ラン種子の無菌発芽に関する研究 (第1報)

Cymbidium 種子の発芽および発育について

鳥 潟 博 高*・沢 完**・志 佐 誠*

H. TORIKATA, Y. SAWA and M. SISA : Non symbiotic germination and growth of the orchid seeds. I. Studies on the medium and additive for germination of seed in *Cymbidium*

Summary

Experiments were conducted to determine the most favorable medium for germination and growth of seedlings on sterilized culture of *Cymbidium*. The results obtained are as follows :

1. KNUDSON'S C solution or BURGEFF'S Eg-1 solution gives better growth than both KNUDSON'S B solution and tomato juice medium for non-symbiotic germination.
2. Fish soluble medium with pepton added accelerates the growth of protocorms and seedlings of *Cymbidium*.
3. The growth of embryos is enhanced in existence of KNUDSON'S C solution containing L-alanine or L-aspartic acid but not containing glutamic acid. Of the vitamins used as the additive, riboflavin and ascorbic acid also promote their growth.

4. Potassium salt of *l*-naphthaleneacetic acid (NAA) in the medium inhibits the germination of seed and growth of protocorms in a short term culture. However, the injection of NAA solution on the medium after the germination resulted in a promotive effect of growth of seedlings. It seems that NAA affects more inhibitory on germination than on later development. It is elucidated by the fact that if NAA solution of lower concentration (0.1~1.0ppm) is given in the medium, it promotes the growth of seedlings in the later stage of growth. Especially in the transplanting medium NAA has a good effect on the growth of seedlings.

5. Extract of silkworm-pupa as the additive stimulate, but extract of globule powder has no effect on the growth of protocorm and seedlings.

I. 緒 言

ランの種子繁殖については、1900年前後に BERNARD (1899), BURGEFF (1904), その他の研究者により、その発芽はラン菌との共生によつて行なわれることが解明され、その後 KNUDSON (1922) が寒天培養基に糖を加え、その pH を 4.5~5.2 に補正することにより無菌発芽に成功した。それ以来、今日まで多数の研究が行なわれ、ランの無菌発芽に関する問題はすべて解決されたかのように思われた。しかし各属について検討してみると *Cymbidium*, *Cypripedium* などの地生ランや半地生ランに属するものには無菌播種の困難なものも多く、また自然における発芽、生長がどのような状況で行なわれているのかも知られていないものが多い。

わが国では東洋ランと称して *Cymbidium* 属に属する温帯産の各種のランが作られているが、この種子繁殖は明らかにされておらず、もっぱら、採集品が培養されている現状であつて、自生の良品は乱獲され、しだいに少なくなりつつある状態である。またこれらと熱帯産

Cymbidium が交配され、今日ミニエチューアー・シンビジュームの流行をみているが、これらはほとんど輸入によつている。わが国で当然行なわれなければならない仕事は外国で多く行なわれている現状である。

筆者らは 1955 年以来、ラン種子の発芽および発育に関する一連の研究を進めてきたが、このうち *Cymbidium* 属の無菌発芽および幼苗の発育に関して従来の培養基の検討および添加薬品、種子発芽の予措、培養方法などについて得た結果を報告する。第1報は、発芽が比較的容易な熱帯産 *Cymbidium* の播種用培養基および移植用培養基について行なつた実験の結果である。

II. 材料および方法

この実験には下記の種子を用いた。

Cymbidium Louis Sander×C. Sumida (戸越農園産)

C. Doris Princess×C. Salome(安部農園産)

C. Doris Princess×C. Alexanderi (")

C. Doris Princess×C. 黄色丸弁 (")

播種方法：培養器は 200 cc, 300 cc あるいは 500 cc の硬質三角フラスコ (タイストン) を使用し、新品に対しては 2 時間熱湯浴を行ないアルカリの溶出後に使用し

* 名古屋大学農学部 ** 高知大学農学部
1964 年 10 月 29 日受理

た。栓は綿栓し、さらに硫酸紙とポリエチレンフィルムでおおったもの、あるいはゴム栓（普通の実験室用赤ゴム）を使用した。殺菌は200°C 乾熱殺菌とコッホ殺菌器で3回蒸熱殺菌を行なった。

種子は蒴よりとりだし、3回微風により比重選別をしたものを用い、種子の消毒はクロールカルキ溶液（サラン粉10gを150ccの蒸留水に溶かしろ過したもの）で10分間以上浸漬処理した。接種箱中には殺菌用紫外線ランプを点灯し播種および移植を行なった。

培養基のpHの測定：培養基のpHの補正は、堀場式ガラス電極pHメーターを使用し、殺菌前の培養基のpHは5.5~5.7を標準とした。

発芽率の測定：発芽率は、低倍率顕微鏡を用い胚が肥大し珠皮 (testa) を破り、suspensor の反対側の一端が扁平となり、いわゆる protocorm 型となつたものを発芽とし、protocorm 形成率すなわち発芽率として算出した（第1図参照）。ゆえに protocorm 形成 % を発芽 % としてとりあつたが、protocorm の中には緑色になつたもの（これからは実生苗が得られる）、無色〜帯黄白色のもの（実生苗が得られないときもある）、あるいは褐変するもの（ほとんど枯死する）などがあり、

