



# Establishment of genome editing platform in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)

Li, ZhongJian

---

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2025-03-25

(Date of Publication)

2027-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9225号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496506>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



# 博士論文内容の要旨

氏 名 LI ZHONGJIAN

専攻・講座 資源生命科学専攻・応用植物学講座

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

Establishment of genome editing platform in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)  
（カーネーションのゲノム編集基盤の構築）

---

---

---

---

---

指導教員 宇野雄一

The carnation (*Dianthus caryophyllus*,  $2n=30$ ) is globally one of the top three cut flowers of commercial importance and is often used for Mother's Day. It belongs to *Caryophyllaceae* family, originates in the Mediterranean, and is cultivated globally (Anonis,1985; Reddy, 2016). Many variations in flower color, flower shape, and plant posture (standard or spray type) were produced to meet the high demand for occasions, such as Mother's Day and other annual events. Carnations are rich in color and flowers. They bloom year-round in the greenhouses. In addition to being used as cut flowers, they can also be used to beautify gardens and parks. Carnations are suitable for growing at 14–21°C. Carnations are usually vegetatively reproduced by cutting because of their high heterozygosity and low seed production efficiency. The complex genetic background associated with heterozygosity complicates breeding. In carnation breeding, crossbreeding and on-bud mutations were the main methods used to date.

As mentioned above, almost all carnation varieties reproduce vegetatively and genetically as heterozygotes. If the heterozygous cultivar is selected as the origin for transformation,  $T_0$  plants should be propagated vegetatively to avoid the segregation of traits other than those of the target. In this case, stock maintenance is time-consuming. If a homozygote was selected, we could obtain  $T_2$  homozygous seeds that could be easily preserved to facilitate genetic analysis. Some of the cultivars used for seed propagation are commercially available. Among them, not  $F_1$  but pure bred variety can be used as homozygous materials. The 'Chabaud Giant' variety (Fukukaen Nursery & Bulb Co., Ltd., Aichi, Japan), intended for seed propagation, is nearly homozygous as a pure bred variety, exhibiting little variation.

Establishment of a regeneration system using tissue culture is the basis for plant gene transformation. Regenerated plants were obtained from many types of explants,

including stem tips, axillary buds, leaves, petals, sepals, ovules, pollen, protoplasts, and somatic cells. Additionally, the conditions for callus induction differed among the varieties. However, currently, the main regeneration system of carnations is the direct regeneration of adventitious shoots, whereas regeneration through callus and somatic embryogenesis was rarely reported (Nontaswatsri et al., 2002). Shoot or root formation from calli is required for transformation experiments to avoid the production of chimeric regenerants. However, the use of homozygotes as experimental materials for tissue culture has not yet been reported. Hyperhydricity, which suppresses shoot formation and acclimatization, is a serious problem for carnation growth *in vitro*. However, no perfect approach existed to solve this problem thus far (Yadav et al., 2003). Therefore, establishing a callus-mediated regeneration protocol using homozygous carnations as the plant material is important for future experiments.

Anther culture is one of the methods used to obtain homozygous plants and offers a considerable time advantage over traditional hybridization methods. The study of plant pollen began in 1953. Tulecke (1953) cultured mature pollen of *Ginkgo biloba* and induced calli. Guha and Maheshuari (1964) obtained embryoids and regenerated plants from anther culture of *Datura innoxia*. Anther culture techniques were applied to a variety of plants, and haploid plants such as datura and tobacco were obtained from over 250 plants using anther culture (Maluszynski et al., 2003). As most carnations are heterozygous, this is a disadvantage for the breeding of new varieties and genetic research in carnations. Obtaining homozygous carnations will be highly significant for future research. However, successful anther culture in carnations has not yet been reported. With the whole genome of the carnation variety 'Francesco' was sequenced, obtaining a homozygous 'Francesco' through anther culture would greatly facilitate the

transformation studies, including genome editing.

New varieties are primarily developed through crossbreeding, natural variation, and artificially induced variation using methods such as radiation and chemical treatments (Henderson and Salt 2017). Crossbreeding is the main approach used to create new carnation varieties meeting commercial demand. However, this methodology requires a large amount of labor and is time consuming. Recently, genome editing has emerged as a novel technology to overcome these problems, making the generation of new plant genotypes with accurate trait modifications possible in less time. Genome editing technology uses artificially designed and modified nucleases to make precise targeted modifications to the genome, including targeted gene knock-in, functional gene knockout, and targeted fragment replacement. These sequence-specific nucleases are divided into three main types: zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and the clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9 system (CRISPR/Cas9). Among these, the CRISPR/Cas9 system has become a popular gene editing system and is widely used because of its simple vector construction and high editing efficiency. CRISPR/Cas9 uses Cas9 and target site-specific gRNA to cut the genome, form a double-strand break (DSB) at the designed target site, and modify the DNA sequence using the DSB repair process. Furthermore, CRISPR/Cas9 genome editing can prevent transgenesis, which may help avoid public and administrative concerns regarding the cultivation and commercialization of genetically modified crops. In 2012, the CRISPR/Cas9 system was first demonstrated in mammalian cells and has since been utilized in plants. Since its success in plants in 2013, the CRISPR/Cas9 system has been used in rice, wheat, Arabidopsis, tobacco, tomato, corn, bean, and petunia many other plants (Gao et al.,

2019). However, a successful study in carnations has not been reported, except for two articles (Adedeji et al., 2024; Mori et al. 2024). For studying carnations and to improve their quality in the future, it would be meaningful to establish a CRISPR/Cas9 genome editing system.

