

博士論文

PSR 培地を用いたコショウランの高效率な大量増殖  
と分子育種への応用に関する研究

長岡技術科学大学 工学研究科  
生物統合工学専攻 榎 真一  
指導教員 高原 美規

## 目次

第1章 緒言	・・・3
第1節 背景	・・・3
1. コチョウラン	・・・3
2. コチョウランにおける組織培養	・・・4
3. コチョウランの組織培養における問題点と PSR 培地	・・・8
4. コチョウランの品種改良	・・・13
第2節 目的と本論文の構成	・・・15
第2章 PSR 培地の有用性の検証	・・・16
第1節 各培地におけるシュート生存率および生育指標の比較	・・・16
第2節 フェノール様物質の測定	・・・23
1. フェノール様物質の定量	・・・23
2. フェノール様物質の培地への拡散	・・・26
第3節 不定芽増殖法の様々な種・品種への適用	・・・28
第4節 考察	・・・36
第3章 ePLB を用いたコチョウラン効率的な大量増殖系の検討	・・・44
第1節 PLB 増殖と長さに対する光条件の影響	・・・46
第2節 ePLB 増殖に対する光順化の影響	・・・50
第3節 部分切開処理を行った nPLB と ePLB 間の増殖率の比較	・・・54
第4節 考察	・・・58
第4章 ePLB を用いた形質転換系の検討	・・・64

1. 緒言	・ ・ ・ 64
2. 材料および方法	・ ・ ・ 65
3. 結果と考察	・ ・ ・ 70
第5章 総合考察	・ ・ ・ 80
摘要	・ ・ ・ 85
謝辞	・ ・ ・ 88
参考文献	・ ・ ・ 89

## 第 1 章 緒言

### 第 1 節 背景

#### 1. コチョウラン

ラン科植物は単子葉植物綱において最も種数の多い科であり，被子植物門全体の中でもキク科，マメ科とともに最も繁栄しているグループの 1 つである．ラン科植物は世界中の寒帯以外の地域，特に熱帯地域に広く分布する．ラン科植物の生態的特徴として，樹木や岩肌にその太い根を利用し付着して生育する着生ランと呼ばれるものが多く存在し，またシンビジウムなど地面に根を張り生育する地生ランと呼ばれる種類も存在する．ラン科植物は唇弁や蕊柱などのラン科植物独特な構造を持ち，特徴的な左右対称の花を付ける．植物体はバルブ（偽球茎）などの特殊な構造を持つことが多く，成長の特徴から複茎性種と単茎性種に分類される．シンビジウムやカトレアに代表される複茎性のランは，栄養貯蔵器官であり一般の植物の茎に当たるバルブを持つことが多い．また株元から芽を出し，バルブが増殖していくため，株分けによる増殖が比較的容易である．単茎性のランは単一の主茎から毎年数枚の葉を展開し続けて成長する．また複茎種と異なり，成長しても茎が複数化しないため，株分けなどによる人為的な栄養繁殖は困難である．単茎種でも花茎から偶発的に生じる高芽を採り新しい株を得ることはできるが，増殖率は極めて小さい．

ラン科植物の中でコチョウランの原種は，フィリピンや中国南部や台湾などの東南アジアや熱帯・亜熱帯地方に多く分布している（千葉，2002）．コチョウランは前述の着生ラン，単茎性に分類される．熱帯雨林などの高温多湿型で標高の高い地域の樹木に着生し，風通しの良い環境に生息する．発芽から 5 年程度で主茎から花茎を伸ばしそこに多数の花を付ける．コチョウランと呼ばれる園芸品種は，*Phalaenopsis* 属の原種と近縁の *Doritis* 属の原種及びそれらの種

間，属間交配により作出された園芸品種を指す．コチョウランの原種の数はずしも定まったものではなく，分類基準の見直しなどにより増減がある．最近では，分子遺伝学的方法による種分類の情報蓄積がなされており，Christenson（2001）は従来別属とされていた *Doritis* 属を含め，コチョウラン属を 5 亜属からなる 62 種とすることを提案している．

ラン科植物は生態・形態的特徴が多様であり，花色，草姿が美しい種が多いため，人々を魅了してきた．またコチョウランを含むラン科植物は，近縁の他属との属間交配が容易なため，多様な品種が多く作出されており，世界中に愛好家の数も多い．現在，コチョウランは白花大輪系の品種が最も多く生産されており，美しく，長持ちする大きな花を多数付ける豪華さ，華やかさから，高級鉢物やコサージュ，ブーケの切り花用の商品として大きな市場を形成している．日本の花卉産出額において 627 億円で第一位のキクに続き，洋ラン類は 310 億円で第二位と花卉類の中でも需要が高い（農林水産省，2014）．さらに，コチョウランは日本で営利生産される洋ランのなかでは，シンビジウム，カトレア等を上回り，生産量および生産額が第一位であり（日本花き生産協会洋らん部会，2013），また洋ランの中でも平均単価が高く，園芸花卉の中でも非常に商業的価値の高い植物である．

## 2. コチョウランにおける組織培養

### ランの種子発芽

高等植物では，地下部，特に根が菌（菌根菌）と相利共生状態にあるものが多い．ラン科植物に関与する菌は，ラン科菌根菌に分類され，その多くは担子菌類の *Rhizoctonia* に属する．ランでは，種子発芽から独立栄養に達するまでの発生初期の成長をもっぱら共生菌（菌根菌）に依存する（筒井，1988）．コチョウランを含むラン科植物の種子は，栄養貯蔵組織である胚乳を持たない無

胚乳種子であり、胚と種皮のみからなる構造を持つ。さらに胚の大きさも小さく未発達なため、自発的な発芽成長は非常に困難である。自然状態での発芽の過程では、一般にラン菌と呼ばれる前述の共生菌との共生により、種子が吸水し、必要な養分を獲得できるようになり、種子中の胚が肥大し、発芽可能な状態になる。その後、胚はさらに肥大し、やがて種皮を破り外へと裸出する。発芽前の胚が種皮から脱離するこの現象は、ラン科植物独特の現象であり、この段階の胚構造はプロトコーム (protocorm) と呼ばれる。その後プロトコームはその下部から仮根が形成された後、上部から芽が分化し、さらに芽の基部から根が分化することで幼植物体へと発達する。

#### ランにおける組織培養の歴史

ランは花粉塊により受粉するため、種によっては一度の受粉で数万もの種子を形成するが、先に述べたラン菌と偶然共生が成立した場合にのみ発芽できるため、発芽率は非常に低い。このため古くから、人為的な栄養培地上での無菌播種法による発芽が研究されている (Knudson, 1922)。コチョウランでは、現在でも白花大輪系品種などの遺伝的にバラつきが少なく表現型の分離が問題とならないものは、無菌播種法による実生苗を用いて営利生産されることが多い。しかし、色花系統では種子繁殖による実生由来の苗は、次世代の形質において花の濃淡など表現型の分離を生じ、また育種の遅れた雑種性の高い品種では実生苗の生育特性などの揃いが悪い。これらの問題の克服のために、組織培養による栄養繁殖で優良個体を増殖するクローン苗生産の手法が研究されてきた。

ラン科植物における組織培養による栄養繁殖の最初の報告は、コチョウランの花茎腋芽培養であり、高芽採りを培養で行うものであった (Rotor, 1949)。さらに、組織培養により少数の外植片から多数の苗を得る初期の試みとして、シンビジウムの茎頂培養における研究がある (Morel, 1960)。シンビジウムの

茎頂培養では、茎頂から直ぐには植物体が分化せず、ラン科植物特有の構造であるプロトコーム状の球体: *Protocorm like body* (PLB) と呼ばれる組織が形成される。この PLB は特定の条件で培養を行うことで表面に多数の二次 PLB を形成するため急速に増殖し、またその後プロトコームと同様、幼植物体へと分化する。茎頂培養による PLB の誘導と増殖法は、他のラン科植物でも多くの研究がなされ、ラン科植物の増殖法として大きく発展した。このように茎頂などの微細組織を外植片とした大量培養法は、微細繁殖法 (マイクロプロパゲーション: *micropropagation*) と呼ばれ、現在ではこの方法の開発により、多くのラン科植物の優良個体がクローン品種として大量生産されている。

#### *PLB* とコチョウランにおける大量増殖 (マイクロプロパゲーション)

PLB は、前述のように増殖率に優れ、また PLB からは植物体へと容易に分化させることができる。このためラン科植物では、前述の茎頂培養由来の PLB を用いた大量増殖が主流であるが、コチョウランへのこの方法の適用は困難であった。それは、シンビジウムなどの複茎性のラン科植物と異なり、コチョウランが単茎性であることに由来する。単茎性の種において唯一の茎頂の摘出は、複茎性のラン科植物と異なり、母株の消失を意味するため損失が大きく、コチョウランなどの単茎性ラン科植物における茎頂の使用は事実上困難である。そこでコチョウランでは微細繁殖法として、茎頂以外の組織を用いる研究がなされてきた。

コチョウランの組織培養では、まず花茎組織が用いられた。先に述べたように、Rotor (1949) はコチョウランの花茎を用い、ラン科植物として初の組織培養法を用いた栄養繁殖を成功させた。この報告の後、花茎腋芽から幼植物体を得る花茎培養法が研究、実用化され (Sagawa, 1961; Arditti *et al.*, 1977; Tanaka and Sakanishi, 1978), 母株へ損傷を与えることなく栄養増殖が可能

になった。しかし、その増殖効率は低く、複茎性の株分けによるものと同程度であった。

その後さらなる増殖率の向上のために、PLB や多芽体の誘導・増殖法の研究が重ねられてきた。コショウランの微細繁殖では、コショウランが単茎種で茎頂が使えないため、成株の花茎あるいはその花茎腋芽から誘導した幼苗を材料とし、PLB または多芽体を誘導、増殖させる方法が研究されてきた。花茎を直接用いた培養法では、花茎節間組織の培養 (Homma and Asahira, 1985; Lin, 1986), 花茎腋芽の直接培養 (Ichihashi, 1992; Tokuhara and Mii, 1993) による PLB 誘導法が報告されている。さらに花茎から得られた幼苗の組織を利用した増殖では、茎頂培養 (Intwang and Sagawa, 1974), 葉片培養 (田中, 1987; Park *et al.*, 2002a; Park *et al.*, 2002b), 根端培養 (王ら, 2000; Park *et al.*, 2003) などによる PLB 誘導が報告されている。また幼苗を利用した PLB 経由以外の増殖法では、主茎の節間培養による多芽体の誘導 (段ら, 1993) や、幼苗の基部切片の培養によるシュート、多芽体やカルス様体の誘導 (市橋ら, 2000) が報告されている。他のラン科植物同様、PLB 経由の増殖は多芽体による増殖に比べて増殖効率が非常に高く、花茎培養及び葉片培養法による PLB の誘導・増殖法が確立されて以来、コショウランでもクローン苗の生産が盛んになった。

生産現場では培養変異の発生は大きな問題となる。植物成長調節物質を使用した組織培養由来の個体は、培養変異を伴うとされ (小倉, 1983), 一方で成長点からの休眠芽組織を利用した増殖は、分裂組織が維持された増殖法であり、培養変異は少ないと考えられている (市橋・三位, 2006)。葉片培養など成長点以外からの PLB 誘導は、高濃度の植物成長調物質の添加が必須であり、培養変異の発生が懸念される。PLB の増殖も表皮由来の二次 PLB を経由するため、PLB 段階での長期間の増殖は、変異の頻度を高めることにつながり、好ましくない。このため、高濃度の植物成長調物質を使用する場合は、天然物のコ



コナツウオーターにより代替されることが多く、また前述の成長点の存在する部位からの誘導法（花茎腋芽，幼苗腋芽，根端）が近年多く検討され，コチヨウランの変異の少ない迅速な大量増殖法は現在も研究が続けられている。

### *ePLB* と *nPLB*

本研究室において，白井（2004）は，PLB を暗所で培養することにより，その形態が本来の球状から細長く変化することを報告した．またこの状態の PLB は体色が白く，形態は通常の PLB と明確に異なる．この形態はその特徴から，暗所形態形成と呼ばれる機構により得られる形態と類似していると考えられる．暗所形態形成は光形態形成に対する言葉であり，シロイヌナズナの実生においてよく研究がなされている．種子が明所で発芽した場合，子葉の展開，葉緑体の分化などが見られ，胚軸の伸長抑制が起こる．一方暗所での場合は，子葉は未発達で葉緑体の分化が見られず，根の形成は減少し，胚軸は急激に伸長する．これらの反応をそれぞれ光形態形成，暗所形態形成と呼ぶ．暗所での培養で得られた PLB の白い体色またその伸長した形状は，上記の特徴に当てはまる．

本研究では，この状態の PLB を伸長型 PLB: elongated PLB (ePLB)，明所での培養で得られた通常の形態の PLB を normal PLB (nPLB) と名付け区別した．ePLB は体表面が nPLB に比べ大きく，培養操作を行いやすい点やその表面積の大きさから，二次 PLB が形成されやすく大量増殖に向いている等の利点があるのではないかと考えた．

## 3. コチヨウランの組織培養における問題点と PSR 培地

### 傷応答とフェノール様物質の影響

ここまで述べたように，コチヨウランの種苗生産では，微細繁殖技術は必須のものとなっているが，ラン科植物，特にコチヨウランは培養中の受傷に弱く，

受傷すると多くのフェノール様物質を含む二次代謝産物が切断面から大量に溶出する。このフェノール様物質が培地を褐変させ、外植片の生存率の低下や生育阻害の原因となる (Mitsukuri *et al.*, 2009)。カトレアでは、*eucomic acid* や *tyramine* 等のフェノール様物質が原因であると特定されている (Fig. 1-1)。*eucomic acid*, *hydroxyeucomic acid* は直接的な生育阻害作用を持ち、また *tyramine*, *dopamine* は直接的な阻害効果はないものの、培地へ溶出し、酸化縮合することにより、植物体においてアミノ酸代謝、TCA サイクルなどの生理的均衡が崩れる。以上の作用により褐変現象が引き起こされ、枯死に至ると考えられている (石井ら, 1976; 石井, 1988)。これらは多くの植物で見られる傷応答と呼ばれる現象による。植物は受傷や菌などの感染への防御反応として、傷口の細胞を壊死させ、コルク化することで内部を保護する。ランではこの傷応答が敏感で強く反応するため、微細繁殖における小さい組織では培養組織全体が枯死することも多い。

フェノール様物質は操作時における組織表面の微細な傷からも浸出するため、培地への浸出を防ぐこと自体は困難である。強い傷応答を示すコチョウランでは、切断を伴う増殖培養は大量のフェノール様物質が浸出するため枯死しやすく、非常に難しいものとなっている。対策としては、古くから培地中への活性炭などの添加によるフェノール様物質の吸着や褐変阻害剤の使用 (Mitsukuri *et al.*, 2010) が行われてきた。しかし、活性炭による吸着では影響を若干軽減できるにすぎず、有効成分も吸着するおそれがある。また褐変阻害剤の使用は有効であるが、全ての植物種においてフェノール系を含む二次代謝系は必要不可欠であるため、高濃度の使用は逆に生理的不調を引き起こす場合もある。そこで本研究室では、フェノール様物質を多く浸出するコチョウランにおいても簡便かつ効果的に安定した組織培養ができる培地を検討してきた。

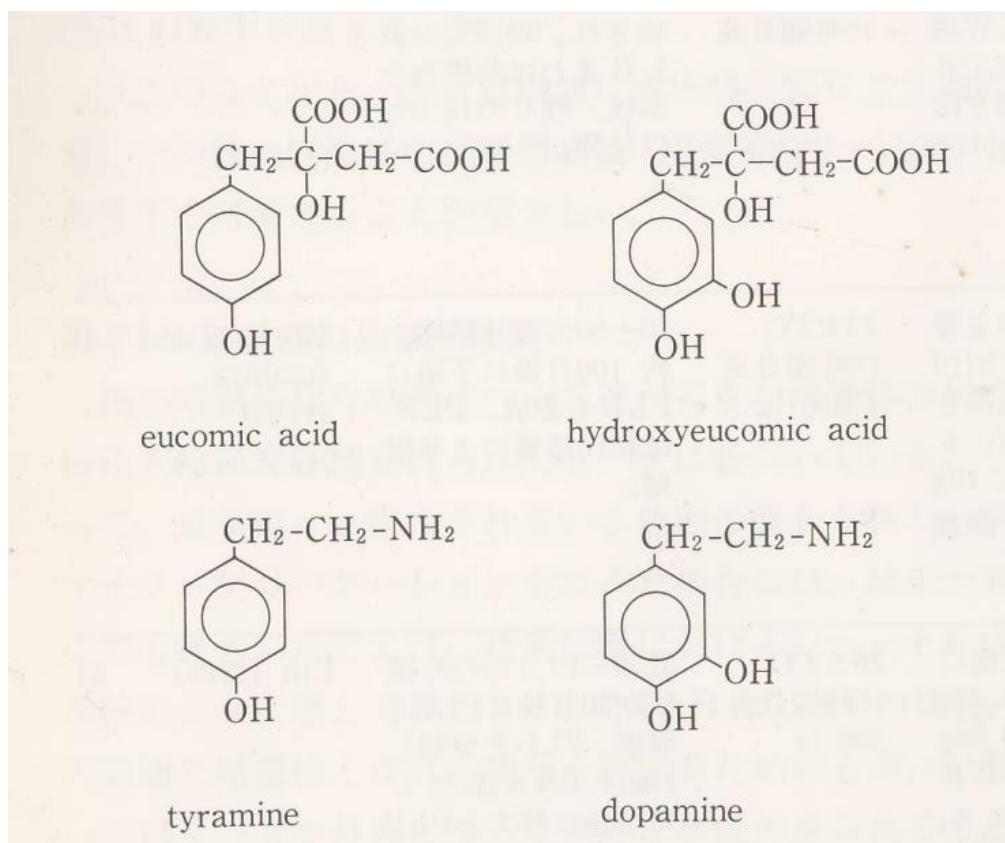


Fig. 1-1 Phenolics isolated from cattleya.

出典：石井実. (1988). カトレヤの茎頂培養. pp.54-61. 加古瞬治 編.  
 図解 ランのバイオ技術 ミクロ繁殖・実生・交配育種. 誠文堂新光社, 東京.

