

論文内容の要旨

氏名 榎 真一

コチョウランは、園芸花卉の中でも商業価値が高く、日本で営利栽培される洋ランの中でも生産量は多く重要な位置づけにある。本研究は、コチョウランの生産、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種々の問題の解決を目的に行ったものである。

まず、第2章では、切断を伴う培養が困難というコチョウランの組織培養の問題を解決すべく開発された修正ムラシゲ・スクーグ培地 (Potato shoot reproduction 培地：以下 PSR 培地) の有用性を検証した。また、PSR 培地の特性を活かした不定芽増殖という方法が市場で主流な広範囲の品種に適応可能か原種レベルで調査、検討した。第3章では、コチョウランの大量増殖における操作の繁雑さおよび増殖率の低さを改善するために、暗所形態形成により伸長した伸長型 PLB (ePLB) を用いた効率的で簡便な大量増殖系の開発を行った。第4章では、急増する分子育種やその応用技術への要望に応えるべく、ePLB を用いた効率的な形質転換系の検討を行った。

第2章 PSR 培地の有用性の検証

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。このため切断を伴う培養に適した培地として開発した PSR 培地と各種培地でシュート生存率を比較したところ、修正 VW 培地に比べ、PSR 培地、NDM で値は非常に高かった。また PSR 培地では旺盛な葉の展開、根の形成が見られ、シュートの生育に良好であった。培地中のフェノール様物質を定量したところ、PSR 培地ではエタノール溶性、NDM では水溶性のフェノールが多く溶出していた。また PSR 培地を用いた不定芽増殖法を市場での主要系統およびその交配親となった原種に適用し、品種間差を調査した。交配親として非常に重要な *Phalaenopsis* 節のほぼ全ての種は、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。以上より、PSR 培地は切断を伴うコチョウランの培養に適しており、またこの培地を用いた不定芽増殖法は市場の大多数の品種に適用可能であると考えられる。

第3章 ePLB を用いたコチョウランの効率的な大量増殖系の検討

次に、暗所形態形成により誘導された伸長型 PLB (ePLB) を用いたコチョウランの簡便で高効率である新規の微細繁殖系を開発した。

まず通常の 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で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、その増殖効率は明、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2次 PLB (ePLB) は暗所形態形成を示し、得られた 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 の頂部に部分切開法を適用し、明条件で培養した場合、同様に部分切開を行った nPLB と増殖率で比較して約 6 倍となる、大量の PLB が得られた。以上の結果より、PLB を暗所で培養することで、PLB 増殖の妨げとなるシュート形成を低労力で抑制しつつ、ePLB を誘導し増殖することができ、またこの ePLB に部分切開法を行ってから明条件へ移すことで、nPLB と比べて非常に大量の 2 次 PLB が得られることが明らかとなった。

第 4 章 ePLB を用いた形質転換系の検討

最後に、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指し、ePLB を用いた形質転換系を検討した。従来、形質転換材料としてよく使用される nPLB と比べて 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、優れた形質転換材料としての可能性が示唆された。また、ePLB への接種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の添加により、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示唆された。なお、本研究では一過的遺伝子発現レベルでの検討段階にあり、将来的には安定した形質転換系の確立をおこない、従来の nPLB を材料として使用した場合と、得られた形質転換個体による効率の比較・検討を行う必要があるだろう。

以上のように本研究では、コショウラン培養において難しいとされていた切断を伴う培養に適するという PSR 培地の有用性が示され、またこの性質を活かした増殖法は市場の大多数の品種へ適応可能であることが示唆された。また、ePLB を用いた簡便で高効率な微細繁殖系を新規開発した。さらに効率的な形質転換系にこの ePLB が適用できる可能性が示唆された。