

ユリの新品種・杜の乙女・杜の精・杜のロマンにおける再分化系と形質転換系の確立

誌名	宮城県農業・園芸総合研究所研究報告
ISSN	13472232
著者名	鈴木,誠一 佐藤,英典 瀬尾,直美 中村,茂雄
発行元	宮城県農業・園芸総合研究所
巻/号	69号
掲載ページ	p. 22-29
発行年月	2002年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ユリの新品種・杜の乙女・杜の精・杜のロマンにおける 再分化系と形質転換系の確立

鈴木誠一・佐藤英典・瀬尾直美・中村茂雄

Development of Plant Regeneration and Transformation System of the New Lily Cultivars, Morino-otome, Morino-sei and Morino-roman

Seiichi SUZUKI, Hidenori SATO, Naomi SHIRASAWA-SEO and Shigeo NAKAMURA

抄 録

シンテッポウユリを種子親、ヒメサユリを花粉親とした交雑で育成されたユリの新品種、杜の乙女、杜の精、杜のロマンについて、主要病害に対する抵抗性を付与するために遺伝子組換え技術が適用可能かどうかを検討した。カルス経由の植物体再分化系を調べた結果、培養子球のりん片または茎頂を明所または暗所で培養して形成されたカルスをホルモンフリーの培地に移植して明所で培養すると、比較的高率にカルスから植物体が再分化した。りん片およびカルスはハイグロマイシンに対する感受性が高かった。パーティクルガン法でGUS遺伝子を導入して一過性の発現を観察したところ、りん片およびカルスにおいて、GUS遺伝子の発現が確認された。

〔キーワード〕 形質転換、再分化、種間雑種、シンテッポウユリ、ヒメサユリ

緒 言

シンテッポウユリを種子親、ヒメサユリを花粉親とした交雑で育成されたユリの新品種、杜の乙女、杜の精、杜のロマン¹⁾は、花色がピンク色の早生で、球根養成期間の短い品種である。これら三つの新品種は、ほとんどの市販品種と同様に葉枯病やウイルス病などの抵抗性を有していない。そこで、近年技術革新がめざましい遺伝子組換え技術によって主要病害に対する抵抗性を付与できれば、これら三つの新品種の利用価値は著しく高まる。

ユリの遺伝子組換えに関しては、テッポウユリのカルスにパーティクルガン法で β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子とピアラフォス耐性遺伝子を導入した形質転換体が得られている²⁾。また、シンテッポウユリのりん片ではパーティクルガン法でGUS遺伝子を導入してその一過性の発現が調べられている³⁾。更に、タカサゴユリのカルスでは形質転換カルスの選抜条件として抗生物質の種類と濃度が検討されている⁴⁾。しかしながら、いずれの報告も効率的な形質転換系の確立に至っていない。

パーティクルガン法でユリに遺伝子導入する際の組織としては、りん片あるいはカルスが有効と考え

られ、カルス経由の植物体再分化系はシンテッポウユリ、ヒメサユリなどで検討されている⁵⁾。

そこで本研究では、まず初めに、上記三つの新品種についてカルス経由の植物体再分化系を確立することとした。次いで、形質転換体の選抜条件として、抗生物質の種類と濃度を検討した。更に、パーティクルガン法でGUS遺伝子を導入する際の形質転換条件を検討して、遺伝子組換え技術を適用することが可能かどうかを検討することとした。

なお、本稿をまとめるに当たり、東北大学大学院農学研究科教授・金濱耕基博士にご校閲いただいた。ここに記して感謝の意を表する。

材料と方法

再分化系の確立

実験1 カルスの形成条件

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびその両親のシンテッポウユリF-1 (宮城県農業センター育成系統) と、ヒメサユリの培養子球を供試した。

ピクロラム 1 mg/l、しょ糖 3%、ゲルライト 0.2%を含むMS培地⁶⁾ (pH5.8) に、りん片または茎頂を置床した。その後、25℃の暗所または約

3,000luxの12時間照明の明所で8週間培養して、カルスの形成率を調べた。

実験2 カルスの増殖条件

実験1で形成されたカルスを切り取り、ピクロラム1mg/l、しょ糖3%、ゲルライト0.2%を含むMS培地(pH5.8)に移植した。その後、同一条件下で8週間培養前後に新鮮重を測定して、増加率を算出した。

