

香 川 大 学 農 学 部 紀 要

第 49 号

1987年2月

MEMOIRS OF FACULTY OF AGRICULTURE
KAGAWA UNIVERSITY

No. 49, February 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

田 中 道 男

香 川 大 学 農 学 部

香川県木田郡三木町

FACULTY OF AGRICULTURE, KAGAWA UNIVERSITY

Miki-tyô, Kagawa-ken, Japan

香川大学農学部紀要

第 49 号

1987年2月 発行

各研究室の業績を発表するため、本学部は“香川大学農学部学術報告”と“紀要”を発行している。この“紀要”は研究の完成した比較的長い論文を発表するために発行されている。既刊の標題は最後の i-iv 頁に記載されている。“学術報告”および“紀要”の交換または寄贈については、香川県木田郡三木町 香川大学農学部 (☎761-07) あて照会されたい。

Memoirs of Faculty of Agriculture, Kagawa University

No. 49, February 1987

The Faculty of Agriculture, Kagawa University publishes “Technical Bulletin” (Gakuzyutu Hokoku) and “Memoirs” (Kiyô), and latter contains extended treatises. The titles of each number of “Memoirs” are printed on the pages i to iv inside back cover. Correspondence concerning the exchange of publications should be directed to Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-tyô, Kagawa-ken, Japan, 761-07.

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

田 中 道 男

Studies on the Clonal Propagation of *Phalaenopsis* through *in vitro* Culture

Michio TANAKA

目 次

緒 言	2
第1章 葉片のプロトコーム状球体 (PLB) 形成能	3
第1節 実生幼苗および成株の葉片における PLB 形成	3
第2節 花茎培養由来シュートの葉片における PLB 形成	5
第3節 考 察	7
第4節 摘 要	8
第2章 葉片獲得のための花茎培養	8
第1節 花茎腋芽の発育と培養環境および培地の条件	8
1. 温度の影響	9
2. 日長の影響	11
3. 照度の影響	12
4. BA の影響	13
5. 活性炭および PVP の影響	15
第2節 花茎片の大きさと腋芽の発育	16
第3節 微生物汚染防止のための抗菌剤の利用	18
1. 汚染防止に対する抗菌溶液の有効性	18
2. エタノールによる予備殺菌の効果	19
3. 花茎の齢および花茎片採取部位と汚染の関係	20
4. 抗菌剤の培地混入の影響	21
5. 超音波洗浄器利用の効果	22
6. 花茎から分離した細菌の薬剤感受性	23
7. 抗菌溶液処理後の花茎片から分離した細菌の抗生物質感受性	27
8. 抗菌溶液処方改良	29
9. 殺菌剤と抗菌溶液の重複処理	30
第4節 考 察	31
第5節 摘 要	34
第3章 PLB 形成のための培地および培養条件	35
第1節 葉片培養用培地の検討	35
1. 培地の簡便化	36
2. adenine, NAA および BA の影響	37
3. inositol, nicotinic acid および thiamine の影響	38
4. 植物生長調節物質除去の影響	40
5. 糖の除去の影響	40
第2節 葉片の PLB 形成に対する花茎培養時の条件	41
1. 培地の影響	41

2.	植物生長調節物質の影響	42
3.	coconut water および糖の影響	43
4.	温度の影響	45
5.	日長および照度の影響	45
第3節	葉片の培養環境と PLB 形成	47
1.	温度の影響	48
2.	培地更新の影響	48
3.	培養容器の栓の影響	49
4.	培養初期の暗処理の影響	50
第4節	考 察	52
第5節	摘 要	55
第4章	PLB 形成能の種および品種間差異	56
第1節	PLB 形成能の種間差異	56
第2節	PLB 形成能の品種間差異	57
第3節	考 察	59
第4節	摘 要	61
第5章	PLB の増殖と幼植物の分化	62
	考 察	64
	摘 要	65
第6章	葉片培養により得られた植物体の花の形質	65
	考 察	66
	摘 要	66
結 論		68
引用文献		68
Summary		76
Plates		81

緒 言

ラン科植物では、一般にさし木や接木による繁殖が困難で、株分けによる繁殖率も極めて低い。このことは生産花卉としてのラン類の利用を著しく遅らせた主要な要因と考えられる。しかし、Morel⁸²⁾ が *Cymbidium* の茎頂培養によるラン科植物の新しい栄養繁殖法を示唆した時から、茎頂培養による栄養系の増殖を目的とした多くの研究がなされ^{41, 48, 63, 73, 77, 82, 83, 84, 109, 117, 118, 126, 141, 158, 160)}、現在では *Cymbidium*, *Cattleya*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Vanda* などの営利栽培において、茎頂由来の幼苗が用いられている。

ラン科植物の茎頂培養において特徴的なことは、茎頂の組織から直ちに幼植物が分化してくることはなく、ラン種子の播種後に形成されるプロトコーム（原塊体）に類似した球体（プロトコーム状球体、PLB）がまず作られ、これから幼植物が形成される点である⁸²⁾。この PLB を反覆して分割し、培養することにより大量増殖が可能となる¹⁶⁰⁾。

ファレノプシス (*Phalaenopsis*) は、近年生産と需要が急増し、営利的に重要なラン科植物の1つとなった。ファレノプシスについても、茎頂培養による個体再生を認めた報告がある⁴⁷⁾。しかし、このランは単茎性であるため1株から1個の茎頂しか得られず、しかも茎頂の摘出は株を著しく傷つけること、さらに培養中の茎頂が黒変して枯死しやすいことなどのために、この方法による繁殖はまだ実用化されていない。従って、ファレノプシスの営利栽培は、現在でも実生苗にたよっている。しかしながら、実生では苗の遺伝的変異が大きいために、優れた形質をもち、商品性の高い均一な株を大量に得ることは困難である。そこで、茎頂以外の組織を培養して、

優良形質をそなえた同質の個体を増殖させる技術の開発が望まれてきた。

培養材料を得る場合には、採取が容易であり、母株の損傷を最小限にとどめることが望ましい。Churchillら¹³⁾は、*Laeliocattleya*において、培養葉片上でのPLB形成を観察し、葉片培養による実用的な栄養繁殖の可能性を初めて示した。ファレノプシスにおいても、葉組織からPLBを形成させることができれば、問題となる茎頂培養を行わずに多くの栽培家の期待に応えることができる。

本研究は、ファレノプシスの葉片培養による栄養系幼植物の育成を目的として、PLBの形成、培養材料、培地および培養条件、および培養技術についての基礎的知見を得るとともに、それらに立脚した栄養繁殖技術を確立するために行なった。

本研究の遂行ととりまとめにあたっては、大阪府立大学農学部坂西義洋教授のご指導とご助言を賜わった。また、同中川昌一教授、大澤孝也教授および平知明助教授には本論文のとりまとめにあたって、有益かつ適切なお助言をいただいた。ここに謹んで、心より深謝の意を表するものである。

本研究は、元香川大学農学部狩野邦雄教授に端緒を与えていただき、その後、岡山大学農学部小西国義教授および前香川大学農学部庵原遜教授にご教示をいただいた。本研究の大部分は、大阪府立大学農学部花卉学研究室および香川大学農学部花卉園芸学研究室において行なわれたが、研究の後半には香川大学農学部五井正憲教授並びに長谷川晴助教授に種々ご指導とご助言をいただき、専攻生諸氏には多大のご協力をいただいた。また実験の遂行にあたっては、両研究室の各位の多大のご援助を得た。さらに、大阪歯科大学細菌学教室尾上孝利博士並びに同教室の各位には、細菌の薬剤感受性試験を行なうにあたり懇篤なご指導とご援助をいただいた。

ここに記して感謝の意を表する。

第1章 葉片のプロトコーム状球体 (PLB) 形成能

in vitro で培養した *Cymbidium* の茎頂組織から PLB が形成されたことを Morel⁹²⁾ が報告して以来、多くのランの属で茎頂培養に関する多数の研究が行なわれてきた。これに対し、茎頂以外の器官が組織培養による栄養繁殖の材料源として用いられた報告例も少なくない。これまでに、種々の属において、花序⁴⁵⁾、花序先端部^{39, 40, 59, 163)}、根端^{61, 62, 136, 138)} および葉片^{7, 12, 13, 14, 15)} などの培養が試みられ、これらの培養体における PLB 形成が観察されているが、まだ実用化には至っていない。

茎頂培養が困難とされているファレノプシスにおいて、組織培養による栄養繁殖の材料源として葉を用いることができれば、実的意義は極めて大きいと考えられている。そこで、本章では、ファレノプシスの葉片からの PLB 形成の可能性を明らかにするために、種々の状態の植物体から葉または葉片を採取して *in vitro* で培養し、PLB 形成の誘導を試みた。

第1節 実生幼苗および成株の葉片における PLB 形成

これまでに行なわれた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の中に葉を培養材料としたものはない。そこで葉からの PLB 形成の可能性を確かめるために、まず、フラスコ内で生育中の実生幼苗から葉片を採取し、培養を行なった。

次に、栄養系の増殖は実際には選抜された優良個体に対して行なう必要があるため、花の形質を確認した成株の葉から葉片を採取し、同様に培養を試みた。

材料および方法

実験には、フラスコ内で発育させた *Phalaenopsis amabilis* 系交雑種の、1葉を展開した120日齢および3葉を展開した350日齢の実生幼苗を供試した。120日齢苗では、全葉（8~10mm長）をプロトコームより切り取った。また、350日齢苗では、最上展開葉の先端部、中央部および基部から、6~8mm平方の葉片を採取した（第1図）。また、成株の葉片の培養では、*Phalaenopsis amabilis* 系交雑種（5~6年生株）の展開中の最上葉（約5cm長）を材料源とした（第1図）。材料葉は母株より手で引き抜き、70%エタノールに2~3秒間浸漬し予備殺菌を行った。次に、0.1% Tween 20を添加した Wilson 液¹⁵⁹⁾（7%次亜塩素酸カルシウム溶液）中にこれらを入れ、10分間振とうして表面殺菌を行ない、ついで滅菌水で3度すすいだ。第1図のようにこの葉の種々の部位から8~10mm平方の葉片を採取した。

これらの葉または葉片は、向軸面を上にして寒天培地に植付けた後、ゴム栓で栓をし、パラフィンで完全にシールした。Murashige・Skoog⁸⁸⁾ 培地（以下MSとする）を基本培地として、 α -naphthaleneacetic acid (NAA) 5~10 ppm および kinetin 5~10 ppm を添加した培地を用いた。培養容器としては、硬質試験管（18×180mm）を使用し、常法にしたがって調整した培地（加熱前のpH5.3）を各試験管に8ml分注後、1.2 kg/cm²（121°C）で15分間オートクレーブを行ない滅菌した。培養条件は、25°C、16時間日長（500 lux、植物育成用ケイ光灯 Homo-Lux）とした。

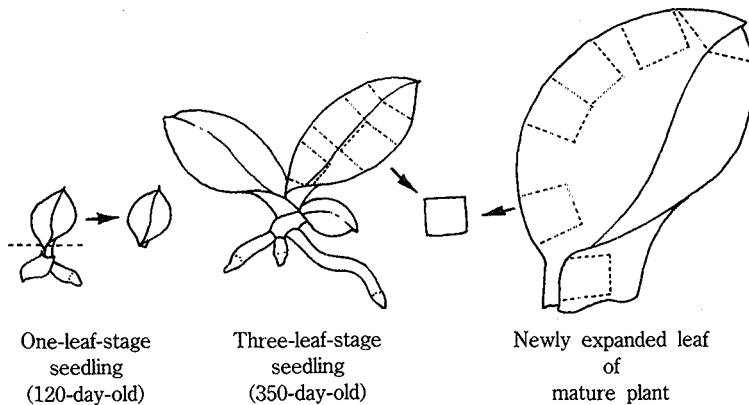


Fig. 1. Leaf segments to be cultured *in vitro*.

結果

120日齢苗の葉の培養における120日後の、PLB形成葉片率（(PLBを形成した培養葉片数/供試葉片数)×100）および平均PLB数（形成されたPLB総数/PLBを形成した培養葉片数）を第1表に示した。PLBは、ほとんどの場合葉片の向軸面および葉縁に形成され、背軸面には全く形成されなかった（Plate I-1）。検討したすべての培地でPLB形成が認められたが、PLB形成率の最も高かったのは、NAA 5 ppm と kinetin 10 ppm を添加した培地で培養した葉片であった。平均PLB数は、NAA と kinetin の濃度の組合せによって異なり、NAA 10 ppm と kinetin 10 ppm を添加した培地で最高となり平均11.5個であった。

次に、350日齢苗から採取した葉片の培養90日後の結果を見ると、120日齢苗の場合に比べるとPLB形成率はかなり低くなった。PLB形成が最も多く観察されたNAA 5 ppm, kinetin 10 ppm の組合せにおいてさえ、PLB形成率は50%、平均PLB数は9.7個であった（第2表）。

Table 1. Effect of NAA and kinetin on the formation of protocorm-like body (PLB) in an excised leaf from 120-day-old seedlings.

NAA (ppm)	kinetin (ppm)	No. of leaves cultured	Per cent leaves with PLB (%)	No. of PLB per leaf	
				Mean	(Range)
5	10	20	35	6.0	(16-1)
10	10	20	20	11.5	(30-1)
10	5	20	20	4.8	(7-1)

A whole leaf from one-leaf-stage seedlings (120-day-old) was cultured on MS medium supplemented with NAA and kinetin, at 25°C with a 16-h light (500 lux).

Seedlings were grown on the germination medium (Hyponex (N: P₂O₅: K₂O=20:20:20) 3.0 g/l, apple juice 10%, nicotinic acid 1 ppm, sucrose 2.0%, agar 1.5%).

Table 2. Effect of NAA and kinetin on the formation of PLB in leaf segments excised from 350-day-old seedlings.

NAA (ppm)	kinetin (ppm)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
				Mean	(Range)
5	10	60	5.0	9.7	(19-1)
10	10	60	1.7	1.0	(---)
10	5	60	1.7	1.0	(---)

Leaf segments of a top leaf were excised from three-leaf-stage seedlings (350-day-old), and cultured on MS medium supplemented with NAA and kinetin, at 25°C with a 16-h light (500 lux).

一方、成株の最上展開葉の種々の部位から採取した葉片の培養においては、PLBの形成は全く認められなかった。

第2節 花茎培養由来シュートの葉片における PLB 形成

前節において、培養材料源としての葉の有用性が示された。しかしながら、前述のように、実生幼苗の栄養繁殖に成功しても実用的には意味がない。そこで、花の形質を確認した後の成株から葉片を採取し、実生幼苗の葉片と同様の培地・培養条件で培養を行なったが、前節で示したように PLB は全く形成されなかった。

ファレノプシスでは、花茎の腋芽を培養して幼苗を得る栄養繁殖法が Rotor⁽¹¹⁾ によって研究され、実用化されている。しかしこの方法では、1腋芽から1植物体しか得られず、増殖能率は極めて低い。

この方法で得られた幼植物は、実生苗とほぼ類似した生育状態を示す。そのことから、花茎腋芽由来の幼葉の生理的、組織的特徴は実生幼苗の葉のそれに近いのではないかと考えられる。そこで、花茎培養由来シュートの葉片の PLB 形成を検討し、実用的栄養繁殖の可能性について調べた。

材料および方法

Phalaenopsis amabilis 系交雑種 (5~6年生株) から花茎を採取し、1腋芽を含む花茎片に切り分けた後、Scully⁽²⁵⁾ および Intuwong⁽⁴⁾ の方法によって表面殺菌を行なった。ついで、花茎片を4cmに調整し、腋芽をおおう包葉を除去した後、Vacin-Went⁽⁵¹⁾ の無機塩類に coconut water 20% (v/v), sucrose 2.0% および agar 1.0% を添加した培地に植付け、28°C, 16時間日長 (500 lux) で培養した。培養約2か月後、腋芽からのシュートの

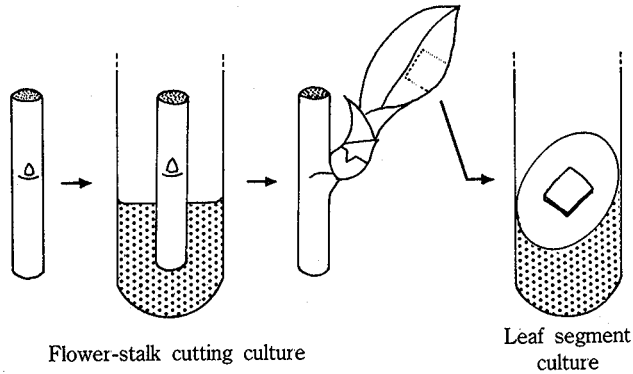


Fig. 2. Diagram illustrating the procedure for clonal propagation of *Phalaenopsis* through *in vitro* leaf segment culture.

第1葉が展開した時に、この葉より6~8mm平方の葉片を採取し、培養を行なった(第2図)。なお、培養条件は前節に述べたものと同様とした。

結 果

まず、葉片を実生幼苗の葉からのPLB形成に成功した培地(MSにNAA 5~10 ppmおよびkinetin 10 ppmを添加)に置床したが、PLB形成はみられなかった。

そこで、培地に添加する植物生長調節物質を、前節で用いたNAAおよびkinetinから、NAA 1 ppmとadenine 10 ppmに種々の濃度のkinetinまたはN⁶-benzyladenine (BA)を加えたものに変更して、再度葉片培養を試みた。

培養1か月以降に、NAA 1 ppm, adenine 10 ppmおよびBA 10 ppmを添加した培地上の葉片の向軸面に突起の形成がみられ、これらは後にPLBに発達した。この培地における培養6か月後のPLB形成率は25.0%、PLBを形成した葉片あたりのPLB数は3.8個であった(Plate I-2)。これに対して、検討した他のすべての培地上の葉片には、PLBは全く形成されなかった(第3表)。

Table 3. Effect of culture media on the formation of PLB in excised leaf segments of shoot derived from flower-stalk cuttings.

Culture medium	No. of segments cultured	Per cent segments with PLB (%)
MS*+NAA 5 ppm+kinetin 10 ppm	20	0
MS +NAA 10 ppm+kinetin 10 ppm	20	0
MS +NAA 1 ppm+kinetin 0.1 ppm+adenine 10 ppm	20	0
MS +NAA 1 ppm+kinetin 1.0 ppm+adenine 10 ppm	20	0
MS +NAA 1 ppm+kinetin 10.0 ppm+adenine 10 ppm	20	0
MS +NAA 1 ppm+BA 0.01 ppm+adenine 10 ppm	20	0
MS +NAA 1 ppm+BA 0.1 ppm +adenine 10 ppm	20	0
MS +NAA 1 ppm+BA 1.0 ppm +adenine 10 ppm	20	0
MS +NAA 1 ppm+BA 10.0 ppm +adenine 10 ppm	20	25.0

* Murashige and Skoog medium (1962)

Leaf segments were cultured at 25°C with a 16-h light (500 lux).

第3節 考 察

ラン科植物において、葉組織からの増殖の可能性を最初に報告したのは Wimber¹⁶⁾ である。これは *Cymbidium* Reflection の PLB を振とう培養 (200 rpm) した際に、フラスコ内で生育してきた幼植物の葉の一部、とくにガラス壁に打ちつけられた部分から PLB が形成されたという偶発の発見であった。葉片培養は、Arditti³⁾ も指摘しているように、茎頂培養のように母株を損うことなくしかも容易に行なえることから、Wimber の報告以降積極的に葉を培養材料とした研究が行なわれた。すなわち、*Epidendrum* と *Laeliocattleya*^{7, 13, 14, 15)}、*Cattleya*¹²⁾、*Vanda* と *Phalaenopsis*⁵⁷⁾ において、培養葉片における PLB 形成が観察された。

本研究はこれらに続くもので、単茎性ラン科植物であるファレノプシスにおいて、この葉片培養による栄養繁殖の可能性を確かめるために、1972年より開始したものである。

実生幼苗の葉を材料とした上述の実験では、苗齢の異なるいずれの植物材料から採取した培養葉片においても PLB の形成が認められ、葉の培養材料源としての有用性が示された。しかしながら、この場合苗齢が進むと葉の PLB 形成能は著しく低下した。さらに成株から採取した葉片を、実生幼苗からの葉片培養と同一の培地で培養したところ、PLB は全く形成されなかった。これらの結果は、株の老化にともなって葉の再生能が低下することを暗示している。

ファレノプシスの花茎培養によって得られるシュートの葉は、実生幼苗のそれと形態的に類似しているにもかかわらず、前述の実生幼苗に用いた培地では、これらの葉片に PLB の形成を誘導できなかった。本章第2節の結果が示すように、それらの葉片の PLB 形成は、比較的高濃度のサイトカイニン (BA 10 ppm) の存在下ではじめて可能であった。

上述の *Laeliocattleya*¹³⁾ やその後報告された *Aranda*²⁷⁾ や *Renantanda*³¹⁾ の葉片培養においても、基本培地はそれぞれ異なるが BA は 0.2~2.0 ppm の濃度で共通に添加されている。このことから、ラン科植物の葉片から PLB 形成を容易に誘導するためには、培地に BA を添加することが適切であると言えよう。

なお、花茎培養で得られた葉片の培養において PLB 形成が認められた前記の培地を用いれば、成株の葉でも PLB を形成し得るのではないかと考え再検討してみたが、最上葉基部の未緑化部分から採取した葉片にのみ PLB の形成が認められたにすぎず、その形成率は 3.2% と著しく低かった (Plate I-3)。

単茎性でしかも茎頂培養^{47, 83)} が比較的困難なファレノプシスを茎頂以外の組織や器官の培養によって栄養繁殖しようとする多くの試みがなされてきた。本研究における葉片培養以外でも、花茎腋芽の培養^{26, 28, 68, 96, 147, 164)}、花茎腋芽培養によって得られた幼植物の各切片の培養^{102, 167, 168)}、さらに最近では若い花茎先端部の節間の培養^{39, 40, 59)} などがあげられる。しかし、いずれも実用的に確立された方法ではない。このような状況において、本実験では、葉を培養材料源として、組織培養による繁殖が可能なが確かめられた。

しかし、園芸学的見地からは、実生幼苗は遺伝的形質上、また成株はその葉片の PLB 形成率の低さの点で、いずれも葉片培養の対象としては不適当であると考えられる。これに対し、開花株から採取した花茎片の培養によって得られる花茎腋芽からのシュートは、母株を全く損わずに得られ、比較的 PLB 形成の容易な若い葉をもち、しかも 1 母株から何本も育成できる点で、極めて有用である。すなわち増殖を目的とする株の花茎片の培養によってその腋芽からシュートを発達させ、そのシュートから葉片を採取し培養する方法が、ファレノプシスの栄養繁殖法として優れた方法であると言える。したがって、以下の実験ではこの方法に絞って、栄養系の増殖を可能な限り高め得る条件を追求することとした。

第4節 摘 要

1. ファレノプシスにおける葉からの PLB 形成の可能性を確かめるために、フラスコ内で发育させた1葉を展開した120日齢の実生幼苗から葉を採取し培養を行なった。NAA 5~10 ppm および kinetin 5~10 ppm を添加した MS 培地に葉を植付けた場合、20~35% の葉が PLB を形成し、培養材料源としての有用性が示された。ただし苗齢が進むと葉の PLB 形成能は低下し、350日齢苗の葉の PLB 形成率は 1.7~5.0% にとどまった。
2. 花の形質を確認した後の成株を用いて、最上展開葉の種々の部位から葉片を採取し、実生幼苗の葉片培養と同一の培地で培養したところ、PLB は全く形成されなかった。
3. 花茎培養由来のシュートから葉片を採取し、前記の実生幼苗と同様の条件で培養したが、PLB 形成は見られなかった。そこで、培地に添加する植物生長調節物質を、NAA および kinetin から、NAA 1 ppm, adenine 10 ppm, および BA 10 ppm に変更したところ、25.0% の葉片において PLB 形成が認められた。なお、この培地を用いて成株の葉片培養について再検討してみたが、葉基部の未緑化部分から採取した葉片にのみ PLB 形成が認められたにすぎず、その PLB 形成率も 3.2% と著しく低かった。
4. これらの結果から、実際に葉片培養により栄養系の増殖をはかる場合は、まず、花茎片を培養してその腋芽の发育による幼葉を得、次にこれの葉片を培養して PLB 形成を誘導する方法が、母株を損うことなく比較的高い PLB 形成率が得られることから、最も優れた方法であると考えられた。

第2章 葉片獲得のための花茎培養

ファレノプシスの花茎の各節は包葉につつまれ、基部数節においてはその内側に腋芽が存在し、それより上の節には小花を分化する。この基部数節の腋芽は通常休眠状態である。

これらの腋芽を、花茎組織をつけたいわゆる花茎片として、*in vitro* で培養し幼植物を得ようとする試みが、1949年に Rotor¹¹¹⁾ によりはじめてなされた。この方法は、後に多くの研究者によって改良され、ファレノプシスの1栄養繁殖法となった。

この花茎培養においては、腋芽は(1)栄養的发育(シュート形成)に向かうか、(2)生殖的发育(二次花茎形成)をするか、または、(3)休眠状態にとどまるかの3通りに分かれる(第3図)。これまでに、これらの发育方向については観察されている^{67, 68, 70, 110, 125, 150)}が、腋芽の发育方向を支配する要因については明らかでない。

本章では、葉片培養の材料となるシュートを可能なかぎり多く獲得するために、花茎片の腋芽の发育方向を支配すると考えられる培養環境条件、培地条件、花茎上の腋芽の節位および花茎片の大きさなどについて調べた。また、花茎培養におけるもう1つの問題点は、植物の組織培養で一般に使用されている殺菌法では、微生物による培養花茎片の汚染を完全に防止することができず、そのため結果的に繁殖効率が制限されることである。ここでは、この微生物汚染を防ぐ一手段として、抗菌剤(antimicrobials)の花茎培養への適用を試みた。

第1節 花茎腋芽の发育と培養環境および培地の条件

培養花茎片の腋芽の发育方向を支配する要因として培養環境条件を調べた研究はほとんどない。一方、ファレノプシスの主茎腋芽は、比較的低温により伸長し花茎として发育するが、高温では腋芽の出現が抑制されることを認めた報告は多い^{18, 90, 120, 146)}。また、主茎腋芽の发育は低温、短日によって促進されるという報告もある^{112, 113, 157)}。

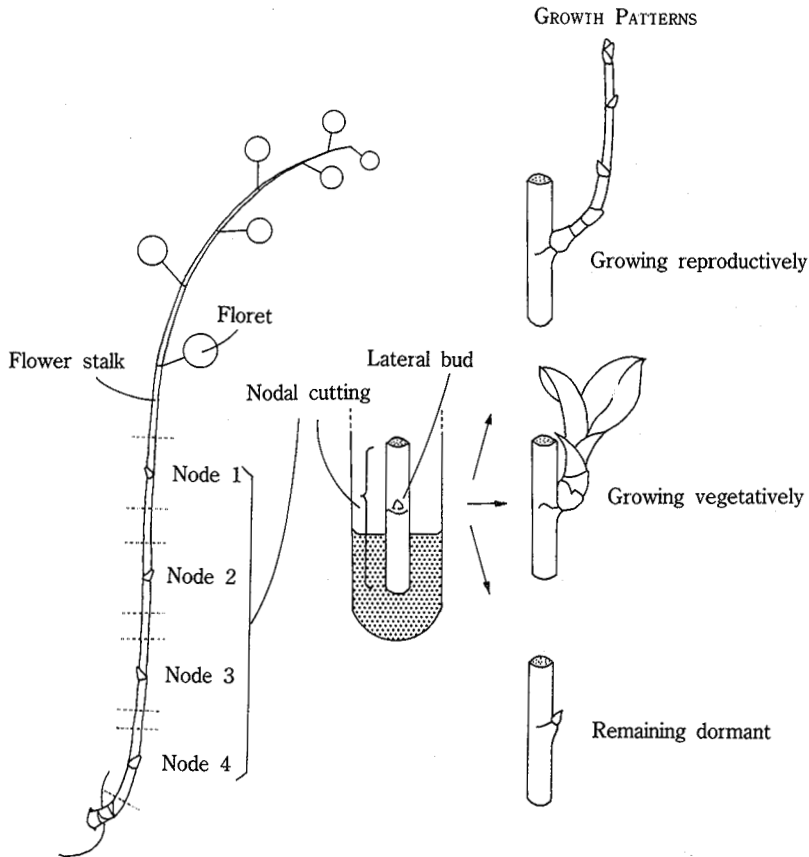


Fig. 3. Diagram illustrating the different growth patterns of cultured lateral buds of nodal cuttings from flower-stalk.

これらのことから、花茎の腋芽の発育も、培養温度をはじめとする培養環境によって支配されるのではないかと推察される。そこで、腋芽の発育方向に及ぼす培養温度、日長および照度の影響を検討した。

1. 温度の影響

花茎片の培養温度として3温度区を設定し、花茎片の腋芽の発育に及ぼす影響を調べた。また、花茎伸長時の栽培温度と培養温度との関係についても調査した。

材料および方法

最低気温 18°C の温室で、素焼鉢に水苔植えし、慣行法により栽培した *Phalaenopsis amabilis* 系交雑種 (5~6 年生株) の母株から、小花が 1~5 輪開花した花茎を切り取った。なお、栽培温度の影響をみた実験には、花茎が 5~10 cm に伸長するまで最低 18°C の温室で育て、その後最低 28°C の条件で開花させた株と、最低 18°C の条件で開花までおいた株を用いた。

これらの花茎を 70% エタノールに湿した脱脂綿で 3 回拭いた後、各腋芽を中心に上下約 3 cm の位置で切断し、花茎片とした。これらの花茎片を、Tween 20 を 0.1% 添加した Wilson 液¹⁵⁹⁾ (7% 次亜塩素酸カルシウム溶液) 中で 10 分間振とうして表面殺菌を行ない、すぐに滅菌水で 3 度すすいだ。ついで、包葉をピンセットで取除き、花茎片の両端 (白変部を含む) を 5~10 mm 切除し、標準の長さを 4 cm とした後、腋芽が培地地面の上方に約 5 mm 出るように垂直に花茎片を植付けた。

培地は、花茎培養に推奨されている coconut water 20% (v/v) を添加した VW 培地 (sucrose 2.0%, agar 1.0%) とした。培地は常法によって調整 (pH 5.3), 24×200mm の硬質試験管に 16ml ずつ分注した後、オートクレーブ (1.2kg/cm², 121°C で15分間) で滅菌した。植付け後の栓は、アルミホイルの2重にしたキャップとした。培養温度としては、20°, 25° および 28°C とし、すべての温度区の光条件は植物育成用ケイ光灯 (Homo-Lux) による 500 lux の16時間日長とした。

結 果

すべての温度区で培養15週後も、休眠状態の腋芽がみられた。この現象は花茎の最上位 (Node 1) から取った花茎片で高率でみられた。

萌芽した腋芽の発育状態は温度により異なった。20°C では、花茎上の下位節の腋芽の一部が栄養的発育を示したが、上位のものはほとんど二次花茎に発達した。25°C では、休眠腋芽がわずかに減少したこととシュートに発達する腋芽が増加したことを除いて、20°C と類似した結果であった。これに対し、28°C では、萌芽したすべての腋芽がシュートになった (第4図, Plate I-4)。

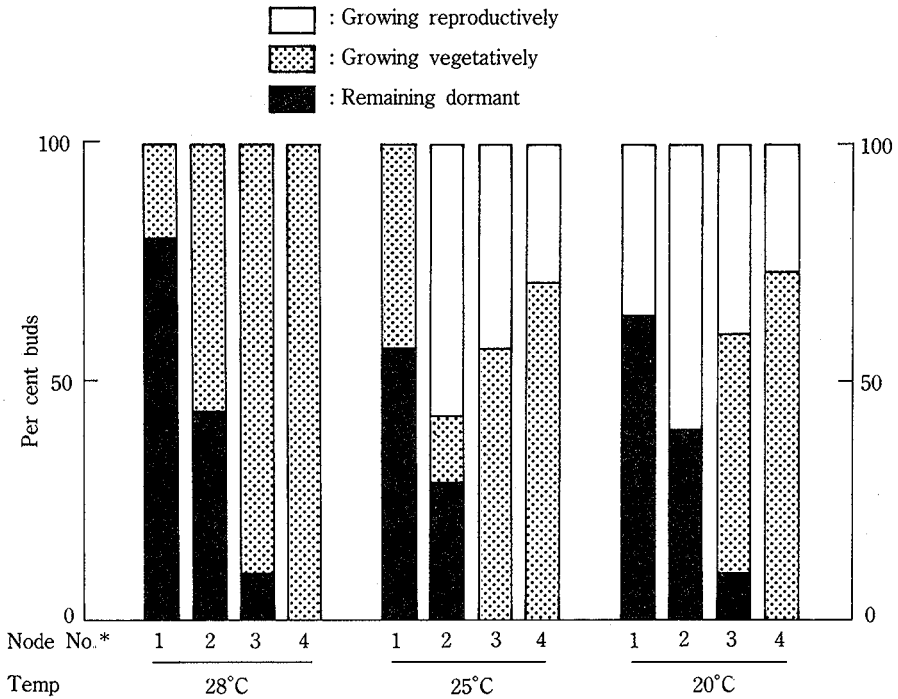


Fig. 4. Effect of temperature on the growth patterns of cultured lateral buds.
 * Numbering node is downwards from top.
 Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium.

20°C および 25°C で腋芽が二次花茎に発達した花茎片を1年間継続して培養した場合、二次花茎の基部1~3節から再度分枝が見られた。20°C では、二次花茎に発育した花茎片の67%が三次花茎を形成し他は動かなかったが、25°C では三次花茎の形成は見られず76%が二次花茎上にシュートを分化した。

母株の花茎伸長時の栽培温度 (最低 18°C および 28°C) は、後の花茎培養における腋芽の発育方向に影響せず、培養温度がこの発育方向を支配した (第4表)。

Table 4. Growth of cultured buds of nodal cuttings from flower-stalk developed by different temperature treatments.

Minimum temperature during flower-stalk development (°C)	Temperature during bud culture (°C)	No. of buds cultured	No. of buds survived	Per cent of buds		
				Growing into		Remaining dormant (%)
				Vegetative shoot (%)	Reproductive shoot (%)	
28	28	20	14	57	0	43
	20	20	15	6	47	47
18	28	24	20	65	0	35
	20	24	21	5	52	43

Flower-stalk cuttings were cultured on VW medium supplemented with 20% coconut water.

2. 日長の影響

ファレノブシスの花茎培養に関するこれまでの報告をみると、培養中の花茎片には研究者によって異なる日長が与えられている。すなわち、12時間⁸⁾、14時間¹⁴⁷⁾、16時間^{4,110)}、17時間²⁰⁾および24時間⁴⁴⁾などの各日長である。しかしながら、これらの報告の中に、花茎培養における培養環境条件としての日長の影響を検討した例はない。そこで、同一培養温度下での種々の日長が、花茎片の腋芽の発育方向と生長に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

ファレノブシス交雑種 (*Phal. White Falcon* × *Phal. Persistent*; 5年生株) の株から、小花が数輪開花した状態の花茎を採取し、実験に供試した。実験区として、25°Cの培養温度条件下に、8、16および24時間の3日長条件を設けた。なお、すべての日長区の照度は900 luxとした。花茎片の調整および培養方法は、前項(1.)で述べた方法に準じたが、ここでは、Wilson液での表面殺菌の前に70%エタノールに10秒間浸漬する予備殺菌を加えた。また、培養容器として21×200 mmの硬質試験管を用いた。

結 果

15週間培養後の非汚染花茎片における腋芽の発育方向を第5図に示す。すべての日長区において、腋芽は、前項(1.)の25°C区と同様に3通りの発育方向(シュート形成、二次花茎形成および休眠)を示した。この場合、8、16、24時間と日長が長くなるに従って、休眠状態の腋芽が減少し、二次花茎に発達する腋芽が増加した。一方、シュート形成を示した腋芽の割合は各日長下で50%前後となり、日長による差異は認められなかった。なお、8時間日長区において、一部の培養花茎片が枯死した。

培養15週間後に、栄養的発育を示したすべての花茎片について、そのシュートの葉数、葉長および葉幅を測定した結果、葉数および葉長に関しては各日長間で有意な差は認められなかった。一方、葉幅は、他の2日長区に比較して16時間日長区でわ

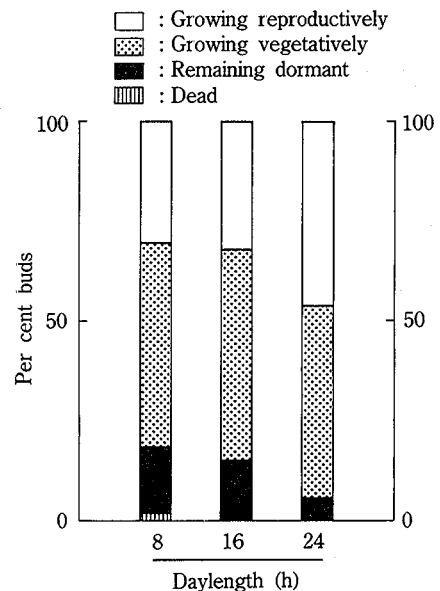


Fig. 5. Effect of daylength on the growth patterns of lateral bud of flower-stalk cutting.

