Cymbidium の生長点培養における 器官形成 (第7報)

シュンラン菌根茎の抽出液について

上 田 博*・鳥 潟 博 高
(名古屋大学農学部)

Organogenesis in the meristem cultures of *cymbidiums*

VII. Study on the Extract from Mycorrhizomes of
Cymbidium goeringii REICHB. f. (*C. virescens* LINDL.)

Hiroshi UEDA and Hirotaka TORIKATA

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

Summary

1. In order to obtain a further evidence for decomposition of protein and RNA of mycorrhizal fungi in the course of digestion, a paperchromatographic study was carried out with the extracts of symbiotic (wild) and asymbiotic (aseptic) rhizomes by *Cymbidium goeringii* REICHB. f. (*C. virescens* LINDL.). The results suggest that the symbiotic rhizomes contain many kinds of free amino acids and purine-pyrimidine compounds which appear to be supplied by digestion of fungal matter.

2. The extracts of asymbiotic/symbiotic rhizomes and of isolated mycorrhizal fungi were bioassayed for cytokinin activity by tobacco callus method. The extract of symbiotic rhizomes exhibited a considerable activity whereas that of asymbiotic rhizomes did little activity. As for mycorrhizal fungi, neither the extract of fungi nor that of the culture medium in which the fungi were cultured showed activity.

3. The results of the present and previous experiments in this investigation series (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) suggest a possible mechanism of organ differentiation of the wild development of terrestrial cymbidiums such as *Cymbidium goeringii*. In these species, the stage becoming autotrophic is later than in epiphytic or semiepiphytic cymbidiums. Mycotrophy appears to play a essential role in the shoot and root formation. Shoot formation would be induced by cytokinins supplied from the mycorrhizome. Starch grains derived from mycorrhizal fungi are utilized as the main energy source. Amino acids and RNA-decomposites, supplied through digestion of fungal matter, are transported to the apical region of the rhizome and promote shoot and root formation.

緒 言

本研究シリーズ (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) ですでに報告したように、シュンラン *Cymbidium goeringii* REICHB. f. のような温帯性地生シンビジウムはいわゆる熱帯シンビジウムと異なり、無菌培養において糖・無機塩のみの培地では根茎のみを作り、容易にシュート、根を分化しない。しかし、糖・無機塩培地 (Knudson C+Nitsch 微量要素液) に 10mg/l カイネチン、 10^{-3} M L-アルギニンを添加したものに暗所培養することにより大部分にシ

ュート、根を分化させることができた (これに光をあけると葉が展開し、根の形成が盛んになった) (8, 9)。一方プロトコームのサイトカイニン活性がシュンランでは熱帯シンビジウムに比して著しく低いことが認められている (6)。これらの無菌培養における器官形成について得られた結果は、自然状態での温帯性地生シンビジウムの器官形成のメカニズムについて何らかの暗示を与える。温帯性地生シンビジウムも自然状態では確実に器官分化を行なっている。その場合、ラン菌を含む野生根茎 (菌根茎) は菌体消化を通して炭水化物だけでなく、器官形成に必要な窒素化合物などの供給を受けている可能性が

* 1973 年 10 月 6 日受理

現在 愛知県教育センター生物学教室

強い。シュンランの野生根茎を組織化学的にしらべた結果では、菌体消化の過程が進行するにしたがつて、菌体のタンパク質、リボ核酸 (RNA) が徐々に分解して行くのがみられる (7)。本研究においては、菌体由来し器官形成に役立つと思われる物質の存在をさらに検討する目的で、シュンラン野生根茎の遊離アミノ酸、プリン・ピリミジン化合物をペーパークロマトグラフィーで調べ、無菌培養した根茎のそれらと比較し、また、サイトカイニン活性を野生根茎、純粋培養したラン菌およびその培養液、無菌根茎についてタバコカルス検定法で調べた。さらに、本実験の結果と前報までに得られた知見とを合わせて、シュンランを含む温帯性地生シンビジウムの自然状態および無菌培養での器官形成について総合的な考察を加えた。

