

# スイカ育種の現状と展望

(株)萩原農場生産研究所 嶋本育泰

## 1. はじめに

スイカ(栽培スイカ; *Citrullus lanatus* var. *lanatus*)は北海道から沖縄まで全国各地で栽培されている。農林水産省の作物統計によれば、平成26年の作付面積は10,800 ha、収穫量357,500 t、産出額 537億円と、他のウリ科作物のキュウリ(11,100 ha, 548,800 t 1,396億円)、メロン(7,300 ha, 167,600 t, 645億円)、カボチャ(16,200 ha, 200,000 t, 287億円)と比較しても主要な果菜類のひとつである。

一方、FAOSTATによれば平成25年の世界スイカ生産量は109,601,914 tであり、果菜類ではトマトの164,492,970 t に次ぐ生産量である。最もスイカ生産量の多い中国が72,943,838 t (66.55%)、イラン 3,947,057 t (3.60%)、トルコ 3,887,324 t (3.55%)、ブラジル 2,163,501 t (1.97%)、エジプト 1,894,738 t (1.15%)、アメリカ 1,771,734 t (1.08%)と続き、中国が世界生産量の過半数以上を生産する。対して日本の生産量は356,063 t (0.32%)とごくわずかであるが、栽培技術力と品種育成力により世界でもトップレベルの果実品質を誇るスイカを生産している。今回はスイカを取り巻く生産の現状と品種の動向、そして奈良県におけるスイカ育種の歴史を振り返りながら、従来の育種法に加えた新しい選抜法による品種開発への取り組みを紹介したい。

## 2. スイカ生産の現状

今から20年前、平成8年の全国のスイカ作付面積は19,000 ha、収穫量632,500 tであったが、平成18年には13,000 ha、418,700 tと、10年間で6,000 haの作付面積と213,800 tの収穫量の著しい減少があった。しかし、5年前の平成23年には11,400 ha、362,500 t、平成26年では10,800 ha、357,500 tとここ数年の減少幅は小さくなっている。

次に東京都中央卸売市場の大玉・中玉スイカの取扱数量(平成10~27年)においても、平成10年以降、50,000 t以上あった取扱数量が平成14年に48,539 t、さらに平成15年には42,554 tへと大きく減少、それ以降も減少傾向が続き、平成18年には40,000tを下回った。しかし、ここ5年間(平成23~27年)の取扱数量は34,000 t台から39,000 t台の間で推移し、作付面積と同様、その減少幅は小さくなっている<sup>1)</sup>。

## 3. スイカ果実の機能性成分

スイカ果実には多くの機能性成分が含まれているが、USDAのNational nutrient database<sup>2)</sup>によれば、強い抗酸化作用を持つリコペン(4,532  $\mu$ g/100g可食部)と $\beta$ -カロテン(303  $\mu$ g)が含まれ、トマトのリコペン(2,573  $\mu$ g)と $\beta$ -カロテン(449  $\mu$ g)と比較しても2倍近くのリコペンを含んでおり、リコペンの摂取源として非常に優れていることがわかる。生体保護分子としての効果、がんの発症予防等の関する効果、心血管系疾患の予防等に関する効果など、リコペンの機能性に関する研究報告がある<sup>3)</sup>。さらにスイカ果実には特徴的な遊離アミノ酸としてシトルリン(180mg/100g可食部)が多く含まれ、血管を若返らせ動脈硬化の予防、冷え性改善、手足のむくみ改善、新陳代謝の改善、疲労回復効果などが期待されている。

#### 4. 最近の育成品種の動向

スイカ需要の減少に対し、従来の緑皮・縞皮の大玉・小玉スイカとは異なる特徴を持った多様な品種育成が進められている。最新の野菜の新品種19<sup>4)</sup>にはスイカの新品種18点(大玉スイカ13品種、小玉スイカ5品種)が採録され、前巻の野菜の新品種18<sup>5)</sup>では、30品種(大玉品種13品種、小玉品種17品種)が採録され、小玉スイカの採録数の減少が目立った。

