

培養変異と有用遺伝子導入を利用した新規形質リンドウの育成
 Production of the New Quality Type Gentian (*Gentiana triflora* var *japonica*)
 by Gene Transformation and Mutant Cultivation

田中正美・工藤陽史・野田孝博
 Masami Tanaka, Kiyofumi Kudo and Takahiro Noda

要 約

リンドウの培養系に変異源処理や病害虫抵抗性の有用遺伝子を導入することで耐暑性や複合耐病虫性系統などリンドウ種内に保存されていない新規形質系統作出の検討を行った。その結果は次の通りである。

1) リンドウのプロトプラストに変異源として紫外線、EMS (エチルメタンスルホン酸) や電気パルス及びHPT等の標識遺伝子導入の処理を行い、EMS処理や電気パルス及び標識遺伝子導入では再分化体が得られた。しかし、いずれの処理の再分化体でも際だった変異は得られなかった。

リンドウの茎頂を培養温度26℃、回転数2~3回/1分、16時間日長の条件として、30日間隔で継代を繰り返し、長期間にわたって回転培養することで多芽体化させ、再分化した個体から30℃の温度負荷条件下でも培養が可能な耐暑性系統を選抜した。

2) 耐暑性系統では非耐暑性系統及び交雑後代等との間にオペロン社のプライマーで多型がみられた。圃場での系統間の耐暑性の差は温度負荷条件下 (15~35℃) の葉片培養での不定芽形成やカルス増殖の大小に近い結果となり、同様の多型が確認された。また、AFLPによる多型の検出によっても複数の断片で異なるピークが認識されているが、耐暑性との関わりは確認できていない。

3) キュウリモザイクウイルス (CMV) 抵抗性系統の育成はHPTとCMV-CP遺伝子をコ・トランスフォーメーション法で処理したプロトプラストからCMV-CP遺伝子が導入できた形質転換体を得られた。しかし、同一カルスから発生した不定芽でも導入遺伝子の組合せが異なることもあり、カルスが複数のプロトプラストから形成されたキメラになっている可能性が示唆された。順化個体にCMVを接種検定し、発病が抑制される系統が確認されていて遺伝資源として利用可能と考えられる。

4) Bt遺伝子導入の耐虫性系統の育成は土壌等から分離した多数のBT菌のうちヨトウムシに特異的に効果を示す菌株からCryIA(a)遺伝子を分離し、pBI 221に遺伝子を挿入して導入処理を行い再分化体を得られたが、形質転換個体は確認できていない。

5) 温度負荷培養で高温に強いことを確認した系統は草丈が低い、花色が淡いなど改善する形質があるものの非耐暑性系統が生育困難な夏期 35℃の場内露地圃場 (北緯 32° 53'、標高82 m) でも生育・開花し、耐暑性があると判断された。しかし、耐暑性関与遺伝子は2個以上のヘテロで存在すると考えられた。また、良色系統との交雑で花色は改良された。

キーワード: リンドウ、培養変異、耐暑性、プロトプラスト、エレクトポレーション、形質転換、CMV

I 緒言

1 背景と目的

リンドウは熊本県の県花であり、阿蘇や矢部等の高冷山間地における重要な花きとして栽培され、夏期の切り花として高い需要がある。しかし、本来は冷涼地を好む植物であるため、適地は限られていて本県の適産地は20年以上の連作と集団化のため病害虫の発生が問題化している。現地でも優良株の選抜等が行われてきたが、他の花きに比べると本格的な品種改良は進んでおらず、複合抵抗性品種や暖地に適した耐暑性系統、早生系統などの新規形質品種の開発が待たれている。

そこで、本県の高冷地特産花きであるリンドウの生産を安定させるためプロトプラストなどの培養系に物理、化学的な変異源処理するなどで有用変異

を誘起・拡大し、選抜するとともに、有用変異をRAPD法等を活用した遺伝子マーカー診断によって早期に選抜する技術を開発する。また、キュウリモザイクウイルス (CMV) 耐性や耐虫性などリンドウ種内に保存されていない病害虫抵抗性等の有用遺伝子を導入することで、暖地に適した耐暑性を持つ複合耐病虫性系統や極早生系統、新規花芽形成系統など本県独自のリンドウ品種を育成するための基礎技術の確立と交配母本の育成を目指した。

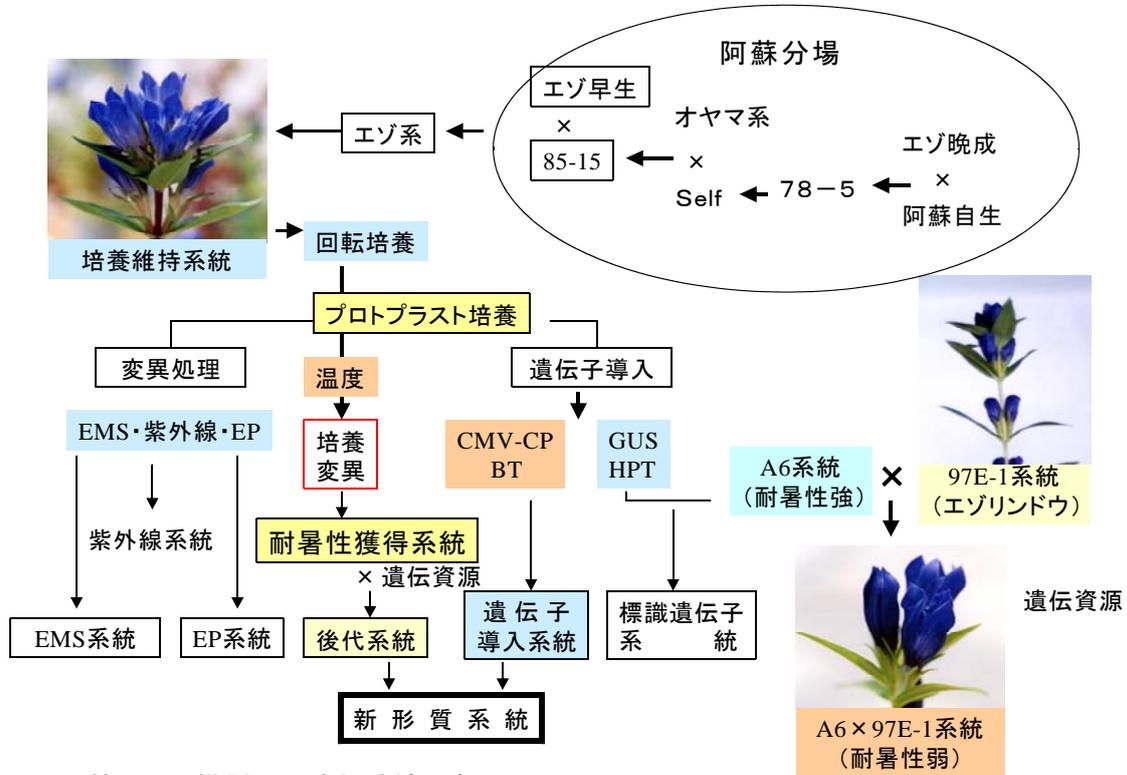
2 研究の進め方

1) 研究に用いた供試系統

本研究に用いた供試材料系統の概要を第1図に示した。源系統は高原農業研究所が阿蘇分場の時代に阿蘇自生のリンドウ (*Gentiana scabra* sp.) にエ

ゾリンドウ (*G. triflora* sp.) を1978年に交配し、その自殖系にオヤマリンドウ (*G. makinoi* sp.) を1985年に交配し、さらにその実生の一系統に1987年エゾリンドウ (*G. triflora* sp.) を交配して得られた実生の茎頂を培養し、回転培養⁹⁾による多芽体で継代を繰り返しながら維持してきたエゾ系リンドウ

(培養維持系統、G) である。G系統の主な特性は淡青紫の半開する5弁を持ち、茎は褐色の丸軸で直立し、葉は淡緑色の被針形でほぼ水平に展開して光沢を持ち、開花期は8月中旬である。この回転培養維持系統を培養容器内で茎葉展開させ、葉や茎頂、葉肉プロトプラストを分離して供試した。



第1図 供試リンドウ系統の概要

2) 研究の進め方

研究目的に添って次のように試験を設定した。

- (1) プロトプラストなどの培養系に物理、化学的な変異源を処理するなど有用変異を誘起・拡大して選抜する。
- (2) 作出した変異個体について、特性を確認してRAPD法等による遺伝子マーカーを検索し、早期に選抜する技術を開発する。
- (3) キュウリモザイクウイルス (CMV) 耐性や害虫抵抗性などリンドウ種内に保存されていない病虫害抵抗性の有用遺伝子をエレクトロポレーション法 (EP) で導入する。

II 培養変異の誘起

1 供試材料と方法

リンドウのプロトプラスト培養法は熊本県農業研究センター研究報告第4号¹⁰⁾と遺伝子導入法は同第9号⁵⁾に準じて実施した。

なお、各項目の実験は必要に応じて設定を変更しながら複数回実施し、平均値や代表例を示した。

1) 紫外線照射処理

葉肉プロトプラストを 6×10^4 cells/ml に調整して腰高シャーレに6mlを分注し、シャーレのふたを外してクリーンベンチ内のUV灯 (日立殺菌灯、20W) の直下25cmの位置に設置して紫外線を0~16分の一定時間照射する。処理後は25℃の暗黒下に静置し、一連の処理直後と1日後、その後は7日おきに細胞培養用24穴マルチプレートに1mlをとり、エバンブルーで染色し、検鏡して生存率を調査した。

2) 化学薬品処理

EMS (エチルメタンサルホン酸) またはMNU (N-メチル-N-ニトロソ尿素) を最終濃度が0、5、10、20、40、60、100ppmになるように添加した培養液にプロトプラストの最終濃度を 6×10^4 cells/ml に調整して培養用24穴マルチプレートに1ml入れ25℃の暗黒下で培養した。

また、EMS処理について 3.6×10^5 cells/ml に調整した葉肉プロトプラストを培養ディスポ遠心チューブで600

rpm、3分の遠心で細胞を集め、5 ppm液を1 ml添加して軽く懸濁した後、30分間水中で反応させた。その後、プロトプラスト洗浄液で2回洗浄した後、 6×10^4 cells/mlに希釈して培養した。

調査は処理当日、処理後1日、2日、7日、それ以降は7日おきにエバンスブルーで染色して行った。また、マイクロカルス化以降は明条件で培養し、培地交換は10日間隔で行い、7日おきに検鏡し、生存率や生育を調査した。

3) 温度負荷選抜

(1) プロトプラスト

葉肉プロトプラストを6週間培養し、肉眼で確認できる程度に成長したマイクロカルスを遠沈管に集め、カルス密度を均一にして再分化培地に播き、温度勾配恒温器(120 Lux、24時間照明)を15、20、25、30、35、40℃の温度に設定して1ヶ月間培養し、カルス形成を調査した。但し、35℃培養区は、培養2週間で培地が乾燥したため、それまでに形成されたカルスを新しい培地に継代し、継代2週間後及び、1ヶ月後に調査した。

また、2ヶ月間培養して発生したコロニーを再分化培地に播き、さらに1ヶ月培養して成長したカルスを材料に、再分化培地に移植(カルス150個/各試験区)後、各設定温度で培養し、1ヶ月後に再分化率等の調査を行った。

