

# BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

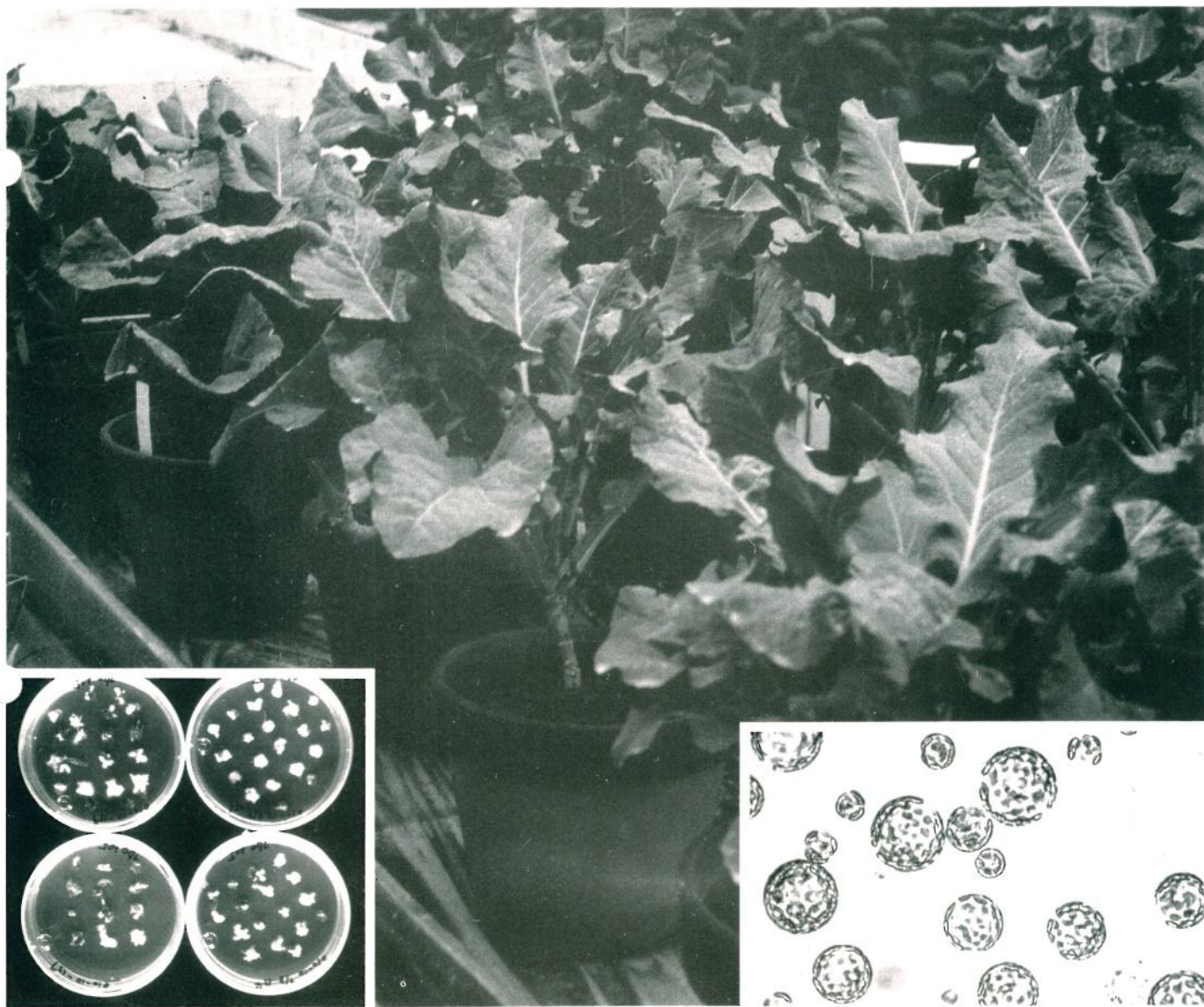
TECHNO NEWS

〈生 研 機 構〉

ブレインテクノニュース

## 第 2 号

NOVEMBER 15, 1987



プロトプラストから再生したケールの植物体  
(中央)

ハクランの葉肉プロトプラスト(右下)

ケールにおけるプロトプラストカルスからの  
茎葉再分化条件の検討(左下)

(本文11ページ参照)

### 本号の紙面

国内情報	1
水産, 病害防除, 植物育種	
文献情報	19
外国特派員便り	25
特別情報	28
お知らせ	30

## 目 録

### 国内情報

- アマノリ育種におけるバイオテクノロジーの利用…………… 1
- 土壌病害の総合防除のための圃場カルテシステム  
——ハクサイ根こぶ病を事例として—— …………… 4
- トマトのプロトプラスト培養…………… 8
- アブラナ科野菜の葉肉プロトプラストからの植物体再生条件…………… 11
- かんしょ塊根裂開症の原因と対策…………… 13
- 染色体工学の基盤としての染色体識別・同定法の開発…………… 16

### 文献情報

- コムギおよび *Nicotiana plumbaginifolia* の組織培養における  
エチレン活性阻害剤硝酸銀による不定芽再分化の促進…………… 19
- プロトプラスト培養によるユリノキの再生…………… 20
- Nicotiana* のゲノムと *Atropa* のプラストームをもち、機能を  
を有する体細胞雑种植物の作出…………… 21
- カナマイシン耐性と硝酸還元能欠損遺伝子を選抜指標として一  
つの核ゲノム内に組合せることにより、広く植物における  
体細胞雑種の選抜に用いる方法の検討…………… 22
- 遺伝子を導入された植物体でのアルファルファモザイクウイルスRNA 4  
の発現とウイルスに対する抵抗性の獲得…………… 23

### 外国特派員便り

- プラントジェネティクス社の経営戦略を聞く…………… 25

### 特別情報

- 第6回国際植物培養学会より  
馬鈴薯・レタス・てんさいの研究進捗状況…………… 28

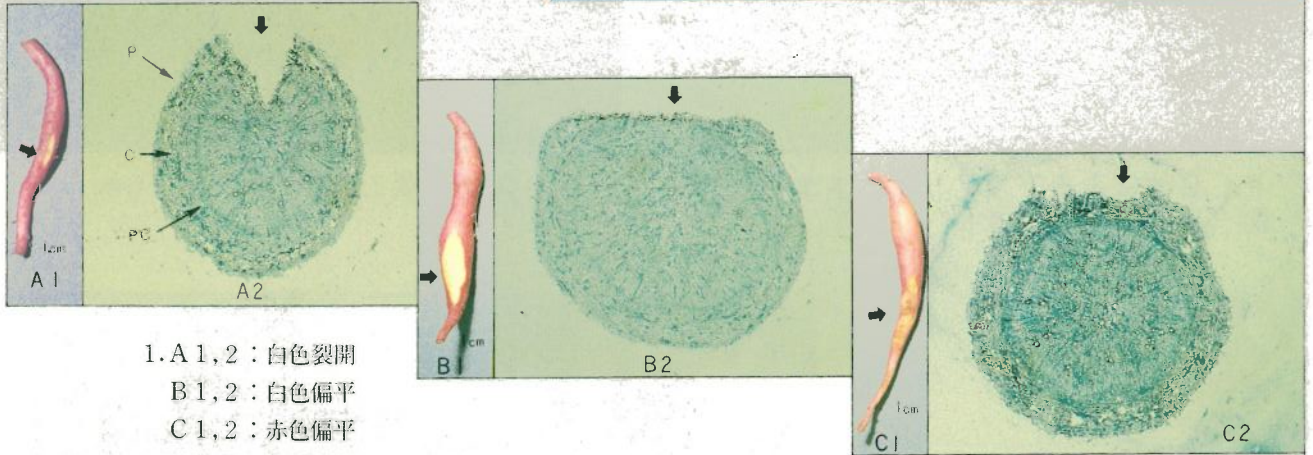
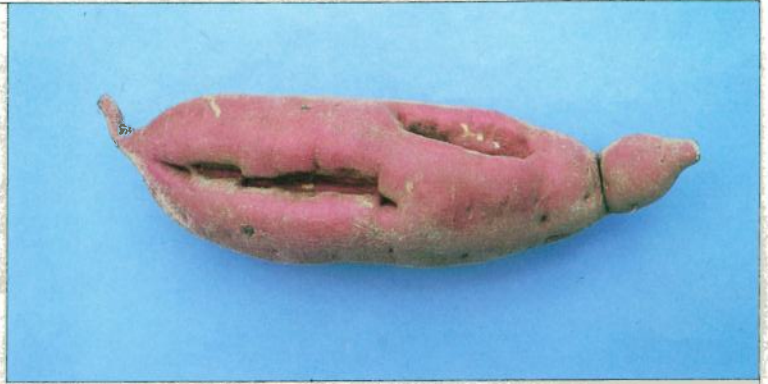
### お知らせ

- 遺伝資源配布あっせん事業…………… 30
- 植物遺伝資源配布目録…………… 30

## かんしょ塊根裂開症の原因

(本文13ページ参照)

### 1. かんしょの裂開症(ベニアズマ)



1. A 1, 2 : 白色裂開
- B 1, 2 : 白色偏平
- C 1, 2 : 赤色偏平
- 太矢印が発症部位
2. P : 周皮 C : 皮層
- PC : 一次形成層

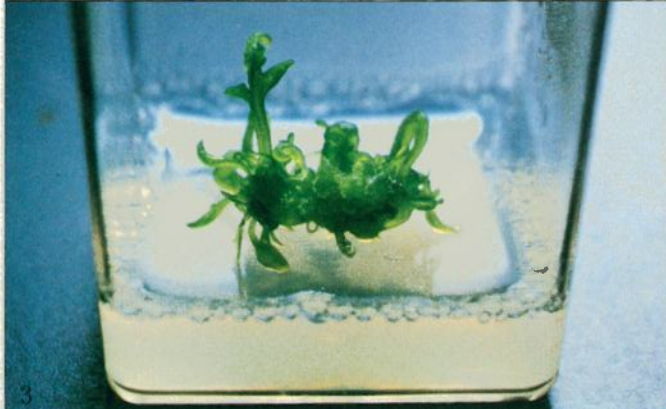
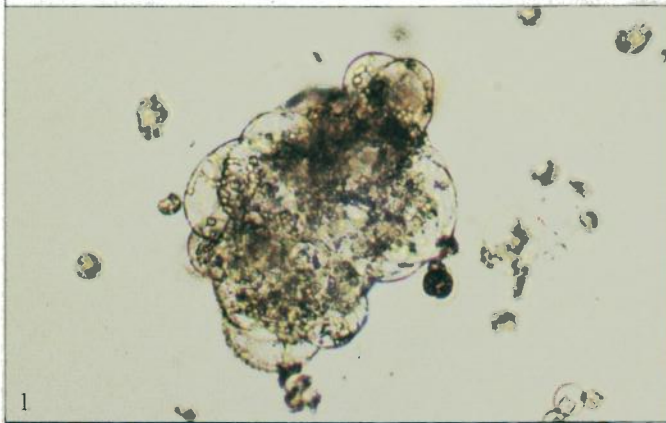
(小柳ら)

### 2. 裂開等異常症状と発症部位の横断面

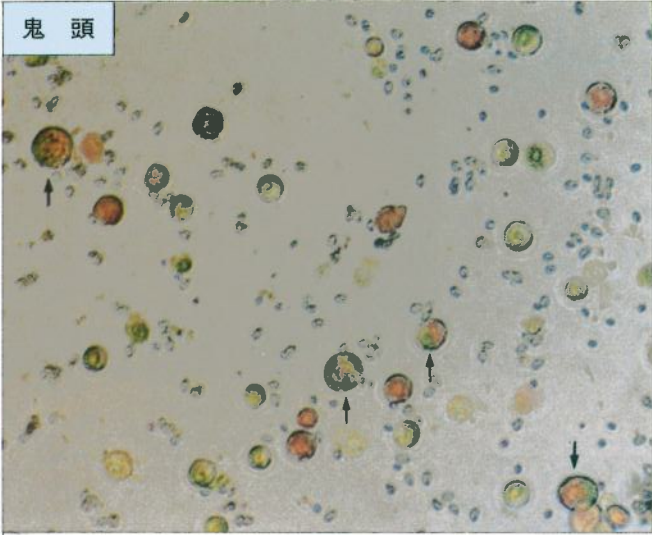
## トマトのプロトプラスト培養

(本文 8 ページ参照)

1. 分裂を繰返す小細胞塊
2. 不定芽を分化したカルス
3. 茎葉の伸長
4. 再生したプロトプラスト由来トマト



鬼頭



駒田



PEG法によるアマノリとヒトエグサの融合細胞(↑印) (本文1ページ参照)

ハクサイ根こぶ病(本文4ページ参照)

染色体工学の基盤としての染色体識別・同定法

(本文16ページ参照)



- a. 植物染色体画像解析装置(CHIAS)の全景
- b. 染色体部分の抽出(白色部分)および必要部分の限定
- c. 染色体の濃度に応じた擬似カラー化
- d. 解析部分の拡大および染色分体中軸部の濃度分布の測定
- e. 染色体の濃度分布に基づくイデオグラムの作製



## 国内情報

## アマノリ育種におけるバイオテクノロジーの利用

農林水産省西海区水産研究所

鬼頭 鈞

## はじめに

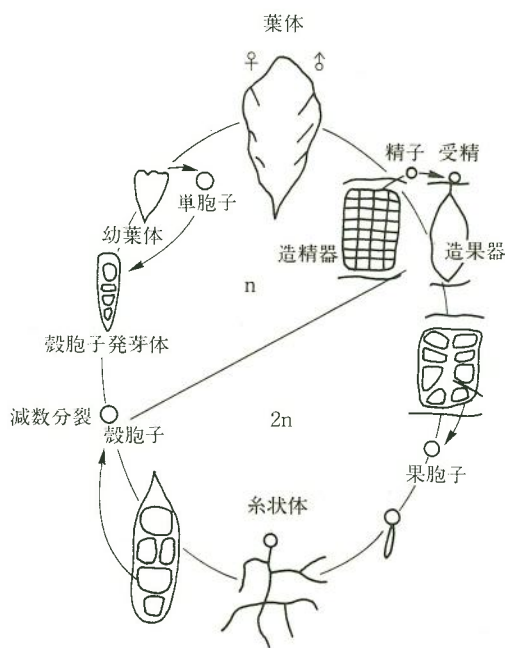
海苔は100%国産で賄われる数少ない食料の一つである。昭和42年度まではわずかつつだが毎年韓国から輸入されていたが、その後は全くなしである。この間激しい諸物価高騰の荒波のなかにあっても、「ノリとタマゴは物価の優等生」との業界にとってはうれしからぬニックネームを載きながら、ノリ生産業はひたすら生産規模の拡大と合理化、更には利潤の減少を克服するなどの努力を積み重ねて、辛うじて生き残ってきているのである。

