
肥大茎の肩張り	極々強	強	極強
肥大茎の太さ	やや大	やや大	大
肥大茎の長さ	短	やや短	中
肥大茎の屈曲	無	無	無
肥大茎の節数	4-5	3-4	3-4
分岐肥大茎の肥大程度	やや高	中	中
肥大茎断面の形	扁円	やや扁円	扁円
肥大茎表皮の色	淡	中	極淡
肥大茎表皮の皮点	中	多	少
肥大茎の肉のかたさ	やや硬	硬	やや軟
肥大茎の肉の厚さ	やや厚	中	中
萌芽の早晚	中	早	晩
開花の早晚	早	早	晩
根茎肥大の早晚	極早	早	晩
地下根茎の深さ	浅	中	中
腐敗病抵抗性	中	低	高

¹⁾ 1991年出島村(現、霞ヶ浦町)で調査し、その後の再調査で一部修正した。

3. 栽培特性

‘早霞’と最近現地に導入された‘ザラッパ’など早生の数品種を1994～1997年の4年間、ハウス、トンネル、露地の3作型で出島村(現、霞ヶ浦町)戸崎、牛渡および桜川村浮島の現地試験圃場において栽培し、特性を比較した(ただし、桜川村浮島のデータは省略した)。試験規模は‘早霞’が約100m²、対照品種の‘天王’、‘ザラッパ’、‘極早生’および‘湖北の光’が約100～900m²であった。栽培管理は本県野菜栽培基準(茨城県農業総合センター, 1994)に準じて行った。調査はレンコンの肥大が完了する時期の確認、レンコンの特性、10a当たり換算収量および食味について行った。なお、10a当たり換算収量は出荷用に調整したものをを用いた。食味調査は材料および調理方法を同一条件として、輪切りにした後水煮したものを14名で、外観、香り、味、歯ごたえ、総合評価により5段階で評価した。

‘早霞’の露地、トンネルおよびハウス栽培における生育およびレンコンの特性を表5に示した。

露地栽培における‘早霞’の生育特性は次の通りである。立葉出葉日は、5月25日で‘極早生’よりやや早く、‘天王’、‘ザラッパ’よりやや遅かった。開花始めは、7月13日で‘ザラッパ’、‘極早生’よりやや早く、‘天王’とほぼ同じであった。開花終わりは、8月22日で‘ザラッパ’よりやや遅く、‘天王’、‘極早生’とほぼ同じであった。レンコンの肥大が完了する時期は、8月下旬～9月上旬であった。これは、県内の主要早生品種‘ザラッパ’とほぼ同時期で‘天王’、‘極早生’より7～10日間ほど早かった。

露地栽培における‘早霞’のレンコンの特性は次の通りである。節数は4.1本で‘ザラッパ’の4.5本よりやや少なく、‘天王’の3.5本、‘極早生’の3.7本よりやや多かった。節間長は‘ザラッパ’、‘極早生’とほぼ同じであったのに対し、‘天王’よりやや短かった。レンコンの重量は2.2kgで、‘天王’の2.3kgとほぼ同じであったのに対し、‘ザラッパ’の1.9kg、‘極早生’の1.6kgよりやや重かった。

露地栽培における‘早霞’の10a当たり換算収量は、約2.2tで‘天王’および‘ザラッパ’の約2.8tよりやや少なく、‘極早生’の約1.5tよりやや多かった。

トンネル栽培における‘早霞’の生育特性は次の通りである。立葉出葉日は、5月23日で‘湖北の光’より12日間遅かった。開花始めは、7月5日で‘湖北の光’とほぼ同じであった。開花終わりは、8月10日で‘湖北の光’とほぼ同じであった。レンコンの肥大が完了する時期は、8月中旬～下旬であった。これは、‘ザラッパ’、‘湖北の光’よりやや遅く、‘天王’よりやや早かった(データの一部省略)。

トンネル栽培における‘早霞’のレンコンの特性は次の通りである。節数は4.5本で‘湖北の光’の4.4本とほぼ同じであった。節間長およびレンコンの重量ともに‘湖北の光’とほぼ同じであった。

