

トールフェスク育種における細胞融合
ならびに遺伝子導入法に関する研究

高 溝 正

トールフェスク育種における細胞融合ならびに遺伝子導入法に関する研究

高溝 正

トールフェスク育種における細胞融合ならびに遺伝子導入法に関する研究

I 緒論	1
II 組織培養系の確立	5
1. カルス培養系の確立ならびにカルスからの再分化における品種間差	6
2. プロトプラスト培養系の確立	21
3. 培養細胞からの再分化個体における変異	35
III 細胞融合技術の確立	47
1. 細胞融合によるトールフェスクとイタリアンライグラスの体細胞雑種の作出	47
2. 体細胞雑種の解析	55
3. 体細胞雑種からキメラ的に分離した個体の解析	69
IV 形質転換植物の作出	75
1. ハイグロマイシン及びフォスフィノスリシンの濃度がプロトプラスト由来コロニーの生育に及ぼす影響	76
2. ハイグロマイシン及びフォスフィノスリシン耐性遺伝子のプロトプラストへの直接遺伝子導入	81
3. シャトルベクターによるプロトプラストへの直接遺伝子導入	91
4. パーティクルガンによる液体培養細胞への直接遺伝子導入	98
V 総合考察	111
摘要	120
謝辞	125
引用文献	127

I 緒論

Festuca 属は植物分類学上、イネ科 (Poaceae) のイチゴツナギ亜科 (Pooideae) イチゴツナギ族 (Poeae) に属し (Watson and Dallwitz 1992)、牧草 (*F. arundinacea*, Schreb., *F. pratensis* Huds.) 及び芝草 (*F. arundinacea*, *F. ovina*, *F. rubra*) として重要なものが多い。それらのうち本論文で取り扱う *F. arundinacea* Schreb. (英名 tall fescue 和名 オニウシノケグサ、トールフェスク、以下トールフェスクとする) は耐寒性、耐暑性に優れた適応性の高い寒地型イネ科牧草であり、ユーラシア及び北米で栽培され、その起源地は北アフリカであると考えられている。わが国には明治維新後より導入されたといわれているが、環境条件に対する適応性の高さから、現在では北海道から九州まで広く栽培されている。近年は牧草の他に、芝草、造成地・道路の法面緑化などにも用いられ、とみに重要性が高まっている。

トールフェスクの大部分の品種は $2n=42$ で ABBCC のゲノム構成を持つ異質 6 倍体であるといわれる (Berg *et al.* 1979)。各ゲノムの内、A ゲノムはメドウフェスク (*F. pratensis*, $2n=14$) と、B ゲノムは *Lolium* 属植物 ($2n=14$) と近縁であるとされている。一方、C ゲノムは *Festuca* 属の他の種に由来するとされる。A、B ゲノムは提供植物がすでに消滅しており、現存のメドウフェスクや *Lolium* 属植物の染色体とは異なるといわれ、トールフェスクとメドウフェスク、あるいはトールフェスクと *Lolium* 属との F₁ の多くは減数分裂における染色体の対合が不規則で、種子は不稔または低稔性となる。

トールフェスクの育種は欧米、特にアメリカ、フランスで古くから積極的に

進められており、1993年には牧草用として64品種が、芝草用として50品種が経済開発協力機構（OECD）に登録されている。わが国ではKentucky31が古く導入されたが、採種地の米国で麦角病が発生したため、その後Fawnがこれに取って代わり、種子が大量に輸入されている。もともと適応性の高い牧草ではあるが、よりわが国の環境条件及び利用管理条件に合致した品種を育成するために、1970年より育種体制が強化され、まず北海道農業試験場においてホクリョウとヤマナミ（川端ら1972）が、続いて九州農業試験場においてナンリョウ（佐藤ら1985）が育成された。その後、民間の雪印種苗によってサザンクロスも育成された（近藤1986）。なお、緑化用及び芝草用としての品種育成はわが国では行われていないがJaguar、Falcon、Mesaなどの外国品種が種苗会社により国内販売されている。牧草としてみた場合、トールフェスクの欠点は家畜の嗜好性及び消化性が劣るという点であり、これを改良する目的で近縁の*F. gigantea*や他属であるが交配親和性のある*Lolium*属との間で交配が行われ（Webster and Buckner 1971）、ある程度嗜好性を高めた品種Kenhyがアメリカ合衆国で作出されているが（Buckner et al. 1977）充分とはいえない。一方、芝草としてみた場合は矮性でなおかつ葉色の鮮やかであることが求められ、さらに人間が直接肌に触れるので農薬等を施用しにくいという点から、より一層の耐病性・耐虫性の付与も必須である。また法面緑化植物としてみた場合は、土壌保全のために地上部よりもむしろ根の生育のよいものが求められ、刈遅れした場合の花穂からの花粉の飛散が近隣住民の花粉症の原因となっていることから雄性不稔の作出も育種目標として挙げられている。このようにトールフェスクの育種目標は極めて多岐にわたり、これを達成するのに、もはや選抜・交配

育種法だけでは必ずしも充分とはいえない。即ち新たな有用変異作出法として組織培養技術の利用が考えられるわけである。

近年各種植物において組織培養技術の進展にともない、プロトプラストからの植物体再生、さらには細胞融合による体細胞雑種や遺伝子導入による形質転換植物の作出があいついで報告されている。これらの手法を用いることにより、従来法では不可能な遺伝的変異の作出・拡大が現実のものとなり、実際育種法と組み合わせることにより画期的有用品種の育成が期待される。しかしながら牧草類、特に寒地型イネ科牧草では他の重要作物に比べ全般に細胞融合や形質転換等の取り組みが遅れているのが現状である。

トールフェスクの組織培養は1979年にLoweとCongerが完熟種子由来カルスからの植物体再分化を報告したのに端を発し、その後薬培養による半数体の作出(Kasperbauer *et al.* 1980)も報告された。しかしながら、本研究の開始された1987年にはプロトプラストからの再分化はもとより、細胞融合や形質転換に関しても全く着手されておらず、早急な取り組みが求められていた。一方イネではおりしも1985年にはFujimura *et al.* が、1986年にはYamada *et al.* がプロトプラストからの植物体再分化に成功し、プロトプラスト培養系を利用したその後の細胞融合や形質転換の技術の華々しい進展の予感が漂っていた。

本研究は細胞融合と形質転換によるトールフェスクの安定的な育種技術を確立し有用育種素材を作出することを最終目的とし、まず各種外植片からのカルス誘導及びカルスからの再分化を行い、品種間差の有無を明らかにした。さらに、これらのカルスを用いて液体培養細胞系を作出して単一遺伝子型の液体培養細胞由来プロトプラストからの植物体再分化系の確立を行い、それらを用い

た細胞融合によるイタリアンライグラスとの体細胞雑種ならびにプロトプラス
トへの直接遺伝子導入法による形質転換植物の作出を達成した。さらに、これ
らの方法により作出された再分化個体についてその農業形質及び細胞・分子遺
伝学的性質を調べ、育種素材としての利用の可能性および今後の問題点につい
て検討した。

II 組織培養系の確立

交配が不可能あるいは困難な遠縁間において細胞融合により新素材を作出するためにはプロトプラストからの植物体再分化系の確立が必須である。また、植物に外来遺伝子を導入しようとする場合、様々な方法があるが現状では、

I *Agrobacterium*のTiまたはRiプラスミドをベクターとして用いる方法

II 電気穿孔法またはPEG法によりプロトプラストへDNAを直接導入する方法、

III パーティクルガンなどにより生長点や培養細胞にDNAを直接撃ち込む方法、の三者が有力である。さて実際にトールフェスクに遺伝子導入を行おうと考えた場合、プロトプラストからの植物体再分化系を確立した後IIの方法によるのが最も妥当と考えられる。すなわちIは今のところイネ科植物では

*Agrobacterium*の感染がきわめて困難なので、実現性は低い。IIIはまだ、技術的に発展段階であり、I、IIともに困難な植物（ダイズ、トウモロコシなど）について最後の手段として用いられている傾向が強く、機器も高価である。また、トールフェスクではプロトプラストからの植物体再分化が既に報告されており、細胞融合及びIIの方法による形質転換系の実現には、プロトプラストからの植物体再分化系を確立することが絶対条件と考えられる。ところで、イネ科植物では葉肉あるいは根などのインタクトな器官より単離したプロトプラストには分裂能が無く、いわゆるembryogenic（胚誘導性）カルスから単離したプロトプラストのみが植物体にまで再分化可能とされている（Vasil 1988）。従って、まずembryogenicカルスを獲得するための品種間差を調べた。

II-1 カルス培養系の確立ならびにカルスからの再分化における品種間差

組織培養による反応には遺伝子型の関与していることが知られ、予め培養に適した優良遺伝子型を選抜することが重要な段階となる。トールフェスクにおいては、カルス (Lowe and Conger 1979, Reed and Conger 1985, Kasperbauer and Eizenga 1985, Eizenga 1989, Dahleen and Eizenga 1990, Eizenga and Dahleen 1990)、液体培養細胞 (Rajaelina *et al.* 1990)、プロトプラストからの植物体再分化 (Dalton 1988) が既に報告されているが、いずれの報告においても、供試された品種数は限られており、培養における品種間差を調べた事例はない。そこで、本節ではトールフェスクのカルス培養、特にカルスからの再分化系の確立を図るとともに品種間差についても検討した。

1) 材料及び方法

材料としてTable1に示す17品種を用いた。国産品種はHokuryo、Nanryo、Southern Cross、及びYamanamiの4品種である。また、Gloria、Maris Jebel、及びMaris Kasbaは地中海沿岸の北アフリカのecotype (生態型) を育種母材としている。

(1) 未熟胚由来カルスの誘導

Table1に示した17品種からFawnを除いた16品種の開花約10日後の未熟胚を外植片として用いた。即ち、種皮ごと70%エタノールに30秒、続いて2%次亜塩素酸ナトリウムに20分浸潤して滅菌し、ピンセットにより実体顕微鏡下で胚を取り出したのち0.8%寒天、3%ショ糖、0.2mg/l Benzylaminopurine (BA)、2mg/lまたは10mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を含むMS固形培地

Table 1. Materials: Cultivar name, their origin, and characteristics

Cultivar name	Institute	Country	Characteristics
Clarine	INRA	France	Late, rust-resistant
Demeter	Armidale Exp. Stn.	Australia	High yield in fall and winter
Fawn	Oregon Agr. Exp. Stn.	U.S.A.	Higher digestibility
Forager	FFR	U.S.A.	High yield, persistent
Gloria	INRA	France	Bred from North African ecotype
Hokuryo	Hokkaido Natl. Agr. Exp. Stn.	Japan	Good preference
Jaguar	Zajac Performance Seeds Inc.	U.S.A.	Turf for rugby, football
Kentucky 31	Univ. Kentucky	U.S.A.	High adaptability and yield
Lubrette	INRA	France	Good preference
Ludion	INRA	France	Late, cold-tolerant
Luther	INRA	France	Late, heat-tolerant
Manade	Villemorin	France	Earliest and high yield
Maris Jebel	Cambridge Plant Breeding Institute	U.K.	Bred from North African ecotype
Maris Kasba	Cambridge Plant Breeding Institute	U.K.	Bred from North African ecotype
Nanryo	Kyushu Natl. Agr. Exp. Stn.	Japan	Early, high yield
Southern Cross	Yukijirushi Syubyou	Japan	Disease-tolerant
Yamanami	Hokkaido Natl. Agr. Exp. Stn.	Japan	High seed yielding

(pH=5.6、今後すべて培地はpH=5.6とした) (Murashige and Skoog 1962)に置床した。直径9cmの滅菌済みベトリディッシュに同一個体由来の未熟胚を10個置床したものを1反復とし、反復数は10とした。品種により種子の熟期が異なり、梅雨期に採取盛期となった品種は糸状菌や細菌を完全に滅菌することが出来ず、汚染により反復数が大幅に減った。汚染した種子は計算から除外し、カルス化した種子数を全体の種子数で割った数をカルス誘導率、カルスから再分化した種子数を全体の種子数で割った数を再分化率とした。尚、再分化は緑色植物のみを対象とした。1988、1989、1991年の3年に亘って実験を行い、カルス誘導率は1989、1991年の2回、再分化率は3年ともすべて求めた。データは反復数の異なる完全無作為化法で分散分析した。

(2) 完熟種子からのカルス誘導

Table1に示した17品種中10品種の完熟種子を50%硫酸で20分間攪拌して種皮を剥いだ後、上記の方法により滅菌し、2,4-Dのみ5mg/lとした上記の培地に置床した。種子の汚染が激しく欠測値が多かったため、分散分析は行わなかった。

(3) 茎頂からのカルス誘導

トールフェスク品種ナンリョウの茎頂を1の方法により無菌的に取り出して、(2)と同様の培地に置床した。

(4) カルス培養から液体培養への移行

上記(1)から(3)までのいずれかの方法で誘導されたカルス約1-3グラムを、2%ショ糖、3%ソルビトール、2mg/l 2,4-D及びB 5 培地のビタミン組成 (Gamborg *et al.* 1968) を含む改変液体A A培地 (Müller and Grafe 1978)

または改変液体N 6 培地 (Chu *et al.* 1975、Ozawa and Komamine 1989により改変) にピンセットではぐして入れて、細胞の増殖状況を観察した。培養は20mlの液体培地を入れた100ml三角フラスコにより1分間に110回転の速度で旋回しんとうし、カルス培養と同様暗黒下25°Cで行った。順調に増殖した液体培養細胞系は1-2週間おきに継代培養した。

(5) 植物体の再分化

(1)-(4)で誘導されたカルスまたは液体培養細胞を、ホルモンフリーのMS固形培地 (3%ショ糖、0.8%寒天を含む) に置床して植物体の再分化を図った。

2) 結果

(1) 未熟胚由来カルスの誘導

Table 2に未熟胚からのカルス誘導率を示した。すべての品種でカルス化がみられたが、カルス誘導率は品種や年次によって大きく異なった。1989年にはManadeが最高の誘導率(88.6%)を示し、Gloriaが最低(10%)であった。1991年にはForagerが最高で(92.2%)、Demeterが最低(5.0%)であった。両年を通してみると、Manade、Forager及びNanryoが平均して高く、Gloriaが低かった。DemeterとKentucky31は1991年の値が1989年に比べて大きく低下した。Table3には未熟胚由来カルスからの再分化率を示した。1988年はKentucky31が最高の再分化率(78.0%)を、Maris Kasbaが最低(5.0%)を示し、1989年はManadeが最高 (45.3%)、Gloriaが最低 (0%) を、1991年はForagerが最高 (60.1%)、Demeterが最低(1.8%)をそれぞれ示した。3年間の平均ではManadeが50.9%と最も高く、Gloriaが8.2%と最低の再分化率を示した。国産品種のNanryo、Southern Cross、及びYamanamiは比較的高い再分化率を示した。

Table 2. Cultivar differences in the frequency (%) of callus induction in immature embryo-derived calli of tall fescue

Year	1989	1991
Cultivar		
Clarine	n.t. ¹⁾	38.3efg ²⁾
Demeter	75.0 ab	5.0 i
Forager	55.4 bc	92.2 a
Gloria	10.0 c	12.9 hi
Hokuryo	n.t.	61.0 cd
Jaguar	n.t.	39.6 efg
Kentucky 31	57.4 bc	16.3 hi
Lubrette	n.t.	37.8 efg
Ludion	n.t.	41.1 def
Luther	n.t.	53.9 cde
Manade	88.6 a	66.9 bc
Maris Jebel	n.t.	19.4 ghi
Maris Kasba	n.t.	38.7 efg
Nanryo	73.6 ab	68.9 bc
Southern Cross	39.3 c	32.0 efgh
Yamanami	43.6 c	86.7 ab
Means	55.3	44.4

1) Not tested

2) Values with the same letters are not significantly different according to Duncan's New Multiple Range Test (1% level).

Table 3. Cultivar differences in the frequency (%) of plant regeneration from immature embryo-derived calli of tall fescue

Year	1988	1989	1991	Means
Cultivar				
Clarine	58.9 a ¹⁾	n.t. ²⁾	21.7 bcde	40.3 abcd
Demeter	69.2 a	14.8 bc	1.8 f	48.2 a
Forager	66.2 a	14.4 bc	60.1 a	48.2 a
Gloria	n.t.	0.0 c	8.8 ef	8.2 f
Hokuryo	22.1 b	n.t.	37.0 b	28.6 bc
Jaguar	52.5 a	n.t.	20.1 cde	36.9 abcd
Kentucky 31	78.0 a	25.8 ab	7.9 ef	37.1 abcd
Lubrette	53.1 a	n.t.	26.1 bcd	39.6 abcd
Ludion	55.6 a	n.t.	14.0 def	34.8 abcd
Luther	64.6 a	n.t.	31.8 bc	44.0 abc
Manade	64.8 a	45.3 a	36.8 b	50.9 a
Maris Jebel	15.0 b	n.t.	11.2 def	13.1 def
Maris Kasba	5.0 b	n.t.	16.0 cdef	11.6 ef
Nanryo	70.8 a	18.6 bc	27.1 bcd	43.0 abc
Southern Cross	55.7 a	29.1 ab	13.6 def	34.7 abcd
Yamanami	69.1 a	27.1 ab	39.4 b	46.3 ab
Means	59.0	21.9	23.3	37.3

1) Values with the same letters are not significantly different according to Duncan's New Multiple Range Test (1% level).

2) Not tested

2,4-D濃度が未熟胚からのカルス誘導に及ぼす影響は1989年には有意ではなかったが、1991年には2mg/l区が10mg/l区より高い誘導率を示した。カルスからの再分化率は1988年は10mg/l区の方が2mg/l区よりも高かったが、1989年と1991年は逆に2mg/l区の方が10mg/lよりも高かった。なお、いずれの年次もカルス誘導率、カルスからの再分化ともに2,4-D濃度と品種の間に交互作用はなかった(データ省略)。

(2) 完熟種子からのカルス誘導

Table 4に完熟種子からのカルス誘導率並びに再分化率を示した。Clarineが最高のカルス誘導率(94.4%)を示しDemeterが最低(24.2%)を示した。再分化率はKentucky31が最高(23.7%)を示し、未熟胚由来カルスでの再分化が劣ったMaris Jebel、Maris Kasba、Gloriaはいずれもきわめて低かった(0-1.7%)。Manadeは未熟胚由来カルスからの再分化率が高かったにもかかわらず、完熟種子由来カルスからの再分化率は5.4%と低かった。

(3) 茎頂からのカルス誘導

茎頂は前2種の外植片に比べて、無菌下で取り出して多く置床することは困難で、統計的に前2種の外植片と比べうるデータをとることはできなかった。

(1)、(2)、(3)のいずれの外植片由来カルスとも、カルスの性状を大きく分類すると、半透明で水っぽいカルス(Fig. 1a)、白色でぼろぼろはぐれやすいフライアブル(friable)なカルス、そして白色から黄色で堅い(コンパクトな)カルス(Fig. 1b)の3種類になった。ただし、ひとつのカルスのなかでもこれらのタイプが混在する場合や、中間的なタイプのものもあった。水っぽいカルスの出現頻度は、完熟種子由来カルスの方が高かった。いずれのタイプのカルス

Table 4. Cultivar differences in the frequency of callus induction and plant regeneration from mature embryo-derived calli of tall fescue

Cultivar	Frequency of callus induction (%)	Frequency of plant regeneration (%)
Clarine	94.4 ¹⁾	11.3 bcde ²⁾
Demeter	24.2	3.7 def
Fawn	51.3	12.2 bcd
Gloria	50.0	1.7 ef
Hokuryo	68.6	13.3 bcd
Kentucky 31	60.8	23.7 a
Manade	60.3	5.4 cdef
Maris Jebel	67.7	0.0 f
Maris Kasba	86.9	0.0 f
Nanryo	59.3	18.9 ab
Southern Cross	44.4	0.0 f
Yamanami	47.3	20.6 ab
Means	60.1	8.4

1) Statistical analysis was not carried out.

2) Values with the same letters are not significantly different according to Duncan's New Multiple Range Test (1% level).

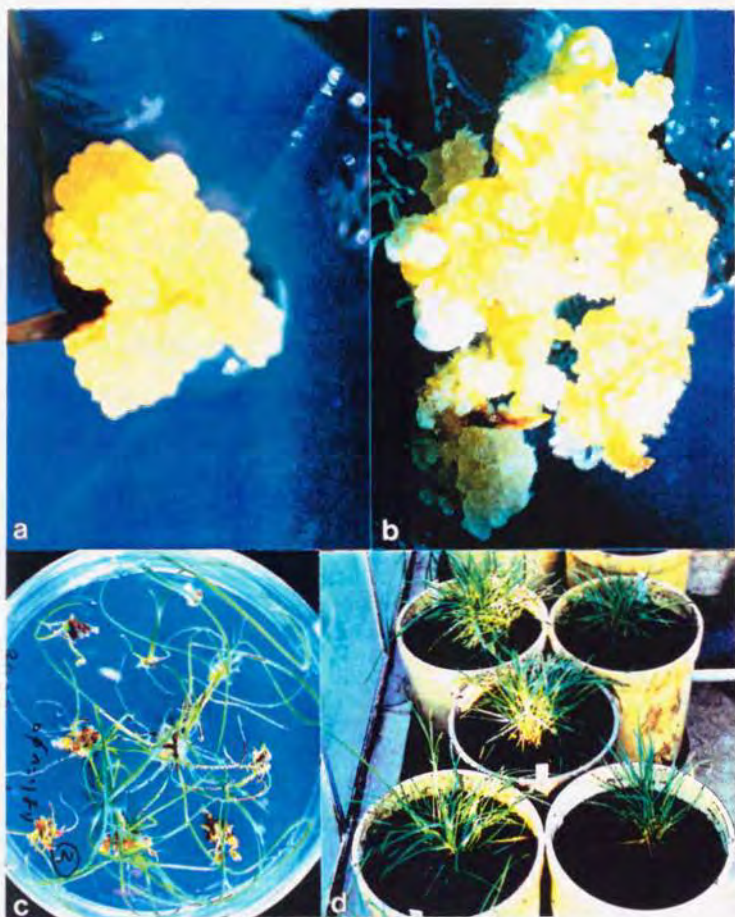


Fig. 1a-d. Plant regeneration from mature seed-derived callus of tall fescue.
a: Non-embryogenic callus, b: Embryogenic callus, C: Plant regeneration
from embryogenic callus, d: Regenerated plants in pots.

からも不定胚を経由して植物体再分化がみられたが、水っぽいカルスからの再分化はきわめて稀であった。そこで、本研究ではフライアブルなカルスとコンパクトなカルスを併せてembryogenic (胚誘導性) カルスとして扱うこととする。

コンパクトなカルスは前2者のタイプに比べてカルスを継代した場合の再分化能の低下が少なく、2,4-Dを含む培地で継代すれば小さな茎葉を付着させたままカルスを増殖させることができ、このようなカルスをホルモンフリーのMS培地に移すと急速に茎葉が伸長した (Fig. 1c)。この方法により再分化能を失わずにカルスを相当長期間 (約1年) 継代することができた。カルスの生長は、フライアブルなカルスが水っぽいカルスやコンパクトなカルスに較べて優った。

(4) カルス培養から液体培養への移行

これらのカルスを液体培地に移した場合、フライアブルなカルスとコンパクトなカルスのタイプは継代を重ねるに連れて徐々に細かい細胞の塊が増えてきたのに対し (Fig. 2b)、水っぽいカルスからは細長く伸長した遊離細胞の割合が常に多かった (Fig. 2a)。液体培養における細胞の生長も、固形培地における時と同様にフライアブルなカルスを用いた場合に最も生育がよく、細胞容積は10日間で約3倍となった (Fig. 3)。

3) 考察

カルスからの再分化率は本実験の場合、一部の品種で年次による変動が相当に大きかった。Lührs and Lörz (1987) は圃場で育成した材料を培養に用いた場合、気象条件の変動により品種間の反応が異なる場合のあることをオオム

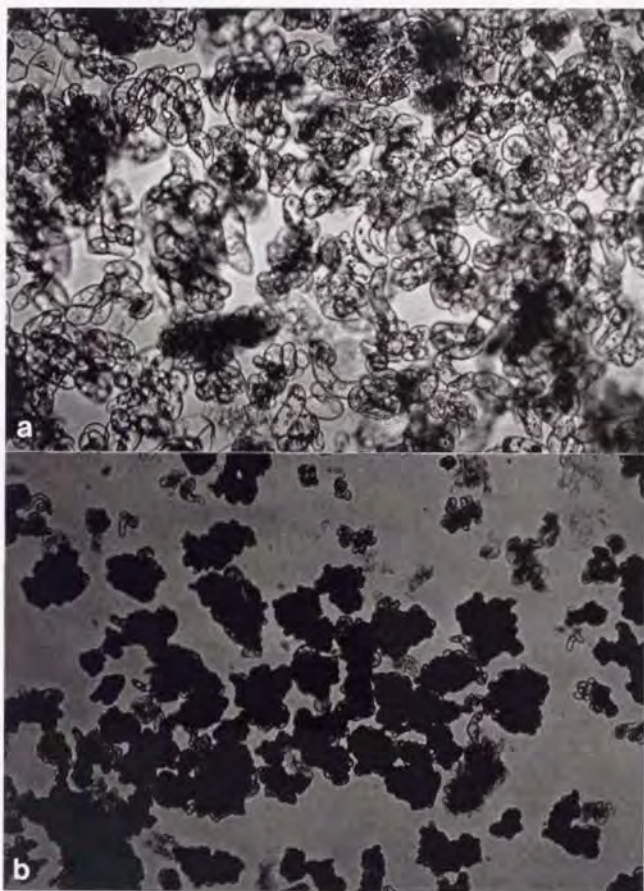


Fig. 2a-b. Two types of cells observed in suspension culture derived from a compact and watery callus. a: Elongated, non-morphogenic cells from watery callus. b: Aggregated, morphogenic cell clumps from compact callus.

