

宿根トレニアにおける R2R3-MYB 遺伝子を用いた形質転換による葉色の改変

藤本卓生・高野美穂・大谷真広・中野 優*

(平成31年1月8日受付)

要約

黄葉・銅葉・赤葉などカラフルな色彩の葉をもつ植物はカラーリーフプランツと呼ばれ、近年その人気が高まっている。多くの場合、それらの葉の細胞ではアントシアニン類が多量に生合成・蓄積されている。アントシアニン類の生合成にはフラボノイド生合成酵素遺伝子の発現制御が関わっており、その転写因子として R2R3-MYB が知られている。本研究では、宿根トレニア (*Torenia concolor*) におけるカラーリーフプランツの育成を目的として、ホトトギス (*Tricyrtis* sp.) およびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 R2R3-MYB 遺伝子 (*TrMYB1* および *PAPI*) を異所発現する形質転換体の作出を試みた。導入した R2R3-MYB 遺伝子の種類に関わらず、形質転換体は葉色の変化の程度により3タイプ (ほとんど変化なし、薄い赤紫色に変化、濃い赤紫色に変化) に分けることができた。アントシアニンの定量分析および外来 R2R3-MYB 遺伝子の発現解析を行ったところ、形質転換体における葉色の変化の程度と葉の総アントシアニン含量および外来遺伝子の発現レベルには相関がみられた。これらの結果から、宿根トレニアへの *TrMYB1* または *PAPI* の導入および異所発現により、葉においてアントシアニン類の生合成・蓄積が誘導され、葉色が改変されることが示唆された。今後は、同様の手法を用いて、他の花き園芸植物におけるカラーリーフプランツの作出を検討する予定である。

新大農研報, 71:35-42, 2019

キーワード: R2R3-MYB 転写因子、アントシアニン、花き園芸植物、カラーリーフプランツ、フラボノイド生合成経路

緒言

近年、黄葉・銅葉・赤葉などカラフルな色彩の葉をもつ花き園芸植物がカラーリーフプランツと呼ばれるようになり、その人気が高まっている。コリウス (*Solenostemon* spp.) やハボタン (*Brassica oleracea* var. *acephala*) など多くのカラーリーフプランツでは、アントシアニン類が葉の細胞で多量に生合成・蓄積されている。アントシアニン類はフラボノイド生合成経路を通して合成されるが、この経路はすでに多くの植物種において詳細に解明されている (Forkmann, 1991; Koes ら, 2005)。また、フラボノイド生合成酵素の遺伝子も様々な植物種から単離されており、それらの遺伝子を単独で用いた形質転換による花色の改変がいくつかの植物種で成功している (Kamiishi ら, 2012; Noda ら, 2013)。しかしながら、葉においては複数のフラボノイド生合成酵素遺伝子の発現が欠如していると考えられ、単独のフラボノイド生合成酵素遺伝子を用いた形質転換による葉色の改変は成功していない。したがって、葉色を改変するためには、複数のフラボノイド生合成酵素遺伝子を同時に導入するか、同時に発現を活性化させることが必要である。

R2R3-MYB 転写因子は、塩基性ヘリックスループヘリックス (basic helix-loop-helix: bHLH) タンパク質および WD40 リピート (WD40 repeat; WDR) タンパク質と複合体 (MBW 複合体) を形成し、複数のフラボノイド生合成酵素遺伝子の発現を活性化することでアントシアニン類の生合成・蓄積を誘導する (Koes ら, 2005)。R2R3-MYB の遺伝子は様々な植物種から単離されており、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やタバコ (*Nicotiana tabacum*) などのモデル植物では、R2R3-MYB 遺伝子の異所発現により植物体全体におけるアントシア

ニン類の顕著な蓄積が誘導されている (Borevitz ら, 2000; Chen ら, 2017)。これらの報告から、R2R3-MYB 遺伝子を用いた形質転換はカラーリーフプランツの作出に有効な手段であると考えられる。しかしながら、花き園芸植物における R2R3-MYB 遺伝子を用いた形質転換は、ペチュニア (*Petunia hybrida*)、ガーベラ (*Gerbera hybrida*)、バラ (*Rosa hybrida*)、カシワバゴムノキ (*Ficus lyrata*)、ペラルゴニウム (*Pelargonium crispum*) など一部の植物種で検討されているに過ぎない (Bradley ら, 1998; Laitinen ら, 2008; Zvi ら, 2012; Zhao ら, 2013; Kanemaki ら, 2018)。

