

キク (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 葉片における安定的な *Agrobacterium* 形質転換系の確立

篠山治恵*・駒野雅保*・野村幸雄*・数馬俊晴*

Stable *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura).

Harue SHINOYAMA*, Masayasu KOMANO*, Yukio NOMURA* and Toshiharu KAZUMA*

キク (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) 品種 '秀芳の力' に耐虫性等の優良形質を付与するため、安定的な *Agrobacterium* 形質転換系を確立した。*Agrobacterium* としては、*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 : pIG121-Hm を使用した。選抜は、葉片置床後10日目に、G418 20mg/ℓ で行うのが最も良いと思われた。*Agrobacterium* の感染効率を向上させるには、感染力が最も高い生育ステージの *Agrobacterium* を使用すること (前培養5時間)、感染液に界面活性剤 Tween 20、共存培地にカザミノ酸を添加することが有効であった。また葉片の作成法は、メスで切断するよりも、コルクボーラーで打ち抜いた方が、感染効率が高まった。この方法で、*Agrobacterium* 形質転換を行ったところ、*Agrobacterium* に感染させた葉片3,717切片のうち、選抜培地上で480個のカルスが誘導された。再分化してきた127個体の植物体のうち、61個体の葉柄について GUS ASSAY を行ったところ、全てに GUS の青い発色が認められた。また、十分に生育した再分化植物30個体について、PCR-サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、GUS 遺伝子の存在が全てに認められるなど、従来^{1), 2), 3), 4), 8), 13), 15), 14)} に比べて安定性が向上した。

Key Words : キク, *Agrobacterium*, 形質転換

I 緒 言

キクは装飾用植物として、我が国では最も重要な園芸作物の一つである。福井県でも、生産量・生産額ともに第1位を占める重要な花き品目となっている。生産現場では、加害する病害虫が非常に多いことや、抵抗性害虫・耐性菌の出現等により、その防除での農薬散布量や散布回数が多くなって、栽培者の健康や環境に対する負荷が増大してきている。

キクの品種育成は、長年にわたって、人工交配や枝変わりを利用してきた。近年開発された育種技術に、*Agrobacterium* による形質転換技術がある。これは、ある形質を支配する遺伝子を、土壌細菌の *Agrobacterium* を使って、人為的に植物の核遺伝子に導入する方法である。この方法では、品種そのものを変えずに、目的とす

る形質のみを変えることが可能である。このため著者らは、この方法を用いて、県内の主要品種に耐虫性等の形質を付与する研究を進めてきた。

キクを材料とした *Agrobacterium* 形質転換系は日本をはじめ、世界各国で報告されている^{1), 2), 3), 4), 8), 11), 13), 14)}。しかしながら、用いた品種の商品価値、或いは形質転換効率が低かったりと、安定した技術とはなっていない。

そこで、商品価値の高い品種を用い、より安定した形質転換系を作出する目的で研究を行った。今回その形質転換系が確立されたので報告する。

この研究を進めるにあたり、京都府立大学田中國介教授に、終始懇篤なるご指導・ご助言を賜った。また、農林水産省農業研究センター若狭暁博士、静岡県農業試験場山田栄成氏、鹿児島県バイオテクノロジー研究所上野敬一郎氏には、幾度となく貴重なご助言を賜った。記して感謝の意を表したい。

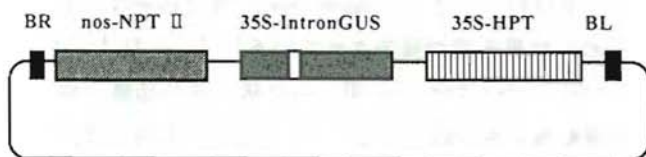
*福井県農業試験場園芸・バイオテク部バイオテク研究グループ

II 材料および方法

1. 供試材料

植物材料は、キク品種‘秀芳の力’を用いた。茎頂を無菌的に摘出し、植物ホルモンを含まないMS基本培地⁹⁾培地上で培養し、無菌植物体を作出した。25℃, 1,500 ℓ x, 16時間日長下で育成し、葉の長径が1～1.2cmになった本葉を材料とした。

