

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 274954

(P 2 0 0 3 - 2 7 4 9 5 4 A)

(43)公開日 平成15年9月30日(2003.9.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C12N 15/09		A01H 1/00	A 2B030
A01H 1/00		C12N 15/00	A 4B024
C12N 5/10		5/00	C 4B065

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全7頁)

(21)出願番号 特願2002 - 88758(P 2002 - 88758)

(22)出願日 平成14年3月27日(2002.3.27)

(71)出願人 598169457

奈良先端科学技術大学院大学長
奈良県生駒市高山町8916 - 5

(71)出願人 000005119

日立造船株式会社
大阪府大阪市住之江区南港北1丁目7番89号

(71)出願人 000003609

株式会社豊田中央研究所
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1

(74)代理人 100060874

弁理士 岸本 瑛之助 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コーヒー属植物の形質転換法

(57)【要約】

【課題】 コーヒー属植物の形質転換不定胚を効率的に誘導し増殖させて、形質転換コーヒー属植物を大量に創出するコーヒー属植物の形質転換法を提供する。

【解決手段】 コーヒー属植物の切断組織片をアグロバクテリウム細菌に感染させて外来遺伝子を導入することにより形質転換コーヒーを得るに当たり、アグロバクテリウム細菌感染の前に、フェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地で切断組織片を前培養する。植物ホルモンであるフェニルウレアタイプのサイトカイニンとしては、4 - C P P U (N - 2 - クロロ - 4 - ピリジル - N - フェニルウレア) または T D Z (チジアズロン) が好ましい。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コーヒー属植物の切断組織片をアグロバクテリウム細菌に感染させて外来遺伝子を導入することにより形質転換コーヒーを得るに当たり、アグロバクテリウム細菌感染の前に、フェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地で切断組織片を前培養することを特徴とするコーヒー属植物の形質転換法。

【請求項 2】 フェニルウレアタイプのサイトカイニンが 4 - C P P U (N - 2 - クロロ - 4 - ピリジル - N - フェニルウレア) または T D Z (チジアズロン) である請求項 1 記載のコーヒー属植物の形質転換法。

【請求項 3】 コーヒー属植物がコーヒー・アラビカ種 (*Coffea arabica*)、コーヒー・カネフォラ種 (*Coffea canephora*)、コーヒー・リベリカ種 (*Coffea liberica*) またはコーヒー・デウエブレイ種 (*Coffea dewevrei*) である請求項 1 または 2 記載のコーヒー属植物の形質転換法。

【請求項 4】 切断組織片が葉の切断組織片である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のコーヒー属植物の形質転換法。

【請求項 5】 培地が M S 培地、B 5 培地またはそれらの改変培地である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のコーヒー属植物の形質転換法。

【請求項 6】 培地中のフェニルウレアタイプのサイトカイニンの濃度が 0 . 1 ~ 4 0 μ M である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のコーヒー属植物の形質転換法。

【請求項 7】 前培養を 5 ~ 3 0 日行う請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のコーヒー属植物の形質転換法。

【請求項 8】 さらに、フェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地、または、フェニルウレアタイプのサイトカイニンおよびオーキシンを加えた培地に切断組織片を移植して培養する請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のコーヒー属植物の形質転換法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、コーヒー形質転換方法に関し、より詳しくはコーヒー属植物の形質転換不定胚を効率的に誘導し増殖させて、形質転換コーヒー属植物を大量に創出する方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【発明の背景】コーヒーに含まれるプリンアルカロイドの一種であるカフェインは、覚醒作用や心機能の増進といった効果を有する一方で、不眠・動機・めまいなどをきたす副作用を有する。そのため、カフェインレスコーヒーの需要が高く、従来は主に有機溶媒抽出など物理化学的な分離手法によりこれを生産していた。しかし、この方法では生産コストがかかる上に、コーヒー本来の味・香りが損なわれてしまう難点があり、新しいカフェインレスコーヒーの創出技術開発が望まれている。また、商業用コーヒー品種の多くは選抜された優良形質個体の

