

ウチヨウラン(*Orchis graminifolia* Tang et Wang.)の低温処理による短期苗育成法

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	雨宮,圭一 米田,和夫 望月,太
発行元	園芸学会
巻/号	3巻4号
掲載ページ	p. 373-376
発行年月	2004年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ウチ ヨ ウラン (*Orchis graminifolia* Tang et Wang.) の低温処理による短期苗育成法雨宮圭一^{1*}・米田和夫²・望月 太^{1**}¹山梨県総合農業試験場 407-0107 北巨摩郡双葉町²日本大学生物資源科学部 252-8510 藤沢市亀井野Seedling Raising Method in a Short Period by Low Temperature Treatment of *Orchis graminifolia* Tang et Wang.Keiichi Amemiya^{1*}, Kazuo Yoneda² and Tohru Mochizuki^{1**}¹Yamanashi Agricultural Research Center, Futaba, Kitakoma, Yamanashi 407-0107²College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510

Summary

Raising seedlings of *Orchis graminifolia* Tang et Wang. in a short period by the low temperature treatment *in vitro* culture method was investigated.

1. The number of seedlings per capsule was increased in immature seeds (1.5 months after cross breeding), compared with that of mature seeds (2.5 months after cross breeding).
2. The number of seedlings per 1/2 capsule on barley liquor medium, was larger than that on Hyponex medium.
3. It was possible to plant seedlings forming tuberous roots into soil directly without acclimatization after 5°C treatment for 2 weeks in a culture container. This culture method shortened the raising of seedlings by about 2 months compared with that of the conventional method.
4. Tuberous root over 6 mm in major axis showed stable acclimatization and growth.

キーワード：無菌培養，種子の完熟度，低温処理，ウチヨウラン

諸 言

ウチヨウラン (*Orchis graminifolia* Tang et Wang.) は、関東以西の山野の岩壁に自生する多年草の小型野生ランで、花色は赤から白を中心に豊富である。本種は趣味家の間では人気が高く、自生地では乱獲により年々減少している。

近年、本種は趣味家だけでなく、直売所などを通じて地域特産の山野草として販売されるようになり、その需要が増加している。こうした需要にこたえるためには苗の安定供給が求められている。

これまでウチヨウランの種子発芽に関する研究が、いくつか行われている(木本, 1990; 小峰・岩田, 1994; 長島, 1989)。これらの報告や趣味家の手引き書などでは、交雑種子を無菌播種することにより容易に苗が得られている。しかし、発芽して莖葉を展開した後、培養した苗では地上部が枯死して生育が停滞してしまう。生育を再開させるために木本(1990)は5°Cの冷蔵処理を行って

る。しかし、どのくらいの処理期間が必要か、またその後の鉢上げまでをどのように管理するかについては十分な見がない。

そこで、本実験ではウチヨウランの無菌培養での適切な播種条件および得られた苗の生育を再開させるための低温処理期間を明確にすることより、播種から鉢上げまでの期間短縮について検討した。

材料および方法

材料は1997年7月11~13日に山梨県総合農業試験場で栽培していたウチヨウラン (*Orchis graminifolia* Tang et Wang.) の花を交雑して得た種子を用いた。以下の各実験とも共通して、培地のpHは5.8に調整し、滅菌はオートクレーブで121°C, 15分間行った。培養時の温度は25°C恒温とし、光は播種後1か月間は暗黒、その後は白色蛍光灯により3,000 lxの照度で18時間照射とした。

1. 無菌発芽条件の検討

交雑親5系統間の6組み合わせにより得られた未熟種子(黄色, 交雑後約1.5か月)及び完熟種子(褐色, 交雑後約2.5か月)を材料(第1表)とし、水道水に界面活性剤を1滴添加した溶液で蕨の表面を洗浄後、水道水で洗い流し

2003年12月11日 受付, 2004年5月11日 受理.

