

# ファレノプシスの組織培養による大量増殖について

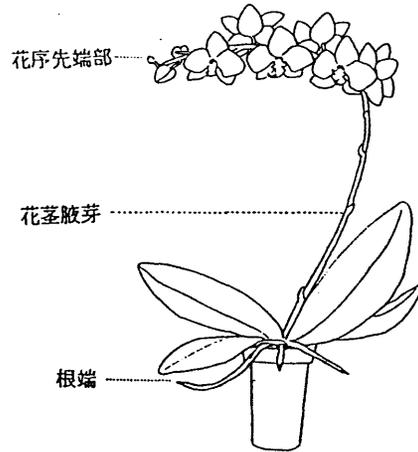
小林光子・米内貞夫

## I 緒 言

本県のラン生産は近年急速に伸びているが、その中でもファレノプシスの占める割合は現在最も多く、1988年には栽培面積も約320 aに達しており、消費者の高級化志向を反映している。現在、これら流通しているファレノプシスの大部分は実生由来のフラスコ苗であるため、遺伝的に固定されておらず、花色等のばらつきが多い。このため、近年組織培養によるクローン増殖法の研究が多く行われ始めた。

ファレノプシスの場合も他のラン科植物と同様に安定した増殖を図るためには protocorm (原塊体) と呼ばれる、胚発生的一段階に似た球状体 protocorm-like body (以下 PLB と略す) の形成が必要である。これらの研究の中には茎頂培養の報告<sup>4)</sup>もあるが、ファレノプシスは単茎ランであるため、できるだけ培養母株を損なわない方法が望ましい。そこで本報で採用した部位は1.花序先端部、2.花茎腋芽、3.根端(第1図参照)等である。特に、根端培養についてはこれまでに、フラスコ中の無菌株の根端を培養した報告<sup>12,10)</sup>はあるが、成株の根端を用いた報告はない。ファレノプシス成株の根端は採取できる数も多く、また、切除してもすぐその付近から新しい根が再生してくるため、母株にはほとんど影響を与えることなく利用できた。また、クリプトモスを殺菌処理し、培地の一部として利用したところ、良好な結果を得たので併せて報告する。

クリプトモス: 杉皮を細切し、繊維状にしたもので水苔に代わるものとして開発された。



第1図 供試部位

第1表 供試材料一覧

( ) 内は本報で用いた略称

白	系 ; <i>Phal. Wataboushi</i> (w) <i>Phal. Hisa Nasu</i> (H.N) <i>Phal. Morning Moon</i> × <i>Phal. Musashino</i> (M×M) <i>Phal. Hinamatsuri</i> (H) 品種名不詳 (p-8801)
ピンク	系 ; <i>Dtps. Happy Valentine</i> (H. V) <i>Phal. otohime</i> (ot) <i>Phal. (Coral Akillips</i> × <i>otohime</i> ) × <i>Phal. Musashino</i> [(C×O)×M] 品種名不詳 (p-8804) 品種名不詳 (p-8910)
白リップ紅	系 ; <i>Phal. Hisa Fantasy</i> (H. F) <i>Phal. Odoriko</i> (O). ( <i>Phal. Happy Valentine</i> × <i>Phal. Ground City</i> )(F×(H×G)) 品種名不詳 (p-8909)
黄	系 ; <i>Phal. Moon Light Toyohashi</i> ' <i>Hagimoto</i> 'BM/12woc(M) 品種名不詳 (p-8905)

## II 外植体からのPLBの分化と増殖

外植体の花序先端、花茎腋芽および根端を用いてPLBを誘導し、その効率的な増殖を促す条件を確立する。

### 1. 試験方法

#### 1) 供試材料

第1表参照。

#### 2) 試料の調製と殺菌方法

花序先端部はメスで花茎から切除し、70%エタノール溶液で30秒間、有効塩素0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で5分間殺菌した。さらに、滅菌水で3回洗浄してから、実体顕微鏡下で苞及び花芽に分化している部分を切除して置床した。

花茎腋芽は周囲の組織と共に花茎から削ぎ取り、花序先端部と同様に殺菌して苞葉を切除し腋芽を摘出、置床した。腋芽は花茎の上位から2~4節位のもので、外苞が厚くふくらみを持ったものを用いた。

根端は、鉢外に伸長した気根の先端10mm程度をメスで切り取り殺菌した。殺菌条件については次の条件-a, b, cの3方法について検討した。条件-a…界面活性剤(Tween20)約20ppmを入れた水道水で10分間攪拌し、70%エタノール溶液で1分間、有効塩素0.5%次亜塩素酸ナトリウム液で10分間殺菌。条件-b…界面活性剤で10分間攪拌、70%エタノール溶液で30秒間、次亜塩素酸ナトリウム溶液で5分間殺菌。条件-c…70%エタノール溶液で30秒間、次亜塩素酸ナトリウム溶液で3分間殺菌。それぞれ最後に滅菌水で3回洗浄した(第2図参照)。

通常は条件-bの方法で殺菌を行ったが、殺菌操作中に切断面からの脱色が進み始めた時は処理時間を短縮し滅菌水で洗浄した。図中のPは切断面を流動パラフィンでコーティングして殺菌操作を行ったものである。この時の供試材料は*Dtps.Happy Valentine(H.V)*, *Phal.Wataboushi(W)*, *Phal.Hisa Nasu(H.N)*をそれぞれ

用いた。

殺菌処理後はメスで切断面からの脱色部位を切り落とし、切断面を下にして培地に置床した。

### 3) 培地組成の検討

基本培地にはMurashige & Skoog (MS) 培地<sup>10)</sup> 修正MS培地(1/2MS, 1/3MS), クリプトモス培地及びHyponex (N, K, P=6, 6, 6) 培地を培養ステージに応じて用いた。この中で1/2MS, 1/3MS, はMS培地の主要無機塩であるKNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の濃度をそれぞれ1/2, 1/3の濃度に修正したものである。

