メロン毛状根の緑化誘導条件の検討

松田 克礼**・豊田 秀吉*・上田 亜由美*
環 早 恵*・細井 好之*・大内 成志*,**

* 近畿大学農学部 ** 近畿大学農学総合研究所

Establishment of Photosynthetic Hairy Roots in Cultures of
Melon Leaves (*Cucumis melo* L.)Yoshinori MATSUDA,** Hideyoshi TOYODA,* Ayumi UEDA,*
Sae TAMAKI,* Yoshiyuki HOSOI* and Seiji OUCHI*,**

*Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631, Japan

**Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University, Nara 631, Japan

The potential traits of photosynthetic and photoautotrophic growth of hairy root derived from co-cultures of *Cucumis melo* L. with *Agrobacterium rhizogenes* were investigated. Thirty-two different lines of hairy roots induced from leaf-explants of the plant were used to determine the conditions which favor the induction of photoautotrophy. Although all of the hairy root lines remained white under dark condition, some of them turned yellow green to pale green when incubated in MS medium containing low concentration of sucrose and supplemented with a buffer releasing CO₂. One of the initially heterotrophic hairy root cultures, KMH-18, turned green rapidly, produced chlorophyll, and grew well depending on CO₂ fixation under these conditions.

(Received July 9, 1996)

1996年7月9日受付

温室メロンの根が土表面に浮き出てくる異常症状は、土壌病原細菌の一つである *Agrobacterium rhizogenes* の感染によって起こることが明らかにされ、メロン毛根病と呼称されるようになった (Shiomi *et al.*, 1987). 現在では、この病原菌の保持する Ri プラスミドは、形質転換のためのベクターとして利用されるに至っている。毛状根由来の再生植物には、短節間、頂芽優勢性低下など種々の遺伝的変異が認められ (Tepfer, 1984; Toyoda *et al.*, 1993), それらが新たな育種素材となる可能性が示されている。一方、毛状根は通常の根と比較して生育が速いこと、また、脱分化した培養細胞より安定した分化器官として維持できることなどから二次代謝産物の生産器官として利用されている (Payne *et al.*, 1987; Jaziri *et al.*, 1988). 通常、根は植物の従属栄養器官として土中に生育している

が、近年、20種類以上の植物種において光合成能力の誘導された培養細胞が報告され (Widholm, 1992), 従属栄養、独立栄養ならびにそれらの二つを合わせて持つ培養細胞の二次代謝産物の解析が試みられるようになっている (Ikemeyer and Barz, 1989). 筆者らは、*A. rhizogenes* をメロンに感染させることによって毛状根が誘導できること、および、植物の形質転換ベクター (pBI121) を導入した *A. rhizogenes* の感染によって毛状根へ外来遺伝子の導入が可能であることを既に報告している (Toyoda *et al.*, 1991). そこで、本報告では、これらの毛状根の利用範囲をさらに拡大するため、*A. rhizogenes* によって誘導されたメロン毛状根の緑化誘導条件を検討し、光独立栄養系統の選抜を試みることにした。

本実験には、*Agrobacterium rhizogenes* MAFF 07-

20001 株を使用した。本菌の培養には、L-broth (1% バクトトリプトン, 0.5% イースト・エキストラクトおよび 1% NaCl) を使用し、30°C で 24 時間振とう培養して得た菌懸濁液を接種源とした。供試植物としては、メロン (*Cucumis melo*) 品種アールスフェバリットを使用し、リーフディスク法によって本菌を接種した (Toyoda *et al.*, 1991)。まず、ビニールハウスで生育したメロンから上位葉を採取し、水洗した後、70% エタノールに 30 秒間、Tween 20 を添加した 1% 次亜塩素酸ナトリウムに 2 分間浸漬して表面殺菌した。これらの葉を滅菌水で 3 回洗浄し、1 cm² に切断した後、上記の接種源に 5 分間浸漬し、さらに、素寒天プレート上で 1 日間培養した。その後、接種葉外植片を 500 μ g/ml のカルベニシリンを添加したホルモン無添加の Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) 培地に置床し、26 $\pm$ 1°C、4 000 lx の連続照明下で 2 週間培養して、*A. rhizogenes* の除菌を行うとともに毛状根を誘導した。

誘導された毛状根を葉外植片から切断した後、500 μ g/ml のカルベニシリンを添加したホルモン無添加 MS 寒天培地に移植し、活発な増殖を示す毛状根を 5 日間隔で 5~6 回継代培養した。得られた毛状根 (0.5 g)

Stage I:

Induced hairy roots (0.5 g) were placed into MS liquid medium (without plant growth regulators) containing 3% sucrose under the dark condition.

Stage II:

After 4 weeks incubation, 3 g hairy roots were transferred to MS medium supplemented with 1% sucrose under the light condition (4 000 lx).

Stage III:

After 2 weeks incubation, 3 g hairy roots were transferred to MS medium containing 0.3% sucrose under similar light condition.