材料および方法

1. ペーパークロマトグラフィー

愛知県猿投山付近で採集したシュンランのシュート形成前の若い野生根茎と Knudson C+Nitsch 微量要素液の固形培地に暗所培養した無菌根茎とをそれぞれ生重 (F. W.) 10g とり、80% エタノール 40ml で抽出し、遠心分離した上澄み液を減圧蒸留し、残渣を蒸留水 10ml にとかして試料とした。アミノ酸については、二次元ペーパークロマトグラフィー (東洋ろ紙 No. 51)、展開剤: n-ブタノール/酢酸/水, 4:1:2 (V/V)、フェノール/水, 4:1 (V/V)、ニンヒドリン、ユールリッヒ試薬、坂口反応などで検出。プリン・ピリミジン化合物については、一次元 (東洋ろ紙 No. 51A)、展開剤: n-ブタノール/酢酸/水, 4:1:5 (V/V)、silber nitrate-bromophenol blue 試薬および紫外線ランプで検出。

2. サイトカイニンの生物検定

ペーパークロマトグラフィーに用いたのと同様の野生根茎と無菌根茎とのそれぞれ F. W. 15g を 80% エタノール 60ml で抽出し、遠心分離して得た上澄み液を減圧蒸留し、残渣を 150ml の Murashige & Skoog 培地 +2mg/l β -インドール酢酸 (IAA) にとかして原液とし (100 gram fresh weight equivalent per litre.....100 GE/l), 1:10, 1:100 (10, 1GE/l) の各濃度区を設けた。

また、野生根茎より純粋分離した *Rhizoctonia* sp. (Fig. 1) を CYG 培地* (1) に暗黒で 22°C, 3週間培養し、それを遠心分離して得た菌体 F. W. 20g を 80% エタノール 80ml で抽出し、抽出液を上記の根茎の

Fig. 1. *Rhizoctonia* sp. isolated from the wild rhizome of *Cymbidium goeringii* REICHB. f. (*C. virescens* LINDL.). Culture condition: 3 weeks in CYG liquid medium (Perombelon and Hadley, 1964) at 22°C in the dark.

場合と同様に処理して三段階の濃度区を設けた。また、菌体を除いた上澄みの培養液 600ml に半量のクロロホルムを加えて1時間振とうしたのち、クロロホルム層を分離し、減圧蒸留、残渣を Murashige & Skoog 培地 +2mg/l IAA の 120ml にとかして原液とし (5 litre equivalent per litre.....5 LE/l), 1:10, 1:100 (0.5, 0.05 LE/l) の各濃度区を設けた。生物検定はタバコカルス (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin No. 38) を用い、第4報 (6) に述べた方法にしたがい、カルスの生重で比較した。

結果

根茎のアミノ酸ペーパークロマトグラフィーの結果は、野生根茎の抽出液では、20個のスポット (未同定9個を含む) が得られ、グリシン、アルギニン、アスパラギン酸、アラニン、スレオニン、グルタミン酸、セリン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリンが検出された (Fig. 2)。これに対し、無菌根茎の場合は9個のスポット (未同定2個を含む) が得られたのみであり、グリシン、アスパラギン酸、アラニン、スレオニン、グルタミン酸、チロシン、バリンは検出されたが、アルギニン、セリン、ロイシン、イソロイシンのスポットは得られなかった。また、各スポットは野生根茎の場合に比べて小さかった (Fig. 3)。

プリン・ピリミジン化合物については、野生根茎抽出液の場合、7個のスポットが得られた。これに対し、無菌根茎のそれでは3個のスポットが得られたのみであ

* CYG 培地組成: グルコース, 1%; カゼイン水解物, 0.35%; 酵母エキス, 0.05%; KH_2PO_4 , 0.1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; 微量要素液 1 滴。

Fig. 2. Paper chromatogram showing amino acids in the extract of the wild rhizome of *C. goeringii*.

1. Glycine, 2. Arginine, 3. Aspartic acid, 4. Alanine, 5. Threonine, 6. Serine, 7. Glutamic acid, 8. Tyrosine, 9. Isoleucine, 10. Valine, 11. Leucine, 12-20. Unidentified spots.

Fig. 3. Paper chromatogram showing amino acids in the extract of the rhizome of *C. goeringii* cultured aseptically on Knudson C medium with Nitsch's microelements.

1. Glycine, 2. Aspartic acid, 3. Alanine, 4. Threonine, 5. Glutamic acid, 6. Tyrosine, 7. Valine, 8, 9. Unidentified spots.

