ラン菌根菌を接種したゲル被覆サギソウプロトコームによるサギソウの実生育成 および自生地における生育

高橋和彦^{1*a}・熊谷 寛^{2b}・石川 林^{3c}・荻原 勲²

¹東京都立農産高等学校 124-0002 東京都葛飾区西亀有

²東京農工大学農学部 183-8509 東京都府中市幸町

³愛知県立作手高等学校 441-1423 愛知県南設楽郡作手村

Development of the Protocorm of *Habenaria radiata* (Thunb.) K. Spreng. Gel Covered and Inoculated with Orchid Mycorrhizal Fungi in Habitat

Kazuhiko Takahashi^{1*a}, Hiroshi Kumagai^{2b}, Hayashi Ishikawa^{3c} and Isao Ogiwara^{2b}

¹Tokyo Metropolitan Nousan Senior High School, Katsushika Tokyo 124-0002

²Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509

³Aichi Prefectural Tsukude Senior High School, Minami-Shitara, Aichi 441-1423

Summary

By sowing protocorms of *Habenaria radiata* after they were gel covered and inoculated with orchid mycorrhizal fungi for some period, some enhancements were observed in the survival rate of protocorms and the rate of tuber formation by plants potted in non-sterilized soil. The suitable period for culturing protocorms from inoculation to sowing could be considered to have increased from 14 days to 42 days. The gel covered and fungi-inoculated protocorms were sown in habitat 28 days after the inoculation. As a result, 98 days after sowing, growth of the inoculated protocorms was recognized, but there was no apparent growth of non-inoculated protocorms. The survival rate of the protocorms sown was 46.1%, and the rate of tuber formation was 53.0%. From these results, the present method could be expected to be effective in the propagation of *H. radiata* in habitat. However, the tubers formed were very small. Further investigations are required to confirm the growth of plants sprouted from these small tubers in the next year.

Key Words: propagation, rate of tuber formation, sowing, survival rate, symbiotic association

キーワード： 播種，共生関係，球根形成率，生存率，増殖

緒 言

自生地におけるラン科植物は、種子が発芽した後のプロトコームにラン菌根菌（以下、菌根菌という）が共生し、発根前の初期生育期に相当する従属栄養期を、もっぱら菌根菌が提供する栄養に依存して生育する (Harley・Smith, 1983)。しかし、絶滅が危惧されるサギソウをはじめとするラン科植物の自生地では、ランと菌根菌の共生関係が成立しにくい状況となり、種子繁殖が困難になっ

ていると考えられる。そこで、衰退した自生地を復活させ、再び種子繁殖を可能とするには、自生地の保護と同時に、自生地においてランと菌根菌の共生関係が営まれる仕組みを構築することが重要である。著者らは衰退した自生地においてサギソウを実生育成する方法を提案した (Takahashiら, 2001)。そこで、その有効性を検討するために、著者らはサギソウプロトコームをゲル被覆処理し、菌根菌を接種して一定期間培養した後に非滅菌用土に設置する方法を開発した。この方法を用いてサギソウ自生地にサギソウプロトコームを設置したところ、ゲル被覆処理をせずに設置する方法に比べてプロトコームの生存率および生育した個体の球根形成率は格段に高くなり、自生地におけるサギソウの実生育成の可能性を認めることができたので報告する。

2005年3月3日 受付。2005年7月11日 受理。

* Corresponding author.

