

CyMV 外被蛋白質遺伝子を導入した *Dendrobium phalaenopsis* の馴化・育成

¹藪野 裕之、¹新美 善行、²関塚 史朗

¹〒727-0023 広島県庄原市七塚町 562 県立広島大学大学院総合学術研究科

²〒901-0336 沖縄県糸満市真壁 820 沖縄県農業研究センター

Acclimatizing and Raising of *Dendrobium phalaenopsis* by *Agrobacterium* mediated
CyMV-Coat Protein Gene Transformation.

¹Yabuno, H., ¹Y. Niimi and ²S. Sekiduka

¹Graduate School of Comprehensive Scientific Research, Prefectural University of Hiroshima,
Nanatuka, Shobara, Hiroshima 727-0023, Japan

²Okinawa Agricultural Research Center, Makabe, Itoman, Okinawa 901-0336, Japan

Summary

Cymbidium mosaic virus (CyMV) of orchid is a very highly contagious and serious virus. CyMV infection induced the discoloration spots to the petal and the leaf of orchid, and reduced the orchid marketability. An effective method of preventing this virus is not found. In this study, we described concerning the acclimatizing and the raising of *Dendrobium phalaenopsis* by *Agrobacterium* mediated CyMV Coat Protein transformation.

It was very difficult to obtain the transgenic orchid plant due to the lack of the apical dominance. The orchid that was broken down the apical dominance was difficult to initiate the roots. Then, we used plant hormones and natural substances and also induced the roots and the apical dominance by devising the medium. The banana medium was the most effective to induce the apical dominance and root initiation. We could take plantlet out from the flask and also take possible in the transgenic *Dendrobium phalaenopsis* nursery.

緒言

Dendrobium phalaenopsis の原種はニューギニア、および周辺の諸島からオーストラリア北部までの熱帯域で生育し、最も高温を好むランの一つである。デンドロビウムのなかのファレナンセ節およびセラトビウム節に属する種を元に交配育種された一群の通称名である(上里2001)。

メリクロンの成功によりランが大量に栽培されるようになると、ウイルス病の蔓延がラン栽培者にとって深刻な問題となった。1943年にオーストラリアで報告されて以来、多くのランでウイルスの存在が分かっており、現在では45種類のウイルス病があるとされている(井上2001)。日本においても、井上(1964)によりシンピジウムモザイクウイルス(CyMV)とオドントグロッサムリングスポットウイルス(ORSV)が報告された。中でもCyMVは世界で最も多く発生しており、宿主範囲も広い。ポテックスウイルス属に属する。長さ約475nm、幅約13nmのひも状粒子のこのウイルスは葉汁液中に1~2ヶ月保持され、100万倍薄めても感染性があり、病原性を失う温度は65~70と安定したウイルスである

と言われている(Jensen 1951; Gara *et al.* 1996; 井上 1968; 近藤ら 1996)。感染により花卉や葉に退色斑が現れ商品としての価値を失うが、ウイルス病の感染は移植、株分け時における接触伝染であるため、農薬散布によって防除することができない。そのため、感染株の焼却、隔離栽培などの対策が行われている。しかし、感染を防ぐ効果的な方法は現在見つからない。本研究室では、防除の効果的な1つの方法としてCyMVの外被蛋白質遺伝子を植物体に導入することによってCyMV抵抗性を付与させることを提案している。外被蛋白質遺伝子を導入することによりウイルス耐性を付与する方法はPowell-Abel *et al.*(1986)によるタバコモザイクウイルス(TMV)に耐性のある遺伝子組換え体が生産されて以来、パパイヤのリングスポットウイルス(PRSV)耐性など、他の植物でもウイルス耐性遺伝子組換え体が生産されるようになった(Fitch *et al.*, 1992)。

松井(2004)は *Agrobacterium* EHA101 を用い CyMV 外被蛋白質を *Dendrobium phalaenopsis* に導入した。導入した *Dendrobium phalaenopsis* は花色が紫色のジェ

シカと白色の丸吉白で、プロトコーム様体 (PLB) に導入した。遺伝子導入の確認は PCR 法や ELISA 法で確認した。成体を得るため、馴化を本実験の課題としたが、遺伝子導入が要因と考えられる成長阻害が見られた。根の発根阻害と多芽体を形成し続けるという点で、この打開に植物ホルモンや培地を検討した。

