

氏名	高橋 知佐子
学位(専攻分野の名称)	博士(農学)
学位記番号	乙第 901 号
学位授与の日付	平成 27 年 1 月 20 日
学位論文題目	Micropropagation and genetic relationships among three species of <i>Pogonia</i> (Orchidaceae)
論文審査委員	主査 教授・Ph.D. 近藤 勝彦 農学博士 新美 善行* 教授・農学博士 河合 義隆 教授・博士(農学) 根岸 寛光

論文内容の要旨

ラン科 *Pogonia* (トキソウ) 属は 4 種からなり、東アジアに 3 種、北東アメリカに 1 種が自生する。本研究では、東アジアに分布する *Pogonia japonica* (トキソウ) 及び *Pogonia minor* (ヤマトキソウ)、北アメリカ南東部に分布する *Pogonia ophioglossoides* を材料として実施した。

日本には *P. japonica* 及び *P. minor* が自生しているが、自生地の崩壊や生態系の変化及び乱獲により、両種ともに絶滅が危ぶまれている。そこで、種の保全、増殖、栽培園芸化を目的に *in vitro* 培養を確立するため、両種の *in vitro* での発芽を分析した。また、*P. japonica* を材料に、培地の栄養分が形態形成に及ぼす影響を調査した。さらに、*P. japonica* の大量増殖系の確立を目指した。

Pogonia 属の染色体は、ラン科植物の中では最大で、最も原始的である。*P. japonica*、*P. minor* 及び *P. ophioglossoides* の 3 種の核型分析、さらに *Pogonia* 属の種間雑種の作出を試み、染色体の動向を観察した。また、自然の中に生育する上記 3 種とは花の形態が異なる *Pogonia* 2 系統を発見し、核型及び RAPD 分析を行った。

1. *Pogonia* 属の *in vitro* での種子発芽

Pogonia japonica 及び *P. minor* において、種子の熟度が無菌発芽に及ぼす影響を調べた。*P. japonica* の受粉後 45 日目の未裂開果実中の未熟種子について、果実を殺菌し、果実中の種子を掻き出して Knudson C 培地に播種した場合に、76.9% と最も良い発芽率を示した。受粉後 60 日目以降の未裂開果実中の未熟種子の Knudson C 培地上での発芽率は 40-60% だった。また、

Hyponex 培地を用いた場合、受粉後 45 日目の未裂開果実中の未熟種子を播種した場合に、57.1% の発芽率を示したが、受粉後 60 日目以降の未裂開果実中の未熟種子の発芽はごくわずかだった。*P. japonica* においては、種子の熟度が増すと、発芽率が下がる傾向が認められた。未裂開果実中の *P. minor* の種子発芽について、Knudson C 培地上での発芽率が最も高かった試験区においては 1.4%、Hyponex 培地上では全く発芽が認められず、*P. japonica* の種子発芽と大きな差が認められた。

完熟裂開果実から得た *P. japonica* と *P. minor* の完熟種子を表面殺菌して Knudson C 培地に蒔いた場合、種子の熟度が高いにも関わらず、*P. japonica* は 83.3%、*P. minor* は 10.2% と高い発芽率を示した。

また、*Pogonia minor* の未裂開果実中の種子を Knudson C 培地に播き、4℃ の低温処理を 30 日間行った場合にも、無処理区と比較して、8.5% のいくらか高い発芽率を得ることができた。

Pogonia japonica の共生発芽について、共生菌を置床したすべての処理区において、90% 以上の高い発芽率を得ることができた。特に OPA 培地に *Spiranthes sinensis* (ネジバナ) 及び *Cymbidium goeringii* (シュンラン) より単離した共生菌を置床して播種した場合に、発芽及びその後の生長が良好で、それらは、Knudson C 培地上のものと比較してより良好であった。

2. 植物体の成長

MS 培地上で生長している *P. japonica* 及び *P. ophioglossoides* の地下茎頂を、植物ホルモンを含まない B5、VW、Hyponex、Knudson C、MS、1/2MS 及び 1/4MS 固形培地上に植え付けたところ、7 日以内にすべての培

* 県立広島大学大学院 教授

地上で、1 地下茎頂から 1 不定芽が形成された。続いて植え付け 60 日後に植物体の生長の様子を観察したところ、MS 及び VW 培地に植えた個体の生長が最も良く、これに対して B5、1/2MS 及び 1/4MS 培地に植えた個体は生長が緩慢だった。また、B5、Knudson C 及び Hyponex 培地で生長した個体の葉はクロロシスを起こした。培地中の多量無機窒素成分を比較したとき、B5 培地は $\text{NO}_3\text{-N}$ (硝酸態窒素) の割合が高いという特徴があることから、培地成分の多量無機窒素形態に着目し、*P. japonica* を材料として研究を進めたところ、MS 培地の多量無機窒素を $\text{NO}_3\text{-N}$ (KNO_3) のみにした場合に、 $\text{NH}_4\text{-N}$ (アンモニア態窒素) [NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] を含む培地と比較して、植物体の生長が阻害され、クロロシスを示した。

