

# 無菌培養によるサギソウ増殖法の試み

西川友貴\*, 武田征士\*

Propagation of *Habenaria radiata* (Orchidaceae) using *in vitro* culture system

Yuki NISHIKAWA\*, Seiji TAKEDA\*

**要旨**：サギソウはシラサギが翼を広げた姿に似た花卉をもつ野生ランの一種であり、近年、生息地である湿地の減少や乱獲などが原因で絶滅の危機に瀕している。貴重な遺伝資源保護のためには、高い増殖効率が期待される種子からの培養が有効である。本研究では無菌培養による増殖法を検討するため、定義した生育ステージをもとに種子成長や球根の内部構造を観察するとともに、スクロース濃度による球根形成への影響や定植後の球根の成長について調査した。その結果、胚は播種後1ヶ月以内に仮根と第1葉を生じて成長し、約200日後に培地内に球根を形成した。球根の形成数は3.5%スクロース培地より2%の培地で多かった。培地内の球根は、土で栽培した球根と同様に芽や中心柱が確認され、培土への定植によって発芽し開花することが分かった。本研究結果から、サギソウは無菌培養により種子からの増殖が可能で、遺伝資源の保全技術として有用であることが示唆された。

(2017年9月29日受理)

## 1. はじめに

約25,000種が存在するラン科植物は、その半数以上が東南アジアや南アメリカに生息している (Dixon et al., 2003; 農業技術大系, 1998)。熱帯・亜熱帯地域には主に木や岩肌に張り付く着生ランが生息し、それらの地域から南北に離れるにつれて、地面に生える地生ランが主となる。このため、日本で見られる野生ランの多くは地生ランである (農業技術大系, 1998)。ランの花は3枚の萼片と3枚の花弁からなり、1枚の花弁は唇弁と呼ばれ、多様な色や形態を示す。花の中心部には雄ずいと雌ずいが融合したずい柱と呼ばれる柱状の生殖器官が存在する。このようなラン特有の花の構造はポリネーターである昆虫を色や形で誘引し、送粉の可能性を高めるために昆虫と共進化してきたと考えられている (農業技術大系, 1998)。

多様な進化を遂げてきたラン科植物には、コチョウランやデンドロビウムなどのように萼片と花弁が類似した形態をもつものがある一方で、サギソウ (*Habenaria radiata* (Thunb.) Spreng., Syn. *Pecteilis radiata* (Thunb.) Raf.) のように萼片と花弁の形態が明確に異なり、唇弁

が複雑な形態になるものがある (図1A)。サギソウは日本の本州、四国、九州のほかロシア、韓国、中国の湿地に生息する野生ランの一種であり、その純白の美しい姿から野生ランとしての人気が高く、古くから親しまれてきた。園芸書としては最古の文献とされる1681年発行の「花壇綱目」や1829年発行の「草木錦葉集」において、青葉や斑入りのサギソウが記載され (水野, 1681; 水野, 1829)、現代でもサギソウを題材にした童話や小説が数多く出版されている (岡田, 2004; くらだ, 2006; 竹田, 2001; なかむら・山本, 2007, 2008)。一方で、近年、サギソウは湿地の埋め立てや乱獲などが原因で野生個体が減少し、2017年の環境省レッドリストでは「準絶滅危惧種」に指定されている (環境省レッドリスト [維管束植物] 2017)。この貴重な遺伝資源を保護するためには、サギソウの効率的な増殖が必要である。

サギソウは球根と種子の両方で増殖が可能であるが、一般的には栽培の容易な球根が用いられる (木村, 1982; 立花・武田, 2016)。サギソウは8月頃に開花を迎え、その後、地下茎の先端に1株あたり2~3個の球根を作り増殖する (東京山野草会ラン・ユリ部会, 2002)。サギソウ地上部では、開花後に1つの子房あた

\* 京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻  
Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

