

Agrobacterium rhizogenes 野生株(MAFF 301724)による カラタチ形質転換体の作出

金好純子

キーワード：カラタチ, *Agrobacterium rhizogenes*, 形質転換体, わい化, 発根力

現在、我が国のほとんどのカンキツ類は、カラタチ (*Poncirus trifoliata* Rafin) を台木として栽培されている。しかし、ハッサク等の中晩柑類や、青島温州等の高品質生産が可能なウンシュウミカンの系統は、既存のカラタチ台木では樹高が3 m以上に達することがあり、傾斜地が多い本県の産地では、作業の効率や安全性に欠ける場面が多い。そのため、生産性を低減することなく、農作業を快適で効率的に行うことができる低樹高化技術の開発が求められている。果樹の低樹高化は、わい性台木の利用や、整枝法の改善によって行われているが、前者はリング、セイヨウナシ、モモ、オウトウ等多くの樹種で実用化している⁸⁾。カンキツでも近年、カラタチの変異系統である‘ヒリュウ’が、わい性台木として注目されている⁹⁾が、さらに収益性の高い台木として、単位面積当たりの収量を維持しつつ、樹容積を小さくすることが可能なわい性台木が求められている。

これまで、わい性台木の育成は、多くの遺伝資源からの選抜や、それら遺伝資源の交雑育種により行われてきた⁸⁾。しかし、この手法は、目的とする形質を持つ台木の育成までに長期間を要するため、育種年限をさらに短縮させる手法の開発が期待されている。筆者は、この問題を解決する方策の一つとして、土壤細菌である *Agrobacterium rhizogenes* を利用した形質転換法に着目した。本法による形質転換体は、これまでに多くの作物で作出され、節間の短縮、分枝の増加、根系の発達等、農業上有用な形質の発現が報告されている^{2,13)}。そこで筆者は、RiプラスミドのT-DNA領域の遺伝子のうち、わい化遺伝子として知られている *rolC* のみをカラタチに導入し、形質転換体は節間が短くなり、わい化することを明らかにした⁷⁾。さらに、わい化程度は、*rolC* のプロモーターによっても異なり、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sのプロモーターの調節下にある

rolC を導入した形質転換体は、極端に節間が短くなり、実用的な利用が困難な個体が多かった。一方、*rolC* 自体のプロモーターでは、幅広いわい化程度の形質転換体が出現した⁷⁾。そこで、*rolC* 自体のプロモーターを用いたほうが、実用栽培に適合するわい化程度の個体を選抜できる可能性が高いと考えた。本報告では、遺伝子組換えの規制に接触しない野生株であり、植物防疫上規制のない、国内で分離された *A. rhizogenes* によるカラタチの形質転換系を開発し、作出した形質転換体の特性を明らかにしたので報告する。

材料及び方法

1. 供試材料

カラタチの種子をはく皮し、1%塩素濃度のアンチホルミンで15分間滅菌後、 $\frac{1}{2}$ 濃度の Murashige and Skoog (以下、MS と記す) 培地¹¹⁾に無菌播種して、25°C、暗黒条件下で20日間培養した。発芽した実生のえき芽を除いた上胚軸を約1 cmに切断し、形質転換体作出の材料として用いた。

形質転換体を作成するための菌株は、千葉県でメロンより分離された *A. rhizogenes* 1724株(MAFF 301724, 以下、1724株と記す)¹²⁾を用いた。

2. 試験方法

1) 形質転換体の作出

1724株は、3 ml の YEB 培地⁴⁾で約16時間液体振盪培養して増殖した後、100 μ M アセトシリンゴンを添加した $\frac{1}{2}$ 濃度の MS 培地で約 10^8 CFU/ml に調整して、切片を浸漬する菌液とした。形質転換処理区の上胚軸切片は、菌液に10分間浸漬した後、100 μ M アセトシリンゴンを添加した $\frac{1}{2}$ 濃度の MS 培地に置床し、25°C、暗黒条件下で、菌と4日間共存培養して感染を促した。その後、

