切断を伴うコチョウランの微細繁殖への修正ムランゲ・スクーク培地の適用 —他培地との生存率の比較と培養特性の品種間差—

榎 真一・高原美規

長岡技術科学大学 生物系 940–2188 新潟県長岡市上富岡町

Application of a Modified MS Medium for Tissue Culture with Cutting in *Phalaenopsis* —Comparison with Other Conventional Media with Regard to the Survival Rate and Varietal Differences in Cultural Characteristics—

Shinichi ENOKI and Yoshinori TAKAHARA

Bioengineering, Nagaoka University of Technology, Kamitomiokamachi, Nagaoka, Niigata 940–2188

Abstract

Cut tissues of *Phalaenopsis* elute a lot of phenolic compounds in the process of wound response, and the toxicity of these phenolic compounds damage the tissues. A newly modified Murashige and Skoog (MS) medium, which we have named *Phalaenopsis* shoot reproduction (PSR) medium, was developed to avoid such damages, and it is suitable for micropropagation with tissue cutting. Shoot survival rates and eluted phenolic compounds were examined when shoots (length, 2 cm) that were cut off from PLBs propagated on PSR medium were grown on PSR medium, modified VW medium, and NDM. The survival rate of shoots was much lower on modified VW medium than on the other media. In addition, shoots on PSR medium formed vigorous leaves and roots; thus PSR medium is the best for shoot growth. Many ethanol-soluble phenolic compounds were eluted on PSR medium, and many water-soluble ones were eluted on NDM. We applied the adventitious bud proliferation method using PSR medium to major varieties and their wild ancestor species and studied the varietal differences in cultural characteristics. This method was easily applicable to almost all species, including all the examined hybrids and wild species of the subgenus *Phalaenopsis* that is an important group as hybrid parents. It was shown that PSR medium is suitable for the culture of *Phalaenopsis* with cutting and that this proliferation method can be used for a large majority of *Phalaenopsis* varieties.

Keywords: adventitious bud proliferation, orchid species, phenolic compounds

諸 言

Phalaenopsis 属は 62 種の原種からなり¹⁾, フィリピンなどの

熱帯・亜熱帯地方, さらには中国南部や台湾などにも分布するラン科植物である。これらの原種から作出された交配種は, 日本ではコチョウランと呼ばれ, カラフルで長持ちする美しい花を持つために愛好家も多い。また贈答用の高級鉢物などとして需要が高く, 現在では日本で最も市場規模の大きい洋ランである。

コチョウランの種子は無胚乳種子であり, また胚も非常に小さく発芽が困難なため, 古くから無菌播種法などの培養技術が研究されてきた²⁾。また単茎性で茎頂を微細繁殖に使いに

2013 年 12 月 16 日受付

2014 年 2 月 22 日受理

Corresponding author: Shinichi Enoki

(esfirefly@gmail.com)

くという制約上、花茎培養³⁾、葉片培養⁴⁾、花茎腋芽などによる PLB 誘導⁵⁾を通じた、多くのクローン増殖法が研究されており、コチョウラン生産における微細繁殖技術は必須のものとなっている。

しかしながら、コチョウランを含むラン科植物の微細繁殖では、組織が受傷すると多くのフェノール様物質を含む二次代謝物が切断面から浸出し、これが酸化して培地を褐変させ、外植片の生存率を低下させる⁶⁾。このためコチョウランでは切断を伴う培養増殖は非常に困難である。

そこで、本研究では、このフェノール様物質の影響を軽減し、高い生存率を維持できる培地の開発を目的として開発した修正ムラシゲ・スーク培地 (*Phalaenopsis* Shoot Reproduction 培地、以下 PSR 培地) と、他培地を用いて培養時の生存率を比較し、この培地の有用性を検証した。PSR 培地は、無機塩濃度を 1/2 にした MS 培地⁷⁾と、コチョウラン培養において、培養特性の向上の効果があつたと報告のある成分 (ポテト煮出し液⁸⁾、ココナツウォーター⁹⁾、アデニン⁴⁾) を組合せた培地であり、さらに花茎培養からの幼植物体形成および様々な外植片由来の PLB 形成に有用とされる植物ホルモンを加えたものである^{4, 5, 10)}。我々はこの修正 MS 培地がコチョウランの培養においてシュート状態での増殖・再生産に適用できるため、PSR 培地と名付けた。

