

## アグロバクテリウムによるカーネーションの形質転換

岩井豊通\*・笠井由紀\*

## 要 約

3品種のカーネーション懸濁培養組織を用いて、マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子、レポーターとして $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を組み込んだバイナリーベクターをもつアグロバクテリウムにより形質転換体を育成した。

- 1 アグロバクテリウムの接種により、懸濁培養組織の不定芽の葉に GUS 活性を示す細胞が多く、カルスには少なかった。
- 2 2品種で形質転換植物が形成されたが、他の1品種ではカルス化する傾向が強く正常な苗条を形成しなかった。
- 3 形質転換組織は共存培養後6~11週間で確認できたが、苗条を得るには2~3か月以上を要した。
- 4 GUS 活性を示した再分化個体2個とカルス4個について、PCR法により GUS 遺伝子の導入を確認した。

Transformation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)  
Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Toyomichi IWAI and Yuki KASAI

## Summary

The authors transformed carnation suspension cultures of three cultivars using *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 containing the binary vector, pIG121-Hm. Two of the three cultivars regenerated transformed plants and the other one formed transgenic calli with malformed shoots. The time needed to produce transgenic shoots was 2~3 months. PCR analysis confirmed two plants and four calli to be transgenic.

キーワード：カーネーション、アグロバクテリウム、形質転換

## 緒 言

植物の形質転換技術は、植物に外来の遺伝子を導入することにより、特定の形質を付加または変更できる技術である。この技術を用いれば、類縁関係と関わりなく有用な遺伝子が利用できる他、人工的に合成した遺伝子を用いて不都合な遺伝子の発現を抑制する等、遺伝子組換え技術を応用した育種が可能となる。これまでに除草剤やウイルスに対する抵抗性の付与、花色の変更、果実の日持ち改善等の成功例が報告されている<sup>1)</sup>。兵庫県の特産花きの一つであるカーネーションについては、茎、葉、花卉の切片を用いてアグロバクテリウムにより形質転換体を育成した Lu ら (1991)<sup>2)</sup>、Robinson ら (1993)<sup>3)</sup> の報告がある。筆者らもこれらの報告に準じて茎、葉、花

弁の切片を用いた形質転換体の育成を試みたところ、形質転換カルスを得たが、形質転換個体を得ることは困難であった。そこで上記方法とは異なる形質転換系の開発に取り組み、懸濁培養を用いたアグロバクテリウムによる形質転換法を検討したところ、形質転換体を得たので報告する。

## 材料及び方法

懸濁培養は Frey ら (1992)<sup>1)</sup> の方法を参考に誘導した。カーネーションの品種スプレングレー、レナ、カルメンの茎頂を、0.2 mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、0.4 mg/l カイネチン、1000 mg/l カゼイン加水分解物を添加した Murashige and Skoog 培地 (1962)<sup>4)</sup> (DKMS と呼ぶ) で1か月培養した後、網目の大きさが 1.25 mm × 1.25 mm のステンレス網を通して 0.45 mg/l ベンジルアデニン (BA) を添加した MS 液体培地 (BMS 液体) に移

1995年8月31日受理

\*中央農業技術センター

し、80~140rpmで振盪した。移植2~3日後に新しい培地に更新し、以後2~3週間毎にステンレス網を通して継代培養した。温度は23±2℃、蛍光灯の照明による16時間日長下で培養した。

アグロバクテリウムはAGL0<sup>5,6)</sup>(カリフォルニア大学, Ludwig教授より分譲)を用い、マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子、レポーターとしてGUS遺伝子を持つプラスミドpIG121-Hm<sup>9)</sup>(名古屋大学農学部, 中村研三教授より分譲)をトリペアレンタルメイティング法<sup>2)</sup>で導入した。即ち、大腸菌pRK 2013, pIG121-Hmを持つ大腸菌そしてAGL0をそれぞれ抗生物質の入ったLB培地で12~16時間振盪培養し、これらをLB寒天培地上で混合した。28℃で17時間放置後、50 mg/ℓカナマイシンと25 mg/ℓハイグロマイシン-Bを含むLB培地に移し選抜することにより、pIG121-Hmを導入したAGL0 (AGL0/pIG121-Hm)を得た。AGL0/pIG121-Hmは、25 mg/ℓハイグロマイシン-Bを添加したLB培地で24時間培養した後、5 mg/ℓハイグロマイシン-Bと40 mg/ℓアセトシリンゴンを添加したLB培地で100倍に希釈し、0~14時間の間で2時間毎に培養液を採取して以後の試験に供試した。培養温度は28℃、130~150rpmで往復振盪した。

