

「シバ中間母本農1号」の育成

小林真*・蝦名真澄*・高溝正・霍田真一^a

農研機構畜産草地研究所 飼料作物研究領域, 那須塩原市, 329-2793

要 約

遺伝的に不均一な市販シバ (*Zoysia japonica* Steud.) 種子約1万粒から組織培養適性に優れた系統を選抜し、栄養繁殖性品種「シバ中間母本農1号」として2009年に品種登録(第18204号)した。本品種には直立茎の生長点から誘導したカルの再分化能が高い特長があるため、種子由来カルスと異なって遺伝的背景が明瞭かつ均一なカルスおよび再分化植物体を得られ、再現性の高い遺伝子組換え実験が可能である。モデル実験では再分化植物における β -glucuronidase 遺伝子の形質転換がPCRによって、発現が染色によってそれぞれ確認された。形態的特性では葉長・葉幅・出穂茎の太さ・小穂数は大であるが、匍匐茎の密度・長さは小であり、生育特性では初期生育・春の草勢・秋の草勢・さび病抵抗性に劣るため、牧草・芝草としての実用栽培には適しない。2008年に登録された特許第4228044号「シバ属植物の再分化植物体及び形質転換植物体」による手法と本品種を組み合わせることにより、シバの遺伝子組換え研究が進むことが期待される。また、さび病罹病性の特徴を活かし、接種源やさび病罹病性の基準品種としての利用も期待される。

キーワード：シバ, 再分化能, 遺伝子組換え, さび病

緒 言

シバ (*Zoysia japonica* Steud.) は我が国を含む東アジアを原産地とし、古くから放牧地の飼料資源として低投入持続型畜産に利用されている。芝草としても重要な地位を占めており、実用栽培の統計はないが平成23年花木等生産状況調査によると、シバ・コウシュンシバ (*Z. matrella* (L.) Merr.)・コウライシバ (*Z. tenuifolia* Willd.) を合わせた日本芝は、種苗生産だけで作付面積4884 ha, 年間出荷数量3832 ha, 年間出荷額55億円に達している¹³⁾。産地の名称や茎葉の大きさによって区別される在来系統⁷⁾も流通しているが、今後は特性が一定かつ明確な種苗法に基づく登録品種が主体になると考えられる。シバ属として品種登録されているのは2013年8月現在で30品種あり¹²⁾、芝草分野では耐踏圧性、病害抵抗性、虫害抵抗性、葉色の濃さ、低草高に伴

う刈芝発生量の少なさ、冬季の緑度維持能などが求められている。農林水産省品種登録ホームページ¹²⁾で公開されている品種登録/出願公表データによると、現在の登録品種には生態型の特性を活かした栄養系選抜や生態型の交雑後代からの選抜によって育成されたものが多いが、今後、芝草用品種育成を加速するためには遺伝子組換え技術の利用も期待される。

シバにおける遺伝子組換えでは、均一な遺伝子型をもつ再分化個体の養成が困難であることが制約となっていた。すなわち、シバは他殖性で母材となる植物のヘテロ接合性が高いことから、それらに由来する個々の種子は異なる遺伝子型をもつと考えられるため、緑化向けの市販種子において遺伝的に均一な種子は入手不可能である。自殖を繰り返して純系(ホモ接合型)種子を得ようとしても自殖によるホモ化の過程で自殖劣性が生じる可能性が大きく、純系品種が存在しないため遺伝的に均一

2013年9月25日受付, 2013年11月18日受理

*共同第1著者

^a 現 国際農林水産業研究センター

な F₁ 種子を得ることもできない。既知の培養系ではシバ種子からカルス誘導・再分化する方法を採っているが²¹⁶¹⁷、これらの方法では上述の理由で遺伝的背景が不明なカルス・再分化個体しか得られないので、遺伝子組換え体作出に適用したとしても再現性の高い実験系構築は期待できない。一方、シバは匍匐茎によって容易に栄養繁殖が可能なので、多数の生長点を切り出して組織培養に供することで遺伝的に均一なカルス・再分化個体が得られ、再現性の高い遺伝子組換え実験系を構築できると考えられる。しかし、これまで生長点由来カルスの再分化を示した報告はない。

著者らはシバの生長点からカルスを誘導し植物体にまで再分化させる培養系およびアグロバクテリウム法によって形質転換¹⁴を行った後に植物体を再分化させる方法を発明し、2002年に特許出願を行い、2008年に特許第4228044号として登録された⁹。この過程で選抜・育成した再分化能の高いシバ系統を2007年に種苗法に基づく品種登録に出願し、2009年に「シバ中間母本農1号」として登録(第18204号)された。「シバ中間母本農1号」はシバ属の組換え体作出において基盤的育種材料として有用であり、本品種の匍匐茎から採取できる生長点を外植体として再現性の高いカルス誘導・遺伝子組換え・再分化が可能である。本報告では、「シバ中間母本農1号」の育成の経過、再分化に関する成績、本品種を用いた遺伝子組換え実験結果および形態的特性・生育特性について報告する。