実験3 カルスからの植物体再分化

実験2で増殖したカルスを、しょ糖3%、ゲルライト0.2%を含むホルモンフリーのMS培地(pH5.8)に置床した。その後、25℃、約3,000luxの12時間照明下で8週間培養して、形成された不定芽数を調べた。

抗生物質に対する感受性

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリの培養子球のりん片またはカルスを供試した。

ピクロラム1mg/l、しょ糖3%、ゲルライト0.2%を含むMS培地(pH5.8)に、ハイグロマイシン0.25, 50, 75mg/l、またはカナマイシン0, 50, 100, 200mg/lを添加し、りん片またはカルスを置床した。その後、りん片は25℃の暗所で6週間培養し、カルスは25℃の暗所で4週間培養して、りん片またはカルスの状態を調べた。

形質転換条件

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリの培養子球のりん片またはカルスを、それぞれ1区あたり10個ずつ供試し

た。

ピクロラム1mg/l、しょ糖3%、ゲルライト0.2%を含むMS培地(pH5.8)に置床した。その後、りん片は25℃、約3,000luxの12時間照明下で0または3週間前培養した。カルスは25℃、約3,000luxの12時間照明の明所で0または1週間前培養した。

遺伝子導入はパーティクルガン法¹⁾で行った。CaCl₂ースペルミジン法により、プラスミドpBI221¹⁾(CaMV35Sプロモーター::GUS::Nosターミネーター)を直径1.0または1.6μmの金粒子に吸着させた。ユリのりん片またはカルスへの金粒子の打ち込みはパーティクルガン装置(PDS-1000He, BIO-RAD社製)を用い、1区あたり2回ずつ行った。打ち込みのヘリウム圧は1,100psiとし、試料距離(ストップスクリーンとりん片またはカルスまでの距離)は6または9cmとした。

打ち込み処理後、りん片またはカルスを25℃、約3,000luxの12時間照明下で2日間培養した。その後、GUS遺伝子の一過性発現をX-Gluc染色²⁾によって調べた。

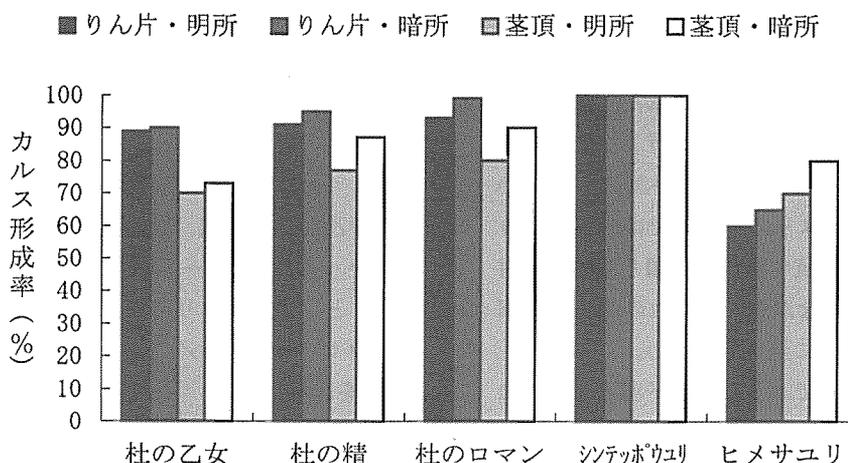
結果と考察

再分化系の確立

実験1 カルスの形成条件

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリのカルス形成条件を検討した結果を第1図に示す。

その結果、カルス形成率は、杜の乙女のりん片明所培養区で89%、りん片暗所培養区で90%、茎頂明所培養区で70%、茎頂暗所培養区で73%であった。杜の精のりん片明所培養区では91%、りん片暗所培



