

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Sinumporn Punpaka
審査委員	主査 深井誠一
	副査 高村武二郎
	副査 島崎一彦
	副査 羽藤堅治
	副査 奥田延幸

### 論文名

*Habenaria* as genetic resources of floriculture

(花き遺伝資源としての *Habenaria*)

### 審査結果の要旨

本論文は、ラン科ハベナリア属植物の内、日本に自生するサギソウと東南アジアに自生するロドケイラ種を取り上げ、種間交雑種を作り出すことを最終目標として、2種の形質の調査、in vitro 繁殖、種間交雑、遺伝資源の保存について検討したものである。

*Habenaria radiata* (サギソウ) は、日本及び朝鮮半島に自生する小型のランで、開花期は初夏、唇弁は純白で側部片に細かな切れ込みを有し、そのユニークな花の形が鳥の羽根を広げた形に似て居ることからサギソウという和名が与えられている。一方 *H. rhodocheila* は東南アジアを中心とした熱帯地方に自生し、多様な花色が特徴である。従来これら花色の異なる近縁種にそれぞれ学名が与えられて来たが、それらは遺伝的に近縁であり、この研究では *H. rhodocheila* complex として扱い、花色のみで遺伝子型を区別することとした。*H. rhodocheila* complex は多様な花色を有しているが、唇弁に含まれる花色色素情報はほとんどない。*H. rhodocheila* complex の唇弁横断切片を観察したところ、表皮細胞の形態は遺伝子型により異なるとともにいずれにも顆粒状の色素体が観察された。色素の抽出液を分光光度計で分析したところカロチノイド、フラボノイド、アントシアニンと推定されるピークが確認された。ところが HPLC ではアントシアニンのピークは確認されず、また緩衝液の pH による色変化も認められず、通常のアントシアニンとは異なる化学的特性を持つ色素であると推察された。

ラン科植物の種子は胚乳を欠くシンプルな構造をしており、自然界ではラン菌の助けを借りて発芽するが、人工培地でも発芽させることができる。ところが *H. rhodocheila* complex の人工培地上での種子発芽は不安定であることが知られている。そこで本研究では、まず *H. radiata* を用いてこれまでラン種子の無菌播種に用いられて来た Murashige & Skoog (MS) 培地、Vacin & Went (VW) 培地、Kudson C (KC) 培地、Malmagern Modified Terrestrial Orchid Medium (MM) 培地を比較検討した。いずれの培地でも *H. radiata* 種子は発芽したが、MM 培地でもっと発芽率が高く、かつ実生苗の生育も良かった。このため MM 培地を用いて

*H. rhodocheila* complex 種子を播種したところ良好な発芽が認められ、以降の実験では MM 培地を使用することとした。交配から発芽までの期間短縮を目的に、子房培養を行ったところ、交配後 4 週以降に採取した子房から発芽が認められ、花粉管の観察と合わせて考えると交配後 4 週以降に受精が起こることが推察された。子房培養により交配から発芽までの期間が大幅に短縮できることが明らかとなった。次に発芽後の *H. rhodocheila* complex プロトコームを MS 及び MM 培地の無機態窒素濃度を変更した培地に移植してその後の生育を比較したが、一定の傾向が認められず、*H. rhodocheila* complex プロトコームは有機態、無機態いずれの窒素を含む培地でも発育できることが確認された。

次に *H. rhodocheila* complex と *H. radiata* の相互交雑を行い、雑種の獲得を検討した。着果率と得られた種子の発芽程度は交配組み合わせにより異なった。得られた植物の交雑性を検定するため rRNA 遺伝子をターゲットにして PCR-RFLP 分析を行った。その結果、*H. radiata* X *H. rhodocheila* complex (orange) では真の交雑種を、*H. radiata* X *H. rhodocheila* complex (pink) ではアポミクトのみを、*H. radiata* X *H. rhodocheila* complex (yellow) では交雑種とアポミクトの両方を、*H. rhodocheila* complex (yellow) X *H. radiata* ではアポミクトのみを産出した。*H. radiata* X *H. rhodocheila* complex (orange) の組み合わせによる雑種の獲得の成功は、本研究が初の報告である。得られた交雑種は、草姿、花形、花色、葉、地下部形態において両親の中間型の形質を示した。

最後に *H. radiata* と *H. rhodocheila* complex の遺伝資源の保存について cryo-plate vitirification 法を用いて検討した。*H. radiata* 種子は脱水処理なしに凍結保存可能であったが、*H. rhodocheila* complex 種子は PVS2 で 20-30 程度の脱水処理により凍結保存が可能であった。*H. rhodocheila* complex プロトコームについては、PVS3 による脱水時間と生存の間に一定の傾向は認められなかったが、十分脱水できればプロトコームの凍結保存が可能であることを示した。

以上本研究で得られた成果は、*Habenaria* の園芸植物としての発展に大いに貢献するものであると判断された。

本論文に関する公開審査会は、令和 2 年 2 月 8 日に愛媛大学農学部において開催され、申請者の論文発表とこれに関する質疑応答が行われた。引き続き開催された学位論文審査会において、学位論文の内容について審査した結果、審査員全員一致して本論文は博士（農学）の学位を授与するに値すると判定した。