モノカルチャーであり、高品質品種の需要は高い。さらに、病虫害や除草剤に高い抵抗性を示す新品種の創出も望まれている。

【 0 0 0 3 】

【従来の技術】コーヒー属植物の育種は、元来、交配による優良品種の選抜、種子繁殖あるいは接木による増殖を主流としている。しかし交配選抜による育種は長い年月を要し、コーヒー種子は貯蔵条件により急激に発芽率低下をきたす。接木による増殖は優良形質品種のクローン増殖に有効であるが、広い育種場の確保や台木の更新などが必要となる。

【 0 0 0 4 】その後、選抜・交配育種に替わるコーヒー属植物の育種技術として組織培養技術が開発されてきた (Staritsky, Acta Bot Neerl, 19: 509-514, 1970; Berthouly and Etienne, Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 5, Kluwer:259-288, 1999)。この技術によれば、栄養成分や植物ホルモンなど植物の成長を制御する物質を組み合わせた至適な培地中でコーヒー属植物の一部組織 (例えば葉の切断組織片) を培養することにより、多数の植物体を得ることができる。近年、遺伝子組換え技術により形質転換植物を創出することが可能になり、コーヒー属植物においても形質転換例が幾つか報告されている (Spiral et al., Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.44, Transgenic Trees, Springer-Verlag: 55-76, 1999)。これによると、コーヒー属植物の形質転換法は、主に、最初に①カルス、②不定胚形成細胞 (不定胚を形成する能力のある細胞であって、通常はエンブリオジェニックカルス、あるいはエンブリオジェニックセルなどと定義される)、あるいは③不定胚と呼ばれる培養細胞塊 (①から③を総称する用語として定義される) を誘導し、次にこれを充分量増殖させ、その後アグロバクテリウム法により形質転換を行い、形質転換細胞を選抜した後に、形質転換植物を得る。この方法は、植物体分化能力の高い培養細胞塊誘導・増殖の難易、すなわち材料によって誘導・増殖率がばらつくこと (Berthouly and Michaux-Ferriere, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 169-176, 1996) や、培養細胞塊の誘導・増殖に時間がかかること、さらに形質転換効率に左右されること等のため、必ずしも実用的な方法とは言えない。

【 0 0 0 5 】

【発明の課題】上述のような状況下において、実用レベルのコーヒー分子育種を進めるためには、さらに汎用性の高く簡便な形質転換技術開発が望まれる。

【 0 0 0 6 】本発明は、組織培養および形質転換の技術を応用した新しいコーヒー属植物の育種技術を提供すること、より詳しくは、コーヒー属植物の形質転換不定胚を効率的に誘導し増殖させて、形質転換コーヒー属植物を大量に創出するコーヒー属植物の形質転換法を提供することを目的とし、ひいてはコーヒーよりカフェイン合

成酵素関連遺伝子の発現を抑制することによりカフェイン含量の少ないコーヒー属植物を創出することを企図とするものである。

【 0 0 0 7 】

【課題の解決手段】本発明によるコーヒー属植物の形質転換法は、コーヒー属植物の切断組織片をアグロバクテリウム細菌に感染させて外来遺伝子を導入することにより形質転換コーヒーを得るに当たり、アグロバクテリウム細菌感染の前に、フェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地で切断組織片を前培養することを特徴とする。

【 0 0 0 8 】植物ホルモンであるフェニルウレアタイプのサイトカイニンとしては、4 - C P P U (N - 2 - クロロ - 4 - ピリジル - N - フェニルウレア) または T D Z (チジアズロン) が好ましい。

【 0 0 0 9 】本発明による形質転換法が適用できるコーヒー属植物は、世界のマーケットで需要の高いコーヒー種であるコーヒー・アラビカ種 (*Coffea arabica*) およびコーヒー・カネフォラ種 (*Coffea canephora*) の外、コーヒー・リベリカ種 (*Coffea liberica*) およびコーヒー・デウブレレイ種 (*Coffea dewevrei*) であってもよい。

