Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

園学雑．(J. Japan. Soc. Hort. Sci.) 67(6)：958-964．1998．

国内産キク品種における茎葉再分化能の差異と効率的な形質転換系の確立

高津康正・友常秀彦・霞　正一・佐久間文雄

茨城県農業総合センター生物工学研究所　319-0292　茨城県西茨城郡岩間町安居

Differences in Adventitious Shoot Regeneration Capacity among Japanese Chrysanthemum [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] Cultivars and the Improved Protocol for *Agrobacterium* -mediated Genetic Transformation

Yasumasa Takatsu, Hidehiko Tomotsune, Masakazu Kasumi and Fumio Sakuma

Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Iwama, Ibaraki 319-0292

Summary

Stem segments of 23 chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) cultivars were cultivated on MS medium containing NAA 2.0 mg・liter^{-1} and BA 0.2 mg・liter^{-1}. Among which 11 cultivars had high adventitious shoot regeneration potentials. Three of these cultivars, 'Shuhonochikara', 'New Summer Yellow' and 'Yamabiko' which were selected for transformation experiments had their regeneration potential suppressed by kanamaycin at 7.5～10.0 mg・liter^{-1}.

The stem segment explants were co-cultivated at 25 °C for 3 days with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, containing pBI121 plasmid. After co-cultivation, the explants were placed on regeneration medium, containing 7.5～10.0 mg・liter^{-1} kanamycin. The presence of the NPTII gene in the regenerated plants was confirmed by PCR-southern analysis. The transformation efficiency increased to 2.46% when the *Agrobacterium* suspension was diluted with a regeneration medium, containing 100 μM acetosyringone.

Key Words: chrysanthemum, regeneration, genetic transformation, *Agrobacterium*, acetosyringone.

緒　言

近年，外来遺伝子導入技術の進展によって，さまざまな新形質をもった植物が育成されつつある（江面ら 1997）．遺伝子導入を応用して育種を行う場合には，いくつかの解決しなければならない問題があるが，まず外植体からの茎葉再分化系の確立があげられる．とくにアグロバクテリウム（*Agrobacterium*）を利用した形質転換においてはこのことが必須の要件となる．

キクの茎葉再分化系についてはこれまでにいくつかの報告があり特定の種および系統（genotype）においては形質転換系も確立されているが（間ら，1992；De Jong ら，1995；Fukai ら，1995；Ledger ら，1991；Renou ら，1993；Yepes ら，1995），一方でキクの茎葉再分化能には著しい品種間差のあることも報告されている（De Jong ら，1993；Kaul ら，1990；Ledger ら，1991；深井ら，1987；宮崎ら，1976；柴田ら，1992；Renou ら，1993；Urban ら，1994）．また形質転換においては，報告のあるキク品種・系統およびアグロバクテリウムの系統が極めて限られていることが実用上の問題となっている．形質転換効率についても一部の系統で15.6%という報告もあるが（Fukai ら，1995），ほとんどの報告では数%以下に留まっており国内の品種では0.1%程度とされている（間，私信）．このようなことから形質転換を育種技術として利用するためには，容易に入手可能な菌株を用いてある程度の形質転換効率を得ることが是非とも必要である．

著者らは外来遺伝子導入法を利用した新たな形質をもったキクを育成することを目的として，茨城県内で栽培されている主要な輪ギクおよび小ギク（以下キクと略す）23品種・系統について，茎葉再分化能の検討を行った．また普遍的に市販されているアグロバクテリウムLBA 4404株を用いて実用的な形質転換系の確立を試みた．その結果，茎切片培養において高い茎葉再分化能をもつ11品種がスクリーニングされ，そのうち3品種において形質転換体が獲得された．さらに2.5%近い形質転換効率が得られ，今後育種技術としても利用できる可能性が示されたので報告する．

1997年9月10日　受付．1997年12月8日　受理．

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

材料および方法

1. 茎切片培養における不定芽形成率の品種間差

不定芽形成率における品種間差を調査し，高い不定芽形成能をもつ品種をスクリーニングするために，茨城県内の産地より収集したキク23品種（第1表）を供試して茎切片培養を行った．母本となる無菌植物の確立は以下のように行った．ガラスハウス内で育成したキク（*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura）の母株より採取したえき芽を含む茎を長さ2 cmに調製して，0.1%次塩素酸ナトリウム溶液で15分間滅菌し，滅菌水で3回洗浄した後，1/2 Murashige-Skoog（1/2 MS）培地（Murashige・Skoog, 1962）にindoleaceticacid (IAA) 0.2 mg・liter^{-1}およびショ糖30 g・liter^{-1}，ゲルライト3 g・liter^{-1}を添加した培地上で培養した．再生した無菌植物体をMS培地上で継代培養して，茎切片培養に供試した．