PLB形成に適したMS培地の主要無機塩濃度とショ糖濃度について検討し第2表に示した。この時の供試材料は*Dtps.Odoriko(O)*, 培地条件はBA 1 mg/ℓ, NAA0.01mg/ℓ, gellangum (GELRITE)0.2%であった。培養条件は25℃, 3,600lx, 12hrs/dayの照明で行った。また, PLB分化を左右する植調物質の種類と濃度については6-Benzylaminopurine (BA), とα-Naphthalene acetic acid (NAA) をそれぞれ第3表に示す濃度で用い、個体分化率及び分化個体の増殖率等について調べた。この時の供試品種は *Dtps.Hisa Fantasy (H.F)*, 培地条件は1/3 MS, ショ糖 0.5%, GELRITE 0.25%, 培養条件は25℃, 3,600lx, 12hrs/dayの照明で行った。これらの植調物質はPLBが分化するまでの期間のみ使用し, PLB分化後は植調物質は全く用いなかった。

均質に増殖したPLBを1/2MS, MSのそれぞれ液体培地, 個体培地で培養し, 生体重の推移からPLBの増殖に適した培地を検討した(第3図参照)。この時の供試材料はP-8801で培養条件は25℃, 3,600lx, 12hrs/dayの照明で行った。また, 10ppm程度のAdenineの添加により, PLB分化率が向上するとの報告<sup>12)</sup>に基づき, Adenineの影響を調べた。Adenineの濃度は0, 10, 50, 100, 200mg/ℓの5水準に設定し,

ファレノプシスの組織培養による大量増殖について

他の培地条件は1/3MS, BA5.0mg/l, NAA 0.05mg/l, ショ糖0.5%, GELRITE 0.25%とした。供試材料は*Phal. Morning Moon* × *Phal. Musashino* (M×M)と*Phal. (Coral Akillips* × *otohime)* × *Phal. Musashino* [(C×o)×M]の根端を用い、培養条件は25°C, 3,600lx, 12hrs/dayの照明で行った(第4表参照)。

pHはHyponex培地以外は全ての培地で5.6とした。

ゲル化剤として用いたGELRITEはMS培地の場合0.2%, 修正MS培地の場合0.25%の濃度で用いた。

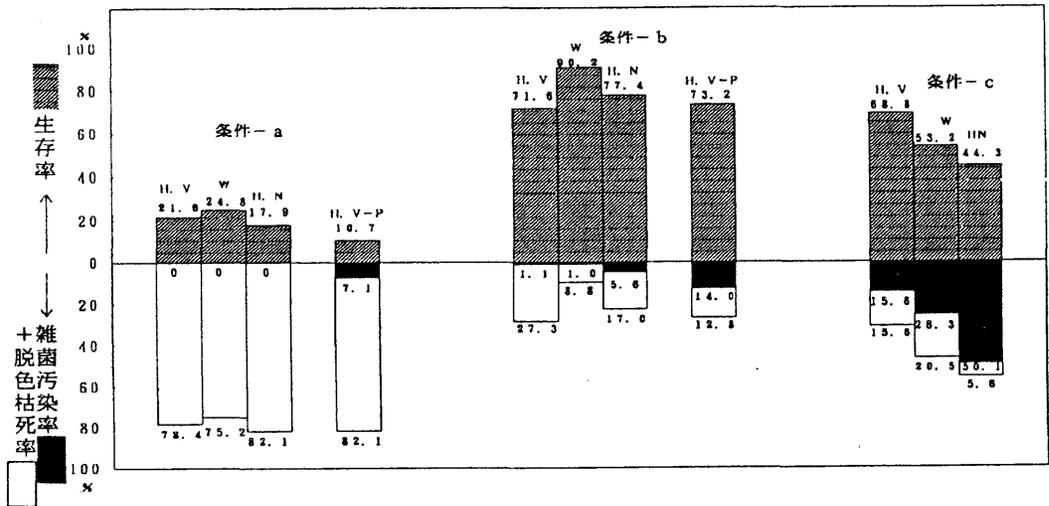
またファレノプシス培養による培地成分の変化を調べ、第8表に示した。用いた供試材料は*Phal. Moon Light Toyohashi 'Hagimoto'* B M/12(M)の幼苗(最大葉1~3cm)を500ml培養びんあたり20本。培地は1/2MS, MSのいずれの場合もショ糖3%, GELRITE 0.25%であり、培養期間は28~90日間であった。測定成

分はpH, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>であり、分析方法はCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>については原子吸光分光光度法, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>についてはイオンクロマトグラフィーにより行った。

3) 培養条件の検討

(1) 光条件

PLBが形成されるまでの期間, 暗黒下での培養条件と3,600lx, 12hrs/day照明下での培養条件についてPLB形成率の比較を行った(第6表参照)。供試材料は*Phal. Morning Moon* × *Phal. Musashino* (M×M), *Phal. (Coral Akillips* × *otohime)* × *Phal. Musashino* [(C×o)×M]及びP-8905-iの根端を用いた。培地条件は1/3MS, BA5.0mg/l, NAA0.05mg/l, ショ糖0.5%, GELRITE 0.25%で培養した。明区で培養したものは培養期間中, 3,600lx, 12hrs/day照明としたが, 暗区で培養したものはPLBの分化を認めた時から50lxの弱光下で



