



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	無菌培養法および共生発芽法で得られたレブンアツモリソウ植物体の鉢上げとその後の生育について
Author(s)	永谷, 工; NAGATANI, Kou; 志村, 華子 他
Citation	北海道大学大学院農学研究科邦文紀要, 28(1), 121-131
Issue Date	2006-02-27
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/8283">https://hdl.handle.net/2115/8283</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	28(1)_3.pdf



## 無菌培養法および共生発芽法で得られたレブンアツモリソウ 植物体の鉢上げとその後の生育について

永谷 工<sup>1</sup>, 志村 華子<sup>2</sup>, 松浦 真弓<sup>2</sup>, 幸田 泰則<sup>1</sup>

(1 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター・植物園, 2 北海道大学大学院農学研究科)

### Acclimation and Potting of Micro-propagated Seedlings of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* obtained from Aseptic Culture and Symbiotic Germination, and Maintenance of the Potted Plants

Kou NAGATANI<sup>1</sup>, Hanako SHIMURA<sup>2</sup>, Mayumi MATSUURA<sup>2</sup> and Yasunori KODA<sup>1</sup>

(1. Botanic Garden, Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University

2. Department of Crop Physiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

#### 緒 言

レブンアツモリソウは北海道礼文島のみで自生する *Cypripedium* 属の多年生地生ランである。成熟した個体では5月初旬に出芽して4枚以上の葉を展開し、6月初旬に白色の大型の花を咲かせる。形態的にこれと類似するアツモリソウは赤紫色の花を着け、礼文島以外にも北海道本島および本州北部に分布している。両者は遺伝的に近接していることが知られている<sup>1)</sup>。レブンアツモリソウではマルハナバチ類が花粉塊を運んで他家受粉させ、十数パーセント程度の花が結実する<sup>2)</sup>。一果実当たり数万粒の微細な種子(重さ数  $\mu\text{g}$ )が作られ、8月下旬に成熟・乾燥して裂開し、種子は風で散布される。親植物の地上部は9月末には枯れ上がり、茎の基部に形成された休眠芽と貯蔵デンプンを含む直径約1.5 mmほどの多数の根が翌年の春まで休眠する。散布された種子は冬の低温により休眠から覚醒する。春の休眠覚醒時の種子に共生能を持つ特定の *Rhizoctonia* 属菌が感染すると、菌糸を栄養として種子は発芽する<sup>3)</sup>。

北半球の温帯から亜寒帯にかけて広く分布する *Cypripedium* 属の中には、美しい花を付けるため、自生地での過剰採取によって絶滅の危機に瀕している種が多い。レブンアツモリソウも園芸的な価値が非常に高く、古くから採取され続けており自生地の数やその規模は大きく減少

してしまった。平成8年には「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律(平成4年6月5日, 法律第75号, 通称, 種の保存法)」の「国内希少野生動植物種」に指定され、原生地での採取が禁止されると共に営利目的の増殖事業には届け出が必要になった。また開花期には北海道, 林野庁北海道森林管理局および地元の礼文町が合同で監視活動を行っているが, 未だに散発的な盗掘が絶えない。また自生地の自然遷移によるトドマツの増加, ススキなどの高茎草本やササの増加, あるいは送粉昆虫の減少等もレブンアツモリソウの圧迫要因になりつつある。更に自生地に人為的に植えられたと思われるカラフトアツモリソウとの自然交雑個体も増え始めており<sup>4)</sup>, このまま放置すれば自生地におけるレブンアツモリソウの遺伝的安定性が損なわれる可能性が高い。

特定の動植物種の保存を計るためには, その種の生存と増殖に及ぼす様々な物理的あるいは生物的要因を究明し, それを元にした生育環境の保全がなされなくてはならない。しかし, 現実問題としては人為的要因も含めた様々な障害がそれを妨げている。例えばカラフトアツモリソウに関してはそれが礼文島の固有種であると主張するグループがあり<sup>5)</sup>, 除去の妨げとなっている。固有種か否かを論議している間にも, カラフトアツモリソウの花粉塊を背負ったマルハナバチが飛び回り, 雑種個体が増加する恐れ

がある。このように現実問題として種の保存が危ぶまれている場合は遺伝形質の保存と緊急避難のために、自生地以外での育成を可能にする人工的な増殖法の研究が重要となってくる。また、そのような研究の副産物として園芸・鑑賞目的の安価な増殖品を流通させることができれば、営利目的の不法な盗掘は減少するであろう。

