

カンラン (*Cymbidium kanran* Makino) のライゾームからの小植物体形成におけるエチレンの役割

島崎一彦

高知大学農学部

(〒783 南国市物部乙200番地)

(1992年8月5日受付)

(1992年9月3日受理)

カンランのライゾームをエチレン阻害剤であるアミノエトキシビニルグリシン (AVG) とチオ硫酸銀 (STS) を添加した MS 培地で培養した。AVG と STS の処理でライゾームからのエチレン放散は抑制され、放散量の少なかった区では小植物体が形成された。ライゾームからの小植物体形成は STS 0.1 μ M 区及び AVG 0.1~1 μ M 区で促進された。窒素塩類量の少ない植物体誘導用修正 MS 培地 (硝酸アンモニウム; 1/4 倍, 硝酸カリウム; 1/2 倍) でライゾームを培養すると、エチレン放散量が少なくなった。

1. 緒言

近年、培養体のエチレン生合成の制御が器官分化に影響することが報告されている。培養体にエチレン阻害剤である硝酸銀 (AgNO_3)、チオ硫酸銀 (STS) 並びにアミノエトキシビニルグリシン (AVG) を処理してエチレンの生合成を抑制することにより *Nicotiana plumbaginifolia* 及び *Triticum aestivum*¹⁾、*Zea mays*²⁾、*Brassica oleracea* var. *gemmifera*³⁾ のカルスからの植物再分化、*Solanum tuberosum* のプロトプラストの成長⁴⁾や *Daucus carota* の体細胞胚形成を促進⁵⁾することが明らかにされている。また、エチレンの器官分化に及ぼす影響は、植物の種類や育成段階によっても異なることが示唆されている⁶⁻⁸⁾が、根茎 (ライゾーム) からの器官分化に及ぼす影響についてはほとんど報告されていない。

カンランなど多くの温帯性地生シンビジウムの種子は発芽してすぐにシュートを形成せずに、ライゾームを形成する⁹⁾ (Fig. 1-a)。ライゾームは地下茎の異形で、根と類似の機能を有するが、内部構造は茎と同様であり、腋芽が分枝し栄養繁殖に役立つ点は根と異なる。また、貯蔵でんぷんを分解してエネルギー源とし、長期間地下で生活した後、シュート及び根を分化する^{10,11)}。

In vitro におけるカンランのライゾームからのシュートは窒素塩類量を減らした修正 MS 培地で誘導できる¹²⁾が、サイトカイニンとオーキシンを添加した培地ではシュートの発根が抑制され、茎葉と根を有する完全な

小植物体を得ることが困難であることが多い。すなわち、サイトカイニン添加培地ではシュート形成は促進されるが、シュートの発根が抑制される。オーキシン添加培地で培養したシュートは発根がほとんど認められず、頂芽及び腋芽からのライゾームが形成され、培養容器からの植え出しは難しい。

本研究はカンランのライゾームからの小植物体分化におけるエチレンの役割を明らかにする目的で、培地中のエチレン阻害剤及び窒素塩類が、ライゾームからのシュート形成と発根及びエチレン生成に及ぼす影響について検討した。

2. 材料および方法

実験 1: 熊本県で採取したカンランを 1977 年 11 月 6 日に自家受粉を行い、得られた種子を 1987 年 9 月 22 日から Kano 培地¹³⁾で培養した。形成されたライゾームのうち 1 個体を、MS 培地中の硝酸アンモニウムを 412.5 mg/l (1/4 倍)、硝酸カリウムを 950 mg/l (1/2 倍)、ショ糖 20 g/l に変更した植物成長調節物質無添加の修正 MS 培地 (MMS 培地) で約 2 カ月おきに継代培養し栄養体を増殖した。これらのライゾームの分枝の先端部長さ約 5 mm を切り取り供試した。ライゾームの培養は MS 培地の塩類組成にショ糖 20 g/l、2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES) 1 mM 及びゲルライト 2 g/l を添加したもので行った。植物ホルモンは無添加とした。培地の殺菌は 120°C で 15 分間行い、培地が固化