## PSR 培地

これまでに、コチョウランの組織培養に良好な影響を及ぼす多くの培地添加物が報告されている。これらの培地成分を組み合わせることで、良好な状態の培養物が得られ、フェノール様物質の影響を和らげることができると考えられる。PSR 培地は上記を目的に考案、試作された培地であり、無機塩を 1/2 にした MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) を基準に、コチョウラン培養において、培養特性の向上が知られるポテト煮出し液 (木村, 1991)、ココナッツウォーター (Sagawa and Kunisaki, 1982)、アデニン (田中, 1987) を組み合わせ、さらに花茎培養からの幼植物体形成及び様々な外植片からの PLB 形成に有効とされる植物成長調節物質 (Homma and Asahira, 1985; 田中, 1987; Tokuhara and Mii, 1993) である NAA (1-Naphthylacetic Acid) と BAP (6-Benzyladenine) を加えた修正 MS 培地である。構成成分における特徴として、PSR 培地はポテト煮出し液やココナッツウォーターなどの天然有機物を豊富に含む。添加量の多いこれらの成分が PSR 培地における生存率維持に良好な影響を与えているのではないかと推測されるが、詳細は不明である。これらの天然有機物は他のラン科植物の培養においても有効性が示されているが、どのような物質が含まれているか詳細に解析された報告はない。また上記のように、そのほかにもコチョウランの培養特性上、有効とされる成分を多く含むため、これらの複合的な効果により生存率が維持されている可能性も考えられる。

本研究では、この修正 MS 培地がコチョウランの培養においてシュート状態での不定芽切り分けによる増殖・再生産に有効であると示唆されているため (高原, 1998)、*Phalaenopsis*-Shoot-Reproduction (PSR) 培地と名付けた。また、これまでに PLB 培養においても、従来からよく用いられる Hyponex 培地、VW+10%CW 培地と比較して、PSR 培地を用いた場合では PLB 生存率、得られる PLB 数が高く、また PLB に形成されたシュートを切り離し別個に培養し

た場合においても、高い生存率が得られることが示唆されている(白井, 2004)。

以上から、PSR 培地では、従来の方法に比べ外植片を高い生存率で維持できるとともに、枯死率の高さから十分な培養増殖が困難であると考えられる外植片の切断を伴う培養が容易となるという利点が存在すると考えられる。

#### 培養特性の品種間差

コチョウランの培養では、品種間差が大きいことも問題となっている。これはコチョウランの品種が 62 種からなる多くの原種を繰り返し交配してできた極めてヘテロな状態にあり、そのヘテロな状態のまま品種として扱われているためである。現在、使用されるコチョウランの種々のクローン苗の増殖法の多くは、増殖の難易などにおいて非常に大きな種間及び品種間差異があることが報告されている(田中, 1987; Tokuhara and Mii, 1993; 寺本・周, 2000; 窪田ら, 2002)。例えば田中(1987)の報告では、25 品種の花茎培養によるシュートの形成の割合は 6 品種で 0%, 4 品種で 100%, 他の品種では 13~89%と品種により著しく異なった。さらにシュート形成された品種において、葉片培養による PLB 誘導を行ったところ、PLB 形成率は 2.1~100%と品種間で著しい差異があり、3 品種では PLB 形成が認められなかった。また 1 葉片あたりの PLB 数についても 1~15.4 個と品種間で差異があった。

周ら(1997)は、品種間差異は用いられるクローン増殖法および品種本来の特性と関係しているようであり、品種の特性はその背景にある交配に用いられた原種と深く関わっていると指摘した。彼らは 110 の供試品種の葉片培養を行い、PLB 形成葉片率と原種構成指数の関係を調査した。原種構成指数とは、ある交配種がどのような原種から構成されているのか、育種過程において各原種がどのような比率で使用されてきたかを示す指標である。PLB 形成品種グループ内におけるそれらの関係を使用頻度の高かった *Phal. equestris* と *Phal.*

*amabilis* 間で比較したところ、前者の原種構成指数が高くなるにつれて PLB 形成葉片率は低下する傾向を示したと報告している。

このような問題のため、クローン増殖法の確立や実際に商業的な計画生産を行う際には、品種間差異は常に考慮しなければならない。ランでは交配種の名前とその交配種の交配親は英国王立園芸協会：The Royal Horticultural Society (RHS) のサンダースリストに登録・管理されている。しかし、品種の多くは十数世代の交配を重ねた膨大な系統図を有するため、これまで品種ごとの原種構成比を調べることは労力を要した。近年では、サンダースリストの情報を記載したデータベースや、各社から発売されている CD-ROM 等から、特定品種の原種構成比を調べることは容易となった。このため、培養の難易度における品種間差を知るため手段として、品種の特性すなわちその品種の成立に関与した各原種の培養特性を明らかにすることは重要であると考えられ、また実際に計画生産を行う際には、特定品種の原種構成比および蓄積された各原種の培養特性の知見により、増殖の容易な品種の予測や選定等が可能になると考えられる。

#### 4. コチョウランの品種改良について

コチョウランを含むラン科植物は園芸用植物としての人気の高さから、19 世紀から現在まで、多種多様な原種を用いた交雑育種法により、多くの品種が作出されてきた (Frowine, 2008)。ランでは種間、属間での生殖的隔離が十分でないものも多く、自然界での自然交配種の存在も確認されている (千葉, 2002)。また種苗生産のための人工交配と無菌発芽法の確立により、容易に新品種が作出できるようになった。

このようにランの育種にとって従来から用いられてきた交雑育種法は、非常に重要な手法であるが、生殖周期が長い、有用な新規形質に対する遺伝資源が

限られるなどの問題点が存在する。

まず、1つ目の問題点に関して、コショウランは栄養成長期が長く、開花まで3~5年を有するという特徴を持つ。現在、市場で主流の大輪系品種は何代も交配を重ねて改良された品種である。これらに形質を導入する場合、大輪系の特徴を残したまま品種として成立させる必要があるため、通常、何回もの戻し交雑が必要となる。しかし、生殖周期が長いコショウランでは、他の園芸種に比べ、膨大な時間と労力、コストが必要となる。また2つ目の問題点に関しては、コショウランの栽培への有効性や消費者の需要などから、耐病性や新規花色、香り、草姿などが望まれている。しかし、ワシントン条約のため、新たな遺伝資源（野生株）の入手は制約があり、既存の原種（遺伝資源）が限られるため、従来の交雑育種によるこれらの形質を持つ品種の作出は困難である。

これらの問題に対し、近年の形質転換技術の進歩による分子育種法により、従来の育種では導入が困難であった優良形質を持つ新品種の作出が可能となった。遺伝子導入法による育種は種を超えた遺伝資源が利用可能であり、他の形質を変えずに狙った特定形質のみを改変できることから、先に述べた育種上の問題を抱えるコショウランにおいて大きな利点が存在する。

コショウランの形質転換法の成功における初期の報告（Anzai *et al.*, 1996; Belarmino and Mii, 2000）に始まり、近年では、耐病性のような重要形質の実際の導入が遺伝子導入法により達成されている（Chang, *et al.*, 2005; Sjahril *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2011）。加えて、形質転換は遺伝子機能解析にとっても重要なツールであり、コショウランにおける分子育種技術として多くの注目を集めている。

現在、コショウランにおける主要な形質転換法として、アグロバクテリウム媒介形質転換法とパーティクルボンバードメント法が主流であり（Jaime *et al.*, 2011）、現在盛んに研究がなされている。しかし、これらの技術を用いた形質

転換はトウモロコシ，ダイズ，イネのような作物において多数報告されているが，これらの作物に比べ，コショウランでの報告は未だに少数である．

## 第 2 節 目的と本論文の構成

コショウランは日本の洋ラン類の中で生産量が最も多く，園芸花卉の中でも商業価値が高く，重要な位置づけにある．本研究はコショウランの生産，育種への貢献を目標に，増殖生産に必須である組織培養，また近年の分子育種における形質転換法における種々の問題の解決を目的に行ったものである．

本論文の構成は以下のとおりである．

第 2 章では，切断を伴う培養における PSR 培地の有用性を，シュートの生存率，生育状況等から評価，検証した．

またその特徴を活かした不定芽増殖法に対する品種間差を評価するため，市場における既存の主要品種及び交配親として重要な原種を用いて適用可能かどうかを調査，検討した．

第 3 章では，従来の PLB を用いた大量増殖法の検討，改良を行い，新たに ePLB を用いた簡便で効率的な大量増殖法の確立を試みた．

第 4 章では，分子育種への応用を目的に，ePLB を用いた効率的な形質転換系の確立を目指し，培養及び感染条件の最適化を行った．

第 5 章では，上記の結果に基づいて総合的な考察を行った．



## 第2章 PSR 培地の有用性の検証

コショウランの微細繁殖では、受傷により大量のフェノール様物質が溶出し、このことが外植片の生存率や生育に悪影響を与える原因となる。このため本章では、フェノール様物質の影響を軽減し高い生存率を維持できる培地として考案された PSR 培地と主要な他の培地を用いて生存率等を比較し、この培地の有用性を検証した。またコショウランでは品種間差が大きく、培養難易が種毎に異なるため、様々なコショウラン品種へ PSR 培地を用いた培養法が適用可能か原種レベルで調査・検討を行った。

### 第1節 各培地におけるシュート生存率および生育指標の比較

PSR 培地（高原，1998）、VW 培地（Vacin and Went, 1949）に 10%ココナツウォーター（以下 CW）を添加した培地（以下修正 VW 培地）、NDM（Tokuhara and Mii, 1993）におけるシュートの生存率と生育指標を比較した。

#### 材料および方法

##### 各種培地の調製

###### ・ PSR 培地

作成方法は以下の通りである。市販のジャガイモ 200 g を 5 mm 角の棒状に切って鍋に入れ、蒸留水 1 L を加えた後、30 分ほど沸騰が続くように煮込んだ。その後煮出し液を回収、濾過し、Table 2-1 の成分を加えた後、1 L にメスアップして用いた。また貯蔵する場合は冷凍保存とした。

###### ・ 修正 VW 培地

Table 2-1 に従って成分を秤量し、10%CW を加え蒸留水でメスアップして pH5.7 に調整してから用いた。

Table 2-1 The components of the three media used in this study

	Components	PSR medium <sup>z</sup>	VW medium <sup>y</sup>	NDM <sup>x</sup>
Macro elements (mg L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825		480
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		500	
	KNO <sub>3</sub>	950	525	200
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	250	550
	KCl			150
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O			470
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		200	
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	220		
	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O			
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185	250	250	
Micro elements (mg L <sup>-1</sup> )	Fe-EDTA			21
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	13.9		
	Na <sub>2</sub> -EDTA	18.65		
	Fe-citrate		28	
	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	11.15		
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O		7.5	3
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.3		0.5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.1		0.5
	KI	0.415		
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.125		0.025
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0125		0.025
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0125		0.025	
Vitamins (mg L <sup>-1</sup> )	<i>myo</i> -inositol	100		100
	Nicotine acid	0.5		1
	Pyridoxine hydrochloride	0.5		1
	Thiamine hydrochloride	0.1		1
	Biotin			0.1
	Calcium pantothenate			1
Amino acids (mg L <sup>-1</sup> )	Glycine	2		
	Cysteine			1
Plant hormones, etc. (mg L <sup>-1</sup> )	NAA	1		0.1
	BAP	1		1
	Adenine	10		1
Natural organic components	Coconut water (%)	10	10	
	Potato (g)	200		
Sugar (g L <sup>-1</sup> )	Sucrose	20	20	10
Gelling agent (g L <sup>-1</sup> )	Gelrite	2.5	2.5	2

<sup>z</sup> 200 g of potato segments placed in a beaker containing 1 L of distilled water. After gently boiling for 30 min, all the constituents listed were added to the strained broth, and its volume was adjusted to 1 L. The pH was not adjusted.

<sup>y</sup> Refer to the Vacin · Went (1949). It was used after adding to a 10 % coconut water to the medium. The pH was adjusted to 5.7.

<sup>x</sup> Refer to the Tokuhara · Mii (1993). The pH was adjusted to 5.4.

In both VW medium and NDM, the gelling agent was changed to Gelrite. Each medium was used after autoclaving (121°C, 1.4 atm, 20 min).

## ・ NDM

Table 2-1 にしたがって成分を秤量し、蒸留水でメスアップして pH5.4 に調整して用いた。また今回、NDM には植物成長調節物質として NAA を 0.1, BAP を 1 mg/L になるように加えてから用いた。また炭素源およびゲル化剤は Table 2-1 のように添加した。

各培地を調製した後、121°C、1.4 atm、20 分のオートクレーブによって滅菌し、予めオートクレーブ滅菌した培養容器に 40 mL ずつ分注した。培養容器はスミロンテクノポット（外寸 80.5 (W) × 80.5 (L) × 100 (H) mm、住友ベークライト（株））を用いた。

## 植物材料

*Phal. Double Delight 'Hawaiian Spots'*（国際園芸株式会社より購入）の花茎培養で得られた葉片を採取し、葉片培養により PLB を誘導した。花茎培養、葉片培養は田中の方法（田中，1987）により行った。誘導した PLB を PSR 培地上で維持・増殖させ、PLB から発生した長さ 2 cm のシュートを切り離し、供試材料とした。シュート発生時までは  $2 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ 、25°C の条件で維持した。

## 試験

前項の長さ 2 cm のシュートを 3 種類の培地に置床し、4 ヶ月培養を行った。最初の 2 ヶ月間は 1 ヶ月毎に継代培養を行い、継代時にシュート基部の黒変した部位と生じた根を切除してから継代培養した。また後半の 2 ヶ月間に関しては継代培養および切断処理を行わなかった。培養条件は光強度  $50 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ 、14 時間日長、25°C で行った。またサンプル数は培地 1 種類、1 反復につき 20 本であり、1 容器当たり 10 本のシュートを置床した。各条件、3 反復試験を行っ

た。毎月生存率を算出し、4ヶ月目ではシュートの生育指標として葉数、葉長、葉幅、ルート数、生体重を測定した。

## 結果

PSR 培地とラン科植物の培養において従来からよく用いられている培地 2 種におけるシュート生存率を比較した (Fig. 2-1)。修正 VW 培地では切断処理を行った 1 ヶ月目以降、大きく生存率が低下し、3 ヶ月目で 7%、4 ヶ月目で 5% となった。対して、PSR 培地と NDM では生存率は高いまま維持され、4 ヶ月目で PSR 培地は 90%、NDM は 78% だった。また 3 ヶ月目および 4 ヶ月目では PSR 培地、NDM における生存率は、修正 VW 培地の値に対し有意に高かった。また PSR 培地では、切断を行った後に培養を継続しても生存率の低下はほとんど見られなかった。対して修正 VW 培地、NDM では切断後に生存率が次第に減少する傾向が見られた。

培養 4 ヶ月目の生育状態を Fig. 2-2, Table 2-2 に示した。PSR 培地では、葉数、生体重が他の 2 種の培地に比べて有意に高かった。また PSR 培地での葉長は修正 VW 培地より有意に高く、NDM とは差はなかった。PSR 培地でのルート数は NDM より有意に高く、修正 VW 培地とは差は見られなかった。葉幅は培地間において有意差が見られなかった。

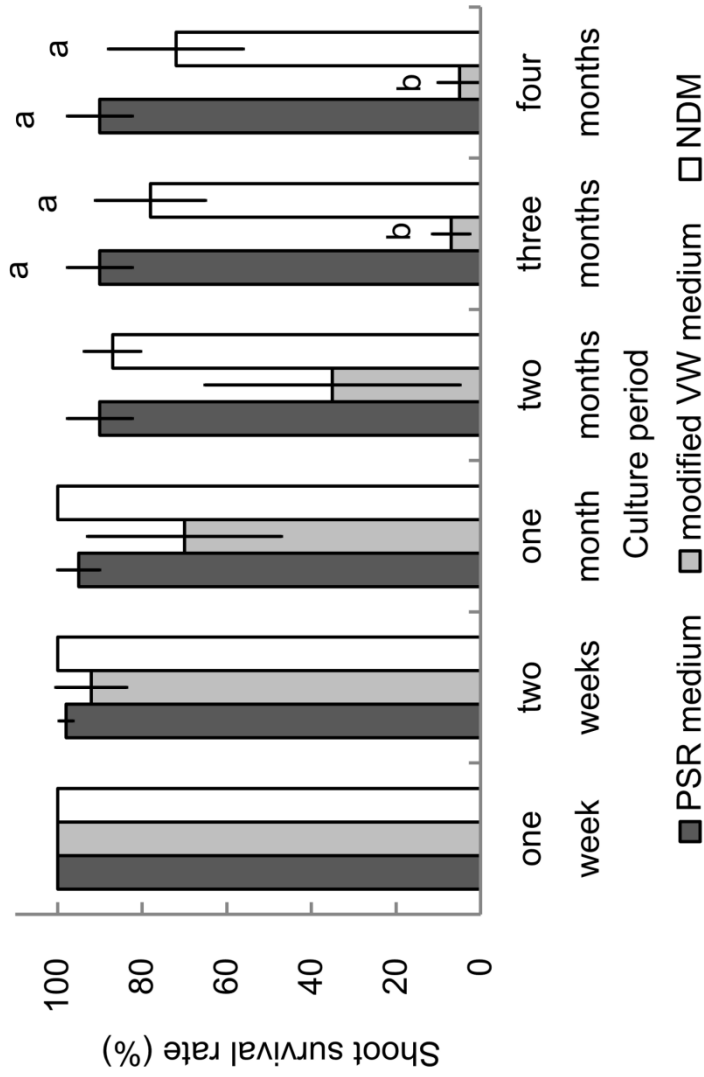


Fig. 2-1 Shoot survival rates on each medium. Error bars are SEM ( $n = 20$ , 3 replicates). The bars with different letters are significantly different by Tukey's range test ( $P < 0.05$ ). Shoots (length, 2 cm) were cultured on three different media for four months. In the first two months, the shoots were subcultured every month. They were subcultured after cutting the generated roots, and the site turned black at the base of the shoot. In the last two months, cut treatment and subculture were not performed.



Fig. 2-2 Appearance of shoot growth on each medium (after four months of culture)  
A: PSR medium, B: modified VW medium, C: NDM  
The arrows indicate roots. Bars = 1 cm.

Table 2-2 Shoot growth on each medium

	Number of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Number of roots	Fresh weight (g)
PSR medium	4.2 a <sup>z</sup>	2.6 a	1.5 a	1.4 a	33.0 a
Modified VW medium	3.2 b	2.1 b	1.2 a	0.8 ab	17.5 b
NDM	3.3 b	2.2 ab	1.2 a	0.0 b	14.3 b

Mean (n = 20, 3 replicates)

<sup>z</sup> Values followed by different letters within columns are significantly different by Tukey's range test ( $P < 0.05$ )

## 第 2 節 フェノール様物質の測定

培地へのフェノール様物質の溶出量と外植片の生存率において正の相関があることが知られている (Krishna *et al*, 2008). 本節では, 前節の試験における各培地での生存率と培地に拡散するフェノール様物質の関係を明らかにするために, フェノール様物質の定量と培地への拡散程度の測定を行った.

### 1. フェノール様物質の定量

前節の試験における培地中に溶出したと推測されるフェノール様物質をエタノール抽出と水抽出により測定した. 試験は Mitsukuri らの報告 (Mitsukuri *et al*, 2009) を参考に以下のように行った.

#### 材料および方法

前節の試験において, 培養 2 ヶ月目, 培養 4 ヶ月目の時点で各種培地 10 g をサンプリングし, 25 mL の 80%エタノール中でホモジナイズした後, 酸化フェノール化合物を抽出するために 100 rpm で 24 時間振盪抽出し, 3000 rpm で 10 分間遠心分離した. その後, 酸化フェノール化合物による培地の褐変レベルを決定するために, 上清 3 mL を 12.5 mm のガラスセルへ移し, エルマ分光光度計 (AE-450, エルマ販売) を用いて 420 nm の吸光度を測定した. 420nm で計測したこの培地の褐変レベルは植物体における総フェノール含量と強い相関があることがわかっている (Mitsukuri *et al*, 2010). また水抽出の場合, 80%エタノールの代わりに蒸留水を用い, 同様に操作して測定した. 各サンプルともに 3 回測定し, 平均値を算出した.

#### 結果

前節の試験における培養 2 ヶ月目と 4 ヶ月目の時点で培地中に溶出したフェ



ノール様物質をエタノール抽出及び水抽出した。抽出物の 420 nm での吸光度の値を Fig. 2-3 に示した。培養 2 ヶ月目ではエタノール抽出及び水抽出の両処理において、培地間でのフェノール様物質量の差はなかった。培養 4 ヶ月目ではエタノール抽出処理では、修正 VW 培地、NDM に比べて PSR 培地の値は有意に高く、修正 VW 培地、PSR 培地間に差は見られなかった。水抽出では、PSR 培地に比べて修正 VW 培地、NDM の値は有意に高く、修正 VW と NDM 間に差は見られなかった。

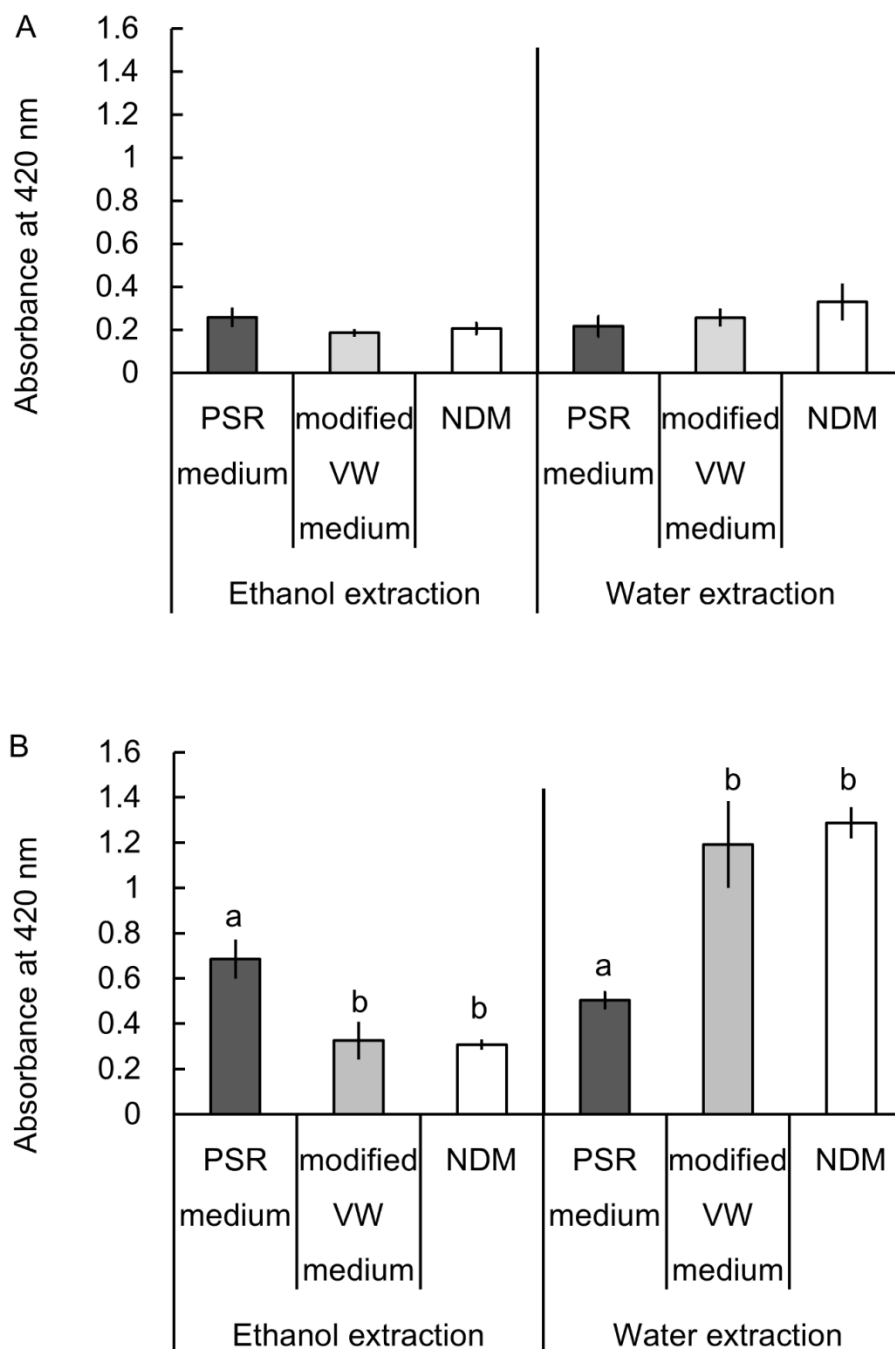


Fig. 2-3 Quantitative determination of phenolic compounds in each medium  
 A: After two months of culture (Subcultured every month)  
 B: After four months of culture (No subculture for the last 2 months)  
 Error bars are SEM (n = 3). The bars with different letters for each extraction process are significantly different by Tukey's range test ( $P < 0.05$ )

