

ハクサンチドリの無菌発芽法による増殖

市橋 正一* 市川 泰子**

*理科教育講座（園芸学）

**卒業生

Multiplication of *Dactylorhiza aristata* Fisch. (Orchidaceae) through Aseptic Seed Culture

Syoichi ICHIHASHI* and Yasuko ICHIKAWA**

*Department of Science Education (Horticultural Science), Aichi University of Education, Kariya 448-8542, Japan

**Graduate, Aichi University of Education

Summary

Culture conditions and culture media of aseptic seed culture were investigated to establish the multiplication of *Dactylorhiza aristata* Fisch. (Orchidaceae). Immature seeds, which are 3 weeks old after pollination, could germinate and 5 weeks old seeds showed the best germination. Chilling increased germination rate of mature seeds on Hyponex media. Addition of 1 ppm BA and/or 1 ppm NAA to Hyponex media showed no effect on germination. Germination on Norstog media showed higher germination rate than that on Hyponex media. Chilling did not stimulate seed germination on Norstog medium but stimulated seed germination on Hyponex media. Addition of NH_4NO_3 into Norstog medium inhibited germination and the cause of inhibition was NO_3^- . Inhibitory effect of NO_3^- was cancelled by chilling and no chilling effect was observed on Norstog medium which contained no NO_3^- . Growth of protocorms was inhibited lesser extent by NO_3^- than germination of seed. Growth of protocorms was stimulated by addition of peptone or potato extract to culture media.

緒 言

ラン科植物には多様で美しい花をつけるものも多く、愛好家も多い。特に熱帯性で花の美しいものは、装飾用鉢物として人気が高く、*Phalaenopsis*、*Cymbidium*、*Dendrobium*などは人工的に大量に増殖・栽培され、重要な園芸植物として世界的に流通している。

日本にも多数のラン科植物の野生種が生息し、観賞価値の高いものも多く、園芸化されているものもある。また薬用植物としても利用され、その経済的価値が大きい種も存在する。しかし、人工的に大量増殖できない種にあっては、野生株の採集利用が行われ、遺伝資源の枯渇・絶滅につながるものが危惧される。

本研究で人工増殖を試みた *Dactylorhiza aristata*（ハクサンチドリ）は、本州の中部以北のほか、アラスカ、カムチャツカ半島、朝鮮半島などの東アジア北部に分布する地生の多年生ラン科植物である。本種は、北海道などでは比較的多く見られるが、山梨では絶滅危惧IB類、栃木、新潟、石川では絶滅危惧II類、秋田では絶

滅危惧類に分類されている（<http://www.rdbplants.jp/>）。

中部地方では高山の草地に生え、花は6～8月に開花し、5～20個の紅紫色もしくは白色で美しい花を総状につけ観賞価値が高い。観光客の訪れる生息地では、採集によって絶滅の危機に瀕している（Fig. 1A、B、C）。

絶滅の危機に瀕した植物を救済するひとつの方法は、人工的に増殖することである。幸いなことに、ラン科植物は一つのさく果中に多数の種子を生産し、多くのラン科植物は無菌発芽法で大量に増殖することが可能である。しかし、一部の地生ランでは難発芽性のものがあり、それらの人工増殖は現在も困難である。

本研究では、難発芽性と言われている（近藤ら、1997）、ハクサンチドリの発芽率を改善し、実生苗の増殖法を確立し、この種の絶滅に歯止めをかけようとする目的で、培養方法と培地組成の検討を行った。

材料と方法

植物材料：ハクサンチドリは、北海道産の軟質プラスチックポット植え休眠株を2月に購入し、愛知教育大学内の温室で栽培し (Fig. 1D)、4月初めに開花した順に自家授粉を行い、授粉のあと3週目から8週目まで毎週さく果を採取し、そのまま未熟種子を供試した。

完熟種子は、授粉後7週間の裂開直前のさく果を採取し、乾燥後開裂したさく果から種子をかき出し、全種子を混ぜ合わせてパラフィン紙で包み、シリカゲルの入ったガラス瓶内に $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 暗条件で保存し利用した。

培地：Hyponex ($6.5\text{-}6\text{-}19$) 3 gL^{-1} 、ペプトン 2 gL^{-1} 、MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) の有機物所定量、シュクロース 20 gL^{-1} 、寒天 8 gL^{-1} を添加したものと、Norstog 培地 (Norstog, 1973) の寒天をジェランガム 3 gL^{-1} に改変したものを基本培地として (Table

Table 1. The media compositions used for seed germination of *Dactylorhiza aristata*.

Components		Media (mgL^{-1})	
		Modified ^Y Hyponex	Norstog ^Y
Comercial fertilizer	Hyponex (N:P:K=6.5 (6.0:19.0))	3000.0	
Major elements	KH_2PO_4		910.0
	KCl		750.0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		740.0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		740.0
Minor elements	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		3.0
	H_3BO_3		0.5
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.5
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.025
	NaMoO_4		0.025
	Fe (III)-EDTA		10.0
Vitamins	myo-inositol	100.0	50.0
	thiamine · HCl	0.1	0.25
	pyridoxine · HCl	0.5	0.25
	nicotinic acid	0.5	
	Ca-pantothenate		0.25
Amino acids	glycine	2.0	
	L-Glutamine		400.0
	L-Alanine		50.0
	L-Cysteine		20.0
	L-Arginine		10.0
	L-Leucine		10.0
	L-Phenylalanine		10.0
	L-Tyrosine		10.0
	L-Malic acid ^Z		1000.0
Organics	peptone	2000.0	
	CW (optional)	100.0 (mL L^{-1})	
Carbohydrate	Sucrose	20000.0	34200.0
Solidifier	Agar	8000.0	
	Gellan gum		3000.0

^Z Malic acid was added after dissolving 30 ml of deionized distilled water.