第1図 *Cymbidium* の発芽過程

1. 種子
 2. 胚
 3. 胚が珠皮を破り外にあらわれる（このときを発芽とみなす）
 4. 胚が生長し protocorm となる
- e : 胚, g : 生長点, s : 胚柄, t : 珠皮, R : 仮根

発芽率と得られる実生苗率とは一致しない。

protocorm の大きさの測定：低倍率顕微鏡あるいは解剖顕微鏡下でマイクロメーターにより測定した。値は大きいものより20~50個体の平均値で示した。

培養基：基本として使用したBURGEFF's medium, CURTIS's medium, および KNUDSON's medium の原著の処法はそれぞれ次のとおりである。

BURGEFF, H. (1936)

Eg-1 solution

A.
Ca(NO₃)₂·4H₂O...1.00 gm
(NH₄)₂SO₄0.25
MgSO₄·7H₂O ...0.25
FeSO₄·7H₂O0.02
Distilled water ...500 ml
B.
K₂HPO₄0.25 gm
KH₂PO₄0.25
Distilled water ...500 ml

A・B両液を混合した後
に下を加える
Sugar..... 20.00 gm
Agar15.00

pH : 5.0

KNUDSON, L. (1922)

Solution B

KH₂PO₄0.25 gm
Ca(NO₃)₂·4H₂O...1.00
(NH₄)₂SO₄0.50
MgSO₄·7H₂O ...0.25
FePO₄0.05
Sucrose.....20.00
Agar17.50
Distilled water

pH : 5.0

CURTIS, J. (1936)

KH₂PO₄0.12 gm
MgSO₄·7H₂O ...0.26
NH₄NO₃0.22
Ca(NO₃)₂·4H₂O
.....0.35
FePO₄0.003
Dextrose10.00
Agar14.00
Distilled water
.....1000 ml
pH : 4.7

KNUDSON, L. (1946)
Solution C

KH₂PO₄0.25 gm
Ca(NO₃)₂·4H₂O...1.00
(NH₄)₂SO₄0.50
FeSO₄·7H₂O0.025
MgSO₄·7H₂O ...0.25
MnSO₄·4H₂O ...0.0075
Sucrose.....20.00
Agar17.50
Distilled water

pH : 5.0

III. 実験結果

1) *Cymbidium* 属の好適培養基

洋ランの無菌発芽に対する培養基は従来多数発表されているが、*Cymbidium* に対しどのような処法の培養基がその発芽および幼苗の発育に最も好結果をおさめるかを調査するため (a) KNUDSON B 液 (pH 5.4), (b) KNUDSON C 液 (pH 5.2), (c) トマト汁培養基 (pH 5.2) の各培養基を使用して比較試験を行なった。

供試品種は *C. Louis Sander* × *C. Sumida* を用い、さ

第1表 *Cymbidium* および *Dendrobium* の発芽・発育に及ぼす培養基の影響 (I)

培 養 基	<i>Cymbidium</i> hybrid Protocorm			<i>Dendrobium</i> hybrid Seedling					
	長さ	幅	形成率	草丈	太さ	葉数	根数	根長	発芽率
KNUDSON B 液	910 ^μ	702 ^μ	92.6 %	4.91 ^{mm}	2.41 ^{mm}	1.79 ^枚	0.81 ^本	0.67 ^{mm}	98.9 %
KNUDSON C 液	1487	806	93.5	6.55	2.66	2.61	1.30	1.55	97.6
トマト汁培養基	1022	639	78.1	5.83	2.54	2.12	1.15	1.23	71.5

〔備考〕 播種後6か月、5ビン中の大きいものから25個体の平均

供試品種 {*Cymbidium* Louis Sander × *C. Sumida*
Dendrobium Merlin × *D. Sir F. Moor*

播 種 期 : 1957 年 7 月 1 日

らに洋ラン中最も無菌発芽しやすい *Dendrobium* (*D. Merlin* × *D. Sir F. Moor*) を対照として供試した。この成績を第1表に示す。

播種後6か月では *Cymbidium* の発芽率および protocorm の発育ともに KNUDSON C (以下 KC と略す) が最も良く、KNUDSON B およびトマト汁培養はやや劣った。 *Dendrobium* においても KC はよい成績を納めた。

また KNUDSON 氏培養基と BURGEFF Eg-1 のそれとを比較して第2表を得た。これによつても KC は後者と比較して発育においてややすぐれ、発芽率には両者の間に大差は見られなかった。一方、培養基を作る際 KC の方が簡単であるため、以下 *Cymbidium* に対する基本的培養基に KC を使用することとした。

第2表 *Cymbidium* および *Dendrobium* の発芽・発育に及ぼす培養基の影響 (II)

培 養 基	<i>Cymbidium</i> hybrid Protocorm			<i>Dendrobium</i> hybrid Protocorm		
	長さ	幅	形成率	長さ	幅	形成率
KNUDSON B 液	360 ^μ	301 ^μ	86.1%	251 ^μ	234 ^μ	95.2%
KNUDSON C 液	423	326	89.5	289	251	97.6
BURGEFF 氏液	410	325	93.7	293	267	98.1