最近ノリが持つ健康食品としての優れた特性が相次いで発表され話題を呼んでいる。すなわち、ノリを食べると大腸癌の発生が抑えられ、タウリンが多く含まれ肝臓病が防がれる、各種ビタミンやEPA、ミネラル等が多く含まれており健康を維持するのに極めて有効であること。このように優れた栄養的価値を持つノリもあまりにも伝統食品としてのイメージが強すぎるのか、また今日の食品として要求されるファッション性に欠けるためか、長らく君臨してきた贈答品トップの座もだんだん怪しくなっている。元来ノリが持つし好品としての価値はあの独特の潮の香りと舌に載せた瞬間に伝わってくる渴いた甘味にあるものと思われる。多収性品種が全国的に用いられるようになり、ノリの味はだんだん薄れていったといわれている。今後はノリのおいしさの基となる特殊成分に焦点を当てて育種を行い、母なる海の香りを世の食卓に送り届けたいと思っている。

## 1. アマノリの生活史とその利用

ノリとして食用となる植物は分類学的にはアマノリ属植物である。そして、その植物の

半数染色体期 ( $n$ ) を利用している。真冬の海で北風に晒されて黒々と育つあの葉体が  $n$  であり、これが乾海苔となる。春先になるとこの葉体の上に雌雄細胞が形成され (種によって雌雄同株、異株いずれもあり)、これらが受精して果胞子が形成される。この果胞子は減数分裂すること無く、 $2n$  のまま発芽して糸状体となる。海ではこの糸状体は主に貝殻に穿孔して生育する。以前わが国の藻類研究者間ではステージが明確に捉えられず、夏ノリ説、休眠胞子説など激しい論議が戦わされたと聞く。



アマノリの生活史

1949年イギリスの Drew<sup>1)</sup> はそれまで別の海藻として扱われていたものが、実はノリの夏のステージであったことをつきとめた。これが糸状体期で  $2n$  の顕微鏡的な世代である。糸状体は貝殻のなかで秋を迎え、減数分裂を経て殻胞子を放出する。最近ある種類では減数分裂が殻胞子として放出されてから、発芽

後第1回、第2回目の細胞分裂のときに起こることが報告された。いずれにしてもこの殻胞子は発芽して $n$ の葉体となる。この殻胞子を人為的に養殖網に着生させることにより、いわゆる人工採苗が行われるのである。

## 2. ノリの育種と生産の飛躍

人工採苗（殻胞子付け）が可能になると、任意の個体群を選択的に種苗として扱うことができるようになる。すなわち、より大きく速く成長する個体に関心が集り、母藻として選抜して次代の糸状体を作るようになる。このようにして作りだされた多収性品種がオオバアサクサノリとナラワササビノリである。オオバアサクサノリは昭和37年頃愛媛県で、また、ナラワササビノリは昭和45年頃千葉県で、いずれも漁業者の手によって選抜分離された<sup>2)</sup>。これらの品種はいずれも細葉型で養殖網への着生密度を濃くできることと生長が速いことにより、導入前の約3倍もの生物生産量が確保された。

自然の状態ではアマノリ類の糸状体は貝殻のなかに潜って生育している。しかし、果胞子をシャーレやビーカーなどで発芽させると無基質状態の糸状体が得られる。この糸状体をミキサーで約50 $\mu$ mぐらいの長さに切断するとその各々は容易に再生する。すなわち、 $2n$ 世代のクローン個体が無数に得られるわけである。この切断片を海水で稀釈して貝殻の上に撒くと、糸状体はその中に穿孔し、いわゆるクローン種苗が得られる。このような技術を新しく開発された多収性品種に応用したため、これらの種苗はまたたく間に全国に広まり生産は飛躍するとともに、利用品種の寡占化が進んでいった。そして、製品品質が全国的に均一化していく傾向が伺われる。

## 3. バイテクの応用

ノリ養殖ではアマノリの $2n$ 世代である糸状体期をカキ殻の中に穿孔させて、春から秋口まで陸上施設で培養管理している。秋口にはこのカキ殻から殻胞子を得、養殖網に着生させて養殖を開始する。

葉体から得られるプロトプラストが容易に

個体へと再生するならば、これを養殖網に直接附着させ種苗として利用できる可能性がある<sup>3)</sup>。また、アマノリの葉体は凍結保存が容易である。実際の養殖では数週間から数カ月という短期間ではあるが、病害が蔓延したときや摘採回数が進み葉体が老化したときに新しく張り変えるための予備網として、育苗を終えた直後の新網を冷凍庫に保存している。この凍結保存法とプロトプラストの種苗化技術を結び付けることにより、糸状体期を養殖体系の中から省略でき、生産コストの低減が図られるものと思われる。

前述のごとく食用とされるアマノリの葉体は半数染色体期である。したがって、アマノリの品種改良を行う上で、交配によって得られる $F_1$ 世代の糸状体期を直接種苗として利用することはできない。利用するにはその次のステージとして得られる葉体群から必要な形質を持つ個体を分離し、自殖などにより遺伝子を固定させ、更にその実用性を確かめてからでなければならない。

細胞融合法では異なった個体を持つそれぞれの有用な形質を一代で兼ね備えるようにすることができ、極めて短期間のうちに全く新しい性質をもつ品種を作出できる可能性がある。このため交配の難しいアマノリの育種には極めて有効な手段といえる。

アマノリのプロトプラストを作出するには細胞壁を溶解できる酵素を見つけ出す必要がある。海藻の細胞壁を構成する物質は陸上植物とは全く違われ、海藻同士でも種によって全く異なる場合が多い。アマノリの細胞壁はタンパク質と3種の多糖類のマンナン、ポルフィラン、キシランからなる。

これらをそれぞれ特異的に分解する酵素は見つかっていない。そこで有効な酵素の検索として、海藻に病害をもたらす海中細菌と海藻を食用とする水棲動物の消化酵素に着目した。その結果アマノリに小孔をあける穴あき病原菌<sup>4)</sup>とアワビの内臓部のアセトン抽出物に含まれる粗酵素<sup>5)</sup>が有効であることがわかった。

アマノリのプロトプラストは作出されるものと葉体の部位の違いや培養開始時の培地、

培養条件の違いなどによって、再生される個体の形態が異なるようである。明確な因果関係は明らかとなっていないが、得られるものとして多層化した不正常的な根様系を持たない個体、ほぼ同じだが沢山の根様系を持つ個体、殻胞子発芽体や単胞子発芽体（二次芽）と全く同じ形の個体などがある。

細胞融合を行った融合体はプロトプラストと同じような発生を行うが、これらの個体について染色体数の変化あるいはその他のマーカーの確認などによって融合を確証するまでには至っていない。融合方法としてはこれまで主としてPEG法によってきたが<sup>5)</sup>、アマノリの場合この方法では二つの細胞が接着しても、続いて行うアルカリ性Caイオン液で洗滌する時に離れてしまう例が多く、融合方法の改善が望まれる。

最近電気融合法が多くの植物で試みられ、よい結果が得られている。アマノリを対象としてこの方法を試みた<sup>6)</sup>。これまで海藻のプロトプラストを得るには、海水をベースにした酵素液及び洗滌液を用いてきた。しかし海水は通電性が高く電気融合には使えない。そこでアマノリプロトプラストの淡水に対する耐性を調べることが必要となり、蒸留水に0.8～1モルのマンニトールを加えた液を用いて実験を行った。この結果アマノリは淡水中に約4時間放置しても再生することが明らかとなり、電気融合実験に十分耐えることが想定された。蒸留水を用いて電気融合を行った結果、PEG法に対し約10倍の融合率が得られた。特に、接合した二つの細胞に融合を開始させるキッカケとなるパルス電圧が極めて有効であり、ときに細胞壁の薄い残骸が若干残ることも見られるアマノリの細胞の融合には極めて有効な方法であることが明らかとなった（グラビアB面、左上）。

## むすび

当研究室がバイテク研究に初めて接したのは、昭和57年度に農林水産技術会議予算の別枠研究「細胞融合・核移植による新生物資源の開発」に参加したときである。アマノリの細胞壁を溶解する酵素など見当もつかなかった当初からすれば、どうにかアマノリの融合産物が得られ、その発芽体も得られるようになったこれまでの成果は十分評価されるべきであろう。しかし、本当の意味での育種につながるような研究はこれからである。アマノリをはじめ有用海藻について具体的な育種目標を設定し、それに沿ってバイテク研究を進めていくことが大切なのであろう。幸い海藻のプロトプラストは細胞分裂能に優れ、再生個体が容易に得られる特徴をもっている。すなわち、遺伝子の変異技術を試みるにはまたとない材料であるといえる。しかも海藻は太陽エネルギーと限りない海の生産力を利用して、ほとんど人手をかけることなく育てることができる。いわばバイオマスとして大いに期待できる未来植物である。このような海藻に対し陸上植物の遺伝子を移植してやることにより、人間にとってより利用しやすい産物を海から生産することができるようになるのではないだろうか。

そんな夢へ向けての第一歩としてアマノリの細胞融合技術が位置づけられれば幸いである。

## 文 献

- 1) Drew, K.M.(1949) *Nature* 164, 748
- 2) 三浦昭雄(1975) 第3回国際海洋開発会付録 3: 81
- 3) 鬼頭 鈞(1985) 研究ジャーナル 8: 20
- 4) Hayasi, S., Sakata, T., Oshiro, Z., Kito, H. (1984) *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 33: 107
- 5) 藤田雄二・右田清治(1987) 藻類 35: 201
- 6) 鬼頭 鈞(1987) 日水会秋季大会要旨

## 国内情報

# 土壤病害の総合防除のための圃場カルテシステム——ハクサイ根こぶ病を事例として

農林水産省農業研究センター

駒田 旦

## はじめに

近年野菜産地では、程度の差こそあれ、土壤病害を主たる要因とする連作障害問題を抱えており、ために産地崩壊の危機に直面している事例も決して珍しくない。

農業研究センタープロジェクト研究第2チームでは、このような現状に対処するため、土壤病害多発生の原因を明らかにするとともに、土壤病害対策の方法論を確立することを目的として、現在多くのハクサイ産地で問題になっている根こぶ病を対象として、準高冷地野菜産地である長野県小諸市においてケーススタディを行ってきた。本研究では、農業研究センター病害虫防除部、野菜・茶業試験場環境部、長野県野菜花き試験場が参画して、文字通りのプロジェクト研究が実施されてきた。その結果、このほどその最初の成果品として、ハクサイ根こぶ病総合防除のための圃場カルテシステムが一応の完成をみた。

## 1. 土壤病害多発生の原因

なぜ、今日このように、多くの産地で種々の作物に土壤病害が激しく発生し、しかも技術の進歩にもかかわらずその勢が衰えを見せないのだろうか、その原因を考えてみることにしよう。

原因の最大のものが連作であることには疑う余地はない。同一種類の作物の連作は、1作ごとにその作物を侵す病原菌の土壤中の密度の増幅をもたらす。また多犯性の病原菌による病害にあつては、病原菌を共通にする宿主作物の連作（見かけ上は輪作）も同じ結果をもたらす。これは病気に罹った作物体で増殖した病原菌が、作物の遺体と共に土壤中に還元され蓄積される、いわば貯金が増えるこ

とによるのである。しかも、土壤病害の病原菌（以下土壤病原菌）の多くは、宿主作物の圃場でない期間、土壤中できき永らえるのに適した耐久生存器官を形成するので生存期間は極めて長く、ひとたび密度が高まってしまうと容易に低下することなく、同じ畑に常に、あたかも風土病のように発生することになる。

第二の原因としてあげられるのは、今日の野菜栽培をめぐる環境が土壤病害の発生の誘因を形成している場合があまりにも多く、しかも困ったことに、その多くは野菜栽培にまつわる農家自身の行動と密接な関係にあることである。このことを少し具体的に説明しよう。図1は土壤病害の発生要因の相互関係を示しており、この図では土壤病害の被害量は病原（主因）と宿主作物の感受性（素因）、そして両者を取りまく環境要因（誘因）という三つの変数をもつ関数として表されている。

土壤病原菌の生存や活動として作物の土壤病害に対する感受性はともに環境要因の直接あるいは間接の影響を強く受ける。ひと口に環境といっても、それはこの図に示すように、気象、地形、土壤といった自然条件に始まり、その上に営まれる農耕に伴う作付体系、農業、農機具、肥料などの栽培条件、また労働力、意欲、市場性、立地などの社会・経済的条件に至るさまざまな要因が、互いに関連をもちながら主因（病因）と素因（作物）の双方に影響して土壤病害の被害をもたらす重要な役割を演じる。

自然条件は産地形成の段階でかなりの部分が運命づけられるので、受動的要因ともいうことができる。しかし、栽培条件はことごとく農家自身の選択の範囲内にある。しかも各要因はすべて何らかの形で目的とする野菜の栽培に関わる技術そのものであり、それら技



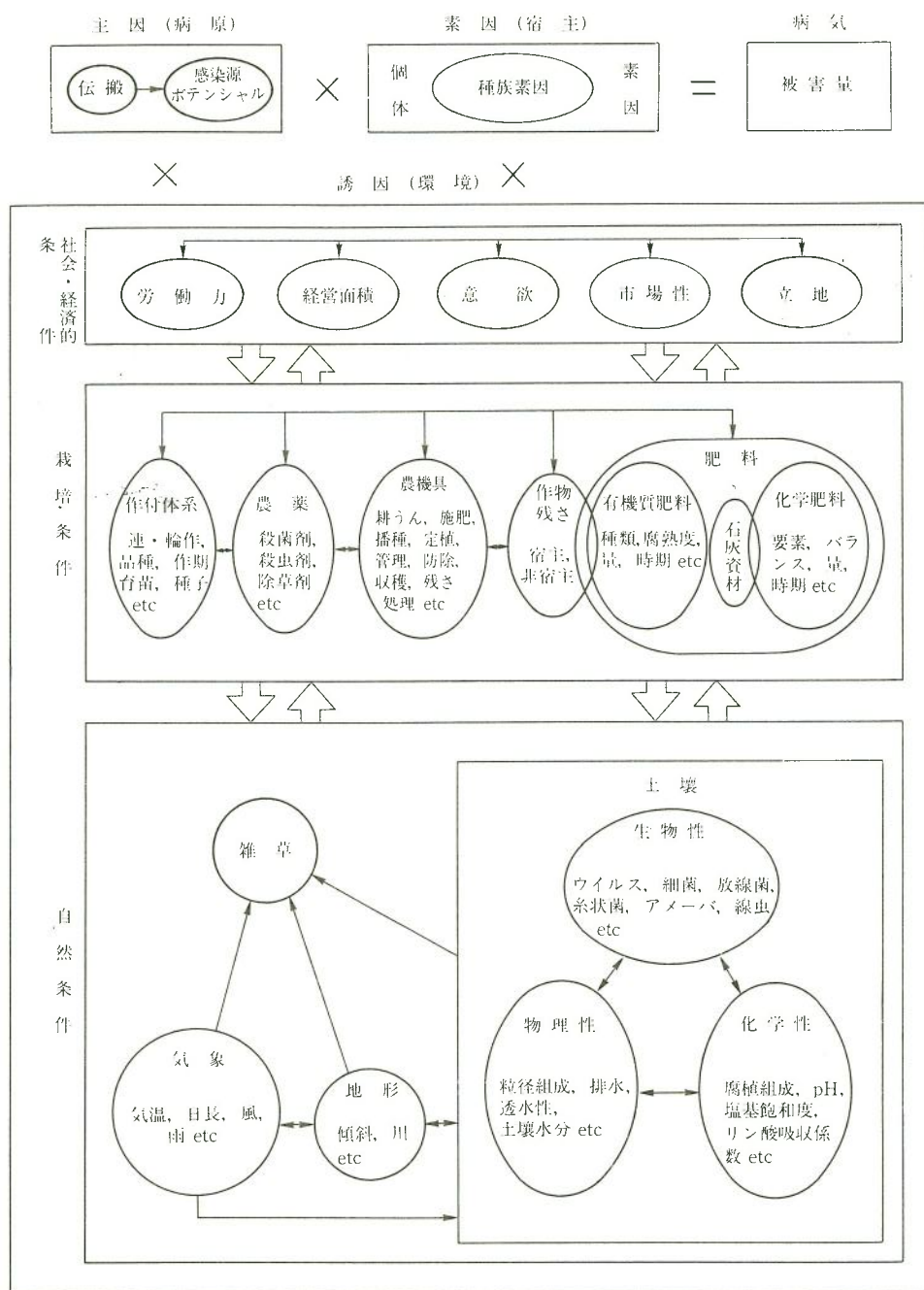


図1 土壌病害の発生要因の相互関係

術の選択のいかにが土壌病害発生の多少を支配するといえることができる。社会・経済的条件にしても、栽培条件と同様農家自身の意志により決定される性格が強く、これら要因のすべてが大なり小なり土壌病害の発生の多少を支配するといえることができる。

