シンビジウム(*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.)の プロトコーム様球体(PLB)の器官形成に及ぼす酸素除放剤 ORC の影響

島崎一彦・谷 悠・福元康文

高知大学農学部 783-8502 南国市物部乙 200

Effect of Oxygen Release Compound(ORC) on Organogenesis in Protocorm-Like Body (PLB) Cultures of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl.

Kazuhiko SHIMASAKI, Yuu TANIBUCHI and Yasufumi FUKUMOTO

Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe B200, Nankoku, 783-8502, Japan

Abstract

Effect of ORC(oxygen release compound) on organogenesis in PLB(protocorm-like body) cultures of *Cymbidium finlaysonianum* was examined. Proliferation of PLB was promoted by addition of ORC at concentrations over 30 mg/l. Addition of ORC to culture medium resulted in a significant increase in shoot numbers developed from PLBs. Number of shoots were increased 1.8 fold compared to that after control treatment.

Keywords : *Cymbidium finlaysonianum*, oxygen release compound, ORC, protocorm-like body, shoot

緒 言

In vitro における組織培養において、培養容器中の酸素濃度は培養体の生長に大きく影響することが明らかにされている¹⁾。 *In vitro* における培養で培養容器の通気が不十分である場合、培養容器中の酸素濃度が低下し、外植体への酸素が十分供給されず生長が抑制され、枯死することが多い¹⁾。 *Phalaenopsis* のプロトコーム様球体(PLB)の培養において、培養体が液体培地中に完全に沈むと肥大生長のみでほとんど増殖しないが、綿を培地支持体中使用し空気と接触させることでPLBの増殖が促進されることが報告されている²⁾。 また、 *In vitro* において共生菌と共培養された急速に生長するランのプロトコームの酸素消費量は、生長の緩慢な無菌培養の場合よりも著しく多く、生長が促進される状態で酸素の消費量が多いことが示されている³⁾。 培養容器中の植物に光を照射すれば光合成により酸素を発生するので密閉状態で

も生育可能であると考えられるが、ラン科植物では、初期生育段階において暗黒条件で種子発芽や生長がより促進されることが多く、強光条件下では生長が抑制される種が多いため強い光の照射は実用的でない^{5,6)}。

本研究は、1995年にアメリカのリジェネシス社が発売したバイオディメーションを目的とした酸素除放剤 ORC(Oxygen-Release-Compound)^{7,8)}の組織培養用培地への利用可能性を検討することを目的に、培地中の ORC が着生シンビジウムである *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. の PLB の生長および器官形成に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 植物材料

タイのコンケン大学から1998年に入手した *C. finlaysonianum* Lindl. の PLB のクローン MS 培地⁹⁾中の硝酸アンモニウムを1/4倍(412.5 mg/l)、硝酸カリウムを1/2倍(950 mg/l)に変更し、ショ糖 20 g/l、ゲルライト 2 g/l を添加した修正 MS 培地¹⁰⁾で約2ヶ月おき

2002年11月18日受付

2003年1月29日受理

に継代培養した。増殖した直径約2.5 mmのPLBを一個ずつ切り取り供試した。

2. 培 養

培地はショ糖20 g/l, Bacto-typtone(Difco 製) 2 g/l, ゲルライト2 g/lを添加したKano培地¹¹⁾を基本培地とした。酸素徐放剤ORCは0, 10, 30, 50, 70および100 mg/lの濃度で培地の殺菌(121°C, 15分)前に添加した。培養容器はポリカーボネート製のキャップの付いた225 ml UM培養瓶(井内盛栄堂, 大阪)を使用し, 各々の容器に40 mlの培地を分注した。PLBは1培養容器あたり5個置床し, 1処理区3個の培養容器で合計15外植体とした。置床後のPLBは25±1°C, 16時間日長の白色蛍光灯照明下(54 μE/m²・s)で8週間培養した。

結果および考察

C. finlaysonianum Lindl. のPLBを酸素徐放剤ORCを添加した培地で8週間培養後の器官形成様相をTable 1およびFig. 1に示した。ORCを培地に添加した全処理区でPLB形成およびシュート形成が促進された。PLB形成数はORC 10 mg/l処理区を除く全ORC添加区で有意に増加し, 高濃度ほど大きい値を示した。ORC 100 mg/l添加区のPLB形成数は, 無添加区と比較して約1.4倍(25.4個)に増加した。外植体のPLB形成率は全ての処理区で100%であった。PLBから形成されたシュート数はORCを添加した全処理区で無添加区と比較して有意に増加した。ORC添加区間のシュート数はほとんど同じ値を示し, 無添加区の約1.8倍の値を示した。シュートはORC無添加区およびORC 70 g/l区を除き全ての培養体で形成された。培養体の新鮮重もORC添加区で無添加区と比較して有意に増加した。ORC添加区間で無添加区と比較して約1.6~1.8倍の値を示した。新鮮重はORC添加区では添加濃度による