^Y pH of Hyponex medium was adjusted by HCl or KOH and that of Norstog medium was adjusted by NH_4OH to 5.5–5.6. After dissolving the solidifier in a hot bath, all media were autoclaved for 15 minutes at 115°C .

1)、処理に応じて各種添加物を添加して用いた。それぞれ pH を 5.5～5.6 に調整後、 115°C 、15 分間オートクレーブで殺菌処理した。滅菌済みプラスチック培養容器を使う場合は、オートクレーブ殺菌直後の培地を、クリーンベンチ内で滅菌済み容器に約 15 ml ずつ分注し、パラフィルムで封をして用いた。

播種方法：未熟さく果は 70% エタノールに約 10 秒間浸漬し、滅菌水ですすぎ、その後 0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 10 分間浸け殺菌し、滅菌水で 3～4 回すすいだ。クリーンベンチ内で、両端を切り落としたさく果を 4～6 等分に輪切りし、培養管内の培地に 2～3 切片を植えつけた。完熟種子の殺菌は、内径 6 mm × 長さ 8 cm のガラスピペットに脱脂綿を詰め、脱脂綿の上に完熟種子を入れ、その上に脱脂綿を重ねて詰め、ピペットにキャップを付け、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を 10 分間吸排した。殺菌終了後、クリーンベンチ内で、滅菌水を吸って捨てるのを 5～6 回繰り返し洗浄した。殺菌のあとキャップを外し、上側の脱脂綿をピンセットで取り除き、種子をスパチュラですくい取り 1 ディッシュあたり 100～200 種子になるように播種し、ピペットで滅菌水を 1 ml 程度注入し、種子を培地上に均一に広げた。

培養条件：培養は、暗条件、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ で行い、実体顕微鏡下で観察し、胚が肥大し種皮を破った段階で発芽とみなした (Fig. 1F)。また、発芽率は (発芽数 / 有胚種子数) × 100 として算出した。

プロトコームの培養：Norstog 培地に播種し、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、暗条件で 24～32 週培養して得たプロトコーム (Fig. 1H) から、1～2 mm のものを選んで供試した。

結果と考察

種子の齢と発芽：ハクサンチドリの授粉後 3 週目から 8 週目まで毎週採取したさく果を、殺菌後 4～6 等分に輪切りにし、そのまま播種した。未熟種子はどの段階でも播種後約 4 週で発芽し、授粉後 5 週目のものの発芽数は有意に多くなった。発芽した種子は、多くの仮根をもつ白色球状のプロトコームを形成した。ベンジルアデニン (BA) 1 ppm と α -ナフタレン酢酸 (NAA) 1 ppm 添加の発芽に対する効果はみられなかった (Table 2)。

完熟種子の発芽に及ぼす BA および低温処理の効果：低温処理なしで BA 無添加の対照区では、播種後 2 週目に発芽が認められたが、その後発芽率はあまり増加せず、播種後 16 週目においても、BA 無添加区で 9.3%、2 ppm 添加区で 3.7%、10 ppm 添加区で 9.8%、20 ppm 添加区で 2.8% となった。本実験結果からは、BA の発芽促進効果は認められなかった (Table 3)。