第2図 ファレノプシス根端の殺菌条件が生育に及ぼす影響

- 注1. 生存率は置床1週間後の調査  
 2. Pは流動パラフィンでコーティングしたもの  
 3. 条件-a: 界面活性剤(Tween20)約20ppm 10分間, 70%エタノール 1分間, 0.5%次亜塩素酸ナトリウム10分間  
 条件-b: 界面活性剤(Tween20)約20ppm 10分間, 70%エタノール 30秒間, 0.5%次亜塩素酸ナトリウム 5分間  
 条件-c: 70%エタノール 30秒間, 0.5%次亜塩素酸ナトリウム 3分間

培養し、約1ヵ月後に明区と同じ条件下での培養に移した。

(2) 温度条件

培養期間を通して25°Cで培養を行った。培養温度がPLBの増殖に及ぼす影響を調べるため、通常の25°Cの他に20°C、30°Cの温度条件において1か月間PLBの培養を行い生体重の変化を測定し、増殖率を検討した(第7表参照)。供試材料はP-8804のPLBを用い、培地条件は1/2MS、シヨ糖3%、GELRITE 0.25%、培養条件は3,600lx、12hrs/day照明で行った。

2. 結果及び考察

1) 試料の調製と殺菌方法

ファレノブシス根端の殺菌条件と1週間後の生存率について第2図に示した。図中の殺菌条件-aの場合、流動パラフィンを切断面にコーティングをしなかったものは、殺菌は完全にはできなかったが、切断面からの脱色による枯死数が70%を超えた。また同条件-cの場合、条件-aと

は反対に殺菌による脱色は少ないが雑菌の発生が15~50%あり、殺菌は不十分であった。条件-bの生存率は各品種とも70%以上で最も高く、雑菌の発生は14%以下であった。品種、栽培管理等によって若干の差はあると思われるが、本報では根端の殺菌方法は条件-bに準じて行うこととした。なお、切断面をパラフィンコーティングした事による脱色進行の抑制効果はあまり見られなかった。切断面とパラフィンとの臨界面にある雑菌を完全に除けなかったと考えられたためパラフィンによる処理は行わないこととした。

2) 培地組成の検討

*Dtps.Odoriko*の根端を用いてPLB分化に適した基本培地とシヨ糖濃度について検討した結果が第2表である。

基本培地、シヨ糖濃度とも最も低い1/3MS、シヨ糖濃度0.5%区の分化率が40%で最も高かった。ただし、低濃度の場合は置床12か月後の分

第2表 根端培養における基本培地とシヨ糖濃度の検討

基本培地	シヨ糖濃度%	供試数	分化に至った数				計	分化率%	12か月後の増殖個体数	増殖倍率
			~1か月	~2か月	~3か月	計				
MS	0.5	20	0	1	2	3	15	144	48	
	1.0	"	0	0	1	1	5	24	24	
	3.0	"	2	0	0	2	10	300	150	
	計	60	2	1	3	6	-	468	-	
1/2MS	0.5	20	0	4	2	6	30	88	2.9	
	1.0	"	1	2	0	3	15	142	47.2	
	3.0	"	1	0	0	1	10	191	191	
	計	60	2	6	2	10	-	421	-	
1/3MS	0.5	20	0	7	1	8	40	72	9.0	
	1.0	"	0	2	2	4	20	103	25.8	
	3.0	"	0	2	0	2	10	240	120	
	計	60	0	11	3	14	-	415	-	

注. 増殖倍率: 分化個体当たりの増殖倍率

化個体数は72本にとどまったのに対し、濃度3.0%区は300本と最も多い結果となった。これらのことから基本培地及びショ糖濃度については、材料が豊富にあるかどうか、できるだけ短期間に分化個体を得たいか等によって適した濃度を選択することが望ましいと思われる。本報では特に条件を記載した試験以外は1/3MS、ショ糖0.5%の濃度を基本的な分化培地として用いた。また、各供試部位に適した植調物質の種類と濃度について検討した結果が第3表である。植調物質としてはBA 0, 0.5, 1.0および5.0mg/lの4水準とNAA 0, 0.01および0.05mg/lの3水準を組合せて用いた。その結果、花序先端部はBAを添加しない場合にはまったく分化をみなかったが、BAが1mg/lになるとほぼ1か月以内に供試材料の80~100%からシュートの伸長が見られた。これらの個体は植調物質の入らないMS培地に移すとまもなく発根し、培養開始5~6か月で最大葉長が2~3cmとな

り馴化も可能となった。

ただし、花序先端部からの分化は外観上PLBらしいものは形成されず、分化個体数は供試個体あたりせいぜい1~数個体に留まった。これらは花序先端部の中で未分化の部分がシュートに分化したものと考えられる。

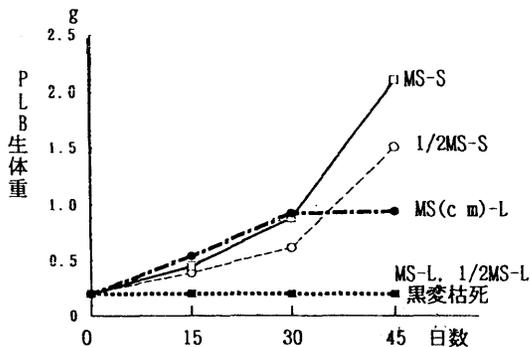
花茎腋芽は供試した部位の中では最も分化率が低く、分化に至るまでの日数も長かかった。しかし、花茎腋芽は植調物質を添加しない培地からも分化が可能であったことが注目される。根端部からの分化数はBA濃度に影響されBA濃度の低い0~0.5mg/lの条件下では全く分化個体は得られなかったが、BA濃度が5mg/lを超えると分化に至る根端は45~65%に達した。しかし、植調物質と変異発生率との関係が明らかになっていない時点では分化に必要な最少限の濃度と使用期間に限ることとした。また、BA単独区とNAA添加区とでは根端培養の場合添加区の方が高い分化率を示したが、花序先端部

