

アグロバクテリウム法によるミヤコグサへの遺伝子導入 (2000年9月版)

秋山 康紀 (あきやま こうき) akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp

大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 生理活性物質化学

私は植物の根と共生する VA 菌根菌と宿主植物との相互認識におけるシグナル因子を探索する目的でここ4年間研究を展開してきました。研究を進めるうちに適当なモデル植物、特に遺伝子を操作しやすい植物(外来遺伝子導入・変異導入)がやはり必要であるとの認識に至り、昨年(1999年)9月末よりミヤコグサを自分の実験系に導入し、2000年2月下旬より本格的に遺伝子導入実験を開始しました。遺伝子導入実験を始める段階で、*Plant J.*, 2, 487-496 (1992) の Handberg K. and Stougaard J. の論文と *J. Exp. Bot.*, 48, 1357-1365 (1997) の Stiller J. (Gresshoff PM) らの論文を比較して、(当時としては)トランスジェニック体を得るまでの期間の短い後者の方を主たる方法として採択しました(現在では前者も改良され、実験期間はほぼ同じです)。このとき必要な関連論文のいくつかが手に入っていない状態で実験を始めたこと、自分の研究室の実験環境に合わせる必要性、あと自分の主観などから自分なりに改変を加えているので、原報とは少し違ったものになっています。現時点で、エスケープがかなり多いものの共存培養から約4ヶ月半で鉢上げできるトランスジェニック体(約80本のミヤコグサ実生からスタートして5系統以上、10~20個体が得られている)を得ることに成功しています。今後、さらなる改良(特に選抜時の抗生物質濃度の検討)が必要かと思いますが、私の経験・知見が皆様の研究の参考になれば幸いです。

<使用ミヤコグサ ecotype, 菌株, ベクター>

植物: ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) Gifu B-129 (川口先生より分与)

使用菌株: *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 C58C1 Rif(こちらを主に使っている)

(pMP90 Gm^r, deletion of T-DNA of pTiC58) (友人からもらったもの)

Mol. Gen. Genet., 204, 383-396 (1986)

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clontech 社)

使用バイナリーベクター: pBGI, pGI (自作)

pBGI: pBI121 (Clontech 社) の *gus* 遺伝子を p35S GUS INT (*Mol. Gen. Genet.*, 220, 245-250 (1990) で発表されたものを現 Max-Planck 研究所の Willmitzer L. 教授に依頼・分与) のイントロンを含む *gus* 遺伝子に入れ替えたベクター。

pGI: プロモーター-*gus* fusion 用に作成したベクターで、上の pBGI の 35S CaMV プロモーターを Hind III, Xba I で切り出した後、Klenow で平滑化・セルフライゲーションして環化したもの。プロモータークロニングサイトとして Xba I, Bam HI, Sma I が使用できる。これまでに本ベクターを使用してミヤコグサに導入し、プロモーター

活性が確認できたものは (1) エンドウ初期ノジュリン遺伝子 ENOD12A プロモーター, (2) アラビドプシス乾燥・塩類ストレス誘導性遺伝子 RD29A プロモーター, の2つである。

トランスジェニック植物体が得られるまでのフローチャート

種子発芽・生育

5日間、暗黒、0.7% 素寒天培地

胚軸共存培養

5日間、1/10X B5 (スクロース無し)+0.5 µg/ml BA +0.05 µg/ml NAA

再分化

4~5日間 1X B5 +0.5 µg/ml BA +0.05 µg/ml NAA +10 mM NH₄⁺

選抜

3週間 再分化培地 +5 µg/ml geneticin base +200 µg/ml クラフォラン

シュート誘導 (選抜)

2週間 再分化培地 +5 µg/ml geneticin base +100 µg/ml クラフォラン

シュート誘導

3週間 再分化培地 +100 µg/ml クラフォラン

シュート伸長

3週間 1X B5 +0.2 µg/ml BA +100 µg/ml クラフォラン

シュート伸長

2~3週間 1X B5 +100 µg/ml クラフォラン

根誘導培地

1週間 1/2X B5 + 0.5 µg/ml NAA

根伸長培地

2~3週間 1/2X B5

ポット鉢上げ

(計 18~20週間: 4.2-4.7ヶ月)