Agrobacterium は、ベクター pIG121-Hm を持つ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (名古屋大学中村研三教授より分譲, 第1図) を使用した。このベクター上には、抗生物質耐性遺伝子の NPT II (neomycin phosphotransferase II) 遺伝子と HPT (hygromycin phosphotransferase) 遺伝子、レポーター遺伝子である intron-GUS (β -D-glucuronidase) 遺伝子が構築されている。NPT II 遺伝子は、抗生物質カナマイシン (kanamycin) と G418 (geneticin), HPT 遺伝子はハイグロマイシン (hygromycin) にそれぞれ耐性を示す。GUS 遺伝子は、基質 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) を分解して indigotin 色素を合成し、細胞・組織を青く発色させる。*Agrobacterium* の前培養には、YEP 培地を用い、振とう培養 (28℃, 200rpm.) を行った。この菌液を懸濁培地 (MS, サッカロース 3%, pH5.8) で希釈 (OD₆₀₀=0.2) し、アセトシリンゴン 10mg/ℓ を加えて感染液とした。



第1図. pIG121-Hm の構築図

2. 選抜物質 G418 の濃度と選抜開始時期の検討

6mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、カルス誘導培地 (MS, NAA 1mg/ℓ, BA 0.5mg/ℓ, サッカロース 3%, pH5.8, ジェランガム 0.3%) 上に置床した。0, 3, 7, 10, 14, 21 日後に、選抜物質 G418 を 0, 10, 20, 30, 40, 50mg/ℓ 添加した選抜培地 (MS, NAA 1mg/ℓ, BA 0.5mg/ℓ, サッカロース 3%, pH5.8, ジェランガム 0.3%) に、それぞれ移植した。2週間ごとに培地の更新を行っ

た。置床から3日ごと2ヶ月間にわたって、カルスを誘導した葉片数、枯死した葉片数を調査した。

3. 形質転換効率向上のための諸試験

1) 切片の作成方法の検討

材料の本葉をメスで 5mm 角に切断した葉片と、6mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、それぞれ感染液に 1, 5, 10, 30, 60 分間浸漬した。感染液の *Agrobacterium* の前培養は 24 時間行った。感染液に葉片を浸漬した後、濾紙で菌液を軽くふき取り、共存培地 (MS, NAA 1mg/ℓ, BA 0.5mg/ℓ, サッカロース 3%, pH5.8, ジェランガム 0.3%) に置床し、25℃, 暗黒下で3日間共存培養した。感染から3日目に GUS ASSAY を行い、ブルースポット数を計測した。

2) *Agrobacterium* 前培養時間の検討

Agrobacterium を 0, 1, 5, 24 時間前培養した感染液に葉片を、それぞれ 1, 5, 10, 30 分間浸漬した。その後、濾紙で菌液を軽くふき取り、共存培地に置床し、25℃, 暗黒下で3日間共存培養した。感染から3日目に GUS ASSAY を行い、ブルースポット数を計測した。

3) 共存培地中のカザミノ酸の添加効果

材料の本葉を、6mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、感染液に 30 分間浸漬した。感染液の *Agrobacterium* の前培養は 5 時間行った。感染液に葉片を浸漬した後、濾紙で菌液を軽くふき取り、カザミノ酸 1g/ℓ 添加および無添加の共存培地に置床し、25℃, 暗黒下で3日間共存培養した。感染から3日目に GUS ASSAY を行い、ブルースポット数を計測した。

4) 感染液中の界面活性剤の添加効果

材料の本葉を、6mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、界面活性剤 0.3, 0.5, 1.0, 5.0, 7.0% 添加および無添加の感染液に 30 分間浸漬した。感染液の *Agrobacterium* の前培養は 5 時間行った。感染液に葉片を浸漬した後、濾紙で菌液を軽くふき取り、共存培地に置床し、25℃, 暗黒下で3日間共存培養した。感染から3日目に GUS ASSAY を行い、ブルースポット数を計測した。

