

バイオテクノロジーを利用した
地域特産園芸作物の改良に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
博士（農学）学位論文

岩本 嗣

目 次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 フキの効率的ウイルスフリー化技術の開発と ソマクローナル変異選抜による品種育成	5
第 1 節 頭花培養によるフキウイルスフリー株の大量増殖	7
第 2 節 在来系統の収集とウイルスフリー株を利用した優良系統の選定	23
第 3 節 ソマクローナル変異選抜によるフキ多収性系統の育成	28
第 4 節 フキ「大阪農技育成 1 号」の育成経過と特性	37
第 3 章 細胞融合による水ナス用台木品種の育成	43
第 1 節 ナス近縁種組織切片からの植物体再生技術の確立	45
第 2 節 ナス近縁種プロトプラストからの 効率的な植物体再生技術の確立	55
第 3 節 <i>Solanum integrifolium</i> と <i>S. sanitwongsei</i> の 体細胞雑種の作出	66
第 4 節 体細胞雑種の青枯病抵抗性	82
第 5 節 ナス台木用品種「羽曳野育成 1 号」の育成経過と特性	90
第 4 章 総合考察	98
摘要	103
Summary	105
謝辞	107
引用文献	109
研究業績	117

第1章 緒言

大阪は難波津とよばれ、淀川と大和川が合流する所に位置し、古来より水運に恵まれてきた。そのため、国内はもとより中国大陸、朝鮮半島からの船が行き交い、日本の玄関口として大きな役割を担い、流通・外交・交通・交易の拠点として栄華を極めてきた。古くは飛鳥から遷都した難波宮がおかれ、その後も藤原京、平城京、長岡京の副都としての機能を維持してきた。

江戸時代になると、全国の藩が堂島や中之島付近に蔵屋敷を構え、米相場の中心として栄え、天保年間（1830-1834）には、125もの蔵屋敷があったと伝えられている。これらの蔵屋敷の名残は、阿波座、土佐堀、信濃橋といった地名として残っている。そのころから、大阪は「天下の台所」と呼ばれるようになり、米相場の中心としてだけでなく、人や文化の交流拠点として大きな役割を担ってきた。その結果、多様な食材が全国各地から集まり、「食い倒れ」の食文化が育まれてきた。また、淀川と大和川が運んだ肥沃な土壌や豊富な水資源は、野菜の栽培に好適で、大阪の気候と風土に適合した野菜が、独自の分化をとげながら品種となり、今日に至っている。

たとえば、小さいが味の良い勝間南瓜、深い紅色で色美しく正月用に欠かせない金時人参、きめこまやかで甘みのある田辺大根、歯切れ良く漬物に適する玉造黒門越瓜と毛馬胡瓜、源八ものとよばれる芽じそ、天満菜ともよばれ煮物や漬物に適する大阪白菜、野沢菜のルーツといわれる天王寺蕪等があり、これら「なにわの伝統野菜」から、大阪に定着した野菜の多様性がうかがわれる。

本学位論文で研究対象としたフキと水ナスも、古くから大阪に定着した伝統的な野菜である。フキについては、平城宮から出土した長屋王家木簡に「山背菌進落六束知佐四束」（奈良国立文化財研究所 1993）の記載があり、古来より食用として栽培されてきた。また、大阪市内における栽培の歴史は古く、さらに大正時代以降は主な栽培地を泉州地域に移し、「愛知早生ふき」の導入、地下茎の冷蔵、ハウス栽培等の技術導入によって、全国有数の産地として生き残ってきた（大阪府農業会議 1984；田中 1993）。

一方、水ナスは、室町時代に書かれたとされる「庭訓往来」に「澤茄子(ミツナス)」の記載があり、近木郷の澤村付近、現在の貝塚市沢周辺が発祥の地と言われている。また一説には泉佐野市に残る「日根野あずきに上之郷なす」の諺から、和泉の国上之郷村、現在の泉佐野市上之郷近辺との説もある。この水ナスは、浅漬にするとほのかな甘みが絶品で、大阪土産ベスト3に入る確固たる地位を築いている。

ところで、これらの伝統野菜は、現在、極めて厳しい環境で栽培されている。大阪府の面積の約半分は、都市計画法に基づく市街化区域、残りの半分が市街化調整区域に指定されている。奈良県と和歌山県の県境には、生駒・葛城山系が縦走し、耕作地

として利用できない。そのため、市街化区域と市街化調整区域をまたがるように農業振興地域が点在している。当然のことながら、耕作地の地価は高い。そのため、単位面積当たりの収益を上げる必要がある。従って、大阪府の農業は、施設栽培を中心とした土地生産性の高い農業形態をとっている。また、農業粗生産額の2/3以上を野菜、花き、果樹といった園芸作物が占めており、大阪農業の特色となっている。

野菜は農業粗生産額の約4割を占め、府内で消費される野菜の約1割を担っている。また、消費地に近い利点を活かし、新鮮で生産者の顔が見えるとれたて野菜を府民に供給している。そのため、多品目少量生産が主流であるが、関西空港対岸の泉州地域では、肥沃な土壌と豊富な水資源を背景に昔から農業が盛んで、フキ、シュンギク、水ナス、サトイモ等を主な作目にした専業農家が多く、異なる一面も持っている。その中で、シュンギクは全国第1位、フキは全国第3位の生産量を誇っている。

市場における大阪野菜の評価は高い。また、そのほとんどが生食用として出荷されるため単価も高く、フキの生産額は約4億から4億6千万円、水ナスに至っては約20億から25億円の生産額を上げ、収益的に極めて有利な作目となっている。

しかし、前述したように府内は地価が高いため、単位面積当たりの収益をかなり上げる必要がある。そのため、収益上の利点から、ビニルハウス等を利用した施設栽培の比率が年々高まり、フキでは10割、水ナスでも6割以上が施設栽培となっている。さらに施設栽培では、長期栽培が可能となり、フキでは9月から翌年6月までの10ヶ月間、水ナスは作型により12月から8月、2月から10月、4月から11月といった長期栽培が毎年行われている。加えて、大阪府内では輪作地の確保が困難なことから、20年、30年連作というほ場も珍しくない。その結果、青枯病、半身萎ちょう病、白絹病、菌核病、葉枯病等、土壌伝染性の病害が蔓延し、アブラムシによって伝搬するウイルス病も相まって、生産性や品質を低下させる大きな要因となっていた。

近畿農政局大阪統計事務所発刊の「大阪の園芸」によると、昭和30年代後半から昭和48年まで、大阪は全国一のフキの収穫量を誇っていた。その後、宅地化や生産者の高齢化、後継者不足等により、収穫量は徐々に低下していったが、栽培技術の向上により、単位面積当たりの収量は漸増していた。ところが、1980年頃から泉州各地で生産性や品質の低下が認められ、10a当たりの収量も低下し、1985年に16.06t得られていた収量が、10年後の1995年には、13.78tまで激減し、「いいフキが作れなくなったので、フキづくりをやめたい。」との声があちこちで聞かれるようになっていた。生産現場では、生産意欲の低下による生産者戸数と作付面積の減少といった悪循環に陥り、わずか10年間で作付面積は1/4の25.8%に、収穫量は22.2%まで激減し、産地存亡の危機を迎えていた。

生育障害の原因究明については、中曽根（1987）が調査を行い、フキモザイクウイルス（BuMV）、キュウリモザイクウイルス（CMV）、アラビスモザイクウイルス（ArMV）

の重複感染による生育障害であることが明らかとなり、生産現場からは、対策法の確立ならびに産地を維持するための新品種育成の要望が上げられていた。

栄養繁殖性野菜のウイルス病防除には、ウイルスフリー株の配布による種苗の更新が有効で、イチゴ（藤本ら 1987；庄子 1990）をはじめ多くの栄養繁殖性野菜で実用化が図られている。フキのウイルスフリー化の研究は、茎頂培養（松原，益田 1980；森下，山田 1979）やカルス培養（森下，山田 1979；森下ら 1980；矢部ら 1986）が報告されているが、茎頂組織は雑菌による汚染率が高い（松原，益田 1980；森下，山田 1979；村上ら 1988）欠点があり、また、カルス培養ではウイルスフリー化するには長期間の継代培養が必要（矢部ら 1986）なことから、茎葉再生率の低下や再生植物体に形質変異が生じる（森下，山田 1981）といった問題があった。

そこで、第2章第1節において、フキウイルスフリー株の効率的作出法として、花芽分化初期の頭花を用いた頭花培養法を開発した。さらに、*in vitro* における大量増殖法として、腋芽増殖法、効率的な発根・順化法を開発し、ウイルスフリー株を大量供給する一連の技術を確立した。

3倍体の「愛知早生フキ」は、100%ウイルスに感染しているため、遺伝的な系統間差を明らかにすることができていなかった。そこで、第2章第2節では、大阪府内で栽培されている「愛知早生フキ」の在来系統を収集し、頭花培養によってウイルスフリー化した系統を用いた比較栽培を行い、系統間の差を明らかにした。その結果をもとに、育種素材としてA系統を選定した。

第2章第3節では、頭花培養系を用いたソマクローナル変異選抜を、A系統を用いて実施し、フキの多収性系統を早期選抜することに成功した。このことから、フキの品種改良におけるソマクローナル変異選抜の有効性を実証した。

第2章第4節では、第1節から第3節の技術の積み重ねによって育成された多収性品種「大阪農技育成1号（愛称：のびすぎでんねん）」の栽培特性を評価し、高い実用性を明らかにした。

一方、水ナスは、贈答用の漬物として近年需要が拡大し、収穫期間の長いハウス栽培へのシフトが進んでいる。ところが、大阪府内では輪作地の確保が困難で、同一ほ場における連作が恒常的に行われているため、土壌伝染性の青枯病や半身萎ちょう病の被害が拡大し、安定生産を妨げ、品質の低下をもたらす大きな要因となっていた。青枯病の防除には、抵抗性台木の利用が有効（宮園 1979）であるが、水ナスに適した台木品種や近縁野生種は見いだされていない。また、ナスと近縁野生種、近縁野生種間の種間雑種の研究も行われているが、十分な成果は上がっていない。

そこで、青枯病には感受性であるが、果実品質や収量に優れた台木品種の *Solanum integrifolium* に青枯病抵抗性を導入する目的で、*S. integrifolium* と近縁野生種の細胞融

合を行った。

第3章第1節では、不定芽形成の基礎的条件を明らかにし、不定芽形成能の高い組織部位を明らかにした。

第3章第2節では、第1節で選定された組織切片からプロトプラストを分離・培養し、初代培養密度、不定芽形成培地移植前の前培養期間の検討を行い、極めて効率的な植物体再生技術を確立した。

第3章第3節では、不活性化処理した *S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* のプロトプラストを細胞融合して体細胞雑種を作出し、アイソザイム分析と RAPD 分析による雑種の同定をおこなった。さらに、GISH 法による染色体の識別技術を確立し、複2倍性体細胞雑種と6倍性体細胞雑種の染色体構成と形質との相関を明らかにした。

第3章第4節では、草勢、採種性、根張りに優れた複2倍性体細胞雑種の青枯病抵抗性を評価し、複2倍性の体細胞雑種間で、抵抗性に大きな系統間差が生じていることを明らかにした。さらに、青枯病抵抗性に優れた系統を選抜できることを実証した。

第3章第5節では、第1節から第4節の積み重ねによって選抜された SH9 系統の自殖第1代の水ナス用台木としての実用性を評価し、生産性に優れた台木品種「羽曳野育成1号」として登録したので、その育成経過と特性を述べる。

第2章 フキの効率的ウイルスフリー化技術の開発と ソマクローナル変異選抜による品種育成

フキ (*Petasites japonicus*)は北海道から九州まで広く自生する多年生のキク科植物(北村 1977 ; Takagi 1994) で、ウド、ミツバ、セリ等とともに、今日では数少ない我が国原産の野菜である。食用の歴史は古く、平城宮から出土した長屋王家木簡に「山背菌進蔕六束知佐四束」(奈良国立文化財研究所 1993) と記されている。以来、独特な香りとほろ苦い食味や長く伸びる特性から、祝い事に欠かせない食材として尊ばれ、正月や雛祭りにはフキを味わい、家族の成長を祈願する風習がある。また、早春にいち早く清々しい姿をみせるため、春の訪れを伝える野菜として珍重されてきた。元禄時代の農業全書に、「市町近きところは、是を売りにて利潤多き物なり。わづかのせばき畠にても、他の菜のおよぶことあらず」とあり、昔から有利な野菜として販売されてきたことがうかがえる。

フキには2倍体と3倍体があるが、主要な栽培品種の「愛知早生フキ」と「水フキ」は3倍体品種である(今津, 藤下 1962 ; Takagi 1994)。これまで、4倍体は確認されておらず、4倍体と2倍体間の交雑種とは考えにくい。また、フキ属は北半球の温帯に20種(北村 1977)ほど分布し、地中海沿岸原産のニオイカントウ (*P. fragrans*) が、昭和初年に園芸植物として渡来(北村 1977)しているが、我が国に自生するフキ属は、フキ1種しかなく、種間交雑によるものとも考えにくい。

今津, 藤下 (1962) の調査によると、3倍体は低緯度地方ほど増える傾向があり、南九州では特に高い頻度で分布していた。低緯度では冬季の気温がフキにとって高すぎるため、非減数性の配偶子が生じ、さらに正常配偶子との受精によって3倍体植物が出現したと考察している。

「愛知早生フキ」や「水フキ」の育成経過は不明であるが、3倍体のフキは萌芽が早く、草勢が強く、高温や乾燥ストレスに強い特性を持つ(今津, 藤下 1962)ため、自然淘汰や人為的に淘汰された3倍体植物の中から、栽培特性に優れた「愛知早生フキ」や「水フキ」が選抜育成されたと推測される。

大阪府におけるフキの栽培歴は古く、明治44年には大阪市内を中心に17.2ha、大正4年には27.5haの面積で栽培されていた記録が残っている。現在の主産地である大阪府南部の泉州地域では、大正時代に「河内フキ(水フキ)」を木島村(現:貝塚市)に導入したのが始まりで、現在栽培されている品種の「愛知早生フキ」は、昭和初期に愛知県から同村に導入されたものである(大阪府農業会議 1984 ; 田中 1993)。その後、昭和15年頃までは門外不出とされ、一部の生産者に限定されていたが、収益性の利点から徐々に広がっていった(田中 1993)。

近畿農政局大阪統計事務所発刊の「大阪の園芸」によると、昭和30年代後半から昭

和 48 年まで、大阪は全国一のフキの収穫量を誇っていた。その後、宅地化や生産者の高齢化等により、収穫量は徐々に低下していったが、2000 年度の収穫量は全国第 3 位で、今日でも愛知、群馬、徳島とともに四大産地の一角を占めている。また、柔らかさとみずみずしさで定評があり、「大阪フキ」のブランドとして高値で取り引きされ、11 月から 6 月までの長期出荷により、生産者は高収益を上げていた。

ところが 1980 年頃から、泉州各地で生産性や品質の低下が認められ、1990 年代に入ると「いいフキが作れなくなったので、フキづくりをやめたい。」との声があちこちで聞かれ、生産意欲の低下による生産者の減少という深刻な問題が生じていた。

昭和初年に「愛知早生フキ」が導入（田中 1993）されて以来、約 80 年間の長きにわたり、栽培が続けられてきた。その間、現地では生産者レベルで、種茎の選抜や交換を行い、生産性の維持を図ってきたが、施設栽培の導入により、生産ほ場が固定化し、長年にわたる連作によって、株の老化が進んでいることが明らかとなった。また、種茎の株分けによる増殖とアブラムシ伝搬により、ウイルスの蔓延が生じており、中曾根（1987）によると、フキモザイクウイルス（BuMV）100%、キュウリモザイクウイルス（CMV）60%、アラビシモザイクウイルス（ArMV）は 80%の株から分離され、3 種類同時に分離された株は 50%、2 種類のウイルスに重複感染した株は 90%に達していた。そのため、萌芽後まもない時期にウイルスによる明瞭なモザイク症状を呈し、生産性や品質の低下が、年々深刻な問題となっていた。

このような状況の中で、大阪府は伝統に育まれた「大阪フキ」を、1993 年度に「なにわ特産品」の 1 品目に指定し、安定した生産体制づくりを推進していくことになった。その一環として、大阪府と泉州地域の各農協のフキ生産出荷部会は、「大阪フキ」生産安定化対策検討会を 1994 年に設置し、著者らも 1996 年度から問題解決に取り組んだ。

第2章 第1節 頭花培養によるフキウイルスフリー株の大量増殖

フキにはフキモザイクウイルス (BuMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、アラビスマザイクウイルス (ArMV)、アルファルファモザイクウイルス (AIMV) の発生が報告され (栃原, 田村 1976)、土壌伝染性病害の半身萎ちょう病 (加藤, 広田 1975)、白絹病 (岸 1976) とともに種茎伝搬によって蔓延し、フキの生産性を低下させる主な要因と考えられている。栄養繁殖性野菜のウイルス病防除には、ウイルスフリー株の配布による種苗の更新が有効で、イチゴ (藤本ら 1987; 庄子 1990) をはじめ多くの栄養繁殖性野菜で実用化が図られている。

フキのウイルスフリー化の研究は、茎頂培養 (松原, 益田 1980; 森下, 山田 1979) や茎頂組織を用いた苗条原基法 (村上ら 1988)、さらに雌小花、花茎、葉柄、葉身を外植体として用いたカルス培養 (森下, 山田 1979; 森下ら 1980; 矢部ら 1986) が報告されている。一方、フキの茎頂部は地下茎や地際にあるため、茎頂組織を用いた培養は雑菌による汚染率が高い (松原, 益田 1980; 森下, 山田 1979; 村上ら 1988) 欠点があり、また、カルス培養では ArMV の除去が困難で、BuMV と CMV においてもウイルスフリー化するには長期間の継代培養が必要 (矢部ら 1986) なことから、茎葉再生率の低下や再生植物体に形質変異が生じる (森下, 山田 1981) といった問題がある。そこで、ウイルスフリー株の効率的な作出を目的として、花芽分化初期の頭花を用いた培養について検討を行った。

材料および方法

1. 頭花からのシュート再生

供試品種は「愛知早生フキ」で、当所フキ栽培ハウスで長年栽培され、電子顕微鏡観察と生物検定によって BuMV、CMV、ArMV の重複感染が確認された株を用いた。6月下旬から7月中旬にフキの花蕾 (ふきのとう) を採取し、中性洗剤で洗浄後、70% エタノールで 1分、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で7-10分表面殺菌し、滅菌蒸留水で3回洗浄して用意した。

花芽分化初期の花蕾を解剖顕微鏡下で露出させ、0.2-0.4 mmの未熟な頭花を無菌的に摘出し外植体とした。MS培地 (Murashige and Skoog 1962) に α -naphthalene acetic acid (NAA) (0, 0.01, 0.1, 1.0 mg l⁻¹) と 6-benzylaminopurine (BA) (0, 0.1, 1.0, 10.0 mg l⁻¹) を組合せた合計 15 区 (Table 1) の寒天 (DIFCO社製: 0.7% BiTekTM AGAR) 培地を作製した。培地 15 ml入りのガラス製サンプル管 (マルエム社製: 35 mm径×75 mm長) に1個ずつ頭花を置床し、シュート再生に及ぼすホルモンの影響を調査した。培養は 25°C、2,000 lx、16 時間日長の培養室内で行い、4 週間ごとに継代を繰り返した。

から 12 週間培養を行った。なお、最初の 8 週間は前述のサンプル管で、後半の 4 週間は培地 70 ml 入りのポリカーボネート製カルチャーボトル（ケニス社製：80 mm 径×102 mm 長）に継代して培養を行った。

2. 腋芽増殖による大量増殖

頭花から再生したシュートを、未展開葉 2 枚含む約 2 cm の大きさに切断して外植体に用いた。MS 培地に NAA (0, 0.01 mg l⁻¹) と BA (0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg l⁻¹) を組合せた合計 8 区 (Table 2) の寒天培地と NAA (0, 0.01, 0.1, 1.0 mg l⁻¹) と BA (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 mg l⁻¹) を組合せた合計 18 区 (Table 2) の液体培地を作製し、カルチャーボトルに 70 ml 分注し、外植体を置床した。培養は 25°C、2,000 lx、16 時間日長の培養室内で行い、寒天培地は静置で、液体培地は毎分 100 回転のロータリー式巡回培養器で 8 週間培養した。

3. シュートからの発根

腋芽増殖で得られたシュートの集塊から、未展開葉を 2 枚含む約 2 cm の大きさのシュートを切断して外植体とした。培地を 25 ml 分注した 100 ml 三角フラスコで 3 週間培養し、培養環境（培養瓶の巡回および光の有無）と基本培地組成が発根に及ぼす影響について検討を行った。

1) シュートからの発根に及ぼす培養環境の影響

Table 3 に示す巡回培養（毎分 100 回転）と光照射（2,000 lx、16 時間日長）条件を組合せた 4 通りの環境で試験を行った。培地はショ糖 3%、ホルモンフリーの MS 液体培地で、培養 3 週間後にシュート重と根重、発根率を調査した。

2) シュートからの発根に及ぼす基本培地組成の影響

ショ糖 3%、ホルモンフリーの MS、B5 (Gamborg et al. 1968)、White (1963) 液体培地と各培地の無機塩を 1/2、1/4 濃度に希釈した液体培地を作製し、25°C、2,000 lx、16 時間日長条件下で 3 週間巡回培養（毎分 100 回転）し、根重と発根率を調査した。また、無機塩濃度を 1/2 に希釈した修正 B5 培地については、有機成分を 1/2、1/4 濃度に希釈した液体培地を作製し、同様に根重と発根率を調査した。

4. 幼植物の順化

森下, 山田 (1979)、松原, 益田 (1980) (0.1 mg l⁻¹ NAA 添加 MS 寒天培地) の方法および矢部ら (1986) (0.5 mg l⁻¹ NAA 添加 MS 寒天培地) の方法で発根させた培養株と無機塩、有機成分ともに 1/2 濃度に希釈したホルモンフリーの修正 B5 液体培地 (1/2B5 培地) で得られた発根個体の本葉を 2-3 枚に調整し、砂壤土 (川砂と当所の埴壤土を 1:1 に混合) またはバーミキュライトをつめた鉢に定植してビニル被覆し、2

5°Cの恒温室で生育させた。定植1週間後からビニル被覆に穴を開け、徐々に穴の大きさや数を増やして湿度を低下させた。定植3週間後に被覆を取り外し、さらに1週間栽培した後、順化率を調査した。

5. 培養株のウイルス検定

BuMVはDN法による電子顕微鏡観察と検定植物の *Chenopodium amaranticolor* への汁液接種による生物検定を行った。CMVとArMVは寒天内二重拡散法による検定とソラマメ(CMV)、センニチコウ(ArMV)を用いた生物検定も併せて行った。

結 果

1. 頭花からのシュート再生

NAAを単独で添加した区で頭花は肥大するが、シュートの再生は認められなかった。一方、BA単独区とNAAとBAの組合せ区ではすべての区でシュートの再生が認められ、そのうち0.1 mg l⁻¹ NAA+1.0 mg l⁻¹ BA区では、80%のシュート再生率で、培養12週間後に得られたシュート数の平均も5.2と最も高かった (Table 1)。

シュート再生の様式は、頭花の伸長と同時に、基部からカルスを経由せず直接シュートが再生する (Figure 1A) 場合と花芽分化初期の頭花が培養により器官分化し、頭花は伸長しながら開花し (Figure 1B)、その後、基部から直接シュート再生する (Figure 1C) 2通りが認められた。

2. 腋芽増殖による大量増殖

寒天培地では0.1 mg l⁻¹ BA区および0.01 mg l⁻¹ NAA+0.01 mg l⁻¹ BA区での増殖率が高く、1本のシュートが腋芽増殖により、8週間で32倍に増殖した (Table 2)。とくに0.1 mg l⁻¹ BA区では、増殖率のばらつきも少なくコンパクトなシュートの集塊 (Figure 2A) が得られた。

液体培地ではBA濃度を高くして旋回培養すると、増殖率は高まり、BAを1.0–3.0 mg l⁻¹で添加すると、37.8–42.3倍の腋芽の増殖が得られた。また、0.01 mg l⁻¹の濃度でNAAを添加するとさらに効果的で、0.01 mg l⁻¹ NAA+3.0 mg l⁻¹ BA区では、培養8週間後に80.9倍に増殖した (Table 2, Figure 2B)。NAA濃度を0.1–1.0 mg l⁻¹に上げると逆に増殖率は著しく低下し、1.0 mg l⁻¹ NAAを含む試験区や10.0 mg l⁻¹ BAを含む試験区では、Vitrificationしたシュートが多く認められた。

3. シュートからの発根

1) 発根に及ぼす培養環境の影響

光条件下で巡回培養を行うと、シュートの生育促進とともに発根促進も認められ、培養3週間後にはすべてのシュートで発根し、シュート当たりの平均根重も生体重で81.2 mg になった (Table 3)。その他の区では1.2–34.9 mg と低く、光と巡回培養の組合せ効果が顕著であった。

2) 発根に及ぼす基本培地組成の影響

各種培地の無機塩濃度を1/2に希釈すると発根促進が認められ、その中でB5培地の1/2希釈が最適で、発根率100%、根重の生体重は312.8 mg に達した (Table 4)。

無機塩濃度を1/2に希釈した修正B5培地の有機成分を1、1/2、1/4濃度に希釈したところ、1/2濃度の有機成分が最適で、発根率100%、根重358.6 mg (Table 4) となり、支根や毛根が著しく発達した (Figure 3)。

4. 幼植物の順化

0.1、0.5 mg l⁻¹ NAA添加MS寒天培地で発根させた培養株の順化率は50%以下であったが、無機塩と有機成分の濃度を1/2に希釈した修正B5液体培地で発根した培養株を砂壤土で順化させたところ、順化率は100% (Table 5) で、良好に生育した。バーミキュライトは過湿のために株の腐敗が生じ、適さなかった。

5. 培養株のウイルス検定

Table 1 に示すように、異なる頭花由来の培養株が136クローン得られた。クローンごと BuMV、CMV、ArMV のウイルス検定を行ったところ、BuMV と CMV は全く検出されなかったが、ArMV のみ11個体 (8.1%) から検出 (Table 6) された。そこで、ArMV に保毒した11株を廃棄し、残りの125クローンを腋芽増殖して多数のウイルスフリー株を育成することができた。

Table 1. Effect of plant growth regulators on shoot formation from flowerhead of *P. japonicus*.

NAA mg l ⁻¹	BA	Number of explants	Number of regenerated shoots (A) ¹	Total number of shoots (B) ¹	Mean number of shoots per explant (B/A)
0.0	0.0	25	0	0	0.0±0.0 ²
0.0	0.1	25	5	9	1.8±0.8
0.0	1.0	25	15	65	4.3±1.2
0.0	10.0	25	8	18	2.3±0.8
0.01	0.0	25	0	0	0.0±0.0
0.01	0.1	25	10	18	1.8±0.2
0.01	1.0	25	18	48	2.7±0.5
0.01	10.0	25	11	24	2.2±0.4
0.1	0.0	25	0	0	0.0±0.0
0.1	0.1	25	15	59	3.9±0.8
0.1	1.0	25	20	104	5.2±0.8
0.1	10.0	25	8	11	1.4±0.2
1.0	0.0	25	0	0	0.0±0.0
1.0	0.1	25	12	21	1.8±0.4
1.0	1.0	25	14	69	4.9±1.3

¹ Data were recorded after 12 weeks of culture.

² Mean±S.E.



Figure 1. Shoot formation from flowerhead of *Petasites japonicus* cultured on MS solid medium supplemented with 0.1 mg l^{-1} NAA and 1.0 mg l^{-1} BA.

A: Direct shoot formation from flowerhead (after 8 weeks of culture).

B: *In vitro* flowering of flowerhead (after 6 weeks of culture).

C: Shoot formation from flowerhead after flowering (after 12 weeks of culture).

Table 2. Effect of plant growth regulators and culture conditions on propagation rate of axillary buds of *P. japonicus*.

NAA mg l ⁻¹	BA	Number of explants (A)	Static culture (Agar)		Gyrating culture (Liquid)	
			Total number of shoots (B) ¹	Propagation rate (B/A)	Total number of shoots (C) ¹	Propagation rate (C/A)
0.0	0.01	10	98	9.8±1.1 ²	—	—
0.0	0.1	10	316	31.6±2.6	69	6.9±0.6
0.0	0.3	10	— ³	—	183	18.3±2.2
0.0	1.0	10	188	18.8±3.0	423	42.3±2.9
0.0	3.0	10	—	—	378	37.8±3.7
0.0	10.0	10	68	6.8±0.9	88	8.8±1.5
0.01	0.01	10	320	32.0±4.2	—	—
0.01	0.1	10	238	23.8±3.3	138	13.8±1.5
0.01	0.3	10	—	—	245	24.5±2.1
0.01	1.0	10	208	20.8±2.9	436	43.6±3.7
0.01	3.0	10	—	—	809	80.9±3.7
0.01	10.0	10	48	4.8±0.4	449	44.9±7.8
0.1	0.1	10	—	—	57	5.7±0.7
0.1	0.3	10	—	—	77	7.7±0.9
0.1	1.0	10	—	—	138	13.8±1.4
0.1	3.0	10	—	—	136	13.6±2.8
0.1	10.0	10	—	—	129	12.9±2.6
1.0	1.0	10	—	—	33	3.3±0.5
1.0	3.0	10	—	—	30	3.0±0.6
1.0	10.0	10	—	—	22	2.2±0.4

¹ Data were recorded after 8 weeks of culture.

² Mean±S.E.

³ Not examined.



Figure 2. Multiple shoot formation of *P. japonicus* from apical and axillary buds.

A: Multiple shoot after 8 weeks of culture on MS solid medium supplemented with $0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$.

B: Multiple shoot after 8 weeks of culture in gyrating MS liquid medium supplemented with $0.01 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$ and $3.0 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$.

Table 3. Effect of gyration and illumination on root formation of *P. japonicus*.

Gyration	Illumination	Number of explants	Mean fresh weight of shoots per explant (mg) ¹	Mean fresh weight of roots per explant (mg) ¹	Rate of root forming explants (%) ¹
+	+	10	910.2±36.9 ²	81.2±10.8	100
+	-	10	340.4±15.0	2.0± 0.8	60
-	+	10	477.6±39.5	34.9± 8.6	70
-	-	10	275.4±37.6	1.2± 0.3	80

¹ Data were recorded after 3 weeks of culture.

² Mean±S.E.

Table 4. Effect of various basal media on root formation of *P. japonicus*.

Inorganic elements	Organic elements	Number of explants	Mean fresh weight of roots per explant (mg) ¹	Rate of root forming explants (%) ¹
MS	MS	10	81.2±10.8 ²	100
1/2MS	MS	10	230.0±26.7	100
B5	B5	10	176.6±16.0	100
1/2B5	B5	10	312.8±16.9	100
1/4B5	B5	10	159.1±19.9	100
White	White	10	3.6± 1.0	60
1/2White	White	10	14.8± 2.6	80
1/2B5	B5	10	286.3±13.5	100
1/2B5	1/2B5	10	358.6±19.2	100
1/2B5	1/4B5	10	324.7±14.0	100

¹ Data were recorded after 3 weeks of culture.

² Mean±S.E.



Figure 3. Root formation from shoot of *P. japonicus* cultured in half-strength B5 phytohormone-free, gyrating liquid medium.

Table 5. Effect of rooting medium and soil type on acclimatization of *P. japonicus* .

Rooting medium	Number of survived plantlets (%) ¹		
	Number of plantlets	Sandy loam	Vermiculite
0.1 mg l ⁻¹ NAA MS agar medium	100	48 (48)	30 (30)
0.5 mg l ⁻¹ NAA MS agar medium	100	42 (42)	— ²
Phytohormone-free 1/2B5 liquid medium	200	200 (100)	124 (62)

¹ Data were recorded 28days after planting.

