

ファレノプシスのホルモン無添加培地による増殖法

岩堀 勝弥

岐阜県立恵那農業高等学校 〒509-7201 岐阜県恵那市大井町 2625-17

Micropropagation of *Phalaenopsis* without plant hormone

K.Iwahori

Gifu prefectural Ena agricultural high school 2625-17 Ohi-cho,Ena,Gifu 509-7201,Japan

Summary

Plantlets were obtained by lateral buds culture from flower stalk at 28°C on media without plant hormones. The plantlets were cultured and etiolated under dark condition. Multiplication was attained by cutting of etiolated plants into node segments and culturing these segments with lateral bud. These segments developed new plantlets or developed PLBs laterally on hormone free media. Plantlets or/and PLBs were cultured without tissue browning on media with potato extracts. Multiplication of *Phalaenopsis* was possible by lateral buds culture of flower stalk on hormone free medium. Reduction of somaclonal mutation rate was expected by this method.

緒言

ファレノプシス (*Phalaenopsis*) は、単茎性のランで茎頂を摘出すると親株を失う危険性が高い。そのため、初代培養の材料として多くの部位を利用する方法が試みられた。花茎や根端などは親株のダメージが少ないので初代培養としての利用価値は高くプロトコーム様体、以下 PLB (Protocorm-like body) が誘導できるという報告がある (千田ら、1974; 田中ら、1975a;b; Honma ら、1985; Lin、1986)。

これまで多く行われてきた方法は、花茎腋芽から得られた幼植物の葉片を用いる方法である。高濃度の植物ホルモンを使用して茎頂以外の器官からプロトコーム様体 (不定芽) を誘導する方法である (田中ら、1975)。しかし、得られた幼植物の葉片から PLB を誘導するときに葉片が褐片枯死したり、ごく少量の葉片から誘導した PLB を分割して増殖するときに褐変枯死することが多く、増殖の初期段階では安定した培養が難しかった。また、PLB 誘導で高濃度の植物ホルモンを使用するため、変異の発生も見られた。

単子葉植物では挿し木を行うと腋芽から幼苗が発生し、栄養繁殖が可能である。最大限、葉の枚数だけ腋芽が存在する。ファレノプシスは単茎性であり短縮茎なので、普通の状態では1節ごとに切り分けることは難しい。段らは培地へのサイトカイニン添加によって苗の節間は伸長し、特に BA (ベンジルアデニン) の効果が大きく、BA を 5 あるいは 10ppm 含んだ培地で 90 日間培養し、茎の伸長した苗を1節切片として培養すると、多芽体が形成されたと報告している (市橋ら、2006)。

茎の伸長や定芽からの PLB の誘導を植物ホルモンを無添加にすることで、高濃度の植物ホルモンを

利用した不定芽的な PLB とは違い変異も少ないのではないかと考えた。

そこで、花茎腋芽から誘導した幼植物の側芽 (定芽) を植物ホルモン無添加で、暗所にて徒長させ、徒長させた植物の節間を切断して得られた定芽由来の植物が増殖可能か検討することにした。

実験方法

実験1. 花茎腋芽培養

供試材料として白地に赤リップのファレノプシス シティーガール (*Phalaenopsis* 'City girl' Fig.1) を用いた。

花茎腋芽培養は、メリクロンの親株から発生した未開花で長さ花茎 30cm 前後の花茎を使用した。花茎の長さは、腋芽の上部 2cm、下部を 3cm 程度に調整したものをを用いた (Fig. 2)。

これまでに植物ホルモンを用いた花茎腋芽からの器官分化の実験は多く行われているが、植物ホルモン無添加培地で増殖のもととなる幼植物が得られるかを検討した。

基本培地は、粉末ハイポネックス 2g/l、硝酸アンモニウム 1g/l、ペプトン 1g/l、ショ糖 20g/l、ジェルライト 3g/l とし、植物ホルモンは無添加とした。培養容器は平底試験管を使用し、1容器当たりの培地量は 10ml とし、1容器に1本植え付けた。培養環境は、植



Fig.1. *Phalaenopsis* 'City girl'.

え付け後、温度を 23 と 28 、照度は白色蛍光灯 2,000ルクス($22.8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$)24 時間照明で管理した。

花茎の長さは、節上部2cm、下部を3cm程度に調整し、腋芽の包葉を取り除いたあと、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素1%)に中性洗剤を数滴加え、10分2回殺菌を行なった。1区当たりの容器数は50本とした。



Fig. 2. Preparation of flower stalk for sterilization. Left: flower stalk used, Right: prepared just before sterilization.



Fig.3. Cutting of plantlet. Left: horizontal, right: vertical.