^a現在：東京都立農芸高等学校

^b現在：フラワーオークションジャパン（株）

^c現在：愛知県南設楽郡鳳来町長篠

本研究の一部は園芸学会平成16年度春季大会にて発表した。

材料および方法

実験 1. 菌根菌を接種したゲル被覆プロトコームからのサギソウの実生育成

サギソウ青葉系の種子を径 90 mm のプラスチック滅菌シャーレ内の水寒天培地に無菌播種し、24°C、2000 lx、12 時間日長の恒温室内で培養した。30 日後、発芽したプロトコームを滅菌した 1 cm 四方のろ紙片上に 20 粒ずつ置床し、3 cm 四方の滅菌ガーゼでろ紙片を挟み、オートミール $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ を混入したアルギン酸ナトリウム $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 液をろ紙片上のガーゼに数滴滴下し、塩化カルシウム $14.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 液に浸して人工種子状にゲル化した。これをオートミール $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 液に浸した 3 cm 四方の無菌の脱脂綿上に載せ、径 90 mm の滅菌シャーレ内のオートミール $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 寒天培地 20 mL に 3 セットずつ置床し、計 20 シャーレ 60 セットを 24°C、照度 2000 lx 白色光、12 時間日長の恒温室内で培養した。1 週間後、雑菌による汚染がないことを確認した後、10 シャーレ内のゲル化したプロトコーム 30 セットにサギソウの生育を促進する 931202A 菌株 (高橋ら, 1996) を接種して菌根菌接種区とし、残りの 10 シャーレ内の 30 セットを菌根菌無接種区として培養を続けた。菌根菌接種から 0 日、7 日、14 日、28 日、42 日後に、菌根菌接種区、菌根菌無接種区各 6 セットずつ、ゲル化したプロトコームを脱脂綿ごと 3.5 号プラスチック鉢 12 鉢の用土上にそれぞれ置床した。鉢は底面に 1 cm の水を浸した水盤の中に置き、鉢内の用土は播種用ピートモスと赤玉土小粒を等量混合した用土 150 g にオートミール 0.5 g を混合した用土 (高橋ら, 1998) を用い、非滅菌とした。試験は最低気温 10°C に設定したガラス温室内で、2 月 2 日 (0 日後区の設置) から 6 月 24 日まで 143 日間行い、生育した植物体を調査に供した。生育調査項目は個体の生存率、草丈、葉数、発根数、総根長、球根数、1 個当たりの球根重、地上部重、球根を含む地下

部重とした。

実験 2. サギソウ自生地に設置した菌根菌接種ゲル被覆サギソウプロトコームの生育

実験 1 と同様の方法で菌根菌を接種したゲル被覆サギソウプロトコームを作成した。菌根菌接種 28 日後の 2003 年 7 月 5 日に滅菌したプラスチック製スライド用マウントで押さえ、愛知県内の衰退したサギソウ自生地内の 6 地点を適意に選び、4 枚ずつ設置した。菌根菌無接種区も同様にサギソウ自生地内の 3 地点を適意に選び、4 枚ずつ設置した。回収は菌根菌接種 98 日後の 9 月 13 日に行った。回収後は生育したプロトコームの割合 (生存率)、草丈、葉数、発根数、総根長、1 個当たりの球根重、球根形成率を調査した。

また、ゲル被覆処理の効果をみるために、実験 1 と同様の方法でゲル被覆処理をしないサギソウプロトコームを作成した。菌根菌接種 14 日後の 5 月 27 日に自生地内の 7 地点を適意に選び、5 枚ずつ設置した。菌根菌無接種区も同様とした。回収は菌根菌接種 120 日後の 9 月 24 日に行い、生育調査に供した。

結 果

実験 1. 菌根菌を接種したゲル被覆プロトコームからのサギソウの実生育成

非滅菌用土に設置時のプロトコームへの菌根菌感染状況およびプロトコームの生育状況を第 1 表に示した。菌根菌は接種 0 日後区のプロトコームを除いて、すべて感染していた。生育状況は、菌根菌接種後の日数が長くなるにつれてプロトコームが肥大し、新芽も伸長した。

菌根菌接種 143 日後の非滅菌用土に設置した全プロトコームに対する生存率と球根形成率を第 1 図に示した。菌根菌を接種してから非滅菌用土に置床するまでの日数が長くなるにつれて、プロトコームの生存率は高くなり、球根形成率も高くなった。

第 1 表 非滅菌用土に設置時のプロトコーム感染状況、プロトコーム縦長および新芽長

	菌根菌接種 0 日後	7 日後	14 日後	28 日後	42 日後
感染状況 ^z	—	+	+	+	+
プロトコーム縦長 (mm)	0.80 ± 0.02^y	1.24 ± 0.04	1.40 ± 0.06	2.27 ± 0.18	3.25 ± 0.28
新芽長 (mm)	0.04 ± 0.02	0.34 ± 0.06	0.61 ± 0.08	2.73 ± 0.40	2.50 ± 0.53

z: プロトコームへの菌根菌の感染状況 —: 非感染, +: 感染

y: 平均値 ± 標準誤差 (n=120)

第 2 表 非滅菌用土に設置した菌根菌接種サギソウプロトコームのうち生育した個体の生育状況 (菌根菌接種 143 日後)

菌株接種から設置までの日数	草丈 (mm)	葉数 (枚)	発根数 (本)	総根長 (mm)	球根数 (個)	地上部重 (mg)	地下部重 (mg)
0 日	11.1 ± 1.2^z	2.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	5.6 ± 1.2	0	15 ± 3	17 ± 4
7 日	11.2 ± 1.1	2.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	9.6 ± 1.3	0.082 ± 0.040	13 ± 3	18 ± 4
14 日	16.6 ± 1.7	2.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	12.4 ± 1.8	0.434 ± 0.069	26 ± 5	36 ± 6
28 日	14.3 ± 0.9	2.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	9.2 ± 1.1	0.610 ± 0.064	14 ± 2	29 ± 3
42 日	7.5 ± 0.4	2.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	3.4 ± 0.4	0.791 ± 0.043	5 ± 1	16 ± 1

z: 平均値 ± 標準誤差 (n=120)