〔備考〕 播種後1か月、5ビン中の大きいものから20個体の平均。供試品種、第1表と同じ

2) 培養基に添加した生長調節物質の影響

Cymbidium 属の発芽、発育に対して各種の生長調節物質およびビタミン類がいかなる影響を与えるかを明らかにするため、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン C、ニコチン酸、パントテン酸、α-ナフタレン酢酸、ジベレリン酸 (これらは以下それぞれ、VB₁、VB₂、VC、NA、PA、NAA、GA と略す) をそれぞれ培養基に添加した。すなわち、C. Louis Sander × C. Sumida の種子を1957年11月4日 KC および BURGEFF Eg-1 培養基に播種し、1週間後に上記薬品の結晶1mgをそれぞれ紫外線殺菌灯下30cmのところに10分間さらした後、殺菌蒸溜水100mlに溶かし10ppm溶液を作り、それらを小型注射器で各培養基上に1ccずつ注入した。

播種3か月後の結果は第3表に示すように、発芽率は

第3表 *Cymbidium* の発芽に及ぼす生長調節物質の影響 (I) 播種後3か月日

	Protocorm 形成率 (%)						Protocorm の大きさ (μ)			
	緑色個体		白色個体		計		長 さ		幅	
	KC	BURGEFF	KC	BURGEFF	KC	BURGEFF	KC	BURGEFF	KC	BURGEFF
VB ₁	78.3	74.2	15.0	22.8	93.3	97.0	600	588	429	556
VB ₂	75.5	66.7	15.3	27.3	90.9	94.0	654	542	456	486
VC	69.8	61.4	24.9	27.9	94.7	89.3	523	672	432	487
NA	77.7	72.4	12.1	25.5	89.8	97.9	804	626	535	482
PA	82.6	82.3	12.1	15.0	94.7	97.2	542	665	419	480
NAA	49.8	87.4	36.6	2.6	86.4	90.0	576	677	401	511
GA	74.6	86.4	15.8	3.6	90.4	90.0	623	847	467	562
対照*	74.7	77.5	20.7	12.4	95.4	89.9	604	649	442	460

〔備考〕 供試品種：C. Louis Sander × C. Sumida

播 種 期：1957年11月4日 * 50個体平均、他は25個体平均

各区とも大差がなかった。また KC と BURGEFF の培養基の間でも差はなかった。protocorm の大きさは BURGEFF 培養基における GA 処理区で発育を促進した以外は有意差が認められなかった。同じものを10か月後に測定した結果では第4表に示すように、BURGEFF 培養基では、VB₂、VC、NA、PA、NAA の各処理区でいずれも protocorm の発育が促進された。GA 処理区では草丈は伸びたが変異が非常に大きく、葉はクロロシスを呈した。NAA 処理により protocorm に多数の仮根の発生が見られ、また葉芽が分化せず、癌腫状に肥大したものも認められた。しかし各区の発育状況を比較すると protocorm から葉および根を生じた個体数ならびに各個体の充実程度は NAA 処理区において著しくよかつた。

第4表 *Cymbidium* の発芽に及ぼす生長調節物質の影響 (II) 播種後10か月日

	Protocorm および幼植物の発育割合				草 丈
	緑 色 protocorm 個 体	白 色 protocorm 個 体	葉を生根を生じた個体	根を生じた個体	
VB ₁	9.2%	80.4%	0%	0%	2.93mm
VB ₂	8.3%	81.5%	1.9%	0%	8.97
VC	7.3%	84.5%	4.7%	0.9%	6.96
NA	9.3%	87.3%	0.9%	0%	6.32
PA	9.7%	82.3%	0%	0%	4.76
NAA	2.8%	78.6%	4.6%	1.7%	7.63
GA	1.5%	77.0%	1.5%	0.5%	14.52*
対 照	5.0%	76.8%	0%	0%	3.66

〔備考〕 供試品種：第3表と同じ

* 10個体平均、他は20個体平均

培 養 基：BURGEFF 氏液

3) 培養基に添加した NAA の影響

さきの実験で NAA が *Cymbidium* の発育を促進する傾向が認められたので、NAA の濃度の影響を知ろうと

した。

培養基は KC とし、これに NAA の K-塩を 0.1, 1.0, 10, 50 ppm の濃度になるように加えた後、コッホ殺菌器で殺菌した。1959 年 5 月 16 日 *C. Doris Princess* × *C. Salome* を播種した。その結果は第 5 表に示すとおりで、50 ppm は発芽率も発育も悪く、10 ppm のものは発芽率においては無処理のものと差が認められなかったが、発育が抑制された。1 ppm, 0.1 ppm 処理では発芽率は無処理と大差なかったが、いつたん発芽したものはその後の発育が促進された。とくに 0.1 ppm では顕著な発育促進作用が認められた。しかし NAA 添加区は protocorm の褐変率高く、生長を停止する protocorm が多かった。すなわち、播種後 100 日で 0.1 ppm 区 68.4