(2) 茎頂・葉片

リンドウの耐暑性に関する品種間差を試験管内で検討するため、茎頂や葉片を用いて温度勾配恒温器(4,000Lux、24時間照明)で15、20、25、30、35℃の温度負荷をかけて培養した。

茎頂は展開葉1節含む茎頂部をMS培地が20ml入った径5 cmの試験管(各試験区20本)に挿して発根及び植物体の生長を調査した。

葉片及び茎片は再分化培地(MS、3% サッカロース、NAA 0.1mg/l、4PU 0.2 mg/l、0.2% ゲルライト、pH 5.75)が5ml入った管ビンに置床し(各試験区

5本)、カルス形成、再分化率を調査した。また、①エゾ系リンドウ(熊本県育成系統、以下Ge系統)、②エゾリンドウ(中生系統:東北)、③エゾリンドウ(早生系統:阿蘇)、④ササ系リンドウ(晩生系統:阿蘇)、⑤ササ系リンドウ(野生種:三重県美里)、⑥ササ系リンドウ(野生種:三重県安濃)、エゾ系リンドウの形質転換体他を供試して、葉片を3~4分割して不定芽形成培地5ml入った管ビンに1片ずつ置床し(各試験区10本)、茎頂と同様の条件で温度勾配恒温器を用いて培養し、葉片からのカルスや不定芽形成を調査し、耐暑性系統リンドウの選抜を試みた。

4) EP処理及び標識遺伝子導入

耐暑性リンドウ系統の葉肉プロトプラストを用い、GUSやHP T遺伝子等をエレクトロポレーション法(コ・トランスフォーメーション)でハリオ社製のCFP-1を用いて導入した。

培養条件は導入後のプロトプラストを 6×10^4 cells/mlに希釈し、25℃の暗黒条件に置き、マイクロカルス化以降は明条件とし、培地交換は10日間隔でおこなった。

2 結果及び考察

1) 紫外線照射処理

紫外線照射直後の見かけ上の生存率は照射時間の長さに関係なく70%以上であった。しかし、培養時間の経過とともに長時間照射ほどプロトプラストの破壊が進み、照射時間が2分間の場合は2~3細胞程度の分裂まで観察できたが、3週間目以降に活性が著しく低下し、35日目には枯死した。

照射時間を2分以下と短くした実験でも生育ステージが進むに従って顕著に差がみられ、1分30秒以上の照射では初期分裂で止まった。1分以下の照射では、マイクロコロニーまでの生育は観察され(第1表)、数回の実験で独立した数個の不定芽が発生したが、順化固体は得られなかった。

第1表 紫外線照射がプロトプラストの生育等に及ぼすの影響

照射時間	0日		1日		4日		7日		14日	21日	28日	35日
	生存率(%)	生存率(%)	生存数(個)	生存率(%)	生育	生存率(%)	生育	生存率(%)	生育	生育	生育	生育
対照(0)	78.2	68.1	8×10^3	61.2	1~3細胞	—	—	—	1~6細胞	マイクロコロニー	マイクロコロニー	コロニー
30秒	—	—	—	—	1~3細胞	—	—	—	1~2細胞	1~2細胞	2~8細胞	マイクロコロニー
1分	—	—	—	—	1~3細胞	—	—	—	1~4細胞	1~8細胞	マイクロコロニー	マイクロコロニー
1分30秒	—	—	—	—	1~3細胞	—	—	—	1~2細胞	1~2細胞	活性細胞なし	活性細胞なし
2分	—	—	6×10^3	—	1~3細胞	—	—	—	1~3細胞	1~2細胞	活性細胞なし	枯死
3分	—	—	—	—	1~2細胞	—	—	—	1~3細胞	1~3細胞	活性細胞なし	—
4分	—	—	3.2×10^3	—	1細胞	分裂	—	—	1細胞	1細胞	活性細胞なし	—
5分	75.1	61.8	—	48.5	1細胞	分裂	—	—	1細胞	1細胞	活性細胞なし	—
8分	74.0	—	2×10	—	—	—	—	—	活性細胞なし	—	—	—
10分	74.0	54.7	—	16.2	—	—	—	—	—	—	—	—
16分	—	—	6	—	—	活性細胞なし	—	—	—	—	—	—

注) マイクロコロニー: 16~32細胞期、コロニー: 32~64細胞期、マイクロカルス: 中心部にカルスを形成

突然変異に有効な紫外線の波長は DNA の最大吸収波長の 265nm とされるが¹³⁾、今回用いた UV 灯は複数波長がブロードになっているなど、染色体に強く作用したためと考えられた。

2) 化学薬品処理

高濃度での処理直後のプロトプラスト数は大きく減少し、EMS では 15ppm 以上の濃度で生存率は 25% 以下となった。また、対照に比べて分裂開始やマイクロカルス化の遅延がみられ、12.5ppm 以上の濃度ではマイクロコロニーまでの生育は不可能であった(第2表、第2図)。通常はマイクロカルスで再分化培地へ移植して再分化体を得るが、

処理区では移植後に全て枯死した。そこで、0.3~0.5mm 程度までカルスを生育させ緑色カルスを再分化培地へ移植することで再分化体を得られた。しかし、緑色カルスからの再分化にも 150 日程度のカルスの増殖が必要であった。48個を移植し、12個体から再分化植物が得られた(第3表)。

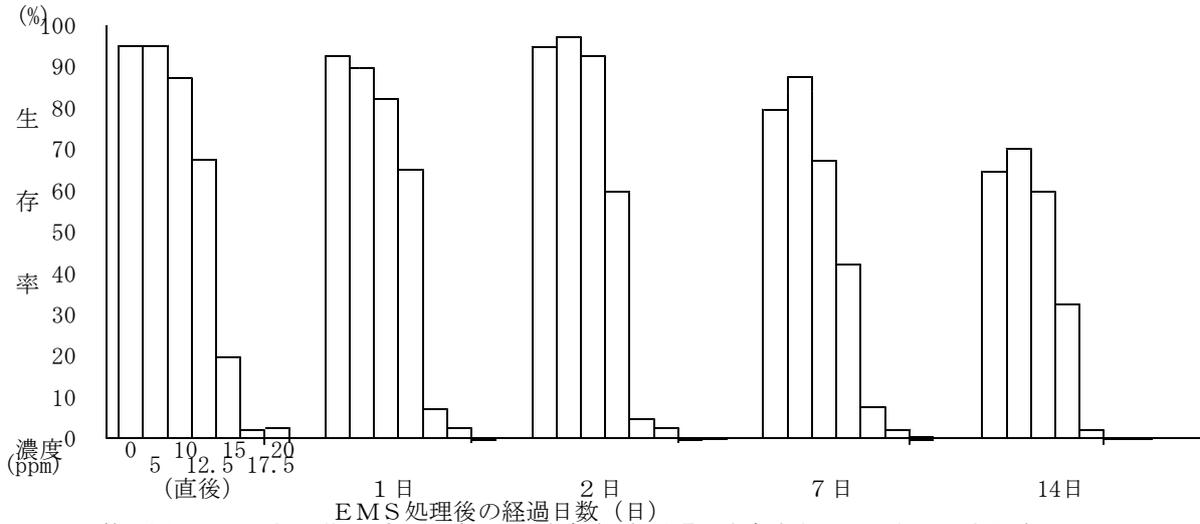
変異処理は LD₅₀ が目安される⁸⁾ことから、リンドウプロトプラストの EMS 処理濃度は 5 ppm 以下と考えられた。

MNU でも高濃度ほどプロトプラストの生存数と生育は劣り、40ppm の濃度まではカルス化した。4週間目以降は急速に褐変枯死した(第4表)。

第2表 EMS 処理がプロトプラストの生育等に及ぼすの影響

処理濃度	0日	4日	7日	10日	14日	21日	28日	35日
	生存率 (%)	生存数 個	生育	生存数 個	生	生	育	育
対照	95.2	8×10 ³	分裂	6×10 ³	1~6細胞	マイクロコロニー	コロニー	マイクロカルス
5 ppm	95.1	6×10 ³	分裂	5×10 ³	1~2細胞	2~8細胞	2~8細胞	6~マイクロコロニー
10 ppm	88.4	6×10 ³	分裂	4×10 ³	1~3細胞	1~8細胞	1~4細胞	1細胞
12.5ppm	67.3	—	分裂	—	1~2細胞	1細胞	活性細胞なし	活性細胞なし
15 ppm	21.4	—	1細胞	—	分裂	活性細胞なし	—	—
17.5ppm	3.0	—	1細胞	—	活性細胞なし	—	—	—
20 ppm	2.6	5×10 ³	1細胞	4×10 ³	活性細胞なし	—	—	—

マイクロコロニー：16~32細胞期、コロニー：32~64細胞期、マイクロカルス：中心部にカルスを形成



第2図 EMS 処理後のプロトプラスト生存率 (対照の生存率を 100% として表示)

第3表 EMS 処理したリンドウプロトプラストの生育

試験区	最終収量 cells/ml	分裂開始 日数	マイクロカルス化 日数	マイクロカルス形成数 数/シャーレ	カルス 大きさ	移植 数	再分化数
無処理	6×10 ⁵	6~	25~	1×10 ³	マイクロカルス	1×10 ³	262
EMS 処理	1.2×10 ⁵	10~	55~	2×10 ²	0.3~0.5	48	12

第4表 MNU 処理がプロトプラストに及ぼす影響

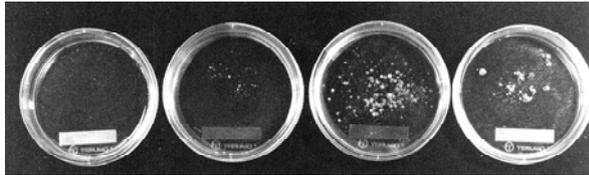
日数等	濃度						
	0	5	10	20	40	60	100
4日目の生存数	8×10 ³	7×10 ³	6×10 ³	3×10 ³	4×10 ³	4×10 ³	3×10 ³
10日目の生存数	6×10 ³	6×10 ³	4×10 ³	2×10 ³	4×10 ²	1×10 ³	1×10 ³
生育	分裂						
25日目の生存数	—	—	—	—	—	1×10 ²	1×10 ²
生育	カルス	カルス	カルス	カルス	カルス	—	—

3) 温度負荷選抜

(1) プロトプラスト

プロトプラスト由来のマイクロカルスを再分化培地に播いた後の成長は温度が高いほど早い傾向がみられるが、カルスの形成は培養温度25℃が最もよく、15℃ではカルス増殖はみられなかった(第3図、第5表)。

同一条件で形成させたカルスを15~35℃の温度で1ヶ月間培養した結果、



(左から: 15℃、20℃、25℃、30℃)

第3図 培養温度の違いによるカルス形成

20℃以上では不定芽を形成した。35℃では全てのカルスで、また、30℃の試験区でも一部に白色化が観察され、再分化体も白色化するが(第5表)、早期に23℃の適温に移植すると退色は回復した。