低温処理区の発芽率はいずれの処理区も無処理区と同程度かそれ以上で、その効果が見られた。発芽率が

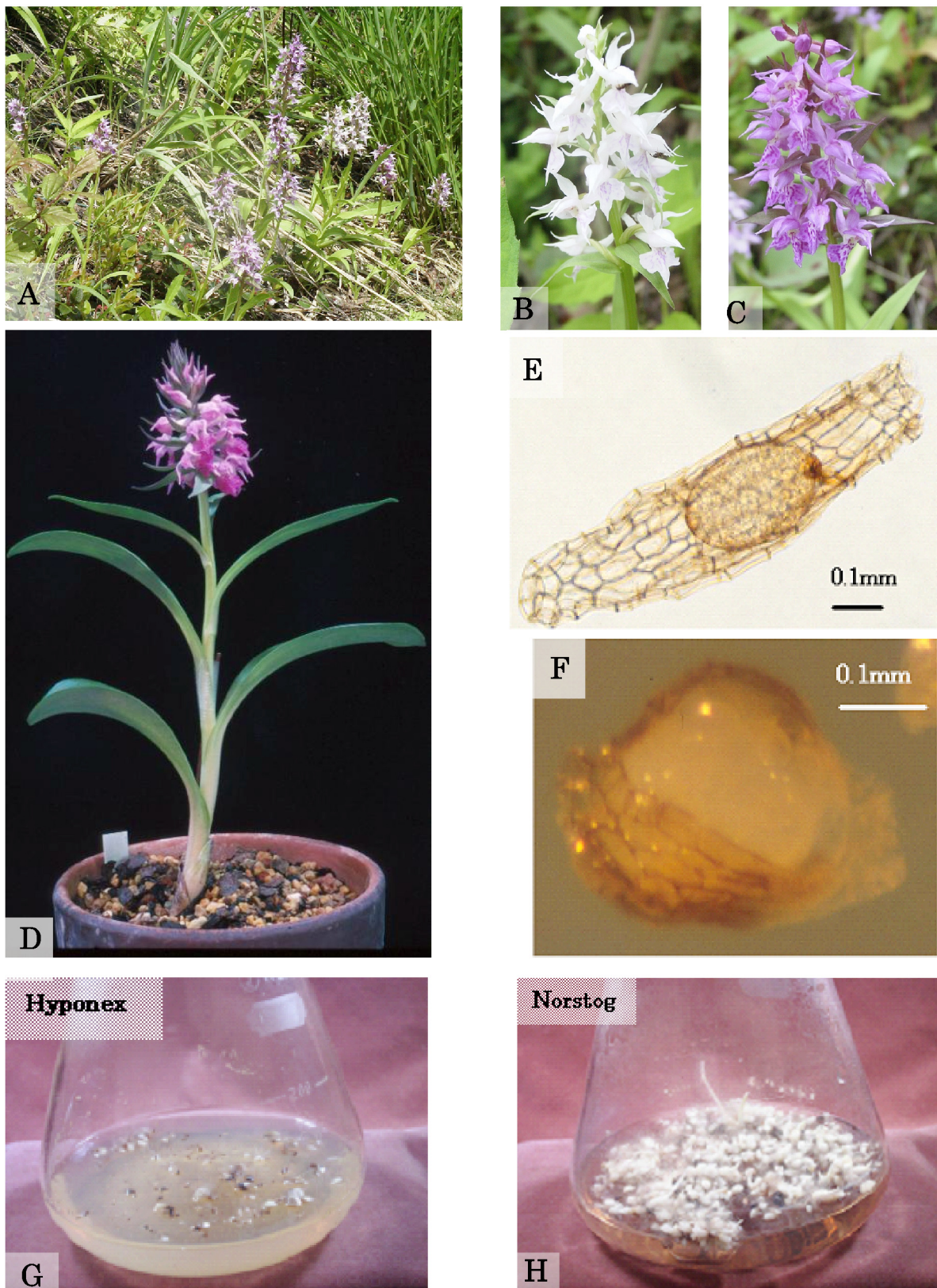


Fig. 1. *Dactylorhiza aristata* in a habitat and plant materials used in this experiments.
A; B; C: *Dactylorhiza aristata* in a habitat. D; One plant used to produce seed materials in this experiments. E; A fertile ripe seed. F; A seed just germinating. G and H; Seeds germinated on a Hyponex and a Norstog medium cultured for 32 weeks in a 100 mL Erlenmeyer flasks.

Table 2. Effects of seed maturation on seed germination of *Dactylorhiza aristata*.

Media ^x Hyponex	Seed age (weeks after pollination)	Average number ^{z,y} of seeds germinated
-PGR	3	31.4 b*
	4	16.0 bc
	5	71.0 a*
	6	10.2 bc
	7	31.0 b
+PGRs (1 ppm BA+ 1 ppm NAA)	8	4.0 c
	3	3.2 b
	4	8.0 b
	5	35.8 a
	6	12.6 bc
	7	24.0 ac
	8	4.4 b

^z Seed capsules were cutted into 4 to 6 segments after sterilization of 0.5% sodium hypochlorite solution for 10 minutes followed by rinsing of deionized-distilled sterilized water and two of them were inoculated on to each medium in a cultur tube. Number of germinated seed were counted after 12 weeks of inoculation.

^y Columns with different letters are statistically significant ($P<0.05$) within the same media by Bonferroni Multiple Range Test. Asterisks (*) indicate significant difference ($P<0.05$) between the same seed maturation on different media with or without PGRs.

^x Hyponex medium (Table 1) with peptone was used as basic medium and plant growth regulators (PGRs; NAA and BA) were added 1 ppm each.

Table 3. Effects of BA and chilling treatments on seed germination of *Dactylorhiza aristata*^z.

Medium ^y	Culture periods of each treatment (weeks)				Germination ^x (%)
	BA (ppm)	Pretreatment 22 ± 1°C	Chilling 5 ± 1°C	Culture 22 ± 1°C	
Hyponex	0	0	0	16	9.3
	0	0	0	16	3.7
			4	16	16.5
			8	16	9.2
			16	16	23.2
	1	1	4	16	20.0
			8	16	25.4
			16	16	46.3
	2	2	4	16	8.8
			8	16	45.2
			16	16	38.7
	4	4	4	16	8.4
			8	16	23.3
			16	16	11.6
	10	0	0	16	9.8
	20	0	0	16	2.8
LSD (5%)					13.8

^z About 100 to 200 mature seeds which polinated at Aug. 3, 2000 and harvested Sept. 20, 2000 were sown at Oct. 12, 2000 in 60 mm diameter disposable petri dishes.

^y Modified Hyponex medium (Table 1) was used as basal medium and benzyl adenin (BA) was added complementarily.

^x Cultures were kept in dark condition and number of germinated seeds was counted after the end of whole culture periods.