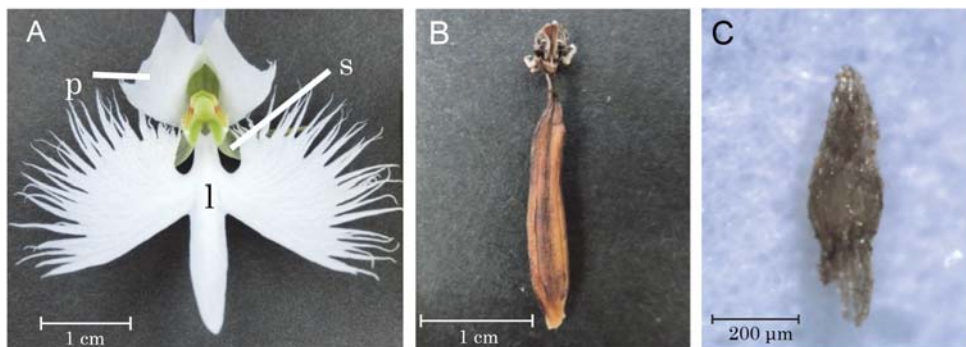


図1 サギソウの花, 子房, 種子の形態

- (A) 開花したサギソウ。s, sepal 萼片; p, petal 側花弁; l, lip 唇弁 Bar: 1 cm  
 (B) 成熟した子房。中に数千の無胚乳種子が入っている。 Bar: 1 cm  
 (C) 成熟種子。 Bar: 200 μm

り平均 3,000 個程度の種子が形成されることから (図 1B, C; 木村, 1982), 種子による増殖は球根を用いる場合に比べ非常に効率的な方法であると期待される。しかし, ラン科植物の種子は無胚乳種子で, 種子の成長に必要な養分は周辺のラン菌との共生により得る必要があり, 通常の栽培では実生の生育は困難とされていた (太田, 2012; 木村, 1982; 東京山野草会ラン・ユリ部会, 2002)。そこで, サギソウを大量増殖させることを目的とした無菌播種や組織培養に関する研究が行われ, 種子発芽や実生成長が可能であることが示されている (太田, 2012, 2013, 2015; 高橋・箱田, 1998; 高橋ら, 2012; Mitsukuri et al., 2009)。その一方で, サギソウの発芽後の胚成長の経時観察や培地内に形成される球根の組織観察を行った事例はほとんど報告されていない。

本研究では, 無菌培養を用いて, 定義した種子生育ステージをもとに種子成長や球根の内部構造を観察するとともに, スクロース濃度による球根形成への影響を調査することで, 無菌培養を用いたサギソウ増殖法の検討とその後の成長過程の観察を行った。

## 2. 材料と方法

### サギソウ系統

2015 年度に屋外で栽培した“東谷山” (愛知県) 系統から採集した成熟種子を, 室温のデシケーター (アズワン) 内で保存したものを無菌培養に使用した。比較のための球根は京都府生物資源研究センターのガラス温室内で自然光, 最低温度 10℃ 以上の条件で栽培したサギソウ青葉系 (タキイ種苗) の球根を実験材料として用いた。

### 無菌播種法

成熟種子を 60% (v/v) キッチンハイター (花王) に 10 分間浸して殺菌し, 続けて滅菌水を加え洗浄した。水面に浮いている種子を白金耳ですくい, 培地上に播種

した。

### 無菌培養を用いた種子生育ステージの測定

ガンボーク B5 培地 (日本製薬, 製造元コード: 399-00621) に 20 g/L のスクロース, 0.5 g/L の MES [2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸], B5 ビタミン (ミオイノシトール 100 mg/L, チアミン HCl 10 mg/L, ニコチン酸 1 mg/L, ピリドキシン HCl 1 mg/L) を加え, pH メーター (Beckman Coulter) を用いて pH を 5.7 ~ 5.8 に調整し, 10 g/L の寒天を加え 121℃, 20 分でオートクレーブを行った (培地 B5\_2SMA とする)。上記の方法で無菌播種を行い, 25 ~ 27℃, 16 時間明期, 8 時間暗期の光条件下で ACP-7 SBR010T-18 型 (島津理化) 内で培養した。播種後 35 日目まで 1 週間ごとにシャーレ内の種子生育ステージとその種子数を記録した。種子生育ステージの割合は (ステージごとの種子数/胚が存在する種子数) × 100 として算出した。

### 培地内の実生の育成と球根形成

ガンボーク B5 培地に 20 g/L のスクロース, B5 ビタミンを加え pH を 5.7 ~ 5.8 に調整し, 10 g/L の寒天を加え, 滅菌した培地 (培地 B5\_2SA) に無菌播種を行った。

