

マヤランの増殖に関する研究 I 兵庫県西播磨で採取されたマヤランの無菌培養法による増殖

永吉 照人*・福岡 誠行**・三宅 慎也***・原田一二三****
高本 修*****・浜野 直樹*****

Properagation of a rare plant species, *Cymbidium nipponicum* (Franch.et Savat.) Makino I

Teruto Nagayoshi, Nobuyuki Fukuoka, Shinya Miyake, Hifumi Harada,
Osamu Takamoto, and Naoki Hamano

はじめに

マヤランは房総半島から琉球までの常緑林、竹やぶなどの林床に生えるラン科、シュンラン属の多年生無葉ランの一種である。葉の長さは1cmほど、鞘状で色は茶褐色であるが、地上茎はうす緑を呈し、明らかに葉緑素を持っている。その生育個体数は少なく、絶滅危急種（日本版レッドデータブック 1989）に、また兵庫県ではAランク（兵庫県版レッドデータブック 1995）に指定されている。1879年に神戸市の摩耶山で発見されたのでこの和名がつけられた。

現在、兵庫県西南部を流れる千種川水系に多目的ダム建設の準備が進められている。建設に先立ち、ダム水没地域及びその周辺地域の生物調査が行われた。そのときこのマヤランが兵庫県内では112年ぶりに発見された（松本・高本 1994）。マヤランの自生地はダム建設予定地内であり、この貴重な植物を保護・保存するためには移植の必要があった。しかし移植しても移植した場所で育つ保証はない。そこでこのランを絶滅から護る方法の一つとして移植前に培養の技術を駆使し、増殖を試みる事は一つの安全かつ有用な手段であると考えた。

培養技術を用いたマヤランの増殖には2つの方法が考えられる。

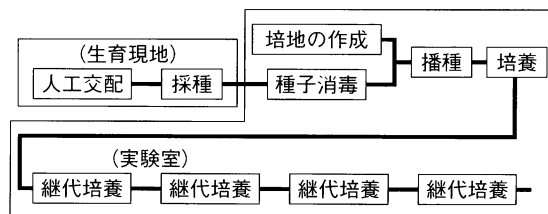
一つは組織を用いる方法である。マヤランは地下に根茎を発達させ、開花時には根茎から地上に花茎を伸ばし、その先端部に花を咲かせる。無葉ランなので葉片は得られないし、花茎も、1年に数本しか伸ばさないので得にくい。花茎が伸びてもそれは種子を得るために残しておきたい。地下の根茎を用いる事も考えられるが、表面の

凹凸がはげしいマヤランの根茎を完全に滅菌する事はほとんど不可能と思われる。従って組織を材料として増殖することは困難と考えた。

他の一つは、無菌播種による方法である。ラン科植物の種子は非常に小さく一般に胚乳がなく、また胚もほとんど発達していない。したがって発芽時に貯蔵養分がないのでランの種子発芽にはラン菌の助けが必要となる。マヤランも例外ではない。ところが、Knudson (1922, 1924)によって無菌発芽法が開発されて以来、多くのランについて無菌播種が試みられ、日本の野生ランについてもいくつかの発芽成功例が報告されている（青木1993）。マヤランについても水野ら(1991)による無菌発芽の報告がある。もし、無菌播種を行って繁殖に成功すれば、同じ果実内に実った種子であってもそれぞれの種子の遺伝子組成は少しずつ異なっていると考えられるので、クローン増殖である組織培養法による増殖と比較し、遺伝的多様性の保存の見地からも都合が良い。また、シンビジウムモザイクウイルスはデンドロビウムの種子を経由しては伝播しないという報告（Yuenら1979）もあり、この結果がマヤランにも当てはまるなら、たとえ親植物がウイルス病に感染していても種子を通しては伝染しないので好都合である。

そこで、西播磨に自生していたマヤランの無菌播種を試みたところ根茎が形成された。この根茎はさらに継代培養中に培養瓶の中で花茎を伸ばし、開花に至った。ここにその経過を報告する。

今回用いたマヤラン増殖の手順は下記のとおりである。



* 兵庫県立人と自然の博物館
** 須栄短期大学
*** 神戸市立森林植物園
**** 兵庫県企業庁都市整備局
***** (財)ダム技術センター
***** 兵庫県土木部竜野土木事務所

すなわち、自生地で人工交配して種子を実らせ、これを実験室に持ち帰り滅菌後培養瓶に無菌播種した。発芽した個体がピンセットで扱えるくらいの大きさの根茎に成長した後は数カ月ごとに継代培養を続けた。