また、本研究ではこれまでに PSR 培地を用いたコチョウランの不定芽増殖法を開発している¹¹⁾。この方法は PSR 培地上でシュートを培養することにより、シュート基部より不定芽として成長する新しいシュートを切り分け、PSR 培地に *in vitro* で挿し木することで増殖を行う方法である。この方法により、シュート増殖、維持と種苗生産が同時に可能であり、優良株の遺伝子型の保持に有効であることが示唆されている。また株の更新も可能であり、得られた幼苗からさらに PLB での大量増殖のための種々の培養が行いやすくなるなどの利点が考えられる。

しかしながら、コチョウランは培養法によって非常に大きな品種間差が存在し、この原因は交配に用いられた原種の特性に由来すると考えられている^{4, 12)}。このため、この不定芽増殖法がどのような品種にも適用できるとは限らない。

そこで本研究では開発した不定芽増殖法が、現在市場で主要な品種系統に適用可能であるか検討するために、交配種およびその親となった原種を使用し、これらの培養特性における種間差を調査した。

材料および方法

1. 各培地におけるシュートの生存率および生育比較

Table 1 に示した PSR 培地¹¹⁾、VW 培地¹³⁾ に 10 % のコ

ナツウォーター (以下、CW) を添加した培地 (以下、修正 VW 培地)、NDM⁶⁾ を用いた場合のシュート生存率を調査し比較した。NDM には植物ホルモンとして NAA を 0.1、BAP を 1 mg L^{-1} になるように添加して用いた。なお、PSR 培地の調製は以下のように行った。市販のジャガイモ 200 g を 5 mm 角の棒状に切り、鍋に入れて蒸留水 1 L を加えた後、30 分間沸騰が続くように煮込んだ。その後、煮出し液を回収、ろ過し、Table 1 の成分を加え 1 L にメスアップして用いた。また、貯蔵する場合は冷凍保存とした。修正 VW 培地は、Table 1 に従って成分を秤量し、10 % CW とともに蒸留水でメスアップし、pH 5.7 に調製して用いた。NDM は、Table 1 に従って成分を秤量し蒸留水でメスアップし、pH 5.4 に調製して用いた。炭素源およびゲル化剤は Table 1 のとおりに添加して用いた。調製した培地は、121 °C、20 分のオートクレーブにより滅菌し、予めオートクレーブ滅菌した培養容器に 40 mL ずつ分注した。培養容器にはスミロンテクノポット (外寸 80.5(W)×80.5(L)×100(H) mm、住友ベークライト (株)) を用いた。

Phal. Double Delight 'Hawaiian Spots' (国際園芸株式会社より購入) の花茎培養で得られた幼植物体から葉片を採取し、葉片培養により PLB を誘導した。花茎培養、葉片培養については田中の方法⁴⁾に従って行った。誘導した PLB を PSR 培地上で維持、増殖し、PLB から発生した長さ 2 cm のシュートを切り離し、供試材料として用いた。シュート発生時の光強度は、 $2 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、温度は 25 °C である。この長さ 2 cm のシュートを、上記 3 種類の培地に置床して 4 か月間培養した。最初の 2 か月間は 1 か月ごとに継代培養を行い、継代時にシュート基部の黒く変色した部位と生じた根を切除した後、継代培養した。また後半 2 か月間は継代培養及び切断処理は行わなかった。培養条件は、光強度 $50 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、14 時間日長、25 °C であり、サンプル数は培地 1 種類、1 反復につき 20 本であり、1 容器当たり 10 本のシュートを置床した。各条件、3 反復で試験を行った。各月ごとに生存率を算出し、4 か月目にはシュートの生育指標として、葉数、葉長、葉幅、ルート数、生体重を測定した。

