

# 組織培養によるバンダの大量増殖法および馴化法に関する研究

北村 治滋・渡辺 健三・森 真理

## Studies on Propagation methods by Tissue Culture and Acclimation of Vanda.

Harushige KITAMURA, Kenzo WATANABE and Mari MORI

キーワード

バンダ 大量増殖 花茎腋芽培養 キトサンオリゴ糖資材

組織培養によるバンダの大量増殖法および馴化法について検討した。

‘Wirat’, ‘Suwapee’の花茎腋芽を外植体として用いた。初代培地は、1/2 MS 培地に NAA 0.05mg/ℓ と BA 0.1mg/ℓ を添加し、ゲル化剤としてジェランガム0.2%を用いた。本固形培地による静置培養で、最も高い PLB 形成率となった。花茎茎頂の培養に用いる花茎の採取ステージは、10~30mmの大きさのものを用いることで、80%以上の外植体から PLB が形成した。また花茎腋芽の培養では、茎頂が最も PLB 形成率が高く、次いで第2、第3節位芽の順であった。第4節位以下では、活着率は低かった。

継代培地は、PLB のみの増殖にはジャガイモ煎汁を添加したハイボネックス培地が、また、再分化を伴った増殖にはジャガイモ煎汁にペプトン 2g/ℓ を添加したハイボネックス培地が適した。

組織培養由来の個体に対し、馴化時にキトサンオリゴ糖資材の200倍希釈液を施用することにより、葉色が良くなり、生体重は3週間で対照より約10%増加した。

### 1 緒 言

滋賀県における洋ラン栽培は、昭和10年頃に彦根市でデンドロビウムの栽培が始められたのが最初である。

その後、洋ランの需要の伸びに支えられ、栽培農家数が増加した。現在では、栽培農家数は18戸、栽培面積は約25,000㎡、総生産額は約1億8千万円になっている。栽培品目は、コショウラン、カトレア、デンドロビウム、バンダ、オンシジウム等多品目に渡っている。

この中で、バンダは近年、高級ギフト用として注目されている。本県のバンダの栽培は、農家数が3戸、栽培面積は2,500㎡である。名古屋市洋ラン専用市場での1992年10月から1年間のバンダの取扱い状況は、鉢数では約1万鉢、取扱金額では約3千5百万円であった。この内、本県産のものは、鉢数では約4千8百鉢(48%)、取扱金額では約2千万円(57%)であり、西日本有数の生産地で、地域重要品目に育ちつつある。

しかし、生産拡大の障害となっているのが苗の確保の問題である。バンダの苗はタイなどからの輸入に頼っており、苗質や花色が不安定である。このため、県洋ラン部会から、均質で優良な苗を大量に獲得するための技術確立の要請があった。

洋ランの組織培養による大量増殖に関しては、多くの成書がある。バンダに関しては、研究例が少ないが、培養に用いる外植体について、Sagawa<sup>6)</sup>らは茎頂および腋芽を、角田<sup>7)</sup>らは茎頂を、田中<sup>7)</sup>らは葉片を用いている。

また、培地組成については、Sagawa<sup>6)</sup>らは、初代培地としてVW培地、継代培地としてBN培地を用いている。角田<sup>7)</sup>らはMS培地を、また田中<sup>7)</sup>らはMS培地を用いた培養事例が報告されているが、平準化した普及技術とはなっていない。

そこで、本県農業試験場に設けられている開放実習室である生物工学実習室を利用して、農家自身でもで

きる簡易な大量増殖技術を確立するため、花茎腋芽培養によるパンダの簡易大量増殖技術について検討した。

## 2 材料および方法

本文において用語を以下のように略して用いる。

PLB：プロトコーム状球体

MS培地：Murashige & Skoog 培地

VW培地：Vacin & Went 培地

BA：ベンジルアデニン

NAA：ナフタリン酢酸

### 2. 1 初代培地組成と培養形態がPLB形成に及ぼす影響

供試材料としてパンダ'Wirat'の花茎の茎頂、第2節位、第3節位芽を用いた(図1, 図2)。

初代培地の種類として、1/2MS (NAA0.05mg/l, BA0.1mg/l添加)培地とVW(ココナツミルク 200ml/l添加)培地を供試した。

培養形態は、固体培地(0.2%ジェランガム添加)による静置培養、液体培地による回転培養(2r.p.m.)および旋回培養(50r.p.m.)とし比較した。

培養条件は、25°C, 5,000~6,000lx, 16時間日長とした(以下、培養試験は同条件とした。)



