愛知教育大学研究報告，49（自然科学編），pp. 51～56, March, 2000

ファレノプシス類の微細繁殖法の改善

市 橋 正 一，都 築 正 文，Chenna Reddy Aswath
（生命科学領域）

Studies on Micropropagation of *Phalaenopsis* Alliance

Syoichi ICHIHASHI, Masafumi TSUZUKI and Chenna Reddy Aswath
(Department of Life Science)

Abstract

Micropropagation of *Phalaenopsis* through flower stalk culture was investigated.

Bracts of flower stalks were removed before or after sterilization. Decontamination rate of nodal sections was higher when they were sterilized with bract. Subsequent growth of lateral buds was affected by the timing of bract removal. Much lateral bud developed flower stalk secondary when bracts were removed after sterilization, but much of them developed vegetative shoots when bract was removed before sterilization.

Propagation from a plantlet was investigated using in vitro clone plantlets. Base part of a plantlet, 1.5 cm was cut into 2.5 mm or 5 mm slice segments, and they were cultured on NP medium with or without coconut water (CW) and/or 6-benzylaminopurine (BA). Regeneration of shoot(s) and callus like body (CLB) was dominant in the slice segments derived from 5-10 mm part from the base of the shoot and was promoted by addition of CW and/or BA.

はじめに

フアレノプシスは単茎性植物であり，栄養繁殖苗による生産は一般的ではなかった。したがって，栄養系の迅速な増殖を目的とした微細繁殖法の必要性は大きいものであったが，その実用化は遅れた。その理由は単純で，ファレノプシスは単茎性のため，茎頂を用いた実験が行い難くかったことにある。しかし，現在では花茎培養によって誘導された幼苗の葉片組織の培養によってプロトコーム様球体（PLB）を誘導し増殖する方法(Tanaka, 1992)，花茎先端部の培養による方法（本間，1985；Lin, 1986)，根端培養によるもの(小林ら，1990)，若い花茎の腋芽培養によるもの(Ichihashi, 1992)などいくつかの方法が開発されている。しかし，1）無菌化の困難な場合があること，2）培養組織が苗として完成し増殖しない場合があること，3）品種によって増殖のし易さが違うこと，4）培養中に起こる変異の問題など，まだ多くの問題点も存在する。今回は，1）と2）について検討し，若干の結果が得られたので報告する。

材料と方法

1）花茎組織の殺菌方法の検討　1999年3月30日にサッポロビール株式会社アグリ事業部群馬センターか

Table 1. Composition of media used. ($mg \cdot l^{-1}$)

	NP	Hyponex
Hyponex (6.5:6:19)		$3 g \cdot l^{-1}$
$(NH_4)_2SO_4$	303.900	
KH_2PO_4	462.700	
NH_4NO_3	32.000	
KNO_3	424.600	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	637.600	
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	256.400	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.800	
Na_2—EDTA	37.300	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	11.200	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4.300	
H_3BO_3	3.100	
KI	0.415	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.125	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.013	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.013	
Nicotinic acid	0.500	<-
Pyridoxine·HCl	0.500	<-
Thiamine·HCl	0.100	<-
myo-Inositol	100.000	<-
Glycine	2.000	<-
BA	0 or 5.000	5.000
Agar	$8 g \cdot l^{-1}$	<-
Coconut water[1)]	0 or 150ml	
Sucrose	$20 g \cdot l^{-1}$	<-

