

宮 崎 大 学 大 学 院  
博 士 学 位 論 文

ルジグラス (*Brachiaria ruziziensis*) における組織培養法の確立と  
その育種的利用に関する研究

2010年3月24日

宮崎大学大学院農学工学総合研究科  
資源環境科学専攻

石垣 元気

## 目次

序 章 .....	1
第 1 章 <i>Brachiaria</i> 属 4 草種におけるゲノムサイズの推定とその特性 .....	7
1. 緒言 .....	7
2. 材料および方法 .....	8
(1) 供試植物 .....	8
(2) フローサイトメトリー分析 .....	8
3. 結果および考察 .....	10
4. 摘要 .....	16
第 2 章 ルジグラスにおける体細胞不定胚および多芽体形成と植物体再分化 ..	17
1. 緒言 .....	17
2. 材料および方法 .....	18
(1) 多芽体形成およびエンブリオジェニックカルスの形成 .....	18
(2) 多芽体およびエンブリオジェニックカルスからの植物体再分化 .....	19
(3) 統計処理 .....	19
3. 結果および考察 .....	20
(1) 多芽体形成と植物体再分化 .....	20
(2) エンブリオジェニックカルス形成と植物体再分化 .....	24
4. 摘要 .....	31
第 3 章 ルジグラスにおける 4 倍体の作出と細胞学的手法による解析 .....	32
1. 緒言 .....	32
2. 材料および方法 .....	34
(1) 供試材料 .....	34
(2) コルヒチン処理 .....	34
(3) フローサイトメトリーによる倍数性の推定 .....	36

(4) 細胞学的手法による染色体数の確認 .....	36
(5) SEMによる孔辺細胞の観察 .....	37
(6) 統計解析 .....	37
3. 結果および考察 .....	37
(1) 異なるコルヒチン処理時間およびコルヒチン濃度が多芽体の生存 および染色体倍加に及ぼす影響 .....	37
(2) 異なるコルヒチン処理時間が種子由来の幼植物体の生存および 染色体倍加に及ぼす影響 .....	38
(3) 4倍体における染色体数の確認および孔辺細胞の特徴 .....	41
4. 摘要 .....	49

#### 第4章 パーティクルインフローガンを用いたルジグラスの形質転換体の作出と

その発現解析 .....	50
1. 緒言 .....	50
2. 材料および方法 .....	52
(1) 多芽体およびエンブリオジェニックカルスの誘導 .....	52
(2) プラスミド調製 .....	52
(3) 浸透圧処理 .....	52
(4) パーティクルガンによる遺伝子導入 .....	55
(5) $\beta$ -glucuronidase(GUS)発現 .....	55
(6) 選抜培地の検討 .....	55
(7) 形質転換体の選抜 .....	56
(8) DNA単離およびPCR分析 .....	56
(9) サザンブロット分析 .....	57
(10) 除草剤耐性試験 .....	57
(11) 統計解析 .....	58
3. 結果および考察 .....	58
(1) 標的組織がガン処理後のトランジェント GUS発現に及ぼす影響 ..	58
(2) ビアラホス濃度がエンブリオジェニックカルスの生存に	

及ぼす影響 .....	60
(3) 形質転換体の作出および導入遺伝子の発現 .....	60
4. 摘要 .....	68
第5章 総合考察 .....	69
要約 .....	77
Summary .....	81
謝辞 .....	86
引用文献 .....	88

## 序章

わが国における暖地型イネ科牧草の育種は、1960年代頃に四国農業試験場、草地試験場、九州農業試験場で始まり、米国、オーストラリア、アフリカ等から導入された暖地型牧草各種における諸特性が評価された。1970年代頃には、大規模な遺伝資源の探索が東アフリカ、ケニア、ミャンマーおよび国内を中心に行われ（宝示戸・堀端 1982; 中川 2003）、これらの遺伝資源の中から、数多くの草種が育成されてきた。わが国では、主に、西南暖地での永年利用を目的としたバヒアグラスやダリスグラスなどの *Paspalum* 属における育種、畑地や水田転換畑での夏季単年利用を目的としたカラードギニアグラスやギニアグラスなどの *Panicum* 属、ローズグラス (*Chloris* 属) およびソルガム (*Sorghum* 属) における育種、沖縄および先島諸島などの亜熱帯地域での永年利用を目的としたギニアグラスおよびジャイアントスターグラス (*Cynodon* 属) の育種が行われてきた（中川 2003）。近年、飼料の生産・利用の場においては、農業従事者の高齢化または自給飼料生産における低コスト化の必要性などの点から、従来の採草中心から放牧中心に関心が集まってきている。このことから、今後、より低管理で持続的な飼料生産を可能とするような草種の育成が望まれている。

*Brachiaria* 属は、Poaceae 科、Panicoideae 亜科、Paniceae 族に属し、主にアフリカを原産とする暖地型イネ科牧草である（Keller-Grein *et al.* 1996）。本属は、南米、東南アジア、オーストラリアおよびアフリカなどの熱帯・亜熱帯地域において広く栽培されており、主に放牧用草種として利用されている。特に、南米では、もともとイネ科牧草が少なかったことを背景に、1970年代に本属の本格的な利用が開始されて以来、その栽培面積はブラジルだけでも3~7千

万 ha にまで達している (Miles *et al.* 1996)。

現在, *Brachiaria* 属は約 100 種確認されており, 中でも, *B. decumbens* Stapf, *B. brizantha* (A. Rich) Stapf, *B. humidicola* (Rendle) Schweick および *B. ruziziensis* Germain & Evrard は, 様々な土壤環境に適応し, 収量性, 飼料品質に優れ, 種子繁殖も行うなどの点から, 優良草種として利用されている (Miles *et al.* 2004)。Table 1 は, これら 4 草種における生殖様式, 染色体数 (倍数性) および主な特性についてまとめたものである。

*B. decumbens* は,  $2n = 18$  (2 倍体),  $36$  (4 倍体),  $45$  (5 倍体) があり, 有性生殖を行う 2 倍体系統を除いては, 条件的アポミクシス性である。本草種は, ウルチソル (Ultisols) のような酸性で低肥沃な土壤においても生育し, 高い収量性を示している。飼料品質は高く, 嗜好性も良い。しかしながら, アワフキムシ類 (spittlebugs: *Zulia entreriana*, *Deois flavopicta*, *Aeneolamia varia* and *Mahanarva fimbriolata*) に対して高い感受性を示す。また, *Pithomyces chartarum* (真菌) に感染すると, スポリデスミンと呼ばれるマイコトキシンを産生し, 家畜の肝機能障害を引き起こすことが知られている (Andrade *et al.* 1978)。

*B. brizantha* は,  $2n = 18$  (2 倍体),  $36$  (4 倍体),  $45$  (5 倍体),  $54$  (6 倍体) があり, 有性生殖を行う 2 倍体を除き, 条件的アポミクシス性である。低肥沃で物理的に劣悪な土壤には適さないものの, 肥料反応性が高く, 耐乾性も 4 草種の中で最も高いことから, 肥沃な土壤条件下では収量性が高い。飼料品質は刈取り間隔が長い場合には急激に低下する反面, アワフキムシ類に対しては抵抗性を示す。

Table 1. Comparison of reproduction mode, chromosome number and attributes of important *Brachiaria* spp.

Species	Reproduction mode (Degree of apomictic as percent) <sup>†</sup>	Chromosome number (Ploidy level) <sup>‡</sup>	Positive attributes	Negative attributes
<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf	A (64.0)	2n = 18 (2X) 36 (4X) 45 (5X)	Tolerance of acid soil, Tolerance of low fertility, High productivity, High quality forage	Susceptibility to spittlebug, Toxin (sporidesmin) production
<i>Brachiaria brizantha</i> (A. Rich) Stapf	A (84.7)	2n = 18(2X) 36(4X) 45(5X) 54(6X)	Responsiveness to fertilizer application, Drought resistance, High productivity, Spittlebug tolerance	Low adaptation to poorly drained soils, Need for moderately fertile soils, Low quality forage under long cutting interval
<i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schweick	A(64.6)	2n = 36 (4X) 54 (6X) 72 (8X)	Strongly stoloniferous habit, Adaptation to low-fertility soils, Low P and Ca requirements, Inhibition of nitrification	Low seed production, Low quality forage
<i>Brachiaria ruziziensis</i> Germain & Evrard	S (0.0)	2n = 18 (2X)	Fast growth early in wet season, Compatibility with legumes, High seed production potential, High quality forage	Need for well-drained fertile soils, Low competitiveness with weeds Susceptibility to spittlebug

Resource; Fisher and Kerridge (1996), Keller-Grein *et al.* (1996), Lascano and Euclides (1996), Nakagawa (1998), Miles (2004) *et al.*

<sup>†</sup> A: apomictic, S: sexual. Degree of apomictic as percent were reported by Kouki (2006) *et al.*

<sup>‡</sup> Diploid *B. decumbens* and *B. brizantha* (2n = 18) are sexual.

*B. humidicola* は、 $2n = 36$  (4 倍体)、 $54$  (6 倍体)、 $72$  (8 倍体) があり、条件的アポミクシス性である。草型は強い匍匐性で、低肥沃または無施肥条件下でもよく生育し、リン酸やカルシウムの要求量が低い。一方、種子生産性がとても低く、さらにその飼料品質も、他の *Brachiaria* 草種と比べて低い。また、本草種の特徴として土壤中のアンモニア態窒素を長期間蓄積することが可能な硝化抑制効果があることが報告されている (Ishikawa *et al.* 2003)。

*B. ruziziensis* は、 $2n = 18$  (2 倍体) であり、有性生殖のみを行う数少ない草種である。本草種は、肥沃な土壌を好み、雑草に対する競合性は低いものの、雨期における初期生育が旺盛で、マメ科牧草との混播に適しており、種子生産性も高い。また、放牧用、乾草用のみならず、良質なサイレージも調製可能で、嗜好性も非常に高い。一方、アワフキムシ類に対しては高い感受性を示す。

以上のように、4 種の *Brachiaria* 属草種は、幅広い形態的変異を示し、各々の草種において有用な形質を保持していることから、これら 4 草種を育種素材として用いた *Brachiaria* 属育種を展開し、より高品質な新品種を育成することが望まれている。*Brachiaria* 属育種では、収量性および消化性の更なる向上に加え、草地の持続性、酸性土壌等に対する環境耐性およびアワフキムシ類に対する抵抗性などが育種目標として掲げられている (Miles and Valle 1996)。特に、収量は熱帯地域の乾季における低温および低雨量により大きく左右され、さらに、*Brachiaria* 属草種の消化性は、暖地型イネ科牧草の中では高いものの、寒地型イネ科牧草に比べて低いなどの欠点を有しており、その改良が望まれている。

しかしながら、前述したように、多くの *Brachiaria* 属草種は、その生殖様式がアポミクシス性であるため、従来の交雑育種法による本草種の改良は困難



である (Valle and Savidan 1996)。そこで、この育種障害を克服し、*Brachiaria* 属草種の品質向上を目的とした育種を展開するためには、従来の遺伝資源を活用しつつ、新たな遺伝資源を作出する必要がある。また、バイオテクノロジー的手法、特に遺伝子組換え技術による育種法を構築することが望まれる (明石ら 2003)。

本研究では、組織培養法を育種的に利用した *Brachiaria* 属の変異拡大とそれを用いた *Brachiaria* 育種を確立するために、2 倍体で有性生殖である *B. ruziziensis* (ルジグラス) に注目し、研究を進めた。Fig. 1 は、本研究における *Brachiaria* 育種戦略を示したものである。まず第 1 章では、ルジグラスを含む 4 種の *Brachiaria* 属草種におけるゲノムサイズをフローサイトメトリーにより推定し、これらの草種における特性を調査した。次に、第 2 章では、ルジグラスの幼植物体由来の生長点を用いて、多芽体およびエンブリオジェニックの誘導とその植物体再分化について諸条件を検討し、組織培養法を確立した。第 3 章では、組織培養法を用いてコルヒチン処理による 4 倍体作出を試みた。最後に、第 4 章では、エンブリオジェニックカルスを標的組織として用いて、パーティクルガン法により形質転換体の作出を試み、分子育種への可能性を考察した。

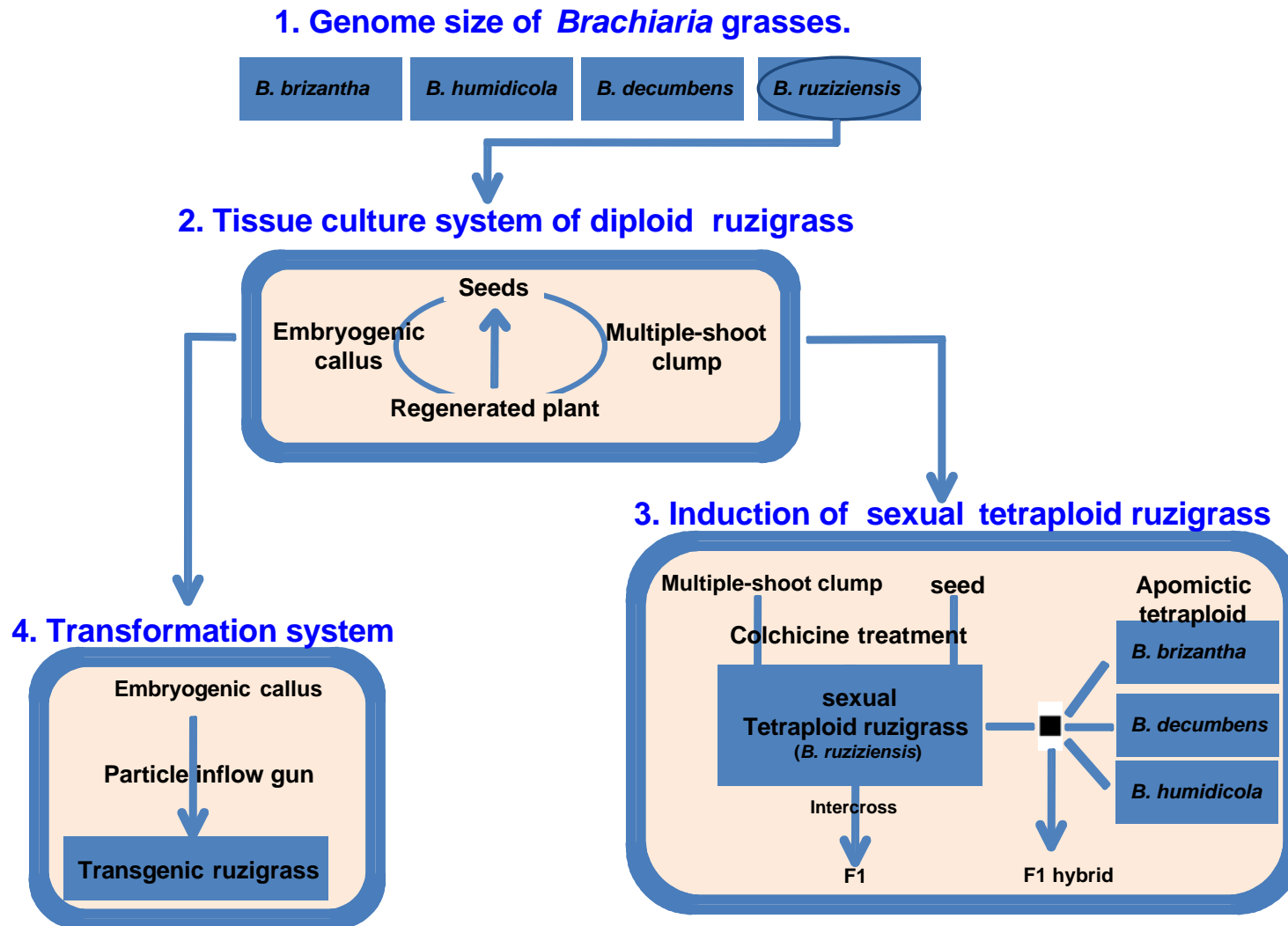


Fig. 1 *Brachiaria* breeding scheme using ruzigrass (*B. ruziziensis*).