材料および方法

1. 再分化系統の選抜と再分化能の評価

2000年に雪印種苗(株)販売のシバ市販種子(品種不確定の「普通種」)約1万粒を用いて再分化能の選抜を行った。培地組成はAsano *et al.*³に準じて下記のように定めた。供試種子を定法(70%エタノール1分、1.0%次亜塩素酸ナトリウム溶液1分浸透後、滅菌水で3回すすぐ)により滅菌後、ガンボルグビタミンを添加したMurashige & Skoog(以下、MS)基本培地に2,4-dichlorophenoxyacetic acid(以下、2,4-D)を2 mg/l、6-Benzylaminopurine(以下、6-BAP)を0.5 mg/l、 α -ケトグルタル酸を100 mg/l、リボフラビンを1 mg/l、ゲルライトを2.5 g/l加えた培地上で培養した。種子を置床後、30日間、25℃・暗条件下で培養し、カルス誘導を行った。優良な生育を示したカルスは、カルス誘導培地と同じ組成でホルモンフリーの再分化培地に置床し、28日間、25℃、24時間の明条件下で培養して、数

多くのシュートを形成することから再分化能が高いと認められるカルスを選抜した。そのカルスから再分化したシュート1本に由来する個体「EM2」をポット栽培に移し、栄養繁殖で維持した。品種登録出願に当たり、この個体「EM2」の栄養系を「シバ中間母本農1号」と付名した。

生長点を外植体とするカルスの再分化能を確かめるため、「シバ中間母本農1号」および「朝駆」(品種登録第10487号、育成:農研機構畜産草地研究所)⁸を供試して、3~4葉期の直立茎を70%エタノールで2分間浸透滅菌を行い、滅菌水で3回すすぎ、クリーンベンチ内で実体顕微鏡による観察を行いながら生長点を切り出した。上記と同じ培養条件で生長点からカルスを誘導し、カルス誘導率とそのカルスからの再分化率を求めた。直径1 cm以上のカルスについてはシュート数も求めた。

「シバ中間母本農1号」の再分化能が安定した特性であることを確認するため、生長点由来カルスから再分化した個体を用いて、さらに生長点からカルス誘導・再分化する処理を2サイクル繰り返した。

遺伝子組換えのモデル実験として、アグロバクテリウム法による β -glucuronidase(以下、GUS)遺伝子の形質転換を行った。「シバ中間母本農1号」の茎頂組織の生長点を外植体としてカルス誘導培地に置床し、25℃・暗条件下で培養してカルスを誘導した。1ヶ月後に誘導されたカルスを分割し、さらにカルス誘導培地で1ヶ月毎に3回以上継代培養した。遺伝子導入を可視化して確認することができる35S-Intron-GUS遺伝子(pIG121 Hm)を導入したアグロバクテリウムLBA4404株⁶(名古屋大学から分譲)のコロニーを液体AB培地⁴に植菌し、3日間・28℃で振盪培養した。この懸濁液20 mlに直径5 mm程度に分割したカルスを浸漬し、25℃・暗条件下で緩やかに振盪した。5日後、懸濁液からカルスを取り出して、アセトシリゴン50 mg/lを含む前述のカルス誘導培地に移し、25℃・暗条件下に7日間静置し共存培養した。カルベニシリン250 mg/lおよびセフトキシム200 mg/lを加えた滅菌水でカルスをすすいで付着しているアグロバクテリウムを除菌した後、ハイグロマイシン50 mg/l・カルベニシリン500 mg/l・セフトキシム100 mg/lをMS基本培地に加えたカルス誘導培地に置床し、25℃・暗条件下で約3ヶ月静置培養した。褐変せずに生き残ったカルスを、ハイグロマイシン50 mg/l・カルベニシリン500 mg/l・セフトキシム100 mg/lをMS基本培地に加えた再分化培地(選抜培地)に置床し、25℃・暗条件下で約1ヶ月間静置培養した。さらに生き残ったカルスを新しい選抜培地に置床し、25℃・34.2 μ mol/

