

日本産エビネの組織培養に関する研究

島崎, 一彦
九州大学農学部園芸学教室

上本, 俊平
九州大学農学部園芸学教室

<https://doi.org/10.15017/22246>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 42 (1/2), pp.9-14, 1987-12. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

日本産エビネの組織培養に関する研究

島崎 一彦・上本 俊平

九州大学農学部園芸学教室
(1987年5月11日 受理)

Studies on the Micropropagation of Japanese *Calanthe* Species

KAZUHIKO SHIMASAKI and SHUNPEI UEMOTO
Laboratory of Horticultural Science, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-01, Fukuoka 812

結 言

Calanthe は熱帯から温帯にかけて約 150 種が分布し、常緑性および落葉性あるいは地生、岩生および着生の種などが含まれ、生態的分化の著しい一群である。エビネ (*C. discolor* Lindl.), キエビネ (*C. sieboldie* Dence.), キリシマエビネ (*C. arisrifera* Reichb. fil.) など数種が混生する地域では自然交雑による種間雑種も多く見られ個体変異に富んでいる。また、種子形成ならびに種子発芽 (伊藤ら, 1968, 狩野, 1968, Ernst *et al.*, 1971, Hasegawa *et al.*, 1978, 長島, 1982, 1984), コルヒチン処理による人為倍数体の作出 (田原, 1977-a) および人工交配による種間雑種の作出 (伊藤, 1967, 田原, 1986) に関する研究も行われ、今後多くの優良品種の出現が期待される。しかしながら、クローンの急速増殖およびウイルスフリー株育成に有効な手段であると考えられる生長点の組織培養では、温帯原生の地生 *Calanthe* の場合、外植体の生存率は非常に低い。田原 (1977-b) によれば、茎頂部の比較的大きな組織を培養すれば生存率は向上し、まれにはプロトコーム様球体を形成するものも見られるが、シュートの形成は単数であり雑菌による汚染率が高いことから組織培養による急速な繁殖は困難視されている。

本研究は、外植体の雑菌による汚染程度が、シュートの生育初期段階に少ない事実より、不特定時期に無菌的に外植体を得る目的で、まず最初に、*in vivo* において偽球茎にサイトカイニン処理を行ない、これが腋芽からのシュート形成に及ぼす影響を検討し、次に、

この処理より得られたシュートの生長点組織を外植体として、*in vitro* 培養における生存率向上を目的に、培地条件および生長点接木法について検討した。

材 料 と 方 法

九大実験圃場で栽培中のエビネを供試した。実験 1 では 1985 年 4 月 5 日に、1) 前年生偽球茎のみ、2) 当年生シュート (偽球茎部を残し葉鞘部を切除) が着生した前年生偽球茎を個々に切り離し、葉および根を切除後、0, 1, 10, 50 および 100 ppm 各濃度の N^6 -benzylaminopurine (BA) 水溶液で 24 時間浸漬処理を行つた。水溶液の pH は 0.1-1 規定の NaOH および HCl であらかじめ 5.5 に調整し、展着剤として Tween 20 を少量滴下した。処理後の植物体は、水道水および蒸留水で洗つた後、25°C の暗黒条件下で培養を行つた。1985 年 5 月 4 日にシュート形成に及ぼす BA の効果を調査した。また、実験 2~5 では 1986 年 5 月 10 日に実験 1 と同様な方法で前年生偽球茎に BA を濃度 50 ppm の水溶液で処理し、2-4 週間後得られた長さ約 1.5 cm のシュートの葉を 4-5 枚取り除いた後、Tween 20 を少量添加したウイルソン氏液 (Wilson, 1915) 中で 10 分間殺菌、滅菌蒸留水中で 3 回水洗後、腋芽の生長点組織を摘出し外植体とした。培地は、実験 2 では Murashige・Skoog (1962) 培地 (MS 培地と略称) の無機塩類のみを 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1 および 2 倍の各濃度とし、20 g/l ショ糖、8 g/l 寒天を添加した培地を用い培養を行つた。また、外植体置床前には、各培地と同一塩類濃度の液体培地を寒天培地上に少量滴下した。実験 3~5 では、MS 培

