

## グロリオーサとエビネにおける組織培養苗生産方法の確立と実用化\*

山本昌生<sup>1)</sup>

### Establishment of the methods for micropropagation and practical cultivation of the propagated plantlets in *Gloriosa* (Colchicaceae) and *Calanthe* (Orchidaceae)\*

Masao Yamamoto<sup>1)</sup>

#### Summary

Tissue culture is very effective for the rapid and mass propagation of plants, but many species are still difficult to propagate by this technology. In this study, *Gloriosa* and *Calanthe*, which have been recognized to be inefficient or hard to propagate by both conventional and tissue culture methods, were subjected to the tissue culture studies to establish efficient and practical methods for propagation and acclimatization, and to confirm the possibilities for the occurrence of somaclonal variations and virus elimination.

In *Gloriosa rothschildiana*, procedures for the micropropagation and cultivation of microtubers to flowering were established in this study. Both meristem and young shoot base explants were cultured on MS medium supplemented with 4.0 mg l<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA, which resulted in the production of 5.0 and 47.2 shoots per explant, respectively, after 150 days of culture. Shoot multiplication of 2-3 times was successfully achieved by subculturing the excised shoots onto the same medium. During the subcultures, microtubers were formed at the base of each shoot by prolonged intervals of the subculture on the same medium. Approx. 85% of the microtubers of over 1 g thus produced successfully sprouted in *ex vitro* condition by the thermal treatment of 8°C for 2 weeks, followed by 30°C for 13 weeks. These results suggest that low temperature (8°C) was effective for breaking the dormancy of buds and high temperature for promoting the growth of buds. Sprouted tubers grew normally after planting in soil, and 80% of over 5 g tubers collected after 2 cycles of cultivation successfully produced flowers. No appreciable change was observed in the morphology including flower characters of the micropropagated plants. These results suggest that the micropropagation method established in this study could be used as the practical propagation method in the commercial cultivation of *Gloriosa*.

In *Calanthe*, there have been no successful reports on propagation with tissue culture. By improving the sterilization method for initial culture of *Calanthe sieboldii*, microbial contamination was prevented at 6% or less in the meristems excised from November to May. In the liquid culture, survival rate of meristems in B5 medium was better than that in MS and 1/2MS medium. Survival rate of meristems was also affected by the strengths (1, 1/2, 1/4) of macro (-CaCl<sub>2</sub>), micro (+CaCl<sub>2</sub> and Fe-EDTA) and organic elements of B5 medium, and the highest survival rate was obtained when the concentration of micro elements (+CaCl<sub>2</sub> and Fe-EDTA) was reduced to the 1/4 strength of standard B5 medium. In this modified B5 medium supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> BA, mass of shoot primordia was produced from shoot meristem explants. Then protocorm-like bodies (PLBs) were obtained from the mass of shoot primordia after transplanting onto agar medium with the same composition. These PLBs were vigorously and rapidly propagated by culturing in the same liquid medium. After two months of culture in the liquid medium, the number and fresh weight of PLBs became about 11 and 10 times, respectively.

---

\* Contribution from the Hiroshima Botanical Garden No.98.

1) 広島市植物公園

Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden, No. 31 : 1-38, 2013

In the next step, the optimum ionic composition of medium for proliferation of PLBs was investigated by arranging systematic variations with 12 different ionic composition media (Ichihashi 1992a) with the use of PLBs induced from shoot meristem tip culture of *Calanthe aristulifera* and *C. striata*. The growth of PLBs was inhibited by higher  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  ratio, but promoted by higher ratios of  $\text{K}^+$  and  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Calculated optimum cationic composition for *C. aristulifera* and *C. striata* were  $\text{NH}_4^+ : \text{K}^+ : \text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+} = 10.4 : 70.0 : 9.6 : 10.0$ , and  $10.9 : 68.1 : 11.0 : 10.0$ , respectively, and optimum anionic compositions were  $\text{NO}_3^- : \text{H}_2\text{PO}_4^- : \text{SO}_4^{2-} = 42.1 : 43.7 : 14.2$ , and  $43.0 : 42.9 : 14.1$ , respectively. It noted that  $\text{NO}_3^-$  was about half and 12-fold strength of  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  in comparison with control B5 medium with 1/4 micro elements.

Somaclonal variations in flower characters were investigated on 100 micropropagated *C. striata* plants. No obvious variations in flower shape and color were observed except two plants, which had larger and thicker flowers than original plants. These two variants were revealed to be tetraploid by flow cytometric analysis on relative nuclear DNA contents.

## 緒 言

### 本研究の背景 — 植物組織培養による増殖

植物の増殖方法として、種子による有性繁殖と株分け、挿し木（挿し芽）・取り木など植物体の一部を利用した無性繁殖（栄養繁殖）がある。種子による繁殖は、大量かつ一斉に増殖させる方法として有効である。しかし、種子繁殖は自家受粉が可能な植物の自殖を繰り返した種子の場合、またはF1雑種による種子の場合は、かなり均一な形質を有するが、両親が異なる場合など一般にヘテロ性が強く、形質にばらつきが出る。

一方、無性繁殖は遺伝的に同一であり、均一な形質をもっている。そのため、多年生草本や樹木に於いては、品種の特性を維持するためには不可欠な手段となっている。この繁殖方法の一つに、植物の組織を無菌的に、容器内で増殖させる組織培養という方法があり、株分け等では増殖困難な植物や短期間に大量に増殖させたい植物に利用されている。Morel and Martin (1955) がジャガイモを材料とし、また Morel (1960) がシンビデュームを材料として組織培養への取り組みが始まった。この分野は、研究が進み、多くの植物が組織培養により増殖が可能となり、商業的に利用されているが、まだ培養法が確立されていない植物も多い。

花き類の中では、高価で増殖しにくいラン科植物において茎頂培養が始まり、ウイルスフリーと大量増殖の両面から組織培養が行われている。カーネーション、カスミソウ、デルフィニウム、アルストロメリア、スターチス、ユリ、ガーベラなどで培養技術により苗生産が行われている（大澤 1994）。ここでは栽培下では増殖しにくく、切り花として大量

に生産されているが、新品種開発後の大量増殖に課題のあるグロリオサ (*Gloriosa*) と今後有望な花きと考えられるエビネ属 (*Calanthe*) について、組織培養を利用した増殖方法を検討したので、その結果を報告する。

### ① グロリオサ (*Gloriosa*)

グロリオサは、イヌサフラン科の半つる性植物で、南アフリカと東南アジアに5～6種類が分布している (De Hertogh and Le Nard 1993, Erhardt *et al.* 2002)。地下に塊茎を持つ多年草である。インドでは薬用植物として利用されており、さらにコルヒチンを生産する植物としても利用されている。花が美しく、輝くような色彩と大きく特異な形から、観賞用植物として鉢植え、切り花として人気があり、広く普及している。

従来は *rothschildiana* 種や *superba* 種、*superba* var. *lutea* 種などに分類されていたが、最近ではすべての種が *superba* 種とされている (二宮 2010)。しかし、本報では研究時に導入した種名である *rothschildiana* 種及び *superba* var. *lutea* 種として扱った。

*Gloriosa* の一種である *G. rothschildiana* は特に花が大きく、切り花として大量に栽培され、流通している。高知県では年間554万本の切り花が出荷された (中国四国農政局高知統計・情報センター 2004)。さらに高知県、愛知県などの産地では品種改良も熱心に行われ、花色も従来からの赤色と黄色の複色タイプだけではなく、ピンク系、オレンジ系の品種もあり (石井ら 2009)、白色系の品種も開発されている。繁殖は種子による有性繁殖、塊茎の分

割による無性繁殖が行われているが、挿し木はできない。種子繁殖は、大量に増殖するのに適しているが、遺伝的に均一ではないため、花の色や大きさ、植物体の高さ、茎の硬さなどの形質にばらつきがある。また、播種から開花するまで2~3年を要する。一方、塊茎の分割による繁殖は遺伝的に同一であり、品種の維持には有効であるため、生産地では一般に行われているが、増殖率が低く、年に2倍程度しか増えない。最近、栽培塊茎を利用し、塊茎の発芽部分にカミソリ等で切り込みを入れ塊茎を増殖させる方法が報告されている(二宮 2010)。特別な技術や培養施設が不要であるため生産者レベルでの利用が期待され、培養で得られる塊茎よりも大きな塊茎が得られるが、増殖率は2~3倍であり、大量増殖には向かない。特に前述のような新品種を開発し、生産者に普及するためには、短期間に大量に増殖する方法を開発することが求められている。そのため、本研究では増殖の手段として組織培養の可能性を検討した。

## ② エビネ属の組織培養

エビネ属 (*Calanthe*) は約 185 種からなる属で (Kurzeil 2007)、多くは美しい花をもつため、観賞価値が高い。日本には 21 の分類群が分布している (Karasawa and Ishida 1998)。しかし、環境の変化や開発、さらに多くの種が園芸的な価値をもつため人為的な採取により絶滅の危機に瀕している。そのため日本では、自生するすべての分類群が絶滅危惧種に指定されている (Environment Agency of Japan 2000)。その多くは春咲き種であり、その種や自然交雑の程度など自生地により花の色、花形、香りなどが異なっている。

これらの種や自然交雑種の豊富な遺伝子を利用し、特に花の形質に於いて幅広い変異をもつ多くの優秀な品種が種内及び種間雑種により作り出されている。しかし、これらの種は種子発芽が困難であり、この問題を解決するために無菌播種の方法が確立されてきた (Miyoshi and Mii 1995ab; 1988, Fukai *et al.* 1997, Park *et al.* 2000, Lee *et al.* 2007, Godo *et al.* 2009, 2010)。そして現在では、種子による大量増殖が比較的簡単にできるようになってきた。しかし、ほとんどの他のラン科植物と同様に播種から開花まで4年以上を要するため純系育種は難しく、すべての品種は遺伝的にヘテロな雑種である。その結果、多くの実生集団から選抜された優秀な個体の増殖は偽球

茎の分割という昔ながらの方法に頼っている。

ラン科植物において、*in vitro* による茎頂培養は、増殖したい優良個体の大量増殖に効率よく利用されている。特に商業的に重要なさまざまな着生ラン (例えば *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Cattleya*, *Phalaenopsis*) では茎頂培養または茎頂組織以外の組織培養は一般的な手段として多くの品種において実用化されている。しかしながら、*Paphiopedilum*, *Cypripedium*, *Calanthe* のような地生ランの増殖は未だに困難で、これらのほとんどの種では商業的に効果的な方法は確立されていない。エビネ属においては、組織培養に関するいくつかの試みが 1970~80 年代になされてきたが、増殖は 1 年に数倍程度で十分な成果は得られなかった (Tahara 1977, Shimasaki and Uemoto 1987)。最初の本格的な微細繁殖は Yamamoto *et al.* (1991) により、茎頂を外植体として液体培地に植え付け、回転培養することにより成功した。さらにこの方法を元に他の種にも適用した報告もある (Ishibashi 1993)。商業的に増殖されているラン、例えば *Cattleya*, *Cymbidium*, *Phalaenopsis* において培養変異は、増殖親とした個体とまったく同じ植物体を増殖させる目的のためには、しばしば深刻な問題となっている。そして遺伝子型 (genotype) により、培養変異の頻度に差があることが報告されている (Tokuhara and Mii 1998)。しかしエビネ属においては、変異についての報告事例はない。

培地組成は、*in vitro* 培養における植物組織の成長と発達のためには重要な要因であり、培養の結果は、培地の選定に左右される (Gamborg *et al.* 1976)。ラン科植物においても、さまざまな種類を材料としたクローン増殖や種子発芽のためにさまざまな培地が利用されてきた (Arditti 2008)。しかし、各々の植物に適する培地を明らかにすることは容易ではなく、ほとんどの組織培養の研究は普通によく使われる培地の中からよさそうな培地を選んで行われてきた。このような状況の中で、Ichihashi and Yamashita (1977); Ichihashi (1978, 1979, 1980, 1991) は、いくつかの種における種子発芽、実生の成長、カルス増殖のための好適なイオン組成や総イオン濃度、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の比率、陽イオンと陰イオンの比率について詳細な研究を行い、シラン、キバナセッコク、ツルラン、ガンゼキラン、コチョウランなどいくつかのランの成育のための培地において最適なイオン組成を明らかにしてきた。

永年性植物においてウイルス病は、品質や収量の

低下などを引き起こす深刻な病気である。ラン科植物においてもウイルス感染は、壞疽や病斑による品質の低下や成育不良を引き起こすため、深刻な問題となっている。現在、エビネ属においては、6属9種のウイルスが報告されている (Yamamoto and Ishii 1981, Inouye *et al.* 1982, Hammond and Lawson 1988, Inouye *et al.* 1988, Chang *et al.* 1991, Gara *et al.* 1998)。ウイルスに罹病した植物からウイルスを除去する方法については抗ウイルス剤の利用、高温処理、組織培養などいくつかの方法がある。また、種子繁殖ではウイルスが伝わらずウイルスフリーとなることも報告されているが (Kawakami *et al.* 2008)、まだ詳細は明らかではない。茎頂を利用した組織培養は、茎頂分裂組織にウイルス濃度が低いことから、ウイルスに罹病した個体からウイルスを除去するには有効な手段であり、実用化もされている。

以上の現状を踏まえて、第2章では、イヌサフラン科のグロリオーサロスチャイルディアナ (*Gloriosa rothschildiana*) の組織培養を利用した大量増殖法、*in vitro* で誘導した小塊茎の休眠打破による発芽条件を検討した。さらに、増殖した塊茎を圃場で栽培し、その成育状況を調査し、実用化への課題についても検討した。

第3章では、ラン科のエビネ属 (*Calanthe*) について、園芸化を進めるために、茎頂組織から PLB を誘導するための殺菌方法、誘導に適した培地の検定、PLB 集塊が増殖するための好適培地の検定、メリクロン増殖した個体の培養変異及びウイルスフリー化の検定について調査を行うことで、大量増殖技術の検討を行った。

最後に、総合考察として本研究から得られた知見をもとに、グロリオーサおよびエビネ属における組織培養苗生産の実用化と今後の研究の方向性、課題について述べた。

## 第1章

### グロリオーサ (*Gloriosa*) の組織培養

#### 第1節 初代培養における外植体の差

##### 緒言

*Gloriosa rothschildiana* の増殖について、Custers and Bergervoet (1994) は、塊茎の発芽部分または先端を外植体とし、N<sup>6</sup>-benzyl adenine (BA) を含んだ培地により、グロリオーサの *in vitro* 増殖に初めて

成功した。また Sivakumar and Krishnamurthy (2004) は *Gloriosa superba* を材料に塊茎からの芽、若い葉、茎などの各部位からカルスを誘導し、多芽体を形成させた。これらの報告から、*Gloriosa rothschildiana* についてはさまざまな部位から増殖の可能性があるが、今回、組織培養に最もよく使われる茎頂組織、および茎頂組織を除いたその直下部分の茎 (幼芽基部) 組織の2カ所を供試材料とし、外植体として有効な部位の比較試験を行った。

#### 材料および方法

*Gloriosa rothschildiana* O'Brien の品種 'Philips Duphar' の塊茎を使用した。休眠打破した約 30g の塊茎から発芽した長さ 10-20 mm の発芽部分 (根原基を含む) を外植体とした (Fig. 1)。

0.1%の塩化ベンザルコニウムで10分間、1%の次亜塩素酸ナトリウムで5分間、70%エタノールで10秒間殺菌後、滅菌水で3回洗浄した。外側の葉鞘を取り除いた幼い芽を実体顕微鏡下でメスを使って、1~2枚の葉原基を含んだ長さ0.5mmの茎頂と直下にある5mmの長さの幼芽基部部分に分けた (Fig. 1)。17個の外植体をこの実験に用い、10mlの培地を含んだ管ビン (直径20mm, 長さ100mm) に直ちに上下方向を維持して植え付けた。培地は、BA 4.0 mg l<sup>-1</sup>, NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup>, ショ糖 30 g l<sup>-1</sup> を添加し、2 g l<sup>-1</sup> のゲランガムで固めた MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) とした。予備実験として、植物成長調整物質 BA 4.0 mg l<sup>-1</sup>, NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup> の代わりに Kinetin 2.0 - 8.0 mg l<sup>-1</sup>, BA 2.0 - 6.0 mg l<sup>-1</sup>, 2,4-D 0.2 - 2.0 mg l<sup>-1</sup>, NAA 0.1 - 1.0 mg l<sup>-1</sup> を添加し、シュート形成を比較した。pHは0.1と1.0NのNaOHまたはHClにより、5.7に調整し、オートクレーブにより120℃、15分間で高圧滅菌した。培養物は、23℃で16時間日長とし、白色蛍光灯により、光強度を54 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> とした。置床後に形成された10mm以上のシュートを培養75日後と150日後に記録した。

形成されたシュートの塊は、基部を分割せずに、1ヶ月おきに継代し、150日後にシュートの基部の部分をつかつかの塊に分割した。シュートは前述した初代培養に用いた培地70mlを分注した900mlのガラス容器 (高さ120mm × 直径70mm) で継代した。2年間およそ1ヶ月ごとの継代培養後、4ヶ月間継代培養せずに放置することにより、萎れた一部のシュートの基部に小塊茎を誘導した。得られた小塊茎は容器から取り出し、附着している茎葉と根を取り除き、流水で丁寧に洗った後、トレイ上に広げた

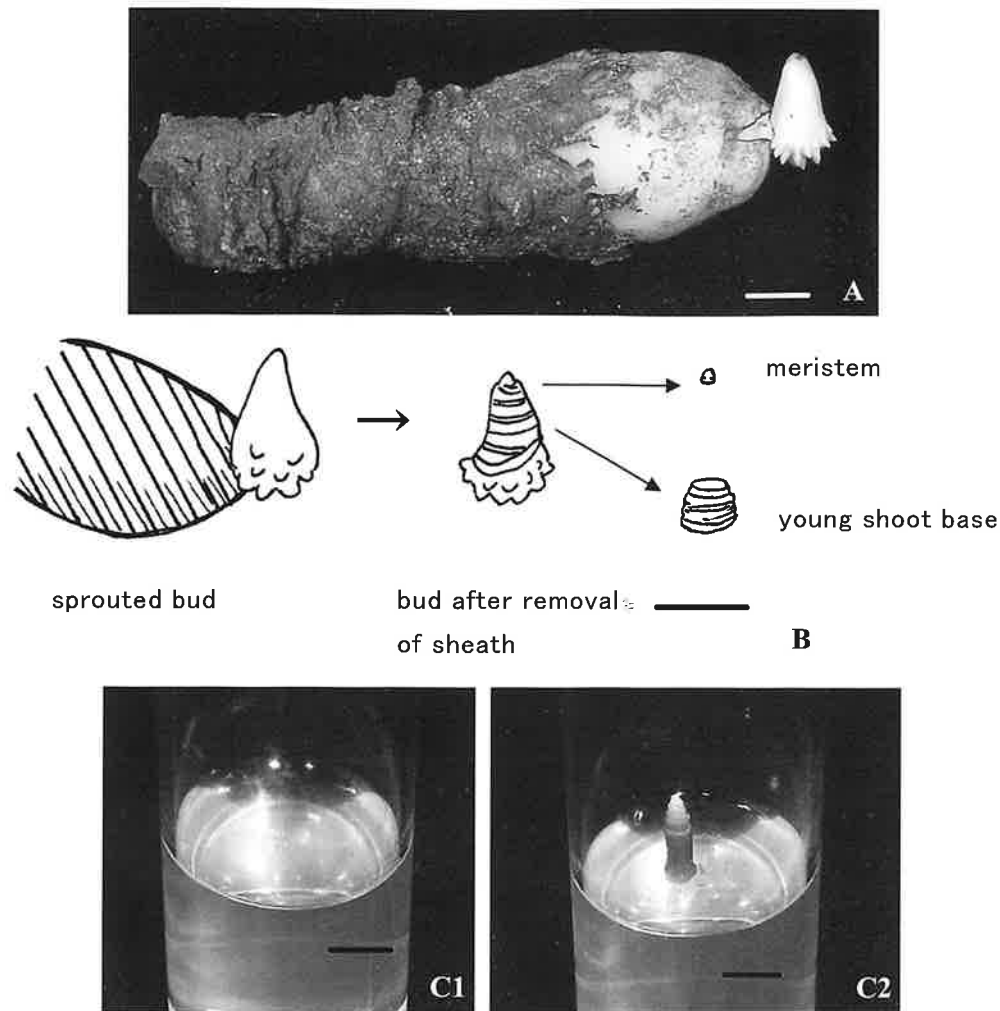


Fig. 1. Explants for micropropagation of *G. rothschildiana*.

A: A sprouted bud of tuber after breaking dormancy. Scale bar = 10 mm.

B: Illustration of explants for micropropagation of *G. rothschildiana*. Scale bar = 10 mm.

C1-C2: Explants just after planting on MS medium supplemented with BA 4.0 mg l<sup>-1</sup> and NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup>. C1: meristem, C2: young shoot base. Scale bar = 5 mm.

