

# キクにおける外来遺伝子発現に有効なプロモーター

村上英子\*・平島敬太・池上秀利・中原隆夫・市川裕章<sup>1)</sup>

キクにおいて外来遺伝子の不活化を回避し、導入遺伝子の発現率を向上させるために、キクに感染する*Agrobacterium tumefaciens*より単離された新規プロモーター (pMAS201, pMAS102) の機能を、従来プロモーター (CaMV35S, E12 $\Omega$ , NCR) と比較検討した。

*A. tumefaciens*接種21日後のキク葉切片におけるGUS遺伝子の一過的な発現率は、新規プロモーター・pMAS201, pMAS102ではそれぞれ11.4%, 13.6%であり、従来プロモーターの2.7~5.3%と比較して2倍以上高率であった。PCRによりGUS遺伝子導入が確認された再生個体においても、新規プロモーターは従来プロモーターに比べて、GUS活性を示す形質転換体の獲得数が多く、かつGUS活性も高かった。これらのことから、新規プロモーターはキクにおける導入遺伝子の発現に有効なことが明らかとなった。

[キーワード: キク, 形質転換, *Agrobacterium tumefaciens*, プロモーター, GUS遺伝子]

Efficient Promoter for Expression of Transgenes in Chrysanthemum. MURAKAMI Hideko, Keita HIRASHIMA, Hidetoshi IKEGAMI, Takao NAKAHARA, and Hiroaki ICHIKAWA (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818-8549 Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 23: 63-67 (2004)

In developing transgenic chrysanthemum, a transgene can be subject to inactivation by gene silencing. The performances of the promoter is an important factor in stability of expression of transgene. Mas promoter (pMAS102, pMAS201) was cloned from a *Agrobacterium tumefaciens* infected with the chrysanthemum. Expression of the GUS gene driven by pMAS102, pMAS201, 35S, E12 $\Omega$ , NCR was assayed by two technical methods. Histochemically assay showed that the transient GUS activity was higher than that of the 35S, E12 $\Omega$ , NCR promoters in segments 21 days after infection. Three months after infection, insertion of MAS promoter of the expression cassette for the GUS gene increased transformant yields and the GUS activity was higher than that of the 35S, E12 $\Omega$ , NCR promoters. MAS promoter enhanced the integration or expression of the transgene, or both. These results indicated the expression of foreign genes in Chrysanthemum in development of an efficient stable transformation system.

[Key words: Chrysanthemum, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, promoter, GUS gene]

## 結 言

キクは葬祭用の花きとして安定的な需要があり、また開花調節技術の発達で周年栽培が可能になったことなどから、切り花の中で最も生産が多い。本県では八女をはじめ県下全域で生産され、全国第4位の生産量を誇っている。

現在、栽培されている品種としては、秋ギクでは‘神馬’、‘秀芳の力’、夏ギクでは‘岩の白扇’‘精雲’等が主力品種である。これらの品種は白さび病、うどんこ病、べと病などの糸状菌病に弱く、品質向上を図るため薬剤防除が行われている。薬剤防除は多くの経費と労力を要し、作業者の健康や環境の面からも大きな問題となっており、防除回数の削減が重要な課題となっている。これらのことから、優れた切花品質は残したまま、病害抵抗性を強化した品種の育成が望まれている。

形質転換技術は、既存品種の優れた特性を維持したまま特定の形質のみ付与することができるなどの利点があることから、植物育種のひとつの有効な手法として広く認知されている。キクにおいても形質転換による耐虫性<sup>19)</sup>、耐病性付与<sup>18)</sup>などの報告がなされている。著者らもこれまでにキクの白さび病抵抗性品種を育成するために、形質転換技術を確認し<sup>10)</sup>、ヤマモキチナーゼ遺伝子を導入した形質転換体を多数作出した。しかし、キク

では形質転換効率が低いという、外来遺伝子の不活化や発現抑制と思われる現象が頻発し、十分な発現レベルの形質転換体が得られていない。このような導入遺伝子の不活化 (ジーン・サイレンシング) はいくつかの植物で報告されており、いくつかの原因が考えられている<sup>20)</sup>。

形質転換植物の育成において、導入形質が安定して発現する個体を獲得するためには、効率的な形質転換系の確立や外来遺伝子の不活化回避及び発現率の向上が必要不可欠である。そのためのひとつの手法として、対象植物でより強力に機能するプロモーターの選定が挙げられる。そこで本研究では、キクに感染する*Agrobacterium*<sup>15)</sup>より単離された新規プロモーターがキクにおいて外来遺伝子を発現させる機能を、従来プロモーターのそれと比較した。その結果、新規プロモーターが著しく発現率を向上させることを明らかにしたので報告する。