1. 人工交配及び採種

a. 1992年の失敗例

1992年7月初旬に西播磨でマヤランの開花株を確認した。7月16日に自生地で2つの花茎に咲いている花3輪を用いて人工交配を行ったところ、その中の2輪（各花茎に1ヶ）では2週間後に子房が肥大しはじめた。授粉に成功したと思われるこれらの果実は花茎よりも緑色が濃くなり、徐々に大きさを増していった。ところが1つの果実は授粉35日後には枯死し、他の1つも授粉53日後に調査したときには果実は褐変し、裂けてしまい（もし稔実した種子が入っていたら）種子はすっかり飛散してしまっていた。

この年の8月初旬に、同じ場所で新たに数本の花茎が地上に現れて1ヶ月後には開花した。そのうちの1本の花茎の2輪を用いて9月14日に人工交配を行った。授粉2週間後には果実が膨らみ、緑色を増しているのが確認された。授粉1ヶ月後には果実は更に生長肥大しているようであった。種子の充実を計るため、出来るだけ採種を遅らし、気温が下がり始めた11月24日（授粉74日目）に果実を切りとり、実験室に持ち帰り切断したところ種子は色も形も大きさも全く未熟なものであり、播種を断念せざるを得なかった。

同様に11月中旬に咲いた花を用いて人工授粉を行ったが、果実の肥大もほとんど見られず、12月半ばには寒さのために花茎が枯死してしまった。

澤（私信）によるとマヤランが稔実するのはその年の第1回目に咲いた花だけだそうである。

b. 1993年の成功例

1993年3月22日に前年と同じ場所で、その年最初の花茎が地上に伸長しているのを確認した。その105日後にはこの花茎に3輪の花が咲き、第2の花茎にも1輪の花が咲いていた。このときが人工授粉するのに適期と思い、第1の花茎の3輪と第2の花茎の1輪合計4輪の花を自家授粉させた。

授粉15日後には、第1の花茎の第1花および第2花の果実が肥大していたが、第3花の果実は花茎から既に落下していた。第2の花茎の花は茶色に変化し、枯死寸前であった。

授粉36日後には、第1の花茎に残っていた第1花、第2花の果実のうち第2花の果実は落下しており、結局この年人工授粉した2本の花茎の4輪のうち第1の花茎の

第1花の果実のみが順調に生育していることになった。この果実は肥大充実しており、種子が来ていると思われた。

授粉50日後、果実はさらに肥大したように見えた。このとき果実の長さは4.5cm、最大巾は6mmに達していた。

その後、ほぼ1週間ごとに果実の生長を調査したが、外形は授粉50日後とほとんど変わりがなかった。

授粉83日後、果実の生育は既に停止しているが、やや果実の緑色が薄くなってきたので、果実ごと採集し兵庫県立人と自然の博物館（三田市）に持ち帰った。

長島（1976, 1977, 1978, 1979a, 1979b, 1980）の一連の報告によると、ラン科植物の種子の発芽能力は受粉後8~10日で発生するモジズリから200日以上必要とするカンランまで種によって差異がみられるが、マヤランは希少種のため実験されていない（長島・私信）。そこでマヤランと同じシュンラン属のシュンラン (*Cymbidium goeringii*) およびカンラン (*Cymbidium kanran*) を参考にすると、前者は98~110日、後者は220~230日と受粉後発芽能力をもつまでの日数は、他の属の種に比べて長い。ところがマヤランに関しては前年（1992年）、人工授粉を行ったときに授粉後51日目までは緑色を残していた果実が、授粉53日後には褐変裂開し、種子が飛散していた。この様なわけで、発芽力をまだ有していないかも知れないと懸念しながら上述のように授粉83日後に種子を採集することにした。

なお、1995年も同じ場所でマヤランは開花したので、人工交配したが、この年はまれにみる干ばつのため、生育肥大し始めた果実はその途中で花茎の基部から枯死してしまっただけで、1996年以降1998年まで、1995年の干ばつの為か地下のライゾームを誰かに掘り取られてしまったのか全く花茎を伸ばしていない。

2. 無菌播種および培養

a. 種子の滅菌

培養に用いる種子や組織の滅菌には70%アルコールやアンチフォルミン（次亜塩素酸ナトリウム溶液）が一般に用いられている。中村（1994）はツチアケビの種子滅菌にアンチフォルミンを用いると発芽に悪影響を及ぼすと報告しているが、本実験では直接種子を滅菌する方法を取らなかったため、取扱いの簡便な市販のアンチフォルミンを用いた。アンチフォルミンの処理濃度や70%アルコールおよびアンチフォルミンの処理時間が適切でなければ滅菌不十分の事もあり、逆に雑菌のみならず種子も死滅してしまう可能性がある。マヤランの種子が70%アルコールやアンチフォルミンを用いて処理したときにそれらの濃度や処理時間にどれだけ耐えられるか不明な