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium at 25°C.

Table 5. Effect of daylength on the vegetative growth *in vitro* of lateral buds.

Daylength (h)	No. of shoots developed	Vegetative growth		
		No. of leaves	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
8	24	2.7a*	30.5a	13.5ab
16	23	2.6a	30.0a	12.5b
24	27	2.3a	31.2a	14.8a

Data were recorded 15 weeks after culture.

* Numbers in a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (*t*-Test).

ずかに減少した (第5表)。

3. 照度の影響

ファレノプシスの花茎培養時に与えられる照度は、研究者によって 1500 lux~5000 lux の差があるが^{4, 44, 70, 110, 125, 147}、照度の影響そのものを調べた報告はない。ここでは、培養花茎片の腋芽の発育方向と生長に及ぼす照度の影響を検討した。

材料および方法

ファレノプシス交雑種 (*Phal. White Falcon* × *Phal. Persistent*; 5年生株) の株から、小花が数輪開花した状態の花茎を採取し、実験に供試した。花茎片の調整・殺菌は前項 (2.) の方法で行ない、同様の培地に植付け後、次の各照度下 (25°C) で培養した。照度は黒色寒冷紗を用いて調節し、1600 lux (対照)、650 lux (寒冷紗1枚被覆)、400 lux (同2枚被覆)、170 lux (同3枚被覆) および 0 lux (暗黒) の5段階とした。なお、日長は、暗黒区を除いて、16時間とした。

結 果

15週間培養後の非汚染花茎片における腋芽の発育方向を第6図に示す。暗黒区を除き、照度が低くなるに従い、二次花茎に発達する腋芽の割合が低下し、シュートに発達する腋芽の割合が高まった。休眠を続けた腋芽は、暗黒区で最も多くみられた (42.9%) が、低照度 (400 lux および 170 lux) では、対照区に比べ減少した。なお、暗黒区において、一部の培養花茎片が枯死した。

次に、各日長下においてシュートとして発達した腋芽の、15週間培養後における葉数、葉長および葉幅について測定した結果を第6表に示す。明区の4区においては、照度が低下するに従ってシュートの葉数と葉長は増加し、葉幅は逆に減少した。一方、暗黒区で得られたシュートは、葉数、葉長および葉幅のすべてにおいて、他の明区に比べ栄養生長が最も劣った。

シュートは、照度の低下に伴い、節間が長くなり、葉色も黄緑色となり、徒長ぎみであった。暗黒区では、一部淡紅色に着色した以外は、ほとんどの葉は白色であっ

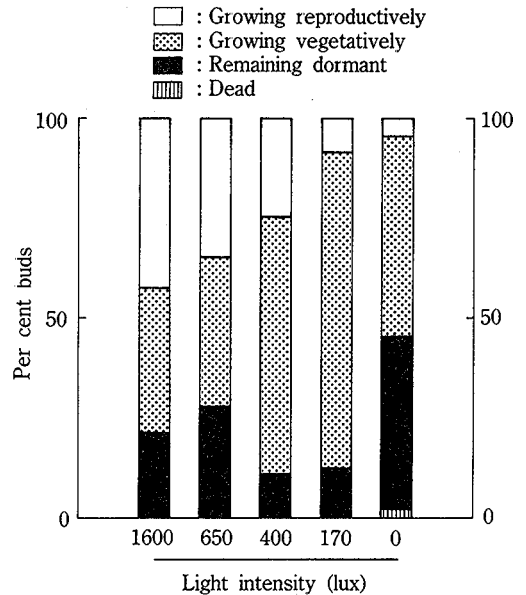


Fig. 6. Effect of light intensity on the growth patterns of lateral buds of flower-stalk cutting. Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light.

Table 6. Effect of light intensity on the vegetative growth *in vitro* of lateral buds.

Light intensity (lux)	No. of shoots developed	Vegetative growth		
		No. of leaves	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
1600	17	1.5bc*	29.5abc	12.1a
650	16	1.5bc	27.0bc	11.9a
400	29	1.7b	31.3ab	10.7ab
170	37	2.1a	33.8a	9.3b
0	21	1.3c	22.9c	7.0c

Data were recorded 15 weeks after culture.

* Numbers in a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (*t*-Test).

た。また、170 lux 下で発達したシュートの葉は、主脈を中心に閉じたままで、平開しないものが多かった。なお、発根はいずれの区でも認められなかった。

4. BA の影響

前項までに示した様に、培養環境は、花茎腋芽の発育方向を支配する要因である。一方、Reisinger ら¹¹⁰⁾は、培養花茎片の腋芽の休眠は、内生オーキシンによって引き起こされる頂芽優勢によるものと考え、anti-auxin を培地に加えて、腋芽の萌芽促進を試みたが、十分な効果は得られていない。しかしながら、このように種々の植物生長調節物質等を培地に添加して培養体の形態形成を制御することは組織培養では広く用いられている手法である。

上述の実験でみたように、coconut water 20% を添加した VW 培地を用いた場合、いかなる温度、光条件でもなお休眠を続ける腋芽が存在した。この現象は、花茎上の上位節から採取した花茎片でとくに頻繁に観察された。そこで、coconut water のかわりに、園芸植物の腋芽に対して萌芽促進効果が知られている BA を培地に添加して、培養花茎片の腋芽の発育に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

前項(1.)に用いたのと同じ状態の *amabilis* 系交雑種(5~6年生株)の花茎を供試した。BA は、培地のオートクレーブ前に、0.01~10.00 ppm の濃度で VW 培地に添加した。なお、培養条件は 28°C、16時間日長(500 lux)とした。

結 果

培養15週後の非汚染花茎片における腋芽の発育方向を第7図に示す。BA 0.50 ppm 添加培地での各発育方向の腋芽の割合は、coconut water 20% (v/v) を添加した培地でのそれ(第4図, 28°C)と類似していた。さらに BA 濃度が高まるにつれて、萌芽する腋芽の増加がみられた。休眠維持の割合が高かった上位節の腋芽も、BA 5~10 ppm 添加によってすべてが萌芽した。しかしながら、これらの高濃度の BA 存在下で発達したシュートの葉のほとんどは、展開しなかったり、周縁部にねじれを生じるなどの奇形症状が観察された。また、これらの濃度では、1腋芽から2以上のシュートが発達することもまれに観察された。

次に、BA の存在下で萌芽した腋芽の温度反応について調べた。その結果、第8図に示したように、BA 2.5 ppm を添加した VW 培地(coconut water を含まず)で萌芽した腋芽は、発育方向に関して温度の影響を強く受けた。すなわち、20°C では、花茎の最上位から採取した花茎片の腋芽はすべて二次花茎として発達し、下位になるにつれてシュートとして発達する腋芽の割合が高かった。一方、28°C では、萌芽したすべての腋芽が栄養的発育を示しシュートになった。なお、BA 2.5 ppm 添加培地で発達したこれらのシュートでは、前述の奇形的

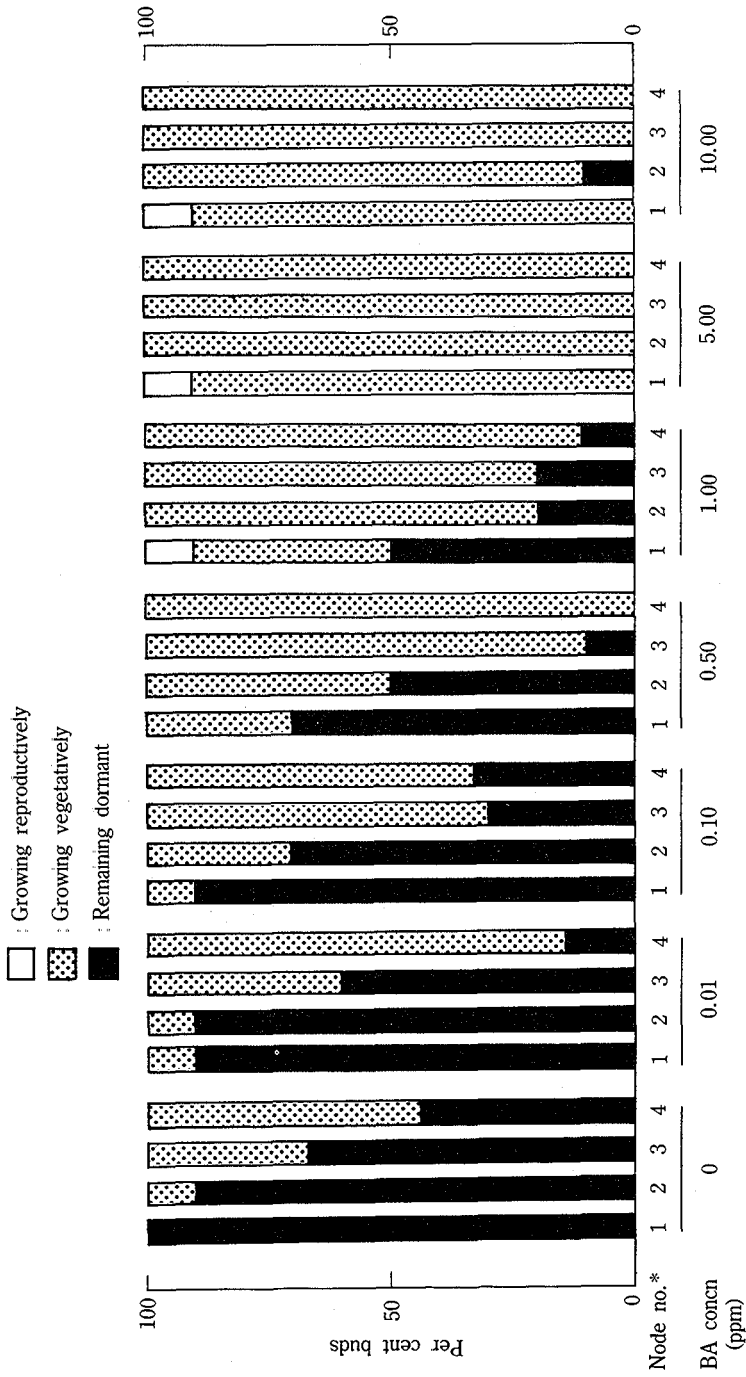


Fig. 7. Effect of BA concentration on the growth patterns of cultured lateral buds.

* Numbering node is downwards from top.

Flower-stalk cuttings were cultured on VW medium supplemented with BA as indicated, at 28°C with a 16-h light (500 lux).

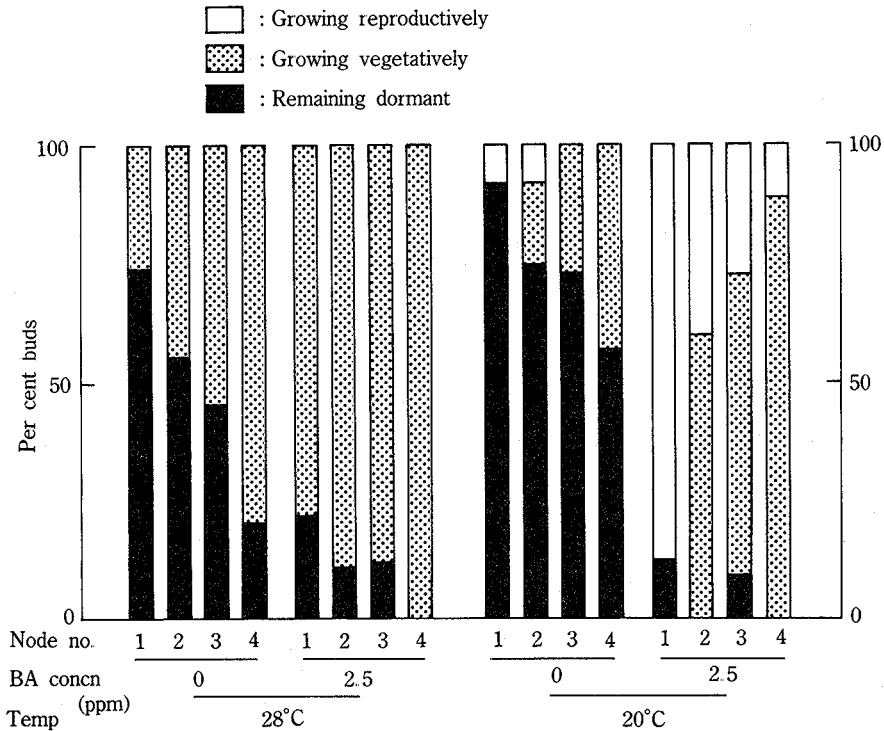


Fig. 8. Effect of temperature on the growth patterns of lateral buds cultured on VW medium supplemented with 2.5 ppm BA.

Flower-stalk cuttings were cultured with 16-h light (500 lux).

な葉は全く観察されなかった (Plate I-5).

5. 活性炭および PVP の影響

ファレノプシスの組織は、フェノール類を多量に含んでいると言われている。ファレノプシスの茎頂培養において、茎頂から多量に滲出する黒色物質は、このフェノール類の酸化物であり、この黒色物質が茎頂の活着と PLB の形成を抑制すると考えられている⁸⁶⁾。

花茎培養においても、培養花茎片の切口からこの黒色物質が滲出し、培地を黒変させる。ここでは、この黒色物質が、花茎片の腋芽の発達を阻害するのではないかと考え、この黒色物質を吸着させるために、活性炭 (activated charcoal) または PVP (polyvinilpyrrolidone) を培地に添加し、その影響を検討した。

材料および方法

活性炭 (半井化学薬品) および PVP (半井化学薬品, M. W. = abt. 24500) は、それぞれ 0.2% (w/v) と 0.4% (w/v) の濃度で、オートクレーブ前に、coconut water 20% を添加した VW 培地に加えた。材料には *Phal. amabilis* 系交雑種の、小花が数輪開花した状態の花茎を用い、花茎片を調整後表面殺菌し、培地に植付けた。培養条件は、25°C, 16時間日長 (900 lux) とした。

結果

15週間培養後の非汚染花茎片における腋芽の発育方向を第9図に示す。培地に添加した活性炭あるいは PVP は、培養花茎片の腋芽の発育方向に影響を与えた。すなわち、0.2% の活性炭添加では、休眠腋芽は、対照区に比べやや減少したが、0.4% では差がなかった。また、活性炭 0.2% と 0.4% の両添加区では、二次花茎に発

Table 7. Effect of charcoal and PVP in culture medium on the vegetative growth *in vitro* of lateral buds.

Additives (%)	concn.	No. of shoots developed	Vegetative growth		
			No. of leaves	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
Charcoal	0.2	17	1.7b*	26.9a	13.3a
Charcoal	0.4	14	2.2a	28.0a	13.7a
PVP	0.2	17	1.3c	22.1a	10.4bc
PVP	0.4	8	1.4bc	24.8a	9.9c
cont.		22	1.7b	26.8a	12.1ab

Data were recorded 15 weeks after culture.

* Numbers in a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (*t*-Test).

達する腋芽が増加し、シュート形成を示す腋芽は減少した。PVP 添加区では、対照区に比べ、休眠腋芽の割合が高かった。また、PVP 0.4% 添加では、11.8% の花茎片が枯死した。

次に、各区においてシュートとして発達した腋芽の、培養15週後の生長状態を第7表に示す。活性炭0.4% 区で葉数がわずかに増加したことを除いて、活性炭添加区のシュートの生長は、対照区のそれに比べ有意な差は認められなかった。一方、PVP の両濃度区では、対照区と比較して、葉長の差は認められなかったが、葉数は0.2% 区で、葉幅は0.4% 区でそれぞれ減少した。

第2節 花茎片の大きさと腋芽の発育

ファレノブシスの花茎培養では、一般に、腋芽をもつ数 cm の長さの花茎片を材料とする。それに対し、花茎組織をわずかにつけてえぐり取った腋芽を材料とする方法も報告されている⁷⁰⁾。しかし、これまで培養花茎片の長さ、その腋芽の発育との関係は、ほとんど検討されておらず、わずかに、王・鳥潟⁹⁶⁾が花茎組織の一部をつけた腋芽と従来の長さの花茎片の比較を行なっているのみである。培養花茎片の腋芽の発育方向がその花茎組織の長さ(量)の影響をうけることが推察されるので、この点を明らかにするため以下の実験を行なった。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種(10年生株)の小花が数輪開花した状態の花茎を供試した。培養花茎片の種類として、1 腋芽を含む花茎片の長さを、1, 2, 4 cm としたもの、および約 3×2×2 mm の花茎組織をつけて切取った腋芽だけの採取片の4種類とした。なお、これらの培養体は、原則として、5 cm の長さの花茎片を表面殺菌した後、無菌的に調整した。

腋芽のみの採取片は、花茎組織部が培地に軽く埋まるように植付け、他の花茎片はこれまでの実験と同様、培

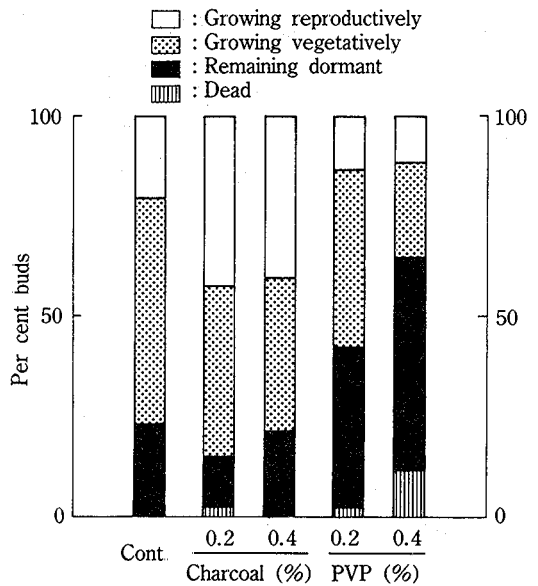


Fig. 9. Effect of charcoal and polyvinylpyrrolidone (PVP) in culture medium on the growth patterns of lateral buds of flower-stalk cutting. Flower-stalk cuttings were cultured at 25°C with a 16-h light (900 lux).

地上に腋芽が約 5mm 出るように植付けた。なお、培養条件は、前述の実験 (1.) で、休眠維持、シュートおよび二次花茎形成のいずれもが認められた 25°C の温度 (900 lux, 16時間日長) とした。

結 果

15週間培養後の非汚染花茎片における腋芽の発育方向を第10図に示す。腋芽部分を切取った培養片を除き、花茎片の長さが短くなるに従い休眠を維持する腋芽と二次花茎形成を示す腋芽の割合は減少し、シュート形成に向かう腋芽の割合が増加した。腋芽部分のみの培養体では、その 4.8% が枯死し、休眠腋芽の割合は 4cm の花茎片のそれと同程度であったが、萌芽した腋芽はすべてシュートに発達した。この場合、他の 3 種類の長さの花茎片の場合とは異なり、腋芽が一旦約 5~7mm の球状に肥大してから葉を出現させた。また、球状に肥大した後、カルスまたは PLB を形成したものが 2 例認められた。

次に、15週間培養後のシュートの生長状態を第 8 表に示す。花茎片をつけて培養した時、シュートの栄養生長に花

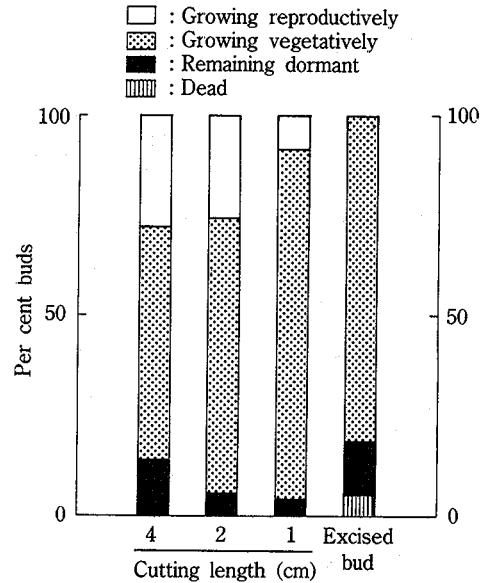


Fig. 10. Effect of length in flower-stalk cutting on the subsequent growth patterns of lateral bud *in vitro*.

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

Table 8. Effect of length in flower-stalk cuttings on the vegetative growth *in vitro* of lateral buds.

Cutting length (cm)	No. of shoots developed	Vegetative growth		
		No. of leaves	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
4	21	2.0a*	26.7a	11.7a
2	24	2.3a	25.0a	11.6a
1	41	2.1a	23.3a	11.1a
Excised bud	31	1.6b	15.2b	9.6b

Data were recorded 15 weeks after culture.

* Numbers in a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (*t*-Test).

Table 9. Effect of length in flower-stalk section on the growth of its lateral bud and root formation.

Cutting length (cm)	No. cultured	No. of shoots developed	Per cent shoots with root (%)	Av. no. of roots per shoot	Av. length of root (mm)
4	36	21	0 %	-	-
2	35	24	4.2	2.0	12.0
1	47	41	31.7	1.3	8.9
Excised bud	38	31	64.5	1.6	8.3

Flower-stalk cuttings and excised buds were cultured on VW+coconut water 20% (v/v), at 25°C with a 16-h light (900 lux).

Data were recorded 15 weeks after culture.

茎片の長さの違いによる有意な差は認められなかった。これに比べ、腋芽のみの培養体から得られたシュートは葉長および葉幅は短く、葉数も少なく、生長は不良であった。

これまでの花茎培養に関する実験では、15週間培養時に発育したシュートが発根する例は極めて少なかった。ところが、本実験において、腋芽部分を切取った培養体のシュートで発根がみられたので、各区でシュートの発根状態を調査した。4 cmの花茎片のシュートでは発根は全く認められなかったのに対し、花茎片の長さが短く(花茎組織が少なく)なるにつれて発根率が高まった(第9表)。

第3節 微生物汚染防止のための抗菌剤の利用

花茎培養によって得られたシュートを葉片培養の材料源とする場合、この材料源を可能なかぎり多数確保することが重要であることを本章第1章において指摘した。しかしながら、前述の殺菌法では、細菌や糸状菌などの微生物による培養花茎片の汚染を完全に防止することができず、全体としての繁殖効率が制限されることがしばしばある。これまでに、ファレノプシスの花茎片の表面殺菌には、アルコール^{44, 114, 125, 150}、次亜塩素酸カルシウム溶液^{20, 111, 150} および次亜塩素酸ナトリウム溶液^{44, 70, 110, 114, 125, 150}等の殺菌剤が使用されてきた。ところが、これらの殺菌剤で入念に殺菌を行っても、培養花茎片の完全な無菌化は困難であった(Plate I-6)。

最近、植物の組織や細胞の培養における外植体の無菌化に抗菌剤(antimicrobials)を用いる方法が報告されている。たとえば、ヒマワリのクラウンゴールの培養³⁷、シクラメンの塊茎培養²⁹、キクイモの塊茎培養¹⁰¹、シロイヌナズナのカルス培養¹²⁴、ペチュニアのプロトプラストの培養¹⁰⁶、タバコの細胞培養¹⁰⁵、およびラン種子の無菌発芽^{9, 144, 145}や茎頂培養¹⁶などの研究で、抗菌剤が汚染防止のために使用されている。

そこで本節ではまず、微生物によるファレノプシス花茎片の汚染が抗菌剤によって防止できるか否かを調べた。さらに、花茎上に存在する細菌の各種薬剤に対する感受性を調査し、これらの結果をもとに、花茎培養における抗菌剤利用の実用性について検討した。

1. 汚染防止に対する抗菌溶液の有効性

植物組織培養における培養体の汚染は、主として細菌と糸状菌による。このため抗菌剤によって培養体の無菌化を実現しようとする場合には、抗細菌剤(antibacterial agent)と抗カビ剤(antifungal agent)の両方を用いなければならない。さらに、一般に、抗菌剤は殺菌スペクトラムが比較的狭いので、実用的には異なる作用スペクトラムをもつものを何種類か組合せて使用することが、汚染防止に有効と考えられる。そこで本項では、抗菌剤(抗カビ剤と抗細菌剤)を数種組合せた水溶液(以下、抗菌溶液とする)を用いて、従来の殺菌剤と同様の処理法により花茎片の表面殺菌を行ない、汚染防止効果を調べた。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種(10年生株)の開花株から、小花が2~3輪開花した花茎を採取して実験に供試した。抗菌溶液による花茎片の表面殺菌を以下の手順で行ない、これを標準殺菌法とした。すなわち、花茎を70%エタノールで浸した脱脂綿で3回拭いた後、各腋芽を中心に上下2.5 cmの位置で切断して花茎片とした。これらを70%エタノール中に10秒間浸漬、振とうし、ついで滅菌水で3度すすいだ。次に包葉をピンセットで取り除き、花茎片の両端部を各5 mm切除した。これらの花茎片を後に述べる方法で作製した抗菌溶液(Tween 20 0.1%を含む)中に浸漬し、暗黒中で30分間振とうした。処理後、花茎片を coconut water 20% (v/v) を添加した VW 培地 16 ml の入った硬質試験管(21×200 mm)に、培地上に腋芽が約5 mm 出るように植付けた。植付け後、培地上に同じ抗菌溶液を1 ml 注入した。以上の標準殺菌法による処理後、培養は25°Cで、最初の10日間は暗黒、その後は900 luxの16時間日長下で行なった。

抗菌溶液のための抗カビ剤として、Benlate, nystatin (Mycostatin), PCNB (pentachloronitrobenzen) および TBZ (thiabendazole) を、抗細菌剤として、penicillin-G, gentamicin, rifampicin, ampicillin (Vicillin) および vancomycin をそれぞれ用いた。これらを数種組合せて、処方 A, B, C および D とした (第10表)。各抗菌溶液は、それぞれの抗菌剤を 100% エタノール 8ml に溶解または懸濁し、滅菌水を 1l まで加え、所定の濃度とした。培養 1 カ月後に、細菌または糸状菌の発生が認められた場合、汚染とした。

Table 10. Composition of antimicrobial solutions for surface-sterilization in flower-stalk cuttings.

Antimicrobials	Formula			
	A	B	C	D
Benlate (f)*	50ppm	50ppm	10ppm	10ppm
nystatin (f)	25	25		
PCNB (f)		25	25	25
TBZ (f)			100	100
penicillin-G (b)	100			100
gentamicin (b)	50			
rifampicin (b)		10	10	10
ampicillin (b)		500	500	500
vancomycin (b)			50	

* f, antifungal agent; b, antibacterial agent

結 果

標準殺菌法による抗菌溶液 A, B, C および D の汚染防止効果を調べたところ、いずれの抗菌溶液も、抗菌溶液処理をしない対照区に比べ、培養花茎片の汚染防止に有効であった。花茎片の非汚染率は、とくに C 処方では 100%、D 処方では 91.2% で、Wilson 液のそれよりも高かった (第 11 図)。また、非汚染花茎片の生存率 (5 カ月後の生存花茎片数/非汚染花茎片数×100) は、いずれの処理区でも高く、差はなかった。次に、非汚染花茎片のうち栄養的発育を示した腋芽の 15 週後の生長状態を調査したが、区による差は認められなかった。

2. エタノールによる予備殺菌の効果

前項において、エタノールによる予備殺菌後の抗菌溶液処理の有効性が示されたが、その方法は実用的にはやや繁雑と考えられる。ここでは、エタノールによる予備殺菌の必要性および抗菌溶液の処理法について検討した。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種 (10 年生株) の株の小花が 2~3 輪開花した花茎を実験に供試した。花茎を、滅菌水または 70% (v/v) エタノールに浸した脱脂綿で 3 度拭き、それぞれ腋芽を中心に 4 cm の花茎片に切り分けた後、包葉を除去し、前項で効果の認められた抗菌溶液 C を用いて種々の方法で花茎片の表面殺菌を行なった。すなわ

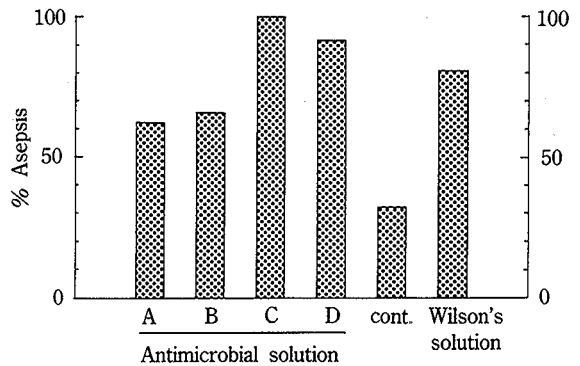


Fig. 11. Effect of antimicrobial solution on the asepsis of flower-stalk cutting cultures. 45-47 cuttings were used for each treatment.

ち、浸漬処理、注入処理、および浸漬・注入処理のほか、抗菌溶液処理をしない対照区を設けた。なお、培地および培養条件は前項に準じた。

結 果

花茎片を滅菌水で前処理した場合、抗菌溶液処理をしない対照区ではすべての花茎片が汚染した。これに対して、70% エタノールの前処理では、非汚染率は約 30% となった。エタノール処理後抗菌溶液の処理を行なった場合は、浸漬または注入のどちらか一方の処理だけでも、非汚染率は非常に高まった。一方、滅菌水の前処理後抗菌溶液処理を行なった場合には、浸漬処理、注入処理、浸漬・注入処理の順で非汚染率は高くなったが、いずれの場合も、エタノール前処理をした場合と比較すると著しく低かった (第12図)。

以上の結果は、エタノールの予備殺菌の効果を示すものであったので、抗菌溶液を用いずに、この点をさらに詳しく調べた。すなわち、(1) 70% エタノールで花茎を3度拭いてから花茎片に切り分ける、(2) (1)の処理後、70% エタノールに10秒間浸漬、(3) (2)の処理後、滅菌水で3度すすぐ、(4) (1)の処理後、エタノールに1分間浸漬した後、滅菌水で3度すすぐ、(5) 同様にエタノールに5分間浸漬後、滅菌水で3度すすぐ、の各処理を行なった。

それぞれの花茎片を培地に植えつけ、培養体の汚染の状況を観察した。その結果、エタノールで花茎を3度拭いたのみの区(1)では、非汚染率は56%であった。この処理のあとに、花茎片をエタノールに10秒間浸漬すると、非汚染率はわずかに増加した。しかしながら、エタノールに浸漬後花茎片を滅菌水ですすいだ場合は、非汚染率を高めることはなかった (第13図)。

3. 花茎の齢および花茎片採取部位と汚染の関係

これまでの花茎培養による報告によれば、花茎培養に供する花茎は無傷の健全なものが望ましいとされている⁴⁴⁾。ここでは、花茎の齢と培養花茎片の非汚染率との関係を調べた。また、花茎片を採取した花茎上の節位と汚染率の関係について調査した。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種 (10年生株) の株から、異なる発達段階の花茎を採取し実験に供試した。すなわち、

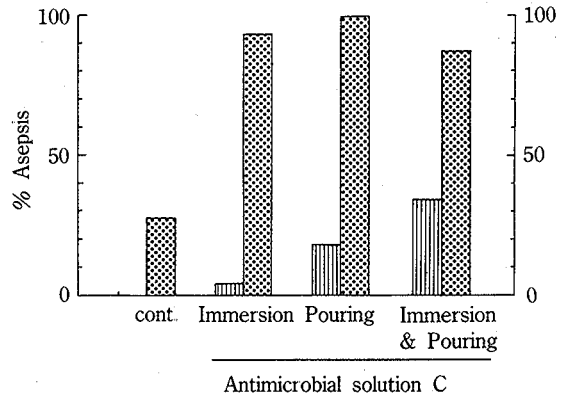


Fig. 12. Effect of pretreatment with sterile water (|||||) or 70% (v/v) ethanol (▨) on the asepsis of flower-stalk cutting cultures. After pretreatment, the cuttings were surface-sterilized with various methods; immersion in solution C, pouring solution C on the surface of media after planting, and immersion and pouring with solution C. 43-46 cuttings were used for each treatment.

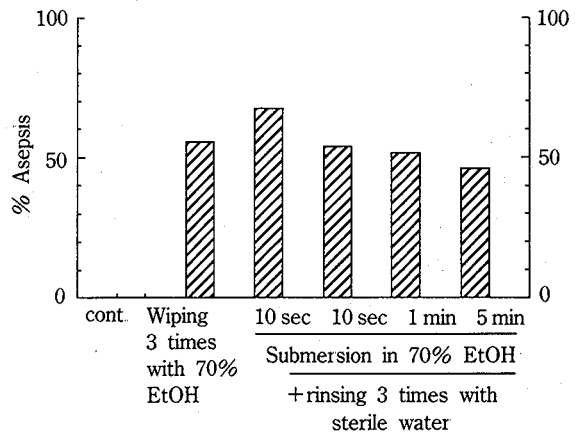


Fig. 13. Effect of separate treatment of ethanol on the asepsis of flower-stalk cutting cultures. After treatment with ethanol, the cuttings were planting on media without surface-sterilization by antimicrobial solution.

(1) 第1小花の直径が3~5mmの花茎, (2) 全小花が開花した花茎, および(3) 全小花が落下した状態の花茎をそれぞれ母株から採取し, 70% エタノールに浸した脱脂綿で3度拭いた後花茎片に切り分けた。これらの花茎片を, 抗菌溶液Cを用いた標準殺菌法により殺菌し, ついで培地に植付け, 1ヵ月後の培養花茎片の汚染状態を調べた。

また, 花茎片を採取した花茎上の節位と汚染の関係を調べるため, 4腋芽を有する花茎のそれぞれの節位から花茎片を採取し, Wilson液と抗菌溶液Cを使った標準殺菌法の2方法により表面殺菌を行ない, それぞれを培地に植付けた。なお, ここでは, 花茎上の最下位の花茎片を第1節とした。

結 果

第1小花が3~5mmに発達した若い花茎から採取した花茎片の非汚染率は94%であった。これに対して, 全小花が開花した花茎の場合, 非汚染率はわずかに低下し, さらに, 全小花が落下した花茎からの花茎片では, 非汚染率は72%で最も低くなった(第14図)。

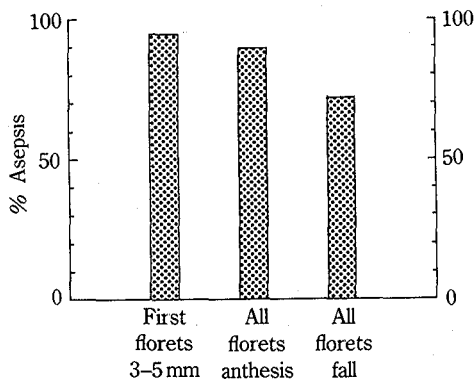


Fig. 14. Effect of age of flower-stalks on the asepsis of flower-stalk cutting cultures using antimicrobial solution. 43-49 cuttings were used for each treatment.