新聞紙上に3日間室温で乾燥させ、催芽処理の試験に用いた。

また、*Gloriosa superba* var. *lutea* を材料とし、今回の増殖法を適用した。外植体は、*G. rothschildiana* と同様に茎頂と幼芽基部を用い、殺菌方法、培地、培養条件についても同じとした。置床2ヶ月後と4ヶ月後に形成されたシュート数を調査した。

統計処理は、Studentのt検定により、 $p < 0.05$  で有意差を検定した。データは、平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。

#### 結果および考察

##### 2種類の外植体の成育の差

今回の殺菌方法により両方のタイプの外植体とも

雑菌によるコンタミは発生しなかった。75日間の培養後、茎頂は1本の通常のシュートしか形成しなかったが、シュート先端を除いたシュートの基部(幼芽基部)組織は、平均  $5.2 \pm 1.7$  本のシュートを形成した (Table 1, Fig. 2A)。幼芽基部が外植体の場合は、この組織の基部からだけでなく、上部からも複数のシュートを形成した (Fig. 2B1-B3)。上部からシュートを形成した場合は、継代時にその部分を切除し、シュートの基部組織を培地内に埋没して植え付けることにより増殖した。外植体当たりのシュート数は、培養150日後に急激に増加した。茎頂を外植体とした場合は、平均  $5.0 \pm 1.7$  本のシュートが、幼芽基部を外植体とした場合は、平均  $47.2 \pm 19.6$  本のシュートを生じた (Table 1)。

これは培養75日後の5.2本に比べて9倍の増殖率となり、このように急激に増加したシュートは基部組織からの不定芽形成に由来するものと思われる。このようにして形成された多芽体は基部組織を切り離して、いくつかのシュートの塊に分割し、同じ培地に継代することにより増殖した。継代したシュートは、さらに基部に新しいシュートを生じ、その数は元の数と同じか、それよりも多く増殖した (Fig. 2C)。一旦増殖し始めると最初の外植体が茎頂か幼芽基部であるかにかかわらず、どちらも同じように増殖した。シュートは約1ヶ月おきの継代により連続して増殖したが、このままでは塊茎を形成しないため、3~4ヶ月間継代培養を遅らせると、シュートは薄茶色に変色し、一部のシュートの基部に休眠した小塊茎を生じた (Fig. 2D, 2E)。このことから、シュートは一定の成長期間と培地の栄養分の枯渇が引き金となって塊茎を生じ、休眠に入るものと思われる。しかし、Kozak (2002) は、いくつかの成長抑制物質たとえば CCC (chlorocholine chloride), Methyl jasmonate (Ja-Me) と 6-9% のショ糖が *in vitro* で、*G. rothschildiana* の塊茎形成を促進したとしているが、一方、*G. superba* では、植物成長調整物質を添加した培地から無添加の MS 培地に移植することにより塊茎形成が見られた (Ghosh *et al.* 2007)。これらの結果は、さまざまなストレス (養分の枯渇または過剰, 生長阻害物質の有無) が *in vitro* で増殖中のシュートにおいて塊茎形成を誘導する可能性を示唆している。

Custers and Bergervoet (1994) は、外植体について様々な部分を検討している。成長した茎の節、節間、葉、小花柄、塊茎から発芽した芽の先端、塊茎の一部分を含んだ先端部分及び種子からの発芽部位を最初の外植体とした。この中で塊茎から発芽した

芽の先端、塊茎の一部分を含んだ先端部分を用い、18週ごとの継代培養において培地の BA 濃度を継代ごとに  $1 \text{ mg l}^{-1}$  の低濃度と  $10 \text{ mg l}^{-1}$  の高濃度に変えることにより、4~7倍の増殖率が得られたと報告している。今回の研究でも発芽した芽の先端を除いた基部である幼芽基部を外植体として用いて、同様の増殖率を得ることができた。しかもこの幼芽基部を用いることで、もっと短い期間 (約11週間) で9倍の増殖率を得ることができ、*G. rothschildiana* の外植体として芽の基部が有利であることが示唆された。茎頂由来の培養はシュートの形成率は低いが、*G. rothschildiana* において、ウイルスフリーの個体を作り出すために必要な培養材料となる。実際、グロリオサの栽培現場ではウイルス病による品質低下が問題となっており、グロリオサ白斑ウイルス (Gloriosa fleck virus), グロリオサ条斑モザイクウイルス (Gloriosa stripe mosaic virus), キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus) が知られている (Araki *et al.* 1985)。ウイルス除去の手段として茎頂培養は有効であると思われるが、ウイルスフリー化の報告は著者の知る限りない。シュートの増殖には幼芽基部が優れているが、茎頂部分も初期の増殖は幼芽基部には劣るものの、同じように増殖するためウイルスフリー化のメリットは大きい。塊茎形成のプロセスも同様であることから今回の増殖方法を適用できる。

Custers and Bergervoet (1994) は、塊茎の芽から多芽体を誘導するために高濃度の BA ( $3-10 \text{ mg l}^{-1}$ ) を使用した。今回の研究では、NAA  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  と BA  $4.0 \text{ mg l}^{-1}$  を培地に植物成長調整物質として添加した。この結果、幼芽基部から100%の割合 (24/24) で多芽体を形成させることができた。植物成長調整物質の効果を比較するためにサイトカイニンの

Table 1. Shoot formation in tissue culture of meristem and young shoot base explants of *G. rothschildiana*.

Type of explant	No. of explants	No. of survived explants*	75 days of culture		150 days of culture	
			Total No. of shoots**	Mean no. of shoots*** (± SD)	Total No. of shoots**	Mean No. of shoots*** (± SD)
Apical meristem	17	16	16	1 ± 0.0 a	80	5 ± 1.7 a
Young shoot base	17	13	68	5.2 ± 1.7 b	613	47.2 ± 19.6 b

Explants were subcultured every one-month on MS medium supplemented with  $4 \text{ mg l}^{-1}$  BA and  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA, and  $2 \text{ g l}^{-1}$  Gellan gum, pH 5.7.

\* Explants which did not turn brown one month after inoculation.

\*\* Total number of shoots over 10 mm formed in cultures.

\*\*\* Total number of shoots / number of survived explants.

Values followed by different letters within a column indicate significant differences at  $P < 0.05$  by Student's T-test.



Fig. 2. Micropropagation of *G. rothschildiana* by *in vitro* culture of apical meristem and young shoot base on MS medium supplemented with 4 mg l<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA, and 2 g l<sup>-1</sup> Gellan gum. Scale bar = 10 mm.

A: right; young shoot base, left; apical meristem, 8 weeks after inoculation.

B: multiple shoot formation at lower part (B1 and B2) and top part (B3) of young shoot base explants 6 weeks after inoculation.

C: Propagated shoots obtained from a young shoot base explant.

D: Formation of microtubers at the base of shoots.

E: Browned microtubers at the base of withered shoots.

kinetin または BA, オーキシンの 2,4-D または NAA を組み合わせて多芽体形成の効果を調べた。その結果, kinetin と NAA の組み合わせでは, 16.7% (4/24), BA と 2,4-D では 33.3% (8/24), kinetin と 2,4-D では 0% (0/24) と多芽体の形成率は低かった。つまり植物成長調整物質としては BA と NAA の組み合わせが有効だった。植物成長調整物質については, TDZ (thidiazuron) の添加が, シュートの増殖に効果があったとの報告もあり (Shimasaki *et al.* 2000), 今後比較検討が必要である。

また, *Gloriosa superba* var. *lutea* を材料とした場合も *G. rothschildiana* と同様に茎頂よりは幼芽基部を外植体として用いた方がシュートの形成がよく, 培養 60 日後に茎頂は平均  $1.2 \pm 0.41$  本, 幼芽基部は平均  $3.9 \pm 3.4$  本, さらに培養 120 日後にはそれぞれ平均  $4.0 \pm 3.2$  本, 平均  $34.3 \pm 30.9$  本だった (Table 2)。このことから, 今回の幼芽基部を外植体とした増殖方法は, *G. rothschildiana* だけではなく *Gloriosa superba* var. *lutea* にも有効であり, ほかの *Gloriosa* の種にも有効である可能性が示唆された。

## 第2節 増殖した小塊茎の温度処理による発芽 緒言

グロリオサの *in vitro* による大量増殖において, 第1節の緒言で述べたように, Custers and Bergervoet (1994) は *Gloriosa rothschildiana* を材料に, Sivakumar and Krishnamurthy (2004) は *Gloriosa superba* の各部位から誘導したカルスを材料に多芽体を形成させている。しかし, 形成されたシュートの発根は, IBA や NAA を用いた報告があるが, 実験的なレベルで, 実用的とは言いにくい (Custers and Bergervoet 1994, Sivakumar and Krishnamurthy 2004)。

一方, *in vitro* で誘導した小塊茎からの発芽につい

ての報告はほとんどない。Kozak (2002) は, *Gloriosa rothschildiana* の *in vitro* で形成された小塊茎からの発芽誘導を目的として様々な条件 (温度処理:  $5^{\circ}\text{C} \cdot 10^{\circ}\text{C} \cdot 20^{\circ}\text{C} \cdot 30^{\circ}\text{C}$ , 貯蔵物質としてピート単独, または MS 培地への BA 添加の有無) を試みたが, 処理 16 週間で最も発芽率がよい区が 50%, 24 週間で最大 76% と期間を長くしても良好な結果は得られなかったとしている。一方, Yamamoto (1990) は, 圃場で栽培した *G. rothschildiana* の塊茎を利用し,  $8^{\circ}\text{C}$  の低温と  $30^{\circ}\text{C}$  の高温を続けて処理することが, 休眠した塊茎からの発芽誘導に効果的であり, 季節により異なるが処理 9 週間から 15 週間で, 90% 以上の発芽率だったとしている。従って第2節では, *in vitro* で誘導され, 休眠している小塊茎を発芽させるための処理について検討した。

## 材料および方法

第1節において *in vitro* で誘導した小塊茎を3日間乾燥した後, 生重量により, (1)  $<0.3\text{g}$ , (2)  $0.3\text{--}1.0\text{g}$ , (3)  $>1.0\text{g}$  の3グループに分け, 次の4区の温度処理を行った。(A)  $8^{\circ}\text{C}$ , 2週間の処理後に  $23^{\circ}\text{C}$  で13週間, (B)  $8^{\circ}\text{C}$ , 2週間の後に  $30^{\circ}\text{C}$  で13週間, (C)  $23^{\circ}\text{C}$  で15週間, (D)  $30^{\circ}\text{C}$  で15週間。これらの処理は, インキュベーター内で暗黒下及び乾燥状態で行った。各処理区に5つの塊茎を供試し, 各区4回処理, 合計で20個の塊茎を供試した。小塊茎の発芽は, 1.5mm 以上の芽が伸長した小塊茎を発芽として評価し, 発芽塊茎数を数えた。

温度処理後, トレイに入れたすべての塊茎は乾燥させ, 日光を遮るために1枚の新聞紙で覆って, 9月中旬から10月上旬の3週間  $15^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$  の温室内に置いた。

次に, 最も成績の良かった試験区をコントロール

Table 2. Shoot formation in tissue culture of meristem and young shoot base explants of *G. superba* var. *lutea*.

Type of explant	No. of explants	No. of survived explants*	75 days of culture		150 days of culture	
			Total No. of shoots**	Mean No. of shoots*** (± SD)	Total No. of shoots**	Mean No. of shoots*** (± SD)
Apical meristem	12	5	5	$1.2 \pm 0.4$ a	20	$4 \pm 3.2$ a
Young shoot base	12	8	31	$3.9 \pm 3.4$ b	240	$30 \pm 30.9$ b

Explants were subcultured every one-month on MS medium supplemented with  $4 \text{ mg l}^{-1}$  BA and  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA, and  $2.0 \text{ g l}^{-1}$  Gellan gum, pH 5.7.

\* Explants which did not turn brown two month after inoculation.

\*\* Total number of shoots over 10 mm formed in cultures.

\*\*\* Total number of shoots / number of survived explants.

Values followed by different letters within a column indicate significant differences at  $P < 0.05$  by Student's T-test.



として、培地、植物成長調整物質、シヨ糖の塊茎への発芽促進効果を見た。塊茎は、*in vitro* で誘導した生重量 0.3–1.0 g のものを用いた。塊茎は、培養器内の培地または培地のない培養器に置床した。処理区は、4 区とし、培地のある区は① MS 培地に BA 4.0 mg l<sup>-1</sup>, NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup>, シヨ糖 30 g l<sup>-1</sup> を添加, ②植物成長調整物質フリーの MS 培地にシヨ糖 30 g l<sup>-1</sup> を添加, ③蒸留水のみ, の 3 区とし、それぞれ pH 5.7, 寒天 8 g l<sup>-1</sup>, 培地量 80 ml とした。コントロールは、④培養器内に培地を入れず、塊茎のみとした。温度処理は、①–③は、23℃一定とし、コントロールは、8℃ 2 週間の低温処理後、30℃の温度で処理した。光条件は白色蛍光灯により 16 時間日長とし、光強度を 54 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> とした。処理後、1, 2, 3, 4 ヶ月後に塊茎から 1.5 mm 以上の出芽が認められた塊茎を発芽塊茎として記録した。

各処理の効果を評価するため、発芽塊茎数を一元配置分散分析に基づき、Tukey の多重分析により、 $p < 0.05$  で有意差を検定した。データは、平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。

### 結果および考察

2 年間の継代培養の結果、培養器内に長さ 5–40 mm, 生重量 0.03–5.4 g の塊茎が形成された。調査した 433 個の塊茎のうち、およそ半数 (47% = 203/433) の塊茎は 0.3 g 未満だったが、1.0 g より重い塊茎はわずか 14% (60/433) だった (Fig. 3)。0.3 g 未満の塊茎の形は球形だったが、1.0 g より重い塊茎はブーメラン状が多く、この形は圃場で栽培した塊茎によく似ていた (Fig. 4)。培養した *Gloriosa* の順化と栽培に関する研究は少ない (Samarajeewa *et*

*al.* 1993, Kozak 2002)。Sivakumar and Krishnamurthy (2004) はカルスから誘導したシュートの発根に IBA または NAA を用いて好結果を得ているが、土壌に移植するための十分な根を生じさせることはできなかった。Custers and Bergervoet (1994) は、NAA を添加した培地で 4 週間培養し発根に成功したが、発根した植物体を土壌に移植してからの生育には失敗した。しかし、彼らは培養器内のシュートの基部に塊茎が生じていたら土壌に移植後に、その塊茎から発芽するが、すでに形成されていたシュートは萎れてしまうことを観察した。これらのことは、培養した *Gloriosa* を順化し、栽培するためには塊茎形成が重要であることを示している。

Akita and Takayama (1994) は、ジャーファーメンターシステムで *in vitro* で形成されたジャガイモの小塊茎は室温で貯蔵でき、まったく順化せず、直接土壌に植え付けることができると *in vitro* の塊茎形成の有益性を報告している。

グロリオサの営利栽培において、温度処理は休眠している塊茎を齊一に発芽させるための実用的な技術になっている。*G. rothschildiana* において、Yamamoto (1990) は、圃場で栽培し 2 月に掘り上げた 40–50 g の塊茎を 8℃, 2 週間の低温と 30℃の高温を連続的に処理し、処理開始から 9 週間後にはほとんどの塊茎が発芽したと報告している。また、吾妻と犬伏 (1986) も休眠塊茎からの発芽温度について調査した。夏に栽培して冬に掘り上げた塊茎を供試し、5℃・30 日間及び 60 日間の貯蔵ではすべてが腐敗したが、10℃・60 日間処理後、30℃で高温処理した場合には約 3 週間(総処理期間約 12 週間)で 100% 発芽したとしている。いずれも 30℃の高温

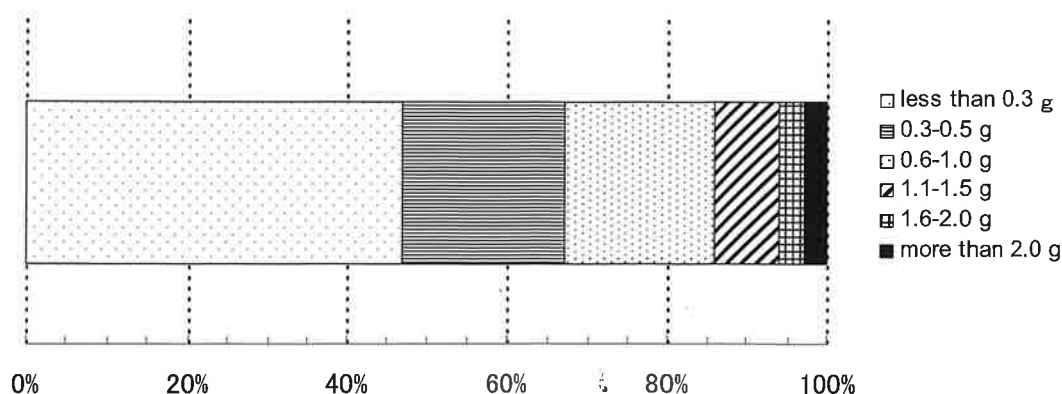


Fig. 3. Fresh weight of microtubers produced by tissue culture of *G. rothschildiana*. 433 tubers produced from 12 explants after repeating subcultures for 2 years were classified into 6 categories according to the fresh weight.



Fig. 4. *In vitro* formed microtubers of *G. rothschildiana* classified according to their fresh weight. (left: less than 0.3 g, middle 0.3 g -1.0 g, right: more than 1.0 g), which were formed by prolonging the subculture intervals from 1 month to 4 months. Scale bar = 10 mm.

処理の前に、低温処理を行うことが有効であるが、低温の温度及び処理期間に差がある。

今回の研究では、Yamamoto (1990) に従い、*in vitro* で形成された塊茎に同様な温度処理 (処理区 B: 8°C, 2 週間の低温処理, 続いて 30°C の高温処理) を行い、9 週間後に 15% (3/20) が発芽した。しかし、ほかの処理区では同じ期間で発芽しなかった。しかし、処理 15 週間後には、すべての区で発芽が見られたが、処理方法によって発芽率に差があった (Table 3)。

もっとも効果的な塊茎の発芽には、2 週間の 8°C の低温処理, 続いて 30°C 13 週間の高温処理がもっとも効果的であり (処理区 B, Table 3, Fig. 5B, 5E), 1.0 g 以上の塊茎の発芽率は 85% (17/20) だった。8°C の低温処理後、より低い温度の 23°C の処理 (処理区 A) では発芽率の低下を生じた (55% 11/20) (Fig. 5A)。8°C の低温処理なしの 23°C の定温処理 (処理区 C) と 30°C の定温処理 (処理区 D) では、10% と 25% の低い発芽率だった (Fig. 5C, 5D)。この結果は、低温は小塊茎の休眠打破に効果的であり、これに続く高温は、*G. rothschildiana* のシュートの発芽に効果的であることを示している。塊茎の発芽は、重い塊茎ほど早い傾向があった。

温度処理後 3 週間、温室内で乾燥した状態で維持したとき、処理区 B の塊茎は、ほとんどすべて発芽し、0.3 g 未満の塊茎は 80% (16/20), 0.3-1.0 g の塊茎は 90% (18/20), 1.0 g より重い塊茎は 95% (19/20) の発芽率だった。対照的に 0.3 g 未満の塊

茎は、処理区 B 以外は温度処理後に温室に移動しても 0-20% と、ほとんど発芽しなかった (Table 3)。

ジャガイモのような塊茎を作る植物において、*in vitro* で増殖した小塊茎の発芽は、4°C 3 週間の低温処理で促進された (Akita and Takayama 1993)。グロリオサにおいても、予備冷蔵は塊茎の休眠打破と一斉発芽のために慣行栽培における通常処理として行われている (Yamamoto 1990)。この結果は、*in vitro* で形成された小塊茎も休眠していて、短期間 (2 週間) の低温 (8°C) で休眠打破できることを示している。それ以上に、低温の後、30°C のような比較的高温で処理することが、芽の成育を促し、早期発芽に必要である。今回の実験結果では、培養により誘導したすべての大きさの塊茎の発芽には約 18 週間が必要だった。Kozak (2002) は、低温処理の区を設けず、5-30°C の一定の温度処理をしている。やはり、低温よりは 25°C または 30°C の区のほうが、発芽率が高かったが、発芽までの期間が 20-24 週間必要で、しかも発芽率は約 70% だった。一方、圃場で栽培した塊茎は、掘り上げ後、1 週間程度乾燥させ、インキュベーターにより 2 週間 8°C の低温処理後に 30°C の高温処理を行った結果、培養塊茎より短い期間で 90% 以上の塊茎が発芽した。ただし、塊茎の収穫時期により発芽までの期間が異なり、栽培及び塊茎形成が低温に遭遇する冬の収穫では 9 週間、低温に遭遇しない夏の収穫では 13 週間の期間がそれぞれ必要だった (Yamamoto 1990)。グロリオサの微細繁殖技術の確立には、小塊茎の休眠打

Table 3. Effect of thermal treatment on sprouting of *in vitro*-produced microtubers of *G. rothschildiana*.

