

植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した形質転換リンゴ樹の作出とその成長特性に関する研究

2011

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物生産科学専攻  
(岩手大学)

李 積軍

## 目 次

序論	1
第1章 形質転換リンゴ樹の作出技術の検討	5
緒言	5
第1節 全実験に共通する供試材料および方法	7
第2節 培養条件の違いがシュートの分化および形質転換効率に 及ぼす影響	17
実験1. アグロバクテリウムの共存日数の影響	17
材料および方法	17
結果および考察	18
実験2 カナマイシン濃度	22
材料および方法	22
結果および考察	22
実験3 カナマイシン添加時期	25
材料および方法	25
結果および考察	26
実験4 感染前培養	28
材料および方法	28
結果および考察	28
考察	32
摘要	35
第2章 作出した形質転換体の確認	36
第1節 PCR法による形質転換体の確認	36

材料および方法	36
結果及び考察	38
第2節 サザンハイブリダイゼーション法による目的遺伝子の 検出	47
材料および方法	48
結果及び考察	51
摘要	55
第3章 形質転換体の成長特性	56
緒言	56
第1節 In vitro 培養における形質転換体の発根	56
材料および方法	56
結果および考察	57
第2節 順化1年目の成長	60
材料および方法	60
結果	61
第3節 順化2年目の成長	64
材料および方法	64
結果	64
第4節 花芽分化に及ぼす影響	76
材料および方法	76
結果	76
第5節 ノーザンハイブリダイゼーション分析	83
材料および方法	83
結果	85

第 6 節 植物組織の観察	90
材料および方法	90
結果	92
考察	100
摘要	104
第 4 章 接木による成長解析	105
緒言	105
第 1 節 JM7を台木に形質転換体を穂木とした成長解析	106
材料および方法	106
結果	107
第 2 節 形質転換体を台木に非形質転換体を穂木とした成長解析	122
材料および方法	122
結果	123
考察	129
摘要	131
第 5 章 総合考察	132
総摘要	137
謝辞	141
引用文献	142
付表	149

## 序 論

リンゴ栽培は他の農作物と比べて労働時間が長く、また脚立での昇降など重労働作業も多いことから、栽培管理の改善としては労働時間短縮のための省力化や軽労働化が大きな課題である。リンゴ樹の大きさや樹形は主として台木と整枝・剪定により制御されている。すなわち、古くから用いられてきたマルバカイドウなどの強勢台木では成長が旺盛で、樹形は大型になりやすいため、その整枝法は開心形など主幹の伸長を止めて横に主枝を拡大していく方法がとられる。一方、リンゴ栽培面積の 25%以上になっているおい性台木では成長量が少なく、主幹形に仕立てるのが一般的である。さらに、最近は、高度な技術を要する剪定作業を必要とせず、また農薬散布などの機械化に適しているカラムナータイプ樹の利用も研究され、カラムナータイプの品種育成が試みられている (Lane ら, 1982 ; Quinlan・Tobutt, 1990; Tobutt, 1984, 1985, 1994)。

リンゴの樹姿形成、すなわち樹の成長生理は、主に植物成長調節物質との関係から研究されている。

リンゴ樹の分枝習性に関して、腋芽の生長を抑制する頂芽優勢性にオーキシシンが中心的な役割を果たしていること (Bangerth, 1989; Greene・Autio, 1994; Faust ら, 1997)、腋芽の成長に関連するサイトカイニンの役割など (Steffens・Stutte, 1989; Faust ら, 1997) が明らかにされている。また、Watanabe ら (2004) は、節間が狭く、側枝の発生が多いカラムナータイプ樹の成長特性を普通樹の成長と比較して、オーキシシンとサイトカイニンのバランスが異なることを報告している。さらに、モデル植物では、オーキシシンとサイトカイニンが根の成長と頂芽優勢を調節することも報告されている (Aloni ら, 2006; Leyser, 1999)。

こうした、これまでの研究は、主に植物ホルモン剤の外生処理や内生ホルモン量の動態から解析したものが多く、しかし、外生処理の場合は樹体内に取り込まれて生理作用を及ぼす正確な濃度は不明である。また、内生量の動態のみではその濃度変化と成長現象との真の因果関係を明らかにすることは困難である。

これらの問題を解決する方法として、オーキシシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンを特異的に生産する形質転換体を作成して、生育特性を解析する方法が有効であると考えられる。すなわち、植物ホルモンの生合成に関わる遺伝子を導入し、特定のホルモンを特異的に生産させ、それにより表現形(成長)がどう変化するかを解析することで、内生植物ホルモンと成長特性との関係が解明できる。

形質転換体の作出には、いくつかの方法があるが、アグロバクテリウム法は比較的簡便で確実性も高いことから、現在植物の形質転換技術として最もよく用いられる方法である。ただし、シロイヌナズナなど一年生の草本植物では形質転換体獲得が容易であるが、木本植物では再分化系が十分に確立されていないこともあり、アグロバクテリウム法による形質転換体効率はきわめて低い。リンゴは木本植物の中では形質転換系が確立されている数少ない樹種の一つであるが、形質転換できる品種は限られている。

果樹で成長に関わる遺伝子の導入として、*rolC* 遺伝子の導入が、リンゴ(Igarashiら, 2002)、カキ(Koshitaら, 2002)、カンキツ(Kaneyoshi・Kobayashi, 1999)で報告されているが、植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した形質転換体の報告は見られない(Petri・Burgos, 2005)。

*Agrobacterium tumefaciens* の T-DNA 領域にはオーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaM*、*iaaH* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* が存在している。*iaaM* はトリプトファンからインドール-3-アセトアミド (IAM) の合成を触媒するトリプトフ

アンモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子で、*iaaH*はIAMからIAAの合成を触媒するインドールアセトアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子である。また、*ipt*はt-ゼアチンを合成しているイソペンテンニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である (Morris, 1986)。これらの遺伝子は植物細胞において、通常の細胞より多くのオーキシンとサイトカイニンを生産する。しかし、これらの遺伝子をリンゴに導入した報告は見当たらない (Petri・Burgos, 2005)。なお、オーキシンは、トリプトファンを前駆体としていくつかの経路により合成される (Pollmannら, 2009)。サイトカイニン(ゼアチン、ゼアチン-リボシド、イソペンテンニルアデニン、イソペンテンニルアデノシン)は、アデノシン-リン酸(AMP)またはアデノシン二リン酸(ADP)のイソペンテンニルラーゼを通して合成される (Kakimoto, 2001)。これらの生合成反応を引き起こしている酵素をコード化している遺伝子のいくつかは、シロイヌナズナや他の植物で明らかにされている (Pollmanら, 2009; Moris, 1986)。

接ぎ木は果樹の繁殖で最も多用される方法であり、台木の選定は果樹栽培において極めて重要である。

わい性台木によるわい化の生理的機構については、オーキシンの極性輸送の減少から報告した Lockard・Schneider (1981)の仮説が代表的である。すなわち、茎頂で作られたオーキシンが基部へ向かって極性移動する際、皮部に存在するインドール酢酸オキシダーゼなどの物質により、インドール酢酸の一部が不活性化される。わい性台木はこの不活性化能力が高いため、根に供給されるオーキシン量が少なくなり、その結果、根の成長や根端などでのサイトカイニンの合成が抑制され、そのため茎頂に供給されるサイトカイニン量も減少し、茎葉の成長やオーキシンの合成が抑制される。そして、根に供給されるオーキシン量は低下する。このパターンを繰り返し、わい化が起こるといふものである。この仮説は、多くの研究者に支持され、内生ホルモン合成の減少

(Hartmann・Kester, 1990)、オーキシンの極性輸送の減少(Rueggerら,1997)などの報告が見られる。しかし、仮説を明確に立証した研究報告は見当たらない。

リンゴの形質転換体作出は 1980 年代後半から、‘Greensleeves’ (Jamesら,1989)、『デリシャス’ (Sriskandarajah ら,1994)、『グラニースミス’ (Trifonovaら,1994)、『ロイヤルガラ’ (Yao ら,1995)、『ジョナゴールド’ (De Bondt ら, 1996)などで報告されている。しかし、形質転換可能な品種でも多くの場合、形質転換効率は約 1%と低い。従って、リンゴでの形質転換体作出には、より多くの品種で形質転換体作出系を確立するとともに、既に系が確立されている品種においてもその転換効率を高めることが重要である。

そこで本研究では、これらの問題を解決するとともに、省力的なリンゴ栽培に関する基礎資料を得る目的で、以下の実験を行った。

まず、第 1 章では、リンゴの樹姿形成に関わる植物ホルモンの役割を解明する基礎資料を得る目的で、オーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM* と *iaaH* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* をアグロバクテリウム法でリンゴ栽培品種 ‘Greensleeves’ に導入した形質転換体の作出を試みた。特に、本実験では、アグロバクテリウムの感染体からの再分化条件を検討することにより転換効率を高めることを中心に検討した。第 2 章では、再分化した植物体が形質転換体であることを PCR 法およびサザンブロット法で確認した。次いで、第 3 章では、獲得した形質転換体を形質転換体専用の特定網室で馴化し、内生ホルモンオーキシンおよびサイトカイニンがリンゴ樹姿形成にどのように影響しているかを明らかにするため、主幹伸長量、節間長などを測定し、生育特性の解析を行った。さらに、第 4 章では、台木による地上部の成長への影響を明らかにするため、形質転換体を穂木また台木として、その成長特性がどう変化するか、解析を行った。

## 第1章 形質転換リンゴ樹の作出技術の検討

### 緒 言

形質転換技術は、植物の生理学的、遺伝学的、育種学的研究にとって不可欠な手法である。形質転換技術の一つであるアグロバクテリウム法は比較的簡便で確実性も高く、特にシロイヌナズナなど一年生の草本植物では形質転換体獲得が容易であることから、最も多く用いられている。しかし、木本植物では形質転換系が確立されている樹種が少ないこと、系が確立されていても形質転換体効率がきわめて低いことなど改善点も多い。リンゴは形質転換系が確立されている数少ない木本植物であるが、遺伝子組み換えに使用できる品種が限られており、多くの品種は依然として形質転換体の作出が困難な現状にある。

リンゴの形質転換体作製については1980年代後半から、海外 (Jamesら, 1989; Maximovaら, 1998; Pawlicki・Welandar, 1994; Puiet・Schaart, 1996) および日本国内 (伴野ら, 1993; Ogasawaraら, 1994; 星ら1998; Igarashiら, 2002; 金丸ら, 2002; 加藤ら, 2000; 斎藤ら, 2001; 山下ら, 1996; 伊藤ら, 1997; 小森ら, 1997; Kotodaら, 2000; 滋田ら, 2004) で多くの報告がある。しかし、形質転換が可能な品種でも多くの場合、形質転換効率は約1%と低い。従って、リンゴでの形質転換体作出には、より多くの品種で形質転換系を確立するとともに既に形質転換系が確立されている品種においてもその転換効率を高めることが重要である。

アグロバクテリウム法による形質転換においては除菌用抗生物質としてセフトキシム(CTX)を使うのが一般的であり、リンゴの形質転換実験では200~500 mg・L<sup>-1</sup>の濃度で使用している(Sediraら, 2001; Yaoら, 1995;

Maximova ら, 1998; Kotoda ら, 2006)。しかし、いくつかの栽培品種において、CTX を除菌濃度で使用するとリンゴ葉切片からのシュート再分化が抑制されることが報告されている(小森ら, 2009)。一方、タバコ、トマト、イネなどのアグロバクテリウム法では除菌用抗生物質としてメロペネム(MEPM)を使用することで CTX を使用する場合よりも高い形質転換効率を得られている(小川ら, 2002; Ogawa ら, 2005, 2007)。リンゴにおいても Wada ら(2009)は MEPM を使用して、リンゴ台木 'JM2' の形質転換体を獲得している。さらに小森ら(2009)は MEPM をリンゴ再分化培地に添加することでシュートの生育および再分化が促進され、形質転換体獲得に優れることを報告している。

一方、Sriskaudarajah ら(1998)はリンゴ栽培品種 'Delicious' と 'Pink Lady' の若い葉をアグロバクテリウムに感染させる前に 4 日間液体培地で培養することで、形質転換効率を大幅に向上したことを報告した。しかし、固形培地でアグロバクテリウム感染前培養を検討した報告は見当たらない。

そこで、本章では、オーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM* と *iaaH* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* を用いて、形質転換系の転換体獲得効率を向上させるため、除菌用抗生物質に MEPM を使用し、アグロバクテリウムの共存日数、カナマイシンの添加濃度・時期および感染前培養について検討した。

## 第1節 全実験に共通する供試材料および方法

### 1. 供試材料

本研究の実験は、果樹園芸学研究室において継代培養で維持しているリンゴ‘Greensleeves’(‘GS’)を用いて行った。

形質転換には、継代培地で維持している‘GS’のシュートをメスで3~4 cm に切り取り、ガラス培養瓶1瓶あたり4本ずつ垂直に植え込み、25℃、16時間日長の培養室で4週間培養したものを使用した。

### 2. 植物体維持用培地

‘GS’の維持用培地は、MS 基本培地(Murashige・Skoog,1962) (第1.1.1表)に炭素源としてスクロース30g/L(87.6mM)、オーキシシン剤としてインドール酪酸 (IBA) 0.1mg/L(0.49mM)、サイトカイニン剤としてベンジルアミノプリン(BAP) 1mg/L (4.44mM)を加え、pH5.7 に調整した後、凝固剤としてバクトアガー6.5g/Lを添加して作製した。実験用シュートは、培養液80mlを入れた直径8cm、高さ13cm のガラス培養瓶に置床し、4週間ごとに継代した。

### 3. 共存用、除菌用および選抜用培地

アグロバクテリウムとの共存用培地(第1.1.2表)、アグロバクテリウム除菌用培地(第1.1.3表)および形質転換体選抜用培地1(第1.1.4表)は、MS基本培地に炭素源としてスクロースとソルビトールを重量比1:3で合計30g/L(スクロース7.5g、ソルビトール22.5g)、オーキシシン剤としてナフタレン酢酸(NAA)5 $\mu$ M、サイトカイニン剤としてチジアズロン(TDZ)15 $\mu$ Mを加え、pH5.8に調整し、凝固剤としてゲルライト2.5gを添加したものを使用した。な

お、リンゴ用培地の炭素源としてはスクロース単独で用いられることが多いが、ソルビトールの割合が多いほどシュート再分化率が高い(Pua・Chong,1984)、スクロースとソルビトールの混合培地で再分化率が上昇した(石谷ら, 2005)などの報告を元に、スクロースとソルビトールの2種類を混合して使用した。

共存用培地(第 1.1.2 表)はオートクレーブ後、そのまま用い、除菌用培地(第 1.1.3 表)はオートクレーブ後、フィルター滅菌した除菌用抗生物質を添加したものを、選抜用培地 1(第 1.1.4 表)はフィルター滅菌した選抜用抗生物質および除菌用抗生物質を添加したものを、それぞれ滅菌済みの直径 9 cm、高さ 1.5cm のプラスチックシャーレに、1 枚に約 25ml 分注した。

#### 4. カナマイシン耐性シュートの継代用培地(選抜培地 2)

カナマイシン耐性シュートの継代用培地(選抜培地 2)の組成は第 1.1.5 表のとおりである。オートクレーブ後、培地温度が 60℃以下になった時に、クリーンベンチ内で選抜用抗生物質カナマイシン(Km)50mg/L、除菌用抗生物質 MEPM 50mg/L を加え、混合後、滅菌済みの直径 9cm、高さ 1.5cm のプラスチックシャーレに、約 25ml 分注した。

#### 5. アグロバクテリウムの増殖用培地

アグロバクテリウムの増殖用培地(第 1.1.6 表)は Bacto Tryptone 20g/L、Bacto Yeast Extract 5g/L、MgSO<sub>4</sub> 10g/L を加え、KOH で、pH7.2 に調整後、凝固剤としてバクトアガー 8g/L を添加し、オートクレーブで滅菌した後、培地温度が 60℃以下になってから、クリーンベンチ内で、選抜用抗生物質カナマイシン(Km)50mg/L 加え、混合後、滅菌済みの直径 9 cm、高さ 1.5cm のプラスチックシャーレに、約 25ml 分注した。

## 6. 感染用プラスミドの構築

pSMAK 251 (Mimida, 2007) を *XbaI* と *SacI* で消化し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) を切り出し、*iaaM*、*iaaH* および *ipt* に置換した。オーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM* と *iaaH* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* は制限酵素 *XbaI* と *SacI* サイトを付加したプライマーを用いて PCR によって増幅した。構築したプラスミドは、それぞれ pSMAK251 (*iaaM*)、pSMAK251 (*iaaH*) と pSMAK251 (*IPT*) と命名した (第 1.1.1 図)。各プラスミドは、アグロバクテリウム LBA4404 に導入し、 $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保存した。

## 7. 感染用アグロバクテリウムの増殖と感染用菌液の作成

菌株は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、適宜解凍して使用した。感染処理 3 日間前に冷凍庫から取り出し、クリーンベンチ内で白金針を火炎で高温消毒して、氷上で溶解させ、Km 50 mg/L 加えたアグロバクテリウム増殖用の  $\phi$  B 固形培地 (第 1.1.6 表) の上に塗り、 $28^{\circ}\text{C}$  の恒温器内で 2 日間培養した。感染処理の 12~18 時間前に爪楊枝を用いて、 $\phi$  B 固形培地の上で増殖したコロニーを選抜し、200ml の三角フラスコに 50 mg/L Km を加えたアグロバクテリウム増殖用の  $\phi$  B 液体培地 (第 1.1.6 表) 20ml に入れた。 $28^{\circ}\text{C}$  恒温器内で 12~18 時間回転振動培養し、アグロバクテリウムを増殖した。

OD<sub>600</sub> 値 1.0 まで増殖させた後、50ml 滅菌チューブに移し、8,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を捨てた後、MS 液体培地 20ml を加え、沈殿したアグロバクテリウムを完全に懸濁した。この操作をもう一度繰り返し、感染用アグロバクテリウム液を作製した。

第 1.1.1 表 維持用培地

	組成	濃 度
MS 無機塩	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650 mg/L
	$\text{HNO}_3$	1900 mg/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170 mg/L
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg/L
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2 mg/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3 mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6 mg/L
	KI	0.83 mg/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3 mg/L
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8 mg/L
MS ビタミンおよび有機物	Thiamine-HCl	0.1 mg/L
	Nicotinic acid	0.5 mg/L
	Pyridoxine-HCl	0.5 mg/L
	Glycine	2 mg/L
	myo-Inositol	100 mg/L
糖組成	Sucrose	7.5 g/L
ホルモン	IBA	0.1 mg/L
	BAP	1 mg/L
凝固剤	Bagto Agr	6.5 g/L

第 1.1.2 表 共存用培地

	組成	濃 度
MS 無機塩	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650 mg/L
	$\text{HNO}_3$	1900 mg/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170 mg/L
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg/L
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2 mg/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3 mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6 mg/L
	KI	0.83 mg/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8 mg/L	
MS ビタミンおよび有機物	Thiamine-HCl	0.1 mg/L
	Nicotinic acid	0.5 mg/L
	Pyridoxine-HCl	0.5 mg/L
	Glycine	2 mg/L
	myo-Inositol	100 mg/L
糖組成	Sucrose	7.5 g/L
	Sorbitol	22.5 g/L
ホルモン	NAA	0.93 mg/L
	TDZ	3.3 mg/L
凝固剤	Gelrite	2.5 g/L

第 1.1.3 表 除菌用培地

	組成	濃 度
MS 無機塩	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650 mg/L
	$\text{HNO}_3$	1900 mg/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170 mg/L
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg/L
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2 mg/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3 mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6 mg/L
	KI	0.83 mg/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3 mg/L
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8 mg/L
MS ビタミンおよび有機物	Thiamine-HCl	0.1 mg/L
	Nicotinic acid	0.5 mg/L
	Pyridoxine-HCl	0.5 mg/L
	Glycine	2 mg/L
	myo-Inositol	100 mg/L
糖組成	Sucrose	7.5 g/L
	Sorbitol	22.5 g/L
ホルモン	NAA	0.93 mg/L
	TDZ	3.3 mg/L
抗生物質	MEPM	50 mg/L
凝固剤	Gelrite	2.5 g/L

第 1.1.4 表 選抜用培地 1

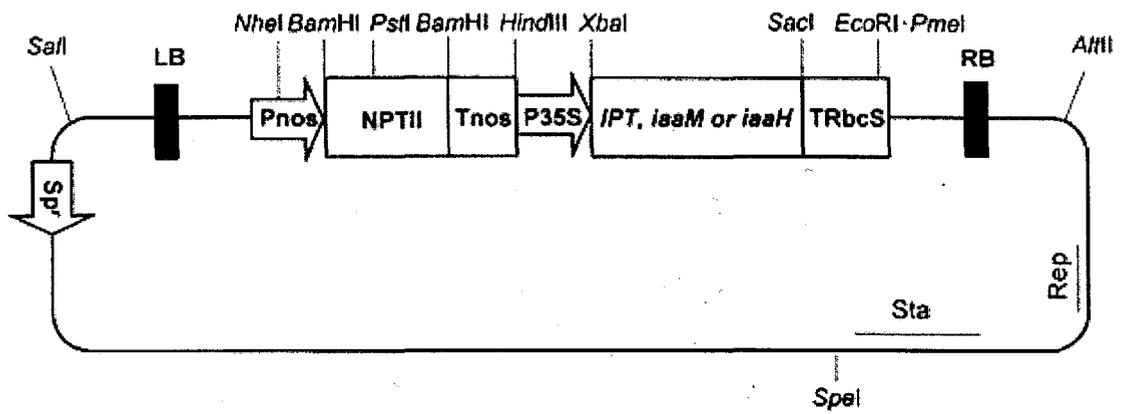
	組成	濃 度
MS 無機塩	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650 mg/L
	$\text{HNO}_3$	1900 mg/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170 mg/L
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg/L
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2 mg/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3 mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6 mg/L
	KI	0.83 mg/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3 mg/L
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8 mg/L
MS ビタミンおよび有機物	Thiamine-HCl	0.1 mg/L
	Nicotinic acid	0.5 mg/L
	Pyridoxine-HCl	0.5 mg/L
	Glycine	2 mg/L
	myo-Inositol	100 mg/L
糖組成	Sucrose	7.5 g/L
	Sorbitol	22.5 g/L
ホルモン	NAA	0.93 mg/L
	TDZ	3.3 mg/L
抗生物質	MEPM	50 mg/L
	Km	10~50 mg/L
凝固剤	Gelrite	2.5 g/L

第 1.1.5 表 選抜用培地 2

	組成	濃 度
MS 無機塩	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650 mg/L
	$\text{HNO}_3$	1900 mg/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170 mg/L
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440 mg/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 mg/L
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2 mg/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3 mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6 mg/L
	KI	0.83 mg/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/L
	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.3 mg/L
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8 mg/L
MS ビタミンおよび有機物	Thiamine-HCl	0.1 mg/L
	Nicotinic acid	0.5 mg/L
	Pyridoxine-HCl	0.5 mg/L
	Glycine	2 mg/L
	myo-Inositol	100 mg/L
糖組成	Sucrose	7.5 g/L
ホルモン	IBA	0.1 mg/L
	BAP	1 mg/L
抗生物質	MEPM	50 mg/L
	Km	50 mg/L
凝固剤	Bagto Agr	6.5 g/L

第 1.1.6 表  $\phi$ B 培地 (1L) の組成

Bacto Tryptone	20g
Bact Yeast Extract	5g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10g
Bacto Agar	8g
KOH で	p H 7.2



第1.1.1図 プラスミドpSMAK251(*iaaM*), pSMAK251(*iaaH*)および pSMAK251(*IPT*)の構築

## 第2節 培養条件の違いがシュートの分化および 形質転換効率に及ぼす影響

アグロバクテリウムによる形質転換系を確立するためには、感染させた葉切片からのシュートの再分化と再分化したシュートの除菌操作をいかに効率よく行えるかが重要となる。そのためには、アグロバクテリウムと葉切片との共存培養日数、除菌及び選抜用の抗生物質の使用法を検討する必要がある。そこで、まずこれら培養条件の検討を行った。

### 実験1. アグロバクテリウムの共存日数の影響

アグロバクテリウムと植物体の共存培養日数は長いほど感染度が高まるが、シュート分化率が低下し、除菌が困難になる。そこで、転換効率と再分化率を考慮した最適共存培養日数を検討した。

### 材料および方法

継代4週間目の‘GS’のシュート先端部位の未展開葉および半展開葉を供試した。

感染用菌株 LBA4404 は、感染前日の夕方からカナマイシン (Km) 50mg/L 添加したアグロバクテリウム増殖用の  $\phi$  B 液体培地で 28℃、12~18 時間培養し、培養液の OD<sub>600</sub> 値 1.0 まで増殖させた後、作成した菌液に葉切片を 30 分浸漬し感染させた。その後、抗生物質を添加しない MS 共存培地 (第 1.1.2 表) で共存培養した。培養期間は 3、5、7、10、15、20 日間の 6 処理とした。共存培養は感染直後から 25℃ の培養室において、最初の

2 週間は暗黒条件で、次の 2 週間は弱光(ca.  $0.15 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF)、その後は 16 時間日長(ca.  $45 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  PPF)条件下で行った。

共存培養終了後、除菌用抗生物質メロペネム(MEPM)を 50 mg/L 添加した MS 液体除菌培地(第 1.1.3 表)で葉切片に付着した菌を 30 分間 100rpm で洗浄する操作を3回行った。その後、MEPM50 mg/L および Km25 mg/L を添加した MS 選抜培地 1(第 1.1.4 表)に移植し、再分化してきた緑色シュートを MS 選抜培地 2(第 1.1.5 表)に継代し、1ヶ月ごとに新たな培地に移植し選抜を継続した。

## 結果および考察

結果を第 1.2.1 表に示した。シュート分化率は共存培養日数によって異なり、最もシュート分化率が高かったのは 5 日間共存培養区で 8.9%であった。次いで 10 日間区の 5.5%で、3 日間、7 日間および 15 日間区のシュート分化率はそれぞれ 4.9%、2.4%、1.7%と低く、20 日間区はシュートが分化しなかった。一方、Km 耐性シュートは 5 日間および 10 日間共存培養区において選抜培地移植後 4 か月頃から分化し、それぞれ 1.6%および 0.7%獲得出来た(第 1.2.1 図、第 1.2.2 図)が、それ以外の培養区からは Km 耐性シュートは分化しなかった。

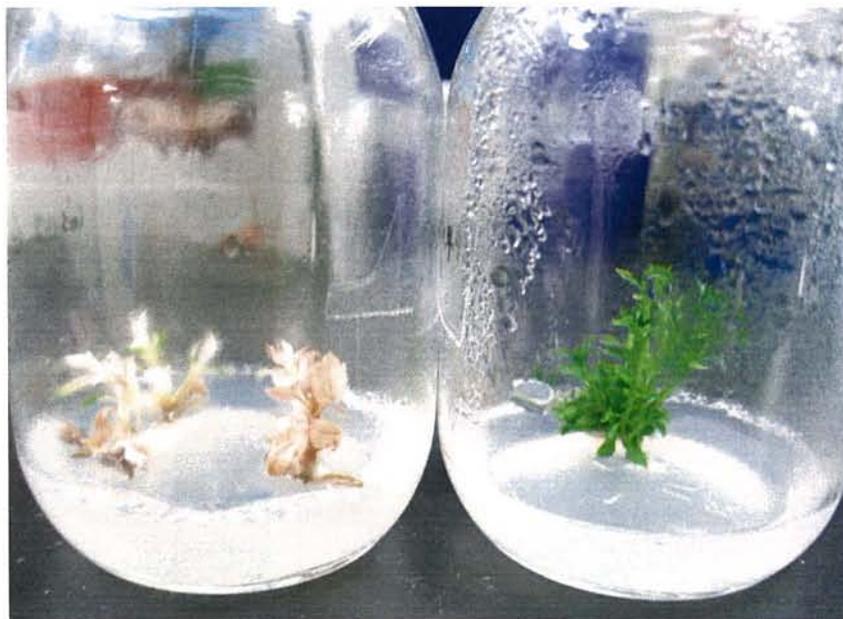
本実験の結果から、共存培養日数が 10 日より長くなるとシュート分化率が低下するとともに除菌が困難になることが認められた。特に 20 日間共存培養区では菌の増殖が多く、葉切片が褐変し枯死した(第 1.2.3 図)ことから、共存培養日数は 5~10 日程度が適当と推察され、シュート分化率が 5%以上になると Km 耐性シュートが獲得できる可能性が高くなると思われた。

第 1.2.1 表 共存培養日数がシュート分化および形質転換率に及ぼす影響

共存 日数	葉切片 数	シュート 数	シュート分化率 (%)	Km 耐性 シュート数	Km 耐性 シュート(%)
3	142	7	4.9	0	0
5	123	11	8.9	2	1.6
7	125	3	2.4	0	0
10	146	8	5.5	1	0.7
15	119	2	1.7	0	0
20	121	0	0	0	0



第 1.2.1 図 10 日間共存培養区における 4 か月目の分化したシュート



第 1.2.2 図 選抜培地 2 に移植後 2 か月目のシュートの成長状態  
(左)非形質転換体シュート (右)Km 耐性シュート



第 1.2.3 図 共存培養 20 日間区の葉切片の状態  
アグロバクテリウムの増殖による葉切片の枯死

## 実験2 カナマイシン濃度

カナマイシンの濃度が低い場合選抜が不十分になり、高すぎると形質転換細胞の増殖に負の影響があらわれシュート分化が困難となる。そこで、適正濃度の検討を行った。

### 材料および方法

継代4週間目の‘GS’のシュート先端部の未展開および半展開葉をピンセット先端で切り取り、OD<sub>600</sub>値1.0に増殖させたアグロバクテリウム懸濁液で、葉切片を30分感染させ、葉に付着した菌液を滅菌ティッシュで除去した後、MS共存培地(第1.1.2表)にシャーレあたり25枚ずつ置床し、暗黒下で5日間共存培養した。その後、MEPM 50mg/L添加したMS液体除菌培地(第1.1.3表)で30分間100rpmで回転振動し、葉切片に付着しているアグロバクテリウムを洗浄した。この操作を3回繰り返した後、除菌用抗生物質MEPM 50mg/L、選抜用抗生物質Kmを10、25および50mg/L加えたMS選抜培地1(第1.1.4表)に移植し、不定芽が形成されるまで、4週間ごとに移植を繰り返した。

4ヶ月後に、緑色を保つシュートをKm 50mg/L添加したMS選抜培地2(第1.1.5表)に移植し、植物体が成長するまで選抜を続けた。

### 結果および考察

結果を第1.2.2表に示した。Km低濃度処理のKm10mg/L区はシュート分化率が高く37.6%に達したが、Km耐性シュートは得られなかった。一方、

Km 高濃度の Km 50mg/L 区ではシュートの分化が見られなかった。それに対して、Km 25mg/L 区ではシュート分化率は 7.8%と Km 10mg/L 区よりは低かったものの、分化したシュート 9 本中、2 本が Km 耐性シュートで、形質転換効率は 1.7%であった。これは実験 1 の共存日数 5 日間区 (Km 25mg/L) の効率とほぼ同様であった。

この実験の結果から、Km 濃度は感染葉切片からのシュート分化に大きな影響を与え、Km 濃度が低いと、シュート分化率が高いが、Km 耐性個体は得られず、Km 濃度が高すぎると、シュート分化そのものが起きなかった。シュート分化率は低くても Km 耐性シュートが得られる濃度の 25mg/L 程度が適当と考えられた。

第 1.2.2 表 Km 濃度がシュート分化および形質転換率に及ぼす影響

Km 濃度 (mg/L)	葉切片 数	シュート 数	シュート分化率 (%)	Km 耐性シュ ート数	Km 耐性シュ ート(%)
0	125	98	78.4	0	0
10	125	47	37.6	0	0
25	116	9	7.8	2	1.7
50	143	0	0	0	0