² Not examined.

Table 6. Virus detection of plants regenerated from flowerheads.

Number of plants	Number of virus detected plants (%)		
	BuMV	CMV	ArMV
136	0 (0)	0 (0)	11 (8.1)

考 察

栃原, 田村 (1976) は、広島、石川、千葉の各県の栽培ほ場から採集したフキの調査を行い、84%から CMV が、77%から BuMV が分離され、その多くは CMV と BuMV に重複感染していた。また、ArMV、AIMV もそれぞれ 35%、12%分離され、ウイルスフリーの株は見当たらなかったと報告している。中曾根 (1987) は大阪府におけるフキのウイルス病発生調査を行い、CMV60%、ArMV80%、BuMV は 100%の株から分離され、3 種類同時に分離された株は 50%、2 種類のウイルスに重複感染した株は 90%に達し、ウイルスに感染していない株はなかったと報告している。

これまで、ウイルスフリー株を育成する目的で、茎頂培養が行われてきたが、地下茎や地際に茎頂部があるため、雑菌の発生が高い (松原, 益田 1980 ; 森下, 山田 1979 ; 村上ら 1988) ことが報告されている。森下, 山田 (1979) によると放線菌の 1 種が 70-87%と高率に発生し、生き残った茎頂の生育も遅く、シュートを再生するのに最も早いもので 34 日、遅い個体では 10 ヶ月要すると報告している。松原, 益田 (1980) の報告によると雑菌の汚染を免れた組織も強い殺菌の影響で褐変するものが多く、また茎頂組織由来の再生個体の中にアカザ検定でモザイク症状を示すものもあり、茎頂培養には残された問題点も少なくない。

一方、森下ら (1980) や矢部ら (1986) は 1 年中採取可能で、雑菌の発生が少ない葉柄や葉身を外植体として用い、いったんカルスを形成し、そのカルスから植物体を再生させる手法を報告している。ところが、カルス培養では ArMV の除去が困難なことや BuMV においてもウイルスフリー化するには 1 年以上の長期間の継代培養 (60-80 日ごとに 5 回継代培養) が必要 (矢部ら 1986) なことから、茎葉再生率の低下や再生植物体に形質変異が生じる (森下, 山田 1981) という問題がある。本実験の材料として用いた花蕾 (ふきのとう) は地上部にあり、表面殺菌により容易に無菌の頭花を摘出することができ、生長点の摘出のように熟練を必要としなかった。

また、頭花由来の植物体は、CMV と BuMV が完全に除去され、ArMV も 8.1%と保毒率が低く、ウイルス検定によって保毒株を容易に除去することができた。本研究で用いた頭花は、花芽分化初期の未熟な頭花であり、茎頂組織と同様にウイルス濃度が低く、ウイルスフリー株が高率に得られたと考えられる。矢部ら (1986) は、フキのカルスを 5 回継代したカルスにおいて BuMV は完全に消失したが、ArMV は 25%のカルスから分離されたと報告しており、本研究で低率ながら ArMV が除けなかった点と類似している。栃原, 田村 (1976) は AIMV と ArMV はフキの生育に及ぼす影響は少なく、CMV と BuMV が問題になると報告している。ウイルスフリー株に ArMV を保毒した株が混入しても実用上は問題ないと考えられるが、保毒株数も少ないため、3 種類ともウイルスフリー化した株のみを以後の増殖株に用いた。

頭花培養の欠点は、材料を採取する時期が限られ、頭花からのシュート再生に8から12週を要する点にあるが、ハウス栽培したフキでは1-2月と6-7月の年2回花蕾を採取できる。また、種茎の冷蔵によって材料の採取時期をずらすことができる。さらに、1つの花蕾は50-80以上の頭花をつけ、花芽分化初期の未熟な状態でも35以上の頭花を培養できる。頭花からのシュート再生率を80%、ウイルスフリー化率を91.9%、シュート再生、腋芽増殖、発根および順化に要する期間をそれぞれ8-12、8、3、4週間とすると、1つの花蕾から半年で1万株（ $35 \times 0.8 \times 5.2 \times 0.919 \times 80.9 = 10,824$ ）以上の再生個体が得られる計算になる。また、いったん頭花から再生したシュートは、腋芽増殖により2ヶ月で約80倍の増殖を繰り返し得られる。これはイチゴの腋芽増殖（培養27日後に48.3倍）（藤本ら1987）と比較しても劣らなかつた。

フキの頭花培養で認められたように、花器組織からの不定芽形成は興味深い。同じキク科植物では、キクの花弁（Bush et al. 1976）やシュンギクの小花（岩本，嘉儀1990）等を用いた不定芽誘導の報告がある。今後、走査電子顕微鏡を用い、不定芽形成過程の観察を行い、形成部位の特定やキクおよびシュンギクとの形成過程の比較により、花器からの不定芽形成のメカニズムを調査することも残された課題である。

ところで、遺伝的安定性に優れた増殖法としてフキの苗条原基法が検討され、1ヶ月で生重量が4-6倍に増殖し、染色体数も安定であると村上ら（1988）は報告している。生重量の増加と腋芽の増加を単純には比較できないが、腋芽増殖は2ヶ月で80.9倍に増殖し、その後、ほ場で栽培した培養苗の中に、形態的変異を示す株は認められず、腋芽増殖は苗条原基法と同様に優れた増殖法であった。

シュートの発根は、NAAを0.1（松原，益田1980；森下，山田1979）から0.5（矢部ら1986）mg l⁻¹添加したMS寒天培地が用いられ、76-100%の高い発根率が得られているが、順化の点で問題がある。松原，益田（1980）や矢部ら（1986）の報告には順化について記載がなく、森下ら（1980）はバーミキュライトを用いた順化率は31%と低く、イチゴパックを用いた過湿条件下では、雑菌の混入によってほとんどの個体が枯死し、効率的な順化法を確立する必要があると報告している。本実験では発根量を基準として検討を行い、1/2B5液体培地、光条件下で旋回培養すると発根量が多く、砂壤土に定植したところ、100%順化できることがわかった。順化率が向上した理由は、まず順化に用いた個体の発根量が多い。次にNAAによって誘導された根に比べ、ホルモンフリーの培地で形成された根は、自然根に近い形態で、支根、毛根が発達している。さらに、液体培地は寒天を取り除く必要がないため根傷みしない等の理由が考えられた。

また、土壌中の過湿を防ぐ目的で砂壤土を用い、好結果を得た。保湿性の高いバーミキュライトは根部が過湿となり、株の腐敗が生じ順化率を低下させる原因となった。今回は、通気膜の利用や発根支持体、順化資材についての検討を行わなかつたが、砂

壤土への定植で十分順化が可能であった。

以上によりフキのウイルスフリー株を効率的に大量供給する体系が確立した。すなわち、1-2月に形成された花蕾を数個採取し、頭花培養-ウイルス検定-腋芽増殖-発根-順化と一連の作業を行うことにより、遅くとも9月中旬の定植時期に、数万株以上のウイルスフリー株の供給が可能となった。

これまでの現地調査で、「愛知早生フキ」、「水フキ」、「山フキ」等の主な栽培品種からウイルスフリー株は見つかっていない(深谷ら 1983; 中曾根 1987; 柄原, 田村 1976)。そこで、本研究で得られたウイルスフリー株と在来株の栽培比較を行うことにより、ウイルスの感染がフキの品質や収量の低下にどの程度関与しているかを明らかにすることができる。

さらに、ウイルスフリー株の現地供給は、半身萎ちょう病、白絹病の防除においても効果が期待される。これまで臭化メチル、クロルピクリン等の薬剤処理や太陽熱利用による栽培ほ場の土壌消毒を実施し生産性を維持してきた。しかし、臭化メチル、クロルピクリン等の効果の高い土壌殺菌剤は、現在、大阪府内では使用できない。また、太陽熱消毒を施しても、病原菌に汚染された従来種の種茎を植え付けると、種茎に付着した病原菌が増殖し、1、2年で消毒効果がなくなる。その意味でも、ウイルスフリー株の定期的導入と太陽熱消毒の併用による病害の軽減が期待される。加えて、土壌殺菌剤は環境保全面からも問題が多く、この点における波及効果も大きい。

第2章 第2節 在来系統の収集とウイルスフリー株を利用した優良系統の選定

木島村（現：貝塚市）のフキ栽培農家であった田中利兵衛氏と田中権一氏は、昭和初年に愛知県を視察した際に、トロ箱1箱の地下茎を持ち帰った。このフキは、当時栽培されていた「河内フキ（水フキ）」より萌芽が早く、葉柄の伸長も優れて収量が増加することから評判となり、その後、泉州全域に広がっていった。これが「愛知早生フキ」大阪在来系統である（田中 1993）。

泉州地域で栽培されている「愛知早生フキ」在来系統は、木島村に導入された系統がルーツであり、また現地では、生産者間で種茎の選抜や交換を行ってきたことから、フキは系統選抜が進んだ野菜で、系統による差は小さく、ウイルスフリー化すればほぼ同じとの考え方が一般的であった。

一方、昭和 34 年の伊勢湾台風による愛知県のフキ産地の被害は甚大で、塩害によって作付けが大幅に減少した（愛知県園芸発達史編さん会 1981）。その時、被害を耳にした木島の生産者は、トラック数十台分の地下茎を運び、昔の恩に報いたという（田中 1993）。その後、大阪から里帰りしたフキは、出来がすこぶる良いとの評判が広まり、その後も愛知県への導入が続き、被害の少なかった地域まで置き換わっていった（愛知県園芸発達史編さん会 1981）。さらに、定植後に余った種茎は、冷蔵会社を通じて北海道から九州まで販売されて行き、4 大産地の 1 つである徳島や中規模産地の兵庫（淡路一宮）、福岡等、数多くの産地形成にも貢献している。

このように、木島村に導入された系統が、大阪の泉州全域に広がり、その後、全国に広がっていったという歴史的背景を考えると、「愛知早生フキ」の中には、遺伝的な系統間差は少ないとの考え方が、一般的であったのもうなずける。

しかし、これまでフキの系統間差については、十分な検討が行われていなかった。さらに、大阪在来の「愛知早生フキ」は、全てウイルスに感染しており、ウイルス感染の影響を除いた系統間差は調べられていなかった。そこで、在来系統の収集と比較栽培、さらにウイルスフリー株を用いた比較栽培を行い、育種素材となる優良系統の選定を実施した。

材料および方法

1. 在来系統の収集と比較栽培

大阪府泉南地区農業改良普及所（現：大阪府泉州農と緑の総合事務所農の普及課）の協力のもと、貝塚市木島農協、泉佐野市農協、泉南市農協、熊取町農協のフキ生産出荷部会（現：JA 大阪泉州フキ生産出荷部会）から推薦された 20 系統を収集し、立毛品評会で 5 系統に絞り込んだ。これら 5 系統の地下茎を同一ほ場で 9 月から翌年 6

月末まで10ヶ月露地栽培し、6月末に地下茎を掘り上げた。これらの地下茎は、定法により洗浄、殺菌後、2°Cの冷蔵庫で2ヶ月冷蔵し、15–20 cmの長さに調整して栽培試験に供試した。

栽培試験は泉南市に設置した現地試験ビニルハウス内で実施し、畝間1.2 m、長さ3 mの試験区(3.6 m²)に、株間20 cm、条間12 cmの5条植えの条件で、5系統の地下茎を9月に定植した。栽培試験は、ハウス抑制栽培作型の慣行法で行い、翌年の2月、4月、5月に3回収穫し、収量と秀品率を調査した。試験は各系統について5反復で行い、調査結果は分散分析にかけた後、TukeyのT検定で有意差を求めた。

2. ウイルスフリー株を用いた比較栽培

ウイルス感染の影響や株の老化を除き、系統そのものの特性を比較する目的で、第2章第1節の方法に従って5系統のウイルスフリー苗を育成した。系統ごとに100株以上のウイルスフリー苗を準備し、9月から翌年6月末まで10ヶ月隔離網室内で栽培し、6月末に地下茎を掘り上げた。これらの地下茎は、定法により洗浄、殺菌後、2°Cの冷蔵庫で2ヶ月冷蔵し、15–20 cmの長さに調整して栽培試験に供試した。

栽培試験は泉南市に設置した現地試験ハウス内で実施し、畝間1.2 m、長さ3 mの試験区(3.6 m²)に、株間20 cm、条間12 cmの5条植えの条件で、5系統の地下茎を9月に定植した。栽培試験は、ハウス抑制栽培作型の慣行法で行い、翌年の2月、4月、5月に3回収穫し、収量と秀品率を調査した。試験は各系統について5反復で行い、調査結果は分散分析にかけた後、TukeyのT検定で有意差を求めた。

結 果

1. 在来系統の収集と比較栽培

3回収穫の総収量は、A系統が17.4 kg m⁻²で最も高く、B系統、C系統、E系統の順に低くなり、D系統は10.5 kg m⁻²で最も低く、A系統とD系統の間には、1.66倍の収量差が認められた(Figure 4)。また、A系統は他の4系統に対して有意に収量が高く、D系統は他の4系統に対して有意に収量が低い結果となった。

2. ウイルスフリー株を用いた比較栽培

ウイルスフリー化により、全ての系統の収量は増加し、系統間差は小さくなったが、ウイルスフリー株を用いて比較した場合においても、A系統とB系統が18.3 kg m⁻²、18.0 kg m⁻²で最も収量が高く、C系統、E系統の順に低くなり、D系統は14.9 kg m⁻²で、A系統とD系統の間には、1.23倍の有意な収量差が生じていた(Figure 5)。

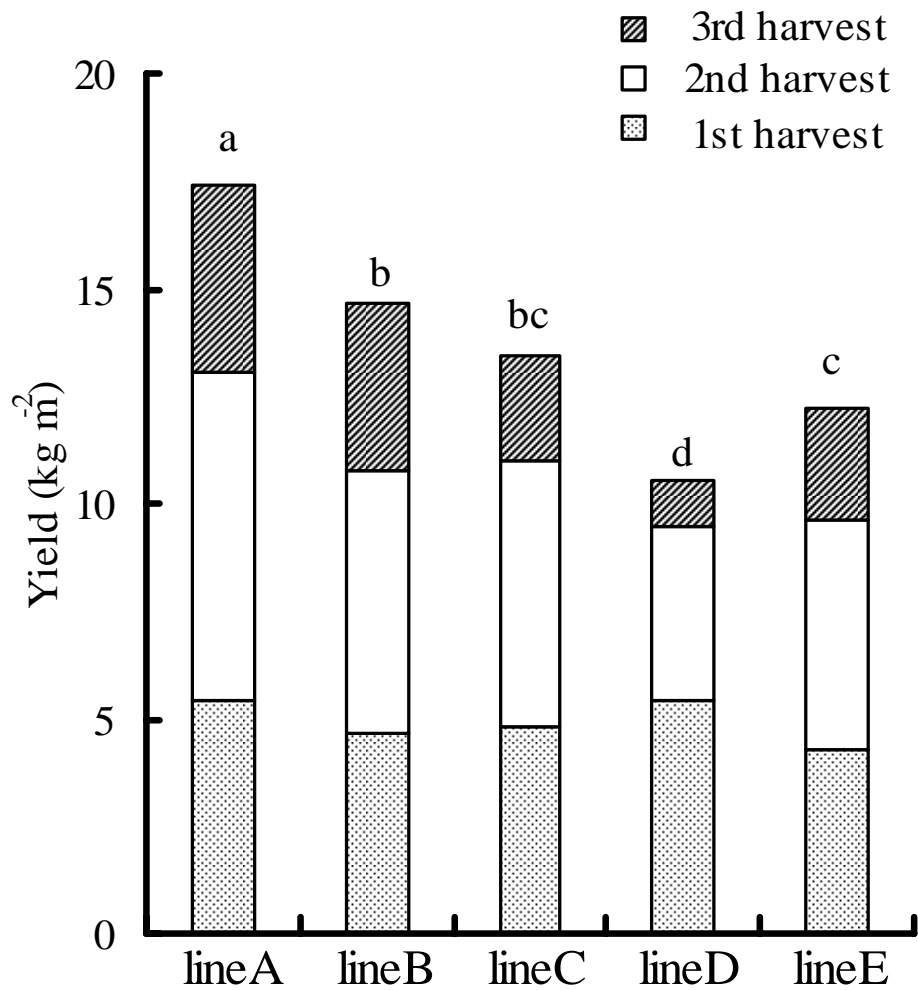


Figure 4. Yield comparison of native lines of *P. japonicus* collected in the field of Osaka prefecture.

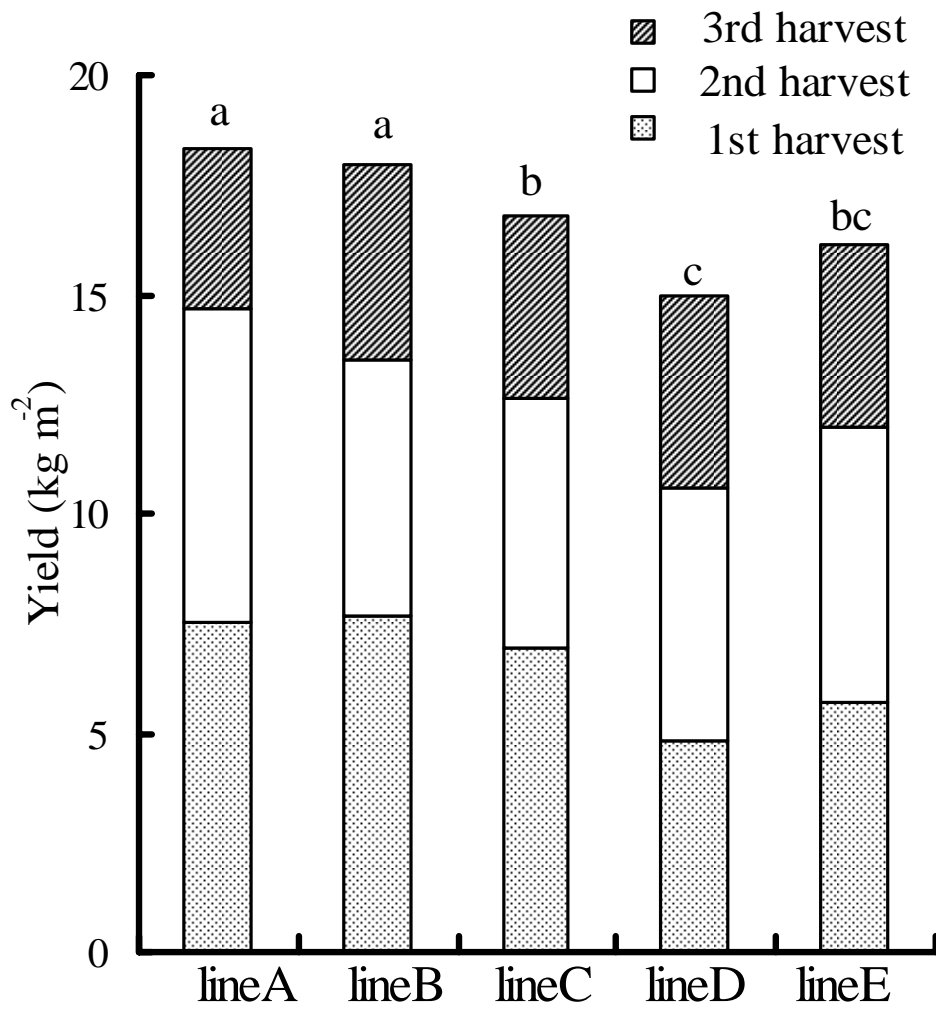


Figure 5. Yield comparison of virus-free plants derived from 5 Osaka native lines.

考 察

泉州地域で栽培されている「愛知早生フキ」は、昭和初期に木島村に導入された 1 系統から由来している。また、生産者間で種茎の選抜や交換を頻繁に行って来た経緯から、フキは系統選抜が進んだ作物で、大阪府内で栽培されているフキの系統間差は小さいと考えられてきた。しかし、在来の優良 5 系統とそのウイルスフリー株を用いた収量試験において、系統間の収量差の傾向が一致した点やウイルスフリー株を用いた結果が、ウイルス感染や株の老化等の影響を除き、系統そのものの遺伝的特性を表している結果と考えられることから、府内で栽培されているフキには、遺伝的な差がかなり存在していることが明らかとなった。すなわち、フキは自然界において芽条変異が頻繁に生じている植物であり、生産者による独自の選抜と相まって、知らず知らずのうちに、系統間差が拡大していったと考える。そこで、ソマクローナル変異選抜による育種のために、A 系統を有望な育種素材として選定した。

第2章 第3節 ソマクローナル変異選抜によるフキ多収性系統の育成

植物は、挿し木、株分け、小芋等の方法で、栄養繁殖を行うことができ、自然界のごく普通の営みとしてクローンが生み出されている。先代の研究者らは、この能力を巧みに利用し、植物の細胞やプロトプラストを無菌条件下で分離・培養し、完全な植物体まで再生することに成功してきた (Nagata and Takebe 1971)。研究の当初は、再生した植物体は皆、遺伝的に均一なクローンと考え、クローン増殖の研究が盛んに行われたが、実際には様々な形質変異が生じることも明らかとなり (Heinz and Mee 1971)、変異を積極的に育種に活用する研究も進んでいった。

Carlson (1973) は、タバコの半数体植物のプロトプラスト培養培地に、野火病菌の毒素類似物質 (メチオニン・スルフォキシミン) を添加し、生き残ったプロトプラストから、野火病菌抵抗性のタバコを再生したと報告した。この先駆的な研究がきっかけとなり、病原菌の毒素や各種のストレスが細胞に与えられ、病害抵抗性や耐塩性等の細胞が多く植物種で獲得された。しかし、耐性細胞から再生した植物体は耐性を示さないという例も相次ぎ、さらに、好ましくない変異の発生が増えることも明らかとなった。そのため、再生した植物体レベルの選抜に関心が向けられるようになっていった。

即ち、細胞レベルでの選抜はあえて行わず、再生植物に生じる変異を目印に選抜する方法である (Larkin and Scowcroft 1981)。この選抜法は、選抜する母数に限りがあるが、目的とする育種素材を確実に得ようとする方法で、ソマクローナル変異選抜法と呼ばれている。

フキのソマクローナル変異については、森下、山田 (1981) によって詳細な研究が行われ、葉柄組織由来のカルスから再生した植物体の中に、葉柄長、葉幅、葉長、葉柄の毛茸量、葉柄色に関する形質変異が生じていたと報告している。また、培養系統間の変異の幅は大きく、その多くは在来系統より劣るが、収量、葉柄長、総葉柄数、葉柄色等の量的・質的形質に優れた優良系統 (培養系統 No.1) が見いだされ、ソマクローナル変異選抜法をフキの育種に利用できると述べている。

その後、培養系統 No.1 を含む 5 系統が現地に導入され、現地適応性検定が行われたが、4 系統では赤フキの発生が 3.5-6 倍に増加し、在来系統より商品価値が下がっていた (森下 1991)。一方、培養系統 No.1 は、赤フキの発生率が在来系統の半分以下で、収量も 7.0% 増収となり、大きな期待が寄せられたが、栽培条件によっては、葉柄に褐色小斑が生じ、秀品率が大幅に低下した (森下 1991)。このような予期せぬ変異の出現が、現地適応性試験において明らかとなり、普及するまでには至らなかった。

本研究では、上記の点を考慮に入れ、カルスを経ないで不定芽を形成する頭花培養系を用いることにした。

材料および方法

1. 供試材料および頭花培養

「愛知早生フキ」大阪在来系統の中から、第2章第2節で選抜されたA系統を供試した。第2章第1節の方法に従い、花芽分化初期の未熟な花蕾の中から0.2–0.4 mmの頭花組織 (Figure 6A) を摘出し、0.1 mg l⁻¹ NAAと1.0 mg l⁻¹ BAを添加したMS寒天培地 (3% Sucrose、0.7% Agar) にA系統の頭花を300個置床し、25°C、3,000 lx、16時間日長条件で培養した。

培養期間中に、不定芽形成までに要する期間、第3本葉が分化するまでの期間、3ヶ月培養後の葉数、3ヶ月培養後の最も長い本葉の葉柄長を記録した。

2. 再生植物体の生長

1次選抜試験のため、再生植物体の中から無作為に50系統を選び、第2章第1節の方法に従って腋芽増殖し、発根・順化により苗を育成した。系統ごとに20苗を用意し、ガラス室内で3ヶ月育苗した後、葉数、最も長い本葉の葉柄長、地下茎の重量を記録した。

3. 収量試験用の地下茎の用意

充実した地下茎を用意する目的で、無作為に選んだ50系統の再生植物体と育種母本である大阪在来のA系統の地下茎を定植し、9月上旬から翌年の6月末まで10ヶ月露地栽培した。栽培試験に用いる地下茎は、第2章第2節の方法で行った。

4. ソマクローナル変異系統の収量性

第2章第2節の方法に従い、ソマクローナル変異50系統とA系統の地下茎を9月中旬に定植し、ハウス抑制栽培の慣行法で栽培した。翌年の2月、4月、5月に3回収穫を行い、収量を記録した。

結 果

1. 供試材料および頭花培養

培養3週間目から不定芽の形成が認められ、不定芽形成率は93.3% (280/300)であった。その内76.4% (214/280) は90日以内に不定芽を形成し、頭花外植体からカルスを経ることなく、直接不定芽を形成していた (Figure 6B)。一方、181–280日後に不定芽を形成する個体も4.6% (13/280) 認められ、大きな差が認められた (Figure 7)。

2. 培養中の1次選抜

育種素材に用いた大阪在来の優良系統、A系統の収量は 16.4 kg m^{-2} であった。一方、試験に用いた50系統の平均収量は 18.2 kg m^{-2} で11.0%の増収となったが、A系統より低い 13.8 kg m^{-2} から 21.6 kg m^{-2} まで大きな差が認められた (Figure 8)。

そこで、収量との相関を調べたところ、収量と不定芽形成までに要する期間 ($r=-0.492^c$) および第3本葉が分化するまでの期間 ($r=-0.869^a$; Figure 8) との間に負の相関が認められた。また、第3本葉が分化するまでの期間は、44日から180日まで大きなばらつきが認められた (Figure 8)。一方、収量と3ヶ月培養後の葉数 ($r=0.618^b$) および3ヶ月培養後の最も長い本葉の葉柄長 ($r=0.556^{bc}$) との間に正の相関が認められたが、第3本葉が分化するまでの期間に比べると低い相関係数であった。

以上の結果から、第3本葉が分化するまでの期間の短い系統を、*in vitro* で1次選抜すると多収性系統を効率的に選抜できることが明らかとなった。

3. 育苗中の2次選抜

1次選抜として、70日以内に第3本葉が分化した21系統を材料に用い、2次選抜の検討を行った。

3ヶ月間、ガラス室内で育苗した苗において、収量と葉数 ($r=0.661^b$) および最も長い本葉の葉柄長 ($r=0.627^b$) との間に正の相関が認められたが、あまり高い相関ではなかった。一方、地下茎の生体重は96gから198gまで大きな差 (Figure 6C) が認められたが、収量と地下茎の生体重の間には、正の相関が認められ、相関係数は、 $r=0.923^a$ と極めて高い相関を示した (Figure 9)。

以上の結果から、頭花培養によって再分化した培養植物の第3本葉展開が70日までの個体を *in vitro* で1次選抜し、その後、ガラス室内で育苗した苗の地下茎の生体重の重い個体を2次選抜することにより、ソマクローナル変異選抜法による多収性系統の早期選抜ができることが明らかとなった。

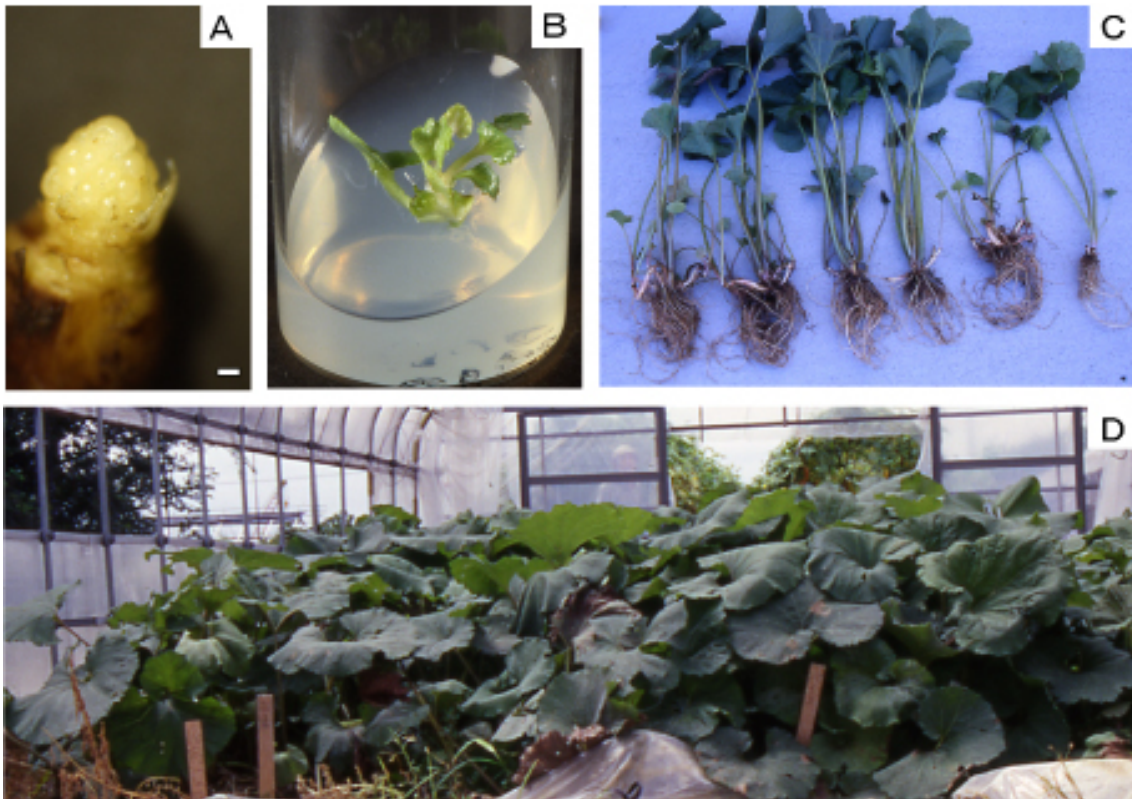


Figure 6. Selection of high-yield lines using somaclonal variation.

- (A) Immature flowerheads of Japanese butterbur. Bar = 0.2 mm.
- (B) Adventitious bud regeneration from flowerhead after 70 days of culture.
- (C) Rhizome proliferation after 3 months of cultivation in a greenhouse.
- (D) Comparison of growth between the selected native line (left) and the high-yield somaclonal variants (right).