Treatment*	Rate of sprouted tubers (% ± SD)					
	0**			3**		
	< 0.3 g***	0.3-1.0 g	> 1.0 g	< 0.3 g	0.3-1.0g	> 1.0 g
A	0 ± 0.0 a	35 ± 19.1 ab	55 ± 19.1 bc	20 ± 16.3 a	55 ± 30.0 bc	85 ± 10.0 b
B	40 ± 16.3 b	60 ± 16.3 c	85 ± 10.0 c	80 ± 16.3 b	90 ± 11.5 c	95 ± 10.0 b
C	0 ± 0.0 a	0 ± 0.0 a	10 ± 11.5 a	0 ± 0.0 a	0 ± 0.0 a	15 ± 10.0 a
D	10 ± 0.0 a	35 ± 19.2 ab	25 ± 19.2 ab	15 ± 19.1 a	40 ± 16.3 b	30 ± 11.5 a

For each treatment of each class of tubers, five tubers each with four replicates were used (total n=20). Tubers each with a 1.5 mm long bud was estimated as sprouted.

\* A; 8°C for 2 weeks followed by 23°C for 13 weeks, B; 2 weeks at 8°C followed by 30°C for 13 weeks, C; Continuous 23°C for 18 weeks without low temperature pretreatment, D; Continuous 30°C for 18 weeks without low temperature pretreatment.

\*\* 0; data obtained after 18 weeks of the thermal treatment, 3; data obtained 3 weeks after keeping dry in a greenhouse after completing the thermal treatment.

\*\*\* weight of a tuber

Different letters within a column show significant difference at  $P < 0.05$  by Tukey's multiple range test.

破期間を短くするため、高温処理前の低温処理の温度及び期間も含めた発芽処理方法の検討が必要である。本研究では、*in vitro*で誘導した小塊茎の暗黒および乾燥条件下の温度処理による障害は特になかった。それゆえ、小塊茎は狭い空間における長期間の貯蔵と取り扱いの容易さから有益であると言える。

重い小塊茎ほど発芽率が高く発芽までの期間が短いことから重い塊茎を養成することが有利である。そのためには継代培養において、まずシュート増殖させる培地及び培養条件で継代を繰り返し、最終段階で重い塊茎を形成させる培地及び培養条件におく必要がある。培養温度は、今回 23°C としたが、高村ら (2002) は、15, 20, 25, 30°C を比較し、シュート数の増加には 25 及び 30°C が有効であり、重い塊茎の誘導には 20°C が優れていたと報告している。今後、これらの条件を組み合わせた検討が望まれる。

この温度処理試験で最も発芽率が高かった 8°C の低温と 30°C の高温を組み合わせた区をコントロールとして、0.7-1 g の小塊茎を水分を含む培地上で培養し、発芽が促進されるかどうかを植物成長調整物質やシヨ糖の効果も含めて検討した。その結果、発芽はコントロールとした④の処理区で 3 ヶ月後に認められたのに対し、温度を 23°C で一定に維持した①~③の処理区はコントロールよりも早く、1 ないし 2 ヶ月後に確認できた。しかし、発芽は斉一ではなく、ばらつきがあり、植物調整物質、シヨ糖および無機養分の有無に関わらず、発芽率に大きな差はなかった (Table 4)。

①~③の処理区は水を含む培地上にあるため、発

芽した芽は直ちに伸張した。そのため、大量の塊茎を扱う場合は、ほぼ毎日観察し、伸びすぎないように順次、土壤に植え付ける必要が生じる。一方、乾燥状態とし、低温と高温を組み合わせた④の処理区は、発芽までには時間がかかるが、ほぼ一斉に発芽し、発芽率も 4 ヶ月後に 93% と高かった (Table 4)。乾燥状態であるため、発芽しても一気に芽が伸長することなく、塊茎を扱いやすい利点があった。このことから、コントロールとした乾燥状態で 8°C の低温と 30°C の高温を組み合わせた処理は、実際栽培においては、大量に扱うことができ、長く伸長した芽を傷めることがないというメリットがあり、実用的であると言える。

### 第3節 組織培養により増殖した塊茎の栽培結果 緒言

グロリオサの *in vitro* 増殖については、いくつかの報告があるが、順化については数個体程度で行っており、多数の個体を順化し、栽培結果を得たという報告は著者の知る限りない。第2節において、小塊茎を発芽させることが可能となったが、この小塊茎が、どのように圃場で増殖するか、また、培養変異に問題がないかの検討が必要である。従って第3節では、小塊茎を圃場で栽培し、塊茎の生産能力と培養変異について調査を行った。

#### 材料および方法

発芽した小塊茎は、真砂土とバークを 7:3 (V/V) で混合した用土に市販の肥料 (N:P:K=10:18:15) を 1 鉢当たり 5g 入れた直径 15cm のビニルポットに植

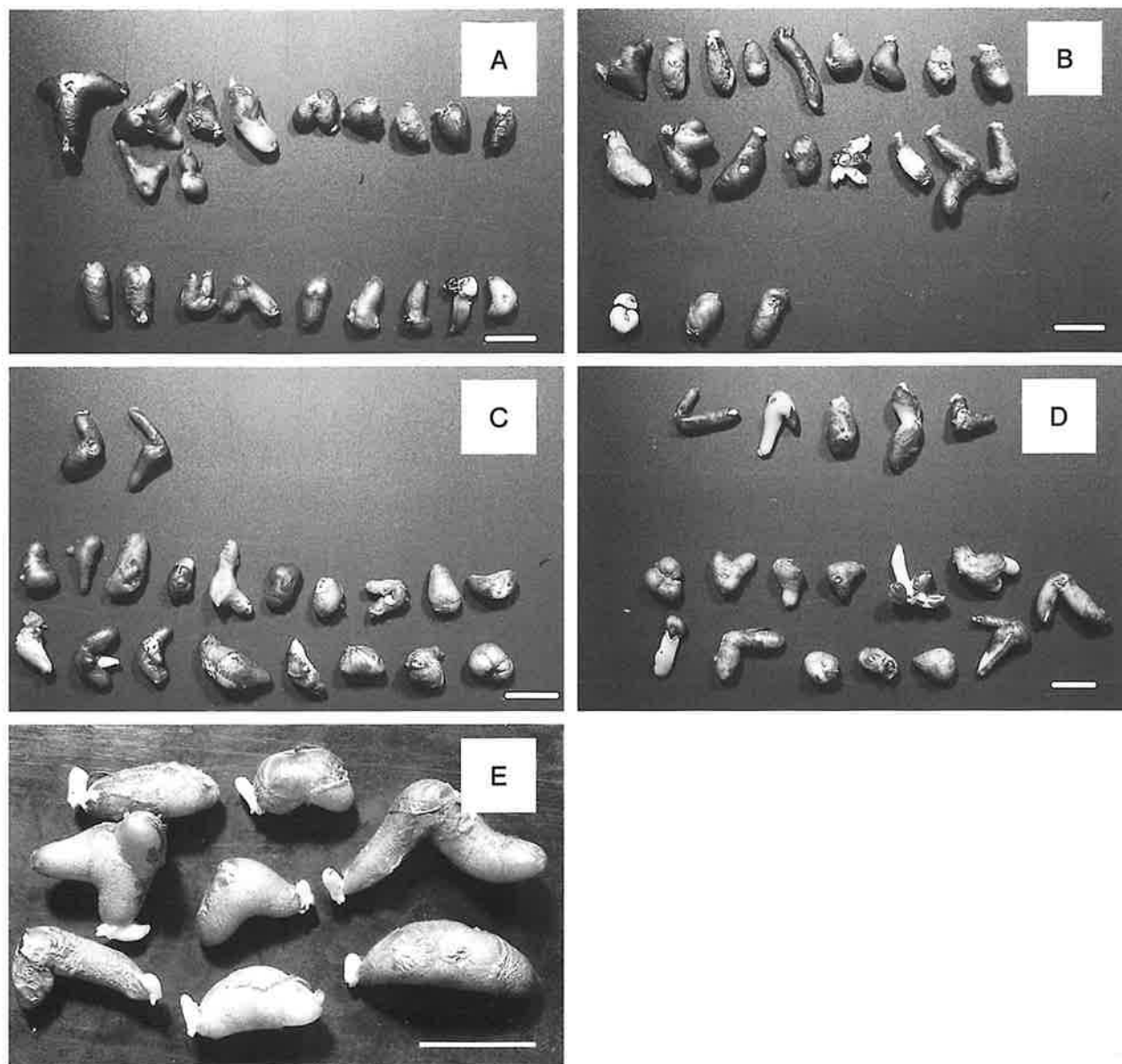


Fig. 5. Microtubers with thermal treatment for sprouting buds of *G. rothschildiana*. Scale bar = 10 mm.

A: 8°C for 2 weeks following 23 °C for 15 weeks,

B: 8°C for 2 weeks following 30 °C for 15 weeks

C: 23°C for 17 weeks

D: 30°C for 17 weeks.

E: sprouting microtubers after thermal treatment B, 8 °C for 2 weeks followed by 30°C for 15 weeks.

え付けた。ポットは、自然日長下で最低 12°C に温度設定した温室で慣行栽培した。実験には *in vitro* で得られた 3 段階のサイズ (<0.3 g, 0.3–1.0 g, >1.0g) の塊茎を催芽し供試した。各段階の小塊茎について 10 球を供試し、3 反復により、栽培後に増殖した塊茎数と重さを調査した。塊茎は、3 月にポットから取り出し、休眠打破するため最低温度 8°C で 3 ヶ月間貯蔵した。塊茎は 6 月に肥料を N:P:K=1.2:0.25:1.2 (kg a<sup>-1</sup>) としたビニルハウスに条間 40cm, 株間 5cm に定植し、8 月に形質 (葉の長さ、花の形と色) を評価し、12 月に塊茎を掘り上げて重量を調査した。

統計処理は、一元配置分散分析に基づき、Tukey の多重分析により、 $p < 0.05$  で有意差を検定した。

塊茎の増殖率については、分析の前にアークサイン変換を行った。データは、平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。

#### 結果および考察

ポットに植え付けた塊茎は、植え付け数日で発芽し順調に成長した。栽培塊茎に比べて、発芽初期に葉色が薄い傾向があるが成育と共に濃くなった (Fig. 6A, 6B)。地上部の成育が停止した栽培 5 ヶ月後に、地下に形成された塊茎を収穫した (Fig. 6C)。収穫した塊茎の大きさは、植え付けた塊茎の大きさと相関があった (Table 5)。0.3 g より小さな塊茎は 7.0 g より大きな塊茎を生じなかった。しかし、0.3–1.0 g の塊茎は栽培後に 12.2% が、1.0 g より大きな塊茎は 25% がそれぞれ 7.0 g 以上の大きさとなった。し

Table 4. Effect of thermal treatment, MS medium with BA and sucrose on sprouting of *in vitro* produced microtubers of *G. rothschildiana*.

Treatment and medium*	Rate of sprouted tubers (% ± SD)			
	1**	2	3	4
①	0 ± 0 a	13.3 ± 7.7 ab	13.3 ± 7.7 a	20 ± 6.7 a
②	20 ± 0 b	20 ± 0 b	20 ± 0 ab	26.7 ± 3.8 ab
③	13.3 ± 3.8 ab	20 ± 6.7 b	20 ± 6.7 ab	20 ± 6.7 a
④ (Control)	0 ± 0 a	0 ± 0 a	73.3 ± 7.7 b	93.3 ± 3.8 b

For each treatment of tubers in 0.3–1.0 g fresh weight, five tubers with three replicates were used (total n=15). Tubers each with a 1.5 mm long bud was estimated as sprouted.

\* ①–③; Continuous 23°C for 4 months, ④; 8°C for 2 weeks followed by 30°C for 3.5 months

①; MS medium supplemented with 4.0 mg l<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA, 30 g l<sup>-1</sup> sucrose, 8 g l<sup>-1</sup> agar ②; MS medium with hormone free, 30 g l<sup>-1</sup> sucrose, 8 g l<sup>-1</sup> agar, ③; Distilled water solidified with 8 g l<sup>-1</sup> agar, sucrose free, ④; Without medium.

\*\* 1; data obtained after one month of the thermal treatment, 2, 3, 4; data obtained after 2, 3 and 4 months of the thermal treatment respectively.

Different letters within a column indicate significant difference at  $P < 0.05$  by Tukey's multiple range test following arcsin transformation.

Table 5. Growth and multiplication of *in vitro*-produced microtubers of *G. rothschildiana* 5 months after cultivation in soil.

Fresh weight of planted tubers	No. of planted tubers	Total No. of harvested tubers	Distribution of tuber weight at harvest			
			<1.0 g	1.0–4.0 g	4.1–7.0 g	>7.0 g
<0.3 g	30	42 a	17 (40.5 ± 2.2 a)*	22 (52.4 ± 2.1 b)	3 (7.2 ± 0.5 a)	0 (0.0 ± 0.0 a)
0.3–1.0 g	30	49 ab	17 (34.7 ± 3.2 a)	12 (24.5 ± 6.8 ab)	14 (28.6 ± 5.9 b)	6 (12.2 ± 0.4 b)
>1.0 g	30	56 b	21 (37.5 ± 16.7 a)	12 (21.4 ± 15.5 a)	9 (16.1 ± 7.2 ab)	14 (25.0 ± 17.0 b)

Ten tubers with 3 replicates were made for each treatment.

\* rate(%) ± SD of tubers ranked as each class of weight at harvest.

Values with different letters within a column show significant difference at  $P < 0.05$  by Tukey's multiple range test following arcsin transformation.

かし、植え付けた3段階の重さの塊茎から収穫して得られた1.0 g未満の塊茎数については有意差はなかった。しかし収穫した塊茎数は、植え付けた塊茎の大きさにより異なった。0.3 g未満の塊茎は、植え付けた30球に対してわずか42個(1.4倍)だが、1.0 gより大きな塊茎は56個(1.9倍)であり、大きな塊茎は、より多くの塊茎を生じた(Table 5)。0.3 g未満の小さな塊茎は、発芽する芽が1個程度であるが、1.0 gより大きな塊茎は2個程度あり、それぞれの芽が伸長し塊茎形成するため、得られた塊茎数が多くなると考えられる。

*in vitro* 増殖により得た大量の小塊茎を温度処理により発芽させ、栽培を簡素化するため、ビニルポットに植えずに直接ハウス内に植え付けた。その結果、問題なく発芽・生育し、大量の小塊茎を容易に栽培することができた(Fig. 6D)。

切り花生産に適した塊茎の重量は、30 g以上である(Kawashima 1983)。培養容器から取り出した塊茎は、1作ではまだ30 g未満が多く、切り花生産には適さないため、収穫した塊茎を、さらに1作栽培した。収穫した塊茎は、休眠を打破するため低温に遭遇させる必要があり、約3ヶ月間、最低8°Cの室内で乾燥貯蔵した。温度が上昇する5月には発芽が確認できたため6月にビニルハウスに定植した。発芽したほとんどの塊茎はよく生長し(Fig. 7A)、植え付け2ヶ月後の8月に、1.1–5.0 gの塊茎の約10% (=8/74)及び5.0 g以上の塊茎の約80% (=12/15)が開花した(Fig. 7B)。12月に塊茎を収穫したとき、1.1–3.0 gの塊茎の26% (=11/42)、3.1–5.0 gの塊茎の82% (=14/17)が60 g以上となった(Fig. 7C, 7D, 7E)。大きなV字型の塊茎は、その末端にそれぞれ1つの芽をもつ(1芽当たり30 g以上の塊

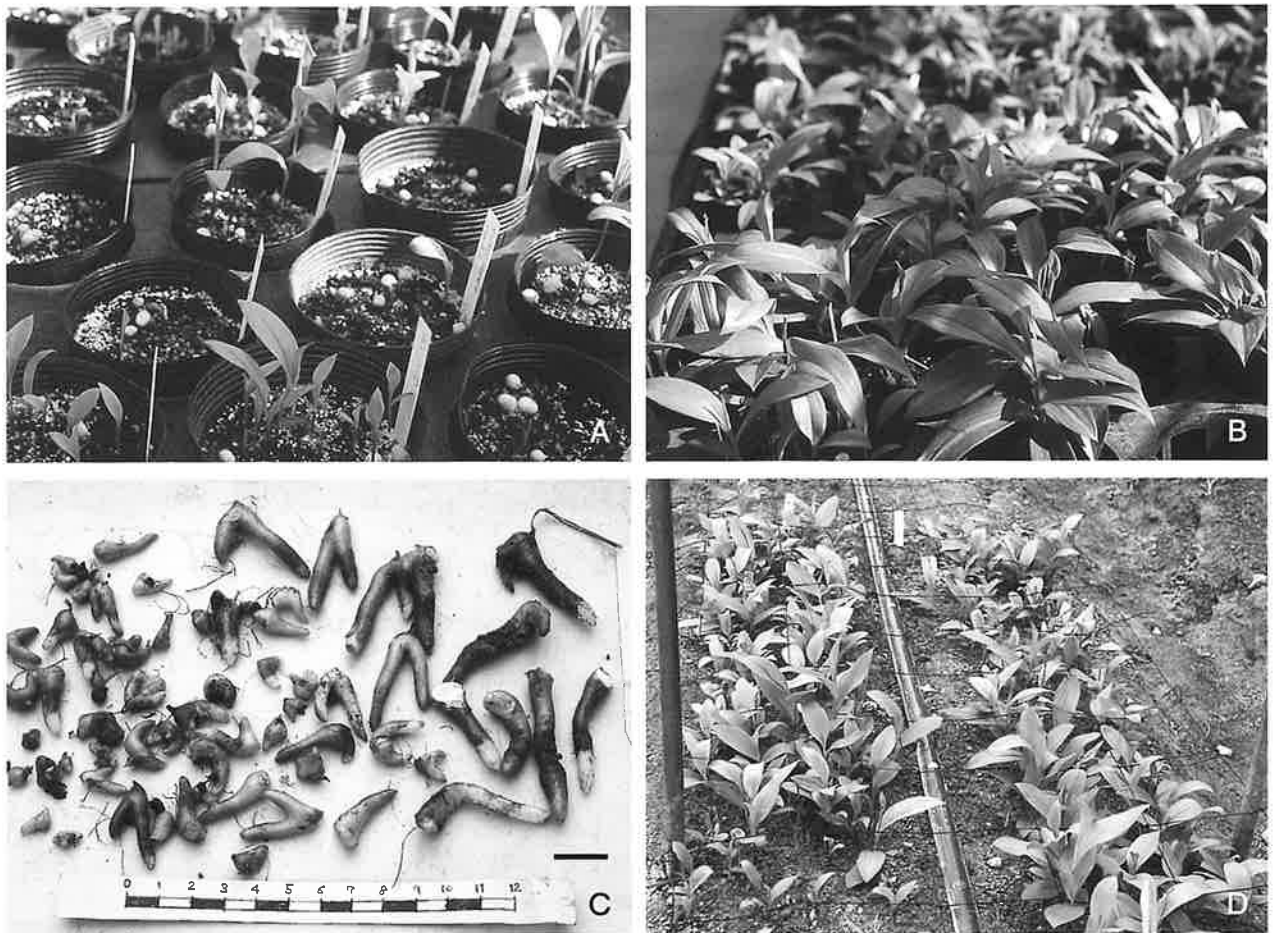


Fig. 6. Cultivation of micropropagated *Gloriosa rothschildiana* after breaking dormancy by thermal treatment. A: Growing plants in pots one month after planting of sprouted microtubers. Diameter of a pot = 15 cm. B: Growing plants in pots two months after planting of sprouted microtubers. C: Harvested tubers 5 months after planting in pots. Scale bar = 2 cm. D: Growing plants one month after directly planting of sprouted microtubers in a greenhouse in July.

莖) ため (Fig. 7F), 二つに分割して催芽処理し, 植え付ければ次の収穫時に2倍に増殖し, 開花球となると考えられる. 栽培した結果, 3.1 g以上5.0 g未満の塊茎では約80%, 5.1–8.0 gの塊茎では100%が60 g以上の塊茎を形成した.