AGL0/pIG121-Hmの接種はリーフディスク法<sup>10)</sup>に準じた。懸濁培養組織をMS培地で5倍に希釈したAGL0/pIG121-Hmの培養液に浸し、室温で10分間振盪した後、滅菌した濾紙の上に置き余分な培養液を除き、順次、共存培養、除菌培養、選択培養用の培地に移植した。

共存培養には、1 mg/ℓナフトレン酢酸(NAA)と1 mg/ℓBAを添加したMS培地(NBMS)、DKMSまたはBMSを用い、いずれも40 mg/ℓアセトシリンゴンを添加した。そして暗所で5日培養した。除菌培養では共存培養用の培地からアセトシリンゴンを除き、200 mg/ℓクラフォランを添加した。他に200 mg/ℓクラフォ

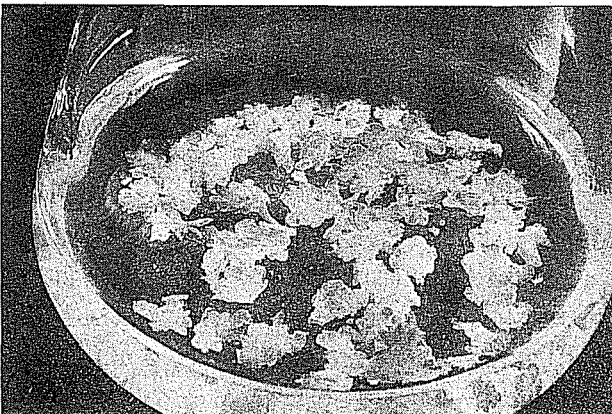


図1 懸濁培養組織(品種スプレnder)

ランを添加したBMS液体も用いた。期間は7~50日とした。選択培養ではDKMS, BMS液体の他、0.1 mg/ℓNAAを添加したMS培地(NMS)を使用し、50~100 mg/ℓクラフォランと10~40 mg/ℓハイグロマイシン-Bを添加した。

GUS活性の検出は接種12日後以降、適宜5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド(X-Gluc)溶液<sup>11)</sup>で行った。

GUS遺伝子の導入はPCR法により確認した。GUS活性の検出された再分化個体の葉片またはカルスから、本田らの方法<sup>9)</sup>に準じてDNAを抽出し、35Sプロモーターの塩基配列(5'-TATATAAGGAAGTTCATTTTCAT-3')及びNOSターミネーターの塩基配列(5'-TTTATTGCCAAATGTTTGAACG-3')を持つプライマーを用いてPCRを行った。PCRは、94℃で5分間保温の後、94℃で変性を1分間、55℃でアニーリングを20秒間、72℃で伸長反応を30秒間の3ステップを40サイクル行った後、72℃で5分間保温することにより行った。増幅産物は、臭化エチジウムを含む0.8%アガロースゲルで電気泳動し観察した。

## 結 果

供試した3品種とも懸濁培養が可能であった。最初の網を通した茎頂培養切片でカルスと共に芽や葉状の器官の分化がみられたが、多芽体を形成するものはなかった。2回目以降の移植で複数の芽の塊を形成し、2か月後にはカルスの増殖を伴った多芽体を形成する懸濁培養系ができた(図1)。その後生長が遅くなり、カルスの増加

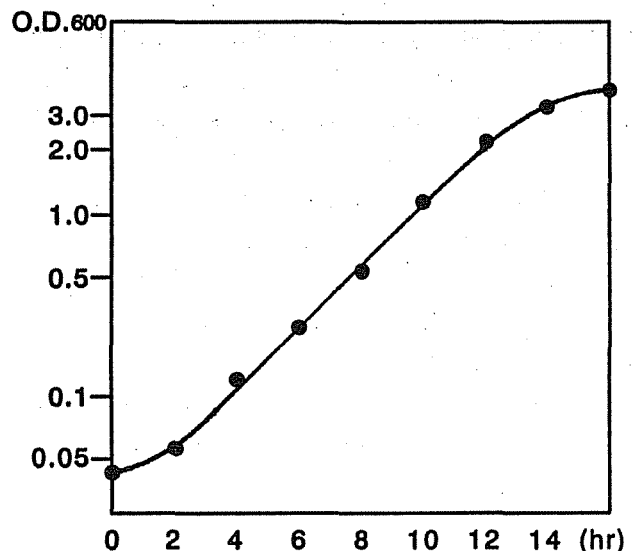


図2 アグロバクテリウムの生育曲線

表1 アグロバクテリウムの生育状態が GUS 活性発現率におよぼす影響

	処理区 <sup>1)</sup>							
	1	2	3	4	5	6	7	8
GUS発現切片率	75	64	70	46	73	46	31	30
GUS発現細胞数 <sup>2)</sup>	2.3	4.4	7.6	2.2	1.9	2.7	0.8	0.5

