

一般報文

Agrobacterium rhizogenes の感染によるコモチカンラン からの毛状根の発生と植物体再生

浜田守彦・細木高志・草開康弘・木子哲也

島根大学農学部

(〒690 島根県松江市西川津町 1060)

(1989年4月3日受付)

(1989年6月5日受理)

育種があまり進んでいないコモチカンランにおいて、*Agrobacterium rhizogenes* をベクター系とする有用遺伝子導入の可能性を検討した。菌を接種した葉からは毛状根の可能性のある根が出現し、無接種区では葉の切断面にカルスのみが発生した。これらの根を除菌後ホルモンフリーの MS 培地に移植したところ、活発に伸長、分枝する根が得られた。これらの根を再分化培地 (NAA 0.1 mg/l + zeatin 5.0 mg/l 添加 MS 培地) に移植したところカルスと 2 次根が発生し、やがて多数の不定芽が出現した。伸長した不定芽からの発根は IBA 0.1 mg/l 添加の MS 培地に移植することで容易に得られた。再生した植物体の 3 分の 2 は正常な形態を示したが矮化した個体も見られた。高圧濾紙電気泳動法により再生植物体中のオパインの検出を行ったところ毛状根由来の 4 個体の再生植物体中 3 個体の葉からマンノピンが検出され形質転換が確認できた。

1. 緒言

コモチカンラン (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) はキャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*) に比べ単位重量当りの蛋白質およびビタミン類の含量が高く¹⁾、中部ヨーロッパでは重要な野菜として食用に供されている。日本においても近年食文化の多様化、高級化に伴い香辛料野菜等とともに需要が高まりつつある²⁾。

コモチカンランは他のキャベツ類に比べ、その栽培の歴史が浅く、耐病性や耐虫性品種の育種が遅れている³⁾。そこで抵抗性を持った栽培品種の作出が望まれるが、従来の交雑育種法では長年月を必要とし、細胞融合法では有用形質のみの導入は難しい。

一方、グラム陰性土壌細菌である *Agrobacterium* の Ti プラスミドや Ri プラスミドをベクター系とする有用遺伝子の導入法がいくつかの野菜で検討されてきた⁴⁻⁶⁾。最近では *A. tumefaciens* を用いてトマトで *Bacillus thuringiensis* の殺虫蛋白の遺伝子の導入に成功した報告がある⁶⁾。アブラナ科植物 (キャベツ, カリフラワー, ハボタン) では *A. rhizogenes* による形質転換体作出の成功例が報告されている⁷⁻⁹⁾。

本報告では育種があまり進んでいないコモチカンランにおいても *A. rhizogenes* をベクター系とする有用遺

伝子導入の可能性を探るためこの菌の葉への感染、毛状根の発生および毛状根からの植物体の再生について検討した結果を述べる、なお形質転換体の確認はオパインの生成の有無により検定した¹⁰⁻¹²⁾。

2. 材料および方法

メロン毛根病由来の *Agrobacterium rhizogenes* (Ar M-123)¹³⁾ を肉汁酵母エキス寒天培地 (牛肉エキス 0.5%, 酵母エキス 0.5%, ペプトン 1%, 食塩 0.1%, MgSO₄ 0.1%, pH 6.8, 寒天 1.5%) 上で 2 ないし 3 日間培養 (28°C 暗黒条件下) し実験に用いた。

供試植物として結球したコモチカンラン (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* Zenker, “早生子持”) を用い、外葉 2 ないし 3 枚を取り除いた後その内側の数枚の葉を使用した。滅菌は次亜塩素酸ナトリウム溶液 (活性塩素 0.7%) に 10 分間浸漬することで行い、その後滅菌水で 2 回洗浄し接種試験に供試した。葉の基部約 1 mm をメスで切り落とし、残された葉の切断面に直接増殖した菌を接種した。その後ホルモンフリーの培地に接種面を上にして寒天内に挿入した (10 葉供試)。対照区は菌を接種せずに植えた。培地組成は MS の主要無機塩類、鉄類¹⁴⁾に Ringe and Nitsch のビタミンおよび微量要素¹⁵⁾を加えしょ糖濃度 2%, 寒天濃度 0.8%。

pH 5.6 とした。なお以下に用いる培地組成は添加ホルモン以外はすべて同様とした。培養は 28°C 3,000 lux 16 時間照明下で行った。培養 1 日後、接種区では葉組織を通して培地中に菌の滲出が認められた。なお 2 日以上除菌せずに培養を続けると、菌が葉内組織や培地内に広がり以後の除菌が困難となった。