## 材料および方法

### 1 遺伝子の導入

2つの新規プロモーター pMAS201及びpMAS102は、キクにクラウンゴールを形成するマンノピン生産系統 *A. tumefaciens*<sup>15)</sup> 由来のものを農業生物資源研究所新生物資源創出研究グループの市川裕章氏より分譲頂いて、試験に用いた。対照に従来から利用されているプロモーターとしてCaMV35S, CaMV35Sを高発現型に改良したE12 $\Omega$ <sup>14)</sup>、ダイズ退緑斑紋ウイルス由来のNCR<sup>13)</sup>の3種類を用いた。

バイナリーベクターはneomycin phospho transferase II

\*連絡責任者 (バイテク部 現病害虫部)

1) (独)農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループ

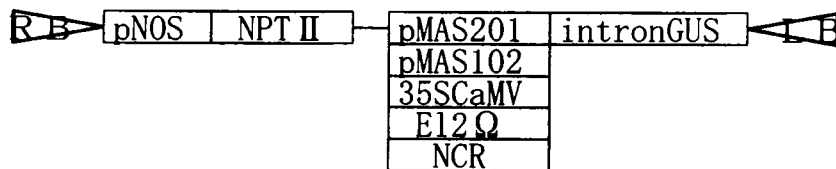


Fig. 1 Construction map of T-DNA region.

pMAS201 : MAS 2'-1' promoter, pMAS102 : MAS 1'-2' promoter, CaMV35S : cauliflower mosaic virus 35S promoter, E12Ω : the longer enhancers of CaMV35S and the Ω sequence of TMV, NCR : the large noncoding region of SoyCMV, intronGUS : intron-β-glucuronidase gene

(NPT II)及びβ-Glucuronidase (GUS)遺伝子をT-DNA内部に持つpBI121 (CLONTECH社)<sup>8)</sup>を用いた。このpBI121のGUS遺伝子をintron GUS遺伝子と入れ替え、さらに上流部に存在するCaMV35Sプロモーター部分を除き、代わりにE12Ω, NCRプロモーター及び2種類の新規プロモーターpMAS201, pMAS102を挿入したベクターを構築した(Fig.1)。こうして得られた2種類の新規プロモーターと3種類の従来プロモーターを持つ、合計5種類のバイナリーベクターを用いて試験を行った。構築したバイナリーベクターは凍結融解法<sup>6)</sup>により*A.tumefaciens* LBA4404 (CLONTECH社)<sup>7)</sup>に導入した。

*A.tumefaciens*はアセトシリシリンゴン100μMを含むpH5.2のYEB培地で前培養後、滅菌水で希釈し、O.D.<sub>540</sub>=0.1となるよう調整した。

供試材料としては、1/2MS培地で無菌的に継代維持しているキク「秀芳の力」を用いた。葉柄よりメスを用いて主脈が含まれるように約2mm×6mmの切片を切り出し、調整した*Agrobacterium*懸濁液に5分間浸漬した。浸漬後、ろ紙で余分な懸濁液を取り除き、カルス形成培地(MS, NAA 1mg/l, BA 0.5mg/l)に置床し、25℃暗黒条件下で3日間共存培養した。その後抗生物質クラフォランを添加した除菌用の培地(MS, NAA 1mg/l, BA 0.5mg/l, clafolan 500mg/l)に移し、25℃暗黒条件下で7日間除菌を行った後、形質転換体選抜のための抗生物質(ジェネティシン)を添加した選抜培地(MS, NAA 1mg/l, BA 0.5mg/l, clafolan 500mg/l, ジェネティシン20mg/l)に移し、14日毎に新しい選抜培地へ継代培養して*Agrobacterium*を除菌しつつ選抜を行った。

## 2 一過的なGUS遺伝子の発現解析

プロモーターがキクでの外来遺伝子の一過的な発現に及ぼす影響を明らかにするため、Jeffersonら<sup>9)</sup>の変法<sup>11)</sup>に従い、X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)を基質としたGUS assayを行った。