切片は500mg/l クラフロンを添加した $\frac{1}{2}$ 濃度のMS培地に移植して毛状根を誘導した。対照区の切片は、菌液への浸漬を行わずに $\frac{1}{2}$ 濃度のMS培地に置床し、処理区と同一条件で培養した。なお、供試切片数は、処理区では216本、対照区では30本とした。切片から発生した毛状根は、500mg/l クラフロンを添加した $\frac{1}{2}$ 濃度のMS培地を用い、2～3週間の間隔で5～7回継代培養して除菌した。その後、毛状根を約1cmに切り、0.5mg/l 6-ベンジルアミノプリン(BA)を添加した $\frac{1}{2}$ 濃度のMS培地に移植し、不定芽の形成を促した。不定芽から伸長したシュートは、 $\frac{1}{2}$ 濃度のMS培地で発根させた。毛状根誘導から発根までの培養条件は、25℃、16時間日長、3000luxとした。

2) 導入遺伝子の解析

(1) オパイン分析

遺伝子の導入及び発現は、オパイン(アグロバクテリウムが感染しT-DNA領域が組み込まれた植物でのみ生産される特殊なアミノ酸)の分析により確認した。分析に供試する個体は、毛状根から再生した植物体のうち、わい化程度の異なる6個体とした。オパインの分析は、1724株が生産するオパインの一種であるミキモピン⁶⁾を検出した。検出は、毛状根より再生したシュートの葉に1N塩酸を加えて磨砕し、10分間煮沸した後、磨砕液の上清で濾紙電気泳動し、パウリ染色する方法により行った。

(2) PCR 分析

rol 遺伝子の導入及び1724株の除菌の確認は、オパイン分析を行った6個体についてPCR分析により行った。PCR分析に用いるDNAは、再生したシュートの葉からSDS法⁵⁾により抽出した。*rol* 遺伝子の導入の確認は、T-DNA領域の*rol* 遺伝子の一部、1635bpを増幅するプライマーである1724A-1724B⁹⁾を用いた。また、PCR分析は、非常に敏感なDNAの検出法であるため、完全にアグロバクテリウムが除菌されず、組織の中に残っている場合には、菌由来の*rol* 遺伝子が増幅される。そのため、形質転換体のDNAを鋳型としたPCR分析においては、検出されたバンドが菌由来でないことを確認する必要がある。一方、アグロバクテリウムのT-DNA領域が組み込まれた植物体では、TL-DNAの境界領域は欠落する。このことを利用して、TL-DNAの境界領域と、その近傍のORF1を認識して962bpを増幅するプライマーTL-B-ORF1を用いたPCR分析で、増幅バンドが認められなければ、除菌を確認できることが報告されている⁹⁾。そこで、この手法により除菌の確認を行った。反応液は、10mM トリス塩酸(pH

8.8)、50mM 塩化カリウム、1.5mM 塩化マグネシウムを組成とする緩衝液(Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Germany)を用い、50ng 鋳型DNA、1μM プライマー、200μM dNTPs、0.5units Taq DNAポリメラーゼ(Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Germany)を混合し、全量50μlで反応を行った。PCR反応は、サイモクリアーII(アトー社製、型式AB-1820)を用い、反応条件は94℃で2分間保温した後、94℃で45秒、次いで55℃で30秒、次いで72℃で2分を1サイクルとし、45サイクル反応させた。

3) 形質転換体の形態特性調査

オパイン分析及びPCR分析で形質転換体と確認した5個体の形態的特性調査は、形質転換体のえき芽をカラタチに接ぎ木し、2か月間、20～30℃、16時間日長、3000lux、底面給水条件下で育苗し、伸長した茎の中位の節間長、葉身長、接木部からの主幹長を1区3反復で測定した。なお、台木として用いたカラタチは、パーミキュライトに播種後、暗所で2週間育てた実生を用いた。

4) 形質転換体の挿し木発根能力調査

形質転換体の繁殖能力の調査は、2年生の形質転換体5個体のうち、奇形の1個体を除いた4個体(個体No. 2, 3, 4, 5)と同樹齢の非形質転換体を用い、挿し木試験により行った。挿し穂は、当年枝から1996年8月上旬に採取し、2～3葉をつけたまま約12cmの長さに調整した。挿し穂からの発根は、挿し穂基部にオキシベロン(IBA 0.5%含有)を塗布して、粒形5～6mmの鹿沼土に挿し、ミスト条件下で促進させた。挿し穂は、挿し木30日後に掘り上げ、発根率、発根数、最長根長、発根形態について、1区当たり15～26本の挿し穂を調査した。