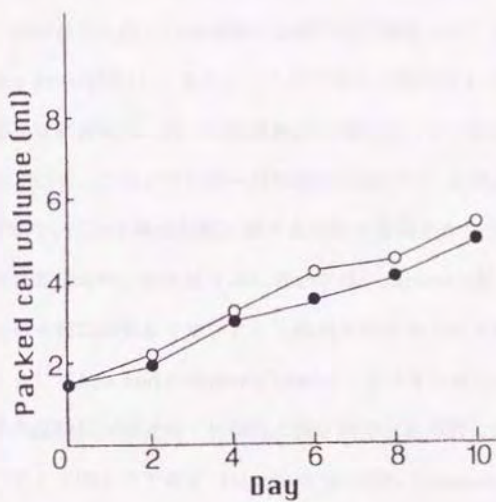


Fig. 3. Growth curve of suspension cell in tall fescue.
○=Manade, ●=Nanryo

ギを用いた実験で報告している。トールフェスクは他家受精植物なので、圃場で放任受粉させた植物の未熟胚を用いた場合、他品種の花粉により受精した可能性があり、気象条件の他にこのことも純粋な品種としての寄与率を低めた一因かもしれない。しかしながら、Gloria、Maris Jebel、及びMaris Kasbaはいずれの年次でも、また未熟胚由来カルス、完熟種子由来カルスとも再分化率が極めて低かった。これら3品種は地中海沿岸の北アフリカ地方のecotypeを育種母材とし、他の北ヨーロッパ品種群とは遺伝的に隔絶していることがわかっている (Evans *et al.* 1973)。また、ミトコンドリアのRFLP解析からもこれら地中海型品種群は北ヨーロッパ型品種群と異なること (高溝ら、1993) が明らかとなっている。このように同一作物種内において、品種よりも上のecotypeや垂種のレベルで再分化能に関する明確な変異が存在することは他の作物でも報告されており、例えばイネにおいては、Japonica型品種群がIndica型品種群よりも一般に培養しやすいという結果が根由来カルスを用いた実験で報告されている (Abe and Futsuhara 1984)、アルファルファでは耐寒性の強いほく型の品種群が直立性で休眠性の弱い暖地型品種群に比べはるかに再分化能が高いことが明らかである (Mitten *et al.* 1984, Brown and Atanassov 1985, Takamizo *et al.* 1991)。わが国のトールフェスク育種における主な母材は北ヨーロッパ型品種群であり、さらに国産品種で比較的安定した再分化能がみられたことは組織培養技術を実際育種に応用する上で、特に形質転換により有用遺伝子のみを既存の優良品種に導入しようとする観点から好都合であると考えられる。

Conger *et al.* (1982) はオーチャードグラス、イタリアンライグラス及び

トールフェスクを供試して2,4-D等の様々なオーキシンのカルス生長に及ぼす影響を調べた。その結果、カルスの生長は2,4-DよりもDicambaあるいはPicloramを用いた場合の方がよいことを報告しているが、再分化に関しては調べていない。その後も彼らはオーチャードグラスのカルスを液体培養するのに引き続きDicambaを用いているが (Conger et al. 1989)、彼らの例を除けばイネ科作物ではカルス誘導のためのオーキシンとして2,4-Dが用いられることがほとんどである。本実験では2,4-D濃度がカルス誘導率及びカルスからの再分化率に及ぼす影響は年次によって異なり、一貫した結果は得られなかった。Creemers-Molenaar et al. (1988) もベレニアルライグラスとイタリアンライグラスでは、2,4-D濃度が2.5mg/lから15mg/lの範囲では未熟花穂からのembryogenicカルスの出現頻度に差はみられなかったとしている。即ち2,4-Dの濃度よりも、環境条件の変異等の方がembryogenicカルスの出現に及ぼす影響はるかに大きいのであろう。

イネを除く多くのイネ科作物では、完熟種子から良質のカルスを得ることは困難だとされ (Maddock 1985, Tomes 1985)、多くの場合未熟胚または未熟花穂が用いられている。本実験では、完熟種子からもembryogenicカルスの誘導が可能であった。その意味において、トールフェスクはイネと同様、培養が容易な作物であるといえる。しかしながら、完熟種子由来カルスからの再分化率の平均 (8.4%) は未熟胚由来カルスからの再分化率の平均 (37.3%) に比べて低く、水っぽい不良なカルスの出現頻度が高かった。このことは、未熟胚からのカルス誘導率と再分化率との間の相関が $r=0.815$ と高かったのに対し

(Fig. 4)、完熟種子からのカルス誘導率と再分化率との間には有意な相関は

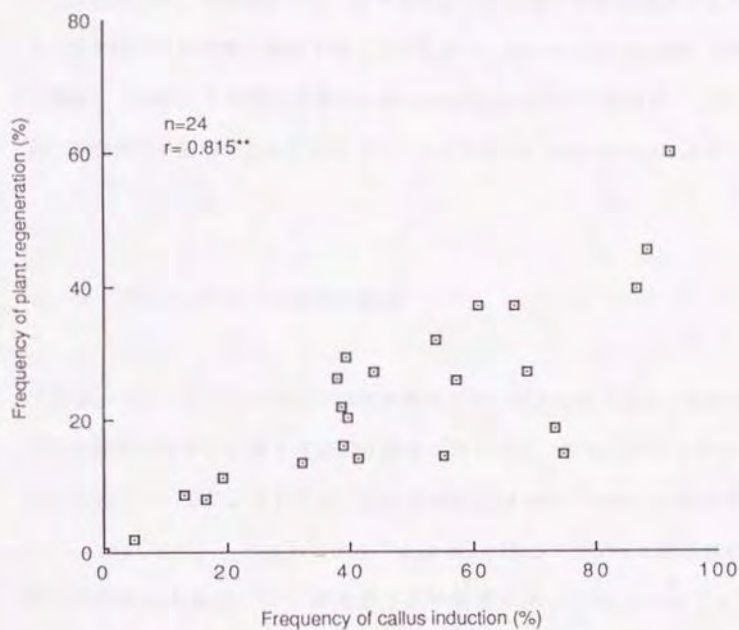


Fig. 4. Correlation between the frequency of callus induction and plant regeneration in immature embryo-derived calli of tall fescue (Each spot represents the mean of 1989 and 1991).

なかった (Fig. 5) ことによっても説明されるであろう。

一方、未熟胚は外植片として年間を通して随時利用することは困難で、季節の影響を受けない点では完熟種子の方が外植片として未熟胚よりすぐれる。

embryogenicカルスの出現頻度が低い欠点は、供試する種子の数を増やすことにより解決され、本実験のように胚を取り出さずに種子を直接置床する方法では大量の種子を短期間に置床することが出来る。Asano and Sugiura (1990) や猪熊ら (1991) も牧草・芝草の一種 *Agrostis alba* やシバを材料として、大量の完熟種子を外植片としてスクリーニングを行い、embryogenicカルスを得ている。

II-2 プロトプラスト培養系の確立

近年、プロトプラストからの植物体再分化系の確立はめざましい進歩を遂げ、イネ科牧草でも多くの種で成功例が報告されている。即ち、フロリダ大学の Vasil らのグループによるトウジンビエ (Vasil and Vasil 1980)、ギニアグラス (Lu *et al.* 1981)、ネビアグラス (Vasil *et al.* 1983) といった暖地型イネ科牧草での成功を皮切りに、寒地型イネ科牧草においてもトールフェスク (Dalton 1988)、オーチャードグラス (Horn *et al.* 1988a)、ベレニアルライグラス (Creemers-Molenaar *et al.* 1989)、メドウフェスク (Wang *et al.* 1993)、ケンタッキーブルーグラス (Nielsen *et al.* 1993) においてプロトプラストからの緑色植物再分化が報告されている。また、芝草用のイネ科植物でも *Festuca rubra* (Zaghmout and Torello 1990)、*Agrostis alba* (Asano and

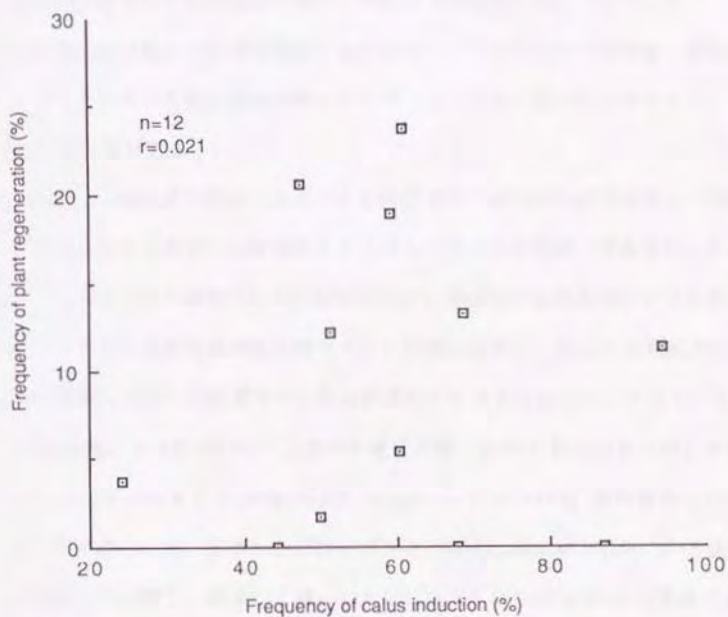


Fig. 5. Correlation between the frequency of callus induction and plant regeneration in mature seed-derived calli of tall fescue (1990).

Sugiura 1990), *Agrostis palustris* (Terakawa et al. 1992), *Zoysia japonica* (猪熊ら 1991)においてプロトプラストからの緑色植物体再分化が報告されている。トールフェスクにおけるDaltonの事例では、多数の完熟種子から同時に直接誘導した液体培養細胞由来プロトプラストを材料として植物体再分化に成功した。しかしながら、培養細胞系の出発点が単一個体ではないため、体細胞変異の解析等に不都合な点が多い。本研究では前節において作出したembryogenicカルスを液体培養した細胞からプロトプラストを単離・培養し、トールフェスクの単一個体由来プロトプラストからの再分化をめざした。

1) 材料及び方法

前節(1)–(3)により作出したカルスを前節(4)の方法により液体培養し、液体培養開始1–8ヶ月後の培養細胞からプロトプラストの単離・培養を行った。まずプロトプラスト単離のための酵素ならびに浸透圧の条件を検討するために、約1グラムの液体培養細胞を継代4–5日後に採取し、10mlの各種組成の酵素液に懸濁して25°C暗黒下で一昼夜静置して収量を比較した。プロトプラストは800rpm、3分間遠心して上澄みを捨てた後、3mMの塩化カルシウムを含む0.6MマニトールまたはCPW13M液 (Frearson et al. 1973) で再懸濁して洗浄し、再び遠心した。洗浄したプロトプラストはKyoizuka et al (1987)の方法により培養した。即ち、洗浄して遠心したプロトプラストは 1×10^6 mlの密度で2倍の塩類濃度、2mg/l 2,4-D、0.6M グルコースを含んだ改変A A培地に懸濁した。そして、0.6M グルコース溶液に2–2.5% Sea Plaque アガロースを温めて溶解させ、40°C付近に冷ましておいた溶液を遠心管中に等量加え、混合した後速やかに直径6cmの滅菌済みベトリディッシュに流し込んでプロトプラストをア

ガロース培地に包埋した。アガロースが完全に凝固した後、メスで6から8等分し、一つずつ1mg/l 2,4-Dと0.6M グルコースを含む等倍の改変AA培地が6ml入った別のペトリディッシュに分配した。さらに、ナース培養を行う場合には各ペトリディッシュに約50-100mgのナース細胞を加えた。ナース細胞は原則としてプロトプラストを単離したものと同一液体培養細胞とし、培養約1-2週間後にアガロース片を新鮮培地の入ったペトリディッシュに3回浮遊させることにより除去し、再び新鮮培地を加えてさらに1ヶ月培養した。培養約1ヶ月後に、肉眼に見えるようになったコロニーを数え、総プロトプラスト数で割ったものをコロニー形成効率 (plating efficiency) とした。そして、アガロースごと、コロニーを各種組成の増殖培地 (Table 5) に移し、さらに1ヶ月暗所で培養した。その後、アガロースより盛り上がったコロニーを各種再分化培地に移し、25°C16時間日長で再分化を促した。またナース細胞を入れずに、代わりにプロトプラストを単離した液体培養細胞の培養液にグルコースを0.2Mになるよう添加した後濾過滅菌し、1/5容となるようにプロトプラスト培地に添加したいわゆるconditioning培地による培養も併せて行った。

2) 結果

(1) プロトプラストの単離・培養

酵素液の濃度や組成がトールフェスク品種Manade及びForagerの液体培養細胞から単離したプロトプラストの収量に及ぼす影響をTable 6に示した。オノズカセルラーゼRSを基本とした6種類の酵素液を供試したが、浸透圧を0.4Mとした場合に最も収量が高かったのは3%RS+2%マセロザイムR10の組合せで細胞新鮮重1グラム当り 14.2×10^5 個のプロトプラストが得られた。

Table 5. Media used for proliferation of colonies and plant regeneration

Abbreviation	Basal medium	Concentration of sugars	Hormone	Other additions
MSSSHF	MS	3% sucrose + 3% sorbitol	-	-
MSSSHFP	MS	3% sucrose + 3% sorbitol	-	1.15 g/l proline
MSSSD1	MS	3% sucrose + 3% sorbitol	1 mg/l 2,4-D	-
MSSSD1P	MS	3% sucrose + 3% sorbitol	1 mg/l 2,4-D	1.15 g/l proline
N6SSHFP	N6	3% sucrose + 3% sorbitol	-	1.15 g/l proline
N6SSD1P	N6	3% sucrose + 3% sorbitol	1 mg/l 2,4-D	1.15 g/l proline
MSS3HF	MS	3% sucrose	-	-
1/2MSS1.5HF	1/2MS	1.5% sucrose	-	-
MSS3HFYE1	MS	3% sucrose	-	1 g/l yeast extract
MSS3Kn2	MS	3% sucrose	2 mg/l Kinetin	-
MSS3NA02	MS	3% sucrose	0.2 mg/l NAA	-
MSS3D5BA02	MS	3% sucrose	5 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l BA	-

Table 6. Effect of various enzymes on protoplast yield from suspension cultured cells in tall fescue cv. 'Forager'

Enzyme mixture	Yield ($\times 10^5/\text{g}\cdot\text{fw}$) (\pm S.E.)
3 % Cellulase Onozuka RS + 0.1 % Pectolyase Y-23	6.2 ± 1.9
3 % Cellulase Onozuka RS + 0.5 % Fungelase	9.6 ± 1.6
3 % Cellulase Onozuka RS + 1.0 % Driselase	6.8 ± 0.9
3 % Cellulase Onozuka RS + 2.0 % Macerozyme R10	14.2 ± 1.5
4 % Cellulase Onozuka RS + 2.0 % Macerozyme R10	13.0 ± 2.4
2 % Cellulase Onozuka RS + 2.0 % Macerozyme R10	7.3 ± 1.8

酵素液中の浸透圧がプロトプラスト収量に及ぼす影響は0.4から0.6Mまでのあいだでは差はなかったが、0.35Mではプロトプラスト収量が有意に減少した(Table 7)。

Table 8にはプロトプラストからのコロニー形成頻度 (plating efficiency) に及ぼす培地及びナース培養の影響を示した。ナース培養がプロトプラストの分裂に必須であり、またB 5培地とA A培地の比較では、A A培地の方が優れていた。また、アガロースの種類はSea Plaque社製がSigma社製のType VIIよりも優れていた。なお、予備実験においてプロトプラストを種々の培地(MS、B 5、改変A A、KM 8 P (Kao and Michayluk 1975))で液体培養したが、プロトプラストの激しい凝集とそれにとまなうプロトプラスト同士の融合が見られただけで、分裂は全くおこらなかった。なお、conditioning 培地を用いた場合もナース培養のときと同様のコロニー形成が見られた(データ省略)。

(2) コロニー増殖培地及び再分化培地の検討

コロニー増殖培地と再分化培地の組成及びそれらがプロトプラスト由来コロニーからの再分化に及ぼす影響をTable 9に示した。最も多くの緑色植物体を得られたのはコロニー増殖培地にMSSSD1P、再分化培地にMSS3HFを用いた場合で、移植したコロニー50個から39のアルビノ個体と15の緑色植物再分化個体を得られた。コロニー増殖培地に2,4-Dが含まれないと、再分化した莖葉が培養器内で枯死する場合があった。また増殖培地にプロリンが含まれない場合も緑色植物体再分化数はきわめて少なかった。

(3) プロトプラストからの植物体再分化に及ぼす品種、継代期間、外植片の影響

Table 7. Effects of mannitol concentration on protoplast yield from suspension cultured cells in tall fescue cv. 'Forager'

Mannitol concentration	Yield ($\times 10^5$ /g·fw) (\pm S.E.)
0.35 M	4.6 \pm 0.2
0.4 M	6.3 \pm 0.5
0.45 M	5.9 \pm 1.1
0.5 M	6.5 \pm 1.2
0.55 M	7.1 \pm 1.6
0.6 M	7.6 \pm 1.2

Condition: 3 % Cellulase Onozuka RS, 2 % Macerozyme R10, 3 mM CaCl₂, pH 5.6

Table 8. Effects of media and nurse cell on the plating efficiency of suspension culture derived protoplasts of tall fescue

Media	B5		AA	
	+	-	+	-
Nurse*				
Cell line				
NE 13	0.035 (%)	0	1.12	0
ME 1	0.015	0	0.045	0

* + = with nurse cell, - = without nurse cell.

Table 9. Effects of media on plant regeneration from protoplast derived colonies of tall fescue¹⁾

Proliferation medium	Regeneration medium	Number of calli on regeneration medium	Number of regenerated plants	
			Albino	Green
MSSSHF	MSS3HF	30	0	2 ²⁾
MSSSHF	MSS3Kn2	10	0	0
MSSSHFP	MSS3HF	20	8	1 ²⁾
MSSSHFP	MSS3Kn2	30	26	2
MSSSD1	MSS3HF	50	11	0
MSSSD1P	MSS3HF	50	39	15
MSSSD1P	MSS3Kn2	20	4	3
N6SSHFP	1/2MSS1.5HF	50	33	1
N6SSD1P	MSS3HF	40	10	5
N6SSD1P	MSS3HFYE1	30	2	4
N6SSD1P	MSS3Kn2	30	12	0
N6SSD1P	MSS3NA02	30	0	3
N6SSD1P				
↓				
MSS3D5BA02→1/2MSS1.5HF		30	0	1
↓				
MSS3D5BA02→1/2MSS1.5HF		30	1	6
Total		450	145	43

1) Protoplasts were isolated from the suspension cell line of NL13 previously cultured in modified liquid N6 medium for a month.

2) Died *in vitro* after one month.

これまで行ったプロトプラスト培養に用いた液体培養細胞の継代期間とプロトプラストからの再分化の有無をTable 10に示した。これまでに国産3品種を含む牧草用4品種及び芝草用1品種の計5品種でプロトプラストからの再分化が可能であった。プロトプラストの単離に用いる液体培養細胞系の由来であるが、未熟胚、完熟種子、及び茎頂のいずれの由来のカルスでも再分化可能なプロトプラストを得ることが可能であった。しかしながら、いずれの場合でも液体培養の期間が5ヶ月を越えるとプロトプラストからの緑色植物体再分化は困難であった。

3) 考察

本節の結果から、トールフェスクにおいてもイネと同様単一個体由来の液体培養細胞からプロトプラストを単離・培養して緑色植物を再分化させる実験系が確立された。もし、Dalton(1988)が行ったようにプロトプラストを単離する液体培養細胞が複数の個体より成り立っているとすると、再分化した個体にみられる変異がもともとの個体間差によるものなのか、それとも培養中の体細胞変異によって生じたものかの区別がつかない。このことは、特に細胞融合によって作出された体細胞雑種のミトコンドリアRFLPを解析する場合に問題となる。即ち、牧草のように他殖性作物の場合、同一品種内でもオルガネラ特にミトコンドリア遺伝子の組成は多様な一方(高溝ら、1993)、種を超えて同一のRFLPを示す場合もある。従って、体細胞雑種のミトコンドリアDNA組成が両親のいずれから由来したものであるか、あるいは両親の和であるか等を解析する上で、融合に用いた両親の培養系が単一のミトコンドリアDNAから出発していないと確かなことは何もいえなくなってしまうこととなる。

Table 10. Morphogenic response of suspension culture-derived protoplasts of tall fescue

Name of cell-lines (cv.)	Origin of suspension culture	Age of suspension culture (month) ¹⁾	Suspension culture medium	Plating efficiency of protoplasts	Morphogenic responses
NE13 (Nanryo)	Immature embryo	8	AA	0.55(%)	Albino shoot
ME1 (Manade)	Immature embryo	8	AA	0.03	Callus
HE1 (Hokuryo)	Immature embryo	2	AA	NT ²⁾	Green plant
NL13 (Nanryo)	Shoot meristem ³⁾	1	N6	0.035	Green plant
		3	N6	NT	Callus
		5	AA	NT	Green plant
		5	AA	>1.0	Callus
NL5 (Nanryo)	Shoot meristem	3	AA	NT	Green plant
ML1 (Manade)	Shoot meristem	3	AA	0.035	Callus
ML2 (Manade)	Shoot meristem	3	AA	NT	Green plant
HL4 (Hokuryo)	Shoot meristem	3	AA	NT	Green plant
YS2 (Yamanami)	Mature seed	3	AA	NT	Green plant
FS1 (Falcon)	Mature seed	3	AA	NT	Green plant

1) Period after the initiation of suspension culture.

2) NT= not tested.

3) Containing immature leaves.

