

短報

## ラン新品種 *Ascocenda Singa Chiba* の組織培養による大量増殖

伊東 靖之

キーワード：アスコセンダ、大量増殖、組織培養、褐変、マルトース

### I 緒 言

*Ascocenda* は、多花性で花色が変化に富む小型の着生ラン *Ascocentrum* と、同じく大型で着生ランを代表する *Vanda* の属間交配から1949年に登録された人工属である。それぞれの交配親の良い形質を備えていることから人気が高く、交配種が多数作出されている (渡辺, 1989)。*Ascocenda Singa Chiba* はシンガポール国立植物園において1985年 *V. Josephine van Brero* × *Ascocenda David Parker* の交配により作出され、草姿は *Vanda* に似た大型で、ピンク色の多花性品種である。

千葉県南房パラダイス (館山市) とシンガポール国立植物園とは1990年の姉妹園提携調印後、盛んに交流が行われるようになった。1993年6月の園内施設再整備の完成を祝う式典の席上、その名前が示すように千葉県とシンガポールの友好の印として駐日シンガポール大使より千葉県知事に当該品種2株が贈呈された。これを受けて千葉県観光公社において同花の品種保存と県内外へ広く普及することを目的に組織培養による増殖が計画され、同年7月県観光物産課から千葉県農業試験場 (現千葉県農業総合研究センター) へ正式な協力依頼があった。

ラン類の増殖は無菌実生やメリクロンが一般的に行われている。また、*Phalaenopsis* 等では花茎培養も可能である (TOKUHARA and MII, 1993)。しかし、培養の難易は種や品種によって異なり、用いる培地によっては容易に組織が褐変することも少なくない。一方、本試験に供試できる材料が稀少であったことから、予備的に近縁品種を用いた茎頂培養や当品種を用いた花茎培養を行った。しかし、通常の方法 (加古, 1985; 角田・富岡, 1976) では、初代培養においてほとんどの外植体は褐変してしまい、培養系を確立することはできなかった。そこで、培地に添加する糖をマルトースに換えるなど数種の改良を加えて1994年6月より改めて培養を行ったところ、安定的に増殖できる系の作出に成功したので報告する。

本研究を実施するに当たり、らんの里堂ヶ島研究開発センターの徳原 憲 室長から貴重な情報と助言を頂いた。ここに記して深謝の意を表する。

### II 材料および方法

#### 1. 茎頂培養による増殖法の確立

A. *Singa Chiba* の主茎部分を生長点を含むように切断し、葉を丁寧に切除した2cm長の茎頂部を70%エタノールで1分間、有効塩素1%濃度の次亜塩素酸ナトリウムに15分間浸漬して表面滅菌を行った。その後、滅菌水で3回洗浄した。これを供試材料として実体顕微鏡下で無菌的に頂芽および腋芽の生長点 (0.3~0.5mm大、11芽) を摘出した。初代培養には無機塩類濃度のみを1/2としたMS培地 (MURASIGE and SKOOG, 1962) を基本に3% (w/v、以下同様) マルトースおよび0.2%ゲルライトを添加した培地を用いた。植物生長調節剤としては0.1mg/l  $\alpha$ -ナフタレン酢酸 (以下NAAとする) および1.0mg/l 6-ベンジルアミノプリン (以下BAとする) を添加した。pHは5.4とした。培養条件は以下すべて25°C、16時間明条件とした。

培養開始30日後、形成したプロトコーム様球体 (以下PLBとする) を同組成培地に移植した。これを1~2ヶ月間隔で継代培養することにより増殖を促した。このPLBから形成した多芽体を、培地支持体であるゲルライト濃度を0.2%から0.8%に高めた培地に移植した。さらに2~3週間後に発根を確認した正常個体を1個体ずつ分割し、植物生長調節剤を含まない培地 (1/2MS、3%ショ糖、1%寒天、0.1%活性炭、pH 5.8) に移植した。その後、3~4葉 (約5~7cm長) に生育させた発根個体を水苔を用いて順化した。

