

キンセイラン及びナツエビネの種子発芽と その後の生育

春 木 和 久*

Seed Germination and Subsequent
Development of *Calanthe nipponica*
Makino and *Calanthe reflexa* Maxim.

Kazuhisa Haruki*

I 緒 言

キンセイラン(*Calanthe nipponica* Makino)とナツエビネ(*Calanthe reflexa* Maxim.)は山の木陰に生える多年草で、ラン科エビネ属に属している。キンセイランは北海道、本州、九州(宮崎県)に分布しており、6月頃に30~50cm程度の花茎を伸ばして淡黄緑色の花をつけ(北村ら, 1976), 山野草愛好家に珍重されている。島根県内では、中国山地沿いと隠岐島に分布することが知られているが、個体数は極めて少なく、「島根レッドデータブック」(島根県, 1997)では「要保護種」に指定されている。また、ナツエビネは本州、四国、九州に分布し、8月頃30cm程度の花茎を伸ばして淡紫色の花をつけ(北村ら, 1976), 園芸面での価値が高い。県内では各地に自生しておりキンセイランほど稀少ではないが、近年個体数が激減しており、キンセイランと同様に「要保護種」に指定されている(島根県, 1997)。

このような園芸価値の高い植物の個体数減少は、不法採取が大きな原因を占めていると考えられる。しかし、取り締まりを強化しても不法採取を完全に無くすことは難しい。そこで、人工的に増殖し、安価で販売することが不法採取

の減少に寄与できるものと考えられる。また、自生地周辺の地域では、増殖個体を地域特産物として販売することにより農業生産振興にも役立つと考えられる。

ラン科植物については、長島(1993, 1994)が22属47種について、胚発生過程、種子発芽及び発育初期の様相について詳細な観察を行っている。しかし、その中で、キンセイランとナツエビネの種子は発芽して球状あるいは長球状の胚には生育することが示されているもののプロトコームの形成は認められず、幼植物体は形成されていない。そこで、本研究ではキンセイランとナツエビネについて無菌播種により幼植物体を形成させるための採取時期、培地の種類、培養中の温度条件について検討した。

II 材料及び方法

供試材料としたキンセイランとナツエビネは、1~3月は露地、7~9月は人工照明の人工気象室(6,000lxで12時間照明12時間暗黒、照明時温度23℃湿度70%、暗黒時温度17℃湿度75%)内で、その他の時期は約90%遮光の無加温ガラス室で栽培した。そして、開花時(キンセイランは5月下旬~6月上旬、ナツエビネは7月中旬~7月下旬)に他の株と人工交配を行い、着

* 作物部 生物工学科

果したさを定期的に採取し(キンセイランは6月27日, 8月6日, 8月23日, 9月25日, ナツエビネは8月30日, 9月22日, 10月10日, 10月25日), その中から種子を摘出して直ちに無菌播種を行った。

種子摘出と無菌播種は, 採取したさを水道水で洗い, 70%エタノールに30秒~1分間浸漬し, その後有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間浸漬することによって滅菌し, さらに滅菌水で3回洗浄した後さやの中から種子を取り出して培地の上に置床するという手順で行った。

培地は表1に示したハイポネックス培地, リンゴ培地及びMS培地(Murashige and Skoog, 1962)を用い, 200ml容の植物培養用フラスコを用いて20℃と25℃で培養した。

また, 培養温度についてさらに詳細な検討を行うために, キンセイラン種子(7月23日, 8

月20日採取)とナツエビネ種子(9月25日, 10月16日採取)をハイポネックス培地に無菌播種し, 10, 15, 20, 25, 30℃で培養を行った。培養はプラスチックシャーレを用いて行い, 実体顕微鏡で種子からのプロトコーム形成の有無を観察し, 形成率を算出した。

このほか, 培養中に褐変したキンセイランの胚の代謝活性を調査するため, 培養中の種子, 正常に形成されたプロトコーム及び褐変した粒状の胚を持つ種子をFluorescein diacetate (FDA)で染色し, 蛍光顕微鏡(B励起)で比較観察した(山田康之・大山莞爾, 1985)。