【 0 0 1 0 】コーヒー属植物の切断組織片は、好ましくは新葉、特に好ましくは枝先端の第一展開葉の切断葉組織片である。

【 0 0 1 1 】好ましい培地は、M S 培地、B 5 培地またはそれらの改変培地である。培地中のフェニルウレアタイプのサイトカイニンの濃度は、好ましくは 0 . 1 ~ 4 0 μ M、より好ましくは 0 . 5 ~ 2 0 μ M、最も好ましくは 1 ~ 1 0 μ M である。

【 0 0 1 2 】前培養の期間は好ましくは 5 ~ 3 0 日、より好ましくは 7 ~ 1 4 日である。

【 0 0 1 3 】フェニルウレアタイプサイトカイニン含有培地での培養の後、さらに、フェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地、または、フェニルウレアタイプのサイトカイニンおよびオーキシンを加えた培地に切断組織片を移植して培養することが好ましい。

【 0 0 1 4 】本発明方法により、フェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地で切断組織片を前培養することによって、切断面の細胞分裂を促進することができる。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】以下、本発明方法を詳しく説明する。

【 0 0 1 6 】(1) コーヒー属植物組織、好ましくは新葉、特に好ましくは枝先端の第一展開葉を採取後、滅菌処理し (例えば、採取物を 7 0 % エタノール中に 1 分間、次いで 2 % 次亜塩素酸水溶液中に 1 0 分間浸漬する。この浸漬により滅菌はほぼ 1 0 0 % 達成される)、滅菌組織を例えば 2 ~ 2 0 mm 角に切断する。

【 0 0 1 7 】(2) 各種栄養成分を含む液体あるいは固体培地、例えば M S 培地 (Murashige, *Physiol. Plant* 1 5: 473-497, 1962) や B 5 培地 (Gamborg, *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158, 1968)、あるいはそれらの改変培地に、植物ホルモンとして、フェニルウレアタイプのサイトカイニン (4 - C P P U : N - 2 - クロロ - 4 - ピリジル - N - フェニルウレアまたは T D Z : チジアズロン) を添加する。改変培地は、例えば、無機塩類のみを通常の濃度から 1 / 2 に低下させた改良 M S 培地 (modified 1/2 MS: 以下 m 1 / 2 MS と略記する) である。植物ホルモンの濃度は、好ましくは 0 . 1 ~ 4 0 μ M、より好ましくは 0 . 5 ~ 2 0 μ M、最も好ましくは 1 ~ 1 0 μ M である。この培地にショ糖を好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 g / l、より好ましくは 2 0 ~ 5 0 g / l 添加し、pH を至適値例えば 5 . 6 ~ 5 . 8 に調節した後、培地固化剤を加える (以下、固体培地とはゲランガムで固化した培地をいう。また培地とは、特にことわりの無い限りは固体培地をいう。)。培地固化剤としてはゲランガムが好ましく、その添加量は 2 ~ 4 g / l である。その後、この培地を高圧高温条件下で滅菌する。この滅菌条件は、好ましくは温度 1 1 5 ~ 1 2 5 、 1 0 ~ 2 0 分、具体的には温度 1 2 1 、期間 1 5 分である。

【 0 0 1 8 】次いで、この滅菌培地に葉切断組織片を植え付け、培養する。

【 0 0 1 9 】培養条件は、従来のコーヒー属植物組織培養 (例えば Berthouly and Michaux-Ferriere, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 169-176, 1996) で用いられている条件と同じであってよく、例えば温度 2 5 ~ 2 8 、期間 3 0 日である。この培養は好ましくは暗所で行う。この培養は、巨視的に細胞分裂の促進、すなわち培養細胞塊の誘導が確認できる程度の期間 (約 5 から 3 0 日間)、継続して行うことが望ましい。

【 0 0 2 0 】(3) その後、好ましくは、上記と同じ組成の m 1 / 2 MS 培地、または、上記と同じ組成にオーキシンの 1 種である 2 , 4 - D : 2 , 4 - ジクロロフェノキシ酢酸を 0 . 1 μ M 添加した m 1 / 2 MS 培地 (すなわち [4 - C P P U] + [2 , 4 - D] の組み合わせ) に、もしくは、前者の培地ついで後者の培地に、上記組織片を移植して培養する。この追加培養の培養条件も、従来のコーヒー属植物組織培養の条件と同じであってよく、例えば温度 2 5 ~ 2 8 、期間 3 0 日である。この培養も好ましくは暗所で行う。