第 5 表 *Cymbidium* の発芽・発育に及ぼす NAA の濃度の影響

NAA 処 理 濃 度	苗 令	Protocorm の 大 き さ (μ)		葉 数	Protocorm 形 成 率 (%)				
		長 さ	幅		褐色	白色	淡緑 色	緑色	計
ppm	月 日	—	—	—	—	—	—	—	—
50	{ 3.5 [*] 1.5	269	176	0	2.3	30.8	15.8	0	48.9
10	{ 3.5 1.5	633 344	534 253	0 0	77.7 5.5	14.1 50.3	1.8 37.4	0 0	93.6 93.2
	{ 3.5 1.5	1750 825	1153 535	0 0	274.8 10.8	8.3 48.5	4.9 29.6	5.7 0.4	98.9 89.9
1	{ 3.5 1.5	2228 735	1401 458	1.3 0	68.4 6.5	8.6 50.0	19.4 35.3	2.3 0	98.7 91.8
	{ 3.5 1.5	1587 819	1288 683	1.2 0	22.6 4.9	3.2 31.7	26.3 72.8	34.1 28.7	594.8 793.6

〔備考〕 供試品種：C. Doris Princess × C. Salome
培養基：KNUDSON C 液
播種期：1959 年 5 月 16 日
6 ビン中大きいものより 30 個体の平均
* 全個体枯死

第 2 図 *Cymbidium* の発芽に及ぼす NAA の影響
A. 対照無処理 B. NAA 0.1 ppm 加用
C. NAA 1.0 ppm 加用 D. NAA 10.0 ppm 加用
培養基：KNUDSON C
品種：C. Doris Princess × C. Salome

%, 1 ppm 区 74.8%, 10 ppm 区 77.7% が褐変した。これらの点からみると NAA は 0.1 ppm でも発芽には阻害作用を示すが、発芽した protocorm に対しては生長促進作用があるものと思われる。(第 2 図参照)

さらに試験管中で発芽させた 5 か月後の実生に対し NAA の注入がその後の発育にいかなる影響を与えるか、または同時にジベレリンの影響を検討したのが第 6 表である。これによると NAA 1 ppm, 0.1 ppm のいずれの濃度でも無処理の対照区に比べて、草丈、葉数、根数、根長、生体重ともに顕著に増加した。とくに低濃度においてこの傾向は著しかった。ジベレリンを添加したものは草丈は顕著に伸長したが、葉は黄緑色となり病的であつて、根の発育は抑制された。

第 6 表 *Cymbidium* の発育に及ぼす NAA およびジベレリンの影響

	分枝数	草丈	葉数	根数	根長	生体重
	本	mm	枚	本	mm	g
NAA { 1.0 ppm	1.00	16.89	4.1	1.2	10.65	31.5
	0.1	19.17	4.3	1.7	18.50	36.0
GA { 100 ppm	1.05	50.82	3.5	0.49	0.15	—
	50	1.00	28.19	3.4	0.15	12.5
対 照 区	1.05	14.33	3.8	0.75	5.59	23.25

〔備考〕 供試品種：第 5 表に同じ
播種期：1959 年 6 月 27 日
処理日：1959 年 12 月 23 日
調査日：1960 年 4 月 23 日

4) 培養基に添加したアミノ酸および蚕蛹、血粉、魚類内臓物などの加水分解物の影響

a) アミノ酸の影響 本実験ではアルギニン、アスパラギン酸およびグルタミン酸が *Cymbidium* 種子の発芽および発育にどのように影響するかを調べ、さらに、蚕蛹および血粉に蛋白分解酵素 (pronase) を加えて加水分解したものおよび魚類の内臓を加水分解したものを培養基とした場合の効果を調査した。

3 種のアミノ酸は KC 培養基に 0.0005 mol および 0.005 mol の濃度になるようにこれを加え、殺菌後これに *C. Doris Princess* × *C. Salome* を播種した。播種 1 年後の生育結果を第 7 表に示す。すなわち、対照区に比べて、アルギニン 0.005 mol 区およびアスパラギン酸 0.005 mol 区で草丈、葉数および生体重が増加することが統計的に認められた。アスパラギン酸 0.005 mol 区およびグルタミン酸 0.005 mol 区では根の発育が抑制される傾向があつたが、これは統計的に有意な差ではなかった。

b) 蚕蛹および血粉の加水分解物の影響 蚕蛹 (大造 × N₄) の雌 20 gr を熱湯で殺虫後すりつぶしてエーテルで油脂類を除去し、残渣を低温乾燥し、3.8 gr

第7表 KNUDSON C 液に添加したアミノ酸が *Cymbidium* の発育に及ぼす影響

	濃度	葉数	草丈	分枝数	根数	根長	生体重
	mol/l	枚	mm	本	本	mm	mg
<i>l</i> -Arginine	0.005	4.80*	44.44*	1.01	1.90	16.95	58.4*
<i>l</i> -Asparatic acid	0.005	4.70*	42.20*	1.01	1.10	8.36	46.1*
	0.0005	4.25	37.34	1.21	1.90	14.40	44.0
<i>l</i> -glutamic acid	0.005	3.60	29.90	1.20	1.60	12.87	26.3
	0.0005	4.45	29.05	1.01	1.80	12.94	29.2
対 照 区		4.00	31.77	1.01	1.87	11.60	32.0