最も高かったのは、播種後1週間の前培養後に低温処理を16週間施した処理区の46.3%で、対照区 (3.7%) の10倍以上の発芽率となった。

播種後直ちに低温処理した区で発芽率が低い傾向であった。種子の吸水が不十分のうちの低温処理は、そ

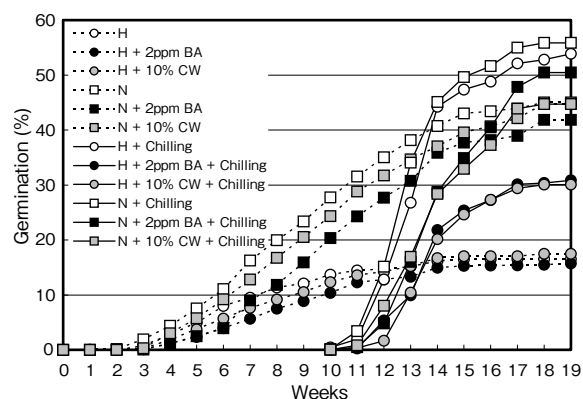
の効果が現れにくいと考えられた。ラン科植物の種子発芽時の低温処理の効果は、*Ponerorchis graminifolia* (Ichihashi, 1986)、*Cypripedium reginae* (Ballard, 1987)、*Cyp. calceolus* (Chu and Mudge, 1994)、*Cyp. macranthos* (富田・榊原, 1995; Tomita and Tomita, 1997; Miyoshi and Mii, 1998) など知られているが、前培養の効果は分かっていない。これらにおいても前培養の効果は存在する可能性が考えられる。

ハクサンチドリ of 種子発芽はHyponex培地で0.00274% (近藤ら, 1997)、Norstog培地では71.3%と高い発芽率が知られている (富田・村元, 2000)。本実験では近藤ら (1997) の場合と同様にHyponex培地を用いたが、発芽率ははるかに高く、低温処理はハクサンチドリの完熟種子の休眠打破のひとつの要因と考えられた。

培地および低温処理が完熟種子の発芽に及ぼす影響：培地の種類と低温処理が発芽に影響することが示唆されたので、それらの影響について検討した。

Hyponex培地あるいはNorstog培地 (Table 1) にBAを2 ppm、またはココナツウォーター (CW) を10%添加した培地に完熟種子を前述の方法で殺菌し播種し、前述の方法で培養した。

いずれの培地でも完熟種子の発芽が認められた。Hyponex培地の無低温処理区では、播種後3週目で発芽が認められたが、最終的な発芽率はいずれも15%前後になった。低温処理区では22 ± 1°Cに戻した後、3、4週で急速に発芽し、Hyponex培地では最終的な発芽率は53.4%と最も高くなった。BAやCWの添加の効果は認められなかった (Fig. 2, 3)。

Fig. 2. Effects of chilling and addition of benzyl adenine (BA) or coconut water (CW) on seed germination of *Dactylorhiza aristata*.

Mature seeds, average 248.7 ± 8.3 (mean \pm SD) were sown on a medium in 60 mm plastic dishes containing 15mL solid medium and replicated at least 10. Basal medium, Hyponex or Norstog was added 2 ppm BA or 10% CW. Seeds were sown at Oct. 17, 2001 and cultured at 22 ± 1°C in dark. Half of dishes were kept at 22 ± 1°C for two weeks and then kept at 5 ± 1°C for 8 weeks and cultured again at 22 ± 1°C in dark (solid lines).