宿根トレニア (*Torenia concolor*) は、アゼナ科に属する多年生草本である。鉢物や花壇用花き園芸植物として人気があるが、葉に鮮やかな色彩をもつ品種・系統はない。一方、近縁種のトレニア (*T. fournieri*) では様々な遺伝子を用いた形質転換に関する研究が行われているが (Suzuki ら, 2000; Nishijima ら, 2013)、形質転換による葉色の改変は検討されていない。本研究では、宿根トレニアにおけるカラーリーフプランツの育成を目的として、ホトトギス (*Tricyrtis* sp.) およびシロイヌナズナ由来 R2R3-MYB 遺伝子 (*TrMYB1* および *PAPI*) を異所発現する形質転換体の作出を試みた。

材料および方法

植物材料

植物材料には、宿根トレニアの鉢植え個体を用いた。鉢植え個体は、明るい室内 (20 ~ 28°C; 日長調節なし) で栽培した。

鉢植え個体から旺盛に成長している茎を採取し、70% エタノールで1分間、次いで有効塩素濃度1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (2 ~ 3滴の Tween 20 を含む) で10分間表面殺菌した。滅菌水で3回すすいだ後、節切片 (長さ約2cm) を

切り出し、小植物体培養用培地 [30 g L⁻¹ ショ糖および 2 g L⁻¹ ゲランガムを含む MS 培地 (Murashige・Skoog, 1962)、pH 5.8] に置床した。腋芽由来の小植物体は、節切片(長さ約 2 cm) を 1 カ月ごとに同組成の新鮮培地に移植することにより継代培養した。培養は、25℃、16 時間日長 (35 μmol m⁻² s⁻¹) 下で行った。

アグロバクテリウム法による形質転換

形質転換には、3 種類の *Agrobacterium tumefaciens* 系統 (EHA101/pIG121Hm, EHA101/pIG-*TrMYB1*, EHA101/pIG-*PAP1*) を用いた。それぞれのバイナリーベクターにおける T-DNA 領域を図 1 に示す。ベクターコントロールとして用いた pIG121Hm の T-DNA 領域には、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター制御下のイントロン付き β-glucuronidase (*GUS*) 遺伝子が含まれる (Ohta ら、1990; Suzuki ら、2001)。pIG-*TrMYB1* の T-DNA 領域には CaMV35S プロモーター制御下のホトトギス由来 R2R3-MYB 遺伝子 *TrMYB1* (アクセッション番号 AB856412; GenBank/EMBL/DDBJ データベース) が含まれ、pIG-*PAP1* の T-DNA

領域には CaMV35S プロモーター制御下のシロイヌナズナ由来 R2R3-MYB 遺伝子 *PAP1* (アクセッション番号 AF325123; GenBank/EMBL/DDBJ データベース) が含まれる。なお、これらの遺伝子に加えて、いずれのバイナリーベクターの T-DNA 領域にも、ノバリン合成酵素遺伝子 (*NOS*) プロモーター制御下のカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) 遺伝子および CaMV35S プロモーター制御下のハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HPT*) が含まれる。

アグロバクテリウム法による形質転換は、Aida ら (2000) の方法を改変して行った。アグロバクテリウム培養物を、OD₆₀₀ = 1.0 の濃度になるように接種用培地 [100 mg L⁻¹ アセトシリンゴン (AS)、0.5 g L⁻¹ 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)、および 30 g L⁻¹ ショ糖を含む MS 培地、pH 5.8] に懸濁した。継代約 1 カ月後の培養小植物体から展開葉を採取し、約 5 mm 角に切断した後、アグロバクテリウム懸濁液に浸漬して 20 分間ゆっくり振とうした。接種後、滅菌したろ紙で葉切片から余分な懸濁液を取り除き、共存培養用培地 [1 mg L⁻¹ インドール酢酸 (IAA)、1 mg L⁻¹ ベンジルアデニン (BA)、100 mg L⁻¹ AS、30 g L⁻¹ ショ糖、および 2 g L⁻¹ ゲランガムを

