コンジュゲーションもしくはエレクトロポレーションによる *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 株が保有する pRi1724 の移行とその解析

田中 伸和*・松本 武*・町田 泰則**

Nobukazu TANAKA*, Takeshi MATSUMOTO* and Yasunori MACHIDA** :
Transfer and Analysis of pRi1724 in *Agrobacterium rhizogenes* Strain MAFF03-01724
by Conjugation or Electroporation

Abstract

A root-inducing plasmid, pRi1724, in *Agrobacterium rhizogenes* strain MAFF03-01724 (mikimopine type) isolated in Japan, was combined with a kanamycin resistant gene. The resulting plasmid called pRi1724::kan was transferred from strain 1724 to other *Agrobacterium* strains by bacterial transconjugation or electroporation. *A. tumefaciens* strain C58C1 harboring pRi1724::kan had abilities such as induction of hairy roots, biosynthesis of mikimopine in infected cells and degradation of mikimopine. We could deduce that the size of pRi1724 ranged from 205 to 210 kb from results of electrophoresis of fragments from pRi1724::kan digested by restriction enzymes.

(Received February 23, 1993)

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, Ri plasmid, conjugation, electroporation.

緒 言

Agrobacterium rhizogenes MAFF03-01724 株 (以下, 1724 株と略) は, 千葉県のカボチャ栽培温室内で発生した毛根病の病原細菌であり⁶⁾, 誘発した毛状根内で非タンパク態アミノ酸誘導体オパインの一種であるミキモピンを生産させる¹⁾。すでに我々は, 本菌株が保有する Ri (root-inducing) プラスミド (pRi1724) より, プラスミドおよびコスミド・ライブラリーを作製し, T-DNA および *vir* 領域の存在を確認している⁸⁾。しかしながら, 本菌株は pRi1724 の他に, 2~3 個のクリプティック・プラスミドを有しているため, pRi1724 の構造及び機能を十分に解析するには, 本プラスミドのみをプラスミドを有していない *Agrobacterium* に移す必要がある。

Agrobacterium 属細菌では, 菌間のプラスミド移行

はコンジュゲーションによって行われる。特に, Ti (tumor-inducing) プラスミドや Ri プラスミドの移行の誘導には, オパインが必要である²⁾。オパインの生合成遺伝子は Ti や Ri プラスミドの T-DNA 上にコードされているが, 同一プラスミド上にはそのオパインの分解酵素がコードされ, 感染植物細胞中で生産されたオパインを単一の窒素源・炭素源として利用できるようになっている¹²⁾。したがって, Ti もしくは Ri プラスミドが菌間を移行すれば, 受容菌には特定のオパインの利用能も付与されるので, オパインを単一窒素源・炭素源として培地に添加することによって, プラスミド受容菌の選抜を行うことが出来る²⁾。このとき, プラスミド供与菌は, それ自身が生育しないように抗生物質に対する感受性などを有する必要がある。しかしながら, 1724 株を供与菌とする場合, 本菌株が野生株であり, 一般的に用いられる抗生物質に対する完全

* ダイセル化学工業(株)総合研究所生薬評価研究所 Bioassay Laboratory, Research Center, Daicel Chemical Industries, Ltd., Shinzaikai, Aboshi-ku, Himeji, Hyogo 671-12, Japan

** 名古屋大学理学部生物学科 Department of Biology, Faculty of Science, Nagoya University, Furou-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464, Japan

な感受性が無いため⁹⁾, pRi1724 を受容した菌を選抜することが極めて困難である。

一方, エレクトロポレーション法などによって, 巨大な Ti プラスミドを直接 *Agrobacterium* 属細菌に導入する方法も開発されている⁹⁾。このときも, 導入されたプラスミドはオパインで選抜するのが適当である。しかし, 1724 株の場合, ミキモピンが市販されておらず, また, その合成は容易であるものの, ミキモピン純品の単離が困難であるため, そのまま使用すれば, 立体異性体であるクモピンや原料のヒスチジンと α -ケトグルタル酸が残り, これらを利用して非導入菌まで生育して, 選抜不可能となる。