材料および方法

【材料と継代培地条件】

Agrobacterium 法によって、CyMV 外被蛋白質 遺伝子を導入したラン科 *Dendrobium phalaenopsis* の PLB を用いた。この PLB は 3 カ月毎の継代によって維持した。培地は 1/2 Murashige & Skoog 培地に 3%(w/v) スクロース、15%(w/v) Coconut Water、ゲランガム 0.3% を添加し pH5.8 に調整後 121℃、20 分間、高圧蒸気滅菌で処理したものを使用した。また、形質転換体の選抜には抗生物質 Hygromycin 50mg/l を使用した。

【方法】

(1) NAA が頂芽の生長・発根促進に与える影響

PLB を 25℃ の培養室で 1 ヶ月もしくは 2 ヶ月培養後、シュートを分化した材料を選び継代したが、ホルモン無添加の培地では発根はほとんど得られなかった。また、多くは茎長 10mm 以下で、培養を続けても成長する傾向は見られなかった。そのため、発根させ成長を促すのに植物ホルモンを用いた。まず、NAA の発根に与える影響を検討した。濃度を 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 (mg/l) と勾配をつけ、1 区画ジェシカは 20 個体、丸吉白は 10 個体植え付けた。また Hygromycin の有無による差異についても検討した。なお、容器はプラントボックスを使用し、1 ボックスに 10 個体を植え付けた。

(2) オーキシンの種類による発根の差異

NAA の場合と同じく、PLB からシュートを分化したものを IBA、IAA、2,4-D のそれぞれのオーキシンでの発根促進を検討した。濃度を 0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.5 (mg/l) の勾配を付け、ジェシカ 1 区画 10 個体とし、Hygromycin は添加しなかった。また、丸吉白については IBA (0.01 ~ 0.5 mg/l)、IAA (0.005 ~ 50 mg/l) を検討し、1 区画 10 個体で Hygromycin 無添加とした。NAA の場合と同条件で培養し、IBA、IAA はオートクレーブ後に冷めてから 0.02 μm の

除菌フィルターを通し培地に添加した。

(3) 頂芽伸長促進におけるジベレリン (GA₃) の影響

植物ホルモンによって頂芽の伸長を促進し、頂芽優勢の誘導を確認するため、作用として、茎、根を細長く伸ばす効果などが挙げられているジベレリン (GA₃) をシュートに処理した。濃度は 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 (mg/l) の勾配を付け、培地添加による方法と、浸漬処理による方法を行った。1 区画 100ml 三角フラスコ当り 10 個体とし、Hygromycin 無添加で検討した。なお、浸漬処理とはクリーンベンチ内で各濃度に滅菌蒸留水で調整後、材料の頂部を数秒間浸した後、培地に植え付ける方法である。

(4) オーキシンとジベレリンの同時処理がシュートに与える影響

オーキシンとジベレリンを同時に処理することによる発根、頂芽優勢への影響を調査した。オーキシンは NAA を使用し 0.01、0.02 (mg/l) の濃度勾配をつけ培地に添加した。ジベレリンは GA₃ を使用し 20、50、100、200、400 (mg/l) の濃度勾配をつけ浸漬処理を行った。ジェシカではプラントボックスを使用し 1 区画 10 個体植え付けた。

(5) パナナを培地として利用することによる根の生長促進と頂芽優勢への影響

天然物質には生長促進物質が含まれており、合成培地より生育が促進されることがよくある。そこで、発根したものをバナナ 100g/l、ジャガイモ 100g/l、ハイポネックス 2g/l、硝酸カリウム 1g/l、スクロース 20g/l、ゲランガム 3g/l (Banana medium A) とバナナ 100g/l、ハイポネックス 3g/l、ペプトン 1g/l、スクロース 20g/l、ゲランガム 3g/l (Banana medium B) によって作成した培地に継代させた。バナナ、ジャガイモは皮を取り除きミキサーですりつぶした。各試薬と混合後、pH5.8 に調整して、高圧蒸気滅菌を行った。ハイポネックスに関しては添加濃度を多くすると草丈は長くなるが、根長は短くなるという報告があり、3g/l が均整の取れた成長ができることが示されている。また、ペプトンを加えることによって実生が良く成長することも示されている (狩野 1968)。

