

キク「秀芳の力」の効率的な形質転換法					
[要約] キク「秀芳の力」の形質転換において、カルス選抜培地のBA濃度を0.5mg/l、選抜用抗生物質のジェネテシン濃度を20mg/lとし、カルス再生時の照度を約750lxにすることにより、遺伝子発現の安定した形質転換体の獲得効率を高められる。					
担当部署	バイオテクノロジー部・遺伝子操作チーム			連絡先	092-924-2970
対象作物	花き・花木	専門項目	バイテク	成果分類	研究手法

[背景・ねらい]

キクの白さび病抵抗性品種を育成するために、ヤマイモキチナーゼ遺伝子を導入した形質転換体を作出した(平成9年度農業関係試験研究の成果)。しかし、形質転換体獲得効率が低く、形質転換体の多くに、外来遺伝子の不活化や発現抑制が認められる。このため、多くの形質転換体の中から遺伝子発現の安定したものを得る必要がある。そこで、形質転換の効率を高める培養や選抜条件を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. キク「秀芳の力」の形質転換において、従来のカルス選抜培地(BA濃度1mg/l、選抜用抗生物質カナマイシン25mg/l)に比べて、BA濃度0.5mg/l、選抜用抗生物質のジェネテシン20mg/lを組み合わせることにより、獲得効率は約1.4倍になり(表1)、キチナーゼの発現率も大幅に向上する(表1)。
2. BA濃度0.5mg/l、選抜用抗生物質のジェネテシン20mg/lを組み合わせ得られる形質転換カルスからの植物体再生時に照度を約750lxにすると、従来の照度約6,000lxに比べて、再生率を約2倍向上できる(表2)。
3. 再生植物241個体のうち、PCRにより147個体でヤマイモキチナーゼ遺伝子の導入を確認した。さらに、この中の33個体からTEBIA法(図2)により、17個体でヤマイモキチナーゼ発現を確認した(表1)。

[成果の活用面・留意点]

1. 形質転換によるキクの病害抵抗性品種の育成等に活用できる。
2. キクの形質転換条件は、品種間差が認められるので、品種毎に最適条件を確認する必要がある。

[具体的データ]

表1 形質転換カルス選抜培地のBAと抗生物質がヤマイモキチナーゼ遺伝子導入形質転換キク獲得に及ぼす影響(平成12-14年)

BA	選抜抗生物質	供試切片数		抗生物質抵抗性カルス		再生植物		キチナーゼ遺伝子の確認(PCR法)			形質転換体獲得率	キチナーゼ発現の確認(TEBIA法)		
		(A)	(B)	(B/A)	(C)	(C/B)	(D)	(E)	(E/D)	(F)	供試数	確認数	率	
mg/l		個	個	%	個	%	個	個	%	%	個	個	%	
0.5	Km	269	357	132.7 a	53	14.8 c	53	18	34.0 c	6.7	-	-	-	
	G	264	191	72.3 b	97	50.8 a	97	64	66.0 ab	24.2	26	15	57.7	
1	Km	265	301	113.6 a	56	18.6 c	56	47	83.9 ab	17.7	4	1	25.0	
	G	259	126	48.6 c	42	33.3 b	35	18	51.4 bc	8.3	3	1	33.3	

注)1. 供試切片数は、各区4反復の総数 2. Km: カナマイシン25mg/l、G: ジェネテシン20mg/l
3. -: 未調査 4. F=(B/A)*(C/B)*(E/D)*100 5. 異文字間は、P<0.05で有意差あり

表2 照度が抗生物質抵抗性カルスの再生に及ぼす影響(平成12年)

照度	BA	抗生物質	カルス選抜培地		カルス	
			置床数	再生数	再生率	
1x	0.5	Km	186	12	6.5	
		G	114	44	38.6	
	1	Km	159	13	8.2	
750		G	74	6	8.1	
	計		533	75	14.1 *	
	0.5	Km	171	6	3.5	
6,000		G	162	32	19.8	
	1	Km	142	10	7.0	
		G	52	4	7.7	
計			527	52	9.9 -	

注)1. 置床28日後に調査 2. *-: P<0.05で有意差あり

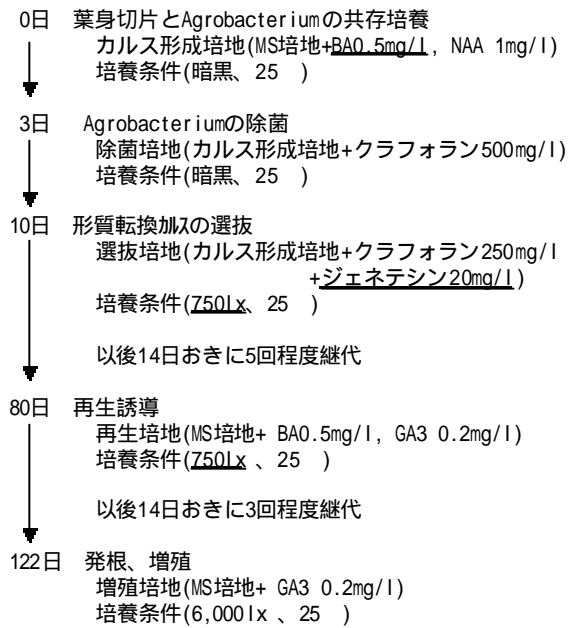


図1 キク「秀芳の力」の形質転換法

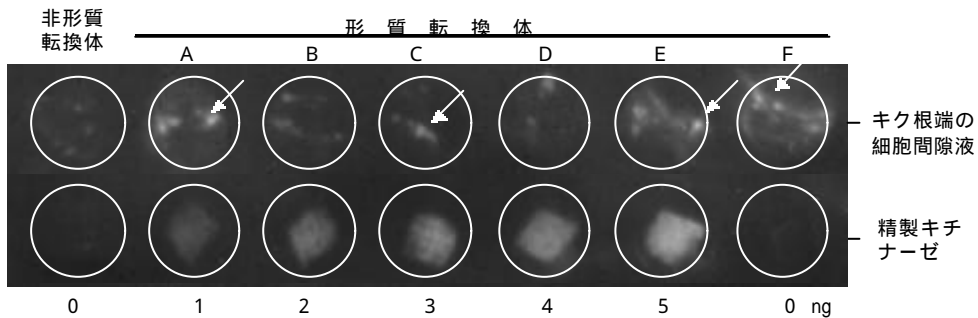


図2 TEBIA解析によるヤマイモキチナーゼの発現確認

注) は、キチナーゼが発現した根の位置を示す発光シグナル

[その他]

研究課題名: キク等の複合病害抵抗性遺伝子導入技術の確立

予算区分: 県特(オリジナルフラワー)

研究期間: 平成14年度(平成12~14年)

研究担当者: 平島敬太、村上英子、甲斐浩臣、池上秀利、高田衣子、中原隆夫