The study objective was to establish a regeneration system using a homozygous carnation variety, obtain homozygous carnations by anther culture using a heterozygous variety as the experimental material, and develop a CRISPR/Cas9 genome-editing system in carnations using the *PDS* as a target gene.

In chapter 2, the effects of four auxins (indole-3-butyric acid, IBA;  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, NAA; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D; and 3-indoleacetic acid, IAA) and five cytokinins (6-benzyladenine, BA; thidiazuron, TDZ; kinetin, KT; zeatin; and N<sup>6</sup>-2-isopentenyl adenine, 2IP) on callus and shoot induction were evaluated with homozygous carnation varieties. The combination of 0.05 mg/l 2,4-D and 4 mg/l TDZ had the highest shoot formation rate (28 %). Shoot hyperhydricity was reduced by increasing the size of the culture vessels. Root formation from shoots was promoted in the presence of IBA, NAA, and KT. Sucrose, agar, and AgNO<sub>3</sub> concentrations as well as pH was optimized to facilitate regeneration.

In Chapter 3, the conditions for anther culture were optimized to obtain a pure line from a heterozygous carnation variety, ‘Francesco,’ whose genome sequence was released. When the type of phytohormone and its concentration were examined, 1.0 mg/l TDZ and 0.5 mg/l 2,4-D showed the highest efficiency for induction of callus and shoots. Induction was facilitated by cold pre-treatment for 2 days. The ploidy of anther-derived shoots was examined by PCR using SSR markers and ploidy analysis by flow cytometry. Haploids, doubled haploids, and tetraploids can be obtained from an established anther

culture.

In Chapter 4, the CRISPR/Cas9 genome editing system for carnations was established using a homozygous carnation variety and *phytoene desaturase* (*PDS*). Hygromycin (12.5 mg) was used as the selection agent after *Agrobacterium*-mediated transformation. Finally, the *PDS* gene was knocked out using the CRISPR/Cas9 system. The albino shoots had a one-base deletion or two-base insertion in the genome sequence. This indicates that the CRISPR/Cas9 genome editing system for homozygous carnations was successfully established, which may contribute to the rapid breeding of new varieties.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                  |     |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|
| 氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | LI ZHONGJIAN                                                                                                     |     |      |
| 論文<br>題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Establishment of genome editing platform in carnation ( <i>Dianthus caryophyllus</i> L.)<br>(カーネーションのゲノム編集基盤の構築) |     |      |
| 審査<br>委員                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 区 分                                                                                                              | 職 名 | 氏 名  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 主 査                                                                                                              | 教授  | 宇野雄一 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 副 査                                                                                                              | 教授  | 安田剛志 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 副 査                                                                                                              | 教授  | 深山 浩 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 副 査                                                                                                              | 助教  | 小山竜平 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 副 査                                                                                                              |     |      |
| 要 旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                  |     |      |
| <p>カーネーション(<i>Dianthus caryophyllus</i> L., 2n=30)は世界の三大花きの一つであり、日本でも2番目に出荷量が多い重要な品目である。切り花用と鉢物用など、需要拡大に応じて多数の品種が育成されてきた。しかしながら、国内の作付け面積と出荷本数は右肩下がりであり、反対に中国やコロンビアからの輸入が台頭している。品種も外国産が多く、適地で栽培された低価格の輸入品に対抗するためには、国内栽培用のオリジナル品種の開発が必要とされている。カーネーションの育種目標としては、花色、花型、花持ち性などに加えて、耐病性、耐暑性、低温生産性、高生産性など、様々な形質が挙げられる。これまでのカーネーションの育種においては、主として交配や突然変異が利用されてきた。その後に遺伝子組換えによる品種が育成され、最近ではゲノム編集技術の利用が始まりつつある。ゲノム編集は狙った遺伝子を改変できることから、効果的に品種開発を加速できる。また外来遺伝子を除けば遺伝子組換えに該当しないので社会的受容が見込める。外来遺伝子を除いたヌル分離体は自殖を通して得ることができるが、ほとんどのカーネーションは栄養繁殖を主体としたヘテロ性であるため、次世代では品種特性を維持できないことが問題とされている。遺伝子がゲノムに挿入されない方法として、RNA-ペプチド複合体をプロトプラストや組織に一過的に導入するゲノム編集が最近報告されているが、再分化効率、体細胞変異、キメラ性に難点がある。この問題を回避するために、本研究では種子繁殖系の固定種のカーネーションを材料に用いることで、安定的形質転換によるゲノム編集の確立を目指している。また、ヘテロ性のカーネーション品種について、ゲノム編集用のホモ系統を短期間で得るために薬培養の適用を検討している。</p> <p>本論文は4章から構成されており、まず第1章では、この研究の着想に至った背景ならびに研究の目的を記述している。</p> <p>第2章では、種子繁殖系の固定種を材料として、葉片の培養によるカルスおよびシュート誘導を検討している。4種類のオーキシシンと5種類のサイトカイニン、3段階の濃度の計60種類の組み合わせの中から、カルス誘導率が高い2,4-DとTDZを選択した。さらにこれらの植物ホルモンについて49種類の濃度処理区を設定し、0.05 mg/l 2,4-Dと4 mg/l TDZの組み合わせにおいて最もシュート形成率が高いことを</p> |                                                                                                                  |     |      |