(1) 共存培養用ミヤコグサ実生の生育

1. ミヤコグサ種子を 400 番耐水紙やすりで種皮処理する。
2. 種子を 70% EtOH-H₂O に 1 分, 2% NaClO に 10 分浸漬して, 表面殺菌する。滅菌種子を滅菌水で 4 回濯ぐ。
3. 滅菌種子をプラントボックス中に調製した 0.7% 素寒天培地に置床する (20-30 粒/ボックス)。*¹
4. アルミホイルで容器を覆って遮光する。
5. 24 16 時間/22 8 時間で 5 日間生育させる。*²

*¹ ひとつの遺伝子導入実験に対して 4 ボックス(約 80 実生)用意する。

*² この生育条件で短めのしっかりした胚軸が得られる。これ以上長く生育させると胚軸がひよろ長い弱いものになってしまい、特に、双葉直下の細い部分から切り出した胚軸切片は以後の胚軸感染、再分化の段階で死んでしまうことが多い。

(2) 共存培養用アグロバクテリウムの培養

1. pBGI あるいはプロモーターを組み込んだ pGI ベクターをエレクトロポレーションで導入した *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 C58C1 の 50% グリセロールストックを氷上で解凍し, 5 μ l をカナマイシン 50 μ g/ml を含む YEP 培地 2 ml に植菌する。

培養容器は内径 15 mm, 長さ 13 cm のガラス試験管を用いて, 綿栓で栓をしている。

2. 28 , 120 rpm で飽和初期から飽和期まで (約 20 時間) (縦方向に) 往復振盪培養する。*³
3. 培養液を一部取り, 水で 10 倍希釈し, OD₆₆₀ を測定する。
4. 培養液を YEP 培地 (抗生物質なし) で希釈し, OD₆₆₀ が 0.3 の菌懸濁液を 8 ml 調製する。

*³ 飽和期を越えてさらに培養時間を延長すると共存培養時の感染率が悪いようである。

(3) ミヤコグサ胚軸-アグロバクテリウム共存培養

1. 9 cm ガラスシャーレに No.2 濾紙を 2 枚敷き, 150 で 1 時間乾熱滅菌しておく。
2. 濾紙上に(2)-4.で調製したアグロバクテリウム菌懸濁液 8 ml をすべて流し込む。
3. (1)-5.で生育させたミヤコグサ実生を寒天培地から引き抜き, 上の菌懸濁液に実生がすべて浸かるように置床する。

4. メスを使って双葉基部，根基部を切除し，残った胚軸を約 5mm 程度の長さに切り分ける。
5. 共存培養培地上に乾熱滅菌した No.2 濾紙を 1 枚敷いておき，この上に 4.の胚軸切片を置く。約 80 本の実生から得られる胚軸切片にはプレート 2 枚が必要である。
6. シャーレをパラフィルムでシールして，アルミホイルで包んで遮光する。
7. 24 16 時間/22 8 時間で 5 日間培養する。
8. ベクターが pBGI の場合，培養後，任意に 5,6 本の胚軸を拾って，トランジェント GUS 活性を GUS 染色して調べて感染率を調べることができる。^{*4}

*4 共存培養後のトランジェント GUS 活性について私が得ているデータを下記に列挙する。

X/X は共存培養後に任意に拾った胚軸におけるトランジェント GUS 活性を GUS 染色して調べた結果である。ただ，(2)の LBA4404 や(4)のようにトランジェント GUS 活性が全く見られない場合でもトランスジェニック植物体を得られていることから，トランジェント GUS 活性がどの程度，感染率の目安となるのかは現段階では何とも言えない。

なお，アセトシリゴン添加についてはこれまでに検討していない（原報では差は無いとのこと）。

- (1) 菌培養条件：28 120 rpm 22 時間 YEP/Km₅₀ 5 ml in 100 ml 三角フラスコ
 培養終了時 OD₆₆₀ 0.7 (このときは何故か増えが悪かった)
 実生生育日数 7 日間

アグロ菌株	菌体濃度 OD ₆₆₀	共存培養 3 日目	5 日目	7 日目
GV3101 C58C1/p35S GUS INT	0.3	5/5	4/6	3/6
同上	0.03	0/6	5/6	4/6