茎切片培養は，柴田ら（1992）の方法を改変して行った．すなわち無菌植物体の茎（節間部）を3 mm長に切断しさらに縦方向に二分割して茎切片を調製した．MS培地にnaphthaleneacetic acid (NAA) 2.0 mg・liter^{-1}, benzyladenine (BA) 0.2 mg・liter^{-1}またはIAA 2.0 mg・liter^{-1}, BA 0.2 mg・liter^{-1}およびショ糖30g・liter^{-1}，ゲルライト3g・liter^{-1}を添加した再分化培地（以下それぞれMNB培地およびMIB培地と略す）を調製し，9 cmシャーレに25 mlずつ分注した．茎切片を培地に切断面が接するように10～15片ずつ置床して，25 °C, 3,000 lx, 16 hr照明下で培養した．実験は時期を変えて2回反復した．それぞれ1か月後に各品種ごとの不定芽形成茎切片数を調査して茎葉再分化率を求めた．

2. 抗生物質に対する感受性

各抗生物質のキクの茎葉再分化に及ぼす影響を知るために，kanamycin (Km), hygromycin (Hyg) およびgenetecin (Gen) に対する感受性程度の調査を行った．材料には茎切片培養で高い茎葉再分化能を示したもののうち3品種（'秀芳の力', 'ニューサマーイエロー', '山彦'）を供試した．MNB培地に，Km 0/7.5/10/15 mg・liter^{-1}，またはHyg 0/2.5/5/7.5 mg・liter^{-1}，またはGen 0/5/10 mg・liter^{-1}を添加した選抜培地を調製し，9 cmシャーレに25 mlずつ分注した．茎切片を20片ずつ置床して25 °C, 3,000 lx, 16 hr照明下で培養を行った．1か月後に不定芽形成茎切片数を調査して，その数がゼロになる最低濃度を最適な選抜圧濃度と判定した．

3. 形質転換体の獲得

形質転換体獲得のために以下の実験を行った．マーカー遺伝子としてはneomycin phosphotranspherase (NPTII) 遺伝子（Hoodら，1993）を用い，プラスミドpBI 121を導入したアグロバクテリウム（*Agrobacterium tumefaciens*）LBA 4404株を供試した．供試品種は抗生物質に対する感受性の調査で用いたものと同様の3品種とした．

1）アグロバクテリウム菌液の調製法の検討

アグロバクテリウムLBA 4404株を，Km 50 mg・liter^{-1}を添加したLuria Broth (LB) 液体培地（Maniatisら，1982）で24時間振とう培養した．菌液を蒸留水またはMNB液体培地で直接約20倍に希釈し，茎切片を浸漬した後，2分間減圧処理を行った．また菌液の希釈法として①蒸留水のみ②蒸留水にacetosyringone (3', 5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) 100 μM添加③MNB培地にacetosyringone 100 μM添加の3区を設け，その効果について試験した．茎切片は感染処理後直ちに，9 cmシャーレに25 mlずつ分注したMNB培地へ切断面が接するように50片ずつ置床した．実験は処理により2～5回反復した．25 °C, 3,000 lxで3日間共存培養した後に，MNB培地にKm 7.5 mgまたは10 mg・liter^{-1}およびClaforan（cefotaxime・ヘキスト社製）250 mg・liter^{-1}を添加した選抜培地へ移植した．2週間ごとに新しい培地へ継代培養し，1か月後に再分化した不定芽由来のシュート数を調査した．得られた再分化個体はMS培地にKm 10 mg・liter^{-1}を添加した培地（MS選抜培地）上へ移植し，発根の有無を確認した．