試験 2., 3. とも、1 シャーレ (直径 6cm) に 9 枚の葉片を置床し、6 回の反復を行った。

4. 再分化植物体の GUS ASSAY

R.A.Jefferson (1987)⁷⁾ の方法を改良した。

X-Glucuronide	1mM
フェリシアン化カリウム	0.5mM
フェロシアン化カリウム	0.5mM
Triton X-100	0.3%
メタノール	5%
NaH ₂ PO ₄ (pH7.0)	50mM

マイクロトームで 0.3mm 厚に横切断した葉柄を、上記の試薬に浸漬 (37 °C, 1 ~ 2 晩) 後、70 %エタノールで脱色した。光学顕微鏡下で発色部位、強度を観察した。

5. PCR-サザンハイブリダイゼーション

1) DNA の抽出

再分化植物体の本葉 100mg を液体窒素で粉碎し、HEPES Buffer で 3 回洗浄^{1,2)}。Alkali-SDS 法⁶⁾にてゲノム DNA を抽出した。

2) PCR 法

intron-GUS 遺伝子が検出できるよう、5'側と 3'側のプライマーを以下のように合成したプライマーを用い、Hot start (94 °C, 2 分), 熱変性 94 °C (1 分), アニーリング 58 °C (1 分), 伸長反応 72 °C (1 分) の PCR 反応を行った (30 サイクル)。

Forward 5'-GTAGAAACCCCAACCCGTGA-3'
Reverse 5'-GTGACCGCATCGAAACGCAGCAC-3'

3) サザンハイブリダイゼーション

PCR 産物を 2 %アガロースゲル中で電気泳動し、DIG DNA 標識及び検出キット (ベーリンガー・マンハイム株式会社) を用いてサザンハイブリダイゼーションした。プローブには、GUS タンパク質をコードする 250bp 部分を用いた。

III 結果および考察

1. 選抜物質 G418 の濃度と選抜開始時期の検討

形質転換体を効率的に選抜するため、G418 の濃度、および選抜開始時期について検討した。

葉片をカルス誘導培地に置床後、0 ~ 3 日目に選抜培地へ移植すると、G418 20mg/l 以上の濃度で、カルスの誘導は認められなかった (第 1 表)。カルス誘導培地に葉片を置床すると、7 ~ 10 日目に切断面にカルスが誘導される。一旦カルスが誘導されてしまうと、選抜培地に移植してもすぐには枯死しなかった。完全に枯死させるには選抜培地で継代を重ねる必要があった。

葉片置床後 0 ~ 3 日目では、たとえ *Agrobacterium* によって NPT II 遺伝子 (G418 耐性) が導入されても、十分発現しておらず、選抜物質 G418 に対して耐性を示すことは難しい。また、14 日目以降では、カルスの生育により葉片自体が歪曲し、固体培地での選抜精度が低下するおそれがある。また、選抜開始時期が遅いほど、作業効率を低下させる。したがって、選抜開始時期をカルス誘導初期の 7 ~ 10 日目とし、G418 濃度 20 ~ 30mg/l で行い、少なくとも 2 週間毎に 3 ~ 4 回継代する必要があると思われた。

第 1 表. G418 の濃度および選抜開始時期がカルス誘導におよぼす影響

濃度 (mg/l)	選抜開始時期 (置床からの日数: 日)																							
	0				3				7				10				14				21			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	9	9	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0	0	0	0	2	1	0	0	8	7	4	0	8	7	4	0	9	8	3	0	9	7	5	2
20	0	0	0	0	0	0	0	0	8	2	1	0	8	3	1	0	8	6	3	0	8	5	4	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	9	3	0	0	9	3	1	0	9	6	3	0	9	6	4	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	9	2	0	0	9	4	2	0	9	7	2	0	9	5	4	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	9	2	1	0	9	5	1	0	9	6	3	0

