

*Agrobacterium rhizogenes* 野生株によるラッカセイ毛状根の誘導

大門弘幸・深見正信・三位正洋\*

千葉県農業試験場

(〒280-02 千葉市大膳野町 808)

\* 千葉大学園芸学部

(〒271 松戸市松戸 648)

(1989年10月11日受付)

(1989年11月24日受理)

数年前、千葉県安房地域において、温室メロンの根が叢生して床土表面に浮き出てくる異常症状が発生し、果実の小型化、ネットの乱れ、糖度の低下等、品質が著しく低下する被害が生じた。この病気は、土壌細菌の一つである *Agrobacterium rhizogenes* によるものであることが明らかにされ、メロン毛根病と称された<sup>1,2)</sup>。

*A. rhizogenes* の保持する Ri プラスミドは、形質転換のためのベクターとして用いられている。また、毛状根由来の再分化植物には、節間が詰まったり、頂芽優勢が弱まったりする種々の遺伝的変異が認められ<sup>3,4)</sup>、これらの再分化植物が新たな育種素材となる可能性が示されている。

著者らは、現在、ラッカセイ各組織からの培養細胞の誘導や器官分化の制御に関して研究を進めると同時に、形質転換体作出のために *A. rhizogenes* の利用を試みている。しかし、現在まで他のいくつかの植物で毛状根誘導に利用されている菌株は、ほとんどが輸入菌株であり、植物防疫上の問題から、再生植物の野外での栽培は自由にできない。また、同じ系統の菌株であっても、宿主との組み合わせや種々の環境要因によって、感染率や誘導された毛状根の生長に大きな差異が認められる。したがって、ラッカセイに毛状根を効率的に誘導する野生菌株の分離が望まれている。

本報告では、千葉県千倉町のメロン毛根病常発圃場から採取した発病株から *A. rhizogenes* を分離し、千葉県におけるラッカセイの主要品種を用いて毛状根形成能について検討した。

1987年8月10日に千葉県千倉町のメロン温室(品種:アールスフェポリット)において、毛根病発病株を採取した。採取後速やかに地下部を水洗して土砂を取り

除き、毛状根を滅菌水中で摩砕し、Kado と Heskett の DIM 培地<sup>5)</sup>を用いて塗抹培養した。25°C で培養後5日ないし6日目に出現したコロニーを単離し、供試菌株とした。

単離した26菌株のうち、20菌株について、トマト(品種:瑞秀)およびキュウリ(品種:ときわ光3号P型)を用いて、以下のように病原性を調査した。あらかじめ滅菌した楊子の先端に菌体液をつけ、4~5葉期のトマトとキュウリの茎に1株当たり2カ所ずつ突き刺して各菌株を接種し、温室内で約1カ月生育させた後に毛状根の発生の有無を観察した。その結果、A5、A13の2菌株を接種した場合に、それぞれ接種部位に根の発生が認められた(Table 1)。開放条件下で接種を行うと、接種部位が乾燥しやすいために毛状根の形成率が低い場合があると言われている<sup>6)</sup>。本実験では、接種部位に紙を巻き付け、毎日水分を補給したので湿度は十分であった。しかし、毛状根の形成には他の環境要因の影響も考えられるので、20菌株中18菌株の病原性については、さらに検討する必要がある。

根の発生が認められた2菌株(A5、A13)を、ラッカセイ無菌実生の未熟葉に接種し、毛状根の誘導を試みた。すなわち、-20°Cに保存した両菌株をYEB寒天培地上で3日間培養後、その1白金耳をYEB液体培地で一晚振とう培養し接種原とした。B5培地にあらかじめ無菌的に播種したラッカセイ(品種:千葉半立、ジャワ13号)の8日齢の実生から切り出した3~5mm長の未展開葉を、*Agrobacterium*懸濁液に浸漬し15分間真空ポンプで引き接種した。真空処理後、葉片に付着した懸濁液を濾紙で拭き取り、滅菌水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレ内に置床した。濾紙上で4日間培養後、除菌の