正常に形成されたプロトコームは, 直径1mm程度になったものから順にMS培地に移植し, 同様の温度条件で培養を続けた。約1年間培養した後, バーミキュライトを入れた育苗箱に移植して温度湿度を調節した順化室(1日12時間3,000lx照明, 照明時温度23℃湿度70%, 暗黒時

表1 実験に用いた培地(1000ml当たりの添加量)

| 添加物 | MS培地 | ハイポネックス培地 | リンゴ培地 |
|---|----------|-----------|--------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 mg | | |
| KNO ₃ | 1900 mg | | |
| KH ₂ PO ₄ | 170 mg | | |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 mg | | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 mg | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 mg | | |
| NaEDTA·2H ₂ O | 37.3 mg | | |
| KI | 0.83 mg | | |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22.3 mg | | |
| H ₃ BO ₄ | 6.2 mg | | |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.6 mg | | |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 mg | | |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 mg | | |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 mg | | |
| myo-Inositol | 100 mg | 100 mg | |
| Nicotinic acid | 0.5 mg | 0.5 mg | |
| Pyridoxine HCl | 0.5 mg | 0.5 mg | |
| Thiamine HCl | 0.1 mg | 0.1 mg | |
| Glycine | 2 mg | 2 mg | |
| ハイポネックス | | 3.0 g | 2.0 g |
| トリプトン | | 2.0 g | 2.0 g |
| リンゴ果汁 | | | 100 ml |
| シヨ糖 | 30.0 g | 30.0 g | 30.0 g |

注) NaOHでpH5.8に調整. 寒天8g/lで固化. 121℃10分間オートクレーブで滅菌.

温度17℃湿度75%)で順化した。

III 結 果

1. 採種時期, 培地の種類, 温度とプロトコーム形成

無菌播種したキンセイラン種子の培養結果を表2に示した。6月27日に採取した種子は, 交配後約1か月経過しているにもかかわらず種子の中に胚は確認できず, 培養しても全く発芽しなかった。これに対して, 8月6日, 8月23日, 9月25日に採取したものでは, ほとんど全

ての種子の中に, 白色でやや長球形の胚が確認できた。

8月6日に採取し, MS培地またはハイポネックス培地に播種し20℃で培養したものは, 11月22日の調査で図1左に示したようなプロトコームが多数確認され, その後培養を続けるとその数が増加した。しかし, 25℃で培養した場合と20℃でリンゴ培地を用いた場合には全くプロトコームは形成されず, 12月11日以降には褐色あるいは黒褐色の粒状になる胚が多かった(図2左)。8月23日と9月25日に採取し, 播種した場合, プロトコーム形成時期はやや遅く

表2 キンセイランの無菌播種における採取時期, 培地の種類と生育状況(2001-2002年)

| 採取日 (月/日) | 培地の種類 | 培養温度20℃ | | | 培養温度25℃ | | |
|--------------|-----------|---------|-------|------|---------|-------|------|
| | | 11/22 | 12/11 | 1/11 | 11/22 | 12/11 | 1/11 |
| 6/27 | MS培地 | — | — | — | — | — | — |
| | リンゴ培地 | — | — | — | — | — | — |
| | ハイポネックス培地 | — | — | — | — | — | — |
| 8/6 | MS培地 | + | + | + | — | 褐色 | 褐色 |
| | リンゴ培地 | — | 褐色 | 褐色 | — | 褐色 | 褐色 |
| | ハイポネックス培地 | + | + | + | — | 褐色 | 褐色 |
| 8/23 | MS培地 | ± | ± | + | — | 褐色 | 褐色 |
| | リンゴ培地 | — | — | 褐色 | — | 褐色 | 褐色 |
| | ハイポネックス培地 | ± | + | + | — | 褐色 | 褐色 |
| 9/25 | MS培地 | — | ± | ± | — | — | — |
| | リンゴ培地 | — | 褐色 | ± | — | 褐色 | 褐色 |
| | ハイポネックス培地 | ± | + | + | — | 褐色 | 褐色 |