第3表 分化培地における植調物質の検討

培養部位	植調物質		供試数	分化に至った供試数			分化率%	12か月後の増殖	
	BA mg/l	NAA mg/l		0~1か月	1~3か月	計		増殖個体数	倍率
花序先端部	0	0	5	0	0	0	0	0	0
	0.5	0	"	0	2	2	40	2	1
	1.0	0	"	1	4	5	100	8	1.6
	1.0	0.01	"	4	0	4	80	7	1.2
	5.0	0	"	4	1	5	100	8	1.6
	5.0	0.05	"	5	0	5	100	11	2.2
計	—	—	30	14	7	21	—	63	—
花茎腋芽	0	0	5	0	1	1	20	40	40
	0.5	0	"	0	1	1	20	17	17
	1.0	0	"	0	1	1	20	24	24
	1.0	0.01	"	0	2	2	40	19	6.3
	5.0	0	"	0	2	2	40	43	22
	5.0	0.05	"	0	1	1	20	23	23
計	—	—	30	0	8	8	—	175	—
根端	0	0	20	0	0	0	0	0	0
	0.5	0	"	0	0	0	0	0	0
	1.0	0	"	0	3	3	15	18	6
	1.0	0.01	"	0	7	7	35	66	9.4
	5.0	0	"	0	9	9	45	157	17.4
	5.0	0.05	"	1	12	13	65	350	26.9
	10.0	0	"	0	10	10	50	490	49
10.0	0.1	"	1	10	11	55	400	36.4	
計	—	—	160	2	51	53	—	1,481	—

第4表 AdenineがPLB分化に及ぼす影響

供試 品種	Adenine 濃度 mg/l	供試数	分化に至った供試数			分化率%
			0~1か月	1~2か月	計	
M × M	0	10	1	3	4	40
	10	"	3	3	6	60
	50	"	2	4	6	60
	100	"	2	2	4	40
	200	"	3	2	5	50
	計	50	11	14	25	-
(C × 0) × M	0	10	0	3	3	30
	10	"	1	2	3	30
	50	"	0	4	4	40
	100	"	0	2	2	20
	200	"	0	1	1	10
	計	50	1	12	13	-



第3図 PLB増殖培地の検討

注. 培地組成 : MS-S ..... MS, ショ糖3%, (固体)  
 1/2MS-S ..... 1/2MS, ショ糖3%, (固体)  
 MS-L ..... MS, ショ糖3%, (液体)  
 1/2MS-L ..... 1/2MS, ショ糖3%, (液体)  
 MS(c m)-L ..... MS, coconut milk, ショ糖3%, (液体)

と花茎腋芽では共にはっきりした差が顕れなかった。

これは根端試料が比較的均質であったのに対し、花序先端部と花茎腋芽は試料の大きさにばらつきがあったことに加えて試料数が少なかったためと思われた。

以上のような植調物質についての検討の結果、本報では花序先端部、花茎腋芽、根端部ともに分化培地についてはBA5.0, NAA0.05mg/lの濃度で試験を行うこととした。

また、PLB分化に対するAdenineの効果を調べるために第4表に示すような条件で交雑種の根端を用いて試験を行った。その結果、(M × M)は200mg/lまでのいずれの濃度水準でも無添加の区と同等かそれ以上の分化率であったが、(C × 0) × Mの場合は100mg/lを超えると枯死するものが増え分化率は20%以下に低下した。これらのことからAdenineに対する根端の感受性には系統間差があると考えられるが、この試験結果からは添加量として50mg/lが妥

当であると考えた。これらの結果から、PLBを効率的に誘導するための分化培地としては次のような培地組成が最適であると考えた。すなわち、基本培地は1/3MS、添加成分としてはBA5.0mg/l, NAA0.05mg/l, Adenine50mg/l, ショ糖0.5%, GELRITE 0.25%であり、pHは5.6とした。

次に、誘導したPLBの増殖培地について検討した結果が第3図である。固体培地と液体培地でのPLBの状態を観察すると、固体培地の場合、1/2MS, MSのいずれの培地でも濃い緑色の細かいPLBが増殖したのに対し、液体培地に供試した個体は増殖せずにやがて脱色枯死していった。ただし、液体培地の中でもcoconut milkを入れたMS培地は入れなかったものよりPLBは肥大し約1か月間は緑色を保っていた。

このように、ファレノプシスの場合、液体培養は適さないとの見地から、分化したPLBは植調物質を含まない1/2MS固体培地へ移した。固体培地上でも移植後数日ごろから植物と培地

の接触面から培地の黒変化が生じ始めるものがあるため、PLBの増殖が定常になってきたらMS培地60mlの表面にクリプトモス約1gを敷いてその上にPLBを置床した。

写真5に示したように、クリプトモス上に置いたPLBは30日程度の培養期間中、培地の変色はほとんど観察されなかった。幼苗も同様に、クリプトモスを敷くことにより、根はクリプトモスから培地中に伸びていくが培地の変色は起こらなかった。クリプトモス施用区と同無施用区の水素イオン濃度を比較したものが第5表である。クリプトモス施用区のpHが培養開始51日後でも4.88~5.44の範囲であったのに対して同無施用区のpHは2.88~3.12と、水素イオン濃度として約100倍の差があった。このことはクリプトモスを培地の表面に敷くことによって、植物体からの代謝物が直接培地に移行するのを妨げ、培地の変色も起こらないのではないかと推察した。馴化約2週間前からは、クリプトモスにHyponex(1/1,000に希釈)をしみこませただけの培地を用い、馴化に備えた。

