

ジベレリン 2-オキシダーゼ遺伝子を過剰発現した矮化ファレノプシスの作出

チンドンポー・三位正洋
千葉大学 〒271-8510 千葉県松戸市松戸 648 番地

Dwarf *Phalaenopsis* plants produced by over-expression of a gibberellin 2-oxidase gene

Chin DP and M. Mii
Chiba University, Matsudo, Chiba 271-8510

Transgenic plants over-expressing of the catabolic enzyme of gibberellins, GA 2-oxidase gene from *Phalaenopsis* (*PhGA2ox*) were produced by *Agrobacterium*-mediated transformation method with the aim of generating the dwarf inflorescence in *Phalaenopsis*. PLBs from liquid culture were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strains EHA101 (pBI-H-P35PhGx) or EHA101 (pBIH-PhGa-PDB) that harbors GA 2-oxidase, hygromycin phosphotransferase and barnase genes. 9 and 34 independent transgenic plants were obtained from each construct, respectively. The plantlets derived from both constructs exhibited short leaf phenotypes compared to untransformed plants probably by reducing amounts of bioactive GA in these plants. RT-PCR confirmed the expression of *PhGA2ox* in hygromycin-resistant plants

緒言

ファレノプシスはアジアを中心に広く栽培されているが、その大部分は鉢物として出荷されている。ファレノプシスの鉢物生産は寄せ植えでの出荷割合が大きく、全体のバランスを良くするために花茎長の短い矮性の品種が必要となっている。また、単鉢として出荷する場合も、日本の住宅事情にあった小型の品種開発に対する潜在的な需要は大きい。一部の生産者は花茎の短い株を生産するために矮化剤を使用しているのが現状であるが、葉の萎縮や生育への悪影響など問題が多い。従って、育種による矮性品種の開発は重要な問題となっている。

矮性の突然変異体は様々な植物で見つかり、その大半はジベレリン(GA)の生合成に関与する遺伝子の突然変異による機能喪失が原因とされている。たとえば、イネのGA生合成遺伝子群のGA20位酸化酵素遺伝子(*OsGA20ox*)はGA生合成経路の主要酵素をコードし、遺伝子の欠損株では半矮性の表現型を示している(Oikawa et al. 2004)。一方、内生GAを分解する酵素遺伝子である*GA2ox*遺伝子は様々な植物から単離されている(Thomas et al. 1999, Busov et al. 2003, Lo et al. 2008)。この遺伝子を過剰発現させた場合にも、内生のGAレベルが低下し、矮性となることが期待される。実際、イネの*OsGA20ox1*遺伝子を茎頂に特異的に発現させた形質転換イネは、活性型のGAが低下し、シュートの伸長が阻害された(Sakamoto et al. 2001)。また、Dijkstraら(2008)の報告ではベニバナインゲンに由来する*GA2ox*遺伝子をナス科植物に導入することにより矮化した形質転換体の作出に成功した。

本研究では内生GAを変化させて花茎の短いファレノプシスをつくるために*GA2ox*遺伝子を恒常的に発現する形質転換体の作出を試みた。

材料と方法

植物材料

ファレノプシス Wedding Promenade の PLB を液体 ND (Tokuhara and Mii 1993) 培地 (10 g/l maltose, NAA 0.1 mg/l, BA 1 mg/l) で1カ月ごとに継代を繰り返し、暗黒条件下で維持した。

Agrobacterium 菌株と接種

A. tumefaciens EHA101 (pBI-H-P35PhGx) および EHA101 (pBIH-PhGa-PDB) を用いた(図1)。ファレノプシスの PLB を接種する2日前に新鮮な培地 (100 ml のフラスコに 40 ml の培地を含む) に移し、液体 LB 培地で約20時間培養した菌株を 4 ml 加え、4 時間浸漬接種を行った。接種処理後 100 μM の acetosyringone を添加した NDM 固形培地で3日間、20℃、暗黒下で共存培養を行った。その後、5 mg/l meropenem を添加した NDM 液体培地で洗浄し、10 mg/l meropenem、20 mg/l hygromycin を添加した固形培地(選抜培地)に移し、選抜を行った。

RT-PCR 解析

順化した植物の葉から Berendzen ら (2005) の方法によって RNA の抽出および RT-PCR を行った。PCR 反応は、94℃ の変性反応を 30 秒、55℃ のアニーリング 30 秒、72℃ の伸長反応を 30 秒とし、合計 38 サイクルを *PhGA2ox* 特異的なプライマーである 5'-CGATTCTTTGCAGGTGCTTACG-3' と

5 -ACAGCGGCAAAGGAGCTACTCT-3 で行った。



図1 T-DNA の構造
(上)pBI-H-P35PhGx
(下)pBIH-PhGa-PDB

結果と考察

選抜培地に置床後、約1週間目から PLB が徐々に褐変し、大部分は約2ヶ月で完全に枯死したが、一部の PLB ではハイグロマイシン耐性を示す2次的な PLB の形成が見られた。それぞれの菌株を約 3 g の PLB に接種した結果、pBI-H-P35PhGx と pBIH-PhGa-PDB ではそれぞれ 9 および 34 個体のハイグロマイシン耐性 PLB が得られた。その後、発根した植物を順化し、閉鎖系インキュベーター内で栽培した。