【 0 0 2 1 】こうして、コーヒー属植物の切断組織片をフェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地で前培養することによって、組織片の切断部で細胞分裂が大幅に促進され、多量の不定胚形成組織、カルス、培養細胞塊が形成される。

【 0 0 2 2 】(4) こうして得られた前培養物をアグロバクテリウム法による遺伝子導入操作に供する。アグロバクテリウム法による遺伝子導入は常法によって行ってよ

い。植物組織への外来遺伝子導入はアグロバクテリウムのバイナリーベクター法により行うことができる。アグロバクテリウム細菌およびベクターには多くの種類があり、それらを適宜用いることができるが、コーヒー属植物の形質転換に有効なアグロバクテリウム細菌として用いられている (Hatanaka et al., Plant Cell Rep. 19: 106-110, 1999) アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の 1 種である E H A 1 0 1 (Hood et al., J. Bacteriol 168: 1291-1301, 1986) が好ましい。遺伝子導入用のベクターとして p I G 1 2 1 - H m (= p B I H 1 - I G) (Ohta et al., Plant Cell Physiol. 31: 805-831, 1990) およびその改良ベクターである p B I H 1 - G F P が好ましい。p I G 1 2 1 - H m は N O S プロモーターによって制御されるカナマイシン耐性遺伝子、植物において強力な転写活性を示すプロモーターであるカリフラワーモザイクウィルス 3 5 S プロモーター (C a M V 3 5 S) によって制御されるイントロンを含む G U S (- グルクロニダーゼ) 遺伝子、およびハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれたベクターである。したがって、これら 3 つの遺伝子が植物に組み込まれる。この場合ターミネーターとしては N O S ターミネーターが好ましい。改良ベクター p B I H 1 - G F P は、イントロンを含む G U S 遺伝子を制限酵素で切断した後、G F P (Green Fluorescent Protein: グリーンフルオレセントプロテイン) 遺伝子を新たに組み込んだベクターである。コーヒー属植物への遺伝子導入に先立ち、ベクター: p I G 1 2 1 - H m および p B I H 1 - G F P をエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム細菌: E H A 1 0 1 に組み込む。ベクターを組み込んだアグロバクテリウム細菌を抗生物質であるカナマイシンおよびハイグロマイシンを加えた培地で増殖させ、アグロバクテリウム懸濁液を調製する。

【0023】この懸濁液に上記前培養葉切断組織を浸漬し、アグロバクテリウム細菌に感染させる。浸漬時間は好ましくは 15 ~ 30 分である。水分除去後、アセトシリンゴン (遺伝子発現誘導剤) を加えた固体 m 1 / 2 M S 培地 (4 - C P P U を好ましくは約 1 μ M および 2 , 4 - D を好ましくは約 0 . 1 M μ 含有) で上記葉切断組織を培養することが好ましい。

【0024】(5) アセトシリンゴン含有培地で培養後の葉切断組織を、アグロバクテリウム細菌の除菌剤としてセフォタキシンを添加した液体 m 1 / 2 M S 培地で洗浄し、セフォタキシンと抗生物質としてハイグロマイシンを加えた固体 m 1 / 2 M S 培地 (4 - C P P U を好ましくは約 1 μ M および 2 , 4 - D を好ましくは約 0 . 1 M μ 含有) で培養する。次いでセフォタキシンを除き、抗生物質を添加した培地で培養する。以後、これを同一組成の培地 (抗生物質濃度やホルモン条件は適宜改良する必要があるので、改変培地を用いてもよい) に移植す

