

# フローサイトメーターによるラン科植物の 倍数性調査

市橋正一 伊藤裕司<sup>1</sup> 小栗達也<sup>2</sup> 加藤淳太郎

理科教育講座

## Investigation on Ploidy of *Cymbidium* and *Dendrobium* Cultivated in Japan Using Flow Cytometer

Syoichi ICHIHASHI, Hiroshi ITO, Tatyua OGURI and Juntaro KATO

Department of Science, Aichi University of Education, Kariya, Aichi 448-8542 Japan

### はじめに

ランの品種改良(育種)は1800年代の中頃から英国で開始され, 現在までの交配記録は Sander's List of Orchid Hybridsとして引き継がれている(狩野・服部, 1965)。Sander's Listには交配種名, 両親名, 登録者名, 登録年が記録されている。したがって栽培・生産されるラン科植物は, その品種名が明らかであれば, 改良の元になった野生種までさかのぼることが可能である。他の植物とは異なりラン科植物は, 種間, 属間雑種の形成が比較的容易であり, 新属, 新種が多数作出されている。しかし, このリストの存在により, 膨大な数のラン交配種の記録やランの品種改良の歴史を正確に知ることができる。

過去に作出されたラン交配種のうち名品と言われるものの多くは, 元になった野生種が通常の2倍体であるにもかかわらず, 倍数性であることが知られている。これは, 倍数性の高次化に伴い, 植物体は大きく頑丈になり, 花形や花の品質もよくなる場合が多いため, 交雑育種の過程で人為的選抜が行われた結果と考えられる。

交雑育種では, 次世代が得られなければ品種のさらなる改良が出来ない。したがって, 品種改良を行う上では稔性の有無は非常に重要な性質である。しかし, 倍数性の高次化が原因で雑種が形成されにくい場合がある。同質4倍体の場合は, 減数分裂時に染色体の対合が不ぞろいとなり稔性は低下する。3倍体植物の場合も, 減数分裂における不整合性のため, 稔性を持たない花粉あるいは卵の割合が多くなる。倍数性に関する

知見は品種改良にとって有用なものであり, 染色体の調査によって行われてきた。しかし, 正確に染色体を調査するには時間と専門的技能を必要とする。

近年, 細胞中の核 DNA 含量をフローサイトメーターにより簡単に短時間で測定できるようになった。この方法では, 染色体数を直接知ることは出来ないが, 染色体数あるいは DNA 含量のわかった基本種と比較することにより, その倍数性を DNA 含量で知ることが出来る。したがって, フローサイトメーターの利用により, 倍数性などの育種上の有用な情報が得られると考えられるが, ラン科植物への適用はまだ限られたものである(Jones & Kuehnle, 1998; 三位ら, 1997)。本報告では, *Cymbidium*, *Dendrobium* の DNA 含量をフローサイトメーターによって調査し, その利用価値と有用性などを検討した。

### 材料と方法

フローサイトメトリー: 倍数性の調査は Partec 社のプロイディーアナライザー PA 型で行った。植物種によっては, 異なった倍数性細胞が組織中に混在する現象(ポリソマティー)が知られている。また, *Phalaenopsis* 等では, 根端以外では本来の倍数性は見られないとする報告もある。そこで, 今回供試した各種ラン科植物において, 供試部位の違いによるポリソマティーの有無について予備的に調査し, 最低の倍数性が見られる部位を用いて倍数性を調査した。

分析に用いた植物材料は, 生産農家などから提供を受けた。*Cymbidium* については主に芽欠きした芽の基部の若い葉の組織を用い, *Dendrobium* は根端あるいはリードバルブの展開葉の先端を用いた。

核は, 直径90mmのプラスチックディッシュ上で, 0.2 cm<sup>2</sup>程度の植物体試料を200 $\mu$ l の High Resolution DNA staining kit type P のA液 (Partec 社) に4 $\mu$ l

1 愛知教育大学学生 (Student, Aichi University of Education)

2 愛知教育大学大学院学生 (Graduate Student, Aichi University of Education)

