

### 第 3 章 組換え DNA 育種法

ある生物種からクローン化された有用遺伝子を他の生物種へ導入するのが組換え DNA 育種である。すでにトマトでは果実の貯蔵性の高い品種の育成などにかかる手法を用いた品種育成が現実化した (Oeller ら, 1991)。アズキにおいてもかかる遺伝子導入系の確立がきわめて重要である。

外来遺伝子を植物に直接導入する方法としては、エレクトロポレーション法 (Fromm ら, 1986; Nishiguchi ら, 1987a, 1987b; Rhodes ら, 1988; Shimamoto ら 1989), ポリエチレングリコール法 (Krens ら, 1982; Hayashimoto ら, 1990), パーティクルガン法 (Klein ら, 1987, 1989, 1990; McCabe ら 1988; Fromm ら, 1990; Tomes ら, 1990; Gordon-Kamm ら, 1990) などがあり、一方ウイルスや土壤細菌の一種であるアグロバクテリウムを媒介と Ti プラスミドによる方法も可能となった (Horsch ら, 1985)。このうち、アグロバクテリウム法は双子葉植物に広く用いられている遺伝子導入法であるので、双子葉植物であるアズキにおいても応用可能と思われる。本章では *Agrobacterium tumefaciens* を用いた遺伝子導入系を確立するため、まず、カナマイシン耐性遺伝子 (NPT II) の導入実験を行い、それを利用して  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子 ( $\alpha$ AI) の導入を試みた。また、*A. rhizogenes* による形質転換体の作出も検討した。

#### 第 1 節 *Agrobacterium tumefaciens* による形質転換体の作出

*A. tumefaciens* は植物に感染すると Ti プラスミド上の T-DNA 領域が植物細胞に移行し、宿主植物細胞の染色体に組み込まれる。このような T-DNA の植物細胞への転移と染色体への組み込みでは T-DNA 内部の遺伝子の全てが必要なのではなく T-DNA の両端にある 25 塩基対からなる境界配列、Ti-プラスミド上の *vir* (*virulence*) 領域などの遺伝子群が必要で、もしこれらの境界配列の間に目的とする外来遺伝子やプロモーターを挿入したアグロバクテリウムを接種すれば、形質転換植物を作成することができる (町田 1989)。

そこで、本節では *Agrobacterium* を利用して NPT II 遺伝子の導入を試みた。

##### 材料及び方法

##### 1) 供試材料

アグロバクテリウムを感染させる外植片としては無菌

的に発芽させた幼植物体の上胚軸を用いた。これらの上胚軸の調製方法は第 1 章と同じである。

品種はエリモショウズ、ハツネショウズ及びカムイダイナゴンをを用いた。

##### 2) 培地

基本培地は MS 培地であり、処理別の培地組成、すなわち、アズキ上胚軸のカナマイシンに対する感受性試験やアグロバクテリウムを感染させる共存培養用の培地、及びカナマイシンで選抜した培地等の組成を以下に記す。

上胚軸にアグロバクテリウムを接種する感染培地は MS 基本培地に 20 g/l グルコースを添加したホルモンフリーの液体培地を用いた。

菌と上胚軸外植片との共存培養培地は MS 基本培地に、30 g/l ショ糖、ホルモンとして 0.06 mg/l BAP もしくは、2 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA, 1 g/l カサミノ酸, 8 g/l 寒天を添加した。

除菌培地は、MS 基本培地に、30 g/l ショ糖, 8 g/l 寒天に 500 mg/l カーベニシリン, もしくは、500 mg/l クラフォランを添加し、ホルモン組成は共存培地と同様にした。

選択培地は、除菌培地に 50 mg/l カナマイシンを添加し、培養開始 1 か月後にカーベニシリンを 250 mg/l に減じた。

また、形成された不定芽の発根用培地としては MS 基本培地に、20 g/l ショ糖と 50 mg/l カナマイシンを添加し、ホルモンは添加しなかった。

##### 3) アグロバクテリウム系統及びプラスミド

使用したアグロバクテリウムは LBA 4404 (Bevan, 1984) で、T-DNA 領域を欠失し、*vir* 領域を保持している Ti プラスミド (pAL 4404) を持つバイナリーベクターシステムである。

用いたプラスミドは、pBI 121 で T-DNA の転移と植物染色体 DNA への組み込みに必要な働きを有する左右境界配列 (25 bp) を持ち、この配列の間にカナマイシン耐性遺伝子である NPT II 遺伝子と GUS ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) 遺伝子を持つものである (プロモーターおよびターミネーターは Fig. 3-1 に記載した)。GUS 遺伝子 (Jefferson ら, 1987) は大腸菌由来の遺伝子で基質 (4-methylumbelliferyl glucuronide) を反応させることにより、遺伝子が発現していれば紫外線下で蛍光を発す

る。したがって反応によって生じた 4-MU を蛍光分光光度計で測定することにより GUS 遺伝子を定量化できる。なお、植物においては、ほとんどその酵素活性が観察されないため感度良く測定できる。

4) アグロバクテリウムの感染方法

アグロバクテリウムの感染から植物体の再分化に至る作業手順の概略を Fig. 3-2 に示した。抗生物質 (50 mg/l kanamycin, 20 mg/l rifampicin, 125 mg/l streptomycin) を含む LB 培地 (10 g/l Bacto-tryptone, 5 g/l Bacto-yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7.0) で一晩培

養したアグロバクテリウム LBA 4404 を遠心し、沈澱をホルモンフリーの MS 液体培地に懸濁した。その懸濁液に約 10 mm に切断した上胚軸を浸して感染させた。ろ紙で余分なアグロバクテリウムを除き、上胚軸を寒天培地にシャーレ当たり 15 本置床し、23°C 暗黒下で 2~4 日間共存培養した (Plate V-5A)。その後上胚軸をカーベニシリンを含む液体培地で洗浄後、除菌培地にシャーレ当たり 15 本移植し、25°C, 3,000 lux で 1 週間培養した。次にカナマイシンを含む選択培地に移植し、選抜を開始した。選択培地上で形成された不定芽はホルモン

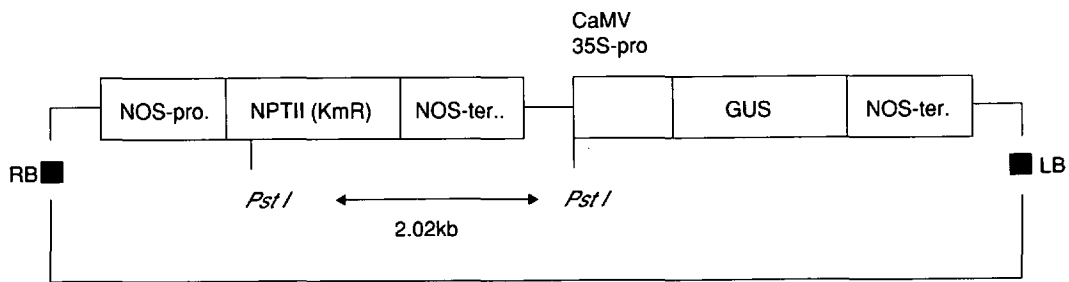


Fig. 3-1. Construct of pBI 121 plasmid used in this experiment.  
 Nos-pro and Nos-ter: Nopaline synthetase gene promoter and terminator, respectively.  
 NPT II: Neomycine phosphotransferase.  
 35S-pro: Califlower mosaic virus 35S promoter.  
 GUS:  $\beta$ -glucuronidase.  
 RB: Right border, LB: Left border.

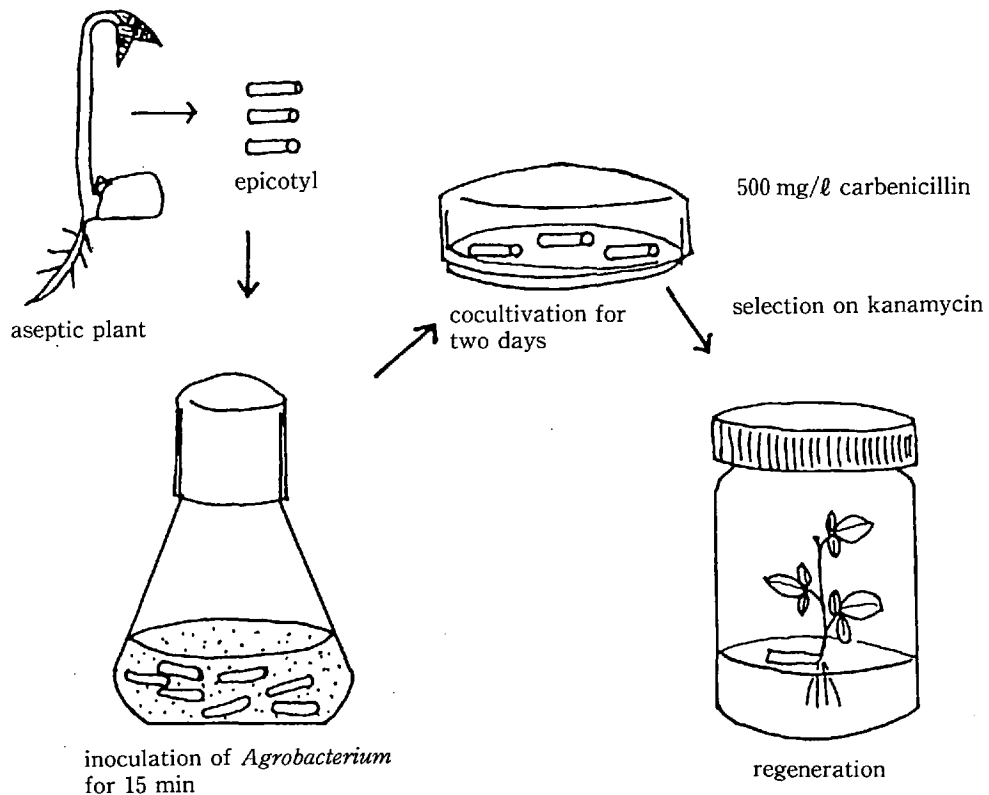


Fig. 3-2. Scheme of transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

フリー培地で伸長させるとともに発根を促した。この場合、培養器にはガラスの培養瓶(φ 55 mm×110 mm)を用いた。

#### 5) NPT II 遺伝子の検出

全 DNA の抽出方法は、まずカナマイシン耐性個体の葉を粉碎し、その抽出液に TE (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA) 飽和フェノールを加え 12,000 rpm で 5 分間遠心した。上清にフェノールとクロロホルムを等量混合した溶液を加えて遠心し、これを 2 回繰り返した。その上清に 3 M 酢酸ナトリウムと 100% のエタノールを加え、-20°C で 30 分間放置した。次いで遠心し、沈澱を 70% エタノールで洗浄後、真空ポンプで吸引して乾燥させた。それに TE を加え DNA を溶解させた。さらに、RNA を除去するために、1 μg/μl RNase を含む TE を加え、55°C で 1 時間反応させた。反応後、20% の PEG を加え 0°C で 1 時間放置した。その後 14,000 rpm, 10 分間遠心し、沈澱を 70% エタノールで洗浄後、乾燥させ、それを TE に溶解した。

サザンブロッティングは ECL 遺伝子検出システム (アマシャムジャパン社) を利用した。基本操作はアマシャムのプロトコールにしたがった。すなわち、抽出した DNA を制限酵素 Pst I で分解後 0.8% のアガロースで電気泳動した。泳動後ナイロンメンブランフィルターにトランスファーした。フィルターはハイブリダイゼーション液で 20~30 分間プレハイブリダイゼーションした後、酵素 (西洋ワサビパーオキシダーゼとポリエチレンイミン複合体) 標識したプローブを加え、42°C で約 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。16 時間後 2 回洗浄し非特異的に結合しているプローブを除去したフィルターを検出試薬に 1 分間浸漬した後、フィルターと高感度フィルムを重ねて化学ルミネセンス反応による励起光を露光させて、これを現像した。また、プローブとしてはプラスミド pBI 121 全塩基配列を用いた。

#### 6) GUS 遺伝子の検出

形質転換体の葉を lysis バッファー (50 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium lauryl sarcosine, 10 mM β-mercaptoethanol) で内容物を抽出後、1 mM の 4-methyl umbellifer-yl glucuronide (MUG) を加え 37°C で 1 時間反応させた。1 時間後に 1 M の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて酵素反応を停止した。その反応液を紫外線で照射することによって GUS の発現を検出した。このシステムでは遺伝子が発現していれば反応液は青白く蛍光を発する。

#### 結果

まず、カナマイシン濃度を決定するために上胚軸のカ

Table 3-1. Effect of kanamycin concentrations on callus formation from epicotyls

Kanamycin conc. (mg/l)	No. of epicotyl	Color of explant on Km medium <sup>1)</sup>	Frequency (%) of callus formation <sup>2)</sup>
0	20	green	100
25	20	pale green	100
50	20	yellow	5
75	20	yellow	0
100	20	yellow	0

1) MS medium containing kanamycin.

2) Frequency was counted 2 weeks after transfer to the Km medium.