第1図 非滅菌用土に設置した菌根菌接種サギソウプロトコムの生存率と球根形成率 (菌根菌接種 143日後)

第2図 非滅菌用土に設置した菌根菌接種プロトコムから生育した個体の発根率, 球根形成率および1個当たりの球根重 (菌根菌接種 143日後, 縦線は標準誤差 (7日: n=10, 14日: n=52, 28日: n=53, 42日: n=99)を示す)

第3表 サギソウ自生地に設置した菌根菌接種ゲル被覆サギソウプロトコムの生育状況

試験区	生育した個体						
	生存率 (%)	草丈 (mm)	葉数 (枚)	発根数 (本)	総根長 (mm)	球根重 (mg)	球根形成率 (%)
菌根菌無接種区	0	—	—	—	—	—	—
菌根菌接種区	46.1	6.78±0.27 ^z	1.79±0.04	0.55±0.04	2.25±0.13	4.31±0.91	53.0

z: 平均値±標準誤差 (n=80)

第4表 ゲル被覆処理をせずにサギソウ自生地に設置した菌根菌接種サギソウプロトコムの生育状況 (菌根菌接種 14日後設置, 120日後調査)

試験区	生育した個体						
	生存率 (%)	新鮮重 (mg)	草丈 (mm)	葉数 (枚)	発根数 (本)	総根長 (mm)	球根形成率 (%)
菌根菌無接種区	0.52	29 a ^z	7.5 a	1.49 a	1.71 a	4.61 a	26.5
菌根菌接種区	0.86	83 a	11.5 a	1.63 a	1.93 a	7.73 a	35.7

z: 異符号間に5%危険率 (1.s.d.法)で有意差があることを示す

第2図は設置したプロトコムから生育した菌根菌接種 143日後の個体の発根率, 球根形成率および1個当たりの球根重を示したものである。発根率は菌根菌接種から設置までの日数が長くなるにつれて上昇し, 28日区が96.6%と最も高くなったが42日区は発根率は69.2%と低くなった。一方, 球根形成率は菌根菌接種から設置までの日数が長くなるにつれて上昇し, 0日区では球根が形成されなかったが42日区では82.4%と最も高くなった。球根重は, 0日区を除いて, 菌根菌接種から設置までの日数が長くなるにつれて減少する傾向が認められ, 7日区と14日区, 28日区の球根重に明らかな違いは認められなかったが42日区は他区に比べて明らかに小さかった。

生育した個体の生育状況を第2表に示した。草丈は14日区と28日区で最も高く, 次いで7日区, 0日区, 42日区の順となった。葉数は0日区から28日区で差は認められなかったが, 42日区は明らかに少なかった。発根数は7日区, 14日区, 28日区が最も多く, 次いで0日区および42日区の順であった。総根長も14日区で最も大きく,

次いで7日区, 28日区の順に大きかった。しかし, 球根数は菌根菌接種から設置までの日数が長くなるにつれて多くなり, 42日区で最も多かった。地上部重および地下部重は, 14日区で最も大きく, 次いで28日区, 0日区および7日区の順であり, 42日区は最も小さかった。

実験2. サギソウ自生地に設置した菌根菌接種ゲル被覆サギソウプロトコムの生育

ゲル被覆処理をして設置したプロトコムの生育状況を第3表に示した。菌根菌無接種区では全くプロトコムが生存しなかったが, 菌根菌接種区では生存と生育が認められた。菌根菌接種区では46.1%のプロトコムが生存して生育した。また, 球根形成率は53.0%であり, 生育した個体の約半数に球根が形成されていた。しかし, 生育した個体が形成した球根はきわめて小さかった。

一方, ゲル被覆処理をせずに設置したプロトコムの生育状況を第4表に示した。プロトコムの生存率と球根形成率は菌根菌無接種区よりも菌根菌接種区でやや高かったが, 生存率は1%に満たず, 球根形成率も35.7%で