第1図 カルスの形成に及ぼす培養部位と光条件の影響

養区では95%、茎頂明所培養区では77%、茎頂暗所培養区では87%であった。杜のロマンのりん片明所培養区では93%、りん片暗所培養区では99%、茎頂明所培養区では80%、茎頂暗所培養区では90%であった。すなわち、三つの新品種とも、りん片は茎頂に比べて、暗所は明所に比べてカルス形成率が高かった。また、カルス形成率は杜のロマンが最も高く、次いで杜の精で高く、杜の乙女は最も低かった。

シンテッポウユリF-1のカルス形成率はいずれの培養区でも100%であった。シンテッポウユリの品種・赤須では、茎頂よりもりん片で植物体再分化能の高いカルスが形成されることが報告されている⁴⁾が、本実験で供試したシンテッポウユリF-1では、りん片と茎頂のいずれでも高率にカルスが形成された。ヒメサユリでは、りん片明所培養区で60%、りん片暗所培養区で65%、茎頂明所培養区で70%、茎頂暗所培養区で80%であった。すなわち、茎頂はりん片に比べて、暗所は明所に比べてカルス形成率が高かった。ヒメサユリのりん片では、明所よりも暗所で植物体再分化能の高いカルスが形成されることが報告されている⁴⁾が、本実験でも同様の結果となった。これらの結果を両親の結果と比較すると、三つの新品種のカルス形成率はその中間となった。

以上の結果、杜の乙女、杜の精、杜のロマンのりん片または茎頂を明所または暗所で培養すると、比較的高率にカルスが形成されることが明らかとなった。

実験2 カルスの増殖条件

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリのカルス増殖条件を検討した結果を第2図に示す。

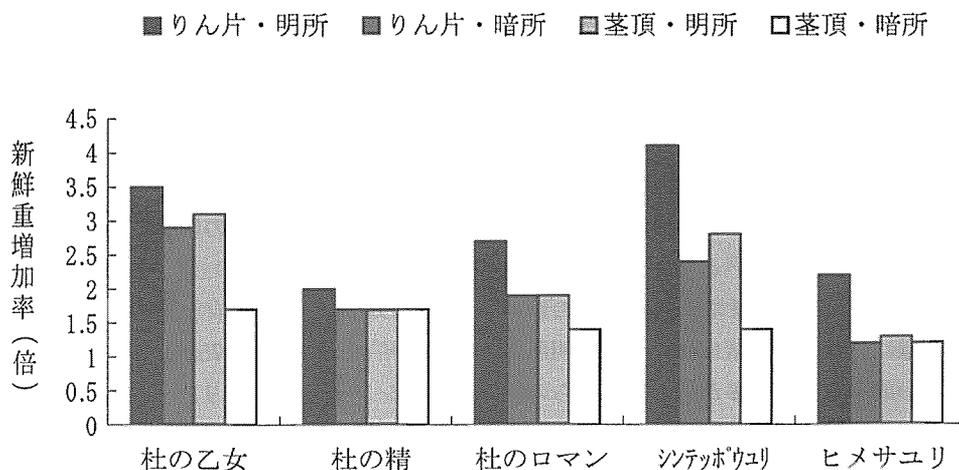
その結果、カルス新鮮重の増加率は、杜の乙女のりん片明所培養区で3.5倍、りん片暗所培養区で2.9倍、茎頂明所培養区で3.1倍、茎頂暗所培養区で1.7倍であった。杜の精のりん片明所培養区では2.0倍、りん片暗所培養区では1.7倍、茎頂明所培養区では1.7倍、茎頂暗所培養区では1.7倍であった。杜のロマンのりん片明所培養区では2.7倍、りん片暗所培養区では1.9倍、茎頂明所培養区では1.9倍、茎頂暗所培養区では1.4倍であった。すなわち、三つの新品種とも、りん片は茎頂に比べて、明所は暗所に比べてカルス新鮮重の増加率が高かった。また、カルス新鮮重の増加率は杜の乙女が最も高く、次いで杜のロマンで高く、杜の精は最も低かった。