第5表 クリプトモス施用が培地中の水素イオン濃度に及ぼす影響

クリプトモス施用の有無	No.	水素イオン濃度pH		備考 外観上の変化 培養51日目
		培養開始時	培養51日目	
未施用	1	5.60	3.10	黒変
	2	"	3.05	"やや溶解
	3	"	2.88	透明, 溶解
	4	"	2.98	黒変, やや溶解
	5	"	3.12	黒変
	6	"	2.97	透明, 溶解
施用	1	5.60	5.44	透明
	2	"	5.19	"
	3	"	4.88	"
	4	"	5.10	"
	5	"	5.38	"
	6	"	5.35	"

第6表 培養初期の光条件がPLB分化に及ぼす影響

明暗	供試品種	供試数	分化に至った供試数			分化率%
			0~1か月	1~2か月	計	
明区	M×M	20	3	4	7	35.0
	(C×0)×M	20	0	5	5	25.0
	p-8905-i	22	1	7	8	36.4
	計	62	4	16	20	-
暗区	M×M	20	5	3	8	40.0
	(C×0)×M	20	3	4	7	35.0
	p-8905-i	22	4	8	12	54.5
	計	62	12	15	27	-

注. 培養条件

明区; 3,600lx, 12hrs/day照明

暗区; PLB分化までは暗黒、PLB分化後1か月間は50lx, 12hrs/day照明. それ以降は明区と同じ条件

### 3) 培養条件の検討

#### (1) 光条件

第6表に示すように、培養開始1か月後の平均分化率は明区で32.2%、暗区で43.5%と暗区の方が約10%高い結果となった。1か月後の根端の表面は、明区で培養した場合、光を受けて濃い緑色であるのに対して暗区での培養した場合は、母体の根端も、分化してきたPLBも退色されて組織は軟化していた。このため、暗区では根端内部から分化が起こりやすくなり1か月未満の早期に分化するPLBが多かったと推察され、暗区での初期培養は有効であると考えられた。

第7表 培養中の温度がPLBの増殖に及ぼす影響

温度 °C	生体重 g, n=5			備考
	培養開始時	1か月後	$\sigma_n$	
20	2.0	5.2	0.65	-
25	"	9.4	3.50	-
30	"	1.2	0.54	培地の黒変化顕著

注. n は培養びんの数

(2) 温度条件

培養中の温度条件がPLBの増殖率に及ぼす影響を調べた結果が第7表である。20, 25, 30°Cの各温度条件下で生体重の増加率はそれぞれ2.6倍, 4.7倍, 0.6倍であり25°Cの条件がPLBの肥大及び増殖に最適であった。20°CではPLBの肥大は25°Cより少ないが小さいPLBが多数増殖し, 30°Cでは枯死するPLBが多く, 培地の変色も著しかった。

(3) 培養日数

増殖効率を上げるためには, 適当な時期に適切な培地に移植する方法をとるのが普通である。分化誘導では, PLBが分化するまでの間約30日ごとに同じ組成の分化培地に継代した。この時, 培地との接触面が黒化したり, 退色した場合は随時メスで取り除いてから新しい培地に移した。

分化したPLBはクリプトモスを敷いた培地の上にはほぼ一層になるように置床すると増殖率の高いPLBは約2週間で数層になった。

PLBから成長した幼苗を培養した場合の培地成分の変化を調べたものが第8表である。pH

は培地の変色の有無にかかわらず培養日数を経るに従って酸性側に傾いていった。陽イオンの中ではK<sup>+</sup>の減少が著しく, 1/2MS培地では28日目に培養開始時の90.6%, 63日目に47.2%, 90日目に9.0%に減少した。また, 2価の陽イオンであるCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>の濃度が1/2MS, MSともに初期の60%前後に減少するとGELRITEは溶解していった。陰イオンではCl<sup>-</sup>の減少は暖慢でMS培地では90日目でも培養開始時の99.1%であったが, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は20.2%, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>は全く検出されなかった。このように培地成分が初期値から減少したことについては1) 培養植物が吸収したか, 2) 植物からの代謝産物と不溶性の化合物を形成したこと等が推定された。

培地更新時期を植物必須の主要成分であるK<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の残存率を指標にするならば1/2MS, MS共にこれらの残存率が70%~80%となる28日以内が望ましいと言える。

幼苗は最大葉が2~3cmになると発根しているため馴化可能であった。しかしどの程度の生育ステージが馴化に最も適しているかは今後、馴化株の栽培試験の結果に経済性が加味されて

第8表 フェレノブシス培養による培地成分の変化

培地の種類	培養日数	分 析 項 目 mg/ℓ						
		pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
1/2MS	0	5.60	141 (100)	40.5 (100)	415 (100)	215 (100)	1,342 (100)	169 (100)
	28	4.26	165 (126)	46.3 (114)	376 (78.0)	218 (101)	1,285 (88.8)	170 (101)
	63	2.98	130 (92.6)	37.3 (92.1)	196 (47.2)	205 (95.3)	830 (61.8)	84 (49.7)
	90	2.75	72 (61.2)	24.9 (61.5)	37.4 (9.0)	163 (75.8)	224 (16.7)	0 (0)
	理論値	—	120	36.5	392	219	1,222	167
MS	0	5.60	116 (100)	45.3 (100)	960 (100)	230 (100)	2,655 (100)	182 (100)
	28	4.26	146 (109)	56.0 (124)	670 (79.4)	227 (98.7)	1,670 (72.0)	185 (102)
	63	3.30	86 (74.1)	38.0 (83.9)	660 (68.8)	242 (105)	1,519 (57.2)	149 (81.9)
	90	3.01	70 (60.3)	23.5 (51.9)	215 (22.4)	228 (99.1)	537 (20.2)	0 (0)
	理論値	—	120	36.5	784	219	2,444	167

注. ( ) 内は残存率

残存率: 培養前の各培地成分をそれぞれ100とした場合の培地成分の濃度比 (%)