次に被接種葉を抗生物質 (carbenicillin sodium 500 mg/l) 入りの培地に移植した。無接種の対照区も同様に行った。以下毛状根の発生については結果の項に述べる。

不定芽発生: α -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg/l, 1.0 mg/l に zeatin 5.0 mg/l を組み合わせた培地に、6 ないし 7 mm に切断した毛状根を置床しカルスの発生と不定芽の分化を調査した。

形質転換植物体の判定: 毛状根より発生した不定芽から再生した植物体の葉 (0.2 g fw) を 0.1 ml の 0.1 N 塩酸中で擦り潰し、遠心分離 (5,000 rpm) にかけて上澄み液約 10 μ l を濾紙 (Whatman 3MM \cdot CHR) 上にスポットした。その後高圧濾紙電気泳動法 (350 V, 1 時間)¹¹⁾ によりオパインの一種であるマンノピンの有無をアルカリ-硝酸銀反応により調べた¹⁰⁻¹²⁾。

3. 結 果

(1) 毛状根の発生

菌を接種した葉基部の切断面から 6 ないし 10 日後に根が発生した。接種後 14 日目までに 80% の供試個体にそれぞれ 2 ないし 4 本の根が認められた。菌を接種しなかった対照区の切断面からはカルスのみが形成した (Fig. 1)。発生した根を順次長さ約 7 ないし 8 mm に達した時に切り取り、1 本ずつ抗生物質入りの培地に移し除菌した。培養 3 週間後完全に除菌された 10 本の根をホルモンフリーの培地に置床した。このうち 4 本の根は活発に伸長、分枝を続け毛状根の可能性を示したが、他の根は伸長せず黄化した。

(2) 不定芽発生

ホルモンフリーの培地で 35 日間毛状根を培養させた後 6 ないし 7 mm の長さずつに切断し再分化培地 (2 区) に移植した (NAA 0.1 mg/l+zeatin 5.0 mg/l 区、

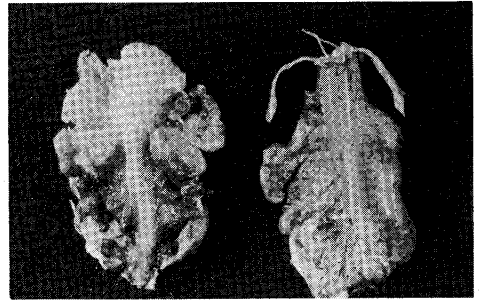


Fig. 1. Hairy root formation (right) from *Agrobacterium rhizogenes*-inoculated leaf cut surface and callus formation (left) from uninoculated cut surface (control).

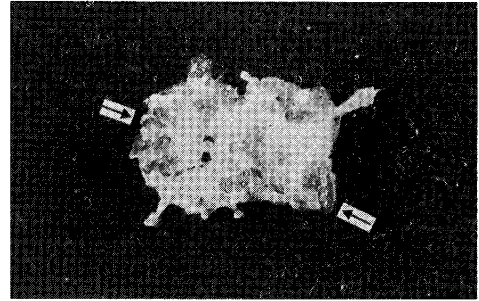


Fig. 2. Adventitious bud formation (arrow) and secondary hairy root formation on the callus derived from a hairy root clone.

12 本供試および NAA 1.0 mg/l+zeatin 5.0 mg/l 区、11 本供試)。NAA 0.1 mg/l+zeatin 5.0 mg/l 区では培養 10 日目頃から 1 個体をのぞいてすべての毛状根からカルスが発生し、置床後約 20 日で 75% のカルスから不定芽の分化が認められた (Table 1, Fig. 2)。一方 NAA 1.0 mg/l+zeatin 5.0 mg/l 区ではほとんどの毛状根はカルス化せず緑色を呈し硬化した。また両区ともカルス化したものについては大部分の個体で 2 次根の発生を認めた。

Table 1. Effect of NAA and zeatin combination on formation of callus, secondary hairy roots and adventitious buds from hairy root explants.