トンネル栽培における‘早霞’の10a当たり換算収量は、約1.8tで‘湖北の光’とほぼ同じであった。

ハウス栽培における‘早霞’の生育特性は次の通りである。立葉出葉日は、4月17日で‘ザラッパ’より12日間遅かった。開花始めは、5月28日で‘ザラッパ’とほぼ同じであった。なお、ハウス栽培では開花中に収穫するため、開花終わりは調査しなかった。レンコンの肥大が完了する時期は、6月下旬～7月上旬であった。これは、‘ザラッパ’よりやや遅かった。

ハウス栽培における‘早霞’のレンコンの特性は次の通りである。節数は4.2本で、‘ザラッパ’の4.7本よりやや少なかった。

表5. ‘早霞’の露地、トンネルおよびハウス栽培における生育およびレンコンの特性

		立葉		開花期		節数 ¹⁾	節 間 長 (cm) ¹⁾					重さ ¹⁾ (kg)	10a当たり ²⁾ 換算収量(kg)	レンコンの 肥大完了期	レンコンの 深さ
		出葉日		始め	終わり		1 2 3 4 5								
露地	早霞	1994年	5.15	7. 2	8.15	4. 5	9. 4	11.6	12.7	15.3	20.5	2. 4	3,101	-	-
		1995年	5.31	7.16	8.20	4. 1	9. 3	12.4	15.6	18.0	-	2. 4	2,203	-	-
		1996年	5.30	7.22	8.30	3. 8	9. 0	12.1	16.8	21.0	-	1. 8	1,400	-	-
	平 均		5.25	7.13	8.22	4. 1	9. 2	12.0	15.0	18.1	20.5	2. 2	2,235	8下～9上	やや浅
	天王	1994年	5.10	7. 5	8.15	3. 6	14.2	16.1	19.5	26.8	-	2. 4	3,105	-	-
1995年		5.20	7.18	8.20	3. 4	12.3	16.9	26.1	-	-	2. 1	2,418	-	-	
平 均		5.15	7.12	8.18	3. 5	13.3	16.5	22.8	26.8	-	2. 3	2,762	9上～中	浅～中	
トンネル	ザラッパ	1994年	5.15	7.18	8.15	4. 5	8. 9	13.2	14.7	17.1	18.7	1. 9	2,826	8下～9上	極浅
	極早生	1995年	6. 3	7.25	8.25	3. 9	10.0	12.5	15.5	-	-	1. 8	1,710	-	-
		1996年	5.30	7.31	8.25	3. 4	10.3	12.2	16.1	22.0	-	1. 3	1,200	-	-
		平 均		6. 1	7.28	8.25	3. 7	10.2	12.4	15.8	22.0	-	1. 6	1,455	9上～中
	ハウス	早霞	1996年	5.20	7. 1	8.10	4. 0	11.2	13.9	16.8	24.7	-	2. 1	1,560	-
1997年			5.25	7. 8	8.10	5. 0	9. 4	13.4	14.9	18.7	22.8	2. 7	2,080	-	-
平 均			5.23	7. 5	8.10	4. 5	10.3	13.7	15.9	21.7	22.8	2. 4	1,820	8中～下	やや浅
湖北の光		1996年	5.10	7. 5	8. 5	4. 0	9. 7	13.9	18.2	23.7	-	2. 0	1,560	-	-
		1997年	5.12	6.30	8. 8	4. 7	10.2	15.3	17.6	21.4	22.0	2. 8	2,040	-	-
	平 均		5.11	7. 3	8. 7	4. 4	10.0	14.6	17.9	22.6	22.0	2. 4	1,800	8上～中	極浅
ハウス	早霞	1996年	4.15	5.20	-	4. 5	12.1	15.6	18.8	24.7	36.5	1. 8	1,580	-	-
		1997年	4.18	6. 5	-	3. 8	10.9	15.4	19.7	23.0	-	1. 8	1,057	-	-
		平 均		4.17	5.28	-	4. 2	11.5	15.5	19.3	23.9	36.5	1. 8	1,319	6下～7上
	ザラッパ	1996年	4. 2	5.27	-	4. 3	11.8	14.4	17.2	21.8	25.5	2. 1	1,700	-	-
		1997年	4. 8	6. 1	-	5. 0	11.7	15.0	16.7	20.3	-	2. 2	1,729	-	-
平 均		4. 5	5.30	-	4. 7	11.8	14.7	17.0	21.1	25.5	2. 2	1,715	6中～下	極浅	