注) 選抜開始時期 (置床からの日数) の下の数値 (1 ~ 4) は、継代回数を表す。
各試験とも 1 シャーレあたり 9 葉片を置床した。

2. 葉片の作成方法の検討

切片の作成方法が、*Agrobacterium* の感染効率におよぼす影響を検討した。

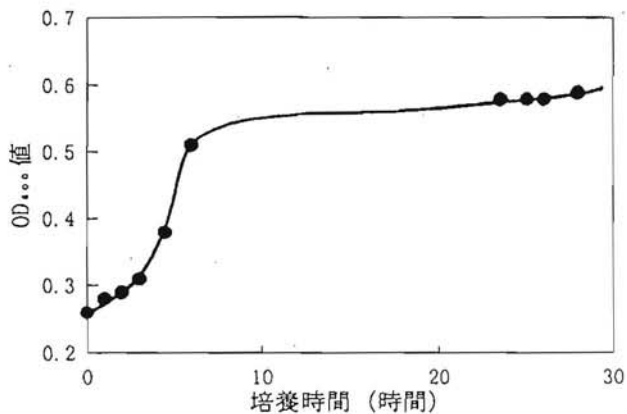
メスによって切断した葉片（写真 1）とコルクボーラーで打ち抜いた葉片（写真 2）のブルースポット数を比較すると、後者の方のブルースポット数が多かった（第 2 表）。特に、コルクボーラーで押し切られた部分にブルースポットは局在していた。また感染時間の比較であるが、時間が経つにつれブルースポット数は増加し、60 分では減少、または増加率の低下が認められた。

以上の結果から、コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、感染液に 30 分程度浸漬するのがよいと思われた。

3. *Agrobacterium* 前培養時間の検討

Agrobacterium 前培養時間が感染効率におよぼす影響を検討した。*Agrobacterium* の前培養時間が長くなるにつれ、ブルースポット数も増加したが、感染時間 30 分以外は 5 時間と 24 時間の間には有意差はなかった。また、感染時間が長くなるにつれ、ブルースポット数は増加し、有意差が認められた。但し、前培養 24 時間では、感染時間 10 分と 30 分との間に、有意差は認められなかった（第 3 表）。

以上から、*Agrobacterium* 前培養時間は 5 時間、感染時間は 30 分間が最適と思われた。前培養 5 時間というのは、*Agrobacterium* 生育の対数増殖期にあたる（第 2 図）。



第 2 図. *Agrobacterium* の培養時間と増殖

4. 共存培地中のカザミノ酸の添加効果

カザミノ酸は pH 緩衝剤などとして、イネの培養系に一般的に用いられている。また、菌類に対しては、生育促進効果があると言われている。そこで *Agrobacterium* と葉片とを共存させる培地にカザミノ酸を添加し、感染およぼす効果について検討した。

カザミノ酸を添加した培地では、3 日間の共存培養期間に、葉片の周囲に菌体が増殖しているのが認められた。添加しなかった培地では、可視的に菌体の増殖は認められなかった。またブルースポット数は、カザミノ酸を添加した培地で有意に増加していた（第 4 表）。

以上のことから、カザミノ酸の添加によって、*Agrobacterium* 感染効率は向上したといえる。

第 2 表. 切片の作成方法と感染時間が *Agrobacterium* 感染効率におよぼす影響

感染時間 (分)	1 切片あたりブルースポット数	
	メス切断	コルクボーラー切断
1	0.0	65.2
5	12.6	47.6
10	17.7	80.8
30	52.9	104.6
60	61.6	100.1

第 3 表. *Agrobacterium* 前培養時間と感染時間が *Agrobacterium* 感染効率におよぼす影響

感染時間 (分)	<i>Agrobacterium</i> 前培養時間 (時間)			
	0	1	5	24
1	6.3	2.3	13.4	14.6
5	3.2	32.6	47.2	39.8
10	11.7	28.8	80.4	82.0
30	24.6	53.9	107.5	84.2