(6) PCR による CyMV-CP 遺伝子の確認

馴化の過程で導入した遺伝子が欠落していないかを確認するために PCR 法による遺伝子の導入確認を定期的に行った。特に、発根後

は Hygromycin が根の成長に悪影響を及ぼすことが示唆されたため、PCR 法による確認を行った。

植物体からの DNA 抽出

植物体からのゲノム抽出は Nucleon Phyto Pure for Plant DNA Extraction Kit (Amersham LIFE SCIENCE)と PCI 混合液を用いて行った。材料は1g以下を-80 で一晩凍結させ粉末にした。DNA 濃縮物に、TAE Buffer (×0.5) 200 μlを加えて-30 で保存した。

PCR

Amersham Pharmacia Biotech 社の Ready-To-Go™ PCR Beads を用い、Forward CyMV CP forward primer (BamHI): 5'-TCA ATA GGA TCC ATG GGA GAG CCC ACT-3')と Reverse CyMV CP reserve primer (EcoR):5'-CAC GCG ATA TCG CTG GCT AAG TAT ATT A-3')の各プライマーを使用した。PCR の設定は 95 で 10 分間保持した後、95 で 1 分間、60 で 1 分間、72 で 1 分間を 35 サイクルとした。

電気泳動と撮影

PCR 生成物を 0.8%で作成したアガロースゲルを使用して、100V で 25 分間電気泳動した。その後、アガロースゲルを 1mg/ml のエチジウムブロマイド溶液に 30 分間浸漬し、紫外線ランプを用いてバンドを確認した。

(7) DAS-ELISA 法による CyMV-CP の確認

CyMV 外被蛋白質が植物体内で合成されているかを確認するために、日本植物防疫協会の ELISA Kit を用いて DAS-ELISA 法により測定した。材料約 0.1g を乳鉢・乳棒で粉末にし、使用した。マイクロプレートリーダーを用いて波長 405nm で吸光度を測定した。測定値は 2 ウェルの平均値を計算し、発色液のみの区を引いた値とした。信頼性を高めるために最低 2 回繰り返した。

結果および考察

(1) NAA が頂芽の生長・発根促進に与える影響

NAA 処理で培養 1 ヶ月後、Hygromycin 無添加のジェシカで発根したシュートが確認できた(表 1)。濃度 0.01mg/l で最も多くの発根が確認でき、その後の繰り返し実験でも同様の結果が得られた。上限は NAA 濃度 0.05mg/l まで発根が確認することができたが 0.1mg/l 以上では確認できなかった。また、下限について

表 1 NAA濃度による発根の促進

NAA濃度 (mg/l)	ジェシカ	丸吉白	ジェシカ	丸吉白
	1カ月培養 (%)	4カ月培養 (%)	培地に Hygromycin 50mg/l添加 (%)	培地に Hygromycin 50mg/l添加 (%)
0	0	0	0	0
0.005	0	0	0	0
0.01	20	30	0	0
0.02	10	30	0	0
0.05	15	0	0	0
0.1	0	0	0	0
0.2	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0

発根したシュートが占める割合

0.005mg/l では確認できなかった。また、NAA 添加培地では培養期間を増やすことで発根数は増加させることができた。一方、Hygromycin 無添加の NAA 処理区では丸吉白で培養 3 ヶ月までは発根は確認することができなかったが、培養 4 ヶ月で 0.01mg/l で 30%、0.02mg/l で 30% 確認することができた。さらに半月後 0.01mg/l 区で 40%の発根が確認できたことから、ジェシカと同様に処理期間を長くすることで発根誘導がもたらされることが解った。丸吉白はシュートが NAA の濃度に応じて異常に肥大化し徒長した。それがジェシカよりも発根誘導の遅れの原因であると考えられる。ジェシカ、丸吉白ともに Hygromycin 50mg/l を添加した NAA 処理では処理期間に関係なく発根は見られなかった。そのため抗生物質の Hygromycin は馴化の過程で利用しなかった。