## 第1章 *Brachiaria* 属 4 草種におけるゲノムサイズの推定とその特性

### 1. 緒言

近年、フローサイトメトリーによる植物の倍数性およびゲノムサイズが容易に推定できるようになった。植物育種において、ゲノムサイズ情報は、植物種の進化に関する研究、倍数性の推定、ソマクローナル変異の調査、遺伝子地図作成さらには交雑育種を展開するための重要な基礎情報である。

これまでに、暖地型イネ科牧草では、ギニアグラス、ネピアグラスおよびバヒアグラスなどにおいてゲノムサイズが推定されている (Jarret 1995; Martel *et al.* 1997; Akiyama *et al.* 2001, 2008; Brito *et al.* 2008)。一方、*Brachiaria* 属においては、Penteado ら (2000) が、*Brachiaria* 属 17 種 430 系統の倍数性をフローサイトメトリーにより調査しているものの、*Brachiaria* 属草種のゲノムサイズに関する研究例は報告されていない。

本研究では、フローサイトメトリーを用いて、*Brachiaria* 属草種のうち有望草種である *B. ruziziensis*, *B. decumbens*, *B. brizantha* および *B. humidicola* の 4 草種におけるゲノムサイズを推定し、これらの草種におけるゲノムサイズから見た特性を調査した。

## 2. 材料および方法

### (1) 供試植物

Table 2 は, *Brachiaria* 属 4 草種について, 本研究に供試した 5 品種を含む, これまでに育成された品種をまとめたものである。供試植物は, *B. ruziziensis* cv. Kennedy, *B. brizantha* cv. Marandu, *B. brizantha* cv. MG5, *B. decumbens* cv. Basilisk および *B. humidicola* cv. Humidicola である。これらの各品種は, 独立行政法人・農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所 (Tochigi, Japan) および国際熱帯農業センター (Cali, Colombia) から 2005 年に分譲された。完熟種子は, 外穎・内穎を取り除き, 滅菌処理を行い (70%エタノール 1 分, 2% 次亜塩素酸ナトリウム 20 分), 滅菌水で 3 回洗浄した。滅菌種子は, ホルモンフリーの MS 固形培地 ( $30 \text{ g L}^{-1}$  スクロース, 0.3%ゲルライト) に置床し, 発芽処理を施した。発芽処理から 1 ヶ月後, 伸長した幼植物体は,  $31^\circ\text{C}$ , 16 時間明条件下のインキュベーター内で順化させた後, 宮崎焼土およびバーミキュライトを 2:1 の割合で充填した 1/5000 a ワグネルポットに移植し, 温室内で栽培した。

### (2) フローサイトメトリー分析

サンプル調製は Galbraith (1989) の方法に準じた。*Brachiaria* 属草種および内部標準であるイネ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) の未展開葉は, 約  $1 \text{ cm}^2$  および約  $0.5 \text{ cm}^2$  に切り取り, 90-mm ペトリ皿に移した。植物細胞からの核抽出は, 切り取った葉身に 1 ml 核解離溶液 (50 mM Tris-HCl, 0.5% polyvinylpyrrolidone-k90, 0.01% Triton-X, 0.63% sodium sulfite, pH7.5) を加え,

**Table 2** Commercially exploited *Brachiaria* species.

Species	Cultivar <sup>†</sup> (CIAT accession number)
<i>Brachiaria brizantha</i> (A. Rich) Stapf	<u>Marandu</u> (6294), Brizantha (6780), Gigante (6780), Insurgente (6780), Diamantes (6780), LaLiberted (26646), Tloedo (26110), Victoria (26110), <u>MG5</u> (26110), MG-5 (26110), Serengeti (6387), Karanga (16835)
<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf	<u>Basilisk</u> (606), Brachiaria (606), Senal (606), Chontalpo (606), Barrera (606), Peludo (606)
<i>Brachiaria humidicola</i> (Rendle) Schweick	Koronivia (679), INIAP-NAPO 701 (679), Aguja (679), <u>Humidicola</u> (679), Chetumal (679), Pasto humidicola (679), Llanero (6133), Ganadero (6133), Gualaca (6133), Brunca (6133)
<i>Brachiaria ruziziensis</i> Germain & Evrard	<u>Kennedy</u> (605)

<sup>†</sup> Materials in this study are underscored.

5 分間染み込ませた後、両刃カミソリ (FEATHER Ltd., Osaka, Japan) で切り刻み、植物細胞内から核そのものを解離した。サンプル液は、50  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュを用いて濾過した後、4°C, 6000rpm, 2 分間遠心分離し、上清を取り除き、50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  RNase を添加した核解離溶液を 500  $\mu\text{l}$  加え、少なくとも 30 分間室温で放置し、RNA を消化した。調製したサンプル液は、PI (Propidium Iodide; Biotium Inc., CA., USA) を 50  $\mu\text{l}$  加え、5 分放置し、核内の全 DNA を染色した。各植物体およびイネにおける蛍光強度は、PARTEC CA II フローサイトメーター (Beckman Coulter Inc., Tokyo, Japan) を用いて測定した。サンプルのゲノムサイズは、測定された蛍光強度値およびイネのゲノムサイズ 395 Mbp (Ohmido *et al.* 2000) を基に算出した。用いた公式は以下の通りである。

$$y = \frac{a}{b} \times 395$$

y: 各サンプルのゲノムサイズ

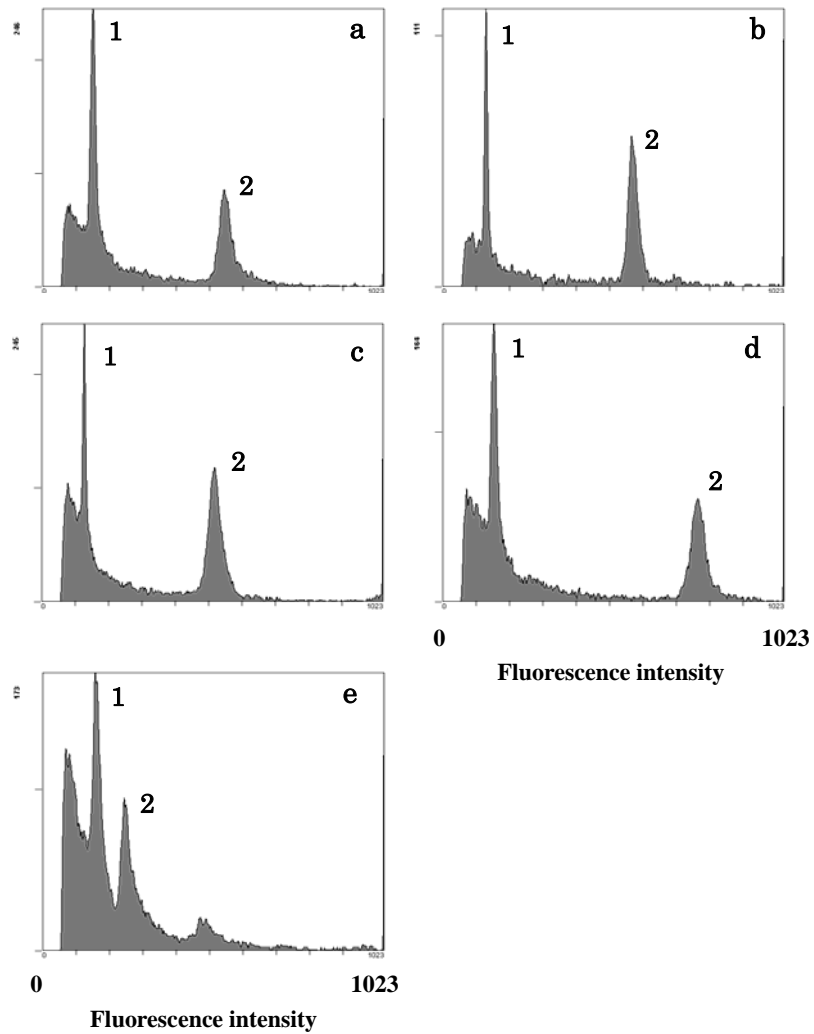
a: 各サンプルの蛍光強度 (G<sub>1</sub> 期)

b: イネの蛍光強度 (G<sub>1</sub> 期)

### 3. 結果および考察

Fig. 2 は、*Brachiaria* 属 4 草種 (5 品種) およびイネにおける蛍光強度のピークを表したものである。*Brachiaria* 属 4 草種 (5 品種) の蛍光強度のピーク (ピーク 2) は、いずれの場合においてもイネの蛍光強度のピーク (ピーク 1) と異なっており、また、草種間においても異なっていた。

Table 3 は、*Brachiaria* 属草種 4 草種 (5 品種) におけるゲノムサイズをま



**Fig. 2** Fluorescent intensities of *Brachiaria* grasses. Peak 1 indicates *O. sativa* cv. Nipponbare, peak 2 indicates *Brachiaria* grasses. (a) *B. brizantha* cv. Marandu, (b) *B. brizantha* cv. MG5, (c) *B. decumbens* cv. Basilisk (d) *B. humidicola* cv. Humidicola (e) *B. ruziziensis* cv. Kennedy.

**Table 3** Nuclear DNA contents in *Brachiaria* grasses.

Species	Cultivar	CIAT accession	Reproduction <sup>†</sup> mode	Ploidy	Analyzed times of DNA content	Mbp C <sup>-1</sup>	S.D.	Mbp Cx <sup>-1</sup>	S.D.
<i>B. ruziziensis</i>	Kennedy	605	S	2	5	615	13	615	13
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	606	A	4	5	1633	17	817	6
<i>B. brizantha</i>	Marandu	6294	A	4	5	1404	13	702	7
	MG5	26110	A	5	5	1743	15	697	6
<i>B. humidicola</i>	Humidicola	679	A	6	5	1953	16	651	5

<sup>†</sup> A: apomictic, S: sexual.



とめたものである。2倍体種である *B. ruzizensis* cv. Kennedy のゲノムサイズは、 $615 \pm 13 \text{ Mbp C}^{-1}$  と推定された。一方、4倍体種におけるゲノムサイズは、*B. brizantha* cv. Marandu が  $1404 \pm 13 \text{ Mbp C}^{-1}$ 、*B. decumbens* cv. Basilisk が  $1633 \pm 17 \text{ Mbp C}^{-1}$  であった。また、5倍体種の *B. brizantha* cv. MG5 および6倍体種の *B. humidicola* cv. Humidicola のゲノムサイズは、それぞれ  $1743 \pm 15 \text{ Mbp C}^{-1}$  および  $1953 \pm 16 \text{ Mbp C}^{-1}$  であった。このことから、*Brachiaria* 属草種のゲノムサイズは、倍数性が高次になっていくとともに増大していくことが認められた。しかしながら、*Brachiaria* 属4草種（5品種）のゲノムサイズは、種間において異なっていたものの、その差は小さく、種間における交雑障壁にはならないと考えられる。

*Brachiaria* 属には、2倍体種から6倍体種まで異なる倍数体が混在していることから、C-value のみにおけるゲノムサイズの比較には限界があると思われる。Greilhuber *et al.* (2005) は、倍数性植物におけるゲノムサイズの比較をより明確に行うために、Holoploid（半数体,  $n$ ）あたりの DNA 含量を示す C-value よりも Monoploid（一倍体,  $x$ ）あたりの DNA 含量を示す Cx-value を用いることを提唱している。一倍体は、生物が所有する一組のみの染色体構成のことである。一方、半数体は単相における染色体構成のことであり、その染色体構成は倍数性の違いによって各々異なっている。Cx-value を用いて一倍体あたりのゲノムサイズを算出したところ、2倍体種である *B. ruzizensis* cv. Kennedy のゲノムサイズは、 $615 \pm 13 \text{ Mbp Cx}^{-1}$  と算出された、一方、4倍体種におけるゲノムサイズは、*B. brizantha* cv. Marandu が  $702 \pm 7 \text{ Mbp Cx}^{-1}$ 、*B. decumbens* cv. Basilisk が  $817 \pm 6 \text{ Mbp Cx}^{-1}$  であった。また、5倍体種の *B. brizantha* cv. MG5

および6倍体種の *B. humidicola* cv. *Humidicola* のゲノムサイズは、それぞれ  $697 \pm 6 \text{ Mbp Cx}^{-1}$  および  $651 \pm 5 \text{ Mbp Cx}^{-1}$  であった (Table 3)。Chrtek *et al.* (2009) は *Hieracium* 属におけるゲノムサイズについて、半数体あたりのゲノムサイズは倍数性が高次になっていくとともに増大していくものの、一倍体あたりのゲノムサイズは、逆に減少する傾向が認められたことを報告している。さらに、他の被子植物においても同様の傾向が認められている (Kellogg and Bennetzen 2004; Leitch and Bennett 2004; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2006)。一方、*Brachiaria* 属では、4倍体種のゲノムサイズが最も大きく、5倍体種、6倍体種と高次になるにつれて減少し、Chrtek *et al.* (2009) の報告と同様の傾向が認められた。しかしながら、4倍体種、5倍体種および6倍体種、すなわちアポミクシス性草種におけるゲノムサイズは、2倍体種である有性草種のゲノムサイズと比べて、大きいものであった。Matzk *et al.* (2003) は、アポミクシス研究におけるモデル植物である *Hypericum* 属を用いて、ゲノムサイズを調査したところ、*Hypericum* 属内にあるアポミクシス性種の一倍体あたりのゲノムサイズは、有性生殖種と比べて大きいことを報告しており、本研究の結果と一致していた。このことから、*Brachiaria* 属においても、ゲノムサイズが倍数性のみではなく、生殖様式の差異によってもなんらかの影響を受けている可能性が示唆される。現在、*Brachiaria* 属における倍数性または生殖様式とゲノムサイズとの関係に関する詳細な研究はまだ報告されていないことから、この結果は、このような研究に新たな知見を加えるものであると考えられる。今後、FISH法などを用いて、*Brachiaria* 属における染色体の動態に関する研究を行う必要があると思われる。

以上のことから、本研究では、*Brachiaria* 属 4 草種 (5 品種) のゲノムサイ

ズをフローサイトメトリーにより推定することができた。ゲノムサイズは、種間において異なっているものの、その差は小さく、種間における交雑障壁にはならないと考えられた。得られたゲノムサイズ情報は、4倍体有性系統を用いた交雑育種を展開する上で交配後の後代における雑種判定の指標として利用できる。さらに、これらの遺伝学的基礎情報は、倍数性の推定、遺伝子地図の作製や本属の進化の解明に関する研究に適用できるものと考えられる。

#### 4. 摘要

フローサイトメトリーにより, *Brachiaria* 属 4 草種のゲノムサイズを推定した。半数体 (C-value) あたりのゲノムサイズは, *B. ruziziensis* cv. Kennedy が 615 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. Marandu が 1404 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. decumbens* cv. Basilisk が 1633 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. MG5 が 1743 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. humidicola* cv. Humidicola が 1953 Mbp C<sup>-1</sup> となり, 種間によって, そのサイズは異なっていたものの, 種間における交雑障壁にはならないと考えられた。一方, 一倍体 (Cx-value) あたりのゲノムサイズは, *B. ruziziensis* cv. Kennedy が 615 Mbp Cx<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. Marandu が 702 Mbp Cx<sup>-1</sup>, *B. decumbens* cv. Basilisk が 817 Mbp Cx<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. MG5 が 697 Mbp Cx<sup>-1</sup>, *B. humidicola* cv. Humidicola が 651 Mbp Cx<sup>-1</sup> となり, そのサイズは有性生殖種よりもアポミクシス性種の方が大きな値であった。また, 4 倍体におけるゲノムサイズが最も大きく, 5 倍体, 6 倍体と高次になるに伴い, 小さくなる傾向が認められた。

## 第2章 ルジグラスにおける体細胞不定胚形成および多芽体形成と植物体再分化

### 1. 緒言

組織培養法は、遺伝子組換え技術による分子育種を展開する上で、必要不可欠である。これまでに、暖地型イネ科牧草では、バヒアグラス (Bovo and Mroginski 1989; Akashi *et al.* 1993), ダリスグラス (Akashi and Adachi 1992a, 1992b), ローズグラス (Gondo *et al.* 2005) およびギニアグラス (Lu and Vasil 1981a, 1981b; Akashi and Adachi 1991) などにおいて、安定的で効率的な組織培養法が確立されている。他方, *Brachiaria* 属では, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura* および *B. ruziziensis* において、体細胞不定胚形成を介した植物体再分化に成功しているものの (Tohme *et al.* 1996), これらの不定胚形成および植物体再分化に関する詳細なデータは公表されておらず、また、これらの組織培養法を用いた形質転換体作出に関する研究は報告されていない。

本章では、遺伝子組換え技術による *Brachiaria* 属草種の品質向上を目的とし、その第一段階として、ルジグラス (*B. ruziziensis* cv. Kennedy) を用いて、幼植物体由来生長点からの多芽体およびエンブリオジェニックカルスの誘導およびそれらの植物体再分化について検討し、一連の組織培養法を確立した。

## 2. 材料および方法

### (1) 多芽体形成およびエンブリオジェニックカルスの形成

2倍体品種であるルジグラス (*Brachiaria ruziziensis* cv. Kennedy) の完熟種子は、外穎・内穎を取り除き、滅菌処理 [70% (v/v) エタノール 1分, 4% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム 20分] を施した後、滅菌水で3回洗浄した。滅菌種子は、5 ml 滅菌水を含ませた濾紙 (Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan) に移し、発芽を促した。発芽処理から2~3日後の幼植物体は、周りの葉および根を取り除き、生長点を剥き出しにして、以後の実験に供した。本実験で供した培地は、MS基本培地 (Murashige and Skoog 1962) に3%スクロースおよび0.3%ゲルライト (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を添加したMS固形培地である。多芽体は、0~1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D および0~4 mg L<sup>-1</sup> BAP を組合わせて添加したMS固形培地に生長点を置床し、31°C, 24時間, 50~60 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の照明下で培養することで誘導した (反復3, 20~30幼植物体/反復)。培養開始から30日後、形成された多芽体は緑色で増殖が旺盛なもののみを選び、30日間隔で継代培養した。一方、エンブリオジェニックカルスは、0~4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D および0~0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP を組合わせて添加したMS固形培地に生長点を置床し、31°C, 24時間, 20~30 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の照明下で培養することで誘導した (反復4, 21幼植物体/反復)。培養開始から30日後、誘導されたエンブリオジェニックカルスは、増殖旺盛で形状がコンパクトなもののみを選び、14日間隔で継代培養した。

## (2) 多芽体およびエンブリオジェニックカルスからの植物体再分化

植物体再分化は、多芽体の場合は、増殖した多芽体の一部を、 $0\sim 2\text{ mg L}^{-1}$  BAP,  $0\sim 3\text{ mg L}^{-1}$  kinetin および  $0\sim 3\text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> を単独あるいは組合わせて添加した MS 固形培地に移植し、30 日間培養することにより行った (反復 4, 21 幼植物体/反復)。一方、エンブリオジェニックカルスの場合は、増殖したエンブリオジェニックカルスの一部を、ホルモンフリーの MS 固形培地上で 14 日間培養し、体細胞不定胚を形成させた後、 $0\sim 0.1\text{ mg L}^{-1}$  NAA および  $0\sim 2\text{ mg L}^{-1}$  BAP を組合わせて添加した MS 固形培地に継代し、シュートを再分化させた (反復 3, 21 幼植物体/反復)。なお、植物体再分化は、どの供試物も、 $31^{\circ}\text{C}$ , 24 時間,  $150\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  の照明下で行った。得られた再分化シュートは、ホルモンフリーの  $1/2$  MS 固形培地に移植し、発根を促した後、 $27^{\circ}\text{C}$ , 16 時間,  $50\sim 60\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  の照明下で順化させた。順化处理 2~3 週間後、幼植物体は、宮崎焼土およびバーミキュライトを 2:1 の割合で充填した  $1/2000\text{ a}$  ワグネルポットに移植し、温室内で栽培した。

## (3) 統計解析

各データ ( $p, \%$ ) は、Claringbold *et al.* (1953) の公式にしたがって逆正弦変換を行った後、エクセル統計 2006 (Social Survey Research Information Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、Tukey の多重比較を行った。なお、Claringbold *et al.* (1953) の公式は以下の通りである。

$$y = \sin^{-1} \sqrt{p/100}$$

### 3. 結果および考察

#### (1) 多芽体形成と植物体再分化

Fig. 3 は、ルジグラスにおける多芽体の形成およびその植物体再分化の過程を示したものである。培養開始から 3 日目、幼植物体の生長点近傍部は膨らみ (Fig. 3a)、その周りの葉および根を取り除くことで、Fig. 3b に示すような生長点が剥き出しになった。培養開始から 14~21 日目、初期多芽体は、剥き出しになった生長点近傍部から形成され (Fig. 3c)、培養 30 日目には Fig. 3d に示すような多くの生長点が密集した多芽体が形成された。Table 4 は異なるホルモン濃度がルジグラスの多芽体形成に及ぼす影響についてまとめたものである。多芽体形成率は、供試した培地において有意な差は認められなかったものの、 $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区において 21.4% と最も高い値を示した。ローズグラスでは、低濃度の 2,4-D ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) と高濃度の BAP ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) を組合わせて添加した MS 固形培地上で幼植物体由来生長点を培養することにより多芽体が最も効率良く誘導され、その形状は、多芽体の表面上に多くのドーム状の生長点が密集していた (Gondo *et al.* 2005, 2009)。また、エンバク (*Avena sativa* L.: Zhang *et al.* 1996) やトウモロコシ (*Zea mays* L.: Zhong *et al.* 1992) においても同様の結果が報告されている。本研究においても、多芽体は、低濃度の 2,4-D ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) と高濃度の BAP ( $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) 条件下で効率良く誘導され、これまでのイネ科植物において報告された結果と同様であった。

多芽体の表面上に密集した生長点は、再分化培地上での培養開始から 14 日目には再分化し (Fig. 3e)、培養 21 日目には多くのシュートが認められた (Fig. 3f)。Table 5 は、異なるホルモン組成が多芽体からの植物体再分化に及ぼす影





**Fig. 3** Developmental stages of multiple shoots cultures of ruzigrass. (a) A swelled seed-derived shoot apical meristem after 3 days of culture on MS medium containing  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP at  $31^\circ\text{C}$  under light condition. (b) A naked shoot apical meristem. (c, d) Primary multiple-shoot clump after 21 days (c) and multiple-shoot clumps after 30 days (d) of culture. (e, f) Plant regeneration from multiple shoots after 14 (e) and 21 (f) days of culture on MS medium containing  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  kinetin +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  at  $31^\circ\text{C}$  under light condition. SAM, shoot apical meristem; PMS, primary multiple shoots.