〔備考〕 供試品種：第5表に同じ。播種1年後

* 5%水準で有意差あり

の乾燥粉末を得た。この全量に1%の pronase を加えて pH 7.2 の磷酸緩衝液で 50 cc とし、表面を少量のトルオールでおおい、35°C の定温器中で 12 時間放置した後に加熱し、酵素および残った蛋白を凝固させろ過した、後全量を蒸留水で 100 cc とし、これを原液とした。この原液 0.2, 2, 20 cc に KC を加え、それぞれ 100 cc としシヨ

第8表 KNUDSON C 液に加えた蚕蛹加水分解物が *Cymbidium* の発芽および発育に及ぼす影響

培養基 1 l 中に添加し た蚕蛹抽出 液の量	Protocorm の 大きさ (μ)		Protocorm 形成率 (%)				
	長さ	幅	褐色	白色	淡緑色	緑色	計
20.0 cc	1501	1170	1.0	54.5	27.0	5.0	87.5
2.0	1039	774	1.0	69.4	16.5	1.0	87.9
0.2	1009	753	2.7	61.2	23.5	3.3	90.7
0.0	1134	920	22.6	3.2	26.5	41.5	95.0

〔備考〕 供試品種：第5表に同じ

播種後3か月、6ビン中の30個体の平均値

糖および寒天を加え pH を補正し、殺菌後 *C. Doris Princess* × *C. Salome* を播種した。

血粉に対しては、乾燥血粉 2 gr に pronase を加えて加水分解をした。操作は蚕蛹の場合と同様に行なつた。播種後3か月の発育状況を第8表および第9表に示す。

蚕蛹抽出液を添加した各区は無添加区に比べ発芽率はやや劣つたが 20 cc 添加区では protocorm の発育が著しく促進された。しかし各個体は葉緑体の生成が悪く緑色の protocorm の形成率が低かつた。2 cc および 0.2 cc 添加区では対照区と同程度かやや劣つた発育を示した。

血粉の分解物を加えたものではいずれの区も対照区に比し、発芽率、発育ともに悪かつた。しかしこれは統計的に有意な差ではなかつた。

第9表 KNUDSON C 液に加えた血粉加水分解物が *Cymbidium* の発芽および発育に及ぼす影響

培養基 1 l 中に添加し た血粉抽出 液の量	Protocorm の 大きさ (μ)		Protocorm 形成率 (%)				
	長さ	幅	褐色	白色	淡緑色	緑色	計
20.0 cc	1064	758	10.1	44.3	16.1	12.7	83.2
2.0	1068	828	2.6	64.9	19.5	5.2	92.2
0.2	1054	759	2.3	49.7	25.4	7.9	85.3
0.0	1134	920	22.6	3.2	26.5	41.5	95.0

〔備考〕 第8表に同じ

c) Fish soluble の影響 遠洋漁業の際に捕獲した魚類の内臓その他の廃棄物を加水分解しペースト状としたものが fish soluble である。これには2種あり、1つは自己の内臓内諸酵素により自己分解したものと、他は高熱高圧の蒸気で蒸煮し分解したものである。これらを用い下記の処方をもととして、fish soluble および

Fish soluble 2.5 gr Agar 16.0 gr
 Pepton 0.7 gr Dist. Water 1,000 ml
 Sucrase 20.0 gr pH 5.2

pepton のみをそれぞれ2倍あるいは3倍の濃度の培養基を作り、2倍液、3倍液として使用した。*C. Doris Princess* × *C. 黄色丸弁* および *C. Doris Princess* × *C. Alexanderi* の種子を用い、その播種3か月後の生育結果を第10表に示す。この結果、発芽率は *C. Doris Princess* × *C. 黄色丸弁* の種子が蒸気分解2倍液区のみ悪かつたが、他は各区とも変わらず、fish soluble 区は protocorm の葉緑体の形成良く濃緑色を呈していた。また fish soluble 区は対照の KC 区に比べ一般に発育が良く、とく

第10表 Fish soluble 培養基が *Cymbidium* の発芽および発育に及ぼす影響

培 養 基		Protocorm の 大きさ (μ)		Protocorm 形成率 (%)					
		長さ	幅	褐色	白色	淡緑色	緑色	計	
C. Doris Princess×C. Alexanderi									
Fish soluble	自己分解	2 倍液	1370	1065	3.9	49.8	38.6	5.3	97.6
		3 倍液	986	694	2.6	65.8	25.0	4.0	97.4
	蒸気分解	2 倍液	1176	904	3.7	66.0	22.8	4.7	97.2
		3 倍液	1146	859	4.4	70.3	15.8	3.8	94.3
対 照 区 (KNUDSON C 液)			1047	859	6.3	76.9	11.2	3.5	97.9
C. Doris Princess×C. 黄色丸弁									
Fish soluble	自己分解	2 倍液	1729	1413	4.5	10.0	37.2	46.1	97.8
		3 倍液	1539	1244	3.7	15.5	43.8	33.3	96.3
	蒸気分解	2 倍液	1578	1230	5.7	15.5	13.1	30.5	64.8
		3 倍液	1404	1074	4.5	25.6	25.6	42.0	97.7
対 照 区 (KNUDSON C 液)			1390	1214	1.7	54.2	11.9	26.0	94.1

