

## 研究ノート

## Agrobacterium rhizogenes による 主要イチゴ品種の形質転換

豊田秀吉\*・嘉美千歳\*・住谷一樹\*  
索 建政\*\*・細井好之\*・大内成志\*

現在、我が国で栽培されている主要なイチゴ品種には『とよのか』や『女峰』があるが、いずれの品種もうどんこ病や炭疽病に弱く、これらの病害に対する抵抗性系統の育成が農業上急務となっている。筆者らの研究室ではイチゴ葉カサの組織培養系を確立したので<sup>1)</sup>、体細胞変異選抜法を利用して病害抵抗性系統の育成を試みってきた。その結果、萎黄病<sup>2)</sup>や炭疽病抵抗性個体の選抜には成功したが、うどんこ病については抵抗性個体を得ることができなかった。一方、うどんこ病菌を抑制するにはキチナーゼ処理が有効であることをすでに報告しており<sup>3,4)</sup>、キチナーゼ生産遺伝子による形質転換が本病の効果的な防除につながるものと考えた。このような観点から、イチゴにおける遺伝子導入実験を開始することにしたが、イチゴの形質転換については Nehra ら<sup>5)</sup>の報告があるものの、一般に実施例も少なく、特に日本産品種を用いるような場合には、形質転換体を作成するための基礎的条件を最初に明らかにする必要がある。そこで、*Agrobacterium rhizogenes* を利用した形質転換系を確立するため、本研究では、まず、毛状根の誘導とその個体再生および各形質転換体クローンにおける導入遺伝子の発現を検討することにした。以下に、それらの結果を報告する。

本実験には、イチゴ (*Fragaria* × *ananassa*) の主要品種である『とよのか』、『女峰』および『宝交早生』を用

いた。また、外来遺伝子の導入には、既報<sup>6)</sup>に述べた *A. rhizogenes* (MAFF07-20001 株) による方法を用いた。まず、通常のガラス温室で育成した各品種のランナー個体から上位の若い展開葉を採取し、表面滅菌した後、2 cm 平方に切断して本菌懸濁液 ( $10^6 \sim 10^7$  細菌/ml) に 1 ~ 2 分間浸漬した。次に接種葉片を素寒天上に置き、26°C, 3,000 lux の全日長照明下で約 10 日間培養した。以上の方法によって毛状根形成の有無を検討したところ、本菌はイチゴのいずれの品種にも感染し、90% 以上の接種葉片に効率よく毛状根を誘導した (Fig. 1-A)。そこで、得られた毛状根の先端部 (1~2 cm) を切断し、カルベニシリン (500 µg/ml) を含むホルモン無添加 Murashige-Skoog (MS) 培地<sup>7)</sup> (pH 6.0, 寒天濃度 1%) で伸長させた。このようにして除菌した毛状根を種々の濃度の 2,4-D と BAP を添加した MS 培地に移植し、毛状根からのカルス誘導ならびにカルス組織からの個体再生の最適条件を調べた。なお、培地には、0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 および 1.0 µg/ml の 2,4-D と 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 および 2.0 µg/ml の BAP をそれぞれ組み合わせた合計 35 種類の実験区を設けた。このような実験区で上記の毛状根を培養したところ、3 品種とも、培養 1~2 ヶ月後にはすべての実験区でカルスの誘導が観察された (Fig. 1-B)。特に、2,4-D を 1.0, BAP を 2.0 µg/ml とした実験区ではカルス組織から多数の再分化個体が得られた (Fig. 1-C)。これらの再分化個体をパーミキュライトに移植し、数日間温室・弱光条件下で馴化させたところ、再生体は通常の栽培個体と同様の成長を示した。以上の結果から、イチゴにおいても *A. rhizogenes* による形質転換系が確立されたものと考え、以下の実験では実際に本法を利用し、マーカー遺伝子の導入とその発現検出を試みることにした。なお、マーカー遺伝子には NPT II 遺伝子と GUS 遺伝子を用いた。まず、triparental mating 法<sup>8)</sup>により pBI121<sup>9)</sup> を本菌に導入し、得られた形質転換細菌を上述の方法でイチゴに感染させた。