る。こうして、順次形質転換体を得る。

【0025】

【実施例】本発明を下記の実施例により具体的に説明する。

【0026】実施例 1

(1) 温室内で栽培しているコーヒー属植物 (カネフォラ種) の鉢植え個体から、新葉を採取し、滅菌処理し、クリーンベンチ内で約 7 mm 角に切断し、30 個の葉切断組織片を得た。滅菌操作では、採取葉を 70 % エタノール中に 1 分間、次いで 2 % 次亜塩素酸水溶液中に 10 分間浸漬した。

【0027】(2) m 1 / 2 M S 培地にフェニルウレアタイプのサイトカイニンの 1 種である 4 - C P P U (1 μ M) を添加し、さらにショ糖を 30 g / l 添加し、pH を 5 . 7 に調節した後、培地固化剤としてゲランガムを 3 g / l 加えた。この培地を 1 2 1 で 20 分間高温条件下で滅菌した。

【0028】この滅菌 m 1 / 2 M S 培地に上記葉切断組織片を植え付け、その後 10 日間、25 で暗黒条件下に培養した。この培養により、全ての葉切断組織片において、巨視的に細胞分裂の促進、すなわち培養細胞塊の誘導を確認した。

【0029】(3) こうして得られた前培養物を、アグロバクテリウムのバイナリーベクター法による植物組織への外来遺伝子導入操作に供した。アグロバクテリウム細菌としてアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) の 1 種である E H A 1 0 1 を用い、ベクターとして改良ベクター p B I H 1 - G F P を用いた (前培養物 30 個のうち 15 個)。このベクターをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム細菌 E H A 1 0 1 に組み込んだ。

【0030】ベクターを組み込んだアグロバクテリウム細菌を抗生物質であるカナマイシンおよびハイグロマイシンを 100 mg / l の濃度で含む培地で増殖させ、600 nm における吸光度約 0 . 5 のアグロバクテリウム懸濁液を調製した。

【0031】この懸濁液に上記前培養葉切断組織を 30 分間浸漬し、アグロバクテリウム細菌に感染させた。次いで滅菌したる紙上で葉切断組織から水分を除いた後、アセトシリンゴン (遺伝子発現誘導剤) 50 mg / l を含む固体 m 1 / 2 M S 培地 (4 - C P P U を 1 μ M および 2 , 4 - D を 0 . 1 M μ 含有) で上記葉切断組織を 1 日培養した。

【0032】(4) アセトシリンゴン含有培地で培養後の葉切断組織を、アグロバクテリウム細菌の除菌剤としてセフォタキシン 300 mg / l を添加した液体 m 1 / 2 M S 培地で洗浄した後、セフォタキシン 300 mg / l と抗生物質としてハイグロマイシンを 50 mg / l の濃度で加えた固体 m 1 / 2 M S 培地 (4 - C P P U を 1 μ M および 2 , 4 - D を 0 . 1 M μ 含有) で培養した。次

いでセフォタキシンを除き、抗生物質を100mg/lの濃度で添加した培地で約2ヶ月間培養した。以降はこれを3週間毎に同一組成の培地に移植した。こうして、順次抗生物質耐性を示す形質転換体が得られた。

【0033】このように不定胚形成細胞が抗生物質耐性を示すことにより、ハイグロマイシン耐性遺伝子が導入され発現したことが確認された。また、図2に示すように、GFP遺伝子を導入した形質転換不定胚形成細胞を蛍光照射の顕微鏡下で観察すると、緑色の蛍光を発しており、この点からもGFP遺伝子が発現していることが確認された。

【0034】実施例2

実施例1の工程(2)の後に、上記組織片を移植して20日間、25℃で暗黒条件下に追加培養した。こうして得られた前培養物を実施例1の工程(4)に供した。上記の点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0035】実施例3

植物ホルモンとして、フェニルウレアタイプのサイトカイニンの1種であるTDZ(ジアズロン)を用いた点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0036】実施例4

前培養物30個のうち残りの15個について、ベクターとして、pBIH1-GFPの代わりにpIG121-Hmを用いた点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0037】実施例5

コーヒー属植物として、カネフォラ種の代わりにアラビカ種のものを用いた点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0038】比較例1