## 2. フェノール様物質の培地への拡散

前項とは別試験として、培地中へ浸出したフェノール様物質の性質を調べるために、3種類の培地における培養初期のフェノール様物質の拡散範囲を測定した。

### 材料および方法

各培地を調製し、オートクレーブ（121℃，1.4 atm，20 分）で滅菌したものを直径 90mm のプラスチックシャーレ（旭硝子（株），SH90-20）に 20 mL ずつ分注し、1 枚当たり 5 本のシュートを置床した。置床したシュートの周りに広がったフェノール様物質により変色した培地領域の直径を 3 日毎に 15 日目まで測定した。実験は 3 反復行った。

### 結果

各培地におけるフェノール様物質の拡散範囲の直径を Fig. 2-4 に示した。置床したシュートの周りに広がったフェノール様物質による変色域の直径は、修正 VW 培地に比べて PSR 培地で大きく、培養日数が経つに連れてその直径は広がった。また NDM では、培養初期からフェノール様物質がシュート周辺だけでなく培地全体に広がり、培養日数が経つに連れて培地の色がフェノール様物質により黒変していった。このため、NDM では変色域は培養日数に関わらず、シャーレ直径と同じく一律 90 mm とした。

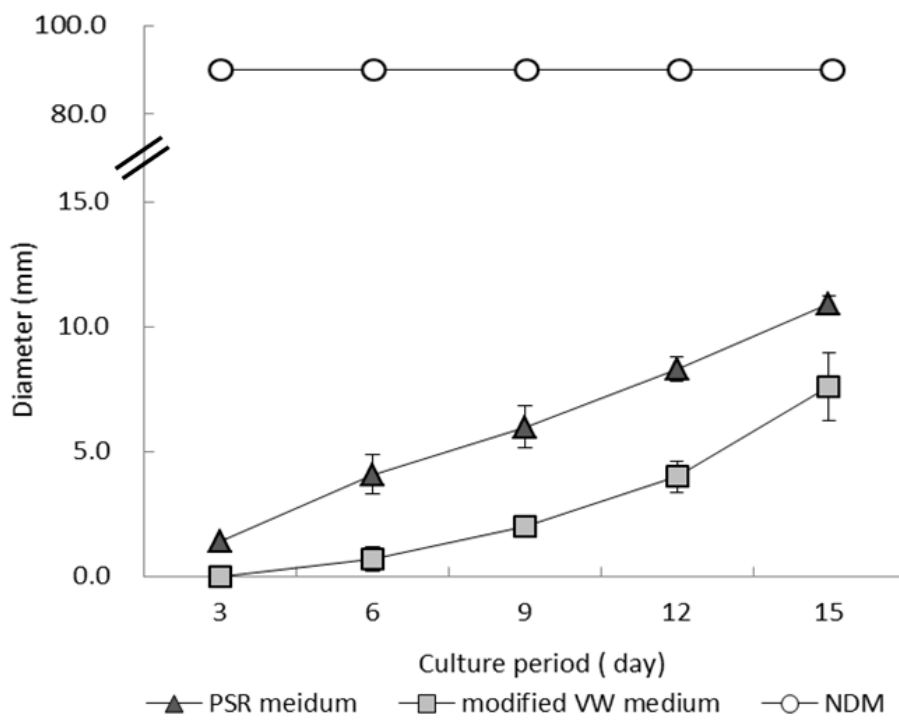


Fig. 2-4 Diffusion of phenolic compounds in each medium

Error bars are SEM (n = 20, 3 replicates)

Shoots were cultured on three different media for 15 days. The diameter of diffusion of phenol-like substances around the shoots was measured every 3rd day. The value for NDM was defined as 90 mm uniformity.

### 第3節 不定芽増殖法の様々な種・品種への適用

本研究室ではこれまでに PSR 培地を用いたコショウランの不定芽増殖法が考案されている（高原，1998）．この方法は PSR 培地上でシュートを培養することによりシュート基部から不定芽として成長した新しいシュートを切り分け，PSR 培地に *in vitro* で挿し木することで増殖を行う．これは第1節で示された切断に強いという PSR 培地の特性を活かした方法である．この方法はシュート増殖，維持と種苗生産が同時に可能であり，優良株の遺伝子型の保持に有効であることが示唆されている．また株の更新も可能であり，さらに得られた幼苗から PLB を誘導することで大量増殖のための種々の培養が行いやすくなるなどの利点が考えられる．

しかしながら，コショウランは培養法によって非常に大きな品種間差が存在し，この原因は交配に用いられた原種の特性に由来すると考えられている（田中，1987；寺本ら，2000）．このため，この不定芽増殖法がどのような品種にも適用できるとは限らない．そこで本研究では，不定芽増殖法が現在市場で主要な品種系統に適用可能であるか検討するために，交配種およびその親となった原種を使用し，これらの培養特性における種間差を調査した．

#### 材料および方法

供試品種は Fig. 2-5 に示した交配種 8 種および交配親として重要な原種 26 種の合計 34 種を用いた．交配種は市場に多く出荷される主要なタイプを考慮して選んだ．本試験で用いた不定芽増殖法の概略図を Fig. 2-6 に示した．温室で育てた各供試品種から常法である花茎培養（田中，1987）によりシュートを得た．このシュートを PSR 培地 40 mL を分注したスミロンテクノポット上に置床し，1 ヶ月ごとに継代した．各種，一開花期に得られた花茎腋芽を初期外植片として用いるため，得られたシュートの大きさや数は種毎に異なる．そこ

で各種における開始本数を後述の Table 2-3 の Shoot number の Start の項に記載した。継代の時に基部から生じたシュートを親株から切り離し、根を切断してから同じ培養ポットで培養した。シュート数が多い場合には、1ポットあたり 10 本として、ポットの数を増やした。培養はシュートが培養途中で枯死しない限り 36 ヶ月まで、またはシュート数が 50 本になるまで継続した。増殖が容易な種では指数増殖となるので、全品種を培養管理する際の労力と当研究室で維持管理できる収容数を鑑み、また過去のシュートを利用した類似の増殖法における増殖効率から十分な増殖量の目安として 50 本までの増殖期間を調査することとした。

subgenus *Phalaenopsis* section *Phalaenopsis*



*amabilis*



*amabilis alba*  
× *self*



*amabilis*  
*ssp. rosenstromii*



*aphrodite*



*shilleriana*



*stuartiana*  
'Larkin Valley'

subgenus *Phalaenopsis* section *Stauroglottis*



*equestris*

subgenus *Phalaenopsis* section *Esmeralda*



*Phal. (Dor.)*  
*buyssoniana*



*Phal. (Dor.)*  
*pulcherrima*  
'K-213'



*Phal. (Dor.)*  
*pulcherrima*  
*alba* 'K-242'



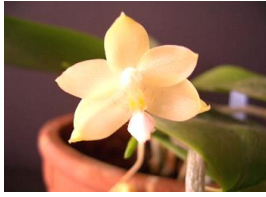
*Phal. (Dor.)*  
*pulcherrima*  
*coerulea*

Fig. 2-5 Species used for experiments

Major types of commercial hybrids and natural species mainly used for commercial cross breeding were chosen for experiment. Classification under genus *Phalaenopsis*, subgenera and sections, is based on Christenson (2001).

Natural species in subgenus *Phalaenopsis* which are the most important for hybrid parents.

subgenus *Polychilos* section *Amboinenses*



*floresensis*



*hieroglyphica*



*javanica*



*mariae*



*modesta*



*venosa*



*violacea*

subgenus *Polychilos* section *Polychilos*



*cornu-cervi*



*manni*

subgenus *Polychilos* section *Zebrinae*



*speciosa*  
*tetraspis*



var. *sumatrana*

subgenus *Polychilos* section *Fuscatae*



*viridis*

subgenus *Parishianae* section *Parishianae*



*gibbosa*



*parishii*

Fig. 2-5 Species used for experiments (continued)

Natural species in subgenera *Porichilos* and *Parishianae*, which are important hybrid parents for colors and markings. They themselves are also important as commercial plants since many amateur growers like them.



Natural hybrid



× *intermedia*

Interspecific commercial hybrid



*Phal.* Chih Shang's  
'Stripes #2'  
(Stripe)



*Phal.* Cosmo-Vegas  
(Semi-alba)



*Phal.* Double Delight  
'Hawaiian Spots'  
(Spotted)



*Phal.* Ginrei × *self*  
(White large flower)



*Phal.* Golden Emperor  
'Sweet'  
(Yellow)



*Phal.* Perfection Is  
'Ching Ruey'  
(Dotted)

Intergeneric commercial hybrids



*Dtps.* Happy Valentine  
(Pink large)



*Dtps.* Kenneth Schubert 'Blue Angel'  
(small plenty flower)

Fig. 2-5 Species used for experiments (continued)

Natural and commercial hybrids. Interspecific and intergeneric hybrids of stripe, semi-alba, spotted, white large flower, yellow, dotted, pink large, and small plenty flower types were chosen since they are popular in flower market.

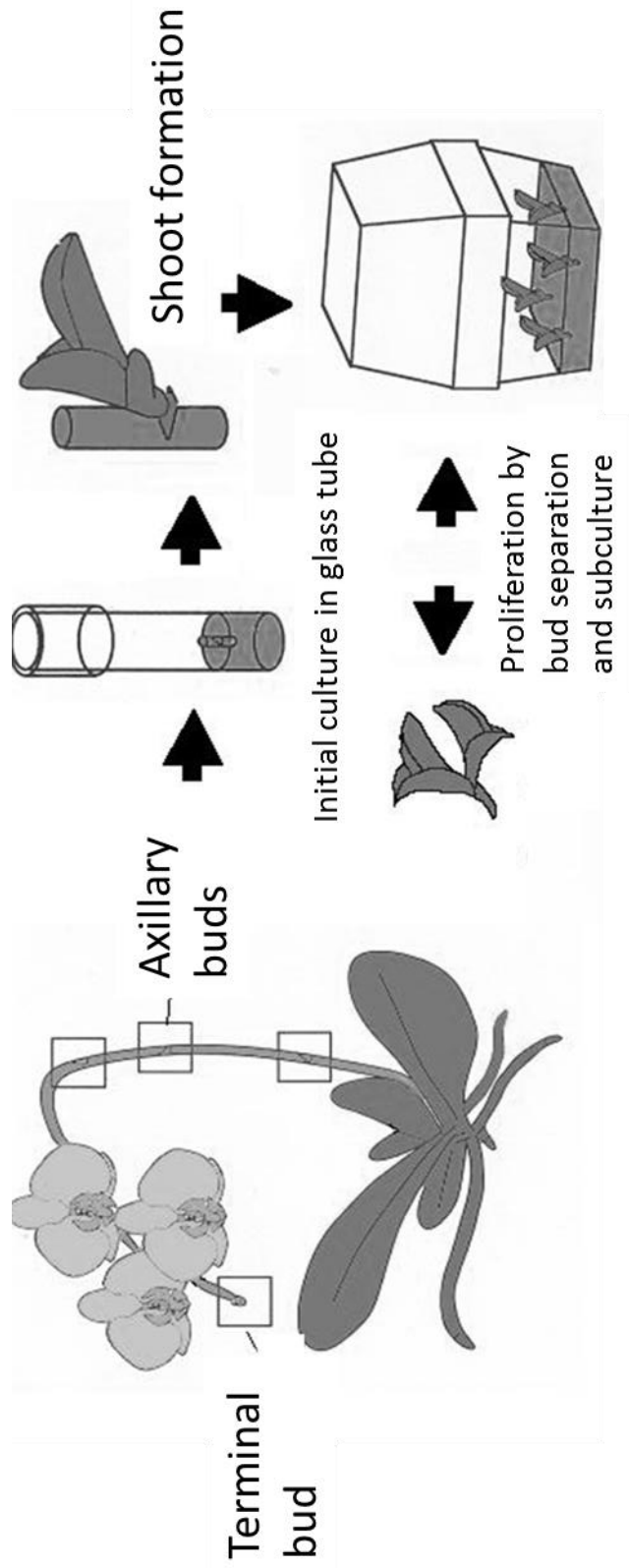


Fig. 2-6 Schematic of adventitious bud proliferation method  
 Flower stalk buds of *Phalaenopsis* were used as explants for initial culture. After shoot formation from flower stalk buds, shoots were cut apart from stalks and subcultured on PSR medium. Newly grown adventitious buds were separated from maternal shoots and subcultured.

## 結果

Table 2-3 に、各供試品種の培養開始時および終了時のシュート数、シュートが目標の 50 本に達するまでに要した培養期間を示した。なお図中の培養期間における—の表記は、36 ヶ月までにシュートが 50 本に達しなかった、または培養途中でシュートが全て枯死したことを示す。交配種では、*Phalaenopsis* 属および *Doritaenopsis* 属の交配種ともに増殖に遅速があるものの、すべて 36 ヶ月以内に 50 本まで増殖した。また原種のうち交配種の親として最も重要な *Phalaenopsis* 亜属では、*Phal. aphrodite*, *Phal. shilleriana* の 2 種を除いて容易に増殖可能だった。このうち *Phal. aphrodite* は増殖速度が *Phalaenopsis* 亜属の他種に比べて遅かったものの、増殖は可能であった。また *Phal. shilleriana* は培養途中で枯死してしまい、培養が困難であることが判明した。また *Phalaenopsis* 亜属以外のその他の亜属原種では、*Phal. modesta*, *Phal. violacea*, *Phal. mannii*, *Phal. × intermedia* が容易に増殖可能であった。対して *Phal. hieroglyphica*, *Phal. venosa* は、茎頂培養後の培養初期のシュート本数から増加はしたものの、増殖速度は低かった。また *Phal. floresensis*, *Phal. javanica*, *Phal. mariae*, *Phal. speciosa* var. *tetraspis*, *Phal. sumatrana*, *Phal. gibbosa*, *Phal. parishii* は、培養中に枯死が確認され、培養自体が困難であることがわかった。概して *Phalaenopsis* 亜属以外の原種では、*Phalaenopsis* 亜属の原種および試験した交配種と比較し、培養途中で枯死する種や増殖速度の低い種が多く、不定芽増殖法の適用が困難なものが多かった。

Table 2-3 Application of adventitious bud propagation method to various varieties

Breed variety and species used in the experiment				Shoot number		Culture period <sup>z</sup>	
Genus	Subgenus	Section	Species	Start	End	(months)	
Phal.	Phalaenopsis		<i>amabilis</i>	4	50	14	
			<i>amabilis alba</i> × self	6	50	21	
			<i>amabilis</i> ssp. <i>rosenstromii</i>	6	50	9	
			<i>aphrodite</i>	4	10	-	
			<i>shilleriana</i>	8	0	-	
			<i>stuartiana</i> 'Larkin Valley'	3	50	14	
			<i>Stauroglottis</i>	<i>equestris</i>	10	50	21
			<i>buyssoniana</i>	4	50	19	
			<i>pulcherrima</i> 'K-213'	7	50	17	
			<i>pulcherrima alba</i> 'K-242'	3	50	9	
Phal. (Dor.)	Esmeralda		<i>pulcherrima coerulea</i>	3	50	16	
			<i>floresensis</i>	3	0	-	
			<i>hieroglyphica</i>	3	7	-	
			<i>javanica</i>	2	0	-	
			<i>Amboinenses</i>	<i>mariae</i>	10	0	-
			<i>modesta</i>	4	50	31	
			<i>venosa</i>	2	4	-	
			<i>Polychilos</i>	<i>violacea</i> ( <i>alba</i> 'K-487' × 'Blue')	2	50	25
			<i>Polychilos</i>	<i>cornu-cervi</i>	3	23	-
			<i>mannii</i>	6	50	14	
Phal.	Zebrinae		<i>speciosa</i> var. <i>tetraspis</i>	1	0	-	
			<i>sumatrana</i>	3	0	-	
			<i>Fuscatae</i>	<i>viridis</i>	5	28	-
			<i>Parishianae</i>	<i>Parishianae</i>	<i>gibbosa</i>	1	0
			<i>parishii</i>	3	0	-	
		(Natural hybrids)	× <i>intermedia</i>	6	50	11	
			Chih Shang's Stripes #2	4	50	30	
			Cosmo-Vegas	5	50	17	
		(hybrids)	Double Delight 'Hawaiian Spots'	6	50	15	
			Ginrei × self	2	50	13	
			Golden Emperor 'Sweet'	9	50	25	
			Perfection Is 'Ching Ruey'	1	50	32	
Dtps.	(hybrids)		Happy Valentine	1	50	17	
			Kenneth Schubert 'Blue Angel'	8	50	20	

<sup>z</sup> Culture period was shown as a number of months until shoots were increased up to 50.

Major 8 hybrids on the market and, 26 species important as breeding parents were used in this study. Shoots of each variety and species obtained by flower stalk culture were placed on Sumilon techno pot that was dispensed to 40 ml of PSR medium and were subcultured every month. At this time, shoots arising from the base of parent shoots were separated and cultured with cutting the roots in the same pot. If the shoots does not die during the culture, the culture was continued up to 36 months or until the number of shoots was 50. It should be noted that notation of - in the culture period in the table 2-3 shows that shoots did not reach 50 by 36 months or that shoots was all died during the culture.

