

## 研究ノート

クリーピングベントグラス (*Agrostis palustris*)

## カルス誘導とその個体再生

反保宏行\*・豊田季吉\*\*・大内成志

芝草は土壤侵食の防止、庭園の栽植など多面的に利用されているが、特に、ゴルフ場ではその栽培管理が最重要課題となっている。しかし、ゴルフ場の芝草は栽植草種も抵抗性の弱いベントグラスと日本芝の2種類に限定されており、また、踏圧や頻繁な刈り込みなどの苛酷な条件下におかれるため、病虫害の発生が著しく、その防除対策が問題となっている<sup>1)</sup>。これらの病虫害は適切な農業施用によって防除することができるが、抵抗性草種の育成も効果的防除策になると考えられる。そこで、筆者らは、細胞工学的手法、特に体細胞変異選抜法による芝草の病害抵抗性系統の育成を試みることにしたが、芝草については、このような観点からの研究がほとんど行われていないので、まず、基礎的な培養条件を確立することが必要であると考えた。本論ではゴルフ場などで特に栽植頻度の高いベントグラスを材料とし、そのカルス誘導ならびに個体再生の条件について検討したので、その結果を報告する。

本実験にはクリーピングベントグラス (*Agrostis palustris*) の品種ペンクロスを使用し、培養にはその成熟種子を用いた。まず、70%エタノールで5分間、1%次亜塩素酸ナトリウムで20分間浸漬滅菌した種子を26°Cの温室、全日長照明(4,000 lux)下に3~4日間置き、発芽種子を得た。次に、液体MS<sup>2)</sup>培地(pH 5.6)に浸漬した濾紙支持体上に発芽種子を置床し、上述と同様の条件下で培養した。培地に添加する2,4-Dの濃度は、

0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 および 16.0  $\mu\text{g/ml}$  とし、1回の実験には、1濃度区につき20粒の発芽種子を置床して、3~4回の反復実験を行った。その結果、培養開始10~12日後には、すべての2,4-D添加区で発芽部位から淡黄色のカルスが誘導されたが、2,4-Dを添加しない区では、培養をさらに継続してもカルスの誘導は認められなかった。種子当たりのカルス誘導率は添加した2,4-D濃度にかかわらず、いずれの区でも100%であり、誘導されたカルスの形態や増殖についても、これらの濃度区間に有意な差異は認められなかった。そこで、カルス組織が5 mm程度に増殖した時点で(培養20日後)、カルス組織のみを切除し、それぞれを同一組成のMS培地に移植して個体再生に及ぼす2,4-Dの影響について検討した。その結果、移植10~20日後には、16.0  $\mu\text{g/ml}$  の2,4-D添加区を除くすべての濃度区で緑色小斑の形成が認められ、さらに5~8日後には50~80%の緑色小斑から幼苗形成が観察された。Fig. 1に示すように、緑色小斑および幼苗形成率ともに、1.0  $\mu\text{g/ml}$  の2,4-D添加区において最も高く、また、カルス当たりの再分化幼苗数(平均幼苗数, 6.7個)についても本濃度区が最高であった。Fig. 2-Aと2-Bには、1.0  $\mu\text{g/ml}$  2,4-D区で形成された再分化個体を示す。これらの再生個体はその後良好な生育を示し、ホルモン無添加MS培地(1/10強度)に移植したところ、約2週間で発根し、良好な根の伸長が観察された。これら再生個体を温室で数日間馴化させた後、通常の土壌条件で栽培したところ、対照の種子発芽個体と同様の生育を示し(Fig. 2-C)、自殖種子の採取も可能であった。

ペンクロスの培養系については、すでにZhongら<sup>3)</sup>が成熟種子由来カルスの胚様体形成を報告し、個体再生にはdicambaとBAの添加が必要であると報告している。また、Kransら<sup>4)</sup>およびBlancheら<sup>5)</sup>は、長期継代した穎果由来カルスからの個体再生には2,4-Dもしくは2,4-Dとカイネチンの添加が有効であると報告している。本研究においては、ペンクロスの成熟発芽種子を使用し、

Hiroyuki TANPO\* Hideyoshi TOYODA\*\* and Seiji OUCHI\*\*

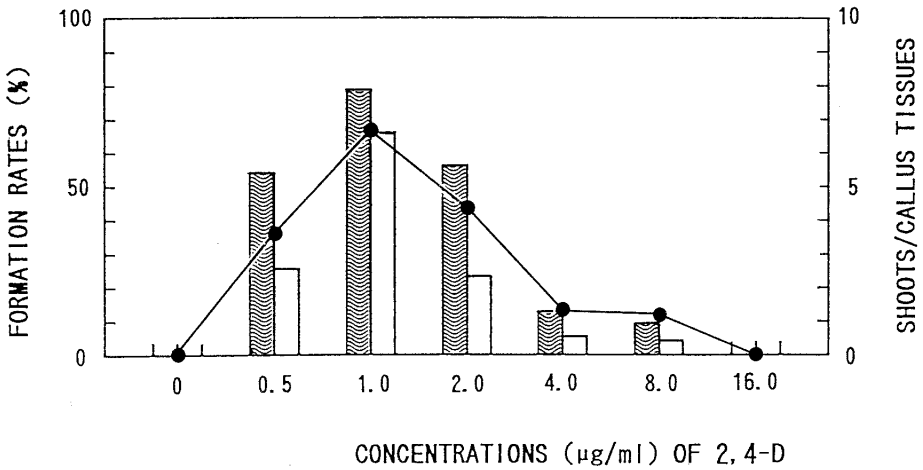
Callus Induction and Plant Regeneration in Creeping Bentgrass (*Agrostis palustris*).