注) —: プロトコーム形成なし, ±: ごくわずか(数個)形成, +: 多数形成。
褐色: 胚が大きくなるが黒褐色あるいは褐色になったもの。

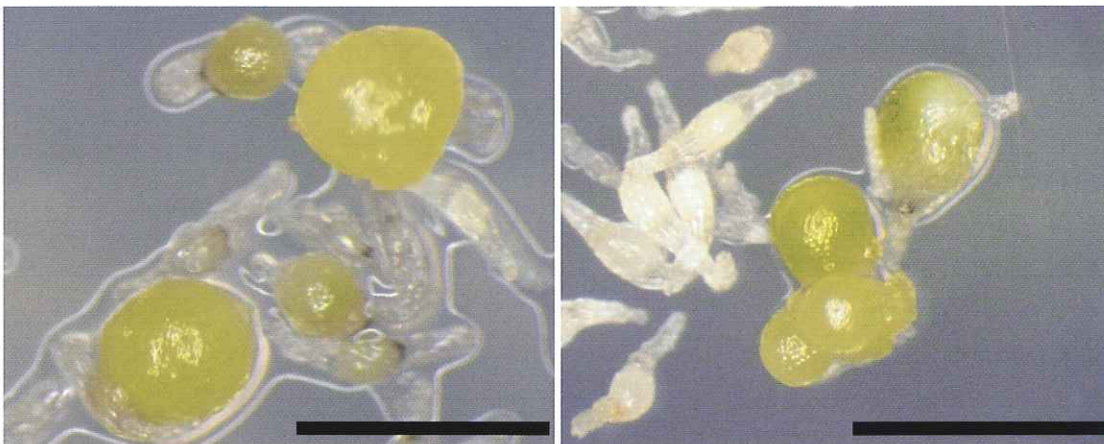


図1 種子から形成されたプロトコーム
左: キンセイラン(20℃で約3か月培養)
右: ナツエビネ(25℃で約3か月培養)
黒いバーの長さは1mmを示す。



図2 褐変したキンセイランの胚

左: 播種後 25°Cで約3か月培養

右: 播種後 25°Cで約3か月培養した後 20°Cで約10か月間培養

なるものの、ほぼ同様の傾向がみられた。また、25°Cで培養して褐変した胚を正常なプロトコームが形成された20°Cの培養条件に移しても正常な状態に戻ることはなかった(図2右)。

以上の結果から、キンセイランを無菌播種により増殖するためには、開花後2か月程度経過した8月以降に種子を採取し、MS培地またはハイポネックス培地を用いて20°Cで培養するのが良いと考えられる。

ナツエビネ種子の培養結果を表3に示した。いずれの時期に採取した種子も、その中に白色でキンセイランよりもやや長い長球形の胚が観察された。

8月30日に採取し25°Cで培養したものでは、いずれの培地でも12月27日あるいは1月25日の調査でプロトコームが確認された。20°Cでは全くプロトコームは形成されなかった。

9月22日に採取したものは、25°Cでは11月24日、20°Cでは12月27日の観察でリング培地とハイポネックス培地で図1右に示すようなプロトコーム形成が確認された。MS培地でも1月25日には観察されたが形成率は低かった。また、20°Cに比べ25°Cの方が形成率が高かった。

10月10日に採取したものは、リング培地とハイポネックス培地を用いて25°Cで培養した場合のみ12月27日の観察からプロトコーム形成が認

表3 ナツエビネの無菌播種における採取時期、培地と生育状況(2001-2002年)

| 採取日 (月/日) | 培地の種類 | 培養温度20°C | | | 培養温度25°C | | |
|--------------|-----------|----------|-------|------|----------|-------|------|
| | | 11/24 | 12/27 | 1/25 | 11/24 | 12/27 | 1/25 |
| 8/30 | MS培地 | — | — | — | — | — | + |
| | リング培地 | — | — | — | — | + | + |
| | ハイポネックス培地 | — | — | — | — | + | + |
| 9/22 | MS培地 | — | — | ± | — | — | — |
| | リング培地 | — | ± | ± | ± | + | + |
| | ハイポネックス培地 | — | ± | ± | ± | + | + |
| 10/10 | MS培地 | — | — | — | — | — | — |
| | リング培地 | — | — | — | — | ± | + |
| | ハイポネックス培地 | — | — | — | — | ± | + |
| 10/25 | MS培地 | — | — | — | — | — | — |
| | リング培地 | — | — | — | — | — | — |
| | ハイポネックス培地 | — | — | — | — | — | — |