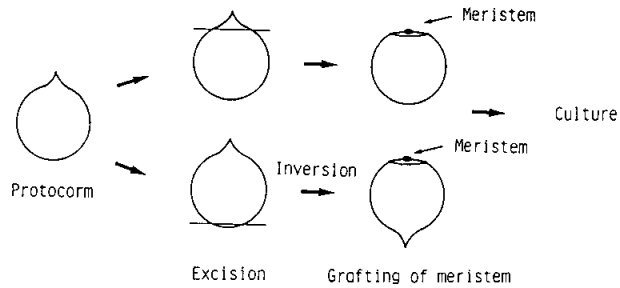


Fig. 1-a Procedure of micrografting of the meristem tissue on the protocorm rootstock.

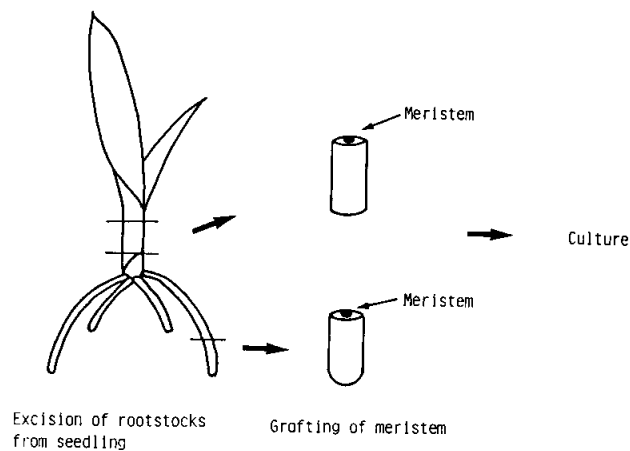


Fig. 1-b Procedure of micrografting of the meristem tissue on the seedling rootstock.

地中の無機塩類のみを1/8倍の濃度に希釈(1/8 MS培地と略称)し、実験2と同量のショ糖および寒天を添加した培地を用いた。培地のpHはオートクレーブによる滅菌前に、0.1-1規定のNaOHおよびHClで5.5に調整した。置床後は全て25°C連続照明下(約1,000 lux)に置き培養を行った。実験3では、1/8 MS寒天培地上に、1) 直接、2) 滅菌蒸留水、3) 1/8 MS液体培地を少量滴下し、この上に外植体を置床し1カ月間培養を行った。実験4では、Fig. 1-a および Fig. 1

-b に示す方法によりエビネ種子の胚培養より得られた直径約2 mmのプロトコーム(protocorm)および長さ約3 cmの幼苗を台木組織とし、1) 寒天培地上に直接、2) プロトコームの頂部を切除し、切り口上に、3) プロトコームの基部を切除し、反転させた後の切り口上に、4) プロトコームの頂部を切除し、切り口上に1/8 MS培地を滴下しこの上に、5) 幼苗の茎部を長さ約5 mmに切り取り、頂部切り口上に、6) 幼苗の根の先端部を長さ約5 mmに切り取り、基部の切り口上に、

それぞれ生長点を接木し、1カ月間培養を行つた。

結 果

実験1. BA 処理1カ月後に偽球茎腋芽から形成されたシュートの数、長さおよび偽球茎部の直径を Table 1 に示す。偽球茎のみの場合、BA:10, 50 および 100 ppm の処理区で、シュートが着生している場合は BA:50 および 100 ppm の処理区で複数のシュート形成が促進された。形成されたシュート数はいずれも BA:50 ppm の処理区で最大であつた。シュートの伸長は、偽球茎のみの場合は BA:10 および 50 ppm の処理区で、シュートが着生している場合は BA:1 ppm の処理区で促進された。また、シュートが着生している場合、BA:100 ppm の処理により偽球茎部の肥大生長が見られた。