m²/s・16時間日長条件で約2ヶ月培養し、再分化した植物体を鉢上げした。

再分化個体におけるGUS遺伝子の導入はPCRにより、発現は組織化学的染色法により確認した。PCRは100 µg/µlのCTAB法¹⁰⁾により抽出したゲノムDNA溶液0.5 µl, 10 × Ex Buffer 2.0 µl, dNTP (各2.5 mM) 1.8 µl, 5 U/µlの耐熱性DNAポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq, タカラバイオ株式会社, 大津市) 0.1 µl, 10 pmol/µlのプライマー各0.5 µl, 滅菌蒸留水14.6 µlの合計20.0 µlの反応液で行い, PCR反応の条件は, 95°Cで10分間, 続いて94°Cで30秒間, 55°Cで1分間, 72°Cで90秒間それぞれ保持するサイクルを30回, 最後に72°Cで10分間保持とした。PCRでは葉身0.1 gからゲノムDNAを抽出し, 35Sプロモーター遺伝子の内部配列5'-ATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC-3' およびGUS遺伝子の内部配列5'-CCCGGCTTTCTTGT AACGCGCT-3' のプライマーを用いて453 bpのPCR増幅バンドにより導入遺伝子の有無を確認した。PCR増幅バンドの確認は, 反応液10 µlをTAE (Tris-base 40 mM, Acetic acid 20 mM, EDTA-2Na 1 mM) バッファーを加えた1%のアガロースゲルにて100 V・30分の電気泳動で行い, 増幅バンドの染色はエチジウムブロマイドで行った。組織化学的染色法では葉身をGUS染色¹⁵⁾した後, 70%エタノールに3時間浸漬して葉緑素を脱色し, 染色の有無を観察した。

2. 形態的特性・生育特性の評価

品種登録の審査基準となっている「昭和57年度種苗特性分類調査報告書」¹¹⁾に基づき, 畜産草地研究所試験圃場(栃木県那須塩原市, 北緯36度55分・東経139度55分, 標高313 m)で特性評価を行った。同報告書で定める標準品種は「Emerald」・「Meyer」のみであるが, 両品種とも1950年代に米国農務省によって育成された匍匐茎の伸長性や葉長・葉幅が小さい品種であり¹⁾, 国内流通品種との比較対象として十分ではないため, 生育旺盛な国内育成品種を対照品種として加えた。対照品種には1995年以降育成された品種から, 緑度維持能の高い「みやこ」(品種登録第4300号, 育成:(株)ジェイツー), 匍匐茎の伸長性に最も優れる「朝駆」⁸⁾, 芝密度と匍匐茎の伸長性に優れる「朝萌」⁸⁾(品種登録第11724号, 育成:農研機構畜産草地研究所), 草高が低く葉色が濃い「つくばグリーン」(育成:茨城県)を選んだ。

各品種とも, 匍匐茎を採取して7.5 cm径ポリポット(個体植区)および5 cm角のピートモス製ポット(密植区)で育苗し, 2003年7月7日に個体植え・密植そ

れぞれ3反復で定植した。施肥はN:P₂O₅:K₂O各15 g/m²を年3回(4月下旬・梅雨明け後・9月上旬), 5 g/m²ずつ分施した。形態的特性・生育特性の評価は, 2003年から2006年にかけて「昭和57年度種苗特性分類調査報告書」¹¹⁾に基づいて行った。

データの有意差検定は, 統計処理ソフトウェア「JMP 7」(SAS Institute Japan 株式会社, 東京)を用いて行った。

結 果

1. 再分化系統の選抜と再分化能の評価

再分化系統の選抜において供試した市販種子約1万粒のうち, カルス誘導培地上で特に優良な生育を示したのは4粒由来のカルスのみであり, このうち, 再分化培地上で優れた再分化能を示したのは1粒由来のカルスのみであった。このカルスから再生した1本のシュートに由来する植物体を「シバ中間母本農1号」として栄養系で維持し, 以後の試験に使用した。

生長点由来カルスは, 「シバ中間母本農1号」が誘導率および再分化率ともに100%, 長径1 cm以上のカルス当たりの平均シュート数9.4であったのに対し, 「朝駆」はカルス誘導率は70%であったが, 再分化培地上ではカルスが褐変・枯死して全く再分化しなかった(図1, 表1)。

再分化個体の生長点からのカルス誘導・再分化を2サイクル繰り返した結果, 「シバ中間母本農1号」のカルス誘導率および再分化能は維持され, 安定した特性であることを確認した。

「シバ中間母本農1号」の生長点から誘導したカルスを用いてGUS遺伝子をアグロバクテリウム法で形質転換し, 得られた再分化植物体は13個体であった。これらの13個体すべてにおいて, PCRの結果ではゲノムDNAにGUS遺伝子が存在していることを示す453 bpのバンドが認められ(図2)⁹⁾, さらにGUS染色によって明らかな発色を示した(図3)。これらの結果は, 本品種のゲノムにGUS遺伝子が導入され, 発現したことを示している。

2. 形態的特性・生育特性の評価

特性評価の結果, 「シバ中間母本農1号」と標準品種「Emerald」・「Meyer」および対照品種「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」の特性評価値の間には有意差が認められた。以下の記述において単位を付さない数値は, 9段階評価値の3反復平均値を示す。