過去の研究で, Samarajecwa *et al.* (1993) と Kozak (2002) は, *in vitro* で増殖したグロリオーサの花の形状と色を調査し, 変異はなかったと報告している. 今回の研究でも, 葉の大きさ, 花の形と色などの形態は元の親植物とほとんど変わらず, 明確

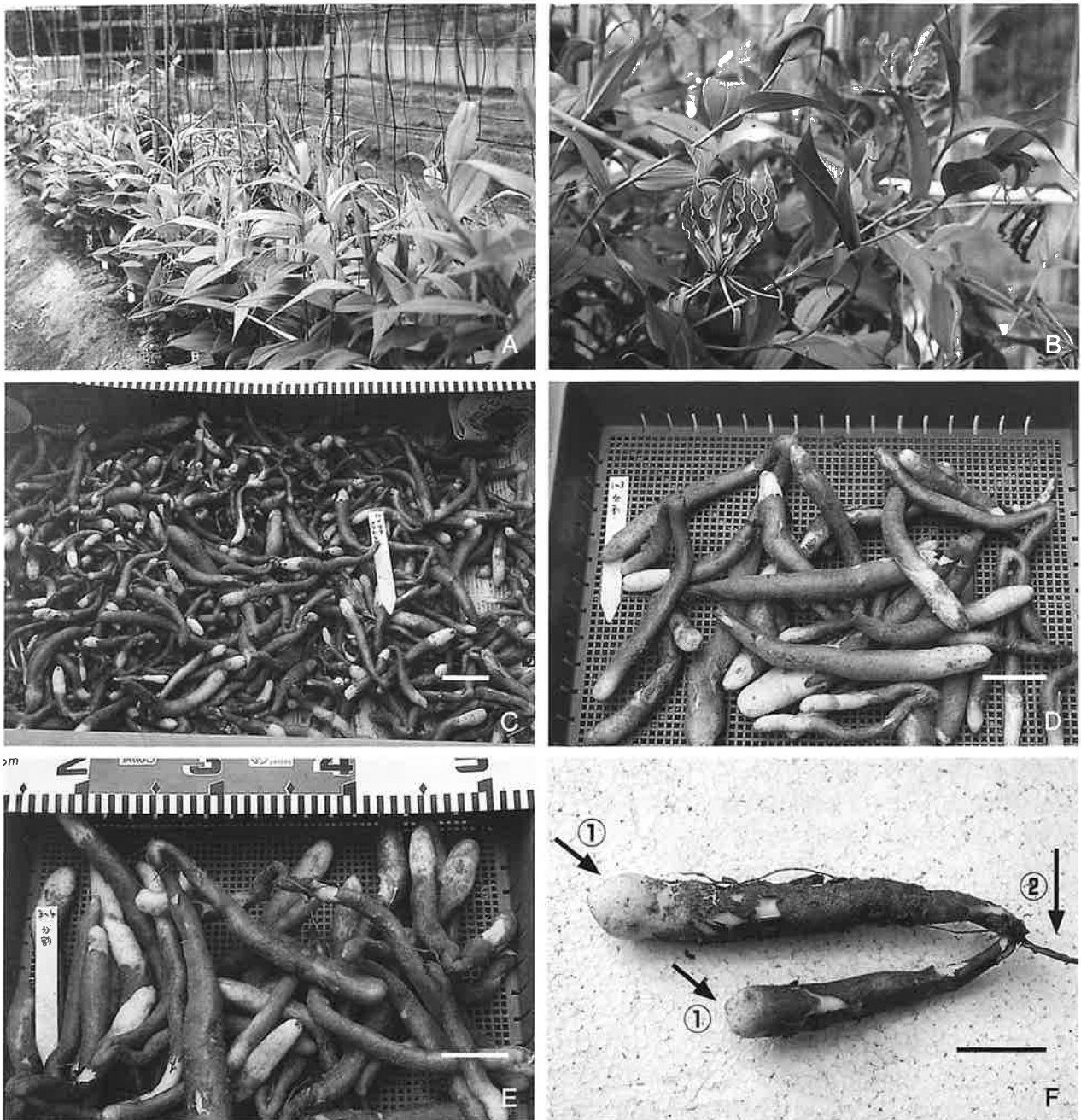


Fig. 7. Field performance of micropropagated *G. rothschildiana*.

- A: Growing plants in a vinyl house in its second growth cycle one month after planting of sprouted tubers.  
 B: Flowering of *G. rothschildiana* in its second growth cycle 14 months after first planting of micropropagated tubers.  
 C: Harvested tubers 6 months after planting of sprouted tubers of less than 1 g. Scale bar = 5 cm.  
 D: Harvested tubers 6 months after planting of sprouted tubers of 1–3 g. Scale bar = 5 cm.  
 E: Harvested tubers 6 months after planting of sprouted tubers of more than 3 g. Scale bar = 5 cm.  
 F: A harvested boomerang-shaped tuber; ① arrows indicate the site of buds, ② arrow indicates an old stem. Scale bar = 5 cm.

な変異は見られなかった (Fig 7B).

## 第2章

### エビネ属 (*Calanthe*) の組織培養

#### 第1節

#### 茎頂培養による苗条原基及び PLB の誘導

#### 緒言

日本産エビネ属の中で、特に春咲きのエビネのいくつかの種は、花が美しく、観賞価値が高い種が多い。また自然交雑による種間雑種、種内雑種も見受けられ、花の色彩、大きさ、香りも変化に富み園芸的価値が高い。近年は、積極的に人工交配が行われ、育種により、自然交雑種を凌ぐ非常に優秀な品種も多く作出されている。しかしながら、これらの品種は遺伝的にヘテロであるため、種子繁殖による増殖は形質が引き継がれることはまれである。そのため、偽球茎の株分けによる以前からの伝統的手法により繁殖が行われている。この繁殖方法は、年間2倍程度と非常に増殖率が低く、たとえ有望な品種を市場流通させたいと思っても不可能である。一方、着生ランであるシンピデウムなどの洋ランでは、主に茎頂組織を外植体としたメリクロン増殖が行われ、クローン株が大量に生産されている。

エビネ属のメリクロン増殖は、非常に困難とされ、Tahara (1977), Shimasaki and Uemoto (1987) による報告があるが、土壌中にある芽の茎頂及び腋芽の茎頂の雑菌による汚染が問題とされ、さらに培養してもわずかに PLB が増殖または単数のシュートが形成されたとあり、満足のいく結果となっていない。

ラン科植物の組織培養による増殖は、PLB による増殖が一般的であるが、ネジバナでは苗条原基による増殖も報告されている (Sato *et al.* 1987)。苗条原基とは、体細胞が培養によって不定苗条になる途上に現れるドーム状の組織体で多数集まってコンパクトウ状の小集塊を作り増殖する。非常に増殖率が高く、染色体数が安定しており、固形培地に移植することで容易に苗条となるとされている (田中・谷口 1988)。この組織は、茎頂組織を植物成長調整物質を含む液体培地に入れ、24 時間連続照明下及び垂直回転培養により誘導することができる (田中・谷口 1988)。これまでのエビネ属の増殖は、固形培地を使用していたが、好結果はでていない (Tahara 1977, Shimasaki and Uemoto 1987)。今回、外植体の

汚染を低減させる殺菌方法を行い、液体培地を用いる苗条原基の誘導方法をキエビネに適用し、苗条原基及び PLB の誘導を試みた。

#### 材料および方法

広島市植物公園で栽培していたキエビネ (*Calanthe sieboldii* Decne.) の 11 月～7 月の芽を使用した。芽は、葉鞘を除去して、腋芽を露出させ、0.1% の塩化ベンザルコニウム溶液で 5 分間または 10 分間攪拌後、さらに 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 5 分間または 10 分間攪拌し、70% のエタノール溶液で 5 秒または 10 秒間攪拌して殺菌した。これら一連の殺菌処理において、各過程の処理時間が短い方を殺菌方法 I、長い方を殺菌方法 II とした。両方法とも最後に、蒸留水で 3 回すすぎ殺菌した。芽の茎頂および腋芽の茎頂から実体顕微鏡を用いて 1 ないし 2 個の葉原基を持つ約 0.5mm の幅と長さの茎頂分裂組織を切り取った。茎頂分裂組織は、25ml の液体培地が入っている試験管 (30mm × 200mm) に各 1 個ずつ植え、2 回転/分の垂直回転培養装置で培養した。

#### <培地及び培養条件>

Gamborg B5 (B5) 培地 (Gamborg *et al.* 1968), Murashige and Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog 1968) と 1/2MS 培地 (マクロ, ミクロ, 有機要素のすべての要素を規定の 1/2 濃度とした培地) を基本培地として用いた。シヨ糖濃度は、MS 培地と 1/2MS 培地は 30 g l<sup>-1</sup>, B5 培地は 20 g l<sup>-1</sup> とした。各培地には植物ホルモンとして、N<sup>6</sup>-benzyl adenine (BA) と  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) をさまざまな濃度で組み合わせて添加し、0.1 または 1.0 N の NaOH または HCl により pH5.7 とした。シヨ糖濃度は、B5 培地では 2%, MS 培地および 1/2MS 培地では 3% とした。この 3 種類の基本培地の中から、各組成の濃度による茎頂組織の生存率を見るために B5 培地を選択し、その組成を次のように改変した。CaCl<sub>2</sub> を除く多量要素 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), CaCl<sub>2</sub> と微量元素 (Fe-EDTA, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, KI), 有機要素 (Nicotinic acid, Thiamine · HCl, Pyridoxine · HCl, myo-Inositol) の 3 つに分け、それぞれ 1 倍, 1/2 倍, 1/4 倍とし 27 区を設定した (Table 6)。CaCl<sub>2</sub> は本来、多量要素に含めるが、この試験では実験を容易にするため微量元素に含めて扱った。培地は、オートク



Table 6. Results of the shoot meristem culture of *C. sieboldii* in media containing different concentration and combination of macro, micro and organic elements of B5 medium.

Medium No.	Strength of components (ratio to the original medium)			Survival rate <sup>1)</sup>		Type of the cultures in B5-9 medium <sup>3)</sup>	Type of the cultures in B5-16 medium <sup>4)</sup>
	Macro elements	Micro elements	Organic elements	Number	%		
1	1	1	1	1/8	13	— <sup>2)</sup>	—
2	1	1	1/2	0/8	0	—	—
3	1	1	1/4	2/8	25	—	A1
4	1	1/2	1	3/7	43	—	—
5	1	1/2	1/2	5/7	71	C1,SP1	SP1
6	1	1/2	1/4	3/7	43	—	—
7	1	1/4	1	8/8	100	C2,A1	Ab1,A1
8	1	1/4	1/2	6/8	75	C2,A1	PLB1,Ab1
9	1	1/4	1/4	6/8	75	SP1,Sh1	A1,C1,PLB1
10	1/2	1	1	2/8	25	—	—
11	1/2	1	1/2	0/8	0	—	—
12	1/2	1	1/4	0/8	0	—	—
13	1/2	1/2	1	2/8	25	—	Sh1
14	1/2	1/2	1/2	3/7	43	—	Ab1
15	1/2	1/2	1/4	2/8	25	—	A2,Sh1
16	1/2	1/4	1	6/7	86	C1,A1	A1,Ab3
17	1/2	1/4	1/2	7/8	88	PLB1,Sh1	C1,Ab1
18	1/2	1/4	1/4	4/8	50	C1,Sh1	C1,Ab1
19	1/4	1	1	0/8	0	—	—
20	1/4	1	1/2	1/8	13	—	—
21	1/4	1	1/4	0/8	0	—	—
22	1/4	1/2	1	1/8	13	—	—
23	1/4	1/2	1/2	1/8	13	—	—
24	1/4	1/2	1/4	1/8	13	—	—
25	1/4	1/4	1	5/8	63	A2	Sh1
26	1/4	1/4	1/2	6/8	75	A2	Sh1
27	1/4	1/4	1/4	5/8	63	A1	—

Four shoot meristems were cultured in each medium.

<sup>1)</sup> Survival rate (%) = [Number of shoot meristems survived / (number of shoot meristems plated - number of shoot meristems contaminated)] × 100. Survival rate was investigated after one month of culture. The percentage in each medium (No.1 - 27) was calculated from the total explants cultured in B5-9 and B5-16 media.

<sup>2)</sup> Growth response after 3 months of culture. — : shoot meristems turned brown and died, A: shoot meristems which were slightly swollen but did not turn brown, C: callus-like tissue, SP: shoot primordia, Ab: abnormal structure growing leaf primordia, PLB: protocorm like bodies and Sh: shoot.

<sup>3)</sup> B5-9= modified B5 medium supplemented with 0.02 mg l<sup>-1</sup> BA and 2 mg l<sup>-1</sup> NAA.

<sup>4)</sup> B5-16= modified B5 medium supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> BA.

レーブにより 120°C, 15 分間高圧滅菌した。

培養物は、白色蛍光灯により光強度 23 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の 24 時間連続照明とし、温度は 23°C とした。

<培養物の切片作成>

誘導した PLB 培養物は、5~6 個に分割して FAA (70% エタノール : ホルマリン : 氷酢酸 = 90 : 5 : 5) で固定した。

固定した試料は、n-BuOH シリーズにより脱水後、

パラフィンで包埋し、10~15 μm の切片として、デラフィールドのヘマトキシリンで染色し、光学顕微鏡により観察した。

### 結果および考察

エビネの培養について土壤中にある芽を利用する場合、過去の報告ではバクテリアや糸状菌に汚染されていて、外植体から微生物を取り除くことは困難

Table 7. Effects of sterilization method and plating season on contamination rate of shoot meristems of *C. sieboldii*.

Sterilizing method*		Plating season	Contamination rate of microbes (%)
I	0.1% benzalkonium chloride for 5 minutes	April	8/32** 25.0%
	→ 1% sodium hypochlorite for 5 minutes	May	42/169 25.0%
	→ 70% ethanol for 5 seconds	June	35/79 44.3%
	→ sterilized distilled water 3 times	July	14/29 48.3%
	Total		99/308 32.1%
II	0.1% benzalkonium chloride for 10 minutes	November	4/137 2.9%
	→ 1% sodium hypochlorite for 10 minutes	December	1/85 1.2%
	→ 70% ethanol for 10 seconds	March	0/31 0.0%
	→ sterilized distilled water 3 times	April	0/32 0.0%
		May	9/153 5.9%
Total			14/438 3.2%

\* After removing leaf sheath, lateral buds were sterilized for 5 or 10 minutes in 0.1%(v/v) benzalkonium chloride solution, for 5 or 10 minutes in 1%(v/v) sodium hypochlorite solution, 5 or 10 seconds in 70%(v/v) ethanol, and finally rinsed three times with sterilized distilled water. After these procedures, apical meristems with one or two leaf primordia were excised.

\*\* Number of shoot meristems contaminated/ Number of shoot meristems plated.

である (Tahara 1977, Shimasaki and Uemoto 1987). 今回の結果でも, 殺菌方法 I では, 25 ~ 48% の高い汚染率であった (Table 7). しかし, 殺菌方法 II では, 0 ~ 5.9% に減少した (Table 7). Tahara (1977) は, エビネの培養において, 芽を 3 月に採取した場合汚染率は低く, 5 月のほうが汚染率は高かったとしている. これは筆者の試験結果も同様であり, 殺菌方法 I では, 4 および 5 月に比較して 6 および 7 月のほうが汚染率は高かった. これは, 11 月 ~ 3 月の葉鞘が硬くしまり, 芽の内部を保護しているときのほうが, 土壌や雨水等が内部に進入することなく比較的清潔な状態が保たれているためだと思われる. しかし, 温度が高くなるにつれ, 葉鞘が展開し, 花茎が伸長して開花する 4 月以降は, 微生物は混入しやすいと思われる. また, 5 月から 10 月は, 腋芽が発達し, 表面が硬くなるため, 実体顕微鏡下で成長点を切り取る作業は非常に困難である. 今回の殺菌方法は, 12 ~ 4 月の冬から春にかけて比較的湿度が低い時期にのみ適用できる方法であるが, ほかに報告されている方法よりも簡便で実用的である. Tahara (1960) は, 芽を次亜塩素酸カルシウムで 60 分間処理し, 3 月のエビネの汚染率は 0% (0/78) であり, キエビネでは 13% (9/72) だった. しかし, 5 月には汚染率は 52% (20/50) と高くなったと報告している. また, Shimasaki and Uemoto (1987) は, 汚染率を低くするため, 5 月に前年生偽球茎 (バックバルブ) を個々に切り離し, 葉と根を切除して

BA 葉腋に浸して, 伸長したシュートの腋芽の成長点を外植体とし, 汚染を軽減した. 今回の筆者の方法は, この方法よりも簡易な方法であり, 汚染率の高くなる 5 月でさえ, わずか 5.9% であり, 実用上は差し支えないといえる.

#### <基本培地の影響>

B5 培地, MS 培地, 1/2MS 培地を基本培地として検定した結果, B5 培地の結果が最も良く, 茎頂組織の培養 1 ヶ月後の生存率は, B5 培地では 54.5% と高く, MS 培地では 15.7%, 1/2MS 培地では 4.0% だった (Table 8). Tahara (1977) と Shimasaki and Uemoto (1987) は, 基本培地として MS 培地を使っている. B5 培地の総イオン濃度は 31.9 me/l と MS 培地の 49.6 me/l よりも低いが, 1/2MS 培地の 24.8 me/l に較べると高い. 一方, 培地の組成をみると, B5 培地の  $\text{NH}_4^+$  は, 陽イオンに占める割合が 6.4% と MS 及び 1/2MS 培地の 41.5% に較べると低いが,  $\text{K}^+$  は MS 及び 1/2MS 培地の 40.3% に較べ, B5 培地は 77.4% と高い (Table 9). しかし, 陰イオンの組成は B5 培地と MS 及び 1/2MS 培地では  $\text{SO}_4^{2-}$  で大きな差が認められた. そのため, これらのイオン組成の差がキエビネの茎頂培養における生存率に影響しているかもしれない. ショ糖濃度は, MS 及び 1/2MS 培地は 3%, B5 培地は 2% と異なり, その影響も考えられるが, 今回は明らかではなかった.

エビネの茎頂培養において, 過去の報告では寒天

培地しか使われていない (Tahara 1977, Shimasaki and Uemoto 1987). 今回の研究では、液体培地を使用し、毎分2回転の垂直回転培養としている。液体培養は、培地の栄養分や植物成長調整物質が茎頂組織全体に直接、連続して供給でき、連続した回転により茎頂組織の位置・向きを変化させ、さらに培養器と組織が常に接触することによりシュートの伸長を抑制し、シュート原基の増加が期待される。本研究でエビネの増殖率が高くなった一因としては、液体培地による回転培養の利用が考えられる。Hoppe and Hoppe (1987) は同様な理由で、液体培地を使用し、ヨーロッパの地生ランである *Ophrys apifera* の茎頂培養に成功している。

Table 8. Effect of basal medium on survival rate of shoot meristems of *C. sieboldii*.

Basal medium	Survival rate	
MS <sup>1)</sup>	3/75 <sup>3)</sup>	4.0%
1/2MS <sup>2)</sup>	8/51	15.7%
B5 <sup>1)</sup>	42/77	54.5%

<sup>1)</sup> Concentration of each element for each medium was full strength. MS medium was supplemented with 3% sucrose, and B5 medium was supplemented with 2% sucrose.

<sup>2)</sup> Concentrations of macro, micro, and organic elements were reduced to the half of MS. 3% sucrose was added.

<sup>3)</sup> Number of shoot meristems survived/ (Number of shoot meristems plated - Number of meristems contaminated). Survived shoot meristems were defined as those not turning brown after one month of culture.

### <植物成長調整物質の影響>

基本培地に BA と NAA を添加して植物成長調整物質の効果を検討した。MS 培地、1/2MS 培地においては、生存率が低く、置床した茎頂組織がほとんど枯死したことから、明確な傾向は認められなかった (Table 10, 11)。B5 培地では、置床した組織の多くが生存し、BA 濃度が高い方が若干生存率は高い傾向があったが、NAA 濃度については傾向がはっきりせず、植物成長調整物質の影響は明らかではなかった (Table 12)。

過去の報告によると植物成長調整物質の要求は、外植体の大きさによって異なっている。Tahara (1977) によると、エビネとキエビネの茎頂の比較の大きなサイズ (1.5~2.0 mm) を培養した場合は、

BA と NAA の添加は PLB またはカルス状組織の誘導に効果があったとしている。しかし、Shimasaki and Uemoto (1987) は、エビネ (*Calanthe discolor*) の茎頂組織は、植物成長調整物質を添加しない 1/8 濃度の MS 培地により緑色組織及び PLB を形成したとしている。*Cymbidium* 'Sazanami' var. 'Harunoumi' の茎頂培養において、最適な植物成長調整物質の濃度は、茎頂組織の大きさ、すなわち葉原基の数により異なる (Kim and Kako 1982)。植物成長調整物質を加えない場合、茎頂の生存率は、4 ないし 6 個の葉原基を持つ場合は比較的高いが (70-100%)、2 個の葉原基の場合、生存率は 30% に低下した。しかし、BA の添加により、2 個の葉原基をもつ茎頂組織でも器官形成は 80% に増加したことから、茎頂組織の培養には BA の添加は有効であるといえる。

今回の結果とこれらの報告から、キエビネの茎頂の生存には植物成長調整物質が有効であり、茎頂の大きさ (葉原基の数) により生存に要求される植物成長調整物質の種類や濃度が異なる可能性が高い。

### < B5 培地の各要素の影響 >

基本培地として最も生存率が高かった B5 培地のマクロ・ミクロ・有機の各要素を 1 倍、1/2 倍、1/4 倍として組み合わせて行った茎頂培養 1 ヶ月後の結果を Table 6 に示した。ミクロ要素を 1/4 倍とした場合 (培地 No.7~9, No.16~18, No.25~27) では、ほかのマクロ要素、有機要素が 1, 1/2, 1/4 倍に関わらず、生存率は 75% (53/72) と高かった (Table 6)。しかし、ミクロ要素が 1 倍のときの生存率は 8.3% (6/72)、1/2 倍のときは 33.3% (21/68) と低く、ミクロ要素の濃度と関係があった。ミクロ要素が阻害的に働く例として、Ichihashi (1979) は、Fe-EDTA を除くミクロ要素の添加は、シランの実生の成育を妨げ、ミクロ要素を減少した方が成育がよかったとしている。また、*Ophrys apifera* の茎頂培養においてもマクロ要素の Ca<sup>2+</sup> をミクロ要素のレベルまで減少させることにより、高い生存率を得ている (Hoppe and Hoppe 1987)。エビネ属の例では、成分を低くした場合、生存率が上がることを、Shimasaki and Uemoto (1987) がエビネの培養において MS 培地の濃度を 1~1/16 倍で検討した結果、1/8 倍とした場合に生存率が高くなったと報告している。これらの結果から、Ca<sup>2+</sup> やミクロ要素の減少がエビネ類の茎頂組織の生存や成育に適していると思われる。

茎頂培養 3 ヶ月後の培養物を、その形状により次

Table 9. Ionic compositions of the various medium for the culture of Orchid.