**Table 1.** Pathogenicity of *A. rhizogenes* isolated from hairy roots of melon plant grown in greenhouse located at Chiba prefecture.

| Isolate number | Pathogenic reaction to |          |
|----------------|------------------------|----------|
|                | Tomato                 | Cucumber |
| A 1            | —                      | *        |
| A 2            | —                      | *        |
| A 3            | —                      | *        |
| A 4            | —                      | *        |
| A 5            | +                      | *        |
| A 6            | —                      | *        |
| A 7            | —                      | *        |
| A 13           | +                      | +        |
| A 14           | —                      | —        |
| A 15           | —                      | —        |
| A 16           | —                      | —        |
| A 17           | —                      | —        |
| A 18           | —                      | —        |
| A 19           | —                      | —        |
| A 20           | —                      | —        |
| A 21           | —                      | —        |
| A 22           | —                      | —        |
| A 24           | —                      | —        |
| A 25           | —                      | —        |
| A 26           | —                      | —        |
| Control**      | —                      | —        |

+: Positive reaction for root formation at the infection site.

—: Negative reaction for root formation at the infection site.

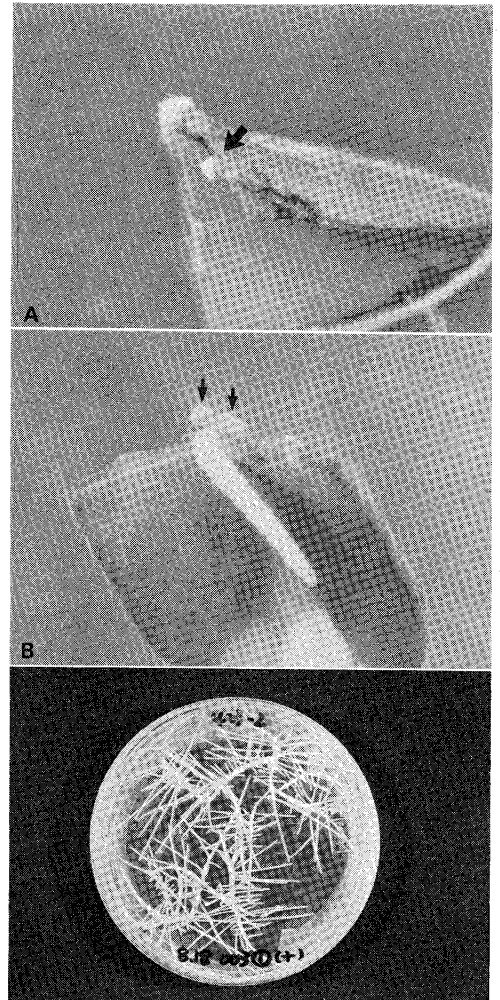
\*: Not tested.

\*\* : Medium containing no bacteria was inoculated.

ために葉片を抗生物質（カルベニシリン 500 mg/l, バンコマイシン 200 mg/l）を添加した B5 寒天培地（植物ホルモン無添加）上に移植した。培養は、25°C, 暗黒条件下で行った。なお、実験は、10~15 枚の葉片を置床したシャーレを処理区当り 2 枚用い、3 反復した。