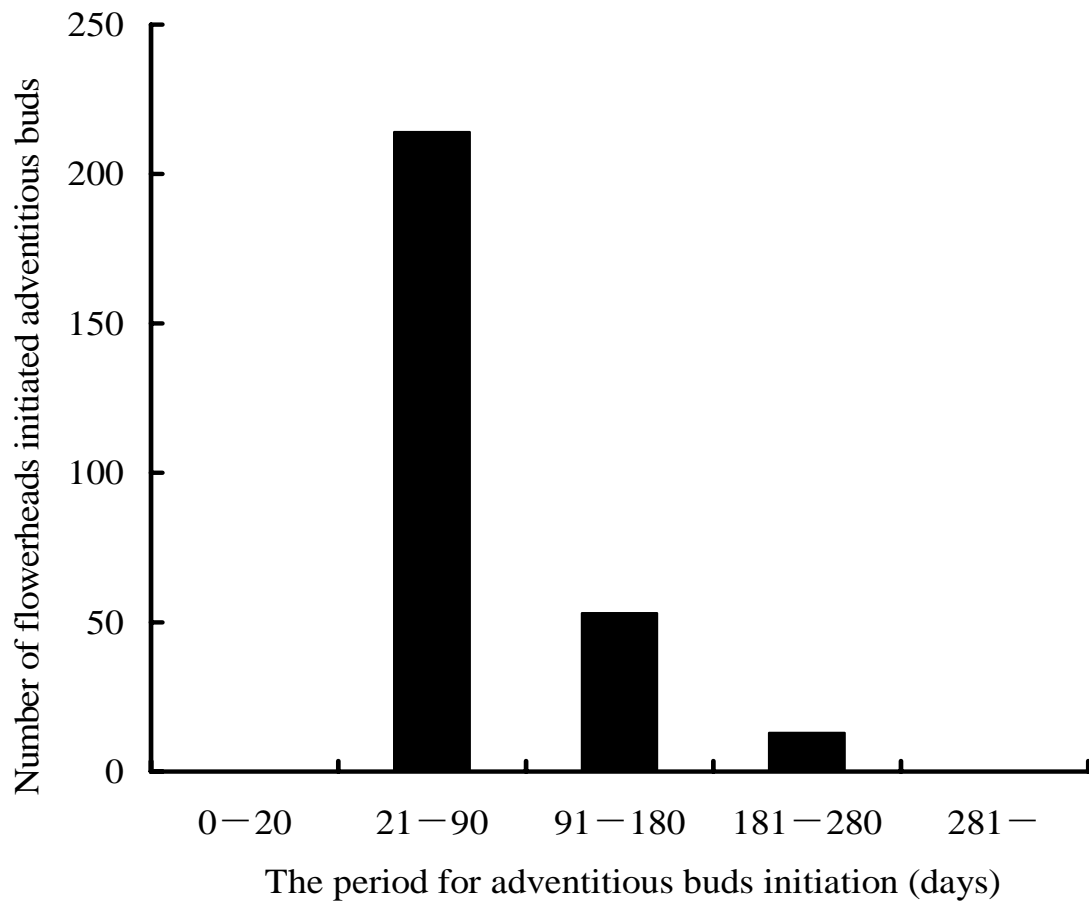


Figure 7. Adventitious bud initiation from immature flowerheads.

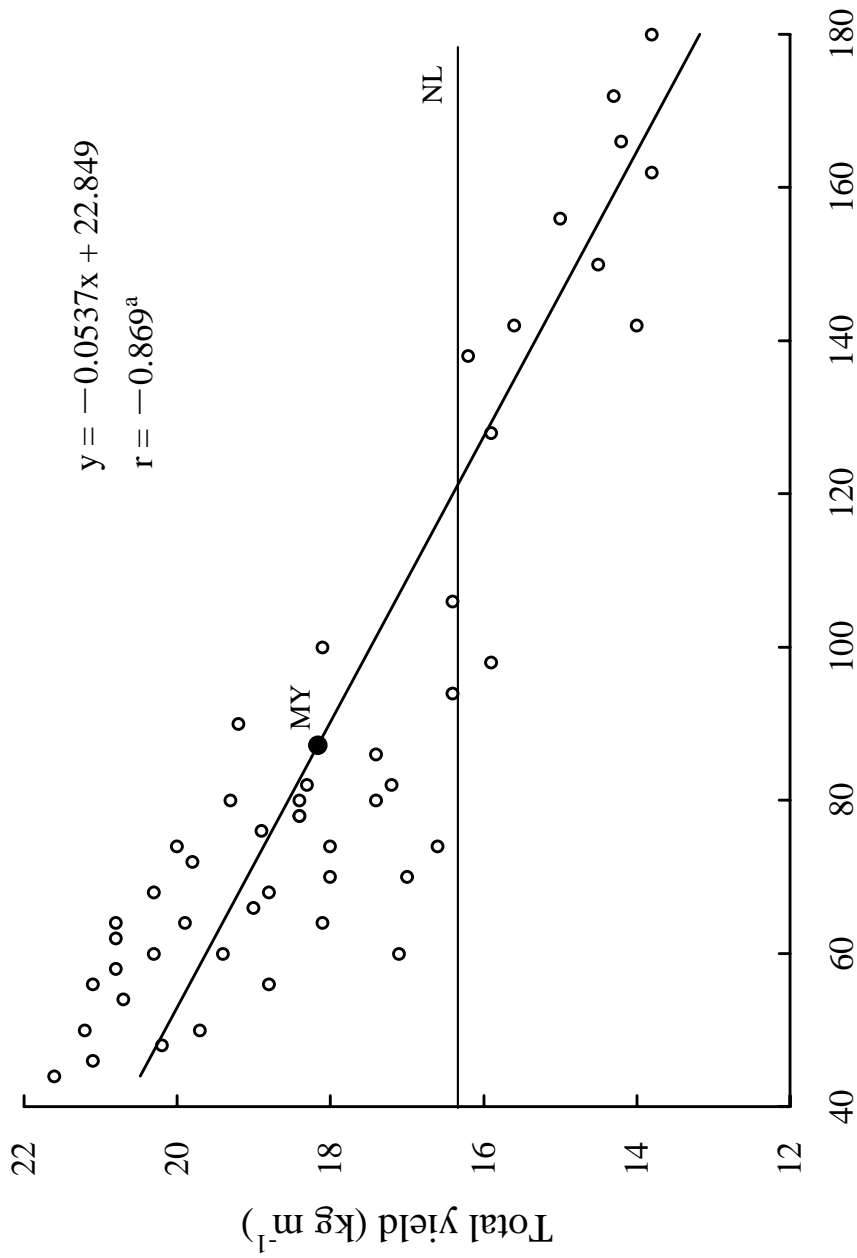
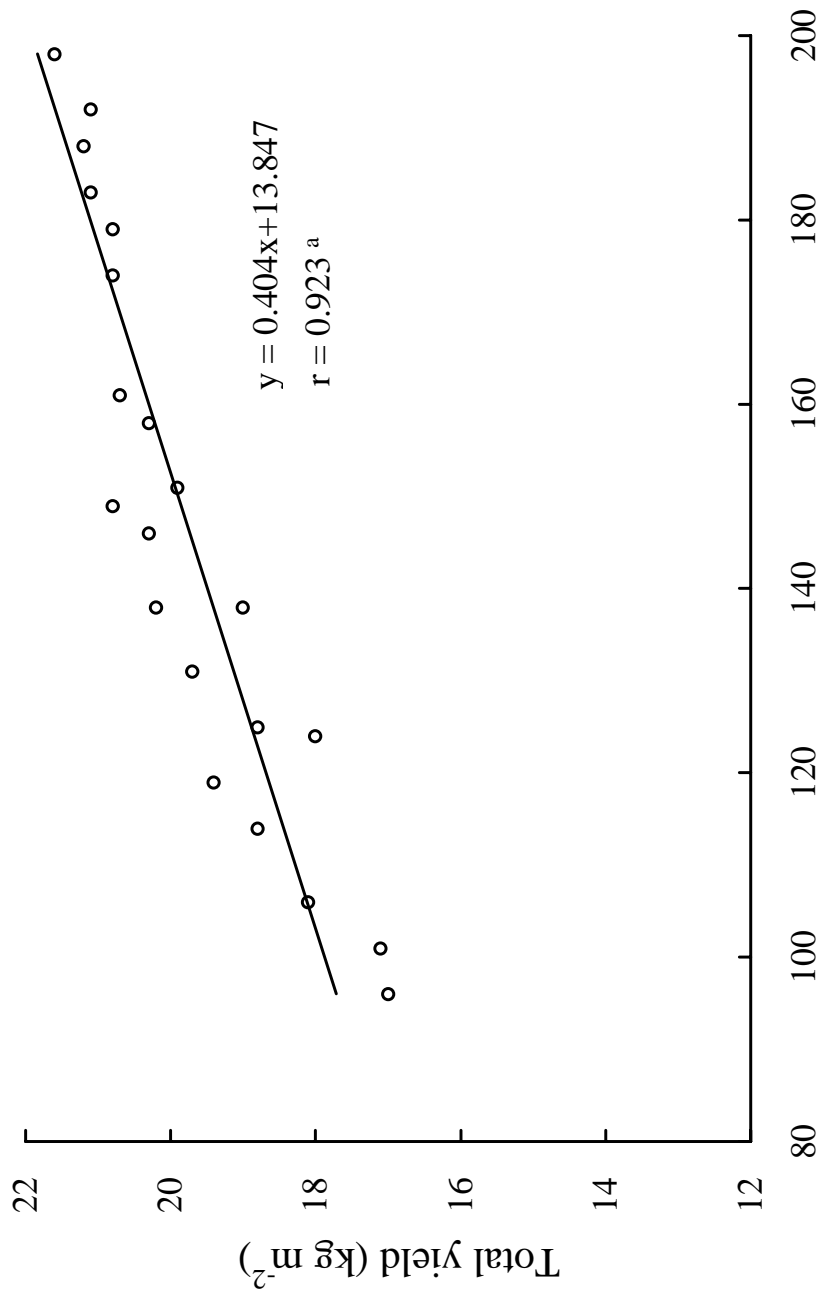


Figure 8. Relationships between the period required for third leaf initiation and the total yield of variants (\circ) and the mean yield of variants (\bullet : MY). The horizontal line indicates the yield of the selected native line (NL).



The fresh weight of rhizomes after 3 months cultivation (g)
 Figure 9. Relationship between the fresh weight of rhizomes and
 the total yield of the variants (○).

考 察

これまでに、イチゴ (Swarts et al. 1981 ; Toyoda et al. 1991 ; Takahashi et al. 1992 ; Hammerschlag et al. 2006)、ニンニク (Novak et al. 1982)、トマト (Evans and Sharp 1983, Barden et al. 1986)、レタス (Engler and Grogan 1984)、セロリー (Heath-Pagliuso et al. 1988)、モモ (Hammerschlag 1990)、バナナ (Cote et al. 1993)、リンゴ (Donovan et al. 1994)、メロン (Ezura et al 1995)、キュウリ (Burza and Malepszy 1995 ; Filipecki et al. 2005) 等、たくさんのソマクローナル変異体が得られている。

ソマクローナル変異の利用は、栄養繁殖性作物の育種にとって有効な手段である (Heinz and Mee 1971)。フキのソマクローナル変異については、森下、山田 (1981) によって詳細な研究が行われ、葉柄組織由来のカルスから再生した植物体の中に、葉柄長、葉幅、葉長、葉柄の毛茸量、葉柄色に関する形質変異が生じていたと報告している。また、培養系統間の変異の幅は大きく、収量では 2.42 倍の差が認められたと報告している。22 の変異体の内、17 の変異体の特性は、在来系統より劣るが、収量、葉柄長、総葉柄数、葉柄色等の量的・質的形質に優れた系統が 5 系統見いだされ、ソマクローナル変異選抜法をフキの育種に利用できると述べている。

その後、5 系統が生産地に導入され、現地適応性検定が行われたが、4 系統では葉柄が赤くなる赤フキの発生が 3.5–6 倍に増加し、商品価値がなかった (森下 1991)。残りの 1 系統は、赤フキの発生率が在来系統の半分以下で、収量が 7.0% 増えるため、大きな期待が寄せられた。しかし、栽培条件によっては、葉柄に褐色小斑が生じ、秀品率が大幅に低下した。このような予期せぬ変異の出現が、現地適応性試験において明らかとなり、普及するまでには至らなかった。以上の結果より、長期間のカルス培養は、変異体を高率に誘導するには適しているが、好ましくない変異が生じるため、フキの育種には適していないと報告している (森下 1991)。

ソマクローナル変異選抜法を行う場合は、変異出現頻度の高い培養系 (Ezura et al. 1995) を用いることが多い。しかし、フキの場合は、培養変異が起こりやすい植物で、変異の制御が難しい。そのため、カルス経由で再生した植物体には、好ましくない変異が多く、カルス培養系は適した培養系ではなかった。そこで、カルスを經由しない方法として、花芽分化初期のふきのとうの中から、0.2–0.4 mm の頭花組織を摘出して培養する頭花培養系を開発した。

頭花培養系は、茎頂培養よりコンタミネーションが少なく、かつ確実にウイルスフリー化できる培養法である。収量における変異の幅は 1.57 倍であり、森下、山田 (1981) の 2.42 倍より低い。変異体の 78% が在来系統の収量を上回った。この結果は、変異出現率の高いカルス培養より、ゆるやかな変異の生じる頭花培養の方が、フキの育種に適していることを示唆している。

ところで、ほ場栽培において、葉数と葉柄の長さは、収量に影響する重要な要因である。しかし、*in vitro* における選抜において、収量に対する葉数および葉柄の長さの相関係数はそれぞれ 0.618^bと 0.556^{bc}で、あまり高い相関は認められなかった。一方、収量と第 3 本葉が分化するまでの期間との間の相関係数は、-0.869^aと高い負の相関が認められ、第 3 本葉が分化するのが早い系統の選抜が、*in vitro* 選抜において有効であった。

そこで、70 日以内に第 3 本葉が分化した 1 次選抜系統について、ガラス室内で育苗した苗の地下茎生体重と収量との相関を調べたところ、相関係数は 0.962 まで上昇し、1 次選抜と 2 次選抜を組み合わせることにより、多収性系統を効率的に選抜できることが実証できた。

第2章 第4節 フキ「大阪農技育成1号」の育成経過と特性

標準的な大阪在来系統の収量は 13.8 kg m^{-2} で、育種母本として選定したA系統の収量は 16.4 kg m^{-2} 、そして、最も収量の高いソマクローナル変異体は、 21.6 kg m^{-2} に達した。また、生育が旺盛で収量が多く、葉柄の緑色も鮮やかでみずみずしい特性を有することも明らかとなったので、品種登録するための特性調査を行った。本節では、「大阪農技育成1号」の育成経過と主要特性について概説する。

育成経過

大阪府内で収集した20系統の「愛知早生フキ」在来系統について立毛品評会を実施し、5系統に絞り込み、ハウス抑制栽培作型で生産力検定を行い、収量と品質に優れた在来優良系統のA系統を選抜し、育種母本に選定した。

次に、A系統の頭花組織を培養し、再分化した培養植物の第3本葉が70日までに生じた個体を *in vitro* で1次選抜し、その後、ガラス室内で育苗した苗の地下茎の生体重の重い個体を2次選抜した。選抜した系統は、ハウス抑制栽培作型で生産力検定を行い、収量と品質の確認を行った。さらに、野菜品種特性分類調査基準に従い、特性調査と現地適応性検定を実施し、目標とする特性を有しているのを確認して育成を終了した。

特性の概要

「大阪農技育成1号」の萌芽数は5.7個で「愛知早生フキ」より1.1個、「青軸水ブキ」より3.3個多い。生育は旺盛で、葉柄の伸びが早く (Figure 10)、第5葉出葉期の最大葉の葉柄長は71.0 cm で「愛知早生フキ」より10.7 cm、「青軸水ブキ」より35.3 cm 長く、葉柄中位の太さは11.5 mm で「愛知早生フキ」より1.0 mm、「青軸水ブキ」より5.4 mm 太い (Table 7)。節当たりの出葉数は5.8枚で「愛知早生フキ」より0.7枚、「青軸水ブキ」より1.7枚多い (Table 7)。

ハウス抑制栽培作型での収量は10a当たり20.89 t で「愛知早生フキ」に対して29.8%の増収となる (Figure 11)。また、葉柄の緑色は鮮やかで冴えがあり (Figure 10 ; Figure 12)、赤色の着色は少なく、秀品率は5.8%向上し、秀品収量は38.6%の増収となる。

「愛知早生フキ」では、年に2-3回収穫されるが、3回目になると地下茎の勢いが悪くなり、赤くて短いフキ (Figure 10) が増える。一方、「大阪農技育成1号」の地下茎の張りは旺盛で (Figure 10)、3回目の収穫時においても、緑色が鮮やかな長いフキ (Figure 10) が収穫できるだけでなく、4回目の収穫も可能である。

葉柄の水分含量が高く (Table 7)、柔らかくてみずみずしく、あくも少ない。



Figure 10. Comparison of growth between 'Osaka-nougi-ikusei No.1' (left) and 'Aichi-wase-fuki' (right).

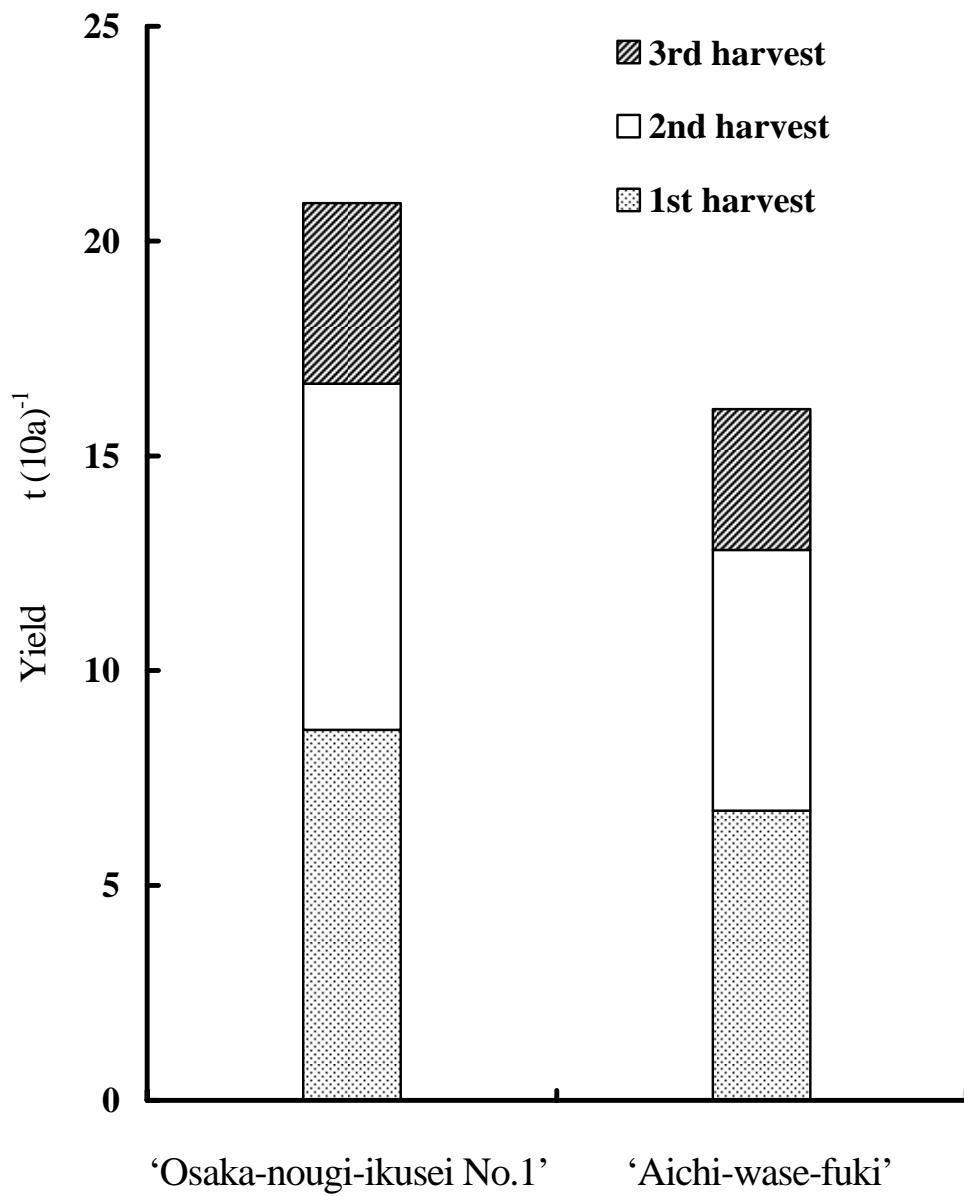


Figure 11. Yield of 'Osaka-nougi-ikusei No.1' and 'Aichi-wase-fuki'.



Figure 12. Field performance of 'Osaka-nougi-ikusei No.1'.

Table 7. Characteristics of ‘Aichi-wase-fuki’, ‘Osaka-nougi-ikusei No.1’, and ‘Aojiku-mizubuki’.

Characteristics	cultivars		
	‘Aichi-wase-fuki’	‘Osaka-nougi-ikusei No.1’	‘Aojiku-mizubuki’
Number of sprouts per mother rhizome	4.6	5.7	2.4
Number of leaves per node of mother rhizome	5.1	5.8	4.1
Petiole: diameter at midpoint (mm)	10.5	11.5	6.1
Petiole: length (cm)	60.3	71.0	35.7
Petiole: density of trichome	medium	slightly few	few
Petiole: moisture content (%)	94.40	95.23	— ¹
Leaf blade: degree of green (SPAD)	medium (32.19)	deep (38.19)	light (—)
Leaf blade: density of trichome	medium	slightly few	few
Rhizome: thickness	medium	thick	thin
Number of flower-stalk buds per mother rhizome	3.5	4.2	3.2
Earliness of leaf sprouting	early	very early	medium
Heat tolerance	medium	slightly strong	medium

¹ Not examined.

考 察

本研究で育成したソマクローナル変異体は、生育が旺盛で収量が多く、葉柄の緑色が鮮やかでみずみずしい特性を有し、生産現場における実証試験においても高い実用性が確認できたため、1999年9月13日に「のびすぎでんねん（仮称）」の名称で出願し、2002年9月30日に「大阪農技育成1号」の名称で農林水産品種登録（第10632号）された。

本品種は、大阪府優良健全種苗供給事業により、1998年度から府内のフキ生産者に配布されている。1998-99年産の大阪府中央卸売市場、大阪市中央卸売市場本場、大阪市中央卸売市場東部市場における大阪産のフキの取扱量は、3市場合計で580.2 tであったが、「大阪農技育成1号」の普及とともに、1999-2000年度産615.4 t、2000-01年度産643.3 tと順調に推移し、現在、大阪産のフキは100%新品種に更新されている。

また、「大阪農技育成1号」は流通時の品質劣化が少なく、日持ちに優れている。この性質は食材としても好都合で、歯切れが良く、定番の煮炊きものが美味しくなるだけでなく、これまでには考えられなかったフキサラダやフキごはん等の新しいメニューにも適している。さらに、フキの葉身は堅くてえぐみがきつく、ほとんど廃棄されてきたが、「大阪農技育成1号」の葉身は柔らかくてえぐみが少ない。さらに、緑色の濃い葉身は、ビタミン、ポリフェノールを豊富に含み、筋は柔らかくて新鮮な大根の葉の食感に似ており、煮炊き物や炒め物の素材としても高い評価を得ている。

今後は、関係機関と連携を取りながら、優れた特性をアピールし、厳しい産地間競争に打ち勝つ切り札として、消費拡大の試みを進めているところである。

第3章 細胞融合による水ナス用台木品種の育成

大阪南部、泉州地域特産の水ナスは、その名が示す通り水分に富む果肉特性をもち、柔らかくてあくが少なく、独特の甘みを持つため、生で食べることができる珍しいナスである。水ナスは、泉州地域の気候風土、食習慣や生活実態に対応し、泉州特有の品種として育成されてきた。その由来は定かではないが、室町時代に書かれたとされる「庭訓往来」に、水ナスの元と思われる「澤茄子（ミツナス）」の記述があり、貝塚市沢周辺が発祥の地と言われている。また一説には、泉佐野市に残る「日根野あずきに上之郷なす」の諺から、泉佐野市上之郷周辺の説もある。

水ナスは、手で果実を絞ると水分が滴るほど果汁に富んだナスで、江戸時代初期にはすでに栽培の記録が残っている。そのころから、田畑のあぜに植え、炎天下の農作業の合間に水ナスを絞って、のどの渇きをいやしたといわれている。

水ナスは果皮が柔らかく、軽く塩もみし、浅漬にすると翌朝には鮮やかな紫色に仕上がりに、ほのかな甘みが絶品と賞賛されている。その反面、この果皮の柔らかさのため輸送が難しく、生産者の自給用や地場消費に限られていたが、一度口にすると忘れられない味として評判をよび、林真理子のエッセイ（1990）やテレビ、新聞、雑誌等にも取り上げられ、全国的に知名度が高まってきている。最近では、梱包資材の開発とともにクール宅配便による全国配送も可能になり、贈答品として需要が急激に伸びている。そのため、高値で取り引きされ、経営的にも有利なことから、生産規模の拡大や新規に参入する生産者が増加している。

生産現場では、現在でも自家採種による系統選抜を行っており、生産者によって長卵形のものから巾着形のものまで、果皮色も濃いものから薄いものまで、バラエティーに富んだ様々な果実の顔を見せる。大阪府は「水ナス」をなにお特産品に選定し、安定した生産体制づくりを推進している。ところが、水ナスは天候や栽培条件等の影響を受けやすいナスで、曇天や低夜温の日が続くと、収量や果実品質が低下し、贈答用として需要の多い、上位等級の構成率が極端に減少する。このような、水ナス特有の不安定さが、生産拡大を妨げる大きな要因となっている。

一方、都市近郊の立地や収益上の利点から、ハウス栽培の比率が年々高まり、さらに、輪作地の確保が困難で、同一ほ場における連作が恒常的に行われている。その結果、土壌伝染性の青枯病や半身萎ちょう病の被害が拡大し、安定生産を妨げ、品質の低下をもたらす大きな要因になっている。青枯病の防除には、抵抗性台木の利用が有効で（宮園 1979）、環境にも優しい防除法として見直されている。これまでにナス近縁野生種の系統選抜により、「トルバム・ビガー」（山川 1981）、「カレヘン」（峯岸ら 1991）、「トレロ」（川合ら 1993）等の抵抗性台木品種が育成されてきた。そこで、これらの台木品種の利用を検討したが、胚軸が細く、低温での発芽伸長性が劣る

ため、育苗期間が長くなる欠点がある。また、接ぎ木苗の初期生育も緩慢で、収益的に有利な初期収量が低く、果形が長くなり、果皮色が薄い無光沢果が増える致命的な欠点もあり、利用は限定されている。そのため、土壌病害のリスクが高いにもかかわらず、初期収量や果実品質に優れた利点から、*Solanum integrifolium* が台木の9割以上を占め、現場からは *S. integrifolium* と同等の栽培特性を持った抵抗性台木品種の育成が求められている。

しかし、ナスの近縁野生種の中には、前述のように水ナス用台木に利用できる種は見いだされていない。また、ナスと近縁野生種、近縁野生種間の種間雑種の研究も行われているが、ナスと *S. integrifolium*、ナスと *S. torvum*、ナスと *S. gilo* 等、一部の組合せを除いて交雑不親和であり、ごくまれに作出されたF₁も不稔で、育種の大きな障害となっている (Ali and Fujieda 1990 ; Bletsos et al. 1998 ; Khan et al. 1978 ; 西尾ら 1984 ; Rao 1971)。

ナスと *S. integrifolium* の1代雑種の台木品種は、「アシスト」(西尾 1985)、「耐病 VF」(高橋 1978)、「茄の力」(安達, 神田 1978)が開発されているが、青枯病、半身萎ちょう病に対する抵抗性は不十分で、台木特性も *S. integrifolium* より劣るため、青枯病、半身萎ちょう病の発病ほ場での利用は限定されている。

ところで、細胞融合は交雑不親和を打破する技術として期待されており、近縁野生種の有する病害抵抗性等をナスに導入する目的で、ナスと近縁野生種の体細胞雑種が作出されている (Daunay et al. 1993 ; Gleddie et al. 1986b ; Guri and Sink 1988a ; Guri and Sink 1988b ; Kameya et al. 1990 ; Sihachakr et al. 1988 ; Sihachakr et al. 1989)。しかし、作出された体細胞雑種は、野生種の持つ好ましくない形質も受け継いでいるため、そのままでは利用することができない。また、自殖やナスとの戻し交雑も試みられているが、作出された体細胞雑種は不稔で種子が得られず、その後の育種は進んでいない。

これらの点を考慮に入れ、著者らは、細胞融合を台木の育種に用いることにし、細胞融合の組合せを近縁野生種間に限定し、稔性のある体細胞雑種の作出を目指した。

第3章 第1節 ナス近縁種組織切片からの植物体再生技術の確立

細胞融合によって体細胞雑種を作出するためには、プロトプラストから効率的に植物体に再生する培養系を確立する必要がある。しかし、プロトプラストを分離する組織部位によって、植物体再生の効率に大きな差があることが報告されている (Bhatt et al. 1979 ; Gleddie et al. 1985 ; Nakano and Mii 1995) 。

そこで、細胞融合に用いるプロトプラストの供給源を選択する目的で、シュート形成能の高い組織や培養条件を *S. integrifolium* と土壤病害抵抗性の近縁野生種を用いて検討し、組織切片からの効率的な植物体再生と増殖技術の確立を目指した。

材料および方法

1. 無菌植物の育成

S. integrifolium はタキイ種苗株式会社の台木品種「赤ナス」の種子を供試した。青枯病、半身萎ちょう病複合抵抗性の近縁野生種 *S. abutiloides* (LS1116) は、農林水産省野菜・茶業試験場 (現：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所) より分譲を受け、当所のほ場において自殖・採種した種子を供試した。

種子の殺菌は70%エタノール溶液に1分間、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸漬し、スターラーで攪拌しながら殺菌した。なお、次亜塩素酸ナトリウム溶液浸漬中にアスピレーターを用いて2分間の減圧処理を行い、殺菌効果を高めた。殺菌処理後、滅菌蒸留水で3回すすぎ、主要成分のみを1/2に希釈したMS (Murashige and Skoog 1962) 寒天 (DIFCO社製：0.7% BiTek™ AGAR) 培地 (1/2MS寒天培地) 上には種して発芽を促した。発芽は25°C、2,000 lx、16時間日長条件の培養室内で行った。また、青枯病抵抗性の近縁野生種 *S. toxicarium* (LS112-2) は、同試験場より培養植物の分譲を受け、無菌的に挿し木を行って繁殖させた培養植物を供試した。

2. *S. integrifolium* と *S. abutiloides* の胚軸切片及び *S. toxicarium* の本葉切片からのシュート形成

1) シュート形成に及ぼす植物ホルモンの影響

ショ糖1%のMS培地に6-benzylaminopurine (BA)、Zeatin、4-pyridyl urea (4PU) の3種類のサイトカイニンを種々の濃度で単独添加した寒天培地を作製し、サイトカイニンの影響について調査した。また、Zeatinについては α -naphthaleneacetic acid (NAA) を0.01、0.1 mg l⁻¹の濃度で組合せ添加した培地を作製し、オーキシンの添加効果につ

いても調査した。培地はポリカーボネート製カルチャーボトル（ケニス社製：80 mm 径×102 mm長）に50 mlずつ分注して用意した。子葉が十分展開した*S. integrifolium*と*S. abutiloides*の無菌実生の胚軸は2 mm幅に切断し、*S. toxicarium*の培養植物の本葉は2 mm角に切断した。これらの切片を培地に置床し、8週間培養を行った後、形成されたシュートの数を調査した。

2) シュート形成に及ぼすショ糖濃度の影響

Zeatinを0.2 mg l⁻¹の濃度で添加したMS寒天培地を基本培地とし、ショ糖濃度を0-5.0%に修正した培地を作製した。*S. integrifolium*と*S. abutiloides*の胚軸切片を8週間培養した後、形成されたシュートの数を調査した。

3. *S. integrifolium* と *S. abutiloides* のシュート形成に及ぼす組織部位の影響

Zeatinを0.1-2.0 mg l⁻¹の濃度で添加したショ糖1%のMS寒天培地を作製した。無菌植物の子葉、胚軸、本葉、茎、葉柄組織の切片（子葉と本葉は2 mm角に、胚軸と茎と葉柄は2 mm幅に切断して調整、*S. abutiloides*は子葉、胚軸、本葉のみを供試）を8週間培養した後、形成されたシュートの数を調査した。

4. シュートの発根と順化

形成されたシュートを基部で切断し、ショ糖を1%添加した1/2MS寒天培地に移植して4週間培養し、発根を促した。発根した個体は根傷みに注意しながら、流水で培地を完全に洗い流した後、25°C、2,000 lxの培養室で順化した。

5. 鉢上げと温室内での栽培

コンテナ（420×645×220 mm）の底に大粒パーライト（宇部パーライト：グリーンサム・スペシャル）を敷き、育苗培土（くみあい園芸用育苗培土「愛菜1号」）をコンテナの80%ほどつめて用意した。そこに再生個体を定植し、温室内で栽培して生育を促した。また、対照として*S. integrifolium*と*S. abutiloides*の実生個体と*S. toxicarium*の培養苗を同時に栽培して比較した。

結 果

1. シュート形成に及ぼすサイトカイニンの影響

実験に用いた3種類のサイトカイニン全てでシュート形成が認められたが、Zeatinを用いるとシュート形成数が高く、シュートの伸長も旺盛であった。*S. integrifolium*と*S. abutiloides*の胚軸を0.2 mg l⁻¹ Zeatin 区で培養すると、シュート形成数はそれぞれ24.5、

16.5 で最大になった。また、*S. toxicarium*の本葉を 1.0 mg l^{-1} Zeatin 区で培養するとシュート形成数は47.6 となり、シュートの伸長も良好 (Figure 13) であった。一方、 0.5 mg l^{-1} 4PU 区の形成数は57.7 と最大となったが (Table 8)、シュートの伸長は著しく抑制された。

2. シュート形成に及ぼす NAA の影響

Zeatin と NAA を組合せて添加するとカルス形成が促進され、シュート形成は著しく阻害された (Table 9)。

3. シュート形成に及ぼすシヨ糖濃度の影響

シヨ糖濃度は 1%が最適で、シヨ糖濃度が高くなるに従い、白色の柔らかいカルスが形成され、シュート形成は阻害された (Table 10)。

4. シュート形成に及ぼす組織部位の影響

供試した組織部位によってシュート形成能に差が認められた。*S. integrifolium*においてシュート形成の高い組織は胚軸で、茎、葉柄、子葉の順に低くなり、本葉が最も低い結果となった。また、組織部位によってシュート形成に最適なZeatin濃度に差が認められ、胚軸は $0.1-0.2 \text{ mg l}^{-1}$ (Table 8)、茎は $0.1-0.2 \text{ mg l}^{-1}$ 、葉柄では $0.5-1.0 \text{ mg l}^{-1}$ 、子葉では 1.0 mg l^{-1} 、本葉ではさらに高い濃度が必要 (Table 11) であった。*S. abutiloides*の胚軸のシュート形成能は高かったが、子葉と本葉からのシュート形成は極めて低かった。

5. 再生植物体の生育

S. integrifolium と近縁野生種の順化は容易で、順化率は 100%であった。また、再生植物体の生育は旺盛で、形態においても母株と差は認められなかった (データ省略)。



Figure 13. Shoot formation from leaf explants of *S. toxicarium* cultured on MS solid medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} Zeatin after 8 weeks of culture.