### 実験3 カナマイシン添加時期

一般にアグロバクテリウム感染葉切片からの再分化率は低く、形質転換シュートがほとんど獲得できない。その原因として、①アグロバクテリウムの感染自体が再分化率を低下させること、②除菌用抗生物質がシュート形成に負の影響を与えることおよび③カナマイシンによる形質転換細胞の選抜が再分化率を下げていることの3点が考えられる。この実験ではカナマイシン添加時期が再分化率および形質転換効率に及ぼす影響を調査した。

#### 材料および方法

継代4週間目の‘GS’のシュート先端部の未展開および半展開葉をピンセット先端で切り取り、OD<sub>600</sub>値1.0に増殖させたアグロバクテリウム懸濁液で、葉切片を30分感染させ、葉に付着した菌液を滅菌ティッシュで除去した後、MS共存培地にシャーレあたり25枚ずつ置床し、暗黒下で5日間共存培養した。その後、MEPM 50mg/L添加したMS液体除菌培地で30分間100rpmで回転振動し、葉切片に付着しているアグロバクテリウムを洗浄した。この操作を3回繰り返した後、除菌用抗生物質MEPM 50mg/Lのみ添加したMS除菌固形培地(第1.2.3表)に置床し、除菌開始日(0日区)、除菌後5日目(5日区)、10日目(10日区)、15日目(15日区)および20日目(20日区)にMEPM 50mg/LとKm 25mg/Lを加えたMS選抜培地1(第1.1.4表)に移植し、不定芽が形成されるまで、同培地で4週間ごと移植を繰り返した。なお、除菌操作後からMS選抜培地1(第1.1.4表)に移植までの間はMS除菌固形培地に置床したままで培養した。

4ヶ月後に、緑色を保つシュートをKm 50mg/L、MEPM 50mg/L加えた

選抜培地2(第 1.1.5 表)に移植し、植物体が大きく成長するまで選抜を続けた。

### 結果および考察

結果を第 1.2.3 表に示した。シュート分化率は、0 日区、5 日区、10 日区、15 日区、20 日区がそれぞれ 7.6%、4.7%、17.2%、47.0%、62.7%で、Km の添加時期が遅くなるほどシュート分化率が高くなった。しかし、Km 耐性シュートは、5 日目添加区から分化したシュート 8 本のうち 2 本が選抜された (Km 耐性シュート獲得率 1.2%) のみで、他の添加区は Km 耐性シュートを選抜できなかった。

この実験結果から、Km 添加時期が遅くなるとシュート分化率は高くなるものの Km 耐性シュートが得られなくなることから、除菌開始後 5 日目頃が適当と判断された。形質転換率も 1.2%で他の実験の転換効率と遜色なかった。

第 1.2.3 表 Km 添加時期がシュート分化および形質転換率に及ぼす影響

Km 添加日 (MEPM 添 加後日数)	置床葉 切片数	分化シュー ト数	シュート分 化率(%)	Km 耐性 シュート数	Km 耐性シュ ート(%)
0	144	11	7.6	0	0
5	172	8	4.7	2	1.2
10	139	24	17.2	0	0
15	119	56	47.0	0	0
20	142	89	62.7	0	0

## 実験4 感染前培養

アグロバクテリウム感染前に葉切片を前培養し葉細胞を活性化させることがシュート分化率および形質転換効率に及ぼす影響を調査した。

### 材料および方法

継代4週間目の‘GS’のシュート先端部の未展開および半展開葉をピンセット先端で切り取った葉切片をMS再分化培地に置床し、3日間または7日間感染前培養を行った。その後、葉切片をOD<sub>600</sub>値1.0に増殖したアグロバクテリウム懸濁液で30分間感染させた。葉切片採取当日(0日)に感染させものを対照とした。葉に附着した余分な菌液を滅菌ティッシュで吸い取り、共存培地にシャーレあたり25枚ずつ置床し、暗黒下で5日間共存培養した。その後MEPM 50mg/L添加したMS液体除菌培地で30分間100rpmで回転振動し、アグロバクテリウムを洗浄した。この操作を3回繰り返した後、除菌用抗生物質MEPM 50mg/L、選抜用抗生物質Km 25mg/Lを加えたMS選抜培地1(第1.1.4表)に移植し、不定芽が形成されるまで、4週間ごとに移植を繰り返した。

緑色を保ったシュートはKm 50mg/L、MEPM 50mg/Lを加えたMS選抜培地2(第1.1.5表)に移植し、選抜を続けた。

### 結果および考察

結果を第1.2.4表に示した。対照区(0日区)のシュート分化率は10.8%で、感染前培養の区よりも高かったが、Km耐性個体は得られなかった。一

方、3日間前培養区および7日間前培養区のシュート分化率は、それぞれ6.7%、6.8%で、対照区よりはやや低かったものの、Km耐性シュートはそれぞれ5本および9本得られ、Km耐性シュート獲得率(形質転換効率)はそれぞれ4.1%、6.1%であった。

0日区は実験1~3では1.2~1.7%の転換効率であったが、本実験では耐性シュートが得られなかった。それに対して、感染前に再分化培地で3~7日間前培養してから感染させた区は、分化したシュートの多くがKm耐性シュートであった。供試葉切片からの形質転換効率も4.1~6.1%とそれまでの効率よりもかなり高かったことから、前培養は形質転換効率を上げる有効な手法と考えられた。感染前培養を行うことであらかじめシュート誘導が促進された状態になり、アグロバクテリウム感染細胞からシュートが発生しやすくなることが考えられるが、その原因については更に検討する必要がある。

第1.2.4図に3日間前培養区から分化したシュートを示し、第1.2.5図には第1.2.4図の分化シュートをMS選抜培地2(第1.1.5表)に移植後1か月の生育状態を示した。いずれも緑色の活性なシュートの状態を示していた。

第 1.2.4 表 感染前培養日数がシュート分化および形質転換率に及ぼす影響

感染前培養 日数	葉切片数	シュート数	シュート分化 率 (%)	Km 耐性 シ ュート数	Km 耐性シュ ート (%)
0	139	15	10.8	0	0
3	121	8	6.7	5	4.1
7	148	10	6.8	9	6.1



第 1.2.4 図 3 日間前培養区におけるシュート分化



第 1.2.5 図 第 1.2.4 図のシュートをKm 50mg/L 添加 MS  
選抜培地 2 に移植後 1 か月目の生育状態

## 考 察

アグロバクテリウム法は植物の形質転換体作出方法として、比較的簡便で確実性も高いことから、最もよく用いられる方法で、特にシロイヌナズナなど一年生の草本植物では形質転換体獲得が容易である。しかし、木本植物では再分化系が十分に確立されていないこともあり、アグロバクテリウム法による形質転換体獲得効率はきわめて低い。リンゴは木本植物の中では形質転換系が確立されている数少ない樹種の一つであるが、アグロバクテリウム法による遺伝子組み換えに使用できる品種は‘GS’や‘王林’など限られており、‘ふじ’を始め多くの品種は依然として形質転換体の作出が困難な現状にある。

そこで、本章ではアグロバクテリウム法による再分化系の確立と形質転換効率の向上のための条件検討を行った。

形質転換効率を高めるためには、アグロバクテリウムに感染させた葉切片の除菌培地からのシュート分化率を向上させることとともにカナマイシン(Km)耐性シュート選抜率を高めることが重要である。そこで、それらに關係すると考えられる共存培養日数の期間、Km 添加の濃度と添加時期および葉切片再分化能の向上のための感染前培養について検討した。

その結果、共存培養日数はシュート分化率に影響し、共存培養日数が10日より長くなるとシュート分化率が低下するとともに除菌が困難になることが認められた。特に20日間共存培養区では菌の増殖が多く、葉切片が褐変し枯死したことから、共存培養日数は5～10日程度が適当と推察された。

次に、Kmの濃度および添加時期の影響について検討した。除菌培地のKm濃度が低いとシュート分化率が高まるもののKm耐性個体は得られず、

反対に Km 濃度が高すぎるとシュート分化そのものができなかった。Km が低濃度の場合に得られたシュートは、非形質転換細胞で形成されたエスケープシュートまたは非遺伝子導入細胞と遺伝子導入細胞のキメラ組織となり、Km 濃度を上げると、シュート全体が枯死することから、シュート分化率は Km 耐性シュートが得られた 25mg/L 程度が適当と考えられた。Km の添加時期については、遅くなるほどシュート分化率が高くなったが、Km 耐性個体が選抜できなかった。Km 耐性シュートが獲得できたのは、除菌開始後 5 日目添加のみであったことから、Km 添加時期は共存培養後の早い時期が適当と推測された。

感染前培養について実験 4 で検討した。採取した葉切片を当日感染させた区(0 日区)のシュート分化率は 10.8%で、感染前培養の区よりも高かったが、本実験では Km 耐性シュートが得られなかった。同じ 0 日区の条件で実験を行った実験 1~実験 3 ではシュート分化率は 4.7~8.9%で、1.2~1.7%の Km 耐性効率であった。それに対して、感染前に再分化培地で 3~7 日間前培養してから感染させた区は、分化したシュートの多くが Km 耐性シュートであった。供試葉切片からの Km 耐性効率も 4.1~6.1%とそれまでの効率よりもかなり高かったことから、前培養は Km 耐性効率を上げる有効な手法と考えられた。

リンゴの形質転換体作成は 1980 年代後半以来多くの報告がある (James ら,1989; Ogasawara ら,1994)が、形質転換可能な品種でも多くの場合、形質転換効率は 1%以下である。アグロバクテリウム法による研究報告もいまだに高い形質転換効率はあげることができないのが現状である (Bolar ら, 1999)。本実験で、葉切片採取当日感染させた全ての実験区で、Km 耐性効率は最高で実験 2 の Km25mg/L 処理区の 1.7%であった。それに対して、感染前に再分化培地で 3~7 日間前培養してから感染させた

区は、分化したシュートの多くが Km 耐性シュートであった。供試葉切片からの Km 耐性効率も 4.1～6.1%とそれまでの効率よりもかなり高かったことから、採取した葉切片を再分化培地で数日間培養した後にアグロバクテリウムを感染させることで、現行の当日感染の場合より高い Km 耐性効率を得られることが判明した。共存日数は 5～10 日間が望ましく、Km 濃度は 25mg/L、Km 添加時期は除菌開始後の早い時期が適当と推定された。

## 摘 要

リンゴの形質転換体の再分化効率は1%以下と低いことから、アグロバクテリウムと葉切片との共存培養日数、カナマイシン(Km)の添加濃度、添加時期および前培養日数について検討した。その結果、共存培養日数は5日共存区がシュート分化率、カナマイシン(Km)耐性シュート獲得率(形質転換)とも高く、選抜培地におけるKmの濃度と添加時期は25mg/Lで除菌培養後の早い時期に添加するのが適当と認められた。また、アグロバクテリウムに感染させる前に、葉切片を再分化培地で数日間培養してから感染させる方法を検討した結果、3~7日間の前培養を行うことにより、形質転換効率が従来 of 1%以下から5~7%に高まった。

以上の結果から、採取した葉切片を再分化培地で数日間培養した後にアグロバクテリウムを5~10日間程度共存培養で感染させ、その後のKm添加濃度は25mg/L、添加時期は除菌開始後の早い時期が適当と判断した。

## 第2章 作出した形質転換体の確認

形質転換植物の作出には、選抜マーカーによる選抜・確認が不可欠である。現在、形質転換体作出のための選抜マーカー遺伝子として、抗生物質耐性遺伝子や除草剤耐性遺伝子が多く用いられているが、選抜した耐性シュートはすべて形質転換体とは限らず、エスケープシュート(非形質転換体)の可能性もある。本実験では第1章で獲得した Km 耐性シュートが形質転換体かどうかを確認するため、PCR 法およびサザンハイブリダイゼーション法により目的遺伝子の検出を行った。

### 第1節 PCR 法による形質転換体の確認

#### 材料および方法

##### 植物材料

第1章で獲得したリンゴ‘GS’のカナマイシン(Km)耐性シュートおよび非感染シュートを供試材料とした。

##### 方法

##### 植物材料からの DNA 抽出

DNA の抽出は、DNeasy Plant Kits (QIAGEN) を用いて、下記プロトコールに従って行った。

- ① サンプル 100mg を液体窒素中で磨砕する。
- ② 400  $\mu$ L の AP1buffer (65°C) に、8  $\mu$ L のメルカプトエタノールと 4  $\mu$ L の RNase を加えて混合する。

- ③ 65℃で10～15分間インキュベート。インキュベートの際に2～3度チューブを振って混合する。
- ④ 室温、14,000rpmで5分間遠心し、上澄みを1.5mLチューブに回収する。
- ⑤ 上澄みに130  $\mu$ LのAP2 bufferを加えて混合し、氷上で5分間放置する。
- ⑥ 室温、14,000rpmで5分間遠心する。
- ⑦ 上澄みを、キットのピンクのカラム(QIA shredder Mini Spin Column)に移し、室温、14,000rpmで2分間遠心する。カラムを通過した水溶液を、2mlのチューブに移す。
- ⑧ 回収した水溶液に、800  $\mu$ LのAP3 bufferを加え、ピペッティングで混合する。
- ⑨ 混合液を650  $\mu$ Lずつ白いカラム(DNeasy Mini Spin Column)に通し、室温、10,000rpmで1分間遠心して溶出液を捨てる。混合液がなくなるまで操作をくり返す。
- ⑩ 500  $\mu$ LのAWを加え、室温、10,000rpmで1分間遠心し、溶出液を捨てる。もう一度その作業をくり返す。溶出液を除去後、何も加えないままで室温、10,000rpmで1分間遠心し、エタノールを完全に除去する。
- ⑪ カラムに1.5mLチューブをセットして、50℃に温めておいた1/10 AEを100  $\mu$ L加える。5分間放置後、10,000rpmで1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度、100  $\mu$ Lの1/10AEを加えて遠心して、DNAを溶出させる。

PCRは、反応液(100ng/ $\mu$ Lの鋳型DNA溶液 1.0  $\mu$ L、10×PCRバッファー1.5  $\mu$ L、2.5mM dNTP ミックス溶液 1.2  $\mu$ L、プライマー1

0.2  $\mu$  L、プライマー 2 0.2  $\mu$  L、5 U/ $\mu$  Lの *Taq* ポリメラーゼ (0.1  $\mu$  L、滅菌水 10.8  $\mu$  L)を PCR チューブに調製し、第 2.1.1 表に示した反応条件下で行った。*NPTII*、*iaaM*、*iaaH* および *ipt* 用のプライマーの塩基配列は第 2.1.2 表に示した。

PCR 産物 5  $\mu$  Lに 1  $\mu$  Lの6×ゲルローディングバッファーを添加し、2%アガロースゲルで電気泳動を行った(100V, 25 分)。電気泳動後、1mg/L 臭化エチジウム溶液で 25 分染色した後、ゲルを臭化エチジウム溶液から取り出して、蒸留水で 5 分間脱色し、AE-6971/2 Light-capture II (ATTO, Tokyo, Japan)で撮影した。

## 結果及び考察

PCR の結果を第 2.1.1~2.1.5 図に示した。第 2.1.1 図に示したのは Km 耐性遺伝子 *NPTII*の PCR の結果である。非形質転換体はバンドが検出されなかったのに対して、Km 耐性シュートは全ての個体から 700bp の位置に *NPTII*の増幅バンドが検出された。

第 2.1.2 図と第 2.1.3 図に示したのはオーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM*増幅の PCR の結果である。*iaaM*は塩基配列が長いため、5'側(前半)と3'側(後半)増幅のプライマーを設定し、PCR を行った。第 2.1.2 図は *iaaM* 遺伝子の5'側の PCR 結果を、第 2.1.3 図は *iaaM* 遺伝子の後3'側の PCR 結果を示した。いずれも非形質転換体はバンドが検出されなかったのに対して、*iaaM*を導入した Km 耐性個体からそれぞれ想定された 1800bp と 500bp の位置にバンドが検出された。

第 2.1.4 図に示したのはオーキシン合成酵素遺伝子 *iaaH*増幅の PCR の結果である。非形質転換体はバンドが検出されなかったのに

対して、*iaaH* 導入の Km 耐性個体からは想定された 1500bp の位置にバンドが検出された。

第 2.1.5 図に示したのはサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* 増幅の PCR の結果である。オーキシシンと同様に、非形質転換体はバンドが検出されなかったのに対して、*ipt* 導入 Km 耐性個体からは、予想された 800bp の位置にバンドが検出された。

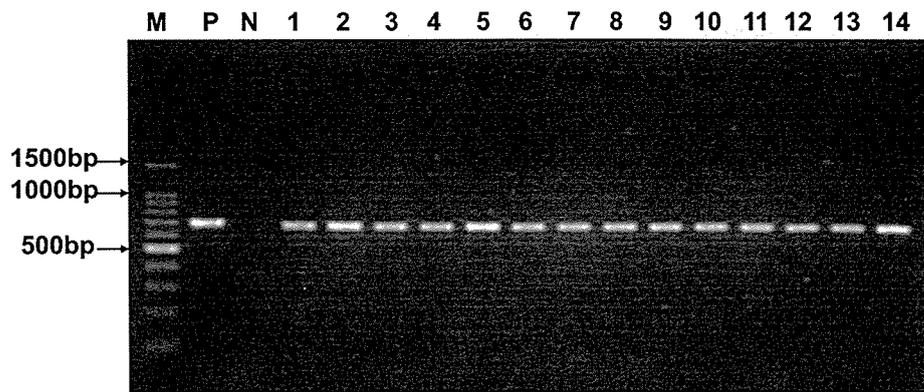
これらの結果から、獲得した全ての Km 耐性個体は各遺伝子が導入された形質転換体と推定された。

第 2.1.1 表 NPT II および目的遺伝子の PCR 条件

NPT II の PCR 条件			<i>iaaM</i> 、 <i>iaaH</i> および <i>ipt</i> の PCR 条件	
1	94℃	3 分	94℃	3 分
2	94℃	30 秒	94℃	1 分
3	94℃	30 秒	94℃	1 分
4	72℃	30 秒	72℃	2 分
5	72℃	5 分	72℃	5 分
2~4			30 回	

第 2.1.2 表 各プライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
NPT-1	GAGGCTATTCGCCTATGACTG
NPT-2	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA
IAAM FFX	CCTCTAGACAATGTCAGCTTCACCTCTCC
IAAM FB	TAGAGGATCCTGCGACTCATAGTCC
IAAM RB	ATTGCCTGGACTATGAGTCGC
IAAM RS	ATGAGCTCATCCATAGACTAATTTCTAGTGC
IAAH FX	CCTCTAGAAACTCAGAGAGATGGTGGCC
IAAH RS	ATGAGCTCGTTTAATTGGGTAAACCGGC
IPT FX	CCTCTAGAGCAAAAACTTATGGACCTGC
IPT RX	ATGAGCTCGGCGTAACCTAATACATTCC



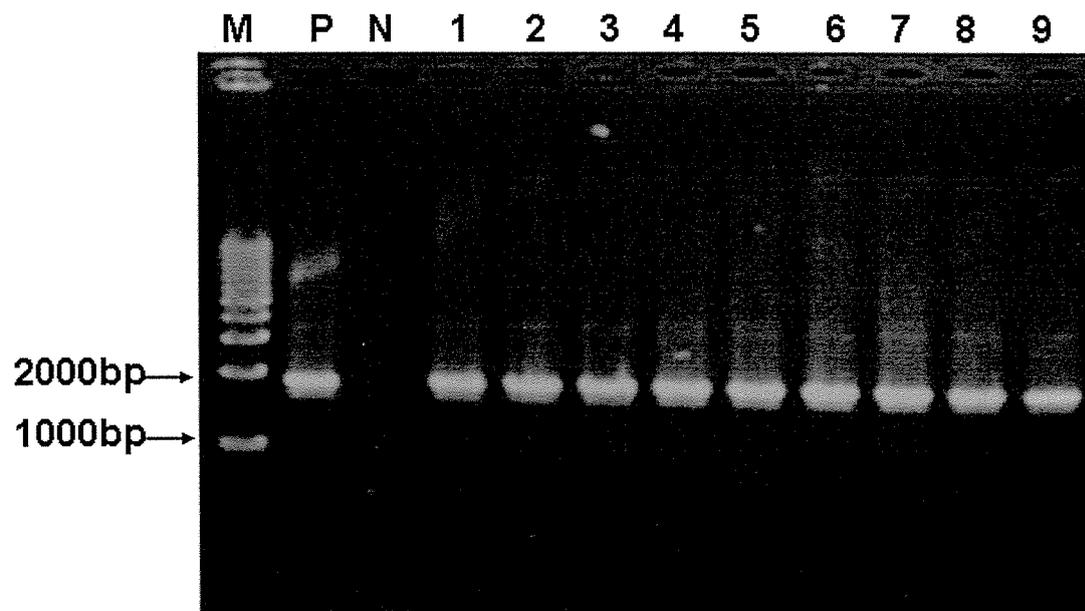
第 2.1.1 図 PCR による Km 耐性遺伝子 *NPTII* の増幅

M:100bp のラダーマーカー

P:プラスミド DNA

N:非形質転換体

1~14:Km 耐性シュート



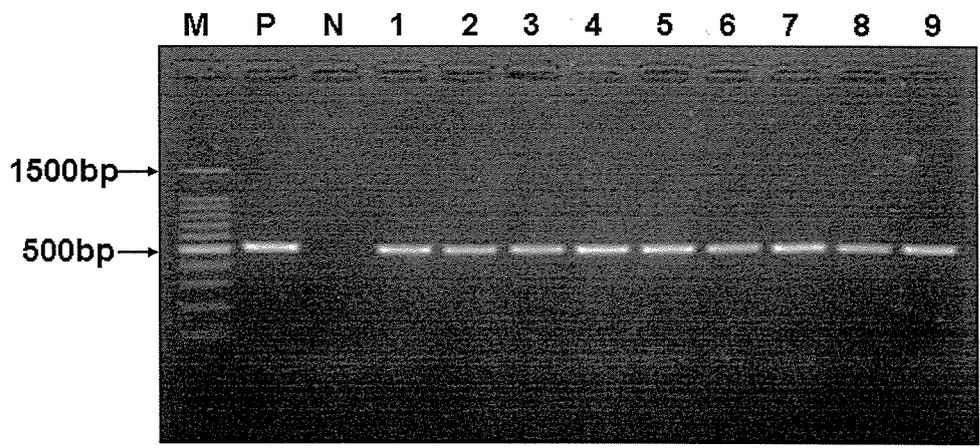
第 2.1.2 図 PCR による *iaaM* 5' 側の増幅

M:1Kbp のラダーマーカー

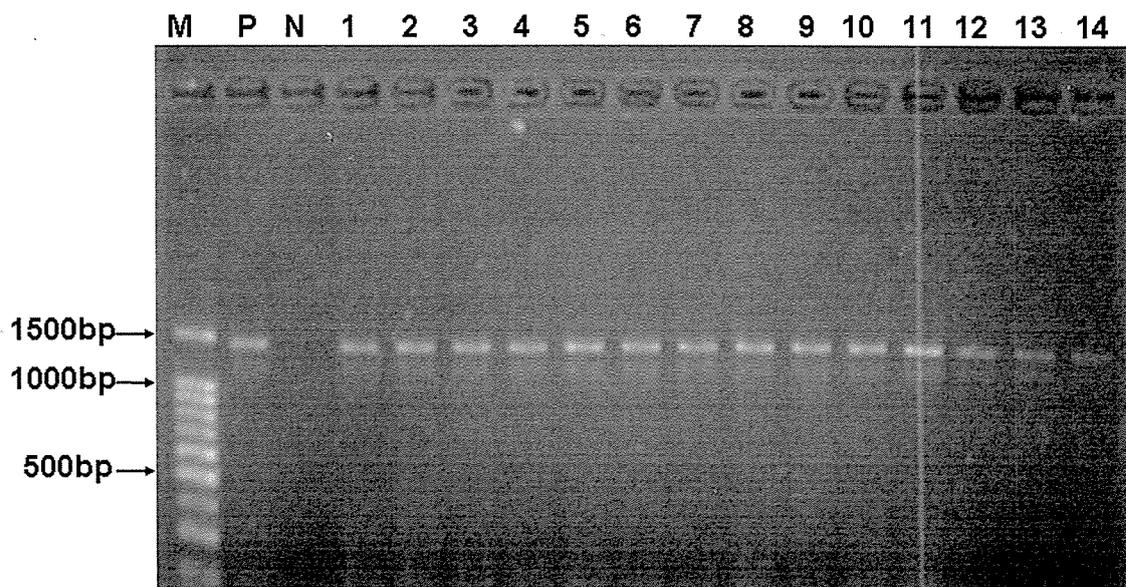
P:プラスミド DNA

N:非形質転換体

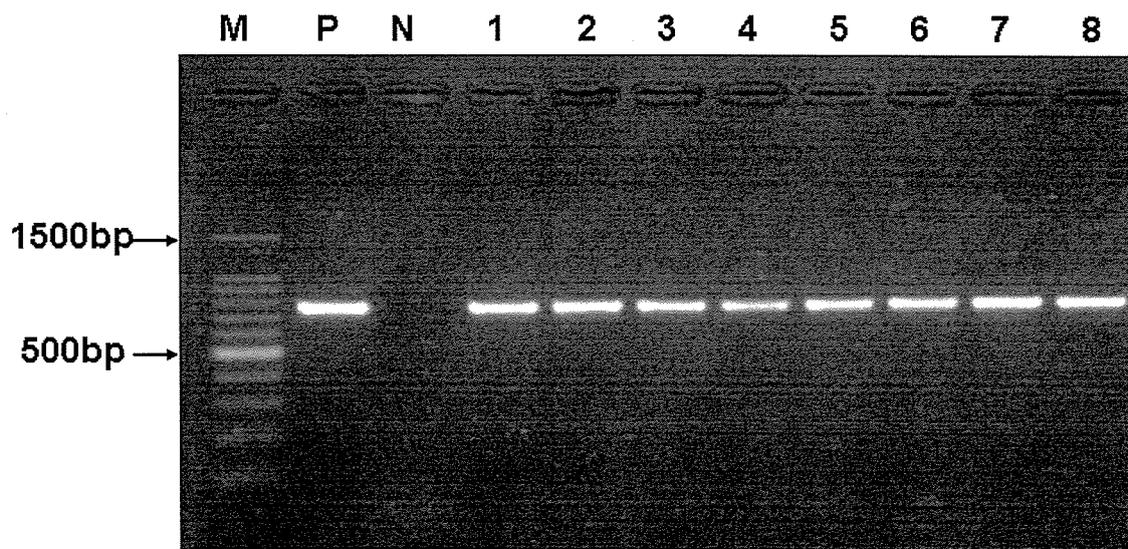
1~9:*iaaM* 導入植物



第 2.1.3 図 PCR による目的遺伝子 *iaaM* 3' 側の増幅  
M:100bp のラダーマーカー  
P:プラスミド DNA  
N:非形質転換体  
1~9:*iaaM* 導入植物



第 2.1.4 図 PCR による目的遺伝子 *iaaH* の増幅  
M:100bp のラダーマーカー  
P:プラスミド DNA  
N:非形質転換体  
1~14: *iaaH* 導入シュート



第 2.1.5 図 PCR による目的遺伝子 *ipt* の増幅

M:100bp のラダーマーカー

P:プラスミド DNA

N:非形質転換体

1~8: *ipt* 導入シュート

## 第2節 サザンハイブリダイゼーション法による 目的遺伝子の検出

サザンハイブリダイゼーション法は、Southern (1975)によって考案された方法で、特定の配列を持つ DNA 断片を検出し、分子量を同定する方法である。その原理は次のとおりである。まず、DNA を適当な制限酵素で消化し断片化した後、電気泳動によって断片の長さに応じて分離し、そのままゲル中でアルカリにより変性させ、メンブレンに転写して固定する。このメンブレンを、特定の塩基配列の DNA または RNA 断片(プローブ)を含むバッファー中でインキュベートすると、プローブと相補的な配列を持つ DNA が、メンブレンに結合した状態でプローブと二本鎖を形成(ハイブリダイズ)する。あらかじめプローブに放射活性を持たせたり化学修飾をおこなったりしておけば、プローブがハイブリダイズした部分のみがメンブレンの中から検出されることになる。本法はゲノムの解析を始めとする DNA の分析に必要な手法となっており、ゲノムサザンハイブリダイゼーションは、目的遺伝子のゲノム構造解析や、遺伝子の多型の解析、細胞のゲノム中に人為的に外来 DNA を導入した際の確認に適している。

PCR 法は極めて微量な DNA を増幅することができるため、ほこりや唾液によって細菌や他の人の DNA が混入するとプライマーと類似の配列を持つゲノム部分を増幅してしまう可能性があり、形質転換体の確認方法としては不完全である。一方、サザンハイブリダイゼーション法は、プローブとして長い塩基配列を用いて、目的遺伝子あるいは塩基配列を任意の DNA 集合体から検出する方法で、形質転換体確認の最も確実な方法である。特に形質転換体のコピー数確認に最

適である。本実験では、サザンハイブリダイゼーション法で遺伝子の導入を確認するとともに、形質転換体のコピー数の確認を行った。

## 材料および方法

サザンハイブリダイゼーション法による目的遺伝子の検出のため、DNeasy Plant Kits で抽出したゲノム DNA の量が少ないため、*in vitro* で培養しているリンゴ‘GS’の非感染シュート、感染葉から再分化した Km 耐性シュートを用いて CTAB 法でゲノムDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行った。

ゲノム DNA 抽出は以下の手順で行った。

- ① 試料 (500mg 程度) を液体窒素中で粉末化する。
- ② 15mL チューブに試料の 10 倍量 (5,000  $\mu$ L) の氷冷した IB を入れ、液体窒素で粉砕した試料を加える。(素早く)
- ③ 氷上で攪拌した後、遠心分離 (15,000 rpm、10 分、4°C) を行い、上清を除く。(この操作で、試料中の多糖類を排除できる)
- ④ 沈殿に試料の 5 倍容 (w/v) (2,500  $\mu$ L) の LB を加え、よく攪拌した後、液量の 1/10 倍容 (250  $\mu$ L) の 10% L-sarcosine を加え、室温に 10 分間放置する。
- ⑤ 等容 (2,750  $\mu$ L) の 2×CTAB 液を加え 65°C で 10 分間インキュベートする。
- ⑥ 等容 (5,500  $\mu$ L) のクロホルム液を加えゆっくり攪拌する。
- ⑦ 遠心分離 (15,000 rpm、10 分、室温)
- ⑧ 水層を取り等容 (5,500  $\mu$ L) のイソプロパノールを加え、核酸を沈殿させる。

- ⑨ 遠心分離 (6,000 rpm、5 分、4℃) により核酸を回収する(溶液は捨てる)。
- ⑩ 沈殿を軽く風乾させた後、適量 (550  $\mu$  L) の TE に溶解する。
- ⑪ 1/100 容 (5.5  $\mu$  L) の 1mg/mL RNase A を加え 37℃ で 1 時間消化する。
- ⑫ 等容 (550  $\mu$  L) の TE 飽和フェノール (pH 8.0) を加えて攪拌する
- ⑬ 遠心分離 (15,000 rpm、10 分、室温)
- ⑭ 水層を取りフェノール/クロロホルム (500  $\mu$  L) を加え、よくボルテックスする。
- ⑮ 遠心分離 (15,000 rpm、10 分、室温)
- ⑯ 上の水層を回収する。中間層の白いところを吸わないように注意する。
- ⑰ 液量と等容のクロロホルム/イソアミルを加え、よくボルテックスする。
- ⑱ 室温、1400 rpm、3 分遠心分離する。
- ⑲ 上の水層を回収する。
- ⑳ グリコーゲン を 1  $\mu$  L 加える。
  - ▮ 1/10 容の 3M 酢酸ナトリウムを加え、よくボルテックスする。
  - ▮ 2.5 倍容の 99.5% ice cold エタノールを加え、転倒混和する。
  - ▮ -80℃ なら 30 分、-20℃ なら over night で置いておく。
  - ▮ 4℃、1,400rpm、10 分遠心分離する。
  - ▮ 沈殿を吸わないように上澄み液をすべて取り除く。
  - ▮ 適量の 70% エタノールを加え、洗浄する。
  - ▮ 4℃、1,400rpm、3 分遠心分離する。
  - ▮ 沈殿を吸わないように上澄み液をすべて取り除く。
  - ▮ チューブをバラフィルムで蓋をし、注射針で穴をあけ、3 分真空乾燥