大玉スイカでは、これまで早出し時期の栽培のための低温伸長性や低温時の着果安定性を目標とした品種から、温暖化対策として、高温期の栽培後半でのつる持ち性、また盛夏期での安定した果実品質を目標とした傾向へシフトしている。生産量の2割近くを占めるようになった小玉スイカにおいても盛夏期での安定した果実品質と、これまで通り大玉スイカ並みのシャリ感を持った肉質への向上が進められている。野菜の新品種19では3倍体スイカ(種なしスイカ)も4品種(緑皮・黒皮)が採録され、種ありスイカに近いレベルの果実品質を持った品種育成への努力がうかがえる。特に3倍体の小玉スイカの育成が困難な中、種子を出さなくてもそのまま食べることができる小粒種子形質を持った小玉スイカが1品種採録されている。その他の特徴を持った品種として黒皮大玉スイカが2品種、黒皮小玉スイカが1品種採録されている。前巻の野菜の新品種18ではその数は多く、黒皮大玉スイカ3品種、黒皮小玉スイカ4品種、3倍体の黒皮大玉スイカ2品種、黒皮黄肉小玉スイカ2品種、黄皮小玉スイカ2品種、その他、縞に特徴のある品種、オレンジ色果肉の品種などがあり、約半数が従来の縞皮大玉・小玉品種とは異なる特徴を持つ品種であった。これらはスイカ産地での付加価値を求めた産地ブランディング、また全国的に展開されている地産地消型の直売所、ファーマーズマーケットに出荷する生産者からの要望によるものであると思われる。なかでも3倍体スイカの果実品質と栽培性の改善が進み、スイカ産地からは差別化農産物として注目されている。まだ作付けに占める比率は小さいものの、今後のさらなる増加が予想されている。すでに種苗各社から特徴のある緑皮・黒皮の多様な3倍体品種が育成されている。各社とも「タネが少なくそ



レアシードスイカ「ひとつだね」

のまま食べられるスイカ」をイメージさせる品種名が多い。また「全く種子が入らない」という印象を与える「種なしスイカ」ではなく、「3倍体スイカ」、「シードレス」、「シードレススイカ」という表記がなされるようになってきている。弊社では3倍体スイカの特徴から「まれに種が入る」という意味で「レアシード」、「レアシードスイカ」と名づけ、品種名には「ひとつだね」というネーミングでの普及推進を行っている。スイカ需要はすでに一玉販売から、カット販売、さらにブロックカット(プラスチック

カップ)販売への流れが大きく、今後、大玉スイカ品種の育成は業務加工用向けを前提とした果肉肉質の改善、果肉色(色のバリエーションも含む)、3倍体、小種子、少量種子形質を導入し、さらにはスイカの機能性成分を高めた品種育成へと大きく進められるであろうと考えている。

## 5. 奈良県における「大和西瓜」とスイカ育種

日本へのスイカ伝来は寛永年間(1624-1645)に長崎から入ったという説が有力であり、大和の国へは天保年間(1830-1843)に紀州の国から伝わった「紀州スイカ」が広まり、慶応3年(1867)には三河の国一色(愛知県西尾市一色町)より持ち帰った「権次スイカ」(別名 黒皮スイカ)の栽培が始まっている<sup>6,7)</sup>。ここに奈良県のスイカ栽培の歴史を語る上で貴重な証拠が



ある。天保13年(1842)に磯城郡川西町結崎にある糸井神社に奉納された絵馬の一端にはスイカの切売りの屋台が描かれている。果皮色は濃暗緑(黒皮)ではなく、無縞皮の海青色であるため「紀州スイカ」ではないかと推測されている。なお、この絵馬は平成6年(1994)に奈良県の有形民俗文化財に指定されている。

明治34年(1901)に奈良県農事試験場(奈良県農業研究開発セン

ター)がアメリカ・カリフォルニア大学から取り寄せた洋種第一号の「アイスクリーム」が県内に一時期大きな広まりを見せた。その後「権次スイカ」でもなく「アイスクリーム」でもない変種が出現し、「アイスクリーム」と「権次スイカ」自然交雑した雑駁な素材の中から、次第に人為淘汰され優良な「大和西瓜」となったと考えられている。当時、篤農家であった弊社創業者の萩原善太郎もこれらの雑駁な大和系から純系種「富民号」を見出し、大正12年(1923)にその優れた特性を認めている。