- (2) 菌培養条件：28 2.5 日 LB/Km₅₀寒天プレート 9cm シャーレ
 共存培養時の菌体濃度 0.3
 実生生育日数 7 日間

アグロ菌株	共存培養 3 日目	4 日目
GV3101 C58C1/pBGI	0/6	3/5
LBA4404/pBGI	0/6	0/5

- (3) 菌培養条件：28 120 rpm 2 日 YEP/Km₅₀ 2 mlin 15mmI.D.X13 cm 試験管
 培養終了時 OD₆₆₀ 0.61 (1/10 希釈液、原液では 2.9)
 共存培養時の菌体濃度 OD₆₆₀ 0.1

実生生育日数 7日間

アグロ菌株	共存培養 7 日目
GV3101 C58C1/p35S GUS INT	1/5

- (4) 菌培養条件：28 120 rpm 21 時間 YEP/Km₅₀ 2 mlin 15mmI.D.X13 cm 試験管
 培養終了時 OD₆₆₀ 0.63 (1/10 希釈液)
 共存培養時の菌体濃度 OD₆₆₀ 0.3
 実生生育日数 12日間

アグロ菌株	共存培養 5 日目	7 日目
GV3101 C58C1/pBGI	0/10	0/10

- (5) 菌培養条件：28 120 rpm 22 時間 YEP/Km₅₀ 2 mlin 15mmI.D.X13 cm 試験管
 培養終了時 OD₆₆₀ 0.53 (1/10 希釈液)
 共存培養時の菌体濃度 OD₆₆₀ 0.3
 実生生育日数 6日間

アグロ菌株	共存培養 4 日目	5 日目
GV3101 C58C1/pBGI	3/6	2/5

(4)アグロバクテリウムの除菌，再分化^{*5}

- 滅菌水に 250 mg/L の濃度になるようにクラフォラン粉末を加える。これを乾熱滅菌しておいた 9 cm ガラスシャーレに入れる。3 枚用意する。さらに滅菌水を入れた 9cm ガラスシャーレも 3 枚用意する。
- 乾熱滅菌しておいた取っ手付きステンレス製茶漉しに共存培養後の胚軸をすべて拾い集める。
- 茶漉しをクラフォラン水溶液を入れたシャーレに入れ，茶漉しをゆすって胚軸に付着した菌を濯ぎ洗う。持ち込みの菌をできるだけ減らすように，1 回の濯ぎ毎に，乾熱滅菌したキムタオルに茶漉しを押し付けて余分の水分を吸い取らせてから，次のシャーレにて濯ぎを行う。これをクラフォランシャーレで計 3 回，滅菌水シャーレで計 3 回行う。
- 濯ぎの終わった胚軸を再分化培地に置床する。このとき茶漉しをひっくり返して，すべての胚軸を培地上に移して，それから並べ置くようにするとやり易い。胚軸は培地中に押し込まず，培地上にそっと載せるような感じで置くこと！
- シャーレをサージカルテープでシールする。

6. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で 4~5 日間培養する

*5 この共存培養後の濯ぎは原報には無い。本プロトコールでは共存培養時のアグロバクテリウムの懸濁に栄養リッチな YEP 培地（原報では YMB 培地）を用いているので、後の再分化、選抜の段階でどうしてもアグロバクテリウムがわいてきてしまうので、この濯ぎは必須である。なお、この濯ぎを行うことで、除菌用抗生物質クラフォラン(セフォタキシム)の濃度を原報の 300 $\mu\text{g/ml}$ から 200 $\mu\text{g/ml}$ に下げることができる。

(5) 選抜

1. 再分化培地で培養した胚軸を選抜培地に移す。
2. シャーレをサージカルテープでシールする。
3. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で 3 週間培養する。1 週間ごとに継代する。

(6) シュート誘導

1. 選抜培地で培養した胚軸をシュート誘導培地 に移す。
2. シャーレをサージカルテープでシールする。
3. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で 2 週間培養する。1 週間ごとに継代する。*6
4. 胚軸カルスをシュート誘導培地 に移す。
5. シャーレをサージカルテープでシールする。
6. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で 3 週間培養する。1 週間ごとに継代する。