本実験でのプロトプラストからのコロニー形成頻度はイネ (Kyozyuka *et al.* 1987)、オーチャードグラス (Horn *et al.* 1988a)、ペレニアルライグラス (Creemers-Molenaar *et al.* 1988) に比べるとかなり低かった。しかしながら、プロトプラストからのコロニー形成頻度は、どこまでコロニーを測定するかによってずいぶん変わる。即ち、上記の3例では肉眼で見えるコロニーだけでなく、顕微鏡で見えるコロニーも数えているが、本実験では肉眼で見えるコロニーのみを数えた。Van der Valk *et al.* (1989) もケンタッキーブルーグラスのプロトプラストからのアルビノ植物体再生の報告の中で、本実験と同様の方法でコロニー形成頻度を算出し、やはり0.001-0.02%と相当に低い値を示している。従って、トールフェスクのプロトプラストからのコロニー形成頻度をイネ、オーチャードグラス、及びペレニアルライグラスと比較するには顕微鏡で見えるコロニーも数えるべきであろう。

プロトプラストの培養において改変A A培地はB 5 培地よりも優れていた。A A培地はイネ (Toriyama and Hinata 1985、Abdullah *et al.* 1986)、ケンタッキーブルーグラス (Van der Valk *et al.* 1989) でも用いられているが、イネではより簡便なR 2 培地 (Ohira *et al.* 1973)でも良好な結果が報告されている (Kyozyuka *et al.* 1987)。A A培地は窒素源としてグルタミンを含み、オートクレーブによりグルタミンの多くがアンモニアに分解してしまうため、濾過滅菌を必要とし、培地調製の手間と出費が大きい。トールフェスクでもR 2 培地の検討の価値はある。

本実験ではナース細胞の共存がプロトプラストの分裂に不可欠であった。ほとんどの実験でプロトプラストを単離したもとの液体培養細胞を加えれば分裂がみられた。ところが、興味深いことに、NL13からプロトプラストを単離培養した場合、プロトプラストを単離したもとのNL13の液体培養細胞を加えても分裂せず、より古いNE13の細胞を加えたときに分裂がみられた。この時のNL13は液体培養開始後1ヶ月しか経っておらず、細胞塊は大きく生長も遅かった。一方、NE13は再分化能は失っていたが、増殖は速く、細胞塊も細かった。即ち、ナース細胞としての要件は再分化能ではなく、増殖能であることが示唆される。Kyojuka *et al.* (1987) の報告でもナース細胞は長年にわたって継代されてきた増殖能には定評のあるイネOc細胞 (Baba *et al.* 1986) が用いられている。また、ナース細胞を除去した時点では殆ど分裂していないプロトプラストもその後分裂していたのが観察され、これは既に分裂したプロトプラストがナース細胞と同等の働きをしたものと考えられる。従って、本実験の結果はナース細胞が最初の分裂に必要な何らかの物質を供給しているという見解を支持するものである。

プロトプラスト由来コロニーを直接ホルモンフリーのMS培地に置床した場合、2週間後にはそこから小さな茎葉が形成されたが培養器から出せる大きさになる前に褐変・枯死した。一方、増殖培地でコロニーを1、2度継代して肥大させてから再分化培地に移植した場合、最も健全な緑色植物体が再分化し、順化も極めて容易であった。このことは、プロトプラスト由来コロニーから健

全な緑色植物を再分化させるためには、ある程度コロニーの大きさが必要だということである。ペレニアルライグラス (Creemers-Molenaar *et al.* 1989)、ギニアグラス (Lu *et al.* 1981)、ネビアグラス (Vasil *et al.* 1983) では再分化植物の順化の困難であることが報告され、後2者では *in vitro* で緑色植物が再分化したにもかかわらず、鉢上げはすべて失敗している。彼らもプロトプラスト由来コロニーがかなり小さいうちから再分化培地に移しているのもそのことが活力の乏しい再分化植物しか得られない原因かも知れない。

コロニー増殖培地でのプロリンの添加は再分化を大幅に促進し、また緑色植物体再分化には2,4-Dの併用が必須であった。再分化能が高いイネにおいてもプロリンを添加することにより極めて効率のよい不定胚形成系が報告され (Ozawa and Komamine 1989)、一方トウモロコシでもembryogenicカルスを高頻度で得るために用いられている (Armstrong and Green 1985)。また、アルファルファではプロリンによる不定胚形成の促進はアンモニウムイオンとの共存下で特に著しいという報告もある (Stuart and Strickland 1984)。トールフェスクもこれら作物と同様の特性を持つものと考えられる。

II-3 培養細胞からの再分化植物における変異

培養細胞からの再分化個体は一般に様々な変異 (Somaclonal variation) を示すことが知られており、その変異を実際育種に応用することも行われている。

前節までに、トールフェスクのカルス、液体培養細胞、及びプロトプラストからの再分化個体が得られたので、これらにおける変異を特に農業的形質について調査し、実際育種への利用側面についても検討した。

1) 材料及び方法

前節までの実験で得られたカルス、液体培養細胞、プロトプラストからの再分化個体を随時鉢上げ順化の後、ガラス室または圃場で栽培した。それらの再分化個体あるいはその後代の一部について、体細胞染色体数を酵素解離空気乾燥法(Fukui and Mukai 1988)で調べた。即ち、一個体当たり3から5本の根端を供試し、体細胞染色体数を酵素解離空気乾燥法(Fukui and Mukai 1988)で調べた。即ち、エタノール：酢酸＝3：1液で固定した根端をスライドガラス上にのせ、そこに酵素液を少量滴下して細胞壁を溶解させた。その後、スライドガラス上で水洗の後、根端を固定したのと同じ液に懸濁してすばやく広げて風乾の後ギムザ染色した。また、1個体当たり3から5本の穂を採取し、各穂から任意に3個の葯を供試して酢酸カーミンにより花粉稔性を調べた。さらに、収量や草丈等の農業的形質についても調査した。

(1) 各種再分化植物の体細胞染色体変異

Table 11に各種再分化植物の体細胞染色体数を示した。カルス、液体培養細胞、及びプロトプラスト由来再分化個体植物各10系統について1～数個体調査した結果、カルス、及び液体培養細胞由来再分化個体では体細胞染色体数はすべて42本で正常であった (Fig. 6A)。しかしながら、プロトプラスト由来再分化個体は多くの系統で染色体数の減少がみられた (Fig. 6B)。

Table 11. Number of chromosomes in tall fescue plants regenerated from a callus, suspension cells, and protoplasts

Clones	Origin of cultivars	Origin of explants	Number of chromosomes
CE-C1	Clarine	Immature embryo derived callus	42
ME2-C1	Manade	♂	42
NE13-C1	Nanryo	♂	42
NE13-C2	Nanryo	♂	42
NL13-L1	Nanryo	Shoot meristem-derived suspension cells	42
NL13-L2	Nanryo	♂	42
ML2-P1	Manade	Protoplast ¹⁾	41
NL5-P1	Nanryo	♂	42
NL5-P2	♂	♂	42
NL5-P3	♂	♂	42
NL13-P1	♂	♂	38
NL13-P3	♂	♂	42
NL13-P5	♂	♂	35 ²⁾
NL13-P7	♂	♂	40
NL13-P8	♂	♂	42
NL13-P9	♂	♂	40
NL13-P10	♂	♂	42
NL13-P12	♂	♂	36 ³⁾
NL13-P13	♂	♂	42
NL13-PA1	♂	♂	40
NL13-PA2	♂	♂	39-40
NL13-PA3	♂	♂	40
NL13-PB	♂	♂	39
Y2S-P1	Yamanami	Protoplast ⁴⁾	42

1) Derived from shoot meristem-derived suspension cells

2) Dwarf mutant.

3) Variegated mutant.

4) Derived from mature seed-derived suspension cells



A



B

Fig. 6A-B. Root tip chromosomes of callus-derived and protoplast-derived tall fescue plants. A: Callus-derived regenerant ($2n=42$), B: Protoplast-derived regenerant ($2n=41$).

(2) 外観上の変異

カルスならびに液体培養細胞からの再分化植物における外観上の変異の主なものはアルビノであった。プロトプラストからの再分化植物では、黄色と薄桃色の斑が縞状に入った個体や、矮化個体もみられた。前者の体細胞染色体数は36本、後者のそれは35本で42本よりも大幅に少なかった (Table 11)。なお、39本から41本を示した個体の外観は正常であった。

(3) 稔性における変異

各種再分化植物、とくにプロトプラスト由来再分化個体において花粉や種子稔性に異常を示したものが多く見つかったが (Table 12)、プロトプラスト由来個体でも高い花粉稔性を示す系統 (ナンリョウ5由来の3系統) があった。

(4) プロトプラスト由来再分化個体放任受粉後代における変異

プロトプラスト由来の再分化植物で42本の染色体数を示した系統 (品種ナンリョウ由来N5) においてプロトプラストを単離したもとの親系統 (N5)、及び同一親系統からのプロトプラスト由来再分化個体3系統を圃場でそれぞれ放任受粉させ、それらの後代約80個体を畝幅80cm、株間50cmで圃場に個体植えし、各種形質を調査した (Table 13)。表には示さなかったが、花粉稔性については親系統と3プロトクローン間で差はみられなかった。一方、出穂個体割合、草丈、及び穂長は、3プロトクローン後代はいずれも親系統よりも低い値を示した。また、生草収量、葉幅、及び秋季の葉腐れ性病斑出現個体割合は3プロトクローン後代ともに親系統との間に有意な差がみられなかった。

Table 12. Pollen stainability and seed yield in tall fescue plants regenerated from a callus, suspension cells, and protoplasts

Clones	Origin of explants	Pollen stainability (%)	Seed yield(g)
NE13C1 ¹⁾	Immature embryo derived callus	2.2	6.96
KE74C1 ²⁾	◇	14.9	0.59
KE74C2	◇	67.2	11.68
NL13C1	Shoot meristem ³⁾ derived callus	3.3	0.33
NL13C2	◇	1.1	0.05
NL13C3	◇	0.0	0.05
NL13C4	◇	0.03	0.37
NL13.111	Shoot meristem derived suspension cells	11.0	3.06
NS72C1	Mature seed derived callus	23.4	0.70
NL5P1	Protoplast derived from shoot meristem derived suspension cells	37.6	0.60
NL5P2	◇	75.2	1.62
NL5P3	◇	38.4	0.978
NL5P4	◇	35.1	1.55
NL5P5	◇	42.9	1.32
NL13PA1	◇	0.0	0.55
NL13PA2	◇	0.0	0.34
NL13PB1	◇	0.0	0.54
NL13P8	◇	0.0	1.47
NL13P9	◇	0.0	0.31

1) N means cv. Nanryo.

2) K means cv. Kentucky 31

3) Containing immature leaves.

Table 13. Comparison of agronomic characters among progenies of open pollinated protoclonal- and parent-derived tall fescue

Agronomic character	Parent-derived	Protoclonal-derived ¹⁾			L.S.D.
		A	B	C	
Ratio of heading individuals	86.8(%)	65.9	68.6	67.9	3.5
Number of spikelets per plant	12.4	11.4	13.5	10.4	n.s.
Length of spikelets	83.9(cm)	78.0	78.9	77.7	4.2
Plant height (1992)	119.6(cm)	98.3	97.1	95.4	17.3
Plant height (1993)	97.7(cm)	93.5	91.9	85.4	5.4
Leaf width	12.2(mm)	11.6	11.9	11.4	n.s.
Fresh weight per plant (1992)	470(g)	429	495	482	n.s.
Degree of leaf blight	1.6 ²⁾	1.7	1.6	1.6	n.s.

1) Derived from NL5P1, NL5P2, NL5P3, respectively

2) 1=healthy, 5=strongly infected.

3) 考察

体細胞染色体数の変異はカルスよりもプロトプラスト由来再分化個体において大きいことが明らかとなった。みられた変異はいずれも染色体の減少で増加は一例もなかった。トールフェスクのカルス培養由来個体における変異については多くの報告があるが (Eizenga 1987, Eizenga 1989, Eizenga and Dahleen 1990)、本研究とは異なりカルス培養においても染色体変異が頻繁におこることが示されている。一方、イタリアンライグラスでは根由来カルスからの再分化植物において4倍体では染色体の減少した個体のみられたが、2倍体ではみられなかったという (Jackson and Dale 1988)。イネではプロトプラスト由来再分化個体の変異について多くの研究がなされているが、染色体数の変異が大きいとするものと (Kanda *et al.* 1988)、小さいとするものがある (Ogura *et al.* 1987)。トールフェスクでは本研究の他に、プロトプラストからの再分化に成功している Dalton (1988) の材料を用いた Humphrey and Dalton (1991) の報告があるが、それによればプロトプラストからの再分化個体はすべて84前後の体細胞染色体数を示し、本研究とは異なった変異のパターンを示した。この差異は彼らの培養法がアガロース・ビーズ法を用いず液体培養法を用いているという点と関連していると思われる。即ち、本研究においても初期の実験は液体培養法を用いたが、その際、培養開始1-2日後に多くの自発的同種融合が観察されたことから、プロトプラストを液体培養した場合、同種融合したプロトプラストからの再分化による倍数性個体の出現が考えられる。ア

ガロース・ビーズ法を用いるとこのような同種融合を防ぐことが出来るのでそのような変異を少なくするのに適していると考えられる。一方、プロトプラスト培養でなくとも培養期間が長くなると *endomitosis* と呼ばれる現象により倍数体が生じやすくなるという報告 (Kasperbauer and Eizenga 1985) もある。また、培養期間が長くなると倍数性に限らず一般に異常な再分化個体の出現頻度がより大きくなり (McCoy *et al.* 1982)、特にイネ科植物のプロトプラスト培養系ではプロトプラストの単離可能な液体培養細胞の作出に長期間を要するということがカルスに比較してプロトプラストからの再分化個体の変異が大きいということと関係があるのかも知れない。イネの場合でも、カルス誘導からプロトプラスト単離・培養を経て再分化まで2~3ヶ月の例では再分化個体に余り大きな変異はみられないが (Ogura *et al.* 1987)、カルス誘導後7~10ヶ月経ってからプロトプラスト単離・培養した例では高頻度で倍数体や異数体が出現している (Kanda *et al.* 1988)。本研究においても、体細胞染色体変異を起こさなかったN5ではプロトプラスト単離に用いた液体培養細胞の通算培養期間は3ヶ月であったが、多くの変異がみられたN13では5ヶ月を経ていた。細胞融合や形質転換を望み通りに行うにはこのような染色体脱落などの変異がおきないことが前提となる。しかしながら、プロトプラストの単離・培養に適した若い液体培養細胞系を常に維持して行くことは大変労力がかかる。今後は良い状態の培養細胞を大量に作出した後、超低温保存法により保蔵し、必要に応じて解凍して用いる方法 (Gnanapragasam and Vasil 1992) も検討する価値

があると思われる。

外観の変異に関してもプロトプラスト由来再分化個体はカルス由来あるいは液体培養細胞由来再分化個体にはみられぬ、斑入りや矮化などの変異が起こった。これらの変異はカルスや液体培養では培養期間が一年以上などの長期間にわたった場合でも見られなかったことから、プロトプラスト培養独特のものと考えられた。一方、大野（1975）はイネでは葍由来カルス培養においてもこれらの変異の起こることを報告している。

稈性に関しても、プロトプラスト由来再分化個体の方がより多くの異常を示し、ナンリョウ由来NL13PA1-NL13P9で花粉稈性0の雄性不稈個体が見つかった。これらのうち、NL13P8以外はすべて染色体数の減少をおこしていたので、染色体異常による雄性不稈と思われる。NL13P8の雄性不稈性が核によるものか細胞質によるものかをさらに正常個体との正逆交雑を行って確かめる必要がある。

トールフェスクでは細胞質雄性不稈がまだ見つかっていないので、培養細胞由来再分化個体からもし得られれば、画期的なことといえよう。緒論で述べたようにトールフェスクの花粉はスギや他のイネ科牧草と同様アレルギー反応による花粉症を引き起こすので、雄性不稈個体の発見や作出が望まれている。さらに、牧草類では茎葉が収穫対象となるので稈性回復遺伝子が不要で、確実な細胞質雄性不稈系統と維持系統が得られれば、実用品種への道はかなり近いと考えられる。

プロトプラスト由来再分化個体には多くの変異がみられたことが明らかとなったが、液体培養を始めてから経過した期間の短い細胞から単離したプロトプラスト由来再分化個体（N5）では稔性、外観ともに正常な個体が得られた。イネ等自殖性作物では培養による変異を解析するためには親系統と培養由来個体系統の自殖後代を比べれば良いが、大多数の牧草のような他殖性作物ではそれが困難である。そこで本来ならば、ある系統を決めて、それとの交配後代の比較を行うべきであるが、労力の関係から本実験では放任受粉後代を用いた。牧草の育種は合成品種法が主流なので、放任受粉後代による比較も大いに意味があると考えられる。本研究では、プロトプラスト由来で生育良好な各系統を放任受粉させた後代の農業的形質を親系統と比較した結果、播種翌年の出穂個体割合、草丈、及び穂長は親系統に比べて有意に少なくなったが、生草収量、葉幅、及び葉の病斑出現頻度は有意な差が認められなかった。 Ogura *et al.*

（1987）は、イネ品種日本晴、藤坂5号、及び祝モチの3品種においてプロトプラスト由来再分化個体当代の各種農業的形質を調査し、プロトプラスト再分化個体では茎数が増加し、その結果1000粒重が対照よりも少ないにも係わらず個体当りもみ収量は増加することを報告した。また、日本晴と祝モチでは穂長が有意に減少した。一方、Abdullah *et al.* (1989) はイネ品種 Taipei309 のプロトプラスト由来個体20系統の後代を用い、15系統の後代では対照と有意差がなかったが、5系統の後代で穂長が有意に減少することを認めている。また、種子100粒重は2系統の後代で対照よりも有意に増加したことを認めたが、個

体当りの種子収量については調査していない。また、イネのコシヒカリのプロトプラスト由来再分化個体のなかから、短稈でなおかつ親のコシヒカリの持つ優良形質を失っていない系統を母材とした品種「初夢」が育成されている（助清ら 1989）。このように短稈化はプロトプラスト由来植物でよく見られる変異であり、他の農業的形質が劣悪化してない場合も多い。

前述のように、本研究におけるN5プロトプラスト由来3系統の放任受粉後代は草丈及び穂長の有意な減少がみられただけでなく、出穂個体割合の有意な減少もみられ、生殖生長に関して遺伝的に何らかの影響を受けていることが考えられた。一方、生草収量、葉幅及び葉の葉腐れ性病斑出現頻度は親系統と差が見られなかったことから、牧草においてはイネ等と異なり栄養体を収穫物とするので、これらプロトプラスト由来再分化個体3系統の放任受粉個体群は親系統に較べて実際の農業的形質において何ら劣るものではないことが明らかであった。

以上のように、トールフェスクにおいて単一個体由来プロトプラストからの植物体再分化系が確立された。これを利用することにより、細胞融合ならびにプロトプラストへの直接遺伝子導入によるトールフェスク新育種素材作出の可能性が大きくなった。

Ⅲ 細胞融合技術の確立

Ⅲ-1 細胞融合によるトールフェスクとイタリアンライグラスの体細胞雑種の作出

細胞融合は交配が不可能またはきわめて困難な植物間で雑種を作出するうえで有効な技術である(Melchers *et al.* 1978)。さらに細胞融合では、核遺伝子のみならず、細胞質遺伝子についても両親から受け継ぐことができる可能性がある。実際、両親からミトコンドリアと葉緑体ゲノムを別々に受け継いだ体細胞雑種の作出の例が多く知られている(Bonnett and Glimelius 1990, Derks *et al.* 1991, Sproule *et al.* 1991)。またミトコンドリア遺伝子に関しては、両親のミトコンドリア間で組み換えをおこしたものが雑種植物に受け継がれていることを示唆する事例も非常に多い(Beillard *et al.* 1979, Asahi *et al.* 1988, San *et al.* 1990, Xu *et al.* 1993, Landgren and Glimelius 1994)。トールフェスクとイタリアンライグラスは、イタリアンライグラスを種子親とした場合は交配により雑種がたやすく得られるが、逆の場合はきわめて困難である(Crowder 1953, Eizenga and Buckner 1986)。トールフェスクとイタリアンライグラスの間で細胞融合を行う目的は以下の通りである。

Ⅰ 交配では得られない新たな細胞質を持つ雑種を作出し、新育種素材としての可能性を検討する。

Ⅱ 非対称融合法を用いてイタリアンライグラスの一部の染色体のみをトールフェスクに導入することによって、イタリアンライグラスの持つ高消化性及び高嗜好性遺伝子を付与してトールフェスクの品質を改善する。また、イタリアンライグラスの細胞質のみをトールフェスクに導入し、細胞質雄性不稔個体を作出する。

1) 材料及び方法

Ⅱ-2で確立したトールフェスクプロトプラスト培養系（品種ナンリョウ由来のNL5、NL13、品種ヤマナミ由来のYS2、品種Fawn由来のFS1、及び品種Manade由来のME2）を細胞融合における片親とした。イタリアンライグラスについては品種ワセアオバ由来のMS17（細胞質雄性不稔系統、小松 1987）、品種ゴルカ・ノロドヴァ由来のGS1及び品種タチワセ由来のTW2を用い、同様の方法で茎頂由来カルスから液体培養細胞系を作出した。これら培養系による両種の融合組合せをTable 14に示した。なお、イタリアンライグラスはトールフェスクに較べてembryogenicカルスの誘導が困難で、これらの培養系は液体培養細胞、プロトプラストのいずれからも再分化能はなかった。これら両植物のプロトプラストを電気的に融合させ、ヨードアセトアミド（IOA）処理による細胞膜の不活化と再分化能の有無を組み合わせで融合細胞を選抜した。即ちトールフェスクプロトプラストを単離後、15分間室温でCPW13Mに溶かした10mMのIOAで処理した後、電気的にイタリアンライグラスプロトプラストと融合させた。融合は島津製作所電気融合装置SSH-1及び付属FTC-03

Table 14. Fusion combination and number of regenerated plants

Tall fescue +		Italian ryegrass		Number of regenerants	
Clones	Cultivars	Clones	Cultivars	Albino	Green
ME2	Manade	MS17	Waseaoba	7	0
NL5	Nanryo	MS17	Waseaoba	5	6
NL5	Nanryo	GS1	Gorka Norodova	Callus only	
NL13	Nanryo	TW2	Tachiwase	2	10
FS1	Fawn	TW2	Tachiwase	4	0
YS2	Yamanami	GS1	Gorka Norodova	Callus only	

チャンバーを用い、40V、0.5MHzの高周波を印可後、1.5-1.75KV、20-30 μ s のパルスを2-4回与えることによって行った。融合処理後、約10分静置してII-2の方法により培養し、生成したコロニーを同様の方法で再分化させた。またナース細胞の種類がコロニー形成頻度に及ぼす影響についても検討した。

2) 結果及び考察

(1) IOA処理がトールフェスクプロトプラストの不活化に及ぼす影響

Table 15にIOAの濃度がトールフェスクプロトプラストの分裂に及ぼす影響を示した。2mMの場合、conditioning培地のみでは分裂がみられなかったが、ナース培養とconditioning培地を併用した場合は分裂がみられた。IOAの濃度を10mMに高めると、いずれの培養法でも分裂はみられなかったため、トールフェスクプロトプラスト不活化のためのIOA濃度を10mMとした。

(2) 融合細胞からの植物体再分化

イタリアンライグラスとトールフェスクのプロトプラストはいずれも培養細胞由来であり、両者の識別は困難だった (Fig. 7a-b)。また、融合処理したプロトプラスト由来のコロニーは生長してカルスになった時、大部分がイタリアンライグラス様の形状を示したが、一部トールフェスク様のコンパクトな形状を示したものもあった。ナース細胞としてイタリアンライグラスを用いた場合、トールフェスクを用いた場合に比べてコロニー形成率は高かったがトールフェスク様のコンパクトなカルス形成の頻度は変わらなかった (Table 16)。これらのコンパクトな部分を掻き取り、増殖培地 (MSSSD1P) を経て再分化培地

Table 15. Effect of iodo-acetamide (IOA) concentration on colony formation from suspension culture derived tall fescue protoplasts

Concentration of IOA (mM)	Condition of protoplast culture	Frequency of colony formation
0	conditioning medium	0.028(%)
2	conditioning medium	0
2	conditioning medium + nurse cell	0.027
10	conditioning medium	0
10	conditioning medium + nurse cell	0

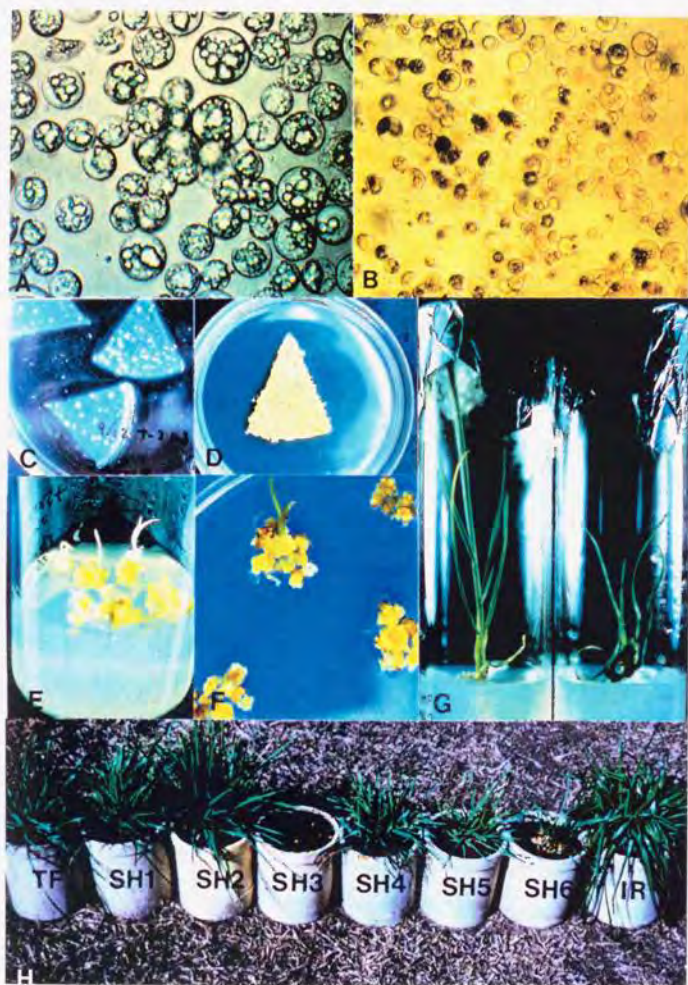


Fig. 7A-H. Plant regeneration from electrofused protoplasts of tall fescue and Italian ryegrass. A: Tall fescue protoplasts derived from suspension culture. B: Italian ryegrass protoplasts derived from suspension culture. C: Colony formation of electrofusion-treated protoplasts embedded in agarose blocks. D: Colony proliferation on MSSSD1P medium. E: Albino regenerants. F: Green regenerants. G: Rooted green regenerants. H: Mature somatic hybrid plants in pots.