奈良県農事試験場の西瓜品種改良事業<sup>8)</sup>では県内の多数の雑駁な大和系素材の中から、純系選抜を行い「大和2号」、「大和3号」、「大和4号」の優良な純系大和種を大正15年(1925)に育成した。これは日本初の組織的なスイカ育種計画による成功事例であり、現在に連綿と続く奈良県におけるスイカ育種の端緒となっている。西瓜品種改良事業の第二次育種計画において、昭和3年(1928)には「大和3号」とアメリカ・カリフォルニア州へ渡った移民が帰国の際に持ち帰った「甘露スイカ」をかけあわせ、一代交配種「新大和」を育成した。これは当時として珍しいF<sub>1</sub>品種であるとともに、縞皮形質という大きなインパクトをスイカ育種界に与えた。その後「新大和」後代分離系統から、昭和8年(1933)に固定品種「旭大和」と「新大和1号」を育成した。同じ頃、千葉県農事試験場(現:千葉県農林総合研究センター)においても、大和系の固定系統と「甘露スイカ」をかけあわせた交雑体の分離系統から「都系」(都1号、都2号、都3号)が育成され、奈良県農事試験場の西瓜品種改良事業で育成された「大和系」、「新大和系」、「旭大和系」とあわせ、現在の日本のスイカ大玉品種の遺伝的な背景のベースとなっている。その後、スイカ育種は民間においても意欲的な品種育成が行われるようになり、萩原農場の萩原善太郎も昭和12年(1937)に「富民号」と「旭大和」の優良系統をかけあわせた「富研号」を育成し、その後、昭和26年(1951)にスイカで初の農林省種苗名称登録品種(第27号)を行っている。現在でも国内で生産されるスイカ種子の約80%は奈良県内の種苗会社の育成による品種であり、このように種苗産業は奈良の歴史ある地場産業のひとつと考えられている。

## 6. 弊社におけるDNAマーカー利用への取り組み

### a) F<sub>1</sub>種子純度検定

野菜茶業試験場(現：農研機構 野菜花き研究部)との共同研究の成果<sup>9)</sup>により、平成4年(1992)の早い段階からF<sub>1</sub>種子に対するDNAマーカーを用いた純度検定法を導入、RAPD法(Random Amplified Polymorphic DNA)により、スイカF<sub>1</sub>種子に混入する母親系統の自殖種子の検出を行った。当時、画期的な手法として種子の遺伝的純度、種子品質の向上に貢献した。現在の弊社のスイカF<sub>1</sub>種子の純度検定ではRAPDマーカーからInDel (Insertion/Deletion)マーカー、あるいはSSR(Simple sequence repeat)マーカーへと移行し、すべてのスイカ品種に対して純度検定を行える体制をとっている。

### b) 連鎖地図の作成

スイカ育種におけるDNAマーカーによる効率的な選抜(MAS; Marker-Assisted Selection)と野生スイカの有用な形質導入を目的とし、まずスイカの連鎖地図を作成、果実表現形質に関するQTL(Quantitative trait locus)解析を行った<sup>10-11)</sup>。

材料には弊社のF<sub>1</sub>品種に用いられている栽培親系統 (*C. lanatus* var. *lanatus*)とアフリカ原産のシトロタイプ<sup>12)</sup>の野生スイカ (*C. lanatus* var. *citroides*)を用いた。連鎖地図の作成には野生スイカを花粉親としたF<sub>1</sub>交雑体由来のF<sub>2</sub>分離集団を用い、計554の分子マーカーにより、スイカの染色体数(n=11)と同じ11の連鎖群、全長 2,384cMの連鎖地図を作成した。さらに果実表現形質の連鎖解析にはそれぞれの花粉親とした2つの戻し交雑集団による連鎖地図も作成し、果実形質(果皮色、果肉色、果皮硬度、果肉糖度)についてのQTL解析を行い、これらの形質に関わるQTLが座乗する位置を確認した。

