

# ファレノプシスの根端培養によるPLB形成に及ぼす諸要因の影響

王 裕霞(平成11年度徳島県海外協力研修員 所属:中華人民共和國廣東省林業科學研究員林業研究所)  
・高木和彦・新居宏延

Some effecting factors on the formation of PLB from the root tips cultured in vitro of  
*Phalaenopsis*.

Wang YUXIA, Kazuhiko TAKAGI and Hironobu NII

## 要約

王 裕霞・高木和彦・新居宏延(2000):ファレノプシスの根端培養によるPLB形成に及ぼす諸要因の影響. 徳島農試研報, (36):18~22

ファレノプシスの根端培養によるクローン苗大量増殖技術を確立するため,無菌培養苗由来の根を用い,根端培養によるPLB形成に及ぼす基本培地組成,根の状態,根端の調整法などの諸要因の影響を検討した。

基本培地に無機塩濃度を1/4にしたMS培地を用いると根端の活着率,PLB形成率が向上した。長さ2~3mmの短い根は,培養後1ヵ月未満からPLB形成が高率で認められ,最終形成率も100%となった。根端培養前の殺菌処理は,根端先端からのPLB形成を促し,PLB形成率が著しく向上した。

キーワード:ファレノプシス,根端培養,培地組成,殺菌処理

## はじめに

ファレノプシスは単茎性ラン類であり,栄養体繁殖法による繁殖率が低い植物である。このため,現在は実生苗を用いた栽培が主流であるが,実生苗は生育や品質が不均一であり,生産管理面で多くの問題を抱えている。

そこで,これらの対策としてクローン苗の利用が検討され,花茎腋芽<sup>2)</sup>,あるいは花茎腋芽から再生させた幼植物体の葉片<sup>1,2,4,6)</sup>を培養し,誘導したPLB(protocorm like body)を利用したクローン苗大量増殖技術が報告され,すでに実用化されている。しかし,個体によりPLB形成能に大きな差があり,葉片培養ではその形成率が低い,あるいは形成されないなどの問題もある<sup>1,4,6)</sup>。

一方,根端は培養材料としては豊富で,採取も容易であり,かつ母体の損傷も少ないと考えられ<sup>2)</sup>,わずかではあるが,根端培養によるPLBの誘導が報告されており,根端も栄養系個体の増殖材料として十分に可能性があることが示唆されている<sup>2,5,7)</sup>。

とくに小林ら<sup>2)</sup>は,若い実生苗と成株の根端を培養し,いずれもPLBを誘導・形成させているが,これらの部位のPLB形成率は,成株の殺菌処理後培養した根端が65%で最も高く<sup>2)</sup>,無菌株由来の根端はすべて40%以下の形成率で低かった<sup>5)</sup>。また,根端置床からPLB形成開始までの期間は,多くの場合1ヵ月以上<sup>2)</sup>,もしくは3ヵ月以上<sup>5,7)</sup>要しており,実用化にはさらに基礎的な研究が必要とされている。

そこで,本研究では,根端培養によるクローン苗大量増殖技術を確立するため,根端からのPLB形成に及ぼす基本培地組成,根および根端の長さ,殺菌処理等の要因の影響について検討したので報告する。

## 試験方法

材料は,選抜実生優良個体の花茎から再生させた幼植物体の葉片を培養し,誘導したPLBから得られたフラスコ苗の根および根端を第1図に示すように採取し用いた。

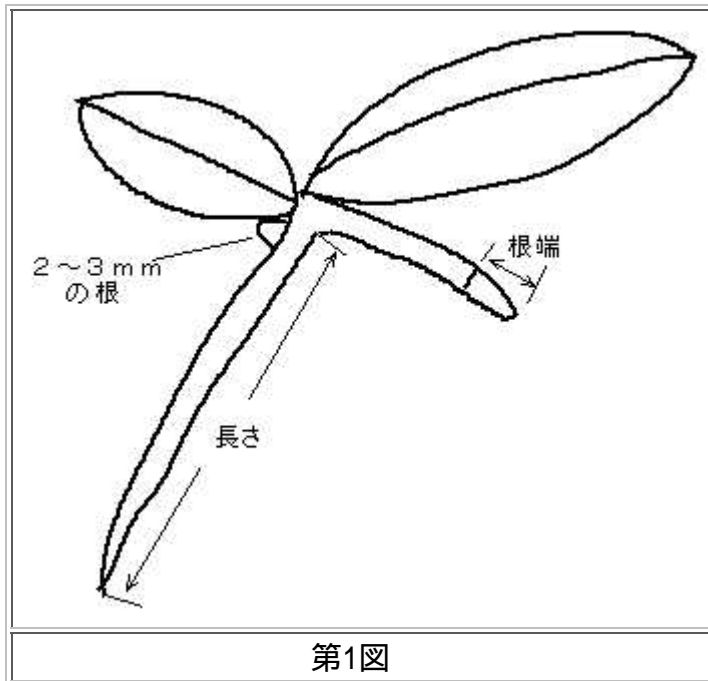
培養条件は,1~4の試験の共通条件として,基本培地以外の培地組成は,6-ベンジルアミノプリン(6-benzyl aminopurine)5.0mg/L,ナフタレン酢酸( $\alpha$ -naphthalene acetic acid)0.05mg/Lとアデニン(Adenine)50mg/L,シヨ糖は0.5%,ゼランガムは0.25%,pHは5.6に調整した。培養容器は直径