**Table 4** Effect of plant hormone on multiple-shoot formation of ruzigrass.

Hormone concentration (mg L <sup>-1</sup> )		No. of explants inoculated	No. of explants with multiple-shoot clumps formed (%)
2,4-D	BAP		
0	0	70	0 (0,0)
0.1	1.0	70	4 (5.7)
0.1	2.0	70	3 (4.3)
0.1	4.0	70	0 (0.0)
0.5	1.0	70	3 (4.3)
0.5	2.0	70	15 (21.4)
0.5	4.0	70	7 (10.0)
1.0	1.0	70	6 (8.6)
1.0	2.0	70	11 (15.7)
1.0	4.0	70	2 (2.9)

There were no significant differences among media by Tukey's test.  
2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; BAP, 6-benzylaminopurine.

**Table 5** Effect of plant hormone on plant regeneration from multiple-shoot clumps in ruzigrass.

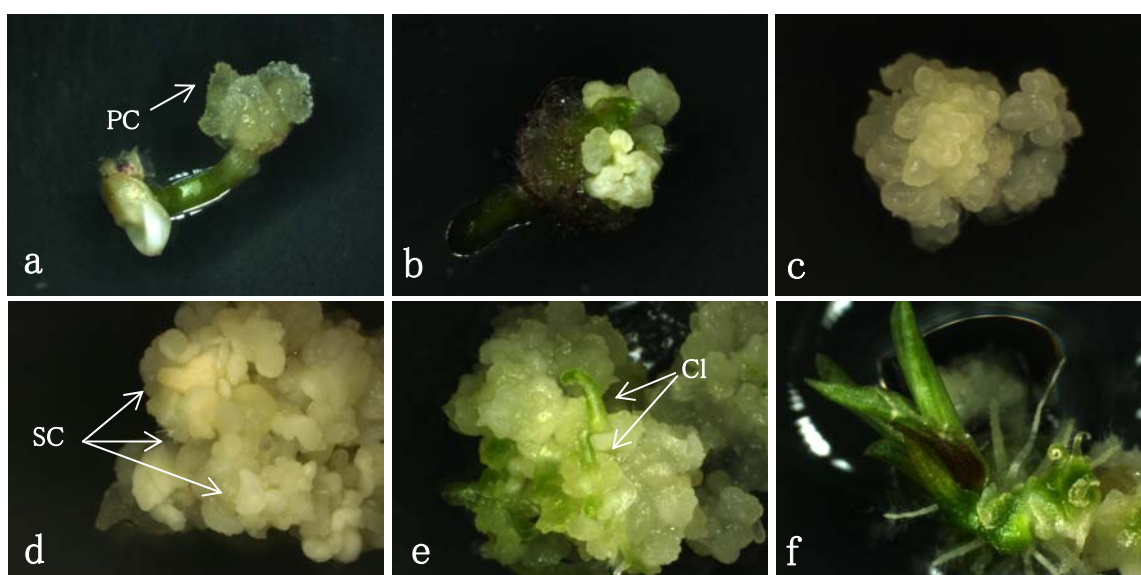
Hormone concentration (mg L <sup>-1</sup> )			No. of multiple-shoot clumps inoculated	No. of regenerated explants (%)
BAP	Kinetin	GA <sub>3</sub>		
0.0	1.0	1.0	84	30 (35.7)
0.0	2.0	2.0	84	45 (53.6)
0.0	3.0	3.0	84	26 (31.0)
0.25	0.0	0.0	84	25 (29.8)
1.0	0.0	0.0	84	45 (53.6)
1.0	1.0	0.0	84	30 (35.7)
2.0	2.0	0.0	84	37 (44.0)

There were no significant differences among media by Tukey's test. GA<sub>3</sub>, gibberellic acid.

響についてまとめたものである。多芽体の再分化率は、供試したホルモン組成区間で有意な差異は認められなかったものの、 $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区または  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  kinetin +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> 添加区において 53.6%と最も高い値を示した。ギニアグラスでは、エンブリオジェニックカルスからの植物体再分化において、kinetin と gibberellin を組合わせて培地中に添加することにより、不定胚の伸長が促進されたことが報告されており (Akashi and Adachi 1991)、本研究では、多芽体においても、kinetin と gibberellin を培地中へ添加することにより再分化率の向上が認められた。

## (2) エンブリオジェニックカルス形成と植物体再分化

Fig. 4 は、ルジグラスにおけるエンブリオジェニックカルス形成およびその植物体再分化の過程を示したものである。培養開始から 3 日目頃から幼植物体の生長点近傍部が膨潤し、7 日目頃には初期カルスが認められた (Fig. 4a)。さらに、14 日目頃にはコンパクトで淡黄色のエンブリオジェニックカルスが形成された (Fig. 4b)。形成されたエンブリオジェニックカルスは増殖旺盛であり、培養開始から 30 日目頃には Fig. 4c に示すような小粒状で淡黄色の初期不定胚が密集したエンブリオジェニックカルス塊が得られた。Table 6 は、異なるホルモン濃度がルジグラスのエンブリオジェニックカルス形成に及ぼす影響についてまとめたものである。エンブリオジェニックカルス形成率は 0~16.7%の範囲であり、 $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区において 16.7%と有意に最も高い値を示した ( $P < 0.05$ )。その後、エンブリオジェニックカルスの一部をホルモンフリーMS 固形培地に移植し、培養したところ、培養 10 日目頃から体細胞



**Fig. 4** Developmental stages of embryogenic callus cultures of ruzigrass. (a) Primary callus after 7 days of culture on MS medium containing  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D and  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP at  $31^\circ\text{C}$  under the light condition. (b, c) Embryogenic calli after 14 days (b) and 30 days (c) of culture. (d) Somatic embryos developed into scutellums on MS medium without plant hormone. (e) Plant regeneration from embryogenic callus on MS medium containing  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA and  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP at  $31^\circ\text{C}$  under the light condition. (f) Regenerated plant after 21 days of culture. PC, primary callus; SC, scutellum; Cl, coleoptiles.

**Table 6** Effect of plant hormone on embryogenic callus formation of ruzigrass.

Hormone concentration (mg L <sup>-1</sup> )		No. of inoculated explants	No. of explants with calli formed (%)	No. of explants with embryogenic calli formed (%)
2,4-D	BAP			
0.0	0.0	84	0 (0.0)	0 (0.0)
0.0	0.2	84	0 (0.0)	0 (0.0)
2	0.0	84	78 (92.9)	1 (1.2) <sup>c</sup>
2	0.2	84	80 (95.2)	5 (6.0) <sup>b</sup>
4	0.0	84	72 (85.7)	1 (1.2) <sup>c</sup>
4	0.2	84	76 (90.5)	14 (16.7) <sup>a</sup>

Means followed by different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ) by Tukey's test.

不定胚が形成された (Fig. 4d)。しかしながら、多くの体細胞不定胚は、幼植物体へと成長しなかったため、それらを再分化培地に移植し培養したところ、これらの不定胚は鞘葉に分化し、その鞘葉が伸長することで (Fig. 4e)、再分化植物体へと成長した (Fig. 4f)。Table 7 は、異なるホルモン濃度がエンブリオジェニックカルスからの植物体再分化に及ぼす影響についてまとめたものである。エンブリオジェニックカルスからの植物体再分化率は、15.9～47.6%の範囲であり、 $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ BAP} + 0.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$  添加区において 47.6%と最も高い値であった ( $P < 0.05$ )。さらに、同添加区において、1カルス当たりの再分化植物体数が 2.2 本と最大であった。ローズグラスでは、エンブリオジェニックカルスからの植物体再分化において、BAP と NAA を組合わせて培地中に添加することにより、体細胞不定胚の伸長が促進されたことが報告されており (Gondo *et al.* 2007)、本研究では、ルジグラスにおいても、BAP と NAA を培地中へ添加することにより再分化率の向上が認められた。

これまでに、バヒアグラス (Bovo and Mroginski 1989; Akashi *et al.* 1993)、ダリスグラス (Akashi and Adachi 1992a, 1992b)、ローズグラス (Gondo *et al.* 2005) およびギニアグラス (Lu and Vasil 1981a, 1981b; Akashi and Adachi 1991) などの暖地型イネ科牧草において、体細胞不定胚形成を介した植物体再分化系が確立されており、いずれの植物種においても、高濃度の 2,4-D を単独もしくは低濃度の BAP と組合わせた培地への添加がエンブリオジェニックカルス形成に有効である事が報告されている。本研究でも同様に、ルジグラスのエンブリオジェニックカルスは、高濃度 ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ) の 2,4-D と低濃度の BAP ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) を組合わせた添加区において最も効率的に誘導された。

**Table 7** Effect of hormone on plant regeneration from embryogenic callus in ruzigrass.

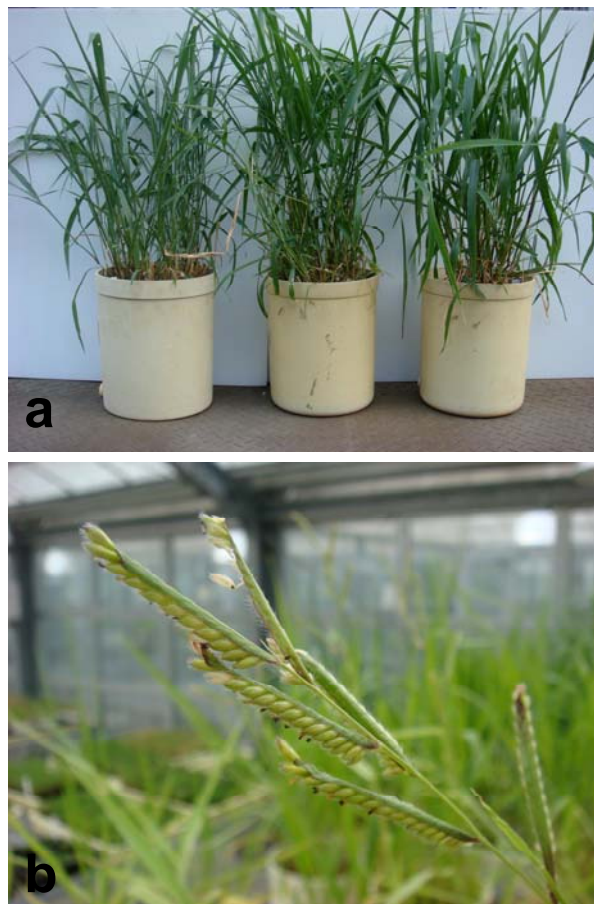
Hormone concentration (mg L <sup>-1</sup> )		No. of inoculated calli	No. of explants with regenerated calli (%)	Total no. of regenerated shoots	No. of shoots / regenerating callus
NAA	BAP				
0.0	0.0	63	12 (19.0) <sup>b</sup>	20	1.7
0.01	1	63	10 (15.9) <sup>b</sup>	11	1.1
0.01	2	63	29 (46.0) <sup>a</sup>	41	1.4
0.1	1	63	11 (17.5) <sup>b</sup>	20	1.8
0.1	2	63	30 (47.6) <sup>a</sup>	68	2.2

Means followed by different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ) by Tukey's test. NAA, naphthaleneacetic acid.



得られた多芽体およびエンブリオジェニックカルスからの再分化植物体は、種子由来の植物体と同程度に順調に生育し (Fig. 5a), さらに出穂した後, 充実種子を得ることができた (Fig. 5b)。

以上のことから, 本研究では, 高い再分化能力を保持する多芽体およびエンブリオジェニックカルスを誘導することができ, ルジグラスにおける一連の組織培養法を確立することができた。今後, 本培養法は, パーティクルガン法による遺伝子組換え技術に十分適用できるものと考えられる。



**Fig. 5** The regenerants derived from multiple-shoot clumps and embryogenic calli of ruzigrass. (a) Plants derived from seeds on the left, regenerants derived from embryogenic calli in the center and regenerants derived from multiple-shoot clumps on the right. (b) Inflorescence of regenerated plant derived from embryogenic callus.

#### 4. 摘要

本章では、ルジグラスの幼植物体由来生長点からの多芽体およびエンブリオジェニックカルスの誘導およびそれらの植物体再分化について検討し、一連の組織培養法を確立した。

多芽体形成率は、 $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区において 21.4% と最も高い値を示した。一方、エンブリオジェニックカルス形成率は、 $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区において 16.7% と最も高い値を示した。多芽体からの植物体再分化は、 $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区および  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  kinetin +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  gibberellin 添加区において再分化率が 53.6% と最大であった。エンブリオジェニックカルスからの植物体再分化は、ホルモンフリーMS 固形培地上で体細胞不定胚が形成された後、 $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 添加の MS 固形培地上で培養することにより、最も効率よく再分化し、その率は 47.6% と最も高い値であった。また、1 カルス当たりの再分化植物体数も 2.2 本と最大であった。以上のことから、本培養法はパーティクルガン法による遺伝子組換え技術に十分適用できるものと考えられた。

### 第3章 ルジグラスにおける4倍体の作出と細胞学的手法による解析

#### 1. 緒言

*Brachiaria* 属草種における品質向上を目的とした変異拡大の方法の一つとして、4倍体有性生殖系統を用いた交雑育種法が挙げられる。コロンビにある国際熱帯農業センター (CIAT) では、2倍体草種ルジグラス (*B. ruziziensis*) へのコルヒチン処理により4倍体有性生殖系統を作出し (Swenne *et al.* 1981), この4倍体有性生殖系統と他種の4倍体アポミクシス系統との間で交雑育種を展開することで、Mulato (CIAT36061) や Mulato II (CIAT36087) などの新優良品種が育成され、一定の成果が認められている (Mile *et al.* 1996, 2004)。しかしながら、この系統の日本での利用には制限があることから、わが国で *Brachiaria* 属育種を展開していくためには、新たに4倍体有性生殖系統を作出し、新しい育種素材を育成することが必要である。

従来の方法では、植物体の分けつ、腋芽および種子由来の幼植物体に細胞分裂阻害剤であるコルヒチンやオリザリンを *in vivo* 条件下で滴下し4倍体を誘導する。ところが、分けつや腋芽などの栄養器官を用いたコルヒチン処理では、キメラ個体が誘導されやすく、全細胞の染色体が倍加された4倍体を取り出すことは容易ではない。また、暖地型イネ科牧草は、種子形成が困難な上、発芽率が低く、休眠性が強いなどの問題があり、種子由来の幼植物体を十分に揃えるのに大きな労力を要する。