¹⁾ 節数、節間長、重さは親レンコンの測定値である。

²⁾ 出荷用の調整を行い、親レンコン、子レンコン、孫レンコンの合計から収量を算出した。

定植日：1994年産；4月18日(露地)

1995年産；4月 9日(露地)

1996年産；4月17日(露地)，3月23日(トンネル)，3月13日(ハウス)

1997年産；3月25日(トンネル)，3月13日(ハウス)

収穫調査：1994年産；9月9～14日(露地)

1995年産；9月7～20日(露地)

1996年産；9月12日(露地)，8月30日(トンネル)，7月 1日(ハウス)

1997年産；9月11日(トンネル)，7月16日(ハウス)

節間長は‘ザラッパ’とほぼ同じであった。レンコンの重量は1.8kgで、‘ザラッパ’の2.2kgよりやや軽かった。

ハウス栽培における‘早霞’の10 a 当たり換算収量は、約1.3 tで、‘ザラッパ’の約1.7tよりやや少なかった。

食味は総合評価の項目でみると‘早霞’が3.2，‘天王’が3.1，‘ザラッパ’が2.9となり、大きな違いはなかったものの、‘早霞’が他品種よりやや優れていた(表6)。

観察の結果、腐敗病に対し‘早霞’は‘天王’より強く、‘ザラッパ’と同様にほとんど発病しなかった。また、早霞は

表6. ‘早霞’の食味

	外観	香り	味	歯ごたえ	総合評価
早霞	3.4	3.2	3.1	3.4	3.2
天王	3.6	3.2	3.1	3.0	3.1
ザラッパ	2.5	3.1	3.0	2.6	2.9

被験者数：14名，5段階評価法で数値が

大きいほど優良となる。

但し、歯ごたえは3が最も良い。

1995年産を9月7日収穫し1日後に第2節を

水煮し食味調査。

露地栽培にお

いて他の早生

品種に比べて

強風による葉

の損傷の被害

が少 な かつ

た。さらに、

‘早霞’は柄

刈り作業を行

わないハウス栽培において商品価値を低下させる赤渋の着生が‘ザラッパ’に比べ、かなり少なく、表皮が美麗であった。

以上の栽培試験結果から、‘早霞’は露地、トンネルおよびハウス栽培で主要品種と同等または優れた特性が認められた。また、これまでの早生品種とはほぼ同様の方法で栽培できることが明らかになった。

栽培上の留意点は次の通りである。一つには、‘早霞’はレンコンを形成する深さが、早生品種としては‘ザラッパ’などよりやや深いので、かご車輪を使った柄刈り作業はレンコンを傷めず、効率的であるが、掘り取り労力はややかかる。二つには、‘早霞’は気象・土壌条件によるレンコンの形状の変化が少ないものの、種レンコンには、品種特性を維持するため、形状等の優れたものを選抜して用いる。三つには、早生品種に共通な特性として、10月中旬以降は中晩生品種と比較して肉質が硬くなり、表皮がやや黄化し、商品価値が低下することがあるので、出荷は10月上旬までが望ましい。

IV. 育成品種の普及と今後の活用

‘霞ヶ浦’の現地への普及は1988年から県内の農業団体を中心に開始され、今年で14年間が経過した。この間、気象および土壌条件による形状の不安定性が問題になったものの、一定の水準で増え続け、その栽培面積は1996年に行った各地域農業改良普及センターの調査によると156 haで茨城県の食用ハス栽培面積の約10%を占めていた（茨城県れんこん振興対策協議会、1997）。現在もこの面積に大きな変化はないと考えられる。一方、‘早霞’の現地への普及は1996年から‘霞ヶ浦’と同様に県内の農業団体を中心に開始され、今年で6年間が経過した。栽培面積は2001年に行った各地域農業改良普及センターの調査によると8 haで、停滞傾向にある。

‘霞ヶ浦’の育成まで茨城県の食用ハスの品種は、大部分が‘中国’、‘天王’であった（塚原、1975）。ところが、‘霞ヶ浦’の育成・普及を契機に品種育成に関する気運が高まり、レンコン問屋、農家から数品種が育成され、一部は品種登録されている（太田、私信）。また、栄養系選抜で育成された‘霞ヶ浦’と同様に食用ハスでは同一品種においてもそれぞれの個体により多少特性の異なることが明らかとなった。このことから、一部の農家では従来の種レンコン田から掘り取ったレンコンを全て定植するのではなく、形状などの優れたものを厳選し種レンコンとして定植することにより、高品質生産が行われつつある。