我々は先に発芽種子由来のプロトコム様体を用いた無菌培養によるレブンアツモリソウの大量増殖法を確立した<sup>6)</sup>。組織培養による増殖の際には突然変異（ソマクローナルミュートーション）が起こる確率が高いことが知られている<sup>7)</sup>。したがって、この方法で得られた個体は自生地への植戻しには適さず、市販価格を下げるために専ら園芸用として用いるべきであろう。また我々は完熟した種子と共生菌を用いた共生発芽法も確立した<sup>3)</sup>。この方法は自然界での発芽を真似たものであり、突然変異が生ずる確率は自然界と同様に低いはずである。したがってこの方法で得られた個体は、失われた原生地の回復や自生地への植戻しに用いることができるものと思われる。

無菌培養や共生発芽により人為的に得られた個体は特殊な環境下で育成されたものであり、これを野外で栽培するためには外に出して自然環境に順応させなければならない。しかし、一般に培養個体の鉢上げは困難であり、園芸家の間では鉢上げ後の枯死率が高いことが知られている。また無菌培養個体と共生発芽個体では適切な管理法が異なる可能性もあるが、アツモリソウ属では共生発芽のそのものの成功例が無かったため、そのような研究は全くなされていなかった。本研究では無菌培養個体と共生発芽個体の鉢上げ後の生育に及ぼす諸要因について検討し、それらの適切な管理法の確立を目指した。

## 材料および方法

### 1) 植物体育成法および馴化法

完熟種子由来のプロトコム様体 (PLB) を経由して増殖した無菌培養個体<sup>6)</sup>と、共生菌を用いた共生発芽法により得られた個体<sup>3)</sup>を実験に使用した。これらの培養方法の概略は下記の

通りである。これらの方法で得られた個体をそれぞれ無菌培養苗および共生発芽苗と呼ぶことにする。

a) 無菌培養法<sup>6)</sup>；完熟種子を実効塩素濃度 0.4% 次亜塩素酸ナトリウム溶液中で 30 分表面殺菌し、 $1\mu\text{M}$  ベンチルアデニンおよび  $1\mu\text{M}$  ナフタレン酢酸を添加したハイポネックス・ペプトン (HP) 培地に播種した。これらの種子を  $4^\circ\text{C}$  暗所で 3 ヶ月置き、休眠を打破した後、 $20^\circ\text{C}$  暗所に移し 7 ヶ月間培養した。種子から生じた PLB は 3 ヶ月毎に継代培養を繰り返し、増殖を図った。PLB をホルモン無添加培地に移植すると 3 ヶ月後に多くの根が発生し、7 ヶ月後には根の基部からシュートが発生した。

b) 共生発芽法<sup>3)</sup>；完熟種子を上述の方法で表面殺菌後、0.2% オートミール培地に播種した。これらの種子はまず  $20^\circ\text{C}$  暗所に 4 週間、次いで  $4^\circ\text{C}$  暗所に 12 週間置いた後、培地に共生菌 (WO-97 株) を接種し  $20^\circ\text{C}$  暗所に戻した。接種後 16 週間で最大 30% 程の種子が発芽しプロトコムが形成された。しかしそのまま培養を続けた場合は、プロトコムの生長が停止し褐変枯死が生じ始めた。そこでプロトコムの生長促進と褐変枯死防止のため、形成されたプロトコムを  $17\mu\text{M}$  ベノミル (殺菌剤) を含む 1/2 HP 培地<sup>6)</sup> に移植した。プロトコムは順調に生育し 10 週間後にはシュートが形成された。

無菌培養苗ではシュートの長さが 1 cm 程になったもの、また共生発芽苗ではシュートの長さが 5 mm 程になったのものを選抜し、根とシュートを十分に水洗して培地を除去した。次にこれらを蒸留水で湿らせたパーミキュライトを含む 300 ml 容プラスチックボトルに 2~3 株ずつ入れて蓋をし、 $10^\circ\text{C}$  暗所で 1 ヶ月間予冷した後、 $4^\circ\text{C}$  暗所に 4 ヶ月間置いて、外部環境に馴化させると共に、シュートの休眠を打破した。

### 2) 鉢上げ法

鉢上げは次のような手順でおこなった。まず駄温鉢 (3号, 径 9 cm, 高さ 8 cm) の底にネットを敷き少量のゴロ石を入れた。その上に赤玉土 (径 4~7 mm) と火山礫 (径 3~6 mm) を 1:2 の割合で混合した植え込み用土を入れ、低

温処理を行った苗を根を広げるようにして2-3 cmの深さに植え込んだ。苗のシュート部分はパーライトで埋め、最後にコケ類などの繁茂を防ぐために土壌表面を軽石で覆った。鉢上げ後は北海道大学植物園内にある建物の西側に隣接した屋外の棚(高さ80 cm)の上で育成した。灌水は一日2回行い、用土の表面が常に適度に湿っている状態に保った。施肥は千倍に希釈したハイポネックスを月1回灌水することにより行った。また、6月半ばから9月下旬に地上部のシュートが枯れ上がるまで、寒冷紗を用いて40~60%の遮光を行った。

