

Agrobacterium tumefaciens によるイチゴ形質転換体の作出

浅尾浩史*・荒井 滋*・佐藤隆徳**・平井正志**・日比忠明***

*奈良県農業試験場栽培課

(〒634 奈良県橿原市四条町)

**野菜・茶業試験場野菜育種部

(〒514-23 三重県安芸郡安濃町草生)

***東京大学農学部

(〒113 東京都文京区)

(1993年2月2日受付)

(1993年11月26日受理)

わが国のイチゴの主要3品種である‘女峰’、‘とよのか’および‘宝交早生’に *Agrobacterium tumefaciens* を用いて NPT II 遺伝子および GUS 遺伝子を導入した。その結果、形質転換カルスおよび不定芽の作出においては、‘女峰’が最も効率がよく、‘とよのか’と‘宝交早生’についても低率ながら形質転換不定芽を得た。‘とよのか’の葉柄からの形質転換カルスの作出において、アセトシリンゴンを含む *A. tumefaciens* 懸濁液に浸漬した後、カルス形成培地で6日間共存培養すると形質転換率が向上した。形質転換個体の GUS 活性を X-Gluc により酵素組織化学的に検出したところ、GUS の発現量は、葉では中肋部、葉柄では維管束部、根では生長点部で非常に高かった。

1. 緒 言

わが国においてもイチゴの育種が長年行われているが、現在の主要品種は‘とよのか’、‘女峰’および‘宝交早生’である。これらの品種は食味はよいが、‘とよのか’はうどんこ病に、‘女峰’は炭そ病に、‘宝交早生’は萎黄病にそれぞれ弱いという欠点がある。イチゴなどの栄養繁殖性植物は種子繁殖性植物とは異なり、交配により耐病性など一部の形質を既存の品種に付加するのは困難である。しかし、近年注目されている遺伝子組換え技術では、目的とする一つの遺伝子を付加することが可能であり、栄養繁殖性作物の育種にとっては特に有効である。このためには、最初に、これらイチゴ品種に遺伝子を導入する技術を確立する必要がある。その際、多くの双子葉植物で用いられている *Agrobacterium tumefaciens*¹⁾ を用いて形質転換を行うため効率のよい再分化系を利用することが前提となる。

イチゴの組織からの再生系の報告は幾つかある^{2,3)}が、その効率は品種間差が大きい。筆者らは、日本の主要品

種を培養器内で大量に増殖させ⁴⁾、それらの葉組織をカルス化させ、さらに個体を再生させるのに成功した⁵⁾。今回、著者らは上記再生系を用いて数種イチゴに *A. tumefaciens* を感染させ、再生個体に NPT II 遺伝子および GUS 遺伝子を含む T-DNA 部分が導入されたことを確認したのでここに報告する。

2. 材料および方法

無菌的に大量増殖した‘女峰’、‘とよのか’および‘宝交早生’の葉片と葉柄片をカルス形成液体培地 (MS 培地にショ糖 3%, バンジルアミノプリン (BA) 2 mg/l, および 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 0.2 mg/l を添加し pH 5.8 に調整したもの) に1日間浸漬 (100 rpm, 25°C, 暗黒下) し、供試材料とした。*A. tumefaciens* は pAL/PC 2760 の株の T-DNA 領域にカナマイシン抵抗性 (NPT II) 遺伝子と β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を有する pBI 121⁶⁾ をトリペアレンタルメイティング法により導入したものをを用いた。

Table 1. Formation of the callus and shoot from explants co-cultured with *Agrobacterium* on the antibiotic-selection medium.

Immersing period (min.)	Leaf discs			Petioles				
	No. of explants examined	Percentage of explant forming callus	No. of shoots regenerated	No. of explants examined	Percentage of explant forming callus	No. of shoots regenerated		
Nyohou								
10	89	28.1	10.1	41	130	25.4	0	0
20	163	37.4	13.5	83	212	22.6	1.4	20
30	111	32.4	3.6	21	135	25.2	0	0
Total	363	33.6	9.6	145	477	24.1	0.6	20
Toyonoka								
10	429	4.0	0.7	3	241	8.7	2.1	5
20	280	5.0	0.4	1	179	9.5	2.2	4
30	366	3.3	0.5	2	169	5.3	1.8	3
Total	1075	4.0	0.6	6	589	8.0	2.0	12
Houkouwase								
10	50	0	0	0	50	6.0	0	0
20	50	0	0	0	50	4.0	6.0	14
30	50	18.0	6.0	5	50	6.0	0	0
Total	150	6.0	2.0	5	150	5.3	2.0	14