NAA (mg/l)	Zeatin (mg/l)	Callus formation (%)	Secondary hairy root formation (%)	Adventitious bud formation (%)	Adventitious bud numbers per explant (Mean \pm SD)
0.1	5	92	67	75	3.4 \pm 2.3
1	5	18	9	9	0.5 \pm 1.5

(3) 植物体の再生

不定芽を少量のカルスをつけたまま切り取り zeatin 1.0 mg/l を含む培地に移植した。30°C では生長が抑えられたので 20°C (光条件は同じ) で培養したところ、茎が伸長し始め葉数も増加した。2週間後さらに zeatin 0.2 mg/l を含む培地に移植し、茎葉の伸長を促した。得られた植物体の3分の2以上(35個体中23個体)は正常な形態を示したが葉が巻いたものや矮化した個体もみられた (Fig. 3)。しかし Ri プラスミドによる形質転換体でよく見られる葉が波打つ個体はなかった。伸長した

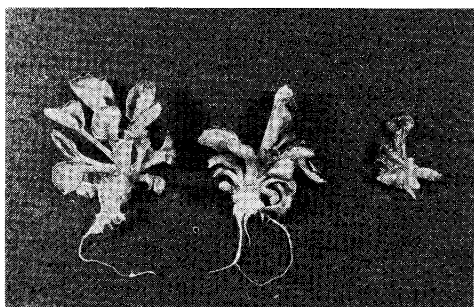


Fig. 3. Regenerated plantlets from a hairy root clone. Normal looking plantlets (left and middle) and a dwarf plantlet (right).

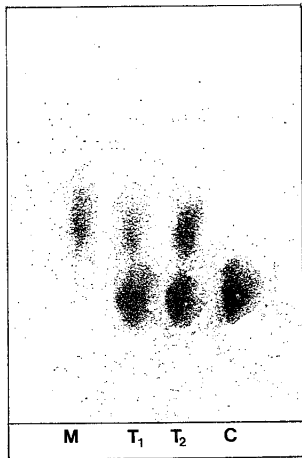


Fig. 4. Example of electrophoretogram for detection of mannopine (evidence of transformation). M: standard mannopine, T₁ and T₂: presence of mannopine (upper spots) detected in leaves of regenerated plants from hairy roots, C: no presence of mannopine (upper spot) in the leaf of mother plant. Lower spots in T₁, T₂ and C were unknown-silver positive reactants.

不定芽のうち2ないし3個体ですでに発根が認められた。残りの個体は IBA 0.1 mg/l を含む培地に移植したところ培養 10 日目には 90% の個体で発根した。

(4) 形質転換体の判定

4本の毛状根由来の再生植物体の葉を用いて検定を行った。その結果4個体中3個体からマンノピンが検出され (Fig. 4) 形質転換が行われていることが確かめられた。残りの1個体および対照として用いた母株の葉からはマンノピンの反応はみられなかった。

4. 考 察

外来遺伝子をコモチカンランに導入するには *A. tumefaciens*¹⁶⁾ と *A. rhizogenes*¹⁷⁾ をベクター系とする方法がある。前者は Ti プラスミドにより形質転換された細胞と正常細胞が混在しクラウンガールを形成するため、カナマイシン抵抗性遺伝子などの選択マーカーを入れないかぎり形質転換細胞の選別が難しい。一方 *A. rhizogenes* では Ri プラスミドの働きにより形質転換された細胞が毛状根として出現しホルモンフリーの培地でよく伸長するので見分けがつきやすい¹⁷⁾。したがって本実験でも、コモチカンランの形質転換体を得るためのベクターとして *A. rhizogenes* を選び接種試験を行った。その結果、活発に伸長、分枝する根が認められ、形質転換した毛状根である可能性が示された。本実験で用いた *A. rhizogenes* (Ar M-123) は前報⁹⁾によりマンノピンのみを生成することが判明している。本実験でも4本の毛状根由来の再生植物体のうち3毛状根由来の個体からマンノピンが検出された。このことからこれら3個体は Ri プラスミドの作用により形質転換が行われたと考えられる。マンノピンが検出されなかった再生植物体については培養の途中で T-DNA 部分が何らかの影響で脱落したか T-DNA 上のマンノピン合成酵素遺伝子のみが染色体中に入らなかったと思われる⁷⁾。

毛状根から再生された多くの植物体では葉が波打ったり、節間がつまり矮化する変異がみられることが知られている¹⁸⁾。本実験では再生植物体中3分の2の個体が正常に発育したが残りの3分の1では節間がつまり矮化した変異個体もみられた。しかし葉が波打った個体は出現しなかった。このようにコモチカンランでは正常な個体が多く、こうした例はキュウリでも報告されている⁵⁾。またコモチカンランと同じアブラナ科のカリフラワーでも再生植物体の3分の2の個体で正常な形態を示した報告もある⁹⁾。なお本実験で用いたコモチカンランではたとえ同一の毛状根由来の再生植物体でも正常株 (13株) と矮化株 (5株) が混在するクローンがあった。このことは、毛状根からのカルスの分裂過程で何らかの変異が