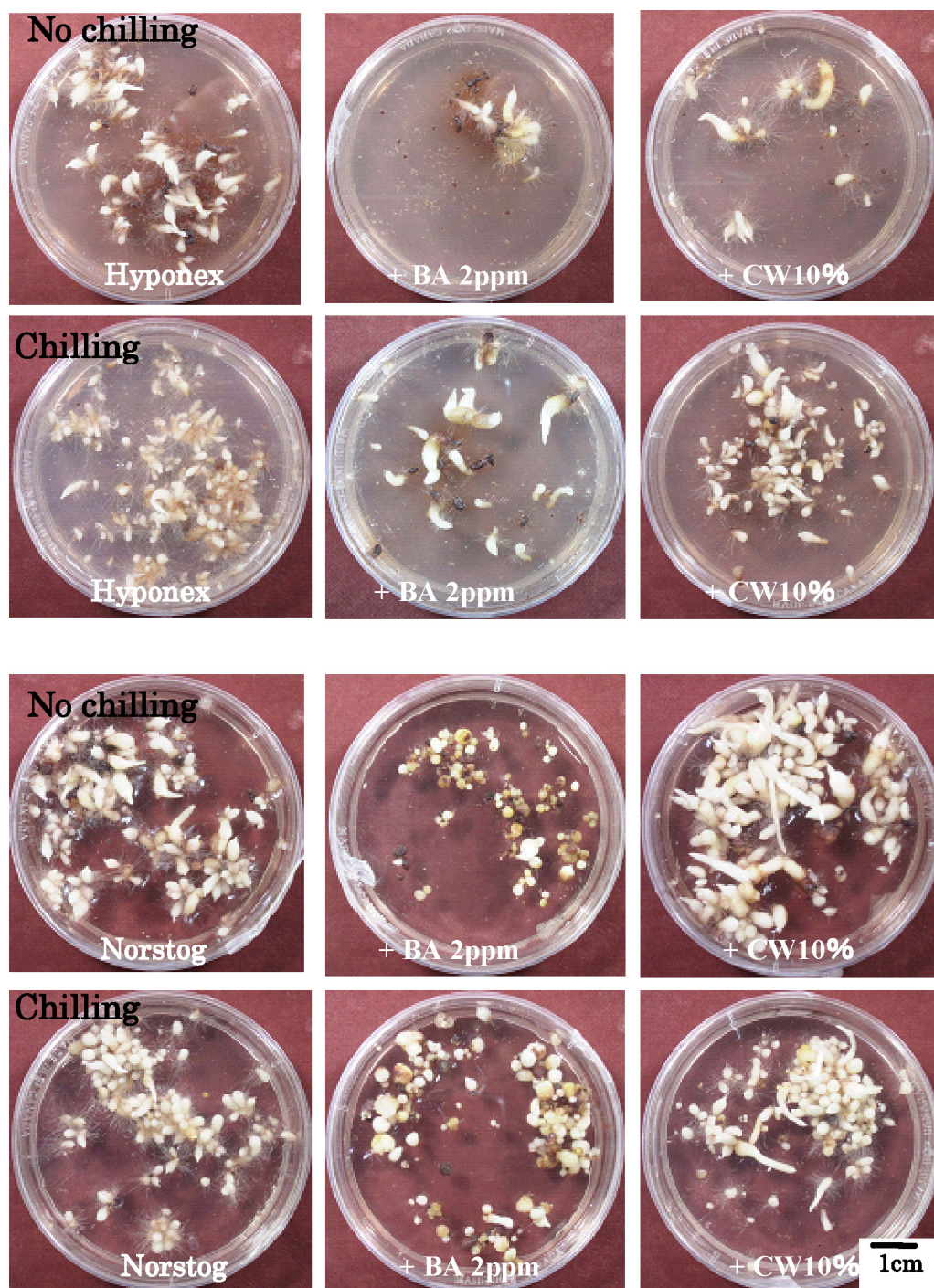


Fig. 3. Effects of chilling and addition of benzyl adenine (BA) or coconut water (CW) on seed germination of *Dactylorhiza aristata*. Mature seeds, 248.7 ± 8.3 (mean \pm SD) were sown on a medium in 60 mm plastic dishes containing 15mL solid medium. Basal medium, Hyponex or Norstog was added by 2 ppm BA or 10% CW. Seeds were sown at Oct. 17, 2001 and cultured at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark for 19 weeks.

Norstog 培地の無低温処理区でも、播種後3週目で発芽が認められ、最終的な発芽率40%以上となった。低温処理区では、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ に戻した後、3、4週で急速に発芽率が上昇し、最終的な発芽率は50%前後になった (Fig. 2、3)。

本実験では低温処理の発芽に対する有効性が再確認できたが、BA、CW添加の効果は認められなかった。また、Hyponex 培地と比較すると、全ての処理区にお

いて Norstog 培地の発芽率は高く、その原因は培地組成にあると考えられた。Norstog 培地にはアンモニア態窒素、硝酸態窒素が含まれていないことから、これがハクサンチドリの発芽を抑制している可能性が考えられた。また、無機態窒素を含む培地での発芽に低温処理が有効で、無機態窒素を含まない Norstog 培地での発芽には低温処理の有効性は低いことが示唆された。

培地中の NH_4NO_3 濃度およびアミノ酸が完熟種子の発芽に及ぼす影響：無機態窒素がハクサンチドリの発芽におよぼす影響を調べるため、Norstog培地に NH_4NO_3 を0、0.5、1.0、2.0 g添加した培地、Norstog培地からアミノ酸を抜き NH_4NO_3 を0、0.5、1.0、2.0 g添加した培地での発芽率について検討した。また、0.5 gL^{-1} (0.0062 M) の NH_4NO_3 と同モルの NaCl (0.365 gL^{-1})、 NH_4Cl (0.334 gL^{-1})、 NaNO_3 (0.531 gL^{-1}) を添加した培地、Norstog培地からアミノ酸を抜き前記と同量の NaCl 、 NH_4Cl 、 NaNO_3 を添加した8種類の培地を用い、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、あるいはアミノ酸態のいずれの窒素源がハクサンチドリの発芽に影響しているのか検討を行った。

ハクサンチドリの発芽率は、アミノ酸の有無に関わらず NH_4NO_3 を添加しない場合に最も高く、 NH_4NO_3 添加によって著しく抑制された (Table 4、Fig. 4A)。

続いて、Norstog培地への NaCl 、 NH_4Cl 、 NaNO_3 の添加では、 NaNO_3 添加区のみで発芽が有意に阻害された。したがって、 Na^+ 、 Cl^- 、 NH_4^+ 、アミノ酸態窒素は発芽を阻害しないが、 NO_3^- は発芽を阻害することが明らかになった (Table 5、Fig. 5)。

ラン科植物の種子は無胚乳で、その発芽は従属栄養的で、無菌培養条件での発芽は培地組成に依存する。本実験の結果では、アミノ酸および NH_4NO_3 無添加区でも種子は発芽し、窒素源がなくても種子は発芽しある程度肥大し、初期段階のプロトコームを形成することが明らかになった。また、種子の発芽は硝酸態窒素で阻害され、アンモニア態窒素、アミノ酸態窒素は抑制しないことが示された。培地作成の手間を考える

Table 4. Effects of NH_4NO_3 on the seed germination of *Dactylorhiza aristata*^z.

Basal Medium ^y Norstog + NH_4NO_3 (gL^{-1})	Germination ^x (%)
0	38.4 a
0.5	5.3 b
1	1.7 b
2	0.0 b
–Amino acid + 0	35.9 a
–Amino acid + 0.5	3.9 b
–Amino acid + 1.0	1.1 b
–Amino acid + 2.0	0.0 b

^z Average number of 155.5 ± 20.5 (mean \pm SD) seeds were sown and replicated 8.