(1) 抗生物質濃度の検討

カナマイシン 10, 30, 50, 70, 100 mg/l およびカルベニシリン 100, 500, 1, 000 mg/l を添加したカルス形成培地 (ゲルライト 0.2% を含む) に大量増殖した各種イチゴの葉片と葉柄片を置床し, 60 日後のカルス形成について調査した。

(2) 形質転換カルスおよび不定芽の選抜

外植片はカナマイシン 50 mg/l を添加した YEB 培地 (イーストエキス 1 g/l, 肉エキス 5 g/l, ペプトン 5 g/l, ショ糖 5 g/l, MgSO₄ 0.5 g/l, pH 7.0) で一晚振とう培養 (100 rpm, 28°C) した *A. tumefaciens* の菌液を YEB 培地で 1/10 に希釈した液に 10~30 分間浸して接種し, カルス形成培地で 2 日間共存培養した。その後, 除菌のためにカルベニシリン 100 mg/l と形質転換カルスの選抜のためにカナマイシン 50 mg/l を添加したカルス形成培地に移植して, 培養 60 日後にカルス形成について調査した。次に, 形成したカルスを前記抗生物質を含んだ再分化培地 (カルス形成培地から 2, 4-D を除いたもの) に移植して 30 日間培養後, 不定芽形成について調査した。

(3) アセトシリンゴンの検討

形質転換率を高めるため, ‘とよのか’の葉片および葉柄片をアセトシリンゴンを 0.1 mM および 0.5 mM 含む *A. tumefaciens* 懸濁液に 20 分浸漬した後, カルス形成培地で 4 日間あるいは 6 日間共存培養し, 上記と同様に抗生物質を含むカルス形成培地に移植した。培養 60 日後にカルス形成について調査した。

(4) 形質転換体の確認

茎葉分化した個体をカナマイシン 50 mg/l を含む 1/2

MS 培地に移植し, 得られた発根植物体の葉を磨碎し, 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) と 37°C で 1 時間反応させ, その反応液を紫外線ランプに当て, 蛍光で β -glucuronidase (GUS) 活性を検出した。また, GUS 活性の組織局在性を調べるため, 葉, 葉柄および根の切片を, X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid) で一晚染色してアルコールで脱色後⁷⁾, 青色の染色度で GUS 活性を評価した。次に, GUS 活性を確認し, それぞれ独立に得られた ‘とよのか’の 2 個体と ‘女峰’の 2 個体を鉢上げし, ランナーを出させ, 親株および第 1 次ランナー苗から第 6 次ランナー苗の個体における根および葉位別の葉と葉柄の GUS 活性を上記の方法で評価した。また, 果実の部位別の GUS 活性も同様に評価した。

(5) 形質転換体の DNA の単離とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による NPT II 遺伝子の確認

再分化した個体の葉から Edwards ら⁸⁾の簡便法により DNA を抽出した。但し, DNA 抽出時の褐変を防ぐため, 抽出緩衝液に 25 mM のジチオスレイトールを添加した。

得られた DNA は 10~30 ng を鋳型とし, NPT II 遺伝子の翻訳領域の 5'-末端部の塩基配列 (5'-CAAGATGGATTGCACGCAGC-3') および 3'-末端部の相補的配列 (5'-GAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG-3') を持つプライマーを用いて PCR を行った。PCR は, 94°C・30 秒保温の後, 変性 94°C・30 秒, アニール 60°C・2 分, 伸長反応 72°C・3 分を 45 サイクル反復した後, 72°C・7 分保温の条件で行った。増幅産物は, 1 μ g/ml エチジウムブロミドを含む 1.5% アガロースゲル

Table 2. Effect of acetosyringone on the transformed callus formation of strawberry cv. Toyonoka.

Acetosyringone (mM)	Co-culture period*1 (days)	Leaf discs		Petioles	
		No. of explants examined	Percentage of explant forming callus	No. of explants examined	Percentage of explant forming callus
0	4	40	2.5	40	5.0
	6	80	5.0	80	2.5
	Total	120	4.2	120	3.3
0.1	4	40	0	40	7.5
	6	80	0	80	45.0
	Total	120	0	120	32.5
0.5	4	40	0	40	2.5
	6	80	0	80	38.8
	Total	120	0	120	26.7

*1 After explants were incubated with *A. tumefaciens* in the presence of acetosyringone for 20 minutes, they were co-cultured.