り, また, それらのスポットは R_f 値が 0.42 以下であり, それより前線側にはスポットが検出できなかった (Fig. 4).

タバコカルスによるサイトカイニンの検定では, すでに第4報で報告した結果からも予想されたように, シュンランの無菌根茎抽出液はほとんど活性を示さなかつ

Fig. 4. Paper chromatogram showing purine-pyrimidine compounds in the extracts of the wild rhizome (A) and of the rhizome cultured aseptically on Knudson C medium with Nitsch's microelements (B).

Table 1. Effects of the ethanol extracts from the wild and aseptic rhizomes of *Cymbidium goeringii* at three levels of concentration on the growth of tobacco callus.

Additives		Average fresh weight per piece
Wild rhizome	1 GE/l*	122mg
	10	137
	100	422
Aseptic rhizome	1	398
	10	124
	100	128
Kinetin	100	135
	10 μ g/l	416

* GE/l: gram fresh weight equivalent per litre.

Table 2. Effects of ethanol extracts from the mycorrhizal fungi and the culture medium at three levels of concentration on the growth of tobacco callus.

Additives		Average fresh weight per piece
Culture medium	5 LE/l*	132mg
	0.5	101
	0.05	114
Mycorrhizal fungi	100 GE/l	136
	10	112
	1	126
Kinetin	10 μ g/l	146
		478

* LE/l; culture medium litre equivalent per litre.

た。一方、野生根茎抽出液では相当の活性がみられ、10 GE/l のレベルで 10 μ g/l カイネチンに相当する活性が認められた (Table 1)。しかし、野生根茎より分離し CYG 液体培地で培養した *Rhizoctonia* sp. については、菌体ならびにその培養液からの抽出液はともに活性を示さなかつた (Table 2)。

考 察

野生根茎 (シュート形成前の) の抽出液では、無菌根茎の場合に比べ、種類も多く、また多量の遊離アミノ酸、プリン・ピリミジン化合物が見い出される。この違いは菌体の消化・分解にもとづくものと考えられ、組織化学的研究 (7) の結果示唆した、菌体のタンパク質、RNA が消化の過程で徐々に分解され、その分解産物が器官形成に役立つであろうという考えを支持する材料といえよう。また、タバコカルス法による検定結果では、無菌根茎抽出液ではサイトカイニン活性がほとんど認められないのに対し、野生根茎 (ラン菌を含む) では相当の活性が認められた。このサイトカイニンレベルの差は、第 4 報 (6) で述べたシュンランと熱帯シンビジウムとの間の違いと同様に、両者のシュート形成の難易に関係していると思われる。野生根茎においてシュート形成が確実に行なわれるのは、無菌根茎と異なり、そのサイトカイニン活性の高いことが第一の原因ではなからうか。しかしながら、野生根茎から分離し純粋培養したラン菌 *Rhizoctonia* sp. の菌体および培養液のいずれの抽出液にもサイトカイニン活性が認められないという結果から考えれば、野生根茎中のサイトカイニンが直接菌自身の生産によるものとは考えにくい。実験に用いた菌の培養条件にも問題があり、*Rhizoctonia* は純粋培養においては栄養条件などに左右され、ランの根または根茎中にある場合とは形態も著しく変化することが認められている。したがって、生理的、生化学的にもかなり変化する可能性があるため、この点今後十分検討が必要である。樹木の外生菌根菌の一種、*Rhizopogon roseolus* がサイトカイニンを生産するという報告 (2) もあるので、*Rhizoctonia* がサイトカイニンを作る可能性も簡単に否定することはできない。

すでに緒言でも述べたような無菌培養における知見と野生根茎についてしらべた結果などを総合した場合、自然状態でのシュンランの器官形成について、現在の段階で考えられるメカニズムは次の通りである。シュンラン種子が自然状態で発芽した場合、シュンランはまず地中に菌根茎を形成し、相当期間の地下生活の後、シュートを分化、さらに最初の根を分化し、その後シュートを地上に出してくる。この場合、シュート、根を分化するの