Medium	% of cations				% of anions				Total ionic concentration (me l <sup>-1</sup> )
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	
Knudson <sup>1)</sup>	38	9.3	42.6	10.2	42.6	9.3	48.2	-	19.9
Vacin & Went <sup>2)</sup>	37.4	34.6	18	10	29.1	10.3	53.8	-	20.3
Murashige & Skoog <sup>3)</sup>	41.5	40.3	12.1	6	79.4	2.4	6	12.1	49.6
1/2 Murashige & Skoog <sup>3)</sup>	41.5	40.3	12.1	6	79.4	2.4	6	12.1	24.8
Gamborg B5 <sup>4)</sup>	6.4	77.4	6.4	6.4	77.4	3.4	12.7	6.4	31.9
Germination medium for <i>Calanthe furcata</i> <sup>5)</sup>	63.7	6.4	20	10	10.4	80	9.7	-	20
PLBs proliferation medium for <i>Phalaenopsis</i> <sup>6)</sup>	25	38	27	10	60	17	23	-	20

1) Knudson (1922), 2) Vacin and Went (1949), 3) Murashige and Skoog (1964),

4) Gamborg *et al.* (1968), 5) Ichihashi (1980), 6) Ichihashi (1992).

Table 10. Results of the shoot meristem culture of *C. sieboldii* in MS medium modified by the combination of NAA and BA.

NAA \ BA	0	0.02	0.2	2.0	4.0	total
	0	1* 1/4**	6 0/3	11 0/2	16 1/4	
0.02	2 0/3	7 0/3	12 0/3	17 0/3	22 0/3	0/15
0.2	3 0/2	8 0/2	13 0/4	18 0/2	23 0/2	0/12
2.0	4 0/3	9 0/3	14 0/4	19 0/4	24 0/3	0/17
4.0	5 0/3	10 0/3	15 0/3	20 0/4	25 1/3	1/16
total	1/15	0/14	0/16	1/17	1/13	3/75

\* Treatment No.

\*\* Number of survived shoot meristems / number of non-contaminated shoot meristems cultured.

Survived shoot meristems were defined as those not turning brown after one month of culture.

の6タイプに分類した (Table 6, Fig. 8). タイプ1: 原基がわずかに肥大成長 (略号:A), タイプ2: シュート (多くは1~2本のシュートだが, 一部5~10本のシュート形成) (略号: Sh) (Fig. 8A), タイプ3: カルス状組織 (黄白色のもろく表面が毛羽立つタイプ) (略号: C) (Fig. 8B), タイプ4: 苗条原基タイプ (乳白色の緻密な組織で表面は丸い小さなコブ状組織が密集し, 明らかに PLB 及びカルス状組織とは異なるタイプ) (略号: SP) (Fig. 8C), タイプ5: プロトコム状球体 (緑色の通常タイプと白色の異常タイプ) (略号: PLB), (Fig. 8D). タイプ6: 葉原基が発達し異常な形態 (略号: Ab).

タイプ3のカルス状組織は, B5培地のマクロ要素を1/1倍, ミクロ要素を1/2倍, 有機要素を1/2倍とし, NAA 0.02 mg l<sup>-1</sup> ショ糖1%を添加し, 8%の寒天で固めた培地に置床すると伸長し, 根となった (Fig. 8E). このため, カルス状に見えたのは, 根の組織が液体回転培養により伸長せず塊となりカルス状に見えたと思われる, 苗条原基 (Shoot primordium) は, コンペイトウ状の小集塊で体細胞が培養により不定苗条になる途上に現れるドーム状の組織体である (田中・谷口 1988). 苗条原基は, 長期間の培養でも染色体数が安定し, 高い増殖能をもつとされ, 液体培地による垂直回転培養から, 固

体培地に置床することにより容易に苗化する植物が多い (田中・谷口 1988, 谷口・田中 1993). Sato *et al.* (1987) によるとラン科のネジバナの培養により得られた培養物は, 形態及び発生様式から胚発生とよく似たタイプ, 腋芽増殖するタイプ, 苗条原基として増殖するタイプ, 及びこれらが混在するタイプがあることが確かめられている. 本研究で得られたキエビネの苗条原基集塊は, 直径約 0.5mm の丸いコブ状組織をもつ金平糖状の塊で, PLBに見られるような葉原基をもたない組織だった. 組織学的な観察により, 分裂組織は内部組織と同様に表皮組織にも観察された (Fig. 8F). このことから, 本研究で得られたキエビネの苗条原基は, Sato *et al.* (1987) が分類した体細胞不定胚と苗条原基が混在するタイプであると思われる. 苗条原基の基本的な培養環境は, マルチプルシュートのそれとほぼ同様であり, 苗条原基と呼ばれる状態は, 植物の種や組織により異なる器官分化能の程度と, 分化不可逆性の程度が実験的に具体化したものと理解できる (駒嶺ら 1990). また, 形態学的にはシュートを構成すべき分裂組織や原基の融合の状態であると考えられることができるとされ, PLBも培養の技術的な側面から見た場合, 同類のものとみなすのが現実的とされる (駒嶺ら 1990).

Table 11. Results of the shoot meristem culture of *C. sieboldii* in 1/2MS medium modified by the combination of NAA and BA.

BA \ NAA	0	0.02	0.2	2.0	4.0	total
0	1* 0/1**	6 0/2	11 1/3	16 0/4	21 1/2	2/12
0.02	2 0/2	7 0/2	12 1/3	17 0/4	22 1/1	2/12
0.2	3 2/2	8 0/1	13 0/2	18 1/2	23 0/1	3/8
2.0	4 0/2	9 0/1	14 0/3	19 0/2	24 0/2	0/10
4.0	5 0/2	10 0/2	15 0/2	20 1/2	25 0/1	1/9
total	2/9	0/8	2/13	2/14	2/7	8/51

\* Treatment No.

\*\* Number of survived shoot meristems / number of non-contaminated shoot meristems cultured.

Survived shoot meristems were defined as those not turning brown after one month of culture.

Table 12. Results of the shoot meristem culture of *C. sieboldii* in B5 medium modified by the combination of NAA and BA.

BA \ NAA	0	0.02	0.2	2.0	4.0	total
0	1* 2/4**	6 0/3	11 2/3	16 2/2	21 1/3	7/15
0.02	2 3/4	7 3/4	12 2/4	17 3/3	22 0/4	11/19
0.2	3 2/3	8 1/3	13 1/3	18 2/3	23 2/2	8/14
2.0	4 2/3	9 3/4	14 0/3	19 1/2	24 1/1	7/13
4.0	5 1/4	10 2/3	15 1/3	20 2/2	25 3/4	9/16
total	10/18	9/17	6/16	10/12	7/14	42/77

\* Treatment No.

\*\* Number of survived shoot meristems / number of non-contaminated shoot meristems cultured.

Survived shoot meristems were defined as those not turning brown after one month of culture.

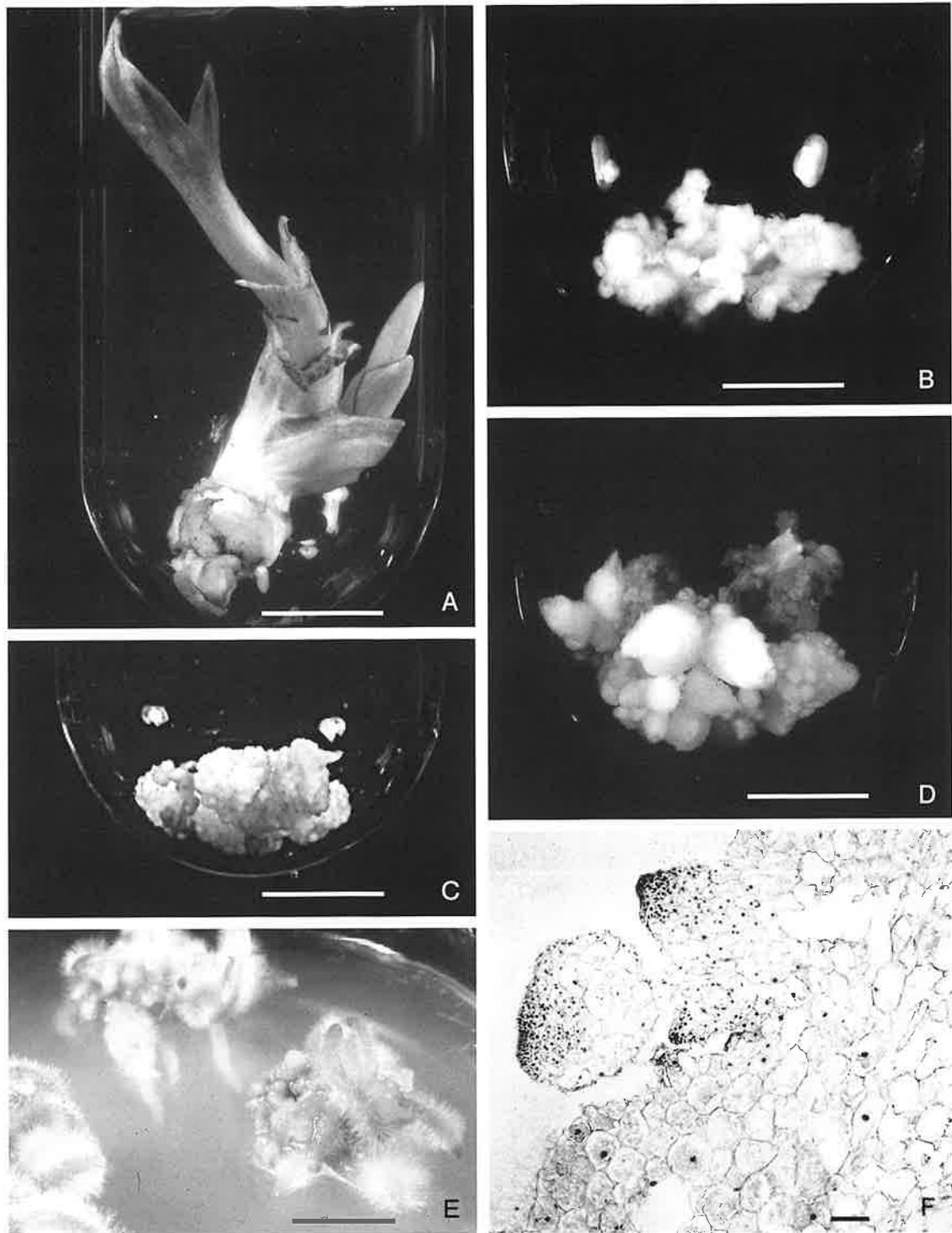


Fig. 8. Various types of cultures induced from shoot meristems of *C. sieboldii* in media containing different concentration of macro, micro and organic elements of B5 medium (table 6) and section of shoot primordia.

A; Shoots (type 2) in 1/2 macro, 1/2 micro and 1/1 organic elements with 2 mg l<sup>-1</sup> BA (medium No.13, B5-16), B; Callus-like tissues (type 3), in 1/2 macro, 1/4 micro and 1/1 organic elements with 0.02 mg l<sup>-1</sup> BA and 2 mg l<sup>-1</sup> NAA (medium No.16, B5-9), C; shoot primordia (type 4) in 1/1 macro, 1/2 micro and 1/2 organic elements with 2 mg l<sup>-1</sup> BA (medium No.5, B5-16), D; PLBs of abnormal type (type 5) in 1/1 macro, 1/4 micro and 1/4 organic elements with 2 mg l<sup>-1</sup> BA (medium No.9, B5-16), E; Differentiated roots from callus-like tissues (type 3) after transplanting on agar medium (1/1 macro, 1/2 micro, 1/2 organic elements with 0.02 mg l<sup>-1</sup> BA and 0.02 mg l<sup>-1</sup> NAA), each medium was added 2% sucrose. F; Section of shoot primordia induced in B5-medium No.5.

A-E; Scale bar = 10 mm, F; scale bar = 300µm.

### < PLB の誘導 >

BA 0.02 mg l<sup>-1</sup> と NAA 2.0 mg l<sup>-1</sup> を添加した B5 培地 (B5-9) の No.5 (Table 6) で誘導された苗条原基は, BA 0.02 mg l<sup>-1</sup> と NAA 0.02 mg l<sup>-1</sup> を添加した No.5 の寒天培地に移植したところ, 3ヶ月後に, 苗条原基集塊の表面に多くの PLB が形成された (Fig. 9A).

### < PLB の増殖 >

寒天培地に移植後, 5ヶ月経過すると PLB の増殖及び苗化が進まなかったため, 再び液体培地 (B5 培地のマクロ要素 1/1, ミクロ要素 1/2, 有機要素 1/2, BA 2 mg l<sup>-1</sup>, ショ糖 2%) に移植した. その結果, PLB は再び成長・増殖を始め, 成長した PLB の基部に多くの小さな PLB を形成した (Fig 9B). 非常に旺盛に短期間に増殖し, 継代培養2ヶ月後に PLB 数は約 11 倍, 生重量は約 10 倍にそれぞれ増加した (Table 13). エビネの PLB の誘導は, 非常に困難であるため, その増殖率についてはこれまで報告されていない. 高い増殖率をもつとされている *Cymbidium* 'Sazanami' var. 'Harunoumi' では, 0.4 g の PLB 集塊を *Cymbidium* に最適な液体増殖培地として開発された培地で 8 週間培養した結果, 生重量が 7.9 倍に増加している (Ichihashi and Uehara 1989). そのため, 培地と培養条件は異なるが, キエビネの PLB 増殖率は, *Cymbidium* 'Sazanami' var. 'Harunoumi'

よりも優れていた.

この結果から, 今回の培養方法は, キエビネにおける, 実用的な大量増殖方法であると言える.

## 第2節

### PLB 増殖培地のイオン組成検討

#### 緒言

ラン科植物においても, さまざまな種類を材料としたクローン増殖や種子発芽のためにさまざまな培地が利用されてきた (Arditti 2008). しかし, 各々の植物に適する培地を明らかにすることは容易ではない. その結果ほとんどの組織培養の研究は普通によく使われる培地の中からよさそうな培地を選んで利用してきた. このような状況の中で, Ichihashi and Yamashita (1977); Ichihashi (1978, 1979, 1980, 1991) は, いづつかの種における種子発芽, 実生の成長, カルス増殖のための好適なイオン組成や総イオン濃度, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の比率, 陽イオンと陰イオンの比率を実験により詳細な研究を行ってきた. この研究を通じて, 彼らはシラン (*Bletilla striata*), キバナセッコク (*Dendrobium tosaense*), ツルラン (*Calanthe furcata*), ガンゼキラン (*Phaius minor*), コチヨウラン (*Phalaenopsis*) などいくつかのランの成育のための培地において最適なイオン組成を明らかにした.

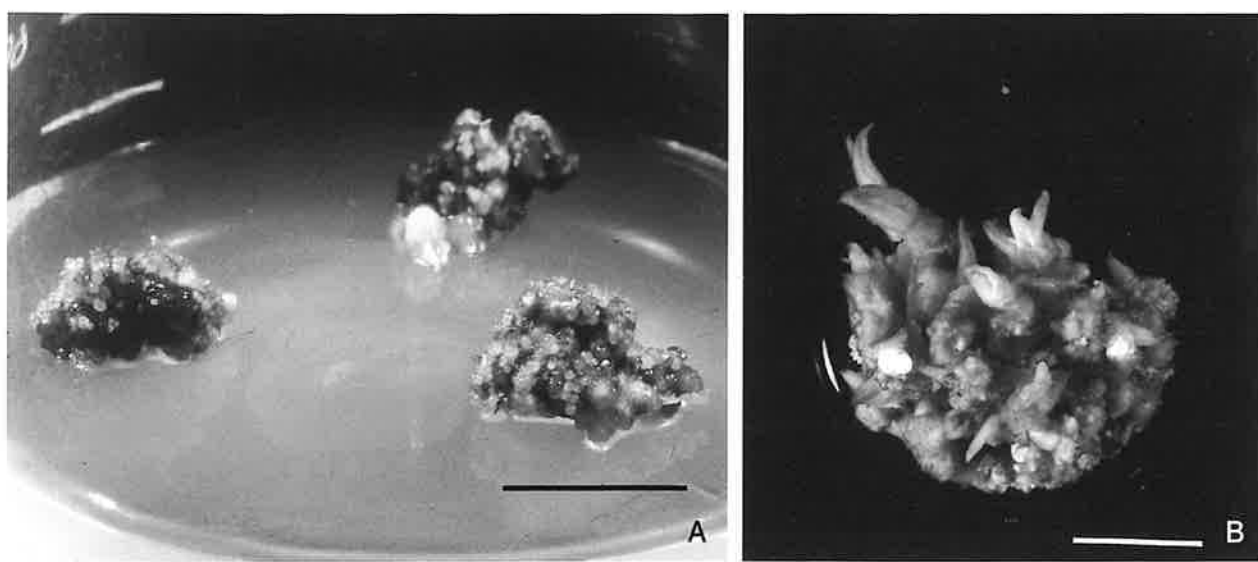


Fig. 9. PLBs induced from *C. sieboldii* by shoot meristem culture.

A; PLBs induced from shoot primordia on modified B5 medium No.5 (1/1 macro, 1/2 micro, 1/2 organic elements) supplemented with 0.02 mg l<sup>-1</sup> BA and 0.02 mg l<sup>-1</sup> NAA. B; Proliferated PLBs in the modified B5 medium supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> BA. Scale bar = 10 mm.

Table 13. Propagation rate of PLBs of *C. sieboldii* during subculture

Test tube No.	Initial		Growth							
	Number of PLBs	Fresh weight (g)	After one month of culture				After two months of culture			
			Number of PLBs	Fresh weight (g)			Number of PLBs	Fresh weight (g)		
1	3	0.11	26	[ 8.7] <sup>2)</sup>	0.56	[5.1] <sup>3)</sup>	45	[15.0] <sup>2)</sup>	1.86	[16.9] <sup>3)</sup>
2	3	0.12	5	[ 1.7]	0.43	[3.6]	23	[ 7.7]	0.7	[ 5.8]
3	3	0.14	12	[ 4.0]	0.53	[3.8]	35	[11.7]	0.97	[ 6.9]
Average	3	0.12	14.3	[ 4.8]	0.51	[4.3]	34.3	[11.4]	1.18	[ 9.8]

Three PLBs originated from same bud were plated in each test tube.

<sup>1)</sup> Number of PLBs over 1.5 mm diameter was counted.

<sup>2)</sup> Number of PLBs after culture / initial number of PLBs.