### 3) 鉢上げ後の観察

鉢上げした苗の成長を、鉢上げ日からおよそ30週間にわたって毎週観察した。植物体が地表へ現れることを「出芽」とし、出芽した日から、植物体の地上部が完全に枯れ上がる日までの期間を「シュート生存期間」とした。その間、植物体の地上部の高さを測定した。

無菌培養苗の鉢上げは2001年から2003年までは3月から9月にわたって行い、2004年は4月と5月に行った。鉢上げした株の総数は582株であった。また共生発芽苗の鉢上げは2003年と2004年の3月から5月に行い、総数は104株であった。

### 4) 越冬方法

予備実験では鉢を地面に並べ、放置して降雪を待ち、そのまま越冬させることを試みた。しかし翌年に出芽するものはなく、根も全てが褐変し枯死していた。この枯死は鉢の内部の急激な凍結によるものと思われた。そこで、本実験では10月下旬に地面に並べた鉢を枯葉で5 cmほどの厚さに覆った。春の融雪後に枯葉を取り除いて棚に並べた。この方法によって、越冬時の凍結が直接の原因と思われる枯死はほぼ防止できた。翌春にシュートが地上に現れた時点で越冬に成功したものと見なした。また植物体は2年に一度、早春に植え替え、その際に地下部が生き残っているかどうかを確認した。健全個体の根はほとんどが乳白色であり、枯死したものは黒褐色であった。

## 実験結果

### 1) 鉢上げ時期が苗の成長と越冬に及ぼす影響

まず無菌培養苗を2001年から2003年の3月から7月に渡って鉢上げし、鉢上げの時期が苗の成長とその後の越冬に及ぼす影響について検討した。表1に示したように、いずれの月に鉢上げした苗でも、60%以上が出芽し葉を展開した。鉢上げから出芽までに要した期間は最大で4週間であった。これらの出芽した個体のうち、次年度まで無事越冬できた個体の割合を年度別に図1に示した。2001年5月に鉢上げした個体では80%近くが次年度まで越冬したが、他の月に鉢上げしたものでは越冬率は大きく減少した。また越冬率には大きな年次変動が見られ、2002年および2003年に鉢上げした株の越冬率は低いものであった。3カ年を平均すると4月と5月に鉢上げした個体の越冬率がもっとも高く30%以上であった。一年目の冬を無事越した個体では、そのほぼ全てが二度目の越冬にも成功しその後も順調に生育した。

表1 無菌培養苗の鉢上げ月が出芽率に及ぼす影響

年次	出芽率 % (鉢上げ苗数)				
	3月	4月	5月	6月	7月
2001	69 (29)	89 (28)	92 (12)	82 (11)	100 (13)
2002	94 (32)	60 (40)	88 (40)	86 (21)	67 (21)
2003	83 (35)	74 (38)	86 (44)	83 (24)	83 (24)

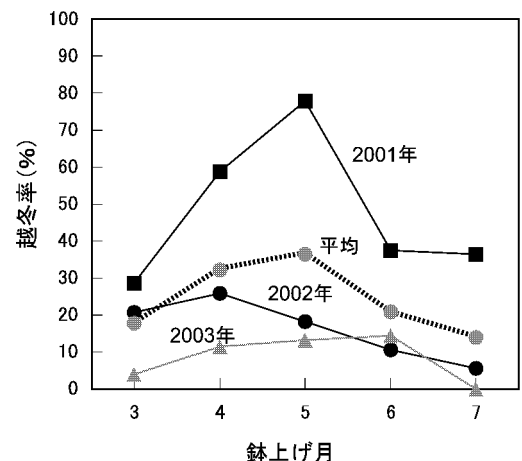


図1 無菌培養苗の鉢上げ月が次年度までの越冬率に及ぼす影響

## 2) 株毎のシュート生存期間の推移

次に2002年4月および5月に鉢上げした無菌培養苗80株を用いて、株毎のシュート生存期間（出芽から地上部枯死までのシュートが展開している期間）の推移を3カ年にわたって調べた（図2）。鉢上げ初年度（2002年）のシュートの生存期間は1週間から23週間まできわめて大きなばらつきが見られた。シュート生存期間が15週間に満たなかった55株はその全てが越冬後の2003年には出芽せず、2004年度には1株を除いて地下部の枯死が確認された。初年度のシュート生育期間が15週を越えた25株のうち16株（64%）は越冬後の2003年度も15週間以上シュートを展開し順調に生育した。またそれらのうち1株を除いて、他は全てが2004年度も順調に生育した（図2、Type A）。興味深いことに、2002年度は全くシュートを出さなかった1株が次年度からは順調に生育する例も見られた（Type B）。また2002年度に18週間以上シュートを展開した2株は、2003年度はシュートを全く展開せず、2004年になってシュートの生育を再開した（Type C）。

