

ファレノプシスの根端培養による大量増殖

1. 試験のねらい

現在、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していないものが多く、花色等のばらつきが大きい。ファレノプシス成株の根端を用いた大量増殖のための培養条件を検討した。

2. 試験方法

気根の先端約10mm程度をメスで切り取り殺菌した。殺菌条件が生存率に影響を及ぼすため、図-1に示すような検討を行った。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約6~7mmの根端の培地に置床した。

プロトコーム様球状体(PLB)を分化させるための培地条件として、基本培地とショ糖濃度、植調物質のナフタレン酢酸(NAA)、ベンジルアデニン(BA)およびアデニンの濃度について検討し、その結果を表-1、表-2、表-3に示した。

PLBの増殖および幼苗の育成にはクリプトモス(杉皮を繊維状に細切し、水苔の代用として開発された植え込み素材)を滅菌してMS培地上に添加し用いた。馴化2週間前には幼苗をクリプトモスにハイボネックス(N:K:P=6:6:6)1/1,000溶液をしみ込ませた培地に移し馴化に備えた。

3. 試験結果及び考察

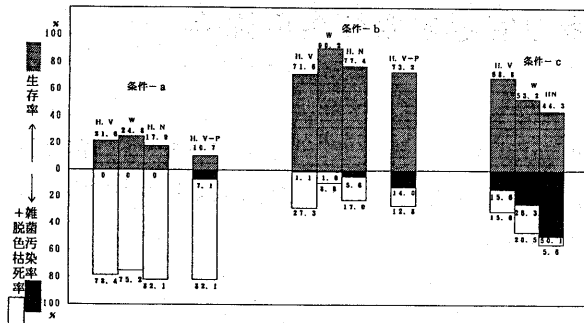
殺菌条件は最も生存率の高い図-1の条件-bに準じて行うこととした。表-1、表-2、表-3等で示した培地条件の検討結果からPLBを効率的に誘導するためには次のような培地組成が最適であると考えた。基本培地は主要無機塩の硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、リン酸二水素カリウムの濃度を1/3に改変したMS培地、BA 5mg/ℓ、NAA 0.05mg/ℓ、アデニン 50mg/ℓ、ショ糖0.5%、ゲルライト0.25%、pHは5.6に調整した。初期の培養は25℃、暗黒下の条件が明条件下よりPLBの分化が早く、分化率が高かった。PLBの分化は早いもので置床後約2週間頃から起こり、図-2に示すように多くは根の先端近くから分化してきた。このように培養初期は比較的低栄養条件、暗黒下で、根端の栄養生長を抑え、植調物質による分化を誘導した。PLBが形成した後は植調物質を全く使わずに順次、富栄養化の培地条件に移行させ、ショ糖3%のMS培地中でPLBの増殖と個体の生長を充分に行い、最終的に馴化2週間前頃から馴化後の栽培環境に近づけるためショ糖を除き、クリプトモスとハイボネックスのみの培地に移した。

また、増殖個体の花色等についての均質性を調べるため現在600個体を馴化養成中である。

4. 成果の要約

ファレノプシスの根端は数も多く、切除しても母株にほとんど影響を与えることなく利用できた。上記の培養条件で、約50%前後の根端からPLBが分化した。クリプトモスを培地に用いることによって図-3に示すように培地の変色を回避することができPLBおよび幼苗の生育も良好であった。

(担当者 生物工学部 小林光子)



- 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

図-1 殺菌条件が根端の生育に及ぼす影響

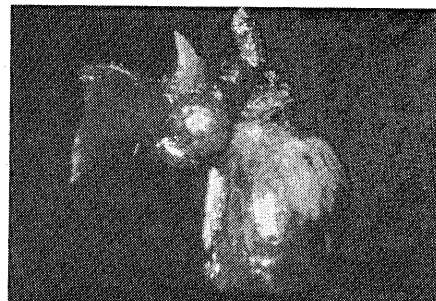


写真1 根端から分化したPLBと幼苗

表-1 基本培地とショ糖濃度がPLB分化に及ぼす影響

基本培地	ショ糖濃度 %	供試数	分化に至った数					12か月後の増殖個体数	増殖倍率
			0	1	2	3	4		
MS	0.5	20	0	1	2	3	15	144	48
	1.0	"	0	1	1	5	24	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	47.3
	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

表-3 アデニンの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×o)×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	—

表-2 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か月後の増殖個体数	増殖倍率
	BA mg/ℓ	NAA mg/ℓ		0~1 か月	1~3 か月	計			
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	—

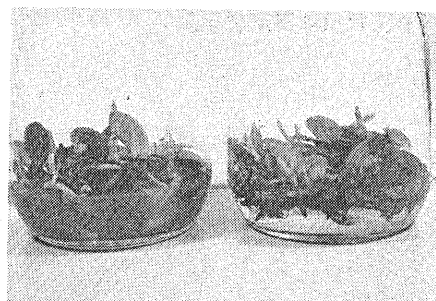


写真2 左が無処理、右がクリプトモス