する。

▮ 適量の TE またはイオン交換水に溶かす。

▮  $-70^{\circ}\text{C}$  ~  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。

制限酵素反応液 (10×制限酵素バッファー10  $\mu\text{L}$ 、ゲノム DNA 10  $\mu\text{g}$ 、制限酵素 100U、全液量は 100  $\mu\text{L}$  になるように精製水を添加) を作製し、 $37^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベートしてから、エタノール沈殿処理で、DNA を精製した。10  $\mu\text{L}$  の TE に精製した DNA を溶解し、6×ゲルローディングバッファーを 2  $\mu\text{L}$  添加し、0.8% のアガロースで電気泳動を行った (50V)。電気泳動後、1mg/L 臭化エチジウム溶液で 25 分染色した後、泳動パターンを確認し、ナイロンメンブレンにブロットした。

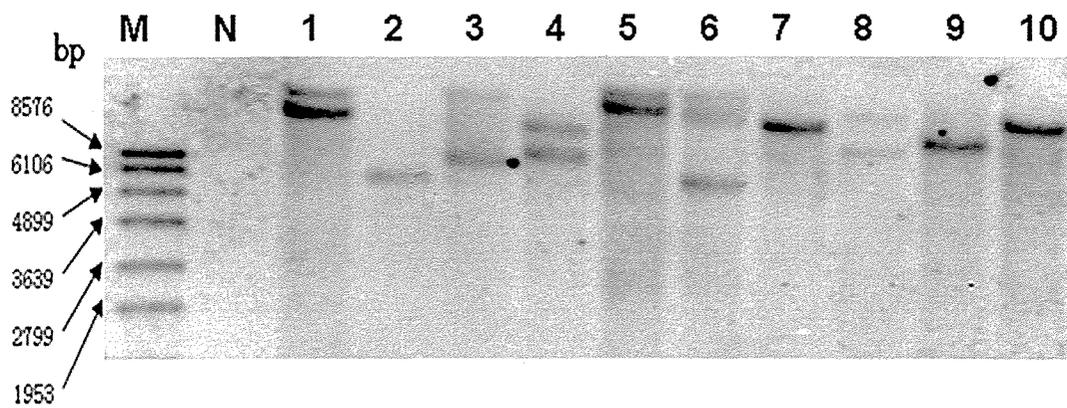
ハイブリダイゼーションは  $42^{\circ}\text{C}$  で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、DIG ラベルした目的遺伝子のプローブを 100 ng/mL になるようにハイブリバッファーを添加し、 $42^{\circ}\text{C}$  で一晩行った。ハイブリ後の洗いは 2×SSC+0.1%SDS で室温 5 分 2 回洗浄し、次いで 0.5×SSC+0.1%SDS で  $68^{\circ}\text{C}$  15 分、2 回洗浄した。さらに洗浄バッファー (0.1M Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.3% (w/v) Tween-20 で 2 分間洗浄した。オートクレーブで融解したブロッキングバッファーで 30 分間浸した後、1 万倍希釈の抗 DIG-AP 抗体 (Roche) を加えたブロッキングバッファーと 30 分間反応させた。次に 1 万倍希釈の抗 DIG-AP 抗体と反応させた後、洗浄バッファーで 2 回洗浄し、CDP-star と反応させた。シグナルの検出には AE-6971/2 Light-capture II (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

## 結果及び考察

サザンハイブリダイゼーションの結果は、第 2.2.1 図にオーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaM* 導入した Km 耐性個体の結果を、第 2.2.2 図にオーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaH* 導入した Km 耐性個体の結果を、第 2.2.3 図にサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* 導入した Km 耐性個体の結果をそれぞれ示した。いずれの結果においても、非形質転換体にはバンドが検出されなかったのに対して、Km 耐性を示した全ての系統からは異なるサイズのバンドが検出された。導入遺伝子は *iaaM* 転換体では 1~3 のコピー数が、*iaaH* 及び *ipt* 転換体では 1~4 のコピー数が観察された。

以上の結果から、導入した目的遺伝子はそれぞれゲノム中の異なるサイトに導入されていること、また系統によって導入遺伝子のコピー数が異なることが認められた。なお、サザンハイブリダイゼーション解析には制限酵素として *HindIII* と *EcoRI* を使用した。オーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaM* の塩基配列中に制限酵素 *HindIII* のサイト (AAGCTT) が存在している(付表 1、2)、*ipt* の塩基配列中に制限酵素 *HindIII* と *EcoRI* 両方のサイトが存在していない(付表 4)ため、オーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaM* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* を消化した場合は制限酵素 *EcoRI* を用いた、オーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaH* の場合は遺伝子の塩基配列中に *EcoRI* のサイト (GAATTC) が存在している(付表 3)ため、制限酵素 *HindIII* を用いて消化処理を行った。

果樹においてこれら植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した報告は、国内はもとより海外でもなく、初めての成果と考えられる。



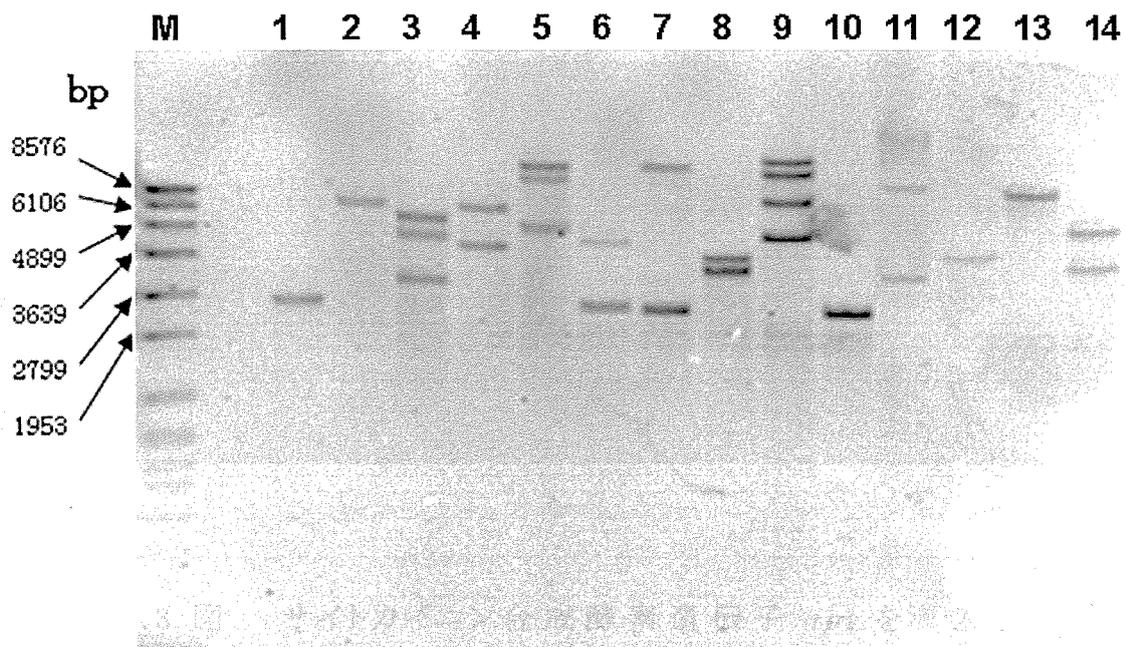
第 2.2.1 図 オーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaM* を導入した形質転換体のサザンブロット解析

非形質転換体および形質転換体植物の葉からゲノム DNA を抽出後、制限酵素 *EcoRI* で消化された

M: DIG ラベルしたマーカー遺伝子

N: 非形質転換体

1~10: 形質転換体



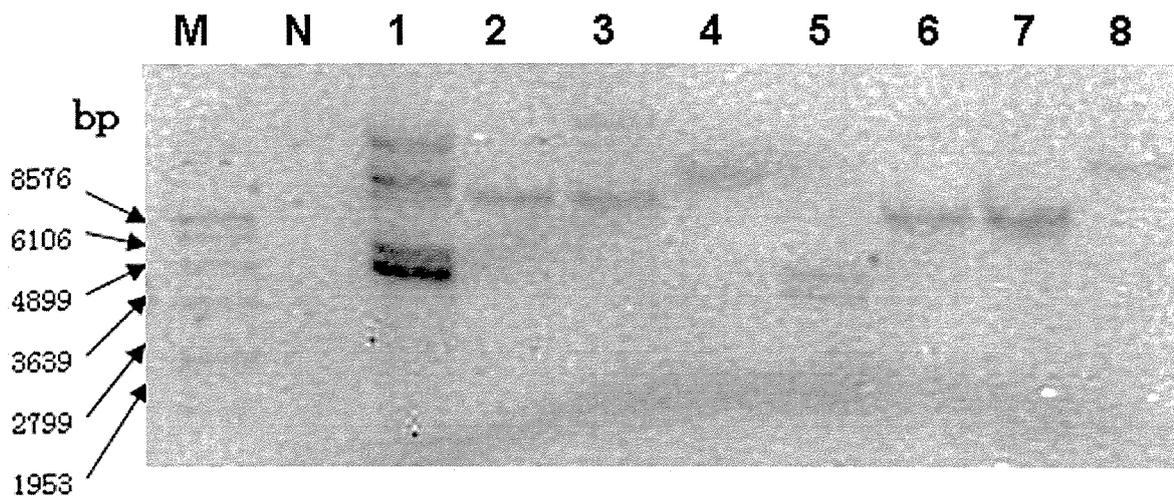
第 2.2.2 図 オーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaH* を導入した形質転換体のサザンブロット解析

非形質転換体および形質転換体植物の葉からゲノム DNA を抽出後、制限酵素 *Hind*III で消化された

M: DIG ラベルしたマーカー遺伝子

N: 非形質転換体

1~14: 形質転換体



第 2.2.3 図 サイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* を導入した形質転換体のサザンブロット解析

非形質転換体および形質転換体植物の葉からゲノム DNA を抽出後、制限酵素 *EcoRI* で消化された

M: DIG ラベルしたマーカー遺伝子

N: 非形質転換体

1~8: 形質転換体

## 摘 要

第1章に獲得した Km 耐性シュートを PCR およびサザンハイブリダイゼーションにより目的遺伝子の導入の有無を検討した結果、いずれの系統も形質転換体であることが確認できた。

## 第3章 形質転換体の成長特性

### 緒言

本章では、内生植物ホルモンのオーキシンのおよびサイトカイニンがリンゴ樹の樹姿形成にどのような役割を果たすかを解明するため、第1章で作出したオーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM*、*iaaH* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* 導入形質転換シュートを馴化して、成長特性を解析した。

### 第1節 *in vitro* 培養における形質転換体の発根

#### 材料および方法

##### 植物材料

第1章で作出した植物ホルモンオーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM*、*iaaH* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* を導入した‘GS’の形質転換体各2系統および非形質転換体を供試材料とした。

##### *in vitro* で発根培養

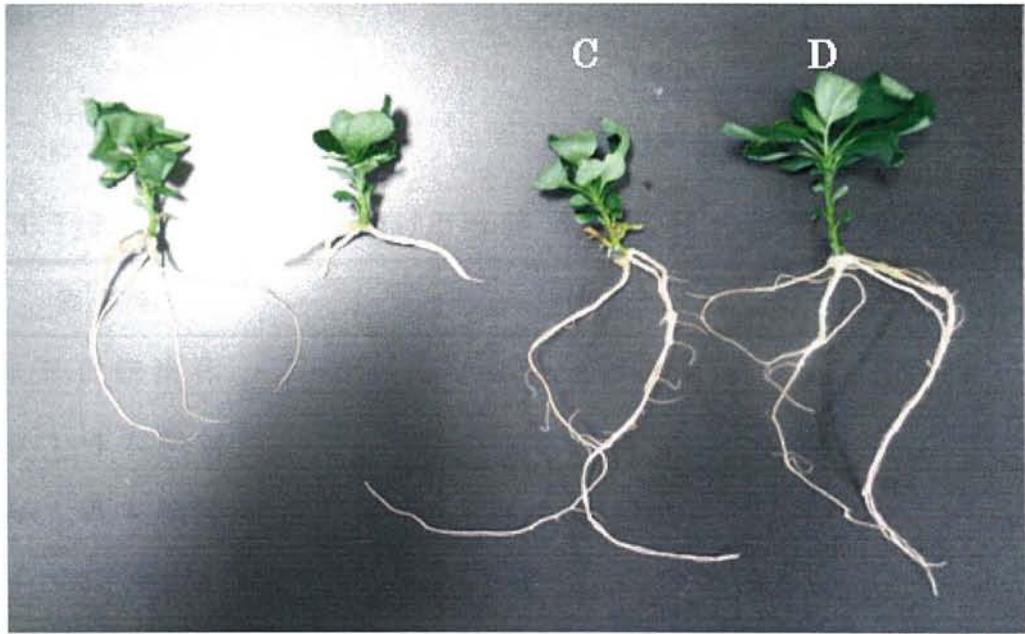
供試したシュートはMS継代培養で4週間培養後、発根培地に移植した。発根培地は0.65%のバクタガーを添加した植物ホルモンフリーの1/2MS培地である。直径8cm、高さ13cmのガラス培養瓶に約80mlずつ発根培地を分注し、オートクレーブで滅菌した後、1瓶あたり4本のシュートを置床した。シュートは25±1℃、16時間日長の培養

室で 6 週間培養した後、発根した後、根の伸長量を測定した。非形質転換体および形質転換体それぞれ 10 反復とした。

## 結果および考察

### *in vitro* で培養された根の成長

培養 6 週間後の各形質転換体および非形質転換体の発根状態を第 3.1.1 図に、根の伸長量を第 3.1.1 表に示した。非形質転換体と比較して、*ipt* 転換体は発根が劣り、毛根も少なかったのに対し、*iaaM* および *iaaH* 転換体は発根が優れ、根量も多いことが認められた。根の平均伸長量は、非形質転換体、*iaaM* 転換体、*iaaH* 転換体および *ipt* 形質転換体がそれぞれ 8.1cm、9.5cm、10.6cm、4.0cm であり、*iaaH* 転換体は非形質転換体よりも有意に長く、反対に *ipt* 転換体は非形質転換体及び他の形質転換体のいずれよりも有意に短かった。



第 3.1.1 図 培養根の発根状態（発根培地に置床後6週間目）

A: 非形質転換体

B: *ipt-1* 形質転換体

C: *iaaM-1* 形質転換体

D: *iaaH-2* 形質転換体

第 3.1.1 表 発根培地における培養 6 週間後の根の伸長量

個体名	伸長量(cm)	
非形質転換体	8.1 ± 1.3 <sup>z</sup>	b <sup>y</sup>
<i>iaaM</i> -1 導入転換体	9.5 ± 1.4	ab
<i>iaaH</i> -2 導入転換体	10.6 ± 1.9	a
<i>ipt</i> -1 導入転換体	4 ± 1.2	c

<sup>z</sup>: 平均 ± 標準偏差

<sup>y</sup>: 一元配置分散分析法により Turkey の多重検定 (HSD) で異符号間に 5% 水準で有意差あり。(n=10)

## 第2節 馴化1年目の成長

### 材料および方法

#### 1. 非形質転換体および形質転換体の馴化

*in vitro* で6週間発根させた植物体を供試したが、特定網室のスペースが広くないことから、各形質転換体それぞれ2系統のみ馴化した。発根した植物はバーミキュライトを充填したプラスチックポットに移植し、形質転換体専用の無加温の網室で40日間ポリエチレン袋を被袋し、徐々に袋に穴を開け、馴化した(第3.2.1図)。馴化はポットに移植後およそ40日間で完了した。各系統および非形質転換体とも各4個体、計28個体を実験に用いた。

#### 2. 馴化後のポットの生育特性

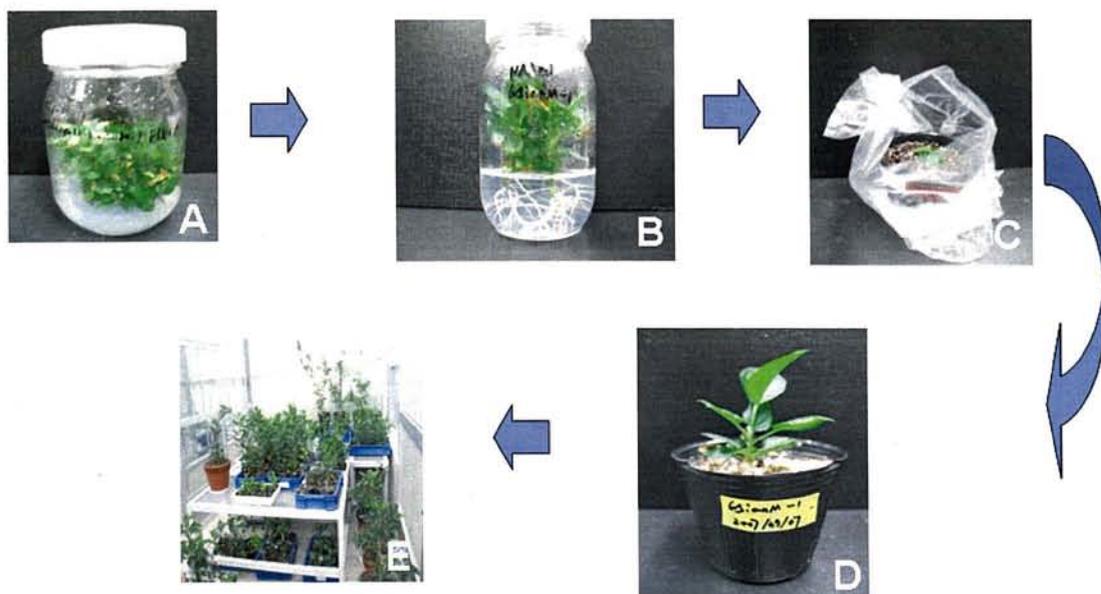
馴化した植物体は網室で土を充填したプラスチックポット(直径9cm、高さ8cm)に移植した。生育期間中、1000倍希釈した液体肥料ハイポネックスを2週間1回施用し、灌水や農薬散布は適宜に行った。

馴化初年目は、6月から10月まで成長したが、全個体とも側枝の発生はみられなかったため、成長停止後の10月に主幹長を測定した。非形質転換体と形質転換体それぞれ4反復とした。

データの統計処理はExcel統計2008(SSRI Co., Ltd., Japan)を用いて、一元配置分散分析法によりTurkeyの多重検定(HSD)を行った。

## 結 果

馴化後初年目の主幹長を第 3.2.1 表、第 3.2.2 図に示した。馴化後の生育期間が 6 月から 10 月までの 5 か月間と短期間であったので非形質転換体、*iaaM*、*iaaH* 転換体および *ipt* 転換体の主幹伸長量はそれぞれ 34.2、27.4、33.9、43.4cm と短かった。その中で *ipt* 転換体の主幹長は他より有意に長かった。*ipt* 転換体は、in vitro の発根状態は他よりも劣っていたことから、馴化後も生育が劣ることが予想されたが、逆に伸長した。



第 3.2.1 図 非形質転換体および形質転換体の馴化手順

A: シュートの増殖培養

B: 発根培養

C: 馴化処理

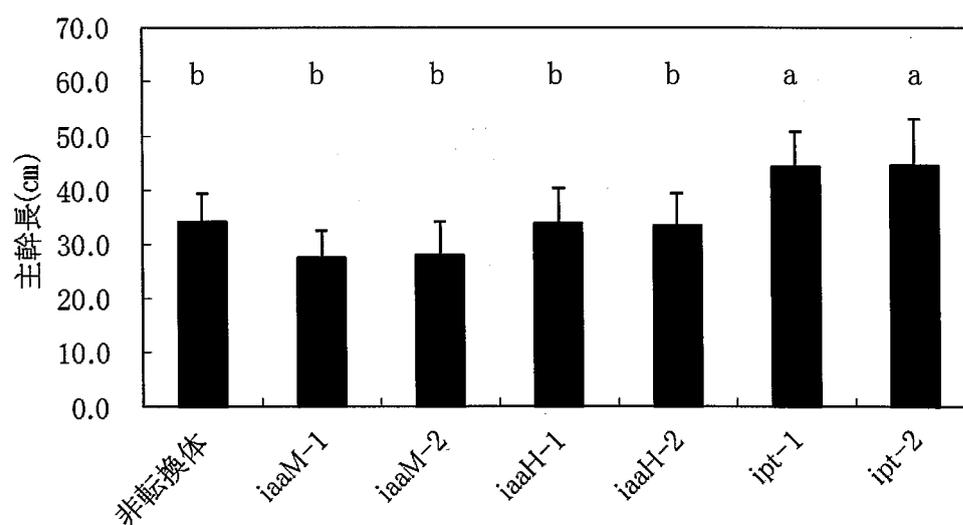
D: 馴化した植物体

E: 形質転換体専用網室で培養

第 3.2.1 表 馴化 1 年目の主幹長

種類	主幹長	標準偏差	検定 <sup>z</sup>
非転換体	34.2	5.2	b
iaaM-1	27.4	5.0	b
iaaM-2	27.9	6.2	b
iaaH-1	34.0	6.3	b
iaaH-2	33.4	5.9	b
ipt-1	44.4	6.4	a
ipt-2	44.6	8.6	a

<sup>z</sup>: Turkey の多重検定で、異符号間に5%水準で有意差あり。



第 3.2.2 図 馴化 1 年目非形質転換体および形質転換体

地上部の主幹伸長量(10月測定)

図中の縦棒は標準偏差(n=4)

-1, -2 は各転換体の系統を示す。

### 第 3 節 馴化後 2 年目の成長

#### 材料および方法

馴化初年目地上部の伸長量を測定した非形質転換体と *iaaM*、*iaaH* および *ipt* 転換体各 2 系統を供試した。

供試樹は、馴化 1 年目と同様に、形質転換体専用の無加温の特定網室にランダムに置いて管理した。管理方法は前年度と同様に行った。なお、前年は前樹とも無剪定である。

生育調査は、主幹長を 2009 年 4 月から 10 月まで週 1 回測定するとともに、成長停止した 10 月中旬に樹高、側枝数、主幹直径、節間長、側枝角度および総伸長量を測定した。主幹直径は、ポット土壌面から 15cm 上部を、節間長は、同約 20cm の位置から上部の 20 節について測定した。側枝の発角度度は、発生したすべての側枝について測定した。非形質転換体と形質転換体それぞれ 4 個体について測定した。

データの統計処理は Excel 統計 2008 (SSRI Co., Ltd., Japan) を用いて、一元配置分散分析法により Turkey の多重検定 (HSD) を行った。

#### 結 果

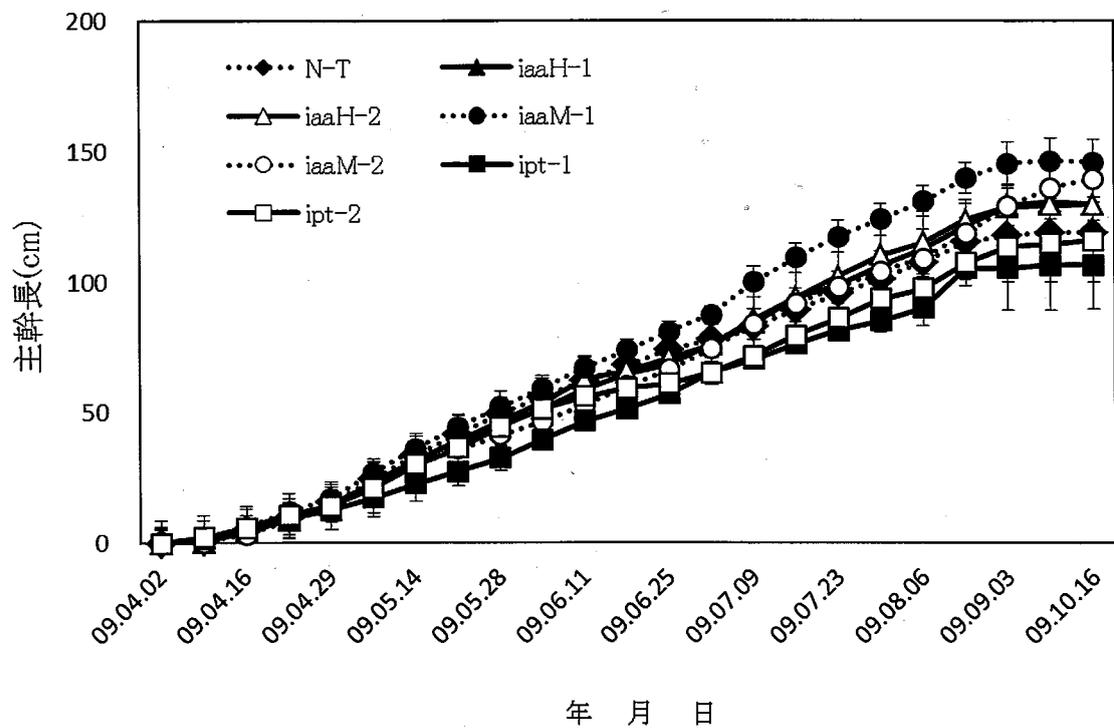
馴化 2 年目の主幹伸長の推移を第 3.3.1 図に示した。各樹とも 4 月上旬から伸長を開始し、10 月上旬に停止した。伸長量は、*iaaM*-1 が最も多く、次いで、*iaaM*-2、*iaaH*-1、2、非形質転換体、

ipt-2、1の順であった。統計的な有意差がみられたのは *iaaM*-1 転換体と *ipt*-1 転換体の間のみであったが、全体的には非形質転換体と比較し、*iaaM* および *iaaH* 転換体で伸長が優れ、*ipt* 転換体で劣る傾向であった。

初年目の伸長との合計で表される樹高については各樹とも 151 ~ 173cm で、有意差は見られなかった(第 3.3.1 表、第 3.3.2 図)。一方、主幹から発生した側枝数は、非形質転換体および *iaaM*、*iaaH* 転換体の各樹は 0.5~4.3 本であったのに対して、*ipt* 転換体は 10.3、8.3 本で、明らかに多く、他の転換体および非形質転換体との間に有意差が見られた(第 3.3.2 表、第 3.3.3 図)。その結果、側枝伸長を合わせた総伸長量は、非形質転換体と *iaaM*、*iaaH* 転換体は 182 ~ 258cm とほとんど同様であったが、*ipt* 転換体の系統はそれぞれ 378 と 416cm で他より有意に多かった(第 3.3.3 表、第 3.3.4 図)。

主幹直径は、非転換体および *iaaM*、*iaaH* 転換体の各系統が 10mm 程度であったのに対して、*ipt* 形質転換体の系統 1 と 2 ではそれぞれ 12.9 と 13.2mm で、有意に太かった(第 3.3.4 表、第 3.3.5 図)。逆に、*ipt* 形質転換体の節間長は他より有意に短かった(第 3.3.5 表、3.3.6 図)。さらに側枝の発生角度は他より狭い(上向き)ことが認められた(第 3.3.6 表、第 3.3.7 図)。

これらの非形質転換体および形質転換体の地上部の表現型の違いは第 3.3.8 図および第 3.3.9 図で示した。また、根の生育状態を評価するため、ポットから取り出して、外観だけを観察した(第 3.3.10 図)。*ipt* 形質転換体の根量は他より少ない様子が観察され、これは第 1 節の培養根の発生が少ないのと同様であった。



第 3.3.1 図 馴化 2 年目の主幹伸長の推移

N-T: 非形質転換体

iaaM-1,2: *iaaM* 転換体系統 1 および 2

iaaH-1,2: *iaaH* 転換体系統 1 および 2

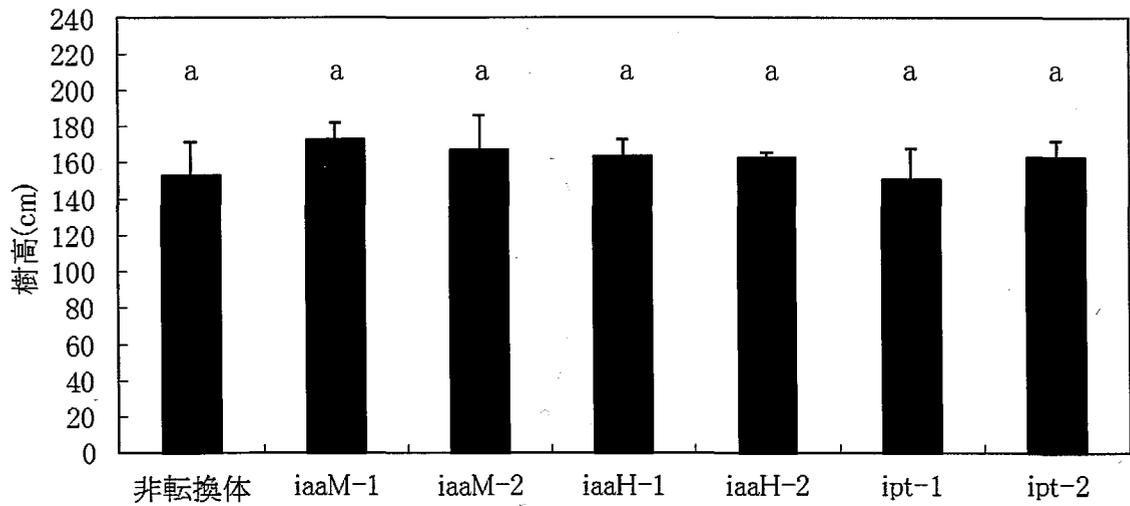
ipt-1,2: *ipt* 転換体系統 1 および 2

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 3.3.1 表 馴化 2 年目樹高

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaM-2	iaaH-1	iaaH-2	ipt-1	ipt-2
樹高 (cm)	152.90	173.00	167.00	163.50	163.00	151.00	163.00
標準偏差	18.63	8.81	19.07	9.40	2.94	16.87	9.31
検定 <sup>z</sup>	a	a	a	a	a	a	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 3.3.2 図 馴化 2 年目の成長停止までの樹高 (10 月 16 日測定)

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1,2: *iaaM* 転換体系統 1 および 2

iaaH-1,2: *iaaH* 転換体系統 1 および 2

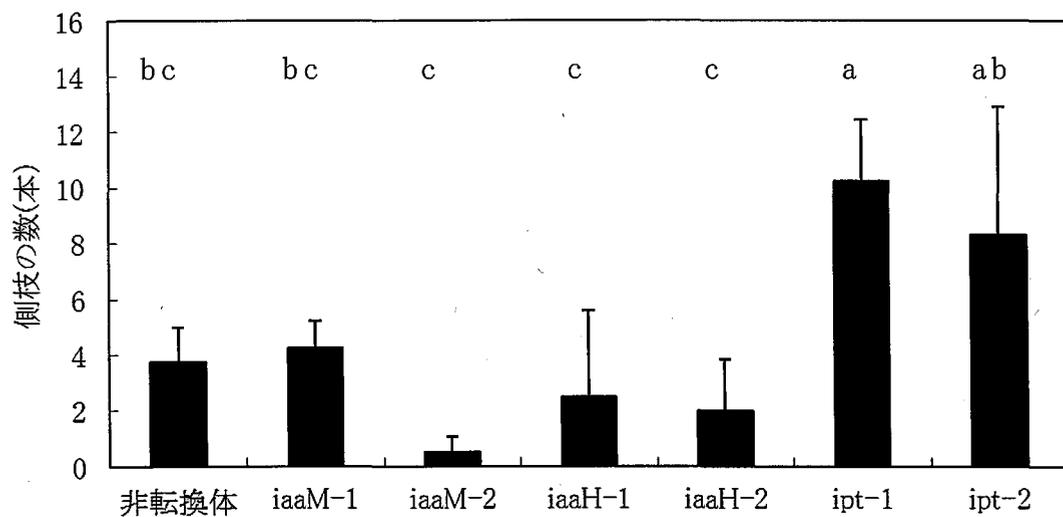
ipt-1,2: *ipt* 転換体系統 1 および 2

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 3.3.2 表 馴化 2 年目の側枝数

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaM-2	iaaH-1	iaaH-2	ipt-1	ipt-2
側枝数(本)	3.75	4.25	0.5	2.5	2	10.25	8.33
標準偏差	1.26	0.96	0.58	3.11	1.83	2.22	4.57
検定 <sup>z</sup>	bc	bc	c	c	c	a	ab