2）形質転換体の確認

得られた再分化個体のうち選抜培地上で発根の認められたものについて，展開葉1枚を5 mm角に調製しLB固形培地上で10日間培養して，アグロバクテリウムによる汚染の有無を確認した．さらに展開葉0.2 gから改変CTAB法（向井・山本，1995）によりDNAを抽出し，NPTII遺伝子の3'および5'側の適当な配列からデザインしたプライマー（NSおよびNA）を用いたPCRおよびNPTII遺伝子をプローブとしたsouthern分析を行って，導入遺伝子の検出を試みた（NS: 5'ACAAGATGGATTGCACGCAGGT3', NA: 5'ACTCGTCAAGAAGGCGATAGAA3'）．PCRの条件は95 °C・9分，1サイクルさらに94 °C・1分，62 °C・2分，72 °C・3分，45サイクルとした．southern分析はDIG法（野村・稲澤，1994）により行い，プローブには精製したpBI 121を鋳型として上記のプライマーを用いて増幅したPCR産物を用いた．また，再分化個体のうち導入遺伝子が確認できなかった個体をエスケープと判断した．

結　果

1. 茎切片培養における不定芽形成率の品種間差

県内より収集した主要なキク23品種について茎切片

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

培養を試みた．供試した23品種のうち'精母'等5品種(21.7%)ではMNB，MIBいずれの培地でも全く再分化がみられなかったが，'クイーンエリザベス'等4品種ではいずれの培地でも高い再分化率を示し，明らかな品種間差が認められた．また，比較的不定芽形成能の高い品種として'精志'，'秀芳の力'，'精雲'，'クイーンエリザベス'，'菊娘'，'ニューサマーイエロー'，'サマーイエロー'，'桂林'(以上輪ギク)，'山彦'，'朝路'，'あすか'(以上小ギク)の11品種がスクリーニングされた．添加するオーキシンの種類に対する反応は品種により異なるが，MIB培地では再分化率が低い品種でもMNB培地では高まる場合があった．特に'秀芳の力'等の4品種では，NAAを用いた場合には50%以上の再分化率を示すにもかかわらず，IAAを用いると0%に留まった．全体としてはオーキシンとしてNAAを用いた場合により多くの品種で再分化率が高まることが明らかとなった(第1表)．　また，これらの中から産地における品種構成等を勘案して'秀芳の力'，'ニューサマーイエロー'，'山彦'の3品種を選び以後の実験に供試した．

2．抗生物質に対する感受性

茎切片培養における，各種抗生物質の再分化率に及ぼす影響を調査したところ，各品種における適当な抗生物質の選抜圧濃度は次のように判断された．'秀芳の力'：Km 7.5 mg・liter^{-1}，Hyg 5 mg・liter^{-1}，Gen 5 mg・liter^{-1}，'ニューサマーイエロー'：Km 10 mg・liter^{-1}，Hyg 5 mg・liter^{-1}，Gen 5 mg・liter^{-1}，'山彦'：Km 10 mg・liter^{-1}，Hyg 5 mg・liter^{-1}，Gen 10 mg・liter^{-1}．以上のように，各種抗生物質の種類・濃度に対する反応性にも品種により明らかな差異が認められた(第1図)．

3．形質転換体の獲得

再分化したシュートをMS選抜培地上で培養し，発根を確認することによって非形質転換体がかなり除去された．また発根の確認された個体についてPCR法により導入遺伝子の確認を試みたところ，期待される778 bp付近にDNAの増幅断片が得られた．さらにsouthern分析を行ったところ得られた断片はNPTII遺伝子であることが確認された(第2図)．PCRによる非特異的な増幅断片等は認められなかった．

供試した3品種('秀芳の力'，'ニューサマーイエロー'，'山彦')について，アグロバクテリウム菌液を蒸留水で希釈した場合には，1，8，7の再分化シュートが得られたが形質転換体は得られなかった．一方，蒸留水にacetosyringone 100 μMを添加した場合には，選抜培地上でそれぞれ11，19，17の発根個体が得られ，PCR・southern分析の結果これらのうちNPTII遺伝子を含む形質転換体はそれぞれ6，12，13個体で，外植体当たりの形質転換効率は0.90%，0.88%，1.36%に留まった．また，菌液をMNB培地で希釈してacetosyringone 100 μMを添加した場合には，選抜培地上でそれぞれ11，4，23の発根個体が得られた．PCR・southern分析の結果これらのうちNPTII遺伝子を含む形質転換体はそれぞれ3，1，5個体で，外植体当たり1.60%，1.33%，2.46%の形質転換効率が得られた(第2表)．いずれの処理区においても得られた発根個体のアグロバクテリウムによる汚染は認められなかった(データ省略)．

考　察

キクの形質転換についてはこれまでにいくつかの成功例が報告されているが，それらは特定のキク品種およびアグロバクテリウムの系統を用いた場合に限られている．また国内の園芸品種の例としては'秀芳の力'を用いた間ら(1992)の報告が唯一である．著者らはアグロバクテ

Table 1. Regeneration ability in some Japanese cultivars of chrysanthemum as affected by auxin in the stem segment culture medium.