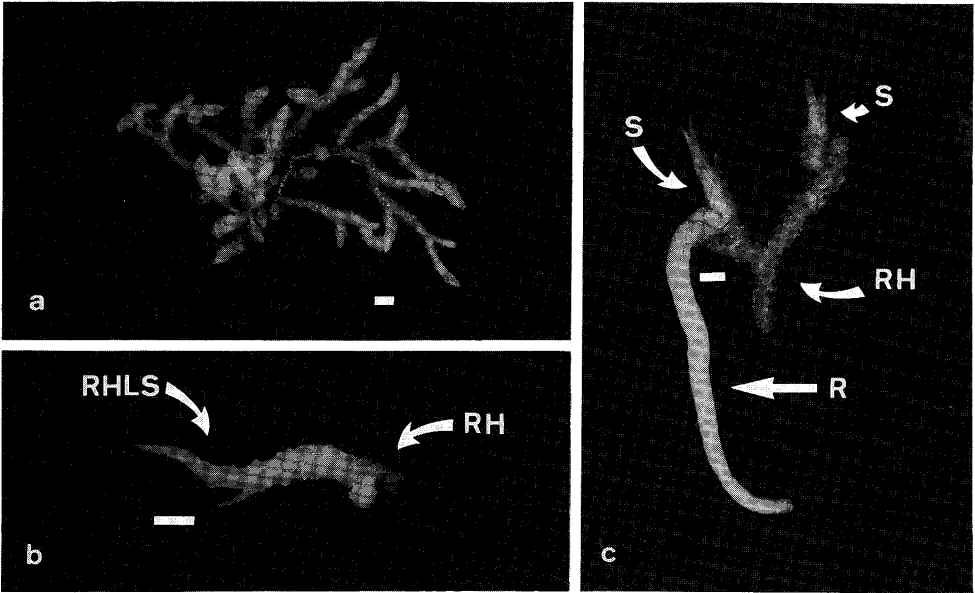


Fig. 1 Shoot and root formation from rhizome cultures. Bar=2 mm

- (a) Proliferated rhizome.
- (b) Development of rhizome-like shoot on MS medium supplemented with AVG 0.01 μM . RHLS : rhizome-like shoot, RH : rhizome
- (c) Plantlet formation on MS medium supplemented with STS 0.1 μM . S : shoot, R : root, RH : rhizome

する直前に AVG または STS を 0, 0.01, 0.1, 1 及び 10 μM の濃度で添加した. なお, AVG 及び STS はフィルター (マイレクス GV, 日本ミリポア工業製) を通して濾過滅菌後添加した. 培養容器には 500 ml 培養 UM サンプル瓶 (井内盛栄堂製) を使用し, 培地量は 1 容器当り 60 ml とした. 供試外植体数は 1 区当り 15 とした. 培養は全て 16 時間日長, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 約 $25\ \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の人工照明室で 2 カ月間行った.

実験 2 : 実験 1 と同様の培地で培養したライゾーム 1 g を培養 10 及び 30 日目に培養容器から取り出してエチレン放散量の測定を行った. ライゾーム 1 g を滅菌水で水洗後, 内容量 20 ml のシリンジバイアルに入れ 16 時間日長, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 約 $25\ \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の人工照明室に 24 時間静置した後, 気相のエチレン量をガスクロマトグラフ

で測定した. ガスクロマトグラフは島津製作所製の GC14A を使用し以下の条件で分析した. カラム : 活性アルミナを充填した長さ 1 m のステンレスカラム, カラム温度 ; 150°C , 注入口温度 ; 100°C , 検出器 ; FID

実験 3 室素塩類量を変更した MS 培地でライゾームを 7 日間培養しエチレン放散量を測定した. ライゾームの培養及びエチレンの測定は実験 1 及び 2 と同様の方法で行った.

3. 結果および考察

AVG 処理区のシュート形成の様相を **Table 1** に示した. AVG 0.01, 0.1 及び 1 μM 区でシュート形成が認められた. 鞘状の葉がありライゾーム様の形態を有するシュート (ライゾーム様シュート, **Fig. 1-b**) の形成も認められた. ライゾーム様シュートを除くシュートの形成

Table 1. Effect of AVG on formation of shoot developed from rhizome cultures.

AVG (μM)	Shoot number*1			Formation rate(%)		
	Rhizome-like shoot	Shoot without root	Shoot with root	Rhizome-like shoot	Shoot without root	Shoot with root
0	0	0	0	0	0	0
0.01	21	3	2	60	20	13.3
0.1	10	9	6	53	40	40
1	19	11	7	60	60	46.7
10	0	0	0	0	0	0

*1 Total shoot number obtained from 15 rhizome cultures.