ところが、今日の野菜生産の現場においては、目先の経済性の追求という哲学がすべてに優先して、土壌病害問題は産地崩壊の瀬戸際に追い込まれて初めて顧みられる場合が多い。しかしこれでは手遅れなのである。「土

壌病害は man-made disease (人によって作られた病気)」ということが一向に理解されていないのである。

第三の原因としては、土壌病害防除の特異性についての認識が不十分で、適切な対応がなされていないことがあげられる。空気伝染性の地上部病害の場合には、病害を発生初期に発見して適切な防除を行うことで実用的には防除が可能である。ところが土壌病害の場合には、一たん作物の地上部に症状が現れると、それは氷山の一角であって既に地下部

は予想外に侵され、しかも圃場のかなりの部分に被害が及んでいることが多い。発生してしまったらあとは施すすべがないということから、土壌病害の防除対策はほとんどすべて、作物の作付け前に処置されなければならない。

さらに、地上部病害の場合、発生予測とそれに対応した防除対策は、地域単位や産地単位に広汎で、不特定多数の圃場を対象とした平均的技術で十分な実用的効果が期待できる。ところが土壌病害の場合には、発生程度は圃場ごとに異なり、しかも発生に関与するさまざまな要因はすべて圃場ごとに異なっている。したがって、作付に先立って行う次作の発生程度予測や、それに対応した防除対策は圃場単位にきめ細かく異なったものでなければならない。

地上部病害の場合、野菜の生産現場では薬剤防除はしばしば唯一無二の防除手段となり、薬剤防除を中心とした少数の技術の適用で十分な実用的防除効果が期待できる。ところが土壌病害の場合、一般に薬剤防除は極めて困難であり、その他の防除技術においても単一の防除技術の適用で功を奏することはおよそまれである。

## 2. 圃場カルテシステムとは

以上、三つに大別して述べた土壌病害多発の原因から、土壌病害防除の理想の姿とは次のようなものであるといえる。「連作を避け残渣処理を行うなど土壌病原菌の土壌中の密度が高まるのを防ぎ、土壌病害の発生の誘因となるような栽培管理を避けて、土壌病害の発生を抑えるようなさまざまな技術を、圃場単位に次作で予想される発生程度に応じて、作付に先立って適用する。」

この理念に基づいた、土壌病害の総合防除のための圃場カルテシステムの大略は次のようなものとなる。すなわち、産地内の全圃場について圃場ごとに、①土壌検診・診断によって、土壌中の病原菌密度、土壌の物理・化学的諸要因、土壌微生物等に関する情報、②農家へのアンケート等によって、経営、経済・社会的環境、栽培条件、自然条件等に関

する情報、さらに③航空機によるリモートセンシングによって、土壌病害の種類と被害程度、作付体系、土壌水分、土壌型、地形等に関する情報を収集して、圃場カルテデータベースを作る。次にそのデータをもとに、個々の圃場の土壌病害の発生要因の解析と次作における発生程度予測を行い、他方個別防除技術の評価を行って、予測された発生程度に応じた適切な総合防除技術を策定し、その経営的評価を行い防除指針を提示する。

## 3. 圃場カルテシステム、ハクサイ根こぶ病の場合

ハクサイ根こぶ病総合防除のための圃場カルテシステムは、①根こぶ病の発生予測と総合防除技術の策定のために必要不可欠な、圃場ごとの情報を集積した圃場カルテデータベースの管理を行う、「圃場カルテデータ処理サブシステム」、②現在根こぶ病の防除に当って有効と考えられている、輪作、土壌酸度の矯正、薬剤防除、土壌消毒ならびに移植栽培などの個別防除手段の効果を評価する、「個別防除技術サブシステム」、③気象条件、病原菌の密度、そして個別防除技術の事前評価に基づいて個々の圃場ごとに次作の根こぶ病の発生と被害程度を予測する、「根こぶ病発生予測サブシステム」、④対象圃場の根こぶ病の防除に当って農家が実施を予定している個別防除技術の効果ならびにその問題点を経済的に明らかにし、予測される発病程度のもとで合理的と考えられる個別防除技術の組み合わせ、さらにはハクサイ生産の収益性分析結果を農家に提示する、「総合防除技術策定サブシステム」という四つのサブシステムから構成される。

図2は、根こぶ病に対する個別防除技術の効果の評価と発生予測に関するサブシステムの全体構造を示す、また図3は合理的総合防除技術の策定に関するサブシステムの処理概要を示すフローダイアグラムである。「総合防除技術策定サブシステム」の開発に当っての基本理念は、過剰防除を排除し、発生程度に応じた適切な個別防除の組み合わせを、経済的な視点から明確にし、産地の安定的発展

を図るという点に置いた。

なお、本システムの予測力は十分満足のいく精度を示しており、発生程度と経済性を考

慮した個別防除技術の選択法についても、実用性の高いことが、前記の本研究の実証対象地において確認された。

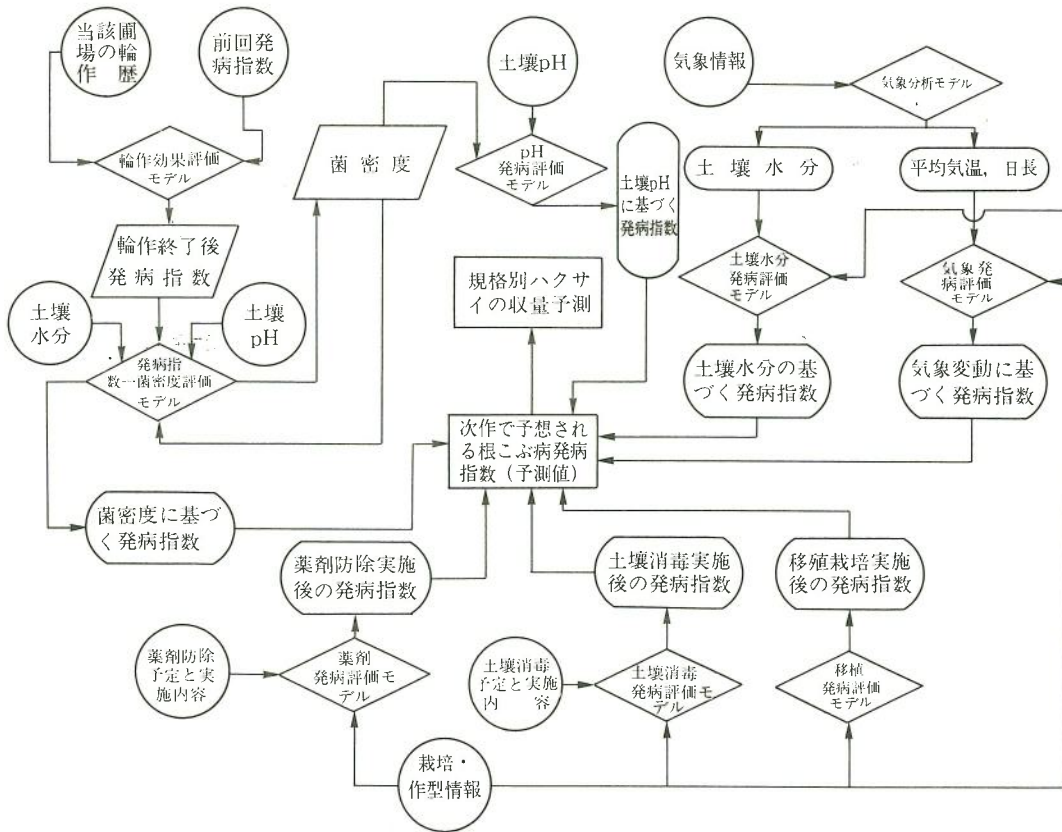


図2 ハクサイ根こぶ病発生予測モデルの概要

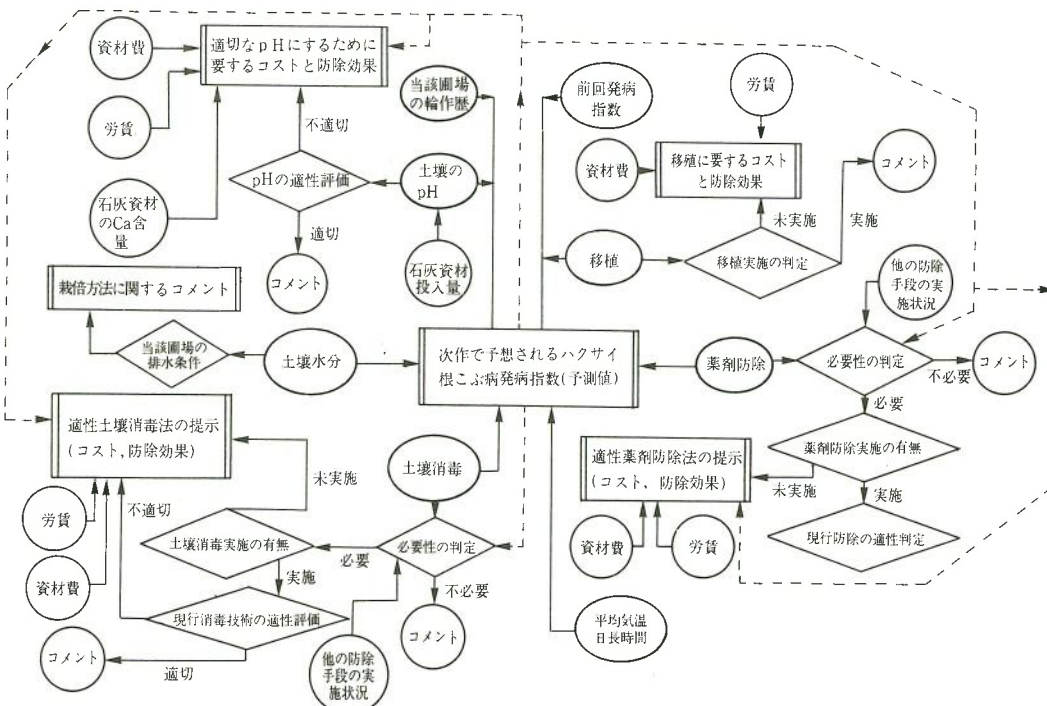


図3 ハクサイ根こぶ病総合防除技術確定のためのサブシステム

#### 4. 圃場カルテシステムの適用

昨今、普及所、防除所、農協という技術の伝達ネットワークは急速に広域化しており、往時のような農家へのスキンシップによるきめ細かな技術伝達はもはや期待するのは困難にさえなりつつある。土壤病害防除にとって、これが由々しい問題となることは前述のことから想像できよう。

圃場カルテシステムは、そのような欠陥を埋める役割を、コンピュータの助けを借りて

果そうとするものである。ハクサイ根こぶ病を対象としたシステムにあっては、農家、農協、農業改良普及所レベルでパソコンを用いて容易に操作できるように構築してあるので、野菜の生産現場における技術指導、生産計画策定のための支援システムとして有益に活用されることであろう。なお圃場カルテシステムの理念は、昭和62年度から農林水産省の行う「野菜産地総合診断対策事業」にとり入れられ、全国の主要産地でモデル的に導入されることになった。

#### 国内情報

## トマトのプロトプラスト培養

農林水産省野菜・茶業試験場

坂田好輝

高等植物には、単細胞から出発して、完全な元の植物体に復元できる力、つまり全能性 (totipotency) があることは古くから知られている。さらにその全能性は、細胞壁が取り除かれたプロトプラストの状態にあっても、発揮されるということを示し、1971年に長田ら<sup>1)</sup>は、タバコを用い証明した。以来、タバコやペチュニアをはじめとするナス科野菜やアブラナ科植物を中心に、プロトプラスト培養技術が、次々に確立されていった。プロトプラスト培養を利用することにより、細胞選抜、細胞融合、遺伝子導入などの技術がより可能性を増し、今後の植物の遺伝的改良にとって、新しい道を拓いたといえる。

とはいえ、全ての植物において一様に、プロトプラスト培養は容易である訳ではなく、木本類や、単子葉植物等では、現在なお困難なものが多い。その中で、世界の主要穀物のイネやトウモロコシでは、各国の多大な研究努力が払われたことにより、イネでは1985年<sup>2)</sup>、トウモロコシでは1987年<sup>3)</sup>に、それぞれようやくプロトプラストから植物体を再生することに成功した。

イネと同様にトマトについても近年まで、

プロトプラスト培養は困難なものとされていた。トマトは、世界的に最も重要な野菜の一つであると同時に、植物学的にみても、充実した遺伝子地図を持つことや、様々な遺伝的系統を持つことなど、農学、植物学の立場から、研究対象として、きわめて価値の高いものである。またトマトは、タバコと同じナス科植物であるため、技術的には比較的容易であると考えられ、数多くの研究者らがプロトプラスト培養を試みてきた。

トマト属 (*Lycopersicon*) のプロトプラスト培養が、最初に報告されたのは1977年のことである。Zapataら<sup>4)</sup>は、トマト近縁野生種の *L. peruvianum*——栽培トマトの各種病害に対し抵抗性を持ち、トマトの育種親としてしばしば用いられる——を材料とし、プロトプラストを単離し、植物体にまで復元させた。以来、この近縁野生種では、数多くの報告がなされ、わが国でも、1983年に今西ら<sup>5)</sup>が、1985年に坂田ら<sup>6)</sup>が、それぞれ植物体の再分化に成功した。

1977年の *L. peruvianum* の成功以来、栽培トマト (*L. esculentum*) においても、プロトプラスト培養は多数試みられた。プロトプラ

ストからカルスまでの誘導は比較的容易であったにもかかわらず、カルスから莖葉の再分化には至らなかった。1982年になってから、Morganら<sup>7)</sup>や、Koblitsら<sup>8)</sup>により、それぞれ独立して、莖葉の再分化に初めて成功した。タバコでの成功から11年目のことである。しかし、それらの実験系の再現性は低いものであった。その後さらに検討が重ねられ、1985年、Shahin<sup>9)</sup>や、Niedzら<sup>10)</sup>により、また1987年、坂田ら<sup>11)</sup>により、培養方法が確立され始め、現在やっと再現性のある実験系となってきたといえる。