そこで、本章では、前章で確立した組織培養法の育種的利用法に関する研究として、2倍体草種ルジグラスの多芽体を用いて、*in vitro* 条件下でのコルヒ

チン処理による 4 倍体有性生殖系統の作出を試みた。また，その作出効率を従来の方法と比較するために，種子由来の幼植物体を用いたコルヒチン処理も行った。

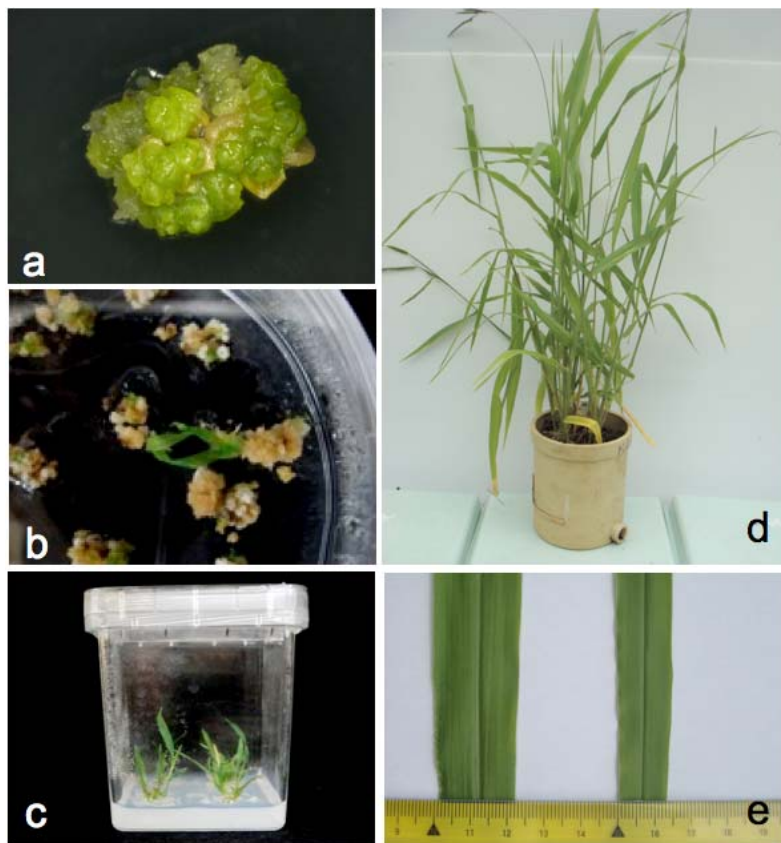
## 材料および方法

### (1) 供試材料

供試植物は、2倍体ルジグラス (*B. ruziziensis* cv. Kennedy) である。多芽体の誘導は、第2章に準じて行った (Ishigaki *et al.* 2009a)。多芽体は、緑色で増殖が旺盛なもののみを選び (Fig. 6a)、コルヒチン処理に供した。一方、幼植物体は、完熟種子を常法で滅菌処理後、ホルモンフリーの MS 固形培地上で発芽させ、2~3日間生育させ、コルヒチン処理した。

### (2) コルヒチン処理

多芽体へのコルヒチン処理は、増殖した多芽体の一部を 0.0125, 0.025, 0.05 および 0.1%濃度のコルヒチン (Sigma-Aldrich Inc, Tokyo, Japan) を添加した MS 固形培地 ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加) に置床し、室温で 12 時間または 48 時間培養することにより行った (反復 3, 30~40 幼植物体/反復)。一方、幼植物体へのコルヒチン処理は、0.1%濃度のコルヒチンを添加したホルモンフリーMS 液体培地中に 3, 6 および 12 時間浸漬することにより行った。コルヒチン処理後、多芽体は、滅菌水で 3 回洗浄した後、 $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP を添加した MS 固形培地に移植し、24 時間、 $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の照明下で 30 日間培養し、再分化を促した。再分化植物体は、ホルモンフリーの 1/2MS 固形培地に移植し、発根させた。一方、コルヒチン処理後の幼植物体は、滅菌水で 3 回洗浄した後、ホルモンフリーの 1/2MS 固形培地に移植し、発根を促した。



**Fig. 6** Induction of tetraploid ruzigrass plants using colchicine-treatment with multiple-shoot clumps. (a) Multiple-shoot clump after 3 days of culture on MS medium containing  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP at  $31^{\circ}\text{C}$  under light conditions. (b) Surviving and regenerated shoot. (c) Plantlet in  $1/2$  MS medium. (d) Acclimatized tetraploid plant in greenhouse. (e) Leaf blade of diploid (right) and tetraploid (left) ruzigrass.

### (3) フローサイトメトリーによる倍数性の推定

発根した再分化植物体および幼植物体は、フローサイトメトリーによる倍数性の推定を行った。サンプル調製は、第 1 章に準じて行った。倍数性は、2 倍体ルジグラスおよびコルヒチン処理後の植物体における DNA 含量値を内部標準であるイネの DNA 含量値 (Uozu *et al.* 1997) を基に算出し、比較することにより推定した。

### (4) 細胞学的手法による染色体数の確認

染色体標本は、酵素解離空気乾燥法 (Fukui and Iijima 1991) の一部を改変し作成した。すなわち、2 倍体および 4 倍体個体の根端を 1 cm 程度に切り取り、イオン交換水中に浸漬し、0°C、24 時間冷水処理し、細胞分裂前中期の染色体を集積させた。冷水処理後、根端は固定液 (99%エタノール : 氷酢酸 = 3 : 1) に移し、24 時間の固定後、以下の酵素解離を行った。酵素解離は、固定した根端をイオン交換水中に 1 時間浸漬して固定液を水洗した後に、3% (w/v) セルラーゼオノヅカ RS (Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan), 2% (w/v) マセロザイム R-10 (Yakult Honsha Co. Ltd.) および 0.5% (w/v) ペクトリアーゼ Y-23 (Kikkoman Co. Ltd., Chiba, Japan) を添加した酵素液中で、37°C、80 分間処理することにより行った。酵素解離後、根端はスライドグラス上に移し、ピンセットを用いて、固定液とともに根端分裂組織を手早く挟み取り、細胞を展開させた。作成した染色体標本は室温に 24 時間放置し、自然乾燥させた。プレパラートを自然乾燥後、染色体を、4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) を用いて蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。染色体像は蛍光顕微鏡 (Olympus BX51,



Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) に付属した冷却 CCD カメラ (DP70, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて撮影した。2 倍体個体および 4 倍体個体の染色体数は、撮影した染色体像を観察することにより測定した。

#### (5) SEM による孔辺細胞の観察

2 倍体個体および 4 倍体個体の葉身は、約  $1\text{ cm}^2$  に切り取り、試料台に貼り付けた後、電子顕微鏡 (Hitachi TM-1000, HITACHI Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて孔辺細胞を観察し、孔辺細胞長および孔辺細胞幅を測定した。測定に用いた個体数は、2 倍体個体が 10 個体、4 倍体個体が 15 個体であり、植物体 1 個体につき 30 個の孔辺細胞を測定した。

#### (6) 統計解析

4 倍体の作出効率 (%) は、Claringbold *et al.* (1953) の公式にしたがって逆正弦変換を行った後、Tukey の多重比較を行った。2 倍体個体および 4 倍体個体における孔辺細胞長および孔辺細胞幅の平均値では、Tukey の多重比較を行った。また、倍数性、孔辺細胞長および孔辺細胞幅の関係は、相関係数により評価した。なお、本研究では、エクセル統計 2006 (Social Survey Research Information Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

### 3. 結果および考察

(1) 異なるコルヒチン処理時間およびコルヒチン濃度が多芽体の生存および染色体倍加に及ぼす影響

Table 8 は、異なるコルヒチン処理時間およびコルヒチン濃度が多芽体の生存および染色体倍加に及ぼす影響についてまとめたものである。ほとんどの多芽体は、茶褐色に変化し枯死した。12 時間処理区では、コルヒチン濃度が高くなるにつれて、その生存率は 40% から 17% へと低下した。一方、48 時間処理区での多芽体は、コルヒチン濃度に関係なく、その生存率は 2~7% と著しく低い値であった。緑色で生存した多芽体は、再分化培地に移植し、再分化を促したところ、培養 30 日目にはシュートへ生長した (Fig. 6b)。得られた再分化シュートは、発根を伴い (Fig. 6c)、植物体へと生長した (Fig. 6d)。

Fig. 7 は、イネ、ルジグラス (2 倍体およびコルヒチン処理後の再分化植物体) におけるフローサイトメトリーでの分析結果を示したものである。イネ (ピーク 1)、2 倍体ルジグラス (ピーク 2) およびコルヒチン処理後のルジグラス再分化植物体 (ピーク 3) における蛍光強度のピークは、各々が明確なピークを示し異なっていた。また、2 倍体ルジグラスの DNA 含量は  $1.41 \text{ pg } 2C^{-1}$  であったのに対して、コルヒチン処理後のルジグラス再分化植物体の DNA 含量は  $2.77 \text{ pg } 2C^{-1}$  であり、2 倍体の DNA 含量の約 2 倍であったことから、再分化植物体は 4 倍体であるものと判断した。また、4 倍体は 2 倍性のピークが全く認められず、キメラ個体ではないことが示された。コルヒチン処理による倍加は、0.1% コルヒチン・12 時間処理区においてその出現率が 28.6% と処理試験区の中で最大値を示した (Table 8)。

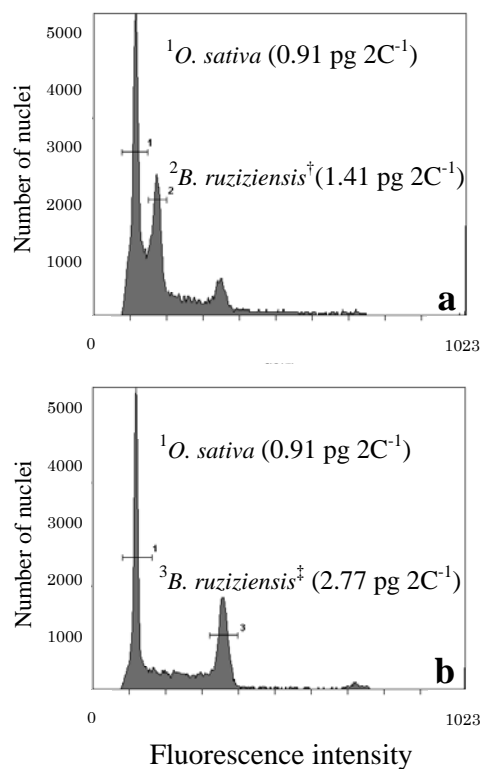
(2) 異なるコルヒチン処理時間が種子由来の幼植物体の生存および染色体倍加に及ぼす影響

**Table 8** Effect of treatment duration and concentration of colchicine on survival and chromosome duplication of multiple-shoot clumps of diploid ruzigrass.

Treatment duration (h)	Conc. (%)	No. of explants treated	No. of explants survived	No. of explants regenerated	No. of shoots acclimatized	Total no. of plants	Ploidy <sup>†</sup>		
							2x	2x + 4x	4x (%)
12	0	100	80	69	69	69	0	0 (0)	
12	0.0125	100	40	46	45	28	15	2 (4.4)	
12	0.025	100	28	43	43	30	6	7 (16.3)	
12	0.05	100	24	36	36	27	4	5 (13.9)	
12	0.1	100	17	28	28	10	10	8 (28.6)	
48	0.0125	100	7	4	3	2	0	1	
48	0.025	100	7	2	1	1	0	0	
48	0.05	100	3	0	0	-	-	-	
48	0.1	100	2	0	0	-	-	-	

There were no significant differences among different colchicine treatments.

† Ploidy level was estimated by flow cytometry.



**Fig. 7** Fluorescent intensity measures of *B. ruziziensis* and *O. sativa* cv. Nipponbare by flow cytometry. (a) Peak 1 corresponds to *O. sativa* cv. Nipponbare, peak 2 corresponds to the diploid plant of *B. ruziziensis*. (b) Peak 1 corresponds to *O. sativa* cv. Nipponbare, peak 3 corresponds to a regenerated plant from multiple-shoot clumps of diploid *B. ruziziensis* treated with 0.1% colchicine.

多芽体からの4倍体作出では0.1%のコルヒチン濃度が最も有効であったことから、種子由来の幼植物体を用いた4倍体作出では、0.1%のコルヒチン添加ホルモンフリーMS液体培地を3, 6および12時間処理することにした。Table 9は、異なるコルヒチン処理時間が種子由来の幼植物体の生存および染色体倍加に与える影響についてまとめたものである。幼植物体は、処理時間3時間の場合のみにおいて生存が認められ、その生存個体率は16%であった。生長した16個体の幼植物体は、フローサイトメトリーにより、その倍数性を調査したところ、5個体が4倍体であることが確認でき、その率は31.3%であった。

### (3) 4倍体における染色体数の確認および孔辺細胞の特徴

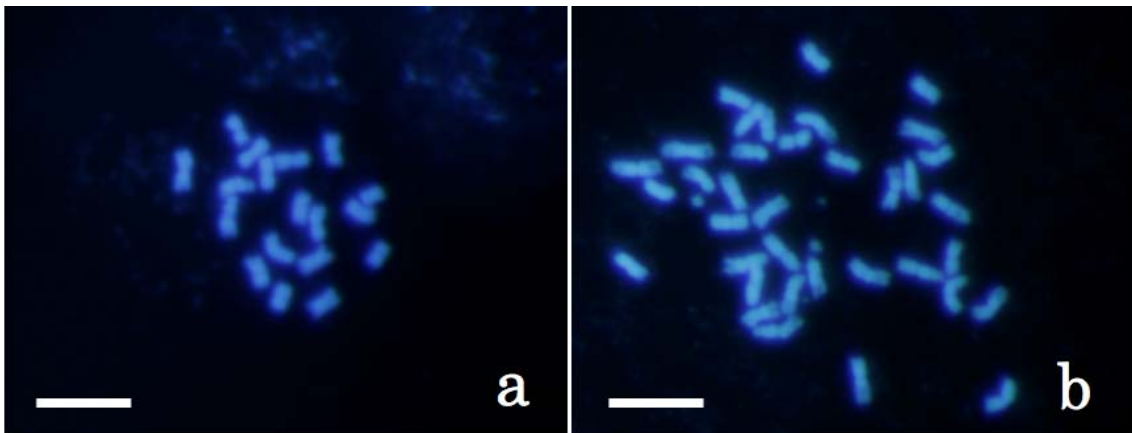
多芽体由来1系統23個体(Table 8)および幼植物体由来5系統5個体(Table 9)の合計6系統28個体の4倍体について、細胞学的手法によりその染色体数を確認した。4倍体の染色体数は $2n = 36$ であり、2倍体( $2n = 18$ , Fig. 8a)と比較して、染色体が倍加されていることが確認できた (Fig. 8b)。

本章で作出された4倍体の葉幅は2倍体のものと比べて広がっていた (Fig. 6e)。さらに、2倍体および4倍体の孔辺細胞を電子顕微鏡下で観察し、各個体における孔辺細胞を調査したところ、4倍体の孔辺細胞が、2倍体の孔辺細胞よりも肥大していることが認められた (Fig. 9)。Table 10は、2倍体および4倍体の孔辺細胞における細胞長および細胞幅をまとめたものである。2倍体の細胞長および細胞幅はそれぞれ $26.4 \pm 1.28 \mu\text{m}$  および  $14.9 \pm 1.02 \mu\text{m}$  であったのに対して、多芽体へのコルヒチン処理により得られた4倍体は、細胞長が $43.0 \pm 3.75 \mu\text{m}$ 、細胞幅が $24.3 \pm 1.40 \mu\text{m}$ であった。さらに、幼植物体へのコル

**Table 9** Effect of colchicine treatment duration on survival and chromosome duplication of seedlings of diploid ruzigrass.

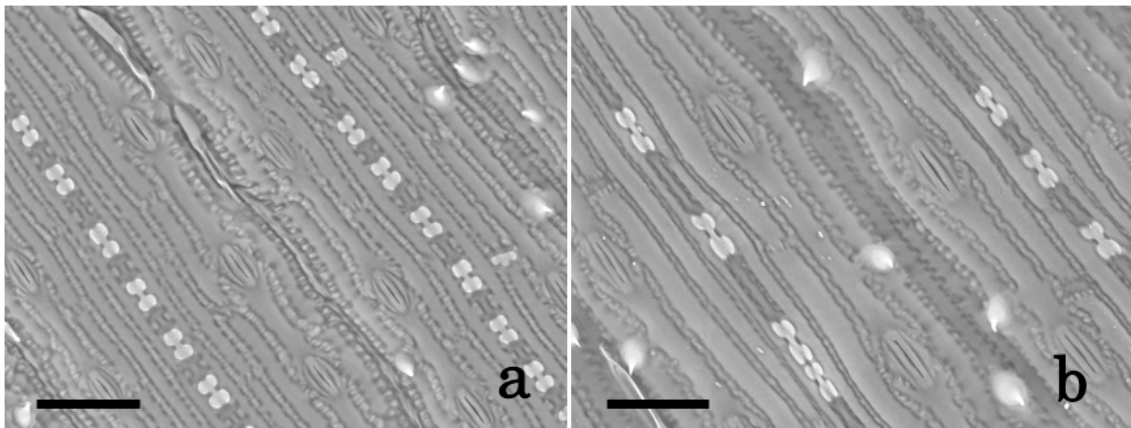
Treatment duration (h)	Conc. (%)	No. of explants treated	No. of explants survived	Total no. of plants acclimatized	Ploidy <sup>†</sup>		
					2x	2x + 4x	4x (%)
3	0.1	100	16	16	3	8	5 (31.3)
6	0.1	100	0	0	-	-	-
12	0.1	100	0	0	-	-	-

<sup>†</sup> Ploidy level was estimated by flow cytometry.



**Fig. 8** Cytological analysis of ruzigrass. a, b) chromosomes in root tip cells of diploid ruzigrass (a) and tetraploid ruzigrass induced by colchicine treatment (b). Bars correspond to 10  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 9** Evaluation of leaf stomatal characteristics. a, b) stomata in the leaf blade of diploid ruzigrass (a) and tetraploid ruzigrass induced by colchicine treatment (b). Bars correspond to 50  $\mu\text{m}$

**Table 10** Stomata characteristics of diploid and tetraploid ruzigrass plants.

Ploidy level	Stomata length ( $\mu\text{m}$ )	Stomata width ( $\mu\text{m}$ )
Diploid	$26.4 \pm 1.28^{\text{a}}$	$14.9 \pm 1.02^{\text{a}}$
Tetraploid (seedling)	$35.6 \pm 2.28^{\text{b}}$	$20.9 \pm 0.82^{\text{b}}$
Tetraploid (multiple-shoot clumps)	$43.0 \pm 3.75^{\text{b}}$	$24.3 \pm 1.40^{\text{b}}$

Means followed by different letters within each column differ significantly ( $P < 0.01$ ) by Tukey's test.