選択されることになるだろう。

### Ⅲ 無菌植物体を用いた増殖法

ファレノプシスの無菌培養株の葉と根端から P L B を誘導し、増殖を図る。

#### 1. 試験方法

##### 1) 供試材料

(1) 同一 P L B 由来の無菌培養株の葉 (P-8910)

(2) 無菌培養株の根端 (H. V)

(3) 外植体の根端 (H. V)

##### 2) 試料の調製

(1) 最大葉長が 0.3~2.0cm に展開した株の最大葉をピンセットで茎から引き裂くように離し第 9 表に示すように各葉長ごとに培地へ置床した。

(2) 無菌培養株の根端約 5~6mm をメスで切り培地へ置床した。一方、殺菌処理の影響を調べるための無菌株の根端を 6~7mm の長さに切り、外植体の根端と同様に処理した。

##### 3) 培地組成及び培養条件

第 9 表、第 10 表の注) 参照。

#### 2. 結果及び考察

無菌培養苗の葉を用いて、無菌状態のまま再び P L B の分化を試みた結果、0.3~2.0cm の最大葉の中で 0.3~0.5cm の若い葉が最も多く P L

第 9 表 無菌個体の葉からの個体分化

区	葉長 cm	供試数	分化に 至った 供試数	増殖個体数	
				6か月後	12か月後
1	0.3~0.5	10	3	160	3,000
2	0.5~1.0	10	1	1	1
3	1.0~1.5	10	1	2	13
4	1.5~2.0	10	0	0	0

B を形成し、1.5~2.0cm の葉長からは P L B は全く分化に至らなかった (第 9 表参照)。

同様に無菌株の根端を切り取って、外植体と同じ条件で植調物質の入った分化培地に置床したところ、同一品種でも無菌の根端は外植体に比べて P L B の分化率は低く、P L B が形成されるまでに 2~4 か月かかった (第 10 表参照)。このため無菌株に同表に示すようないくつかの条件で P L B の誘導を検討した。その結果、外植体と同じ殺菌操作をすると P L B の分化率は向上し、分化に至る日数も早まった。これは殺菌中の刺激が P L B 分化に影響を及ぼしていたことを示唆している。また、UV 照射による刺激が P L B 分化を促すかどうか、i 置床後毎日 8 分間 UV 光源から 50cm 離して、ii 同様に毎日 15 分間、15cm の距離からそれぞれ直接受光させたところ、いずれの場合も根端の表面は固くなり、P L B の分化は阻害された。特に処理 ii で

第 10 表 無菌根端を用いた P L B 誘導条件の検討

供試根 端の別	処 理	供試数	P L B を分化した供試数					分化率%
			1か月	1~2か月	2~3か月	3~4か月	計	
	無処理	20	0	0	1	2	3	15
無菌 根端	殺菌処理	20	0	3	3	0	6	30
	UV-1	20	0	1	1	0	2	10
	UV-2	20	0	0	0	0	0	0
	暗黒処理	20	1	4	2	0	7	35
	外植体の根端	19	0	5	4	2	11	58

注 1. 供試材料: *Dtps. Happy Valentine* (H. V)

2. 処理条件: 殺菌処理…外植体と同じ条件 (II, 1, 2) の条件-b) で殺菌処理  
 UV-1 …置床後毎日 8 分間, UV 光源から 50cm 離れた場所で受光  
 UV-2 …置床後毎日 15 分間, UV 光源から 15cm 離れた場所で受光

は全く、PLBの分化には至らなかった。培養初期の暗黒処理では、培養後2週間ごろから先端部が軟化し、数週間から3か月でPLBを分化し、分化率、分化までの日数ともに無処理の場合に比べて向上した。しかしこのような処理を施しても無菌根端からのPLB分化は外植体に比べて劣った。

#### IV 総合考察

ファレノプシスの組織培養に関するこれまでの報告では、培養に供する部位として花茎<sup>12)</sup>、花茎腋芽<sup>1)</sup>、葉組織<sup>7)</sup>、黄化徒長茎<sup>8)</sup>、花序先端部(花茎頂芽)<sup>2)</sup>、根端<sup>9, 1, 2, 10)</sup>等が用いられていたが、これらのうち、根端は全て無菌株の根端が用いられていた。

本研究では成株の花序先端部、花茎腋芽および根端を用いて大量増殖技術を検討し、ファレノプシス苗生産の実用技術を確立することを目的とした。このうち本報では特に根端を利用した大量増殖法を中心に、in vitroでの分化、増殖についての検討を行った。

ファレノプシスの場合の培地組成に関する報告は、他のランの培地組成と同様に多岐にわたっている。Hyponex<sup>1, 10)</sup>、MS<sup>7)</sup>、Vacin. Went<sup>2, 8)</sup>、homal<sup>8, 10)</sup>等が主な基本培地として報告されているが本研究ではMS培地を培養植物の成育ステージに応じ修正して用いることを検討した。材料の‘置床-分化-増殖-馴化’という培養の流れの中で培養初期は暗黒下で、比較的貧栄養状態の中で植調物質による分化を誘導し、PLBが形成されたら植調物質を除き、次第に富栄養化の培地条件に移行させた。そこで増殖と個体の生長を充分に行い、最終的に馴化約2週間前頃から馴化後の栽培環境に近づけ再び貧栄養状態の中で光合成への自立を促した。

この間問題となるのはカトレアの培養時における阻害要因と同じく培地の変色<sup>3, 5, 6)</sup>である。カトレアの場合、褐変化が培養時期によって異

なるとの報告<sup>6)</sup>もあるが、第11表に示したように季節による変動よりも培養部位による差が大きかった。最も変色のおこる部位は花序先端部であり、変色率の低い部位は根端であった。同