あった。生育した個体の新鮮重、草丈、葉数、発根数および総根長では両区に明らかな差は認められなかった。

考 察

実験1の結果より、接種した菌根菌がプロトコームによく感染し、安定して共生関係が営まれる状態に達した後には戸外に設置することがプロトコームの生存率と球根形成率を高めるものと考えられた。非滅菌用土に設置して生育した個体の草丈、葉数、発根数、総根長(第2表)に関して限り、7日区、14日区および28日区の生育が良好と考えられたが、生育した個体に形成された球根数は42日区が最も多かった。しかし、1個当たりの球根重をみると(第2図)、42日区は最も小さく14日区および28日区で大きかった。これは、鉢内の用土に含まれる栄養(オートミール)量が限られているために、形成される球根数が少ないと1個当たりの球根重は大きくなり、球根数が多いと1個当たりの球根重は小さくなったものと考えられた。鉢内において生育を良好にして大きい球根を形成させるには菌根菌接種14日後または28日後の戸外設置が適し、球根数を増加させるには42日後が適すると考えられた。着目すべきは、42日区の個体のうち球根が形成されていたにも関わらず発根が認められなかった個体があり(第2図)、その割合は14.2%と多かったことである。菌根菌はプロトコームと根に感染するが、発根が認められなかった個体ではプロトコームに感染した菌根菌を経由して球根形成に必要な栄養が植物体に供給されたと考えられた。すなわち、プロトコームに感染した菌根菌は植物体に糖を供給する(Hadley, 1969; Smith, 1966)ので、形成された球根には光合成産物の他に菌根菌から供給された糖も蓄積されたと考えられた。このことから、プロトコームに感染した菌根菌は個体の生育を促進すると同時に、球根形成数の増大にも寄与すると推察された。

これらのことから、非滅菌用土においてサギソウプロトコームの生存率および球根形成率を高めるには、菌根菌を接種したゲル被覆サギソウプロトコームによる実生育成が有効で、菌根菌接種から設置までの日数は14~42日間が適すると考えられた。

実験2では、菌根菌を接種したゲル被覆サギソウプロトコームを自生地に設置したところ、菌根菌無接種区ではプロトコームの生存は全く認められなかったが、菌根菌接種区の生存率は46.1%となり、球根形成率も53.0%になった(第3表)。この結果を、ゲル被覆処理をせずにプロトコームを自生地に設置した場合の生存率(0.86%)および球根形成率(35.7%)と比べると、生存率は顕著に高く、球根形成率も高かった。このことから、菌根菌を接種したゲル被覆プロトコームによるサギソウの実生育成法は自生地においても高い効果を示すことが明らかとなった。しかし、形成された球根重はかなり小さいことから、

翌年もこの球根から発芽した個体が順調に生育するかどうかをさらに検討する必要がある。

摘 要

サギソウ自生地においてサギソウプロトコームの生存率と生育した個体の球根形成率を高め、実生育成する方法を検討した。

3.5号鉢内の非滅菌用土においてサギソウプロトコームの生存率および球根形成率を高めるには、サギソウプロトコームをゲル被覆し、菌根菌を接種して一定期間培養した後に非滅菌用土に設置する実生育成法に効果が認められた。菌根菌接種から設置までの培養日数は14日~42日間が適すると考えられた。

そこで、菌根菌を接種したゲル被覆サギソウプロトコームを菌根菌接種28日後にサギソウ自生地に設置して98日後の生育状況を調査したところ、菌根菌無接種区では全く生育せず、菌根菌接種区のみ生育が認められた。とりわけ、設置したプロトコームの生存率は46.1%となり、球根形成率も53.0%となった。このことから、菌根菌接種ゲル被覆サギソウプロトコームによるサギソウの実生育成法は自生地においても高い効果を示すことが明らかとなった。

しかし、サギソウ自生地で形成された球根重はかなり小さいことから、翌年もこの球根から発芽した個体が順調に生育するかどうかをさらに検討する必要がある。

謝 辞 本実験を遂行するに当たり、愛知県立作手高等学校荻野崇義先生ならびに秦名俊光先生に調査のご協力を頂いた。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- Hadley, G. 1969. Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 68: 933-939.
- Harley, J. L. and S. E. Smith. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. p. 483. Academic press, London.
- Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 65: 488-499.
- 高橋和彦・増原 学・箱田直紀. 1996. ラン菌根菌によるサギソウの実生育成。(第1報)サギソウの初期生育に及ぼすラン菌根菌の影響. *日農教誌*. 27: 63-71.
- 高橋和彦・荻原 勲・箱田直紀. 1998. ラン菌根菌によるサギソウの実生育成。(第3報)鉢播きによるサギソウ球根の形成. *日農教誌*. 29: 23-28.
- Takahashi, K., I. Ogiwara and N. Hakoda. 2001. Inoculation of *Habenaria (Pecteilis) radiata* with two isolates of orchid mycorrhizal fungi: Germination and growth response to separate, simultaneous, and consecutive inoculation. *Lindleyana* 16: 102-108.