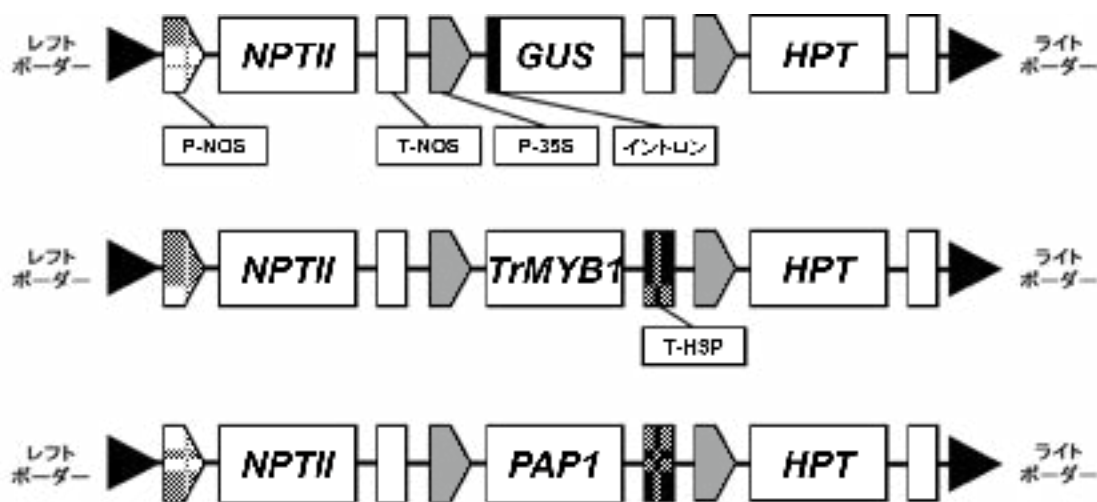


図 1 バイナリーベクター pIG121Hm、pIG-*TrMYB1*、および pIG-*PAP1* の T-DNA 領域。HPT、ハイグロマイシン耐性遺伝子; *NPTII*、カナマイシン耐性遺伝子; *PAP1*、シロイヌナズナ由来 R2R3-MYB 遺伝子; P-NOS、ノバリン合成酵素遺伝子プロモーター; P-35S、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター; T-HSP、熱ショックタンパク質ターミネーター; T-NOS、ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター; *TrMYB1*、ホトトギス由来 R2R3-MYB 遺伝子。

表 1 実験に使用したプライマーの塩基配列および PCR 反応条件

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	用途	PCR 反応条件
hpt290F	GTGCTTTCAGCTTCGATGTAGG	形質転換の確認 (<i>HPT</i> の増幅)	94℃、2 分; 35 サイクル (94℃、30 秒;
hpt290R	GCTCGTCTGGCTAAGATCGG	形質転換の確認 (<i>HPT</i> の増幅)	60℃、30 秒; 72℃、30 秒); 72℃、3 分
TrMYB1 RT-F	TGAGCAGCACCAAGAAGATG	発現解析 (<i>TrMYB1</i>)	95℃、30 秒; (95℃、5 秒; 60℃、30 秒;
TrMYB1 RT-R	TGCAAAATCATACTAACCCAGAG	発現解析 (<i>TrMYB1</i>)	蛍光強度検出) 45 サイクル
PAP1-real-F	TAATCCTCCATGCCTTGAC	発現解析 (<i>PAP1</i>)	
PAP1-real-R	GTTGTCGTCGCTTCAGGAAC	発現解析 (<i>PAP1</i>)	
toreniaACT3F	AACTGCAGAGCGTGAAATCG	発現解析 (<i>Torenia fournieri actin3</i>)	
toreniaACT3R	GCCCATCTGGGAGTTCATAG	発現解析 (<i>Torenia fournieri actin3</i>)	

含む MS 培地、pH 5.8] に置床した。共存培養は、25℃、暗黒下で3日間行った。共存培養後の葉切片を選抜用培地（1 mg L⁻¹ BA、300 mg L⁻¹ カナマイシン、20 mg L⁻¹ メロペネム、30 g L⁻¹ ショ糖、および2 g L⁻¹ ゲランガムを含む MS 培地、pH 5.8）に移植し、25℃、16 時間日長（35 μmol m⁻² s⁻¹）で培養した。葉切片は、2 週間ごとに同組成の新鮮培地に継代した。選抜培地上で形成された不定芽（長さ約 1 cm）を葉切片から単離し、20 mg L⁻¹ メロペネムを含む小植物体培養用培地に移植して、同様の条件下で培養した。

再生した小植物体における形質転換の確認は、*HPT* 特異的プライマーセットを用いた PCR 分析により行った（Suzuki ら、2001）。プライマーの塩基配列および PCR 反応条件を表 1 に示す。PCR 反応後、目的のサイズの増幅産物が得られたものを形質転換体とした。

形質転換小植物体は、順化後、鉢に定植し、材料に用いた鉢植え個体と同様の条件下で栽培した。形質転換体の形質調査は、順化して約 1 カ月後に行った。

葉色の評価

葉色は、Kanemaki ら（2018）の報告に従って評価した。まず日本園芸植物標準色票を用いて肉眼で評価し（Kuwayama ら、2005）、次に色彩色差計（CR400；Konica Minolta）を用いて CIEL*a*b* 表色系により数値化した（Gonnet ら、1995）。

アントシアニン定量分析

葉のアントシアニン含量は、Kanemaki ら（2018）の報告に従って分析した。新鮮重 20 mg の葉から総アントシアニンを抽出し、抽出液の 530 nm および 657 nm における吸光度を分光光度計（Ultrospec 3000；GE healthcare）により測定した。