#### 第 4 節 考察

Knudson (1922) が無菌発芽用に完全合成培地を開発して以来、ラン科植物の培養培地として多くの培地が検討され、考案されてきた。初期は Knudson C 培地 (Knudson, 1922), Knudson C 培地のオートクレーブ後の pH 変動を抑える目的で作られた VW 培地 (Vacin and Went, 1949) などが用いられてきた。しかし初期の培地では成分的に不完全なことが多く、VW 培地などの培地では、CW のような天然有機物が加えられて用いられることが多かった (Kotomori and Murashige, 1965)。また商業的な微細繁殖では、市販の園芸肥料を培地成分として流用したハイポネックス培地 (Tsukamoto *et al.*, 1963) や改良を加えたハイポネックス・ポテト培地 (木村, 1991) が安価で調製も簡単なことから広く用いられてきた。天然有機物の効果は認められているものの、その成分が明確でないため培養の再現性は得られにくい。そこで天然有機物を含まない完全合成培地として近年では NDM (Tokuhara and Mii, 1993) が開発され広く用いられている。これは初期の培地において天然有機物で補われていた成分を組成が明確である試薬に置き換え、不要な成分を除去し培養効果と再現性を高めたものである。しかし、コチョウランは第 1 章で述べたように、様々な原種を何代も組み合わせてできた交配種の総称であり、多くの種、系統に共通で用いることができる最適な培地条件を検討することは困難であった。このため、成分が不明瞭な天然有機物であってもコチョウランの培養に良好な効果があると報告のあった成分を組み合わせることで、広範囲の系統で良好な培養結果が得られることを期待して PSR 培地が考案された。

第 1 節では、ラン科植物の培養において現在までに多用されてきた修正 VW 培地と近年よく用いられている NDM, 本研究室で考案された PSR 培地を用い、培養を行った時のシュートの生存率、生育状況を比較した。Fig. 2-1 より、PSR 培地では修正 VW 培地と比較して有意に生存率が高く、長期培養でも NDM と

ともに生存率は高いまま維持された。また PSR 培地におけるシュートの生育は他の 2 種に比べ非常に良好であり，旺盛な葉の展開と根の発生が見られ，生体重は他の 2 種に比べ約 2 倍の値を示した (Fig. 2-2, Table 2-2)。以上の結果より，本研究室で考案した PSR 培地はフェノール様物質による影響が少なく，切断を伴う培養に適しており，シュートなどの培養物の生育も従来の培地に比べて非常に良好であることが示された。今回用いた修正 VW 培地，PSR 培地は天然有機物を含む半合成培地であり，NDM は完全合成培地である。培地に CW などの天然有機物を加えた場合，生育に良好な結果が得られることが報告されているが (Ernst, 1967; Ichihashi and Islam, 1999; Islam *et al.*, 2003)，今回の結果では CW を加えた修正 VW 培地における生存率は低く，切断処理後の生存率維持における効果は見られなかったため，従来型の培地では切断を伴う培養に適さないことが示された。また同じ半合成培地でありながら，修正 VW 培地と異なり，PSR 培地では切断処理後も生存率が高いまま維持された。これは PSR 培地中に修正 VW 培地には含まれていない植物成長調節物質とポテト煮出し液が含まれていることが影響していると推測されるが詳細は不明である。また NDM は完全合成培地であるが，他の 2 種の培地には含まれない各種ビタミンや褐変防止剤として知られるシステインが含まれており，これらの物質が高い生存率の維持に影響していると推察される。

第 2 節では，各種培地での生存率と培地に拡散するフェノール様物質の関係を調査するために培地中のフェノール様物質の測定を行った。まず第 1 項では前節の培養試験と平行し，培養期間中に培地へと浸出したフェノール様物質を定量した。フェノール様物質の量は培養 2 ヶ月目では 3 種類の培地間で有意差はなかった。培養 4 ヶ月目では PSR 培地におけるフェノール様物質の量を他 2 種類と比べた場合，エタノール溶性では有意に高く，水溶性では有意に低かつ

た (Fig. 2-3). 2 ヶ月目で差が見られず, 4 ヶ月目で有意差が見られた今回の結果の理由としては, 2 ヶ月目までの 1 ヶ月毎の継代培養による短期培養では培地中にフェノールがそれほど累積されず, 差が顕著にならなかったのではないかと, また 2 ヶ月目以降の継代培養なしの長期培養では培養環境の悪化によるストレス応答としてフェノールの浸出量が増加したのではないかと等の理由が考えられる. フェノール溶出と外植片の枯死は正の相関が報告されているが (Krishna *et al*, 2008), Fig 2-3 の定量結果と第 1 節の生存率との相関は見られなかった. また Fig 2-3 の定量結果と Fig 2-4 の培地へのフェノール様物質の拡散程度の結果より, 生存率が高かった PSR 培地と NDM に関して, PSR 培地はエタノール溶性, NDM は水溶性の物質が多く, 浸出している物質は異なるということが示唆される. これまでにカフェ酸, クマル酸, クロロゲン酸, カテコール, カテキン, 没食子酸, p-ヒドロキシ安息香酸などのフェノール様物質がコショウランの褐変枯死に影響することが報告されている (Yin *et al*, 2008). これらはベンゼン環に結合している官能基の違いにより性質が異なり, 水酸基, カルボキシル基, アミノ基などの親水基を持つものや配糖体化しているものは水溶性となる. 前述の物質のうちエタノール溶性のものは桂皮酸誘導体である前者 2 つ, 水溶性のものはそのほかの物質である. しかしながら, これまでにランの褐変枯死に溶出したフェノール様物質の違いが与える影響は知られておらず, 使用する培地の違いにより溶解性の異なるフェノール様物質が浸出するという報告はない. また Fig. 2-4 の結果より, PSR 培地はフェノール様物質が大きく拡散しないことが示された. これは重合などによりフェノール様物質が高分子化するなどの理由により, フェノール様物質が不溶化して無害化され, 褐変枯死への影響が軽減されるのではないかと考えられる. 対して NDM では培地全体へとフェノール様物質が拡散し, シュートへの影響が軽減されているのではないかと考えられる.

第3節では、PSR培地を用いた不定芽増殖法が様々な品種へと適用可能か調査した。現在コチョウランの営利栽培では、人工交配により作出された品種が主に利用されているが、交配種はその交配親の組み合わせによる遺伝的多様性が大きく、培養特性も非常に広い多様性を示す(田中,1987)。また品種の特性はその背景にある原種と深く関わっており、品種の成立に関わった原種によりその品種の培養特性が左右される可能性が示唆されている(周ら,1997)。このため様々な品種への増殖法の実用化に際しては、品種作出によく用いられる主要な原種の培養特性の調査が重要であり、それらの知見を得ることで各品種に多く用いられた原種からその品種の培養特性をある程度推し量ることが出来ると推察される。

今回の試験では、交配種として市場で人気の高い白花大輪系、ピンク大輪系、セミアルバ系、筋花系、点花系、黄花系、斑花系、小中輪多花系の8系統を用いた。Table 2-3に示したように、現在営利栽培されている主流な交配品種の系統は、全て目標の50個体まで容易に増殖可能であった。また *Phalaenopsis* 属および従来別属とされていた *Doritis* 属との交配種である *Doritaenopsis* 属の別なく、また系統により増殖速度に違いがあるものの、容易に増殖可能であった。今回用いた系統のうち特に増殖の早かった白花大輪系 (*Phal. Ginrei*)、セミアルバ系 (*Phal. Cosmo-Vegas*)、ピンク大輪系 (*Phal. Happy Valentine*) の系統は市場流通量の約9割を占めており、今回の増殖結果と同様、市場の大多数の品種が本手法により容易に増殖可能であると推察される。

原種に関しては、*Phalaeopsis* 亜属の種は *Phal. shilleriana* を除いて容易に培養増殖可能であった。この亜属に含まれる種には現在市場流通している交配種の交配親となった重要な種が多く存在する。*Phal. amabilis* およびその変種、亜種は何度も白花大輪系の交配親として使用されてきたことが知られている。また他の色花、模様の大輪系統は、色模様が導入された後、商業向けの特徴を



元から所持しており育種の進んでいた白花大輪系の品種を何度も戻し交雑して作られたという歴史を持つ (Griesbach, 2002). このため、大半の大輪系品種は *Phal. amabilis* 等の増殖しやすかった *Phalaenopsis* 亜属の遺伝的寄与が非常に大きく、どのような品種であっても容易に増殖可能であると推察できる. またこれより、今回用いた全ての交配種が容易に増殖可能であったという結果は、*Phalaenopsis* 亜属の原種の容易に培養可能であるという培養特性に基づくものであると考えられる. また原種個別の培養特性を見た場合、*Phal. shilleriana* は途中で枯死してしまい培養自体が困難であった. *Phal. shilleriana* はこれまでも、花茎培養や花茎腋芽培養など初代培養から大量増殖までの培養が難しい種であると報告されており (田中, 1987; 窪田ら, 2002), 効率のよい増殖のためには培地成分だけでなく、用いる組織部位など培養手法の改良の検討も今後必要であろう.

培養の難易における特性は、培養・培養条件による影響よりもその種固有の増殖能などに由来することが示唆されている (江藤ら, 1995; 周ら, 1997). これらの原因として田中 (1987) は、種の組織・形態学のおよび内生成長調節物質の質的・量的差異に由来している可能性を指摘しているが、現在までに種間差の詳細な解析と原因に関する研究報告はない. 今回検討した原種のうち、*Phalaenopsis* 亜属以外の *Polychilos* 亜属、*Parishianae* 亜属の種は、増殖困難な種が多いことがわかった. この培養特性は種固有のものであると考えられ、基本的にこれらの品種の遺伝的寄与が大きな品種は、増殖しにくいことが予想される. これらの *Phalaenopsis* 亜属以外の *Polychilos* 亜属、*Parishianae* 亜属の原種の多くは、黄花大輪系への黄色の導入に使われた *Phal. mannii* などの色や模様の高伝性が高い原種が多く存在し、色花、模様の大輪系の育種に使用されてきた. しかしながら先に述べたように、市場に出回っている色花、模様の大輪系 (筋花系、点花系、黄花系) などは、形質の導入後に白花大輪系品

種を何度も戻し交雑し作出された背景を持つ。このため、今回増殖能が高いと判明した *Phal. amabilis* 等の *Phalaenopsis* 亜属の原種の遺伝的寄与は極めて大きい。以上のことから、色花、模様系統の大輪系の品種であっても、本手法は適用可能であると推測される。このことは、*Polychilos* 亜属、*Parishianae* 亜属の増殖が困難であった多くの原種と異なり、今回用いた各種色花、模様系統が容易に増殖可能であったことから妥当であると思われる。しかしながら、*Polychilos* 亜属、*Parishianae* 亜属の原種同士の一代交雑種などは、これらの亜属の原種の遺伝的寄与が非常に大きく、増殖は非常に困難であると予想される。そのような品種は市場流通量上数%にも満たないが、原種に近い特徴を持つ品種を好む愛好家も多い。そのため、この属の原種およびその遺伝的寄与が極めて大きい交配種等も含め、どのような品種にも適用可能な培地組成に近づけるために、今後さらなる組成の改善検討が必要であろう。

また本手法の実用化に際しては増殖率も考慮する必要がある。今回の結果において Table2-3 の交配種のうち増殖率が最大の品種は Ginrei × self であり、最小のものは Golden Emperor ‘Sweet’であった。本手法による 1 ヶ月あたりの増殖率は、単純な指数近似で前者が 1.33 倍、後者が 1.08 倍である。また各交配種の平均倍率は 1.17 倍となった。現在までに、花茎培養由来の幼植物体からのシュート増殖を試みた研究は、幼植物体の腋芽を利用したものが報告されている（市橋ら, 2000; 岩堀, 2010）。市橋らはフラスコ苗の基部 1.5 cm を 2.5 mm に細断し、6 ヶ月間培養したところ、60 の苗から 15 のカルス様組織、12 の多芽体、38 のシュートが得られた。また岩堀は、91 日の暗所培養により節間伸長した 40 本の幼植物体を 4 分割に横断し、植物生長調節物質を含まない培地上で、腋芽を含むこの節間切片を 43 日間培養したところ、80 本のシュートまたは/および 40 個の PLB が得られた。前者の 1 ヶ月あたりの増殖率は、多芽体とシュートのみに着目した場合、1.10 倍であった。また後者は、暗所培養

と節間切片培養を合計した約4ヶ月の倍率は1.18倍であり、1ヶ月あたりに換算すると1.04倍となる。これらより、本手法の1ヶ月あたりの増殖率は上記の類似の増殖法の値に比べて高く、また自然状態でのコショウランの栄養繁殖法である高芽とりの年率2倍程度の増殖率と比較しても大幅に高く、かつ継続的に増殖できるため、シュート形態による増殖法としては優れた方法であると考えられる。

今回得られた上記の不定芽増殖法の増殖率は、ラン科植物の大量増殖時に用いられるPLB経由の増殖と比べた場合、その効率は大きく劣る。PLBは増殖効率に優れ、その増殖率は高いもので1ヶ月あたり数倍～数十倍になる。このため、第1章で述べたようにコショウランの培養増殖では、まず花茎から幼植物体を誘導し、この幼植物体の葉片や根を用いてPLBを誘導あるいは花茎腋芽から直接PLBを誘導し、大量増殖系に移行する方法が既に確立され、商業利用がなされている。しかしながら、コショウラン成株の花茎の採取は栽培特性上1年に1回程度に限られ、初代培養の立ち上げには成株の季節的な計画栽培が必要となる。今回用いた不定芽増殖法は幼植物体のままでの増殖が可能であり、PLB誘導材料としての葉や根などの無菌培養物が常時供給可能である。このため、季節的な栽培計画を要する成株花茎からの初代培養の立ち上げと異なって時期を選ばず、既存のPLB誘導法により、無菌培養物から大量増殖系へと直ぐに移行できることにもこの方法の利点が存在すると考えられる。

一般的に脱分化を経ることのない茎頂培養などの方法は、極めて変異発生頻度が低いものと考えられており、西村・山田(1992)の報告ではカキ葉組織からの不定芽形成において、体細胞から脱分化過程を経ることなく直接に不定芽が形成されることから、変異の誘発頻度が少ないと考えられると言及している。本研究において試験した不定芽増殖法についても脱分化を経ることのない器官形成的な増殖であり、PLB増殖などの脱分化を経る増殖法と比べ、培養変異の

発生は比較的少ないものであると考えられる。また本手法は根や葉を落とすことによって植物体を小さくした状態で増殖，培養状態の維持が可能であり，株の保存に適している。これらのことから，本手法は交配種の優良株や原種株を遺伝資源として維持更新し，保存する上で非常に有効であると予測される。これまでに変異率の調査に関する文献は非常に少なく，田中（1987）が葉片培養由来の PLB 増殖において 2.9%，Tokuhara・Mii ら（1998）が腋芽由来の 3 品種の各遺伝子型の PLB 増殖において 10%未満の変異があると報告している。PLB 等の大量増殖段階ではこれらの変異率では実用上問題ない水準とされているが，遺伝資源保持の観点からはより少ない変異率が期待される。本試験中に培養した苗における表現型の変異は全く見られなかったが，花についての変異は開花時ではないと判断はできない。このため，培養変異については今後本手法で増殖した開花株について随時調査が必要であろう。

### 第3章 ePLBを用いたコチョウラン効率的な大量増殖系の検討

PLBは適切な条件下で培養することにより、その表面に二次的に新たなPLBを形成するため、形成された二次PLBを母体となるPLBから分離培養することで急速に増殖する。それらの得られたPLBは植物体へと容易に分化させることができる。この段階での増殖効率はPLB塊を断片へと分割すること（Amaki and Higuchi, 1989）、成長点を傷つけること（新居ら, 2004）などの処理により著しく増加する。

上記の増殖技術は小さなPLBを手作業により切除や分割を行う必要があるため、時間と労力の負担が非常に大きい。しかしながら、シュートが形成したPLBは二次PLBを形成しにくいため（Amaki and Higuchi, 1989; 田中, 1997）、シュート形成の阻害や成長点の切除などの煩雑な作業が必要となる。他のラン科植物に比べ、コチョウランのPLBは比較的容易にシュートが分化する傾向にあり（田中, 1987）、これは上記のような操作なしではマイクロプロパゲーション段階において増殖効率が著しく低下することを意味する。

そこで、暗条件培養することにより得られた伸長型PLB: elongated PLB (ePLB)を用いることで、マイクロプロパゲーション段階におけるPLB分離のような操作が、試料の大きさのために行いやすく簡単になるのではないかと考えた。さらに暗所形態形成では光合成器官の発達が抑制されるため、シュート形成が抑制されることも考えられる。またePLBは通常のPLB; normal PLB (nPLB)よりも大きいため、ePLBを用いることで一回の操作により、1つの試料から大量の二次PLBを得ることができ、増殖効率を向上させることが出来るのではないかと考えた。ゆえに、本章ではePLBの詳細な培養特性の知見を得ることを目的とすると共に、ePLBを用いた効率的で簡便なマイクロプロパゲーション系の確立を試みた。

## 本章全体における材料および方法

### 植物材料

品種としては、市場で購入し温室で育成した *Phal. Double Delight* ‘Hawaiian Spots’を用いた。

### 植物体および *PLB* の誘導

花茎培養による幼植物体の誘導，得られた幼植物体からの葉片培養による *PLB* 誘導は，Tanaka の方法 (Tanaka, 1992) に従った。また花茎培養による幼植物体の誘導には *PSR* 培地 (第 2 章, Table 2-1 参照)，葉片培養ではコチヨウランの葉片培養用培地 (Tanaka, 1992) を用いた。その後，得られた *PLB* は *PSR* 培地上で継代培養を行い，本章の試験に用いた。長さ約 4, 5 mm である *nPLB* は明条件下で増殖，維持を行い，一方，長さ約 1 cm の *ePLB* は暗条件および薄明条件での育成により誘導した。

### *nPLB* と *ePLB*

本章の試験では通常の *PLB*; normal *PLB* (*nPLB*) と伸長型 *PLB*; elongated *PLB* (*ePLB*) の両方を使用した。

### 培養条件

*PSR* 培地を用い，25°C，以下の 3 つの光条件下で *PLB* の培養を行った。白色蛍光灯，光合成有効光量子束密度で，3 条件；暗条件：0，薄明条件：2，明条件：80  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度である。暗条件を除き，光周期は 14 時間日長とした。

## 第 1 節 PLB 増殖と長さに対する光条件の影響

nPLB や ePLB の誘導や維持には光条件が関与する。本章では、その光条件下で培養を継続的に行った際、光条件が PLB 長や増殖率に与える影響を調査した。

### 材料と方法

葉片培養で得られた PLB を 3 つの光条件（暗条件，明条件，薄明条件）と成長点切断処理（あり，なし）を組み合わせた 6 条件下で 6 ヶ月間培養した。これらの PLB を二次 PLB 生産のために 2 週間毎に継代培養した。長さ 4 mm 以上に成長した二次 PLB を親 PLB から分離し，それぞれ別個に置床し，継代培養した。成長点切断処理については，PLB の上部 1/3 を切除する処理を行い，この処理は 1 ヶ月毎に行った。この試験の開始時点で，5 つの PLB をシャーレ内の PSR 培地上に置床し，各々 6 条件下で培養を行った。これらの PLB は PSR 培地上で継代し，継代時には各々の条件で 1 シャーレ当たり 16 個の PLB を置床した。

培養 6 ヶ月後に，総個体数： number of total individuals (Nt)，PLB 数： number of PLBs (Np)，シュート形成率： shoot formation percentage  $\{ (Nt - Np) \} / Nt \times 100$  を各々の条件において観察・計測し，値を算出した。Nt の値は初期置床した PLB 数，シュートを発生した PLB 数，Np の合計である。Np は Nt のうちシュート形成していない PLB の数である。各々の条件に対し，継代培養中に生じた二次 PLB も含むシュート形成していない全 PLB (Np) から 200 個の PLB を無作為抽出した（非切断処理の薄明条件下のみ 50 個）。その後，各々の光条件に対し，200 個の PLB の全長を定規で 0.1 mm 単位で測定し，得られた PLB の平均長を算出した。

### 結果

Table 3-1 に PLB の長さ，増殖，シュート形成に対する光条件と成長点切断の影響を示した。

成長点切断処理を行わなかった条件では，Nt は明条件，暗条件，薄明条件の順で大きく，Np は暗条件，明条件，薄明条件の順に大きかった。明条件と薄明条件におけるシュート形成率は，約 70% であり全個体の半数以上が幼植物体へと分化していた。対して，暗条件下におけるシュート形成率は 8% と非常に低かった。Fig. 3-1 に切断処理なしの各光条件で培養した PLB の様子を示した。明条件下では，多くの PLB がシュートとルートを形成しており，幼植物体へと発達している様子が観察された。薄明条件下では，いくつかの PLB は葉を形成していた。暗条件下では，多くの細長い PLB が親 PLB の基部から生じていた (Fig. 1-E)。暗条件下において PLB から生じたシュートは白色に近い色で，葉は展開していなかった。

成長点切断処理を行った条件では，Nt および Np の値は明条件，薄明条件，暗条件の順に大きかった (Table 3-1)。明条件と薄明条件では，一ヶ月ごとに成長点切断処理を行ったにも関わらず，培養 6 ヶ月目の段階では，総個体数の約 40% からシュートが形成されていた。一方，暗条件でのシュート形成率は 1% と非常に低かった。

切断処理なしの各光条件における PLB 長は各々，明条件で 4.5 mm，薄明条件で 6.2 mm，暗条件で 9.6 mm であった。切断処理ありでは，明条件で 4.5 mm，薄明条件で 6.4 mm，暗条件で 8.8 mm の長さだった。これより，Fig. 3-1D に示されるように，薄明条件と暗条件における PLB は明条件と比べて長く伸長していることがわかった。また，明条件で得られた PLB の色は緑色であり，一方，薄明条件および暗条件で得られた PLB の色はそれぞれ，黄緑色，白色



Table 3-1. Effects of light condition and growing point excision treatment on shoot formation, PLB proliferation and PLB length

Light condition	Light intensity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	No treatment			Growing point excision treatment				
		Nt	Np	Shoot formation <sup>z</sup> percentage (%)	PLB length <sup>y</sup> (mm)	Nt	Np	Shoot formation <sup>z</sup> percentage (%)	PLB length <sup>y</sup> (mm)
Light	80	840	267	68.2	4.5 ± 0.1	2178	1252	42.5	4.5 ± 0.1
Low light	2	156	53	66.0	6.2 ± 0.1	934	481	48.5	6.4 ± 0.2
Dark	0	791	728	8.0	9.6 ± 2.0	283	280	1.1	8.8 ± 0.3

<sup>z</sup> Percentage of shoot formation =  $[(\text{Nt} - \text{Np}) / \text{Nt} \times 100]$ . Nt: number of total individuals. Np: number of PLBs.

<sup>y</sup> Mean ± SE (n = 200 or 50).

Five PLBs were used for each light condition at the beginning of the experiment. Growing point excision treatment was conducted by excising off the top one-third of the PLBs every month. The PLBs were subcultured every two weeks and secondary PLBs of more than 4 mm were separated from parental PLBs at the subcultures, with inoculation of 16 PLBs per Petri dish for each condition. The excision treatment on these secondary PLBs was conducted only their first excision time. After 6 months, total number of individuals (Nt), which included PLBs both with and without shoot formation, and number of PLBs without shoot formation (Np), were counted, and the rate of shoot formation was calculated for each condition. The average length of PLBs was determined by measuring lengths of 200 PLBs (50 PLBs for low light and no treatment culture), which were randomly selected from all of the PLBs without shoot and with or without growing point excision treatment for each light condition.

