

キク [*Dendranthema x grandiflorum*
(Ramat.) Kitamura] における
バイオテクノロジーを用いた育種技術の確立と
新育種素材の作出

2 0 0 4

篠山 治恵

キク [*Dendranthema x grandiflorum*
(Ramat.) Kitamura] における
バイオテクノロジーを用いた育種技術の確立と
新育種素材の作出

篠山 治恵

目次

略語	1
第1章 緒言	2
第2章 細胞融合による体細胞属間雑種の作出	7
2-1 材料および方法	
2-1-1 電氣的融合条件の検討	9
2-1-2 体細胞属間雑種の作出	16
2-1-3 体細胞属間雑種の生育および開花特性調査	18
2-2 結果	
2-2-1 電気融合条件の検討	22
2-2-2 体細胞属間雑種の作出	26
2-2-3 体細胞属間雑種の生育および開花特性調査	30
2-3 考察	37
まとめ	39
第3章 遺伝子組換え技術の確立	40
3-1 材料および方法	
3-1-1 <i>Agrobacterium</i> 感染効率に関する研究	41
3-1-2 再分化方法に関する研究	
3-1-2-1 不定芽由来再分化系の確立	45
3-1-2-2 カルス由来再分化系の確立	46
3-1-2-3 遺伝子組換えのための再分化方法に関する研究	47
3-1-3 遺伝子組換え技術の他品種への応用	51
3-2 結果	
3-2-1 <i>Agrobacterium</i> 感染効率に関する研究	53
3-2-2 再分化方法に関する研究	
3-2-2-1 不定芽由来再分化系の確立	62
3-2-2-2 カルス由来再分化系の確立	66
3-2-2-3 遺伝子組換えのための再分化方法に関する研究	68
3-2-3 遺伝子組換え技術の他品種への応用	73
3-3 考察	76
まとめ	78
第4章 遺伝子組換えによる新品種の育成	79
4-1 材料および方法	
4-1-1 <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来 <i>cryIAb</i> 遺伝子導入による耐虫性個体の作出	80
4-1-2 <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来改良 <i>cryIAb</i> 遺伝子導入による耐虫性個体の作出	85
4-2 結果	
4-2-1 <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来 <i>cryIAb</i> 遺伝子導入による耐虫性個体の作出	91
4-2-2 <i>Bacillus thuringiensis</i> 由来改良 <i>cryIAb</i> 遺伝子導入による耐虫性個体の作出	98
4-3 考察	108

まとめ	111
第5章 遺伝子組換え植物の安全性に関わる評価試験	113
5 - 1 材料および方法	
5 - 1 - 1 生育および開花特性調査	115
5 - 1 - 2 導入遺伝子の安定性	116
5 - 1 - 3 アレロパシー物質産生性の検討	117
5 - 1 - 4 土壌微生物相への影響	120
5 - 1 - 5 遺伝子拡散に関する調査	122
5 - 1 - 6 <i>Agrobacterium</i> 残存性の調査	125
5 - 2 結果	
5 - 2 - 1 生育および開花特性調査	126
5 - 2 - 2 導入遺伝子の安定性	129
5 - 2 - 3 アレロパシー物質産生性の検討	134
5 - 2 - 4 土壌微生物相への影響	137
5 - 2 - 5 遺伝子拡散に関する調査	139
5 - 2 - 6 <i>Agrobacterium</i> 残存性の調査	146
5 - 3 考察	148
まとめ	149
第6章 総合考察	150
摘要	154
Summary	156
謝辞	159
引用文献	161
研究業績一覧	170

略語

第 1 章

AC: alternating current
BA: 6-benzyladenine
BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
DC: direct current
DIG: digoxigenin
EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt solution
GA₃: gibberellic acid A3
HEPES: N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IOA: iodoacetoamido
MS 培地: Murashige and Skoog basal medium
NAA: naphthalic acid
NBT: (nitro blue tetrazolium salt)
PPF: photosynthetic photon flux
PVP: polyvinylpyrrolidone
RFLP: restriction fragment length polymorphism
rpm: radian per minutes
SDS: sodium dodecyl sulfate

第 2 章

G418: Geneticin
hpt: hygromycin phosphotransferase gene
IAA: indole acetic acid
intron-gus: intron β -D-glucuronidase gene
Kin: kinetin
nptII: neomycin phosphotransferase gene
X-Gluc: 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-glucuronide

第 3 章

CaMV35S: Califlower mosaic virus 35S promoter
CUTG: codon usage tabulated from GenBank
DTT: dithiothreitol
IPTG: isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
Nos: nopaline synthase
PCR: polymerase chain reaction
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF: polyvinylidene difluoride
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-poliacrylamido gel electrophoresis

第1章 緒言

キク [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] は、世界でも重要な花卉品目の一つであり、福井県内においては生産量・生産額ともに第1位を占め、毎年の生産額は5億2000万円強にもものぼる。また、日本の国花として、さらに皇室の紋章のデザインとしても用いられてきたことから、古くから日本人と深い関わりを持ってきた日本を代表する花卉品目といえる。江戸時代より今日まで、交雑育種や枝変わりなどの突然変異育種によって、園芸作物の中でも多種多様な品種が育成されてきたが、交雑育種や突然変異育種では遺伝的多様性の拡大に限界があり、多様化する生産者および消費者ニーズに応えるためには、従来の育種法では不可能であった有用形質の導入を行わなければならない。

キクの起源は不詳であり、諸説があるものの、決定的な証拠は得られていない。キクが初めて文献に登場するのは、今から2000年以上も前の中国の書物「周禮」や「禮記」においてである。このころ栽培されていたキクは薬用を目的としたもので、中国北部に自生していた野生種であると考えられている。唐代（西暦618～907年）に入るとキクを題材にした詩文が増えていることから、北村（1950）はこの時代を栽培キクの起源と推定している。北村（1950）によると、唐代またはそれ以前に、中国北部および東北部に分布する2倍体（ $2n=18$ ）のチョウセンノギク（*D. zawadski* Tzvelev var. *latilobum* Kitam.）と、中南部および中部に分布する4倍体（ $2n=36$ ）のハイシマカンギク（*D. indicum* Desmoul. var. *procumbens* Kitam.）とが、両者の分布の重なる地方で交雑し（3倍体、 $2n=27$ ）、その後染色体数が倍化して、6倍体のキク（ $2n=54$ ）の祖先が出来たとしている。柴田（1995a）は、キク属植物は基本数が9の倍数性を示し、栽培ギクは一般に6倍体（ $2n=54$ ）とされているが、実際には幅広い異数性を示し、栽培ギクで最も染色体数が少ない品種は‘YS（ $2n=36$ ）’（遠藤 1969）、反対に最も多い品種は夏秋ギク‘ハート（ $2n=85$ ）’（Shibata and Kawata 1986）であるとしている。さらに $2n=53$ や55といった奇数の染色体を有する品種も多く存在することを指摘し、こうした奇数の品種は偶数の品種と比較して、形態や稔性に全く違いが認められず、このことはキク属植物の大きな特徴となっているとしている。

わが国へのキクの伝来については諸説があり、明確には分かってない（柴田 1995b）。安田（1982）によれば、江戸時代に刊行された「和漢三才図会」において、仁徳天皇の時代（西暦385年）に百済（朝鮮）が青、赤、黄、白、黒の5種類のキクを貢いだ、と記されていることを受け、これを日本への伝来としている。しかし、丹羽（1929a、b）は朝鮮から渡来したという記録に信憑性がないことを指摘し、平安時代以前にはキク栽培の記録がないこと、奈良時代において中国からの文物の伝来が盛んであったこと、キクの呼称が漢名由来であることから、今日栽培されている栽培ギクは栽培品として奈良時代の天

平年間（西暦749～756年）に中国より伝来したと推定している。

小西（1995）はキクの栽培の歴史について、以下のように述べている。キクは平安時代に貴族など上流社会の間で栽培され、鑑賞された。江戸時代になって一般市民の間にも広く普及し、育種や栽培の面で著しく発展した。江戸時代中期には、今日見られるような大輪ギクの厚物や管物、広物、中輪ギクの嵯峨ギク、伊勢ギク、肥後ギク、小輪ギクの懸崖ギクや盆栽など、様々な花型のキクが育成された。1810年代には「菊人形」が江戸鴻巣の植木屋で始められ、栽培技術の多様化が進んだ。このころになると現在日本各地で見られるような菊花展も開催された。このように、江戸時代に育種と栽培の面で飛躍的な発展を遂げたキクは、その後も品種改良が進み、今日のような多種多様の品種が育成されていった。

日本におけるキクの切り花生産は明治時代後期に始まった。この頃すでに日本には、夏ギク、秋ギク、寒ギクなど、様々な生態型を持ったキクが栽培されていた。大正時代中期にアメリカから切り花用品種が導入されたことにより、商業生産が活発化した。短日処理によって開花期を早める遮光栽培が1928年に、暗期中断による長日処理で開花期を遅らせる電照栽培は1937年に日本で始められた。同時に日本の気候や日本人の嗜好に合わせた品種育成が磯江によって1930年ごろに開始されている。

日本における主要な育種成果として、柴田（1995c）は以下の5つの項目を挙げている。第1に、草姿の改良と耐湿性の強化が挙げられる。日本で育成された品種は、剛直で節間が短く、葉柄が短く立ち葉であるなどの茎葉形質を有している。また、湿潤な気候下での露地栽培が可能であるように、育種選抜の成果として耐湿性が強化されてきた。

第2に、夏秋ギク品種の育成が挙げられる。岡田（1963）は、夏ギクの起源を江戸時代に突然変異で生まれたとしているが、昭和に入って、長野県の小井戸直四郎によって、高冷地用の品種として選抜・育成された。小井戸は、秋ギク実生の早咲き系統を、約30年にわたって繰り返し選抜することによって、1946年頃に9月咲き、1948年頃に8月咲き、そして1956年頃に7月咲きを相次いで作出した。これらのキクは新盆、旧盆、秋の彼岸における輪ギクの需要期に、開花調節を必要とせずに開花したことから、秋ギクのシェード栽培にとって変わって普及した。これら夏秋ギクの育成によって、手間のかかる秋ギクのシェード栽培は夏秋ギクの季咲き栽培と変わっていった。その結果、冬は暖地、夏は冷涼地、春秋は中間地といった異なる生産地における季節的な生産分担によってまかなわれるようになった。

さらに小井戸は無側枝性ギクの作出にも成功している。輪ギクにおける摘蕾作業は、実に労働時間の4分の1を占め、こうした手間のかかる作業からの解放は、生産者にとっての夢であった。9月咲き品種の中から無側枝タイプを選抜し、育種を行った結果、1979年に無側枝性品種2品種の作出に成功した。

第3に、古典ギクを利用した品種育成である。平安時代は貴族を中心に、江戸時代以

降は庶民を中心に育種が進み、その結果として様々なタイプのキクが育成された。こうした品種をベースに蓬左菊（林 1987）、「マイクロマム」（精興園 1986年発表）や、「風車菊」（精興園 1989年発表）など、これまでになかった新しい花形のキクが育成された。

第4に、野生種との種間交雑による育種である。現在の栽培ギクはいくつかの種の種間交雑によって作成されたとされる（北村 1950）。農林水産省野菜・茶業試験場では、日本に自生する野生ギクと栽培ギクの種間交雑を試み、野生ギクのもつ有用形質の栽培ギクへの導入に取り組んでいる。柴田ら（1988）はイソギク（*Chrysanthemum*（現 *Dendranthema*） *pacificum* Nakai）とスプレーギク（*Chrysanthemum morifolium* Ramat.）[現 *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] のF₁にスプレーギクを戻し交配することで、スプレーギクの優れた茎の伸長性や鮮やかな花色と、イソギクの旺盛な分枝性や小輪多花性とを合わせ持つ、新しいタイプのキクの育成に成功した。

第5に、突然変異による育種である。キクはもともと枝変わりによる突然変異体が利用されてきた。近年では放射線や薬剤による人為突然変異の誘起も試みられている。Nagatomi *et al.* (1996) はキク品種「太平」に γ 線を照射し、いくつもの花色変異体を得ている。こうしたキクの突然変異体は、一般に周縁キメラ構造を有しているといわれ、柴田ら（1984）はキク品種「ピンクマーブル」とその突然変異体の周縁キメラ構造を解析し、アントシアニンとカロチノイドの発現に関してそれぞれ3段階の組合せを持つ異数性キメラであることを明らかにした。いわゆる色セロファンを重ね合わせるかのように、アントシアニンの青紫色とカロチノイドの赤橙色の、2つの色調の組合せで、様々な花色が期待できる。

このように江戸時代以降、品種や栽培技術の面で大きな進化を遂げたキクであるが、さらに多様化した栽培体系や消費者ニーズに応えるためには、育種操作による有用遺伝子の導入が不可欠である。なかでも、切り花としての品質向上のために使用される農薬の環境や生産者の健康に及ぼす影響が年々問題化しており、これらの負荷軽減のために病虫害抵抗性品種の育成が求められている。

キクにおける重要な病気は白さび病（*Puccinia horiana* Henning、山口 1981）であり、施設栽培では重要視されない傾向にあるが、露地栽培では依然として重要な病害である。白さび病抵抗性は1または、2の優性遺伝子に支配されており（De Jong and Radmaker 1986）、その強弱は品種間の差が大きい。商品性が高く、常に高値で取引される主要品種の中にはこの白さび病に弱い品種も多く、栽培者は防除のために多大な労力と費用を余儀なくされている。また、耐虫性に関しては、キクではマメハモグリバエ（*Liriomyza trifolii*）（De Jong and Radmaker 1991、末永ら 1995）とミカンキイロアザミウマへの抵抗性が報告されているのみであり、その他の害虫への抵抗性は報告されていない。主要害虫としてあげられるオオタバコガ、ハスモンヨトウなどの鱗翅目昆虫は、食害面

積が大きいこと、発生活長が捉えにくいことから、薬剤での防除が困難であり、さらに寄主範囲が広いこと、発育停止温度が低く施設栽培では冬季でも発生して加害することなどから、重要害虫の一つとして挙げられる。

キク科は植物種の中でも、多種多様な植物が属する巨大な科であり、有用な形質に関わる遺伝子資源にも富んでおり、これまでも広く活用されてきた。しかし、耐病性や耐虫性の付与などに関しては、従来の生殖過程を経る交雑育種では限界に来ており、生殖過程を経ないで遠縁植物や動物、微生物からの有用形質の導入が可能であり、遺伝的多様性の拡大も期待できるバイオテクノロジーに活路を求めざるを得ない状況になっている。

このような生産者側のニーズのほか、消費者ニーズとして今までになかった花形や花色のキクが求められている。すなわち永きに渡る交雑育種や自然突然変異育種（枝変わり）では作出し得なかった新しいキクの育成が、バイオテクノロジーを利用した花の色や形に関する遺伝子の導入によって実現する可能性がある。

バイオテクノロジーによる遺伝的多様性の拡大は近年様々な植物で報告されている。1つは細胞融合技術であり、もう一つは遺伝子組換え技術である。キク科植物における種間雑種作出については、胚培養が報告されている（亀野ら 1979、柴田ら 1988、長谷川 1986）が、属間雑種の報告はない。遺伝子組換え技術については、キクにおいて形質転換効率の低さ（Renou *et al.* 1993、De Jong *et al.* 1994、Urban *et al.* 1994）、キメラ化（Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995）などの問題から、実用化が難しい現状である。また、遺伝子組換え植物については、組換えDNA実験指針および、2004年2月19日に遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）が施行され、その取り扱いが規制されている。生物多様性や環境への影響および安全性の問題から、導入遺伝子の安定性、アレロパシーなど他植物や土壌微生物など他生物への影響、遺伝子の拡散性や交雑性などについて、閉鎖系温室、非閉鎖系温室（特定網室）および隔離圃場にて、段階的に調査し、それぞれ管轄の大臣認可が必要であり、通常の作物と同様に一般圃場で栽培するには、いくつものステップを経て、組換えを行っていない原品種と差がないこと、生物多様性への影響がないことなどが証明されなければならない。このことは消費者の不安を取り除き、社会に対して、遺伝子組換え植物への理解と浸透を図る上でも重要なことである。

そこで本研究ではこの2つの技術について、効率的な技術の確立を目指した。細胞融合技術では、キクと紫色のアスター [*Callistephus chinensis* (L.) Nees]、青色のシネラリア [*Senecio x hybridus* (Willd.) Regal]、糸状菌耐性が報告されている中国原産のハイロヨモギ (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex Willd.) (Tang *et al.* 2000) などキク科植物における属間での細胞融合を行い、花色や耐病性に関してこれまで単離・同

定されていない遺伝子が支配する有用形質の導入を試み、両親の形質を併せ持つ雑種という観点から、遺伝的多様性の拡大を図った。遺伝子組換え技術では、キメラの出現を抑制し、遺伝子が全身で安定して働く組換えキクを作出できる技術を確立し、遺伝的背景をほとんど変えずに単離・同定された有用遺伝子の一つである耐虫性遺伝子の導入を試みた。さらにバクテリア由来の遺伝子を高等植物であるキクで高発現させるため、塩基配列の改良を行って人工合成遺伝子を作成し、キクに導入して遺伝子発現を検証した。遺伝子組換えキクについては、組換え DNA 実験指針に基づいて閉鎖系温室にて、導入した遺伝子の安定性を調べ、環境への影響が原品種と相違ないかどうかを調査し、安全性を評価した。

第2章 細胞融合による体細胞属間雑種の作出

キクは交雑育種や突然変異育種によって、様々な品種が育成されてきたが、その可能性が交雑できる範囲内に限られているという欠点を持つ。近年では細胞融合により、生殖過程を経ないで遺伝的多様性を拡大する手法が開発された。これによって元来交雑できない遠縁の植物同士での雑種の作出が可能になった。1978年に Melchers *et al.* によるジャガイモ (Poteto; *Solanum tuberosum* L.) とトマト (tomato; *Lycopersicon esculentum* Mill.) の体細胞属間雑種を初めとして、今日までに種間および属間での体細胞雑種が作出されてきた。種間の組合せでは *Dianthus* 属 (Nakano *et al.* 1993)、*Datura* 属 (Krumbiegel and Schieder 1979)、*Brassica* 属 (Sundberg and Glimelius 1986)、*Primula* 属 (Mizuhiro *et al.* 2001) を中心に、26 組合せで雑種植物が得られている。また、属間の組合せでは前出のポマト (Melchers *et al.* 1978) のナス科をはじめ、アブラナ科 (Gleba *et al.* 1980、Nishio *et al.* 1987、Taguchi *et al.* 1986、Terada *et al.* 1987、Fahleson *et al.* 1988)、ミカン科 (Yamamoto *et al.* 1995)、食料生産上重要なイネ科 (Niizeki *et al.* 1992) などで報告があるのみである。現在、科を超えた雑種育成の例はない。これは、細胞融合には、プロトプラストの単離、培養、または融合細胞からの再分化といった技術的な問題がある上に、異質のゲノムが融合した際に、生理学的・遺伝学的な不均衡が生じ、それらが細胞融合が可能な植物種を限定する要因になっている。

キク科の中には、キク属にはない紫の花色を有するアスター [*Callistephus chinensis* (L.) Nees]、青色を有するシネリア [*Senecio x hybridus* (Willd.) Regal]、また、強い草勢と白さび病 (Rust; *Puccinia horiana* Henning) に抵抗性を持つ中国原産のハイロヨモギ (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex Willd.) など有用な形質を持った植物種が多数存在する。キク科においては、現在の栽培ギクが種間交雑によって育成されてきたことから明らかなように、比較的雑種が得やすく、亀野ら (1979) がピレオギク (*Chrysanthemum* (現 *Dendranthema) weyrichii* Miyabe *et* Miyake) と栽培ギク (スプレーギク) (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) [現 *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] の間で、柴田ら (1988) がイソギク (*Chrysanthemum* (現 *Dendranthema) pacificum* Nakai) とスプレーギクの間で、また長谷川 (1996) が、胚珠培養を用いてキクとハマギク [*Chrysanthemum* (現 *Dendranthema) nipponicum* (Franch.) Kitamura] の種間雑種の獲得に成功している。しかしながら属間になると報告がなく、キクとアスター、シネリア、ハイロヨモギの間でも交雑による雑種種子は得られなかった (古田 未発表)。そこで本研究では、すでに確立されたキク品種 ‘秀芳の力’ のプロトプラスト培養技術 (古田ら 1996) を用いて、キクとアスター、シネリアまたはハイロヨモギのプロトプラストを電気融合し、アスターやシネリアの花色、ハイロヨモギの

白さび病抵抗性をキクに導入することを目的とした。まず、プロトプラスト同士の融合を図る電気融合条件について、材料であるキクとアスター、シネリアおよびハイロヨモギのプロトプラストを用いて検討した。次に、キクと属を異にするアスター、シネリア、またはハイロヨモギとキクのプロトプラストの電気融合を行い、得られた再分化植物体について RFLP (Restriction fragment length polymorphism) をはじめとした雑種検定を行った。さらに得られた体細胞属間雑種について、白さび病抵抗性をはじめとした生育および開花特性を調査することを目的とした。

2 - 1 材料および方法

2 - 1 - 1 電氣的融合条件の検討

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’（山手秀芳園）とアスター品種‘マーガレット系ディーブルー’（タキイ種苗）、シネリア品種‘メロディシリーズ ヘブンリーブルー’（第一園芸）、およびハイロヨモギ（中国原産、武生市立万葉菊花園 清水純一氏より分譲）（Fig. 1）を用いた。昼温 25℃、夜温 20℃ に設定したガラスハウスで栽培したキク植物体（茎長約 5 cm）を、70%エタノールで 30 秒間処理し、1%次亜塩素酸ナトリウムに 15 分間浸漬して滅菌した。滅菌水で 3 回洗浄した後、実体顕微鏡下で葉原基を有しない生長点を約 0.5 mm 以下の大きさで無菌的に摘出し、外植体とした。MS 基本培地（Murashige and Skoog 1962）（Table 1）に置床した。培地はオートクレーブにて 121℃、15 分間の滅菌処理を行った。植物体は 25℃、16 時間日長、白色蛍光灯 [photosynthetic photon flux (PPF) (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 下で培養し、無菌植物体を育成した。

(2) プロトプラストの単離

プロトプラストの単離は古田ら（1996）の方法で行った。無菌植物体の本葉（約 1×1 cm）の裏面に、メスで 1 mm 角の格子状の傷をつけ、傷をつけた面を下にして酵素液 [1% Cellulase R-10（ヤクルト、Japan）、0.5% Macerozyme R-10（ヤクルト、Japan）、CPW 塩（Fearson *et al.* 1973）（Table 2）、0.4 M mannitol、pH5.8] に浸漬し、25℃ で 16 時間静置し、プロトプラストを単離した。ナイロンフィルター（50 μm メッシュ）（Millipore、USA）で未消化物を除去し、700 rpm で 3 分間遠心し、プロトプラストのみを沈殿させた。沈殿したプロトプラストを洗液（0.4 M mannitol、2 mM CaCl_2 ）で 3 回洗浄した。‘秀芳の力’のプロトプラストは、10 mM の iodoacetoamido (IOA)（和光純薬工業株式会社、Japan）で 5、10 分間処理し不活化した。プロトプラストは融合前に、各々 1×10^5 個/ml になるように、洗液で濃度調整した。

(3) 電氣的融合条件の検討

10×10^4 個/ml の濃度に調整したキクとアスター、シネリア、もしくはハイロヨモギのプロトプラストを等量混合した細胞液を、0.5 ml ずつシャーレ（直径 6 cm）に分注した。細胞融合装置 SSH-1（島津製作所、Japan）の細胞融合チャンバー 03（電極間隔 2 mm）を用いて、交流電圧（alternating current field voltage）（V）および直流パルス幅（direct current square pulse）（ μs ）の電氣融合条件を検討した。融合処理した細胞を古

田ら (1996) の方法に従って培養し (Table 3 および Fig. 2)、融合細胞数、細胞分裂の程度、およびコロニー形成数を計測した。

(4) 融合したプロトプラストの培養

融合したプロトプラストは古田ら (1996) の方法に従って培養した。融合したプロトプラストを含む細胞液に、55℃ で溶解した 0.5 ml のコロニー形成包埋培地 [1/2MS 基本培地; 0 mg/l NH_4NO_3 、0.4 M mannitol、1% sucrose、0.4% Gellan Gum (Pure Chemical Co., Japan)] を加え、ゲルプレートを作った。これに 0.5 ml のコロニー形成液体培地 [1/2MS 基本培地; 100 mg/l NH_4NO_3 、1 mg/l naphthylacetic acid (NAA)、1 mg/l 6-benzyladenin (BA)、0.4 M mannitol、1% sucrose] を加え、25℃ 暗黒下で培養した。2 週間後希釈用培地 (1/2MS 基本培地; 0.5 mg/l NAA、0.5 mg/l BA、3% sucrose、0.2% Gellan Gum) を 1 ml 添加し、マンニトール濃度を 1/2 にし、コロニー形成を促した。実験 1 回につき 3 シャーレ、3 反復行い、平均値を算出した。



Fig. 1. Materials of *Compositae* family for cell fusion.

A: Chrysanthemum 'Shuho-no-chikara' by Yamate-shuhoen, *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura.

B: Annual aster 'Deep blue' by Takii Co., *Callistephus chinensis* (L.) Nees.

C: Florist's cineraria 'Heavenly blue' by Daiichi engei Co., *Senecio x hybridus* (Willd.) Regal.

D: Wormwood, *Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex. Willd.

Table 1. The composition of Murashige & Skoog basal medium (1962).

Elements	Concentration (mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ -7H ₂ O	370
CaCl ₂ -2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ -4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.025
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MO ₄ -2H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ -7H ₂ O	27.8
Inositol	100
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30000
pH	5.8

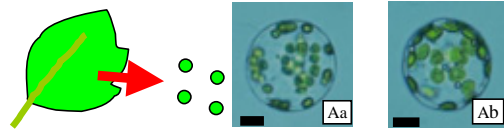
Table 2. The composition of CPW salts (Fearson *et al.* 1973).

Elements	Concentration (mg/l)
KNO ₃	101.1
MgSO ₄ -7H ₂ O	246
CaCl ₂ -2H ₂ O	1480
KH ₂ PO ₄	27.2
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.025
KI	0.16
pH	5.8

Table 3. Media composition for protoplast culture and plant regeneration (Furuta *et al.* 1996).

Concentration of elements (mg/l)	Solid medium for colony induction	Liquid medium for colony induction	Mannitol free medium	Callus induction medium	Regeneration medium	Rooting medium
KNO ₃	950	950	950	950	1900	1900
NH ₄ NO ₃	-	100	100	825	1650	1650
MgSO ₄ -7H ₂ O	185	185	185	185	370	370
CaCl ₂ -2H ₂ O	220	220	220	220	440	440
KH ₂ PO ₄	85	85	85	85	170	170
MnSO ₄ -4H ₂ O	11.15	11.15	11.15	11.15	22.3	22.3
ZnSO ₄ -7H ₂ O	4.3	4.3	4.3	4.3	8.6	8.6
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.025
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125	0.025	0.025
KI	0.415	0.415	0.415	0.415	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	3.1	3.1	3.1	3.1	6.2	6.2
Na ₂ MO ₄ -2H ₂ O	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25
Na ₂ EDTA	18.65	18.65	18.65	18.65	37.3	37.3
FeSO ₄ -7H ₂ O	13.9	13.9	13.9	13.9	27.8	27.8
Inositol	50	50	50	50	100	100
Glycine	1	1	1	1	2	2
Nicotinic acid	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
Pyridoxine-HCl	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
Thiamine-HCl	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1
Sucrose	10000	10000	30000	30000	40000	30000
Mannitol	72870	72870	-	-	-	-
NAA	-	1	0.5	0.5	-	-
BA	-	1	0.5	0.5	0.5	-
GA ₃	-	-	-	-	0.2	0.2
IBA	-	-	-	-	-	-
Gellan Gum	400	-	-	2000	3000	2000
pH		5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

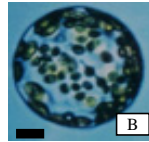
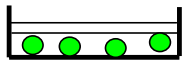
Cell isolation



Enzyme composition

CPW salt
cellulase R-10
macerozyme R-10
0.4M mannitol
pH 5.6

Cell fusion



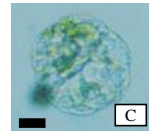
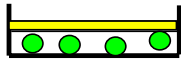
Medium

Colony formation solid medium (1/2X MS salts; 0 mg/l NH_4NO_3 , 0.4 M mannitol, 1% sucrose, 0.4% Gellan Gum)

+

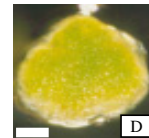
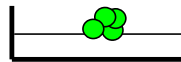
Colony formation liquid medium (1/2X MS salts; 100 mg/l NH_4NO_3 , 1 mg/l NAA, 1 mg/l BA, 0.4 M mannitol, 1% sucrose)

Colony formation



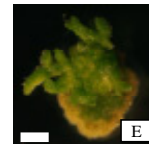
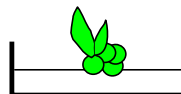
Supply colony formation liquid medium lacking mannitol (1/2X MS salts, 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.2% Gellan Gum)

Callus formation



Transfer to callus induction medium (1/2X MS salts, 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.2% Gellan Gum)

Plant regeneration



Transfer to regeneration medium (MS salts, 0.5 mg/l BA, 0.2 mg/l GA_3 , 4% sucrose, 0.3% Gellan Gum)

Fig. 2. Protocol for protoplast fusion of *Compositae* family (Referenced by Shinoyama *et al.*, 2000).

Aa; Protoplast of chrysanthemum cultivar Shuho-no-chikara.

Ab; Protoplast of wormwood.

B; Fused cell 2 hr. after electrofusion.

C; Cell division 8 days after electrofusion.

D; Callus formation from fused cell 30 days after electrofusion.

E; Regeneration from callus about 80 days after electrofusion.

Scale bar indicates 10 μm on A to C, and 5 mm on D to E.

The all medium were adjusted to pH5.8.

2 - 1 - 2 体細胞属間雑種の作出

(1) 植物材料の調製

植物材料として、2 - 1 - 1と同じ品種および植物種 (Fig. 1) の無菌植物体を用いた。植物体は25℃、16時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 日長下で培養し、無菌植物体を育成した。

(2) プロトプラストの単離

プロトプラストの単離は、2 - 1 - 1と同様、古田ら (1996) の方法で行った。キク品種‘秀芳の力’のプロトプラストは、10 mM のIOA (和光純薬工業株式会社、Japan)で5℃、10分間処理し不活化した。プロトプラストは融合前に、各々 1×10^5 個/mlになるように、洗液で濃度調整した。

(3) 電氣的融合条件

1×10^5 個/mlの濃度に調整したキクとアスター、シネリリア、もしくはハイイロヨモギのプロトプラストを等量混合した細胞液を、0.5 mlずつシャーレ (直径6 cm) に分注した。細胞融合装置SSH-1 (島津製作所、Japan) の細胞融合チャンバー03 (電極間隔2 mm) を用いて、2 - 1 - 1の結果から、最も効果の高かった交流電圧200 V/cmおよび直流パルス幅50 μs の条件でプロトプラストを電気融合した。

(4) 融合したプロトプラストの培養

融合したプロトプラストは古田ら (1996) のキクプロトプラスト培養技術に従って培養した。融合したプロトプラストを含む細胞液に、55℃で溶解した等量のコロニー形成包埋培地を加え、ゲルプレートを作った。これに0.5 mlのコロニー形成液体培地を加え、25℃暗黒下で培養した。2週間後希釈用培地を1 ml添加し、マンニトール濃度を1/2にし、コロニー形成を促した。コロニーが直径0.5 mm位に生長したら、カルス誘導培地 (1/2MS基本培地; 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.2% Gellan Gum) に移植し、25℃、16時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) =60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 下で培養した。直径1 ~ 1.5 mmに生長したカルスを再分化培地 (MS基本培地; 0.5 mg/l BA, 0.2 mg/l GA₃, 4% sucrose, 0.3% Gellan Gum)に移植し、2週間毎に3回継代し、カルスから不定芽を再分化させた。再分化した植物体は発根培地 (MS基本培地; 3% sucrose, 0.2% Gellan Gum) に移植し、発根を促した。1回に10シャーレ、18反復行った。

(5) 雑種検定

1) RFLPによる雑種検定

順化後の植物体の本葉 100 mg を液体窒素で Takagi *et al.* (1993) の方法に従って HEPES Buffer [0.1M HEPES (pH8.0)、0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP)、4% 2-mercaptoethanol] で 3 回洗浄し、Alkali-SDS 法 (Honda and Hirai 1990) を用いてゲノム DNA を抽出した。キクとシネリアの融合細胞由来再分化植物体のゲノム DNA は制限酵素 *Bam*HI で、キクとハイロヨモギの融合細胞由来再分化植物体のゲノム DNA は制限酵素 *Eco*RV で、それぞれ DNA 5 μ g を処理した。0.7% アガロースゲル中で電気泳動し、Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., England) にアルカリブロットイングした。DIG Labbering & Delection Kit (Roche & Behringer Mannheim, Germany) を用いてサザンプロット (Southern 1975) を行い、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) と NBT (nitro blue tetrazolium salt) の発色反応により RFLP 法にてそれぞれの DNA 多型を検出した。プローブには、制限酵素 *Eco*RI で消化したイネのリボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) 断片 7.7 kbp (Takaiwa *et al.* 1984) を用いた。

2) 染色体観察による雑種検定

順化後の植物体根端を酵素液 [4% Cellulase Onozuka RS (ヤクルト、Japan)、0.1% Pectolyase Y-23 (キッコーマン、Japan)、75 mM KCl、7.5 mM Na₂-EDTA (pH 4.0)] に浸漬し、37 °C で 2 時間インキュベートした。その後滅菌水で 3 回洗浄した。プレパラート上に置床し、固定液 [ethanol:acetic acid solution (3:1 v/v)] を 1 滴垂らして押しつぶし、染色体を露出させた。その後 8% Giemsa 染色液に 30 分間浸漬して染色し、光学顕微鏡下で染色体数を計測した。

2 - 1 - 3 体細胞属間雑種の生育および開花特性調査

(1) 植物材料

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’とハイイロヨモギの体細胞属間雑種を用いた。

(2) 苗の育成

発根を促した体細胞属間雑種植物体を2日間外気に馴らし、パーミキュライト(旭工業株式会社、Japan)とパーライト(フヨー工業株式会社、Japan)の混合用土(容積比7:3)を詰めたセルトレイ(72穴)に移植し、ガラスハウス内で順化した(1995年10~12月)。生育に合わせてポリポット($\phi=15$ cm)に植え替えた。1997年1月から3月まで低温処理(10℃)を行った。1997年5月にマルチがけした福井県農業試験場内の圃場に定植し、同年に開花した23個体を選抜した。選抜系統については1998年1月~3月まで低温処理(10℃)を行い、冬至芽を挿し芽して苗の増殖を行った。

(3) 開花特性検定

挿し芽増殖後の両親および雑種植物体を、各1個体ずつ、1998年5月に15 cm間隔で圃場に定植し、作物耕種基準(福井県1976)のキクの基準に則って栽培し、開花後、開花日、莖長、莖径、葉形、花形などについて調査した。

(4) 花粉稔性

1) 花粉培地の作成

花粉培地はIkeda and Numata(1998)の方法に従って作成した。キクの舌状花弁20 gを酢酸エチル100 mlに浸漬し、密閉して4℃で24時間インキュベートした後、ドラフト内で酢酸エチルを揮発させた。残った抽出物に液体培地(100 mg/l H_3BO_3 、300 mg/l $CaCl_2$ 、0.01 mg/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、30% sucrose)を10 ml加え、密封して30℃のインキュベーター内で一晩保存した。懸濁液を乳鉢に入れて乳棒で磨砕し、さらに液体培地を10 ml加えて混合し、これを‘酢酸エチル抽出液’とした。その後、液体培地:酢酸エチル抽出液=3:1(v/v)で混合し、花粉培地とした。

2) 花粉の発芽検定

両親および開花した雑種植物体の花の雄蕊より花粉を採取し、スライドグラス上に置床し、花粉培地を1~2滴滴下した。25℃、16時間日長、白色蛍光灯[PPF(400~700 nm) = 60 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]下で培養した。置床より2時間後、顕微鏡下で花粉管の伸長を観察した。

(5) 発根試験

両親および開花した雑種植物体について、無菌植物体の MS 培地（試験管培地、10 ml）における発根率および発根日数（Fig. 3A）、順化後の植物体による園芸培土（呉羽化学工業株式会社、Japan）における発根試験を行った（Fig. 3B）。無菌植物体は草丈 3 cm、順化後の植物体は草丈 5 cm の個体を用いた。1 区 10 本 3 反復の試験を行った。

(6) 白さび病 (*Puccinia horiana* Henning) 抵抗性の検定

以下の試験を 1998 年 6 月下旬より 7 月上旬に実施した。

1) 罹病葉片付着による白さび病抵抗性検定

10~15 枚の本葉を有する草丈 15~20 cm の健全な両親および雑種植物体 23 系統を $\phi=15$ cm のポリポットに定植した。福井県農業試験場内でキク品種‘秀芳の力’の本葉に自然発生した白さび病斑 ($\phi=3$ mm) を 0.5×0.5 mm の大きさに切り取り、界面活性剤 Tween 20 で両親および雑種植物体の本葉に貼り付けた（Fig. 4A）。各植物体 1 個体、1 個体 10 枚の本葉について処理を行った。1 系統 1 個体、合計 23 系統の雑種植物体について行った。窓を開放したガラスハウスにポットを静置し、20 日後に罹病葉数、病斑の大きさを計測した。

2) 罹病株混植による白さび病抵抗性検定

8~10 枚の罹病葉を有するキク植物体（キク品種‘秀芳の力’、草丈約 10 cm）1 個体と、健全な両親および雑種植物体（草丈約 10 cm）それぞれ 1 個体を $\phi=30$ cm のポリポットに混植し、圃場に静置した（Fig. 4B）。1 系統 1 個体、合計 23 系統の雑種植物体について行った。20 日後に罹病葉数、病斑の大きさを計測した。

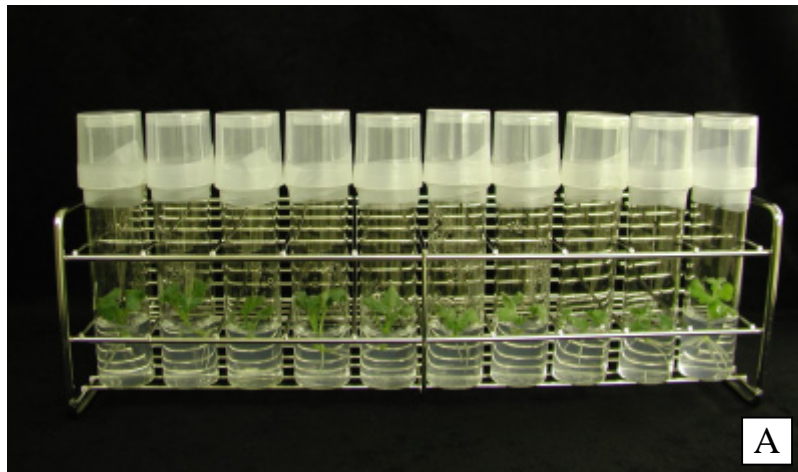


Fig. 3. Test of rooting ability in the test tubes and in soil.

A: Shoots in 3 cm- length of somatic hybrids were planted to test tubes with MS basal medium.

B: Shoots in 5 cm- length of somatic hybrids were planted to soil.

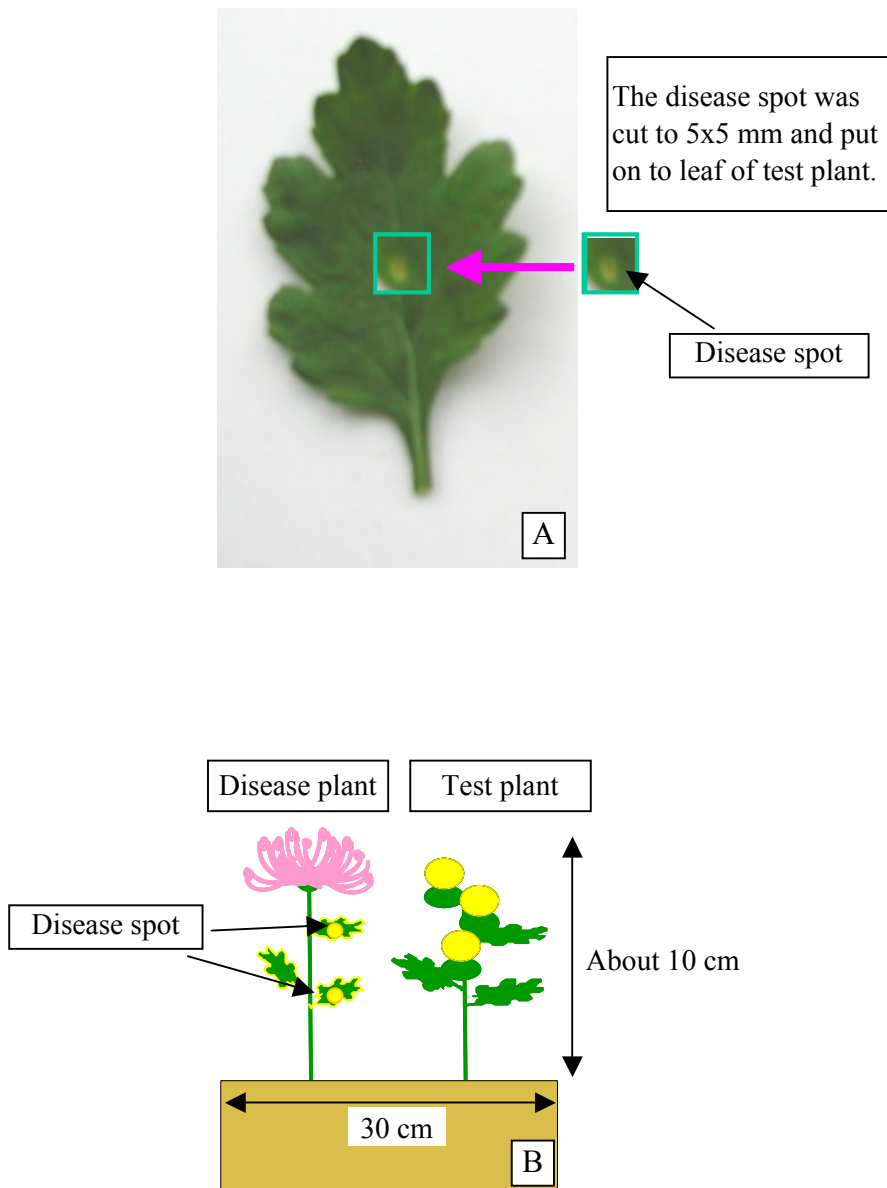


Fig. 4. Rust (*Puccinia horiana*) resistance test in the greenhouse (A) and in the field (B).