(A) 播種後 36 日目のプロトコームを 0.5 g/L の MES を加えた培地 B5\_2SMA に 1 度継代し, 播種後 69 日経過した草丈約 5 mm までの実生をサンプルとして用いた。培養は 25 ~ 27℃, 16 時間明期, 8 時間暗期の光条件下の ACP-7 SBR010T-18 型 (島津理化) 内で行った。新たに寒天の代わりに 3.5 g/L のゲルライトを加えた培地 (培地 B5\_2SMG) とスクロース濃度のみが異なる 35 g/L の培地 (培地 B5\_3.5SMG) を作製し (pH: 5.7 ~ 5.8), スクロース濃度の異なる 2 処理区を設けた (図 2A)。1 個のプラントボックスあたりに実生を 3 個体ずつ継代し, 1 処理区あたり 3 個のプラントボックスを用意した。培養は 28 ~ 30℃, 16 時間明期, 8 時間暗期の光条件下で

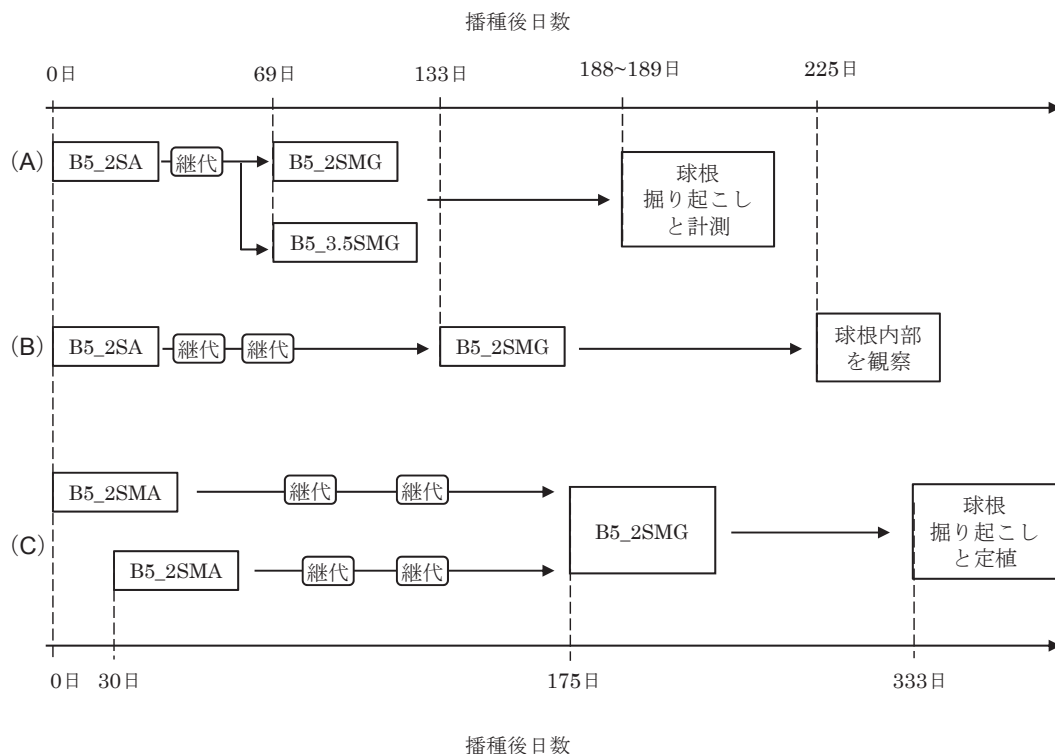


図2 培地と継代のフローチャート

[培地組成]

B5\_2SA: ガンボーグ B5 無機塩類, B5 ビタミン, 2%スクロース, 1%寒天

B5\_2SMA: ガンボーグ B5 無機塩類, B5 ビタミン, 2%スクロース, MES, 1%寒天

B5\_2SMG: ガンボーグ B5 無機塩類, B5 ビタミン, 2%スクロース, MES, 0.35%ゲルライト

B5\_3.5SMG: ガンボーグ B5 無機塩類, B5 ビタミン, 3.5%スクロース, MES, 0.35%ゲルライト

SANYO GROWTH CABINET MLR-350 (三洋電機) 内で行った。播種後 188 ~ 189 日まで観察を続けた後、球根を掘り起こし処理区ごとに球根数を計測した。