*6 シュート誘導培地 には選抜用抗生物質 geneticin base が含まれているので、実質的にここまでの通算 5 週間が選抜にあたる。共存培養直後の胚軸は白色であるが、選抜後 1 週間ぐらいの間に緑色になる。それに伴い、胚軸径が太くなっていく。再分化から選抜初期にかけて少し褐変化が見られることがあるがあまり気にしなくてよい。著しく褐変化する場合はコンタミが起こっている可能性が高い。切断面がかなり肥大するがここからトランスジェニックカルスが出現することはまれである。トランスジェニックカルスは胚軸表皮を突き破るようにして出現する。濃い緑色でしっとりした光沢を有している。非形質転換胚軸は再分化・選抜初期に白色から緑色に変化し、選抜過程で徐々に生気の無い濃い褐色を呈するようになる。あまり区別がつかないときは、可能性のあるすべての胚軸を継代するようになる。

(7) シュート伸長

1. 胚軸カルスをシュート伸長培地 に移す。
2. シャーレをサージカルテープでシールする。
3. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で3週間培養する。1週間ごとに継代する。^{*7}
4. 胚軸カルスをシュート伸長培地 に移す。
5. プラントボックスをサージカルテープでシールする。
6. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で2～3週間培養する。継代はしなくてよい。^{*8}

^{*7} シュート誘導培地 でシュート原基の形成如何にかかわらず、すべての胚軸カルスを継代する。このシュート伸長培地 の段階でカルス上に多くのシュート原基が形成される(多芽体になる)。カルスがかなり大きくなることがあるので、培地上に直接置くと大きすぎてふたに当たってしまうことがある。この場合は培地をピンセットで掘って、穴を作って置くようにするとよい。シュート原基の形成されなかったカルスは後のシュート伸長培地 に移してもシュートを形成しないので放棄する。

^{*8} シュート原基が旺盛に形成されたカルスのみが良好なシュート伸長を示す。早ければ培養1週間目には根誘導に持っていきけるぐらいの長さのシュートが得られる。

(8) 根誘導・根伸長

1. シュート伸長培地に置床したカルスから生じたシュートが5 mm 以上になったら、シュート基部をメスで切り、シュートを切り出す。
2. シュートを縦にして、シュート基部を根誘導培地に差し込む。^{*9}
3. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で1週間培養する。
4. シュート切り口が少し肥大化したシュートを根伸長培地に縦に差し込む。
5. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で2～3週間培養する。^{*10}

^{*9} シュート基部のみを浅く培地に差し込むようにする。葉が培地に当たると NAA のためか葉が白化してしまうので注意する。

^{*10} 約 80%のシュートに根が形成される。この段階でできるだけ根を長くするようにする。あまり根が長くなっていない状態で鉢上げすると、鉢上げ後の植物体の生育が極めて悪い。

(9) 鉢上げ

1. 植物体を培地から抜き取り，根に付着したゲルを水中でよく洗い落とす。^{*11}
2. 植物体を適当な培土を充填した 9 cm ポットに移植する。
3. 植物体に 100 ml ビーカーを被せて，少し湿度の高い状態にする。
4. 24 16 時間明所/22 8 時間暗黒で生育させる。1 週間後にはビーカーを外してよい。^{*12}
5. その後の目的に応じて生育させる。

***11** 根にジェランガムが付着していると鉢上げ後に根表面上で乾燥・固化し，植物の生育を阻害する。鉢上げ初期の根からの水分・養分供給がその後の植物体の生育の良否を決定付ける。

***12** 馴化は 1 週間で十分である。これ以上長くビーカーで覆っていると，植物体がひ弱な状態で生育し，ビーカーを外したときに湿度差に耐えられず，枯れてしまう。

(10) トランスジェニック植物体の選抜 ^{*13}

1. 適当な大きさにまで育った植物体の葉(1 - 3 枚で十分)から DNA を抽出する。
2. *gus5* (5'CCATCGCAGCGTAATGCTCT3'), *gus6* (5'GCCGACAGCAGCAGTTTCAT3') プライマーを用いた PCR により *gus* 遺伝子の導入を確認する。^{*14}

95 1min, 95 30sec 55 30sec 72 1 min 30-35 サイクル

***13** 本プロトコールでは選抜に用いる *geneticin* の濃度が低いためかエスケープがかなり多い。現段階で再分化植物におけるトランスジェニック体の割合は約 50% である。

***14** *gus* 遺伝子を見る場合，精製度の悪い *Taq* polymerase を用いると大腸菌からの持ち込み DNA による偽の増幅バンドが見られることがあるので要注意。プロモーター-*gus* fusion を導入した場合はプロモータークロニングサイトを挟むプライマー対 (5'-プライマー CTCGTATGTTGTGTGGAATTGT, 3'-プライマー TCACGGGTTGGGGTTTCTAC) が有用である。95 1min, 95 30sec 55 30sec 72 X min 30-35 サイクル