<sup>3)</sup> Fresh weight after culture / initial fresh weight

Medium: modified B5 medium consisting of 1/1 macro elements, 1/2 micro elements and 1/2 organic elements supplemented with 2 mg l<sup>-1</sup> BA

## 材料および方法

### 茎頂から PLB の誘導

2月と3月に広島植物公園で栽培していたキリシマエビネ (*Calanthe aristulifera* Rchb. f.) とタカネ (*C. striata* R. Br. ex Lindl.) の休眠中の芽を使用した。それぞれの種から10～20個の芽を、一連の実験に利用した。

芽は、葉鞘を除去した後、0.1%の塩化ベンザルコニウム溶液で10分間、1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間、70%のエタノール溶液で10～20秒間攪拌して殺菌した。最後に、蒸留水で3回すすぎ殺菌した。シュートの芽の腋芽から実体顕微鏡を用いて1ないし2個の葉原基を持つおよそ0.5mmの幅と長さの茎頂分裂組織を切り取った。茎頂分裂組織は、25mlの液体培地が入っている試験管(30mm×200mm)に植え、2回転/分の垂直回転培養装置で培養した。

培地は前節のキエビネの茎頂培養で有効であった改変B5培地をコントロールとして使用した(Yamamoto *et al.* 1991)。この培地は元のB5培地(Gamborg *et al.* 1968)を次のように改変した。CaCl<sub>2</sub>を除く多量要素(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)と有機要素(Nicotinic acid, Thiamine·HCl, Pyridoxine·HCl, myo-Inositol)を1/2に、CaCl<sub>2</sub>と微量元素(Fe-EDTA, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, KI)を1/4、Fe-EDTAを1/2とした。茎頂培養には、この改変B5培地に2.0mg l<sup>-1</sup>のN<sup>6</sup>-benzyl adenine (BA)と20g l<sup>-1</sup>のシヨ糖を添加したものをを用いた。

pHは0.1または1.0-N NaOHにより、pH 5.7に調節し、オートクレーブにより15分間120℃で高圧滅菌処理した。培養物は、白色蛍光灯により光強度23 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の24時間連続照明とし、温度は23℃とした。

### PLB 増殖培地の検討

PLB増殖のための最適培地組成を明らかにするために、12種類の異なる組成の培地を準備した(Table 14)。培地は、B5培地の陽イオンと陰イオンを独立させ、その比率をTable 15に示したように変化させた。総イオン濃度は20 me l<sup>-1</sup>とした。また、陽イオンの処理区に於いて、PLBの成長における陽イオンの影響を明らかにするために陰イオンバランスを一定にした。

培地No.1, 2と4の処理区の間でイオンのバランスは、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>とK<sup>+</sup>以外は、一定の状態に保った。したがって、PLB成長の違いは、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/K<sup>+</sup>の差による。これらの3つの処理区の結果から、最適のK<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の比率は、処理区No.1とNo.4のうち最高の成長を示す結果の比率とし、もし最大値がNo.2であれば、二次方程式(y=ax<sup>2</sup>+bx+c)を使用して最大の成長を示す比率を推定することができる。同じ方法で最適のK<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>及びNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>は、それぞれ処理区4, 5, 6と処理区6, 3, 1のデータから決定することができる。次に、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:Ca<sup>2+</sup>の好適な比率は、K<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>の最適値から、3つの比率で考えることができる。つまりK<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の最適値ならば、Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup>とNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>は、a/b, c/d, e/fにより、そしてNH<sub>4</sub><sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:Ca<sup>2+</sup>の好適な比率は、b×d:a×d:



Table 14. The media compositions tested with different ionic compositions arranged systematically.

Medium No.	% of cations					% of anions			
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>
1	70	10	10	10	-	70	10	20	-
2	40	40	10	10	-	70	10	20	-
3	40	10	40	10	-	70	10	20	-
4	10	70	10	10	-	70	10	20	-
5	10	40	40	10	-	70	10	20	-
6	10	10	70	10	-	70	10	20	-
7	40	30	20	10	-	80	10	10	-
8	40	30	20	10	-	60	30	10	-
9	40	30	20	10	-	60	10	30	-
10	40	30	20	10	-	40	50	10	-
11	40	30	20	10	-	40	30	30	-
12	40	30	20	10	-	40	10	50	-
Cont.	6.5	80.2	3.2	6.5	3.6	80.2	3.6	13	3.2

Each medium was supplemented with one fourth strength of micro elements, half strength of Fe-EDTA and organic elements of B5 medium (Yamamoto et al. 1991), 2 mg l<sup>-1</sup> BA and 20 g l<sup>-1</sup> sucrose, and adjusted to pH 5.7. Total anionic and cationic concentrations of the each medium were 20 me l<sup>-1</sup>.

$a \times c, b \times e: a \times e: b \times f, c \times e: d \times f: c \times f$  を求め,  $(b \times d + b \times e + c \times e) / 3, (a \times d + a \times e + d \times f) / 3, (a \times c + b \times f + c \times f) / 3 = \text{NH}_4^+ : \text{K}^+ : \text{Ca}^{2+}$  として最適比率を推測した. 陰イオン処理区の場合,  $\text{NO}_3^- : \text{H}_2\text{PO}_4^- : \text{SO}_4^{2-}$  の好適な比率も同じ方法によって推測した. コントロール培地は, PLB を誘導した培地と同じ改変 B5 培地とした. PLB の最初の新鮮重は, 試験管当たり 0.5 g とし, 培養 1 ヶ月後に重さを計った. 各々の処理区は, 10 本の試験管でおこなった. 培養環境は, PLB を誘導した環境と同じとした.

統計処理は, 一元配置の分散分析に基づき, Tukey の多重分析により, 危険率  $p < 0.05$  で有意差を検定した. データは, 平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) で表した.

### 結果及び考察

PLB の成長は培地のイオン組成により影響を受けた (Table 15, Fig. 10).

キリシマエビネにおいては, 培地 No.1, No.6, No.7, No.11, No.12 の培地で, タカネにおいては No.6, No.7, No.11, No.12 の培地で PLB は褐変し, 低い増殖率を示した. 陽イオン処理区の中で PLB の成長は, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の比率が高い培地 (培地 No.1) と Ca<sup>2+</sup> の比率が高い培地 (培地 No.6) では明らかに

阻害されたが, K<sup>+</sup> の比率が高い培地 (培地 No.4) では促進された. 培地 No.4 は, 両方の種において PLB は最高の成長を示した. この培地 No.4 の陽イオン組成はコントロール培地 (改変 B5 培地) の組成と類似していた.

陰イオン処理区では, 陽イオン処理区と同様に PLB の成育に差が見られたが, 最高の成長を示す処理区は, キリシマエビネとタカネで異なった. キリシマエビネでは培地 No.9 が, タカネでは培地 No.8 の結果がよかった. また, 両種に於いて培地 No.7, 8, 12 の成育が悪かった. 培地 No.12 は, 高い割合の SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> が阻害的に働いたと考えられるが, 培地 No.7 及び 8 は, コントロールとした培地の陰イオン組成と大きな差はなく, 今後の詳しい研究が必要である.

Table 15 の結果に基づき, キリシマエビネとタカネに最適な培地を, 系統変量法の計算により得ることができた (Table 16). 陽イオンに関する最適の培地は, コントロール培地と類似していたが, 陰イオン培地において, コントロール培地と比較すると最適培地の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は, コントロール培地の約半分の割合であり, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> は約 12 倍の割合であった. コントロール培地は, 前節の茎頂分裂組織培養用の培地を検討して得られた培地である (Yamamoto et

Table 15. Effects of ionic compositions in medium on the fresh weight of PLBs of *Calanthe aristulifera* and *C. striata*.

Treatment	Medium No.	<i>C. aristulifera</i>		<i>C. striata</i>	
		fresh weight (g)		fresh weight (g)	
Cationic	Control	1.35 ± 0.13	b	0.91 ± 0.04	d
	1	0.83 ± 0.07	cd	1.26 ± 0.08	c
	2	1.21 ± 0.10	bc	1.83 ± 0.23	b
	3	1.21 ± 0.33	bc	1.70 ± 0.07	b
	4	2.28 ± 0.32	a	2.29 ± 0.15	a
	5	1.47 ± 0.50	b	1.90 ± 0.36	b
	6	0.67 ± 0.14	d	1.27 ± 0.10	c
Anionic	Control	1.35 ± 0.13	ab	0.91 ± 0.04	bc
	7	0.72 ± 0.03	de	0.71 ± 0.02	c
	8	1.04 ± 0.15	c	1.42 ± 0.19	a
	9	1.51 ± 0.52	a	1.10 ± 0.19	ab
	10	1.16 ± 0.19	bc	1.20 ± 0.32	ab
	11	0.74 ± 0.06	d	0.75 ± 0.08	c
	12	0.69 ± 0.02	e	0.64 ± 0.02	c

Initial fresh weight was 0.5 g. Fresh weight was measured after one month of culture. Each treatment consisted of 10 test tubes. Fresh weight indicates mean ± SD. Same letters in each of cationic and anionic treatments for each species indicate insignificant difference by Tukey's multiple range test at  $P < 0.05$ .

Table 16. Optimum medium compositions calculated for the culture of PLBs in *C. striata* and *C. aristulifera*.

Medium for:	% of cations					% of anions			
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>
<i>C. aristulifera</i>	10.4	70.0	9.6	10.0	-	42.1	43.7	14.2	-
<i>C. striata</i>	10.9	68.1	11.0	10.0	-	43.0	42.9	14.1	-
Control (modified B5)	6.5	80.2	3.2	6.5	3.6	80.2	3.6	13.0	3.2

Total ionic concentration was adjusted to 20 me l<sup>-1</sup> for each medium. Other additional substances were shown in Table 14.

al.1991). そのため、PLB 増殖培地に適した培地は、茎頂分裂組織培養用培地とは異なる可能性もある。

ラン科植物の組織培養と種子発芽のために、従来いくつかの培地、たとえば Murashige and Skoog 培地 (1962)、Knudson B 培地 (1922)、Vacin and Went 培地 (1949) などが主に使われてきた。しかし、これらの3つの培地のイオン構成は大きく異なっているにも関わらず (Table 9)、他の培地組成との比較をしないで使われてきた可能性が高い。無機イオンの要求性は種により異なり、組織培養の培地組成は、増殖させたい種により最適化したイオン組成の培地を開発すべきである。この点について Ichihashi

(1980) は、3種のラン (*Dendrobium tosaense*, *Calanthe furcata*, *Phaius minor*) の苗の成長を調べ、Hamner et al. (1940) や Takano and Kawazoe (1973) により開発された三角法 (triangle method) を用いて研究し、それぞれ最適の培地組成を明らかにした。D. tosaense, C. furcata, P. minor の結果はそれぞれ、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: K<sup>+</sup>: Ca<sup>2+</sup>: Mg<sup>2+</sup> = 60: 15: 15: 10, 25: 55: 10: 10, 40: 30: 20: 10 であり、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 70: 20: 10, 70: 20: 10, 70: 10: 20 であった (Ichihashi 1980)。また *Phalaenopsis* の若い花梗から誘導した PLB 増殖培地のイオン組成は、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: K<sup>+</sup>: Ca<sup>2+</sup>: Mg<sup>2+</sup> = 25: 38: 27: 10, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 60: 17: 23 であった (Ichihashi

1992a). これらの報告された培地と比較するとキリシマエビネとタカネの PLB 増殖培地は、陽イオン組成に関してはよく似ているが、陰イオン組成に関しては異なっていた。また、種は異なるが、Ichihashi (1980) によると *Calanthe furcata* の発芽率は陰イオン組成の  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  の割合が 80% の培地で良好だった (Table 9)。このように  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  の比率が特に高いことは、エビネ属の培地の特徴かもしれないので、今後エビネ属の PLB 増殖や組織培養においてどのような役割をはたしているのか明らかにする

ことが必要である。

### 第3節 *in vitro* 増殖したタカネの培養変異 緒言

商業的に増殖されているラン、例えば *Cattleya*, *Cymbidium*, *Phalaenopsis* において培養変異は、クローン増殖を目的とした場合には、しばしば深刻な問題となっている。そして遺伝子型により、培養変異の頻度の差が報告されている (Tokuhara and Mii 1998)。しかしエビネ属においては、変異について

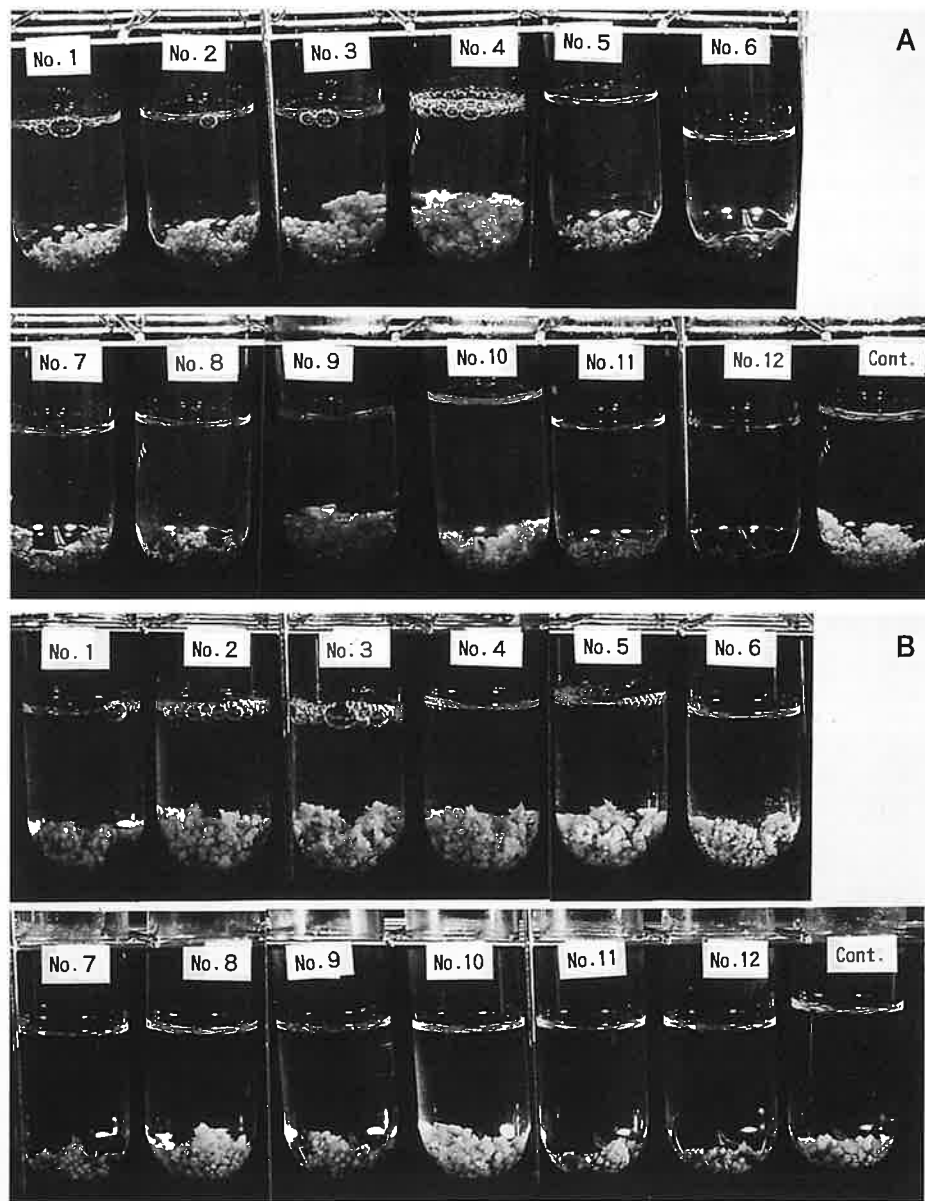


Fig.10. Results of PLB proliferation after one month of culture in 12 media each with different ionic concentrations in two species of *Calanthe*.

A: *C. aristurifera*, B: *C. striata*, No. on each test tube refers to the medium number in Table 5.

Diameter of a test tube = 30 mm.

の報告事例はない。

### 材料および方法

第1節のキエビネを材料として確立した茎頂培養法を用い、第2節に於いて、タカネからPLBを誘導し、増殖させた。PLBは、NAA 0.02 mg l<sup>-1</sup>とショ糖 10 g l<sup>-1</sup>とゲランガム 2 g l<sup>-1</sup>を添加した改変B5培地に置床した。培地は0.1 Nまたは1.0 NのNaOHまたはHClでpH5.7に調整し、オートクレーブで15分120°C高压滅菌処理した。光強度23 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の白色蛍光灯16 h day<sup>-1</sup>で、培養温度は23°Cとした。

苗化培地に移植4~5ヵ月後、2~3枚の葉に成長した高さ5~10cmの小植物は、根から培地を取り除いた後に根を水苔で巻いて鉢植えにし、湿度を保つために発泡スチロールの容器内に並べ、その容器をビニールで覆い、2~3ヵ月間順化した。その後、水苔から軽石で植え替え、成育するにつれて数回鉢増しを行い、最低気温を5°Cとしたガラス温室内で4年間実生苗と同様に開花するまで栽培した。開花した100個体の花の形質を調査した。

組織学的研究のために、増殖した異なる形質をもつ2個体のタカネとほかの通常個体の花弁と葉の徒手切片を作成し、グリセリンで包埋して光学顕微鏡で観察した。

また、変異した個体の倍数性をフローサイトメーターにより以前報告された方法で確認した(Mishiba *et al.* 2000)。タカネ (*Calanthe striata*) の通常個体と

花が大きい変異した個体の若い葉から組織を約1cm<sup>2</sup>切り取った。これらの葉は、核を放出させるために、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液 (pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 2mM MgCl<sub>2</sub> と 2mg l<sup>-1</sup> DAPI の 10mm の Tris-HCl 緩衝液) 内で、外科ナイフにより小さく刻んだ。遊離した核を含んだDAPI溶液は、大きな細胞片を除去するために20 μm ナイロン・メッシュで濾過し、フローサイトメーター (CA II, Partec Ltd. Muster, Germany) によってDNA量を評価するためのサンプルとして使った。内部標準は、シラン (*Bletilla striata* Rchb.f.) を用いた。

統計処理は、一元配置の分散分析に基づき、Studentのt検定により、危険率p<0.05で有意差を検定した。データは、平均値±標準偏差 (SD) で表した。

### 結果と考察

茎頂培養により増殖したタカネの100株の中では2個体を除いて花の形と色彩には大きな変化はなかった (Fig. 11A, 11B)。しかしこの2個体の花は通常の個体の花とは明らかに異なり、大きくて厚みがあった (Fig. 12)。フローサイトメーターによる分析では、この2個体は元の株に比べて核のDNA量が2倍であることを示し、4倍体であることを示唆した (Fig. 13)。4倍体は、2倍体のすべての花の形質において2倍体よりも有意に大きく、花の幅は8.4%、高さは20.1%、側花弁の幅は41.3%、上萼片は22.7%大きくなった (Table 17.Fig. 12A)。4倍

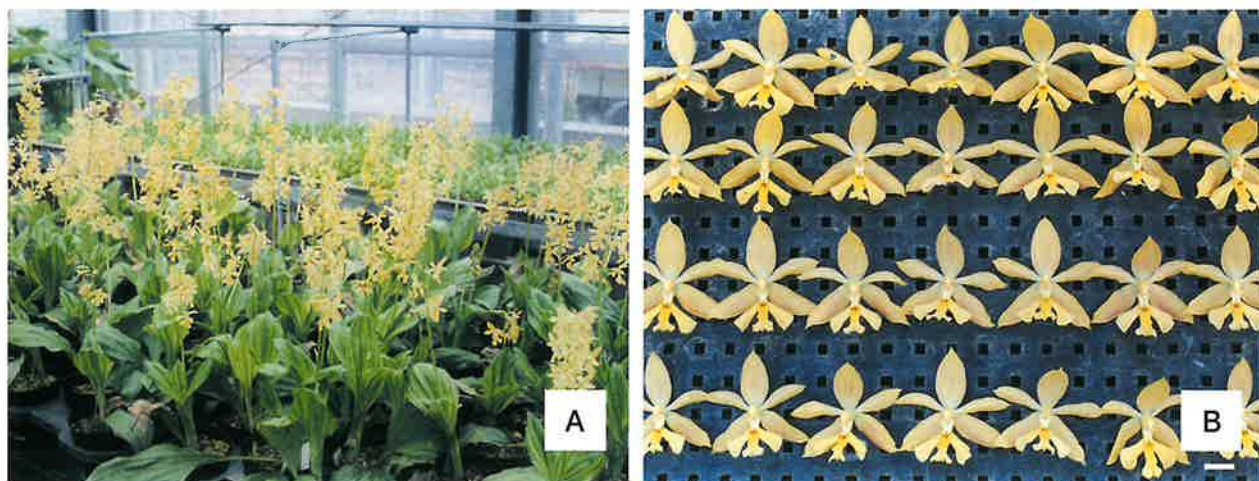


Fig. 11. Micropropagated plants of *C. striata*.

A; Flowering potted plants in a greenhouse in April.

B; Variation in flower morphology of micropropagated plants.

Each flower was collected from different individual plants. Scale bar = 10 mm.

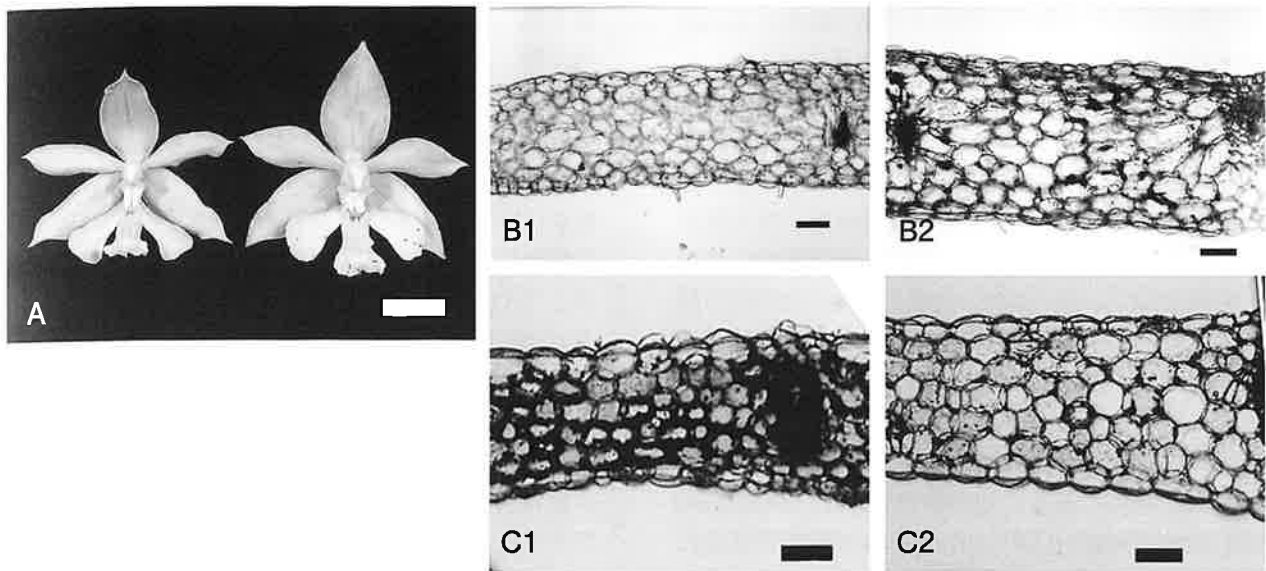


Fig. 12. Flowers and transverse sections of petals and leaves of micropropagated *C. striata*.

