Cymbidium の生長点培養における器官形成 (第1報)

連続照明下における培養基添加物の与える影響について

上田 博・鳥潟 博 高

(名古屋大学農学部園芸学教室)

Organogenesis in meristem cultures of *Cymbidiums*. I.

Studies on the effects of growth substances added to culture media under continuous illumination.

H. UEDA and H. TORIKATA

College of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya

Summary

Effects of growth substances added to culture media for the growth and organogenesis in the cultures of *Cymbidiums* were studied.

Protocorms used as materials were prepared by meristem cultures and following subcultures with *C. insigne* Rolfe, *C. pumilum* Rolfe and *C. goeringii* Reichb. f. The former two are semi-epiphytic species in tropical or subtropical Asia, whereas the latter is a true terrestrial in Japan.

Pieces of protocorms were placed on culture media and further development of them was observed. Results were summarized as follows:

1. In the case of *C. insigne* and *C. pumilum*, most of the pieces developed into whole plants on the basal medium (Knudson C with Nitsch microelement) within two months. NAA, Bacto-trypton, L-arginine, and L-aspartic acid promoted their growth and

development at appropriate concentration, whereas yeast extract was rather inhibitory.

2. *C. goeringii* was different from above two species in the developmental process on the basal medium; the pieces developed into rhizomes without shoot-formation. On the basal medium supplemented with 0.1 mg/l NAA, however, about a half of them produced shoots. Yeast extract (1 g/l) and Bacto-trypton (1–5 g/l) promoted the growth of shoots and roots remarkably. L-arginine, L-aspartic acid, glycine and L-tryptophan exhibited growth-stimulating effects.

3. Increase in fresh weight and branching of protocorm were considerably affected by sucrose concentration of the culture medium, and the most abundant growth was observed at 4% in both *C. pumilum* and *C. goeringii*.

緒 言

Cymbidium は元来アジアを中心として北は日本、南はオーストラリアに至る広い緯度にわたって分布を示す変化に富んだ属であり、着生ラン、半地生ラン、地生ランなどを含む。ビルマ、インドを中心に原産する一般に大型の着生種および半地生種（いわゆる熱帯 *Cymbidium*）と中国、日本など温帯にかけて産する小型の地生種（いわゆる東洋ランの大部分、ただしキンリョウヘン *C. pumilum* はその性質から前者に含めるのが妥当と考える）との間に発芽生理、発生過程などにおいて著しい差が見られる。

着生（半地生）*Cymbidium*（以下 *C. insigne* で代表される熱帯、亜熱帯産 *Cymbidium* を単に着生 *Cymbidium* と称する）は Knudson C 培地で無菌は種が容易であり、発芽すると protocorm を生じ、次いで葉、根を出して完全な植物体に発生する。しかし地生 *Cymbid-*

ium（以下 *C. goeringii* で代表する温帯産 *Cymbidium* を指す）では、種皮に発芽抑制物質を含み、無菌は種の場合特別の予措を必要とすることが報告されている（狩野^(10,11)、加古⁽⁹⁾）。また発芽に成功しても、まず根茎 rhizome を作り、それが分岐、生長するのみで葉、根を容易に作らないとされている（沢、鳥潟⁽¹⁷⁾）。

一方 MOREL^(13,14,15)、WIMBER^(21,22) 以来急速に開発されてきた生長点培養による無性繁殖法においても、*Cymbidium* の両群の間には難易の差があり、地生 *Cymbidium* ではより複雑な培養基を必要とする（上田、鳥潟⁽²⁰⁾）。一般に生長点培養は属あるいは種により相当の難易の差があり、現在なお困難な種類について、まず摘出した meristem から確実に protocorm 様球体（以下単に protocorm と呼ぶ）を得ることが第一の問題であり、そのため培養基に各種の生長物質を添加することがいろいろ試みられている。しかし最終的には同一遺伝組成をもつ健全な植物体を多く得ることが目的であるから、

1968年5月17日受理

次の問題として protocorm の増殖、器官形成の過程についての検討が必要であろう。地生 *Cymbidium* では生長点培養の場合に、比較的容易に protocorm から rhizome が形成されるが、葉、根の分化が困難である。筆者らは器官形成に問題のある地生 *Cymbidium* (*C. goeringii* Reichb. f. ニホンシュンラン) を中心に、着生 *Cymbidium* (*C. insigne* Rolfe および *C. pumilum* Rolfe キンリョウヘン) と比較して、生長点培養における生長および器官形成に対する培養基添加物の影響を調べた。

1. 材料と方法

1966 年 10 月着生 *Cymbidium* (*C. insigne* Rolfe および *C. pumilum* Rolfe) と地生 *Cymbidium* (*C. goeringii* Reichb. f.) の shoot meristem を摘出し組織培