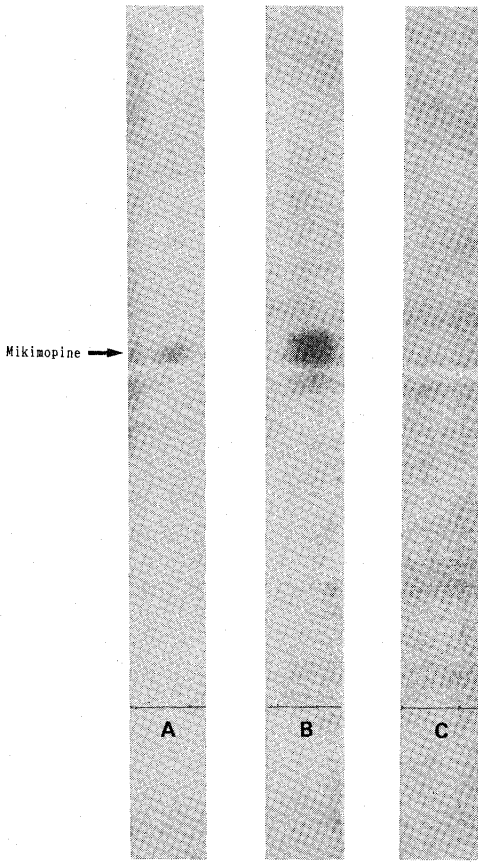
両菌株接種区ともに接種後 10 日目頃に、葉片の切口の葉脈付近に小さな突起が認められ（Fig. 1 (A)）、20 日目頃には根であることが確認された（Fig. 1 (B)）。接種後 30 日目に分岐した根の先端約 2 cm を切り取り、継代培養したところ、旺盛な生育を示し、毛状根特有の分岐根を多く発生した（Fig. 1 (C)）。これらの根は、植物ホルモン無添加の培地上でよく生育した。一方、対照区として YEB 培地のみを接種した葉片では、根の発生がまったく認められなかった。

鎌田らは、メロン毛根病細菌として分離された *A. rhizogenes* (NIAES 1724 菌株<sup>2)</sup> の感染によってタバ



**Fig. 1.** Hairy root formation after infection of a leaf segment of peanut cv. Java No. 13 with *A. rhizogenes* A 13. A: a small outgrowth (arrow) arising from a cut end of leaf segment after 10 days of culture. B: a root initiated from a small outgrowth. Each arrow indicates a small outgrowth that has not yet grown to root (after 20 days of culture). C: hairy roots growing on hormone-free medium (after 50 days of culture).

コに形成された毛状根が、以前から報告されていたアグロピンやマンノピンとは異なるオバインを産生することを報告し、これをミキモピンと称した<sup>7)</sup>。そこで、本実験で A 13 菌株の接種によって得られた「ジャワ 13 号」の根についても、同様の方法によってミキモピンの検出を行った。すなわち、採取した根を少量の 1 N 塩酸を加



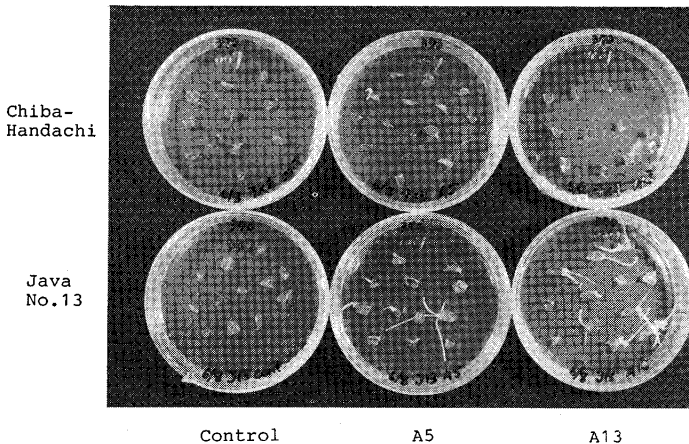
**Fig. 2.** Electrophoretic analysis of extracts from root tissue of peanut cv. Java No. 13. Lane A: mikimopine standard extracted from hairy roots of tobacco plant infected with *A. rhizogenes* strain NIAES 1724. Lane B: hairy root induced from leaf segments by A 13 infection. Lane C: lateral root of seedling.