		Regeneration rate[z] on MNB[x] medium			
		0 %	1 ～ 20 %	21 ～ 20 %	51 ～ 100 %
Regeneration rate on MIB[x] medium	0 %	Y-Shuhonokagami Seibo Oubai Spot Benigeshiki	Natsukodachi Meisei	Y-Shuhonochikara Natsuzukiyo	Seishi Shuhonochikara Asaji Seiun
	1 ～ 20 %	Momozato	Shuhoyamabuki		Asuka
	21 ～ 20 %			Natsuyasumi	
	51 ～ 100 %			Summer Yellow Keirin	Queen Elizabeth Kikumusume New Summer Yellow Yamabiko

[z] No. of segments with shoots/No. of total stem segments × 100
[x] MNB：MS + NAA 2 mg・liter^{-1} + BA 0.2 mg・liter^{-1}
MIB：MS + IAA 2 mg・liter^{-1} + BA 0.2 mg・liter^{-1}

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

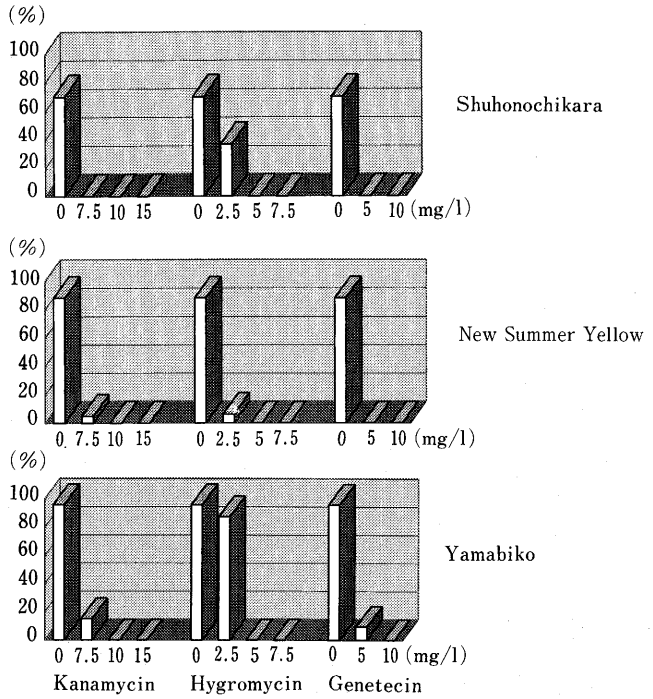

Fig. 1. Suppression of adventitious shoot regeneration from stem segments of three chrysanthemum cultivars by three antibiotics at different concentrations.

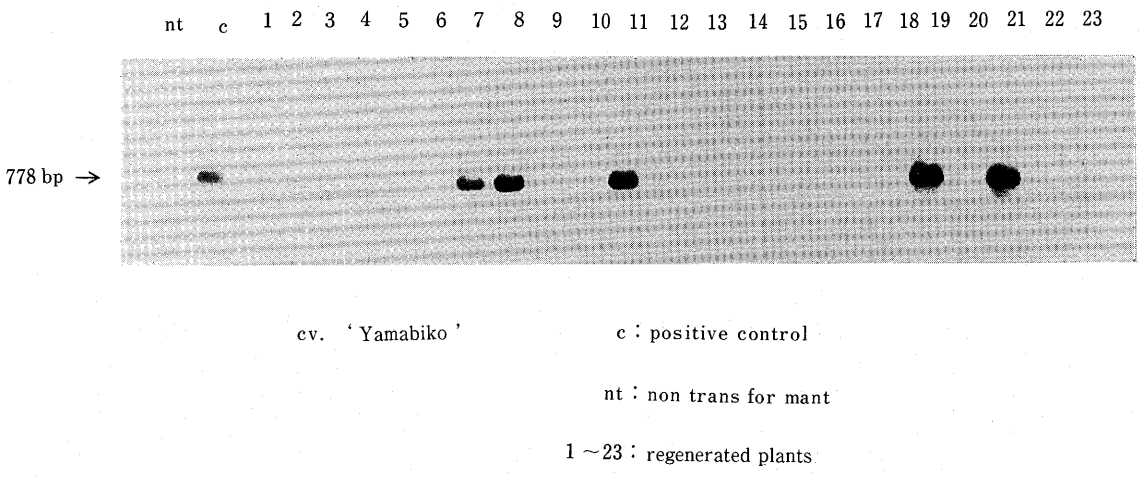

Fig. 2. Gel plate showing the presence of NPTII gene derived by PCR-southern blot analysis in some regenerated chrysanthemum plants.