Table 8. Effect of cytokinins on shoot formation from hypocotyl explant of *S. integrifolium* and *S. abutiloides*, and leaf explant of *S. toxicarium*.

mg l ⁻¹	Mean number of shoots per explant ¹				Mean number of shoots per explant				Mean number of shoots per explant			
	<i>S. integrifolium</i>				<i>S. abutiloides</i>				<i>S. toxicarium</i>			
	BA	Zeatin	4PU	BA	Zeatin	4PU	BA	Zeatin	4PU	BA	Zeatin	4PU
0.05	— ²	—	—	3.1±0.4	9.1±0.9	—	—	—	—	—	—	—
0.1	6.1±1.1 ³	21.1±1.4	10.5±2.6	10.1±1.1	12.9±1.2	0.4±0.1	—	—	—	—	—	—
0.2	5.8±1.1	24.5±2.0	3.0±1.1	11.1±1.0	16.5±1.2	0.9±0.3	0.1±0.1	34.9±5.1	27.3± 4.3	36.8±6.4	57.7± 9.5	52.5±10.6
0.5	5.6±1.0	13.0±1.2	0.5±0.3	6.2±0.7	5.2±0.8	0.1±0.1	0.6±0.3	47.6±6.6	20.8± 2.4	44.4±3.1	20.8± 2.4	12.3± 1.4
1.0	5.7±0.9	9.6±1.2	0.0±0.0	—	—	—	12.7±2.9	30.4±4.0	21.0±2.8	21.0±2.8	21.0±2.8	21.0±2.8
2.0	9.5±1.6	4.0±0.8	0.0±0.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

¹ Data were recorded after 8 weeks of culture.

² Not examined.

³ Mean ± S.E.

Table 9. Effect of Zeatin and NAA combination on shoot formation from hypocotyl explant of *S. integrifolium* and *S. abutiloides*, and leaf explant of *S. toxicarium*.

NAA	Zeatin	Mean number of shoots per explant ¹		
		<i>S. integrifolium</i>	<i>S. abutiloides</i>	<i>S. toxicarium</i>
0.0	0.1	21.1±1.4 ²	12.9±1.2	— ³
0.01	0.1	3.9±1.0	8.3±0.7	—
0.1	0.1	1.7±0.4	—	—
0.0	0.2	24.5±2.0	16.5±1.2	—
0.01	0.2	2.5±0.8	11.2±1.0	—
0.1	0.2	3.3±0.7	6.7±0.7	—
0.0	0.5	13.0±1.2	5.2±0.8	—
0.01	0.5	1.5±0.5	—	—
0.1	0.5	0.8±0.6	—	—
0.0	1.0	—	—	47.6±6.6
0.01	1.0	—	—	46.9±3.4
0.1	1.0	—	—	20.2±4.3

¹ Data were recorded after 8 weeks of culture.

² Mean±S.E.

³ Not examined.

Table 10. Effect of sucrose concentrations on shoot formation from hypocotyl explant of *S. integrifolium* and *S. abutiloides*.

sucrose %	Mean number of shoots per explant ¹	
	<i>S. integrifolium</i>	<i>S. abutiloides</i>
0.0	1.7±0.3 ²	— ³
0.5	13.8±1.1	10.2±1.2
1.0	24.9±2.5	15.8±1.6
2.0	10.4±0.6	8.8±1.0
3.0	7.4±2.3	—
5.0	1.2±0.8	—

¹ Data were recorded after 8 weeks of culture.

² Mean±S.E.

³ Not examined.

Table 11. Effect of various explants on shoot formation of *S. integrifolium* and *S. abutiloides*.

Zeatin mg l ⁻¹	Mean number of shoots per explant ¹ <i>S. integrifolium</i>				Mean number of shoots per explant <i>S. abutiloides</i>			
	hypocotyl	cotyledon	leaf	petiole	stem	hypocotyl	cotyledon	leaf
0.1	— ²	0.8±0.6 ³	0.0±0.0	4.9±1.3	11.0±1.1	—	0.0±0.0	0.0±0.0
0.2	23.2±2.6	1.2±0.3	0.5±0.2	4.3±1.0	10.9±1.3	16.1±1.4	0.0±0.0	0.0±0.0
0.5	—	1.9±0.5	0.4±0.2	7.6±1.3	8.3±1.5	—	0.0±0.0	0.0±0.0
1.0	—	4.0±0.7	0.8±0.3	7.3±0.8	4.8±0.8	—	0.4±0.2	0.1±0.1
2.0	—	2.2±0.6	2.6±0.9	4.2±0.9	3.9±0.5	—	0.6±0.3	0.1±0.1
5.0	—	—	—	—	—	—	0.4±0.2	0.0±0.0

¹ Data were recorded after 8 weeks of culture.

² Not examined.

³ Mean ± S.E.

考 察

ナス (*Solanum melongena*) は、日本、中国、東南アジア、南アジアを中心に世界中で栽培されている重要な作物で、ナス科 (*Solanaceae*)、ナス属 (*Solanum*) に属している。ナス科には 100 属、3,000 種が存在し、その内ナス属は約 2,000 種を占め、ジャガイモとその近縁野生種約 170 種を除くと、ほとんどがナスの近縁野生種である (Seithe 1962)。

ナス近縁野生種の中には食用、観賞用、医薬用 (アルカロイド等) だけでなく、有用遺伝子 (病虫害抵抗性等) の供給源として優れた植物が多く存在する (望月, 山川 1979a; 望月, 山川 1979b; 坂田 1991)。Day (1977) は、経済的に優れた形質をもつ作物を育成するためには細胞培養と再分化の系は有効な手段であると提唱した。その後、ナス近縁野生種の組織培養が多くの種で試みられ、根こぶ線虫抵抗性の *S. sisymbriifolium* (Fassuliotis 1975; Gleddie et al. 1985)、青枯病及び半身萎ちょう病抵抗性の *S. torvum* (Gleddie et al. 1985)、低温抵抗性の *S. lycopersicoides* (Handley and Sink 1985a) 等で組織切片からの植物体再生が報告されている。

ナス近縁野生種の組織培養では、MS 培地 (Hendrix et al. 1987) と有機成分を改変した修正 MS 培地 (Bhatt et al. 1979; Gleddie et al. 1985; Handley and Sink 1985a; Pauli 1988) が多く用いられている。*S. integrifolium* と近縁野生種においても MS 培地は良好で、サイトカイニンを添加することにより高率にシュートが形成され、有機成分の修正は不要であった。また、オーキシンの添加は胚軸組織からのシュート形成に阻害となり、サイトカイニンの単独添加が良好で、実験に用いた 3 種類のサイトカイニン全てでシュート形成が認められた。

ナス近縁野生種のシュート形成で報告されたホルモン組成は、サイトカイニン単独添加では Zeatin (*S. gilo*: Gleddie et al. 1985; *S. lycopersicoides*: Handley and Sink 1985a)、カイネチン (*S. aculeatissimum*、*S. torvum*: Gleddie et al. 1985)、BA (*S. aviculare*: Gleddie et al. 1985; *S. dulcamara*: Bhatt et al. 1979; *S. khasianum*: Gleddie et al. 1985; *S. nigrum*: Bhatt et al. 1979)、6-benzylaminopurine riboside (*S. sisymbriifolium*: Gleddie et al. 1985)、オーキシンとサイトカイニンの組合せ添加では、IAA とカイネチン (*S. candidum*、*S. quitoense*、*S. sessiliflorum*: Hendrix et al. 1987)、IAA と BA (*S. khasianum*: Bhatt et al. 1979)、IAA と 2iP (*S. sisymbriifolium*: Fassuliotis 1975)、NAA と BA (*S. muricatum*: Pauli 1988) と多岐にわたり、ジベレリンを添加するとシュート形成が促進される報告 (Hendrix et al. 1987; Pauli 1988) もある。

しかし、サイトカイニンの種類を比較した研究は Gleddie et al. (1985)、Handley and Sink (1985a) と少ない。Gleddie et al. (1985) は、シュート形成や植物体再生において、植物の種や組織器官が異なると要求するサイトカイニンの種類や濃度が異なり、

また同じ組織を用いた場合でもサイトカイニンの種類が変わると最適濃度も変わると報告している。*S. integrifolium* では、供試した5つの組織全てでシュート形成が認められているが、組織が変わるとシュート形成に最適な Zeatin 濃度も変わった。また、胚軸組織を用いた実験では、サイトカイニンの種類によってシュート形成に最適な濃度やシュート形成数が異なり、Gleddie et al. (1985) と同様な結果を得た。

さらに、*S. integrifolium* と *S. abutiloides* のシュート形成において、サイトカイニンとともにショ糖濃度の影響が大きいことが明らかとなった。Mukherjee et al. (1991) は、栽培ナス (*S. melongena*) の葉片からのシュート形成について検討し、ショ糖濃度を 11–22 mM (0.377–0.753%) に下げるとシュート形成が促進されることを報告している。本研究ではショ糖濃度は 1% が最適で、ショ糖濃度が高くなるに従い、白色の柔らかいカルスの形成が進み、シュート形成が阻害された。また、逆に 0–0.5% と低くてもシュート形成数は低下し、同様な傾向が認められた。しかし、ショ糖を 2–3% 添加した培地で、良好なシュート形成を示す種 (Bhatt et al. 1979; Fassuliotis 1975; Gleddie et al. 1985; Handley and Sink 1985a; Pauli 1988) も多く、必ずしもナス近縁野生種に共通した傾向ではないと思われる。

これまでナス近縁野生種では、茎節間組織 (Bhatt et al. 1979; Fassuliotis 1975; Gleddie et al. 1985; Handley and Sink 1985 a; Pauli 1988) や本葉組織 (Bhatt et al. 1979; Gleddie et al. 1985; Hendrix et al. 1987) を用いた報告が多く、組織間でのシュート形成を比較した報告は少ない。*S. integrifolium* では胚軸組織のシュート形成能が最も高く、茎、葉柄、子葉の順で低くなり、本葉が最も低い結果となった。シュート形成能の高い組織や培養条件を明らかにしておくことは、細胞選抜や遺伝子導入に用いる再分化系、細胞融合に用いるプロトプラストの供給源を選択する上で重要である。

今回の実験で、茎節間組織や葉柄組織からも効率的にシュートが形成された。このことは、細胞選抜や細胞融合、遺伝子導入によって得られた優良個体を、実生を経ずに、*in vitro* で大量増殖する上で都合が良いと考えられる。

以上により、台木として優れた *S. integrifolium* とその近縁野生種の組織からのシュート形成と *in vitro* 増殖が可能となった。今後は、半身萎ちょう病菌や青枯病菌の毒素による細胞選抜 (浅尾ら 1992) や病害抵抗性の高いナス近縁野生種との細胞融合 (Tamura et al. 2002)、ほ場抵抗性に関与すると思われるキチナーゼ (Nishizawa and Hibi 1991) 等の有用遺伝子の導入といった、収益性を備えた抵抗性台木の育成が期待される。

第3章 第2節 ナス近縁種プロトプラストからの効率的な植物体再生技術の確立

体細胞雑種を作出するためには、プロトプラストから安定して植物体に再生する培養系を確立する必要がある。プロトプラストからの植物体再生は、タバコ (Nagata and Takebe 1971) で初めて成功して以来、アスパラガス (Bui-Dang-Ha and Mackenzie 1973)、イチゴ (Nyman and Wallin 1988)、イネ (Fujimura et al. 1985 ; Yamada et al. 1986)、エンドウ (Puonti-Kaerlas and Eriksson 1988)、カンキツ (Vardi et al. 1982)、キャベツ (Xu et al. 1982)、キュウリ (Orczyk and Malepszy 1985)、サツマイモ (Murata et al. 1987 ; Sihachakr and Ducreux 1987)、ジャガイモ (Shepard and Totten 1977)、トウモロコシ (Rhodes et al. 1988)、ナタネ (Thomas et al. 1976)、ニンジン (Kameya and Uchimiya 1972)、メロン (山中ら 1990)、レタス (Engler and Grogan 1981) 等多数の作物で報告されている。

ナス (*Solanum melongena*) のプロトプラストから植物体の再生は、1981年に初めて報告され (Bhatt and Fassuliotis 1981 ; Jia and Potrykus 1981 ; Saxena et al. 1981)、その後、培養方法の改良が加えられ、効率的な植物体再生がいくつか報告された (Gleddie et al. 1986a ; Guri and Izhar 1984 ; Nishio et al. 1987 ; Saxena et al. 1984)。

一方、ナス台木品種や近縁野生種においても *S. abutiloides* (岩本 1994)、*S. integrifolium* (浅尾ら 1989)、*S. lycopersicoides* (Handley and Sink 1985b)、*S. sanitwongsei* (浅尾ら 1989)、*S. torvum* (Guri et al. 1987)、*S. toxicarium* (佐土原ら 1993) 等でプロトプラストからの植物体再生が相次いで報告されたが、植物体再生率は低かった。

そこで、ナス台木品種と近縁野生種のプロトプラストから効率的に植物体に再生する培養条件の検討を行った。

材料および方法

1. 供試材料

S. integrifolium はタキイ種苗株式会社の台木品種「赤ナス」の種子を供試した。青枯病、半身萎ちょう病複合抵抗性の近縁野生種 *S. abutiloides* (LS1116) と半身萎ちょう病抵抗性の *S. scabrum* (LS1183) は、農林水産省野菜・茶業試験場 (現：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所) より分譲を受け、当所のほ場において自殖・採種した種子を供試した。青枯病、半身萎ちょう病複合抵抗性の近縁野生種 *S. toxicarium* (LS112-2) の種子は、京都府農業総合研究所において採種された種子の分譲を受けた。なお、無菌植物の育成は、第3章第1節の方法に従って行った。

2. プロトプラストの単離と培養

無菌は種 2-3 週間後の実生の中から、十分に子葉が展開した個体を選び、子葉と胚軸を供試した。また、節培養によって増殖した継代 3 週間目の *in vitro* 植物の本葉を供試した。

子葉、胚軸、本葉を培地A (Table 12) 中で細かく切り刻み、25°C、暗黒条件で 1 時間静置した。その後、ろ過滅菌した酵素液 (硝酸アンモニウムの濃度を 200 mg l⁻¹ に修正した 1/2MS培地に 0.5 M マンニトール、0.05-0.1%マセロザイムR-10、0.25-0.5%メイセラゼP-1、10 g l⁻¹ ショ糖を添加) に浸漬し、25°C、暗黒条件で 16 時間静置し、酵素処理を行った。酵素処理後、50 μm のナイロンメッシュで混合液をろ過し、W5 培地 (Menczel et al. 1981) で 2 回洗浄し、100g、3 分間の遠心分離でプロトプラストを回収した (Figure 14A)。

プロトプラストはトーマの血球計算盤で濃度を測定し、1×10⁵ 個 ml⁻¹ の濃度になるように培地A (Table 12) を加え、25°C、10 μE m⁻²s⁻¹の弱光、16 時間日長条件で 7 日間培養した。初代培養は 60 mm 径×15 mm のプラスチックシャーレを用い、培地量 2 ml で開始した。

細胞分裂とコロニーの増殖を促す目的で、培養 7 日後に培地B (Table 12) を 2 ml 加え、培養 14 日後には培地C (Table 12) を 4 ml 加え、大型プラスチックシャーレ (90 mm 径×15 mm) に全溶液を移し替えた。その後、25°C、60 μE m⁻²s⁻¹、16 時間日長条件に移して培養を続け、培養開始 1 ヶ月後に肉眼で観察できるコロニーの数を計測し、コロニー形成率を求めた。

直径が 0.5-1.0 mm のコロニーを培地E (*S. integrifolium*、*S. scabrum*、*S. toxicarium*) または培地F (*S. abutiloides*) に 100 個以上移植した。25°C、60 μE m⁻²s⁻¹、16 時間日長条件で 2 ヶ月培養し、不定芽を形成したカルスを計測し、不定芽形成率を求めた。

試験は 5 反復で行い、得られた結果は分散分析にかけた後、Tukey の T 検定で有意差検定を行った。

3. コロニー形成と不定芽形成に及ぼすプロトプラスト単離組織部位の影響

S. abutiloides、*S. integrifolium*、*S. scabrum* については、本葉、胚軸、子葉から十分な量のプロトプラストが分離できたため、本葉、胚軸、子葉由来のプロトプラストについて検討した。*S. toxicarium* は分譲された種子が古く、無菌は種した実生の生長が極めて悪く、子葉と胚軸から十分な量のプロトプラストが得られなかったため、節培養によって増殖した *in vitro* 植物の本葉由来のプロトプラストのみ実験に供試した。

これらのプロトプラストを前述 (2. プロトプラストの単離と培養) の方法で培養し、コロニー形成率と不定芽形成率を調査した。

4. コロニー形成と不定芽形成に及ぼす初代培養のプロトプラスト密度の影響

S. abutiloides 胚軸由来のプロトプラスト、*S. integrifolium*、*S. scabrum* 子葉由来のプロトプラスト、*S. toxicarium* 本葉由来のプロトプラストを、2.5、5.0、10.0×10⁴個 ml⁻¹の3種類の濃度で初代培養し、前述（2. プロトプラストの単離と培養）の方法で培養を続け、コロニー形成率と不定芽形成率を調査した。

5. 不定芽形成に及ぼすカルス増殖期間の影響

初代培養のプロトプラスト密度を検討した試験（Table 14）で得られたコロニーを、直接不定芽形成培地（培地 E または F：Table 12）に移植した対照区（0 日区）、培地 D（Table 12）に移植し、7、14 日間カルスを増殖させた後、不定芽形成培地（培地 E または F：Table 12）に移植した試験区（7 日区、14 日区）を設けた。不定芽形成培地に移植 2 ヶ月後に不定芽形成率を測定し、不定芽形成に及ぼすカルス増殖期間の影響を調査した。

6. 不定芽の発根と植物体再生

カルスからメスで切断された不定芽は、ホルモンフリーの培地 G（Table 12）に移植し、発根を促した。発根した植物は、寒天培地を流水で洗い流した後、水耕栽培用のウレタンマットに挟み、水道水を満たした 50 ml のガラス製サンプル管（マルエム社製：35 mm 径×70 mm 長）に根の部分の挿し入れ、地上部にビニル袋を被せ、輪ゴムで封をした。その後、ビニル袋に徐々に穴を開け、根の伸長と順化を促した。さらに、黒色のビニルポットの底に大粒パーライト（宇部パーライト：グリーンサム・スペシャル）を敷き、育苗培土（くみあい園芸用育苗培土「愛菜 1 号」）を満たして苗を定植し、ガラス室内で栽培した。

結 果

1. コロニー形成と不定芽形成に及ぼすプロトプラスト単離組織部位の影響

S. abutiloides、*S. integrifolium*、*S. scabrum* 本葉、胚軸、子葉由来のプロトプラストと *S. toxicarium* 本葉由来のプロトプラストは、培養 4–7 日目に細胞分裂を開始し（Figure 14B）、液体培地 B、C の追加と大型シャーレ（90 mm 径×15 mm）へのスケールアップにより、コロニーを形成し（Figure 14C）、1 ヶ月後には直径 0.5–1.0 mm のカルス（Figure 14D）に生長した。

初代培養密度 10×10⁴ 個 ml⁻¹ の条件で培養したところ、*S. abutiloides* は胚軸由来のプロトプラスト（Figure 14A）、*S. scabrum* は子葉由来のプロトプラストのコロニー形

成率が高く、他の2つの組織由来のプロトプラストのコロニー形成率は有意に低い結果となった (Table 13)。一方、*S. integrifolium*は、本葉、胚軸、子葉いずれの組織由来のプロトプラストも高いコロニー形成率を示し、有意差は認められなかった (Table 13)。*S. toxicarium*については、本葉由来のプロトプラストのみ供試したが、本葉由来のプロトプラストであっても高いコロニー形成率を示した (Table 13)。

培養 1 ヶ月後に形成された直径 0.5–1.0 mmのカルス (Figure 14D) を培地E (*S. integrifolium*、*S. scabrum*、*S. toxicarium*) と培地F (*S. abutiloides*) に移植した。25°C、 $60 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、16 時間日長条件で 2 ヶ月培養したところ、不定芽形成が認められた (Figure 14E)。

不定芽形成率もコロニー形成率と同様な傾向が認められ、*S. abutiloides* の胚軸プロトプラスト由来のコロニーと *S. scabrum* の子葉プロトプラスト由来のコロニーの不定芽形成率は、他の2つの組織から単離したプロトプラスト由来のコロニーより不定芽形成率が高く (Table 13)、この2つの植物にとって、プロトプラストを単離する組織部位が、極めて重要であることが明らかとなった。一方、*S. integrifolium* は、本葉プロトプラスト由来のコロニーの不定芽形成率は 19.4%とやや低いものの、子葉と胚軸から分離されたプロトプラスト由来のコロニーの不定芽形成率はそれぞれ 34.2%、30.4%といずれも高かった (Table 13)。また、*S. toxicarium* については、本葉プロトプラスト由来のコロニーのみの検討であるが、他の3種で低かった本葉プロトプラスト由来のコロニーにおいても、45.2%の不定芽形成率が得られており (Table 13)、種によって異なる結果となった。

以上の結果から、ナス近縁種のプロトプラストからの植物体再生にとって、プロトプラストを単離する組織部位が重要であることが明らかとなった。

2. コロニー形成と不定芽形成に及ぼす初代培養のプロトプラスト密度の影響

*S. abutiloides*胚軸由来のプロトプラスト、*S. integrifolium*、*S. scabrum*子葉由来のプロトプラスト、*S. toxicarium*本葉由来のプロトプラストを 2.5 、 5.0 、 10.0×10^4 個 ml^{-1} の濃度で培養したところ、分裂率に大きな差は認められなかった (データ省略) が、 10.0×10^4 個 ml^{-1} の試験区では、その後分裂を停止するものが多く認められ、コロニー形成率が低くなった (Table 14)。一方、 2.5 – 5.0×10^4 個 ml^{-1} の試験区では、安定して高いコロニー形成率が認められた (Table 14)。

コロニーからの不定芽形成も 2.5 – 5.0×10^4 個 ml^{-1} の試験区の不定芽形成率が高く、 10.0×10^4 個 ml^{-1} の試験区に対して有意差が認められた (Table 14)。

以上の結果から、初代培養のプロトプラスト密度は、コロニー形成率だけでなく、不定芽形成率にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

3. 不定芽形成に及ぼすカルス増殖期間の影響

S. abutiloides 胚軸プロトプラスト、*S. integrifolium*、*S. scabrum* 子葉プロトプラスト、*S. toxicarium* 本葉プロトプラスト由来の直径 0.5–1.0 mm の灰白色のカルスを、直接不定芽形成培地に移植した試験区の不定芽形成率は、それぞれ 59.0、44.8、34.6、75.6% であった。一方、直径 0.5–1.0 mm のカルスを培地 D で 7 日間培養すると、カルスの色は薄黄緑色に変わり、その後不定芽形成培地に移植すると、不定芽形成率はそれぞれ、98.0、92.0、91.8、98.8% に向上した。カルス増殖期間を 14 日まで延長したところ、*S. toxicarium* 本葉プロトプラスト由来のカルスでは 7 日間と差が認められなかったが、*S. abutiloides* 胚軸プロトプラスト、*S. integrifolium*、*S. scabrum* 子葉プロトプラスト由来のカルスは、柔らかい綿状のカルスが表面に増殖し、不定芽形成率は、それぞれ 35.2、65.4、73.4% に低下した。

以上の結果から、培養 1 ヶ月後の直径 0.5–1.0 mm のカルスを、培地 D で 7 日間培養した後に不定芽形成培地に移植すると、90% 以上の安定した不定芽形成率が得られ、プロトプラストから効率的に植物体に再生する培養系を確立した。

4. 不定芽の発根と植物体再生

培地 G で培養した不定芽は全て発根し、順化を経て植物体に再生した。ガラス室内における生育は良好で、形態的な変異は認められなかった (Figure 14F)。

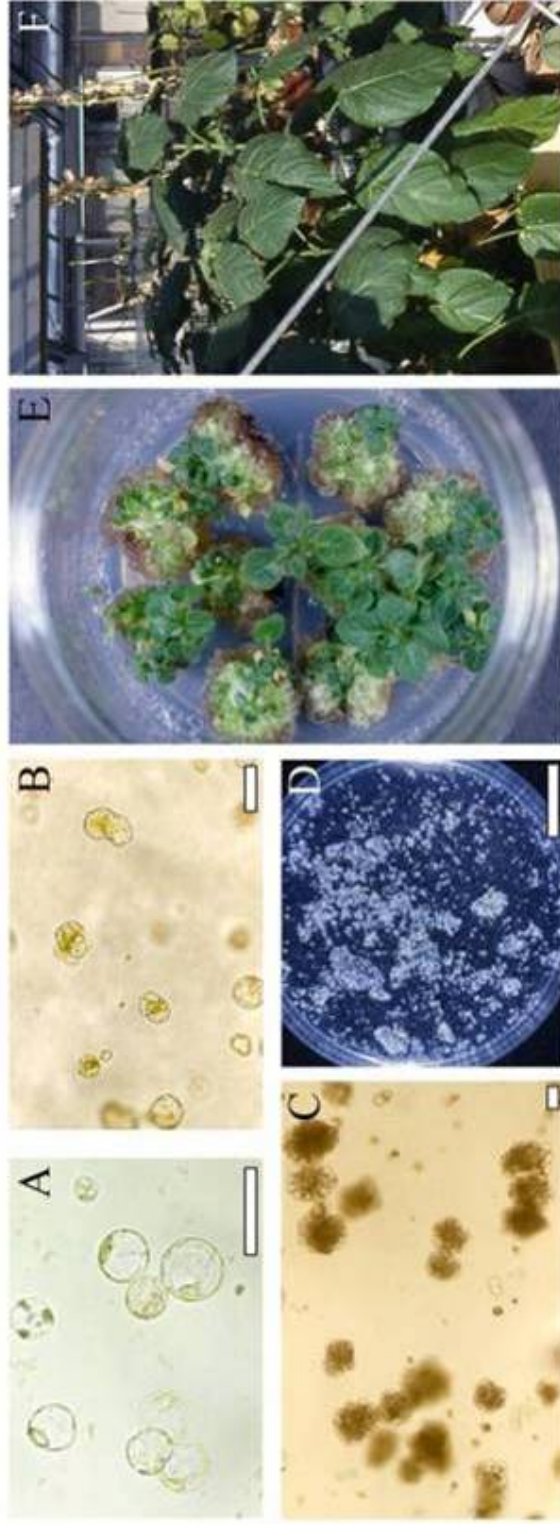


Figure 14. Plant regeneration from protoplasts of *Solanum abutiloides*.

- (A) Protoplasts isolated from hypocotyls. Bar = 50 μ m.
- (B) Protoplast division after 5 days of culture. Bar = 100 μ m.
- (C) Colony formation after 2 weeks of culture. Bar = 100 μ m.
- (D) Protoplasts derived callus after one month of culture. Bar = 2 cm.
- (E) Shoots regenerated from protoplast-derived callus on medium F.
- (F) A regenerated whole plant grown in a greenhouse.

Table 12. Composition of culture media for protoplasts of *Solanum* species.

Contents	Culture media						
	A ¹	B ²	C ³	D ⁴	E ⁵	F ⁵	G ⁶
Basal medium	1/2 MS	1/2 MS	1/2 MS	1/2 MS	MS	MS	1/2 MS
(NH ₄ NO ₃ mg l ⁻¹)	200	200	1650	1650	1650	1650	825
Mannitol (M)	0.4	0.2	-	-	-	-	-
2,4-D (mg l ⁻¹)	1.0	0.1	-	0.1	-	-	-
NAA (mg l ⁻¹)	1.0	0.1	-	0.1	-	-	-
Kinetin (mg l ⁻¹)	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	-
IAA (mg l ⁻¹)	-	-	-	-	0.1	-	-
Zeatin (mg l ⁻¹)	-	-	-	-	2.0	0.2	-
Sucrose (%)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gerlite (%)	0.2	-	-	0.2	-	-	-
Agar (%)	-	-	-	-	0.7	0.7	0.7

All kinds of media were autoclaved at 121°C for 15 min.

¹The protoplast cultures had an initial density of 10×10^4 protoplasts ml⁻¹ in solid medium A.

²Two ml of liquid medium B was added after one week of culture.

³After two weeks of culture, four ml of liquid medium C was added, and colonies and media transferred to new Petri dish (90 × 15 mm).

⁴Medium D for calli proliferation was used experiment of Table 15 before transfer to medium E or F.

⁵After 1 month of culture, visible calli were transferred to either medium E (*S. integrifolium*, *S. scabrum*, and *S. toxicarium*) or medium F (*S. abutiloides*).

⁶Regenerated shoots excised from calli were transferred to medium G for rooting.

Table 13. Differences in colony formation and shoot regeneration among different sources for protoplast isolation in four *Solanum* species.