2. フェノール様物質の定量

試験 1 において培地中に溶出したフェノール様物質を、エタノール抽出と水抽出により測定した。Mitsukuri らの報告¹⁴⁾を参考にして以下のように行った。試験 1 において培養 2 か月目、培養 4 か月目において、各種培地 10 g をサンプリングし、25 mL の 80 % エタノールでホモジナイズした後、100 rpm で 24 時間振盪抽出し、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上清 3 mL を 12.5 mm のガラスセルへ移し、エルマ分光光度計 (AE-350、エルマ販売) を用いて 420 nm の吸光度を測定した。また水抽出の場合、80 % エタノールの代わりに蒸留水を用い、同様に操作し測定した。各サンプルとも 3 回

Table 1 The components of the three media used in this study.

	Components	PSR medium ^z	VW medium ^y	NDM ^x
Macro elements (mg L ⁻¹)	NH ₄ NO ₃	825		480
	NH ₄ H ₂ PO ₄			
	(NH ₄) ₂ SO ₄		500	
	KNO ₃	950	525	200
	KH ₂ PO ₄	85	250	550
	KCl			150
	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O			470
	Ca ₃ (PO ₄) ₂		200	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	220		
	Mg(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O			
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	250	250
Micro elements (mg L ⁻¹)	Fe-EDTA			21
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	13.9		
	Na ₂ -EDTA	18.65		
	Fe-citrate		28	
	MnSO ₄ · 7H ₂ O	11.15		
	MnSO ₄ · 4H ₂ O		7.5	3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4.3		0.5
	H ₃ BO ₃	3.1		0.5
	KI	0.415		
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.125		0.025
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.013		0.025
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.013		0.025
Vitamins (mg L ⁻¹)	<i>myo</i> -inositol	100		100
	Nicotine acid	0.5		1
	Pyridoxine hydrochloride	0.5		1
	Thiamine hydrochloride	0.1		1
	Biotin			0.1
	Calcium pantothenate			1
Amino acids (mg L ⁻¹)	Glycine	2		
	Cysteine			1
Plant hormones, etc. (mg L ⁻¹)	NAA	1		0.1
	BAP	1		1
	Adenine	10		1
Natural organic components	Coconut water	10 %	10 %	
	Potato	200 g		
Sugar (g L ⁻¹)	Sucrose	20	20	10
Gelling agent (g L ⁻¹)	Gelrite	2.5	2.5	2

^z200 g of potato segments placed in a beaker containing 1 L of distilled water. After gently boiling for 30 min, all the constituents listed were added to the strained broth, and its volume was adjusted to 1 L. The pH was not adjusted.

^yRefer to the Vacin · Went¹³⁾. It was used after addition of 10 % coconut water to the medium. The pH was adjusted to 5.7.

^xRefer to the Tokuhara · Mii⁵⁾. The pH was adjusted to 5.4.

In both VW medium and NDM, the gelling agent was changed to Gelrite. Each medium was used after autoclaving (121 °C, 20 min).

測定し、平均値を算出した。

また、3種類の培地において培養初期のフェノール様物質の広がり具合を測定した。各培地を直径 90 mm のプラスチックシャーレに 20 mL ずつ分注し、1 枚当りシュートを 5 本置床し、置床したシュートの周りに広がったフェノール様物質の直径を、15 日目まで 3 日ごとに測定した。3 反復実験を行った。

3. 不定芽増殖法の様々な品種への適用

供試品種は、交配種 8 種、および交配親として重要な原種 26 種を用いた。交配種は市場に多く出荷される主要なタイプを考慮して選んだ。温室で育てた各供試品種から、常法である花茎培養⁴⁾によりシュートを得た。このシュートを PSR 培地 40 mL を分注したスミロンテクノポット上に置床し、1 か月ご

とに継代した。得られたシュートの大きさや数は種毎に異なるため、開始本数を後述の Table 3 の Shoot number の Start の項に記載した。継代の時に基部から生じたシュートを親株から切り離し、根を切断して同じ培養ポットで培養した。培養はシュートが培養途中で枯死しない限り、36 か月まで、またはシュート数が 50 本になるまで続けた。