ここでは、栽培トマトにおいて、筆者らがやっている葉肉プロトプラスト培養方法を中心に述べるが、基本的な技術は国外で開発されたものも多い。わが国でのトマトのプロトプラスト培養は、今、ようやく緒についた段階といえる。

## 1. プロトプラストの単離

### 1) 材料と酵素前処理

プロトプラスト培養の成功は、高い活性を持つプロトプラストを単離できるか否かにかかっているといても過言ではない。プロトプラストの活性は葉位、葉令、品種、生理状態によって大きく変わる<sup>12)</sup>。筆者らは、できる限り活性の高いプロトプラストを得るために、25°C、2000lux 16時間日長で、10~14日間無菌的に育てた植物の子葉のみを材料として用いている。また、酵素処理に先立って、カルシウム塩を含む0.4~0.5Mのマンニトール液に、葉片を1時間程度浸漬し、原形質分離処理を行い、細胞壁と細胞膜とを分離しておく、プロトプラストの収率は向上し、酵素処理時間も短縮できる。さらにShahin<sup>9)</sup>は原形質分離処理に先立って、暗黒処理及び低温処理を行い、好結果を得ている。

### 2) 酵素処理

葉肉プロトプラストの単離には、細胞単離酵素として、ペクトリアーゼY-23 (0.1%)、マセラゼ (0.1%)、マセロザイム (0.1%) 等、また細胞壁消化酵素として、セルラーゼYC (0.5%)、セルラーゼRS (0.5%)、セルリシン (0.6~0.75%)、メイセラゼP

(3%) 等が主として用いられる。酵素処理時間は、振とう条件や使用する酵素の種類によって異なるが、40~60spm位のゆっくりとした振とう条件の場合は、4~6時間、静置の場合は12~18時間が目安である。従来タバコ等で行われてきたような比較的速いスピードで振とうし、短時間で単離する方法は、トマトの場合、プロトプラストが壊れ易く、また活性も低下するため好ましくない。筆者らは、ペクトリアーゼY-23、セルラーゼYCを用い、40spmとゆっくり振とうし、4時間かけて活性の高いプロトプラストを単離している。

## 2. プロトプラストの培養

### 1) コロニー~カルスの誘導

プロトプラスト培養において、活性の高いプロトプラストを単離することと共に重要なことは、適切な培地を用いることと適切な環境条件を与えてやることである。表1にトマトの葉肉プロトプラスト培養においてコロニー誘導に用いられる培地組成例を示した。この中でポイントとなる点を挙げると、まず(1)硝酸アンモニウム(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)をできる限り少なくすること、次に(2)8P<sup>13)</sup>培地や、TM-2培地<sup>9)</sup>のように、有機物を豊富に含む培地を用いること、さらに(3)オーキシシンとしてNAAや2,4-Dを0.5~1.0mg/l、サイトカニンとしてBAやゼアチンを0.5mg/l程度添加することなどが挙げられる。また、プロトプラスト同士の凝集を回避するため低濃度のアガロースを添加したり、寒天中にプレートする方法も効果的である。

初期培養の温度は27~29°C程度とし、光は全く与えない。25°C以下、また30°C以上の培養温度では細胞分裂はほとんど起こさず、また、光は阻害的である<sup>12)</sup>。

プロトプラスト単離後、1~2日目には細胞壁の再生が認められ、早いものでは2日目、遅いものでも7日目には細胞分裂が起こる。

1~2回の細胞分裂後、単離後約10日目に、25°C 300 luxの条件下に移し、さらに4日ごとにマンニトールを含まない培地を加え、浸透圧の調整と養分補給を行う。この25°C、

表1 トマト葉肉プロトプラスト用培地組成

報告者	発表年	有機物	有機物	IAA	NAA	2,4-D	BA	ゼアチン
Morganら <sup>7)</sup>	1982	MS <sup>a</sup>	B5 <sup>b</sup>	2.0			2.5	
Shahin <sup>9)</sup>	1985		TM-2 <sup>c</sup>		1.0			0.5
Niedzら <sup>10)</sup>	1985		8E <sup>d</sup>		1.0	1.0	0.5	
Sakataら <sup>11)</sup>	1987	修正MS	8p <sup>e</sup>		1.0		0.5	
Tanら <sup>14)</sup>	1987	修正B5	8p		1.0	0.5	0.5	

a: Murashige &amp; Skoog(1962)

b: Gamborg(1968)

c: Shahin(1985)

d: Niedz *et al.*(1985)

e: Kao &amp; Michyluk(1975)

300 lux への培養条件の変更と培地の添加を行わないと、コロニーの褐変が起り、やがて枯死する。単離後30日目には、白色の0.5~2.0mmの小カルスになる。

### 2) 茎葉再分化

1982年のMorganらの成功以前には、このプロトプラスト由来カルスからの茎葉再分化過程こそが、長い間ネックにされていた。

Morganらはまずトマト14品種を用い、再分化能力のスクリーニングを行った。その中で能力の高かった品種Lukullusを用いたことによって、再分化への壁を打ち破ることができたのであった。

筆者らは、近縁種の *L. peruvianum* のプロトプラストで得られた知見を基に改良を加えた方法を用いたことによって、幸いにもこの再分化過程はスムーズにクリアできた。直径1mm程度の健全な小カルスさえ誘導できれば、後は、ゼアチン及びジベレリンを添加したMS培地に移植することにより、20%程度のカルスは、肥大、緑化、そして茎葉を再分化する。この方法ではプロトプラスト単離から再分化培地に移植するまでに要する期間は約1カ月間と短く、このことが、再分化能力を保持したカルスを誘導できる理由の一つと考えられる。カルスからの茎葉の再分化には、前歴、例えばホルモンの種類、濃度、また培養温度などの影響が大きいものと思われる。

### 3) 発根、順化、鉢上げ

再分化培地に移植して約1カ月後にはシュートが伸び、ホルモンフリーの発根培地に移せる状態になる。

十分に発根したものから順化、鉢上げできるようになるが、トマトでは順化時に失敗することも多いので注意を要する。

以上、栽培トマトにおけるプロトプラスト培養について、筆者らの行っている方法を中心に概略を述べてみた。バイオテック時代といわれて久しいが、単にプロトプラスト培養ができるようになったからといって、直ちにこれが品種改良に結び付く訳ではない。とはいえ、このような研究の積み重ねが“明日のトマト”になるものと信じている。

## 文 献

- 1) Nagata, T. & Takebe, I. (1971) *Planta* 99: 12-20
- 2) Fujimura, T. *et al.* (1985) *Plant Tissue Culture Letters* 2: 74-75
- 3) 人民日報. (1987)
- 4) Zapata, F.J. *et al.* (1977) *Plant Sci. Lett.* 8: 119-124
- 5) Imanishi, S. & I. Hiura (1983) *Jap. J. Breed.*, 33: 359-368
- 6) 坂田ら (1985) 野菜試報 A 13: 11-19
- 7) Morgan, A. & E.C. Cocking (1982) *Z. Pflanzenphysiol.* 106: 97-104
- 8) Koblits, H. & D. Koblits (1982) *Plant Cell Reports* 1: 143-150
- 9) Shahin, E.A. (1985) *Theor. Appl. Genet.* 69: 235-240
- 10) Niedz, R.P. *et al.* (1985) *Plant Science* 39: 199-204
- 11) Sakata, Y. *et al.* (1987) *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 56: (in press)
- 12) 坂田ら (1987) 園芸学会秋季大会発表要旨
- 13) Kao, K.N. & M.R. Michyluk (1975) *Planta* 126: 105-110
- 14) Tan, M.M.C. *et al.* (1987) *Plant Cell Reports* 6: 172-175

## 国内情報

# アブラナ科野菜の葉肉プロトプラストからの植物体再生条件

農林水産省野菜・茶業試験場  
山岸 博

## はじめに

組織・細胞培養技術及び遺伝子操作技術の急速な発達に伴い、いわゆるニューバイオテクノロジーが植物の育種において大きく貢献するという期待が広く持たれるようになった。しかしながら、細胞融合や遺伝子組換え等の技術を効果的に植物の育種に結びつけるためには、対象とする作物でプロトプラストからの植物体再分化系を確立しておかなくてはならない。

農水省では昭和57年から5年間「細胞融合・核移植による新生物資源の開発」に関するプロジェクト研究が行われたが、野菜・茶業試験場育種部では、上述の観点から主としてプロトプラストからの植物体の再分化条件の解明に力点が置かれた。この過程で、特にアブラナ科野菜についていくつかの知見が得られたので以下に紹介したい。

## 1. プロトプラストの単離と培養

アブラナ科野菜においては、すでに多くのプロトプラスト培養に関する研究があり、また細胞融合による体細胞雑種作出の報告も行われている。しかし、これらの再分化例を比較すると、プロトプラストの培養に用いた培地組成が大きく異なっており、さらに再分化に成功した培地組成がどのような比較検討の結果見出されたかも必ずしも明確でない。

プロトプラストの最適な培養条件を明らかにするためには、まず活性のあるプロトプラストを安定的に大量に単離することが大切である。従来は温室等で育苗された植物体を材料としていたことが多かったために、育苗環境によってプロトプラストの収量に大きな差が生じ、また滅菌操作によってプロトプラ

ストの活性が落ちていた。このような問題を回避するために、対象植物の種子を滅菌して播種し、培養室で無菌的に育苗した植物を材料とした。これによって、いつでも安定して活性のあるプロトプラストが得られるようになった(表紙右下)。

こうして得られたプロトプラストを用いて、植物体再分化までの好適培養条件の検討がなされた。プロトプラストの単離から植物体再生に至る過程では、図1に示すように、液体培地でのプロトプラスト培養によるコロニー形成(3,4)、プロトプラスト由来コロニーのカルス化(5)及びカルスからの茎葉再分化(6)の3段階が重要なステップとなり、それぞれについて培養条件の検討が必要であった。

1. 無菌植物を育成する
- ↓
2. 無菌植物の葉からプロトプラストを単離する
- ↓
3. プロトプラストを液体培地中で培養する
- ↓
4. 新しい培地を補給する(2~3回)
- ↓
5. コロニーを培養液とともにカルス化用寒天培地に移す
- ↓
6. カルスを再分化培地に移植する
- ↓
7. 茎葉を発根培地に移植する

図1 アブラナ科野菜におけるプロトプラストから植物体再生に至る操作

## 2. プロトプラストからの植物体の再生条件

まずプロトプラストの分裂に及ぼす培地組成の影響を検討したところ、通常の Murashige & Skoog 培地(以下MS培地)ではプロトプラストの分裂にはやや無機塩濃度が高

すぎ、1/2又は1/4濃度にうすめた培地の方が分裂に効果的であることが認められた。しかもMS培地の無機塩のうち、特に $\text{NH}_4\text{NO}_3$ の濃度が分裂に大きく影響し、通常の濃度(1650mg/l)を含む培地では分裂率が低く、200~400mg/lに希釈したときに分裂率が高かった。これらのことは調査したすべての*Brassica*属植物に共通して認められた。次にプロトプラストの分裂に及ぼす植物ホルモンの効果を見ると、オーキシン類にNAAを用いた場合ハクランでは10mg/lが、またキャベツやハクサイでは2~5mg/lが好適濃度であり、植物種によって多少の差はあるが全般に高濃度のオーキシンが効果的であった。これに対してサイトカイニン類の濃度の差は、プロトプラストの分裂頻度にさほど大きな影響を与えず、0.5~1mg/lの範囲で効果的であることが認められた。

ところが、プロトプラストの初期分裂に効果的な高濃度のオーキシンを含む培地は、プロトプラストのその後の分裂とコロニー形成にはむしろ阻害的に働き、より低濃度のオーキシン(0.5~1mg/l)が適することが明らかになった。これらのことから、図1の3で比較的高濃度のオーキシンを含む培地を用いてプロトプラストの初期分裂を誘起し、その後に添加する培地(図1の4)には低濃度のオーキシンのものを用いることによって、高い初期分裂率を効率的にコロニー形成に結びつけることができるものと考えられた。

このようにして得られたコロニーを寒天培地に移植することによって(図1の5)、コロニーからのカルス形成が認められる(表紙左下)。

一般に植物のカルス化には培地中の植物ホルモンの濃度が影響し、オーキシン濃度のサイトカイニン濃度に対する比率が高い場合にカルス化が起りやすい。アブラナ科野菜でもオーキシン濃度がサイトカイニンのその2倍程度のときにカルス化が進みやすいことが認められた。しかしながら、このカルス化培地におけるオーキシン濃度が後にカルスを再分化培地に移植したときの茎葉の再分化率に影響することが認められた。

例えばキャベツについてカルス化培地中の2,4-D濃度の、茎葉再分化率に及ぼす効果を比較すると、2,4-Dが0.5mg/lの培地に由来するカルスの方が2mg/lの培地に由来するカルスよりも再分化率が高かった。また、カルス化培地中のカイネチン濃度が高いほど、茎葉の再分化率が高いことが認められた。

これらのことから、プロトプラスト由来のカルスは、1mm以下の小さい段階ですでに、好適条件下では茎葉再分化の方向に向かって動き始めており、これらが新たに再分化培地に移植されることによってすみやかに茎葉を分化させるものと考えられた。

再分化培地での植物ホルモンには、オーキシン類を除いてサイトカイニン類を添加したものが用いられ、主としてBA又はゼアチンを1~2mg/l添加した培地が再分化に効果的であった。しかしアブラナ科の植物種によって最適なサイトカイニンの種類と濃度に若干差のあることが認められた。

以上のように、アブラナ科野菜のプロトプラストから植物体再生に至る一連の培養過程で、効率的に再生植物を得る条件、とりわけ植物ホルモンの種類と濃度が明らかにされ、培養の比較的早い時期のホルモン組成が最終的な再分化率に大きく影響することが認められた。これらの知見に基づいて野菜・茶業試験場ではアブラナ科野菜の多くの種類についてプロトプラストからの植物体再生に成功し(表紙中央)、またハクサイ類とキャベツ類の体細胞雑種も得ている。

今後、更に多くの種属間で体細胞雑種を得るとともに、これらプロトプラスト培養技術も遺伝子操作等の技術と結びつけ、野菜の育種研究に役立てようとしている。

なお、これらアブラナ科野菜の葉肉プロトプラストからの植物体再生条件についての詳細は以下の論文を参照願いたい。

## 文 献

- 1) 西尾 剛, 山岸 博, 高柳謙治(1986)アブラナ科野菜葉肉プロトプラストの初期培養条件に関する研究, 野菜試報 A14: 11-20
- 2) Nishio, T., H. Yamagishi and K. Takayanagi



(1987) Shoot regeneration capacity destined at an early stage of protoplast culture in cabbage, *Japan J. Breed.* 37: 22-28

3) 山岸 博, 西尾 剛, 高柳謙治 (1987) ハクサイ葉肉プロトプラストからの植物体再分化, 園芸学会雑誌 (投稿中)

## 国内情報

# かんしょ塊根裂開症の原因と対策

農林水産省農業研究センター  
古明地通孝

## はじめに

青果用のかんしょは、いもの大きさのほか、形や皮色で品質規格が決まり、規格による価格の差がいちじるしい。いもの外見的な異常症により商品性が失われるが、塊根の表面が縦方向に割れたりくぼんだりする裂開症(グラビヤ写真1)も問題となっている。

