

# ルジグラスの完熟種子由来カルスからの植物体再分化と形質転換 Callus Induction from seeds, Regeneration of Plantlets from Callus and Transformation by Particle Bombardment in Rugigrass (*Brachiaria ruziziensis*).

田中正美  
Masami TANAKA

## 要 約

強酸性土壌でも生育するイネ科牧草であるルジグラスの完熟種子からのカルス化・再分化の条件とパーティクルガン法によるカルスへのGUS遺伝子の導入条件を検討し、以下の結果を得た。

- 1) 再分化能を有するコンペイトー状のカルスはMS培地にBAが0.4か0.5mg/lと2,4-D 3mg/lを添加した培地で安定して形成された。
- 2) カルスからの再分化は硝酸アンモニウムを165mg/lに減じ、L-グルタミンなど複数のアミノ酸を添加したMS培地で安定した。また、コンパクトカルスの継代はBAを0.4mg/l添加したMSの液体培地が安定した。環境条件は暗条件より明条件で再分化能の維持効果が高く、ロータリー振とう培養の回転速度は60rpmがカルスの褐変も少なく、増殖や再分化が優れた。
- 3) 遺伝子導入についてはヘリウムガス圧を1350psi程度、照射距離を4.0cm~7.5cmの範囲がよく、再分化した植物でGUS遺伝子の発色が確認できた。

キーワード：ルジグラス、完熟種子、カルス、パーティクルガン法、GUS遺伝子、形質転換体

## I. 緒言

ルジグラス (*Brachiaria ruziziensis* [Ruzigrass]) は南米産のイネ科で草丈1m程度に伸び、この地域では広く牧草として栽培されている。中南米を中心とした地域はアルミニウムを多く含む強酸性土壌が広がり、これらの痩せた土地を利用して牧畜が行われている。ルジグラスは強酸性土壌でも生育し、アルミニウム等の金属イオンを吸収する能力が他の作物より高いという特性を持つとされる。この特性はリン酸吸収係数が高く、酸性の火山灰土壌が広がる我が国でも重要な形質であり、土壌環境保全の立場からも、遺伝子資源として有用と考えられる。

近年、組織培養や遺伝子操作技術の進歩により多くの作物で外来遺伝子を導入した形質転換体の作出が可能となりつつある。イネ科ではイネなど多くの事例があるが、ルジグラスが属する*Brachiaria*属の報告はない。そこで、ルジグラスの完熟種子からのカルス誘導及び再分化とカルス継代による培養系の確立を試みた。さらに得られた培養系を材料にパーティクルガン法による外来遺伝子の導入についても検討した。

## II. 材料および方法

### I) カルス誘導条件

ルジグラスの完熟種子を供試し、種皮を除いて70%エタノールで30秒間と3%アンチホルミン液で15分間消毒した後、培地に置床した。脱分化のためのカルス化培地はショ糖 30g/l、pH 5.8、ゲルライト0.3g/lとしたMS培地を基本とし、ホルモンとしてBA 0.1~0.5mg/lと2,4-D 1~3mg/lを組み合わせた25種類の培地とN<sub>6</sub>Y<sub>1</sub>培地(プロリン 1g/l、ショ糖 30g/l、pH 5.8、ゲルライト 0.3g/l)に2,4-Dを1または2mg/l添加した培地とした。1種類の培地につき10個の種子を25℃、暗黒条件に静置した(第1表)。

### II) カルスの継代と植物体再分化条件

カルスからの再分化培地はMSホルモンフリー培地及び硝酸アンモニウムを1/10(165mg/l)に減じて複数のアミノ酸を添加した改変MS培地または水稻の薬培養に用いられるN<sub>6</sub>Y<sub>1</sub>培地にホルモンを添加し、25℃、2,000Luxの明条件に静置した(第1表)。

分化能を維持するカルスの継代にはMS培地の硝酸アンモニウムを1/10(165mg/l)に減じた改変MS培地及びN<sub>6</sub>Y<sub>1</sub>培地にホルモンを添加した液体培地を使用し、回転(25℃、1,000lux明条件、3rpm)または振とう(25℃、1,000luxまたは暗黒、ロータリー振とう40、60、80、120rpm)した。回転培養には径20mmの試験管に5ml、振とう