(B) 途中、播種時と同じ組成の培地に 1 度継代し、播種後 86 日目のプロトコームを培地 B5\_2SMA に継代した。播種後 133 日経過した実生は、引き続いてプラントボックス内の培地 B5\_2SMG に継代し、播種後 225 日に培地内に形成された球根をサンプルとして用いた (図 2B)。培養は 28 ~ 30℃, 16 時間明期, 8 時間暗期の光条件下で SANYO GROWTH CABINET MLR-350 (三洋電機) 内で行った。培地から掘り起こした球根を垂直方向に半分に切り、その縦断面の構造を観察した。さらに、縦断面で 1 ~ 2 mm の厚さになるように切り、5 倍に希釈したイソジンゲル [日局ポビドンヨード 70 mg/ml (有効ヨウ素 7 mg/ml), 明治製菓] を滴下し 10 分放置した後、デンプン粒の蓄積を観察した。

#### 培地内に形成された球根の定植

滅菌した培地 B5\_2SMA に完熟種子の無菌播種を行った。途中、同じ組成の培地に 2 度継代した。播種後 175 日経過した実生苗を、引き続いてプラントボックス内の培地 B5\_2SMG に継代した (図 2C)。培養は 28 ~ 30℃, 16 時間明期, 8 時間暗期の光条件下で SANYO GROWTH CABINET MLR-350 (三洋電機) 内で行った。播種後 333 日 (2017 年 4 月 21 日) に培地内に形成された球根を掘り起こし、ガラス温室内でニッピー園芸培土 1 号 (日本肥糧) の入ったプラスチックポット (口径: 13.5 cm, 深さ: 11 cm) へ 11 個ずつ 2 ポットに分けて定植した。最後に培土の表面に水苔 (コーナン商事, チリ産) をかぶせた。水やりは培土が乾燥しない程度に行い、その後の成長を観察した。

#### 顕微鏡観察

植物体や組織観察には実体顕微鏡 Leica ES2 (Leica) 及び Leica S8 APO (Leica), デンプン粒観察には生物

顕微鏡 Leica DM2500 (Leica) を使用した。写真は Leica S8 APO 付属の Leica EC3 (Leica) 及び Leica DM2500 付属の Leica DFC450 C (Leica) で撮影した。

### 3. 結果と考察

ラン科植物では種子が発芽すると、まず胚が膨らみプロトコームと呼ばれる球状の胚を形成し生育することが知られている。本実験では Stewart et al., (2002) における *Habenaria repens*, *H. quinqueveta*, *H. macroceratitis* の種子の生育ステージを観察に基づいて一部改変し、サギソウの種子生育ステージとして stage 0 ~ 4 を定義した。stage 0 では胚が種皮内にあり発芽していない状態 (図 3A), stage 1 では胚が膨らむ段階 (図 3B), stage 2 では仮根が種皮外へ伸長し発芽し始め (図 3C),

stage 3 ではプロトコームの頂点に突起状の葉原基が生じ (図 3D), stage 4 では第 1 葉が伸長する状態とした (図 3E)。そして、播種後 7 日ごとに生育ステージの変化を調査したところ、stage 1, 2 は播種 7 日後、stage 3 は播種 14 日後、stage 4 は播種 21 日後に現れ始めることが観察された (図 4)。しかし、発芽した種子の中には播種後 35 日が経過したにも関わらず stage 1, 2 の段階の胚が見られた。このことから、一部のプロトコームの生育が培養途中で停止したことが示唆され、実生へと成長するプロトコームの割合は発芽率よりも低いと考えられる。

次に、スクロース濃度 2% と太田, (2012) で無菌播種に用いられた 3.5% の培地における実生の生育を比較した。その結果、播種後 146 日が経過する頃には生育の差が現れはじめ、2% スクロース培地では多くの葉が緑

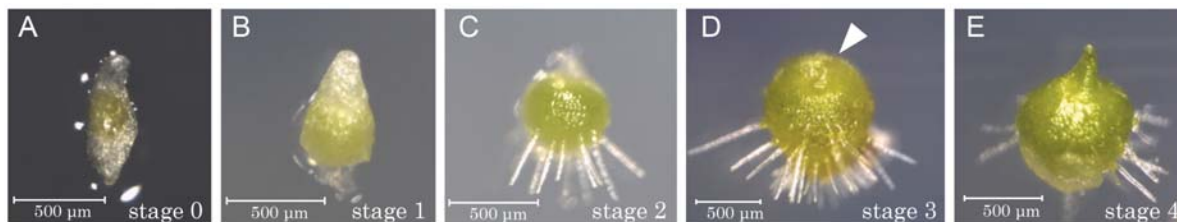


図 3 サギソウの種子生育ステージ

- (A) stage 0: 播種直後の発芽前種子。
- (B) stage 1: 胚が膨らむ。
- (C) stage 2: 仮根が種皮外へ伸長し発芽する。
- (D) stage 3: 葉原基 (白矢尻) が現れる。
- (E) stage 4: 第 1 葉が伸長する。 Bars: 500 µm