#### 2. 培養物の褐変症状発生に及ぼす糖の影響

前試験で増殖した多芽体を用いて、培養中の褐変症状の発生率と添加する糖の種類および濃度の関係について検討した。添加する糖はショ糖およびマルトースとし、各濃度を1%、3%とした。さらにpH値を5.2および5.8

に設定した。それ以外は前述した継代培地・培養条件に準じた。供試数は1区72個体とした。

また、供試する多芽体組織の大きさを3段階（大；5～7mm、中；3～4mm、小；2mm以下）に設定し、褐変症状の発生に及ぼす影響を調査した。糖の種類および濃度は前記と同じ試験区とし、pH値は5.8とした。供試数は1区27個体とした。

### Ⅲ 結果および考察

#### 1. 茎頂培養による増殖法の確立

添加する糖をマルトースとして*A. Singa Chiba*の茎頂培養を行った結果、供試した11芽の生長点組織のいずれからも褐変症状は認められず、培養開始30日後には1～2mm大のPLBを形成した。2mm程度のPLBを同組成培地で継代することにより、移植30日後には組織の肥大、増殖が良好となった。さらに30日後には多芽体状の茎葉分化を確認した（写真1-①、②）。

この時点での特徴は、増殖は非常に旺盛であるが組織は水浸状を呈していた。通常、この状態のままでは正常個体として伸長並びに発根する可能性は極めて低い。この解消法としては通気性の改良やバクトペプトンの添加等の報告（SATO et al., 1993）があるが、この品種の場合、ストックの培養（摺崎ら, 1995）と同様に培地支持体の濃度を高めることが最も効果的であった。すなわち、ゲルライト濃度を0.2%から0.8%に換えた培地に約1cm大の多芽体を移植することにより、わずか1週間で水浸状態が消え正常個体となった。さらに1～2週間で発根が確認された（写真-③～⑤）。ただし、この段階まで植物生長調節剤（0.1mg/NAAおよび1.0mg/BA）を添加していることが必須条件で、植物生長調節剤を含まない培地に水浸状を呈したままの多芽体を移植した場合は、ほとんどの個体が褐変した。

正常に発根した個体は植物生長調節剤を含まないショ糖培地で培養することにより、マルトース培地と比較して生育がより良好となった。3～4葉（約5～7cm長）以上に生育した個体は水苔を用いた培養土で容易に順化できた。

以上の方法で*A. Singa Chiba*の組織培養による大量増殖が確立でき、1995年2月には450mlの培養ビンで約50本（写真1-⑥、順化可能株400～500本）を南房パラダイスに譲渡することができた。なお、培養株を当場の温室内で順化し養成した結果、順化後3年目（1998年）頃から開花が認められた（写真2）。

#### 2. 培養物の褐変症状発生に及ぼす糖の影響

培養開始30日後の結果では、ショ糖区において明らか

第1表 *Ascocenda Singa Chiba*の組織培養における褐変症状発生に及ぼす糖の種類と濃度および培地のpHの影響

糖の種類	糖の濃度 (%)	褐変発生率 (%)	
		pH 5.2	pH 5.8
ショ糖	1.0	65.2	47.2
	3.0	97.2	86.1
マルトース	1.0	2.8	2.8
	3.0	0	0

に褐変症状が多く認められた。特に、濃度の高い3%区においてその頻度が高かった。一方、マルトース区では1%区で若干確認されたが、3%区では全く発生が認められなかった（第1表、写真3）。

この結果から、培地に用いる糖にマルトースを使用することで実用上の障害となる褐変発生の被害を容易に回避できることが明らかとなった。また、pHの影響についてはショ糖区では5.2で褐変発生率が高い傾向がみられたが、マルトース区ではほとんど発生せず、主要な原因ではないと判断された。

供試する外植片組織の大きさが褐変症状に及ぼす影響は、ショ糖区の褐変発生率から明らかなように、小さい組織ほど被害程度が大きくなる結果となった。本試験においてもショ糖区の3%区で最も多発生となった。また、マルトース区では、1%添加した場合にのみ小さな外植片組織で発生したが、発生率はきわめて少なかった。このことから、マルトースを添加することにより、外植片組織の大小にかかわらず、褐変の発生を防止できることが明らかになった（第2表）。