シンテッポウユリF-1のカルス新鮮重の増加率は、りん片明所培養区で4.1倍、りん片暗所培養区で2.4倍、茎頂明所培養区で2.8倍、茎頂暗所培養区で1.4倍であった。ヒメサユリでは、りん片明所培養区で2.2倍、りん片暗所培養区で1.2倍、茎頂明所培養区で1.3倍、茎頂暗所培養区で1.2倍であった。すなわち、三つの新品種の両親も同様に、りん片は茎頂に比べて、明所は暗所に比べてカルス新鮮重の増加率が高かった。これらの結果を両親の結果と比較すると、三つの新品種のカルス新鮮重の増加率はその中間となった。

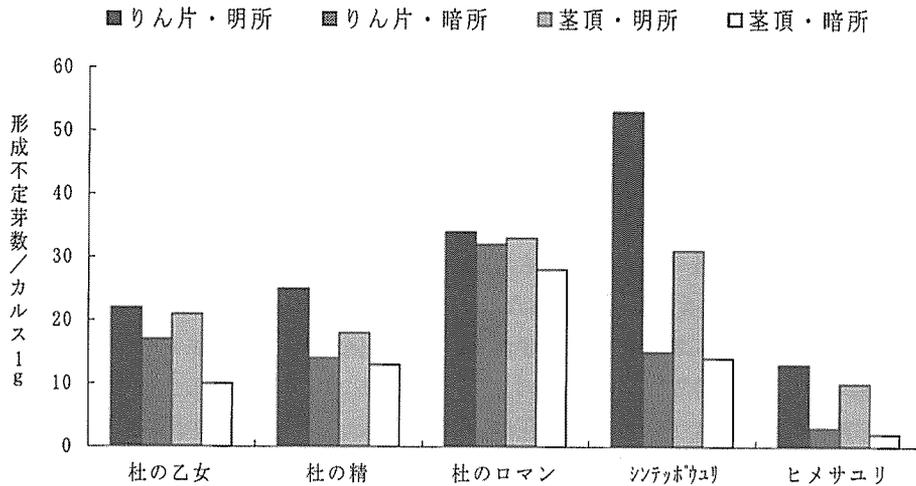
以上の結果、杜の乙女、杜の精、杜のロマンのりん片または茎頂を明所または暗所で培養して形成されたカルスを同じ条件で継代すると、比較的効率良くカルスを維持できることが明らかとなった。

実験3 カルスからの植物体再分化

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリのカルスからの植物体



第2図 カルスの増殖に及ぼす培養部位と光条件の影響



第3図 カルスからの植物体再分化に及ぼす培養部位と光条件の影響

再分化について検討した結果を第3図に示す。

その結果、カルス1gからの形成不定芽数は、杜の乙女のりん片明所培養区で22本、りん片暗所培養区で17本、茎頂明所培養区で21本、茎頂暗所培養区で10本であった。杜の精のりん片明所培養区では25本、りん片暗所培養区では14本、茎頂明所培養区では18本、茎頂暗所培養区では13本であった。杜のロマンのりん片明所培養区では34本、りん片暗所培養区では32本、茎頂明所培養区では33本、茎頂暗所培養区では28本であった。すなわち、三つの新品種とも、りん片は茎頂に比べて、明所は暗所に比べて形成不定芽数が多かった。また、形成不定芽数は杜のロマンが最も多く、次いで杜の精で多く、杜の乙女は最も少なかった。

シンテッポウユリF-1の形成不定芽数は、りん片明所培養区で53本、りん片暗所培養区で15本、茎頂明所培養区で31本、茎頂暗所培養区で14本であった。シンテッポウユリの品種・雷山では80.3%のカルスから植物体が再分化することが報告されている¹⁾が、本実験で供試したシンテッポウユリF-1でも高率に不定芽が形成された。ヒメサユリでは、りん片明所培養区で13本、りん片暗所培養区で3本、茎頂明所培養区で10本、茎頂暗所培養区で2本であった。ヒメサユリでは89.3%のカルスから植物体が再分化することが報告されている¹⁾が、本実験では不定芽形成数は少なかった。すなわち、三つの新品種の両親も同様に、りん片は茎頂に比べて、明所は暗所に比べて形成不定芽数が多かった。これらの結果を両親の結果と比較すると、三つの新品種の形成不定芽数はその中間となった。