ルで電気泳動により分析した。また、λ DNA を *Eco*RI と *Hind* III で酵素処理したマーカー遺伝子を同時に電気泳動した。

3. 結果および考察

(1) 形質転換体選択に用いる抗生物質の濃度

得られた形質転換体を効率よく選択するために、非形質転換体を用いて抗生物質の濃度を検討した。カナマイシンを 50 mg/l 以上添加した培地では、葉片および葉柄片からのカルス形成が全ての品種で認められなかった。また、供試した品種の中では、‘とよのか’が最もカナマイシンの影響を受けてカルス形成率が低く、特に、葉片からのカルス形成は、カナマイシンを 30 mg/l 添加した培地でも全く認められなかった。一方、カルベニシリンは、カルス形成率には全く影響を及ぼさなかったが、1,000 mg/l 添加区のカルスの生育は全ての品種で若干劣った。

以上の結果より、イチゴの形質転換体はカナマイシンを 50 mg/l 添加した培地でほぼ完全に選択できると考えられる。

(2) 形質転換カルスおよび不定芽の形成

共存培養を行った後の選択培地上でカルス形成は 3 品種のうち‘女峰’が最も効率よく、置床した外植片のうち 20% 以上からカルスが得られた (Table 1)。一方、他の 2 品種では置床した外植片のうち 10% 以下からカ

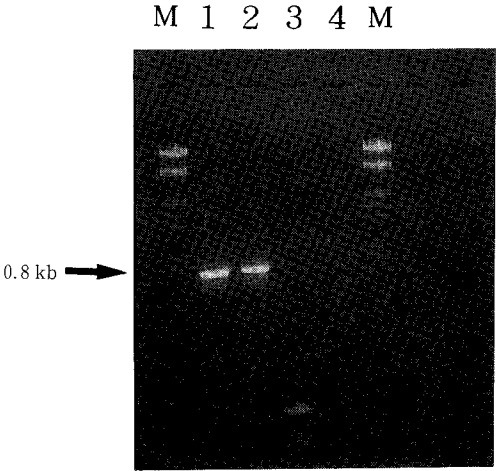


Fig. 1 Amplification of NPTII gene fragment in transformed strawberry by PCR.
1, 2 : Transformant
3, 4 : Non-transformant
M : Marker gene

ルスが得られたにすぎなかった。葉片と葉柄片を比較すると葉片でカルス形成がよく、‘女峰’では置床した葉片の 33.6% からカルスが得られた。置床した外植片あたりの再分化した不定芽数も‘女峰’が多かった。‘とよのか’および‘宝交早生’からも低率ながら不定芽が得られ

Table 3. β-glucuronidase activity in the leaf position and root of the transgenic plant of strawberry cv. Toyonoka.

Plant	Sample	Leaf position (New←→Old)							Root
		1*1	2	3	4	5	6	7	
Mother plant	Leaf	—*2	++	++	++	++	+++	+++	+
		—	—	+	+	+	+	++	
Primary runner plant	Leaf	—	++	++	++	+++	+++	+++	+++
		—	—	+	+	+	++	++	
Secondary runner plant	Leaf	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
		—	—	+	+	+	++	++	
Third runner plant	Leaf	+	++	++	++				+++
		—	+	+	+				
Fourth runner plant	Leaf	+	++	++	++				+++
		—	+	+	+				
Fifth runner plant	Leaf	+	++	++					+++
		+	++	++					
Sixth runner plant	Leaf	+	+						no rooting
		+	++						

*1 The leaves were numbered from young one to old ones in each runner plant.

*2 Score for relative intensity of blue colour after staining with X-Gluc.

—: negative, +: low, ++: high, +++: very high.

た。菌懸濁液への浸漬時間は、‘女峰’の不定芽形成においては20分間が最適であったが、‘とよのか’と‘宝交早生’では浸漬時間による差は認められなかった (Table 1)。再分化した不定芽をカナマイシンを添加した発根培地に置床すると非常に発根しにくかった。これはカナマイシンに対するイチゴの根の感受性が他の組織に比べ高いことによると考えられる。カナマイシン存在下でイチゴの不定芽の発根能力が弱くなることについては、Nehra ら⁹⁾も同様な結果を報告している。

(3) アセトシリングンの効果

形質転換体が得られる効率の低い‘とよのか’についてはアセトシリングンの添加効果を調べた。葉柄を外植片として、アセトシリングンを含む *A. tumefaciens* 懸濁液に20分間浸漬した後、カルス形成培地で6日間共存培養を行った時にのみ、明らかな効果が見いだされ、カルスを形成した外植片の率は大幅に増加した。しかし、葉片の場合には逆にカルス形成が抑制された (Table 2)。以上の結果は James ら¹⁰⁾の実験結果とほぼ同様であった。