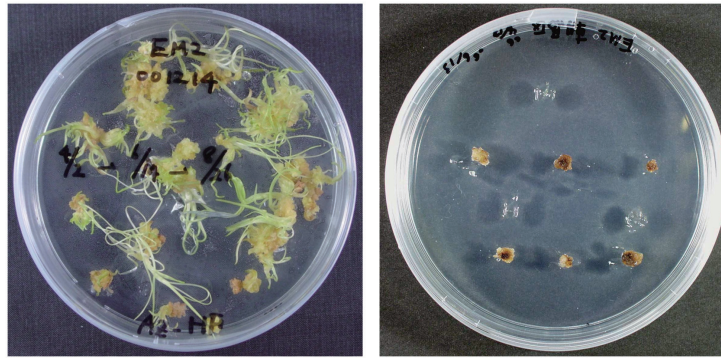


図1. 生長点から誘導したカルスの再分化培地上での再分化（左：シバ中間母本農1号）と褐変（右：朝駆）

表1. カルス誘導培地における誘導率および再分化培地における再分化能

		シバ中間母本農1号	朝駆
カルス誘導率		100% (100)	70% (30)
再分化率		100% (100)	0% (30)
シュート数	平均	9.4	0
	最大値	22	0
	最小値	4	0

注：カルス誘導率は生長点からの誘導率で示した。（ ）内の数字は置床数を示す。再分化率は再分化培地に置床したすべてのカルスについて、シュート数は長径1cm以上のカルスについて計測した。

1) 形態的特性等

草型（極直立：1～極匍匐：9）は5.8で標準品種・対照品種との間に有意差がなかった。匍匐茎の密度（極疎：1～極密：9）は2.4で「Emerald」・「朝駆」・「朝萌」より疎であり、「Meyer」・「みやこ」・「つくばグリーン」並みであった。匍匐茎の長さは定植3ヶ月後は14.0 cm、同11ヶ月後は18.3 cmで「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」より短く「Emerald」・「Meyer」並みであった。匍匐茎の太さは2.26 mmで「Emerald」・「Meyer」・「みやこ」・「朝萌」・「つくばグリーン」より太く「朝駆」より細かった。葉長は4.97 cm、葉幅は5.12 mmで「Emerald」・「Meyer」・「みやこ」・「つくばグリーン」より大で、「朝駆」・「朝萌」並みであった。葉色（極淡：1～極濃：9）は4.3で「Meyer」・「朝駆」・「つくばグリーン」より淡く、「Emerald」・「みやこ」・「朝萌」並みであった（表2）。

出穂茎の太さは1.33 mmで「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」より太く「朝萌」並み、出穂茎の長さは15.2 cm、穂長は46.8 mmで「Meyer」より長く「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」並みであった。穂色（極淡：1～極濃：9）は7.0で

「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より濃く、小穂長は3.75 mmで「みやこ」・「朝萌」より長く「Meyer」・「朝駆」並み、小穂幅は1.41 mmで「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より広く、小穂数（1穂当たりの計数値）は49.5で「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」より多く「朝萌」並みであった（表3）。出穂始め（極早：1～極晩：9）は7で有意差検定はできなかったが遅めであり、出穂は春のみであった。穂数は1484.5本/m²で「Meyer」より少なく「朝萌」並み、自然受粉による稔実率は1.2%で「Meyer」・「朝駆」・「朝萌」より低かった（表4）。

2) 生育特性

定植後の初期生育（極不良：1～極良：9）は3.1で「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より不良で「Emerald」・「Meyer」・「つくばグリーン」並み、2004年春の草勢（極不良：1～極良：9）は2.0で「Emerald」・「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より不良で「つくばグリーン」並み、2004年秋の草勢（極不良：1～極良：9）は3.0で「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」より不良で「Emerald」・「Meyer」並み、再生の良否（極不良：1～極良：9）は5.3で「みやこ」・「朝駆」より良で

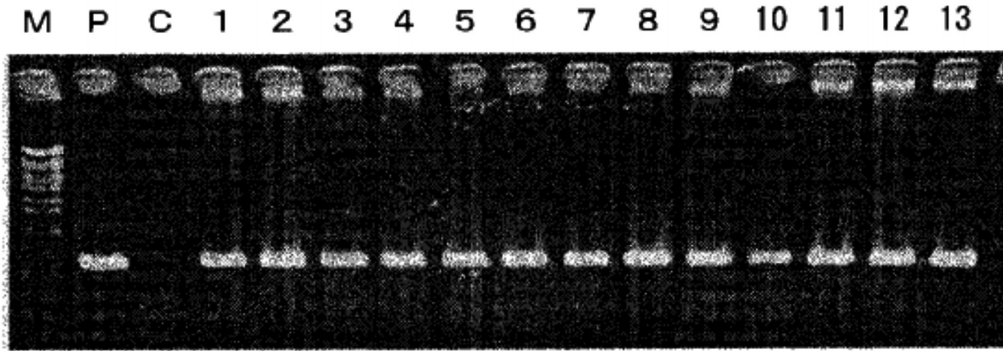


図2. PCRによるGUS遺伝子導入の確認

M:分子量マーカー (λ-EcoT14I), P:バイナリーベクター pIG121 Hm のPCR産物, C:非形質転換「シバ中間母本農1号」のPCR産物, 1~13:「シバ中間母本農1号」由来形質転換体 (全13個体) のPCR産物