リウムを利用した外来遺伝子導入法による品種育成のために，茎葉再分化能の高い国内産キク品種のスクリーニングおよび実用的な形質転換法の確立を試みた．

形質転換系に用いる外植体としては，これまでに葉片・茎切片・葉柄・小花柄等が報告されている（De Jong ら，1995 ; Renou ら，1993 ; Fukai ら，1995 ; Urban ら，1994）．一方，Kaul ら（1990）および柴田ら（1992）が確立した茎切片を用いたダイレクトな茎葉再分化系は，カルスを経由しないために再分化に要する日数が短く，体細胞変異が起こりにくいという利点がある．著者らは4品種のキクを用いて葉片と茎切片の茎葉再分化能を比較したところ，茎切片がより高い再分化能を持つことが明らかとなり（データ省略），これらのことから形質転換系に用いる外植体として茎切片を採用した．また再分化培地へ添加する植物ホルモンの種類および濃度については，国内のキク品種での検討が成されている柴田ら（1992）の方法を参考にした．

つぎに県内で栽培されている主要なキク23品種・系

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

Table 2. Effect of Agrobacterium infection on transformation efficiency in three chrysanthemum cultivars.

Treatment[z]	Cultivar	No. of stem segments (A)	No. of harvested shoots (B)	No. of rooted shoots (C)	No. of NPT II -positive shoots (D)	Efficiency (%) B/A	D/A	(B − D)/B[y]
Distilled water	Shuhonochikara	97	1	0	0	1.03	0.0	100
	New Summer Yellow	97	8	0	0	8.24	0.0	100
	Yamabiko	136	7	0	0	5.14	0.0	100
Distilled water with acetosyringone (100 μ M)	Shuhonochikara	661	13	11	6	1.96	0.90	53.8
	New Summer Yellow	1350	69	19	12	5.11	0.88	82.6
	Yamabiko	950	18	17	13	1.89	1.36	27.7
Liquid MNB medium with acetosyringone (100 μ M)	Shuhonochikara	187	26	11	3	13.90	1.60	88.4
	New Summer Yellow	75	13	4	1	17.33	1.33	92.3
	Yamabiko	203	31	23	5	15.27	2.46	83.8

[z] Agrobacterium suspension was diluted twenty times with three solutions for regeneration.
[x] Rate of non-infected shoots.

統について茎切片培養を試みたところ，外植体からの茎葉再分化率には著しい品種間差が認められ，比較的高い不定芽形成能をもつ11品種がスクリーニングされた．キクでは茎葉再分化能の品種間差が大きいことが国内外の品種について以前から指摘されており，今回の結果からもそのことが再確認された．茎切片培養に用いる培地に添加するオーキシンの種類については，NAAをIAAに代えると全く不定芽形成がみられなくなる現象がいくつかの品種でみられた．特に'秀芳の力'では不定芽形成率が，NAAを用いた場合には70%を示すにもかかわらず，IAAを用いると0%に留まった．ところで'秀芳の力'はこれまでの報告ではオーキシンの種類に関係なく約50%の不定芽形成率を示すとされている（柴田ら，1992）．このように得られた結果が異なったのは，外植体の種類もしくは培養方法の違いによるものと思われる．すなわち，柴田らは外植体としてガラス室内で生育した植物を用いているのに対し著者らの実験では無菌的に継代培養した植物を用いたこと，またIAAを用いるとすべての外植体がカルス化することが観察されたがホルモンフリーの培地に移植することなく培養を継続したことにより，シュートの再分化が誘導されなかったこと等が原因と考えられる．