植物ホルモンとして、アデニンタイプのサイトカイニンの1種である2ip(2-イソペンテニルアデニン)を用いた点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0039】比較例2

植物ホルモンとして、アデニンタイプのサイトカイニンの1種であるBA(N⁶-ベンジルアデニン)を用いた点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0040】比較例3

植物ホルモンを添加してない培地において前培養を行った点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0041】比較例4

対照条件として、実施例1の工程(1)で得られた葉切断組織片を前培養せずにそのまま実施例1の工程(4)に供した点を除いて、実施例1と同じ操作を行った。

【0042】評価試験

a) 細胞分裂促進効果

培養細胞塊の誘導に要する期間を比較した。この結果を表2に示す。表2から分かるように、2ipを用いた場合には培養細胞塊を巨視的に確認するまでに概ね2~3ヶ月を要するのに対して、4-CPPUによって10日から30日以内にほぼ全ての葉切断組織片より培養細胞塊が誘導された。

【0043】b) 実施例および比較例における前培養の

前後の葉切断組織片の生重量を、表1にまとめて示す。また、前培養を行う前の葉切断組織片の平均生重量を100とした時の、前培養後の葉切断組織片の生重量の比を図1に示す。表1および図1中、「無添加前培養」は植物ホルモンを添加してない培地において前培養を行った例を示す。「2ip 1/2, 4-D 0」は、2ipを濃度1μM含む培地で30日間培養を行った例を示し、「2ip 1/2, 4-D 1」は、2ipを濃度1μM含む培地で10日間培養を行い、その後2ipを1μMと2, 4-Dを濃度1μM含む培地で20日間培養を行った例を示す。4-CPPUおよびTDZについても同じである。

【0044】表1および図1から分かるように、従来用

いられていた2ipに比べて4-CPPUおよびTDZは格段に生重量を増加させた。すなわちコーヒー属植物の切断組織片をフェニルウレアタイプのサイトカイニンを加えた培地で前培養することによって、組織片の切断部で細胞分裂が大幅に促進され、多量の不定胚形成組織、カルス、培養細胞塊が形成された。

【0045】c) 抗生物質耐性を示す形質転換体の獲得

サンプル数を、4-CPPUを含む培地での前処理の前後について比較した。その結果を表3に示す。表3から分かるように、サイトカイニンのうち4-CPPUを含む培地で前処理を行った場合に、格段に高い頻度で抗生物質耐性を示す形質転換体が得られた。

【0046】

40 【表1】

表1 葉組織片の生重量

サンプル処理条件	供試数	平均生重量 (mg)	標準誤差	標準偏差
培養前	15	11.9	0.5	2.0
無添加前培養	15	15.0	0.5	1.9
2ip 1/2, 4-D 0	15	12.0	0.9	3.4
2ip 1/2, 4-D 0.1	15	10.5	1.2	4.6
2ip 10/2, 4-D 0	15	15.1	1.1	4.1
2ip 10/2, 4-D 0.1	15	21.5	2.1	8.2
4CPPU 1/2, 4-D 0	15	30.0	4.5	17.5
4CPPU 1/2, 4-D 0.1	15	34.3	1.5	5.6
4CPPU 10/2, 4-D 0	15	37.1	2.9	11.2
4CPPU 10/2, 4-D 0.1	15	47.9	4.3	16.5
TDZ 1/2, 4-D 0	15	12.2	1.1	4.3
TDZ 1/2, 4-D 0.1	15	16.2	2.8	10.7
TDZ 10/2, 4-D 0	15	22.9	3.0	11.6
TDZ 10/2, 4-D 0.1	15	32.0	2.6	10.2

【 0 0 4 7 】

【表 2】

表 2 葉組織片からの培養細胞塊誘導期間の比較

コーヒー種	サイトカイニン	培養細胞塊誘導期間	誘導の難易
アラビカ種	2iP	2-3ヶ月	難
	4-CPPU	10-30日	易
カネフォラ種	2iP	2-3ヶ月	やや難
	4-CPPU	10-30日	易