ナマイシンに対する感受性について検討した (Table 3-1)。すなわち、MS 培地にカナマイシンを 0, 25, 50, 75, 100 mg/l 添加した培地上胚軸をシャーレ当たり 10 本ずつ置床した (Plate V-5B)。培養条件は 25°C, 3,000 lux (16 時間日長) とし、2 週間後に上胚軸の色とカルス形成率を調査した。なお、各濃度区について 2 シャーレずつ供試した。これによると、25 mg/l ではカルス形成についてはほとんどカナマイシンの影響がみられず、対照区と同様、100% の形成率であり、上胚軸の色も緑であった。50 mg/l ではカルス形成率は 5% と大きく低下した。さらに 75 mg/l 以上では 0% となった。これらの上胚軸の色は淡い黄色に変化していた。したがって、培養初期から高濃度で選抜を行うと上胚軸が枯死するおそれがあるので、カナマイシンの濃度としては 50 mg/l が適当と思われた。

次にアグロバクテリウムの接種時間を 5, 10, 15, 30 分としてカルス形成率と再分化率を比較した (Table 3-2)。カルス形成率はいずれの区でも 90% 前後で高く、接種時間による差は明らかではなかった。また、不定芽の発生はエリモショウズでは 15 分区が他の処理区よりも高い再分化率を示した。ハツネショウズでは 10 分と 15 分の各処理区のみであったが、10 分区の方で不定芽形成率が高い結果となった。また、選抜培地上で発根をみたのは両品種とも 15 分区のみであった。これらの結果から接種時間としては 15 分が適当と思われた。

次に、アグロバクテリウムを除菌するための抗生物質について比較した結果を Table 3-3 に示した。これによると除菌培地の抗生物質としてクラフォランよりもカーベニシリンを用いた場合、エリモショウズ、カムイダイナゴンの両品種において不定芽形成率が高い傾向にあった。さらにカーベニシリンを用いた方が、不定芽形成に要する期間が短く、また、カナマイシン培地における発根率は両品種とも高い傾向にあった。

Table 3-2. Effect of inoculation period on the callus, shoot and root formation on the selection medium<sup>1)</sup>

Cultivar	Inoculation period (min)	No. of epicotyls	Frequency (%) of callus formation	No. of shoots	Rooting medium <sup>2)</sup>	
					No. of plants	Rooted plants
Erimo-shozu	5	50	88	3	—	— <sup>3)</sup>
	10	50	90	8	6	0
	15	55	100	15	6	1
	30	50	96	6	—	—
Hatsune-shozu	10	50	80	14	6	0
	15	50	95	10	6	1

1) MS medium containing 50 mg/ℓ kanamycin.

2) Rooting medium was MS medium containing 50 mg/ℓ kanamycin, without plant growth regulators.

3) Not tested.

Table 3-3. Frequency of shoot and root formation on the selection medium containing kanamycin<sup>1)</sup>

Cultivar	Medium		<i>Agrobacterium</i> <sup>1)</sup>	Antibiotics <sup>2)</sup>	Acetosyringon	Frequency (%) of shoot formation	Frequency (%) of root formation
	BAP (mg/ℓ)	NAA					
Erimo-shozu	0.06		—	—	—	50(15/30) <sup>3)</sup>	—
			+	Claf.	—	16(12/76)	10(1/10)
			+	Claf.	+	16(12/75)	20(2/10)
			+	Carb.	—	28(25/90)	20(4/20)
			+	Carb.	+	29(25/87)	28(7/25)
Erimo-shozu	2.0	0.1	—	—	—	40( 4/10)	—
			+	Claf.	—	35(23/65)	9(2/22)
			+	Claf.	+	43(33/76)	13(4/31)
Kamui-dainagon	0.06		—	—	—	45( 9/20)	0(0/ 7)
			+	Claf.	—	35(19/55)	16(2/12)
			+	Claf.	+	44(24/54)	7(1/15)
			+	Carb.	+	45(25/55)	16(2/16)
Kamui-dainagon	2.0	0.1	—	—	—	33( 5/15)	0(0/ 3)
			+	Claf.	—	4( 2/50)	0(0/ 2)
			+	Claf.	+	11( 5/44)	0(0/ 3)
			+	Carb.	+	34(24/70)	13(2/15)

1) pBI 121 was used as plasmid vector.

—: Explants were not inoculated with *Agrobacterium*.+: Explants were inoculated with *Agrobacterium*.

2) Claf.: Claforan, Carb.: Carbenicillin.

3) Number of shoot-forming explants/No. of tested explants.

4) Number of root-forming explants/No. of tested explants.

カーベニシリンに比べクラフォランを用いた場合に褐変する切片が多かった。クラフォランの含まれる培地でホルモンの種類を比較するとエリモショウズにおいて 0.06 mg/ℓ BAP を用いた場合で、また、カムイダイナゴンにおいて 0.1 mg/ℓ NAA と 2.0 mg/ℓ BAP を用いた場合で不定芽形成率が低かった (Table 3-3)。なお、カーベニシリンで形成された不定芽に比べクラフォランを含

む培地で形成された不定芽の生育が劣る傾向がみられた。以上の結果から抗生物質としては、カーベニシリンの方が適していると思われた。

また、エリモショウズでは、*vir* 遺伝子の発現を誘発するアセトシリンゴンを添加した培地で共存培養した後、クラフォラン及びカーベニシリンの抗生物質がそれぞれ含まれている培地で培養し、形質転換に及ぼす効果を比

較した。これによるとアセトシリングンの含まれた培地で共存培養した場合には不定芽を形成するまでの期間が短かったが、形成率には差がみられず、また、発根培地におけるカナマイシン耐性個体率にも若干高い傾向がみられ、また、カムイダイナゴンでは、クラフオランのみの比較であったが、アセトシリングンを添加した培地で共存培養しても不定芽が形成するまでに要する期間に差がみられなかった。また、0.06 mg/l BAP の培地ではエリモショウズの場合と同様、不定芽形成率に顕著な差はみられなかった。これらにより、アセトシリングンの効果は明らかではないが、発根率はこの試験全体でみる限り高い傾向にあり、共存培養培地にはこの物質を添加した方が良いと思われた。

アグロバクテリウムの接種時間を15分にして抗生物質をカーベニシリンにして形質転換効率を検討したのがTable 3-4である。アグロバクテリウムの非感染区では不定芽形成率がエリモショウズでは88%、ハツネショウズでは78%であった。その不定芽をカナマイシンを含む選択培地にそれぞれ10個移植したところ、いずれも発根せず、不定芽の生長もほとんどみられなかった(Plate V-5C)。アグロバクテリウムを感染させてカナマイシンで選抜した区ではエリモショウズで63%、ハツネショウズで51%の不定芽が形成された。その不定芽を発根培地に移植したところエリモショウズで8個体(18%)、ハツネショウズで6個体(20%)が発根した。

さらにNPT II遺伝子の導入を確認するために上記のエリモショウズより任意に選んだ6個体の葉から全DNAを抽出し、これらを制限酵素Pst Iで切断してpBI 121をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った(Fig. 3-3)。もし、NPT II遺伝子が導入されていればPst I断片の2.02 kbpの位置にハイブリダイゼーション

シグナルの出現が期待されたが実際に個体番号1, 2, 6でそのシグナルが認められた。したがってこれら3個体にはNPT II遺伝子が導入されたと考えてよい。

NPT IIで形質転換されたエリモショウズ3個体を温室に鉢上げした。形質転換個体の外部形態は通常のアズキとほぼ同様であり、開花して、結実をみた。3個体のうちの結実した2個体からの種子について、カナマイシンを含む培地(50 mg/l)で発根試験を行い、カナマイシン耐性を調べた(Table 3-5)。MS培地でコントロールのエリモショウズとともに無菌的に発芽させ、莖長5~6

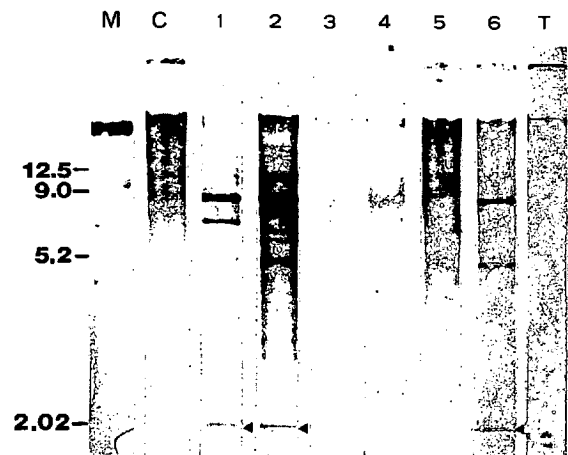


Fig. 3-3. Southern blot analysis of kanamycin resistance gene.

Total DNAs from both kanamycin resistant and control plants were digested with restriction endonuclease, *Pst* I, and hybridized to pBI 121 as probe.

M: Size marker, C: Control, T: Tomato leaf.

O-5: Resistant plants.

2.02 kbp: Size of NPT II gene.

Table 3-4. Transformation by *A. tumefaciens* harbouring pBI 121

Cultivar	<i>A. tumefaciens</i>	Frequency (%) of shoot <sup>1)</sup> formation	Frequency (%) of root <sup>1)</sup> formation	Frequency (%) of plants having NPT II
Erimo-shozu	- <sup>2)</sup>	88(90/102) <sup>3)</sup>	0(0/10) <sup>4)</sup>	
	+	63(63/100)	18(8/45)	50(3/6) <sup>5)</sup>
Hatsune-shozu	-	78(80/102)	0(0/10)	
	+	51(52/101)	20(6/30)	

1) Frequency of shoot and formation was counted on the selection medium containing 50 mg/l kanamycin.

2) -: Not inoculated with *Agrobacterium*, +: Inoculated with *Agrobacterium*.

3) Number of shoot-forming explants/Number of tested explants.

4) Number of root-forming explants/Number of tested explants.

5) Number of NPT II-having plants/Number of tested plants.

Table 3-5. Root formation from control plants and transgenic progeny plants on the Km medium

Plant tested	Km conc. (mg/l)	No. of plants	No. of rooting plants	No. of not rooting plants
<u>Control</u>				
Erimo-shozu #1	0	10	10	0
Erimo-shozu #2	50	10	0	10
<u>Transgenic progeny</u>				
ET1	50	6	4	2
ET2	50	8	5	3

cm くらいまで生育させた後、50 mg/l のカナマイシンを含む培地に移植して新たに根を発生するか否かを調査した。まず、コントロールのエリモショウズでは、カナマイシンを含まない培地では100%発根をみたが、カナマイシンを含む培地では全く発根しなかった。これに対し ET 1 (個体番号1) と ET 2 (個体番号2) の自殖後代では、それぞれ4個体と5個体が発根し、残りの2個体と3個体では全く発根しなかった。したがってこれらの発根個体では ET 1 と ET 2 に導入された NPT II が自殖を通して次代へ遺伝したと思われる。供試個体数が少なかったため自殖次代における NPT II の分離比は明らかでなかったが非発根個体すなわちカナマイシン感受性個体を分離したことから少なくとも ET 1 と ET 2 にはそれぞれ NPT II が1コピーずつ導入されていた可能性が高い。

発根した ET 1 のうち1個体の葉をすりつぶして内容を抽出し、マイクロチューブ内でその抽出物と MUG と反応させた。反応液の入ったマイクロチューブを紫外線を照射して GUS 遺伝子の活性をみたところコントロールに比べて蛍光のレベルに差がみられ、GUS 遺伝子の発現が確認された (Fig. 3-4)。

## 第2節 *A. rhizogenes* による形質転換体の作出

土壌細菌 *A. rhizogenes* の Ri プラスミド中の T-DNA が植物染色体に組み込まれる機構は、基本的には *A. tumefaciens* の Ti プラスミドの場合と同様であるが、感染組織片から毛状根を生じることが特徴である (Tepfer, 1990)。

毛状根の発生に関与する毛状根誘導遺伝子群としては、*rol* (root loci) A, *rol*B, *rol*C, 及び *rol*D (D の存在しない Ri プラスミドもある) が同定されている (齊藤と山崎, 1993)。この毛状根は植物ホルモンを含まない培地でも根の形態や生理的特性を維持しながら活発に増殖し、その特性を利用する様々な試みがなされている。代

表的な利用法としては植物の根で特異的に生産される二次代謝物質の合成の試みがある。

また、毛状根から植物体が再分化することも知られており、培養中に自然に植物体が再生したり、植物ホルモンや光の存在下で植物体の再分化する場合がある。毛状根からの再分化個体は一般に節間がつまって矮化し、葉が幅広になって波打つなど、正常の植物体に見られないような変異に富む個体が出現する。

アズキにおいてはこれまで *A. rhizogenes* による形質転換の報告がなかったため、本章では、まず、*A. rhizogenes* による毛状根の誘導と毛状根からの再分化系の確立を試みた。

### 材料及び方法

#### 1) 供試材料

*A. rhizogenes* を感染させる外植片としては無菌的に養成したハツネショウズ、黄金大納言、及びカムイダイナゴンの上胚軸と初生葉を用いた。

#### 2) *A. rhizogenes* の菌株

本実験に供試した *A. rhizogenes* の A5, A13 株は千葉県農業試験場、大門弘幸博士 (現大阪府立大学農学部) から分譲を受けた。これらはメロンに感染させた菌より単離された株である。なお、これらの菌の合成するオパインは、ミキモピン型である。

#### 3) 培地

菌と上胚軸切片を共存培養させる培地にはホルモンフリーの MS 培地へ 30 g/l ショ糖と 8 g/l 寒天を添加したものを用い、除菌培地としてはこれに 500 mg/l カーベニシリンと 200 mg/l バンコマイシンを添加したものをを用いた。

形成された毛状根の再分化培地には、MS 基本培地に 30 g/l ショ糖、8 g/l 寒天、及びホルモンとして NAA, BAP, カイネチン、ゼアチンを添加した培地を用いた。

#### 4) アグロバクテリウムの接種方法

*A. rhizogenes* の接種方法は *A. tumefaciens* の場合に

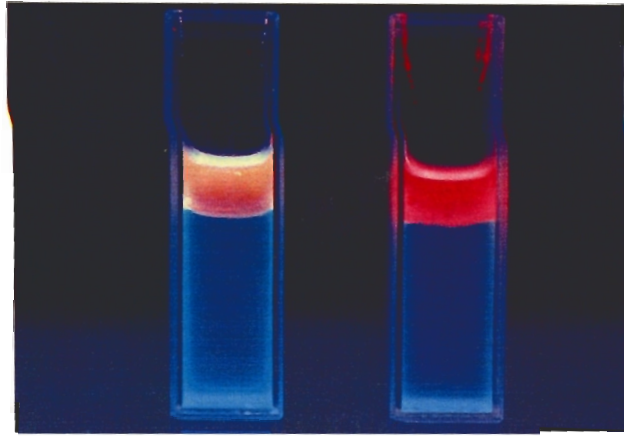


Fig. 3-4. Detection of GUS activity in transgenic plant under UV irradiation.  
Leaf extract was reacted with MUG.  
Left: Transformant, Right: Control.