の2-メルカプトエタノールを添加した核酸単離液中で、カミソリで細切り単利した。数分間放置後、1 ml の High Resolution DNA staining kit type P の B 液 (Partec 社) により DAPI 染色し、50 $\mu$ m の Cell Trics フィルター (池田理科) により残渣を取り除き測定溶液とした。内部標準として *Dendrobium* の場合は *P. obconica*, *Cymbidium* の場合は *Ble. striata* の葉を用い、これらの内部標準試料のピーク位置を50とした (図)。なお、*Hordeum vulgare* (DNA 含量10.4pg) のピーク位置が172.11のとき *P. obconica* は50.50であり、*H. vulgare* が57.14のとき *Ble. striata* は48.95であった。この値より *P. obconica* の DNA 含

量は3.1pg, *Ble. striata* の DNA 含量は8.9pg と計算された。

**染色体観察**：伸長中の根端を用いて、染色体数を調べた。根端部分を3~5℃に冷やした蒸留水の入った管ピン内に浸漬し、低温中で24時間の前処理を行った。固定は、酢酸と99%アルコール(1:3 v/v)の混合液(カルノア液)で行い、そのまま4℃で保存した。解離は、蒸留水で洗浄した根端をカミソリで先端から5mm程度切り取り、縦に2分割したものに、4.0%(w/v) Cellulase Onozuka RS (ヤクルト), 1.0% (w/v) Pectolyase Y-23 (セイシン化学) を含む1.0mM EDTA (pH 4.0) 溶液を試料が浸かる程度加え、1.5