Table 16. Effect of origin of nurse cells on colony formation in electro-fusion treated protoplasts of tall fescue cv. Nanryo and Italian ryegrass cv. Gorka Norodova

Origin of nurse cells	Number of colonies per petri dish	Number of embryogenic colonies per petri dish
Tall fescue	8.2	0.67
Italian ryegrass	27.6	0.57
Tall fescue + Italian ryegrass	24.0	0.33

(MSY)に移したところ、NL5とMS17の融合組合せからはアルビノ植物と緑色植物が順次再分化し、最終的に6個体の緑色植物(SH1~SH6)が鉢上げされた。NL13とTW2の組合せからはアルビノ2個体と緑色植物10個体が再分化し、後者はすべて鉢上げされた(SHa~SHj)。ME2とMS17及びFS1とTW2の組合せからはアルビノ植物のみが再分化した。NL5とGS1及びYS2とGS1の組合せからはカルスしか形成されなかった(Table 14)。

本研究が成果を挙げるに至った頃までに、イネ科作物における種間または属間での細胞融合は数多くの組み合わせで行われてきたが(Hayashi *et al.* 1988, Ozias-Akins *et al.* 1986, Tabeizadeh *et al.* 1986, Vasil *et al.* 1988, Terada *et al.* 1987, Finch *et al.* 1990)、雑種植物の鉢上げにまで成功したのは、イネと野生イネの組み合わせだけで(Hayashi *et al.* 1988)、ほかの例では試験管内のみで雑種シュートあるいは雑種カルスが得られたにすぎない。その原因としては遠縁すぎる組み合わせを選んでいるか(Vasil *et al.* 1988, Terada *et al.* 1987, Finch *et al.* 1990)、あるいはプロトプラストからの植物体再分化の再現性に問題があるもの(Ozias-Akins *et al.* 1986, Tabeizadeh *et al.* 1986, Vasil *et al.* 1988)と考えられる。

IOAによる不活化と再分化能の有無の組合せは、肉眼によるヘテロカリオンの分取が困難な場合に極めて有効な融合細胞の選択的培養法である。タバコでは単一のプロトプラスト同士の融合による植物体再分化も報告されているが(Spangenberg *et al.* 1990)、イネ科作物のようにプロトプラストの分裂率が

低いものでは、たとえ顕微鏡下でヘテロカリオンのみを拾い上げてもコロニーまで育つ確率は極めて低い。本研究では合計6種類の融合組合せを実施したが、緑色植物再分化個体が得られたのはその内の2組合せのみであった。トールフェスクとイタリアンライグラスはイタリアンライグラスを種子親とした場合は交配によっても比較的容易に種子が得られるが、その場合でも品種によって交雑親和性が異なることが知られている (Komatsu *et al.* 1990)。このような遺伝的な親和性の差異も、本研究においてすべての細胞融合組合せからは再分化しなかったことと関連している可能性があるが、それよりもむしろ、融合に用いられた培養系特にトールフェスクの液体培養細胞の再分化能が緑色植物を得るために重要な要因であろう。

Ⅲ-2 体細胞雑種の解析

これら緑色再分化個体が真に体細胞雑種であるかどうかを確認するために、主として体細胞雑種SH1-SH6を材料として根端染色体数の調査、アイソザイム分析及び核とオルガネラDNAのRFLP解析を行った。

1) 材料及び方法

- (1) 根端染色体数をⅡ-3-1)により調査した。
- (2) 第3葉の中肋部分からタンパク質を粗抽出し、ポリアクリルアミドnative電気泳動によるペルオキシダーゼ、およびアンフォライン等電点電気泳動によ

るエステラーゼの活性染色(Wetter and Deyck 1983)を各行ってザイモグラムを調査した。

(3) 非放射性または放射性のサザンハイブリダイゼーション法によりイネのrDNAプローブを用いて全DNAのBamHI分解物に対する制限酵素切断断片長多型(RFLP)を調べた。同様に種々の作物のミトコンドリアと葉緑体のプローブ(Table 17)を用いて細胞質ゲノムについてもRFLP解析した。全DNAの抽出は本田と平井の方法(1991)により行った。

(4) ポットまたは圃場に定植し、外観(穂型、葉耳の毛の有無)を比較・観察した。

2) 結果

(1) 体細胞雑種の根端染色体数

各体細胞雑種の根端染色体数をTable 18に示す。両親の染色体数の和である56本を示した個体はなかったが、その近傍の数を示した個体が8個体中3個、また73-76本を示した個体が4個体あった。

(2) 体細胞雑種の葉のアイソザイム分析

体細胞雑種SH1-SH6のペルオキシダーゼのザイモグラムはすべて、両親に固有のバンドを併せ持っていた(Fig. 8)。エステラーゼではSH1とSH2の2個体しか供試していないが、両親に固有のバンドを共有する一方、バンドの欠落も一部見られた。

(3) 体細胞雑種の核及びオルガネラDNAプローブによるRFLP解析

Table 17. DNA probes used for RFLP analysis in somatic hybrid plants

DNA probes	Original plasmid	Original plant	DNA size	References
rDNA	pRR217	<i>Oryza sativa</i>	7.7 kb	Takaiwa <i>et al.</i> (1984)
cox1	pBN6601	<i>Zea mays</i>	3.9 kb	Isaac <i>et al.</i> (1985)
cox2	pZME1	<i>Zea mays</i>	2.4 kb	Fox and Leaver (1985)
cox3		<i>Oenothera</i>	1.1 kb	Schuster (pers. comm.)
atp6		<i>Oryza sativa</i>	2.4 kb	Iwabuchi <i>et al.</i> (1993)
atp9	pBNI102B	<i>Brassica napus</i>	1.5 kb	Handa (1993)
atpA	pBNP56	<i>Brassica napus</i>	5.6 kb	Handa and Nakajima (1991)
rbclSU	pWHsp403	<i>Spinacia oleracea</i>		Herrman (pers. comm.)
pTBa1	pTBa1	<i>Nicotiana tabacum</i>	19.5 kb	Sugiura <i>et al.</i> (1986)
pTBa2	pTBa2	<i>Nicotiana tabacum</i>	18.8 kb	Sugiura <i>et al.</i> (1986)

Table 18. Number of chromosomes in somatic hybrids

Clones	Number of chromosomes in original somatic hybrids	Number of chromosomes in chimaerically derived shoots
SH1	53	not tested
SH2	60-66	not tested
SH3	44-46	not tested
SH4	74-76	not tested
SH5	73	14-20
SH6	58	14-20
SHa	74	-1)
SHb	75	-

1) Chimaeric plant was not obtained.

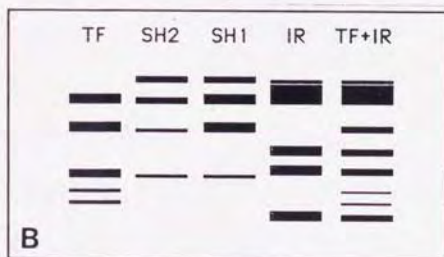
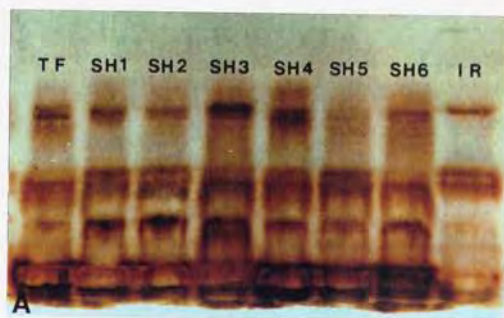


Fig. 8A-B. Peroxydase (A) and esterase (B) zymogram pattern in somatic hybrid plants between tall fescue and Italian ryegrass. TF=Tall fescue, IR=Italian ryegrass, SH1-SH6=independently obtained somatic hybrids.

インテ DNA による全 DNA の BamHI 分解物に対する RFLP 分析の結果、初期に再分化した体細胞雑種 SH1-SH6 及びあとから再分化した SHa-SHf ともに両親固有の DNA 断片を持っていた (Fig. 9a-b)。SHg-SHj の 4 個体は鉢上げしてからの期間が短く、分析できなかった。

SH1-SH6 の 6 個体について、6 種の各種作物ミトコンドリア DNA プローブを用いた全 DNA の EcoRI 分解物に対する RFLP 分析を行った結果を Table 19 にまとめた。体細胞雑種のミトコンドリアゲノムは両親のいずれかと同じパターン (cox2, atp9, atpA₁)、両親の和 (cox3, atp6)、両親の和 + 新規のバンド (cox1) の 3 種類に大別された。cox1 をプローブとした場合は、供試した雑種個体すべてで異なる RFLP がみられ、新規のバンドのうちの 1 本は SH1, SH2, SH3 及び SH6 で共通の位置にあった (Fig. 10)。一方、葉緑体 DNA に関しては、いずれのプローブを用いた場合も トールフェスク と同一のパターンを示し、新規のバンドの出現や親由来バンドの欠損は全く見られなかった。

(4) 体細胞雑種の形態的特徴

鉢上げされた体細胞雑種は極めて矮性を示した 1 個体 (SH3) を除き、草型はほぼ両親の中間的形態を示した (Fig. 7)。生育不良によりその後枯死した SH3 を除き、初期に再分化した SH1, SH2, SH4, SH5 及び SH6 は春化の後出穂した (Fig. 11A-B) が、穂に分岐のない点はイタリアンライグラスに、穎花に包穎のない点は トールフェスク に似ていた。5 個体とも、イ

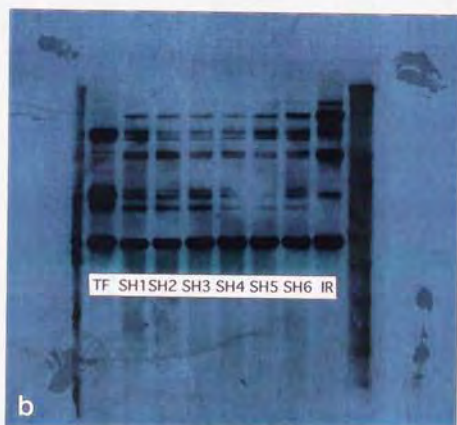
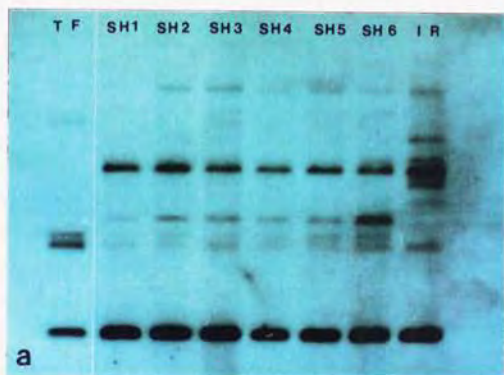


Fig. 9a-b. Southern blot from total DNA (BamHI digested) hybridized to rice ribosomal DNA probe (pRR217). a, TF=Tall fescue; IR=Italian ryegrass; SH1-SH6=Earlier regenerated somatic hybrids. b, TF=Tall fescue; IR=Italian ryegrass; SHa-SHf=Later regenerated somatic hybrids.

Table 19. Summary of organellar RFLP in somatic hybrid plants between tall fescue and Italian ryegrass

Clone	SH1	SH2	SH3	SH4	SH5	SH6
mt Probe						
cox1	TF+IR+N ¹⁾	TF+IR+N	TF+IR+N	TF+IR	TF+IR	TF+IR+N
cox2	T F	T F	T F	T F	I R	T F
cox3	TF+IR	TF+IR+N	TF+IR	TF+IR	TF+IR	TF+IR
atp6	TF+IR	TF+IR	TF+IR	TF+IR	TF+IR	TF+IR
atp9	I R	T F	n.t. ²⁾	I R	I R	I R
atpA	T F	T F	T F	T F	T F	T F
ct Probe						
rbcLSU	T F	T F	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
pTBa1	T F	T F	T F	T F	T F	T F
pTBa2	T F	T F	T F	T F	T F	T F

1) Novel band undetectable in either parent.

2) Not tested.



Fig. 10. Southern blot from total DNA (EcoRI digested) hybridized to maize mitochondrial *cox1* DNA probe. TF=Tall fescue; IR=Italian ryegrass; SH1-SH6=Earlier regenerated somatic hybrids.

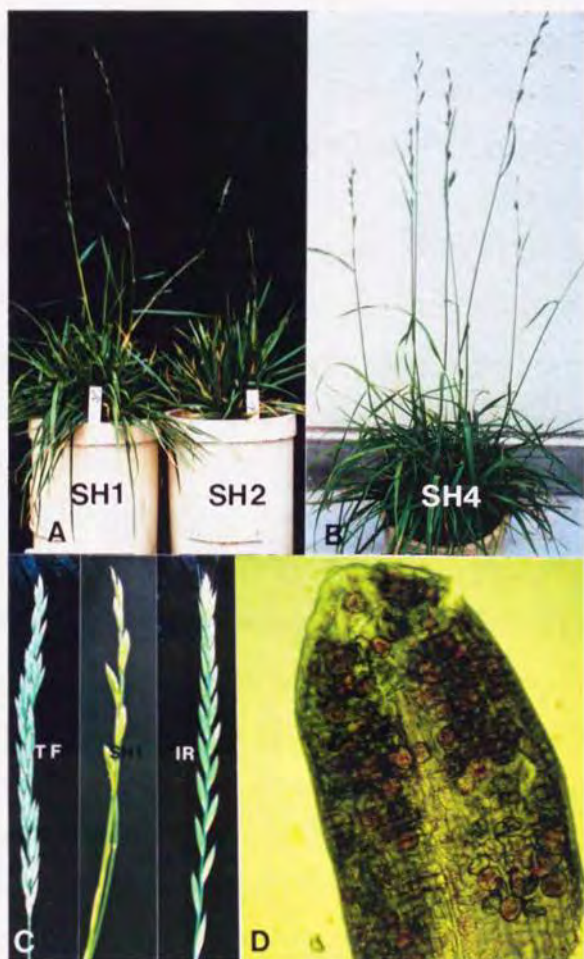


Fig. 11. Flowering somatic hybrid plants after vernalization. A: Flowering SH1 and SH2, B: Flowering SH4, C: Inflorescence of SH1 and the parents, D: Acetocarmine-stainable pollen of SH4.

タリアンライグラス、トールフェスクいずれの花粉を掛けた場合も不稔であった。SH1, SH2, SH6では葯内に花粉粒が全くみられなかったが、

SH4とSH5ではアセトカーミンで染まる花粉が若干みられた(図11D)。葉耳の毛の有無は無から有まで異なり、SH1, SH2, SH3は無毛で、SH4, SH5, SH6は有毛であった(Fig. 12)。SH1—SH6のいずれの体細胞雑種も圃場では越冬できなかった。SHa—SHjは鉢上げ後、日が浅くまだ出穂には至っていないが、やはりいずれも両親の中間型の草型を示した。

3) 考察

得られた体細胞雑種の雑種性は上記結果に示されたようにアイソザイムレベル及びDNAレベルで証明された。属間で体細胞雑種が得られ、鉢上げまでに至ったのはイネ科作物では本実験の事例が世界で初めてである。しかしながら、いずれの体細胞雑種の染色体も両親の染色体数の和から逸脱したものばかりで、全て不稔であった。しかしながら、花粉稔性に関しては一部アセトカーミンで染色される花粉粒が観察されたので、袋かけによる他植物との交配を行いこの花粉に授精能力があるか確かめる必要があろう。

種子繁殖性である牧草の育種素材として稔性は大前提であり、その付与がこれら体細胞雑種を実際育種に利用するために不可欠であると考えられる。そのための今後の方策としては、

- i より多くの融合実験を行い多くの体細胞雑種の中から稔性のあるものを選ぶ
- ii 非対称融合法によりイタリアンライグラスのプロトプラストを照射してか

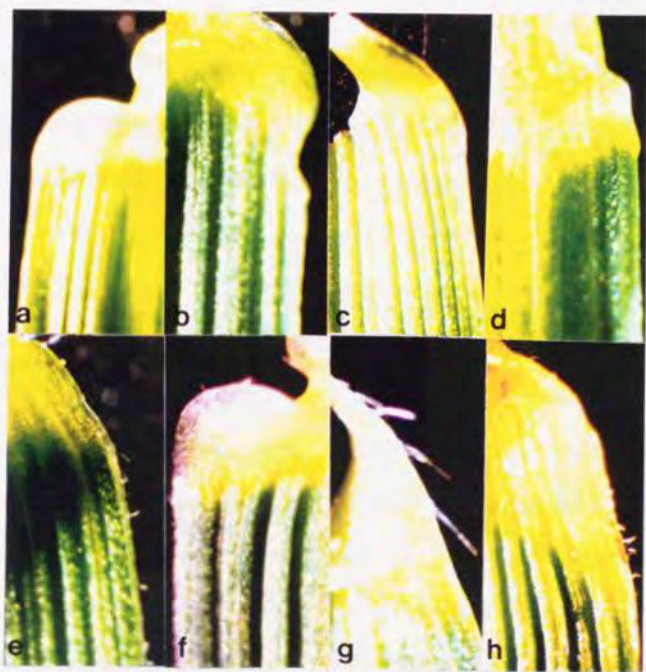


Fig. 12a-h. Leaf morphology with respect to the pubescence in auricle of somatic hybrid plants and their parents. a: Italian ryegrass, b-g: SH1-SH6, h: Tall fescue.

ら融合し、ごく一部のみの染色体を導入する、いわゆる非対称融合を行う

Ⅲ 体細胞雑種からカルスを再び誘導・再分化させ、新たな変異を起こさせ、その中から稔性のあるものを探索する
などが考えられる。

特にⅡの手法は、イタリアンライグラス側のプロトプラストを染色体が完全に死滅するまで照射してから融合することにより、イタリアンライグラスの細胞質のみを導入することも可能である。この方法によりタバコ (Menczel *et al.* 1983)、イネ (Akagi *et al.* 1989, Kyojuka *et al.* 1989, Yang *et al.* 1989)、ナタネ (Sakai and Imamura 1990)、トマト (Melchers *et al.* 1992) で細胞質雄性不稔植物が作出されている。牧草類ではペレニアルライグラスで同様の実験が行われているが、雑種カルスが作出されただけで、植物体は再分化していない (Creemers-Molenaar *et al.* 1992)。トールフェスクにおいても早急に本方法による細胞質雄性不稔植物の作出が望まれるところである (藤森ら 1994)。

体細胞雑種の雑種性判定にはアイソザイムだけでは不十分な場合があり、核および細胞質レベルでの RFLP 分析が有効であることは論を待たない。一方、本実験で用いたイネ rDNA プローブは、両親間で多型が見られたものの、共通のバンドも多く、より明瞭な差異を示すプローブの探索も今後必要であろう。近年、トールフェスクのゲノミック DNA ライブラリーから様々な程度の多型を示すクローンが得られており (Xu *et al.* 1991, Xu *et al.* 1992, Xu *et al.* 1994)、これらを利用することにより、より正確な雑種性判定ができるようになるかも

れない。また、近年RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA, Williams *et al.* 1990) の利用により体細胞雑種を判定しようとする試みもバレイショでなされており (Baird *et al.* 1992, Takemori *et al.* 1994)、サザン解析を行わなくてもよいので、より簡便・迅速に雑種性を判別できる可能性がある。本実験において得られた体細胞雑種は両親由来の核ゲノム及びミトコンドリアゲノムを合わせ持ち、さらに両親由来のミトコンドリア間で組換えを起こしている可能性の高いことが示唆された。一方、葉緑体ゲノムに関しては体細胞雑種はこれまで解析した6個体ともトールフェスクと同じRFLPを示し、葉緑体ゲノムはトールフェスク由来である可能性が高いと考えられた。ミトコンドリアは細胞融合により両親間のゲノムで組換えを起こすことを示唆する例が多数知られるが (Beillard *et al.* 1979, Ozias-Akins *et al.* 1987, Tabaeizadeh *et al.* 1987, Asahi *et al.* 1988, San *et al.* 1990, Xu *et al.* 1993)、葉緑体では1つしか知られず、(Medgeysey *et al.* 1985)、体細胞雑種における挙動は保守的であることが知られる。なお、トマトではPEG法により *Lycopersicon pervianum* との間に作出された体細胞雑種は電気融合法により作出されたそれと較べてオルガネラゲノム組成が複雑であることが報告されている (San *et al.* 1990)。一方、バレイショとその野生種 *Solanum brevidens* との組み合わせでは融合法の差異は体細胞雑種のオルガネラDNA組成に影響を及ぼさなかったとしている (Xu *et al.* 1993)。本実験では電気融合法を用いたが、より多彩なオルガネラ組成を持った雑種作出という観点からPEG法も検討する必要があるか

もしれない。また、本実験でcox1をプローブとした場合、両親にない新規のバンドがほとんどの個体でみられ、しかもそのサイズは体細胞雑種間で共通の場合があった (Fig. 10)。このことは細胞融合によるミトコンドリア分子の組み換えが全くランダムにおこるわけではなく、組換わりやすい部位のあることを示唆している。

Ⅲ-3 体細胞雑種からキメラ的に分離した個体の解析

SH1～SH6は栽培期間が1年から2年を越えるにつれて、株の中心部分から明らかに本体とは外観の異なる茎葉が伸長してきた (Fig. 13a)。これらのほとんどはイタリアンライグラスに酷似し出穂開花の後 (Fig. 13b)、通常のイタリアンライグラス (品種ワセアوبا) の花粉により結実した (Fig. 13c)。また、SH5のある個体ではトールフェスクに似て、なおかつより粗剛な茎葉と、上記のイタリアンライグラスに似た部分の両方が出てきた。

1) 材料及び方法

これらの茎葉を分離肥培し、染色体数の調査ならびに核及びオルガネラDNAのサザン解析をⅢ-2に準じて行った。

2) 結果

SH5及びSH6からキメラ状に発生したイタリアンライグラス酷似個体SH5N、SH6Nの根端染色体数は14、18～20本が見いだされ、ミク

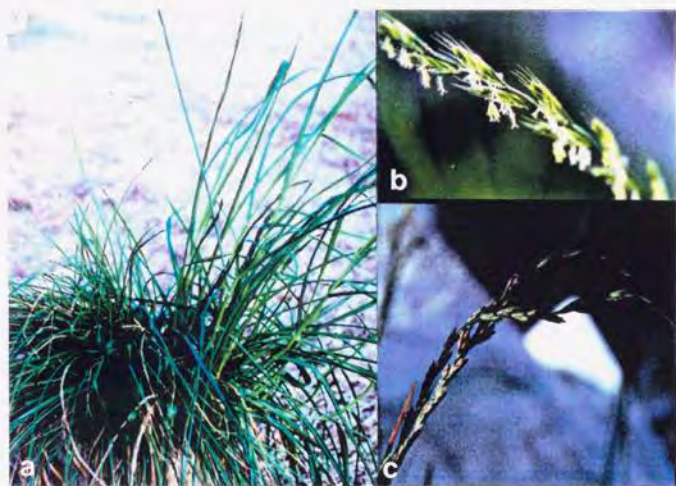


Fig. 13a-c. Chimaerically derived pseudo-Italian ryegrass plant from SH1. a: Morphology of chimaerically unstable SH1 plant (right side of the plant is morphologically similar to Italian ryegrass). b: Inflorescence of the pseudo-Italian ryegrass plant. c: Seeds developing on the plant.