アメリカではこの種の症状を cracking と称し、塊根の中心柱の肥大による内圧に外側組織が耐えられず裂開すると推察されている。一般的に窒素過多、湿度不足、あるいは石灰過剰などで発生が多いとされている。また、線虫防除で減少するとか、ほう素欠乏が原因とする説などがある。

わが国でも、古くから裂開病、あるいは亀裂ともよばれ、温度、湿度等の環境激変による内圧の高まり、土壌水分の急激な過不足などが原因と考えられてきた。また、品種では沖縄100号に裂開が多いことが示されている<sup>1)</sup>。発生の原因や機構等について、なお、不明確な点が多いことから、農業研究センターで裂開症の発生実態を調査し、原因を検討したのでその概要を紹介する。

## 1. 生産地における裂開症の発生実態

全国のかんしょ生産地の農業改良普及所にアンケート調査をした結果(70カ所)、裂開症は四国では60%と少ないが、他の地域では90~100%のところでは発生をみている。発生は古く、この症状にたいして、地方により、われ、くぼみ、女いも、桃割れ、わらいいも、

へこみ等とも呼ばれている<sup>2)</sup>。

## 2. 裂開症発症率の品種間差

最近、品種の裂開症の発症が多いのかどうか知るために、表1に主要品種の発症率を示した。沖縄100号、コガネセンガンは発症率が高かった。ベニアズマのポリマルチ栽培もやや多かったが、高系14号、紅赤、ベニコマチ等は0~5%の発症率で、現在普及している青果用の品種にとくに多いわけではない。

表1 主要品種の塊根裂開状況(1983年)

品種名	無マルチ		ポリマルチ	
	調査個数	裂開発症率	調査個数	裂開発症率
沖縄100号	28個	25.0%	32個	43.8%
コガネセンガン	22	22.7	16	31.3
高系14号	23	4.4	29	3.5
紅 赤	28	0	37	2.7
ベニコマチ	19	5.3	26	3.9
ベニアズマ	25	4.0	28	14.3

(小柳のデータより抜すい)

## 3. 実験室条件での裂開発症要因の解明

一葉挿し栽培で、発症の時期、条件等を検討した。

### 1) 裂開症状の特徴と生育に伴う変化

挿苗30日後に直径2mm以上の根について裂開の症状を区分すると、表2に示す白色裂開、白色偏平、赤色偏平(いずれも仮称)の症状があり、それらをグラビヤ写真2に示した。

適温で、水分を一定にした条件下で裂開の症状を追跡調査したところ(図1)、挿苗20日後には、すでに白色裂開がみられ、塊根数割合で38%と比較的多かった。挿苗25日後には、

表2 塊根裂開の症状 (品種, ベニアズマ)

症状	形状	裂開面または発症部位の色	組織学的特徴
白色裂開	塊根の表面がクサビ型に裂開	白色	裂開が一次形成層を切断することが多い。周皮欠除
白色偏平	塊根の表面が紡錘形につぶれたようにみえる	白色	周皮, 皮層, 一次形成層が欠落することもある
赤色偏平	同上	赤色または褐色	周皮, 皮層, 一次形成層あり

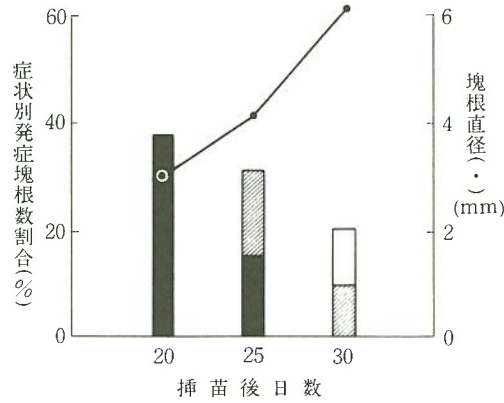


図1. 温度 (28/10℃) 及び水分一定条件における裂開症状の推移 (小柳ら)

注) ■: 白色裂開, ▨: 白色偏平  
□: 赤色偏平

白色裂開は15%に減少し, 代わって白色偏平が認められた。さらに, 挿苗30日後には, 白色裂開はみられなくなり, 白色偏平と赤色偏平が10%ずつとなり, 両者を合計した異常症率も挿苗20日後よりも少なくなった。これらの現象から, 塊根形成の初期に肥大がよければ, 通常的环境条件で, かなりの高率で裂開が生じ, 白色偏平, 赤色偏平を経て治癒していくものと考えられる。

2) 裂開誘起後の低温・乾燥と異常症状

さきの実験 (図1) と同じ条件で挿苗25日まで養成し, それから10日間, 低温 (昼16℃, 夜12℃), 乾燥 (ポリエチレングリコール10%溶液で水分吸収を阻害) および低温乾燥処理を行った。図2に示すように, 挿苗25日後における白色裂開は46%であったが, 無処理区では, 挿苗35日後には白色裂開はなくなり, 代わって, 白色偏平と赤色偏平とが認められ, 治癒過程にあることを示唆した。一方, 低温処理では挿苗35日後に白色裂開が42%, 乾燥処理では17%, 低温乾燥処理では50%が認められた。これらのことから, 低温, 乾燥などの条件は裂開を誘起する要因としてではなく, 裂開した組織の治癒を抑制する要因として作用するものと考えられる。

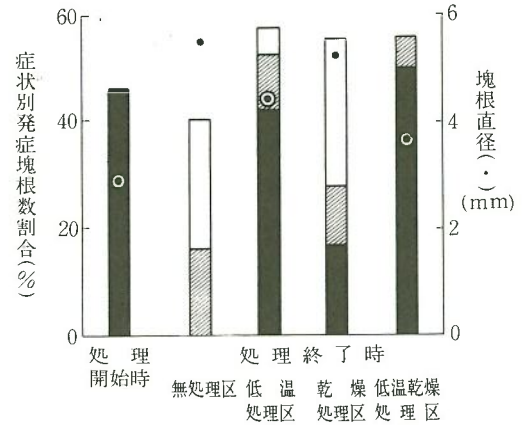


図2. 裂開誘起後の低温・乾燥条件と異常症との関係

注) 1. 処理期間: 挿苗25~35日目  
2. 症状区分: 図1に準ずる

4. 圃場における裂開発症の様相

紅赤, 高系14号, ベニアズマの3品種を用い, ポリエチレンフィルムマルチ (以下ポリマルチと称する) および無マルチで5月9日に挿苗し, 塊根形成初期 (挿苗5週間後) の裂開発症とその後 (挿苗10週間後) の症状の変化を追跡調査した。

図3に示すように, 挿苗5週間後には, 各区に白色裂開がみられたが, 10週間後には全く認められなくなった。代わって, 塊根の表面が縦方向に深く陥没し, 裂開面の周皮にアントシアンが形成され赤色となる症状 (以下, 赤色裂開と称する) と, 赤色偏平とが認められた。挿苗5週間後の白色裂開の発症率に比べ, 10週間後におけるこれらの症状の発症率は, 高系14号及びベニアズマのポリマルチ区を除けばいちじるしく低下した。すなわち, 挿苗5週間後の無マルチ区とポリマルチ区の白色裂開の発症率は, 紅赤ではそれぞれ35%, 28%であったが, 挿苗10週間後には, 挿苗5週間以前に塊根化していたとみられる根の赤色裂開の発症率は7%, 16%と少なくなり, 高系14号の無マルチ区では13%から, 1%に減少した。このことは圃場においても, 裂開

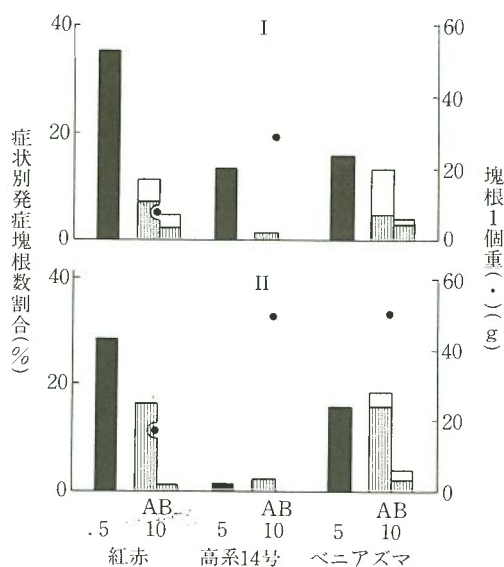


図3 圃場における挿苗5, 10週目の塊根重及び  
症状別発症塊根割合

注) 1. I: 無マルチ II: ポリマルチ

2. 5: 挿苗5週目 10: 同10週目

3. A: 挿苗5週目前に塊根化したもの

B: 同5週目以降に塊根化したもの

4. ■, □: 図1に準ずる, ▨: 赤色裂開

部位が治癒することを示し、赤色裂開は白色裂開の治癒の過程で裂開部位の治癒が不完全であったため、陥没状の裂開痕を残しているものと考えられた。

また、挿苗10週間後の裂開発症率は無マルチ区よりポリマルチ区のほうが多い傾向であった。これは、挿苗5週間後から挿苗10週間後に至る間の発症率の減少がポリマルチ区で小さいため、ポリマルチ区で裂開の治癒が抑制されているものと推察された。ポリマルチにより地温が上昇し塊根肥大が促進されるにもかかわらず、治癒が抑制される点については、ポリマルチにより雨水が根の近くに浸透せず乾燥しやすいことが理由の一つに考えられる。高温の影響について、武田<sup>2)</sup>は、トンネル栽培で高温により苗の枯死が多かった所では、生き残った株のいもはほとんど裂開したこと、トンネル内に水を張り温度を下げた所では、裂開は皆無であったことなどを述べている。

## 5. 裂開症の防止対策

初期の裂開誘起の原因・機構については、十分な検討を行っていないが、初期の塊根を水中に投ずると裂開することを認めた。急激な水分変化がその原因の一つと考えられる。これらのことから、裂開防止の対策としては、次のようなことが挙げられる。

① 急激な水分変化を回避する。そのために、土壌が乾燥しているときの挿苗は避ける。

② 低温に遭う機会の多い極端な早植えは避ける。早期出荷を目的とする早植栽培では、湛水栽培など保温対策に留意する。

③ 極端な高温も回避する。白黒ダブルマルチにすると裂開を減ずるとしている<sup>2)</sup>。

## おわりに

以上、現時点で摘出できる対策を列記したが、水分状態を一定にした場合でも裂開が誘起されており、水分変動以外に外的・内的要因があるものと思われる。また、海外でのcrackingの症状が必ずしも明確ではなく、異常症については、症状を明確に規定したうえで検討を行うことが重要と思われる。

なお、本稿は、農業研究センター研究官小柳敦史らの「サツマイモ塊根裂開症の発症要因に関する研究」日記記 56及び部内資料をもとにまとめたものである。

## 文献

- 1) 藤田時雄 (1956) 三重大農学部報告 12: 123~134
- 2) 武田英之ほか (1984) 食用カンショ生産技術の現状と改善法, 農及園 59: 803-806
- 3) 渡辺 泰ほか (1987) カンショ塊根異常症の発生実態及び発症要因解明研究の現状, 農研センター研究資料 13: 1~19

## 国内情報

## 染色体工学の基盤としての染色体識別・同定法の開発

農林水産省農業生物資源研究所

福井希一

1984年に Nägeli が特定の時期に核がいくつかの小さな物体に分かれることを見い出した。この物体は色素によく染まることから後に Waldeyer によって染色体と命名されることになる。核酸が遺伝情報のもととすれば、染色体はそれがパッケージされたものであり、かつ対合や凝縮等を行うなど、それ自体の独自の制御機構を有している。染色体は光学顕微鏡で観察が可能であり、しかも植物学者の永年におたる研究の結果、多くの種で染色体の個数や形態についての情報が蓄積されている。例えばイネは24本、コムギは42本、イチゴは56本、そしてサツマイモは90本の染色体を有することがわかっている。したがって染色体は形態的に観察し得る遺伝情報とみることができる。

染色体が遺伝情報の担体でありかつ目で見えることから、染色体を操作して育種に役立たせようという試みは古くから数多く行われてきた。細胞分裂阻外物質であるコルヒチンの発見とそれに続く染色体数を倍加する育種法の開発。さらには単に交配操作のみならず放射線や化学物質で処理して誘起した染色体変異を利用する染色体操作法も多く試みられてきた。前者の具体例は園芸品種の改良で数多くみられ染色体の倍数化に伴う花器の巨大化を利用することが試みられなかった園芸植物はむしろ少ないくらいである。その結果フリージャ、ストックその他で4倍体の数多くの園芸品種が生まれた。後者の具体例では野生種の耐病性を栽培種に導入した例がよく知られている。まず、コムギと赤さび病抵抗性をもつコムギの野生種を交配して雑種を作る。それにコムギを何回も戻し交配をすることにより、抵抗性遺伝子が座する染色体1対のみを余分に有する染色体添加系統を作りあげ

る。この系統に放射線処理を行い抵抗性遺伝子の座する染色体部分のみがコムギ染色体上に転座したものを選抜する。コムギの赤さび病抵抗性品種 Transfer はこのようにして育成された。しかしながら、植物の染色体操作はその後成果としてあまり見るべきものがなく停滞を余儀なくされた。その最大の理由は細胞レベルの操作が不可能だったことと染色体の識別・同定が不可能であることの2点である。すなわち、もし植物個体のみしか材料としてとり扱えないのならば、その実験や研究のサイクルは1年間が基本となり、現代の時間感覚では時間がかかりすぎることになる。しかし1960年代後半に新開らによって花粉から、また70年代に入って建部らのプロトプラストからの再分化系の確立によって、植物では育種操作の対象となる材料を個体レベルから細胞レベルまで広げ、細胞融合など新しい交配法を行うことも可能とした。染色体の識別・同定については、残念ながらこの間大きく状況を変えるような新技術はなく現在に至っている。ただいくつかの技術的進展はあり、例えば染色体に固有のマークをつける方法、すなわち分染法の開発により、ここ10年の間にオオムギ、ライムギなどの染色体が同定できるようにはなってきた。コムギについてもようやく昨年に至って分染法による全染色体の同定がなされた。しかしながら、イネについては未だ分染法は開発されていないし、分染法により全染色体の識別・同定される植物種は今の所きわめて限定されている。これは植物種によって同じN分染法でも多少条件が異なるうえ、植物染色体を取り扱える研究者数が極端に少ないことがその理由である。したがって現在開発が進められている *in vitro* の種々の技術、例えば、セルソ

ーターによる染色体の分別、マイクロマニピレーターによる染色体の抽出、移植、マイクロレーザー処理による染色体手術、染色体のマイクロダイセクションやマイクロクロニング法等と極めて多くの技術が植物においては実際にはほとんど意味を有しない。あたりまえのことではあるが、ターゲットになる染色体、染色体部分を特定できないというのがその原因である。植物においては染色体を識別・同定し得ないことは、また細胞融合を行って作出された植物が両親の染色体を併せもった雑種かどうかの検定法が出来ない。培養過程での染色体異常が特定染色体についてのみ生じているかどうか不明なことなどごく基本的な問題の解決も出来ないといった結果を生じる。以上述べてきたことから明らかのように、近い将来、細胞工学、遺伝子工学と並んで重要なバイオテクノロジーの分野となるにちがいない染色体工学の基本技術として、染色体の識別・同定法の開発は現在極めて重要な課題となっている。