(4) GUS 活性による形質転換体の確認と発現組織の観察

カナマイシンを含む培地で再分化した不定芽についてMUGを用いてGUS活性を検出したところ、‘女峰’では再分化した18個体中15個体で、‘とよのか’では12個体中8個体で、‘宝交早生’では10個体中7個体でGUS活性が検出された。一方対照として用いた非形質転換体ではいずれも活性が検出されなかったため、GUS活性を示すこれらの再分化個体が形質転換体であることが確認された。また形質転換体を確認された個体についてX-Gluc染色によりGUS活性が認められたのは葉と葉柄において葉脈と維管束で、根においては生長点付近で高い活性が認められた (Fig. 1)。これは、Jefferson ら¹¹⁾や Terada ら¹²⁾が報告しているように、今回用いたCaMV-35Sプロモーターは全ての器官で発現するが、活発に細胞分裂が行われている部分で特に発現が強いという組織特異性があり、Nagata ら¹³⁾が述べているように細胞周期のphaseに依存しているためであると考えられる。

再分化個体当代のX-Glucを基質として検出したGUS活性は葉、葉柄、根の順に高い傾向であった (Table 3)。しかし、‘女峰’においてGUS活性が根にはあるが葉柄には無いものが1個体認められた。また、‘とよのか’の2個体では他の形質転換個体で示されるように、葉柄組織で一様にGUS活性を示さず、一部の細胞のみ活性が観察されキメラと判定された。このように、

得られた形質転換個体のGUS活性の強さと発現部位には個体によって差異があった。これは、Araki ら¹⁴⁾や Stiekema ら¹⁵⁾が報告しているように導入遺伝子の位置効果やコピー数の相違によるものであると考えられる。

展開直後の若い葉身およびその葉柄のGUS活性を形質転換当代の親株およびそのランナーから派生した苗で比較検討した (Table 3)。親株と第1次ランナー苗のそれらではGUS活性が認められなかったが、第5次ランナー苗以降の苗のそれらでは活性が認められた。第2次ランナー苗から第4次ランナー苗の展開直後の若い葉では葉身のみでGUS活性が認められた。この点は、CaMV-35Sプロモーターが活発に細胞分裂が行われている部分で特に発現が強いという今までの報告^{11,12)}とは

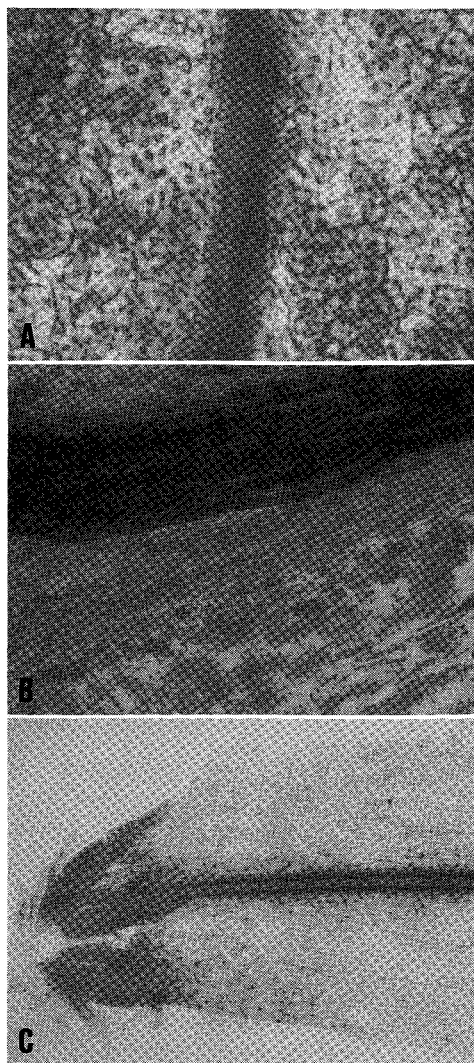


Fig. 2 Histochemical staining for GUS activity in transformed tissues. A: Leaf. B: Petiole. C: Root apex.