図1 花茎の採取ステージ



図2 花茎の採取位置と供試腋芽の節位

### 2. 2 花茎の採取ステージと供試花茎腋芽の節位が置床後の活着に及ぼす影響

供試材料として、パンダ'Wirat'の花茎腋芽を用い

た。花茎の採取ステージは、約10~35mmの大きさのものを用い(図1)、この腋芽の茎頂~第7節位の芽を用いた(図2)。

置床のための初代培地の組成は、1/2MS+NA A 0.05mg/l+BA 0.1mg/lとし、培養形態は、0.2%ジェランガム添加の固形培地による静置培養とした。

### 2. 3 継代培地組成がPLBの増殖に及ぼす影響

供試材料は、パンダ'Wirat'のPLBを用いた。

継代培地の組成は、ハイポネックス培地を基本とした5種類の組成で、バナナ煎汁添加A培地、ジャガイモ煎汁添加B培地、同C培地、同D培地、同E培地(表1、以下A培地、B培地、C培地、D培地、E培地と略す。)で、比較検討した(表1)。

表1 供試継代培地の組成(g/l)

	A	B	C	D	E
バナナ(煮汁)	50	-	-	-	-
ジャガイモ(煮汁)	-	50	50	50	50
ハイポネックス(N,P,K=6.5,6,19)	3	3	-	3	-
ペプトン	2	2	-	-	2
しょ糖	20	20	20	20	20

注) それぞれジェランガム0.2%添加, pH5.8

### 2. 4 キトサンオリゴ糖資材が馴化後の生育促進に及ぼす影響

材料は、パンダ'Wirat'を組織培養により大量増殖し、馴化した個体で、成葉が3~4葉出葉した生育ステージのものを用いた。

供試したキトサンオリゴ糖資材は、滋賀県守山市の株式会社トダバイオシステムが開発した商品名'バイネキトン'である。本資材は、土壌改良資材として開発され、pH2~3、水溶性リン酸約5%、生物処理キトサン約2%を含有する。

本資材の原液、100倍希釈液、200倍希釈液、500倍希釈液および1,000倍希釈液を供試材料に施用した。

また、対照は水のみを施用した。

試験には、各濃度区および対照区とも、1区当り12個体を供試した。

耕種概要は、供試個体を、縦5cm×横5cm×高さ5cmのジフィーポットを用い、水苔に植え付けた。この時、キトサンオリゴ糖資材を水苔が十分湿るまで施用

した。

以後、灌水は約3～5日間隔に、植付資材である水苔が乾いたら行なった。施肥は、試験開始後7、14日目にハイポネックスの1,000倍液を施用した。栽培管理はガラス温室内で行ない、栽培温度は、約18～30℃であった。調査は、試験開始前と試験開始21日目に生体重を測定した。

### 3 結 果

#### 3. 1 初代培地組成と培養形態がPLB形成に及ぼす影響

初代培地では、いずれの培養形態や供試節位でも、VW培地に比べて1/2MS培地のPLB形成率が高かった(表2)。

培養形態では、いずれの初代培地や供試節位でも、液体回転培養や液体旋回培養に比べて固体培地による静置培養のPLB形成率が高かった(表2)。

#### 3. 2 花茎の採取ステージと供試花茎腋芽の節位が置床後の活着に及ぼす影響

花茎の採取ステージが置床後の活着に及ぼす影響では、本試験の10～35mmの範囲(図1)ではいずれのステージでも活着が良く、その後のPLB形成率も高かったので最適期は明かにできなかった(表3)。

供試花茎腋芽の節位が置床後の活着に及ぼす影響については、茎頂が活着やその後のPLB形成率も良く、次いで第2節位、第3節位の順であった。第4節位以下になると、極めて活着率が低かった(表4)。