第2表 *Ascocenda Singa Chiba*の組織培養における褐変症状発生に及ぼす糖の種類と濃度および外植片組織の大きさの影響

糖の種類	糖の濃度 (%)	褐変発生率 (%)		
		大 <sup>1)</sup>	中	小
ショ糖	1.0	7.4	59.3	70.4
	3.0	77.8	96.3	96.3
マルトース	1.0	0	0	7.4
	3.0	0	0	0

#### 1) 外植片組織の大きさ

大;5～7mm、中;3～4mm、小;2mm以下

今回供試した*A. Singa Chiba*の培養ではマルトースを添加することで褐変を回避できたが、ラン類をはじめとして、褐変発生の多い他の作物においてもマルトース利用の検討は価値あるものと考えられた。

#### IV 摘 要

千葉県南房パラダイス（館山市）と姉妹園提携のあるシンガポール国立植物園から友好の印として1993年6月にラン新品種 *Ascocenda Singa Chiba* が贈呈された。そこで、このランの大量増殖を目的に組織培養を行った。

初代培養は3%マルトース、0.2%ゲルライト、0.1mg/ℓ NAAおよび1.0mg/ℓ BAを添加した1/2MS培地でPLBを誘導し、同組成培地で培養することにより、多芽体の形成および増殖が可能となった。この多芽体は培地支持体であるゲルライトの濃度を0.8%に換えて培養することにより、正常な発根個体を獲得することができ、大量増殖に成功した。

また、培地の炭素源を通常のショ糖とした場合には褐変個体が多く発生し、マルトースを用いることが必須条件と考えられた。

#### V 引用文献

加古舜治(1985). 園芸植物の器官と組織の培養. 増補版.

228-231. 誠文堂新光社. 東京.

MURASHIGE, T. and T.SKOOG (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.

SATO, S., M. HAGIMORI and S. IWAI (1993).

Recovering vitrified carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoots using Bacto-Peptone and its subfractions. *Plant Cell Reports.* 12. 370-374.

摺崎宏・一条利治・見持洋司 (1995) 未熟胚由来カルスによるストックの増殖. 園学雑. 64 (別2). 586-587.

TOKUHARA, K. and M. MIH, (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports.* 13. 7-11.

角田昌一・富岡美子 (1976). *Vanda* の茎頂培養とくに培養する茎頂のexplantの大きさについて. 昭和51年秋園芸学会研究発表要旨. 246-247.

渡辺尚一 (1989). 園芸植物大事典5. 250-252. 小学館. 東京

## Mass propagation of *Ascocenda Singa Chiba* by tissue culture

Yasuyuki ITO

Key words : *Ascocenda*, Mass propagation, tissue culture, browning, maltose

### Summary

A new intergeneric hybrid orchid variety *Ascocenda Singa Chiba*, bred in the Singapore Botanic Gardens' breeding programs, was presented to Chiba Prefectural Botanical Garden Nambo Paradise for the symbol of friendship as a sister garden, in June 1993.

For mass propagation of this orchid, the method of tissue culture was developed as follows.

Protocorm-like bodies (PLBs) were initiated from shoot tip meristem using 0.2% (w/v) gelrite solidified 1/2 Murashige and Skoog (MS) medium containing 0.1mg/ℓ  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), 1.0mg/ℓ 6-benzylaminopurine (BA) and 3% (w/v) maltose. These PLBs were subcultured on the same medium for more propagation and to induce the multiple shoots. After the shoots were transferred to 0.8% (w/v) gelrite solidified medium, the rooted and normal plantlets were developed. The results suggest that a maltose application is essential as a carbohydrate source in these culture, instead of a sucrose application which caused browning injury by initial- and sub-cultures.