<i>Solanum</i> species	Protoplast source	Colony(%) ¹	Shoot regeneration(%) ³
<i>S. abutiloides</i>	Leaves	1.12±0.29 ^{b2}	0.5±0.5 ^c
	Hypocotyls	2.38±0.22 ^a	34.8±3.8 ^a
	Cotyledons	1.39±0.31 ^b	8.6±1.1 ^b
<i>S. integrifolium</i>	Leaves	3.13±0.94 ^a	19.4±4.3 ^b
	Hypocotyls	2.97±0.32 ^a	30.4±4.9 ^a
	Cotyledons	3.29±0.42 ^a	34.2±6.1 ^a
<i>S. scabrum</i>	Leaves	0.05±0.02 ^c	0.0±0.0 ^b
	Hypocotyls	0.37±0.14 ^b	0.6±0.9 ^b
	Cotyledons	0.89±0.25 ^a	8.4±3.0 ^a
<i>S. toxicarium</i>	Leaves	1.37±0.28	45.2±5.7

¹ For examining frequencies of colony formation, each experiments consisted of five culture dishes in which 10×10^4 protoplasts ml^{-1} were plated. Percentage of plated protoplasts which developed into visible calli (ca.0.5-1 mm in diameter) after 1 month of culture.

² Within the same species, mean±S.D. followed by different letters (a,b and c) indicate significant differences at 5% level by Tukey test.

³ Percentage of protoplast-derived calli which regenerated shoots by 2 months after transfer to medium E or F. Values represent the mean±S.D. of five independent experiments each of which consisted of at least 100 protoplast-derived calli produced after 1 month of culture.

Table 14. Effect of plating concentrations on colony formation and shoot regeneration of four *Solanum* species.

<i>Solanum</i> species	Protoplast source	Plating Conc. ($\times 10^4$)	Colony ¹ (%)	Shoot regeneration ³ (%)
<i>S. abutiloides</i>	Hypocotyls	2.5	4.07 \pm 0.36 ^{a 2}	57.8 \pm 14.4 ^a
		5.0	4.99 \pm 0.80 ^a	59.0 \pm 6.7 ^a
		10.0	2.38 \pm 0.22 ^b	34.8 \pm 3.8 ^b
<i>S. integrifolium</i>	Cotyledons	2.5	5.44 \pm 0.76 ^a	40.6 \pm 8.1 ^a
		5.0	5.63 \pm 0.35 ^a	44.8 \pm 5.0 ^a
		10.0	3.29 \pm 0.42 ^b	37.0 \pm 4.5 ^a
<i>S. scabrum</i>	Cotyledons	2.5	1.18 \pm 0.21 ^{ab}	28.6 \pm 6.3 ^a
		5.0	1.40 \pm 0.37 ^a	34.6 \pm 13.6 ^a
		10.0	0.89 \pm 0.25 ^b	8.4 \pm 3.0 ^b
<i>S. toxicarium</i>	Leaves	2.5	4.35 \pm 0.80 ^a	73.2 \pm 13.1 ^a
		5.0	4.30 \pm 0.56 ^a	75.6 \pm 14.0 ^a
		10.0	1.37 \pm 0.28 ^b	45.2 \pm 5.7 ^b

¹ For examining frequencies of colony formation, each experiments consisted of five culture dishes in which 2.5-10 $\times 10^4$ protoplasts ml⁻¹ were plated.

Percentage of plated protoplasts which developed into visible calli (ca.0.5-1 mm in diameter) after 1 month of culture.

² Within the same species, mean \pm S.D. followed by different letters (a,b and c) indicate significant differences at 5% level by Tukey test.

³ Percentage of protoplast-derived calli which regenerated shoots by 2 months after transfer to medium E or F. Values represent the mean \pm S.D. of five independent experiments each of which consisted of at least 100 protoplast-derived calli produced after 1 month of culture.

Table 15. Effect of callus proliferation period on shoot regeneration from protoplast derived calli of four *Solanum* species.

<i>Solanum</i> species	Protoplast source	callus proliferation period (day)		
		0	7	14
<i>S. abutiloides</i>	Hypocotyls	59.0± 6.7 ^{b 1 2}	98.0± 2.3 ^a	35.2±10.0 ^c
<i>S. integrifolium</i>	Cotyledons	44.8± 5.0 ^c	92.0± 6.9 ^a	65.4±12.6 ^b
<i>S. scabrum</i>	Cotyledons	34.6±13.6 ^c	91.8± 7.9 ^a	73.4±10.0 ^b
<i>S. toxicarium</i>	Leaves	75.6±14.0 ^b	98.8± 1.8 ^a	96.8± 5.2 ^a

¹ For examining frequencies of regeneration, calli which was begun to culture at a density of 5×10^4 protoplasts ml⁻¹, were used.

² Within the same species, mean±S.D. followed by different letters (a, b and c) indicate of significant differences at 5% level by Tukey test.

Percentage of protoplast-derived calli which regenerated shoots by 2 months after transfer to medium E or F. Values represent the mean ±S.D. of five independent experiments each of which consisted of at least 100 protoplast-derived calli.

考 察

ナス (*Solanum melongena*) のプロトプラストから植物体の再生は、1981年に初めて報告され (Bhatt and Fassuliotis 1981 ; Jia and Potrykus 1981 ; Saxena et al. 1981)、その後、培養方法の改良が加えられ、効率的な植物体再生がいくつか報告された (Gleddie et al. 1986a ; Guri and Izhar 1984 ; Nishio et al. 1987 ; Saxena et al. 1984) 。

一方、ナス台木品種や近縁野生種においても *S. abutiloides* (岩本 1994)、*S. integrifolium* (浅尾ら 1989)、*S. lycopersicoides* (Handley and Sink 1985)、*S. sanitwongsei* (浅尾ら 1989)、*S. torvum* (Guri et al. 1987) 、*S. toxicarium* (佐土原ら 1993) 等でプロトプラストからの植物体再生が相次いで報告されたが、植物体再生率は低かった。

これまでの研究において、コロニー形成率と不定芽形成率は、別のデータとして整理されている文献が多く、佐土原ら (1993) 、近藤 (2002) を除き、ナス近縁種の初代培養に用いたプロトプラスト当たりの植物体再生率を記載している文献は少ない。佐土原ら (1993) は *S. toxicarium* のプロトプラストの 0.04% が植物体に再生すると報告している。近藤 (2002) は、プロトプラストの単離に用いる *in vitro* 植物の培養条件や酵素処理条件がプロトプラストからの植物体再生に影響を及ぼし、*S. abutiloides*、*S. sanitwongsei*、*S. toxicarium* のプロトプラストのそれぞれ 0.09%、0.14%、0.07% が植物体に再生すると報告しているが、いずれも再生率は低い。

本研究において、プロトプラスト単離に用いた組織部位、初代培養のプロトプラスト密度がコロニー形成率だけでなく、不定芽形成率にとっても重要な要因であることを明らかにした。また、単離に用いる組織部位の影響は、第3章第1節の結果と同様な傾向を示していた。

さらに、不定芽形成培地に移植する前に、固形培地でカルスを7日間増殖すると、不定芽形成率が向上することが明らかとなった。この7日間の内に、カルスは灰白色から薄黄緑色に変わっていくだけでなく、質的な変化が生じていることが示唆される。この点については、さらに検討を要する。

以上の培養方法の改良により、*S. abutiloides* と *S. scabrum* のプロトプラストからの植物体再生に著者らが初めて成功した。また、*S. abutiloides*、*S. integrifolium*、*S. scabrum*、*S. toxicarium* のプロトプラストの 4.89、5.18、1.29、4.25% が植物体に再生する極めて効率の良い植物体再生系を確立した。

この培養系を用いることにより、効率的な体細胞雑種の作出が可能となったので、細胞融合と体細胞雑種の作出について、第3章第3節以降で述べる。

第3章 第3節 *Solanum integrifolium* と *S. sanitwongsei* の体細胞雑種の作出

ナス (*Solanum melongena*) は、熱帯から亜熱帯まで広く栽培されている野菜である (Kalloo 1993)。土壌伝染性の病害、たとえば *Ralstonia solanacearum* による青枯病や *Verticillium dahliae* による半身萎ちよう病、*Fusarium oxysporum* による半枯病は、ナスの生産性を妨げる大きな要因となっている (Goth et al. 1991 ; Kalloo 1993)。これらの病害を防除するには、抵抗性品種の育種が有効である。トマトにおいては、抵抗性の遺伝に関する研究が広く行われ、抵抗性遺伝資源として野生種が利用されている

(Yamakawa et al. 1978)。しかし、ナスに関する研究は少なく、ナス生産で利用されている抵抗性品種は限定されている (Goth et al. 1991 ; Kalloo 1993 ; Wang et al. 1998)。土壌殺菌剤である臭化メチルは、土壌伝染性病害を防除する目的で広く使用されてきた。しかしながら、オゾン層を破壊することが明らかとなり (Anderson et al. 1989)、先進国においては、2005年以降使用が禁止されている。さらに、効果の高い薬剤のクロルピクリンは、大阪府内全域で使用制限がかかっており、代替薬剤としてバスアミド等が検討されている。

しかし、農薬の使用は生産者の健康を害し、また、土壌殺菌剤は、発病の如何に関わらず作付け前に保険的に使用されるため、使用量はおのずと多くなり、環境への影響も懸念されている。

抵抗性台木の利用は、土壌伝染性病害を防除する有効な選択肢であり、我が国においては、ナス、トマト、キュウリ、メロン等の果菜類で広く使用されている。ナスの台木品種の1つ、*Solanum integrifolium* は、半枯病に抵抗性を示し、接ぎ木したナスは収穫後期まで収量が多いため、我が国において最も多く利用されているナスの台木である (Tachibana 1994)。しかし、ナス栽培品種よりは青枯病に抵抗性を示すが、青枯病菌の菌群によっては全滅することもある (Sheela et al. 1984 ; 尾崎, 木村 1992)。もう1つの種である *S. sanitwongsei* (syn. *S. kurzii*) は、高い青枯病抵抗性を有し (峯岸ら 1991)、抵抗性台木として販売されている。しかし、*S. sanitwongsei* は草勢が弱く、特に、低温発芽・伸長性が劣り、育苗期間が長い。また、収益的に有利な初期収量が低く、胚軸が細くて接ぎ木作業が難しいため、大阪府内ではほとんど利用されていない。

細胞融合は、近縁種の有する病虫害抵抗性等の有用形質を栽培品種に導入する手法として期待されている (Asao et al. 1994 ; Daunay et al. 1993 ; Evans et al. 1981 ; Guri and Sink 1988a ; Guri and Sink 1988b ; Puite 1992 ; Rizza et al. 2002)。しかしながら、作出された体細胞雑種はそのままでは利用できないため、交雑によって好ましくない形質の除去が必要であるが、そのほとんどは不稔で、その後の育種に利用できていない。さらに、Daunay et al. (1993) が育成した体細胞雑種の片親 *S. aethiopicum group gilo* は、青枯病

には罹病性で、半枯病抵抗性ナスの育種素材としては価値があるが (Rizza et al. 2002)、好ましくない形質の除去には長い期間を要する。たとえば、トマトの Tm-2a 遺伝子の場合、10 回以上の戻し交雑後でさえ、野生種の染色体の大きな領域が残っていたと Young and Tanksley (1989) は報告している。もし、近縁野生種の青枯病抵抗性がポリゾーン支配であったなら、実用品種の育種はさらに困難を極めるであろう。

これらの点を考慮に入れ、著者らは、細胞融合を台木育種のツールとして用い、細胞融合の組合せを近縁野生種間に限定し、稔性のある体細胞雑種の作出を目指した。

材料および方法

1. 供試材料

S. integrifolium はタキイ種苗株式会社の台木品種「赤ナス」の種子、*S. sanitwongsei* は社団法人日本種苗協会奈良県支部生産卸部会の台木品種「カレヘン」の種子を供試した。無菌植物の育成は、第3章第1節の方法、プロトプラストの単離は、第3章第2節の方法に従って行った。

2. プロトプラストの不活性処理

S. sanitwongsei のプロトプラストは 0.4 M マンニトール、2.5 mM 塩化カルシウムを含む 0.2 mM のヨードアセトアミド溶液 (pH5.8) で、25°C、10 分間処理した。2.5 mM 塩化カルシウムを含む 0.4 M マンニトール溶液に懸濁した *S. integrifolium* のプロトプラストには、GL-15 ランプ (ナショナル) を用い、30 cm の距離から 10 秒間紫外線を照射した。不活性処理後のプロトプラストは、2.5 mM 塩化カルシウムを含む 0.4 M マンニトール溶液で洗浄し、 5×10^5 個 ml^{-1} 濃度に調整し、氷水中で保存した。

3. 電気融合

不活性処理した 2 種類のプロトプラストを 1 : 1 に混合し (Figure 15A)、シャーレ (15 × 60 mm) の真ん中に混合液を置いた。その上から、浸漬型細胞融合チャンバー FTC-33D5 (島津製作所) を被せ、細胞融合装置 SSH-1 (島津製作所) を用いて、1 MHz、 150 V cm^{-1} の高周波電界を 30 秒間かけてパールチェーンを形成させた。さらに、 750 V cm^{-1} 、20 μs の直流パルス を 3 回印加して細胞を融合 (Figure 15B) させた。

4. 融合細胞の培養と植物体再生

プロトプラストの培養と植物体再生は、第3章第2節の方法に従って行い、薄黄緑色のカルスを不定芽形成培地 E (Table 12) に千個移植した。再分化した個体はガラス室で栽培し、形態観察により体細胞雑種の可能性の高い個体を予備選抜した。

5. ほ場における栽培と形態観察

予備選抜された 23 系統と *S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の苗を当所のほ場に 5 株ずつ定植し、4 月から 11 月まで露地栽培した。草丈、株本の茎径、本葉の形態、花卉の色、花卉のストライプの色、花序当たりの花数、果実の直径、株当たりの果実数、果実当たりの種子数、果実の水分含量、株当たりの根の重量、株当たりの種子量、花粉稔性、染色体数を調査した。花粉稔性は 9 月に調査し、1%酢酸カーミン染色液で花粉を染色し、顕微鏡下で計測した。果実と種子に関する調査は 11 月に行った。

6. アイソザイム分析

in vitro 植物の本葉を 200 mg 採取し、Hirai et al. (1986) の方法に従って、1 ml の抽出バッファー中で摩砕し、遠心分離した。その上清をポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法により泳動した。ゲルは Wendel and Parks (1982) の方法に従って染色し、shikimate dehydrogenase (SKDH; EC 1.1.1.25)、phosphoglucosylmutase (PGM; EC 2.7.5.1)、isocitrate dehydrogenase (IDH; EC 1.1.1.41) の 3 種類のアイソザイムを分析した。

7. DNA の抽出と random amplified polymorphic DNA (RAPD) 分析

全 DNA の抽出は、Hashizume et al. (1996) の方法に従って行った。57 種類の 12 塩基対 PCR プライマー用い、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の多型の検出を検討し、得られた多型を用いて、体細胞雑種の同定を行った。

8. 染色体構成

S. integrifolium と *S. sanitwongsei* の染色体は大きさ、形が類似しているため、染色体の核型分析で識別することはできなかった。そこで、genomic *in situ* hybridization (GISH) による染色体の識別を行った。

体細胞雑种植物の根端を 4°C 処理後、エタノール：酢酸=3:1 の混合液で固定した。その後、1%セルラーゼオノズカ RS、0.75%マセロザイム R-200、0.15% ペクトリナーゼ Y-23、0.5 mM EDTA を含む酵素液を用い、酵素解離・空気乾燥法 (Fukui and Iijima 1991) で染色体標本を作成し、4%ギムザ液で染色して染色体数をカウントした。

Fukui et al. (1994) の方法をナス用に改変した (Figure 21)。まず、*S. sanitwongsei* の全 DNA を抽出し、ランダムプライマー法でビオチン標識してプローブ DNA とした。プローブ DNA とブロッキング用に断片化した *S. integrifolium* 全 DNA の濃度を変えて混合した反応液を作成し、体細胞雑種の染色体標本上で 37°C、15 時間の分子交雑を行った。ビオチン標識した抗アビジン D でシグナルを増幅させた後、アビジン FITC で検出し、高感度冷却 CCD カメラで撮影した。さらに、画像解析処理によってシグナルを明瞭化し、DAPI で対比染色した染色体像とシグナル像を重ね合わせて表示した。

結 果

1. 融合細胞の培養と植物体再生

培養4-5日後に細胞分裂が始まり、シャーレ当たり数個から十数個のコロニーが形成された (Figure 15C)。不定芽形成培地に移植した千個の薄黄緑色のカルスの内、792個のカルスから緑色の不定芽が再分化した (Table 16、Figure 15D)。ガラス室内で栽培した792の植物体の中から、形態的に雑種と想定される24系統を選抜した (Table 16)。その内1系統の染色体数は77本で、奇形とクロロシスが激しく (Figure 16)、花も形成されなかったため、以後の研究材料から除外した。

2. ほ場における栽培と形態観察

残りの23系統をほ場栽培したところ、本葉、花蕾、花卉の色、果実の形態から3グループに分類された (Table 17)。

第1グループに属する13系統は、本葉 (Figure 17A)、花蕾 (Figure 17B)、花卉の色 (Figure 17C)、未熟果実と完熟果実 (Figure 17D) が *S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の中間型を示した (Table 17)。

草勢は両親より旺盛で、両親より茎は太く、根重も重く、着果数も多かった (Figure 17F ; Table 17)。果実当たりの種子数は16.8個で (Table 17) で、種子は両親より大型 (Figure 17E)、株当たり49.6 ml (約5千粒) の採種量であった (Table 17)。染色体数は48本で (Table 17 ; Figure 22A) であった。このグループにおける形態的な顕著な差は認められなかった。

第2グループに属する4系統は、本葉 (Figure 18A)、花序 (Figure 18B)、完熟果実 (Figure 18C) の形態において、第1グループより *S. integrifolium* に近い形態を示した (Table 17)。花卉の色は、*S. integrifolium* と同じ形態を示した (Table 17)。

第3グループに属する6系統は、本葉 (Figure 18A)、花序 (Figure 18B)、完熟果実 (Figure 18C) の形態において、第1グループより *S. sanitwongsei* に近い形態を示した (Table 17)。花卉の色と果実の水分含量は、*S. sanitwongsei* と同じ特性を示した (Table 17)。

第2グループと第3グループに属する10系統は、いずれも草勢が弱く、少量しか着果しなかった。染色体数は67-72本で、花粉稔性は低く (Table 17)、まれに種子が認められることもあるが、しいなであった。さらに、本葉は軽いクロロシスを伴う奇形葉であった (Figure 18A ; Table 17)。

3. アイソザイム分析と RAPD 分析による体細胞雑種の同定

3グループに属する23系統は、shikimate dehydrogenase、phosphoglucosylmutase、isocitrate

dehydrogenase の 3 種類のアイズタイム分析において、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の種特異的なバンドを併せ持っており (Figure 19)、23 系統全てが体細胞雑種と同定された。また、種特異的なバンドの欠失や新規のバンドは認められなかった。

S. integrifolium と *S. sanitwongsei* の多型バンドを検出するために、57 種類のランダムプライマーを検索した。その内、20 種類のプライマーにおいて多型が認められ、3 グループに属する 23 系統は、*S. integrifolium* 種特異的バンド 57 本と *S. sanitwongsei* 種特異的バンド 43 本を全て併せ持っており (Figure 20)、体細胞雑種と同定された。

4. GISH による体細胞雑種の染色体構成の解析

ブロッキング未処理区では、シグナルの強弱は認められるものの、*S. integrifolium* の染色体も相当量のシグナルを発生し、染色体の識別はできなかった。プローブ DNA に対し、100 倍濃度のブロッキング DNA を処理した区では、シグナルに強弱は認められるものの、*S. sanitwongsei* 由来の 24 本の染色体が強いシグナルを発生し、両種の染色体を視覚的に完全に識別することができた (Figure 22A)。この条件を用いて 3 グループに属する 23 系統の体細胞雑種の染色体の識別を行った。

第 1 グループに属する 13 系統の体細胞雑種の染色体数は 48 本で、24 本からシグナルが認められ、*S. integrifolium* の染色体が 24 本、*S. sanitwongsei* の染色体が 24 本で (Figure 22A)、*S. integrifolium* のプロトプラストと *S. sanitwongsei* のプロトプラストが、1:1 に対称融合した複 2 倍性の体細胞雑種 (複 2 倍体; $2n=4x=48$) であった。

第 2 グループに属する 4 系統の体細胞雑種の内、2 系統の体細胞雑種の染色体数は 72 本で、24 本からシグナルが認められ、*S. integrifolium* の染色体が 48 本、*S. sanitwongsei* の染色体が 24 本で、*S. integrifolium* のプロトプラストと *S. sanitwongsei* のプロトプラストが、2:1 に非対称融合した 6 倍性の体細胞雑種 ($6n=4x=72$) であった。残りの 2 系統の染色体数は、67 本と 70 本で、24 本からシグナルが認められ、*S. integrifolium* のプロトプラストと *S. sanitwongsei* のプロトプラストが、2:1 に非対称融合した後に、*S. integrifolium* の染色体が数本脱落した可能性と、紫外線照射されて染色体数が数本脱落した *S. integrifolium* のプロトプラストと 24 本保持された *S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* のプロトプラストが、1:1:1 に融合した細胞由来の可能性が想定された。

第 3 グループに属する 6 系統の体細胞雑種の染色体数は 72 本で、48 本からシグナルが認められ、*S. integrifolium* の染色体が 24 本、*S. sanitwongsei* の染色体が 48 本で (Figure 22B)、*S. integrifolium* のプロトプラストと *S. sanitwongsei* のプロトプラストが、1:2 に非対称融合した 6 倍性の体細胞雑種 ($6n=4x=72$) であった。

GISH による染色体構成の結果と形態的な特性の結果から、6 倍性体細胞雑種において、染色体構成比は形態的特性に影響を及ぼすことが強く示唆された。



Figure 15. Production of somatic hybrids between *Solanum integrifolium* and *S. sanitwongsei*.

(A) Protoplasts isolated from cotyledons. Bar = 30 μ m.

(B) Fused cell. Bar = 50 μ m.

(C) Colony formation after 3 weeks of culture. Bar = 200 μ m.

(D) Shoots regenerated from calli 3 weeks after transfer onto shoot regeneration medium.



Figure 16. Plant morphology of somatic hybrid (Chromosome number = 77) showed malformed leaf which the shrank with severe chlorosis.



Figure 17. Morphology of *S. integrifolium* (left), the amphidiploid somatic hybrid of first group (center), and *S. sanitwongsei* (right).

(A) Leaf. (B) Flower-bud. (C) Flower color.

(D) Immature fruit (upper) and mature fruit (lower). (E) Seed. (F) Entire plant.

Table 16. The results of somatic hybridization between *Solanum integrifolium* and *S. sanitwongsei*.

Total number of calli ¹	Number of regenerated calli ²	Identification of regenerated plant ³	
		<i>S. integrifolium</i>	Somatic hybrid <i>S. sanitwongsei</i>
1000	792	336	24 428

¹ Total number of calli plated on regeneration medium, 5-6 weeks after protoplast fusion.

² Regenerated calli counted 4 months after protoplast fusion.

³ Identification of somatic hybrid plants and their parents was based on the morphological analysis of greenhouse-grown plants.

Table 17. Characteristics of *S. integrifolium*, *S. sanitwongsei* and three groups of somatic hybrids.

	<i>S. integrifolium</i>			Somatic hybrids			<i>S. sanitwongsei</i>
	group 1	group 2	group 3	group 1	group 2	group 3	
Height (cm)	118.6±9.7	136.4±22.3	203.4±12.3	136.0±26.5	155.2±20.1		
Stem diameter (cm)	2.33±0.44	2.37±0.40	4.91±0.81	2.00±0.53	2.91±0.57		
Leaf shape	Lobed	Malformed	Slightly divided	Malformed	Deeply divided		
Petal color	White	White	Light purple	Purple	Purple		
Petal stripe color	Red purple	Red purple	Red purple	White	White		
Mean number of flower per inflorescence	9.6±2.4	9.2±2.8	13.0±1.6	5.6±0.8	2.7±0.2		
Mean diameter of fruit (cm)	51.3±3.0	23.5±1.6	19.1±1.8	13.5±1.1	10.4±1.2		
Mean number of fruits per plant	77.0±8.2	29.6±5.1	481.6±92.6	38.0±16.6	930.0±136.0		
Mean number of seeds per fruit	349.3±34.3	0.6±0.5	16.8±2.3	0.0±0.0	34.9±4.4		
Moisture content of fruit	82.9±1.8	81.6±1.9	81.5±0.8	69.7±3.4	69.3±3.6		
Mean dry weight of root per plant (g)	29.2±4.0	18.4±6.2	41.3±7.8	28.6±4.4	37.3±5.6		
Mean volume of seeds per plant (ml)	256.4±54.6	0.0±0.0	49.6±9.6	0.0±0.0	186.2±31.9		
Pollen viability (%)	92.9±1.8	52.9±1.6	78.8±2.1	31.1±7.3	94.3±0.8		
Chromosome number	24	67, 70, 72	48	72	24		
Number of plants		4	13	6			



Figure 18. Morphology of *S. integrifolium* (I), hexaploid somatic hybrid of second group (IIS), the amphidiploid somatic hybrid of first group (IS), hexaploid somatic hybrid of third group (ISS) and *S. sanitwongsei* (S).

(A) Leaf shape. (B) Inflorescence. (C) mature fruit.

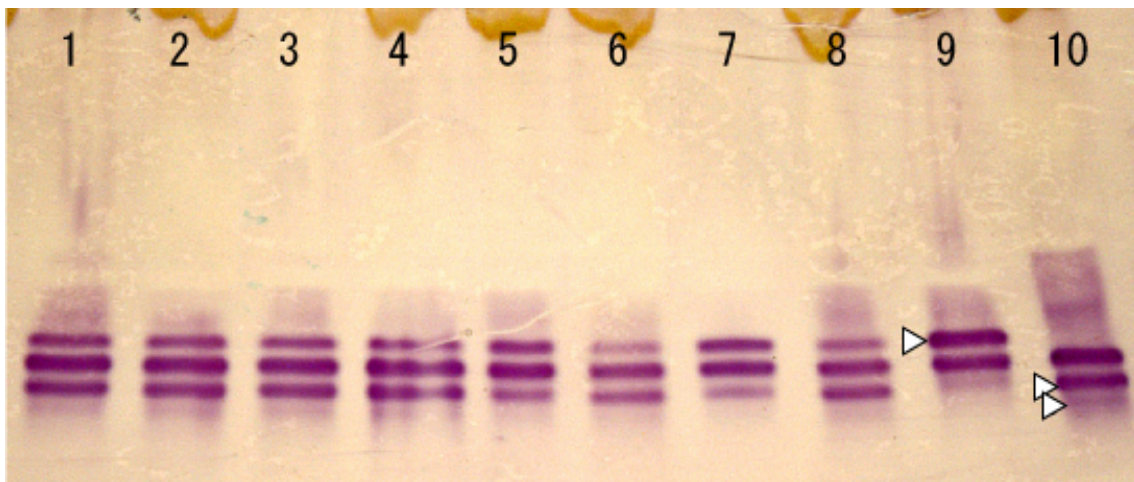


Figure 19. Shikimate dehydrogenase (SKDH) banding patterns of *S. integrifolium*, *S. sanitwongsei*, and the somatic hybrids. Lane 1-7: somatic hybrids. 8: the mixture of parental extracts. 9: *S. integrifolium*, 10: *S. sanitwongsei*. Parent-specific fragments are indicated by arrowheads (▷).

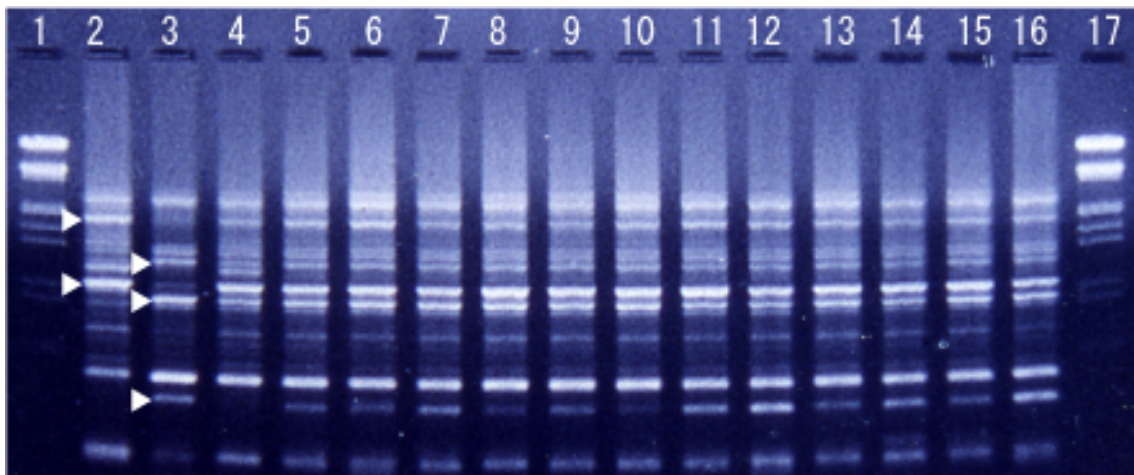


Figure 20. Amplification of genomic DNA by random primer RA12-28.
Lane 1,17: Molecular maker. 2: *S. integrifolium*. 3: *S. sanitwongsei*.
4: Mixture of parental DNA. 5-16: somatic hybrids.
Parent-specific polymorphic fragments are indicated by arrowheads (▷).

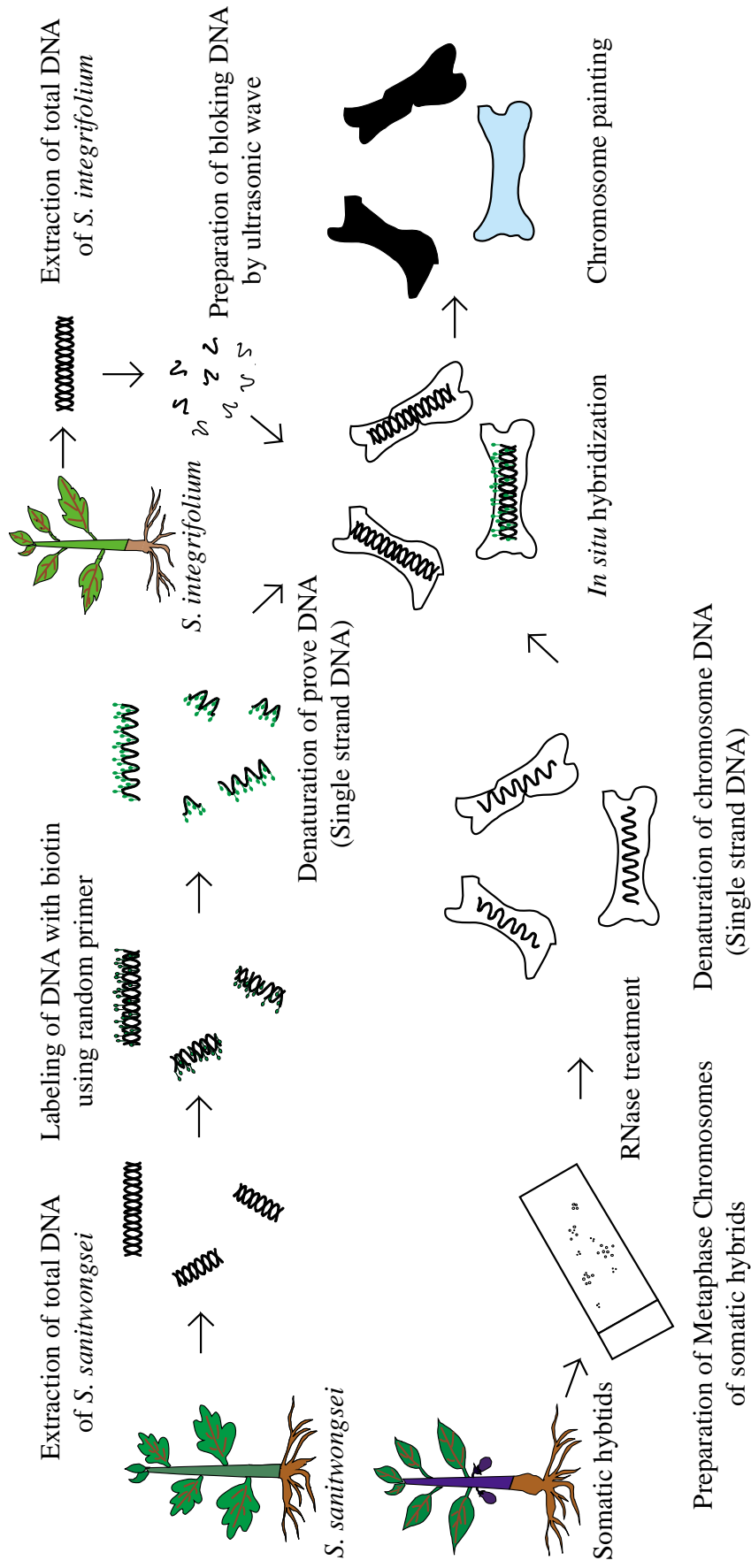


Figure 21. Procedure of genomic *in situ* hybridization (GISH).