第11表 培養30日後の培地の黒変率

置床 月日	供試 部位	明暗培 養の別	供試数	黒変程度			黒変率 %
				-	+	++	
第1回 2/9	花序	明区	10	0	0	10	100
	先端	暗区	10	1	0	9	90
	花茎	明区	10	1	5	4	90
	腋芽	暗区	10	0	7	3	100
第2回 5/9	根端	明区	20	19	1	0	5
		暗区	20	18	2	0	10
	花序	明区	10	0	0	10	100
	先端	暗区	10	0	2	8	100
花茎	明区	10	0	8	2	100	
	腋芽	暗区	10	0	7	3	100
根端	明区	20	20	0	0	0	
	暗区	20	19	1	0	5	

注1. 供試試料: *Phal. otohime*(ot)

2. 黒変程度: - 変色なし

+ やや着色, 培地は更新せず

++ 黒変化が進み, 培地を更新

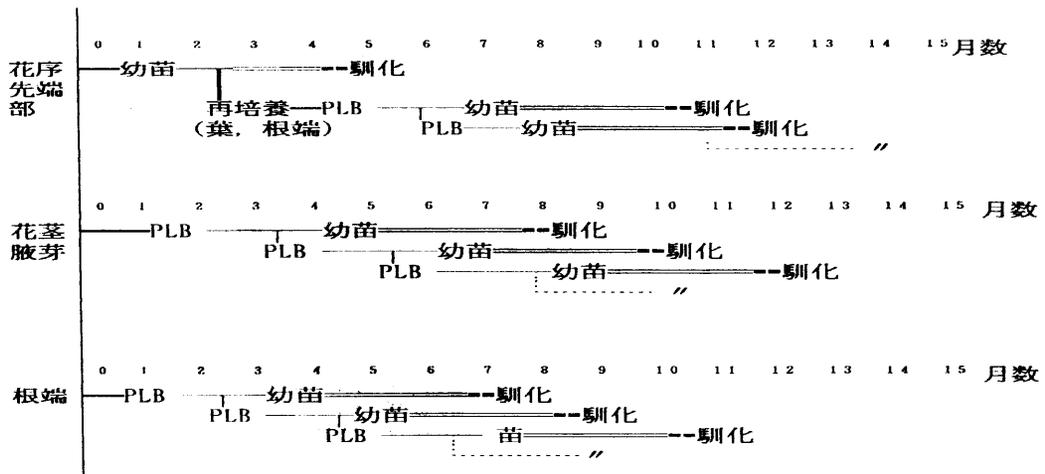
一株の根端でも培地が変色するものと約1か月間ほとんど変色しないものに分けられた。

培養初期に変色が観察された供試材料は早めに切断面の黒変化した部分を切除し、新しい培地に移植した。花序先端部は黒変しながら分化に至るものが多かった。

本報ではPLBの分化率の向上、増殖率の向上のために培養部位、培地組成、培養条件等について様々な検討を行い、第4図に示すように、それぞれの供試部位に適した培養条件がほぼ明らかにできた。

花序先端部のように、シュートへの分化率は高いが、増殖率が低い場合は分化した幼苗の葉や根端を再び植調物質を加えた培地で培養し、PLBの分化を促すことが可能であった。

ファレノプシスの組織培養による大量増殖について



第4図 ファレノプシス各部位の培養模式図

注. ——— 1/3MS, BA 5.0mg / ℓ, NAA 0.05mg / ℓ, Adenine 50mg / ℓ, ショ糖 0.5%, GELRITE 0.25%, 暗黒培養.  
 ——— 1/2MS, ショ糖3%, GELRITE 0.25%, 明培養.  
 ——— MS, クリプトモス, ショ糖3%, GELRITE 0.2%, 明培養.  
 - - - - - Hyponex, クリプトモス, 明培養.

PLBの増殖率を左右するのはPLBの分化後、植調物質を除いた培地へ移植した時に、不定胚が二次胚を形成して増殖するようにPLBが増殖に向かうか否かによって決まる。今後、同一条件で、PLBの分化増殖に関する品種間差について更に検討を加えたい。

また、組織培養による大量増殖法を生産現場に還元しようとする場合、増殖過程での変異発現の有無、変異率などが最終的には重要な問題となってくる。植調物質の使用を伴う組織培養由来の植物には遺伝的変異を伴う<sup>11)</sup>とされ、変異体を育種に利用することもされているがファレノプシスの場合、変異発現率まで調査した報告は非常に少ない。その中で、田中ら<sup>12)</sup>が420株について調査した結果全体の2.9%に肉眼で変異個体が認められた。また、香川県農業試験場で行った調査<sup>13)</sup>では2,596調査個体数のうち37個体に異常葉が観察され、系統別には2.5%~2.6%と比較的高い変異株出現率を示したという報告もあった。本研究では植調物質を全く用いず分化増殖した

花茎腋芽由来300個体と植調物質を用いた根端由来300個体について馴化し、開花検定のため養成中である。

組織培養による増殖個体の‘変異’については現在、必ずしも共通の認識があるとは言いがたい。今後、馴化した個体の開花検定にはできるだけ具体的な形質の差異を示し、変異の有無を明らかにしていきたい。