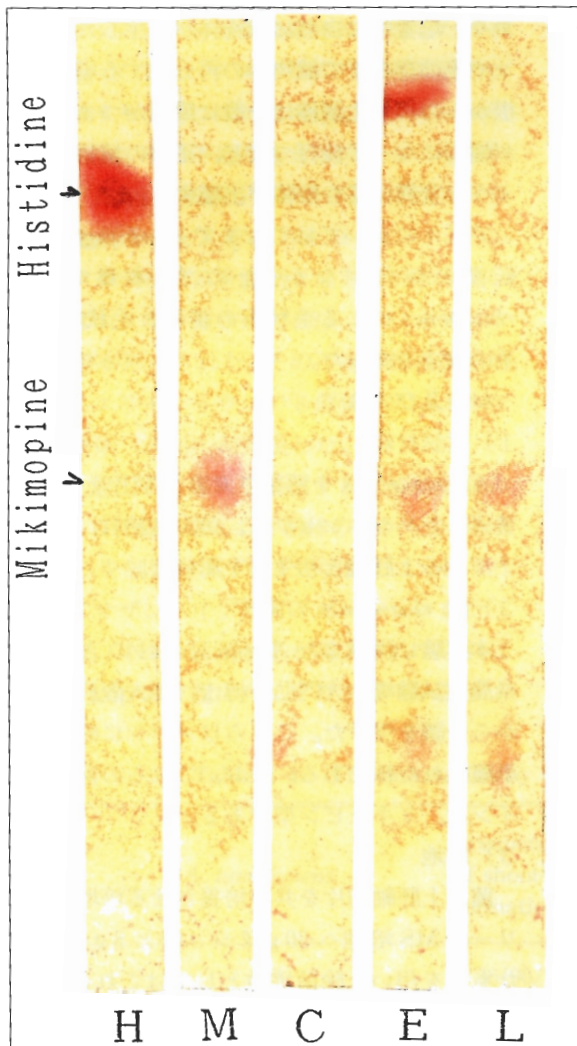


Fig. 3-6. Detection of mikimopine in hairy roots which were induced from epicotyl and primary leaf inoculated with *A. rhizogenes*.  
H: Histidine marker.  
M: Mikimopine marker.  
C: Control.  
E: Hairy root from epicotyls.  
L: Hairy root from primary leaves.

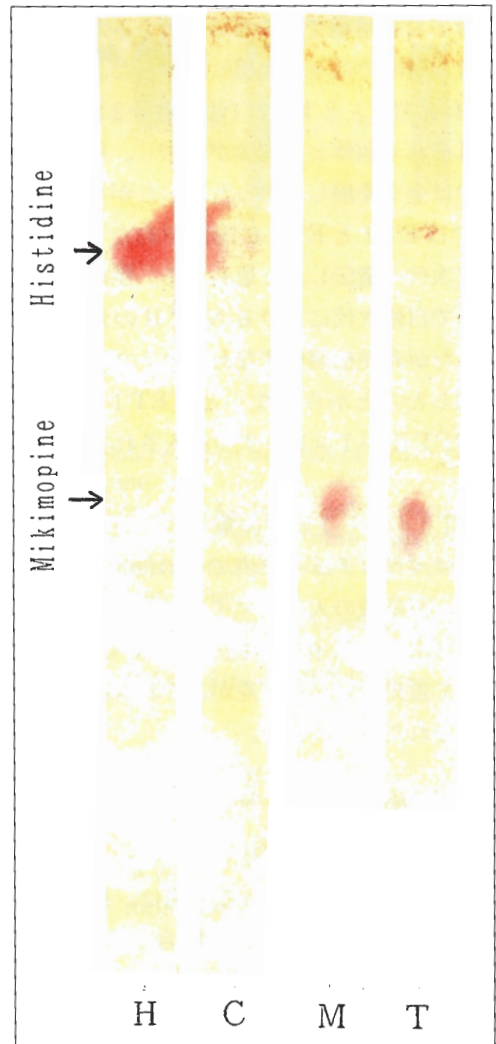


Fig. 3-7. Detection of mikimopine in transformed plants from hairy root clones.  
H: Histidine marker.  
C: Control.  
M: Mikimopine marker.  
T: Hairy root of transformant.

準ずるが、その概略を Fig. 3-5 に示した。*A. rhizogenes* を YEB 培地 (1 g/l Yeast extract, 5 g/l Beef extract, 5 g/l Bacto pepton, 5 g/l sucrose, 0.492 g/l  $MgSO_4$ , pH 5.8) で一晩培養し、遠心後 20 g/l グルコースを含む MS 液体培地に懸濁し、その溶液に 3 品種の上胚軸切片と初生葉切片を 15 分間感染させた。2 日間 25°C の暗黒下で共存培養した後に除菌した。形成された根は除菌培地で 2 週間毎に継代し、3 カ月間維持増殖した。その 3 カ月後に抗生物質を含まない培地へ継代した。

#### 5) 毛状根からの再分化

毛状根はホルモンフリーの MS 培地で増殖した後、再分化培地へ置床した。(ホルモン組成は Table 3-7 を参照)。再分化した不定芽はホルモンフリーの MS 培地を含む培養瓶に移植して生育させた。カムイダイナゴンの場合は培地のホルモンを 2.0 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA に固定して毛状根のクローン別に不定芽の再分化率を比較した。

#### 6) ミキモピンの検出

毛状根からのミキモピンの検出にはパウリ染色法(タンパク質の呈色反応)を用いた。すなわち、根を 1 規定の塩酸で摩砕後、遠心して上清をろ紙にスポットした。そのろ紙を 450 V で 2~3 時間、電気泳動(バッファは 5%ギ酸, 15%酢酸, pH 1.8)した。泳動後、乾燥させたろ紙に 1%スルファニル酸と 5%亜硝酸ナトリウムの等量混合液を噴霧し、再び乾燥させた。さらに、15%炭酸ナトリウムを噴霧した。ミキモピンが合成されていれば橙黄色~赤色のスポットとして検出された。

#### 結果

Table 3-6 に A5, A13 両菌株による毛状根の誘導結果を示した。これによると 3 品種の上胚軸, 初生葉ともに感染後 10 日頃から根が形成され始め (Plate V-5D), やがて感染区の根は多数の分岐を伴いながら旺盛に伸長し, ホルモンフリーの MS 培地で盛んに増殖した (Plate V-5E)。一方, 無処理区においても上胚軸と初生葉から根が形成されたが, その伸長は緩慢で分岐はあまり見られず, 毛状根の形態とは明らかに異なっていた。

菌株の根の形成率についてみるとハツネショウズ, 黄金大納言では A13 で高く, 外植片別では初生葉に比較して上胚軸で高い傾向がみられた。また, カムイダイナゴンでは根の形成率は, 菌株の A5 で高く, 部位別では初生葉で高い形成率を示し, 上記の 2 品種とは逆の傾向であった。それぞれの処理区で形成された根の形態には, 顕著な差はみられなかった。

これらの毛状根を磨砕して, その上清液を高圧ろ紙電気泳動にかけ, パウリ染色によりミキモピンの検出を行ったところ, ハツネショウズの初生葉由来の根や黄金大納言の上胚軸由来の根からそれぞれミキモピンが検出された (Fig. 3-6)。また, カムイダイナゴンの初生葉及び上胚軸由来の毛状根からそれぞれミキモピンが検出され, 毛状根が確認された。なお, コントロール(通常の種子)の根からはミキモピンは検出されなかった。

次に, ハツネショウズ, 黄金大納言より誘導され, ミキモピンの検出された毛状根を 1 mg/l BAP, 0.05 mg/l NAA+1 mg/l BAP 及び 0.1 mg/l NAA+2.0 mg/l BAP を含む再分化培地へ置床したところ, 毛状根

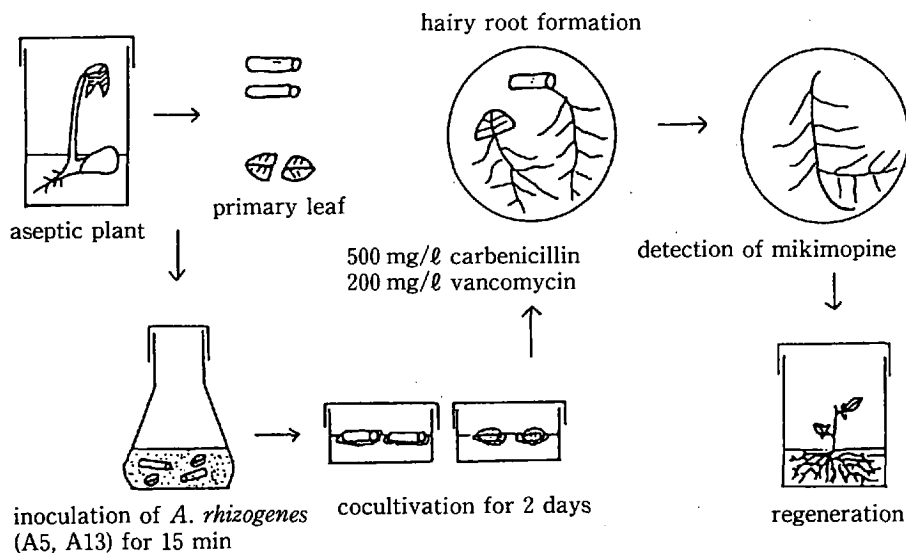


Fig. 3-5. Scheme for induction of hairy roots via inoculation with *A. rhizogenes*.



Table 3-6. Induction of hairy roots in the plants inoculated with *A. rhizogenes*

<i>A. rhizogenes</i> strain	Explant	Hatsune-shozu	Kogane-dainagon	Kamui-dainagon
Control <sup>1)</sup>	P.I. <sup>2)</sup>	6 <sup>3)</sup> ( 1/18) <sup>4)</sup>	13 ( 2/16)	80 (16/20)
	E.	93 (14/15)	81 (13/16)	89 (16/18)
A5	P.I.	43 ( 6/14)	28 ( 5/18)	67 (12/18)
	E.	45 (10/22)	100 (12/12)	58 (11/19)
A13	P.I.	77 (10/13)	56 ( 9/16)	59 ( 7/12)
	E.	93 (13/14)	86 (12/14)	38 ( 6/16)

1) Control; Explants were not inoculated with *A. rhizogenes*.

No conspicuous branching was noted in roots from primary leaf and epicotyl of control.

2) P.I.: Primary leaf, E: Epicotyl.

3) Frequency (%) of root formation.

4) Number of explants forming hairy root/Number of treated explants.

Table 3-7. Plant regeneration from hairy roots which were induced from primary leaves and epicotyls inoculated with *A. rhizogenes*.

Cultivar	R medium <sup>1)</sup>			No. of explants	No. of calli	No. of green spots	No. of roots forming shoots	
	BAP	P.G.R. <sup>1)</sup> KIN (mg/ℓ)	NAA					
Hatsune-shozu <sup>2)</sup>	Exp.1							
	1.0			35	33	10	0	
	1.0		0.05	25	25	13	0	
		1.0		25	3	1	0	
	Exp.2							
	0.1			25	15	2	0	
	1.0			25	25	6	0	
	2.0		0.1	25	20	20	2(2) <sup>4)</sup>	
	Kogane-dainagon <sup>3)</sup>	Exp.1						
		1.0			30	18	4	0
1.0			0.05	25	20	3	0	
		1.0		25	2	2	0	
Exp.2								
1.0				25	25	1	0	
2.0			0.1	25	25	4	2(5) <sup>4)</sup>	

1) R medium: Regeneration medium, P.G.R: Plant growth regulators.

2) Hairy root derived from primary leaf inoculated with A13 strain.

3) Hairy root derived from epicotyl inoculated with A13 strain.

4) Number in parenthesis means total number of shoots developed from hairy roots.

よりカルスが形成された。1 mg/ℓ カイネチンの含まれる培地でもカルスは形成されたが、形成率は低かった。そのカルスを同じ培地で継代したところ、多数のグリーンスポットが形成された。その形成率はハツネショウズで高く、0.1 mg/ℓ NAA+2.0 mg/ℓ BAP ではすべてのカルスで形成された。培養開始後3カ月目から不定芽が形成され始め、6カ月後において、上記の培地で形成されたグリーンスポットからハツネショウズでは2切片か

ら2個体、黄金大納言では、2切片から5個体の再分化個体が得られた (Table 3-7)。

黄金大納言の再分化個体の形態は、節間がつまり、莖長はわずか3 cm程度であり、それ以上に伸育しなかった。さらに葉は細く原品種の円形葉とは大きく異なっていた (Plate V-5F)。

カムイダイナゴンの外植片に形成された毛状根はそれぞれ別個のクローンとして増殖し、そのクローンを同様

Table 3-8. Plant regeneration via calli from hairy root induced from primary leaves and epicotyls inoculated with *A. rhizogenes*<sup>1)</sup>

<i>A. rhizogenes</i> strain	Clone of hairy roots	No. of calli	No. of calli having green spots	No. of calli having shoots	Frequency (%) of shoot formation
<u>Experiment 1</u>					
A5	E1 <sup>2)</sup>	25	6	0	0
A13	E1	25	2	1	4
	L1	25	4	0	0
	L2	20	2	3	15
<u>Experiment 2</u>					
A13	E1	15	0	2	13
	E2	20	1	1	5
	E3	20	1	1	5
	L1	20	0	0	0
	L2	20	2	7	35
	L3	25	2	3	12

1) Cultivar; Kamui-dainagon.

2) E: Hairy roots derived from epicotyl.

L: Hairy roots derived from primary leaf.