## 7. ゲノム情報を利用したスイカ育種への取り組み

近年の次世代シーケンサー技術の発展と普及により、これまでゲノム配列情報が限られていた園芸作物に対してもホールゲノムシーケンシングとリシーケンシングが大きく進んでいる。スイカにおいても平成23年(2011)10月に中国のNERCV (National Engineering Research Center for Vegetables)を中心とするグループによりスイカのドラフトゲノム配列情報が公開された<sup>12)</sup>。International Cucurbit Genomics Initiative (ICuGI)のCucurbit Genomics Database (CuGenDB), Watermelon Genome (97103) Ver.1によりウェブサイト (<http://www.icugi.org/>)上でのBlast検索やGenome Browserの利用が可能となっている。ドラフトゲノム情報の公開以後、リファレンスゲノムとし活用され、アメリカ、中国、韓国を中心とした海外の研究グループにより栽培系統・野生系統に対するリシーケンシングやSSRマーカー開発、シーケンシングによるジェノタイピング (GBS) による高密度連鎖地図や有用形質のファインマッピングの試みなど数多くの報告がなされ<sup>13-22)</sup>、スイカを取り巻くゲノム情報の状況は大きく変化している。このような状況に対し、弊社においてもスイカのゲノム情報を利用した育種を目的とした取り組みを始め、外部機関の次世代シーケンサーによる受託解析サービスにより、F<sub>1</sub>品種の親系統や野生スイカ系統に対するリシーケンシングを進めている。リファレンスゲノムに対して親系統間のSNPやSSR多型を検出し、物理的位置情報に基づき、遺伝的距離との関係を検証しながら、栽培スイカの系統間での連鎖地図の作成や有用形質のマッピング、育種現場での選抜に利用可能なマーカー開発に取り組んでいる。

## 8. スイカ育種選抜における有用形質と有用なマーカー

### a) 果肉色選抜マーカー

Bang ら (2007) は Lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB) 遺伝子配列上の SNP によりカナリア黄色の果肉と赤色の果肉を選抜することが可能な CAPS マーカーを開発と報告した<sup>23)</sup>。栽培スイカの赤色の果肉はカナリア黄色の果肉に対して劣性を示すことが知られている<sup>24)</sup>。カナリヤ黄色の果肉(*C*)と赤色の果肉(*c*)の原因遺伝子は LCYB 遺伝子であるとし、赤色の果肉のスイカは LCYB 遺伝子の変異により LCYB 活性が低下、生合成経路においてリコペンから $\gamma$ -カロテン、次の $\beta$ -カロテンへの2ステップの環状化がなされず、果肉中にリコペンが蓄積すると推測した<sup>23, 25)</sup>。

弊社においても F<sub>1</sub> 品種の親系統(赤色果肉)と野生系統(白色果肉)の交雑体由来の F<sub>2</sub> 分離集団(124 個体)を栽培したところ果肉色が赤色から白色まで広く分離し、表現型において評価判定に迷う個体も存在した。しかしこのマーカーを用いてジェノタイピングを行ったところ、遺伝子型はメンデル比の理論値に合致した。特に赤の果肉色の栽培系統に野生系統の有用な形質を導入する場合、まず野生系統側の白色果肉のアレル(LCYB)を排除することが必要であり、評価を迷う個体に対してこのマーカーが非常に有効であることがわかった。

### b) 縞皮形質の選抜マーカー

昭和3年(1928)に奈良県農事試験場において「大和3号」と「甘露スイカ」をかけあわせた一代交配種「新大和」が育成され、「甘露スイカ」の縞皮形質は育種素材的にも大きなインパクトを与えた。栽培スイカの親系統には無縞皮形質の系統もあるが、日本において縞皮形質はスイカ果実をイメージさせる代表的な形質の一つであることは間違いない。また縞皮形質(*g*<sup>o</sup>)は無縞皮形質(*g*)に対し単一優性を示す遺伝様式は古くからよく知られている<sup>24)</sup>。