*Agrobacterium*接種3日後、7日後、14日後、21日後の切片をGUS染色液(1mM X-Gluc, 0.5mM potassium ferrocyanide, 0.5mM potassium ferricyanide, 0.3% Traiton X-100, 0.1M sodium phosphate pH7.0, 20% methanol)に浸漬し、30秒間減圧処理した後37℃のインキュベーターで24時間反応させた。その後、70%エタノール中で7日間かけて脱色し、青く染色された切片数を調査した。青く染色された切片の割合を百分率で表し、GUS遺伝子の一過的発現率とした。

## 3 PCRによるGUS遺伝子の検出

選抜された抗生物質抵抗性カルスを、再生培地(MS, BA 0.5mg/l, GA3 0.2mg/l)上で培養した。再分化した植物体のうち選抜培地上で発根が認められたものについて、展開葉約50mgからNucleonTM Phytopure (Amersham pharmacia biotech)によりゲノムDNAを抽出し、GUS遺伝子特異的プライマーGUS1, 5'-CACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACG (29mer)及びGUS2, 5'-TTGTTTGCCCTCCCTGCTGCGGTTTTTCAC (29mer)を用いてPCRによりGUS遺伝子の検出を行った。PCRの条件は94℃/9分間予備加熱処理後、変性反応94℃/1分間、アニーリング反応60℃/2分間、伸長反応72℃/3分間の45サイクルとした。PCR反応後アガロースゲル電気泳動により、増幅遺伝子の有無とそのサイズを確認した。

## 4 定量的なGUS遺伝子の発現解析

GUS遺伝子の導入が確認された形質転換キク(*A.tumefaciens*接種3ヶ月後)で、5種類のプロモーターがGUS遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするため、Jeffersonらの方法<sup>9)</sup>に従い、MUG (4-methyl umbelliferyl β-D-Glucuronide)を基質とした蛍光光度分析(MUG assay)を行った。

抽出緩衝液(50mM sodium phosphate pH 7.0, 10mM β-mercaptoethanol, 10mM Na2EDTA, 0.1% Sarcosyl)を用いて、再生植物体の葉50mgからタンパク質を抽出した。MUGを基質として葉の抽出物と37℃で60分間反応させた。生成された4-MUについて、365nmの励起光による455nmの蛍光を画像解析装置(Fluorchem TM 8000, ASTER)で測定した。

抽出物中のタンパク質含量の測定はProtein assay Kit (BCA Protein Assay Reagent, PIERCE)により行った。GUS遺伝子の発現レベルは4-MU pM / mg protein · minで算出した。

## 結 果

### 1 *A. tumefaciens*接種切片におけるGUS遺伝子の一過的発現

プロモーターの違いがGUS遺伝子の一過的発現に及ぼす影響を明らかにするため、*A.tumefaciens*接種3, 7, 14, 21日後の切片のGUS染色を行った結果をTable 1.に示した。

pMAS201及びpMAS102 (以下、新規プロモーター)はCaMV35S, E12Ω及びNCR (以下、従来プロモーター)

Table 1 Effects of five promoter on transient expression of GUS gene in the chrysanthemum leaf segment

| Days after inoculation of <i>A.tumefaciens</i> |       |       |        |            |
|------------------------------------------------|-------|-------|--------|------------|
| promoter                                       | 3days | 7days | 14days | 21days     |
| pMAS201                                        | 51.4  | 63.0  | 30.4   | 11.4 a (%) |
| pMAS102                                        | 87.0  | 67.7  | 35.5   | 13.6 a     |
| 35S                                            | 59.8  | 41.4  | 16.9   | 2.7 b      |
| EL2Ω                                           | 65.7  | 51.5  | 27.2   | 5.3 ab     |
| NCR                                            | 70.5  | 31.2  | 31.2   | 3.2 b      |

Ten days after inoculation the selection began on medium containing 20 μg/ml Genetecin. Transient lines showing GUS activity 3,7,14,21days after inoculation. Experiment was replicated three times.

1) numbers of GUS-expressing explants / number of explants × 100 (%)

2) The same letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$  by multiplex comparison official approval after arc sign conversion was performed.