に再分化培地 (2.0 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA) に置床したところカルスが形成され、そのカルスからグリーンスポット及び不定芽が形成された。クローン別の再分化率は、A13-L2 (初生葉由来) クローンにおいて再分化率が高かった (Table 3-8)。最終的には 18 個体が再分化した。そのうち 17 個体の形態は上記の 2 品種の場合と同様に節間がつまり矮化しており、根は分岐して発育も旺盛であった。しかし、残る 1 個体の形態は正常で通常の生育を示した。おそらく、この個体では再分化の過程で Ri プラスミドを欠落した可能性がある。

カムイダイナゴンの毛状根から再分化した個体は通常のアズキに比べて根の生育が極めて旺盛であったが、その根からの抽出物中からミキモピンが検出され、これらの再分化植物体は Ri プラスミドが導入した形質転換個体であることが確認された (Fig. 3-7)。

### 第3節 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子の導入

アズキゾウムシ (*Callosobruchus chinensis* L.) はアズキの貯蔵中に粒を食害する害虫であるが、これまで栽培アズキではこのアズキゾウムシに対する抵抗性品種は見い出されていない。アズキゾウムシの幼虫は、通常の場合では寄生しないダイズやソラマメでは人工的に飼育することが可能であるが、インゲンマメではこれができない (Ishimoto と Kitamura, 1988)。これはインゲンマメ種子には、ほ乳類や昆虫のアミラーゼ活性を阻害する  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ AI) が存在することによる

と考えられている (Marshall と Lauda, 1975; Powers と Whitaker, 1977)。このタンパク質は、水溶性の糖タンパク質の一種であり、分子量は 45 kd (15 kd~18 kd のサブユニットから成る) である (Powers と Whitaker, 1977)。

また、この  $\alpha$ AI 遺伝子はすでに Hoffmann ら (1982) が同定しているレクチン様タンパク質遺伝子と同じものであることが強く示唆されている (Moreno と Chrispeels, 1989)。また、Altabella と Chrispeels (1990) は、この  $\alpha$ AI 遺伝子をタバコへ導入して、その形質転換タバコの種子でタンパク質を発現させ、それが *Tenebrio molitor* (コメムシ) のアミラーゼ活性を阻害することを報告している。

本試験では、インゲンマメの持つ  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子をアズキへ導入し、アズキゾウムシ抵抗性の導入を試みた。

#### 材料及び方法

##### 1) 供試材料

アズキの供試品種としてはエリモショウズ、ハツネショウズ及びカムイダイナゴンの 3 品種を用いた。外植片の調製方法とアグロバクテリウムの接種方法は第 1 節と同じであった。

供試したプラスミドの機能を解析するためのモデル実験としてタバコの形質転換系を用いた。品種はサムスンで、ホルモンフリーの MS 培地に無菌的に播種し、培養瓶内で生育させた植物体の葉を *A. tumefaciens* により形質転換した。

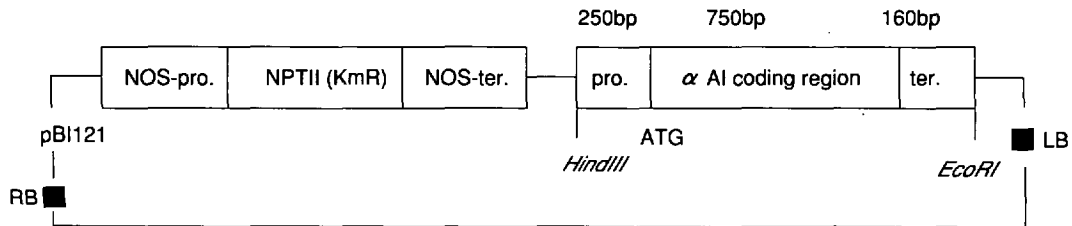


Fig. 3-8. Construct of pBI 121- $\alpha$ AI which was used in the transformation experiment. NOS-pro. and ter.: Nopaline synthase gene promoter and terminator (polyadenylation site). NPT II: Neomycin phosphotransferase. pro.,  $\alpha$ AI and ter.: Upstream sequence of  $\alpha$ AI coding region,  $\alpha$ -amylase inhibitor gene and downstream sequence of  $\alpha$ AI coding region in the genomic DNA from *Phaseolous vulgaris*. RB: Right border, LB: Left border.

## 2) 培地

アズキで用いた各種の培地は、第 1 節と同じである。

タバコでは、MS 無機塩+B5 ビタミンを基本培地として、アグロバクテリウムと外植片との共存培養では、ホルモンとして 0.1 mg/l IAA+1.0 mg/l BAP を加えた。また、カナマイシンで選抜する場合には、0.2 mg/l NAA+1.0 mg/l BAP とし、他の除菌培地や選択培地の抗生物質の種類及び濃度はアズキの場合と同じである。

## 3) アグロバクテリウムの系統及びプラスミド

供試したアグロバクテリウムは、LBA 4404 である。

プラスミドは、pBI 121 から GUS 遺伝子を除き、その部位に  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ AI) 遺伝子を挿入した (Fig. 3-8)。この遺伝子は Hoffmann (1982) の報告したレクチン様遺伝子の塩基配列の一部を用いてプライマーを設定し、Polymerase chain reaction (PCR) 法によりインゲンマメ品種の大正金時およびケンタッキーワンドーの完熟種子から抽出した DNA の断片を増幅することによってクローニングされた。プロモーター及びターミネーターはその構造遺伝子部位の上流および下流の 250 ベース及び 160 ベースであった。なお、今回クローニングされた  $\alpha$ AI 遺伝子はすでに Hoffmann ら (1982) が報告しているレクチン様遺伝子と塩基配列レベルで 90% のホモロジーを有していた (萩原, 未発表)。

## 4) アグロバクテリウムの感染方法

アズキの場合には第 1 節の方法により感染させた。ただし本節で用いた上胚軸は暗黒下で 3~4 日間前培養した (培地は MS 基本培地に 0.1 mg/l BAP を添加) ものをを用いた。

タバコの場合は、無菌植物体の葉を約 1 cm 四方に切断し、アグロバクテリウム培養液に浸して感染させた。共存培養はアズキの方法に準拠した。

## 5) 遺伝子の検出

再分化植物 (アズキ, タバコ) 中で、カナマイシン耐

性個体の葉から第 1 節と同様の方法により全 DNA を抽出し、濃度を 100 ng/ $\mu$ l に調整した。 $\alpha$ AI 遺伝子の検出は、PCR 法により行った。反応液は、抽出した DNA 1  $\mu$ l+緩衝液 ( $\times 10$ , PERKIN ELMER CETUS 社, 以下の試薬も同じ)+塩化マグネシウム 0.6  $\mu$ l+プライマー (5' 及び 3') 0.2  $\mu$ l ずつ+滅菌水 6.75  $\mu$ l+dNTP 0.2  $\mu$ l+Taq ポリメラーゼ 0.05  $\mu$ l とし反応温度と回数は、94°C 1 分, 55°C 2 分, 72°C 3 分の反応を 35 回繰り返した。なお、PCR に使用した機種は ASTEC 社 PC-700 であった。反応後、0.8% アガロースゲルで 100 V, 20 分間電気泳動し、泳動後、紫外線下で  $\alpha$ AI 遺伝子の増幅について検定した。

プライマーは以下の通りで、5' 末端, 3' 末端ともに  $\alpha$ AI 構造遺伝子の一部で 20 ヌクレオチドであった。

5' プライマー 5'-ATGGCTTCCTCCAAGTTACT-3'

3' プライマー 5'-TTATGCACTAATAAGACGCA-3'

## 結果

$\alpha$ AI 遺伝子はインゲンマメの大正金時およびケンタッキーワンドー由来の 2 種類を用い、トリペアレンタルメイティングによって、これらの  $\alpha$ AI 遺伝子が挿入されたプラスミドを持つアグロバクテリウムを得たが、実験は主に大正金時由来の遺伝子を持つプラスミドを用いた。

タバコにおいて葉切片に上記のアグロバクテリウムを感染させ、50 mg/l カナマイシンを含む培地へ置床した。その結果、供試した 50 切片のうち 40 切片から不定芽の形成がみられた。1 切片に多くの不定芽が形成されたが、それらの中から生育の旺盛な不定芽を全部で 15 個選び、カナマイシンの含まれる培地に置床することにより発根試験を行った。その結果 10 個体で旺盛な発根がみられ、これらはカナマイシン耐性個体と思われた。

次にアズキにおいて上記のタバコの場合と同じアグロバクテリウム (プラスミドの pBI 121 及び pBI 121- $\alpha$ AI

**Table 3-9.** Frequency of shoot and root formation when inoculated with *A. tumefaciens* harbouring pBI 121- $\alpha$ AI on the selection medium containing kanamycin<sup>1)</sup>

<i>Agrobacterium</i>	Plasmid	Acetosyringon	Frequency (%) of shoot formation	Frequency (%) of root formation	No. of plants having $\alpha$ AI gene
- <sup>2)</sup>	-	- <sup>3)</sup>	38(23/ 60) <sup>4)</sup>	0(0/10) <sup>5)</sup>	
+	pBI 121	-	24(27/111)	15(3/19)	
+	pBI 121- $\alpha$ AI	-	23(28/123)	18(4/22)	1(1/4)
-	-	-	84(38/ 45)	0(0/13)	
+	pBI 121- $\alpha$ AI	-	87(52/ 60)	18(9/49)	
+	pBI 121- $\alpha$ AI	+	79(59/ 75)	11(6/53)	1(1/4)

1) MS medium containing 0.06 mg/l BAP and 50 mg/l kanamycin. Cultivar; Hatsune-shozu.

2) -: Explants were not inoculated with *Agrobacterium*.

+: Explants were inoculated with *Agrobacterium*.

3) -: No acetosyringon in the cocultivation MS medium.

+: 200  $\mu$ mol acetosyringon in the medium.

4) Number of shoot-forming explants/Number of tested explants.

5) Number of root-forming explants/Number of tested explants.

**Table 3-10.** Frequency of shoot and root formation when inoculated with *A. tumefaciens* harbouring pBI 121- $\alpha$ AI on the selection medium containing kanamycin<sup>1)</sup>

<i>Agrobacterium</i>	Plasmid	Acetosyringon	Frequency (%) of shoot formation	Frequency (%) of root formation	No. of plants having $\alpha$ AI gene
- <sup>2)</sup>	-	- <sup>3)</sup>	38(20/ 60) <sup>4)</sup>	0(0/12) <sup>5)</sup>	
+	pBI 121	-	29(20/ 69)	12(2/17)	
+	pBI 121- $\alpha$ AI	-	25(29/116)	12(2/17)	
-	-	-	55(18/ 33)	0(0/ 7)	
+	pBI 121- $\alpha$ AI	-	77(58/ 75)	11(6/53)	1(1/6)
+	pBI 121- $\alpha$ AI	+	96(75/ 78)	11(8/75)	2(2/7)

1) MS medium containing 0.06 mg/l BAP and 50 mg/l kanamycin. Cultivar; Erimo-shozu.

2) -: Explants were not inoculated with *Agrobacterium*.

+: Explants were inoculated with *Agrobacterium*.

3) -: No acetosyringon in the cocultivation MS medium.

+: 200  $\mu$ mol acetosyringon in the medium.

4) Number of shoot-forming explants/Number of tested explants.

5) Number of root-forming explants/Number of tested explants.

を持つ)を用いて、上胚軸に接種試験を行った。ハツネショウズの結果を Table 3-9 に示した。培養開始後3カ月にはそれぞれ20%の頻度で不定芽が形成された。両者のプラスミドで不定芽形成率に差はみられなかった。

また、アセトシリノンを共存培地に添加した区を設定した。添加の有無に拘わらず、不定芽形成率に大きな差はみられなかった。これは第1節と同様の結果であった。また、この試験区での不定芽形成率は前者の実験よりも高く、約80%前後となったが、これはコントロール(カナマイシンを含まない培地で上胚軸を培養)の不定芽形成率からみて、接種時のアグロバクテリウムの状態及

び上胚軸切片の生理的状态の違いによると思われた。

形成された不定芽をカナマイシンを含む培地で発根試験を行い、それを Table 3-9 に示した。これによる発根個体率は、4処理区で11~18%であり、pBI 121- $\alpha$ AI 遺伝子を含むプラスミドの区では19個の発根個体を得た。なお、コントロールのハツネショウズでは発根した個体はみられなかった。

エリモショウズの感染実験の結果を Table 3-10 に示した。エリモショウズにおいてもハツネショウズとほぼ同様の不定芽形成率を示した。また、発根個体率は11~12%であり、16個の発根個体を得た。

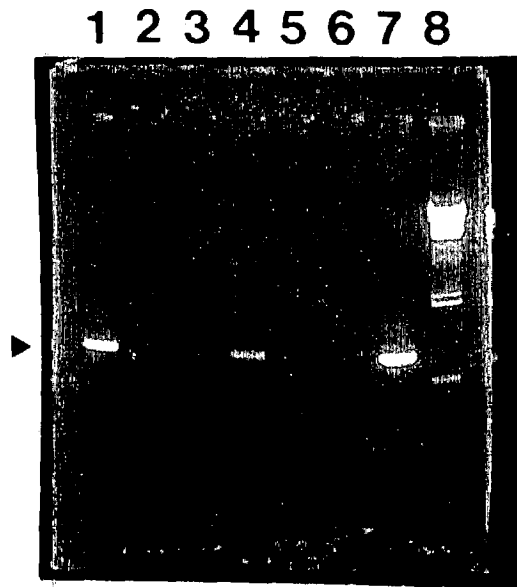


Fig. 3-9. Detection of  $\alpha$ AI gene in kanamycin resistant plants by polymerase chain reaction.

- 1: Transgenic tobacco.
- 2: Control.
- 3-6: Kanamycin resistant adzuki.
- 7: Plasmid pBI 121- $\alpha$ AI.
- 8: Size marker  $\lambda$ /Hind III.