一方, 我々は, 1724 株をニトロソグアニジン処理することによって, カナマイシンおよびクロラムフェニコール感受性の菌株を取得し, これらの菌にエレクトロポレーション法で外来 DNA を導入する方法を確立した⁹⁾。さらに, 相同組換えによってカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだ pRi1724::kan を作製している⁹⁾。本プラスミドが移行したとき, 受容菌がカナマイシン耐性を獲得するため, カナマイシンでの選抜が可能である。

本報では, 従来のコンジュゲーション法およびエレクトロポレーション法によってカナマイシン耐性遺伝子を組み込んだ pRi1724 を 1724 株から *A. tumefaciens* C58C1 株に移行し, pRi1724 の毛状根誘発能, ミキモピン生合成および分解能の確認, ならびに制限酵素切断と電気泳動による本プラスミドのサイズの推定を行ったので報告する。

材料および方法

細菌およびプラスミド 本実験で使用した *Agrobacterium* 属細菌ならびにプラスミドについては, Table 1 に示した。

培地および抗生物質 本実験で使用した培地および

その組成は Table 2 に示した⁹⁾。固形培地は, 全て 1.5% となるようバクタアガー (Difco 社製) を加えて固化した。

抗生物質は, カナマイシンおよびリファンピシンを使用し, それぞれ 50 μ g/ml となるよう添加した。

プラスミドの単離, 制限酵素切断およびアガロースゲル電気泳動 *Agrobacterium* 属細菌からのプラスミド単離については, 我々が先に報告した方法を用いた⁹⁾。制限酵素による切断には, *Bam*HI, *Eco*RI, もしくは *Hind*III (いずれも宝酒造(株)製) を使用した。電気泳動には, 0.7% アガロースゲルを用いた。

コンジュゲーション *Agrobacterium* 属細菌間のコンジュゲーションによるプラスミド移行は, Lichtenstein と Draper²⁾ の方法を改変して用いた。すなわち, 供与菌である DC-AR 4 株および受容菌である C58C1 株 (Table 1) をそれぞれ SM 液体メイティング培地で 30°C で一晩振盪培養後, 1/20 に希釈した菌液をさらに 6 時間培養して, OD₆₀₀=0.8 まで増殖させた。その 0.2 ml ずつを滅菌したミリポア・フィルター上で混合し, 培地を吸引濾過によって除去した。次に, 菌のついたフィルターを SMNO 固形培地上に置かし, 30°C で 2 日間培養した。フィルター上の菌を 1 ml の λ 希釈緩衝液 (10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) に懸濁し, さらに同じ緩衝液で適当に希釈した。この菌液を 50 μ g/ml カナマイシンおよび 50 μ g/ml リファンピシンを加えた LB 固形培地に塗布接種した。30°C で 2 日間培養し, リファンピシンおよびカナマイシン耐性コロニーを形成させた。

エレクトロポレーション エレクトロポレーション用の *Agrobacterium* 属細菌の調製法ならびに細菌への DNA 導入法については, 我々が先に報告した方法を用いた⁹⁾。すなわち, *Agrobacterium* 属細菌を 10 ml の LB 液体培地に接種し, 30°C で 16 時間振盪培養後, その 1 ml を 2 l のバッフル付きフラスコに入れた 300

Table 1. Strains and antibiotic resistance

Strain	Antibiotic resistance ^{a)}	Source
<i>Agrobacterium</i> spp.		
<i>A. rhizogenes</i> DC-AR4 (pRi1724::kan)	Am ^R , Cb ^R , Cm ^R , Km ^R , Rif ^R , Sm ^R , Tc ^R , Vm ^R	9)
<i>A. tumefaciens</i> C58C1	Km ^R , Rif ^R	C58 cured of pTiC58, 10)
Plasmids		
pRi1724::kan	Km ^R	pRi1724 recombined by pF11, 9)
pF11	Km ^R	Constructed from pHSG298 and 8.5 kb of <i>Bam</i> HI fragment from pRi1724, 9)

a) Abbreviations: Am, ampicillin; Cb, carbenicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Rif, rifampicin; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline; Vm, vancomycin; R, resistance; S, sensitive.