Table 2. Effect of STS on formation of shoot from rhizome cultures.

STS (μ M)	Shoot number* ¹			Formation rate(%)		
	Rhizome-like shoot	Shoot without root	Shoot with root	Rhizome-like shoot	Shoot without root	Shoot with root
0	0	0	0	0	0	0
0.01	7	2	1	40	26.7	6.7
0.1	9	17	12	40	73.3	66.7
1	14	6	0	60	33.3	0
10	6	4	0	26.7	26.7	0

*1 Total number obtained from 15 rhizome cultures.

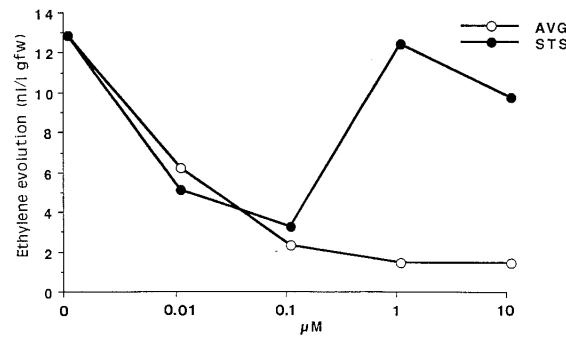


Fig. 2 Effect of AVG and STS on evolution of ethylene from rhizome cultures (10 days of culture).

数はAVG1 μ M区>0.1 μ M区>0.01 μ M区の順で大であった。ライゾーム様シュートの形成数はAVG0.01 μ M区>1 μ M区>0.1 μ M区の順で大であった。シュート形成率は1 μ M区で最大値を示した。発根したシュート(小植物体, Fig. 1-c)の形成率は1 μ M区>0.1 μ M区>0.01 μ M区の順で大であり、他の処理区ではシュートからの発根が認められなかった。ライゾーム様シュートの形成率は0.01及び1 μ M区>0.1 μ M区の順で大であり、他の処理区では形成されなかった。対照区及びAVG10 μ M区ではシュート形成が認められなかった。また、AVG10 μ M区ではライゾームの成長が抑制された。

STS処理区のシュート形成様相をTable 2に示した。STSを添加した全処理区でシュート形成が認められた。発根したシュートの数は0.1 μ M区で著しく多かった。ライゾーム様シュート以外の未発根のシュート形成数は0.1 μ M区>1 μ M区>10 μ M区の順で高い値を示した。ライゾーム様シュートの形成数は1 μ M区で最大値を示した。シュート形成率は、ライゾーム様シュートを除き、0.1 μ M区で最大値を示した。シュートの発根は0.01及び0.1 μ M区だけで認められた。0.1 μ M区で顕著に高い値を示した。ライゾーム様シュートの形成率は1 μ M

Table 3. Effect of nitrogen salts on evolution of ethylene from rhizome cultures (7 days of culture).

Medium	Ethylene evolution (n/l·gfw)
MMS* ¹	6.3
MS	10.0
2 MS* ²	14.0

*1 Modified MS medium containing 412.5 mg/l (1/4 strength) of ammonium nitrate and 950 mg/l (1/2 strength) of potassium nitrate.

*2 Modified MS medium containing 3300 mg/l (2 strength) of ammonium nitrate.

区で最大値を示した。STSを1 μ M以上の濃度で添加した処理区ではシュートの発根が認められなかった。STS無添加区ではシュート形成が認められなかった。

エチレン阻害剤添加培地で培養10日目のライゾームからのエチレン放散量をFig. 2に示した。STS及びAVGの処理によってエチレン放散が抑制された。STSを1 μ M以上の濃度で処理した区ではエチレン生成抑制効果が少なかった。データは示していないが培養30日目のエチレン放散量は10日目のそれとほぼ同じ値を示した。

次に、小植物体形成とエチレンの関係を検討する別のアプローチとして、ライゾームからの小植物体を誘導することのできるMMS培地¹²⁾におけるライゾームのエチレン生成について調査した。MMS培地と比較のためにMS培地及び硝酸アンモニウムを2倍の濃度に変更した2MS培地を用いた。7日間培養後のライゾームからのエチレン放散量をTable 3に示した。エチレン放散量は窒素塩類を減らしたMMS区でMS区の63%、硝酸アンモニウムを2倍にした2MS区では140%となった。データには示していないが、エチレン放散量は以降の培養においても同様の傾向を示した。