^y Norstog medium (Table 1) was used as basal medium and NH_4NO_3 was added 0, 0.5, 1.0, or 2.0 gL^{-1} each into original medium or the medium deleted amino acids, respectively.

^x Germination was observed after 13 weeks of culture. Columns with different letters are statistically significant ($P < 0.05$) within the same basal media by Bonferroni Multiple Range Test.

Table 5. Effects of NaCl , NH_4Cl , and NaNO_3 on the seed germination of *Dactylorhiza aristata*^z.

Basal Medium ^y Norstog + salt (gL^{-1})	Germination ^x (%)
Norstog	29.4 a
+ NaCl 0.36	25.3 ac
+ NH_4Cl 0.33	26.7 a
+ NaNO_3 0.53	14.6 bc
–Amino acid	30.6 a
–Amino acid + NaCl 0.36	27.2 a
–Amino acid + NH_4Cl 0.33	23.0 a
–Amino acid + NaNO_3 0.53	15.8 b

^z Average number of 143.8 ± 22.8 (mean \pm SD) seeds were sown and replicated 6.

^y Equal molar amount of additives to 0.5 gL^{-1} NH_4NO_3 (6.2 mM) were added to each medium.

^x Germination was observed after 13 weeks of culture. Columns with different letters are statistically significant ($P < 0.05$) within the same basal media by Bonferroni Multiple Range Test.

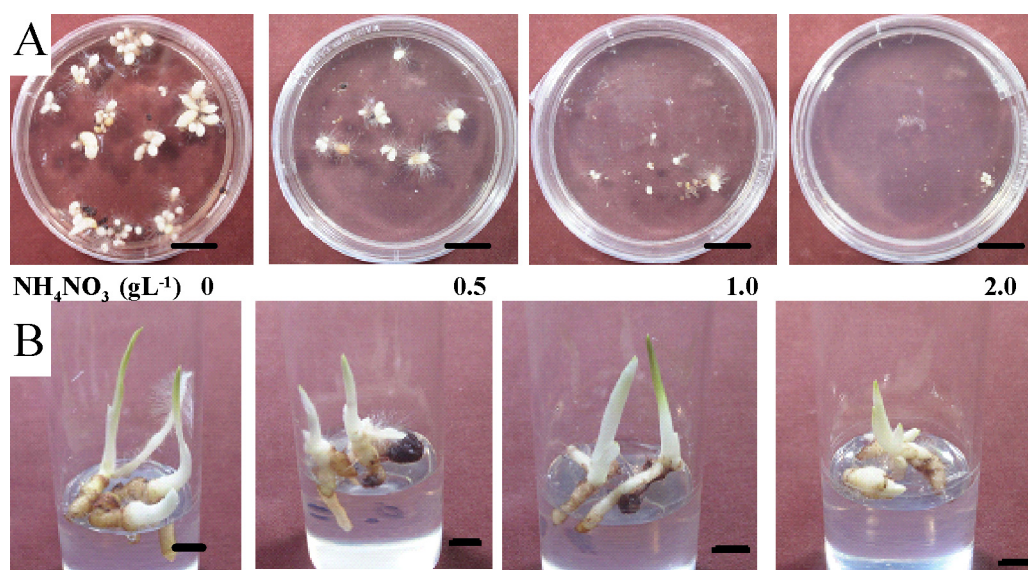


Fig. 4. Effects of NH_4NO_3 on the seed germination (A) and the growth of *Dactylorhiza aristata* protocorms (B). NH_4NO_3 , 0, 0.5, 1.0, or 2.0 gL^{-1} was added into Norstog medium. Mature seeds were cultured for 13 weeks at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark (A). One to two mm protocorms were cultured for 24 weeks at 15°C under 500 lux and 16 hr fluorescent light (Plantlux) conditions (B). Scale bars indicate 1 cm (A) and 5 mm (B).

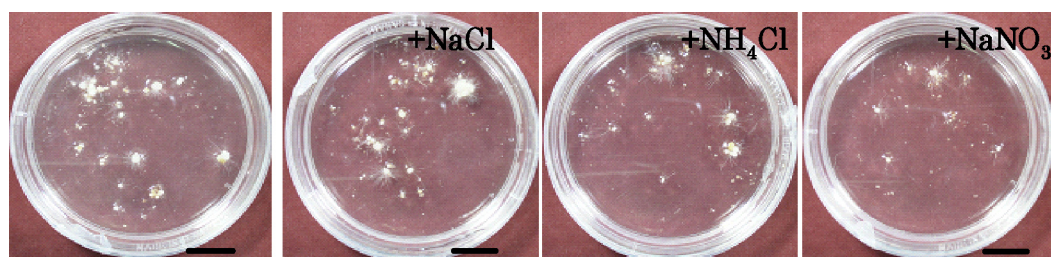


Fig. 5. Effects of NaCl, NH_4Cl , NaNO_3 on the seed germination of *Dactylorhiza aristata* protocorms.

NaCl , NH_4Cl , NaNO_3 were added 0.37 gL^{-1} , 0.33 gL^{-1} , 0.53 gL^{-1} into Norstog medium. Mature seeds were cultured for 13 weeks at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark. Scale bars indicate 1 cm.

Table 6. Effects of NH_4NO_3 on the growth of *Dactylorhiza aristata* protocorms^z.