このことから、30℃~35℃で培養したカルスから再分化させることで耐暑性の強い個体を選抜できる可能性が示唆された。

(2) 茎頂・葉片

茎頂挿しは40℃では1ヶ月後に全個体が枯死した。35℃では地上部は徒長し、2ヶ月後には29.5%が上位葉から枯死し、発根もみられなかった。30℃では発根は良好であったが、23.5%が花芽を形成した。25℃では腋芽の形成は活発で発根も良好であった。20℃では太い根が形成され、35.7%がロゼット化した(第6表)。また、2ヶ月間培養した後に順化した結果、30℃で81%、25℃で94%、20℃で100%の順化率であった。20℃で培養したもののうちロゼットしていた株で順化は特に良い結果が得られた。

葉片及び茎片を培養した結果、40℃では外植片は枯死した。35℃ではカルス形成後不定芽を形成したが、白色化した後に枯死した。30℃では多芽体を形成したが一部の不定芽は白色化した。25℃では濃緑色の多芽体を形成した。

20℃では不定根が先に分化してその後多芽体を形成する傾向がみられ、この多芽体はビトリフィケーションがひどかった(第6表、第4図、第5図)。これらの結果より、35℃で生育、再分化し、枯死しない系統は耐暑性が強うと考えられた。

耐暑性選抜をカルス誘導から考えると全ての系統が培養温度25℃で最適の結果が得られたが、①熊本県育成系統、

第5表 培養温度がプロトプラスト由来カルスに与える影響

培養温度 ℃	増殖率 %	カルス 程度	形成力 カルス数	再分化率 (%)	白色化率 (%)
35	100	+5	54	4	88
30	100	+4	29	9	6
25	100	+3	185	27	0
20	100	+3	4	2	0
15	0	-	0	-	-

⑥ササリンドウ安濃町系、④ササリンドウ阿蘇晩生系では培養温度30℃でも同じような結果が得られ、最適温度域が広く、高温に強いと考えられた。②エゾリンドウ東北中生系は20℃と25℃で同じような結果が得られ、適温が他の系統より低いと考えられる。

不定芽形成から考えると④ササリンドウ阿蘇晩生系と②エゾリンドウ東北中生系は25℃がよく、①熊本県育成系統、⑥ササリンドウ安濃系、⑤ササリンドウ美里系では30℃が最も良かった。この試験結果から、①熊本県育成系統、⑥ササリンドウ安濃系が耐暑性を保有すると考えられた(第7表)。

葉片による温度反応の比較である。この方法は、系統間の葉片培養の難易度が問題となるが、培養温度に勾配をもうけることで一系統間の温度反応の比較が可能であり、試験系統の再分化能力を考慮することができた。このことから、インビトロでの耐暑性比較の有効な方法であると考えられる。

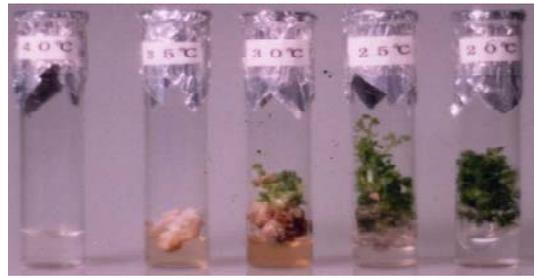
また、育成系統を材料とした形質転換体268系統を含め、いずれも35℃の高温下で育成系統以上の不定芽形成する系統はなかった。さらに、耐暑性を持つと思われる育成系統に濃色のエゾリンドウを交配したF₁系統は育成系統より耐暑性は劣ったが、2系統は花粉親より高温域(25~30℃)での不定芽形成は良かった(第8表)。

第6表 培養温度が茎頂挿芽の生育と葉片または茎片からの再分化率に与える影響

培養温度	茎				葉片		茎	
	地上部位	節数	腋芽数	根長	再分化率(%)	枯死率(%)	再分化率(%)	枯死率(%)
40℃	2.5cm	2.4	0	0cm	0	100	0	100
35℃	6.5	3.8	0	0	100	100	100	100
30℃	19.5	6.5	2.7	4.8	100	60	100	20
25℃	14.4	8.0	1.4	6.6	100	0	100	0
20℃	4.0	8.3	1.4	6.3	100	0	60	0



第4図 茎頂部位の温度反応(2ヶ月培養)
(左から、20、25、30、35、40℃)



第5図 再分化培地上での葉片の温度反応
(右から、20、25、30、35、40℃：3ヶ月培養)

第7表 培養温度の違いによる系統間の葉片変化

培養温度	形態	1ヶ月						2ヶ月					
		①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	⑤	⑥
15℃	培養変化	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	3/10	5/10	8/10	6/10	6/10	10/10
	カルス	-	-	-	-	-	-	6/10	-	1/10	4/10	3/10	-
	不定芽形成	-	-	-	-	-	-	1/10	-	-	-	-	-
20℃	培養変化	7/10	5/9	7/10	1/10	3/10	8/10	2/10	2/9	5/10	-	5/10	10/10
	カルス	3/10	1/9	3/10	9/10	7/10	2/10	6/10	5/9	-	9/10	5/10	-
	不定芽形成	-	-	-	-	-	-	2/10	-	-	1/10	-	-
25℃	培養変化	-	1/10	5/10	-	-	-	-	-	2/10	-	-	-
	カルス	10/10	4/10	5/10	9/9	8/10	10/10	1/10	6/10	5/10	3/9	6/10	7/10
	不定芽形成	-	-	-	-	2/10	-	9/10	1/10	-	6/9	2/10	3/10
30℃	培養変化	-	-	1/10	-	3/10	-	-	-	1/10	-	-	-
	カルス	5/10	-	1/10	9/10	1/10	10/10	-	-	1/10	9/9	-	-
	不定芽形成	5/10	-	-	-	1/10	-	10/10	-	-	-	3/10	8/10
35℃	培養変化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	カルス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	不定芽形成	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※強調文字：各供試系統における不定芽形成率の高い値を示す。

第8表 リンドウ葉片からの温度負荷条件下でのカルス及び不定芽形成

系統名等	系統数	培養温度(℃)				
		35	30	25	20	15
育成系統(対象)	--	+ s	+3 s	+3 s	+2 s	+
エリトウ(比較)	--	-	-	+2 s	+2 s	+
形質転換系	268	0	8 s	238 s	22 s	0
F ₁ 系統	8	0	2 s+3	2	1	0
その他	3	0	1	2 s	1	0

注) 対象及び比較の項：-(カルス形成：無)~+3(高)、sは不定芽形成
試験区：数値は各温度で形態形成した系統数、(数字s：不定芽形成)

4) EP処理及び標識遺伝子導入
GUS及びHPT遺伝子を単独、または両遺伝子をコ・トランスフォーメーション法で導入処理したり、遺伝子なしで電気パルス処理した結果、形質転換体など多数獲の植物体を得られた。GUS遺伝子を導入処理して、非選抜培地上で再分化した個体の約60%が未導入であり、HPT遺伝子を導入し、ハイグロマイシン添加培地で培養して得られた再分化植物のうち、PCRで

遺伝子の確認はできなかった個体はエスケープと考えられ、その割合は2~5%程度であった。また、GUSとHPT遺伝子をコ・トランスフォーメーション処理して得られた個体の3~8%がエスケープと判断された(第9表)。以上から、ハイグロマイシン培地における選抜は高い効率となった。また、一回の導入処理で4個体程度の形質転換体が獲得可能と考えられた。

第9表 標識遺伝子導入および選抜の効率

導入遺伝子	試験回数	選抜の有無	獲得個体数	PCR確認				エスケープ割合%
				HPT	GUS	HPT+GUS	無	
GUS	4	無	36	-	14	-	22	60
HPT	6	hpt	63	61	-	-	3	2~5
HPT+GUS	53	hpt	233	115	8	67	14	3~8

Ⅲ 特性と遺伝子診断

1 供試材料と方法

1) 特性調査

特性調査は再分化植物体が得られた処理について、種苗特性分類調査報告書のリンドウ科リンドウ属（昭和55年度「農林水産省農蚕園芸局」種苗特性分類調査委託事業、長野県野菜花き試験場）に従い、花色及び茎色の調査は、R. H. S. カラーチャートに従った。

(1) 化学薬品処理

供試系統は①EMS処理して得られた再分化植物体、②プロトプラスト培養系統、③A6×97E-1（熊本育成系統にGUS遺伝子を導入した系×エゾリンドウ）、④エゾリンドウを用いて開花期に花色、葉状、茎等の特性を評価した。

栽培は12cmプラスチック鉢や18cmの硬質ポットで閉鎖系温室に順化して昼間23～25℃、夜間15～20℃の条件で底面吸水栽培した。

(2) 温度負荷選抜

供試系統は温度負荷実験で耐暑性が特に高いと確認した育成系統（Ge）及びエゾリンドウとササリンドウを対照にして耐暑性や花色、葉状、茎等を調査した。また、各系統は回転培養で増殖・順化して供した。

栽培は1996年10月下旬に熊本県農業研究センター内の圃場（熊本県菊池郡合志町、標高82m作物部梓水田圃場）に定植し、1998年8月4～12日に調査した。調査は任意に45株を選び、草丈10cm程度に成長した時点で株当たりの立茎数を15本に整理して株の中でも中庸な茎（5本）を対象とした。

また、①耐暑性系統（熊本育成）②ササリンドウ系統 ③エゾリンドウ系統について平成11年4月27日に高原研究所露地圃場（標高500m）定植し、露地で栽培して生育、花型、抵抗性などを調査した。

(3) EP処理及び

標識遺伝子導入

供試系統は耐暑性系統のプロトプラストに①遺伝子の添加なしでエレクトロポレーション（EP：325 V/cm）処理した非組み換え体、②CMV-CP遺伝子、③HP T遺伝子、④GUS遺伝子、⑤GUSとHP T遺伝子をコ・トランスフォーメーション処理して得られた組換え体等について行った。

栽培は九州農業試験場（熊本県菊池郡西合志町）の隔離温室で11～4月の冬季の昼温（7～21時）を18℃、夜温（21～7時）を最低温度2℃、5～10

月の夏季は常時25℃で管理した。

2) 遺伝子診断

DNAは栽培中の展開した植物体葉片からCTAB法で抽出し¹²⁾、DNA濃度を0.5ng/μlに調節して供試した。RAPD法のプライマーはオペロン社の10bpを用い、バイオラッド社のPCR-7800で遺伝子を増幅した。多型はアガロースゲル泳動後、エチジウム・ブロマイド染色し、UV下で検出した。

(1) 化学薬品処理

供試材料は①EMS処理して得られた再分化植物体、②Ge×97E-1（熊本育成系統×エゾリンドウ）、③エゾ系リンドウ（Geの花選抜-P-99A）、④エゾ系リンドウ（Geの選抜---P-98C-1）、⑤ササ系リンドウ（葉片培養---Gbp）、⑥ササ系リンドウ（Ge×Gbp---99B-17）、⑦ササ系リンドウ（Ge×ササリンドウ---99C-11）を用いた。

PCR反応は（94℃/30sec→36℃/1min→72℃/1min）×35cyclesで行った。

(2) 温度負荷選抜

回転培養で連続継代して耐暑性を獲得したと考えられる熊本育成系統（Ge）の無菌植物体と耐暑性のないエゾリンドウ（東北）selffeの無菌播種植物体（耐暑性無し）-GaE-1(f)およびGe（♀）×GaE-1(f）（♂）のF₁（耐暑性無し）系統を供試し、オペロン社のランダムプライマーA1～K20までの220種類を用い、PCR反応は前者と同様とした。