えて磨碎し、磨碎液の上清を濾紙電気泳動にかけ、パブリ染色によって検出した。対照区には無菌実生の側根を、ミキモピンの標準試料には上述のタバコ毛状根を用いた。その結果、A 13 菌の接種によって誘導された根においてミキモピンが検出された (Fig. 2)。したがって、少なくとも A 13 菌株は、以前この地で見つかった上述の菌株同様、ミキモピンタイプであり、感染の結果得られた根が毛状根であることが確かめられた。

毛状根の形成程度は、供試したラッカセイ 2 品種で異なり、「ジャワ 13 号」において発生頻度が高く、毛状根の生育もよかった (Fig. 3)。また、菌株間で比較すると、感染頻度や誘導の早さあるいはその後の根の生長に供試菌株間で差異が認められ、A 13 菌株の方が優る傾向にあった (Fig. 3)。この結果は行った 3 回の実験でほぼ同様であった。また、すでに千葉県安房地域から分離されているいくつかのメロン毛根病菌 (千葉県暖地園芸試験場保存) を利用して誘導したラッカセイ毛状根の生育にも差異が認められた。

細菌学的性質では同一の菌株であっても、プラスミド DNA の変異によって感染能力や誘導された根の形質が影響される可能性は十分にある。毛状根形成能力に基づいた菌株の分類については、遺伝子レベルの解析を待たなければならないが、現象的に差異の見られるいくつかの菌株を利用することによって、より広範囲の植物種に毛状根を誘導できるようになる可能性もあろう。

ラッカセイは千葉県の主要畑作物であり、メロン温室と近接した圃場に作付けられる場合もある。したがって、ラッカセイにおいて毛根病が引き起こされる可能性もあるが、病原菌の感染には、種々の要因が関与しており、実際にはそのような報告はない。本研究において自然条件下での感染例のないラッカセイにおいても、千葉県産の *A. rhizogenes* が感染し毛状根が形成されるこ



**Fig. 3.** Difference in growth of hairy roots initiated from *A. rhizogenes* A 5 and A 13 after inoculation to the leaf segments of peanut cv. Chiba-Handachi and Java No. 13 respectively. Rapid growth and lateral branching were observed in the roots initiated from A 13-inoculated leaf segment of cv. Java No. 13.

とが明らかになり、これらの菌株の宿主範囲の広さが示された。今後、形質転換体を作成するために、実際の場面でこれらの菌株が比較試験される価値があると思われる。

本研究を行うに当たり、ミキモピンの標準試料の提供および分析方法をご教示を頂いた筑波大学遺伝子実験センター 鎌田 博博士、ならびに貴重な菌株を提供して頂いた千葉県暖地園芸試験場 植松清次研究員に深謝します。

なお、本研究に供試した *A. rhizogenes* 各菌株は、農林水産省農業生物資源研究所遺伝資源センター（ジーンバンク）に保存されている。

## 文 献

- 1) 大泉利勝, 1986. 農業及び園芸, **61**: 78-82.
- 2) 塩見敏樹, 白川 隆, 竹内昭士郎, 大泉利勝, 植松清次, 1987. 日植病報, **53**: 454-459.
- 3) Tepfer, D., 1984. Cell, **37**: 959-967.
- 4) Noda, T., N. Tanaka, Y. Mano, C. Matsui, 1987. Plant Cell Rep., **6**: 283-286.
- 5) Moore, L. W., A. Anderson, C. I. Kado, 1980. In "Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria" (ed. by Schaad, N. W.), p. 17-25, American Phytopathological Society, St. Paul.
- 6) Beach, K. H., P. M. Gresshoff, 1988. Plant Sci. **57**: 73-81.
- 7) Isogai, A., N. Fukuchi, M. Hayashi, H. Kamada, H. Harada, A. Suzuki, 1988. Agric. Biol. Chem., **52**: 3235-3237.

## Summary

### Hairy Root Formation in Peanut by the Wild Type Strains of *Agrobacterium rhizogenes*

Hiroyuki DAIMON, Masanobu FUKAMI and Masahiro MII\*

Chiba Prefectural Agricultural Experiment Station, 808, Daizenno, Chiba, 280-02, Japan

\* Faculty of Horticulture, Chiba University, 648, Matsudo, Chiba, 271, Japan

Wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* were isolated from hairy root of melon plants grown in greenhouses located at Chiba prefecture. Two isolates, A 5 and A 13, induced roots from the leaf segments of peanut *in vitro*. The roots grew vigorously and showed extensive lateral branching on a hormone-free medium. Mikimopine was detected in the extract of these hairy roots.