ソブroidと考えられた(Table 18)。また、SH 5、SH 6、SH 5 N、及びSH 6 Nと両親の核DNAのHindIII分解物に対するcox2並びにcox3プローブによるサザン解析の結果をFig. 14に示す。プローブにcox2を用いた場合、もともとSH 5はイタリアンライグラス型、SH 6はトールフェスク型を示していたが、上記に示したような形態の変化に伴いSH 5はトールフェスク型、SH 6はイタリアンライグラス型にそれぞれ変化した。

3) 考察

SH 1～SH 6の5個体は栽培している内に大部分が染色体脱落によると思われるキメラ状の個体の分離を示し、そのほとんどはイタリアンライグラスに酷似し、稔性を示した。SH 5から得られたイタリアンライグラス酷似個体は少なくともトールフェスクのミトコンドリアゲノムを有しており、交雑では極めて得にくい素材と考えられる。また、SH 5からはトールフェスク酷似個体も発生し、やはり稔性を有していた。フェスク類とライグラス類の属間体細胞雑種作出の意義の一つがここに達成されたといえよう。現在これら後代の農業的性質を片親であるイタリアンライグラス品種ワセアオバと比較しているところである。即ち、トールフェスク由来ゲノムの導入によりイタリアンライグラス酷似個体が通常のイタリアンライグラスよりも耐暑性等のストレス耐性を示すことが期待される。

体細胞雑種における体細胞染色体の不安定性、特に片親の染色体が選択的に除去されていく現象はカルス等の培養細胞では多く報告があるが(Kao 1977,

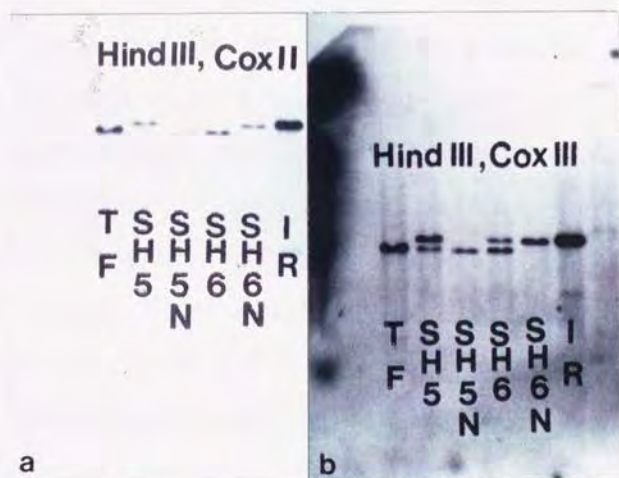


Fig. 14a-b. Southern blot from total DNA (Hind III digested) hybridized to mitochondrial cox2 and cox3 DNA probes. TF=Tall fescue, IR=Italian ryegrass, SH5N and SH6N are chimaerically derived pseudo-Italian ryegrass shoots from SH5 and SH6, respectively.

Wetter and Kao 1980、Chien *et al.* 1982、Niizeki and Saito 1989)、再分化した体細胞雑種が鉢上げの後相当年月を経てから染色体を脱落して表現型を変えることを明らかにしたのは本研究が初めてである。一方、デュラム小麦の葉鞘由来カルスからの再分化個体において穂の体細胞染色体数を調べた報告では出穂までのかなり長い間様々な数の体細胞染色体が見いだされたが、開花が近づくにつれて正常染色体数の割合が増えてゆき、その後代はすべて正常な染色体数を示したという(Lupi *et al.* 1981)。培養細胞由来再分化個体では、再分化が必ずしも単一の細胞からおきるとは限らないので、培養時にみられた異常な染色体数が再分化後も体内に残り続けることが考えられる。そして、栄養生長から生殖生長へ移る際に異常な染色体を持つ細胞は淘汰されていくのではないかと考えられる。本実験においても、キメラ的に表現型を変えた個体はすべて春化を経た個体であったので、上記のようなデュラム小麦におけるのと同様な現象がおきたのかもしれない。

即ち、体細胞雑種は再分化の時点で有していた様々な染色体数の細胞を再分化後も内包しており、春化を受けることにより本来の片親の染色体数に近い細胞群が優勢となって分離したことが考えられる。従って遠縁雑種カルスにおける片親の染色体の脱落とは意味合いを異にする。これら表現型の変化を示した個体がこれ以上変化を示さないのかどうか、さらに後から再分化したSHa～SHjもこのような染色体の不安定性を示すかどうか追跡する必要がある。また、ミクソプロイドを示した18-20本の染色体はトールフェスクの染色体が脱

落してゆき、イタリアンライグラスの14本とトールフェスクの一部の染色体が残ったのか、あるいはもともとの体細胞雑種に14本以上のイタリアンライグラスの染色体があつてそれが残ったのかどうかを明らかにするために、トールフェスクまたはイタリアンライグラス特異的DNA配列 (Perez-Vicente *et al.* 1992) を用いた *in situ hybridization* を行うのが極めて有効であると思われる。

IV 形質転換植物の作出

前章(III)において細胞融合によるトールフェスクとイタリアンライグラスの体細胞雑種を作出する事に成功した。さらに、そこからキメラ状に発生した個体は片親に酷似したもののもう一方の親のゲノムを有しており、なおかつ稔性があり新育種素材としての可能性が期待される。しかしながら、初めに作出された体細胞雑種は稔性がなく、牧草のような種子繁殖性の作物の場合は問題となる。一方、遺伝子導入法による形質転換体では有用遺伝子のみを既存の優良個体に導入することが出来るので、両親のゲノム間の不親和による不稔は回避できる。双子葉植物における遺伝子導入は、多くの植物でアグロバクテリウム感染による方法が既に確立されているが、イネ科植物ではアグロバクテリウムの感染が困難なため、PEG法や電気穿孔法によるプロトプラストへの直接遺伝子導入ならびにパーティクルガンによる培養細胞や生長点への直接撃ち込みが有望である(Potrykus 1990)。形質転換植物を得るためには、形質転換体を多くの非形質転換体から効率よく選抜するためにマーカーとして各種抗生物質等に対する耐性遺伝子を用いるのが普通である。このマーカーそのものが有用遺伝子(例、除草剤耐性遺伝子)である場合もあるが、普通は他の有用遺伝子と組み合わせる。マーカーには抗生物質としてカナマイシン、ハイグロマイシン等、及び除草剤の一種フォスフィノスリシン(グルタミンシンターゼを阻害し、細胞中にアンモニアを蓄積させることにより植物を枯死させる)等が

用いられている。一方、組換え植物を将来実用品種として利用する場合にはこれら薬剤耐性遺伝子が導入されていない方が望ましいという意見と、これらの耐性遺伝子は食品として考えても安全であるという意見 (Napet *et al.* 1992) の2つがある。

本章においてはトールフェスク育種における組換えDNA技術の実用化を目指して、薬剤耐性遺伝子をマーカーとしたプロトプラストへの直接遺伝子導入による形質転換植物の作出、ならびにパーティクルガンによる遺伝子の一過性発現の確認を行った。

Ⅳ-1 ハイグロマイシン及びフォスフィノスリシンの濃度がプロトプラスト由来コロニーの生育に及ぼす影響

マーカー遺伝子による選抜を旨とした形質転換を行うに当たってはまず、各種マーカー物質に対して非形質転換体がどの程度の耐性を示すかを調べ、選抜に適当な濃度を決定する必要がある。

1) 材料及び方法

Ⅱ-2 で確立したプロトプラスト培養系 (品種ヤマナミ) を用い、プロトプラスト単離培養10-14日後にナース細胞を除去し、新鮮培地とともにハイグロマイシンまたはフォスフィノスリシンが所定の濃度となるように添加した。なお、フォスフィノスリシンは培地にグルタミンがあるとその効果が減少する

ので、フォスフィノスリシンを添加した場合はA A培地のグルタミンをアスパラギンに置換した培地（改変A A培地）を用いた。培養約1ヶ月後にコロニーの形成数を比較した。また、MSホルモンフリー培地にハイグロマイシンを所定濃度となるよう添加し、無菌発芽させたトールフェスク幼苗の生育に対する影響も調べた。

2) 結果及び考察

Fig. 15に示すようにトールフェスク・プロトプラスト由来コロニーの生育を完全に抑えるにはハイグロマイシンの濃度は200mg/l必要であった。また、無菌幼苗に対しても同様の結果が得られた（Fig. 16）。

Fig. 17にトールフェスク・プロトプラスト由来コロニーの生育に及ぼすフォスフィノスリシンの濃度の影響を示した。フォスフィノスリシン濃度50mg/l以上ではコロニーの生成がみられなかった。しかし、対照区のコロニー数は50個と少なく、培地の変更による悪影響がみられた。

一般にイネ科作物は抗生物質等に対して内在的耐性が高いとされており、トールフェスクにおいても同様であった。ハイグロマイシンをマーカーとする場合、選抜のための濃度は200mg/l以上必要であろう。フォスフィノスリシンをマーカーとして用いる場合、改変A A培地では生育が阻害されたのでグルタミンを含まないさらに適当な培地を探索する必要がある。

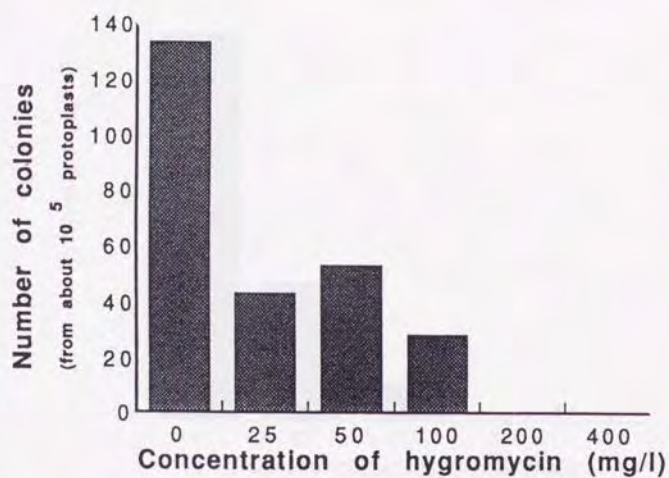


Fig. 15. Dose response of tall fescue protoplasts to hygromycin.

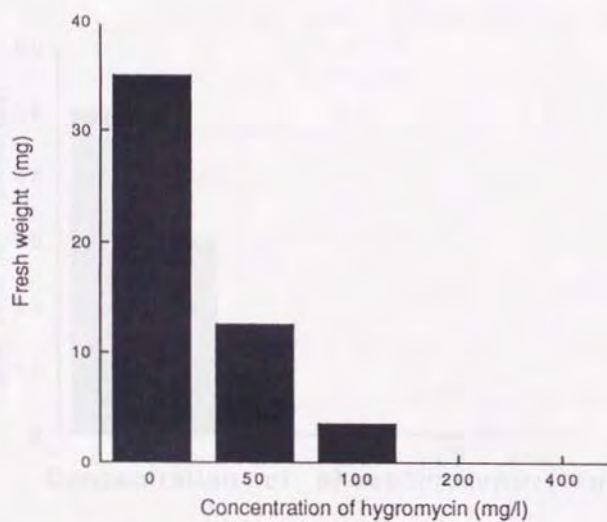


Fig. 16. Dose response of tall fescue seedlings to hygromycin.

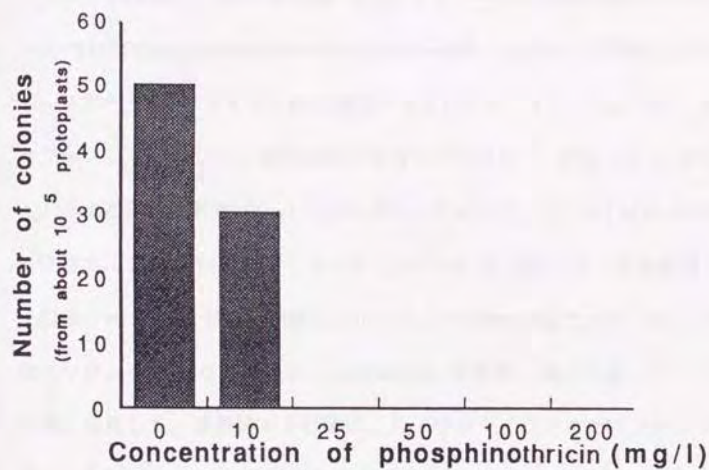


Fig. 17. Dose response of tall fescue protoplasts to phosphinothricin.

Ⅳ-2 ハイグロマイシン及びフォスフィノスリシン耐性遺伝子のプロトプラストへの直接遺伝子導入

1) 材料及び方法

Ⅱ-2の方法により作出したプロトプラスト培養系を用い、PEG法 (Negrutiu *et al.* 1987)により直接遺伝子導入を行った。即ち、単離したプロトプラスト 10^6 個を0.5mlの緩衝液 {0.6Mマニトール+15mM塩化マグネシウム+0.1%MES(Morpholinoethanesulphonic acid)、pH5.6} に懸濁し、DNA (pGL2=ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド [Fig. 18]、pDHBar=フォスフィノスリシン耐性遺伝子を含むプラスミド [Fig. 19]) 溶液(10 μ g/30 μ l)とPEG溶液300 μ l {40% ポリエチレングリコール (MW. 6000)+0.1 M硝酸カルシウム+0.4Mマニトール、pH 7-9} を添加し15分間静置した。その後、W5溶液 (154mM塩化ナトリウム+125mM塩化カルシウム+5mM塩化カリウム+5mMグルコース、pH5.6-6.0) で希釈・遠心の後、Ⅱ-2の時と同様に培養した。培養約10日後に、ハイグロマイシンまたはフォスフィノスリシンを25-200mg/lの濃度になるよう与えた。なお、フォスフィノスリシン耐性遺伝子を導入した場合は改変AA培地だけでなく、Li and MuraiのGeneral培地(1990)にAA培地のグルタミン以外の3種のアミノ酸を添加したものをを用い、洗浄液についての検討も行った。1ヶ月後に増殖するコロニーを引き続き抗生物質等を含む選抜培地 (MSSSD1P)で培養した後、再分化培地(MSY)に移した。

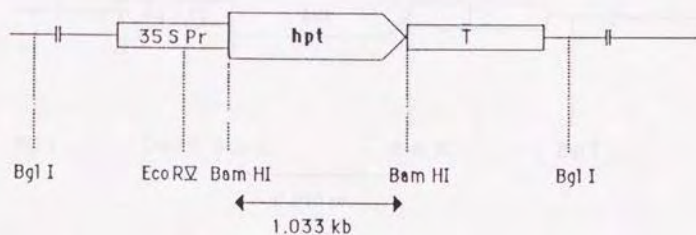


Fig. 18. Plasmid pGL2 used for transformation of tall fescue.

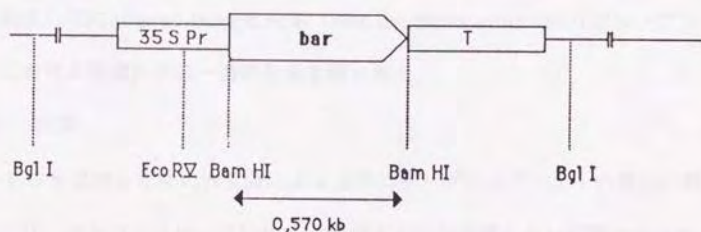


Fig. 19. Plasmid pDHbar used for transformation of tall fescue.

再分化個体についてサザンハイブリダイゼーション法で導入遺伝子の確認を行った。即ち、約10 μ gの全DNAをBamHIで分解した後、ハイグロマイシンまたはフォスフィノスリシン耐性遺伝子を含む領域をもとのDNAから切り出したものをプローブとして、DIG法によりアイソトープを使わないサザンハイブリダイゼーションを行った。

また、遺伝子の導入が行われているかどうかを短時間で確かめるために transient assay も行った。即ち PEG 処理したプロトプラストを一部液体培養して 48 時間後に粉碎・抽出し、ハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ (hpt) 及びフォスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (pat) の活性を測定して (Cabanès-Bastos *et al.* 1989, De Block *et al.* 1987) プロトプラストにおける両遺伝子の一過的発現を確かめた。

2) 結果

PEG を添加した後の W5 液による洗浄によりプロトプラストの激しい凝集がおこり、アガロースビーズに均一に包埋するのが困難となり問題であった。そこで洗浄液を W5 ではなく PEG 添加直前に懸濁した緩衝液に替えたところ、凝集は少なくなったがプロトプラストの分裂率が大きく下がった (Fig. 20)。おそらく凝集の主な原因は懸濁液のイオン組成の急激な変化によると思われるので、プロトプラスト単離の際の酵素液の浸透圧の調整をマニトールではなく W5 により作成したところ、凝集も少なくなり分裂も安定した。また Li *et al.* の Inorganic 培地 (General 培地) は、W5 液を洗浄液とした場合は、AA 培地

に及ばなかったものの、かなり高いコロニー形成率が得られた(Fig. 20)。

数回の実験を行ったが、pGL2で形質転換してハイグロマイシン200mg/lで選抜し、再分化したものの中からヤマナミで1系統、ホクリョウで2系統ハイグロマイシン耐性遺伝子の組込みが確認された(Fig. 21)。なお100mg/l以下で選抜したものはすべてエスケープであった。ハイグロマイシン耐性形質転換個体は春化の後出穂したが、通常ヤマナミの個体の花粉を授粉しても不稔であった。フォスフィノスリシンについても200mg/lで選抜したもの1個体が再分化したが、生育がきわめて遅く、まだサザン実験を実施するに到っていない。

プロトプラストにおける一過的発現はhpt、patともに確認できた(Fig. 22 a-b)。Hptの発現においては、牛胸腺DNAの効果を試したが、発現の強さは対照区とほとんど変わらなかった。また、非形質転換区のプロトプラストもかなりのバックグラウンドを示した。

3) 考察

イネ科牧草において形質転換体を得たのはオーチャードグラス (Horn et al. 1988b)に続いてこれが2番目である。プロトプラストへの直接遺伝子導入を行う場合、PEG法と電気穿孔法の2つがあるが、一過的発現による条件検討のより容易な後者がより多く用いられているようである。しかしながら、実際に形質転換個体を得ようとする場合、両方法の間に大きな差はないとする報告もある (Negrutiu et al. 1990)。オーチャードグラスの場合、ポリエチレングリコールと電気穿孔法を併用しており、そのような併用法もみられる。

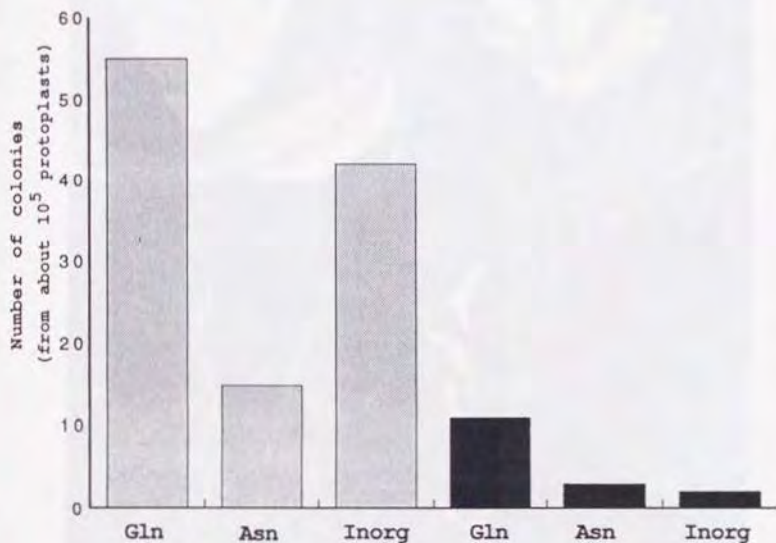


Fig. 20. Effects of washing solution and media on colony formation from PEG-treated protoplasts of tall fescue.

Gln=Normal AA medium, Asp=Medium in which asparagine is used instead of glutamine, Inorg=Medium which contains no amino acids (Li and Murai 1990)

Light gray bar = W5 is used as a washing solution

Black bar = Transformation buffer is used as a washing solution

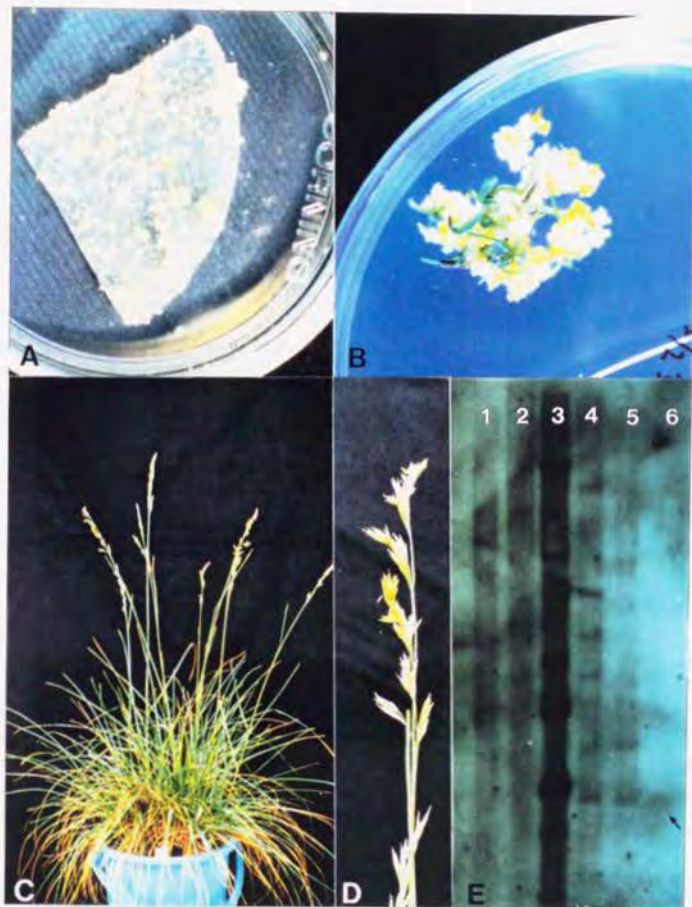


Fig. 21a-e. Regeneration of transgenic tall fescue plants from PEG-treated protoplasts transformed by pGL2. a: Colony developing on selection medium, b: Plant regeneration from protoplast-derived colonies, c-d: Mature transgenic tall fescue plants. e: Southern analysis of transgenic tall fescue plants. 1=control plant, 2=escape, 3=transgenic 'Yamanami' tall fescue plants, 4-5=transgenic 'Hokuryo' tall fescue plants, 6=BamHI fragment of pGL2 (1.033kb, indicated by arrow).

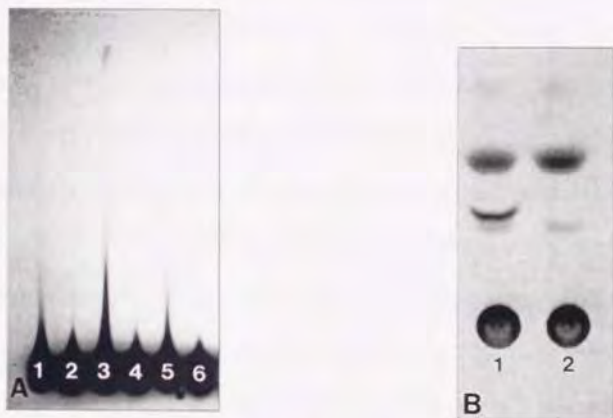


Fig. 22a-b. Transient assays after direct gene transfer to tall fescue protoplasts. a: Hpt assay after protoplast transformation with plasmid pGL2. Direct gene transfer to tall fescue protoplasts was performed without plasmid (1,2); with pGL2 alone (3,4) and with calf thymus DNA (5,6). b: Pat assay after protoplast transformation with plasmid pDHbar. Lanes: (1) pDHbar, and (2) control calf-thymus DNA alone, were used for direct gene transfer. Assay was performed 48 hours after protoplast transformation.