また、耐暑性系統（Ge）リンドウと非耐暑性のエゾリンドウについてEcoR1とMse1の制限酵素で切断し、AFLP法による検出を行った。反応は72or94℃/2min+「cycles」+60℃/30min→4℃保持とし、一次増幅は72℃/2min、（94℃/1sec→56℃/30sec→72℃/2min）×20cycles、二次増幅は94℃/2min、（94℃/1sec→65～57℃/30sec→72℃/2min）×各1cycles→（94℃/1sec→56℃/30sec→72℃/2min）×23cyclesとした。

(3) EP処理及び

標識遺伝子導入

供試系統は耐暑性系統のプロトプラストに①遺伝子の添加なしでエレクトロポレーション（EP：325 V/cm）処理した非組み換え体と②HP T遺伝子、③GUS遺伝子、④GUSとHP T遺伝子をコ・トランスフォーメーション処理して得られた組換え体等について行った。

3) 育成系統及び交雑系統

熊本育成系統の耐暑性系統 (Ge) に GUS 遺伝子を導入した系統 (A6) と非耐暑性 (97E-1) の交雑系統、及び Ge に非耐暑性 (GaE-1(f)) を交雑して得られた 1 系統について RAPD 法または AFLP 法で遺伝子診断を試みた。

順化後の初開花年は EMS 処理した系統では花粉粘性がない個体が出現した。また、花卉や花色の劣化を認める個体が見られた。しかし、2 年目以降は花粉粘性の低下や花卉、花色の劣化は改善され、母本や系統間で生育特性に大差はみられてない (第 10、11 表)。これは多くの植物培養時にみられるホルモン剤などによる一時的な発現と考えられた。

2 結果及び考察

1) 特性調査

(1) 化学薬品処理

第10表 順化後の初開花年における各系統の特性

系統名等	開花期	花の形	花色	花粉粘性	ロゼット(%)
熊本育成系統	8月上旬	狭鐘形・半開	紫	有	0
フルクトース培養系統	9月上~中旬	狭鐘形・半開	淡紫	有	73
遺伝子導入系統(HPT)	8月上~9月中旬	狭鐘形・半開	淡紫	無~有	73
CMV-CP導入系統-A	-	-	-	-	100
CMV-CP導入系統-B	10月中旬	狭鐘形・半開	淡紫	有	25
EMS処理系統	9月中~10月中旬	狭鐘形・半開	緑紫	無~有	0
A6×97E-1	8月上旬	鐘形・閉	濃紫	有	0
エゾリンドウ(98B-3)	9月中~10月中旬	狭鐘形・半開	白	無	0
エゾリンドウ(98B-7)	10月中旬	鐘形・閉	濃紫	有	90

第11表 供試リンドウ系統の形質特性

系統名	花色等		葉 状				茎		耐暑性の程度	
	青	斑点	大きさ	光沢	草質	着生	強さ	帯色	培養下	圃場
①熊本育成系統	+2	+	+	+2	+2	+3	+3	+	強	強
②EMS系統	+2	+	+	+2	+2	+3	+3	+	-	強

注) 数値が大きいほど、濃、多、大、強、上向き

(2) 温度負荷選抜と

育成系統の特性

耐暑性系統は夏期 35℃ の場内露地圃場 (北緯 32° 53'、標高 82m) でも生育し、ウイルス病や葉枯れ病、土壤病害には普通であったが、開花した。しかし、エゾリンドウ系統やオオヤマリンドウ系統は高温期に生育が抑制されて枯死した (第 6 図)。

標高 500m の阿蘇では耐暑性系統でも初年目から欠株がみられたが、2 年目の生存はササリンドウ系統やエゾリンドウ系統より多かった。開花期は初年目に比べ 2 年目で 40 日程度遅く、8 月中下旬が耐暑性系統の本来の開花期と考えられる (第 12 表)。しかし、耐暑性系統は草丈が低い、花色が淡いなど改良する必要がみられた。

これから育成系統の特性は

1) 葉色では、対照系統が薄黄緑色 (R. H. S. カラーチャート No. 145 [YELL

OW-GREEN] A~D) であるのに対し、クチクラ層に富んだ濃緑色 (R. H. S. カラーチャート No. 131 [GREEN] B) であった (第 13 表)。

2) 花の大きさなどがくの変異はほとんどみられなかった。花色は、花卉の内側の色は R. H. S. カラーチャート No. 94 (VIORET-BLUE) A~B、花卉の外側の色は、R. H. S. カラーチャート No. 145 B~C であった。但し、11 月上旬に咲いた 2 番花は、花卉の外側の色も R. H. S. カラーチャート No. 94 A であった (第 13 表)。

3) 育成系統の採花日は 8 月 4 日から 8 月 12 日の 1 週間に集中し、開花の順序は、頂花、中段の 1 節側枝、頂部、下段の 2 節側枝であった。

4) 栽植密度の低い場所の個体ほど側枝数が多く、これに伴い花段数、総花数及び、切り花重が増加しボリュームが増した (データ略)。

第12表 耐暑性系統の高原農業研究所圃場での特性

系統名	平成11年(初年目)					平成12年(2年目)				
	草丈	芽数	開花期	花色	欠株率	草丈	芽数	開花期	花色	欠株率
	cm	本	月日		%	cm	本	月日		%
熊本育成系統	19	3	7/5	4.1	28	19	8	8/21	4.1	44
ササ系	27	3	7/29	5.7	4	37	3	9/12	5.9	79
エゾ系	25	3	6/28	6.3	12	-	-	-	-	100

花色: 富士フィルムリンドウ花色票による 7 段階評価 (濃: 7~淡: 1)

第13表 エゾ系リンドウ（熊本県育成）特性調査

形質	特性区分	形質	特性区分
I 植物体		36. 葉表面の光沢	9 あり
1. 1年生、多年生の別	5 多年草	39. 低温期での紅葉	1 しない
2. 植物体の形状	5 直立性	V 開花特性	
3. 草丈	5 40~59 cm	40. 開花期	5 中
	6 60~89 cm	41. 花房のつき方	4 茎頂~下位に群生
II 茎		42. 開花の順序	1 頂部から
4. 茎立数	6 25本以上	43. 頂部の着花数	3 9~12
5. 茎の直径	5 3.0~4.9	44. 着花中央部着花数	7 13以上
6. 茎の横断面の形状	1 円形	45. 花段数	4 6~8
11. 茎の空洞の有無	1 なし		6 12~14
12. 節数	4 15~19	46. 茎当たりの総花数	4 20~29
III 側枝			5 30~49
15. 1節側枝発生数	0~10	VI 花	
16. 2節以上の側枝発生数	0~19	49. 花冠の形状	5 漏斗形
17. 1節側枝発生位置	2 上部~中部	50. 花冠の長さ	6 5.0~5.9 cm
18. 2節以上側枝発生位置	5 中部~下部	51. 花冠の直径	4 1.2~1.5 cm
19. 1節側枝長	5 6.0~8.9 cm		5 1.6~1.9 cm
20. 2節以上の側枝長	2 5~9 cm	52. 花冠先端の直径	6 2.5~2.9 cm
	3 10~14 cm	53. 花冠先端の回転	3 やや外転
IV 葉		54. 花冠内面上部色	94A
22. 葉長	5 5.0~6.9 cm	55. 花冠内面中部色	149C~D
	6 7.0~9.9 cm	56. 花冠外面の色	145B~C
23. 葉幅	4 1.5~1.9 cm	57. 花冠内面上部の斑点	3 少
	5 2.0~2.9 cm	58. 花冠内面中部の斑点	5 中
24. 葉身の形状	5 広披針形	59. 花冠外面の斑点	3 少
25. 葉縁の形状	1 全縁	VII がく	
26. 最大葉の位置	5 中部	83. がく筒の長さ	4 1.5~1.9 cm
27. 葉の厚さ	7 厚い	84. がく筒の直径	3 6.0~7.9mm
34. 葉表面の色	3 131B	X 抵抗性	
35. 葉裏面の色	2 134B	95. 耐暑性	7 強



第6図 熊本平坦での生育状況（左：熊本育成系統（Ge）、右：非耐暑性系統）

第14表 試験栽培と熊本県下のリンドウ主生産地の気温条件比較

気温(℃)	栽培場所	4月	5月	6月	7月	8月	9月
平均	試験圃場	17.9	21.2	22.9	27.0	28.2	25.1
	主生産地付近	15.4	18.0	20.1	23.8	24.7	21.5
最高	試験圃場	23.3	26.2	27.2	31.6	33.4	30.5
	主生産地付近	20.9	22.7	24.1	28.2	29.4	26.5

※試験圃場：熊本県菊池郡合志町 標高 82 m (熊本県農業研究センター)
リンドウの主生産地付近：熊本県阿蘇郡南小国町満願寺 標高 549 m

2) 栽培は、リンドウの生育には不向きな気象条件である西南暖地で行った結果である(第14表)が、対照系統が不十分な生育(データ略)であったにも関わらず、育成系統は採花することができた。このことからこの系統は耐暑性を持つと考えられた。

(3) EP処理及び

標識遺伝子導入

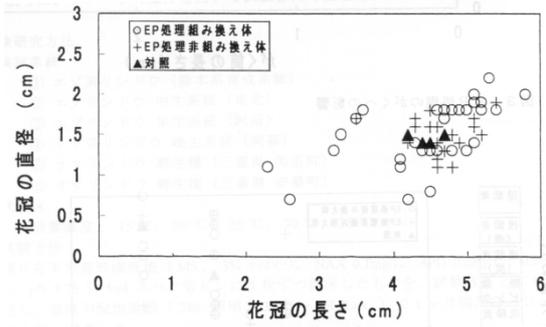
花の大きさやがくの大きさの変異幅は対照<EP処理のみ<遺伝子が導入された組換え体の順に拡大した(第7

図、第8図)。

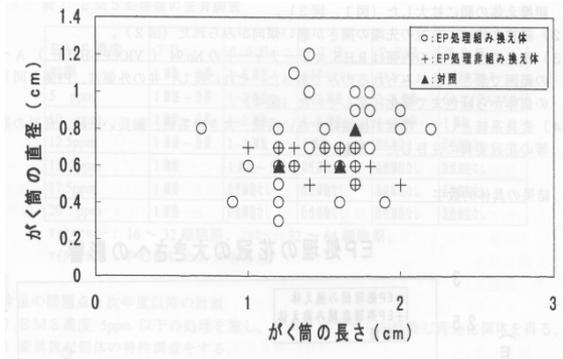
組換え体は花冠の先端の開きが悪い傾向がみられた(第9図)。

花色のうち、弁の内側はR.H.S.カラーチャートのNo. 94(VIOLET-BLUE) A~Dの範囲で濃さに差がみられるのみであった。それに反し、弁の外側は、内側と同じ色の個体から緑色まで変化に富んでいた(第10図)。