養により protocorm を得た。それらの protocorm を分割し、基本培地 (Knudson C+Nitsch 微量要素液) に置床し、2~3 週後分割片より新しい protocorm を得た後にさらに分割し、新しい同培地に置床した。この操作をくりかえすことにより多数の protocorm を得た。技術の詳細は既報 (上田, 鳥潟⁽²⁰⁾) による。遺伝的に均一な系を得るためにそれぞれ一つの生長点より得られた protocorm を分割、増殖したものを材料として用いた。上記のように増殖、維持された protocorm を分割して新しい基本培地に置床し、約 2 週後、再生された protocorm が径 2 mm 程度に達した時、頂部を通る面で 2~4 個に分割したものを供試培地 (Erlenmeyer flask 125 ml 入りに固形培地 20 ml, 寒天濃度 1.1 %) 上にほぼ

Table 1. The effect of sucrose concentration on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium pumilum* Rolfe.

Sucrose Conc.	0 %	1 %	2 %	4 %	6 %	8 %
Average Fresh Weight* Initial (mg)	3.5	3.8	3.6	3.6	3.8	3.6
Final (8 weeks)	9.6	17.4	29.2	48.0	18.1	15.2
Final Wt./Initial Wt.	2.7	4.6	8.1	13.3	4.8	4.2
Mortality Rate**	5.0%	3.8%	3.8%	5.0%	15.0%	21.3%
Chlorophyll	+	++	+++	+++	++	+
Average No. of Branch*	1.0	1.6	2.7	6.7	7.6	4.8
Average No. of Shoot*	0.0	1.5	2.1	3.1	2.0	0.1
Average Length of Shoot* (mm)	—	14.5	22.0	24.5	6.5	2.0
Average No. of Root*	0.0	0.5	0.5	0.7	0.6	0.3
Average Length of Root* (mm)	—	2.5	4.2	8.5	10.5	5.5

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks.

Table 2. The effect of sucrose concentration on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium goeringii* Reichb. f..

Sucrose Conc.	0 %	1 %	2 %	4 %	6 %	8 %
Average Fresh Weight* Initial (mg)	3.9	3.8	3.6	3.6	3.7	3.8
Final (8 weeks)	5.4	13.7	21.7	89.0	37.0	30.5
Final Wt./Initial Wt.	1.4	3.5	6.0	24.7	10.1	8.0
Mortality Rate**	3.8%	1.3%	3.8%	6.3%	13.8%	18.8%
Chlorophyll	+	+++	+++	+++	++	+
Average No. of Branch*	1.0	1.0	1.5	4.9	2.4	2.1
Average No. of Shoot*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Average Length of Shoot* (mm)	—	—	3.0	—	—	—
Average No. of Root*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Average Length of Root* (mm)	—	—	—	—	—	—
Average No. of Rhizome*	0.0	0.4	0.8	3.7	0.9	0.6
Average Length of Rhizome (mm)	—	2.0	2.5	6.0	3.0	2.5

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks.

等間隔で 20 個ずつ置床した。容器の栓はゴム栓とし中央に穴をあけ綿をつめこみ通気のあるものとした。培養基の pH はガラス電極 pH メーター (HITACHI-HORIBA KFA) を用い、希塩酸および希カセイカリで 5.0 に調整した。滅菌はオートクレーブで 1.0 kg/cm², 20 分、滅菌後の pH は 5.0 ± 0.3 であった。

培養は恒温 (20°—22°C) 培養室で Vitalux NEC による連続照明 (1500—2000 lux) で行ない、調査は 8 週後に行なつた。

Average No. of Branch, Average No. of Shoot, Average No. of Root, Average No. of Rhizome はそれぞれ分割片 1 個

Fig. 1. Successive stages of regeneration and further development in protocorm-pieces cultured for 10 weeks (scale shown in mm).

A. *Cymbidium pumilum* (basal medium); the piece developed readily into the plantlet.

B. *Cymbidium goeringii* (basal medium); the piece developed into the rhizomes which showed no tendency to form shoots.

C. *Cymbidium goeringii* (basal medium+0.1 mg/l NAA); the piece developed into the plantlet.

Table 3. The effect of NAA on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium insigne* Rolfe.