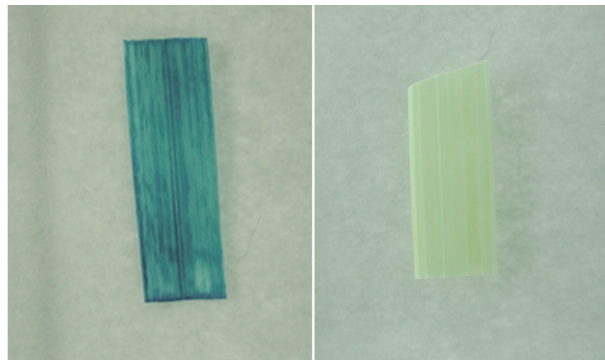


図3. 葉身の組織化学的染色によるGUS遺伝子発現の確認

左:GUS遺伝子が発現している「シバ中間母本農1号」カルス由来の再分化個体, 右:非形質転換「シバ中間母本農1号」

表2. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の形態的特性 (栄養体)

品種	草型	匍匐茎の密度		匍匐茎の長さ (cm)		匍匐茎の太さ (mm)		葉長 (cm)	葉幅 (mm)	葉色	
		極直立:1~ 極匍匐:9	極疎:1~ 極密:9	定植3ヶ月後	定植11ヶ月後	極淡:1~ 極濃:9					
シバ中間母本農1号	5.8 ab	2.4 c	14.0 d	18.3 c	2.26 b	4.97 ab	5.12 a	4.3 de			
Emerald	7.0 a	5.2 ab	33.5 bed	39.1 bc	1.14 e	2.07 d	1.69 d	5.2 cd			
Meyer	4.3 b	3.0 bc	24.0 cd	36.5 bc	1.65 d	2.20 d	3.13 c	6.4 b			
みやこ	6.5 a	4.7 abc	50.0 b	55.4 b	1.89 cd	3.65 c	4.25 b	3.9 e			
朝駆	6.4 a	4.7 ab	122.6 a	141.9 a	2.69 a	5.61 a	5.53 a	6.1 bc			
朝萌	6.0 ab	5.4 a	115.6 a	118.8 a	1.83 cd	4.29 bc	4.78 ab	4.4 de			
つくばグリーン	6.5 a	4.0 abc	43.9 bc	55.8 b	1.94 c	1.83 d	4.06 b	7.6 a			

注: Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

「Emerald」・「Meyer」・「つくばグリーン」並みであった。緑化の早晚 (3月31日を0とした日数) は2005年は22.0で「Emerald」・「Meyer」・「朝駆」より早く「みやこ」・「朝萌」・「つくばグリーン」並みであったが, 2006年は

25.0で「Emerald」・「つくばグリーン」より早く「朝萌」より遅く「Meyer」・「朝駆」並みであった (表5)。

紅葉の早晚 (10月31日を0とした日数) は16.7で供試品種・系統の中で最も早かった。越冬の良否 (極不良:

1～極良：9)は4.0で有意差は検出できなかった。越夏の良否(極不良：1～極良：9)は5.3で最も不良であった。さび病(*Puccinia zoysiae* Dietel)抵抗性(審査基準における表記はシバさび病抵抗性, 極弱：1～極強：9)は4.3

で最も弱, 斑葉葉巻病抵抗性(極弱：1～極強：9)は9.0と罹病が認められず, 「Meyer」より強く「Emerald」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」並みであった(表6)。

表3. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の形態的特性(穂・種子, その1)

品種	出穂茎の太さ (mm)	出穂茎の長さ (cm)	穂長 (mm)	穂色 極淡：1～ 極濃：9	小穂長 (mm)	小穂幅 (mm)	小穂数 小穂/穂
シバ中間母本農1号	1.33 a	15.2 a	46.8 a	7.0 a	3.75 ab	1.41 a	49.5 a
Emerald	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Meyer	0.73 c	7.8 b	25.8 b	2.6 c	3.37 bc	0.93 c	31.5 c
みやこ	0.73 c	15.4 a	43.7 a	4.4 b	3.08 c	0.90 c	39.5 b
朝駆	1.03 b	13.0 a	43.3 a	4.4 b	4.20 a	1.18 b	34.5 bc
朝萌	1.10 ab	12.2 a	47.6 a	4.8 b	3.06 c	1.15 b	50.7 a
つくばグリーン	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -

注1：Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

注2：「Emerald」, 「つくばグリーン」は試験期間中出穂しなかった。

表4. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の形態的特性(穂・種子, その2)

品種	出穂始め 極早：1～ 極晩：9	春秋の出穂の有無 1：不出穂, 2：春のみ, 3：秋のみ, 4：春も秋も	穂数 本/m ²	稔実率(自然受粉) (%)
シバ中間母本農1号	7 -	2 -	1484.5 b	1.2 d
Emerald	- -	1 -	- -	- -
Meyer	5 -	2 -	2714.2 a	76.4 a
みやこ	7 -	4 -	- -	- -
朝駆	6 -	2 -	- -	25.2 c
朝萌	6 -	2 -	635.1 b	49.1 b
つくばグリーン	- -	1 -	- -	- -