実験2. MS 培地中の無機塩類のみを、1/16, 1/8,

1/4, 1/2, 1 および 2 倍の濃度とし、これが生長点組織片の生存に及ぼす影響について調査した。一カ月後の結果を Table 2 に示す。無機塩類を 1/8-1/2 倍の濃度に希釈することにより置床1週間後より緑色化組織が多く見られ、濃度 1/8 倍の場合、1カ月後に 65% の組織が緑色化した。また、濃度 2 倍の処理区では全ての組織が白色あるいは褐色化し最終的には活着しなかつた。

実験3. 寒天培地上に滅菌蒸留水および 1/8 MS 液体培地を滴下し、これが生長点組織片の生存に及ぼす影響を調査した。1カ月後の結果を Table 3 に示す。1/8 MS 液体培地を滴下した場合、組織の緑色化が多く見られた。蒸留水滴下の効果はほとんど見られなかつた。

実験4. 胚培養により得られたエビネのプロトコムおよび幼苗に外植体組織を接木し、これが生存率に

Table 1. Effect of BA on the shoot formation of pseudobulb axillary buds.

BA (ppm)	Number		Length (mm)		Diameter(mm)	
	P	P+S	P	P+S	P	P+S
0	1.0	1.0	7.4	5.0	3.7	3.0
1	1.0	0.3	11.1	21.5	3.7	4.0
10	1.5	1.0	18.7	8.0	4.9	3.8
50	1.6	2.5	17.3	7.9	5.0	3.6
100	1.3	1.6	10.3	8.3	4.4	6.0

P ; Pseudobulb.

P+S; Pseudobulb with shoot.

Diameter; Pseudobulb diameter of the developed shoot.

Table 2. Effect of dilution of inorganic salts in MS medium on the success of the meristem tissue culture.

Treatments	No. of explants	Green tissue (%)	White tissue (%)	Brown tissue (%)
1/16 MS	15	1 (6.7)	10 (66.7)	4 (26.7)
1/8 MS	20	13 (65.0)	6 (30.0)	1 (5.0)
1/4 MS	15	3 (20.0)	9 (60.0)	3 (20.0)
1/2 MS	12	3 (25.0)	6 (50.0)	3 (25.0)
1 MS	12	2 (16.7)	9 (75.0)	1 (8.3)
2 MS	11	0 (0)	8 (72.7)	3 (27.3)

Table 3. Effect of a liquid drop fell on the surface of agar medium on the success of the tissue culture.

Treatments	No. of explants	Green tissue (%)	White tissue (%)	Brown tissue (%)
1	20	4 (20.0)	14 (70.0)	2 (10.0)
2	20	4 (20.0)	16 (80.0)	0 (0)
3	20	13 (65.0)	6 (20.0)	1 (5.0)

1. Explant was placed on the surface of agar medium.

2. Explant was placed on a drop of distilled water.

3. Explant was placed on a drop of 1/8 MS medium.

Table 4. Effect of micrografting on the success of the meristem tissue culture.

Treatments	No. of explants	Green tissue (%)	White tissue (%)	Brown tissue (%)
1	10	2 (20.0)	7 (70.0)	1 (10.0)
2	10	5 (50.0)	5 (50.0)	0 (0)
3	9	5 (55.6)	4 (44.4)	0 (0)
4	9	8 (88.9)	1 (11.1)	0 (0)
5	12	6 (50.0)	4 (33.3)	2 (16.7)
6	10	5 (50.0)	5 (50.0)	0 (0)

1. Explant was placed on the surface of agar medium.
2. Explant was placed on the apical incision of the protocorm.
3. Explant was placed on the basal incision of the protocorm.
4. Explant was placed on a drop fell on the apical incision of the protocorm.
5. Explant was placed on the apical incision of the stem tip.
6. Explant was placed on the basal incision of root tip.