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 3.3.3 図 馴化 2 年目の側枝数

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1,2: *iaaM* 転換体系統 1 および 2

iaaH-1,2: *iaaH* 転換体系統 1 および 2

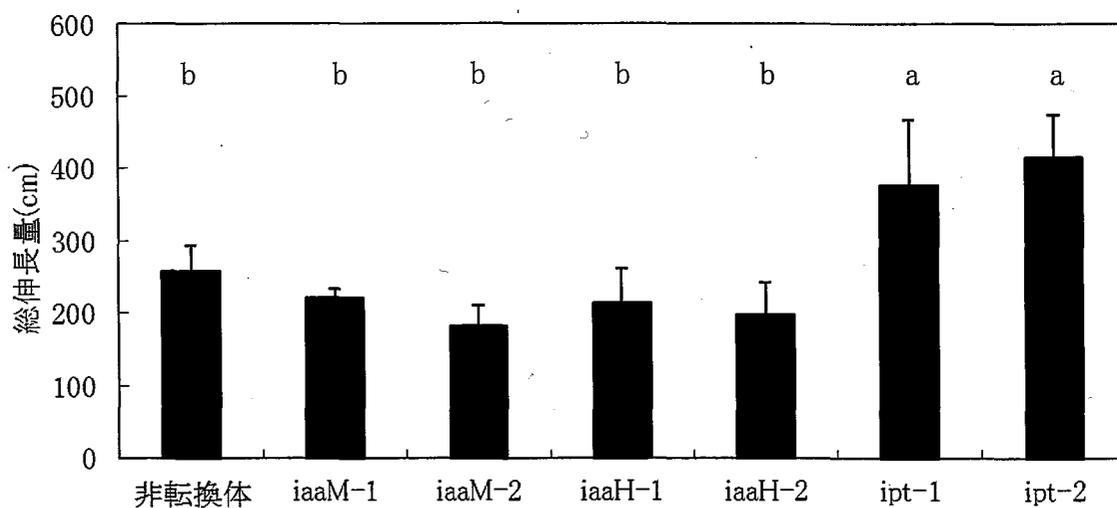
ipt-1,2: *ipt* 転換体系統 1 および 2

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 3.3.3 表 馴化 2 年目総伸長量

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaM-2	iaaH-1	iaaH-2	ipt-1	ipt-2
総伸長量 (cm)	257.75	221.75	181.5	213.67	197.75	376.1	416.27
標準偏差	35.1	11.7	28.4	47.23	44.21	90.9	57.14
検定 <sup>z</sup>	b	b	b	b	b	a	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 3.3.4 図 馴化 2 年目の総伸量

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1,2: *iaaM* 転換体系統 1 および 2

iaaH-1,2: *iaaH* 転換体系統 1 および 2

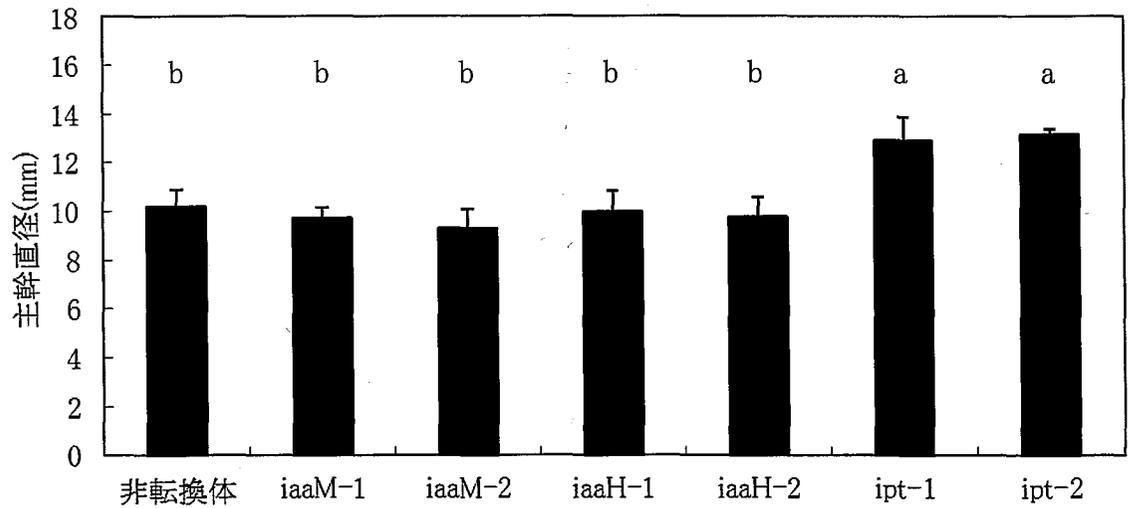
ipt-1,2: *ipt* 転換体系統 1 および 2

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 3.3.4 表 馴化 2 年目の主幹直径

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaM-2	iaaH-1	iaaH-2	ipt-1	ipt-2
直径 (mm)	10.20	9.70	9.30	9.99	9.76	12.91	13.16
標準偏差	0.66	0.44	0.80	0.84	0.81	0.96	0.24
検定 <sup>z</sup>	b	b	b	b	b	a	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に 5% 水準で有意差あり。



第 3.3.5 図 馴化 2 年目の主幹直径

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1,2: *iaaM* 転換体系統 1 および 2

iaaH-1,2: *iaaH* 転換体系統 1 および 2

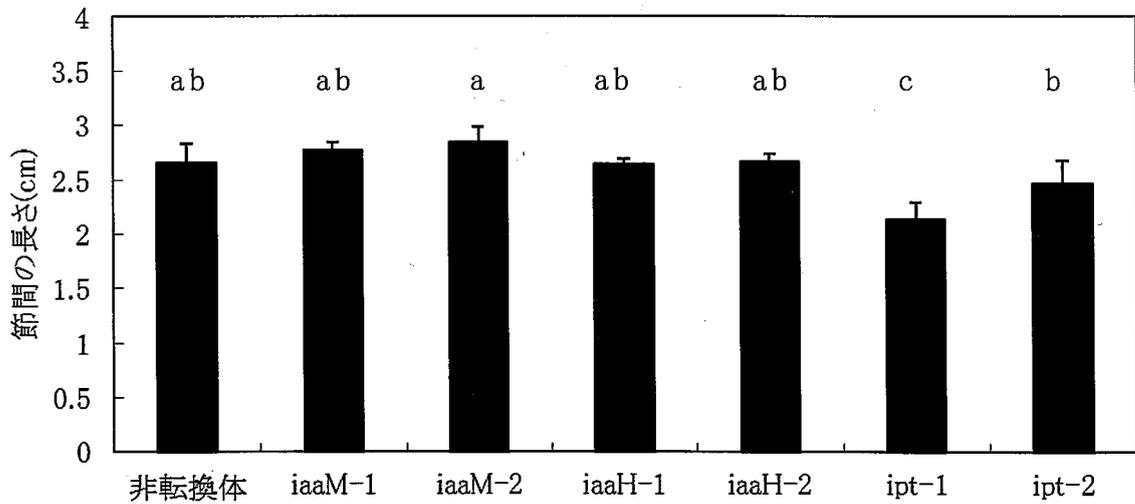
ipt-1,2: *ipt* 転換体系統 1 および 2

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 3.3.5 表 馴化 2 年目節間長

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaM-2	iaaH-1	iaaH-2	ipt-1	ipt-2
節間長 (cm)	2.65	2.77	2.84	2.64	2.66	2.14	2.46
標準偏差	0.18	0.08	0.15	0.05	0.07	0.15	0.22
検定 <sup>z</sup>	ab	ab	a	ab	ab	c	b

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 3.3.6 図 馴化 2 年目の主幹節間長

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1,2: *iaaM* 転換体系統 1 および 2

iaaH-1,2: *iaaH* 転換体系統 1 および 2

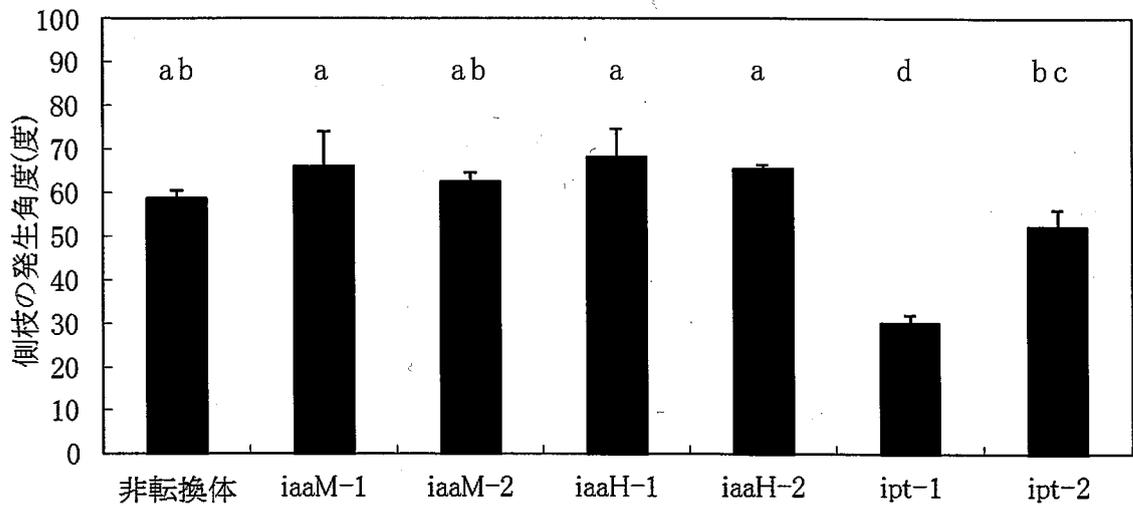
ipt-1,2: *ipt* 転換体系統 1 および 2

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 3.3.6 表 馴化 2 年目の側枝の発角度

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaM-2	iaaH-1	iaaH-2	ipt-1	ipt-2
角度(度)	58.70	66.08	62.50	68.22	65.58	30.01	52.27
標準偏差	1.81	8.07	2.12	6.52	0.80	1.79	3.81
検定 <sup>z</sup>	ab	a	ab	a	a	d	bc

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に 5% 水準で有意差あり。



第 3.3.7 図 馴化 2 年目の側枝発角度

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1,2: *iaaM* 転換体系統 1 および 2

iaaH-1,2: *iaaH* 転換体系統 1 および 2

ipt-1,2: *ipt* 転換体系統 1 および 2

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)



第 3.3.8 図 馴化 2 年目非形質転換体および形質転換体の地

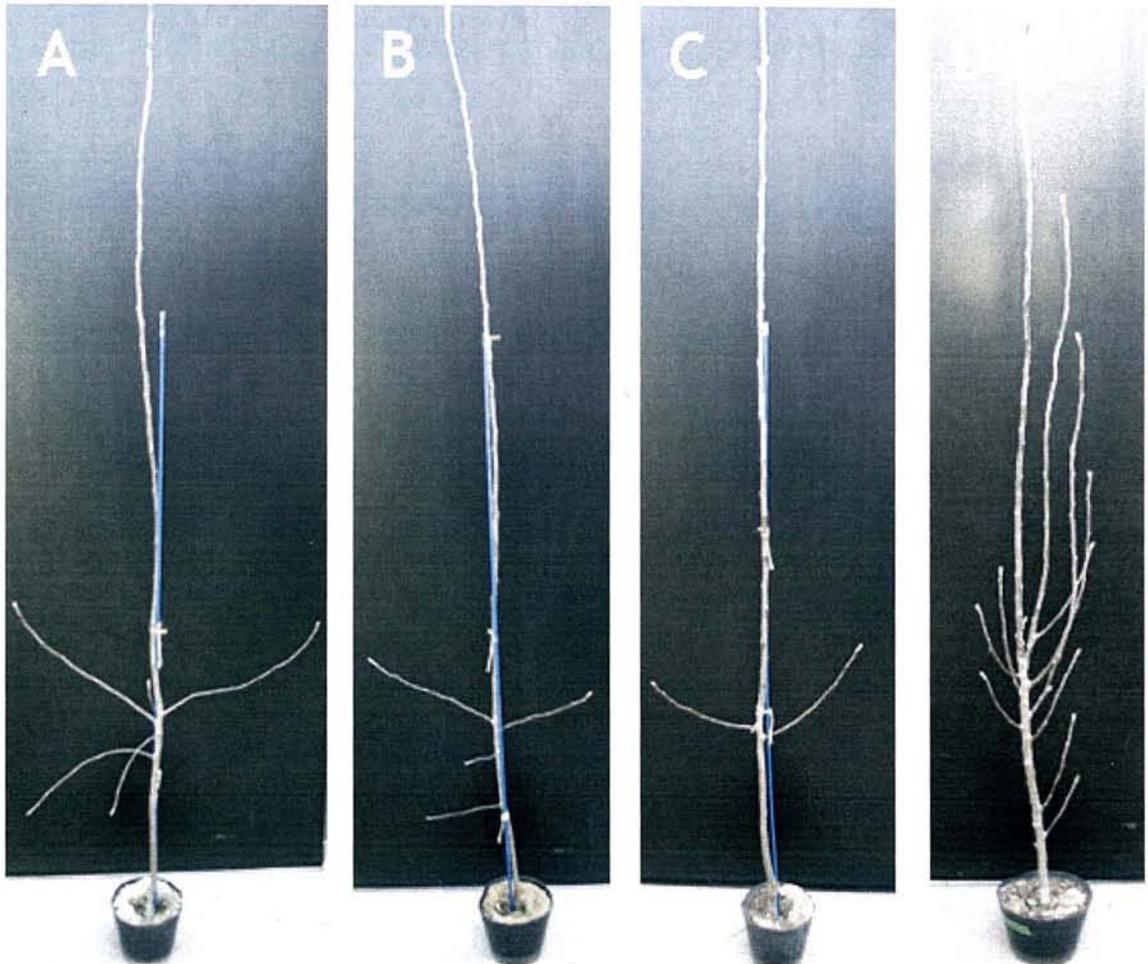
上部の生育比較

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

C: *iaaH-2* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体



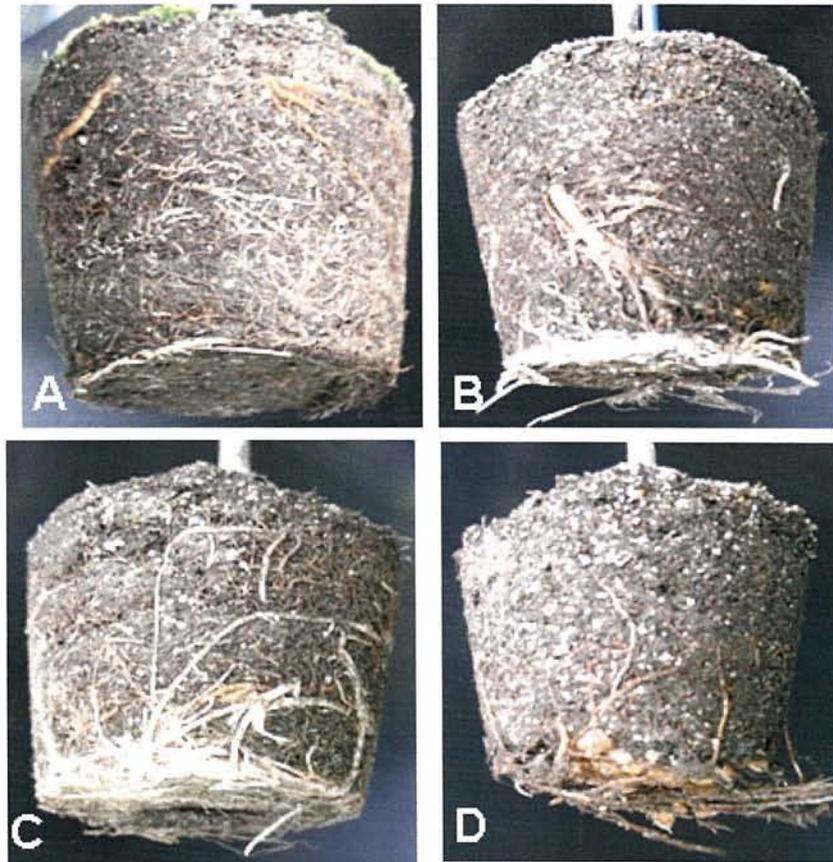
第 3.3.9 図 馴化2年目落葉後の非形質転換体および形質  
転換体の地上部の生育比較

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

C: *iaaH-1* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体



第 3.3.10 図 馴化 2 年目根の成長状態

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

C: *iaaH-2* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体

## 第 4 節 早期開花した花器官の調査

馴化後3年目の4月に *iaaM* 導入形質転換体の系統 2 と *iaaH* 導入形質転換体の系統 2 の各4樹中の1樹で開花が見られた。

花芽の分化は、主幹および側枝の頂芽、側芽のほか、主幹頂芽の花芽から新生した果台枝の側芽にもみられた(第 3.4.1 図)ことから、通常の開花現象とは異なる様相を呈した。そこで、開花した花器官について調査した。

### 材料および方法

花粉稔性を調査するため、早期開花した花器官から花粉を採取し、スクロース17%、バクトアガー1%の花粉発芽培地で8時間培養後、光学顕微鏡下で花粉の発芽率を算出した。50花粉粒を1反復として、3反復で調査し平均値を求めた。次に、開花した花の花器官が正常であるかを調査するために、‘ふじ’の貯蔵花粉を形質転換体の早期開花した花に授粉した。また、開花した花から採取した花粉を同じ特定網室内にある‘JM7’の花に授粉し、結実を観察した。

### 結 果

形質転換体開花した花の花粉管の成長状態は第 3.4.2 図に示した。非形質転換体は開花しなかったので、比較できなかったが、開花した *iaaM*-形質転換体と *iaaH* 形質転換体の花粉の発芽率はそれぞれ 33%と 36%であった(第 3.4.1 表、第 3.4.3 図)。

‘ふじ’の貯蔵花粉を授粉したところ、正常に結実することが認められた(第 3.4.4 図)。また、開花した花から花粉を採取して、同じ網室内にある JM7 の花に授粉したところ、結実した(第 3.4.5 図)。このことから、開花した花の生殖機能は正常であることが認められた。



第 3.4.1 図 馴化後 3 年目オーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaM* と *iaaH* 導入した形質転換体の開花した状態

A の 1: 非形質転換体

A の 2: *iaaM*-2 形質転換体

A の 3: *iaaH*-2 形質転換体

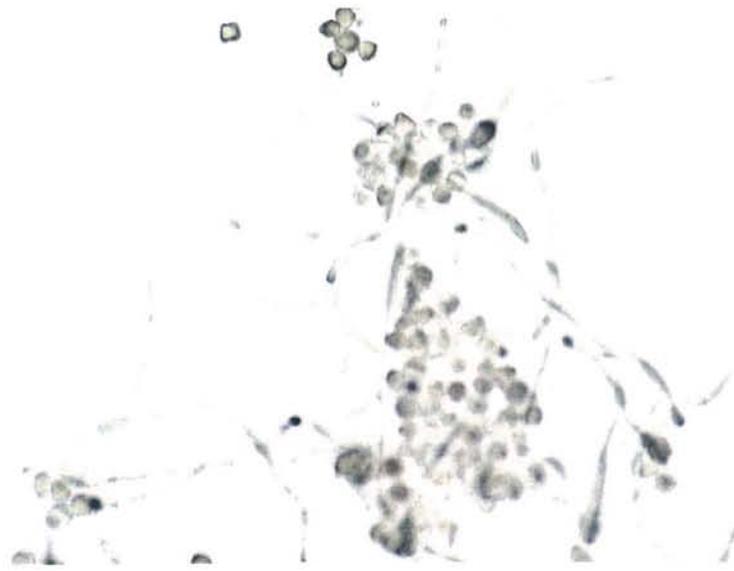
A の 4: *ipt*-1 形質転換体

B: *iaaH*-2 の主幹の頂芽と腋芽に花芽分化

C: 非形質転換体と形質転換体の主幹先端部の比較  
(左: *iaaH*-2, 右: 非形質転換体)

D: *iaaH*-2 の側枝の頂芽に花芽分化

E: *iaaM*-2 の頂芽の花芽の果台から派出した果台枝の腋芽  
に花芽分化

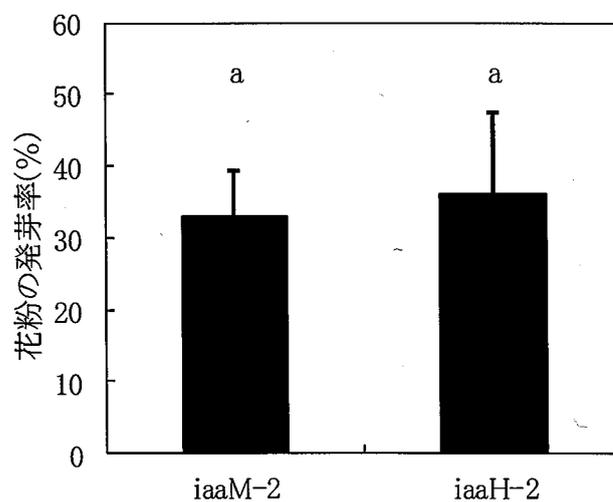


第 3.4.2 図 形質転換体 *iaaH-2* の花粉管の伸長

第 3.4.3 表 開花した形質転換体の花粉の発芽率

個体名	花粉発芽率 (%)	標準偏差	検定 <sup>z</sup>
iaaM-2	33	6.24	a
iaaH-2	36	11.53	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 3.4.3 図 開花した形質転換体の花粉の発芽率

iaaM: *iaaM*-2 形質転換体

iaaH: *iaaH*-2 形質転換体

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)



第 3.4.4 図 ‘ふじ’の貯蔵花粉による *iaaH-2* の結実状況  
(2010年5月7日授粉、2010年7月20日撮影)



第 3.4.5 図 形質転換体の花粉による‘JM7’の結実状況

(2010年5月19日授粉、2010年7月20日撮影)

## 第 5 節 ノーザンハイブリダイゼーションによる 遺伝子発現の確認

前節までの生育特性調査から明らかなように、各形質転換体は非形質転換と比較し、成長特性の異なることが認められた。本節では導入した各遺伝子が実際に発現しているかどうかを確認するため、特定の mRNA の発現を定性的かつ定量的に測定する最も一般的な方法であるノーザンハイブリダイゼーションにより検討した。

### 材料および方法

植物材料は馴化させた *iaaM*、*iaaH* および *ipt* を導入した形質転換体各 2 系統である。全 RNA を抽出するため、2010 年 5 月形質転換体専用の網室で培養している 3 年目の各転換体の若い葉を採取した。

全 RNA の抽出は改変 2×CTAB 法 (Kotoda ら, 2000) により以下の手順で行った。

- ① 試料 (0.5g 程度) を液体窒素中で粉末化して、15mL チューブに入れる。
- ② 試料の 10 倍容 (w/v) (5000  $\mu$ L) の 2×CTAB 液を加え 65°C で 10 分間インキュベートする。
- ③ 等量 (5000  $\mu$ L) のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) 液を加えゆっくり攪拌する。
- ④ 遠心分離 (15000 rpm、10 分、室温) 後、水層を取る。
- ⑤ ③、④の操作を繰り返す。

- ⑥ 水層を取り、3/4 倍容のイソプロパノールを加え、室温で 10 分間放置する。
- ⑦ 遠心分離 (15000 rpm、10 分、4℃) 後、沈殿を適量の TE に溶解する。
- ⑧ 1/4 倍容の 10M 塩化リチウム液を加え、2時間以上氷上に放置する。
- ⑨ 遠心分離 (15000 rpm、10 分、4℃) 後、沈殿を適量の TE に溶解する。
- ⑩ 等量の TE 飽和フェノール (PH9.0) を加え攪拌する。
- ⑪ 遠心分離 (15000 rpm、10 分、室温) 後、水層を取る。
- ⑫ フェノール/クロホルムを加え攪拌する。
- ⑬ 遠心分離 (15000 rpm、10 分、室温) 後、水層を取る。
- ⑭ 1/10 容の 3M 酢酸ナトリウムを加え、よくボルテックスする。
- ⑮ 2 倍容のエタノール (-20℃) を加え、-80℃ に 10 分間放置する。
- ⑯ 遠心分離 (15000 rpm、10 分、4℃) によって RNA を沈殿させる。
- ⑰ 沈殿を 70% のエタノールで洗浄する。
- ⑱ 沈殿を吸わないように上澄み液をすべて取り除く。
- ⑲ チューブをバラフィルムで蓋をし、注射針で穴をあけ、3分真空乾燥する。
- ⑳ 適量の TE またはイオン交換水に溶かす。

□ -20℃ で保存する。

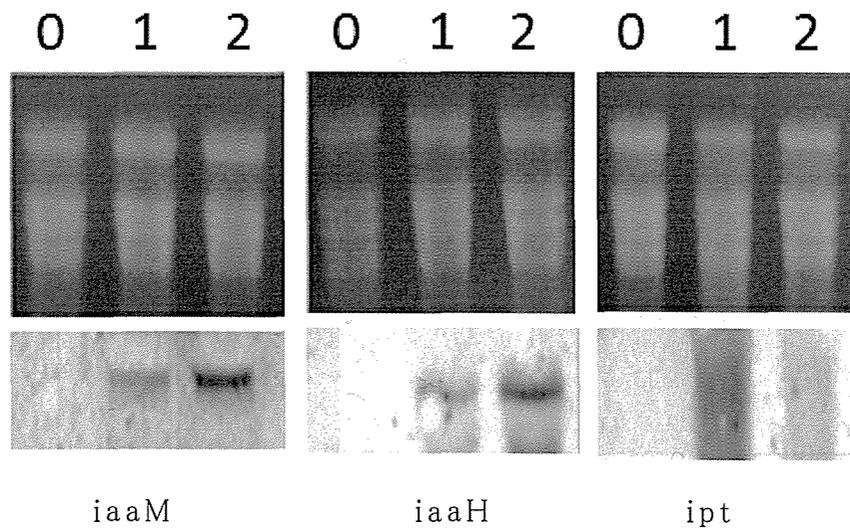
非形質転換体および各形質転換体の葉から抽出した全 RNA をそれぞれ 20  $\mu$ g 用いて、ホルムアルデヒドで調製し、65℃ で 15 分間変性させ、ホルムアルデヒド入りの 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンにブロットする。

ハイブリダイゼーションは 42℃で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、DIG ラベルした目的遺伝子のプローブを 100 ng/ml になるようにハイブリバッファーを添加し、42℃で一晩行った。ハイブリ後の洗浄は 2×SSC+0.1%SDS で室温 5 分 2 回、次いで 0.5×SSC+0.1%SDS で 68℃15 分、2 回行った。さらに洗浄バッファー(0.1M Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、0.3% (w/v) Polxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween-20)で 2 分間洗浄した。オートクレーブで融解したブロッキングバッファーに 30 分間浸した後、1 万倍希釈の抗 DIG-AP 抗体 (Roche)を加えたブロッキングバッファーと 30 分間反応させた。次に 1 万倍希釈の抗 DIG-AP 抗体と反応させた後、洗浄バッファーで 2 回洗浄し、CDP-star と反応させた。シグナルの検出には AE-6971/2 Light-capture II (ATTO, Tokyo, Japan)を用いて行った。検出した発光値を発現量として定量した。

## 結 果

ノーザンハイブリダイゼーション解析の結果を第 3.5.1 図に示した。目的の mRNA は非形質転換体からは検出しなかった。オーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM*、*iaaH* 導入した形質転換体の各系統からはそれぞれ目的の mRNA が検出され、系統によりバンドの濃さに違いがみられた。このことから導入したオーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM*、*iaaH* が発現していること、また系統による発現量の違いが明らかになった(第 3.5.2 図、第 3.5.3 図)。それに対して、*ipt* の 2 系統からは目的の mRNA のバンドが検出できなかった。この理由として mRNA がメンブランにうまく転写しなかったか、あるいは、途中で分解したことが考えられる。

これについてはさらに検討する必要がある。



第 3.5.1 図 形質転換体のノーザンハイブリダイゼーションの結果

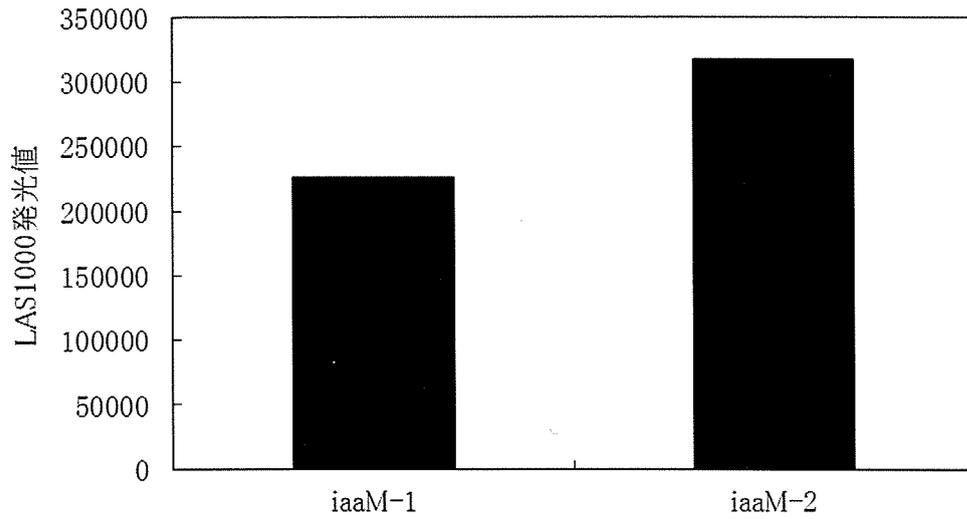
iaaM: *iaaM* 転換体

iaaH: *iaaH* 転換体

ipt: *ipt* 転換体

0 は非形質転換体

1、2 は形質転換体の異なる系統

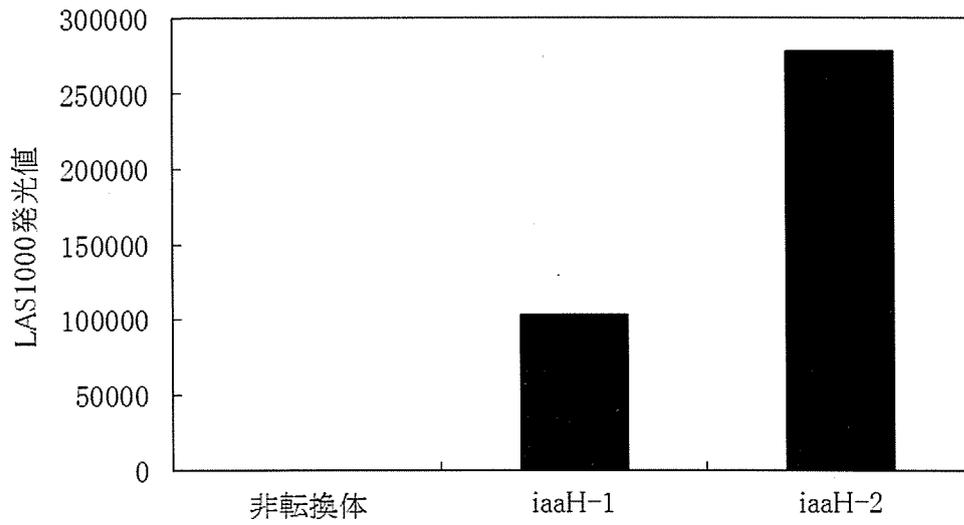


第 3.5.2 図 オーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM* 導入した形質転換体の *iaaM* 遺伝子の発現量 (全 RNA20  $\mu$ g)

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1: *iaaM* 転換体系統 1

iaaM-2: *iaaM* 転換体系統 2



第 3.5.3 図 オーキシシン合成酵素遺伝子 *iaaH* 導入した形質転換体の *iaaH* 遺伝子の発現量。(全 RNA20  $\mu$ g)