昨年、Kim ら (2015) は縞皮形質に連鎖する近傍マーカーの開発を報告し、保有する100の育種系統に対してジェノタイピングを行い、縞皮形質を示す36系統のうち、34系統が縞皮形質側の遺伝子型をホモに持ち、残り64の系統(無縞皮とCrimson sweet タイプの縞皮)は無縞皮側の遺伝子型をホモに持つこと確認した<sup>25)</sup>。我々もこのマーカーを用い、栽培スイカ(縞皮形質×無縞皮形質)の F<sub>2</sub> 分離集団(124 個体)に対するジェノタイピングを行ったところ、少し離れた遺伝的距離にあることが確認され、すでに我々が開発した縞皮形質選抜マーカーは Kim ら (2015) が報告したマーカーと遺伝的距離、物理的距離とも近くにあるとともに、より正確に縞皮形質の遺伝子座(*g*<sup>o</sup>)を捉えていることが明らかとなった。

## 9. おわりに

日本におけるスイカ需要は減少の状況にあるが、スイカ産地と販売流通現場からの要望もあり、従来の縞皮・大玉小玉品種に加え、遺伝的にも多様性のある特徴を持った品種が多く育成されている。今回、一部紹介したゲノム情報を用いたマーカー選抜法と経験豊富な従来の育種法を組み合わせることにより、今後も日本の嗜好にあったより特徴のあるスイカ品種の開発が可能であると考えている。魅力ある品種が全国のスイカ産地での「儲かるスイカづくり」と農業の活性化、そして「西瓜を食する文化」を守り豊かにする一端を担うことを願ってやまない。

参考、及び引用文献

- 1) 杉山充啓 (2012). 品種開発と今後の育種方向. p.19-28. 農耕と園芸編集部編. 高品質安定生産を狙うスイカの生理生態と生産事例. 誠文堂新光社.
- 2) 明石欣也、七里吉彦 (2012). スイカに含まれる機能性成分と栄養. p.121-129. 農耕と園芸編集部編. 高品質安定生産を狙うスイカの生理生態と生産事例. 誠文堂新光社.
- 3) National nutrient database for standard reference (Reference 28). <http://ndb.nal.usda.gov/>.
- 4) 伊東正 監修 (2016). 蔬菜の新品種 19. 公益財団法人 園芸植物育種研究所. 誠文堂新光社.
- 5) 伊東正 監修 (2013). 蔬菜の新品種 18. 公益財団法人 園芸植物育種研究所. 誠文堂新光社.
- 6) 鈴木栄次郎 (1971). 大和スイカ全編. 富民協会.
- 7) 三浦雅之 (2009). 大和彩食館 大和の野菜に魅せられて 最終回 夏・大和西瓜. あかい奈良 44:31-35.
- 8) 竹崎嘉徳・神田武 (1934). 西瓜品種改良事業成績 臨時報告第3号. 奈良県立農事試験場.
- 9) Hashizume T, Sato T, Hirai M (1993). Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Jpn J Breed* 43:367-375.
- 10) Hashizume T, Shimamoto I, Harushima Y, Yui M, Sato T, Imai T, Hirai M (1996). Construction of a linkage map for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica* 90:265-273.
- 11) Hashizume T, Shimamoto I, Hirai M (2003). Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM & NAKAI] using RAPD, RFLP, and ISSR markers. *Theor Appl Genet* 106:779-785.
- 12) Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, Lucas WJ, Zhang H, Zheng Y, Mao L, Ren Y, Wang Z, Min J, Guo X, Murat F, Ham BK, Zhang Z, Gao S, Huang M, Xu Y, Zhong S, Bombarely A, Mueller LA, Zhao H, He H, Zhang Y, Zhang Z, Huang S, Tan T, Pang E, Lin K, Hu Q, Kuang H, Ni P, Wang B, Liu J, Kou Q, Hou W, Zou X, Jiang J, Gong G, Klee K, Schoof H, Huang Y, Hu X, Dong S, Liang D, Wang J, Wu K, Xia Y, Zhao X, Zheng Z, Xing M, Liang X, Huang B, Lv T, Wang J, Yin Y, Yi H, Li R, Wu M, Levi A, Zhang X, Giovannoni JJ, Wang J, Li Y, Fei Z, Xu Y (2013). The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nature Genetics* 45:51-58.
- 13) Ren Y, Zhao H, Kou Q, Jiang J, Guo S, Zhang H, Hou W, Zou X, Sun H, Gong G, Levi A, Xu Y (2012). A high resolution genetic map anchoring scaffolds of the sequenced watermelon genome. *PLoS One* 7:e29453.
- 14) Zhang H, Wang H, Guo S, Ren Y, Gong G, Weng Y, Xu Y (2012). Identification and validation of a core set of microsatellite markers for genetic diversity analysis in watermelon, *Citrullus lanatus* Thunb. Matsum. Nakai. *Euphytica* 186:329-342.
- 15) Sandlin K, Prothro J, Heesacker A, Khalilian N, Okashah R, Xiang W, Bachlava E, Caldwell DG, Taylor CA, Seymour DK, White V, Chan E, Tolla G, White C, Safran D, Graham E, Knapp