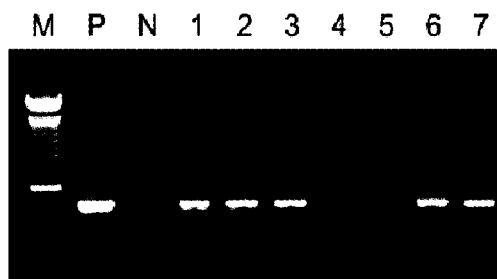


Fig. 2 Electrophoretic patterns of amplified GUS gene by PCR on regenerated Chrysanthemum.

lane P: DNA of transformant of chrysanthemum with the GUS gene, lane N: DNA of non-transformed plant, lane 1-7: DNA of Genetecin-resistant plants, lane M: 100bp DNA Ladder

に比較して、接種後3日を除き高い発現率を示した。また、接種後7～14日では、新規プロモーターの発現率は、従来のプロモーターと比較して高いもののその差はわずかであった。しかし、接種21日後には、新規プロモーター pMAS201, pMAS102のGUS遺伝子の発現率はそれぞれ11.4%, 13.6%であり、従来プロモーターの2.7～5.3%よりも2倍以上高い発現率を示し、有意差が認められた。

## 2 再生植物体での導入遺伝子の検出

*A.tumefaciens*を接種したキク 75葉切片(25切片の3反復)から得られた再生植物体は、pMAS201で44個体、pMAS102で60個体、CaMV35Sで34個体、EL2Ωで11個体、NCRで15個体であった。また、再生植物体全てをPCR解析した結果(Fig. 2), pMAS201で16個体、pMAS102で18個体、CaMV35Sで6個体、EL2Ωで6個体、NCRで3個体でGUS遺伝子の導入が確認された。プロモーターとしてpMAS201, pMAS102, CaMV35S, EL2Ω, NCRを用いた場合の形質転換率{(組換え体数/供試切片数) × 100}は、それぞれ21.3%, 24.0%, 8.0%, 8.0%, および4.0%であった。

## 3 形質転換体におけるGUS遺伝子の発現

プロモーターの違いが形質転換キクのGUS活性に及ぼ

す影響を明らかにするため、PCR解析でGUS遺伝子の導入が確認された再生個体(*A.tumefaciens*接種3ヶ月後)について、定量的なGUS遺伝子の発現解析を行い、その結果をFig. 3に示した。PCRでGUS遺伝子の導入が確認された全個体について解析を行ったため、プロモーターの種類によって供試数が異なった。

形質転換体の間で、GUS活性は大きな差が認められた。特に、新規プロモーターを用いた場合、GUS活性の個体間差が大きかった。また、新規プロモーターでは従来プロモーターに比べて、対照の非形質転換体より高いGUS活性を示す個体の割合が多く認められた。

一方、全てのプロモーターにおいて、GUS遺伝子の導入が確認されているに関わらず、GUS活性が非形質転換体と同じか、もしくはそれ以下の個体が多数確認された。

## 考 察

CaMV35Sプロモーターは多くの植物種で利用されている<sup>3,22,23)</sup>が、その発現レベルは目標とするレベルには及ばないことが多い。これまで著者らは、CaMV35Sプロモーター、CaMV35Sプロモーターを高発現型に改良したEL2Ωプロモーターに、GUS遺伝子をつないだバイナリーベクターを用いてキクの形質転換を行ってきた。その結果、EL2Ω-GUSが導入された形質転換キク96個体

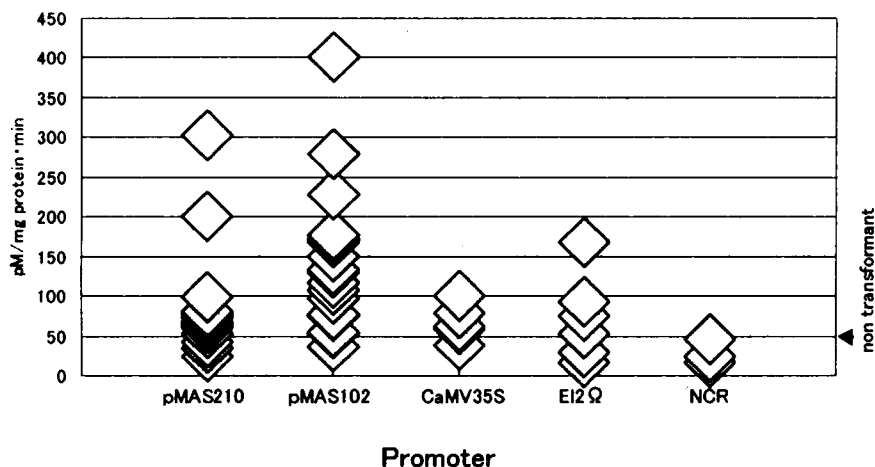


Fig. 3 Effects of five promoters on expression of the GUS gene in the transgenic chrysanthemum 3 months after the inoculation.