非転換体 : 非形質転換体

iaaH-1 : *iaaH* 転換体系統 1

iaaH-2 : *iaaH* 転換体系統 2

## 第 6 節 植物組織の観察

前節までの結果から、形質転換体の成長は非形質転換体と比較して異なっており、特に *ipt* 転換体は側枝の発生や節間長、主幹径などが他と異なる特性を示した。そこで、本節では成長部位の組織を観察した。

### 材料および方法

*iaaM*、*iaaH* および *ipt* 転換体の各 1 系統および非形質転換体を供試し、前節までの調査に用いた個体とは別の 1 個体について、2010 年 8 月 10 日に成長中のシュート先端部を約 3cm 採取し、茎頂分裂組織と茎の横断面および縦断面の細胞を観察した。

試料は、FAA 液 (1.48% ホルムアルデヒド、5% 酢酸、50% エタノール、0.1% Tween20) に浸漬し、固定した。

FAA 液から取り出した試料を 50% エタノールに浸漬し、次いで 60% エタノール、70% エタノール、85% エタノール、95% エタノールの順に溶液を交換した。各溶液には 4°C で半日ずつ静置した。次に無水エタノールに交換し室温で半日静置を 4 回繰り返した。無水エタノールは 99.5% エタノールに 30 g/L となるようにモレキュラーシーブスを加え、2~3 時間攪拌し、約 2 週間静置後に使用した。その後、25% レモゾール (Wako, Osaka, Japan): 75% 無水エタノール、50% レモゾール: 50% エタノール、75% レモゾール: 25% 無水エタノール、100% レモゾール、再度 100% レモゾールの順に溶液を交換し、各ステップとも室温で半日静置した。なお 50% エタノールから 100% レモゾール溶液までのステップご

とに、10分の脱気処理を行った。さらに100%レモゾールを再度交換し10分の脱気後、液量の1/4量のパラプラストプラス粒(SIGMA)を加え室温に一晩静置した。翌日60℃のインキュベーターにパラプラストが解けるまで数時間静置し、パラプラストが完全に溶解した後、添加したパラプラストと同量のパラプラストを加え、完全に解けるまで数時間60℃に静置した。その後、レモゾールとパラプラストの混合液を捨てて、融解パラプラストに交換し60℃で一晩静置した。再び融解パラプラストを交換し60℃で半日静置する操作をさらに6回繰り返した後4℃で保存した。

#### 切片スライドの作成

4℃で保存のパラフィン包埋サンプルから、切片作成用のブロックを作成した。マイクローム(PR-50, Yamato koki, Asaka, Japan)を用いて10 μm厚の連続切片にした。連続切片は滅菌水を載せたMASコート済みのスライドグラス上に載せ、42℃で軽く伸展させすぐに水分を吸い取り、さらに一晩ベーキングすることで完全に伸展させた。

#### 脱パラフィン処理

一晩乾燥処理した切片をレモゾールに10分間2回処理して、脱パラフィンを行った。Entellan Newを滴下しカバーグラスをかぶせ、蛍光顕微鏡(LABOPHOT-2 Nikon, Tokyo, Japan)で観察した。

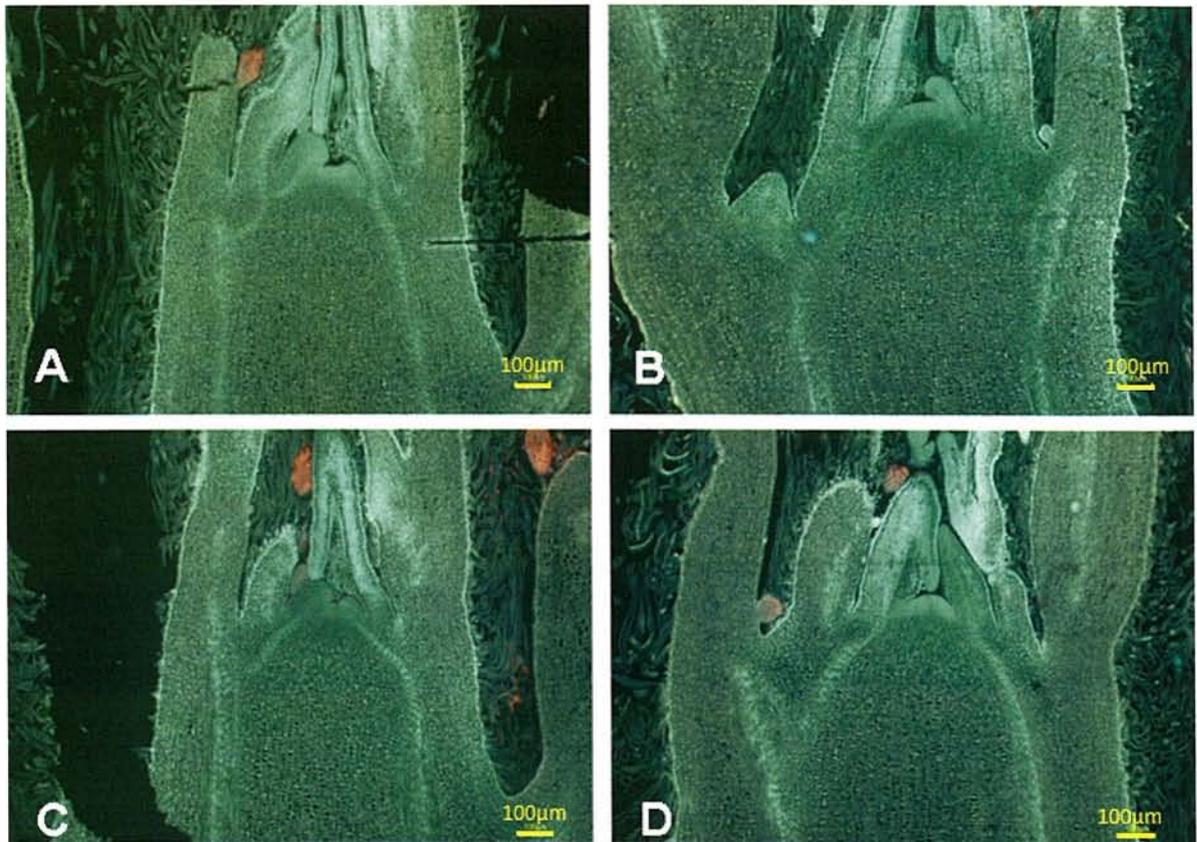
## 結 果

茎頂分裂組織のパラフィン切片は第 3.6.1 図に示した。光学顕微鏡下で非形質転換体および形質転換体の茎頂分裂組織には差異が見られなかった。

茎横断面のパラフィン切片は第 3.6.2 図に示した。*ipt-1* 形質転換体の木質部は非形質転換体、*iaaM-1*、および *iaaH-2* 転換体より大きかった。そして、木質部の横断面の細胞の横径は非形質転換体の  $31.28 \mu\text{m}$  に対して、*iaaM-1* 転換体、*iaaH-2* 転換体および *ipt-1* 転換体はそれぞれ  $32.59 \mu\text{m}$ 、 $30.96 \mu\text{m}$ 、 $41.14 \mu\text{m}$  で、非形質転換体、*iaaM-1* と *iaaH-2* 転換体の間に差が見られなかった。*ipt-1* 転換体の細胞の横径が非形質転換体、*iaaM-1* および *iaaH-2* 転換体より有意に大きいことが認められた(第 3.6.3 図、第 3.6.1 表、第 3.6.4 図)。

茎縦断面のパラフィン切片は第 3.6.5 図に示した。木質部の縦断面の細胞の大きさは第 3.6.6 図、第 3.6.2 表と第 3.6.7 図に示す。非形質転換体の細胞の縦径は  $35.04 \mu\text{m}$  に対して、*iaaM-1* 転換体、*iaaH-2* 転換体および *ipt-1* 転換体はそれぞれ  $34.12 \mu\text{m}$ 、 $37.78 \mu\text{m}$ 、 $37.43 \mu\text{m}$  で、非形質転換体、*iaaM-1* 転換体、*iaaH-2* 転換体および *ipt-1* 転換体の間に有意差が認められなかった。

これらの結果から、サイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt-1* 導入した形質転換体の主幹の太さは主に木質部の細胞の肥大によって達成することが推測された。



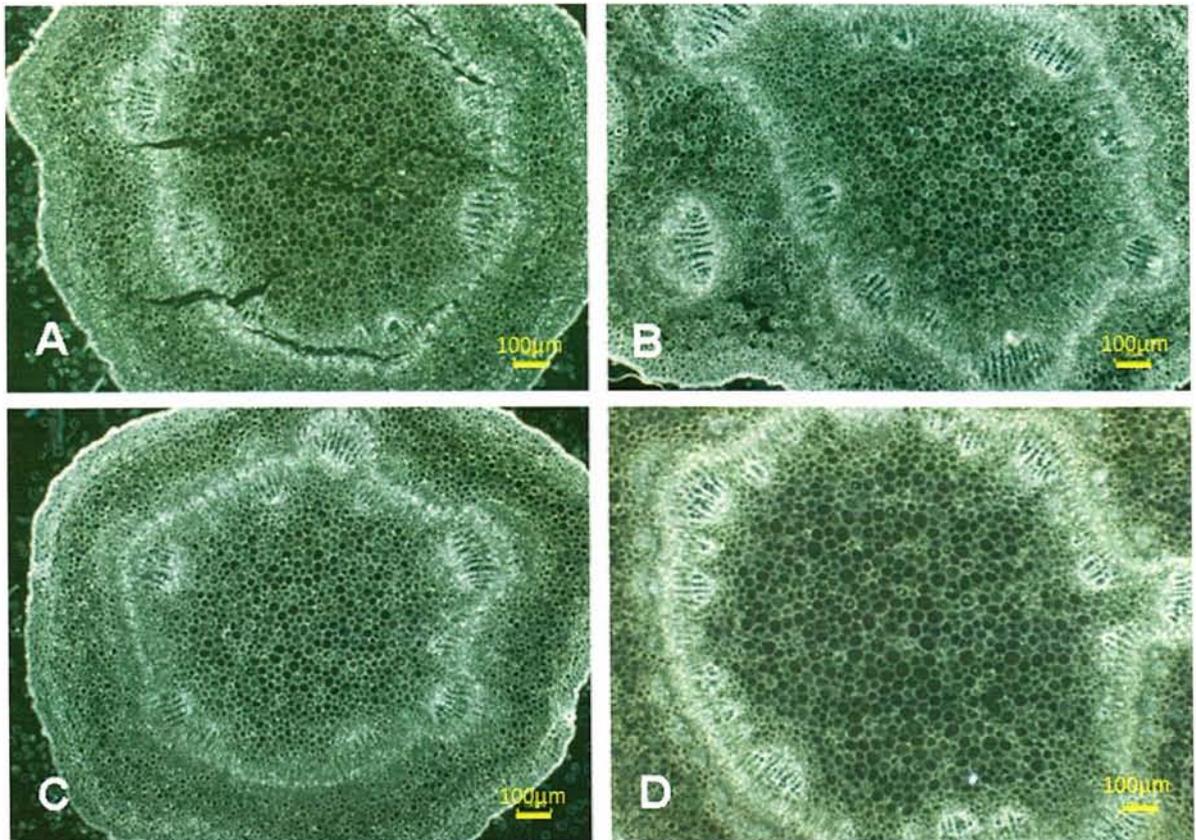
第 3.6.1 図 茎頂分裂組織のパラフィン切片 (4×)

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

C: *iaaH-2* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体



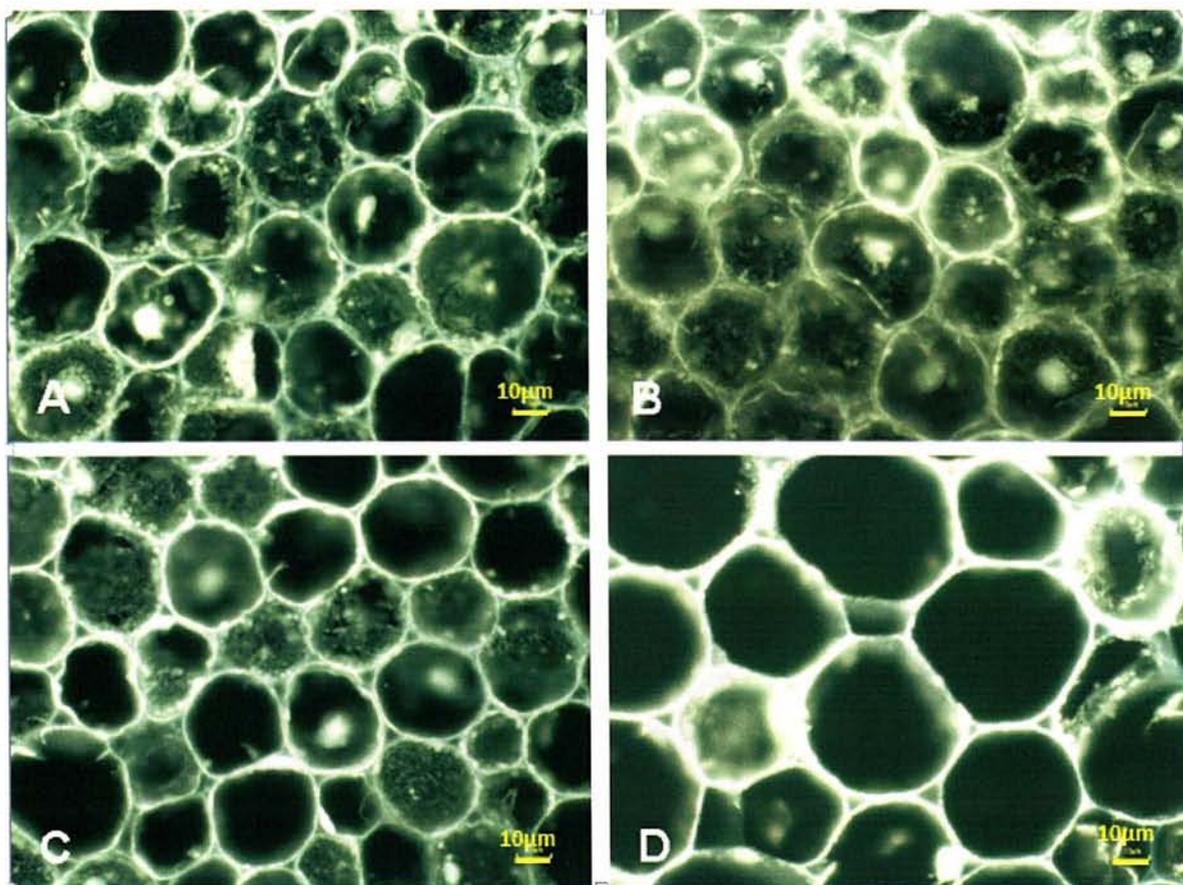
第 3.6.2 図 茎横断面組織のパラフィン切片 (4×)

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

C: *iaaH-2* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体



第 3.6.3 図 茎横断面木質部組織のパラフィン切片 (40×)

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

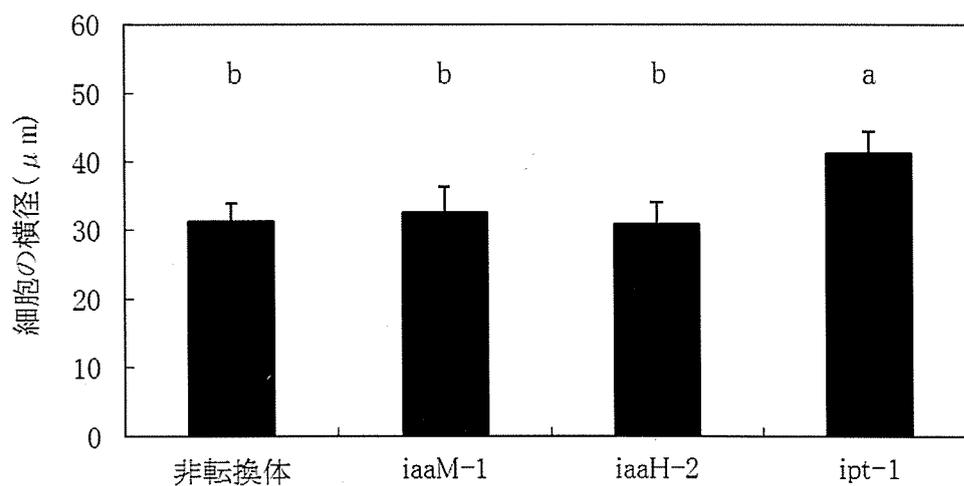
C: *iaaH-2* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体

第 3.6.1 表 形質転換細胞の横径 ( $\mu\text{M}$ )

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaH-2	ipt-1
反復	15	15	15	15
細胞の横径 ( $\mu\text{M}$ )	31.28	32.59	30.96	41.14
標準偏差	2.63	3.81	3.10	3.28
検定 <sup>z</sup>	b	b	b	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



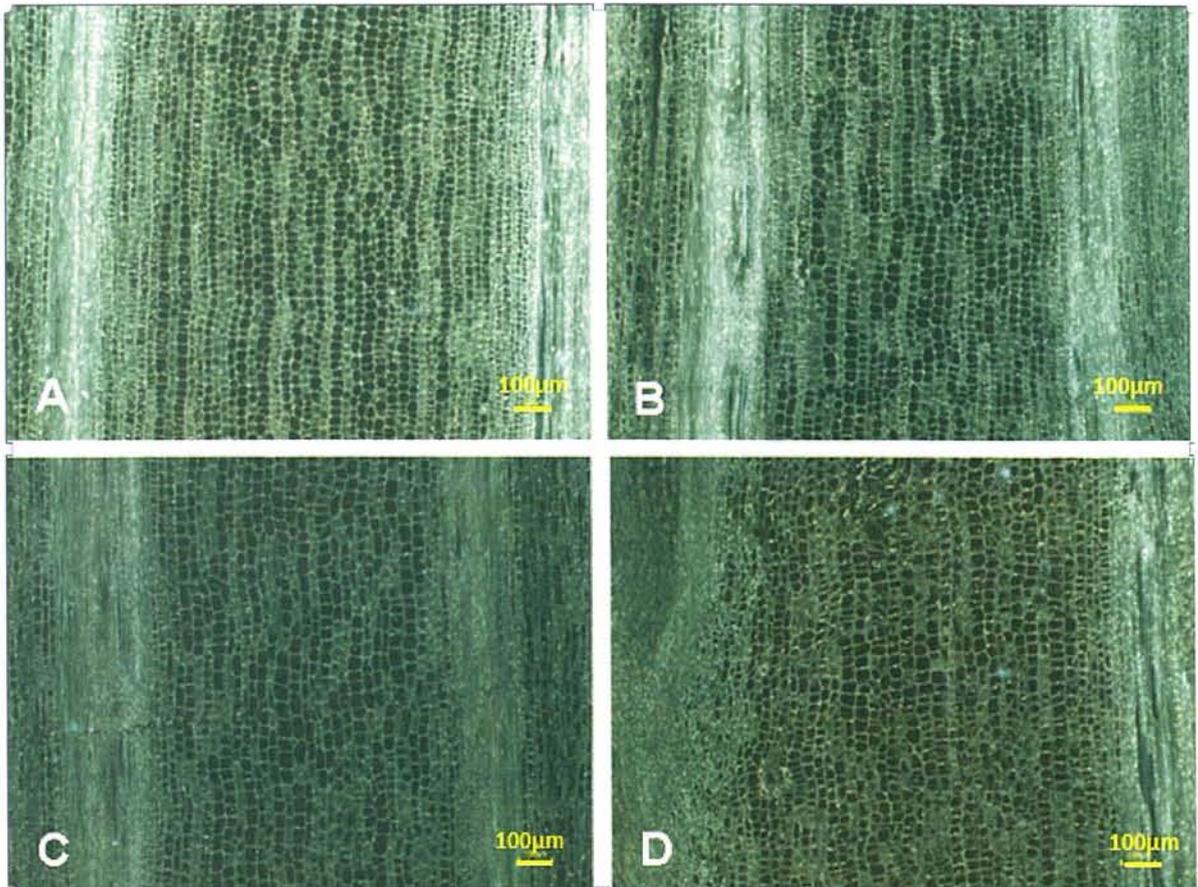
第 3.6.4 図 シュート先端部から 2 cm 下部の木質部細胞の横径

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1: *iaaM-1* 転換体

iaaH-2: *iaaH-2* 転換体

ipt-1: *ipt-1* 転換体



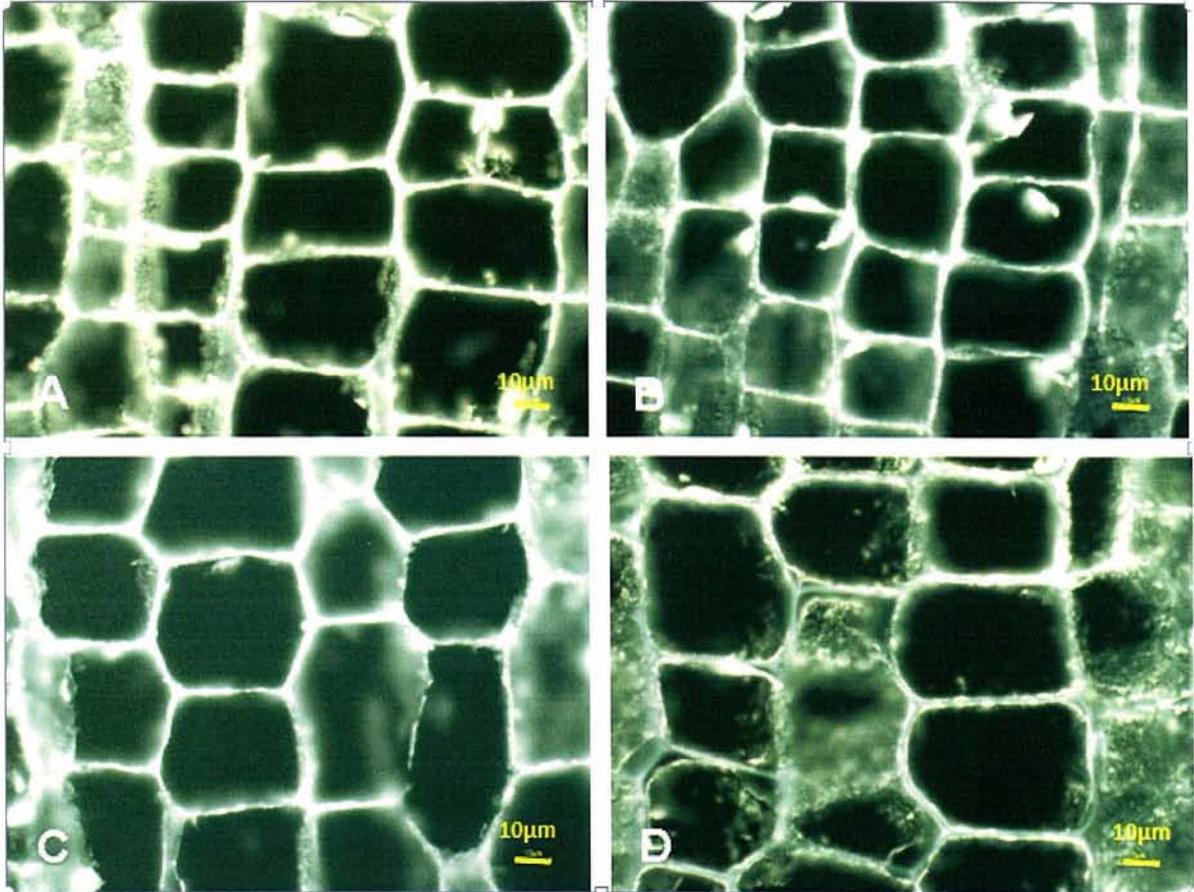
第 3.6.5 図 茎縦断面のパラフィン切片 (4×)

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

C: *iaaH-2* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体



第 3.6.6 図 茎縦断面木質部組織のパラフィン切片(40×)

A: 非形質転換体

B: *iaaM-1* 形質転換体

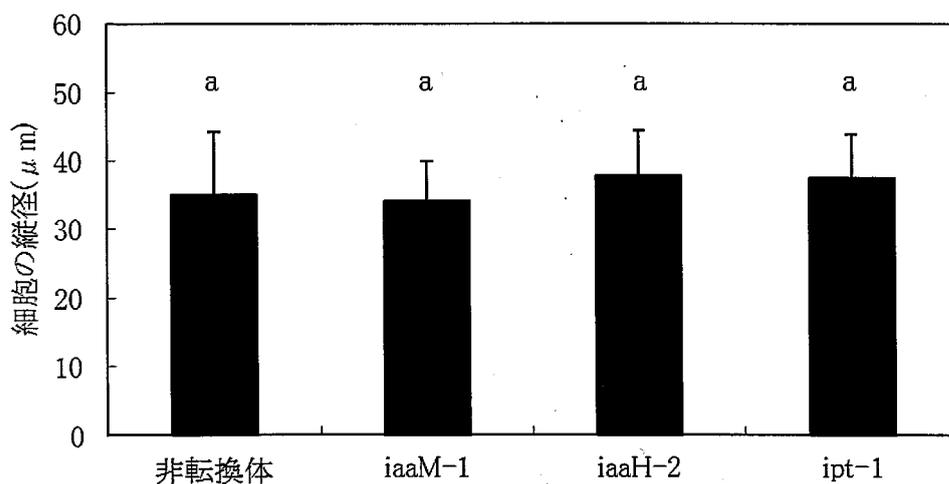
C: *iaaH-2* 形質転換体

D: *ipt-1* 形質転換体

第 3.6.2 表 形質転換体細胞の縦径

個体名	非転換体	iaaM-1	iaaH-2	ipt-1
反復	15	15	15	15
縦径 ( $\mu\text{m}$ )	35.04	34.12	37.78	37.43
標準偏差	9.12	5.72	6.53	6.34
検定 <sup>z</sup>	a	a	a	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 3.6.7 図 シュート先端部から 2 cm 下部の木質部細胞の縦径

非転換体: 非形質転換体

iaaM-1: *iaaM-1* 形質転換体

iaaH-2: *iaaH-2* 形質転換体

ipt-1: *ipt-1* 形質転換

## 考 察

リンゴ樹の生育特性に関するオーキシシンとサイトカイニンの役割を調査するために、pSMAK251 を持つ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 菌系を用いて、*iaaM*、*iaaH* および *ipt* 遺伝子を *in vitro* で培養した葉切片に導入した。再分化シュートへの目的遺伝子の挿入を PCR 法とサザンブロット法で確認した。その結果、*iaaM*、*iaaH*、*ipt* の各感染個体とも 1～数コピーの挿入が確認された。木本植物におけるこれらの植物ホルモン合成酵素遺伝子の導入例はポプラで報告されている(Peña・Séguin, 2001)が、リンゴ樹に導入した報告はなく(Petri・Burgos, 2005)、少なくとも、日本においては最初の研究である。

形質転換シュートを発根培地に移植した結果、いずれの転換体も発根したが、移植後6週間目の根の成長は非形質転換体と比較して、*iaaM* と *iaaH* 形質転換体が優れ、*ipt* 形質転換体は劣った(第 3.1.1 表、第 3.1.1 図)。類似した傾向は、特定網室で栽培中の個体の根の成長でも認められた(第 3.3.10 図)。これらの結果は、オーキシシンとサイトカイニンがリンゴ樹の根の成長に影響することを示している。

馴化 1 年目の生育は、ポット移植時期が 6 月と遅れたため、成長期間が短く、非形質転換体および形質転換体の主幹長はいずれも 50cm 以下であった。その中では、*ipt* 形質転換体の系統 1 と系統 2 は非形質転換体および各 2 系統の *iaaM*、*iaaH* 転換体より有意に長かったが、この理由については不明である。側枝は非形質転換体およびすべての形質転換体とも形成されなかった。

馴化後、2年目の各形質転換体の成長は大きく異なった。すなわち、*iaaM*と*iaaH*形質転換体は非形質転換体より側枝の発生が少ない傾向がみられ、その発生は主幹先端から遠位の下部に限られていた(第3.3.8図、第3.3.9図)。これは、成長点で合成されたオーキシンの量が増加することにより頂芽優性が下部の側芽まで現れたことを示唆している。なお、*iaaM*または*iaaH*を介したオーキシン合成経路はインドールアセトアミド(IAM)を中間物とするため、単独で導入した場合は生合成が完結しない。またこの経路はアグロバクテリウムなど微生物にみられると考えられている。しかし、Pollmannら(2009)はシロイヌナズナでインドールアセトアミド(IAM)に依存するオーキシン生合成経路を報告していることから、リンゴにおいてもこの経路が存在しているかどうか確認する必要である。

対照的に、*ipt*形質転換体は、短い節間、多数の側枝、大きな主幹直径および側枝の発生活角が狭いことを示した。(第3.3.8図、第3.3.9図)。*ipt*形質転換体が生じた樹形は、'McIntosh'の枝変わりとして発見された'Wijcik'やその後代のカラムナータイプ樹の樹形に相似した。Watanabeら(2004, 2006)は、カラムナータイプリンゴ樹の特性と内性オーキシンとサイトカイニンとの関係を調査し、オーキシン/サイトカイニン比率がカラムナータイプリンゴ樹の樹形に関与することを報告している。本研究の結果は、*ipt*形質転換体の生育特性は内生サイトカイニンが過剰に合成されて、オーキシンとの比率を変化させていることを示唆する。

馴化した形質転換体植物の葉から、全RNAを抽出し、ノーザンブロット解析した結果はオーキシン合成酵素遺伝子*iaaM*、*iaaH*導入した形質転換体のすべての供試した個体から当該遺伝子の発現を示

す mRNA のバンドが検出された。この結果から導入遺伝子が機能していることが示された。しかし、サイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* 導入した2系統から遺伝子発現を示す mRNA のバンドが検出されなかった。その原因として RNA のメンブランへの転写の不具合か、RNA の分解とが考えられる。これらの形質転換体の成長特性を解明するため、さらに、時期別、部位別遺伝子発現量と内性オーキシンとサイトカイニン合成量を明らかにする必要がある。

細胞の形は多くの場合は、分裂によって生じた細胞がどの方向にどれだけ伸長するかによって決まる。細胞伸長の方向は細胞壁最内層に付加されるセルロース微繊維の方向により制御されており、細胞壁最内層に付加されるセルロース微繊維の方向は、細胞壁直下、細胞膜の内側に配置された細胞質表層微小管により制御されている。細胞はセルロース微繊維の方向と直角の方向に伸長する。すべての植物ホルモンについて表層微小管の並び方を制御する働きが報告されている (Shibaoka, 1994)。オーキシン、ジベレリン、ブラシノリドは微小管を横方向に、エチレン、サイトカイニン、アブシジン酸は縦方向に整列させる。このことから、植物ホルモンは微小管の配列を制御することにより、細胞壁最内層に付加されるセルロース微繊維の方向を制御し、それによって細胞伸長の方向を制御するという考えが提出されている。

本研究の *ipt* 形質転換体の主幹の直径は非形質転換体、*iaaM* と *iaaH* 形質転換体より有意に大きかった。主幹先端部を顕微鏡で観察した結果、*ipt* 形質転換体の木質部の細胞は非形質転換体および *iaaM* と *iaaH* を導入した個体より大きかった。すなわち、*ipt* 形質転換体は木質部細胞の肥大に関与する可能性が示された。内生サイト

カイニン濃度によって側枝の発生角度が狭くなることについても形態学的に検討する必要がある。

オーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM*、*iaaH* を導入した形質転換体は馴化後2年11か月に開花がみられた。花芽の分化は、主幹および側枝の頂芽、側芽のほか、主幹頂芽の花芽から新生した果台枝の腋芽にもみられた。この現象は通常の花芽分化ではみられない現象である。また、花芽は自根樹を馴化してからの2年目に分化したことになり、これも一般的にはみられない現象である。これらのことは、オーキシン合成酵素遺伝子の導入が花芽分化を促進したことを示唆するものであり、非常に興味深いものである。

## 摘 要

作出した形質転換シュートを発根培地に置床し、発根処理を行った結果、非形質転換体シュートの発根と比較し、*iaaM* と *iaaH* 形質転換体シュートの根は毛根が多く、根長も優っていた。逆に、*ipt* 形質転換体シュートは他区より劣っていた。この結果から、内生オーキシンはリンゴ樹の根の成長に促進的に、内生サイトカイニン は抑制的に作用することが認められた。