25mm × 高さ110mmの平底試験管を用い、培地を10mLずつ分注した。

調整した根端(各試験区分別に根端約2～6mmの長さをメスで切断, 第1図参照)を各試験管に1個ずつ, 先端を上向きにして置床した。

培養は置床後1ヵ月間は25℃, 暗黒下, その後2ヵ月間は約40lxの16時間日長下で行った。

調査は, 根端活着率, 置床後1, 2, 3ヵ月目のPLB形成率, およびPLB形成部位を調査した。



## 1 基本培地および濃度

材料は選抜個体A-1, 1のフラスコ苗の長さ約2cmの根の根端部約3mmを用いた。

培地は, MS培地<sup>5)</sup>の無機塩濃度を1/3および1/4にした1/3MS, 1/4MS培地とHyponex<sup>R</sup> (N - P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - K<sub>2</sub>O = 6.5:6:19)の0.67g/L, 0.5g/L培地とした。

供試数は各区15個とした。

## 2 根の長さおよび色

材料は, 選抜個体A-1, 1の苗化培養開始後約5ヵ月目のフラスコ苗の根端を用いた。

試験区は, 根の長さ0.2～0.3cm(第1図参照), 同じく長さ4cmで色は緑と紫の3区とした。

長さ0.2～0.3cmの根はそのまま, 4cmの根は根端部約6mmを採取し, 培養に用いた。

基本培地は, 1/4MS培地を用い, 供試数は15個もしくは20個とした。

## 3 根の殺菌処理および根端長

材料は, 選抜個体A-1, 1のフラスコ苗の根(長さ約2cm)を用いた。

殺菌方法は, 採取した根を70%エタノール溶液で30秒間, 界面活性剤(Tween20<sup>R</sup>)を入れた有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に5分間浸した後, 滅菌水で3回洗浄した。

試験区は, 殺菌処理の有無と長さ3mm, 6mmに調整した根端を組み合わせた4区を設けた。

基本培地1/4MS培地とし, 供試数は各区16個とした。

## 4 殺菌処理, 根の長さとPLB形成率および形成部位

材料は, 選抜個体R.M-1, 4のフラスコ苗の根を用いた。

殺菌方法は3と同じとした。

試験区は, 殺菌処理の有無と採取した根の長さ(0.5, 1.0, 2.0cm)の組合せによる6区を設けた。

殺菌処理後、長さ1cm以上の根は、根端部約6mmを用い、0.5cmの根は底面を約1mm切除後、置床した。

基本培地は、Hyponex<sup>R</sup>0.67g/Lを用いた。

## 試験結果

### 1 基本培地および濃度

培養開始1および2ヵ月後の根端のPLB形成状況を第1表に示した。PLBは、培養開始後1ヵ月目には形成が始まっており、その後も継続して形成が認められた。

培養後2ヵ月目の根端活着率は、MS培地では93～100%と高い値を示したが、Hyponex<sup>R</sup>培地では枯死PLBが発生したため、67～73%と低くなった。

最終のPLB形成率は、1/3MS培地では14%と低かったが、その他の培地はいずれも27%であった。

第1表 根端培養における基本培地とPLB形成状況(個体番号:A-1, 1)

基本培地	根端活着率(%)	PLB形成率(%)	時期別PLB形成率	
			置床～1ヵ月(%)	1～2ヵ月(%)
1/3MS	93	14	7	7
1/4MS	100	27	20	7
Hyponex 0.67g/L	73	27	20	7
" 0.50g/L	67	27	20	7

注)根端活着率:培養開始2ヵ月後調査, PLB形成率:PLB形成根端数 / 供試数 × 100

### 2 根の長さおよび色

培養開始後1, 2, 3ヵ月目の根端のPLB形成状況を第2表に示した。

長さ0.2～0.3cmの根は、根端活着率、PLB形成率とも100%であり、暗黒条件下で培養中にPLB形成を開始した根端が80%と多く、長さ4cmの根の根端と比べPLB形成開始時期が早い傾向にあった。