注1：Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。出穂始めには反復間差がないため, 春秋の出穂の有無は質的形質であって不連続値のため検定できなかった。

注2：「Emerald」, 「つくばグリーン」は試験期間中出穂しなかった。

注3：稔実率は試験圃場において放任受粉状態で結実した種子数を小花数で除して求めた。

表5. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の生育特性(その1)

品種	初期生育 極不良：1～ 極良：9	2004年春の草勢 極不良：1～ 極良：9	2004年秋の草勢 極不良：1～ 極良：9	再生の良否 極不良：1～ 極良：9	緑化の早晚 (2005年) 3月31日を0と した日数	緑化の早晚 (2006年) 3月31日を0と した日数
シバ中間母本農1号	3.1 b	2.0 c	3.0 b	5.3 ab	22.0 a	25.0 cd
Emerald	4.3 b	3.7 b	3.7 b	5.5 ab	16.0 c	37.0 a
Meyer	4.3 b	3.7 b	3.3 b	5.2 ab	18.3 bc	23.0 de
みやこ	6.2 a	6.0 a	5.7 a	3.0 c	20.0 ab	- -
朝駆	6.5 a	7.3 a	5.7 a	3.3 c	18.7 bc	27.0 c
朝萌	6.8 a	7.3 a	7.0 a	4.2 bc	20.0 ab	20.0 e
つくばグリーン	3.6 b	3.0 bc	5.7 a	6.3 a	21.0 ab	31.0 b

注：Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

表 6. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の生育特性（その2）

品種	紅葉の早晚 (2003年)		越冬の良否		越夏の良否		さび病抵抗性		斑葉葉巻病抵抗性	
	10月31日を0と した日数		極不良：1～ 極良：9		極不良：1～ 極良：9		極弱：1～ 極強：9		極弱：1～ 極強：9	
シバ中間母本農1号	16.7	e	4.0	n.s.	5.3	e	4.3	c	9.0	a
Emerald	30.7	abc	6.0		6.9	c	9.0	a	9.0	a
Meyer	24.0	d	5.3		6.1	d	7.0	b	5.7	b
みやこ	35.0	a	4.0		8.9	b	9.0	a	9.0	a
朝駆	33.0	ab	4.3		8.9	b	9.0	a	7.3	ab
朝萌	30.0	bc	5.0		9.0	a	9.0	a	8.7	a
つくばグリーン	28.0	cd	6.0		8.9	b	9.0	a	8.7	a

注：Tukeyの多重比較の結果、異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

考 察

GUS 遺伝子を形質転換した「シバ中間母本農1号」の生長点由来カルスが再分化し、その再分化個体のゲノム DNA に GUS 遺伝子が導入されていることが PCR によって、GUS 遺伝子の発現が GUS 染色によって、それぞれ示された。サザン解析においても形質転換体のみから GUS 遺伝子配列のシグナルが検出され（データ省略）、これらの結果から遺伝子組換え植物が得られたことが示された。目的とする他の遺伝子を GUS 遺伝子に置き換えれば、同様に目的遺伝子を導入することが可能である。

アグロバクテリウム法によるシバの形質転換に関して、種子由来のカルスを用いた方法が2003年に報告された¹⁷⁾。さらに、形質転換系の効率化・単純化のためシバ品種「El Toro」の匍匐茎節を用いてカルスへの脱分化・再分化を経ずに直接遺伝子組換えする方法が報告された⁵⁾。これらの報告のうち、種子由来カルスでは遺伝的に均一な材料を使わず、匍匐茎節を用いた場合は形質転換効率が6.8%と低く、匍匐系節の発育程度の差が影響している可能性がある。本報告の再分化能が高い品種の生長点由来のカルスを経る方法では多数の均一な細胞レベルの材料を揃えることができ、また、遺伝的にも均一なため、再現性の高い実験材料を提供する意味で高い有用性を持つ。本報告で記述したように特許第4228044号「シバ属植物の再分化植物体及び形質転換植物体」で用いた方法⁹⁾と「シバ中間母本農1号」を組み合わせるにより、シバの遺伝子組換え研究が進むことが期待される。我が国では遺伝子組換えに対する社会的受容性が低く、遺伝子組換え農産物と混ざらないよ

うに（意図しない混入が5%以下に）管理されたことを示す「遺伝子組換えでない」表示がされている加工食品が多い。一方で、「青いバラ」に代表されるように花卉類では遺伝子組換えの成果が好意的に報道されることもあり、シバを含む非食用の緑化・観賞用植物では受容されやすいとも考えられる。病害虫抵抗性品種の育成を通じた芝生の減農薬管理の達成など、芝生管理者や芝生利用者の需要に沿った遺伝子組換えに本品種が利用されることが期待される。