結 果

1. 各培地におけるシュートの生存率および生育比較

本研究室で開発した PSR 培地と、従来の培養でよく用いられている 2 つの培地におけるシュート生存率を比較した

Fig. 1 Shoot survival rates on each medium. Error bars are SEM ($n = 20$, 3 replicates). The bars with different letters are significantly different by Tukey's range test ($P < 0.05$). Shoots (length, 2 cm) were cultured on three different media for four months. In the first two months, the shoots were subcultured every month. They were subcultured after cutting the generated roots, and the site turned black at the base of the shoot. In the last two months, cut treatment and subculture were not performed.

Fig. 2 Appearance of shoot growth on each medium (after four months of culture). A: PSR medium, B: modified VW medium, C: NDM. The arrows indicate roots. Bars = 1 cm.

Table 2 Shoot growth on each medium.

	Number of leaves	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Number of roots	Fresh weight (g)
PSR medium	4.2a ^z	2.6a	1.5a	1.4a	33.0a
Modified VW medium	3.2b	2.1b	1.2a	0.8ab	17.5b
NDM	3.3b	2.2ab	1.2a	0.0b	14.3b

Mean (n = 20, 3 replicates)

^zValues followed by different letters within columns are significantly different by Tukey's range test ($P < 0.05$)

Fig. 3 Quantitative determination of phenolic compounds in each medium.

A: After two months of culture (Subcultured every month)

B: After four months of culture (No subculture for the last 2 months)

Error bars are SEM (n = 3). The bars with different letters for each extraction process are significantly different by Tukey's range test ($P < 0.05$)

(Fig. 1). 修正 VW 培地は切断処理以降、大幅に生存率が低下した。対して、PSR 培地と NDM では、生存率は高いまま維持され、3 か月目および 4 か月目では修正 VW 培地に対し、PSR 培地、NDM での生存率は有意に高かった。また

PSR 培地では切断を行った後、培養を継続しても、生存率の低下はほぼ見られなかった。対して、修正 VW 培地、NDM では、切断後、生存率が徐々に減少する傾向が見られた。

また、培養 4 か月目の生育状態を示した (Fig. 2, Table

Fig. 4 Diffusion of phenolic compounds in each medium.

Error bars are SEM (n = 20, 3 replicates)

Shoots were cultured on three different media for 15 days. The diameter of diffusion of phenol-like substances around the shoots was measured every 3rd day. The value for NDM was defined as 90 mm uniformity.

2). PSR 培地では、葉数、生体重が他の 2 種の培地に比べて有意に高かった。また PSR 培地での葉長は修正 VW 培地より有意に高く NDM とは差はなかった。PSR 培地でのルート数は NDM より有意に高く、修正 VW 培地とは差は見られなかった。葉幅は培地間で有意差は見られなかった。

2. フェノール様物質の定量

試験 1 の培養 2 か月目と 4 か月目において培地中に溶出したフェノール様物質をエタノール抽出及び水抽出したときの 420 nm での吸光度測定の結果を Fig. 3 に示した。培養 2 か月目では、エタノール抽出及び水抽出の両処理において培地間でのフェノール様物質量の差は見られなかった。培養 4 か月目では、エタノール抽出処理では修正 VW 培地、NDM に比べ PSR 培地の値は有意に高く、修正 VW 培地、PSR 培地間に差は見られなかった。水抽出では PSR 培地に比べ、修正 VW 培地、NDM の値は有意に高く、修正 VW と NDM 間に差は見られなかった。

各培地におけるフェノール様物質の拡散程度を Fig. 4 に示した。置床したシュートの周りに広がったフェノール様物質の直径は、修正 VW 培地に比べ PSR 培地で大きく、培養日数が経つに連れ、その直径は広がった。また NDM では、培養初期からフェノール様物質が、シュートの周りだけでなく培地全体に広がり、培養日数が経つに連れて培地の色がフェノール様物質により黒変していった。このため、NDM では広がり具合は培養日数に関わらず一律シャーレ直径と同じく 90 mm とした。

