サギソウ球根苗の *in vitro* における新球根形成に及ぼすラン菌根菌の影響

高橋和彦^{1a*}・熊谷 寛^{2b}・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

Effect of Orchid Mycorrhizal Fungi on the Growth of Daughter Tubers in *Habenaria radiata* (Thunb.) K. Spreng. Plantlets Raised from Tubers *in Vitro*

Kazuhiko Takahashi¹, Hiroshi Kumagai² and Isao Ogiwara²

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

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

Summary

Orchid mycorrhizal fungi were inoculated on *Habenaria radiata* tubers *in vitro*, and we tried to make it clear whether the growth of the plants was promoted, and what kind of absorbed nutrients brought about the growth promotion. Based on these findings, the effectiveness of the mycorrhizal fungi inoculation in the growth promotion of the daughter tubers was discussed.

1. As for the orchid mycorrhizal fungi inoculation, it became clear that the orchid mycorrhizal fungi promoted plant growth and the enlargement of daughter tubers.

2. It was considered that plant growth was promoted by the mycorrhizal fungus inoculation because the plant absorbed carbon compounds from the oatmeal medium through the action of the fungi.

3. It could not be determined whether the plant absorbed carbon compounds directly through its own roots, or through the orchid mycorrhizal fungi.

Key Words: absorbed nutrients, carbene, enlargement of daughter tuber, growth promotion, nitrogen

キーワード: 窒素, 球根肥大, 生育促進, 炭素, 養分吸収

緒 言

サギソウをはじめとするラン科植物は、ラン菌根菌（以下、菌根菌という）と共生していることが知られているが、衰退したサギソウの自生地ではランと菌根菌の共生関係が成立せず、種子繁殖が困難になっていると考えられる。そこで著者らは衰退したサギソウ自生地を復元するための一方策として、菌根菌を予めサギソウ種子に接種して自生地に播種する方法を提案し（Takahashi ら, 2001）、その有効性を明らかにした（高橋ら, 2005）。しかし、この方法により自生地で実際に形成された球根重は4～5 mg と小さかったため、自生地で開花させるにはこの球根苗から形成される新球根をさらに肥大させる必要がある。一方、菌根菌はサギソウをはじめとするラン科植物の初期生育期のプロトコムに糖を供給している（Smith, 1966; Hadley, 1969）こ

とが明らかとなっているが、発根後の根に感染した菌根菌の機能に関する知見はほとんどなく（アーディティ, 1991）、球根から発根した苗の生育を菌根菌が促進するかどうか不明にされている。

そこで、本実験では *in vitro* においてサギソウ球根苗に菌根菌を接種し、球根苗の生育が促進されるかどうかを明らかにしようとした。また、それはどのような栄養の吸収によるものであるかを調査した。これらのことから、球根苗から形成される新球根の肥大に菌根菌接種は有効かどうかを検討した。

材料および方法

実験 1. 菌根菌を接種したサギソウ球根苗の生育

ハイポネックス粉末（6.5-6-19）2 g・L⁻¹ およびショ糖 30 g・L⁻¹ 溶液を pH5.5 に調整し、寒天 9 g・L⁻¹ を加えた培地にサギソウ青葉系種子を無菌播種した。その後、24°C、12 時間日長の恒温室で 6 か月間培養して得られた無菌球根を材料に用いた。球根は重量別に 0.05 g 以下、0.05 ～ 0.10 g、0.10 ～ 0.15 g、0.15 ～ 0.20 g、0.20 g 以上の 5 区に区分した。500 mL 容の透明容器にオートミール（全粒粉末、雪印乳業

2005 年 3 月 11 日 受付. 2005 年 8 月 18 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）