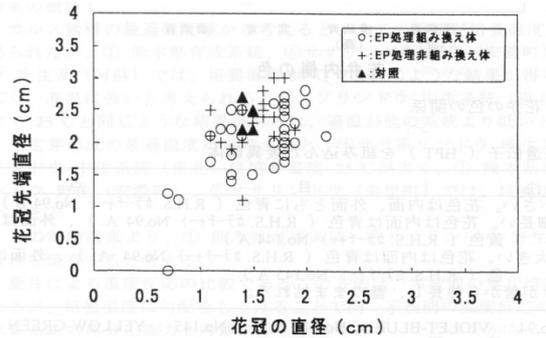
変異系統として、花冠が極端に小さい系統、大きい系統、細長い系統、奇形の系統等の花冠変異に注目した(第15表)。



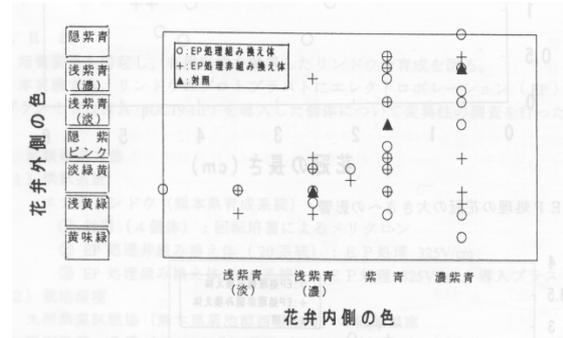
第7図 EP処理の花冠の大きさへの影響



第8図 EP処理のがくへの影響



第9図 EP処理の花冠の開きへの影響



第10図 EP処理と花卉の色の関係

第15表 注目した外来遺伝子 (HPT) を組み込んだ変異個体

系統名	注	目	点
B-2	・花冠が小さい。花色は内面、外面ともに青色 (R. H. S. カラーチャート No. 94 B)		
A-21	・花冠が細長い。花色は内面は青色 (R. H. S. カラーチャート No. 94 A)、外面は濃緑黄色 (R. H. S. カラーチャート No. 144 A)		
A-19	・花冠が大きい。花色は内面は青色 (R. H. S. カラーチャート No. 94 A)、外面は緑黄色 (R. H. S. カラーチャート No. 145 A)		
F-2	・柱頭だけが蕾から伸長し、蕾のまま枯れる。		

※R. H. S. カラーチャート No. 94 : VIOLET-BLUE、No. 144 及び、No. 145 : YELLOW-GREEN
A→D : 濃い→薄い

2) 遺伝子診断

(1) 化学薬品処理

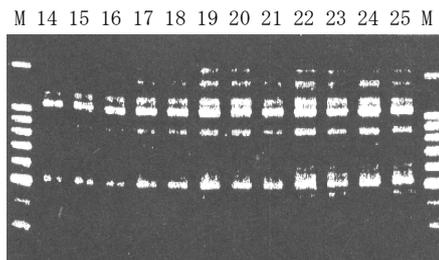
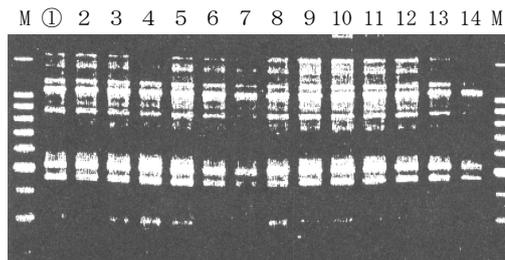
EMS 処理系統は母本や系統間で生育特性に大差がなく、再分化した24個体全てについて、PCR法で15種のプライマーを用いて検討したが、有効な多型が得られていない (第11図)。

(2) 温度負荷選抜

圃場での耐暑性の系統間差は温度負荷条件下 (15~35℃) の葉片培養での

不定芽形成やカルス増殖の大小に近い結果となった (第16表)。

PCR法で耐暑性系統 (Ge) に複数の多型がみられた。そのうちのプライマー (A-10) で培養条件下の耐暑性の高・中系統に同様のバンドが確認できた (第12図)、A-10プライマーの耐暑性関与は不明である。また、他のプライマーに一定の傾向は見られていない (データ省略)。



第11図 EMS 処理系統のバンドパターン例 (① : Ge、2~ : EMS 系統、プライマー : A-10)

第16表 各温度負荷条件での数種リンドウ葉片からのカルス・不定芽形成と耐暑性評価

系 統 名	培 養 温 度 (°C)					耐暑性の程度	
	35	30	25	20	15	培養条件下	露地圃場
①エゾ系-Ge	+	+3 s	+3 s	+2 s	+	強	強
②Ge×97E-1-1	-	+ s	+2 s	+	-	弱	弱
③エゾ系-P-99A	+	+2 s	+3 s	+2 s	+	強	強
④エゾ系-P-98C-1	+	+2 s	+3 s	+2 s	+	強	一
⑤ササ系-Gbp	-	-	+2 s	+	-	弱	弱
⑥ササ系-99B-17	+	+ s	+2 s	+	+	中	一
⑦ササ系-99C-11	+	+ s	+2 s	+	+	中	一



第12図 耐暑性評価の異なる数種リンドウにおける耐暑性特異プライマー(A-10)による検定の例

(3) E P 処理及び

標識遺伝子導入

遺伝子導入系統は別項で述べるが、E P 処理のみの非組み換え体の変異幅は狭く、Ge系統の間に明確なバンドはえられていない。また、標識遺伝子を導入した系統でも生育特性が明確でなく、バンドの確定はできていない(データ省略)。

3) 育成系統及び交雑系統

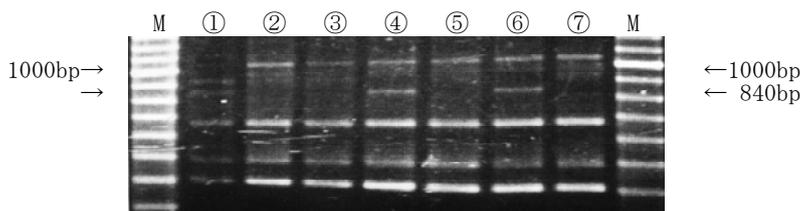
①耐暑性系統にG U S 遺伝子を導入した系統(A6)と非耐暑性系統(97E-1)の交雑6系統は外花卉の農青紫化などの改善や閉鎖花性等の変化がみられ、これまでに100種のプライマーのうち11個で16個の多型が得られている。育成系統にみられたA-10プライマーのバンドもみられる(第13図)。

A F L P 法でも耐暑性(Ge)と非耐暑性系統(97E-1)間に10数個の多型が見ら

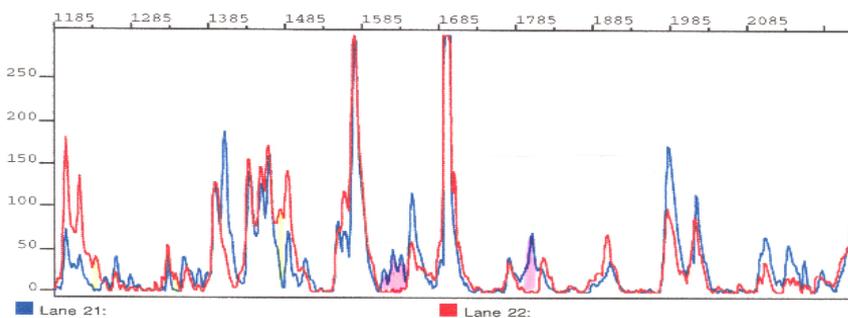
れている(第14図、第17表)。

②熊本育成系統(Ge)と非耐暑性系統(GaE-1(f))を交雑して得られた1系統のF₁と両親の3系統を供試した多型は220種類のプライマーのうち28種類で認められ、熊本育成系統だけにみられるバンドは7個、エゾリンドウ(GaE-1(f))だけにみられるバンドは1個が確認され、F₁に特異なバンドはみられなかった。また、熊本育成系統とF₁に共通するバンドは、24種類のプライマーで33個が確認され、エゾリンドウ(GaE-1(f))とF₁に共通するバンドは、5種類のプライマーで5個が確認された(第15図)。

R A P D 法では耐暑性系統、培養変異系統及び交雑系統などに対象とプライマーを拡大し、多数の多型が得られているが、耐暑性や他の有用形質との相関は不十分であり、F₂個体の拡大が必要である(第16図、第19表)。



第13図 供試系統間に多型がみられたプライマーによる増幅バンドの泳動例
M: マーカー(100Ladder)、①: A6、②~⑦: 非耐暑性系統(97E-1-1~6)

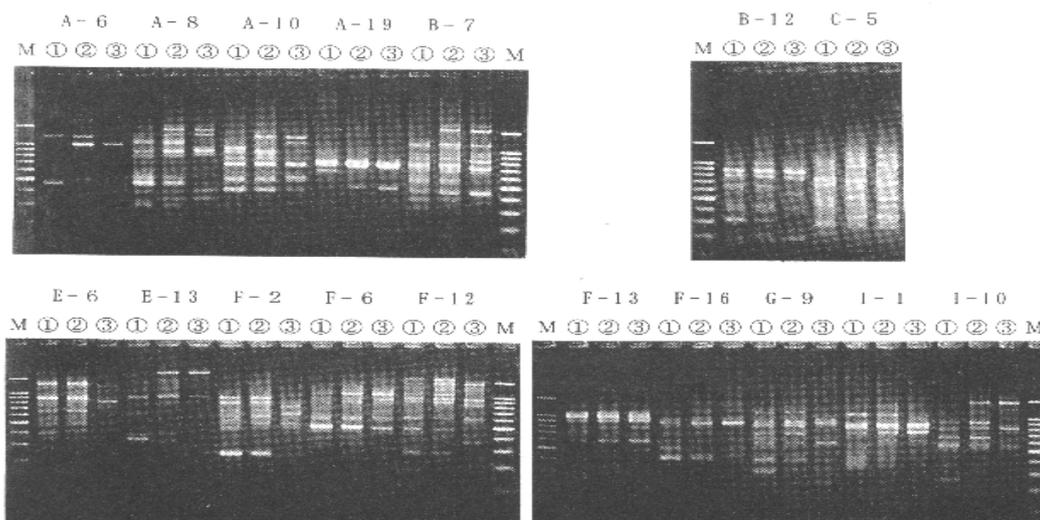


第14図 耐暑性系統(Ge)と非暑性系統(97E-1)間にみられるAFLP法による多型の例

第17表 耐暑性系統と非耐暑性系統に見られるAFLP法の多型数

系 統 名	多型数
耐 暑 性 (Ge)	10
非耐暑性 (97E-1)	3

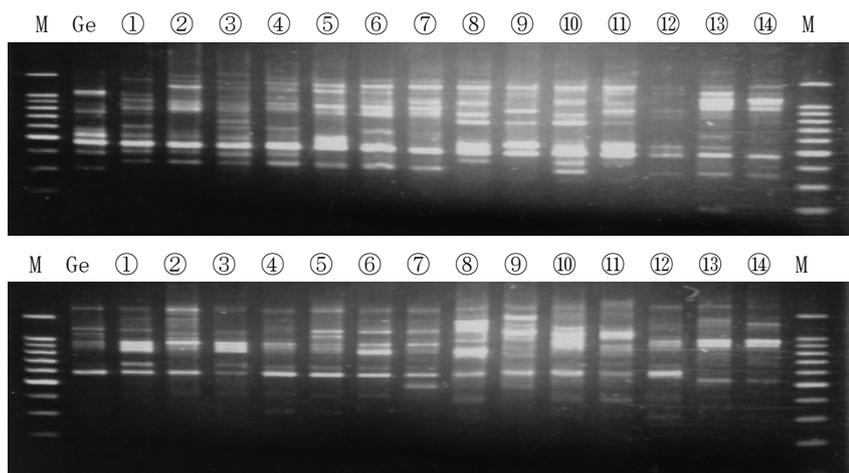
注) 制限酵素: EcoR I / Mes I



第15図 供試系統間に多型がみられたプライマーによる増幅バンドの泳動例
M：マーカー（100Ladder）、①：Ge、②：F₁、③：非耐暑性系統(GaE-1(f))