使用培地・使用機器

培地調製の仕方

培地の調製にはオートクレーブ滅菌可能な 1~2L ぐらいの手おけが便利である。

1. 抗生物質(geneticin base, クラフォラン)、ゲル化剤(アガー、Phytigel)を除くすべてのものを Milli-Q 水で溶かす。
2. pH を 0.5N KOH, HCl で合わせる。
3. ゲル化剤を入れ、スターラーでよく混ぜる。
4. 手おけの口を二重にしたアルミホイルでぴったり覆う。
5. オートクレーブ滅菌(120℃、10-15分)する。
6. オートクレーブ後、速やかにクリーンベンチ内でスターラーで攪拌してゲル化剤を均一に溶かす。
7. 抗生物質水溶液(必要重量をオートクレーブ滅菌したエッペンチューブ中で測り取り、少量の滅菌 Milli-Q 水で完全に溶かしたもの。フィルター滅菌はしていない)を加え、攪拌して均一に溶かす。

使用容器等、その他の留意事項

- 使用容器は共存培養培地~シュート伸長培地 までは IWAKI SH90-20 の深型 90X20 mm 滅菌シャーレ(ポリスチレン製)を用い、1枚あたり 20-30 ml の培地を入れている。シュート伸長培地 ~根伸長培地は IWAKI CUL-JAR300 プラントボックス(植物培養用、ポリカーボネイト製)をオートクレーブ滅菌して用い、1個あたり約 100 ml の培地を入れている。それぞれ、1~2ヶ月分を予め作り置きして、4℃で保存、必要時に室温まで戻してから使用している。
- 容器のシールは 3M 1530-0 マイクロポア サージカルテープ 1.25 cm X 9.1 m を使用している。通気性に優れ、且つ水分の蒸散損失が最小限に抑えられる(9cm シャーレ、1週間培養で 4~6%の損失)。
- 植物ホルモン(BA, NAA)はそれぞれ特級 DMSO に 10mg/ml の濃度で溶かし、ストック液として使用している。-20℃で保存する。
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ は下記ストック液を用いている。4℃で保存している。
- ゲル化剤は共存培養培地ではアガーを用いているが、これは本培地では塩濃度が低すぎて Phytigel(ジェランガム)ではゲル化しないためである。ここでは Wako 製の安価なアガーを用いているが、培養日数も短いので問題は無い。なお、原報では共存培養は共存培地を染み込ませた濾紙パイル上で行うが、私はゲル化させた培地上に濾紙を 1枚敷いて行っている(全くの個人的好みで)。
- 原報(*J. Exp. Bot.*, **48**,1357-1365 (1997))ではゲル化剤はアガー Sigma A-7921 を 0.6%の濃度で用いているが、これは 500 g 32,200 円と大変高価なため、私は Phytigel Sigma P-8169

500 g 18,400 円を 0.2%の濃度で用いている(約 1/5 のコスト)。Wako のジェランガムは少し品質が落ちるようで、遺伝子導入実験には適さないので勧めない。

- *Agrobacterium* 除菌用のセフトキシムは試薬用は例えば Sigma C-7039 1g 20,400 円と大変高価なので、医薬用が安価で効きも良いのでこちらを勧める。ちなみに当研究室での納入価で 5 g(0.5 g 力価 X10 本)分が 7,830 円ととても安い(1/10 以下)。

1. 共存培養培地

最終濃度	使用メーカー・code No. (内容量)	for 1 L
1/10X B5 ソルト	Sigma G-5768 (31 g)	0.31 g
1/10X B5 ビタミン	100X ストック液 下記参照	1 ml
5 mM MES	DOJINDO 341-01622 (25 g)	1.1 g
0.5 µg/ml BA	Wako 020-07621 (1 g)	500 µg
0.05 µg/ml NAA	Wako 148-00092 (25 g)	50 µg
0.6% アガー	Wako 016-11875(500 g)	6 g
pH 5.2		

B5 ビタミン(100X ストック液、-20 保存)