第 4 表. カザミノ酸の添加が *Agrobacterium* 感染効率におよぼす影響

共存培地	1 切片あたりブルースポット数
	カザミノ酸無添加
カザミノ酸添加	118

5. 界面活性剤の添加効果

キク葉片の表面には、細かな毛耳（トライコーム）が密生している。そのため、*Agrobacterium* 感染液が葉片の表面や傷口に接触せず、感染効率を低下させる原因になっている。そこで感染液に添加する界面活性剤の効果について検討した。

Agrobacterium の感染効率が高まったのは Tween 20 であった。Triton X-100 は 1.0 % 以上になると、葉片が脱水症状を起こし、枯死した。Tween 20 では枯死は起こらず、5.0 % までは濃度が高まるにつれ、ブルースポット数も増加した。7.0 % では効果が劣った（第 5 表）。

以上のことから、Tween 20 を 5.0 % 懸濁培地中に加えることで、*Agrobacterium* の感染効率が高まることが判明した。

第 5 表. 界面活性剤が *Agrobacterium* 感染効率におよぼす影響

界面活性剤	濃度 (%)	1 切片あたりブルースポット数
Tween 20	0.3	40.2
	1.0	76.6
	5.0	90.3
	7.0	41.2
Triton X-100	0.3	16.6
	1.0	枯死
	5.0	枯死
	7.0	枯死
Control	0.0	25.5

6. 形質転換系の確立

以上の結果をふまえて、キク品種‘秀芳の力’の形質転換系を確立した。

1) 供試材料

キク；キク品種‘秀芳の力’茎頂培養由来無菌植物体の本葉（長径 1～1.2cm）を、6mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片

Agrobacterium tumefaciens；EHA101:pIG121-Hm

2) 形質転換方法

(1) 感染方法

Agrobacterium を 10 ml YEP 培地にて 5 時間前培養（28 °C, 200rpm.）。懸濁培地で希釈（OD₆₀₀=0.2）し、アセトシリンゴン 10mg/l、Tween 20 5.0 % を加える。ここに葉片を 20～30 分間浸漬。

(2) 共存培養

葉片を共存培地に置床し、25 °C、暗黒下で 3 日間培養。

(3) 除菌

感染より 3 日後、葉片を除菌培地に移植し、25 °C、弱光（1,000 lx 以下）、16 時間日長下で培養。

(4) 選抜

感染より 10 日後、葉片を選抜培地 I に移植し、25 °C、弱光（1,000 lx 以下）、16 時間日長下で培養。2 週間ごとに 3 回継代する。その後は選抜培地 II へ移植し、2 週間ごとに 2 回継代する。

(5) 再分化

緑色のカルスが分化してきたら、葉片ごと再分化培地⁵⁾に移植。25 °C、弱光（750 lx 以下）、16 時間日長下で培養。3 週間ごとに継代する。

(6) 発根

再分化してきた植物体をかきとり、発根培地に移植。25 °C、2500 lx、16 時間日長下で培養し発根を促す。

(7) 培地組成

YEP 培地：Bacto peptone 10g/l、Bacto yeast extract 10g/l、NaCl 5g/l、pH7.2

懸濁培地：MS、サッカロース 3 %、pH5.8

共存培地：MS、NAA 1mg/l、BA 0.5mg/l、カザミノ酸 1g/l、サッカロース 3 %、pH5.8、ジェランガム 0.3 %

除菌培地：MS、NAA 1mg/l、BA 0.5mg/l、サッカロース 3 %、pH5.8、ジェランガム 0.3 %、cefotaxime sodium salt 250mg/l

選抜培地 I：MS、NAA 1mg/l、BA 0.5 mg/l、サッカロース 3 %、pH5.8、ジェランガム 0.3 %、cefotaxime sodium salt 250mg/l、G418 20 mg/l

選抜培地 II：MS、NAA 1mg/l、BA 0.5 mg/l、サッカロース 3 %、pH5.8、ジェランガム 0.3 %、cefotaxime sodium salt 100mg/l、G418 20 mg/l

再分化培地⁵⁾：MS、BA 0.5mg/l、GA₃ 0.2 mg/l、サッカロース 4 %、pH5.8、ジェランガム 0.3 %、cefotaxime sodium salt 100mg/l