‘霞ヶ浦’、‘早霞’とも現在の栽培面積は必ずしも多くはな

い。また、レンコンの消費は緩やかな減少傾向にあるのに加えて、中華人民共和国などからの輸入レンコンは増加傾向にあって、レンコン農家の経営は10年前と比較し、たいへん厳しくなっている（太田、私信）。そこで、消費の拡大と輸入レンコンとの差別化をはかるため、さらなる優良品種の育成が望まれている。

著者らはこれまで不明であった食用ハスの交配方法（霞・佐久間、1998；霞ら、2000a）および交配母本としても利用可能な食用ハス遺伝資源の簡易保存方法を開発した（霞ら、2000b）。また、食用ハスは他の作物と比べて交配実生集団における変異の幅が小さいとする報告もある（南川、1963）が、著者らが実施した‘霞ヶ浦’と‘早霞’の交配実生集団の調査では、レンコンの形状、硬さ、表皮の色、土壌中の形成位置など多くの特性において幅広い変異が認められ（霞ら、1999）、食用ハスにおいても交配育種の有効性が示唆された。さらに、交配実生集団から効率的に優良個体を選抜するため、分子マーカーによる早期選抜法の開発に取り組み始めた。今後、交配育種の有用な交配母本として‘霞ヶ浦’、‘早霞’の活用が期待される。

謝 辞

本研究を推進するにあたり現地試験圃場の栽培管理は山崎清氏、山崎利夫氏、山崎由雄氏、野口久敬氏、野口信男氏、野口裕司氏、前島和夫氏、中島信夫氏、来栖孝一氏、飯田敬一氏、斉藤幸雄氏、宮本和昭氏が担当して下さった。また、茨城県農業総合センター、土浦地域農業改良普及センター、江戸崎地域農業改良普及センターの関係者には多大なるご協力をいただいた。特に太田利美氏には数多くの貴重な情報をいただいた。さらに、所内試験圃場の栽培管理は小島和明氏、田崎孝氏、木村茂樹氏、大久保繁氏のご協力によるところが大きかった。ここに記してこれらの方々に感謝の意を表する。

引用文献

- 茨城県(2001)茨城の園芸. p. 13.
- 茨城県農業総合センター(1994)茨城県野菜栽培基準. p. 171-175.
- 茨城県農林水産部(1990)茨城県野菜栽培基準. p. 168-170.
- 茨城県れんこん振興対策協議会(1973)茨城県におけるれんこんの品種. pp. 19.
- 霞正一・佐久間文雄(1998)食用ハスの開花、受精および種子形成. 園学雑. 67(4): 595-599.

- 霞正一・八城和敏・林幹夫(2000a)食用ハス(*Nelumbo nucifera*)の交配種子の獲得に及ぼす花粉の低温貯蔵の効果. 園学雑, 69(6): 732-735.
- 霞正一・八城和敏・窪田満・林幹夫(1999)レンコンの新品種育成 ①交配実生の特性検定. 平成10年度茨城農総セ生工研試験成績書, p. 85-86.
- 霞正一・八城和敏・佐久間文雄・林幹夫(2000b)繊維強化プラスチック製大型容器を用いた食用ハス遺伝資源の簡易保存と交配育種への利用. 茨城農総セ生工研報告, 3: 61-68.
- 南川勝次, (1963). 食用蓮に関する研究. 佐賀農試研報, 4: 1-73.
- 大賀一郎(1937)食用シナバスの蓮根について. 植物及動物, 5(1): 39-46.
- 塚原章(1975)茨城県におけるレンコン栽培の歴史. 猪崎政敏編著: 水生蔬菜の栽培と経営. 家の光協会, 東京, p. 8-19.

New Edible Lotus Rhizome Varieties ‘Kasumigaura’ and ‘Hayaka’

Masakazu Kasumi, Eitarou Komatsu¹⁾, Kazutoshi Yashiro, Fumio Sakuma²⁾, Hiroshi Amagai³⁾, Hiroshi Ezura⁴⁾, Satoshi Nishimiya⁵⁾, Yuuichi Miyagawa⁶⁾, Nobuhiko Iida⁶⁾ and Yoshiyuki Ishitsuka¹⁾

Plant-Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago, Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki 319-0292, Japan.