ので、果実にまだ緑色が残っている時に果実ごと滅菌（虫害や傷がなければ果実の中は無菌である）し、種子への悪影響を防いだ。処理時間は最初70%アルコール液で30秒間、滅菌水で水洗後約3%のアンチフォルミン溶液で10分間である。両溶液に浸漬したときには容器を数秒間はげしく揺り動かす事を数回繰り返した。

b. 培地の作成および培養容器

ラン科植物の種子発芽に関する培地の研究は市橋(1982)による詳しい報告があるが、今回は水野ら(1991)の結果を参考に、ハイボネクス培地(表1.)を用いた。これは、培地製作6カ月後でも効果は代わらない(長島1988)こと、また過去に報告の少ないラン科植物の無菌播種にはハイボネクス培地を用いるとよいとの長島の助言(長島私信)、これに加えて筆者らがサギソウ、トキソウなど他の野生ランの無菌播種にハイボネクス培地を用いて、好成績を得たからである(Nagayoshi et al. 1996)。なお、種子発芽用培地のpHは4.8-5.5の間に保たねばならない(Ardity, 1991)との説、あるいはいずれのランにおいても実生にはpH5.2~5.6がよい(長島1988)などの報告に基づき、本実験ではpHを5.5に調整した。

表1. ハイボネクス培地の組成

ハイボネクス(6.5-6-19/N-P-K)	3g
蔗糖	30g
寒天	10g
酵母エキスやペプトンなど	2g
蒸留水を加えて	1,000mlにする

*寒天を加える前に0.1N NaOHまたはHClを用いてpHを5.5に調整する

培養容器の大きさについて筆者らは、予備実験で大小の三角コルベン(100ml~1,000ml)、各種プラスチック容器(500ml円筒、600ml角など)、ガラス瓶(50ml~800ml)などを用いて比べたところ、播種後発芽までに長期間を要するマヤランの無菌播種実験には培地の乾燥が防げる800mlのマヨネーズ瓶が最適と解り、播種時に100mlの三角コルベンを併用した以外はすべて800mlのマヨネーズ瓶を用いた。これらの容器に上記培地をそれぞれ50ml~100mlずつ加え、オートクレーブで滅菌(121°C 20分)したものを冷却後用了。

c. 播種

播種前処理についてはカンランを用いた澤ら(1974)の報告があるが、今回は特別な播種前処理は行わなかった。

自生地で採種した9月27日当日、クリーンベンチ内で

滅菌したマヤランの果実をシャーレに取り出し、これを滅菌した眼科用のメスで斜めに切り、同じメスの先端を用いて種子を果実から取り出しながら6本の培養瓶に植え分けた。完熟したマヤランの種子は幾分褐色を帯びているが、このときに播種した種子はまだ白く、完熟前の状態と思われた。

d. 培養

播種を終えた培養瓶は水野の方法(1991)に従い、20°C暗黒下で培養した。

播種3ヶ月後には分裂を始めたと思われる種子もあった。播種1年後には直径1mm前後のプロトコームが現れ、それらの中のいくつかは順調に成長を続け根茎へと成長した。

中村(1994)は、ツチアケビを用いて、種子発芽用と幼植物成長用の培地の処方を変えて好結果を得ているが、本実験では両者とも同じ処方のハイボネクス培地(表1)を用いた。

数多くの種子がプロトコームを経て根茎へと生長したが、およそ播種16カ月経過したときに、突然コンタミネーションを生じ、生育中のプロトコームや根茎の大部分を失った。幸いにも13ケの根茎を救出する事が出来、これらの根茎をその後の継代培養に用いる事が出来た。

もっとも生育の早い個体(以後系統1とする)は播種2年2カ月後(1995年の11月)に培地中の根茎から花茎を伸ばし、その1カ月後には開花した。その後、この系統は次々と開花(少なくとも143ケの花)を続けている。

2番目に生育の早い個体(以後系統2とする)は系統1に比べ約1カ月遅れて最初の花茎を伸ばしたが、開花にはいたらなかった。系統2の最初の開花は播種2年6カ月後であった。この系統2も系統1と同じようにその後次々に開花(少なくとも33ケの花)している。

系統3~5は系統1および2に比べて生育が遅く、開花までに4年を要した。系統6は根茎は大きく生育しているが、まだ開花に至っていない。系統7~13は根茎がまだ小豆大にまでしか生長していない。

現在系統1は94本の培養瓶に、系統2は40本の培養瓶に継代培養されている。また、系統3~6はそれぞれ13本、3本、12本、10本の培養瓶に継代培養されている。

おわりに

ラン科植物の種子は一般に非常に小さい。しかし一度種子が捻れば、一つの果実から数千、数万の種子が得られる。したがって発芽させる方法さえ見つかれば、多数の個体が一度に得られる可能性が大である。