Pogonia japonica 及び *P. ophioglossoides* の地下茎頂からの植物体の生長に対する共生菌の影響を調べた。両種とも、共生発芽と同様に、OPA 培地に *Spiranthes sinensis* (ネジバナ) 及び *Cymbidium goeringii* (シユンラン) より単離した共生菌を置床して地下茎頂を植え付けた場合に、生長が良好だった。

3. *Pogonia japonica* の大量増殖

Pogonia japonica の増殖体を形成させるため、地下茎頂を NAA (ナフトレン酢酸) 及び BA (ベンジルアデニン) を含む MS 及び B5 液体培地に植え付け、2 rpm, 2,000~10,000lux, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件で回転培養を行った。BA 0.02mg/l 以上、NAA 0.02~0.2mg/l を含む MS 及び B5 液体培地に地下茎頂を植え付けた時、2 種類の増殖体が形成された。一つはプロトコーム様体 (Protocorm-like body) (PLB) で、地下茎由来の PLB という意味でライゾーム由来 PLB (Rhizome-originated protocorm-like body) (RPLB) と名付けた。RPLB は MS 及び B5 培地で形成された。もう一つは薄緑の多数の葉芽が集まったような増殖体で、奇形の葉芽の集合体という意味で ASTA (Abnormal shoot tip aggregation) と名付けた。ASTA は MS 培地でのみ形成された。RPLB は同じ培養条件下で培養することにより、よく増殖したが、ASTA はほとんど増殖しなかった。RPLB 及び ASTA を植物ホルモン無添加の MS 固形培地に移植すると、多芽体を形成し、その後それらは幼植物体に生長した。さらにそれらを馴化し、野外で栽培したところ、2~3 年後には花を咲かせた。

4. *Pogonia* 属の細胞遺伝学的分析

P. japonica, *P. minor* 及び *P. ophioglossoides* を核

形態学的に比較した。*P. japonica* の核型は $2n = 20 = 16m + 4t$ であった。*P. minor* の核型は $2n = 18 = 18m$ であった。その特徴は、相対長 5.50~6.00、腕比 1.50~1.70 の染色体を 4 個含んでいることであった。*P. ophioglossoides* の核型は $2n = 18 + 2 - 3B$ で、*P. minor* と同様にすべてが中部動原体型染色体であった (18 m)。しかし *P. minor* に含まれる相対長 5.50~6.00、腕比 1.50~1.70 の中部動原体型染色体は観察されなかった。さらに今回の研究で観察した *P. ophioglossoides* のすべての核型は、2~3 個の約 $3\mu\text{m}$ の小さな染色体を含んでおり、B 染色体として取り扱った。3 種全ての核型で、1 対の二次狭窄を持つ中部動原体型染色体が観察された。

Pogonia 3 種間で正逆人工交雑を行い、形成された受粉後 75-90 日目の種子を Knudson C 培地上に無菌的に播種した。すべての F_1 雑種の種子の胚形成率は 90% 前後、それらの発芽率は 80% だった。

Pogonia japonica と *P. minor* 間 F_1 雑種の染色体数は $2n = 19$ で、明らかに *P. japonica* と *P. minor* の中間の染色体数であった。核型について、 F_1 雑種は *P. japonica* 由来の 2 個の端部動原体型染色体及び *P. minor* 由来の相対長 5.50~6.00、腕比 1.50~1.70 の中部動原体型染色体 2 個を含む 17 個の中部動原体型染色体を持ち、両親の中間型を示した。

Pogonia japonica と *P. ophioglossoides* 間の F_1 雑種の染色体数について、*P. japonica* × *P. ophioglossoides* は $2n = 19 + 1B$ 、*P. ophioglossoides* × *P. japonica* は $2n = 19 + 2B$ で、常染色体については 17 個の中部動原体型染色体及び 2 個の端部動原体型染色体から成り、両親の中間型を示した。

Pogonia minor × *P. ophioglossoides* の F_1 雑種の染色体数については $2n = 18 + 2B$ 、*P. ophioglossoides* × *P. minor* については $2n = 18 + 1B$ であった。核型は、両親の中間型を示さなかった。観察したすべての核型は、両親に含まれない腕比 2.00 以上の次中部動原体型染色体を 1 個必ず含んでいた。また、*P. minor* の特徴である相対長 5.50~6.00、腕比 1.50~1.70 の中部動原体型染色体の個数は、個体により異なり、その数は 0~2 個であった。

屋外で 2~3 年間栽培したところ、すべての F_1 雑種において花が咲いた。 F_1 雑種間で、花の形態に大きな違いはなかった。

Pogonia japonica と *P. minor* の正逆 F_1 雑種からは多くの種子を得ることができた。しかし *P. ophioglossoides* を片親とすると、花粉の形成が悪く、*P. japonica*