Culture Media	BM	BM+NAA mg/l			
		0.01	0.1	1.0	10.0
Average Fresh Weight* Initial (mg)	4.5	4.4	4.3	4.2	4.5
Final (8 weeks)	29.8	36.6	42.3	49.8	45.8
Final Wt./Initial Wt.	6.6	8.3	9.8	11.8	10.1
Mortality Rate**	3.8%	6.3%	6.3%	12.5%	62.5%
Chlorophyll	+++	+++	+++	++	±
Average No. of Branch*	2.4	1.9	1.9	1.4	1.6
Average No. of Shoot*	0.7	1.0	1.2	1.1	0.1
Average Length of Shoot* (mm)	13.0	14.5	16.4	15.0	9.9
Average No. of Root*	0.3	0.5	0.8	0.9	0.4
Average Length of Root* (mm)	2.2	3.8	6.1	9.4	7.7

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks.

当たりから生産されたものの値を示す (生長の最もよいものから 20—30 sample の平均)。protocorm の増殖の程度は Average No. of Branch で表わしている。rhizome の数は 2 mm 以上に伸長したもののみとした。

結 果

1. sucrose 濃度の影響

C. pumilum, *C. goeringii* を用い、基本培地の sucrose 濃度を変えた場合の影響について調べた結果を Table 1, 2 に示す。Fresh Weight 増加率 (以下 F. W 増加率) は両種ともに 4% 区において最高であつた。*C. pumilum* では 6% 区で分岐数, root の生長は最高値を示したが, shoot の生長は抑制された。*C. goeringii* では各区ともほとんど shoot, root の形成が起こらず 4% 区では rhizome の形成生長が特に著しかつた。

2. NAA 添加の影響

Table 3, 4 は *C. insigne*, *C. goeringii* を用いて基本培地に NAA (α -naphthalene acetic acid) を 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/l の各濃度で添加した場合の結果を示す。*C. insigne* では各濃度区とも, F. W. 増加率を高めたが, 10.0 mg/l 区では枯死率高く, クロロフィルの形成も悪く, shoot, root の形成も抑制された。shoot の形成, 生長は 0.1 mg/l 区で最高, root の形成, 生長は 1.0 mg/l 区で最高であつた。*C. goeringii* では F. W. 増加率, 分岐数, rhizome の形成, 生長は 10.0 mg/l 区で最高を示したが枯死率も高かつた。0.01, 0.1, 1.0 mg/l 区で shoot の形成が促進され, 0.1 mg/l 区で最もよかつた。

3. 2,4-D 添加の影響

基本培地に 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を添加した場合の結果を Table 5, 6 に示す。*C. insigne* では 0.01

Table 4. The effect of NAA on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium goeringii* Reichb. f..

Culture Media	BM	BM+NAA mg/l			
		0.01	0.1	1.0	10.0
Average Fresh Weight* Initial(mg)	4.4	4.2	4.5	4.3	4.5
Final(8 weeks)	22.5	29.6	36.1	32.8	50.5
Final Wt./Initial Wt.	<u>5.1</u>	<u>7.0</u>	<u>8.0</u>	<u>7.6</u>	<u>11.2</u>
Mortality Rate**	2.5%	6.3%	8.9%	17.5%	42.5%
Chlorophyll	+++	+++	+++	++	+
Average No. of Branch*	3.0	2.3	2.2	2.2	3.8
Average No. of Shoot*	0.0	0.1	0.5	0.2	0.0
Average Length of Shoot* (mm)	—	2.2	3.1	2.4	—
Average No. of Root*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Average Length of Root* (mm)	—	—	—	—	—
Average No. of Rhizome*	0.4	0.2	0.0	0.1	1.7
Average Length of Rhizome* (mm)	2.0	2.2	—	2.6	3.5

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks.

Table 5. The effect of 2.4.D on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium insigne* Rolfe.

Culture Media	BM	BM+2.4.D mg/l			
		0.01	0.1	1.0	10.0
Average Fresh Weight* Initial(mg)	4.5	4.5	4.3	4.4	4.4
Final (8 weeks)	29.8	45.8	35.5	29.0	***
Final Wt./Initial Wt.	<u>6.6</u>	<u>10.2</u>	<u>8.3</u>	<u>6.6</u>	—
Mortality Rate**	3.8%	11.3%	25.0%	46.3%	100.0%
Chlorophyll	+++	++	+	±	—
Average No. of Branch.	2.4	1.2	1.2	1.0	—
Average No. of Shoot*	0.7	0.8	0.4	0.0	0.0
Average Length of Shoot* (mm)	13.0	16.0	14.8	—	—
Average No. of Root*	0.3	0.6	0.0	0.0	0.0
Average Length of Root* (mm)	2.2	3.4	—	—	—

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks. *** all died.

Table 6. The effect of 2.4.D on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium goeringii* Reichb. f..