以上の結果、杜の乙女、杜の精、杜のロマンのり

ん片または茎頂を明所または暗所で培養して形成されたカルスをホルモンフリーの培地に移植し明所で培養すると、比較的高率にカルスから植物体が再分化することが明らかとなった。

抗生物質に対する感受性

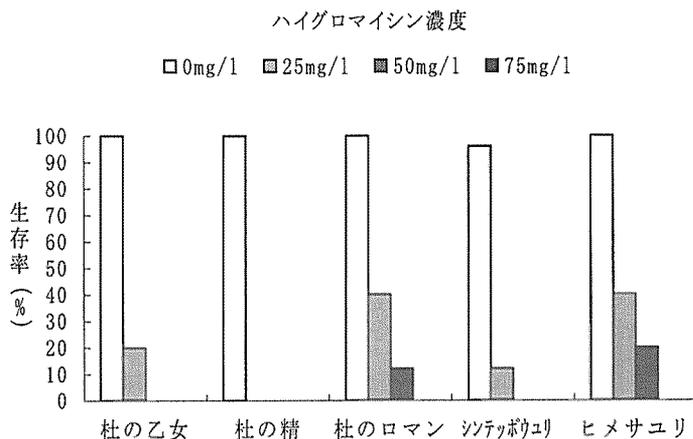
杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリのりん片の生存に及ぼすハイグロマイシンの影響について検討した結果を第4図に示す。

その結果、生存率が0%となるハイグロマイシン濃度は、杜の乙女で50mg/l、杜の精で25mg/l、杜のロマンで75mg/lであった。したがって、ハイグロマイシンに対する感受性は杜の精が最も高く、次いで杜の乙女で高く、杜のロマンは最も低かった。

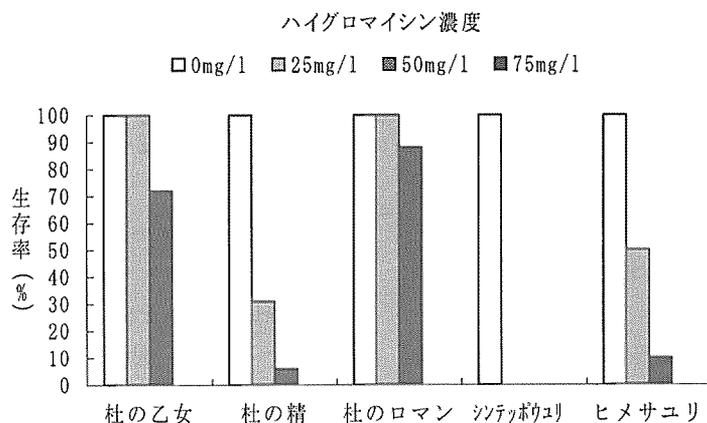
シンテッポウユリF-1ではハイグロマイシン50mg/lで生存率が0%となった。ヒメサユリではハイグロマイシン75mg/lで生存率が0%となった。これらの結果を両親の結果と比較すると、三つの新品種のりん片におけるハイグロマイシンに対する感受性は両親のいずれかに近いものとみられた。

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリのカルスの生存に及ぼすハイグロマイシンの影響について検討した結果を第5図に示す。

その結果、杜の乙女、杜の精および杜のロマンではハイグロマイシン75mg/lで生存率が0%となった。シンテッポウユリF-1ではハイグロマイシン25mg/lで生存率が0%となった。シンテッポウユリの交雑親であるタカサゴユリのカルスはハイグロマイシン50mg/lで枯死することが報告されてい



第4図 りん片の生存に及ぼすハイグロマイシンの影響



第5図 カルスの生存に及ぼすハイグロマイシンの影響

る²⁾が、シンテッポウユリはタカサゴユリと比べてハイグロマイシンに対する感受性が高いものと考えられた。ヒメサユリではハイグロマイシン75mg/lで生存率が0%となった。これらの結果を両親の結果と比較すると、三つの新品種のカルスにおけるハイグロマイシンに対する感受性はヒメサユリに近いものとみられた。

以上の結果、杜の乙女、杜の精、杜のロマンのりん片およびカルスはハイグロマイシンに対する感受性が高かったため、形質転換体を作成するための選抜マーカーとしてハイグロマイシンが利用できるものとみられた。