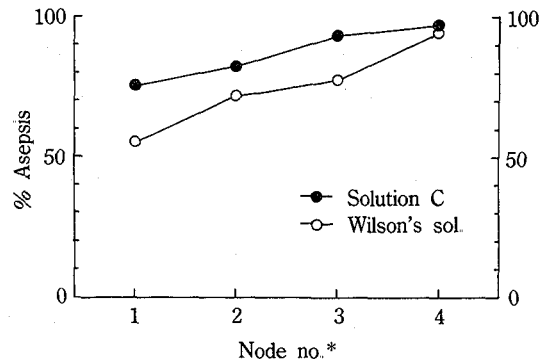


Fig. 15. Asepsis of flower-stalk cutting cultures in relation to original positions of cuttings on flower-stalk. * Numbering node is upwards from base. Cutting with lowermost node is node 1.

抗菌溶液Cによる標準殺菌法での非汚染率は, Wilson液を用いた従来の表面殺菌法でのそれと比較して, 各節位の花茎片で常に高かった。この場合, 最上節位(第4節)から採取した花茎片は, 両処理区とも非汚染率は最も高かった。また, 両処理区において, 花茎上の節位が低下するにしたがって, 花茎片の非汚染率は徐々に低下した(第15図)。

4. 抗菌剤の培地混入の影響

抗菌剤を用いて殺菌を必要としないラン種子発芽用培地を開発したArdittiの研究グループ^{144, 145)}は, その手法をファレノプシスの花茎培養に応用している⁵⁾。すなわち, 花茎片をNaClOで表面殺菌し, その後抗菌剤(第10表処方A)を直接混入した培地に植付ける方法である。ここでは, この抗菌剤の培地混入法と抗菌溶液による浸漬・注入法との汚染防止効果を比較した。

材料および方法

ファレノプシス交雑種(*Phal. White Falcon* × *Phal. Persistent*; 4年生株)の株から, 小花が2~3輪開花した状態の花茎を採取し, 実験に供試した。抗菌剤としては, 第10表の処方AおよびCを用い, それぞれの処方を以下の方法により抗菌剤混入培地を作製した。すなわち, coconut water 20% (v/v)を添加したVW培地を常法に

より作製し、14.4 ml を各試験管に分注後オートクレーブで加圧滅菌した。ついで、培地が75°Cに冷えた時に各処方10倍濃度の溶液1.6 ml を添加し、十分に攪はんした後、静置し培地を固まらせた。この両混入区と比較するために、抗菌溶液Cを用いた標準殺菌法も用いた。

結 果

抗菌剤の培地混入区において、1項の浸漬・注入法での結果と同様に、A処法に比べ汚染防止に対するC処法の有効性が示された。しかしながら、両処法の培地混入区では、花茎片の多くが培養中に枯死し（第16図）、生存した花茎片の腋芽もその栄養生長が阻害された（第11表）。一方、C処法の抗菌溶液を用いた浸漬・注入法においては、花茎片の枯死は全く認められなかった（第16図）。

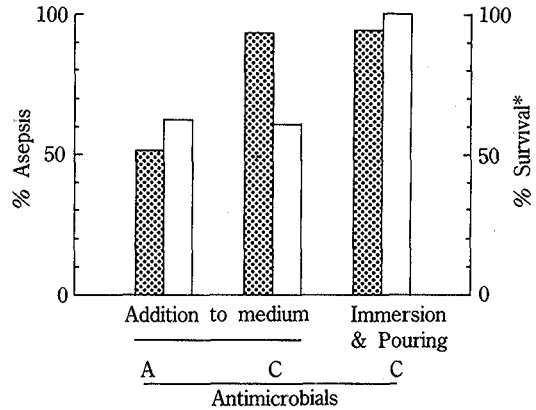


Fig. 16. Effect of different methods using antimicrobials on the aseptis (▨) and the survival (□) of flower-stalk cutting cultures. 42-44 cuttings were used for each treatment.

* Survival rate is calculated on basis of clean culture only.

Table 11. Effect of different methods using antimicrobials on the vegetative growth of flower-stalk cuttings cultured *in vitro*.

Antimicrobials		Vegetative growth		
Methods	Formula*	No. of leaves	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)
Addition to medium	A	1.9a	21.2a	10.1a
Addition to medium	C	1.8a	30.3b	9.8a
Immersion & Pouring	C	1.6a	35.5c	13.4b

Numbers followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level (*t*-Test).

* See Table 6.

5. 超音波洗浄器利用の効果

これまで抗菌溶液への花茎片の浸漬処理は手で振とうして行ってきた。しかし、この方法では、花茎片の皮目や小さな傷の部分に付着した微生物に、抗菌溶液が行き渡らない可能性がある。そこで、抗菌溶液処理を超音波洗浄器内で行ない、汚染防止と花茎片の腋芽の生存に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

ファレノプシス交雑種 (*Phal.* White Falcon × *Phal.* Persistent; 5年生株) の株から、全小花が開花したもの、一部の小花が萎凋・落下した花茎を供試した。抗菌溶液はC溶液とし、殺菌手順は超音波洗浄器の使用以外、標準的な方法とした。まず、エタノールで予備殺菌を行なった花茎片を抗菌溶液を入れた広口びんに入れ、これを超音波洗浄器 (Bransonic 220) 中に置いた。超音波洗浄器での処理は、30分間の浸漬の初めの5または10分間とし、次に抗菌溶液を新しいものに取り換えた後、残りの25分または20分間手で振とうした。対照として、標準的な方法 (30分間手で振とうして浸漬処理を行なう) による区も設けた。

結 果

5週間培養後の非汚染率と15週間培養後の生存率を第17図に示した。抗菌溶液浸漬処理時に超音波洗浄器を使用することは、花茎片の汚染防止に有効ではなかった。すなわち、非汚染率は、対照区よりも超音波洗浄器を使用した区で低く、かつ5分間区よりも10分間使用した区で低かった。また、花茎片の生存率も超音波洗浄器を使用した区で低かった。

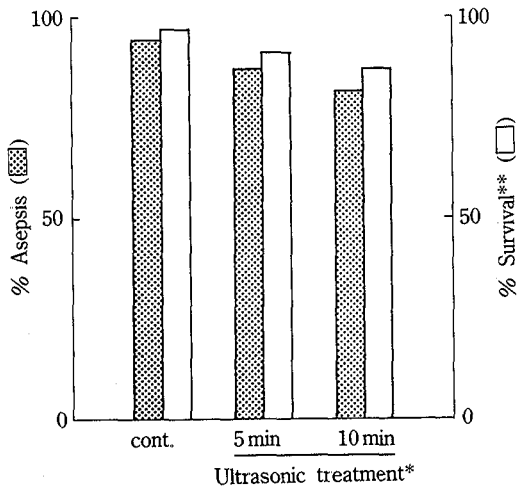


Fig. 17. Effectiveness of ultrasonic treatment in addition to antimicrobials sterilization in flower-stalk cutting culture.

* Flower-stalk cuttings with solution C in container were placed in ultrasonic equipment for 5 or 10 min.

** Survival rate is calculated on basis of clean culture only.

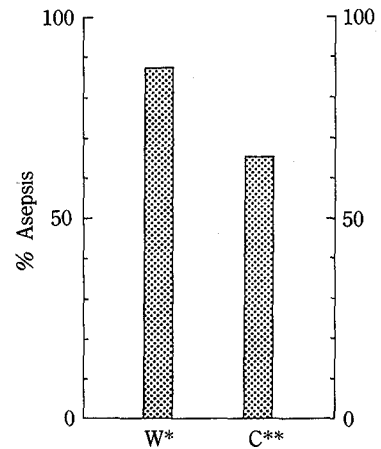


Fig. 18. Effectiveness of Wilson's solution and antimicrobial solution C as sterilizing agent in flower-stalk cutting culture.

* W=conventional surface-sterilization using 7% calcium hypochlorite solution

** C=standard surface-sterilization procedure using antimicrobial solution C.

6. 花茎から分離した細菌の薬剤感受性

これまでに、抗菌溶液（C処方）の浸漬・注入処理によって、花茎培養時の汚染がかなり防止できることが明らかとなった。しかし、この抗菌溶液の殺菌効果は実験ごとに差があり、常に完全に汚染を防止することは困難であった。また、Wilson液よりも非汚染率が低かったことも1度観察された（第18図）。これは、花茎に付着した微生物の中に、標準殺菌法によるC処方の抗菌剤では死滅しないものが存在するためと考えられる。これらの微生物は、肉眼による観察では細菌が大部分と思われた。

これまでに、花茎培養時に微生物が発育する（つまり、微生物による汚染が発生する）ことは、多くの研究者により報告されている^{70,114,125}が、それらの微生物の薬剤感受性については全く検討されていない。そこで、70%エタノールで拭いた花茎片を培養し、得られた汚染培養体から細菌を分離し、グラム染色性と形態を調査し、さらに、これらの各種薬剤に対する感受性試験を行なった。

材料および方法

汚染した培養花茎片から分離した供試菌株は、以下の方法で得た。1982年4月に *Phal. amabilis* 系交雑種（10年生株）の花茎（32本）を70%エタノールに浸した脱脂綿で、花茎基部から先端部に向かい3回、また各包葉の周囲を1回拭いた後、1腋芽を有する4cmの花茎片（計136花茎片）に切断し、常法で培養した。これらの培

養中に発育した微生物を potatodextrose 寒天平板 (PDA, ニッスイ) に画線塗抹し, 30°C で 2 日間培養後, 発育したコロニーのうち形態の異なったコロニーを新しい PDA 平板に再塗抹した。さらに 30°C で 2 日間培養し, 発育したコロニーのうち形態の異なったコロニーから細菌を採り, 常法⁴³⁾ によりグラム染色を行なった。その結果, グラム陽性桿菌 96 株とグラム陰性桿菌 5 株を得た。これらを受感性試験に供した。

これらの菌株は, 2 ml の trypticase soy 液体培地 (TSB, B.B.L) で 24 時間培養した菌液と 2 ml の滅菌グリセリンをよく攪はん後, -20°C で保存した。また, 使用に際しては, 5 ml の TSB に 0.01 ml のグリセリン保存した菌液を接種し, 24 時間前培養してから用いた。

抗生物質は, ペニシリン系として penicillin-G (PCG, 明治製薬)・ampicillin (ABPC, 明治製薬)・piperacillin (PIPC, 富山化学) の 3 種, セファロsporin 系として cephaloridine (CER, 塩野義製薬)・cefmetazole (CMZ, 三共) の 2 種, アミノ配糖体系として gentamicin (GM, 塩野義製薬)・debekacin (DKB, 明治製薬)・amikacin (AMK, ブリストル 萬有) の 3 種, マクロライド系として erythromycin (EM, 塩野義製薬)・rifampicin (RFP, 日本チバガイギー)・lincomycin (LCM, 日本アップジョン) の 3 種, テトラサイクリン系として minocyclin (MINO, 日本レダリー) の 1 種と vancomycin (VCM, シグマ), chloramphenicol (CP, 山之内製薬) の計 14 種を使用した。また, 化学療法剤の pipemidic (PPA, 大日本製薬), nalidixic acid (NA, 第 1 製薬) と消毒剤のヒビテン (H, 住友化学工業) もあわせて使用した。

抗生物質は, 使用に際して, 感受性測定に用いた培地 (PDA) の液体培地で, 力価の明らかな原末を 2 倍連続希釈法で 100 $\mu\text{g/ml}$ から 10 段階希釈した。ただし, 化学療法剤の PPA および NA は 800 $\mu\text{g/ml}$ から, 消毒剤のヒビテンは 5% から各々 10 段階希釈した。抗生物質を組合せて使用した実験では, C 溶液中の抗細菌剤の組合せ (ABPC 500 $\mu\text{g/ml}$ ・VCM 50 $\mu\text{g/ml}$ ・RFP 10 $\mu\text{g/ml}$) と最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, 以下 MIC と略す) の結果にもとづいて, (ABPC・VCM・RFP) の組合せでは各々 (4000・400・80 $\mu\text{g/ml}$) から, (ABPC・RFP) の組合せでは各々 (800・400 $\mu\text{g/ml}$) から, それぞれ 10 段階希釈した。

なお, 水に難溶の RFP はメタノールに溶解してから液体培地で希釈し, MINO は超音波で分散懸濁し, CP は加熱溶解した。

MIC は, 化学療法学会標準法⁸¹⁾ に準じて寒天平板希釈法で行なった。感受性測定培地は PDA 培地 (ニッスイ) を用いた。薬剤加平板は, 1 ml の薬剤希釈液と 9 ml の感受性測定培地をよく混和して作製した。エタノールで拭いた花茎片から分離した細菌については, MIC は, 薬剤加平板に緩衝食塩水にゼラチンを加えた BSC (buffered saline with gelatin) で 1/100 に希釈した前培養菌液 (10^6 cell/ml) をマイクロプランター (佐久間, 東京) で接種し, 37°C で 24 時間培養後, 肉眼でコロニーの発育が全く認められない最低濃度とし, 力価 ($\mu\text{g/ml}$, ただしヒビテンは%) で示した。なお, 供試菌株が発育したか否かは, 薬剤無添加平板を対照として判断した。

結 果

(1) グラム陽性桿菌の薬剤感受性

グラム陽性桿菌 96 株に対する供試抗生物質の MIC 分布を第 12 表に示す。VCM, RFP および MINO の MIC は, $\leq 0.2 \mu\text{g/ml}$ にすべての菌株が分布していた。PCG, PIPC, ABPC, CER および GM の MIC は $\leq 25 \mu\text{g/ml}$ に分布し, 77.1~95.8% の菌株は $\leq 0.2 \mu\text{g/ml}$ に分布した。DKB の MIC のほとんどは $\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$ に分布した。その他, CMZ では約 70% の菌株が 0.4~0.8 $\mu\text{g/ml}$ に分布し, AMK では約 80% が 0.8~1.6 $\mu\text{g/ml}$ に分布した。EM の MIC は, 約 94% が ≤ 0.2 ~25 $\mu\text{g/ml}$ に分布したが, 6 株は $> 100 \mu\text{g/ml}$ であった。LCM の MIC は 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上に 99% 分布していた。

また, 化学療法剤 PPA および NA に対するグラム陽性桿菌 (以下, G (+) 桿菌とする) の感受性を調べたと

Table 12. Minimum inhibitory concentration (MIC) of various antibiotics in 96 types of Gram positive bacteria isolated from flower stalk.

Antibiotic**	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	100<
PCG	88*	1	1	2		2	1	1			
PIPC	74	10	3	6		1		2			
ABPC	92		1	1			2				
CER	88	3	1	1	1		1				
CMZ	4	34	33	13	8	4					
VCM	96										
GM	83	4	3	4		2					
DKB	82	2	2	2	4		2				2
AMK	1	14	35	41	3	1		1			
EM	2	27	31	10	2	14	3	1			6
RFP	96										
LCM	1									1	94
MINO	96										
CP					47	44	3		1		

* Data represented the number of Gram positive bacteria types dead at indicated concentration. 96 types of bacteria were examined for each antibiotic.

** PCG, penicillin-G; PIPC, piperacillin; ABPC, ampicillin; CER, cephaloridine; CMZ, cefmetazole; VCM, vancomycin; GM, gentamicin; DKB, dibekacin; AMK, amikacin; EM, erythromycin; RFP, rifampicin; LCM, lincomycin; MINO, minocyclin; CP, chloramphenicol.

Table 13. Minimum inhibitory concentration (MIC) of pipemidic acid (PPA) and nalidixic acid (NA) in 96 types of Gram positive bacteria isolated from flower-stalk.

Chemical	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	200	400	800	800<
PPA	17*	11	37	22	4	1				1	2
NA	83	5		1	1	3			1		1

* Data represent the number of Gram positive bacteria types dead at indicated concentration.

ころ (第13表), MIC 1.6~50 $\mu\text{g/ml}$ にほとんどの菌株が分布した。さらに消毒剤ヒピテンに対する感受性を調べたところ, 98% の菌株が $\leq 0.01\%$ であった。

(2) グラム陰性桿菌の薬剤感受性

次に, 5株のグラム陰性桿菌 (以下, G(-)桿菌とする) に対する各薬剤の MIC を調べたところ, 1菌株を除く他の4菌株に対する PCG, ABPC, CER, CMZ, VCM, EM, LCM および CP の MIC は $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ であり, PIPC の MIC は 25~100 < $\mu\text{g/ml}$, RFP のそれは 6.3~50 $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし, 供試アミノ配糖体系の MIC は, 2菌株で高く, MINO の MIC も異なる2菌種で高かった (第14表)。

化学療法剤 PPA と NA の MIC を見ると, 前者で 2.5~100 $\mu\text{g/ml}$, 後者では 12.5~800 < $\mu\text{g/ml}$ に分布していた (第15表)。ヒピテンの MIC は, 5株中3株が 0.63~1.25% と比較的高い値を示した (第16表)。

(3) 抗生物質の併用効果

作用機構の異なる抗生物質を組合せることにより, 細菌に対する相乗的な殺菌効果を期待できる。そこで, 多くの薬剤に対して高い MIC を示した G(+)桿菌12株と G(-)桿菌4株に対する (ABPC・VCM・RFP),

Table 14. Minimum inhibitory concentration (MIC) of various antibiotics in five types of Gram negative bacteria isolated from flower-stalk.

Antibiotic**	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.2	0.4	0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	100<
PCG	1*										4
PIPC	1							1			3
ABPC			1								4
CER					1						4
CMZ					1						4
VCM	1										4
GM	1							2	2		
DKB	1							2		2	
AMK		1					1	1	1	1	
EM					1					1	3
RFP		1					1	2		1	
LCM											5
MINO		1		1	1					2	
CP							1			2	2

* Data represent the number of Gram negative bacteria types dead at indicated concentration. Five types bacteria were examined for each antibiotic.

** See footnotes of Table 8.

Table 15. Minimum inhibitory concentration (MIC) of pipemidic acid (PPA) and nalidixic acid (NA) in five types of Gram negative bacteria isolated from flower-stalk.

Chemical	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	200	400	800	800<
PPA					2*	1	2				
NA				1		1		1			2

* Data represent the number of Gram negative bacteria types dead at indicated concentration.

Table 16. Minimum inhibitory concentration (MIC) of Hibiten in five types of Gram negative bacteria isolated from flower-stalk.

Sterilant	MIC (%)										
	≤ 0.01	0.02	0.04	0.08	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5	5<
Hibiten® *	2**						2	1			

* Hibiten® is a popular sterilant used in hospital.

** Data represent the number of Gram negative bacteria types dead at indicated concentration.

(ABPC・RFP) および (PCG・GM) の組合せの併用効果を発育阻止濃度で調べてみた。

その結果、12株のG (+) 桿菌に対する (ABPC・VCM・RFP) と (ABPC・RFP) の発育阻止濃度は各々 ($\leq 8 \cdot \leq 0.8 \cdot \leq 0.02 \mu\text{g/ml}$)、($\leq 8 \cdot \leq 0.02 \mu\text{g/ml}$) という値を示した。これに対して、(PCG・GM) の組合せでは、2 菌株に対して高い値を示した以外は、すべて ($\leq 1.6 \cdot 0.8 \mu\text{g/ml}$) であった (第17表)。

一方、4 株のG (-) 桿菌に対する抗生物質の併用効果を発育阻止濃度で調べた結果、G (+) 桿菌のそれより著

Table 17. Inhibitory concentration of a certain combination of antibiotics in 12 types of selected Gram positive bacteria isolated from flower-stalk.

Bacteria* type	Antibiotic combination (inhibitory concn $\mu\text{g/ml}$)								
	(ABPC	VCM	RFP)	(ABPC	RFP)	(PCG	GM)		
82-16	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-24	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-49	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(31	16)		
82-50	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-53	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-37	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-38	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-44	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-45	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-73	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-74	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(≤ 1.6	≤ 0.8)		
82-22	(≤ 8	≤ 0.8	≤ 0.002)	(≤ 8	≤ 0.002)	(25	12.5)		

* This code is given to identify each type and does not mean any established nomenclature.

Table 18. Inhibitory concentration of a certain combination of antibiotics in four types of selected Gram negative bacteria isolated from flower-stalk.

Bacteria* type	Antibiotic combination (inhibitory concn $\mu\text{g/ml}$)								
	(ABPC	VCM	RFP)	(ABPC	RFP)	(PCG	GM)		
82-14	(250	25	5)	(250	5)	(100	50)		
82-29	(250	25	5)	(250	5)	(50	25)		
82-30	(250	25	5)	(250	5)	(50	25)		
82-58	(2000	200	40)	(4000	80)	(400	200)		

* This code is given to identify each type and does not mean any established nomenclature.

しく高い値を示した。とくに、82-58株に対する発育阻止濃度は (ABPC・VCM・RFP) の組合せでは (2000・200・40 $\mu\text{g/ml}$)、(PCG・GM) では (400・200 $\mu\text{g/ml}$) という値を示した (第18表)。

7. 抗菌溶液処理後の花茎片から分離した細菌の抗生物質感受性

前項において、ファレノプシスの培養花茎片から分離した細菌のうち、グラム陰性桿菌のほとんどで、多くの薬剤に対する MIC は高かった。また、C処方中の3種の抗細菌剤の組合せ (ABPC・VCM・RFP) で発育阻止濃度を測定したところ、グラム陰性桿菌の中には、発育を阻止できない菌株が存在した。これらのことから、C溶液処理を行ってもなおかつ生存する細菌はグラム陰性桿菌であることが推察される。そこで、この点を確かめるために、実際に抗菌溶液処理をした花茎から分離した細菌を用いて、グラム染色性と形態を調査し、さらに抗生物質感受性試験を行なった。

材料および方法

C溶液を処理した花茎片から分離した菌株は、以下の方法で得た。1983年1～9月に、*Phal. amabilis* 系交雑種の花茎を用い、C溶液の標準殺菌法による表面殺菌後、花茎培養を行なった。このうちの汚染された花茎片 (39花茎片) で発育してきた微生物を PDA 平板に画線塗抹し、発育してきたコロニーから細菌および糸状菌をとりグラム染色を行なった。その結果、グラム陰性桿菌 (G (-) 桿菌) 23株と糸状菌9株を得た。このうち色およ

び形態の異なったG(-)桿菌15株のみについて、抗生物質感受性試験を行なった。なお、糸状菌についても同様に感受性試験を行なったが、供試した抗生物質がすべて抗細菌剤であり発育を阻止できなかったため結果は示さなかった。この供試菌株は、TSBで十分に発育しなかったためPDAを用いた斜面培地で保存した。

感受性試験に用いた抗生物質は前項と同様のものを用いた。PCG・ABPC・PIPC・CER・CMZ・GM・CPおよびVCMは1600 µg/mlから、DKB・AMKおよびMINOは2400 µg/mlから、RFP・LCMおよびEMは800 µg/mlから各々15段階希釈した。また、前項と同様、それぞれの菌株に対して(ABPC・VCM・RFP)の組合せの併用効果についてあわせて調査した。なお、MINO・RFP・LCM・EMおよびCPでは、高濃度の場合、溶解が困難であり、懸濁液で使用した。

14種の抗生物質に対するMICは前項のMIC測定法に準じた。MIC測定のための接種用菌液は、PDA斜面培地で発育した菌体を2mlのBSGに1白金耳とり作製した。

結 果

(1) 抗生物質感受性

PCG, PIPCおよびABPCのMICは ≥ 200 µg/mlに分布し、供試菌株の67~87%のMICは ≥ 1600 µg/mlと高い値を示した。CERとCMZのMICは ≥ 12.5 µg/mlにほとんどが分布し、 ≥ 1600 µg/mlに分布する菌株は53~67%であった。GMのMICは800 µg/mlをピークに分布し、 ≥ 2400 µg/mlで発育する菌株が2株認められた。EMもGMと同様、800 µg/mlをピークに分布した。RFPのMICは供試濃度全域に分布したが ≥ 800 µg/mlで発育する菌株が3株認められた。MINOのMICは16.3~1200 µg/mlにほとんどが分布し、VCMとCPのMICは、

Table 19. Minimum inhibitory concentration (MIC) of various antibiotics in some Gram negative bacteria isolated from cultured flower-stalk cuttings* using antimicrobial solution (C).

Antibiotic	MIC (µg/ml)													
	≤ 0.8	1.6	3.1	6.3	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	1600<	
PCG									1**		1	4	9	
PIPC										1	1		13	
ABPC									2	1	2		10	
CER	1						1	1	1	1	3	2	6	
CMZ					1	1	1	1		1		3	7	
VCM		1						1	3			1	9	
GM						2	2		1	2	6	2		
CP		1						3	2	4	2	1	2	
	≤ 1.0	2.0	4.1	8.1	16.3	32.5	75	150	300	600	1200	2400	2400<	
DKB			1	1		1		1	2		6		2	
AMK	1			3				1		2	6	1	1	
MINO	2				1	1	4		2	3	2			
	≤ 0.4	0.8	1.6	3.2	6.3	12.5	25	50	100	200	400	800	800<	
EM							1	1	2		1	9	1	
RFP	2	1			1		4		1	2			3	
LCM												1	14	

* Flower-stalk cuttings were pre-treated with antimicrobial solution containing 10ppm Benlate, 25ppm PCNB, 100ppm TBZ, 10ppm rifampicin, 500ppm ampicillin, and 50ppm vancomycin.

** Data obtained by testing bacterium samples from 15 primary isolates, and values represent the number of dead bacteria-isolates at the concentration indicated.

≥100 μg/ml にほとんどが分布した (第19表)。

(2) 抗生物質の併用効果

第20表に示したように, ABPC, VCM および RFP のそれぞれの単独使用に比較して, 3剤の相乗的な併用効果が4菌株で認められた。しかし, 10菌株で, C溶液の抗細菌剤の組合せ濃度 (ABPC 500 μg/ml・VCM 50 μg/ml・RFP 10 μg/ml) よりも高い, 発育阻止濃度が示された。

Table 20. Inhibitory concentration of a certain combination of antibiotics in some Gram negative bacteria isolated from cultured flower-stalk cuttings** using antimicrobial solution (C).

Bacteria-isolates*	Antibiotic combination (inhibitory concn μg/ml)		
	(ABPC)	VCM	RFP)
83-25	62.5	6.25	1.25
83-22	125	12.5	2.5
83-23	62.5	6.25	1.25
83-24	125	12.5	2.5
83- 1	2000	200	40
83- 4	1000	100	20
83- 6	1000	100	20
83- 7	1000	100	20
83-12	2000	200	40
83-13	4000	400	80
83-17	4000	400	80
83-18	500	50	10
83-21	2000	200	40
83-26	2000	200	40
83-27	2000	200	40

* This code is given to identify each isolates and does not mean any established nomenclature.

** Flower-stalk cuttings were pre-treated with antimicrobial solution containing 10ppm Benlate, 25ppm PCNB, 100ppm TBZ, 10ppm rifampicin, 500ppm ampicillin, and 50ppm vancomycin.

8. 抗菌溶液処方の改良

本節6項の結果より花茎から分離した細菌に対するMINO, PIPC, RFPおよびGMの100%発育阻止濃度は, 比較的低いことが明らかとなった。そこで, これまでの抗菌溶液の処方では使用していなかったMINOとPIPCについて調査した。また, 花茎片の予備殺菌にはこれまで70%エタノールを使用してきたが, これまでの結果より, 消毒剤ヒピテンの利用も有効と考えられたので, この点についても検討した。

材料および方法

抗菌溶液の処方を再検討した実験では, 処方C (第10表), CのABPCをPIPC (500ppm)に変更した処方 (以下, C-1とする) およびCのABPCをMINO (500ppm)に変更した処方 (C-2とする) の3処方を用いた。それぞれの抗菌溶液による殺菌手順は標準的な方法とした。材料には, *Phal. amabilis* 系交雑種 (10年生株) の第1小花の節以下に4または5節をもった花茎を1区あたり11または12本 (50~53花茎片) 用いた。これらの花茎の開花状態は全小花が開花したものから一部の小花が萎凋落下したものであった。

ヒビテンによる予備殺菌について検討した実験では、70% エタノール10秒間、0.02% および0.2% ヒビテンの超音波洗浄器使用5分間と3区を設けた。予備殺菌を除き、手順はC溶液を用いた標準殺菌法とした。材料には、上記と同じものを1区あたり10または11本（3または4腋芽を有する花茎）供試した。

結 果

(1) 抗細菌剤 MINO または PIPC の効果

5週間培養後の非汚染率を第19図に示す。非汚染率はMINOを加えたC-2溶液で最も高かったが、C溶液とC-1溶液のそれは約20%、C-2溶液では39.8%と、いずれも前述の結果よりはるかに低かった。

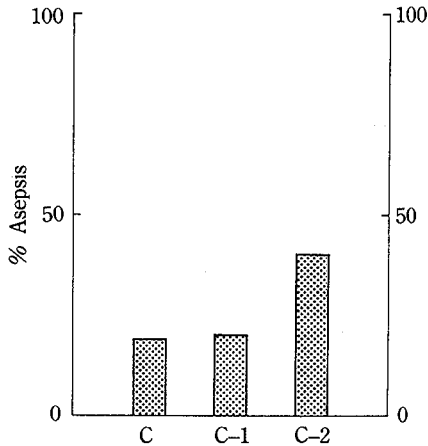


Fig. 19. Effectiveness of various antimicrobial solutions as sterilizing agent for flower-stalk cutting culture.

C=Benlate 10 ppm, PCNB 25 ppm, TBZ 100 ppm, rifampicin 10 ppm, ampicillin 500 ppm, vancomycin 50 ppm.
 C-1=as in (C) except ampicillin was replaced by 500 ppm piperacillin.
 C-2=as in (C) except ampicillin was replaced by 500 ppm minocyclin.

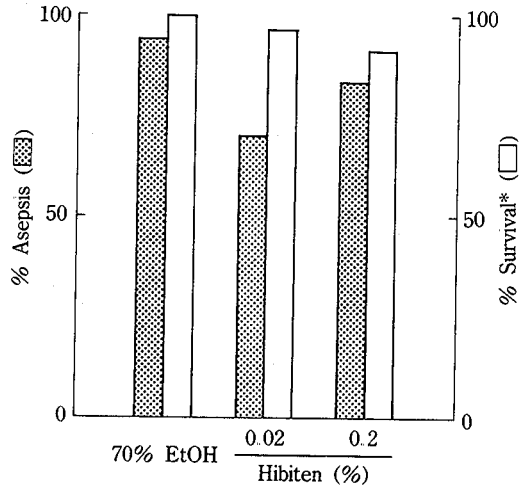


Fig. 20. Effectiveness of ethanol and Hibiten in flower stalk cutting culture as pre-sterilizing agent. * Survival rate is calculated on basis of clean culture only.

(2) 予備殺菌剤ヒビテンの効果

5週間培養後の非汚染率と15週間培養後の生存率を第20図に示す。エタノールに比べ、ヒビテンによる予備殺菌を行なった区は非汚染率はやや低かった。また、生存率もヒビテン区の方がやや低かった。

9. 殺菌剤と抗菌溶液の重複処理

本節6項の結果から、C溶液中の抗細菌剤 (ABPC・VCM・RFP) で发育を阻止できない細菌が、花茎上に存在することが明らかとなった。また、花茎片から分離した細菌の種々の薬剤に対する感受性試験の結果有望と考えられたMINOやPIPCによってC溶液の改良を行なっても完全に微生物汚染を防止することはできなかった。とくに、G(-)桿菌のほとんどは多剤耐性を示したので、他の抗細菌剤を加えてさらにC溶液の改良を検討することは極めて困難であると考えられる。そこで、ここでは花茎片の汚染防止をより確実なものとする一方法として、殺菌剤と抗細菌剤の両方を使用する方法について検討した。

材料および方法

実験区は、Wilson液およびWilson液とC溶液を重複処理する2区とした。Wilson液による花茎片の殺菌手順は、本章第1節で示した方法とした。Wilson液とC溶液の重複処理を行なった区では、まず、Wilson液で表面

殺菌し、その後C溶液を用いて標準殺菌法により花茎片を殺菌した。材料には、ファレノプシス交雑種である *Phal.* White Falcon×*Phal.* Persistent と (*Phal.* White Falcon×*Phal.* Persistent)×*Phal.* Jimmy Hall の花茎を1区当り、それぞれ5本と3本(35~36花茎片)を供試した。

結 果

5週間培養後の非汚染率と15週間培養後の生存率を第21図に示す。Wilson液だけで殺菌した花茎片の非汚染率は88.6%であった。これに対し、Wilson液による殺菌後、C溶液を処理した区では97.1%の高い非汚染率が得られた。また生存率は両区とも高かった。

第4節 考 察

Rotor¹¹¹⁾ は、ファレノプシスの花茎培養を試み、培養した花茎上の腋芽が幼植物として発育することを報告した。それ以来今日まで、花茎培養により繁殖しようとする数多くの研究が行なわれてきた^{4, 5, 8, 17, 20, 44, 67, 68, 70, 110, 114, 116, 125, 143, 147, 150)}。その結果明らかにされたことは、培養花茎片の腋芽は必ずしも一定の発育をするわけではなく、一部は栄養生長でシュート(幼植物)を形成し、他の一部は再び花茎(二次花茎)として発育し、残りは萌芽せず休眠状態にとどまるということであった^{44, 67, 68, 125, 150)}。

ファレノプシスの母株からは、1シーズンに1~2本の花茎しか得られず、したがって培養に用いられる花茎片も10本以内に限定される。それらの腋芽の一部しか栄養生長をしないとすれば、第1章で論じた葉片培養による栄養繁殖はその第1段階で増殖効率上重大な制限を受けることになる。繁殖効率を高めるためには、花茎片の腋芽をすべてシュート形成に向かわせ、材料葉片を多数確保することを考えなければならない。しかし、この点に関しての知見は少なく、花茎の上位節から採取した花茎片の腋芽は二次花茎形成に向かいやすく、下位のものはシュートとなる傾向が報告されている^{67, 68, 110, 150)}だけで、ほとんど不明であった。このような背景から、本章第1および2節においては、培養した花茎腋芽の萌芽率を高め、さらに萌芽しても二次花茎とならずシュートになる要因(培地・培養条件)を見出すための諸実験を行なった。

前述の実験結果は、培養温度が花茎片の腋芽の発育方向を支配する1要因であることを明らかにした。これまでの報告では、培養温度については十分な考慮が払われておらず、一般に22~38°Cの温度が用いられた。本研究で明らかになったことは、花茎片の腋芽が、28°Cでは栄養生長、それ以下の温度では二次花茎の発達に向かうということであった。すなわち、培養花茎片の腋芽をシュートとして発達させたい場合には、28°Cで花茎片を培養する必要がある。

Tran Thanh Van¹⁴⁶⁾ は、*Phal. amabilis* と *Phal. schilleriana* の先端部を除去した花茎に27°Cの高温を与えると、腋芽はシュートとして発達することを報告している。また、ファレノプシスの主要腋芽は、12~21°Cの気温の時花茎として発達するが、高温(27~34°C)ではそれが抑制されることが知られている^{18, 90, 120, 146)}。

以上のことから、温度に対する *in vitro* での花茎腋芽の反応は、*intact* の植物体の主茎または花茎上の腋芽の温度反応と非常に類似していることが判明した。このことは、ファレノプシスは言うに及ばず、他のランの花茎

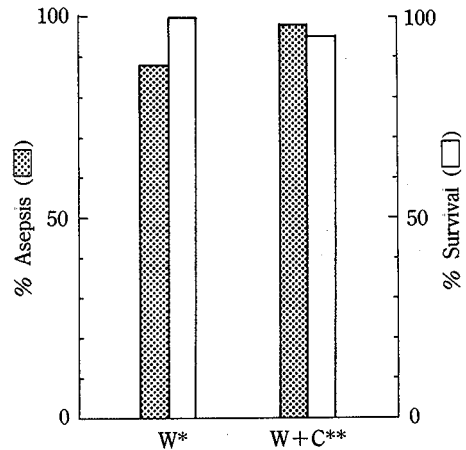


Fig. 21. Effectiveness of Wilson's solution, and combination of Wilson's solution and antimicrobial solution C as sterilizing agent in flower-stalk cutting culture.