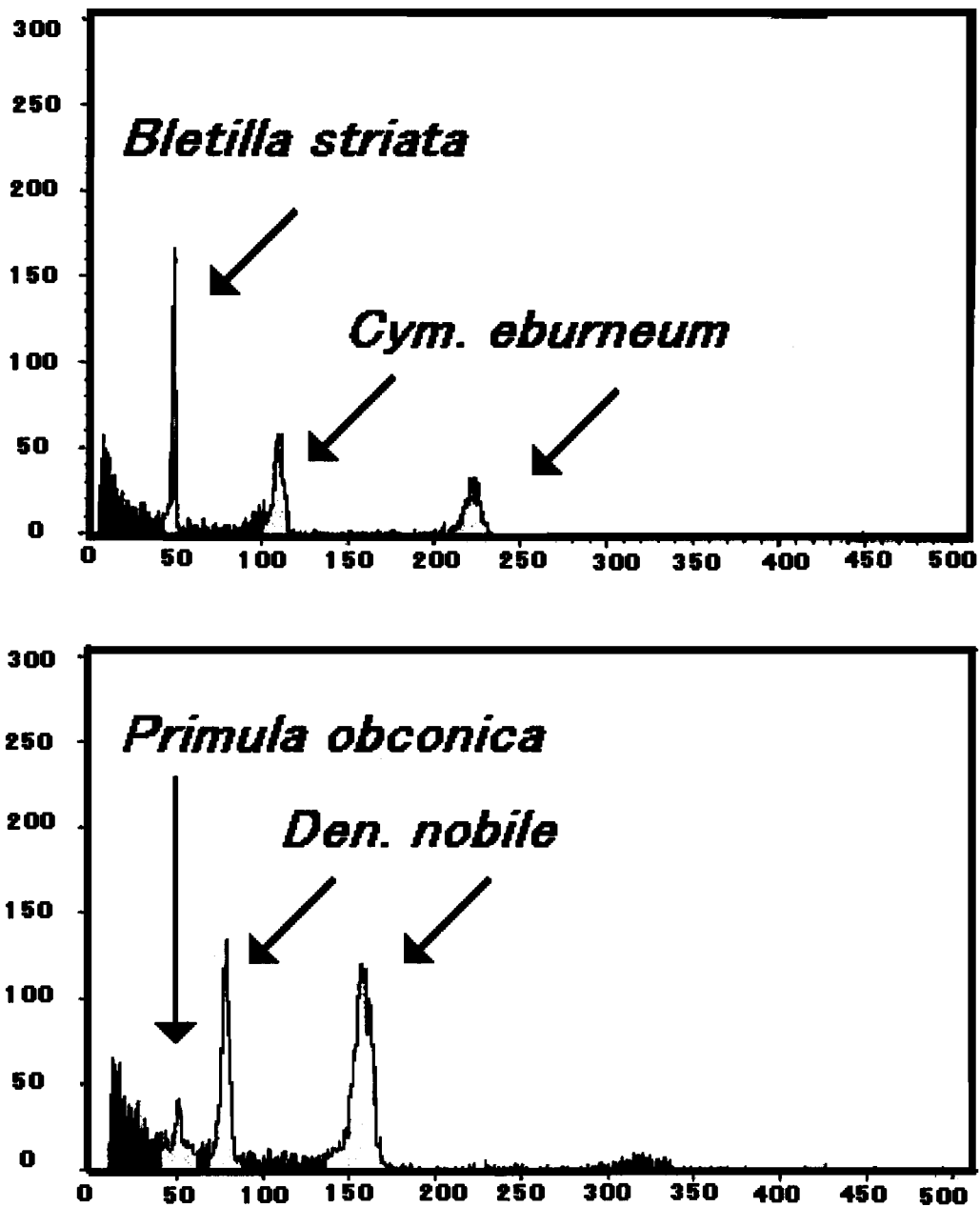


図 フローサイトメーターを用いて測定した *Cymbidium*, *Dendrobium* の内部標準に対する相対 DNA 含量値の比較。上段：内部標準を *Bletilla striata* とした時の *Cym. eburneum* の分析結果，下段：内部標準を *Primura obconica* とした時の *Den. nobile* の分析結果。縦軸は検出された核の個数，横軸は DAPI 染色による蛍光強度，すなわち核の相対的な DNA 量を示す。