ヒチン処理により得られた 4 倍体は、細胞長が  $35.6 \pm 2.28 \mu\text{m}$ 、細胞幅が  $20.9 \pm 0.82 \mu\text{m}$  であった。いずれにおいても、孔辺細胞長および細胞幅は、2 倍体個体のものよりも有意に大きかった ( $P < 0.01$ )。また、孔辺細胞のこれらの特徴と倍数性との間には有意な正の相関 ( $P < 0.01$ ) が認められた (Table 11)。

本章では、2 倍体草種ルジグラスの多芽体または幼植物体を *in vitro* 条件下でコルヒチン処理することで 4 倍体を作出することができ、その最大出現率は多芽体が 28.6%で幼植物体が 31.3%であった。Swenne *et al.* (1981) は、ルジグラスの種子由来幼植物体を用いて、0.05~0.1%コルヒチンを *in vivo* 条件下で 1~8 時間処理することにより 4 倍体の作出を試みており、その出現頻度は 0~38%であった。本研究で認められた出現頻度は、Swenne *et al.*が報告している値と比べて、向上は認められなかったものの、ほぼ同程度であった。多芽体などの培養物は、クローンにより無限に増殖できることから、コルヒチン処理に用いる材料として季節性に関係なく大量に供給することができる点で有利である。これまでに、ブドウ (*Vitis vinifera* L.)、バナナ (*Musa acuminata*)、コガネバナ (*Scutellaria baicalensis*) およびクワ (*Morus alba* L.)などを始めとする 2 倍体作物において、エンブリオジェニックカルスや多芽体などの培養物を用いて、*in vitro* 条件下でコルヒチンまたはオリザリン処理し、本研究と同様に、効率的に 4 倍体を作出する研究例が数多く報告されている (van Duren *et al.* 1996; Chakraborti *et al.* 1998; Gao *et al.* 2002; Yang *et al.* 2006)。

近年、フローサイトメトリーは、倍数性の推定をより正確かつ迅速に行う上で有効な手法となっている (Pinheiro *et al.* 2000; Gu *et al.* 2005; Yang *et al.* 2006)。本研究では、フローサイトメトリーを用いることで、従来の細胞学的手

**Table 11** Relationship between ploidy level and stomata size across diploid and tetraploid ruzigrass.

	Ploidy	Stomata length	Stomata width
Ploidy	1.000		
Stomata length	0.861 **	1.000	
Stomata width	0.926 **	0.945 **	1.000

\*\* All correlations are significant at the 1% level.

法に比べ、より簡便で、迅速に 4 倍体を選抜することができた。さらに、4 倍体における孔辺細胞長および孔辺細胞幅は、2 倍体よりも有意に大きくなっており、これらの孔辺細胞の特徴と倍数性との間には有意な正の相関が認められたことから、孔辺細胞の特徴は、4 倍体個体の選抜において、フローサイトメトリ分析や細胞学的手法を行う前の簡易指標として適用できることが示唆された。

#### 4. 摘要

本章では、前章で述べた 2 倍体草種ルジグラスの多芽体、または種子由来の幼植物体を用いて、*in vitro* 条件下でのコルヒチン処理により 4 倍体を作出した。

コルヒチン処理した多芽体および幼植物体から得られた全 172 個体の植物体から、多芽体由来 1 系統 23 個体および幼植物体由来 5 系統 5 個体の合計 6 系統 28 個体の 4 倍体を作出した。4 倍体の最大作出効率は、多芽体が 28.6% (コルヒチン濃度 0.1%, 12 時間処理区), 幼植物体が 31.3% (コルヒチン濃度 0.1%, 3 時間処理区) であった。

また、フローサイトメトリーを用いることで、従来の細胞学的手法に比べ、より簡便で迅速に4倍体を選抜することができた。さらに、孔辺細胞長、細胞幅および倍数性との間には、有意な正の相関が認められたことから、孔辺細胞の特徴を指標とした、2倍体および4倍体の簡易判別が可能であると考えられた。

## 第4章 パーティクルインフローガンを用いたルジグラスの形質転換体の作出 とその発現解析

### 1. 緒言

近年、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法などの遺伝子組換え技術の発展により、ダイズ、トウモロコシ、ワタおよびナタネなどの主要作物において、遺伝子組換え品種の開発が盛んに行われている。これまでに、農薬散布の大幅な軽減を目的とした除草剤耐性、病害虫抵抗性および殺虫性タンパク（Bt タンパク）産生機能を付与した遺伝子組換え品種や食品・飼料としての栄養価向上を目的とした高リシン生産遺伝子組換えトウモロコシ、オレイン酸高含有遺伝子組換えダイズなどが開発され、広く利用されている（Bayer CropScience 2009; 日本モンサント 2009）。さらに、地球温暖化により世界各地で深刻化する乾燥化・砂漠化を背景として、高温ストレス、低温ストレス、乾燥ストレスまたは土壌中での高塩ストレスなどの環境ストレスに対する耐性を付与したコムギ（Pellegrineschi *et al.* 2004）、イネ（Chen *et al.* 2008）および牧草類（Zhao *et al.* 2007; James *et al.* 2008）なども作出され、今後は、品質および栽培特性の向上を目指した遺伝子組換え品種の育成が望まれている。

暖地型イネ科牧草の遺伝子組換えでは、これまでにダリスグラス（Akashi *et al.* 2002）、デージーグラス（*Dichanthium annulatum* (Forsk.) Stapf: Dalton *et al.* 2003）、パールミレット（*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.: Goldman *et al.* 2003）やローズグラス（Gondo *et al.* 2009）およびバヒアグラス（Gondo *et al.* 2007）などの草種において、パーティクルガン法を用いた形質転換系の確立が報告さ

れている。一方、ルジグラスでは、これまでに効率的な組織培養法の確立が報告されていなかったことから、形質転換体の作出には至っていない。

そこで、本章では、第 2 章において述べた 2 倍体草種ルジグラスの多芽体およびエンブリオジェニックカルスを標的細胞として用いて、パーティクルガン法による遺伝子組換え技術の諸条件を検討し、形質転換体の作出を試みた。



## 2. 材料および方法

### (1) 多芽体およびエンブリオジェニックカルスの誘導

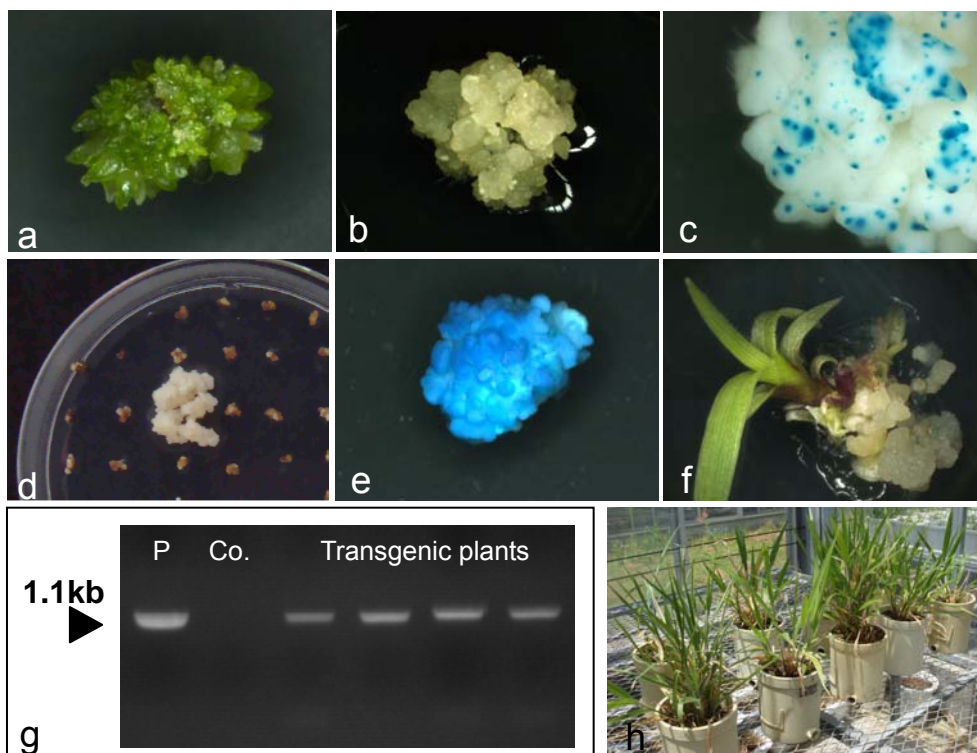
供試植物は 2 倍体ルジグラス (*B. ruziziensis* cv. Kennedy) である。多芽体およびエンブリオジェニックカルスの誘導は、第 2 章で述べた通りである (Ishigaki *et al.* 2009a)。多芽体およびエンブリオジェニックカルスは、増殖が旺盛なもののみを選び (Fig. 10a, 10b)、ガン処理に供した。

### (2) プラスミド調製

プラスミドは、pAHC25 (Christensen and Quail 1996) を用いた (Fig. 11)。pAHC25 は、*Escherichia coli* K-12 由来 GUS 遺伝子および除草剤ビアラホス耐性を示す *Streptomyces hygroscopicus* 由来 bar 遺伝子を保持しており、これらの遺伝子は、それぞれトウモロコシ由来のユビキチンプロモーターにより調節されている。

### (3) 浸透圧処理

標的組織である多芽体とエンブリオジェニックカルスは、等濃度のマンニトールおよびソルビトール (終濃度 0.6 M) を含む MS 固形培地 (多芽体の場合は  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D および  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加, カルスの場合は  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D および  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加) に移植し (反復 4, 20~30 培養物/反復), ガン処理前 4 時間およびガン処理後 16 時間, 浸透圧処理した。標的組織は, 直径 4 cm のガラスシャーレの中央部に直径 2 cm の円状に置床し, ガン処理時の組織の飛散を防止するため, 組織上部をステンレス製メッシュで覆った。



**Fig. 10** Transformation of diploid ruzigrass mediated by particle inflow gun. (a) Multiple-shoot clumps derived from shoot apical meristem. (b) Highly regenerative embryogenic callus derived from shoot apical meristem. (c) Transient GUS expression 16 h after bombardment with embryogenic calli. (d) Bialaphos-resistant callus on MS medium containing 4.0 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L BAP and 10 mg/L bialaphos. (e) Stable GUS expression on bialaphos-resistant callus. (f) Regenerated plants from bialaphos-resistant embryogenic callus. (g) Detection of GUS gene in transgenic plants by PCR (P, plasmid pAHC25; Co, non-transformed plant). (h) Acclimatized transgenic ruzigrass plants in green house.



#### (4) パーティクルガンによる遺伝子導入

パーティクルガン装置は, Akashi *et al.* (2002) により記述されたものを用いた。ガン処理条件は, ヘリウムガス圧 5.0 kg/cm<sup>2</sup>, ターゲットディスタンス 9.6 cm, チャンバー内圧-0.1 Mpa とし, 1 シャーレ当たり 1 ショットとした。プラスミド DNA (1 ショット当たり 0.8 µg) は, 直径 1.5~3.0 µm の金粒子 (Aldrich, USA) (1 ショット当たり 0.2 mg) にエタノール沈殿法 (Takeuchi 1992) により 10 ショット分コーティングした。コーティングされた金粒子は, 200 µL の 99% エタノール中に超音波洗浄器で懸濁させ, 1 ショット当たり 20 µL をガン処理に供した。

#### (5) β-glucuronidase(GUS)発現

トランジェント GUS 発現は, Jefferson *et al.* (1987) らの方法により検出した。標的組織は, パーティクルガン処理および浸透圧処理後, X-gluc 染色液 (1.9 mM X-gluc, 0.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>3</sub>, 0.3% TritonX-100, 20%メタノール, 100 mM リン酸緩衝液) に浸し, 37°C で 16 時間発色反応させた。発色反応後, 染色液は取り除き, 70%エタノールを加え, 反応を停止させた。遺伝子導入効率は, 青色に染色されたスポット数をデジタルマイクروسコープ VH-8000 (KEYENCE CO., Osaka, Japan) で測定することにより算出した (Gondo *et al.* 2009)。

#### (6) 選抜培地の検討

ビアラホス濃度は, ガン処理を施していないエンブリオジェニックカルス

を、0, 3, 5 および 10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホス (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD, Tokyo, Japan) を添加した MS 固形培地 (4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D および 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP 添加) 上で培養し (反復 3, 21 カルス/反復), カルス生存率を 14 日間隔で測定することで検討した。

#### (7) 形質転換体の選抜

エンブリオジェニックカルスは、パーティクルガンおよび浸透圧処理し、ビアラホス無添加の MS 固形培地 (4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D および 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP 添加) で 3 日間培養した後、10 mg/L ビアラホス添加の MS 固形培地 (4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D および 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP 添加) 上で約 60 日間選抜した。形質転換カルスは、10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホス添加のホルモンフリーMS 固形培地上で体細胞不定胚を形成させた後、0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA, 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP および 10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホス添加の MS 固形培地に移し、シュートを再分化させ、1/2MS 固形培地に移植し発根させた。

#### (8) DNA 単離および PCR 分析

導入遺伝子を確認するため、ゲノム DNA は、植物 DNA 抽出キット ISOPLANT (NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて、再分化植物体の葉身 (0.1~0.5 g) から抽出および精製し、鋳型 DNA として PCR 反応に用いた。PCR 反応溶液は、250 ng 鋳型 DNA, 200 μM dNTPs mixture, 50 nM 各プライマー, 0.5 units Ex-Taq ポリメラーゼ, 10 × Taq ポリメラーゼバッファー (TAKARA BIO. INC., Shiga, Japan) の計 20 μl である。

GUS 遺伝子を検出するためのプライマーは、5′末端部の塩基配列 (5′

-AACTGGACAAGGCCTAGCGC-3') および 3' 末端部の相補配列 (5'-AAGTTCATGCCAGTCCAGCGT-3') である。PCR 反応は、94°C で 5 分間の熱変性後、94°C 1 分間、66°C 1 分間、72°C 1 分間のサイクルを 45 反復し、72°C の伸長反応を 7 分間行った (Gondo *et al.* 2009)。

#### (9) サザンブロット分析

サザンブロット分析 (Sambrook *et al.* 1989) は、形質転換体から CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) により抽出および精製されたゲノム DNA を用いて行い、形質転換体における導入遺伝子の確認およびコピー数を調査した。ゲノム DNA は、制限酵素 *SacI* で切断し、0.6% のアガロース電気泳動で分画した。泳動ゲルは、0.4 N NaOH 溶液中に 16 時間浸漬し、ブロッキングさせることにより、断片 DNA を変性させ、ナイロンメンブレン (Roche, Germany) へトランスファーした。ハイブリダイゼーションは、DIG 標識化した GUS 遺伝子 1.1 kb をプローブとして用い、68°C、16 時間振とうすることで行った。プローブ DNA は、ハイブリダイゼーション後、DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche, Germany) を用いて検出し、X 線フィルム (Fuji, Japan) に感光させた。

#### (10) 除草剤耐性試験

形質転換体の除草剤に対する耐性を調査するため、Herbicide painting assay を、Howarth *et al.* (2005) の方法に一部改変を加えて行った。形質転換体および非形質転換体の葉身 10 枚に 1% BASTA (Aventis, Frankfurt am Main,

Germany) および 0.1% Tween 20 を添加した除草剤溶液を、毎日 1 週間塗布した。1 週間後、除草剤耐性または感受性の判別は、非形質転換体および形質転換体の葉身の状態を観察し、比較することで行った。

#### (11) 統計解析

異なる標的組織におけるガン処理後の GUS トランジェント発現数は、エクセル統計 2006 (Social Survey Research Information Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、student の t-test により比較した。

### 3. 結果および考察

#### (1) 標的組織がガン処理後のトランジェント GUS 発現に及ぼす影響

Table 12 は、異なる標的組織がガン処理後のトランジェント GUS 発現に及ぼす影響についてまとめたものである。GUS スポット数は、エンブリオジェニックカルスが 907 スポット、多芽体が 204 スポットであり、エンブリオジェニックカルスの方が多芽体よりも有意 ( $P < 0.01$ ) に高い発現を示した。また、1 カルス当たりの GUS スポット数においても、多芽体が 7 スポットであるのに対し、エンブリオジェニックカルスが 26 スポットと、より多くの GUS 遺伝子が導入されていることが確認できた。特に、これらの GUS スポットの多くは、前胚が密集した部分で観察されたことから(Fig. 10c)、以後の遺伝子導入にはエンブリオジェニックカルスを用いることとした。

**Table 12** Effect of different tissue culture on transient GUS expression in ruzigrass after particle bombardment.

Target tissue	Number of shotted explants	Total GUS spots †	Number of	Number of GUS spots per callus‡
Embryogenic callus	140	907 <sup>a</sup>		26 <sup>a</sup>
Multiple-shoot clump	125	204 <sup>b</sup>		7 <sup>b</sup>

Letters indicate significant difference by t-test ( $P < 0.01$ ).

†, ‡Values mean of 4 independent experiments.