Table 2. Components of media employed in this study

Component ^{a)} (g)	Medium					
	LB	LBMG	SOC	SM	SM liquid mating	SMNO
Bactotryptone (Difco)	10.0	5.0	20.0			
Bacto yeast extract (Difco)	5.0	2.5	5.0			
CaCl ₂				0.02	0.02	
FeSO ₄					0.001	
KCl			0.19			
K ₂ HPO ₄				2.05	2.05	10.25
KH ₂ PO ₄		0.25		1.45	1.45	7.25
MgCl ₂ ·6 H ₂ O			2.03			
MgSO ₄ ·7 H ₂ O		0.1	2.46	0.5	0.5	0.5
MnSO ₄					0.001	
NaCl	5.0	2.6	0.58	0.15	0.15	0.15
NaOH						0.014
(NH ₄) ₂ SO ₄				3.0	3.0	
Mikimopine and Cucumopine						0.20
Sodium glutamate		1.16				
Biotin		0.001				
Glucose			3.6	4.0	4.0	2.0
Mannitol		5.0				
Bromophenol blue						0.15
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

a) All quantities are given for 1 liter of medium. Agar media were prepared by addition of 15 g/l of Bactoagar (Difco). The pH was adjusted by addition of 1 N NaOH.

mlのLB液体培地に接種し、30°Cで16時間振盪培養することによって、OD₆₀₀=0.5~0.7まで増殖させた。この培養液を10分間氷冷後、4°C、6,000 rpm、10分間の遠心分離を行い集菌した。菌体は、300, 150, 6 mlの冷10% (v/v) グリセロールへの懸濁と上記の遠心分離を繰り返すことによって洗浄した。最後の遠心分離後、沈澱を3 mlの冷10%グリセロールに懸濁し、エレクトロポレーション用の菌として使用した。これらの操作は全て氷上で行った。

エレクトロポレーションには、バイオ・ラッド社のジーン・パルサー™を使用した。200 µlの調製菌液に少量(20 µl以下)の滅菌水に溶解した単離プラスミドを添加し、よく混合して氷冷したサンプル・キューベット(電極間距離0.2 cm)に移し、12.5 kV/cm、25 µF、600 Ω (10 msec)でエレクトロポレーションを行った。これに、0.8 mlのSOC液体培地を加え、30°Cで1時間振盪培養し、50 µg/mlのカナマイシンを添加したLB固形培地に塗布接種して30°Cで36時間培養し、形質転換コロニーを形成させた。

毛状根の誘発とミキモビンの検出 シソ科 *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* およびナス科 *Nicotiana tabacum* の無菌植物リーフ・ディスクに、我々が先に

報告した方法²⁾で、pRi1724::kan 受容菌を接種した。接種ディスクは、500 µg/mlカルベニシリンと500 µg/mlバンコマイシンを添加し、0.2%ジェランガム(三栄源エフエフアイ㈱製)で固化したMurashige-Skoog培地⁵⁾に置床し、暗黒下で培養して1724株由来の抗生物質感受性変異株の毛状根誘発能の検定を行った。ミキモビンの検出は、簡便な濾紙電気泳動法⁷⁾を用いた。

ミキモビンの分解 *A. reptans* var. *atropurpurea* 毛状根をSMNO液体培地中で摩砕し、200 µlの摩砕液にpRi1724::kan 受容菌を接種して、30°Cで24時間振盪培養した。この培養液5 µlを濾紙にスポットし、簡便な濾紙電気泳動法⁷⁾によってミキモビンの分解を確認した。

結果と考察

C58C1株へのpRi1724::kanの移行

カナマイシン耐性遺伝子を保有する大腸菌のクローニング・ベクターpHSG298のBamHI部位に、pRi1724の8.5 kbのBamHI断片(T-DNAおよびvir領域以外)を組み込んだプラスミドpF11⁹⁾は、*Agrobacterium* 属細菌内では複製できない。この性質

を利用して、我々は本プラスミドをエレクトロポレーション法によってカナマイシン感受性 1724 株 (DC-AR 2 株) に導入し、カナマイシン耐性菌株 (DC-AR 4 株) が取得できた⁹⁾。DC-AR 4 株が有している pRi1724::kan は、菌体内で相同組換えによって pF11 が pRi1724 に組み込まれたものである。このプラスミドは、pHSG298 のカナマイシン耐性遺伝子が組み込まれているため、菌間を移行、もしくは菌に導入されたとき、受容菌はカナマイシン耐性コロニーとして選抜することができると考えられた。

