

学位論文の要旨（1200 字程度）

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* 育種を確立することを目的とし、2 倍体草種のルジグラス (*B. ruziziensis*) の組織培養法の確立とその育種的利用に関する研究として、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。

本研究に先立ち、4 種の *Brachiaria* 属草種 (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola*, *B. ruziziensis*) 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たところ、そのサイズは種間において異なっていたことから、これら 4 草種は、*Brachiaria* 属における変異拡大による育種に有用な草種であることが示唆された。

次に、ルジグラスの組織培養法について諸条件を検討した。多芽体は、0.5 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BAP 添加区において、一方、エンブリオジェニックカルス (E カルス) は、4 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L BAP 添加区において最も効率良く誘導できた。また、それらの植物体再分化では、多芽体の場合は、1.0 mg/L BAP 添加区および 2.0 mg/L kinetin + 2.0 mg/L gibberellin 添加区が有効であった。一方、E カルスの場合では、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、2 mg/L BAP + 0.1 mg/L 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た。

組織培養法の育種的利用に関する研究として、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 倍体作出を試みた。コルヒチン処理の結果、両供試物から全 172 個体の植物体を得られ、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。

最後に、E 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た。本実験において、E カルスは標的組織として適しており、また、形質転換カルスの選抜には 10 mg/L ビアラホスが最も有効であることが示唆された。E カルス計 290 個は、8 ショット分のガン処理に供し、10 mg/L 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 系統得られ、そのうち 2 系統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 分析およびサザンブロット分析により、GUS 遺伝子の導入を示すバンドを確認することができた。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である。