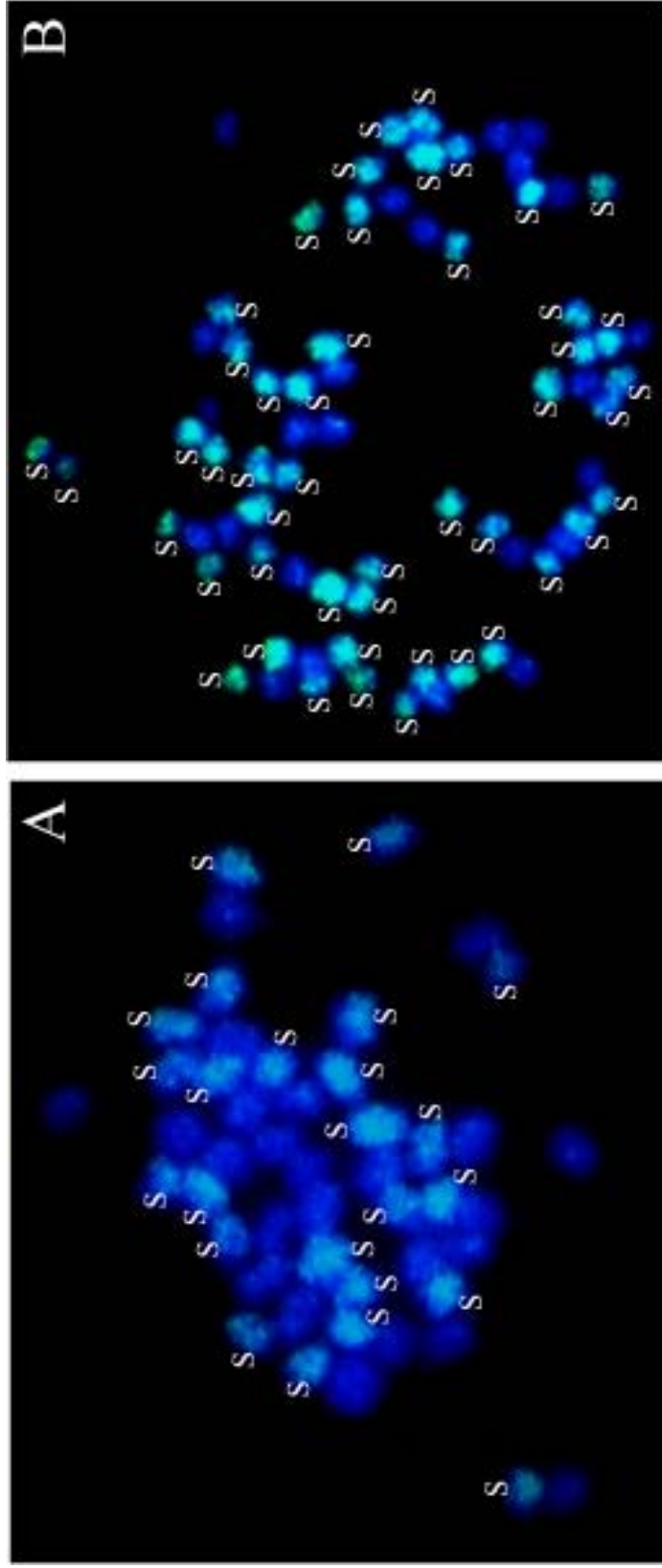


Figure 22. Identification of parental chromosomes in somatic hybrid using genomic *in situ* hybridization (GISH).

A: Somatic metaphase chromosomes of amphidiploid somatic hybrid ($2n = 4x = 48$) with 24 chromosomes of *S. sanitwongsei* (Green ; S) and 24 chromosomes of *S. integrifolium* (Blue).

B: Somatic metaphase chromosomes of hexaploid somatic hybrid ($2n = 6x = 72$) showing 48 chromosomes of *S. sanitwongsei* (Green ; S) and 24 chromosomes of *S. integrifolium* (Blue).

考 察

体細胞雑種はタバコ栽培品種と野生タバコの組合せで初めて報告された (Carlson et al. 1972)。それ以降、ナスとナス近縁野生種の組合せだけでも、数多く報告されてきている (Daunay et al. 1993 ; Gleddie et al. 1986b ; Guri and Sink 1988a ; Guri and Sink 1988b ; Kameya et al. 1990 ; Sihachakr et al.1988 ; Sihachakr et al.1989)。これらの研究の多くは、野生種の有する有用形質を栽培品種に導入する目的で体細胞雑種を作出している。そのため、体細胞雑種は野生種の好ましくない形質も有しており、そのままでは栽培品種として利用できていない。さらに、ごく近縁の野生種に有望な素材が見つかる場合はまれであり、比較的遠縁の野生種を利用することも少なくない。そのため、体細胞雑種のほとんどは不稔であり、自殖や戻し交雑によるその後の育種プロセスを適用できていない。このような原因により、経済的に価値のある品種はこれまで世に出していない。

そこで著者らは、栽培品種の改良ではなく、台木品種の改良に的を絞って細胞融合を行った。台木品種の育種は、接ぎ木親和性、低温発芽・伸長性、土壌伝染性の病害抵抗性、採種性等に育種目標が限定され、最も複雑な果実形質を考慮せずに育種できるため、栽培品種に比べて容易であり、短い年限で品種育成ができる。

その上、栽培品種の縛りがないため、台木品種間、台木品種と野生種、野生種間の組合せまで幅を広げることができる。その結果、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei*、*S. integrifolium* と *S. toxicarium*、*S. abutiloides* と *S. sanitwongsei* の3種類の組合せで体細胞雑種を作出し、その内、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の13系統の体細胞雑種は稔性を有し、系統によっては株当たり5千粒以上の種子量も得られる。組織培養によって増殖したクローン苗を台木に用いることも可能であるが、コストを考えると、採種の可否が実用化のポイントとなる。その点でも、重要な壁をクリアできたことになる。

13系統の体細胞雑種の自殖第1代の中から、*S. integrifolium* 並みの収量性と *S. sanitwongsei* と同等の青枯病抵抗性を併せ持ち、安定した特性を有する自殖第1代を選抜することができれば、そのまま台木品種としての実用化も可能である。

そこで、第3章第4節では、体細胞雑種の青枯病抵抗性について述べる。

第3章 第4節 体細胞雑種の青枯病抵抗性

第3章第3節では、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の組合せで、24 系統の体細胞雑種を作出し、13 系統は稔性を有していることを述べた。そこで、13 系統の中で、生育が旺盛で採種性にも優れた 9 系統の体細胞雑種について、青枯病抵抗性の検定を行い、*S. sanitwongsei* と同等の抵抗性を有する系統を選抜した。

材料および方法

1. 自根苗の準備

複 2 倍性の体細胞雑種 13 系統の中から、稔性と草勢に優れた 9 系統を選び、SH1—SH9 まで系統番号を付けた。SH1—SH9 を *in vitro* 増殖によりクローン苗を育苗し、本葉 9—10 葉期の苗を検定に供試した。また、対照植物としてナス罹病性栽培品種の「千両二号」、罹病性台木品種の *S. integrifolium*、抵抗性台木品種の *S. sanitwongsei* も本葉 9—10 葉期の実生苗を検定に供試した。

2. 接ぎ木苗の準備

SH1—SH9 と *S. integrifolium*、*S. sanitwongsei* の 5—6 葉期の苗に、「千両二号」を割り接ぎ法で接ぎ木し、穂木の本葉が 8—10 葉期に生育した接ぎ木苗を検定に供試した。

3. 検定方法

所内に設置した青枯病汚染ほ場（約 5×10^6 cf μ g⁻¹ dry soil）に、6 月 1 日に 20 株ずつ定植し、露地栽培の慣行法で 9 月 1 日まで栽培した。各月の 1 日と 15 日に発病株率と 5 段階の発病指数（0：無病徴、1：一部の葉が萎ちよう、2：約半数の葉が萎ちよう、3：ほとんどの葉が萎ちよう、4：全ての葉が萎ちよう又は枯死）を記録し、下記の計算式により発病度を求めた。さらに、接ぎ木苗の検定結果は、*S. integrifolium* の接ぎ木苗を無処理区とした防除価も下記の式で求めた。

$$\text{発病度} = \frac{0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4}{n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4}$$

（ n_0 — n_4 は、0—4 の発病指数を示した個体数）

$$\text{防除価} = 100 - (\text{処理区の被害} / \text{無処理区の被害}) \times 100$$

結 果

1. 自根苗の抵抗性検定

「千両二号」と *S.integrifolium* の発病株率は 100%、発病度も 4.00 と 3.80 で、100% と 90%の株が枯死したが、*S. sanitwongsei* の自根苗は発病が全く認められなかった (Table 18)。一方、9 系統の体細胞雑種の平均発病株率は 45.6%、発病度は 0.72 で、中程度の抵抗性を示した。しかし、系統により発病程度に差が認められ、発病株率 75.0%、発病度 1.15 の弱い抵抗性の SH1 系統から、発病株率 20.0%、発病度 0.30 の強い抵抗性の SH9 系統まで、大きなばらつきが認められた (Table 18)。

2. 接ぎ木苗の抵抗性検定

9 系統の体細胞雑種の接ぎ木は容易で、活着率も 95%以上と高かった。

S. integrifolium の接ぎ木苗の発病株率は 100%、発病度も 3.95 で 95.0%の株が枯死した (Table 19)。青枯病抵抗性の *S. sanitwongsei* の接ぎ木苗は、発病株率 35.0%、枯死率 25.0%、発病度 1.30 であった (Table 19)。一方、9 系統の体細胞雑種の接ぎ木苗の平均発病株率は 78.9%、枯死率 38.9%、発病度は 2.36 で、中間の抵抗性を示した (Table 19)。また、自根苗の検定結果と同様に、系統間において抵抗性のばらつきが認められ、発病株率 100%、枯死率 50.0–65.0%、発病度 2.95–3.30 の弱い抵抗性の SH1、SH2、SH8 系統から、発病株率 40.0%、枯死率 20.0%、発病度 1.35 で *S. sanitwongsei* と同等の高い抵抗性を示す SH9 系統まで、大きなばらつきが認められた (Table 19)。

3. 接ぎ木苗の防除価

発病度の結果を *S. integrifolium* 接ぎ木苗に対する防除価としてとらえると、SH9 系統の接ぎ木苗の防除価は 65.8 で、*S. sanitwongsei* の接ぎ木苗の防除価 67.1 (Figure 23) と同等の高い防除効果ありと判定された。農薬の効果試験の場合、防除価 60%以上で効果が高いと判定されることから、体細胞雑種の SH9 系統は、青枯病抵抗性台木の有望な素材であると判定された。

4. 発病度の推移

2. 接ぎ木苗の抵抗性検定試験で得られた発病度の結果を基に、発病度の推移を継続的に示したのが Figure 24 である。青枯病罹病性の *S. integrifolium* に接ぎ木したナスは、定植 1 ヶ月後の 7 月 1 日には発病が認められ、その後、急激に病徴が進行し、8 月 15 日には 80%株が枯死し、発病度は 3.80 に達した。一方、青枯病抵抗性の *S. sanitwongsei* と SH9 に接ぎ木したナスの発病度の進行は遅延し、同様な推移を示し、定植 3 ヶ月後の 9 月 1 日における発病度は 1.30–1.35 で、ともに強い抵抗性を示した。

Table 18. Bacterial wilt resistance of *S. melongena*, *S. integrifolium*, *S. sanitwongsei*, and the 9 lines of somatic hybrids.

	No. of plants examined	No. of diseased plants ¹	No. of dead plants ¹	Disease Frequency (%)	Mortality (%)	Disease Severity ¹
<i>S. melongena</i> 'Senryo No.2'	20	20	20	100.0	100.0	4.00
<i>S. integrifolium</i>	20	20	18	100.0	90.0	3.80
<i>S. sanitwongsei</i>	20	0	0	0.0	0.0	0.00
Total of 9 lines of somatic hybrids	180	82	0	45.6	0.0	0.72
SH1	20	15	0	75.0	0.0	1.15
SH2	20	12	0	60.0	0.0	1.05
SH3	20	8	0	40.0	0.0	0.50
SH4	20	8	0	40.0	0.0	0.60
SH5	20	9	0	45.0	0.0	0.75
SH6	20	6	0	30.0	0.0	0.35
SH7	20	9	0	45.0	0.0	0.75
SH8	20	11	0	55.0	0.0	1.05
SH9	20	4	0	20.0	0.0	0.30

¹ Data was scored at 3 months after transplanting on the soil contaminated with *Ralstonia solanacearum*.

Table 19. Bacterial wilt resistance of *S. melongena* grafted on *S. integrifolium*, *S. sanitwongsei*, and the 9 lines of somatic hybrids.

Rootstocks ¹	No. of plants examined	No. of diseased plants ²	No. of dead plants ²	Disease Frequency (%)	Mortality (%)	Disease Severity ²
<i>S. integrifolium</i>	20	20	19	100.0	95.0	3.95
<i>S. sanitwongsei</i>	20	7	5	35.0	25.0	1.30
Total of 9 lines of somatic hybrids	180	142	70	78.9	38.9	2.36
SH1	20	20	13	100.0	65.0	3.30
SH2	20	20	13	100.0	65.0	2.95
SH3	20	12	8	60.0	40.0	1.80
SH4	20	12	4	60.0	20.0	1.80
SH5	20	18	7	90.0	35.0	2.40
SH6	20	12	4	60.0	20.0	1.70
SH7	20	20	7	100.0	35.0	2.60
SH8	20	20	10	100.0	50.0	3.30
SH9	20	8	4	40.0	20.0	1.35

¹ *S. melongena* 'Senryo No.2' seedlings were grafted on several kinds of rootstocks.

² Data was scored at 3 months after transplanting on the soil contaminated with *Ralstonia solanacearum*.

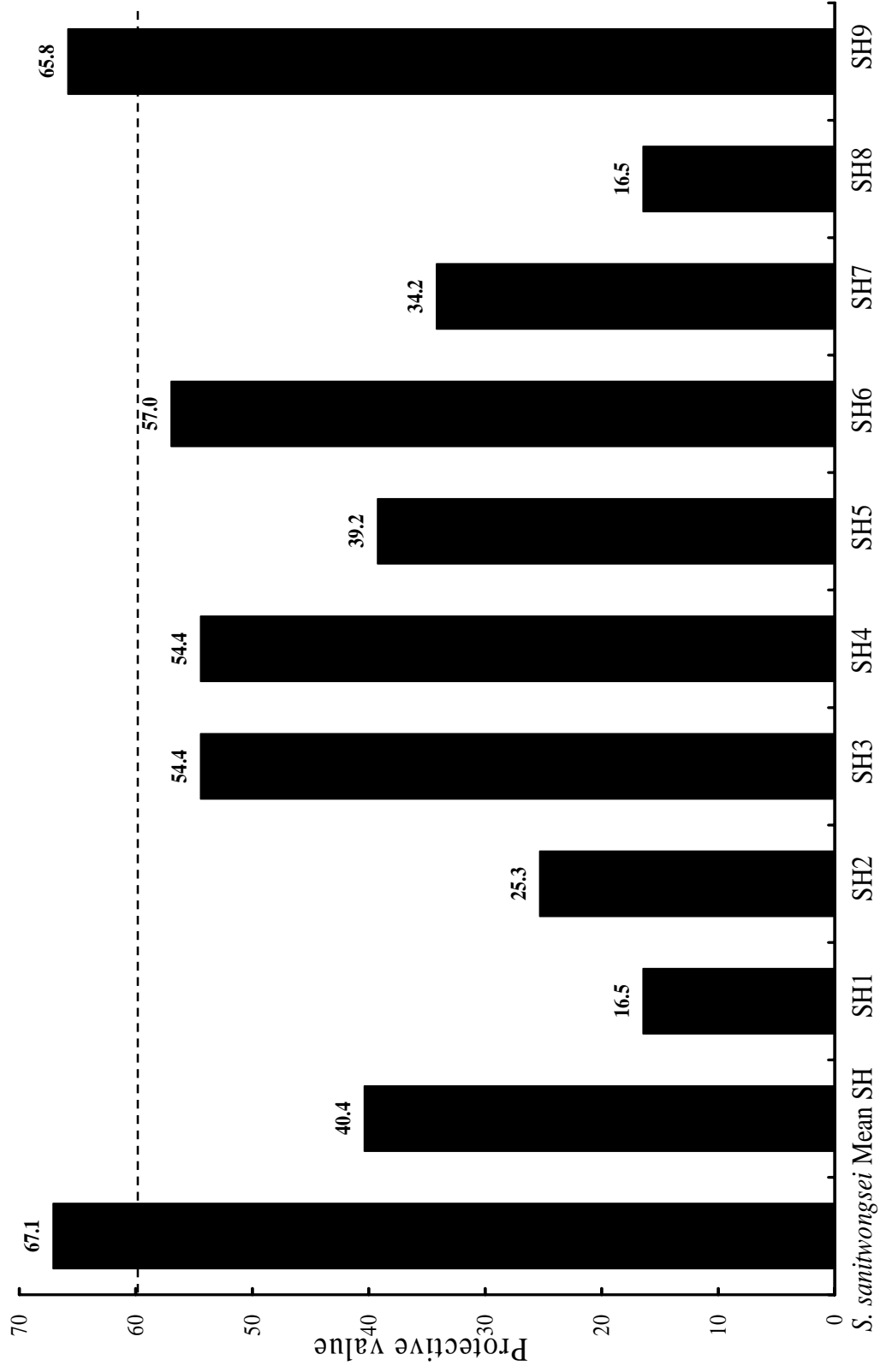


Figure 23. Protective value of *S. sanitwongsei* and the 9 lines of somatic hybrids against bacterial wilt.

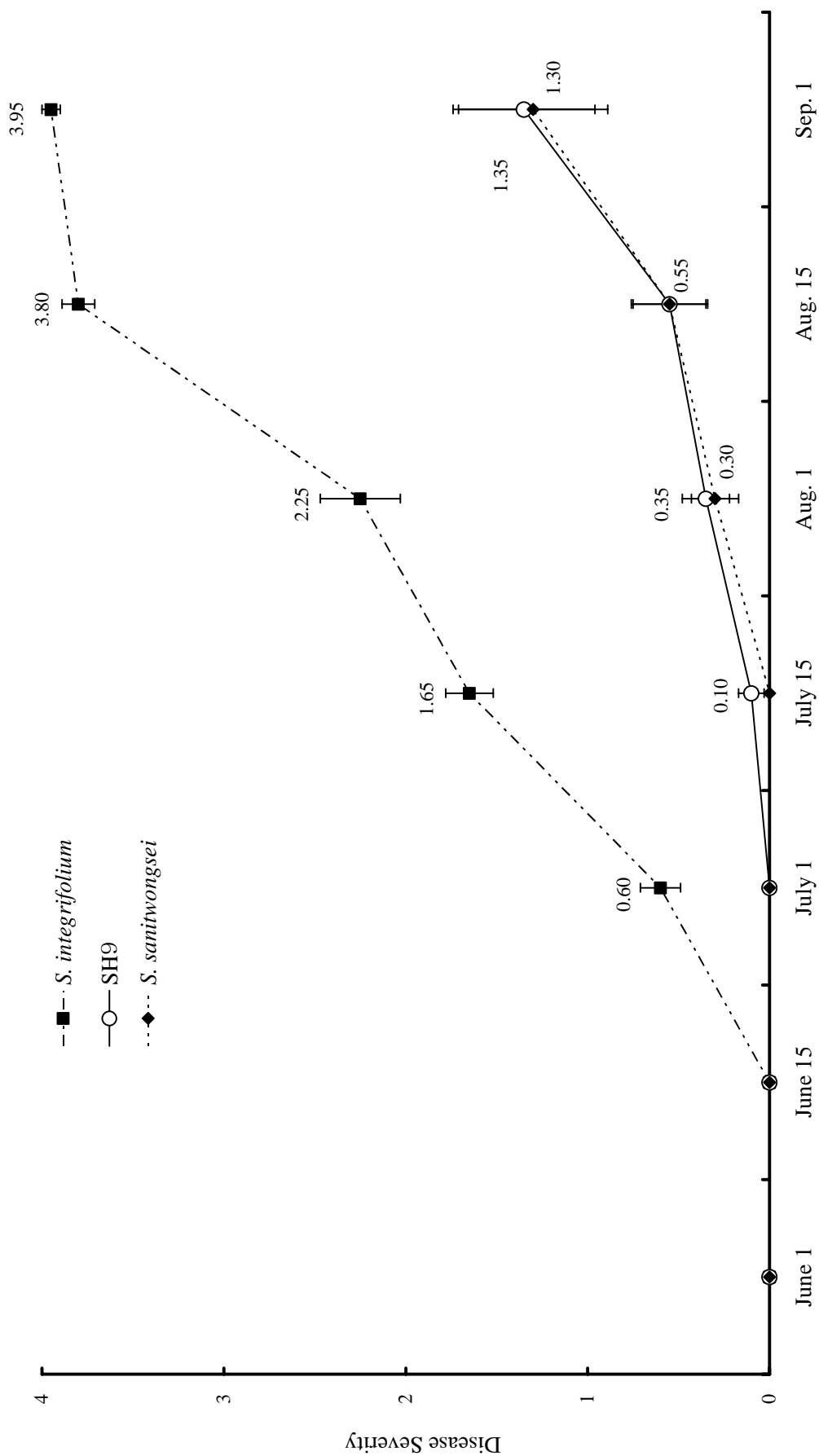


Figure 24. Progress of disease Severity of *S. melongena* grafted on *S. integrifolium*, *S. sanitwongsei*, and SH 9.

考 察

複 2 倍性の体細胞雑種 13 系統の中から、稔性と草勢に優れた 9 系統を選び、青枯病抵抗性検定を行ったところ、9 系統は、罹病性の *S. integrifolium* より強い青枯病抵抗性を示した。しかし、系統間で大きなばらつきが認められ、抵抗性の弱い SH1、SH2、SH8 系統から、*S. sanitwongsei* と同等の抵抗性を示す SH9 系統まで認められ、目的とする *S. sanitwongsei* と同等の抵抗性をクリアできた系統は 1 系統のみであった。

これまでに、多くの組合せで体細胞雑種作出の報告があるが、そのほとんどは 1 から数個体しか得ていない。そのため、限定された個体数の中で特性評価を行っている。本研究において、複 2 倍性の体細胞雑種間には形態的変異は認められなかったが、稔性や採種性、とりわけ青枯病抵抗性に大きなばらつきが生じていた。もし、既報の体細胞雑種の組合せにおいて、細胞融合を繰り返し行い、多くの体細胞雑種を獲得していたならば、稔性のある個体や特性に優れた個体を選抜できた可能性がある。この点を勘案すると、数個体レベルの特性評価でネガティブな結果しか得られず、その積み重ねが、細胞融合の実用性を低く見積もる結果になっているのかもしれない。

本研究では、数種類のナス近縁種野生種で、安定したプロトプラスト培養系を確立し、その培養系を用い、広い組合せで細胞融合を行った。さらに、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の体細胞雑種は 24 系統作出しており、その内、稔性のある体細胞雑種が 13 系統、稔性と草勢に優れた系統が 9 系統、そして、高い抵抗性を有する 1 系統に幸運にもたどり着くことができた。仮に、プロトプラストからの植物体再生効率が低く、体細胞雑種が数個体しか得ることができていなかった場合、この 1 系統にたどり着けなかった可能性が高い。

Daunay et al. (1993) は、交雑可能な組合せのナス (*Solanum melongena*) と *S. aethiopicum* の体細胞雑種が 35 系統得られたのは、高い融合率と特別な培養法によると考察している。35 系統の体細胞雑種の中には、稔性の高い系統があり、その後、Rizza et al. (2002) によって 2 倍性半数体が作出され、2 倍性半数体は半枯病抵抗性を示し、単為結果すると報告している。本研究と同様に、基本となる安定したプロトプラスト培養系を確立することにより、体細胞雑種を多数作出し、その中から、育種素材の候補を選抜している。

接ぎ木栽培が普及している我が国では、半枯病の被害は皆無であり、Rizza らの育種素材は、利用価値はあまり高くないが、体細胞雑種の実用化を目指した研究として高く評価したい。

ところで、複 2 倍性の体細胞雑種間のばらつきは、不活性化処理による変異の誘発やプロトプラスト培養中のソマクローナル変異、細胞質ゲノムの構成による差等も考えられる。しかし、本研究で行った RAPD 分析と GISH の結果では、複 2 倍性の 13

系統の体細胞雑種間において、染色体数の変異、多型バンドの欠失、新規バンドの出現等は認められなかった。近年、マイクロサテライトマーカーを利用した高感度多型検出の技術開発が飛躍的に進み、ナスにおいてもマイクロサテライトマーカーの開発が進んでいる（Nunome et al. 2003）。高感度な検出法を用い、体細胞雑種間の形質の変異が、遺伝的な変異によるものか否かを明らかにすることが、今後に残された課題である。

また、Daunay et al. (1993) は、*S. melongena* と *S. aethiopicum* の体細胞雑種の倍数性と葉緑体型によって、特性が異なることを報告している。稔性が高く、着果数が多い系統は、複2倍性で *S. melongena* 型の葉緑体を持つ体細胞雑種が多いと報告している。葉緑体の分析法も開発が進んでおり、葉緑体特異的な配列を利用し、PCR-RFLP 分析を行うと、容易に葉緑体型を知ることができる（Isshiki et al. 1998）。葉緑体型の調査も、今後検討したい課題である。

本研究で作出した体細胞雑種 SH9 系統は、採種性に優れ、草勢が旺盛で、高い青枯病抵抗性を有することから、第3章第5節では、SH9 系統の自殖第1代 S1-9 系統の台木特性について述べる。

第3章 第5節 ナス台木品種「羽曳野育成1号」の育成経過と特性

S. integrifolium と *S. sanitwongsei* の体細胞雑種 SH9 系統は、採種性、草勢、青枯病抵抗性に優れた特性を有する。また、自殖第1代 (S1-9) にもその特性が受け継がれていることが明らかとなった。そこで、品種登録するために特性調査を行った。本節では、「羽曳野育成1号」の育成経過と主要特性について概説する。

育成経過

「羽曳野育成1号」は、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の体細胞雑種の中から、選抜・育成した SH9 系統の自殖第1代である。

まず、細胞融合によって24系統の体細胞雑種を作成し、その自根苗を当所試験ほ場（羽曳野市）で露地栽培した。根張り、草勢、採種性の特性を調査し、9系統を選抜して自殖第1代を採種した。

次に、6系統の自殖第1代の実生を台木に用い、水ナス露地栽培の作型で系統適応性試験を泉南市で実施し、SH9系統の自殖第1代の S1-9 系統を選抜した。同時平行して青枯病抵抗性検定を実施し、SH9系統が *S. sanitwongsei* と同等の抵抗性を有することを確認し、SH9系統の自殖第1代 S1-9 系統を選抜した。

系統適応性試験、青枯病抵抗性検定いずれにおいても、SH9系統の自殖第1代 S1-9 系統が選抜されたことから、水ナス露地栽培作型で現地適応性検定を岸和田市で2年実施し、目標とする特性を有しているのを確認して育成を終了した。

特性の概要

1. 自根苗の形質

「羽曳野育成1号」は、*S. integrifolium* および *S. sanitwongsei* と比較すると、草丈、茎径、葉身の大きさ、花の大きさ、分枝数、株の広がり、花房あたりの花数と果実数において、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の形質を上回る (Table 20、Figure 17)。花色は薄紫色で、*S. integrifolium* の白色、*S. sanitwongsei* の青紫色と区別され、果実重は *S. sanitwongsei* の5倍、*S. integrifolium* の1/10である (Table 20)。

2. 採種と自殖第1代の形質

種子の千粒重は5.42gで、*S. integrifolium* の3.24g、*S. sanitwongsei* の2.05gに対し、「羽曳野育成1号」の種子は大きい (Table 20、Figure 17)。

発芽は *S. integrifolium* より数日遅れるが、子葉展開時の実生は大型で低温伸長性に

優れ、接ぎ木適期は *S. integrifolium* と同等の播種後 50 日で、*S. sanitwongsei* より 2 週間早い (Table 21)。

播種 50 日後の茎径は 4.06 mm で *S. integrifolium* の 4.18 mm と同等で、*S. sanitwongsei* の 2.44 mm より有意に太い (Table 21)。

茎は真っ直ぐで接ぎ木しやすく、接ぎ木所要時間は株当たり 68.2 秒で *S. integrifolium* と同等で、*S. sanitwongsei* より所要時間が短い (Table 21)。

接ぎ木活着率は 96.1% で、*S. integrifolium* の 94.8% と同等で高く、*S. sanitwongsei* の 90.4% を有意に上回る (Table 21)。

「羽曳野育成 1 号」を台木に用いると、水ナス露地栽培作型における株当たりの総収穫果実数は 112.1 個となり、*S. integrifolium* の 99.2 個、*S. sanitwongsei* の 93.9 個に対し、大幅に増収となる。また、6-7 月の収穫果実数は 33.5 個で、収益的に有利な初期収量が多い (Figure 25)。

「羽曳野育成 1 号」は、贈答用に用いられる上位等級 (A 品 + B 品) の構成率が高くなり (Figure 26)、収益的に有利である。

S. integrifolium は細くて短い根が多く、*S. sanitwongsei* は太くて長い根が多いのに対し、「羽曳野育成 1 号」は、太くて長い根も細くて短い根も多く、根重が大幅に増え、(Table 21) 根張りに優れた特性を示す。

3. 適地と栽培上の注意

「羽曳野育成 1 号」は、ナスの台木品種として広く利用が可能であるが、とりわけ、水ナスとの相性が良く、現在、水ナス栽培の約 13% が「羽曳野育成 1 号」を利用している。

水ナス用台木として利用すると、収穫果実数が増加するが、収穫後期には他の台木品種と同様に、成り疲れによって無光沢果が発生しやすくなるので、追肥時期や灌水に留意する。

根張りに優れた特性を示すが、灌水を抑えた栽培管理を行うと、直根が伸びて細根の伸長が妨げられるため、こまめな灌水が必要である。

Table 20. Characteristics of *S. integrifolium*, *S. sanitwongsei* and ‘Habikino-ikusei No.1’.