DC-AR 4 株 (カナマイシン耐性、リファンピシン不完全耐性) と C58C1 株 (カナマイシン感受性、リファンピシン耐性) とをミキモピン存在下で 2 日間培養してコンジュゲーションを行い、カナマイシン及びリファンピシン含有 LB 固形培地上で培養すると、これらの抗生物質の存在下で生育するコロニーが多数得られた (DC-AT 1 株群)。1724 株および本菌株由来の DC-AR 4 株はリファンピシンに対し 2.3×10^{-5} の頻度で耐性菌が出現する⁹⁾ が、この頻度では pRi1724::kan が移行してカナマイシン耐性になった C58C1 株を選抜するのに障害になることはないと考えられた。

ところで、これまで調べられている Ti および Ri プ

ラスミドでは、それらの T-DNA 上にオパイン生合成遺伝子が存在し、植物細胞内で生産されたこれらのオパインを分解する酵素の遺伝子が T-DNA 外のプラスミド上に存在することが知られている。そこで、DC-AT 1 株群のミキモピンの分解能を調べた。すなわち、本株群から適当に選んだ 4 コロニー (DC-AT1-1, 同-2, 同-3, 同-4) をミキモピン含有 SMNO 液体培地に接種し 24 時間培養すると、ミキモピンが分解され、濾紙電気泳動で検出されなくなることが確認された (Fig. 1)。コントロールの C58C1 株ではミキモピンは分解されないから、DC-AT 1 株群は pRi1724::kan が移行して出現したコロニー群と推測された。

一方、DC-AR 4 株から単離したプラスミド 1 μ g をエレクトロポレーション法によって C58C1 株に導入し、カナマイシン含有 LB 固形培地で 2 日間培養すると、カナマイシン耐性コロニーが得られた (DC-AT 2 株群)。この菌株群の 4 コロニー (DC-AT2-1, 同-2, 同-3, 同-4) もミキモピン分解能を持っており (Fig. 1), pRi1724::kan が導入された菌株群であることが推測された。1724 株には pRi1724 の他に 2~3 個のクリプティック・プラスミドが存在する⁹⁾ため、実際には 250~330 ng の pRi1724::kan がエレクトロポレーシ

Fig. 1. Degradation of mikimopine by *A. tumefaciens* strain C58C1 transformed with pRi1724::kan by conjugation and/or electroporation. Bacterial strains 1724 (1724), C58C1 (C58), C58C1 transformed with pRi1724::kan by electroporation (C58=EP) or C58C1 transformed with pRi1724::kan by conjugation (C58=Conj) were incubated over night in a SMNO medium containing mikimopine. Five μ l of the each medium was spotted on a filter paper, followed by paper electrophoresis in 5 g/l ammonium carbonate solution (pH 9.8) for 30 min at 500 V. Lane B is bromophenol blue for a tracking dye of electrophoresis. Miki 1 and 2 show the lanes of the medium containing mikimopine without bacterial inoculation. The arrow on the left indicates the portion of authentic mikimopine. Numbers described in each strain show the different colonies separately isolated from plates for bacterial selection.

Fig. 2. *Ajuga* hairy roots initiated by inoculation of *A. tumefaciens* C58C1 transformed with pRi1724::kan by electroporation (strain DC-AT2). Leaf disks of *Ajuga* plants inoculated with bacteria were cultured at 25°C for 20 days in the dark. Left and right arrows indicate a control leaf disk and an inoculated one, respectively.

ョン法によって導入されたことになる。このとき形質転換頻度は、 $1.0 \sim 1.5 \times 10^2 / \mu\text{g}$ DNA である。Mozo と Hooykaas が報告しているように⁴⁾、エレクトロポレーション法では 200 kb を越える巨大なプラスミドを *Agrobacterium* 属細菌に導入できることが本報でも実証された。

pRi1724 が Ri プラスミドである証明

すでに我々は、pRi1724 上に *A. rhizogenes* A4 株の Ri プラスミド pRiA4b の TL-DNA と相同な配列が存在すること、本配列が 1724 株によって誘発された毛状根から単離した DNA 中に検出されることを報告している⁸⁾。そこで、pRi1724 が 1724 株の真の Ri プラスミドであるかを確認するため、*A. reptans* var. *atropurpurea* および *N. tabacum* のリーフ・ディスクに DC-AT1-1 株および DC-AT2-1 株を接種した。その結果、約 2 週間後にリーフ・ディスクから毛状根が出現した (Fig. 2)。また、濾紙電気泳動によって、これらの毛状根中でのミキモビンの生産を確認したところ、*A. reptans* では検出されなかったが、*N. tabacum* では、全ての毛状根中にミキモビンが検出された (データ省略)。 *A. reptans* 毛状根でミキモビンが検出されなかった理由は不明である。