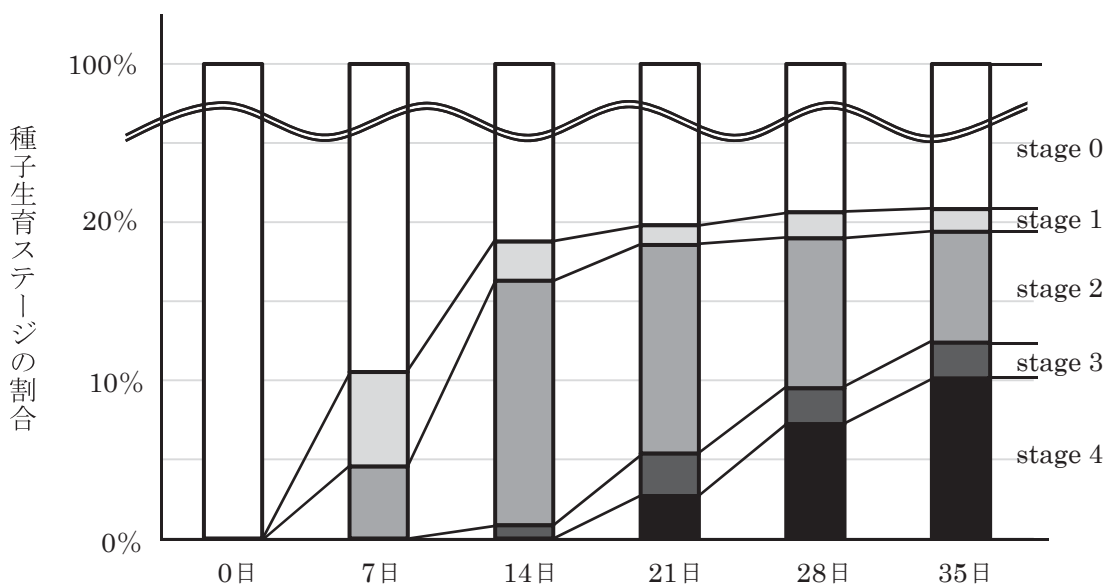


図 4 播種後日数の経過に伴う種子生育ステージの変化 種子数 = 485



色を維持していたのに対し, 3.5%スクロース培地では生育が不良で葉の黄化や枯死が観察された(図5A, C)。培養期間が長くなるにつれて元々透明であった培地が黒く変色し, 播種後174日では3.5%スクロース培地内で黒い変色がより広がることが確認された(図5B, D)。

培地の変色の原因は植物体から排出されたフェノール物質によるものと考えられる(Mitsukuri et al., 2009)。播種後188~189日の培地内の球根(図5E)の数を計測したところ, 1つのプラントボックスあたり2%スクロース培地では4~9個, 3.5%スクロース培地で