クエーカーオートミール) $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培地 100 mL を注入し、サギソウの生育を促進することが明らかな菌根菌 931202A 株 (高橋ら, 1996) を接種した接種区および菌株を接種しない無接種区を設定した。菌根菌接種区の培地に菌糸が十分に繁殖したことを確認した後、区分した無菌球根を各区に 10 球ずつ植え付けた。培養は 25°C , 24 時間日長 (2000 lx) に設定した恒温室で行った。球根植え付け 4 か月後、植物体が成長したのでオートミール $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培地 200 mL を注入した 800 mL 容の透明容器に移植した。球根植え付け開始から 6 か月後、培養を終了して生育調査に供した。調査項目は、草丈、植物体乾物重、根数、根長、根径、地上部乾物重、新たに形成された球根および植え付けた母球根を除いた地下部乾物重、球根形成数、1 個体当たりの新たに形成された球根乾物重とした。

実験 2. 生育したサギソウ球根苗の各部位に含まれる炭素量および窒素量

実験 1 で生育調査を行った後、植物体を 90°C で 48 時間通風乾燥して乾物重を測定し、各部位の炭素量および窒素量を NC アナライザー (SUMIGRAPH NC-80) で測定した。分析はヘリウム $80\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、酸素 $0.3\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の流量で、カラムは Sunpak A を用いた。

結 果

実験 1. 菌根菌を接種したサギソウ球根苗の生育

生育調査の結果を第 1 表に示した。植え付けた球根重の区分ごとに接種区と無接種区の生育量を比較すると、 0.05 g 以下の区では根長に、 $0.05\text{ g} \sim 0.10\text{ g}$ 区では根長、球根形成数および 1 個体当たりの球根乾物重に、 $0.10\text{ g} \sim 0.15\text{ g}$ 区では草丈、植物体乾物重、根長、地上部乾物重、地下部乾物重、球根形成数および球根乾物重に、 $0.15\text{ g} \sim 0.20\text{ g}$ 区では植物体乾物重、根数、根径、地上部乾物重、地下部乾物重および球根乾物重に、 0.20 g 以上の区では草丈、植

物体乾物重、根径、地上部乾物重、地下部乾物重、球根形成数および球根乾物重に明らかな差が認められ、植え付けた球根重が大きくなるにつれて、接種区は無接種区よりも生育が旺盛となった。このことから、植え付けた球根重が大きくなるに従い、まず根長に差が認められ、次に球根形成数および 1 個体当たりの球根乾物重に、そして草丈、植物体乾物重、地上部乾物重および地下部乾物重の順に次第に差が認められ、接種区の生育が無接種区の生育よりも旺盛となった。

第 1 図は生育した個体の部位別乾物重を割合で示したものである。球根重区分 0.05 g 以上の区では接種区の球根重

第 1 図 球根重別サギソウ球根から生育した個体の部位別乾物重の割合
(地下部重は形成された球根重および植え付けた母球根重を含まない、球根重は形成された球根重を示す)

第 1 表 菌根菌接種および無接種における植え付け球根重別の生育状況

植え付けた球根重 (g)	処理区	草丈 (mm)	植物体 ² 乾物重 (mg)	根数 (本)	根長 (mm)	根径 (mm)	地上部乾物重 (mg)	地下部 ³ 乾物重 (mg)	球根形成数 (個)	1 個体当たりの球根乾物重 (mg)
~ 0.05	無接種	12.0 a ^x	6.8 a	2.5 a	6.7 a	0.9 a	1.1 a	4.3 a	0.8 a	1.4 a
	接 種	17.2 a	9.3 a	2.5 a	11.8 b	1.0 a	1.6 ab	5.7 a	1.0 a	2.0 a
0.05 ~ 0.10	無接種	16.4 a	16.9 ab	2.7 ab	10.4 b	0.8 a	2.5 b	10.7 b	1.0 a	3.7 a
	接 種	21.7 a	25.1 b	2.9 ab	15.0 c	1.0 a	2.8 b	10.8 b	1.8 b	11.5 c
0.10 ~ 0.15	無接種	24.2 b	22.0 b	4.3 c	12.5 b	0.9 a	2.8 b	14.2 b	1.5 b	5.0 ab
	接 種	36.5 c	42.5 c	4.5 c	15.9 c	1.1 a	4.6 c	21.2 c	2.6 c	16.7 d
0.15 ~ 0.20	無接種	35.1 bc	29.5 b	4.3 c	18.0 c	0.8 a	4.3 c	18.4 bc	1.7 b	6.8 b
	接 種	42.9 cd	52.8 d	5.6 d	17.4 c	1.3 b	7.0 d	25.5 d	1.6 b	20.3 e
0.20 ~	無接種	42.2 cd	41.4 c	3.7 bc	16.4 c	0.9 a	6.2 d	27.2 d	1.3 a	8.0 b
	接 種	58.8 e	67.8 e	5.0 c	17.2 c	1.3 b	12.8 e	29.1 e	2.4 bc	25.9 f