A: 5x5 mm cutting leaf segment with one disease spot was put on to somatic hybrid and their parents.

B: Infected plants of somatic hybrids or their parents were planted on pot ($\phi = 30$ cm) and grown in the field.

2 - 2 結果

2 - 2 - 1 電氣的融合条件の検討

結果を Table 4 に示した。プロトプラストは交流電圧を加えることで Fig. 5 のようなパールチェーンを形成し、その後の直流パルスによって連結した部分の細胞膜を破壊して細胞同士が融合する。この最適条件を推定するため、1 シャーレあたりの融合細胞数、分裂した融合細胞数およびコロニー形成数について調査した。

1 シャーレあたり、キクとキク科植物あわせて 1×10^5 個のプロトプラストが存在する。融合細胞率については、この細胞数の半数を分母とし、血球計算版にて融合した細胞数を計測して融合細胞率を算出した。キクとアスター、シネリアもしくはハイロヨモギの各組合せにおいて、直流パルス幅 50 μ s では、交流電圧 100 および 150 V/cm で融合細胞は全く見られなかった。200 V/cm では各組合せで平均 35.0 ~ 40.2%、250 V/cm 以上ではキク + アスターで平均 58.0 ~ 58.3%、キクとシネリアで平均 69.0 ~ 89.5%、キク + ハイロヨモギで平均 57.3 ~ 78.2%の割合でプロトプラストが 2 個ずつ融合しているのが確認された。直流パルス幅 100 μ s では、各組合せとも交流電圧 100 ~ 250 V/cm のすべての区において、平均 36.0 ~ 82.2%の割合でプロトプラストが 2 ~ 5 個ずつ融合した。各組合せにおいて、直流パルス幅 50 μ s および 100 μ s ともに、交流電圧が大きくなるにつれ、融合細胞数の割合が上昇する傾向が認められた。

次に、各条件で融合したプロトプラストを培養し、融合処理から 14 日目に 1 シャーレあたりの細胞分裂を開始した融合細胞数を顕微鏡下で計測した。キクとアスター、シネリアもしくはハイロヨモギの各組合せにおいて直流パルス幅 50 μ s では、交流電圧 100 および 150 V/cm で、分裂を開始した融合細胞は全く見られなかった。200 V/cm では各組合せで 1 シャーレあたり平均 51.0 ~ 63.0 個、250 V/cm 以上では、キクとアスターで平均 32.0 ~ 34.0 個、キクとシネリアで平均 21.5 ~ 25.0 個、キクとハイロヨモギで平均 31.0 ~ 46.0 個の融合細胞が細胞分裂を開始した。直流パルス幅 100 μ s では、各組合せとも交流電圧 200 V/cm 以上で融合細胞の分裂が確認できなかった。キクとアスターでは 100 V/cm で 1 シャーレあたり平均 17.0 個、キクとシネリアでは平均 9.0 個、キクとハイロヨモギでは平均 13.0 個であった。また 150 V/cm では、キクとアスターが平均 6.0 個、キクとシネリアが平均 6.0 個、キクとハイロヨモギは平均 7.0 個であった。各組合せにおいて、プロトプラストの融合が認められた試験区において、直流パルス幅 50 μ s および 100 μ s ともに、交流電圧が大きくなるにつれ、細胞分裂を開始する融合細胞数が減少する傾向が認められた。

さらに、培養を継続し、融合から 28 日目に 1 シャーレあたりのコロニー数を顕微鏡下で計測した。キクとアスター、シネリアもしくはハイロヨモギの各組合せにおいて直流パルス幅 50 μ s では、交流電圧 100 および 150 V/cm で、コロニー形成は全く見られなかった。

200 V/cm では、キクとアスターの組合せで 1 シャーレあたり平均 3.0 個、キクとシネリアでは平均 57.0 個、キクとハイロヨモギでは平均 63.0 個のコロニーが観察された。250 V/cm では、キクとアスターで平均 2.0 個、キクとシネリアで平均 11.0 個、キクとハイロヨモギで平均 14.0 個、さらに 300 V/cm では、キクとアスターではコロニーは認められなかったが、キクとシネリアで平均 17.2 個、キクとハイロヨモギで平均 6.0 個のコロニーが観察された。直流パルス幅 100 μ s では、キクとアスターの組合せでは、コロニー形成は全く観察されなかった。キクとシネリアでは 100~150V/cm で 1 シャーレあたり平均 0.7 個、キクとハイロヨモギでは 100 V/cm で平均 8.0 個、150 V/cm で平均 0.3 個のコロニーが観察された。各組合せにおいて、プロトプラストの融合が認められ、細胞分裂が確認された試験区において、直流パルス幅 50 μ s および 100 μ s とともに、交流電圧が大きくなるにつれ、コロニーの形成数が減少する傾向が認められた。

以上の結果、キク科植物における細胞融合には、直流パルス幅 50 μ s、交流電圧 200 V/cm が最適であろうと思われた。

Table 4. Efficient electrical parameters on the cell fusion in *Compositae* family.

		Chrysanthemum and annual aster		
DC square pulse (μ s)	AC field's voltage (V/cm)	Percentage of fused cells (%)	Number of divided cells	Number of colonies
50	100	0.0	0.0	0.0
50	150	0.0	0.0	0.0
50	200	35.0	47.0	3.0
50	250	58.0	32.0	2.0
50	300	58.3	34.0	0.0
100	100	53.0	17.0	0.0
100	150	58.7	6.0	0.0
100	200	66.3	0.0	0.0
100	250	70.7	0.0	0.0

		Chrysanthemum and florist's sineraria		
DC square pulse (μ s)	AC field's voltage (V/cm)	Percentage of fused cells (%)	Number of divided cells	Number of colonies
50	100	0.0	0.0	0.0
50	150	0.0	0.0	0.0
50	200	70.3	57.0	57.0
50	250	69.0	25.0	11.0
50	300	89.5	21.5	17.2
100	100	57.0	9.0	0.7
100	150	69.7	6.0	0.7
100	200	66.2	0.0	0.0
100	250	74.1	0.0	0.0

		Chrysanthemum and wormwood		
DC square pulse (μ s)	AC field's voltage (V/cm)	Percentage of fused cells (%)	Number of divided cells	Number of colonies
50	100	0.0	0.0	0.0
50	150	0.0	0.0	0.0
50	200	35.6	63.0	63.0
50	250	78.2	46.0	14.0
50	300	57.3	31.0	6.0
100	100	36.0	13.0	8.0
100	150	68.0	7.0	0.3
100	200	79.0	0.0	0.0
100	250	82.2	0.0	0.0

The data of cell division was measured on 14 days and the colony formation was measured on 28 days after initial culturing.

The data shows the average of 3 repetitions per Petri dish.

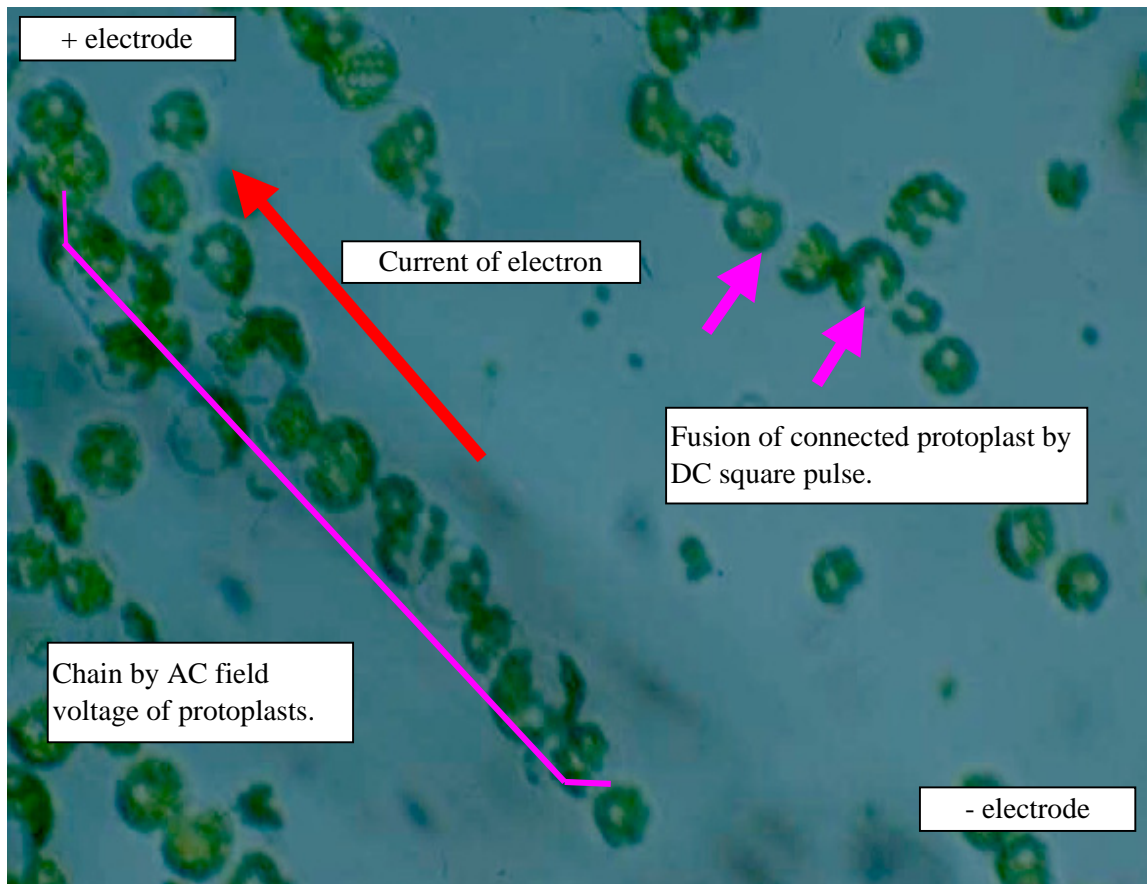


Fig. 5. Electrofusion of protoplasts.
Several protoplasts were connected by AC field voltage.
After then, these protoprasts were fused by DC square pulse.

2 - 2 - 2 体細胞属間雑種の作出

結果を Table 5 に示す。直流パルス幅 50 μ s、交流電圧 200 V/cm で、それぞれの組合せで 180 シャーレ (1シャーレの細胞数はキクとキク科植物を合わせて 1×10^5 個) について細胞融合を行った。すべての組合せにおいて、融合細胞が認められたが、キクとアスターでは、融合細胞の細胞分裂が 8 分裂期で止まり、コロニー形成には至らなかった。キクとシネリアでは、融合後 4 日目から融合細胞が順調に細胞分裂を繰り返し、約 20 日後にはコロニーを形成した。コロニーをカルス誘導培地に移植することで、融合から約 30 日目にカルスを形成した。2,287 個のカルスから 14 個体の再分化植物体を得た。キク + ハイロヨモギでは、同様に融合後 4 日目から融合細胞が順調に細胞分裂を繰り返し、約 20 日後にはコロニーを形成した。コロニーをカルス誘導培地に移植することで、融合から約 27 日目にカルスを形成した。3,864 個のカルスから、1,342 個体の再分化植物体を得た。

順化後のキクとシネリアの再分化植物体 14 個体、キクとハイロヨモギの再分化植物体 1,342 個体の本葉からゲノム DNA を抽出し、RFLP 法にて DNA 多型を検出した。制限酵素 *Bam*HI で切断することでキクは 19、16、13 kbp に、シネリアは 2.7 および 2.0 kbp に特異的なバンドが検出された。9.4 kbp のバンドは、キクとシネリアに共通していた。また、制限酵素 *Eco*RI で切断することでキクは 5.1 kbp、ハイロヨモギは 5.9 kbp にそれぞれ特異的なバンドが認められた。ここでは共通するバンドは認められなかった。RFLP の結果、キクとシネリアの再分化植物体では 19、16、13、9.4 kbp のキク特有のバンドしか検出されなかったが、キクとハイロヨモギでは全個体が 5.1 kbp と 5.9 kbp の両親のバンドを共有しており、雑種性が認められた (Fig. 6)。

親品種の染色体数は、キクが $2n=54$ 、アスターが $2n=18$ 、シネリアが $2n=60$ 、ハイロヨモギが $2n=18$ である (北村 1950、松尾 1989)。再分化植物体の染色体数は、キクとシネリアでは $2n=54$ であった (Table 5)。キクとシネリアの再分化個体を順化し、生育させたところ、生育特性はキク品種 ‘秀芳の力’ に酷似し、花器も白色八重花であり、シネリアの形質は外観的に認められず、雑種性は認められなかった (Fig. 7)。

一方、キクとハイロヨモギでは再分化植物体の染色体数は $2n=64$ から 72 であり、両親のすべての染色体を有するか、あるいはどちらかの染色体が数本欠落した染色体数であった (Table 5)。再分化植物体の外観を Fig. 8 に示した。

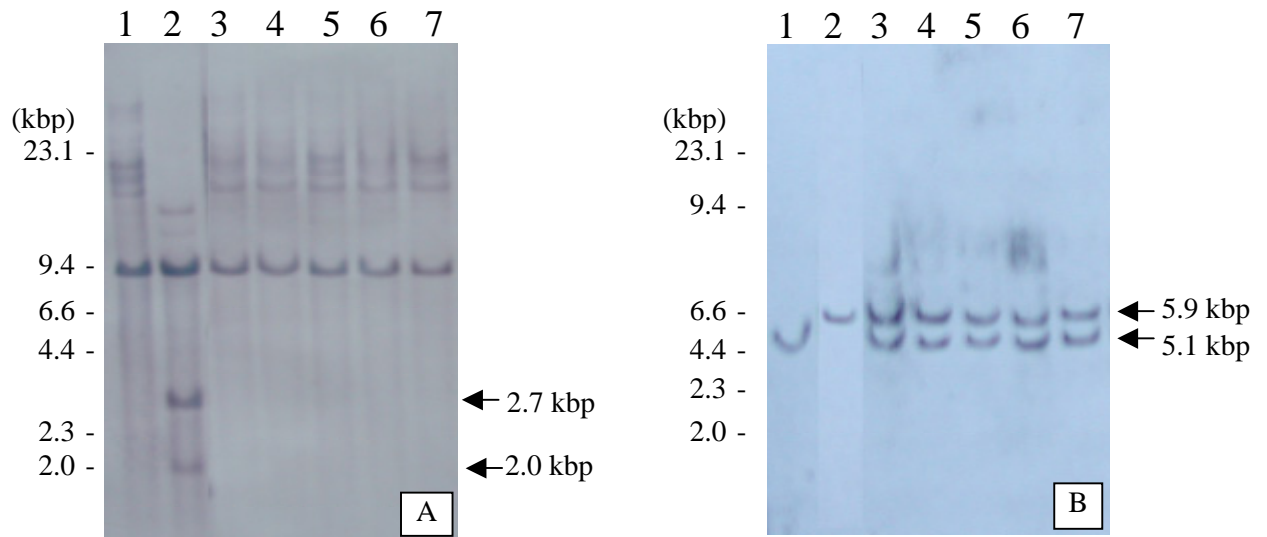


Fig. 6. DNA analysis by RFLP in regenerants of chrysanthemum and cineraria, and chrysanthemum and wormwood.

A; Genomic DNA from parents and regenerated plants from fusion cells between chrysanthemum and cineraria digested with *Bam* HI and hybridized with the rice rDNA probe.

Lane1: Chrysanthemum

Lane2: Florist's cineraria

Lane3-7: Regenerated plantlets

B; Genomic DNA from parents and regenerated plants from fusion cells between chrysanthemum and wormwood digested with *Eco* RV and hybridized with the rice rDNA probe.

Lane1: Chrysanthemum

Lane2: Wormwood

Lane3-7: Regenerated plantlets

Table 5. Regeneration of somatic hibrids plants on *Compositae* family.

Parents	Number of callus	Number of regenerants	Regeneration frequency(%)	Number of somatic hybrids ¹⁾	Chromosome number ²⁾	Plant shape
chrysanthemum + annual aster	0	0	0.0	0	-	-
chrysanthemum + cineraria	2,287	14	0.6	0	2n=54	chrysanthemum
chrysanthemum + wormwood	3,864	1,342	34.7	1,342	2n=62-72	various

¹⁾ Somatic hybrids were confirmed by RFLP analysis.

²⁾ Chromosome number was counted on root tip.

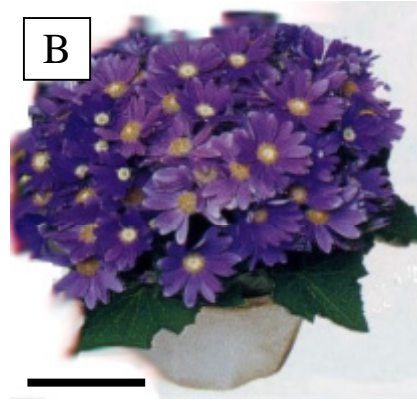
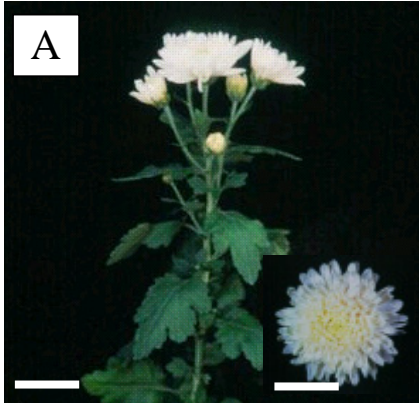


Fig. 7. Morphological characteristics of regenerated plants from fusion cells between chrysanthemum and cineraria.
A: Chrysanthemum 'Shuho-no-chikara'
B: Florist's cineraria 'Heavenly blue'
C-F: Regenerated plants (C: No.1, D: No.2, E: No.3, F: No.4).
Scale bar indicates 50 mm.

2 - 2 - 3 体細胞属間雑種の生育および開花特性調査

(1) 生育・開花特性調査

キクとハイロヨモギの再分化植物体 1,342 個体を 1995 年 10～12 月に順化した。2 - 2 - 2 で述べたように、この 1,342 個体はすべて体細胞属間雑種であった。順化後、順調に生育した個体数は 509 であった。1997 年 5 月に圃場に定植したところ、53 個体が順調に生育した。このうち 23 個体が開花した。この 23 個体を 1998 年 1～3 月まで低温処理 (10℃) を行い、冬至芽による挿し芽増殖を行い、試験苗を育成した。

両親および雑種植物体 23 個体の開花特性を Table 6 および Fig. 8 に示した。開花日は、ハイロヨモギは 8 月 30 日、‘秀芳の力’ は 10 月 24 日に対し、雑種植物体 23 個体が 9 月下旬～11 月上旬であった。雑種植物体の茎葉の生育は、草丈は両親よりも短く、茎径は‘秀芳の力’と同程度かやや細かった。葉数は‘秀芳の力’より極端に少ない 26 枚 (No. 9) や 16 枚 (No. 16) のものも出現し、全体的に‘秀芳の力’よりも少なかった。葉長および葉幅は、‘秀芳の力’より小さいものから大きいものまで幅広く、特に No.6 では葉幅 2.4cm と小さかった。また‘秀芳の力’よりも欠刻が大きいものから小さいものまで出現した。花の特徴として、形状は一重 (No.5～23) 筒状花 (No.6、7、8、9、14、15、16、17、18、19、20、22、23) のものが多かったが、舌状花 (No.1、2、3、4、5、10、11、12、13、21) や二重 (No.1、2、3)、半八重 (No.4) のものも出現した。花色は白 (No.5、8、12、15、16、21、23) の他、ピンク (No.3、6、7、14、20) や黄色 (No.1、2、9、10、11、13、17、18、19、22)、ピンクと黄色の複輪 (No.4) のものも見られた。花の直径は全個体とも‘秀芳の力’の半分以下の大きさで、11～40 cm までばらつきがあった。花弁数は、形状が一重や二重のため‘秀芳の力’より極端に少なかった。

花の数では、‘秀芳の力’が 17 個、ハイロヨモギが 120 個に対し、雑種植物体では 4～98 個であり、幅広く分布した。

(2) 花粉稔性

キクの花粉は人工培地上では発芽が困難であり、Ikeda and Numata (1998) は人工培地にキク花弁の酢酸エチル抽出液を加えることで、最大で 49.4% の発芽率を得ている。花粉培地上に親植物および雑種植物体の花粉を置床したところ、親植物では、1 割程度の花粉から花粉管の伸長が認められた。一方開花した雑種植物体 23 個体では、全個体とも花粉管の伸長は認められず、花粉稔性は無いと考えられた (Table 6)。

(3) 発根試験

試験管および園芸培土における発根試験の結果を、Table 7 に示した。両親と開花した雑種植物体 23 個体について、1 区 10 本 3 反復の発根試験を行った。

試験管で生育させた無菌植物体を用いて無菌的に挿し芽をし、発根率と発根日数を調べたところ、‘秀芳の力’の発根率は100.0%で、発根日数は平均2.5日、ハイロヨモギの発根率は85.3%で、発根日数は平均5.3日であった。雑種植物では発根率は100.0%に近く、発根日数は最も短いもので6.8日(No.5)最も長いもので16.2日(No.2)であった。

園芸培土への挿し芽を試みたところ、‘秀芳の力’の発根率は100.0%で、発根日数は平均6.8日、ハイロヨモギの発根率は46.3%、発根日数は平均10.6日であった。雑種植物体の発根率は最も低いもので3.8%(No.17)、最も高いもので26.8%(No.5)、発根日数は最も短いもので6.0日(No.7)、最も長いもので17.0日(No.17)であった。

(4) 白さび病抵抗性

ガラスハウスにおける検定では、両親および雑種植物体それぞれ10枚の本葉を検定に用いた。キク品種‘秀芳の力’では、試験開始20日後には10枚のうち8枚に病斑が生じ、それらは病斑が拡大し、枯死した。病斑の大きさは直径1~2mmが35個、直径3mm以上が29個であった。ハイロヨモギでは10枚のうち1枚に、直径1~2mmの病斑が1個生じただけであり、その後も病斑は拡大しなかった。このことからハイロヨモギは白さび病に対して強い抵抗性を持つと言える。一方雑種植物体では、1~3枚の本葉に病斑が生じ、病斑の大きさは直径1~2mmが2~10個、3mm以上が0~5個であった。さらに直径1~2mmの病斑はそれ以上拡大しなかった(Table 8およびFig. 9)。

圃場における検定では、キク品種‘秀芳の力’においては、11枚の本葉中7枚に白さび病斑が認められた。大きさとしては直径1~2mmが25個、3mm以上が14個であった。これらはさらに拡大していった。ハイロヨモギには病斑は認められず、さらに強い抵抗性が認められた。雑種植物体では、1~3枚の本葉に病斑が認められ、大きさとしては直径1~2mmが1~8個、3mm以上は0~3個であった。これらの病斑が拡大しなかった(Table 8)。

Table 6. Morphological characteristics of intergenetic hybrid plants between chrysanthemum and wormwood in the greenhouse.

No.	Day of flowering (day/month/year)	Stem ¹⁾		Leaves ¹⁾			Flower characteristics							
		Length (cm)	Diameter (cm)	Number of leaves	Length (cm)	Width (cm)	Shape		Color	Diameter (mm)	Number of petals	Number of flowers	Chromosom number	Pollen fertility
1	25/09/98	86	0.4	58	7.3	3.2	double	spoon	pale yellow	26	44	48	68	-
2	25/10/98	57	0.4	35	5.2	3.1	double	spoon	pale yellow	24	46	6	68	-
3	05/10/98	45	0.5	33	5.7	3.3	double	spoon	pale pink	13	52	98	70	-
4	17/10/98	65	0.4	42	5.3	2.8	complex	spoon	pale pink	32	55	31	68	-
5	14/10/98	77	0.5	65	7.5	4.1	single	spoon	white	32	33	26	66	-
6	17/10/98	57	0.4	52	5.1	3.3	single	straw	pale pink	40	37	34	68	-
7	15/10/98	25	0.4	39	2.4	3.2	single	straw	pale pink	11	25	57	64	-
8	27/10/98	42	0.5	32	4.5	3.3	single	straw	white	15	39	34	68	-
9	25/10/98	44	0.4	26	2.3	2.3	single	straw	yellow	15	26	56	70	-
10	17/10/98	46	0.4	31	3.5	2.5	single	spoon	yellow	22	16	21	70	-
11	27/10/98	31	0.4	23	3.4	2.3	single	spoon	yellow	18	33	23	72	-
12	08/11/98	51	0.5	38	4.2	2.2	single	spoon	white	16	15	34	68	-
13	06/11/98	67	0.5	47	4.7	2.4	single	spoon	yellow	11	34	52	68	-
14	13/10/98	57	0.3	37	4.2	2.1	single	straw	pale pink	35	16	12	66	-
15	26/10/98	55	0.4	39	4.5	2.4	single	straw	white	32	25	15	68	-
16	21/10/98	29	0.4	16	3.0	3.2	single	straw	white	31	34	26	64	-
17	25/09/98	42	0.3	28	4.8	3.3	single	straw	yellow	14	33	33	66	-
18	02/10/98	53	0.4	36	5.0	3.5	single	straw	pale yellow	21	14	15	68	-
19	09/10/98	41	0.5	32	4.0	4.0	single	straw	pale yellow	22	15	25	62	-
20	22/10/98	44	0.3	28	5.3	3.2	single	straw	pale pink	35	17	32	70	-
21	26/10/98	58	0.4	34	4.0	3.5	single	spoon	white	12	24	12	68	-
22	19/10/98	68	0.5	46	5.2	3.3	single	straw	pale yellow	37	22	4	66	-
23	22/10/98	74	0.5	52	3.0	3.4	single	straw	white	21	46	7	68	-
Chrysanthemum	24/10/98	90	0.5	76	5.2	3.3	double	straw	white	109	231	17	54	+
Wormwood	30/08/98	186	1.3	107	20.3	9.0	-	-	yellow	12	-	120	18	+

¹⁾ The data of length, diameter or width means that measured at the middle height of that plant.

²⁾ The data means number of root, ±; 1-3, +; 4-6 and ++; up to 7.

³⁾ Chromosome number was counted on root tip which treated enzymes.



Fig. 8. Morphological feature of intergenetic somatic hybrid plants between chrysanthemum and wormwood. Scale bar indicates 50 mm.

A: Chrysanthemum 'Shuho-no-chikara'

B: Wormwood (seedling stage)

C-H: Somatic hybrid plants (C: No.1, D: No.2, E: No.3, F: No.4, G: No.6, H: No.7).

Table 7. Rooting ability of intergeneric somatic hybrids in test tube and soil.

No.	Test tube		Soil	
	The rate of rooting (%)	The day of rooting (days)	The rate of rooting (%)	The day of rooting (days)
Chrysanthemum	100.0	2.5	100.0	6.8
Wormwood	85.3	5.3	46.3	10.6
1	100.0	7.5	23.5	11.8
2	99.8	16.2	5.5	12.0
3	100.0	11.0	6.3	13.0
4	98.8	10.3	4.4	13.4
5	100.0	6.8	26.8	15.6
6	97.6	11.3	3.5	16.0
7	99.8	10.8	5.5	6.0
8	100.0	10.3	5.1	16.0
9	98.6	14.3	5.3	15.0
10	96.5	9.6	4.8	13.3
11	97.3	7.6	4.4	12.2
12	98.8	8.3	4.6	14.0
13	100.0	7.2	5.2	15.0
14	100.0	11.2	5.5	13.5
15	98.6	10.8	5.8	12.0
16	97.3	9.3	6.0	15.0
17	100.0	9.2	3.8	17.0
18	98.6	7.7	6.5	13.2
19	100.0	8.6	13.2	14.0
20	97.3	8.8	21.0	12.0
21	100.0	7.8	5.7	14.0
22	100.0	9.8	5.0	15.2
23	100.0	11.0	7.0	12.0

The data shows the average of 3 repetitions.

The 3-cm stem-length plant was planted in each test tube and the 5-cm stem-length plant was planted in soil, and the rate of rooting and the day of rooting were measured.

Table 8. Rust (*Pucconia horiana* Henning) resistance of intergenetic hybrid plants between chrysanthemum and wormwood in the greenhouse and field.

No.	In the greenhouse				In the field			
	Number of tested leaves	Number of infected leaves	Total No. of lesion		Number of leaves of a plant	Number of infected leaves	Number of lesion	
			1-2mm	up to 3mm			1-2mm	up to 3mm
Chrysanthemum	10	8	35	29	11	7	25	14
Wormwood	10	1	1	0	10	0	0	0
1	10	2	5	0	14	1	2	0
2	10	1	4	0	10	1	3	0
3	10	2	6	1	11	1	4	0
4	10	3	8	3	13	2	6	1
5	10	2	6	1	12	2	3	0
6	10	2	4	1	11	2	2	0
7	10	1	5	0	14	1	3	0
8	10	1	3	0	11	1	2	0
9	10	1	2	0	11	1	2	0
10	10	2	5	0	12	1	3	0
11	10	1	3	1	12	1	2	0
12	10	3	9	3	12	2	7	1
13	10	3	7	5	14	2	6	2
14	10	2	4	2	12	2	4	0
15	10	1	2	0	11	1	1	0
16	10	1	2	0	10	1	2	0
17	10	1	4	1	12	1	3	0
18	10	2	8	2	12	1	5	0
19	10	3	10	6	11	1	8	3
20	10	1	3	0	13	1	1	0
21	10	2	6	0	11	1	4	0
22	10	3	9	3	12	3	7	3
23	10	3	10	3	15	2	8	1

The data was measured 20 days after infection or co-planting.

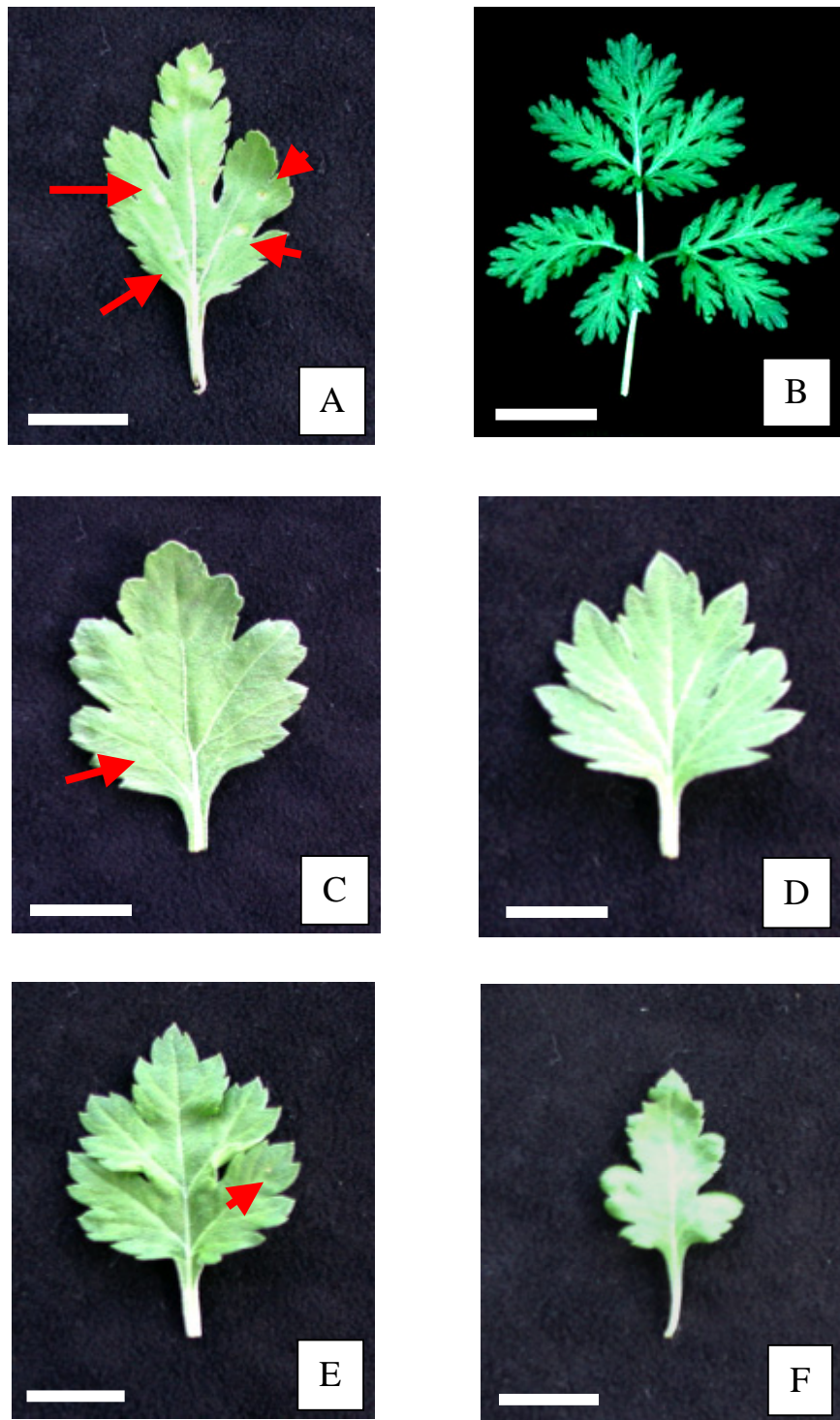


Fig. 9. Disease resistant test on the leaves of somatic hybrid plants and their parents, chrysanthemum and wormwood.

A: Chrysanthemum cultivar 'Shuho-no-chikara'.

B: Wormwood.

C-F: Somatic hybrid plants (C: No.1, D: No.2, E: No.6, F: No.7).

Scale bar indicates 20 mm.

Arrows indicates disease spots.

2 - 3 考察

キク科の中には、キク属にはない紫の花色を有するアスター [*Callistephus chinensis* (L.) Nees]、青色を有するシネリア [*Senecio x hybridus* (Willd.) Regal]、また、強い草勢と白さび病 (Rust; *Puccinia horiana* Henning) などの糸状菌病に抵抗性を持つ中国原産のハイロヨモギ (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex Willd.) (Tang *et al.* 2000) が存在するが、キク科においては属が異なると、通常の交雑では雑種種子が得られない。そこですでに確立されたプロトプラスト培養技術 (古田ら 1996) を用いて、キクとアスター、シネリアまたはハイロヨモギのプロトプラストを電気融合し、アスターやシネリアの花色、ハイロヨモギの草勢の強さや耐病性をキクに導入することを目的とした。

本研究では、先ずプロトプラスト同士の融合を図る電気融合条件について、材料であるキクとアスター、シネリアおよびハイロヨモギのプロトプラストを用いて検討したところ、融合細胞数、細胞分裂の有無および、コロニー形成頻度の観点から、電気融合条件は直流パルス幅 50 μ s、交流電圧 200 V/cm が最適であった。

この条件で細胞融合を行ったところ、キクとアスターでは、再分化植物体は得られなかったが、キクとシネリアおよびキクとハイロヨモギでは、再分化植物体を得ることができた。RFLP 法による雑種検定では、キクとシネリアではキクのバンドしか検出されなかったが、キクとハイロヨモギでは全個体が両親のバンドを共有しており、雑種性が認められた。染色体数の観察では、キクとシネリアの細胞融合で得られた再分化植物体の染色体数は $2n=54$ で、植物体の外観は、キクそのものであったのに対し、キクとハイロヨモギの細胞融合で得られた再分化植物体の染色体数は、 $2n=64$ から 72 であり、植物体の外観も両親の中間の形質であった。この原因として、遠縁な組合せほど、再分化植物体を得られないこと、再分化しても再分化の過程でどちらか一方の染色体が脱落することが報告されている (Gelba *et al.* 1980, Sundberg *et al.* 1986, Terada *et al.* 1987, Fahleson *et al.* 1988, Chatterjee *et al.* 1988)。今回の細胞融合においても、キクとアスターでは再分化植物体を得られないこと、キクとシネリアでは再分化植物体は得られたが、染色体数が $2n=54$ と両親を足した数値 114 の半数以下であり、再分化植物体の外観はキクと酷似していたことから、融合細胞の分裂もしくは再分化の過程でシネリアの染色体が脱落したと考えられる。さらにキクとハイロヨモギでは両親の染色体と形質を併せ持つ体細胞属間雑種が得られたことから、キクに一番近縁な植物種はハイロヨモギであり、ついでシネリア、アスターの順であると推測できる。

今回用いた培養技術がキクのプロトプラスト専用のものであり、アスター、シネリアおよびハイロヨモギのプロトプラストはこの方法では再分化できないこと、キクのプロトプラストを IOA 処理して不活化したため、キクのプロトプラストが生育するためには、アスター、シネリア、もしくはハイロヨモギのプロトプラストと融合し、活性のある細胞質を獲得せね

ばならないことから、理論的には、この培養条件で再分化してくる植物体はすべて両者の雑種であると考えられる。今回、キクとハイイロヨモギの細胞融合による再分化植物体全てにおいて、雑種性が認められたことから、比較的近縁な属間であれば、IOAによる雑種選抜が可能であり、今回確立した技術でキク科植物における体細胞属間雑種を作出できると考えられた。

作出されたキクとハイイロヨモギの体細胞属間雑種について、開花特性検定を行ったところ、両親の花色では白や黄色に加えて、ピンクやピンクと黄色の複輪も出現した。花の形も一重、二重、半八重、平弁、管弁など多様であった。こうした様々な形質変異が見られたのは、培養過程において、遺伝的相補性 (Genetic complement)、DNA のメチル化 (Kaepler and Phillips 1993)、トランスポゾン (Peschke *et al.* 1987、Ozeki *et al.* 1997) などによる体細胞変異 (Somaclonal variation) (Larkin and Scowcroft 1995、Kaepler *et al.* 2000) が起きたと考えられる。発現メカニズムは現段階では不明であり、解明には融合植物の遺伝解析が必要であるが、得られた体細胞変異はキク科における遺伝的多様性の拡大に大いに貢献できる。

さらに、作出された体細胞属間雑種では白さび病に対する強い抵抗性が認められたことから、細胞融合によって有用遺伝子を有する雑種獲得の可能性が認められた。また、雄性不稔形質が認められたことから、細胞融合による雄性不稔化 (Kumashiro and Kubo 1986) の実用性も示唆された。しかしながら、発根力が両親に比べて弱く、発根日数が長く、挿し芽による増殖が多少困難であることから、育種素材としての問題点が残った。

今後の課題としては、雑種植物体のめしべの稔性を調査するとともに、材料としては属間での細胞融合だけでなく、比較的近縁な種間の細胞融合 (Nakano *et al.* 1993) や遠縁な組合せでの非対称融合 (Yamanaka *et al.* 1992) も行うことで、雄性不稔や発根不良といった育種的な欠点がなく、さらに交雑育種では得られなかった形質を持ったキク科雑種の育成を目指すことが必要である。

まとめ

- 1) 細胞融合における電気融合条件は、融合細胞数、細胞の分裂およびコロニー形成数の程度から、直流パルス幅 50 μ s、交流電圧 250 V/cm が最適と考えられた。
- 2) 直流パルス幅 50 μ s、交流電圧 200 V/cm で細胞融合を行ったところ、キクとアスターでは、融合細胞の細胞分裂が 8 分裂期で止まり、コロニー形成には至らなかった。キクとシネリアでは 2,287 個のカルスから 14 個体の再分化植物体を得た。キクとハイロヨモギでは、3,864 個のカルスから、1,342 個体の再分化植物体を得た。
- 3) 順化に成功したキクとシネリアの再分化植物体 14 個体、キクとハイロヨモギの再分化植物体 1,342 個体について、RFLP 法と染色体数から雑種性を検定した。キクとシネリアではキクのバンドしか検出されなかったが、キクとハイロヨモギでは全個体が両親のバンドを共有しており、雑種性が認められた。
- 4) 染色体数の観察では、キクとシネリアの再分化植物体では、染色体数 $2n=54$ であったが、キクとハイロヨモギでは $2n=64\sim72$ であり、両親の染色体を共有していた。
- 5) 生育特性は、両親の形質を受け継ぐものから、両親の形質を超えるものまで、草姿、草丈、花形、花色などにばらつきが見られ、細胞融合による遺伝資源の拡大の可能性が示唆された。
- 6) 花粉稔性
花粉培地上に開花した花の花粉を置床したところ、23 個体とも花粉管の伸長は認められず、花粉稔性は無いと考えられる。
- 7) 発根試験
試験管および混合用土において、発根試験をおこなったところ、試験管内での発根程度(発根率および発根日数)は両親と同程度かやや劣る程度であったが、混合用土での発根程度は両親に比べてかなり低かった。
- 8) 白さび病抵抗性について、ガラスハウスおよび圃場で検定したところ、ハイロヨモギに近い抵抗性が観察された。病斑数も少なく、病斑も拡大が極めて抑制されていた。

第3章 遺伝子組換え技術の確立

生殖過程を経ずに有用遺伝子を導入する手法として、遺伝子組換え技術が開発され、現在までに様々な植物体で遺伝子の導入と導入遺伝子の発現が報告されている。キクの遺伝子組換えも数多く報告されているが、形質転換効率が低いこと (Renou *et al.* 1993、De Jong *et al.* 1994、Urban *et al.* 1994)、キメラ化を起こしやすいこと (Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995)、品種による効率の差が著しい (Benetka and Pavingerova 1995) などの問題点から、実用化が難しかった。また、導入した遺伝子がサイレンシングを起こして機能しなくなる (Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995、Takatsu *et al.* 2000) という報告もある。

そこでまず本研究では、遺伝子組換え技術の基礎となる、*Agrobacterium tumefaciens* の感染効率向上のための諸研究を行った。次にキメラ化 (Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995) を解決するため、再分化方法に着眼点を置き、外来遺伝子が安定して発現する植物体が効率よく作出できる系の確立を目的とした研究を行った。さらに上記研究において、外来遺伝子の導入効率が良く、導入した遺伝子が安定的に発現する遺伝子組換え技術を確立したので、この技術の他品種への応用を行った。

3 - 1 材料および方法

3 - 1 - 1 *Agrobacterium* 感染効率に関する研究

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’を用いた。昼温 25℃、夜温 20℃ に設定したガラスハウスで栽培したキク植物体（茎長約 5 cm）を、70%エタノールで 30 秒間処理し、1%次亜塩素酸ナトリウムに 15 分間浸漬して消毒した。滅菌水で 3 回洗浄した後、実体顕微鏡下で葉原基を有しない生長点を約 0.5 mm 以下の大きさで無菌的に摘出し、外植体とした。MS 基本培地に置床した。培地はオートクレーブにて 121℃、15 分間の滅菌処理を予め行っておいた。植物体は 25℃、16 時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] 下で培養し、無菌植物体を育成した。

(2) 培養および調査

1) *Agrobacterium* の調整

Agrobacterium は、ベクター-pIG121-Hm (Ohta *et al.* 1990、Hiei *et al.* 1994) を持つ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (名古屋大学中村研三教授より分譲、Fig. 10) 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* (neomycin phosphotransferase) 遺伝子と *hpt* (hygromycin phosphotransferase) 遺伝子、レポーター遺伝子であるイントロンを含む *gus* (β -D-glucuronidase) 遺伝子が構築されている。*npt* 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* の培養には、YEP 培地 (10 g/l Bacto pepton, 10 g/l Bacto yeast extract, 5 g/l NaCl) を用い、振とう培養 (28℃、200 rpm) を行った。この菌液を懸濁培地 (MS 基本培地; 3% sucrose、pH5.8) で希釈 ($\text{OD}_{600} = 0.2$) し、10 mg/l アセトシリンゴンを加えて感染液とした。

(3) 形質転換効率向上のための諸条件の検討

1) 選抜条件の検討

材料の本葉を 6 mm 径コルクボーラーで打ち抜いて葉片を作成した。この葉片をカルス誘導培地 [MS 基本培地; 1 mg/l NAA (naphthalic acid), 0.5 mg/l BA、(6-benzyladenin)、3% sucrose、0.3% Gellan gum (Pure chemical Inc., Japan)、pH5.8] で前培養し、0 ~ 21 日後に選抜物質 G418 を添加した選抜培地 (MS 基本培地; 1 mg/l NAA、0.5 mg/l BA、3% sucrose、0.3% Gellan gum、0 ~ 50 mg/l G418、pH5.8) へ置

床した。葉片は2週間ごとに合計3回、新しい選抜培地に移植し、最初の選抜培地を選抜1回目とし、その後2~4回目とした。移植前に生存している葉片数を計測し、生存葉片数とした。試験は、1シャーレ ($\phi=9$ cm) 9葉片で、1区6シャーレを用いた。

2) 切片の作成方法と感染処理時間の検討

材料の本葉をメスで5 mm角に切断した葉片と、6 mm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1~60分間浸漬した。24時間前培養した *Agrobacterium* 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 基本培地; 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, pH5.8) に置床し、25℃、暗黒下で3日間共存培養した。感染から3日目に後述の方法でGUS染色を行い、ブルースポット数を計測した。試験は、1シャーレ ($\phi=9$ cm) 9葉片で、1区6シャーレを用いた。

3) *Agrobacterium* 培養時間と感染処理時間の検討

Agrobacterium を0、1、5、24時間培養した感染液に葉片を、それぞれ1~60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日目に後述の方法でGUS染色を行い、ブルースポット数を計測した。試験は、1シャーレ ($\phi=9$ cm) 9葉片で、1区6シャーレを用いた。

4) 共存培地中のカザミノ酸の添加効果と感染処理時間の検討

6 mm径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、感染液に1~60分間浸漬した。5時間前培養した *Agrobacterium* 感染液に葉片を浸漬した後、濾紙で菌液を軽くふき取り、カザミノ酸添加 (0.1~7.5 g/l) 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日目に後述の方法でGUS染色を行い、ブルースポット数を計測した。試験は、1シャーレ ($\phi=9$ cm) 9葉片で、1区6シャーレを用いた。

5) 感染液中の界面活性剤の添加効果

6 mm径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、界面活性剤0.5~10.0%添加および無添加の感染液に15分間浸漬した。*Agrobacterium* の前培養を5時間行った後、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日目に後述の方法でGUS染色を行い、ブルースポット数を計測した。試験は、1シャーレ ($\phi=6$ cm) 9葉片で、1区6シャーレを用いた。

(4) GUS 染色の検定

感染から3日目の葉片を、下記の試薬に浸漬 (37℃、1~2晩) 後、70%エタノール

で脱色し、光学顕微鏡下で観察した。これは、Jefferson *et al.* (1987) の方法を改良したものである。

1.0 mM	X-Glucuronide
0.5 mM	フェリシアン化カリウム
0.5 mM	フェロシアン化カリウム
0.3%	Triton X-100
5.0%	メタノール
50.0 mM	NaH ₂ PO ₄ (pH7.0)

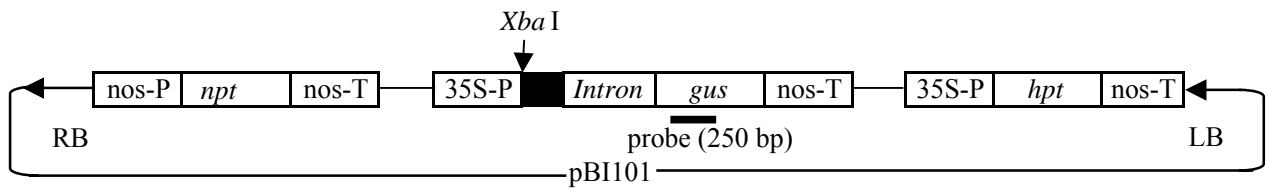


Fig. 10. Map of the binary vector pIG121-Hm.

pIG121-Hm was constructed from pBI101 vector (Jefferson *et al.* 1987),

pIG221(35S-P:*Intron gus*; Ohta *et al.* 1990) and pLAN101MHYG

(*hpt*; Dr. K. Shimamoto).