* W=conventional surface-sterilization using 7% calcium hypochlorite solution

** C=standard surface-sterilization procedure using antimicrobial solution C.

培養が計画される場合にも考慮すべき知見であろう。

培養時の光条件についての実験結果では、日長は腋芽の発育に明確な影響を与えなかった。これに対し、照度は腋芽の発育方向に影響を及ぼした。照度が1600~170 luxの範囲では、低照度下でシュートに発達する腋芽が増加し、しかもそれらのシュートは正常に生長した。Friend²⁵⁾は、*Brassica campestris*の*in vitro*で発芽させた実生を低照度下で培養した場合、花芽分化株率が低下したことから、光合成を低下させる条件がこれを導いたと推察した。さらに彼は、この培地中に sucrose を添加すると花芽分化株率が回復することを認め、光合成の低下による花芽誘導の抑制は炭水化物の不足によるものと結論づけた。これらの結果は、低照度下で花芽分化の方向（二次花茎形成）に向かう腋芽が減少したという本実験の結果とは矛盾しない。しかしながら、この *Brassica* の例のように、多くの植物は葉の存在下で光に反応する。すなわち、腋芽が直接光に反応する例は少ない。そうした観点からすれば、ファレノプシスの花茎組織と腋芽だけの培養体が日長に反応しなかったことの説明は可能であるが、どの部位で照度の差異を感知したのかについての説明は困難である。ファレノプシスの花茎腋芽は、5~6リン片がすでに分化しているので、これらのリン片が照度の差を感知して反応した可能性もある。*Rhododendron* の1腋芽をもつ新茎切片の培養においても、シュート形成に対する照度の影響が認められている¹⁰⁴⁾。

花茎片の長さに関する実験結果から、花茎組織の長さが短くなるほど萌芽する腋芽の割合が増加し、またシュート形成に向かう腋芽が増加することが明らかとなった。他の多くの研究においては、一般に3~5 cmの長さの花茎片が用いられてきた^{44, 67, 68, 111, 125, 150)}。このような比較的長い花茎片が培養された場合には、二次花茎形成に向かう腋芽が認められている。これに対し、腋芽のみを花茎よりえぐり取って培養すると、萌芽しない腋芽は認められたが、萌芽した腋芽はすべてシュートになった^{8, 70)}。本実験の結果は、これらの報告と一致し、さらに花茎組織の量が腋芽の発育方向を決定する1要因であることを明らかにした。腋芽の周囲の花茎組織がどのような機作によって腋芽の発育に影響するのかわからない。前述の Friend ら²⁵⁾の実験結果から考えると、花茎片が短くなるにしたがって腋芽における C/N ratio が低下し、その結果腋芽は花芽分化（二次花茎形成）の方向に進まず、栄養生長すなわちシュート形成をしたものと推察される。さらに、花茎片の長さが短くなるほど休眠腋芽が減少したのは、一定以上の大きさの花茎組織そのものの存在が、培地中の生長調節物質 (coconut water に含まれている zeatin など) に対する腋芽の反応を妨げているのかもしれない。この点については、さらに検討する必要がある。

coconut water は、ランの茎頂培養^{47, 48, 63, 73, 84, 117, 126, 132, 141, 153)}におけると同様に、ファレノプシスの花茎培養用培地にもしばしば添加される^{70, 125, 150)}。本研究において、coconut water (20%) を培地に添加すると、無添加の場合に比べ腋芽の萌芽率が35%から76%と高くなった。これは、coconut water に含まれる天然サイトカイニンである zeatin や zeatin 誘導体¹⁶⁹⁾ が腋芽の休眠打破を促進したためである。

しかしながら、本研究を通じ coconut water を含む培地を用いて行なった上述の温度・光条件などに関する実験ではなお一部の腋芽は萌芽しなかった。そこで、それらの萌芽をさらに促進するために、合成サイトカイニン (BA) を種々の濃度で培地に添加した。その結果、比較的萌芽率の低い上位節の腋芽も、BA 5~10 ppm ですべて萌芽することが分った。すなわち、多くの園芸植物^{1, 2, 11, 19, 21, 46, 60, 65, 89, 95, 100, 122, 168)}で認められているのと同様に、腋芽の萌芽促進に対する BA の効果は、ファレノプシスの花茎培養においても確認された。

ファレノプシスの組織培養において培地中に滲出する黒色物質は、外植体に何らかの悪影響を与える可能性がある。そこで、このような物質を吸着することで知られている活性炭²⁴⁾ や PVP を用いて花茎片を培養したが、活性炭の添加は二次花茎に発達する腋芽の割合を、PVP は休眠腋芽の割合を増加させただけであった。すなわち、これらの使用は、多くのシュートを得たい本研究の目的に対しては逆効果であった。

一般の殺菌剤の代りに抗菌剤を用いて培養材料の殺菌を行なう場合、次の2つの方法が知られている。すなわち、(1)次亜塩素酸カルシウム溶液を用いる場合のように、抗菌溶液中に材料を浸漬して表面殺菌を行なう方法と、(2)抗菌剤を培地中に混入して微生物の発生を防止する方法である¹⁶²⁾。後者においては、一般に、培養材料を培地に植付ける前に次亜塩素酸ナトリウム溶液などによる表面殺菌が併用される^{5, 29)}。本研究では、上記の両方法で花茎培養時の微生物汚染を防ぐことを試みた。その結果は、どちらの方法で処理しても、抗菌剤は同様に汚染防止に有効であることを明らかにした。しかしながら、抗菌剤混入培地で培養した花茎片の多くは枯死し、生存した花茎片の腋芽もその生長が阻害された。このことは、Yeoman・Macleod¹⁶²⁾やThurston¹⁴⁴⁾も指摘しているように、抗菌剤は培養組織の生長を著しく阻害する危険性をもつことを示している。抗菌剤を培地へ混入して汚染を防ぐことが完全に否定されたわけではないが^{5, 144)}、現在のところ花茎培養において抗菌剤を利用する場合は、植付け前の花茎片を抗菌溶液に浸漬する本標準殺菌法を用いることが薦められる。

その場合、当然のことながら抗菌溶液の組成が問題となる。この実験で最も汚染防止効果の高かったC溶液は、Masagoら⁷⁹⁾が土壌中や植物体から*Phytophthora* sppを分離するために考案した処方から、nystatinを除き、vancomycinを添加して修正した処方である。この処方中に含まれるrifampicinは、広域の抗菌スペクトルを示す半合成抗生物質であり³³⁾、*Helianthus tuberosum*の組織培養においても生長阻害なしに、バクテリアの汚染を防ぐ効果が認められている¹⁰¹⁾。

植物組織培養において、微生物による汚染防止に抗菌剤が使用される場合には、一般に抗カビ剤と抗細菌剤が組合せて用いられる^{5, 9, 10, 37, 106, 130, 144)}。どんな物質であっても単独で使用された場合は汚染防止効果は高くない³⁰⁾。これは、単一の物質では抑制できる微生物の種類が限定されるためである。C溶液が汚染防止に比較的有効であったのは、含まれる各種の物質がそれぞれの欠点を補い合うように組合せられていることによるものと考えられる。

微生物汚染を防ぐもうひとつの有効な手段は、エタノールの予備殺菌であった。エタノールの効果を調べた実験において、70%エタノールのみでの処理で半数程度の花茎片が汚染をまぬがれ、しかも糸状菌による汚染がほぼ防止されたことは注目に値する。エタノール処理を併用した時、C処方に含まれる3種類の抗カビ剤の必要性については今後詳しく検討する必要がある。

本実験に用いた抗菌溶液Cは、汚染防止効果には有効ではあったが、その効果は時により不安定であった。この原因を調べるためにいくつかの実験を行なったが、花茎の老化した部分はC溶液を用いても汚染されやすいことが分った以外、注目すべき結果は得られなかった。

以上述べた結果は、抗菌溶液を用いた一連の実験において時として汚染を防止することが出来なかったのは、処理法よりもC溶液の処方と微生物の感受性に問題があったことを示している。そこで、花茎培養における抗菌剤利用法の基礎資料を得るため、花茎培養中に分離した細菌について、主に病原細菌¹²¹⁾で行なわれている薬剤感受性を測定した。

ファレノプシスの花茎に付着した細菌叢のすべてを同定することは困難であること、および細菌の薬剤感受性はグラム染色性と細胞形態によって著しく異なることを考慮して、本実験では花茎から分離した細菌をグラム染色し、グラム染色性および形態で分類し、抗細菌剤に対する感受性を測定した。これらの実験結果でMICが低いことは微生物の薬剤感受性が高く、いわゆる容易に殺菌されやすいことを示す。この観点からすると、グラム陽性桿菌の96株は多くの薬剤に対し感受性が高く、一方、グラム陰性桿菌は薬剤感受性が低く、とくにこのうちの4株は多くの薬剤に耐性を示すと考えられる。そこで、C溶液中の抗細菌剤の組合せ(ABPC・VCM・RFD)およびMIC値の低い薬剤の組合せ(PCG・GM)で発育阻止濃度を測定したところ、グラム陰性桿菌の中には発

育を阻止できない菌株が存在した。以上のことから、C溶液処理で発育を阻止できない細菌がファレノプシスの花茎上に存在する可能性が高いと考えられた。

この点を確認するために、C溶液処理後に花茎片のまわりに発育した微生物を分離し、グラム染色したところ、グラム陰性桿菌と糸状菌が認められ、グラム陽性桿菌は全く見られなかった。このうちグラム陰性桿菌15株の多くの抗生物質に対する感受性は低かった。さらに、これらに対するC溶液中の3抗菌剤の組合せ (ABPC・VCM・RFP) の発育阻止濃度を調べたところ、C処方濃度以上でもなおかつ生存するものが存在した。この結果もまた、C溶液では発育を阻止できない細菌の存在を裏づけた。

以上の結果は、C溶液処理後も生存し得る細菌は、ある種のグラム陰性桿菌である可能性が高いことを示している。このグラム陰性桿菌による汚染を防止するために、これらに対してより抗菌力の強い抗生物質を見出す必要があった。このような理由から、グラム陰性桿菌に有効と考えられた minocyclin をC処方の ampicillin に代替したところ、C溶液に比べ汚染防止効果をかなり高めることができたが、その非汚染率はかなり低かった。

以上のいくつかの事実から、花茎片およびその腋芽に悪影響を与えずに、抗菌剤によって花茎培養における汚染を常に完全に防止することは困難であるといえよう。

実用的見地からは、次亜塩素酸カルシウム溶液 (Wilson 液) による花茎片の殺菌後、C溶液を用いた標準殺菌法で処理すると、汚染をほぼ完全に防止できることが分った。このことから、今後、抗菌溶液の処方を再検討する余地はあるものの、実用的には殺菌剤と抗菌溶液の重複処理による花茎片の殺菌法が推奨されよう。

第5節 摘 要

- 1 ファレノプシスの花茎片を培養した場合、腋芽は栄養的発育 (シュート形成) に向かうか、生殖的発育 (二次花茎形成) をするか、または休眠を維持するかの3通りに分かれた。葉片培養の材料源となるシュートを多数獲得するために、腋芽の発育方向に影響すると考えられる培養条件、培地および花茎片の大きさなどについて調べた。
- 2 培養温度が腋芽の発育方向に及ぼす影響をみるために、花茎上の各節位の腋芽を含む花茎片を、20°、25° および 28°C で培養した。すべての温度区で休眠を続ける腋芽がみられ、上位節の腋芽ほどその割合が高かった。萌芽した腋芽をみると、20°C および 25°C では、二次花茎に発達することが多く、ことに上位節のほとんどは二次花茎になった。これに対し、28°C ではすべてが栄養的発育を示しシュートになった。なお、母株の花茎伸長中の栽培温度は、後の花茎培養における腋芽の発育方向に影響せず、培養温度がそれを支配した。
- 3 培養時の日長が腋芽の発育方向に及ぼす影響は明確ではなかったが、照度の影響は認められた。すなわち、25°C で、照度が 1600 lux から 170 lux まで低下するに従って、休眠を続ける腋芽は減少し、シュート形成に向かう腋芽の割合は徐々に増加した。
- 4 検討したいかなる温度・光条件でもなお休眠を続ける腋芽が存在したので、BA を培地に添加し、腋芽の萌芽促進を試みた。BA 濃度が高まるにつれて萌芽する腋芽の増加がみられ、1 ppm 以上では coconut water (20%) よりも萌芽の割合が高まった。休眠維持の割合が高かった上位節の腋芽も含め、BA 5~10 ppm 添加によってすべてが萌芽した。しかし、5 ppm 以上の濃度では葉の奇形症状がみられたので、実際に葉片採取を目的とする場合は 2.5 ppm が適当である。なお、BA によって萌芽した腋芽の発育方向は培養温度によって支配され、上述のような反応を示した。
- 5 花茎片から培地に滲出する黒色物質を吸着させるために、培地に活性炭および PVP を添加した。しかし、活性炭の添加は二次花茎に発達する割合を、PVP は休眠腋芽の割合を増加させ、多くのシュートを得たい本培

養の目的に対しては逆効果であった。

6. 1 腋芽を含む花茎片の長さを 1, 2, 4 cm としたもので、および腋芽だけの採取片を培養し、腋芽の発育状態を比較した。花茎片の長さが短くなるに従い、シュート形成に向かう腋芽の割合が増加した。腋芽だけの培養では、枯死や休眠維持の割合がやや高くなったが、萌芽したものはすべてシュートに発達した。しかしながら、その生長は不良であった。以上の結果から、花茎片は腋芽を中心に 1 cm の長さに調整するのがよいと考えられた。
7. 従来の殺菌法では、細菌や糸状菌などの微生物による培養花茎片の汚染を完全に防止し得なかったため、抗菌剤の利用を試みた。標準殺菌法による花茎片の汚染防止に最も有効であったのは、抗カビ剤として Benlate 10 ppm, PCNB 25 ppm, TBZ 100 ppm, 抗細菌剤として rifampicin 10 ppm, ampicillin 500 ppm, vancomycin 50 ppm を組合せた抗菌溶液であった。なお、この抗菌溶液処理前の 70% エタノールによる予備殺菌は必須であった。
8. 抗菌剤を直接培地に混入し、花茎片の汚染防止に対する効果を、抗菌溶液を用いる標準殺菌法と比較した。その結果、どちらの方法で処理しても、抗菌剤は同様に汚染防止に有効であったが、培地混入法では花茎片の多くが培養中に枯死し、生存しえた腋芽もその生長が阻害された。
9. 上述の抗菌溶液は、花茎片の汚染防止には有効であったが、その効果は時により不安定であった。この原因を知るため、花茎に付着した細菌を分離し、種々の抗菌剤に対する感受性を測定した。その結果、グラム陽性桿菌 96 株は多くの薬剤に対して感受性は高かったが、グラム陰性桿菌 5 株の薬剤感受性は低かった。さらに、これらのグラム陰性桿菌の中には上記の抗菌溶液中の抗細菌剤の組合せでも発育を阻止できない菌株が存在した。抗菌溶液処理後に汚染を示した培養花茎片から細菌を分離したところすべてグラム陰性桿菌であることが分かった。
10. 感受性試験の結果より、グラム陰性桿菌により有効と認められた minocyclin または piperacillin を、前述の抗菌溶液中の ampicillin に代えたところ、minocyclin 添加の抗菌溶液でわずかに汚染防止効果を高めることができた。しかしながら、この場合非汚染率はこれまでに比べてくに低かった。そこで、殺菌剤である Wilson 液と ampicillin を含む抗菌溶液とを重複処理した結果、培養花茎片の微生物汚染はほぼ完全に防止できた。

第 3 章 PLB 形成のための培地および培養条件

組織培養によるファレノプシスの栄養繁殖法として、花茎培養によって得られたシュートから採取した葉片を培養材料とする葉片培養法が最も推奨できる方法であることを第 1 章において論じた。本章においては、この葉片培養において安定した高い PLB 形成率を得、繁殖効率を高めるため、花茎培養および葉片培養時の培養条件の影響を詳細に検討した。まず、第 1 節においては、葉片培養用の培地を検討し、第 2 節では葉片培養時の PLB 形成に及ぼす花茎培養時の種々の培養条件の影響について調査した。さらに、第 3 節においては、葉片培養時の培養環境条件が PLB 形成に及ぼす影響を調べた。これらの結果をもとに、本手法によるファレノプシスの実用的栄養繁殖の有用な手順について論じた。

第 1 節 葉片培養用培地の検討

ファレノプシスの葉（葉片）からの PLB 形成は、狩野⁵⁷⁾ によってはじめて観察された。その後、著者や、Pieper・Zimmer¹⁰²⁾、Zimmer・Pieper^{166, 167, 168)} および Koch⁶⁷⁾ らによって研究されてきた。いずれの研究も、葉片を培養材料として、組織培養による栄養繁殖法を確立することを意図して行なわれたものである。ここでは、第 1 章第 2 節で示したように、花茎培養由来のシュートから採取した葉片における PLB 形成率を可能なかぎり高めるといふ見地から、次の実験を行なった。すなわち、基本培地の簡便化を試み、さらに PLB 形成に及ぼす植

物生長調節物質およびビタミン類の影響について調べた。

1. 培地の簡便化

1922年に Knudson⁷¹⁾ が、無機塩類、糖、寒天および水で合成した培地でラン種子の無菌発芽 (asymbiotic germination) に成功して以来、多くの処方が開発され、この方法はラン栽培における種子発芽法の主流となった。一方、Tsukamoto ら¹⁴⁸⁾ は、発芽培地中の無機塩類のかわりに、市販の水溶性複合肥料である Hyponex[®] (N: P₂O₅: K₂O=7:6:19, The Hyponex Company, Inc., Coplex, Ohio) を用いこれに sucrose と agar を加えた簡便培地 (Kyoto solution) を提唱した。その後、この培地については Kano⁵⁴⁾ によって詳しく検討され、さらに茎頂培養の基本培地としても用いられてきた^{58, 75, 164, 165)}。本項では、第1章第2節で用いた MS 培地の無機塩組成を簡便化する目的で、この Kyoto solution の Hyponex 濃度を 3.5 g/l とし、さらに inositol 100 ppm, nicotinic acid 1 ppm, thiamine·HCl 1 ppm, sucrose 2.0% および agar 1.0% を添加した培地 (以下、この培地を単に Hyponex 培地と呼ぶ) を用い、培養葉片における PLB 形成について、MS 培地と比較した。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種 (5~6年生株) の開花株から、小花が2~5輪開花した花茎を採取して実験に供試した。花茎片の調整、殺菌手順、植付け方法および培地については第2章第1節1項と同様とした。これらの花茎片を培地に植付け後、28°C、16時間日長 (500 lux) の条件下で培養した。

2~3カ月後に、花茎片の腋芽から発達したシュートの最上展開葉 (2~2.5 cm) を基部より切り離した。これらの葉を、ろ紙を入れて乾熱殺菌したシャーレの中で、基部、中央部および先端部に切り分け、さらに、それらを中央脈の部分で2等分し、1葉から6葉片を得た。なお、各葉片の大きさは6~8 mm 平方となる様、葉片の切り分け時に考慮した。これらの葉片を、斜面培地に向軸面を上にして切り口が培地中に埋まる様に植付けた。

葉片培養の培地としては、第1章第2節で示した MS 培地と Hyponex 培地 (Hyponex (N: P₂O₅: K₂O=7:6:19) 3.5 g/l, inositol 100 ppm, nicotinic acid 1 ppm, thiamine·HCl 1 ppm, sucrose 2.0%, agar 1.0%) を用いた。なお、両培地とともに NAA 1 ppm, adenine 10 ppm, および BA 10 ppm を添加した。葉片培養は、25°C、16時間日長 (500 lux) の条件下で行なった。

結 果

培養5カ月後の葉片における PLB 形成を見ると、MS 培地では、基部と中央部から採取した葉片のそれぞれ 20% と 5% が PLB を形成したが先端部からの葉片は PLB を形成しなかった。これに対して、Hyponex 培地においては、先端部、中央部、基部への各葉片のそれぞれ、12.5%、20.0% および 17.0% が PLB を形成した。全体

Table 21. Comparison between MS medium and Hyponex medium in PLB formation on leaf segments of shoot from flower-stalk cuttings.

Medium	No. of segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
Murashige & Skoog medium (1962)	60	8.3	1.4	(3-1)
Hyponex medium*	120	16.7	3.7	(9-1)

* 3.5 g/l Hyponex (N: P₂O₅: K₂O=7:6:19), 100 ppm inositol, 1 ppm nicotinic acid, 1 ppm thiamine·HCl, 2.0% sucrose, 1.0% agar.

Both media contained 1 ppm NAA, 10 ppm adenine, and 10 ppm BA.

Leaf segments were cultured at 25°C with a 16-h light (500 lux).

Data were recorded 5 months after culture.

としてみると、Hyponex 培地では MS 培地の約 2 倍にあたる 16.7% の PLB 形成率が得られた。また、PLB を形成した葉片あたりの PLB 数についても、MS 培地での 1.4 個に比べ Hyponex 培地では 3.7 個と多かった (第 21 表)。

2. adenine, NAA および BA の影響

器官形成に対する adenine の効果は一般に疑問視されているが、Nitsch・Nitsch⁹³⁾ は、Plumbago の節間 segment の *in vitro* 培養において、不定芽形成に対する adenine とサイトカイニンとの相加効果を認めている。そこで本項では、Hyponex 培地に含まれている adenine が、フェレノプシスの葉片培養における PLB 形成にどう影響を及ぼすかについて検討した。また、前項では、NAA および BA の最適濃度の組合せの検討を行っていないので、これらについても検討した。

材料および方法

前項で用いた同様の材料から花茎を採取し、花茎培養の手順も前項に準じて行なった。また花茎培養に用いた培地も同様とした。葉片培養用培地に含まれる adenine の影響をみるために、NAA 1 ppm を含む Hyponex 培地に、(1) adenine 10 ppm, (2) BA 10 ppm, (3) adenine 10 ppm + BA 10 ppm を添加した各培地を用いた。また、(3) の他に、adenine を加えずに、BA 濃度を 2.5~10 ppm とした培地についても検討した。さらに、adenine を 10~40 ppm に高めた場合の BA 濃度との関連について調査した。

次に、adenine 10 ppm を含む Hyponex 培地に、NAA と BA を種々の濃度で組合せて添加し、PLB 形成に対する影響について調べた。培養 5 カ月後に、培養葉片に形成されている PLB を調査した。

結 果

(1) adenine の効果

第 22 表に示したように、培養葉片における PLB 形成率は、adenine と BA を添加した (3) の培地で 16.7% となり、adenine を添加しない BA だけの (2) の培地では 8.9% と低下した。なお、adenine 単独では PLB の形成は全く認められなかった。

Table 22. Effect of adenine on the formation of PLB in leaf segments of shoot from flower-stalk cuttings *in vitro*.

Plant growth substances	No. of segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
10ppm adenine	90	0	—	—
10ppm BA	90	8.9	3.4	(7-1)
10ppm adenine + 10ppm BA	90	16.7	4.2	(14-1)

Hyponex medium was used as basal medium. Besides adenine and/or BA, 1ppm NAA was commonly added into medium.

Leaf segments were cultured at 25°C with a 16-h light.

同様の結果が、第 23 表に示した実験において示された。すなわち、adenine を添加しない場合、PLB 形成率は低下した。また、adenine を添加しないで BA 濃度を下げると、PLB 形成率は低下し、BA 2.5 ppm では PLB 形成は認められなかった。

次に、adenine の高濃度の影響を調べた結果、高濃度の adenine は PLB 形成を抑制した。すなわち、adenine 10 ppm と BA 10 ppm で PLB 形成率が最も高く、adenine の濃度を 20 または 40 ppm に高めた場合、それぞれ

Table 23. Effect of adenine and BA on the formation of PLB in leaf segments of shoot from flower-stalk cuttings.

Adenine (ppm)	BA (ppm)	No. of leaf segments cultured	Per cent leaves with PLB (%)	No. of PLB per segment	
				Mean	(Range)
10	10	30	13.3	1.5	(3-1)
0	10	30	10.0	1.7	(3-1)
0	5	30	3.3	1.0	(---)
0	2.5	30	0	-	-

Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA was used as basal medium.

Leaf segments were cultured at 25°C with a 16-h light.

Table 24. Effect of adenine and BA on the formation of PLB in leaf segments of shoot from flower-stalk cuttings.

Adenine (ppm)	BA (ppm)	No. of segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
				Mean	(Range)
0	10	60	8.3	1.8	(3-1)
0	15	90	13.3	3.4	(7-1)
10	0	90	0	-	-
10	10	60	23.3	3.6	(8-1)
20	0	60	0	-	-
20	1	60	1.7	1.0	(---)
20	5	60	5.0	1.7	(3-1)
20	10	60	1.7	2.0	(---)
40	0	60	0	-	-
40	1	60	1.7	2.0	(---)
40	5	60	3.3	2.0	(3-1)
40	10	60	1.7	11.0	(---)

Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA was used as basal medium.

Leaf segments were cultured at 25°C with a 16-h light.

1.7%と抑制された(第24表)。また、adenine濃度を高めてBA濃度を低下させた場合も、PLB形成率は低くなった。一方、adenineを添加しない場合は、第22表の結果と同様にPLB形成率は低下した。この場合、BA濃度を15ppmに高めても、adenine10ppmとBA10ppmを組合せた場合に比べ、PLB形成率は低かった。また、平均PLB数は、adenine濃度が10ppmのとき最も多かった。

(2) NAA および BA の効果

NAAとBAを種々の濃度で組合せた場合、培養葉片におけるPLB形成は第25表に示したとおりである。最も高いPLB形成率は、NAA0ppm、BA10ppmの培地で25%、次いでNAA1ppm、BA10ppmの21.8%であった。しかし、NAAが10ppmになると、BAの5ppmまたは10ppmとの組合せでPLB形成が抑制された。NAA濃度が0または1ppmで、BA濃度が0または5ppmのときPLB形成は全く認められなかった。

平均PLB数は、NAA0ppm、BA5ppmで最も多く、次いでNAA1ppm、BA10ppmの培地で多かった。

3. inositol, nicotinic acid および thiamine の影響

葉片培養用のHyponex培地には、MS培地と同様に各種のビタミン類が含まれている。ランの種子発芽⁸⁰⁾や

Table 25. Effect of NAA and BA on the formation of PLB in leaf segments of shoot from flower-stalk cuttings.

NAA (ppm)	BA (ppm)	No. of segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
				Mean	(Range)
0	0	32	0	—	—
	1	32	0	—	—
	5	32	9.4	4.7	(8-3)
	10	32	25.0	2.5	(5-1)
1	0	32	0	—	—
	1	32	0	—	—
	5	32	15.6	2.2	(4-1)
10	10	32	21.8	3.6	(7-1)
	0	32	0	—	—
	1	32	3.1	1.0	(---)
	5	32	0	—	—
	10	32	0	—	—

Hyponex medium supplemented with 10ppm adenine was used as basal medium.

Leaf segments were cultured at 25°C with a 16-h light.

茎頂培養^{23, 129)}においては、これまでにビタミン類の効果が検討されているが、葉片培養において培地に含まれるそれらがPLB形成に及ぼす影響について調べられた研究はない。本節1項で論じた培地の簡便化のためにも、Hyponex培地に含まれるビタミン類についてその必要性を調査しておく必要がある。そこで本項ではこの点について検討した。

材料および方法

第2章第1節1項と同様に調整・殺菌をして植付けた花茎片の腋芽が発育して得られたシュートから葉片を採取した。検討した葉片培養用培地は、Hyponex培地から、inositol, nicotinic acid, thiamine・HClをそれぞれ単独で除去した3種類の培地と、対照としてこれら3種類のビタミン類を含むHyponex培地を用いた。なお、すべての培地には、NAA 1ppm, adenine 10ppm および BA 10ppm を添加した。

結 果

各培地における培養5カ月後の、培養葉片のPLB形成率および平均PLB数を第26表に示した。inositol, nicotinic acid および thiamine・HClのうち、1つでも基本培地から除かれた場合、対照区に比べPLB形成率は低下した。

Table 26. Effect of removal of vitamins from complete Hyponex medium on the formation of PLB in leaf segments.

Vitamin removed	No. of segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
Complete medium*	60	18.3	2.7	(11-1)
—inositol	60	11.7	3.3	(8-1)
—nicotinic acid	60	5.0	5.3	(11-1)
—thiamine・HCl	60	6.7	1.8	(2-1)

* Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA.

このうち、nicotinic acid を除去した場合、PLB 形成率は最も低く、続いて thiamine・HCl 除去培地で低かった。検討したすべてのビタミン類を含む基本培地では、PLB 形成率は18.3%であった。一方、平均 PLB 数については、基本培地から nicotinic acid を除いた培地で最も多かった。

4. 植物生長調節物質除去の影響

ファレノプシスの葉片培養においては、比較的高濃度の BA や adenine が PLB 形成を促進する要因と推察される(本節2項)。しかしながら、PLB 形成が最も促進された培地でも PLB 形成率は20%前後にとどまった。サイトカニンやオーキシンを含む培地で培養した後、それらを含まない培地に移植した場合、ニンジンの不定胚形成が促進されたという報告がある¹⁰⁸⁾。ファレノプシスの場合、PLB 形成率が低いのは、培養葉片が生長調節物質の存在下に長時間おかれることに問題があるとも考えられるのでこの点を検討した。

材料および方法

実験には、(*Phal. Mount Kaala*×*Phal. Terri Cook*)×*Phal. Mount Kaala* (5年生株)の開花株から、小花が3~5輪開花した花茎を採取した。これらの花茎を調整・殺菌後、花茎片を coconut water 20% (v/v) を添加した VW 培地に植付け、25°C、16時間日長(500lux)で培養した。培養花茎片の腋芽が2~3枚の葉を展開させた時点で葉片を採取した。これらの葉片を、NAA 1ppm, adenine 10ppm および BA 10ppm を添加した Hyponex 培地で、1, 2, 4 および 8 週間培養し、その後 NAA, adenine および BA を含まない培地に移植した。なお、葉片培養は 25°C、16時間日長(500lux)の条件下で行なった。

結 果

生長調節物質(NAA 1ppm, adenine 10ppm, BA 10ppm)の存在下で短期間(1または2週間)培養した葉片は、生長調節物質無添加培地へ移植すると、全く PLB を形成しなかった(第27表)。これらの葉片の多くは、移植後、培地に黒色物質をほとんど滲出させることなく枯死した。しかし、生長調節物質を含む培地で4週間培養し、無添加培地に移植した葉片では、8週間培養したものに比べ、PLB 形成率はわずかに高まった。また、生長調節物質を含む培地で全期間培養した場合は、8週間培養した場合と同じ PLB 形成率であった。平均 PLB 数は、4週間培養区で5.2個と最も多かった。

Table 27. Effect of duration exposing leaf segments to plant growth substances on the formation of PLB.

Duration of treatment (week)	No. of segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
1	30	0	-	-
2	30	0	-	-
4	30	20.0	5.2	(12-1)
8	30	16.7	3.8	(8-1)
Continuous*	30	16.7	2.4	(4-1)

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, and then replanted to hormone-free Hyponex media as indicated. Segments were incubated for 20 weeks.

* No replanting until the end of incubation.

5. 糖の除去の影響

Vanda の茎頂培養においては、一度形成された PLB の増殖は糖を除去した培地に移植することによって促進

されるという報告がある¹⁴⁾。Hyponex 培地には sucrose 2.0% が加えられており、葉片の培養期間中常に糖が存在する。ここでは、葉片培養中の糖の存在と PLB 形成との関係について調べた。

材料および方法

前項で用いた同様の材料から花茎を採取し、実験に供試した。花茎片の殺菌、培養の手順および培養条件も前項に準じて行なった。培養花茎片の腋芽が 2～3 枚の葉を展開させた時点で最上展開葉より葉片を採取した。これらの葉片を、NAA 1ppm, adenine 10ppm および BA 10ppm を添加した Hyponex 培地で 1, 2, 4 および 8 週間培養した後、糖を含まない同培地に移植した。なお、葉片培養は全期間を通じて前項と同様の条件下で行なった。

結 果

糖 (sucrose 2.0%) の存在下で、1～4 週間培養し、無添加培地に移植した葉片では、PLB 形成は全く認められなかった。また、同様に 8 週間の培養後、糖添加培地に移植しても PLB 形成率は 3.3% と低かった。これに対して、全培養期間を通じて、糖の存在下で培養した葉片は、13.3% と最も高い PLB 形成率を示した (第 28 表)。

Table 28. Effect of duration exposing leaf segments to sucrose on the formation of PLB.

Duration of treatment (week)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
1	30	0	—	—
2	30	0	—	—
4	30	0	—	—
8	30	3.3	2.0	(—)
Continuous*	30	13.3	2.4	(12-1)

Leaf segments were cultured on Hyponex medium (which contained sucrose 2.0%) supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, and then replanted to the sucrosefree media as indicated. Segments were incubated for 20 weeks.

* No replanting until the end of incubation.

第 2 節 葉片の PLB 形成に対する花茎培養時の条件

第 2 章第 1 節で述べたように、ファレノプシスの花茎培養においては、腋芽の萌芽率を高めるために coconut water^{70, 125, 150)} や種々の生長調節物質^{8, 20, 67, 68, 110)} が培地に添加されている。花茎培養によってシュートを高率で得ようとすればこれらの添加は必須である。したがって、このシュートの葉を葉片培養の材料とする場合は、これらの物質添加が PLB 形成に及ぼす影響を考慮しなければならない。

花茎培養時の培養環境条件 (温度や照度) は、花茎腋芽の発育方向を支配することを第 2 章第 1 節でみてきた。培養環境条件が異なれば、発育するシュートの葉が、生理的、形態的、組織的に異なることが考えられる。ペゴニアでは、日長により葉の内生長調節物質のレベルが変化し、同時に葉片の再生能が変化することが知られている³⁸⁾。このことはファレノプシスの葉片培養にもあてはまる可能性がある。

以上のような理由から、本節においては、花茎培養時の培地条件 (培地の種類、植物生長調節物質、糖, coconut water) と培養環境条件 (温度, 日長, 照度) が、後の葉片培養での PLB 形成にも影響を与えるのではないかと考え、この点を検討した。

1. 培地の影響

葉片培養時の培地の種類が PLB 形成に影響することについては前節 1 項で示した。ここでは、花茎培養時の

培地の種類 (BA などの添加物についても検討) が、花茎培養によって得られたシュートから採取した葉片の培養における PLB 形成にも影響を及ぼすかどうかを調べた。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種 (5~6年生株) の開花株から、小花が2~5輪開花した花茎を採取して実験に供試した。花茎片の調整、殺菌手順および植付け方法については前節と同様とした。これらの花茎片を、BA (2.5, 5.0 ppm) または coconut water (20% v/v) の添加または無添加の培地に植付けた。なお、基本培地としては、VW 培地と Hyponex 培地からビタミン類を除いた培地 (Hyponex 3.5 g/l, sucrose 3.0%, agar 1.0%) を用いた。花茎培養条件は、28°C, 16時間日長 (500 lux) とした。

培養90日後に、発育したシュートは1~3枚の葉を展開していた。それらの最上展開葉の先端部、中央部、基部の3部位に分け、6~8mm 平方の6葉片を1葉から採取した。これらの葉片を同一の培地、すなわち前節で、PLB 形成に好適と認められた NAA 1 ppm, adenine 10 ppm および BA 10 ppm を添加した Hyponex 培地に植付け、25°C, 16時間日長 (500 lux) の条件下で培養した。

結 果

各培地における培養花茎片の腋芽の発育方向および生長状態の様相を第29表に示した。用いた2種の基本培地において、BA 濃度が高いほど萌芽率が高まり、また萌芽後分化発達した葉の平均長は減少したが、一定期間内の葉数は増加した。すなわち、plastchron は短くなった。

Table 29. Effect of culture media and BA on the growth of lateral buds in flower-stalk cuttings cultured *in vitro*.