発根シュートを馴化し、特定網室で2年間成長特性を調査した。馴化後2年目の地上部の成長は、非形質転換体と比較して *iaaM* と *iaaH* 形質転換体は側枝の発生が少なく、発生位置は主幹先端からはなれた下部に限られていた。この結果は、形質転換体で頂芽優性が非形質転換体よりも強く表れていることを示唆した。対照的に、*ipt* 形質転換体の地上部の形態は、非形質転換体や *iaaM*、*iaaH* 形質転換体よりも、節間が短く、主幹直径が太く、側枝の発生が多く、その発角度は狭く、顕著な差異が認められた。この *ipt* 形質転換体の樹形は、内生サイトカイニンが側枝の発生や成長方向、幹の肥大成長に関与していることを示唆した。なお、根の生育は、目視による観察ではあるが、培養シュートの発根と同様 *iaaM*、*iaaH* 形質転換体樹で優り、*ipt* 形質転換体樹で劣った。

以上の結果から、オーキシンおよびサイトカイニン合成酵素遺伝子を導入した形質転換体は、オーキシンおよびサイトカイニンの過剰発現と考えられる成長特性を示したことが明らかになった。これら形質転換体の導入遺伝子の mRNA の発現を幼葉で確認した結果、*iaaM*、*iaaH* は確認できたが、*ipt* は確認できなかった。

## 第4章 非形質転換体と形質転換体の 接木による成長解析

### 緒言

遺伝的に雑ばくな果樹においては、実生繁殖では品種特性が維持できないため、接木などの栄養繁殖が行われている。接木における台木と穂木は共生関係にあり、台木により穂木の成長、すなわち、栽培品種の大きさをはじめとするさまざまな性質が制御される。

台木が穂木の成長に及ぼす影響については諸説あるが、十分には解明されていない。わい性台木によるわい化機構については、茎頂で合成されたオーキシシンと根で合成されたサイトカイニンとの関係で論じた Lockard ら(1981)の仮説が支持されているが、その確証は得られていない。

本研究において作出した形質転換体自根樹はそれぞれ、内生オーキシシンやサイトカイニンの過剰生産の影響と考えられる表現型を示したことから、これらを用いることにより、わい化機構の解明が可能になることが考えられる。そこで、形質転換体および非形質転換体を穂木あるいは台木にして接木し、その成長特性を解析しようとした。

## 第1節 JM7台木に形質転換体を穂木とした成長解析

### 材料および方法

#### 材料

2009年に、直径 30cm、高さ 24cmのポットに移植した4年生わい性台木JM7を形質転換体専用の特定網室内で、2008年に馴化した *iaaM*、*iaaH* および *ipt* 形質転換体および非形質転換体を接ぎ木した。接ぎ木用の穂木は2009年2月中旬に切り取り、接ぎ木時まで4°Cで保存した。4月10日にJM7台木の地上部15cmの部位に各形質転換体および非形質転換体を接木した。各転換体および非形質転換体とも各3樹作成した。

接ぎ木した植物体は特定網室内で管理した。生育期間に1000倍希釈した液体肥料ハイポネックスを2週間1回施用し、灌水や農薬散布は適宜に行った。

2年目の管理は1年目と同様に、無加温の形質転換体専用の網室内で培養し、生育期間に1000倍希釈した液体肥料ハイポネックスを2週間1回施用し、灌水や農薬散布は適宜に行った。

#### 調査項目

初年目の主幹長は2009年4月29日から10月まで週一回測定した。主幹直径、節間長、葉の形状は成長停止した10月中旬に測定した。主幹直径は接木部から15cm上部の位置を、節間長は接ぎ木部の約20cm上部から先端方向へ20節について測定し、その平均値で示した。葉の形状は葉柄、葉身長、葉幅について測定した。

非形質転換体および各形質転換体とも3反復とした。

2年目の計測は、1年目と同様に行ったが、節間長については2年目に伸長した主幹の伸長部から10cm上部から先端方向の10節を測定し、その平均値で示した。

データの統計処理はExcel統計2008(SSRI Co., Ltd., Japan)を用いて、一元配置分散分析法によりTurkeyの多重検定(HSD)を行った。

## 結 果

主幹伸長の推移の結果は第4.1.1図に示す。*ipt*転換体は初期の成長は非形質転換体および*iaaM*、*iaaH*転換体より遅れたが、7月中旬ごろから旺盛になり、成長停止期には各樹ともほぼ同じ高さになった。

節間長の結果を第4.1.1表、第4.1.2図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*各転換体の節間長はそれぞれ2.7、3.1、2.8、3.0cmで、有意差がみられなかった。

主幹直径の結果を第4.1.2表、第4.1.3図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*各転換体の節間長はそれぞれ9.5、8.7、9.2、9.9mmで、*ipt*でやや太い傾向が見られたが、有意差はなかった。

1年目の葉の形状について第4.1.3表、第4.1.4図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*の葉柄長、葉身長、葉幅とも有意差はみられなかった。

2年目の樹高について第4.1.4表、第4.1.5図に示す。非形質転

換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* および *ipt-1* はそれぞれ 224.0、251.3、243.6、219.3cm で、Turkey の多重検定で *iaaM-2* と *ipt-1* 間に有意差がみられた。

2年目の節間長を第 4.1.5 表、第 4.1.6 図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* および *ipt-1* はそれぞれ 2.5、3.0、2.5、2.3 cm で、Turkey の多重検定で *iaaM-2* と *ipt-1* のみ有意差がみられた。

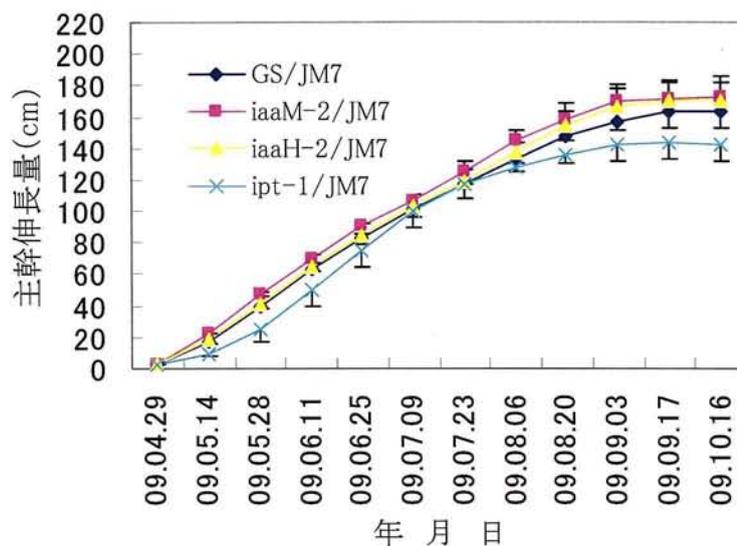
2年目の側枝数を第 4.1.6 表、第 4.1.7 図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* および *ipt-1* はそれぞれ 13.0、11.7、15.0、36.7 本であった。非形質転換体、*iaaM-2* と *iaaH-2* の間には有意な差はみられなかったが、*ipt-1* と非形質転換体および *iaaM-2*、*iaaH-2* の間に有意差が認められた。

2年目の主幹直径について第 4.1.7 表、第 4.1.8 図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* および *ipt-1* はそれぞれ 11.0、11.1、11.0、13.4 mm であった。*ipt-1* は非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* より有意に太かった。

2年目の側枝伸長量を含む総伸長量について第 4.1.8 表、第 4.1.9 図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* および *ipt-1* はそれぞれ 531.7、612.0、538.7、794.7cm であった。*ipt-1* は非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* 転換体の間より有意に伸長量が多かった。2年目4月の生育状態を第 4.1.10 図に示し、2年目落葉後の生育状態は第 4.1.11 図に示す。

2年目の葉の形状については第 4.1.9 表、第 4.1.12 図に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* および *ipt-1* の葉柄長はそれぞれ 4.03、3.99、4.09、3.19cm、葉身長はそれぞれ 10.35、10.16、10.35、8.75cm、葉幅はそれぞれ 6.80、6.34、7.23、5.26cm であった。非形

質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2* の間に、葉柄、葉身長、葉幅のいずれでも有意差はみられなかった。*ipt-1* の葉身長と葉幅は他区より有意に小さいことが認められた。



第 4.1.1 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を穂木とした 1 年目主幹の推移

GS/JM7: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

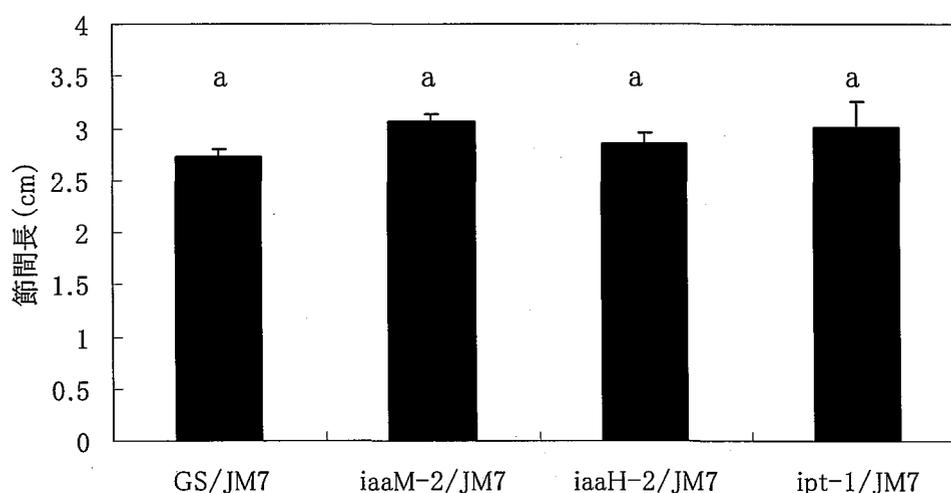
ipt-1/JM7: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)

第 4.1.1 表 ‘JM7’を台木に非転換体、転換体を穂木とした接ぎ木樹  
の 1 年目の節間長

個体名	GS/JM7	iaaM-2/JM7	iaaH-2/JM7	ipt-1/JM7
節間長 (cm)	2.727	3.070	2.850	3.013
標準偏差	0.064	0.061	0.101	0.239
検定 <sup>z</sup>	a	a	a	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で、異符号間に5%水準で有意差あり。



第 4.1.2 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を  
穂木とした 1 年目の節間長

GS/JM7: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

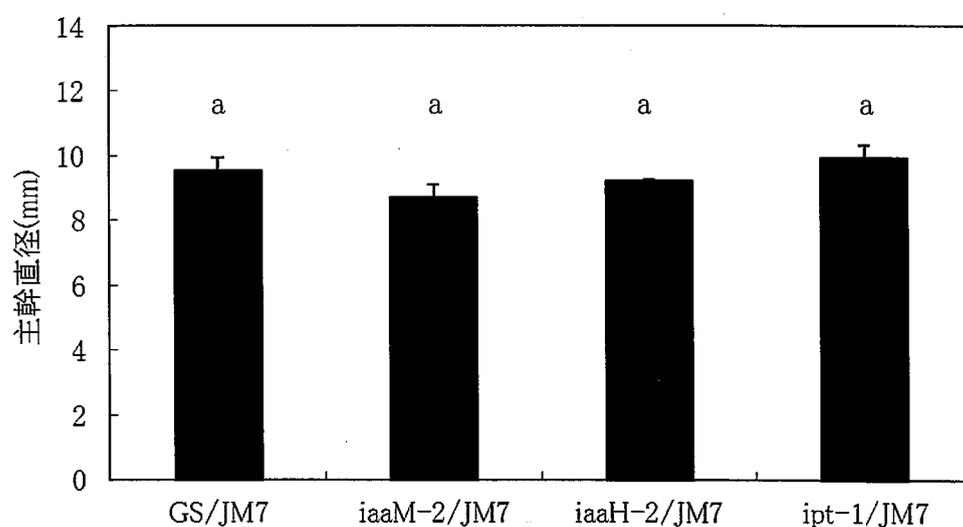
ipt-1/JM7: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)

第 4.1.2 表 ‘JM7’を台木に非転換体、転換体を穂木とした接ぎ木樹  
の 1 年目の直径

個体名	GS/JM7	iaaM-2/JM7	iaaH-2/JM7	ipt-1/JM7
直径 (mm)	9.54	8.71	9.21	9.92
標準偏差	0.39	0.39	0.04	0.41
検定 <sup>z</sup>	a	a	a	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で、異符号間に5%水準で有意差あり。



第 4.1.3 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を  
穂木とした 1 年目の主幹直径

GS/JM7: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

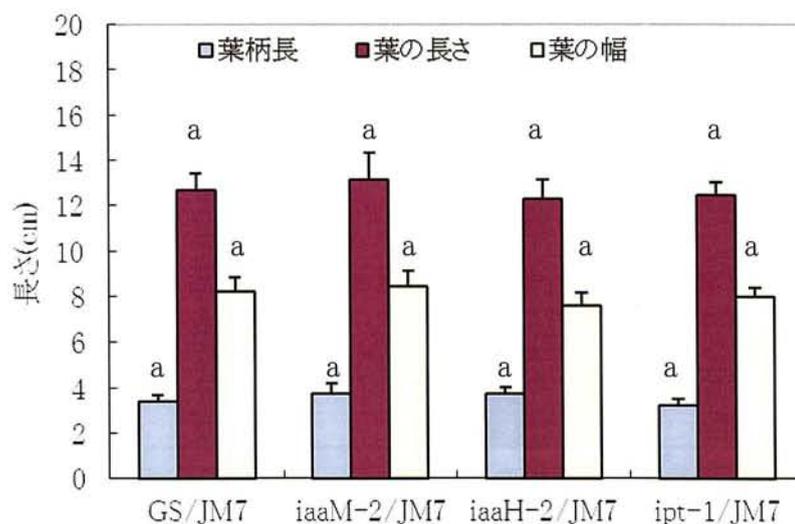
ipt-1/JM7: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)

第 4.1.3 表 ‘JM7’ を台木に非転換体および転換体を穂木とした接ぎ木樹の 1 年目の葉の形状

個体名	葉柄			葉身長			葉幅		
	長 (cm)	標準 偏差	検 定 <sup>z</sup>	長 (cm)	標準 偏差	検 定 <sup>z</sup>	長 (cm)	標準 偏差	検 定 <sup>z</sup>
GS/JM7	3.4	0.3	a	12.66	0.73	a	8.2	0.63	a
iaaM-2/JM7	3.7	0.29	a	12.28	0.84	a	7.58	0.54	a
iaaH-2/JM7	3.72	0.45	a	13.15	1.18	a	8.43	0.69	a
ipt-1/JM7	3.23	0.27	a	12.46	0.55	a	7.99	0.39	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に 5% 水準で有意差あり。



第 4.1.4 図 ‘JM7’ を台木に非形質転換体および形質転換体を穂木とした接ぎ木樹の 1 年目の葉の形状

GS/JM7: ‘JM7’ を台木に非形質転換体 ‘GS’ を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’ を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

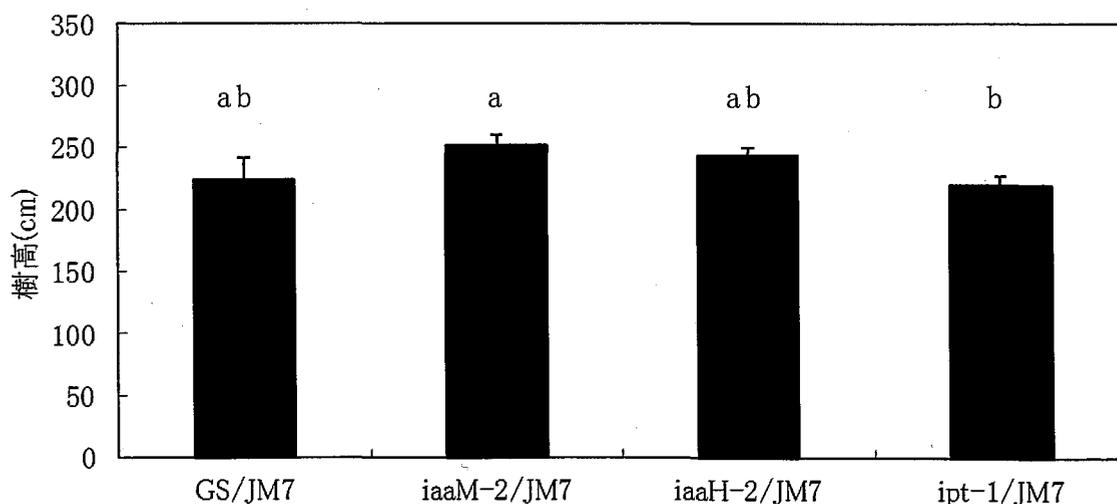
iaaH-2/JM7: ‘JM7’ を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

ipt-1/JM7: ‘JM7’ を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

第 4.1.4 表 ‘JM7’ を台木に非転換体および転換体を穂木とした 2 年目の樹高

個体名	GS/JM7	iaaM-2/JM7	iaaH-2/JM7	ipt-1/JM7
樹高 (cm)	224.00	251.33	243.67	219.33
標準偏差	17.06	8.50	6.03	7.37
検定 <sup>z</sup>	ab	a	ab	b

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に 5% 水準で有意差あり。



第 4.1.5 図 ‘JM7’ を台木に非形質転換体および形質転換体を穂木とした 2 年目の樹高

GS/JM7: ‘JM7’ を台木に非形質転換体 ‘GS’ を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’ を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’ を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

ipt-1/JM7: ‘JM7’ を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

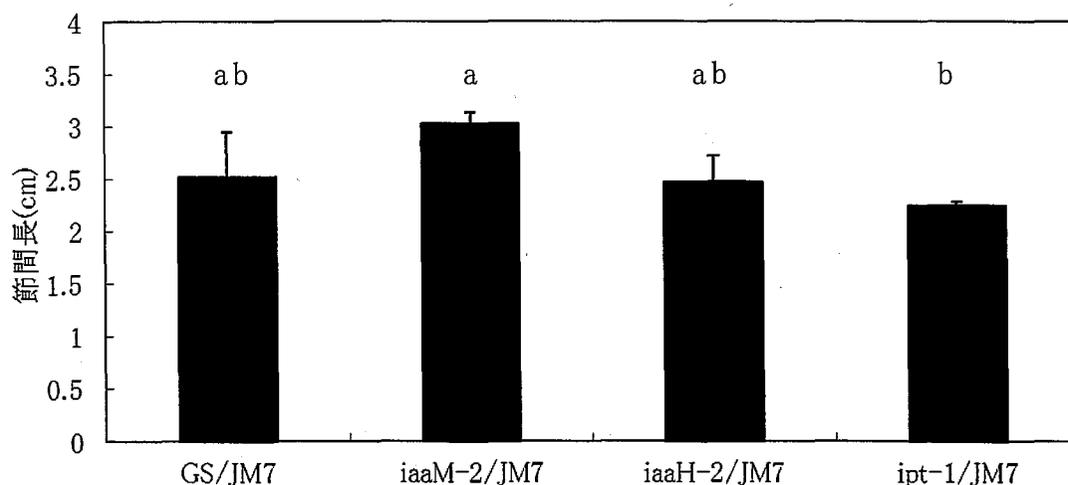
図中の縦棒は標準偏差 (n=3)

第 4.1.5 表 ‘JM7’ を台木に非転換体および転換体を穂木とした

2 年目の節間長

個体名	GS/JM7	iaaM-2/JM7	iaaH-2/JM7	ipt-1/JM7
節間長 (cm)	2.52	3.03	2.47	2.25
標準偏差	0.43	0.11	0.26	0.03
検定 <sup>z</sup>	ab	a	ab	b

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で、異符号間に 5 % 水準で有意差あり。



第 4.1.6 図 ‘JM7’ を台木に非形質転換体および形質転換体を穂

木とした 2 年目の節間長

GS/JM7: ‘JM7’ を台木に非形質転換体 ‘GS’ を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’ を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’ を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

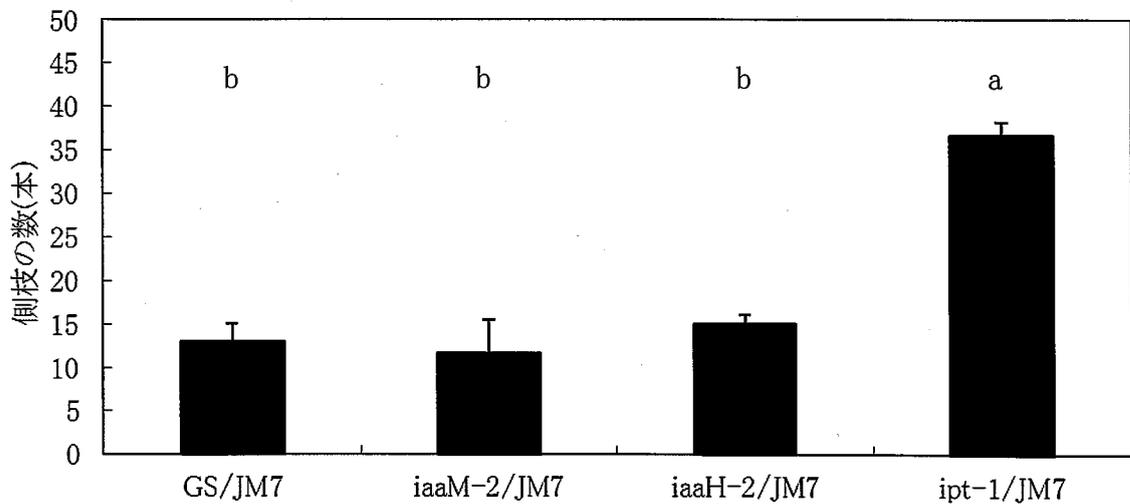
ipt-1/JM7: ‘JM7’ を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)

第 4.1.6 表 ‘JM7’を台木に非転換体および転換体を穂木とした2年目の側枝数

個体名	GS/JM7	iaaM-2/JM7	iaaH-2/JM7	ipt-1/JM7
側枝数(本)	13	11.67	15	36.67
標準偏差	2	3.79	1	1.53
検定 <sup>z</sup>	b	b	b	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 4.1.7 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を穂木とした2年目の側枝数

GS/JM7: ‘JM7’を台木に非形質転換体‘GS’を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

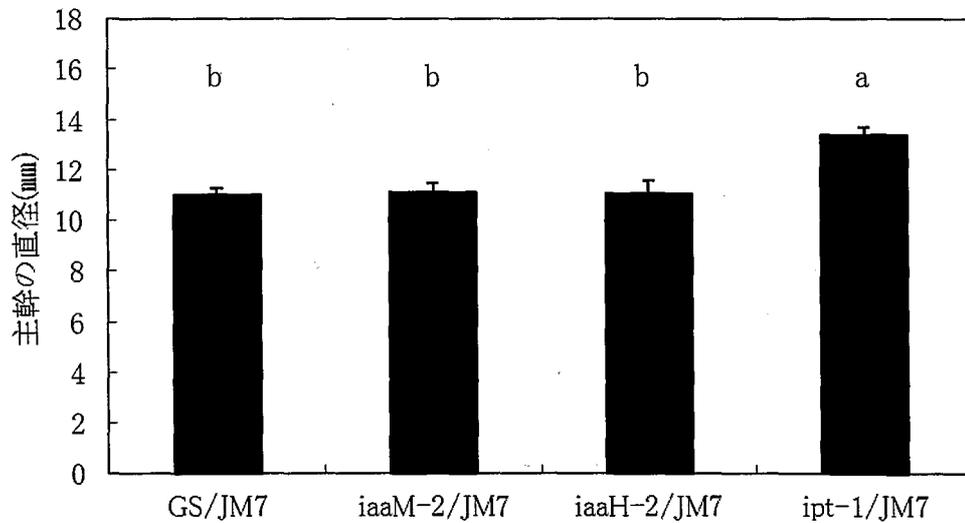
ipt-1/JM7: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)

第 4.1.7 表 ‘JM7’を台木に非転換体および転換体を穂木とした 2 年目の  
主幹直径

個体名	GS/JM7	iaaM-2/JM7	iaaH-2/JM7	ipt-1/JM7
側枝数(本)	11.22	11.56	11.15	12.95
標準偏差	0.21	0.36	0.75	0.48
検定 <sup>z</sup>	b	b	b	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 4.1.8 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を穂  
木とした 2 年目の主幹直径

GS/JM7: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

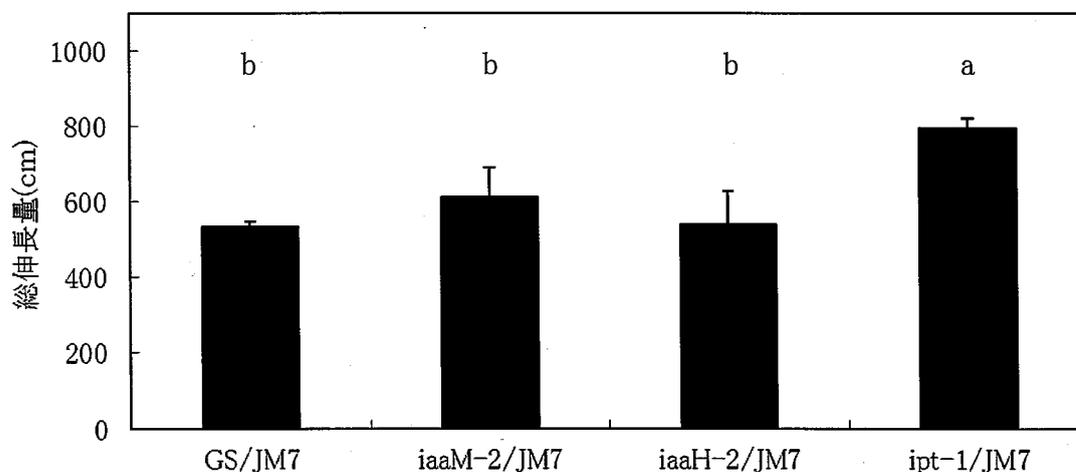
ipt-1/JM7: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差(n=3)

第 4.1.8 表 ‘JM7’を台木に非転換体および転換体を穂木とした 2 年目の  
総伸長量

個体名	GS/JM7	iaaM-2/JM7	iaaH-2/JM7	ipt-1/JM7
総伸長量	531.67	612	538.67	794.67
標準偏差	15.37	76.86	89.67	24.58
検定 <sup>z</sup>	b	b	b	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で, 異符号間に5%水準で有意差あり。



第 4.1.9 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を穂木  
とした 2 年目の総伸長量

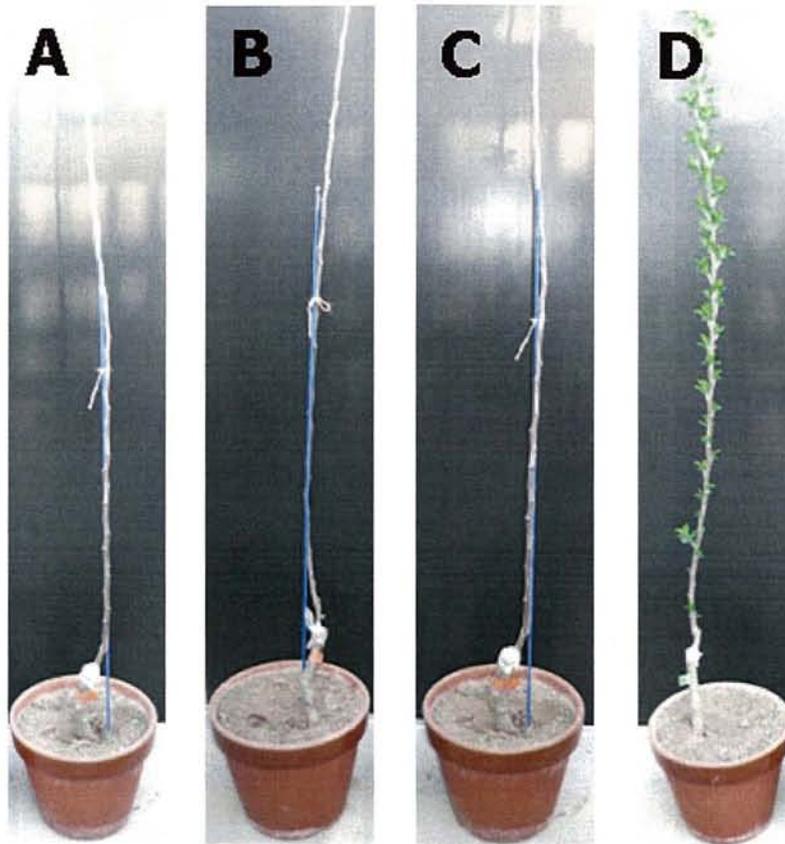
GS/JM7: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

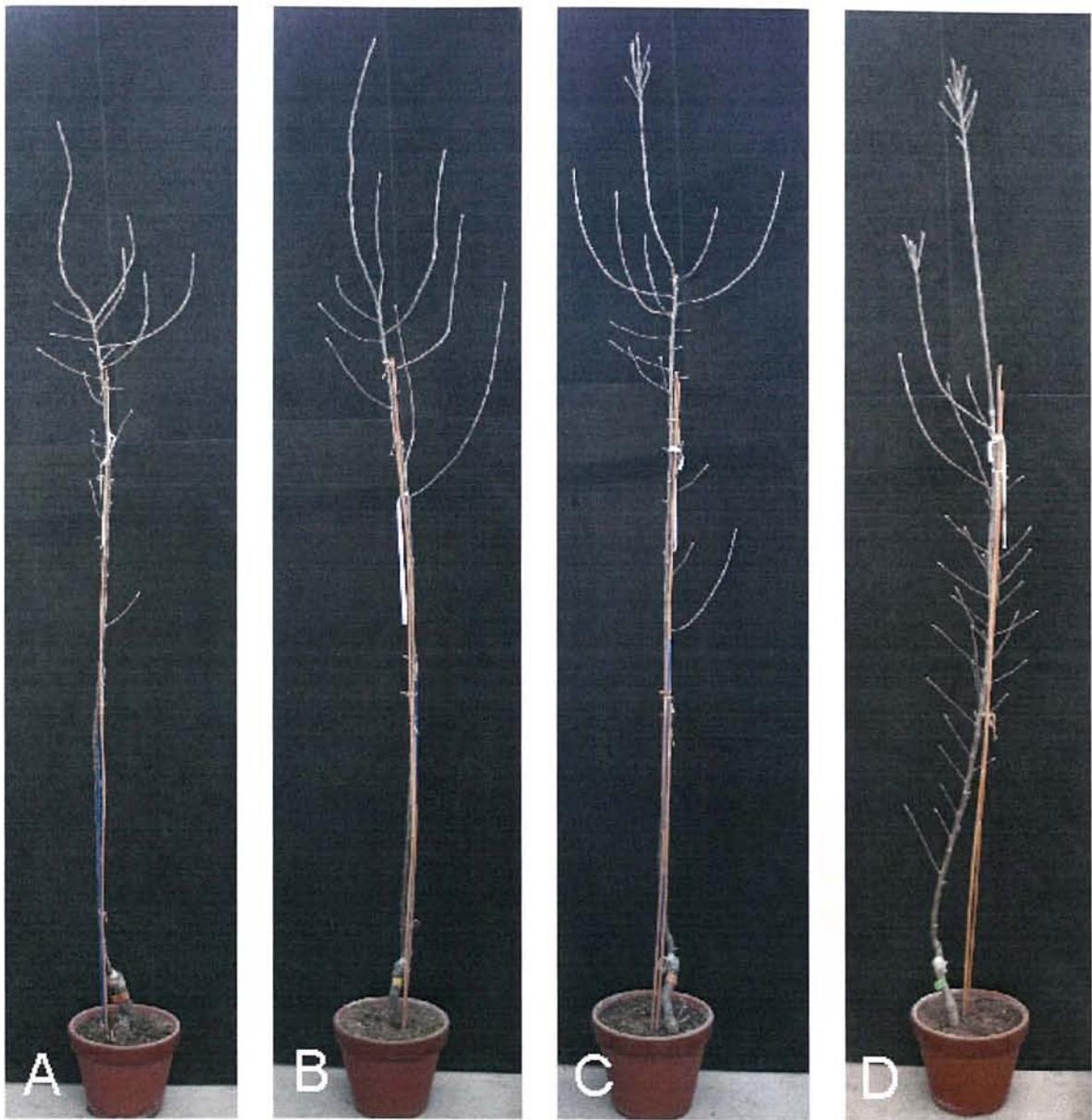
ipt-1/JM7: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)