植物染色体を識別・同定するためには、中期染色体の形状を比較する従来からの核型分析法の他に現在では特定染色体と交雑するDNAあるいはRNAのプローブを用いた *in situ* ハイブリッド法、また通常の植物染色体の分染法であるN、C分染法よりはるかに多くのハンドを得ることのできる高精度分染法の開発等々が現在行われている。しかしそれぞれの技術には一長一短があり、例えば染色体操作に用いる染色体を特定したいという様な場合に、*in situ* ハイブリッド法を用いると染色体を特定できたとしてもその染色体は既に種々の処理を受けてしまい、次のステップには利用できないという問題が予想される。

染色体操作に用いることの出来る生きた(インタクトな)染色体を識別・同定する方法として画像解析法が注目されるゆえんである。画像解析法では基本的には染色体を染色せずとも解析できることが明らかにされており、前記の意味で大きなメリットがあるといえる。農業生物資源研究所ではグリーンエナジー計画の一環として画像解析法を用いた

C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>植物の染色体の識別・同定法の開発を行ってきた。その結果、市販の汎用大型画像解析装置をベースに植物染色体を解析するのに必要な顕微鏡その他のハードウェア、および植物染色体解析に必須のソフトウェアを組み合わせ、植物染色体画像解析システム(CHIAS,キアス)を開発した。またキアスを用いて染色体の識別・同定のための新しい方法も開発した。グラビアの組み写真はそのひとつの例を示したものである。図のaはキアスの全景である。キアスの開発にあたって設定した要件の概略は①植物の染色体を主たる解析の対象とすること、②研究者の経験や技量が生かせるシステムであること、③ルーチンワークについては可能な限り自動化すること、④顕微鏡オートメーションが可能なことおよび⑤画像解析の全課程をデジタル化することであった。このうち①から③のように、主としてソフトウェアに関する部分、④のようにハードウェアに関する部分、そして⑤のように用いてみた結果として大丈夫であるとわかったものなどいろいろである。キアスはこれらの要件をすべて満足するようにシステムアップされ、現在も毎日のように染色体データを生み出している。図のbからeはハマアカザ(*Atriplex patula* L.)の染色体を識別するために新たに開発したイメージパラメーター凝縮型(Condensation pattern, CP)を用いた識別法を画像処理の各段階にわけて示したものである。染色体は細胞分裂周期の前中期に至るとそれまでは長い繊維状であったものが不均一に凝縮し始める。CPはその凝縮様式が個々の染色体に特有であるという点を利用したものである。具体的には染色体あるいは染色分体の中肋部分の濃度分布を求め、そのプロファイルパターンでそれぞれの染色体を識別する。図のbはまず染色体の領域を決定するために2値化を行ったもので白い部分が染色体部分であり、いくつかのゴミが同様に白く抽出されている。塩をまいた様なゴミは適当なデジタルフィルターを用いることによって簡単にとり除けるが、それ以上の大きさをもつゴミはインタラクティブモードにより画面と対話してとり除く。

そのために必要な部分と消去する部分との境界線を緑のオーバーラインで書き込んだところである。

次にゴミとりの終了した染色体部分のりんかく線を抽出し明るさ0でもとの画像に書き込み染色体部分を限定する。その後、疑似カラーを発生させ、各画素の濃度に応じて着色した。色別による濃淡の表示は人間の濃淡の識別能力を飛躍的に増大させ、客観的なデータをとるという意味で極めて有用である。さらにデータをとり扱いやすい大きさにするため2倍の大きさに画面を拡大したものが図のCである。ここで染色分体の中軸上の濃淡の分布を見るためにインタラクティブモードでオーバーラインを引く。この場合はオーバーラインを引くと同時にその下のグレイイメージの濃度が記録される。その結果、それぞれの染色分体に濃度分布のプロファイルが得られる。図のdは染色分体中軸上に引いたオーバーラインのみをとり出し、その長さを測定するため、各オーバーラインごとに異なった色をつけて区別しているところである。

以上のような操作で各染色分体の長さ、中軸線の濃度分布プロファイルが得られれば、それらのデータをもとに染色体のイディオグラムを作成する。この場合、動原体部両側に認められる最も凝縮した部分と、染色体の両端部分を占める最も拡散した部分およびその中間的な部分の3段階に分けて色を変えて示した。そのイディオグラムによる表示からそ

れぞれの染色体の凝縮型(CP)は一見して区別でき、また相同染色体の対を作ることも容易である。一方染色体の長さは相同染色体間でもかなりバラツクことが了解され、長さのみによる染色体の識別は十分な注意を払う必要があることも図のeから明らかである。

以上述べてきたようにイメージパラメータ、CPを用いて染色体を識別・同定することは画像解析法が単にデータを得る際の省力化、規格化のみならず、従来になかった生物学的データを得ることが出来る可能性を示しているものとして興味深い。すなわち今始まったばかりの染色体の画像解析は、染色体の識別・同定を定量的に染色体工学という今後の発展が期待される広大なバイオテクノロジー領域の基盤技術となるばかりでなく、染色体研究それ自体にも大きな影響を与えるものと考えられる。ちょうど以前はDNAの操作が大きなサイズか小さく切断するかの、2つの選択しか可能でなかったものが、制限酵素の発見以来特定の塩基配列を認識して切断することが出来るようになり、遺伝子操作が急激に進んだように、画像処理におけるデジタルフィルターも画素の特定の濃度変化を認識してその部分を変換することができ、生化学における制限酵素と同様な働きをするとも考えられる。画像処理により得られる情報は生化学的な情報とは次元が異なっており、今後バイオテクノロジー分野で大きな役割を果たすものと期待される。



## 文献情報

コムギおよび *Nicotiana plumbaginifolia* の組織培養におけるエチレン活性阻害剤硝酸銀による不定芽再分化の促進

組織培養技術を用いて作物の改良を行うためには、カルスからの植物体復原のための不定芽の再分化が重要である。しかしながら、重要作物であるイネ科植物は一般的に不定芽の再分化がむずかしいなど種によって再分化の効率が異なり、また遺伝子型による差異も大きいなど問題が多く、不定芽形成の効率化が望まれている。不定芽形成に関与する要因の一つとしてまずオーキシンがある。オーキシンはカルス誘導のためには必要であるが、不定芽の再分化には阻害的に働く。しかしながら一方オーキシンは内生エチレンの生産を強く促すこと、また不定芽を形成するタバコのカルスは形成しないカルスに比べてエチレンの前駆物質 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid の含量が少なくエチレンの発生も少ないこと、さらに、外生エチレンまたはエチレンの前駆物質の添加によって不定芽形成が阻害されることなどが報告されている。これらの結果は、不定芽形成はエチレンによって阻害され、オーキシンはエチレンの生産を誘導することを通して不定芽形成を阻害していることを示唆すると考えられる。したがって、エチレンの作用を阻害することによって、不定芽形成を促進できると考えられる。本報では、エチレンの作用を阻害することが知られている銀イオン ( $\text{Ag}^+$ ) の添加によるコムギと *Nicotiana plumbaginifolia* のカルスにおける不定芽形成の促進を試みた。

コムギ (*Triticum aestivum*) は再分化能力の高い系統 GK Kincsö と低い系統 GK Maraton とを用い、未熟胚からカルスを誘導した。基本培地は Murashige and Skoog を用い、カルス誘導のためには 2,4-D (1.0mg/ℓ) を添加した (第1培養)。形成されたカルスを 4週間後に 2,4-D 0.5mg/ℓ の培地に

移植し (第2培養)、さらに 4週間後に 2,4-D 無添加の培地に移植して不定芽を形成させた (第3培養)。銀イオンとしては硝酸銀 ( $\text{AgNO}_3$ ) を用いた。予備実験の結果、 $\text{AgNO}_3$  は 5~50mg/ℓ の範囲で不定芽形成を強く促進したが、高濃度の場合ネクロシスをおこすことがあったので、以降の実験には 10mg/ℓ を用いることにした。 $\text{AgNO}_3$  は上記 2つの系統のどちらにおいても不定芽形成を促進し、特に不定芽形成率の低い GK Maraton においてその促進効果は顕著であった。また、温室で栽培した植物体から得たカルスは圃場で栽培した植物体からのものよりも不定芽は形成しにくいだが、それらにおいても  $\text{AgNO}_3$  の添加によって効率良く不定芽が形成された。また、 $\text{AgNO}_3$  を添加する時期については、第2および第3培養の際に添加すれば不定芽形成率は有意に上昇したが、培養の全過程にわたって添加することが最も効果的であった。 $\text{AgNO}_3$  の添加により、不定芽を形成したカルスの割合、カルス当りの不定芽の数ともに増加した。一方、 $\text{AgNO}_3$  の添加により不定根の形成は抑制された。しかし、これらはその後  $\text{AgNO}_3$  無添加の培地へ移植すれば十分発根したので、この点はあまり問題ではなかった。

また、 $\text{AgNO}_3$  の添加は *Nicotiana plumbaginifolia* においても有効であった。硝酸還元酵素欠損など不定芽形成能力を失った 6種類の突然変異系統のカルスの培養の際に  $\text{AgNO}_3$  (10~50mg/ℓ) を添加したところ、そのすべてで効率良く不定芽が形成された。

以上のように、 $\text{AgNO}_3$  の添加はカルスからの不定芽形成を促進する効果があり、特に、不定芽形成の効率の悪いものにおいて、その効果が顕著であることが示された。

$\text{AgNO}_3$  の働きを確認するために、コムギ (GK Kincsö) を用いて、2,4-D およびエチレンと  $\text{AgNO}_3$  との相互作用を検討したところ、培地に 2,4-D (0.5mg/ℓ) が存在すれば不定芽形成は阻害されるが、ここに同時に  $\text{AgNO}_3$  を添加すると、2,4-D が存在しない場合とほぼ同じぐらいの率で不定芽が形成された。また、エチレンを発生するエチレ

(70  $\mu$ M) を添加するとやはり不定芽形成は阻害されたが、ここでも同時に  $\text{AgNO}_3$  を添加することにより、不定芽が形成された。以上の結果から、 $\text{AgNO}_3$  はエチレンの作用を阻害することによって、2,4-D およびエチレンの不定芽形成の抑制を排除し、不定芽形成を促進することが示された。

$\text{AgNO}_3$  は、ここで用いた以外のコムギの品種における不定芽形成、パールミレットのカルスからの植物体形成、イチゴの茎頂培養の際のランナーの形成なども促進した。エチレンの活性を阻害する際の  $\text{Ag}^+$  の作用機作は現在のところ明らかではない。しかし上述のように、 $\text{AgNO}_3$  の添加はかなり一般的に形態形成を促進することから、実用的には十分価値があると考えられる。

(抄訳 有賀 小海)

**Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana glauca* tissue cultures using the ethylene inhibitor  $\text{AgNO}_3$ .**

Purnhauser László, Péter Medgyesy, Mihály Czakó, Philip J. Dix and László Márton

*Plant Cell Reports* 6 : 1-4(1987)

**文献情報**

**プロトプラスト培養による  
ユリノキの再生**

プロトプラストの酵素的単離は、多くの木本植物でも報告されている。しかし、木本植物のプロトプラスト培養の成功例は少なく、また、北アメリカの主要な樹木のプロトプラスト培養から体細胞不定胚を経て個体を再生できたという報告はない。そこで、ユリノキ (*Liriodendron tulipifera* L.) のプロトプラストの単離と体細胞不定胚を経ての個体再生について報告する。

(材料と方法) 2種類の系統 (yellow-poplarlines) A, B が選ばれ、回転振盪培養で

育てられた。培地は、2 mg/ℓ の 2,4-D, 0.25 mg/ℓ の BA, そして、カゼインの加水分解物 (1000 mg/ℓ) を含み、14 時間日長、あるいは暗黒条件下に置かれた。次に約 1 g の組織をろ過滅菌した培地に移し、30°C で 12 時間回転振盪培養された (50 rpm)。この培地は、500 mg/ℓ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/ℓ MES, 0.5 M マンニトール, 2% セルリシン, 1% マセラゼ, 100 mg/ℓ アルブミンを含む Merkle・Sommer の調整培地である。懸濁液は 2 層のミラクロースで、次に、25  $\mu$ m 孔のステンレスのふるいでろ過された。ろ液は 5 分間遠心分離され (100 g), 上澄液を除き, pellet はろ過滅菌した 5 ml の洗滌培地に移された。以上の操作を 2 回以上くり返し、最後の遠心分離後, pellet 中のプロトプラストは次の 2 種類の再生培地に移された。培地 I は、40 g/ℓ のシュクロースと浸透圧調整剤として 0.5 M のマンニトールを、培地 II は、250 mg/ℓ のシュクロースと 0.5 M のグルコースを含むものである。プレーティング法として、薄層液体法、懸滴培養液、高密度アガロース法などを少なくとも 3 回反覆で試みた。最終の操作で、プロトプラストは  $2 \sim 4 \times 10^5/\text{ml}$  に希釈された。プロトプラスト懸濁液 0.2 ml をプラスチックのペトリ皿に入れ、同量の再生培地 (Seaplaque アガロース 2.5% を含む) を加え、38°C に保った。その混合液はピペットで 0.05 ml に再分配され、2 ml の再生培地を加えた。かくて、アガロース小滴中のプロトプラストは  $1 \sim 2 \times 10^5/\text{ml}$  となるが、実際に測定された数はもっと少なかった。ペトリ皿は 30°C 暗黒条件下で約 1 カ月インキュベートされ、再生培地は同量の調整培地で希釈された。更に 1 カ月後、カルスを含むアガロース小滴は、40 ml の調整培地に移して回転培養するか、あるいは、ペトリ皿の寒天培地に移された。

(結果と考察) 光条件下での培養によって、1 g の組織から  $1 \sim 2 \times 10^6$  個のプロトプラストが得られたが、暗黒条件下では多くのプロトプラストを得ることはできなかった。光条件下でのプロトプラストは充実しており、大きなデンプン粒で満たされていた。プロト



プラストは40% Percoll 溶液上に浮上するが、プロトプラスト化してない細胞も同じようになるので、単離するまでの時間を12時間かけてろ過した。薄層液体法及び懸濁培養法によるとプロトプラストは分裂せず、2週間以内に死ぬことになるが、高密度アガロース法では良い結果が得られた。細胞膜は3日以内に再生され、最初の細胞分裂は4日以内に観察された。8個あるいはそれ以上の細胞のコロニーが2週間以内に、また、小さなカルスは3週間以内に形成された。結局、コロニー形成率(plating 効率)は30%となり、これは、培地 I と II ではほとんど同様であった。小さなカルスを含むアガロースの小滴を液体調整培地に移して回転培養すると、数週間でカルスは小滴外にひろがった。通常、カルスをホルモンフリーの Merkle・Sommer の培地に移すと1カ月以内に胚形成がみられ、分化、発芽に至った。

本実験の懸濁培養はユリノキのプロトプラストの再生に極めて有効であるといえる。6日ごとに新鮮な培地に移すことによって、強い生存力のプロトプラストと高いコロニー形成率が得られた。