次に、 $\alpha$ AI 遺伝子が導入されているか否かを確認するために、カナマイシン耐性個体から DNA を抽出して、PCR 法により  $\alpha$ AI 遺伝子の増幅を試みた。その結果、ハツネショウズの 2 個体、エリモショウズの 3 個体において、それぞれ  $\alpha$ AI 遺伝子の長さ (約 890 bp) に相当する DNA 断片の増幅がみられ、 $\alpha$ AI 遺伝子の導入が確かめられた (Fig. 3-9)。また、同時にタバコにおいても 2 個体において  $\alpha$ AI 遺伝子が導入されていた。

#### 考察

双子葉植物の形質転換にはアグロバクテリウムを用いた遺伝子導入法が広く用いられている。マメ科では、すでに Kohler ら (1987) による *V. aconitifolia* への NPT II 遺伝子 (カナマイシン耐性) の導入、Puonti-Kaerlas ら (1990) によるエンドウへのハイグロマイシン耐性遺伝子の導入、Schroeder ら (1993) によるエンドウへの除草剤耐性遺伝子のフォスフィノスルシン転移酵素遺伝子 (PAT) の導入、Hinchee ら (1988) 及び Zhou と Atherly (1990) によるダイズへの NPT II 遺伝子の導入などが報告されている。

アズキでは著者 (佐藤ら, 1990) により、NPT II 遺伝子 (カナマイシン耐性) の導入に初めて成功した。また、宮田ら (1992) も著者らの方法に準拠し、アズキにシカクマメより単離したキモトリプシンインヒビター遺伝子

を導入した。さらに、最近、著者らはインゲンマメに由来するアズキゾウムシ耐虫性遺伝子 ( $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子) を北海道のアズキ品種ベニダイナゴンへ導入することに成功した。このようにアズキの形質転換も脚光を浴びるようになった。

本章では、アグロバクテリウムを用いた遺伝子導入法と上記の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子の導入例について記した。

第 1 節では、*A. tumefaciens* による遺伝子導入系の確立を試み、NPT II 遺伝子をアズキへ導入することができたが、この系では遺伝子導入に要する期間が比較的長かったため、今後は感染組織として茎頂や子葉腋芽の分裂組織を用いる方法 (Schrammeijer, 1990; Davies ら, 1993) などについて検討を進める必要がある。

第 2 節においては *A. rhizogenes* によりアズキの形質転換を試みた。*A. rhizogenes* の感染によって毛状根が形成されたが、それから再分化した植物体には、根や茎での頂芽優勢の低下、節間の短縮、根の速い生長、不稔種子の増加などがみられた (真野, 1989)。このような変異の発現には T-DNA 上の rol 遺伝子が深く関与し、それらは後代に伝わる。したがって、それらの変異体の中から農業上有用な変異体を選抜して利用することも可能である。また、T-DNA が染色体へアトランダムに挿入されるので、これを利用した遺伝子タギングも可能である (真野, 1989)。

本実験では初生葉及び上胚軸に *A. rhizogenes* を感染させたところ、毛状根が形成され、それから誘導したカルスを経て植物体を再分化させることができた。なお、再分化個体の根からはミキモピンが検出されたので形質転換体であることが証明された。この再分化個体は節間がつまって矮化しており、根が旺盛に生育するなど、*A. rhizogenes* による形質転換体の特徴を有していたが、矮化が激しかったので、鉢上げには至らなかった。

斉藤と山崎 (1993) は、薬用植物のペラドンナやカンゾウに *A. rhizogenes* により除草剤耐性遺伝子 (PAT) を導入したが、得られた植物体では毛状根病が激しく自家受粉できなかつた。そこで戻し交配によって、除草剤耐性で毛状根の発生しない個体を得ている。したがって、*A. rhizogenes* からの Ri-プラスミドベクターを遺伝子導入に利用できると思われる。今後はアズキでもかかる方法を検討する必要がある。

第 3 節では第 1 節で確立したアグロバクテリウム法を用いて、インゲンマメから単離された  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター ( $\alpha$ AI) 遺伝子をアズキへ導入することを試みた。なお、この  $\alpha$ AI 遺伝子は既に Hoffmann ら (1982)

のレクチン様タンパク質遺伝子と同じ遺伝子であることが Moreno と Chrispeels (1989) によって強く示唆されている。なお, Altabella と Chrispeels (1990) はこの  $\alpha$ AI 遺伝子をタバコに導入し, その種子中で発現させたタンパク質が *Tenebrio molitor* のアミラーゼ活性を阻害することを報告している。

本試験では, Hoffmann ら (1982) のインゲンマメのレクチン遺伝子の一部をプライマーにして PCR 法によりクローニングした遺伝子を用い, これをアズキへ導入し, 最終的にハツネショウズで 2 個体, エリモショウズで 3 個体が  $\alpha$ AI 遺伝子を持つことを実証した。Altabella と Chrispeels (1989) もタバコを用いて同様の実験を行って, タバコ種子の中で発現させた  $\alpha$ AI タンパク質が

ブタの膵臓由来のアミラーゼ活性を阻害することを確認している。

本実験では, 得られた  $\alpha$ AI 遺伝子のタンパク質の発現は確認できなかったが, Altabella と Chrispeels (1989) の用いたプラスミドをアズキへ導入したところ, ベニダイナゴン由来の個体の種子中でタンパク質の発現が確認され, さらに  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性を持つ個体を得た。

以上の結果から,  $\alpha$ AI 遺伝子の利用によるアズキゾウムシ耐虫性品種の育成へ大きく前進した。今後は, この系を利用して他の有用遺伝子の導入についても積極的に進める必要がある。

## 第4章 総合論議

北海道の畑作物の一つとしてマメ類は重要な作物種であり、中でもアズキは、生産量が全国の 77% (1992 年) を占めている。

アズキはダイズと同様に極東アジアにおいて古くから栽培されて来た。今や世界的な作物として広がったダイズとは対照的に、アズキは、現在もなお極東地域においてのみ食用に供されている作物である。

本研究は、アズキの育種に、近年急速に発展したいわゆるバイオテクノロジーを応用して品種育成を行うための基礎研究を行った。すなわち、細胞培養による個体再分化技術を考究して、それを利用して遺伝子導入を図り新育種技術の開発を試みた。

アズキの組織培養に関する上胚軸及び初生葉の培養に成功した尾崎 (1985, 1986), 及び足立ら (1990) などの報告や、プロトプラストからの植物体の再分化に関しては葉肉細胞からプロトプラストを単離した Koulin Ge (1989) の報告にならって、本研究ではまず、アズキの上胚軸からの効率的な再分化系を確立し、さらに上胚軸由来カルスやプロトプラストからの植物体再分化にも成功した。また、これらの再分化植物体を温室において鉢上げし、正常な種子を採種することができたが、これはアズキでは最初の研究例と言える。したがって、細胞培養を育種へ応用する上での前提条件である植物体の再分化への条件を確立できた。

プロトプラストからの再分化系は、エレクトロポレーションによる遺伝子導入や細胞融合にも応用できるので、近縁野生種から耐病、耐虫性等の形質をアズキに導入するために役立つであろう。

外植片やプロトプラストから再分化個体を得る要因は大きく 2 つに分けられる。ひとつは培養に用いる植物材料であり、もうひとつは培養条件である。

材料に関しては多くの植物種で報告されているように、遺伝子型により明らかに再分化率に差がみられた。本研究ではアズキの上胚軸からの再分化においてベニダイナゴンは不定芽形成率が高く、上胚軸カルスからの再分化では、ハツネショウズで不定芽形成率が高い傾向が認められた。

Komatsuda (1992) はダイズの 288 品種と野生ダイズの未熟子葉を培養し、不定胚形成能のスクリーニングを行ったところ、高い再分化能を持つダイズ品種を見出した。また、リョクトウにおいても Mendoza と Futsu-

hara (1992) は、子葉片からの再分化において顕著な品種間差を認め、品種×培地の相互作用も有意であることを報告している。

再分化を支配するもう一つの要因として外植片に用いる植物の部位及びその生育段階と、さらに、その材料を作った環境条件があげられる。

Kathal ら (1988) は、メロンにおいて葉片からの不定芽形成は、用いる葉片の大きさと age が関係していたことを報告している。また、リョクトウの茎頂組織の培養ではその大きさが重要であった (Bajaj と Dhanju, 1979; Goel ら, 1983; Singh ら, 1985; Mathews, 1988)。培養切片としては一般には未熟な組織や分裂中の組織、器官の再分化能が高いとされており、培養する際には材料の生理的な状態も加味する必要がある。

植物細胞の培養における器官分化が、オーキシシンとサイトカイニンの量的なバランスによって制御されるという考えは、Skoog と Miller (1957) のタバコの髄組織を用いた実験以来、普遍的な概念として認識されている。一方、カルス誘導という脱分化に際しても多くの植物ではオーキシシンとサイトカイニンが必要であるとされている。

しかし、本研究では、必ずしも両者ともが必要ではなく、サイトカイニンの BAP の単独処理でも効率よく植物体を再分化させることができ、また、オーキシシンの 2, 4-D 単独でも増殖のよいカルスを形成できた。これらの結果は器官分化及び脱分化に内生ホルモンの関与を示唆していると思われる。

アズキの再分化に重要な役割を果たす BAP は、他の *Vigna* 属の実験でも同様であったので (Godbole ら, 1984; Eapen と Gill, 1986; Kumer ら, 1988; Mathews ら, 1988; Gulati と Jaiwal, 1990, 1992; Mendoza と Futsuhara, 1990, 1992), BAP は *Vigna* 属の培養に必須のホルモンと思われる。なお、BAP とオーキシシンの組み合わせを用いると再分化率が高まる場合もみられたので、さらに検討が必要と思われた。

再分化植物体には原品種と異なる体細胞変異体が発現する。この変異が外植片にすでに内在していたのか、あるいは培養過程で新たに誘導されたかの 2 つの可能性が考えられる。体細胞変異の中には染色体変異、遺伝子変異 (反復配列の増幅、メチル化を含む)、葉緑体、ミトコンドリアなどの細胞質突然変異 (真山, 1990) が含まれ

ている。

本研究においては、得られた再分化個体の後代系統を5年間にわたり圃場試験を実施し、再分化個体中には多くの変異体が生じていたことを明らかにした。

可視的な変異体としては矮性、アルピノ、葉形異常、晩生変異、大粒、小粒、及び莢色の変異体などであり、これらの変異体率は0.4%~3.8%であり、従来の突然変異よりも高率と思われた。Gavarzziら(1987)は、トマトにおける変異体の発生率は、組織培養から再分化させた個体の方が種子に変異原(EMS)処理を行った場合よりも明らかに高率であったことを報告している。また、本研究では、種子に放射線照射(X線、ガンマー線)を行ってから、その上胚軸を培養することにより、通常の培養よりも可視的な変異体の発生率(1.3~6.7%)が高かった。

また、ハツネショウズにおいては体細胞変異体についての、粒大選抜により原品種よりも明らかに百粒重の重い系統を作ることができた。また、同時に小粒系統も作出することができた。原品種のハツネショウズはアズキ落葉病に抵抗性であったが、これらの大粒の1系統では本病に対して感受性に変化していた。これは望ましくない方向への変異であった。アズキにおいても耐病性に関して体細胞変異を生じることが明らかとなったので、逆に抵抗性変異への誘発も期待できるであろう。

マメ類の遺伝子導入では、エレクトロポレーション法を用いたダイズへのマーカー遺伝子(ハイグロマイシン遺伝子、GUS遺伝子)の導入(Dhirら, 1991)、インゲンマメへのパーティクルガン法による除草剤耐性遺伝子の導入(Russellら, 1993)の他に、アグロバクテリウムを用いた報告例として、エンドウへのハイグロマイシン遺伝子の導入(Puonti-Kaerlasら, 1990, 1992)や除草剤耐性遺伝子の導入(Schroederら, 1993)の報告や発芽

した子葉節にガラス針でアグロバクテリウムを接種し、GUS遺伝子を導入した(Daviesら, 1993)例などがある。アズキにおいてアグロバクテリウムを利用した形質転換系を確立できたことは、アズキ育種においてきわめて重要であり、将来の耐冷性や病虫害抵抗性育種へ新たな道が開かれたことになる。

農作物を安定して収穫するための重要な栽培管理の一つとして病虫害防除が挙げられる。病原菌に関しては、まだ、研究途上のものが多いが、糸状菌では、病原菌毒素の不活化酵素遺伝子がクローニングされて耐性タバコが作出されている(安西と米山, 1990)。ウイルス病抵抗性を例にとると、タバコにおいて、はじめてウイルス外被タンパク質の遺伝子を導入してウイルス抵抗性タバコが作出されている(Powell-Abellら, 1986)。

$\alpha$ -アミラーゼインヒビターはアズキゾウムシの消化管のアミラーゼ活性を阻害する物質でインゲンマメ中に存在する。このインヒビターに関する研究は、日本ではIshimotoとKitamura(1988, 1989, 1991)が進んでいる状況であり、この遺伝子をアズキに組込めば農薬を使わずにアズキゾウムシを駆除できて、アズキの貯蔵が容易になるであろう。本実験では、この $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子を実際にアズキ品種へ導入できた。耐虫性が実際に発現されるか否かは今後の研究に待つ必要があるが、少なくともインヒビタータンパク質の発現した個体が得られたことは、遺伝子導入によるアズキ育種の第一歩と言えよう。

以上、本研究では、北海道の主要畑作物であるアズキにおける細胞育種の基礎として細胞培養による再分化技術と遺伝子導入技術の実際育種への応用を可能とした。さらに、体細胞変異を利用した育種素材の作出も可能となった。また外来遺伝子を導入した形質転換体を作成して、アズキ育種に新たな手法を導入する道を開いた。



## 第5章 摘 要

### 1. 細胞及び組織片からの植物体再分化

#### 1) 上胚軸からの植物体再分化

- (1) 上胚軸、根及び初生葉の中では上胚軸切片の不定芽形成率が最も高く、外植片として適していた。根の不定芽形成率は低かったが再分化個体を得た。また、初生葉からは不定芽が形成されなかった。
- (2) 上胚軸の採取適期は播種後7~10日で、切片の長さは10mmが適当であった。発芽培地に0.05 mg/ℓ NAAと2.0 mg/ℓ BAPを添加すると上胚軸の再分化率が向上したが、上胚軸の伸長は抑制されて材料としてはやや不適であった。
- (3) 基本培地にはMS及びB5が適していた。培地に加えるホルモンはBAPが適しており、濃度は0.1 mg/ℓ~1.0 mg/ℓが適当であった。カイネチンも有効であったが再分化まで長時間を要し、かつ不定根の形成率が高いという欠点があった。
- (4) 糖はショ糖(30 g/ℓ)が適当で、品種によってはグルコース(30 g/ℓ)も適したが、いずれの糖も45 g/ℓ以上では再分化率が大きく低下した。また、ゲル化剤としては寒天で良く、アガロースやゲランガムでは逆に再分化率が低下した。
- (5) 再分化には品種間差異がみられ、ベニダイナゴンとハヤテショウズは再分化能が高く、最高92%と80%の不定芽形成率であった。また、アカネダイナゴンは最高でも6%の不定芽形成率で、再分化能が低かった。
- (6) 再分化の培養温度としては25~30°Cが適当であった。培養容器は試験管よりも培養瓶(φ55 mm×105 mm)が適していた。温室で鉢上げた個体の約7割は正常に発育して開花結実に至った。