一方、杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリのりん片およびカルスでは、カナマイシンが200mg/lでも生存率は0%にならなかった。

シンテッポウユリの交雑親であるタカサゴユリのカルスはカナマイシン200mg/lでも生存することが報告されている²⁾が、シンテッポウユリでも同様

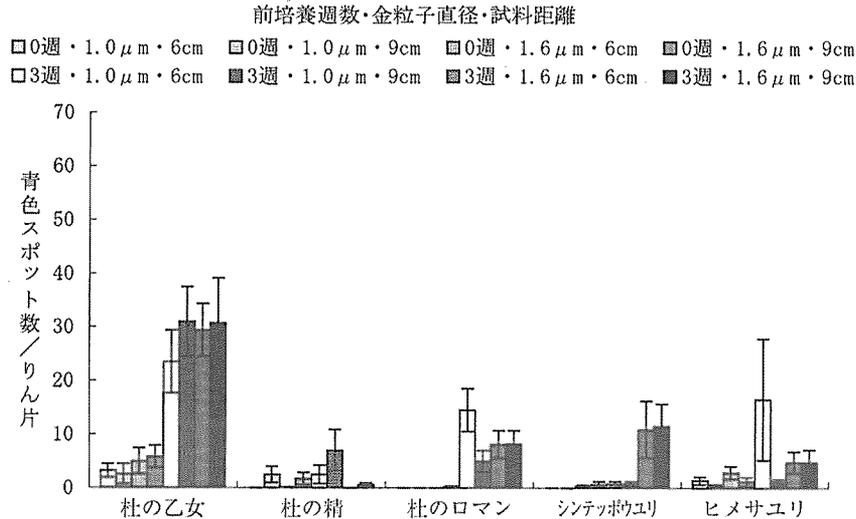
の結果となった。

以上の結果、杜の乙女、杜の精、杜のロマンのりん片およびカルスはカナマイシンに対する感受性が低かったため、形質転換体を作成するための選抜マーカーとしてカナマイシンは利用できないものとみられた。

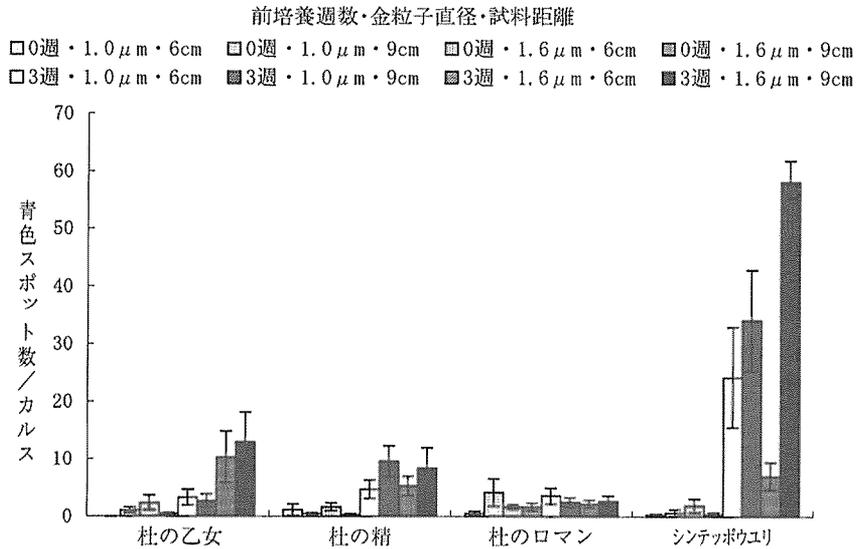
形質転換条件

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1と、ヒメサユリのりん片におけるGUS遺伝子の一過性発現について検討した結果を第6図と第8図に示す。

その結果、1りん片当たりの青色スポット数は、杜の乙女の前培養区が23.5~31.0で、無培養区の2.6~5.8に比べて多かった。杜の精では前培養の有無に関わらず0~7.0であった。杜のロマンでは前培養区が5.0~14.5で、無培養区の0~0.2に比べて多かった。三つの新品種とも、金粒子の直径および試料までの距離の影響は明瞭でなかった。また、1りん片当た