RB, Right border; LB, Left border; nos-P, nopaline synthase promoter; nos-T,

nopaline synthase terminator; 35S-P, cauliflower mosaic virus 35S promoter;

npt, neomycin phosphotransferase gene; *Intron*, the intron of castor bean catalase gene

within the N-terminal part of the *gus* gene coding sequence; *gus*, β -D-glucuronidase

gene; *hpt*, hygromycin phosphotransferase gene; A probe used for Southern blot

analysis of *Xba* I-digested DNAs (250-bp PCR product) was indicated below

the *gus* gene.

3 - 1 - 2 再分化方法に関する研究

3 - 1 - 2 - 1 不定芽由来再分化系の確立

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’を用い、3 - 1 - 1と同様に生長点を 0.5 mm 以下で無菌的に摘出し、無菌植物体を育成した。

(2) 試験方法および培養方法

培地は固形培地とし、MS 基本培地に種々の種類と濃度のオーキシンとサイトカイニン [NAA-BA 区、NAA-Kin (kinetin) 区、IAA (indole acetic acid) -BA、IAA-Kin 区] を添加した。いずれの培地も sucrose 3%を添加して pH5.8 の調整後、0.3 % Gellan Gum で固化した。121 ℃、15 分間オートクレーブし、シャーレ (φ=9 cm) に 20 ml ずつ分注した。

無菌植物体より展開したばかりの本葉を採取し、6 mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を 1 シャーレあたり 9 枚ずつ置床し、25 ℃、16 時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) =60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 下で培養した。30 日後、不定芽等の形成を調査した。1 区 10 シャーレ行った。

3 - 1 - 2 - 2 カルス由来再分化系の確立

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’を用い、3 - 1 - 1と同様の方法で、無菌植物体を育成した。

(2) 培養および調査

3 - 1 - 2 - 1の各ホルモン処理区で最もカルスを形成した植物ホルモンの組合せで誘導されたカルスを材料に用いた。NAA 1 mg/l-BA 0.5 mg/l、NAA 1 mg/l-Kin 1 mg/l、IAA 1 mg/l-BA 0.5 mg/l および、IAA 1 mg/l-Kin 1 mg/l を添加したカルス誘導培地で形成されたカルスをメスで 5 mm 角に切断し、再分化培地 (MS 基本培地; 0.5 mg/l BA、0.2 mg/l GA₃、3% sucrose、0.3% Gellan gum、pH5.8、古田ら 1996) に1シャーレあたり 9 個ずつ置床し、25℃、16 時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400~700 nm) =60 μmol·m⁻²·s⁻¹] 下で培養した。再分化培地は 20 日ごとに 3 回更新し、その都度カルスは 5 mm 角に切断した。再分化培地置床から 10 日ごとに 80 日目まで、再分化した植物体数を計測した。1 試験区あたり 10 シャーレ、3 反復行った。

3 - 1 - 2 - 3 再分化方法による遺伝子組換え体の獲得効率の違い

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’を用いて、3 - 1 - 1と同様に、無菌植物体を育成した。

(2) 形質転換方法

1) *Agrobacterium* の調整

Agrobacterium は、ベクター-pIG121-Hm を持つ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Fig. 10) を使用した。*Agrobacterium* の前培養には、YEP 培地を用い、5 時間の振とう培養 (28 ℃、200 rpm) を行った。この菌液を $OD_{600}=0.2$ に調整し、アセトシリンゴン 10 mg/l と界面活性剤 Tween 20 を 5.0% 添加して感染液とした。

2) 再分化系の検討

形質転換体の獲得効率について、カルス経由の再分化 (CI) と不定芽由来再分化 (SI) の 2 方法について検討した。3 - 1 - 2 - 1と同様に、6 mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、感染液に 20 分間浸漬した。5 時間前培養した *Agrobacterium* 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 1 g/l を添加した CI 共存培地 (MS 基本培地; 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, pH5.8) または、SI 共存培地 (MS 基本培地; 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, pH5.8) に置床し、25 ℃、暗黒下で 3 日間共存培養した。共存培養後直ちに、葉片を CI 除菌培地 (MS 基本培地; 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 250 mg/l cefotaxim sodium salt, pH5.8) または、SI 除菌培地 (MS 基本培地; 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 250 mg/l cefotaxim sodium salt, pH5.8) に移植し、25 ℃、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$], 16 時間日長下で培養し、感染より 10 日後、葉片を CI 選抜培地 (MS 基本培地; 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 250 mg/l cefotaxim sodium salt, G418 20 mg/l, pH5.8) および SI 選抜培地 (MS 基本培地; 2 mg/l NAA, 1 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 250 mg/l cefotaxim sodium salt, G418 20 mg/l, pH5.8) に移植し、25 ℃、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$], 16 時間日長下で培養し、2 週間ごとに 3 回継代した。その後は CI 選抜培地 (MS 基本培地; 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 100 mg/l cefotaxim sodium salt, G418 20 mg/l, pH5.8) および SI 選抜培地 (MS 基本培地; 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 100 mg/l cefotaxim sodium salt, G418 20 mg/l, pH5.8) へ移植し、2 週間ごとに 2 回継代した。CI 選抜培地 につ

いては、緑色のカルスが分化してきたら、葉片ごと再分化培地 (MS 基本培地; 0.5 mg/l BA, 0.2 mg/l GA₃, 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 100 mg/l cefotaxim sodium salt, pH5.8) に移植し、25 ℃、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 μmol · m⁻² · s⁻¹], 16 時間日長下で培養し、3 週間ごとに継代し、再分化を促した。再分化培地および SI 選抜培地上で再分化してきたシュートは、発根培地 (MS 基本培地; 3% sucrose, 0.3% Gellan gum, 250 mg/l cefotaxim sodium salt, pH5.8) に移植し、25 ℃、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 μmol · m⁻² · s⁻¹], 16 時間日長下で培養し発根を促した (Table 9)。

(3) 導入遺伝子の確認

1) GUS 染色

Jefferson *et al.* (1987) の方法を改良した 3 - 1 - 1 の方法で行った。

2) サザンプロット分析

DNA の抽出

再分化植物体の本葉 100mg を液体窒素で粉碎し、Takagi *et al.* (1993) の方法に従って HEPES Buffer [0.1M HEPES (pH8.0), 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP), 4% 2-mercaptoethanol] で 3 回洗浄し、Alkali-SDS 法 (Honda and Hirai 1990) を用いて、ゲノム DNA を抽出した。

サザンプロット分析

ゲノム DNA 15 μg を制限酵素 *Xba* で消化し、0.8% アガロースゲル中で電気泳動し、positive charged Nylon membranes (Roche & Boehringer Mannheim, Germany) にアルカリプロットした。DIG (digoxigenin) labeling & detection kit (Roche & Boehringer Mannheim, Germany) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、GUS 遺伝子をコードする 250bp 部分を以下のプライマーを用いて Polymerase chain reaction (PCR) 法 (Saiki *et al.* 1988) にて増幅し、これをプローブとし、CDP star (Roche & Boehringer Mannheim, Germany) を用いて検出を行った。

Forward 5'-GTAGAAACCCCAACCCGTGA-3'

Reverse 5'-GTGACCGCATCGAAACGCAGCAC-3'

Table 9-1. Time table for transformation of chrysanthemum.

1) Transformation using the callus induction (CI) system.

Day	Procedure
0	Culture <i>Agrobacterium</i> in liquid LB medium for 5 h Immerse leaf segments into MS liquid medium containing <i>Agrobacterium</i> for 30 min Cocultivate leaf segments with <i>Agrobacterium</i> on cocultivation CI medium
3	(End of cocultivation for 3 days) Transfer to bacteria elimination CI medium
10	Transfer to selection CI medium (selection of putative transformed cells)
24	Transfer to fresh selection CI medium
38	Transfer to fresh selection CI medium (Callus induction on the edge of leaf segments)
52	Transfer to selection CI medium
66	Transfer to fresh selection CI medium
80	Transfer G418-resistant calli to plantlet regeneration medium
101	Transfer to fresh plantlet regeneration medium
122	Transfer to fresh plantlet regeneration medium (shoot regeneration) Collect elongating shoots (first collection) and transfer to rooting medium
143	Transfer remaining shoots and calli to fresh plantlet regeneration medium Collect elongating shoots (second collection) and transfer to rooting medium
143-180	Transfer rooted plantlets to green house
200 onwards	Plants available for testing

Medium construction

CI medium: MS+NAA 1.0 mg l⁻¹, BA 0.5 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%

Cocultivation CI medium: MS+NAA 1.0 mg l⁻¹, BA 0.5 mg l⁻¹, Casamino acids 1.0 g l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%

Bacteria elimination CI medium: MS+NAA 1.0 mg l⁻¹, BA 0.5 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%, Cef. 250 mg l⁻¹

Selection CI medium : MS+NAA 1.0 mg l⁻¹, BA 0.5 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%, Cef. 250 mg l⁻¹, G418 20 mg l⁻¹

Selection CI medium : MS+NAA 1.0 mg l⁻¹, BA 0.5 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel 0.3%, Cef. 100 mg l⁻¹, G418 20 mg l⁻¹

Plantlet regeneration medium: MS+BA 0.5 mg l⁻¹, GA₃ 0.2 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.4%, Cef. 100 mg l⁻¹

Rooting medium: MS+ Suc. 3%, Gel. 0.4%, Cef. 100 mg l⁻¹

*Cef. : Cefotaxime sodium salt

Suc. : Sucrose

Gel. : Gellan Gum

Table 9-2. Time table for transformation of chrysanthemum.

2) Transformation using adventitious shoot induction (SI) system.

Day	Activity
0	Culture <i>Agrobacterium</i> in liquid LB medium for 5 h Immerse leaf segments into MS liquid medium containing <i>Agrobacterium</i> for 30 min Cocultivate leaf segments with <i>Agrobacterium</i> on cocultivation SI medium
3	(End of cocultivation for 3 days) Transfer to bacteria elimination SI medium
10	Transfer to fresh selection SI medium
24	Transfer to fresh selection SI medium
38	Transfer to fresh selection SI medium
52	Transfer to selection SI medium Collect elongating shoots (first collection) and transfer to rooting medium
66	Transfer remaining shoots to fresh selection SI medium Collect elongating shoots (second collection) and transfer to rooting medium
80-120	Transfer rooted plantlets to green house
140 onwards	Plants available for testing

Medium construction

SI medium : MS+NAA 2.0 mg l⁻¹, BA 1.0 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%

Cocultivation SI medium : MS+NAA 2.0 mg l⁻¹, BA 1.0 mg l⁻¹, Casamino acids 1.0 g l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%

Bacteria elimination SI medium: MS+NAA 2.0 mg l⁻¹, BA 1.0 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%, Cef. 250 mg l⁻¹

Selection SI medium : MS+NAA 2.0 mg l⁻¹, BA 1.0 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%, Cef. 250 mg l⁻¹, G418 20 mg l⁻¹

Selection SI medium : MS+NAA 2.0 mg l⁻¹, BA 1.0 mg l⁻¹, Suc. 3%, Gel. 0.3%, Cef. 100 mg l⁻¹, G418 20 mg l⁻¹

Rooting medium: MS+ Suc.3 %, Gel. 0.4%, Cef. 100 mg l⁻¹

*Cef. : Cefotaxime sodium salt

Suc. : Sucrose

Gel. : Gellan Gum

3 - 1 - 3 遺伝子組換え技術の他品種への応用

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’他 21 品種を用いた (Table 18)。3 - 1 - 1と同様、ガラスハウスで栽培したキク植物体 (茎長約 5 cm) を、70%エタノールで 30 秒間処理し、1%次亜塩素酸ナトリウムに 15 分間浸漬して消毒した。滅菌水で 3 回洗浄した後、実顕微鏡下で葉原基を有しない生長点を約 0.5 mm 以下で無菌的に摘出し、外植体とした。MS 基本培地に置床した。培地はオートクレーブにて 121 °C、15 分間の滅菌処理を行った。植物体は 25 °C、16 時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 下で培養し、無菌植物体を育成した。

(2) 形質転換方法

1) *Agrobacterium* の調整

Agrobacterium は、ベクター pIG121-Hm (Fig. 10) を持つ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 を使用し、3 - 1 - 2 - 3と同様の方法で感染用の *Agrobacterium* を調整した。

2) 形質転換方法の検討

感染に先立ち、*Agrobacterium* への感染程度、カルス誘導培地 (CI) でのカルス誘導および再分化培地での再分化能の有無、選抜様抗生物質 G418 の濃度について検討した。*Agrobacterium* への感染程度については、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。再分化能については、*Agrobacterium* 感染を行わない葉片を用いて、CI および再分化培地での再分化試験を行った。G418 濃度については、確立されたカルス経由の形質転換方法 (CI system、Table 16 および Fig. 12) により、G418 を 10-50 mg/l 添加した選抜培地を用いて行った。各シャーレ ($\phi = 9$ cm) に 9 枚ずつ葉片を置床し、1 区 20 シャーレ用いた。

(3) 導入遺伝子の確認

1) GUS 染色

Jefferson *et al.* (1987) の方法を改良した 3 - 1 - 1 の手法で行った。

2) サザンブロット分析

DNA の抽出

再分化植物体の本葉から、3 - 1 - 2 - 3の方法で、ゲノム DNA を抽出した。

サザンプロット分析

抽出したゲノム DNA15 μg を3 - 1 - 2 - 3の方法でサザンプロット (Southern 1975)を行い、導入遺伝子の確認を行った。

3 - 2 結果

3 - 2 - 1 *Agrobacterium* 感染効率に関する研究

1) 選抜条件の検討

結果を Table 10 に示す。葉片を共存培地に置床後 0 日目に選抜培地へ移植すると、G418 10 mg/l 以上で、全くカルスは形成されなかった。置床後 3 日目に選抜培地へ移植すると、選抜物質 G418 の濃度 20 mg/l 以上で、すべての葉片が褐変して死滅した。10 mg/l では、選抜 1 回目に 2.0 個の葉片が生存したが、選抜 4 回目にはすべて死滅した。置床後 7 日目に選抜培地へ移植すると、選抜物質 G418 すべての濃度において、選抜 1 回目には殆どの葉片が生存したが、10 および 20 mg/l では選抜 4 回目に、また 30 mg/l 以上では、選抜 3 回目にすべての葉片が死滅した。置床後 10 および 14 日目に選抜培地へ移植すると、選抜物質 G418 の濃度 10 mg/l 以上で、選抜 1 回目には殆どの葉片が生存したが、選抜 4 回目にはすべて死滅した。置床後 21 日目に選抜培地へ移植すると、選抜物質 G418 の濃度 10 mg/l 以上で、選抜 1 回目には殆どの葉片が生存したが、選抜 4 回目には 10 mg/l の区を除いてすべて死滅した。10 mg/l の区では、葉片は褐変しなかったものの、カルスを形成することはなかった。

以上により、選抜は G418 20 ~ 30 mg/l で、選抜開始時期は感染から 7 ~ 10 日目に行うのが最適であると思われた。

2) 葉片の作成方法と感染処理時間の検討

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とコルクボーラーで打ち抜いた葉片の、GUS 染色による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 (Table 11 および Fig. 11)。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は、双方とも時間が経つにつれブル - スポット数は増加し、メスでは 30 分以降、コルクボーラーでは 20 分以降に横ばいになった。

最もブルースポット数が多くなったのは、葉片をコルクボーラーで作成し、*Agrobacterium* 感染液に 20 分間浸漬した区であり、1 葉片あたり 86.1 ± 2.5 個のブルースポットが確認された。

3) *Agrobacterium* 培養時間と感染処理時間の検討

Agrobacterium などの細菌類は、対数曲線を描いて増殖する (Fig. 12)。この増殖時期 (培養時間) が感染効率におよぼす影響を検討した。*Agrobacterium* の培養を開始してから、対数増殖期にあたる 5 時間までは、ブルースポット数が増加したが、その後ブ

ブルースポット数は一定もしくは、減少する傾向にあった。また、感染時間 20 分までは、ブルースポット数は増加したが、30 分以上ではブルースポット数が減少する傾向があった (Table 12)。

最もブルースポット数が多くなったのは、*Agrobacterium* を 5 時間前培養した感染液に、葉片を 20 分間浸漬した区であり、1 葉片あたり 117.1 ± 2.3 個のブルースポットが確認された。

4) 共存培地中のカザミノ酸の添加効果と感染処理時間の検討

カザミノ酸は、pH 緩衝剤などとして、イネの培養系にも一般的に用いられている。また、菌類の培養培地には、生育促進効果のある栄養剤として添加されている。そこで *Agrobacterium* と葉片とを共存させる共存培地にカザミノ酸を添加し、感染に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 1.0 g/l までは増加していたが、それ以上の濃度では、*Agrobacterium* が異常に増殖し、葉片が枯死してしまった (Table 13)。

感染時間 20 分まではブルースポット数が増加したが、それ以上ではブルースポット数が減少した。

最もブルースポット数が多くなったのは、*Agrobacterium* 感染液に葉片を 20 分間浸漬し、カザミノ酸 1.0 g/l 添加した共存培地で培養した区であり、1 葉片あたり 154.3 ± 0.7 個のブルースポットが確認された。

5) 界面活性剤の添加効果

キク葉片の表面には、細かな毛耳が密生しているため、*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と考えられる。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。

Triton X-100 は 1.0%以上になると、葉片が脱水症状を起こして枯死した。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が、7.5%以上では効果が劣った (Table 14)。

最もブルースポット数が多くなったのは、Tween 20 を 5%添加した区であり、1 葉片あたり 131.2 ± 0.6 個のブルースポットが確認された。

Table 10. Effect of the concentration and selection stage with G418 for elimination of non-transgenic cells.

Concentration of G418 (mg/l)	Start day of selection after culture initiation (days)																							
	0				3				7				10				14				21			
	Selection number ¹⁾																							
	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	9.5	9.0	9.0	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	0.5	0.0	8.0	7.0	4.0	0.0	8.0	6.5	4.0	0.0	9.0	8.0	3.0	0.0	9.0	7.0	5.0	2.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.5	2.0	1.5	0.0	8.5	3.0	1.5	0.0	8.5	6.0	3.5	0.0	8.3	5.0	4.5	0.0
30	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	3.5	0.0	0.0	9.0	3.0	1.3	0.0	9.0	6.0	3.3	0.0	9.3	6.0	4.0	0.0
40	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	2.3	0.0	0.0	9.0	3.5	2.0	0.0	9.0	7.0	2.0	0.0	9.0	5.5	4.0	0.0
50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	0.0	0.0	0.0	9.0	2.0	1.0	0.0	9.0	5.0	1.0	0.0	9.0	6.0	3.3	0.0

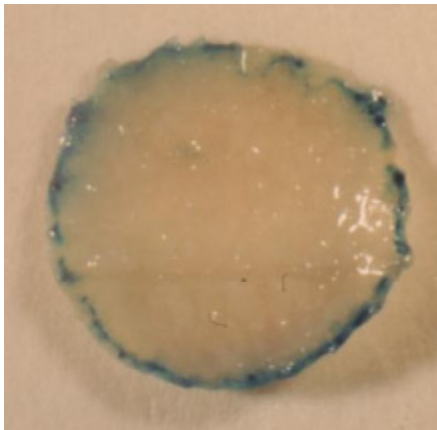
¹⁾ The selection number indicates the number of subculture each 2 weeks to selection medium.

The data shows the number of survived leaf segments on the selection medium.

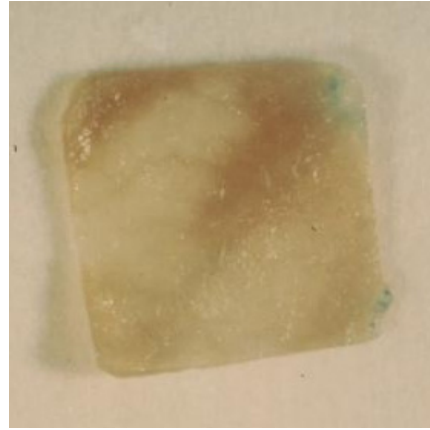
Table 11. Influence of the cutting methods by scalpel and cork-borer and the immersing time in *Agrobacterium* solution.

Time of immersing (min.)	The number of blue spots ¹⁾	
	scalpel	cork-borer
1	0.0 ± 1.6	33.2 ± 2.1
5	16.6 ± 2.2	36.8 ± 3.1
10	19.7 ± 0.6	56.9 ± 0.6
20	16.8 ± 1.3	86.1 ± 2.5
30	43.6 ± 0.9	82.3 ± 0.5
40	40.6 ± 2.6	85.3 ± 2.1
50	45.7 ± 1.6	82.3 ± 1.6
60	48.3 ± 2.4	79.6 ± 3.3

¹⁾ The data shows the number of blue spots per one leaf segment, average±SE.



A: Cork-borer



B: Scalpel

Fig. 11. Influence of the cutting methods on GUS assay.
The each segments were co-cultured with *Agrobacterium* for 3 days and immersed in GUS buffer on overnight at 37 °C.

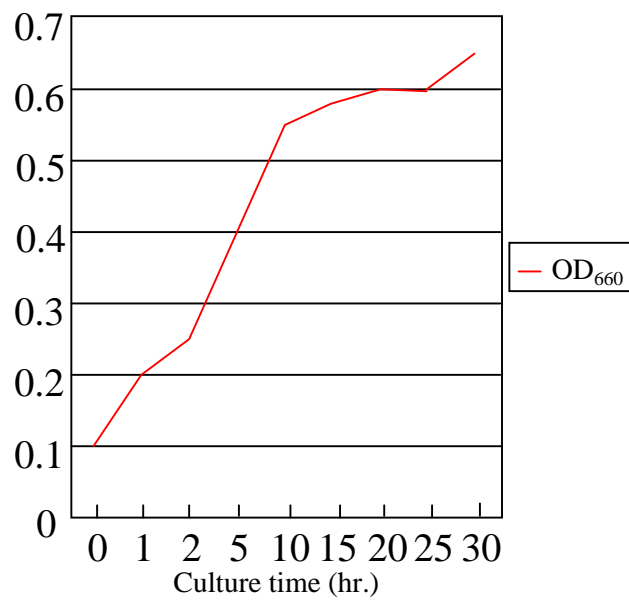


Fig. 12. *Agrobacterium* growth curve in YEP liquid medium.

Table 12. Influence of culturing time of *Agrobacterium* on GUS expression 3 days after co-culture.

Time of immersing (min.)	Time of pre-culture with <i>Agrobacterium</i> (hr.) ¹⁾				
	0	1	5	8	24
1	7.3 ± 1.2	3.3 ± 1.3	17.4 ± 0.7	13.2 ± 1.2	17.6 ± 1.4
5	6.2 ± 4.2	30.4 ± 2.0	55.3 ± 1.4	40.2 ± 1.6	43.8 ± 2.0
10	13.6 ± 2.3	27.8 ± 0.9	88.4 ± 1.6	75.4 ± 1.0	86.0 ± 2.6
20	25.4 ± 1.6	50.2 ± 2.4	117.1 ± 2.3	92.1 ± 0.9	83.1 ± 1.0
30	24.6 ± 1.5	53.9 ± 2.2	107.5 ± 3.1	71.3 ± 2.2	84.2 ± 1.7
60	18.2 ± 0.6	40.6 ± 1.6	52.1 ± 2.0	50.2 ± 3.1	43.8 ± 0.5

¹⁾ The data shows the number of blue spots per one leaf segment, average±SE.

Table 13. Effect of casamino acids on the infection of *Agrobacterium*.

Time of immersing (min.)	Concentration of casamino acids ¹⁾						
	0.0	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5
1	63.2 ± 1.2	65.1 ± 1.2	86.9 ± 1.7	91.0 ± 1.5	rot	rot	rot
5	58.9 ± 0.4	55.6 ± 2.0	91.2 ± 2.1	105.3 ± 2.2	rot	rot	rot
10	90.2 ± 1.6	87.6 ± 3.0	102.5 ± 1.6	126.3 ± 1.6	rot	rot	rot
20	118.3 ± 2.0	120.8 ± 0.4	123.3 ± 0.8	154.3 ± 0.7	rot	rot	rot
30	105.3 ± 1.7	96.3 ± 0.8	99.3 ± 1.4	120.3 ± 0.8	rot	rot	rot
60	95.4 ± 2.0	75.2 ± 0.7	74.2 ± 0.7	86.4 ± 0.1	rot	rot	rot

¹⁾ The data shows the number of blue spots per one leaf segment, average±SE.

Table 14. Effect of detergents on the infection of *Agrobacterium*.

Detergents	Concentration (%)	No. of blue spots ¹⁾
Tween 20	0.5	43.6 ± 1.4
	1.0	87.2 ± 2.1
	2.5	99.6 ± 2.0
	5.0	131.2 ± 0.6
	7.5	77.6 ± 0.7
	10.0	33.8 ± 2.1
Triton X-100	0.5	21.1 ± 2.2
	1.0	rot
	2.5	rot
	5.0	rot
	7.5	rot
	10.0	rot
Control		21.6 ± 0.8

¹⁾ The data shows the number of blue spots per one leaf segment, average±SE.

3 - 2 - 2 再分化方法に関する研究

3 - 2 - 2 - 1 不定芽由来再分化系の確立

(1) NAA、IAA、BA、Kin 単独処理区

NAA 単独処理区 (N05、N1、N2)、IAA 単独処理区 (I05、I1、I2)、BA 単独処理区 (B05、B1、B2) および Kin 単独処理区 (K05、K1、K2) では、いずれも 置床後約 10 日目から葉片の切断面および表面に黄白色のカルスが形成された。不定芽は置床から 50 日経っても形成されなかった (Table 15)。

(2) NAA-BA 区

NAA と BA を両方添加した処理区では、置床後 10 日目から葉片の切断面および表面に黄白色のカルスが形成された。カルの形成頻度は、N1B05 (1 mg/l NAA-0.5 mg/l BA) の区で最も高かった。また置床から 30 日目より切断面上のカルスを押し除ける形で、不定芽が形成された。不定芽の形成頻度は、N2B1 (2 mg/l NAA-1 mg/l BA) で最も高く、1 葉片あたり平均 60.1 ± 1.9 個であった (Table 15、Fig. 13A)。

(3) NAA-Kin 区

NAA と Kin を両方添加した処理区では、置床後 10 日目から葉片の切断面および表面に黄白色のカルスが形成された。カルの形成頻度は、N1K1 (1 mg/l NAA-1 mg/l Kin) の区で最も高かった。また置床から 30 日目より切断面上のカルスを押し除ける形で、不定芽が形成された。不定芽の形成頻度は、N2K2 (2 mg/l NAA-2 mg/l Kin) で最も高く、1 葉片あたり平均 36.7 ± 0.4 個であった (Table 15、Fig. 13B)。

(4) IAA-BA 区

IAA と BA を両方添加した処理区では、置床後 10 日目から葉片の切断面および表面に黄白色のカルスが形成された。カルの形成頻度は、I1B05 (1 mg/l IAA-0.5 mg/l BA) の区で最も高かった。また置床から 40 日目より切断面上のカルスを押し除ける形で、不定芽が形成された。不定芽の形成頻度は、I2B1 (2 mg/l IAA-1 mg/l BA) の区で最も高く、1 葉片あたり平均 44.8 ± 1.3 個であった (Table 15、Fig 13C)。

(5) IAA-Kin 区

IAA と Kin 処理区では、置床後 10 日目から葉片の切断面および表面に黄白色のカルスが形成された。カルの形成頻度は、I1K1 (1 mg/l IAA-1 mg/l Kin) の区で最も高かった。また置床から 40 日目より切断面上のカルスを押し除ける形で、不定芽が形成さ

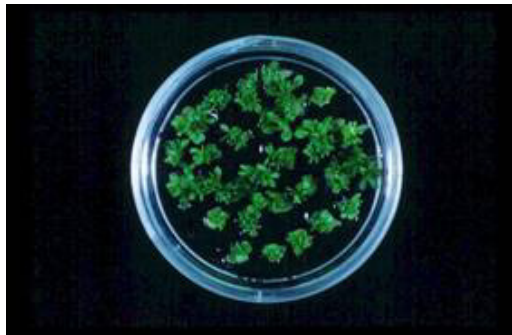
れた。不定芽の形成頻度は、I2K2 (2 mg/l IAA-2 mg/l Kin) の区で最も高く、1 葉片あたり平均 13.0 ± 1.8 個であった (Table 15、Fig. 13D)。

Table 15. Influence of phytohormone combination on callus and adventitious shoot formation.

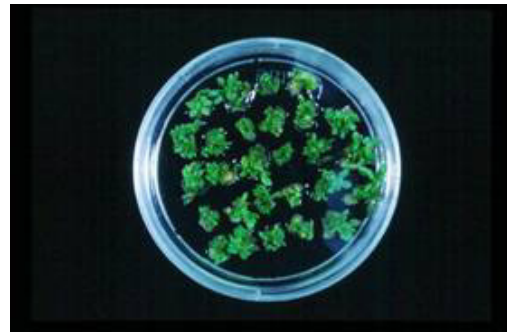
Media	Additional substances				Callus formation ¹⁾	No. of adventitious shoot per leaf segment ²⁾	
	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BA (mg/l)	Kin (mg/l)			
MS	Control	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0 ± 0.0
	B05	0.0	-	0.5	-	+	0.0 ± 0.0
	B1	0.0	-	1.0	-	+	0.0 ± 0.0
	B2	0.0	-	2.0	-	+	0.0 ± 0.0
	N05	0.5	-	0.0	-	±	0.0 ± 0.0
	N05B05	0.5	-	0.5	-	++	19.1 ± 0.5
	N05B1	0.5	-	1.0	-	++	20.1 ± 1.6
	N05B2	0.5	-	2.0	-	++	18.2 ± 2.0
	N1	1.0	-	0.0	-	±	0.0 ± 0.0
	N1B05	1.0	-	0.5	-	+++	18.1 ± 0.6
	N1B1	1.0	-	1.0	-	++	30.1 ± 1.5
	N1B2	1.0	-	2.0	-	++	40.6 ± 1.9
	N2	2.0	-	0.0	-	±	0.0 ± 0.0
	N2B05	2.0	-	0.5	-	+	24.3 ± 2.2
	N2B1	2.0	-	1.0	-	++	60.1 ± 1.9
	N2B2	2.0	-	2.0	-	++	37.8 ± 2.6
	K05	0.0	-	-	0.5	+	0.0 ± 0.0
	K1	0.0	-	-	1.0	+	0.0 ± 0.0
	K2	0.0	-	-	2.0	+	0.0 ± 0.0
	N05K05	0.5	-	-	0.5	+	7.6 ± 1.3
	N05K1	0.5	-	-	1.0	++	10.1 ± 2.3
	N05K2	0.5	-	-	2.0	++	9.6 ± 1.3
	N1K05	1.0	-	-	0.5	++	9.2 ± 1.6
	N1K1	1.0	-	-	1.0	+++	18.1 ± 3.2
	N1K2	1.0	-	-	2.0	++	16.1 ± 2.9
	N2K05	2.0	-	-	0.5	+	12.4 ± 1.3
	N2K1	2.0	-	-	1.0	++	20.1 ± 0.6
	N2K2	2.0	-	-	2.0	++	36.7 ± 0.4
	I05	-	0.5	0.0	-	±	0.0 ± 0.0
	I05B05	-	0.5	0.5	-	++	8.1 ± 2.0
	I05B1	-	0.5	1.0	-	++	20.1 ± 1.3
	I05B2	-	0.5	2.0	-	+	32.1 ± 1.9
	I1	-	1.0	0.0	-	±	0.0 ± 0.0
	I1B05	-	1.0	0.5	-	+++	5.2 ± 0.3
	I1B1	-	1.0	1.0	-	++	10.1 ± 4.1
	I1B2	-	1.0	2.0	-	++	12.1 ± 0.6
	I2	-	2.0	0.0	-	±	0.0 ± 0.0
	I2B05	-	2.0	0.5	-	+	10.1 ± 2.1
	I2B1	-	2.0	1.0	-	+	44.8 ± 1.3
	I2B2	-	2.0	2.0	-	++	30.8 ± 1.2
	I05K05	-	0.5	-	0.5	++	8.1 ± 0.6
	I05K1	-	0.5	-	1.0	++	9.2 ± 2.4
	I05K2	-	0.5	-	2.0	++	6.9 ± 0.9
	I1K05	-	1.0	-	0.5	+	7.1 ± 2.1
	I1K1	-	1.0	-	1.0	+++	6.1 ± 1.3
	I1K2	-	1.0	-	2.0	++	7.9 ± 3.2
	I2K05	-	2.0	-	0.5	+	5.6 ± 0.6
	I2K1	-	2.0	-	1.0	+	9.2 ± 1.5
	I2K2	-	2.0	-	2.0	++	13.0 ± 1.8

¹⁾ Evaluated by the frequency of callus formation, -, non, + ; a little, ++ ; middle and +++ ; much.

²⁾ The data shows the number of adventitious shoots per one leaf segment, average±SE.



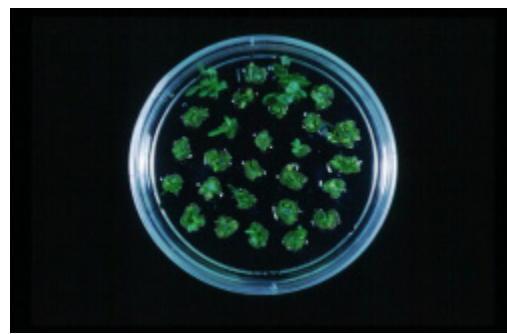
A: NAA 2 mg/l and BA 1 mg/l



B: NAA 1mg/l and Kin 1 mg/l



C: IAA 2 mg/l and BA 1 mg/l



D: IAA 2 mg/l and Kin 2 mg/l

Fig. 13. Adventitious shoots formation on MS medium with several phytohormone combination.

3 - 2 - 2 - 2 カルス経由再分化系の確立

結果を Table 16 に示す。

(1) NAA-BA 区

NAA 1 mg/l-BA 0.5 mg/l を添加したカルス誘導培地で形成されたカルスは、再分化培地に置床 30 日目より再分化し始め、50 日目に最も多く再分化した。最終的な再分化率はカルスあたりで 15.6%であった。

(2) NAA-Kin 区

NAA 1 mg/l-Kin 1 mg/l を添加したカルス誘導培地で形成されたカルスは、再分化培地に置床 40 日目より再分化し始め、60 日目に最も多く再分化した。最終的な再分化率はカルスあたりで 5.6%であった。

(3) IAA-BA 区

IAA 1 mg/l-BA 0.5 mg/l を添加したカルス誘導培地で形成されたカルスは、再分化培地に置床 50 日目より再分化し始め、60 日目に最も多く再分化した。最終的な再分化率はカルスあたりで 7.7%であった。

(4) IAA-Kin 区

IAA 1 mg/l-Kin 1 mg/l を添加したカルス誘導培地で形成されたカルスは、再分化培地に置床 50 日目より再分化し始め、60 日目に最も多く再分化した。最終的な再分化率はカルスあたりで 2.2%であった。

Table 16. Regeneration frequency from callus.

Callus induction medium				No. of callus	The duration for regeneration (days) ¹⁾								The regeneration Frequency (%)
Auxin (mg/l)	Cytokinin (mg/l)				10	20	30	40	50	60	70	80	
NAA	1	BA	0.5	100	-	-	+	++	+++	++	++	+	15.6
NAA	1	Kin	1.0	100				±	+	++	++	+	5.6
IAA	1	BA	0.5	100					+	+++	++	+	7.7
IAA	1	Kin	1.0	100					±	+	±	±	2.2

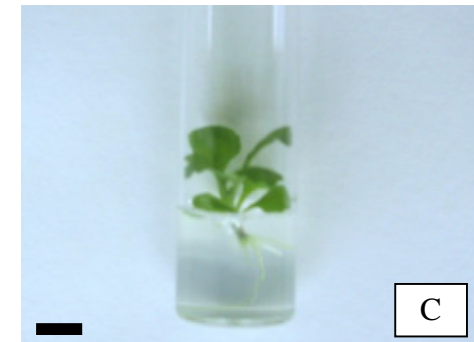
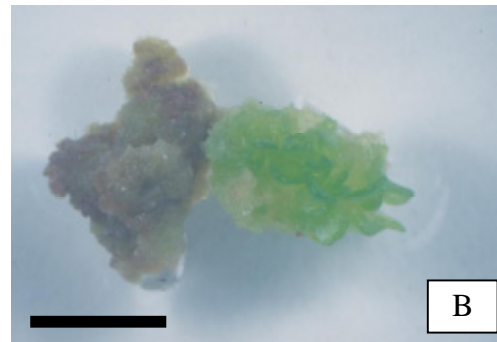
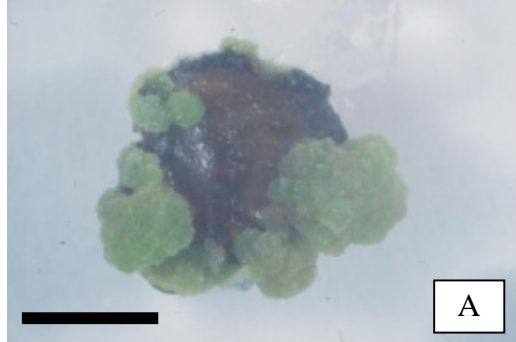
¹⁾ Evaluated by the frequency of regenerated plantlets, -; no, +; a little, ++; much and +++; many

3 - 2 - 2 - 3 再分化方法による遺伝子組換え体の獲得効率の違い

形質転換体の獲得効率について、カルス経由の再分化 (CI、Fig. 14A-C) と不定芽由来再分化 (SI、Fig. 14D-E) の 2 方法について検討した。

植物体の獲得日数は CI が 122 日、SI が 52 日と SI の方が早かった。サザンブロット分析および GUS 染色により、形質転換体の獲得効率を算出した。CI では、3,513 葉片のうち 123 個体の植物体が再分化してきた。これらすべての個体からサザンブロット分析により *gus* 遺伝子の存在を示すバンドが検出された (Fig. 15)。また、GUS Assay により、再分化してきた植物体全てが GUS 遺伝子を安定的に全身で発現する形質転換体であった (Table 17、Fig. 16A、D、G)。形質転換効率は葉片あたりで 4.4%、キメラの出現頻度は 0.0%であった。一方 SI では、3,413 葉片のうち 979 個体の植物体が再分化してきた。このうちサザンブロット分析により *gus* 遺伝子の存在を示すバンドが検出された個体は 45 個体であった (Table. 17)。また、GUS Assay により、45 個体中安定的に全身で発現する個体は 9 個体で、残り 36 個体はモザイク状に GUS 遺伝子を発現するキメラであった (Fig. 16B、E、H)。形質転換効率は葉片あたりで 1.3%、そのうちキメラが占める割合は 1.0%であり、安定的に全身で発現する個体の形質転換効率は 0.3%であった。また SI では、継代後 GUS 遺伝子がサイレンシングを起こしていると思われる個体も出現した。

1) Transformation using callus induction (CI) system.