Stage IV:

After 2 weeks incubation, 3 g hairy roots were placed into the modified two-flask system as shown in Fig. 2. MS medium contains 0.3% sucrose and cultures were supplemented with an enriched 2% CO₂ atmosphere. Light condition was kept at 4 000 lx.

Stage V:

After 2 weeks incubation, 1 g hairy roots were finally placed into MS medium without sucrose and 2% CO₂ atmosphere under the same light condition.

Fig. 1 Photosynthetic root cultures.

We used this protocol to obtain photosynthetic hairy root cultures.

を種々の濃度の 2, 4-D (0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 μ g/ml) とカイネチン (0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 μ g/ml) を組み合わせた MS 固型培地に置床し、26 $\pm$ 1°C、4 000 lx の連続照明下で 1 カ月間培養し、毛状根の形態変化を観察した。一方、ホルモン無添加培地で 5~6 回継代培養した毛状根に Maldonado-Mendoza and Loyola-Vargas (1995) らの方法を改良して適用し、培養を行った (Fig. 1)。すなわち、MS 固型培地で継代培養した毛状根 (0.5 g) を MS 液体培地に移植し、26 $\pm$ 1°C、暗黒条件下で 4 週間培養した。約 3 g に生育した毛状根をショ糖濃度を 1% に減少させた MS 液体培地に移植し、4 000 lx の連続照明下で 2 週間培養した後、MS 液体培地のショ糖濃度を 0.3% に低下させ、同じ照明下においてさらに 2 週間培養を行った。次に、Husemann and Barz (1977) らによって考案された two-flask システムを改良し (Fig. 2)、ショ糖濃度を 0.3% に調整した MS 液体培地に毛状根を移植した後、CO₂ の供給は Flores *et al.* (1993) の方法によって 2% の CO₂ を供給して、2 週間培養した。さらに、培養毛状根をショ糖無添加の MS 液体培地に移植し、2% の CO₂ を炭素源として同じ連続照明下で培養した。

以上の方法によって毛状根を誘導したところ、MAFF07-20001 を接種した葉の切断面から培養 10 日後には根が誘導され、2 週間後には、80% の葉外植片から 2~4 本の発根が認められた。本菌を接種しなかった対照区では若干のカルス形成が認められたものの、根は誘導されなかった。それぞれ 32 個の葉外植片から根を 1 本ずつ選抜し、さらに、MS 寒天培地 (ホルモン無添加) で培養を行ったところ、それらのすべてにおいて活発な増殖・伸長が認められたことから、これらの

Fig. 2 Scheme of the modified two-flask system.

For providing enriched CO₂ atmosphere (2%), CO₂-releasing buffer (C) poured into a small bottle (B) fixed with MS medium containing 0.8% agar (E). Finally, liquid MS medium (D) was poured onto the solidified MS medium (E), and hairy roots were incubated in the culture bottle (A).

32 系統が MAFF07-20001 によって誘導された毛状根であることが確認された。

これら 32 系統のうち、特に、増殖・伸長が活発であった KMH-16 および -18 系統を 2,4-D とカイネチンを組み合わせた 121 通りの各濃度区で培養したところ、KMH-16 は高濃度の 2,4-D ($1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上) およびカイネチン ($0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上) を添加した濃度区において根毛部分に顕著なカルスが形成された。カルスが誘導された KMH-16 をさらに、同じホルモン濃度区で継代培養したところ、誘導されたカルスと毛状根部分が薄い黄緑色に変化した。また、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ の 2,4-D と $0.5 \mu\text{g/ml}$ のカイネチンを含む濃度区では、胚様体が形成され、多数の幼植物体が再生された。一方、KMH-18 は、置床したすべての濃度区において若干のカルス誘導とその緑化が認められ、特にホルモン無添加の区においては毛状根に薄い緑化が確認された。しかしなが

ら、この培養方法では、毛状根は黄緑色または淡い緑色を呈したものの、すべてのホルモン濃度区においても強い緑化は認められなかった。

一方、32 系統の毛状根を 1% のショ糖を添加した MS 液体培地で培養し、2 週間後にショ糖を 0.3% に低下させた MS 液体培地に移植した場合には、すべての系統において増殖度の若干の低下が見られたものの、毛状根の緑化は認められず、淡い黄緑色を呈するに留まった。次に、それらの毛状根を 2% の CO_2 を供給する培地に移したところ、培養 2 週間後に毛状根が緑色に変化する五つの系統 (KMH-4, -5, -16, -18, -21) が得られた。他の 27 系統については、根の先端部分に若干のカルスが形成され、それらカルスはわずかに緑化したが、毛状根の緑化は認められなかった。これら緑化 5 系統 (KMH-4, 5, 16, 18, 21) をさらに、ショ糖無添加の MS 培地に移植し、2% の CO_2 を供給したところ、培養 2 週間後に主根部分が濃緑色に変化した (Fig. 3)。しかし、これら 5 系統も暗黒下で培養した場合には、緑化する傾向は認められなかった。得られた緑化毛状根については、Arnon (1949) の方法に従ってクロロフィルを抽出し、定量した。その結果、KMH-18 のクロロフィル含量は、3% ショ糖添加培地で暗黒下培養した場合には $3.0 \mu\text{g/g}$ であったのに対し、Fig. 1 に示した緑化条件下では、 $150 \mu\text{g/g}$ に達し、顕著な増加を示した (Table 1)。また、KMH-18 系統はショ糖無添加の培地においても増殖・伸長したことから、本系統は根に葉緑体を形成し、供給した CO_2 を炭素源として光合成を行っていると考えられた。 CO_2 の固定能力については、現在詳細に検討している。