Culture Media	BM	BM+2.4.D mg/l			
		0.01	0.1	1.0	10.0
Average Fresh Weight* Initial(mg)	4.4	4.3	4.2	4.4	4.3
Final (8 weeks)	22.5	23.7	25.5	27.3	***
Final Wt./Initial Wt.	<u>5.1</u>	<u>5.5</u>	<u>5.1</u>	<u>6.2</u>	—
Mortality Rate**	2.5%	15.0%	23.8%	56.3%	100.0%
Chlorophyll	+++	++	++	+	—
Average No. of Branch*	3.0	1.1	1.2	1.1	—
Average No. of Shoot*	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0
Average Length of Shot* (mm)	—	2.4	2.2	—	—
Average No. of Root*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Average Length of Root* (mm)	—	—	—	—	—
Average No. of Rhizome*	0.4	0.2	0.7	1.0	—
Average Length of Rhizome* (mm)	2.0	2.0	3.6	8.8	—

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks. *** all died.

mg/l 区で発育促進効果が見られるが、濃度が高まるにしたがい、クロロフィル形成は悪くなり、枯死率が増し、10.0 mg/l では100%枯死した。

C. goeringii の場合、0.01 mg/l 区がわずかに shoot を形成したが、0.1, 1.0 mg/l 区では rhizome の形成、生長が促進された。濃度が高くなるにしたがい、クロロフィル形成は悪くなり、枯死率が増し、10.0 mg/l 区では100%枯死した。なお両種とも、2・4・D を添加した場合は対照区に比し、分岐の少なくなる傾向が見られた。

4. kinetin 添加の影響

Table 7, 8 は基本培地に Kinetin を添加した場合の結果である。*C. insigne* では著しい発育促進あるいは抑制効果は見られなかつた。また *C. goeringii* では低濃度でやや shoot 形成を促進し、高濃度で rhizome の形成、生長を促進する傾向が見られた。両種共に一般にクロロフィル形成が良好であつた。

5. yeast extract ならびに trypton 添加の影響

前述の実験で *C. goeringii* の shoot 形成が最も良好であつた。基本培地 + 0.1 mg/l NAA (A 培地) にさらに yeast extract ならびに Difco Bactotrypton をそれぞれ加えた培地についての結果を Table 9~12 に示す。yeast extract は *C. insigne* に対してはいずれの濃度も発育促進効果を示さずむしろ抑制的に働くが、*C. goeringii* に対しては 1000 mg/l で shoot, root の形成、生長を著しく促進した。trypton は両種に対してともに発育を促進し、*C. goeringii* では 5000 mg/l で shoot, root

Table 7. The effect of kinetin on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium insigne* Rolfe.

Culture Media	MB	BM+Kinetin mg/l			
		0.01	0.1	1.0	10.0
Average Fresh Weight* Initial (mg)	4.5	4.3	4.3	4.2	4.4
Final (8 weeks)	29.8	29.7	33.5	31.1	26.4
Final Wt./Initial Wt.	6.6	6.9	7.8	7.4	6.0
Mortality Rate**	3.8%	6.3%	6.3%	15.0%	42.5%
Chlorophyll	+++	+++	+++	+++	++
Average No. of Branch*	2.4	2.6	2.8	2.1	1.9
Average No. of Shoot*	0.7	0.9	0.9	0.8	0.8
Average Length of Shoot* (mm)	13.0	16.8	17.0	16.0	9.8
Average No. of Root*	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4
Average Length of Root* (mm)	2.2	2.4	2.8	2.0	2.1

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks.

Table 8. The effect of kinetin on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium goeringii* Reichb. f..

Culture Media	BM	BM+Kinetin mg/l			
		0.01	0.1	1.0	10.0
Average Fresh Weight* Initial (mg)	4.4	4.2	4.4	4.3	4.5
Final (8 weeks)	22.5	22.7	24.4	30.2	35.8
Final Wt./Initial Wt.	5.1	5.4	5.5	7.0	8.0
Mortality Rate**	2.5%	3.8%	5.0%	10.0%	21.3%
Chlorophyll	+++	+++	+++	++	++
Average No. of Branch*	3.0	1.6	1.6	1.8	2.2
Average No. of Shoot*	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
Average Length of Shoot* (mm)	—	2.2	2.0	—	—
Average No. of Root*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Average Length of Root* (mm)	—	—	—	—	—
Average No. of Rhizome*	0.4	0.5	0.8	1.0	1.3
Average Length of Rhizome* (mm)	2.0	2.4	2.8	3.2	4.6

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks.

Table 9. The effect of yeast extract on the growth and organogenesis in the tissue Cultures of *Cymbidium insigne* Rolfe.