表1 *Cymbidium* のフローサイトメーターによる分析結果

| 種あるいは品種名                       | 登録年  | 測定部位   | ピーク位置  | 倍数性の |       | 材料の出所 |
|--------------------------------|------|--------|--------|------|-------|-------|
|                                |      |        |        | 推定値  | 染色体数  |       |
| <i>aloifolium</i>              |      | 若い葉の基部 | 157.55 | 2x   | 40*   | To.   |
| <i>debonianum</i>              |      | "      | 84.69  | 2x   | 40*   | To.   |
| <i>eburneum</i>                |      | "      | 112.53 | 2x   | 40**  | To.   |
| <i>eburneum 'Mukoh Yama'</i>   |      | "      | 110.16 | 2x   | 40*   | To.   |
| <i>giganteum</i>               |      | "      | 108.80 | 2x   | 40*   | To.   |
| <i>grandiflorum</i>            |      | "      | 124.39 | 2x   | 40**  | AUE   |
| <i>insigne</i>                 |      | "      | 100.09 | 2x   | 40*   | To.   |
| <i>longifolium</i>             |      | "      | 86.40  | 2x   | 40*** | AUE   |
| <i>lowianum</i>                |      | "      | 117.28 | 2x   | 40**  | AUE   |
| <i>madidam</i>                 |      | "      | 109.27 | 2x   | 40*** | To.   |
| <i>parishii</i>                |      | "      | 115.68 | 2x   | 40*   | To.   |
| <i>pumilum</i>                 |      | "      | 60.66  | 2x   | 40*   | AUE   |
| <i>pumilum</i>                 |      | "      | 59.73  | 2x   | 40*   | To.   |
| <i>tracyanum</i>               |      | "      | 99.02  | 2x   | 40*   | To.   |
| Akatuki                        | 1970 | "      | 188.42 | 4x   |       | To.   |
| Alexanderi 'Fine'              | 1911 | "      | 101.81 | 2x   | 40**  | To.   |
| Alexanderi 'Westonbirt'        | 1911 | "      | 191.51 | 4x   | 80*   | To.   |
| Alice Luna                     |      | "      | 139.91 | 3x   |       | To.   |
| All Star 'High Sense'          | 1982 | "      | 139.55 | 3x   |       | To.   |
| All Star 'Marrian'             | 1982 | "      | 196.13 | 4x   |       | To.   |
| All Star 'Red King'            | 1982 | "      | 190.47 | 4x   |       | To.   |
| Calle Del Rey 'Jade Queen'     | 1973 | "      | 246.73 | 5x   |       | To.   |
| Calle Real 'Pink Suffusion'    | 1970 | "      | 161.30 | 3x   |       | To.   |
| Cariga 'Golden'                | 1951 | "      | 101.61 | 2x   |       | To.   |
| Charming Yellow                |      | "      | 143.41 | 3x   |       | Fu.   |
| Clare Armstrong 'Clarisse'     | 1948 | "      | 159.72 | 3x   | 60**  | To.   |
| Crystal Cherry 'Lip Stick'     | 1987 | "      | 191.75 | 4x   |       | To.   |
| Crystal Cherry Princess Masako | 1987 | "      | 207.35 | 4x   |       | To.   |
| Crystal Cherry 'Sakura'        | 1987 | "      | 192.82 | 4x   |       | To.   |
| Delrosa 'The King'             | 1952 | "      | 142.55 | 3x   |       | To.   |
| Desert Look                    |      | "      | 151.76 | 3x   |       | Fu.   |
| Enzan Sky 'Cassiopeia'         |      | "      | 140.69 | 3x   |       | Fu.   |
| Enzan Spring 'In The Mood'     | 1993 | "      | 102.84 | 2x   |       | To.   |
| Enzan Storm 'Orpheus'          | 1994 | "      | 158.37 | 3x   |       | Fu.   |
| Forgot Fruits                  |      | "      | 171.90 | 3x   |       | Fu.   |
| Gawain 'Empres'                | 1963 | "      | 122.16 | 2x   |       | To.   |
| Great Flower 'Ballerina'       | 1985 | "      | 183.77 | 4x   |       | Fu.   |
| Great Katy 'Cupid Lady'        | 1990 | "      | 188.15 | 4x   |       | Fu.   |
| Great Katy 'Hatsukoi'          | 1990 | "      | 188.38 | 4x   |       | Fu.   |
| Great Katy 'Little Laurencin'  | 1990 | "      | 190.27 | 4x   |       | Fu.   |
| Great Waltz 'My Fair Lady'     | 1973 | "      | 180.72 | 4x   |       | To.   |
| Half Moon 'Wonderland'         |      | "      | 99.82  | 2x   |       | Fu.   |
| Hikumano                       |      | "      | 169.42 | 3x   |       | To.   |
| Honeymoon 'Tropical Yellow'    | 1985 | "      | 196.19 | 4x   |       | To.   |
| Hunter's Point 'Sunset'        | 1962 | "      | 166.60 | 3x   |       | To.   |
| Jenteel Peppermint             | 1990 | "      | 196.67 | 4x   |       | To.   |
| Jenteel Peppermint             | 1990 | "      | 202.99 | 4x   |       | Fu.   |
| Katydid 'Yasuko Oji'           | 1970 | "      | 89.05  | 2x   | 40*   | To.   |
| Lancelot 'Velvet'              | 1962 | "      | 130.76 | 3x   |       | To.   |
| Latigo 'Yellow Magic'          | 1983 | "      | 193.55 | 4x   |       | To.   |
| Lcyi Princess                  |      | "      | 129.74 | 3x   |       | To.   |
| Lemon Ice 'Sherbet'            | 1987 | "      | 132.67 | 3x   |       | Fu.   |