根の色では、緑の根の根端活着率は100%であったが、紫の根の根端の活着率は半数が枯死したため、50%と低率になった。

第2表 根端培養における根の状態とPLB形成状況(個体番号:A-1, 1)

根の状態		供試数	根端活着率(%)	PLB形成率(%)	時期別PLB形成率		
長さ(cm)	色				置床～1ヵ月(%)	1～2ヵ月(%)	2～3ヵ月(%)
4	緑	15	100	34	20	7	7
4	紫	20	50	15	0	10	5
0.2～0.3	-	15	100	100	80	20	0

注)根端活着率:培養開始1ヵ月後調査

PLB形成率:PLB形成根端数 / 供試数 × 100

### 3 根の殺菌処理および根端長

培養開始後1, 2, 3ヵ月目の根端のPLB形成状況を第3表に示した。

PLB形成率は、殺菌処理を行った根端では無処理の根端と比べ長さ3mmで19%、6mmで30%高かった。

根端長とPLB形成の関係では、殺菌処理の有無にかかわらず長さ3mmの根端が6mmの根端よりPLB形成開始時期が早く、形成率も高くなった。

第3表 根端培養における殺菌処理および根端長とPLB形成状況(個体番号:A-1,1)

殺菌処理	根端長(mm)	PLB形成率(%)	時期別PLB形成率		
			置床～1ヵ月(%)	1～2ヵ月(%)	2～3ヵ月(%)
有	3	88	38	50	0
	6	74	6	56	12
無	3	69	19	50	0
	6	44	0	38	6

注)PLB形成率:PLB形成根端数 / 供試数 × 100

#### 4 殺菌処理,根の長さともPLB形成率および形成部位

培養開始後1,2,3ヵ月目の根端のPLB形成率とその根端上の形成部位を第4表に示した。

殺菌処理を行った根端では,長さ1cmの根から採取した根端はすべてPLBを形成した。しかし,無処理では最も高い長さ0.5cmの根の形成率においても47%と低かった。

PLB形成部位については,殺菌処理を行った根端はその先端にPLBが形成されたものが多く,無処理の根端では先端にPLBは形成されず,先端近くと根端底面切り口付近に形成したものが認められ,その形成率の平均はそれぞれ58%,42%であった。

第4表 根端培養における殺菌処理及び根の長さともPLB形成状況(個体番号:R.M-1,4)

殺菌処理	根の長さ(cm)	PLB形成率(%)	部位別PLB形成率		
			先端部(%)	先端部付近(%)	底面切り口(%)
有	0.5	88	43	50	7
	1.0	100	100	0	0
	2.0	88	100	0	0
無	0.5	47	0	57	43
	1.0	27	0	50	50
	2.0	20	0	67	33

注)PLB形成率:PLB形成根端数 / 供試数 × 100

## 考察

本研究では,フラスコ苗の根端を培養材料として,PLB形成に及ぼす培地条件,根の状態,根端の調整方法,殺菌処理などの諸要因の影響を検討した。

基本培地組成について(小林ら<sup>2)</sup>)は,MS,1/2MS,1/3MS培地の中で,無機塩およびショ糖濃度が低いほど根端のPLB形成率が高く,1/3MS,ショ糖濃度0.5%の培地条件で40%の分化率を示したと報告している。

そこで,基本培地として1/3MS培地と,さらに無機塩の濃度を薄くした1/4MS,Hyponex<sup>R</sup>0.67g/LおよびHyponex<sup>R</sup>0.50g/L培地を検討したところ,PLB形成率は27%と小林の形成率よりは低率ではあったが,1/4MS培地で最もPLB形成率が高かった。しかし,2種類のHyponex<sup>R</sup>培地は根端の活着率が低かったが,PLB形成率は高かった。このことは,さらに貧栄養状態にすることでPLB形成率が向上する可能性を示している。

次に,培養した根端の由来<sup>2,5,7)</sup>や長さ<sup>5,7)</sup>によってもPLB形成率が異なることが報告されている。そこで,基本培地にPLB形成率の高かった1/4MS培地を用い,フラスコ苗由来の根の長さおよび色とPLB形成率との関係を検討したところ,根端活着率やPLB形成率に大差が認められた。とくに本試験で用いた発生間もない長さ2～3mmの根は,培養開始後2ヵ月のうちに100%の根端がPLBを形成し,田中<sup>5)</sup>が実生苗の3mmの根端を1/2MS培地で培養した場合の形成率40%を大きく上回った。