Culture Media	Medium A BM+NAA (0.1 mg/l)	Medium A+YE mg/l			
		125	500	1000	5000
Average Fresh Weight* Initial (mg)	4.3	4.3	4.4	4.4	4.4
Final (8 weeks)	43.4	44.2	42.5	44.1	26.7
Final Wt./Initial Wt.	10.1	10.3	9.9	10.0	6.1
Mortality Rate**	2.0%	5.0%	10.0%	19.0%	47.0%
Chlorophyll	+++	++	+	±	±
Average No. of Branch*	2.0	2.1	2.0	2.2	1.7
Average No. of Shoot*	1.8	1.6	1.3	1.4	0.5
Average Length of Shoot* (mm)	16.4	16.5	9.8	10.2	6.2
Average No. of Root*	0.8	0.3	0.2	0.2	0.0
Average Length of Root* (mm)	8.4	7.8	8.2	8.8	—

* calculated from 30 of the most developed samples in 5 flasks.

** calculated from 100 samples in 5 flasks.

Table 10. The effect of yeast extract of the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium goeringii* Reichb. f..

Culture Media	Medium A BM+NAA (0.1 mg/l)	Medium A+YE mg/l			
		125	500	1000	5000
Average Fresh Weight* Initial (mg)	4.3	4.2	4.2	4.3	4.3
Final (8 weeks)	33.9	30.2	34.0	67.1	55.0
<u>Final Wt./Initial Wt.</u>	<u>7.9</u>	<u>7.2</u>	<u>8.1</u>	<u>15.6</u>	<u>12.5</u>
Mortality Rate**	4.0%	9.0%	11.0%	12.0%	41.0%
Chlorophyll	+++	++	++	++	±
Average No. of Branch*	2.2	2.3	2.2	1.3	1.2
Average No. of Shoot*	0.5	0.3	0.3	0.9	0.7
Average Length of Shoot* (mm)	3.2	3.0	2.8	10.2	7.2
Average No. of Root*	0.0	0.0	0.1	0.8	0.5
Average Length of Root* (mm)	—	—	2.0	13.6	5.6
Average No. of Rhizome*	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0
Average Length of Rhizome* (mm)	2.2	2.0	—	—	—

* calculated from 30 of the most developed samples in 5 flasks.

** calculated from 100 samples in 5 flasks.

Table 11. The effect of Trypton on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium insigne* Rolfe.

Culture Media	Medium A BM+NAA (0.1 mg/l)	Medium A+TP mg/l			
		125	500	1000	5000
Average Fresh Weight* Initial (mg)	4.3	4.2	4.2	4.3	4.3
Final (8 weeks)	43.4	54.8	70.1	85.4	106.0
<u>Final Wt./Initial Wt.</u>	<u>10.1</u>	<u>13.0</u>	<u>16.7</u>	<u>19.8</u>	<u>24.7</u>
Mortality Rate**	2.0%	4.0%	12.0%	18.0%	38.0%
Chlorophyll	+++	++	++	+	±
Average No. of Branch*	2.0	2.1	2.0	2.4	3.3
Average No. of Shoot*	1.8	1.9	1.9	2.2	2.2
Average Length of Shoot* (mm)	16.4	18.3	18.7	23.3	23.7
Average No. of Root*	0.8	1.1	1.3	1.4	1.1
Average Length of Root* (mm)	8.4	7.2	9.0	9.6	8.6

* calculated from 30 of the most developed samples in 5 flasks.

** calculated from 100 samples in 5 flasks.

Table 12. The effect of trypton on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium goeringii* Reichb. f..

Culture Media	Medium A BM+NAA (0.1 mg/l)	Medium A+TP mg/l			
		125	500	1000	5000
Average Fresh Weight* Initial (mg)	4.3	4.4	4.4	4.3	4.4
Final (8 weeks)	33.9	36.1	40.0	71.0	80.5
<u>Final Wt./Initial Wt.</u>	<u>7.9</u>	<u>8.2</u>	<u>9.1</u>	<u>16.5</u>	<u>18.3</u>
Mortality Rate**	4.0%	10.0%	24.0%	36.0%	46.0%
Chlorophyll	+++	++	+	+	±
Average No. of Branch*	2.2	2.3	2.0	1.5	1.3
Average No. of Shoot*	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8
Average Length of Shoot* (mm)	2.8	4.5	6.8	8.4	10.0
Average No. of Root*	0.0	0.0	0.2	0.4	0.7
Average Length of Root* (mm)	—	—	2.0	9.8	12.1
Average No. of Rhizome*	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0
Average Length of Rhizome* (mm)	2.2	2.4	—	—	—

* calculated from 30 of the most developed samples in 5 flasks.