のうち、発現量には差があるものの、安定的にGUS活性を示すものが3個体確認されている。しかし、その遺伝子導入効率は非常に低く、遺伝子の導入が確認されてもGUS活性を示さないか、当初は活性を示していても次第に活性を失う個体が多かった。つまり、安定的に遺伝子を発現し続ける形質転換体を得るためには、膨大な数のキク切片に対して*Agrobacterium*を接種しなければならず、実用的な形質転換キクの獲得を困難なものにしている。このため形質転換効率の向上と、強力なプロモーターや翻訳エンハンサー等の利用による導入遺伝子の不活化の回避が必要と考えられる。

今回5種類のプロモーターを用いて形質転換を行った結果、Table 1.に示す通り、*A.tumefaciens*接種3日後の発現率は大きく差がなかったものの、接種21日後における発現率は、新規プロモーターが従来プロモーターに比較して2倍以上高く、一過的なGUS活性を高めることが明らかになった。

また、PCRでGUS遺伝子の導入が認められた形質転換体(*Agrobacterium*接種3ヶ月後)においても、新規プロモーターは従来プロモーターに比較して、多くのGUS陽性個体が得られ、かつ高いGUS活性を示した(Fig.3)。接種直後の段階で観察されるGUS遺伝子の発現は、まだ植物ゲノムへ安定的に組み込まれていない一過的なものである。このため、遺伝子導入後、次第にその発現率が低下していくと考えられる。しかし、新規プロモーター、特にpMAS102は従来プロモーターと比較して、接種直後における導入遺伝子の発現の低下が緩やかであることから、より安定的にゲノムへ組み込まれ、外来遺伝子の発現を高く維持できるものと考えられる。

近年、タバコやイネではCaMV35Sプロモーターよりもマーカー遺伝子の発現を高める強力なプロモーターが報告されているが、タバコで最も発現効率を高めるプロモーターはイネで同様の高い発現効果を示さず、植物種間、あるいは双子葉植物と単子葉植物の間で遺伝子発現の特異性に差があることが示唆されている<sup>14)</sup>。キクにおけるGUS遺伝子の発現は他の植物に比べて低く、タバコの1/10<sup>4)</sup>、カラコエの1/100<sup>1)</sup>でしかない。このことから

キクでのCaMV35Sプロモーターの働きはタバコなどと比べて低いと推測されており、キクに特異的な高発現プロモーターを開発することが必要である。今回用いた新規プロモーターは、キクに感染しクラウン病を形成した*Agrobacterium*のT-DNA上に存在するものである。このため、新規プロモーターは従来の植物ウイルス由来のプロモーターに比べ、キクにおいて特異的に発現が高いと考えられる。

これまでにキクの形質転換については多くの報告があり<sup>5,12)</sup>、実用的な形質を持つ形質転換体の作出も報告されている<sup>18,19)</sup>。しかし、今回の結果同様、形質転換系統ごとに導入遺伝子の発現レベルがばらつくこと<sup>16,21)</sup>、作出した組換え体において導入遺伝子の発現がみられない<sup>2,17,21)</sup>という現象も観察されている。これらのことから、キクは導入遺伝子の不活化を比較的起こしやすい植物であると推察される。今回、新規プロモーターは比較的高い発現を示したが、一方ではGUS活性のレベルが非形質転換体と差がない程度に低く、導入遺伝子の不活化が起きていると思われる個体が観察された。しかし、このような導入遺伝子の不活化が起きる頻度及び程度はプロモーターにより差がみられ、新規プロモーターでは従来プロモーターより少なかった(Fig. 3)。このことから新規プロモーターでは導入遺伝子の発現抑制が発生しにくい可能性があり、形質転換体においても長期的に遺伝子発現させることが期待される。しかし、組換えキクにおいても植物体の成長に伴って次第に導入遺伝子の発現が見られなくなる現象が確認されている<sup>21)</sup>。従って、新規プロモーターの導入によりGUS遺伝子の発現が認められた個体について、GUS活性を経時的に観察し、発現の長期的な安定性を調査する必要がある。

また、新規プロモーターを用いた場合は、従来プロモーターに比べて、得られた形質転換体数が多かった(Fig. 3)。新規プロモーターがキクに感染しクラウン病を形成した*A.tumefaciens*由来であること、双方向性を有するデュアルプロモーターであることなどが選抜効率や再生効率に何らかの影響を及ぼしている可能性が推察される。このことから新規プロモーターは形質転