〔備考〕 播種3か月後

に自己分解2倍区は2品種ともに促進されていた。

さらに fish soluble の自己分解物と蒸気分解物のいずれが良いかを調べるために同じ *Cymbidium* の2品種について同様の実験を繰り返した。その結果を第11表に示す。いずれにおいても自己分解の fish soluble で成績が良かった。

しかし濃度については品種によつて違つていた。一方 300 cc 3 角コルペンに播種した他の実験によると fish soluble 培養基は長期間の培養は不可能で、250 日前後で2~4cm になつた個体が枯れ始めるのが認められた。

第11表 Fish soluble 培養基による *Cymbidium* の発育

Fish soluble 稀釈程度	培養基	草丈	葉数	根長
C. Doris Princess×C. Alexanderi				
自己分解	2 倍液	11.40mm	2.3枚	3.5mm
	3 倍液	2.90	0.3	0
蒸気分解	2 倍液	9.84	2.3	2.0
	3 倍液	2.86	0.3	0
C. Doris Princess×C. 黄色丸弁				
自己分解	2 倍液	8.3	2.9	0.6
	3 倍液	13.1	3.4	1.3
蒸気分解	2 倍液	3.3	0.5	0
	3 倍液	5.0	1.3	0.4

〔備考〕 播種6か月後

5) 移植用培養基に添加した NAA が *Cymbidium* の発育に及ぼす影響

実生の移植培養基に NAA を加え、この発育を調査した。すなわち 1959 年 5 月 29 日 *C. Doris Princess*×*C. Salome* を KC 培養基に播種し、190 日間そのまま発育させ、第3葉が展開中の実生苗を KC および fish soluble 培養基に各々 NAA 0.2 ppm を加えた移植培養基を作り、これに無菌的に移植した。そして5か月後の 1960 年 6 月 10 日に各区の生長量を測定し第12表を得た。

結果は前記 NAA の試験と同様に、これを加えたもの

第12表 移植培養基に加えた NAA が *Cymbidium* の発育に及ぼす影響 (I)

播種培養基	移植培養基	草丈 mm	葉数 枚	分枝数 本	根長 mm	根数 本	生体重 gm
KC	KC	26.68	4.44	1.12	16.30	1.56	1.10
KC	KC+NAA 0.2 ppm	42.84	5.55	1.00	21.69	1.90	0.98
KC	Fish soluble	24.32	4.56	2.48	13.12	1.48	1.85
KC	Fish soluble+NAA 0.2 ppm	38.48	5.50	1.60	41.81	2.55	2.32

〔備考〕 供試品種：第5表に同じ、移植5か月後、大きいものから25個体の平均値

は加えないものに比し草丈、葉数、根長、根数などいずれも増大した。ただ生体重について KC+NAA 区で小さかつたが、これはランの気根は水分の蒸散が容易なので秤量の際手間取り、水分を失つたためと思われる。

また 1959 年 5 月 26 日に fish soluble 自己分解2倍液に播種し、8か

月の幼苗を、KC および fish soluble に各々 NAA 0.2 ppm を加用した培養基上に、無菌的に移植し、約9か月後に調査した。この結果を第13表に示す。

この結果は使用した2品種とも NAA 0.2 ppm を移植培養基に加えたものは無添加に比し、地上部、地下部ともに発育が良かった。

さらに、第3図に示すように

第3図 NAA 添加 KNUDSON C 培養基に移植した *C. pumilum*, 右は地上葉の出たものと褐変 protocorm が混在し、左は褐変したものがない

第13表 移植培養基に加えた NAA が *Cymbidium* の発育に及ぼす影響 (II)

品 種	播種培養基	移植培養基	草丈 mm	葉数 枚	根長 mm	根数
C. Doris Princess×C. Alexanderi	Fish soluble	KC	39.9	5.05	11.3	2.15
	Fish soluble	KC+NAA 0.2 ppm	49.4	5.55	9.6	2.30
C. Doris Princess×C. 黄色丸弁	Fish soluble	Fish soluble	20.2	4.80	7.1	1.3
	Fish soluble	Fish soluble+NAA 0.2 ppm	30.9	5.15	11.4	1.8

〔備考〕 培養基の Fish soluble は1倍液を使用

播種期：1959年5月26日 移植期：1960年1月28日 調査日：1960年10月10日

C. pumilum について、KC 培養基にまいて、生じた protocorm を KC+NAA 1ppm 培養基に移植した。120 日後の調査では、対照区は平均草丈 7.1mm で全部緑色であつたが、NAA 添加区は地上葉が出て大きくなつた個体が多く、平均草丈も 11.2mm を示した。しかし同じ区でも地上葉の出なかつた個体はすべて褐色 protocorm となつていた。すなわち移植培養基においても NAA 1ppm では濃度が高すぎる結果を得た。