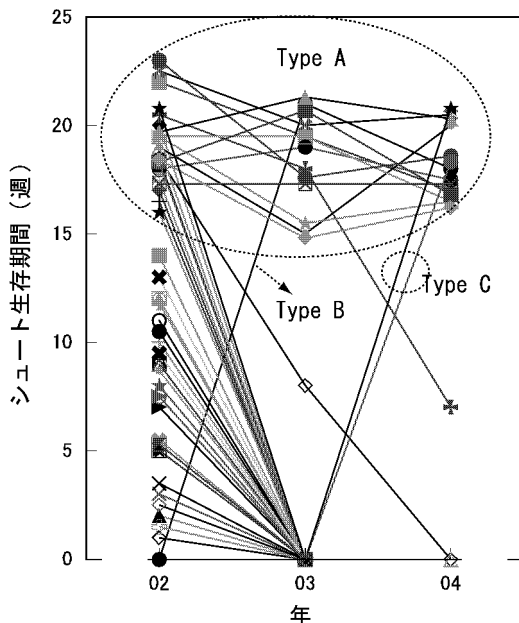


図2 鉢上げした無菌培養苗の3カ年にわたるシュート生存期間の推移 2002年4月および5月に鉢上げした80株を観察した。

2002年に鉢上げしたこれら80株のうち、15株は順調に生育を続けた。それらの2005年度までの草丈の変化を図3に示した。草丈増加速度は緩慢であり、個体差が極めて大きく、中には越年することによりかえって草丈が減少するものも見られた。草丈の平均値もわずかに増加しているに過ぎなかった。これらの15株のうち、2005年度夏の時点で葉を2枚展開しているものが3株、3枚のものが10株、4枚のものが2株であった。

## 3) 苗の増殖法がシュート生存期間および越冬率に及ぼす影響

共生発芽によって得られた苗は、2003年度から鉢上げ可能なサイズに達した。そこで2004年度は、3月から5月に鉢上げした共生発芽苗57株および無菌培養苗71株を用いて、苗の増殖法がシュート生存期間および越冬率に及ぼす影響について検討した。培養法に関わらず鉢上げ後4週目から一斉にシュートの出芽が見られた。図4にシュート生存期間の分布を示した。鉢上げ後に出芽に失敗し枯死したものは無菌培養苗で9.9%、共生発芽苗で1.8%であった。無菌培養苗ではシュート生存期間が1週間から23週間まで大きなばらつきが差見られ、短期間でシュートが枯れてしまうものも多く見られた。前述のように15週間以上シュートを展開し次年度への越冬が期待できるものは58%に過ぎなかった。一方、共生発芽苗では出芽後も長期間にわたって順調にシュートを展開し続けるも

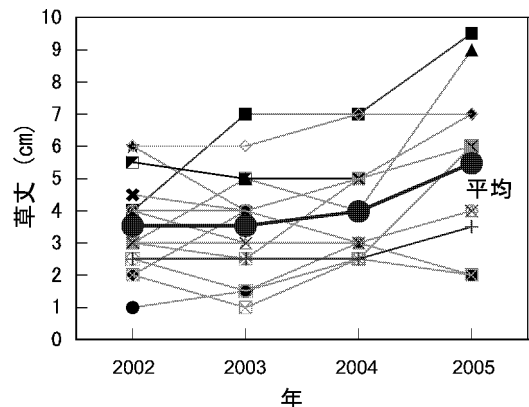


図3 定着した15株の無菌培養個体の草丈の経年変化

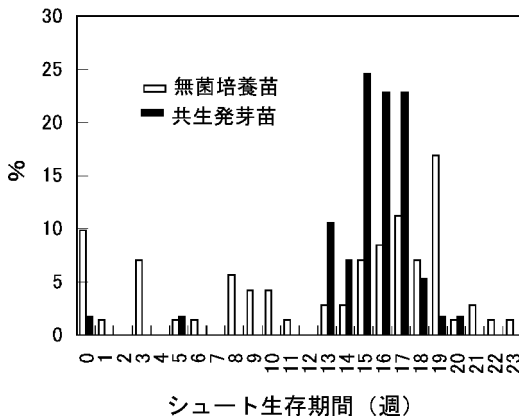


図4 3月から5月に鉢上げした無菌培養苗と共生発芽苗のシュート生存期間の比較

のが多く、シュート生存期間は13週間から20週間に集中しており、79%が15週間以上シュートを展開できた。実際に次年度(2005年)まで越冬し無事出芽できたものは、無菌培養苗が43%、共生発芽苗では73%であった。