** calculated from 100 samples in 5 flasks.

の形成、生長は最良であつた。しかし 1000 mg/l 以上ではクロロフィルの形成が悪くなる傾向が見られた。

6. アミノ酸添加の影響

基本培地に種々のアミノ酸を 10^{-3} mol の濃度で添加した場合の影響を調べた結果を Table 13, 14 に示す。供試品種は *C. pumilum*, *C. insigne* である。*C. pumilum* においては L-アルギニン添加区で F. W. 増加率が対照区にまさり、L-アスパラギン酸添加区で shoot の生長がまさつたほかは抑制的に働いた。*C. goeringii* では F. W. 増加率、分岐数は、グリシン、L-アスパラギン酸添加区で対照区にまさり、shoot 形成は L-アルギニン、L-アスパラギン酸、グリシン添加区の順にわずかながら促

進される傾向が見られた。L-トリプトファン添加区では枯死率は高いが、rhizome の形成、生長は最良であつた。

考 察

親株の茎生長点を分離培養し、これをもとに増殖して得た protocorm の分割片をショ糖、無機塩のみの基本培地に置床した場合、着生 *Cymbidium* (*C. insigne* および *C. pumilum*) ならびに地生 *Cymbidium* (*C. Goeringii*) はそれぞれ発芽後観察されるのとはほぼ同様の、特徴的な発生過程を示す。すなわち、*C. insigne*, *C. pumilum* では分割片から新しい protocorm を再生し引続いて葉、根を形成して 6~8 週後にはほとんどが完

Table 13. The effects of several amino acids (10^{-3} mol) on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium pumilum* Rolfe.

Culture Media	BM	Gly.	Ala.	Arg.	Asp.	Glu.	Met.	Try.	Val.
Average Fresh Weight* Initial (mg)	5.2	5.0	4.8	5.1	4.9	4.8	4.9	5.0	4.7
Final (8 weeks)	42.6	39.3	21.4	56.8	39.6	18.4	***	26.3	22.4
Final Wt./Initial Wt.	8.2	7.9	4.5	10.9	8.1	3.8	—	5.3	4.8
Mortality Rate**	1.3%	7.5%	10.0%	5.0%	6.3%	5.0%	100.0%	52.5%	87.5%
Chlorophyll	+++	++	++	++	++	++	—	+	+
Average No. of Branch*	2.8	2.3	1.2	3.1	2.8	1.3	—	2.1	2.0
Average No. of Shoot*	1.9	1.3	0.4	1.4	1.1	0.8	—	1.0	0.0
Average Length of Shoot. (mm)	24.2	12.4	2.5	23.5	34.0	4.0	—	8.6	—
Average No. of Root*	0.3	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0	—	0.0	0.0
Average Length of Root* (mm)	3.0	—	—	0.5	3.2	—	—	—	—

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks. *** all died

BM; basal medium, Gly; Glycin, Ala; L-Alanine, Arg; L-Arginine, Asp; L-Aspartic Acid, Glu; L-Glutamic Acid, Met; L-Methionine, Try; L-Tryptophan, Val; L-Valine.

Table 14. The effects of several amino acids (10^{-3} mol) on the growth and organogenesis in the tissue cultures of *Cymbidium goeringii* Reichb. f..

Culture Media	BM	Gly.	Ala.	Arg.	Asp.	Glu.	Met.	Try.	Val.
Average Fresh Weight* Initial (mg)	3.9	3.7	4.0	4.1	3.9	4.0	4.1	4.2	4.0
Final (8 weeks)	20.2	28.8	10.2	11.3	29.7	15.6	10.3	23.5	13.0
Final Wt./Initial Wt.	5.2	7.8	2.6	2.8	7.6	3.9	2.5	5.6	3.3
Mortality Rate**	5.0%	6.3%	47.5%	7.5%	8.9%	10.0%	60.0%	62.5%	3.8%
Chlorophyll	+++	++	++	++	++	++	+	++	++
Average No. of Branch*	3.9	4.2	1.7	1.4	4.3	2.1	2.4	2.7	1.2
Average No. of Shoot*	0.0	0.1	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Average Length of Shoot* (mm)	—	5.0	—	6.8	4.8	—	—	—	—
Average No. of Root*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Average Length of Root* (mm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Average No. of Rhizome*	1.2	1.2	0.4	0.5	1.1	1.0	0.1	2.5	1.3
Average Length of Rhizome* (mm)	2.5	3.5	2.2	2.0	2.8	3.2	2.0	7.5	2.4

* calculated from 20 of the most developed samples in 4 flasks.