注) —: プロトコーム形成なし, ±: ごくわずか(数個)形成, +: 多数形成。

表4 キンセイランの無菌播種における培養温度と生育状況(2002-2003年)

| 採取日 (月/日) | 培養温度 (°C) | 11/ 1 調査 | | 12/ 2 調査 | | 1/ 3 調査 | |
|--------------|--------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | | プロトコーム (%) | 褐変 (%) | プロトコーム (%) | 褐変 (%) | プロトコーム (%) | 褐変 (%) |
| 7/23 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 0 | 0.4 | 0 | 2.3 | 0 |
| | 20 | 8.7 | 0 | 14.2 | 0.7 | 37.0 | 2.9 |
| | 25 | 0 | 6.3 | 0.3 | 41.9 | 0 | 86.6 |
| | 30 | 0 | 0 | 0 | 8.4 | 0 | 11.0 |
| 8/20 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 0 | 0.4 | 0 | 1.9 | 0 |
| | 20 | 1.0 | 0 | 0.9 | 1.5 | 5.7 | 1.6 |
| | 25 | 0 | 0 | 0 | 45.1 | 13.8 | 76.0 |
| | 30 | 0 | 36.0 | 0 | 38.8 | 0 | 89.9 |

注) 培地はハイポネックス培地を用いた。

実体顕微鏡で種子数とプロトコーム形成数, 褐変した胚の数を調査してプロトコーム形成率, 褐変率を算出。

められた。10月25日採取では, 調査期間中にプロトコームは形成されなかった。

以上の結果から, ナツエビネはリング培地またはハイポネックス培地を用い, 開花後2か月程度経過した9月下旬頃に種子を採取して無菌播種し, 25°Cで培養すると良いことが明らかとなった。

2. プロトコーム形成に最適な温度条件の検討 無菌播種したキンセイラン種子を異なる温度

で培養した結果を表4に示した。7月23日採取20°C培養区では, 11月1日には8.7%の種子がプロトコームを形成し, 1月3日にはプロトコーム形成率は37.0%となった。また, 12月2日には褐変した粒子状の胚が観察され始め, 1月3日にはその割合が2.9%になった。これに対して, 25°C区ではプロトコームはほとんど形成されず, 培養期間が長くなるとともに褐変した粒状の胚が次第に増加し, 1月3日には発生率が86.6%に達した。

表5 ナツエビネの無菌播種における培養温度と生育状況(2002-2003年)

| 採取日 (月/日) | 培養温度 (°C) | 1/ 3 調査 | | 2/ 2 調査 | |
|--------------|--------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | | プロトコーム (%) | 褐変 (%) | プロトコーム (%) | 褐変 (%) |
| 9/25 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 20 | 0.9 | 0 | 4.0 | 0 |
| | 25 | 4.5 | 0 | 10.1 | 0 |
| | 30 | 0 | 12.5 | 0 | 28.4 |
| 10/16 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 5.1 | 0 | 21.2 |

注) 培地はハイポネックス培地を用いた。

実体顕微鏡で種子数とプロトコーム形成数, 褐変した胚の数を調査してプロトコーム形成率, 褐変率を算出。

10°C区では観察期間中に変化はなく, 15°C区ではごく低率でプロトコームが形成されたが, 胚の褐変は観察されなかった。30°Cではプロトコームは形成されず, 褐変した粒状の胚が10%程度観察された。

8月20日に採取・播種した場合には, 15~25°Cでの培養でプロトコームが形成され, 1月3日に25°C区で形成率は最

高の13.8%となった。褐変した粒状胚は20℃で僅かに見られたが、25℃及び30℃ではそれぞれ76.0%、89.9%と高率に発生した。10℃及び15℃では全く発生しなかった。

以上の結果から、キンセイランのプロトコーム形成率は、採種時期によって異なるが、20～25℃で高く、25～30℃では褐変した粒状の胚の発生が急増することが明らかとなった。したがって、キンセイランの無菌播種における培養温度は、プロトコーム形成率が高く、褐変の少ない20℃が適当であると考えられる。