第18表 供試系統の多型確認プライマー数とバンド数

	Ge	F ₁	GaE-1(f)	Ge=F ₁	F ₁ =GaE-1(f)	Ge=GaE-1(f)
プライマー数	7	0	1	2	4	5
バンド数	7	0	1	3	3	5



第16図 耐暑性系統、培養変異系統及び交雑後代にみられる多型の例
耐暑性系統 (Ge)、②~④変異系統、①、⑤~⑭交雑後代系統
プライマー：上段 A-08、下段 C-09

第19表 耐暑性系統、培養変異系統及び交雑後代相互間にみられる多型の例

A-08	Ge	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭
Ge		3	3	4	2	3	3	3	3	2	2	3	1	3	2
①	1		1	2	2	3	1	1	3	3	2	3	1	1	1
②	2	2		2	1	2	1	1	3	2	3	3	1	3	1
③	1	0	0		0	0	0	1	3	1	2	1	0	2	1
④	1	1	1	1		1	0	1	2	2	1	2	1	2	2
⑤	0	2	1	2	2		1	1	2	1	3	2	0	3	1
⑥	1	1	1	2	1	2		0	2	2	2	2	1	2	1
⑦	1	2	0	3	1	1	2		2	2	3	2	1	3	1
⑧	1	1	0	2	1	2	2	1		1	1	0	0	3	2
⑨	0	2	0	2	2	1	2	1	3		4	1	1	4	2
⑩	0	2	0	2	1	1	1	1	0	1		1	0	2	1
⑪	1	1	0	2	1	0	1	1	1	0	2		0	3	1
⑫	0	2	0	2	1	1	1	0	1	1	4	3		4	1
⑬	1	0	0	1	0	1	1	1	2	1	2	2	0		0
⑭	2	3	2	3	2	2	3	1	3	2	3	3	1	2	

左下：横系統に有って縦系統にない多型数
右上：縦系統になくて横系統にある多型数

IV 遺伝子導入

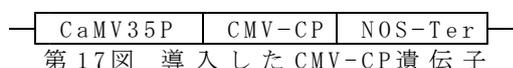
1 材料と方法

1) CMV-CP遺伝子の導入

(1) CMV-CP遺伝子の導入と確認

耐暑性系統 (Ge) にキュウリモザイクウイルスのコートタンパク (CMV-CP) 遺伝子を導入してウイルス抵抗性リンドウを作出する。導入方法はプロトプラストへのコ・トランスフォーメーション法で行い、選抜方法はPCR法で行った。また、プラスミドの構築は pBI221 の GUS を Sma I と Sac I で切り放し、平滑末端化して CMV-CP 遺伝子を挿入した⁴⁾⁶⁾¹¹⁾ (第17図)。

なお、CMV-CP 遺伝子は当時の九州農業試験場花田室長から CMV-Y 系統の分譲を受けた。



第17図 導入したCMV-CP遺伝子

また、導入した遺伝子は以下のプライマーを用いてPCR法で確認した。

確認に用いたプライマー

HPT : 5' CGCACAAATCCCCTATCCTTCGCAA3'
 5' CGCAGTTCGGTTTCAGGCAGGTCTT3'
 CMV-CP : 5' CTCGGACTTATCCGTTGC 3'
 5' CTGAGTTGGCAGTTCTGC 3'

なお、反応条件は94℃ / 5分、94℃ / 30秒、60℃ / 30秒、72℃ / 30秒、72℃ / 7分の35サイクルで行った。

(2) 遺伝子の導入効率

コ・トランスフォーメーション処理したプロトプラストは50日程度、通常に培養してマイクロカルス化させた。そのカルスをハイグロマイシン20mg / 1添加の不定芽形成培地に移植して選抜する方法とハイグロマイシンを添加しない不定芽形成培地で培養して再分化した個体についてPCRの結果から遺伝子の導入効率を検討した。

(3) 組換え体の特性

順化できたCMV-CP遺伝子を導入して得られた組換え体について一特性を調査した。

なお、順化は平成12年春に完成した隔離栽培施設の閉鎖系温室で行い、12cm径の18cm深さの硬質プラスチック鉢で栽培した。

2) Bt遺伝子の導入

(1) 菌分離とH血清型

による同定

特定害虫に効果を示す殺虫遺伝子を持つBt菌を検索するため、県内外の土壌等から分離し、そのBt菌株について同定を行った。

菌の分離と一次スクリーニング及び生物検定は熊本県農業研究センターが担当した⁷⁾。

同定は九州大学農学部生物的防除施設が担当し、SMY培地(酵母エキス加用麦芽寒天培地)に斜面培養後3~5日目の菌株について、日を違え、異なる斜面上を2回ずつ検鏡してクリスタルの有無とH血清型凝集反応(H1~H55)によって調査した。

(2) CryI遺伝子の確認と

プラスミドの構築

特定害虫に効果を示すCryI遺伝子を検索するため、前項で同定、または既存の*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai* 10系統と*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 10系統の菌株から遺伝子を抽出した。

DNAの抽出方法はコロニーピック法とSDS法を検討し、CryI遺伝子の検定にはKalman *et al.* のプライマーを用いた³⁾ (第20表)。

PCR条件は、酵素にExTaq(宝酒造)とPCR9700(ハートキンエルマー社)を使って、95℃ / 5分、95℃ / 30秒、55℃ / 30秒、72℃ / 1分、72℃ / 7分の30サイクルで行った。

単離は鱗し目昆虫に殺虫性を示し⁷⁾、CryIA(a)遺伝子の存在を確認した菌株系統について、既知の配列より全長を増幅するように設計したプライマーCryAa-F1 + CryAa-R2、CryAa-F1 + CryAa-

第20表 CryI検定に使用したプライマーの配列

Praimer	増幅遺伝子	増幅サイズ	配列
TYIAA	<i>CryIAa</i>	724	GAGCC AAGCA GCTGG AGCAG TTTAC ACC
TYIAB	<i>CryIAb</i>	238	TCGAA TTGAA TTTGT TCCGG CAGAA GTA
TYIAC	<i>CryIAc</i>	487	TCACT TCCCA TCGAC ATCTA CC
TYIB	<i>CryIBa</i>	830	GTCAA CCTA TGAGT CACCT GGGCT TC
TYIC	<i>CryICa</i>	288	CAACC TCTAT TTGGT TCAGG TTC
TYID	<i>CryIDa</i>	414	GGTAC ATTA GATAT TCACA GCCAC
TYIE	<i>CryIEa</i>	880	CTTAG GGATA AATGT AGTAC AG
TYIF	<i>CryIFa</i>	368	CCGGT GACCC ATTA CATT CCAATC
Reverse			ATCAC TGAGT CGCTT CGCAT GTTTG ACTTT CTC

R4、CryAa-F3+CryAa-R2、CryAa-F3+CryAa-R4の組み合わせを検討した。各プライマーの配列は(第21表)の通りとした¹⁾。

第21表 単離に用いたプライマー

CryAa-F1	5'-CTCTAGAGATGGATAACAATCCGAAC-3'
CryAa-F3	5'-CTCTAGAGATGGATAACAATCCG-3'
CryAa-R2	5'-CACCGCGGTAGTTTATGTCCTCCCC-3'
CryAa-R4	5'-GCGAGCTCTTATTCCTCCATAAGGAG-3'

PCR条件は酵素にEx Taq(宝酒造)とPCR9700(パーキソエルマー社)を使って、95℃/5分、95℃/30秒、45℃/30秒、72℃/2分、72℃/7分の45サイクルで行った。

プラスミドの構築はpBI221のGUSをSmaIとSacIで切り放し、平滑末端化してBt遺伝子を挿入した(第18図)。



第18図 導入したCry I 遺伝子

(3) CryIA(a)遺伝子の導入
とリンドウの殺虫性確認

耐暑性系統のリンドウプロトプラスミドに構築したCryIA(a)遺伝子(平成12年度作成pBC1a-1及び3)と(平成14年度作成pBC1a-6)をHPT遺伝子とのコ・トランスフォーメーション法で導入した。

また、遺伝子の導入確認は、CryIA(a)遺伝子に特有の配列(5'側:GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC)のプライマーを用いてPCR法で検定した。

pBC1a-1及び3とpBC1a-6を処理して得られたリンドウ系統を供試し、紙コップの中に遺伝子組換え処理したり

ンドウの茎葉と共に入れて5日間、常温で飼育し、虫の生育と生死を調査した。

2 結果及び考察

1) CMV-CP遺伝子の導入

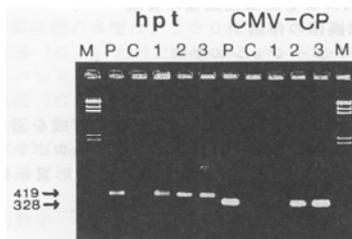
(1) CMV-CP遺伝子の導入と確認

一回目のCMV-CP遺伝子導入ではプロトプラスミドから16個のカルスが得られた。カルスをハイグロマイシン20mg/l添加の不定芽形成培地に移植して培養した結果、14個体のカルスから21個体の再分化がみられ、異なるカルスから14-Aと14-Bの2系統の形質転換体を得られた。いずれもコ・トランスフォーメーション法に寄ったためHPT遺伝子の導入も確認された(第19図)。

二回目もHPTとCMV-CP遺伝子をコ・トランスフォーメーション法で導入したが、ハイグロマイシンによる選抜を行わずに再分化を試みた結果、21個のカルスから55本のシュートが得られた。

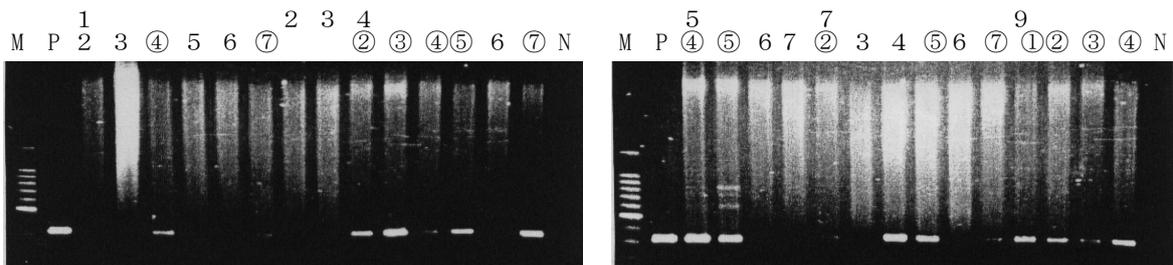
得られたシュートの内48本を苗化させ、PCRでCMV-CPとHPTの存在を確認した結果、両方の遺伝子が導入されたのは10個体、CMV-CP遺伝子のみは15個体、HPT遺伝子のみは5個体あり、いずれの遺伝子も確認できなかったのは18個体であった。