#### 4) 鉢上げ時の苗の生重がシュートの生存期間に及ぼす影響

無菌培養法では再生した個体を新しい培地に植え替えながら長期間培養することにより、大苗を得ることができる。しかし共生発芽法では発芽個体の成長は極めて緩慢であり、大苗を得ることは困難である。一般的には鉢上げ時の苗のサイズが大きいほど、その後の生育は順調であると期待できる。そこで図4で用いた株を鉢上げする際に、苗の生重を測定し、鉢上げ時の苗の生重がシュート生存期間にどのように影響するかを検討した。無菌培養苗では生重が1gを越すものもあったが、共生発芽苗はほとんどが1g未満であった。(図5)。培養法に関わらず苗の生重とシュート生存期間の相関関係は全く認められなかった。

#### 5) シュート出芽日の分布

2002年から2003年は62株が、また2003年から2004年は104株が越冬に成功した。これら越冬苗の出芽日の分布を図6に示した。両年とも4月下旬から5月下旬の4週間に

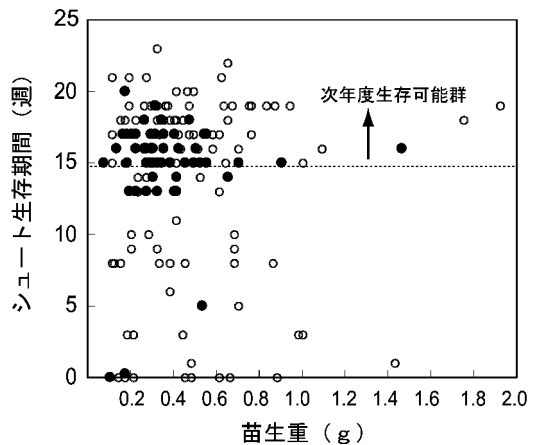


図5 鉢上げ時の苗の生重とシュート生存期間の関係 ○, 無菌培養苗; ●, 共生発芽苗。

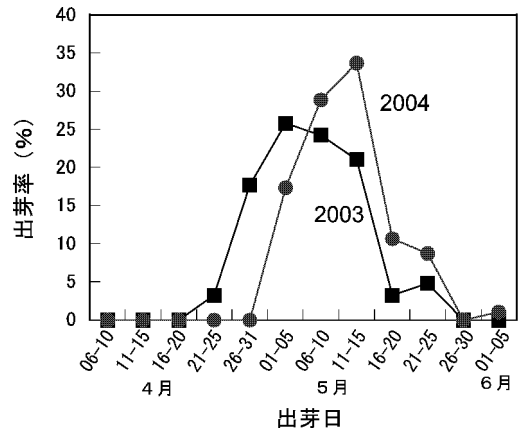


図6 越冬に成功したレブニアツモリソウ苗の出芽日の分布  
2003年, 計62株; 2004年, 計104株。

### 考 察

無菌培養苗の鉢上げをどの月に行っても、60%以上の出芽が見られ、鉢上げ月と出芽率の間に有意な関係は認められなかった(表1)。しかし次年度までの越冬に成功した個体は、4月から5月に鉢上げしたものに多かった(図1)。図6に示したように、札幌(北大植物園)においては、越冬に成功したレブニアツモリソウの出芽は4月下旬から5月上旬に集中している。人工増殖した苗を鉢上げする際もこの時期に出芽できるように12月に馴化を開始し、遅くとも5月上旬までに鉢上げすれば、次年度までの越冬

成功率は高まるものと思われる。図2から明らかのように、越冬に成功するためには15週間以上シュートを展開する必要があるが、この時期に鉢上げした場合は、秋にシュートが枯れるまでの間に十分に15週間以上のシュート生存期間が確保できる。4月あるいは5月に鉢上げした場合でも越冬成功率には10%から80%まで大きな年次差が見られた(図1)。また図には示されていないが2004年度の同期間に鉢上げした株の越冬成功率は43%であり、2001~2003年までの3カ年の平均に近い値であった。初年度(2001年)に鉢上げした株の越冬成功率が高かったのは、それまで形成された多くの無菌培養個体群から、生育の良好な個体を選抜したためであると考えられる。次年度(2002年)からは、そのような選抜を行わなかったため、越冬成功率が減少したものと推察される。