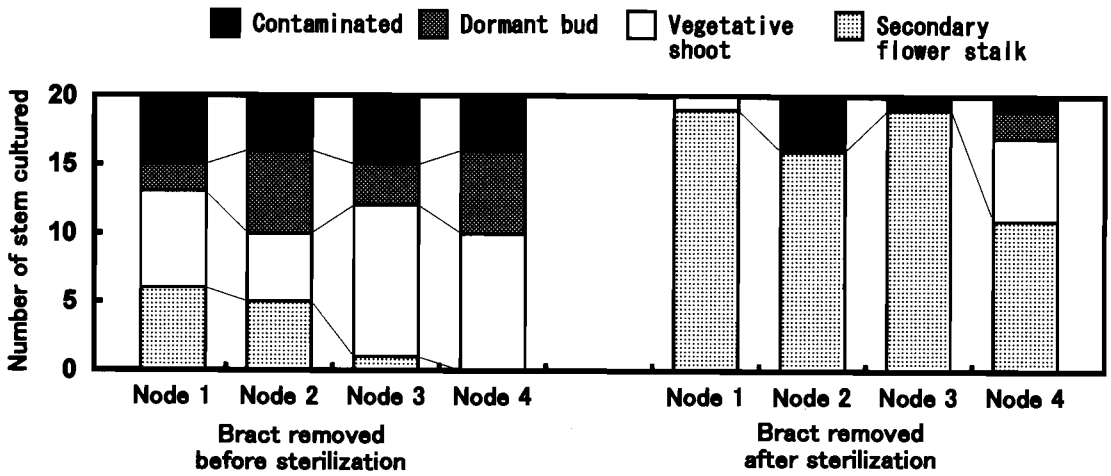

Fig. 1. Effects of node position and removal of bract before or after sterilization on decontamination and growth behavior of lateral buds on flower stalk. After sterilization flower stalks were cut both cut surface again and cultured 1.5cm long 20 stem in each treatment.

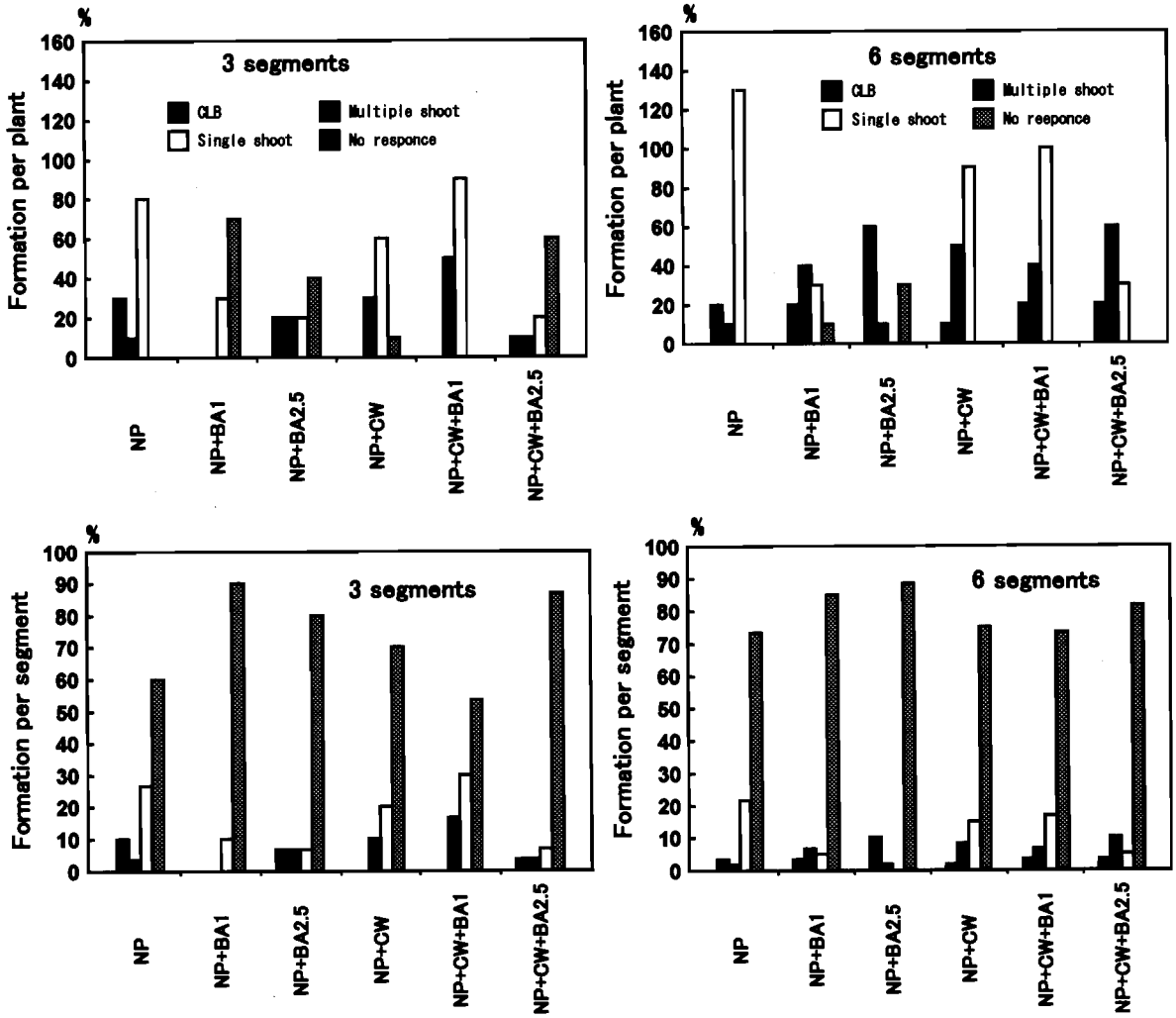

Fig. 2. Effects of culture media on growth of shoot slice segments. Base part of plantlet in vitro, 1.5cm from the base were cut into 2.5mm of 6 slices or 5mm of 3 slices and they were cultured together on the same medium.