IV. 考 察

KNUDSON, L. (1922)⁽⁵⁾ が無菌培養法を案出して以来、ランの無菌培養のために多数の処方が発表された。WITHNER, C. L. はその著書⁽¹²⁾に約 40 の処方を記載している。一方 *Cymbidium* 属では無菌培養で容易に発芽する種もあるし、またいかにしても発芽しない種もある。一般に洋種と称する *Cymbidium* では無菌培養ができることは明らかとなつている (KNUDSON, L. 1924)⁽⁶⁾。しかし培養ビン中での発育は *Dendrobium* や *Cattleya* に比べ遅々としている。そこで実用的に確実に好結果をおさめる培養基の探求が必要となる。

筆者らは熱帯産 *Cymbidium* 相互の交配種（わが国で洋種 *Cymbidium* と称するものはインド・ビルマから東南アジアにかけての熱帯原産の *Cymbidium* を指す）に対し、KNUDSON B 液、C 液、BURGEFF EG-1、および VACIN & WENT のトマト汁培養基を比較して第 1 表、第 2 表に示されるように KNUDSON C 液が良い成績をおさめた。さらに表には示さなかつたが各種微量要素を含めた WHITE 氏液あるいは VACIN 氏液でも培養を試みたが、いずれも発芽が悪かつたり、protocorm の緑化がはなはだしくおそかつたり、あるいは褐変 protocorm が多かつたりして推奨すべき結果を得なかつた。洋種 *Cymbidium* と称するものに対し、調整が簡単でしかも良い成績を得るものは KNUDSON C 培養基である。ただ KNUDSON C 液には微量要素としては Mn が入っているだけであり、B, Zn, Cu, Mo などの他の微量要素があればさらに良い結果が得られる。筆者らは下記の処方では微量要素を入れ、これらを添加しないものと比較した結果、発育の量的差異はなかつたが、添加区のは葉色が濃く、健全な苗の外観を呈していた。

微量要素	H ₃ BO ₃	1.1 gr
	CuSO ₄	3.0
	MoO ₃	3.6
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5.5
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	3.0
	全量を蒸留水 1000cc に溶解し KNUDSON C 液 1000cc 中に 1cc 混入する。	

しかし、通常の硬質ガラスを使用し、用いる寒天を精製することを行なわなければこれらの影響はほとんど考慮しなくてよい。

ランの無菌培養では種子は多数であり、微細なために多くの場合厚まきとなりやすい。したがって、1 蒴内の遺伝的に違つている種子が同一の発芽率および発芽勢で発芽すると仮定すれば全体の発芽率は 70~80% もあれば実用的にさしつかえない。しかし、この培養はビンの中で数か月から 1 年ぐらゐ育てるものであるから、発芽率と同時にその中での苗の発育が良くなければ、鉢出し後の残存率が低下する。したがって、ビン中での発育がよく、しかも健全に育つためにビタミン類、あるいは生長促進物質の探求もまた問題となる。

本実験でビタミン類および生長調節物質類を添加した場合、効果が顕著だと思われたものは、VC および NAA であり、GA は草丈を異常に伸長させはしたが、発根を抑制し、病的な苗となつた。一方 *Vanda*, *Phalaenopsis* の発芽にはニコチン酸あるいはその誘導体が必要なことがすでに SHAFFSTEIN⁽⁸⁾, BAAME⁽¹⁾, らにより解明されている。本実験によれば *Cymbidium* に対しニコチン酸は無処理に比し生長を促進するが、なければ発育しないというほどのこともなかつた。VB₂ も発育促進には効果が認められた。

ランの発芽・生長に及ぼす植物ホルモンの影響については古くから研究され、BURGEFF (1936)⁽²⁾ は花粉塊中にあるオーキシンを期待し、これを培養基に加えたが良い成績は得られなかつた。また CURTIS & NICHOL (1948)⁽³⁾ は IAA が *Vanda* の胚には影響なかつたが、*Cymbidium* の胚ではこれを最初黒変させ、後に生長点の部分より再び生長し始め、最後に無処理と変らなかつたと報告している。一方促進の効果も多くの人により認められている。すなわち、WITHNER の著者によると、MEYER (1945)⁽⁷⁾ は NAA が *Laeliocattleya* および *Oncidium* の実生の生育を促進することを見ている。その他、YATES と CURTIS (1949)⁽¹³⁾ は *Epidendrum* に NAA が、HEGARTY (1955)⁽⁴⁾ は *Cypripedium* および *Vanilla* の実生に IBA がそれぞれ生長促進に効果があると述べている。WITHNER (1955)⁽¹¹⁾ も同じく *Vanilla* で IBA 1ppm では促進し、10ppm では抑制したと報告している。本実験では *Cymbidium* の発芽に対し NAA は 0.1ppm でも抑制作用があり、10ppm では著しく阻害作用（褐変 protocorm が多数でる）があつた。しかし実生に対しては 0.1~1.0ppm で顕著に発育を促進した。これは、ランの種子発芽と生長の各段階に対し生長ホルモンの最適濃度が異なるためであると思われる。ま