#### 3. 3 継代培地組成がPLBの増殖に及ぼす影響

有機物としてバナナの煎汁を添加したA培地と、ジャガイモの煎汁を添加したB培地を比較した結果、PLB重の増加率では有意な差はなかったが(表5)、バナナ煎汁を添加した場合には、PLBの肥大が促進されるのに対し、ジャガイモ煎汁を添加した場合には、PLBの分割が促進され、小さなPLBが多く形成した。これを継代し続けると、PLBの増殖とともに再分化も伴った。

ジャガイモ煎汁を添加したB培地から、ハイポネックスやペプトンを省略することを検討した結果、ハイポネックスを抜いたC培地やE培地は、B培地に比べてPLB重の増加率は明かに低く(表5)、さらにPLBが黄化し、一部枯死するものが見られた。ペプト

表3 花茎の採取ステージが置床後の活着とその後の生育に及ぼす影響

腋芽のステージ	供試数	生育状況		
		枯死	PLB形成	シュート形成
10mm以下	5	1 (20)	4 (80)	0 (0)
10mm以上	5	1 (20)	4 (80)	0 (0)
20mm以上	4	2 (50)	2 (50)	0 (0)

注) ( ) 内は供試数に対する割合%

表4 供試腋芽の節位が置床後の活着とその後のPLB形成に及ぼす影響

採芽位置(節位)	茎頂	第2	第3	第4	第5	第6	第7
花茎 No.							
No.2	○	×	×	×	×		
No.4	○	○	○	×	×	×	×
No.16	○	○	○	×	×	×	
No.18	○	○	×	×	×		
No.21	○	○	×	×	○		
PLB形成率	5/5(100)	4/5(80)	2/5(40)	0/5(0)	1/5(20)	0/2(0)	0/1(0)

注1) ○は活着後PLB形成、×は活着せず  
2) PLB形成数/供試数 (PLB形成率%)

表2 初代培地組成、培養形態、供試腋芽の節位がパンダのPLB形成に及ぼす影響

初代培地組成	1/2MS			VW		
	静置	回転	旋回	静置	回転	旋回
供試節位						
茎頂	4/5(80)	2/4(50)	3/4(75)	2/5(40)	1/4(25)	2/4(50)
第2節位	3/5(60)	2/4(50)	1/4(25)	1/5(20)	1/4(25)	1/4(25)
第3節位	3/5(60)	1/4(25)	1/4(25)	1/5(20)	0/4(0)	0/4(0)

注) PLB形成数/供試数 (PLB形成率%)

ンのみを抜いたD培地は、B培地に比べてPLB重の増加率は明かに高かった。しかし、B培地に比べて継代を続けた時に再分化する個体は少なかった(表5)。

表5 継代培地組成がPLBの増殖に及ぼす影響

培地組成	供試 フラスコ数	平均供試 PLB重 (g)	試験終了時の 平均PLB重 (g)	平均PLB重 増殖率	再分化 程度
A	25	1.15	8.34	7.25b	+
B	27	1.03	6.62	6.43b	++
C	21	1.02	4.04	3.96c	±
D	21	1.00	9.03	9.03a	±
E	19	1.02	4.77	4.68c	±

注1) 継代培地に移植後、50日後にPLB重を調査した。

2) 平均PLB重増殖率は、New Multiple Range Test 5%有意水準で検定

3) 再分化程度は、++多、+中、±少で観察評価

### 3. 4 キトサンオリゴ糖資材が馴化後の生育に及ぼす影響

原液あるいは100倍希釈液を施用した区では、生育不良や枯死する個体が発生した。観察結果から、200~1,000倍希釈区では、対照区に比べ、葉色や葉長が

表6 キトサンオリゴ糖資材が馴化後の生育促進に及ぼす影響

供試 資材濃度	平均供試 個体重(g)	試験終了時の 平均個体重 (g)	平均個体重 増殖率
原液	1.93	1.20	0.62 c
100倍希釈	1.83	2.13	1.16 ab
200倍希釈	2.15	2.71	1.26 a
500倍希釈	1.94	2.34	1.21 ab
1,000倍希釈	1.58	1.94	1.23 ab
対照	1.92	2.21	1.15 b