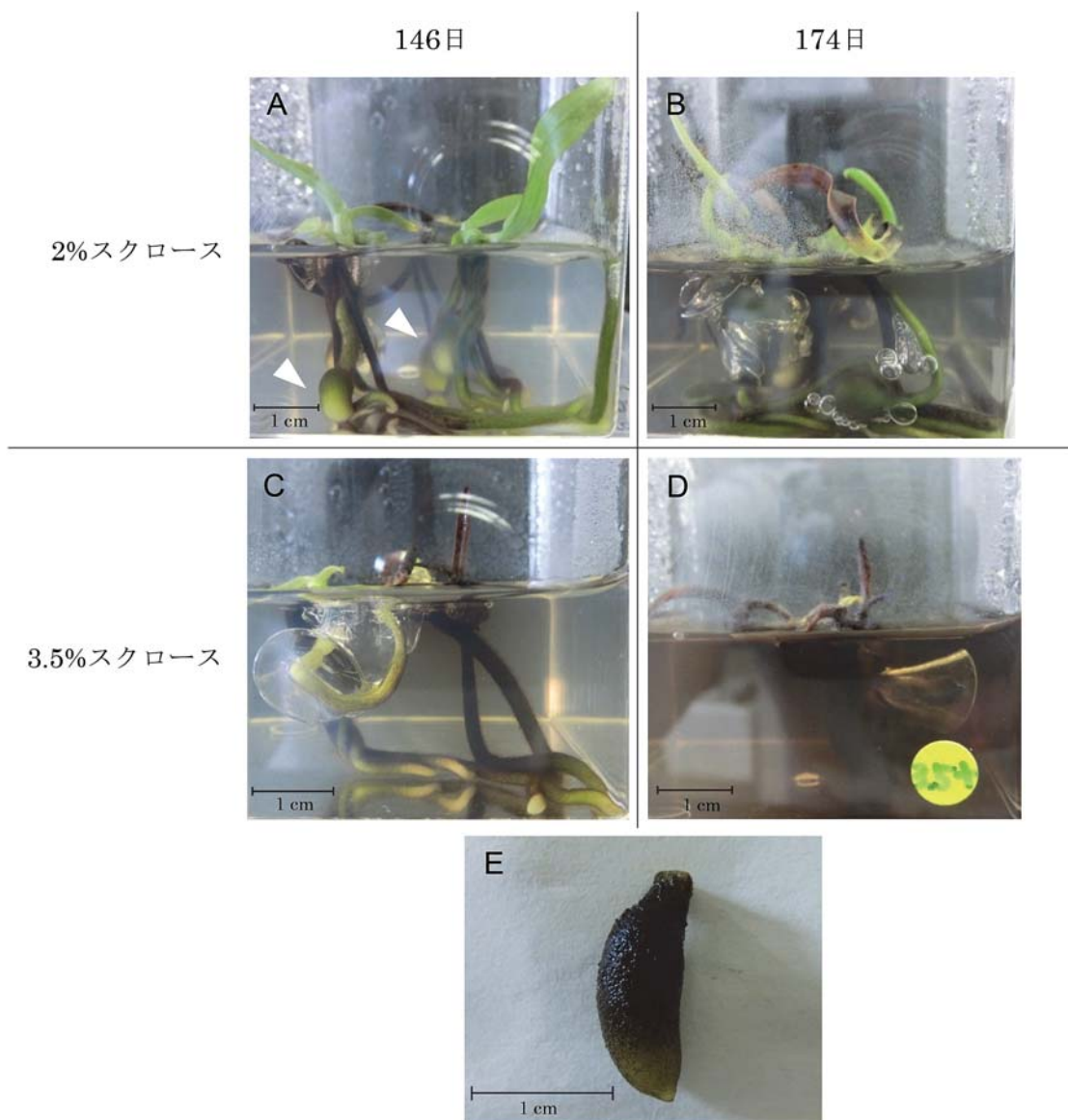


図5 異なるスクロース濃度の培地による実生苗の成長

(A, B) 2%スクロース培地の実生苗。

(C, D) 3.5%スクロース培地の実生苗。

(A, C) 播種後146日。(B, D) 播種後174日。

(E) 培地内に形成された球根。

白矢尻(A): 培地内に形成された球根。 Bars: 1 cm

は1~2個の球根を形成していた。これより、2%スクロース培地の方がサギソウ実生の培養に適していることが示唆された。MS培地を用いた場合においても、移植区の2%スクロース培地でより多くの球根が得られたことが報告されている(太田, 2013)。このことから、培地の種類を問わず、球根形成は低スクロース濃度で促進されると考えられる。

播種後225日には、培地内に形成された球根の表面には毛が生え、垂直方向に半分に切った球根の縦断面には中心柱と地上部の芽が観察された(図6A)。これはタキイ種苗の市販品種(図6C)やKumazawa, (1956)の球根縦断面の構造と一致した。さらに、球根内部のデンプンの存在を調べるために球根断面をイソジンで染色したところ、培地内の球根と市販品種の球根の両方で、中心柱以外の部分が紫色に染まり(図6B, D)、生物顕微鏡による観察でデンプン粒の蓄積が確認された(図6E)。これらのことから、無菌培養によって培地内に作られた球根は市販品種と同様に正常に作られ、球根内部にデンプンを蓄積し、芽の成長に必要な養分として利用されると考えられる。