ら提供を受けた *Phalaenopsis* White Castle の切り花の花茎を供試した。花茎下部の節位に存在する節を，最下位小花の直下から順に4節供試した。これらの節にはすべて腋芽が存在した。節の前後に2.5cmの茎を付けて花茎を切断し，包葉を削除したものとしないものに分けた。それぞれ100倍オスバン液に30分浸漬後に蒸留水で1回水洗し，70%エタノールに3分間浸漬後に蒸留水で1回水洗し，クリンベンチ内に移動して1%次亜塩素酸水溶液で10分間殺菌し滅菌水で3回濯いだ。次に，花茎の節の上部を5mm，下部を10mm残して余分な花茎は切除し，各節位ごとに各区20本を上下を揃えて置床した。

培地（Table 1）はハイポネックス（N：P_2O_5：K_2O=6.5：6：19）3g·l^{-1}に MS 培地の有機物を処方量，スクロースを20g·l^{-1}，寒天8g·l^{-1}，BA を5mg·l^{-1}添加し，pH5.6とし湯せんで寒天を溶かし，植物培養用試験管（平底，直径25mm×高さ120mm）にそれぞれ10mlずつ分注し，オートクレーブ（115℃，15分）で滅菌処理した。培養温度は20-23℃，植物育成用蛍光灯24時間照明（TOSHIBA プラントルクス，300-500ルックス）とした。

7月19日に，汚染したもの，腋芽から二次花茎を発生したもの，幼苗を形成したもの，休眠状態に留まったものの割合を調査した。

2）幼苗からの再増殖法の検討　1998年1月に吉田薬品工業㈱アスペック事業部より提供を受けたエクエストリス系フラスコクロン苗を0.5%次亜塩素酸水溶液で5分間再殺菌し滅菌水で濯いだ後，苗の基部1.5cmを2.5mmの厚さの6切片あるいは5mmの厚さの3切片にスライスし，上下が逆にならないように同一培地上に置床した。供試数は各区10苗とした。基本培地はNP培地（Table 1）とし，ココナッツウオーター（CW；150ml·l^{-1}）を無添加あるいは添加したものにベジルアミノプリン（BA；0，1，2.5mg·l^{-1}）を組み合わせ添加した。培養温度は20-23℃，植物育成用蛍光灯24時間照明（TOSHIBA プラントルクス，300-500ルックス）とした。培養は1999年1月30日から7月21日まで行った。

結　　果

1）花茎組織の殺菌方法の検討　ほう葉の有無による無菌化率の違いには統計的な有意差は認められなかったが，ほう葉を付けて殺菌した方が無菌化率は高かった。予備実験では，汚染率は今回の結果よりもかなり高かったが，本実験の結果の無菌化率は75%以上であり，実用的には特に問題はなかった。

培養後の生育の節位による違いには統計的な有意差は認められなかったが，上位節は花茎として，下位節は幼苗として発達するものの割合が多かった。

ほう葉の除去が殺菌前か後かで，培養時の生育反応は影響された。すなわちほう葉を除去して殺菌したものは腋芽が茎葉（栄養芽）として発達するか休眠状態に留まるものの割合が多かったのに反し，ほう葉を付けて殺菌したものでは腋芽が二次花茎として発達するものの割合が多くなった。

2）幼苗からの再増殖法の検討　花茎培養では，腋芽は幼苗あるいは二次花茎として発達し，放置すれば増殖はできない。したがって，増殖を目的とする場合は，何らかの処理によって増殖をはかる必要がある。

完成した無菌苗からの再増殖は，無菌化の過程を省くことが可能なこと，苗の茎頂あるいは腋芽の培養が可能なことなど，成株の場合よりも容易であると考えられる。本実験では，完成した無菌苗からの再増殖を目的として幼苗の切片を培養し，切片の厚さ，培地が切片の生育に及ぼす効果について検討した。