第 4.1.10 図 ‘JM7’を台に非形質転換体および形質転換体を穂木とした 2 年目 4 月の生育状態

- A: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした
- B: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした
- C: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした
- D: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした



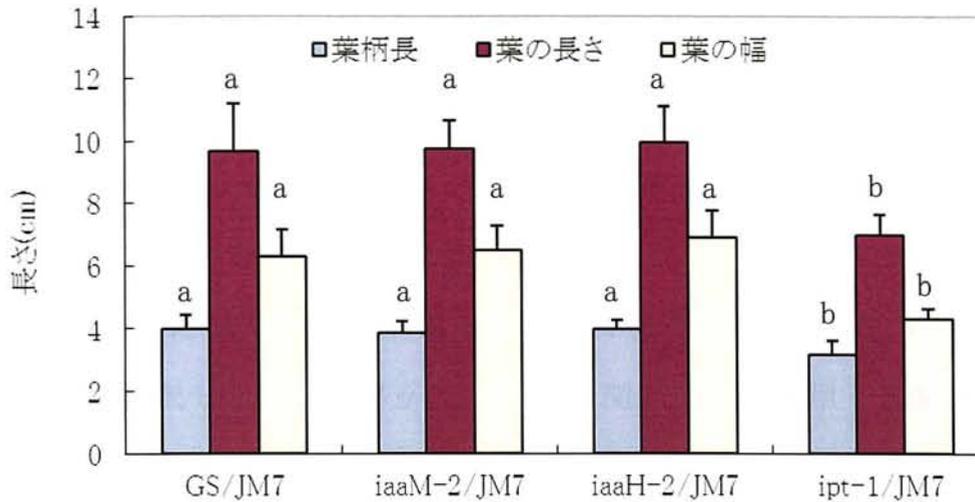
第 4.1.11 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を  
穂木とした 2 年目落葉後の生育状態

- A: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした
- B: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした
- C: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした
- D: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

第 4.1.9 表 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を穂木とした 2 年目の葉の形状

個体名	葉柄			葉身長			葉幅		
	長 (cm)	標準偏差	検定 z	長 (cm)	標準偏差	検定 z	長 (cm)	標準偏差	検定 z
GS/JM7	3.12	0.41	a	11.45	1.11	a	8.09	1.31	a
iaaM-2/JM7	3.37	0.42	a	11.57	1.23	a	7.54	0.94	a
iaaH-2/JM7	3.75	0.33	a	11.36	0.96	a	7.52	0.81	a
ipt-1/JM7	3.18	0.45	b	9.73	1.29	b	6.28	0.86	b

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で、異符号間に 5% 水準で有意差あり。



第 4.1.12 図 ‘JM7’を台木に非形質転換体および形質転換体を穂木とした 2 年目の葉の形状

GS/JM7: ‘JM7’を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした

iaaM-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaM* 転換体系統 2 を穂木とした

iaaH-2/JM7: ‘JM7’を台木に *iaaH* 転換体系統 2 を穂木とした

ipt-1/JM7: ‘JM7’を台木に *ipt* 転換体系統 1 を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=3)

## 第2節 形質転換体を台木に非形質転換体を 穂木とした成長解析

### 材料および方法

2009年に馴化した1年目の非形質転換体、*iaaM*、*iaaH*転換体および*ipt*転換体を直径9cm、高さ8cmのポリポットから直径15cm、高さ12cmのポリポットに移植し、無加温の特定網室で栽培した。穂木用の非形質転換体‘GS’シュートは2010年2月中旬に採穂し、切り取って、接ぎ木まで4℃の冷蔵庫で保存した。

2010年3月26日に台木として用いる非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*各4本(4反復)の地上部15cmの部位に非形質転換体‘GS’を接ぎ木した。

接ぎ木した植物は無加温の特定網室で栽培し、生育期間中は1000倍希釈したハイポネックスを2週間に1回施用し、灌水や農薬散布は適宜に行った。

### 調査項目

主幹長は5月7日から経時時に2週間に1回経時的測定し、節間長、主幹直径、葉の形状は成長が停止した10月中旬に測定した。主幹直径は接木部の15cm上部を、節間長は接ぎ木部の約20cm上部に位置する葉から20節について、それぞれ測定した。葉の形状は葉柄長、葉身長、葉幅について測定した。非形質転換体と形質転換体それぞれ4反復とした。

データの統計処理はExcel統計2008(SSRI Co., Ltd., Japan)を用いて、一元配置分散分析法によりTurkeyの多重検定(HSD)を行った。

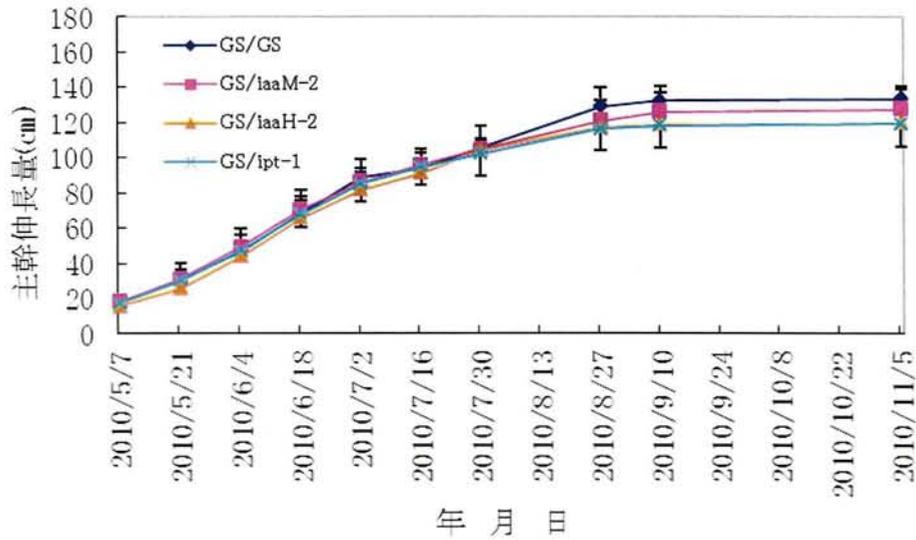
## 結 果

穂木部の主幹伸長の推移を図4.2.1に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*は7月30日までほぼ同様に直線的に成長した。9月10日以降は成長がほぼ停止した。12月5日最終的測定した非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*の主幹の伸長量はそれぞれ133.7, 127.5, 119.6, 119.2cmで、有意差がみられなかった。側枝の発生はどの個体でも見られなかった(図4.2.2)。

節間長についての結果を図4.2.3に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*の節間長はそれぞれ2.84, 2.72, 2.73, 2.76cmで、有意差がみられなかった。

主幹の直径についての結果を図4.2.4に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*の主幹の直径はそれぞれ6.56, 6.71, 6.32, 6.98mmで、*ipt-1*が太い傾向が見られたが、有意差はなかった。

1年目の葉の形状について図4.2.5に示す。非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*および*ipt-1*の葉柄長はそれぞれ3.2、3.5、3.7、3.6cm、葉身長はそれぞれ11.5、11.6、11.6、10.9cm、葉身幅はそれぞれ7.2、7.0、7.0、6.5cmで有意差がみられなかった。



第 4.2.1 図 非形質転換体および形質転換体を台木に非形質転換体 ‘GS’を穂木とした 1 年目主幹伸長の推移

GS/GS: 非形質転換体を台木および穂木とした

GS/iaaM-2: *iaaM-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

GS/iaaH-2: *iaaH-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

GS/ipt-1: *ipt-1* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)



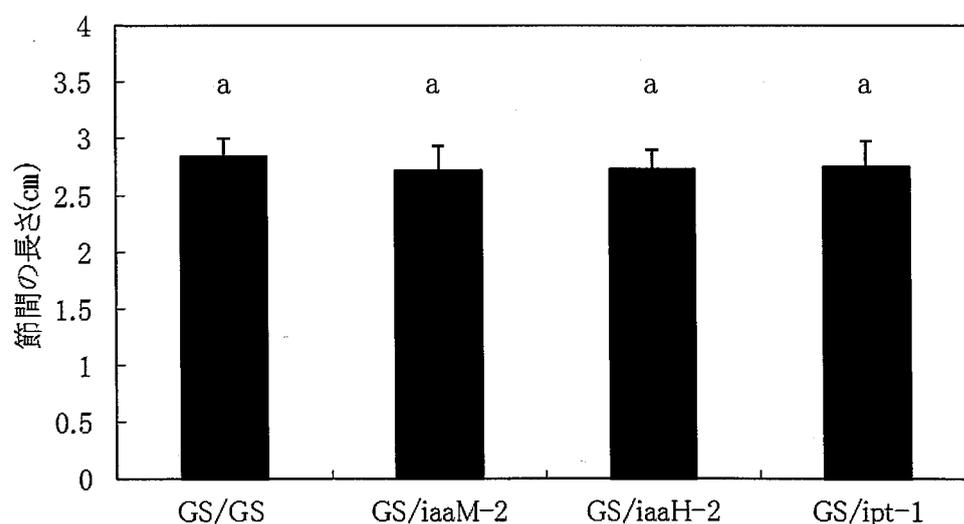
第 4.2.2 図 非形質転換体および形質転換体を台木に非形質  
転換体‘GS’を穂木とした1年目生育比較

- A: 非形質転換体を台木および穂木とした
- B: *iaaM-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした
- C: *iaaH-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした
- D: *ipt-1* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

第 4.2.1 表 非転換体、転換体を台木に非転換体を穂木とした 1 年目の節間長

個体名	GS/GS	GS/iaaM-2	GS/iaaH-2	GS/ipt-1
節間長 (cm)	2.84	2.72	2.73	2.76
標準偏差	0.16	0.21	0.16	0.22
検定 <sup>z</sup>	a	a	a	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で、異符号間に 5 % 水準で有意差あり。



第 4.2.3 図 非形質転換体および形質転換体を台木に非形質転換体 ‘GS’ を穂木とした 1 年目の節間長

GS/GS: 非形質転換体を台木および穂木とした

GS/iaaM-2: *iaaM-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

GS/iaaH-2: *iaaH-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

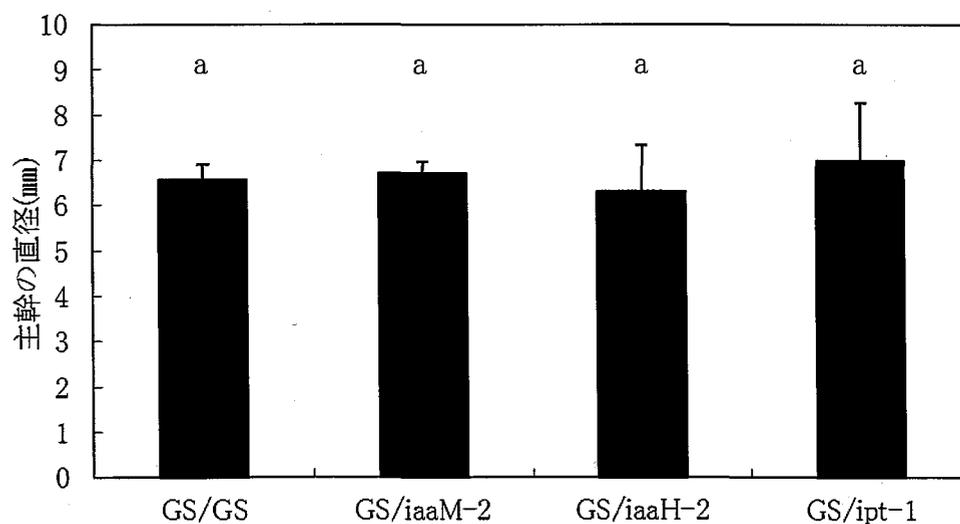
GS/ipt-1: *ipt-1* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 4.2.2 表 非転換体、転換体を台木に非転換体を穂木とした 1 年目の主幹直径

個体名	GS/GS	GS/iaaM-2	GS/iaaH-2	GS/ipt-1
直径 (mm)	6.56	6.71	6.32	6.98
標準偏差	0.34	0.25	1.02	1.28
検定 <sup>2</sup>	a	a	a	a

<sup>2</sup>; Turkey の多重検定で、異符号間に 5% 水準で有意差あり。



第 4.2.4 図 非形質転換体および形質転換体を台木に非形質転換体 'GS' を穂木とした 1 年目の主幹直径

GS/GS: 非形質転換体を台木および穂木とした

GS/iaaM-2: *iaaM-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

GS/iaaH-2: *iaaH-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

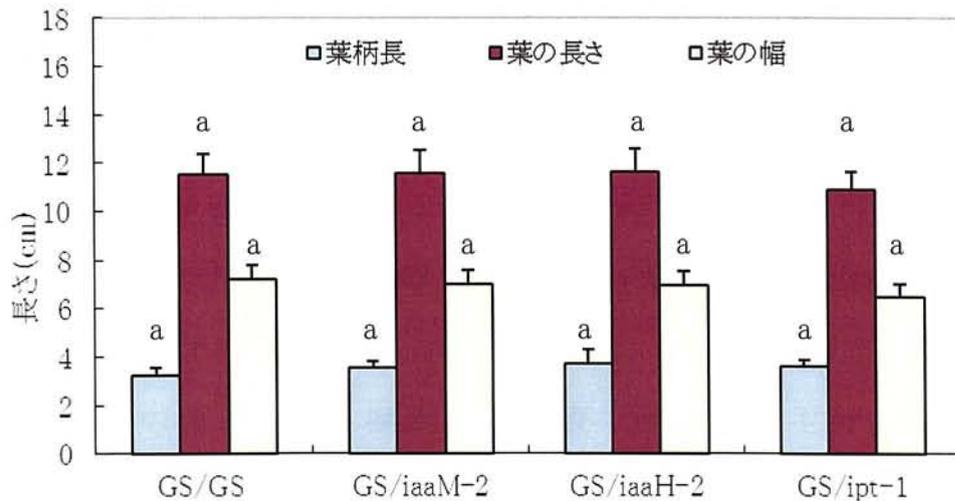
GS/ipt-1: *ipt-1* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

第 4.2.3 表 転換体を台木に非転換体、転換体を穂木とした 1 年目の葉の形状

個体名	葉柄			葉身長			葉幅		
	長 (cm)	標準 偏差	検 定 <sup>z</sup>	長 (cm)	標準 偏差	検 定 <sup>z</sup>	長 (cm)	標準 偏差	検 定 <sup>z</sup>
GS/JM7	3.21	0.32	a	11.53	0.82	a	7.24	0.57	a
iaaM-2/JM7	3.54	0.30	a	11.57	0.97	a	6.99	0.61	a
iaaH-2/JM7	3.73	0.57	a	11.61	0.96	a	6.96	0.59	a
ipt-1/JM7	3.60	0.29	a	10.88	0.75	a	6.45	0.56	a

<sup>z</sup>; Turkey の多重検定で、異符号間に5%水準で有意差あり。



第 4.2.5 図 形質転換体を台木に非形質転換体および形質  
転換体 ‘GS’ を穂木とした 1 年目の葉の形状

GS/GS: 非形質転換体を台木および穂木とした

GS/iaaM-2: *iaaM-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

GS/iaaH-2: *iaaH-2* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

GS/ipt-1: *ipt-1* 転換体を台木に非転換体を穂木とした

図中の縦棒は標準偏差 (n=4)

## 考 察

頂端優勢によって抑制された腋芽成長がサイトカイニンの局所的  
使用によって解放されることが報告されている(Wickson・Thiman,  
1958)。頂端分裂組織を除去すると、頂芽優勢が減少し、腋芽が成  
長するのは、オーキシン輸送量の減少にともなって、腋芽でのサイトカ  
イニン合成が誘導されるためと考えられている。しかし、サイトカイニンが  
芽で合成されるか、根から輸送されるかは不明である (Letham,  
1994; Mok, 1994; Tamas, 1995)。

本研究は‘JM7’を台木として、非形質転換体、*iaaM-2*、*iaaH-2*  
および *ipt-1* を穂木として、接ぎ木した場合、1年目の穂木の成長は、  
主幹伸長量、節間長、主幹直径、葉の形状について非形質転換体  
および各形質転換体の間に違いが見られなかった。同様に、形質転  
換体を台木した場合、1年目の穂木の成長には、これらの項目の間  
に有意な差は見られなかった。しかし、2年目の‘JM7’を台木した場  
合の穂木の成長には、樹高、節間長、側枝数、主幹直径、総伸長  
量、葉の形状については自根個体の場合と同様に *ipt-1* は非形質  
転換体および *iaaM-2*、*iaaH-2* と比較して、側枝数、直径、総伸長  
量の増加と葉の小型化などが認められた。これらの結果は、リンゴの  
地上部においてもサイトカイニンが合成されることを示唆している。

本研究ではサイトカイニンの輸送量を調査していないが、サイトカイ  
ニンが根から輸送された報告はある(Letham, 1994)。多くの木本植  
物において、台木は樹勢の強弱に影響を及ぼす(加藤正、1996; 緒  
方達志、1993; 副島淳一・山口、1997; 村松裕司、1992) ことは周知  
の事実である。形質転換体を台木とした実験は現在1年目であり、2

年目の生育特性のデータは得られていない。自根体および‘JM7’を台木として、形質転換体を接ぎ木した場合、側枝数、主幹径の太さなどの生育特性は2年目から認められたことから、根で合成されたサイトカイニンが穂木の生育に影響するかどうか、さらに調査する必要がある。

## 摘 要

‘JM7’を台木に，非形質転換体および *iaaM-2*、*iaaH-2* および *ipt-1* 形質転換体を穂木にして接ぎ木した結果、接ぎ木 1 年目の穂木の成長は、主幹伸長量、節間長、主幹直径、葉の形状について、非形質転換体および各形質転換体の間に差が見られなかった。しかし、2 年目の成長は、自根個体の場合と同様に *ipt-1* 形質転換体と非形質転換体および *iaaM-2*、*iaaH-2* 形質転換体との間で、側枝の発生，主幹直径、総伸長量などに有意な差異が見られた。一方、形質転換体を台木に非形質転換体を穂木にして接ぎ木をした個体の 1 年目の穂木の成長は、各項目に違いが見られなかった。

## 第5章 総合考察

果樹の形態形成には主に植物ホルモンオーキシシンとサイトカイニンが関与している。すなわち、両ホルモンは、相互に頂芽優勢を調節する(Broome・Zimmerman, 1976; Leyser, 2005; Wangら., 1994)。オーキシシンは腋芽の成長を抑制し、根の形成を促進する(Bangerth, 1989; Greene・Autio, 1994; Faustら, 1997)。逆にサイトカイニンは腋芽の成長を促進し、根の形成を抑制する(Steffens・Stutte, 1989; Faustら, 1997; Lloret・Casero, 2002)。また、カラムナータイプリンゴ樹の生育特性もオーキシシンとサイトカイニンのバランスと関与する(Watanabeら, 2004)。

こうした、これまでの研究手法は、主にホルモン剤の外性処理や内性ホルモン量の動態から解析したものが多い。しかし、外性処理の場合は樹体内に取り込まれて生理作用を及ぼす正確な濃度は不明である。内生量の動態のみではその濃度と発育現象との真の因果関係については明らかにできない。

これらの問題を解決する方法として、オーキシシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンを特異的に産生する形質転換体を作成して、生育特性を解析する方法が有効であると考えられる。すなわち、植物ホルモンの生合成に関わる遺伝子を導入し、特定のホルモンを特異的に生産させ、それにより表現型がどう変化するかを解析することで、内生植物ホルモンと成長特性との関係が解明できる。

果樹で成長に関わる遺伝子の導入として、*rolC* 遺伝子の導入が、報告されているが、植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した形質転換体の報告は見られない。

形質転換技術の一つであるアグロバクテリウム法は比較的簡便で、確実性も高く、特にシロイヌナズナなど一年生の草本植物では形質転換体獲得が容易であることから、最も多く用いられている。しかし、木本植物では形質転換系が確立されている樹種が少ないこと、系が確立されていても形質転換体効率がきわめて低いことなど改善点も多い。効率的に形質転換体を作成するために、本研究ではオーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM* と *iaaH* およびサイトカイニン合成酵素遺伝子 *ipt* を用いて、アグロバクテリウムの共存日数、カナマイシンの添加濃度・時期および感染前培養について検討を行うとともに、これらの遺伝子を導入した形質転換体の作成を試みた。その結果、共存培養日数が 10 日以上になるとシュート分化率が低下するとともに除菌が困難になることが認められた。特に 20 日間共存培養区では菌の増殖が多く、葉切片が褐変し枯死したことから、共存培養日数は 5~10 日程度が適当と推察された。除菌培地の Km 濃度が低いとシュート分化率が高まるものの Km 耐性個体は得られず、反対に Km 濃度が高すぎるとシュート分化そのものができなかった。Km が低濃度の場合に得られたシュートは、非形質転換細胞で形成されたエスケープシュートまたは非遺伝子導入細胞と遺伝子導入細胞のキメラ組織となり、いずれの場合でも Km 濃度を上げて形質転換細胞のみで形成されたシュートを獲得しようとする、シュート全体が枯死して、形質転換体の選抜が困難であることから、シュート分化率は低くても Km 耐性シュートが得られる濃度の 25mg/L 程度が適当と考えられた。Km の添加時期については、遅くなるほどシュート分化率が高くなったが、Km 耐性個体が選抜できなかった。Km 耐性シュートが獲得できたのは、除菌開始後 5 日目添加のみであったことから、Km 添加時期は共存培

養後の早い時期が適当と推測された。感染前培養については、採取した葉切片を当日感染させた区のシュート分化率は感染前培養の区よりも高かったが、形質転換効率は3～7日間の前培養を行うことにより、従来の1%以下から5～7%に上がった。以上の結果から、採取して葉切片を再分化培地で数日間培養した後に、アグロバクテリウムを感染させ、その共存日数は5～10日間程度、Km濃度は25mg/L、Km添加時期は除菌開始後の早い時期が適当と判断した。果樹においてこれら植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した報告は、国内はもとより海外でもなく、初めての成果と考えられる。

得られた形質転換シュートを発根培地に置床し、発根処理を行った結果、非形質転換体シュートの発根と比較し、*iaaM*と*iaaH*形質転換体シュートの根の成長は毛根が多く、根長も優っていた。逆に、*ipt*形質転換体シュートは他より劣っていた。この結果から、内生オーキシンはリンゴ樹の根の成長に促進的に、内生サイトカイニンは抑制的に作用することが認められた。

発根シュートを馴化し、組み換え体専用隔離温室で2年間成長特性を調査した。馴化初年目、ポット移植時期が6月と遅れたので、成長期間が短く、非形質転換体および形質転換体の主幹長はいずれも50cm以下であった。その中では、*ipt*形質転換体の系統1と系統2は非形質転換体および*iaaM*、*iaaH*転換体より有意に長かったが、この理由については不明であった。馴化後2年目の地上部の成長は、非形質転換体と比較して*iaaM*と*iaaH*形質転換体は側枝の発生が少なく、発生位置は主幹先端からはなれた下部に限られていた。この結果は、形質転換体で頂芽優性が非形質転換体よりも強く表れていることを示唆した。対照的に、*ipt*形質転換体は、非形質

転換体や *iaaM*, *iaaH* 形質転換体よりも、節間が短く、主幹直径が太く、側枝の発生が多く、その発角度は狭く、顕著な差異が認められた。この *ipt* 形質転換体の樹形は、内生サイトカイニンが側枝の発生や成長方向、幹の肥大成長に関与していることを示唆した。なお、根の生育は、目視による観察ではあるが、培養シュートの発根と同様 *iaaM*, *iaaH* 形質転換体樹で優り、*ipt* 形質転換体樹で劣った。以上の結果から、オーキシンおよびサイトカイニン合成酵素遺伝子を導入した形質転換体はオーキシンおよびサイトカイニンの過剰発現と考えられる成長特性を示したことから、これら形質転換体の導入遺伝子の mRNA の発現を幼葉で確認した結果、*iaaM*, *iaaH* は確認できたが、*ipt* は確認できなかった。この理由として mRNA がメンブランにうまく転写しなかったか、あるいは、途中で分解したことが考えられる。これらの形質転換体の成長特性と内生植物ホルモンとの関係を解明するため、さらに、時期別、部位別遺伝子発現量と内生ホルモンオーキシンとサイトカイニン合成量を明らかにする必要がある。

なお、馴化後3年目の4月に *iaaM* 導入形質転換体の系統 2 と *iaaH* 導入形質転換体の系統 2 の各4樹中の1樹で開花が見られたことから、オーキシン合成酵素遺伝子の導入が花芽分化を促進したことを示唆するものであり、非常に興味深いものであると思われる。

本研究において作出した形質転換体自根樹はそれぞれ、内生オーキシンやサイトカイニンの過剰生産の影響と考えられる表現型を示したことから、これらを用いることにより、おい化機構が茎頂で合成されたオーキシンと根で合成されたサイトカイニンと関係があるかどうかの解明が可能になることが考えられる。そこで、形質転換体および非形質転換体を穂木あるいは台木にして接木し、その成長特性の解析を行

った。その結果、JM7 を台木に、非形質転換体、*iaaM*、*iaaH* および *ipt* 形質転換体を穂木にして接ぎ木した場合、接ぎ木 1 年目の穂木の成長は、主幹伸長量、節間長、主幹直径、葉の形状について、非形質転換体および各形質転換体の間に違いが見られなかった。しかし、2 年目の成長は、自根体と同様に *ipt* 形質転換体は非形質転換体および *iaaM*、*iaaH* 形質転換体と比べて、側枝の発生、幹直径、総伸長量などに有意な差異が見られた。一方、形質転換体を台木に非形質転換体を穂木にして接ぎ木した樹の 1 年目の穂木の成長は、これらの各項目に違いが見られなかった。形質転換体を台木とした実験は現在 1 年目であり、2 年目の生育特性のデータは得られていない。自根体および‘JM7’を台木として、形質転換体を接ぎ木した場合、側枝数、主幹径の太さなどの生育特性は 2 年目から認められたことから、根から合成されたサイトカイニンが穂木の生育に影響するかどうか、さらに調査する必要がある。

以上の結果、*Agrobacterium* 法による遺伝子導入および再分化条件を検討し、転換効率を従来よりも 10 倍程度高めるとともに、果樹では始めて、植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した形質転換体リンゴ樹を作出することに成功した。さらに、それらの形質転換体を馴化し、成長特性を調査した結果、*iaaM*、*iaaH* 形質転換体は頂芽優勢性を強く表現した生育特性を、*ipt* 形質転換体は、側枝の発生や主茎の肥大、節間長などに特徴ある生育特性を示した。

## 総 摘 要

果樹の成長にはオーキシシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンが関与しているが、その詳細はまだ不明な点も多く残されている。また、果樹における遺伝子組み換えは、リンゴなど一部の樹種で確立されているものの、形質転換効率が低かったり、品種が限定されたり、多くの改良の余地が残されている。そこで、本研究では、リンゴ‘Greensleeves’の培養シュートに *Agrobacterium* 法によりオーキシシン生合成酵素遺伝子 (*iaaM*、*iaaH*) およびサイトカイニン生合成酵素遺伝子 (*ipt*) を導入するため、種々の培養条件の検討を行うとともに、それらの遺伝子を導入した形質転換体の作出を試みた。さらに得られた形質転換体を馴化し、自根樹および接木樹を養成し、その成長特性を解析した。

### 1. 形質転換リンゴ樹の作出技術の改良と作出した形質転換シュートの目的遺伝子導入の確認

リンゴの形質転換体の再分化効率は1%以下と低いことから、アグロバクテリウムと葉切片との共存培養日数、カナマイシン(Km)の添加濃度、添加時期および前培養日数について検討した。その結果、共存培養日数は5日共存区がシュート分化率、カナマイシン(Km)耐性シュート獲得率(形質転換)とも高く、選抜培地における Km の濃度と添加時期は 25mg/L で除菌培養後の早い時期に添加するのが適当と認められた。また、アグロバクテリウムに感染させる前に、葉切片を再分化培地で数日間培養してから感染させる方法を検討した結果、3～7日間の前培養を行うことにより、形質転換効率が従来の1%以下

から 5~7%に上がった。

以上の結果から、採取して葉切片を再分化培地で数日間培養した後、アグロバクテリウムを感染させ、その共存日数は 5~10 日間程度、Km 濃度は 25mg/L、Km 添加時期は除菌開始後の早い時期が適当と判断した。

上記の方法により、*iaaM*、*iaaH* および *ipt* 遺伝子をそれぞれ単独で導入した形質転換体各 8~14 系統を作出した。それらの形質転換体を PCR およびサザンハイブリダイゼーションにより目的遺伝子の導入の有無を検討した結果、いずれの系統も形質転換体であることが確認できた。果樹においてこれら植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した報告は、国内はもとより海外でもなく、初めての成果と考えられる。

## 2. 形質転換体自根樹の成長特性

作出した形質転換シュートを発根培地に置床し、発根処理を行った結果、非形質転換体シュートの発根と比較し、*iaaM* と *iaaH* 形質転換体シュートの根の成長は毛根が多く、根長も優っていた。逆に、*ipt* 形質転換体シュートは他より劣っていた。この結果から、内生オーキシンはリンゴ樹の根の成長に促進的に、内生サイトカイニンは抑制的に作用することが認められた。

発根シュートを馴化し、組み換え体専用隔離温室で 2 年間成長特性を調査した。馴化後 2 年目の地上部の成長は、非形質転換体と比較して *iaaM* と *iaaH* 形質転換体は側枝の発生が少なく、発生位置は主幹先端からはなれた下部に限られていた。この結果は、形質転換体で頂芽優性が非形質転換体よりも強く表れていることを示

唆した。対照的に、*ipt* 形質転換体は、非形質転換体や *iaaM*, *iaaH* 形質転換体よりも、節間が短く、主幹直径が太く、側枝の発生が多く、その発角度度は狭く、顕著な差異が認められた。この *ipt* 形質転換体の樹形は、内生サイトカイニンが側枝の発生や成長方向、幹の肥大成長に関与していることを示唆した。なお、根の生育は、目視による観察ではあるが、培養シュートの発根と同様 *iaaM*, *iaaH* 形質転換体樹で優り、*ipt* 形質転換体樹で劣った。以上の結果から、オーキシンおよびサイトカイニン合成酵素遺伝子を導入した形質転換体はオーキシンおよびサイトカイニンの過剰発現と考えられる成長特性を示したことから、これら形質転換体の導入遺伝子の mRNA の発現を幼葉で確認した結果、*iaaM*, *iaaH* は確認できたが、*ipt* は確認できなかった。

### 3. 接木による成長解析

JM7 を台木に、非形質転換体、*iaaM*、*iaaH* および *ipt* 形質転換体を穂木にして接ぎ木した結果、接ぎ木 1 年目の穂木の成長は、主幹伸長量、節間長、主幹直径、葉の形状について、非形質転換体および各形質転換体の間に違いが見られなかった。しかし、2 年目の成長は、自根体と同様に *ipt* 形質転換体は非形質転換体および *iaaM*、*iaaH* 形質転換体と比べて、側枝の発生、幹直径、総伸長量などに有意な差異が見られた。一方、形質転換体を台木に非形質転換体を穂木にして接ぎ木した樹の 1 年目の穂木の成長は、これらの各項目に違いが見られなかった。

以上の結果、*Agrobacterium* 法による遺伝子導入および再分化条件を検討し、転換効率を従来よりも 10 倍程度高めるとともに、果

樹では始めて、植物ホルモン合成酵素遺伝子を導入した形質転換体リンゴ樹を作出することに成功した。さらに、それらの形質転換体を馴化し、成長特性を調査した結果、*iaaM*, *iaaH* 形質転換体は頂芽優勢性を強く表現した生育特性を、*ipt* 形質転換体は、側枝の発生や主茎の肥大、節間長などに特徴ある生育特性を示した。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を頂いた岩手大学農学部農学生命課程果樹園芸学研究室教授壽松木章博士に心から感謝するとともに、御礼申し上げます。同研究室准教授の小森貞男博士には、組織培養及び遺伝子組換え実験のご指導をいただき、深謝申し上げます。論文の審査に当たり、有益なご助言を戴いた弘前大学農学生命科学部准教授伊藤大雄博士および山形大学農学部教授平智博士に厚く御礼申し上げます。

ご協力いただいた独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所リンゴ研究拠点リンゴ研究チーム和田雅人博士に厚く御礼申し上げます。本実験をご指導、ご支援下さった耳田直純博士に御礼申し上げます。

本研究に台木を提供して頂いた岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター渡邊学博士に御礼申し上げます。

また、日頃から実験など様々な形でご協力いただいた果樹園芸学研究室の方々にも深く感謝いたします。

## 引用文献

- Aloni, R., E. Aloni, M. Langhans and C. I. Ullrich. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals Botany* 97:883-893.
- Bangerth, F. 1989. Dominance among fruit/sinks and the search for a correlative signal. *Physiol. Plant* 76:608-614.
- 伴野 潔・上原秀之・熊代克己. 1993. *Agrobacterium rhizogenes* によるリンゴの形質転換と植物体再生. *園学雑*. 62(別 2): 174.
- Bolar, J. P., S. K. Brown, J. L. Norelli and H. S. Aldwinckle. 1999. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55:31-38.
- Broome O. C. and Zimmerman R. H. 1976. Breaking bud dormancy in tea crabapple [*Malus hupehensis*. (Pamp.) Rehd.] with cytokinins. *J Am Soc Hortic Sci.* 101:28-30.
- De Bondt, A., K. Eggermont, T. Pennincx, I. Goderis and W. F. Broekaert. 1996. *Agrobacterium* mediated transformation of apple (*Malus × domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 15:549-554.
- Faust, M, A. Erez, L. J. Rowland, S. Y. Wang and H. A. Norman. 1997. Bud dormancy in perennial fruit trees : physiological basis for dormancy induction , maintenance, and release. *HortScience* 32:623-629.
- Greene, D. W. and W. R. Autio. 1994. Notching techniques increase branching of young apple trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:678-682.
- Hartmann, H.T and Kester, D.E., 1990. Propagazione delle piante. Edizioni Agricole, Bologna. Hartmann and Kester, 1990, p. 369.