今回の無菌播種法によるマヤラン増殖の試みは途中でコンタミネーションに見舞われた。その結果7系統の根

茎から増殖したことになるが、現在培養瓶の数は170本を越え、それらの中で兵庫県産マヤランの根茎は生育中である。したがって現在までの経過より判断し、マヤラン増殖についての第1段階は突破出来たと考えている。将来の自生地への復元を見据えて、現在これらの根茎を用いて野外での栽培に挑戦中である。また、新たに別の地域で発見されたマヤラン自生地でも得られた種子を用いて発芽を試みているが、現在数千ケのプロトコームが培養瓶の中で生育中である。

本研究の上述の成果は、自生地調査を行った植物分類学者、県の行政担当者（土木部）、植物の保全に係わる者の連携プレーによる貴重な植物保護の成功例の1つであると自負している。

この研究を進めるに当たり株式会社建設技術研究所より研究費の助成を受けた。また、兵庫県土木部河川開発課をはじめ、多くの方々のお世話になった。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 青木哲哉. 1993. 日本野生蘭の無菌培養. Orchids. No. 32:48-49.
- Arditti, J. Orchid Biology. 1991. 日本語訳 市橋正一編集 ランの生物学 I, 84-85. 誠文堂新光社, 東京.
- 兵庫県環境管理課. 1995. 兵庫県の貴重な自然—兵庫県版レッドデータブック—, 286pp. 兵庫県, 兵庫県.
- 市橋正一. 1982. ラン科植物の発芽に関する研究 (第10報). 園芸学会昭和57年春期大会講演要旨集, 294-295.
- Knudson, L. 1922 Non symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz., 73:1-25.
- Knudson, L. 1924 Further obserbations of non symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz., 77:212-219.
- 松本幸男・高本修. 1994. 金出地ダム自然環境保全への取り組みについて. ダム技術, 93:52-60.
- 水野直美・楡山一郎・樋口春三. 1991. マヤランの無菌培養と試験管内開花, 結実. Proceedings of NIOC'91, Nagoya. 145.
- 長島時子. 1976. シランの種子形成および発芽に関する実験. 園芸学会昭和51年度春期大会講演要旨集, 268-269.
- . 1977. エビネの種子形成および発芽に関する実験. 園芸学会昭和52年度春期大会講演要旨集, 380-381.
- . 1978. シュンランの種子形成および発芽に関する研究. 園芸学会昭和53年度春期大会講演要旨集, 323-333.
- . 1979. キエビネの種子形成および発芽に関する研究.

- 園芸学会昭和54年度春期大会講演要旨集, 276-277.
- . 1979. 二, 三のらん科植物の種子形成および発芽に関する研究. 恵泉女子大学 英文科・園芸生活科 研究紀要, 第12号 77-111.
- . 1980. エビネ属数種 シベリペジュウムおよびコチウランの種子形成および発芽に関する研究. 園芸学会昭和55年度秋期大会講演要旨集, 306-307.
- . 1988. ラン科種子の無菌培養—播種—. 自然と野生ラン, 3:82-85.
- Nagayoshi, T., Hatanaka, T. and Suzuki, T. 1996. Seed propagation of *Habenaria radiata*. Morphological and Physiological Characteristics of Plants derived from in vitro Cultured Seedlings. Nature and Human Activities, 1:67-81.
- 中村信一. 1994. 無葉緑ラン, ツチアケビの無菌培養—種子発芽が栄養生長まで—. ラン懇話会誌, No. 9: 1-13.
- 澤 完・難波道子. 1974. カンランの種子発芽に関する研究. 園芸学会昭和49年秋期大会講演要旨集, 328-329.
- 我が国における保護上重要な植物種及び群落に関する研究委員会種分科会. 1989. 我が国における保護上重要な植物の現状. 日本自然保護協会. 320pp. 東京.
- Yuen, C. K. K., H. Kamemoto, and M. Ishi. 1979. Transmission of *Cymbidium* mosaic virus through seed propagation in *Dendrobium*. Amer. Orchid Soc. Bull, 48:1245-1247.

写真説明

- A: 自生地で花茎を地上に現したマヤラン
 B: 地上に姿を現してから86日目のマヤランの花茎
 C: 自生地で開花したマヤラン
 D: 人工受粉後36日目のマヤランの果実
 E: 粟粒大に生長したマヤランの根茎 (矢印)
 (播種後1年経過)
 F: 培養瓶の中で花茎を伸ばしたマヤランの根茎
 G: 培養瓶の中で開花したマヤラン
 H: 培養瓶の中で開花したマヤラン (花茎の長さ約10cm)
 (いずれも兵庫県産のマヤランである)