発根培地：MS、サッカロース 3 %、pH5.8、ジェランガム 0.3 %、cefotaxime sodium salt 100mg/l

7. 確立した形質転換系の検証

Agrobacterium に感染させたリーフディスク 3717 切片のうち、480 個のカルスが誘導された。1998 年 3 月までに、127 個体の植物体が再分化してきた。このうち 61 個体の葉柄を用いて、GUS ASSAY を行った。

その結果、供試個体 61 個体全てに青い発色が見られ、GUS 遺伝子を有している形質転換体と思われる。

非形質転換体では青く発色した部分が全く見られなかった（写真 3）が、G418 耐性個体（写真 4-1）は、全体に青く発色した。拡大（写真 4-2）してみると、細胞壁・細胞間隙が濃く発色しているのが確認された。

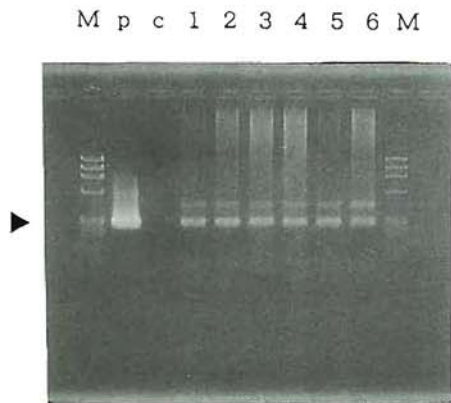
また、表皮細胞やトライコーム、或いは維管束周囲の細胞や気孔の孔辺細胞が強く発色する個体なども出現した。これらについては、より詳細な細胞組織学的分析が必要であろう。尚、これら 61 個体は、3 ~ 4 回試験管内で挿し穂によって継代しているが、GUS 遺伝子は安定して発現している。

生育が進んだ 30 個体について DNA を抽出し、PCR-サザンハイブリダイゼーションを行った。結果を第 3、

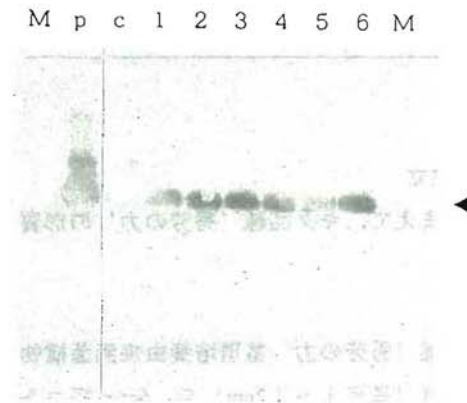
4 図に示した。G418 (20mg/l) 耐性のカルスから再分化した 30 個体全てについて、intron-GUS 遺伝子の一部である 250bp のバンドが確認された。このことから、これらの個体は、intron-GUS 遺伝子を有していると考えられる。

以上のことから G418 (20mg/l) 耐性のカルスから再分化した個体 30 個体全てについては、intron-GUS 遺伝子の導入およびその発現双方が確認された。従来の方法^{1), 2), 3), 4), 8), 11), 13), 14)}の形質転換効率（再分化植物体に対する形質転換体の割合）が 30 ~ 80 %であるのに対して、この方法はかなり安定性が高いといえる。

形質転換体において、外来遺伝子が期待どおりに発現しないという現象が近年多く報告されている^{1), 3), 4), 7), 10), 11), 13)}。この現象の原因の一つとして、複数の遺伝子とその塩基配列の相同性に依存して相互作用した結果起こる、相同性依存型ジーンサイレンシング (homology-dependent gene silencing ; HDGS) が挙げられる。相同性依存型ジーンサイレンシングは大きく 2 つに分けられる。1 つは転写抑制型不活化で、もう 1 つは転



第 3 図. PCR 産物の電気泳動像



第 4 図. PCR-サザンハイブリダイゼーション

M:Marker、 ϕ X174/Hae III
 p:plasmid DNA (pBI121)
 c:control (秀芳の力)
 1 ~ 6:transformants