オーチャードグラスでも、本実験と同様ハイグロマイシン耐性遺伝子とカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモータをつないだ類似のコンストラクトが用いられたが、選抜時のハイグロマイシン濃度が25ppmと低かったためか、多くのエスケープが得られたと報告されている(Horn *et al.* 1988b)。本研究のように選抜圧を高くすればエスケープの発生は抑止できるであろうが、一部でいわれているように35Sプロモータがイネ科植物であまり強く働いていないとすれば、それだけ形質転換頻度が下がることになるので、より効果的なマーカの探索や導入細胞における遺伝子の発現を高めるためのより強力なプロモーターの利用が必要であろう。また、35Sプロモータを用いる場合でもトウモロコシadh1のイントロンを挿入することにより発現効率を高めることが出来た例もあり(Kyozuka *et al.* 1990)、新たなプロモータの単離だけではなく既存のプロモータの改良も必要である。また、コムギに感染するジェミニウィルス由来のベクターを用いることによりイネ科のベントグラスできわめて高頻度で形質転換個体が得られたという報告もあり(浅野と宇垣1992)、ベクター自身の選択も考えられる。Hptの一過性発現をみた実験で、形質転換していない対照区でかなりのhpt活性が見られたこと、及びIV-1の結果から、トールフェスクはハイグロマイシンに対して相当に耐性であるといえる。従って、ハイグロマイシンの濃度を高くしてなおかつ高頻度で形質転換体を得るためには、このように一層の耐性遺伝子の発現が求められる。

形質転換植物を品種として実用化することを考えた場合、薬剤耐性遺伝子由

来のDNAが組み込まれていると、食品としての安全上問題だという意見もある。そこで抗生物質等の選抜をかけずに植物体をすべて再分化させ、あとから β -glucuronidase (GUS) やLuciferase遺伝子のようなレポーター遺伝子により形質転換体をスクリーニングする戦略も考えられる (Zhang *et al.* 1991)。

Congerらのオーチャードグラスを用いた例ではその後、後代にハイグロマイシン耐性が遺伝したという報告はない。再分化個体に稔性がなかったのか、それともあっても遺伝しなかったのかは不明であるが、彼らは最近パーティクルガンによる直接遺伝子導入に着手しており、プロトプラストからの植物再分化の再現性に問題があるのかも知れない (Conger *et al.* 1993)。形質転換個体を育種素材として利用する場合にも、体細胞雑種の利用と同様、稔性の獲得は最重要課題である。本実験における形質転換個体は1年目は春化处理したが、出穂しなかった。2年目は出穂したが雄性、雌性ともに稔性がなかった。同時期に行った遺伝子導入処理をしていない対照区のプロトプラスト由来再分化個体は1年目より出穂・稔実したことから、導入遺伝子なんらかの悪影響を与えていることが考えられる。直接遺伝子導入法は外来遺伝子の入り方がランダムであり既存の遺伝子領域に割り込む形で挿入されてその遺伝子を不活性化するという可能性が高い。本研究においても、プラスミドの断片がゲノムの複数カ所に組み込まれていることがサザン解析のデータからわかった。今後はより多くの形質転換個体を得て、外来遺伝子が少ないコピー数できれいに導入されたものを選抜して行くことが必要となるだろう。

Ⅳ-3 シャトルベクターによるプロトプラストへの直接遺伝子導入

シャトルベクターは植物細胞内でも大腸菌内でも増殖する新たなベクターで Ugaki *et al.* (1991)によって開発された。植物プロトプラストの中で数百コピーに複製し外来遺伝子を効率よく発現させることができ、通常のベクターに比べ染色体へ組み込まれる頻度も1.0-10.0倍も高いという(宇垣ら1993)。そこで、本節ではトールフェスクプロトプラストへの効果的な直接遺伝子導入をめざして、シャトルベクターを用いた実験を行うことにした。

1) 材料及び方法

ナンリョウ(N13)の茎頂由来カルスから液体培養細胞系を誘導し、前節と同様の方法により直接遺伝子導入を行った。用いたベクターはコムギのジェミニウィルス由来シャトルベクターで、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ(NPTⅡ)遺伝子をコードしたpWI-K6 (Fig. 23) 及び対照として通常のプラスミドPUC19に同様の遺伝子を組み込んだpFF10Ka (Fig. 24)を用いた。選抜にはG418(ジェネテシン硫酸塩)を2.5または5.0 mg/lで用いた。

2) 結果

プロトプラストへの直接遺伝子導入後、2.5 mg/lで選抜した場合のコロニーの増殖程度を (Fig. 25) に示す。pWI-K6で形質転換した場合はpFF10Kaを用いた場合よりもはるかに多くの耐性コロニーが得られた。即ち直接遺伝子導入による形質転換においてシャトルベクターの使用は極めて有効と考えられ

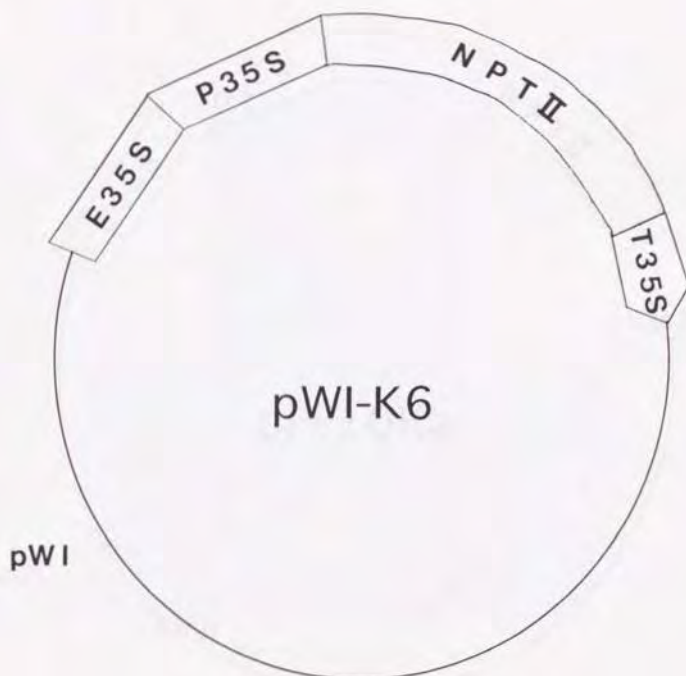


Fig. 23. Shuttle vector pWI-K6 used for transformation of tall fescue. E35S=Cauliflower mosaic virus 35S enhancer, P35S=Cauliflower mosaic virus 35S promoter, NPT II = Neomycin phosphotransferase gene, T35S=Cauliflower mosaic virus 35S terminator, pWI=Wheat dwarf virus based shuttle vector (Ugaki et al. 1991).

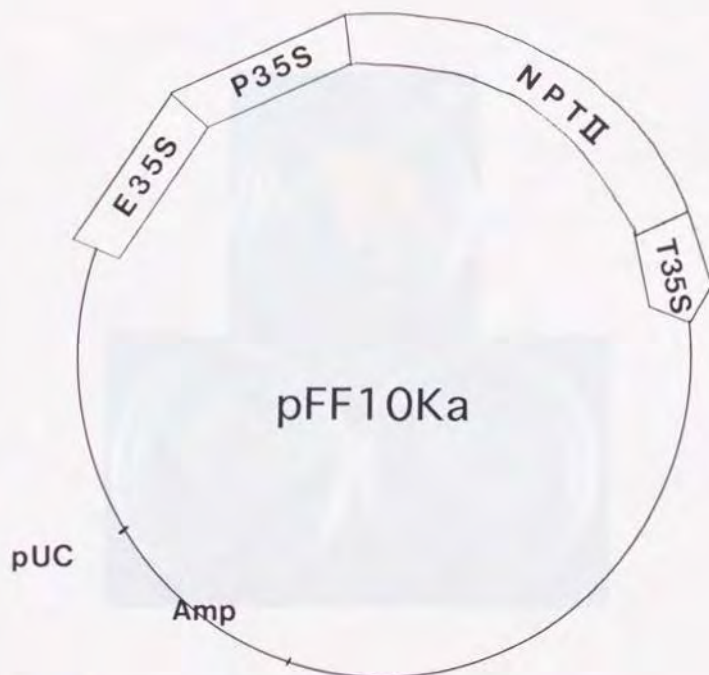


Fig. 24. Plasmid pFF10Ka used for transformation of tall fescue.
 E35S=Cauliflower mosaic virus 35S enhancer, P35S=Cauliflower mosaic
 virus 35S promoter, NPT II = Neomycin phosphotransferase gene,
 T35S=Cauliflower mosaic virus 35S terminator, pUC=pUC19,
 Amp=ampicillin resistant gene

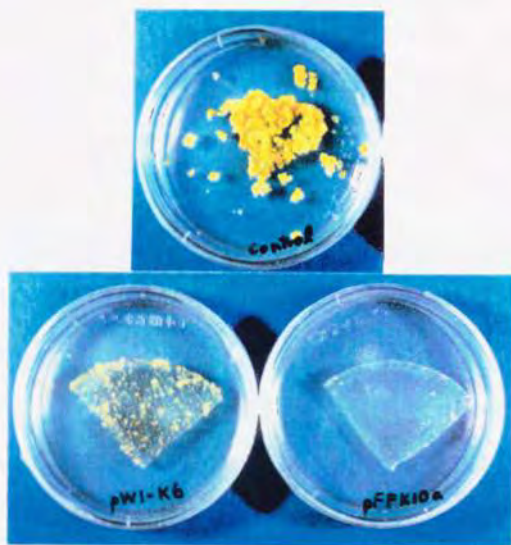


Fig. 25. Colony formation from PEG-treated tall fescue protoplasts transformed by pFFK10a and pWI-K6.

る。なお、G418の濃度を50 mg/lとした場合はpWI-K6を用いた場合もコロニーの生成数が大幅に減少した。そこでG418の濃度は25 mg/lで充分と考えられた。これらの耐性コロニーはコロニー増殖培地、再分化培地をへて緑植物体に再分化し、現在までに8個体が鉢上げされた。これらの再分化個体は前節のpGL2によるハイグロマイシン耐性形質転換個体に比べて旺盛な生育を示している(Fig. 26)。

3) 考察

シャトルベクターはコムギのジェミニウィルス由来のベクターで、植物細胞内で自立的に増殖するので遺伝子の導入効率・発現程度が極めて高い(Ugaki *et al.* 1991)。シャトルベクターを用いて実際に植物を再分化させた報告はこれまでのところ、ベントグラス(浅野・宇垣1992)のみであるが、その実験においても類似の遺伝子(pWI-H5K)が用いられている。pWI-K6とpWI-H5Kの違いは、そのサイズの差である。即ちpWI-H5Kは大腸菌での選抜に必要なマーカーはハイグロマイシン耐性遺伝子を、植物でのマーカー遺伝子はNPT II遺伝子を用いているが、pWI-K6は大腸菌での選抜に必要なマーカー遺伝子と植物での発現に必要なマーカー遺伝子を同じNPT II遺伝子で兼ねており、全体のサイズが4Kb強とかなり小さい。従って、まだまだ本ベクター内にさらに各種有用遺伝子を組み込むことが可能である。直接遺伝子導入法においては、ひとつのプラスミドにサイズの大きなDNAを組み込むと、DNA全体が損なわれずに正しく導入される可能性が低くなるので、いわゆるco-transformationが広く行われ



Fig. 26. G418 resistant tall fescue plants (indicated by arrow) recovered from protoplasts transformed by pWI-K6.

る(Schocher *et al.* 1986, Shimamoto *et al.* 1989, Tada *et al.* 1990)。しかし、co-transformationではマーカー遺伝子で選抜するしかないので、運良く有用遺伝子も導入された個体を得られる確率は種や実験によってまちまちであり、予備実験を行った方が望ましい。サイズの小さいひとつのプラスミドにマーカー遺伝子と有用遺伝子を組み込めれば、この問題は解決するだろう。

イネにおける形質転換実験では、カナマイシンよりもハイグロマイシンの方が効果的に形質転換体を選抜できることや、再分化に関してもアルビノの発生が少ないので優れているといわれている(島本1989)。しかしながら、カナマイシンの類似体でより強力な作用スペクトルを持つG418を用いることによりイネ科作物でもハイグロマイシンより確かな選抜を行えたとする報告もある(Potrykus *et al.* 1985, Asano and Ugaki 1994)。実際、本研究でもG418を用いた場合は50 mg/lでは完全にコロニーの形成が抑えられたことからハイグロマイシンの場合(200 mg/l)よりも低濃度(ハイグロマイシンの分子量=528, G418=629, 従ってmol比で比べても大きな差はない)で選抜が可能であった。Asano and Ugaki (1994) はベントグラスにおいてG418による選抜の濃度として20mg/lを採用している。

Ⅳ-4 パーティクルガンによる液体培養細胞への直接遺伝子導入

プロトプラストからの再分化個体には稔性の低いものなど劣悪な変異が出易いことは既に述べた。プロトプラストを利用した直接遺伝子導入においても当然このことは問題となる。一方、近年パーティクルガンにより組織や培養細胞に直接DNAを撃ち込む遺伝子導入法が開発された (Sanford *et al.* 1987)。この方法により *Agrobacterium* の感染・再分化やプロトプラスト培養が困難な重要作物で形質転換体が得られ (McCabe *et al.* 1988, Walters *et al.* 1992, Vasil *et al.* 1992)、しかもそれらは稔性を有していた。トールフェスクでは前節までの結果及び他の例 (Ha *et al.* 1992) が示すようにプロトプラストへの直接遺伝子導入により形質転換体が得られることは示されたが、形質転換体の稔性に関してはいまだ肯定的な報告がない。このことは、さまざまな原因が考えられるが、プロトプラスト由来植物における稔性の低さが関わっていることは否めないであろう。パーティクルガンによる直接遺伝子導入は、培養期間の短い材料を用いることができるので培養が長期間にわたることによる悪影響を除去することができる。また、パーティクルガンによればGUS 遺伝子等により、導入遺伝子の発現効率を一過的に調べるためのいわゆる transient assay をプロトプラストを用いた場合よりもさらに簡便に行うことができる点でも優れた実験系となりうる。

本節では、将来トールフェスクにおいてできるだけ劣悪な体細胞変異のない

形質転換体を得ることを最終目的として、まず液体培養細胞を用いたtransient assayを実施し、その後stable transformation実験を行った。

1) 材料と方法

(1) Transient assay

イネ科牧草各種液体培養細胞：トールフェスク（品種フォーン、ヤマナミ）、イタリアンライグラス（品種ゴルカ・ノロドヴァ）及びメドウフェスク（品種トレダー）の完熟種子由来カルスからR 2 A A培地（R 2 培地にA A培地のアミノ酸並びにB 5 培地のビタミンを加えた培地、ホルモン及び糖組成はII-1-1）-（4）の改変A A培地に同じ）により液体培養を開始した。

DNA：レポーター遺伝子として広く用いられているGUS遺伝子を各種プロモーターに連結したDNAを液体培養細胞に撃ち込み、2日後にX-glucにより染色して青色点を数えることによりプロモーター活性の強さを比較した。撃ち込みはBIO-RAD社のPDS-1000/Heを用い、MS固形培地の入った直径9cmのベトリディッシュ上に濾紙上に集めた液体培養細胞を置いて行った。DNAの金またはタングステン粒子へのコーティングは金属粒子3mgを50 μ lの50%グリセロール液に懸濁し、そこに5 μ gのDNA、50 μ lの2.5M塩化カルシウム及び20 μ lの0.1Mスベルミジンを加えて2、3分激しくしんとうすることによって行った。DNAをコーティングした金属粒子は最終的に50 μ lの100%エタノールに懸濁し、6 μ lずつをマクロキャリアーに塗布し、撃ち込みの材料とした。また、形質転換の効率を向上させるために、PBC-1を用いて撃ち込みの圧力等各種バ

ラメータの検討も行った。

(2) Stable transformation

PBC-1を導入処理したフオーン液体培養細胞を処理一週間後にハイグロマイシン200ppmを含むMS培地に置床し、形質転換細胞を選抜しようとした。

2) 結果

(1) Transient assay

パーティクルガンによる実験には多量の液体培養細胞を用いるので培地の調製に手間がかかる。そこで、従来用いた濾過滅菌AA培地の代わりにR2培地にAA培地のアミノ酸を加え、オートクレーブ滅菌したR2AA培地を試したところ、良好な生育がみられたので今後トールフェスクの液体培養にはR2AA培地を用いることとした。

① 撃ち込みの圧力が青色点の発現に及ぼす影響

DNAとしてPBC-1を用い、撃ち込み圧を900、1100、1300psiの3段階に変えて青色点の発現を調べたところ、1300psiの場合に最も青色点の発現が多かった (Table 20)。

② 撃ち込みに用いる金属の種類が青色点の発現に及ぼす影響

撃ち込みの際の粒子として用いる金属について金とタングステンで青色点の発現に及ぼす影響を比較したところ、タングステンの方が高い発現が得られた (Table 21)。

Table 20. Effect of bombardment pressure on the transient GUS expression in tall fescue suspension cultured cells (PBC-1 was used)

Pressure (psi)	900	1100	1300
Number of blue spot \pm S.E.	29.8 \pm 15.9	22.5 \pm 9.3	160.7 \pm 20.9

Table 21. Effect of kind of microcarrier on the transient GUS expression in tall fescue suspension cultured cells (PBC-1 was used, 1100psi)

Kind of microcarrier	Gold	Tungsten
Number of blue spot \pm S.E.	12.5 \pm 4.9	28.7 \pm 12.4

③ 培養細胞の継代日数が青色点の発現に及ぼす影響

培養細胞の継代後の日数を1～3日で青色点の発現を比べたところ、2日目
が最も高い発現が得られた (Table 22)。

④ 各種イネ科牧草培養細胞におけるGUS遺伝子の発現の差異

トールフェスク、イタリアンライグラス及びメドウフェスク培養細胞にお
けるGUS遺伝子の発現を比べたところ、トールフェスクにおいて最も高い発現が
示された (Table 23)。

⑤ 各種プロモータが青色点の発現に及ぼす影響

PBI-221, PBC-1, PWI-GUS, PAct-1D, PREX-GUS, PREX ϕ GUSの各種
DNAコンストラクト (Fig. 27)を用い、GUSによる青色点の発現量の多少を比
べた結果、最も高い発現がみられたのはPWI-GUSであった (Table 24、
Fig. 28)。対照として用いたPBI-221は最も低い発現しか示さなかった。

(2) Stable transformation

PBC-1により遺伝子導入処理したトールフェスク細胞をハイグロマイシンを
200ppm含む培地で継代培養したが、非形質転換細胞と思われる細胞も生長を
続け、明らかな耐性細胞は得られなかった。

3) 考察

上記のように、GUS遺伝子をレポーター遺伝子としてトールフェスク液体
培養細胞における一過性の発現をパーティクルガンによる撃ち込みで確認する
ことができた。この結果から、パーティクルガンによる形質転換体作出の可能

Table 22. Effect of period after subculture on the transient GUS expression in tall fescue suspension cultured cells (PBC-1 was used, 1100psi)

Days after subculture	1	2	3
Number of blue spot \pm S.E.	78 \pm 33.2	133.8 \pm 39.3	56.8 \pm 33.1

Table 23. Effect of species on the transient GUS expression in suspension cultured cells (PBC-1 was used, 1100psi).

Species	Tall fescue	Meadow fescue	Italian ryegrass
Number of blue spot \pm S.E.	104.7 \pm 15.5	1.7 \pm 0.3	8.0 \pm 1.8

PBI221 -----[P35S][----GUS----][Nos-T]-----

PBC1 -[Adh1][IAdh1][--GUS--][Nos-T][P35S][IAdh1][-hph-][Nos-T]-

pWI-GUS -[PWDV][--NPT II--][35S-T]-[E35S][P35S][--GUS--][35S-T]-

pAct1-D -----[PAct1][----GUS----][Nos-T]-----

pREX-GUS ----[P35S][I_{Phaseolin}][--GUS--][Nos-T]-----

pREX ϕ GUS--[P35S][ϕ][I_{Phaseolin}][--GUS--][Nos-T]---

Fig. 27. Various DNA constructs carrying GUS gene used for particle bombardment to tall fescue suspension cultured cells.

P35S=Cauliflower mosaic virus 35S promoter, GUS=Coding region of *E. coli* β -glucuronidase gene, Nos-T=Polyadenylation site of nopaline synthase gene, Adh1=Maize alcohol dehydrogenase promoter, IAdh1=Its intron, PWDV=Wheat dwarf virus promoter, E35S=Cauliflower mosaic virus 35S enhancer, 35S-T=Cauliflower mosaic virus 35S terminator, PAct1=Rice act1 5' region, I Phaseolin=Phaseolin intron, ϕ =90bp of RSV leader sequences.

Table 24. Effect of various DNA constructs on transient GUS expression in tall fescue suspension cultured cells (1300 psi)

DNA	pBI221	pBC1	pWI-GUS	pAct1-D	pREX-GUS	pREX ϕ GUS
Number of blue spot \pm S.E.	37.5 \pm 5.2	34.1 \pm 12.9	187.2 \pm 103.3	104.5 \pm 60.4	154.2 \pm 76.2	170.5 \pm 68.4

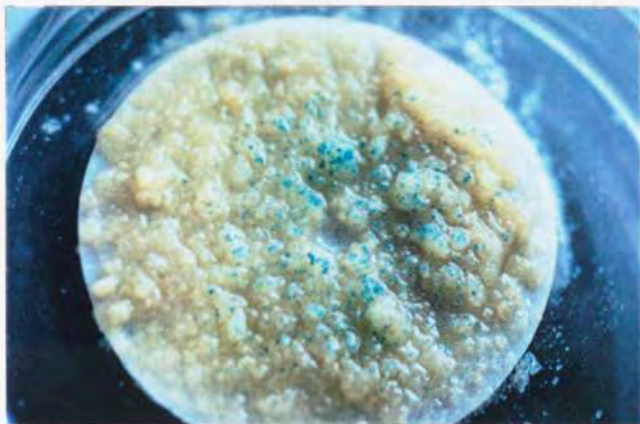


Fig. 28. Blue spot observed on suspension cultured cells of tall fescue bombarded by pWI-GUS.