ナツエビネ種子の培養結果を表5に示した。9月25日に採取し無菌播種したものでは、1月

3日には、25℃で4.5%、20℃で0.9%の種子でプロトコームが形成された。また、キンセイランと同様に30℃では12.5%の種子で胚の褐変が観察されたが、25℃以下では胚の褐変は見られなかった。さらに1か月経過した2月3日には、25℃で10.1%、20℃では4.0%にプロトコーム形成率が上昇した。30℃ではプロトコームは全く形成されず、胚の褐変率がさらに高くなった。

10月16日に採取したものは、いずれの温度条件でもプロトコームは形成されなかった。30℃では9月25日播種と同様に胚の褐変が観察された。

以上の結果から、ナツエビネの無菌播種にお

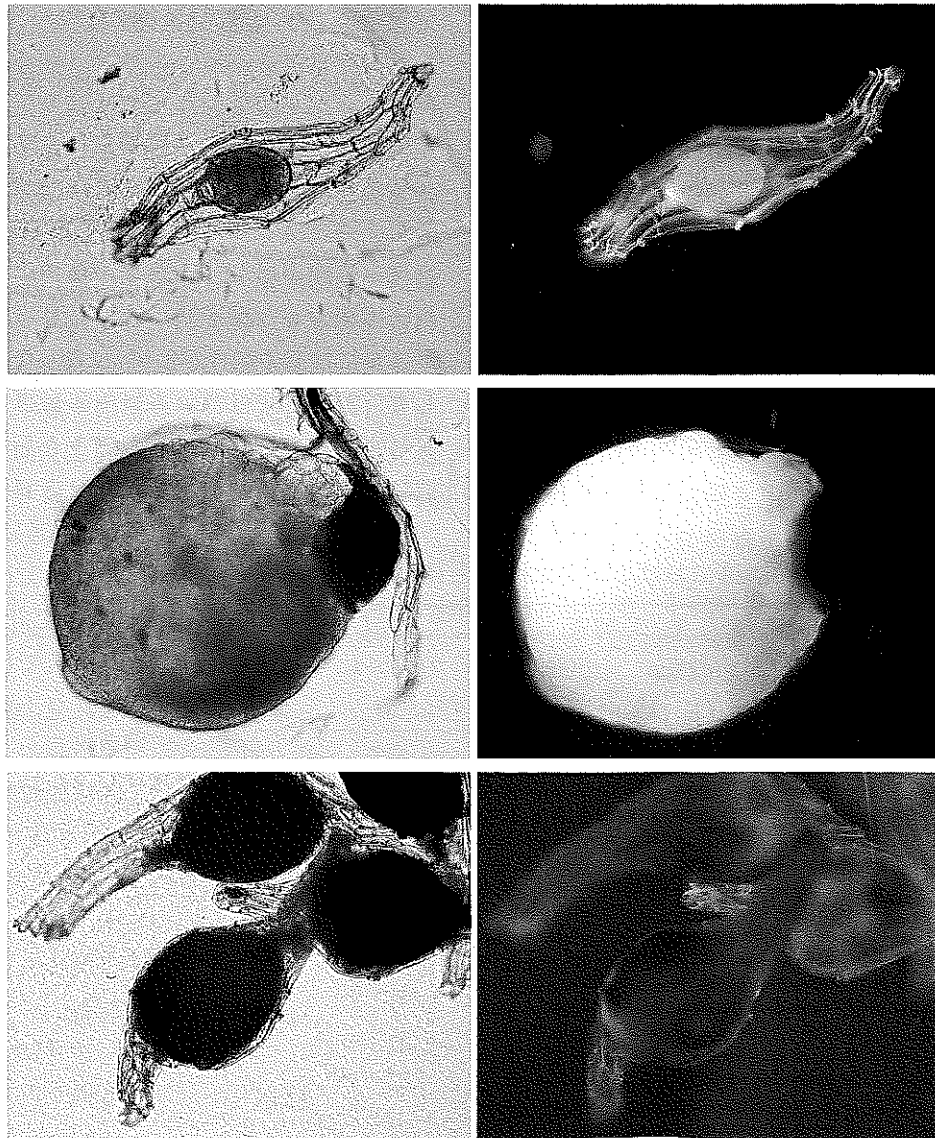


図3 FDA活性の比較(左列:可視光 右列:B励起)
 上段:播種2か月後の種子
 中段:プロトコーム
 下段:褐変した胚

ける培養温度は25℃が適当であると考えられる。

3. 褐変した胚の活性検定

培養中の種子の胚、正常なプロトコーム、褐変した胚のFDA染色結果を図3に示し、胚の位置と蛍光を発生している部分を対比させるために、FDA染色した試料を可視光で観察した写真とB励起光を照射して蛍光顕微鏡で観察した写真とを並べた。培養中の種子にある胚と正常に発生したプロトコームからは、生存している細胞が持っているエステラーゼ活性を示す強い蛍光が発生した。しかし、褐変した胚では全く蛍光が発生しなかった。このことから、褐変した胚は枯死しているものと推定される。