換キク獲得のために有用であると考えられる。

本研究においてpMAS201及びpMAS102プロモーターは従来のプロモーターに比較して、キクでの外来遺伝子発現を高めることが明らかになった。今後、これらのプロモーターに有用遺伝子を連結することで、実用的な形質転換キクを効率よく獲得できることが期待される。

## 引用文献

- 1) Aida, R. and M. Shibata (1996) Transformation of *Karanchoe blossfeldiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgenic silencing. *Plant Sci.* **121**: 175-185.
- 2) Benetka, V. and D. Pavingerova (1995) Phenotypic differences in transgenic plants of chrysanthemum. *Plant Physiol.* **85**: 1103-1109.
- 3) Benfey, P.N. and Chua, N-H (1990) The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinational regulation of transcription in plants. *Science* **250**: 959-966.
- 4) Daub, M.E., A.E. Jenness, L.A. Urban and S.C. Brintle (1994) Transformation frequency and foreign gene expression in burley and flue-cured cultivars of tobacco. *Tob. Sci.* **38**: 51-54.
- 5) 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 Report.* **14**: 59-64.
- 6) Gynheung, A. (1987) Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology.* **153**: 292-305.
- 7) Hoekema, A., P.R. Hirsch, P.J. Hooykaas and R.A. Schilperoort (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature.* **303**: 179-180.
- 8) Jefferson, R.A., Bevan, M. and Kavanagh, T. (1978) The use of the E. coli beta-glucuronidase gene as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants. *Biochemical Society Transactions.* **15**: 17-18.
- 9) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907.
- 10) 古賀正明, 平島敬太, 中原隆夫 (1999) キク '秀芳の力' における形質転換体獲得効率に及ぼす諸要因. *九州農業研究* **61**: 192.
- 11) Kosugi, S., Phashi, Y., Nakajima, K., Arai, Y. (1990) An improved assay for  $\beta$ -glucuronidase in transformed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous-glucuronidase activity. *Plant Sci.* **70**: 133-140.
- 12) Ledger, S. E., S. C. Deroles and N. K. Given (1991) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Rep.* **10**: 195-199.
- 13) Luis R. Conci, Y. Nishizawa, M. Saito, T. Date, A. Hasegawa, K. Miki and T. Hibi (1993) A strong promoter fragment from the large noncoding region of soybean chlorotic mottle virus DNA. *日植病報* **59**: 432-437.
- 14) Mitsuhara, I., M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohsima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Katayose, S. Nakamura, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki and Y. Ohashi (1996) Efficient Promoter Cassettes for Enhanced of foreign Genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants. *Plant Cell Physiol.* **37** (1): 49-59.
- 15) 太田光輝, 西山幸司 (1984) 花き類の根頭がんしゅ病に関する研究 I. 病害の発生ならびに病原細菌の細菌学的性質. *日植病報* **50**: 197-204.
- 16) Renou, J. P., P. Brochard and R. Jalouzet (1993) Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. *Plant. Sci.* **89**: 185-197.
- 17) Sherman, J. M., J. W. Moyer and M. E. Daub (1998a) A regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation system for genetically diverse Chrysanthemum cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **123**: 189-194.
- 18) Sherman, J. M., J. W. Moyer and M. E. Daub (1998b) Tomato spotted wilt virus resistance in chrysanthemum expressing the viral nucleocapsid gene. *Plant Disease* **82**: 407-414.
- 19) Shinoyama, H., M. Komano, Y. Nomura and T. Nagai. (2002) Introduction of Delta-endotoxin Gene of *Bacillus thuringiensis* to Chrysanthemum [*Dendranthema*  $\times$  *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] for Insect Resistance. *Breeding Science* **52**: 43-50.
- 20) Sonoda, S. and Nishiguchi, M. (2000) Delayed activation of post-transcriptional gene silencing and de novo transgene methylation in plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus. *Plant Sci.* **156**: 137-144.
- 21) Takatsu, Y. (2002) Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to fungal diseases.
- 22) Terada, R. and Shimamoto, K. (1990) Expression of CaMV 35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 389-344.
- 23) Yang, N-S. And Christou, P. (1990) Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS gene in transgenic soybean plants. *Dev. Genet.* **11**: 289-293.