また，添加ホルモンの種類・濃度およびバランスについては，オーキシン（IAAまたはNAA）をサイトカイニン（BA）の2〜10倍量添加して良い結果を得ている報告があり（間ら，1992；De Jongら，1995；Urbanら，1994），逆にBAをIAAまたはNAAの2〜10倍量添加するとした報告もある（Fukaiら，1995；Ledgerら，1991；Kaulら，1990；Renouら，1993；Yepesら，1995）．一方，オーキシンの種類についてはNAAでもIAAでも大差なしという報告もあることから（Yepesら，1995），ホルモンに対する反応性は品種・系統によってかなり異なることが推察される．さらに，抗生物質の種類および選抜圧濃度に対する反応性についても明らかな品種間差が認められたが，kanamycinに対する感受性が比較的高いという点では従来の報告と一致する結果となった（De Jongら，1994）．

さて，キクではこれまでに形質転換がいくつか報告されているが，供試菌株は報告によりさまざまである．その中でアグロバクテリウムLBA 4404株を用いた例はシマカンギク（*D. indicum* L.）におけるものが唯一で（Ledgerら，1991），栽培ギク（*D. grandiflora*）では再分化シュートは得られるものの形質転換体を得るには至っていない（Ledgerら，1991；Loweら，1993；De Jongら，1993，1994；Urbanら，1994）．本実験では，感染に際しacetosyringoneを100 μM添加することおよびkanamycin 7.5〜10.0 mg・liter^{-1}という低濃度で選抜を行うことにより，LBA 4404株を用いて比較的高い効率で形質転換体を得ることができた．

Ledgerら（1991）はLBA 4404株を用いて形質転換を試みているが，選抜に当たりkanamycin濃度を20 mg・liter^{-1}としている．さらに25 mg・liter^{-1}という比較的高濃度で，得られたシュートの発根確認を行った．キクの細胞はkanamycinに対する感受性が高く10 mg・liter^{-1}以上では再分化が著しく抑制されるとされることから（De Jongら，1994），形質転換がシマカンギクで成功したにもかかわらず栽培ギクで不成功に終わったのは，kanamycinに対する種間差により選抜圧濃度が不適当だったことが原因の一つと考えられる．ところで，acetosyringoneの添加はすでにアグロバクテリウムLBA 4404株およびAGLO株で試みられており（De Jongら，1994；Fukaiら，1995），De Jongら（1994）は本実験と同様に，acetosyringoneを100 μM添加してLBA 4404株で形質転換を行っているが形質転換体を得るには至っていない．このことは導入したプラスミドの構造の違い，またはLBA 4404株とキク供試品種との親

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

和性の違いによるものと推察されるが，原因については明らかでない．

一方，キクの抗生物質に対する感受性が高いことからアグロバクテリウムの感染に際し，抗生物質の外植体に対する影響を減ずるためにMS液体培地，液体再分化培地，蒸留水等を用いて菌液を希釈する方法が検討されている（間ら，1992；De Jongら，1995；Fukaiら，1995；Renouら，1993；Urbanら，1994）．本実験では蒸留水に比べてMNB培地で希釈した場合に，エスケープがかなりの割合で発生した．キクでは従来から形質転換実験においてエスケープが50～80%の割合で発生することが指摘されており，感染初期の一過性のNPTII遺伝子発現，転換細胞と非転換細胞間の相互作用（cross protection）または転換細胞が完全（stable）なT-DNA領域を欠いていること等が原因であろうとされている（De Jongら，1993，1994；Fukaiら，1995；Ledgerら，1991；Loweら，1993）．本実験では菌液を単に蒸留水で希釈した場合には，再分化個体はすべてエスケープと判断されたが，acetosyringoneを添加した場合にも，27.7～92.3%と高率でエスケープが発生した．しかしながら，得られた再分化シュートをKm 10 mg・liter^{-1}を含むMS培地に移植し発根の有無を確認することにより，エスケープをかなり除去することができることも明らかとなった．今回観察されたエスケープの発生原因の解明については今後の検討課題としたい．

以上のように国内産のキクについて，茎切片培養において高い不定芽形成能をもった11品種がスクリーニングされた．そのうち3品種について各種抗生物質の適当な選抜圧濃度を調査したところ，明らかな品種間差が認められ感受性も比較的高かった．また形質転換に際しては共存培養時にacetosyringoneを100 μM添加することおよびkanamaycin濃度を7.5～10 mg・liter^{-1}として選抜を行うことにより，LBA 4404株を用いて比較的高率で形質転換体が得られた．今後は，形質転換における供試菌株の種類・共存培養方法等の改良を通して形質転換効率をさらに向上させ，実用的な育種技術としての確立を目指したい．