培養には100mlの三角フラスコにそれぞれ20mlの培地を分注した(第1表)。

第1表 ルジグラス完熟種子からカルスを経由して再分化する培養系に用いた培地

培地名	脱分化		再分化培地			継代培地			
	MS1~25	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub> -1	MSf	改変MS-1	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub> -2	MSD	改変MS-2	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub> -3	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub> -4
基本培地名	MS	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub>	MS	MS	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub>	MS	MS	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub>	N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> mg/l	-	-	-	165	-	-	165	-	-
BA mg/l	0.1~0.5	-	-	0.4	-	-	0.4	-	-
2,4-D mg/l	1~3	1, 2	-	-	-	1	-	1	2
NAA mg/l	-	-	-	-	2	-	-	-	-
カイネチン mg/l	-	-	-	-	1	-	-	-	-
プロリン g/l	-	1	-	-	-	-	-	1	1
L-グルタミン mg/l	-	-	-	750	-	-	750	-	-
ミイノシトル mg/l	-	-	-	100	-	-	-	-	-
チアミン mg/l	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-
ソルビトール mg/l	-	-	-	-	35	-	-	-	-
ショ糖 g/l	30	30	30	35	20	30	30	30	30
ゲルライト g/l	3	3	3	3	3	-	-	-	-
pH	5.8	5.8	5.75	5.8	5.8	5.75	5.75	5.75	5.75

III) 再分化率向上のための培養法

材料は前項で作出した種子由来のカルスを約30日間隔で25℃、500luxの連続照明下、60rpmのロータリー振とう培養で継代してきた再分化能を有しているコンペイトー状カルスを供試した。

均一なカルスを得る目的で滅菌した0.5mmのステンレス網にスパーテルを用いてコンペイトー状カルスを押しつぶす裏ごし操作と、このときの浮遊物を洗い流す除去効果について検討した。また、継代する培地のpH濃度を4.0と5.75に設定した(第2表)。

裏ごし処理して継代を進めたカルスと1/2 MS培地を用いてリン酸及びアルミニウムがルジグラスのカルス増

殖や再分化に及ぼす影響について検討した(第3表)。さらに、継代から再分化培地に移植するまでの期間を5日間隔で設け、培地の組成と併せて再分化に及ぼす影響を検討した(第4表)。

第2表 継代操作方法と培地のpH

継代時のカルス分割操作	pH	
A: ピンセットではぐす	5.75	4.0
B: 裏ごし操作(0.5mmステンレス網)	-	4.0
C: 裏ごし操作、浮遊物を洗浄除去	5.75	4.0

第3表 継代培地の組成及びpH

- ①: MS培地、L-グルタミン 350mg/l、ショ糖 30g/l、2,4-D 1mg/l、BA 0.4mg/l、pH 5.75
- ②: 1/2MS、添加物は①の基本培地に同じ、pH 5.75
- ③: ②の培地に同じ、pH 4.8
- ④: ②の培地に同じ、pH 4.0
- ⑤: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を全て除いた②の培地、pH 5.75
- ⑥: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を全て除いた②の培地、pH 4.8
- ⑦: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を全て除いて、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> を 0.03ml/l 添加した②の培地、pH 5.75
- ⑧: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を全て除いて、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> を 0.03ml/l 添加した②の培地、pH 4.8

第4表 再分化培地と移植時期

再分化培地の組成	移植時期 (継代後日数)			
MS f : MS培地、ショ糖 30g/l、pH 5.75、ゲルライト 0.4g/l	5	10	15	20
C-prt : MS培地、NAA 2.0mg/l、BA 1.0mg/l	5	10	15	20

V) 遺伝子導入条件

遺伝子の導入にはパーティクルガン (バイオラッド社 PDS-1000/He) を使用し、1.6 μm の金粒子にマニュアルに従って遺伝子を吸着させた。真空度を20Hgに固定して、ヘリウム (He) ガス圧は1100psi、1350psi、ストップングスクリーンと試料間の距離は4.0cm、7.5cm、10.7cmの組み合わせとした。一試料につき照射は1回とした。プラスミドDNAは pBI221 (35S + GUS) を供試した (第1図)。