\* 林化学工業株式会社技術部  
(〒601 京都市南区吉祥院石原堂ノ後西町31)

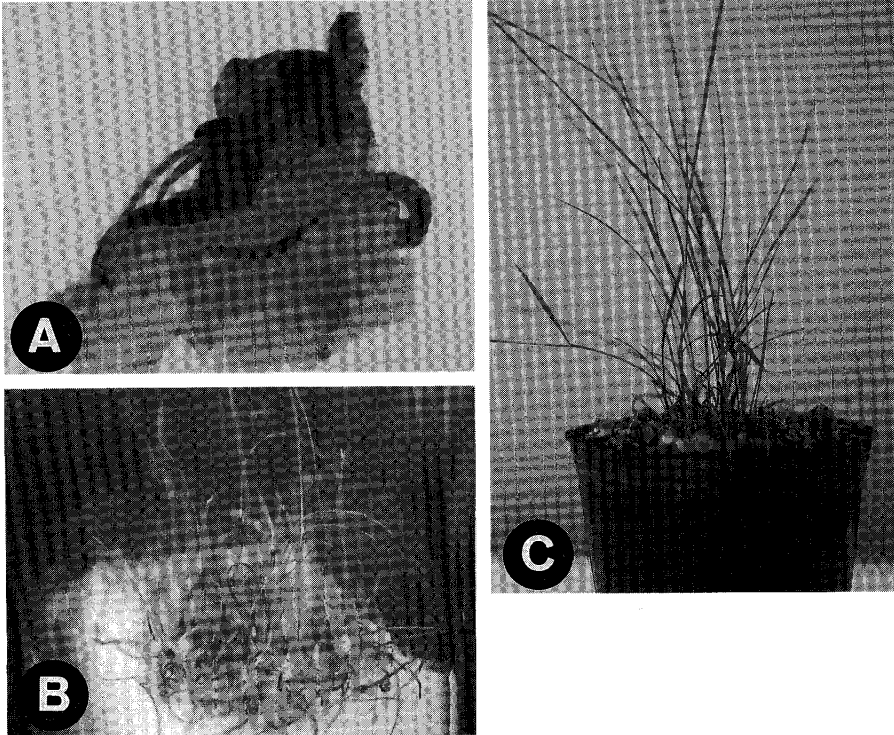
\*\* 近畿大学農学部植物病理学研究室  
(〒631 奈良市中町3327-204)

\* Hayashi Chemical Industry Co., Ltd., Kyoto, 601 Japan

\*\* Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi 3327-204, Nara, 631 Japan



**Fig. 1** Plant regeneration from callus tissues of creeping bentgrass (*A. palustris* cv. Penncross). Germinating seeds were cultured in MS medium containing various concentrations of 2,4-D, and callus tissues were excised and transferred to fresh media with the same 2,4-D concentrations for subculturing. Formation of greening spots (shaded box) and shoots (open box) were scored 40 and 50 days after incubation, respectively. The number of shoots per callus tissue (solid line) was also examined 50 days after incubation. The data were given as the means of four separate replications.



**Fig. 2** Plant regeneration of callus tissues of creeping bentgrass (*A. palustris* cv. Penncross). Several shoots were redifferentiated 20 (A) and 35 days (B) after subculturing callus tissues with MS medium containing 1.0 µg/ml 2,4-D. Regenerants (C) were acclimated and transplanted to soil, and viable seeds were obtained from these regenerants 3 months after planting.

カルス誘導とその個体再生条件を検討したが、筆者らが確立した培養法には、① 2,4-D を単独に添加した場合でも、発芽種子からカルス組織が効率よく誘導され、さらにカルスから不定芽を経由して個体再生される（1000粒の種子を使用すれば、最終的には最高3000の再生個体が得られる）こと、②同一培地条件で、単一の継代操作を行うだけで、誘導されたカルスから個体再生が行えること、③培養を開始して約2カ月（Zhongら<sup>3)</sup>は個体再生に15週間を要した）で多数の再生個体が得られること、などの利点がある。このような結果は、筆者らの培養法においてもペンクロス<sup>®</sup>の効率的で迅速な培養が可能であることを意味するもので、本法を利用すれば体細

胞変異選抜をはじめとする細胞工学実験が効果的に遂行できるものと考えた。（1992年7月15日受理）

#### 文 献

- 1) 谷 利一, 1988. 新訂芝生と緑化 (日本芝草学会編), p. 197-205, ソフトサイエンス社, 東京.
- 2) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 3) Zhong, H., C. Srinivasan, M. B. Sticklen, 1991. *Plant Cell Rept.*, **10**: 453-456.
- 4) Krans, J. V., V. T. Henning, K. C. Torres, 1982. *Crop Sci.*, **22**: 1193-1197.
- 5) Blanche, F. C., J. V. Krans, G. E. Coats, 1986. *Crop Sci.*, **26**: 1245-1248.