結 果

1. 形質転換体の作出

図1に示すように、1724株と共存培養を行った切片は、培養10日目頃から、切り口に毛状根の形成を始めた。培養30日後の処理区の毛状根形成率は32.4%であったが、対照区では毛状根の形成は認められなかった。毛状根は、継代培養して除菌を行う間、分枝することなく伸長するのみで、その伸長量は1か月で2～3倍と緩慢であった。

除菌後の毛状根は、約1cmに切って0.5mg/l BAを添加した $\frac{1}{2}$ 濃度のMS培地に移植すると、30日後には、79.5%の根の切片で多くの不定芽を形成した。これらの不定芽のいくつかは、伸長してシュートに生育した。このシュートは、基部から切り取り、植物ホルモン無添

表1 形質転換体の形態的特性

個体No (mm)	節間長* (%)	同左比 (mm)	葉身長* (mm)	主幹長* (mm)	備考
形質転換体 1	0.7a	10.6	9.2a	15.8a	葉が下に巻く
形質転換体 2	1.4ab	21.2	10.0a	19.4a	
形質転換体 3	2.4b	36.4	9.2a	19.2a	
形質転換体 4	4.7c	71.2	14.0bc	27.1ab	
形質転換体 5	5.4c	81.8	15.1bc	33.2b	
非形質転換体	6.6d	100.0	14.7c	47.6c	

注) 表中数値は平均値

*: a~c は, Tukey の多重検定 (5%水準) を示し, 同一項目の同一文字間に有意差なし。

表2 形質転換体の挿し木発根能力

個体No	挿し穂数	発根 挿し穂数	同左率 (%)	発根数* (本)	最長根長* (mm)
形質転換体 2	15	15	100	10.4 b	55.0c
形質転換体 3	15	15	100	5.4 a	31.0a
形質転換体 4	26	22	84.6	13.2 b	53.0b c
形質転換体 5	18	15	83.3	6.8 a	38.0b
非形質転換体	19	12	63.2	5.3 a	39.3bc

注) 表中数値は平均値

*: a~c は, Tukey の多重検定 (5%水準) を示し, 同一項目の同一文字間に有意差なし。

加の1/2濃度のMS培地に移植すると容易に発根し, 完全な植物体に生育した。

考 察

2. 導入遺伝子の解析

オパイン分析の結果を図2に示す。毛状根から再生した植物体6個体について, オパイン分析を行った結果, 5個体からミキモピンが検出された。さらに, ミキモピンが検出された5個体は, 図3Aに示すように, *rol* 遺伝子を検出するプライマーを用いたPCR分析においても, 導入遺伝子の存在が確認できた。また, 図3Bに示すように, TL-DNAの境界配列をプライマーに用いたPCR分析では, 供試した6個体のいずれにも, 1724株の存在を示すバンドは検出されず, 除菌されていることを確認できた。

3. 形質転換体の形態特性調査

オパイン分析及びPCR分析で形質転換体であることを確認した5個体は, 非形質転換体に比べ, いずれも節間が短くわい化していた(図4)。また, 表1に示すように, 形質転換体の節間長は, いずれも非形質転換体との有意差が認められたが, 節間長比の範囲は, 10.6~81.8%であり, 個体による差が大きかった。また, 節間長の短いものほど, 葉身長, 主幹長は短い傾向にあった。最もわい化程度の強い1個体は, 葉が下に巻く奇形が見られた。

4. 形質転換体の挿し木発根能力調査

挿し木発根能力の調査結果を表2に示す。形質転換体4個体は, 非形質転換体に比べ, いずれも挿し木発根率が高かった。発根数は形質転換体2と4が多く, 他の形質転換体3, 5及び非形質転換体との間に有意差が認められた。一方, 最長根長は, 発根数の多い形質転換体2, 4が多かった。また, 図5に示すように, 根の発根角度は, 形質転換体4個体はいずれも非形質転換体に比べ, 地面に対して水平に近い角度で伸長する傾向がみられ, 屈地性が弱まっていると考えられた。

