

Agrobacterium rhizogenes による Ri プラスミドのアルファルファへの導入

伊井田 実・堀川 洋 (帯広畜産大学)

Introduction of Ri-plasmid into alfalfa (*Medicago sativa* L.) by *Agrobacterium rhizogenes*
Minoru Iida, Yoh Horikawa (Obihiro Univ. of Agric. & Vet. Med.)

緒 言

土壌細菌である *A. rhizogenes* が双子葉植物に感染すると *A. rhizogenes* が持つ Ri プラスミドの作用により形質転換を起こし、生長量が大きく、分岐が盛んな根が発生することが一般に知られている¹⁾。このような根を毛状根と呼び、この根から再生体を誘導すると通常のものとは異なった形質を有する植物体ができる。本実験ではアルファルファを用いて *A. rhizogenes* による形質転換について調査した。

材料及び方法

A. rhizogenes は千葉県農業試験場生物工学研・深見正信氏より分譲を受けた A5 型ミキモピントタイプ²⁾ の野性株を用いた。アルファルファは、キタワカバ、BEAVER、GRIMM を供試した。アルファルファを無菌播種し、各品種について約 300 個体ずつの胚軸部分を *A. rhizogenes* に感染処理した。感染させた胚軸を MS 培地上で暗黒下、25℃ で 3 日間共存培養し、その後 *A. rhizogenes* を除菌するために抗生物質を含む MS 培地に移し、この培地で一週間毎に 4 回移植した。菌感染約 2~3 週間後に胚軸から発生した根の形態的差異が明らかになるまで 8 週間培養し、根の形態に基づいて次の 3 段階に評価した；

I 直根のみか、側根は僅かしかない

II 側根がある程度存在する

III 側根が多く存在し、その間隔が狭い(毛状根)

典型的な毛状根の形態を示す根について *A. rhizogenes* 由来の T-DNA が導入されているかどうかを確認するために、高圧 3 紙電気泳動を行い、パウリ反応によりミキモピンの検出を行った。次に、毛状根から再生体を作成するために毛状根からカルスを誘導し、その再分化を試みた。

結果及び考察

A. rhizogenes の感染によって毛状根を形成した形質転換率 (Fig.1. の III) は、キタワカバで 2.2%、BEAVER で 1.9% とほぼ同じ割合を示したが、GRIMM では毛状根の発生は全く認められなかった。これらの形質転換率の品種間差異は、感染処理時の胚軸部位の大きさに関連するものと考えられる。特に GRIMM で毛状根が得られなかったことは、種子が小さいために幼植物体の成育が劣っていたために、殺菌時及び菌感染時のストレスにより植物体の活性が失われてしまったことが大きな原因と思われる。そのため、十分に生育した植物体の生長点付近に直接接種法で感染させたなら、感染効率も高くなるものと考えられる。

本実験によって得られた毛状根については、コントロールに比べて、根の生長量が大きく、側根の分岐が旺盛で、根の径もやや太い特徴がみられた。また毛状根は、培地から空中に根が飛び出しているものが多く見られたことから根の屈性が減少しているものと思われた (Fig. 2)。本実験で得られた毛状根を高圧ろ紙電気泳動によって分析した結果 (Fig. 3)、毛状根レーンのスポットとミキモピンを産出する小豆変移体³⁾のレーンのスポットが同じ位置に存在した。このことから、本実験で得られた毛状根は、*A. rhizogenes*によって形質転換を起こした植物体特有の形質であるオパインを産出していることが確認された。

毛状根からの再生個体の作出については、現時点ではカルスから再分化誘導を行っている最中である。今後、再生体を作成し、Riプラスミド導入による形態的差異やその遺伝について更に実験を進める予定である。

引用文献

- 1) L. Spano, D. Mariotti M. Pezzotti, F. Damiani and S. Arcioni (1987) Theor. Appl. Genet. 73 : 523 - 530
- 2) 大門 弘幸・深見 正信・三位 正洋 (1990) 植物組織培養 7 : 31-34
- 3) 佐藤 毅・玉掛 秀人・鈴木慶次郎・松川 勲 (1991) 育種・作物学会北海道談話会会報 32

Summary

Hairy roots of alfalfa were obtained by the infection with *Agrobacterium rhizogenes* strain A5. The rate of transformation showing hairy root was 2.2 % for Kitawakaba, 1.9 % for Beaver, however it was not appeared for Grimm. Transformed roots had a distinct

phenotype compared with untransformed controls. Their growth was vigorous and quick, and their morphological characteristic was abundant lateral roots and short internodes. Genetic transformation was confirmed by the presence of mikimopine from Ri-T-DNA.

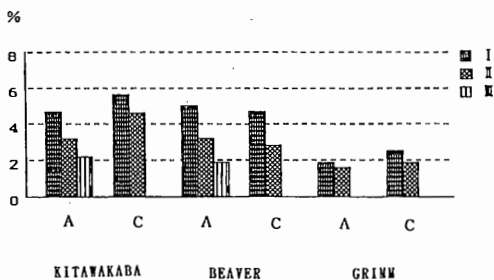


Fig.1. Variety comparison of morphological root characteristic.

- I Only tap root, or little lateral root.
- II A little lateral root.
- III Abundant lateral roots and short internodes (Hairy root).

(A ; *A. rhizogenes* infected, C ; Control)

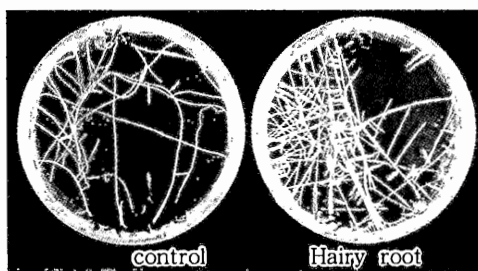


Fig.2. Comparison between hairy root and control.

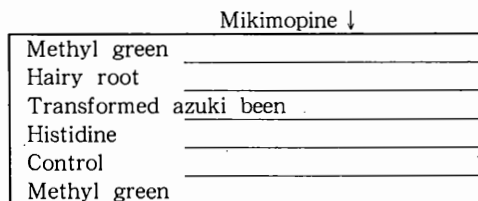


Fig.3. The electrophoretic banding pattern of mikimopine from hairy root.