#### 2) 上胚軸カルスからの植物体再分化

- (1) 2,4-Dを2 mg/ℓ含むMS培地で上胚軸を培養したところ、上胚軸の切断面から白色の柔らかいカルスが形成された。このカルスはいずれの品種においても旺盛に増殖した。カルスの誘導には2,4-Dが有効であったが、NAAとBAPを組合わせて用いても効果がみられた。
- (2) BAPを含む再分化培地に置床したカルスにはグリーンスポットが形成され、続いて不定芽、不定根が形成された。不定芽形成率は最高20%で、上胚軸からの直接再分化に比べ低かった。また、カルスの継代回

数が多くなると再分化率が低下した。

- (3) 再分化培地のBAP濃度は1 mg/ℓが適当であったが、BAPにNAAを添加すると不定芽形成率が向上した。0.5 mg/ℓ NAA+10.0 mg/ℓ BAPで最も再分化率が高く、ハツネショウズで36%、エリモショウズでは28%となった。また、ショ糖は30 g/ℓが適当で、90 g/ℓでは不定芽が全く形成されなかった。
- (4) 再分化培地のカルスには不定芽とは全く形態の異なるorganogenicカルスが形成された。これをホルモンフリー培地で増殖すると継代中にしばしば不定芽を形成し植物体が再分化した。その再分化能は最長7年以上も失われなかった。

#### 3) プロトプラストからの植物体再分化

- (1) 上胚軸から酵素処理(0.5%セルラーゼオノズカRS, 0.05%ペクトリアーゼY23, 0.75%ドリセラゼ)によってプロトプラストを単離できた。プロトプラストの収量は生重1g当たり $10^5$ 程度で、単離直後のプロトプラストの生存率は99%以上であった。また、上胚軸カルスからもプロトプラストを単離でき、その収量は上胚軸の場合に比べて約10倍( $10^6$ )まで増加した。
- (2) プロトプラストの分裂率はアガロースに包埋した方が高く、培地にアミノ酸であるプロリンやポリアミンであるスペルミジンを添加するとさらに分裂率が増大した。また培地の浸透圧調節剤としてはソルビトールよりもグルコースが良く、その濃度は0.3 Mが適当であった。ホルモンはオーキシン単独よりも2,4-DとBAPの組合せが有効であった。
- (3) 培養開始時の細胞密度は $1 \times 10^5$ /mlが適しており、 $2 \times 10^5$ /ml以上の高密度では細胞が褐変した。また、培地は液体よりもアガロースに包埋した固体培地の方が分裂速度が早く分裂率が高かった。
- (4) 上胚軸由来のプロトプラストからも、さらにカルス由来のプロトプラストからも再分化個体が得られ、いずれも採種できた。

### 2. 再分化個体の特性

#### 1) 上胚軸カルスからの再分化個体の特性

- (1) 再分化個体の後代( $R_1 \sim R_5$ )を5年間(1988年~1992年)にわたり圃場で栽培し、特性調査及び生産力試験を実施した。

(2) 可視的な変異体として R<sub>1</sub> 代において矮性, アルビノ, 異常葉, 蔓性, 及び莢色変異を生じた。それらの変異体率は R<sub>1</sub> 集団当たり 0.4%~3.8% という高率であった。

(3) 主茎長, 主茎節数, 稔実莢数, 百粒重などの農業形質についても変異を生じ, 原品種に比べて R<sub>1</sub> 集団の変異幅の方が広がった。

(4) 粒大に着目して R<sub>2</sub> 系統を選抜したが, これらの系統では粒大以外の形質についての変異も生じていた。ハツネショウズの R<sub>2</sub> 系統では早生や晩生化がみられ, エリモショウズでも晩生系統を生じた。

#### 2) 放射線照射種子の上胚軸培養による再分化個体及び次代系統の特性

(1) ガンマー線や X 線を照射した種子の上胚軸からの不定芽形成率は放射線照射によって顕著な影響を受けなかったが, 生育途中の枯死等により最終的な再分化個体率は低下した。

(2) R<sub>1</sub> 集団には不稔, 矮性及び莢色変異が出現したが, これらの変異体率は 1.3~6.7% と前節の変異体率よりもやや高くなる傾向を示した。

(3) 変異体では農業形質の変異幅も拡大する傾向がみられ, 正規分布型を示さないものが多く, 大粒個体などが出現した。

#### 3) 粒大変異系統の特性

(1) ハツネショウズ (1988 から 1990 年の R<sub>1</sub> 集団) に由来する大粒系統を作出した。これら的大粒系統は原品種に比べて 14~24% 百粒重が重かった。また, 粒重が 10~20% 軽い小粒系統も選抜できた。

(2) 大粒系統の 88 H 1, 89 H 1 及び 89 H 13 の 3 系統について生産力試験を 3 年間にわたり実施した。系統によっては原品種より低収となる年もあったが, 平均すると原品種とほとんど変わらなかった。これら的大粒系統の主茎長は原品種よりやや短く, 分枝数が多く, 稔実莢数は同程度であった。ただし, 大粒化に伴って粒揃いが不整となり, 品質が低下した。

(3) ハツネショウズはアズキ落葉病に抵抗性であるが, 上記の 3 系統中 89 H 1 は落葉病検定の結果感受性と判定された。また, 耐冷性現地選抜圃場では 88 H 1 と 89 H 1 の 2 系統が晩生の生育型を示し, 環境条件に対する反応にも変異を生じていた。

### 3. 組換え DNA 育種法

#### 1) *Agrobacterium tumefaciens* による形質転換体の作出

(1) *A. tumefaciens* の感染時間は 15 分で良く, アグロバクテリウムの除菌用の抗生物質としてはカーベニシリンが適当であった。*vir* 遺伝子の発現を誘発するアセトシリシロンは除菌用の抗生物質がカーベニシリンの場合には不定芽形成までの期間を 1~2 週間短縮する効果がみられた。

(2) 上胚軸に *A. tumefaciens* を利用して NPT II 遺伝子 (カナマイシン耐性) の導入を行った。選択培地のカナマイシン濃度は 50 mg/l とし, 形成された不定芽をカナマイシンを含むホルモンフリー培地で発根させ, カナマイシン耐性個体を選抜した。この葉から全 DNA を抽出し, サザンブロット解析によって NPT II 遺伝子の導入を証明した。

(3) 形質転換体を隔離温室で採種し, その種子をカナマイシンを含む培地で発根させたところ, 発根個体が分離したので, 導入遺伝子が次代へ伝達することが確認された。さらに, 形質転換体の葉の抽出液で GUS 遺伝子 ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) の発現も確認できた。

#### 2) *A. rhizogenes* による形質転換体の作出

(1) アズキの組織片に *A. rhizogenes* を感染させた結果, 初生葉及び上胚軸から旺盛に伸長する根が形成された。その根からミキモピンが検出され, 毛状根であることが明らかとなった。

(2) 再分化培地に置床した毛状根からはカルスが形成され, 継代培養中に不定芽が形成され, さらに植物体へ再分化した。この再分化個体は, 根の生育が旺盛で, 節間がつまって植物体が矮化するなど, *A. rhizogenes* による形質転換体の特徴を示したが, 根からもミキモピンが検出され形質転換体であることが確認された。

#### 3) $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子の導入

(1) アズキゾウムシの消化管のアミラーゼ活性を阻害する  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子を組み込んだ *A. tumefaciens* を感染させ, 選択培地上でカナマイシン耐性個体を得た。

(2) これらの再分化個体より全 DNA を抽出し, PCR 法により  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子の検出を行った。ハツネショウズの 2 個体, 並びにエリモショウズの 3 個体で  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター遺伝子の長さに相当する約 890 bp の DNA 断片が増幅され, 遺伝子の導入が確認された。

## 引用文献

- 足立大山, 喜久田嘉郎, 岡沢養三 1990. アズキ「エリモショウズ」の上胚軸カルスからの植物体再生. 北農. 57: 63-65.
- 足立大山, 成河智明, 千葉一美, 村田吉平, 原正紀, 島田尚典 1988. あずき新品種「ハツネショウズ」の育成について. 道立農試集報 57: 13-24.
- Altabella, T. and M. J. Chrispeels 1990. Tobacco plants transformed with the bean  $\alpha$  ai gene express an inhibitor of insect  $\alpha$ -amylase in their seeds. *Plant Physiol.* 93: 805-810.
- Arnold, S. V. and T. Eriksson 1976. Factors influencing the growth division of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant.* 36: 193-196.
- 安西弘行, 米山勝美 1990. 病原菌毒素不活化による病害抵抗性植物の育種. *植物細胞工学* 2: 713-720.
- Bajaj, Y. P. S. and M. S. Dhanju 1979. Regeneration of plants from apical meristem tips of some legumes. *Curr. Sci.* 48: 906-907.
- Barwale, U. B. and J. M. Widholm 1987. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. *Plant Cell Rep.* 6: 365-368.
- Bhargava, S. and N. Chandra 1983. In vitro differentiation in callus cultures of moth bean, *Vigna aconitifolia* (JACQ) Marechal. *Plant Cell Rep.* 2: 47-50.
- Carlson, P. S. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science.* 180: 1366-1368.
- Chee, P. P., K. A. Fober and J. L. Slighton 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 91: 1212-1218.
- Chu, C-C., C-C. Wang, C-S. Sun, C. Hsu, K-C. Yin, C-Y Chu and F-Y. Bi 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica.* 18: 659-688.
- 千葉一美 1982. アズキ落葉病抵抗性に関する研究第2報抵抗性の遺伝について. *育種・作物学会北海道談話会報* 22: 39.
- Davies, D. R., J. Hamilton, P. Mullineaux 1993. Transformation of peas. *Plant Cell Rep.* 12: 180-183.
- Dhir, S. K., S. Dhir, J. M. Widholm 1991. Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) *Plant Cell Rep.* 10: 39-43.
- Dhir S. K., S. Dhir, A. P. Sturtevant and J. M. Widholm 1991. Regeneration of transformed shoots from electroporated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) protoplasts. *Plant Cell Rep.* 10: 97-101.
- Eapen, S. and R. Gill 1986. Regeneration of plants from cultured root explants of mothbean (*Vigna aconitifolia* L. Jacq. Marechal). *Theor. Appl. Genet.* 72: 384-387.
- 江面 弘, 雨ヶ谷洋, 飯田修一 1990. ハクサイ培養前種子へのガンマー線照射の再分化個体に対する影響. *育種* 40 別 1: 32-33.
- Frearson, E. M., J. B. Power and E. C. Cocking 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* 33: 130-137.
- Fromm, M. E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas and T. M. Klein 1990. Influence and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8: 833-839.
- Fromm, M. E., L. P. Taylor and V. Walbot 1986. Stable transformation of maize after transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50: 51-158.
- Gamborg, O. L., J. Shyluk and K. K. Kartha 1975. Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from the shoot apices of *Pisum sativum* L. *Plant Sci. Lett.* 4: 285-292.
- Gavazzi, G., C. Tonelli, G. Toresco, F. Raffaldi, F. Vecchio, G. Barbizzi, M. Biasini and F. Sala 1987. Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 74: 733-738.
- Gill, R., Eapen, S. and P. S. Rao 1987. Callus induction from protoplasts of *V. unguiculata*, *V. sublobata*

- and *V. mungo*. Theor. Appl. Genet. 74, 100-103.
- Gill R. and S. Eapen 1986. Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of mothbean (*Vigna acotinifolia*). Curr. Sci. 55: 100-102.
- Gilmour, D. M., M. R. Davey and E. C. Cocking 1987. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of wild *Medicago* species. Plant Sci. 48: 285-292.
- Godbole, D. A., M. N. Kunachgi, U. A. Potdar, K. V. Krishnamurthy and A. F. Mascarenhas. 1984. Studies on a drought resistant legume: The moth bean, *Vigna aconitifolia* (Jacq) Marechal. II. Morphogenetic studies. Plant Cell Rep. 3: 75-78.
- Goel, S. A., K. Mufgal and S. C. Gupta 1983. Development of plants regeneration in vitro cultured shoot tips of *Vigna mungo* and *V. radiata*. Trop. Plant Sci Res. 1: 31-33.
- Gordon-Kamm, W. J., T. M. Spencer, M. L. Mangano, T. R. Adams, R. J. Danies, W. G. Start, J. V. O'Brien, S. A. Chambers, W. R. Adams, N. G. Rice, C. J. Mackey, R. W. Kreuger, A. P. Kausch and P. G. Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell 2: 603-618.
- Graybosh, R. A., M. E. Edge and X. Delannay 1987. Somaclonal variation in soybean plants regenerated from cotyledonary node tissue culture system. Crop Sci. 27: 83-806.
- Gulati A. and P. K. Jaiwal 1990. Culture conditions effecting plant regeneration from cotyledons of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 23: 1-7.
- Gulati A. and P. K. Jaiwal 1992. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 29: 199-205.
- 原 正紀 1988. アズキの育種 総合農業研究叢書第 10 号「わが国におけるマメ類の育種」, 351-414.
- Hayashimoto, A., Z. Li and N. Murai 1990. A polyethylene glycol-mediated protoplast transformation system for production of fertile transgenic rice plants. Plant Physiol. 93: 857-863.
- Hinchee, M. A. W., D. V. Connor-Ward, C. A. Newell, R. E. McDonnell, S. J. Sato, C. S. Gasser, D. A. Fischhoff, D. B. Re, R. T. Fraley, and R. B. Horsch 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. BIO/TECHNOLOGY 6: 915-922.
- Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse, S. E. Sheerman, R. F. Barker and D. Boulter 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 300: 160-163.
- Hoffman L. M., Y. Ma and R. F. Baker 1982. Characterization of two *Phaseolous vulgaris* lectin mRNA and use of cDNA as a probe to estimate lectin transcript levels in various tissues. Nucleic Acids Res. 10: 7819-7828.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231.
- Inoue, M. and E. Maeda 1981. Stimulation of shoot bud and plantlet formation in rice callus cultures by two-step culture method using abscisic acid and kinetin. Jpn. J. Crop. Sci. 50: 318-322.
- Ishimoto, M. and K. Kitamura 1988. Identification of the growth inhibitor on azuki bean weevil in kidney bean (*Phaseolous vulgaris* L.). Jpn. J. Breed. 38: 367-370.
- Ishimoto, M. and K. Kitamura 1989. Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from the kidney bean, *Phaseolous vulgaris* (L.) on three species of Bruchids (*Coleoptera: Bruchidae*). Appl. Ent. Zool. 24: 281-286.
- Ishimoto, M. and K. Kitamura 1991. Effect of absence of seed  $\alpha$ -amylase inhibitor on the growth inhibitory activity to azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis*) in common bean (*Phaseolous vulgaris* L.). Jpn J. Breed. 41: 231-240.
- 伊藤隆二 1989. イネ新品種「初夢」の育成経過とその特性. BRAIN テクノニュース, 14: 1-3.
- Jefferson R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.
- Jia, S. 1982. Factors affecting the division frequency of pea mesophyll protoplasts. Can. J. Bot. 60: 2192-2196.
- Kaepfer, H. F., W. Gu, D. A. Somers, H. W. Rines and A. F. Cockburn 1990. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. Plant Cell