	<i>S. integrifolium</i>	‘Habikino-ikusei No.1’	<i>S. sanitwongsei</i>
Height (cm)	129	207	155
Stem diameter (cm)	2.4	4.9	2.8
Leaf area (cm ²)	448	483	321
Flower diameter (cm)	2.2	2.9	2.4
Mean number of branch per plant	12	53	31
Extent of stock	narrow	extremely wide	wide
Mean number of flower per inflorescence	9.6	13	2.7
Mean number of fruits per inflorescence	2.1	7.8	2.3
Petal color	White	Slightly purple	Blue purple
Mean weight of fruit (g)	30.1	3.0	0.6
Mean weight of seeds per 1000 seeds (g)	3.24	5.42	2.05

Table 21. Rootstock characteristics of *S. integrifolium*, *S. sanitwongsei* and ‘Habikino-ikusei No.1’.

	<i>S. integrifolium</i>		‘Habikino-ikusei No.1’		<i>S. sanitwongsei</i>	
Days after the seeding which is optimum for grafting	50	50	50	50	65-70	65-70
Stem diameter (mm) ¹	4.18	4.18	4.06	4.06	2.44	2.44
Operation time per seedling (s)	66.7	66.7	68.2	68.2	92.3	92.3
Grafting success rate (%)	94.8	94.8	96.1	96.1	90.4	90.4
Mean weight of roots per plant ²	73.3	73.3	98.4	98.4	83.5	83.5

¹ Data was recorded after 50 days of seeding.

² Data was recorded after the harvesting.

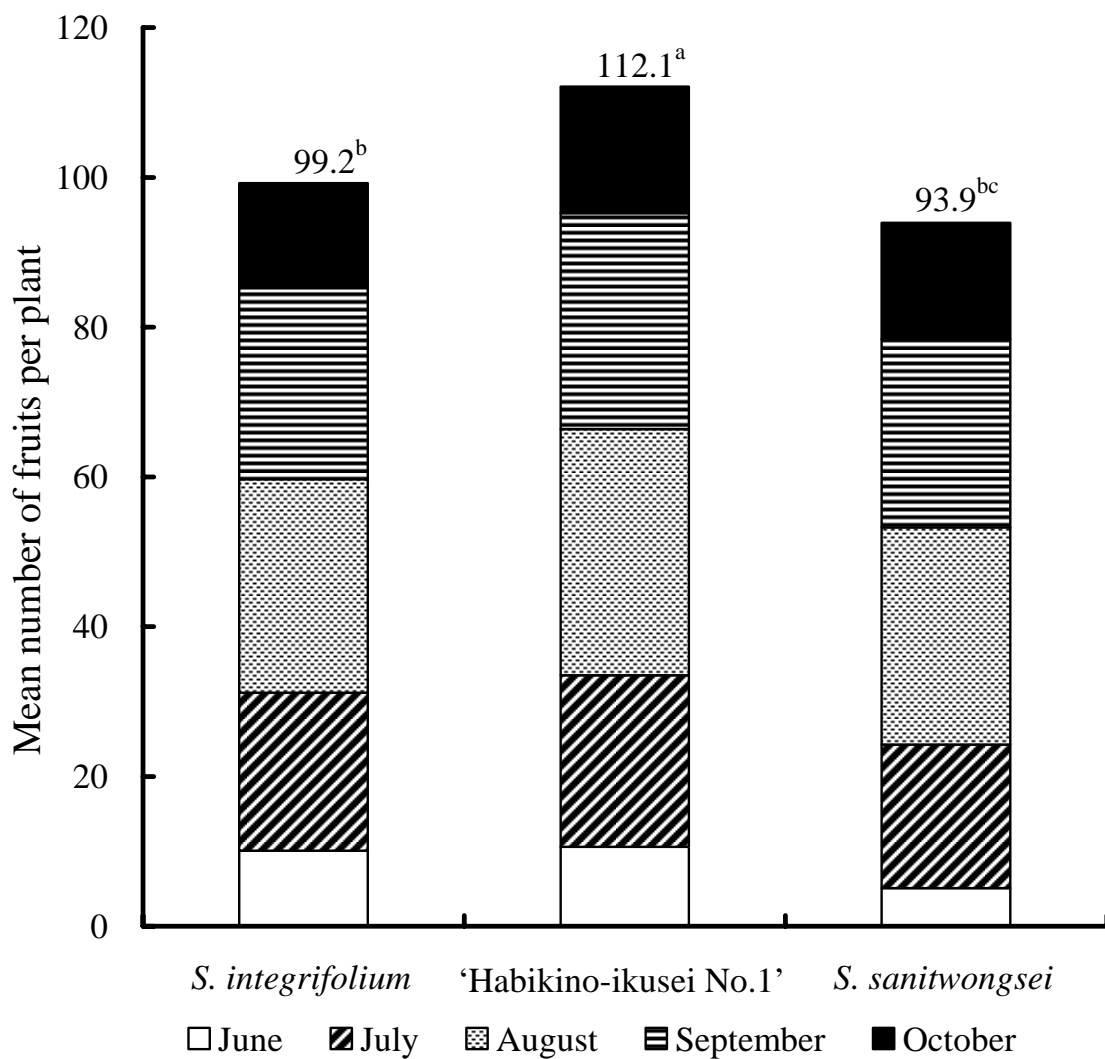


Figure 25. Fruit yield of *S. melongena* grafted on *S. integrifolium*, 'Habikino-ikusei No.1', and *S. sanitwongsei*.

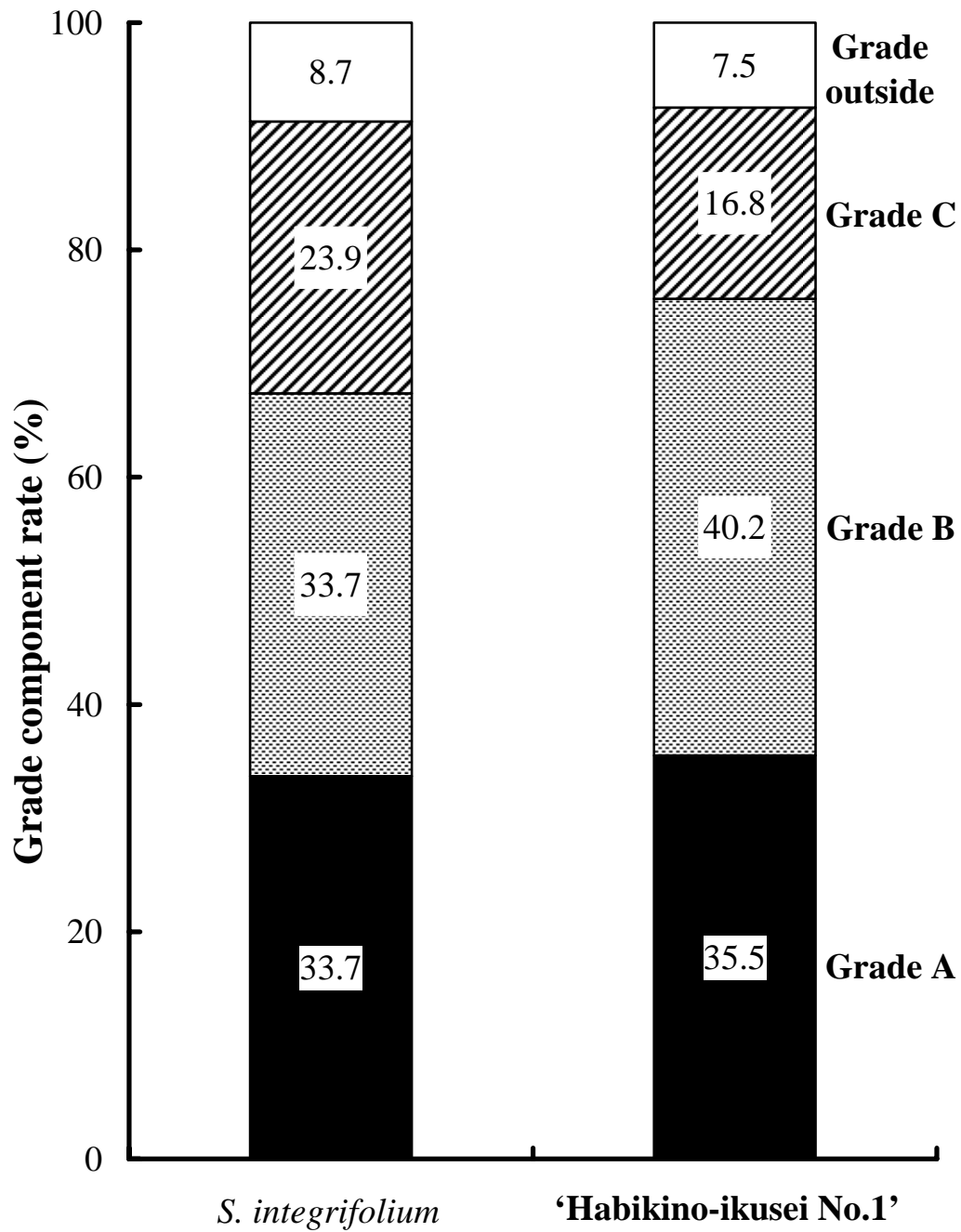


Figure 26. Grade comparison of Mizunasu-eggplant fruit.

考 察

本研究で育成した *S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の体細胞雑種 SH9 系統の自殖第 1 代 (S1-9 系統) は、台木特性に優れることから、2000 年 3 月 29 日に「大阪農技育成 2 号 (仮称)」の名称で品種登録出願し、2003 年 2 月 20 日に「羽曳野育成 1 号」の名称で農林水産品種登録 (第 10976 号) された。

本品種は、大阪府優良健全種苗供給事業により、2001 年度から府内のナス生産者に採種用苗が配布され、現在、水ナスの 13% で台木として利用されている。また、河南町では、「千両二号」の台木としての利用も進んでおり、普及の広がりをみせている。

自殖第 1 代である「羽曳野育成 1 号」は、青枯病抵抗性にばらつきが認められ、約 1% の個体は中程度の抵抗性しか示さない。しかし、抵抗性以外の形質については、十分揃っているため、青枯病抵抗性を宣伝せずに、収益性の高い水ナス用台木品種として、生産現場への普及を進めた。その後、青枯病にも強いとの評判が口コミで広がり、順調に普及しつつある。

著者らは、青枯病抵抗性を固定する目的で、「羽曳野育成 1 号」の後代の選抜と自殖による形質固定を進めてきたが、自殖第 2 代、第 3 代と世代が進むにつれて、抵抗性は固定されてくるが、発芽率の低下、発芽不揃い、本葉のクロロシスといった好ましくない変異が生じることが明らかとなった。また、これらの系統について、RAPD 分析したところ、体細胞雑種が持つ *S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の種特異的バンドのほとんどは後代に受け継がれていたが、一部のバンドの欠失や新規のバンドの出現等、DNA レベルでばらつきが生じていた。この変異は、自殖第 1 代よりも第 2 代にかけて拡大しており、実用上大きな問題が生じ、その後の育種は進んでいない。

自殖後代で形質変異が生じるメカニズムは不明な点も多いが、パキテン期における染色体対合の過程で、転座や挿入等が生じるためと考えられている (Escalante et al. 1998)。形質のばらつきが、世代を繰り返すうちに収束するのか否かを把握することは、品種育成上の重要なポイントである。また、自殖後代の植物の中には、稔性が高い、生育が旺盛、発芽が早い、青枯病抵抗性が高いといった優れた形質を示す個体もあり、遺伝的なばらつきを優良系統の選抜に利用できる興味深い素材である。

しかし、品種に育成するまでには多大な労力を要し、変異が収束しない場合も想定され、府県レベルの試験研究機関では、それ以上の対応はできないのが残念である。

これまで述べてきたように、病害抵抗性育種の研究において、細胞融合は盛んに行われ、作出された体細胞雑種も少なくない。しかし、高い抵抗性を有した市場性の高い品種が育成された報告はない。それは、体細胞雑種は近縁野生種の病害抵抗性を持っているが、同時に栽培品種としてふさわしくない形質を受け継いでおり、そのまま実用品種として利用できない点にある。また、体細胞雑種と栽培品種の戻し交雑にお

いて、不稔性や倍数性が育種の大きな妨げとなっている。本研究で育種目標にした台木は、体細胞雑種そのものや自殖の固定系統をそのまま品種として利用できるため、細胞融合による育種を行う上で有利な題材であったと考えている。また、融合の組合せによっては、稔性の高い体細胞雑種を作出することも可能であり、使い方によって、細胞融合も有力な育種ツールになることを実証した。

第4章 総合考察

日本の農業は、狭い耕作地を有効活用した土地生産性の高い集約的農業が特徴となっている。特に都市近郊の農業は、耕作地に制限があるため、土地生産性を極限まで高めた農業を営み、おのずと施設栽培の比率が高くなっている。大阪府における施設栽培の最大の特徴は、ビニルハウスを利用した無加温半促成栽培が発達している点にある。厳冬期はハウス内を3重ビニルで被覆して気温を保ち、それ以外の時期は被覆を調節して温度の上昇を防ぐ。職人技の温度管理で暖房費をかけずに、質の良い野菜を端境期に出荷して高収益を上げてきた。一方、高温期になるとハウスのビニルを外し、骨組みだけにして収穫を続けたり、出荷に要する期間が短い葉菜類やキュウリ等を作付けしたりして、周年収穫する体系を確立してきた。このような特徴が、「大阪の農家は畑を遊ばせない」と言われるゆえんである。

かつては、数年ごとに耕作地を替えていたが、都市化により代替地の確保が困難となり、耕作地の固定化が進んでいった。以前から、土壤伝染性病害の発生は報告されていたが、抵抗性台木の導入やクロルピクリン、臭化メチル等効果の高い土壤殺菌剤が導入され、生産が安定した時期もあった。しかし、ほ場周辺でのペットの死亡が契機となり、クロルピクリンは大阪府内全域で使用禁止となった。また、発ガン性のリスクから PCNB 剤も販売を中止した。さらに、臭化メチルはオゾン層を破壊することが明らかとなり、先進国では 2005 年に使用禁止となった。

このような状況の中、大阪府内では 20 年以上連作のほ場も珍しくなく、ナスでは青枯病、褐色腐敗病、菌核病、半身萎ちょう病、フキでは葉枯病、菌核病、白絹病、半身萎ちょう病等の土壤伝染性病害の発生が問題となり、ほ場によっては全滅の被害も報告されるようになってきた。クロルピクリン、臭化メチル、PCNB 剤の代替薬剤も検討されているが、効果が不十分で、効果の高い薬剤を探しているのが現状である。また、土壤殺菌は定植前に処理を行うため、発病するしないにかかわらず予防的に処理されており、おのずと使用量が増える。そのため、河川流出による環境汚染や生産者の健康被害が危惧されている。

そこで、夏期にハウス内に水を溜め、ハウスを締め切って蒸し焼きにする太陽熱消毒が開発された。この方法は、環境に優しい防除法として推奨され、天候に恵まれた 7-8 月の時期に、30-50 日間きっちり処理すれば、土壤伝染性病害であっても効果が高いことが分かっている。しかし、その効果は天候に左右され、曇天が続いた冷夏の年や処理日数が短い場合は効果が不十分である。さらに、ナスでは収穫時期と重なるため、無加温半促成栽培作型、露地栽培作型では適応できていない。

フキは 7-8 月が休作期で、太陽熱消毒が効果的に行われている作目の 1 つである。しかし、殺菌効果が高く、地下茎の痛みが少ない PCNB 剤の発売中止以降、有効な薬

剤が見あたらず、定植用の地下茎内部に付着した病原菌が感染源となり、太陽熱消毒の効果が十分に上がっていない。最近では、従来ほとんど問題とならなかった葉枯病の被害が拡大し、大きな問題となってきた。

露地のフキは、霜が降りてから翌春まで地上部が枯れるが、ハウス栽培では厳冬期も温暖なため、アブラムシが活発に活動し、あちこちで吸汁による縮葉が観察され、ウイルスの蔓延を引き起こしている。泉州農と緑の総合事務所農の普及課には、フキの写真が記録として残されているが、モザイクの病徴が、時代とともに顕著になっているのがわかる。

フキのモザイク病徴は、萌芽まもない葉身には明瞭に表れるが、生長とともに葉身全体が黄緑色になり、病徴がマスキングされてしまう。また、葉柄はすくすくと伸びるため、病徴だと認識している生産者はほとんどいない。そのため、ウイルス病防除の対策は皆無であり、「愛知早生フキ」大阪在来系統は、100%ウイルスに感染しており、その多くは2-3種類のウイルスに重複感染していた(中曾根 1987)。その結果、1990年代に入ると、「フキが伸びない。フキが萎れる。」との声があちこちで上がるようになっていた。

このような状況の中で、大阪府は伝統に育まれた「大阪フキ」、「水ナス」等 12 品目を、1993 年度に「なにわ特産品」に指定し、安定した生産体制づくりを推進して行くことになった。その一環として、大阪府と泉州地域の各農協のフキおよび水ナスの生産出荷部会(組合)は、大阪産生産安定化対策検討会と泉州水茄子生産安定化対策検討会を 1994 年と 95 年に設置し、大阪府農林技術センター栽培部生物資源室(現:大阪府立食とみどりの総合技術センター食品・資源部生物資源グループ)も 96 年度から参画した。

フキの効率的ウイルスフリー化技術の開発とソマクローナル変異選抜による品種育成

最初に、ウイルスフリー化による無病苗の育成に取り組んだ。茎頂培養とカルス培養によるウイルスフリー化は、従来から報告されていたが、茎頂培養は雑菌汚染が多く、生き残った茎頂の生育も遅く、シュートを再生するのに最も早いもので 34 日、遅い個体では 10 ヶ月要していた(森下、山田 1979)。また、雑菌の汚染を免れた組織も強い殺菌の影響で褐変するものが多く、再生個体の中にアカザ検定でモザイク症状を示すものもあり(松原、益田 1980)、茎頂培養には問題点が多かった。一方、カルス培養法はウイルス除去率を高めるために長期培養する必要があり、効率的手法が求められていた。そこで、花芽分化初期の頭花を培養することにより、ウイルスフリー株を短期間に、確実に作出する手法を開発した。さらに、腋芽増殖による大量増殖技術と効率的な発根技術を開発し、ウイルスフリー苗の供給効率を飛躍的に向上させた。

次に、在来系統の収集と育種素材となる優良系統の選定を行った。「愛知早生フキ」

大阪在来系統は、100%ウイルスに感染しているため、系統間差について厳密な調査ができなかった。そこで、頭花培養で作出したウイルスフリー株を用い、ウイルス感染や株の老化等の影響を除き、系統そのものの遺伝的特性を比較した。その結果、府内で栽培されているフキには、遺伝的な差がかなりあることが明らかとなった。

続いて、ソマクローナル変異選抜法の適用を検討した。一般に、ソマクローナル変異選抜を行う場合、変異出現頻度の高い培養系 (Ezura et al. 1995) を用いることが多い。しかし、フキは変異が生じやすい植物で、変異の制御が難しい。そのため、カルス経由で再生した植物体には、好ましくない変異を示す個体が多く (森下、山田 1981)、カルス培養系は適さなかった。そこで、カルスを経由せず、確実にウイルスフリー化できる頭花培養系を用いた。その結果、収量における変異の幅は 1.57 倍で、カルス培養系の 2.42 倍 (森下、山田 1981) より低いが、変異体の 78% が在来系統の収量を上回った。このことから、変異出現率の高いカルス培養より、ゆるやかな変異の生じる頭花培養の方が、フキの育種に適していることを明らかにした。さらに、頭花培養によって再生したシュートの第 3 本葉が早い個体を *in vitro* で 1 次選抜し、その後、温室で育苗した苗の中から、地下茎の張りの良い個体を 2 次選抜する早期選抜技術を開発した。この選抜方法により、在来優良系統より収量が 29.6% 増収し、柔らかくてみずみずしく、色調にも優れた系統を最終選定し、「大阪農技育成 1 号 (愛称: のびすぎでんねん)」の名称で品種登録 (第 10632 号) した。

本品種は日保ち性に優れ、歯切れが良く、しゃきしゃきした食感がサラダに向く等の長所が明らかとなり、現在では、大阪府産のフキは 100% 「大阪農技育成 1 号」に更新されている。以上により、フキの品種改良におけるソマクローナル変異選抜の有効性を実証した。

細胞融合による水ナス用台木品種の育成

ナス栽培において、青枯病は最も恐ろしい病気である。ナス青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は根の傷口から侵入し、水分とともに道管を上り、急激に増殖して道管を詰まらせ、ナスは水分を断たれる。さらに、細胞外多糖物質 (Exopolysaccharide : EPS) を菌体外に産生し (Gowda and Vittal 1980a ; Gowda and Vittal 1980b) 、萎ちょう症状を引き起こす。萎ちょうの進行は急激で、青いまま枯れる特徴から、青枯病と名付けられている。大阪府内では、収穫開始頃から収穫最盛期にかけて発病する。特に、成り疲れによって樹勢が衰える収穫最盛期と青枯病菌の増殖に適した気温とが重なるため、被害は甚大で、ハウスが全滅することも珍しくない。また、ナスの根は土壌深くまで伸びており、ナス青枯病菌も地下 3 m 以上の深さまで分布している。太陽熱消毒の殺菌効果はそこまで届かず、菌密度は下がるが、完全に死滅させることは不可能である。

一方、接ぎ木は我が国独特の防除技術で、トマト、ナス、キュウリ、メロン、スイカ等の果菜類や果樹で広く行われている。ナスの青枯病防除には、抵抗性台木の利用が有効で（宮園 1979）、環境にも優しい防除法としても見直されている。しかし、既存の抵抗性台木品種の中に、水ナスに適した台木は見いだされていない。また、ナスと近縁野生種は交雑不親和のものが多く、ごくまれに作出されたF₁も不稔で、育種の大きな障害となっている（Ali and Fujieda 1990 ; Bletsos et al. 1998 ; Khan et al. 1978 ; 西尾ら 1984 ; Rao 1971）。

細胞融合は交雑不親和を打破する技術として期待されており、近縁野生種の有する抵抗性等の有用形質をナスに導入する目的で、ナスと近縁野生種の体細胞雑種が作出されている（Daunay et al. 1993 ; Gleddie et al. 1986b ; Guri and Sink 1988a ; Guri and Sink 1988b ; Kameya et al. 1990 ; Sihachakr et al. 1988, 1989）。しかし、作出された体細胞雑種は、野生種の持つ好ましくない形質も受け継いでいるため、そのままでは利用することができない。また、自殖やナスとの戻し交雑も試みられているが、作出された体細胞雑種は不稔で種子が得られず、その後の育種はほとんど進んでいない。これらの点を考慮に入れ、著者らは、細胞融合を台木の育種に用いることにし、細胞融合の組合せを近縁野生種間に限定し、稔性のある体細胞雑種の作出を目指した。

まず、細胞融合の基礎技術となる、組織切片からの植物体再生とプロトプラストからの植物体再生条件を検討し、*S. abutiloides*、*S. integrifolium*、*S. scabrum*、*S. toxicarium* の4種でプロトプラストからの植物体再生に成功し、培養したプロトプラストの4.89、5.18、1.29、4.25%が植物体に再生する極めて効率の高い植物体再生系を確立した。

続いて、この安定したプロトプラスト培養系を用いて、ナス近縁野生種間の細胞融合を広い組合せで行い、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei*、*S. integrifolium* と *S. toxicarium*、*S. abutiloides* と *S. sanitwongsei* の3種類の組合せで体細胞雑種を作出した。その内、*S. integrifolium* と *S. sanitwongsei* の組合せでは、24系統の体細胞雑種を作出しており、稔性のある複2倍性の体細胞雑種は13系統、稔性と草勢に優れた系統が9系統、そして、*S. sanitwongsei* と同等の青枯病抵抗を示した1系統（SH9系統）を最終的に選抜した。

Daunay et al. (1993) は、交雑可能な組合せのナス (*Solanum melongena*) と *S. aethiopicum* の体細胞雑種を35系統得ているが、高い融合率と特別な培養法がなければ、同様な結果は得られなかっただろうと述べている。本研究においても、プロトプラストからの植物体再生効率を高めたことにより、SH9系統を得るに到ったと考えている。

SH9系統の自殖第1代（S1-9系統）は、台木特性に優れることから、2003年2月20日に「羽曳野育成1号」の名称で農林水産品種登録（第10976号）した。また本品種は、大阪府優良健全種苗供給事業により、2001年度から府内のナス生産者に採種用苗が配布され、現在、水ナスの13%で台木として利用されている。さらに、南河内地域では、「千両二号」の台木としての利用も進み、普及の広がりをみせている。

ソマクローナル変異選抜と細胞融合は、オールドバイオテクノロジーと呼ばれ、確立された技術、悪くいえば、これまでの積み重ねを超える際だった成果は得にくいとの評価を受けている。しかし、本研究において得られた2つの実用品種の成果を考えると、使い方をうまく工夫すれば、有力な育種ツールになることを実証した。

かつてバイオテクノロジーは、夢の育種技術ともてはやされた時代もあったが、振り返ると実用化のハードルは相変わらず高いと言わざるをえない。しかし、生産現場の問題点を汲み上げ、それにあつた育種ツールを選択し、そのツールの実力を把握しながら取り組めば、実用的な品種はおのずと生まれてくるに違いない。

21世紀を迎え、環境問題、食糧問題等を解決する手段として、バイオテクノロジーに対する期待はますます膨らんでいる。基礎研究、応用研究、そして実用化研究が足並みを揃え、消費者に貢献できる品種作りがより一層進むことを期待したい。

摘 要

大阪府の農業は、都市近郊の立地条件を生かし、施設栽培を中心とした土地生産性の高い農業形態をとっている。特に野菜の生産が盛んで、農業粗生産額の約4割を野菜が占めている。その中でもフキ、シュンギク等の葉菜類、河内（千両）ナスや水ナスは、大阪特産の野菜として評価が高く、収益性の高い作目となっている。しかし、長年にわたる連作により、土壌伝染性病害やウイルス病等が蔓延し、生産性や品質を低下させる大きな要因となっていた。そこで、本研究では、バイオテクノロジーを用いた大阪府特産野菜であるフキとナスの品種改良に取り組んだ。フキについてはウイルスフリー化とソマクローナル変異選抜による品種改良、ナスについては細胞融合による青枯病抵抗性台木品種の作出に取り組んだ。

1. フキの効率的ウイルスフリー化技術の開発とソマクローナル変異選抜による品種育成

大阪府は、かつては全国一のフキ生産地であったが、都市化、高齢化とともに産地が衰退し、近年ではウイルス病の蔓延が深刻な問題となっていた。茎頂培養とカルス培養によるウイルスフリー化は従来から報告されていたが、茎頂培養は雑菌汚染が多く、カルス培養はウイルス除去率を高めるために長期培養する必要があり、効率的手法が求められていた。一方、1年中採取可能で、雑菌の発生が少ない葉柄や葉身を外植体として用い、いったんカルスを形成し、そのカルスから植物体を再生させる手法も開発されたが、カルス培養では ArMV の除去が困難なことや BuMV においてもウイルスフリー化するには1年以上の長期間の継代培養が必要なことから、茎葉再生率の低下や再生植物体に形質変異が生じる問題があった。そこで、本研究では、花芽分化初期の花蕾（ふきのとう）から、0.2–0.4 mm の頭花組織を摘出し、カルスを経ずに直接シュートを再生させる培養系を確立した。この培養系は、雑菌の汚染がほとんどなく、前述の培養に比べて短期間に、確実にウイルスフリー株を作出する技術として開発できた。さらに、腋芽増殖による大量増殖法と効率的な発根法を組合せ、フキウイルスフリー株の供給効率を飛躍的に向上させることに成功した。

次に、生産現場から優良系統を収集し、ウイルスフリー株を用いた比較栽培により、収量性と品質に優れた在来系統を選抜した。さらに、頭花培養によって植物体に再生した個体間で、収量性に差が認められることを見だし、収量の高い系統を早期に選抜する手法を開発した。すなわち、頭花培養によって再生したシュートの第3本葉が早くできる個体を1次選抜し、その後、温室で育苗した苗について、地下茎の張りの

良い個体を2次選抜する方法である。この選抜方法により、在来優良系統より収量が29.6%増収し、柔らかくてみずみずしく、色調にも優れた系統を最終選定し、「大阪農技育成1号（愛称：のびすぎでんねん）」の名称で品種登録（第10632号）した。本品種は日保ち性に優れ、下ごしらえも容易で、サラダに向く等の長所が明らかとなり、現在では、大阪府産のフキは100%「大阪農技育成1号」に切り替わっている。本研究により、フキの品種改良におけるソマクローナル変異選抜の有効性を実証した。

2. 細胞融合による水ナス用台木品種の育成

大阪南部の泉州地域特産の水ナスは、水分に富む果肉特性や独特の甘みを持つため、浅漬は絶品と賞賛され、需要が拡大している。しかし、大阪府内ではハウス栽培が主に行われており、土壌伝染性の細菌病である青枯病の被害が拡大し、安定生産を妨げ、品質の低下をもたらす大きな要因になっていた。

青枯病の防除には、抵抗性台木の利用が有効で、環境にも優しい防除法として見直されているが、従来在台木では草勢が弱く、独特な栽培を行う水ナスに適した抵抗性台木は無かった。また、台木に利用する近縁野生種間では雑種作出が困難であり、万1雑種が得られた場合でも自殖第1代が不稔となり、近縁野生種を利用した台木の育種はほとんど行われていなかった。そこで、収量性は高いが青枯病に弱い台木の *Solanum integrifolium* と青枯病には強いが、収量性や果実品質の低い台木 *S. sanitwongsei* の体細胞雑種を作出した。さらに、体細胞融合から得られた複2倍性の種間雑種の中から、台木特性（接ぎ木苗の果実品質や収量、青枯病抵抗性、採種性）に優れた系統を選抜し、「羽曳野育成1号」の名称で品種登録（第10976号）した。「羽曳野育成1号」は、大阪特産の水ナスとの相性が良く、*S. sanitwongsei* 並の青枯病抵抗性と高い収量性を兼ね備えており、果実も卵形になる利点もある。現在までのところ、既に水ナス栽培全体の13%に利用され、今後、農薬に頼らない環境に優しい防除法として一層の普及を進めているところである。

以上のように、本研究において、フキの頭花培養による効率的なウイルスフリー化技術とソマクローナル変異利用による品種改良技術、及びナス近縁野生種の細胞融合による体細胞雑種作出技術を開発した。さらに、これらの技術を利用して、生産現場に普及する品種が育成できることを、フキと水ナス用台木で実証した。

Summary

Agriculture in Osaka Prefecture has the advantage of being located close to a major consumer market. Japanese butterbur and Mizunasu-eggplant are the most important specialty product vegetables produced there, and to achieve a high yield within a small area, cultivation is carried out mainly in plastic greenhouses. Farmers have produced these crops in the same fields for a long time due to the encroachment of urbanization in Osaka Prefecture. In addition, growth problems caused by both soil-borne diseases and plant viruses have been increasing widely. As the breeding of resistant cultivars would be the ideal solution to overcome these diseases, I attempted to breed new cultivars of Japanese butterbur and Mizunasu-eggplant using biotechnological techniques such as somaclonal variation and cell fusion.

1. Mass propagation of virus-free plants and production of a high-yield cultivar of Japanese butterbur using flowerhead culture.

Japanese butterbur (*Petasites japonicus*) is a perennial herbaceous plant belonging to the Compositae. The petioles are used mainly as a human food source, and 'Aichi-wase-fuki,' the most widely grown cultivar, is triploid and propagated vegetatively. Growth problems have been caused by three types of wide-spreading virus in Osaka Prefecture.