2) Transformation using adventitious shoot induction (SI) system.

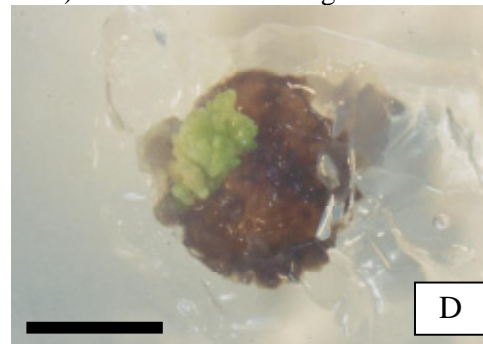


Fig. 14. Production of transgenic plants in two culture systems.

A: Callus induced on selection CI medium .

B: Shoots formed from G418 resistant callus on plantlet regeneration medium.

C: A rooted plantlet on rooting medium.

D: Adventitious shoots induced directly on each segment cultured in selection SI medium .

E: A rooted plantlet on rooting medium.

Scale bar indicates 5 mm.



Fig.15. Southern blot analysis of regenerated plantlets.
 DNA was digested with *Xba* I and hybridized with a probe of *gus* gene.
 Lane 1: Plasmid DNA of pIG121-Hm, used as positive control.
 Lane 2: DNA from a non-transformed plantlet, used as negative control.
 Lane 3-6: DNA from plantlets expressing *gus* gene in chimeric manner.
 The plantlets were obtained by adventitious shoot induction (SI) system.
 Lane 7-10: DNA from plantlets expressing *gus* gene in whole plant.
 The plantlets were obtained by SI system.
 Lane 11-14: DNA from plantlets expressing *gus* gene in whole plant.
 The plantlets were obtained by callus induction (CI) system.

Table 17. Transformation frequency of chrysanthemum cultivar 'Shuho-no-chikara' in two culture systems.

Culture	Number of leaf segments cultured (A)	Number of regenerated plantlets (B)	Number of transformed plantlets ³⁾ (C)	Transformation frequency (C/A : %) ²⁾
Callus induction (CI)	3,513	123	123(0) ¹⁾	4.4(0.0) ²⁾
Adventitious shoot induction (SI)	3,413	979	45(36) ¹⁾	1.3(1.03) ²⁾

¹⁾ () means No. of plantlets expressing *gus* gene in chimeric manner.

²⁾ () means transformation frequency of plantlets expressing *gus* gene in chimeric manner.

³⁾ Transformation was confirmed by Southern blot analysis.

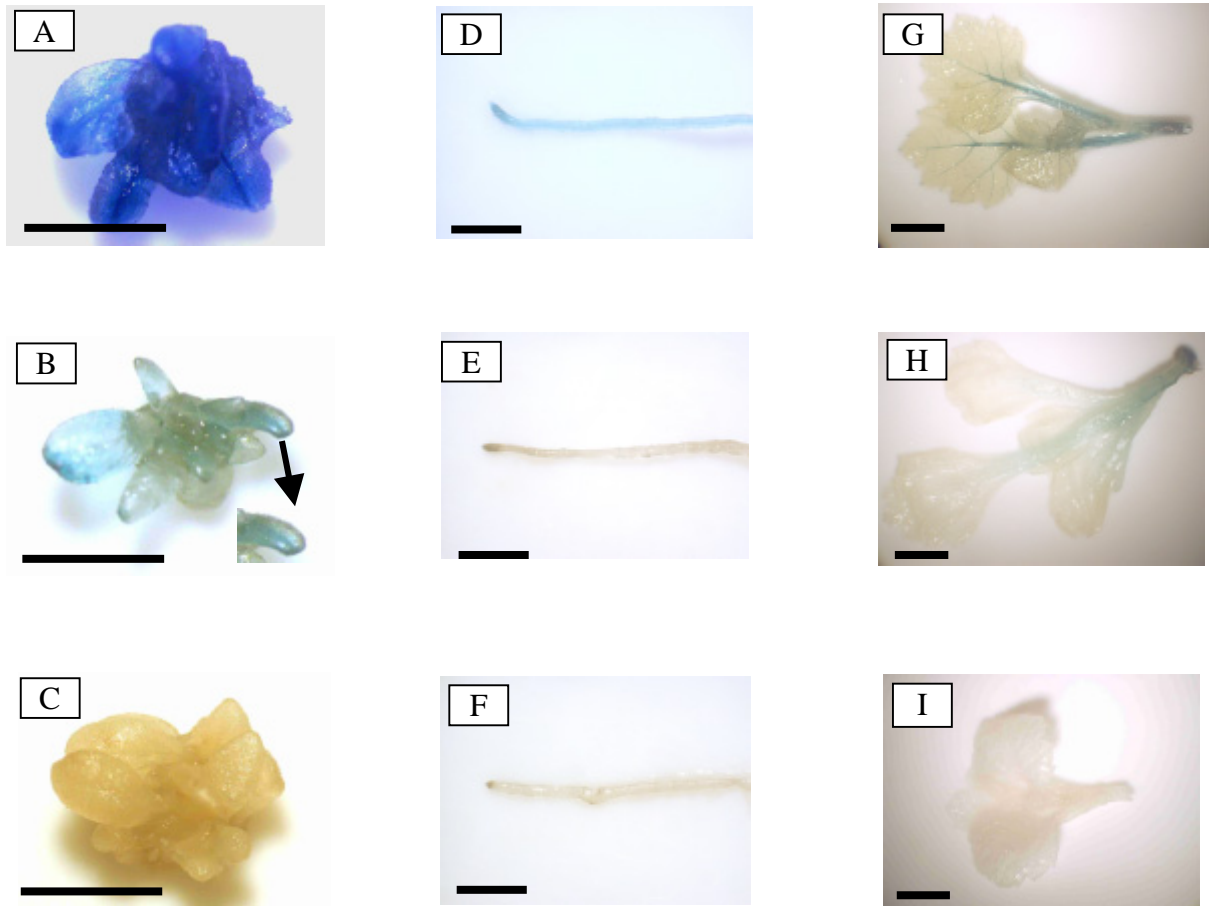


Fig. 16. Expression of *gus* gene in plants obtained in two culture systems.

A ~ C: Shoots of plants obtained by callus induction (CI) system (A) and by adventitious shoot induction (SI) system (B), and of non-transformed plants (C) were stained with X-gluc. Scale bar indicates 5 mm.

D ~ F: Roots of plants obtained by CI system (D) and by SI system (E), and of non-transformed plants (F) were stained with X-gluc. Scale bar indicates 10 mm.

G ~ I: Above ground parts with leaves of plants obtained by CI system (G) and by SI system (H), and of non-transformed plants (I) were stained with X-Gluc. Scale bar indicates 10 mm.

An arrow in panel B indicates the magnified photograph of a part of the leaf.

3 - 2 - 3 遺伝子組換え技術の他品種への応用

結果を Table 18 に示した。形質転換に先立ち、*Agrobacterium* 感染性の試験を行った。‘黄金城’、‘モンロー’、‘ミスベティ’、‘宴’、‘金風車’の 5 品種は、‘秀芳の力’よりも *Agrobacterium* 感染性が高く、‘ピーチ’と‘精雲’は、*Agrobacterium* 感染性は認められなかった。他の 14 品種は‘秀芳の力’と同程度の感染性を示した。

次に再分化能の調査を行った。‘山手白’、‘広島紅’、‘幸福の鳥’、‘ロザンナ’、‘宴’、‘金風車’の 6 品種は、‘秀芳の力’よりも高い再分化能を示し、‘ピーチ’、‘シンボル’、‘ピngo’、‘スワン’の 4 品種は低い再分化能を示した。他の 11 品種は‘秀芳の力’と同程度の再分化能を示した。

さらに選抜物質 G418 の濃度についても検討した。‘山手白’、‘広島紅’、‘小鈴’、‘金風車’の 4 品種では 30 mg/l、他の 17 品種では 20 mg/l が最適であった。先の 4 品種において 20 mg/l で選抜を行うと、外来遺伝子を持たないで選抜培地上で再分化してくるエスケイプが多く出現した。一方、残りの 17 品種について 30 mg/l で選抜を行うと、選抜培地上で再分化してくる形質転換体の数が著しく低下した。

以上の結果を踏まえて、確立された形質転換系 (CI system、Fig. 17) にて、15 品種の形質転換を行った。再分化植物体をサザンブロット分析と GUS 染色で検定したところ、全品種の再分化植物体全てで *gus* 遺伝子が検出され、GUS 発現を示す青い発色も認められた。形質転換効率は葉片あたり 1.1 ~ 23.9% であり、8 品種が‘秀芳の力’よりも高い形質転換効率を示した。最も高かったのは‘広島紅’であった。残りの 6 品種は、*Agrobacterium* 感染性が認められず、再分化能も低いあるいは無いため、形質転換体は獲得できなかった。

Table 18. Transformation frequency of some chrysanthemum cultivars using callus induction (CI) transformation system.

Cultivars	Number of leaf segments cultured (A)	Sensitivity to <i>Agrobacterium</i> infection ¹⁾	Regeneration ability ²⁾	G418 concentration ³⁾ (mg l ⁻¹)	Number of regenerated plantlets (B)	Number of transformed plants (C)	Transformation frequency (C/A:%)
Seiun	180	-	+	20	0	0	0.0
Summer yellow	180	++	++	20	13	13	7.2
Yamate-shiro	180	++	+++	30	39	39	21.7
Hiroshima-beni	180	++	+++	30	43	43	23.9
Kosuzu	180	++	+	30	5	5	2.8
Kofuku-no-tori	180	++	+++	20	34	34	18.9
Rosanna	180	+	+++	20	5	5	2.8
Snow queen	180	++	-	20	0	0	0.0
Ohgon-jo	180	+++	++	20	25	25	13.9
Monroe	180	+++	++	20	25	25	13.7
Miss Betty	180	+++	++	20	2	2	1.1
Utage	180	+++	+++	20	32	32	17.8
Kin-fusha	180	+++	+++	30	36	36	20.0
Pinky	180	+	+	20	7	7	3.9
Peach	180	-	-	20	0	0	0.0
Symbol	180	+	-	20	0	0	0.0
Bingo	180	++	-	20	0	0	0.0
Rocky	180	++	+	20	7	7	3.9
Orange pinky	180	++	+	20	5	5	2.8
Swan	180	++	-	20	0	0	0.0
Susie	180	+	+	20	4	4	2.2
Shuho-no-chikara	180	++	++	20	10	10	5.6

¹⁾ Evaluated by No. of GUS blue spots observed per leaf segment after *Agrobacterium* infection. -: no spot, +: 1 to 10, ++: 11 to 50, +++: 51 to 100.

²⁾ Evaluated by No. of plantlets formed per leaf segment. -: no plantlets, +: 1 to 5, ++: 6 to 10, +++: more than 11.

³⁾ At the concentration, leaf segments of non-transformed plants could not form any callus.

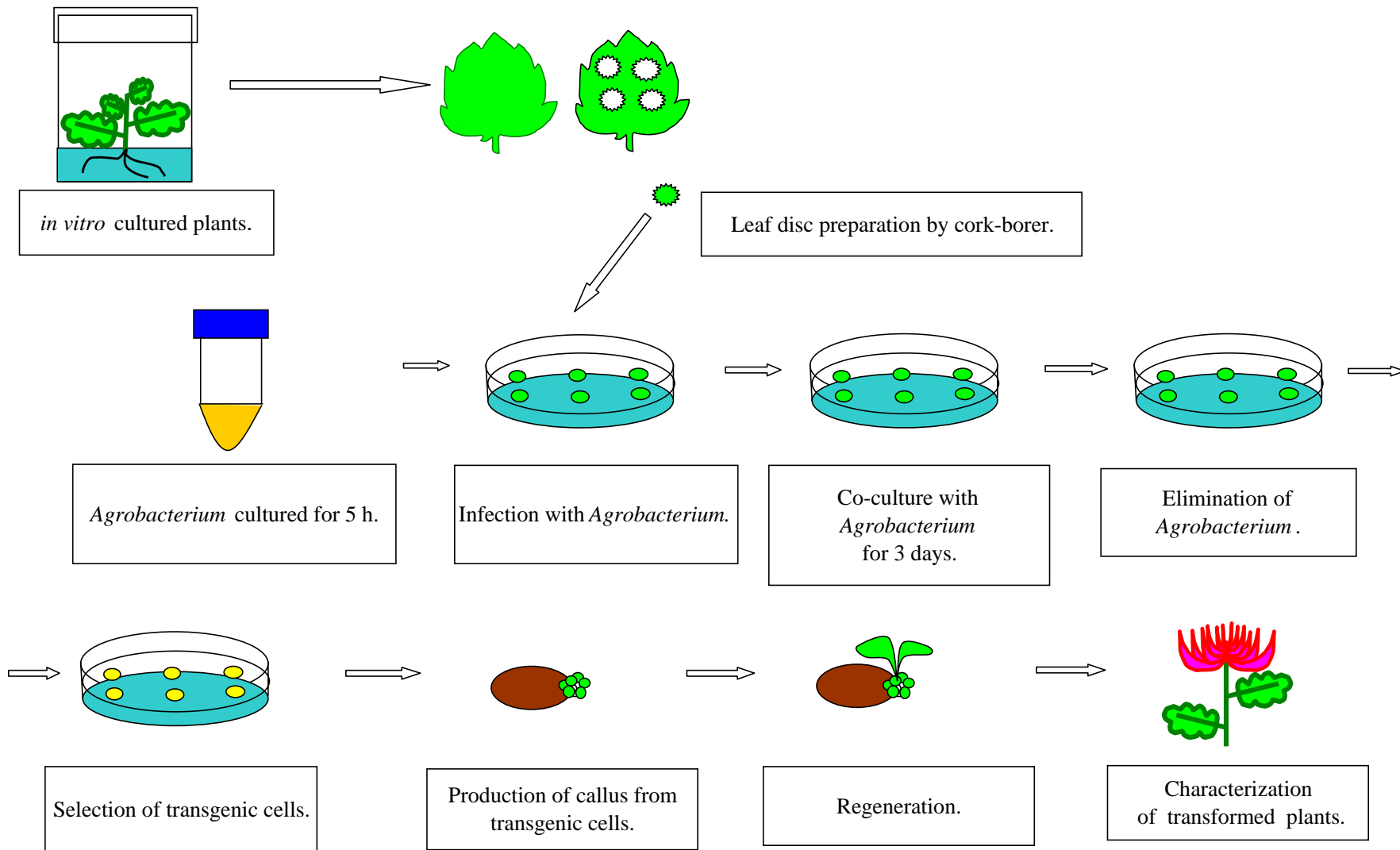


Fig. 17. Schematic representation of *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum using callus-induction transformation (CI) system.

3 - 3 考察

*Agrobacterium tumefaciens*を用いた形質転換にはじめて成功したのは、1985年タバコ (*Nicotiana tabacum*) においてであった (Horsch *et al.* 1985)。その後、この手法はいろいろな植物の形質転換に用いられたが、植物種および品種によって*Agrobacterium*への感染性が異なることから、実用化できる植物は限られていた (Godwin *et al.* 1992)。

キクにおける*Agrobacterium*感染性の存在 (Miller 1975、De Cleene and De Ley 1976、Hooykaas *et al.* 1994) と感染性の品種間差異 (Wordrangen *et al.* 1991) は以前から報告されてきた。またキクでは、様々な器官や組織を利用した*in vitro*培養系が数多く報告されている (Hill *et al.* 1968、Iizuka *et al.* 1973、Earle and Langhans 1974、Khalid *et al.* 1989) ことから、大変培養しやすい植物種であることが伺える。しかしながら、感受性があり、培養しやすい性質にもかかわらず、キクでの形質転換効率は供試材料あたり1~12%であり、サイレンシングやキメラ化の問題もあって実用化は困難であった (Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995)。

そこで本研究では、*Agrobacterium*を用いた、導入遺伝子が全身で安定して発現する効率的な形質転換技術の確立を目指した。共存培地に葉片を置床すると、7~10日に切断面にカルスが形成される。一旦カルスが形成されてしまうと、選抜培地に移植してもすぐには枯死せず、完全に枯死させるには選抜培地で継代を数回重ねる必要があった。*Agrobacterium* によって導入された外来遺伝子は2~3日目から発現はするとされている (Jefferson *et al.* 1987) ことから、選抜開始は少なくとも、G418に耐性を示す *npt* 遺伝子が発現する3日目以降がよいと考えられる。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恐れがある。したがって選抜開始時期をカルス形成初期の7~10日目とし、G418濃度は20~30 mg/lで行い、少なくとも3~4回継代する必要があると考えられる。

まず感染効率向上のための試験結果から、*Agrobacterium* はメスの鋭い切り口より、ギザギザに押しつぶしたような切り口を好むこと、対数増殖期という最も生育の盛んな時期に感染力が最も高まることが分かった。また、感染に障害をもたらす毛耳のような物理的障害を界面活性剤などで緩和してやること、共存培養期間にカザミノ酸のような栄養物質を補ってやることで、感染効率が向上することが明らかになった。

また、キクにおけるキメラ出現 (Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995) の問題については、再分化方法を検討することで、問題の解決を図った。先ず再分化系の確立については、キク品種‘秀芳の力’においては、オーキシンとしてNAAを用いる方が、IAAを用いた場合に比べて、10日早く再分化植物体が得られること、2 mg/l NAA-1 mg/l BAの濃度の植物ホルモンを添加したN2B1培地を用いることで、1葉片あたり平均 60.1±1.9 個の不定芽が効率よく獲得できることが明らかとなった。これは、葉片

からの Hill (1968) の効率の 5 倍であり、さらに効率的に不定芽経由の再分化植物体の獲得が可能となった。一方、カルス経由での再分化方法については、NAA 1 mg/l-BA 0.5 mg/l を添加した培地で形成されたカルスがもっとも高い再分化能を持つと考えられ、再分化は、50 日目にピークを持つことが明らかになった。なお、カルスあたりの再分化率は 15.6% で、再分化率をそれぞれ 1.5% (大塚ら 1985)、および 3.4% (深井ら 1988/1989) とした従来報告より効率が高かった。

形質転換体の獲得効率について、確立した不定芽由来再分化とカルス経由の再分化の 2 方法について検討した。植物体の獲得日数は CI に比べて SI の方が半分以下の日数と早かったが、サザンブロット分析および GUS 染色により、CI では再分化植物体すべてが、導入遺伝子を全身で安定して発現する形質転換体であること (葉片あたり 4.4%)、一方 SI では導入遺伝子を全身で安定して発現する形質転換体の割合が極めて低く (葉片あたり 0.3%)、キメラになっている個体が大多数を占めたことが明らかになった。また SI では、継代後 GUS 遺伝子がサイレンシングを起こしていると思われる個体も出現した。このことは、再分化個体の作出日数の長さという欠点を十分補填するものである。不定芽経由の再分化とカルス経由の再分化で、キメラの出現が明らかに異なったことから、今回確立したカルス経由の再分化方法は、キメラの出現を大いに抑制する効果があることが明らかになり、CI の再分化系を用いることで、キメラが無く、安定して全身で導入遺伝子を発現する形質転換体が獲得できるといえる。

また、他の複数の品種を使って、CI 再分化系による形質転換を行ったところ、品種によって選抜物質 G418 の濃度を変えるだけで、再分化能があり、*Agrobacterium* に感受性のある品種において、葉片あたり 1.1 ~ 23.9% の形質転換効率で、確立した形質転換系 (CI system) による形質転換体の獲得が可能であった。

キクでの 35S プロモーターによる *gus* 遺伝子発現は、タバコの 1/10 (Daub *et al.* 1994)、またはカラコエ (*Kalanchoe blossfeldiana*) の 1/100 (Aida and Shibata 1996) であると報告されている。本研究でも 35S プロモーターで *gus* 遺伝子を発現させたが、GUS 染色において、幼植物体では全身が強く染まったものの、生長した植物体では、維管束細胞や毛耳のみが強く染色され、花弁は染色されなかった。このことから、今後は、導入遺伝子の高発現およびさらなる発現安定性を図るため、キク用のプロモーターの単離や導入遺伝子の塩基配列の改良を行う必要がある。

まとめ

- 1) 葉片の選抜は、選抜物質 G418 の濃度 20 mg/l 以上で、選抜開始時期をカルス形成初期の 7~10 日目とし、G418 濃度は 20~30 mg/l で行い、少なくとも 3~4 回継代する必要がある。
- 2) 感染処理用の葉片は、*Agrobacterium* の感染効率の観点から、コルクボーラーで押し切って作成し、感染液に 20 分程度浸漬するのがよい。
- 3) 感染前に *Agrobacterium* を 5 時間培養して、対数増殖期にしてから感染させることで、感染効率が向上することが明らかになった。
- 4) *Agrobacterium* の栄養源にもなりうるカザミノ酸を、共存培地に添加することで、*Agrobacterium* 感染効率が向上した。
- 5) *Agrobacterium* 感染液を葉片の表面や傷口に接触させるため、感染液に界面活性剤の 1 種である Tween 20 を 5.0% 感染液に加えることで、*Agrobacterium* の感染効率が高まることが判明した。
- 6) 培養方法については、不定芽誘導であれば、2 mg/l NAA-1 mg/l BA で、カルス誘導であれば、NAA 1 mg/l-BA 0.5 mg/l を添加した培地を用いることで、従来の報告より効率的に誘導することができるようになった。
- 7) キクの遺伝子組換えにおける再分化系を検討したところ、不定芽経由 (SI system) では、形質転換体の獲得効率が低く、キメラが出現したが、カルス経由で植物体を再分化させることで、キメラが無く、安定して全身で導入遺伝子を発現する形質転換体が獲得できた。このことから、カルス経由の再分化系は従来の問題点を解消する 1 手段であるといえる。
- 8) 再分化能があり、*Agrobacterium* に感受性のある品種において、確立した形質転換系 (CI system) による形質転換体の獲得が可能であった。

第4章 遺伝子組換えによる新品種の育成

キクは生産量・生産額ともに、日本では第1位の花き品目である。近年では農薬散布量の増大に伴う栽培者の健康や環境に対する負荷、コストが大きくなってきている。特に農薬散布のタイミングは害虫の発消長に大きく関与しているため、その予測が大変困難になっている。*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1由来の *cry1Ab* 遺伝子は、鱗翅目昆虫に特異的に殺虫性を発現する。この遺伝子をキクに組み込み、全身で安定して発現させることで、鱗翅目害虫を発生初期に防除することが出来る。

Bt-toxin 遺伝子はアミノ酸配列の相同性や殺虫活性により分類されている。オオタバコガに対する殺虫活性として、Cry1Acタンパク質はCry1Abタンパク質より12倍強力であった (Padidam *et al.* 1992)。一方でキクの主要害虫である *Spodoptera exigua* (シロイチモジヨトウ)、*S. litura* (ハスモンヨトウ) や *Mamestera brassicae* (ヨトウガ) はCry1Acタンパク質よりもCry1Abタンパク質の方が有効であるとしている (Perlak *et al.* 1990, Höfte *et al.* 1988, Asano *et al.* 2000)。このことから、キクの複数の鱗翅目害虫に殺虫性を示すCry1Abタンパク質の方が殺虫剤使用量の低減に有効であると考え、今回の形質転換には *cry1Ab* 遺伝子を用いた。

cry1Ab 遺伝子はバクテリアの遺伝子であるため、高等植物における mRNA の不安定配列、すなわち polyadenylation signal sequence (ATTTA) sequences を多く含んでいて、これが遺伝子発現を抑制しているという報告がある (Murray *et al.* 1991, Van Aarssen *et al.* 1995)。また最近では、Bt 遺伝子の塩基配列を高等植物のコドンに合わせて改良し、mRNA の不安定配列を除去した人工合成遺伝子を導入した耐虫性のタバコ (Parlak *et al.* 1991, Sutton *et al.* 1992)、トマト (Parlak *et al.* 1991)、ジャガイモ (Adang *et al.* 1993)、ワタ (Perlak *et al.* 1990)、イネ (Fujimoto *et al.* 1993)、トウモロコシ (Kozziel *et al.* 1993) などが報告されている。

そこで本研究では、まず、第3章で確立した、キメラが無く、導入遺伝子が全身で安定して発現する形質転換系を用いて、キクに *cry1Ab* 遺伝子を導入し、キクの主要害虫の1つである鱗翅目害虫オオタバコガ (*Helicoverpa armigera*) に対する抵抗性を持った耐虫性キクの作出を試みることを目的とした。次に、*cry1Ab* 遺伝子の高発現のため、*cry1Ab* 遺伝子内に存在する A/T-rich 領域である ATTTA sequence などの mRNA 不安定配列 (Shaw and Kamen 1987, Dean *et al.* 1986, Goodall and Filipowicz 1989) を除去し、キク科植物で使用頻度の高いコドンに置き換えるなどした人工合成遺伝子を作成した。これをキクに導入することで、Cry1Abタンパク質の合成量を高め、オオタバコガ幼虫に高い耐虫性を持った組換えキクの作出を試みた。

4 - 1 材料および方法

4 - 1 - 1 *Bacillus thuringiensis* 由来 *cry1Ab* 遺伝子導入による耐虫性個体の作出

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種‘秀芳の力’を用いた。昼温 25℃、夜温 20℃ に設定したガラスハウスで栽培したキク植物体（茎長約 5 cm）を、70%エタノールで 30 秒間処理し、1%次亜塩素酸ナトリウムに 15 分間浸漬して消毒した。滅菌水で 3 回洗浄した後、実体顕微鏡下で葉原基を有しない生長点を約 0.5 mm 以下で無菌的に摘出した。MS 基本培地に置床した。培地はオートクレーブにて 121℃、15 分間の滅菌処理を行った。植物体は 25℃、16 時間白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 日長下で培養し、無菌植物体を育成した。

(2) 培養および形質転換

1) *Agrobacterium* の調整

A. tumefaciens は、ベクター pIAbT1（北海道大学浅野眞一郎助教授より分譲、Fig. 18）を持つ LBA4404 (Ooms *et al.* 1982) 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* (neomycin phosphotransferase) 遺伝子、*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 由来 *cry1Ab* 遺伝子が構築されている。*cry1Ab* 遺伝子は、殺虫活性を持つ 29 ~ 618 のアミノ酸をコードする断片を含み、CaMV 35S プロモーターと nopaline synthase (Nos) ターミネーターでドライブされている。また、*npt* 遺伝子は Nos プロモーターと Nos ターミネーターでドライブされている (Fig. 18)。ベクター pIAbT1 を有する *Agrobacterium* の培養には、YEP 培地 (10 g/l Bacto pepton, 10 g/l Bacto yeast extract, 5 g/l NaCl) を用い、振とう培養 (28℃、200 rpm) を行った。この菌液を懸濁培地 (MS 基本培地; 3% sucrose, pH5.8) で希釈 ($\text{OD}_{600} = 0.2$) し、アセトシリゴン 10 mg/l と Tween 20 を 5% 加えて感染液とした。

2) 形質転換方法

形質転換方法は Table 9-1 に示したカルス経由 (CI system) で行った。6 mm 径コルクボーラーで打ち抜いた葉片を、感染液に 20 分間浸漬し、ろ紙で余分な感染液をふき取った後、CI 共存培地 [MS 基本培地; 1 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, 1.0 g/l カザミノ酸, 0.3% Gellan Gum (Pure Chemical Inc., Japan), pH5.8] 上に置床した。感染から 3 日目に CI 除菌培地へ移植し、*Agrobacterium* を除菌した。10 日目に、CI 選抜培地 に移植し、形質転換細胞の選抜を行った。培地は 2 週間毎に 3 回更新した。その後再分化を促すため cefotaxim sodium salt の濃度を 2/5 に下げた CI 選抜培地

に移植し、2 週間毎に 2 回継代した。形成されたカルスは再分化培地に移植し、再分化を促した。培地は 3 週間毎 3 回更新した。再分化植物体は発根培地に移植し、発根させた。充分発根した植物体は、バーミキュライト (旭工業株式会社、Japan) を用いて閉鎖系温室で順化した。1 回の試験で葉片 144 枚を感染させ、13 回行った。

(3) *cry1Ab* 遺伝子の確認

1) DNA の抽出

非組換え体および再分化植物体の本葉 100 mg を液体窒素で粉碎し、HEPES Buffer [0.1 M HEPES (pH 8.0)、0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP)、4% 2-mercaptoethanol] で 3 回洗浄 (Takagi *et al.* 1993) して、ポリフェノールやポリサッカライドを除去した。その後 SDS 法 (Honda and Hirai 1990) にてゲノム DNA を抽出した。

2) サザンブロット分析

ゲノム DNA を制限酵素 *EcoRV* で消化した後、0.8% アガロースゲル中で電気泳動し、Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., England) にアルカリブロットングした。以下のプライマーを用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki *et al.* 1988) 法にて *cry1Ab* 遺伝子をコードする 250 bp 断片を合成し、これをプローブとしてサザンブロット分析 (Southern 1975) を行った。DIG (digoxigenin) Labeling & Detection Kit (Roche & Boehringer Mannheim, Germany) を用い、CDP-star (Roche & Boehringer Mannheim, Germany) で発光させて、導入遺伝子を検出した。

Forward; 5'-ACGGATGCTCATAGAGGAGA

Reverse; 5'-TGTCCCGTCAAGAACAGATA

(4) *Cry1Ab* タンパク質量の同定

1) タンパク質の抽出

再分化植物体および非組換え植物の本葉 1 g より SDS Buffer [200 mM HEPES Buffer (pH 8.0)、20 mM EDTA、100 mM DTT、200 mM PMSF、0.2 mg/ml Leupeptin、50 mg/ml Polyclar VT (和光純薬工業株式会社、Japan)] を用いてタンパク質を抽出した。タンパク質量の測定は Bradford 法 (Bradford 1976) にて行った。

2) ウェスタンブロット分析

総タンパク質 50 µg を 10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (Laemmli 1970) し、PVDF membrane (MICRON SEPARATIONS Inc., USA) に semidry transfer cell

(BioRad, USA) を用いてセミドライ式ブロットニングを行った。その後、Cry1A ポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットニング (Koziel *et al.* 1993) を行った。Cry1A タンパク質の精製は Mochizuki (1994) の方法で行った。ベクター pIAbT1 を持つ大腸菌 JM109 を 0.1 mM IPTG を含む Terrific Broth liquid medium にて 37 °C で一晩培養した。菌液を 4 °C、8,000 rpm で 8 分間遠心し、沈殿を A buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、2 mM PMSF] に懸濁した。再度遠心し、沈殿を 0.1 mg/ml lysozyme を含む A buffer に再懸濁した。超音波破碎を 30 分間行った後遠心し、沈殿を 0.1 mg/ml lysozyme (和光純薬工業株式会社, Japan) を含む A buffer に再懸濁した。この操作を 3 回繰り返す、pH 7.5 の水溶性タンパク質を除去した。遠心後 B buffer [50 mM Glycin-NaOH (pH 10.0)、10 mM DTT、2 mM PMSF、5 mM EDTA] に懸濁し、室温に 30 分間放置した。この懸濁液を蒸留水に対して 3 日間透析した後、4 °C で 10,000 rpm、15 分間の遠心を行った。このタンパク質を 10.0 %ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (Laemmli 1970) し、62 kDa の Cry1Ab タンパク質を電気溶出 (electroelution) にて単離した。ウサギを用いて Cry1Ab タンパク質のポリクローナル抗体を作成した。この抗体を一次抗体とし、二次抗体に alkaline phosphatase 抗ウサギヤギ抗体 (BIO-SOURCE International, USA) を用いた。各バンドの濃さは Cry1Ab タンパク質 (5、25、50 µg) を指標とし、Densitograph AE-6920V-05 (ATTO, Japan) にて算出した。

(5) オオタバコガに対する殺虫性試験

オオタバコガ *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera; Noctuidae) の蛹は、鹿児島県農業試験場の福田健主任研究員よりいただいた。幼虫は人工飼料 (Insecta LF) (日本農産工業株式会社, Japan) を用い、25 °C、16 時間白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 µmol·m⁻²·s⁻¹] 下で飼育した。

1) 食害試験

オオタバコガ初齢幼虫を用いて、食害試験を行った。順化後の本葉 (長さ 1.5 cm) の基部を蒸留水で湿らせた脱脂綿でくるみ、プラスチックシャーレ (φ= 9 cm、深さ 6 cm) に入れた。葉上に初齢幼虫を 5 頭のせて 5 日間食害させた。シャーレは 25 °C、16 時間白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700nm) = 60 µmol·m⁻²·s⁻¹] 日長下の人工気象室に静置した。葉面積の測定は葉面積計 (林電工株式会社, Japan) を用いて測定した。各個体および非組換え植物につき 10 シャーレを用い、3 反復行った。食害面積のデータは % 表示とし、Arcsin 変換を行った後、t 検定により非組換え植物との差異を比較した。

2) 発育試験

オオタバコガ 3 齢幼虫を用いて、発育試験を行った。順化後の本葉（長さ 5 cm）を 3 齢幼虫が蛹になるまで与え続けた。3 齢幼虫 1 頭をパーライト（フヨー工業株式会社、Japan）（深さ約 3 cm）を敷き詰めたプラスチックシャーレ（φ= 9 cm、深さ 6 cm）に入れ、葉が無くなったら新鮮な葉と取り替えた。蛹化の有無、蛹化まで日数、羽化の有無、羽化まで日数を計測した。シャーレは 25 ℃、16 時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 下の人工気象室に静置した。各個体および非組換え植物につき 10 頭用い、3 反復行った。データの平均値は、t 検定により非組換え植物との差異を比較した。また、%表示のデータ（食害面積、蛹化率、羽化率）は Arcsin 変換を行い、t 検定により非組換え植物との差異を比較した。

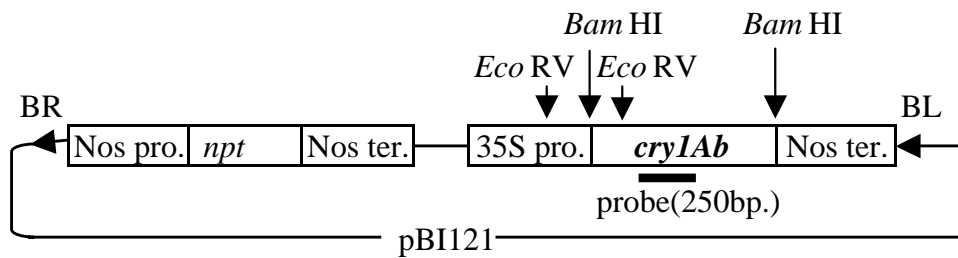


Fig. 18. Map of the binary vector pIAbT1.

An expression vector pBI121 into which the truncated *cryIAb* gene of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 was introduced. The coding region of the gene contains the DNA sequence corresponding to amino acid positions 29 to 618.

4 - 1 - 2 *Bacillus thuringiensis* 由来改良 *cry1Ab* 遺伝子導入による耐虫性個体の作出

(1) 植物材料の調製

植物材料として、キク品種 ‘秀芳の力’ を用い4 - 1 - 1と同様の方法で、無菌植物体を育成した。

(2) 培養および形質転換

1) *cry1Ab* 遺伝子の塩基配列改良と人工合成

B. thuringiensis var. *kurstaki* HD-1 由来の *cry1Ab* 遺伝子のうち、アミノ酸番号1-615 までの塩基配列について、Perlak ら (1991) の方法で改良を行った。コードするアミノ酸を変えずに、mRNA の不安定配列といわれる ATTTA sequence (Shaw and Kamen 1986) を除去し、さらにキク科植物で使用頻度の高いコドンに置き換えた。

コドンの使用頻度については、GenBank (CUTG) (World Wide Web. address: www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html) において、レタス [*Lactuca sativa*; 7 コード領域 (2,899 コドン)]、ヒマワリ [*Helianthus annuus*; 61 コード領域 (21,200 コドン)]、コセンダングサ [*Bidens pilosa*; 1 コード領域 (150 コドン)]、アスター [*Callistephus chinensis*; 4 コード領域 (1,477 コドン)] のコドン使用頻度を集計し、最も頻度の高いコドンを選んだ。

制限酵素サイトについて調査したところ、*Bam*HI サイトが3つあり、これらは消去した。また、411bp に *Eco*RI サイトを新たに作成した。いずれもアミノ酸を変更せずに改良し、改良 *cry1Ab* 遺伝子 (*mcbt*) を設計した (Fig. 19)。

このようにして改良した *cry1Ab* 遺伝子 (*mcbt*) を制限酵素サイト (*Eco*RI; 411 bp、*Nco*I; 1019 bp、*Kpn*I; 1565 bp) で4つのフラグメントに分割した。さらに5'上流の開始コドン (first ATG) には *Bam*HI サイト、3'下流の終止コドンには *Sac*I サイトをそれぞれ付加した。それぞれのフラグメントはさらに2~4つの約80bpのDNA断片に分割し、それぞれが20bp程度オーバーラップするように設計した。PCR (Saiki *et al.* 1988) 法を用いた鋳型DNAなしのプライマーダイマー法 (Fig. 20) によって完全長のDNAフラグメントを合成した (Fujimoto *et al.* 1993)。合成後、それぞれのフラグメントをベクター-pKF3に連結し、大腸菌 TH2 で増殖させて、シーケンスした。DSQ1000 (島津製作所、Japan) にて5'側および3'側より塩基配列を確認した。塩基配列確認後、制限酵素サイトで4つのフラグメントを連結し、*Xba*I サイトと *Sac*I サイトでベクター-pKF3に連結し、このフラグメントを *mcbt* と命名した。*mcbt* を再び *Xba*I サイトと *Sac*I サイトで切り出し、ベクター-pIG121-Hm (Ohta *et al.* 1990、Hiei *et al.* 1994) の intron- β -D-glucuronidase (*gus*) 遺伝子の部分 (*Xba*I-*Sac*I サイト) へ導入した。このベクターを ‘pIG121*mcbt*’ と命名し

た (Fig. 21)。これにより *mcbt* 遺伝子は CaMV 35S プロモーターと nopaline synthase (Nos) ターミネーターによってドライブされる。

2) *Agrobacterium* の調整

Triparental mating 法により、ベクター pIG121*mcbt* を *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 へ導入した。*Agrobacterium* の前培養には、YEP 培地を用い、振とう培養 (28 °C、200 rpm) を行った。この菌液を懸濁培地 (MS 基本培地; 3% sucrose, pH5.8) で希釈 ($OD_{600}=0.2$) し、アセトシリンゴン 10 mg/l と Tween 20 を 5% 加えて感染液とした。

3) 形質転換方法

感染方法は 4 - 1 - 1 と同様、カルス誘導の形質転換系 (Table 9-1) で行った。

(3) *mcbt* 遺伝子の確認

DNA の抽出

非組換え体および再分化植物体の本葉 100 mg を液体窒素で粉碎し、4 - 1 - 1 の方法でゲノム DNA を抽出した。

サザンプロット分析

抽出したゲノム DNA を制限酵素 *EcoRV* で消化した後、4 - 1 - 1 の方法でサザンプロット分析 (Southern 1975) を行い、導入遺伝子の確認を行った。

(4) RNA 分析

改良 *cry1Ab* 遺伝子導入キク、改良していない *cry1Ab* 導入キクおよび非組換えキクの本葉 100 mg を液体窒素で粉碎後、Qiagen RNeasy Plant Total RNA Kit (Qiagen, USA) にて、Total RNA を抽出した。20 μ g の Total RNA を formaldehyde ゲル中 (0.8% agarose) に入れ、ethidium bromide を含む MOPS buffer (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH7.0) 中で電気泳動した。泳動後、ゲルを positive charged Nylon membrane (Roche & Boehringer Mannheim, Germany) にブロットイングした。Prehybridization、hybridization および検出は Southern (1975) の方法に従って行った。Total RNA の検出は guanidinium thiocyanate protocol (Newman *et al.* 1993) に従い、DIG でラベルした *mcbt* 遺伝子の DNA 断片 500bp をプローブとして用いた。

(5) Cry1Ab タンパク質量の同定

タンパク質の抽出

mcbt 導入キク、改良していない *cryIAb* 導入キクおよび非組換えキクの本葉 1 g より、4 - 1 - 1の方法で総タンパク質を抽出し、Bradford 法 (Bradford 1976) で定量した。

ウェスタンブロット分析

総タンパク質 50 μg を 4 - 1 - 1の方法で抽出し、ウェスタンブロッティング (Koziel *et al.* 1993) を行い、タンパク質の分子量やタンパク質量の定量を行った。

(6) オオタバコガに対する殺虫性試験

食害試験

オオタバコガ初齢幼虫を用いて、4 - 1 - 1の方法と同様に食害試験を行った。

発育試験

オオタバコガ初齢幼虫を用いて、発育試験を行った。順化後の *mcbt* 導入キク、改良していない *cryIAb* 導入キクおよび非組換えキクの本葉 (長さ 5 cm) を初齢幼虫が蛹になるまで与え続けた。初齢幼虫 1 頭をパーライト (フヨー工業株式会社、Japan) (深さ約 3 cm) を敷き詰めたプラスチックシャーレ ($\phi=9$ cm、深さ 6 cm) に入れ、葉が無くなったら新鮮な葉と取り替えた。蛹化の有無、蛹化まで日数、羽化の有無、羽化まで日数を計測した。シャーレは 25 $^{\circ}\text{C}$ 、16 時間白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) =60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 日長下の人工気象室に静置した。各個体および非組換え植物につき 10 頭用い、3 反復行った。

(7) 統計処理

(6) の食害試験については Fisher's protected LSD による有意差検定を行った。食害面積については、%数値を Arcsine 変換して分析した。については、Tukey-Cramer's HSD を用いた生存時間分析を行った。

atggacaacaaccaacaatcaacgaatgcatccaatacaactgctgtccaaccagaagtgaagtgctggaggagaacgtaacgag 90
M D N T P N I N E C I P Y N C L S N P E V E V L G G E R I E
accgggtacaccccacatcgacatctcctgtccttgaccaggtccttctctccgagttcgtgccagggtcgtgggtcgtgctcggactc 180
T G Y T P I D I S L V D I I W G I F G P S Q W D A F L V Q I
gttgacatcatctggggtatcttcggtccatctcaatgggagccttccctgcaaatcgagcagttgatcaaccagaggatcgaagag 270
V D I I W G I F G P S Q W D A F L V Q I E Q L I N Q R I E E
ttcgccaggaaccaggccatctccagggtggagggactctccaactgtaccagatctatgcagagtccttcagagagtggaagccgat 360
F A R N Q A I S R L E G L S N L Y Q I Y A E S F R E W E A D
cctaccaaccagctctcaggaggagatgctgtaccagttcaacgacatgaatccgccttgaccacagctatcccactctccgagtg 450
P T N P A L R E E M R I Q F N D M N S A L T T A I P L F A V
cagaactaccaagtctctctgtccgtgacgttcaagcagcaacttccactcctccgtgcttagggagcgtgctccgtgtccgtgag 540
Q N Y Q V P L L S V Y V Q A A N L H L S V L R D V S V F G Q
aggtgggggttcgagtgctgcaaccaatcaactcccggttacaacgaccttaccaggctcatcggaactacaccgaccagcgtgtagggtgg 630
R W G F D A A T I N S R Y N D L T R L I G N Y T D H A V R W
tacaaccggacttgagagggtgggggtcctgactccagagactggatcagatcaaccagtttcaggagagaactcacccttgacagtg 720
Y N T G L E R V W G P D S R D W I R Y N Q F R R E L T L T V
ttggacatcgtgtcctcttcccgaactatgactccagaacctaccctatccgtaccgtgtccaacttaccagagagatctacaaccaac 810
L D I V S L F P N Y D S R T Y P I R T V S Q L T R E I Y T N
ccagtgcttgaagaactcgacgggtccttccagggttctgcccaaggatcgagggttccaacaggtcaccacacctcagacatcttg 900
P V L E N F D G S F R G S A Q G I E G S I R S P H L M D I L
aaactcaaccatctacaccgatgctcacagaggagactactggtctggaccacagatcattggccttccagtggggttctccgggt 990
N S I T I Y T D A H R G E Y Y W S G H Q I M A S P V G F S G
ccagagttcaccctccctctctacggaaccaatgggaacgcccgtccacagcagaggaatcgtggctcagctcgggtcagggtgtgacaga 1080
P E F T F P L Y G T M G N A A P Q Q R I V A Q L G Q G V Y R
acctgtctccacctgttacagaggccgttcaacatcggatcaacaaccagcagctcctccgtgctcgacggaaccaggttccgctac 1170
T L S S T L Y R R P F N I G I N N Q Q L S V L D G T E F A Y
ggaacctcctccaacttgccatccgctgtgtacaggaagtccggaaccgtggactcctcgatgagatcccacctcagaacaacaatgtg 1260
G T S N L P S A V Y R K S G T V D S L D E I P P Q N N N V
ccacctaggcagggttctcccacaggtgtcccacgtgtccatgtccggttccggttctccaactcctccgtgtccatcatcagggt 1350
P P R Q G F S H R L S H V S M F R S G F S N S S V S I I R A
cctatgtctcctggatcaccgttccgctgagttcaacaacatcatcccatcctcagatcaccagatcccactcaccaggtccacc 1440
P M F S W I H R S A E F N N I I P S S Q I T Q I P L T K S T
aaccttgggtccggaacctcgtgtgagggtccagggttccaggagggtgacatccttaggaggacctcctcgggcagatctccacc 1530
N L G S G T S V V K G P G F T G G D I L R R T S P G Q I S T
ctcagagtgaaactcaccgtccactctcagaggatccgtgtgaggatcaggatccgctcaccaccaacttgcagttccacacctcc 1620
L R V N I T A P L S Q R Y R V R I R Y A S T T N L Q F H T S
atcgacggaaggcctcaaccaggggaacttctccgccacatgctccggttccaacttgcagtcgggtccttcagaaccgtgggt 1710
I D G R P I N Q G N F S A T M S S G S N L Q S G S F R T V G
ttcaccactccttcaactctccaacgggtcctctgtgttaccctctccgctcaggtgttcaacttgggaaccaggtgtacatcgac 1800
F T T P F N F S N G S S V F T L S A H V F N S G N E V Y I D
aggatcgagttcgtgccagccgaggtgaccttcgagggtgagttactaa 1845
c a t a t t g a a a t a a t
R I E F V P A E V T F E A E Y *

Fig. 19. DNA sequence of a highly modified truncated variant of the *cryIAb* gene (*mbt*). The nucleotide sequence of the *mbt* gene is shown on the numbered line with the corresponding non-modified *cryIAb* sequence directly below. The coding region of the gene contains the DNA sequence corresponding to amino acid positions 1 to 615.