無菌培養苗を鉢上げした場合、初年度のシュート生存期間には非常に大きなばらつきが見られた(図2, 図5)。プラスチック内で無菌的に培養されていた苗は極めて安定した環境下におかれていたため全く淘汰を受けておらず、屋外の生育環境には適応できないような虚弱な株が多く含まれていたものと思われる。シュートの生育期間と次年度までの越冬成功率の間には明確な関係が認められ(図2)、15週間以上シュートを展開できなかった株では98%が越冬できず枯死してしまった。光合成産物を十分に根に蓄えることができず、越冬に失敗したものと思われる。鉢上げから2年目以降も15週間以上のシュートを展開できた株は全てが翌年も順調に生育した。一方、図2のタイプBやCのように、ある年はシュートを全く展開しなかったにも関わらず、その翌年にシュートを生育させる株も見られた。北米に分布する *Cypripedium reginae* などの地生ランでは、地下部の芽が一年間以上休眠することが知られている<sup>8)</sup>。礼文島の自生地においても同様なことが観察されており、本研究からもレブンアツモリソウが長期間休眠する可能性があることが確認された。

鉢上げ後順調に越冬し生育した株でも、その草丈の増加は極めて緩慢であり、また個体差も大きいものであった(図3)。平均値から見ると、

草丈の増加速度は徐々に速くなっているように見える。年間の光合成産物の蓄積量が次第に増加し、加速度的に生育量が増加するものと期待される。2005年度では葉を3枚以上展開している個体が多かった。自生地での観察によれば、葉が3枚以上になると開花する株が見られ始め、4枚以上では半数以上の株が開花できるようになる。2006年度には何株かが開花するものと期待される。

無菌培養苗ではその多くが初年度の越冬に失敗し枯死したが(図2)、共生発芽苗ではほとんどの株が15週間以上シュートを展開し(図4)、70%以上が次年度まで越冬した。使用した共生発芽苗は発芽後に、殺菌剤であるベノミルを17  $\mu\text{M}$  の濃度で含む富栄養培地に移植して培養し、菌の除去と株の生育促進を図っている。したがって鉢上げに用いた土壌への共生菌の持ち込みがこの高い生存率の原因であるとは考えられない。共生発芽は微妙なバランスの上に成り立っており、発芽に成功しプロトコームとなった後も菌の制御に失敗したものは菌に犯されて枯死してしまい、最終的には4%程の種子がシュートを形成するまでに成長するに過ぎない<sup>3)</sup>。この過酷な共生発芽過程で自然条件での生育に適した個体を選抜されたために、越冬率も増加したものと思われる。また共生発芽に成功した株では菌の成長を制御するために適度の抗菌物質を生産していることが認められており(未発表データ)、この抗菌物質が雑菌の侵入を抑制し越冬成功に寄与した可能性も考えられる。

鉢上げ時の苗の生重と、その後の苗の生存率に大きく関わるシュート生存期間との間には何らの相関も認められなかった(図5)。無菌培養苗では生重のばらつきも、またシュート生存期間のばらつきも極めて大きかったが、共生発芽苗のそれは比較的まとまっていた。

以上述べたように本研究の結果から、図7に示したように12月初旬に培養植物体の馴化を開始し、5月の初旬に鉢上げすることが、苗の生存に最も適していることが判明した。9月下旬にシュートが枯れるまで少なくとも15週間以上シュートを展開させることができれば、越

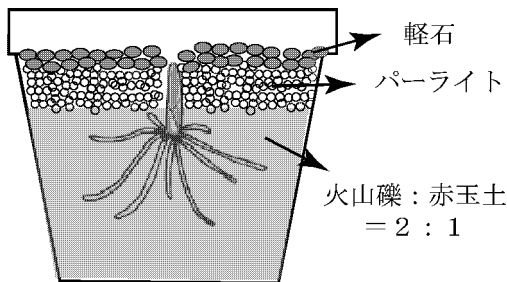
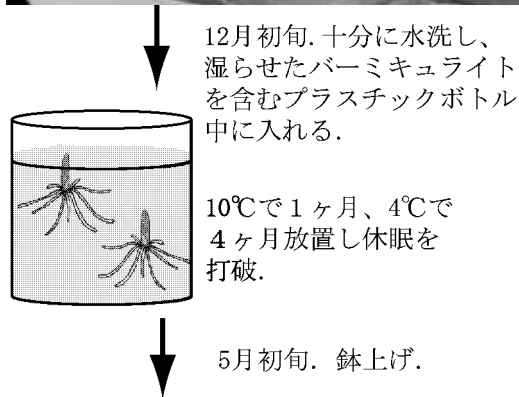
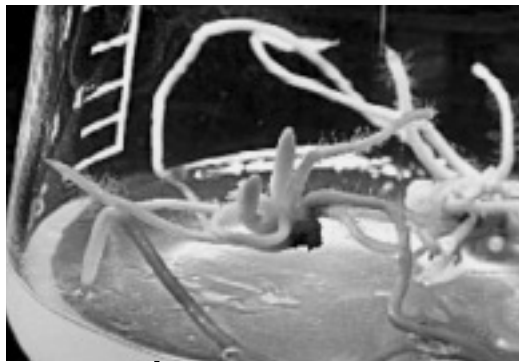