² 植え付けた母球根を含まない

³ 形成された球根および植え付けた母球根を含まない

^x LSD 法により同列異符号間に 5% 危険率で有意差があることを示す

が占める割合は無接種区のそれに比べて大きく、地下部重の占める割合は小さかった。地上部が占める割合は接種区と無接種区ではほぼ同じであった。

以上のことから、菌根菌を接種すると植え付けた球根重区分によって生育が促進される部位は異なり、0.05 g 以下の区では根長が、0.05 g 以上の区では根長に加えて球根が、さらに 0.10 g 以上の区では球根に加えて地下部および地上部の生育も促進された。

実験 2. 生育したサギソウ球根苗の各部位に含まれる炭素量および窒素量

植え付けた球根重区分ごとに接種区および無接種区の個体の部位別炭素量およびその割合を第 2 表に示した。菌根菌の接種、無接種に関わらず、植え付けた球根の重量が大きくなるにつれて、いずれの部位でも含まれる炭素量は多

くなる傾向が認められた。部位別に接種区と無接種区の個体当たりの炭素量を比較すると、地上部は 0.05 g 以下の区で接種区の炭素量の増加が認められたが、他の球根重区分では差が認められなかった。地下部では 0.10 ~ 0.15 g 区を除くいずれの球根重区分でも、接種区と無接種区で違いは認められなかった。球根では 0.05 ~ 0.10 g 区を除くいずれの球根重区分でも、接種区の炭素量の増加が認められた。

乾物 1 g 当たりの炭素量をみると、無接種区では 0.15 g 以下の区で地下部に最も多かったが、0.15 g 以上の区では地上部に最も多かった。同様に、接種区では 0.05 g 以下の区で球根に、0.05 ~ 0.10 g 区で地下部に、0.10 g 以上の区では地上部に最も多かった。

個体の各部位に含まれる炭素量の割合をみると、地上部炭素量が占める割合は、いずれの球根重区分でも接種区と

第 2 表 菌根菌接種・無接種における植え付け球根重別の個体当たりの部位別炭素量およびその割合

植え付けた球根重 (g)	処理区	炭素量 (mg)			炭素量の割合 (%)		
		地上部	地下部 ²	球 根 ³	地上部	地下部	球 根
~ 0.05	無接種	0.38 a ^x (350) ^w	1.79 a (414)	0.31 a (229)	15.4	72.1	12.6
	接 種	0.51 b (314)	2.10 a (369)	0.90 b (454)	14.5	59.8	25.7
0.05 ~ 0.10	無接種	1.09 c (431)	5.17 bc (484)	1.71 c (463)	13.7	64.8	21.5
	接 種	0.76 bc (277)	3.89 b (362)	2.29 cd (199)	11.0	56.0	33.0
0.10 ~ 0.15	無接種	1.33 c (471)	7.34 d (517)	2.20 cd (445)	12.3	67.5	20.2
	接 種	2.02 cd (444)	9.09 e (429)	7.12 e (426)	11.1	49.9	39.1
0.15 ~ 0.20	無接種	2.56 d (595)	9.64 e (524)	2.93 d (433)	16.9	63.7	19.4
	接 種	2.69 d (385)	7.78 de (305)	7.35 e (362)	15.1	43.7	41.2
0.20 ~	無接種	2.82 d (452)	10.82 ef (398)	2.88 d (360)	17.0	65.5	17.5
	接 種	3.89 de (305)	8.90 e (306)	7.71 e (298)	19.0	43.4	37.6