¹⁾Deceased

²⁾Horticultural Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago, Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki 319-0292, Japan.

³⁾Retired

⁴⁾Institute of Agriculture and Forestry, Gene Research Center, University of Tsukuba, Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan.

⁵⁾Ohmiya Agricultural Extension Center, Ibaraki Agricultural Center, Nonaka, Ohmiya, Naka, Ibaraki 319-2215, Japan.

⁶⁾Ibaraki Plant Protection Office, Sakucho, Mito, Ibaraki 310-0802, Japan.

Summary

‘Kasumigaura’ is a medium maturing and ‘Hayaka’ is an early maturing edible lotus rhizome variety, released by Horticultural Institute and Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center. ‘Kasumigaura’ originated from clonal selection of ‘Chugoku’ which matures slightly later than ‘Kasumigaura’. In comparison with most of the medium and late maturing varieties such as ‘Chugoku’, ‘Kasumigaura’ has shorter internode length of enlarged rhizome which grow shallow in the soil. ‘Kasumigaura’ is highly resistant to root rot as well as ‘Chugoku’. ‘Hayaka’ originated from an open-pollinated population of seedlings of early maturing variety ‘Gokuwase’. ‘Hayaka’ matures slightly earlier than ‘Tennou’. In comparison with ‘Tennou’, ‘Hayaka’ has shorter internode length, greater node numbers, lighter skin color, tenderer flesh of enlarged rhizome, and higher resistance to root rot.