図7 馴化および鉢上げ法

冬可能となる。レブンアツモリソウの自生地においても、ススキなどの高茎草本による過度の被覆が生じて、この期間が保証されなければ、株はやがて消耗し消滅してしまうものと推察される。被覆植物を適切に管理することも自生地の存続に必要であると思われる。

本研究を含めた一連の研究<sup>3)6)</sup>により、レブンアツモリソウの無菌培養あるいは共生発芽による人工増殖と、得られた植物体の鉢上げとその後の管理法が確立され、人工増殖法の技術的な目途は立った。2005年度秋の時点で北大植物園では、2005年度に鉢上げしたものも含めて計



図8 鉢上げしたレブンアツモリソウの個体群 2005年6月。

481株が順調に生育している(図8)。今後も入念な管理を続け、早期の開花・結実を図る予定である。種子採取から増殖まで自己完結した系が確立できれば、自生地には全くの負担をかけずに連続的な人工増殖が可能になる。今後は礼文島内の各地から集めた種子を共生発芽させることにより、礼文島と同じような遺伝的変異幅を有した個体群の確保を目指したい。これにより遺伝資源の緊急避難を完成させることができる。更に共生菌を保持したままの苗の生産や鉢上げ株への共生菌の接種も試み、発芽後に独立栄養に転じた後も菌を保持させた場合、成長にどのように影響するかも検討したい。鉢植えではなく地植えも行い、植物園の展示品の拡大にもつなげたいと考えている。

### 摘 要

礼文島の固有種であるレブンアツモリソウは、日本の代表的な絶滅危惧種であり、人工的な種の増殖方法の開発が急務となっている。我々は先に、プロトコム様体を用いた無菌培養による大量増殖と<sup>6)</sup>、共生菌を用いた共生発

芽に成功した<sup>3)</sup>。本研究では、これらの方法によって得られたレブンアツモリソウ苗の鉢上げと、その後の管理法の確立を目指した。またレブンアツモリソウの生育の特徴を観察した。ここで得られた知見は原生地におけるレブンアツモリソウの保全にも有用であると思われる。

- 1) 無菌培養苗では、鉢上げ後のシュートの展開期間（シュート生存期間）に、極めて大きなばらつきが見られた。15週間以上シュートを展開できた場合は、その多くが次年度までの越冬に成功し順調に生育した。この15週間のシュートの生育を保証するためには鉢上げは4月中旬から5月初旬に行う必要があった。15週間以上の期間にわたって十分に同化産物を蓄積できた個体が越冬可能になるものと思われる。無菌培養苗では4月から5月に鉢上げた株の約40%（2001年から2004年までの4カ年の平均値）が越冬に成功した。
- 2) 鉢上げ時の苗の大きさと、その後の生育の間には何らの相関も見出せなかった。従って長期間プラスチック中で継代培養し大苗を得る必要は無いことが判明した。
- 3) 無菌培養苗とは異なり、共生発芽苗では80%以上が15週間以上シュートを展開し、70%以上（2003年と2004年の2カ年の平均値）が越冬に成功した。共生菌は鉢上げ以前に殺菌剤により除去しているため、鉢上げ土壌への共生菌の持ち込みが高い生存率の原因とは考えられなかった。共生発芽時には強い淘汰圧が加わり、生存に適した種子のみが選択されたものと考えられる。
- 4) 2002年に鉢上げし越冬に成功した無菌培養苗15株はその後も順調に生育したが、年を重ねることによる草丈や葉の枚数の増加は極めて緩慢であった。しかし徐々に生育速度が上昇する傾向が見られた。自生地では葉が4枚になると約半数の株が開花することが知られている。15株中の2株は4枚の葉を有していた。従って近いうちにこれらは開花に至るものと期待される。
- 5) 本研究で確立された鉢上げ法・管理法は下記の通りである。①12月初旬に、苗を湿らせたパーミキュライトを入れたプラスチックボトルに入れ、10°Cで1ヶ月置いた後に、4°Cに4ヶ月置き、シュートの休眠を打破すると同時に外部環境に馴化させる。②5月初旬にこの苗を赤玉土と火山礫を1:2で混合した用土を用いて鉢植する。1日2回灌水し、常に用土の表面が適度に湿っている状態を保つ。施肥は千倍希釈のハイポネックスを月1回与える。③6月半ばから寒冷紗で40~60%遮光する。④10月下旬に鉢を地面に並べ、約5cmの厚さに落ち葉で被覆し越冬させる。
- 6) 2005年秋の時点で、2005年度に鉢上げたものも含めて計481株が順調に生育している。