Medium	BA (ppm)	Per cent buds			Shoot growth	
		growing into		remaining dormant (%)	Av. no. of leaf	Av. leaf length (cm)
		Shoot (%)	Flower-stalk (%)			
Vacin and Went (1949)	0	59	0	41	1.4	2.1
	2.5	83	7	10	2.1	1.7
	5.0	89	7	4	2.3	1.7
Hyponex*	0	55	0	45	1.6	2.0
	2.5	88	0	12	2.0	1.8
	5.0	95	0	5	2.5	1.6

flower-stalk cutting were cultured at 28°C with a 16-h light (500 lux) for 90 days.

* Hyponex medium without vitamins (Hyponex (N:P₂O₅:K₂O=7:6:19) 3.5 g/l, sucrose 3.0%, agar 1.0%).

培養5ヵ月後の培養葉片における PLB 形成をみると、BA 添加とくに 5 ppm 添加の培地で培養された花茎片から由来したシュートの葉片では、無添加のものに比べ PLB 形成率が高かった。BA のかわりに coconut water 20% (v/v) を添加した培地で得られた葉片では、PLB 形成率はさらに高くなり、平均 PLB 数は増加した (第30表)。なお、PLB 形成に対する基本培地の影響は明瞭ではなかったが、最も高い PLB 形成率は、coconut water 20% を添加した VW 培地で得られた。平均 PLB 数についてみると、BA 5 ppm を添加した VW 培地で5.2個と最も多かった。

2. 植物生長調節物質の影響

葉片培養における PLB 形成が、材料源としての葉を得るために行なう花茎培養時の培地に含まれる BA に

Table 30. Effect of culture media and additives used for flower-stalk on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Flower-stalk culture medium	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
VW*+BA 0 ppm	120	7.5	3.0	(9-1)
VW +BA 2.5ppm	120	15.8	4.3	(16-1)
VW +BA 5.0ppm	120	18.3	5.2	(26-1)
VW +CW 20% (v/v)	120	35.8	3.6	(9-1)
Hyponex**+BA 0 ppm	120	1.7	4.5	(5-4)
Hyponex +BA 2.5ppm	120	1.7	3.0	(5-1)
Hyponex +BA 5.0ppm	120	26.7	3.9	(16-1)
Hyponex +CW 20% (v/v)	120	30.0	4.8	(22-1)

Flower-stalk cuttings were cultured at 28°C with a 16-h light (500 lux).

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (500 lux).

* Vacin and Went medium (1949)

** See footnotes of Table 29.

よって影響をうけることを前項で示した。このことは、花茎培養培地への植物生長調節物質の添加がシュートの葉の再生能を高める可能性を示唆している。ここでは、花茎培養時の培地に添加する2, 3の生長調節物質が、後の葉片培養におけるPLB形成に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

実験には、ファレノプシス交雑種 (*Phal. White Falcon* × *Phal. Persistent*; 3年生株) の開花株から小花が3~5輪開花した花茎を採取し、供試した。これらの花茎を調整・殺菌後、花茎片を得た。VWの基本培地にBA, zeatin および NAA を 0.01~10.0ppm の濃度でそれぞれ単独で添加した培地で花茎片を培養して得られたシュートから葉片を採取した。これらの葉片を、NAA 1ppm, adenine 10ppm および BA 10ppm を添加した Hyponex 培地で培養した。なお、花茎培養、葉片培養ともに、25°C, 16時間日長 (900lux) の条件下で行なった。

結 果

培養5カ月後の培養葉片におけるPLB形成を第31表に示した。花茎培養培地に生長調節物質を添加しない場合、培養葉片のPLB形成率は6.7%と低かった。花茎培養培地へのBAの添加は、PLB形成率を高めた。この場合、BAの濃度が高いほどPLB形成率は高くなり、10.0ppmでは20%に達した。zeatinは0.01~1.0ppmの間でPLB形成に有効であったが、10.0ppmは抑制的であった。一方、NAAは、PLB形成に対して効果がなく、むしろ抑制的であった。

平均PLB数は、1葉片にのみPLB形成が認められたNAA 10ppm添加区で18個と最も多かった。BAまたはzeatinを添加した場合、平均PLB数は1~3.0個で、対照区に比べ明瞭な差はなかった。

3. coconut water および糖の影響

花茎培養培地にcoconut waterを添加すると、後の葉片培養におけるPLB形成率が高まった(本節1項)。そこで、本項においては種々の濃度のcoconut waterを花茎培養用培地に添加し、それらのPLB形成に対する効果を再検討した。なお、花茎培養培地に添加したsucroseの後影響についても調査した。

材料および方法

前項で用いたものと同様の材料から花茎を採取し、実験に供した。花茎片の殺菌、培養の手順も前項に準じて

Table 31. Effect of BA, zeatin, and NAA in flower-stalk culture media on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Plant growth substances (ppm)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
BA	0.01	30	3.3	1.0 (---)
	0.1	30	10.0	2.3 (3-1)
	1.0	30	16.7	3.0 (5-1)
	10.0	30	20.0	2.5 (6-1)
zeatin	0.01	30	6.7	3.0 (5-1)
	0.1	30	13.3	2.0 (4-1)
	1.0	30	10.0	2.0 (3-1)
	10.0	30	3.3	1.0 (---)
NAA	0.01	30	6.7	2.0 (3-1)
	0.1	30	3.3	1.0 (---)
	1.0	30	0	-
cont.*	30	6.7	3.3	18.0 (---)
			2.0	(3-1)

* Flower-stalk cuttings were cultured at 25°C with a 16-h light (900 lux) on Vacin and Went medium (1949).

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

行なった。VWの基本培地に、coconut water (1~30%, v/v) または sucrose (1~8%) を添加した培地において、花茎片を培養した。なお、coconut water 添加培地には、sucrose 20%を加えた。花茎片の腋芽の発育によって得られたシュートから葉片を採取し、NAA 1 ppm, adenine 10 ppm および BA 10 ppm を添加した Hyponex 培地で培養した。花茎培養、葉片培養の培養条件は前項に準じた。

結 果

培養5カ月後の培養葉片における PLB 形成を第32表および第33表に示した。対照区に比べ、coconut water は、検討したすべての濃度で、葉片培養における PLB 形成率を高めた。この場合、coconut water 20%添加区で最も

Table 32. Effect of coconut water in flower-stalk culture media on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Coconut water concn (%)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
0	30	6.7	2.0	(3-1)
1	30	23.3	3.6	(10-1)
10	30	20.0	1.5	(2-1)
20	30	26.7	3.4	(6-1)
30	30	13.3	2.3	(4-1)

Flower-stalk cuttings were cultured on VW medium (2% sucrose) supplemented with coconut water as indicated, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

高い PLB 形成率 (26.7%) が得られた (第32表)。

一方, sucrose の 1 または 2% 区の PLB 形成率はそれぞれ 10% で, 4 または 8% の高濃度の sucrose では PLB 形成率は低下した。平均 PLB 数は, sucrose 1% 添加区で 8.0 個と最も多かった (第33表)。

Table 33. Effect of sucrose concentration in flower-stalk culture media on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Sucrose concn (%)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
1	30	10.0	8.0	(14-2)
2	30	10.0	2.0	(4-1)
4	30	3.3	1.0	(---)
8	30	5.6	1.0	(---)

Sucrose concentration in VW medium for flower-stalk cutting was modified as indicated. Flower-stalk was cultured at 25°C with a 16-h light (900 lux).

Leaf segments were incubated on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

4. 温度の影響

Zimmer・Pieper^{166, 167, 168)} は, ファレノプシスの花茎から切り取った腋芽のみを培養して幼植物を得, これらを切断して器官培養の材料とした。この場合, 花茎腋芽の培養条件として, 2週間は 26°C 暗所, その後は 22°C 明所で培養することを推奨している。しかしながら, 彼らはこれらの培養条件が後の器官培養における PLB 形成に影響するかどうかの検討は行っていない。そこで本項では, 花茎培養時の温度が, 後の葉片培養における PLB 形成に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種 (5~6年生株) の開花株から, 小花が 2~5 輪開花した花茎を採取して実験に供試した。花茎片の調整, 殺菌手順および培地については, 第 2 章第 1 節 1 項と同様とした。花茎片を培地に植付けた後, 20°, 25° および 28°C の各温度, 16 時間日長 (500 lux) の条件で培養した。15 週間後, 腋芽由来のシュートから葉片を採取し, 25°C, 16 時間日長 (500 lux) で培養した。なお, 葉片培養には, NAA 1 ppm, adenine 10 ppm および BA 10 ppm 添加した Hyponex 培地を用いた。また, 原種の *Phal. aphrodite* を供試した同様の実験もあわせて行なった。

結 果

各温度での花茎培養によって得られた葉片は, 25°C で培養した場合, いずれも 20% 以上の PLB 形成率を示した (第34表)。なお, 平均 PLB 数は, 25°C で花茎培養を行なって得られた葉片で 5.4 個と最も多かった。原種の *Phal. aphrodite* を用いて, 異なる温度で花茎培養を行ない, 得られた葉片を 25°C で培養した結果, *amabilis* 系交雑種での結果と同様に, いずれも比較的高い PLB 形成率が得られた (第35表)。

5. 日長および照度の影響

花茎培養に関する研究において, 培養環境条件として与えた日長や照度は研究者によって異なる^{8, 20, 44, 70, 110, 125)}。一方, 日長や照度が, 培養花茎片の腋芽の発育方向に影響することは第 2 章第 1 節で明らかにした。本項では, 温度の場合と同様に, 花茎培養時の日長や照度が, 後の葉片培養における PLB 形成に及ぼす影響を調べた。

Table 34. Effect of temperature during flower-stalk cutting culture on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Temperature (°C)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
28	60	21.7	3.7	(9-1)
25	60	23.3	5.4	(17-1)
20	60	21.7	2.8	(6-1)

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, with a 16-h light (500 lux).

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (500 lux).

Table 35. Effect of temperature during flower-stalk cutting culture on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Temperature (°C)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
28	36	30.6	3.6	(11-1)
25	36	36.1	1.8	(6-1)
20	36	27.8	5.6	(15-3)

Species used was *Phalaenopsis aphrodite* (native to Taiwan).

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, with a 16-h light (500 lux).

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (500 lux).

材料および方法

実験には、本節 2 項で供試したものと同一交雑種 (*Phal. White Falcon* × *Phal. Persistent*) の開花株を用いた。花茎片の調整、殺菌手順および培地については、第 2 章 1 項と同様とした。これらの花茎片を培地に植付け後、25°C、8、16 および 24 時間の各日長 (900 lux) で培養した。また、花茎培養時の照度の影響をみる実験においては、900、440、300 および 180 lux の各照度下 (25°C、16 時間日長) で花茎片を培養した。花茎片の腋芽から 2~3 枚の葉を展開させたシュートが発達した時点で葉片を採取し、NAA 1 ppm, adenine 10 ppm および BA 10 ppm を添加した Hyponex 培地で培養した。なお、葉片培養時の培養条件は、25°C、16 時間日長 (900 lux) とした。

結 果

花茎培養時の日長は、後の葉片培養における PLB 形成にかなりの影響を与えた。すなわち、花茎培養を短日 (8 時間) 下で行なった場合、長日 (16 時間) および連続照明 (24 時間) に比べ、培養葉片における PLB 形成が抑制された。平均 PLB 数は、16 時間日長で 6.7 個と最も多かった (第 36 表)。

一方、花茎培養時の照度は、標準照度である 900 lux より低くなるほど、培養葉片の PLB 形成に有効であった。また、平均 PLB 数も照度の低下にともなって増加した (第 37 表)。

この花茎培養時の照度の影響に関して、第 2 章 第 1 節 3 項 (花茎培養における腋芽の発育に及ぼす照度の影響の実験) で得られたシュートを用いて追試したところ、同様の結果が得られた (第 38 表)。

Table 36. Effect of daylength during flower-stalk cutting culture on the subsequent formation of PLB in leaf segments

Daylength (h)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
8	30	6.7	2.0	(3-1)
16	30	20.0	6.7	(11-1)
24	30	20.0	3.5	(8-1)

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C.

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

Table 37. Effect of light intensity during flower-stalk cutting culture on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Light intensity (lux)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
900	48	14.6	2.0	(3-1)
440	60	23.3	2.3	(5-1)
300	60	26.7	3.4	(10-1)
180	60	38.3	3.7	(16-1)

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light.

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

Table 38. Effect of light intensity during flower-stalk cutting culture on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Light intensity (lux)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
1600	30	16.6	3.8	(7-2)
650	30	20.0	2.3	(4-1)
400	30	20.0	2.7	(5-2)
170	30	50.0	4.3	(9-1)
0	30	0	-	-

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light.

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (1600 lux).

第3節 葉片の培養環境と PLB 形成

葉片培養における PLB 形成は、培養材料としての葉片を得るために行なう花茎培養時の培地や培養環境条件の影響を強く受けることを前節で明らかにした。これらのすべての実験を通じて、葉片培養は、本章第1節の結

果から最適と考えられた培地を用いて行なってきた。しかしながら、葉片培養については PLB 形成を誘導できる培地が明らかになっただけで、培養条件については不明な点が多い。

一方、これまでに報告されているファレノプシスの茎頂培養⁴⁷⁾や器官培養^{167, 168)}においては、培養体における PLB 形成を誘導するために、培養条件の改良が試みられている。そこで本節においては、花茎培養時の条件を一定にして、培養葉片における PLB 形成率を高めるという見地から、葉片培養時の培養環境条件の影響を中心にいくつかの検討を行なった。

1. 温度の影響

前節 4 項で示されたように、花茎培養時の培養温度は、後の葉片培養における PLB 形成率にはほとんど影響しないことがわかった。一方、葉片培養時の培養温度については全く不明である。ここでは、花茎培養時の温度を一定にして、得られたシュートから採取した葉片の培養温度が PLB 形成に及ぼす影響について調べた。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種 (5~6 年生株) の開花株から、小花が 2~5 輪開花した花茎を実験に用いた。花茎片の調節、殺菌手順および培地については第 2 章第 1 節 1 項と同様とした。これらの花茎片を培地に植付けた後、25°C または 28°C、16 時間日長 (500 lux) の条件下で培養した。15 週間後、両温度区で得られた腋芽由来のシュートから葉片を採取し、NAA 1 ppm, adenine 10 ppm および BA 10 ppm を添加した Hyponex 培地に植付け、それぞれ 25°C および 28°C (16 時間日長, 500 lux) の両条件下で培養し、PLB 形成に及ぼす培養温度の影響をみる実験を行なった。

結 果

25°C での花茎培養によって得られたシュートの葉片は、25°C で培養した場合、PLB 形成率は 23.3% であったのに対し、28°C では 10% と低下した。この場合の平均 PLB 数は、25°C で培養した葉片では、28°C の場合に比べ 2 倍以上の 5.4 個であった。

一方、28°C での花茎培養によって得られたシュートの葉片は、25°C で培養した場合、PLB 形成率は 21.7% であった。これに対し、この葉片を 28°C で培養すると、PLB は全く形成されなかった (第 39 表)。

Table 39. Effect of incubation temperatures for flower-stalk cutting and leaf segments on the subsequent formation of PLB in leaf segments.

Temperature (°C)		No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
Flower stalk	Leaf segment			Mean	(Range)
28	28	60	0	—	—
	25	60	21.7	3.7	(9-1)
25	28	60	10.0	2.5	(4-1)
	25	60	23.3	5.4	(17-1)

Flower-stalk cuttings were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, with a 16-h light (500 lux).

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (500 lux).

2. 培地更新の影響

ファレノプシスの葉片培養においては、葉片から黒色物質が培地に大量に滲出してくる。この物質は現在のと

ころ、フェノール物質の酸化物と考えられている⁸⁶⁾。液体培地で茎頂培養を行なった場合も黒色物質が培地中に滲出することが観察されている⁴⁷⁾。一方、*cattleya* では、培養した茎頂組織の褐変に関する研究が進んでおり^{42, 50, 52)}、そこに関与するフェノール物質の同定もなされている^{49, 51)} が、ファレノプシスについてはこの方面の研究はない。この物質を吸着させるために、ここでも培地への活性炭添加を試みたが、培養葉片は植付け後1週間以内にすべて枯死した。そこで、活性炭添加のかわりに、培地の更新により黒色物質の培地への蓄積を回避することを試みた。

材料および方法

前項で用いた同様の材料から花茎を採取し実験に供試した。花茎片の殺菌、培養の手順および培養条件も前項に準じた。培養花茎片の腋芽が2～3枚の葉を展開させた時点で葉片を採取した。これらの葉片を、NAA 1 ppm, adenine 10 ppm, および BA 10 ppm を添加した Hyponex 培地で培養し、1, 2 および 4 週間に1度の頻度で培地の更新、すなわち新しい培地への移植をくり返した。対照として、培地の更新を行なわない区も設けた。なお、葉片培養は、25°C, 16時間日長(900 lux)の条件下で行なった。

結 果

培養5カ月後の、培養葉片における PLB 形成を第40表に示した。葉片を1または2週間に1度の頻度で新しい培地に移植をくり返した場合、葉片の PLB 形成率は30%以上になった。葉片の移植頻度が4週間に1度になった場合、PLB 形成率はやや低下した。これに対し、葉片の移植を全く行なわなかった場合、PLB 形成率は3.3%と著しく低下した。

Table 40. Effect of replanting interval on the formation of PLB in leaf segments.

Interval (week)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
1	30	33.3	3.8	(8-1)
2	30	36.7	3.1	(8-1)
4	30	26.7	4.6	(12-1)
No replanting	30	3.3	1.0	(---)
Medium with charcoal (2g/l)	30	0	-	-

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

3. 培養容器の栓の影響

ラン科植物種子の無菌発芽において、培養容器に用いる栓の種類が種子発芽率と幼苗の生長に大きな影響を与えることが知られている^{54, 56, 58, 123)}。これまで、ファレノプシスの葉片培養は、試験管の栓としてはゴム栓を用い完全にシールした条件で行なってきた。ここでは、培養容器の栓の種類が培養葉片における PLB 形成に影響するのではないかと考え、この点について検討した。

材料および方法

前項で用いた同様の材料から花茎片を採取し、実験に供試した。花茎培養は前項に準じて行なった。培養花茎片のシュートから葉片を採取して NAA 1 ppm, adenine 10 ppm および BA 10 ppm を添加した Hyponex 培地に植付けた。培養容器には、これまでの培養で用いたゴム密栓の他、通気性のよい通気シリコン栓またはアルミホイル

で作製したキャップを用い、培地の更新を行わず、葉片の培養を行なった。なお、アルミホイルのキャップを用いた場合は、ゴムバンドで固定した。本実験には、これまでの18×180 mmの試験管とは異なり、21×200 mmの硬質試験管を用い、培地量は15 mlとした。培養は、25°C、16時間日長(900 lux)の条件下で行なった。

結 果

培養葉片におけるPLB形成は、培養容器に用いた栓の種類によって異なった(第41表)。すなわち、これまでのガス交換の全くないゴム栓(密栓)に比べ、通気のある栓を用いるとPLB形成率が高くなり、シリコン栓では38.9%、アルミホイルキャップでは47.2%に達した。また、ゴム密栓に比べ通気栓において平均PLB数は多かった。

Table 41. Effect of various plugs for culture vessel on the formation of PLB in leaf segments.

Type of plug	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
			Mean	(Range)
Rubber stopper	36	13.9	2.6	(3-1)
Forming silicone stopper	36	38.9	4.1	(8-1)
Aluminium foil	36	47.2	3.6	(21-1)

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

4. 培養初期の暗処理の影響

Zimmer・Pieper^{166, 167, 168)}は、ファレノプシスの花茎腋芽培養によって得られた幼植物をメスを用いないで引きちぎることによって、葉、葉片、根および茎組織に分割し、これらを培養してPLBを得ている。この場合、培養初期の明条件は個体再生能を抑制するとの考えから、培養体はまず暗黒におかれ、その後明所に移された。これまで本章で述べてきた葉片培養は、連続して25°Cの明所下で行なったものであり、Zimmer・Pieperの推奨する暗処理の効果については不明である。ここではこの点について調べた。

材料および方法

実験には、ファレノプシス交雑種(*Phal. White Falcon* × *Phal. Persistent* および *Phal. Enshyu*)の開花株から小花が3~5輪開花した花茎を採取し、供試した。これらの花茎を調整、殺菌後、花茎片を得、coconut water 20% (v/v)を添加したVW培地で培養した。花茎片の培養条件は、25°C、16時間日長(180 lux)とした。培養花茎片の腋芽が2~3枚の葉を展開させた時点で最上展開葉より葉片を採取し、NAA 1ppm, adenine 10ppm および BA 10ppmを添加したHyponex培地に植付けた。これらを培養初期の1~8週間は25°C暗黒下に置き、その後同温度の明所(16時間日長, 900 lux)に移して培養を継続した。次に、暗処理後の照度の影響を調べるために、同様にして植付けた葉片を培養初期の1, 2, 3および4週間暗黒下で培養し、その後900 luxまたは180 luxの明所下(16時間日長)に移し、葉片のPLB形成を調べた。

結 果

まず、第1の実験において、供試した2品種ともに、葉片の培養開始時に2週間の暗処理を行ないその後明所に移した区で、最も高いPLB形成率が得られた(第42表)。2週間以上の暗処理を行なった場合は、PLB形成率は低下した。平均PLB数は、品種Aでは2週間処理で最も多かったが、品種Bでは処理期間との関係は明確ではなかった。

Table 42. Effect of duration of darkness after commencement of culturing on the formation of PLB in leaf segments from two hybrids.

Hybrid*	Duration of darkness (week)	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	No. of PLB per segment	
				Mean	(Range)
A	0	30	10.0	1.7	(3-1)
	1	30	13.3	3.0	(6-1)
	2	30	16.7	4.0	(8-1)
	3	30	13.3	2.8	(4-1)
B	0	30	6.7	5.0	(6-4)
	1	30	6.7	1.0	(1-1)
	2	30	30.0	2.0	(4-1)
	4	30	20.0	2.2	(4-1)
	8	30	6.7	1.5	(2-1)

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a light condition as indicated.

* A, White Falcon × Persistent; B, Enshyu.

次に、葉片培養初期の暗処理と暗処理後の照度の影響を調べたところ、暗処理後の照度にかかわらず、ここでも2週間の明処理を行なった区で、最も高いPLB形成率が得られた。この場合、暗処理後は比較的高い照度(900 lux)に移すよりも、低照度(180 lux)下に移して培養を継続したほうが、PLB形成率はやや高くなった(第43表)。

Table 43. Effect of duration of darkness after commencement of culturing and light intensity after the darkness on the formation of PLB in leaf segments.

Duration of darkness (week)	Light intensity after darkness (lux)	No. of leaf segments cultured	Per cent leaves with PLB (%)	No. of PLB per segments	
				Mean	(Range)
0	900	30	10.0	2.3	(5-1)
1	900	30	10.0	4.7	(12-1)
2	900	30	16.7	3.8	(7-1)
3	900	30	10.0	1.0	(1-1)
4	900	30	10.0	6.3	(8-4)
0	180	30	3.3	8.0	(---)
1	180	30	13.3	2.3	(5-1)
2	180	30	20.0	4.3	(6-2)
3	180	30	16.7	4.8	(8-3)
4	180	30	10.0	2.7	(6-1)
In continuous darkness		30	6.7	4.0	(7-1)

Flower-stalk cuttings were cultured on VW + coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light (170 lux).

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA, at 25°C with a light condition as indicated.

第4節 考 察

PLB は主として培養葉片の向軸面に直接に形成され、しかもこれらは種子起源のプロトコム⁹¹⁾ に形態的に非常に類似していることが、本章の諸実験においてくり返し観察された。莖頂培養によって得られる PLB が、プロトコムとはほぼ同じものとし広義のプロトコムとする考え方¹⁴⁹⁾ がある。しかしながら、プロトコムという用語はラン種子の胚発生の1段階を示すのに用いられる⁸⁵⁾ ことから、混乱を避ける意味からも、ファレノプシスの培養葉片に形成される PLB は、プロトコムではなく不定胚 (somatic embryo) と見るのが適切であろう。

懸濁培養系における不定胚形成については、Steward¹³⁴⁾ の報告以来多くの研究がなされてきた^{35, 133, 156)} が、Konor・Nataraja⁶⁹⁾ は単離されない細胞すなわち器官培養においても不定胚が直接に形成されるという興味深い報告を行なっている。これは、*in vitro* で発育させた *Ranunculus sceleratus* の実生において、胚軸の表皮から典型的な不定胚が形成されたというものであった。ラン科植物である *Malaxis Paludosa* は、*in vivo* において、成熟葉の先端部に種子胚と類似した不定胚が生じることが知られている¹⁴⁰⁾。ファレノプシスの培養葉片で見られた PLB 形成も、これらの観察と同様に、分化した細胞に保持されている接合子の能力が培養によって発現されたものであろう。

ラン科植物の莖頂培養によって得られる PLB も不定胚と考えられる。これについては多くの報告があり、PLB 形成の要因も種々調べられている。それらのうち用いられた培地をみると、Knudson C 培地^{82, 83, 117, 118, 149, 152, 158)}、Tuchiya 培地^{16, 160)}、MS 培地^{41, 64)}、VW 培地^{4, 48, 63, 73, 118, 126, 129, 141)}、Fonnesbeck 培地²³⁾、Reinert・Mohr 培地^{50, 72, 149)}、Vajrabhaya 培地¹⁵³⁾ および Heller 培地¹³⁵⁾ などがある。このように莖頂培養に用いられた培地はランの種類や研究者によって異なり、さらに生長調節物質などの添加物や培養環境条件も一定ではない。したがって、ランの莖頂培養における普遍的な PLB 形成誘導条件を提示するのは困難であろう。

以上のような理由から、本章で取り扱ったファレノプシスの葉片培養における PLB 形成誘導要因の検討も、学理的興味よりもむしろ実際の技術として応用される場面を種々想定して行なった。

不定胚分化の誘導には、一般に、無機塩類濃度の低い White 培地などに比べ、無機塩類濃度の高い MS 培地が適当であると言われているので、第1章の諸実験においては MS 培地を採用した。すでに述べた様に、NAA、adenine および BA を添加したこの培地で葉片を培養することによって PLB 形成が誘導されることが明らかとなった。前述の実験において、培地の調整が非常に簡便な、市販の水溶性肥料の Hyponex® をベースとした Hyponex 培地⁶⁾ が、MS 培地と比較して PLB 形成に関して非常に有効であることが示された。ラン種子の無菌発芽用培地として開発された Hyponex をベースとする Kyoto solution¹⁴⁸⁾ は、その後 *Cymbidium*^{55, 58, 75)}、*Cattleya*¹⁶⁵⁾ などの莖頂培養やファレノプシスの花茎腋芽培養^{28, 164)} などの培地として、修正して用いられており、従来の培養に比べ効果が高いことも認められている。

1957年に Skoog・Miller¹²⁷⁾ がタバコの髓組織からの器官分化が、培地に添加したオーキシシンとサイトカイニンの量比によって制御されることを見出して以来、これら2種の生長調節物質の相互作用による器官分化の制御は多くの植物について研究された。ランの莖頂培養においても、PLBの増殖に関して両物質の効果が調べられている^{22, 64, 149)}。本研究の結果は、ファレノプシスの葉片培養においても、NAAとBAがPLB形成誘導の制御要因になっていることを示している。本研究よりわずかに遅れて開始された Hannover 理工科大学における Zimmer と Pieper の研究^{102, 166, 167, 168)} では、ファレノプシスの花茎腋芽のみの培養によって得られた幼植物を根、莖、葉の部分に切り分けて再び培養する方法が検討された。その結果、NAA 0.3 ppm および BA 2 ppm を添加した培

地で、種々の培養体に PLB の形成が認められた。この場合、NAA や BA 濃度が本研究に比較して低いのは、彼らが培地に添加したカバの木の樹液 (bleeding sap of birch tree) 中に含まれる天然サイトカイニン様物質¹⁶⁷⁾ が何らかの効果を与えたからであろう。

葉片培養用培地に、NAA と BA の他にさらに adenine を添加することによって PLB 形成率が高まることが本実験の結果より明らかとなった。この場合、adenine の濃度が 20~40 ppm と高くなると PLB 形成は抑制され、最適濃度は 10 ppm であった。Skoog・Tsui¹²⁸⁾ は、adenine がタバコ茎切片における不定芽形成を著しく促進することを報告している。また、*Plumbago indica* の茎切片^{93,94)}、グロキシニアの小花柄切片¹⁰⁷⁾、セントポーリア (*Saintpaulia ionantha*) の葉片¹³¹⁾ の培養において、オーキシンとサイトカイニンに adenine (または adenine sulfate) を添加することによって、不定芽形成率が高まることが知られている。前述の結果は、これらの結果と一致するものである。

Reinert¹⁰⁸⁾ は、coconut milk と IAA 添加培地で培養したニンジンの細胞を、両添加物を含まない培地に移植することによって不定胚が形成されることを報告している。本研究においても、NAA, adenine および BA を含む培地で培養した葉片を、4 週間後にこれらを含まない培地に移植したところ、移植しないものに比べ PLB 形成率がわずかに高まった。培養葉片に PLB の形成が肉眼的に認められるのは置床後 1 カ月以降であることから、PLB 形成の始発後は必ずしも生長調節物質が必要でないと考えられるが、この点についてはさらに詳細な検討を要する。

一方、培養途中で葉片を糖を含まない培地に移植することによって、PLB 形成が完全に抑制されることが前述の結果より明らかになった。他属のランにおける葉片培養でこれまでに PLB 形成が認められた報告例^{15,27,31,78,167)} をみても、すべての場合、全培養期間を通して培地に糖が添加されている。また、12 属のランについて、茎頂、花序、葉、根など種々の培養における PLB 形成の可能性を確認した Sagawa・Kunisaki¹¹⁵⁾ の最近の研究においても、PLB 形成誘導には糖が必要であることが示された。

茎頂培養培地にはビタミン類が加えられることがあるが、それらは種により有効²³⁾ であることも有害¹²⁹⁾ であることもあって、問題は複雑である。本研究では、Hyponex 培地に含まれる inositol, nicotinic acid および thiamine・HCl などのビタミン類は、PLB 形成誘導に欠くことのできないものであることが示された。

第 2 節の諸実験において、花茎培養時の培地組成および培養環境条件は、後の葉片培養における PLB 形成にも強く影響することが示された。

花茎培養培地について考察すると、添加した BA や zeatin は PLB 形成に促進的に働いた。PLB 形成に対し、これらのサイトカイニンよりもさらに有効であったのは、coconut water であった。培養葉片における PLB 形成率を高めるためには、花茎培養培地に BA (25 ppm) や coconut water (20%, v/v) を添加することが勧められる。

一方、花茎培養時の糖濃度は 2.0% が最適であった。4% あるいは 8% の高濃度の場合には、花茎片の腋芽は萌芽し難くなり、得られたシュートの葉は小さく、それから採取した葉片の再生能も低かった。

以上みてきたように、培養材料を得るために行なう一次培養の培地組成が後の培養片の二次培養における個体再生能に影響を及ぼす例は、ラン科植物に関しては他に全く報告例がない。しかし、本実験の明らかな結果を考えると、おそらく花茎培養培地中の BA や coconut water に含まれている zeatin が花茎片を経由してシュートの葉に移行・蓄積された結果、その葉片の再生能が高まったことが推察される。ムシトリスミレ (*Dionaea muscipula*) の葉を 2ip 溶液に 24 時間浸漬した後に培養すると不定芽形成が著しく促進されたという報告⁹⁹⁾ は、この可能性を暗示している。

花茎培養時の培養環境のうち、培養温度の影響はほとんどなかったが、日長および照度は後の葉片培養におけ

る PLB 形成に影響を及ぼした。とくに照度の後影響は顕著で、より低照度下で得られたシュートから採取した葉片ほど高い PLB 形成率を示した。この原因は不明であるが、より低照度下で発育したシュートほど淡黄緑色で、柔らかい葉が形成されたことから、さし木における黄化処理的效果と同様に、何らかの抑制物質が減少したことにより葉片の再生能が高まったのかもしれない。ところで、第2章第1節の実験において、低照度ほど休眠を維持する腋芽が減少し、シュートに発達する腋芽の割合が増加することを明らかにした。これらの結果から、実際の培養においては、花茎培養を 170 lux 程度の低照度下で行なうことによって材料源となるシュートが高率で得られ、しかもそれから採取した葉片の再生能をも高めることができることが示された。

葉片培養時の光は、PLB 形成誘導のために必要であり、暗黒下では葉片の PLB 形成率は低下した。これまでに報告されている莖頂培養は、ほとんどの場合明所下で行なわれ、*Cymbidium* では 1,200~2,000 lux で 12 時間日長~連続照明、*Cattleya* では 1,000~2,000 lux で連続照明などの条件が採用されている。また、葉片培養においても、*Laeliocattleya*¹⁵⁾ では 1,500 lux, 18 時間日長、*Aranda* や *Ascocenda Renantanda*³¹⁾ では 2,500 lux, 12 時間日長のいずれも明条件下で行なわれた。これらの結果は、ランの培養組織から PLB 形成を誘導するためには光が必要であることを示している。

葉片の培養温度も PLB 形成に影響を与え、25°C が最適であり、28°C では PLB 形成が抑制された。この傾向は、28°C で花茎片を培養して得られたシュートの葉片の培養において顕著に認められた。ファレノプシスの腋芽由来の幼植物を細切して培養材料とした Zimmer・Pieper¹⁶⁷⁾ は、培養初期の 2 週間は 26°C, その後は 22°C に低下させることを勧めている。しかし、*Laeliocattleya*¹⁵⁾ の葉片培養は 22~25°C, *Aranda* や *Ascocenda*²⁷⁾ および *Renantanda*³¹⁾ の葉片培養は 28°C の温度で行なわれており、一般的な適温を規定することはできない。ファレノプシスの場合は、第2章第1節で明らかになった様に、多数の葉片を獲得するために花茎培養は 28°C で行ない、葉片培養は上記の結果より 25°C で行なうのが能率的と考えられる。

培養葉片から滲出する黑色物質の蓄積を回避するために培地の更新を行なった前記の実験結果は、1~2 週間おきに培地更新をすることによって、培養葉片における PLB 形成率が著しく高まることを明らかにした。PLB 形成に対する培地更新の効果は、ファレノプシスの莖頂培養においても認められている⁴⁷⁾。これらの結果は、黑色物質が PLB 形成に対して抑制的に働くことを示唆しているが、この点については bioassay などの手法を用いてさらに検討する必要があるだろう。

葉片培養時の培養条件のうち、PLB 形成に顕著な影響を及ぼしたのは、培養容器に用いる栓の種類であった。これまで、培養容器はすべてゴム栓を用い密栓としてきた。これは、*Cymbidium* の莖頂培養^{58,160)} や シュンラン (*Cymbidium virens*) 種子の発芽促進のためにゴム栓が用いられた例^{56,58)}、あるいはカンキツ類の芽の培養で、その切口より発生するエチレンによって callus 形成が促進された³²⁾ という報告などにもとづいてゴム栓を採用したことによる。しかしながら、培養容器の栓として、密栓よりも通気性のあるシリコン栓やアルミホイールキャップを用いた場合、高い PLB 形成率が得られることが本実験によって確かめられた。このことから、培地更新で示された PLB 形成率の向上も更新時の葉片移植にともなうガス交換による可能性も高いと考えられた。