第6図 りん片におけるGUS遺伝子の一過性発現



第7図 カルスにおけるGUS遺伝子の一過性発現

りの青色スポット数は杜の乙女が最も多く、次いで杜のロマンで多く、杜の精は最も少なかった。

シンテッポウユリF-1では前培養区が0.8~11.5で、無培養区の0~0.7に比べて多かった。シンテッポウユリの品種・北岳2号のりん片にパーティクルガン法でプラスミド(pBI221)を導入した場合、1りん片当たりの青色スポット数は10日間前培養した区が無培養区に比べて多く、最大で47.4であることが報告されている⁴⁾が、これと比較すると本実験で供試したシンテッポウユリF-1ではGUS遺伝子の導入効率が低かった。ヒメサユリでは前培養区が1.1~16.5で、無培養区の0.5~2.9に比べて多かった。また、三つの新品種の両親でも金粒子の直径および試料までの距離の影響は明瞭でなかった。これらの結果を両親の結果と比較すると、杜の

精および杜のロマンのりん片におけるGUS遺伝子の導入効率は両親と同程度であったが、杜の乙女は両親に比べて高かった。

杜の乙女、杜の精、杜のロマンおよびシンテッポウユリF-1のカルスにおけるGUS遺伝子の一過性発現について検討した結果を第7図と第9図に示す。

その結果、カルスあたりの青色スポット数は、杜の乙女の前培養区が2.7~13.0で、無培養区の0~2.4に比べて多かった。杜の精では前培養区が4.7~9.6で、無培養区の0.3~1.7に比べて多かった。杜のロマンでは前培養の有無に関わらず0.5~4.2であった。三つの新品種とも、金粒子の直径および試料までの距離の影響は明瞭でなかった。また、カルスあたりの青色スポット数は杜の乙女が最も多く、

次いで杜のロマンで多く、杜の精は最も少なかった。

シンテッポウユリF-1では前培養区が7.0~58.1で、無培養区の0.3~1.9に比べて多かった。また、シンテッポウユリも三つの新品種と同様に、金粒子の直径および試料までの距離の影響は明瞭でなかった。これらの結果をシンテッポウユリの結果と比較すると、三つの新品種のカルスにおけるGUS遺伝子の導入効率率はシンテッポウユリに比べて低かった。

以上の結果、杜の乙女、杜の精、杜のロマンのりん片およびカルスにおいて、パーティクルガン法でGUS遺伝子が導入され、発現することが確認された。したがって、三つの新品種に耐病性遺伝子などを導入できる可能性があると考えられた。

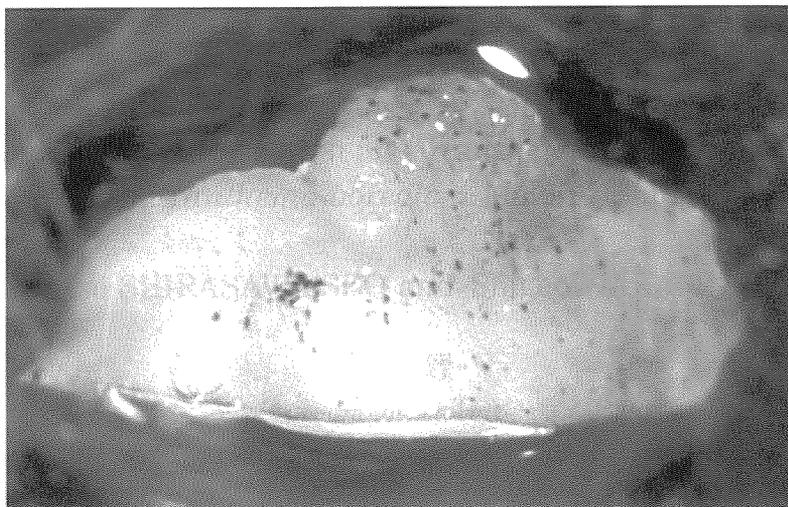
今後は、本研究で明らかとなった形質転換条件を用いて、形質転換体を獲得する必要がある。