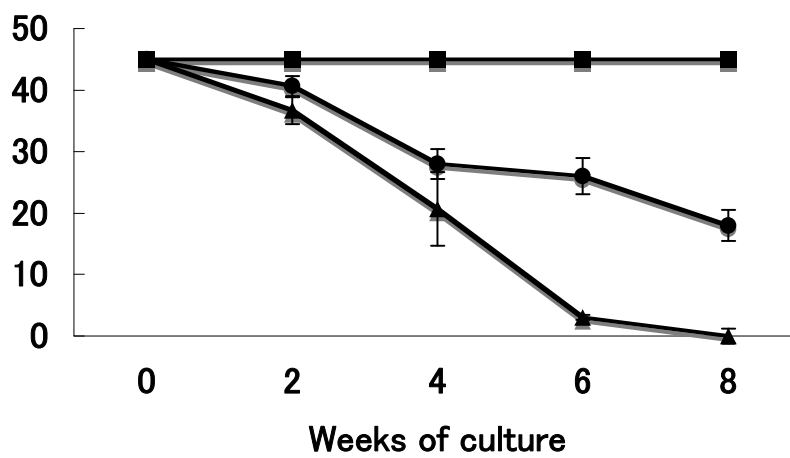
## (2) ビアラホス濃度がエンブリオジェニックカルの生存に及ぼす影響

Fig. 12 は、ビアラホス濃度がガン処理を施していないエンブリオジェニックカルの生存率に及ぼす影響について経時的に示したものである。培養開始から 8 週間後、0 および 3 mg L<sup>-1</sup> ビアラホス添加区では、全てのカルスが生存した。また、5 mg L<sup>-1</sup> ビアラホス添加区では、半数以上のエンブリオジェニックカルスが生存した。一方、10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホス添加区では、全てのエンブリオジェニックカルスが枯死した。このことから、形質転換カルの選抜には 10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホスが最も有効であることが示唆された。

## (3) 形質転換体の作出および導入遺伝子の発現

Table13 は本研究における形質転換効率についてまとめたものである。ガン処理および選抜開始から約 60 日後、290 個のエンブリオジェニックカルスは、そのほとんどが茶色く褐色し、枯死したものの、一部のカルスは生存し (Fig. 10d)、それらが増殖し、Fig. 10e に示すような強い GUS 発現を示す形質転換カルスが 4 系統 (1.4%) 得られた。これらのうち 2 つの系統 (0.7%) において、体細胞不定胚を経由して、植物体が再分化した (Fig. 10f)。ガン処理から約 3 ヶ月後、78 個体の緑色の再分化個体が得られ、そのうち 75 個体 (96%) が発根した。

得られた再分化植物体について、PCR 分析により導入遺伝子の確認を行ったところ、1.1 kbp 上に GUS 遺伝子の増幅バンドが検出された (Fig. 10g)。PCR 分析の結果、75 個体のうち 41 個体 (54.7%) において増幅バンドが認められ、形質転換体であることが確認できた。これらの形質転換体は、順化後、隔離温



**Fig. 12** Effect of bialaphos concentration on survival of non-transformed embryogenic callus of ruzigrass. ■, 3.0 mg/L bialaphos; ●, 5.0 mg/L bialaphos; ▲, 10.0 mg/L bialaphos. Number of survived calli for 0.0 mg/L bialaphos (control) is same as that of 3.0 mg/L bialaphos.

**Table 13** Selection of herbicide-resistant calli and recovery of transgenic plants after particle bombardment.

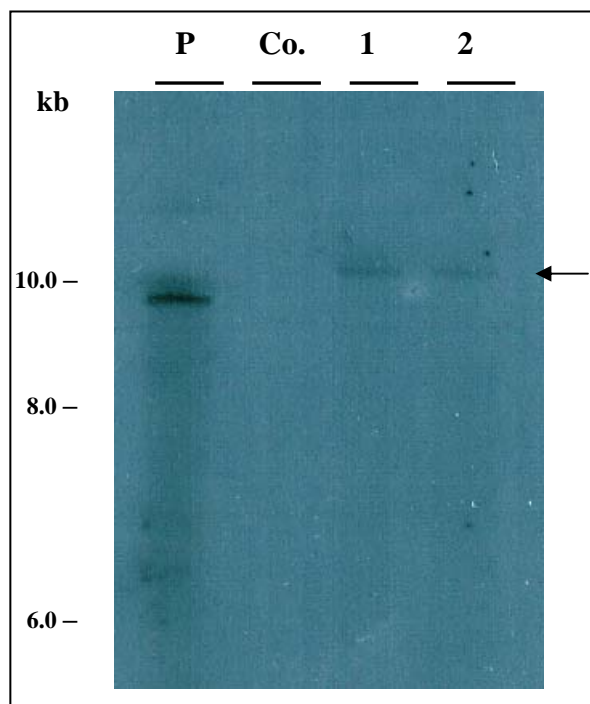
Bialaphos concentration (mg L <sup>-1</sup> )	No. of bombarded calli	No. of bialaphos-resistant calli	No. of GUS-positive calli (%)	No. of regenerated plant line (%)	No. of GUS-containing plant line (%) <sup>†</sup>
10	290	4	4 (1.4)	2 (0.7)	2 (0.7)

<sup>†</sup> GUS gene was checked by PCR analysis and Southern blot analysis.

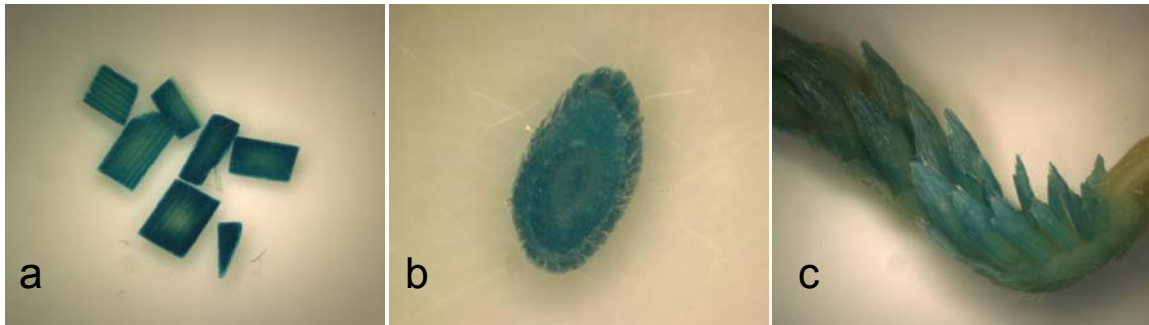
室内で育成された (Fig. 10h)。

本研究で得られた形質転換体 2 系統は、サザンブロット分析により、GUS 遺伝子の発現を調査したところ、Fig. 13 に示すように両系統とも 1 コピーの GUS 遺伝子が約 10 kb 上に検出された。これらの形質転換体は、葉身 (Fig. 14a)、茎 (Fig. 14b) および未熟穂 (Fig. 14c) において GUS 遺伝子を強く発現した。さらに、形質転換体の除草剤に対する耐性を調査したところ、除草剤溶液の塗布から 1 週間目には、非形質転換体の葉身は茶色に変色し、完全に枯死した (Fig. 15a, 15b)。一方、形質転換体の葉身は、濃い緑色を呈し、全く枯死しなかったことから、遺伝子導入により、除草剤に対する耐性が付与されていることが確認できた。

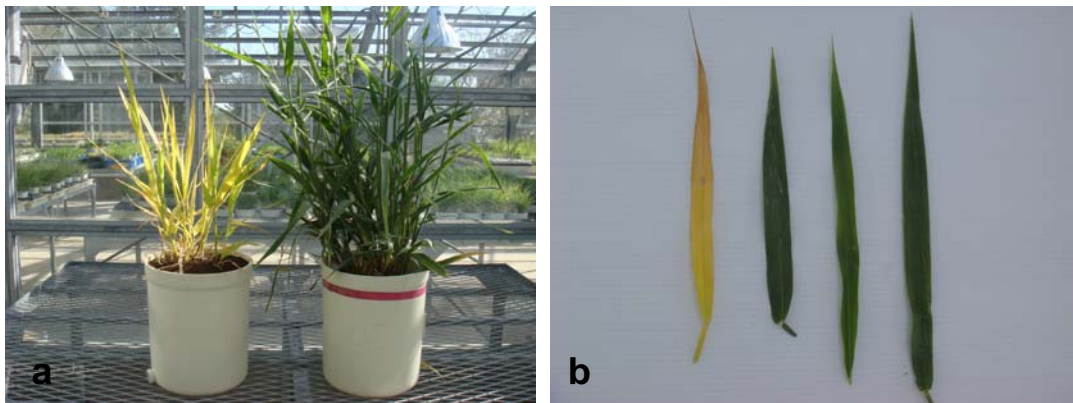
本研究では、パーティクルガン法による形質転換ルジグラスの作出に初めて成功し、その形質転換効率は 0.7%であった。今後、より効率的に形質転換ルジグラスを作出するために、培地組成および選抜方法などの諸条件を検討する必要がある。バヒアグラスでは、培地中に硫酸銅と BAP を組合わせて添加することで高い再分化能を保持するカルスが形成され、さらに、これらを標的組織として遺伝子導入に用いることで、形質転換体を効率的に作出することに成功している (Gondo *et al.* 2005)。また、コムギ、オオムギおよびトールフェスクなどのいくつかのイネ科植物においても、硫酸銅の培地中への添加により同様の効果が得られている (Cho *et al.* 1998, 1999, 2000, 2001)。これらのことから、今後、硫酸銅の培地中への添加がルジグラスのエンブリオジェニックカルス形成およびそれらのカルスを遺伝子導入に用いた場合の形質転換効率に与える効果について検討する必要がある。



**Fig. 13** DNA gel blot analysis of transgenic ruzigrass plants. Five  $\mu\text{g}$  genomic DNA, isolated from leaf tissue of non-transformed (Co) and two transformed lines (T1 and T2), was digested with Sac I. Hybridization was carried out with a DIG-dUTP labeled GUS gene probe. P is positive control of 5  $\mu\text{g}$  Sac I-digested plasmid pAHC25 DNA. The arrow indicates the expected band after Sac I digestion and southern hybridization.



**Fig. 14** Histochemical assay of *GUS* gene expression in transgenic ruzigrass plants. a) Leaf segments. b) Stem. c) Immature inflorescence.



**Fig. 15** Herbicide painting test with “BASTA” herbicide for *bar* gene expression in transgenic ruzigrass plants. a) Seed-derived plant (left) and transgenic plant (right) 1 week after herbicide painting. b) Leaf blade of seed-derived plant (left), transgenic plants (center-left, center-right and right) 1 week after herbicide painting.

Vain *et al.* (1993) は、トウモロコシ (*Zea mays*) の懸濁培養細胞を用いたパーティクルガン法による形質転換体作出において、 $3\sim 5\text{ mg L}^{-1}$  のビアラホスを形質転換カルの選抜に使用している。さらに、暖地型イネ科牧草では、バビアグラス (Smith *et al.* 2002; Gondo *et al.* 2005) やローズグラス (Gondo *et al.* 2009) においても、 $3\text{ mg L}^{-1}$  ビアラホス存在下において最も多くの形質転換体を選抜している。一方、本研究では、 $10\text{ mg L}^{-1}$  ビアラホスを用いて形質転換カルを選抜しており、このビアラホス濃度は、他のイネ科植物の報告例と比べて、かなり高いものである。この高濃度のビアラホスによる選抜がガン処理後の形質転換カルの再分化または再分化植物体からの発根を阻害し、その結果、形質転換効率が低下していることが考えられることから、ルジグラスにおける形質転換体の選抜方法に関してより詳細に検討することで、形質転換効率が向上するものと思われる。



#### 4. 摘要

本章では、2 倍体草種ルジグラスの多芽体およびエンブリオジェニックカルスを標的細胞として用いて、パーティクルガン法による遺伝子組換え技術の諸条件を検討し、遺伝子組換えルジグラスの作出を試みた。

多芽体およびエンブリオジェニックカルスの標的組織としての適性をトランジェント GUS 発現によって調査したところ、エンブリオジェニックカルスは、多芽体よりも有意に高い GUS 発現を示し、標的組織として適していた。

形質転換カルスを効率的に選抜するための選抜培地を検討したところ、10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホス添加区では、全てのエンブリオジェニックカルスが枯死した。このことから、形質転換カルスの選抜には 10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホスが最も有効であることが示唆された。

エンブリオジェニックカルス計 290 個について、8 ショット分のガン処理に供し、10 mg L<sup>-1</sup> ビアラホスで選抜したところ、GUS 発現を示す形質転換カルスが 4 系統 (1.4%) 得られ、そのうち 2 系統 (0.7%) において植物体への再分化が認められた。得られた形質転換体は、PCR による導入遺伝子の確認を行い、1.1 kbp 上に GUS 遺伝子の増幅バンドが認められた。形質転換体 2 系統は、サザンブロット分析により、GUS 遺伝子の発現を調査したところ、両者とも 1 コピーの GUS 遺伝子が約 10 kb 上に検出された。得られた形質転換体は、葉、茎および穂において強い GUS 発現を示し、また、除草剤耐性試験により、除草剤に対する耐性が付与されていることが確認できた。以上のことから、本研究では、パーティクルインフローガンによる形質転換ルジグラスの作出に初めて成功した。

## 第5章 総合考察

本論文は、ルジグラスにおける組織培養法の確立とその育種的利用および分子育種に関する基礎的研究について述べたものであり、得られた成果は、今後、実用的な品種育成に向けた育種戦略に活用されなければならない。そこで、本章では、4倍体有性生殖系統（4倍体ルジグラス）を用いた交雑育種法および遺伝子組換え技術による分子育種法について触れ、これらの育種的な利用面での展開について述べることにしたい。

### (1) 4倍体の育成と交雑育種法

序章で述べたように、*Brachiaria*属は、その多くが高次倍数性で、アポミクシス性であることから、従来の交雑育種法では新品種を育成することは困難である。したがって、本研究では、現存する遺伝資源を有効に活用し、新たな遺伝資源を育成するために、4倍体ルジグラスを作出した(Ishigaki *et al.* 2009b)。また、フローサイトメトリーにより*Brachiaria*属4草種のゲノムサイズを推定したところ、種間によって、そのサイズは異なっていたものの、種間における交雑障壁にはならないと考えられる。特に、*B. brizantha* cv. Maranduおよび*B. decumbens* cv. Basiliskは、4倍体であることから、この2草種を花粉親として、また、4倍体ルジグラスを種子親として用いた交雑育種を展開することが可能になると考えられる。

本研究で作出された4倍体ルジグラスは、当代間の開放受粉により得られた120個体の4倍体後代集団から50系統を選抜し、品種登録を行うために、沖縄県

畜産研究センター内の圃場にて栽培特性の評価が行われている (Fig. 16)。調査の結果、本草種が新規育種素材として適した性質を持っていること、さらに高採種性を付加した母集団を育成する方向性が示唆されている (幸喜ら 2009)。今後、これらの新規育種素材については、宮崎大学、国際農林水産業研究センターおよび沖縄県が共同で栽培特性および飼料特性を調査する予定であり、今後のわが国での *Brachiaria* 育種の展開に期待できる状況となっている (幸喜・蝦名 2009)。わが国では、最近になって、沖縄本島や先島諸島を中心に *Brachiaria* 属草種の栽培が試みられており (中西ら 2006, 2008; 花ヶ崎ら 2007)、収量性や消化性の更なる向上などの共通した育種目標に加え、沖縄独特の土壌 (国頭マーヅや島尻マーヅ) や台風および干ばつなどの自然災害に適応した新品種の育成が望まれている (花ヶ崎ら 2008)。また、ルジグラスの栽培利用が盛んであるタイ王国の北東部においても、現地の気候風土に適応した新しい優良品種が作出されることが期待される。

## (2) 遺伝子組換え技術による分子育種法

本研究で確立されたルジグラスの遺伝子組換え法は、*Brachiaria* 属の中で初めての報告である。これらの成果により、*Brachiaria* 属草種における分子育種の可能性を見いだすことができた。今後、飼料の消化性を向上させた品種や低温ストレス、高温ストレス、水分ストレスおよび土壌中の高塩ストレスなどに左右されない高度な環境ストレス耐性を付与した品種の育成が可能となるであろう。

低い消化性の要因の一つとして、暖地型牧草のリグニン含量やリグニン組

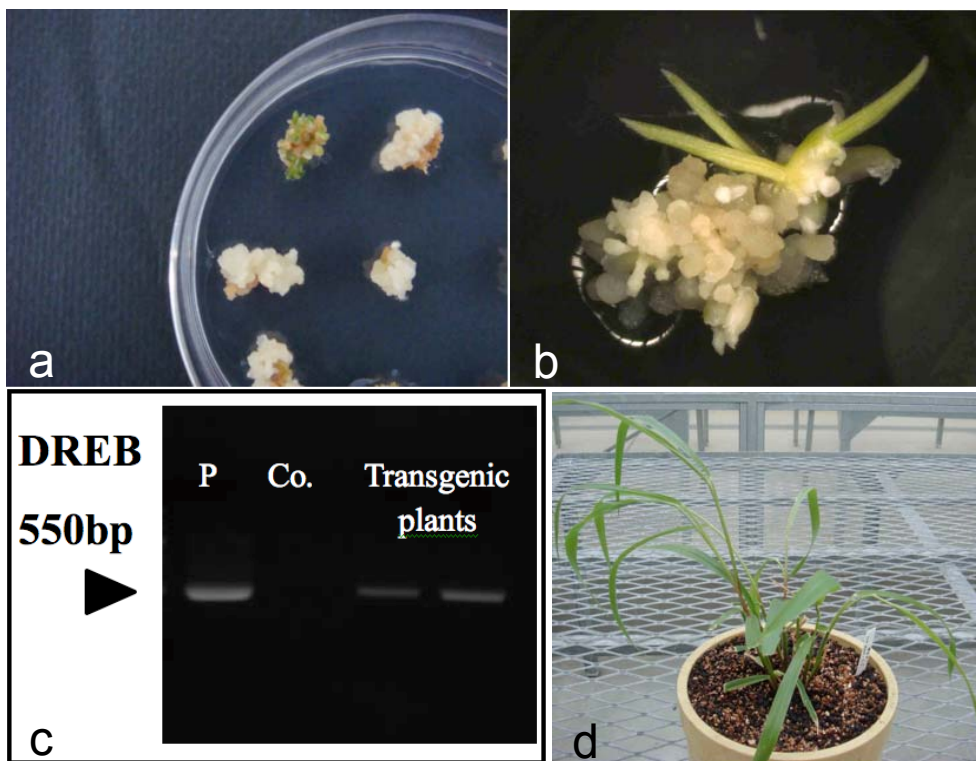


**Fig. 16** Field test of tetraploid ruzigrass developed in chapter 3 in Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center (21 May 2009).