- 星 伸枝・仲谷房治・峰 正樹・西原昌宏・山村三郎. 1998. キチナーゼ遺伝子導入リンゴの斑点落葉病に対する抵抗性の検定. 育学雑. 48(別 2): 245.
- Igarashi, M., H. Ogasawara, Y. Hatsuyama, A. Saito and M. Suzuki. 2002. Introduction of rolC into Marubakaidou [*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami Mo 84-A] apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 163:463-473.
- 石谷栄子・佐藤智子・小森貞男・滋田徳美・壽松木章. 2005. 糖類および培地組成がリンゴのシュート再分化に及ぼす影響. 園学雑, 74 別 2, 309.
- 伊藤祐二・小森貞男・大村三男・金山喜則・山木昭平・副島淳一. 1997. ソルトール合成酵素遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. 育学雑. 47(別 1): 157.
- James, D. J. , A. J. Passey, D. J. Barbara and M. Bevan. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* 7:658-661.
- Kakimoto, T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42:677-685.
- Kaneyoshi, J. and S. Kobayashi. 1999. Characteristics of transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.) possessing the rolC gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri Plasmid. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68:734-738.
- 加藤秀憲・斎藤美智子・大橋祐子・阿部和幸・古藤田信博・岩波 宏・副 島淳一. 2000. ザルコトキシシン遺伝子を導入した形質転換リンゴの作出. 園学雑. 69(別 1): 178.
- 加藤正. 1996. 青森県におけるリンゴ育種の現状と将来. 果樹種苗. 62:6-9.
- 金丸直明・伊藤祐二・小森貞男・斎藤美智子・高橋佐栄・副島淳一・白武勝裕・山木昭平. 2002. ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素のリンゴ形質転換体の作出とその発現解析. 園学雑. 71(別 2): 513.
- 小森貞男・伊藤祐二・西澤洋子・副島淳一. 1997. キチナーゼ遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. 育学雑. 47(別 1): 158.

- 小森貞男・渡邊麻紗乃・渡邊学・田中紀充・壽松木章・和田雅人・副島淳一・松本省吾・安達義輝・李積軍.2009.リンゴの形質転換における *Agrobacterium* 除菌用抗生物質の検討.園学研. 8(4) : 419-426.
- Koshita, Y., Y. Nakamura, S. Kobayashi and K. Morinaga. 2002. Introduction of the *rolC* gene into the genome of the Japanese persimmon causes dwarfism. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 71:529-531.
- Kotoda, N., H. Iwanami, S. Takahashi and K. Abe. 2006. Antisense expression of *MdTFL*, a *TFL1*-like gene, reduces the juvenile phase in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131: 74-81.
- Kotoda, N., M.Wada, S. Komori, S. Kidou, K. Abe, T. Masuda and J. Soejima. 2000. Expression pattern of homologues of floral meristem identity genes *LFY* and *AP1* during flower development in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 398-403.
- Lane W.D., Looney N.E. and Mage P. 1982. A selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. *Theor. Appl. Genet.* 61:219-223.
- Letham D. S. 1994. Cytokinins as phytohormones: sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In: Mok DWS, Mok MC, editors. *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 57-80.
- Leyser, O. 1999. Plant hormone: Ins and outs of auxin transport. *Current Biology* 9:R8-R10.
- Leyser, O. 2005. The fall and rise of apical dominance. *Current Opinion in Genetics & Development* 15:468-471.
- Lloret PG and Casero PJ. 2002. Lateral root initiation. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, eds. *Plant roots – the hidden half*. New York: Marcel Dekker, 127-155.
- Lockard, R.G and Schneider, G.W. 1981. Stock and scion growth relationships and the dwarfing mechanism in apple. *Hort. Rev.* 3, pp. 315-375.

- Maximova, S. N., A. M. Dandekar and M. J. Gultinan. 1998. Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Mol. Bio.* 37 : 549-559.
- Mimida, N., S. Kidou and N. Kotoda. 2007. Constitutive expression of two apple (*Malus × domestica* Borkh.) homolog genes of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 affects flowering time and whole-plant growth in transgenic *Arabidopsis*. *Mol. Genet. Genomics* 278: 295-305.
- Mok, M.C. 1994. Cytokinins and plant development: An overview. In *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, D.W.S Mok and M.C. Mok, eds (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 155-156.
- Morris, R. O. 1986. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:509-38.
- 村松裕司. 1992. オウトウの台木と矮化栽培. *農及園.* 67 (7) : 801-806.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A reserved medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.
- Ogasawara, H., S. Ueda, T. Harada, R. Ishikawa, M. Niizeki and K. Saito. 1994. Introduction of a herbicide resistant gene into an apple root-stock with *Agrobacterium tumefaciens*. *Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ.* 57: 1-8.
- 緒方達志. 1993. 台木による樹勢調節. *今月農業.* 37 (5) : 86-89.
- 小川洋一・三位正洋 2002. メロペネムおよびモキサラクタムはアグロバクテリウム法によるタバコの形質転換効率を向上させる. *育研 4 別 2* : 204.
- Ogawa, Y. and M. Mii. 2005. Evaluation of 12  $\beta$ -lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. *Plant Cell Rep.* 23: 736-743.

- Ogawa, Y. and Mii, M. 2007. Meropenem and moxalactam: Novel  $\beta$ -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Sci.* 172: 564-572.
- Pawlicki, N. and M. Welander. 1994. Adventitious shoot regeneration from leaf segments of in vitro cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. *J. Hort. Sci.* 69: 687-696.
- Petri, C. and L. Burgos. 2005. Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research* 14:15-26.
- Peña, J. and A. Sèguin. 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. *TRENDS in Biotechnology* 19:500-506.
- Pollman, S., P. Düching and E. W. Weiler. 2009. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by ' IAA-synthase ' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* 70:523-531.
- Pua, E. C. and C.Chong. 1984. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for in vitro propagation of *Malus robusta* NO.5. *Can. J.Bot.* 62 : 1545-1549.
- Puiet, K. J. and J. G. Schaart. 1996. Genetic modification of commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elster via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. *Plant Sci.* 119: 125-133.
- Quinlan, J. D and K.R.Tobutt. . 1990. Manipulating fruit tree structure chemically and genetically for improved performance. *Hort Science.* 25:60-64.
- Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G. and Estelle, M. 1997. Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* 9:745-757.
- 齋藤 彰・五十嵐 恵・初山慶道・小笠原博幸・鈴木正彦. 2001. rol C 遺伝子導入を導入したリンゴ台木(マルバカイドウ)の特性. *園学雑.* 70(別2): 124.
- Sedira, M., A. Holefors and M. Walender. 2001. Protocol for transformation of the apple

rootstock Jork 9 with the rolB gene and its influence on rooting. *Plant Cell Rep.* 20: 517-524.

滋田徳美・石谷栄子・小森貞男・辻村匡・壽松木章. 2004. *Agrobacterium* 感染時にリンゴの再分化に影響を与える諸条件の検討. *園学雑.* 73(別 2): 280.

Shibaoka, H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: Alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 527-544.

副島淳一・山口正己. 1997. 果樹のわい性台木及び品種の特異形質を利用した低樹高省力栽培技術. *研究ジャーナル*, 20(8):11-17.

Sriskandarajah, S.; Goodwin, P. B and Speirs, P. 1994. Genetic transformation of the apple scion cultivar Delicious via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Cell Tiss. Org. Cult.* 36:317-329.

Steffens, G. L. and G. W. Stutte. 1989. Thidiazuron substitution for chilling requirement in three apple cultivars. *J. Plant Growth Regul.* 8:301-307.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Tamas IA 1995. Hormonal regulation of apical dominance. In PJ. Davies, ed, *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The. Netherlands, pp . 572-597.

Tobutt, K.R. 1984. Breeding columnar apples at East Malling. *Acta Hort.* 159:63-68.

Tobutt, K.R. Breeding columnar self-rooting apples 1985. *North Amer. Fruit Explorers.* 17(2):149-152.

Tobutt, K.R. 1994. Combining apetalous parthenocarpy with columnar growth habit in apple. *Euphytica.* 77:51-54.

Torrey, J.G. 1976. Root hormones and plant growth, *Ann. Rev. Plant Physiol.*

27:435-459.

Trifona, A., Savova, D and Jvanova, K. 1994. Agrobacterium-mediated transformation the apple cultivar Granny Smith. u: Schmidt H., Keller M. (ur.) Progress in Temperate Fruit Breeding, Dordrecht, itd: Kluwer Academic Publisher, str. 343-347

Wada, M., A. Ureshino, N. Tanaka, S. Komori, S. Takahashi, K. Kudo and H. Bessho. 2009. Anatomical analysis by two approaches ensure the promoter activities of apple AFL genes. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 32-39.

Wang, S. Y., M. Faust and M. J. Line. 1994. Apical Dominance in Apple (*Malus domestica* Borkh): The Possible Role of Indole-3-Acetic Acid (IAA). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119:1215-1221.

Watanabe, M., A. Suzuki, S. Komori and H. Bessho. 2004. Comparison of endogenous IAA and cytokinins in shoots of Columnar and normal type apple trees. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73:19-24.

Watanabe, M., A. Suzuki, S. Komori and H. Bessho. 2006. Effects of heading-back pruning on shoot growth and IAA and cytokinin concentrations at bud burst of columnar-type apple trees. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75:224-230.

Wickson, M. and Thimann, K.V. 1958 . The antagonism of auxin and kinetin in apical dominace. *Physiol. Plant.* 11 : 62-74.

Yao, J-L., D. Cohen, R. Atkinson, K. Richardson and B. Morris. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Rep.* 14: 407-412.

山下裕之・増田哲男・羽生田忠敬. 1996. *Agrobacteriumrhizogenes* によるリンゴ台木からの毛状根形成とその再分化個体の特性. *園学雑.* 65 (別 1) : 80.

付表 1

*iaaM* 遺伝子前半の塩基配列

1	AACTTGATTGAGCGGCGAGGTGGACCCGCATGAACATCATATTAAGAAAGCCCAAATTG	60
61	TCGCTTTCCATTGGCATGTCAACGAACAGTATGTTCCCGATTCTCAACTTAAATAGAAA	120
121	CGGTTGATGTGGTTATTTATCTACACAAAAACGAATCTTTTCTAACAATGTCAGCTTCAC	180
	<i>iaaM</i> FFX	
181	<u>CTCTCCT</u> TGATAACCAGTGGCATCATCTCCAACCAAAAATGGTGGATCTGACAATGGTCG	240
241	ATAAGGCGGATGAATTGGACCGCAGGGTTCCGATGCCTTCTTAGAACGAGA <u>AAGCTT</u> CTA	300
	<i>Hind</i> III (AAGCTT)	
301	GGGGAAGGAGGATTACTCAAATCTCCACCGAGTGCAGCGCTGGGTTAGCTTGCAAAAAGGC	360
361	TGGCCGATGGTCGCTTCCCGAGATCTCAGCTGGTGGAAAGGTAGCAGTTCTCTCCGCTT	420
421	ATATCTATATTGGCAAAGAAATTCTGGGGCGGATACTTGAATCGAAACCTTGGGCGCGGG	480
481	CAACAGTGAGTGGTCTCGTTGCCATCGACTTGGCACCATTTTGCATGGATTTCTCCGAAG	540
541	CACAATAATCCAAGCCCTGTTTTTGGCTGAGCGGTAAAAGATGTGCACCGATTGATCTTA	600
601	GTCATTTCCGTGGCCATTTCAATCTCTAAGACTGCCGGCTTTCGAACCCTGCCAATGCCGC	660
661	TGTACGAGAATGGCAGCATGAAATGCGTTACCGGGTTTTACCATAACCCTTGAAGGGGCCG	720
721	TGCCATTTGACATGGTAGCTTATGGTCGAAACCTGATGCTGAAGGGTTCGGCAGGTTCCCT	780
781	TTCCAACAATCGACTTGCTCTACGACTACAGACCGTTTTTTGACCAATGTTCCGATAGTG	840
841	GACGGATCGGCTTCTTTCCGGAGGATGTTCCCTAAGCCGAAAGTGGCGGTCATTGGCGCTG	900
901	GCATTTCCGACTCGTGGTGGCAAACGAACCTGCTTCATGCTGGGGTAGACGATGTTACAA	960
961	TATATGAAGCAAGTGATCGTGTGGAGGCA <u>AAGCTT</u> TGGTACATGCTTTCAGGGACGCTC	1020
	<i>Hind</i> III (AAGCTT)	
1021	CTAGTGTCTGGCCGAAATGGGGCGATGCGATTTCCCTCCTGCTGCATTCTGCTTGT	1080
1081	TCTTCCTCGAGCGTTACGCCCTGTCTTCGATGAGGCCGTTCCCAAATCCCGGCACAGTCG	1140
1141	ACACTTACTTGGTCTACCAAGGCGTCCAATACATGTGGAAAGCCGGGCAGCTGCCACCGA	1200
1201	AGCTGTTCCATCGCGTTTACAACGGTTGGCGTGCCTTCTTGAAGGACGGTTTTTCATGAGC	1260
1261	GAGATATTGTGTTGGCTTCGC (TGTCGCTATTACTCAGGCCTTGAATCAGGAGACATTA	1320
1321	GGTGGGCTCATGACTCCTGGCAAATTTGGCTGAACCGTTTCGGGAGGGAGTCCTTCTCTT	1380
1381	CAGGGATAGAGAGGATCTTTCTGGGCACACATCCTCCTGGTGGTGAACATGGAGTTTTT	1440
1441	CTCATGATTGGGACCTATTCAAGCTAATGGGAATAGGATCTGGCGGGTTTGGTCCAGTTT	1500
1501	TTGAAAGCGGGTTTATTGAGATCCTCCGCTTGGTCATCAACGGATATGAAGAAAATCAGC	1560
1561	GGATGTGCCCTGAAGGAATCTCAGAACTTCCACGTCGGATCGCATCTGAAGTGGTTAACG	1620
1621	GTGTGTCTGTGAGCCAGCGCATATGCCATGTTCAAGTCAGGGCGATTGAGAAGGAAAAGA	1680

1681 CAAAAATAAAGATAAAGGCTTAAGAGCGGGATATCTGAACTTTATGATAAAGGTGGTGGTCA 1740  
 1741 CATCTGGACTCGCAAATATCCAACCTCAGGCATTGCCTGACATGCGATACCAATATTTTTC 1800  
 1801 AGGCACCAGTGAACCAAGCGGTTGATAACAGCCATATGACAGGATCGTCAAAACTCTTCC 1860  
 1861 TGATGACTGAACGAAAATTCTGGTTAGACCATATCCTC (CGTCTTGTGTCCTCATGGACG 1920  
 1921 GGATCGCAAAAGCAGTGTATTGCCTGGACTATGAGTCGCAGGATCCTCTACGCCGGACGC 1980

iaaM RS

1981 ATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATC 2040  
 2041 ACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGT 2100  
 2101 ATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTTC 2160  
 2161 CTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAG 2220  
 2221 TCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTC 2280  
 2281 CGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAA 2340  
 2341 CTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGG 2400  
 2401 AGCGCGACGATGATCGGCCTGTGCTTGGCGTATTCGGAATCTTGACGCGCCCTCGCTCAA 2460  
 2461 GCCTTCGTCACTGGTCCC GCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGC 2520  
 2521 ATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGGACGCGAGGCTGGATGGCC 2580  
 2581 TTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATG 2640  
 2641 CTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTT 2700  
 2701 ACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCTCGGGC 2760  
 2761 AGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCC 2820  
 2821 GCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACC 2880  
 2881 TCGCTAACGGATTCAACCACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGGCGAGAACTGTGA 2940

付表 2

*iaaM* 遺伝子後半の塩基配列

1	CTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGA	60
61	GGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTGGTCA	120
	<i>Hind</i> III (AAGCTT)	
121	CATGCTTTCAGGGACGCTCCTAGTGTCGTGGCCGAAATGGGGGCGATGCGATTTCCCTCCT	180
181	GCTGCATTCTGCTTGTTTTTCTTCCTCGAGCGTTACGGCCTGTCTTCGATGAGGCCGTTT	240
241	CCAAATCCCGGCACAGTCGACACTTACTTGGTCTACCAAGGCGTCCAATACATGTGGAAA	300
301	GCCGGGCAGCTGCCACCGAAGCTGTTCCATCGCGTTTACAACGGTTGGCGTGCCTTCTTG	360
361	AAGGACGGTTTTTCATGAGCGAGATATTGTGTTGGCTTCGCCTGTCGCTATTACTCAGGCC	420
421	TTGAAATCAGGAGACATTAGGTGGGCTCATGACTCCTGGCAAATTTGGCTGAACCGTTTC	480
481	GGGAGGGAGTCCTTCTCTTCAGGGATAGAGAGGATCTTCTGGGCACACATCCTCCTGGT	540
541	GGTGAACATGGAGTTTTTCTCATGATTGGGACCTATTCAAGCTAATGGGAATAGGATCT	600
601	GGCGGGTTTGGTCCAGTTTTTCAAAGCGGGTTTATTGAGATCCTCCGCTTGGTCATCAAC	660
661	GGATATGAAGAAAATCAGCGGATGTGCCCTGAAGGAATCTCAGA ACTTCCACGTCGGATC	720
721	GCATCTGAAGTGGTTAACGGTGTGTCTGTGAGCCAGCGCATATGCCATGTTCAAGTCAGG	780
781	GCGATTCAGAAGGAAAAGACAAAAATAAAGATAAGGCTTAAGAGCGGGATATCTGAACTT	840
841	TATGATAAGGTGGTGGTCACATCTGGACTCGCAAATATCCA ACTCAGGCATTGCCTGACA	900
901	TGCGATACCAATATTTTTTCAAGGCACCAAGTGAACCAAGCGGTTGATAACAGCCATATGACA	960
961	GGATCGTCAAAACTCTTCTGATGACTGAACGAAAATTCTGGTTAGACCATATCCTCCCG	1020
1021	TCTTGTGTCTCATGGACGGGATCGCAAAAGCAGTGTATTGCCTGGACTATGAGTCGCAG	1080
	<i>iaaM</i> RB	
1081	GATCCGAATGGTAAAGGTCTAGTGCTCATCAGTTATACATGGGAGGA (GACTCCCACAAG	1140
1141	CTGTTGGCGGTCCCCGACAAAAAAGAGCGATTATGTCTGCTGCGGGACGCAATTTGAGA	1200
1201	TCTTTCCCGGCGTTTGGCCAGCACCTATTTCTGCCTGCGCTGATTACGACCAAAATGTT	1260
1261	ATTCAACATGATTGGCTTACAGACGAGAATGCCGGGGGAGCTTTCAA ACTCAACCGGCGT	1320
1321	GGTGAGGATTTTTATTCTGAAGAACTTTTCTTCAAGCACTGGACACGGCTAATGATACC	1380
1381	GGAGTTTACTTGGCGGGTTGCAGTTGTTCCCTTACAGGTGGATGGGTGGAGGGTGCTATT	1440
1441	CAGACCGCGTGTAACGCCGTCTGTGCAATTATCCACAATTGTGGAGGCATTTTGGCAAAG	1500
1501	GGCAATCCTCTCGAACACTCTTGAAGAGATATAACTACCGCACTAGAAAATTAGTCTATG	1560
	<i>iaaM</i> RS	
1561	GATCCTGTTACAAGTATTGCAAGTTTTATAAATTGCATATTAATGCAATCTTGATTTTTA	1620
2221	TTTGTATTCAATATACTGCAAAAAACTTATGGACCTGCATCTAATTTTCGGTCCA ACTTG	2280

2281 CACAGGAAAGACGACGACCGGATAGCTCTTGCCCAGCAGACAGGGCTTCCAGTCCTTTC 2340  
2341 GCTTGATCGGGTCCAATGCTGTCCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGACCAACAGTGGA 2400  
2401 AGAACTGAAAGGAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCTGGTGGAGGGTATCAT 2460  
2461 CGCAGCCAAGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGTGTATAATCATGAGGCCAACGG 2520  
2521 CGGGCTTATTCTTGAGGGAGGATCCACCTCGTTGCTCAACTGCATGGCGCGAAACAGCTA 2580  
2581 TTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTATTGCGCCACAAGTTACCCGACCAAGAGACCTT 2640  
2641 CATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAGTTAAGCAGATGTTGCACCCCGCTGCAGGCCATTCTAT 2700  
2701 TATTCAAGAGTTGGTTTATCTTTGGAATGAACCTCGGCTGAGGCCATTCTGAAAGAGAT 2760  
2761 CGATGGATATCGATATGCCATGTTGTTTGGCTAGCCAGAACCAGATCACGGCAGATATGCT 2820  
2821 ATTGCAGCTTGACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCTCAGGAGTATTT 2880  
2881 CATCCATGCGCGCCAACAGGAACAGAAATTCCCCCAAGTTAACGCAGCCGCTTTTCGACGG 2940  
2941 ATTCGAAGGTCATCCGTTTCGGAATGTATTAGGTTACGCCAGCCCTGCGTCGCACCTGTCT 3000  
3001 TCATCTGGATAAGATGTTTCGTAATTGTTTTTGGCTTTGTCCTGTTGTGGCAGGGCGGCAA 3060  
3061 ATACTTCCGACAATCCATCGTGTCTTCAAACCTTTATGCTGGTGAACAAGTCTTAGTTTCC 3120  
3121 ACGAAAGTATTATGTTAAATTTTAAATTTTCGATGTATAATGTGGCTATAATTGTAAAAA 3180  
3181 TAAACTATCGTAAGTGTGCGTGTTATGTATAATTTGTCTAAATGTTTAATATATATCATA 3240  
3241 GAACGCAATAAATATTAATATAGCGCTTTTATGAAATATAAATACATCATTACAAGTTG 3300  
3301 TTTATATTTGGGTACCTTTTCCATTATTTTGCGCAACAAGTCACGGATATTCGTGAAAA 3360  
3361 CGACAAAAACTGCGAAATTTGCGGGCAGTGCCTTCAGTTTTCTTATTAATATTTAGTTT 3420  
3421 GACACCAGTTGCTATCATTGCGGCCAAGCTCAGCTGTTTTCTTTCTTGAACGATGGATC 3480  
3481 GAATGAGCATGGCTCGGCAAGGTTGGCTTGTACCATGTCTTTCTCATGGCAAAGATGATC 3540  
3541 AACTGCAGGGTGAACCTCTCGGAGCTTTCAAAGTTTATCGGGAAAAGTTTCAAACCGATC 3600  
3601 TACACACTAAGTCTGGCGACATCATCAATCCTGGCGGGGAATTTCTGTACATTTATCTCG 3660  
3661 ATAAAGAGAATTATCGGTTATGTCGGCAAAGAATGGTTCTAGTTTTCAAATGCTTCAGATG 3720  
3721 GATTGCTTGCCACGACACTGGAACCCTATTCTGATGGTTATACATTCCGGCAGGTGAGGG 3780

付表 3

遺伝子 *iaaH* の塩基配列

1	TTGGTCTGAATGGGTTTAAAATTTCCA <u>ACTCAGAGAGATGGTGGCCA</u> TTACCTCGTTAG	60
	<i>iaaH</i> FX	
61	CCCAAAGCCTAGAACACCTGAAACGGAAAGACTACTCCTGCTTAGAACTAGTAGAAACTC	120
121	TGATAGCGCGTTGTGAAGCTGCAAAATCATTAAACGCCCTTCTGGCTACAGACTGGGATG	180
181	GTTTGTTCGAAGCGCCAAAAAATTGATCGCCATGGAAACGCCGGAGTAGGTCTTTGCG	240
241	GCATTCCACTCTGTTTTAAGGCGAACATCGCTACCGGCGTATTTCCACAAGCGCCGCTA	300
301	CGCCGGCGCTGATAAACCACTTGCCAAAGATACCATCCCGCGTCGCAGAAAGACTTTTTT	360
361	CAGCTGGAGCACTGCCGGGTGCCTCGGGAAATATGCATGAGTTATCGTTTGAATTACAA	420
421	GCAACAACATATGCCACCGGGGCGGTGCGAAACCCGTGGAATCCAGATCTGATACCAGGGG	480
481	GCTCAAGCGGTGGTGTGGCTGCTGCGGTAGCAAGCCGATTGATGTTAGGCGGCATAGGCA	540
541	CCGATACCGGTGCATCTGTTTCGCTACCCGCAGCCCTGTGTGGCGTAGTAGGATTTGCAC	600
601	CGACGCTTGGTAGATATCCGGGAGATCGGATAATACCGGTTAGCCCTACCCGGGACACTC	669
661	CCGGAATCATAGCGCAGTGCCTAGCCGATGTTGTAATCCTCGACCGGATAATTTCCGGCA	720
721	CACCGGAGAGAATACCACCCGTGCCGCTGAAGGGGCTAAGGATCGGCCTCCCTACAACCT	780
781	ACTTTTATGATGACCTTGATGCTGATGTGGCCCTAGCAGCTGAAACAACGATTTCGCCTGC	840
841	TAGCAAACAAAGGCGTAACCTTTTGTGAAGCTAACATTCCCCACCTTGACGAACTGAATA	900
901	AAGGGGCCAGCTTCCCAGTTGCACTCTATGAATTTCCACACGCTCTAAAACAGTATCTCG	960
961	ACGACTTTGTAAAACTGTTTCTTTTTCTGACGTCATCAAAGGAATTCGTAGCCCTGATG	1020
	<i>EcoRI</i> (GAATTC)	
1021	TAGCCAACATTGCCAATGCGCAAATTGATGGACATCAAATTTCCAAAGCTGAATATGAAC	1080
1081	TGGCCCGCCACTCCTTCAGACCAAGACTTCAAGCCACCTATCGCAACTACTTCAAACCTGA	1140
1141	ATAGATTAGATGCTATTCTCTTCCCAACAGCACCCCTTGGTGGCCAGACCCATAGGTCAGG	1200
1201	ATTCCTCAGTTATCCACAATGGCACGATGCTGGACACATTCAAGATCTACGTGCGAAATG	1260
1261	TGGACCCAAGCAGCAACGCAGGCCTACCTGGCTTGAGCATTCTGTTTGCCTGACACCTG	1320
1321	ATCGCTTGCCTGTTGGAATGGAGATCGATGGATTAGCGGATTAGACCAACGTCTGTTAG	1380
1381	CAATCGGGGGGCATTGGAAGAAGCCATTGGATTCCGATATTTTGCCGGTTTACCCAATT	1440
	<i>iaaH</i> RS	
1441	<u>AAACTTTCTACCATGTTTCGTTTTTACAATTTTTTCAGATTGATGACAATCAATCCTTGTAT</u>	1500

付表 4

遺伝子 *ipt* の塩基配列

2041	ACTTCAATAATGAATTTCAAGGAGACAATATAACCGCCTCTGATAACACAATTCTCTAAT	2100
2101	ATAAAAATCAGTTTGTATTCAATATACT <u>GCAAAAACTTATGGACCTGCATCTAATTTTC</u>	2160
ipt FX		
2161	GGTCCAACCTTGCACAGGAAAGACGACGACCGCGATAGCTCTTGCCCAGCAGACAGGGCTT	2220
2221	CCAGTCCTTTTCGCTTGATCGGGTCCAATGCTGTCCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGA	2280
2281	CCAACAGTGGAAGAACTGAAAGGAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCTGGTG	2340
2341	GAGGGTATCATCGCAGCCAAGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGTGTATAATCAT	2400
2401	GAGGCCAACGGCGGGCTTATTCTTGAGGGAGGATCCACCTCGTTGCTCAACTGCATGGCG	2460
2461	CGAAACAGCTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTATTCGCCACAAGTTACCCGAC	2520
2521	CAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAGTTAAGCAGATGTTGCACCCCGCTGCA	2580
2581	GGCCATTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTATCTTTGGAATGAACCTCGGCTGAGGCCATT	2640
2641	CTGAAAGAGATCGATGGATATCGATATGCCATGTTGTTTGCTAGCCAGAACCAGATCAGC	2700
2701	GCAGATATGCTATTGCAGCTTGACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCT	2760
2761	CAGGAGTATTTTCATCCATGCGCGCCAACAGGAACAGAAATCCCCCAAGTTAACGCAGCC	2820
2821	GCTTTCGACGGATTTCGAAGGTCATCCGTT <u>CGGAATGTATTAGGTTACGCCAGCCCTGCGT</u>	2880
ipt RS		
2881	CGCACCTGTCTTCATCTGGATAAGATGTTTCGTAATTGTTTTTGGCTTTGTCCTGTTGTGG	2949
2941	CAGGGCGGCAAATACTTCCGACAATCCATCGTGTCTTCAAACCTTTATGCTGGTGAACAAG	3000
3001	TCTTAGTTTCCACGAAAAGTATTATGTTAAATTTTAAATTTTCGATGTATAATGTGGCTAT	3060
3061	AATTGTAAAAATAAACTATCGTAAGTGTGCGTGTTATGTATAATTTGTCTAAATGTTTAA	3120
3121	TATATATCATAGAACGCAATAAATATTAATATAGCGCTTTTATGAAATATAAATACATC	3180
3181	ATTACAAGTTGTTTATATTTTCGGGTACCTTTTCCATTATTTTGCGCAA (AAGTCACGGAT	3240
3241	ATTCGTGAAAACGACAAAAACTGCGAAATTTGCGGGCAGTGCCTTCAGTTTTCTTTATTA	3300
3301	ATATTTAGTTTGACACCAGTTGCTATCATTGCGGCCAAGCTCAGCTGTTTCTTTCTTGA	3360
3361	AACGATGGATCGAATGAGCATGGCTCGGCAAGGTTGGCTTGTACCATGTCTTTCTCATGG	3420
3421	CAAAGATGATCAACTGCAGGGTGAACCTCTCGGAGCTTTCAAAGTTTATCGGGAAAAGTT	3480