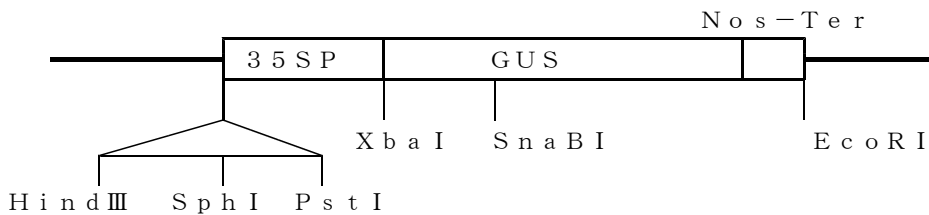
また、ハイグロマイシン耐性 (*hpt*) 遺伝子による選抜を考慮して、ハイグロマイシン濃度を0、20、30、50mg/lに調製した再分化用のMSホルモンフリー培地を9cmのシャーレに20ml分注した。この培地に20日間隔で継代しているコンペイトー状カルス塊をシャーレ当たり10個置床して、生育、枯死の状況を調査することで選抜濃度を

検討した。

カルスは照射処理2日前に振とう培養培地からMSホルモンフリー培地に置床し、2cmの円形に隙間をなくして敷き詰めた。

GUS遺伝子の導入処理が済んだカルスは不定芽形成培地 (MS培地、NAA 2.0mg/l、BA 1.0mg/l、ゲルライト 0.2%、pH 5.8) に置床し、25℃、明条件で培養した後、一部は32時間後と7日目にGUSの発現を調査した。また、新たな不定芽形成培地に移植し、25℃、明条件で培養して形質転換体の獲得を試みた。

GUS遺伝子導入は20%メタノールを含む1mM X-Glucを基質とする組織化学的アッセイ法により溶液に2時間以上浸漬した後、発色によって確認した。



第1図 導入に用いた pBI221

III. 結果および考察

I) カルス誘導条件

カルスの発生<sup>5)</sup>は水稻などと同様に胚の部分で起こり、早いものでは置床3日目から発芽と同時に幼芽や幼根で始まった。また、しばしば芽を伸ばして培地に接した茎の分裂組織がカルス化することも観察された (写真1-a~d)。

発生初期のカルスは柔らかく透明感があるが、カルス表面が赤褐色に着色することもあった。また、10日前後を経過した後、白く透明感のある突起状カルスや表面が滑らかなカルスも形成された。更に、置床して約25日後には透明感のあるカルスの間に明らかに周囲とは異なる不透明で白いカルスが発生した。このカルスはピンセットでつまむと硬く、コンペイトー状をしていた (写真1-e)。

白く堅いコンペイトー状カルスは、MS培地にBAと

2,4-Dを添加した培地で発生し、BAを0.4または0.5mg/l、2,4-Dを3mg/l添加した場合に安定して形成された (第5表)。しかし、50日と長期間培養を継続すると、より低いホルモンレベルでも散見された。

誘導された4種類のカルスをMSホルモンフリー培地に移植すると柔らかいカルスや滑らかなカルスの多くはそのままの形態で増殖し、一部に細毛のある突起を形成した。また、白く透明感のあるカルスの多くは細毛のある突起を形成した。しかし、白く堅いカルスからはグリーンスポットの形成を経て、不定芽の発生がみられ、温室で順化して種子が得られた (写真2)。

水稻や多くの植物で再分化能のあるカルスは、ここで不定芽の発生がみられた白く不透明で堅いカルスと同様の形態を有するので、いわゆる再分化が可能なコンパクトカルスが誘導できたと考えられる<sup>1)</sup>。

第5表 脱分化培地がルジグラス完熟種子のカルス形態におよぼす影響

BA濃度 (mg/l)	培養 25 日目					培養 55 日目				
	2,4-D 濃度 (mg/l)					2,4-D 濃度 (mg/l)				
	1	1.5	2	2.5	3	1	1.5	2	2.5	3
0.1	S/CR	s/C	C	s/C	○	S/C#R	S/C	C	C	C
0.2	C	s/R	s/C	s/C	○	C\$	C	C	C\$*	C
0.3	s/CR	s/C	△	C	s/C	C\$*	Cr	△	C	C\$*
0.4	s/CR	s/C	C	△	s/C	C\$	C\$	C	C	C*
0.5	s/C	s/R	s/C	s/C	C*	C\$	S/C	C	C\$	C*

凡例：S--シュート，s--小芽，R--根，r--毛根，C--柔らかいカルス，C\$--なめらかなカルス，C\*--コンパクト状カルス，C\$\*--C\$+C\*，C#--突起状カルス，○--無変化，△--褐変