性がトールフェスクでも強く示された。各種コンストラクトの比較実験の結果より、PBI-221の持つカリフラワーモザイクウイルス35SプロモータだけではGUS遺伝子の発現が不十分であることが解った(Table 24)。PWI-GUSはコムギジェミニウイルスを利用した細胞内で自立的に増殖するいわゆるシャトルベクターであり、おそらくそれが高発現に役立っていると考えられる。また、PREX-GUS及びPREX ϕ GUSは35Sプロモータの働きを強めるためにイントロンやリーダーシーケンスが挿入されており、イネのプロトプラストを利用したトランジェントアッセイ系でもその有効性がすでに証明されている(広近ら、未発表)。しかしながら、PREX ϕ GUSで形質転換したイネは稔性に問題があるという報告もあり(大槻、私信)、前節で得られたシャトルベクターによるG418耐性個体のサザン解析及び稔性を早急に調べる必要がある。なお、Transient assayにおいては一処理6反復を用いたが、それでも反復間で大きなばらつきが見られた。このことの最大の原因は、マクロキャリアーにDNAをコーティングした金属懸濁液を塗布する際に、均一に行うのが困難なためと思われる。すべて機械で行えるかのようにみえたパーティクルガンも人為的なばらつきを生じる部分があった。また、Table 22にみられるように培養細胞の継代からの日数により発現が異なったが、同じ日に継代した同じ状態の培養細胞を6反復分集めるのもかなり大変なことであった。

本実験ではハイグロマイシン耐性遺伝子を持ったpBC-1を撃ち込んだ液体培養細胞を、ハイグロマイシンを含む固形培地に置いて選抜して形質転換体を得

ようとしたが、エスケープが多すぎて形質転換体を得ることはできなかった。その原因としては、撃ち込みを行った培養細胞の直径が大きすぎてそもそもハイグロマイシンによる選抜がうまく効いていない可能性が疑われた。また、プロトプラスト由来コロニーの選抜の時と異なり、抗生物質の入った培地に対する培養細胞の量比が大きすぎることも選抜の効かなかった原因の一つと考えられる。今後は、より細かな細胞塊よりなり、なおかつ再分化能を維持した液体培養細胞を作出し、できるだけ薄く広げてならべて培地からの抗生物質による選抜が効きやすいようにする必要がある。

V 総合考察

組織培養の新しい技術である細胞融合及び形質転換は従来の方法では作出しえない新たな育種素材の作出方法として期待されている。本研究の最終目的は細胞融合ならびに形質転換技術を用いて重要な寒地型イネ科牧草ならびに緑化植物であるトールフェスクの有用育種素材を作出することである。前章までにそのためのカルス、液体培養細胞そしてプロトプラストからの再分化系の作出を図り、それを利用してイタリアンライグラスプロトプラストとの細胞融合を行い、体細胞雑種を得た。さらに、プロトプラストへの直接遺伝子導入による形質転換体作出し、また液体培養細胞へのパーティクルガンによる直接遺伝子導入も行った。以上、明らかになった事実をもとに総合的、特に育種利用に重点をおいて考察し、得られた結論と今後の問題点について言及したい。

1. プロトプラスト培養系の確立と再分化個体における有用変異

細胞融合や形質転換を行い体細胞雑種植物や形質転換植物を得るにはプロトプラストからの再分化系が確立されていることが大前提となる。そこで、本章においてはトールフェスクのプロトプラストからの再分化系確立が一つの重要な課題であったが、イネ科植物では唯一の例外(Gupta and Pattanayak 1993)を除き、葉肉等インタクトな組織由来のプロトプラストからはコロニー形成までしかみられず(Potrykus *et al.* 1977)、植物体の再分化は報告されていない。即ち、いわゆるembryogenicカルスから単離したプロトプラストを培養するこ

とにより初めて植物体再分化が可能であり(Vasil and Vasil 1980)、培養法の重要さもさることながらプロトプラスト単離のもととなるカルス細胞の素質が成功に関する大きな要因となっている。本研究では植物体まで再分化可能なプロトプラストが単離できるembryogenicカルスを未熟胚、完熟種子、茎頂のいずれからも得られたが、今後はより高頻度で得るための培養条件についても検討する必要がある。例えばイネではMS培地よりもN6培地の方がカルス誘導に好適であり、寒天よりもアガロースで培地を固形化した方がembryogenicカルスの出現頻度が高いという(経塚、私信)。またイネ品種コシヒカリは日本晴に比べてカルスが褐変しやすく培養が困難であるといわれているが、培地にグルタミンを加えることにより解決できたという報告もある(神田ら1991)。これらの点についてトールフェスクでも検討することにより、いっそう効率よくembryogenicカルスが得られるようになるであろう。

トールフェスクでは地中海型品種の培養適性の劣ることが明らかとなったが、イネのコシヒカリと日本晴にみられるような顕著な品種間差は北ヨーロッパ型品種群内にはみられなかった。合成品種法で育種されたために品種内に残っている遺伝的多様性が、かえって多くの個体から培養適性の高い遺伝子型を選ぶのに都合よく働くものと思われる。培養適性の高いことと他の農業的形質の間に負の相関がないことも今後確かめていく必要がある。

プロトプラストからの緑植物体再分化は、液体培養細胞の継代期間が3ヶ月を超えると困難となった。embryogenic カルスを液体培地に投入してからすぐ

にはプロトプラストの単離が困難だが、プロトプラストが単離されるようになると急速に再分化能が低下してゆくというジレンマが現在、イネ科作物のプロトプラスト培養の最大の問題点としてあげられる。即ちプロトプラストが単離できるembryogenic液体培養細胞を早く作出するための条件検討をイネ（小沢・石毛1994）と同様トールフェスクにおいても行う必要がある。

カルス、液体培養細胞、及びプロトプラストのいずれからの再分化植物においても様々な変異が観察され、雄性不稔や短稈化など農業的に有用と思われる素材も発見された。これらはプロトプラストからの再分化系を利用した細胞融合や直接遺伝子導入技術を確認する途中のいわば副産物であるが、もし優良なものができればそれ自体で立派な育種素材作出法となる。本実験で得られた雄性不稔個体が、核遺伝子支配の変異によるものか、細胞質遺伝子支配の変異によるものかは今後正常個体との相互交配を行って確かめる必要があるが、トールフェスクでは細胞質雄性不稔が今のところ発見されていないので大変期待される。雄性不稔の利用法としては雑種強勢によるF₁育種がまず第一に挙げられるが、牧草類では合成品種法が主流なのでトウモロコシや多くの野菜ほど利用価値はない。むしろ、最近トールフェスクやオーチャードグラスなどイネ科牧草が野生化したものから飛散する花粉による花粉症公害が問題となっており、この見地から雄性不稔を用いて花粉の飛散しないトールフェスク品種を作出する必要がある。さらに、牧草や緑化植物では種子は収穫対象とならないので、稔性回復遺伝子の必要がなく細胞質雄性不稔の場合、維持系統が見つかりさえ

すれば実用品種作出への道も近いと考えられる。

短稈化した個体については、芝草用トールフェスクの育種素材としての利用も考えられる。即ち現在芝草用として販売されているトールフェスク品種でも、刈り込みを怠ると牧草用と変わらないくらい草丈が伸長する場合があります、トールフェスクの強健性・環境耐性を維持したまま矮化できれば芝草用素材として有望であろう。

2. 細胞融合技術の確立とその育種利用

上記により作出されたプロトプラスト培養系を用い、イタリアンライグラスとプロトプラストの電氣的融合により体細胞雑種を得た。牧草としてみた場合トールフェスクの最大の欠点は家畜の嗜好性が低く、消化率の低い点であり、一方イタリアンライグラスはこれらの点において優れ、両者の交配により嗜好性が高くかつ環境耐性に優れたイネ科牧草の作出が期待される。しかしながら、両者の F_1 は多くの場合不稔で、後代を得るためにはコルヒチンによる倍加を必要とする(Jauhar 1993)。細胞融合によって得られた体細胞雑種は理論的には初めから複2倍体となるので、稔性を得るためのコルヒチンによる倍加の必要がない。また核ゲノムだけでなく細胞質ゲノムも混じりあうので交配では得られない全く新規な細胞質組成を持った個体を育成できる可能性が高い。さらに、稔性には核ゲノムだけでなく核と細胞質の相互作用も関与している場合があるので、細胞融合によって作出された新しい細胞質を持つ体細胞雑種が交配により作出された雑種よりも稔性が優れる可能性もある。しかしながら、本実験で

得られた体細胞雑種はこれまでのところすべて不稔であった。その原因として、両種の染色体数の和である56本を示した個体がひとつもなかったことから、まず染色体異常による減数分裂時の対合不能が考えられる。今後はより多くの融合組み合わせから体細胞雑種を得て、稔性のあるものを選抜することが必要である。また、*Festuca-Lolium*属間雑種では相当高次の倍数性の存在も知られるので(Jauhar 1993)、今回得られた体細胞雑種をさらにコルヒチンで倍加することとも稔性を得るために有効かもしれない。

本実験で得られた体細胞雑種のほとんどの個体は出穂開花を経た後に、キメラ状に新たな個体が分離した。そのほとんどはイタリアンライグラスに酷似したが、一部トールフェスクに酷似した個体も得られた。イタリアンライグラスに酷似した個体の根端染色体は14-20本のミクソプロイディを示し、またイタリアンライグラス品種の花粉の授粉により結実した。ミトコンドリアDNAのRFLP解析から、一部のイタリアンライグラス酷似個体は少なくともトールフェスク由来のミトコンドリアDNAゲノムを持っており、全くイタリアンライグラスに先祖帰したわけではなかった。即ち、本来体細胞雑種を得ようとした実験においてもその後の染色体の脱落により、非対称体細胞雑種が得られたわけである。一般に不定胚形成による植物体再分化は単一細胞由来であり、一方、器官形成による再分化は複数細胞を始源とする可能性が高いといわれる。本実験においては再分化の様相を厳密に組織化学的には観察していないので確かなことは言えないが、器官形成による再分化がおこり、体細胞雑種再分化におけ

る出発点の細胞がすでにキメラ状であった可能性もある。いずれにせよ、こうして得られたキメラ状の個体から種子が得られたのは画期的なことであり、細胞融合により交配では得られないゲノム組成を持った*Festuca-Lolium*属間雑種の育種的利用の実現性が高まった。今後、それぞれの親に酷似した個体は酷似してない方の親の核ゲノムの有無を種特異的DNAプローブによる*in situ hybridization* (Perez-Vicente *et al.* 1992)を行って確認するとともにイタリアンライグラス酷似個体はトールフェスクのゲノム導入による環境耐性の向上について、トールフェスク酷似個体はイタリアンライグラスのゲノム導入による嗜好性と消化率の改善についてもとの親クローンとの比較をする必要がある。

本研究ではトールフェスクとイタリアンライグラスの組み合わせしか細胞融合を行わなかったが、今後はペレニアルライグラス等、イタリナライグラス以外の他の*Lolium*属との細胞融合も当然検討されるべきであろう。融合細胞からの再分化においてはほとんどの場合片親のプロトプラストに再分化能があれば必要十分であることがわかっているので、トールフェスクの相手方となるプロトプラストは必ずしもembryogenicカルスから単離する必要はないので培養系の選択の幅が広がる。また、非対称融合による細胞質雄性不稔性の導入ということであれば、ペチュニアとタバコの間でサイブリッドが作出されていること(Bonnett and Glimelius 1990)から考えても、もっと遠縁の材料、例えばオーチャードグラスあるいはイネなどとの融合も可能性がないとはいえないだろう。本研究で確立された技術により、トールフェスク以外の*Festuca*属も含めて様々

な組み合わせによる属間、種間体細胞雑種が作出されれば、育種素材の作出あるいは細胞遺伝学的の進展に大きく寄与することが期待される。

3. 形質転換植物の作出とその育種的利用

前述のようにトールフェスクにおいて細胞融合技術が確立されたので、*Lolium*属の持つ高品質性を導入したり、他種あるいは他属のもつ異質な細胞質の導入により細胞質雄性不稔をおこさせるなど、有用育種素材作出の可能性が大きく高まった。しかしながら、全く新しい機能を持つ遺伝子を導入しようとする場合は細胞融合では限界があり、形質転換によらざるを得ない。

形質転換による遺伝子導入では、理論的には既存の優良品種の諸形質を全く損なわずに有用外来遺伝子を付与することができる。本研究では、トールフェスクに各種有用遺伝子を導入し画期的な新品種を育成することを最終目標に、まずプロトプラストへの直接遺伝子導入による形質転換体作出を行った。その結果、ハイグロマイシン耐性遺伝子を導入した形質転換植物を数個体得たものの、これらはすべて不稔であった。このことの原因としてはまず、プロトプラストからの再分化個体自体に稔性の低下するものが多いという事実から、プロトプラスト培養による悪影響が考えられる。これを回避する方策としては、プロトプラストからの再分化よりは培養期間が短く変異がおきにくい液体培養細胞や未熟胚等へのパーティクルガンによる直接遺伝子導入がある。そこで本研究においても、トールフェスク液体培養細胞へのパーティクルガンによる直接遺伝子導入を β -glucuronidase遺伝子によるtransient assay系を用いて行い、

本方法による形質転換体作出の可能性を明らかにした。近年、従来法では形質転換が困難であった様々な作物でパーティクルガンにより稔性のある形質転換個体が得られており、トールフェスクにおいても本方法による形質転換植物作出の系を早急に確立する必要がある。さらに、最近これまで大変困難だとされていた *Agrobacterium* によるイネの形質転換体作出が報告され (Chan *et al.* 1993, Hiei *et al.* 1994)、しかも後者の例では非常に効率よく外観や稔性が正常な形質転換体を得られている。即ち、トールフェスクにおいて形質転換系を確立しようとする場合、数年前まではプロトプラストへの直接遺伝子導入しか方法がないかのように思われていたのが、現時点では有力な方法が少なくとも3種類もあるわけで、これらの方法の長短所の比較検討を早急に行う必要がある。

イネよりも培養が困難なために稔性のある形質転換植物がなかなか得られなかったムギ類においてもパーティクルガン法により稔性のある形質転換体が続々と得られている (Vasil *et al.* 1992, Somers *et al.* 1992, Ritala *et al.* 1994)。このことから類推して、上記3つの方法を正しく取捨選択することによりトールフェスクにおいても近い将来稔性のある形質転換体が再現性高く得られるようになるものと思われる。そうすれば、つぎには如何なる有用遺伝子を導入するかという問題になる。有用遺伝子のクローニングは近年長足の発展をみせ、植物界でも様々な機能の遺伝子が次々と単離されている。また、遺伝子の単離だけでなく遺伝子の発現調節領域の解析も大きく進み、別種の外来遺伝子を導入

するだけではなく、同種のある機能を持った遺伝子に様々な別種のプロモーターを繋げて導入することにより、その遺伝子発現を部位特異的あるいは時期特異的に制御した新機能作物作出の可能性がある。ところで、牧草類はコストや利用場面の点から農薬の施用が大きく制限されるので、耐病性の付与は最大の課題である。近年、溶菌酵素であるキチナーゼや β -グルカナーゼをコードする遺伝子が各種作物より単離され、これらの遺伝子を植物に導入することによる病原糸状菌耐性作物の作出(西沢ら1992)が現実味を帯びてきた。トールフェスクにおいて当面、形質転換により導入すべき遺伝子はこれらの耐病性関連のものであろう。また、トールフェスクはその強健性から、牧草や芝草としてだけでなく緑化植物、特に悪環境下での緑化、汚染物質の除去などにも今後用いられるだろう。この観点からは、重金属耐性遺伝子の付与(Misra and Gedam 1989)が興味深いテーマとなるであろう。

以上、本研究ではトールフェスクにおいて細胞融合による体細胞雑種や直接遺伝子導入による形質転換植物体を得て、両技術の実際育種への応用の可能性を大きく高めた。しかしながら、いかなる方法にせよ優良個体が得られた場合、種子繁殖性作物である牧草類ではその後代を種子から得る必要があるので、再分化個体における稔性を高める研究をなお充実させる必要がある。

摘要

本研究ではトールフェスクにおいて細胞融合ならびに形質転換により有用育種素材を開発することを最終目的として、まず基礎となるカルス、液体培養、及びプロトプラスト培養系の確立を図った。さらに、それらを用いてイタリアンライグラス・プロトプラストとの細胞融合による体細胞雑种植物の獲得ならびにプロトプラスト及び培養細胞への直接遺伝子導入に関する検討を行った。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 組織培養系の確立

1) カルス培養系の確立ならびにカルスからの再分化における品種間差

トールフェスクの主要17品種を供試し、未熟胚、完熟種子、及び茎頂を外植片としてカルス誘導及びカルスからの再分化を行った。カルスからの再分化は一般型品種で高く、地中海型品種では低かった。国産品種は比較的高い再分化率を示した。カルスの性状は、みずっぱいもの、ぼろぼろとほぐれやすいフライアブル (friable) なもの、及び緻密で固いコンパクトなものの3種類に大別された。フライアブルまたはコンパクトなカルスを液体培養することによりプロトプラストの単離・培養に必要な液体培養細胞が得られた。

2) プロトプラスト培養系の確立

セルラーゼオノヅカRSとマセロザイムR10を含む酵素液により健全なプロトプラストが単離できた。アガロースビーズ法とナースカルチャーを併用することによりプロトプラストからのコロニー形成が可能であった。AA培地が、

B5培地よりも優っていた。プロトプラスト由来コロニーは2,4-Dとプロリンを含むMS培地で増殖させてから再分化培地に移すことにより健全な緑色植物体が再分化した。プロトプラストを単離する液体培養細胞の培養期間が5ヶ月を超えると緑色植物体再分化は困難であった。

3) 培養細胞からの再分化個体における変異

カルス、液体培養細胞、ならびにプロトプラストからの再分化個体について染色体数や稔性を調査したところ、プロトプラスト由来再分化個体において最も変異が多くみられた。変異のおもなものは染色体数の減少と花粉・種子稔性の低下であった。また、プロトプラスト由来個体で正常な稔性を持つ個体の放任受粉後代と、もとの個体の放任受粉後代の農業的形質を圃場で比較したところ、草丈や出穂個体割合はプロトプラスト由来系統でやや減少したが、新鮮重や葉腐れ性病斑出現程度には差がなかった。

2. 細胞融合技術の確立

1) 細胞融合によるトールフェスクとイタリアンライグラスの体細胞雑種の作出

トールフェスクプロトプラストをヨードアセトアミドで細胞膜のみ不活化して分裂できなくした後に、再分化能を持たないイタリアンライグラスプロトプラストと電気的に融合させ、上記の培養法によりコロニーを増殖させた。コロニーはイタリアンライグラスまたは融合細胞由来と考えられ、再分化培地に置床した後に緑植物が合計16個体再分化した。

2) 体細胞雑種の解析

これらの緑色植物体が真に体細胞雑種であることをイネrDNAプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法により確認した。

初期に再分化した6個体についてはオルガネラDNAプローブによるサザンハイブリダイゼーションも行った。その結果、体細胞雑種のミトコンドリアDNAがいずれの親から由来したかは用いたプローブにより異なり、片親由来の場合と、両親のDNAを合わせ持つ場合とがあった。また、cox1をプローブとした場合は両親にみられないバンドが検出され体細胞雑種6個体とも異なるRFLPを示し、両親間のミトコンドリアDNAで組み換えをおこなっている可能性が示唆された。一方、葉緑体DNAは用いた3種類のプローブすべてでトールフェスクと同一のRFLPを示し、トールフェスク由来であると考えられた。

体細胞雑種の染色体数は44-46本から74-75本まで様々であったが、両親の和である56本を示した個体はなかった。春化の後に出穂・開花したがすべて不稔であった。

3) 体細胞雑種よりキメラ的に分離した個体の解析

体細胞雑種は栽培に伴い、片親に酷似した個体をキメラ的に分離した。その大部分はイタリアンライグラスに酷似し、このような形態の変化に伴いミトコンドリアDNAプローブであるcox2、cox3のRFLPも変化した。染色体数は14-20本を示し、ミクソプロイドであると考えられた。また、いずれの親に酷似した個体も放任受粉により開花結実した。これらの変化した個体のあるも

のは外観がイタリアンライグラスを示しているにも拘わらずトールフェスクのミトコンドリアゲノムを持っていたので、交配では極めて得にくいオルガネラゲノム組成を持った体細胞雑種の後代が得られたことになり、育種素材としての活用が期待される。

3. 形質転換植物の作出

1) ハイグロマイシン及びフォスフィノスリシン耐性遺伝子のプロトプラストへの直接遺伝子導入

プロトプラストへの直接遺伝子導入による形質転換のために、トールフェスクプロトプラスト由来コロニーの生育を抑制するのに必要なマーカー物質の濃度を調べた結果、ハイグロマイシンでは200mg/l、フォスフィノスリシンでは50mg/l必要であった。ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドpGL2を用いたプロトプラストへの直接遺伝子導入により、トールフェスク品種ヤマナミ及びホクリョウで形質転換体が得られた。サザンハイブリダイゼーションの結果はハイグロマイシン耐性遺伝子が染色体の複数の位置に組み込まれていることを示唆した。形質転換体は春化の後出穂したが、不稔であった。

2) シャトルベクターによるプロトプラストへの直接遺伝子導入

コムギのジェミニウィルス(Wheat dwarf virus)由来のベクターで、カナマイシン耐性遺伝子を持つシャトルベクターpWI-K6によりトールフェスクプロトプラストを形質転換したところ、同じ遺伝子を通常のpUCプラスミドに組み込んだベクターに比べて大幅に多量のカナマイシン耐性コロニーが得られた。

3) パーティクルガンによる液体培養細胞への直接遺伝子導入

パーティクルガンによりトールフェスク液体培養細胞に β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を撃ち込み、一過性の発現を観察した。その際、撃ち込みの圧力は1300psiが1100psi及び900psiよりも、DNAをコーティングする金属粒子はタングステンが金よりもそれぞれ優った。また、GUS遺伝子につないだ各種プロモータやベクターの差異による一過性発現の違いを調べたところ、コムギのジェミニウィルス由来のベクターにGUS遺伝子を組み込んだpWI-GUSが最も高い発現を示した。

以上を要約すると、トールフェスクにおいてカルス、液体培養細胞及びプロトプラストからの再分化系が確立された。そしてプロトプラスト培養系を利用して細胞融合による体細胞雑種ならびに直接遺伝子導入による形質転換個体が得られた。得られた個体についてその育種的利用について考察した。

謝辞

本研究の大部分は草地試験場育種部育種工学研究室において実施された。研究開始の端緒は、筆者が研究室配属になった1986年秋の杉信賢一前研究室長(現北海道農業試験場企画科長)の示唆によるものであり、以後現在まで同博士から賜ったご指導とご鞭撻は本研究推進上大きな力となった。また、草地試験場育種部山田実元部長(現社団法人農林水産先端技術産業振興センター理事)、同長谷川寿保前部長(現北海道農業試験場草地部長)、同寺田康道現部長、同育種工学研究室大杉立元主任研究官(現農業生物資源研究所炭素代謝研究室長)、同藤森雅博研究員、同育種素材研究室小松敏憲元主任研究官(現鹿児島県農業試験場牧草育種指定試験地主任)、同飼料生産利用部調製貯蔵研究室北本宏子研究員、農業生物資源研究所中島皐介細胞育種部長、植物工学研究所経塚淳子元研究員、ならびに山梨県酪農試験場牧草育種指定試験地山田敏彦主任の方々からは本研究に対して多くの有益な後助言を戴いた。さらに、スイス連邦工科大学チューリヒ校 Ingo Potrykus教授とGerman Spangenberg博士には本研究の一部を実施するための留学許可と絶えざる激励を戴いた。パーティクルガンを用いた形質転換実験は農業生物資源研究所細胞操作研究室において流動研究員制度を活用して行ったものであり、平林利郎同室長及び萩尾高志同主任研究官の指導を仰いだ。圃場試験の遂行に当たっては草地試験場業務1科の各職員、臨時職員、培養実験の遂行に当たっては研究室の臨時職員の方々の尽力に負うところが大きい。あわせてここに心からの謝意を表する。

本論文の取りまとめに当たっては、東京大学農学部教授武田元吉博士ならびに同助教授長戸康郎博士のご校閲を賜り、多くの貴重なご教示を戴いたので、ここに深甚なる謝意を述べたい。

引用文献

- Abe, T. and Y. Futsuhara 1984. Varietal difference of plant regeneration from root callus tissues in rice. Japan. J. Breed. 34:147-155.
- Abdullah, R., E.C. Cocking and J.A. Thompson 1986. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. Bio/Technology 4:1087-1090.
- Abdullah, R., J.A. Thompson, G.S. Khush, R.P. Kaushik and E.C. Cocking 1989. Proclonal variation in the seed progeny of plants regenerated from rice protoplasts. Plant Sci. 65:97-101.
- Akagi, H., M. Sakamoto, T. Negishi and T. Fujimura 1989. Construction of rice cybrid plants. Mol. Gen. Genet. 215:501-506.
- Armstrong, C. L. and C.E. Green 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164:207-214.
- Asahi, T., T. Kumashiro and T. Kubo 1988. Constitution of mitochondrial and chloroplast genomes in male sterile tobacco obtained by protoplast fusion of *Nicotiana tabacum* and *N. debneyi*. Plant Cell Physiol. 29:43-49.
- 浅野義人・宇垣正志 1992. エレクトロポレーションによるベントグラス形質転換植物の育成 育種 42:別(2) 272-273.
- Asano, Y. and K. Sugiura 1990. Plant regeneration from suspension culture-derived protoplasts of *Agrostis alba* (Redtop). Plant Sci. 72:267-273.
- Asano, Y. and M. Ugaki 1994. Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. Plant Cell Reports 13: 243-246.
- Baba, A., S. Hasezawa and K. Syono 1986. Cultivation of rice protoplast and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. Plant Cell Physiol. 27: 463-472.
- Baird, E., S. Cooper-Bland, R. Waugh, M. Demaine and W. Powell 1992. Molecular characterisation of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Mol. Gen. Genet. 233:469-475.
- Beillard, G., F. Vedel and G. Pelletier 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana* by protoplast fusion. Nature 281:401-403.
- Berg, C.C., G.T. Webster and P.P. Jauhar 1979. Cytogenetics and genetics. In: Buckner, R.C. and L.P. Bush (eds.), Tall fescue. Amer. Soc. Agron. Inc., Wisconsin pp 93-109.
- Bonnett, H.T. and K. Glimelius 1990. Cybrids of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* have an intergeneric mixture of chloroplasts from *P. hybrida* and mitochondria identical or similar to *N. tabacum*. Theor. Appl. Genet. 79:550-555.