注) 平均個体重増殖率は、New Multiple Range Test 5%有意で検定

優った。また、個体重量において明かに増加率が高かったのは200倍希釈区であり、生体重では3週間で対照より約10%増加した(表6)。

## 4 考 察

バンダは、単茎性で分枝することは希であり、株分けにより増殖することはほとんど期待できない。このため、茎部を切断し、側芽を出させて増殖する方法が取られてきたが、側芽の発生数は少なく、生育も遅いため、効率的な方法とは言えない。

そこで、組織培養による大量増殖法が考えられた。<sup>9)</sup> 一般的に、植物の組織培養の成否の鍵は、培養に用いる外植体の部位や大きさと、培地組成と言われている。

まず、外植体について、Sagawa<sup>9)</sup>らは茎頂および腋芽を、角田<sup>10)</sup>らは茎頂を、田中<sup>11)</sup>らは葉片を用いている。

これに対し、著者らは、花茎茎頂および花茎腋芽を用いた。通常、バンダは1株、市況で、数千円から数万円で販売されていて、洋ランの中では高価な品目である。このため、できるだけ親株を傷めない部位を外植体としたいと考えた。花茎を採取することは、茎頂や葉片を採取することに比べて、親株を傷めることは極めて少ない。

次に培地組成については、Sagawa<sup>9)</sup>らは、初代培地としてVW培地、継代培地としてBN培地を用いている。

角田<sup>10)</sup>らはMS培地を、また田中<sup>11)</sup>らはMS培地を用いている。

著者らは、培地組成を検討する際に次の3つの条件が必要であると考えた。

その1は、できるだけ簡易な組成であること。元々、本研究は、本県の洋ラン部会の要請を受けてスタートした。当场には、農家の方々が技術習得するための生

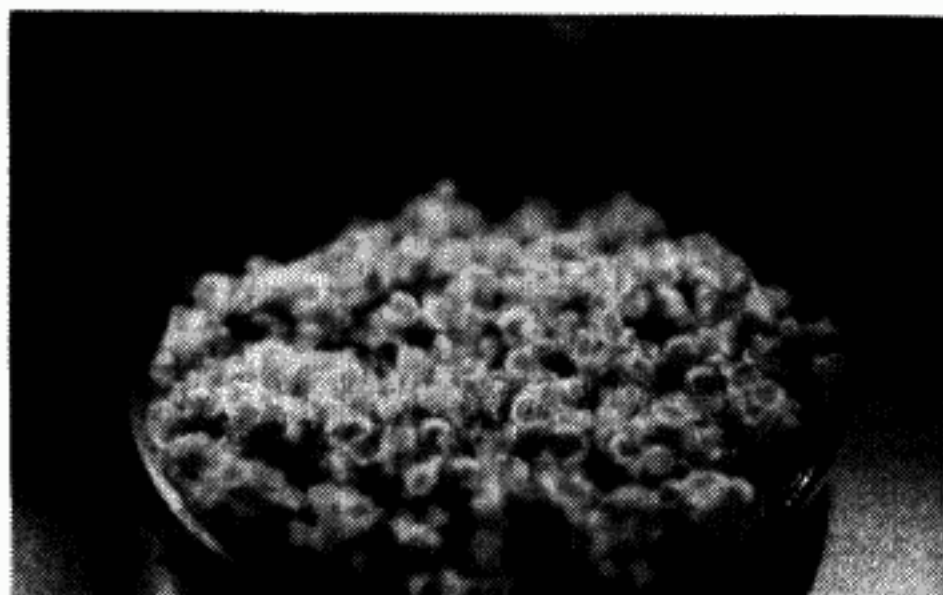


写真1 増殖中のPLB

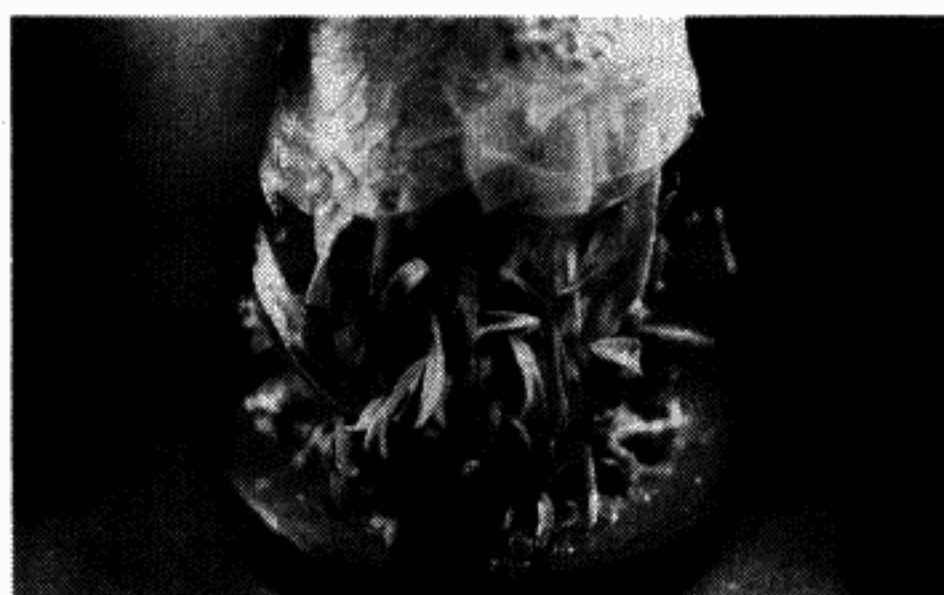


写真2 再分化したバンダ

物工学実習室があり、技術習得後は、農家自身自宅で増殖できる技術の開発が望まれていた。このため、培地組成を簡易にする必要があった。