(2)オーキシンの種類による発根の差異

ジェシカの IBA 処理では、1 ヶ月経過しないで発根するシュートが見られた(表 2)。処理期間を増やすことで発根するシュートは多く見られ、3 ヶ月間処理したものでは 0.01mg/l と 0.05mg/l でそれぞれ 60%、50%であり、半数以上が発根した(図 1)。また、NAA 処理の場合と異なり 0.1mg/l や 0.5mg/l の処理区でも発根を確認することができた。2,4-D、IAA でも発根は確認できたが、処理期間が 3 ヶ月以上必要であり、根の成長も NAA より効果的ではなかった(表 3)。よってジェシカについては IBA、NAA の利用が発根促進として良いと考えられた。丸吉白については、4 ヶ月間 IBA 処理した区でも発根が確認できず、シュートが肥大化し徒長していた。一方、IAA 処理は 4 ヶ月後、根の長さ、太さは短かったが各濃度で発根が確認できた (0.02、0.05、0.2、1、10、50mg/l の区でそれぞれ 10%)。これらの区画ではシュートの肥大は確認されな

表2 オーキシンの種類によるジェシカの発根割合

濃度 (mg/l)	NAA 3か月培養 (%)	IBA 1か月培養 (%)	IBA 3か月培養 (%)	IAA 3か月培養 (%)	2,4-D 3か月培養 (%)
0	0	0	0	0	0
0.005	0	0	0	10	0
0.01	20	30	60	10	0
0.02	20			10	
0.05	15	20	50	0	0
0.1	0	10	30	10	10
0.2	0	0	0	0	0
0.5	0	10	0	0	0

発根したシュートが占める割合

かった。よって、オーキシンの種類による影響は丸吉白とジェシカでは異なり、品種間でそれぞれ効果が違う可能性がある。NAA、IBA は主として丸吉白でシュートの肥大に作用しているように見られた。IAA においては発根する率はジェシカと似ており、あらゆる区画でまばらに発根したが4ヶ月以上の処理が必要で発根促進作用は弱かった。

表3 ジェシカのオーキシンによる根の生長

	NAA	IBA	IAA	2,4-D
1シュート当りの発根数	~5	~9	~2	~3
最長の根の長さ	8mm	20mm	5mm	7mm

(3) 頂芽の伸長促進におけるジベレリン(GA₃)の影響

培地に添加したジベレリンの影響は、2ヶ月間培養したが、シュートの伸長は見られなかった。また、濃度の違いによる差異も確認できなかった。浸漬処理においても全処理区において伸長、濃度差による変化は見られなかった。

(4) オーキシン(NAA)とジベレリン(GA₃)の同時処理がシュート形成に与える影響

ジェシカにおいては処理2ヶ月後、NAAの影響と思われる発根をNAA0.01mg/lで30~50%、NAA0.02mg/lで10~20%確認することができた。また、3ヶ月後では、さらに発根数は増加した。さらに、ジベレリン添加の各区では10~20%ほど徒長しているものがあったが、ジベレリンの濃度差による違いは見られなかった。また、

おおよそ80%は腋芽が多数発生した。しかし、ジベレリン単独処理よりも徒長を促しており、発根することがシュートを伸張させることに何らかの関係があると考えられた。

(5) パナナを培地として利用することによる根の生長促進と頂芽優勢への影響

バナナを培地として用いる場合は一般的に *Dendrobium phalaenopsis* に用いられている Banana medium B と、その改良型(根上り防止)のコチョウラン用の Banana medium A を用い、発根したシュートを植えつけた。3ヶ月後、ジェシカをそれぞれ比べたがどちらも根の生長が促進されており、長さ、太さ共に増加していた。また、シュートも生長しており、葉がで、腋芽の伸張が抑えられ、頂芽優勢が促された(図2)。しかし、中には分化誘導バランスが崩れたものも見られ、それらは腋芽から根が発生したり、葉の生長が見られなかったり、基部の肥大化などの異常な状態であるものも見られた(図3)。約4ヶ月後、地上部約3cm以上の幼苗をフラスコから取りだし、ミズゴケで根を巻いて鉢に植えることができた。幼苗の育成は25℃、明(14時間)、暗(10時間)に設定された培養室で育成した。