Fig. 1 Effect of ORC(oxygen release compound)on organogenesis in PLB cultures of *C. finlaysonianum*. Bars=10 mm
a : Control, b : ORC 30 mg/l, c : ORC 50 mg/l, d : ORC 100 mg/l

有意差は認められなかった。8週間の培養期間中にシュートの発根は認められなかった。

以上の結果から着生シンビジウムの一種である*C. finlaysonianum* Lindl. のPLBの培養において培地に添加した酸素徐放剤ORCはPLBの増殖およびPLBからのシュート形成を促進することが明らかになった。Kano(1968)はシュンラン(*Cymbidium goeringii*)および*Cypripedium acaule*の実生の無菌培養において, 密閉容器を使用すると枯死率が高いことを明らかにしている¹⁾。また, *Galeola septentrionalis* (ラン科)の無菌培養において実生の生長に最適な酸素濃度は土壤中と同様の2~3%であるとされている⁴⁾。本実験の結果から着生シンビジウムである*C. finlaysonianum*のPLBの培養において, 培地に添加した酸素徐放剤ORCは, PLBの増殖およびシュート形成を促進することが明らかになり, 組織培養における生育促進に有効であることが示された

Table 1 Effect of ORC on organogenesis in PLB cultures of *C. finlaysonianum* Lindl.

ORC(mg/l)	Average number/explant		Formation rate(%)		FW/explant(mg)
	PLB	Shoot	PLB ¹⁾	Shoot ²⁾	
0	17.7 a	2.7a	100	87	237a
10	19.8 ab	4.8b	100	100	376b
30	20.8 bc	4.9b	100	100	420b
50	21.4 bc	4.8b	100	100	420b
70	24.3 bc	4.9b	100	93	402b
100	25.4 c	4.8b	100	100	422b

Means separation by Duncan's new multiple range test (5% level, n=15)

¹⁾ (Number of explants forming PLB/15)×100

²⁾ (Number of explants forming shoot/15)×100

が、この効果が酸素濃度の増加に直接起因するかどうかについては明らかでなく、今後さらに詳細な検討が必要である。

引用文献

- 1) Kano, K. : Acceleration of the germination of so-called hard-to-germinate orchid seeds, Amer. Orchid Soc. Bull., 37 : 690-698(1968)
- 2) Park, Y. S., Kakuta, S., Kano, A. and Okabe, M. : Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium. Plant Cell. Tiss. Org. Cul., 45 : 79-85(1996)
- 3) Blakeman, J. P., Monahel, M. A. and Hadley, G. : Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorm, New Phytol. 77 : 697-704 (1976)
- 4) Nakamura, S. I. : Atmospheric conditions required for the non symbiotic culture of an achlophyllous orchid *Galeola septentrionalis* seedlings, Botanical Magazine Tokyo, 89 : 211-218 (1976)
- 5) Harvaris, G. : Growth requirement of and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture, Canadian J. Bot., 50 : 1223-1229(1973)
- 6) Mitchell, R. B. : Growing hardy orchids from seeds at Kew, The Plantsman, 11 : 152-169 (1989)
- 7) Barcelona, M. J. and Xie, G. : In situ lifetimes and kinetics of a reductive whey barrier and an oxidative ORC barrier in the subsurface, Environmental Science and Technology, 35 : 3378-3385(2001)
- 8) Burns, K. A., Codi, S. and Swannell, R. J. P., Duke, N. C. : Assessing the oil degradation potential of endogenous micro-organisms in tropical marine wetlands, Mangroves and Salt Marshes, 3 : 67-83(1999)
- 9) Murashige, T. and Skoog, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-493(1962)
- 10) Shimasaki, K. and Uemoto, S. : Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes developed from seeds and pseudobulbs. Plant Cell. Tiss. Org. Cul. 22 : 237-244(1990)
- 11) Kano, K. : Seed germination of oriental *Cymbidium* and their shoot tip culture. Proc. 6th World Orchid Conf., pp. 133-142(1971)