さらに、導入されたプラスミドが pRi1724::kan のみかを確認するために、DC-AT1-1 株および DC-AT2-1 株よりプラスミドを単離し、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、1724 株からプラスミドを単離したときに見られる 2~3 個のクリプティック・プラス

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of pRi1724::kan isolated from strain DC-AT2 (a) and the restriction patterns of pRi1724::kan digested by *Bam*HI, *Eco*RI or *Hind*III (b). Electrophoresis was performed at 100 V for 60 min (a), or at 80 V for 4 hr (b) in a 0.7% agarose gel. An arrow with pRi1724::km of left in (a) indicates the band of pRi1724::kan. The figures of left in (b) are DNA sizes (kb) based on λ -*Hind*III fragments in lane 1.

ミドのバンドは検出されず、一本のプラスミドのバンドのみが検出された (Fig. 3a)。

以上の結果より、pRi1724 が 1724 株の Ri プラスミドであることが証明された。

pRi1724 のサイズ

DC-AT1 株群および DC-AT2 株群の各コロニーは pRi1724::kan のみを保有するため、これらの菌から単離した pRi1724::kan を用いて、pRi1724 のサイズを決定することが可能となった。すなわち、DC-AT2 株 pRi1724::kan を *Bam*HI, *Eco*RI, もしくは *Hind*III で切断し、アガロースゲル電気泳動を行った (Fig. 3b)。これらの断片のサイズを加算したところ、215~224 kb となった (Table 3)。pRi1724::kan は、約 11.2 kb の pF11 が組み込まれているため、これを引くと pRi1724 のサイズは 204~213 kb となる。このサイズは、先に我々の報告で示した約 200 kb⁸⁾ とほぼ一致する結果となった。

カナマイシン耐性遺伝子を組み込んだ pRi1724::kan のメリット

これまで研究されてきた *A. rhizogenes* の多くは、抗生物質に対する耐性が少なく、また、選抜マーカーとしてのオパインは市販のものがあるか、合成が容易

Table 3. Molecular size of the restriction fragments of pRi1724::kan

	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III
	21.0	22.5	25.0
	13.5	14.5	14.5
	11.5	10.0	13.2
	11.0	8.9	10.5×2
	10.0×2	8.4×2	10.0
	9.5×2	7.9×2	8.9
	8.5×2	7.1	7.2
	8.2	6.5	6.8
	7.8	6.1×2	6.2
	7.0	5.1×2	5.9
	6.2	4.9×2	5.5×2
	5.5×2	4.6	4.8×2
	4.7	4.4	4.4
	3.8×2	4.0	4.1
	3.6×2	3.5×3	4.0
	3.1×3	3.4×2	3.7
Molecular size (kb)	3.0	3.2	3.5
	2.95	3.1×3	3.3
	2.70×2	2.95	3.2
	2.55	2.85×2	3.0×2
	2.20×2	2.75×2	2.95×3
	2.10×2	2.60×2	2.80
	2.00×2	2.40×2	2.60
	1.90	2.30×2	2.45×2
	1.80	2.25	2.30×2
	1.50	2.10	2.05×2
	1.35×3	2.00	1.95×2
	1.10×2	1.60	1.72
	1.05×2	1.30×2	1.45
	0.92×2	1.15	1.27×2
	0.72	1.05×2	1.20×2
	0.56	0.88×2	0.88
		0.72	0.80×2
		0.66×2	0.62×2
Total size	222.2	223.5	215.2
Size of pRi1724 (Total size - 11.2 kb ^{a)})	211.0	212.3	204.0

a) The size of pF11 integrated in pRi1724.