このユリノキの実験結果は、懸濁培養によるビャクダン (*S. Album*) のプロトプラストの単離と培養の詳細な報告と類似している。しかし、ビャクダンで成功した薄層液体法による細胞分裂を、われわれはユリノキで認めることはできなかった。ユリノキのプロトプラストの連続的な分裂には、高密度アガロースプレATING法が有効であると云える。

(抄訳, 山本友英)

### Regeneration of *Liriodendron tulipifera* (family Magnoliaceae) from protoplast culture

Merkle, S.A. and H.E. Sommer  
*Amer. J. Bot.* 74: 1317-1321(1987)

#### 文献情報

### *Nicotiana* のゲノムと *Atropa* のプラストームをもち、機能を有する体細胞雑種植物の作出

細胞融合で稔性をもつ雑種は同属内に限られていたが、ここでは、非相称 (asymmetric) な体細胞融合により稔性をもつ雑種植物を作出した。

用いた材料は、*Nicotiana tabacum* の葉肉プロトプラストでクロロフィル欠損とストレプトマイシン抵抗性を含むプラストーム (plastome—細胞質内の色素体のもつゲノム) と、野生型 *Atropa belladonna* のプロトプラストである。両者を高 pH, 高  $Ca^{++}$  でポリエチレングリコールを用いた Dimethylsulfoxide 法により融合させた。融合細胞は MO 2 培地で培養した。この培地はタバコ細胞は分裂するが、*Atropa* は分裂しないこと、および *N. tabacum* はクロロフィル欠損であるので、緑色のコロニーは雑種であると思われる。

この融合—培養実験で41の緑色コロニーを選抜した。これらを分化させ細胞遺伝的 (染色体の数および形態) と生化学的 (エステラーゼ, アミラーゼおよびパーオキシダーゼのアイソザイム分析) 調査を行い、再生植物の核遺伝子構成を明らかにした。また、プラスミドの遺伝構成を調べるために、クロロプラスト DNA の制限酵素による分析を行った。

以上の結果、41のコロニーから得られた分化系統は3つのグループに分けられた。すなわち

- a) *N. tabacum* と *Atropa* の核雑種——4 cell lines
- b) *Atropa* に似ており、*Atropa* の細胞からまれに得られたエスケープと思われるもの——4 cell lines
- c) タバコ型で緑色あるいは斑入りで、タバコのゲノムと *Atropa* のプラストームをもつ体細胞雑種——33 cell lines

c) グループについてはさらに調査を行った。このグループのうちいくつかは生育良好

で、開花結実（自殖）した。

染色体数は  $2n=48$  でタバコ型であった。アミラーゼ、エステラーゼおよびパーオキシダーゼのアイソザイムはタバコ型であったが、雑種は DSR に欠けているアミラーゼのバンド 1 本をもっていた。

クロロプラスト DNA の BamHI, HindIII および PstI の制限パターンはいずれも *Atropa* 型であった。斑入り個体の葉を電顕で調べたところ分化したクロロプラストと未分化のクロロプラストが混在していた。

Thylakoid 膜タンパクについては、体細胞雑種は *Atropa* に特異的なバンドを 1 本もっていたが、他のバンドはすべてタバコ型であった。また両親が共にもっていた 27 kD の主要バンドがうすくなっていた。これは、クロロフィル a/b binding protein が著しく減少しているものと考えられる。

ここに用いた方法は、得られた再生個体の 90% 以上が雑種であったことから、実用性があるものと考えられる。緑色のタバコ型個体は、タバコの核と *Atropa* のプラストームをもつ体細胞雑種と考えられる。その理由は、1) 形態が正常であること、2) タバコ型の染色体をもつこと、3) タバコ型のアイソザイムをもつこと、4) *Atropa* 型のクロロプラスト DNA をもつこと、および 5) reverse mutant がなかったことである。

以上のように、属間においても、ゲノムとプラストームの組合せで、両親の特性をもち、生長や生殖機能をもつ体細胞雑種が得られることは、有用であると考えられる。

(抄訳 久保友明)

#### Functional cybrid plants processing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome

Kushnir, S. G., L. A. Shulumukov, N. J. Pogrebnyak, S. Berger and Y. Gleba  
*Mol. Gen. Genet.* 209: 159-163 (1987)

#### 文献情報

カナマイシ耐性と硝酸還元能欠損遺伝子を選抜指標として一つの核ゲノム内に組合せることにより、広く植物における体細胞雑種の選抜に用い方法の検討

目的とする融合雑種の作出のために、その効率のよい選抜法の検討を行った。ここでは、核ゲノムに支配される耐性および栄養要求性のマーカーを付与した細胞 (*Nicotiana tabacum*) を用いて、*N. tabacum* SR1 及び 3 種の野生種に対して細胞融合を行い、その雑種の解析を通じて、本法が一般的に適用できるかどうかを調査した。

用いた材料は、*N. tabacum* niaK<sup>+</sup> (NR<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>) - *N. tabacum* cell line nia115 に対して、遺伝子直接導入法によりカナマイシン (Km) 耐性を導入して作出したもの——、*N. tabacum* cv Petit Havana SR1 (NR<sup>+</sup>, K<sup>-</sup>, SR<sup>+</sup>)、*N. glutinosa*、*N. repanda* および *N. sylvestris* である。

プロトプラストの単離および融合、再生は以下の手順で行った。

プロトプラスト単離, TVL solution  
に懸濁



PEGによるプロトプラスト融合, 7  
日間培養



40  $\mu$ g/ml の Kanamycin sulfate を含  
み, 還元態 N を含まない 0.8% 寒天培  
地で培養



50  $\mu$ g/ml の Km 入り培地で 4 週間継代  
培養し, 2~3 mm の calli を 50  $\mu$ g/ml  
Km 入り修正 LS 培地に移し, 1 カ月  
おきに継代培養する



50  $\mu$ g/ml Km 入り再分化培地で再生  
させる

以後再生個体について染色体数の確認およ

び Southern blot analysis を用いて, total DNA に対し pABDI を用いて Km<sup>+</sup> 遺伝子を同定した。

まず, *N. tabacum* 同志の組合せについての結果を述べると, 融合していない SR1 (Km存在下で生育不可) と niaK<sup>+</sup> (還元態Nがないので生育不可) は, コロニーが成長せず雑種と区別することができる。処理したプロトプラスト75,000個のうち12個の耐性コロニーが生じた。

これらのコロニーから個体を再生し, 鉢に移植し, その形態を親のSR1と比較した。厚いねじれた葉をもつ異常な個体が一部に認められた。再生個体の染色体数は  $2n=94\sim 96$  であり, 50mg/l Km, 還元態N抜き培地で生育した。硝酸還元酵素の活性はSR1と同様であった。

APH(3')II 遺伝子の存在については, 再生した個体のうち F<sub>1</sub> の1個体を除いて shoot culture によるもの, 土に移植したものいずれにも認められた。

正常に見える個体すべてと奇型を呈した個体の一部が花をつけたが, それらの99%(320個体のうち317個体)は不稔であった。さらにとれた種子の発芽率は5%以下であった。一つの花に由来する F<sub>1</sub> 個体の葉型は多様であり, さらにそれらのうち1個体については, APH(3')II 遺伝子が検出できなかった。

野生種3種と niaK<sup>+</sup> との融合実験をそれぞれ行ったが, *N. sylvestris* との雑種だけが Km 耐性の完全な植物体まで生育し, 土に移植後もその耐性は残っていた。

以上により, 二つの付加的マーカーを含む系統を用いた実験法は, 細胞融合の選抜に有効と考えられる。

*N. repanda* および *N. glutinosa* と *N. tabacum* との融合植物はすでに作出されているので, 本実験ではうまく行かなかった同組合せにおいて, 本実験法をさらに一般的に適用することを可能にするためにも, さらに検討することが必要であると考えられる。

(抄訳 朝日孝宏)

#### Combination of Kanamycin resistance

#### and nitrate reductase deficiency as selectable markers in one nuclear genome provides a universal somatic hybridizer in plants

Brunold Christian, Susanne Krüger-Lebus, Michel W. Saul, Samuel Wegmüller and Igo Potrykus

*Mol. Gen. Genet.* 208: 469-473 (1987)

#### 文献情報

#### 遺伝子を導入された植物体でのアルファルファモザイクウイルスRNA4の発現とウイルスに対する抵抗性の獲得

ウイルス病を防除するには, 主として二つの方法がとられている。一つは交雑により栽培品種に抵抗性遺伝子を導入するもので, 抵抗性育種と呼ばれる。もう一つはウイルスの交叉防御 (cross protection) を利用するもので, 弱毒ウイルスに感染した植物が, 病原性の強いウイルスに対し感染しにくくなる現象を用いる。しかしながら, 抵抗性育種では交雑可能な範囲に真性抵抗性遺伝子が見い出されることはほとんどなく, また交叉防御には, 遠縁のウイルスには抵抗性を示さない, 弱毒性ウイルスでも他系統のウイルスと同時に感染すると形質変化し, 強毒性のものになる可能性があるといった, 安全性や効率の点で問題があるので, 現在でも実用できない。

そこで, 細胞に針を刺したり高周波で電圧をかけて細胞膜に一瞬穴をあけ, DNAを取り込ませる直接導入法や, 大腸菌とアグロバクテリウムの両方で増殖できるプラスミドを使ったバイナリーベクター (binary vector) を用いて外来遺伝子を導入する方法が考えられる。導入する遺伝子としては, ①目標とするウイルスのコートタンパクの遺伝情報, ②ウイルス粒子内にある頻度で存在するウイルスのゲノムを含まないサテライトDNA (RNA), ③ウイルスゲノムの塩基配列に相補的なアンチセンスDNAの三つが考えられる。このうち①, ②はタバコモザイクウイル

ス (TMV) での実験では抵抗性が確認されている。③の実験はまだ行われていない。本実験ではバイナリーベクターを用いアルファルファモザイクウイルス (AMV) のコートタンパクの遺伝子をタバコに導入し、その発現と AMV の感染及び病徴の拡大が阻害されるのを観察した。

アグロバクテリウムは植物に感染するとクラウンゴールと呼ばれる病気をひきおこすが、その際に中に含まれる Ti プラスミドの一部の DNA を感染した植物の核内に割り込ませる。そこで Ti プラスミドに目的とする DNA をつなぐことにより植物の核内に外来遺伝子を導入できる。そこで、プロモーターとして CaMV19S を用い、AMV のコートタンパクをコードしている RNA4 の cDNA と選抜のためのカナマイシン耐性の遺伝子を組み込んだ Ti プラスミドを大腸菌内でつくり、アグロバクテリウムに移した。

タバコ (品種 Xanthi-nc) の葉を  $3 \times 7$  mm にきざみ、このアグロバクテリウムに感染させ、カナマイシンを含む培地上で培養し再生した苗のうち健全な 51 本を選抜し、温室で育てた。このうち 63% の 32 本で葉においてコートタンパクの合成が見られたが、その量は最大と最小で約 20 倍の開きがあった。また、その絶対量は最大の個体でも、実際にウイルスに感染した植物の 1% 以下であり、また、葉の全タンパク量の 0.1% 程度であった。このコートタンパクの合成が見られた植物の核の DNA を制限酵素で切って調べたところ、導入した cDNA と同じバンドが見られ、AMV の遺伝子が核に組み込まれたことが示された。

この形質転換体の自殖及び正常タバコ株との戻し交雑により得られた種子をまき、そのカナマイシン抵抗性を調べた。その結果耐性のものと感受性のものが、3:1, 15:1 及び 63:1 に分離する三つの系統があり、外来遺伝子はメンデル遺伝し、その遺伝子数はそれぞれ 1, 2, 3 であることがわかった。先のコートタンパク量の最大の株は 3, 最小の株は 1 個外来遺伝子を持っている。

これらの形質転換体に、コートタンパクの遺伝子をとった AMV 及びその RNA、別系

統で強毒性の AMV 及びその RNA, TMV の五つをそれぞれ接種し、抵抗性を調べた。その結果、2 系統の AMV ウイルス粒子には抵抗性を示したが、その RNA 単独と TMV には抵抗性を示さなかった。こうした特異的な抵抗性は交叉防御で見られる抵抗性とよく似ている。しかし AMV ウイルス粒子に対する抵抗性は交叉防御ほど完全ではなく、コートタンパクの量が少なくなるほど、抵抗性は低くなった。このため、より強い抵抗性転換体を得るためには、核に取り込まれるコピー数を増やすか、より強いプロモーターを用いることで植物体中でのコートタンパクの合成量を増加させるとよいかもかもしれない。また形質転換体では病徴進展の遅延が見られた。

交叉防御の抵抗性の機構は、コートタンパクの存在下では、ウイルス粒子から遺伝子である RNA が脱離できず、そのためウイルスが増殖せず、感染が抑さえられるのだと考えられており、初めから遊離の RNA に対しては抵抗できない。この実験の結果はこの仮説によりうまく説明でき、同じ機構によると思われる。

形質転換体の生育及び形態は一部草丈の低いもの、稔性の低いものが出たが大部分が正常であった。しかし、合成されたコートタンパク量が実際に感染した場合の 1% 以下と少なかったため、大量に合成する植物が得られた場合、それも正常となるかどうかは判断できない。

(抄訳 高原美規)

#### Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance

Loesch-Fries, L. S., D. Merlo, T. Zinnen, L. Burhop, K. Hill, K. Krahn, S. Nelson, N. Jarvis and E. Halk

*EMBO J.* 6: 1845-1851 (1987)

外国特派員便り

## プラントジェネティクス社の経営戦略を聞く

生物系特定産業技術研究推進機構

岸 國平

この夏、アメリカのベンチャービジネス、プラントジェネティクス社（以下PGIと略称）を訪ね、副社長のK.A.Walker博士から同社の経営戦略について聞く機会があった。またその際、研究所の中もすみずみまで見せてもらうことができた。今回BRAINテクノロジー第2号に、特派員報告として登場の機会を与えられたので、その時の見聞をもとに若干の感想も加えながら報告させて頂くことにしたい。

なお出発前、人工種子のノウハウの関係で同社とは関係の深いキリンビール社から紹介して頂き、そのために初めから大変好意的に、しかもずい分機微にわたるところまで話を聞くことができた。この便りを記すに当ってPGIとキリンビール社に深く感謝申し上げます。

デービス市は、カリフォルニア大学デービス校のある大学町として有名だが、PGIはこのデービス市の一角にある。会社がそのまま研究所というのがPGIの特徴なので、さぞかし立派な研究所があるものと思ったが、外見はごく質素なただ一棟の細長い建物である。創立後6,7年のベンチャービジネスとしては、建物に金をかけるより中味が勝負ということなのであろう。

同社の最大の戦略商品は人工種子だろうと見当をつけ、人工種子についてとくに細かく聞きたいと思って行ったが、意外なことにWalker博士の話には人工種子の話は切れ切れにしか出てこず、頂いたペーパーの中の説明の分量でも同様であった。これは多分、人工種子の方は将来の芽としては大きい、現在まだ毎年大きな利益を上げる段階でないためであらう。