及ぼす影響を調査した。1カ月後の結果を Table 4 に示す。50%以上の組織が緑色化し台木組織の違いによる差はほとんど見られなかつた。緑色化率は、プロトコムの頂部を切除し、この切り口上に液体培地を滴下した処理区で最大であつた。また、緑色化した組織の多くからは、培養を継続することにより複数のプロトコム様球体、シュートおよび根の形成が見られた。白色化組織のなかに緑色化するものも見られたが多くは褐色化し活着しなかつた。

考 察

温帯原生の地生 *Calanthe* の生長点組織培養に際して、親株から組織片を無菌的に摘出すること、および培地上で生存することは共に困難であるとされている。本研究では、合成サイトカイニンである BA を処理し生育停止中あるいは生育開始前の偽球茎腋芽の萌芽およびその後の急速な生育を強制的に促し、腋芽から形成されたシュートの生育初期に、生長点組織の摘出を行えば、菌類による汚染を完全に回避することができた。このことより生長点組織の汚染率は、シュートの生育段階に関係し、BA 処理によりシュート形成を促せば、不特定時期に生長点組織の無菌的摘出が可能であると考えられる。*In vivo* における偽球茎への BA 処理が *in vitro* 培養における外植体組織の生存率に及ぼす影響については示していないが、以前の実験（未発表）において BA 処理による確実な生存率の向上が認められた。ラン科植物の *in vitro* における種子培養において、種子の発芽およびその後の生育は、培地中の無機塩類の組成および濃度に大きな影響を受けることが明らかにされている。(Ernst *et al.*, 1971, 市橋, 1980)。本実験では、濃度の検討のみ行つたが、生長点組織の培養においても種子培養の場合と同様で、エビ

ネ組織片の生存率は、MS 培地中の無機塩類濃度の希釈によつて著しく向上することが明らかとなつた。また、寒天培地上への培養液滴下の効果については、生長点組織から溶出する生長阻害物質が液体中で希釈され、生育抑制効果が緩和された結果生存率が向上したと考えられる。*In vitro* における生長点接木の生存率向上効果については、培養の初期段階においては、台木組織からの拡散性生長促進物質の移動による保護効果によるものと考えられ、組織の違いによる差がほとんど見られなかつたことより、これらの物質が植物体中の各部位に存在することが示唆された。本研究では、エビネの組織培養において、従来困難視されていた生長点培養によるプロトコム形成誘導が生長点組織の接木により容易に誘導されたことより、プロトコムの増殖によるクローン苗の急速増殖の可能性が示唆された。*In vitro* における生長点接木法は、Murashige *et al.* (1972) によつて初めて行われ、柑橘類のウイルスフリー株育成に対する有効性が示された。エビネの種子を *in vitro* 培養した場合、ウイルスの種子への感染が認められない事実より、得られた幼苗はウイルスフリーである可能性が高い。このため、エビネの生長点接木においては、台木組織から生長点組織へのウイルス感染の可能性は極めて低く、柑橘の場合と同様ウイルスフリー株育成に有効な手段であると考えられる。

要 約

1. エビネ生長点培養を行う際、外植体の雑菌による汚染程度がシュートの生育初期段階に少ない事実より、不特定時期に外植体を得る目的で、まず最初に、*in vivo* において偽球茎に BA 処理を行い、これが腋芽からのシュート形成に及ぼす影響を検討し、次に、*in vitro* 培養における外植体組織の生存率向上を目的

に、培地条件と生長点接木法について検討した。

2. 偽球茎腋芽からのシュート形成は、BA 処理により促進され、シュート形成数は濃度 50 ppm の処理区で最大であった。

3. MS 培地中の無機塩類濃度を希釈することにより外植体の生存率は向上した。外植体の生存率は、無機塩類濃度 1/8 倍の処理区で最大であった。

4. 寒天培地上に液体培地を少量滴下した場合、外植体の生存率は向上した。蒸留水滴下の効果はみられなかった。

5. 種子の胚培養より得られたプロトコームおよび幼苗を台木組織とした場合、生存率は、各処理区とも 50% 以上であり組織の違いによる差は見られなかった。生存率は、プロトコームの上部切り口上に 1/8 MS 液体培地を滴下した処理区で最大であった。