培養切片の多くは培養しても生育せずに枯死した（Fig. 2）。これは，培養した切片には必ずしも茎頂あるいは腋芽が含まれるわけではなく，節間あるいは葉からの器官形成は行われにくいためと思われた。培養後に生育の認められた切片は，肥大したカルス状の組織（CLB; Callus like body）が形成されたもの，複数の茎葉が発生したもの，単一の茎葉が発生したものに分けられた。増殖の目的からすれば CLB か複数の茎葉の形成が望ましいが，その割合は CW，BA あるいはその両方の添加によって増加した。とくに CLB の形成は BA の添加で増加した。本実験の期間内には CLB からの植物体の分化は見られなかったが，その後 CLB からは多数のシュートが分化した。

切片の厚さを2.5mmあるいは5mmとした場合の生育の違いは少なかったが，2.5mmとした方が新たに形成される茎葉数が多い傾向が見られた。

切り出した切片の位置の違いによる生育反応の起こり易さは，培地の種類別に見た場合には，生育した切片の数が少なく，一定の傾向は見られなかった。しかし，培地処理をまとめて部位別に集計してみると，一定の傾向が見られた。すなわち3切片（5mm厚）の場合は中央部切片から器官形成する場合が最も多く（Fig. 3a），6切片（2.5mm厚）の場合も中央部切片からの器官形成が多くなった（Fig. 3b）。これは，この部分に腋芽あるいは茎頂が多く含まれるためと思われた。

考　　察

ファレノプシスの微細繁殖における問題点の一つは無菌化率の低さにある（Ichihashi, 1992）。予備実験でも，無菌化出来ないものが多く，確実な殺菌法の必要性が感じられた。しかし，本実験の結果の無菌化率は75%以上であり，この値なら特に問題はないものと思われた。これらの違いは，培養材料とした植物体の汚染程度によるものと思われた。すなわち，予備実験で