その2は、使用する植物生長調節剤の量を極力少なくすること。これは、植物生長調節剤を多量に用いることによる培養変異の発生を危惧したからである。特にバンダは、幼苗から開花まで生産者の経験では5～7年程度の長期間を要すると言われ、この時点で培養変異の発生が認められても手遅れである。

その3は、安価な組成にすること。特に、継代培地は、PLBや幼植物の継代を繰り返す過程で大量に必要であり、経済性を考える必要があったからである。

本試験で得られた、初代培地として1/2MS培地、継代培地としてジャガイモ煎汁添加ハイポネックス培地が最適培地であったという成果は、上記の3条件を十分満たすものであった。

次に培養苗を用いて生育促進試験を行った。バンダは生育が極めて緩慢で、開花までには5～7年を要すると言われている。バンダ栽培農家の収益を増加するためには、できるだけ開花までの期間を短縮する必要がある。このため、滋賀県内メーカーが開発したキトサンオリゴ糖資材を用い、生育促進の可能性を検討した。

本資材に関しては、これまで、バラ根頭がんしゅ病の防除<sup>1)</sup>、ナシ白紋羽病の防除<sup>2)</sup>、パッションフルーツの生育促進<sup>3)</sup>などに有効であったとの成績のほか、滋賀県内の農業改良普及センターによる展示圃試験では、水稻、ダイズ、インゲンマメの生育促進や収量増、あるいは、トマトのネコブセンチュウやミツバ根腐病の抑制に効果があったとの成績が報告されている<sup>4)</sup>。

しかし、いずれの効果に関してもそのメカニズムは解明されていない。

本試験において、バンダにも生育促進効果が認められた。しかし、3週間のみの結果であり、今後継続的に施用し、調査を続けていく必要があると考えられる。

本試験で約5,000株の馴化個体を得た。現在、この苗を試験場、ラン栽培農家、農業大学校、守山市農業技術拠点施設などに配布し、培養変異についての検定と生育促進試験を実施中である。

また、継代培地として開発したジャガイモ煎汁添加ハイポネックス培地は、作製が容易、廉価、植物生長ホルモンを使っていない上、コショウラン、デンドロビウム、オンシジウム等のPLBの増殖にも有効であ