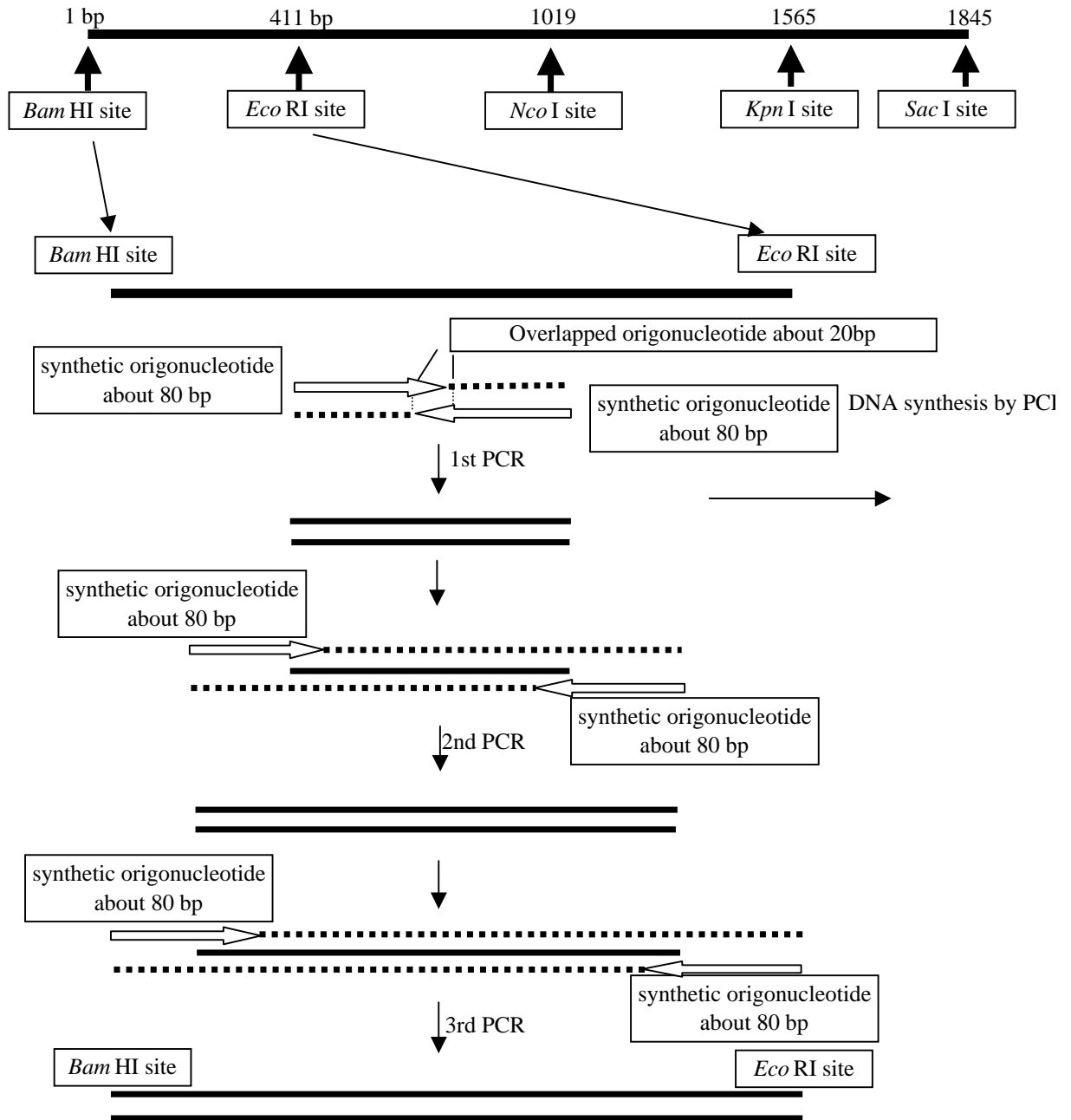


Fig. 20 . The DNA synthesis of modified *cryIAb* gene (*mcbt*) by polymerase chain reaction method (Fujimoto *et*

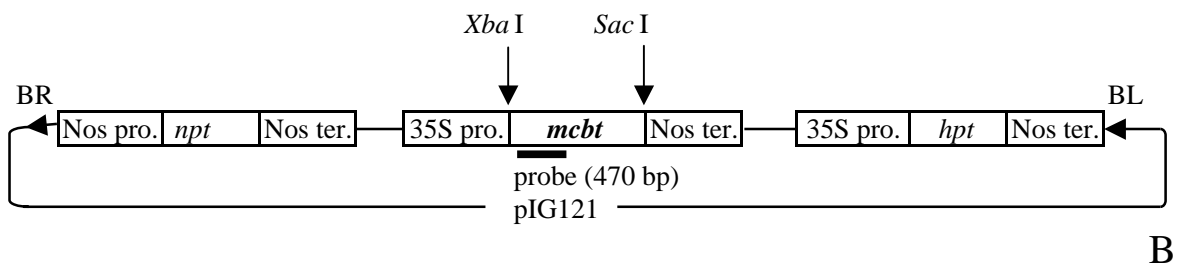


Fig. 21. Map of binary vector pIG121mcbt.

An expression vector pIG121-Hm into which the *mcbt* gene was introduced.

BR, Right border; BL, Left border; Nos pro., nopaline synthase promoter; Nos ter., nopaline synthase terminator; 35S pro., cauliflower mosaic virus 35S promoter; *npt*, neomycin phosphotransferase gene;

hpt, hygromycin phosphotransferase gene.

The probe (470-bp PCR product) used for Southern blot analysis of *Xba* I-digested DNAs is indicated by the *mcbt* gene.

4 - 2 結果

4 - 2 - 1 *Bacillus thuringiensis* 由来 *cry1Ab* 遺伝子導入による耐虫性個体の作出

1) 再分化効率

抗生物質 G418 を含む選抜培地上で 1,760 の葉片のうち、162 の葉片がカルスを形成し (葉片あたりのカルス形成率 9.2%)、そこから 92 個体の幼植物体が再分化 (葉片あたりの再分化率 5.2%) した (Table 19)。

2) サザンブロット分析による形質転換効率

全再分化植物体 92 個体について、サザンブロット分析を行ったところ、*cry1Ab* 遺伝子の存在を示すバンドが全個体から検出された。非組換えキクからはバンドが検出されなかった。再分化植物体のバンドの数は全て 1 つで、個体毎に独立していた。このことから、再分化植物体はそれぞれ独立しており、少なくとも 1 コピーの *cry1Ab* 遺伝子を有していることが明らかになった (Fig. 22)。

3) ウェスタンブロット分析による Cry1Ab タンパク質の定量

サザンブロット分析により *cry1Ab* 遺伝子の導入が確認された 92 個体より無作為に 20 個体を抽出し、Cry1Ab タンパク質の定量を行った。20 個体すべてより、濃度の異なる 56 kDa のバンドが検出された。再分化植物体の Cry1Ab タンパク質量は、総タンパク質あたり 0.009 ~ 0.08% であった。また再分化植物体で合成された Cry1Ab タンパク質は、大腸菌で合成された Cry1Ab タンパク質 (62 kDa) より分子量が小さかった。なお、非組換えキクからはバンドは検出されなかった (Fig. 23)。

4) オオタバコガに対する殺虫性試験

(1) 食害試験

無作為に抽出した 20 個体の *cry1Ab* 組換えキク植物体について、オオタバコガ初齢幼虫を用いて食害試験を行った。遺伝子を導入していない非組換えキクでは、5 頭による 5 日間の食害により、62.9% の葉が食害された。また、*cry1Ab* 組換えキクでは、4.7 ~ 62.1% の食害面積を示した。最も食害面積が少なかったのは、Bt(b)-11 の 4.7% であり、この植物体では、総タンパク質 50 μ g あたり Cry1Ab タンパク質合成量が 40 ng であった。t 検定の結果、総タンパク質 50 μ g あたり 15.5 ng 以上の個体で、食害面積が 5% 水準で有意に低下した。もっとも食害面積が多かったのは Bt(b)-16 の 62.1% であり、総タンパク質 50 μ g あたり Cry1Ab タンパク質合成量が 4.5 ng であった。(Table 20, Fig. 24)。

(2) 発育試験

3 齢幼虫から蛹になるまでの期間 (蛹化まで日数; Larval duration) は、Cry1Ab タンパク質の合成量が総タンパク質 50 μg あたり 32.5 ng 以上の 3 個体 [Bt(b)-11、Bt(b)-12 および、Bt(b)-2] で、t検定の結果、5%水準で有意に長くなった。蛹から成虫になるまでの期間 (羽化まで日数; Pupal duration) は、Cry1Ab タンパク質の合成量が総タンパク質 50 μg あたり 32.5 ng [Bt(b)-2] と 36.5 ng [Bt(b)-12] の個体で、5%水準で有意に長くなった。総タンパク質 50 μg あたり 40.0 ng を合成した Bt(b)-11 では、羽化まで日数に有意差は認められなかった。蛹化率 (Pupation rate) にはどの個体も有意差は認められなかったが、羽化率 (Emergence rate) では、Bt(b)-11 で有意差が認められた。殺虫性効果はどの個体でも観測されなかった (Table 20)。

Table 19. Transformation frequency of *Bacillus thuringiensis cry1Ab* gene of chrysanthemum cultivar 'Shuho-no-chikara'.

Transformation system	Number of leaf segments cultured (A)	Number of regenerated plantlets (B)	Number of plantlets ¹⁾ (C)	Transformation frequency (C/A : %)
Callus induction (CI)	1,760	92	92	5.2

¹⁾ Transformation was confirmed by Southern blot analysis.



Fig. 22. Southern blot analysis of putative transformed plants. Genomic DNA digested with *Eco* RV and hybridized with the *cryIAb* specific probe.

Lane1: pIAbT1

Lane2: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'

Lane3-10: Bt-transformed lines (3: Bt(b)-1, 4: Bt(b)-2, ---10: Bt(b).

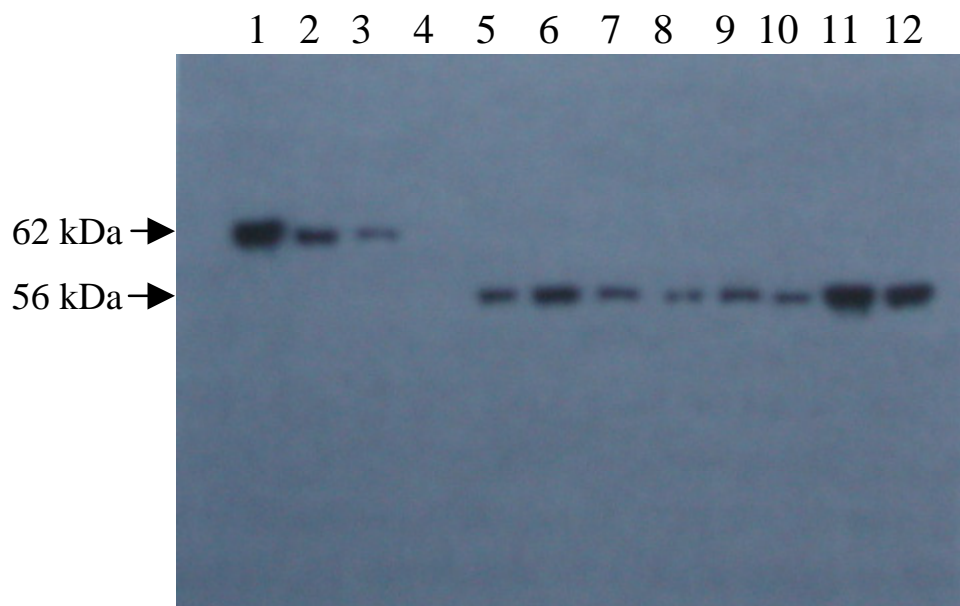


Fig. 23. Western immunoblot analysis of leaf from chrysanthemum plants expressing the *cryIAb* gene. Lanes 1, 2 and 3: 50, 25 and 5 ng of Cry1Ab protein
 Lane 4: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'
 Lanes 5-12: Bt-transformed lines (5: Bt(b)-1, 6: Bt(b)-2, 7: Bt(b)-3, 8: Bt(b)-5, 9: Bt(b)-7, 10: Bt(b)-10, 11: Bt(b)-11, 12: Bt(b)-12)
 50 μ g of total soluble protein was loaded on 4 to 12 lanes.

Table 20. Insect bioassay of transformed lines using *Helicoverpa armigera*

Lines	Cry1Ab expression (ng/50 μ g total protein) ¹⁾	Experiment 1		Experiment 2		
		Feeding leaf area ²⁾ (%)	Larval duration ³⁾ (days)	Pupation rate ³⁾ (%)	Pupal duration ³⁾ (days)	Emergence rate (%)
Bt(b)-11	40.0	4.7 **	21.6 \pm 0.04*	85.6	16.1 \pm 0.10	70.0 *
Bt(b)-12	36.5	5.7 **	21.7 \pm 0.05*	87.8	17.5 \pm 0.04*	87.5
Bt(b)-2	32.5	5.9 **	20.1 \pm 0.12*	86.7	17.0 \pm 0.05*	81.7
Bt(b)-1	20.0	14.2 *	18.8 \pm 0.10	92.2	15.2 \pm 0.13	78.6
Bt(b)-9	15.5	14.4 *	18.0 \pm 0.14	94.4	15.5 \pm 0.10	84.8
Bt(b)-6	13.5	20.0	17.9 \pm 0.04	92.2	16.0 \pm 0.06	86.6
Bt(b)-3	12.5	46.2	14.6 \pm 0.02	93.3	14.7 \pm 0.04	85.7
Bt(b)-4	11.5	44.8	17.7 \pm 0.13	95.6	15.9 \pm 0.02	86.1
Bt(b)-19	10.5	42.9	17.4 \pm 0.10	93.3	15.2 \pm 0.13	89.2
Bt(b)-8	9.5	43.5	13.6 \pm 0.06	96.7	13.9 \pm 0.12	84.8
Bt(b)-18	9.5	46.2	15.8 \pm 0.08	88.9	15.3 \pm 0.10	92.5
Bt(b)-7	8.5	47.4	13.8 \pm 0.10	96.7	15.2 \pm 0.03	82.8
Bt(b)-20	8.5	53.2	14.7 \pm 0.12	87.8	13.6 \pm 0.02	91.3
Bt(b)-5	7.5	63.9	13.1 \pm 0.12	87.8	15.1 \pm 0.10	90.1
Bt(b)-10	6.5	58.0	12.1 \pm 0.10	96.7	13.1 \pm 0.12	83.8
Bt(b)-13	6.5	58.9	13.3 \pm 0.03	94.4	13.2 \pm 0.12	82.3
Bt(b)-14	5.5	54.2	14.5 \pm 0.02	93.3	13.7 \pm 0.10	78.6
Bt(b)-17	5.5	59.8	14.4 \pm 0.05	94.4	13.8 \pm 0.03	88.3
Bt(b)-15	4.5	61.0	15.7 \pm 0.10	92.2	15.1 \pm 0.02	85.6
Bt(b)-16	4.5	62.1	13.0 \pm 0.10	96.7	12.8 \pm 0.10	85.9
Control	-	62.9	12.0 \pm 0.13	94.4	13.3 \pm 0.12	85.9

¹⁾ Cry1Ab accumulation was determined using a Densitograph (ATTO Co.) compared to pure Cry1Ab protein.

²⁾ Feeding area was measured with Leaf Area Measure (Hayashi Denko Co.) on the 5th day using first instar larvae.

³⁾ Larval duration, pupation rate, pupal duration and emergence rate were determined by using the data of days or rate of third instar larvae to pupa and pupa to adult.

The letters means Average \pm ξ

*and ** ; significant at the 5 % and 1 % levels, respectively

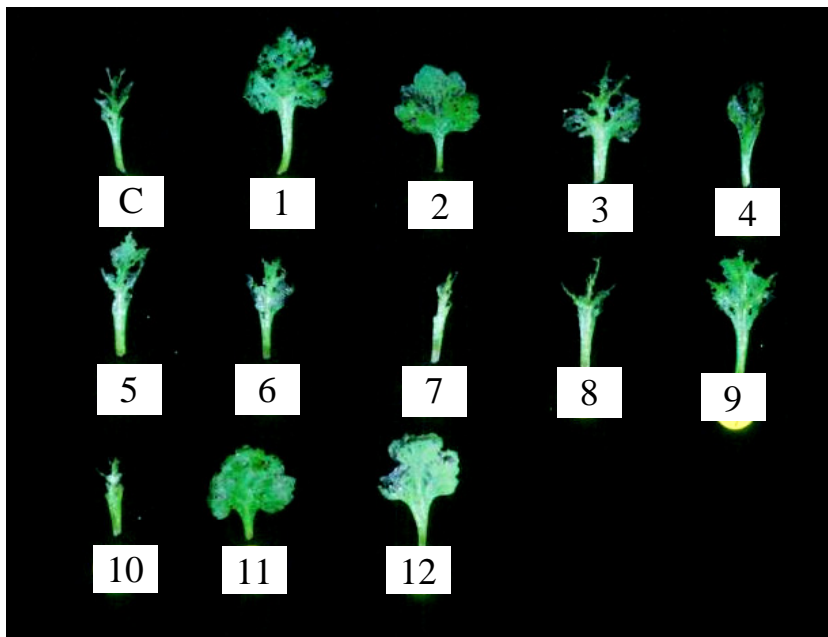


Fig. 24. Bioassay of insect feeding on the chrysanthemum leaf.
The five first instar larvae of *H. armigera* were allowed to feed on leaves of transformed and non-transformed plants.
C: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'
1-12: Bt-transformed lines (1: Bt(b)-1, 2: Bt(b)-2, 3: Bt(b)-3, 4: Bt(b)-4, 5: Bt(b)-5, 6: Bt(b)-6, 7: Bt(b)-7, 8: Bt(b)-8, 9: Bt(b)-9, 10: Bt(b)-10, 11: Bt(b)-11, 12: Bt(b)-12)

4 - 2 - 2 *Bacillus thuringiensis* 由来改良 *cry1Ab* 遺伝子導入による耐虫性個体の作出

1) *cry1Ab* 遺伝子の塩基配列の改良

4つのDNA断片をそれぞれ10クローンずつ合成した。シーケンスの結果、設計どおりの塩基配列を持ったクローンが各断片とも1~3個ずつ作成できた。*cry1Ab* 遺伝子に含まれる ATTTA sequence を除去することで、G+C含量を増加させ、さらにキク科植物のコードンにあわせて改良し、改良 *cry1Ab* 遺伝子 (*mcbt*) を人工合成した (Fig. 19)。この結果、615個のコードンのうち、442個のコードンが変更になり、G+C含量は36.9%から54.9%に増加した (Table 21)。

2) 再分化効率

3,618葉片のうち、G418 20 mg/lを含む選抜培地上で、411個の葉片がカルスを形成した。そこから317個の植物体が再分化してきた。カルス形成率は葉片あたりで11.4%、再分化率は葉片あたりで8.8%であった (Table 22)。

3) *mcbt* 遺伝子の確認

T-DNA 領域内に1つだけ存在する *Xba*I サイトで、再分化植物体から抽出したゲノムDNAを消化し、サザンブロット分析を行い、導入遺伝子の存在とコピー数について分析した。その結果、全ての再分化植物体から、*mcbt* 遺伝子をコードするプローブによって1~3つのバンドが検出された。非組換えキクからはバンドは検出されなかった (Fig. 25)。

4) RNA 分析

mcbt 遺伝子および改良していない *cry1Ab* 遺伝子をもつ組換えキク、および非形質転換キクについて、ノーザンブロット分析を行った。*mcbt* 遺伝子を有する組換えキクでは、1.8 kbpにはっきりしたバンドが検出されたが、改良していない *cry1Ab* 遺伝子をもつ組換えキク [Bt(b)-11] では、mRNAが崩壊 (degradation) していた。非組換えキクからはバンドが検出されなかった (Fig. 26)。

5) Cry1Ab タンパク質の同定

組換えキクのうち、無作為に20個体を抽出し、ウェスタンブロット分析を行った。*mcbt* を持つ組換えキクからは58 kDa、改良していない *cry1Ab* 遺伝子を持つ組換えキク [Bt(b)-11 および Bt(b)-12] からは56 kDaのバンドが検出された。一方、大腸菌 *Escherichia coli* JM109: pIG121*mcbt* で合成されたCry1Abタンパク質62 kDaであった。発現量としては、総タンパク質50 µgあたり10.5-80 ng (0.021-0.16%総タンパク質あた

り)であった。非組換えキクからはバンドは検出されなかった (Fig. 27)。

6) 耐虫性検定

オオタバコガ初齢幼虫の食害面積は、*mcbt* 遺伝子による Cry1Ab タンパク質の発現量と高い負の相関があった ($y=165.48e^{-0.0697x}$ 、 $R^2=0.9371$)。発現量が総タンパク質 50 μg あたり 9 ng までは、非組換えキクとの間に 5%水準で Fisher's protected LSD による有意差が認められなかった (Table 23、Fig. 28)。生存時間分析では、10.6 ng 以下で非組換え体との間に有意差が認められなかった (5%水準、Tukey-Cramer's HDS)。47.6 ng 以上になると、オオタバコガ幼虫は、全て初齢で死亡した。食害試験に用いた幼虫を解剖したところ、非組換えキクを食害させた幼虫の中腸や結腸は弾力があり、正常な色を示していたが、改良していない *cry1Ab* 遺伝子を導入したキクでは、中腸がやや変色し、結腸が白濁していた。さらに *mcbt* 遺伝子を導入した組換えキクでは中腸は褐変し、結腸が寸断されていた (Fig. 29)。

mcbt を持つ組換えキクについては、導入遺伝子 (*mcbt*) が 1~2 コピーの組換え体は高い耐虫性を示したが、3 コピー以上になると耐虫性が抑えられた (Table 23)。

Table 21. Modification of codons in *cryIAb* gene of *Bacillus thuringiensis* for high expression in chrysanthemum.

Amino acid		Total number	Modified number
Ala	A	31	18
Arg	R	43	25
Asn	N	44	33
Asp	D	23	17
Cys	C	2	1
Gln	Q	31	20
Glu	E	30	18
Gly	G	46	26
His	H	10	10
Ile	I	46	45
Leu	L	49	40
Lys	K	3	3
Met	M	9	0
Phe	F	36	29
Pro	P	34	17
Ser	S	64	53
Thr	T	42	33
Trp	W	9	1
Tyr	Y	25	21
Val	V	38	32
Total number		615	442

Table 22. Transformation frequency of *Bacillus thuringiensis* modified *cryIAb* gene in chrysanthemum cultivar 'Shuho-no-chikara'.

Transformation system	Number of leaf segments cultured (A)	Number of regenerated plantlets (B)	Number of transformed plantlets ¹ (C)	Transformation frequency (C/A : %)
Callus induction (CI)	3,618	317	317	8.8

¹⁾ Transformation was confirmed by Southern blot analysis.

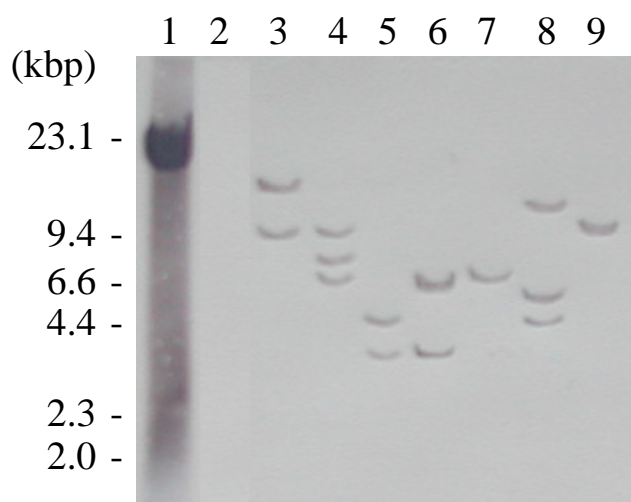


Fig. 25. Southern blot analysis of putative transgenic chrysanthemum with modified *cryIAb* (*mcbt*) gene.

Genomic DNA digested with *Eco* RV and hybridized with the *mcbt* specific probe.

Lane1: pIG121*mcbt*

Lane2: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'

Lane3-9: Bt-transformed lines (3: mcBt(b)-1, 4: mcBt(b)-2, ---9: mcBt(b)-7)

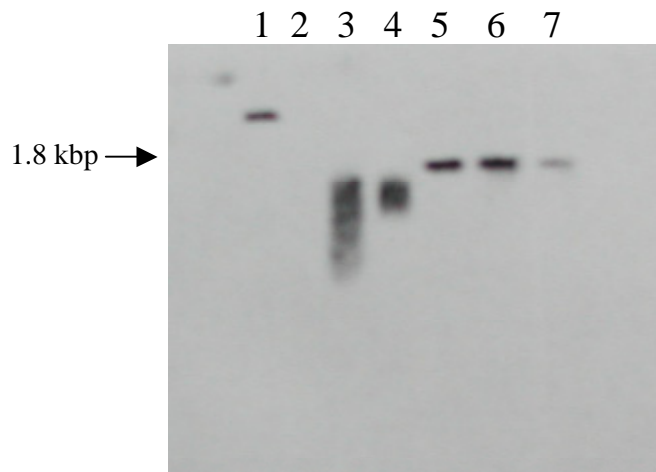


Fig. 26. Northern blot analysis of transgenic chrysanthemum with modified *cryIAb* gene. Total RNA was isolated from leaves of control, non-modified *cryIAb* gene and modified *cryIAb* (*mcbt*) gene, and approximately 20 μ g total RNA was applied in each lane. The probe is the 470 bp specific fragment of *mcbt* gene.

Lane1: pIG121*mcbt*
 Lane2: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'
 Lane3, 4: non-modified *cryIAb*-transformed lines (3: Bt(b)-11, 4: Bt(b)-12)
 Lane5-7: modified *cryIAb*-transformed lines (5: mcBt(b)-1, 6: mcBt(b)-4, 7: mcbt(b)-2)



Fig. 27. Western immunoblot analysis of leaf from chrysanthemum plants expressing the *mcbt* gene. Lanes 1, 2 and 3: 50, 25 and 5 ng of Cry1Ab protein
Lane 4: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'
Lanes 5-12: Bt-transformed lines (5: Bt(b)-11, 6: Bt(b)-12, 7: mcBt(b)-1, 8: mcBt(b)-15, 9: mcBt(b)-4, 10: mcBt(b)-7, 11: mcBt(b)-2, 12: mcBt(b)-14)
25 μ g of total soluble protein was loaded on 4 to 12 lanes.

Table 23. Insect bioassay of transformed lines using *Helioverpa armigera*

Lines	Cry1Ab expression (ng/50µg total protein) ¹⁾	No. of bands by Southern blot analysis	Experiment 1		Experiment 2						
			Feeding leaf area ²⁾ (%)		No. of larvae survived				destroyed midguts	No. of pupae	No. of adult emerged
				L1	L2	L3	L4				
mcBt(b)-1	80.0	2	0.8 a*	50	0	-	-	++	-	-	a **
mcBt(b)-15	75.0	1	0.8 a	50	0	-	-	++	-	-	a
mcBt(b)-10	65.0	1	1.0 a	50	0	-	-	++	-	-	a
mcBt(b)-12	55.0	2	1.9 b	50	0	-	-	++	-	-	a
mcBt(b)-17	50.2	2	5.2 b	50	0	-	-	++	-	-	a
mcBt(b)-5	47.6	1	6.2 ce	50	0	-	-	++	-	-	a
mcBt(b)-13	47.0	1	6.6 ce	50	14	4	2	++	2	0	ab
mcBt(b)-3	46.6	2	6.9 ce	50	8	2	0	++	-	-	ab
mcBt(b)-4	45.6	2	7.2 ce	50	15	6	3	++	3	0	ab
mcBt(b)-18	45.6	1	7.4 ce	50	16	9	6	++	3	0	ab
mcBt(b)-7	43.2	1	7.8 ce	50	16	9	7	++	2	0	ab
mcBt(b)-19	43.2	2	7.9 ce	50	19	13	7	++	6	1	abc
mcBt(b)-9	41.2	2	8.8 cde	50	27	21	11	++	10	2	abc
mcBt(b)-20	40.6	1	10.2 de	50	34	19	11	+	8	2	c
mcBt(b)-6	30.6	3	51.3 f	50	44	38	23	±	15	4	d
mcBt(b)-8	29.6	3	50.2 f	50	42	39	21	±	18	11	d
mcBt(b)-11	12.3	3	49.1 f	50	41	37	19	±	18	13	d
mcBt(b)-2	10.6	3	87.0 g	50	50	48	46	-	46	41	e
mcBt(b)-16	10.0	3	70.9 g	50	47	47	47	-	47	42	e
mcBt(b)-14	9.0	3	92.1 h	50	50	48	48	-	47	41	e
Bt(b)-11	40.0	1	10.3 de	50	48	42	42	±	42	26	e
Bt(b)-12	36.6	1	12.1 I	50	47	46	43	±	43	32	e
Control	-	-	91.1 h	50	48	46	43	-	43	35	e

¹⁾ Cry1Ab accumulation was determined using a Densitograph (ATTO co.) compared to pure Cry1Ab ICP.

²⁾ Feeding area was measured with Leaf Area Measure (Hayashi Denko co.) on the 5th day using first instar larvae.

³⁾ The results of statistical analysis of the larval survival pattern from the first instar larvae to the adults by Fisher's protected LSD.

* The data followed by the same letter are not significantly different at the 5 % by Fisher's protected LSD.

** The same letter in the column are not significantly different at the 5 % by Tukey-Cramer's HDS.

L1, L2, L3, and L4 meaned first larvae stage, second larvae stage, third larvae stage and fourth (final) larvae stage, respectively.

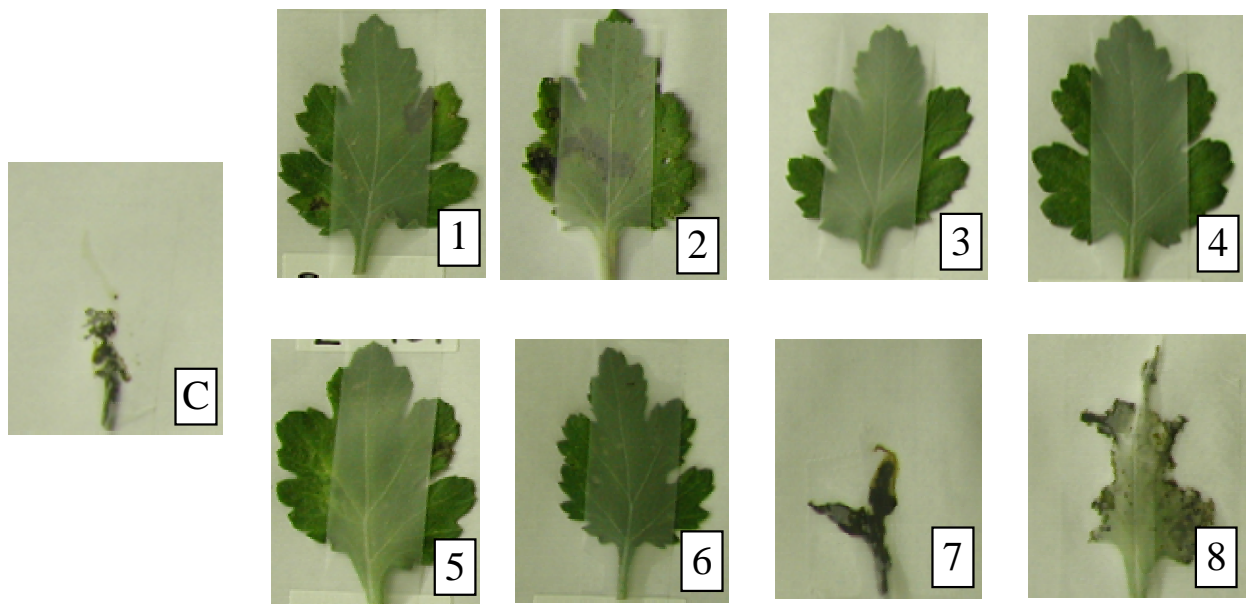


Fig. 28. Bioassay of insect feeding on the chrysanthemum leaf.

The five first instar larvae of *H. armigera* were allowed to feed on leaves of transformed and non-transformed plants.

C: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'

1-8: Bt-transformed lines (1: Bt(b)-11, 2: Bt(b)-12, 3: mcBt(b)-1, 4: mcBt(b)-15
5: mcBt(b)-4, 6: mcBt(b)-7, 7: mcBt(b)-2, 8: mcBt(b)-14)

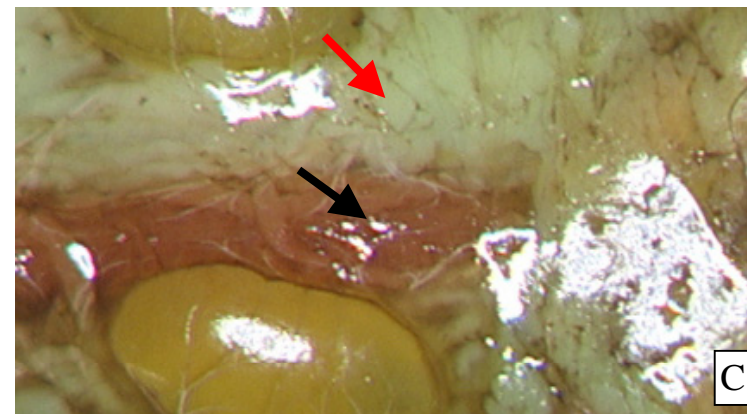
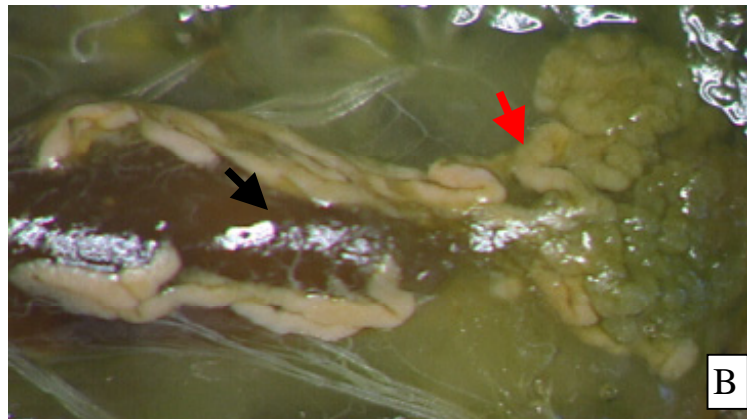
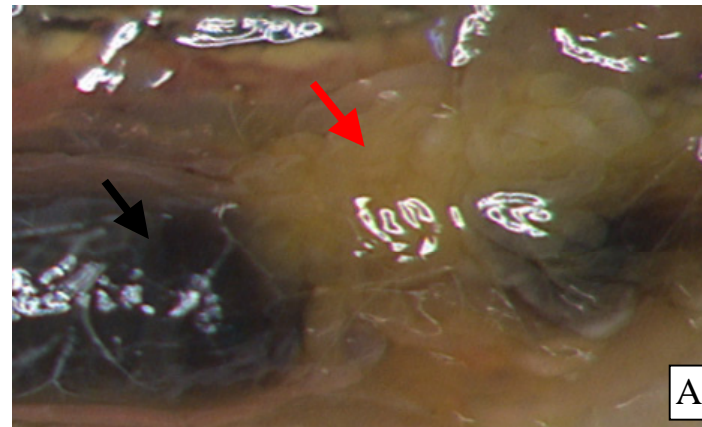


Fig. 29. Light micrographs of midguts of the third instar *H. armigera* larvae.
A: Control midgut 50 hr after treatment with non-transformed chrysanthemum leaves.
B: The midgut 50 hr after treatment with transformed chrysanthemum Bt(b)-11 leaves.
C: The midgut 50 hr after treatment with transformed chrysanthemum mcbt(b)-1 leaves.
The black arrows indicate midgut and red arrows indicate colon .