カラタチの胚軸切片は, 1724株の感染により, 毛状根を形成し, 得られた毛状根からの再分化及びシュートからの発根は容易であった。また, 毛状根から再生した植物体6個体のうち, わい化等の形態変化を示した5個体は, オパイン分析によりミキモピンが検出され, PCR分析でも *rol* 遺伝子が検出され, 除菌も確認できたことから, 形質転換体であると判断した。これらの結果から, カラタチでは *A. rhizogenes* 野生株により, 効率的に形質転換体を作出できることが明らかになった。しかし, 非形質転換体と同様の生育, 外部形態を示した1個体については, ミキモピン, *rol* 遺伝子共に検出できなかった。これは, タバコでの報告⁹⁾と同様に, 非形質転換根から再分化した非形質転換体であると考えられる。

A. rhizogenes による形質転換体は多くの作物で作出されているが, いずれも節間の短縮, 分枝の増加, 根系の発達, 屈地性の喪失等の生理的变化を示している^{1,2,12)}。カラタチにおいても, 形質転換体は節間が詰まったわい化症状, 挿し木繁殖力の向上, 屈地性の低下等の特性を示し, 他の作物の結果と一致した。一方, 我々は, *rolC* のみをカラタチに導入し, 節間の短縮, 葉の小型化, 挿し木発根率の増加等の変化が起きた形質転換体を得ている⁷⁾。これらの特性は, 本報の野生株による形質転換体と非常に類似したものであった。しかし, 屈地性の弱まりは, *rolC* 遺伝子を導入した形質転換体では認められなかった。このことから, カラタチでは, 野生株のRiプラスミドのT-DNAを導入した形質転換体の形態変化は, *rolC* の働きによるところが大きいが, 屈地性の弱まりは, *rolC* 以外の *rol* 遺伝子の働きによるものと推察される。

本報の形態的調査は非形質転換体であるカラタチを台

木として、形質転換体のカラタチを接ぎ木した植物体で行った調査である。そのため、この形質転換体のカラタチを中間台木として用いる際には適応できるが、台木として用いるためには、形質転換体の自根での調査が必要である。また、台木あるいは中間台木として利用するには、このわい化する形質が接木をした地上部の穂木品種へ伝わる必要がある。Hansen ら³⁾は、Ri プラスミドの T-DNA 上の ORF13 をタバコに導入して台木として使用し、導入遺伝子の形質が穂木品種にも伝わり、形態変化を起こすことを報告している。しかし、*A. rhizogenes* 野生株による形質転換体を台木として用いた報告例はない。今後は *A. rhizogenes* により形質転換したカラタチの自根樹の特性調査を行うと共に、形質転換体を中間台木、あるいは台木として食用品種を接ぎ木し、その実用性を明らかにしたい。

摘 要

カラタチの胚軸に野生株である *A. rhizogenes* 1724 株を感染させた結果、毛状根を形成した。毛状根からは不定芽を分化させ、完全な植物体を再生させることができた。再生した植物体はオパイン分析と *rol* 遺伝子を検出するプライマーを用いた PCR 分析により形質転換体であることを確認し、TL-DNA の境界配列をプライマーに用いた PCR 分析により 1724 株が除菌できていることを確認した。形質転換体はいずれもわい化していたが、節間長は個体により差があり、非形質転換体の 10.6～81.8% であった。葉身長と主幹長は節間長の短いものほど短い傾向にあった。また、挿し木発根率が高まり、屈地性が弱い傾向にあった。これらのことから、*A. rhizogenes* 野生株によるカラタチの形質転換体は、わい性台木としての利用の可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、岡山理科大学猪野口雅彦博士からオパイン分析の教示、有益なご助言をいただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。

引用文献

1) CAPONE, I., L. SPANO, M. CARDARELLI, D. BELLINCAMPI, A. PETIT and P. COSTANTINO: 1989. Introduction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium*

rhizogenes T-DNA. Plant Molecular Biology 13: 43-52.