* Corresponding author

** 現在: 山梨県立農業大学校

第1表 交配親に使用した母株と交雑の組み合わせ

記号	系統名	交配組み合わせ(♀×♂)
B	純白	B×H, B×I
E	白一点	
H	ヒミコ	H×B
I	ボカシ連舌	I×E, I×K, I×H
K	ヒミコ系	

た。その後はクリーンベンチ内で70%エタノールを30秒間及び有効塩素1%のアンチホルミン溶液を10分間の順で表面殺菌を行い、最後に滅菌水で洗浄した。培地にはハイポネックス(6.5-6-19, 1.5 g/l)またはオオムギ種子(品種ミノリムギ, 25 g/l)の煮汁の2種類を基本培地に寒天7 g/lを加えたものを用いた。オオムギ種子の煮汁は、種皮の付いているオオムギ25 gを蒸留水1,000 mlで1時間炊き、ガーゼで濾過した液を冷却後、蒸留水を加えて再度1,000 mlとして調製した。培地を加熱溶解後、培養容器(6×6×7 cm)に50 mlを分注した。

1) 種子の熟度

未熟種子と完熟種子の比較では、蒴1個中のすべての種子を培養容器1個に播種して、発芽種子数を調査した。培地にはオオムギ煮汁培地を用いた。

2) 培地の種類と糖の添加の効果

2種類の培地(ハイポネックス, オオムギ煮汁)と糖(スクロース)添加の有無により、第3表のような試験区を設定した。未熟蒴1個をペトリ皿上で1/2に分割し、その全種子を各区とも培養容器1個に播種した。また糖添加区では、スクロース20 g/lを加えた。

2. 培養苗の順化、鉢上げ条件の検討

以下の各実験に供試した苗は未熟種子(交雑1.5か月)をオオムギ煮汁培地に無菌播種して育成したI×Hの交雑由来苗で、1)~3)では長径約5 mmの球根をつけたものを用いた。

1) 順化、鉢上げ後の苗の生育

材料は各試験区当り10個体を用いた。順化は、パーミキュライト(50 ml)にハイポネックス3,000倍液(20 ml)を入れたイチゴパックに培養容器から出した苗を植え、室温下(10~25°C)に1か月間おいた。その後、これらの苗を市販の山草用土で鉢上げし、無加温温室内で育苗した。順化開始時期は1998年4月2日で、鉢上げは5月1日で、葉長、葉数を順化開始から1か月おきに測定した。

2) 低温処理と鉢上げ後の生育促進

一時的に生育の停滞した苗の生育再開を促進させる低温処理の効果について検討するため、苗を順化前の培養容器に入ったままの状態、または1)のイチゴパックに植えた順化時の状態で5°Cの低温処理を行い、その後の生育を調査した。実験区は①イチゴパックに植えた状態で20°C恒温に設定したインキュベータ内で1か月間処理した後に鉢上げする区(対照)、②イチゴパックに植えた状態で20°C、4週間の順化終了後、そのまま5°C、4週間低温処理して鉢上げする区、③順化前の培養容器に入っている状態で5°C、4週間低温処理後、順化をせずに直接、鉢上げする区の3区を設けた。各処理区当り20個体(培養容器1個当り5苗を植えたもの4容器)用い、処理終了後に鉢上げしてその2週間後に生育を調査した。調査は1999年4月に行った。

3) 低温処理期間と鉢上げ後の生育促進

5°Cで1, 2, 3及び4週間の低温処理を行う区を設けた。低温処理は地上部が枯れた苗20個体(培養容器1個当り5苗を植えたもの4容器)を培養容器ごと5°Cの暗黒下に置いた。処理終了後に容器から出して順化せずにそのまま鉢上げし、1か月後に生育を調査した。

4) 球根の大きさと鉢上げ後の活着

培養容器内で5°C、2週間の低温処理を行った球根を大球(長径6~8 mm)と小球(長径2~3 mm)の2段階の大きさに分け、順化しないで直接、鉢上げして3か月間育苗した後の生存個体数を調査した。各段階20個体を供試した。

結果および考察

1. 無菌発芽条件の検討

種子の熟度と発芽の関係に関しては、ラン科植物のエビネ類などの野生ランやフェレノプシス類などでは未熟種子が完熟種子より発芽しやすいという報告がある(坂本, 1985;長島, 1990)。本実験でも未熟種子の方が完熟種子に比べて、発芽蒴数はやや少なかったが、1蒴当りの平均発芽種子数は全体で60%ほど多かった(第2表)。また、未熟種子の方が発芽数が多い傾向は供試した交雑組合せすべてでみられた。(データ未掲載)。