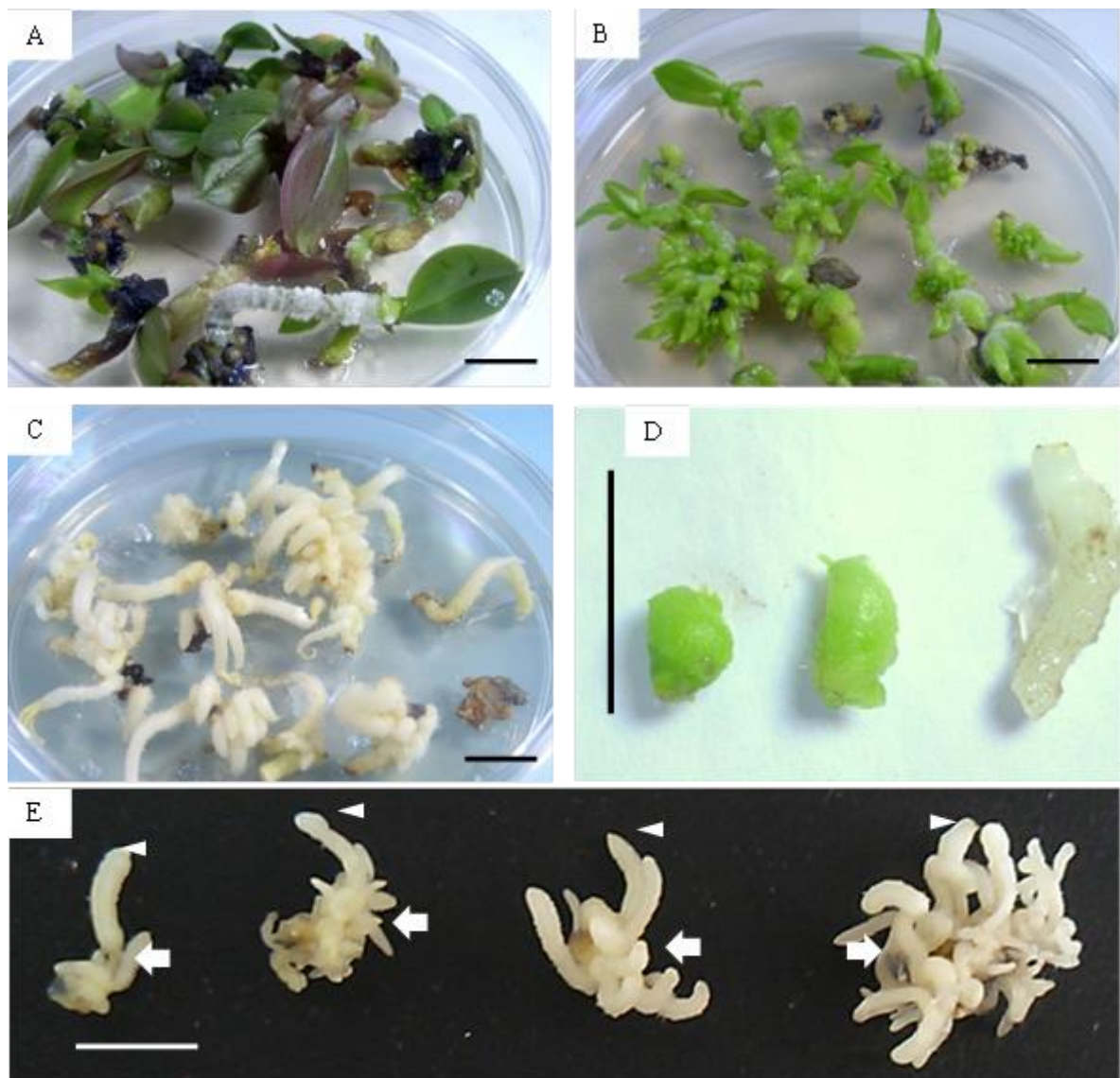


Fig. 3-1. Difference in growth of PLBs after culture under different lighting conditions with or without growing point excision treatment.

A-C: PLB cultures without growing point excision under (A) high light, (B) low light, and (C) dark conditions. Under high light condition, formation of leaves and roots from many PLBs was observed. Under low light, some PLBs formed leaves, but most parental PLBs developed secondary PLBs arising from their basal parts. Under dark, many long and narrow PLBs developed from the basal part of the parental PLBs. These PLBs cultured under dark conditions were pale yellowish-white and thin, and did not expand their leaves, which are features of skotomorphogenesis. D: Difference in lengths of secondary PLBs produced from PLBs with growing point excision treatment after culture under high light (nPLB) (left), low light (center), and dark (ePLB) (right) conditions. PLB length increased as light intensity decreased. E: Some examples of ePLB proliferation after culture without growing point excision under dark condition. Arrowheads show parental ePLBs and arrows show secondary ePLBs. Long and narrow ePLBs developed from the basal part of the parental ePLBs. Scale bars, 1 cm for A to E. Observations were made after 6 month culture.

であった。これらより、暗条件で得られた二次 PLB は、暗所形態形成における特徴が見られることがわかった。

## 第 2 節 ePLB 増殖に対する光順化の影響

第 1 節では、暗条件で PLB を培養することで、PLB は全長が細長く伸長すること、体色が白色へと変化すること、また葉を展開しないなど暗所形態形成における特徴が見られた。これらの特徴は通常用いられる PLB とは明らかに異なるため、第 1 章の緒言で述べたように、これ以降の実験では、通常用いられる PLB を nPLB、暗所形態を示す細長く伸長した PLB を ePLB と区別して用いることとした。また第 1 節では、nPLB の成長点に切断処理を行い明条件で培養した場合、多くの二次 PLB が得られることが示された。そこで、暗所生育させた全長の長い ePLB に成長点切断処理を行うことで、一度に大量の二次 PLB が得られるのではないかと考えた。このとき暗所から明所へ直接移動させた場合、環境適応できず PLB 試料の生存率等に悪影響を及ぼす可能性がある。そこで第 2 節では、光順化処理が ePLB の生存率、二次 PLB 増殖に与える影響を調査した。

ここで第 2 節以降では、第 1 節と異なり、完全なる成長点切断と比べて PLB への傷害が少なく、後の生存率が高いという新居ら (2004) の報告を参考に部分切開法を用いることとした。部分切開は PLB の先端に切れ目処理を行い、PLB の増殖をはかる方法である。

### 材料および方法

暗条件で培養することにより誘導した長さ約 1 cm の ePLB を薄明条件または暗条件下へ移動させ、2 週間培養を行った。その後、両条件の ePLB に部分切開 (新居ら, 2004) を行い、さらに明条件で 2 週間培養を行った。本研究で

は、順化した ePLB に対して、後述の先端肥大部の頂部 1/3 の長さで部分切開を行い、順化処理しなかった ePLB に対しては、先端から順化処理ありの ePLB に対して行った切れ目処理と同様の長さで部分切開を行った。

その後、生存率 : percentage survival [ (number of surviving samples / total number of samples) × 100], 二次 PLB 形成率 : percentage secondary PLB formation [ (number of samples produced secondary PLBs / the number of samples) × 100], 平均二次 PLB 数 : average number of secondary PLBs [total number of secondary PLBs subjected to each condition / number of samples] を各条件に対して算出した。各条件につき 20 個の ePLB を用い、試験は 3 反復行った。

## 結果

暗所で維持した ePLB の色は白色であり、一方、光順化処理を行ったものは黄緑色だった (Fig. 3-2)。光順化処理を行わなかった ePLB は棒状に伸長しており、一方、光順化を行った ePLB は棒状に伸長した ePLB の頂部は球状に肥大している様子が観察された。また、ePLB 増殖における光順化の影響を調査するために、光順化ありまたはなしの ePLB を明条件へ移し、2 週間培養を行った。その結果を Table 3-2 に示した。2 条件間における生存率の有意な差は存在しなかった。しかし、光順化した ePLB における二次 PLB 形成率および平均二次 PLB 数の値は、処理を行わなかった ePLB のものと比べ有意に高かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。



Fig. 3-2. Morphological changes in ePLB in response to light acclimation. A: With acclimation. B: Without acclimation. Bar = 1 cm. During the acclimation period of 2 weeks under low light condition, the tops of the ePLBs became enlarged and they turned yellow-green from pale yellowish-white (A) compared with ePLBs maintained under dark condition (B).

Table 3-2. Effect of light acclimation treatment of ePLBs on secondary PLB propagation

Acclimation treatment	Percentage survival (%)	Secondary PLB formation (%)	No. of secondary PLB
—	100	55.0 ± 4.7 <sup>z</sup>	1.3 ± 0.2
+	100	88.3 ± 2.4	2.8 ± 0.4
Significance <sup>y</sup>	NS	**	*

<sup>z</sup> Mean ± SE (n = 3).

<sup>y</sup> NS, \* and \*\* indicate a non-significant and a significant difference with  $P < 0.05$  and a significant difference with  $P < 0.01$  by the t-test, respectively.

ePLBs produced by dark condition culture were transferred under either low light or dark condition for additional 2 weeks. The culture under low light condition was performed as light acclimation treatment. After 2 weeks of culture with or without light acclimation, the PLBs were subjected to partial incision treatment and transferred under high light condition. After 2 weeks of culture under high light condition, percentage survival, percentage secondary PLB formation and average number of secondary PLBs per initially placed PLB were calculated. Twenty ePLBs were used for each treatment, each of which was performed in triplicate.

### 第3節 部分切開処理を行った nPLB と ePLB 間の増殖率の比較

第2節での仮説を元に第3節では、順化处理後の ePLB に部分切開処理を行い、明条件下で培養を行った場合、大量の二次的な nPLB が得られるかどうか部分切開処理をした nPLB と比較検討を行った。

#### 材料および方法

nPLB と ePLB の増殖率に対する部分切開処理の効果を調査するために、部分切開処理（あり、なし）とサンプルタイプ（nPLB, ePLB）を組み合わせた4条件の試験を行った。各々のサンプルに対し、部分切開処理はこの試験の最初にのみ行った。部分切開ありの ePLB では、この試験に用いるために明条件へ移す前に、光順化处理として薄明条件で2週間培養した。部分切開処理は nPLB では全長の 1/3 の長さで、ePLB に対しては ePLB の肥大部の頂部 1/3 の長さで行った。nPLB と ePLB は処理後、明条件下で2ヶ月間培養を行った。継代培養は2週間毎に行った。その後、各条件において生存率：percentage survival [ (number of surviving samples / number of samples) × 100], シュート形成率 shoot formation percentage [ (number of samples that developed shoots / number of samples) × 100], 二次 PLB 形成率：percentage secondary PLB formation [ (number of samples that formed secondary PLBs / number of samples) × 100], 平均二次 PLB 数：average number of secondary PLBs [the total number of secondary PLBs / the number of samples] を算出した。各条件 20 のサンプル (nPLB または ePLB) を用い、試験は5反復行った。

## 結果

部分切開処理が nPLB と ePLB の増殖に与える影響を Table 3-3 に示した。各条件間において、部分切開処理をした nPLB の生存率は、他の条件区のものより有意に低く、57%だった。対して、部分切開処理なしの nPLB と処理なしおよび処理ありの ePLB の値において有意差は見られず、生存率はいずれも高く維持された。

部分切開処理ありの ePLB のシュート形成率は、処理なしの nPLB および ePLB の両方における値よりも有意に低く、概して部分切開処理はシュート形成を抑制する影響を及ぼすことがわかった。また、nPLB, ePLB どちらのサンプルにおいても、部分切開処理の有無は二次 PLB 形成率自体に有意な影響を及ぼすことはなかった。4 条件間において、部分切開処理ありの ePLB における二次 PLB 数は、他の 3 条件のものよりも有意に高かった。

Fig. 3-3 にこの試験の各条件における二次 PLB 形成の様子を示した。処理なしの nPLB では、シュート、ルートが nPLB から形成され、幼植物体へと発達しており、二次的な nPLB 形成はほとんど見られなかった (Fig. 3-3A)。処理ありの nPLB では、親 nPLB からある程度の幼植物体の発達が見られるものの、nPLB の基部から多くの二次的な nPLB が形成される様子が観察された (Fig. 3-3B)。また、処理なしの ePLB (Fig. 3-3C) では、ePLB の頂部から幼植物体の発達が見られるものの、ePLB の基部から非常に多くの二次的な nPLB が形成された (1 ePLB 当り 9.8 個)。処理ありの ePLB (Fig. 3-3D) では、ePLB の頂部からの幼植物体の発達はほとんどなく、ePLB の表面全体から非常に大量の二次的な nPLB が形成されていた (1 ePLB 当り 31.9 個)。



Table 3-3. Effect of cutting treatment of PLBs on PLB cultures

Sample type	Cut treatment	Percentage survival (%)	Shoot formation percentage (%)	Secondary PLB formation (%)	No. Secondary PLB
nPLB	—	95.0 a <sup>z</sup>	88.0 a	40.0 b	4.0 a
	+	57.0 b	54.0 ab	42.0 b	5.6 a
ePLB	—	100.0 a	96.0 a	86.0 a	9.8 a
	+	89.0 a	21.0 b	89.0 a	31.9 b

<sup>z</sup>Different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  according to the Tukey's test ( $n = 5$ ).

Twenty nPLBs or ePLBs were used for each treatment. ePLBs were acclimated for 2 weeks under low light condition before cutting treatment. Each treatment was performed 5 times. After 2 months of culture with subculturing every 2 weeks, observation was made.

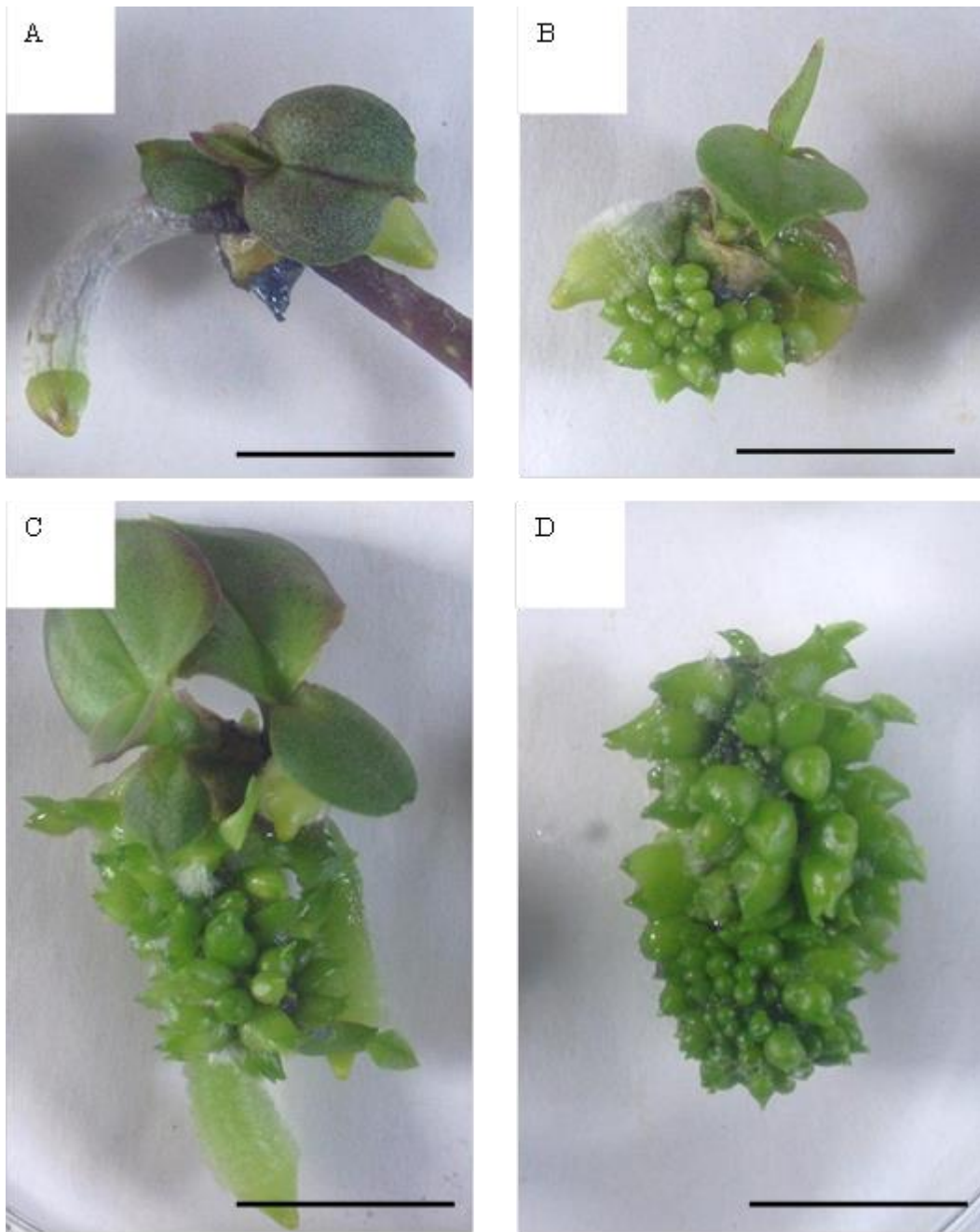


Fig. 3-3. Effect of partial incision treatment on secondary PLB formation from the surface of PLBs.

A: nPLB (without partial incision). B: nPLB (with partial incision). C: ePLB (without partial incision). D: ePLB (with partial incision). Bar = 1 cm. PLBs were cultured as described of Materials and Methods. In comparison with nPLBs (A, B), many secondary PLBs were formed from the surface of ePLBs (C, D). Shoot formation from the top of ePLBs with partial incision (D) was hardly observed and formation of numerous secondary PLBs was confirmed on the most surface of the ePLBs.

#### 第 4 節 考察

シュート形成した PLB は二次 PLB が形成しにくいことが知られており、また田中 (1987) は、シンビジウムのような他のラン科植物と比較して、コチウランの PLB はシュートが形成しやすいことを示唆している。この特徴はマイクロプロパゲーション段階における PLB 増殖率低下の一因となるため、非常に重要な問題である。このため現在までに、成長点切断 (Amaki and Higuchi, 1989), シュート形成の阻害 (田中, 1997), シュート発生前の PLB 分割 (Murdad *et al.*, 2006; Tomuro *et al.*, 1994) のような PLB 増殖を促進する多くの方法が研究されてきた。

本章では第 1 節において、異なる 3 つの光条件下において成長点切断処理が PLB 増殖に与える影響を調査した (Table 3-1)。処理なしでは、暗条件下の PLB (ePLB) は明条件、薄明条件のもの比べて非常にシュートを形成しにくく、 $N_p$  の高さから二次的な ePLB 増殖が盛んであることがわかった。また切断処理なしの薄明条件下は全 6 条件の中で最も  $N_t$ ,  $N_p$  の値が低かった。Table 3-1 より、薄明条件におけるシュート形成率の値は明条件のものと同程度であり、暗条件のようにシュート分化を著しく抑制できるわけではないことが示された。また成長点切断ありの各光条件の  $N_p$  の値は明、薄明の順に大きいことから、成長点切断処理等によりシュート分化を抑制できる状態ならば、光強度が大きいほど PLB 増殖は盛んなのではないかと推察される。これらのことから、成長点切断処理なしの薄明条件では、暗条件ほどシュート抑制効果はなく、同処理なしの明条件と比べてもシュート形成の程度に差がないこと、また光強度による増殖能も明条件よりも低いと考えられ、このため成長点切断処理なしの薄明条件では PLB 増殖能が著しく低かったのではないかと考えられる。一方、成長点切断処理ありの場合では、処理なしの場合と比べてシュート抑制がなされ、また光の存在下、特に明条件において成長点切断処理は PLB 増殖を

強く促進することが示された。しかしながら、処理ありの場合での暗条件培養における ePLB 増殖は、処理なしのものとは比べて大きく減少した。これは、処理なしの場合、処理ありの場合と同様、二次的な ePLB 形成が見られたものの、処理後に枯死する切断処理個体が多く見られたためである (data not shown)。

第 2 節以降では先の第 1 節の結果から、暗所生育させた ePLB に対して成長点切断処理を行い明条件で培養することで大量の二次的な nPLB が得られると考えられたため、明条件への移行方法および成長点の処理法について検討を行った。培養組織は培養環境の変化がストレスとなるため、明条件へ ePLB を直接移行した場合は、異なる環境下への適応が生存に不利である可能性が推測される。このため、光順化処理の有無が ePLB における生存率、二次的な nPLB 増殖に与える影響を調査した。順化処理をしたものを観察すると、期間中に ePLB はその頂部が球状に肥大し、表面の体色は黄緑色へと変化することがわかった (Fig. 3-2)。また Table 3-2 の結果より、薄明条件で順化した ePLB は、順化なしの ePLB よりも高い二次 PLB 形成率を示し、直接明条件へ移すよりも多くの二次的な nPLB が得られることが示された。