To establish efficient mass propagation of virus-free plants, adventitious buds were regenerated directly from immature flowerheads of Japanese butterbur. Osaka native lines of Japanese butterbur were collected from the production field, and the highest yielding line (line A) was selected by comparison cultivation using virus-free plants regenerated from the collections. To induce somaclonal variation related to plant yield, adventitious buds were regenerated directly from immature flowerheads of Japanese butterbur. In the first screening, the total yield ranged from 13.8 to 21.6 kg m⁻², and a significant linear correlation ($r = -0.869$) was observed between the yield and the period required until third leaf initiation. In the second screening, the total yield ranged from 17.0 to 21.6 kg m⁻², and a significant linear correlation ($r = 0.923$) occurred between the yield and the fresh weight of rhizomes. The yield of the original native line was 16.4 kg m⁻², whereas the mean yield of the 50 regenerated lines was 18.2 kg m⁻²; the highest yield of any line was 21.6 kg m⁻². Subsequently, the highest yielding line was registered in 2002 as 'Osaka-nougi-ikusei No.1.' Currently, all farmers in Osaka Prefecture cultivate the high-yield cultivar 'Osaka-nougi-ikusei No.1.'

2. Production of a rootstock cultivar for Mizunasu-eggplant production using cell fusion.

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is the major factor limiting Mizunasu-eggplant production. The use of rootstocks is an ideal method to avoid bacterial wilt, and rootstocks are used extensively for eggplant production in Japan. Among the rootstock species, *Solanum integrifolium* remains vigorous until the later stages of eggplant production, making it the most common rootstock in Japan. Although this species was reported to be more resistant to bacterial wilt than other cultivars of eggplant, plants on this rootstock are severely damaged by the pathogen. Another species, *Solanum sanitwongsei* (syn. *S. kurzii*) is highly resistant to bacterial wilt and has been recognized recently as a rootstock source. However, it is not very vigorous, especially at the early stages of eggplant production. Moreover, its thin stem is a limiting factor for its use as a rootstock because it makes grafting more difficult.

Somatic hybridization is a technique used to incorporate desirable genes from related species into cultivated crops. Inactivated cotyledonary protoplasts of *S. integrifolium* and *S. sanitwongsei* were electrofused and cultured, and 13 somatic hybrid plants bore fruit with viable seeds and had a chromosome number of $2n = 48$, the sum of the parental chromosome numbers. The SH9 line of the 13 amphidiploid somatic hybrids grew more vigorously than the parental plants and produced more than 5000 seeds per plant.

Both the SH9 line of the amphidiploid somatic hybrids and its S1 plants (S1-9) were resistant to bacterial wilt to the same extent as the resistant rootstock cultivar *S. sanitwongsei*. Mizunasu-eggplants grafted onto the S1-9 plants as rootstocks were more productive than those grafted on *S. integrifolium* and *S. sanitwongsei*. Subsequently, the S1-9 line was registered in 2003 as 'Habikino-Ikusei No.1.' Currently, 'Habikino-Ikusei No.1' is used for commercial Mizunasu-eggplant production in Osaka Prefecture. Thirteen percent of farmers that cultivate Mizunasu-eggplant use this new rootstock cultivar.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻と暖かい激励を賜り、また、本論文をまとめるにあたり、御校閲の労をとって頂いた筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 江面浩博士に深甚なる感謝の意を表す。

本論文をまとめるにあたり、御校閲の労をとって頂いた筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 西村繁夫博士、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 弦間洋博士、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 渡邊和男博士に深謝の意を表す。

体細胞雑種の DNA 解析に関して、終始懇篤なるご助言とご指導を賜った京都府立大学農学研究科教授 平井正志博士に深甚なる感謝の意を表す。

GISH 法による染色体の識別に関して、終始懇篤なるご助言とご指導を賜った大阪大学大学院工学研究科教授 福井希一博士ならびに神戸大学発達科学部助教授 近江戸伸子博士に深甚なる感謝の意を表す。

貴重な遺伝資源であるナス近縁野生種の種子を分譲頂いた独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所所長 門馬信二博士、京都府農業総合研究所稲葉幸司作物部長に深謝の意を表す。

本研究の遂行にあたり、終始ご助言を賜った大阪府環境農林水産部環境農林水産総務課 嘉儀隆研究マネージャーに深謝の意を表す。

大阪府立食とみどりの総合技術センター 榎幹雄所長、日野和裕企画部長、草刈眞一都市農業部長、西村和彦食品・資源部長、西尾和平元技術普及課長、出雲章久生物資源グループリーダーには、絶えず温かい激励とご鞭撻を賜った。

大阪府立食とみどりの総合技術センター 森下正博野菜園芸グループリーダー、愛知県農業総合試験場園芸研究部 矢部和則副部長には、フキ研究の大先輩として、様々なご助言を賜った。

大阪府立食とみどりの総合技術センター 中曽根渡主任研究員、谷本秀夫主任研究員、古川真主任研究員には、終始温かい激励を賜った。

大阪府環境農林水産部 大東忠信氏、深井正清氏、尾崎憲治氏をはじめとする農政室関係各位には、種苗配布の事業化にご尽力を賜った。また、服部和雄氏（元泉州地域農業改良普及センター長）、阪本周作氏、谷川典宏氏、小野本徳人氏、藤岡一氏、晒一浩氏、辻哲哉氏、久保田知美氏をはじめとする大阪府環境農林水産部泉州農と緑の総合事務所農の普及課歴任の関係各位には、現地試験の設置と運営に関して多大なご尽力を賜った。

さらに、道具楠彦氏、道具久子氏、辻貢氏、二ノ井幸一氏、川岸一馬氏、北本幹雄氏、中尾修氏、向井利夫氏をはじめとする JA 大阪泉州露生産出荷部会、山本敏勝氏、西野楠広氏、奥野利男氏、西野洋司氏をはじめとする JA きしわだ水茄子生産出荷組

合の関係各位、隅谷吉弘氏、北浦清氏、浅沢孝一郎氏をはじめとする JA 大阪泉州水茄子出荷部会の各位には、フキと水ナスの栽培試験に多大なご尽力を賜った。また、西田繁雄氏、南口義彦氏、田宮功氏、石橋数人氏をはじめとする JA 大阪泉州の関係職員、山田進氏、谷口敏信氏、西田康司氏、松田浩典氏をはじめとする JA きしわだの関係職員各位には、現地試験の調整の労をとって頂いた。

北海道大学大学院農学研究院教授 大澤勝次博士には、本研究の初めから学位論文の取りまとめるに至るまで、北の大地より絶えず激励を賜った。

最後に、本研究を遂行するにあたり、家族から常に温かい激励と協力を受けた。

本論文が、いかに数多くの方々のご協力のもとに行われたかをここに記し、心より謝意を表すものである。

引用文献

- 安達 稔, 神田 武 (1978) 神田交配 茄の力. 日本園芸生産研究所編, *蔬菜の新品種* 7:66 誠文堂新光社. 東京.
- 愛知県園芸発達史編さん会 (1981) フキ. *愛知県園芸発達史*. 愛知, pp 294-297
- Ali M, Fujieda K (1990) Cross compatibility between eggplant (*Solanum melongena* L.) and wild relatives. *J Japan Soc Hort Sci* 58:977-984
- Anderson JG, Brune WH, Proffitt MH (1989) Ozone destruction by chlorine radicals within the Antarctic Vortex. *J Geophys Res* 94:11465-11479
- Asao H, Arai S, Sato T, Hirai M (1994) Characteristics of a somatic hybrid between *Solanum melongena* L. and *Solanum sanitwongsei* Craib. *Breed Sci* 44:301-305
- 浅尾浩史, 谷川元一, 荒井 滋, 小畠博文 (1989) 栽培ナスおよび近縁野生種の葉肉プロトプラストからの植物体再生. *奈良農試研報* 20:73-78
- 浅尾浩史, 谷川元一, 岡山健夫, 荒井滋 (1992) 青枯病萎凋誘導物質を用いた細胞選抜法による耐病性ナス科個体の作出. *奈良農試研報* 23:7-12
- Barden KA, Smith SS, Murakishi HH (1986) Regeneration and screening of tomato somaclones for resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Sci* 45:209-213
- Bhatt DP, Fassuliotis G (1981) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant. *Z Pflanzenphysiol* 104:81-89
- Bhatt PN, Bhatt DP, Sussex IM (1979) Organ regeneration from leaf disks of *S. nigrum*, *S. dulcamara*, *S.khasianum*. *Z Pflanzenphysiol* 95:355-362
- Bletsos FA, Roupakias DG, Tsaktsira ML, Scaltsoyannes AB, Thanassoulopoulos CC (1998) Interspecific hybrids between three eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars and two wild species (*Solanum torvum* Sw. and *Solanum sisymbriifolium* Lam.). *Plant Breed* 117:159-164
- Bui-Dang-Ha D, Mackenzie IA (1973) The division of protoplasts from *Asparagus officinalis* L. and their growth and differentiation. *Protoplasma* 78:215-221
- Burza W, Malepszy S (1995) Direct plant regeneration from leaf explants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) is free of stable genetic variation. *Plant Breed* 114:341-345
- Bush SR, Earle ED, Langhans RW (1976) Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Amer J Bot* 63:729-737
- Carlson PS (1973) Methionine sulfoximine-resist and mutants of tobacco. *Science* 180:1366-1368
- Carlson PS, Smith HH, Dearing RD (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc*

Natl Acad Sci 69: 2292-2294

- Cote FX, Sandoval J, Marie P, Auboiron E (1993) Variations in micropropagated bananas and plantains: literature survey. *Fruits* 48:15-23
- Daunay MC, Chaput MH, Sihachakr D, Allot M, Vedel F, Ducreux G (1993) Production and characterization of fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Theor Appl Genet* 85:841-850
- Day RP (1977) Plant genetics: Increasing crop yield. *Science* 97:4311-4315
- Donovan AM, Morgan R, Valobra-Piagnani C, Ridout MS, James DJ, Garrett CM (1994) Assessment of somaclonal variation in apple. I. Resistance to the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *J Hort Sci* 69:105-113
- Engler DE, Grogan RG (1981) Regeneration of head lettuce from isolated leaf mesophyll protoplasts. *Phytopath* 71:872-873
- Engler DE, Grogan RG (1984) Variation in lettuce plants regenerated from protoplasts. *J Hered* 75:426-430
- Escalante A, Imanishi S, Hossain M, Ohmido N, Fukui K (1998) RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization (GISH) in somatic hybrids and their progenies between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Theor Appl Genet* 96:719-726
- Evans DA, Flick CE, Jensen RA (1981) Incorporation of disease resistance into sexually incompatible somatic hybrids of genus *Nicotiana*. *Science* 213:907-909
- Evans DA, Sharp WR (1983) Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 221:949-951
- Ezura H, Amagai H, Kikuta I, Kubota M, Oosawa K (1995) Selection of somaclonal variants with low-temperature germinability in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Rep* 14:684-688
- Fassuliotis G (1975) Regeneration of whole plants from isolated stem parenchyma cells of *S. sisymbriifolium*. *J Amer Soc Hort Sci* 100:636-638
- Filipecki M, Wisniewska A, Yin Z, Malepszy S (2005) The heritable changes in metabolic profiles of plants regenerants in different types of *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 82:349-356
- 藤本まなみ, 浅尾浩史, 小島博文, 小玉孝司 (1987) 茎頂部の腋芽増殖によるイチゴの効率的な大量増殖. *奈良農試研報* 18:65-71
- Fujimura T, Sakurai M, Akagi H, Negishi T, Hirose A (1985) Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Cult Lett* 2:74-75
- 深谷雅博, 花田 薫, 栃原比呂志, 宮川寿之 (1983) 愛知早生フキから検出されるウイルスの種類について. *関西病虫研報* 25:42

- Fukui K, Iijima K (1991) Somatic chromosome map of rice by imaging methods. *Theor Appl Genet* 81:589-596
- Fukui K, Ohmido N, Khush GS (1994) Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 87:893-899
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspensions of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158
- Gleddie S, Keller WA, Setterfield G (1985) Plant regeneration from tissue, cell and protoplast culture of several wild *Solanum* species. *J Plant Physiol* 119:405-418
- Gleddie S, Keller WA, Setterfield G (1986a) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena* L. *Can J Bot* 64:335-361
- Gleddie S, Keller WA, Setterfield G (1986b) Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. *Theor Appl Genet* 71:613-621
- Goth RW, Haynes KG, Barksdale TH (1991) Improvement of levels of bacterial wilt resistance in eggplant through breeding. *Plant Disease* 75: 398-401
- Gowda SS, Vittal RP (1980a) Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopath Z* 98:68-75
- Gowda SS, Vittal RP (1980b) Phytotoxic glycopeptides produced by *Pseudomonas solanacearum* II. *Phytopath Z* 98:76-81
- Guri A, Izhar S (1984) Improved efficiency of plant regeneration from protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Rep* 3:247-249
- Guri A, Sink KC (1988a) Organelle composition in somatic hybrids between an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* and *Solanum melongena*. *Plant Sci* 58:51-58
- Guri A, Sink KC (1988b) Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. *Theor Appl Genet* 76:490-496
- Guri A, Volokita M, Sink KC (1987) Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum torvum*. *Plant Cell Rep* 6:302-304
- Hammerschlag FA (1990) Resistance responses of plants regenerated from peach callus cultures to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *J Amer Soc Hort Sci* 115:1034-1037
- Hammerschlag FA, Garces S, Koch-Dean M, Ray S, Lewers K, Maas J, Smith BJ (2006) *In vitro* response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletorichum acutatum*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 84:255-261
- Handley LW, Sink KC (1985a) Plant regeneration of *Solanum lycopersicoides* Dun from stem explants, callus and suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 5:129-138
- Handley LW, Sink KC (1985b) Plant regeneration of protoplasts isolated from suspension

- cultures of *Solanum lycopersicoides*. *Plant Sci* 42:201-207
- Hashizume T, Shimamoto I, Harushima Yui M, Sato T, Imai T, Hirai M (1996) Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica* 90: 265-273
- 林真理子 (1990) わびさび日記真夏の宵の和食のいただき方. *小説現代* 28:416-419
- Heath-Pagliuso S, Pullman J, Rappaport L (1988) Somaclonal variation in celery: Screening for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*, race 2. *Theor Appl Genet* 76:976-981
- Heinz DJ and Mee GWP (1971) Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *Amer J Bot* 58:257-262
- Hendrix RC, Litz RE, Kirchoff BK (1987) *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl, *S. quitoense* Lam (naranjilla) and *S. sessiliflorum* Dunal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 11:67-73
- Hirai M, Kozaki I, Kajiura I (1986) The rate of spontaneous inbreeding of trifoliolate orange and some characteristics of the inbred seedlings. *Japan J Breed* 36:138-146
- 今津 正, 藤下典之 (1962) 栽培および野生フキの形態, 生態ならびに細胞学的研究 (第4報) 染色体数について. *園学雑* 31:293-302
- Isshiiki S, Uchiyama T, Tashiro Y, Miyazaki S (1998). RFLP analysis of PCR amplified of chloroplast DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Euphytica* 102:295-299
- 岩本 嗣 (1994) *Solanum abutiloides* の子葉, 本葉, 胚軸組織からの植物体再生とプロトプラスト培養. *育雑*44 (別1) :90
- 岩本 嗣, 嘉儀 隆 (1990) 小花培養によるシュンギク雄性不稔株の大量増殖. *育雑* 40 (別1) :74
- Jia J, Potrykus I (1981) Mesophyll protoplasts from *Solanum melongena* var *depressum* bailey regenerate to fertile plants. *Plant Cell Rep* 1:71-72
- Kaloo G (1993) Eggplant *Solanum melongena*. In: Kaloo G, Bergh BO (eds) *Genetic Improvement of Vegetable Crops*. Pergamon Press, Oxford, pp 587-604
- Kameya T, Uchimiya H (1972) Embryoids derived from isolated protoplast of carrot. *Planta* 103:356-360
- Kameya T, Miyazawa N, Toki S (1990) Production of somatic hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. integrifolium* Poir. *Japan J Breed* 40:429-434
- 加藤喜重郎, 広田耕作 (1975) フキの新病害半身萎ちよう病について. *日植病報*41:271
- 川合隆雄, 伊達寛敬, 飛川光治, 坪井 勇 (1993) ナス耐病性台木‘トレロ’の特性. *岡山農試研報* 11 : 27-34
- Khan R, Rao GR, Baksh S (1978) Cytogenetics of *S. integrifolium* and its possible use in eggplant breeding. *Ind J Genet* 38:343-347

- 近畿農政局大阪統計事務所. 大阪の園芸.
- 岸 国平 (1976) フキの病害白絹病. *野菜の病害虫*. 全国農村教育協会, 東京, p280
- 北村四郎 (1977) フキ. *週刊朝日百科世界の植物*. 朝日新聞社, 東京, pp 119-120
- 近藤恵美子 (2002) ナス近縁野生種のプロトプラスト培養と細胞融合. *埼玉農総研研報* 2:13-20
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197-214
- 松原幸子, 益田忠雄 (1980) フキのウィルスフリー株育成のための茎頂培養. *岡山大学農学報* 56:21-28
- Menczel L, Nagy I, Kizz ZR, Maliga P (1981) Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana* : correlation of resistance to *N. tabacum* plastid. *Theor Appl Genet* 59:191-195
- 峯岸正好, 内藤潔, 位田晴久, 野村寿志, 宮本重信 (1991) ナス青枯病抵抗性台木「カレヘン」の特性と実用性. *農業および園芸* 66:1065-1069
- 宮園正敏 (1979) ナスの青枯病抵抗性台木の利用. *農耕と園芸* 34:97
- 望月英雄, 山川邦夫 (1979a) ナス栽培品種及び近縁野生種の青枯病抵抗性に関する研究. *野菜試験場報告* A6:1-10
- 望月英雄, 山川邦夫 (1979b) ナス近縁野生種の青枯病抵抗性台木利用に関する研究. *野菜試験場報告* A6:11-18
- 森下正博 (1991) フキの組織培養とその由来株の実用化に関する研究. *神戸大学学位論文* pp 1-114
- 森下正博, 嘉儀 隆, 山田貴義 (1980) フキの花茎および葉柄組織からのウィルスフリー株大量育成. *大阪農技セ研報* 17:1-6
- 森下正博, 山田貴義 (1979) フキの茎頂およびカルスからの器官分化について. *近畿作育会報* 24:25-30
- 森下正博, 山田貴義 (1981) フキの組織培養株の形質変異について. *大阪農技セ研報* 18:9-18
- Mukherjee SK, Rathinasabapathi B, Gupta N (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 25:13-16
- 村上 章, 田中隆荘, 谷口研至 (1988) フキ (*Petasites japonicus*) の苗条原基法による大量クローン増殖. *育種* 38 (別 2):86-87
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479
- Murata T, Hoshino K, Miyaji Y (1987) Callus formation and plant regeneration from petiole

- protoplast of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Japan J Breed* 37:291-297
- Nagata T, Takebe I (1971) Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99:12-20
- Nakano M, Mii M (1995) Plant regeneration from protoplasts in *Dianthus*: Comparison of cultural behavior of different donor tissues. *Plant Tissue Cult Lett* 12:62-67
- 中曾根渡 (1987) フキのウイルス病発生調査. 昭和61 大阪農技セ病害虫成績概要 6-1-1.
- 奈良国立文化財研究所 (1993) 出土木簡概報一長屋王家木簡四一. 平城宮発掘調査 27:5
- 西尾 剛 (1985) アシスト. 日本園芸生産研究所編, 蔬菜の新品種 9:81 誠文堂新光社. 東京.
- 西尾 剛, 望月英雄, 山川邦夫 (1984) ナス及びその近縁野生種の種間交雑に関する研究. *野菜試報* A12:57-64
- Nishio T, Sato T, Takayanagi K (1987) Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts in eggplant (*Solanum melongena* L. and *Solanum insanum* L.). *Japan J Breed* 37:389-396
- Nishizawa Y, Hibi T (1991) Rice chitinase gene: cDNA cloning and stress-induced expression. *Plant Sci* 76:211-218
- Novak FJ, Havel L, Dolezel J (1982) *In vitro* breeding system of *Allium*. In: Fujiwara A (ed) *Plant Tissue Culture* 1982. Maruzen, Tokyo, pp 273-298
- Nunome T, Suwabe K, Ohyama A, Fukuoka H (2003) Characterization of trinucleotide microsatellites in eggplant. *Breed Sci* 53:77-83
- Nyman M, Wallin A (1988) Plant regeneration from strawberry (*Fragaria*×*Ananassa*) mesophyll protoplasts. *J Plant Physiol* 133:375-377
- 大阪府農業会議 (1984) フキ. 大阪府農業史. 大阪, pp 308-310
- Orczyk W, Malepszy S (1985) *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L.V. Stabilizing effect of glycine of leaf protoplasts. *Plant Cell Rep* 4:269-273
- 尾崎克美, 木村俊彦 (1992) 病原性に基づくナス科野菜青枯病細菌の類別. *中国農研報* 10:49-58
- Pauli R (1988) Micropropagation of Pepinos (*S. muricatum* Ait.). *Acta Hort* 227:387-389
- Puite KJ (1992) Progress in protoplast research. *Physiol Plant* 85:403-410
- Puonti-Kaerlas J, Eriksson T (1988) Improved protoplast culture and regeneration of shoots in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep* 7:242-245
- Rao NN (1971) The barriers to hybridization between *Solanum melongena* and some other species of *Solanum*. In: Hawkes JG., Lester RN, Skelding AD (eds) *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London. pp 605-614
- Rhodes CA, Lowe KS, Ruby KS (1988) Plant regeneration from protoplasts isolated from

- embryogenic maize cell culture. *Bio/Technology* 6:56-60
- Rizza F, Mennella G, Collonnier C, Sihachakr D, Kashyap V, Rajam M, Prestera M, Rotino G (2002) Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group *gilo* as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. *Plant Cell Rep* 20:1022-1032
- 佐土原 武, 大久保 敬, 藤枝国光 (1993) *Solanum toxicarium* の葉肉プロトプラストからの植物体再生. *九大農学芸誌* 48:13-19
- 坂田好輝 (1991) 遺伝資源としてのナス近縁野生種. *バイオホルティ* 5:38-41
- Saxena PK, Gill R, Rashid A (1984) Optimal conditions for plant regeneration from mesophyll protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Sci Hort* 31:185-194
- Saxena PK, Gill R, Rashid A, Maheshwari SC (1981) Plantlet formation isolated protoplasts of *Solanum melongena* L. *Protoplasma* 106:355-359
- Seithe A (1962) Die Haararten der Gattung *Solanum* L. und ihre taxonomische. *Verwertung Bot Jahr* 81:261-366
- Sheela KB, Gopalakrishnan PK, Peter KV (1984). Resistance to bacterial wilt in a set of eggplant breeding lines. *Ind J Agric Sci* 54: 457-460
- Shepard JF, Totten RE (1977) Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiol* 60:313-316
- 庄子孝一 (1990) フリー苗を使ったイチゴ栽培. *バイオホルティ* 1:94-96
- Sihachakr D, Ducreux G (1987) Plant regeneration from protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Plant Cell Rep* 6:326-328
- Sihachakr D, Haicour R, Chaput H, Barrientos E, Ducreux G, Rossignol L (1989) Somatic hybrid plants produced by electrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* Sw. *Theor Appl Genet* 77: 1-6
- Sihachakr D, Haicour R, Serraf I, Barrientos E, Herbreteau C, Ducreux G, Rossignol L, Souvannavong V (1988) Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. Clark. *Plant Sci* 57: 215-223
- Swartz HJ, Galletta GJ, Zimmerman RH (1981) Field performance and phenotypic stability of tissue-culture-propagated strawberries. *J Amer Soc Hort Sci* 106:667-673
- Tachibana S (1994) Eggplant. In: Konishi K, Iwahori S, Kitagawa H, Yakuwa T (eds) *Horticulture in Japan*. Asakura Publishing, Tokyo, pp 63-66
- Takagi H (1994) Japanese Butterbur, Fuki. In: Konishi K, Iwahori S, Kitagawa H, Yakuwa T (eds) *Horticulture in Japan*. Asakura Publishing, Tokyo, pp 63-66
- Takahashi H, Takai T, Matsumoto T (1992) Resistant plants to *Alternaria alternata* strawberry pathotype selected from calliclones of strawberry cultivar Morioka-16 and their characteristics. *J Japan Soc Hort Sci* 61:323-329

- 高橋 治 (1978) 長岡交配台木用 VF. 日本園芸生産研究所編, *蔬菜の新品種*. 7:65
誠文堂新光社. 東京.
- Tamura N, Murata Y, Mukaihara T (2002) A somatic hybrid between *Solanum integrifolium* and *Solanum violaceum* that is resistant to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Rep* 21: 353-358
- 田中博一 (1993) ふるさときのしま探訪. 撰河泉文庫, 貝塚.
- Thomas E, Hoffmann F, Potrykus J, Wenzel G (1976) Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenetic rape. *Mol Gen Genet* 145:245-247
- 柄原比呂志, 田村 実 (1976) フキのウイルス. *日植病報* 42:533-539
- Toyoda H, Horikoshi K, Yamano Y, Ouchi S (1991) Selection for *Fusarium* wilt disease resistance from regenerants derived from leaf callus of strawberry. *Plant Cell Rep* 10:167-170
- Vardi A, Spiegel-Roy P, Galun E (1982) Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor Appl Genet* 62:171-176
- Wang JF, Chen NC, Li HM (1998) Resistance sources to bacterial wilt in eggplant (*Solanum melongena*). In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) *Bacterial Wilt Disease*. Springer, Belin, pp 284-289
- Wendel JF, Parks RP (1982) Genetic control of isozyme variation in *Camaria japonica* L. *J Hered* 73:197-204
- White PR (1963) *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. (2nd ed) Ronald Press, New York.
- Xu ZH, Davey MR, Cocking EC (1982) Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Sci Lett* 24:117-121
- 矢部和則, 桜井雍三, 飯田孝則, 鷺田純彦 (1986) 葉身及び葉柄培養によるフキ(*Petasites japonicus* Fr. Schmidt)無病苗の作出. *愛知農総試研報* 18:102-109
- Yamada Y, Yang ZQ, Tang DT (1986) Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* 5: 85-88
- 山川邦夫 (1981) ナスの新台木トルバム・ビガアの導入. *農業技術* 36:461-464
- Yamakawa K, Kuniyasu K, Nagata N (1978) Incorporation of disease resistant genes from *Lycopersicon peruvianum* into cultivated tomatoes. *Gamma Field Symp* 17:45-60
- 山中寿子, 天笠一美, 吉田裕 (1990) メロンの子葉プロトプラストからの植物体再分化. *植物組織培養* 7:103-107
- Young ND, Tanksley SD (1989) RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. *Theor Appl Genet* 77:353-359

研究業績一覧

I 原著論文

1. 岩本 嗣, 嘉儀 隆(1995). 組織培養によるフキ(*Petasites japonicus* Fr. Schmidt)ウイルスフリー株の大量増殖. *園学雑* 64 : 103-111
2. 岩本 嗣 (1999) ヒラナス(*Solanum integrifolium*)および近縁野生種(*S. abutiloides*, *S. toxicarium*)の組織切片からの植物体再生と*in vitro*増殖. *近畿作育研究* 44:21-25
3. Iwamoto Y, Ezura H (2006) Efficient plant regeneration from protoplasts of eggplant rootstock cultivar and its wild relatives. *Plant Biotech* 23: 525-529
4. Iwamoto Y, Hirai M, Ohmido N, Fukui K, Ezura H (2007) Fertile somatic hybrids between *Solanum integrifolium* and *S. sanitwongsei* (syn. *S. kurzii*) as candidates for bacterial wilt-resistant rootstock of eggplant. *Plant Biotech* 24: in press
5. Iwamoto Y, Nakasone W, Ezura H (2007) Selection of a high-yield line by using somaclonal variation in Japanese butterbur (*Petasites japonicus*). *Plant Biotech* 24: in press
6. 梶村計志, 岩本 嗣, 吉田精作, 山崎勝弘, 田中涼一, 鈴木澄子, 中澤裕之, 米田該典 (1991) *Astragalus mongholicus*の培養に関する研究 (第1報) 種子, 幼植物, 培養細胞のアミノ酸組成について. *生薬学雑誌* 45:293-298
7. 梶村計志, 岩本 嗣, 山崎勝弘, 坂上吉一, 横山 浩, 米田該典 (1994) *Ephedra distachya*の成長とエフェドリン系アルカロイド含量の変動. *Natural Medicines* 48:122-125

II. 総説

1. 岩本 嗣 (1987) ナスの細胞融合に関する研究. *大阪農業* 25:52-57
2. 岩本 嗣 (1996) 細胞融合による耐病性育種の取組. *大阪農業* 33:31-35
3. 岩本 嗣 (1996) 細胞融合による新しいナスの台木育成. *農林水産技術研究ジャーナル* 19:27-33
4. 岩本 嗣 (1999) バイオふきの開発と現地への普及. *農業技術* 54:4-5
5. 岩本 嗣 (1999) 細胞融合による新しいナスの台木品種の開発. *農業技術* 54:3-4
6. 岩本 嗣 (1999) *in vitro* 選抜を利用したフキの優良系統「のびすぎでんねん」の育成. *近畿作育研究* 44:73-76
7. 岩本 嗣 (1999) 試験管内選抜により育成したフキ新品種候補「のびすぎでんねん」. *近畿中国地域における新技術* 33:1-4
8. 岩本 嗣 (2000) 試験管内選抜により育成したフキ新品種候補「のびすぎでんねん」. *今月の農業* 44:94-98

9. 岩本 嗣 (2000) ソマクローナル変異選抜法によるフキの育種. *農業および園芸* 75:241-247
10. 岩本 嗣 (2000) 培養変異によるフキ新品種の育成. *化学と生物* 38:289-291
11. 岩本 嗣 (2000) フキ新品種候補「大阪農技育成1号」の育成経過と特性. *農耕と園藝* 55:168-170
12. 岩本 嗣 (2001) 培養変異を利用したフキ新品種「のびすぎでんねん」の育成. *耕* 90:63-66
13. 岩本 嗣 (2001) なす台木の新品種「羽曳野育成1号」. *近畿中国地域における新技術* 35:1-4
14. 岩本 嗣 (2001) なす体細胞雑種における染色体識別法の開発と利用. *大阪食とみどりの新技術* 6:17-18

III. 著書

1. 岩本 嗣 (2002) 文部科学省検定済教科書高等学校用「植物バイオテクノロジー」大澤勝次, 久保田旺 (編), 農文協, 東京. 160-202
2. 岩本 嗣 (2003) 農学基礎セミナー「植物バイオテックの実際」大澤勝次, 久保田旺 (編), 農文協, 東京. 160-202
3. 岩本 嗣 (2003) 「*蔬菜の新品種*」第15巻伊藤正 (編), 誠文堂新光社, 東京. 13

IV. 報文

1. 岩本 嗣, 浜田広延, 嘉儀 隆 (1988) ハス(*Nelumbo nucifera Gaert*)の組織培養に関する研究 (1) - 茎頂組織からの個体再生 -. *大阪農技セ研報* 25 : 47-53
2. 岩本 嗣, 嘉儀 隆 (1995) *Solanum integrifolium Poir.*の組織切片からの植物体再生と増殖. *大阪農技セ研報* 31 : 38-42
3. 梶村計志, 山崎勝弘, 田中涼一, 岩本 嗣, 嘉儀 隆, 米田該典 (1990) フタマタマオウの組織培養に関する研究 - カルスの誘導及び増殖 -. *大阪府立公衛研所報* 24:17-21
4. 梶村計志, 山崎勝弘, 田中涼一, 岩本 嗣, 嘉儀 隆, 米田該典 (1991) フタマタマオウの組織培養に関する研究 (第2報) - カルスの誘導に及ぼす各種条件の影響 -. *大阪府立公衛研所報* 25:41-43

V. 品種登録

1. ふき「大阪農技育成1号」 (第10632号 : 2002年9月30日登録, 育成者 : 岩本 嗣, 中曽根 渡)
2. なす「羽曳野育成1号」 (第10976号 : 2003年2月20日登録, 育成者 : 岩本 嗣, 辻 博美, 中曽根 渡, 長町知美)