成があげられる。Halpin *et al.* (1998) は、リグニン生合成経路の主要な酵素である CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase) の活性がリグニン含量を制御していることを報告した。これを受け、CAD 遺伝子のアンチセンス RNA を作成し導入することで人為的にリグニン合成を抑制し、高消化性牧草を育成することが可能になると考えられた。マメ科牧草のセイヨウミヤコグサ (*Lotus corniculatus* L.) では、ウド (*Aralia corda*) 由来の CAD アンチセンス RNA を導入した結果、CAD 活性の低下によりリグニン含量が有意に低下している (Akashi *et al.* 1999)。

DREB (dehydration responsive element binding factor) 遺伝子は、乾燥、低温及び塩害等への耐性機構を制御する遺伝子で (Shinozaki *et al.* 1996, 1997; Liu *et al.* 1998), 転写活性化因子を制御しており、環境ストレス応答性遺伝子群のプロモーター中に存在するシス因子の DRE (dehydration responsive element) 配列を認識して結合し、各遺伝子の発現を促進する。現在までに、DREB 遺伝子を導入したコムギ (Pellegrineschi *et al.* 2004), イネ (Chen *et al.* 2008) および牧草類 (Zhao *et al.* 2007; James *et al.* 2008) なども作出され、非形質転換体と比べて耐乾性や耐塩性の向上が認められている。

現在、著者は、ソルガム由来の CAD 遺伝子 (Tsuruta *et al.* 2007) やシロイヌナズナ由来の DREB 遺伝子 (Liu *et al.* 1998) をルジグラスに導入し、本草種の消化性の向上および高度な環境ストレス耐性を付与した系統の作出を試みており、現段階で、DREB 遺伝子を導入した形質転換ルジグラス (Fig. 17) を作出することに成功している。このような本草種の家畜に対する消化性の改善や、高度な環境適応性を付与することによる牧草の安定生産の確保を通じて、



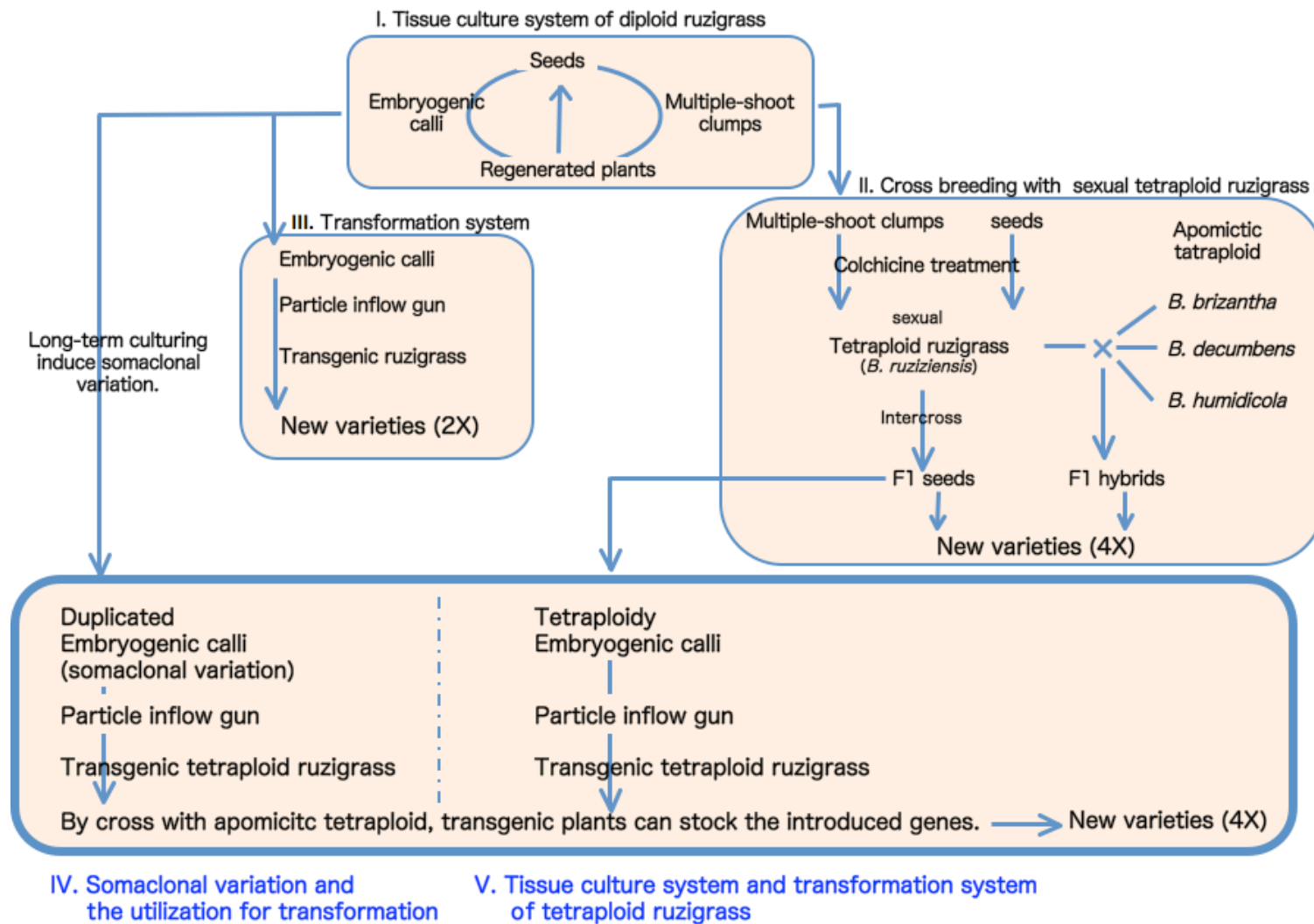
**Fig. 17** Particle inflow gun mediated transformation with DREB1A. (a) Bialaphos-resistant callus on MS medium containing 4.0 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L BAP and 10 mg/L bialaphos. (b) Regeneration from bialaphos-resistant embryogenic callus. (c) Detection of GUS gene in transgenic plants by PCR (P, plasmid DREB1A; Co, non-transformed plant). (d) Acclimatized transgenic ruzigrass plants in green house.

生産性の低い土地での家畜の生産効率の向上が期待できる。

最後に、本研究で得られた研究成果を応用した新しい *Brachiaria* 新育種戦略を提案したい。Fig. 18 は、本研究で報告した組織培養法，4 倍体ルジグラスを用いた交雑育種法および遺伝子組換え技術による分子育種法を応用した新しい *Brachiaria* 新育種戦略について示したものである。ルジグラスは他殖性であるため，有用遺伝子を導入した形質転換体を得られたとしても，その付与された有用形質を固定することは困難である。このことから，今後，得られた形質転換体を固定しつつ，他のアポミクシス性草種との交雑育種を展開することが必要となってくる。そこで，著者は，本研究で作出した 4 倍体ルジグラスと長期間培養により誘発されるソマクローナル変異の一つである染色体倍加に注目している。4 倍体ルジグラスからのエンブリオジェニックカルスの誘導もしくは 2 倍体ルジグラスのエンブリオジェニックカルスを長期間培養することにより 4 倍性のエンブリオジェニックカルスを誘発することができれば，これらのカルスを用いて，形質転換し，有用遺伝子が導入された 4 倍体形質転換ルジグラスを育成することが可能となる。この 4 倍体形質転換ルジグラスを種子親とし，アポミクシス性草種を花粉親として交配することで，優良な形質転換体を世代だけで固定しつつ，アポミクシス性草種の有用形質を取り入れ，短期間で品種化することができる考える。この育種戦略は，*Brachiaria* 属をはじめとする *Chloris* 属，*Paspalum* 属，*Panicum* 属および *Pennisetum* 属などのような，属内に有性生殖系統とアポミクシス系統の両方を含んでいる暖地型イネ科牧草に応用することができるものと思われる。

以上，本研究では，ルジグラスの組織培養法の確立，さらにその育種的利





**Fig. 18 New approach for *Brachiaria* breeding scheme.**



用に関する基礎的研究として 4 倍体ルジグラスの作出およびパーティクルガン法による形質転換系の確立について述べてきた。近い将来, 4 倍体ルジグラスを用いた交雑育種および遺伝子組換え技術による分子育種の展開により, 新しい優良品種が作出されることが期待される。

## 要約

本研究は、組織培養法を育種的に利用した *Brachiaria* 属の変異拡大とそれを用いた *Brachiaria* 育種を確立するために、2 倍体草種のルジグラス (*B. ruziziensis*) の組織培養法を確立し、その育種的利用に関する研究として、組織培養法を用いたコルヒチン処理による 4 倍体作出を試みた。また、パーティクルガン法によるルジグラスの形質転換体の作出を試みた。

1. *Brachiaria* 属 4 草種 (5 品種) を用いて、半数体 (n) あたりのゲノムサイズ (C-value) をフローサイトメトリーにより推定したところ、*B. ruziziensis* cv. Kennedy が 615 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. Marandu が 1404 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. decumbens* cv. Basilisk が 1633 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. MG5 が 1743 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. humidicola* cv. Humidicola が 1953 Mbp C<sup>-1</sup> と推定され、そのサイズは種間で異なっていた。また、そのゲノムサイズは倍数性が高次になるにつれて、増加した。さらに、一倍体あたりのゲノムサイズ (Cx-value) は、*B. ruziziensis* cv. Kennedy が 615 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. Marandu が 702 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. decumbens* cv. Basilisk が 817 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. brizantha* cv. MG5 が 697 Mbp C<sup>-1</sup>, *B. humidicola* cv. Humidicola が 651 Mbp C<sup>-1</sup> と推定され、アポミクシス性草種におけるゲノムサイズは、有性草種のゲノムサイズと比べて、大きいものであった。

2. ルジグラスの幼植物体由来の生長点を用いて、多芽体およびエンブリオジェニックカルス誘導およびそれらの植物体再分化条件について検討し、一連の組織培養法を確立した。多芽体は、 $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区において最も効率良く誘導され、その率は 21.4%であった。また、その植物体再分化は、 $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区および  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  kinetin +  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  gibberellin 添加区においてその率が 53.6%と最も効率的であった。一方、エンブリオジェニックカルスは、 $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D +  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP 添加区において最も効率良く誘導され、その率は 16.7%と有意に最も高い値を示した。エンブリオジェニックカルスからの植物体再分化は、ホルモンフリーMS 固形培地上で体細胞不定胚が形成された後、 $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 添加の MS 固形培地上で培養することにより、最も効率よく再分化し、その率は 47.6%であった。さらに、1 カルス当たりの再分化植物体数も 2.2 本であった。

3. *Brachiaria* 属の交雑育種法を展開するため、ルジグラスの多芽体または種子由来の幼植物体を用いて、*in vitro* 条件下でコルヒチン処理し、4 倍体を作出した。コルヒチン処理した多芽体および幼植物体から計 172 個体の植物体が得られ、これらの中から、多芽体由来 1 系統 23 個体および幼植物体由来 5 系統 5 個体の合計 6 系統 28 個体の 4 倍体が作出された。4 倍体の作出効率は、多芽体ではコルヒチン濃度 0.1%、12 時間処理区において 28.6%、幼植物体ではコルヒチン濃度 0.1%、3 時間処理区において 31.3%と最も高い値であった。4 倍体の選抜は、フローサイトメトリーを用いることで、従来の細胞学的手法に比べ、より簡便で迅速に行うことができた。また、孔辺細胞長、孔辺細胞幅および倍

数性との間には、有意な正の相関が認められたことから、これらの孔辺細胞の特徴を指標とした、2倍体および4倍体の簡易判別が可能であると考えられた。現在、作出された4倍体後代集団は、品種登録に向けた栽培特性が調査され、本草種が新規育種素材として有望であることが報告された。

4. *Brachiaria* 属における遺伝子組換え技術を用いた分子育種を展開するため、ルジグラスのエンブリオジェニックカルスおよび多芽体を標的組織として用いて、パーティクルガン法により形質転換体の作出を試み、得られた形質転換体の導入遺伝子の発現について調査した。本実験において、エンブリオジェニックカルスは、多芽体よりも有意に多いGUS発現スポットが認められたことから、標的組織として適していることが示唆された。ビアラホス選抜濃度の検定では、 $10 \text{ mg L}^{-1}$  ビアラホス添加区のみにおいて、全てのエンブリオジェニックカルスが枯死したことから、形質転換カルスの選抜には  $10 \text{ mg L}^{-1}$  ビアラホスが最も有効であることが示唆された。

エンブリオジェニックカルス計 290 個は、8 ショット分のガン処理に供し、 $10 \text{ mg L}^{-1}$  ビアラホスで選抜したところ、GUS発現を示す形質転換カルスが4系統(1.4%)得られ、そのうち2系統(0.7%)において植物体への再分化が認められた。得られた形質転換体は、PCRによる導入遺伝子の確認を行い、1.1 kb 上にGUS遺伝子の増幅バンドが認められた。また、サザンブロット分析により、GUS遺伝子の発現を調査したところ、両者とも1コピーのGUS遺伝子が約10 kb 上に検出された。これらの形質転換体は、葉、茎および穂において強いGUS発現を示した。さらに、除草剤耐性試験を行ったところ、形質転換

体は、除草剤に対して強い耐性を示し、導入した *bar* 遺伝子が発現していることが確認できた。

以上のことから、本研究では、*Brachiaria* 属 4 草種のゲノムサイズの推定、2 倍体草種ルジグラスにおける組織培養法の確立、その育種的利用としての 4 倍体有性生殖系統の作出、そしてパーティクルガン法による形質転換体の作出に成功した。本研究で得られた成果は、今後、わが国における *Brachiaria* 育種の展開に寄与するものと思われる。

**Studies on establishment of tissue culture system and its utilization for  
breeding in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*)**

**Genki Ishigaki**

**Summary**

*Brachiaria* is tropical forage grasses, which has been cultivated in tropical and subtropical region as pasture mainly. The *Brachiaria* genus has about 100 species recognized in the world. At present, some species such as *B. brizantha* (A. Rich.) Stapf, *B. decumbens* Stapf, *B. humidicola* (Rendle) Schweick and *B. ruziziensis* Germain & Evrard have been important commercially because these species have many positive attributes, e.g., tolerance to acid soil, high productivity and high quality forage. Thus, these cultivars are also important as breeding material for development of *Brachiaria* breeding. In *Brachiaria* breeding, besides productivity and digestibility, persistence, adaptation to infertile acid soil and antibiotic resistance to spittlebugs are also important breeding objectives (Miles and Valle 1996). However, it is very difficult to develop a *Brachiaria* breeding program through a traditional hybridization approach because almost all species are predominantly facultative apomictic tetraploids. Therefore, it is proposed that *B. ruziziensis* (ruzigrass) should be useful for *Brachiaria* breeding programs based on tissue culture system because this species has sexuality.

In the first chapter of this study, the author estimated genome sizes of five *Brachiaria* cultivars by flow cytometry to evaluate their utility as breeding material. In the second chapter, the author established an effective method for plant regeneration through multiple-shoot formation or somatic embryogenesis from seed-derived shoot apical meristems of diploid ruzigrass. Furthermore, tetraploid ruzigrass were produced by *in vitro*-colchicine treatment with multiple-shoot clumps or seedlings. Finally, a particle bombard mediated transformation system was established with embryogenic calli in ruzigrass.

#### 1. Genome sizes in five *Brachiaria* cultivars

Genome sizes of five *Brachiaria* cultivars were estimated by flow cytometry to evaluate their utility as breeding material from the standpoint of genome size. The diploid *B. ruziziensis* cv Kennedy was calculated to possess  $615 \pm 13$  Mbp  $C^{-1}$ . On the other hand, tetraploid *B. decumbens* cv. Basilisk and *B. brizantha* cv. Marandu were determined to possess genome size of  $1633 \pm 17$  Mbp  $C^{-1}$  and  $1404 \pm 13$  Mbp  $C^{-1}$ . Additionally, pentaploid *B. brizantha* cv. XARAES and hexaploid *B. humidicola* cv. Humidicola were determined to possess genome size  $1743 \pm 15$  Mbp  $C^{-1}$  and  $1953 \pm 16$  Mbp  $C^{-1}$ . In these cultivars, the genome size in C-value (genome size per holoploid) increased with increasing ploidy level. On the other hand, genome size in Cx-value (genome size per monoploid) of apomictic cultivars (tetra-, penta-, hexaploid cultivars) were bigger than that of sexual cultivar (diploid). Additionally, the genome size in Cx-value decreased

with increasing ploidy level in apomictic cultivars.

## **2. Multiple shoots formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in Ruzigrass.**

A plant regeneration system via multiple shoots formation, or somatic embryogenesis from seed-derived shoot apical meristems of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis* cv Kennedy) was established. Shoot apices as initial explants were isolated from aseptically germinated seedlings, and cultured *in vitro*. The most effective treatments for multiple shoots and embryogenic calli formation were 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 2.0 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP) and 4.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP, respectively. Plant regeneration from multiple shoot-clumps was achieved by culturing on solid MS medium containing 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP or 2.0 mg L<sup>-1</sup> kinetin + 2.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. Somatic embryos regenerated plantlets on a MS medium without plant hormones. Regenerated shoots were germinated precociously on MS medium containing 0.01 or 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA and 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP. All regenerants were successfully grown up to maturity.

## **3. Induction of tetraploid ruzigrass plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings**

Tetraploid ruzigrass have been obtained by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and germinated seedlings. Multiple-shoot clumps were



induced and maintained on MS basal medium with 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP according to a previous report. The colchicine treatment consisted of culturing multiple-shoot clumps on MS basal medium containing 0.0125–0.1% colchicine for 12 and 48 h. Surviving multiple-shoot clumps were regenerated on MS basal medium containing 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP. The ploidy level of plants after colchicine treatment was determined by flow cytometry. Eight tetraploid plants were obtained from multiple-shoot clumps treated with 0.1% colchicine for 12 h. This treatment was identified as the optimum treatment that resulted in highest frequency (28.6%) of tetraploid plants among the treatments tested on multiple-shoot clumps. Five tetraploid plants (31.3%) were obtained when seedlings were treated with 0.1% colchicine for 3 h. Although higher concentrations of colchicine and longer durations of colchicine treatment reduced the survival rate of the explants, such treatments increased the frequency of tetraploid plants. A total of 27 tetraploid plants were obtained from 900 different colchicine-treated multiple-shoot clumps, and a total of 5 tetraploid plants were obtained from 300 colchicine-treated seedlings. Cytological analysis affirmed the results of flow cytometry. Significant differences in leaf blade stomata were observed between diploid and tetraploid ruzigrass.