外来遺伝子の発現解析

外来遺伝子（*TrMYB1* または *PAP1*）の発現解析は、Kanemaki ら（2018）の報告に従ってリアルタイム RT-PCR 分析により行った。外来遺伝子の発現量は、トレニアのアクチン遺伝子（*Torenia fournieri actin3*；アクセッション番号 AB330989；GenBank/EMBL/DDBJ データベース）の発現量で標準化した。用いたプライマーの塩基配列および PCR 反応条件を表 1 に示す。

結果および考察

形質転換体の作出

アグロバクテリウムを接種した葉切片を選抜用培地に置床したところ、2 週間後にはカルスが形成され、4 週間後には不定芽が形成され始めた。EHA101/pIG-*TrMYB1* または EHA101/pIG-*PAP1* を接種した場合には、カルスおよび不定芽の一部において赤紫色の色素の蓄積が観察された（図 2）。長さ約 1 cm に伸長した不定芽を小植物体培養用培地に移植したところ、3 日後には発根し、2 週間後には順化可能な小植物体に成長した。EHA101/pIG-*TrMYB1* または EHA101/pIG-*PAP1* を接種した場合には赤紫色の葉をもつ小植物体が観察されたが、EHA101/pIG121Hm を接種した場合には小植物体の葉色に変化はみられなかった。

再生した小植物体について *HPT* 特異的プライマーセットを用いた PCR 分析を行なったところ、EHA101/pIG121Hm については 5 系統、EHA101/pIG-*TrMYB1* については 10 系統、EHA101/pIG-*PAP1* については 8 系統の小植物体が形質転換体であることが明らかになった。

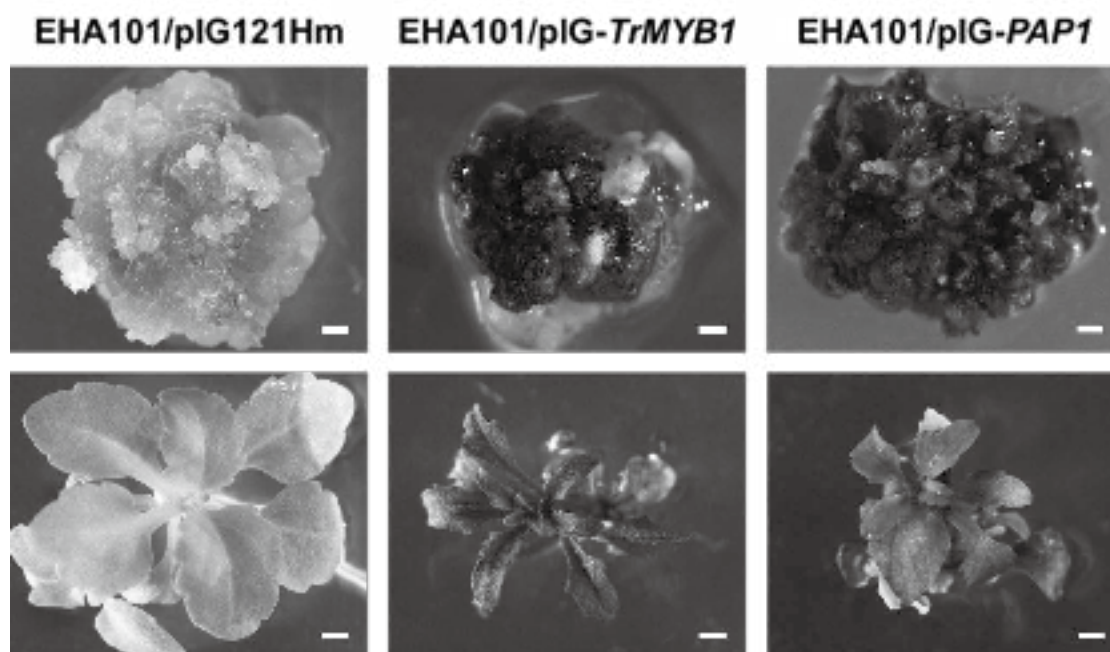


図 2 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pIG121Hm、EHA101/pIG-*TrMYB1*、および EHA101/pIG-*PAP1* を接種した宿根トレニア（*Torenia concolor*）の葉片から形成されたカルス（上段）および不定芽（下段）。スケールバー = 1 mm。