×*P. ophioglossoides* の F₁ 雑種の自家受粉により、F₂ 種子をわずかに得ることができたが、他 3 パターンの F₁ 雑種においては、F₂ 種子を全く得ることができず、雑種不稔性を示した。北東アメリカに自生する *P. ophioglossoides* は、東アジアに自生する *P. japonica* 及び *P. minor* と遺伝的に遠縁であることが示唆された。

P. minor × *P. japonica* の F₂ 種子の発芽率は 1% 以下であった。*P. japonica* × *P. minor* の F₂ 種子の発芽率はいくぶん高く、26.0% であった。

F₂ 雑種の染色体数は、*P. japonica* × *P. minor* の F₂ 雑種で、2n = 19 および 20、*P. minor* × *P. japonica* の F₂ 雑種では 2n = 18, 19, 20 であった。

一方、野生で自生する *Pogonia* で、花の形態が *P. japonica* や *P. minor* といくらか異なる 2 つの野生タイプの *Pogonia* を入手したため、それらの核型分析を行った。一つは、趣味家が‘ミヤマトキソウ’と呼んでいる *Pogonia* で、白山に自生する個体である。もう一つは、広島県東広島市の湿地で偶然に発見した個体である。‘ミヤマトキソウ’と呼ばれる *Pogonia* は、核型は 2n = 18 であるが、*P. minor* の特徴である相対長 5.50~6.00、腕比 1.50~1.70 の染色体は含まれなかった。*P. ophioglossoides* の核型とも、二次狭窄を持つ中部動原体染色体の順番が異なっていた。東広島市産の *Pogonia* は 2n = 20 で、染色体数及び核型は *P. japonica* と同様であった。

5. *Pogonia japonica* 及び *P. minor* とは異なる 2 系統の RAPD 分析

Pogonia japonica と *P. minor* の両者の花とも異なる花の形態をもつ 2 タイプの *Pogonia* について、起源や

原種との関係を知るため、RAPD 手法を用いて DNA 多型を解析した。400 種類の RAPD プライマーを用いて分析を行った結果、*P. ophioglossoides* のバンドパターンは、他の *Pogonia* と大きく異なるものだった。*P. japonica* の特異的バンドが現れたのは OPO-02 のみで、*P. minor* については特異バンドを示すプライマーは見つからなかった。OPO-02 プライマーを用いた時に得られた *P. japonica* の特異バンドは、‘ミヤマトキソウ’や東広島産の *Pogonia* では見られなかった。また、OPO-04 により、*P. japonica*、*P. minor* に共通に見られたバンドは、‘ミヤマトキソウ’及び東広島産の *Pogonia* では見られなかった。‘ミヤマトキソウ’と東広島市産の *Pogonia* は、*P. japonica* や *P. minor* とは異なる DNA パターンを示した。このことから、‘ミヤマトキソウ’及び東広島市産の *Pogonia* が、*P. japonica* 及び *P. minor* の変種や 2 種間の雑種ではない可能性が示された。また、‘ミヤマトキソウ’と東広島市産の *Pogonia* は、花の形態は類似していたが、OPE-02 において異なる DNA パターンを示した。

クラスター分析により、*P. ophioglossoides* は *P. japonica* や *P. minor* とは遠縁であり、*P. japonica* と *P. minor* は非常に近縁であることが分かった。また、‘ミヤマトキソウ’と東広島市産の *Pogonia* の間の関係も近縁であった。‘ミヤマトキソウ’と東広島市で発見された *Pogonia* は、*P. japonica* 及び *P. minor* の関係と比較すると、いくらか遠縁であった。*P. ophioglossoides* との関係については、*P. japonica* 及び *P. minor* との関係よりも、‘ミヤマトキソウ’及び東広島市産の *Pogonia* との関係の方が近く、*P. japonica* や *P. minor* より早く分化した系統であることが推測された。

審査報告概要

本研究は、*Pogonia* (トキソウ) 属絶滅危惧 3 種 (トキソウ、ヤマトキソウおよび *P. ophioglossoides*) の系統解析と種の保全を目的として行われたものである。供試 3 種間では細胞遺伝学・分子生物学的分析により *P. ophioglossoides* がやや遠縁であるものの、互いに F₁ 雑種の作出は可能であり変異が少ないことを明らかにするとともに、野外調査において 3 種とは異なる新種の可能性を持つ *Pogonia* の存在を認めた。これら *Pogonia* 属植物は多様性が小さく急激な絶滅も考えられることから、人工的な種子発芽誘導や大量増殖法を試み、未熟種

子の利用や種子表面殺菌の実施、低温処理、共生菌の利用により *in vitro* での発芽促進、ヤマトキソウでは初の無菌発芽、トキソウでは地下茎頂を用いての初の大量増殖系を確立するとともに馴化にも成功した。本研究で確立した増殖系は他の絶滅危惧野生ランなどへの応用も期待でき、地球温暖化等に伴う環境変化への対応等にも利用できる技術と判断された。

よって、審査員一同は博士 (農学) の学位を授与する価値があると判断した。