複数のシュートが得られたカルスでは、シュートによって導入遺伝子の異なる組み合わせが混在し、カルスの起源が単一の細胞からでないことが示唆された(第20図、第21図、第22表)。



第19図 PCR法により増幅されたHPT遺伝子のバンド(419bp)とCMV-CP遺伝子のバンド(328bp)

M:分子量マーカー(λ-HindIII)
P:ポジティブコントロール(導入遺伝子)
C:ネガティブコントロール(E P無処理非形質転換体)
1~3:形質転換体



第20図 CMV-CP遺伝子を導入した形質転換リンドウのPCRによる検定例

第22表 導入処理して得られたカルス別の再分化体における導入遺伝子の確認

カルス番号	シュート数	CMV+HPT	CMV	HPT	未導入	未確認	備考
1	7		2		5		
2	1				1		
3	1				1		
4	7	1	4		1	1	
5	7	2			2	3	
6	1					1	
7	6	3	1		2		
8	1		1				
9	7	1	4	1		1	
10	6	2		3	1		
11	1				1		
12	1				1		
13	1				1		
14	1		1				
15	1			1			
16	1					1	
17	1	1					
18	1		1				
19	1				1		
20	1				1		
21	1		1				
合計	55	10	15	5	18	7	未確認は枯死



第21図 プロトプラスト由来カルスからの再分化
複数のシュートが発生し、導入形態が異なる

(2) 遺伝子の導入効率

リンドウの葉肉細胞プロトプラストにHPT遺伝子とCMV-CP(キュウリモザイクウイルスの外皮タンパク質)遺伝子をエレクトロポレーション法でコ・トランスフォーメーションし、再分化個体をCTAB法により抽出してPCR法により目的遺伝子の導入効率を調査した。

その結果、ハイグロマイシン20mg/lを含む不定芽形成培地で選抜した場合、再分化個体は全てHPT遺伝子を確認した。CMV-CP遺伝子の組み込みは21個体中2個体で確認し、導入効率は9.5%であった。

事前にCMV-CP遺伝子の代わりにGUS遺伝子を目的遺伝子としたコ・トランスフォーメーションでは32個体中7個体でGUS遺伝子の組み込みを確認し、導入効率は21.9%であり、目的遺伝子を単独で組み込んだ形質転換体はなかった(第23表)。

一方、不定芽形成培地にハイグロマイシンを添加しない培地で再分化した結果、コ・トランスフォーメーションの効率は18.2%となり、目的のCMV-CP遺伝子のみを組み込んだ形質転

換体は55個体中15個体と27.5%の高い導入率となった。

形質転換体を一般圃場にリリースする場合、抗生物質であるハイグロマイシンに抵抗性を示すHPT遺伝子の削除が求められるが、この例からPCR法の操作性等の進歩により、選抜効率を上げるための抗生物質とコ・トランスフォーメーションは無意味と考えられる。しかし、GUS遺伝子とBt遺伝子等を持つ複合耐性植物の作出など、複数遺伝子を同時に組み込むには有効な手段として活用が期待される。

(3) 組換え体の特性

CMV-CP遺伝子を導入した組換え体の一部について花粉稔性を調査した結果、導入系統でも花粉粘性に著しい差があった(第24表、第22図)。

また、系統140では4年間の閉鎖系温室での栽培で導入遺伝子が脱落した株が確認された²⁾(第23図)。

なお、CMV-CP遺伝子確認株におけるカーボンランダム法による接種検定では発病が見られないが、抵抗性の確認はできていない。また、発病遅延が見られる株もあるが、再確認が必

要である。さらに、第22表でCMV-C P 遺伝子の導入が確認された残りの系統についても順化後に接種検定の必要がある。

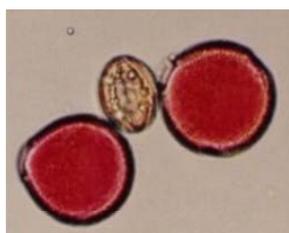
第23表 リンドウプロトプラストへのエレクトポレーション法による遺伝子導入の効率

目的遺伝子	形質転換体数				非形質 転換体 合計 E	導入効率(%)		備考
	HPT遺伝子 A	HPT+目的遺伝子 B	目的遺伝子 C	目的遺伝子 D		コトランスフォーメーション B/E	目的遺伝子 C/E	
CMV-CP遺伝子	19	2	0	0	21	9.5	—	選抜培地
GUS遺伝子(参考)	25	7	0	0	32	21.9	—	選抜培地
CMV-CP遺伝子	5	10	15	18	55	18.2	27.3	非選抜

注) GUSプライマー: 5' CAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGAA3' 5' CATTGTTTGCCTCCCTCGCTGCGGT3'
 反応条件: Boiling 5 min; 94°C 30sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec (35 サイクル); 72°C 7 min

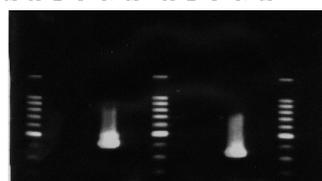
第24表 CMV-C P 遺伝子を導入した形質転換リンドウ等の花粉稔性

系統名	花粉粒数				稔性率 %	備考	系統名	花粉粒数				稔性率 %	備考
	稔性	不稔	計					稔性	不稔	計			
T7-2-2	6	391	397	1.5	a1	T4-5-0	2	139	141	1.4	a1		
CMV+	7	231	238	2.9	a1	CMV+	1	324	325	0.3	a1		
	3	299	302	1.0	a1		2	276	278	0.7	a2		
	2	71	73	2.7	a1		2	234	236	0.8	a2		
T7-5-0	53	6	59	89.8	a1	Ge-A	48	150	198	24.2	a1		
CMV+	112	21	133	84.2	a1	79	132	211	37.4	a1			
	90	13	103	87.4	a1	Ge-B	41	239	280	14.6	a2		
	47	9	56	83.9	a1	50	207	257	19.5	a2			



第22図 リンドウの花 pollen 稔性

140 (hpt) 140 (CMV-CP)
M A B P N M A B P N M



第23図 導入遺伝子の脱落

2) B t 遺伝子の導入

(1) 分離株の H 血清型による同定

採取場所の異なる選抜した56菌株を含む80系統のうち35菌株について九州大学農学部で同定した結果、11種類

の血清に反応し、5系統は2つの血清と反応した。3系統にクリスタルがみられたが、凝集反応は一致しなかった。また、小型の粒子をつくる菌株もあったが、2系統は自家凝集し、観察できなかった(第25表、第26表)。

第25表 H抗原の凝集によるB t 菌同定

分離菌系統	クリスタルの有無	H凝集反応	H serovar	備考
k-1-2	-	-		コンタミ
k-12-18	-	-		
k-18-1	+?	H15/21*	dakota/colmeri	コンタミ
k-18-12	-	H24ab	neoleonensis	
k-20-4	-	-		
k-21-17	-	H15/21*	dakota/colmeri	コンタミ
k-23-5	-	-		コンタミ
k-30-7	-	-		
k-34-17	-	-		
k-36-5	-	-		コンタミ
k-37-6	+	-		コンタミ
k-41-15	-	-		
k-42-3	-	H4ab	sotto	
k-50-25	+	-		コンタミ
k-61-2	-	-		
k-62-50	-	-		コンタミ

注) * : 双方の抗原を有する。

第26表 分離したB T菌のH血清型による同定

菌株記号	H抗原	H serovar	備 考
K-20	27	<i>mexicanensis</i>	
k-22	27	<i>mexicanensis</i>	
k-37	3abc	<i>kurstaki</i>	
k-48	UTE		自家凝集・観察困難
k-53	7	<i>aizawai</i>	
k-62	UTE		自家凝集・観察困難
k-63	7	<i>aizawai</i>	
k-64	7	<i>aizawai</i>	
k-65	22	<i>shandongiensis</i>	
k-66	4ac	<i>kenyae</i>	
k-68	4ab	<i>sotto</i>	
k-69	4ac	<i>kenyae</i>	
k-70	14/19	<i>israelensis/tochigiensis</i>	双方の標準血清と反応
k-71	4ab	<i>sotto</i>	
k-72	4ab	<i>sotto</i>	
k-73	4ab	<i>sotto</i>	
k-74	14/19	<i>israelensis/tochigiensis</i>	双方の標準血清と反応
k-75	14/19	<i>israelensis/tochigiensis</i>	双方の標準血清と反応
k-111	4ac	<i>kenyae</i>	

(2) Cry I 遺伝子の確認と
プラスミドの構築

コロニーからの直接増幅ではバンドは得られなかったが、SDS法により抽出したDNAでは20系統すべてで複数のCryI遺伝子の増幅が認められた。*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*の14、15、16系統、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*の21、22、23系統と27、28、29、30系統はそれぞれに、同じ増幅の傾向をした(第24図、第27表)。
また、CryAa-F1+CryAa-R4のプライマー組合せでPCR反応を行った場合、CryIaA遺伝子と思われる約3500bpの位置にsubsp. *Aizawai*では10系統、subsp. *kurstaki*では8系統でバンドが認められた(第25図)。

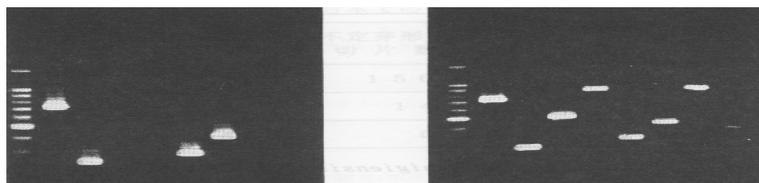
リンドウに食害を起こすハスモンヨトウの飼料を人工飼料(インセクタL F)からキャベツに変えてBt毒素の接種検定を試み、殺虫性が高く、CryI A(a)遺伝子を持つが、他のCryI遺伝子を少なく持つAizawai系統No12を選抜した(第26図)。

Aizawai系統No12の菌株から抽出した全DNAを鋳型として、2種類のプライマーセットを用いてPCRを行った結果、CryI A(a)遺伝子の大きさである約3.6kbのDNA断片が増幅された(第27図)。

プラスミドを構築してpBI221に挿入した結果、目的の大きさの遺伝子CryI A(a)遺伝子が挿入できたpBC1a-1及びpBC1a-3を確認した(第28図)。

Aizawai(系統12)

kurstaki(系統22)

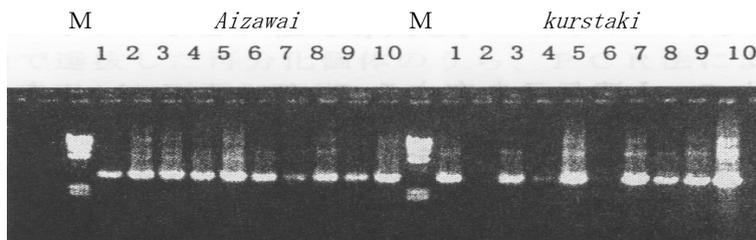


lane 1 : 100bpマーカー
lane 2~9 :
CryI Aa, CryI Ab, CryI Ac,
CryI Ba, CryI Ca, CryI Da,
CryI Ea, CryI Fa