Media		Survival (%)	Growth of shoot			Growth of root		
BM	+ NH_4NO_3 (gL^{-1})		formation ^x (%)	average ^y number	average ^y height (mm)	formation ^x (%)	average ^y number	average ^y length (mm)
Norstog	0	80.0	95.8	1.1a	13.0a	79.2	1.5a	9.9a
Norstog	0.5	70.0	95.2	1.2a	7.0b	76.2	1.8a	6.6bc
Norstog	1	46.7	85.7	1.1a	12.6a	71.4	1.7a	8.4ab
Norstog	2	66.7	90.0	1.2a	5.5b	65.0	1.4a	4.3c

^z One to two mm diameter of protocorms which germinated and grew on Norstog medium for 32 weeks at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ in dark were transplanted onto Norstog medium with different NH_4NO_3 concentrations and cultured for 24 weeks at $15 \pm 1^\circ\text{C}$ under 500 lux provided by fluorescent lamp for 16 hour photoperiods.

^y Columns with different letters are statistically significant ($P < 0.05$) within the media with different NH_4NO_3 concentrations by Duncan Multiple Range Test.

^x Growth of shoot formation (%); (number of protocorm which formed shoot/number of protocorm which survived) $\times 100$.

と、Norstog 培地は多種のアミノ酸を含むため実用的ではない。アミノ酸混合物などを窒素源とした簡便な培地の開発が望まれる。

Cattleya labiata の種子は、アンモニア態窒素存在下で発芽するが、硝酸態窒素を唯一の窒素源とする時には発芽しない。これは、発芽時には硝酸態窒素が利用できないためである (Raghaven and Torrey, 1964)。またこれが、多くのランの種子発芽培地にはアンモニア態窒素あるいは有機態窒素が含まれる理由と考えられる。

本実験の結果では、ハクサンチドリの難発芽性の原因の一つは、硝酸態窒素の阻害効果によるもので、代謝できないためではなく、その利用が正常に行われていないことによるためと推測された。さらに、*Dactylorhiza incarnata* の無菌発芽においてはアンモニア態窒素の阻害効果も知られている (Dijk and Eck, 1995) が、当実験で用いた *Dactylorhiza aristata* ではアンモニア態窒素の阻害効果は見られなかった。このことは、属内に異なった仕組みによる種子発芽の阻害機構が存在していることを示唆しているが、その詳細については不明である。

プロトコームの生育に及ぼす NH_4NO_3 ならびに各種天然有機物の影響：ハクサンチドリのプロトコームの生育に対する NH_4NO_3 の影響について検討するため、Norstog 培地に播種し、24～32週培養して得られた1～2 mmのプロトコームを、 NH_4NO_3 を0、0.5、1.0、2.0 gL^{-1} 添加したNorstog培地に移植した。また、

Hyponex 培地およびNorstog培地を基本培地とし、ペプトン 2.0 gL^{-1} 、CW 5%、ジャガイモ抽出液 5%、あるいはバナナ摩砕物を 5% 添加した10種類の培地に移植し、プロトコームの生育に対する影響を検討した。培地は、植物培養管（平底、直径 25 mm \times 高さ 120 mm）に 10 ml ずつ分注しオートクレーブ殺菌した。

プロトコームは培養管あたり3個体移植し、10反復とした。培養は、 15°C で植物育成用蛍光灯（プラントレックス）の約 500lux、16時間明条件8時間暗条件下で行った。培養物は4週間ごとに継代培養し、最終的な測定は培養24週間後に行った。

移植後4週間目までは目立った変化は見られなかったが、その後 NH_4NO_3 の添加の有無に関わらずほとんどのプロトコームでシュート分化が始まり、移植後8週目には白色または緑色のシュートを形成した。移植後12週目には根を形成するものもあった (Table 6, Fig. 4B)。 NH_4NO_3 添加の影響は肉眼的にはあまり認められなかったが、移植後24週目の結果では、生存率、シュートと根の生育は、 NH_4NO_3 無添加区で良好となった (Table 6, Fig. 4B)。

これらの結果から、ハクサンチドリのプロトコームの生育においても NH_4NO_3 の阻害効果が示唆されたが、種子発芽の場合よりも阻害効果は軽微に観察された。これは、実生の生育段階の進展とともに、窒素代謝が独立栄養化するためと推測された。

Cattleya は種子発芽の初期段階では、硝酸イオンが利用できないが、発芽の阻害効果は見られない。ま

Table 7. Effects of organic additives on the growth of *Dactylorhiza aristata* protocorms^z.

Media		Survival (%)	Growth of shoot			Growth of root		
BM	Additive		formation ^x (%)	average ^y number	average ^y height (mm)	formation ^x (%)	average ^y number	average ^y length (mm)
Hyponex	—	88.9	95.8	1.1a	8.5a	87.5	1.4a	8.2b
	Peptone	73.3	95.5	1.0a	6.1a	77.3	1.5a	10.7b
	CW	76.7	100.0	1.0a	8.6a	87.0	1.4a	11.1b
	Potato extract	90.0	100.0	1.0a	7.8a	77.8	1.3a	12.5ab
	Banana	96.7	96.6	1.1a	9.8a	89.7	1.5a	16.4a
Norstog	—	63.3	84.2	12.0a	9.3b	57.9	1.7a	10.8b
	Peptone	70.0	100.0	1.0a	17.2a	85.7	2.2a	20.4a
	CW	48.2	84.6	1.1a	11.9b	61.5	1.8a	10.9b
	Potato extract	83.3	100.0	1.1a	13.4ab	92.0	1.9a	18.8a
	Banana	66.7	94.4	1.1a	11.4a	83.3	2.0a	16.3ab

^z One to two mm diameter of protocorms which germinated and grew on Norstog medium for 32 weeks at 22 ± 1°C in dark were transplanted onto different media containing different organic additives and cultured for 24 weeks at 15 ± 1°C under 500 lux provided by fluorescent lamp for 16 hour photoperiods.