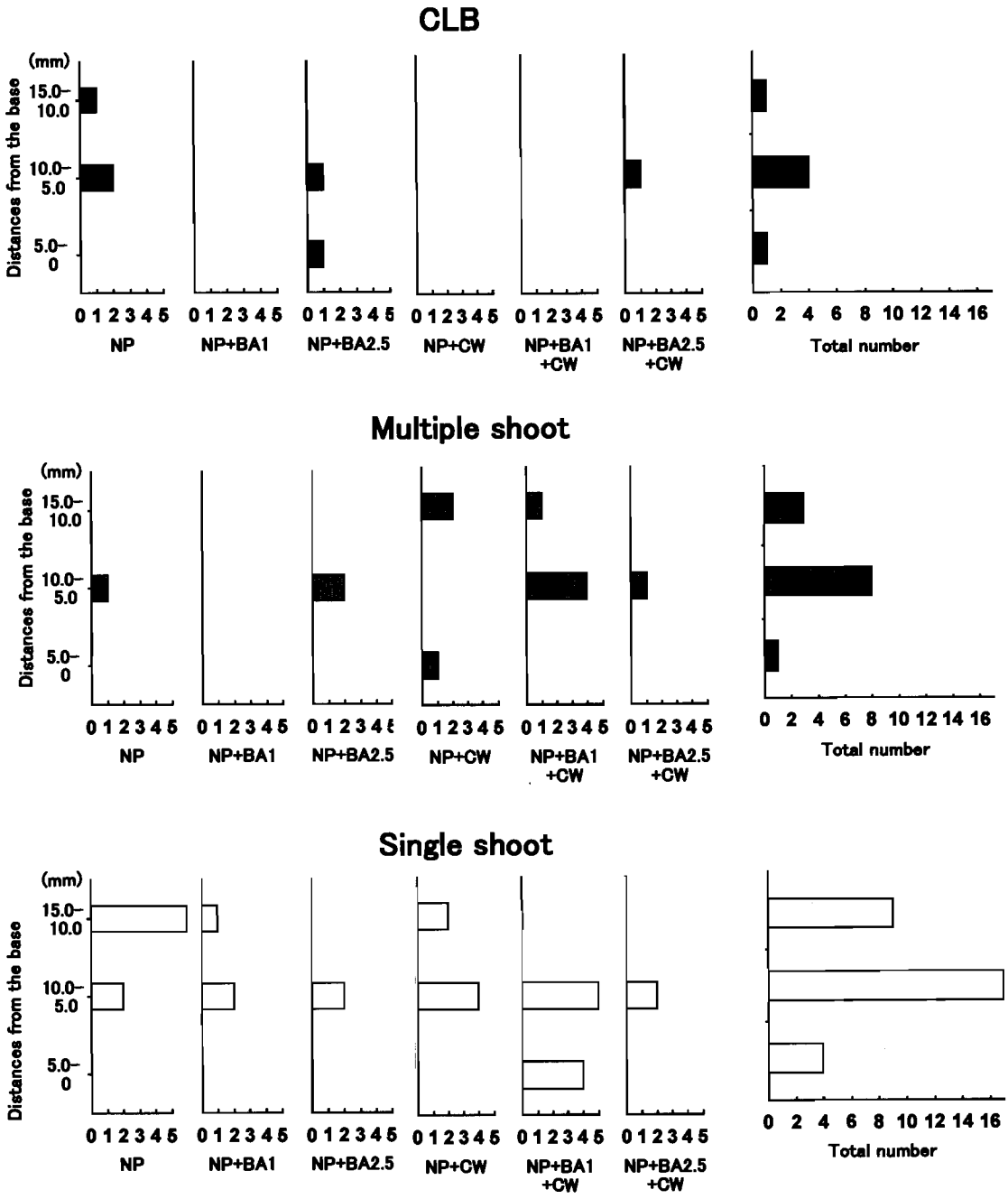

Fig. 3a. Growth responce of shoot slice segments. Shoots were cut into 5.0mm of 3 slices from the base and cultured in the same culture tube.