次ページに続く。

表1 *Cymbidium* のフローサイトメーターによる分析結果 (前ページからの続き)。

| 種あるいは品種名                                       | 登録年  | 測定部位 | ピーク位置  | 倍数性の<br>推定値 | 染色体数 | 材料の出所 |
|--|------|------|--------|-------------|------|-------|
| Lillian Steart                                 | 1955 | "    | 91.18  | 2x          |      | To.   |
| Little Morning 'Lemon Pie'                     | 1986 | "    | 134.21 | 3x          |      | To.   |
| Lovely Moon 'Cressent'                         | 1991 | "    | 151.10 | 3x          |      | Fu.   |
| Lucky Flower 'Anmituhime'                      | 1984 | "    | 190.08 | 4x          |      | To.   |
| Lucky Gloria 'Shuzannu'                        | 1996 | "    | 152.02 | 3x          |      | Fu.   |
| Luna Beach                                     |      | "    | 199.85 | 4x          |      | Fu.   |
| Lunagrad 'Export'                              | 1967 | "    | 98.65  | 2x          |      | To.   |
| Mary Pinchess 'Lime Lite'                      | 1960 | "    | 129.39 | 3x          |      | To.   |
| Mayfair 'Stonehurst'                           | 1942 | "    | 103.49 | 2x          |      | To.   |
| Melody Color Arabesch                          |      | "    | 150.94 | 3x          |      | To.   |
| Melody Fair 'Marilyn Monroe'                   | 1973 | "    | 145.48 | 3x          |      | Fu.   |
| Miranda 'Yamaoka'                              | 1916 | "    | 159.31 | 3x          |      | To.   |
| Miretta 'Mem A A Mc Bear'                      | 1946 | "    | 109.87 | 2x          |      | To.   |
| Mizuha Okada 'Christmas Tree'                  | 1983 | "    | 140.80 | 3x          |      | To.   |
| MN450  |      | "    | 186.63 | 4x          |      | Fu.   |
| Oiso 'Line No Homare'                          | 1966 | "    | 80.66  | 2x          | 40*  | To.   |
| Olymilum 'White Elf'                           | 1964 | "    | 78.60  | 2x          | 40*  | To.   |
| Olympus 'Invincible'                           | 1931 | "    | 148.15 | 3x          | 60*  | To.   |
| Orion  | 1918 | "    | 89.69  | 2x          |      | To.   |
| Peach Melba 'Lorelei'                          | 1987 | "    | 192.62 | 4x          |      | Fu.   |
| Peter Pan 'Green Sleeves'                      | 1957 | "    | 94.73  | 2x          | 42*  | To.   |
| Pipeta 'No.4'                                  | 1961 | "    | 82.89  | 2x          | 40*  | To.   |
| Princess Nobuko                                |      | "    | 149.81 | 3x          |      | Fu.   |
| Raspberry 'Mirowari'                           | 1993 | "    | 198.40 | 4x          |      | Fu.   |
| Salon d'Tohkai 'Lucky punch'                   |      | "    | 96.55  | 2x          |      | To.   |
| Sarah Jeen 'Ice Cascade'                       | 1973 | "    | 80.87  | 2x          |      | Fu.   |
| Seaside 'Princess Masako'                      | 1988 | "    | 188.71 | 4x          |      | To.   |
| Seaside 'Princess Masako'                      | 1988 | "    | 186.84 | 4x          |      | Fu.   |
| September Green(gyokubi sosin × Blue<br>Smoke) |      | "    | 138.73 | 3x          |      | To.   |
| Shine Heart 'Silhouette'                       | 1991 | "    | 189.54 | 4x          |      | Fu.   |
| Showgirl 'Husky Honey'                         | 1962 | "    | 182.82 | 4x          | 78*? | To.   |
| Sleeping Beauty 'Golden Gate'                  | 1970 | "    | 102.08 | 2x          |      | To.   |
| Sweet Angel 'Second Love'(メリクロン変異)             | 1992 | "    | 140.60 | 3x          |      | To.   |
| Sweet Angel 'Second Love'(正常個体)                | 1992 | "    | 142.98 | 3x          |      | To.   |
| Sweet Wine 'Lika'                              | 1986 | "    | 133.29 | 3x          |      | To.   |
| Sweetheart 'Hakuun'                            | 1955 | "    | 80.58  | 2x          | 40*  | To.   |
| Sylvan Fair 'Princass Kiko'                    | 1991 | "    | 177.81 | 4x          |      | To.   |
| Tachibana                                      | 1981 | "    | 148.57 | 3x          |      | To.   |
| Tsurugi 'Awabijin'                             | 1979 | "    | 87.58  | 2x          |      | To.   |
| Urara  | 1976 | "    | 225.75 | 4x          |      | To.   |
| Wakakusa 'Kinryu'                              | 1968 | "    | 90.68  | 2x          | 40*  | To.   |
| Wiganianum                                     | 1902 | "    | 106.31 | 2x          | 40** | To.   |
| Winter Paradise 'Perfection'                   | 1985 | "    | 189.94 | 4x          |      | To.   |
| Zaskar 'Solong'                                | 1984 | "    | 102.05 | 2x          |      | To.   |
| 交配番号1233③                                      |      | "    | 183.48 | 4x          |      | Fu.   |
| 交配番号1651①                                      |      | "    | 192.86 | 4x          |      | Fu.   |
| 交配番号1686①                                      |      | "    | 155.01 | 3x          |      | Fu.   |