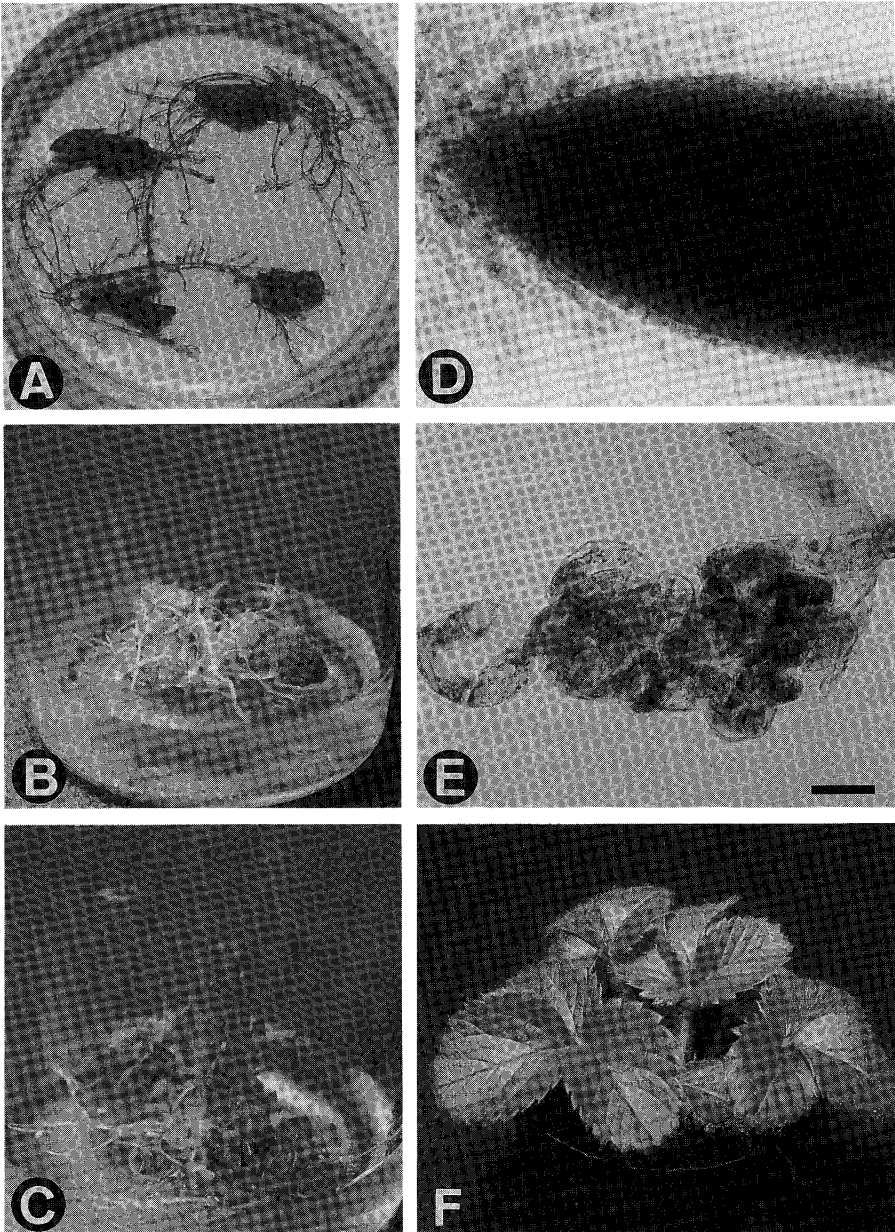
Hideyoshi TOYODA\*, Chitose KAMI\*, Kazuki SUMITANI\*,  
Suo Jian ZHENG\*\*, Yoshiyuki HOSOI\* and Seiji OUCHI\*  
Transformation of Japanese Cultivars of Strawberry with  
*Agrobacterium rhizogenes*.

\*近畿大学農学部植物病理学研究室  
(〒631 奈良市中町 3327-204)

\*\*北京衛生局臨床薬学研究所  
(〒100035 中国北京新街口)

\*Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi  
3327-204, Nara, 631 Japan

\*\*The Institute of Clinical Pharmacology, Beijing Municipal  
Public Health Bureau, Beijing 100035, China



**Fig. 1** Transformation of strawberry cultivars with *A. rhizogenes*.

Hairy roots were generated from leaf segments of strawberry (cv. Hoko-wase) on hormone-free MS medium containing  $500 \mu\text{g/ml}$  Carbenicillin 2 weeks after inoculation (A). Callus tissues were induced from hairy roots (cv. Nyoho) on MS medium containing  $1.0 \mu\text{g/ml}$  2, 4-D and  $2.0 \mu\text{g/ml}$  BAP one month after incubation of hairy roots (B). Plant regeneration was observed when hairy root-derived callus tissues (cv. Nyoho) were continuously cultured on the same medium for another month (C). Hairy root tip (D) and callus cells (E) of strawberry (cv. Toyonoka) were histochemically stained after enzymatic hydrolysis of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide by  $\beta$ -glucuronidase. Bar represents  $50 \mu\text{m}$ . The transformant (F) of Hoko-wase was obtained by regenerating kanamycin-resistant and GUS-positive hairy root to intact plant via callus tissues.