^y Columns with different letters are statistically significant (P<0.05) within the same basal media with different organic additives by Duncan Multiple Range Test.

^x Growth of shoot formation (%); (number of protocorm which formed shoot/number of protocorm which survived) × 100.

た、硝酸イオン存在下では硝酸還元酵素が誘導形成され、生育と共に硝酸態窒素を吸収利用できるようになる (Raghaven and Torrey, 1964)。ハクサンチドリの場合には利用できないだけではなく、発芽の阻害効果が見られ、生育段階が進むと阻害効果は軽減された。したがって、硝酸態窒素の利用に関して、*Cattleya*の場合とは違った仕組みが関与していることが推察された。

多くのラン科植物の実生苗育成過程では、生育促進のため、各種の天然有機物の培地への添加が行われている。本研究でも、幾つかの有機物の添加の効果を検討したが、プロトコームの生存率への影響はあまり見られなかった。プロトコームの生育に関しては、Hyponex 培地へのバナナとジャガイモ抽出液添加で根の伸長が有意に促進された。Norstog 培地では、ペプトン、バナナ、ジャガイモ添加でシュートと根の生長が有意に促進された (Table 7)。

Hyponex 培地と Norstog 培地の比較では後者が優り、さらにペプトンおよびジャガイモ添加が効果的であった。*Dactylorhiza purpurella* でもアミノ酸混合物であるカザミノ酸の添加効果が報告されている (Harvais, 1972)。これらの結果は、地生ランである本属の従属栄養性の高さを示しているものと考えられた。

また、これらの処理区以外でも旺盛に生育するものが見られ、実生個体の生育特性に違いが存在すること、培地による特定個体の選抜の可能性が示唆された。無菌発芽法による人工増殖では、その条件に適した個体が選抜される可能性があるが、それは園芸の利用する場合には不可避なことであり、特定の形質を備えた個体が選抜されたとしても、間接的に絶滅危惧種の保護に寄与できるものと考えられる。

摘 要

ハクサンチドリの無菌発芽法による増殖法を検討した。

ハイポネックス培地に播種したハクサンチドリ未熟種子は、授粉後3週目で発芽が認められ、授粉後5週目で発芽数は最高になった。

ハイポネックス培地に播種したハクサンチドリ完熟種子の発芽には、低温処理の効果が認められた。

BA (1 ppm) と NAA (1 ppm) 添加の発芽に対する効果はみられなかった。

Hyponex 培地と比較して、Norstog 培地での発芽が勝り、同培地では低温処理の効果は認められなかった。

Norstog 培地に NH₄NO₃ を添加すると、ハクサンチドリの発芽は有意に抑制され、その原因は硝酸態窒素の発芽抑制効果によるものであった。

硝酸態窒素を含む培地での発芽には、低温処理が有効で、無機態窒素を含まない Norstog 培地での発芽には低温処理の効果はなかった。

ハクサンチドリのプロトコームの生育においても硝酸態窒素の阻害の効果が示唆されたが、種子発芽の場合よりも影響は少なかった。

ハクサンチドリのプロトコームの生育にはペプトン添加およびジャガイモ抽出物添加の効果が認められた。

引用文献

- Ballard, W. W. 1987. Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds. Amer. Orchid. Sci. Bull. 56: 935–946.
- Chu, C. C. and K. W. Mudge. 1994. Effect of prechilling and liquid suspension culture on seed germination of the yellow lady's slipper orchid. (*Cypripedium calceolus* var. *pubescens*). Lindleyana 9: 153–159.
- Harvais, G. 1972. The developments and growth requirement of *Dactylorhiza purpurella* in asymbiotic cultures. Can. J. Bot. 50: 1223–1229.
- Ichihashi, S. 1989. Seed germination of *Ponerorchis graminifolia*. Lindleyana 4: 161–163.
- Kondo, K., C. Tanaka, T. Shimada, and M. Ohtani. 1997. Developmental morphology of seeds and micropropagation of *Orchis aristata*

- Fischer (Orchidaceae) in axenic culture. Ann. Tsukuba Bot. Gard. 16: 41–48.
- Miyoshi, K. and M. Mii. 1998. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, prechilling and cytokinins on the germination of seed of *Cypripedium macranthos* Swartz in vitro. Physiol. Plant. 102: 481–486.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantar. 15: 473–497.
- Norstog, K. 1973. New synthetic medium for the culture of premature barley embryos. In Vitro 8 (4): 307–308.
- Raghaven, and J. G. Torrey. 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the embryos of the orchid *Cattleya*. Amer. Jour. Bot. 5 (3): 264–274.
- 富田正徳・神原三奈. 1995. アツモリソウの発芽と実生の生育に及ぼす培養条件の影響. 園学雑. 64 (2): 592–593.
- Tomita, M., and M. Tomita. 1997. Effects of culture media and cold treatment on germination in asymbiotic culture of *Cypripedium macranthos* and *Cypripedium japonicum*. 1997. Lindleyana 12 (4): 208–213.
- 富田正徳・村元千恵子. 2000. 数種のハクサンチドリ植物の無菌および共生発芽について. 園学雑. 69 (2): 415.

(2011年9月14日受理)