第 3 節では、部分切開処理の有無による nPLB と ePLB 間の二次的な nPLB 形成の差を比較した。Table 3-3 より、部分切開処理した ePLB の平均二次 PLB 数は他条件よりも有意に高く、非常に多くの二次的な nPLB が形成された。このことから部分切開処理は形成される二次 PLB の数の増加において高い効果を持つことが示唆された。以下では、ePLB への部分切開処理が二次 PLB 形成に与える促進効果の理由を考察する。

第一に、部分切開した nPLB の生存率の値は処理なしの nPLB また処理ありとなしの ePLB と比べ有意に低かった (Table 3-3)。部分切開は nPLB の頂部から全長の約 1/3 に対して切断処理を行った。コショウランにおける傷応答は他のラン科植物よりも深刻であり、しばしば枯死を引き起こす。このため、

ePLB と比べ小さな nPLB は受傷に対し十分に耐えられず、生存率が低下したものと考えられる。対して、ePLB における部分切開は、順化後に発達した肥大部の頂部からその肥大部の全長 (Fig. 3-2) の 1/3 に対してのみ行っており、また ePLB は nPLB よりも大きいため受傷による影響が少なく、ePLB では受傷による影響のない組織部位が十分に存在することから、枯死する可能性が低いと考えられる。nPLB と ePLB 間における生存率の差は以上のことが影響していると考えられる。

第二に、部分切開処理をした ePLB において見られた低いシュート形成率の値は、新居ら (2004) による nPLB において 70.0–96.7% のシュート形成率とする報告よりも著しく低いものである。また部分切開を行った nPLB においてシュート形成率の低下が見られたが、この減少は処理なしの nPLB そして処理なしの ePLB の値と比べ有意差は見られなかった。

最後に、ePLB の二次 PLB 形成率は nPLB のものよりも有意に高いが、部分切開処理は二次 PLB の形成率の増減には影響を及ぼしていない。nPLB では、二次 PLB の形成率は nPLB の頂部 (上半分) よりも基部 (下半分) で高いという報告がなされており (Amaki and Higuchi, 1989; 田中, 1987)、成長点のある頂部付近からは二次的な nPLB が形成されにくく、基部からは多くの二次的な nPLB が形成されることが示されている。今回の試験では、明条件へ移す前に、薄明条件で順化して部分切開処理した ePLB は、暗条件培養中に誘導された棒状に伸長した部分全体および順化中に誘導された球状の肥大部の下部からも、大量の二次 PLB が形成されていた (Fig. 3-3D)。以上の結果から、ePLB では伸長している部分に多くの二次的な nPLB が形成されるという特性を鑑みると、nPLB の二次 PLB 形成能が高い基部に対応する部分が、暗所形態形成により伸長しているのではないかと推測される。また ePLB の先端部は順化処理により肥大するが、この範囲が光形態形成時に成長点からの影響を受ける領域

であり、この肥大した部分が nPLB と直接的に対応する部分であると考えられる。しかし上記はあくまで推測であり、今後 ePLB の伸長部分の詳細な解析が必要であろう。

以上より、部分切開処理をした ePLB において同処理の nPLB よりもより多くの二次的な nPLB が得られるのは、比較的小さな生存率の低下、シュート形成率の低下による二次 PLB 増殖能の増加、伸長部と頂部肥大による二次 PLB 形成可能な体表面積の増加が理由であると考えられる。

結論として、本章では第 1 節により、暗条件下での培養によりシュートを抑制することで二次 PLB 増殖が促進されることが明らかとなった。このことは暗所形態形成により、PLB の分割や成長点切除のような従来の煩雑な操作が不要となることを意味している。また、暗条件培養で得られた ePLB は、暗所形態形成により二次 PLB 形成能の高い部位が伸長していると推察され、新居ら

(2004)による部分切開処理を ePLB への適用することで、同処理をした nPLB と比較して 6 倍、処理なしの nPLB と比べて 8 倍の二次 PLB が生産可能であった (第 3 節)。

また本章の結果より、Fig. 3-4 に示した ePLB を用いた高効率で簡便なマイクロプロパゲーション系を提案する。この系では、暗条件下で培養することにより ePLB が誘導され、シュート形成を抑制したまま PLB 状態での維持・増殖が可能である。加えて、この方法は成長点切除や PLB 分割のような煩雑な操作を必要としない。さらに、光順化の後に部分切開処理した ePLB を明条件下で培養することで、大量の二次的な nPLB を得ることができる。またこれらの得られた二次的な nPLB を暗条件下に戻すことで再び ePLB を誘導することも可能である。この系を用いることでまず I の過程において、5 つの nPLB の暗条件下での初代培養から 6 ヶ月間で 728 個の ePLB を得ることが可能である (Table

3-1). またその後、得られた ePLB に対し、II の過程を適用することで、1 つの ePLB から 2 ヶ月間で約 32 個の二次的な nPLB が得られる (Table 3-3). よって単純計算では、1 年以内に 5 つの nPLB から 20,000 本以上の幼植物体を生産することが可能であり、以上のことからこの系はコショウランの商業的なクローン苗生産に適用できると考えられる.

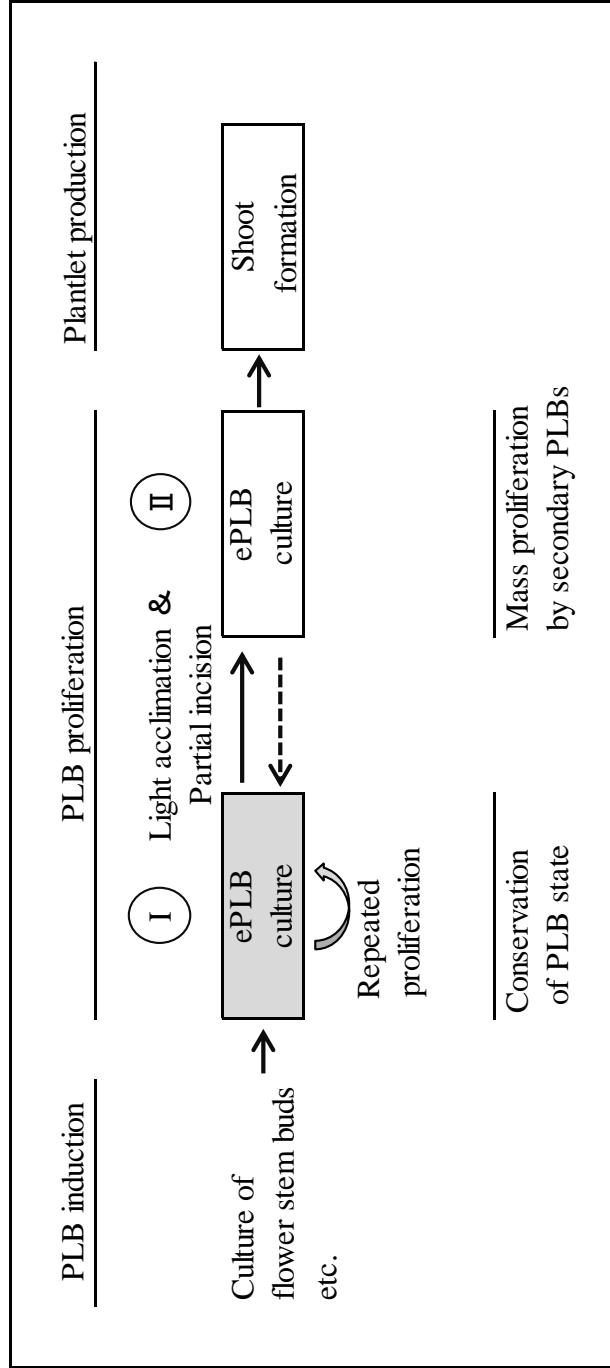


Fig. 3-4 Schematic diagram of a simple and efficient PLB proliferation system. Open and shaded squares indicate high light and dark conditions, respectively. In this system, by subculturing under dark conditions in process I, ePLBs can be produced and maintained with suppressed shoot formation. Subsequently, after light acclimation, numerous secondary PLBs (nPLBs) can be obtained by culturing the ePLBs with partial incision under light conditions in process II.



## 第4章 ePLBを用いた形質転換系の検討

### 1. 緒言

コチョウランは他の植物と比べ、種間交配種や属間交配種の作出が容易なため、これまで交配育種により多くの品種が作出されてきた。しかしコチョウランの長い生殖周期のため、また消費者に需要が高い新規花色や香り、耐病性や耐寒性など栽培特性上重要な遺伝資源は限られているため、従来の交配育種によるコチョウランへの新形質の導入は困難である。しかし、バイオテクノロジーにおける劇的な進歩は、コチョウランにおいて従来の育種法では導入が困難であった優良形質を持つ新品種の作出を可能にした。コチョウランの形質転換法の確立は1990年代後半からの初期の報告 (Anzai *et al.*, 1996; Belarmino and Mii, 2000) に始まり、近年では耐病性のような優れた形質の実際の導入が遺伝子導入法により達成されている (Chang, *et al.*, 2005; Sjahril *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2011)。加えて、形質転換は遺伝子機能解析にとっても重要なツールであり、コチョウランにおける分子育種技術は多くの注目を集めている。

現在、コチョウランにおける主要な形質転換法はアグロバクテリウム媒介形質転換法とパーティクルボンバードメント法の2つが主流である。特に前者はパーティクルボンバードメント法のような直接導入法と異なり、高い形質転換効率、低コスト、比較的大きなDNA断片の導入が可能、導入遺伝子が低コピー数であるためジーンサイレンシングが起こりにくいなどの特徴があり (Cheng *et al.*, 1997; Hiei *et al.*, 1994; Shou *et al.*, 2004)、現在盛んに研究がなされている。これらの技術を用いた形質転換体はトウモロコシ、ダイズ、イネのような作物において多数確立されているが、これらの作物に比べてコチョウランでの報告は少なく、多くの形質転換系において必須であるDNA伝達、高効率の再分化系、形質転換細胞の最適な選抜条件などを検討する必要がある。

PLBは増殖しやすく簡単に再分化するという性質のため、一般的に多くのラン科植物において形質転換のための標的組織として用いられている。本研究では、前章においてePLBを用いたコショウランの高効率で簡便な微細繁殖系を確立した。ePLBを用いることで、PLB1個あたりの換算で一度に大量の二次PLBが得られることがわかった。そこでこのePLBを感染材料として用いた場合、従来のnPLBを用いるアグロバクテリウム媒介形質転換法と比較し、感染可能な組織部位が広がり、また得られる二次PLBの多さから短期間で一度に多くの形質転換体を得られるのではないかと考えた。

本章では、ePLBを用いた効率的なアグロバクテリウム媒介形質転換法の確立を目的とし、感染前の前培養や抗酸化物質の使用などのレポーター遺伝子の一過性発現効率に影響を及ぼす条件の最適化を行った。

## 2. 材料および方法

### 植物材料

第2章、第3章同様、*Phal. Double Delight 'Hawaiian Spots'*を用い、PLBを誘導した。感染試験には3章と同様の方法で誘導したnPLBとePLBを使用した。nPLBとePLBは各々、明条件、暗条件下において、25°C、PSR培地上で2-4週間毎に継代培養を行うことで維持した。試験前にePLBに対して薄明条件で2週間、順化处理をしてから用いた。

### アグロバクテリウム株とプラスミドベクター

バイナリーベクタープラスミド pIG121-Hm (Ohta *et al.* 1990) を持つ *Rhizobium radiobacter* EHA101 (Hood *et al.*, 1986) を試験に用いた。Fig. 4-1 に示すように pIG121-Hm は neomycin phosphotransferase II (*nptII*) gene (nos promoter), 改変されたイントロンを持つレポーター遺伝子である

$\beta$ -glucuronidase (GUS) (35S promoter), hygromycin phosphotransferase (*hpt*) gene (35S promoter) を持つ。

#### アグロバクテリウムの前培養と形質転換

20 mg/L のハイグロマイシンと 50 mg/L のカナマイシンを含む液体 YEB 培地中でアグロバクテリウムを暗条件, 27°C, 1 晩の条件で培養した。その後 3000 rpm, 30 分間, 遠心分離を行った。それから YEB 培地を取り除き, ペレットを 0.1 mg/L の NAA, 1 mg/L の BAP, 250  $\mu$ M のアセトシリンゴンを含む液体 NDM (Tokuhara and Mii, 1993) を用い, 吸光度 OD<sub>600</sub> = 0.2 になるように懸濁, 希釈を行った。サンプル (nPLB または ePLB) を 20 mL のアグロバクテリウム懸濁液を分注した 50 mL のファルコンチューブに入れ, 振盪培養機 (TAITEC MONOD-MINI, TAITEC Co., Ltd., Japan) を用い, 40 rpm で 2 時間培養し, アグロバクテリウムの接種を行った。接種のための振盪培養後, 共存培地 (0.25% グランガムで固化した上記の同様の組成の固体 NDM) に置床し, 暗条件, 25°C で 3 日間, 共存培養を行った。

なお, 前章までの試験や本章の植物材料の準備ではその有効性から PSR 培地を用いてきた。しかし, 本章の形質転換実験 (アグロバクテリウムとの共存培養) では PSR 培地を用いた場合, 共存培養時に培地全体にアグロバクテリウムの過増殖が見られ, 以降の除菌操作が困難となるため, 近年多くのラン科植物の形質転換で用いられている NDM を共存培地とした。

#### 実験計画

本章では, 形質転換効率に影響を及ぼす 3 つの要因について試験を行った。その要因はサンプルタイプ (nPLB と ePLB), 前培養とサンプルへの切断処理の組み合わせ (処理なし, 前培養, 切断処理, 前培養+切断処理), 抗酸化物質

として作用する L-システインの共存培地への様々な濃度での添加である。前培養は、アグロバクテリウムの接種前に共存培地と同組成の新鮮な固体 NDM 上において、2 日間培養を行った。切断処理は接種過程の直前にサンプルに対して部分切開法（新居ら，2004）を行った。共存培養後，一過的形質転換効率における要因の影響を，組織化学的 GUS アッセイにより評価した。試験は 1 条件につき 20 のサンプルを用い，5 または 6 反復を行った。

### 組織化学的 GUS アッセイ

PLB における一過的 GUS 発現を 3 日間の共存培養後に評価した。組織化学的染色は Jefferson *et al.* (1987) の方法を参考に行った。以下にその方法を示した。50 mM のリン酸緩衝液，0.1% Triron X-100，0.5 mg/mL の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-gluc)，20%メタノールの組成からなる GUS 染色溶液を調製し，サンプルをこの溶液に浸した。その後，サンプルを含む染色溶液を 5 分間，穏やかな減圧条件下に置き，その後，37°C で 1 晩培養した。その後，染色が観察しやすいようにクロロフィルが除去されるまでサンプルを繰り返し 70%エタノールに浸した。

### GUS スコアの設定とデータ解析

サンプルの GUS 発現レベルを 1 サンプル当りのブルースポット（染色された形質転換細胞）の数と範囲により，0 から 3 までのスケールでスコア付けした（Fig. 4-2）。スコアの設定は以下の通りである。0；スポットなし，1；スポットが 1 つ，2；複数のスポット，3；複数のスポットを持ちかつ直径 1 mm 以上のスポットを含む。GUS 発現における様々な要因の効果はノンパラメトリック解析（Mann-Whitney の *U* 検定，Kruskal-Wallis 検定後の Steel-Dwass 法による多重比較）により行った。

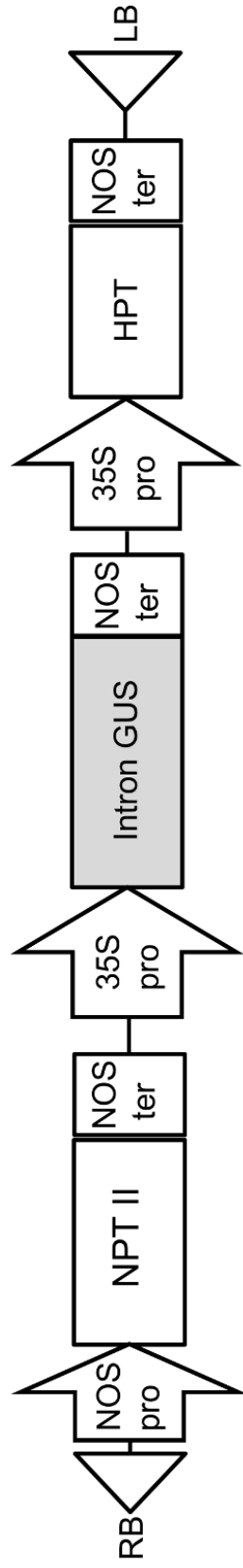


Fig. 4-1 T-DNA region of the plasmid pIG121-Hm used for transformation experiment.  
*RB*: right border, *LB*: left border, *NPTII*: neomycin phosphotransferase, *HPT*: hygromycin phosphotransferase, *Intron GUS*: intron-containing  $\beta$ -glucuronidase, *NOS pro* and *ter*: nopaline synthase promoter and terminator, *35S pro*: *CaMV* 35S promoter.



Fig. 4-2 Scoring for the histochemical GUS assay in PLBs

Figures show examples of GUS staining in ePLBs. The scores were ranked into 4 levels according to the number and extent of blue spots by transient *gus* expression. Score 0: no spot, score 1: one spot, score 2: two or more spots, score 3: a number of spots and including spots over 1 mm. Arrowhead show a spot over 1 mm. Bar = 1 cm.

### 3. 結果と考察

アグロバクテリウム法において形質転換効率に影響を与える要因として植物体の遺伝子型や外植片のタイプ、アグロバクテリウムの菌株、プラスミド、接種時の菌濃度や共存培養期間、さらに単子葉植物の場合ではアセトシリンゴンの有無や濃度が関与することが知られている (Hiei *et al.*, 1994; Rashied *et al.*, 1996; Belarmino and Mii., 2000). これらの基本的な条件については事前に予め検討を行っていたため、今回の試験では、近年、形質転換効率に影響を与える要因として報告がなされている切断処理や前培養、共存培地中のシステインの濃度の効果を検討した。またサンプルタイプ (nPLB, ePLB) による比較を行い、形質転換材料としての ePLB の有用性について検討した。

#### サンプルタイプの効果

形質転換材料として 2 種類の PLB (nPLB, ePLB) を用いてアグロバクテリウム感染試験を行った。サンプルタイプの効果 Table 4-1 に示した。ePLB の GUS スコアの値は nPLB のものよりも有意に高かった (Mann Whitney  $P < 0.05$ )。スコア 0 から 3 までのサンプル数の内訳に関しては、nPLB ではスコア 0 のものが一番多く、ePLB ではスコア 1 または 2 のサンプルが多いという傾向が見られた。また GUS 染色を行ったサンプルを Fig. 4-3 に示した。nPLB では成長点付近と PLB の表面のいくつかの部位に染色が見られた。しかし、PLB 体表面に多少の褐変が見られた。ePLB ではサンプルの成長点付近がよく染まっていた。Table 4-1 の結果における GUS スコアから、ePLB の方が一過的形質転換効率は高いことがわかった。また染色サンプル数の内訳から、ePLB の方が、全く形質転換の見られないスコア 0 のサンプルは少ないことが示された。これは単純に ePLB の方が表面積は大きく、感染の機会が多いためであると推察される。

### 切断と前培養の効果

アグロバクテリウム法ではその機構上、植物の受傷は菌が組織へ感染するための重要なステップであり、双子葉植物や一部の単子葉植物では受傷に対する傷応答により遺伝子転移のためのインデューサーが放出されるため、創傷処理はアグロバクテリウム感染による形質転換効率を上昇させる。また感染前の前培養による形質転換効率の向上の報告が報告されている (Jacq *et al.*, 1993; Robichon *et al.*, 1995; Villemont *et al.*, 1997)。これは前培養中の細胞分裂の活性化が影響すると考えられている。さらにランのような単子葉植物では、前培養培地に予めアセトシリンゴンを添加することで良い効果が得られている (Mishiba *et al.*, 2005)。

このため、切断処理と前培養の形質転換に対する効果を調査した。その結果を Table 4-2 に示した。切断処理と切断+前培養における GUS スコアは処理なしのものよりも有意に高かった (Kruskal-Wallis  $P < 0.05$ )。処理なしと前培養間に有意差は見られず、一過的形質転換効率への効果は切断処理を用いた場合のみ見られた。有意差の見られた切断処理、切断+前培養の条件下では処理なしのものとは比べて、染色個体数はスコア 0 のものが少なく、スコア 2, 3 のものが多いという傾向が見られた。また切断処理条件の GUS 染色したサンプルを Fig. 4-3C に示した。

今回の結果では、形質転換において切断処理による促進効果が見られたが、前培養処理に関しては非処理よりもやや改善が見られたものの、有意差はなかった。切断処理条件では Fig. 4-3C に示したように、切り口のみならず表面全体に多くのブルースポットが観察された。染色サンプルの中には、小さな突起状のブルースポットを持つものも見られた。これはその形状から二次 PLB であると推察される。安定した GUS 発現には細胞分裂と増殖が必要であり、DNA 複製 (S 期) と細胞分裂 (M 期) が安定した形質転換に強く影響することが示



唆されている (Villemont *et al.*, 1997). 今回の結果は前章で示唆されたように、部分切開処理により ePLB において二次 PLB が誘導されやすい状態、つまり表皮において細胞分裂が起きやすい状態にあり、このため ePLB の表面の広範囲に遺伝子導入が生じやすく、多くの GUS 遺伝子発現が見られたと考えられる。ランの形質転換では表皮層の除去や注射針での受傷 (Chai *et al.*, 2002)、スライス、引っ掻き傷、超音波処理などが検討され、促進効果が報告されている (Shrestha *et al.*, 2007)。今回は創傷 (切断) 処理として部分切開法を用いたが、超音波以外の多くは操作等が煩雑であるため、形質転換向けの創傷処理として使用する際も ePLB への部分切開法は簡単で高い効果を及ぼす可能性が考えられる。

Jacq ら (1993) は、前培養はテンサイの子葉の形質転換効率に良効果を与えたが、胚軸の形質転換効率には影響しなかったことを報告している。これはサンプルによっては前培養を必要としないことを意味する。また前培養の影響を述べた過去の報告では、植物種やサンプルにより効果的な前培養期間は 2 日から 2 週間程度と範囲が広く、今回の試験では最適な前培養期間が試験されなかった可能性も考えられる。

#### L-システインの効果

組織の褐変枯死はアスコルビン酸や L-システインなどの酸化防止剤を共存培地中へ添加することで減少させることができ、そのような条件において形質転換効率が上昇することが報告されている (Enriquez-Obregon *et al.*, 1999; Olhoft and Sormers, 2001; Julkifle *et al.*, 2010)。

共存培地中のシステインの濃度が一過的形質転換効率に与える影響を Table 4-3 に示した。10 ppm と 50 ppm における GUS スコアは、コントロールとした NDM の規定濃度である 1 ppm のものよりも有意に高く (Kruskal-Wallis *P*

< 0.05), 最適濃度は 50 ppm であった. 1 ppm と 600 ppm, 10 ppm と 50 ppm 間で有意差は見られなかった. GUS スコアの高かった 10, 50 ppm の条件における染色サンプルの内訳では, 1 ppm のものと比べ, スコア 0 の染色個体数が少なく, スコア 3 の試料が多い傾向が見られた.