- Brown, D.C.W. and A. Atanassov 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4:111-122.
- Buckner, R.C., P.B. Burrus II and L.P. Bush 1977. Registration of Kenhy tall fescue. *Crop Sci.* 17:672-673.
- Cabanes-Bastos, E., A.G. Day and C.P. Lichtenstein 1989. A sensitive and simple assay for neomycin phosphotransferase 2 activity in transgenic tissue. *Gene* 77: 169-177.
- Chan, M.T., H.H. Chang, S.L. Ho, W.F. Tong and S.M. Yu 1993. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol. Biol.* 22:491-506.
- Chien, Y. C., K.N. Kao and L.R. Wetter 1982. Chromosomal and isozyme studies of *Nicotiana tabacum*-*Glycine max* hybrid cell lines. *Theor. Appl. Genet.* 62:301-304.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bin 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18:659-668.
- Conger, B.V., L.L. Hifenski, K.W. Lowe and J.V. Carabia 1982. Influence of different auxins at varying concentrations on callus induction and growth from embryo and leaf tip-explants in Gramineae. *Env. Exp. Bot.* 22:39-48.
- Conger, B.V., J.C. Hovanesian, R.N. Trigiano and D.J. Gray 1989. Somatic embryo ontogeny in suspension cultures of Orchardgrass. *Crop Sci.* 29:448-452.
- Conger, B.V., D.D. Songstad, J.K. McDaniel and J. Bond 1993. Transient expression of genes introduced into *Dactylis glomerata* by microprojectile bombardment. *Proc. 17th Internat. Grassl. Congr.*
- Creemers-Molenaar, J., J.P.M. Loeffen and P. van der Valk 1988. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence derived callus of *Lolium perenne* L. *Plant Sci.* 57: 165-172.
- Creemers-Molenaar, J., P. van der Valk, J.P.M. Loeffen and M.A.C.M. Zaal 1989. Plant regeneration from suspension cultures and protoplasts of *Lolium perenne* L. *Plant Sci.* 63:167-176.
- Creemers-Molenaar, J., R.D. Hall and F.A. Krens 1992. Asymmetric protoplast fusion aimed at intraspecific male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L. *Theor. Appl. Genet.* 84:763-770.
- Crowder, L.V. 1953. Interspecific and intergeneric hybrids of *Festuca* and *Lolium*. *J. Hered.* 44:195-203.
- Dahleen, L.S. and G.C. Eizenga 1990. Meiotic and isozymic characterization of plants regenerated from euploid and selfed monosomic tall fescue embryos. *Theor. Appl. Genet.* 79:39-44.

- Dalton, S.J. 1988. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass). J. Plant Physiol. 132:170-175.
- Derks, F.H.M., J. Wijbrandi, M. Koorneef and C.M. Colijn-Hooymans 1991. Organelle analysis of symmetric and asymmetric hybrids between *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum*. Theor. Appl. Genet. 81:199-204.
- Eizenga, G.C. and R.C. Buckner 1986. Cytological and isozyme evaluation of tall fescue x Italian ryegrass hybrids. Plant Breeding 97:340-344.
- Eizenga, G.C. 1987. Cytogenetic and isozymic characterization of anther-panicle culture derived tall fescue aneuploids. Euphytica 36:175-179.
- Eizenga, G.C. 1989. Meiotic analysis of tall fescue somaclones. Genome 32:373-379.
- Eizenga, G.C. and L.S. Dahleen 1990. Callus production, regeneration and evaluation of plants from cultured inflorescence of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Plant Cell Tissue Organ and Culture 22:7-15.
- Evans, G.M., K.H. Asay and R.G. Jenkins 1973. Meiotic irregularities in hybrids between diverse genotypes of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Crop Sci. 13:376-379.
- Finch, R.P., I.H. Slamet and E.C. Cocking 1990. Production of heterokaryons by the fusion of mesophyll protoplasts of *Porteresia coarctata* and cell suspension-derived protoplasts of *Oryza sativa*: A new approach to somatic hybridization in rice. J. Plant Physiol. 136:592-598.
- Fox, T.D. and C.J. Leaver 1981. The *Zea mays* mitochondrial gene coding for cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons. Cell 26:315-323.
- Frearson, E.M., J.B. Powel and E.C. Cocking 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. Dev. Biol. 33:130-137.
- 藤森雅博・高満正・杉信賢一 1994. 非対称融合によるイタリアンライグラス雄性不稔遺伝子のトールフェスクへの導入 育種44 別(1):77.
- Fujimura, T., M. Sakurai, H. Akagi, T. Negishi and A. Hirose 1985. Regeneration of rice plants from protoplasts. Plant Tissue Culture Letter 2:74-75.
- Fukui, K. and Y. Mukai 1988. Condensation pattern as a new image parameter for identification of small chromosomes in plants. Jpn. J. Genet. 63:359-366.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- Glimelius, K. and H. Bonnell 1986. *Nicotiana* cybrids with *Petunia* chloroplasts. Theor. Appl. Genet. 72:794-798.

- Gnanapragasam, S. and I.K. Vasil 1992. Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Sci.* 83:205-212.
- Gupta, H.S. and A. Pattanayak 1993. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/Technology* 11:90-94.
- Ha, S.-B., F.-S. Wu and T.K. Thorne 1992. Transgenic turt-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Reports* 11:601-604.
- Handa, H. 1993. RNA editing of rapeseed *atp9* transcript: RNA editing changes four amino acids, but termination codon is already encoded by genomic sequence. *Jpn. J. Genet.* 68:47-54.
- Handa, H. and K. Nakajima 1991. Nucleotide sequence and transcription analyses of the rapeseed (*Brassica napus* L.) mitochondrial F1-ATPase alpha-subunit gene. *Plant Mol. Biol.* 16:361-364.
- Hayashi, Y., J. Kozuka and K. Shimamoto 1988. Hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and wild *Oryza* species obtained by cell fusion. *Mol. Gen. Genet.* 214:6-10.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.
- 本田秀夫・平井眞志 1991. 非放射性DNAプローブによる雑種の検定 植物細胞工学 3:141-146.
- Horn, M.E., B.V. Conger and C.T. Harms 1988a. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) *Plant Cell Reports* 7:371-374.
- Horn, M.E., R.D. Shillito, B.V. Conger and C.T. Harms 1988b. Transgenic plants of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. *Plant Cell Reports* 7:469-472.
- Humphreys, M.W. and S.J. Dalton 1991. Stability at the phosphoglucosomerase (PGL2) locus in *Festuca arundinacea* plants regenerated from cell suspension and protoplast culture. *Genome* 34:59-65.
- 猪熊千恵・杉浦清之・趙徹・金子誠二 1991. ノシバ (*Zoysia japonica*)のプロトプラストからの植物体再生 育種 41別(1):60-61.
- Isaac, P.G., V.P. Jones and C.J. Leaver 1985. The maize cytochrome c oxidase subunit I gene: sequence, expression and rearrangement in cytoplasmic male sterile plants. *EMBO J.* 4:1617-1623.
- Iwabuchi, M., J. Kozuka and K. Shimamoto 1993. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J.* 12:1437-1446.

- Jackson, J.A. and P.J. Dale 1988. Callus induction, plant regeneration and an assessment of cytological variation in regenerated plants of *Lolium multiflorum* L. J. Plant Physiol. 105:267-274.
- Jauhar, P.P. 1993. Intergeneric hybridization, genome relationships, and plant improvement. In Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex. pp 149-176. Springer-Verlag.
- Kanda, M., S. Kikuchi, F. Takaiwa and K. Oono 1988. Regeneration of variant plants from rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts derived from long term cultures. Jpn. J. Genet. 63:127-136.
- 神田真里・北村治滋・豊岡幸二・渡辺健三 1991. コシヒカリのプロトプラストからの効率的な植物再生系(第1報) 育種41別(2)248-249.
- Kao, K.N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of Soybean-*Nicotiana glauca*. Mol. Gen. Genet. 150:225-230.
- Kao, K.N. and M.K. Michayluk 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126:105-110.
- Kasperbauer, M.J., R.C. Buckner and W.D. Springer 1980. Haploid plants by anther-panicle culture of tall fescue. Crop Sci. 20:103-106.
- Kasperbauer, M.J. and G.C. Eizenga 1985. Tall fescue doubled haploids via tissue culture and plant regeneration. Crop Sci. 25:1091-1095.
- 川端智太郎・後藤寛治・森行雄・雑賀優・鈴木茂・阿部二郎・高瀬昇 1972. トールフェスクの新品種「ホクリョウ」および「ヤマナミ」について 北農試研報 103:1-22.
- 小松敏憲 1987. イタリアンライグラス(*Lolium multiflorum* Lam.)で見いだされた雄性不稔性. 日草誌 33:289-290.
- Komatsu, T., K. Sugimoto and S. Suzuki 1990. Crossability of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) with tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Japan. J. Breed. 40:175-181.
- 近藤 聡 1986. トールフェスクの新品種「サザンクロス」の特性について 牧草と園芸 34:15-17.
- Kyozuka, J., Y. Hayashi and K. Shimamoto 1987. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. Mol. Gen. Genet. 206:408-413.
- Kyozuka, J., T. Kaneda and K. Shimamoto 1989. Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion. Bio/Technology 7:1171-1174.
- Kyozuka, J., T. Izawa, M. Nakajima and K. Shimamoto 1990. Effect of the promoter and the first intron of maize Adh1 on foreign gene expression in rice. Maydica 35:353-358.

- Landgren, M. and K. Glimelius 1994. A high frequency of intergenomic mitochondrial recombination and an overall biased segregation of *B. campestris* or recombined *B. campestris* mitochondria were found in somatic hybrids made within Brassicaceae. *Theor. Appl. Genet.* 87:854-862.
- Li, Z. and N. Murai 1990. Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium. *Plant Cell Reports* 9:216-220.
- Lowe, K.W. and B.V. Conger 1979. Root and callus formation from callus cultures of tall fescue. *Crop Sci.* 19:397-400.
- Lu, C.Y., V. Vasil and I.K. Vasil 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass): somatic embryogenesis and plantlet formation. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:311-318.
- Lührs, R. and H. Lörz 1987. Plant regeneration *in vitro* from embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 75:16-25.
- Lupi, M.C., A. Bennici, S. Baroncelli, D. Gennai and F. D'Amato 1981. *In vitro* regeneration of durum wheat plants. 2. Diplontic selection in aneusomatic plants. *Z. Pflanzenzüchtg.* 87:167-171.
- Maddock, S.E. 1985. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in wheat, barley, oats, rye and triticale. In: Bright, S.J. and M.G.K. Jones (eds.) *Cereal tissue and cell culture*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, pp 131-174.
- McCabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Mertinell and P. Christou 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6:923-926.
- McCoy, T.J., R.L. Phillips and H.W. Rines 1982. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures: high frequency of partial chromosome loss. *Can. J. Genet. Cytol.* 24:37-50.
- Medgeysey, P., E. Fejes and P. Maliga 1985. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6960-6964.
- Melchers, G., M.D. Sacristan and A.A. Holder 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43:203-218.
- Melchers, G., Y. Mohri, K. Watanabe, S. Wakabayashi and K. Harada 1992. One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6832-6836.
- Menczel, L., F. Nagy, G. Lazar and P. Maliga 1983. Transfer of cytoplasmic male sterility by selection for streptomycin resistance after protoplast fusion in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* 189:365-369.

- Mitra, S. and L. Gedamu 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theor. Appl. Genet.* 78:161-168.
- Mitten, D.H., S.J. Sato and T.A. Skokut 1984. *In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm source. *Crop Sci.* 24:943-945, 1984.
- Müller, A.J. and R. Grafe 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* 161:67-76.
- Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nap, J.P., J. Bijvoet and W.J. Stiekema 1992. Kanamycin resistance in transgenic plants: full legislative clearance of the trait suggested. *Protophyta* 5:48-51.
- Negrutiu, I., R. Shillito, I. Potrykus, G. Biasini and F. Sala 1987. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. 1. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 8:363-373.
- Negrutiu, I., J. Dewulf, M. Pietrzak, J. Botterman, E. Rietveld, E.M. Wurzer-Figurelli, De Ye and M. Jacobs 1990. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions: 2. Transient expression vs stable transformation - analysis of parameters influencing gene expression levels and transformation efficiency. *Physiol. Plant.* 79:197-205.
- Nielsen, A.N., E. Larsen and E. Knudsen 1993. Regeneration of protoplast-derived green plants of Kentucky blue grass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Reports* 12:537-540.
- Niizeki, M. and K. Saito 1989. Callus formation from protoplast fusion between Leguminous species of *Medicago sativa* and *Lotus corniculatus*. *Japan. J. Breed.* 39:373-377.
- 西沢洋子・阿久津克己・日比忠明 1992. 植物溶菌酵素遺伝子の導入による菌類病抵抗性植物の作出 植物防疫 46:500-506.
- Ogura, H., J. Kiyozuka, Y. Hayashi, T. Koba and K. Shimamoto 1987. Field performance and cytology of protoplast-derived rice (*Oryza sativa*): high yield and low degree of variation of four japonica cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 74:670-676.
- Ohira, K., K. Ojima and A. Fujiwara 1973. Studies on the nutrition of rice cell culture 1. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14:1113-1121.
- 大野清春 1975. イネの薬培養による半数体の作出とその育種の利用 農技研報 D26: 139-222.
- Ozawa, K. and A. Komamine 1989. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 77:205-211.
- 小沢憲二郎・石毛光雄 1994. エレクトロポレーション法におけるイネ科形質転換技術の改良 育種44別(1):81.

- Ozias-Akins, P., R.J. Fert and I.K. Vasil 1986. Somatic hybridization in the Gramineae: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. (pearl millet) + *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass). *Mol. Gen. Genet.* 203:365-370.
- Ozias-Akins, P., D.R. Pring and I.K. Vasil 1987. Rearrangements in the mitochondrial genome of somatic hybrid cell lines of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. + *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* 74:15-20.
- Perez-Vicente, R., L. Petris, M. Osusky, I. Potrykus and G. Spangenberg 1992. Molecular and cytogenetic characterization of repetitive DNA sequences from *Lolium* and *Festuca*: application in the analysis of *Festulolium* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 84:145-154.
- Potrykus, I., C.T. Harms, H. Lörz and E. Thomas 1977. Callus formation from stem protoplasts of corn. *Mol. Gen. Genet.* 156:347-350.
- Potrykus, I., M. Saul, J. Petruska, J. Paszkowski and R.D. Shillito 1985. Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188.
- Potrykus, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8:535-542.
- Rajaelina, S.R., G. Alibert and C. Planchon 1990. Continuous plant regeneration from established embryogenic cell suspension cultures of Italian ryegrass and tall fescue. *Plant Breeding* 104:265-271.
- Reed, J.N. and B.V. Conger 1985. Meiotic analyses of tall fescue plants regenerated from callus cultures. *Env. Exp. Bot.* 25:277-284.
- Ritala, A., K. Aspegren, U. Kurten, M. Salmenkallio-Marttila, L. Mannonen, R. Hannus, V. Kauppinen, T.H. Teeri and T.M. Enari 1994. Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol. Biol.* 24:317-325.
- Sakai, T. and J. Imamura 1990. Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 80:421-427.
- San, H.L., F. Vedel, D. Sihachakr and R. Remy 1990. Morphological and molecular characterization of fertile tetraploid somatic hybrids by protoplast electrofusion and PEG-induced fusion between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon pervianum* Mill. *Mol. Gen. Genet.* 221:17-26.
- Sanford, J.C., T.M. Klein, E.D. Wolf and N. Allen 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Technol.* 5:27-37.
- 佐藤信之助・上山泰史・吉山武敏・中嶋弘一・寺田康道・鶴見義朗・中島卓介 1985 トールフェスクの新品種「ナンリョウ」九州農業研究 47:175.
- Schocher, R.J., R.D. Shillito, M.W. Saul, J. Paszkowski and I. Potrykus 1986. Co-transformation of unlinked foreign genes into plants by direct gene transfer. *Bio/Technology* 4:1093-1096.

- Shimamoto, K., R. Terada, T. Izawa and H. Fujimoto 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338:274-276.
- 島本功 1989. イネへの遺伝子導入 植物細胞工学 1:51-57.
- Somers, D.A., H.W. Rines, W. Gu, H.F. Kaeppler and W.R. Bushnell 1992. Fertile, transgenic oat plants. *Bio/technology* 10:1589-1594.
- Spangenberg, G., M. Osusky, M.M. Oliveira, E. Freydl, J. Nagel, M.S. Pais and I. Potyrkus 1990. Somatic hybridization by microfusion of defined protoplast pairs in *Nicotiana*: morphological, genetic and molecular characterization. *Theor. Appl. Genet.* 80:577-587.
- Sugiura, M., K. Shinozaki, N. Zaita, M. Kusuda and M. Kumano 1986. Clone bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Sci.* 44:211-216.
- Sproule, A., P. Donaldson, M. Djak, E. Bevis, R. Pandeya, W.A. Keller and S. Gleddie 1991. Fertile somatic hybrids between transgenic *Nicotiana tabacum* and transgenic *N. debneyi* selected by dual-antibiotic resistance. *Theor. Appl. Genet.* 82:450-456.
- Stuart, D.A. and S.G. Strickland 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. 2. The interaction of amino acids with ammonium. *Plant Sci. Lett.* 34:175-181.
- 助清泰教・小倉久和・木村雄輔・伊藤隆二 1989. プロトプラスト育種による新品種「初夢」の育成 育種 39別(1):138-139.
- Tabaeizadeh, Z., R.J. Feri and I.K. Vasil 1986. Somatic hybridization in the Gramineae: *Saccharum officinarum* L. (Sugarcane) + *Pennisetum americanum* (L.) K. Schumm. (Pearl millet). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5616-5619.
- Tabaeizadeh, Z., D.R. Pring and I.K. Vasil 1987. Analysis of mitochondrial DNA from somatic hybrid cell lines of *Saccharum officinarum* (sugarcane) and *Pennisetum americanum* (pearl millet). *Plant Mol. Biol.* 8:509-513.
- Tada, Y., M. Sakamoto and T. Fujimura 1990. Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants: Use of electroporation buffer lacking chloride ions. *Theor. Appl. Genet.* 80:475-480.
- Takaiwa, F., K. Oono and M. Sugiura 1984. The complete nucleotide sequence of a rice 17S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* 12:5441-5448.
- Takamizo, T., K. Sugimoto and R. Ohsugi 1991. Somatic embryogenesis in a recalcitrant cultivar of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium. *Bull. Natl. Grassl. Res. Inst.* 44:15-22.
- 高溝 正・藤森 雅博・杉信 賢一 1993. トールフェスクミトコンドリアDNAのRFLP分析. 草地学会誌 39巻 別号 87-88.

- Takemori, N., K. Shinoda and N. Kadotani 1994. RAPD markers for confirmation of somatic hybrids in the dihaploid breeding of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 13:367-371.
- Terada, R., J. Kyozuka, S. Nishibayashi and K. Shimamoto 1987. Plantlet regeneration from somatic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and barnyard grass (*Echinochloa oryzicola* Vasing). *Mol. Gen. Genet.* 210:39-43.
- Terakawa, T., T. Sato and M. Koike 1992. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.). *Plant Cell Reports* 11:457-461.
- Tomes, D.T. 1985. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: Bright, S.J. and M.G.K. Jones (eds.). *Cereal tissue and cell culture*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, pp 175-203.
- Toriyama, K. and K. Hinata 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* 41:179-183.
- Ugaki, M., T. Ueda, M.C.P. Timmermans, J. Vierira, K.O. Elliston and J. Messing 1991. Replication of a geminivirus derived shuttle vector in maize endosperm cells. *Nucleic Acids Res.* 19:371-377.
- 宇垣正志・浅野義人・大槻義昭 1993. 新しい遺伝子ベクターを利用した植物細胞への外来遺伝子導入 細胞 25:26-30.
- Van der Valk, P., M.A.C.M. Zaai and J. Creemers-Molenaar 1989. Regeneration of albino plantlets from suspension culture derived protoplasts of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass). *Euphytica Suppl.* 169-176.
- Vasil, V., D.Y. Wang and I.K. Vasil 1983. Plant regeneration from protoplasts of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Z. Pflanzenphysiol.* 111:233-239.
- Vasil, V. and I.K. Vasil 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts Part 2: embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Thero. Appl. Genet.* 56:97-99.
- Vasil, V., R.J. Ferl and I.K. Vasil 1988. Somatic hybridization in Gramineae: *Triticum monococcum* L. (Einkorn) + *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. (Pearl millet). *J. Plant Physiol.* 132:160-163.
- Vasil, I.K. 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology* 6:397-402.
- Vasil, V., A.M. Castillo, M.E. Fromm and I.K. Vasil 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10:667-674.
- Walters, D.A., C.S. Vetsch, D.E. Polts and R.C. Lundquist 1992. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* 18:189-200.

- Wang, Z. Y., M.P. Valles, P. Montavon, I. Potrykus and G. Spangenberg 1993. Fertile plant regeneration from protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). Plant Cell Reports 12:95-100.
- Watson, L. and M.J. Dallwitz 1992. Classification of the grass genera. In: The grass genera of the world, CAB International Wallingford, UK.
- Webster, G.T. and R.C. Buckner 1971. Cytology and agronomic performance of *Lolium-Festuca* hybrid derivatives. Crop Sci. 11:109-112.
- Wetter, L. R. and J. Dyck 1983. Isozyme analysis of cultured cells and somatic hybrids. In: Evans, D. A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada, (eds.) Handbook of plant cell culture, vol. 1, Techniques for propagation breeding. MacMillan, New York, pp 607-628.
- Wetter, L.R. and K.N. Kao 1980. Chromosome and isozyme studies on cells derived from protoplast fusion of *Nicotiana glauca* with *Glycine max-Nicotiana glauca* cell hybrids. Theor. Appl. Genet. 57:273-276.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
- Xu, Y.S., M.G.K. Jones, A. Karp and E. Pehu 1993. Analysis of the mitochondrial DNA of the somatic hybrids of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum* using non-radioactive digoxigenin-labelled DNA probes. Theor. Appl. Genet. 85:1017-1022.
- Xu, W.W., D.A. Sleper and D.A. Hoisington 1991. A survey of restriction fragment polymorphism length (RFLPs) in tall fescue and its relatives. Genome 34:686-692.
- Xu, W.W., D.A. Sleper and S. Chao 1992. Detection of RFLPs in perennial ryegrass, using heterologous probes from tall fescue. Crop Sci. 32:1366-1370.
- Xu, W.W., D.A. Sleper and G.F. Krause 1994. Genetic diversity of tall fescue germplasm based on RFLPs. Crop Sci. 34:246-252.
- Yamada, Y., Z.Q. Yang and D.T. Tang 1986. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports 4:85-88.
- Yang, Z.Q., T. Shikanai, K. Mori and Y. Yamada 1989. Plant regeneration from cytoplasmic hybrids of rice (*Oryza sativa*). Theor. Appl. Genet. 77:305-310.
- Zaghmout, O.M.F. and W.A. Torello 1990. Isolation and culture of protoplasts from embryogenic suspension cultures of red fescue (*Festuca rubra* L.). Plant Cell Reports 9:340-343.
- Zhang, W., D. McElroy and R. Wu 1991. Analysis of rice Act1 region activity in transgenic rice plants. Plant Cell 3:1155-1165.