AUE; 愛知教育大学自然観察園、Fu.; 福岡農園、To.; 東海市農業センターより試料を入手。

\*今回染色体を調査したもの。\*\*Tanaka and Kamemoto (1991)より引用。

\*\*\*Aoyama (1989)より引用。Showgirl 'Husky Honey'の染色体数は多少変動の可能性はある。

表2 *Dendrobium* のフローサイトメーターによる分析結果

| 種あるいは品種名                     | 登録年  | 測定部位 | ピーク位置  | 倍数性の |      | 材料の出所 |
|------------------------------|------|------|--------|------|------|-------|
|                              |      |      |        | 推定値  | 染色体数 |       |
| <i>aphyllum</i>              |      | 葉    | 68.21  | 2x   | 38** | Asa.  |
| <i>falcorostnum</i>          |      | "    | 108.43 | 3x   |      | Asa.  |
| <i>farmeri</i>               |      | "    | 102.76 | 3x   | 40** | Asa.  |
| <i>lituiflorum</i>           |      | "    | 71.41  | 2x   | 38** | Asa.  |
| <i>miyakei</i>               |      | "    | 60.69  | 2x   | 38** | AUE   |
| <i>monilifome</i>            |      | "    | 159.07 | 4x   | 38** | Asa.  |
| <i>nobile 1</i>              |      | "    | 77.68  | 2x   | 38** | AUE   |
| <i>nobile 2</i>              |      | "    | 60.69  | 2x   |      | AUE   |
| <i>nobile</i> 'Cooksonianum' |      | "    | 76.16  | 2x   |      | Asa.  |
| <i>nobile</i> (白) シツキム       |      | "    | 75.04  | 2x   |      | Asa.  |
| <i>nobile</i> (紅) シツキム       |      | "    | 160.24 | 4x   |      | Asa.  |
| <i>tortile</i>               |      | "    | 157.52 | 4x   | 38** | Asa.  |
| <i>unicum</i>                |      | "    | 155.36 | 4x   | 34*  | Asa.  |
| A478                         |      | "    | 309.72 | 8x   |      | Asa.  |
| Amarelo Margarita            |      | "    | 162.91 | 4x   |      | Asa.  |
| Colorado Springs 'Clementi'  | 1995 | "    | 242.70 | 6x   |      | Asa.  |
| Colorado Springs 'New Year'  | 1995 | "    | 236.49 | 6x   |      | Asa.  |
| Colorado Springs 'Toch'      | 1995 | "    | 244.61 | 6x   |      | Asa.  |
| Ekapol 'Big Panda'           | 1982 | 花卉   | 140.28 | 4x   |      | AUE   |
| Fantasy Crown                |      | 葉    | 165.14 | 4x   |      | AUE   |
| Flower Palace 'Cinderella'   |      | "    | 158.55 | 4x   |      | Asa.  |
| Golden Blossom 'Kogane'      | 1971 | "    | 143.72 | 4x   |      | Asa.  |
| Golden Years 'Hino'          | 1995 | "    | 164.08 | 4x   |      | Asa.  |
| Haga 94-4                    |      | "    | 159.29 | 4x   |      | Asa.  |
| Hambühren Gold 'Lady'        | 1975 | "    | 153.29 | 4x   |      | Asa.  |
| Jealousy                     |      | "    | 166.69 | 4x   |      | Asa.  |
| Kuniko                       | 1983 | "    | 71.71  | 2x   |      | Asa.  |
| Lucky Gal 'Emiko'            |      | "    | 157.24 | 4x   |      | Asa.  |
| Maspron                      |      | "    | 168.72 | 4x   |      | Asa.  |
| Nester Kamemoto              | 1893 | "    | 376.47 | 10x  | 38*  | Asa.  |
| New Star 'Red River'         | 1995 | "    | 122.85 | 3x   |      | Asa.  |
| Oriental Paradise 'Aurora'   | 1971 | "    | 158.57 | 4x   |      | Asa.  |
| Petite Prasol                |      | "    | 117.51 | 3x   |      | Asa.  |
| Pittero Gold 'Grace'         | 1977 | "    | 148.15 | 4x   |      | Asa.  |
| Rainbow Dance                | 1988 | "    | 353.59 | 10x  |      | Asa.  |
| Roy Tokunaga                 |      | "    | 271.38 | 8x   |      | Asa.  |
| Sachi 'Marchen'              | 1982 | "    | 155.98 | 4x   |      | Asa.  |
| Santa Isabel 'True Love'     |      | "    | 176.30 | 4x   | 76*  | Asa.  |
| Santana Canally              | 1985 | "    | 76.29  | 2x   |      | Asa.  |
| Second Love 'Kirameki'       | 1986 | "    | 173.47 | 4x   |      | Asa.  |
| Second Love 'Tokimeki'       | 1986 | "    | 159.43 | 4x   |      | Asa.  |
| Snow Flake 'Red Star'        | 1964 | "    | 158.61 | 4x   |      | AUE   |
| Star Carnival                | 1973 | "    | 162.67 | 4x   |      | Asa.  |
| Stardust 'Chiyomi'           | 1986 | "    | 152.69 | 4x   |      | Asa.  |
| Stardust 'Fire Bird'         | 1986 | "    | 108.11 | 3x   |      | Asa.  |
| Takkun                       |      | "    | 144.09 | 4x   |      | Asa.  |
| Utopia 'Messenger'           | 1971 | "    | 176.45 | 4x   |      | Asa.  |
| White Christmas 'Seagull'    | 1983 | "    | 162.91 | 4x   |      | Asa.  |
| Yachiyo                      | 1980 | "    | 120.25 | 3x   |      | Asa.  |
| Yohkou 'Black Eye'           | 1982 | "    | 161.73 | 4x   |      | Asa.  |