- S, McGregor C (2012). Comparative mapping in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai]. *Theor Appl Genet* 125:1603-1618.
- 16) Ren Y, McGregor C, Zhang Y, Gong G, Zhang H, Guo S, Sun H, Cai W, Zhang J, Xu Y (2014). An integrated genetic map based on four mapping populations and quantitative trait loci associated with economically important traits in watermelon (*Citrullus lanatus*). *BMC Plant Biology* 14:33.
  - 17) Nimmakayala P, Abburi VL, Bhandary A, Abburi L, Vajja VG, Reddy R, Malkaram S, Venkatramana P, Wijeratne A, Tomason YR, Levi A, Wehner TC, Reddy UK (2014). Use of VeraCode 384-plex assays for watermelon diversity analysis and integrated genetic map of watermelon with single nucleotide polymorphisms and simple sequence repeats. *Mol Breed* 34:537-548.
  - 18) Nimmakayala P, Levi A, Abburi L, Abburi VL, Tomason YR, Saminathan T, Vajja VG, Malkaram S, Reddy R, Wehner TC, Mitchell SE, Reddy UK (2014). Single nucleotide polymorphisms generated by genotyping by sequencing to characterize genome-wide diversity, linkage disequilibrium, and selective sweeps in cultivated watermelon. *BMC Genomics* 15:767.
  - 19) Reddy UK, Nimmakayala P, Levi A, Abburi VL, Saminathan T, Tomason YR, Vajja G, Reddy R, Abburi L, Wehner TC, Ronin Y, Karol A (2014). High-resolution genetic map for understanding the effect of genome-wide recombination rate on nucleotide diversity in watermelon. *G3 (Bethesda)* 4:2219-2230
  - 20) Reddy UK, Abburi L, Abburi VL, Saminathan T, Cantrell R, Vajja VG, Reddy R, Tomason YR, Levi A, Wehner TC, Nimmakayala P (2015). A genome-wide scan of selective sweeps and association mapping of fruit traits using microsatellite markers in watermelon. *J Hered* 106:166-176
  - 21) Liu S, Gao P, Zhu Q, Luan F, Davis AR, Wang X (2016). Development of cleaved amplified polymorphic sequence markers and a CAPS-based genetic linkage map in watermelon (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum. and Nakai) constructed using whole-genome re-sequencing data. *Breeding Science* 66:244-259.
  - 22) Shang JL, Li N, Li N, Xu Y, Ma S, Wang J (2016). Construction of a high-density genetic map for watermelon (*Citrullus lanatus* L.) based on large-scale SNP discovery by specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *Scientia Horticulturae* 203:38-46.
  - 23) Bang H, Kim S, Leskovar D, King S (2007). Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene  $\beta$ -cyclase (LCYB) gene. *Mol Breed* 20:63-72.
  - 24) Poole CF. (1944). Genetics of cultivated cucurbits. *J Hered* 35:122-128.
  - 25) Bang H, Davis AR, S. Kim, Leskovar DI, King SR (2010). Flesh color inheritance and gene interactions among canary yellow, pale yellow, and red watermelon. *J Amer Soc Hort Sci* 135:362-368.
  - 26) Kim H, Han D, Kang J, Choi Y, Levi A, Lee G, Park Y (2015). Sequence-characterized amplified polymorphism markers for selecting rind stripe pattern in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Hortic Environ Biotechnol* 56:341-349.