V 摘 要

成株の1.花序先端部, 2.花茎腋芽, 3.根端を用いた組織培養による大量増殖法を検討した。

1. 培養部位の中で、花序先端部は早期に、しかも高率で分化するが、増殖率は低かった。

花茎腋芽は分化率は低く、また分化までの時間はかかるが、植調物質を用いない1/3MS培地からもPLBが形成された。

根端は供試材料としては豊富であり、PLBの分化、増殖等からも最も適した材料であると考えられた。ただし、植調物質の加用下ではじ

めて分化（PLB形成）がみられ、馴化後の変異検定と併せて判断しなければならない。

2. 培養初期のPLB誘導条件としては、供試個体の栄養生長をできるだけ抑え、植調物質の効果を促進させる条件（低栄養、暗黒培養）が最も良い結果を得た。

植調物質の添加は全培養期間を通してPLBの分化までの期間とした。

3. PLBの増殖は‘ホルモンフリー’培地で可能であった。ただし、PLBの増殖については品種間に差があった。

4. 試験管内で分化した幼植物の葉と根端を用い無菌条件下で再び培養を行い、PLBを分化させることが可能であった。

5. 無菌培地としてのクリプトモスをPLB、幼苗、それぞれの育成ステージに合わせて使用したところ、培地の変色を回避することができ、生長も良好であった。

本研究の遂行に際して協力いただいた花き部の久地井主任研究員、栃木県洋らん生産者組合の皆様へ深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、有益な御助言を賜った方々に心から感謝の意を表する次第であります。

#### 引用文献

1. 古川仁郎、坂本立弥（1971）：ファレノプシスの花茎えき芽培養による繁殖。園学要旨昭46秋 278-279.
2. 本間義之、浅平端（1983）：ファレノプシス花茎先端部の培養による不定芽のPLB形成。園学要旨昭58秋 368-369.
3. 市橋正一、加古舜治（1977）：カトレヤの茎頂培養による栄養繁殖法に関する研究（第2報）カトレヤのかわ変現象について。園学雑. 46（3）：325-330.
4. Intuwong, O. and Sagawa, Y. 1974. Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot tip culture. Amer. Orchid Soc. Bull., 43 : 893-895.
5. 石井實（1980）：カトレヤの組織培養に関する研究（第2報）培養組織のかわ変防止法について。園学雑. 48（2）：199-204.
6. 石井實（1980）：カトレヤの組織培養に関する研究（第3報）かわ変前駆物質の季節的消長と活着率について。園学雑. 49（1）：127-131.
7. 狩野邦雄（1981）：PhalaenopsisおよびVandaの葉組織からの増殖の可能性について。園学要旨昭46秋 270-271.
8. 河瀬晃西郎（1987）：ファレノプシスの黄化花茎培養における培地組成の検討。園学要旨昭62秋 556-557.
9. M. E. Churchill, E. A. Ball and J. Arditti 1972 :Tissue culture of Orchids-I II, Methods for root tip., 41, 726-730.
10. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. ,15 479.
11. 小倉久和（1983）：植物組織培養と染色体変異〔1〕. 農業および園芸, 58 : 15-18.
12. 田中道男（1987）：組織培養によるファレノプシスの栄養繁殖に関する研究, 香川大学紀要49 : 85pp
13. 田中道男, 村口浩, 五井正憲（1987）：単茎性ラン科植物の組織培養による栄養繁殖に関する研究（第8報）Phalaenopsisの葉片培養により得られた植物体の花の形質。園学要旨昭62秋 560-561.
14. 米田和夫, 百瀬博文. 1988. ファレノプシスの根端培養について。日大農獣医研報, 45, 191-196.
15. 香川県農業試験場：葉片培養によるファレノプシスの大量増殖. 1-19. (1989)

Studies on the Vegetative Propagation of Phalaenopsis by Tissue Culture

Mitsuko KOBAYASHI and Sadao YONAI

Summary

The Methods for the vegetative propagation of phalaenopsis through inflorescence nodul buds, axillary buds and root-tips of mature plants were studied.

The results were as follows.

1. As compared with the other parts of material plants, inflorescence nodul bud differentiated direct plantlets at high percentage with short culture period, but those buds generally produced only a few plantlets.

Axillary buds differentiated protocorm-like-bodies(PLBs) even without growth regulator, but the differentiation rate was low and it took more than one month to differentiate.

Aerial roots of phalaenopsis demonstrated high percentage of differentiation and propagation. However those needed the presence of growth regulator, so its relationship with the occurrence of mutation is to be clarified.

2. In the examination of the medium condition for inducing PLBs, the most suitable medium was as follows.

1/3 MS		sucrose	0.5 %
BA	5 mg/ℓ	GELRITE	0.25%
NAA	0.05 "	pH	5.6
Adenine	50 "		

It revealed that low nutrition and culturing in the darkness increased the differentiation rate. Once PLBs were formed, they propagated and grew on hormonfree-MS medium with sucrose 3%.

When PLBs and plantlets were cultured in the presence of "Cryptomos" which is fibrous Japanese cedar bark, the browning of medium was almost inhibited and their growth was smooth.

{ Bull.Tochigi Agr.Exp. }  
{ Stn.No37:57~70(1990) }



写真1 分化し始めた根端



写真2 根端から分化したPLB

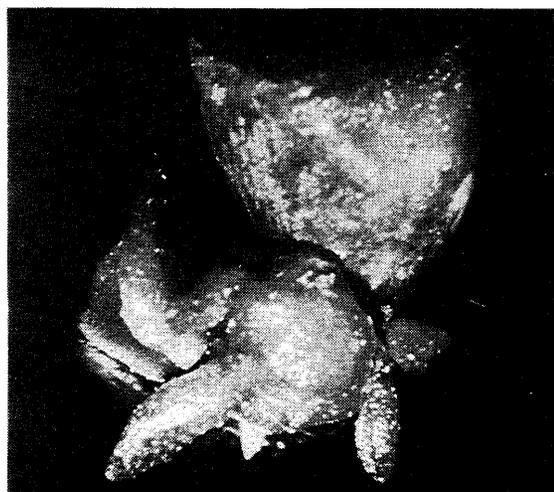


写真3 根端から分化した幼植物



写真4 増殖したPLB



写真5 クリプトモス施用区(左)と無施用区(右)



写真6 同一根端由来の開花株