3. 不定芽増殖法の様々な品種への適用

シュート数が 50 本に増えるまでの培養期間、または 36 か月時点でのシュート数を Table 3 に示した。交配種は、増殖に遅速があるもののすべて 36 か月以内に 50 本まで増殖可能であった。また、原種のうち交配種の親として最も重要な *Phalaenopsis* 亜属では 2 種を除き容易に増殖可能だった。このうち *P. aphrodite* は増殖速度がこの亜属の他種に比べて遅かった。また *P. shilleriana* は培養途中で枯死してしまい培養が困難だった。また、その他の亜属の原種は、*Phalaenopsis* 亜属の原種および試験した交配種と比較して、培養途中で枯死する種や増殖速度の遅い種が多く、不定芽増殖法の適用が難しかった。

考 察

Knudson²⁾ がカトレアを材料にランの無菌播種に、Rotor³⁾ がコチョウランの花茎培養によりランのクローン増殖に、初めて成功して以来、初期のラン科植物の培養では、Knudson C 培地¹⁵⁾ や VW 培地¹³⁾ などの完全合成培地が用いられてきた。しかし最初期の完全合成培地は、成分的に不完全な物が多く、CW¹⁶⁾ などの天然有機物を加えた培地が用いられてきた。また商業的な微細繁殖では、ハイポネックス培地¹⁷⁾、ハイポネックス・ポテト培地⁸⁾ のような、培地調製が簡便な培地がよく用いられる。CW やポテトなどの天然物を加えた培地は、成分が不明確であり、厳密な再現性が得られにくい。そのため、天然物を含まない完全合成培地として NDM⁵⁾ が開発され、近年広く用いられるようになっている。これは、初期の培地において天然物で補われていた成分を精製された試薬に置き換え、不要な成分を除くことで再現性を高めたものであるが、コチョウランは様々な原種とその組合せによる交配種の総称であり、種間・品種間差が大きいため、多くの種、系統に共通で用いられる最適な培地条件を検討することは困難であった。そこで、成分が不明確な天然物であっても、コチョウラン培養に良好であると報告のある成分を多く組み合わせることで、多数の系統で良好な培養が得られることを目的として PSR 培地を開発した。

ラン科植物の培養でこれまでに多用されてきた修正 VW 培地と近年よく用いられている NDM、今回開発した PSR 培地を用いて培養したときのシュートの生存率、生育状況を比較した。Fig. 1 より、PSR 培地では修正 VW 培地より生存率が有意に高く、長期培養でも NDM とともに生存率は高いまま維持された。またシュートの生育は PSR 培地において、他の 2 種の培地に比べ非常に良好であり、旺盛な葉の展開と根の発生が見られた (Fig. 2, Table 2)。以上の結果より今回開発した PSR 培地は、切断を伴う培養に適しており、培養物の生

Table 3 Application of adventitious bud propagation method to various varieties.