「シバ中間母本農1号」の形態的特性は、葉長・葉幅・出穂茎の太さ・小穂数は大であるが、匍匐茎の密度・長さは小であるため、「朝駆」・「朝萌」のように疎植による草地・芝生造成には適していない。さらに生育特性では、初期生育・春の草勢・秋の草勢が供試品種中最低値を示したことから、さび病抵抗性が弱く顕著な発病を示した（図4）ことから、牧草・芝草としての実用栽培には適さないと判断する。2003年の紅葉の早晚は16.7と最も早かったが、2004年以降は夏から秋にかけて「シバ中間母本農1号」にさび病の発生が多く、観察不可能であった。越夏の良否は5.3と最も不良であったが、判断基準となる被覆率や葉の枯死程度がさび病の発生に影響され、必ずしも夏季の気象条件に依存しない可能性がある。さび病の発生程度は感染源の多寡によって影響を受けるので、発生が多い地域・圃場で栽培する場合は越夏性・越冬性に影響を及ぼす可能性に注意し、薬剤防除やポット栽培等でバックアップの栄養系を維持するなどの対策が必要である。一方で、さび病の感染源や罹病性の基準品種など、芝生病害の研究材料としての利用も考えられ、本品種が芝草の研究・技術開発に貢献することが期待される。

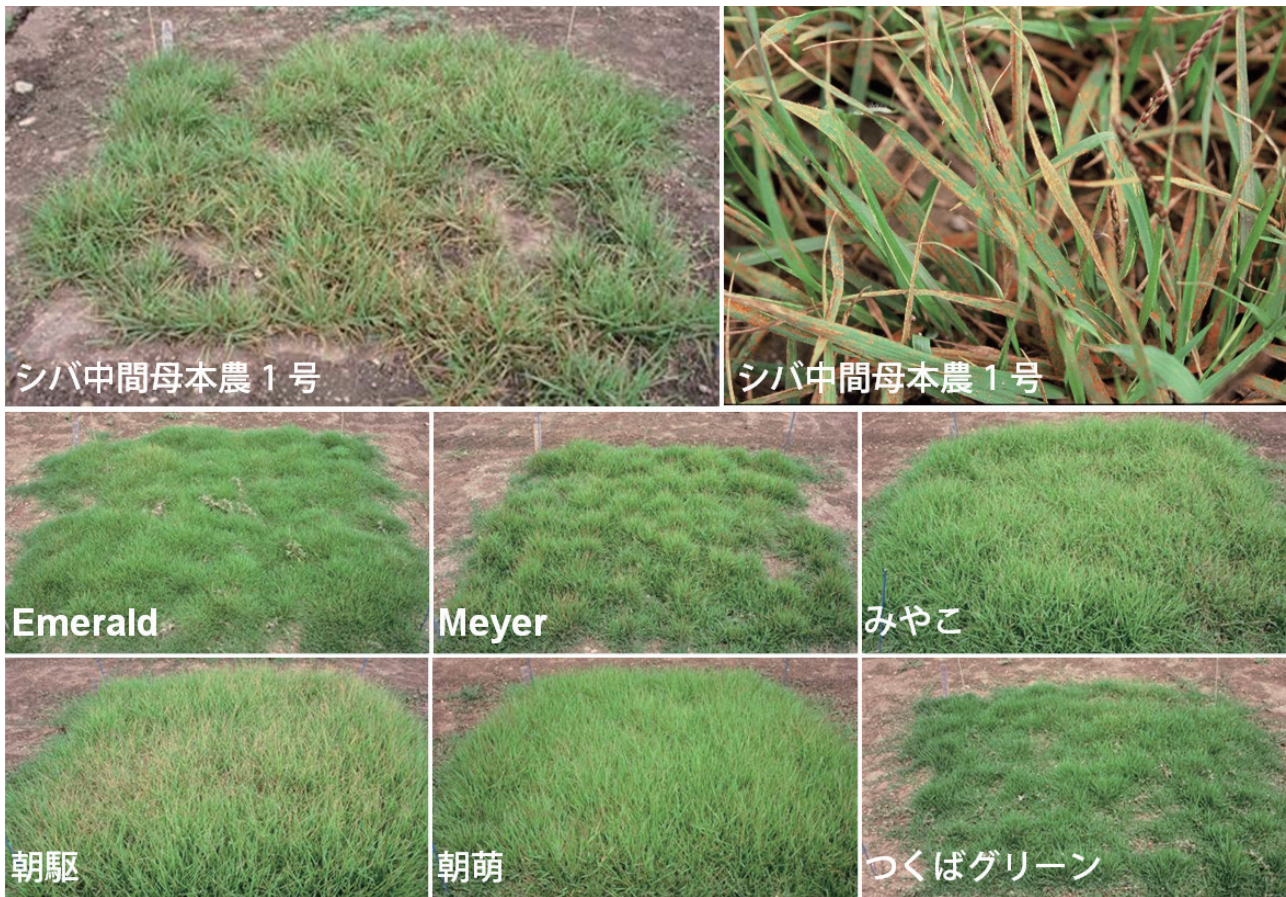


図4. 「シバ中間母本農1号」と標準・対照品種の草姿とさび病罹病程度
(2004年7月5日に畜産草地研究所試験圃場にて撮影)