第24図 *B. thuringiensis*のCry I 遺伝子のPCRによる増幅例

第27表 *B. thuringiensis*のPCRによるCry I 遺伝子の検定

系統	Aizawai										kurstaki									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CryI Aa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CryI Ab	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CryI Ac	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CryI Ba	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CryI Ca	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CryI Da	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CryI Ea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CryI Fa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-



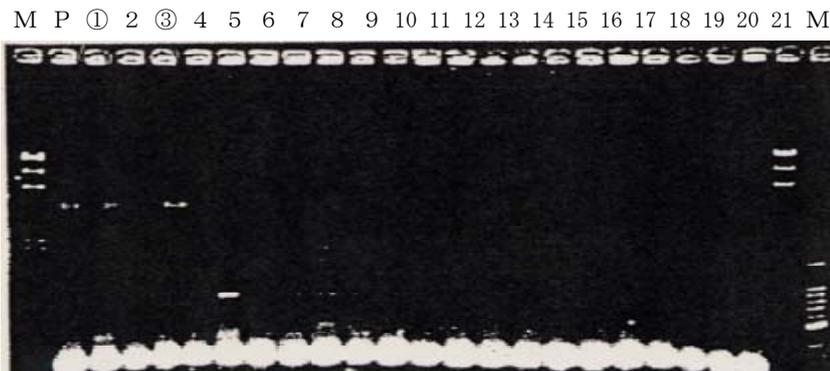
第25図 PCRによるCry I 遺伝子の増幅 (M. λ-HindIII)



第26図 Aizawai系統12菌株の
Cry1遺伝子のPCRによる増幅
lame1:マーカー, lame2:A(a), lame3:A(b),
lame6:C(a), lame7:D(a)



第27図 Cry1A(a)遺伝子の確認
lame1: マーカー
lame2: 特異配列
lame3: 全長



第28図 pBI221に導入したCry1A(a)遺伝子の確認

(3) Cry1A(a) 遺伝子の導入
とリンドウの殺虫性確認

pBC1a-1及びpBC1a-3の両系統とも増殖が遅く、継代を繰り返す毎にCry1A(a)遺伝子の脱落がみられた。

得られたCry1A(a)遺伝子をHPTとのコ・トランスフォーメーション法で導入処理し、非選抜培地で再分化を試みたが、カルス化や不定芽形成はコントロールに比べ著しく少なかった。

導入処理して得られた7個の再分化体についてPCR法で確認したが、Cry1A(a)遺伝子は確認されず、HPT遺伝子は2個体で確認された(第28表)。

pBC1a-1及びpBC1a-3を処理して得られた植物体でのハスモンヨトウの生育は対照と差が無く、PCRの結果とも一致し、Cry1A(a)遺伝子は導入できていないことが確認された(第29表)。

第28表 Cry1A(a)遺伝子を導入して得られて再分化体のPCR結果

導入遺伝子	再 分 化 系 統						
	Cyl-1	Cyl-2	Cyl-3	Cyl-4	Cyl-5	Cyl-6	Cy3-1
Cry1A(a)	-	-	-	-	-	-	-
HPT	+	+	-	-	-	-	-

第29表 Cry1A(a)遺伝子を導入して得られて再分化体の接種検定

導入遺伝子	再 分 化 系 統							非形質転換体 (対照)
	Cyl-1	Cyl-2	Cyl-3	Cyl-4	Cyl-5	Cyl-6	Cy3-1	
食害程度	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
幼虫の生育	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3

V 摘要

1 培養変異の誘起と有用形質の獲得

1) 培養変異の誘起
 ・リンドウの茎頂を回転培養によつて多芽体化させ、培養温度26℃、回転回数2〜3回/分、16時間日長の条件下で約30日間隔で長期にわたって継代を繰り返して、再分化した個体から30℃の温度負荷条件下でも培養可能な系統を選抜した。
 ・プロトプラストへの変異処理として紫外線照射、電気パルス、MNU (N-メチル-N-ニトロソ尿素)、EMS (エチルメタンスルホン酸) およびGUSやHPT等の標識遺伝子の導入を試みた結果、EMSでは5ppm以下の濃度で再分化体が得られる。また、電気パルスおよび遺伝子導入処理でも一定の再分化体が得られた。

2) 培養変異の遺伝子診断
 ・RAPDによる多型の検出：変異源処理した系統は調査した50種のプラマイでは特異的な育成した耐暑性系統は、非耐暑性系統及び後代等にオペロン社のプラマイで耐暑性の系統間差は温度負荷条件下(15〜35℃)の葉片培養での不定芽形成やカルス増殖の大小に近い結果となり、多型のみられたプラマイで検定した結果、耐暑性の高・中系統に同様のバンドが確認された。
 ・AFLPによる多型の検出：AFLPによっても複数の断片で異なる複数のピークが認識されているが、耐暑性との関わりは確認できない。

2 有用遺伝子導入による形質転換体の作出

1) CMV-CP遺伝子の導入
 ・HPTとCMV-CP遺伝子を導入し、抗生物質未添加地で培養したプロトプラストからCMV-CP遺伝子が導入できた形質転換体を得られた。しかし、同一カルスから発生した不定芽でも導入遺伝子が異なる結果となることもあり、カルスが複数のプロトプラストから形成される可能性があることが示唆された。

2) Bt遺伝子の導入
 ・土壌等から分離した多数のBT菌のうちハスモンヨトウに特異的に効果を示す菌株からCryIA(a)遺伝子を分離し、pBI221に遺伝子を挿入できた2系統を得たが、両系統とも増殖が遅く、

菌の継代を繰り返す毎に導入遺伝子の脱落がみられた。再構築したプラスミドでは4系統で確認でき、繁殖の良い1系統を選抜した。
 ・得られたCryIA(a)遺伝子をHP-T遺伝子とのコ・トランスフォーメーション法で導入処理し、非選抜地ではHPT遺伝子導入個体は得られたが、CryIA(a)遺伝子導入個体は確認されなかった。

3 有用変異体の特性評価と系統育成

1) 有用変異体の特性評価
 ・選抜した耐暑性系統(Ge)は非耐暑性系統が生育困難な夏期35℃の場内露地圃場(北緯32°53'、標高82m)でも生育した。しかし、開花期は8月上旬であつたが、草丈が低い、花色が淡いなどの形質を示した。また、標高500mの高原農業研究所露地圃場の栽培でも草丈が低いなどの形質と変わらなかつた。
 ・変異源であるEMS(エチルメタンスルホン酸)を処理して得られた再分化体は母本との間で生育特性に大差はなく、有効な変異は得られていない。
 ・GUS遺伝子等をエレクトロポレーション法で導入した系統は花色等の変異が拡大し、花粉稔性に差がみられ、稔性の高い系統の自殖後代でも導入遺伝子が確認できた。
 ・CMV-CP遺伝子導入の順化個体の一部にCMVを接種検定した結果、発病が抑制される系統が確認されており、未検定の個体も含め、遺伝資源として利用可能と考えられる。

2) 有用系統の育成
 ・選抜した系統(Ge)の耐暑性はエゾリンドウやオオヤマリンドウなど複数の非耐暑性系統との交雑F₁に耐暑性がないことやPCRによる多型の結果から2個以上の遺伝子が関与し、関与する遺伝子はヘテロか、別染色体上に位置すると考えられた。
 ・エゾリンドウやオオヤマリンドウと耐暑性系統との間で交雑した結果、試験の範囲では花色等は改良された。また、ピンクや白などの系統との交雑後代では草姿や花色などに多様な系統が得られており、品種育成の素材として期待したい。

謝辞
 本研究は国庫助成課題、地域先端技術共同研究開発促進事業の内「培養変異の遺伝子診断による有用形質獲得体の早期選抜技術の開発」の課題で平

9年から14年にかけて前期3年、後期3年の6年間の研究成果である。この間、当時の農業生物資源研究所、九州農業試験場には課題設定からご指導いただき感謝致します。また、BTに関連する項目では菌の同定を委託した九州大学農学部生物的防除研究施設には菌の分離や保存・増殖など多大の支援を頂きました。ここに併せて感謝致します。

V 引用文献

- 1) 橋本直樹、佐々木潤、浅野真一郎、伴戸久徳、飯塚敏彦：日蚕雑、65(3)、185-191、1996
- 2) 平井篤志、内宮博文、杉浦昌弘：植物細胞育種入門、学会出版センター、東京、77-82、1982
- 3) Kalman, s., Kiehne, K. L., Libs J. L. and Yamamoto, T.: Appl. Environ. Microbiol., 59, 1131-1137
- 4) Keiko Yoshioka, Kaoru Hanada, Yukou Nakazaki, Yuzo Minobe, Toshihiro Yakuwa and Katsuji Oosawa: Japan. J. Breed., 42, 277-285, 1992
- 5) 工藤陽史、田中正美：熊本県農業研究センター研究報告 9、58-72、2000.
- 6) Naoto Nitta etc.:日植病報、54、516-522、1988
- 7) 野田孝博、西口達郎、田中正美：熊本県農業研究センター研究報告 12、57-69、2003
- 8) 島本功、岡田清孝監修：モデル植物の実験プロトコール、秀潤社、東京、44-46、1996
- 9) 田中正美・小代寛正：熊本県農業研究センター研究報告 4、64-74、1995.
- 10) 田中正美・小代寛正：熊本県農業研究センター研究報告 4、75-85、1995.
- 11) 都丸啓一、日高醇：秦野たばこ試験場報告、46、143-149、1960
- 12) 渡辺格監修：クローニングとシーケンス、252-264、農村文化社、東京、1992
- 13) 渡辺好郎、山口彦之監修：突然変異育種、養賢堂、東京、62-69 1983

Production of the new quality type Gentian (*Gentiana triflora* var *japonica*) by gene transformation and mutant cultivation

Masami Tanaka, Kiyofumi Kudo and Takahiro Noda

summary

The examination of the race raising which has new quality was carried out by doing a variation processing and so on in protoplasts of the gentian. That result is as the next.

- 1) It could get a regeneration with EMS processing, the electric pulse and recombination of signal gene (hpt or GUS). But, it couldn't get a remarkable variation. Shoot-apex was cultivated with temperature of 26°C and rotalli of 2 - 3 rpm for a long time. The heat tolerance race that even temperature of 30°C could grow was selected.
- 2) Polymorphic bands by PCR-analysis were asked to heat-tolerance race, a non and F₁. And, it is aware of the different peak with more than one fragment even with AFLP-analysis. But, relations with heat-tolerance race can't be confirmed.
- 3) Transgenic of CMV could get HPT and a CMV-CP gene by co-transformation transfer. But, the combination of the gene varied even in the bud of the same callus. The possibility to be chimera of this callus was suggested. And, as a result of inoculating CMV on transgenic, races of the illness delay is confirmed. These can be thought to use it as genetic resources.
- 4) The Bt fungus which showed effect peculiarly in tobacco-cutworm was separated from the soil and so on. As a result that transfer did that CryIA (a) in the gentian. It could get a regeneration. But, transgenic can't be confirmed.
- 5) The improvement of quality is necessary for a flower color to be light with heat-tolerance race. But, it was judged that there was heat-tolerance because growth and bloomed even with open field that 35°C was exceeded. Heat-tolerance participation gene could be thought to exist with two and more heterozygote.