Breed variety and species used in the experiment				Shoot number		Culture period ^z (months)
Genus	Subgenus	Section	Species	Start	End	
Phal.	Phalaenopsis		<i>amabilis</i>	4	50	14
			<i>amabilis alba</i> × self	6	50	21
			<i>amabilis</i> ssp. <i>rosenstromii</i>	6	50	9
			<i>aphrodite</i>	4	10	—
			<i>skilleriana</i>	8	0	—
	Phalaenopsis		<i>stuartiana</i> 'Larkin Valley'	3	50	14
			<i>Stauroglossis equestris</i>	10	50	21
	Phal. (Dor.)	Esmeralda	<i>buyssonianana</i>	4	50	19
			<i>pulcherrima</i> 'K-213'	7	50	17
			<i>pulcherrima alba</i> 'K-242'	3	50	9
			<i>pulcherrima coerulea</i>	3	50	16
Phal.	Polychilos		<i>floresensis</i>	3	0	—
			<i>hieroglyphica</i>	3	7	—
			<i>javanica</i>	2	0	—
			<i>Amboinenses mariae</i>	10	0	—
			<i>modesta</i>	4	50	31
			<i>venosa</i>	2	4	—
			<i>violacea</i> (alba 'K-487' × 'Blue')	2	50	25
			<i>Polychilos cornu-cervi</i>	3	23	—
			<i>mannii</i>	6	50	14
	Phal.	Zebrinae	<i>speciosa</i> var. <i>tetraspis</i>	1	0	—
			<i>sumatrana</i>	3	0	—
	Parishianae	Parishianae	<i>Fuscatae viridis</i>	5	28	—
			<i>gibbosa</i>	1	0	—
	(Natural hybrids)	(hybrids)	<i>parishii</i>	3	0	—
			× <i>intermedia</i>	6	50	11
	(hybrids)		Chih Shang's Stripes #2	4	50	30
			Cosmo-Vegas	5	50	17
			Double Delight 'Hawaiian Spots'	6	50	15
			Ginrei × self	2	50	13
			Golden Emperor 'Sweet'	9	50	25
			Perfection Is 'Ching Ruey'	1	50	32
	Dtps.	(hybrids)	Happy Valentine	1	50	17
			Kenneth Schubert 'Blue Angel'	8	50	20

^zCulture period was shown as a number of months until shoots were increased up to 50.

Major 8 hybrids on the market and 26 species important as breeding parents were used in this study. Shoots of each variety and species obtained by flower stalk culture⁴⁾ were placed on Sumilon techno pot that was dispensed to 40 ml of PSR medium and were subcultured every month. At this time, shoots arising from the base of parent shoots were separated and cultured with cutting the roots in the same pot. If the shoots does not die during the culture, the culture was continued up to 36 months or until the number of shoots was 50.

育も従来の培地に比べ非常に良好であると考えられる。

今回用いた修正 VW 培地、PSR 培地は天然有機物を加えた半合成培地であり、NDM は完全合成培地である。培地に CW などの天然有機物を加えた場合生育に良好な結果が得られることが知られているが、今回の結果では、CW を加えた修正 VW 培地において、切断処理後の生存率維持への効果は見られず、従来型の培地では切断を伴う培養には適さないことが示唆された。同じ半合成培地でありながら、今回 PSR 培地と VW 培地で差が見られた。これは、PSR 培地に

は、VW 培地に含まれない植物ホルモン、ジャガイモ煮出し液が含まれていることが影響していると考えられるが、詳細は不明である。また、NDM は完全合成培地であるが、今回の他 2 種の培地に含まれない各種ビタミンや、培養物の褐変枯死の防止に効果のあることで知られているシステインが含まれており、これらが高い生存率の維持に影響していると推察される。

次に各種培地での生存率と培地に拡散するフェノール様物質との関係を調査するために、培地中のフェノール様物質の定量を行った。培地中に浸出しているフェノール様物質質量

は培養2か月では3種類の培地間で有意差はなく、培養4か月ではPSR培地において他の2つの培地に対し、エタノール溶性物質が有意に高く、水溶性物質は有意に低かった (Fig. 3)。フェノール溶出と外植片の枯死は正の相関があることが報告されているが¹⁸⁾、Fig. 3のフェノール量と試験1の生存率との相関は見られなかった。また Fig. 3の定量結果と Fig. 4のフェノール様物質の広がり方より、PSR培地ではエタノール溶性、NDMでは水溶性の物質が多く、浸出している物質が異なることが示唆された。コチョウランの褐変枯死には、カフェ酸、クマル酸、クロロゲン酸、カテコール、カテキン、没食子酸、p-ヒドロキシ安息香酸などのフェノール様物質が影響することが報告されている¹⁹⁾。これらの物質のうち、エタノール溶性のものは前者の2つ、親水性のものはその他となるが、溶出した種々の物質の違いがコチョウランの褐変枯死に与える影響は知られていない。また、今回の結果より、PSR培地ではフェノール様物質が大きく拡散しないことが示された。これは重合などにより高分子化するなどのため不溶化し、このため褐変枯死への影響が軽減されているのではないかと考えられる。対してNDMでは培地全体にフェノール様物質が拡散し、シュートへの影響が軽減されていると考えられる。

