

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 箕作 和彦
学位授与の日付	平成21年3月31日
論文名	ラン科植物の褐変抑制によるマイクロプロパゲーション効率の向上
論文審査委員	主査 小田 雅行 副査 大門 弘幸 副査 池田 英男

論文要旨

ラン科植物の多くは美しい形と芳香に特徴があり、優れた観賞価値が認められている。しかし、増殖効率が低いので1960年代までは普及が限られていた。洋ランのシンビジウムにおいて、マイクロプロパゲーション技術が確立 (Morel, 1960) されて以来、その技術は、カトレアやファレノプシスなどの他の洋ラン類にも適用されるようになり、それらの生産が産業として成り立つようになった。一方、東洋ランおよび野生ランでは、洋ランにはない清楚な形や芳香を有するものがあるにもかかわらず、低い増殖効率が克服されないまま今日に至っている。

野生ランであるフウラン (*Neofinetia falcata* H. H. Hu) は、その形と芳香が好まれ、愛好家によって古くから観賞されてきた。かつて、フウランは、株分けによって細々と増殖されていたが、無菌播種技術の開発によって容易に繁殖できるようになった。しかし、種子繁殖では、優れた形質の個体が現れても、形質を維持して増殖することはできない。そこで、低い栄養繁殖効率を向上するために、洋ランの手法を用いてフウランのマイクロプロパゲーション技術を開発しようとした。特にフウランは、ラン科植物の組織培養で共通の問題となっている褐変を伴って枯死するケースが多いので、褐変の抑制が組織培養法の確立に重要と考えた。

そこで本研究では、褐変の抑制によってフウランの組織培養における増殖効率の向上を目指した。まず、第1章ではフウランの *in vitro* 増殖に関する基礎的知見を収集し、次に、第2章ではフウランの培養における褐変抑制法の開発を試み、さらに、第3章では開発した褐変抑制法をフウラン以外の他のラン科植物および増殖が不安定なナス科

植物の *in vitro* 増殖に適用して、効果の検証と適用範囲拡大の可能性を検討した。

第1章 フウランの組織培養法

フウランの *in vitro* 増殖についての基礎データを収集した。まず、組織培養に適した培地を見出すために、2葉齢の幼植物を MS, 1/2MS (MS 培地の無機塩濃度のみを 1/2 にしたもの), Knudson C, Hyponex 培地でそれぞれ培養した。1/2MS 培地は幼植物の草丈、葉長、生体重ともに最も優れたので、以下の実験の基本培地とした。次に、栽培植物を *in vitro* 環境に導入するのに適した部位を選抜するために、ハウスで栽培したフウランの茎頂、子株、花茎、葉、根端を外植体として培養した。その結果、茎頂および子株で増殖効率が高かったが、採取時期が制限されない茎頂が *in vitro* 培養への導入に適していると判断された。さらに、*in vitro* での繰り返し増殖によって増殖効率を向上させるために、プロトコームおよび幼植物の分割培養法を検討した。プロトコームの分割培養では、外植体の生存率が低く、芽の形成もわずかであった。一方、幼植物の分割培養では、上部切片のすべてが生存したが、茎頂由来の 1 芽の発達にとどまった。これらにより、フウランの *in vitro* 増殖では、茎頂を外植体として *in vitro* 環境下で培養し、形成したシュートを繰り返し増殖できる可能性が示された。しかし、繰り返し増殖のモデルである幼植物培養では、外植体はすべて生存するが、増殖効率の向上には至らなかった。また、これらの培養では、外植体の生存および芽形成を抑制する褐変が顕著であった。

第2章 褐変抑制法による増殖効率の向上

組織培養における褐変枯死は、ラン科植物、果樹、森林樹など多くの植物で認められている。そこで、褐変抑制法として、低温、抗酸化剤、活性炭、ポリビニルピロリドン、暗黒の影響を検討したところ、暗黒処理により芽の形成数が最も多くなった。そこで、暗黒処理効果の発現機作について検討を加えた。

まず、照明および暗黒下で培養した 2 葉齢の幼植物を上下二分割して上部を培養すると、1 外植体当たりの不定芽形成数は照明下の 1 個に対して、暗黒下では 5.1 個と増加した。また、暗黒処理は、外植体で不定芽形成がみられる 4 週間後まで、培地の褐変および外植体の総フェノール含量を抑制した。この時、フェノール物質代謝系の上位に位置する律速酵素のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子の発現は、暗黒処理により抑制された。これらにより、暗黒処理はフェノール物質の生成を抑制することによって不定芽形成を促進することが示された。しかし、暗黒処理は生存率を低下させることも分かった。