矛盾する。また、果実においては GUS 活性が果肉と種子で認められたが、果実の表層組織では認められなかった。

(5) PCR による NPT II 遺伝子の導入確認

形質転換個体から単離した DNA を鋳型にして、NPT II 遺伝子の翻訳領域の 5'-末端部の塩基配列および 3'-末端部の相補的配列を持つプライマーを用いて PCR を行った。その結果、pBI121 を鋳型とした場合と同様に約 0.8 kb の DNA 断片が増幅され (Fig. 2)、これらの再分化植物が NPT II 遺伝子を持つ形質転換体であることが確認された。

(6) まとめ

本研究においては、*A. tumefaciens* を用いて、イチゴ栽培品種の効率よい形質転換系を確立した。これは我々が先に報告した効率のよいイチゴ再分化系⁵⁾を利用したこと、およびカナマイシン 50 mg/l の添加でほぼ完全な選抜が可能であったことによる。

Nehra ら^{9,16)}と James ら¹⁰⁾は *A. tumefaciens* を用いて、また、嘉美¹⁷⁾らは *A. rhizogenes* を用いてイチゴへの外来遺伝子導入に成功している。しかし、現在日本の主要品種である‘女峰’や‘とよのか’に *A. tumefaciens* を用いて、効率よく外来遺伝子を導入したのは本報が初めてである。形質転換体における導入遺伝子の発現は個体ごとに大きく異なることが知られている。従って、病害抵抗性に関与する遺伝子等有用な遺伝子を導入してこれを育種母本として利用する場合、まず多くの形質転換体を作出し、その中から発現量の高いものを選抜することが必要とされる。このためには効率のよい形質転換系が必須であるが、ここで報告したイチゴの形質転換系はこのような目的に十分利用できるものと考えられる。

謝 辞

本研究にあたって、御指導・御助言をいただきました

近畿大学農学部 豊田秀吉助教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Gasser, C. S., R. T. Fraley, 1989. Science, **244**: 1293 - 1299.
- 2) Nehra, N. S., C. Stushnoff, K. K. Kartha, 1989. J. Amer. Soc. Hort. Sci., **114**: 1014-1018.
- 3) Nehra, N. S., C. Stushnoff, K. K. Kartha, 1990. Plant Science, **66**: 119-126.
- 4) 藤本まなみ, 浅尾浩史, 小島博文, 小玉孝司, 1987. 奈良農試研報, **18**: 65-71.
- 5) 荒井 滋, 浅尾浩史, 1993. 奈良農試研報, **24**: 19-21.
- 6) Jefferson, R. A, 1987. Plant Molecular Biology Reporter, **5**: 387-405.
- 7) Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima, Y. Arai, 1990. Plant Science, **70**: 133-140.
- 8) Edwards, K., C. Johnstone, C. Thompson, 1991. Nucleic Acids Research, **19**: 1349.
- 9) Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. S. S. Datla, W. L. Crosby, C. Stushnoff, 1990. Plant Cell Reports, **9**: 10-13.
- 10) James, D. J., A. J. Passey, D. J. Barbara, 1990. Plant Science, **69**: 79-94.
- 11) Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, M. W. Bevan, 1987. EMBO Journal, **6**: 3901-3907.
- 12) Terada, R., K. Shimamoto, 1990. Mol. Gen. Genet., **220**: 389-392.
- 13) Nagata, T., K. Okada, T. Kawazu, I. Takebe, 1987. Mol. Gen. Genet., **207**: 242-244.
- 14) Araki, T., H. Hirano, S. Naito, Y. Komeda, 1989. Plant Cell Reports, **8**: 259-262.
- 15) Stiekema, W. J., F. Heidekamp, J. D. Louwerse, H. A. Verhoeven, P. Dijkhuis, 1988. Plant Cell Reports, **7**: 47-50.
- 16) Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. S. S. Datla, W. L. Crosby, C. Stushnoff, 1990. Plant Cell Reports, **9**: 293-298.
- 17) 嘉美千歳, 豊田秀吉, 細井好之, 大内成志, 1992. 第3回植物組織培養コロキウム, p. 108-109.

Summary

Transformation of Strawberry Using *Agrobacterium tumefaciens*

Hiroshi ASAO*, Shigeru ARAI*, Takanori SATOU**, Masasi HIRAI** and Tadaaki HIBI***

*Nara Agricultural Experiment Station, Kashihara, Nara, 634 Japan

**National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Ano,
Mie, 514-23 Japan

***The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

Strawberry (*Fragaria* × *Ananassa*) cv. Nyohou, Toyonoka and Houkouwase were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* carrying plasmid pBI 121 containing a Kanamycin resistant gene (NPT II) and a β -glucuronidase gene (GUS). All three cultivars produced antibiotic-resistant calli and shoots. Among them 'Nyohou' was the most efficient, while 'Toyonoka' and 'Houkouwase' showed lower transformation efficiency. The antibiotic-resistant calli of 'Toyonoka' were efficiently produced from explants when incubated with *A. tumefaciens* in the presence of acetosyringone and co-cultured for 6 days. High activity of GUS in the transgenic plant was observed enzyme-histochemically in midribs of the leaves, vascular bundles of the petioles and the root apices.