A: flowers, left diploid, right: tetraploid. Bar = 10 mm. B: transverse sections of petal of diploid (B1) and tetraploid (B2). C: transverse sections of leaf of diploid (C1) and tetraploid (C2). Scale bar = 100  $\mu$ m.

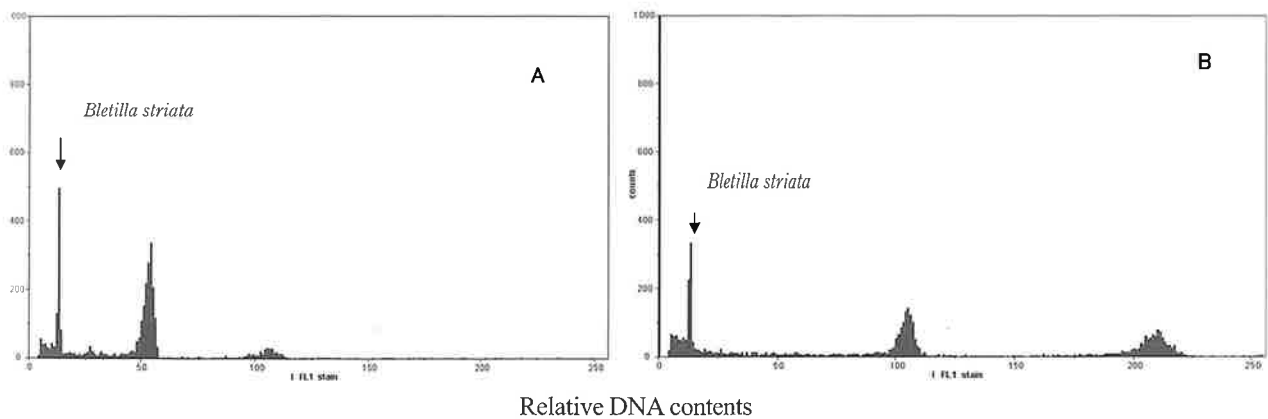


Fig. 13. FCM analysis of nuclei isolated from young leaves of 2 types, 2x(A) and 4x(B), of micropropagation of *C. striata*. DNA contents of the variants were estimated by using *Bletilla striata* as an internal standard.

Table 17. Characteristics of diploid and tetraploid of micropropagated *C. striata*.

Ploidy level	Width of flowers (mm)	Height of flowers (mm)	Width of petal (mm)	Width of dorsal sepal (mm)
Diploid	39.5 $\pm$ 3.5 a	35.8 $\pm$ 3.0 a	6.3 $\pm$ 0.4 a	9.7 $\pm$ 0.4 a
Tetraploid	42.8 $\pm$ 2.1 b	43.0 $\pm$ 2.3 b	8.9 $\pm$ 0.2 b	11.9 $\pm$ 0.6 b
Rate of increase <sup>1)</sup>	8.4%	20.1%	41.3%	22.7%

Number of investigated plants; width and height of flowers, diploid=100 flowers from 100 plants, tetraploid=10 flowers from 2 plants. Width of lateral petals and dorsal sepals, diploid=10 flowers from 10 plants, tetraploid=10 flowers from 2 plants.

<sup>1)</sup>(Data of tetraploid - data of diploid)/data of diploid  $\times$  100

Data expressed mean  $\pm$  SD. Values followed by different letters within a column indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Student's T-test.

体の花の側花弁と葉が2倍体より厚くなり、側花弁はそれぞれ2倍体では380 $\mu$ m、4倍体では510 $\mu$ m、葉は250 $\mu$ mと300 $\mu$ mとそれぞれ34.2%、20%厚くなった (Fig.12 B1-B2, C1-C2).

組織培養された植物がしばしば培養変異を生ずることが知られている (Vajrabhaya 1977). ランではデンドロビウム (Vajrabhaya 1977) など多くの種類で観察されている. これらの変異の中には倍化や異数化の染色体変異を伴うものが見られ、倍数化した変異個体では花の大型化、丸型化、肥厚化が観察された (田中・長久 1979). 一方、ランでは比較的早い年代から染色体数が調査され、主要な品種の多くが高次倍数体であることが報告された (Tanaka and Kamemoto 1984). このため、優れた個体を得るためにコルヒチン処理による人為倍数体の作出も試みられた (Vajrabhaya 1977, Wimber and Van Cott 1966, Sanguthai *et al.* 1973, Griesbach 1981; 1985, Watrous and Wimber 1988). コショウランでは、染色体数が倍加した植物体は、polysomaty (体細胞における倍数性細胞の混在) をもつ PLB から誘導された2次 PLB において効果的に生じることが報告されている (Chen *et al.* 2009). また、茎頂培養により誘導した他のタカネ (*Calanthe striata*) の PLB をフローサイトメーターで調査したところ、2倍体の細胞以外にも4倍体の細胞が高い割合で含まれていて polysomaty を示した (データ未発表).

エビネ属においては従来大量増殖が困難だったため、組織培養による変異の報告はされていない. エビネ属 (Tahara 1987) や *Phalaenopsis* (Chen *et al.* 2009) など多くのラン科植物においても4倍体は2倍体に比べて花が大きくなり、花持ちが長くなることが知られている. 今回の研究においてタカネの4倍体でも同様なことが確認でき、2倍体より価値の高い園芸植物として有益であり、さらに3倍体を生み出すための育種親としても重要である. そのため、組織培養による増殖の過程で起きる4倍体の形成を明らかにすることは、コルヒチン処理による人為的な染色体倍加方法と同様にエビネ属のさまざまな種やゲノムタイプにおいて重要であろう. この研究で明らかにした最適培地によるエビネ属の増殖方法は親とまったく同じクローンを増殖できるだけでなく、染色体を倍加した植物体を生み出すためにも効果的であると言える.

## 第4節 ウイルス検定

### 緒言

永年性植物においてウイルス病は、品質や収量の低下などを引き起こす深刻な病気である. ラン科植物においてもウイルス感染による病気は、壞疽や病斑による品質の低下や成育不良を引き起こすため、深刻な問題となっている. 現在、エビネ属においては、① CyMV (シンビジウムモザイクウイルス)、② CaMMV (エビネ微斑モザイクウイルス)、③ OFV (ランエゾ斑紋ウイルス)、④ ORSV (オドントグロッサムリングスポットウイルス)、⑤ CMV (キュウリモザイクウイルス)、⑥ BYMV (インゲン黄斑モザイクウイルス)、⑦ TuMV (カブモザイクウイルス)、⑧ CYVV (クローバ葉脈黄化ウイルス)、⑨ CalMV (エビネモザイクウイルス) の6属9種のウイルスが報告されている (Yamamoto and Ishii 1981, Inouye *et al.* 1982, Hammond and Lawson 1988, Inouye *et al.* 1988, Chang *et al.* 1991, Gara *et al.* 1998). ウイルスに罹病した植物からウイルスを除去する方法については抗ウイルス剤の利用、高温処理、組織培養などいくつかの方法がある. また、種子繁殖ではウイルスが伝わらずウイルスフリー化となることも報告されているが (Kawakami *et al.* 2008), まだ詳細は明らかではない. 茎頂を利用した組織培養は、茎頂分裂組織にウイルス濃度が低いことから、ウイルスに罹病した個体からウイルスを除去するには有効な手段である.

### 材料および方法

第1節と同様の方法で茎頂培養により誘導したエビネ属 (ヒゼン (*Calanthe aristurifera* × *C. striata*), タカネ (*C. striata*), エビネ (*C. discolor*)) から誘導した PLB とその茎頂を摘出した母株のウイルス検定を行った.

CyMV, ORSV, CMV の検定は ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法で行った. ELISA 検定は、親株の葉と増殖中の PLB から各 100 mg を破碎し、ELISA 法で検定した. CyMV, ORSV, CMV のウイルス抗体と AP 標識ウイルス抗体は、日本植物防疫協会製を用いた. また、各検体を電子顕微鏡により検鏡した.

ELISA 法は、以下の手順で行った.

- (1) ELISA プレートにウイルス抗体 ( $\gamma$ -グロブリン) 200 $\mu$ l を分注する. 抗体は 0.05M 炭酸ナトリウム (pH9.6: 使用直前に調整) で 200~600

- 倍に希釈する。
- (2) 37°Cで2時間 (4°Cで一夜) 静置する。プレートは密閉する。
  - (3) PBSTで3回以上洗浄する。プレートを保存する場合は洗浄後、NaCl 150mmol l<sup>-1</sup>, BSA 0.5% (W/V) の溶液でコーティングする。内容物を除去してからプレートを空にして密封後-20°Cで保存する。
  - (4) PBST中ですりつぶした検体試料を200 μl分注する。検定試料の濃度は50~100mg/ml。摩砕後、5,000~10,000rpmの遠心を5分間おこない、上清を得る。
  - (5) 37°Cで2時間 (4°Cで一夜) 静置する。プレートは密閉する。
  - (6) PBST上で5回以上洗浄する。
  - (7) PBSTで200~600倍に希釈したAP標識ウイルス抗体を200 μl分注する。
  - (8) 37°Cで4時間 (4°Cで一夜) 静置する。プレートは密閉する。
  - (9) PBSTで5回以上洗浄する。
  - (10) 10%ジエタノールアミン液にパラニトロフェニルリン酸を1 mg ml<sup>-1</sup>添加した基質を200 μl分注する。
  - (11) 暗黒下で30~60分静置する。
  - (12) 3N NaOHを50 μl分注し、反応を停止させる。
  - (13) 405nmで吸光度を測定する。

### 結果及び考察

エライザ法及び電子顕微鏡法によるウイルス検定の結果をTable 18に示した。茎頂を摘出した母株のうちウイルス感染していなかった2株8茎頂から誘導したPLBからは、ウイルスが検出されなかった。また、ウイルス感染していた5株からの26茎頂由来のPLBのうち、CyMVに感染した親株から誘導した26茎頂からCyMVの感染は認められなかった。しかし、CalMVに感染していた親株からの22茎頂由来のPLBのうち1茎頂から誘導したPLBからCalMVが確認された (Table 19)。

ウイルス感染した植物体の茎頂は、ウイルスが侵入していないか濃度が低いいため、茎頂培養はウイルス感染した植物体から、ウイルスを除く有効な手段である。ウイルスフリーを望むには一般には0.3mm程度以下に茎頂を取ることが必要とされている。洋ランの増殖に茎頂培養が使われるが、シンビジウムの例では、茎頂の生存率を高め、さらに増殖させるためにはある程度の大きさ (約2-3 mm) に茎頂を取っている。今回の試験では、0.5 mm程度の大きさに茎頂を摘出した。その結果、親株がウイルス感染していても茎頂培養により26茎頂由来のPLBのうち25茎頂由来のPLB (96%) がウイルスフリーとなった。残りの1茎頂に由来するPLB (4%) ではウイルスが完全に除去できなかった (Table 19) が、この1茎頂と同じ株から誘導した他の3茎頂由来の

Table 18. Results on virus test of mother plants and induced PLBs of *Calanthe*.

Mother plants number	Mother plants of taxa	Virus species <sup>1)</sup> detected in mother plants	Number of cultured meristems	Results on virus test of induced PLBs	
				+	-
1	<i>C. aristulifera</i> × <i>C. discolor</i>	—	4	0	4
2	<i>C. aristulifera</i>	—	4	0	4
3	<i>C. striata</i>	CyMV, CalMV	4	0	4
4	<i>C. striata</i>	CyMV, CalMV	10	0	10
5	<i>C. aristulifera</i> × <i>C. discolor</i>	CyMV, CalMV	4	0	4
6	<i>C. aristulifera</i> × <i>C. discolor</i>	CyMV	4	0	4
7	<i>C. discolor</i>	CyMV, CalMV	4	1 <sup>2)</sup>	3
Total			34	1	33

<sup>1)</sup> —: Virus was not detected using ELISA test.

<sup>2)</sup> Detected virus was CalMV using an electro micro scope.

CyMV: Cymbidium mosaic virus, CalMV: Calanthe mosaic virus

PLBからはウイルスが検出されなかった。1茎頂からのPLBがウイルス感染していたのは、茎頂の摘出サイズがウイルスの検出されなかった他の茎頂に比較して大きかった可能性がある。以上の結果は、ウイルス感染したエビネ類の植物体をウイルスフリー化するのに、茎頂培養は非常に有効な手段であることが示された。エビネ属に感染するウイルスとして、現在までに6属9種のウイルスが報告されている (Yamamoto and Ishii 1981 Inouye *et al.* 1982, Hammond and Lawson 1988, Inouye *et al.* 1988, Chang *et al.* 1991, Gara *et al.* 1998)。エビネ類は観賞植物として園芸的に価値が高いことから、多くの愛好家が栽培しているが、アブラムシによる汁液伝搬や株分け時の接触感染などによりウイルス感染する機会が多い。一方、完熟種子による繁殖では、次世代へはウイルス感染しないとの報告がある (Kawakami *et al.* 2008)。以前は山採りにより優秀な形質をもつエビネを得ていたが、乱獲や自然開発により、野生株が少なくなった。さらに人工交配による技術が確立したこともあり、無菌播種による苗作りがさかんになり、交配親の選抜が進んだことから優秀な形質をもつ個体が多数作出されている。しかし、種子繁殖では、均一な形質をもつ個体を大量に得ることができない。例えば、大型で、色彩・形に優れ、香りもあり、花持ちがよく、栽培しやすいなどの傑出した形質を持つ個体が交配により作出されたとしても、増殖に時間がかかり、さらに普及の段階までにウイルス感染してしまう可能性もある。そのため、そのような個体をウイルスフリーの状態に維持し、さらに大量増殖することはエビネ属の園芸化にとって有意義である。また、過去に野生から選抜されたエビネの名品もウイルス感染している株が多く、本来の形質を表していない。そこで、茎頂培養により過去の名品をよみがえらせることも可能だと思われる。

### 第3章

#### 総合考察

難増殖性の植物のクローン増殖における組織培養の利用は、ヘテロな植物を短期間に大量に増殖するための非常に有効な手段である。しかしながら、必要とされる植物のすべてにおいて、組織培養法が確立されているというわけではない。本論文では、従来から難増殖性花卉とされているグロリオサとエ

ビネ類について増殖技術、順化方法、培養変異、ウイルス除去の可能性などについて個別に増殖の実用化に関する課題の検討を行った。

グロリオサの圃場栽培における年間の増殖効率が2倍程度と低いため、組織培養による増殖方法が研究されてきた (Custers and Bergervoet 1994, Sivakumar and Krishnamurthy 2004)。しかし、実用的な技術としてはまだ不十分な状況にある。そこで、第1節では、増殖の効率化を図るため、初代培養の培養部位の検討を行った。これまでの研究では、培養部位として芽の先端部や塊茎の発芽部分を使用している。一方、芽を含まない塊茎の培養では、根しか形成しなかったと報告されている (Finnie and Staden 1989)。従って本研究では、培養部位として茎頂と幼芽基部の比較検討を行った。シュートの増殖率は、培養75日後には、茎頂は1倍、幼芽基部は5.2倍となり、150日後には、それぞれ5倍と47.2倍だった。培養開始から早い段階からのシュートの増殖は、その後のシュートの増殖に影響があり、最終的に一定期間の増殖に大きく影響する。本研究により茎頂部分より幼芽基部が外植体としてシュートの増殖に適していることがわかった。

培養物の順化は、外界への適応を促し、栽培するためには不可欠な手段である。グロリオサにおいても、*in vitro*で増殖したシュートは、順化する前に、発根させるなど何らかの処理が必要である。発根にはNAA, IBAなどのオーキシンが有効とされている (Samarajeewa *et al.* 1993, Sivakumar and Krishnamurthy 2004)。しかし少数個体を扱った実験室レベルの研究であり、実用化に向けた栽培試験が必要とされる。特にグロリオサの場合はシュートが軟弱であり、大量の苗を育成することは、非常に手間がかかり、順化等の施設も必要となる。一方、球根植物の場合は *in vitro* で球根を形成させることにより、乾燥、寒さ、暑さなどの外部ストレスに強い状態となるため、実際にジャガイモ、サギソウ、ウチョウランなどの組織培養では、*in vitro* で形成させた球根による増殖が行われている。

そのため、グロリオサでも *in vitro* で塊茎を形成させる方法が有効と考えられ、塊茎形成は植物成長調整物質の添加やホルモンフリーの培地で引き起こされるといふ報告がある (Kozak 2002, Ghosh *et al.* 2007)。本研究では継代期間を延長することにより、増殖したシュートから塊茎を形成させることができた。しかし、このままでは、休眠しているため、圃



場栽培の塊茎の休眠打破方法を参考に *in vitro* の塊茎の休眠打破に関する試験を行った。その結果、2週間 8℃の低温とその後 30℃の高温に置くことにより発芽させることができた。塊茎は、乾燥・暗黒下でも発芽することから、段ボール等の容器に入れてインキュベーター内で場所を取らず大量に処理することが可能となり、実用的な処理方法が確立できたものと考えられる。また、発芽した *in vitro* 由来の塊茎は、圃場栽培の塊茎と同様に栽培が可能であり、2作することで *in vitro* で形成された 1g 以上の塊茎のうち、12.2% は 7g 以上の重さとなり、かつすべての塊茎が開花した。このように培養塊茎の特性が調査できたことにより、今後実際栽培で組織培養による計画的な塊茎生産に利用できるものと思われる。また、培養変異は特に観察されなかったため、今後、育種により優良形質を有する親株を育成後、今回の技術を利用することにより生産地への塊茎供給が図れると思われる。

エビネ属では、*in vitro* 増殖は困難であり、大量増殖に関しては筆者らの報告が最初である (Yamamoto 1991)。この方法により、これまで汚染率が高いとされていた殺菌方法を改善し、数%の汚染率に抑えることができた。また、茎頂組織部分から PLB を誘導する基本培地を検討し、B5 培地が優れていること、植物成長調整物質の検討により BA が有効であること、さらに培地の要素について細かく検討し、特に無機微量元素を基本組成の 1/4 に減少することにより、生存率が大幅に高まることがわかった。この結果、これまで不可能と思われていたキエビネの大量増殖が可能となり、今後のエビネ属の増殖について、活路を開くことができた。この方法を発展させるため、キリシマエビネとタカネの PLB を誘導し、増殖培地について検討した。植物の組織培養用培地は、いくつも開発されているが、どの培地が最も適しているかは試行錯誤を重ね、その中から結果がよい培地を使っている。Ichihashi は、系統変量法を用いてシラン等の実生の成育やカルスの増殖について調査し、ランの種類や成育ステージ等で差があることを報告した (Ichihashi and Yamashita 1977; Ichihashi 1978, 1979, 1980, 1991, 1992a)。エビネの PLB の増殖については、どのような培地が優れているのかのデータがなかったため、Ichihashi (1992a) の方法により、増殖培地の決定を試みた。その結果、キリシマエビネとタカネでは、ほぼ同様のイオン組成の培地であることが確認された。今回の試験区設

定ではキリシマエビネは  $\text{NH}_4^+ : \text{K}^+ : \text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+} = 10.4 : 70 : 9.6 : 10$ ,  $\text{NO}_3^- : \text{H}_2\text{PO}_4^- : \text{SO}_4^{2-} = 42.1 : 43.7 : 14.2$  であり、タカネは  $\text{NH}_4^+ : \text{K}^+ : \text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+} = 10.9 : 68.1 : 11 : 10$ ,  $\text{NO}_3^- : \text{H}_2\text{PO}_4^- : \text{SO}_4^{2-} = 43 : 42.9 : 14.1$  となり、コントロールとした B5 培地と比較して、陽イオンでは  $\text{NH}_4^+$  の比率が高く、陰イオンでは、 $\text{NO}_3^-$  の比率が低く、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  の比率が高くなっている。今後、その理由について明らかにする必要がある。