#### 引用文献

- 1) Jo, S., Ochiai, M., Furuta, K. and Yagi, K. (2005): Genetic analysis of genus *Cypripedium* found in northern Japanese island and related species endemic to northeast China, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 74, 234-241.
- 2) Sugiura, N., Fujie, T., Inoue, K. and Kitamura, K. (2001): Flowering phenology, pollination, and fruit set of *Cypripedium macranthos* var. *rebumense*, a threatened lady's slipper (Orchidaceae), *J. Plant Res.* 114, 171-178.
- 3) Shimura, H. and Koda, Y. (2005): Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebumense* following inoculation after cold treatment, *Physiol. Plant.* 123, 281-287.
- 4) 幸田泰則：カラフトアツモリソウの早期撤去を，モーリー，5：35-37，2001
- 5) Taniguchi, H., Nakamura, T., Mizukami, H., Kawano, S., Sano, H., and Katsumi, M. (2001): Identity of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) in Rebus Island: Comparative DNA analysis on the related species, *Genes Genet. Syst.* 76: 181-188
- 6) Shimura, H. and Koda, Y. (2004): Micro-

- propagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds, *Plant Cell Tiss Org Cult* 78, 273-276.
- 7) Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981): Somaclonal variation: novel source of variability from cell cultured for plant improvement. *Theor. Appl. Genet*, 60, 197-214.
- 8) Kery, M. and Gregg, K.B. (2004): Demographic analysis of dormancy and survival in the terrestrial orchid *Cypripedium reginae*, *J. Ecology*, 92, 686-695.
- (受付: 2005.10.31 受理: 2006.1.12)

## Summary

*Cypripedium macranthos* var. *rebunense* is one of the most famous wild orchids in Japan, because the variety is considered as a symbol for conservation of threatened plants. Recently we have established two kinds of efficient propagation methods; one being from protocorm-like bodies (PLBs) derived from mature seeds and the other from symbiotic seed germination with a symbiotic fungus. The present study was carried out to establish manuals for efficient acclimation and potting of the plants obtained by these methods, and for management of potted plants.

1. When plants derived from PLBs (designated as aseptically cultured seedlings) were potted, nearly 80% of the plants developed shoots within 4 weeks after the potting. However, a large variation was found in the longevity of the shoots. Some of the shoots died off within a short period of time. Only the plants that could maintain shoots more than 15 weeks succeeded in overwintering and developed shoot next spring. The result suggests that a sufficient accumulation of photosynthetic compound is indispensable for the survival of underground crowns during the winter season. To synchronize with natural seasonal change and to ensure growth period of shoot for more than 15 weeks, the potting should be carried out in spring. On an average of 4-year experiments nearly 40% of the plants that potted in spring succeeded in overwintering and survive thereafter.
2. No causal relation was found between the

size of the plant and the longevity of shoot, indicating that raising seedlings *in vitro* for long time to get larger plants is not necessary.

3. Different from aseptically cultured plants, symbiotically germinated plants were vigorous. More than 80% of them developed shoots for more than 15 weeks and more than 70% overwintered.
4. The method for acclimation and potting established here are summarized as follows. The plants for potting were washed thoroughly with running water to remove culture medium and then transferred to a plastic pot that contained wet vermiculite. The plants were pre-cooled at 10 °C for 1 month and then kept at 4 °C in the dark for 4 months to acclimate the plantlets and to break dormancy of the shoot. Then they were potted in a soil mixture of one part red clay granule (4-7 mm in diameter) and two parts volcano ash granule (3-6 mm in diameter). Roots should spread out flat with the shoots upward. The crowns of the plantlets should be covered with an inch of soil. To synchronize with natural seasonal change, the potting should be carried out in spring. The pots were placed outside on a bench.
5. The management of potted plans was as follows. a) water; keep soil wet at all times even after the shoots were died off and the underground parts have gone dormant. b) fertilizing; apply Hyponex solution diluted one thousand once a month. c) light conditions; the natural light was shaded by 40-60% by black cheesecloth from middle of June to late September. d)

overwintering; the pots are placed on the ground and covered with litter 5 cm in thickness and remove the litter in spring around last frost date.

6. At the end of September 2005, we are cultivating approximately 480 plants in our Botanic Garden.