▲は 250bp のバンドを示す

写後抑制型不活化である。前者はプロモーター領域の相同性に依存して起こり、後者はコーディング領域の相同性に依存して起こる。転写抑制型不活化には DNA のメチル化の関与が強く示唆されている。キクでも近年こうした遺伝子発現抑制が問題になっている^{11), 3), 4), 11), 13)}。すなわち、遺伝子導入されているにもかかわらず、その遺伝子発現が抑制されているのである。例えば、PCR法やサザンハイブリダイゼーション法によって、GUS 遺伝子が確認されているのに、GUS ASSAY では組織が全く青く染まらないというものである。こうした遺伝子発現を抑制する原因を、メカニズムを含めて解明し、遺伝子の高発現化を図る必要がある。

また、形質転換体については、しばしばキメラ化も問題となる^{11), 10), 11)}。形質転換し抗生物質耐性を獲得した細胞が、形質転換されていない細胞に耐性を付与し、形質転換された細胞とされていない細胞が入り混じって植物体を再分化させた場合、キメラが生じる。単一細胞由来といわれる不定胚を経由させれば、キメラ化の可能性は低下する¹¹⁾。

この形質転換系で作出された形質転換体は、高濃度の G418 および長期にわたる選抜を経たカルスから再分化していること、挿し穂による継代 (3 ~ 4 回) を経ても、GUS 遺伝子の発現が安定していることから、キメラ化の可能性は低く、今のところ相同性依存型ジーンサイレンシングも起こしていないと思われる。

今後は、形質転換の効率化を図るため、感染効率と耐性カルス誘導率およびカルスからの再分化率の向上について、さらに追究していく予定である。

引用文献

- 1) Benetka, V. and Pavingerova, D. (1995) Phenotypic differences in transgenic plants of chrysanthemum. *Plant Breeding* 114:169-173
- 2) De Jong, J., Rademaker, W. and Ohishi, K. (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* Vol.1, No.1:38-42
- 3) De Jong, J., Mertens, M. J. and Rademaker, W. (1994) Stable expression of the GUS reporter gene in chrysanthemum depends on binary plasmid T-DNA. *Plant Cell Reports* 14:59-64
- 4) 深井誠一, 山口直子, 五井正憲, 田島茂行 (1997) アグロバクテリウムによるキクの形質転換。園芸学雑誌 66-別刷 2:68-69
- 5) 古田秀雄, 野村幸雄, 前田榎夫, 真柄紘一 (1996) キク (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) プロトプラストからの植物体の効率的な再分化。福井県農業試験場研究報告 33:7-14
- 6) Honda, H. and Hirai, A. (1990) A simple and efficient methods for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. *Japan J. Breed.* 40:339-348
- 7) Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405
- 8) Ledger, S. E., Deroles, S. C. and Gigen, N. K. (1991) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Report* 10:195-199
- 9) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Planta* 15:473-497
- 10) Pavingerova, D., Briza, J., Kodyytek, K. and Niedermeierova, H. (1997) Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with a GUS-intron chimeric gene. *Plant Science* 122:165-171
- 11) Pavingerova, D., Dostal, J., Biskova, R. and Benetka, V. (1994) Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Science* 97:95-101
- 12) Takagi, H., Tanaka, Y., Tarumoto, I., and Murata, N. (1993) *Japan J. Breed.* 43 (Suppl.1):192
- 13) Renou, J. P., Brochard, P. and Jalouzet, R. (1993) Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) after hygromycin resistance selection. *Plant Science* 89:185-197
- 14) Van Wordragen, M. F., De Jang, J., Huitema, H. B. M. and Dons, H. J. M. (1991) Genetic transformation of chrysanthemum using wild type *Agrobacterium* strains; strain and cultivar specificity. *Plant Cell Report* 9:505-508