- Rep. 8: 415-418.
- Karen F. T. 1991. Increasing resistance in celery to *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* race 2 with somaclonal variation. *Plant Disease* 75: 1034-1037.
- Kanai, R. and G. Edwards 1973. Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts C3, C4 and crassulacean acid metabolism plant using an aqueous dextranpolyethylene glycol two-phase system. *Plant Physiol.* 52: 484-490.
- Kathal, R., S. P. Bhatnagar and S. S. Bhojwani 1988. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. *Plant Cell Rep.* 4: 449-451.
- Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu, and J. C. Sanford 1987. High velocity microprojectile for delivery of nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
- Klein, T. M., E. C. Harper, Z. Svab, J. C. Sanford and M. E. Fromm 1988. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 8502-8505.
- Klein, T. M., L. Kornstein, J. C. Sanford and M. E. Fromm 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol.* 91: 440-444.
- Kohler, F., C. Golz, S. Eapen and O. Schieder 1987. Influence of plant cultivar and plasmid-DNA on transformation rates in tobacco and moth bean. *Plant Sci.* 53: 87-91.
- Kohler, F., C. Golz, S. Eapen and O. Schieder 1987. Stable transformation of moth bean *Vigna aconitifolia* via direct gene transfer. *Plant Cell Rep.* 6: 313-317.
- Komatsuda, T. 1992. Research on somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean. *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 7: 1-78.
- Koulin Ge, Y. Wang, X. Yuan, P. Huang, J. Yang, Z. Nie, D. Testa and N. Lee 1989. Plant regeneration from protoplasts isolated from mesophyll cells of adzuki bean (*Phaseolous angularis*, Wight). *Plant Sci.* 63: 209-216.
- Krens, F. A., L. Molendijk, G. J. Wullem and R. A. Schilperoort 1982. In vitro transformation of plant protoplasts with naked DNA. *Nature* 296: 72-74.
- Krishnamurthy, K. V., Godbole, D. A. and A. F. Mascarenhas 1984. Studies on a drought resistant legume: The moth bean, *Vigna aconitifolia* (Jacq) marechal. I. Protoplast culture and organogenesis. *Plant Cell Rep.* 3: 30-32.
- Kumar, A. S., O. L. Gamgorg and M. W. Nabors 1988. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Vigna aconitifolia*. *Plant Cell Rep.* 7: 138-141.
- Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Lehminger-Mertens, R. and H. J. Jacobsen 1989. Plant regeneration from pea protoplasts via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 8: 379-382.
- 町田泰則 1989. 遺伝子導入の原理と方法. 植物細胞工学. 1: 19-29.
- 真野佳博 1989. 毛状根クローン間のバリエーションとその応用. 植物組織培養. 6: 1-9.
- Mathews, H. 1988. Morphogenetic responses from in vitro cultured seedling explants of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 11: 233-240.
- 真山滋志 1990. 植物組織培養系での変異体選抜による病害抵抗性植物の作出. 植物細胞工学. 2: 704-711.
- McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell and P. Christou 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6: 923-926.
- Menczel, L., I. Nagy, Zs. R. Kizz and P. Maliga 1981. Streptomycin-resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor. Appl. Genet.* 59: 191-195.
- Mendoza A. B. and Y. Futsuhara 1990. Varietal Differences on plant regeneration by tissue culture in mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Jpn. J. Breed.* 40: 457-467.
- Mendoza A. B., K. Hattori and Y. Futsuhara 1992. Shoot regeneration from the callus immature primary leaves in mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Jpn. J. Breed.* 42: 145-149.
- 宮田英明, 堀田 貢, 新発田修治, 大野峰司 1992. アグロバクテリウムによるキモトリプシンインヒビター遺伝子の小豆への導入. 育種・作物学会北海道談話会報 33: 6-7.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium

- for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murashige, T. and R. Nakano 1965. Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultured and implication of plant senescence. *Amer. J. Bot.* 52: 819-827.
- Murashige, T. and R. Nakano 1967. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Amer. J. Bot.* 54: 963-970.
- Murata M., O. Ishizuka-Nishizawa, S. Higashi, H. Hayashi, Y. Tasaka and I. Nishida 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356: 710-713.
- Nagata, T. and I. Takebe 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 12-20.
- Nishiguchi, M., T. Sato and F. Motoyoshi 1987a. Factors influencing the transfer of the chloramphenicol acetyltransferase gene by electroporation and its transient expression in tobacco mesophyll protoplasts. *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 3: 105-114.
- Nishiguchi, M., T. Sato and F. Motoyoshi 1987b. An improved method for electroporation in plant protoplasts: infection of tobacco protoplasts by tobacco mosaic virus particles. *Plant Cell Rep.* 6: 90-93.
- Oeller, P. W., M. W. Lu, L. P. Taylor, D. A. Pike and A. Thoenig 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*. 254: 437-439.
- 尾崎厚一 1985. アズキ上胚軸ならびに上胚軸カルスからの植物体の再生. *植物組織培養*. 2: 59-62.
- Ozaki, K. 1986. Plantlet formation from the calli of primary leaf of Azuki bean (*Vigna angularis*). *Jpn. J. Breed.* 36: 416-419.
- Parrott, W. A., L. M. Hoffmann, D. F. Hildebrand, E. G. Williams and G. B. Collins 1989. Recovery of primary transformation of soybean. *Plant Cell Rep.* 7: 615-617.
- Powell-Abel, P., R. S. Nelson, B. De, N. Hoffman, S. G. Rogers, R. T. Fraley and R. N. Beachy 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Puonti-Kaerlas J. and T. Eriksson 1988. Improved protoplast culture and regeneration of shoots in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 7: 242-245.
- Puonti-Kaerlas J., T. Eriksson, and P. Engstrom 1990. Production of transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Theor. Appl. Genet.* 80: 246-252.
- Puonti-Kaerlas J., T. Eriksson, and P. Engstrom 1992. Inheritance of a bacterial hygromycin phosphotransferase gene in the progeny of primary transgenic pea plants. *Theor. Appl. Genet.* 84: 443-450.
- Rhodes, C. A., D. A. Pierce, I. J. Mettler, D. Mascarenhas and J. J. Detmer 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* 24: 204-207.
- Rubluo, A., K. K. Kartha, L. A. Mroginski and J. Dyck 1984. In vitro culture of shoot apical meristem of various *Phaseolous* species and cultivars. *J. Plant. Physiol.* 119: 612-615.
- Russell D. R., K. M. Wallase, J. H. Bathe and D. E. McCabe 1993. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep.* 12: 165-169.
- 齊藤和季, 山崎真巳 1993. 遺伝子組換え系としての毛状根の利用—Riプラスミドによるトランスジェニック植物の作製. *遺伝* 47: 60-65.
- Sato, S., C. Newell, K. Kolacz, L. Tredo, J. Finer and M. Hinchee 1993. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.* 12: 408-413.
- 佐藤 毅, 安積大治, 松川 勲 1988. アズキ上胚軸カルスからの植物体再生. *育種・作物学会北海道談話会報*. 28: 32.
- 佐藤 毅, 原田竹雄, 安積大治, 松川 勲 1989. アズキプロトプラストからの植物体再分化. 第11回植物組織培養学会大会, シンポジウム講演要旨集: 105.
- 佐藤 毅, 松川 勲 1990. アグロバクテリウムによるトランスジェニック小豆の作出. 第2回植物組織培養コロキウム, 9: 124-125.
- 佐藤 毅, 松川 勲, 玉掛秀人, 鈴木慶次郎, 菊地治己 1992. 小豆の組織培養由来再分化個体の農業形質. *育種・作物学会北海道談話会報*. 33: 12-13.
- Sato T., D. Asaka, T. Harada and I. Matsukawa 1993. Plant regeneration from protoplasts of adzuki bean (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI). *Jpn. J. Breed.* 43: 183-191.

- Schrammeijer, B., P. C. Sijmons, P. J. M. V. D. Elzen, and A. Hoekema 1990. Meristem transformation of sunflower via *Agrobacterium*. *Plant Cell Rep.* 9: 55-60.
- Schroeder, H. E., A. H. Schotz, T. Wardley-Richardson, D. Spencer and T. J. V. Higgins 1993. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* 101: 751-757.
- Sen, S., R. J. Newton, F. Fong and P. Neuman 1989. Abscisic acid: a role in shoot enhancement from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) cotyledon explants. *Plant Cell Rep.* 8: 191-194.
- Shekhawat, N. S. and A. W. Galston 1983. Isolation, culture, and regeneration of moth bean *Vigna aconitifolia* leaf protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 32: 43-51.
- Shepard, J. F. 1980. Abscisic acid-enhanced shoot initiation in protoplast derived calli of potato. *Plant Sci. Lett.* 18: 327-333.
- Shillito, R. D., J. Paszkowski and I. Potrykus 1983. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep.* 2: 224-227.
- Simamoto, K., R. Terada, T. Izawa, and H. Fujimoto 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- Singh, R. P., B. D. Singh, R. M. Singh and H. Jaiswal 1985. Genotypic differences in callus growth and organogenesis in green gram. *Indian J. Agric. Sci.* 55: 612-615.
- Skoog, F. and C. O. Miller 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-130.
- Stephens, P. A., C. D. Nickell and J. M. Widholm 1991. Agronomic evaluation of tissue-culture-derived soybean plants. *Theor. Appl. Genet.* 82: 633-635.
- 鈴木慶次郎, 玉掛秀人, 佐藤 毅, 菊地治己 1992. 組織培養によるアズキ落葉病トキシン耐性カルスの選抜. 育種・作物学会北海道談話会報 33: 12-13.
- 谷本静史, 原田 宏 1990. 植物組織細胞培養再入門 4 培地の固化剤・培地の pH. *植物細胞工学* 2: 235-240.
- Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol. Plant.* 79: 140-146.
- Tomes, D. T., A. K. Weissinger, M. Ross, R. Higgins, B. J. Drummond, S. Schaaf, J. Malone-Schoneberg, M. Staebell, P. Flynn, J. Anderson and J. Howard 1990. Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* 14: 261-268.
- Torrizo, L. B. and F. J. Zapata 1986. Anther culture in rice: IV. The effect of abscisic acid on plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 5: 136-139.
- White P. R. 1939. Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey Botanical Club* 66: 507-513.
- Wright M. S., D. V. Ward, M. A. Hinchee, M. G. Carnes and R. J. Kaufman 1987. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue. *Plant Cell Rep.* 6: 83-89.
- 山口俊彦, 中島哲夫 1972. サツマイモの培養組織における不定芽の形成におよぼすアブシジン酸の影響. *日作紀* 41: 531-532.
- 由田宏一 1987. 豆類の粒大変異に関する作物学的研究. *北大学農邦文紀* 15: 385-434.

# Basic study of Biotechnology in Adzuki Bean (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI)

by  
Takashi SATO

## Summary

Adzuki bean (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI) is one of the major legume crops in Japan. The cultivation of the crop is limited to the Far East. Adzuki bean is cultivated almost all over Japan, and the main producing district is Hokkaido. The breeding objective for adzuki bean is high yield, high grain quality and resistance to disease and cold weather.

To utilize so-called 'biotechnology' for adzuki bean breeding, this study was undertaken to produce a basic system for plant regeneration from epicotyl, calli derived from epicotyl and from protoplasts in the adzuki bean. A transformation system for this crop was established successfully.

### 1. Plant regeneration from cell and tissue in adzuki bean

#### 1) Plant regeneration from epicotyls

Fifteen cultivars were used as materials. Adzuki bean seeds were sterilized by NaClO. They were sown in MS medium without plant growth regulators and contained 3% (w/v) sucrose and 0.8% (w/v) agar for germination. After incubation at 25°C in the dark, primary leaf, root and epicotyl were cut into pieces and plated on MS medium under 25°C and 16 h daylight at about 5,000 lux.

The explant suitable for culture of adzuki bean was the epicotyl among tested three explants. Shoot formation capacity of epicotyl was high, when the length of epicotyl was approximately 10 mm and seven days-grown epicotyl. Higher shoot frequency was obtained from epicotyl cultured in MS and B5 basal medium than cultured in N6 medium. Optimal plant growth regulators for shoot formation from epicotyl was BAP and cultured in the medium containing 0.1 mg/ℓ BAP resulted in high shoot formation. There were genotypic differences in shoot formation frequency, and a high frequency (92%) was observed in the cultivar Beni-dainagon.

Sucrose and glucose concentration, temperature of incubation and gelling agents on shoot formation were also investigated. Thirty g/ℓ sucrose was effective for shoot formation in Hatsune-shozu and Erimo-shozu. More than 45 g/ℓ sucrose and glucose resulted in low shoot formation frequency. The optimal temperature for shoot formation was 25-30°C and the optimal gelling agent was agar compared with agarose and gellum gum.