II) 植物体再分化と継代条件

カルスからの不定芽誘導と再分化は、水稻の培養に用いられるN<sub>6</sub>Y<sub>1</sub>培地やMSホルモンプリー培地でも可能であるが、硝酸アンモニウムを1/10 (165mg/l) に減じて、水稻の再分化に効果がある複数のアミノ酸を添加したMS改変-1培地では置床カルスに対する不定芽発生カルスの割合が2倍の40%とより安定した<sup>3)</sup> (第6表)。

再分化能を有するコンパクトカルスの継代は、カルス化培地など供試した全ての培地で可能であるが、BAを

0.4mg/l 添加したMS改変-2の液体培地が安定した。光は暗条件より明条件で再分化能の維持効果が高く、ロータリー振とう培養の回転速度は60rpmがカルスの褐変も少なく、増殖や再分化が優れた(第7表)。また、約30日の間隔で継代すると3~5倍の増殖量となった。

なお、苗状源基や多芽体培養等に効果的な回転速度3rpm程度の培養条件<sup>6)</sup>では、カルスは黒変・枯死し、増殖や継代はできなかった。

第6表 形態の異なるカルスからの植物体再生におよぼす再分化培地の影響

培地名	移植後30日目					移植後70日目				
	カルスの形態					カルスの形態				
	C	C\$	C*	C\$*	C#	C	C\$	C*	C\$*	C#
MS7- MS改変-1 N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub> -2	微増 増 増	増 極増 増	g g+S g	増 極増 極増	微増 増 微増	褐変 褐変 褐変	毛根・黒変 毛根 毛根	S--20 S--40 S--20	毛根・g 毛根・S--5 毛根・g	褐変 褐変 褐変

凡例：g--グリーンスポット，S--シュート，数字は再分化率(%),カルス形態--第5表に同じ

第7表 継代培地及び培養条件が再分化におよぼす影響

培地名	暗条件				明条件			
	回転数 (rpm)				回転数 (rpm)			
	40	60	80	120	40	60	80	120
MSD	bc	B-2	B	B	bc	B-10	B	B
MS改変-2	bc	bc-7	bc-2	B	bc-20	bc-40	bc-5	B
N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub> -2	bc	bc-5	B-5	B	bc	bc-20	B-5	B
N <sub>6</sub> Y <sub>1</sub> -3	bc	bc-5	B-5	B	bc	bc-10	B-5	B

凡例：bc--カルスの一部黒変，B--カルスの殆どが黒変，数字は再分化率(%)

III) 再分化率向上のための培地

30日の継代間隔では継代時のカルスが黒変し、その一部にコンペイトー状の硬い白色カルスが再生される。このカルスをピンセットで解し、黒変した部分を除いて再継代する方法をとっていたため、カルスが不均一で植物体再生にばらつきがあった。そこで、滅菌処理した0.5mmステンレス網を用いて水稻のカルス継代と同様な裏ごし操作を行った<sup>4)</sup>。その結果、カルスのそろいがよくなった。さらに、細胞の剥離片等を洗浄することで増殖効果は高まった(第8表、写真3)。

ルジグラスがpH 4.0前後の強酸性土壌でも生育するとされることからカルスについて低pHの影響を検討した結果、培地のpHの違いによるカルスの増殖や再分化

能に差はなかったが、pH 4.0ではカルスの褐変が抑制される傾向にあった。ルジグラスの継代には1/2MS培地にL-グルタミン 350mg/l、2,4-D 1mg/l、BA 0.4mg/lを添加し、ショ糖 30g/lを加えて、pH 4.0に調整した液体培地が安定した。また、リン酸とアルミニウムの影響について検討した結果、リン酸を除いたり、リン酸の代わりにアルミニウムを加えた培地でのカルスの生育は著しく劣り、30日目では黒変萎縮した(第9表)。

再分化にはNAA 2.0mg/lとBA 1.0mg/lを添加したMS培地が良く、継代後15日間程度培養したカルスを置床すると安定して植物体を確保できた(第10表)。