葉色の評価

形質転換体は、葉色の変化の程度により、ほとんど変化のみられない系統 (タイプ I)、薄い赤紫色に変化した系統 (タイプ II)、および濃い赤紫色に変化した系統 (タイプ III) に分けることができた (図 3)。EHA101/pIG-*TrMYB1* においては、10 系統の形質転換体のうちの 3 系統 (MYB1-1、-2、-10) がタイプ I、2 系統 (MYB1-3、-4) がタイプ II、5 系統 (MYB1-5、-6、-7、-8、-9) がタイプ III であった。一方、EHA101/pIG-*PAP1* においては、8 系統の形質転換体のうちの 2 系統 (PAP1-1、-2) がタイプ I、3 系統 (PAP1-3、-4、-5) がタイプ II、3 系統 (PAP1-6、-7、-8) がタイプ III であった。タイプ II およびタイプ III のような葉色の変化は、R2R3-MYB 遺伝子を異所発現するシロイヌナズナやタバコの形質転換体においても観察されている (Borevitz ら、2000; Chen ら、2017)。なお、EHA101/pIG121Hm においては、5 系統の形質転換体 (ベクターコントロール) の全てがタイプ I であった。

一部の形質転換体の葉において色彩色差計を用いた計測を行ったところ、EHA101/pIG-*TrMYB1* および EHA101/pIG-

PAP1 接種由来の系統とベクターコントロール間で L* 値、a* 値、および b* 値に差異がみられた (表 2; 図 4)。特に、タイプ III 形質転換系統においては、ベクターコントロールと比較して L* 値および b* 値が顕著に低く、一方、a* 値は顕著に高かった。タイプ I およびタイプ II 形質転換系統においても同様の傾向がみられたが、変化の程度はタイプ III 形質転換系統よりも小さかった。これらの結果から、EHA101/pIG-*TrMYB1* および EHA101/pIG-*PAP1* 接種由来の形質転換系統の葉では、輝度が低下し、赤味および青味が増していることが示された。

葉におけるアントシアニン定量分析

一部の形質転換体において葉のアントシアニン含量を測定したところ、外来 R2R3-MYB 遺伝子の種類にかかわらず、タイプ III 形質転換系統の総アントシアニン含量は他の系統よりも有意に高かった (図 5)。ベクターコントロールの総アントシアニン含量と比較すると、MYB1-8 では約 6 倍、PAP1-8 では約 8 倍の量であった。これらの結果から、EHA101/pIG-*TrMYB1* および EHA101/pIG-*PAP1* 接種由来の形質転換体に



図 3 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pIG121Hm (ベクターコントロール) および EHA101/pIG-*TrMYB1* (MYB1-2、MYB1-3、および MYB1-8) により形質転換された宿根トレンニア (*Torenia concolor*) の小植物体。MYB1-2はタイプ I、MYB1-3はタイプ II、MYB1-8はタイプ III 形質転換系統。スケールバー = 1 cm。

表 2 宿根トレンニア (*Torenia concolor*) における形質転換体の葉色

葉色の変化	形質転換系統 ^a	色名 ^b	カラーコード No. ^b	CIEL*a*b* 表色系 ^c		
				L*	a*	b*
タイプ I	ベクターコントロール	Vivid yellow green	3303	62.8	-20.5	34.7
	MYB1-2	Dull green	3712	56.7	-11.6	15.5
	PAP1-1	Dull green	3712	63.6	-13.7	19.4
タイプ II	MYB1-3	Dk. green	3716	36.6	-13.0	19.4
	PAP1-5	Dk. yellow green	3508	56.2	-11.9	13.6
タイプ III	MYB1-8	Dk. green	3716	49.4	-7.4	11.7
	PAP1-8	Dk. yellow green	3508	33.7	-5.9	11.2

^a ベクターコントロールは *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pIG121Hm により形質転換された系統。MYB1-2、MYB1-3、および MYB1-8は *A. tumefaciens* EHA101/pIG-*TrMYB1* により形質転換された系統。PAP1-1、PAP1-5、および PAP1-8は *A. tumefaciens* EHA101/pIG-*PAP1* により形質転換された系統。