1) 図2参照

2) 1切片当たりの青色斑点数

表2 懸濁培養組織の網通過後の日数が GUS 活性発現率に及ぼす影響<sup>1)</sup> (品種・スプレnder)

	網通過後の日数			
	4	7	9	14
GUS発現切片率	7	20	100	100
GUS発現斑点数 <sup>2)</sup>	0.1	0.7	11.6	39.3

1) 共存培養より26日目に調査, 各区15切片供試

2) 1切片当たりの青色斑点数

や褐変が生じたが, 多芽体の形成能は維持された。しかし品種間差があり, レナとスプレnderでは比較的整った芽を形成したのに対し, カルメンでは葉状の器官がカルス化し易く, 葉は奇形になった。

アグロバクテリウムの生育状態が培養組織の形質転換効率に及ぼす影響を調べるため, AGL0/pIG121-Hmの生育曲線を作成し, 生育の各段階での形質転換効率を調べた。24時間培養した AGL0/pIG121-Hm を100倍に希釈して, 28°C, 150rpmで往復振盪培養すると約2時間で対数増殖期に入り, 約14時間で定常期に到達した(図2)。希釈時から定常期の間で2時間毎に採取した菌を, 網を通して8日目の培養組織に接種し, 共存・除菌培養した。共存培養より20日目にGUS活性の調査を行った結果, 対数増殖期の菌を接種した処理区でGUS活性発現切片率が高く, 特に希釈後4時間振盪培養した菌を接種した処理区では切片当たりの平均スポット数が最も多かった(表1)。以後の試験では, この条件で培養した菌を供試した。

スプレnderでは, 網を通して16日目の懸濁培養組織をNBMSで共存・除菌培養した。共存培養より26日目の調査では, GUS活性発現切片率は25%であった。除菌培養より50日後, 100mg/ℓクラフォランと40mg/ℓハイグロマイシン-Bを添加したDKMSで選択培養した。共存培養後80日目に緑色の芽を認め, 100mg/ℓクラフォランと30mg/ℓハイグロマイシン-Bを添加したNMSに移植したところ多芽体を形成, 発根し苗条が伸長した。102日目の検定でGUS活性を示す不定芽

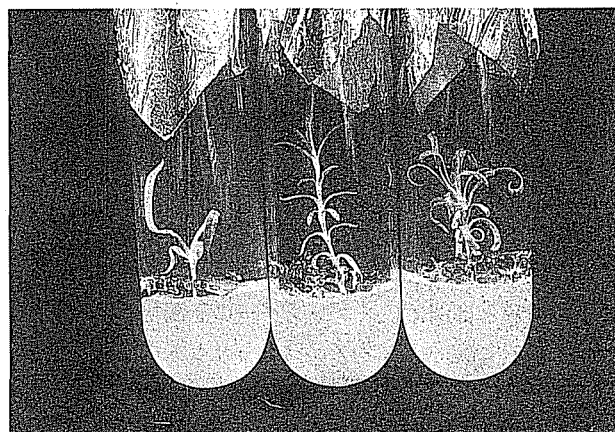


図3 レナの形質転換体

左: 対照, 中・右: 形質転換体

培地は30mg/ℓハイグロマイシン-B添加のNMS

1 2 3 4 5 6 7 8

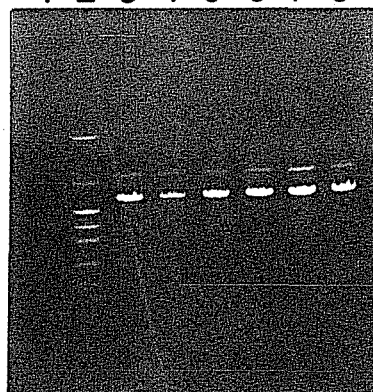


図4 導入遺伝子の増幅

- 1; 非形質転換体
- 2; マーカー
- 3, 4; 再分化固体
- 5-8; カルス

を確認した。

レナでは, 網を通して10日目の培養組織をBMSで共存培養しBMS液体で除菌培養した。共存より12日目のGUS活性発現切片率は50%であった。除菌培養7日後, 網を通して50mg/ℓクラフォランと10~30mg/ℓハイグロマイシン-Bを添加したBMS液体で選択培養した。共存培養後40日目に緑色の芽を認め, 30mg/ℓハイグロマイシン-Bを添加したNMSに移植したところ, 68日目にGUS活性を示す不定芽を得た。形質転換体は葉を形成するものの茎の伸長が遅れ, 苗条の伸長に3か月以上を要した(図3)。

カルメンでは, 網を通して4日目の培養組織をDKMSで共存培養し, DKMSまたはBMS液体で除菌培養した。共存培養より26日目のGUS活性発現切片率は30%であった。除菌培養より43~45日後, 網を通して50mg/ℓ