*in vitro* 増殖した培養物については、必ずしも同様の形質をもつとは限らない。ラン科植物においては、培養変異が問題とされ、その頻度は、10%程度なら容認できるとされている (Tokuhara and Mii 1998)。今回、100 株の個体の中で、2 株に花が大きくなるという変異が観察された。これは約 2% であり、エビネの培養については、まだ事例が少ないが、変異については問題ないと思われる。一般に培養変異については様々な変異が報告されている。花の奇形、退色、葉の奇形など、母株と較べて明らかに園芸的価値が低くなる例も多いが、中には花の大型化、収量の増加など園芸的価値が高くなる変異も現れる。今回は花が大型化し、観賞価値が母株よりも高くなった。この株の花を調査した結果、花の幅は 8.4%、高さは 20%、側花弁の幅は 41.3%、厚さは 34.2%、上がく片の幅は 22.7% それぞれ増加し、葉の厚さも 20% 増加した。フローサイトメーターによる調査では、母株の 2 倍の DNA 量を持つことがわかり、4 倍体であることが確認された。PLB 集塊が得られれば、その PLB 集塊からの苗化は比較的容易であるため、コルヒチン処理により、容易に 4 倍体を作成することは可能であると思われる。さらに 4 倍体の個体を使って、2 倍体と交配し、3 倍体を作成することも可能になる。

植物のウイルス病は、特に栄養繁殖を行う植物にとっては大きな問題となっている。エビネにおいても、栽培中にウイルス感染するケースが多く、貴重な品種や原種が感染した場合でも決定的な治療法はない。茎頂は、ウイルス濃度が低く、分裂能力が高いため供試部位としてよく使われている組織である。従ってイチゴやジャガイモ、サツマイモ等の野菜については、茎頂培養によりウイルスフリー株を作成し、さらに網室等で増殖させたウイルスフリー苗が流通し、高品質・高生産の苗として生産現場において利用されている。花きにおいても、ガーベラやスターチスなどでウイルスフリーと増殖を兼ねて茎頂培養されている。今回タカネにおいて、茎頂培養に

よりウイルスフリー化が可能なが実証された。今後グロリオサにおいてもその可能性を検討する発用があろう。

今回、グロリオサとエビネ属を材料として組織培養を行い、グロリオサにおいては実用化に近づくことができた。また、エビネ属については、これまで困難とされていた大量増殖が可能であることが実証され、さらに変異についても実用上問題なく、ウイルスフリー化も達成できることがわかったため、今後、茎頂からの PLB 誘導の効率を高めるなど、より実用化に向けた研究が必要であらう。

### 摘 要

植物における組織培養の利用はヘテロな植物を短期間に大量に増殖するためには非常に有効な手段であるが、すべての植物において、組織培養による増殖法が確立されているわけではない。この研究では、難増殖性とされるグロリオサとエビネを材料に増殖技術、順化方法、培養変異、ウイルス検定について増殖の実用化および課題について検討を行った。

グロリオサ (*Gloriosa rothschildiana* O'Brien) の茎頂と幼芽基部を外植体として植物調整物質の BA を  $4 \text{ mg l}^{-1}$ 、NAA を  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  添加した MS 培地で培養した。その結果、培養 150 日後には、茎頂は平均 5 本のシュートを、幼芽基部は平均 47.2 本のシュートを形成した。シュートの数は、初代培養と同じ培地で継代を繰り返すことにより、およそ 1 ヶ月で 2~3 倍に増えた。継代培養の期間を延長することにより、シュートの基部に小塊茎を形成させた。休眠している小塊茎を発芽させるためには、 $8^{\circ}\text{C}$  で 2 週間、続けて  $30^{\circ}\text{C}$  で 13 週間の連続処理が有効で、1g 以上の小塊茎の約 85% が発芽した。小塊茎は低温により休眠打破され、続く高温により芽が成育したと推察された。発芽した小塊茎は圃場栽培により正常に成長し、塊茎を形成した。2 作目で植え付けた 5g 以上の塊茎の 80% は開花した。花も含めて形態的な培養変異は認められず、実用的な培養苗生産方法が確立できた。

エビネ属の組織培養による増殖は困難であり、ほとんど報告がない。キエビネ (*Calanthe sieboldii* Decne.) の茎頂を材料として増殖方法を検討した。地中内に存在する休眠芽を培養材料とするため、従来の殺菌方法を改善し、通常の 2 倍の殺菌時間とした結果、5 月でも 5.9% の汚染率ですみ、有効な殺菌方法が確立できた。殺菌した茎頂を回転培養によ

り、液体培地で苗条原基集塊の誘導を試みた。基本培地としては MS 培地、1/2MS 培地、B5 培地を検討した結果、B5 培地の生存率が優れていた。植物調整物質は、BA 単独または BA と NAA の組み合わせがよかった。さらに生存率をあげる為に、B5 培地のマクロ培養、ミクロ要素、有機物の 3 つに分けて、それぞれ 1/1 倍、1/2 倍、1/4 倍とし、これを組み合わせた培地で茎頂分裂組織を培養した。生存率はミクロ要素を 1/4 倍としたときが最も高かった。苗条原基は、特定の培地組成による液体培地で回転培養により長期間維持され、ハプロパッパス (*Haplopappus gracilis*) では 9 年間維持されたと報告がある (谷口・田中 1993)。しかし、ラン科植物であるネジバナでは、PLB には胚発生型、腋芽増殖型、苗条原基型、それらの混成型がある (Sato *et al.* 1987)。実際、筆者が誘導したキエビネに於いても苗条原基型を長期間維持することは困難で、一部は PLB に発達した。PLB 集塊は苗条原基を寒天培地に置床することにより得られ、これを液体培地に移植したところ活発に増殖した。培養 2 ヶ月後の PLB の増殖率は数で 11 倍、生重量で 10 倍になり、大量増殖に利用できることがわかった。

この茎頂培養方法により誘導したキリシマエビネ (*C. aristulifera* Rchb. f.) とタカネ (*C. striata* R. Br. ex Lindl.) の PLB 増殖培地について、12 種類の異なるイオン組成培地を使い、系統変異法により検討した。PLB の成長は培地のイオン組成により大きな影響を受け、高比率の  $\text{NH}_4^+$  及び  $\text{Ca}^{2+}$  により阻害され、高比率の  $\text{K}^+$  及び  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  により促進された。計算による最適なイオン組成は、キリシマエビネとタカネにおいて、それぞれ、陽イオン区は  $\text{NH}_4^+ : \text{K}^+ : \text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+} = 10.4 : 70.0 : 9.6 : 10.0$  と  $10.9 : 68.1 : 11.0 : 10.0$ 、陰イオン区は  $\text{NO}_3^- : \text{H}_2\text{PO}_4^- : \text{SO}_4^{2-} = 42.1 : 43.7 : 14.2$  と  $43.0 : 42.9 : 14.1$  であった。最適なイオン組成はコントロールとした B5 培地に比較して、 $\text{NO}_3^-$  は半分程度であり、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  は 12 倍であった。

組織培養により増殖し、開花した 100 株のタカネを調査した。2 株を除いて、花の形、色には大きな変異はなかったが、この 2 株の花は大きく、花弁は厚かった。変異した植物の倍数性を、フローサイトメーターにより確認した結果、その DNA 量は、元の株に比べて 2 倍であり、4 倍体であることが確認された。また茎頂培養由来個体のウイルスフリー化も確認できた。この結果、エビネ属における培養苗生産に関する基礎的な知見が得られた。

## 謝 辞

本研究を遂行ならびに本論文を作成するにあたり、終始懇切な御指導および御助言を賜った千葉大学園芸学部大学院自然科学研究科教授 三位正洋博士に心より感謝の意を表します。また、本論文をまとめるにあたり、御指導および御校閲を賜った秋田県立大学生物資源科学部准教授 三吉一光博士、愛知教育大学教育学部特別教授 市橋正一博士、本論文をまとめるにあたり、御助言・御助力をいただいた理化学研究所イノベーション推進センター イオンビーム育種研究チーム研究員 平野智也博士、千葉大学園芸学部大学院 チンドンポー博士、広島大学技術センター 青山幹男博士、元山口大学助教 田原望武氏、広島市役所佐伯区農林担当部長 河嶋孝彦氏に感謝の意を表します。最後に御支援をいただいた広島市植物公園園長 石田源次郎博士をはじめ植物公園の職員の方々、いつも励ましてくれた家族に心より感謝いたします。

## 引用文献

- 吾妻浅男, 犬伏貞明 (1986). グロリオサ・ロスチャイルディアナの周年栽培に関する研究. 園芸学会中四国支部. 昭和 61 年度大会研究発表要旨: 61-61.
- Akita M., Takayama S. (1993). Resting period and the field performance of potato tubers propagated in a jar fermentor. *Plant Tissue Culture Lett.*, 10: 255-259.
- Akita M., Takayama S. (1994). Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Rep.*, 13: 184-187.
- Araki M., Yamashita S., Doi Y. and Yora K. (1985). Three viruses from *Gloriosa* (*Gloriosa rothschildiana* O'Brien); *Gloriosa* fleck virus, *Gloriosa* stripe mosaic virus, cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopath. Japan*, 51: 632-636. (in Japanese)
- Arditti J. (2008). *Micropropagation of Orchids*. 2nd ed. Blackwell Publishing, USA.
- Chang M.U., Chun H.H., Baek D.H., Chung J.D. (1991). Studies on the viruses in orchids in Korea. 2. *Dendrobium* mosaic virus, *Odontogllossum* ringspot virus, *Orchid* fleck virus, and unidentified Potyvirus. *Korean J. Plant Pathol.*, 7: 118-129.
- Chen W.H., Tang C.Y., Kao Y.L. (2009). Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 98: 229-238.
- 中国四国農政局高知統計・情報センター (2004). 県内の主要花きの生産状況: 18-29, 高知の花き. 高知農林統計協会.
- Custers J.B.M., Bergervoet J.H.W. (1994). Micropropagation of *Gloriosa*: Towards a practical protocol. *Sci Hortic*, 57: 323-334.
- De Hertogh A., Le Nard M. (1993). *The Physiology of Flower Bulbs*. Elsevier, Amsterdam: 755-756.
- Erhardt W., Götz E., Bödeker N., Seybold S. (2002). Zander: Handwörterbuch der Pflanzennamen. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart: 450. (in Germany).
- Environment Agency of Japan (2000). 'Threatened Wildlife of Japan: Red Data Book. Vascular plants. Vol. 8.' 2nd ed., Wildlife Research Center, Tokyo.
- Finnie J. F., Staden J.V. (1989) In vitro propagation of *Sandersonia* and *Gloriosa*. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, 19: 151-158.
- Fukai S., Fujiwara K., Okamoto K., Hasegawa A., Goi M. (1997). Effects of red and blue light on germination and protocorms growth of *Calanthe* Satsuma. *Lindleyana*, 12: 169-171.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe A., Vasil I.K. (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 12: 473-478.
- Gara I.W., Kondo H., Maeda T., Inouye N., Tamada T. (1998). *Calanthe* mild mosaic virus, a new Potyvirus causing a mild mosaic disease of *Calanthe* orchid in Japan. *J. Phytopath.* 146: 357-363.
- Ghosh S., Ghosh B., Jha S. (2007). *In vitro* tuberisation of *Gloriosa superba* L. on basal medium. *Scientia Hortic.*, 114: 220-223.
- Godo T., Komori M., Nakaoki E., Yukawa T., Miyoshi K. (2010). Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 46: 323-332.
- Griesbach R. J. (1981). Colchicine induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1:

- 103-107.
- Griesbach R. J. (1985). Polyploidy in *Phalaenopsis* orchid improvement. *J. Heredity*, 76: 74-75.
- Hammond J., Lawson R.H. (1988). A strain of bean yellow mosaic virus is aphid-transmitted from orchid. *Acta Hort.*, 234: 365-370.
- Hamner C.L. (1940). Growth responses of Biloxi Soybeans to variation in relative concentration of phosphate and nitrate in the nutrient solution. *Bot. Gaz.*, 101: 637-649.
- Hoppe E.G. and Hoppe H.J. (1987). Tissue culture of the European terrestrial orchid species *Ophrys apifera* Huds. *Proc. World Orchid Hiroshima Symp.*, 104-108.
- Ichihashi S., Yamashita M. (1977). Studies on the media for orchid seed germination. I. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 45: 407-413.
- Ichihashi S. (1978). Studies on the media for orchid seed germination. II. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 46: 521-529.
- Ichihashi S. (1979). Studies on the media for orchid seed germination. III. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 47: 524-536.
- Ichihashi S. (1980). Effects of mineral composition on the seed germination and the seedling growth of *Dendrobium tosaense*, *Calanthe furcata*, and *Phajus minor*. *Bull. Aichi Univ. Educ.*, 29: 177-190. (in Japanese)
- Ichihashi S., Uehara Y. (1989). Studies on the Batch culture systems for *Cymbidium* protocorm like bodies. *Bull. Aichi Univ. Educ.*, 38: 145-156. (in Japanese)
- Ichihashi S. (1991). Development of the media for aseptic seed germination of *Dendrobium*. *Bull. Aichi Univ. Educ.*, 40: 95-100.
- Ichihashi S. (1992a). Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. *Lindleyana*, 7: 208-215.
- Ishibashi T. (1993). Clonal propagation of *Calanthe*. *Japan. J. Breed.*, 43(Suppl. 2): 136-137. (in Japanese)
- 石井敬子, 二宮千登志, 松本満夫 (2009). 橙色のグロリオサ「高育1号」の育成. 高知県農業技術センター研究報告, 18: 21-24.
- Inouye N., Maeda T., Mitsuhara K. (1982). Cucumber mosaic virus isolated from *Calanthe discolor*. *Rep. Ohara Inst. Agr. Biol.*, 60: 1-11.
- Inouye N., Maeda T., Mitsuhara K. (1988). A strain of Clover yellow vein virus isolated from *Calanthe* sp.. *Acta Hort.*, 234: 61-68.
- Kawakami K., Fuji S., Miyoshi K. (2008). Endangered wild population of endemic *Calanthe* orchids on an isolated Japanese island tested for viruses. *Australian J. Bot.*, 55: 831-836.
- Kawashima T. (1983). The relationships between flowering and fresh weight of tubers of *Gloriosa rothschildiana*. *Ann. Rep. Hiroshima City Hortic. Inst.*, 117-119. (in Japanese)
- Karasawa K., Ishida G. (1998). '*Calanthe*.' Yasaka-Shobo Inc, Tokyo. (in Japanese)
- Kim K.W. and Kako S. (1982). Effect of plant growth regulators on organ formation in the *Cymbidium* shoot apex culture in vitro. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 51: 106-114. (in Japanese)
- Knudson L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.*, 73: 1-25.
- 駒嶺穆, 小島邦彦, 三川潮, 庄野邦彦, 原田宏, 日向康吉, 藤村達人, 山口彦之 (1990). 植物バイオテクノロジー事典, (株)朝倉書店: 233-234.
- Kozak D. (2002). Studies on micropropagation of *Gloriosa (Gloriosa rothschildiana O'Brien)*. *Diss. of Agr. Univ. Lublin*, 261: pp72.
- Kurzweil H. (2007). Taxonomic problems in the genus *Calanthe*. *Proc. 9<sup>th</sup> Asia Pacific Orchid Conf.*, 387-392.
- Lee Y.I., Lu F.L., Yeung E.C., Chung M.C. (2007). Developmental change in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 132: 246-252.
- Mishiba K., Ando T., Mii M., Watanabe H., Kokubun H., Hashimoto G., Marchesi E. (2000). Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia* sensus Jussieu (Solanaceae). *Ann. Bot.*, 85: 665-673.
- Miyoshi K., Mii M. (1995a). Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae) in asymbiotic culture. *Sci. Hortic.*, 63: 263-267.
- Miyoshi K., Mii M. (1995b) Enhancement of seed germination and protocorm formation in *Calanthe discolor* (Orchidaceae) by NaOCl and polyphenol absorbent treatments. *Plant Tissue Culture Lett.*, 12: 267-272.
- Miyoshi K., Mii M. (1988). Ultrasonic treatment for

- enhancing seed germination of terrestrial orchid *Calanthe discolor* in asymbiotic culture. *Sci. Hortic.*, 35: 127-130.
- Morel G., Martin C. (1955). Guérison de plantes atteintes de maladies à virus; par culture de meristems apicaux. *Rep. XIVth Int. Hort. Congr. Netherlands*, p.303-310.
- Morel G. M (1960). Producing virus -free Cymbidiums. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 33: 473-478.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- 二宮千登志. (2010). グロリオサの切り花生産体系における塊茎の形成・肥大促進ならびに貯蔵に関する研究. 高知県農業技術センター特別研究報告, 第10号; pp66.
- 大澤勝次 (1994). 植物バイオテクの基礎知識, P115 農文協.
- Park S.Y., Murthy H.N., Paek K.Y. (2000). *In vitro* seed germination of *Calanthe citrina*, an endangered orchid species. *J. Plant Biol.*, 43: 158-161.
- Samarajeewa P. K., Dassanayake M.D., Jayawardena S. D. G. (1993). Clonal propagation of *Gloriosa superba* L.. *Indian J. Exp. Biol.*, 31: 719-720.
- Sanguthai O., Sanguthai S., Kamemoto H. (1973). Chromosome doubling of a *Dendrobium* hybrid with colchicine in meristem culture. *Na Pua Okika O Hawaii Nei, Hawaii*, 3: 12- 16.
- Sato K., Tanaka R., Taniguchi K., Miyagawa H., Okada M. (1987). Clonal mass-propagation of orchids by means of tissue cultured shoot primordia. *Proc. World Orchid Hiroshima Symp.*, 129-132.
- Shimasaki K., Uemoto S. (1987). Studies on the micropropagation of Japanese *Calanthe* species. *Sci Bull Fac Agr Kyushu Univ*, 42(1-2): 293-297. (in Japanese)
- Shimasaki K., Suzuki S., Fukumoto Y. (2000). Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* organogenesis in apical and nodal stem segments of axillary branches of *Gloriosa superba* at flower stage. *Environ. Cont. Biol.*, 38: 207-210.
- Sivakumar G., Krishnamurthy K.V. (2004). *In vitro* organogenetic responses of *Gloriosa superba*. *Russian J. Plant Physiol.*, 51: 790-798.
- 高村武二郎, 中村恵美, 富永真由美, 田中道男 (2002). グロリオサのマイクロプロパゲーションに及ぼす培養温度の影響. 香川大学農学部学術報告, 第54号: 41-44.
- Tahara M. (1977). Studies on the shoot-tip cultures of *Calanthe* I. Effects of the growth regulators on survival and callus formation. *Abstr. Japan. Soc. Hort. Sci. Autumn Meet.*, 350-351. (in Japanese)
- Tahara M. (1987). Polyploidy and hybridization in *Habenaria* and *Calanthe*. *Proc. World Orchid Hiroshima Symp.*, 79-82.
- Takano T., Kawazoe F. (1973). Balanced nutrient solutions for vegetable crops determined by Homes' method of systematic variations I. Sand culture. *Sci. Rep. Fac. Agric. Meijo Univ.*, 9: 7-15.
- 田中隆莊, 長久逸 (1979). 日本蘭協会誌, 25: 3-6.
- 田中隆莊, 谷口研至 (1988). 苗条原基法, 植物組織培養の世界, 柴田ハリオ硝子: 262-270.
- Tanaka R., Kamemoto H. (1984). Chromosomes in orchids: counting and numbers. In *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, Vol. 3 (ed. J. Arditti) pp. 323-410. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- 谷口研至, 田中隆莊 (1993). 苗条原基の誘導—その理論と方法. p9-13. バイオホルティ6, 誠文堂新光社.
- Tokuhara K., Mii M. (1998). Somaclonal variation in flower and inflorescence axis in micropropagated plants through flower stalk bud culture of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Plant Biotechnol.*, 15: 23-28.
- Vacin E., Went F. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.*, 110: 605-613.
- Vajrabhaya T. (1977). Variations in clonal propagation. 176-201 In: Arditti J(ed), *Orchid Biology*, Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y.
- Watrous S.B., Wimber D.E. (1988). Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. *Lindleyana*, 3: 177-183.
- Wimber D.E., Van Cott A. (1966). Artificially induced polyploidy in *Cymbidium*. in : De Garmo, L. R. (ed.) *Proc. Fifth World Orchid Conf.*, Long Beach, California, 27-32.
- Yamamoto T., Ishii M. (1981). Mosaic disease of *Calanthe discolor* Lind.. *Proc. of the Assoc. for Plant Protection of Shikoku*, 16: 75-79.
- Yamamoto K. (1990). Studies of thermal treatment for sprouting of dormant tubers of *Gloriosa rothschildiana*. *Ann. Rep. Hiroshima City Hortic. Inst.*, p.25-27. (in Japanese)

Yamamoto M., Taniguchi K., Tanaka R., Kondo K., Hashimoto K. (1991). Studies on clonal mass-propagation of *Calanthe sieboldii* by using tissue-

cultured shoot primordium method. Bull. Hiroshima Bot. Gard., 13: 1-15.