実験2. 幼植物の暗所培養

花茎腋芽培養で得られた幼植物を植物培養槽内で 25、30、35、40 に設定し、暗所培養を行って茎の徒長が可能か検討した。培地は、ホルモン無添加の基本培地を使用した。培養容器は、プラントボックスを使用して1容器当たりの培地量を50ml、植え付け本数は4本とした。1区当たりの容器数は5容器とした。

実験3. 側芽培養

暗所で徒長させた幼植物をカットし、側芽の再生が可能かどうかを試みた。材料は前実験で徒長させた植物を用いて葉を取り除いたあと、節の位置を想定して横切りと、茎を2分割する縦切りを行った。

培地は基本培地を使用し、有機物無添加区と有機物添加物を設定した。有機物添加区は、バナナジュース100g/l、ポテトジュース100g/l、バナナジュースとポテトジュースを各50g/l添加したものを使用し、培地量は1容器当たり50mlとした。各添加物は皮を剥いた後ジューサーで粉碎したものを添加した。ポテトジュースについては皮をむいたあと、オートクレーブ($1.2\text{kg}/\text{cm}^2$, 121、15分)で加熱処理し、冷凍保存したものを解凍してジューサーで粉碎したものを利用した。

横切りは、1本の幼植物を切断して1容器に4~5本植え付け、縦切りは、1容器当たり2本の幼植物を切断して4本プラントボックスに植え付けた。1区当たりの容器数は10容器とした。

実験4. 苗育成培地の検討

培養の最終段階で用いる苗育成培地の添加有機物を検討した。培養環境は、温度25、白色蛍光灯2,000ルクス($22.8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$)24時間照明とした。基本培地に、前述の方法で調整したバナナ摩砕物(BH)、ポテト摩砕物(PH)、オレンジ摩砕物(OH)、キャロット摩砕物(CH)、アップル摩砕物(AH)、5種類の有機物を添加し、全ての区に活性炭0.5g/l添加した。各区の有機物配合割合は第4表の組み合わせとし、培養容器はプラントボックスを使用して1容器当たりの培地量を50mlとした。材料は、側芽培養で得られたPLBを1粒に切断して各容器に8個ずつ置床した。1区当たりの容器数は8容器とした。

結果

実験1. 花茎腋芽培養

結果を第1表に示す。花茎腋芽の培養は、89日間行った。温度調整によって幼植物に成長する栄養的な動きと、二次花茎に成長する生殖的な動きがみられた。設定温度を28にすることで植物ホルモン未添加培地でも約70%の幼植物が得られた。生育停止する腋芽は18%みられた(Fig. 4)。植物ホルモン未添加でも腋芽の成長が可能であることを実証できた。

Table 1. Effects of temperature on the growth of lateral buds in flower stalk culture. (Culture periods: 89 days)

Temperature (°C)	Number of					Percentage of shooting
	stem planted	shooted	secondary inflorescence developed	dormant bud	contaminated	
23	50	4	33	13	0	8.3
28	50	34	7	9	0	69.4

実験2 . 幼植物の暗所培養

結果を Table 2 に示す。培養期間は 91 日間行った。茎の徒長を促すために暗所培養を行い、培養温度による茎の徒長を調査した。しかし、40 °C は1週間、35 °C は2週間、30 °C は7週間で茎葉と根が変色して枯死した。約3ヶ月の培養で生存したのは25 だけであった。培養中の調査は、容器外から培地表面から葉の先端部分までの丈を測定した。節数の増加を確認する方法としては、葉の出る枚数を数えて節の増加と考えた。25 °C では、3ヶ月間の葉の増加枚数が1.6枚だった。丈は3.4cm長くなった(Fig. 5、Fig. 6)。暗所培養によって葉の枚数の増加は少ないが、節の位置が確認できる程に伸長させることができた(Fig. 7)。

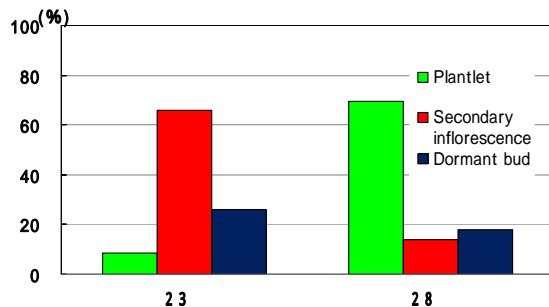


Fig. 4. Growth responses of lateral buds from flower stalks.

