

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580037

研究課題名（和文） ラン科コチョウランにおける半数体の誘導と完全ホモ個体の作出

研究課題名（英文） Haploid production and induction of doubled haploid in Phalaenopsis orchid

研究代表者

三吉 一光 (MIYOSHI KAZUMITSU)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：60312237

研究成果の概要（和文）：

市販の 4 倍体コチョウラン品種 3 点ならびに 2 倍体品種 5 個体を供試して、半数体を誘導する条件の検討を行った。コチョウランでは体細胞多倍数性 (polysomaty) が観察されるので、倍数性の検定は根端約 1mm の若い組織を用いた。4 倍体から偽受精胚珠培養によって得られた幼植物体の半数近くが 2 倍性半数体であり、染色体の半減が認められた。2 倍体を供試した場合、得られた個体の殆んどが 2 倍体であったが、コチョウランにおいて初めて人為的に誘導した半数体を 1 個体獲得した。

研究成果の概要（英文）：

Four tetraploid varieties and five diploid plants were used for the induction of haploid through pseudo-fertilization in phalaenopsis orchids. Di-haploid plants obtained from tetraploid. However, mainly diploid were obtained from diploid plants. One haploid was obtained from diploid plants. This is the first induction of haploid plant in phalaenopsis orchids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・園芸科学

キーワード：ラン科植物、半数体、コチョウラン、偽受精胚珠培養、F1 品種、種子繁殖性品種

1. 研究開始当初の背景

ランの品種の多くは栄養繁殖性である。しかしコチョウラン属 (*Phalaenopsis*) ならびに同属と近縁の属との交配種 (以下、コチョウランとする) においては、主に白花大輪の品種が種子繁殖によって生産されている。白花大輪品種は、花色などの形質について実用的に十分に斉一であったため、種子繁殖によ

っても品種として成立してきた。またコチョウランは近年まで組織培養が困難であることも、栄養繁殖性品種の作出を妨げていた。コチョウランには白花以外にも桃、橙、黄色などの多様な花色が存在する。また、いわゆるセミアルバと呼ばれる白と赤の複色花や、花弁に斑点もしくは筋状の模様がある花なども知られている (Christenson, 2001)。

近年、クローン技術の確立や消費の需要により、白花大輪以外の栄養繁殖性品種の作出が試みられている。しかし、培養変異が大きな問題となり（市橋, 1993; Tokuhara & Mii, 1998）、こうした栄養繁殖性品種の普及を妨げている。今後のコショウラン消費の拡大には、白以外にも、様々な花色や模様などの形質を持った品種の作出が切望されている。なお、こうした花色などの実用形質は異型性が高いため、従来の自殖を重ねて遺伝的な固定するには、何世代もかかり、一世代を完了するのに数年かかるコショウランでは事実上不可能である。

半数体育種法は、半数体を倍加して遺伝的に固定された二倍体を利用する方法であり、得られた集団から希望する遺伝子型を選抜することにより、品種として利用することができる（岩田, 1998）。この方法を利用すると、種子繁殖によっても遺伝的に均一な集団を維持することが可能である。さらに、従来の自殖を重ねて遺伝形質を固定する方法に比べて、純系を得るのに要する時間も大幅に短縮することができる。

これまで、総合緒言において述べたように、ラン科植物において人為的な半数体作出方法は報告例がない。コショウランにおいて、半数体を誘導することが可能となれば、現在、コショウランが抱えている先のような問題を解決し、新品種を作出する新しい方法となりえる。

2. 研究の目的

本研究では、偽受精胚珠培養により、4倍体のコショウラン品種より半数性2倍体の誘導効率を明らかにする。さらに、2倍体品種を用いて、半数体の誘導を試みる。

3. 研究の方法

4倍体品種は3点および2倍体個体5点を供試したが、既に発表した4倍体一品種の結果について詳述する。なお、他の4倍体2品種についても同様の傾向が認められている。

材料には4倍体品種としては *P. White Dream* $2n=4X$ 他3点、2倍体個体は、識別番号、1-5を供試した。

栽培は素焼鉢とミズゴケを用い、温室内において自然光条件下で、週に2-3回灌水を行なった。

4倍体より採取した花粉塊には50、100、150KRの照射線量の軟X線を花粉塊に照射した。軟X線照射には『照射用軟X線発生装置（型式名：OM-100RE、株式会社オーミック）』を使用した。X線照射条件は、電圧80KVp、電流4mA、照射距離150mmで行い、照射時間は50、100、150KRにおいてそれぞれ23分56秒、47分53秒、71分49秒間であった。ま