20 mg/l クラフォランと 20~40 mg/l ハイグロマイシン-B を添加した BMS 液体で選択培養した。共存培養後 102 日目に、BMS 液体で除菌した懸濁培養組織に緑色の芽とカルスを認め、50 mg/l クラフォランと 20 mg/l ハイグロマイシン-B を添加した NMS に移植したところ、葉状の器官を分化し発根したがカルス化する傾向が強くなり、4 か月以上経っても正常な苗条の形成はなかった。

上記実験とは別に、スプレnderの懸濁培養組織を用いて行った実験では、アグロバクテリウムの接種によって GUS 活性を示す細胞は、網を通してからの期間が長いほど多くなった(表 2)。また、GUS 活性を示す細胞は不定芽からの葉に多くみられ、カルスには少なかった。

GUS 活性を示した再分化個体 2 個、カルス 4 個から DNA を抽出し、PCR を行ったところ、GUS 遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子のバンドが観察できた(図 4)。

#### 考 察

供試した 3 品種のうち、レナとスプレnderでは形質転換個体が形成されたが、カルメンではカルス化する傾向が強くなり正常な形質転換体ができなかった。このことから、品種によって懸濁培養や個体再生条件を更に検討する必要がある。

スプレnderでは共存培養から形質転換体の苗条の伸長に長期間を要した。形質転換体は、選択培地上で非形質転換体と比べて葉が濃い緑色であったが、生長が停止していた。選択培養に用いた DKMS でレナとカルメンの懸濁培養組織を培養したところ、NBMS の方が黄褐変しにくかったことから、不定芽の生育に適した選択培地改善の可能性を認めた。レナは他の品種に比べて比較的早く形質転換体の確認ができたが、これは不定芽の生育が他の品種よりも速いことによるのかもしれない。しかし、茎の伸長に時間を要したため、ジベレリンの添加等による茎の伸長促進条件の解明が課題である。

スプレnderでは、網を通してから 9 日目以降の懸濁培養組織で、GUS 活性を示す細胞が多数生ずることが観察できた。このことから、アグロバクテリウムを接種する材料としては、不定芽の分化が旺盛になる 9 日目以降のものが適していると判断できる。カルメンでは、他の 2 品種と異なり懸濁培養組織がカルス化し易いので、網通過後の日数が短くても形質転換組織を得られたと思われる。

Robinson ら<sup>9)</sup> は、葉の基部切片を用いた形質転換実験で、再分化した苗条の中に、形質転換細胞と非形質転換細胞からなるキメラ個体を認めている。懸濁培養組織を用いた本法においても、不定芽の脇芽付近や基部のカ

ルス部分に形成された不定芽の幼葉や生長点付近がキメラ状に形質転換しているのが観察される。このような不定芽から再分化した個体は、形質転換組織に非形質転換細胞が混在したり、形質転換組織が複数の形質転換細胞に由来していることも考えられるので、今後、形質転換体がキメラになっていないかどうか確認する必要がある。また、導入された遺伝子が安定して維持されるかどうかについても調査を要する。

#### 引用文献

- (1) Frey, L., Y. Saranga and J. Janick (1992) : Somatic Embryogenesis in Carnation : HortScience 27 (1), 63-65
- (2) Herrera-Estrella, L. and J. Simpson (1988) : Foreign gene expression in plants : Plant molecular biology (IRL Press) 131-160
- (3) 本田秀夫・平井篤志 (1991) : 非放射性 DNA プローブによる雑種の検定 : 植物細胞工学 3, 141-146
- (4) 飯田朝子・山下稔哉・服部悦子・森川弘道 (1992) : 遺伝子導入実験法①パーティクルガン法 : 植物細胞工学 4, 43-48
- (5) Lazo, G. R., P. A. Stein and R. A. Ludwig (1991) : A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium* : Bio/Technology 9, 963-967
- (6) Lu, C. -Y., G. Nugend, T. Wardley-Richardson, S. F. Chandler, R. Young and M. J. Dalling (1991) : *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) : Bio/Technology 9, 864-868
- (7) Murashige, T. and F. Skoog (1962) : A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures : Physiol. Plat 15, 473-497
- (8) 中村研三・森上 敦・松岡 健 (1991) : サツマイモのスポラミン遺伝子の形質転換植物での発現 : 植物バイオテクノロジー II (東京化学同人) 123-132
- (9) Robinson, K. E. P. and E. Firoozabady (1993) : Transformation of floriculture crops : Scientia Horticulturae 55, 83-99
- (10) 内宮博文 (1990) : 植物遺伝子操作マニュアル (講談社サイエンティフィック) 28-31
- (11) 渡辺雄一郎・岡田吉美 (1990) : トランスジェニック植物の作成とその展開 : 蛋白質核酸酵素 Vol.35, 2490-2502