PSR培地を用いた不定芽増殖法が様々な原種および品種に適用できるかを調査した。コチョウランの営利栽培では、人工交配によって作出された交配種が主として利用されているが、交配種はその交配親の組合せにより遺伝的多様性が大きく、培養特性も非常に広い多様性を示す。そこで、主要な交配種系統および交配種作出に寄与の大きい原種について、花茎腋芽由来の不定芽増殖の培養特性を調査した。しかし原種の多くは花茎が短く、利用できる花茎腋芽が少数しか得られなかったため、初期外植片数を揃えて増殖率を比較することは困難であった。そこで、原種または品種において、1開花期に得られる花茎腋芽を初期外植片とし、50個体まで増殖するまでの期間あるいは36か月培養時の個体数で、本手法により増殖可能かどうかを判断した。培養シュートの基部から新たに生じるシュートを切り離すことで増殖させたが、親株との組織のつながりが強く、シュートの縦断切片の切断面が茎組織であるため、PLBあるいは不定胚ではなく、不定芽による増殖であると判断した (データ未掲載)。Table 3より、現在の営利栽培において主要な交配種系統はすべて目標の50個体まで容易に増殖可能であった。また原種においても、*Phalaeopsis* 亜属の種は、*P. shilleriana*を除き、容易に培養増殖可能であった。白花大輪の交配親として最重要と考えられている*P. amabilis*は本手法で容易に増殖可能であり、またこの原種の遺伝的寄与が大きい大輪系統および他の色花系統の交配種も容易に増殖できることが示唆された。これらの白花大輪系統は市場流通量の約9割を占めており、こ

れら広範囲の品種に本手法が適用可能であると判断できる。また、今回培養の難しかった*P. shilleriana*は、これまでの報告^{4,20)}でも花茎培養や花茎腋芽培養など初代培養から大量増殖までの難しい種であり、培地成分だけでなく培養方法の検討も今後必要であろう。対して、*Polychilos* 亜属、*Parishiana* 亜属の種は増殖困難な種が多かった。この属およびこの系統の交配種の培養増殖は、困難であることが示唆されるため、今後培地組成などの改善を検討する必要があるだろう。PSR培地を開発する上で組合わされた成分は、*P. amabilis*の寄与の大きい白花大輪系の培養における有効成分であるため、結果として*P. amabilis*と異なる培養特性を持つ原種への有効性が低くなったと考えられる。

本研究により、PSR培地を用いることでシュートの基部を切り戻しながら、シュートの状態で多くの原種、交配種を維持・増殖できることが示された。生存率ではNDMにおいても高く保たれていたが、PSR培地を用いた培養時のシュートは発根が盛んで葉の展開も速く、鉢出し順化が容易な状態であり、かつ、切り戻しにより植物体を小さくした状態で培養を維持できる。これは、交配種の優良株や原種株を、遺伝子源として維持更新し、保存する上で非常に有用な培養法であると言える。コチョウランの原種は全て、ワシントン条約付属書IIに記載され、国際的な取引が制限され、自然界からの新たな遺伝子源の獲得は困難であるため、既存の遺伝子源の維持が重要となっている。このため本手法は、現在重要度が増している原種の既存の遺伝子源の維持にとっても有用であると考えられる。

コチョウランの培養では、傷応答によるフェノール様物質の影響が他のランと比べて大きい。そのため、培養物に傷を与えないことが重要とされ、手作業による継代操作が行われてきたが、本研究によりシュート切断という傷害操作を行っても、十分な生存率で健全な種苗の育成が可能なが示された。したがって、PSR培地を用いることで、コチョウランの継代培養が自動化できる可能性が示唆され、省力化した植物工場での種苗生産への展開が期待できる。