葉片培養開始後に、2 週間の暗処理を行なうことも葉片の PLB 形成率を高めるのに有効であった。この結果は、Zimmer・Pieper^{167,168)} が花茎腋芽由来の幼植物の切片を用いて行なった実験結果と完全に一致した。本実験において、暗処理を行なった葉片からは黑色物質の滲出量が比較的少ないことを確認しているため、このことによって葉片の再生能が高められた可能性もある。この点についても今後詳しく検討し結論を導く必要があろう。

以上述べてきたように、培養葉片における PLB 形成誘導に関与する要因は非常に多数あったが、これら諸要因の作用機作はほとんど不明である。しかしながら、栄養繁殖を目的として実際に花茎培養や葉片培養を行なう

場合には、PLB 形成率を高めるこれらの諸条件について十分考慮することが望まれる。

第5節 摘 要

1. 培地調整を簡便化するために、無機塩組成を市販の水溶性肥料である Hyponex® (N:P₂O₅:K₂O=7:6:19, 3.5g/l) とし、これに inositol 100ppm, nicotinic acid 1ppm, thiamine-HCl 1ppm, sucrose 2.0% および agar 1.0% を加えたもの (Hyponex 培地) を基本培地として、MS 培地と比較した。なお、両培地ともさらに NAA 1ppm, adenine 10ppm, BA 10ppm を添加した。その結果、Hyponex 培地では MS 培地の約 2 倍にあたる 16.7% の PLB 形成葉片率が得られ、また、PLB 形成葉片あたりの PLB 数も MS 培地での 1.4 個に比べ 3.7 個と多く、Hyponex 培地の有用性が示された。

2. NAA 1ppm を含む Hyponex 培地を用いて、PLB 形成に対する adenine の効果を検討した。adenine 単独では PLB の形成は全く認められなかったが、BA に adenine を添加すると、BA 単独に比べ PLB 形成率が高くなり、adenine の相加効果が示された。なお、20~40ppm の高濃度の adenine は PLB 形成を抑制し、最適濃度は 10ppm であった。

3. adenine 10ppm を含む Hyponex 培地に、NAA と BA を種々の濃度で組合せて添加し効果を比較したところ、NAA 1ppm, BA 10ppm の組合せにおいて、PLB 形成率 21.8%、葉片あたりの PLB 数は 3.6 個となり、有効な培地であることが示された。したがって、以下の葉片培養においては、これらの生長調節物質をこの濃度で添加した Hyponex 培地を用いた。

4. Hyponex 培地から、この培地に含まれるビタミン類 (inositol, nicotinic acid, thiamine) のどれを除いても、葉片の PLB 形成率は低下した。

5. 最大の PLB 形成誘導を示した上記培地でも PLB 形成率は 20% 前後にとどまり、培養葉片が生長調節物質の存在下に長期間おかれることに問題があるとも考えられたので、この点を検討した。その結果、4 週間生長調節物質の添加培地で前培養し、無添加培地に移植した葉片では、PLB 形成率がわずかに高められた。なお、培養途中で糖を除去した培地に葉片を移植したところ、PLB 形成は著しく抑制された。

6. 花茎培養時の培地に添加した BA, zeatin および coconut water は、後の葉片培養における PLB 形成率を高めた。これに対し、NAA および高濃度の sucrose の花茎培養培地への添加は、PLB 形成に抑制的に働いた。このことより、花茎培養時の培地条件が葉片培養における PLB 形成にまで影響を及ぼすことが示された。この場合、coconut water 20% (v/v) 添加培地で得られた葉片が最高の PLB 形成率 (35.8%) を示した。

7. 花茎培養時の培養温度は、得られたシュートから葉片の PLB 形成率に影響を与えなかった。

8. 花茎培養時の日長および照度と、後の葉片培養における PLB 形成との関係を調査した。その結果、花茎培養を短日 (8 時間) で行なった場合、16 時間以上の日長の場合に比べ、葉片培養における PLB 形成が抑制された。一方、花茎培養時の照度 (180~900lux) は、後の葉片培養における PLB 形成に強く影響し、低照度ほど PLB 形成に有効であった。

9. 葉片の培養温度も PLB 形成に影響を与えた。花茎培養を 25°C で行なって得られたシュートの葉片は、25°C で培養した場合、PLB 形成率は 23.3% であったのに対し、28°C では 10% と低下した。この傾向は、28°C で花茎培養を行なって得られた葉片の培養で顕著に認められ、28°C で葉片を培養すると PLB は全く形成されなかった。したがって、花茎培養はシュート形成率の高い 28°C で、葉片培養は 25°C で培養するのが能率的と考えられる。

10. 培養葉片から培地に滲出する黒色物質を吸着させるために、培地への活性炭添加を試みたが、葉片は植

付け後1週間以内にすべて枯死した。そこで、活性炭添加のかわりに、培地の更新により黒色物質の培地への蓄積を回避することを試みた。その結果、1または2週間に1度新しい培地に移植した葉片では、移植しない葉片に比べ、PLB 形成率が高まった。

11. 培養容器に、これまでの培養で用いたゴム密栓の他、通気性のよい栓またはキャップを用い培地無更新で培養した結果、ゴム密栓での PLB 形成率が13.9%であったのに比べ、通気のよいアルミホイルキャップでは47.2%に高まった。

12. 葉片培養開始後に、1～8週までの種々の期間暗黒とし、その後明所下に移した。その結果、対照区の連続照明下では6.7%の PLB 形成率であったのに対し、2週間の暗黒で30%と最も高い形成率が得られた。

第4章 PLB 形成能の種および品種間差異

これまで白花大輪系交雑種を用いて、葉片培養における PLB 形成に対する種々の条件の解明を行ってきた。白花大輪系の品種はファレノプシスの切花生産の大部分をしめているが、近年種々の原種や品種の交配によって作出された色彩の豊かな新しい系統も用いられるようになり、これらの需要も年々増加の傾向にある。したがって、葉片培養による栄養繁殖法を実用化するにあたっては、前述の方法がこれらの系統にも適用できるかどうかについて検討しておく必要がある。そこで、本章においては、この点を明らかにするために以下の実験を行なった。

第1節 PLB 形成能の種間差異

Sweet¹³⁷⁾によれば、ファレノプシス属には自然交雑種も含めると45種が含まれており、これらは東南アジアを中心にヒマラヤ、中国、インド、ニューギニア、北オーストラリアなどに分布している。

ファレノプシスの育種過程においては、*Phal. amabilis*, *Phal. schillerana*をはじめ種々の原種がくり返し用いられてきた。個々の原種の再生能を調べることによって、現在栽培されている各品種を実際に増殖するときに役立つ資料が得られるかもしれない。そこで本節では、18種の原種を供試して、花茎培養におけるシュートの発育および葉片培養における PLB 形成率などを比較した。

材料および方法

実験には、*Phalaenopsis* 節7種、*Slauglottis* 節1種、*Amboinenses* 節2種、*Zebrinae* 節5種、自然交雑種2種および近年注目されるようになった *Doritaenopsis* (属間交雑種) 成立の母株となった *Doritis pulcherrima* の計18種を供試した(第44表)。花茎培養および葉片培養の手順は、それぞれ第2章および第3章に準じた。なお、花茎培養は coconut water 20% (v/v) を添加した VW 培地を用い、25°C、16時間日長(170 lux)の条件下で行ない、葉片培養は NAA 1 ppm, adenine 10 ppm および BA 10 ppm を添加した Hyponex 培地で、培養初期2週間は25°C 暗黒、その後は同温度の16時間日長(900 lux)の明所下に移した。これらの培養条件はいずれも前章までで好適とみなされたものである。

結 果

まず、葉片獲得のための花茎培養を行なった。培養3カ月後の腋芽の発育方向をみると、腋芽がすべて栄養的発育を示しシュートになった種 (*Phal. amboinensis* 他3種) もあれば、シュートが全く得られない種 (*Phal. Schillerana* 他3種)、6～88%の腋芽がシュートに発達した種など、大きな種間差異が認められた(第40表)。シュートの平均葉数および平均葉長についても種によって異なったが、いずれも培養3カ月後には1～3枚の普

Table 44. Comparison of *in vitro* vegetative growth of lateral buds in flower-stalk cuttings of various species.

Section	Species	No. of cuttings cultured	Per cent vegetative shoots developed (%)	Shoot growth	
				Av. leaf number	Av. leaf length (cm)
<i>Phalaenopsis</i>					
	<i>amabilis</i>	19	42	1.5	2.5
	<i>aphrodite*</i>	42	51	2.0	3.0
	<i>aphrodite**</i>	24	54	2.2	2.8
(Phalaenopsis)	<i>sanderana</i>	4	50	3.0	4.1
	<i>sanderana alba</i>	30	32	2.3	2.0
	<i>schillerana</i>	15	0	—	—
	<i>stuartiana</i>	17	6	1.0	1.1
(Stauroglottis)	<i>lindenii</i>	15	47	1.9	2.2
(Amboinenses)	<i>amboinensis</i>	2	100	2.0	1.7
	<i>gigantea</i>	7	0	—	—
	<i>fasciata</i>	14	100	2.1	1.8
	<i>hieroglyphica</i>	1	0	—	—
(Zebrinae)	<i>lueddemanniana</i>	8	88	2.1	2.2
	<i>mariae</i>	2	50	1.0	2.1
	<i>pulchra</i>	15	100	1.9	2.7
(Natural hybrids)	× <i>intermedia</i>	3	100	2.7	2.5
	× <i>leucorrhoda</i>	10	0	—	—
<i>Doritis pulcherrima</i>		8	50	3.0	3.6

Flower-stalk cutting were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light (170 lux).

Data were recorded 3 months after culture.

* native to Philippine, ** native to Taiwan

通葉の分化がみられ、1葉から6葉片程度を採取することができた(第44表)。

次に、シュートから葉片が採取できた種について葉片培養を行なったところ、ほとんどの品種で培養1カ月以降に、葉片の向軸面にPLB形成が観察された。葉片培養においても、PLB形成率は0%(*Phal. lindenii*)から100%(*Phal. × intermedia*)と種間の差が著しかった。また、1葉片あたりのPLB数についても1~6.5個の差異があった(第45表, Plate II-10, 11)。

培養葉片からの黒色物質による培地の黒変程度にも種間で差がみられたので、黒変程度を1~5段階で各試験管ごとに評価して平均値を得た(第45表, Plate II-9)。しかしながら、培地の黒変程度とそれぞれの種のPLB形成能との間には明確な関係は認められなかった。

第2節 PLB形成能の品種間差異

現在営利的に栽培されているファレノプシスは、実用的に6つの花色・模様系統に大別されているが、いずれも複数の原種がくり返し交雑された遺伝的に極めてヘテロな品種からなる。PLB形成能に著しい種間差異があることが前節で示されたことから、原種の交雑により作出された品種の再生能にも差異があることが当然予想される。ここでは、6系統25品種を用いてこの点を調べた。

Table 45. Comparison in PLB formation on leaf segments among various species.

Species	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	Av. no. of PLB per segment	Degree* of media blackening
<i>Phal. amabilis</i>	43	41.9	6.2	2.2
<i>aphrodite*</i>	54	27.8	2.6	3.8
<i>aphrodite**</i>	72	13.9	3.4	2.9
<i>sanderana</i>	18	16.7	1.0	2.8
<i>sanderana alba</i>	54	5.6	5.7	2.6
<i>stuartiana</i>	48	35.4	5.8	2.6
<i>lindenii</i>	24	0	—	1.9
<i>amboinensis</i>	18	16.7	4.7	1.4
<i>fasciata</i>	48	27.1	6.5	1.8
<i>lueddemanniana</i>	48	35.4	6.4	1.5
<i>pulchra</i>	54	3.7	1.0	1.9
× <i>intermedia</i>	24	100	4.8	3.4
<hr/>				
<i>Doritis pulcherrima</i>	24	20.8	5.6	2.0

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA.

Data were recorded 5 months after culture.

* Scored by means of the following visual scale: 1=no blackening, 5=all media turned black, 2, 3 and 4=intermediate between 1 and 5.

** native to Philippine, *** native to Taiwan

材料および方法

系統としては、白花系3品種、白弁赤リップ系4品種、ピンク系7品種、黄花系4品種、ストライプ系4品種および点花系3品種を供試した(第46表)。各品種の花茎培養および葉片培養の手順、培地、培養条件などについては前節に準じた。

結 果

培養3カ月後の、花茎培養における腋芽のシュート形成の割合は、6品種で0%、4品種で100%、他の品種では13~89%と品種によって著しく異なった(第46表)。シュートの平均葉数および葉長も品種によって異なったが、培養3カ月後にはほとんどの品種で1~3枚の普通葉が発達した(第46表)。しかしながら、各系統間におけるシュート形成率およびシュートの生長量には、系統内の品種間差が大きいため、明確な傾向は認められなかった。

次に、シュートから葉片が採取できたすべての品種について葉片培養を行なったところ、ほとんどの品種で培養1カ月以降に、葉片の向軸面にPLB形成が観察された。培養5カ月後のPLB形成率は、21%~100%と品種間で著しい差異があり、3品種ではPLB形成が全く認められなかった。また、1葉片あたりのPLB数も1~15.4個と品種間で差異があった(第47表, Plate II-7, 8)。

なお、PLB形成能には系統の違いによる一定の傾向はみられなかった。

葉片培養による培地の黒変程度にも品種間で差があり、培地の黒変程度が低い品種ではPLB形成率が比較的高く、平均PLB数も多い傾向があった(第47表)。

Table 46. Comparison of *in vitro* vegetative growth of lateral buds in flower-stalk cuttings between various hybrids.

Color of flower	Code* of hybrid	No. of cuttings cultured	Per cent vegetative shoots developed (%)	Shoot growth	
				Average leaf number	Average leaf length (cm)
White	A	26	65	1.9	3.6
	B	7	86	2.0	3.6
	C	26	89	1.8	3.5
White with red-lip	D	10	42	1.8	2.7
	E	8	50	2.8	2.6
	F	7	86	2.1	3.6
	G	1	0	—	—
	H	6	50	2.3	3.8
	I	4	75	1.7	3.8
Pink	J	7	14	3.0	1.9
	K	3	33	1.0	1.4
	L	5	60	1.3	2.9
	M	5	0	—	—
	N	5	0	—	—
	O	24	13	1.3	3.1
Yellow	P	2	100	1.5	2.4
	Q	1	100	4.0	1.7
	R	1	0	—	—
Striped	S	7	29	2.5	4.3
	T	4	25	1.0	0.9
	U	5	0	—	—
	V	7	0	—	—
	W	4	100	2.5	3.1
Spotted	X	4	25	1.0	1.0
	Y	2	100	2.5	3.3

Flower-stalks were cultured on VW+coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light (170 lux).

Data were recorded 3 months after culture.

* A, White Falcon × Persistent; B, Enshyu; C, (White Falcon × Persistent) × Jimmy Hall; D, Pink Cheers × *mannii*; E, George Woodward × (Makua Shore × Percy Porter); F, unknown; G, unknown; H, Callie Flynn; I, unknown; J, Kyoto × Zauberrose; K, Callie Flynn × [Lavender Lady × (Mount Kaala × Makua Shore)]; L, Lavender Lady × [Lavender Lady × (Clarelen × Zada)]; M, Zada; N, Marion Fowler; O, *mannii* × Mount Martian; P, Golden Sands; Q, Memoria Isolina Cestero; R, *mannii* × Pat Darby; S, Pink Cheers × [Lavender Lady × (Mount Kaala × Makua Shore)]; T, Zada × [Lavender Lady × (Mount Kaala × Makua Shore)]; U, [Lavender Lady × (Mount Kaala × Makua Shore)] × Promissing Day; V, unknown; W, George Moler; X, Lolita × *mannii*; Y, Surfrider × *gigantea*

第3節 考 察

莖頂培養法が *Cymbidium* の大量増殖法になり得ることをはじめて示した Morel が、この手法を他属のランに応用したところ培養の難易さに属間差のあることが明らかにされた⁸³⁾。その後、多くの研究者によって、培地の組成、培養環境条件および培養手法が種々の属で改良され、現在では営利的に主要なほとんどの属に適用でき

Table 47. Comparison in PLB formation on leaf segments among various hybrids.

Code of hybrid	No. of leaf segments cultured	Per cent segments with PLB (%)	Av. no. of PLB per segment	Degree** of media blackening
A	90	14.4	2.1	2.6
B	90	38.9	3.7	2.9
C	364	30.2	3.3	2.7
D	48	37.5	3.6	2.6
E	84	21.4	3.6	2.7
F	48	12.5	7.8	2.0
G*	6	83.3	15.4	1.8
H	30	13.3	4.0	3.1
I	48	2.1	9.0	2.7
J	48	37.5	4.0	3.0
K	24	29.2	4.9	2.2
L	48	31.3	6.4	2.2
M*	12	0	—	3.8
O	39	44.4	3.9	1.9
P	24	8.3	4.0	2.5
Q	6	100	5.8	2.3
S	48	4.2	1.5	2.3
T	18	0	—	2.6
V*	42	0	—	2.4
W	65	53.8	11.6	2.0
X	12	8.3	1.0	2.5
Y	6	66.7	3.5	2.0

Leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with 1ppm NAA, 10ppm adenine, and 10ppm BA.

Data were recorded 5 months after culture.

* Leaf segments were obtained from shoots formed on the basal node of reproductive shoot developed after culturing flower-stalk cuttings.

** See footnotes of Table 42.

る技術となった。

一方、茎頂培養による増殖の難易度を、同属内の種または品種を用いて比較した研究もいくらかなされている。茎頂培養が困難であった *Cattleya* では、Scully¹²⁶⁾ が数属の原種の培養を試み、市橋・加古⁴¹⁾ も原種や品種間の比較を行ない活着率に差のあることを指摘した。*Cymbidium* では、Kano⁵⁸⁾ が茎頂培養の成功率に種間差のあることを明らかにした。これらの結果はいずれも、茎頂培養による再生能に種または品種間差が存在することを示している。

このような理由から、本実験においては、ファレノプシスの葉片培養による繁殖法が、実際の場面で用いられるときに遭遇するであろう上述のような種間・品種間の再生能の差異について調査した。

まず、品種作出の母体となった原種についてみると、花茎片の腋芽がシュート形成に向かう割合、シュートの平均葉数および葉長などに関して明らかに種間差異が存在した。花茎培養に関するこれまでの研究においては、*Phal. amabilis*¹¹¹⁾、*Phal. schillerana* および *Phal. sanderana*¹⁵⁰⁾ 以外の原種は用いられておらず、しかも腋芽の各発育方向の割合や生長量についても詳細に調べられていないので、本実験の結果と比較することはできない。

本手法による繁殖効率は、上述のシュート形成率、葉数（採取できる葉片数）、さらに PLB 形成率や平均 PLB 数の積によって決定される。この中でも特に重要な PLB 形成率は、種によって著しい差異がみられた。一般に、PLB 形成率の高い種は平均 PLB 数も多く、逆に形成率が低い場合は平均 PLB 数も少ない傾向が認められた。

以上述べてきた再生能の種間差異は、すべて同一培養条件のもとで示されたものであったことから、これらの差異がそれぞれの種の組織・形態学および内生生長調節物質の質的・量的差異に由来している可能性を暗示している。この点を明らかにするための一手段として、葉片の内生生長調節物質の活性を調査する必要がある。

ついで、多数の品種を用いた実験の結果は、種において得られた結果と同様の傾向を示した。現在営利的に栽培されているファレノブシスの品種が、複数の原種や品種がくり返し交雑された遺伝的に極めてヘテロなものであることから、ここに示された PLB 形成能の品種間差異は、その育種の過程で用いられた原種の再生能に起因することが示唆された。この点については、再生能の高い種と低い種を用いて相互交雑を行ない、後代の再生能を調査することによって証明していきたい。トマトにおいてはすでに、不定器官分化能の遺伝について調べられた Ohki ら⁹⁶⁾ の興味深い研究がある。

培養葉片から滲出する黒色物質による培地の黒変程度も品種間で差が認められた。同一系統内でみると、黒変程度が低ければ PLB 形成率が比較的高く PLB 数も多いが、逆に黒変程度が高い品種では PLB 形成率も低い傾向があった。これらの観察結果と、第 3 章第 3 節で示された葉片培養時の培地更新の実験結果から、黒色物質の量の多少も PLB 形成能を支配している可能性のあることが推察された。この点についてはさらに検討する必要がある。

Zimmer・Pieper¹⁶⁷⁾ は、前述の研究において、*Phal. Lipperose*, *Phal. Zauberrose* および *Phal. Zada* × *Phal. Zada* 'Emma' などの品種を用い、PLB 形成の誘導を試みたが、PLB 形成率などについての詳しい記述はない。一方、本研究と同一の方法で、実用段階で行なわれた葉片培養では、品種によって 5～20% の PLB 形成率が得られている³⁶⁾。本研究においても、多くの品種（86%）が花茎培養と組合せた葉片培養によって確実に栄養繁殖できることが分かった。なお、現在の営利栽培の主要系統である白花大輪種は、検討した範囲では、容易に増殖できると考えられる。

第 4 節 摘 要

1. ファレノブシスの育種過程で用いられてきた原種 18 種について、花茎培養におけるシュートの発育および葉片培養における PLB 形成率を比較した。培養は、前章までの白花交雑種の培養において最高の結果が得られた培地・培養条件で行なった。

2. まず、葉片獲得のための花茎培養を行なったところ、腋芽がすべてシュートになる種 (*Phal. amboinensis* 他 3 種) もあれば、シュートが全く得られない種もあり、大きな種間差異が認められた。

3. 葉片培養においても、PLB 形成率は 0% (*Phal. lindeni*) から 100% (*Phal.* × *intermedia*) と種間の差が著しく、1 葉片あたりの PLB 数についても 1～6.5 個の差異が認められた。

4. 原種を用いて得られた結果から、品種によって葉片培養による増殖能率にも差があることが予想されたので、花色の異なる 6 系統 25 品種を用いてこの点を調べた。まず、花茎培養におけるシュート形成の割合は、6 品種で 0%、4 品種で 100%、他の品種では 13～89% と、品種によって著しく異なった。

5. シュートから葉片が採取できた品種について葉片培養を行なったところ、ほとんどの品種で培養 1 カ月以降に PLB 形成が観察されたが、PLB 形成率は 2.1～100% と品種間で著しい差異があり、3 品種では PLB 形成が

認められなかった。また、1葉片あたりのPLB数についても1~15.4個と品種間で差異があった。なお、花色の違いによるPLB形成能には一定の傾向はみられなかった。

6. 葉片培養における培地の黒変化の程度にも品種間で差があり、あまり黒変させなかった品種ではPLB形成率が高く、平均PLB数も多い傾向が認められた。

第5章 PLBの増殖と幼植物の分化

培養葉片に形成されたPLBは、ラン種子の無菌発芽用培地に移植すると容易に幼植物に発達するが、通常1PLBから1個体しか得られない。幼植物を大量に得るためには、PLBの段階でこれを増殖しておく必要がある。

茎頂由来のPLBの増殖法は、*Cymbidium*, *Cattleya*, *Dendrobium*, *Vanda*などの属で確立されており、PLBの分割、液体培地への移植、通気培養など種々の手法で行なわれている。

ここでは、葉片培養によって得られたPLBの液体回転振とう培養および分割などの物理的処理がPLBの増殖に及ぼす影響を調べた。

さらに、これらの増殖したPLBから幼植物を得るための移植培地についても検討した。

材料および方法

Phal. amabilis 系交雑種(5~6年生)の花茎培養由来の葉片を培養して得られたPLBを、coconut water 20%(v/v)を添加し、sucroseおよびagarを除いたVW培地で回転振とう培養(160rpm)に移した。培養条件は、25°C、16時間日長(500lux)とした。

次に、PLBに加える種々の物理的処理が、新たなPLBの増殖に及ぼす影響を調べた。実験を進めるにあたって、大きさの均一なPLBを得ることが困難であること、培養葉片に形成されるPLBが種子由来のプロトコーム

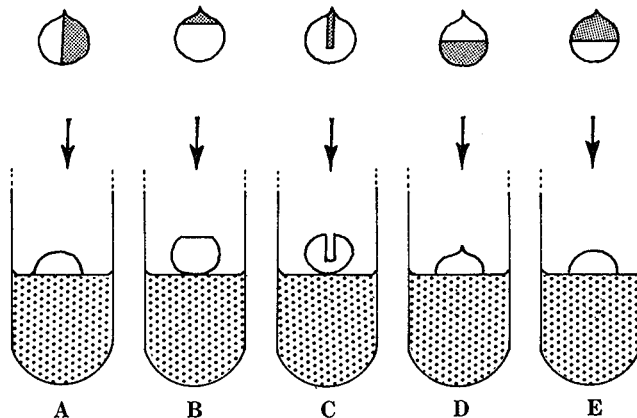


Fig. 22. Diagram illustrating various ways of incision of protocorm. 45-day-old protocorm from seed was cut and cultured as indicated in the following criteria:

A=longitudinal half

B=apical tip removed

C=tissues of protocorm pricked with red-hot needle from apical end

D=apical half of transverse cut

E=basal half of transverse cut

Protocorms operated were cultured on MS medium supplemented with 1 ppm NAA and 0.1 ppm kinetin.

と形態的に非常に類似していることなどから、ここではまず、PLBのかわりにプロトコームを本実験の材料として用いることとした。*Phal. amabilis* 系交雑種の無菌播種後45日のプロトコームを用い、これに第22図に示したような5種類の物理的処理を加えて、MS培地 (NAA 1 ppm, kinetin 0.1 ppm, sucrose 2.0%, agar 1.0%) に植付けた。培養条件は、25°C, 16時間日長 (900 lux) とした。

同様の目的で、葉片培養由来のPLBを横断2分割し、前述の花茎培養用培地 (coconut water 20% (v/v) を添加したVW培地) に、切口を培地面につけて置床し、培養片における新たなPLBの増殖の様相を観察した。

PLBから幼植物を得るための移植培地を検討するために、ラン種子の無菌発芽用培地を3種類準備し、実生幼苗の培養葉片に形成されたPLBを移植した。培養条件は、25°C, 16時間日長 (900 lux) とした。

結 果

(1) PLBの増殖

液体回転振とう培養を行なった場合、PLBの33%は新しいPLBを増殖することなくそのまま幼植物に発達したが、他のものは1 PLBあたり平均10.8個の新しいPLBを形成した (Plate・II-12)。

種子由来のプロトコームに種々の物理的処理を加えて50日間培養した結果を第23図に示した。プロトコームの横断2分割を行ない、その下半分を切口を培地面につけて植付けたすべての培養体は新たにPLBを増殖し、平均PLB数も7.6個と最大であった。これに対し、縦断2分割を行なったものは、PLB形成率は80%と最も低かった。培養片あたりに形成されたPLB数が最も少なかったのは、横断2分割を行なった上半分の切片であった。

次に、花茎培養由来シュートの葉片を培養して得られたPLB (品種L) を横断2分割して再培養を行なった結果、下半分の切片はすべて新たなPLBのみを増殖し、その平均数は13.7個であった。これ

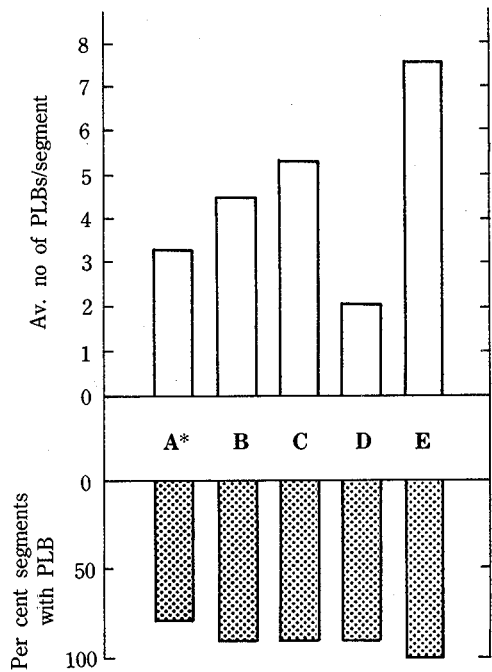


Fig. 23. Formation of daughter PLB in operated-protocorm.

* See footnotes of Fig. 22.

Table 48. Comparison of daughter PLB formation and/or shoot development between upper and lower half of cut PLB.

Section	No. of cultured	Developed organ on culture				
		PLB and Shoot		PLB		Shoot
		%	No. of PLB/culture	%	No. of PLB/culture	%
Upper	16	31	1.0	38	5.3	31
Lower	16	0	-	100	13.7	0

Hybrid used: Lavender Lady × [Lavender Lady × (Clarelen × Zada)]

PLBs were transversally bisected, and cultured on VW + coconut water 20% (v/v) medium, at 25°C with a 16-h light (900 lux).

Data were recorded 55 days after culture.

に対し、上半分の切片は、その31%がPLBとシュート、38%がPLBのみ、31%がシュートのみをそれぞれ形成した。このうち、新たにPLBのみを形成した切片では、1切片あたり5.1個のPLBを形成するにとどまった(第48表, Plate II-13)。

(2) PLBからの幼植物の分化

3種類の培地における培養280日目の幼植物の生育状態を調査した。その結果、生育に対する培地の影響はほとんどなく、いずれの培地においても、十分実用に供しうる健全な苗が得られた(第24図)。

考 察

茎頂培養によって得られたPLBをさらに増殖する方法は、現在ではほとんどの属において確立されている。たとえば、*Cymbidium*では、液体回転培養¹⁶⁰⁾、PLBの分割^{83, 85, 149)}、通気培養^{66, 103)}などの培養手法や、培地に添加する生長調節物質^{22, 74)}、種々の添加物質^{23, 74)}などに関して詳細な研究がなされてきた。しかしながら、葉片培養で形成されたPLBについてのこの方面の研究は非常に少ない。

この研究では、培養葉片に形成されたPLBは、2つの方法、すなわち液体回転振とう培養とPLBの分割切片の培養によって、さらに大量増殖できることが明らかになった。

PLBの増殖には、sucroseは不用であるとの報告^{45, 48, 73, 141, 142)}があるので、本実験の液体回転振とう培養には、sucroseを除去し coconut water 20% (v/v)を添加したVW培地を用いた。この培地は、sarcantheneラン(*Phalaenopsis*, *Vanda*, *Aranda*, *Doritis*などを含む)の茎頂、花序、葉および根の各培養によって得られたPLBの増殖に好適な培地である¹¹⁵⁾。また、ファレノプシスの腋芽培養²⁶⁾や*Aranda*および*Ascocenda*の葉片培養²⁷⁾によって得られたPLBの増殖にも、この培地を用いることができるとの報告もある。本実験の結果は、この培地の有用性を確認することになった。

種子起源のプロトコムに加える物理的処理のうち、PLBの増殖に最も有効であったのは、これまでも報告¹⁴⁹⁾があるとおりの、横断2分割を行なった下半分の切片を、切断面を培地につけて植付ける方法であった。そこで、葉片培養によって得られたPLBを用いて同じ実験を行なったところ、全く同様の結果が得られた。この場合、横断2分割の上半分の切片はシュート形成に向かうものが多く、新たに形成されたPLBも少なかった。これは、上半分の切片は、その先端に生長点を有し、PLBの増殖よりもむしろシュート形成に向かうことが優先されたためと考えられる。なお、この実験に用いた培地は、coconut water 20% (v/v)を添加したVW培地であり、sucrose (2.0%)も添加されていた。このことより、sucroseの除去は、PLBの増殖には必ずしも必要でないことが示された。

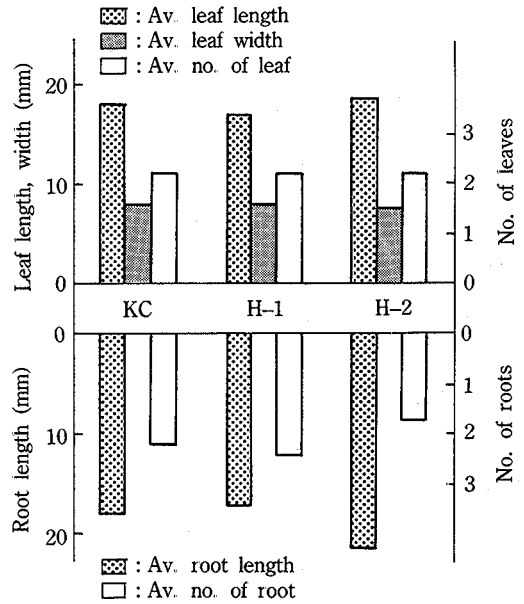


Fig. 24. Effect of various nutrient media on the growth and development of PLBs derived from cultured leaf segment.

Data were recorded 280 days after transplanting.
 KC=Knudson C medium (1946)
 H-1=Hyponex (N:P₂O₅:K₂O=7:6:19) 3.0 g/l, apple juice 10% (v/v), sucrose 3.5%, agar 1.5%.
 H-2=Hyponex (N:P₂O₅:K₂O=20:20:20) 3.0 g/l, apple juice 10% (v/v), sucrose 3.5%, agar 1.5%.