Asa.: 浅井大桂園、AUE: 愛知教育大学自然観察園より試料を入手。

\* 今回染色体を調査したもの。\*\* Tanaka and Kamemoto (1991)より引用。

mlマイクロチューブ (IWAKI 社) 中で、37℃で1時間酵素処理を行った。酵素処理による組織の解離後、酵素液をパスツールピペットで吸い取り蒸留水に置換し、根端を蒸留水ごと吸い上げ、スライドガラス上で水分を濾紙で取り除いた。カルノア液を根端に滴下し、ピンセットで根端を軽く叩きながら細胞がバラバラになるように展開し、さらにカルノア液を数滴滴下し風燥した。

染色は、プレパラートを1.0% (v/v) ギムザ染色液 (MERCK 社, 1/15Mリン酸緩衝液に溶解, pH 6.8) に40分間浸漬した後、軽く水洗し、風乾後キシレンで封入し光学顕微鏡で観察した。

## 結果と考察

調べたすべてのラン科植物においてポリソマティーが確認された。そこで、最低の倍数性が見られる組織、*Cymbidium* の場合は若い葉の基部組織、*Dendrobium* の場合は根端あるいは葉を使って分析を行った。

*Cymbidium* の分析結果では、染色体を調査した原種はすべて2倍体であったが、DNA含量に違いが見られた。*Cym. pumilum* (syn. *floribundum*) ではピーク位置が60程度と低いものに対して、他のものではピーク位置が80-120程度と高DNA含量側にずれ、とくに *Cym. aloifolium* では157.55と最も高い値を示した (表1)。

*Cym. pumilum* の交雑種 (Katydid 'Yasuko Oji', Oiso 'Line No Homare', Olymilum 'White Elf', Pipeta 'No. 4', Sweetheart 'Hakuun', Wakakusa 'Kinryu' など) においてはDNA含量は両親の中間に位置し、妥当な結果となっていた (表1)。その他の交配種においては、ピーク位置は段階的に100前後、150前後、200前後に見られるものが多く、これは倍数性レベルの2倍体、3倍体、4倍体に対応しているものと考えられた。この他に、ピーク位置が多少ずれるものも見られ、これは異数性による可能性が考えられるが、染色体を観察しないと断定は出来ない。

*Dendrobium* の分析結果では (表2)、ピーク位置が70前後に見られた原種は、染色体を調査したものはすべて2倍体であった。交配種のDNA含量は、ピーク位置が70-80, 100-120, 150-170, 230-250, 300-380に見られた。これはそれぞれ2倍体、3倍体、4倍体、6倍体、8倍体に対応するものと推測された。しかし、6倍体と8倍体については最低のDNA含量レベルが検出出来ない可能性もある。これらの倍数性を決定するためには染色体を観察する必要がある。*Dendrobium* では *Cymbidium* に比べ、交雑種のピーク位置のばらつきは大きかった。この理由としては、*Cymbidium* の場合と同様に異数体の存在が考えられる。