第8表 継代操作と培地のpHがカルスに及ぼす影響

試 験 区 継代操作	p H	カルス (継代20日目)		
		増殖程度	大きさ	色
A : ピンセット	5.75	+3	2~4mm	W+b
	4.0	+3	2~4	W+br
B : 裏ごし	5.75	-	-	-
	4.0	+3	0.5~2	W+br
C : 裏ごし洗浄	5.75	+3	1~2	Wbr
	4.0	+4	1~2	W

注 : A区は1mm程度のカルスを置床。W-白色、b-黒色、br-淡い褐色

第9表 培地の組成及びpHがカルスに及ぼす影響

培 地	継代後20日			継代後30日		
	増殖程度	カルス 大きさmm	色	増殖程度	カルス 大きさmm	色
① : MS、pH 5.75(対照)	+2	1~4	W+b	+3 <sup>o</sup>	2~8	Br+b
② : 1/2MS、pH 5.75	+2	1~4	W+b	+3	2~6	Br+b
③ : 1/2MS、pH 4.8	+2	1~5	WBr	+3	2~7	Br+b
④ : 1/2MS、pH 4.0	+3	1~4	W	+3	2~6	WY+(G)
⑤ : 1/2MS、-P、pH 5.75	+	1~1.5	Br	+	1~1.2	b
⑥ : 1/2MS、-P、pH 4.8	+	1~1.5	Br	+	1~1.2	b
⑦ : 1/2MS、+Al、pH 5.75	+	1~1.5	Br	+	1~1.3	b
⑧ : 1/2MS、+Al、pH 4.8	+	1~1.5	Br	+	1~1.5	b

注 : 1mm程度のカルスを置床。W-白色、b-黒色、Br-褐色、WY-乳白色、(G)-緑色化、+-混在

第10表 再分化培地と移植時期が再分化率に及ぼす影響

培地名	移植時期 (継代後日数)			
	5 (~0.2mm)	10 (~0.5mm)	15 (~1mm)	20 (~2mm)
MS f (%)	0.8	9.6	10.1	20.8
C-prt	4	21.1	46	38.6

注 : 2反復3回の平均。1区50カルス以上。裏ごし洗浄したカルスを使用  
( )内はカルスの大きさ

V) 遺伝子導入条件

ルジグラスカルスからの不定芽誘導法を確立できたことから、パーティクルガンによる遺伝子導入法について検討した。まず、選抜のためのハイグロマイシン濃度について調べた結果、ハイグロマイシンを含まない対照の培地でも10%程度でカルスの抑制がみられたが、20mg/lのハイグロマイシン濃度では数%、30mg/lでは30%程度、50mg/lでは全てが枯死し、50mg/lの濃度が選抜には必要と考えられた<sup>7)</sup> (第12表、写真4)。

導入条件のうち、ヘリウムガス圧は 1100psiではいずれの距離でもGUSの一次発現はみられなかった。1350 psi では4cmの距離でのみGUSの発現が見られたが、スポット数は少なく(写真5-a)、処理後7日目の再生されたカルスの一部では強い発色も認められた(写真5-b)が、発色はシャーレ間やカルス間に大きな差がみら

れた<sup>2)</sup>。また、この条件では試料の一部が飛散したため、ブルースポットは計測しなかった。処理条件ごとに5個のシャーレで約100個のカルスのうち各数個のカルスから再分化固体が得られた。

再分化した個体についてGUSの発色を調査した結果、ヘリウムガス圧1350psi、ストップングスクリーンと試料の距離7.5cmの条件で処理したカルスの一部から多芽体状に発生した12本の不定芽のうち2個体でのみ根の先端で活性が認められた(第13表、写真6)。

以上、ルジグラスカルスへの遺伝子導入条件はヘリウムガス圧は1350psi程度が必要であり、照射距離は4.0cm~7.5cmの範囲にあることが明らかになった。しかし、4.0cmと近い距離では試料の飛散に注意が必要である。

第12表 ハイグロマイシン濃度がカルスの枯死に及ぼす影響

濃度 (mg/l)	0	20	30	50
カルス枯死数	2/25 (-)	2/50 (4)	14/50 (28)	50/50 (100)

注：枯死数/供試数、( )内は%

第13表 処理条件の違いによるGUS活性

ガス圧 psi	照射距離 cm	カ ル ス			再 分 化				
		GUS活性		カルス数	個体数	GUS活性			
		調査数	32時間後			7日目	葉	根	割合
1100	4.0	25	+-	-	3/100	7	-	-	0
	7.5	25	-	-	2/101	11	-	-	0
	10.7	25	-	-	8/100	16	-	-	0
1350	4.0	25	+(3)	+(1)	1/86	1	-	-	0
	7.5	25	+-	-	6/102	18	-	2	0.02
	10.7	25	-	-	5/100	14	-	-	0