Greisbach³⁴⁾は、本葉片培養法によって得られた PLB を、indoleacetyl glycine (0.5 mg/l) を添加した培地に移植すると、PLB の増殖率が高まることを報告している。また、Zimmer・Pieper¹⁶⁷⁾は、腋芽培養によって得られた幼植物を分割した培養片から PLB を得、それぞれの PLB を幼植物に発達させ、これをくり返すことにより増殖を試みている。これらの報告から考えても、ファレノプシスの葉片培養によって得られた PLB の増殖は比較的容易であると考えられる。ただし、*Cymbidium* において、莖頂由来の PLB の増殖には品種間差異のあることが認められている⁷⁶⁾ので、ファレノプシスにおいてもこの点については、今後検討する必要がある。

このようにして増殖した個々の PLB から幼植物を分化させる培地について検討した上述の結果は、ランの無菌発芽に用いられているような培地であれば実用上ほとんど問題なくこれに流用できることを明らかにした。他の葉片培養に関する報告をみても、*Laeliocattleya*¹⁵⁾では Knudson C 培地、*Renantanda*³¹⁾では VW 培地のように、無機塩類と糖のみから成る単純な培地が用いられている。これらのことから、莖頂培養の場合と同様に、葉片培養によって得られた PLB から幼植物を分化させることは極めて容易であると言える。

以上みてきたように、培養葉片からの PLB 形成誘導、PLB の増殖および PLB からの幼植物分化という一連の栄養繁殖過程における問題がほぼ解決されたことから、葉片培養は他のランにおける莖頂培養と同様、ファレノプシスの効率的な栄養繁殖法となり得るであろう。

摘 要

1. 葉片培養によって幼植物を大量に得るためには、PLB の段階でさらにこれを増殖しておく必要があることから、PLB の増殖法について検討した。
2. 葉片培養で得られた PLB を回転振とう培養 (VW の無機塩類溶液に coconut water 20% 添加) に移したところ、33% の PLB は新しい PLB を増殖することなくそのまま幼植物に発達したが、他のものは 1 PLB あたり平均 13.7 個の新しい PLB を形成した。
3. 種子起源のプロトコームに種々の物理的処理を加えて MS 培地 (NAA 1 ppm, kinetin 0.1 ppm, sucrose 2.0%, agar 1.0%) に植付けた結果、プロトコームの横断 2 分割を行なって得られた下半分の切片はすべてが新たに PLB を形成し、平均 PLB 数も 7.6 個と他の処理に比べ最大であった。
4. 次に、葉片培養によって得られた PLB を横断 2 分割し、coconut water 20% を添加した VW 培地に切口を培地面につけて植付けた。この場合、下半分の切片はすべて新たな PLB を増殖し、その平均数は 13.7 個であった。これに対し、上半分の切片は、その 31% が PLB とシュートの両方を形成し、38% が PLB のみ、残りの 31% がシュートのみを形成した。このうち、PLB のみを形成した切片では、平均 5.1 個の PLB を増殖するにとどまった。
5. 葉片培養によって得られた PLB から幼植物を分化させる培地について検討した結果、一般にラン種子の無菌発芽に用いられるような培地であれば十分実用に供しうる健全な苗が得られることが分かった。

第 6 章 葉片培養により得られた植物体の花の形質

ラン科植物の莖頂培養による大量増殖は、現在約 21 属において商業的規模で行なわれているが、培養による突然変異の発現率は 0.01% 以下である¹¹⁹⁾。この場合、増殖されたメリクロンの数が 1 万を超えなければ変異は全く見られないと言われている。しかしながら、葉片培養に関しては、このような変異出現に関する研究報告はなされていない。ここでは、葉片培養によって得られた栄養系個体群の花の諸形質を、母植物のそれと比較することによって、変異出現の可能性の有無を調べた。

材料および方法

第4章で得られた19品種および12原種のPLBを、Hyponex (N:P₂O₅:K₂O=7:6:19) 3.0g/l, Nitsch微量要素(1967), inositol 100ppm, nicotinic acid 1ppm, 活性炭2g/l, sucrose 3.0%, agar 1.0%を含む培地に移植した。PLBから発達した幼植物が、いずれも2~3葉齢時に達した5~7カ月後に(Plate III, 14), フラスコより取出し鉢上げし、温室で慣行法によって栽培を行なった(Plate III, 15)。鉢上げ後2年を経過した1984年3月までに5品種(第4章第2節で用いた品種A, B, D, HおよびO)が開花した(Plate III-16)。

これらの開花個体において、花色、模様、花型、花の大きさおよびcallus(リップの基部にある突起で、Sweet¹³⁷⁾はこれをファレノプシスの種の分類に用いた)について観察した。また、それぞれの母植物についても同様の観察を行ない、変異の有無を推察した。

観察結果

1984年1月から3月の間に開花した5品種について、葉片培養由来の植物体およびそれらの母植物(花茎培養によって得られた植物体も含む)の花の諸形質について、園芸学的見地より比較した結果、これらの花の諸形質は同一であり、培養による変異はなかったものと考えられた(Plate III-17, 18)。

考 察

培養組織およびこれに由来する植物では、遺伝的変異を伴うことが普通と考えられている⁹⁷⁾。Nishiyama・Taira⁹²⁾は、*Nicotiana glauca*の髄組織由来のカルスから異数体植物を得たが、これは2n植物の組織培養によって異数体植物を育成した最初の報告である。その後、タバコ単細胞由来のカルスから再分化した植物体⁹⁷⁾で報告されたように、倍数体と異数体の再分化植物は多くの種で知られている。この点において組織培養は、変異体を育種的に利用する場合には適しているが、植物の栄養繁殖法としては一般に不都合である。このような理由から、本研究においても、葉片培養によって得られた花の形質を観察することは重要な問題である。

写真(Plate III, 17, 18)が示すように、葉片培養由来の植物体と母植物の花の諸形質(実用形質)は外見的には全く同一であり、培養による変異はなかったものと推察された。ランの組織培養による増殖が1万を超えなければ増殖植物は母植物と同一であるが、万単位の場合には、突然変異発生率は0.01%以下と考えられており、実用的にはほとんど問題はない¹¹⁹⁾。

しかしながら、Vajrabhaya¹⁵⁴⁾は、*Dendrobium*のメリクローンの過程で倍数体が生じたことを報告している。また、加古⁵³⁾は、*Cymbidium*の茎頂培養由来の植物体について、4種類の変異を報告し、田中・長久¹³⁹⁾は*Cymbidium*のメリクローン突然変異体には、倍数体、異数体および染色体数の変化を伴っていないものの3種類があることを認めている。このように、ランにおいても培養による変異体出現の可能性は否定できない。

一方、Vacil¹⁵⁵⁾は、体細胞からの胚発生(Somatic embryogenesis)で生じた再分化植物体は、染色体変異も表現型の変異もなく母植物と同じで2倍体であろうと述べている。いずれにしても、今後、未開花の多数の品種も含めて、葉片培養由来植物体の細胞遺伝学的研究を中心に、変異体出現の有無を確認する必要がある。

摘 要

1 19品種および12原種のPLBから発達した幼植物を、いずれも2~3葉齢時に達したときフラスコより取り出して素焼鉢に鉢上げし、温室で慣行法による栽培を行なった。鉢上げ後2年を経過した1984年3月までに、5品種が開花した。

2 これらの花の形質は母植物のそれと同一であり、培養による変異はないと考えられた。

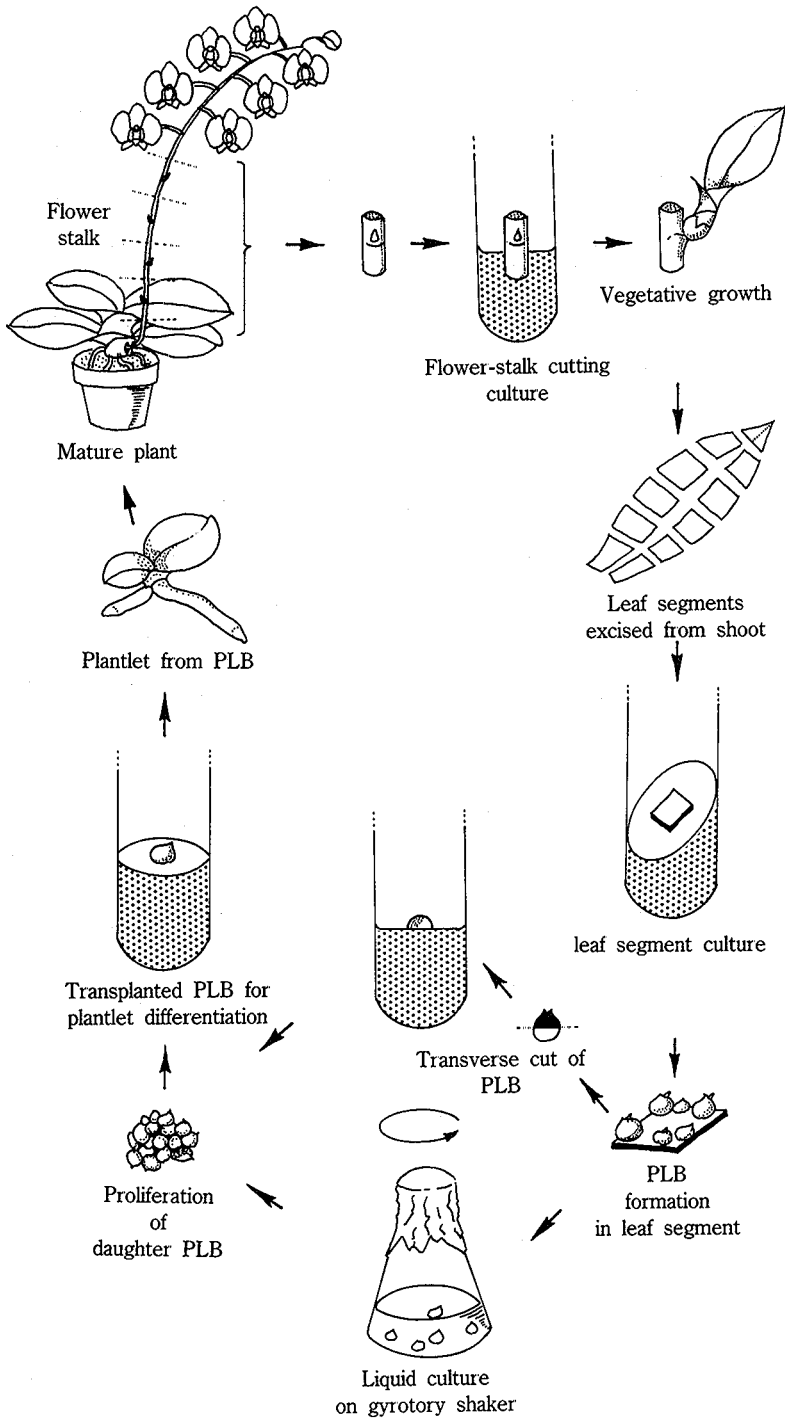


Fig. 25. Schematic representation of clonal propagation of *Phalaenopsis* through tissue culture.

結 論

緒言でも述べたように、本研究は、ファレノプシスの葉片培養による PLB の形成さらに幼植物の育成を目的として、培養材料の検討、培地組成および培養条件等について基礎的知見を得るとともに、栄養繁殖技術を確立するために行なったものである。

まず、葉を培養材料として用いた場合、培養葉片に PLB の形成が認められ、葉片培養による栄養繁殖が可能なることが確かめられた。種々の培養材料を検討した結果、葉片培養によって栄養系の増殖を計る場合は、まず花茎片の培養によってその腋芽の発育による幼葉を得（花茎培養）、次にその葉片を採取し培養して PLB を得る方法（葉片培養）が、最も優れた方法であることがわかった。

第25図は、本栄養繁殖法の手順を示したものである。花茎培養および葉片培養の培地・培養条件に関して得られた結果から、ファレノプシスの栄養系増殖を最も効率よく行なう手順は次のようになる。

花の形質を確認したのち、花茎を1腋芽ずつつけて長さ1cmに切り分け、coconut water 20% (v/v) または BA 2.5ppm を添加した Vacin・Went 培地に植付ける。これを 28°C, 170 lux, 16時間日長の条件下で培養して腋芽を萌芽させ、2~3葉時に最上葉から6~8mm 平方の葉片を採取する。次に、これらの葉片を NAA 1ppm, adenine 10ppm および BA 10ppm を添加した Hyponex 培地に置床後、25°C で2週間は暗黒、その後 900 lux の16時間日長で培養すると、1カ月後には PLB の形成がみられる。この間培地がひどく黒変した場合は、培地の更新が望ましい。約3カ月後にこの PLB を分割して花茎培養用培地に移し、照明下の葉片培養時と同じ培養条件で PLB の増殖をはかる。増殖した PLB を個々にラン種子の無菌発芽用培地に移植して、幼植物への発達を促す。この幼植物は約半年後に鉢上げが可能となり、2~3年後には開花が期待される。

なお、品種およびこれの母体となった原種間で、個体再生能力にはかなり差がみられた。なかには上記の培地・培養条件では全く再生されなかったものもあり、この点は今後の検討を要する。しかし、現在営利栽培されている多くの品種（白花系）では問題がなく、本繁殖法によって、現在の要求を満たすだけの大量の栄養系増殖は可能である。

ランの茎頂培養はウイルスフリー株の育成を目的として開始されたが、その後は栄養繁殖の手段としてのみ用いられてきたため、現在ではウイルス除去への配慮はほとんど払われていない。以上述べてきた本栄養繁殖法によってもウイルス除去は望み得ないと考えられるので、選抜された母株は衛生的に取り扱っておく必要がある。なお、ウイルスフリー株を育成しなければならない場合は、葉片培養によって得られた PLB から無ウイルス部分を得る方法が考えられよう。

引 用 文 献

- 1) ABDULLAH, M. and ARDITI, J. 1983. Preparation of hormone pastes for plantlet induction on *Phalaenopsis* flower stalks. *Orchid Rev.*, **91**: 291-292.
- 2) ALTOMAN, A. and GOREN, P. 1974. Growth and dormancy cycles in *Citrus* bud cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant.*, **30**: 240-245.
- 3) ARDITI, J. 1977. Clonal propagation of orchids—by means of leaf cultures *in vitro*. A short Review. *Orchid Rev.*, **85**: 102-103.
- 4) ARDITI, J., BALL, E. A. and REISINGER, D. M. 1977. Culture of flower-stalk buds: a method for vegetative propagation of *Phalaenopsis*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **46**: 236-240.
- 5) ARDITI, J., JOHNSON, J. A. and PERERA, R. G. 1981. Culture media which do not require sterilization: *Phalaenopsis* flower stalk nodes. *Orchid Rev.*, **89**: 49-52.

- 6) BALL, E. A. and ARDITI, J. 1976. Node culture as a means of clonal propagation for *Dendrobium*. Proc. 8th World Orchid Conf. (Frankfurt, 1975), pp. 367-371.
- 7) BALL, E. A., ARDITI, J. and CHURCHILL, M. E. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. Orchid Rev., 79: 281-288
- 8) BOURIQUET, R., BROLY, H. and LEGRAND, B. 1982. Clonal propagation of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) by *in vitro* culture. In: E. D. Earle, ed., Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publishers, New York, pp. 35-46.
- 9) BROWN, D. M., GROOM, C. L., BROWN, M. A. and ARDITI, J. 1984. Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination. Orchid Rev., 92: 220-223
- 10) BROWN, D. M., GROOM, C. L., CVITANIK, M., BROWN, M., COOPER, J. L. and ARDITI, J. 1982. Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination and shoot tip cultures *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1: 165-180.
- 11) CARPENTER, W. J., RODRIGUEZ, R. C. and CARLSON, W. H. 1971. Growth regulator induced branching on non-pinched poinsettias. HortScience, 6: 457-458.
- 12) CHAMPAGNAT, M., MOREL, G. and MOUNETOU, B. 1970. La multiplication vegetative des *Cattleya* a partir de jeunes feuilles cultivees aseptiquement *in vitro*. Ann. Sci. Nat. Bot., Paris, 12 Serie, XI: 97-114.
- 13) CHURCHILL, M. E., ARDITI, J. and BALL, E. A. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. Amer. Orchid Soc. Bull., 40: 109-113
- 14) CHURCHILL, M. E., BALL, E. A. and ARDITI, J. 1970. Clonal propagation of orchid plants from seedling leaf tips. Orchid Dig., 34: 271-273.
- 15) CHURCHILL, M. E., BALL, E. A. and ARDITI, J. 1973. Tissue culture of orchid. I. Methods for leaf tips. New Phytol., 72: 161-166.
- 16) CVITAINC, M. and ARDITI, J. 1984. Effects of anticontaminants on *Cymbidium* shoot tip cultures. Orchid Rev., 92: 118-121.
- 17) DAERR, M. 1967. Vegetative Vermehrung bei *Phalaenopsis*. Die Orchidee, 18: 322-324.
- 18) DE VRIES, J. T. 1953. On the flowering of *Phalaenopsis schilleriana* Rchb. f. Ann Bogor., 1: 61-76.
- 19) DUTCHER, R. D. and POWELL, L. E. 1972. Culture of apple shoots from buds *in vitro*. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 97: 511-514.
- 20) FLAMEE, M. and BOESMAN, G. 1977. Clonal multiplication of *Phalaenopsis*-hybrids by means of sections of the flower stalk. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 42: 1865-1868.
- 21) FLAMEE, M. and BOESMAN, G. 1981. Preliminary investigations on the use of benzyladenine (BA) for the multiplication *in vivo*. *Paphiopedilum*- and *Phalaenopsis* hybrids. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 46: 241-245.
- 22) FONNESBECH, M. 1972. Growth hormones and propagation of *Cymbidium in vitro*. Physiol. Plant., 27: 310-316.
- 23) FONNESBECH, M. 1972. Organic nutrients in the media for propagation *Cymbidium in vitro*. Physiol. Plant., 27: 360-364.
- 24) FRIDBERG, G., PEDERSEN, M., LANDSTRÖM, L. and ERIKSSON, T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue culture: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant., 43: 104-106.
- 25) FRIEND, D. J. C., BODSON, M. and BERNIER, G. 1984. Promotion of flowering in *Brassica campestris* L. cv Ceres by sucrose. Plant Physiol., 75: 1085-1089.
- 26) FU, F. M. L. 1978. Studies on the tissue culture of orchids. 1. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by lateral vuds from flower stems. Orchid Rev., 86: 308-310.
- 27) FU, F. M. L. 1979. Studies on the tissue culture of orchids. 2. Clonal propagation of *Aranda*, *Ascocenda*, *Cattleya* by leaf tissue culture. Orchid Rev., 87: 343-346.
- 28) 古川仁郎・楠元 守. 1970. ファレノプシスの花こうえき芽培養. 第2回植物組織培養シンポジウム, p. 8.
- 29) GEIER, T. 1977. Morphogenesis and plant regeneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*. Acta Hort., 78: 167-174.
- 30) GILADI, I., ALTMAN, A. and GOREN, R. 1979. A method for aseptic culture of bud explant from citrus trees. Scientia Hort., 10: 357-362.
- 31) GOH, C. J. and TAN, H. 1982. Clonal propagation from leaf explants in *Renantanda* orchid hybrid. Orchid Rev.,

- 90: 295-296.
- 32) GOREN, R., ALTMAN, A. and GILADI, I. 1979. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in citrus bud cultures. *Plant Physiol.*, **63**: 280-282
- 33) 五島瑳智子・金子康子・桑原章吾. 1970. Rifampicin の *in vitro* 抗菌作用. *Chemotherapy*, **18**: 334-338.
- 34) GREISBACH, R. J. 1983. The use of indoleacetyl amino acids in the *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* orchids. *Scientia Hort.*, **19**: 363-366.
- 35) HALPERIN, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Amer. J. Bot.*, **53**: 443-453.
- 36) 服部慶俊. 1981. ファレノプシスの組織培養. *新花卉*, **110**: 40-42.
- 37) HAYASHI, T., HILDEBRANDI, A. C. and RIKER, A. J. 1964. Isolation of crown gall tissue freed from bacteria by antibiotics. *Bot. Mag. Tokyo*, **77**: 270-273.
- 38) HEIDE, O. M. 1965. Photoperiodic effects on the regeneration ability of the leaf cuttings. *Physiol. Plant.*, **18**: 185-190.
- 39) 本間義之・浅平 端. 1983. ファレノプシス花茎先端部の培養による不定芽的 PLB 形成. *園学要旨*, 昭58秋, pp. 368-369.
- 40) 本間義之・浅平 端. 1984. ファレノプシスの花茎培養における繁殖効率について. *園学要旨*, 昭59秋, pp. 370-371.
- 41) 市橋正一・加古舜治. 1973. カトレヤの茎頂培養による栄養繁殖法に関する研究. (第1報) 茎頂組織の活着と生育に及ぼす要因について. *園学雑*, **42**: 264-270.
- 42) 市橋正一・加古舜治. 1977. カトレヤの茎頂培養による栄養繁殖法に関する研究. (第2報) カトレヤのかっ変現象について. *園学雑*, **46**: 325-330.
- 43) 医科学研究所学友会. 1974. 細菌学実習提要. 丸善, 東京, pp. 123-124.
- 44) INTUWONG, O., KUNISAKI, J. T. and SAGAWA, Y. 1972. Vegetative propagation of *Phalaenopsis* by flower stalk cuttings. *Na Okika O Hawaii (Hawaii Orchid J.)*, **1**: 13-18.
- 45) INTUWONG, O. and SAGAWA, Y. 1973. Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescence. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **42**: 209-215.
- 46) INTUWONG, O. and SAGAWA, Y. 1974. Plantlet (Keiki) formation in *Phalaenopsis*. *Na Okika O Hawaii (Hawaii Orchid J.)*, **3**: 17-19.
- 47) INTUWONG, O. and SAGAWA, Y. 1974. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **43**: 893-895.
- 48) INTUWONG, O. and SAGAWA, Y. 1975. Clonal propagation of *Dendrobium* Golden Wave and other nobil types. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **44**: 319-322.
- 49) 石井 実・正山征洋・上本俊平・西岡五夫・藤村国光. 1976. カトレヤの組織培養に関する研究. 1. フェノール物質の分離同定および同物質の生物活性について. *九大農芸芸誌*, **31**: 99-105.
- 50) 石井 実・上本俊平・藤村国光. 1979. カトレヤの組織培養に関する研究. (第2報) 培養組織のかっ変防止法について. *園学雑*, **48**: 199-204.
- 51) ISHII, M., UEMOTO, S., FUJIEDA, K., NONAKA, M., SHOYAMA, Y., MIYAHARA, Y. and NISHIOKA, I. 1979. A new biological active phenolic from *Cattleya trianaei*. *Phytochemistry*, **18**: 1211-1213.
- 52) 石井 実. 1980. カトレヤの組織培養に関する研究. (第3報) かっ変前駆物質の季節的消長と活着率について. *園学雑*, **49**: 127-131.
- 53) 加古舜治. 1979. ランのメリクロン変異について. *新花卉*, **103**: 84-87.
- 54) KANO, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Agr. Kagawa.*, No. 20.
- 55) KANO, K. 1967. The non-symbiotic germination of orchids and their clonal propagation by meristem culture. *Advances in Germ free Research and Gnotobiology*, Iliffe Books, London, pp. 398-405.
- 56) KANO, K. 1968. Acceleration of the germination of so-called "hard-to-germinate" orchid seeds. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **37**: 690-698.
- 57) 狩野邦雄. 1971. *Phalaenopsis* および *Vanda* の葉組織からの増殖の可能性について. *園学要旨*, 昭46秋, pp. 270-271.
- 58) KANO, K. 1972. Seed germination of oriental *Cymbidium* and their shoot tip culture. *Proc. 6th World Orchid Conf. (Sydney, 1971)*, pp. 133-142.
- 59) 河瀬晃四郎. 1984. ファレノプシス花茎培養における黄化处理の影響. *園学要旨*, 昭59秋, pp. 368-369.

- 60) KENDER, W. J. and CARPENTER, S. 1972. Stimulation of lateral bud growth of apple tree by 6-benzylamino purine. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **97**: 377-380.
- 61) KERBAUY, G. B. 1984. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Z. Pflanzenphysiol.*, **113**: 287-291.
- 62) KERBAUY, G. B. 1984. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. *Plant Cell Reports*, **3**: 27-29.
- 63) KIM, K. K., KUNISAKI, J. T. and SAGAWA, Y. 1970. Shoot-tip culture of *Dendrobiums*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **39**: 1077-1080.
- 64) KIM, K. W. and KAKO, S. 1982. Effect of plant growth regulators on organ formation in *Cymbidium* shoot apex culture *in vitro*. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, **51**: 106-114.
- 65) KLEHM, A. J. 1978. Producing plantlets of *Phalaenopsis* spikes using cytokinins. *Plant Propagator*, **24**: 9-10.
- 66) KOCH, L. 1973. Vergleich zweier Verfahren zur Vermehrung von *Cymbidium*-Protokomen. *Gartenbauwiss.*, **38**: 419-426.
- 67) KOCH, L. 1974. Untersuchungen zur vegetativen Vermehrung bei *Phalaenopsis in vitro*. Dissertation TU Hannover, pp. 1-169.
- 68) KOCH, L. 1974. Erbgleiche Vermehrung von *Phalaenopsis in vitro*. *Gartenwelt*, **74**: 482-484.
- 69) KONAR, R. N. and NATARAJA, K. 1965. Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. Development of embryos from the stem epidermis. *Phytomorphology*, **15**: 132-137.
- 70) KOTOMORI, S. and MURASHIGE, T. 1965. Some aspects of aseptic propagation of orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **34**: 484-489.
- 71) KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **15**: 214-217.
- 72) KUKULCZANKA, K. and WOJCIECHOWSKA, U. 1983. Propagation of two *Dendrobium* species by *in vitro* culture. *Acta Hort.*, **131**: 105-110.
- 73) KUNISAKI, J. T., KIM, K. K. and SAGAWA, Y. 1972. Shoot-tip culture of *Vanda*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **41**: 435-439.
- 74) 楠元 守. 1978. 生長調節物質の組合せや有機物の添加が *Cymbidium* protocorm の増殖と器官形成に及ぼす影響. *園学雑*, **47**: 391-400.
- 75) KUSUMOTO, M. 1980. Effects of coconut milk, agar and sucrose concentrations and medium pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured *in vitro*. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, **48**: 503-509.
- 76) 楠元 守. 1980. 器内培養された *Cymbidium* protocorm like body の増殖と器官形成における品種間差異と生長調節物質の影響. *園学雑*, **48**: 510-518.
- 77) LINDEMANN, E. G. P., GUNCKEL, J. E. and DAVIDSON, O. W. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **39**: 1002-1004.
- 78) LOH, C. S., RAO, A. N. and GOH, C. J. 1976. Clonal propagation from leaves in the orchid *Aranda*. *J. Singapore Nat. Acad. Sci.*, **4**: 97-99.
- 79) MASAGO, H., YOSHIKAWA, M., FUKUDA, M. and NAKANISHI, N. 1977. Selective inhibition of *Pytnium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology*, **67**: 425-428.
- 80) MATHEWS, V. H. and RAO, P. S. 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrids through tissue culture technique. *Plant Sci. Lett.*, **17**: 383-389.
- 81) MIC 測定法改定委員会 (三橋 進他). 1981. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について. *Chemotherapy*, **29**: 76-78.
- 82) MOREL, G. M. 1960. Producing virus-free *Cymbidium*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **29**: 495-497.
- 83) MOREL, G. M. 1964. Tissue culture—A new means of clonal propagation of orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **33**: 473-478.
- 84) MOREL, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Soc. News*, **20**: 3-10.
- 85) MOREL, G. M. 1972. Morphogenesis of stem apical meristem cultivated *in vitro*: application to clonal propagation. *Phytomorphology*, **22**: 265-277.
- 86) MOREL, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. In: C. L. Withner, ed., *The Orchids: scientific studies*, Wiley-Interscience, New York, pp. 169-222.

- 87) MURASHIGE, T. and NAKANO, R. 1977. Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells. *Amer. J. Bot.*, **54**: 963-970
- 88) MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497
- 89) NAVARRO, L., ROISTACHER, C. N. and MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, **100**: 471-479.
- 90) 西村悟郎. 1972. *Phalaenopsis* の開花生理に関する研究. 日本蘭協会誌, 18: 3-9.
- 91) NISHIMURA, G. 1981. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Bot. Gaz.*, **142**: 360-365.
- 92) NISHIYAMA, I. and TAIRA, T. 1966. The effects of kinetin and indoleacetic acid on callus growth and organ formation in two species of *Nicotiana*. *Japan. J. Genet.*, **41**: 357-365.
- 93) NITSCH, C. and NITSCH, J. P. 1967. The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta*, **72**: 355-370.
- 94) NITSCH, J. P., NITSCH, C., ROSSINI, L. M. E. and BUI DANG HA, D. 1967. The role of adenine in bud differentiation. *Phytomorphology*, **17**: 446-453
- 95) 王 博仁. 1977. *Phalaenopsis* 花梗上の潜芽の利用—無性繁殖および再開花—. 鳥潟博高編: 増補ラン科植物の種子形成と無菌培養, 誠文堂新光社, 東京, pp. 302-303.
- 96) 王 博仁・鳥潟博高. 1968. ランの生長点培養による無性繁殖法 (とくに *Phalaenopsis* の花梗腋芽の培養について). 鳥潟博高編: ラン科植物の種子形成と無菌培養, 誠文堂新光社, 東京, pp. 264-270.
- 97) 小倉久和. 1983. 植物組織培養と染色体変異(1). 農業および園芸, 58: 15-18.
- 98) OHKI, S., BIGOT, C. and MOUSSEAU, J. 1978. Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. *Plant and Cell Physiol.*, **19**: 27-42.
- 99) PARLIMAN, B. J., EVANS, P. T. and MAZUR, A. R. 1982. Adventitious bud differentiation and development in leaf cuttings of *Dionaea muscipula* Ellis Ex. L. (Venus Fly-trap) cultured *in vitro*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **107**: 310-316.
- 100) PARUPS, E. V. 1971. Use of 6-benzylamino purine and adenine to induce bottom breaks in greenhouse roses. *HortScience*, **6**: 456-457.
- 101) PHILLIPS, R., ARNOTT, S. M. and KAPLAN, S. E. 1981. Antibiotics in plant tissue culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminations without affecting the growth of short-term explant culture of *Helianthus tuberosus*. *Plant Sci. Lett.*, **21**: 235-240.
- 102) PIEPER, W. and ZIMMER, K. 1976. Clonal propagation of *Phalaenopsis in vitro*. *Acta Hort.*, **64**: 21-23.
- 103) PIEPER, W. and ZIMMER, K. 1976. Ein neues System für die Vermehrung von Geweben *in vitro*. *Gartenbauwiss.*, **41**: 221-224.
- 104) PIERIK, R. L. M. 1976. Relative dormancy in excised vegetative buds of *Rhododendron*. *Neth. J. agric. Sci.*, **24**: 98-104.
- 105) POLLOCK, K. 1983. *Plant Cell Rep.*, **2**: 36. (cited in *Agricell Rep.*, **1**: 22)
- 106) POWER, J. B., FREARSON, E. M., GEORGE, D., EVANS, P. K., BERRY, S. F. and COCKING, E. C. 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. *Plant Sci. Lett.*, **7**: 51-55.
- 107) RAMAN, K. 1977. Rapid multiplication of *Streptocarpus* and *Gloxinia* from *in vitro* cultured pedicel segments. *Z. Pflanzenphysiol.*, **83**: 411-418.
- 108) REINERT, J. 1959. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryoen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, **53**: 318-333.
- 109) REINERT, R. A. and MOHR, H. C. 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **91**: 664-671.
- 110) REISINGER, D. M., BALL, E. A. and ARDITTI, J. 1976. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by means of flower-stalk node cultures. *Orchid Rev.*, **84**: 45-52.
- 111) ROTOR, G. 1949. A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **18**: 738-739.
- 112) ROTOR, G. 1952. Daylength and temperature in relation to growth and flowering of orchids. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Bul.*, **885**: 3-47.

- 113) RÜNGER, W. 1971. Blütenbildung und Blütenentwicklung. Paul Parey, Berlin, p. 194.
- 114) SAGAWA, Y. 1961. Vegetative propagation of *Phalaenopsis* by stem cuttings. Amer. Orchid Soc. Bull., **30**: 808-809.
- 115) SAGAWA, Y. and KUNISAKI, J. T. 1982. Clonal propagation of orchids by tissue culture. In: A. Fujiwara, ed., Plant Tissue Culture 1982. Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo, Japan, pp. 683-684.
- 116) SAGAWA, Y. and NIIMOTO, D. 1960. Vegetative propagation of *Phalaenopsis*. Fla. Orchidist, **3**: 22.
- 117) SAGAWA, Y. and SHOJI, T. 1967. Clonal propagation of *Dendrobium* through shoot meristem culture. Amer. Orchid Soc. Bull., **36**: 856-859.
- 118) SAGAWA, Y. and SHOJI, T. and SHOJI, T. 1966. Clonal propagation of *Cymbidiums* through shoot meristem culture. Amer. Orchid Soc. Bull., **35**: 118-122.
- 119) SAHAVACHARIN, O. 1980. Mutation in the tissue culture of orchids. Proc. 9th World Orchid Conf. (Bangkok, 1978), pp. 223-225.
- 120) SAKANISHI, Y., IMANISHI, H. and ISHIDA, G. 1980. Effect of temperature on growth and flowering of *Phalaenopsis amabilis*. Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B, **32**: 1-9.
- 121) SAKURAI, H., NAITO, H. and FUJITA, S. 1976. Sensitivity distribution of phytopathogenic bacteria and fungi to antibiotics. V. J. Antibiotics, **29**: 1230-1236.
- 122) 澤 完. 1977. *Phalaenopsis* の開花に及ぼす Benzyladenin および Gibberellin の影響. 園学要旨, 昭52春, pp. 338-339.
- 123) 澤 完・鳥潟博高. 1968. *Cymbidium* 種子の無菌発芽と発芽生理に関する研究. 鳥潟博高編: ラン科植物の種子形成と無菌培養, 誠文堂新光社, 東京, pp. 153-173.
- 124) SCHOLL, R. J. and DENNISON, K. M. 1978. Sensitivity of cultured tissue of *Arabidopsis thaliana* to sulfanilamide. Physiol. Plant., **43**: 321-325.
- 125) SCULLY, R. M. 1966. Stem propagation of *Phalaenopsis*. Amer. Orchid Soc. Bull., **35**: 40-42.
- 126) SCULLY, R. M. 1967. Aspects of meristem culture in *Cattleya* alliance. Amer. Orchid Soc. Bull., **36**: 103-108.
- 127) SKOOG, F. and MILLER, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., **11**: 118-131.
- 128) SKOOG, F. and TSUI, C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. Amer. J. Bot., **35**: 782-787.
- 129) SOEDIONO, N. 1983. Use of coconut water, NAA, 2, 4-D and vitamins in shoot tip cultures of *Dendrobium* cv. Jacqueline Thomas 'White'. Orchid Rev., **91**: 86-87.
- 130) SOEDIONO, N. 1983. A method for saving contaminated tissue cultures of *Dendrobium*. Orchid Rev., **91**: 22.
- 131) START, N. D. and CUMMING, B. G. 1976. *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. HortScience, **11**: 204-206.
- 132) STEWARD, F. C. and MAPES, M. O. 1971. Morphogenesis in aseptic cell cultures of *Cymbidium*. Bot. Gaz., **132**: 65-70.
- 133) STEWARD, F. C., MAPES, M. O., KENT, A. E. and HOLSTEN, R. D. 1964. Growth and development of cultured plant cells. Science, **143**: 20-27.
- 134) STEWARD, F. C., MAPES, M. O. and MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot., **45**: 705-708.
- 135) STEWART, J. and BUTTON, J. 1975. Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. Amer. Orchid Soc. Bull., **44**: 591-599.
- 136) STEWART, J. and BUTTON, J. 1978. Development of callus and plantlets from *Epidendrum* root tips cultured *in vitro*. Amer. Orchid Soc. Bull., **47**: 607-612.
- 137) SWEET, H. R. 1980. The genus *Phalaenopsis*. The Orchid Dig. Inc., California, pp. 1-128.
- 138) TANAKA, M., SENDA, Y. and HASEGAWA, A. 1976. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis*. Amer. Orchid Soc. Bull., **45**: 1022-1024.
- 139) 田中隆荘・長久 逸. 1978. シンビジウムのメリクロン突然変異体に関する細胞遺伝学研究. 日本蘭協会誌, **25**: 3-6.
- 140) TAYLOR, R. L. 1967. The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. Can. J. Bot., **45**: 1553-1556.
- 141) TEO, C. K. H., KUNISAKI, J. T. and SAGAWA, Y. 1973. Clonal propagation of strap-leafed *Vanda* by shoot-tip

- culture. Amer. Orchid Soc. Bull., **42**: 403-405.
- 142) TEO, C. K. H. and WONG, C. H. 1978. Effects of sucrose on the growth of protocorms of *Holttumara* Loke Tuck Yip. Orchid Rev., **85**: 285-289.
- 143) TEWS, G. 1974. Einfache vegetative Phalaenopsisvermehrung. Orchideen (Greifswald, DDR), **3**: 14-15.
- 144) THURSTON, K. C., SPENCER, S. J. and ARDITTI, J. 1979. Phytotoxicity of fungicides and bactericides in orchid culture media. Amer. J. Bot., **66**: 825-835.
- 145) THURSTON, K. C., SPENCER, S. J. and ARDITTI, J. 1980. Incorporation of fungicides and bactericides in orchid seed and seedling culture media. Proc. 9th World Orchid Conf. (Bangkok, 1978), pp. 179-190.
- 146) TRAN THANH VAN, M. 1974. Methods of acceleration of growth and flowering in a few species of orchids. Amer. Orchid Soc. Bull., **43**: 699-707.
- 147) TSE, A. T., SMITH, R. J. and HACKETT, W. P. 1971. Adventitious shoot formation on *Phalaenopsis* nodes. Amer. Orchid Soc. Bull., **40**: 807-810.
- 148) TSUKAMOTO, Y., KANO, K. and KATSUURA, T. 1963. Instant media for orchid seed germination. Amer. Orchid Soc. Bull., **32**: 354-355.
- 149) 上里健次. 1978. ラン科植物の生活環における protocorm の形成と発育に関する研究. 琉球大学農学部学術報告, **25**: 1-76.
- 150) URATA, U. and IWANAGA, E. T. 1965. The use of Ito-type vials for vegetative propagation of *Phalaenopsis*. Amer. Orchid Soc. Bull., **34**: 410-413.
- 151) VACIN, E. F. and WENT, F. W. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz., **110**: 605-613.
- 152) VAJRABHAYA, M. 1978. Tissue culture of dormant buds from *Cattleya* backbulbs. Orchid Rev., **86**: 256-257.
- 153) VAJRABHAYA, M. and VAJRABHAYA, T. 1970. Tissue culture of *Rhyncostylis gigantea*, a monopodial orchid. Amer. Orchid Soc. Bull., **39**: 907-910.
- 154) VAJRABHAYA, T. 1977. Variations in clonal propagation. In: J. Arditti, ed., Orchid Biology. Reviews and Perspectives, I, Cornell University Press, Ithaca and London, pp. 179-201.
- 155) VASIL, I. K. 1983. Genetic engineering in Eukaryotes. In: P. E. Lurquin and Kleinhofs, A., Plenum Publishing Corp., p. 233-252.
- 156) VASIL, I. K. and HILDEBRANDT, A. C. 1965. Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures. Science, **150**: 889-892.
- 157) WENT, F. W. 1953. The experimental control of plant growth. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., pp. 149-150.
- 158) WILFLEI, G. J. 1966. Formation of protocorm-like bodies on excised *Cymbidium* shoot tips. Amer. Orchid Soc. Bull., **35**: 823-827.
- 159) WILSON, D. E. 1915. Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. Amer. J. Bot., **2**: 420-427.
- 160) WILMBER, D. E. 1963. Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. Amer. Orchid Soc. Bull., **32**: 105-107.
- 161) WILMBER, D. E. 1965. Additional observation on clonal propagation of *Cymbidium* through culture of shoot meristems. Cymbidium Soc. News, **19**: 7-10.
- 162) YEOMAN, M. M. and MACLEOD, A. J. 1977. Tissue (Callus) culture—Techniques. In: H. E. Street, ed., Plant Tissue and Cell Culture. 2nd ed. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, pp. 31-59.
- 163) 米田和夫・百瀬博文・佐々木弘康. 1984. 洋らん類の茎頂培養に関する研究. (第2報) ファレノプシスの花茎先端部の培養. 園学要旨, 昭59春, pp. 352-353.
- 164) 米田和夫・坂本立弥・佐々木弘康. 1976. 洋らん類の茎頂培養に関する研究. (第1報) *Phalaenopsis* の花梗えき芽利用による PLB 形成について. 園学要旨, 昭51秋, pp. 250-251.
- 165) 米田和夫・坂本立弥・佐々木弘康. 1979. 洋らん類の茎頂培養に関する研究. I. カトレヤ類の茎頂培養について. 日大農獣医研報, **36**: 64-73.
- 166) ZIMMER, K. and PIEPER, W. 1977. Zur vegetativen Vermehrung von *Phalaenopsis in vitro*. Die Orchidee, **28**: 118-122.
- 167) ZIMMER, K. and PIEPER, W. 1978. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by excised buds. Orchid Rev., **86**: 223-227.
- 168) ZIMMER, K. and PIEPER, W. 1979. *Phalaenopsis*—Zur vegetativen Vermehrung. Gb+Gw, **79**: 258-260.