なため、Ri プラスミドの菌株間の移行もさして困難でなかったようである。一方、1724 株は、一般的に使用される多くの抗生物質に対して耐性である⁹⁾。また、ミキモピン純品は現在市販されておらず、合成は容易であるものの、立体異性体であるクモピンを同時に合成してしまう上に、pH 2.0 以下の条件下でラクタム化してしまうので、イオン交換樹脂などによって、クモピンや原料のヒスチジンと α -ケトグルタル酸からの単離が極めて困難であり、大量の純品を入手することが難しい(未発表データ)。したがって、これらの不純物が混入したままのミキモピンを添加した選択培地

では pRi1724 が移行した菌のみを単離することは極めて困難である。

一方、我々が取得したカナマイシン感受性 DC-AR2 菌株およびこれに pF11 を導入して得られた pRi1724::kan を用いて移行を行えば、抗生物質耐性によってプラスミド受容菌を容易に選抜でき、最少培地にオバインを添加する選抜法に比較して実験手順も極めて簡便である。さらに、エレクトロポレーション法を用いれば、一段階の培養でプラスミド導入菌を選抜できる。

これまで、Ri プラスミドの薬剤耐性遺伝子によるマ

ーキングには、しばしばトランスポソンが利用されてきた¹¹⁾。トランスポソンの場合、挿入部位が特定しないために、後から挿入位置を確認する手順が煩雑であり、扱い慣れた研究者でなければ使いにくいという問題点がある。

一方、pRi1724::kanのような相同組換え法で抗生物質耐性遺伝子を組み込んだプラスミドは、取得頻度が極めて低いものの⁹⁾、特定位置に遺伝子導入できるため、後からの解析や反復実験が可能であり、有用な実験法であると言える。ここで得られたpRi1724::kanは、今後のpRi1724の解析において貴重な実験材料となろう。

摘 要

これまで、国内産 *Agrobacterium rhizogenes*

MAFF03-01724 (ミキモピン型) が保有する pRi1724 は、本菌株が多くの抗生物質に対して感受性がないこと、およびミキモピンが大量に入手不可能なことから、他の *Agrobacterium* 属細菌に移行不可能であった。しかしながら、本プラスミドにカナマイシン耐性遺伝子を組み込むことによって取得した pRi1724::kan は、コンジュゲーションもしくはエレクトロポレーションによって *A. tumefaciens* C58C1 株に移行できた。得られた受容菌は、毛状根誘発能を持ち、ミキモピンの生産とその分解能を有していたので、pRi1724 が 1724 株の Ri プラスミドに間違いのないことが証明された。単離した pRi1724::kan を制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI, もしくは *Hind*III で切断し、アガロースゲル電気泳動することによって、切断片のサイズを測定し、pRi1724 が約 210 kb であることを確かめた。

引用文献

1. Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H. and Suzuki, A. (1990). Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry* 29: 3131-3134.
2. Lichtenstein, C. and Draper, J. (1985). DNA Cloning. Vol. II (Glover, D.M. ed.). IRL Press, Oxford, Washington, D.C. pp. 67-119.
3. Matsumoto, T. and Tanaka, N. (1991). Production of phytoecdysteroids by hairy root cultures of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1019-1025.
4. Mozo, T. and Hooykaas, P.J.J. (1991). Electroporation of megaplasmid into *Agrobacterium*. *Plant Mol. Biol.* 16: 917-918.
5. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
6. 塩見敏樹・白川 隆・竹内昭士郎・大泉利勝・植松清次 (1987). *Agrobacterium rhizogenes* biovar 1 によるメロン毛根病. *日植病報* 53: 454-459.
7. 田中伸和 (1990). 濾紙電気泳動法によるオパインの検出法. *植物組織培養* 7: 45-47.
8. Tanaka, N., Matsumoto, T. and Oka, A. (1993). Molecular analysis of T-DNA region on the root-inducing plasmid (pRi) in a mikimopine type *Agrobacterium rhizogenes* strain 1724. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59: 155-162.
9. 田中伸和・高尾実里・松本 武・町田泰則 (1993). エレクトロポレーションによる *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 株の形質転換. *日植病報* 59: 586-592.
10. Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature* 252: 169170-.
11. White, F.F., Taylor, B.H., Huffman, G.A., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1985). Molecular and general analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 164: 33-44.
12. White, F.F. and Sinker, V.P. (1987). *Plant DNA Infection Agents* (Hohn, T. and Schell, J. eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 149-177.