以上の結果からカンランのライゾームの小植物体形成

はライゾームのエチレン生合成を抑制することで促進されることが明らかになった。ライゾームのエチレン生成の抑制には AVG 及び STS ともに有効であった。小植物体を効率よく誘導するためには STS $0.1 \mu\text{M}$ の処理が最適であると考えられる。

以前の実験¹²⁾において MMS 培地ではライゾームから小植物体形成が誘導され、MS 及び 2MS 培地ではライゾームの分枝及び伸長成長のみが認められたのは、MMS 培地で培養したライゾームのエチレンの生合成が抑制されたことが一因であると考えられる。

ライゾーム形成は種子発芽後のプロトコーム、偽球茎の腋芽、また、オーキシン添加培地で幼シュートや幼花芽を培養したときに認められ、これらの成育過程においても植物体のエチレン生成が関与していると推定される。

双子葉植物である *Pelargonium*¹⁴⁾ や *Rosa hybrida*¹⁵⁾ の挿し木実験では STS は発根を阻害することが明らかにされているが、本実験では AVG を $0.01 \sim 1 \mu\text{M}$ 及び STS を $0.01 \sim 0.1 \mu\text{M}$ の濃度で添加した区でシュートの発根促進が認められ、双子葉植物を用いた実験とは異なる結果が得られた。エチレン阻害剤が発根に及ぼす影響についてはさらに詳しく検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) Purnhauser, L., P. Medgyesy, M. Czako, P. J. Dix, L. Márton, 1987. Plant Cell Rep., **6**: 1-4.
- 2) Songstad, D. D., D. R. Duncan, J. M. Widholm, 1988. Plant Cell Rep., **7**: 262-265.
- 3) Biddington, N. L., R. A. Sutherland, R. A. Robinson, 1988. Ann. Bot., **62**: 181-185.
- 4) Perl, A. A., D. Aviv, E. Galun, 1988. Plant Cell Rep., **7**: 403-406.
- 5) Roustan, J. P., A. Latche, J. Fallot, 1989. Plant Cell Rep., **8**: 182-185.
- 6) Cornejo-Martin, M. J., A. M. Mingo-Castel, E. Primo-Millo, 1979. Z. Pflanzenphysiol., **94**: 117-123.
- 7) Kochba, J., P. Spiegel-Roy, H. Neumann, S. Saad, 1978. Physiol. Plant., **71**: 151-156.
- 8) Robinson, K., E. Paterson, D. O. Adams, 1987. Physiol. Plant., **71**: 151-156.
- 9) Shimasaki, K., S. Uemoto, 1987. J. Fac. Agr., Kyushu Univ., **32**: 31-39.
- 10) 沢 完, 鳥潟博高, 1968. ラン科植物の種子形成と無菌培養 (鳥潟博高編), p. 153-173, 誠文堂新光社, 東京.
- 11) 田原望武, 1984. 四国・紀州のカンラン (ガーデンライフ編), p. 156-161. 誠文堂新光社, 東京.
- 12) Shimasaki, K., S. Uemoto, 1990. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **22**: 237-244.
- 13) Kano, K., 1971. Mem. Fac. Agr. Pagawa Univ., No. 20.
- 14) Paton, F., W. W. Schwade, 1987. Hort. Sci., **62**: 79-87.
- 15) Sun, W. Q., N. L. Bassuk, 1991. HortScience, **26**: 1288-1290.

Summary

The Role of Ethylene in the Plantlet Formation of *Cymbidium kanran* from Rhizome Cultures

Kazuhiko SHIMAZAKI

Department of Subtropical Agriculture, Kochi University, Monobe B200, Nankoku city, Kochi 783, Japan

Rhizome of *Cymbidium kanran* was cultured on Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with ethylene inhibitors AVG or STS. Application of either AVG or STS resulted in suppression of ethylene evolution. Rhizome cultures evolving smaller amounts of ethylene usually developed plantlets. The presence of $0.1 \mu\text{M}$ STS or $0.1 \sim 1 \mu\text{M}$ AVG enhanced plantlet formation from rhizome cultures. Modified MS medium for plantlet induction containing smaller amounts of nitrogen salts (NH_4NO_3 ; 1/4 strength, KNO_3 ; 1/2 strength) reduced the amount of ethylene evolution from rhizome cultures.