そこで、暗黒処理に替わる簡便で増殖効率の高いフウランの増殖法を開発するために、PAL の反応を拮抗的に阻害する L-2-アミノオキシ-3-フェニルプロピオン酸 (AOPP) を添加した培地でフウランの幼植物上部を培養した。その結果、0.01 mM AOPP を添加した培地で培養すると、外植体はすべて生存し、外植体当たりの不定芽形成は 7.2 個と最も多くなった。また、褐変程度は AOPP の濃度が高くなるにつれて低くなった。一方、AOPP を添加しない場合には、培養期間が長くなると褐変程度も増加した。暗黒処理と同様に、0.01 mM AOPP では、培養開始から 4 週間後までの褐変割合および総フェノール含量が低

く維持され、その後増加した。また、AOPPの添加によるPAL遺伝子の発現に変化はなかった。その結果、AOPPは、暗黒処理の生存率 83%を 100%に、不定芽の形成数 5.1 個を 7.2 個に増加させた。すなわち、AOPPの培地への添加は、暗黒処理よりもフウランの不定芽形成を促進することが明らかになった。また、1年間の増殖効率は、株分けで2~3倍に対し、組織培養による理論値が、暗黒処理で $5.1^6=17,000$ 倍、AOPPの利用で $7.2^6=140,000$ 倍となった。

第3章 AOPP のフウラン以外の培養への適用

フウランの組織培養で増殖効率の向上に効果がみられた AOPP を、他のラン科植物であるウチョウラン (*Ponerorchis graminifolia* Rchb. f) およびサギソウ (*Habenaria radiata* (Thunb.) K. Spreng.) の *in vitro* 増殖に適用した。いずれの植物種においても、0.01 mM AOPP を添加した培地で小花を培養すると、生存率が高くなったが、芽の形成の増加には至らなかった。これらの結果から、フウラン以外のラン科植物の組織培養においても AOPP により増殖効率を向上できる可能性は示されたものの、芽の形成を促進する方法についてはさらに検討する必要がある。また、AOPP の効果をラン科以外の植物に適用拡大することを目的として、ナス科のトマト (*Solanum lycopersicum* L.) とナス (*Solanum melongena* L.) の胚軸を AOPP 添加培地で培養した。これらの種の組織培養については多くの報告があるが、再分化が不安定で不定芽を形成しにくいといわれている。本実験では、両植物種において、0.01~0.1 mM AOPP 添加培地で外植体の生存、カルス形成および不定芽形成が促進された。これらにより、AOPP は、褐変あるいはフェノール物質の生成が原因で、組織培養による増殖が困難とされる、多くの植物種のマイクロプロパゲーション効率を向上させると考えられた。

以上より、フウランの組織培養では、野外にある母株の茎頂を外植体とし、形成される幼植物を AOPP 添加培地で繰り返し培養すれば、褐変の抑制により、従来よりも高い効率で大量増殖できることが示された。また、AOPP の培地への添加は、ウチョウランおよびサギソウの培養における外植体の生存や、トマトおよびナスの培養における不定芽形成の促進にも有効であった。したがって、AOPP は褐変により組織培養が困難な他のラン科植物、果樹、森林樹などの増殖にも拡大して適用できると考えられた。

審査結果の要旨

洋ランの生産は、マイクロプロパゲーション技術の確立によって産業化されたが、東洋ランおよび野生ランは、低い増殖効率が克服されないまま今日に至っている。野生ランの中でもフウラン (*Neofinetia falcata* H. H. Hu) は、美しい形と芳香に対する大きな需要が見込まれるので、条件が満たされればその生産が産業化される可能性が高い。しかし、遺伝的に固定されていないフウランの無菌播種は、均一な形質での増殖ができず、株分けでは増殖効率が極めて低いといった問題がある。このため、増殖効率の高い栄養繁殖法が求められている。

そこで、フウランの栄養繁殖効率を向上するために、洋ランの手法を導入してマイクロプロパゲーション技術を開発しようとした。フウランは、他のラン科植物の組織培養と同様に褐変・枯死するケースが多いので、組織培養における褐変の抑制法について検討した。また、本研究で開発した褐変抑制法をフウラン以外の他のラン科植物および増殖が不安定なナス科植物の培養に適用して、効果の検証と適用範囲拡大の可能性を検討した。

第1章では、フウランを組織培養する際に必要な基礎データを収集した。まず、各種の組織培養用培地の中からフウランに適した培地を選択した。その結果、1/2MS培地は幼植物の草丈、葉長、生体重ともに最も優れたので、以下の実験の基本培地とした。次に、栽培植物を *in vitro* 環境に導入するのに適した部位を選抜した。その結果、茎頂および子株で増殖効率が高かったが、採取できる季節が制限されない茎頂が *in vitro* 培養への導入に適していると判断された。さらに、*in vitro* 環境での繰り返し増殖によって増殖効率を向上させるために、プロトコームおよび幼植物の分割培養法を検討した。その結果、幼植物の分割培養では、上部切片のすべてが生存したが、茎頂由来の1芽の発達にとどまった。また、これらの培養では、外植体の生存および芽形成を抑制する褐変が顕著であった。