に最小限必要な物質は、糖、無機塩以外に、サイトカイニン、アミノ酸であると思われる。菌体消化の初期の段階では、まず菌体の炭水化物が消化され根茎の皮層細胞 (storage region) で貯蔵でんぷん粒に変わりたくわえられる。その後やや長い期間をかけて菌体のタンパク質、RNA も分解を受け、アミノ酸、核酸分解物も根茎先端部に供給されるのであろう。その間にサイトカイニンも形成されるであろう (菌の分解産物、あるいは菌の何らかの関与によりラン自身によって合成されるところの現在のところ妥当と思われるが、この点を明らかにするにはさらに十分な研究が必要である)。サイトカイニン、アミノ酸などの物質ならびに根茎の先端部に近い皮層の貯蔵でんぷん粒が分解して生じた糖が生長点に供給され、生長点付近のタンパク質合成が著しくたかまり、シュートの分化、さらに根の分化が起これらと思われる。シュート形成時の生長点付近の組織化学的研究 (未発表) によれば、シュート形成時には生長点付近のタンパク質、RNA 分布が著しくたかまり、subapical region の貯蔵でんぷん粒が急激に消失することが観察されている。このようにして地中 (暗所) でシュートと最初の根とを分化したのち、シュートを地上に出し、光を受けて葉が展開し、光合成、窒素同化が行なわれ、その結果として根の形成も盛んになるものと考えられる。

着生の傾向の強い、いわゆる熱帯シンビジウムの場合には、自然状態では発生のごく初期の段階に糖、無機塩、ビタミンなどの供給をラン菌に依存している程度であり、比較的早く autotrophic (独立栄養的) な生活段階に移行すると思われる。したがって、無菌培養における栄養要求も比較的単純であり、糖、無機塩のみの培地でも十分器官形成が進行する。これに対して、温帯性地生シンビジウムが自然状態で発生する場合には、ラン菌がはるかに重要な役割を果たしていると思われる。シュンランなどが比較的高緯度の温帯まで自然分布していることを考えると、発芽してから最初のシュート、根を分化するまで地中で過ごすことは、低温に対する生態的適応の意味をもつのであろう。そしてこのような発生過程は、菌根茎を形成し、すでに述べたような器官形成のしくみをもつことにより成立するのではなからうか。また、自然状態での発生過程がラン菌に深く依存し、それに伴って根茎自身の物質合成能が遺伝的に低いため、無菌培養で完全な植物体に発生させるためには、より複雑な培地組成を必要とするのであろう。

摘 要

1. シュンランの野生根茎 (菌根茎) ならびに無菌根茎の抽出液の遊離アミノ酸、プリン・ピリミジン化合物

をペーパークロマトグラフィーでしらべた結果、野生根茎には、無菌根茎に比べ、種類も多くまた多量の遊離アミノ酸、プリン・ピリミジン化合物が検出された。この差は野生根茎中の菌体の消化分解に基づくものと思われる。

2. タバコカルス検定法により、野生根茎、無菌根茎、野生根茎から分離、培養した *Rhizoctonia* sp. の菌体およびその培養液からの抽出液についてサイトカイニン活性を調べたところ、無菌根茎の抽出液は活性をほとんど示さなかったが、野生根茎のそれは相当の活性を示した。純粹培養したラン菌の菌体およびその培養液からの抽出液にはいずれも活性が認められなかった。

3. 本実験の結果ならびに前報までに得られた知見を総合して、シュンランなど温帯性地生シンビジウムの自然状態および無菌培養における器官形成について考察した。

引用文献

1. PEROMBELON, M., and G. HADLEY. 1965. Production of pectic enzymes by pathogenic and symbiotic *Rhizoctonia* strains. *New Phytologist*. 64 : 144—155.
2. MILLER, C. O. 1967. Zeatin and zeatin riboside from a mycorrhizal fungus. *Science*. N. Y. 157 : 1055—1056.
3. UEDA, H., and H. TORIKATA. 1968. Organogenesis in the meristem cultures of *cymbidiums*. I. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 37 : 240—248.
4. ———., and ———. 1969. II. *ibid.* 38 : 188—193.
5. ———., and ———. 1969. III. *ibid.* 38 : 262—266.
6. ———., and ———. 1970. IV. *ibid.* 39 : 202—205.
7. ———., and ———. 1970. V. *ibid.* 39 : 256—260.
8. ———., and ———. 1970. VI. *ibid.* 39 : 363—368.
9. ———., and ———. 1972. Effects of light and culture medium on adventitious root formation by *cymbidiums* in aseptic culture. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 41 : 322—327.