生じた可能性も考えられる。しかし正常株が多数を占めたことを考え合わせると、コモチカンランへの遺伝子導入には *A. rhizogenes* をベクターとして利用できる可能性が示された。今後は Ri プラスミドの T-DNA 部分に有用遺伝子を組み込むことができればコモチカンランの新品種の作出に有効な手段となると期待される。

Agrobacterium rhizogenes (Ar M-123) を供与していただいた、静岡県農業試験場、太田光輝氏に深く感謝します。

文 献

- 1) 戸田幹彦, 1982. 野菜園芸ハンドブック (西貞夫監修), p. 849-854, 養賢堂, 東京.
- 2) 田村 茂, 1985. 野菜園芸大事典 (清水茂監修), p. 1200-1204, 養賢堂, 東京.
- 3) McCormick, S., J. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch, R. Fraley, 1986. *Plant Cell Rep.*, **5**: 81-84.
- 4) Shahin, E. A., R. B. Simpson, 1986. *HortScience*, **21**: 1190-1201.
- 5) Trulson, A. J., R. B. Simpson, E. A. Shahin, 1986. *Theor. Appl. Genet.*, **73**: 11-15.
- 6) Fischhoff, D. A., K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McCormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers, R. T. Fraley, 1987. *Bio/technology*, **5**: 807-813.
- 7) Birot, A. M., D. Bouchez, F. Casse-Delbart, F. Durand-Tardif, L. Jounanin, V. Pautot, C. Robaglia, D. Tepfer, M. Tepfer, J. Touneur, F. Vilaine, 1987. *Plant Physiol. Biochem.*, **25**: 323-335.
- 8) David, C., J. Tempé, 1988. *Plant Cell Rep.*, **7**: 88-91.
- 9) Hosoki, T., K. Shiraishi, T. Kigo, M. Ando, 1989. *Sci. Hort.*, **40**: 259-266.
- 10) Kamada, H., N. Okamura, M. Satake, H. Harada, K. Shimomura, 1986. *Plant Cell Rep.*, **5**: 239-242.
- 11) Tepfer, D. A., J. Tempé, 1981. *CR. Acad. Sci. Paris, Ser. III*, **292**: 153-156.
- 12) Wei, Z. M., H. Kamada, H. Harada, 1986. *Plant Cell Rep.*, **5**: 93-96.
- 13) 牧野孝宏, 大沢高史, 森田 儔, 1986. *日植病報*, **52**: 504.
- 14) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 437-497.
- 15) Ringe, F., J. P. Nitsch, 1968. *Plant Cell Physiol.*, **9**: 639-652.
- 16) Barton, K. A., A. N. Binns, A. J. M. Matzke, M. D. Chilton, 1983. *Cell*, **32**: 1033-1043.
- 17) Tepfer, M., F. Casse-Delbart, 1987. *Microbiol. Sci.*, **4**: 24-28.
- 18) Tepfer, D., 1984. *Cell*, **37**: 959-967.

Summary

Hairy Root Formation and Plantlet Regeneration from Brussels Sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) Mediated by *Agrobacterium rhizogenes*

Morihiko HAMADA, Takashi HOSOKI, Yasuhiro KUSABIRAKI and Tetsuya KIGO

Faculty of Agriculture, Shimane University, 1060, Nishikawatsu-cho, Matsue 690, Japan

A good delivery system to introduce specific certain DNA fragment into Brussels sprouts was investigated by using *Agrobacterium rhizogenes*.

Potential hairy roots in appearance were formed from leaf tissue whereas only callus was formed from uninoculated tissue. After elimination of bacterium, some of these roots grew well on the hormone free Murashige and Skoog (MS) medium. They produced callus and secondary hairy roots on the MS medium supplemented with NAA 0.1 mg/l and zeatin 5 mg/l. Within 20 days after starting culture, adventitious buds were induced from the callus, and the elongated adventitious buds rooted well on the MS medium supplemented with IBA 0.1 mg/l. Two third of the regenerated plantlets were normal in appearance, but the rest were dwarf. The presence of opines, which is the evidence of genetic transformation, was analyzed by using the leaves of the regenerated plantlets with electrophoresis. Three hairy root clones out of 4 clones were confirmed to be transformed because these plantlets showed the presence of mannopine.