^b 日本園芸植物標準色票に準ずる。

^c L*、輝度；a* および b*、色彩構成要素。

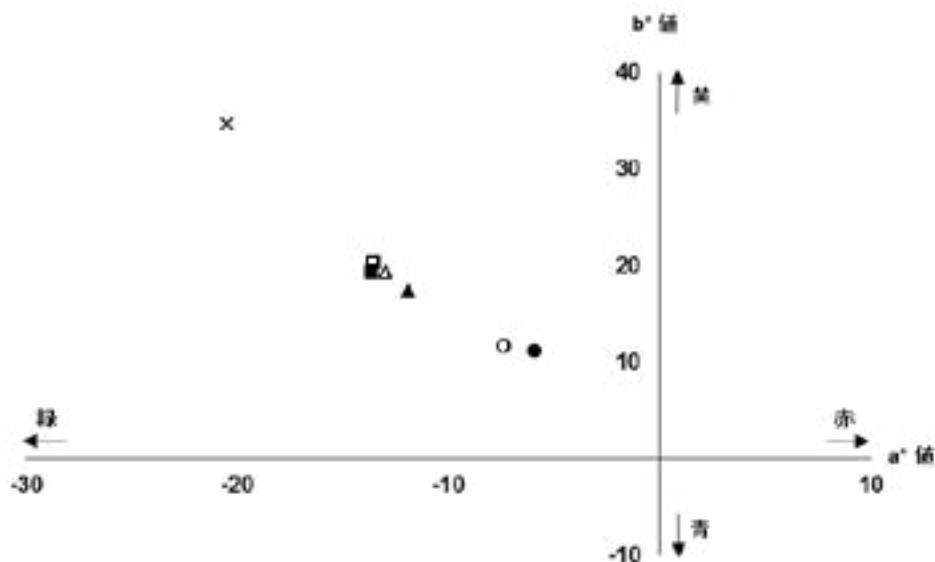


図4 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pIG121Hm (ベクターコントロール)、EHA101/pIG-*TrMYB1* (MYB1-2, MYB1-3, および MYB1-8)、および EHA101/pIG-*PAPI* (PAPI-1, PAPI-5, および PAPI-8) により形質転換された宿根トレンア (*Torenia concolor*) における CIEL*a*b* 表色系による葉色の分布。MYB1-2 および PAPI-1 はタイプ I、MYB1-3 および PAPI-5 はタイプ II、MYB1-8 および PAPI-8 はタイプ III 形質転換系統。a* 値および b* 値の負から正への推移は、色彩の緑から赤および青から黄色への変化をそれぞれ示す。×、ベクターコントロール；□、MYB1-2；△、MYB1-3；○、MYB1-8；■、PAPI-1；▲、PAPI-5；●、PAPI-8。

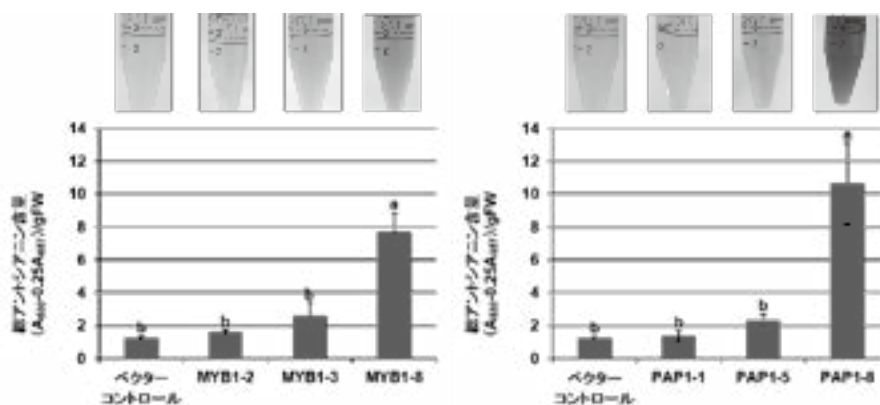


図5 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pIG121Hm (ベクターコントロール)、EHA101/pIG-*TrMYB1* (MYB1-2, MYB1-3, および MYB1-8)、および EHA101/pIG-*PAPI* (PAPI-1, PAPI-5, および PAPI-8) により形質転換された宿根トレンア (*Torenia concolor*) の葉におけるアントシアニン定量分析。上段、葉からの抽出物；下段、葉の総アントシアニン含量。MYB1-2 および PAPI-1 はタイプ I、MYB1-3 および PAPI-5 はタイプ II、MYB1-8 および PAPI-8 はタイプ III 形質転換系統。各分析は 3 反復し、Tukey-Kramer 法による有意差検定 (1% 水準) を行なった。

における葉色の変化はアントシアニン類の蓄積によるものであることが示された。

なお、タイプ III 形質転換系統では、他の形質転換系統と比較して、順化後の植物体の成長に遅れがみられた。これは栄養器官におけるアントシアニン類の過剰な蓄積が原因であると考えられる。同様の現象は、R2R3-MYB 遺伝子を過剰発現するベチュニア形質転換体においても観察されている (Bradley ら、

1998)。

葉における外来遺伝子の発現解析

一部の形質転換体においてリアルタイム RT-PCR 分析により外来 R2R3-MYB の発現解析を行ったところ、タイプ I、タイプ II、タイプ III のいずれの形質転換系統においても *TrMYB1* または *PAPI* の転写産物が検出された (図 6)。特に、