以上の結果は、本実験で明らかにした培養方法 (Fig.

Fig. 3 Heterotrophic and photoautotrophic hairy root cultures.

A, Heterotrophic hairy root culture line KMH-1 in photosynthetic culture for 14 days; B, Photoautotrophic hairy root culture (KMH-18) of *C. melo* grown in photosynthetic culture for 14 days.

Table 1 Coloration and chlorophyll contents of hairy root lines induced to photoautotrophy.

Lines	Color of hairy root	Growth (g) in photosynthetic culture ^z	Chlorophyll contents ^y
KMH-4	yellow-green	1.0 ± 0.21	27.7 ± 1.77
KMH-5	yellow-green	1.0 ± 0.21	21.0 ± 3.21
KMH-16	green	1.5 ± 0.17	73.3 ± 4.11
KMH-18	green	2.1 ± 0.11	150.4 ± 11.13
KMH-21	yellow-green	1.0 ± 0.23	34.6 ± 1.51
Control	white	1.0 ± 0.14	2.5 ± 0.21

^z Photosynthetic culture; roots (1.0 g) were transferred to no sucrose medium supplemented with 2% CO_2 as a sole source of carbon and incubated under continuous light (4 000 lx).

^y Total chlorophyll contents ($\mu\text{g/g}$).

1)を用いることによって通常の従属栄養毛状根から光独立栄養毛状根を誘導・選抜することが可能であることを示唆する。

光独立栄養毛状根は、*Datura stramonium* や *Acmella oppositifolia* などから誘導されており、アルカロイドやポリアセチレンなどの生合成に利用されている。筆者らは、メロンから誘導した毛状根やタバコから誘導した毛状根の再生個体などを用いて河川・湖沼水の富栄養化の原因となっているリンおよび窒素の吸収能力を検討している。しかしながら、これまでの単純毛状根の利用では炭素源の供給が必須となり、実用的でない。本報で確立した緑化毛状根の誘導条件を活用し、リンおよび窒素の吸収能力の高い光独立栄養毛状根系を選抜することができれば毛状根を利用した実用的富栄養化水の浄化システムが確立されるものと考え

文 献

- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Flores, E. H., Dai, Yao-ren, Cuello, J. L., Maldonado-Mendoza, I. E., Loyola-Vargas, V. M. 1993. Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiol.* **101**: 363-371.
- Husemann, W., Barz, W. 1977. Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures from *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plant.* **40**: 77-81.
- Ikemeyer, D., Barz, W. 1989. Comparison of secondary product accumulation in photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic *Nicotiana tabacum* cell suspension culture. *Plant Cell Rept.* **8**: 479-482.
- Jaziri, M., Legros, M., Homes, J., Van Haelen M. 1988. Tropine alkaloids production by hairy root cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Phytochemistry* **27**: 419-420.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Loyola-Vargas, V. M. 1995. Establishment and characterization of photosynthetic hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **40**: 197-208.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Payne, J., Hamill, J. D., Robins, R. J., Rhodes, M. J. C. 1987. Production of hyoscyamine by hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med.* **53**: 474-478.
- Shiomi, T., Shirakawa, T., Takeuchi, S., Oizumi, T., Uematsu, S. 1987. Hairy root of Melon caused by *Agrobacterium rhizogenes* Biovar 1. (Japanese text with English abstract) *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* **53**: 454-459.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transformation of the transformed genotype and phenotype. *Cell* **47**: 959-967.
- Toyoda, H., Hosoi, Y., Yamamoto, A., Nishiguchi, T., Maeda, K., Takebayashi, T., Shiomi, T., Ouchi, S. 1991. Transformation of Melon (*Cucumis melo* L.) with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Tissue Culture Lett.* **8**: 21-27.
- Toyoda, H., Kami, C., Sumitani, K., Zheng, S. J., Hosoi, Y., Ouchi, S. 1993. Transformation of Japanese cultivars of strawberry with *Agrobacterium rhizogenes*. (Japanese text with English abstract) *Plant Tissue Culture Lett.* **10**: 92-94.
- Widholm, J. M. 1992. Properties and uses of photoautotrophic plant cell cultures. *Int. Rev. Cytol.* **132**: 109-175.