実験3 . 側芽培養

結果を Table 3 に示す。培養期間は43日である。縦切りを行った区は、植え付けた本数より減少した。培地の種類を問わず増殖率が全て

1.0 を割り、多くの植物体が枯死した。培地の褐変もみられないことから切断後間もなく枯死したと思われる。

最も増殖率が高かった区は、ポテト添加区の横切りだった。カット前の植物本数 10 本から、新たに葉の展開がみられた数は34本となり3.4倍の増殖率となった。また、腋芽の成長だけでなく、PLBの形成もみられた。葉片培養などで高濃度の植物ホルモンを使用した不定芽的なPLBとは異なる分裂組織の腋芽由来のPLBが得られた。

実験4 . 苗育成培地の検討

結果を Table 4 に示す。培養期間は74日である。これまでは PLB をカットする増殖から苗育成の段階で褐変枯死することが多く、この過程が最も課題であった。5種類の有機物を利用した培養の結果、ポテトジュース単用区ではPLBからの茎葉の出芽率が約86%と最も高かった。

Table 2. Effects of temperature under dark condition on the growth of lateral buds in flower stalk culture. (Culture periods: 91 days)

Temperature (°C)	Number of		
	stem planted	survived	died
25	20	20	
30	20		20
35	20		20
40	20		20

Table 3. Effects of organic additives and method of cutting of plantlet on subsequent growth.

Additives	Treatments		Number of		Number of		Shooting (%)	Multiplication (fold)
	Cutting		plantlets provided	segments planted	shooted (overlap each other)	PLBs formed		
	direction	number						
BM	horizontal	4	10	40	19	14	47.5	1.9
	verticle	2	20	40	6	3	15.0	0.3
Banana	horizontal	4	10	40	12	10	30.0	1.2
	verticle	2	20	40	7	4	17.5	0.35
Potato	horizontal	4	10	40	34	10	85.0	3.4
	verticle	2	20	40	9	7	22.5	0.45
Banana +Ptato	horizontal	4	10	40	15	6	37.5	1.5
	verticle	2	20	40	6	4	15.0	0.3
Average					13.5	7.25	33.8	1.18

Table 4. Effects of organic additives on growth of PLBs.

Treatment	Organic additives (homogenate; g/l)					Number of			Shooting (%)
	Potato (Po)	Banana (Ba)	Orange (Or)	Carot (Ca)	Apple (Ap)	PLBs planted	shoots (overlapped other)	PLB formed each	
All 20	20	20	20	20	20	64	17	16	26.6
Po	100					64	55	51	85.9
Ba		100				64	20	26	31.3
Or			100			64	5	5	7.8
Ca				100		64	16	18	25.0
Ap					100	64	1	4	1.6
Po+Ba	50	50				64	20	23	31.3
Po+Or	50		50			64	13	22	20.3
Po+Ca	50			50		64	32	37	50.0
Po+Ap	50				50	64	19	24	29.7
Ba+Or		50	50			64	7	8	10.9
Ba+Ca		50		50		64	17	23	26.6
Ba+Ap		50			50	64	3	9	4.7
Or+Ca			50	50		64	15	15	23.4
Or+Ap			50		50	64	2	3	3.1
Ca+Ap				50	50	64	4	3	6.3
Average							15.4	17.9	24.0

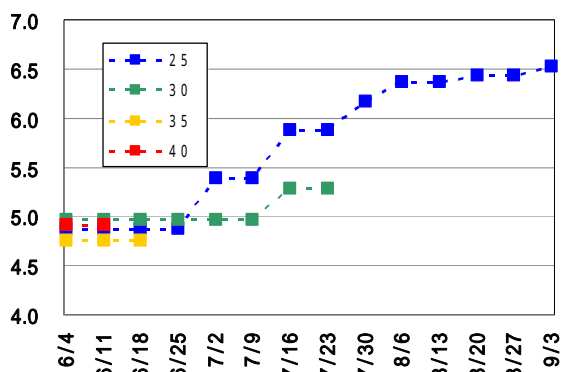


Fig. 5. Changes of leaf number under dark condition at different temperatures.

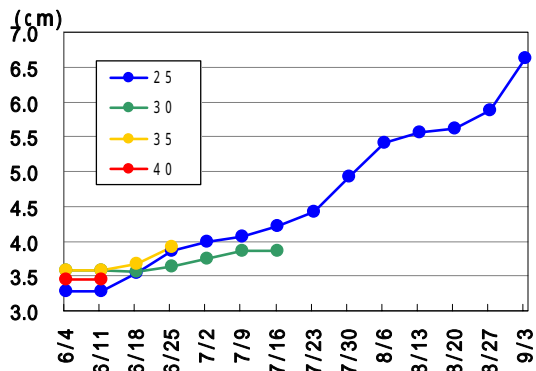


Fig. 6. Changes of plant height under dark condition at different temperatures.