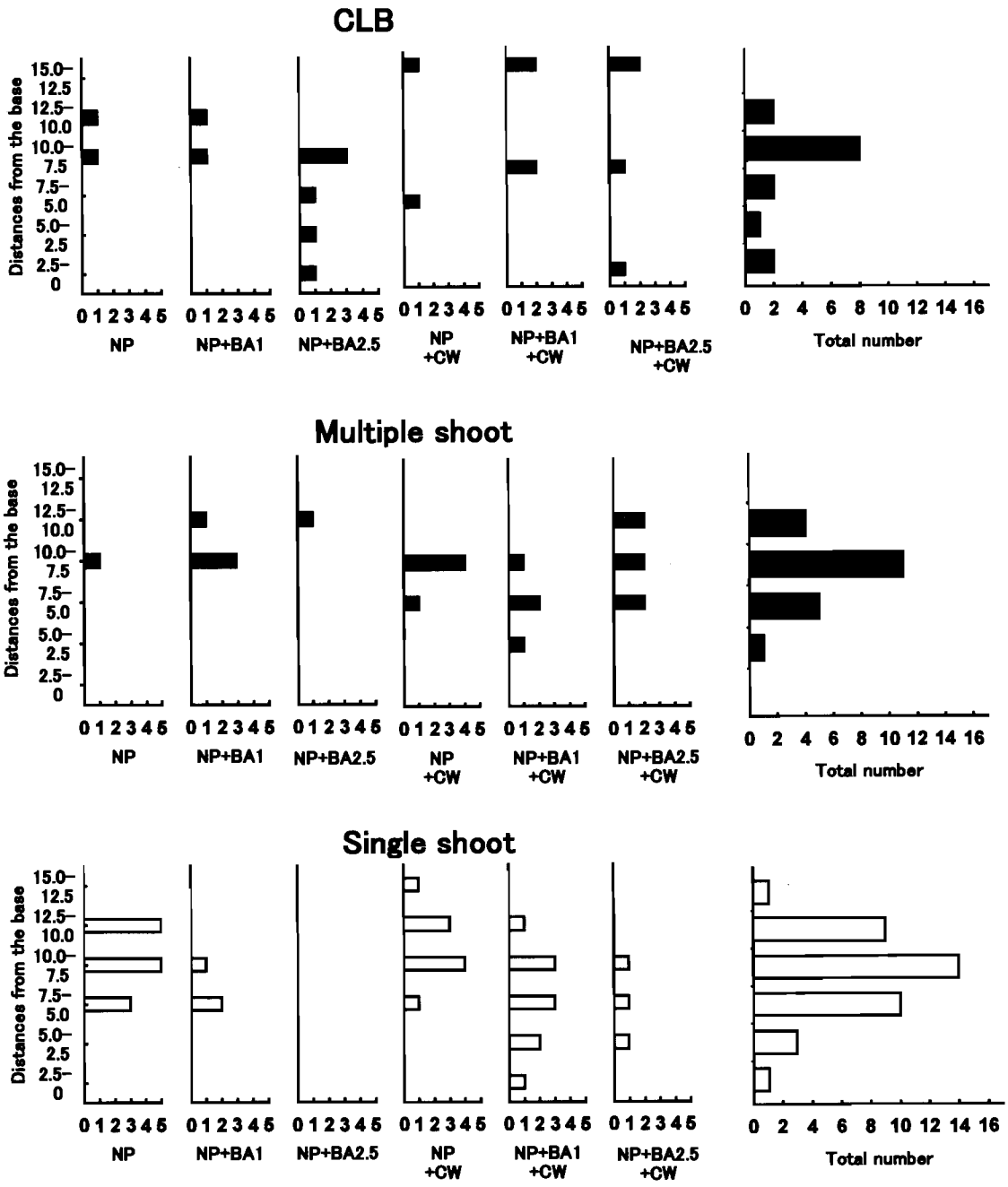

Fig. 3b. Growth responce of shoot slice segments. Shoots were cut into 2.5mm of 6 slices from the base and cultured in the same culture tube.

は汚染の進んだと思われる古い花茎を用いたため，無菌化率が低かったと考えられた。無菌化率を向上させるために，出来るだけ若い花茎を使うこと，殺菌剤の定期的な散布によって培養植物周辺の微生物密度を低下させることなど，培養材料の選別と事前の準備が必要と思われた。

ファレノプシスの花茎培養では，節間腋芽は休眠状態に留まるか，茎葉かあるいは二次花茎を形成する（Tanaka, 1992）。増殖を目的とする場合には茎葉あるいは PLB の形成が望ましいが，花茎培養では腋芽から直接の PLB の形成は見られない。花茎培養での腋芽からの茎葉の形成については種々の要因が関係することが知られている（Tanaka, 1992）。本実験の結果からは，ほう葉を除去して殺菌した場合に腋芽からの茎葉の形成が多く見られ，増殖目的にはこの殺菌方が適するものと思われた。

いったん形成された苗からの再増殖は，葉片培養による方法（Tanaka, 1992）や BA 処理により節間を伸長させた苗の節培養による方法などが知られている（段ら，1993）。何れの方法でも苗からの再増殖は可能であるが，これらには特別の処理・操作が必要である。今回の方法は単に茎葉を切片として培養するだけであり，より簡便な増殖方法である。同様な方法はすでにパフィオペディルム（田中ら，1995），アランダなどにも適用されており（Lakshmanan *et al.*, 1995），比較的汎用性のある方法として今後さらに普及するものと考えられる。

摘　　要

ファレノプシスの花茎培養による増殖方法の検討を行った。培養組織は，ほう葉を付けたまま殺菌した方が無菌化率は高かった。またほう葉を付けたまま殺菌し，その後ほう葉をとって培養したものは腋芽が二次花茎として発達するものが多かった。一方，ほう葉をとってから殺菌したものは茎葉として発達する腋芽の割合が多かった。

完成した幼苗からの再増殖を目的に，苗基部1.5cmを2.5mmあるいは5mmの切片とし培養した場合，いずれの場合も中央部切片からの幼苗あるいは CLB の形成が多かった。多芽体あるいはカルス状組織の形成は培地への BA あるいは CW の添加によって増加した。

謝　　辞

本実験に供試した植物はサッポロビール㈱アグリ事業部群馬センターおよび吉田薬品工業㈱アスペック事業部より提供を受けた。この紙面を借りて謝意を表する。

引 用 文 献

Homma, Y. and T. Asahira. 1985. New means of *Phalaenopsis* propagation with internal sections of flower stalk. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 54(3): 379-387.

Lin, C. C. 1986. In vitro culture of flower stalk internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Lindleyana 1(3): 158-163.

小林光子・米内貞夫．1990．ファレノプシスの組織培養による大量増殖について．栃木農研報．37：57-70.

Ichihashi, S. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. Lindleyana 7(4): 208-215.

Tanaka, M. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* spp. P. 246-248. In Bajaji ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 20. High-Tech and Micropropagation IV. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

段健雄・片桐圭子・矢澤進．1993．サイトカイニンによるファレノプシスの茎伸長と節培養．園学雑62別1．'93：450-541.

Lakshmanan, P., C-S Loh and C-J Goh. 1995. An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda* Deborah using thin section culture. Plant Cell Report 14: 510-514.

田中道男・筒井政道・天野恵理・周天甦・高村武二郎．1995．パフイオペディルムのマイクロプロパゲーション．（第1報）In vitro 実生苗の横断切片（TTS）培養における小植物体形成．園学雑64別2，'95：596-597.

（平成11年9月9日受理）