4 - 3 考察

キクの生産現場においては、農薬散布量の増大に伴う栽培者の健康や環境に対する負荷、コスト増大が大きな問題になっている。そこで、*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 由来の耐虫性遺伝子 *cryIAb* をキクに組み込み、耐虫性キクの作出を目的とした。改良をしないまま *cryIAb* 遺伝子を導入したところ、組換えキク体内では Cry1Ab タンパク質の分子量 (56 kDa)、大腸菌では 62 kDa のタンパク質が合成された。こうした報告はワタ (Perlak *et al.* 1990) や、イネ (Fujimoto *et al.* 1993) でも報告されている。これは、Cry1Ab タンパク質がアミノ酸配列の 28 と 29 の間、および 601 と 602 の間にトリプシン分解部位を持ち、キク内在性トリプシン様物質によってこの部位でタンパク質が消化されるけれども、こうして消化されたタンパク質は、殺虫活性を失わないことも確認されている (Höfte *et al.* 1986, Nagamatsu *et al.* 1984)。

改良しない *cryIAb* 遺伝子の導入では、キクの主要害虫であるオオタバコガ幼虫に対して、食害抑制効果と発育遅延効果をもたらす組換えキクの作出に成功した。しかしながら、オオタバコガの初齢幼虫に対する殺虫性がなかったことから、*cryIAb* 遺伝子の発現をキク体内で高める必要がある。

Bt-toxin タンパク質が植物体内で十分に合成されないことは以前から報告されており、その原因を De Rocher *et al.* (1998) は、mRNA の早期分解とし、Ohme-Takagi *et al.* (1993) と Chen and Shyu (1995) は ATTTA-sequence (polyadenylation signal sequence) が mRNA の不安定化を引き起こすとしている。そこで、こうした mRNA 不安定配列を除き、高等植物型の塩基配列に改良することで、Perlak *et al.* (1990; 1991) は Bt-toxin タンパク質合成量を 100 倍に高めた組換えワタの作出に成功している。

そこで、塩基配列を改良し、GC 含量を 36.9% から 54.9% に増加させ、mRNA 不安定配列を除去した改良 *cryIAb* 遺伝子 (*mcbt*) を人工合成し、遺伝子組換えによってキクに導入した。ノーザンブロット分析の結果、改良していない *cryIAb* 遺伝子の mRNA は崩壊を起こしていることが判明した。このことがオオタバコガ初齢幼虫に対する殺虫活性の欠如につながったと考えられる。*mcbt* 遺伝子は 1.8 kbp にはっきりしたバンドが検出され、完全長の mRNA が合成されていることが明らかになった。ウェスタンブロット分析では、大腸菌で 62 kDa、改良していない *cryIAb* 導入キクで 56 kDa、*mcbt* 導入キクで 58 kDa であった。このように分子量に差が生じたのは、*mcbt* を導入した組換え体では大腸菌で合成された 62 kDa の Cry1Ab タンパク質がアミノ酸配列の 28-29 と 601-602 に存在するトリプシン分解部位でキクに内在するトリプシン様物質によって消化されて 58 kDa になり、さらに改良していない *cryIAb* 遺伝子を導入した組換え体では、ノーザンブロット分析の結果から、1.6 kbp 付近に存在する mRNA 不安定配列 (Murray *et al.* 1991) によって mRNA が切断されて 56 kDa になったと考えられる。また、Cry1Ab タンパク質の合成量は、

改良前の約 2 倍に増加し、オオタバコガ幼虫に対する高い殺虫性効果を持った組換えキクの作出に成功した。

導入遺伝子数の違いは、第 1 節で使用した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 では形質転換効率は 5.2%、導入遺伝子数は 1 コピーであったことから、これは *Agrobacterium* の感染効率の差と考えられる。また、導入遺伝子の発現抑制 [Transgene inactivation (silencing)] については、いくつかの植物種で報告されており、Vaucheret *et al.* (1998) は転写抑制型ジーンサイレンシング (TGS: Transcriptional gene silencing) 或いは転写後抑制型ジーンサイレンシング (PTGS: Post-transcriptional gene silencing) と分類している。転写抑制型では、1つ或いは複数の遺伝子が高度に DNA メチル化を受けたゲノム領域 (いわゆるヘテロクロマチン部位) の近傍に位置する遺伝子座に導入された場合、導入遺伝子の DNA 塩基配列とその近傍のゲノム配列の間でメチル化パターンに大きな不適合が生じ、それによって導入遺伝子のメチル化と不活性化が引き起こされるとしている。一方、PTGS では、主に、mRNA の過剰生産や転写途中の切断によって、適正な長さの mRNA が合成されず、それによって導入遺伝子の不活化が起こるとしている (Dean *et al.* 1986、Shaw and Kamen 1986、Goodall and Filipowicz 1989、光原ら 2002)。また三木と島本 (2004) は、RNA による PTGS が、二本鎖 RNA (dsRNA) をトリガーとして起こると報告していることから、改良 *cryIAb* 遺伝子における mRNA 発現レベルや安定性向上により、この改良 *cryIAb* の mRNA をテンプレートにして RNA-direct RNA polymerase (RdRP) が働いて dsRNA が形成され、配列特異的な mRNA の分解および発現抑制が起こった可能性も考えられる。改良 *cryIAb* 遺伝子を導入した形質転換キク系統において、3 コピー以上の導入遺伝子を持つ系統では耐虫性が弱い或いは全くないという結果であった。改良 *cryIAb* 遺伝子については、導入前に mRNA の不安定配列を除去したので、この改良 *cryIAb* の mRNA の特異的切断 (specific degradation of mRNA) の可能性は低い。戸栗ら (2003) は、35S プロモーターでドライブした *gus* 遺伝子の発現レベルが低いキク組換え体では、35S プロモーター配列が高度にメチル化されていたと報告していることから、3 コピー以上の同一プロモーター (35S) が存在することで、何らかのシグナルを誘発し、メチル化を亢進したという可能性が考えられる。従って、キクの遺伝子組換えにおいても、発現抑制を受けにくいプロモーターを探索し、さらに導入遺伝子のコピー数を制御する必要があると思われる。

このように、遺伝子組換え技術によって、耐虫性キクの作出に世界で初めて成功した。この耐虫性キクは害虫防除のコスト、労働時間の短縮のみならず、生産者の健康や環境への負荷を軽減するのに非常に有用である。このように、交雑育種ではその生殖的隔離によって導入できなかった農業上有用な形質を、遺伝子組換え技術を用いることでキクに付与することが可能になった。今後は、ウイルス病耐性や花形などの器官形成に関

わる遺伝子など、交雑育種では導入が困難な有用遺伝子をキクに導入するとともに、発現制御のための技術開発を行う必要がある。さらに遺伝子組換えキクについては、環境影響評価を行い、一般圃場での実用化に向けて、研究を行っていく必要がある。

まとめ

- 1) *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 由来の耐虫性遺伝子 *cry1Ab* を、確立した形質転換技術によってキクに導入し、耐虫性キクの作出を試みた。改良していない *cry1Ab* 遺伝子を用いて形質転換を行ったところ、抗生物質 G418 を含む選抜培地上で 1,760 の葉片のうち、162 の葉片がカルスを形成し（葉片あたりのカルス形成率 9.2%）、そこから 92 個体の幼植物体が再分化（葉片あたりの再分化率 5.2%）してきた。
- 2) 全再分化植物体 92 個体より DNA を抽出し、サザンブロット分析を行ったところ、*cry1Ab* 遺伝子の存在を示すバンドが全個体から検出された。バンドの数は全て1つで、個体毎に独立していた。このことから、再分化植物体はそれぞれ独立しており、少なくとも 1 コピーの *cry1Ab* 遺伝子を有していることが明らかになった。
- 3) 再分化植物体より無作為に 20 個体を抽出し、Cry1Ab タンパク質の定量を行った。20 個体すべてより、濃度の異なる 56 kDa のバンドが検出された。再分化植物体の Cry1Ab タンパク質量は、可溶性タンパク質あたり 0.009 ~ 0.08% であった。
- 4) オオタバコガに対する殺虫性試験を行ったところ、再分化植物体のうち、Cry1Ab タンパク質の合成量が可溶性タンパク質 50 μ g あたり 15.5 ng 以上の個体で、食害面積が 5% 水準で有意に低下した。もっとも低かったのは Bt(b)-11 で、非組換え植物の 62.9% に対し 4.7% であった。
- 5) オオタバコガの発育試験の結果、3 齢幼虫から蛹になるまでの期間（蛹化まで日数）は、Cry1Ab タンパク質の合成量が可溶性タンパク質 50 μ g あたり 32.5 ng 以上の形質転換個体で、5% 水準で有意に長くなった。成虫になるまでの期間（羽化まで日数）は、Cry1Ab タンパク質の合成量が可溶性タンパク質 50 μ g あたり 32.5 ng と 36.5 ng の個体 [Bt(b)-2 および Bt(b)-12] で、5% 水準で有意に長くなった。可溶性タンパク質 50 μ g あたり 40.0 ng を合成した個体 [Bt(b)-11] では、有意差は認められなかった。蛹化率にはどの個体も有意差は認められなかったが、羽化率では、Bt(b)-11 で有意差が認められた。殺虫性効果はどの個体でも観測されなかった。
- 6) 耐虫性遺伝子 *cry1Ab* 遺伝子を高発現させ、殺虫活性を持った耐虫性キクを作出するため、塩基配列をキクのコドンに変更し、mRNA の不安定配列を除去し、改良 *cry1Ab* 遺伝子 (*mcbt*) を人工合成した。615 個のコドンのうち、442 個のコドンを変更し、G + C 含量を 36.9% から 54.9% に増加させた。
- 7) この *mcbt* 遺伝子を *Agrobacterium* に導入し、キクに形質転換したところ、3,618 葉片のうち、G418 20 mg/l を含む選抜培地上で、411 個の葉片がカルスを形成した。そこから 317 個の植物体が再分化してきた。カルス形成率は葉片あたりで 11.4%、再分化率は葉片あたりで 8.8% であった。

- 8) サザンブロット分析により、全ての再分化植物体から、*mcbt* プローブによって1-3つのバンドが検出された。非組換え植物からはバンドは検出されなかった。以上から、再分化植物体は少なくとも1-3コピーの *mcbt* 遺伝子を有すると言える。
- 9) *mcbt* 遺伝子および改良していない *cry1Ab* 遺伝子をもつ組換えキク、および非形質転換体について、ノーザンブロット分析を行った。*mcbt* 遺伝子を有する組換えキクでは、1.8 kbp にはっきりしたバンドが検出されたが、改良していない *cry1Ab* 遺伝子をもつ組換えキク [Bt(b)-11] では、mRNA の分解が起きていた。非組換え体からはバンドが検出されなかった。
- 10) 組換えキクのうち、無作為に20個体を抽出し、ウェスタンブロット分析を行ったところ、*mcbt* を持つ組換えキクからは58 kDa、改良していない *cry1Ab* 遺伝子を持つ組換えキク [Bt(b)-11 および Bt(b)-12] からは56 kDa のバンドが検出された。一方、大腸菌 *Escherichia coli* JM109: pIG121*mcbt* で合成された Cry1Ab タンパク質は62 kDa であった。発現量としては、総タンパク質 50 μ g あたり 10.5-80 ng (0.021-0.16% 総タンパク質あたり) であった。
- 11) オオタバコガ初齢幼虫の食害面積は、*mcbt* 遺伝子による Cry1Ab タンパク質の発現量と高い負の相関があり ($y=165.48e^{-0.0697x}$ 、 $R^2=0.9371$)、発現量が総タンパク質 50 μ g あたり 9 ng までは、非組換え体との間に5%水準で Fisher's protected LSD による有意差が認められなかった。生存時間分析では、10.6 ng 以下で非組換え体との間に有意差が認められなかった。47.6 ng 以上になると、オオタバコガ幼虫は、全て初齢で死亡した。解剖の結果、これらの死亡幼虫の中腸は褐変し、結腸は寸断されていた。さらに、*mcbt* 遺伝子が1~2コピーの組換え体は高い耐虫性を示したが、3コピー以上になると耐虫性が抑えられた。

第5章 遺伝子組換え植物の安全性に関わる評価試験

現在日本においては、生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書の批准に伴い、国内担保法である「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号）が制定され、2004年2月19日に施行された。これは、遺伝子組換え生物などの開発・使用について、今までは文部科学省、厚生労働省、農林水産省および経済産業省がそれぞれ策定したガイドラインに基づき、運用されてきたが、遺伝子組換え生物等が生物多様性におよぼす影響を防止するため、国際的に取り組もうとする動きがあり、前出の議定書の的確かつ円滑な実施を行うため制定された。この法律の下で、遺伝子組換え植物について、閉鎖系温室および非閉鎖系温室（特定網室）（第2種使用）、隔離圃場（第1種使用）にて、1.導入遺伝子の安定性、2.競合における優位性、3.有害物質の産生性、4.交雑性などについて生物多様性影響評価を行い、その評価の結果を踏まえて生物の多様性を損なう恐れがあるか否かを総合的に判断する。

本研究は、実験当時（2000年4月～2002年3月）に従うべき指針とされた、文部科学省の定める組換えDNA実験指針に基づいて、閉鎖系温室にて、導入した遺伝子の発現安定性を調べ、環境への影響が原品種と相違ないかどうかを調査し、安全性を評価した。

最初に、生育・開花特性として、*Bacillus thuringiensis* 由来の *cry1Ab* 遺伝子をキクに導入し、鱗翅目昆虫オオタバコガの食害抑制効果と発育遅延効果をもたらす耐虫性キクについて、閉鎖系温室内での生育特性などが非組換えキクと相違ないかを調査した。

2番目に導入遺伝子の安定性として、組換えキクの培養株および順化後挿し芽増殖した温室栽培株を用いて合成される殺虫性タンパク質を定量し、合成量の変化を検定した。さらに、培養株および順化後の温室栽培株が示す耐虫性を、オオタバコガを用いた食害試験で検定することを目的とした。

3番目には、アレロパシー物質（他植物への有害物質）産生性として、組換えキクがアレロパシー物質を産生し、他の植物や環境に悪影響を与える可能性について調査するため、レタス種子を用いた生物検定により（1）大気中に放出されるアレロパシー物質、（2）土壌中に放出されるアレロパシー物質、（3）植物体内に産生されるアレロパシー物質および、（4）後作におよぼす影響について検討した。またガスクロマトグラフィーを用いて（5）栽培大気中に放出される揮発成分の分析を行った。

4番目には、土壌微生物への影響（土壌微生物への有害物質産生性）として、組換えキクと非組換えキクの栽培土壌中の微生物数を比較し、組換え植物の栽培が土壌微生物相に与える影響を調査した。

5 番目には、遺伝子拡散（交雑性）に関して、2001 年 6～12 月にわたって閉鎖系温室（昼温 25℃、夜温 20℃ に設定）内で栽培した組換えキク・非組換えキクおよび交雑試験に用いるキクの近縁種の花粉の形状および花粉稔性、花粉の寿命、人工風による花粉の飛散性を調査し、近縁種との交雑を試みた。

最後に、組換えキクを作出する際に用いた *Agrobacterium tumefaciens* が、作出した組換えキクに付着して外部に拡散することを回避するため、安全性評価に供試する組換え植物に *A. tumefaciens* が残存していないことを確認した。

5 - 1 材料および方法

5 - 1 - 1 生育および開花特性調査

植物材料として、非組換えキクである原品種‘秀芳の力’(2 - 1 - 1の方法によって作成した無菌植物体)と第4章で作出した‘秀芳の力’に *Bacillus thuringiensis* 由来の *cryIAb* 遺伝子導入した組換えキク Bt(b)-11 および Bt(b)-12 の2系統を用いた。それぞれの試験管培養物 (T_0) を1999年4月に、パーミキュライト(旭工業株式会社、Japan)を用いて順化した後、混合用土[園芸培土(呉羽化学工業株式会社、Japan):パーライト(フヨー工業株式会社、Japan):パーミキュライト=1:1:1]を入れたポリポット($\phi=15$ cm)に幼植物体を植え付けた。昼温25 夜温20 の閉鎖系温室にて1年間栽培した。この間電照は行わなかった。2000年2月および2001年2月より2ヶ月間人工気象器にて10 の低温処理を行った後、挿し芽増殖を行い、5~6月に昼温25 夜温20 の閉鎖系温室にて栽培し、栽培試験用の苗を育成した。挿し芽1回目(2000年4月実施)の組換えキクを T_1 、挿し芽2回目(2001年4月実施)の組換えキクを T_2 、挿し芽1回目(2000年4月実施)の非組換えキクを C_1 、挿し芽2回目(2001年4月実施)の非組換えキクを C_2 とした。苗は混合用土を詰めたプラスチックバット(65×45×12 cm、作土の深さ10 cm)に1バット5株の割合で7月上旬に定植した。定植後2週間目に摘心し、摘心2本仕立てとした。これらを閉鎖系温室にて栽培した。定植後光中断方法(午前0時から2時まで電照)にて電照を開始した。電照は10月上旬まで行った。腋芽は摘みとり、1茎1花とした。11月下旬の開花期に開花特性調査を行った。栽培は作物耕種基準(福井県1979)のキクの基準に則って行った。試験区の規模は、1系統2バットとした。

5 - 1 - 2 導入遺伝子の安定性

(1) 導入遺伝子の検出

アグリポット内で25℃、16時間白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) =60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 日長下で培養した組換え当代 (T_0) の組換えキクおよび、2000年に5 - 1 - 1の手法で順化・育成した T_1 および C_1 について、4 - 1 - 1の手法にて *cry1Ab* 遺伝子の検出を行った。

(2) Cry1Ab タンパク質の定量

cry1Ab 遺伝子の導入が確認された組換えキクについて、アグリポット内で25℃、16時間白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) =60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 日長下で培養した組換え当代 (T_0) の組換えキクおよび、5 - 1 - 1の手法で育成した組換えキク T_1 および、 T_2 、非組換えキク C_0 、 C_1 および C_2 について、4 - 1 - 1の手法にてCry1Abタンパク質の定量を行った。

(3) 耐虫性の検定

1) オオタバコガ (*Helicoverpa armigera*) 幼虫による食害試験

5 - 1 - 1の手法で育成した組換えキク T_1 および、 T_2 、非組換えキク C_1 および、 C_2 について4 - 1 - 1の手法にて食害試験を行った。

2) オオタバコガの発育試験

オオタバコガの3齢幼虫を用い、5 - 1 - 1の手法で育成した組換えキク T_1 および、 T_2 、非組換えキク C_1 および、 C_2 について4 - 1 - 1の手法にて発育試験を行った。

5 - 1 - 3 アレロパシー物質産生性の検討

(1) 大気中に放出されるアレロパシー物質の有無

閉鎖系温室 (25) で 1999 年 4 月に順化し、5 - 1 - 1 の手法にて育成した組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、T₂) および非組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、C₂) を、6 月上旬に園芸培土 50 ml を敷き詰めたアグリポットに定植し、25 、16 時間日長、白色蛍光灯 [photosynthetic photon flux (PPF) (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] 下の人工培養室 (P1 室) にて育成した。6 月下旬に、レタス種子 (グレートレークス 366) を、1% 次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間消毒後、滅菌水で湿らせた濾紙を置いた 3 cm シャーレに約 50 粒播種し、キク植物体の茎より 5 mm 離れた株元に設置した。これを同条件の人工培養室に静置し、2 週間後、発芽率・生体重・茎長および根長を測定した (Fig. 30)。試験は 1 回 5 シャーレで、3 反復行った。

(2) 土壌中に放出されるアレロパシー物質の有無

(1) と同様に閉鎖系温室 (25) で 1999 年 4 月に順化し、5 - 1 - 1 の手法にて育成した組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、T₂) および非組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、C₂) を 6 月上旬に園芸培土 50 ml を敷き詰めたアグリポットに定植し、同条件の人工培養室に静置した。2 週間後、土壌中の水を、ガーゼでろ過して採取し、1 ml を 3 cm シャーレに注入し、この中に 1% 次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間消毒したレタス種子 (グレートレークス 366) を約 50 粒播いた。これを同条件の人工培養室に静置し、2 週間後、発芽率・生体重・茎長および根長を測定した (Fig. 30)。試験は 1 回 5 シャーレで、3 反復行った。

(3) 植物体内に産生されるアレロパシー物質の有無

(1) と同様に閉鎖系温室 (25) で 1999 年 4 月に順化し、5 - 1 - 1 の手法にて育成した組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、T₂) および非組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、C₂) の葉片 4 g を乳鉢と乳棒で磨砕し、5 ml の蒸留水に懸濁した。この懸濁液 1 ml を 3 cm シャーレに注入し、この中に 1% 次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間消毒したレタス種子 (グレートレークス 366) を約 50 粒播いた。これを (1) と同条件の人工培養室に静置し、2 週間後、発芽率・生体重・茎長および根長を測定した (Fig. 30)。試験は 1 回 5 シャーレで、3 反復行った。

(4) 後作におよぼす影響

(1) と同様に閉鎖系温室 (25) で 1999 年 4 月に順化し、5 - 1 - 1 の手法にて育成した組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、T₂) および非組換えキク (茎長約 5

cm、挿し芽増殖 2 回目、C₂) を、6 月上旬から 12 月下旬までポリポット (φ=15 cm) で栽培した。収穫後、残さを土壤に鍬込み、その土壤を 50 ml を採取してアグリポットに入れ、1%次亜塩素酸ナトリウムで消毒したレタス種子 (グレートレークス 366) を約 50 粒播種した。そのまま閉鎖系温室内に静置し、2 週間後、発芽率・生体重・茎長および根長を測定した。試験は 1 回 5 シャーレで、3 反復行った。

(5) ガスクロマトグラフィーによる揮発成分の分析

(1) と同様に閉鎖系温室 (25) で 1999 年 4 月に順化し、5 - 1 - 1 の手法にて育成した組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、T₂) および非組換えキク (茎長約 5 cm、挿し芽増殖 2 回目、C₂) の葉身 (長径 5 cm、短径 3 cm) を用いた。葉身を直径 5mm のパンチでリーフディスクを 15 枚採取し、1.5 ml のバイアル瓶に入れ、30 で 15 分間密閉して揮発成分の平衡化を図った後、30 で 45 分間揮発成分の捕集を行った。固相マイクロ抽出法 (Solid phase micro extraction; SPME) により SPME ファイバーに捕集された揮発成分は、ガスクロマトグラフ (GC) の試料気化室にて 280 で 5 分間熱脱離を行い、カラムへ導入した。

GC 条件は次のとおりである。

ガスクロマトグラフ: パーキンエルマーオートシステム

カラム: TC-5 (30 m×内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm)

カラムオープン温度: 50 (3 分間保持) から 280 まで 7 /分で昇温、20 分保持

キャリアガス: ヘリウム、22.0 psig

検出器: 水素炎イオン化検出器 (FID)、280

試料導入: 280 、splitless 法



Production of volatile compounds Released compounds in soil from root. Compounds production in leaves and stems.

Fig. 30. Evaluation of allelopathic effects of transformed plants on germination and growth of lettuce seeds.

About 50 lettuce seeds were in each Petri dish ($\varphi=3$ cm), and they cultured at 25°C and 16-h photoperiod in the article culture room

5 - 1 - 4 土壤微生物相への影響

微生物の測定は、希釈塗布法（土壤微生物実験法、土壤微生物研究会編、1992）を用いた。土壤の採取は5 - 1 - 1で2001年の栽培試験（組換えキク T₂、非組換えキク C₂）に用いた混合用土 [園芸培土：パーライト：バーミキュライト = 1：1：1] から行った。定植前、生育初期（定植後2週間目）、生育中期（9月上旬）、生育後期（11月上旬）、および収穫後の5期において土壤を適宜採取し、ビニール袋内でよく混和した後、その30 gを500 ml三角フラスコ内で270 mlの15 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）とともに攪拌した。攪拌後15 mMリン酸緩衝液を用いて10²～10⁵倍希釈液を作成し、各希釈液0.1 mlを直径9 cmシャーレの寒天培地上に塗布した。同時に30 gの土壤を、105℃で24時間通風乾燥し、含水率を測定した（Fig. 31）。

細菌・放線菌測定用培地として、PTYG寒天培地（0.25 g/l Bacto Pepton、0.25 g/l Bacto Trypton、0.5 g/l Bacto Yeast extract、30 mg/l MgSO₄·7H₂O、3.5 mg/l CaCl₂·2H₂O、15 g/l 寒天）を使用し、25℃、7日間培養後、コロニー数を計測した。糸状菌測定用培地としてローズベンガル寒天培地（5 g/l Bacto Pepton、10 g/l グルコース、0.5 g/l MgSO₄·7H₂O、1 g/l K₂HPO₄、15 g/l 寒天）を使用し、25℃、4日間培養後のコロニー数を計測した。得られた結果はすべて乾土1 g当たりで換算した。各処理区とも5シャーレ用いた。

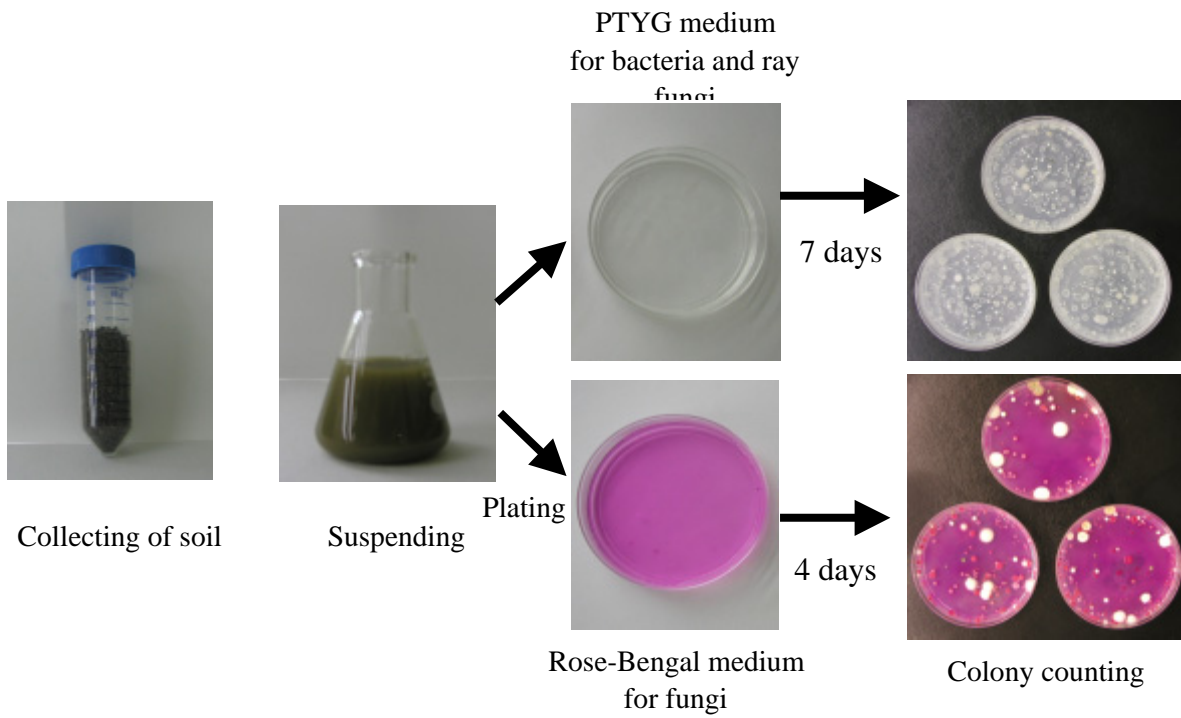


Fig. 31. Culture method for soil microflora.
 Collected soil was suspended by 15 mM phosphate buffer (pH7.0) and plated on several medium.
 The bacteria and ray fungi were cultured at 25°C for 7 days and fungi for 4 days in the dark.

5 - 1 - 5 遺伝子拡散に関する調査

(1) 花粉の形状と稔性

1) アセトカーミンによる染色

組換えキクおよび非組換えキクは、5 - 1 - 1の手法にて育成した 2001 年の栽培試験用の苗 (T_2 および C_2) を用い、ポリポットで生育させた。キク近縁種はスプレーギク ‘ロザンナ’ (*Dendranthema x grandiflorum*)、食用菊 ‘金康松’ (*D. x grandiflorum*)、ノジギク福井保存系統1号 (*D. occidentali japonense*, Fukui No.1)、アシズリノジギク福井保存系統1号 (*D. occidentali japonense* var. *ashizuriense*, Fukui No.1)、イソギク (*D. pacificum*) およびコンギク (*Aster ageratoides* var. *ovatus*) (Fig. 32) を用いた。これらについても 2001 年に同様な低温処理を行い、5 - 1 - 1と同様に苗を育成した。雌蕊が露出する前の組換え植物、非組換え植物および、キク近縁種の筒状花より花粉を採取し、プレパラート上でアセトカーミン染色を行い、1 時間後に花粉粒の染色程度を観察し、判定した。1 植物種、1 系統につき、10 花について調査を行った。

2) 花粉培地による花粉の発芽

花粉培地の作成

花粉培地は Ikeda and Numata (1998) の方法に従って作成した。キク品種 ‘秀芳の力’ (非組換えキク) の舌状花 (全体) 20 g を酢酸エチル 100 ml に浸漬し、密閉して 4 で 24 時間インキュベートし、ドラフト内で酢酸エチルを揮発させた。残った抽出物に液体培地 (100 mg/l H_3BO_3 、300 mg/l $CaCl_2$ 、0.01 mg/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、30% sucrose) を 10 ml 加え、密封して 30 のインキュベーター内で一晩保存した。懸濁液を乳鉢に入れて乳棒で磨砕し、さらに液体培地を 10 ml 加えて混合し、これを ‘酢酸エチル抽出液’ とした。その後、液体培地 : 酢酸エチル抽出液 = 3 : 1 (v/v) で混合し、花粉培地とした。

花粉の発芽

組換えキク (T_2)、非組換えキク (C_2) および、1) で用いたキク近縁種の開花した花の雄蕊より花粉を採取し、スライドガラス上に置床し、花粉培地を 1-2 滴滴下した。25 °C、16 時間日長、白色蛍光灯 [PPF (400 ~ 700 nm) = 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] 下で培養した。置床より 2 時間後、顕微鏡下で花粉管の伸長を観察した。2 時間後に花粉管が花粉直径程度に達したものを発芽と見なした。1 植物種、1 系統につき、10 花を供試した。

(2) 花粉の寿命

組換えキク (T_2)、非組換えキク (C_2) および、1) で用いたキク近縁種の筒状花から、

雌蕊の突出によって放出された花粉を採取し、プレパラート上へのせ、0～72時間後にアセトカーミン染色および発芽培地に置床し、花粉の寿命を推定した。1植物種、1系統につき、10花について調査を行った。

(3) 花粉の飛散性

筒状花から花粉が放出された組換えキク (T_2) および、非組換えキク (C_2) の花器後方 50 cm から、扇風機 (風速 3.5～7.5 m/s; TOSHIBA F-140B) で送風した。卵白を塗布したプレパラートを花器から 0、5、10m 離れた場所に置き、1時間後プレパラートにトラップされた花粉数を計測した。1系統につき、10花について調査を行った。

(4) 近縁種との交雑親和性

組換えキク (T_2)、非組換えキク (C_2) および、1) と同様のキク近縁種をそれぞれ花粉親・種子親として用いた。雌蕊の露出によって放出された花粉をシャーレ ($\varphi=9$ cm) に集め、これを雌蕊の柱頭が露出した種子親の筒状花に人工授粉した。人工授粉は小筆を用いて行った。授粉 1 日後に受精を示す柱頭の収縮の有無を調査するとともに、授粉 2ヶ月後に種子を採取し、湿らせた濾紙を入れたシャーレ ($\varphi=9$ cm) に入れ、25 暗黒下に 3 日間置き、発芽の有無を調査した。1 回の試験で 1 系統、1 植物種につき、10 花について人工授粉を行い、3 反復した。



Dendranthema x grandiflorum
cultivar, 'Rosanna'



D. x grandiflorum
cultivar, 'Kinkoumatsu'



D. occidentali japonense,
Fukui No.1



D. occidentali japonense
var. *ashizuriense*, Fukui No.1



D. pacificum



Aster ageratoides
var. *ovatus*

Fig. 32. The cultivars and wild species of *Compositae* family in the experiment of cross c to chrysanthemum.
Scale bar indicates 5 cm.

5 - 1 - 6 *Agrobacterium* 残存性の調査

組換えキクおよび非組換えキクは、5 - 1 - 1の手法にて育成した 2001 年の栽培試験用の苗 (T₂およびC₂) を用いた。(1)と同様に、閉鎖系温室内 (昼温 25、夜温 20 に設定) で栽培し、組換えキクおよび非組換えキク 10 g (根を含む) を滅菌水で洗浄した後、乳鉢と乳棒で磨砕し、5 ml の蒸留水に懸濁した。この懸濁液 100 μl を 50 mg/l kanamycin、40 mg/l rifampicin を含む AB 培地 (1 g/l NH₄Cl、300 mg/l MgSO₄·7H₂O、150 mg/l KCl、13.4 mg/l CaCl₂·2H₂O、2.5 mg/l FeSO₄·7H₂O、3 g/l K₂HPO₄、1.3 g/l NaH₂PO₄·7H₂O) に塗布し、形質転換に用いた *Agrobacterium* の残存性を調査した。対照区は *cry1Ab* 遺伝子の導入に用いた *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404: pIAbT1 とした。培養は 28 とし、培養期間は1週間とした。1 試験区 5 シャーレで、3 反復行った。

5 - 2 結果

5 - 2 - 1 生育および開花特性調査

結果を Table 24 および Fig.33 に示した。開花期は 2000 年および 2001 年とも、組換えキク Bt(b)-11 (T_1 , T_2) および Bt(b)-12 (T_1 , T_2)、非組換えキク (C_1 , C_2) とともに 11 月 25 ~ 26 日で、組換えキクと非組換えキクの間に有意な差異は認められなかった。植物体の全重は、各系統において 2000 年よりも 2001 年の方が若干軽い傾向が認められたが、2000 年および 2001 年それぞれの試験年および試験区において、組換えキクと非組換えキクで有意差はなかった。茎長は 2000 年よりも 2001 年の方が、各系統とも長かったが、それぞれの試験年および試験区において、組換えキクと非組換えキクの間に有意差はなかった。茎の太さは 2001 年よりも 2000 年の方が太めではあったが、各試験年と試験区において、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかった。葉数は 2000 年よりも 2001 年の方が多い傾向が認められたが、2000 年および 2001 年それぞれの試験年および試験区において、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかった。

花の大きさについて、長径、短径、最大花弁長ともに 2000 年より 2001 年の方が長く、大きな花を咲かせたが、2000 年および 2001 年それぞれ試験年および試験区において、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかった (Fig. 33)。

舌状花の数は 2001 年より 2000 年の方が多い傾向が認められたが、2000 年および 2001 年それぞれの試験年および試験区において、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかった。筒状花は舌状花と逆に、2000 年よりも 2001 年の方が多い傾向が認められたが、2000 年および 2001 年それぞれの試験年および試験区において、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかった (Fig. 33)。

以上により、挿し芽増殖 2 回目までにおいて、組換えキクと非組換えキクの生育および開花特性には有意差がないことが明らかになった。

Table 24. Morphological characteristics of transformed plants and non-transformed control.

Line	Year	Day of flowering (date/month)	Total weight (g)	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)	Number of leaves	Flowers				
							Flower diameter		Max. petal length(mm)	Number of floret	
						long(mm)	short(mm)			ray shaped	tubular shaped
Bt(b)-11 (T ₁)	2000.A	26/Nov. ±0.2	59.8 ±0.3	48.1 ±0.5	6.2 ±0.1	37.7 ±3.1	9.2 ±0.1	8.8 ±0.1	4.7 ±0.1	242.3 ±1.1	24.2 ±1.1
Bt(b)-12 (T ₁)	2000.A	26/Nov. ±0.3	54.6 ±0.7	49.4 ±0.2	6.3 ±0.2	39.9 ±2.2	9.3 ±0.2	8.9 ±0.2	4.6 ±0.2	261.3 ±1.2	18.2 ±2.2
Control (C ₁)	2000.A	26/Nov. ±0.0	55.5 ±0.2	48.8 ±0.2	5.9 ±0.2	39.3 ±2.2	9.1 ±0.2	8.6 ±0.2	4.7 ±0.2	264.6 ±1.3	13.2 ±2.2
Bt(b)-11 (T ₁)	2000.B	25/Nov. ±0.1	56.8 ±0.5	51.2 ±0.3	6.6 ±0.1	41.9 ±1.2	8.7 ±0.2	8.3 ±0.2	4.3 ±0.2	239.3 ±1.2	23.5 ±3.2
Bt(b)-12 (T ₁)	2000.B	26/Nov. ±0.2	56.7 ±0.4	50.1 ±0.2	6.3 ±0.2	41.6 ±2.2	9.3 ±0.2	9.0 ±0.2	4.5 ±0.2	254.4 ±1.2	18.6 ±0.9
Control (C ₁)	2000.B	26/Nov. ±0.1	60.1 ±0.6	53.1 ±0.7	5.9 ±0.2	42.2 ±1.2	9.0 ±0.1	8.8 ±0.1	4.9 ±0.1	266.3 ±1.1	14.9 ±0.7
Bt(b)-11 (T ₂)	2001.A	25/Nov. ±0.1	53.4 ±1.1	78.8 ±0.5	5.5 ±0.2	53.8 ±2.1	10.6 ±0.2	10.2 ±0.2	5.2 ±0.2	206.4 ±0.7	32.6 ±0.9
Bt(b)-12 (T ₂)	2001.A	25/Nov. ±0.0	61.2 ±0.2	80.9 ±0.6	5.8 ±0.2	55.1 ±1.2	10.6 ±0.1	10.2 ±0.3	5.1 ±0.1	210.5 ±1.2	30.1 ±0.8
Control (C ₂)	2001.A	26/Nov. ±0.1	50.1 ±0.7	80.4 ±0.5	5.6 ±0.2	51.8 ±0.9	10.4 ±0.2	10.3 ±0.2	5.2 ±0.2	225.8 ±1.4	28.4 ±0.5
Bt(b)-11 (T ₂)	2001.B	26/Nov. ±0.1	49.8 ±0.2	74.5 ±0.4	4.9 ±0.1	52.4 ±0.8	9.6 ±0.1	9.4 ±0.1	4.9 ±0.1	210.1 ±1.2	31.2 ±1.1
Bt(b)-12 (T ₂)	2001.B	26/Nov. ±0.2	48.6 ±0.5	74.5 ±0.2	4.9 ±0.2	54.2 ±1.2	9.9 ±0.2	9.7 ±0.2	4.8 ±0.2	219.4 ±1.2	24.2 ±1.2
Control (C ₂)	2001.B	26/Nov. ±0.1	50.7 ±0.3	76.4 ±0.3	5.3 ±0.1	51.5 ±1.2	10.2 ±0.2	9.7 ±0.2	5.1 ±0.2	221.3 ±0.9	20.1 ±0.9

The data means the average±SE.

T₁ and T₂ indicates the transformed plant generations by one or two-time-cutting in greenhouse.

C₁ and C₂ indicates the non-transformed plant generations by one or two-time-cutting in greenhouse.

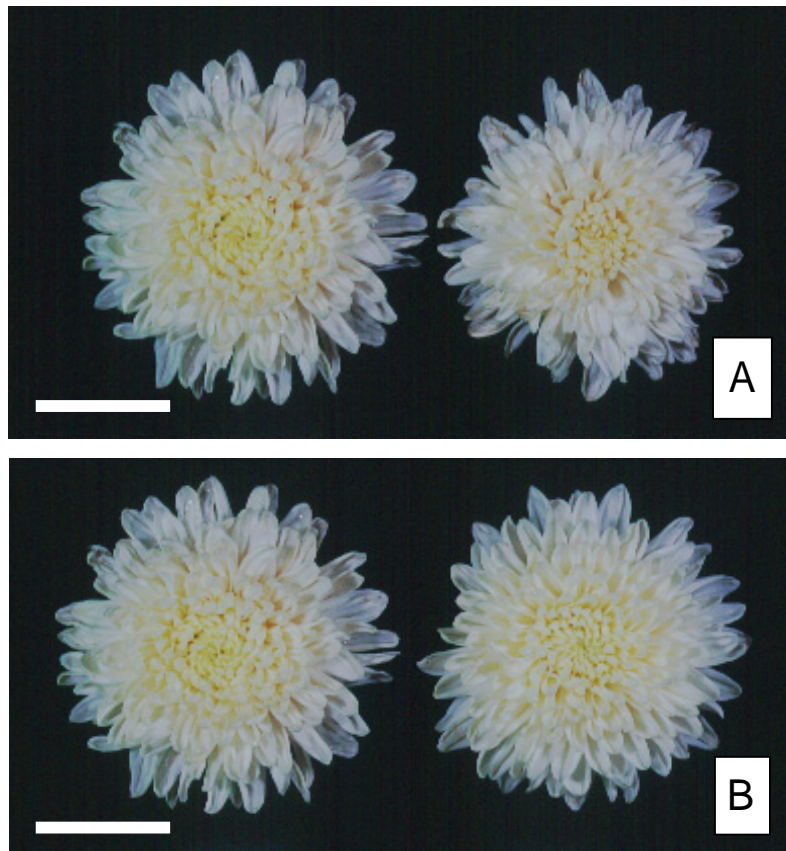


Fig. 33. Morphological feature of transformed plants and non-transformed plant.
A: Left; non-transformed plant 'Shuho-no-chikara' (C₂), Right; transformed plant Bt(b)-11 (T₂).
B: Left; non-transformed plant 'Shuho-no-chikara' (C₂), Right; transformed plant Bt(b)-12 (T₂).
T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.
Scale bar indicates 50 mm.