無菌培養で作られた球根を培土に定植すると、約2ヶ月後には22個のうち4個が発芽し、さらに3ヶ月後にはそのうち1個体が蕾を形成し開花した(図6F)。これにより、種子の無菌培養から球根を経て世代を回すことが可能であることが示唆された。一方、球根が低い発芽率を示した原因として、プラントボックスへの継代時期が遅い、すなわち根がすでに伸長した実生を無理に継代したことにより、地上部や地下部の生育が十分ではないまま枯死したことが考えられる。*H. macroceratitis*の無菌培養では、短日条件(8時間明期, 16時間暗期)の条件の方が長日条件(16時間明期, 8時間暗期)に比べ球根数や球根重量が大きくなったことが報告されていることから(Stewart et al., 2006)、サギソウの培養でも短日条件でより多くの球根が形成される可能性がある。サギソウの無菌播種では、地上部が枯れ始め球根が形成されるまでに約6ヶ月の期間が必要であり、培養中には花成が誘導されなかったことから、自然界においても実生の世代はまず地下に球根を形成し、その球根が翌年に発芽することで世代が回ると考えられる。

本研究では、サギソウを種子から球根を経て開花させることに成功し、種子を用いた増殖が可能であることが示された。一方で、生育条件による種子の生育停滞や球根発芽率が低い結果となった。今後は、培地内の球根形成を促進するための適切な日長や植物ホルモンの添加、培養期間、植え替え時期などの条件についても検討することで、より効率的な増殖が可能になると期待される。

## 謝辞

供試材料であるサギソウの球根を分譲いただいた愛知

県の猿渡橋秀氏、無菌培養についてご指導いただいた本学細胞工学研究室の立花耕氏、ならびに研究助言をいただいた同研究室メンバーに感謝申し上げます。

## 引用文献

- 太田和子(2012)サギソウの無菌播種による増殖Ⅰ—培地の検討—, 岐阜女子大学紀要第41号
- 太田和子(2013)サギソウの無菌播種による増殖Ⅱ—培地のスクロース濃度の影響—, 岐阜女子大学紀要第42号
- 太田和子(2015)サギソウの無菌播種による増殖Ⅲ—順化について—, 岐阜女子大学紀要第44号
- 岡田純也(2004)サギソウのような女の子, KTC中央出版
- 環境省レッドリスト[維管束植物](2017) <http://www.env.go.jp/press/files/jp/105449.pdf>
- 木村なほ(1982)サギソウの観察と栽培(4版), ニュースサイエンス社
- くろだたけつぐ(2006)—湿原の小植物・水辺の幻想—サギソウものがたり, 新風舎
- 高橋和彦, 箱田直紀(1998)サギソウ青葉系および‘玉竜花’系のプロトコム期の生育に及ぼすラン菌根菌の影響, J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67(1): 112-115.
- 高橋和彦, 秦名俊光, 石川林, 荻原勲(2012)自生地のラン菌根菌を接種したゲル被覆サギソウプロトコム設置法によるサギソウの実生育成, Hort. Res. (Japan) 11(2): 213-217.
- 竹田道子(2001)さぎ草ものがたり, 神戸新聞総合出版センター
- 立花耕, 武田征士(2016)異なる土壌を用いたサギソウの栽培条件検討, 京都府立大学学術報告第68号: 1-5.
- 東京山野草会ラン・ユリ部会(2002)ふやして楽しむ野生ラン(5刷), 社団法人農山漁村文化協会, 29-34.
- なかむらふさこ, 山本えりこ(2007)サギソウの夏, 新風舎
- なかむらふさこ, 山本えりこ(2008)サギ草になったネコ, 株式会社文芸社
- 水野元勝(1681)花壇綱目
- 水野忠暁(1829)草木錦葉集
- 農業技術大系 花卉編12 ラン/サボテン/多肉植物/ハーブ類(1998)社団法人農山漁村文化協会, 5-8.
- Dixon, K. W., Kell, S. P., Barrett, R. L., Cribb, P. J.(2003) Orchid conservation. Natural History Publications: 1-24.
- Kumazawa, M. (1956) Morphology and Development of the Sinker in *Pecteilis radiata* (Orchidac.). 植物学雑誌 69(820-821): 455-461.
- Mitsukuri, K., Arita, T., Johkan, M., Yamasaki, S., Mishiba, K., Oda, M. (2009) Effects of Type of