これまでウチョウランの胚発達に適した培地としてハイポネックス、MSやエンバクの煮汁などが用いられてい

第2表 未熟種子と完熟種子が発芽に及ぼす影響²⁾

種子の熟度	供試蒴数 ³⁾	発 芽		1蒴当りの 平均発芽種子数
		蒴数	蒴率 (%)	
未熟(交配後1.5か月)	36	13	36	20.1
完熟(交配後2.5か月)	42	18	43	12.0* ⁴⁾

²⁾ 調査結果は無菌播種5か月後

³⁾ 交雑組み合わせはB×H, B×I, H×B, I×E, I×Kで、数値はこれらの合計値

⁴⁾ * は χ^2 検定により5%水準で有意差あり

第3表 培地の種類と2%のスクロース添加の有無が発芽に及ぼす影響

培地の種類	供試蒴数 ^z	発 芽		1/2 蒴当りの 平均発芽種子数
		蒴数	蒴率 (%)	
ハイポネックス	19	6	32	7.5
ハイポネックス+スクロース	19	9	47	3.1 ^{*y}
オオムギ煮汁	20	17	85	19.6
オオムギ煮汁+スクロース	20	11	55	6.4 [*]

^z 交雑組み合わせはI×H及びB×Hで、数値はこれらの合計値^y * は χ^2 検定により5%水準で有意差あり第4表 鉢上げ後^zの苗の生育

鉢上げ後 の生育 ^y	1 か月後		2 か月後		3 か月後	
	葉長 (mm)	葉数 (枚)	葉長 (mm)	葉数 (枚)	葉長 (mm)	葉数 (枚)
平均値	0	0	0	0	7.0	1.7

^z 供試材料は順化開始および鉢上げ時点では枯死した葉のついた球根の状態^y 10 個体供試第5表 鉢上げ前の低温処理が鉢上げ後の生育に及ぼす影響^z

鉢上げまでの過程			茎葉展開		草 丈 (cm)	葉 数 (枚)
			個体数	%		
20℃順化	→	鉢上げ	0	—	—	—
20℃順化+5℃処理	→	鉢上げ	18	90	1.7	1.5
5℃処理	→	鉢上げ	18	90	1.5	1.4

^z 鉢上げ2 週間後に調査第6表 低温処理期間が処理後の苗の生育に及ぼす影響^z

低温処理期間 (5℃)	茎葉分化 個体数	茎葉分化率 (%) ^y
1	12	60
2	18	90
3	18	90
4	19	95
無処理	0	—

^z 処理1 か月後に調査^y 供試個体数20 株に対する茎葉分化個体数の割合(%)

る(Arditti, 1991; 木本, 1990; 長島, 1989). 本実験では発芽用培地にはオオムギの煮汁培地がハイポネックスより適していた(第3表).

またスクロース添加効果については, どちらの培地も糖無添加区で平均発芽種子数が多かった.

2. 培養苗の順化, 鉢上げ条件の検討

発芽約3か月後の苗は葉長約5 mm, 葉数2枚, 球根の長径が約5 mmになったが, このころから葉が褐変し始め, 一時的に生育が停滞した. そこで苗を培養容器から出して4週間順化を行った後に鉢上げし, その後無加温温室で管理したところ, 鉢上げから2か月後まではまったく茎葉を展開せず, 生育停滞状態であった. 2か月半後から再び生育を開始し, 3か月目には茎葉が分化してきた(第4表). また3か月後の生存率は生育が停滞している個体もあったが100%であった. このことから一時的な

生育停滞となる期間は2か月から2か月半と考えられた. また20℃下で4週間順化後に鉢上げした苗と低温処理後に鉢上げした苗の4週間後の生育を調査したところ, 順化だけではまったく茎葉を展開してこなかったが, 低温処理によって90%が茎葉を展開した(第5表). この低温処理は, 順化前の培養容器に入った状態で与えても同様に有効であり, これにより順化期間が省略され, その後の育苗期間の短縮につながった. さらに5℃の低温処理期間とその後の生育について調査したところ, 1週間処理では, 1か月以内に生育を再開した個体は全体の60%でやや少なかったが, 2週間以上の処理では, 90%以上の個体が1か月以内に生育を再開した(第6表).