4. プロトコームの培養と植物体の順化

直径約1mm以上になったプロトコームをホルモンフリーMS培地に移植し、その後約1年間

培養した結果を図4に示した。キンセイラン、ナツエビネとも3~5cmに生育し、葉も1~3枚展開した。順化も容易で、約1か月で活着し、順化後約3か月で図5に示すような状態になった。

IV 考 察

今回の試験から、キンセイランの無菌播種における採取(播種)適期は8月頃以降で、培地はハイポネックス培地またはMS培地、培養温度は20℃が良いことが明らかとなった。また、ナツエビネでは、9月下旬頃に採取(播種)し、ハイポネックス培地またはリンゴ培地を用い、25℃で培養すると良い結果が得られることが明らかとなった。いずれも、形成されたプロトコームを移植し、約1年間の培養後に順化して

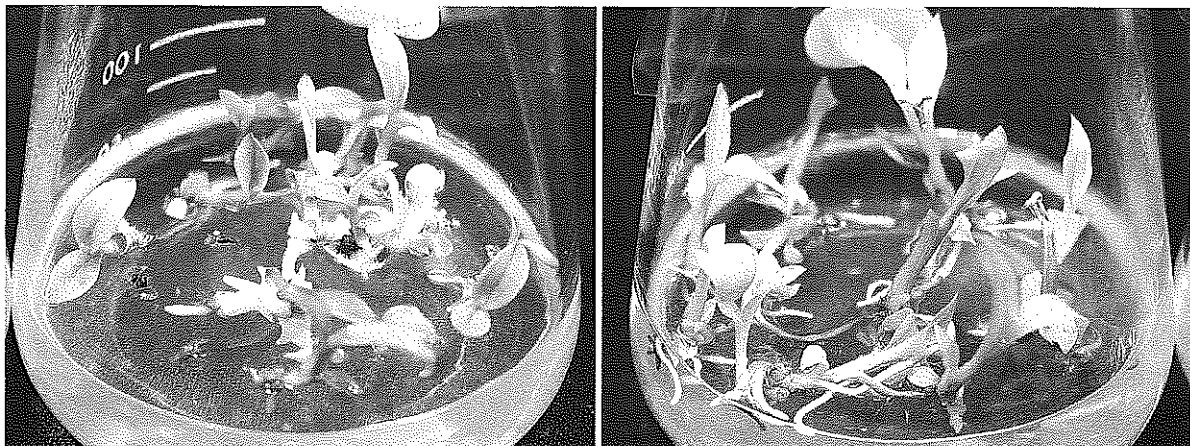


図4 プロトコームから形成された小植物体
左: キンセイラン (20℃で約1年間培養)
右: ナツエビネ (20℃で約1年間培養)
容器は 200ml 容植物培養用フラスコ、培地はMS培地。



図5 順化したキンセイラン(左)とナツエビネ(右)