²形成された球根および植え付けた母球根を含まない

³形成された球根

^xLSD 法により同列異符号間に 5%危険率で有意差があることを示す

^w乾物 1 g 当たりの炭素量 (mg)

第 3 表 菌根菌接種・無接種における植え付け球根重別の個体当たりの部位別窒素量およびその割合

植え付けた球根重 (g)	処理区	窒素量 (mg)			窒素量の割合 (%)		
		地上部	地下部 ²	球根 ³	地上部	地下部	球根
~ 0.05	無接種	0.046 a ^x (42.5) ^w	0.093 a (21.5)	0.050 a (36.7)	24.5	49.1	26.4
	接 種	0.037 a (22.8)	0.163 ab (28.6)	0.101 ab (50.8)	12.3	54.2	33.5
0.05 ~ 0.10	無接種	0.046 a (18.2)	0.293 b (27.4)	0.086 b (23.2)	10.8	69.0	20.2
	接 種	0.034 a (12.3)	0.288 bc (26.7)	0.150 bcd (13.1)	7.2	61.0	31.8
0.10 ~ 0.15	無接種	0.084 b (29.7)	0.552 bc (38.9)	0.088 bc (17.8)	11.6	76.2	12.2
	接 種	0.071 b (15.6)	0.700 c (33.0)	0.123 c (7.3)	8.0	78.3	13.7
0.15 ~ 0.20	無接種	0.110 bc (25.7)	0.902 bc (49.0)	0.198 d (29.3)	9.1	74.5	16.4
	接 種	0.209 c (29.9)	0.732 bc (28.7)	0.244 d (12.0)	17.7	61.8	20.6
0.20 ~	無接種	0.434 d (69.7)	1.112 c (40.9)	0.292 cd (36.4)	23.6	60.5	15.9
	接 種	0.471 d (36.9)	0.778 bc (26.7)	0.198 d (7.6)	32.5	53.8	13.7

²形成された球根および植え付けた母球根を含まない

³形成された球根

^xLSD 法により同列異符号間に 5%危険率で有意差があることを示す

^w乾物 1 g 当たりの窒素量 (mg)

無接種区ともにほぼ同じであった。地下部炭素量の割合は、いずれの球根重区分でも接種区が無接種区に比べて少なかったのに対して、球根炭素量の割合はいずれの球根重区分でも接種区が無接種区に比べて顕著に多い傾向が認められた。

次に、植え付けた球根重区分ごとの接種区および無接種区の個体の部位別窒素量およびその割合を第 3 表に示した。接種、無接種に関わらず、いずれの部位でも植え付けた球根重が大きくなるにつれて、含まれる窒素量は多くなる傾向が認められた。部位別に接種区と無接種区の個体当たりの窒素量を比較すると、いずれの部位でも両処理区間に明らかな差は認められなかった。

乾物 1 g 当たりの窒素量をみると、無接種区では 0.05 g 以下の区で地上部に最も多く、0.05 ~ 0.20 g の区では地下部に、0.20 g 以上の区では再び地上部に最も多かった。同様に、接種区では 0.05 g 以下の区で球根に、0.05 ~ 0.20 g 区で地下部に、0.20 g 以上の区では地上部に最も多かった。

個体の各部位に含まれる窒素量の割合をみると、地上部では接種区、無接種区ともに 0.05 g 以下の区よりも、0.05 ~ 0.15 g 区で減少する傾向がみられ、0.20 g 以上の区では再び接種区、無接種区ともに増加した。地下部では接種区、無接種区ともに、0.05 g 以下の区よりも 0.05 ~ 0.20 g の区で増加する傾向がみられ、0.20 g 以上の区では再び減少した。球根では接種区、無接種区ともに 0.10 g 以下の区よりも、0.10 g 以上の区で減少した。