第2章では、褐変抑制によるフウランのマイクロプロパゲーション効率の向上を目指した。まず、褐変抑制法として、活性炭、ポリビニルピロリドン、抗酸化剤、低温、暗黒の影響を検討した。その結果、暗黒処理が芽の形成数を最も多くした。そこで、暗黒処理効果の発現機作について検討を加えた。

照明および暗黒下で培養した幼植物を培養したところ、1外植体当たりの不定芽形成数は照明下の1個に対して、暗黒下では5.1個と増加した。また、暗黒処理は、外植体で不定芽形成がみられる4週間後まで培地の褐変および外植体の総フェノール含量を抑制した。この時、フェニルプロパノイド経路の上位に位置する律速酵素のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子の発現も抑制された。これらの結果により、暗黒処理はフェノール物質の生成を抑制することによって不定芽形成を促進することが示された。しかし、暗黒処理は生存率を低下させることも分かった。

暗黒処理に替わる簡便で増殖効率の高いフウランの増殖法を開発するために、PALの活性を拮抗的に阻害するL-2-アミノオキシ-3-フェニルプロピオン酸 (AOPP) を添加した培地で幼植物を培養した。その結果、0.01 mM AOPPを添加した培地では、外植体はすべて生存し、外植体当たりの不定芽形成数は7.2個と最も多くなった。また、褐変程度

はAOPP濃度が高くなるにつれて低くなった。一方、AOPPを添加しない場合には、培養期間が長くなると褐変程度が増加した。暗黒処理と同様に、0.01 mM AOPPでは、培養開始から4週間後までの褐変割合および総フェノール含量が低く維持され、その後増加した。また、AOPPの添加によるPAL遺伝子の発現に変化はなかった。その結果、AOPPは、暗黒処理の生存率83%を100%に、不定芽の形成数5.1個を7.2個に増加させた。すなわち、AOPPの培地への添加は、暗黒処理よりもフウランの不定芽形成を促進することが明らかになった。また、1年間の増殖効率は、株分けでは2~3倍だったのに対し、組織培養の理論値として暗黒処理で $5.1^6=17,000$ 倍、AOPP処理で $7.2^6=140,000$ 倍となった。

第3章では、フウランで褐変抑制と増殖効率の向上に効果がみられたAOPPを、他のラン科植物であるウチョウラン (*Ponerorchis graminifolia* Rchb. f) およびサギソウ (*Habenaria radiata* (Thunb.) K. Spreng.) の小花培養に適用した。その結果、いずれの植物種においても、0.01 mM AOPP を添加した培地で生存率が高くなったが、芽の形成の増加には至らなかった。また、AOPP の効果をラン科以外の植物に適用拡大することを目的として、ナス科のトマト (*Solanum lycopersicum* L.) とナス (*S. melongena* L.) の胚軸をAOPP添加培地で培養したところ、両種ともに0.01~0.1 mM AOPP添加培地で外植体の生存、カルス形成および不定芽形成が促進された。したがって、AOPPは、褐変あるいはフェノール物質の生成が原因で組織培養による増殖が困難とされる多くの植物種のマイクロプロパゲーション効率を向上させると考えられた。

これらのことから、フウランの組織培養では、野外にある母株の茎頂を外植体とし、形成される幼植物をAOPP添加培地で繰り返し培養すれば、褐変の抑制によって従来よりも高い増殖効率のマイクロプロパゲーション系を確立できることが明らかになった。また、AOPPは、ウチョウランおよびサギソウの組織培養における外植体の生存や、トマトおよびナスの培養における不定芽形成の促進にも有効であった。したがってAOPPは、褐変が原因でマイクロプロパゲーションが困難な他のラン科植物、果樹、森林樹などの増殖にも拡大して適用できると考えられた。

以上のように、マイクロプロパゲーション効率の向上によって、フウラン生産の産業化を可能にした成果は、園芸学にとどまらず、園芸産業への貢献が大きい。また、AOPPによる再分化促進は、簡便で効果が顕著な新しい組織培養法として注目されるものであり、植物バイサイエンスに貢献する。さらに、この再分化促進法は、培養系が確立されていないか、不安定な植物種の培養系への適用によって、遺伝子組み換えが困難であった植物種の組み換え体作出に展望を開く。よって、本論文の審査および学力確認の結果とあわせて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。