摘　要

キクでは茎葉再分化能の品種間差およびアグロバクテリウムとの親和性の違いが著しく，これまでに海外を中心に報告されている形質転換の成功例は，ごく一部の品種およびアグロバクテリウムの系統を用いたものに限られている．そこで国内産キクを用いた実用的な形質転換系を確立するために茎葉再分化能の調査および市販のアグロバクテリウムLBA 4404株を用いた形質転換実験を行った．主要な23品種・系統のキクについて茎切片培養を試みたところ不定芽形成率には著しい品種間差があることが認められたが，比較的高い不定芽形成率を示す11品種がスクリーニングされた．その中の3品種（'秀芳の力'，'ニューサマーイエロー'，'山彦'）について茎葉再分化に及ぼす各種抗生物質の影響を調査したところ適当な選抜圧濃度が明らかとなった（それぞれkm 7.5/10/10 mg・liter^{-1}）．さらに上記3品種を用いてアグロバクテリウムLBA 4404株を用いて形質転換実験を試みたところ，アグロバクテリウムの感染に際しacetosyringoneを100 μMを添加することにより，NPTII遺伝子を発現する形質転換体が最高2.46%の効率で得られた．

謝　辞　本研究を行うに当たり，農水省野菜茶業試験場間竜太郎博士には有益なご助言を頂いた．また当研究所長西村繁夫博士には本文のご校閲を頂いた．ここに深く御礼申し上げます．

引用文献

間　竜太郎・田部井豊・平井正志・柴田道夫．1992．アグロバクテリウムを用いたキク形質転換体の作出．育雑．42（別2）：270-271.

De Jong, J., W. Rademaker and M. F. Wordragen. 1993. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell,Tissue and Organ Cult. 32 : 263-270.

De Jong, J., M. M. J. Mertens and W. Rademaker. 1994. Stable expression of the GUS reporter gene in chrysanthemum depends on binary plasmid T-DNA. Plant Cell Rep. 14 : 59-64.

De Jong, J., W. Rademaker and K. Ohishi. 1995. Agrobacterium-mediated Transformation of Chrysanthemum. Plant Tissue Cul. and Biotech. 1 : 38-42.

江面　浩・人見綾子・東　克己・佐藤隆英・窪田　満．1997．メロンへのACC合成酵素アンチセンス遺伝子の導入．育雑．47（別1）：163.

Fukai, S., J. De Jong and W. Rademaker.1995. Efficient genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) using stem segments. Breeding Science 45 : 179-184.

深井誠一・陳　忠英・大江正温．1987．キクの葉片培養におけるシュート形成に関する品種間差異．大阪農技セ研報．24 : 55-58.

Hood, E. E., S. B. Gelvin, L. S. Melchers and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Research 2 : 208-218.

Kaul, V., R. M. Miller, J. F. Hutchinson and D. Richards 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev(syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 21 : 21-30.

Ledger, S. E., S. C. Deroles and N. K. Given. 1991. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Cell Rep. 10 : 195-199.

Lowe, J. M., M. R. Davey, J. B. Power and K. S. Blundy. 1993. A study of some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 33 :

NII-Electronic Library Service

Japanese Society for Horticultural Science (JSHS)

171-180.
Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor. New York.
宮崎貞巳・田代洋丞・島田恒治. 1976. キクの組織培養（第1報）. 佐賀大農彙. 40 : 31-44.
向井 譲・山本直樹. 1995. 植物の PCR 実験プロトコール. p. 54-56. 秀潤社. 東京.
Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
野村慎太郎・稲澤譲治. 1994. 脱アイソトープ実験プロトコール. p. 35-43. 秀潤社. 東京.
Renou, J. P., P. Brochard and R. Jalouzot. 1993. Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. Plant Science 89 : 185-197.
柴田道夫・間 竜太郎・池田 広・清水明美. 1992. キクの茎切片からの不定芽形成能の品種・種間差. 育雑. 42 (別 2) : 556-557.
Urban, L. A., J. M. Sherman, J. W. Moyer and M. E. Daub. 1994. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium* -mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). Plant Science 98 : 69-79.
Yepes, L. M., V. Mittak, S. Z. Pang, C. Gonsalves, J. L. Slightom and D. Gonsalves. 1995. Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted wilt virus. Plant Cell Rep. 14 : 694-698.

NII-Electronic Library Service