引用文献

- 1) Agricultural Research Service, USDA (1972). *Zoysia japonica* Steud., Japanese lawngrass and *Zoysia japonica* × *Z. tenuifolia* Willd. ex Trin., In: Grass varieties in the United States, 115-116, U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.
- 2) Al-Khayri, J. M., Huang, F. H., Thopmpson, L. F. and King J. W. (1989). Plant regeneration of Zoysiagrass from embryo-derived callus, *Crop Sci.*, 29, 1324-1325.
- 3) Asano, Y., Katsumoto H., Inokuma C., Kaneko S., Ito Y. and Fujie A. (1996). Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud., *J. of Plant Physiol.*, 149, 413-417.
- 4) Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1974). *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3672-3676.
- 5) Ge, Y., Norton, T. and Wang, Z.-Y. (2006). Transgenic zoysiagrass (*Zoysia japonica*) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Cell Rep.*, 25, 792-798
- 6) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation on rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant J.*, 6, 271-282.
- 7) 北村文雄 (1970). 日本芝の園芸的分類および成立に関する研究, 東京大学農学部附属園芸研究所研究報告, 3, 1-60.
- 8) 小林真・蝦名真澄・春日重光・奥村健治・高井智之・荒谷博・鶴見義朗・中川仁 (2013). シバ品種「朝駆」

- および「朝萌」の育成, 畜産草地研究所報告, 13, 11-22.
- 9) 小林正樹・福澤洋光・蝦名真澄・高溝正・中川仁・小林真. シバ属植物の再分化植物体及び形質転換植物体, 特許第 4228044 号, 2008.
- 10) Murray, M.G. and Tompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucl. Acids Res.* 8, 4321-4325.
- 11) 日本飼料作物種子協会 (1983). 昭和 57 年度種苗特性分類調査報告書
- 12) 農林水産省食料産業局新事業創出課 (2013). 農林水産省品種登録ホームページ, <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>
- 13) 農林水産省生産局 (2013). 平成 23 年花木等生産状況調査
- 14) Rahman, S.M.L., Mackay, A.W., Ebina, M., Nakagawa, H., Ahmed, A.S.M.M. and Quebedeaux, B. (2003). Transient gene expression in *Zoysia japonica* using *Agrobacterium tumefaciens*, *Subtrop. Plant Sci.*, 55, 11-17.
- 15) 高橋美佐・森川弘道 (1997). GUS 遺伝子のトランジェントアッセイ, 植物工学別冊 植物細胞工学シリーズ 6 植物の細胞を観る実験プロトコール (福田裕穂・西村幹夫・中村研三監修), 秀潤社, 東京, 75-77.
- 16) 反保宏行・豊田秀吉・野々村照雄・大内成志 (1994). ノシバ (*Zoysia japonica* Steud.) におけるカルス誘導とその個体再生, *芝草研究*, 23, 27-30.
- 17) Toyama, K., Bae, C.H., Kang, J.G., Lim, Y.P., Adachi, T., Riu, K.Z., Song, P.S. and Lee, H.Y. (2003). Production of Herbicide-tolerant *Zoysiagrass* by *Agrobacterium*-mediated Transformation, *Molecules and Cells* 16, 19-27.

Breeding of “Japanese Lawngrass Intermediate Parent Nou 1”

Makoto KOBAYASHI*, Masumi EBINA*, Tadashi TAKAMIZO and Shin-ichi TSURUTA^a

Forage Crop Research Division,
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, 329-2793 Japan

Summary

The vegetatively propagated cultivar of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) “Japanese Lawngrass Intermediate Parent Nou 1” was selected for tissue culture adaptability from about 10,000 seeds which were genetically heterogenous and commercially sold as “common”. The cultivar shows superior redifferentiation ability of callus induced from shoot apical meristem. Because homogenous and/or homozygous seeds are not available in Japanese lawngrass, conventional method inducing callus from seed are poor in repeatability. The cultivar enables homogenous callus induction from meristem and promotes reliability of tissue culture and genetic transformation. As a model, genetic transformation of GUS (β -glucuronidase) gene was tested and successful. The cultivar was registered as number 18204 in 2009 by The Plant Variety Protection and Seed Act. Its leaf size, culm diameter and number of spikelet are significantly bigger than standard cultivars. Because density and length of stolon, vigor of early stage, spring vigor, fall vigor and resistance to rust disease are significantly inferior to standard cultivars, “Japanese Lawngrass Intermediate Parent Nou 1” will not be adaptable to actual use as forage grass and turf grass. It will be valued as experimental material and will contribute to studies for genetic transformation and rust disease.

Key words: Japanese lawngrass, redifferentiation ability, gene recombination, rust

* First coauthors

^a Present address: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ishigaki, 907-0002 Japan