今回の結果より, コントロールとした 1 ppm よりも 10 ppm, 50 ppm の濃度のシステインを共存培地中へ添加して用いたとき, 一過的形質転換効率における促進結果が得られた. 600 ppm では 1 ppm と有意差はなく, 一過的形質転換効率は最適条件よりも減少した. これは Olhoft・Sormers (2001) のダイズでの形成転換の報告と異なり, 今回の試験では Julkifle ら (2010) の *Phal. violacea* の結果と同様, 最適濃度以上の高濃度において一過的形質転換効率の減少が見られた. Julkifle らは, 高濃度でのシステインの使用は過敏反応と同様の兆候が見られることを報告している. 今回の実験では共存培養中にサンプルの褐変等は見られなかったが, 上記のような懸念のため共存培養後は通常組成の NDM を用いた方が良いと考えられる.

本章では ePLB を用いた効率的なアグロバクテリウム媒介形質転換法の確立を目的とし, 感染前の前培養や抗酸化物質の使用など形質転換体効率に影響を及ぼす要因の最適化を行った. nPLB と ePLB において GUS スコアによる一過的形質転換効率の比較を行ったところ, ePLB の方が GUS スコアは有意に高く, 形質転換材料としての有用性が示唆された. 過去のコショウランの形質転換における一過的形質転換効率の報告では, Julkifle ら (2010) が, 硝酸銀含有の共存培地において *Phal. violacea* の PLB とアグロバクテリウム株 EHA 101 株を共存培養させたところ約 40–71%の一過的形質転換効率を得られたことを, また Belarmino and Mii (2000) らは, 共存培地中のアセトシリンゴン添加濃度の検討においてカルス 100 mg 当りのブルースポット数が 2.0–

42.4 個得られたと報告している。本研究では Table 4-1 から 4-3 に示した染色サンプル数の内訳から、1 サンプル当りの形質転換効率を算出した場合、nPLB では  $(30 + 23 + 13) / 119 \times 100 = 55.5\%$  となり、ePLB では  $(36 + 36 + 13) / 118 \times 100 = 72.0\%$  の値となる。また最適条件は Table 4-2 に示したように切断処理を施した ePLB の場合であり、その値は  $(24 + 36 + 37) / 100 \times 100 = 97.0\%$  であった。これらの値を前者の報告と比較すると、nPLB を用いた場合の値は Jukifile らのコントロールの値である 40% よりもやや高く、最適条件における 71% よりも低かった。また本研究で得られた切断処理済みの ePLB における 97.0% の一過的形質転換効率の値は、Jlkifile らの nPLB を用いた試験や Table 4-1 における nPLB の値よりも非常に高かった。後者の報告では使用材料が異なり、また GUS 染色による評価法も異なるため、単純に比較することは困難である。また現在までに、コショウランにおける選抜 PLB や植物体を調査した安定形質転換効率は、プロトコームを前培養しアセトシリンゴン添加培地で共存培養した場合の 1.93% (Mishiba *et al.*, 2005)、針で創傷処理をした PLB を用いた場合の 16.2% (Chai *et al.*, 2002)、プロトコームを CW とトマト抽出物を含む New *Phalaenopsis* medium (NP 培地, Islam *et al.*, 1998) 上で前培養した場合の 16.6% (Semiarti *et al.*, 2010) という値が報告されている。本章では ePLB の形質転換試料としての可能性を検討し、形質転換における種々の要因の最適化を検討した。しかし、今回の試験は一過的遺伝子発現段階での評価であり、上記の安定形質転換効率との比較はできない。そのため、将来的には安定した形質転換として選抜再分化後の最終的に得られる形質転換個体の数などについて nPLB を用いた場合の従来との報告と比較し、その有効性を検証する必要があるだろう。

また今回 ePLB をサンプルとして用い、感染操作前に切断処理を与えること、また共存培地中へのシステインを添加することにより、それぞれの処理は一過

的形質転換効率を大幅に向上させる効果があることが明らかとなり，ePLB を用いることで大量の形質転換個体が得られる可能性があるとして示唆された。切断処理などの創傷処理は菌の感染経路の確保と細胞分裂の活性化により，そしてシステインなどの酸化防止剤の使用は褐変枯死防止により，形質転換効率を上昇させる効果があると考えられている。また創傷処理は使用組織の生存率の低下を導く可能性もあるため，両条件の組み合わせにより形質転換効率の上昇に対して相互作用が有意となる可能性も存在すると考えられる。形質転換における酸化防止剤の使用は元来培養が困難な種において使用されてきたが，培養困難な種あるいはそれ以外の種においても創傷処理と酸化防止剤の同時適用はこれまでに報告されていない。また本研究においても同時適用の検討は行っていない。創傷処理を行ったコショウラン組織は，褐変枯死しやすい培養困難な組織であり，相互作用によりさらに形質転換効率を高められるか検討する必要があると考えられる。

Table. 4-2 Effect of sample type on transient *gus* expression

Sample type <sup>z</sup>	Number of samples	Number of GUS staining samples <sup>y</sup>			GUS score <sup>x</sup>	
		0	1	2		3
nPLB	119	53	30	23	13	0.97
ePLB	118	33	36	36	13	1.25
Significance						*

<sup>z</sup> two types of PLBs were used. nPLBs: PLB of about 4mm in length, which was maintained by subculture under light conditions, ePLBs: ePLB (PLB of about 1 cm in length, which was maintained by subculture under light conditions) was transferred to low light condition for 2weeks. then they were used for experiment.

<sup>y</sup> GUS staining samples were ranked into 4 levels, 0: no spot, 1: one spot, 2: two or more spots, 3: a number of spots and including spots over 1 mm. Arrowhead show a spot over 1 mm.

<sup>x</sup> Mean values of GUS score

\* significant at  $P < 0.05$  by Mann-Whitney  $U$  test.

Table. 4-2 Effect of cut and preculture treatment on transient *gus* expression in ePLBs

Treatment <sup>z</sup>	Number of samples				GUS score <sup>x</sup>	
	0	1	2	3		
No treatment	100	20	27	32	21	1.54 a
Cut	100	3	24	36	37	2.07 b
Preculture <sup>y</sup>	97	11	19	40	27	1.86 a
Cut + Preculture	100	7	13	47	33	2.06 b

<sup>z</sup> cut treatment; ePLBs were subjected to partial incision treatment (Nii et al., 2004) just before the infection, preculture treatment; samples were transferred to the NDM (supplemented with acetocyringone of 50 ppm)

<sup>y</sup> GUS staining samples were ranked into 4 levels, 0: no spot, 1: one spot, 2: two of more spots, 3: a number of spots and including spots over 1 mm. Arrowhead show a spot over 1 mm.

<sup>x</sup> Mean values of GUS score  
 Different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  by Steel-Dwass test

Table. 4-3 Effect of L-cysteine concentrations on transient *gus* expression in ePLBs

Cysteine (ppm)	Number of samples	Number of GUS staining samples <sup>z</sup>			Gus score <sup>y</sup>	
		0	1	2		3
1	120	20	31	50	20	1.58 a
10	119	6	29	50	34	1.94 b
50	122	11	26	39	45	1.98 b
600	119	13	24	54	28	1.82 ab

<sup>z</sup> GUS staining samples were ranked into 4 levels, 0: no spot, 1: one spot, 2: two of more spots, 3: a number of spots and including spots over 1 mm. Arrowhead show a spot over 1 mm.

<sup>y</sup> Mean values of GUS score

Different letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  by Steel-Dwass test.

Cysteine at various concentrations was added in the co-culture medium. Normal concentration of cysteine in NDM is 1ppm, cysteine was not newly added in the condition of 1ppm.

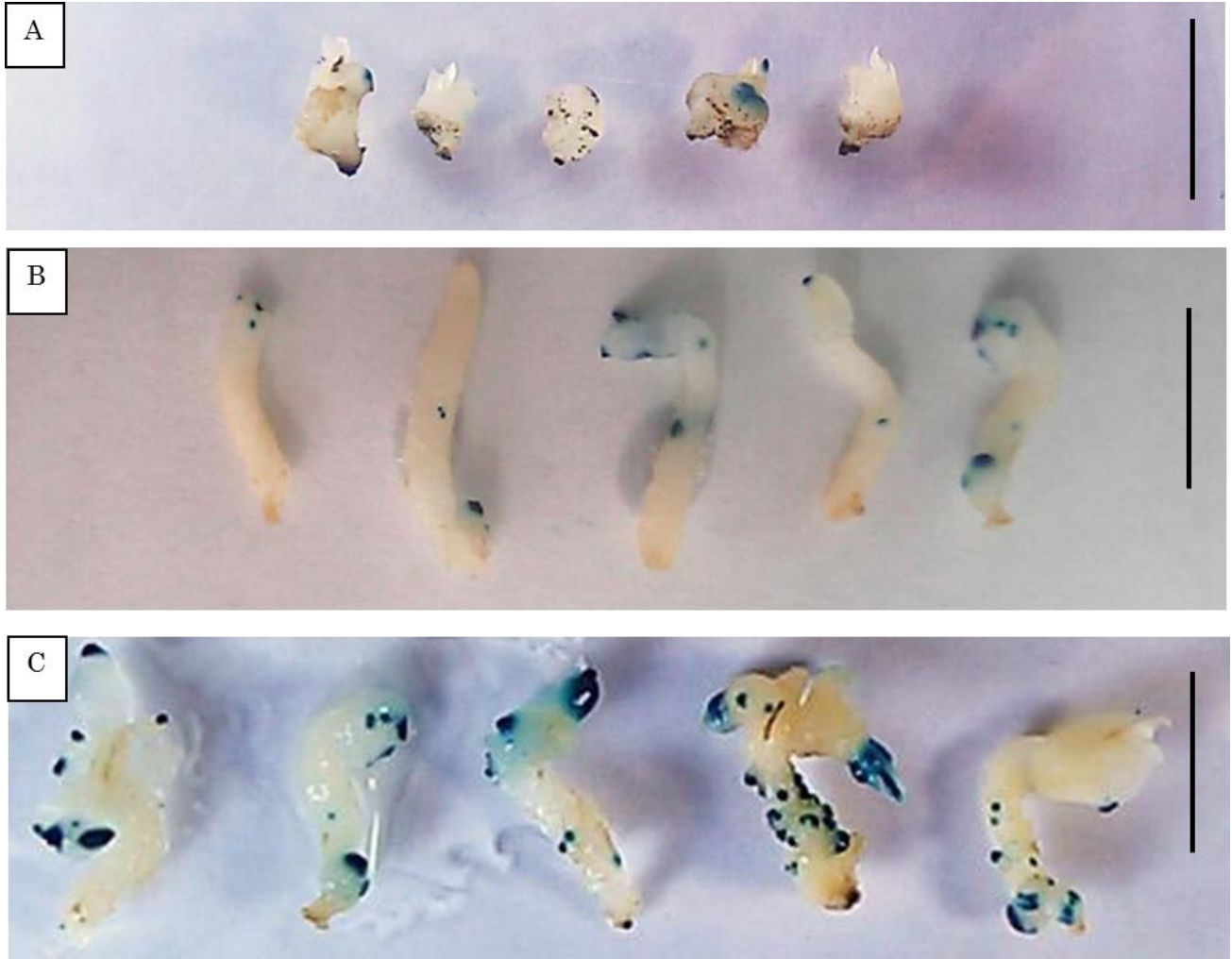


Fig. 4-3 Staining results of the samples used for the experiment

A: nPLB

B: ePLB

C: ePLB with cut treatment

Bars = 1cm.



## 第5章 総合考察

### *PSR* 培地の有用性

*PSR* 培地において切断処理後のシュートを長期培養した際、生存率は高く維持され、またシュート生育においても他培地と比較して非常に良好な結果が得られると判明し（第2章1節）、切断を伴う培養に適する *PSR* 培地の有用性が示された。緒言で述べたようにラン科植物の培養においてフェノール様物質による褐変枯死は大きな問題である。このため、古くから化学物質の添加などによる培養時の褐変防止案が検討されてきたが（市橋・加古，1977）、培地単体での使用時の生存率に着目した報告はほとんどない。切断という組織培養技術では欠かせない操作を行った際に、培地中へ特別な褐変防止剤などを添加せずとも高い生存率を維持可能であるという点において *PSR* 培地は大きなメリットが存在すると考えられる。

また各種培地におけるシュート生存率と培地中に浸出したフェノールの関係を明らかにするためにフェノールの測定を行ったところ、*PSR* 培地では培地に浸出したフェノールの溶解性が他培地とは異なることが示唆された（第2章の第2節）。第2章の考察で述べたように、培地の違いにより溶解性の異なるフェノール様物質が蓄積されるという知見はなく、またこれまでの報告では植物中で合成されるフェノールは合成経路や効果について不明な点も多く、このような違いが現れた理由は現時点では不明瞭である。考えられる理由としては各種培地の成分的な違いにより、コチウラン内部で合成されたフェノール様物質に違いが出る、もしくは培地中へ浸出されやすいフェノール様物質が異なるなどの理由が考えられる。本研究では生存率比較のために既存培地との比較を行ったが、今回示された有用性とフェノール様物質との関連を明らかにするためには、*PSR* 培地の成分を足し引きした試験区を設け、各試験区でのシュートの生存率、フェノール様物質の量、溶解性の違いなどを調査し、培地成分の違

いにより溶出フェノール様物質に差が出るか検討するのが望ましいと考えられる。またこの試験により、PSR 培地におけるフェノール様物質軽減の有効成分も判明すると期待できる。また今回はフェノール様物質の溶解性にのみ着目したが、生存率等との関連を調べるためには、各種フェノール様物質を単離、同定しより詳細な解析を行っていくことが望ましいと考えられる。

### 大量増殖・種苗生産

本研究では、第 2 章において不定芽増殖法による広範囲の品種に適応可能なシュート増殖法を確立、第 3 章において ePLB を用いた簡便で高効率な大量増殖系を確立した。

PSR 培地を用いたシュートの培養では、Table 2-2 において示されたように旺盛な葉の展開と盛んな根の形成が見られる。このため、他培地と異なり発根培地を必要とせず、1 種類の培地のみで幼植物体までの生産が可能であるという利点が考えられる。また不定芽増殖法では広範囲の品種に対し、葉や根を切り落として株を小さくした状態でシュートの維持・増殖が可能である。第 3 章の考察で述べたように培養変異も小さいと考えられるため、この方法は交配種の優良株や原種株を維持更新し保存する上で有効な増殖法であると考えられる。さらに葉や根などの PLB 誘導材料が通年供給されるため、既存の PLB 誘導法により直ぐに大量増殖系に移行可能であるという利点も考えられる。

ePLB を用いた大量増殖系では光条件を制御することで、暗条件における ePLB を用いた増殖（シュート抑制しつつ PLB 培養状態の維持増殖）と光条件における部分切開処理済みの ePLB による大量の二次 PLB 生産が、簡単に相互変更可能となる。この系では、非常にシュート形成されやすい nPLB を用いた従来の大量増殖系と異なり、PLB 増殖段階とシュート発生段階が混在すること無く、ePLB からの大量の二次 PLB 形成、その直後に一斉にシュート形成さ

せ PSR 培地で培養することで発根が見られ、栽培管理の均一な種苗生産が可能となるだろう。

以上のことから、今回開発した 2 つの増殖法と既存の PLB 誘導法を組み合わせることで、PLB による大量増殖から種苗生産までの一連の工程を PSR 培地 1 種類のみで安定して行うことができると考えられる。

### *ePLB* について

本研究では暗所形態形成により誘導された *ePLB* を用いることで、簡便で高効率な大量増殖系を確立できた (第 3 章)。本研究により増殖効率等の利点が見られた *ePLB* だが、その培養特性には不明な点も多く、それらの知見は未だ集積していく必要がある。第 3 章においてこの *ePLB* を光順化として薄明条件で培養した場合、頂部が球状に肥大するという興味深い現象が観察された (Fig. 3-2)。元来、*ePLB* を薄明条件で培養した理由としては、暗条件から直接明条件へ移した際に、生存率等に不利な影響が現れるのではないかと考えたためである。しかしながら、第 3 章、第 2 節の試験において、生存率は両条件とも 100% と差はなく、明条件 (強光下) へ直接 *ePLB* を移すことは *ePLB* の生存率に影響を及ぼさないことが示された。このことは、第 2 節およびその後の 3 節の試験での二次 PLB 形成という観点において、薄明条件で 2 週間培養する意義としては、急激な環境変化による生存へのダメージ軽減対策という順化处理というよりもむしろ、暗所生育した *ePLB* の成長点付近が露光したことにより肥大することに重要な意味がある。すなわち、薄明条件下での培養により *ePLB* 頂部が肥大した段階において部分切開法による成長点傷害を与えることが、*ePLB* からの二次 PLB 増殖の促進にとって効果的な影響を及ぼすのではないかと考えられる。また Fig. 3-2 に示した頂部の変化は、暗所形態形成により抑制されていた成長点周辺の組織が露光により成長肥大したものであると仮定した

場合、この現象は薄明だけでなく明条件においても起こりうると予想される。また光強度の強さから肥大成長に要する期間は2週間より速くなる可能性も十分に考えられる。その場合は、ePLBにおける二次PLBの大量形成までに要する期間をさらに短縮できる可能性があるため、今後、順化处理なしで直接明条件へ移した場合にePLBの先端は肥大するのか、また肥大する場合はそれに要する期間は薄明条件よりも短縮可能か、その後の増殖効率等も含めて詳細に検討する必要があるだろう。

### 褐変枯死の防止

褐変枯死の対策及び植物組織の生育の促進効果の報告は、アスコルビン酸 (Arditti and Ernst, 1993; He *et al.*, 1995; Poudyal *et al.*, 2008) やシステイン (Enriquez-Obregon *et al.*, 1999; Julkifle *et al.*, 2010; Olhoft and Sormers, 2001) などの抗酸化物質の使用, Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Perl *et al.*, 1996; Poudyal *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2007; Zhou, 2007) や活性炭 (Wang and Huang, 1976; Seeni and Latha, 1992; Seeni and Latha, 2000) などのフェノール吸着剤の使用, フェニルプロパノイド経路の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) の阻害剤であり褐変抑制効果が報告されている L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) の使用 (Mitsukuri, *et al.*, 2010) などが存在する。

ePLBにおける形質転換ではシステインが一過性の形質転換効率の上昇に有効であった(第4章)。この効果はnPLBを用いたJulkifleら(2010)の報告と一致した。この原因はシステインが受傷部位の酵素的褐変及びそれに伴う植物細胞死を減少させ、菌の感染性が増加し形質転換効率を改善するためと考えられており、組織の褐変枯死の防止、生存率の改善はコショウランの大量増殖や種苗生産段階のみならず、形質転換などを行う際にも非常に重要な要因であ

ると考えられた。

本研究では第 2 章において、他培地との比較により生存率維持や生育における PSR 培地の有用性が示されたが、今回、上述のような褐変防止対策物質と PSR 培地の効果の比較検討は行っていない。またラン科植物における研究では活性炭の効果は古くから知られているものの、上記に示した物質の使用例は未だ少なく、また同条件で全ての物質の効果を詳細に比較検討した文献は存在しない。このため今後、組織培養におけるこれらの効果について PSR 培地を使用した場合と網羅的に比較検討していくことが望ましいだろう。