| 氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | LI ZHONGJIAN |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <p data-bbox="140 203 1485 490">見いだした。また、培養の過程では、カルスとシュートが過剰な水分を含み半透明で変形する水浸状化 (hyperhydricity) が頻発し、再分化と順化の効率が下がったため、スクロース、寒天、AgNO<sub>3</sub>の培地添加物の濃度条件と共に、pH や容器体積の条件を検討している。その結果、30g/l のスクロース、8g/l の寒天、pH5.8、450ml の容器体積が、水浸状化の回避に最適であることを明らかにしている。さらにシュートからの発根条件を検討し、0.01mg/L の IBA と 450ml の容器体積が発根率を高めることを示している。以上により、カーネーションの固定種の葉片から個体への再分化系を確立している。</p> <p data-bbox="140 557 1485 1196">第 3 章では、ゲノム配列が公開された栄養繁殖系のヘテロ性品種'Francesco'を材料とし、半数体獲得のために薬培養を試み、最適培養条件を検討している。3 種類のオーキシシンと 3 種類のサイトカイニン、3 段階の濃度の計 27 種類の組み合わせの中から、シュート誘導率が高い 2,4-D と TDZ を選択した。これらの植物ホルモンについて 25 種類の濃度処理区を設定し、0.5mg/l 2,4-D と 1.0mg/l TDZ の組み合わせにおいて最もシュート形成率が高いことを見いだした。また、4℃ の低温で 2 日間の前処理を行うと、カルスの脱分化とシュート形成が促進されることを明らかにしている。次に、獲得した 31 株の薬由来シュートについて SSR マーカーによるジェノタイピングを行い、7 株が小孢子由来の半数体であると判断している。さらにフローサイトメトリーにより倍数性を再確認している。今後は半数体シュートの発根馴化条件の詳細な検討や倍加半数体の育成が必要ではあるが、本研究はカーネーションの薬培養により半数体を獲得した初めての事例である。'Francesco'は、カーネーションでゲノム配列が公開された唯一の品種であり、ゲノム情報に基づく標的遺伝子改変の設計が容易であることから、今後の品種改良の短期化に貢献できる。また倍加半数体による純系の作出は F<sub>1</sub> 雑種の開発につながり、ウィルス感染率が高いカーネーションの種子繁殖によるウィルスフリー化が期待できる。</p> <p data-bbox="140 1263 1485 1803">第 4 章では、第 2 章で確立した再分化系を使用して種子繁殖系固定種のゲノム編集を試みている。アグロバクテリウムを介した形質転換系では、選抜培地に添加する抗生物質を検討し、エスケープを除去し、かつ植物体の生育を完全に阻害しない最適な濃度の抗生物質が 12.5 mg/l のハイグロマイシンであることを示している。ゲノム編集の標的としては、カロテノイドの生合成過程におけるフィトエン以降の脱水素反応を触媒する不飽和化酵素としてフィトエンデサチュラーゼ (PDS) を選択し、色素合成が阻害されるアルビノを指標としている。次に、供試品種の <i>PDS</i> 遺伝子のクローニングを行い、シーケンスを確認することにより、CRISPR/Cas9 の標的となる PAM 配列と gRNA を設計している。その後、構築した PDS-KO-CRISPR/Cas9 ベクターをアグロバクテリウムに導入してカーネーションの葉片に感染させ、再分化したシュートの中からアルビノを呈する株を選抜している。アルビノシュートから抽出した gDNA の PCR およびシーケンスによってゲノム配列を確認し、1 塩基の欠失または 2 塩基の挿入があることを明らかにしている。これらの結果から、種子繁殖系固定種を用いたカーネーションのゲノム編集システムを確立したといえる。</p> <p data-bbox="140 1870 1485 2004">以上のように、本研究は、種子繁殖型の固定種を用いたカーネーションの再分化系とゲノム編集、さらには栄養繁殖型のヘテロ接合性品種を用いた薬培養を研究したものであり、今後のカーネーションの品種改良について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。</p> <p data-bbox="172 2022 1342 2056">よって、学位申請者の LI ZHONGJIAN は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。</p> |              |