5 - 2 - 2 導入遺伝子の安定性

(1) 導入遺伝子の検出

組換え当代 (T_0) の組換えキクおよび、順化し2000年に閉鎖系温室で育成した組換えキク Bt(b)-11 (T_1) および、Bt(b)-12 (T_1) から、*cry1Ab* 遺伝子の存在を意味するバンドがそれぞれ同一部位 (19 kbp および 14 kbp) に検出された (Fig. 34)。非組換えキク (C_0 , C_1) からはバンドは検出されなかった。

(2) 殺虫性タンパク質の定量

試験管で育成した組換えキク Bt(b)-11 (T_0) および Bt(b)-12 (T_0) の Cry1Ab タンパク質合成量は総タンパク質 50 μ g あたり、それぞれ 38.2 ± 0.1 ng および 34.7 ± 0.2 ng であった。非組換えキク (C_0) からは Cry1Ab タンパク質は検出されなかった。順化後に挿し芽増殖を行った Bt(b)-11 および Bt(b)-12 の Cry1Ab タンパク質合成量は、総タンパク質 50 μ g あたり、それぞれ2000年の苗 (挿し芽増殖1回目、 T_1) が 40.0 ± 0.1 ng および 36.5 ± 0.1 ng、さらに再び挿し芽増殖した2001年の苗 (挿し芽増殖2回目、 T_2) において、 41.2 ± 0.2 ng および 34.2 ± 0.1 ng であり、順化・挿し芽増殖後の組換え植物体の Cry1Ab タンパク質は、試験管内で栽培した植物体よりも10%程度多く、挿し芽増殖1回目 (T_1) と2回目 (T_2) の組換え植物体の殺虫性タンパク質は挿し芽増殖前の植物体と同程度であった。組換えキク体内で合成される Cry1Ab タンパク質は、大腸菌で合成されたタンパク質 (62 kDa; アミノ酸配列 29~618 で構成) よりも分子量の小さい 56 kDa であった。(Table 25、Fig. 35)。

(3) 耐虫性の検定

オオタバコガによる食害試験では、非組換えキク 62.9% (2000年、 C_1) および 64.6% (2001年、 C_2) に対し、組換えキク Bt(b)-11 で 4.7% (2000年、 T_1)、4.2% (2001年、 T_2) および Bt(b)-12 で 5.7% (2000年、 T_1)、5.8% (2001年、 T_2) であり、組換えキク2系統とも、非組換えキクに対して5%水準で有意差が生じた。食害面積はそれぞれの系統において、2000年と2001年の試験で有意差は認められなかった。

発育試験では、蛹化率については、2系統 (T_1 , T_2) とも非組換えキク (C_1 , C_2) に比べて有意差は生じなかった。蛹化までの日数は2系統 (T_1 , T_2)、羽化までの日数については Bt(b)-12 (T_1 , T_2)、羽化率については Bt(b)-11 (T_1 , T_2) に、それぞれ5%水準で非組換えキク (C_1 , C_2) との有意差が生じた。またそれぞれの系統において、2000年と2001年の試験の数値に有意差は認められなかった (Table 25、Fig. 36)。

以上により挿し芽増殖2回目までは、導入遺伝子が安定して存在し、発現していることが確認された。

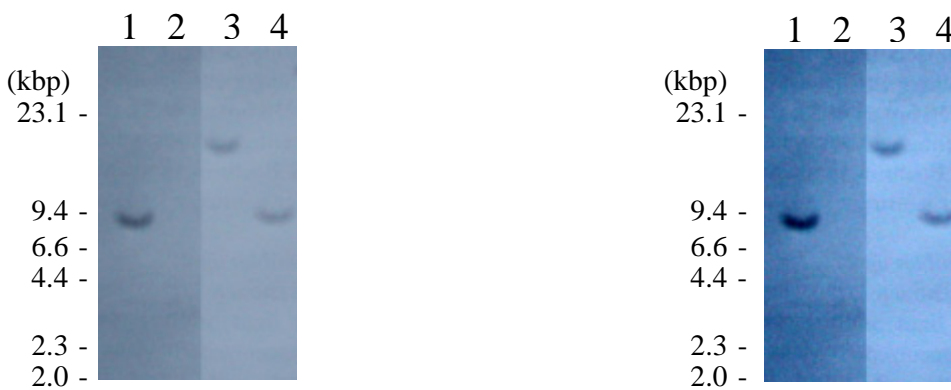


Fig. 34. Southern blot analysis of transformed plants.

Genomic DNA digested with *Eco*RV and hybridized with the cry1Ab specific probe.

A: The plants in test tube.

B: The plants in greenhouse.

Lane1: pIAbT1

Lane1: pIAbT1

Lane2: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara' (C_0)

Lane2: Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara'

Lane3: Bt(b)-11 (T_0)

Lane3: Bt(b)-11 (T_1)

Lane4: Bt(b)-12 (T_0)

Lane4: Bt(b)-12 (T_1)

T_0 indicates the transformed plant generation by no cutting in test tube, and T_1 indicates the transformed 1st generation by one-time-cutting in greenhouse.

C_0 indicates the non-transformed plant generation by no cutting in test tube, and C_1 indicates the non-tran plant generation by one-time-cutting in greenhouse.

Table 25. Insect bioassay of transformed lines using *Helicoverpa armigera*

Year	Lines	Cry1Ab expression (ng/50 µg total protein)		Experiment 1	Experiment 2			
		Test tube (T ₀ or C ₀)	Greenhouse	Feeding leaf area	Larval duration ¹⁾ (days)	Pupation rate (%)	Pupal duration ¹⁾ (days)	Emergence rate (%)
				(%)				
2000	Bt(b)-11 (T ₁)	38.2 ± 0.1	40.0 ± 0.1	4.7 **	21.6 ±0.04*	85.6	16.1 ±0.10	70.0 *
	Bt(b)-12 (T ₁)	34.7 ± 0.2	36.5 ± 0.1	5.7 **	21.7 ±0.05*	87.8	17.5 ±0.04*	87.5
	Control (C ₁)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	62.9	12.0 ±0.13	94.4	13.3 ±0.12	85.9
2001	Bt(b)-11 (T ₂)	38.2 ± 0.1	41.2 ± 0.2	4.2 **	22.0 ±0.12*	86.2	17.1 ±0.16	72.0 *
	Bt(b)-12 (T ₂)	34.7 ± 0.2	34.2 ± 0.1	5.8 **	21.3 ±0.09*	88.1	18.3 ±0.08*	85.1
	Control (C ₂)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	64.6	11.6 ±0.18	95.3	15.6 ±0.17	86.9

Cry1Ab accumulation was determined using a Densitograph (ATTO Co.) compared to pure Cry1Ab protein.

Feeding area was measured with Leaf Area Measure (Hayashi Denko Co.) on the 5th day using first instar larvae.

Larval duration, pupation rate, pupal duration and emergence rate were determined by using the data of days or rate of third instar larvae to pupa and pupa to adult.

¹⁾ Average ± SE, *and ** significant at the 5 % and 1 % levels, respectively

T₀ indicates the transformed plant generation by no cutting in test tube, and T₁ and T₂ indicates the transformed plant generations by one or two-time-cutting in greenhouse.

C₀ indicates the non-transformed plant generation by no cutting in test tube, and C₁ and C₂ indicates the non-transformed plant generations by one or two-time-cutting in greenhouse.

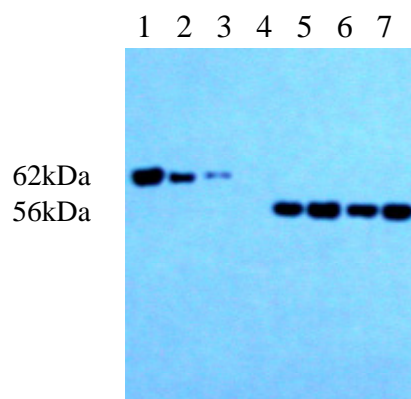


Fig. 35. Western immunoblot analysis of leaf from chrysanthemum plants expressing the *cry1Ab* gene. Lanes 1, 2 and 3 : 50, 25 and 5 ng of Cry1Ab protein
 Lane 4 : Non-transformed plant 'Shuho-no-chikara' (C₁)
 Lane 5 : Bt(b)-11 (T₀), in test tube.
 Lane 6 : Bt(b)-11 (T₁), in greenhouse.
 Lane 7 : Bt(b)-12 (T₀), in test tube.
 Lane 8 : Bt(b)-12 (T₁), in greenhouse.
 T₀ indicates the transformed plant generation by no cutting in test tube, and T₁ indicates the transformed plant generation by one or two-time-cutting in greenhouse.
 C₁ indicates the non-transformed plant generation by one-time-cutting in greenhouse.

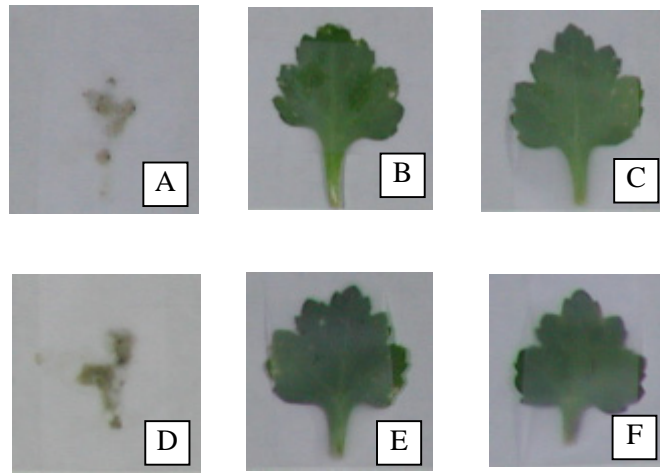


Fig. 36. Bioassay of insect feeding the chrysanthemum leaf of transformed pl
 The five first instar larvae of *H. armigera* were allowed to feed on leaves
 of transformed and non-transformed plants 'Shuho-no-chikara'.
 A: Non-transformed plant (C_1), B: Bt(b)-11 (T_1), C: Bt(b)-12 (T_1) (in greenho
 D: Non-transformed plant (C_2), E: Bt(b)-11 (T_2), F: Bt(b)-12 (T_2) (in greenho
 T_1 and T_2 indicates the transformed plant generations by one or two-time-cutl
 C_1 and C_2 indicates the non-transformed plant generation by one or two-time-

5 - 2 - 3 アレロパシー物質産生性の検討

結果を Table 26 に示す。大気中に放出されるアレロパシー物質の有無について、各系統におけるレタス種子の発芽率は、組換えキク Bt(b)-11 (T₂) および Bt(b)-12 (T₂)、および非組換えキク (C₂) ではともに 95.8 ~ 96.2% で有意差は認められなかった。発芽したレタス幼苗の生育に及ぼす影響については、生体重は、組換えキクおよび非組換えキクともに 12.5 ~ 13.2 mg、茎長は、組換えキクおよび非組換えキクとも、15.1 ~ 16.4 mm、根長は組換えキク・非組換えキクともに 19.6 ~ 20.0 mm で、すべて有意差は生じなかった。

土壌中に放出されるアレロパシー物質の有無について、各系統におけるレタス種子の発芽率は、組換えキク Bt(b)-11 (T₂) および Bt(b)-12 (T₂)、および非組換えキク (C₂) ではともに 98.4 ~ 98.9% で有意差は認められなかった。発芽したレタス幼苗の生育に及ぼす影響については、生体重は、組換えキクおよび非組換えキクともに 12.3 ~ 12.9 mg、茎長は、組換えキクおよび非組換えキクともに 15.3 ~ 15.6 mm、根長は組換えキク・非組換えキクともに 20.0 ~ 20.1 mm で、すべて有意差は生じなかった。

植物体内に産生されるアレロパシー物質の有無について、各系統におけるレタス種子の発芽率は、組換えキク Bt(b)-11 (T₂) および Bt(b)-12 (T₂)、および非組換えキク (C₂) ではともに 96.9 ~ 98.0% で有意差は認められなかった。発芽したレタス幼苗の生育に及ぼす影響については、生体重は、組換えキクおよび、非組換えキクともに、12.1 ~ 12.7 mg、茎長は、組換えキクおよび非組換えキクとも、14.5 ~ 15.4 mm、根長は組換えキク・非組換えキクともに 19.9 ~ 20.2 mm で、すべて有意差は生じなかった。

後作におよぼす影響について、各系統におけるレタス種子の発芽率は、組換えキク Bt(b)-11 (T₂) および Bt(b)-12 (T₂)、および非組換えキク (C₂) ではともに 96.2 ~ 98.2% で有意差は認められなかった。発芽したレタス幼苗の生育に及ぼす影響については、生体重は、組換えキクおよび非組換えキクともに 13.2 ~ 13.8 mg、茎長は、組換えキクおよび非組換えキクとも、15.9 ~ 16.3 mm、根長は組換えキク・非組換えキクともに 22.1 ~ 23.0 mm で、すべて有意差は生じなかった。

ガスクロマトグラフィーによる分析では、組換えキク (T₂) と非組換えキク (C₂) の GC のピークの位置、形状に差異は認められなかった (Fig. 37)。ピークの高さに若干の違いが認められたが、この違いは供試個体間の誤差の範囲内であった。

Table 26. Evaluation of allelopathic effects of transformed plants on germination and growth of lettuce seeds.

1. Production of volatile compounds.

Lines	Growth ability			
	Germination frequency (%)	Fresh weight (mg)	Stem length (mm)	Root length (mm)
Bt(b)-11 (T ₂)	96.2 ± 2.2	13.2 ± 1.6	15.5 ± 2.4	20.0 ± 2.1
Bt(b)-12 (T ₂)	95.8 ± 1.2	12.5 ± 1.6	16.4 ± 2.4	19.8 ± 1.3
Control (C ₂)	96.0 ± 1.1	12.5 ± 1.4	15.1 ± 2.3	19.6 ± 1.6

2. Released compounds in soil from root.

Lines	Growth ability			
	Germination frequency (%)	Fresh weight (mg)	Stem length (mm)	Root length (mm)
Bt(b)-11 (T ₂)	98.5 ± 2.1	12.3 ± 2.1	15.6 ± 2.9	20.0 ± 1.8
Bt(b)-12 (T ₂)	98.4 ± 1.6	12.4 ± 2.6	15.5 ± 1.2	20.0 ± 1.4
Control (C ₂)	98.9 ± 1.1	12.9 ± 2.3	15.3 ± 0.9	20.1 ± 1.2

3. Compounds produced in leaves and stems.

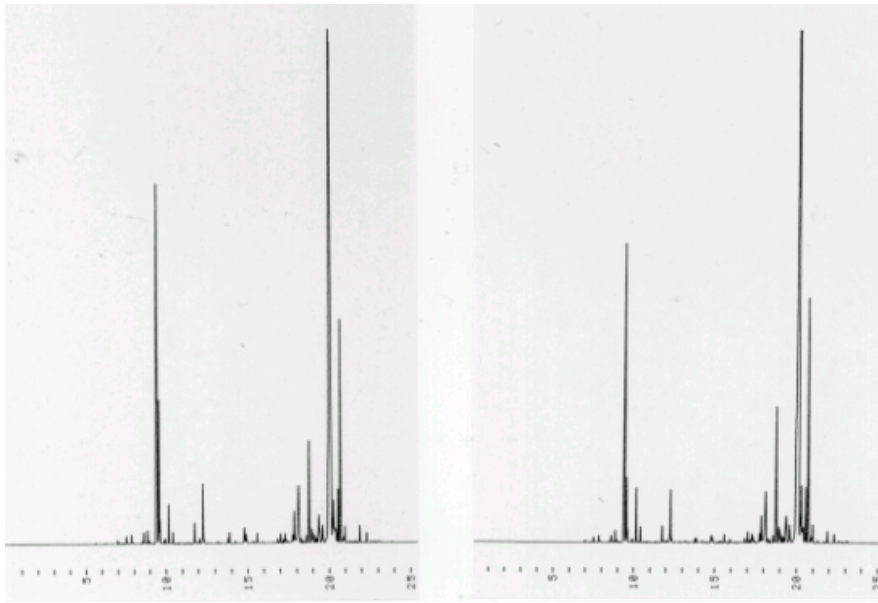
Lines	Growth ability			
	Germination frequency (%)	Fresh weight (mg)	Stem length (mm)	Root length (mm)
Bt(b)-11 (T ₂)	98.0 ± 1.6	12.1 ± 2.1	14.5 ± 1.5	20.2 ± 0.9
Bt(b)-12 (T ₂)	97.2 ± 1.8	12.7 ± 1.9	15.4 ± 1.2	20.0 ± 2.3
Control (C ₂)	96.9 ± 2.4	12.3 ± 2.2	14.9 ± 2.2	19.9 ± 2.2

4. Influence on succeeding crop.

Lines	Growth ability			
	Germination frequency (%)	Fresh weight (mg)	Stem length (mm)	Root length (mm)
Bt(b)-11 (T ₂)	98.2 ± 2.2	13.6 ± 1.6	16.2 ± 2.4	22.1 ± 2.1
Bt(b)-12 (T ₂)	96.2 ± 1.2	13.2 ± 1.6	16.3 ± 2.4	23.0 ± 1.3
Control (C ₂)	97.3 ± 1.1	13.8 ± 1.4	15.9 ± 2.3	22.9 ± 1.6

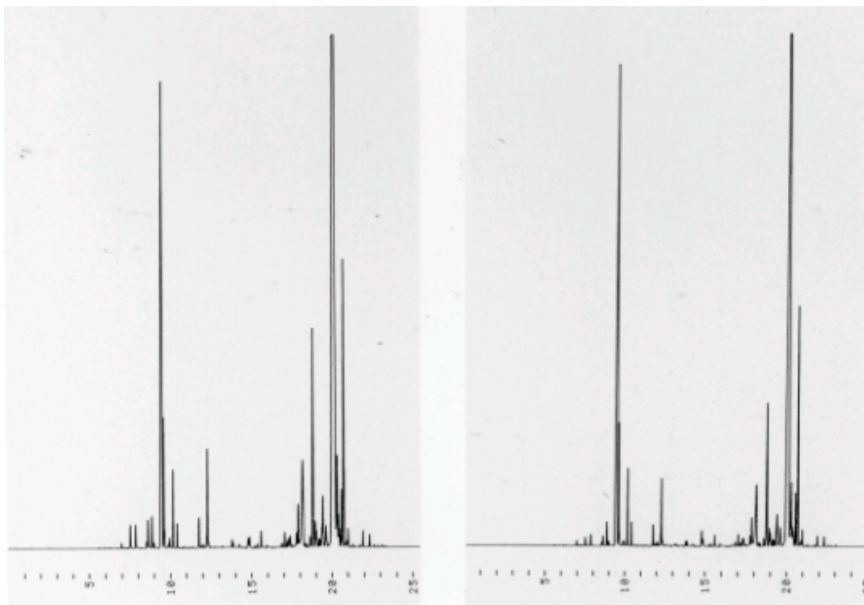
The data means average±SE.

T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.



Retention time
A: Control (C₂) (analysed in am.)

Retention time
B: Bt(b)-12 (T₂) (analysed in am.)



Retention time
C: Control (C₂) (analysed in pm.)

Retention time
D: Bt(b)-11 (T₂) (analysed in pm.)

Fig. 37. Results of gas chromatograph analysis of volatile compounds produced in leaves of transgenic chrysanthemum with non-modified *cryIAb* gene. T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting. C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

5 - 2 - 4 土壤微生物相への影響

結果を Table 27 に示した。細菌数については、生育中期に、組換えキク Bt(b)-12 (T₂) の土壤中の細菌数 (5.1×10^4 CFU/g) は非組換えキク (C₂) の土壤中の細菌数 (3.8×10^4 CFU/g) よりやや多めになったが、定植前 ($5.1 \sim 5.3 \times 10^4$ CFU/g)、生育初期 ($4.1 \sim 5.0 \times 10^4$ CFU/g)、生育後期 ($2.4 \sim 3.0 \times 10^4$ CFU/g)、および収穫後 ($2.0 \sim 3.0 \times 10^4$ CFU/g) では、組換えキク (T₂) の栽培土壌と非組換えキク (C₂) の栽培土壌に大きな差は認められなかった。

放線菌数については、定植前 ($2.2 \sim 3.4 \times 10^4$ CFU/g)、生育初期 ($2.8 \sim 3.6 \times 10^4$ CFU/g)、生育中期 ($4.1 \sim 4.4 \times 10^4$ CFU/g)、生育後期 ($4.2 \sim 4.6 \times 10^4$ CFU/g)、および収穫後 ($4.3 \sim 4.9 \times 10^4$ CFU/g) であり、生育期間を通じて組換えキク (T₂) の栽培土壌と非組換えキク (C₂) の栽培土壌と非組換えキクの栽培土壌中に大きな差は認められなかった。

さらに糸状菌数については、定植前 ($1.2 \sim 1.5 \times 10^4$ CFU/g)、生育初期 ($2.1 \sim 2.5 \times 10^4$ CFU/g)、生育中期 ($2.0 \sim 2.6 \times 10^4$ CFU/g)、生育後期 ($2.9 \sim 3.5 \times 10^4$ CFU/g)、および収穫後 ($4.7 \sim 5.1 \times 10^4$ CFU/g) であり、生育期間を通じて組換えキク (T₂) の栽培土壌と非組換えキク (C₂) の栽培土壌中の糸状菌数に大きな差は認められなかった。

Table 27. Influence of transformed plants on soil microflora.

Lines	No. of bacteria (CFU/g dried soil)				
	Before culture	Early stage of culture	Middle stage of culture	Late stage of culture	Post harvest
Bt(b)-11 (T ₂)	5.1 ×10 ⁴	4.4 ×10 ⁴	3.8 ×10 ⁴	2.4 ×10 ⁴	2.0 ×10 ⁴
Bt(b)-12 (T ₂)	5.3 ×10 ⁴	5.0 ×10 ⁴	5.1 ×10 ⁴	3.0 ×10 ⁴	3.0 ×10 ⁴
Control (C ₂)	5.2 ×10 ⁴	4.1 ×10 ⁴	3.5 ×10 ⁴	2.7 ×10 ⁴	2.4 ×10 ⁴

Lines	No. of ray fungi (CFU/g dried soil)				
	Before culture	Early stage of culture	Middle stage of culture	Late stage of culture	Post harvest
Bt(b)-11 (T ₂)	2.2 ×10 ²	3.0 ×10 ²	4.2 ×10 ²	4.6 ×10 ²	4.9 ×10 ²
Bt(b)-12 (T ₂)	3.4 ×10 ²	2.8 ×10 ²	4.1 ×10 ²	4,2 ×10 ²	4.3 ×10 ²
Control (C ₂)	3.3 ×10 ²	3.6 ×10 ²	4.4 ×10 ²	4.6 ×10 ²	4.7 ×10 ²

Lines	No. of fungi (CFU/g dried soil)				
	Before culture	Early stage of culture	Middle stage of culture	Late stage of culture	Post harvest
Bt(b)-11 (T ₂)	1.2 ×10 ²	2.1 ×10 ²	2.0 ×10 ²	3.1 ×10 ²	5.1 ×10 ²
Bt(b)-12 (T ₂)	1.3 ×10 ²	2.4 ×10 ²	2.6 ×10 ²	2.9 ×10 ²	4.7 ×10 ²
Control (C ₂)	1.5 ×10 ²	2.5 ×10 ²	2.6 ×10 ²	3.5 ×10 ²	4.8 ×10 ²

CFU; Colony formation unit.

The data shows the average of 5 petri dishes.

T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

5 - 2 - 5 遺伝子拡散に関する調査

1) 花粉の形状および稔性

結果を Table 28 および、Fig. 38 に示す。組換えキク (T_2)・非組換えキク (C_2) および、キクの近縁種の花粉は、いずれも $\phi=30\sim 40\mu\text{m}$ の大きさで、棘のある球状粒であり、アセトカーミンによく染まった。最もよく染まったのはスプレーギクの‘ロザンナ’と食用菊‘金康松’で 100.0%の花粉が染まった。組換えキク Bt(b)-11 (T_2) および Bt(b)-12 (T_2) の染色程度はそれぞれ $98.3\pm 0.1\%$ 、 $93.3\pm 0.1\%$ であり、非組換えキク (C_2) の染色程度 $93.0\pm 0.1\%$ と有意差は認められなかった。

花粉稔性は、もともとキクの花粉が人工培地での発芽が困難なため、組換えキク・非組換えキク、キク近縁種とも 10%前後と低い値であった。組換えキク Bt(b)-11 (T_2) および Bt(b)-12 (T_2) の発芽率はそれぞれ $10.3\pm 0.0\%$ 、 $10.2\pm 0.2\%$ であり、非組換えキク (C_2) の発芽率 $10.4\pm 0.1\%$ と有意差は認められなかった。最も良く発芽したものはコンギクで 18.9%であり、最も低かったのは組換えキク Bt(b)-12 (T_2) であった。

2) 花粉の寿命

結果を Table 29 に示す。アセトカーミンによる染色では、組換えキク Bt(b)-11 (T_2) および Bt(b)-12 (T_2) および、非組換えキク (C_2) とともに、プレパラート置床 24 時間までは 80%以上と高かったが、34 時間後には約 50%、48 時間後には約 20%に低下し、72 時間後には殆ど染色されなかった。発芽培地による試験では、プレパラート置床 24 時間までは 10%前後、34 時間後には約 5%、48 時間後には約 0.1%に低下し、56 時間後には全く発芽しなかった。

花粉のアセトカーミン染色や発芽率については、組換えキクと非組換えキクに有意差は認められず、*cryIAb* 遺伝子の導入はキクの花粉の寿命に影響を与えていないと考えられる。

3) 花粉の飛散性

組換えキク Bt(b)-11 (T_2) と Bt(b)-12 (T_2) および非組換えキク (C_2) が開花し、葯の放出が認められた個体の花器に、0、5 および、10 m/sec.の風を扇風機で当てたところ、どの各位置のプレパラートの全てにおいても花粉粒は見いだせなかった (Table 30)。キクは虫媒花であることから、強い風を当てても花粉の飛散は見られないことが明らかになった。

4) 近縁種との交雑親和性

結果を Table 31 に示した。組換えキク (T_2) および非組換えキク (C_2) を花粉親とし

た試験では、スプレーギク、食用菊、ノジギク福井保存系統1号、アシズリノジギク福井保存系統1号、イソギクで、受粉後1日目に柱頭の収縮がみられた。コンギクでは柱頭の収縮は見られなかった。交雑種子の発芽試験では、コンギクを除く近縁種との交雑種子で5~10数%の発芽が見られた。属内の近縁種と組換えキク・非組換えキクの交雑種子の発芽率について、組換えキク (T_2) と非組換えキク (C_2) の間に有意差は認められなかった。

同様に、組換えキクおよび非組換えキクを種子親とした試験では、スプレーギク、食用菊、ノジギク福井保存系統1号、アシズリノジギク福井保存系統1号、イソギクの花粉をつけた筒状花で、組換えキク(T_2)および非組換えキク(C_2)とも、受粉後1日目に柱頭の収縮がみられた。コンギクの花粉では柱頭の収縮は見られなかった。交雑種子の発芽試験では、コンギクを除く近縁種との交雑種子で5~25%前後の発芽が見られた。属内の近縁種と組換えキク・非組換えキクの交雑種子の発芽率について、組換えキク (T_2) と非組換えキク (C_2) の間に有意差は認められなかった。

また、組換えキク (T_2) と非組換えキク (C_2) の自殖では種子は得られなかった。これは自家不和合性によるものと思われる。

Table 28. Pollen characteristics of transformed plants and its allied species.

Allied species	Scientific name	Pollen form	Fertility of pollen	
			Staining of acetocarmine ¹⁾	Pollen germination
Bt(b)-11 (T ₂)	<i>Dendranthema x grandiflorum</i>	oval-shaped, spine	98.3 ± 0.1	10.3 ± 0.0
Bt(b)-12 (T ₂)	<i>D. x grandiflorum</i>	oval-shaped, spine	93.3 ± 0.2	10.2 ± 0.2
Shuho-no-chikara (C ₂)	<i>D. x grandiflorum</i>	oval-shaped, spine	93.0 ± 0.1	10.4 ± 0.1
Rosanna	<i>D. x grandiflorum</i>	oval-shaped, spine	100.0 ± 0.0	14.0 ± 0.1
Kinkoumatsu	<i>D. x grandiflorum</i>	oval-shaped, spine	100.0 ± 0.1	10.3 ± 0.0
Nojigiku Fukui No.1	<i>D. occidentali japonense</i> , Fukui No.1	oval-shaped, spine	96.0 ± 0.1	14.6 ± 0.1
Ashizuri-nojigiku Fukui No.1	<i>D. occidentali japonense</i> var. <i>ashizuriense</i> , Fukui No.1	oval-shaped, spine	94.1 ± 0.3	11.5 ± 0.2
Iso-giku	<i>D. pacificum</i>	oval-shaped, spine	96.8 ± 0.1	11.3 ± 0.1
Kon-giku	<i>Aster ageratoides</i> var. <i>ovatus</i>	oval-shaped, spine	93.4 ± 0.1	18.9 ± 0.1

The data means average±SE.

¹⁾The percentage of stained pollen among total pollen (%).

²⁾The percentage of pollen germinated on the pollen germination medium after 2 hours (%).

T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

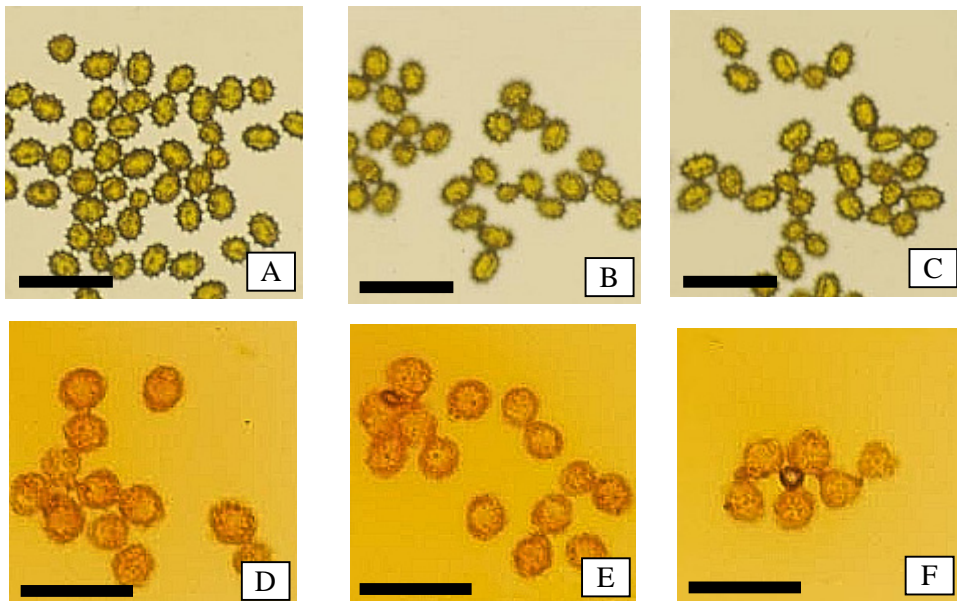


Fig. 38. The pollen shape and staining with acetocarmine.
 A: Control (C_2), B: Bt(b)-11 (T_2), C: Bt(b)-12 (T_2), Pollen shape.
 D: Control (C_2), E: Bt(b)-11 (T_2), F: Bt(b)-12 (T_2), Staining of acetocarmine.
 T_2 indicates the transformed plant generation by two-time-cutting.
 C_2 indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.
 Scale bar indicates 100 μm .

Table 29. Pollen life span of transformants and non-transformant.

1. Staining with acetocarmine.

Lines	Time after harvesting on the preparation (h)								
	0	1	5	10	24	34	48	56	72
Bt(b)-11 (T ₂)	100.0 ± 0.1	98.9 ± 0.1	92.5 ± 0.0	84.1 ± 0.0	82.5 ± 0.1	54.0 ± 0.1	30.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.1
Bt(b)-12 (T ₂)	98.1 ± 0.2	91.1 ± 0.2	96.6 ± 0.2	80.3 ± 0.2	79.2 ± 0.1	54.3 ± 0.0	28.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.0 ± 0.1
Control (C ₂)	98.8 ± 0.0	96.9 ± 0.0	93.4 ± 0.0	86.7 ± 0.0	81.7 ± 0.0	52.0 ± 0.0	31.2 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

The data shows the Arcsin transferred percentage data of stained pollen±SE.

T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

2. Germination on pollen germination medium.

Lines	Time after harvesting on the preparation (h)								
	0	1	5	10	24	34	48	56	72
Bt(b)-11 (T ₂)	10.2 ± 0.1	10.0 ± 0.1	9.9 ± 0.0	10.0 ± 0.0	9.6 ± 0.1	5.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Bt(b)-12 (T ₂)	11.2 ± 0.1	10.7 ± 0.1	10.0 ± 0.1	9.9 ± 0.2	9.4 ± 0.2	5.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control (C ₂)	9.8 ± 0.0	9.7 ± 0.0	9.8 ± 0.0	9.6 ± 0.2	9.2 ± 0.0	5.6 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

The data shows the Arcsin transferred percentage data of germinated pollen ±SE.

T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

Table 30. Pollen dispersal by artificial wind.

Lines	Velocity of the wind (m/sec)	Number of pollen trapped at preparation.			
		0 (m)	1 (m)	5 (m)	10 (m)
Bt(b)-11 (T ₂)	0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Bt(b)-12 (T ₂)	0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control (C ₂)	0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

The flowers were winded by the fan F-140B (TOSHIBA, Japan).

The data shows average±SE.

T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

Table 31. Cross compatibility to allied species and wild relatives

Pollen parents	<i>D. x grandiflorum</i>		<i>D. occidentali japonense</i>				<i>D. pacificum</i>		<i>A. ageratoides</i>		Self			
	Rosanna		Kinkoumatsu		Nojigiku Fukui No.1		Ashizuri-nojigiku Fukui No.1		Iso-giku		Kon-giku			
	SS ¹⁾	Germination ²⁾	SS	Germination	SS	Germination	SS	Germination	SS	Germination	SS	Germination		
Bt(b)-11 (T ₂)	+	5.2 ± 2.4	+	4.6 ± 2.2	+	16.6 ± 1.2	+	15.2 ± 2.1	+	4.6 ± 2.2	-	0.0 ± 0.0	-	0.0 ± 0.0
Bt(b)-12 (T ₂)	+	4.1 ± 1.4	+	5.2 ± 3.2	+	15.9 ± 0.8	+	14.7 ± 0.5	+	5.2 ± 1.2	-	0.0 ± 0.0	-	0.0 ± 0.0
Control (C ₂)	+	5.3 ± 3.0	+	6.8 ± 2.4	+	17.0 ± 1.1	+	15.7 ± 1.3	+	5.4 ± 2.4	-	0.0 ± 0.0	-	0.0 ± 0.0

¹⁾ SS means Stigma shrinking.

²⁾ Germination means the percentage of the seed germinated and the data shows the Arcsine transferred percentage±SE.

T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

Pollen parents	<i>D. x grandiflorum</i>					
	Bt(b)-11 (T ₂)		Bt(b)-12 (T ₂)		Control (C ₂)	
	SS ¹⁾	Germination	SS	Germination	SS	Germination
Rosanna	+	13.2 ± 1.2	+	14.2 ± 0.8	+	13.6 ± 1.0
Kinkoumatsu	+	5.2 ± 0.9	+	5.6 ± 3.2	+	4.9 ± 2.0
Nojigiku Fukui No.1	+	25.2 ± 2.4	+	26.0 ± 3.0	+	25.1 ± 2.2
Ashizuri-nojigiku Fukui No.1	+	15.2 ± 3.2	+	14.6 ± 2.1	+	16.2 ± 1.3
Iso-giku	+	4.1 ± 1.4	+	6.3 ± 2.1	+	5.2 ± 3.2
Kon-giku	-	0.0 ± 0.0	-	0.0 ± 0.0	-	0.0 ± 0.0

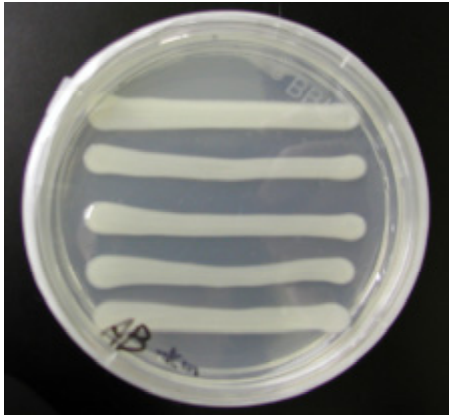
¹⁾ SS means Stigma shrinking.

²⁾ Germination means the percentage of the seed germinated and the data shows the Arcsine transferred percentage±SE.

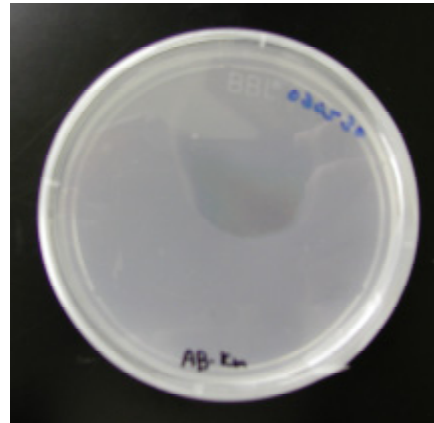
T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting and C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

5 - 2 - 6 *Agrobacterium* 残存性の調査

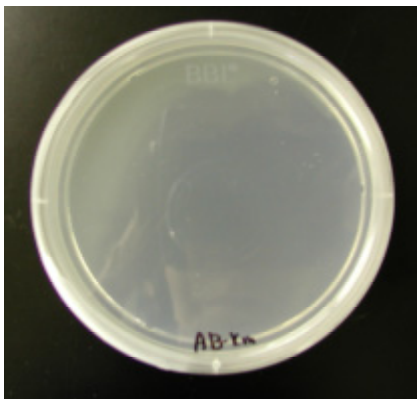
cry1Ab 遺伝子の導入に用いたアグロバクテリウムを塗布した培地では、2日後からアグロバクテリウムの生育が認められた。しかし、組換えキク (T₂) および非組換えキク (C₂) のいずれからもアグロバクテリウムの生育やその他微生物の生育は認められなかった (Fig. 39)。このことから、組換え植物にはアグロバクテリウムは残存していないことが確認された。



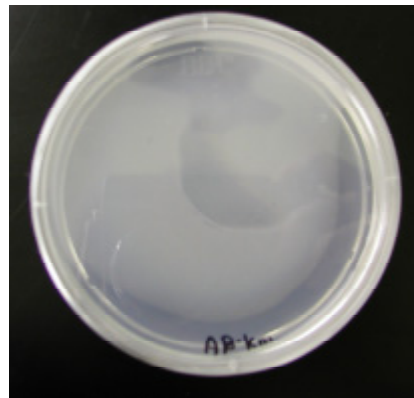
Agrobacterium tumefaciens LBA4404:pIAbT1



Bt(b)-11 (T₂)



Bt(b)-12 (T₂)



Control (C₂)

Fig. 39. Detection of residual *Agrobacterium tumefaciens* used for transformation. Each plant extraction was plated to AB medium with 50 mg/l kanamycin and cultured at 28°C for 7 days. T₂ indicates the transformed plant generation by two-time-cutting. C₂ indicates the non-transformed plant generation by two-time-cutting.