key words: edible lotus rhizome, Kasumigaura, Hayaka, variety, breeding

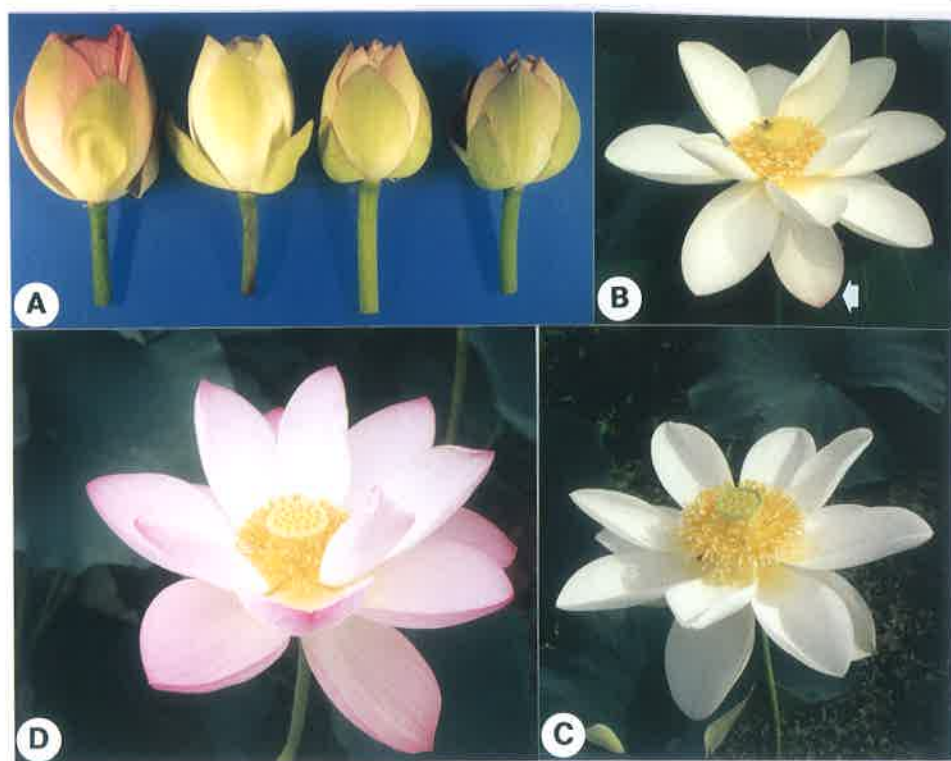


図1. 食用ハス‘霞ヶ浦’および‘早霞’の花器特性

A：つぼみの花色、左から‘天王’、‘早霞’、‘中国’、‘霞ヶ浦’。

B：‘霞ヶ浦’の開花様相、花色が白地につま紅がある（矢印）。

C：‘早霞’の開花様相、花色が白でつま紅がない。

D：‘天王’の開花様相、ピンク色の花色。

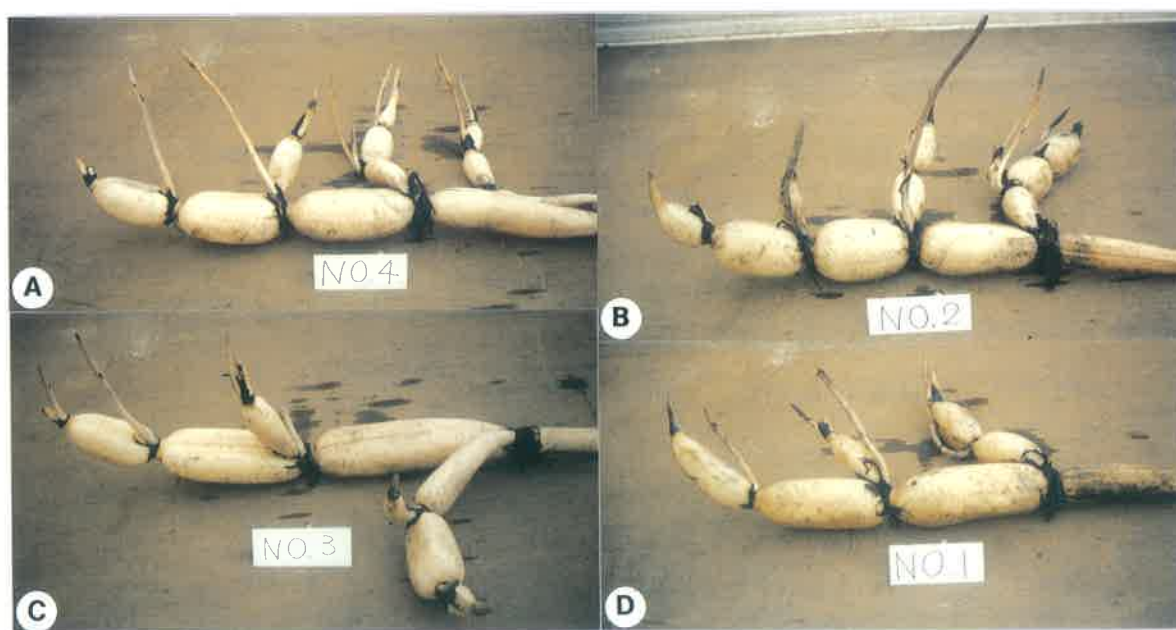


図2. 食用ハス‘霞ヶ浦’および‘早霞’のレンコンの形状

A：‘霞ヶ浦’、B：‘早霞’、C：‘中国’、D：‘天王’

所 長 岡 成 美

編集委員長 池 上 隆 文

編 集 委 員 富 田 健 夫
飯 田 幸 彦
霞 正 一
成 澤 才 彦

茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告 第5号
平成14年3月20日発行

発行所 茨城県農業総合センター生物工学研究所
〒319-0292 西茨城郡岩間町安居3165-1
電話 0299-45-8330

印刷所 ワ タ ヒ キ 印 刷 株 式 会 社
〒310-0012 水戸市城東1丁目5番21号
電話 029-221-4381 (代)

Bulletin
of the
Plant Biotechnology Institute
Ibaraki Agricultural Center
No.5(2002)

Contents

- Transgenic chrysanthemum(*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.)Kitamura)
expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to fungal diseases 1-39
Yasumasa Takatsu
- Breeding of a New Rice Cultivar for Sake-Brewing 'Hitachinishiki' 41-51
Ritsuo Suga, Yukihiro Iida, Kunio Yokota, Toshiaki Kiriwara,
Satomi Nishimiya, Yoshiaki Takagi, Haruo Hanawa and Yoshiaki Okutsu
- Virus-free Line "B-27" derived from a Variety of Sweet Potato "Beniazuma" 53-59
Kunio Yokota, Yukihiro Iida, Toshiaki Kiriwara, Eiichi Kashimura and Ritsuo Suga
- New Edible Lotus Rhizome Varieties 'Kasumigaura' and 'Hayaka' 61-69
Masakazu Kasumi, Eitarou Komatsu, Kazutoshi Yashiro,
Fumio Sakuma, Hiroshi Amagai, Hiroshi Ezura, Satoshi Nishimiya,
Yuuichi Miyagawa, Nobuhiko Iida and Yoshiyuki Ishitsuka