摘 要

コチョウランの培養では切断面から多量のフェノール様物質が溶出し生存率が低下するため培養が困難である。このため切断を伴う培養に適した培地の開発を目標に研究を行った。開発した修正MS培地 (以下PSR培地) と各種培地に、PLBをPSR培地上で培養増殖させ得られた長さ2 cmのシュートをPLBから切り離して置床し、シュート生存率を比較したところ、修正VW培地に比べ、PSR培地、NDMで値は非常に高かった。またPSR培地では旺盛な葉の展開、根

の形成が見られ、シュートの生育に良好であった。培地中のフェノール様物質を定量したところ、PSR 培地ではエタノール溶性、NDM では水溶性のフェノールが多く溶出していた。また PSR 培地にシュートを置床し、基部に生じた不定芽を切り離すことで増殖させる不定芽増殖法を市場での主要系統およびその交配親となった原種に適用し、品種間差を調査した。試験したすべての交配種および交配親として重要な *Phalaenopsis* 亜属の種はほぼすべて容易に培養可能であり、これ以外の交配品種でも容易に培養可能であると示唆される。以上より、PSR 培地は切断を伴うコチオウランの培養に適しており、この培地を用いた不定芽増殖法は市場の大多数の品種に適用可能であることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究を補助していただいた田中みづき氏、石川藍氏に深く感謝致します。

引用文献

- Christenson EA. *Phalaenopsis*: A Monograph. Timber Press, Inc., Portland, Oregon. 2001.
- Knudson L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1–25. 1922.
- Rotor G. A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. Amer. Orchid Soc. Bull. 18: 738–739. 1949.
- 田中道男. 組織培養によるファレノプシスの栄養繁殖に関する研究. 香川大学農学部紀要. 49: 1–85. 1987.
- Tokuhara K, Mii M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tip of flower stalk buds. Plant Cell Rep. 13: 7–11. 1993.
- Mitsukuri K, Mori G, Johkan M, Mishiba K, Morikawa T, Oda M. Effect of explant source and dark preconditioning on adventitious bud formation in *Neofinetia falcata* H.H.Hu in vitro. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 252–256. 2009.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497. 1962.
- 木村康夫. コチオウラン大量増殖法の改良. 群馬農業研究 D 園芸 6: 33–40. 1991.
- Sagawa Y, Kunisaki JT. Clonal propagation of orchid by tissue culture. In: A. Fujiwara. ed., Plant Tissue Culture 1982. Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp.683–684. 1982.
- Homma Y, Asahira T. New Means of *Phalaenopsis* Propagation with intermodal section of Flower Stalk. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 54: 379–387. 1985.
- 高原美規. コチオウランの *in vitro* cutting による株の更新・増殖と遺伝子型の保存. 育雑 48 (別 2): 278. 1998.
- 寺本貴尚, 周 天魁. 異なる培養方法におけるファレノプシス類の品種間差について. 園学雑. 69 (別 1): 370. 2000.
- Vacin EF, Went EW. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110: 605. 1949.
- Mitsukuri K, Johkan M, Yamasaki S, Tanaka H, Tezuka T, Mishiba K, Oda M. L-2 aminooxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) controls browning and promotes adventitious bud formation in *Neofinetia falcata* in vitro. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 79: 367–371. 2010.
- Knudson L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 15: 214–217. 1946.
- Kotomori S, Murashige T. Some aspects of aseptic propagation of orchids. Amer. Orchid Soc. Bull. 34: 484–485. 1965.
- Tsukamoto Y, Kano K, Katuura T. Instant media for orchid seed germination. Amer. Orchid Soc. Bull. 32: 354–355. 1963.
- Krishna H, Sairam RK, Singh SK, Patel VB, Sharma RR, Grover M, Nain L, Sachdev A. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pretreatments. Sci. Hortic. 118: 132–138. 2008.
- Yin, F, Ge H, Peng K, Zhao L, Zhou Y, Li Q. Relationship between tissue browning and phenolic acids and related enzymes in *Phalaenopsis*. Sci. Agr. Sin. 41: 2197–2203. 2008.
- 窪田浩一, 清水麻美, 國友義博, 藤本俊也. ファレノプシス属およびその近縁属のクローン苗の増殖. 山梨総農試研報. 11: 9–18. 2002.