苗が得られた。

キンセイランとナツエビネの無菌播種について長島(1993, 1994)がハイポネックス培地を用いて検討を行っているが、発芽して球状あるいは長球状の胚までは生育するもののプロトコームの形成は認められておらず、幼植物体も形成されていない。この研究では、供試材料の栽培は無加温ガラス室(神奈川県伊勢原市)で行われ、培養条件は、培養温度 $26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照度2000~2300lxであった。筆者も当初は無加温ガラス室(島根県出雲市)で栽培を行ったが、キンセイランは開花せず、ナツエビネは開花して人工交配により結実したものの、得られた種子には胚が観察されず無菌播種しても全く発芽しなかった。そこで、夏の高温を避けるために人工気象室内で栽培し、人工交配によって得られた種子を用いて温度条件を変えて試験を行った。

その結果、キンセイランを開花させることができ、ナツエビネでは種子内部に球状の胚を持った種子が得られた。これらの材料を用いた培養温度条件の比較試験により、キンセイランでは 20°C が、ナツエビネでは 25°C が培養適温であることが明らかとなった。長島の試験でキンセイランとナツエビネの無菌播種により植物体を得られなかったのは、キンセイランでは培養温度が不適当であったこと、夏に開花するナツエビネでは開花期の高温により胚が正常に形成されなかったことが原因であると推察される。

今回の試験では、キンセイラン種子の培養温度が高いと胚が生育中に枯死し、褐変した球状体が形成された。このような褐変した球状の胚はFDA染色で枯死していることが確認され、褐変後に培養温度を変えても正常な状態に戻ることはなかった。この現象はナツエビネにおいても 30°C で培養したもので観察されており、適正な温度を超えると発生しやすいことが明らかとなった。また、キンセイランでの胚の褐変はリンゴ培地で多く発生しており、高温とリンゴ培地に多く含まれる成分との相互作用で発生する可能性も示唆される。

増殖できたキンセイランとナツエビネの苗の順化は容易であり、夏季の高温を防ぐことができれば栽培も困難ではないと考えられる。キンセイランは5月下旬から6月中旬にかけて開花

し、野趣のある姿は山野草愛好家に好まれている。また、ナツエビネは7月~9月に淡紫色あるいは赤紫色のエビネに似た花を咲かせ、鉢植えとして利用できるものと思われる。今後これらのランの自生する地域で特産物としての利用が期待される。

V 摘 要

無菌播種によるキンセイランとナツエビネの増殖法を検討した。

1. キンセイランは、8月以降に採取した種子を用い、MS培地またはハイポネックス培地に播種して 20°C で培養するとプロトコーム形成が良好であった。
2. ナツエビネは、9月下旬頃にリンゴ培地またはハイポネックス培地に播種し、 25°C で培養するとプロトコーム形成が良好であった。
3. キンセイラン、ナツエビネとも、発芽適温より高い温度で培養すると胚が褐色の球状体になり、生育が停止し、FDA染色により枯死していることが確認された。
4. キンセイランとナツエビネのプロトコームは約1年間培養することによって幼植物体となり、容易に順化することができた。

VI 引 用 文 献

- 北村四郎・村田源・小山鐵夫(1976) 原色日本植物図鑑. 草本編III 単子葉類. 保育社, 54.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- 長島時子(1993) ラン科植物の胚発生過程と発芽との関係に関する研究. *園学雑*62, 581-594
- 長島時子(1994) ラン科植物の種子発芽および初期発育の様相に関する研究. *園学雑.* 63, 139-149.
- 島根県(1997) しまねレッドデータブック(植物編). 島根県立三瓶自然館, 98-99及び104-105.
- 山田康之・大山莞爾(1985) 細胞育種実験法. サイエンスフォーラム, 176.

Summary

Proliferation by seeding *in vitro* of *Calanthe nipponica* Makino and *Calanthe reflexa* Maxim. was examined.

1. Many protocorms of *C. nipponica* were formed when seeds collected after August were cultured on MS medium or Hyponex medium at 20°C.
2. Many protocorms of *C. reflexa* were formed when seeds collected in around the end of September were cultured on Apple medium or Hyponex medium at 25°C.
3. Dark brown spheroidal bodies were formed from the embryos of *C. nipponica* and *C. reflexa* when they were cultured at the high temperature from the suitable condition, and the growth was prevented. It was shown by FDA staining that the spheroidal bodies were withering.
4. The obtained protocorms of *C. nipponica* and *C. reflexa* grew up to plantlets by the cultivation for one year, and the acclimatization of the plantlets was easy.