5 - 3 考察

遺伝子組換え植物を一般圃場で栽培するにあたっては、遺伝子組換え実験安全指針にもとづいた環境安全性評価試験を、閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場にて、段階的に行うことが義務付けられている。本章では、閉鎖系温室において環境への影響が無いかどうかを調査し、安全性評価試験を閉鎖系温室から非閉鎖系温室へ進めることを目的とした。

先ず *Bacillus thuringiensis* 由来の *cryIAb* 遺伝子をキクに導入し、鱗翅目昆虫オオタバコガの食害抑制効果と発育遅延効果をもたらす耐虫性キクについて、閉鎖系温室内の生育特性が、挿し芽増殖 2 回 (T_1 および T_2) まで、2 年間にわたって非組換えキクと相違ないかを調査したところ、生育特性について、非組換えキクと相違なく、また導入遺伝資も安定して発現していることが確認された。

他生物への影響として、アレロパシー物質に敏感に反応するレタス種子を用いて試験を行ったところ、その発芽と生育について、組換えキク (T_2) と非組換えキク (C_2) の間に有意差は認められなかった。さらにガスクロマトグラフィーによる分析では、組換えキクと非組換えキクの GC のピークの位置、形状に差異は認められなかったことから、組換えキクは新たなアレロパシーを引き起こす揮発成分を産生していないと判断された。土壌微生物についても生育期間を通じて、人工培地上で生育する糸状菌、放線菌、細菌の数に組換えキクと非組換えキクの間に有意差が生じなかった。

遺伝子の拡散性については、花粉稔性、形状、飛散性および、野生種との交雑性は、組換えキク (T_2) と非組換えキク (C_2) との間で有意差はなく、このことから遺伝子拡散による環境への影響は非組換えキクと同程度であることが確認された。

以上の結果を取りまとめ、文部科学大臣に申請したところ、文部科学省の組換え DNA 安全審議会において、導入遺伝子の効果以外には、環境に対する影響は組換えキクと非組換えキクとの間で同等であることが確認され、次のステップである非閉鎖系温室での実験が許可された (2002 年 7 月)。

遺伝子組換え植物で問題になっているのは、導入遺伝子の産生する物質の有害性と導入遺伝子の自然界への拡散性である。本研究で作出した組換えキクについても、導入遺伝子の産生物質以外には、非組換えキクと有意差はなかったが、花粉に稔性があり、キク科の野生植物と交雑可能であることが確認されたことから、今後は遺伝子拡散を防止する、雄性不稔性を組換えキクに導入する必要がある。

まとめ

- 1) *Bacillus thuringiensis* 由来の *cry1Ab* 遺伝子を有し、鱗翅目昆虫オオタバコガの食害抑制効果と発育遅延効果をもたらす耐虫性キクについて、閉鎖系温室内での生育特性が原品種と相違ないかを調査したところ、生育特性について、原品種と相違なく、また導入遺伝資も安定して発現していることが確認された。
- 2) 他生物への影響として、アレロパシー物質に敏感に反応するレタス種子を用いて試験を行ったところ、その発芽と生育について、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかったことから、レタス種子の発芽および生長を抑制する物質について、組換えキクと非組換えキクとの間に有意差はないものと判断された。
- 3) さらにガスクロマトグラフィーによる分析では、組換えキクと非組換えキクの GC のピークの位置、形状に差異は認められなかったことから、組換えキクと非組換えキクの葉から放出される揮発成分の種類・量ともに差異は認められず、組換えキクは新たな有毒揮発成分を産生していないと判断された。
- 4) 土壌微生物についても生育期間を通じて、人工培地上で生育する糸状菌、放線菌、細菌の数に組換えキクと非組換えキクの間に有意差が生じなかったことから、組換えキクは土壌微生物に対する有毒物質を産生していないものと判断された。
- 5) 遺伝子の拡散性については、花粉稔性、形状、飛散性および、野生種との交雑性は、組換えキクと非組換えキクとの間で有意差はなく、このことから遺伝子拡散による環境への影響は非組換えキクと同程度であることが確認された。
- 6) 組換えキクからは、遺伝子導入に用いた *Agrobacterium* は検出されなかった。
- 7) 以上の結果を取りまとめ、文部科学大臣に申請したところ、大臣の組換え DNA 安全審議会が組換えキクの安全性が確認され、次のステップである非閉鎖系温室での実験が許可された (2002 年 7 月)。

第6章 総合考察

キク [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] は、江戸時代から盛んに育種され、今日までに多様多種の品種が育成されてきた。これ以上の遺伝的多様性の拡大は、交雑育種では限界があり、生殖過程を経ない有用遺伝子の導入を試みなければならない。本研究では、交雑育種では行えない変異の拡大技術として細胞融合技術および遺伝子組換え技術といったバイオテクノロジーを利用した新しい育種技術の開発を行い、有用形質を付与した新しいキクの作出を目的とした。

キク科の中には、キク属にはない紫色を有するアスター [*Callistephus chinensis* (L.) Nees]、青色を有するシネリア [*Senecio x hybridus* (Willd.) Regal]、また、強い草勢と白さび病に抵抗性を持つハイロヨモギ (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex Willd.) が存在する。しかしながらこれらは、キクとは属が異なるため、通常の交雑では雑種子が得られない。そこで細胞融合法を用いて属間雑種の作出を試みた。

その結果、キクとシネリアの再分化植物体にはキクの DNA マーカーしか検出されず、また染色体数が $2n=54$ であり、形態的にもキクに酷似していたため、雑種とは認められなかった。一方、キクとハイロヨモギの再分化個体では、全個体が両親の DNA マーカーを共有しており、染色体数が $2n=64\sim 72$ で、雑種性が認められた。開花したキクとハイロヨモギの体細胞属間雑種 23 個体について特性検定を行ったところ、白さび病に対して、強い抵抗性を示し、生育特性に関しても両親の形質を超えた多種多様な形態を示し、変異の拡大に貢献した。花粉培地上に開花した花の花粉を置床したところ、23 個体とも花粉管の伸長は認められず、花粉稔性は無いと考えられた。さらに、試験管および混合用土における発根試験の結果から、発根力は両親より弱かった (Furuta *et al.* 2004)。

花粉稔性の欠如や発根力の低下については Melchers *et al.* (1978)、Gelba *et al.* (1980)、Guri *et al.* (1991) らが報告している。そこで大澤 (1994) は、培養などで雑種が得られる範囲の比較的近縁な種間雑種は、細胞融合後の植物体が維持され育種素材としても利用しうるが、遠縁な組合せでは、再分化の過程でどちらか一方の染色体が脱落したり、再分化植物体が不完全であったりして、次代の子孫をとることは勿論、当代の維持が困難であるため、一方の細胞核や細胞質の一部を融合対象にした非対称融合が主流になるとしている。さらに、融合処理から、分裂・コロニー形成・植物体再分化の過程で変異が生じる機会が多いため、変異の幅を拡大する手段としても有効であるとしている。

今回作出された体細胞属間雑種では、発根力の弱さや雄性不稔という欠点を持つにもかかわらず、白さび病に対する強い抵抗性が認められたことから、細胞融合によるキクへの有用遺伝子導入の可能性が認められた。キク科植物における属間細胞融合の今

後の展望としては、キク属と比較的近縁な属を探索して細胞融合を行ったり、軟 X 線や IOA などを用いて両親の染色体を不活性化し、遠縁あるいは、染色体の過剰による発根性などの不良形質の発現を抑制した非対称融合を行ったりすることが必要であると考えられる。また、今回作出された耐病性雄性不稔雑種については、遺伝子拡散が防止されるため、遺伝子組換えの材料としても活用できる可能性がある。

次に、有用遺伝子の導入に重点を置き、遺伝子組換え技術について検討した。キクの遺伝子組換えは数多く報告されているが、形質転換効率の低さ (Renou *et al.* 1993、De Jong *et al.* 1994、Urban *et al.* 1994)、キメラ化 (Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995) など、実用化への難しい課題が残されていた。また、導入した遺伝子がサイレンシングを起こして機能しなくなる (Pavingerova *et al.* 1994、Benetka and Pavingerova 1995、Takatsu *et al.* 2000) という報告もある。そこで、これらの欠点を回避できる技術の確立を試みた。

まず、感染効率向上のための諸試験を行ったところ、選抜条件としては、選抜開始時期をカルス形成初期の7-10日目とし、G418濃度は20~30 mg/lで行い、少なくとも3~4回継代する必要があること、感染効率向上には、葉片の作成方法としては、メスよりコルクボーラーを用いること、*Agrobacterium* 培養時間は *Agrobacterium* の増殖が最も活発な対数増殖期にあたる5時間行うこと、共存培地中にカザミノ酸を1.0 g/l添加すること、界面活性剤 Tween 20を5.0%感染液に加えること、などで *Agrobacterium* の感染効率が高まることが判明した。

さらに形質転換効率の低さやキメラ化の問題点を解決するため、再分化系について検討した。カルス経由の再分化 (CI) と不定芽由来再分化 (SI) の2方法について検討したところ、植物体の獲得日数は SIの方が早かったが、形質転換体の獲得効率を見ると、SIは再分化個体の殆どがエスケイプであり、形質転換体もその多くはキメラの症状を示したのに対し、CIは、再分化個体すべてが形質転換体であり、そのすべてがキメラの症状を示さなかった。したがって、CIの方がキクの形質転換系において優れているといえる (Shinoyama *et al.* 2002)。

この技術を用いて、発生予察が困難であり、その防除のための農薬費・労働時間などが年々増加し、栽培者にとって身体的、金銭的な負担が大きくなっている鱗翅目昆虫について、キクに *Bacillus thuringiensis* 由来の耐虫性遺伝子 *cry1Ab* を組み込み、鱗翅目昆虫に対して特異的に殺虫性を持った耐虫性キクの作出を試みた。その結果、改良していない *cry1Ab* 遺伝子を組み込んだ形質転換体では、キクの主要害虫であるオオタバコガ幼虫に対して、食害抑制効果と発育遅延効果が認められた (Shinoyama *et al.* 2002)。

さらに殺虫性効果を高めるために、*cry1Ab* 遺伝子の塩基配列をキクのコードンにあわせて改良し、コード領域内不安定配列を除去 (Shaw and Kamen 1986、Goodall and

Filipowicz 1989) した人工合成遺伝子 *mcbt* を作成し、キクに導入した。その結果、改良していない *cryIAb* 遺伝子による Cry1Ab タンパク質は、殺虫性効果が低かったが、改変した *mcbt* では、mRNA の degradation を起こさなかったことから、高い殺虫性を付与できたと考えられる。さらに、塩基配列の改変によって Cry1Ab タンパク質の合成量は、改変前の約 2 倍に増加するなど、オオタバコガ幼虫に対する高い耐虫性を持った組換えキクの作出に成功したといえる (Shinoyama *et al.* 2003)。この実用化によって福井県では生産費の 2% を占める鱗翅目害虫防除費の削減と労働時間の短縮、さらには農薬を使わないことから環境や栽培者の健康への負荷が軽減されると考えられる。

遺伝子組換え植物を一般圃場で栽培するには、環境への影響が無いかどうかを調査することが義務づけられているので、導入した遺伝子の安定性を調べ、環境への影響が非組換えキクと相違ないかどうかを調査し、安全性を評価した。

まず、葉、茎、花、草姿等の形態全てについては、各作付け年において組換えキクと非組換えキクとの間に有意差が認められなかった。また、開花日等の諸生育特性についても組換えキクと非組換えキクで有意差は認められなかったことから、非組換えキクとの形態的な差はないと判断された。殺虫性タンパク質は、培養容器内で栽培した組換えキク植物体よりも 10% 程度多かったが、挿し芽増殖後の組換えキク植物体の殺虫性タンパク質は挿し芽増殖前の植物体と同程度であり、安定していた。耐虫性試験のうちオオタバコガによる食害試験では、非組換えキクに対し組換えキク 2 系統とも、5% 水準で有意差が生じた。食害面積は 2000 年と 2001 年の試験で有意差は認められず、安定していた。オオタバコガの発育試験では、蛹化率については、2 系統とも非組換えキクに比べて有意差は生じなかった。蛹化までの日数では 2 系統、羽化までの日数では Bt(b)-12、羽化率では Bt(b)-11 に、それぞれ 5% 水準で組換え植物との有意差が生じた。発育試験では 2000 年と 2001 年の試験の数値に有意差は認められず、挿し芽増殖後も導入形質が安定していることが確認された。

アレロパシー物質産生性についてはレタス種子の発芽と生育を指標とした生物検定および GC による機器検定の双方において、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかったことから、組換えキクは新たなアレロパシー物質を産生していないと考えられた。また土壌微生物相への影響についても、非組換えキクと比較し、組換えキクの栽培による影響はないものと判断される。

遺伝子の拡散性については、花粉の形状、稔性および、寿命は、組換えキクと非組換えキクの間に有意差は認められなかった。花粉の飛散性について人工風（扇風機）を用いて試験したところ、各風力の各位置のプレパレート的全てにおいて花粉粒は見いだせなかったことから、風媒性はないと判断された。近縁種との交雑親和性は、組換えキクおよび非組換えキクともに、属内近縁種で交雑種子が得られ、近縁植物との交雑親和性に関して、組換えキクと非組換えキクで有意差は認められなかった。

さらに、遺伝子導入に用いた *Agrobacterium* の残存性については、組換えキクおよび非組換えキクのいずれからもアグロバクテリウムの生育やその他微生物の生育は認められず、組換え植物にはアグロバクテリウムは残存していないことが確認された。

以上のことから、組換えキクは形態的に非組換えキクに酷似し、導入遺伝子が安定して働くこと、さらに他植物や土壌微生物などへの影響も非組換え植物体を同程度であることから、組換えキクの栽培による環境への影響は、非組換えキクを栽培した時と同程度であることが確認された。以上の結果をまとめて、2002年4月に文部科学大臣に非閉鎖系温室での実験申請を行ったところ、同年7月に組換えキクの非閉鎖系温室で実験を行う上での安全性が認められて認可が下り、非閉鎖系温室での実験を開始した。

以上本研究により、新たな育種技術としてキク科植物における細胞融合技術を確立した。さらに従来報告に比べて、形質転換体の作出効率が高く、多品種に活用できる汎用性の高い、遺伝子組換え技術を確立することができた。これらの技術を利用することにより、交雑育種では不可能であった有用遺伝子の導入による新しい形質を持ったキクの作出が可能になった。さらに耐虫性遺伝子 *cry1Ab* の改良による発現強化に成功したことから、導入遺伝子の発現を強化する1手法も確立できた。

今後はこれらの手法を多くのキク品種に応用し、キクの遺伝資源の拡大を図っていきたい。また、遺伝子組換え技術については、現在、日本を初め、ヨーロッパ各国等において社会に受け入れられない状況になっている。これについては、本研究で育成された耐虫性キクの有用性、すなわち農薬使用の低減による人体や環境への負荷軽減をひろくアピールすることで、組換え植物の有用性を証明し、組換え植物に対する社会の理解と浸透を図る必要がある。また、キク科植物には今回組換えに用いた栽培ギクと交雑可能な近縁種が自然界に多数存在するために、安全面において社会への理解を妨げとなっている遺伝子拡散について、この耐虫性キクの導入遺伝子 *cry1Ab* 遺伝子が拡散した場合の標的以外の昆虫の死滅と、それによる食物連鎖への影響、さらには野生ギクへの遺伝子拡散による生態系への影響といった環境影響の程度を調査するとおもに、遺伝子の拡散を防止する雄性不稔系統の作出、葉緑体形質転換技術の確立などを目指していきたい。

摘 要

キク [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] は、江戸時代以降、交雑育種法や突然変異育種法を用いて多種多様な品種が作出されてきたが、多様化した栽培体系、消費者ニーズ、環境保護等に応えるため、これまでにない花形、花色、耐病性、耐虫性等の新形質の付与が強く望まれており、従来の育種法では限界がある。そこで本研究では、遺伝子組換え技術をはじめとするバイオテクノロジーを用いた育種技術を確立し、有用遺伝子を導入することで、キクに今まで存在し得なかった新形質を付与し、新しいキクの育種素材の作出を試みた。

1. 細胞融合による体細胞属間雑種の作出

キクは交雑育種によって様々な品種が育成されてきたが、交雑できる範囲は限られており、それが有用遺伝子の導入をはじめとした変異の拡大を妨げる要因になっている。そこでキクで既に確立されていたプロトプラスト培養技術を活用し、電気融合条件を検討することで、キク科植物で初めて、電気融合による体細胞属間雑種の獲得に成功した。キクとハイイロヨモギを両親とした体細胞雑種植物は雄性不稔であり、両親と比較して発根力が弱かったが、強い白さび病抵抗性と両親にない花形・花色、草姿を示したことから、単離・同定されていない有用遺伝子の導入と遺伝的多様性の拡大に大きく貢献すると考えられ、今後、非対称融合などによって有用な形質を持った育種素材作出の可能性が示唆された。

2. 遺伝子組換え技術の確立

キクの遺伝子組換えは数多く報告されているが、形質転換効率の低さやキメラの出現により実用化が困難であった。そこで、形質転換細胞からの植物体の再分化を従来の不定芽経路からカルス経路に変更することで、全ての再分化植物体が導入遺伝子を全身で安定して発現する形質転換体となる効率的な遺伝子組換え技術の確立に成功した。さらに、対数増殖期の *Agrobacterium* の使用、感染液への界面活性剤の添加、共存培地へのカザミノ酸の添加等の改良を加えることで、高い感染効率を示す新しい形質転換技術を確立した。

3. 遺伝子組換えによる新品種の育成

キク栽培に際して大きな問題となっている農薬散布量の増大、それに伴う栽培者の健康や環境に対する負荷、コストの増大等を解決するため、遺伝子組換えによる耐虫性キクの作出を試みた。鱗翅目昆虫に殺虫性を示す *Bacillus thuringiensis* 由来の *cry1Ab* 遺伝子を遺伝子組換え技術によってキクに導入したところ、オオタバコガによる食害面積が非組換え体では 91.1%であったのに対し、*cry1Ab* 遺伝子を導入したキクでは 10.0%へと著しく減少した。幼虫に対しては 2 週間程度の発育遅延効果が認められたが、殺虫効果は認められなかった。これは、*cry1Ab* 遺伝子の 1.6kb 付近に存在する mRNA 不安定

配列のため、mRNA の合成がそこでストップし、完全長の殺虫性タンパク質 Cry1Ab が合成されなかったためと考えられた。そこで、殺虫性をさらに高めるため、*cry1Ab* 遺伝子の塩基配列をキクのコドン使用頻度に合わせて改良し、mRNA 不安定配列を除去することで殺虫性タンパク質生成量を高めた改良 *cry1Ab* 遺伝子 (*mcbt*) 遺伝子を構築した。この遺伝子を、遺伝子組換え技術によってキクに導入したところ、完全長の殺虫性タンパク質 Cry1Ab が合成された。これにより、食害面積が1%以下となり、実験に供試したオオタバコガ初齢幼虫の全てにおいて、中腸が褐変して死亡するといった強い耐虫性を持つ遺伝子組換えキクの作出に世界で初めて成功した。

4. 遺伝子組換え植物の安全性に関わる評価試験

遺伝子組換え植物を一般圃場で栽培するにあたっては、閉鎖系温室、非閉鎖系温室および隔離圃場にて、段階的に環境への影響の程度を調査する必要がある。そこで、他殖性かつ虫媒性で、宿根性といった環境影響評価上厄介な性質を持つキクにおいて、閉鎖系温室実験を行い、1.導入遺伝子の安定性、2.アレロパシー物質産生性、3.土壌微生物相への影響、4.遺伝子拡散性、5.*Agrobacterium* 残存性等の項目について調査した。その結果、導入遺伝子は生活環を通じて安定に発現し、環境への影響は原品種と基本的に変わらないことが証明された。

以上のことから、本研究により、有用遺伝子をキクに導入し、安定して発現させる新しい遺伝子組換え技術が確立され、交雑育種や突然変異育種では得られなかった形質を持つ育種素材としてのキクの作出が可能となった。

Summary

Chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] is one of the important ornamental plants and many useful agronomical traits have been introduced into chrysanthemum by conventional cross breeding and selection, and more recently through mutation breeding (Broertjes *et al.*, 1976; Preil *et al.*, 1983; De Jong and Custers, 1986; Dalsou and Short, 1987; Huitema *et al.*, 1987). However, in cross breeding, utilizable gene resources are limited to related species which are able to be cross pollinated, so genetic diversity is narrow in chrysanthemum.

The biotechnology such as cell fusion method or gene transformation system has potentials to expand the range of genetic variation in chrysanthemum. So, we established some biotechnology such as cell fusion or gene transformation to introduce agronomical interesting traits to chrysanthemum and expanded genetic diversity of chrysanthemum.

1. I produced intergeneric somatic hybrids between chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex. Willd.) by electrofusion of mesophyll protoplasts. Chrysanthemum protoplasts were inactivated with iodoacetamide and electrofused with wormwood protoplasts. The 3,864 calli that appeared produced 1,342 plantlets, all of which had RFLP bands specific for both chrysanthemum and wormwood. After acclimation, 23 intergeneric somatic hybrids were flowered. These 23 somatic hybrid plants were more resistant to rust than parent chrysanthemum, and the disease spots that appeared had diameters of only 1-2 mm, and they have not expanded any more. The characteristics of the flowers such as flower shapes and colors of their flowers differed from those of the parent plants.

2. For elimination of the appearance of the chimeric regenerants consisting of transgenic and non-transgenic tissues, I succeeded in establishing a stable and efficient transformation system of chrysanthemum. The transformation frequency in callus induction (CI) system (4.4%) was higher than that in adventitious shoot induction (SI) system (0.3%). All regenerated plantlets obtained by CI system express *gus* gene stably even after vegetative propagation. While a few regenerants obtained by SI system have *gus* gene and express *gus* gene in chimeric manner. Moreover, it is very efficient to increase the infection frequency of gene transformation by *Agrobacterium* that caused by using of 20 mg/l G418 after 10 days from infection for

selection, using of cork-borer, 5-h cultured *Agrobacterium*, attending Tween 20 in infection and casamino acid in cocultivation.

3. The chrysanthemum cultivar 'Shuho-no-chikara' was transformed using a disarmed strain of *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404, carrying a binary vector, pIAbT1 that harboured a truncated delta-endotoxin gene, *cryIAb* of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 which has a specific biological activity against lepidopteran insects. Leaf discs were co-cultured with *Agrobacterium* and there after cultured on the callus induction medium containing G418. A total of 92 shoots were regenerated from 1,760 leaf discs on the regeneration medium and the *cryIAb* gene was detected in all the regenerated plantlets by Southern blot analysis. The accumulation of Cry1Ab protein in 20 transformed lines, selected at random, was confirmed by Western blot analysis. Insect bioassay was conducted using tobacco budworm (*Helicoverpa armigera*) larvae. On the lines showing a high expression of Cry1Ab (more than 32.5 ng per 50 ng of total soluble protein), a significantly higher feeding inhibition and/or growth inhibition of the insects was observed, compared to those on the non-transformed control plants.

4. The chrysanthemum cultivar 'Shuho-no-chikara' was transformed using a disarmed strain of *Agrobacterium tumefaciens*, EHA101, carrying a binary vector, pIG121*mcbt* that harboured a modified delta-endotoxin gene, modified *cryIAb* (*mcbt*) gene encoding an insecticidal crystal protein fragment of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. Leaf discs were co-cultured with *Agrobacterium* and there after cultured on the callus induction medium containing G418. A total of 317 shoots were regenerated from 3,618 leaf discs on the regeneration medium and the *mcbt* gene was detected in all the regenerated plantlets by Southern blot analysis. The level of accumulation of Cry1Ab ICP by Western blot analysis ranged from 10.5 ng to 80 ng per 50 µg total soluble protein. Insect bioassay was conducted using tobacco budworm (*Helicoverpa armigera*) larvae and all larvae of *H. armigera* tested was dead during first instar on the *mcbt* transformed lines whose expression level were more than 47.6 ng per 50 µg compare to wild type *cryIAb* transformed lines which performed a significantly higher feeding inhibition and/or growth inhibition of the insects was observed, compared to those on the non-transformed control plants.

5. Then we should examine safety assessment of these insect resistant transgenic chrysanthemums. The morphological assay, transgenic chrysanthemum was similar to non-transgenic chrysanthemum. And transgene was expressed stably. Allelopathy was not inducing in transgenic chrysanthemum. The influence to soil bacteria was similar

to non-transgenic chrysanthemum. The gene propagation was similar to non-transgenic chrysanthemum. The *Agrobacterium* was not existed on the transgenic chrysanthemum. So these data indicate that the influence to other organism of transgenic chrysanthemum was similar to non-transgenic chrysanthemum.

謝 辞

本論文を取りまとめるにあたり、終始ご指導とご校閲、ご鞭撻をいただきました筑波大学農林学系 西村繁夫 教授、同大学生物科学系 鎌田博 教授、同大学農林学系 弦間洋 教授、同大学農林学系 江面浩 助教授ならびに同大学農林学系 大澤良助教授に、深甚なる感謝の意を表します。

本研究において、客員教授としてご指導とご助言を賜りました京都府立大学農学部 田中國介 教授ならびに、福井大学地域教育学部 前田柊夫 教授、長期研修時代よりご指導・ご助言、激励をいただきました独立行政法人〔以下(独)〕農業・生物系特定産業技術研究機構 作物研究所 遺伝子技術研究室長 若狭暁 博士に心より感謝いたします。また、大学時代より終始懇篤なるご指導を賜りました元筑波大学農林学系 菊池文雄 教授ならびに生井兵治 教授、組織培養に関するご指導をいただきました石川県農業短期大学 島田多喜子 教授、福井県立大学生物資源開発研究センター 大城閑 教授ならびに名古屋大学 前田英三 名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。

キクの培養方法および組換え系の確立にあたって終始懇篤なるご助言とご指導をいただきました、静岡県農業試験場生物工学部 山田栄成 主任研究員、鹿児島県バイオテクノロジー研究所細胞機能研究室 上野敬一郎 博士、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構花き研究所生理遺伝部長 柴田道夫 博士、同研究所生産利用部機能解析利用研究室長 間竜太郎 博士、(独)農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ 市川裕章 博士、茨城県農業総合センター生物工学研究所 果樹・花き育種研究室 高津康正 博士および、福井県農林水産部農畜産課 古田秀雄 企画主査、細胞融合法について懇篤なるご指導をいただきました千葉大学園芸学部 三位正洋 教授、Bt に関する研究について鄭重なるご助言をいただきました、北海道大学 飯塚敏彦 名誉教授ならびに同大学農学部 浅野眞一郎 助教授、Bt 遺伝子の改良設計や耐虫性試験の計画・実行にあたって暖かいご助言とご指導をいただきました、(独)農業環境技術研究所生物環境案全部昆虫研究グループ長 望月淳 博士ならびに千葉県農業試験場生物工学部遺伝子工学研究室 深見正信 上席研究員、Bt タンパク質の実験にあたって手法等についてご指導いただきました、東亜合成株式会社つくば研究所 岡本雅次 博士、オオタバコガ蛹を幾度となくご提供いただきました鹿児島県農業試験場病虫部 福田健 主任研究員、遺伝子組換えキクの環境安全性評価について鄭重なるご指導・ご助言をいただきました、(独)農業生物資源研究所企画調整部遺伝子組換え研究推進室長 田部井豊 博士、(独)農業技術研究機構北陸農業研究センター北陸地域基盤研究部長 田中宥司 博士、(独)農業生物資源研究所新生物資源創出研究グループ 森中洋一 博士、(株)日本

モンサント取締役社長 山根精一郎 博士ならびにシンジェンタシード株式会社 眞鍋忠久 博士に、深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、多大なご配慮とご支援を賜った元福井県農林水産部長 岩田忠寿 博士、福井県農業試験場長 堀内久満 氏、前福井県農業試験場長 前原貞一 氏、元福井県農業試験場長 青木源久 氏、元高志農業改良普及センター所長 青木研一 氏、元奥越農林総合事務所長 真柄紘一 氏、福井県園芸試験場長 数馬俊晴 氏、前園芸試験場長 鹿子島力 博士、福井県農業試験場企画・経営部長 山崎昌三郎 氏、園芸・バイテク部長 岡本博 博士、元園芸・バイテク部長 永井輝行 博士、水稻育種部長 寺田和弘 氏、バイテク研究グループ長 野村幸雄 博士、前バイテク研究グループ長 石川武之甫 氏、およびバイテク研究グループの皆様 に深く感謝いたします。また、長きに渡って試験研究を支援して下さり、激励をいただきました福井県農業試験場園芸・バイテク部、水稻育種部、生産環境部、企画経営部、食品加工研究所および管理室の皆様 に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Aida, R. and Shibata, M., 1996. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgenic silencing. *Plant Sci.*, 121: 175-185.
- Adang, M. J., Brody, M. S., Cardineau, G., Eagan, N., Rouch, R. T., Shewmarker, C. K., Jonew, A., Oakes, J. V. and McBride, K. E., 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.*, 21: 1131-1145.
- Asano, S., Ogiwara, K., Takahashi, M. and Indrasith, L. S., 2000. Culture medium of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* Buibui enhances the insecticidal activities of δ -endotoxins from *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* and *aizawai* against lepidopterous pest insects. *Appl. Entomol. Zool.*, 35: 575-582.
- Benetka, V. and Pavingerova, D., 1995. Phenotypic differences in transgenic plants of chrysanthemum. *Plant Breeding*, 114: 169-173.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chatterjee, G., Sikdar, S. R., Das, S. and Sen, S. K., 1988. Intergeneric somatic hybrid production through protoplast fusion between *Brassica juncea* and *Diplotaxis muralis*. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 915-922.
- Chen, C. YA. and Shyu, A. B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.*, 20: 465-470.
- Daub, M. E., Jenns, A. E., Urban, L. A., and Brintle, S. C., 1994. Transformation frequency and foreign gene expression in burley and flue-cured cultivars of tobacco. *Tob. Sci.*, 38: 51-54.
- Dean, C., Tamaki, S., Dunsmuir, P., Favreau, M., Katayama, C., Dooner, H. and Bedbrook, J., 1986. mRNA transcripts of several plant genes are polyadenylated at multiple sites in vivo. *Nucleic Acids Res.*, 14: 2229-2240.
- De Cleene, M. and De Ley, J., 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.*, 42: 389-466.
- De Jong J. and Radmaker W., 1986. The reaction of chrysanthemum cultivars to *Puccinia horiana* and the inheritance of resistance. *Euphytica*, 35: 945-952.
- De Jong J. and Radmaker, W., 1991. Life history studies of the leafminer *Liriomyza trifolii* on susceptible and resistant cultivars of *Dendranthema grandiflora*.

- Euphytica, 56: 47-53.
- De Jong, J., Mertens, M. M. J. and Rademaker, W., 1994. Stable expression of the GUS reporter gene in chrysanthemum depends on binary plasmid T-DNA. *Plant Cell Rep.*, 14: 59-64.
- De Rocher, E. J., Vargo-Gogola, T. C., Diehn, S. H. and Green, P. J., 1998. Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol.*, 117: 1445-1461.
- 土壤微生物実験法, 1992. 土壤微生物研究会編. (株) 養賢堂.
- Earle, E. D. and Langhans, R. W., 1974. Propagation of Chrysanthemum *in vitro*. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 90: 128-132.
- 遠藤伸夫, 1969. 栽培ギクの染色体研究(第2報). 栽培ギクの染色体について(その2). *園学雑.*, 38:343-349.
- Fahleson, J., Rahlen, L. and Glimelius, K., 1988. Analysis of plants regenerated from protoplast fusion between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 507-512.
- Fearson, E. M., Power, J. B. and Cocking, E. C., 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.*, 33: 130-137.
- Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J. and Shimamoto, K., 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 11: 1151-1155.
- 深井誠一, 柴田道夫, 天野正之, 山崎教道, 大江正温, 1988/1989. キクプロトプラストからの植物体再生. *大阪農技セ研報*, 25: 25-30.
- 古田秀雄, 野村幸雄, 前田柵夫, 真柄紘一, 1996. キク [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] プロトプラストからの植物体の効率的な再分化. *福井農試研報*, 33: 7-14.
- Furuta, H., Shinoyama, H., Nomura, Y., Maeda, M. and Magara K. (2004). Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex. Willd) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts. *Plant Sci.* 166: 695-702.
- Gleba, Y. Y. and Hoffman, F., 1980. "Arabidobrassica": A novel plant obtained by protoplast fusion. *Planta*, 149: 112-117.
- Godwin, I. D., Ford-Lloyd, B. V. and Newbury, H. J., 1992. In vitro approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. *Aust. J.*

- Bot., 40: 751-763.
- Goodall, G. and Filipowicz, W., 1989. The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell*, 58: 473-483.
- Guri, A., Dunbar, L. J. and Sink, K. C., 1991. Somatic hybridization between selected *Lycopersicon* and *Solanum* species. *Plant Cell Rep.*, 10: 76-80.
- 長谷川徹, 1996. 胚珠培養によるキクとハマギクの雑種作出. *育種学雑誌*, 46 (2): 231.
- 林季夫, 1987. 蓬左菊を作る. *ガーデンライフ*, 236: 56-57.
- Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 6: 271-282.
- Hill, G. P., 1968. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* 'Bronzu Pride'. *Physiol. Plant.*, 21: 386-389.
- Höfte, H., De Greve, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., van Montague, M., Zabeau, M. and Vaeck, M., 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. *Eur. J. Biochem.*, 161: 273-280.
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H. and Vaeck, M., 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2010-2017.
- Hooykaas, P. J. J. and Beijersbergen, A. G. M., 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 157-179.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T., 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.
- Honda, H. and Hirai, A., 1990. A simple and efficient method for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. *Japan. J. Breed.*, 40: 339-348.
- Iizuka, M., Matsuoka, E., Doi, A., Madorigal, R. and Fukushima, A., 1973. Tubular floret culture of *chrysanthemum* and *cineraria* in vitro. *Japan. J. Genet.*, 48: 79-87.
- Ikeda, H. and Numata, S., 1998. Pollen storage of *chrysanthemum*. *Acta Hort.*, 454: 329-333.
- Jefferson, R. A., 1987. Assaying chimeric genes in plants : GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rpt.*, 5: 387-405.
- Kaepler, S. M. and Phillips, R. L., 1993. Tissue culture-induced DNA methylation

- variation in maize. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 8773-8776.
- Kaeppler, S. M., Kaeppler, H. F. and Rhee, Y., 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol. Biol., 43: 179-188.
- 亀野貞, 川田穰一, 山岸博, 豊田努, 1979. キク属植物の種間交雑に関する研究 (第2報). ピレオギクと栽培ギクとの雑種 'キク安濃1号' の育成経過と特性. 園学要旨 昭54春, 260.
- Khalid, N., Davey, M. R. and Power, J. B., 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plant of potential commercial value. Scientia Hort., 38: 287-294.
- 北村四郎, 1950. 園芸大辞典, 576-585. 誠文堂, 新光社, 東京.
- 小西国義, 1995. キクの栽培史. 農業技術体系花卉編 6 キク (クリサンセマム), 17-19.
- Kozziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M. R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M. and Elora, S. V., 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology, 11: 194-200.
- Kumashiro, T. and Kubo, T., 1986. Stability of agronomic traits in cytoplasmic male sterile tobacco obtained by protoplast fusion. Jpn. J. Breed., 36: 284-290.
- Krumbiegel, G. and Schieder, O., 1979. Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill and *Atropa belladonna* L. Planta, 145: 371-376.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R., 1981. Somaclonal variation—a model source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60: 197-214.
- 松尾孝嶺, 1989. 植物遺伝資源集成 第3巻, (株) 講談社, 東京.
- Melchers, G., Sacristan, M. D. and Holder, A. A., 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg. Res. Commun., 43: 203-218.
- 三木大介, 島本功, 2004. 植物におけるRNAiの分子機構とその応用. 実験医学, 22: 461-469.
- Miller, M., 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathol., 65: 805-811.

- 光原 一郎, 瀬尾 (白澤) 直美, 大橋 祐子, 2002. 転写後型ジーンサイレンシングが遺伝子しないわけ. 細胞増殖によるサイレンシングの解除. 植物細胞工学, 21: 650-651.
- Mizuhiro, M., Ito, K. and Mii, M., 2001. Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*. Plant Sci., 161: 489-496.
- Mochizuki, A., 1994. Toxicity of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 to the rice stem borer larvae, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). Jpn. J. Appl. Zool., 38:46-49
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Murray, E. E., Rocheleau, T., Eberle, M., Stock, C., Sekar, V. and Adang, M., 1991. Analysis of enstable RNA transcripts of insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic plants and electroporated protoplasts. Plant Mol. Biol., 16: 1035-1050.
- Nakano, M. and Mii, M., 1993. Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *D. barbatus* through protoplast fusion. Theor. Appl. Genet., 86: 1-5.
- Nagamatsu, Y., Itai, Y., Hatanaka, C., Funatsu, G. and Hayashi, K., 1984. *Bacillus thuringiensis* gene for BtT84A1 crystal protein, complete cds. Agric. Biol. Chem., 48: 611-619.
- Nagatomi, S., Miyahira, E. and Degi, K., 1996. Combined effect of gamma irradiation methods and in vitro explant sources on mutation induction of flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Gamma field symposia, 35: 51-69.
- Newman, T. C., Ohme-Takagi, M., Taylor, C. B. and Green, P. J., 1993. DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. Plant Cell, 5: 701-714.
- Niizeki, M., Nakajo, S., Ishikawa, R., Harada, T. and Saito, K., 1992. Behavior of mitochondrial and chloroplast DNA in somatic hybrid calli between rice and alfalfa. Japan J. Breed., 42: 803-809.
- Nishio, T., Watanabe, K., Sato, T. and Hirai, M., 1987. Production of somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Brassica campestris* by electric cell fusion. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants and Tea, Japan, A 1: 165-172.
- 丹羽鼎三, 1929a. 日本栽培菊の起源に関する考説 (一). 日本園芸学雑誌, 41 (5); 1-17
- 丹羽鼎三, 1929b. 日本栽培菊の起源に関する考説 (二). 日本園芸学雑誌, 41

(6);1-17

- Ohme-Takagi, M., Taylor, C. B., Newman, T. C. and Green, P. J., 1993. The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11811-11815.
- Ohta, S., Mita, S., Hattori, T. and Nakamura, K., 1991. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.*, 31: 805-813.
- 岡田正順, 1963. 菊の花芽分化及び開花に関する研究. 東京教育大農学部紀要, 9; 63-202.
- Ooms, G., Hooykaas, P. J., Veen, R. J. M., Bleelen, P., Regensburg-Tuink, T. J. G. and Schilperoort, R. A., 1982. Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7: 15-29.
- 大澤勝次, 1994. 図集 植物バイオテックの基礎知識, 農文協.
- 大塚寿夫, 末松信彦, 戸田幹彦, 1985. キクのプロトプラスト培養と植物体再分化. 静岡農試研報, 30: 25-33.
- Ozeki, Y., Davies, E. and Takeda, J., 1997. Somatic variation during long term subculturing of plant cells caused by insertion of a transposable element in a phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene. *Mol. Gen. Genet.*, 254: 407-416.
- Padidam, M., 1992. The insecticidal crystal protein CryIA(c) from *Bacillus thuringiensis* is highly toxic for *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 109-111.
- Pavingerova, D., Dostal, D., Biskova, R. and Benetka, V., 1994. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium* -mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Sci.*, 97: 95-101.
- Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T. and Fischhoff, D. A., 1990. Insect resistant cotton plant. *Bio/Technology*, 8: 939-943.
- Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L. and Fischhoff, D. A., 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3324-3328.
- Peschke, V. M., Phillips, R. L. and Gengenbach, B. G., 1987. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science*, 238: 804-805.
- Renou, J. P., Brochard, P. and Jalouzot, R., 1993. Recovery of transgenic

- chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. Plant Sci., 89: 185-197.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A., 1988. Primer-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491.
- 作物耕種基準 福井県, 1979. 275-302.
- Shaw, G. and Kamen, R., 1987. A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mediates selective mRNA degradation. Cell, 46: 659-667.
- 柴田道夫, 1984. 花き品種—キク—. 農業および園芸, 69 (5).
- Shibata, M. and Kawata, J., 1986. Chromosomal variation of recent chrysanthemum cultivars for cut flower. Development of new technology for identification. Fruit Tree Res. Stn. M. A. F. F., 41-45.
- 柴田道夫, 川田穰一, 亀野貞, 山岸博, 豊田努, 山口隆, 沖村誠, 宇田昌義, 1988. イソギク (*Chrysanthemum pacificum* Nakai) とスプレーギク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) との種間交雑による小輪系スプレーギク品種ムーンライトの育成経過とその特性. 野菜茶試研報, A2: 257-277.
- 柴田道夫, 1995a. キクの原産地と野生種. 農業技術体系花卉編 6 キク (クリサンセマム), 9-15.
- 柴田道夫, 1995b. キクの起源と日本への伝来. 農業技術体系花卉編 6 キク (クリサンセマム), 7-8.
- 柴田道夫, 1995c. 育種動向と今後の課題. 農業技術体系花卉編 6 キク (クリサンセマム), 49-57.
- Shinoyama, H., Komano, M., Nomura, Y. and Nagai, T., 2002. Introduction of Delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* to chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] for insect resistance. Breed. Sci., 52: 43-50.
- Shinoyama, H., Kazuma, T., Komano, M., Nomura, Y. and Tsuchiya, T., 2002. An efficient transformation system in chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] for stable and non-chimeric expression of foreign genes. Plant Biotechnol., 19: 335-343.
- Shinoyama, H., Mochizuki, A., Komano, M., Nomura, Y. and Nagai, T., 2003. Insect Resistance Transgenic Chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] by modified δ -endotoxin Gene of *Bacillus thuringiensis*. Breed. Sci., 53: 359-367.
- Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments

- separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.
- 末永博, 1995. マメハモグリバエの加害に対するキウの感受性の品種間差. *応動昆*, 39; 245-251.
- Sundberg, E. and Glimelius K., 1986. A method for production of interspecific hybrids within *Brassica siceae* via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci.*, 43: 155-162.
- Sutton, D. W., Havstand, P. K. and Kemp, J. D., 1992. Synthetic cryIIIA gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. *Transgenic Res.*, 1: 228-236.
- Taguchi, T. and Kameya, T., 1986. Production of somatic hybrid plants between cabbage and Chinese cabbage through protoplast fusion. *Japan J. Brred.*, 36: 185-189.
- Takagi, H., Tanaka, Y., Tarumoto, I. and Murata, N., 1993. Evaluation of genetic diversity of sweet potato germplasm. I. Characterization by restriction polymorphisms analysis. *Japan. J. Breed.*, 43 (Suppl.1): 192.
- Takaiwa, F., Oono, K. and Sugiura, M., 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17s rDNA gene. *Nucleic Acids Res.*, 12: 5441-5448.
- Takatsu, Y., Hayashi, M. and Sakuma, F., 2000. Transgenic inactivation in *Agrobacterium*-mediated chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) transformants. *Plant Biotechnol.*, 17: 241-245.
- Tang, H. Q., Hu, J. and Tan R. X., 2000. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Med.*, 66: 391-393.
- Terada, R., Yamashita, Y., Nishibayashi, S. and Shimamoto, K., 1987. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Plant Sci.*, 48: 123-128.
- 戸栗敏博, 藤井敏雄, 小川俊也, 2003. 外来遺伝子のメチル化様式の解析とメチル化受容配列の改変による遺伝子発現の改良の試み. 第21回植物細胞分子生物学会講演要旨, 48.
- Urban, L. A., Sherman, J. M., Moyer, J. W. and Daub, M. E., 1994. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Sci.*, 98: 69-79.
- Van Aarssen, R., Soetaert, P., Stam, M., Dockx, J., Gossele, V., Seurinck, J., Reynaerts, A. and Cornelissen, M., 1995. CryIA(b) transcript formation in tobacco is inefficient. *Plant Mol. Biol.*, 28: 513-524.
- Wordrangen, M. F., De Jong, 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 Rep.*, 9: 505-508.
- Yamamoto, M. and Kobayashi, S., 1995. A cybrid plant produced by electrofusion between *Citrus unshu* (Satsuma mandarin) and *C. sinensis* (sweet orange). *Plant Tissue Culture Letter*, 12 (2): 131-137.
- Yamanaka, H., Kuginuki, Y., Kanno, T. and Nishio, T., 1992. Efficient production of somatic hybrids between *Raphanus sativus* and *Brassica oleracea*. *Jpn. J. Breed.*, 42: 329-339.
- 安田 勲 1982. 花の履歴書, 97-110. 東海大学出版会.
- 山口 隆 1981. キクの白さび病抵抗性育種に関する研究. *育種学雑誌*, 31: 121-132.

研究業績一覧

I. 原著論文

1. 田中治恵, 鄭柔, 堀内久満, 寺田和弘, 1994. イネ薬培養におけるカルス誘導培地の研究. 北陸作物学会報, 29: 18-21.
2. Shinoyama, H., Komano, M., Nomura, Y. and Nagai, T., 2002. Introduction of Delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* to chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] for insect resistance. Breed. Sci., 52: 43-50.
3. Shinoyama, H., Kazuma, T., Komano, M., Nomura, Y. and Tsuchiya, T., 2002. An efficient transformation system in chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] for stable and non-chimeric expression of foreign genes. Plant Biotechnol., 19: 335-343.
4. Shinoyama, H., Mochizuki, A., Komano, M., Nomura, Y. and Nagai, T., 2003. Insect Resistance Transgenic Chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] by modified δ -endotoxin Gene of *Bacillus thuringiensis*. Breed. Sci., 53: 359-367.
5. Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T., 2004. A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura]. Plant Biotechnol., 21: 25-33.
6. Furuta, H., Shinoyama, H., Nomura, Y., Maeda, M. and Magara, K., 2004. Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh. ex. Willd) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts. Plant Sci., 166: 695-702.

II. 総説

1. 篠山治恵, 2002. キクにおける個体再分化系の確立と遺伝子組換え体の育成. 第20回日本植物細胞分子生物学会奈良大会, シンポジウム「最近の植物組織培養について—実用と課題—」.

III. 報文

1. 篠山治恵, 駒野雅保, 野村幸雄, 数馬俊晴, 1998. キク [*Dentranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] における安定的な *Agrobacterium* 形質転換系の確立. 福井県農業試験場研究報告, 35:13-21.
2. 篠山治恵, 古田秀雄, 野村幸雄, 土屋孝夫, 前田柅夫, 数馬俊晴, 真柄紘一, 2000. 細胞融合によるキク [*Dentranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] とハイイロヨモギ (*Artemisia sieversiana* J. F. Ehrh ex. Willd.) の体細胞属間雑種の作出. 福井県農業試験場研究報告, 37: 11-21.

IV. 品種登録

1. 水稻「ゆめあこがれ」(平成 8 年 8 月 21 日登録, 育成者: 堀内久満, 水野進, 中川宣興, 寺田和弘, 富田桂, 山本明志, 古田秀雄, 正木伸武, 青木研一, 篠山治恵, 池田郁美, 見延敏幸, 田野井真, 田中勲, 石川武之甫)
2. 水稻「さきひかり」(平成 15 年 9 月 5 日登録, 育成者: 堀内久満, 富田桂, 寺田和弘, 田中勲, 小林麻子, 見延敏幸, 古田秀雄, 山本明志, 篠山治恵, 池田郁美, 田野井真, 青木研一, 鹿子島力, 正木伸武, 南忠員, 杉本明夫)