

25. 超音波処理はアグロバクテリウムの除菌に有効である

〔要約〕サトウキビのアグロバクテリウムを用いた形質転換において、一般の超音波洗浄機による超音波処理でアグロバクテリウムの菌密度を低下させ、除菌・選抜培養中の過剰増殖を抑制することができる。

所属	国際農林水産業研究センター・沖縄支所・育種素材開発研究室			連絡先	0980(88)6301		
推進会議名	国際農林水産業	専門	バイテク	対象	工芸作物	分類	研究

〔背景・ねらい〕

植物のアグロバクテリウムを用いた形質転換では、アグロバクテリウムの接種、菌と対象とする組織・細胞との共存培養後に、アグロバクテリウムを除くための除菌操作が不可欠である。一般には、共存培養後に洗浄することにより組織・細胞に付着するアグロバクテリウムの菌密度を低くし、さらにカルベニシリン等の抗生物質を添加した培地上で培養することによって、除菌を行っている。しかし、除菌培養・選抜培養の過程で、アグロバクテリウムが再び過剰に増殖し、形質転換を行った組織・細胞に大きなダメージを与え、結果的に形質転換効率を低下させることもままあり、簡便で効果の高い除菌方法が求められている。

〔成果の内容・特徴〕

1. アグロバクテリウム (菌株 EHA101) を N6-2 培地 (表 1) に懸濁し、超音波処理 (5 分間) を行う。この菌液 50 μl を MS-1 培地に接種し、26°C (暗所) で培養する。4 日後の培地上のコロニー数は超音波処理区で無処理区よりも著しく少なくなり、超音波処理によって生菌数が減少することが分かる (図 1)。菌株 LBA4404 でもこれとほぼ同様の結果が得られる。
2. アグロバクテリウム (菌株 EHA101) を N6-2c 培地に懸濁し、サトウキビ液体振とう培養細胞を加え振とう培養する。24 時間後に培養細胞は滅菌水にて洗浄し、超音波処理を行う。培養細胞は共存培養培地 MS-1c に移植し 3 日間培養した後、除菌培地 MS-1e に移植する。2 週間後に観察すると、超音波処理区では菌の過剰増殖は全く認められないが、無処理区では多数の過剰増殖が認められる (図 2)。
3. サトウキビ液体振とう培養細胞に超音波処理を行った後、MS-1 培地上で培養する。2 週間後のカルス重量では、超音波処理区と無処理区で差は認められない (表 2)。また、このカルスを再分化培地 MS-R9 で培養しても、3 週間後のシュート形成率に差は認められない (表 3)。1 ~ 5 分程度の超音波処理は、サトウキビ培養細胞の生育および再分化に対し悪影響を及ぼさない。

〔成果の活用面・留意点〕

1. 超音波処理には市販の超音波洗浄機 Ultrason Velvo Clear VS-150H (44 kHz) を用いた。超音波処理の際、菌および培養細胞は 50ml 容量のプラスチックチューブ (ポリプロピレン製) に入れた。
2. 本手法はサトウキビだけでなく、植物一般のアグロバクテリウムを用いた形質転換に広く利用できる可能性が高い。他の植物種で本手法を用いる場合、あらかじめ超音波処理が対象とする組織・細胞に及ぼす影響を確認しておく必要がある。

〔具体的データ〕

表 1 培養に用いた培地

MS-1:	MS + 2mg/l 2,4-D + 500mg/l カザミノ酸, 3% ショ糖, 0.9% Agar, pH 5.8
N6-2:	N6 修正 + 2mg/l 2,4-D + 500mg/l カザミノ酸, 3% ショ糖, pH 5.8
N6-2c:	N6-2 + 50mg/l アセトシリニン, pH 5.2
MS-1c:	MS-1 + 50mg/l アセトシリニン, pH 5.2
MS-1e:	MS-1c + 200mg/l カルベニシリン, pH 5.8
MS-R9:	MS + 0.5mg/l IAA+1mg/l BA + 1.5% ショ糖 + 1.5% ソルビトール 1.2% Agar, pH 5.8

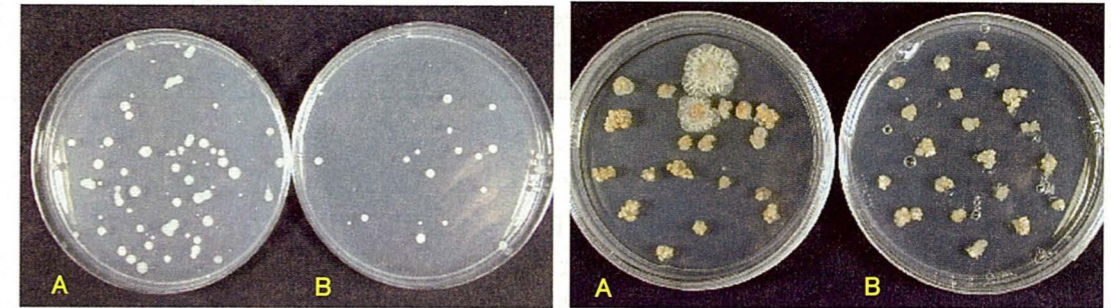


図 1 培地上で生育するアグロバクテリウム (EHA101) のコロニー
A; 超音波無処理、B; 超音波処理 (5 分)。OD₆₀₀=1 × 10⁶ の菌密度に調整した菌液を接種した。図は接種から 4 日

図 2 除菌培地上で培養中のカルスとアグロバクテリウム (EHA101) の過剰増殖
A; 超音波無処理、B; 超音波処理 (5 分)。サトウキビ培養細胞は OD₆₀₀=0.5 の菌密度に調整した菌液中で振とう培養した。図は除菌培地に移植して 14 日後の状況。供試品種は NiF 4。

表 2 サトウキビカルスの生育に及ぼす超音波処理の影響

処理	カルス重量 (g) / シャーレ	
	置床時	14 日後
超音波無処理	0.19 ± 0.023	1.52 ± 0.161
超音波処理(1 分)	0.21 ± 0.028	1.82 ± 0.244
超音波処理(5 分)	0.18 ± 0.049	1.61 ± 0.267

1 シャーレあたり 15 個のカルスを置床、値は 5 反復の平均値 ± 標準偏差。供試品種は NiF 4。

表 3 カルスからのシュート再分化に及ぼす超音波処理の影響

処理	シュート形成率 (%)
超音波無処理	63 ± 13.8
超音波処理(1 分)	79 ± 11.0
超音波処理(5 分)	69 ± 23.4

1 シャーレあたり 15 個のカルスを置床、値は 5 反復の平均値 ± 標準偏差。供試品種は NiF 4。

〔その他〕

研究課題名：サトウキビの効率的な形質転換体作出技術の開発

予算区分：基盤

研究期間：2002 年度 (2001 ~ 2005 年度)

研究担当者：松岡誠、N.S. アリフィン (沖縄招へい、インドネシア)、寺内方克、田村泰章、谷尾昌彦
 発表論文等：松岡誠, N.S. アリフィン, 田村泰章, 谷尾昌彦, 寺内方克 (2002): アグロバクテリウムによるサトウキビ形質転換体の作出—超音波処理はアグロバクテリウムの除菌に有効である—, 熱帯農業, 46 (別 2), 94-95.