カトレヤの組織培養に関する研究 (第3報)

かっ変前駆物質の季節的消長と活着率について

石 井 實

(久留米農芸高等学校)

Studies on Tissue Culture *Cattleya* Species III. The Relationship between Seasonal Changes of Phenolics Exuded from Pseudobulb Tissues and Survival Rate of Explants

Minoru ISHII

Kurume Agriculture High School

Yamakawa-machi, Kurume, Fukuoka 830

Summary

Concerning the browning of liquid media which occasionally takes place *in vitro* culture of *Cattleya* shoot tips, the relationship between survival rate of explants and seasonal variation of the amount of browning substrates exuded from the chops of young *Cattleya* tissues was studied. In addition, effects of rutin supplementation on the survival rate of explants were investigated in this experiment.

1. Browning substrates were exuded in large amounts from the chops of young shoot tips in the period from June to September when the growth of shoots was vigorous and the browning of explants, lateral buds, was also remarkable. The survival rate of explants was consequently reduced to about 30%. On the other hand, a survival rate of more than 70% was attained in the period from November to February when stock plants remained in dormant condition and thus browning of explants and exudation of browning substrates both were restrained markedly.

2. Survival rate of explants was increased up to 60 or more when rutin was added to the liquid culture medium at a concentration of 50 ppm during the period from the summer to the fall when many explants usually fail to survive *in vitro* culture. Optimum concentrations of rutin added to the culture medium were 50 to 100 ppm for the tissue culture of *Cattleya* plants.

緒 言

カトレヤ類は茎頂培養に当たり、培養中の組織がかっ変し、枯死に至ることが多く、活着率が安定していない。したがって、茎頂培養による増殖法を実用化するには、このかっ変現象の生理を解明し、抑止する手法の確立が前提となる。前報(6)において、外植体の採芽法、採芽する新茎の大きさ、培養温度、培養液の pH などが、外植体の活着に及ぼす影響を、新茎組織から培養液中に溶出するかっ変前駆物質との関連で検討し、活着促進のための手順について報告した。引き続き、その手順を一層確実なものにするために、次の試験を行った。

組織や培地のかっ変現象を引き起こす前駆物質は eucomic acid や tyramine などのフェノール物質と推定され、外植体はそれらの溶出によって生理的不均衡に陥り、さらに溶出した eucomic acid の生長阻害作用を受けて枯死に至るものと思われる(5)。これら物質の生成溶出は採芽する母株の生理状態に左右されることが予測されるので、本試験では周年的に採芽し、その活着率を茎頂組織から培地に溶出するかっ変前駆物質との関連で検討し、採芽の適期を確かめた。

一方、外植体の活着率を高めるには、フェノール物質の組織からの溶出に伴う生理的害作用に拮抗させる化学的処理が有効と思われる。そこで、オーキシン酸化酵素

の活性を阻害し、オーキシンの共存で生長促進効果が知られている(8) オルトジフェノール誘導体の培地添加を試みた。また、シンビジウム(10)やパフィオペディルム(3)で培地に光吸収剤として活性炭を加用し、幼苗の生長促進効果がえられているが、その理由の一つに培地に溶出する有害なフェノール物質の吸着が考えられている。カトレヤの外植体の活着不良も培地に溶出した eucomic acid の害作用が要因の一つと考えられるので、活性炭の培地添加についても、併せて検討した。

材料及び方法

試験 1. かつ変前駆物質溶出の季節的变化

供試品種には *Cattleya trianae* 'Mooreana' を用い、1977 年 1 月より 12 月まで試験を行った。毎月 1 回、長さ約 10 cm に伸びた新茎から茎頂組織を 200 mg 摘出し、三つに分割して 20 ml の蒸留水に浸漬し、25℃、連続照明下で 12 時間インキュベートした。その溶液の吸光スペクトルの極大吸収波長は 280 nm で、先に報告したように(5) カトレヤの新茎組織から多量に単離される eucomic acid や tyramine などフェノール物質の極大吸収波長と一致する。そこで、本試験においても、所定のインキュベーションの後に、その溶液の 280 nm における吸光度を測定し、かつ変前駆物質溶出の季節的变化を推定した。

試験 2. 活着率の季節的变化

試験 1 と平行して、毎月 15 日に約 10 cm に伸びた新茎の側芽を採取して培養に供した。初めの 3 週間は液体培養を行い、その間 1 週間に 1 回培養液を更新した。その後に包葉を切除して茎頂組織を露出させ、十分水洗した後、固体培地に移植して 15 週間培養し、活着率を調査した。なお、培地は Reinert and Mohr(9) の組成に準じて調製したが、NAA を 1.0 ppm に変更し、IBA の代りにカイネチン 0.1 ppm を加え、pH は 5.3 に調整した。培養容器は、いずれも 100 ml の三角フラスコを用い、液体培地は 10 ml、固体培地は 1% の寒天を加えて 35 ml/ずつ分注した。培地の滅菌はオートクレーブで 1.2 kg/cm² に加圧して 15 分間行った。培養は 25℃ 恒温室のビタルックス連続照明下(容器面, 2000lx)で行った。試験個体数は 4 本の新茎から 12 個の側芽を採取して供試した。