り、洋ランの培養に汎用的に使えるのではないかと考えている。

本培養技術は、当場の生物工学実習室での、研究会等を通じて普及や定着化を図った。

## 謝 辞

本研究は、農業改良普及センターからの要請課題であり、現地での問題点の調査および課題の取りまとめをいただいた、元滋賀県庁農林水産部 雲茂総括専門技術員、湖南地域農業改良普及センター 臼居仁司主任に厚く感謝いたします。

また、研究を進めるにあたり、培養材料の提供をいただいた滋賀県洋ラン部会 齊藤文夫部会長をはじめ部会員の皆様に、終始有益な御助言をいただいた守山市農業技術拠点施設 中井昭彦所長に厚く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 微生物処理キトサン研究会編：農業新資材バイオキトサン。89-124。大成出版社、東京、1991。
- 2) 蒲生英美：湖東地域における白紋羽病の発生と防除の取り組み。関西病虫害研究会報 34,141,1992。
- 3) HELENA MATHEWS, V and P.S.RAO.: IN VITRO MULTIPLICATION OF VANDA HYBRIDS THROUGH TISSUE CULTURE TECHNIQUE. Plant Science Letters.17, 383-389, 1980.
- 4) 北村治滋, 長谷川清善, 森修一：バラ根頭がんしゅ病に対するキトサン資材の効果。滋賀農試研究報告 30.101-103. 1989。
- 5) オラディー・サハバチャリン：タイの魅力的なバンダとその仲間。新花卉 142.42-47. 1989。
- 6) SAGAWA Y, J.T.KUNISAKI: CLONAL PROPAGATION OF ORCHIDS BY TISSUE CULTURE. In A. Fujiwara (Editor), Plant Tissue Culture. Jpn. Assoc Plant Tissue Culture Tokyo, PP.683-684, 1982.
- 7) 田中道男, 長谷川 晴, 五井正憲：単茎性ラン科植物の組織培養による栄養繁殖に関する研究(第1報)。園学雑 44(1),47-58, 1975。
- 8) 角田昌一, 富岡美子：Vandaの茎頂培養。園芸学会 昭和51年秋季発表要旨 246-247, 1976。
- 9) 宇都宮直樹, 木内宏彰：キトサンオリゴ糖を主成

分とする土壌改良剤がパッションフルーツの生育に  
及ぼす影響. 園学雑 63 別冊 2, 100-101, 1994.

### Summary

The present studies were carried out in order to establish the method of clonal propagation by tissue culture and acclimation of Vanda.

Axillary buds of flower stalk of Vanda 'Wirat' 'Suwapee' were used for culture.

As a practical medium for the protocorm-like bodies (P.L.B.) formation, the following recipe will be recommended.

Basal Media : 1/2MS (Murashige and Skoog)	
Sucrose	30 g
NAA (Naphthalene Acetic Acid)	0.05mg
BA (Benzyladenine)	0.1mg
Gellan Gum (Gelrite)	2 g
Distilled Water	1000ml
pH was adjusted to approx.	5.8

Sections were placed under 5-6 klxs illumination for 16 hrs per day at 25°C.

The adequate shoot tip harvest time for tissue culture was 10~30 mm in length from actively grown flower stalks and P.L.B. formation rate was bigger than 80%.

As for axillary bud culture, shoot apex showed the highest P.L.B. formation ability, the second node followed that and the third node was third in ability.

Axillary buds of fourth order and below showed remarkably low P.L.B. formation ability.

As a practical medium for the P.L.B. propagation, the following recipe will be recommended.

Hyponex(N:P:K=6.5:6:19)	3 g
Poteto extract	500ml
(extract from boiling 50 g diced potato in 500ml water for 10min.)	
Sucrose	20 g
Gellan Gum (Gelrite)	2 g
Distilled Water	500ml
pH was adjusted to approx.	5.8

Plantlet formation from P.L.B. was enhanced on Hyponex - poteto medium supplemented with 2 g / l Peptone.

On acclimating plantlets originated from tissue culture, 200 fold dilution of (0.5% solution of) chitosan - oligosaccharides soil conditioner treatment increased their vigor and leaf color became deep green, fresh weight became 10% bigger than that of controls within 3 weeks.