#### **4. Establishment of a genetic transformation system for ruzigrass using particle inflow gun**

The author attempted to establish a particle inflow gun-mediated

transformation protocol for ruzigrass using multiple-shoot clumps and embryogenic calli. These *in vitro* cultures were bombarded with a vector containing the herbicide resistance gene (*bar*) as a selectable marker and the *GUS* reporter gene. Following bombardment and selection with 10 mg L<sup>-1</sup> of bialaphos, 4 bialaphos-resistant calli (1.4%) were obtained from 290 bombarded embryogenic calli; 2 out of 4 bialaphos-resistant calli produced a total of 75 regenerated and rooted plants. PCR analysis confirmed that 41 plants (54.7%) were PCR-positive for the *GUS* gene, and Southern blot analysis verified the transgene integration in these transgenic plants. All transgenic ruzigrass plants could be acclimatized. Transgene *GUS* and *bar* was stably expressed in mature plants.

In this study the author estimated genome sizes of five *Brachiaria* cultivars by flow cytometry and established an efficient tissue culture system of ruzigrass. Additionally, as the utilization of tissue culture system, the author produced tetraploid ruzigrass and established a genetic transformation system of ruzigrass. These results could be applied to develop *Brachiaria* breeding programs in Japan.

## 謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成に当たって終始懇切な指導を賜った宮崎大学フロンティア科学実験総合センター教授（宮崎大学農学部教授兼任）明石 良博士に誠心より感謝の意を表する。

本論文において校閲の労をとられた宮崎大学農学部教授 川村 修博士，同大学農学部教授 平田 昌彦博士，同大学農学部教授 藪谷 勤博士，同大学農学部准教授 石井 康之博士に厚く御礼を申し上げます。また，宮崎大学フロンティア科学実験総合センター助教 権藤崇裕博士，国際農林水産業研究センター 畜産草地領域プロジェクトリーダー 末永一博博士，沖縄県畜産研究センター 育種改良班農林水産省牧草育種指定試験地研究員 幸喜 香織氏，同研究センター 育種改良班農林水産省牧草育種指定試験地主任 主任研究員 稲福 政史氏，独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所 飼料作物育種工学研究チーム 上席研究員 蝦名 真澄博士には本論文の完成に至るまで温かい指導を賜った。

さらに，独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター 飼料作物育種研究サブチーム 主任研究員 秋山 征夫博士ならびに **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** **Cacilda Borges do Valle** 博士には，本研究に関する諸情報・文献を快く提供して頂き，**Department of Developmental and Cell Biology, University of California Irvine** 教授 **Franz Hoffmann** 博士，宮崎大学農学部 外国人特別研究員 **Mohammad Mijanur Rahman** 博士には英文の

校閲を賜った。心より感謝の意を表す。なお研究の遂行に当り、温かい理解と激励の言葉を惜しまれなかったバイエルクロップサイエンス株式会社バイオサイエンスグループ研究開発本部 井上 公一博士，独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所 飼料作物育種工学研究チーム 上席研究員 小林 真氏，宮崎大学農学部助教 霍田 真一博士の各位にも謹んで謝意を表したい。さらに，宮崎大学フロンティア科学実験総合センター産学官連携研究員 橋口 正嗣博士，同大学フロンティア科学実験総合センター産学官連携研究員 外山 潤博士，同大学フロンティア科学実験総合センター産学官連携研究員 田中 秀典博士，宮崎大学農学部附属自然共生フィールド科学教育研究センター技能補佐員 太田原鉄秀氏には本研究活動に対し温情ある理解と指導を賜った。また，実験の遂行に際し，種々ご協力下さった宮崎大学農学部育種学研究室の諸兄姉に対し厚く御礼申し上げたい。ここに記して関係各位に対する謝辞とする次第である。

## 引用文献

- Akashi R, Adachi T (1991) High frequency somatic embryo formation in cultures of immature embryos of guineagrass, *Panicum maximum* JACQ. Jpn J Breed 41: 85–93.
- Akashi R, Adachi T (1992a) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). Plant Sci 82: 213–218.
- Akashi R, Adachi T (1992b) Plant regeneration from suspension cultured-derived protoplasts of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). Plant Sci 82: 219–225.
- Akashi R, Hashimoto A, Adachi T (1993) Plant regeneration from seed-derived embryogenic callus and cell suspension cultures of bahiagrass (*Paspalum notatum*). Plant Sci 90: 73–80.
- Akashi R, Kawamura O, Hoffmann F (1999) The advance of transformation in *Lotus corniculatus*: Towards low lignin pasture through antisense RNA. *Proceeding International Workshop: Utilization of transgenic plant and genome analysis in forage crops*, p57–65.
- Akashi R, Yuge C, Gondo T, Kawamura O, Hoffmann F (2002) Bialaphos-resistant cells of dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.) through particle bombardment with a simple self-built inflow gun. Grassl

Sci 47: 588–593.

明石 良・権藤崇裕・川村 修 (2003) バイオテクノロジーを利用した暖地型  
イネ科牧草の育種. 日草誌 49: 79–87.

Akiyama Y, Yamada-Akiyama H, Yamanouchi H, Takahara M, Ebina M,  
Takamizo T, Sugita S, Nakagawa H (2008) Estimation of genome size  
and physical mapping of ribosomal DNA in diploid and tetraploid  
guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). Grassl Sci 54: 89–97.

Akiyama Y, Yamamoto Y, Ohmido N, Ohshima M, Fukui K. (2001) Estimation of  
the nuclear DNA content of strawberries (*Fragaria* spp.) compared with  
*Arabidopsis thaliana* by using dual-step flow cytometry. Cytologia 66:  
431–436.

Andrade SO, da Silva Lopes HO, de Almeida Barros M, Leite GG, Dias SM,  
Saueressig M, Nobre D, Temperini JA. (1978) Photosensitization in  
cattle grazing on pastures of *Brachiaria decumbens* Stapf infested with  
*Pithomyces chartarum* (Berk. & Curt.) M.B. Ellis. Arquivos do Instituto  
Biologico 45: 117–136 (In Portuguese with English abstract).

Bayer Crop Science (2009) Products, BioScience,  
Germany, [http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf  
/id/BioScience](http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/BioScience)

Bovo OA, Mroginski LA (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration  
from cultured mature and immature embryos of *Paspalum notatum*  
(*gramineae*). Plant Sci 65: 217–223.

- Brito G, Loureiro J, Lopes T, Rodriguez E, Santos C (2008) Genetic characterization of olive trees from Madeira Archipelago using flow cytometry and microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol* 55: 657–664.
- Chakraborti SP, Vijayan K, Roy BN, Qadri SMH (1998) *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Rep* 17: 799–803.
- Chen J-Q, Meng X-P, Zhang Y, Xia M, Wang X-P (2008) Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnol Lett* 30: 2191–2198.
- Cho MJ, Choi HW, Lemaux PG (2001) Transformed T<sub>0</sub> orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) plants produced from highly regenerative tissues derived from mature seeds. *Plant Cell Rep* 20: 318–324.
- Cho MJ, Ha CD, Lemaux PG (2000) Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Cell Rep* 19: 1084–1089.
- Cho MJ, Jiang W, Lemaux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci* 138: 229–244.
- Cho MJ, Jiang W, Lemaux PG (1999) High-frequency transformation of oat via microprojectile bombardment of seed-derived highly regenerative cultures. *Plant Sci* 148: 9–17.

- Christensen AH, Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* 5: 213–218.
- Chrtek Jr J, Zahradníček J, Krak K, Fehrer J (2009) Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups. *Ann Bot* 104: 161–178.
- Claringbold PJ, Biggers JD, Emmens CW (1953) The angular transformation in quantal analysis. *Biometrics* 9: 467–484.
- Dalton SJ, Bettany AJE, Bhat V, Gupta MG, Bailey K, Timms E, Morris P (2003) Genetic transformation of *Dichanthium annulatum* (Forssk) – an apomictic tropical forage grass. *Plant Cell Rep* 21: 974–980.
- do Valle CB, Savidan YH (1996) Genetics, Cytogenetics, and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In: *Brachiaria; Biology, Agronomy and Improvement* (Eds Miles JW, Maass BL, do valle CB), CIAT, Colombia, p147–163.
- Fisher MJ, Kerridge PC (1996) The Agronomy and Physiology of *Brachiaria* Species. In: *Brachiaria; Biology, Agronomy and Improvement* (Eds Miles JW, Maass BL, do valle CB), CIAT, Colombia, p43–52.
- Fukui K, Iijima K (1991) Somatic chromosome map of rice by imaging methods. *Theor Appl Genet* 81: 589–596.



- Galbraith DW (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cell by flow cytometry. *Biol Plant* 31: 113–120.
- Gao SL, Chen BJ, Zhu DN (2002) *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 70: 289–293.
- Goldman JJ, Hanna WW, Fleming G, Ozias-Akins P (2003) Fertile transgenic pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] plants recovered through microprojectile bombardment and phosphinothricin selection of apical meristem-, inflorescence-, and immature embryo-derived embryogenic tissues. *Plant Cell Rep* 21:999–1009.
- Gondo T, Matsumoto J, Tsuruta S, Yoshida M, Kawakami A, Terami F, Ebina M, Yamada T, Akashi R (2009) Particle inflowgun-mediated transformation of multiple-shoot clumps in rhodes grass (*Chloris gayana*) *Journal of Plant Physiol* 166: 435–441.
- Gondo T, Matsumoto J, Yamakawa K, Tsuruta S, Ebina M, Akashi R (2007) Somatic embryogenesis and multiple-shoot formation from seed-derived shoot apical meristems of rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth). *Grassl Sci* 53: 138–142.
- Gondo T, Tsuruta S, Akashi R, Kawamura O, Hoffmann F (2005) Green, herbicide-resistant plants by particle inflow gun-mediated gene transfer

to diploid bahiagrass (*Paspalum notatum*). J Plant Physiol. 162: 1367–1375.

Greilhuber J, Dolezel J, Lysak MA, Bennett MD. (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. Ann Bot 95: 255–260.

Gu XF, Yang AF, Meng H, Zhong JR (2005) In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Rep 24: 671–676.

花ヶ崎敬資・安里直和・守川信夫・長利真幸（2008）ブラキアリア属新導入品種の生産性の解明と干ばつ耐性の検討（1）ブリザンタ MG5 の踏圧耐性の検討. 沖縄畜研セ研報 45: 53–56.

花ヶ崎敬資・望月智代・守川信夫・長利真幸・當眞嗣平（2007）導入暖地型牧草の適応品種選定試験（2001年～2005年）（2）可消化乾物収量および粗タンパク質収量の比較. 沖縄畜研セ研報 44: 79–84.

Halpin C, Holt K, Chojecki J, Oliver D, Chabbert B, Monties B, Edwards K, Barakate A, Foxon GA. (1998) Brown-midrib maize (bm1)- a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. Plant J 14: 545–553.

宝示戸貞夫・堀端俊造（1982）アフリカからの新作物探索導入調査報告書. 熱研資料 58: 1–120.

Howarth JR, Jacquet J, Doherty A, Jones HD, Cannell ME (2005) Molecular genetic analysis of silencing in two lines of *Triticum aestivum*

- transformed with the reporter gene construct pAHC25. *Ann Appl Biol* 146: 311–32.
- Ishigaki G, Gondo T, Suenaga K, Akashi R (2009a) Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). *Grassl Sci* 55: 46–51.
- Ishigaki G, Gondo T, Suenaga K, Akashi R. (2009b). Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicines treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. *Grassl Sci* 55: 164–170.
- Ishikawa T, Subbarao GV, Ito O, Okada K (2003) Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. *Plant Soil* 255: 413–419.
- James VA, Neibaur I, Altpeter F. (2008) Stress inducible expression of the DREB1A transcription factor from xeric, *Hordeum spontaneum* L. in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flüggé) enhances abiotic stress tolerance. *Transgenic Res* 17: 93–104.
- Jarret RL, Ozias-Akins P, Phatak S, Nadimpalli R, Duncan R, Hiliard S. DNA contents in *Paspalum* spp. determined by flow cytometry. *Genet Resour Crop Evol* 42: 237–242.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387–405.
- Keller-Grein G, Maass BL, Hanson J (1996) Natural Variation in *Brachiaria* and

Existing Germplasm Collections. In: *Brachiaria; Biology, Agronomy and Improvement* (Eds Miles JW, Maass BL, do valle CB), CIAT, Colombia, p16–42.

Kellogg EA, Bennetzen JL (2004) The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *Am J Bot* 91: 1709–1725.

幸喜 香織・蝦名 真澄 (2009) ブラキアリアグラスの育種経緯と品種および利用. *日草誌* 55: 179–187.

幸喜香織・蝦名真澄・守川信夫・望月智代・中西雄二 (2006) 南西諸島における *Brachiaria* 属の導入. 1. *Brachiaria* 属の種子繁殖特性. *日草誌* 52(別2) : 104–105.

幸喜香織・石垣元気・蝦名真澄・稲福政史・末永一博・権藤崇裕・明石良 (2009) ルジグラス (*Brachiaria ruzizensis*) 4 倍体系統の特性. 第 72 回九州農業研究会, p82.

Lascano CE, Euclides VPB (1996) Nutritional Quality and Animal Production of *Brachiaria* Pastures. In: *Brachiaria; Biology, Agronomy and Improvement* (Eds Miles JW, Maass BL, do valle CB), CIAT, Colombia, p106–123.

Leitch I, Bennett MD (2004) Genome downsizing in polyploidy plants. *Biol J Linn Soc* 82: 651–663.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal

transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1391–1406.

Lu C-Y, Vasil IK (1981a) Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely-suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq. *Ann Bot* 48: 543–548.

Lu C-Y, Vasil IK (1981b) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. *Theoretical and Applied Genetics* 59: 275–280.

Martel E, Nay D de, Siljak-Yakovlev S, Brown S, Sarr A (1997) Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. *J Hered* 88: 139–143.

Matzk F, Hammer K, Schubert I (2003) Coevolution of apomixes and genome size within the genus *Hypericum*. *Sex Plant Reprod* 16: 51–58.

Miles JW, Maass BL, do Valle CB (1996) Preface In: *Brachiaria; Biology, Agronomy and Improvement* (Eds Miles JW, Maass BL, do valle CB), CIAT, Colombia, vii–viii.

Miles JW, do Valle CB (1996) Manipulation of Apomixis in *Brachiaria* Breeding. In: *Brachiaria; Biology, Agronomy and Improvement* (Eds Miles JW, Maass BL, Do valle CB), CIAT, Colombia, 147–163.

Miles JW, do Valle CB, Rao IM, Eiclides VPB (2004) Brachiriagrasses. In : *Warm-Season (C4) Grass* (Eds Moser LE, Burson BL, Sollenberger

LE), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, p745–783.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl Acid Res* 8: 4321–4325.

中西雄二・花ヶ崎敬資・幸喜香織・与古田稔・平野 清・小路 敦 (2008) 熱帯牧草ブリザンタ (MG5) の乾物収量および栄養収量. 畜産草地研究成果情報 7.

中西雄二・平野 清・小路 敦 (2006) 熱帯牧草ブリザンタ (MG5) の肉用繁殖牛における栄養価と採食性. 畜産草地研究成果情報 5.

中川 仁 (1998) 熱帯の飼料作物. 国際農林業協力協会, 東京, p25–28.

中川 仁 (2003) 暖地型イネ科牧草の育種と遺伝的研究. *日草誌* 49: 64–71.

日本モンサント株式会社 (2009) 日本モンサントの遺伝子組換え作物, 東京,  
<http://www.monsanto.co.jp/biotech/index.shtml>

Ohmido N, Kijima K, Akiyama Y, de Jong JH, Fukui K. (2000) Quantification of total genomic DNA and selected repetitive sequences reveals concurrent changes in different DNA families in *indica* and *japonica* rice. *Mol Genet Genomics* 263: 388–394.

Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D. (2004) Stress-induced expression in wheat of *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays

- water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47: 493–500.
- Pinheiro AA, Pozzobon MT, Do valle CB, Penteado MIO, Carneiro VTC (2000) Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. *Plant Cell Rep* 19: 274–278.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. In: *A Laboratory Manual*. 2nd ed. (Eds Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr opin Biotechnol* 7: 161–167.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115: 327–334.
- Smith RL, Grando MF, Li YY, Seib JC, Shatters RG. (2002) Transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). *Plant Cell Rep* 20: 1017–1021.
- Swenne A, Louant B, Dujardin M (1981) Induction par la colchicine de formes autotetraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* GERMAIN et EVRARD (Graminée). *Agron Trop* 36: 134–141. (In French).
- Takeuchi Y, Dotson M, Keen NT (1992) Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol Biol* 18: 835–839.
- Tohme J, Palacios N, Lenis S, Roca W (1996) Application of Biotechnology to

- Brachiaria*. In: *Brachiaria; Biology, Agronomy and Improvement* (Eds Miles JW, Maass BL, do valle CB), CIAT, Colombia, p196–204.
- Tsuruta S, Ebina M, Nakagawa H, Kawamura O, Akashi R. (2007) Isolation and characterization of cDNA encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Grassl Sci* 53: 103–109.
- Uozu S, Ikehashi H, Ohmido N, Ohtsubo H (1997) Repetitive sequences: cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. *Plant Mol Biol* 35: 791–799.
- Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep* 12: 84–88.
- van Duren M, Mopurgo R, Dolezel J, Afza R (1996) Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica* 88: 25–34.
- Weiss-Schneeweiss H, Greilhuber J, Schneeweiss GM (2006) Genome size evolution in holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) and related genera. *Am J Botany* 93: 148–156.
- Yang XM, Cao ZY, An LZ, Wang YM, Fang XW (2006) *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152: 217–224.
- Zhang S, Zhong H, Sticklen MB (1996) Production of multiple shoots from shoot



apical meristems of oat (*Avena sativa* L.). *J Plant Physiol* 148: 667–671.

Zhao J, Ren W, Zhi D, Wang L, Xia G (2007) Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep* 26: 1521–1528.

Zhong H, Srinivasan C, Sticklen MB (1992) In-vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryo from shoot tips. *Planta* 187: 483–489.