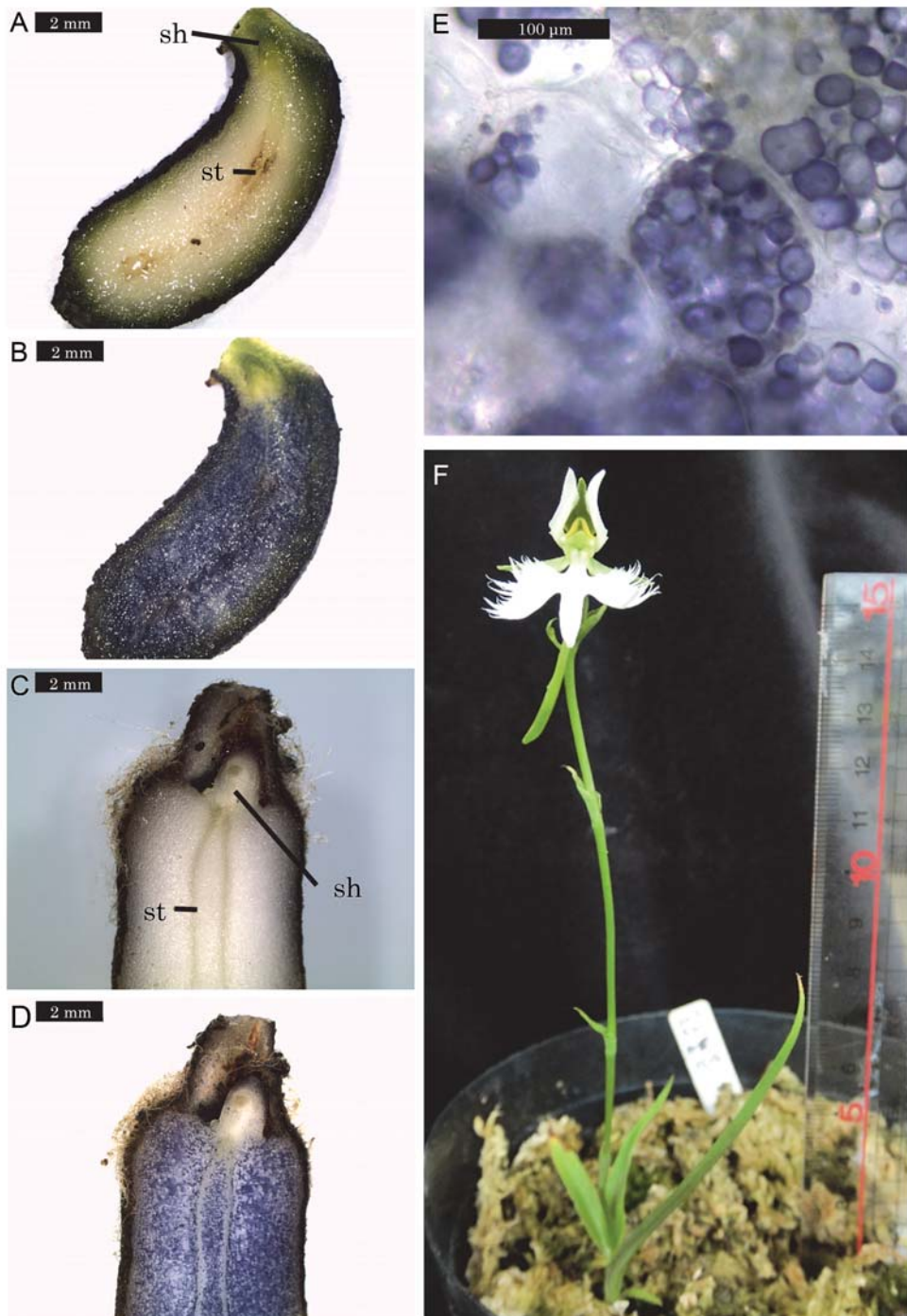


図6 球根内部の観察

(A, B) 培地内に形成された球根の縦断面。(B) 縦断面をイソジン染色したもの。

(C, D) 市販品種の球根の縦断面。(D) 縦断面をイソジン染色したもの。

st, stele 中心柱; sh, shoot 地上部 Bars: 2 mm

(E) イソジン染色されたデンプン粒。 Bar: 100  $\mu$ m

(F) 無菌培養で作られた球根から開花したサギソウ

- Explant and Dark Preconditioning on Bud Formation in *Habenaria radiata* (Thunb.) in Vitro. Hort Science 44 (2) : 523-525.
- Stewart, S. L., Zettler, L. W. (2002) Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. Aquatic Botany 72 : 25-35.
- Stewart, S. L., Kane, M. E. (2006) Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tiss Organ Cult 86 : 147-158.