た対照区として軟X線非照射の花粉塊を受粉した。交配を行なって得られた果実を培養に用いた。培地にはNDM培地（表1）、NDM+1%ポテトグラニオール、NDM+1%VT（Polyclar VT、530-78725、Wako）を使用した。得られた実生は試験管中のNDM培地に移植し、倍数性を検定した。検定には、2-4枚の葉を展開した実生を用いた。クリーンベンチ内で無菌的に試験管内の実生から約1~2mmの根端を切り出し、フローサイトメーター（パルテック社製、Ploidy Analyzer (PA)）を用いて計測を行った。根端を、氷冷したCystain UV植物DNA分析試薬キット（Partec社）のCystain UV precise P Nuclei Extraction Buffer（A液）内で刻んだ。核の懸濁液を30 μm のCell Tricsフィルターを通し、余分な残渣を除去した。濾液にCystain UV植物DNA分析キットのCystain UV precise P staining Buffer（B液）を濾液の4倍量以上加えて、核のDNAを染色した。染色した試料のDNA含量は、水銀高圧ランプを備えたフローサイトメーターを用いて測定した。

4. 研究成果

50および100KRの軟X線照射を行なった花粉塊を用いた交配により、得られた果実から実生が得られた。得られた実生中から、両線量区合わせて92個の実生を用いて倍数性を検定した（表2）。50KR区ではフローサイトメーターを用いた倍数性の検定の結果、検定個体の約53%が半数性二倍体で、約21%が四倍体だった。100KR区では検定個体の約33%が半数性二倍体で、約36%が四倍体だった。また八倍体のピークを示す個体も1個体あった（表2および図1）。フローサイトメーターにおいて、ピークが小さく倍数性の判別が付かないものは、判定不能とした。

表1 NDM培地の組成

多量要素	mg/l
NH_4NO_3	480
KNO_3	200
KH_2PO_4	550
KCl	150
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	470
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
微量要素(modified Nitsch 1956)	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.5
H_3BO_3	0.5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
conc. H_2SO_4	$0.5 \mu\text{l}^{-1}$
有機物(modified Morel & Wetmore 1951)	
Inositol	100
Nicotinic Acid	1.0
L-cysteine	1.0
Thiamine Hydrochloride	1.0
Pyridoxine Hydrochloride	1.0
Calcium Pantothenate	1.0
(+)-Biotin	0.1
Fe(III)-EDTA	21
sucrose	20g
agar	8g

表2 フローサイトメーターにおける倍数性の検定結果

照射線量 (KR)	検定個体	半数体 (二倍体)	四倍体	八倍体	判定不能
50	53	28	11	0	14
100	39	13	14	1	11
計	92	41	25	1	25

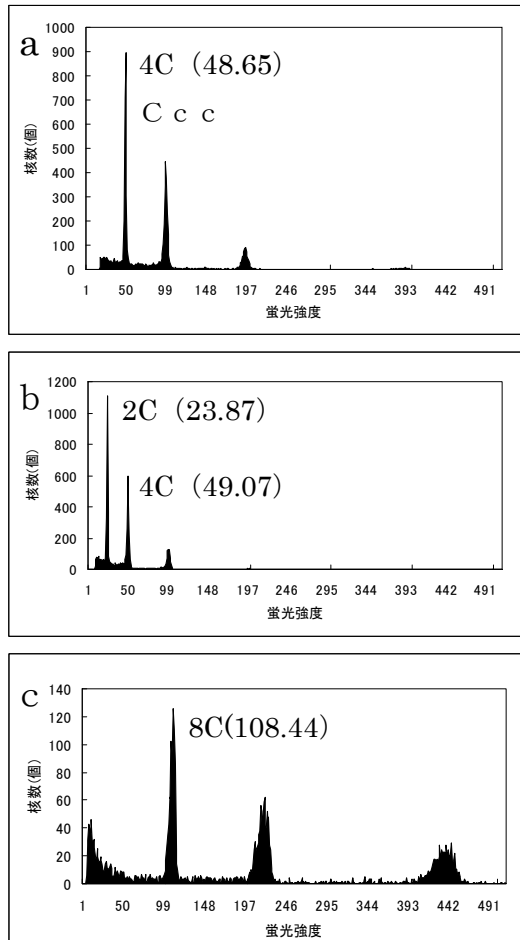


図1 *P. White Dream* におけるフローサイトメーターによる倍数性の違い
 a: 34A - 1 (50KR) 四倍体、b: 34D - 1 (50KR) 半数性二倍体、
 c: 38B - 1 (100KR) 八倍体
 ※図中のかっこ内の数字はそれぞれのピークにおける蛍光強度