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	X100 ストック液 for 100 ml
100 µg/ml ミオイノシトール	Wako 092-00282 (25 g)	1 g
1 µg/ml ニコチン酸	Wako 142-01232 (25 g)	10 mg
1 µg/ml 塩酸ピリドキシン	Wako 163-05402 (25 g)	10 mg
10 µg/ml 塩酸チアミン	Wako 201-00852 (25 g)	100 mg

2. 再分化培地

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1X B5 ソルト	同上	3.1 g
1X B5 ビタミン	同上	10 ml
2% スクロース	ICN 194747(Wako カタログ掲載)	20 g
10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	Wako 019-03435 (500 g) 400 mM(5.36 g/100 ml)ストック液	10 ml
0.5 µg/ml BA	同上	500 µg
0.05 µg/ml NAA	同上	50 µg
0.2% Phytigel	Sigma P-8169 500 g	2 g
200 µg/ml クラフォラン	Hoechst 社注射用セフトキシムナトリ ウム 0.5 gX10 本入り	200 mg
pH 5.5		

3. 選抜培地 (再分化培地に geneticin base (Sigma G-1279, 250 mg) を終濃度 5 µg/ml で加えたもの)

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1X B5 ソルト	同上	3.1 g
1X B5 ビタミン	同上	10 ml
2% スクロース	同上	20 g
10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	同上	10 ml
0.5 µg/ml BA	同上	500 µg
0.05 µg/ml NAA	同上	50 µg
0.2% Phytigel	同上	2 g
200 µg/ml クラフォラン	同上	200 mg
5 µg/ml geneticin base	Sigma G-1279 (250 mg)	5 mg
pH 5.5		

4. シュート誘導培地 (選抜培地のクラフォラン濃度 100 µg/ml にしたもの)

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1X B5 ソルト	同上	3.1 g
1X B5 ビタミン	同上	10 ml
2% スクロース	同上	20 g
10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	同上	10 ml
0.5 µg/ml BA	同上	500 µg
0.05 µg/ml NAA	同上	50 µg
0.2% Phytigel	同上	2 g
100 µg/ml クラフォラン	同上	100 mg
5 µg/ml geneticin base	同上	5 mg
pH 5.5		

5. シュート誘導培地 (シュート誘導培地 の geneticin base を無しにしたもの)

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1X B5 ソルト	同上	3.1 g
1X B5 ビタミン	同上	10 ml
2% スクロース	同上	20 g
10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	同上	10 ml
0.5 µg/ml BA	同上	500 µg
0.05 µg/ml NAA	同上	50 µg
0.2% Phytigel	同上	2 g
100 µg/ml クラフォラン	同上	100 mg
pH 5.5		

6. シュート伸長培地

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1X B5 ソルト	同上	3.1 g
1X B5 ビタミン	同上	10 ml
2% スクロース	同上	20 g
0.2 µg/ml BA	同上	200 µg
0.2% Phytigel	同上	2 g
100 µg/ml クラフォラン	同上	100 mg
pH 5.5		

7. シュート伸長培地 (シュート伸長培地 のBA を無しにしたもの)

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1X B5 ソルト	同上	3.1 g
1X B5 ビタミン	同上	10 ml
2% スクロース	同上	20 g
0.2% Phytigel	同上	2 g
100 µg/ml クラフォラン	同上	100 mg
pH 5.5		

8. 根誘導培地

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1/2X B5 ソルト	同上	1.55 g
1/2X B5 ビタミン	同上	5 ml
1% スクロース	同上	10 g
0.5 µg/ml NAA	同上	500 µg
0.4% Phytigel	同上	4 g
pH 5.5		

9. 根伸長培地(根誘導培地の NAA を無しにしたもの)

最終濃度	使用メーカー・code No.(内容量)	for 1 L
1/2X B5 ソルト	同上	1.55 g
1/2X B5 ビタミン	同上	5 ml
1% スクロース	同上	10 g
0.4% Phytigel	同上	4 g
pH 5.5		

10. YEP 培地 (for *Agrobacterium*)

Bacto-peptone 10 g
 乾燥酵母エキス 10 g
 NaCl 5 g
 1M MgCl₂ 2 ml for 1 L pH 7.2

使用植物培養器

サンヨー MLR-350 温度・照明設定 24 16 時間照明/22 8 時間暗黒

照明：40W 白色蛍光灯 15 本すべて点灯、20,000 lux , 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (仕様データ)