## 摘要

コチョウランは日本で営利栽培される洋ランの中で生産量が最も多く、また園芸花卉の中でも平均単価の高い商業的に重要な花卉である。本研究はコチョウランの増殖および生産、育種への応用を目標に、増殖生産において必須技術である組織培養や近年の分子育種における種々の問題の解決を目的として行ったものである。

第1章では、緒言としてコチョウランの増殖生産における組織培養の必要性とその歴史、現状における問題点などを取りまとめ、本論文の目的、構成について述べた。

第2章では、PSR 培地の有効性の検証を行った。コチョウランの培養では切断面から多量のフェノール様物質が溶出し生存率が低下するため培養が困難である。このため、フェノール様物質の影響を和らげ、良好な培養結果が得られる培地として考案、試作された PSR (*Phalaenopsis* Shoot reproduction) 培地と、他培地（修正 VW 培地、NDM）を用いてシュートを培養し、生存率、生育指標を比較して PSR 培地の有用性を検証した。結果として PSR 培地では、シュートの切断移植後に継代培養なしの長期培養を行った場合でも、シュート生存率は高いまま維持可能であることを明らかにした。さらに各培地におけるシュートの生育指標を比較したところ、修正 VW 培地、NDM と比べて PSR 培地上のシュートからは旺盛な葉の展開や根の形成が見られ、シュートの生体重も他 2 種類の培地に比べ有意に高かった。これより、PSR 培地では生存率の維持のみならずシュート生育においても非常に良好な効果を持つことが示された。また培地中のフェノール様物質と生存率との関係を明らかにするためにフェノール様物質を定量したところ、PSR 培地はエタノール溶性、修正 VW 培地、

NDM は水溶性のフェノールが多く溶出しており，PSR 培地は他培地と比べ，外植片の傷害の軽減などの機構が異なることが考えられた。

また前述までの結果により示された切断を伴う培養に適するという特性を活かした PSR 培地を用い，シュートから発生した不定芽を切り分けることで増殖を図る不定芽増殖法の確立を試みた。この方法が広範囲の品種に適応可能か検証するために，市場における主要系統およびその交配親となった原種に適用し，実際の商業利用時に問題となる品種間差を調査して適用可能性の検討を行った。交配親として非常に重要な *Phalaenopsis* 節のほぼ全ての種，特に *Phal. amabilis* 等の白花種は容易に増殖可能であることがわかった。現在の市場流通量の 9 割を占める大輪系交配種は，今回容易に増殖可能であった *Phalaenopsis* 亜属内の白花原種の遺伝的寄与が高く，同様に容易に増殖可能であると考えられ，本手法が市場の広範囲の品種に適用可能であることが示唆された。

第 3 章では，PLB を用いたコチョウランの大量増殖系における増殖率を高めるため，既存の PLB 増殖における操作の繁雑さ，増殖効率の低さの改善を目的とし，暗所形態形成により誘導された伸長型 PLB (elongated PLB: ePLB) を用いたコチョウランの簡便で高効率な微細繁殖系の開発を行った。通常の PLB (normal PLB: nPLB) を各光条件 (明 : 80, 薄明 : 2, 暗 : 0, 単位は  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) で培養した場合，暗条件では大量増殖段階において増殖の妨げとなるシュート形成は，他の 2 条件と比べ非常に低く抑えられており，増殖効率は明，薄明条件と比較して暗条件で高かった。また暗条件で得られた二次 PLB (ePLB) は暗所形態形成を示しており，得られた二次的な ePLB は nPLB の約 2 倍の長さに伸長していた。この ePLB に薄明条件で 2 週間光順化処理を行った後，ePLB の肥大部に部分切開法を適用して明条件で培養した場合，同様に部分切開を行った nPLB と比較して約 6 倍，非切開処理の nPLB と比較し

て約 8 倍となる大量の二次 PLB が得られた。これらの結果から、光条件制御による ePLB を用いた簡便で高効率な大量増殖系を提案した。

第 4 章では ePLB を用いた形質転換系の検討を行った。前章において二次 PLB 増殖における有用性が示された ePLB を用い、従来よりも高効率なアグロバクテリウム媒介形質転換法の確立を目指し、形質転換系の諸条件を検討した。従来、形質転換材料に使用される nPLB と今回使用した ePLB において一過性の形質転換効率の比較を行ったところ、ePLB におけるレポーター遺伝子の一過性発現の効率値は有意に高く、遺伝子導入の対象組織として優れている可能性が示唆された。また ePLB への接種操作前に部分切開処理を与えること、共存培地中へのシステインの添加により、一過性の形質転換効率を大幅に向上させられることが判明し、ePLB を用いることで大量の形質転換個体を得られる可能性があること示唆された。なお、本研究では一過性の遺伝子発現レベルでの検討段階にあるため、将来的には安定した形質転換系の確立を行い、従来の nPLB を材料として使用した場合との形質転換効率等の比較・検討が必須であろう。

以上より本研究では、コショウラン培養において困難であった切断を伴う培養に適する PSR 培地の有用性が明らかとなった。またこの特性を活かした不定芽増殖法、ePLB を用いた大量増殖系を開発した。さらに増殖効率に優れる ePLB は形質転換材料としても優れている可能性が示唆され、今後、形質転換系を確立できれば、遺伝子導入による品種改良への応用、貢献が期待できる。



## 謝辞

本研究は、長岡技術科学大学 大学院 工学研究科 生物物質工学講座  
応用植物工学研究室で行われたものである。

本研究の遂行にあたって懇切なる御指導，御鞭撻を与えてくださった 長岡  
技術科学大学 工学部 生物系 生物物質工学講座 高原美規 准教授に心よ  
り深く感謝致します。

本研究に協力いただいた，田中みずきさん，石川藍さんに深く感謝致します。

研究への適切な御助言をいただき，公私ともにお世話になりました同博士後  
期課程の先輩である大塩愛子博士，田中啓介博士に深く感謝の意を表します。

また研究室生活において様々な面で協力いただいた応用植物工学研究室の先  
輩，同輩，後輩の皆様ならびに，研究へ御助力いただいた高柳充寛技術職員に  
感謝致します。

最後に長きにわたる学生生活を支えてくれた，父，母，妹に，心からお礼申  
上げます。

## 参考文献

- Amaki, W., and Higuchi, H. (1989) . Effects of dividing on the growth and organogenesis of protocorm-like bodies in *Doritaenopsis*. *Scientia Horticulturae*, 39 (1) : 63-72.
- Anzai, H., Ishii, Y., Shichinohe, M., Katsumata, K., Nojiri, C., Morikawa, H., and Tanaka, M. (1996) . Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tissue Culture Letters*, 13 (2) : 265-272.
- Arditti, J., Ball, E. A., and Reisinger, D. M. (1977) . Culture of flower-stalk buds: a method for vegetative propagation of *Phalaenopsis*. *American Orchid Society Bulletin*, 46: 236-240.
- Arditti, J. and Ernst, R. (1993) . *Micropropagation of Orchids*. John Wiley and Sons, New York.
- Belarmino, M. M., and Mii, M. (2000) . *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Reports*, 19 (5) : 435-442.
- Chang, C., Chen, Y. C., Hsu, Y. H., Wu, J. T., Hu, C. C., Chang, W. C., and Lin, N. S. (2005) . Transgenic resistance to *Cymbidium mosaic virus* in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene. *Transgenic Research*, 14 (1) : 41-46.

Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W., and Wan, Y. (1997) . Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 115 (3) : 971-980.

千葉雅亮. (2002). 胡蝶蘭の原種 *Phalaenopsis* species. 千葉雅亮「胡蝶蘭の原種」刊行会, 埼玉.

Christenson, E. A. (2001) . *Phalaenopsis*: a monograph. Timber Press, Portland.

段健雄, 片桐圭子, 矢澤進. (1993). サイトカイニンによるファレノプシスの茎伸長と節培養. 園芸学会雑誌, 62 (1) : 450-451.

Enríquez-Obregón, G. A., Prieto-Samsónov, D. L., Gustavo, A., Pérez, M., Selman-Housein, G., and Vázquez-Padrón, R. I. ( 1999 ) . *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59 (3) : 159-168.

Ernst, R. (1967) . Effect of select organic nutrient additives on growth *in vitro* of *Phalaenopsis* seedlings. *American Orchid Society Bulletin*, 36: 694-704.

江藤哲也, 天木若慶, 樋口春三. (1995). ファレノプシス属のプロトコーム及

びプロトコーム様球体 (PLB) 切片培養における増殖能の比較. 園芸学会雑誌, 64 (別 2) : 604-605.

Frowine, S. A. (2008) . *Moth orchids: The complete guide to Phalaenopsis*. Timber Press, Portland.

Griesbach, R. J. (2002) . Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. pp.458-465. In: Janick, J. and Whipkey, A (eds.) . Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria.

He, Q. Y., Zhang, D. Y., and Wang, R. H. (1995) . A preliminary study on preventing brown truning of sucker explants from banana by ascorbic acid pre-treatment. *Journal of South China Agricultural University*, 16 (3) : 79-82 (In Chinese with English abstract) .

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (1994) . Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T - DNA. *The Plant Journal*, 6 (2) : 271-282.

Homma, Y., and Asahira, T. (1985) . New means of *Phalaenopsis* propagation with internodal sections of flower stalk. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 53: 379-387.

Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D. (1986) . The

hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, 168 (3) : 1291-1301.

Ichihashi, S. (1992). Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. *Lindleyana*, 7: 208-215.

Ichihashi, S. and Islam, M. O. (1999) . Effects of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis*, and *Neofinetia*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 68: 269-274.

市橋正一・三位正洋. (2006). 実践花き園芸技術 ファレノプシス 栽培と生産. 誠文堂新光社, 東京.

市橋正一, 都築正文, Aswath, C. R. (2000). ファレノプシス類の微細繁殖法の改善. 愛知教育大学研究報告, 49: 51-56.

Intuwang, O., and Sagawa, Y. (1974) . Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture. *American Orchid Society Bulletin*, 54: 893-895.

石井実. (1988). カトレヤの茎頂培養. pp. 54-61. 加古瞬治 編. 図解 ランのバイオ技術 ミクロ繁殖・実生・交配育種. 誠文堂新光社, 東京.

石井実, 正山征洋, 上本俊平. (1976). カトレヤの組織培養に関する研究 (1) :

フェノール物質の分離同定および同物質の生物活性について. 九州大学農学部学芸雑誌, 31 (2/3) : 99-105.

Islam, M. O., Ichihashi, S., & Matsui, S. (1998) . Control of growth and development of protocorm like body derived from callus by carbon sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnology*, 15 (4) : 183-187.

Islam, M. O., Rahman, A. R. M. M., Matsui, S., and Prodhan, A. U. D. (2003) . Effects of complex organic extracts on callus growth and PLB regeneration through embryogenesis in the *Doritaenopsis* orchid. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37 (4) : 229-236.

岩堀勝弥. (2010). フェレノプシスのホルモン無添加培地による増殖法. 名古屋国際蘭会議 2010 記録 : 26-30.

Jacq, B., Lesobre, O., Sangwan, R. S., and Sangwan-Norreel, B. S. (1993) . Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet. *Plant Cell Reports*, 12 (11) : 621-624.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. (1987) . GUS fusions:  $\beta$ glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6 (13) : 3901-3901.

Julkifle, A. L., Rathinam, X., Sinniah, U. R., and Subramaniam, S. (2010) . Optimisation of transient green fluorescent protein (GFP) gene

expression in *Phalaenopsis violacea* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4 (8) : 3424-3432.

木村康夫. (1991). コチョウラン 大量増殖法の改良. 群馬農業研究 D 園芸, 6: 33-40.

Knudson, L. (1922) . Non symbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette, 73: 1-25.

Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 15 (9) : 214-217.

Kotomori, S. N., and Murashige, T. (1965) . Some aspects of aseptic propagation of orchids. American Orchid Society Bulletin, 34: 484-489.

Krishna, H., Sairam, R. K., Singh, S. K., Patel, V. B., Sharma, R. R., Grover, M., Nain, L., and Sachdev, A. (2008) . Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horticulturae, 118 (2) : 132-138.

窪田浩一, 清水麻美, 國友義博, 藤木俊也. (2002). ファレノプシス属およびその近縁属のクローン苗の増殖. 山梨県総合農業試験場研究報告, 11: 9-18.

Lin, C. C. (1986) . *In vitro* culture of flower stalk internodes of

*Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Lindleyana, 1 (3) : 158-163.

Mishiba, K. I., Chin, D. P., and Mii, M. (2005) . *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination. Plant Cell Reports, 24 (5) : 297-303.

Mitsukuri, K., Johkan, M., and Yamasaki, S. (2010) . L-2-aminoxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) controls browning and promotes adventitious bud formation in *Neofinetia falcata* *in vitro*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 79 (4) : 367-371.

Mitsukuri, K., Mori, G., Johkan, M., Mishiba, K. I., Morikawa, T., and Oda, M. (2009) . Effects of explant source and dark-preconditioning on adventitious bud formation in *Neofinetia falcata* *in vitro*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 78 (2) : 252-256.

Morel, G.M. (1960) . Producing virus-free *Cymbidium*. American Orchid Society Bulletin, 29: 495-497.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962) . A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15 (3) : 473-497.

Murdad, R., Hwa, K. S., Seng, C. K., Latip, M. A., Aziz, Z. A., and Ripin, R.



(2006) . High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique. *Scientia horticulturae*, 111 (1) : 73-79.

日本花き生産協会洋らん部会 . (2013) . 資料③ .  
<http://orchid-all.sakura.ne.jp/phal/wp-content/uploads/2013/01/資料③.pdf> (閲覧日:2014年6月2日).

新居宏延, 川村泰史, 吉原均. (2004). 切れ目処理がファレノプシスの PLB 形成に及ぼす影響. *園芸学会雑誌*, 73 (別 1) : 191.

西村浩一郎, 山田員人. (1992). カキ葉組織からの不定芽形成による植物体再生. *島根農業試験場研究報告* 26: 106-113.

農林水産省 . (2014) . 花きの現状について .  
[http://www.maff.go.jp/j/seisan/kaki/flower/pdf/kakimeguji1404\\_1.pdf](http://www.maff.go.jp/j/seisan/kaki/flower/pdf/kakimeguji1404_1.pdf) .  
(閲覧日:2014年6月2日).

小倉久和. (1983). 植物組織培養と染色体変異 [1]. *農業および園芸*, 58: 15-18.

Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., and Nakamura, K. (1990) . Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant and cell physiology*, 31 (6) : 805-813.

- Olhoft, P., and Somers, D. (2001) . L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 20 (8) : 706-711.
- Park, S. Y., Murthy, H. N., and Paek, K. Y. (2002) . Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38 (2) : 168-172.
- Park, S. Y., Murthy, H. N., and Paek, K. Y. (2003) . Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science*, 164 (6) : 919-923.
- Park, S., Yeung, E., Chakrabarty, D., and Paek, K. (2002) . An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Reports*, 21 (1) : 46-51.
- Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M., and Holland, D. (1996) . Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.) : the role of antioxidants during grape–*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnology*, 14 (5) : 624-628.
- Poudyal, B. K., Du, G., Zhang, Y., Liu, J., and Shi, Q. (2008) . Studies on browning problem and phenols content on shoots of Yali, Aikansui and Abbe Fetel pears for *in vitro* culture. *Frontiers of Agriculture in China*, 2

(3) : 321-330.

Qin, X., Liu, Y., Mao, S., Li, T., Wu, H., Chu, C., and Wang, Y. (2011) . Genetic transformation of lipid transfer protein encoding gene in *Phalaenopsis amabilis* to enhance cold resistance. *Euphytica*, 177 (1) : 33-43.

Rashid, H., Yokoi, S., Toriyama, K., and Hinata, K. (1996) . Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. *Plant Cell Reports*, 15 (10) : 727-730.

Robichon, M. P., Renou, J. P., and Jalouzot, R. (1995) . Genetic transformation of *Pelargonium* × *hortorum*. *Plant Cell Reports*, 15: 63-67.

Rotor, G. (1949) . A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. *American Orchid Society Bulletin*, 18: 738-739.

Sagawa, Y. (1961) . Vegetative propagation of *Phalaenopsis* stem cutting. *American Orchid Society Bulletin*, 30: 808-809.

Sagawa, Y., and Kunisaki, J. T. (1982) . Clonal propagation of orchids by tissue culture. pp. 683-684. In: Fujiwara, A. (ed.) . *Proceedings of the 5th congress of Plant tissue and cell culture*. Maruzen, Tokyo.

Seeni, S., and Latha, P. G. (1992) . Foliar regeneration of the endangered Red Vanda. *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae) . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29: 167-172.

Seeni, S., and Latha, P. G. (2000) . In vitro multiplication and corehabilitation of the endangered Blue Vanda. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 1-8.

白井唯之助 . (2004) . PSR 培地を用いたコショウラン増殖培養と *Agrobacterium rhizogenes* 感染による形質転換 . 長岡技術科学大学大学院工学研究科修士論文 (未公刊).

Shou, H., Frame, B. R., Whitham, S. A., and Wang, K. (2004) . Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding*, 13 (2) : 201-208.

Shrestha, B. R., Chin, D. P., Tokuhara, K., and Mii, M. (2007) . Efficient production of transgenic plantlets of *Vanda* through sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies (PLBs) . *Plant Biotechnology*, 24 (4) : 429-434.

Sjahril, R., Chin, D. P., Khan, R. S., Yamamura, S., Nakamura, I, Amemiya, Y. and Mii, M. (2006) . Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora* produced by introducing wasabi defensin gene

using *Agrobacterium* method. *Plant Biotechnology*, 23 (2) : 191-194.

高原美規. (1998). コチョウランの *in vitro* cutting による株の更新・増殖と遺伝子型の保存. *育種学雑誌*, 48 (別 2) : 278.

田中道男. (1987). 組織培養によるファレノプシスの栄養繁殖に関する研究. *香川大学農学部紀要*, 49: 1-85.

Tanaka, M. (1992). Micropropagation of *Phalaenopsis* spp. pp. 246-268. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) . High-tech and micropropagation. *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 20. Springer-Verlag, Berlin.

田中道男. (1997). ファレノプシス属植物のプロトコーム状球体の増殖方法. 特開平 9-84477. 1997-03-31.

Tanaka, M. and Y. Sakanishi. (1977) . Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf tissue culture. *American Orchid Society Bulletin*, 46: 733-737.

Tanaka, M., and Sakanishi, Y. (1978) . Factors affecting the growth of *in vitro* cultured lateral buds from *Phalaenopsis* flower stalks. *Scientia Horticulturae*, 8:169-178.

寺本貴尚・周天甦. (2000). 異なる培養方法におけるファレノプシス類の品種間差について. *園芸学会雑誌*, 69 (別 1) : 370.

- Tokuhara, K., and Mii, M. (1993) . Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*, 13 (1) : 7-11.
- Tokuhara, K and Mii, M (1998) . Somaclonal Variations in Flower and Inflorescence Axis in Micropropagated Plants through Flower Stalk Bud Culture of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Plant Biotechnology*, 15 (1) : 23-28.
- Tsukamoto Y., Kano K., and Katuura T. (1963) . Instant media for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*, 32: 354-355.
- 筒井澄. (1988). ランの種子発芽と共生菌. pp.24-29. 加古瞬治 編. 図解 ランのバイオ技術 ミクロ繁殖・実生・交配育種. 誠文堂新光社, 東京.
- Villemont, E., Dubois, F., Sangwan, R. S., Vasseur, G., Bourgeois, Y., and Sangwan-Norreel, B. S. (1997) . Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: Evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*, 201 (2) : 160-172.
- Wang, P. J., and Huang, L. C. (1976) . Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 12 (3) : 260-262.

王裕霞, 高木和彦, 新居宏延. (2000). ファレノプシスの根端培養による PLB 形成に及ぼす諸要因の影響. 徳島県立農業試験場試験研究報告, 36: 18-22.

Wei, F., Su, S. C., Fu, F. Z., and Hou, X. L. (2007) . Phenol contents and browning in tissue culture of *Pistacia vera*. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 22 (1) : 50-53 (In Chinese with English abstract) .

Yin, F., Ge, H., Peng, K. Q., Zhao, L. L., Zhou, Y. J., and Li, Q. X. (2008) . Relationship between tissue browning and phenolic acids and related enzymes in *Phalaenopsis*. Scientia Agricultura Sinica, 41 (7) : 2197-2203 (In Chinese with English abstract) .

周天甦, 寺本高尚, 高山美穂子, 小林千祐. (1997). ファレノプシスの増殖・育苗技術 ファレノプシスのクローン増殖における問題点. 農耕と園芸, 52 (2) : 88-91.

Zhou, X. L. (2007) . A primary study on reducing browning of callus induced from *aloe saponaria* haw callus. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 29 (4) : 539-544 (In Chinese with English abstract) .