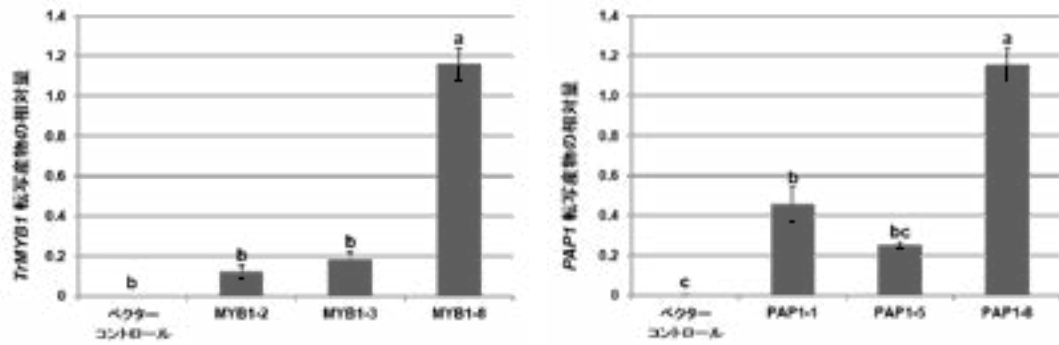


図6 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101/pIG121Hm (ベクターコントロール)、EHA101/pIG-*TrMYB1* (MYB1-2、MYB1-3、およびMYB1-8)、およびEHA101/pIG-*PAPI* (PAPI-1、PAPI-5、およびPAPI-8)により形質転換された宿根トレンニア (*Torenia concolor*) の葉におけるリアルタイム RT-PCR 分析による外来 R2R3-MYB 遺伝子の発現解析。MYB1-2およびPAPI-1はタイプ I、MYB1-3およびPAPI-5はタイプ II、MYB1-8およびPAPI-8はタイプ III 形質転換系統。各分析は 3 反復し、Tukey-Kramer 法による有意差検定 (1% 水準) を行なった。

タイプ III 形質転換系統では、他の系統と比較して転写産物の相対量が有意に高かった。なお、ベクターコントロールでは外来 R2R3-MYB の転写産物は検出されなかった。

結論

本研究では、R2R3-MYB 遺伝子を用いた形質転換により、宿根トレンニアにおける葉色の改変に成功した。葉色の変化の程度と葉における総アントシアニン含量および外来 R2R3-MYB 遺伝子の発現レベルに相関がみられたことから、外来 R2R3-MYB 遺伝子の導入および異所発現により、葉における内生フラボノイド生合成酵素遺伝子の発現が活性化され、それによりアントシアニン類の生合成・蓄積が誘導され、最終的に葉色が変わったと考えられた。今後は、内生フラボノイド生合成酵素遺伝子の発現解析を行う必要がある。

本研究では、単子葉植物であるホトトギス由来の R2R3-MYB 遺伝子 (*TrMYB1*) と双子葉植物であるシロイヌナズナ由来の R2R3-MYB 遺伝子 (*PAPI*) を用いたが、外来 R2R3-MYB 遺伝子の種類が形質転換効率や形質転換体の形質に及ぼす影響はほとんど観察されず、いずれの R2R3-MYB 遺伝子を用いた場合にも葉色が変わった形質転換体を効率的に得ることができた。この結果から、R2R3-MYB 遺伝子を用いた形質転換がカラーリーフプランツ育成の手段として有効であることが示された。今後は、*TrMYB1* および *PAPI* 用いた形質転換により、他の花き園芸植物におけるカラーリーフプランツの作出を検討する予定である。

引用文献

- Aida, R., S. Kishimoto, Y. Tanaka and M. Shibata. 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Sci.*, **153**: 33-42.
- Borevitz, J. O., Y. Xia, J. Blount, R. A. Dixon and C. Lamb. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, **12**: 2383-2394.
- Bradley, J. M., K. M. Davies, S. C. Derolles, S. J. Bloor and D. H. Lewis. 1998. The maize *Lc* regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *Plant J.*, **13**: 381-392.
- Chen, K., H. Liu, Q. Lou and Y. Liu. 2017. Ectopic expression of the grape hyacinth (*Muscari armeniacum*) R2R3-MYB transcription factor gene, *MaAN2*, induces anthocyanin accumulation in tobacco. *Front. Plant Sci.*, **8**: 965.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed.*, **106**: 1-26.
- Gonnet, J. F. 1995. A colorimetric look at the RHS Chart - Perspectives for an instrumental determination of colour codes. *J. Hortic. Sci.*, **70**: 191-206.
- Kamiishi, Y., M. Otani, H. Takagi, D.-S. Han, S. Mori, F. Tatsuzawa, H. Okuhara, H. Kobayashi and M. Nakano. 2012. Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. *Mol. Breed.*, **30**: 671-680.
- Kanemaki, A., M. Otani, M. Takano, T. Fujimoto, H. Okuhara, T. Nomizu, M. Kondo, H. Kobayashi, F. Tatsuzawa and M. Nakano. 2018. Ectopic expression of the R2R3-MYB gene from *Tricyrtis* sp. results in leaf color alteration in transgenic *Pelargonium crispum*. *Sci. Hortic.*, **240**: 411-416.
- Koes, R., W. Verweij and F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.*, **10**: 236-242.
- Kuwayama S., S. Mori, M. Nakata, T. Godo and M. Nakano. 2005. Analyses of anthocyanidins and anthocyanins in flower petals of *Lychnis senno* and its related species (Caryophyllaceae). *Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, **58**: 35-38.
- Laitinen, R. A. E., M. Ainasoja, S. K. Broholm, T. H. Teeri and Elomaa, P. 2008. Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. *J. Exp. Bot.*, **59**: 3691-3703.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for

- rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- Nishijima, T., Y. Morita, K. Sasaki, M. Nakayama, H. Yamaguchi, N. Otsubo, T. Niki and T. Niki. 2013. A torenia (*Torenia fournieri* Lind. ex Fourn.) novel mutant 'Flecked' produces variegated flowers by insertion of a DNA transposon into an *R2R3-MYB* gene. *J. Japan. Soc. Hortic. Sci.*, **82**: 39-50.
- Noda, N., R. Aida, S. Kishimoto, K. Ishiguro, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Tanaka and A. Ohmiya. 2013. Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant Cell Physiol.*, **54**: 1684-1695.
- Ohta, S., S. Mita, T. Hattori and K. Nakamura. 1990. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.*, **31**: 805-813.
- Suzuki, K., H. M. Xue, Y. Tanaka, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Murakami, Y. Katsumoto, S. Tsuda and T. Kusumi. 2000. Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. *Mol. Breed.*, **6**: 239-246.
- Suzuki, S., K. Supaibulwatana, M. Mii and M. Nakano. 2001. Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli. *Plant Sci.*, **161**: 89-97.
- Zhao, J., Z. T. Li, J. Chen, R. J. Henny, D. J. Gray and J. Chen. 2013. Purple-leaved *Ficus lyrata* plants produced by overexpressing a grapevine *VvMybA1* gene. *Plant Cell Rep.*, **32**: 1783-1793.
- Zvi, M. M., E. Shklarman, T. Masci, H. Kalev, T. Debener, S. Shafir, M. Ovadis and A. Vainstein. 2012. PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. *New Phytol.* **195**: 335-345.

Leaf color modification in *Torenia concolor* by ectopic expression of R2R3-MYB genes

Takuo FUJIMOTO, Miho TAKANO, Masahiro OTANI and Masaru NAKANO*

(Received January 8, 2019)

Summary

Ornamental plants with red, purple and/or yellow leaves are generally called colored-leaf plants. Colored leaves are resulted from biosynthesis and accumulation of pigments in leaf cells. Among such pigments, anthocyanins are the most major ones, and they are synthesized through the flavonoid biosynthetic pathway. R2R3-MYB, a member of the MYB transcription factor family, is known to activate the flavonoid biosynthetic pathway. In the present study, we examined genetic transformation of *Torenia concolor* with R2R3-MYB genes from *Tricyrtis* sp. (*TrMYBI*) or *Arabidopsis thaliana* (*PAPI*) for producing novel colored-leaf plants. Totally ten and eight independent transgenic plants have so far been obtained by transformation with *TrMYBI* and *PAPI*, respectively. Transgenic plants could be classified into three types according to the leaf color phenotype: green leaves as the wild-type plants (Type I), light red-purple leaves (Type II), and deep red-purple leaves (Type III). Three Type I, two Type II and five Type III transgenic plants were obtained for *TrMYBI*, whereas two Type I, three Type II and three Type III transgenic plants were obtained for *PAPI*. Total anthocyanin contents in leaves of Type III transgenic plants were significantly higher than the vector control. Real-time RT-PCR analysis showed that *TrMYBI* and *PAPI* expression levels generally correlated with the degree of leaf color alteration. These results indicate that ectopic expression of the heterogeneous R2R3-MYB genes in *T. concolor* may activate the flavonoid biosynthetic pathway in leaves leading to anthocyanin accumulation and leaf color alteration.

Bull. Facul. Agric. Niigata Univ., 71:35-42, 2019

Key words : anthocyanin, colored-leaf plant, flavonoid biosynthetic pathway, ornamental plant, R2R3-MYB transcription factor