以上のように、測定部位の選択、測定方法に改善の

余地はあるが、フローサイトメーターによって容易に倍数性レベルを調べられる。これは、従来は推定に留まっていた品種の倍数性レベルを知る事の出来る有効な手段となる。しかし、正しい結果を得るためには以下に示すような、幾つかの点に注意しなければならない。

**測定部位の選択**；*Cymbidium* の場合は葉の先端で測定した場合、明瞭なピークが得られなかった。根端を用いた場合、鉢から株を抜かなければならないため母株を傷める危険性が存在する。また、染色時間を長くしないと最低のDNA含量ピークが得にくい傾向にあった。しかし、本実験で用いた芽欠きリードの葉の基部は測定が容易で、この分析に適した部位と考えられた。*Dendrobium* の場合は、葉の先端、根端いずれにおいても分析可能であった。今回の供試植物では、以上に述べたような試料が得られれば倍数性の検定は可能であろう。

**核単離時間**；検出できるピークの数にはA液処理時間によって異なる場合があった。*Ble. striata* や *P. obconica* では処理時間が30秒程度と短くても明瞭なピークが得られたが、*Cymbidium* では処理時間を長くしないとピークは得られなかった。したがって、材料によってはこの処理時間を検討しなければならない。

**内部標準になる基準植物の選択**；測定装置の不安定性によるピーク位置のずれを補正するために、内部標準として *Ble. striata* ないしは *P. obconica* の生葉を検体に混ぜて測定した。これらの生葉ではポリソマティーが観察されず、低い変動係数 (CV; coefficient of variation) 値の鋭いピークが得られた。また、本実験期間中を通して安定して材料を得られたことから、内部標準に適していたと考えられる。

**基本種の染色体数調査**；フローサイトメーターによる測定で得られる値はDAPI染色による相対DNA含量にすぎず、正確な染色体数を確定するものではない。したがって、代表的なものについては染色体観察により染色体数を確定する必要がある。その結果とフローサイトメーターの結果を総合し倍数性レベルが確定できる。

## 摘 要

倍数性に関する知見は品種改良にとって有用であるが、染色体調査による方法は、簡便さと迅速性に欠けるものである。フローサイトメーターによる方法では、染色体数あるいはDNA含量のわかった基本種と比較することにより、その倍数性あるいはDNA含量を短時間に知ることが出来る。本実験ではこの方法により、代表的なラン科植物の倍数性の検定を行った。

DNA含量は *Dendrobium*, *Cymbidium* の順で多くなった。*Cymbidium* の分析結果では、染色体を調査し

た原種はすべて2倍体であった。交配種においては、2倍体、3倍体、4倍体が確認できた。*Dendrobium* の分析結果では、一部の原種を除いて染色体およびフローサイトメーターから2倍体であることが確認でき、交配種は、2倍体、3倍体、4倍体が確認できた。

## 謝 辞

本実験に供試した植物は浅井大桂園、東海市農業センター、福岡洋蘭園、靄山農園から提供を受けた。また、フローサイトメーターは、池田理科のご好意により貸与され使用できたものである。この紙面を借りて謝意を表する。

## 引 用 文 献

青山幹男。1989. Karyomorphological Studies in *Cymbidium*

and its Allied Genera, Orchidaceae. Bull. Hiroshima Bot. Gar. 11: 1-121.

Jones, W. E. and A. R. Kuehnle. 1998. Ploidy identification using flow cytometry in tissues of *Dendrobium* species and cultivars. *Lindleyana* 13 (1): 11-18.

服部慶俊・狩野邦雄。1965。洋らん。P. 102-104。保育社カラーボックス。

三位正洋・三柴啓一郎・徳原憲。1997。コショウランの polysomy と倍数体の識別。育種学雑誌47 (別2) : 373。

三柴啓一郎・三位正洋。1999。植物研究への応用 中内啓光監修 フローサイトメーター自由自在。秀潤社

Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1991. 染色体リスト (その調査と染色体数)。市橋正一編集。ランの生物学II。誠文堂新光社。

(平成12年9月11日受理)