引用文献

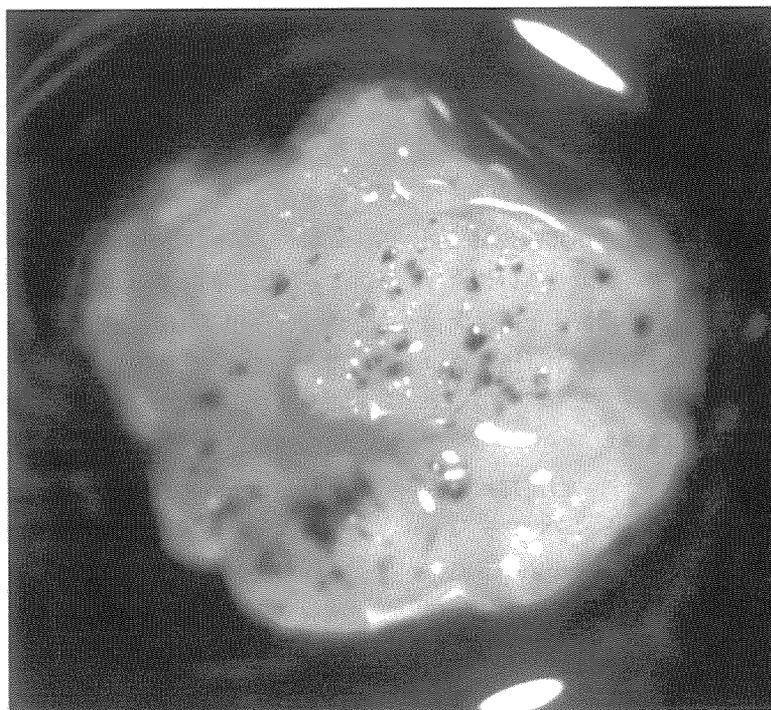
- 1) Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 : 3901-3907.
- 2) Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima and Y. Arai. 1990. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells : methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci.* 70:133-140.
- 3) Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- 4) Sanford, J. C., F. D. Smith and J. A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 217 : 483-510.
- 5) Supaibulwatana, K. and M. Mii. 1998. Induction of meristematic nodular calli from various explants of *Lilium* spp. and long term stability in plant regeneration ability and ploidy level of the calli. *Plant Biotech.* 15 : 95-102.
- 6) Suzuki, S., Y. Niimi, T. Sakakibara, K. Hosokawa, S. Yamamura and M. Nakano. 1998. Effects of several antibiotics and bialaphos on the growth and organ formation of *Lilium formosanum* calli and transient expression of the gusA gene after co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology.* 15:213-216.
- 7) 鈴木誠一・庄子孝一. 2001. シンテッポウユリとヒメサユリから育成されたユリの新品種杜の乙女・杜の精・杜のロマンの特性. 宮城農セ研報. 68 : 16-22.
- 8) Tsuchiya, T., S. Takumi and T. Shimada. 1996. Transient expression of a reporter gene in bulb scales and immature embryos of three *Lilium* species is affected by 5' upstream sequences and culture conditions. *Physiol. Plant.* 98 : 699-704.
- 9) Watad, A. A., D. -J. Yun, T. Matsumoto, X. Niu., Y. Wu, A. K. Kononowicz, R. A. Bressan and P. M. Hasegawa. 1998. Microprojectile bombardment mediated transformation of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Rep.* 17 : 262-267.

Summary

Plant regeneration and transformation system of the new lily cultivars, 'Morino-otome', 'Morino-sei' and 'Morino-roman' developed from *Lilium* \times *formolongi* and *L. rubellum* were investigated. Calli were successfully induced from bulb scales and shoot apices on media containing 1 mg/l picloram under 25°C · light or 25°C · dark conditions. Plants were regenerated from these calli on hormone free media under 25°C · light condition. Bulb scales and calli were sensitive to hygromycin. Transient expression of GUS reporter gene in bulb scales and calli was detected after particle bombardment-mediated transformation method.



第8図 りん片におけるGUS遺伝子の一過性発現（青色スポット）



第9図 カルスにおけるGUS遺伝子の一過性発現（青色スポット）