本研究で実験に用いたファレノプシス Wedding Promenade は3倍体であるが、培養中に自然倍加した個体は稔性を持つことが以前の実験でわかっている。従って、倍加した形質転換体の出現を想定し、それを雄性不稔にするために pBIH-PhGa-PDB では RNA 分解酵素遺伝子である *barnase* が含まれている。今後人為的に倍加した個体を作成し、花粉稔性について調べる予定である。

現在、一部の形質転換植物から花茎の形成が見られており、その長さを非形質転換体と比較した。その結果、形質転換体のほうは花茎が短いことを確認できたが、非形質転換体と比べて花茎の伸長が遅い傾向がみられた。このような現象は矮化剤を使用した時にも確認されているようである。

さらにそれぞれのコンストラクトに由来するハイグロマイシン耐性植物を3個体ずつランダムに選び、RT-PCRを行った。図3に示すようにすべての個体から *PhGA2ox* 遺伝子の発現が認められた。これに対し、非形質転換体の葉からは *PhGA2ox* の mRNA の発現が見られなかった。この結果から CaMV35S プロモーターを用いたことにより本来発現しない葉でも *GA2ox* 遺伝子の発現によって葉の長さが減少したと考えられた。このように花茎の長さだけでなく、株全体の小型化は実際の生産栽培上、面積あたりの栽培できる数が増やすことができ、運搬上にも有利であると考えられる。また、葉の重なりが少ないため、光合成効率の向上と病気の低減にも役立つ可能性がある。今後、目的に応じたプロモーターを用いることによって、より栽培しやすいファレノプシスシステムの開発が期待

できる。

本研究では、*GA2ox* 遺伝子をファレノプシスで過剰発現した形質転換植物の作出に成功した。これらの形質転換体は非形質転換体と比べて葉と花茎の長さに明らかな違いが見られた。今後はまだ花の咲いていない形質転換体を含め、さらに多くの個体から生育や開花時期、葉と花茎の長さなど総合的に比較をする必要がある。



図2 順化して2.5号ポットで栽培しているファレノプシス

(左)形質転換体
(右)非形質転換体

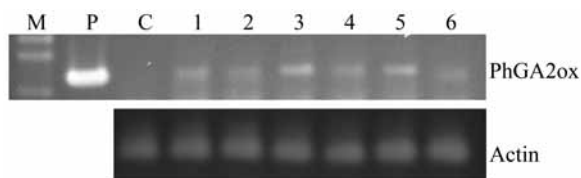


図3 RT-PCR 解析

M:サイズマーカー(x174/ *Hae*III)
P:ポジティブコントロール(プラスミド)
C:非形質転換体
1-3: pBI-H-P35PhGx 由来形質転換体
4-6: pBIH-PhGa-PDB 由来形質転換体

摘要

矮性のファレノプシスをつくる目的で、アグロバクテリウム法を用いて形質転換を行い、ファレノプシス由来の GA 2-oxidase (*PhGA2ox*) 遺伝子を過剰発現したファレノプシスを作成した。液体培地で増殖と維持をしているファレノプシスの PLB を *PhGA2ox*, *hpt* および *barnase* 遺伝子を保有する *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (pBI-H-P35PhGx) もしくは EHA101 (pBIH-PhGa-PDB) に接種した。それぞれのコンストラクトから 9 および 34 の独立した形質転換体を得られた。非形質転換体と比べ、形質転換体

の葉は短くなり、活性型のジベレリンが減少した結果と考えられた。また、導入遺伝子の発現は RT-PCR で確認できた。

参考文献

- Berendzen K, Searle I, Ravenscroft D, Koncz C, Batschauer A, Coupland G, Somssich IE, Ulker B (2005) A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* 1:4
- Busov VB, Meilan R, Pearce DW, Ma C, Rood SB, Strauss SH (2003) Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene (*GA 2-oxidase*) from poplar that regulates tree stature. *Plant Physiology* 132: 1283-1291
- Dijkstra C, Adams E, Bhattacharya A, Page AF, Anthony P, Kourmpetli S, Power JB, Lowe KC, Thomas SG, Hedden P, Phillips AL, Davey MR (2008) Over-expression of a gibberellin 2-oxidase gene from *Phaseolus coccineus* L. enhances gibberellin inactivation and induces dwarfism in *Solanum* species. *Plant Cell Rep* 27: 463 470
- Lo SF, Yang SY, Chen KT, Hsing YI, Zeevaart Jan AD, Chen LJ, Yu SM (2008) A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell* 20: 2603 2618
- Oikawa T, Koshioka M, Kojima K, Yoshida H, Kawata M (2004) A role of *OsGA20ox1*, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Mol Biol* 55: 687-700
- Sakamoto T, Kobayashi M, Itoh H, Tagiri A, Kayano T, Tanaka H, Iwahori S, Matsuoka M (2001) Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiology* 125: 1508-1516
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4698 4703
- Tokuhara K, Mii M (1993) Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep* 13: 7 11