【 0 0 4 8 】

20 【表 3】

表3 アグロバクテリウム法によるコーヒー属植物の形質転換割合

4-CPPU前培養の有無	導入ベクター	供試サンプル数	抗生物質耐性獲得サンプル数	割合 (%)
前培養の前	pBIH1-GFP	30	0	0.0
前培養 (10日)	pBIH1-GFP	15	10	66.7
前培養 (10日)	pIG121Hm	15	10	66.7

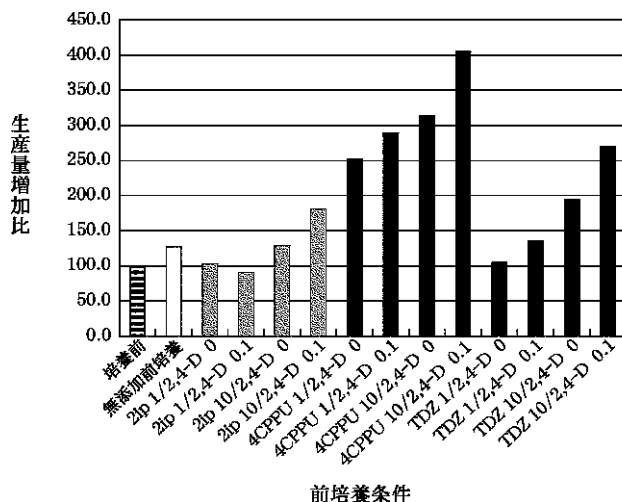
【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は前培養条件と生重量増加比の関係を示すグラフである。

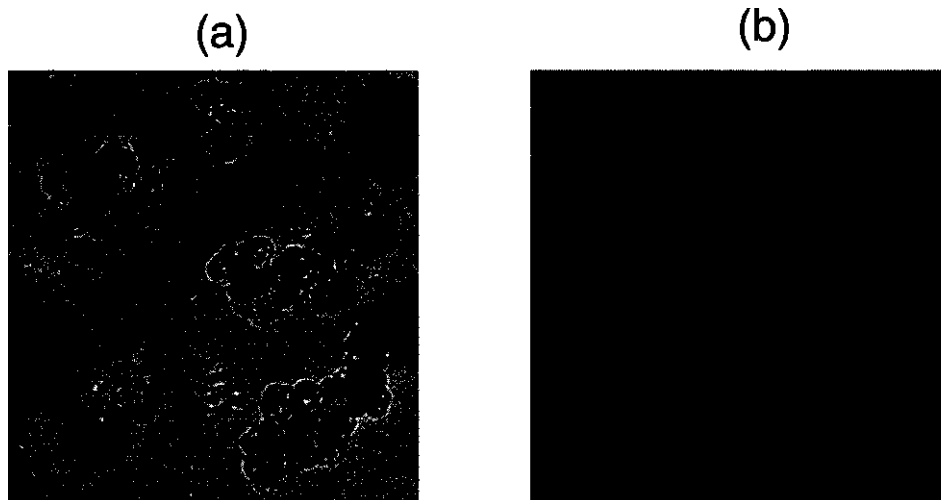
【図 2】 図 2 (a) は G F P 遺伝子を導入した形質転換

不定胚形成細胞を白色光で顕微鏡下で観察した時の写真 (倍率: 200倍)、図 2 (b) は同形質転換不定胚形成細胞を蛍光照射の顕微鏡下で観察した時の写真 (倍率: 200倍) である。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 荻田 信二郎
奈良県生駒市高山町8916 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究調査センター内バイオテクノロジー開発技術研究組合内

(72)発明者 佐野 浩
奈良県生駒市高山町8916 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター内

(72)発明者 小泉 望
奈良県生駒市高山町8916 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター内

(72)発明者 新名 惇彦
奈良県生駒市高山町8916 - 5 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科内

F ターム(参考) 2B030 AA03 AB03 AD06 CA06 CA17
CA19 CB03 CD03 CD06 CD09
CD14
4B024 AA08 CA02 DA01 GA14 GA17
HA20
4B065 AA89 AB01 BA04 BB34 CA53