** calculated from 80 samples in 4 flasks.

BM; basal medium, Gly; Glycin, Ala; L-Alanine, Arg; L-Arginine, Asp; L-Aspartic Acid, Glu; L-Glutamic Acid, Met; L-Methionine, Try; L-Tryptophan, Val; L-Valine.

全な植物体に分化する。一方、*C. goeringii* では protocorm から rhizome が形成され、それが生長、分岐するのみで葉、根の形成にいたらない。培地のショ糖濃度は培養の F・W 増加率、分岐数に顕著な影響をおよぼし、これらの数値はショ糖濃度が上がるほど大きくなり、4%で最高を示し（*C. pumilum* では分岐数は6%で最高）、これ以上ショ糖濃度を増しても、かえって減少する。この傾向は着生 *Cymbidium* でも地生 *Cymbidium* でもほぼ同様であつた。しかし NAA 0.1 mg/l 添加培地では *C. goeringii* においても約 50% が shoot 形成に進み、これにさらに yeast extract 1 g/l あるいは trypton 1~5 g/l を添加した培地では、葉、根の発育が著しく促進され 8~10 週後には 80% 以上が完全な植物体に発生した。

オーキシンのラン実生に対する発育促進効果については多くの報告があり（Yates & Curtis⁽²⁵⁾, Withner⁽²³⁾, Hegarty⁽⁶⁾, 狩野⁽¹⁰⁾, 鳥潟, 沢, 志佐⁽¹⁹⁾), trypton の発育促進効果についてもよく知られている（伊藤⁽⁸⁾, Wimber⁽²¹⁾, 狩野⁽¹⁰⁾）。この実験で扱った生長点由来の protocorm の器官形成に対してもほぼ同様の効果を示すと思われる。

yeast extract については地生ラン *Cypripedium* (Liddell⁽¹²⁾), *Goodyera repens* (Downie⁽⁶⁾) の実生に対しては発育促進効果を示し、着生ラン *Dendrobium*, *Brassolaeliocattleya* などの発芽、実生の生長に対してはむしろ抑制作用を示す（狩野⁽¹⁰⁾）ことが報告されている。本実験において *C. insigne* の発育に対しては抑制的に働き、*C. goeringii* では発育促進作用を示すのも上記と同様の傾向を示すものであろう。

アミノ酸添加の効果については、なお、濃度を変えて十分検討する必要があるが、*C. pumilum* については、L-アルギニン、L-アスパラギン酸のみに発育促進効果が見られ、これは Spoerl⁽¹⁸⁾, 鳥潟, 沢, 志佐⁽¹⁹⁾ の実生についての報告とほぼ一致する。*C. goeringii* ではやや異なり、L-アルギニン、L-アスパラギン酸以外にグリシン、L-トリプトファンなども有効と思われる。

以上のように地生 *Cymbidium* と着生 *Cymbidium* との間に発育、器官分化に対する栄養摂取の型に差があり、さらに、二者間の形態発生の過程が一部異なるということは、この過程における物質合成能にも差があり、地生 *Cymbidium* は着生 *Cymbidium* より heterotrophic な性質をもつのであろう。地生 *Cymbidium* における shoot 形成の条件は不明であるが、NAA, yeast extract, trypton などの物質が shoot 形成を促進することから、オーキシン、アミノ酸、ビタミンなどの物質の供給と関

係をもつことが一応考えられる。

C. goeringii の自然状態で発芽したものは rhizome を地下に形成し、ある期間の後、初めて shoot を地上に出してくる。その rhizome 中に非常に多量のラン菌の存在が認められるので、植物体がラン菌からある種の物質の供給を受け、そのことが shoot 形成の条件として関係しているとも考えることも無理ではないであろう。

本実験は連続照明、恒温の条件で、生長点由来の protocorm からの器官形成の過程を見たものであり、その過程は自然状態のものとは相当に異なつた形をとるとも考えられる。また本報告ではふれなかつたが伸長した rhizome（生長点由来のものならびに種子からのもの）の先端約 2 mm を切り取つて置床した場合も protocorm の分割片を置床した場合とほぼ同様の結果を得ている。これらについては次報で述べる。

摘 要

生長点培養により得た protocorm からの器官形成に対する培養基添加物の影響について、特に地生 *Cymbidium* (*C. goeringii*) を中心に、着生（半地生）*Cymbidium* (*C. insigne* および *C. pumilum*) と比較して実験を行ない、次のような結果を得た。

1. 基本培地 (Knudson C + Nitsch 微量要素液) においては、*C. insigne* および *C. pumilum* では protocorm から葉、根を形成し、6~8 週後には完全な植物体に発生したが、*C. goeringii* では rhizome が形成されてそれが分岐、生長するのみで葉、根が形成されなかつた。