試験 3. ルチンの培地添加

オルトジフェノール誘導体には、ルチンのほかにコヒ酸、クロロゲン酸などが知られているが、ここでは化学的に安定で、入手が容易なルチン (C₂₇H₃₀O₁₆) を供試した。培地は前項に準じて調製し、滅菌前にルチンを 0, 5, 10, 50, 100 及び 500 ppm 添加して 6 試験区を設けた。

1977 年 7 月 5 日に採芽し、前項と同様な手法で 120 日間培養して活着率を調べた。また、試験 2 にルチン 50 ppm 添加区を設けて対比させ、ルチンの効果の季節的变化を確かめた。

試験 4. 活性炭の培地添加

培地の調製並びに培養条件は試験 2 に準じた。活性炭(片山化学)は培地滅菌前に、それぞれ 0, 0.1, 0.5 及び 1.0% 添加した。かつ変現象の著しい 7 月 5 日(1977 年)に採芽して 120 日間培養した。

結 果

試験 1. かつ変前駆物質溶出の季節的变化

新茎の茎頂組織をインキュベートした後の溶液の 280 nm における吸光度は第 1 図に示すような月別変化を示した。

すなわち、培養液中の吸光物質はかつ変前駆物質のフェノール化合物と推定されるが、新茎の伸生長のおう盛な 6 月から 9 月にかけて著しく高まり、生長の弱まる冬春季は低くなることが確かめられた。

試験 2. 活着率の季節的变化

活着率の月別変化は第 2 図に示した。新茎の生長がおう盛な 6 月から 9 月にかけて採芽した外植体の活着率は明らかに低く、特に 7 月並びに 8 月の採芽では 30% を割る低率となった。そして母株の生長が緩慢となる 10 月からは好転し、12 月の採芽では 82%、1 月では 92% の高率に達した。

これらの液体培養中に培養液は赤かつ色に汚染したが、活着率の高いシーズンには軽度で、低いシーズンには汚染が著しく、生理的に害作用をもたらすと思われるかつ変前駆物質の溶出と密接な関係にあることが示唆された。ちなみに、外植体の活着率と試験 1 の茎頂組織をインキュベートした後の溶液の吸光度との間には有意な負の相関関係が認められた(第 3 図)。

Fig. 1. Seasonal changes of phenolics exuded from *Cattleya pseudobulb* tissue.

The phenolics were measured by absorbancy at 280 nm after 12 hour incubation at 25°C.

Fig. 2. Seasonal changes of the survival rate of lateral bud explants of *Cattleya trianae*.

The explants were placed in the liquid medium for 3 weeks, and then the explants were exposed a meristem and cultured on the basal solid medium for 15 weeks.

RM medium containing 1.0 ppm and 0.1 ppm kinetin was served as basal medium and 50 ppm rutin was added to liquid medium for rutin treatment.

Fig. 4. Effect of addition of rutin to the liquid medium on the survival rate of lateral bud explants.

Fig. 3. Correlation between the absorbancy of phenolics exuded from pseudobulb tissue and the survival rate of lateral bud explants.

試験 3. ルチンの培地添加

培地に添加するルチンの濃度に関する試験は、活着率が最も低下する7月の採芽で行った。第4図に示すように、5 ppm 以上で活着率を向上させる効果が認められたが、最適濃度は 50~100 ppm で、その際の活着率は 70 % をこえた。

一方、ルチン 50 ppm 添加培地における月別活着率は第2図に、ルチン添加培地と対比させて図示した。ルチンの効果は無添加培地で活着率が低下する6月から9月にかけて明らかに認められた。しかし、無添加培地でも活着率が 65% を越える 10 月から3月にかけての採芽では、ルチンを添加しても無添加培地を上回る活着率は

Fig. 5. Effect of addition of activated charcoal to the liquid medium on the survival rate of lateral bud explants.

えられなかった。

試験 4. 活性炭の培地添加

本試験も前項と同様に活着率の低下する7月の採芽で行ったが、第5図に示したように、液体培地に対する活性炭添加の効果は認められなかった。

考 察

先に報告したように(5), カトレヤの新茎からは著しい量の eucomic acid と tyramine が単離される。カトレヤの茎頂培養時に外植体や培地がかつ変現象を起こすのは、組織の切断に伴って酸化酵素の活性が高まり、これらフェノール物質が酸化縮合されるためと推定される。そして、これらフェノール物質の溶出により、外植体内のアミノ酸代謝の均衡が崩れ、TCA サイクルも乱れて生理的不均衡に陥るとともに、溶出した eucomic acid の生長阻害作用も受け、外植体は生長を抑制され、さらには枯死に至るものと思われ。