考 察

実験 1 では接種区の生育が無接種区に比べて旺盛となったが、どのような栄養供給によるものかを実験 2 の結果からみると、植え付けた球根重区分に関わらず、個体当たりの球根炭素量が無接種区よりも接種区で顕著に増加していたことから、接種した菌根菌の作用により培地の炭素化合物が植物体に多く供給され、球根に蓄積したと考えられた。一方、個体当たりの窒素量では、いずれの部位でも接種区と無接種区に明らかな違いは認められなかった。しかし、各部位が占める個体当たりの窒素量の割合をみると、接種区、無接種区ともに 0.10 g 以下の区では地下部と球根に多く、0.10 ~ 0.20 g 区では地下部に、0.20 g 以上の区では地下部と地上部に多くなる傾向が認められたことから、植え付けた球根重区分によって植物体内の窒素が配分される部位に偏りがあるものと考えられた。

これらのことから、球根苗の生育が接種区で旺盛となったのは、菌根菌の接種によりオートミール培地から炭素化合物を多く吸収し、生育が促進されたためと考えられた。実験 1 において、接種区の 0.10 g 以下の区で根や球根の生育が良好となったのは、菌根菌の作用により培地から吸収した炭素化合物と植物体内の窒素化合物が根と球根に多く配分されて生育が旺盛になったためであり、0.15 g 以上の区で地下部、球根とともに地上部の生育も良好となったの

は、菌根菌の作用により培地から吸収された炭素化合物に加えて植物体内の窒素化合物が地下部、球根とともに地上部にも多く配分されて生育が旺盛になったためであると考えられた。

以上のことから、菌根菌接種は球根苗の生育を促進し、形成される新球根を肥大させることが明らかとなった。しかし今回の実験で用いたオートミール培地では、菌根菌接種によって肥大の促進はみられたものの、球根苗から形成された新球根は小さく、また、植物体が吸収した炭素化合物は培地のオートミールが菌根菌によって分解され、根から直接吸収されたものであるか、あるいは菌根菌を経由して吸収されたものであるかは判別できなかった。Alexander と Hadley (1985) は ^{14}C でラベルした炭素化合物を用いて培地中の炭素化合物の移動を調べたところ、菌糸を経由してプロトコームと幼植物体に移動しており、この移動はランの葉が 3 ~ 4 枚展開した状態に達すると停止したと報告している。そこで、菌根菌によるサギソウの実生育成により 0.14 g 程度の大きな球根が形成される赤玉土とビートモスを等量に混合した用土を用いた高橋ら (1998) の方法で再度実験し、球根苗から形成される新球根がどの程度肥大するかを確認するとともに、培地のオートミールが菌根菌によって分解され、根から直接吸収されたものであるか、あるいは菌根菌を経由して吸収されたものであるかを明らかにする必要があると考えられた。

摘 要

In vitro においてサギソウ球根苗に菌根菌を接種し、菌根菌は球根苗の生育を促進するかどうかを明らかにしようとした。また、それはどのような栄養の吸収によるものであるかを調査した。このことにより、球根苗が形成する新球根の肥大に菌根菌接種は有効かどうかを検討した。

1. 菌根菌接種は球根苗の生育を促進し、形成される新球根を肥大させることが明らかとなった。
2. 菌根菌接種が球根苗の生育を促進したのは、菌根菌の作用によりオートミール培地から植物体が炭素化合物を多く吸収したことによると考えられた。
3. 植物体が吸収した炭素化合物は培地のオートミールが菌根菌によって分解され、根から直接吸収されたものであるか、あるいは菌根菌を経由して吸収されたものであるかは判別できなかった。

引用文献

- Alexander, C. and G. Hadley. 1985. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. New Phytol. 101: 657-665.
- アーディティ. 1991. ランの生物学 I (市橋正一訳). p. 35-36. 誠文堂新光社. 東京.
- Hadley, G. 1969. Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. New Phytol. 68: 933-939.

- 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. *日本農業教育学会誌.* 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. *日本農業教育学会誌.* 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.
- 高橋和彦・熊谷 寛・石川 林・荻原 勲. 2005. 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. *園学研.* 4: 397–400.