切れ切れの話と、研究所の見学中に見た進

行中の研究の中味をつなぎ合わせて見ると、以下のようなことになりそうである。まず第一点は、人工種子の技術は現在すでに1分間数十粒を連続生産できるところまで来ており、機械的にはすでに完成の段階に来ていること。機械は動かすところまで見せてもらったが、試作品なので不十分だが、需要が出て、機械の専門メーカーが作ることになれば、たちまち立派な機械として完成されるに違いないと思われた。第二点は、現在人工種子について開発中の技術は、でき上がった人工種子の粒がくっつかずバラバラになり、播種機にかかりやすくなるようなコーティング剤であり、かなり有効な試作品ができ上がっていること。第三点は、人工種子技術にとって現在、未来ともに最も重要なポイントは、中味に何をを入れるかということであり、この点は同社としてもなお十分な自信作がないという段階のようである。実験室の方で、胚様体作出をねらって研究中のガーリックやセルリー、アスパラガスなどを見せてもらったが、狙いはいいもののまだまだこれからという感じであった。第四点は、キリンビール社に特許を買ってもらって、これはPGIの経営にとって大きく寄与していること(Walker氏の話)。カナダ、オーストラリアにも話があるようであるが、PGIとしては、この技術の特許の段階で買ってもらい、買った先で中に入れる植物の胚様体技術が開発され、この技術がどんどん使われて、特許料が入って来るとというのが最も望ましい姿であらう。人工種子に関する限り、すでにしっかり網は張ってあるということである。

人工種子のことではあまり雄弁でなかったWalker博士が、最も雄弁に話してくれたのは次の3点であった。

一つは加工用トマトの品種開発についてである。加工用トマトは全米でもカリフォルニアが最大の生産地であり、今後とも有望品目である。そこで同社としては、耐病性、加工適性、収量などの点ですぐれた特徴をもった新品種の開発を進め、いままでにPGI-1101, 1103, 1106, 1202, 1204などの品種を世に出してきた。しかし残念ながら加工用トマトの種子の市場は、日本をはじめ全米の大きな種苗専門企業と競合し、小さなベンチャー企業であるPGIにとっては、あまりよい市場でないことが分った。そこで、現在では新しい品種の開発はストップしているということである。どんなによい品種が開発されても、その生産販売を他社に任せ、品種のローヤリティだけで利益を得ようというのは、アメリカでもやはり成り立たないということであろう。

第二はジャガイモの“ミニチューバー”の開発、生産である。ジャガイモは全米はもちろん世界中で種いもによる栄養繁殖であり、中米、南米などでは消費も多く、生産も多いにもかかわらず、よい種いもが供給されていない。ここにウイルスフリーで品質のよい原種を供給してやれば、安定したよい市場が開発されるに違いない。これがPGIの戦略上のねらいである。そしてこれを実現する技術上のノウハウを確立するのは、PGIの優秀なスタッフ達にとっては朝飯前なのであろう。まず相手国の市場を綿密に調査し、現在よく用いられている品種を選び、さらにそれだけでなく、将来売りこめそうな新品種も加えておく。もちろん相手国の注文が優先されることは当然である。第一段階はまずこれらの品種を芽先培養にかけ、カルスを経て再分化した個体をエライザ法によって綿密なウイルス検定にかける。PVX, PVY, PLRVをはじめ、どのウイルスにもフリーなことが確認された個体を原々種として保存する。第二段階は、これらの原々種を用いてカルスの大量増殖を行う。こうしてできたカルスをバラして再分化させ、スクリーンハウスの中で厳密な隔離栽培を行い、親指大のミニチューバーを作らせる。1本の苗から10個以上の親指大のミニチューバーが生産され、これが商品

になる。ときに普通のジャガイモ大のものも出来て来るがこれは除かれる。1本からいかに多くの、形の揃ったミニチューバーを作らせるか、これが企業秘密に属する技術である。

ミニチューバーは特製の網袋に入れて販売されるが、販売先は、米国内はもちろん、中米、南米などの種いも生産者である。日本のカルビー社にも入っているとのことである。

このミニチューバーの事業は順調にのびており、1985年に293,133ドルだった売り上げが、1986年には約2倍の640,945ドルに達している。

第三はアルファルファ新品種の開発、生産である。Walker博士によるとミニチューバーの売り上げに比べて、こちらはまだ1/8くらいだが、将来性はあるので今後も大いに力を入れていくとのことである。

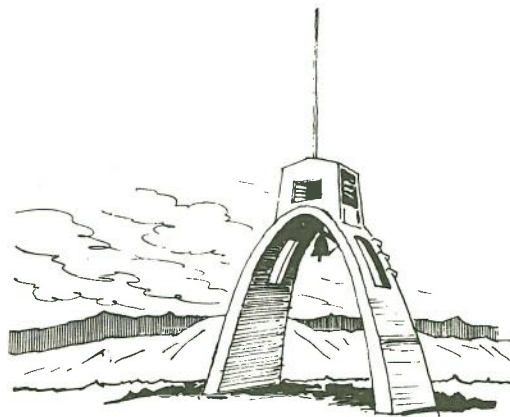
アルファルファの場合は、最終製品が合成ハイブリッドであり、トマトにくらべると既存種苗企業との競合が少ないのがPGIにとって有利な点である。この場合はまず、多数のアルファルファ品種を集め、スクリーンハウス内で病気や害虫の発生を予防しながら選抜、採種を行う。さらに各種の栽培上の性質を対象に選抜を繰り返す。こうして十分に優秀遺伝子の集積ができたところで、次に3代にわたって合成ハイブリッド育成の手順を繰り返す。もちろんこれもすべてスクリーンハウス内で行われる。アルファルファはジャガイモと違って栄養繁殖ではなく、種子繁殖であるが、アルファルファには種子伝染性の重要ウイルスがあるため、ウイルス予防は徹底して行われる。そしてこの点がPGIの種子の価値を高める決定的なポイントになっている。なにしろアルファルファは、普通の場合でも5,6年、多いときには10年間も作り続けられるので、最初からウイルスフリーなものと、ウイルスにかかっているものでは、収量に莫大な差が生じて来るのである。

PGI作出のアルファルファ品種には、MECCA, MADERA, MARICOPA YOLO, SUTTERなどがあるが、これらの品種はいずれも高い生産性と耐病性、耐環境性も持ち、さらにあるものは高い耐虫性を、またあるも

のは高い不休眠性を持っている。

以上の、ジャガイモのミニチューバーやアルファルファ種子の生産は、本社とは数十キロ離れた農場に多数のスクリーンハウスを持ち、そこで進められている。現在この両者で PGI のもうけの大部分を稼ぎ出しており、去年の売り上げは一昨年 of 3 倍だというのが、Walker 博士の自慢であったが、65人という

研究者、技術者の数と活発な研究活動から見て、まだとても黒字には達していないであろう。この上に、どのような現実的な儲けをもたらすものを開発し、付加するか、また将来それに何倍する利益をもたらすような技術の芽を育てるか、それが PGI 幹部の戦略の原点だというのが Walker 博士の話の結論であった。



特別情報

第6回国際植物培養学会より  
馬鈴薯・レタス・てんさいの研究進捗状況

馬鈴薯

発表者	国名	分類	要約
Dodds, J. (427) Kane, E.J. (255) Garner, N. (232)	Peru U.K. U.K.	Shoot tip culture Meristem culture Organ culture	Shoot tip 8ヶ月~2年保存 栽培種4種について生長点培養 ウィルスフリー Nodal explant培養 Microtuberを得る休眠19 °Cで20週間, GA <sub>3</sub> で休眠打破可能
Muhlbach, H. (305)	F.R.G.	Cell suspension culture	栽培種健全株とPSTV感染株 <i>Solanum demissum</i> の培養 PSTV共存 Cell culture system確立, ウィ ルス研究への応用
Zachrius, R.M. (372)	U.S.A.	Cell culture	Cell suspension cultureのもとでのオゾンO <sub>3</sub> の影響を調べる
Jain, S.M. (34)	Finland	Organogenesis	3品種についてTuber disksからのShoot形成 比較 Var, Bintje, Pito, Record中, Pitoがもっ ともShoot形成良い
Dai, C. (254)	U.S.A.	Protoplast culture	Hypocotyl, Cotyledon栽培種2点, 野生種1 点, <i>S.bulbocastanum</i> protoplast 48h→分裂 6 days 30~40%分裂続く, 14~17%小Callus, 移植→植物体得る
Tavazza, R. (55)	Italy	Protoplast	4品種葉肉Cell→Protoplast→培養→分裂コロ ニーカルス→再生個体 (4品種), 修正MS, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> を除く
Austin, S. (87)	U.S.A.	Somatic fusion	<i>S.brevidens</i> × <i>S.tuberosum</i> Fused cellの選 択培地→Hybrid得る, 前者はPotato leaf rol l virus抵抗性 (PLRV), 1500個体 (雑種) 得る HybridはPLRV抵抗性Peroxidase isoz ymeパターンにより雑種性確認
Feenstra, W. (384)	Holland	Electro-fusion	Emethyl tryptophane line >Electrofusion S-2-aminoethyl-cysteine line (Double-resistant fusion, 植物体再生は実験 中)
Helgesan, J.P. (386)	U.S.A.	Somatic hybrid	<i>S.brevidens</i> × <i>S.tuberosum</i> (Mesophyllプ ロトプラスト融合), PLRV resistant hybrid 得る
Vries, S.E. (388) Simo, P. (392) Shahin, E.A. (152)	Holland France U.S.A.	Somatic hybrid Protoplast regeneration 形質転換	<i>S.tuberosum</i> , <i>S.brevidens</i> , (他Hybrid) カナマイシン抵抗遺伝子を <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> を用いポテトCellに挿入 カナマイシン耐性株を得る (Callus) →再生 植物を得る
Jaynes, J.M. (153) Debnath, S. (229)	U.S.A. F.R.G.	形質転換 ウィルス抵抗性	導入遺伝子 葉, 茎, 葉柄, 根, Stolonで発現 合成遺伝子ポテトへ導入 形質転換植物調査 薬培養で得た植物→倍化して得た植物から (PVS) 抵抗性のもを選抜した

レタス

発表者	国名	分類	要約
Mitten, D. (381)	U.S.A.	Cell selection	Lettuce corky root rot (CRR) の生産する 毒素に対し抵抗性を持つCell selection Callus culture assay-toxinを含む培地で耐性 株を選抜, 植物体再生
Oka, S. (333)	Japan	Morphogenesis	Cotyledon→Callus→Shoot bud (起源につい て組織学的観察)
Ohyama, K. (319)	Japan	Protoplast culture	Cotyledon→Protoplast→Cell division→Co lony→Callus→Shoot→再生個体→開花→採種
Carpenter, T. (22)	U.S.A.	木部分化	レタスPithをExplantとし木部要素の分化発 達機構の解析



## てんさい

発表者	国名	分類	要約
Andersen, J. (336)	Denmark	Regeneration	Callus→Plant regeneration 継代中に分化能低下 Hormone habituationとRegenerationとの関係
Saunders, J. (415)	U.S.A.	Regeneration	Leaf explant→Callus→Shoot Somaclonal variant→Shooty strain
Barocka, K. (403)	F.R.G.	Morphogenesis	Ovules由来カルス→Somatic embryo genesis Shoot formation
Huizing, H. (402)	Holland	Genetic manipulation	アグロバクテリウム→Sugar beet感染株→ Callus→Regeneration
Kilby, N.J. (352)	U.K.	物質生産	Sugar beetのCell cultureから超音波 (1.02M Hz) 処理によりBetanin (赤色素) 分離

## 遺伝資源配布あっせん 事業のご案内

生研機構は、農林水産ジーンバンクに保存されている遺伝資源の配布についてあっせんを行っています。昭和62年9月1日から、今までの植物遺伝資源に加えて微生物遺伝資源についても配布されることになりました。ここに、生研機構が行っている遺伝資源あっせんについて紹介し、広く御利用をお待ちいたします。

### あっせん内容は

生研機構は、遺伝資源の配布を希望される企業等のニーズに応じて、申し込みから配布手続きの完了まで一貫してお世話いたします。

#### 1. あっせんの受付

生研機構は、農業生物資源研究所を中心とする農林水産ジーンバンクに対する遺伝資源配布申請を受け付ける窓口となります。この際、配布された遺伝資源を用いて行う研究のテーマ、目的等を提示して下さい。

#### 2. 配布遺伝資源に関する情報の提供

生研機構は、あっせん申込みをされた方に対して、国の遺伝資源配布制度の紹介、配布可能な遺伝資源についての情報および遺伝資源の特性等についての紹介をします。

#### 3. 事務手続きの紹介及び代行等

農林水産ジーンバンクに希望する遺伝資源が保存されているかどうかの照会や遺伝資源の配布にいたるまでの手続きを代行します。

### あっせん経費は

遺伝資源配布のあっせん手数料は、以下のとおりです。

#### 1. 基本料金 1,500円

基本料金は、生研機構に遺伝資源の配布あっせん申込書を出していただいた時点で申し受けます。

#### 2. 付加料金 所要額

付加料金は、あっせんのために特別に要した費用（職員出張旅費、調査費等）を申し受けます。

### 《お問い合わせ先》

農林水産ジーンバンクからの遺伝資源配布あっせんに関するお問い合わせは、下記をお願いいたします。

生研機構 企画部

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16

日本生命新宿6丁目ビル3階

T E L (03) 205-6565

F A X (03) 205-6566

生研機構  
出版案内

農林水産ジーンバンク

## 『植物遺伝資源配布目録』

生研機構では、貴重な遺伝資源を広く活用していただくために、遺伝資源配布のあっせんを行っています。この「植物遺伝資源配布目録」は、企業の皆さんの研究開発に、農林水産ジーンバンクの遺伝資源をより多く活用していただくこと、農林水産省から著作権使用許可を得て発行したものです。

この目録に掲載されているのは、主として品種名等所在情報のみですが、その生育特性およびパスポートデータ等については、御希望により生研機構が照会のお手つだいをします。

遺伝資源をより多く有効に御利用いただくために実費にてお頒けいたします。どうぞ御検討の上、注文いただくよう御案内いたします。

仕様

B 5 版上製 416頁

表紙NTラシヤ、くるみ、ダークグリーン

内容

利用手引

目次（植物名）

品種名一覧（41,646品種）

植物遺伝資源配布規定

植物別の種子配布用品種数、品種当たりの

受入種子量ならびに配布種子単位量

原産地コード

植物名の索引

頒価（送料こみ）

2,500円（ただし生研機構への出資者2,000円）

## 編集後記

BRAIN テクノニュース 第2号をおとどけします。9月末に創刊号をおとどけたところですが、幸い会員数も着実に伸びつつあり、編集者として喜びとともに責任を痛感しています。創刊号、第2号をとおして、「国内情報」の専門分野にやや片寄りが感じられま

すが、今後はより広い範囲の、より新しい情報を分りやすいかたちで会員の皆様に提供できるようつとめたいと思っています。お気付きの点、御希望がありましたら是非お寄せいただきますようお願いいたします。（大畑）

ブレイン テクノニュース (第2号)

---

昭和62年11月15日発行

発行者 渡邊 五郎

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構  
東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F  
TEL. 03-205-6565 FAX. 03-205-6566

編集 農林水産技術情報協会  
東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F  
TEL. 03-667-8931 FAX. 03-667-8933

© Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1987