この場合も、前述と同様に効率よく毛状根が誘導されたので、これらの毛状根を選択培地(カナマイシンを加えたホルモン無添加MS培地)に移植し、その伸長の有無からNPTII遺伝子の発現を判定した。なお、選択培地に加えるカナマイシン濃度を決定するため、pBI121を導入しないMAFF07-20001株によって誘導された毛状根をカナマイシン存在下で培養したところ、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ でその伸長が完全に抑制されたので、この濃度のカナマイシンを選択培地に添加した。以上の方法によって、毛状根のカナマイシン抵抗性を検定したところ、いずれの品種においても、誘導した毛状根のうち、70%以上の毛状根がカナマイシンに抵抗性を示した。そこで、このような抵抗性クローンについて、 $\beta$ -グルクロニダーゼの活性を組織化学的<sup>9)</sup>に検出し、GUS遺伝子の発現を検討した。Fig. 1-DとFig. 1-Eに、それぞれ陽性染色された毛状根および毛状由来カルス細胞を示す。今回の実験では、カナマイシン抵抗性でGUS染色が陰性のクローンやカナマイシンに感受性であってもGUS染色に陽性を示すクローンも存在したが、得られたカナマイシン抵抗性クローンのほとんどが(宝交早生では20クローン中16、女峰では12クローン中10、とよのかでは11クローン中9クローン)、GUS染色に陽性を示した。これらのカナマイシン抵抗性GUS陽性クローンについては、毛状根から染色体DNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーション分析によって、GUS遺伝子領域が染色体へ組込まれていることを確認した。このようにして遺伝子導入の確認された毛状根クローンを前述の再分化培地に移し、カルス誘導後、再生個体を育成して形質転換体を作出した(Fig. 1-F)。

イチゴの形質転換に関しては、すでにNehraら<sup>5)</sup>が、*A. tumefaciens*を用いて行っている。筆者らの研究室でも同様の方法でイチゴの形質転換実験を行っているが、誘導されたカルス細胞の中に『エスケープ』した細胞が多数混在するため、選択培地で数世代にわたって抵抗性細胞のみを単離する必要があった。一方、*A. rhizogenes*を用いた方法では、誘導された毛状根のカナマイシン抵抗性を一次選抜に使用するため、形質転換体の選抜が非常に容易であった。今回分離したクローンの中には、マーカー遺伝子の一方のみが検出されるものも存在した。この理由については、現在分子レベルから解析を

加えているところであるが、いずれにしても、ほとんどのクローンが両マーカー遺伝子を発現していた。このことは、マーカー遺伝子間に目的とする遺伝子を組込めば、マーカー遺伝子の発現を検出することで、目的遺伝子の宿主染色体への組込みを保証できる可能性があり、効果的な遺伝子導入系として利用できるものと考えている。

*A. rhizogenes*を利用した形質転換系においては、一般に、得られた形質転換体に花粉の稔性低下や種々の形態異常が出現する場合が多い。本研究では、毛状根からの個体再生条件を確立し、これらの条件が異なったイチゴ品種にも適用できることを明らかにしたので、毛状根から得た3品種の再生個体について、葉の形状、矮化の有無、ランナー形成の頻度とランナー個体の生育度、着花率や果実形成などを調査したが、いずれの品種においても、通常の栽培個体と同様の形態ならびに生育度を示した。このような結果を、イチゴにおける特徴として一般化するには、さらに多数の再生個体を解析する必要があるが、少なくとも、今回の結果は、本実験系が我が国の主要イチゴ品種の形質転換に広く利用できることを示唆する。

(1992年10月27日受理)

## 文 献

- 1) Toyoda, H., K. Horikoshi, K. Inaba, S. Ouchi, 1990. Plant Tissue Culture Lett., 7: 38-41.
- 2) Toyoda, H., K. Horikoshi, Y. Yamano, S. Ouchi, 1991. Plant Cell Rept., 10: 167-170.
- 3) Toyoda, H., Y. Matsuda, T. Yamaga, S. Ikeda, M. Morita, T. Tamai, S. Ouchi, 1991. Plant Cell Rept., 10: 217-220.
- 4) Ikeda, S., H. Toyoda, K. Yoshida, K. Koreeda, K. Chatani, S. Ouchi, 1992. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 58: 780-783.
- 5) Nehra, N. S., R. N. Chibbar, K. K. Kartha, R. S. Datla, W. L. Crosby, C. Stushnoff, 1990. Plant Cell Rept., 9: 293-298.
- 6) Toyoda, H., Y. Hosoi, A. Yamamoto, T. Nishiguchi, K. Maeda, T. Takebayashi, T. Shiomi, S. Ouchi, 1991. Plant Tissue Culture Lett., 8: 21-27.
- 7) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 8) Ditta, G., S. Stanfield, D. Colbin, D. R. Helinski, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77: 7347-7351.
- 9) Jefferson, R. A., 1987. Plant Mol. Biol. Rept., 5: 387-405.