Shoots derived from the epicotyl were transferred to MS medium without plant growth regulators to develop and stimulate root formation. Rooted shoots were under high humidity conditions for acclimation. After one week, agar was washed off and the plants were transplanted in soil in a greenhouse.

#### 2) Plant regeneration from calli derived from epicotyls

Aseptic epicotyls were cut into pieces about 10 mm in length and placed on MS medium containing 2 mg/ℓ 2,4-D. Soft calli were induced from cut ends of the epicotyls. The calli were transferred to the regeneration medium containing BAP (0.1-10.0 mg/ℓ). Green spots were induced on the surface of the calli and shoots were regenerated from calli on all tested cultivars. The optimal BAP concentration of BAP was 1.0 mg/ℓ and the shoot



formation frequency was 20% in Hatsune-shozu. When calli were cultured in medium containing only kinetin as cytokinin, shoots were not induced from calli.

Also callus called "organogenic callus" was obtained. These calli were brown in color and contained a green leaf-like structure. The organogenic calli were able to form shoots by subculture on MS medium without plant growth regulators. In Hatsune-shozu ninety-two plants were obtained from tested two hundreds and fifty calli. Furthermore, the regeneration frequency was increased by culture in the medium containing 0.05 mg/l NAA and 10.0 mg/l BAP and frequency was 36% in Hatsune-shozu.

Sucrose concentration (15 g/l-90 g/l), subculture times of calli and pretreatment of ABA to calli before placing regeneration medium for shoot formation from calli were also examined. The optimum sucrose concentration for shoot formation was 30 g/l, on the other hand, a high sucrose concentration (90 g/l) was not suitable for regeneration. As the number of subculture on MS medium of calli containing 2 mg/l 2,4-D increased, the regeneration capacity was decreased. Calli subcultured 12 times was lowest in regeneration frequency among other subculture times. Shoot formation frequency of ABA-pretreated calli was increased slightly more than non-treated calli. Thus pretreatment of ABA to calli did not affect the efficiency of shoot formation.

When calli were induced on the medium containing twelve combinations of NAA (0, 0.05, 0.1, 1.0 mg/l) and BAP (1, 2, 4 mg/l), the shoot formation frequency of these calli was higher than when induced on the medium containing 2 mg/l 2,4-D. The optimum concentration was 0.05 mg/l NAA+1 mg/l BAP in Hatsune-shozu and Kamui-dainagon, 0.1 mg/l NAA+2 mg/l BAP in Erimo-shozu.

### 3) Plant regeneration from adzuki bean protoplasts

#### (1) Protoplasts isolated from epicotyls

Approximately  $2 \times 10^5$  protoplasts were released per 1 g fresh weight of epicotyl treated by enzyme (0.5% Cellulase 'Onozuka' RS, 0.05% Pectolyase Y23, 0.75% Driselase, 0.4 M mannitol, pH 5.7). Freshly isolated protoplasts were 99% viable based on the staining test with 1% Evans' blue.

Forty days after initial protoplast culture, the frequency of protoplast division was calculated. Protoplast culture on the agarose-solidified MS medium (containing various plant growth regulators, glucose and 0.5% agarose) showed more frequency divisions than those in liquid medium. The protoplast division frequency could be increased by adding proline and spermidine to the culture medium.

Osmotic pressure and plant growth regulators (2,4-D, NAA, BAP, kinetin: 6 combinations) were examined. The highest division frequency was obtained at a concentration of 0.3 M glucose compared than 0.3 M sorbitol in tested three cultivars. When the protoplasts were cultured on the medium containing only auxin, the frequency was low. Protoplasts were cultured in 2,4-D and BAP, the frequency was highest among 6 combinations.

In a suitable culture medium, the protoplasts proliferated actively and small colonies were formed after 40-50 days. The colonies were transferred to the MS growth medium containing 0.5 mg/l 2,4-D, 1.0 mg/l BAP. The grown calli were cultured on the regeneration medium (MS, IAA or NAA and BAP, six combinations). Shoots were regenerated from calli in the all tested media, but the shoot formation frequency was low.

#### (2) Protoplasts isolated from suspension cells

Soft calli derived from epicotyl were used for inoculation in 100 ml Erlen meyer flasks containing MS liquid medium with 2 mg/l 2,4-D. The calli were cultured at 25°C and maintained by inoculation of 5 ml from suspension cells into 30 ml fresh medium.

Approximately  $2 \times 10^6$  protoplasts were released per 1 ml packed cell volume of suspension cells in all the genotypes except for Erimo-shozu. Freshly isolated protoplasts were 98% viable based on the staining test with Evan's Blue. The days after the initial protoplast culture, the frequency of protoplast division was calculated.

When protoplasts were cultured on the medium containing only 0.1 mg/l 2,4-D the frequency was about 2%.

When the BAP concentration was half of that of 2,4-D in the medium, the frequency was higher. Furthermore, when BAP was added at the same concentration as that of 2,4-D, the frequency was the highest. At a 2,4-D concentration of 1 mg per liter, similar results were obtained. The highest division frequency of 30.4% was obtained at 1 mg/l 2,4-D and BAP in the agarose-solidified MS medium.

The effect of osmotic pressure and protoplast density were also investigated in terms of division frequency. The highest division frequency was obtained at a concentration of 0.3 M glucose in all cultivars. In contrast, the protoplasts failed to divide at a concentration of 0.2 M glucose. Protoplast division frequencies of Sahoro-shozu, Hatsune-shozu and Akane-dainagon were higher than those of Erimo-shozu and Beni-dainagon, respectively. When the density of the protoplasts increased from  $0.25 \times 10^5$  protoplasts/ml to  $5 \times 10^5$  protoplasts/ml, the division frequency increased. However, when the densities were  $2 \times 10^5$  and  $5 \times 10^5$  protoplasts per ml, the protoplasts did not grow and showed a brown color. The optimal cell density for adzuki bean was estimated to be  $1 \times 10^5$  protoplasts/ml.

Frequencies of division of the protoplasts cultured on liquid and agarose-solidified media were compared using five cultivars. Protoplasts cultured on the agarose-solidified medium divided more frequently than those in liquid medium. The effect of agarose was conspicuous in Hatsune-shozu and Sahoro-shozu, but not significant.

The calli were then transferred to the regeneration medium. Shoots were induced from the calli after two subcultures at four-week intervals on the same regeneration medium. In Hatsune-shozu, two shoots were induced from fifty calli on the medium containing 1.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l IAA. The 'organogenic callus' was obtained. In Hatsune-shozu, the frequency of organogenic callus formation was 10% on the medium containing 0.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l kinetin + 0.1 mg/l ABA.

The regenerated shoots were transferred to MS medium without plant growth regulators to grow further and to stimulate the root development. Roots were formed within 10 days. After acclimation for one week, the regenerated plants were transplanted to pots containing soil. These plants showed a quite normal morphology and the plants grew well, normally flowered and produced seeds in all tested cultivars in the green house.

## 2. Field performance in plants regenerated from epicotyl and calli derived from epicotyl.

Plants regenerated from tissue culture have exhibited various morphological and biochemical variations due to mutations which Larkin and Scowcroft (1981) termed somaclonal variations.

Plants from cultured epicotyl and calli derived from epicotyl were regenerated in the present study. The regenerated plants were grown in a green house and produced seeds. Morphological variation and agronomic traits in regenerated plants were examined and their progenies ( $R_1$ - $R_5$ ) were compared with parental cultivars (control plants).

Variant phenotypes were obtained in  $R_1$  generations (next generation obtained from regenerated plants) including chimeral albino, abnormal leaf morphology, long stem, dwarf, pod colour variant and sterile plant. The frequency of mutant phenotype per  $R_1$  plant was 0.4-3.8%.

In agronomic traits, from comparison of  $R_1$  and  $R_2$  somaclonal lines with the parental cultivar, the pods number per plant and main stem length and node number per main stem showed a wide range of distribution.

X-ray and  $\gamma$ -ray irradiated seeds were cultured on MS medium without plant growth regulators. Seedlings grown after irradiation by a strong dose mutagen were weak. Frequency distribution of the agronomic traits in  $R_1$  plants after regeneration from epicotyl derived from irradiated seeds showed wide range than parental cultivar and did not show normal distribution. For example, pods number per plant of  $R_1$  was three times that of control plants and 100-grain weight was 5 g heavier than control plants in Erimo-shozu. Furthermore, the frequency of variant phenotype per  $R_1$  plant was 1.3-6.7% in the experiment.

In Erimo-shozu and Hatsune-shozu  $R_2$  lines, the distribution range of date of maturity was 10-20 days. There were late-maturity lines compared with parental cultivar and some lines did not mature.

Three lines were selected about 100-grain in Hatsune-shozu. The 100-grain weight of three lines approximately 2 g heavier than that of control cultivar. One line with a light 100-grain weight was selected. 100-grain weight of this line was significant differences compared with that of control plants. The three lines with heavier were examined for yield. Yield in one year in some lines were low, but the average yield of these lines did not decrease with control plants.

The field performance of these three lines was also examined in the field inflected with adzuki brown stem rot disease. One line had shown a high disease rate compared with control (Hatsune-shozu was resistance for this disease). The yield of this line was decreased, so this line was considered susceptible to the disease. In cold tolerance trial, 100-grain weight of three lines was slightly heavy and the date maturity was delayed in two lines.

### 3. Transformation of adzuki bean by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*.

Transformation technique is essential for crop improvement. The following process was to produce a transgenic adzuki bean.

First, to investigate the susceptibility of adzuki bean epicotyl for kanamycin (Km), epicotyls were plated on a medium containing various concentrations of Km. The callus formation frequency of epicotyl on 50 mg/l Km was 5% and the frequency was 0% on more epicotyl 75 mg/l Km. Thus the Km concentration used as a selectable marker for transformation experiment was 50 mg/l.

Epicotyl explants of adzuki bean were inoculated with overnight cultured *A. tumefaciens* (LBA 4404 harbouring pBI 121-NPT II, *GUS* gene) for 15 minutes and cocultivated for 2 days. Explants were cultured on MS selection medium containing 50 mg/l Km, 500 mg/l carbenicillin and BAP. After one month of culture, shoots were regenerated on selection medium and then transferred on MS selection medium without plant growth regulators. Plant resistant to Km were rooted on the medium. Total DNA was isolated from leaves of these plants and prepared for Southern blot analysis. The presence of *NPT II* gene was detected in these plants using a horse-radish probe for pBI 121. Transgenic adzuki bean were selected on medium containing kanamycin.

To detect *GUS* gene expression, cell extract of transgenic plants was inoculated with 4-methyl umbelliferyl glucuronide (MUG). An assay can be made by placing the reaction tube on a long-wave UV light box and observing the blue fluorescence, but that of control plant did not express it. So, *GUS* gene expression of transgenic plants was detected by fluorescence of 4-methylumbelliferone.

Transgenic adzuki bean were raised in the green house to produce flowers and viable seeds. The next generation was seeded on the selection medium. Some transgenic plants were rooted on the medium.

*A. rhizogenes* grown overnight in the YEB medium was inoculated on cut of aseptic epicotyls and primary leaves. About 10 days after inoculation, hairy roots appears at the inoculated sites of both sides. the hairy roots were cut off at about 10 mm in length and cultured on MS medium without plant growth regulators with 500 mg/l carbenicillin and 200 mg/l vancomycin. The roots grew vigorously and showed extensive lateral branching on the medium. Plant cells transformed by *A. rhizogenes* generally produce new compounds called opines. The presence of opines, which is evidence of genetic transformation, was analyzed by hairy roots with electrophoresis. Thus, the hairy root derived from epicotyl and primary leaf showed the presence of mikimopine.

Hairy roots were then cultured on the regeneration MS medium supplemented with 0.1 mg/l NAA + 2.0 mg/l BAP. Calli were induced from the roots and shoots were regenerated from the calli. The shoots rooted on a hormone-free MS medium. Regenerated plants were dwarf types and had a thin leaf. The regenerated plants were confirmed to be transformed because of the presence of mikimopine in the root.

The adzuki bean weevil (*Callosabruhchus chinensis*) is commonly known as a pest of the adzuki bean during storage. But they can not be raised on the kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Kidney bean seed contains a

proteinous inhibitors markedly suppressed  $\alpha$ -amylase activities in the larval of the weevils.

To produce weevil resistant adzuki bean, the transformation of the adzuki bean was conducted. The materials and methods were as described above. In this case *A. tumefaciens* harbouring  $\alpha$ -amylase inhibitor gene ( $\alpha AI$ ) was used. Shoots were induced from inoculated explants on the selection medium (50 mg/l kanamycin). Total DNA was isolated from leaves of these kanamycin resistant plants. The DNA was subjected to polymerase chain reaction (PCR) using  $\alpha AI$  gene primers. The amplified DNA was electrophoresed in a 1% agarose gel. Amplification of  $\alpha AI$  gene was obtained with DNA from Km-resistant plants.

From the present studies, the regeneration and transformation system of adzuki bean will lead to a new approach in adzuki bean breeding.

## 謝 辞

本研究の遂行と取りまとめにあたり、北海道大学農学部教授木下俊郎博士には終始御懇篤なる御指導、御激励と論文の御校閲を賜った。ここに深く謝意を表す。また、本論文において御校閲の労をとられた北海道大学農学部教授原田隆博士、同学部教授三上哲夫博士に心から感謝申し上げる。

北海道立中央農業試験場長野村信史氏には終始御激励いただいた。また、本研究の端緒を与えられ、研究開始以来、生物工学科長玉田哲男博士には、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜った。また、取りまとめに際し同生物工学科細胞育種科長菊地治己博士には特段の御配慮と御援助いただいた。細胞育種科ならびに遺伝子工学科の職員各位、臨時職員の各位には、実験遂行上、多大の御援助を受けた。ここに心から感謝申し上げる。

北海道立滝川畜産試験場長国井輝男氏には、終始御激励、御指導いただいた。また、北海道立植物遺伝資源センター場長関谷長昭氏には、終始御指導、御鞭撻いただいた。ここに忠心より感謝の意を表す。

北海道立十勝農業試験場主任研究員松川勲氏、ならびに弘前大学農学部助教授原田竹雄博士には研究遂行上貴重な御示唆と御援助いただいた。

ここに記し、深甚の謝意を表す。