た NAA を使用した培養基は仮根以外に本根の発育がはなはだ良かった。無菌培養のランはピンから鉢に出した場合枯死するものが多い。しかし本根が出ているとほとんど枯死することなく活着するものである。この意味で NAA の効果は顕著である。しかし本実験の結果より 1 ppm では濃すぎるのであつて、実用的使用濃度は 0.1~0.2 ppm であろうと思われる。なおその添加に際しては培養基に当初から混入しコッホ殺菌器で殺菌するのが良い。一度発芽させ、あとから注入する方法は確実であるが手間がかかり、その上菌類で汚染する心配もある。また *Cymbidium* と mycorrhizal fungus 相互の間ではオーキシンが問題となるものと思われるので、IAA で実験を進めるべきであるが、IAA は加熱および紫外線照射により分解されやすく、著者らの方法では効果の安定を期し得なかつた。

次にアミノ酸および蛋白分解物についてみると、すでに SPOERL⁽⁹⁾ は *Cattleya* で、WITHNER⁽¹¹⁾ は *Vanilla* でアルギニン、アスパラギンの効果を認めている。本実験においても *Cymbidium* に対し、L-アルギニンおよび L-アスパラギン酸はその発育を促進したが、L-グルタミン酸はその効果が認められなかつた。これは SPOERL の結果と一致した。その有効濃度は 0.005 mol 程度であると思われた。

さらに蚕蛹および血粉を蛋白分解酵素により分解して得たアミノ酸含有液を KC 培養基に加える事は、発育を促進する場合もあるが、緑色 protocorm の形成率が低いので実用的でない。むしろ fish soluble および pepton を培養基に使用した方が、緑色 protocorm の形成率が高く、発育も 30% ぐらい促進される。ただその場合 fish soluble としては、自己分解製品を使用する必要がある。筆者らが使用したものは国産の飼料添加物であるが、米国では fish emulsion を用いて好成績を上げている。筆者らが入手した米国の Atlas Fish Emulsion Co. 製のものと fish soluble とを比較したところ、形状、内容から両者は大体同等のものと認められた。この培養基は 200 日以上 の長期間培養には成績がよくない。これは無機物の不足をきたすものと思われる。したがって播種後数カ月で新しい培養基に移植する様にすれば好結果が期待できる。

次に第 11 表および第 12 表に示されるごとく、移植培養基に適量の NAA を加えることは、草丈、根長、生体重などを顕著に増大する。とくに KC 培養基で発芽させた後、fish soluble に NAA を添加した培養基に移植したものは、NAA 無添加のものに比し約 2 倍の発育を示した。

V. 摘 要

Cymbidium の無菌発芽および実生の発育に対し、好適培養基探求のために実験を行ない、以下の結果を得た。

1) 熱帯産 *Cymbidium* hybrid の種子の無菌培養基としては KNUDSON C 液および BURGEFF Eg-1 液が良い成績を示し、KNUDSON B 液および VACIN と WENT のトマト汁培養基はこれより劣つた。

2) ペプトン加用の fish soluble 培養基は生長促進効果が認められた。

3) KNUDSON C 培養基に対する添加物として、L-アルギニンおよび L-アスパラギン酸の加用は *Cymbidium* の生長を促進したが、グルタミン酸はその効果が認められなかつた。一方、ビタミン類では B₂ および C で実生の生長促進が認められた。

4) KNUDSON C 培養基に NAA を添加すると、0.1 ppm でも *Cymbidium* の種子発芽を阻害するが、実生の発育に対しては 0.1~1.0 ppm の濃度で著しい促進効果を示した。とくに移植培養基に NAA を添加した場合に顕著に生長促進作用が認められた。

5) KNUDSON C 培養基に蚕蛹抽出物を加えたものは生長を促進したが、血粉の分解抽出物ではなんらの効果も認められなかつた。

文 献

1. BAAME, R. 1949. Science 108 : 522-523.
2. BURGEFF, H. 1936. Samenkeimung der Orchideen. G. Fischer, Jena. 312 pp.
3. CURTIS, J. T. and M. A. NICHOL. 1948. Cu-Bull. Torrey Bot. Club. 75 : 358-373. (cited from WITHNER, C. : The orchids, a scientific survey p. 334. 1959)
4. HEGARTY, C. P. 1955. Amer. Orchid Soc. Bull. 24 : 457-464.
5. KNUDSON, L. 1922. Bot. Gaz. 73 : 1-25.
6. 1924. Bot. Gaz. 77 : 212-219.
7. MEYER, J. R. 1945. O Biologico. 11 : 151-153. (cited from WITHNER, C. : The orchids a scientific survey p. 334. 1959)
8. SCHAFFSTEIN, G. 1938. Jahrb. Wiss. Bot. 86 : 720-752.
9. SPOERL, E. 1948. Amer. J. Bot. 35 : 88-95.
10. VACIN, E. F. and E. W. WENT. 1949. seedc Bot. Gaz. 111 : 175-183.
11. WITHNER, C. L. 1955. Amer. Orchid Soc. Bull. 24 : 380-392.
12. 1959. The Orchids, a scientific survey. New York
13. YATES, R. and J. T. CURTIS. 1949. Amer. J. Bot. 36 : 390-396.