培養容器内で育成した苗を鉢上げした段階で球根の大きさ(大球, 小球)別に育苗したところ, 球根が2~3 mm大のものは鉢上げ3か月後に20個体中15個体が枯死したが, 大きく発育した6~8 mm大の球根では20個体中17個体が生存し, その後も生育を続けた(第7表). これは球根の大きさが小さい場合, 鉢上げ後の温度や水分などの環境の変化に十分に適応できなかったためではないかと考えられた.

ラン科植物の種子は発芽前に一次休眠, 発芽後に二次休眠に入るものがあり, その打破法は種類によっては5℃以下の低温が効果的である(木本, 1990; 長島, 1993). 本種でも, 種子または発芽後の苗に一時的に生育が停滞する期間が観察され, 低温に感応させることにより早期

第7表 鉢上げ時の球根の大きさがその後の苗の生育²に及ぼす影響

球根の大きさ	発芽株数	発芽株率 (%) ³	草丈 (cm)	葉数 (枚)
大球 (長径 6~8mm)	17	85	2.7	4.5
小球 (長径 2~3mm)	5	25	0.9	2.4

² 鉢上げ3か月後に調査。調査個体数は各区20株。交雑組み合わせはI×H。

³ 供試個体数20株に対する発芽株数の割合(%)

に生育が再開した。

本実験の結果から、無菌播種し発芽後生育が一時的に停滞した苗に対して5°Cで2週間の低温処理を行うことにより、無処理(従来法)に比べて生育が再開するまでの期間が2か月間以上短縮されることが明らかになった。さらに低温処理を行った後、培養容器内の苗をすぐに鉢上げすると順化期間も必要なく、球根の大きさが6mm以上であれば鉢上げ後の生存率も高いことが明らかになった。今後は早期の商品化に向けて鉢上げから開花までの期間の短縮法の検討が課題である。

摘 要

ウチョウラン (*Orchis graminifolia* Tang et Wang.) の無菌培養における発芽率の向上と発芽後の苗の効率的な育成方法を確立するための培養条件、発芽した苗の低温処理や鉢上げ条件について検討した。

1. 交雑種子の無菌播種では、未熟種子を用いると完熟種子に比べて1蒴当たりの平均発芽種子数が多くなった。
2. 無菌播種時の培地にオオムギ煮汁培地を用いるとハイポネックス培地に比べて1蒴当たりの平均発芽種子数が多くなった。
3. 発芽後、球根および根を形成した苗は、容器ごと5°C下で2週間処理後、順化せずに直接鉢上げすることで無処

理に比べて約2か月の生育期間の短縮ができた。

4. 育成した苗は、球根の長径が6mm以上のものを鉢上げすると、その後の活着がよかった。

引用文献

- Arditti, J. 1991. ランの生物学 I (市橋正一訳). p. 12-176. 誠文堂新光社. 東京.
- 木本沙智雄. 1990. 共生菌によるウチョウランの種子発芽と生育促進. 加古舜治編. p. 100-103. 図解ランのバイオ技術. 誠文堂新光社. 東京.
- 小峰 篤・岩田直記. 1994. ウチョウランの増殖法. 群馬農業研究. D園芸. 8: 57-62.
- 長島時子. 1989. ウチョウランの胚発生並びに種子形成と発芽について. 園学雑. 58: 187-194.
- 長島時子. 1990. ランの種子形成と未熟種子の発芽能力. p. 18-23. 加古舜治編. 図解ランのバイオ技術. 誠文堂新光社. 東京.
- 長島時子. 1993. ラン科植物の生殖器官の形成に関する研究—エビネ属を中心に—. 恵泉女学園短大研究紀要. 26: 1-85.
- 坂本立弥. 1985. ランの無菌播種. p. 124-131. 古川仁朗編. 図解組織培養入門. 誠文堂新光社. 東京.