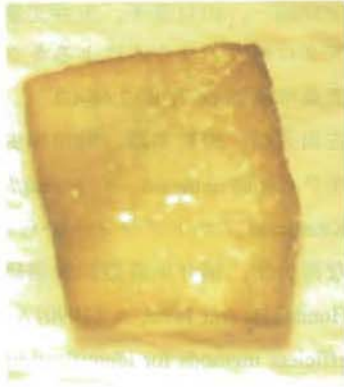


写真1. メスによるキク葉片



写真2. コルクボーラーによるキク葉片

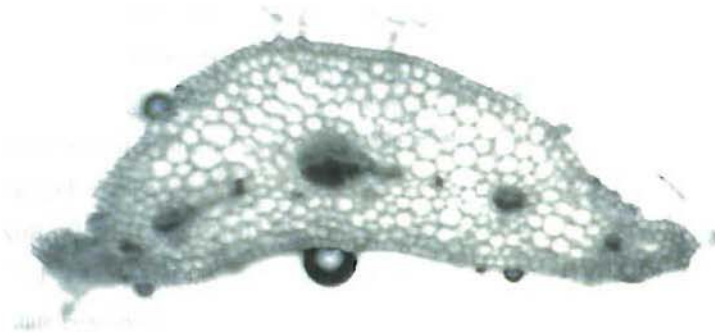


写真3. キク非形質転換体の葉柄

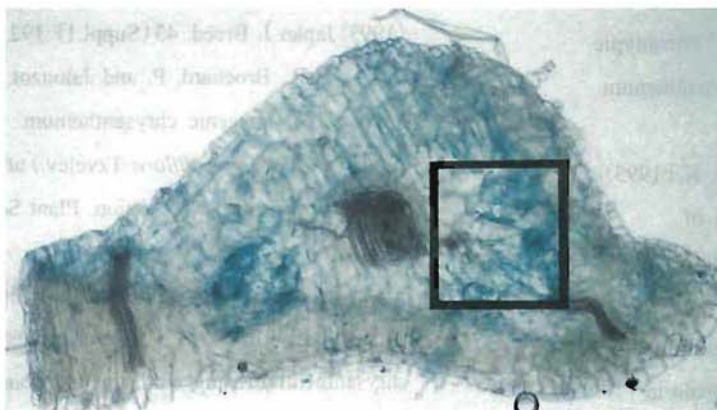


写真4-1. キクG418耐性個体の葉柄

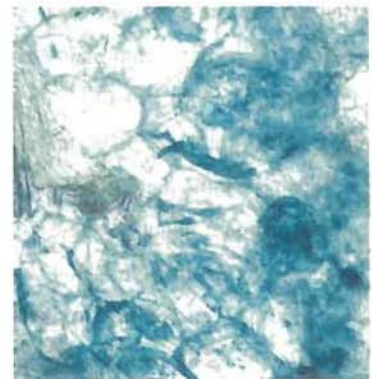


写真4-2. 拡大図

Stable *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Chrysanthemum* (*Dendranthema* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura).

Harue SHINOYAMA*, Masayasu KOMANO*,
Yukio NOMURA* and Toshiharu KAZUMA*

Summary

Stable methods to transformed chrysanthemum plants were established. Leaf discs were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101(pIG121-Hm), which contained a selection marker gene, neomycin phosphotransferase II (NPT II) and hygromycin phosphotransferase (HPT), and reporter gene, β -D-glucuronidase (GUS). We improved the infection methods that prepared leaf discs using cork-borer, co-cultivated with *Agrobacterium*, added Tween 20 to infection buffer and casamino acid to co-cultivation medium. Green-colored callus were induced on the edges of leaf discs on the selection medium, containing 20mg/l G418 about two months after *Agrobacterium* infection. Three thousands seven hundreds and seventeen leaf discs produced 480 resistant calli. One hundred and twenty seven shoots were regenerated from 3,717 leaf discs within 40 to 50 days, after green calli were replaced to the regeneration medium. Histochemical assay with GUS gene expression showed that all examined shoots were positive. The presence of GUS gene was also confirmed by PCR-Southern analysis. According to our methods, 3 to 4 % of leaf discs produced transformed shoots constantly, and these shoots had stable expression of GUS gene. This made it stable to produce transformed chrysanthemum.