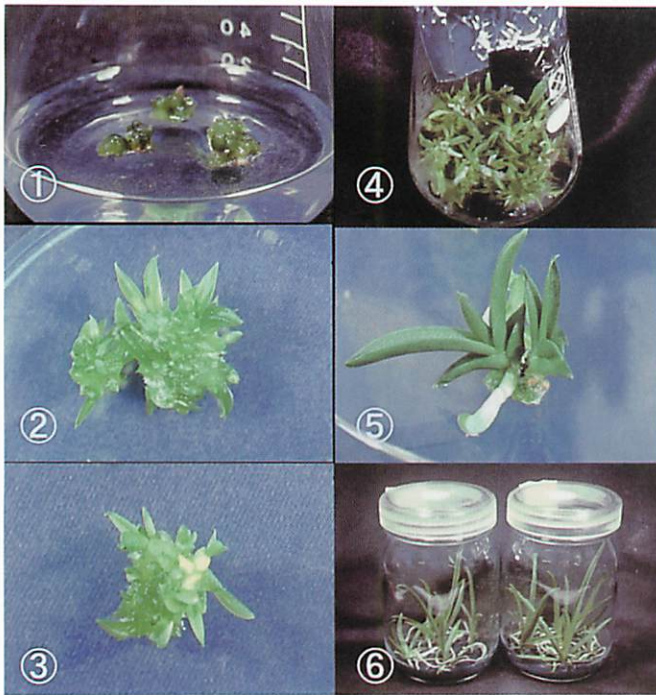


写真1 *Ascocenda Singa Chiba* の培養過程

- ①：PLB（プロトコーム様球体）、②：水浸状で分化開始
- ③：水浸状が一部正常化、④旺盛な増殖（発根開始）
- ⑤：発根した幼植物、⑥：茎葉伸長させた順化前の状況



写真2 *Ascocenda Singa Chiba* の開花状況  
(順化後5年目の株)

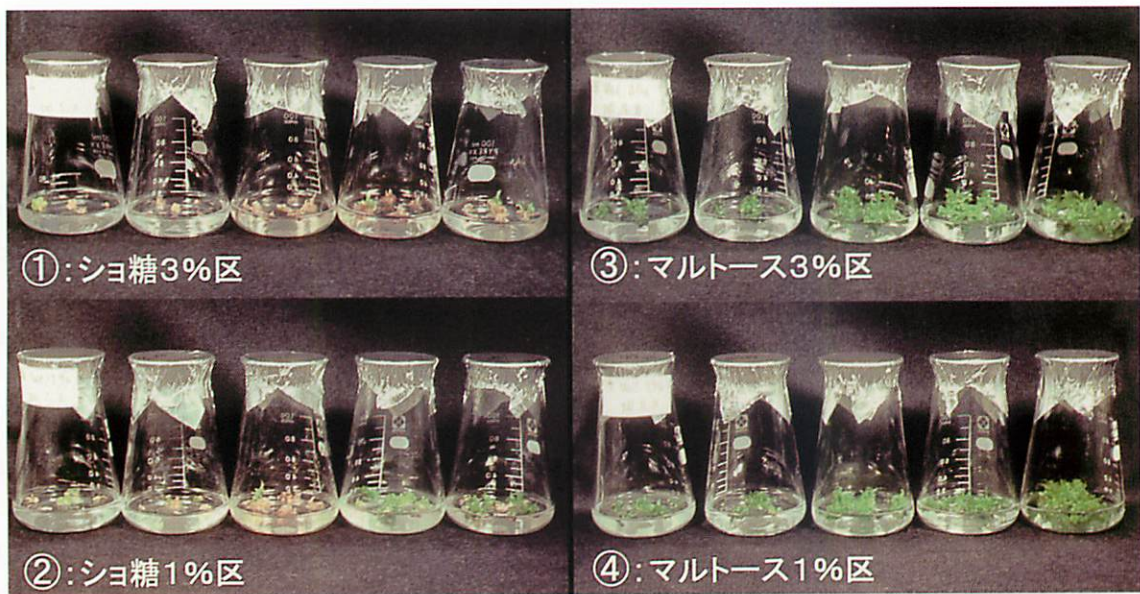


写真3 培養物の褐変症状に及ぼす培地に添加する糖の種類・濃度の影響  
供試材料：*Ascocenda Singa Chiba* の培養細胞（PLB～多芽体）  
置床30日後の状況を示す