(6) PCRによるCyMV-CP遺伝子の確認

CyMV外被蛋白質遺伝子が存在する740bpのバンドが確認できた。このことから、Hygromycinを添加した区で発根は確認できなかったが、導入遺伝子の欠落による発根ではなかったことが示唆できた。

(7) DAS-ELISA法によるCyMV-CPの確認

3時間の測定で、非形質転換体と比べ約2

倍の値を示した。この結果から導入された遺伝子によって蛋白質が発現していると判断した(高橋 1988)。

一方、CyMV に感染したエピデンドラムの葉から採取した測定では約5倍の値を示した。CyMV に感染するとウイルスは植物に活発に外被蛋白質を合成させるので差は出てくると予測されるが、2 倍のタンパク質合成によりウイルスの増殖を防ぐことができるのかについては馴化した形質転換体にウイルスを汁液接種法で接種し、実際に CyMV に耐性を示すかどうかを確認する必要がある。

摘要

Cymbidium mosaic virus は非常に感染力が強く、深刻なウイルスである。感染により、花卉や葉に退色斑が現れ、商品性が無くなる。このウイルスを防除する効果的な方法は見つかっていない。この論文では、遺伝子組換えによって CyMV 外被蛋白質を導入したデンファレの馴化・育成について調査した。

形質転換体は頂芽優勢が打破され、発根が困難であり、成体まで誘導することが困難であった。そこで植物ホルモンや天然物を用いた培地を工夫することによって、発根を誘導し、頂芽優勢を誘導することが可能となった。また、この生長には、バナナを用いた培地が効果的であることが解り、プラスチックから取りだして栽培することが可能になった。

引用文献

井上成信 (1964) ランのウイルス病について (1) *Cymbidium* に発生するウイルス病 日本蘭協会誌 10:6-10
 井上成信 (1968) Some experiments on the transmission of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ring spot virus*. 農学研究 52:89-97
 井上成信 (2001) 病害虫対策 ウイルス病 花卉園芸大百科 15 ラン 社団法人 農文協 pp46-51
 Fitch, M., R.M. Manshardt, D.Gonsalves, J.L. Slightom & J.C. Sanford. (1992) Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ring spot virus. *Bio/Technology*, 10,

1466-1472.
 Gara, I. W., Kondo, H., Maeda, T., Mitsuata, K. and Inouye, N. (1996) Further characterization of *Cymbidium mosaic virus* from *Vanda* orchid. *Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ.* 4:163-174
 Jensen, D. D. (1951) Mosaic of black streak disease of *Cymbidium* Orchid. *Phytopathol.* 41:401-414
 狩野邦雄 (1968) ラン科植物の種子形成と無菌培養 加古瞬治編 株式会社誠文堂新光社 pp93-152
 Kondo, H., Maeda, T., Mitsuata, K. and Inouye, N. (1996) Detection of the viruses occurring in oriental *Cymbidium* in Japan. *Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ.* 4:163-174 4:149-162
 松井 剛 (2004) *Agrobacterium tumefaciens* を使った *Dendrobium phalaenopsis* への遺伝子導入 広島県立大学生物資源開発学科 新美研究室 卒業論文集 13:1-32
 Matsumoto, J., Urabe, S., Maeda, T., Mitsuata, K., Kondo, H., Tahara, M. and Inouye, N. (1996) Some properties of *Cymbidium mosaic virus* isolated from *Calanthe* spp. *Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ.* 4:187-199
 Men, S., Ming, X., Liu, R., Wei, C. and Li, Y. (2003) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75:63-71
 Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hofmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
 高橋善行 (1988) 植物防疫基礎講座 植物ウイルス病の血清学的診断法(2) ELISA 法 その特徴と実施上の注意 植物防疫 42:88-92
 上里健次 (2001) デンファレ 花卉園芸大百科 15 ラン 社団法人 農文協 pp147-151



図1 NAAで処理することで発根したシュート



図3 基部が太くなりすぎ正常に成長しない幼苗



図2 バナナ培地で培養することで得た幼苗