6. 偽球茎の BA 処理により得られたシュートの生長点組織を外植体とした場合、菌類による汚染は完全に回避できた。また、外植体組織からは複数のプロトコームが形成され、プロトコームの増殖によるクローン苗の急速増殖の可能性が示唆された。

文 献

- Ernst, R., J. Arditti and P. L. Healey 1971 Biological effects of surfactants I. Influence on the growth of orchid seedlings. *New Phytol.*, 70: 457-475
- Hasegawa, A., M. Goi, M. Sato and Y. Ihara 1978 Fundamental studies on the asymbiotic seed germination of *Calanthe*. *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 29:251-259
- 伊藤五彦 1967 エビネの種間交雑和合性. 日本蘭協会誌, 13: 9-11
- 伊藤五彦・三位正洋・加古舜治 1968 雑発芽性ラン種子の発芽問題. 鳥潟博高編: ラン科植物の種子形成と無菌培養. 誠文堂新光社, 東京, 314-322 頁
- Kano, K. 1971 Acceleration of the germination of so-called "Hard to germinate" orchid seeds. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 37: 690-698
- Murashige, T. and F. Skoog 1962 A revised medium and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497
- Murashige T., W. P. Bitters, T. S. Rangan, E. M. Nauer, C. N. Roistacher and P. B. Holliday 1972 A technique of shoot apex grafting and its utilization toward recovering virus-free *Citrus* clones. *HortScience*, 7:118-119
- 長島時子 1982 シン及びエビネの種子形成ならびに種子発芽について. □ Z'f\$M&, 51: 82-93
- 長島時子 1984 シンマエビネ, ニオイエビネ及びアマミエビネの種子形成並びに種子発芽について. 園芸学会雑誌, 53: 176-186
- 田原望武 1977-a エビネの人為倍数体作出に関する研究. 日本蘭協会誌, 23: 3-7
- 田原望武 1977-b エビネの茎頂培養に関する研究 (第1報) 活着とカルス形成におよぼすホルモンの影響. 園芸学会昭和 52 年度秋季大会研究発表要旨, 350-351
- Wilson, J. K. 1915 Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. *Amer. Jour. Bot.*, 2: 420-427

Summary

1. In the meristem tissue culture of *Calanthe* species, a contamination by fungi or bacterium was scarcely observed when an axillary bud as an explant was excised from rapid growing young shoot. Therefore, this study, was carried out with the objects of obtaining aseptic explants in all seasons and increasing survival rate of explants. Firstly, the effect of BA treatment on the shoot formation in axillary buds of pseudobulb was examined. Secondly, after the examination of culture medium condition, micrografting of explant on the protocorm and seedling rootstock was conducted.

2. The treatment of BA promoted shoot formation from the axillary buds of the pseudobulb, and gave the maximum number of shoots by the treatment of 50 ppm concentration of BA.

3. The dilution of inorganic salts of MS medium was effective for an increase of survival rate of explants.

4. A drop falling of 1/8 strength of MS liquid medium on the surface of agar medium was effective for the success of the meristem tissue culture. A drop of distilled water was not effective.

5. Micrografting of the meristem tissue was the most effective for the formation of

protocorms. More than half number of explants survived and turned to green by all micrograftings. Differentiation in survival rate between each treatments of micrografting was not observed. The optimum survival rate was obtained when the explant was placed on a drop of 1/8 strength of MS liquid medium fell on the apical surface of an incision of the protocorm.

6. Contamination by fungi and/or bacteria in the meristem explants was scarcely observed when explants were excised in young shoots obtained by the treatment of BA. After greening of meristem tissue, the plural number of protocorms were developed from these explants. This fact suggested that rapid mass propagation by proliferating, protocorm would be practicable.