- 2) HANDA, T.: 1992. Regeneration and characterization of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum*) plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Tissue Culture Letters. 9: 10-14.
- 3) HANSEN, G., D. VAUBERT, J. N. HERON, D. CLEROT, J. TEMPE and J. BREVET: 1993. Phenotypic effects of overexpression of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA ORF 13 in transgenic tobacco plants are mediated by diffusible factor(s). The Plant Journal. 4: 581-585.
- 4) HERRERA-ESTERELLA, L. and J. SIMPSON: 1988. Foreign gene expression in plants. In "Plant molecular biology" Shaw, C.H. (Ed.), IRL Press, Oxford. 131-160.
- 5) HONDA, H. and A. HIRAI: 1990. A simple efficient method for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. Japan J. Breed. 40: 339-348.
- 6) ISOGAI, A., N. FUKUCHI, M. HAYASHI, H. KAMADA, H. HARADA and A. SUZUKI: 1990. Mikiopine, an opain in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Phytochemistry. 29: 3135-3139.
- 7) KANEYOSI, J. and S. KOBAYASHI: Characteristics of transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. Plant Cell Reports (In Press).
- 8) 河瀬憲次: 1995. 果樹台木の特性と利用. 農文協.
- 9) 清川繁人・菊池泰弘・鎌田博・原田宏: 1992. PCR 法による Ri プラスミド *rolC* 遺伝子の検出と形質転換確認への応用. 植物組織培養. 9: 94-98.
- 10) 小林康志・大野文征・鹿野英士・岡田正道・牧野好高・佐々木俊之・原節夫: 1995. 'ヒリュウ' 台木が '青島温州' の樹体生育・収量・果実品質に及ぼす影響. 園学雑. 64 別 2: 92-93
- 11) MURASHIGE, T. and F. SKOOG: 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497.
- 12) 塩見敏樹・白川隆・竹内昭士郎・大泉利勝・植松清次: 1987. *Agrobacterium rhizogenes* biovar 1 に

よるメロン毛根病. 日植病報. **53**: 454-459.

- 13) YAZAWA, M., C. SUGINUMA, K. ICHIKAWA, H. KAMADA and T. AKIHAMA: 1995. Regeneration of transgenic plants from hairy root of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Breeding Science. **45**: 241-244.