従って,根の生理状態もPLB形成能に関係すると考えられ,発生間もない長さ2～3mmの若い根の根

端は、細胞の活性が高く、かつPLB形成能も高いと推察され、さらに栄養条件面から検討を加えれば、根端培養における最も有望な部位になる可能性があると考えられる。

なお、緑色の根の根端は紫色の根の根端と比べ、活着率、PLB形成率ともに高かった。

殺菌処理の影響については、小林ら<sup>2)</sup>は殺菌処理によってPLB形成率が向上したことから殺菌中の刺激がPLB分化に影響を及ぼしたのではないかと推察している。

今回、殺菌処理が根端のPLB形成に及ぼす影響を観察したところ、殺菌処理をするとPLB形成率が高まり、さらに、長さ3mmの根端が従来用いられていた6mmの根端よりPLB形成率が高くなった。また、殺菌処理とPLB形成部位との関係を調査したところ、殺菌処理によってPLBは主に根端先端部から形成されていることが明らかになった。しかし、無処理では、先端部からの形成は認められず、ほとんどのPLBが先端近くや根端底面切口などに形成されていた。

これは、殺菌処理中に根端の表面細胞層が傷められ、これらの分裂増殖能が抑制された反面、根端先端の中心部にある生長点は十分な栄養分を供給され、分裂増殖能力が向上し先端部からPLBが形成されたのではないかと推察される。従って、根端からのPLB形成過程を明らかにし、その形成率をより高めることで根端培養によるクローン技術を実用化することが今後の課題である。

## 摘要

ファレノプシスの根端培養によるクローン苗増殖法実用化技術を確立するため、フラスコ苗由来の根端を用い、根端培養によるPLB形成に及ぼす基本培地条件、根の状態、根端の調整方法などの諸要因の影響を検討した。

1) 1/3, 1/4MS, Hyponex<sup>R</sup>0.67g/L, Hyponex<sup>R</sup>0.50g/Lの4種類の基本培地でPLB形成状況を検討したところ、1/4MS培地は根端活着率とPLB形成率が最も高かった。

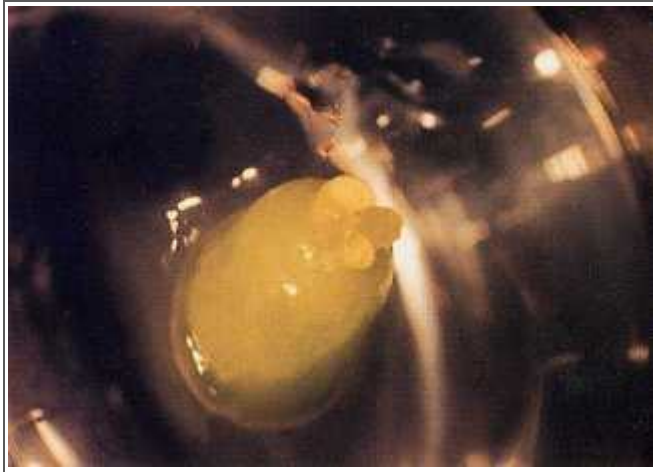
2) 長さ約2~3mmの若い根は、PLB形成が早く、形成率は100%であった。長さ4cmの根では、紫色の根端は活着率が低く、PLB形成率は緑色の根端は紫色の根の根端の約2倍であった。

3) 培養前の殺菌処理は、PLBの誘導と形成を促し、根端長は3mmが6mmよりPLB形成率が高く、形成時期も早くなった。また、その場合PLBは、根端の先端、先端の近く、根端底面切口などの部位から形成が確認された。

謝辞: この研究実施にあたり、ご指導およびご支援をいただいた育種科の方々に心から感謝の意を表する次第であります。

## 引用文献

- 1) 木村康夫(1991): コチョウラン大量増殖法の改良. 群馬農業研究D園芸6:33~40.
- 2) 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, 栃木農試研報, 37:57~70.
- 3) Murashige, T. and F. Skoog(1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473~497.
- 4) 周天甦, 寺本貴尚, 高山美穂子, 小林千裕(1997): ファレノプシスのクローン増殖における問題点 - 品種間差異, 培養変異など -. *農耕と園芸*, 52(2):88~91.
- 5) M. Tanaka, Y. Senda and A. Hasegawa(1976): Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 45:1022~1024.
- 6) 田中道男(1987): 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. *香川大学紀要*, 49:1~85.
- 7) 米田和夫, 百瀬博文(1988): ファレノプシスの根端培養について. *日大農獣医研報*, 45:191~196.



根端先端部に形成されたPLB



根端先端付近に形成されたPLB



根端から再成した植物体