本実験において 50 および 100KR いずれの線量区においても、半数体を得られた (表 2)。供試した *P. White Dream* は四倍性品種のため、二倍体が半数体となる。本実験においてフローサイトメーターには、2 - 4 枚の葉を展開させた実生を供試した。しかし 100KR 区に

おいて得られた実生中には、倍数性の検定に用いるのに適当な大きさや形態の実生が少なかった。また検定個体の倍数性は、二倍体の他に四倍体も多く存在し、50KR 区においては出現しなかった八倍体も存在し (図 1)。これは、100KR の軟 X 線を照射した花粉塊を受粉したことにより、卵細胞側の核分裂にも影響を及ぼした可能性が考えられる。卵細胞側の核分裂が異常を起こしたり、卵細胞以外の、胚のう内の細胞が胚様の発達をしたりして、二倍体、四倍体および八倍体、または異数体などが形成された可能性が考えられる。そのために倍数性の出現の仕方にばらつきが見られ、さらに形態の変化が多数起こったのではないだろうか。異数体は倍数体に付随して形成されることが多く、その形成の主因は異数性配偶子の形成である (田中, 1976b)。異数性配偶子形成は、染色体に対する物理化学的刺激や生物学的要因によって起き、主として減数分裂における不均等な染色体分配に起因する。したがって、軟 X 線照射花粉を受粉したことが、卵細胞側の減数分裂にも影響を及ぼし、倍数体や異数体を誘発した可能性は十分にあり得ると考えられる。

フローサイトメーターにより、その個体の倍数性を示すピークの他に、ピークが出現した (図 1)。これは、コチウランにおける polysomy (核内多倍数性) に起因していると考えられる。コチウランは根端や茎頂の分裂組織など一部を除いて、分化した組織や器官において様々な倍数性の細胞が混在していることが知られており、この現象を polysomy という。本実験においてフローサイトメーターには、根端約 1 - 2mm を用いた。しかし、供試した部位に polysomy を起こした細胞が混在していた可能性が考えられる。そのため、供試した個体の元来の倍数性とは異なる蛍光強度の位置にも、ピークが出現したと考えられる。

2 倍体を供試した場合、得られた個体はほとんどが 2 倍体であった。しかしフローサイトメーターによる簡易検定の結果、一個体の半数体を得ることが出来た (未発表)。この半数体は *in vitro* において増殖し、現在 PLB を誘導し、増殖した PLB を用いて *in vitro* における染色体の倍加処理を行っている。

今後はこれらの処理個体の倍数性の検定を行い半数体が倍加した倍加半数体を選抜する。

さらに、2 倍体個体から採取した花粉塊の放射線に対する感受性は 4 倍体個体からのそれに比較して、著しく高い可能性が予想される。今後は異なる倍数性の花粉塊の放射線感受性について、精査する必要があると考えられる。



図2 *P. White Dream* における各倍数性の実生
左：37C（二倍体）、中：39D - 3（四倍体）、
右：38B - 1（八倍体）
倍数性検定後約16ヵ月経過した実生
※図中の目盛：1 cm

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

① 三吉一光・三位正洋・徳原憲・國分尚 2012
ラン科植物における半数体育種に関する研究
1 偽受精胚珠培養によるコショウラン
半数体の誘導 園芸学研究 11 (2) p 241
査読無し

〔学会発表〕（計1件）

① 三吉一光・三位正洋・徳原憲・國分尚 ラ
ン科植物における半数体育種に関する研究
1 偽受精胚珠培養によるコショウラン半数
体の誘導 園芸学会 平成24年度秋季大
会 福利県立大学福井キャンパス 9月2
2日～24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三吉 一光 (MIYOSHI KAZUMITSU)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号：60312237