注：生存数/供試数

謝辞

本研究は「有用遺伝子導入による地域振興作物の新品種育成と育種利用技術の確立：平成7~12年度」の課題で取組んできたうちのルジグラスに関する試験を取りまとめたものである。実験に供試したルジグラスは元九州農業試験場正岡淑邦土壌保全研究室長(現広島大学)より分譲いただいた。また、実験に際し、九州農業試験場斉藤彰育種工学研究室長(現独法九州沖縄農業研究センター)、元同室宮崎研究員から適切なアドバイスを受けた。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Chie Inokuma etc. 1996. Plant Cell Report. (15) 737-741
- 2) 萩尾高志 1997、農業技術 52(8). 337-341
- 3) Niizeki, H. and Oono, K 1968. Proc. Japan Acad. 44 554-557
- 4) 大槻義昭 1990、実験映像マニュアル. 農林水産技術情報協会
- 5) 大源正明・阿部聖一 1993. 植物組織培養10 (2). 176-179

6) 田中正美 1955. 熊本県農業研究センター研究報告  
4 64-74

7) 内宮博文 1990. 遺伝子操作マニュアル・トランス  
ジェニック植物の作り方. 講談社. 65-70

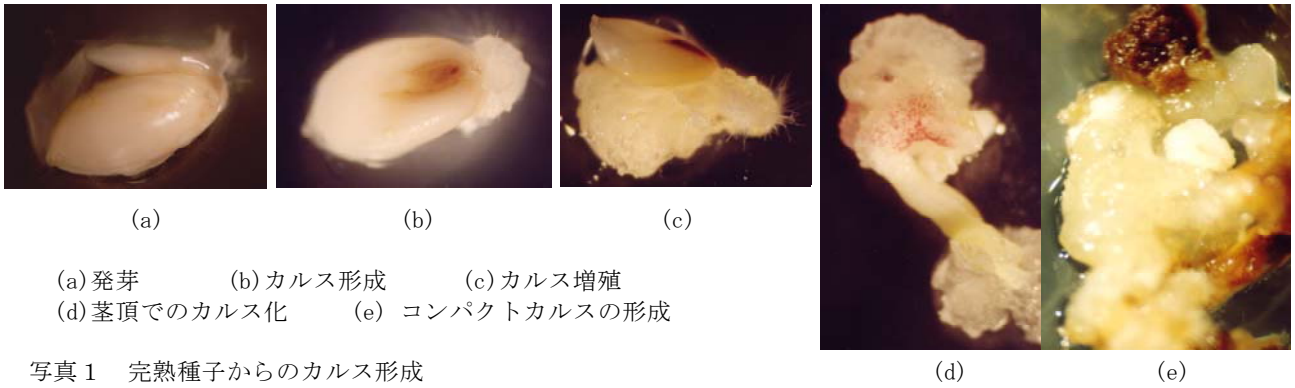


写真1 完熟種子からのカルス形成

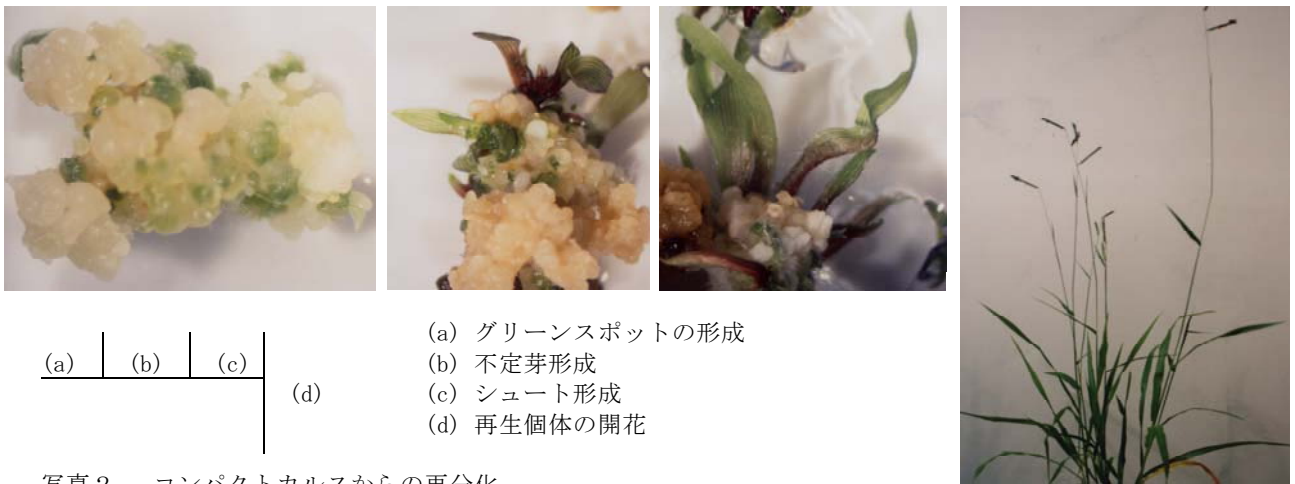


写真2 コンパクトカルスからの再分化

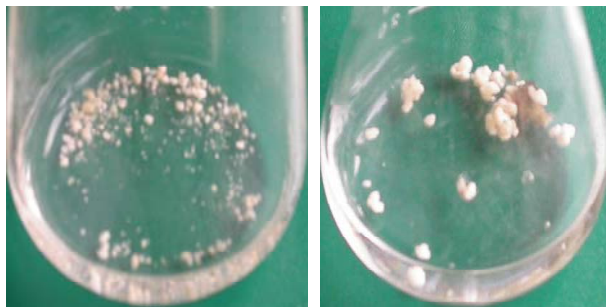


写真3 裏ごし処理後のカルス生育  
(左から: 20日目、40日目)

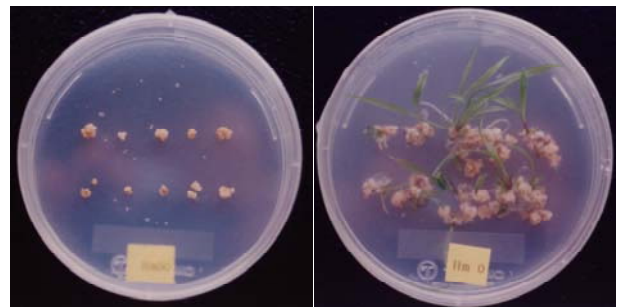
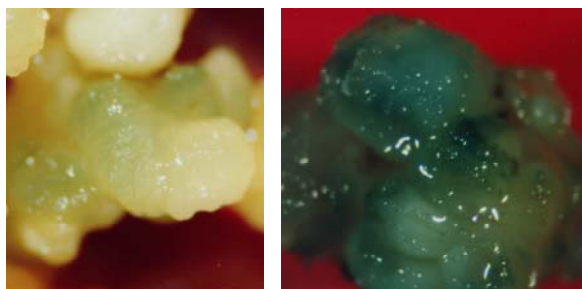


写真4 ハイグロマイシン添加培地での生育  
(左から: 50 mg/l, 0 mg/l)



(a) 32時間後 (b) 7日後  
写真5 ルジグラスカルスでのGUS活性



(a) 多芽体状の不定芽 (b) 根部での活性  
写真6 ルジグラスのGUS活性

## Summary

The conditions of callus induction seeds, regeneration of plantlets from callus and GUS gene introgression by particle bombardment were examined in Ruzigrass which can grow even strong acid soil. The following results were obtained.

- 1) The formation of compact callus was observed on the MS medium containing 0.4-0.5mg/l 6-benzyl-aminopurine (BAP) and 3mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).
- 2) Shoots were regenerated from compact callus by transferring on the MS medium diluted with 165 mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , and containing 0.4mg/l BAP and 750mg/l L-glutamin etc. Subculture of compact callus were possible with the MS lipid-medium diluted with 165mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and containing 750mg/l L-glutamin and 0.4mg/l BAP. the plantlet regeneration ability of callus was maintained better than darkness under light and was excellent as for rotary shaking at 60rpm under the light of 300 lux.
- 3) As for the gene transformation, keeping gas pressure of helium to 1350 psi irradiation distance 4.0-7.5 cm was good, GUS expression was could be confirmed in the regeneration plants.