2. 培地のショ糖濃度は F.W. 増加率、分岐数に顕著な影響を与え、*C. pumilum*, *C. goeringii* とともに 4% で最高値を示した。

3. 0.1 mg/l NAA 添加培地では *C. goeringii* も約 50% が shoot 形成に進み、これにさらに yeast extract (1 g/l) または Bacto-trypton (1~5 mg/l) を添加した培地では 8~10 週後には 80% 以上が完全な植物体に発生した。

4. *C. insigne* に対しても Bacto-trypton は著しい発育促進効果を示したが、yeast extract は抑制的に働いた。

5. アミノ酸添加の影響については、*C. pumilum* では L-アルギニン、L-アスパラギン酸のみに発育促進効果があり、*C. goeringii* ではその他にグリシン、L-トリプトファンも有効であつた。

参 考 文 献

1. ARDITTI, J. 1967 Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev. 33: 1-97

2. BUTENKO, R. G. 1968 Plant tissue culture and plant morphogenesis. Academy of science of USSR.
3. BURGEFF, H. 1932 Saprophytismus und Symbiose. G. Fischer Verlag, Jena.
4. ———. 1936 Samenkeimung der Orchideen. G. Fischer Verlag, Jena.
5. DOWNIE, D. G. 1940 On the germination and growth of *Goodyera repens*. Trans. & Proc. Bot. Soc. Edinburgh 33 (1) : 36-51
6. HEGARTY, C. P. 1955 Observation on the germination of orchid seed. Amer. Orch. Soc. Bull. 24 (7) : 457-464.
7. ITO, I. 1955 Germination of seeds from immature pod and subsequent growth of seedlings in *Dendrobium nobile* Lindl. Sci. Rept. Saikyo Univ. Agr. 7 : 35-42.
8. 伊藤五彦. 1960. 蘭果実の人工培養による実生育成. 日本洋蘭会報 6 : 4-7
9. 加古舜治. 1968. シュンラン種子の発芽に関する研究. ラン科植物の種子形成と無菌培養 (誠文堂新光社) p. 174-234.
10. KANO, K. 1965 Studies on the media for orchid seed germination. Memoirs Faculty Agri. Kagawa Univ. No. 20.
11. 狩野邦雄. 1968. ランの無菌発芽培養に関する研究. ラン科植物の種子形成と無菌培養 (誠文堂新光社) p. 95-150.
12. LIDDELL, R. W. 1953 Notes on the germinating Cypripedium seeds. II. Amer. Orch. Soc. Bull. 22(8) : 580-582.
13. MOREL, G. M. 1960 Producing virus-free Cymbidiums. Amer. Orch. Soc. Bull. 29 : 495-497.
14. ———. 1965 Erbgleiche Vermehrung bei Orchideen durch Meristem-Kultur. Galtenwelt. 65 : 350-352.
15. ———. 1965 Clonal propagation of orchid by meristem culture. Cymbidium Soc. News. 20 (7) : 3-11.
16. SAGAWA, Y., T. SHOJI and T. SHOJI 1966 Clonal propagation of Cymbidium through shoot meristem culture. Amer. Orch. Soc. Bull. 35 : 118-122.
17. 沢完・鳥潟博高. 1968. Cymbidium 種子の無菌発芽と発芽生態に関する研究. ラン科植物の種子形成と無菌培養 (誠文堂新光社) p. 153-173.
18. SPOERL, E. 1948 Amino acids as a sources of nitrogen for orchid embryos. Amer. Jour. Bot. 35 (2) : 88-95.
19. 鳥潟博高・沢完・志佐誠. 1965. ラン種子の無菌発芽に関する研究 (第1報). 園学雑. 34 : 63-70.
20. 上田博・鳥潟博高. 1968. ラン科植物の生長点組織培養. ラン科植物の種子形成と無菌培養 (誠文堂新光社) p. 271-282.
21. WIMBER, D. E. 1963 Clonal multiplication of Cymbidium through tissue culture of the shoot meristem. Amer. Orch. Soc. Bull. 32 : 105-107.
22. ———. 1965 Additional observation on clonal multiplication of Cymbidium through culture of shoot meristem. Cymbidium Soc. News. 20 (4) : 7-10.
23. WITHNER, C. L. 1951 Effects of plant hormones and other compounds on the growth of orchids. Amer. Orch. Soc. Bull. 20 (5) : 256-278.
24. ———. 1959 The orchids, a scientific survey. New York.
25. YATES, R. C. and J. T. CURTIS. 1949 The effects of sucrose and other factors on the shoot-root ratio of orchid seedling. Amer. Jour. Bot. 36 (5) : 390-396.