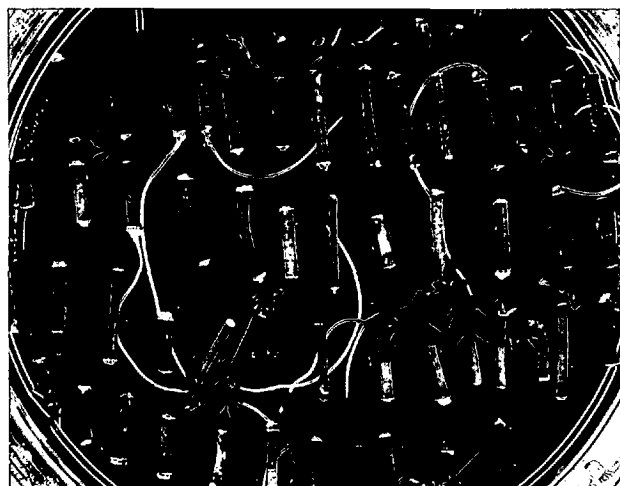


図1 カラタチ胚軸切片から形成された毛状根

1 2 3 4 5 6 7 8 9

図2 再生植物体からのミキモピンの検出
注) 1, 9 : ミキモピン, 2 : 非形質転換体
3 - 8 : 毛状根からの再生植物体

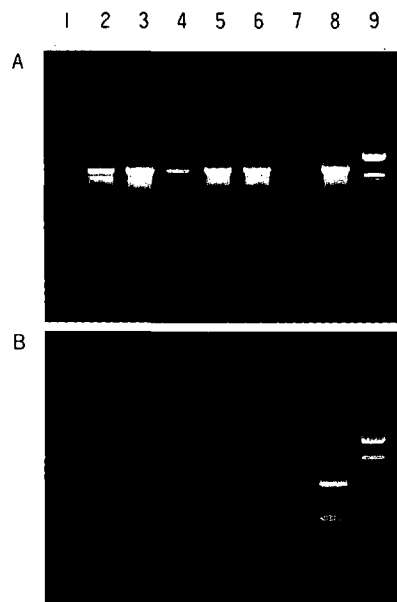


図3 PCR分析による再生植物体の導入遺伝子の検出と除菌の確認

注) A : *rol* 遺伝子の検出,
B : 除菌の確認
1 : 非形質転換体
2 - 7 : 毛状根からの再生植物体
8 : 1724株の Ri プラスミド
9 : DNA マーカー (100kb ladder)

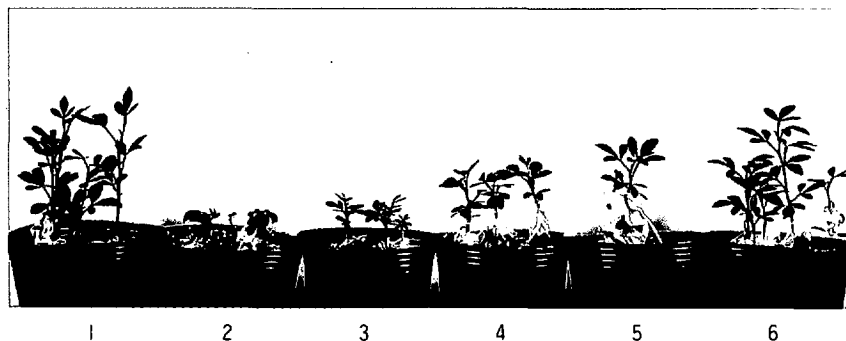


図4 *Agrobacterium rhizogenes* 1724株による形質転換体
注) 1 : 非形質転換体, 2 - 6 : 形質転換体

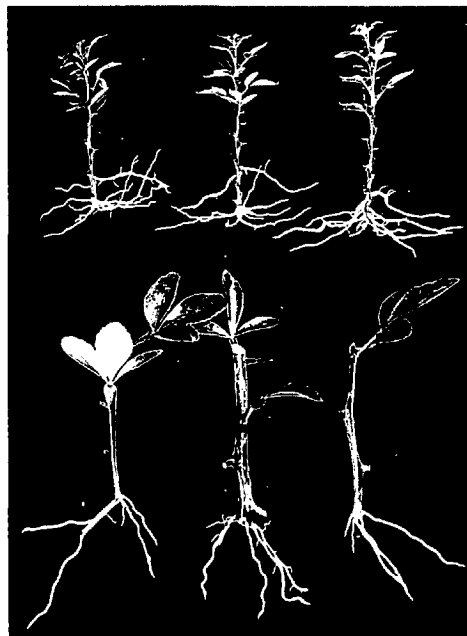


図5 形質転換体のさし木発根状況
注) 上 : 形質転換体2, 下 : 非形質転換体

Regeneration of Transgenic Plants from Hairy
Root of Trifoliate Orange (*Poncirus trifoliata* Raf.)
Induced by *Agrobacterium rhizogenes* 1724 (MAFF 301724)

Junko KANEYOSHI

Summary

In this paper I described the successful development of trifoliate orange transformants from hairy roots induced by *A. rhizogenes*. Epicotyls of trifoliate orange seedlings inoculated with a domestic wild strain of *A. rhizogenes* 1724 (MAFF 301724) produced many hairy roots, and gave rise to complete plants. The stable integration of the genes was confirmed by detection of mikimopine and PCR analysis that detected *rol* gene. PCR analysis with border sequences of T-DNA as primers showed that bacteriaDNA in the explants were not presence. These transformants developed shorter internodes ranged from 10.6–81.5% of control. The length of leaf blade and trunk were related to that of internodal, and apical dominance was reduced on the transformants. On cutting, all of the transformants examined showed higher rooting ability than control, and geotropism was reduced on the transformants. These results suggest that transgenic trifoliate oranges by *A. rhizogenes* 1724 could be utilized as dwarfing rootstock.

Key Words : trifoliate orange, *Agrobacterium rhizogenes*, transformant, dwarfing, rooting ability