- 169) ZWAR, J. A. and BRUCE, I. M. 1970. Cytokinins from apple extract and coconut milk. *Aust. J. Biol. Sci.*, **23**: 289-297.

Studies on the Clonal Propagation of *Phalaenopsis* through *in vitro* Culture

Michio TANAKA

Summary

Phalaenopsis, being a monopodial, rarely produces vegetative offshoots. For this reason, a reliable methods of vegetative propagation has long been expected. Excision of shoot tips or axillary buds from adult plants causes inevitable damage on mother plant and, in addition, an amount of explants available is limited. Therefore, it is considered to be desirable to use leaf tissue as explants. The present studies were carried out to establish the convenient methods for clonal propagation in *Phalaenopsis* by means of *in vitro* culture of leaf segments.

Section I of this study was undertaken to examine the capability of producing protocorm-like body (PLB) in leaf segments from various sources, such as seedlings, adult plants, and shoots derived from flower-stalk cuttings cultured *in vitro*. Any leaf segment from various sources showed the regenerative capability, but those from flower-stalk origin are preferable to others because they had high potentiality in PLB formation and brought about no damage to selected mother plants.

Lateral buds on flower-stalk cuttings cultured *in vitro* show three growth patterns; remaining dormant, growing vegetatively (shoot formation), and growing reproductively (secondary flower-stalk formation). Therefore, section II of this study dealt with the various factors affecting the production of shoots from flower-stalk cuttings in order to get a large number of leaf segments for culturing.

It was found that when 4-cm flower-stalk cuttings with one axillary bud were cultured on Vacin and Went (VW) medium supplemented with 20% coconut water, under low light intensity (170 lux) with a 16-h light at 25°C, about 80% of the buds developed into vegetative shoots. Under the light intensity of 900 lux with a 16-h light at 25°C, culturing 1-cm flower-stalk cuttings on the same medium gave 87% shoot production.

When the flower-stalk cuttings were cultured on VW medium supplemented with 5 or 10 ppm N⁶-benzyladenine (BA) at 28°C with a 16-h light (500 lux), all the buds on the flower-stalk cuttings grew into shoots. There existed, however, the malformation of shoot development in some extent.

Culturing the flower-stalk cuttings using VW medium containing 20% coconut water, at 28°C with a 16-h light (500 lux), gave only 66% shoot formation. Similarly only about 36% of shoot production were obtained when the flower-stalk cuttings were cultured on the same medium at 25°C with a 16-h light (500 lux).

Varying the daylength during culture has no effect on the production of shoot from the cuttings.

When flower-stalk cuttings were transferred onto nutrient medium, these explants were often contaminated with a wide range of micro-organisms using the conventional sterilizing chemicals. Usually from 20 to 25% of the cultures were contaminated when they were surface-sterilized with calcium hypochlorite solution.

A new method was devised to overcome this contamination problem. The flower-stalk cuttings were first sterilized with Wilson solution (7% calcium hypochlorite solution) for 10 min, after which they were immersed in antimicrobial solution for 30 min in the dark. The flower-stalk cuttings were then transferred onto the nutrient medium and 1 ml of the microbial solution was added to the surface of the medium. The cultures were then placed in the dark for 10 days after which they were transferred to light condition at 25°C. This procedure gave 97% asepsis.

The antimicrobial solution used consisted of: Benlate 10 ppm, pentachloronitrobenzen (PCNB) 25 ppm, thiabendazole (TBZ) 100 ppm, rifampicin 10 ppm, ampicillin 500 ppm, and vancomycin 50 ppm.

When only the antimicrobial solution was used, some fluctuations of asepsis were observed on each experiment. The results obtained from the susceptibility tests of bacteria isolated from flower-stalks to various antibiotics suggested that such fluctuation depended on the presense or absence of some types of Gram negative bacteria.

In section III of this study, various factors affecting the formation of PLBs in leaf segments were investigated.

When leaf segments of about 6–7 mm square were cultured on Hyponex medium [Hyponex (N: P₂O₅: K₂O=7: 6: 19) 3.5 g/l, inositol 100 ppm, nicotinic acid 1 ppm, thiamine HCl 1 ppm, sucrose 2.0%, and agar 1.0%] supplemented with NAA 1 ppm, adenine 10 ppm, and BA 10 ppm, 16.7% of the leaf segments produced PLBs. This was found to be the best medium for PLB formation when compared to other media used in this study.

The conditions under which the shoots were developed from the flower-stalk cuttings had tremendous influences on the subsequent formation of PLBs in leaf segments. The optimum condition to culture the flower-stalk cuttings was obtained on VW medium containing 20% coconut water at 25°C with a low light intensity of 170 lux. This gave the highest rate of PLB formation in leaf segments.

In order to obtain good results, leaf segments need to be transferred onto new medium every one to two weeks. Similarly good results were also obtained by transferring the cultures under the light condition after those were incubated for two weeks in the dark.

Aeration was important when culturing these leaf segments. Culture vessels covered with aluminium foils gave higher PLB formation than those plugged with rubber of silicon stoppers.

Section IV of this study was devoted to testing the response of various species and types of hybrids to this method of propagation. Twenty five hybrids consisting of six general types: viz. white, white with red lip, pink, yellow, stripe, and spotted, were used. The flower-stalk cuttings were cultured on VW medium containing 20% coconut water at 25°C with a 16-h light (170 lux), while leaf segments were cultured on Hyponex medium supplemented with NAA 1 ppm, adenine 10 ppm, and BA 10 ppm at 25°C with a 16-h light (900 lux). Nineteen hybrids were successfully propagated. Of the 6 hybrids which failed to respond, three hybrids produced no shoots from the flower-stalk cuttings, while for the remaining three, the leaf segments did not form PLBs.

There were, however, differences between various hybrids in the number of PLBs formed per leaf segment, in that it ranged from 1 to 15.4 PLBs. This indicated that some hybrids were easy to produce PLBs, whereas others difficult.

Eighteen *Phalaenopsis* species (including one *Doritis* species) were also used to test this method of propagation. Twelve species were successfully propagated using this method. These species were: *Phal. amabilis*, *Phal. aphrodite* (Philippine type), *Phal. aphrodite* (Taiwan type), *Phal. sanderana*, *Phal. sanderana alba*, *Phal. stuartiana*, *Phal. amboinensis*, *Phal. fasciata*, *Phal. luddemanniana*, *Phal. pulchra*, *Phal. × intermedia*, and *Doritis pulcherrima*. Of the 6 species which did not positively respond to these propagation methods, four species did not produce shoots from the flower-stalk cuttings, whereas the other two species did not form PLBs in leaf segments. Of the species in which the leaf segment culture was successful, the number of PLBs formed per leaf segment varied from 1 to 6.5 PLBs depending on the species concerned.

Section V of this study was devoted to studying the method of proliferating the PLBs and their subsequent development to plantlets.

Secondary proliferation of PLBs which were already formed in leaf segments will be of importance in obtaining a numerous plantlets.

— 78 —

When the PLBs were bisected transversally and the basal sections were placed upside down on VW medium containing 20% coconut water, it was found that each section produced daughter PLBs of 13.7 in the average.

To obtain plantlets, PLBs were cultured on the medium contained Hyponex 3.0 g/l, Nitsch's microelements (1967), inositol 100 ppm, nicotinic acid 1 ppm, activated charcoal 2.0 g/l, sucrose 3.0%, and agar 1.0%.

The final section of this study was to determine whether the regenerated plants express the original mother plant characters such as flower color and shape. This fact, though simple, is very important for the practical application. When the employment of a clonal propagation gives the high frequency of variation of plants, this method will not be useful. It took 5 to 7 months to obtain plantlets from the PLB stage in the flask. All these plantlets were planted using a conventional way in the greenhouse. In 1983, after 22 months of growth, many plants from similar to their respective mother plants. These results confirmed that the clonal propagation method of *Phalaenopsis* mentioned above will have a commercial value.

Explanation of plates

Plate I

1. Protocorm-like bodies (PLBs) formed on adaxial surface of leaf excised from 120-day-old seedlings. 106 days after planting.
2. PLBs formed on adaxial surface of leaf segment of shoot derived from flower-stalk cuttings. 125 days after planting.
3. PLB (arrow) formed on adaxial surface of leaf segment excised from newly expanded leaf (about 5 cm in length) of mature plants. 239 days after planting.
4. Different growth patterns of cultured lateral buds of nodal cuttings from flower-stalk. Left, vegetative growth; middle, reproductive growth; right, dormancy.
5. Flower-stalk cuttings growing into vegetative shoots on Vacin and Went medium supplemented with BA 2.5 ppm at 28°C with a 16-h light (500 lux). 60 days after planting.
6. Contaminated cultures of flower-stalk cuttings. Left, aseptic culture; right, microbial contaminated culture.

Plate I

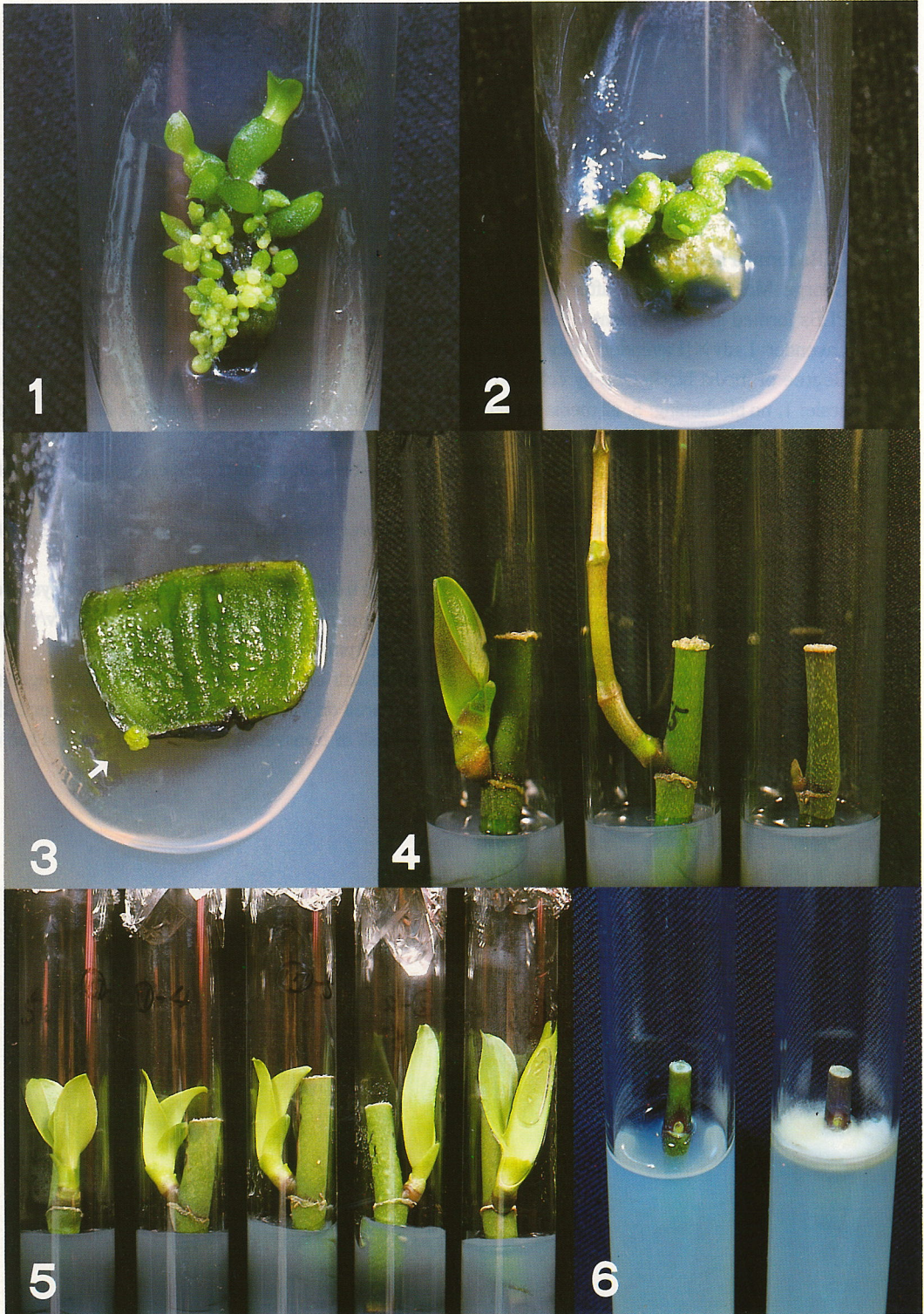


Plate II

7. PLBs formed in leaf segment of shoot derived from flower-stalk cuttings. Hybrid used was *Phal.* George Moler. 171 days after planting.
8. PLBs formed in leaf segment of shoot derived from flower-stalk cuttings. Hybrid used was *Phal.* Lavender Lady×[Lavender Lady×(Clarelen×Zada)]. 178 days after planting.
9. Degree of media blackening by cultured leaf segments. Scored by means of the following visual scale: 1, no blackening; 5, all media turned black; 2, 3, and 4, intermediate between 1 and 5. Three months after planting. Left to right: 1, 2, 3, 4, and 5.
10. PLBs formed in leaf segment of shoot derived from flower-stalk cuttings. Species used was *Phal. stuartiana*. 155 days after planting.
11. PLBs formed in leaf segment of shoot derived from flower-stalk cuttings. Species used was *Phal. amboinensis*. 178 days after planting.
12. Proliferation of daughter PLBs from single PLB derived from leaf segment culture. 165 days after transferring into liquid Vacin and Went medium supplemented with coconut water 20% (v/v) and omitted sucrose on reciprocating rotary shaker (160rpm).
13. Proliferation of daughter PLBs from upper and lower half of cut PLB derived from leaf segment culture. PLBs were transversally bisected, and cultured on Vacin and Went+coconut water 20% (v/v) medium. 55 days after planting. Left, basal half of transverse cut PLB; right, apical half of transverse cut PLB.

Plate II

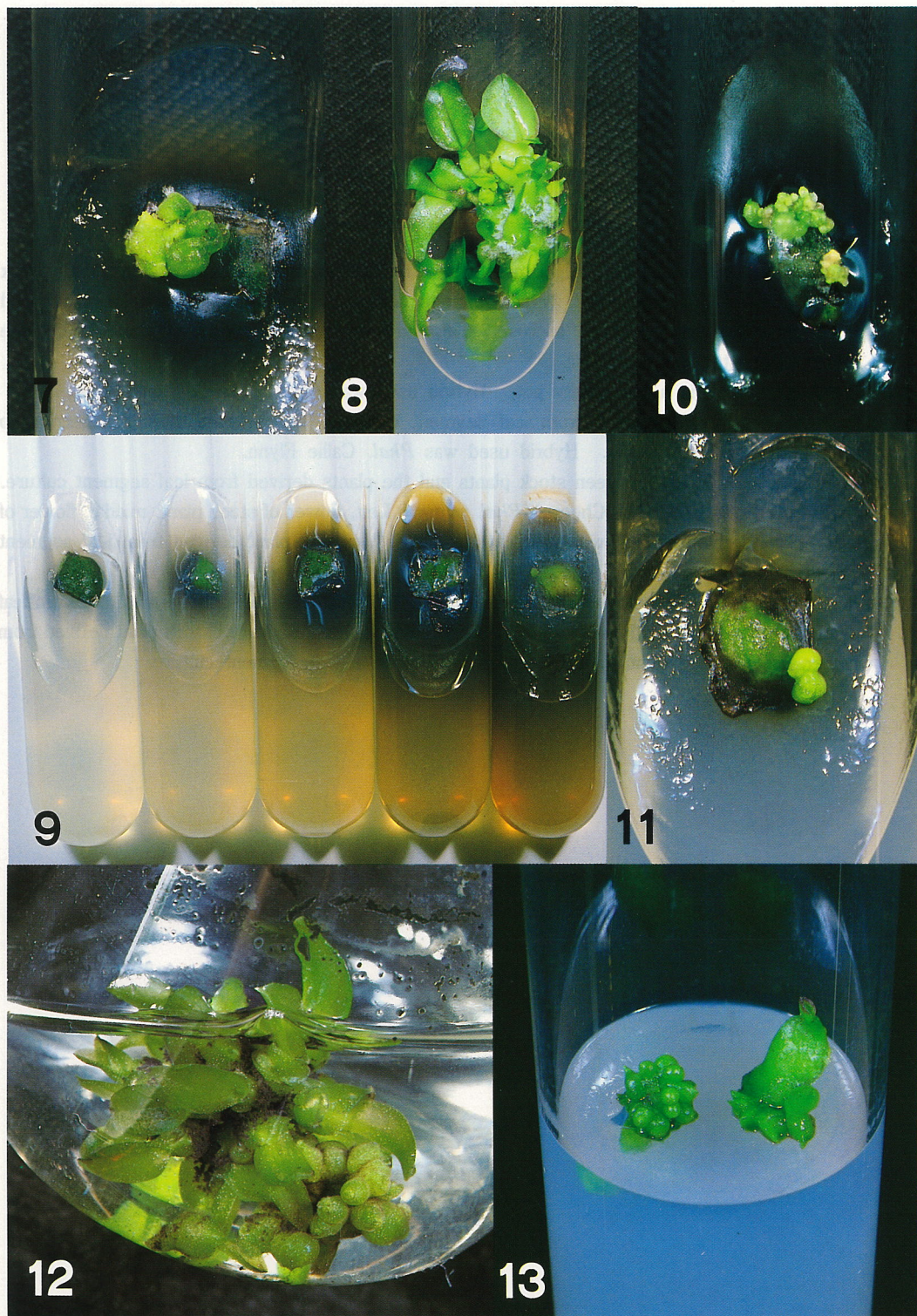
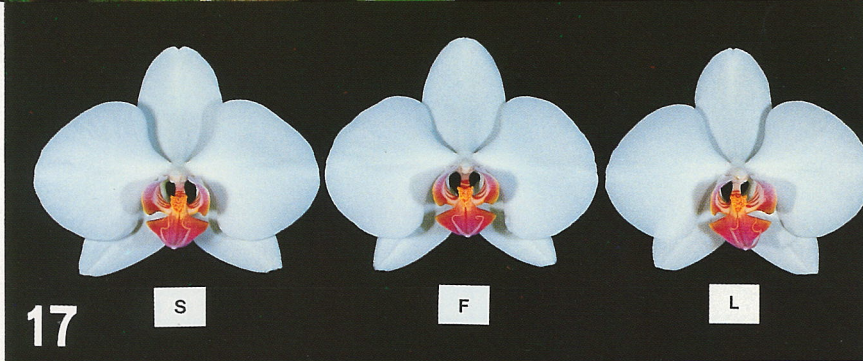


Plate III

14. Plantlets derived from PLBs. Eight months after transferring to the medium contained Hyponex (N:P₂O₅:K₂O=7:6:19) 3.0 g/l, Nitsch microelements (1967), inositol 100 ppm, nicotinic acid 1 ppm, activated charcoal 2.0 g/l, sucrose 3.0%, and agar 1.0%. Hybrid used was *Phal.* (White Falcon×Persistent)×Jimmy Hall.
15. Plantlets growing in a community pot. Hybrid used was *Phal. manni*×Mount Martian.
16. First flowering plant derived from leaf segment culture. Three years after transferring to community pots from flasks. Hybrid used was *Phal.* Callie Flynn.
17. Comparison of flowers between stock plants and the plants derived from leaf segment culture. Hybrid used was *Phal.* Pink Cheers×*Phal. manni*. Left, flower of stock plant; middle, flower of stock plant derived from flower-stalk cutting; right, flower of plant derived from leaf segment culture.
18. Comparison of flowers between stock plants derived from flower-stalk cuttings and that from leaf segment culture. Hybrid used was *Phal.* Callie Flynn. Left, Flower of stock plant derived from flower-stalk cutting; right, flower of plant derived from leaf segment culture.

Plate III



香川大学農学部紀要

- 第1号 幡 克 美：アカマツ材の成分並びにパルプ化に関する研究 (1955年3月)
- 第2号 内 藤 中 人：植物成長ホルモンに関する植物病理学的研究 特に植物病原菌に及ぼす影響について (1957年10月)
- 第3号 松 沢 寛：アオムシコマユバチの生態に関する研究 (1958年3月)
- 第4号 梶 明：和紙原料の醱酵精練に関する研究 (1959年3月)
- 第5号 森 和 男：傾斜地蜜柑園経営の構造分析 (1960年3月)
- 第6号 玉 置 鷹 彦：ガラク並びに池泥の研究 (1960年3月)
- 第7号 上 原 勝 樹：傾斜地開発利用に関する物理気象の研究 (1961年3月)
- 第8号 桑 田 晃：オクラとトロロアオイとの種間交雑およびそれらより育成された種々の雑種ならびに倍数体に関する研究 (1961年9月)
- 第9号 中 潤三郎：甘藷の生育過程に関する作物生理学的研究 (1962年3月)
- 第10号 齊 藤 実：香川県及び北愛媛県の地質について (1962年3月) (英文)
- 第11号 小 杉 清：グラジオラスの生産と開花に関する研究 (1962年9月) (英文)
- 第12号 吉 良 八 郎：貯水池の滞砂に関する水理学的研究 (1963年2月)
- 第13号 野 田 愛 三：禾穀類の根鞘に関する研究 (1963年3月)
- 第14号 川 村 信一郎：豆類のデンプンの研究 (1963年3月) (エスペラント文)
- 第15号 浅 野 二 郎：種子の耐塩性を中心とした海岸地帯におけるアカマツおよびクロマツ林の成立に関する研究 (1963年3月)
- 第16号 山 中 啓：乳酸菌のペントース・イソメラーゼに関する研究 (1964年8月) (英文)
- 第17号 葦 沢 正義：香川県における葡萄の旱害に関する研究 (1964年3月)
- 第18号 谷 利 一：カキ炭疽病の病態生理学的研究, とくに罹病果実の病徴発現にあずかるペクチン質分解酵素の役割 (1965年3月)
- 第19号 樽 谷 隆 之：カキ果実の貯蔵に関する研究 (1965年3月)
- 第20号 狩 野 邦 雄：ラン種子の発芽培地に関する研究 (1965年3月) (英文)
- 第21号 山 本 喜 良：コモンベッチおよびその近縁種の雑種に関する研究 (1965年3月)
- 第22号 中 広 義 雄：鶏における飼料の消化率測定法に関する研究 (1966年10月)
- 第23号 井 上 宏：ナツダイダイの果実発育に関する研究, とくに水腐病の発生機構を中心として (1967年3月)
- 第24号 宮 辺 豊 紀：異常乳の生成と塩類均衡とくにカゼイン磷酸カルシウムに関する研究 (1967年8月) (英文)
- 第25号 十 河 村 男：樹皮リグニン及び樹皮フェノール類に関する研究 (1971年9月)
- 第26号 大 島 光 昭：赤クローバーサイレージ中の窒素栄養源に関する研究 (1971年11月) (英文)
- 第27号 辰 巳 修 三：林木葉部中におけるカルシウムの化合形態とその生理に関する基礎的研究 (1974年11月)
- 第28号 樽 谷 勝：ブドウの葉脈黄変による早期落葉の研究 (1974年12月)
- 第29号 倉 田 久 男：カボチャ・スイカの性の分化におよぼす日長および温度の影響に関する研究 (1976年3月)
- 第30号 鎌 田 萬：中小河川治水計画に適用する計画降雨の合理的算定法に関する研究 (1976年6月)
- 第31号 山 本 弘 幸：エンバク冠さび病の抵抗性発現機構に関する研究 (1978年3月)
- 第32号 岡 本 秀 俊：テントウムシの摂食の生態に関する実験的研究 (1978年3月)
- 第33号 山 崎 徹： α -ヒドロキシフェニル並びにシリングルリグニンに関する研究 (1978年9月) (英文)
- 第34号 市 川 俊 英：イネを加害する4種の同翅亜目頸吻群昆虫の配偶行動に関する研究 (1979年2月) (英文)
- 第35号 吉 田 博：農業生産共同組織の展開・構造・運営に関する研究 (1980年3月)

- 第36号 一色 泰：鶏盲腸の栄養生理学的研究（1980年3月）
- 第37号 中條 利明：富有カキ果実の発育ならびに品質に及ぼす温度条件に関する研究（1982年2月）
- 第38号 五井 正憲：温帯花木の花芽形成ならびに開花調節に関する研究（1982年2月）
- 第39号 松井 年行：和三盆糖の食品学的研究（1982年2月）
- 第40号 藤目 幸擴：ハナヤサイ類の花らい形成並びに発育の温度条件に関する研究—特に異常花らいについて—（1983年2月）
- 第41号 西山 壮一：カンガイ用管水路における空気混入流の水撃作用に関する研究（1983年2月）
- 第42号 真山 滋志：エンバク冠さび病の抵抗性発現におけるアベナルミンの役割（1983年10月）（英文）
- 第43号 門谷 茂：海洋堆積物中のアミノ酸の初期統成過程に関する研究（1983年10月）
- 第44号 一井 真比古：水稻育種における再生茎形質の選抜指標としての効用に関する研究（1984年11月）（英文）
- 第45号 片岡 郁雄：ブドウ果実の着色に関する研究—とくにアブジン酸による着色の制御について—（1986年10月）
- 第46号 鈴木 晴雄：畑地栽培におけるフィルムマルチと植被が地温に及ぼす影響に関する農業気象学的研究（1986年10月）
- 第47号 蓑輪 雅好：開放型畜舎内の放射熱環境に関する研究（1986年10月）
- 第48号 藤田 政之：サツマイモ塊根組織のチトクロム P-450 系酵素に関する研究（1986年10月）
- 第49号 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（1987年2月）

Memoirs of Faculty of Agriculture, Kagawa University

- No. 1 Katsumi HATA: Studies on the Constituents and Pulping of "Akamastu" (*Pinus densiflora* SIEB et ZUCC) Wood (March, 1955)
- No. 2 Nakato NAITO: Phytopathological Studies Concerning Phytohormones with Special Reference to Their Effect on Phytopathogenic Fungi (October, 1957)
- No. 3 Hiroshi MATSUZAWA: Ecological Studies on the Branconid Wasp, *Apanteles glomeratus* (March, 1958)
- No. 4 Akira KAJI: Studies on the Retting of Plant Fiber Materials for Japanese Paper Manufacture (March, 1959)
- No. 5 Kazuo MORI: An Analytical Study on the Structure of the Mandarin Orange Growing Orchard Farm in a Sloping Land Region (March, 1960)
- No. 6 Takahiko TAMAKI: Studies of Garaku Paddy Soil and Reservoir Deposits (March, 1960)
- No. 7 Masaki UEHARA: Physical and Meteorological Studies on the Cultivation and Utilization of Slope Land (March, 1961)
- No. 8 Hikaru KUWADA: Studies on the Interspecific Crossing between *Abelmoschus esculentus* MOENGH and *A. Manihot* MEDIC and the Various Hybrids and Polyploids Derived from the Above Two Species (September, 1961)
- No. 9 Junzabro NAKA: Physiological Studies on the Growing Process of Sweet Potato Plants (March, 1962)
- No. 10 Minoru SAITO: The Geology of Kagawa and Northern Ehime Prefectures, Shikoku, Japan (March, 1962) (in English)
- No. 11 Kiyoshi KOSUGI: Studies on Production and Flowering in Gladiolus (September 1962) (in English)
- No. 12 Hachiro KIRA: Hydraulic Studies on the Sedimentation in Reservoirs (February, 1963)
- No. 13 Aizo NODA: Studies on the Coleorhiza of Cereals (March, 1963)
- No. 14 Sin'itiro KAWAMURA: Studoj pri Ameloj de Legumenoj (March, 1963) (in Esperanto)
- No. 15 Jiro ASANO: A Study on the Formation of Pine Forests on Seaside Areas, giving due Consideration to the Salt Resistance of the Seeds (March, 1963)
- No. 16 Kei YAMANAKA: Studies on the Pentose Isomerases of Lactic Acid Bacteria (August, 1963) (in English)
- No. 17 Masayoshi ASHIZAWA: Studies on the Drought Damage of Grape Trees in the Region of Kagawa Prefecture (March, 1964)
- No. 18 Toshikazu TANI: Studies on the Phytopathological Physiology of Kaki Anthracnose, with Special Reference to the Role of Pectic Enzymes in the Symptom Development on Kaki Fruit (March, 1965)
- No. 19 Takayuki TARUTANI: Studies on the Storage of Persimmon Fruits (March, 1965)
- No. 20 Kunio KANO: Studies on the Media for Orchid Seed Germination (March, 1965) (in English)
- No. 21 Kiyoshi YAMAMOTO: Studies on the Hybrids among the *Vicia sativa* L. and its Related Species (March, 1966)
- No. 22 Yoshio NAKAHIRO: Studies on the Method of Measuring the Digestibility of Poultry Feed (October, 1966)
- No. 23 Hiroshi INOUE: Studies on the Fruit Development of Natsudaidai (*Citrus Natsudaidai* HAYATA), with Special Reference to Water Spot Injury (March, 1967)
- No. 24 Toyoki MIYABE: Studies on the Production and the Salt Balance in Relation to Calcium Phosphocaseinate of Abnormal Milk (August, 1967) (in English)
- No. 25 Murao SOGO: Studies on the Bark Lignin and Bark phenolic Compounds (September, 1971)
- No. 26 Mitsuyuki OHSHIMA: Studies on Nutritional Nitrogen from Red Clover Silage (November, 1971) (in English)
- No. 27 Shuzo TATSUMI: Fundamental Studies of the Chemical Forms of Calcium and Their Metabolisms in the Tree Leaves (November, 1974)
- No. 28 Masaru KURATANI: Studies on the Early Summer Defoliation of Grape Vines Caused by Veinyellowing (December, 1974)
- No. 29 Hisao KURATA: Studies on the Sex Expression of Flowers induced by Day-length and Temperature in Pumpkin and Watermelon (March, 1976)
- No. 30 Takashi KAMADA: Studies on the Rational Estimation of Rainfall for Design Flood (June, 1976)
- No. 31 Hiroyuki YAMAMOTO: Study on the Mechanism of Resistance Expression in the Crown Rust Disease of Oat (March, 1978)
- No. 32 Hidetoshi OKAMOTO: Laboratory Studies on the Food Ecology of Aphidophagous Lady Beetles (Coleoptera: Coccinellidae) (March, 1978)

- No. 33 Toru YAMASAKI: Studies on *p*-Hydroxyphenyl- and Syringyl Lignins (September, 1978) (in English)
- No. 34 Toshihide ICHIKAWA: Studies on the Mating Behavior of the Four Species of Auchenorrhynchous Homoptera which Attack the Rice Plant (February, 1979) (in English)
- No. 35 Hiroshi YOSHIDA: A Study of the Development, Structure and Management of Co-operative Groups (March, 1980)
- No. 36 Yutaka ISSHIKI: Nutritional and Physiological Studies on the Function of Ceca in Chickens (March, 1980)
- No. 37 Toshiaki CHUJO: Studies on the Effects of Thermal Conditions on the Growth and Quality of Fruits of Fuyu Kaki (February, 1982)
- No. 38 Masanori GOI: Studies on the Flower Formation and Forcing of Some Ornamental Trees and Shrubs in East Asia (February, 1982)
- No. 39 Toshiyuki MATSUI: Food Chemical Studies on Wasanbon-to Sugar (Japanese traditionally refined sugar) (February, 1982)
- No. 40 Yukihiro FUJIME: Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Reference to Abnormal Curd Development (February, 1983)
- No. 41 Souichi NISHIYAMA: Studies on the Water Hammer of the Air-entrained Flow in Irrigation Pipe Lines (February, 1983)
- No. 42 Shigeyuki MAYAMA: The Role of Avenalumin in the Resistance of Oats to Crown Rust (October, 1983) (in English)
- No. 43 Shigeru MONTANI: Early Diagenesis of Amino Acids in Marine Sediments (October, 1983)
- No. 44 Masahiko ICHII: Studies on the Utility of Ratoon Traits of Rice as the Indicator of Agronomic Characters in Breebing (November, 1984) (in English)
- No. 45 Ikuo KATAOKA: Studies on the Coloration of Grape Berries with Special Reference to the Regulation of Color Development by Abscisic Acid (October, 1986)
- No. 46 Haruo SUZUKI: Agrometeorological Studies on the Effect on Soil Temperature, of Film Mulching and Canopy in the Upland Mulching Culture (October, 1986)
- No. 47 Masayoshi MINOWA: A Study on Thermal Radiation Environment in an Open-type Livestock Barn (October, 1986)
- No. 48 Masayuki FUJITA: Studies on Cytochrome P-450-Dependent Mixed Function Oxygenase in Sweet Potato Root Tissue (October, 1986)
- No. 49 Michio TANAKA: Studies on the Clonal Propagation of *Phalaenopsis* through *in vitro* Culture (February, 1987)

昭和61年10月28日印刷 昭和62年2月27日発行

香川県木田郡三木町
香川大学農学部

印刷所 大学印刷株式会社

広島市中区十日市町二丁目1-15
電話 広島 231-4231 番(代)