著者はこのような、いわゆるかつ変現象に季節的消長のあることに早くから気づいていたが、ここにその実態を確認できた。すなわち、新茎の組織から溶出するかつ変前駆物質は6月から9月にかけての生長の著しい季節に多く、11月から2月にかけての生長停滞期に少ないことが確かめられ、しかも夏季においては改良された培養条件下においても(6), 30% 程度の活着率にとどまったのに対し、冬季においては同様な手順で活着率が70% を越えたことが注目される。特に、12月から1月にかけては、培養液の汚染は著しく少なく、液体培養時に培養液の更新を行わなくても高率の活着率がえられることも確かめられている。このように、培養時の外植体のかつ変枯死は培養液のかつ色汚染と深い関係があるが、採芽する新茎からのかつ変前駆物質の溶出量と密接な相関関係のあることが再確認されたといえよう。

ところで、かつ変現象が母株の新茎の伸長生長が最も盛な夏季に著しいことは、採芽が容易な季節だけに、茎頂培養によるカトレヤ繁殖法の確立に当たって大きな支障となろう。そこで、夏季の採芽に対し、活着率を向上させるために行った試験では、初期の液体培養時に培地にルチン添加が有効なことを確かめた。ルチンにはオーキシン酸化酵素の活性を阻害する作用があり、エンドウの生長を促進したり(8)、さし木繁殖のさいの発根促進効果が知られている(2)。本試験で認められたルチンの効果は、その原因は推測の域を出ないが、外植体のオーキシン活性を維持することによって、かつ変前駆物質の溶出に伴う生理的害作用に拮抗しえた結果とも考えられる。その生理作用の究明は今後の検討に待ちたい。

なお、市橋・加古(7)はルチン添加の効果を認めていないが、同氏らはルチン 1 ppm を固体培地に添加し、茎頂組織を直接置床して検討されたもので、本試験とは処理濃度や培養条件が著しく相違するからではなかろうか。

一方、活性炭の培地添加は本試験の範囲内では認められなかった。活性炭は培地の光吸収剤としての効果のほかに、有害なフェノール物質やエチレングスなどの吸着効果などが考えられており、シンビジウムやパフィオペディウムなどの幼苗の生長促進や屈地根の形成に有効なことが報告されている(10, 3)。しかし、ニンジンやタマネギのカルスからの再分化にさいしては、培地に添加した活性炭がオーキシンを吸収することによって、形態形成が促されるとする見解もある(4)。本試験で効果が現れなかったのは、正、負両面の効果が相殺した結果かも知れない。

摘 要

カトレヤの茎頂培養時に起こるかつ変現象について、新茎の茎頂組織から溶出するかつ変前駆物質の年間変動と側芽外植体の活着率との関係を検討した。また、培地にルチンを添加して活着率に及ぼす効果を確かめた。

1. 新茎組織からのかつ変前駆物質の溶出量は伸長生長のおう盛な6月から9月にかけて多く、その時期の側芽外植体はかつ変現象が著しく、活着率は30% 前後にとどまった。一方、新茎の生長が停止する11月から2月にかけては、その組織からのかつ変前駆物質の溶出は少なく、外植体のかつ変も軽度で、活着率は70% を越えた。

2. 側芽外植体の活着率が低下する夏秋季に、培地にルチンを添加すると活着率が60% 以上に高まった。添加するルチンの最適濃度は50~100 ppm であった。

謝 辞 本研究に当たり、九州大学農学部上本俊平教授並びに藤枝國光助教授に適切な御指導をいただき、また、九州大学薬学部西岡五夫教授より有益な助言をいただいた。ここに深謝の意を表する。

引用文献

1. ANAGNOSTAKIS, S.L. 1974. Haploid plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal. *Planta* (Berl.) 115: 281—283.
2. CHOONG, I.L. and Jr. H.B. TUKEY. 1971. Induction of root-promoting substances in *Euonymus alatus* 'Compactus' by intermittent mist. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96: 731—736.
3. ERNST, R. 1974. The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 26: 35—38.
4. FRIDDORG, G. and T. ERIKSON. 1975. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. *Physiol. Plant.* 34: 306—308.
5. 石井 実・正山征洋・上本俊平・西岡五夫・藤枝國光. 1976. カトレヤの組織培養に関する研究(第1報) フェノール物質の分離同定および同物質の生

- 物活性について，九大農学芸誌，31：99—105.
6. 石井 実・上本俊平・藤枝國光. 1979. カトレヤの組織培養に関する研究（第2報）. 培養組織のかっ変防止法について. 園学雑. 48：199—204.
 7. 市橋正一・加古舜治. 1977. カトレヤの茎頂培養による栄養繁殖法に関する研究（第2報）. カトレヤのかっ変現象について. 園学雑. 46：325—330.
 8. RABIN, R. S. and R. M. KLEIN. 1957. Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indole-acetic acid oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 70：11—15.
 9. REINERT, R. A. and H. C. MOHR. 1967. Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 91：669—671.
 10. WERCKMEISTER, P. 1970. Über die Lichtinduktion der geotropen Orientierung von Luft- und Bodenwurzeln in Gewebekulturen von *Cymbidium*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83(1)：19—26.