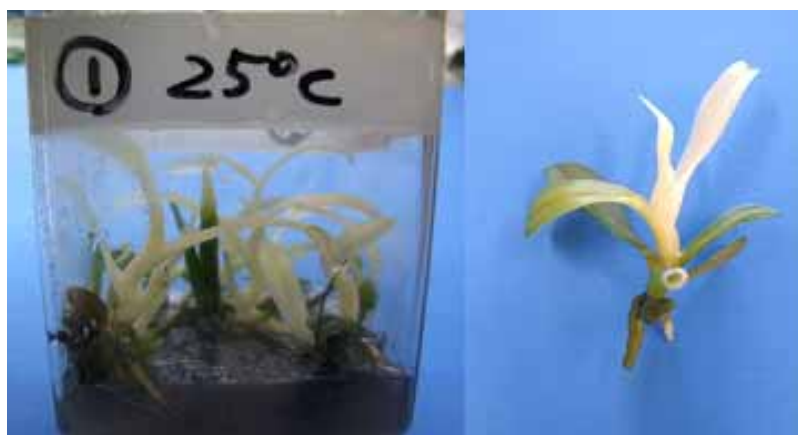


Fig. 7. Plantlets elongated under dark culture.

考察

材料として未開花の組織が柔らかい 30cm 前後の花茎を用いたことや、殺菌方法の改善によりコンタミネーションは全く見られなかった。殺菌時間は、10分1回では不十分なきがある。20分1回では植物のダメージが大きいため10分2回に分けて行った。また、殺菌剤に中性洗剤を加えることで殺菌する植物表面の気泡を完全に除去でき、殺菌剤が気泡などに妨げられず接触することから、表面殺菌の確率を向上できると考えた。滅菌水による殺菌剤の洗浄では中性洗剤の泡を取り除くことにより、殺菌剤の除去の目安としている。

この実験は、従来植物ホルモンを添加した培地で行われてきた方法が、植物ホルモン無添加培地で可能かどうかを検討した。また、材料としては、定芽を由来としたものを用いることを基本に行った。実験3の側芽培養については、出芽した側芽のみで増殖して PLB の増殖を行わないことが理想と思われる。しかし、側芽だけでは増殖効率が低いことが課題となる。

従来問題となっていた培養初期の褐変枯死は、暗所培養によって抑制され、また、カットした茎や PLB に対しては添加物のポテトジュースが効果的だった。

植物ホルモン無添加でも培養の過程で花茎腋芽(定芽)由来の PLB が得られたことから、植物ホルモン無添加でもファレノプシスの安定的な苗生産ができるのではないかと期待している。

全培養行程は、花茎腋芽培養 89 日、幼植物の暗所培養 91 日、側芽培養 43 日、苗育成培養 74 日の計 297 日である。現在、流通量が増えている大苗まで育成するには、さらに半年ほどの育成期間が必要であるが、植物ホルモン無添加培地でファレノプシスの増殖が可能であることが実証できた。

摘要

植物ホルモン無添加培地で、28 日の培養条件で花茎腋芽から幼植物が得られた。得られた幼植物を 25 ℃、暗所で培養して茎葉を徒長させ、茎を横切り

することで定芽である側芽を増やしていくことが可能だった。植物ホルモン無添加培地で、側芽培養を行う過程では定芽を由来とする PLB (Protocorm-like body: プロトコーム様体) の形成もみられた。側芽培養や PLB から幼苗の育成過程ではポテト添加培地を使用すると褐変枯死することが少なかった。花茎腋芽を由来とした培養で、植物ホルモンが無添加でも増殖が可能であることを実証できた。定芽を由来とした増殖方法が変異の減少にもつながると期待される。

引用文献

- 段建雄ら.(1993). 市橋正一・三位正洋著(2006). 実践花き園芸技術 ファレノプシス 栽培生産. P.118-125. 誠文堂新光社.
- Honma, Y. and T. Asahira. (1985). New Means of *Palaenopsis* Propagation with Inter Sections of Flower Stalk. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 54. (3):379-387.
- Lin, Chin-Chi. (1986) In-vitro Culture of Flower Stalk internodes of *Palaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Lindleyana* 1(3):158-163.
- 千田良信・田中道男・長谷川晴. (1974) 根の組織培養によるラン科植物の繁殖に関する研究 (予報) *Palaenopsis* および *Vanda* の根端培養による繁殖の可能性について. 園学要旨. 49 春:360-361
- 田中道男・坂西義洋. (1975) *Palaenopsis* の花茎培養におけるえき芽の発育におよぼす温度の影響. 園学要旨. 50 秋:368-369.
- 田中道男・長谷川晴・五位正憲. (1975) 単茎性ラン科植物の組織培養による栄養繁殖に関する研究 (第1報) *Palaenopsis* および *Vanda* の葉組織からのプロトコーム様体の形成について. 園学雑 44(1):47-58.