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キトサンの影響

島崎一彦・谷渕 悠・福元康文

高知大学農学部 783-8502 高知県南国市物部乙 200

The Effects of Chitosan on Organogenesis in Protocorm-Like Body (PLB) of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl.

Kazuhiko SHIMASAKI, Yuu TANIBUCHI and Yasufumi FUKUMOTO

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

Abstract

Protocorm-like bodies (PLBs) of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. were explanted on modified Kano's medium (Hyponex medium) supplemented with two kinds of chitosans. Within 8 weeks of culture, proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) and differentiation of shoots from PLBs were observed. Explants were cultured on medium containing chitosans formed mass of PLBs followed by differentiation of shoots. The number of PLBs and the number of shoots from proliferated PLBs were significantly increased by application of chitosans.

Keywords : shoot, protocorm-like body, chitosan, *Cymbidium finlaysonianum*

緒 言

キトサンは農業分野において、植物の生長促進^{1,2)}、切り花や果実のポストハーベストにおける品質保持³⁻⁵⁾、抗菌性の増大⁶⁾、ウイルスの感染防御⁷⁾など多方面で利用されている。キトサンおよびその誘導体による植物生長に及ぼす影響については、キャベツの葉からのカルス形成⁸⁾、トルコギキョウ⁹⁾、ダイコン、ハツカダイコンの实生の生長促進作用¹⁾などが明らかにされている。しかしながら、ラン科植物の生長に及ぼすキトサンの影響については明らかにされていない。自然条件下でのラン科植物の初期生長に必要であると考えられている菌根菌の菌糸壁の主成分は、キチン、キトサン、マンナン、 β -グルカンなどの多糖類であり⁹⁾、ランの植物体内で菌糸が消化された後にはキチン由来の多糖類が存在することが確認されている¹⁰⁾が、それらの生長に及ぼす作用につ

いては明らかでない。また、ラン科植物の種苗生産において利用されている組織・細胞培養技術においても、生長に及ぼす影響については、エリシターに関する研究¹¹⁾を除き、ほとんど検討されていないために利用されていない。

本実験では、熱帯性の着生シンビジウムの一種である *C. finlaysonianum* のプロトコーム様球体(PLB)を供試し、2種類のキトサン(‘キトサン H’ および ‘キトラゼ’)が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

1998年にタイのコンケン大学から入手した *C. finlaysonianum* Lindl. のプロトコーム様球体(PLB)のクローンを、MS培地¹²⁾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を添加した改変MS培地¹³⁾で約2ヶ月おきに継代培養した。増殖した植

2002年11月12日受付

2003年2月28日受理

Table 1 Effect of 'Chitosan H' on organogenesis in PLB cultures of *C. finlaysonianum*

Chitosan H (g/l)	PLB	Shoot without root	Shoot with root	mgFW /explant
0	8. 3 ^a (100) ^x	0. 4 ^a (20) ^y	0	135 ^a
1	23. 9 ^{bc} (100)	4. 3 ^c (93)	0	351 ^{bc}
3	23. 5 ^{bc} (100)	5. 5 ^c (93)	0	379 ^{bc}
5	26. 5 ^d (100)	5. 7 ^c (100)	0. 8 ^a (6) ^y	567 ^d
7	18. 6 ^b (100)	2. 3 ^b (73)	0. 9 ^a (6)	333 ^{bc}
10	15. 8 ^b (100)	0. 2 ^a (60)	0. 5 ^a (6)	237 ^b

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

Average number for one explant

()^x= (Total number of explants forming PLB/15) × 100()^y= (Total number of explants forming shoot/15) × 100**Table 2** Effect of 'Chitolaze' on organogenesis in PLB cultures of *C. finlaysonianum*

Chitolaze (g/l)	PLB	Shoot without root	Shoot with root	mgFW/ explant
0	8. 3 ^a (100) ^x	0. 4 ^a (20) ^y	0	135 ^a
1	16. 6 ^b (100)	1. 6 ^b (60)	0	245 ^b
3	22. 6 ^c (100)	2. 5 ^c (67)	0	326 ^b
5	12. 3 ^d (100)	1. 2 ^b (33)	0	182 ^a
7	12. 4 ^b (100)	0. 8 ^b (13)	0	190 ^a
10	12. 1 ^b (100)	0. 2 ^a (7)	0	185 ^a

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

Average number for one explant

()^x= (Total number of explants forming PLB/15) × 100()^y= (Total number of explants forming shoot/15) × 100

物体から直径約 2.5 mm の PLB を一個ずつ切り取り供試した。

2. 培 養

ハイポネックス 3 g/l, ペプトン (Difco 製), ショ糖 20 g/l およびゲルライト 2 g/l を添加した改変 Kano 培地¹⁴⁾ (ハイポネックス培地) を基本培地として使用した。キトサンとして高分子キトサン (分子量 $5 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$) である 'キトサン H' (君津化学製, 東京) および低分子キトサン (平均分子量 5×10^4) である 'キトラーゼ' (リコー農研製, 東京) を 0, 1, 3, 5, 7 および 10 g/l の濃度で添加し, 1 mM (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid) sodium salt (MES, Sigma Chemical 社製) を用い, 培地の殺菌 (121°C, 15 分) 前に pH 5.8 に調整した。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。培地の殺菌は 121°C で 15 分間行った。 *C. finlaysonianum* の 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 個培養した。置床後は $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 時間日長の白色蛍光灯 (東芝 FL40SS・W37) 照明下 ($54 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) で 8 週間培養後器官形成様相を調査した。

結果および考察

'キトサン H' を添加した改変 Kano 培地で *C. finlaysonianum* の PLB 培養 8 週間後の器官形成様相を Table 1 に示した。'キトサン H' の添加によって PLB 増殖及び PLB からシュート形成が著しく促進された。プロトコーム様球体の形成数は 'キトサン H' 1, 3 および 5 g/l 処理区で有意に増加し, 無添加区と比較して 2.8~3.2 倍の値であり, 5 g/l 区で最大値 (26.5) を示した。'キトサン H' の添加によってシュート形成も促進された (Fig. 1)。未発根のシュート形成数は 1~5 g/l 区で無添加区と比較して有意に増加し, 10.7~14.3 倍の値を示した。シュート形成数は 5 g/l 区で最大値を示した。シュートの発根は 'キトサン H' 5~10 g/l 区で認められ, 'キトサン H' 0, 1 および 3 g/l 区ではシュートは発根しなかった。培養体の新鮮重は 1~7 g/l で無添加区よりも有意に大きい値を示した。

培地への 'キトラーゼ' 添加によって 'キトサン H' 同様に PLB の増殖およびシュート形成が著しく促進された。PLB の形成数は 'キトラーゼ' を添加した全ての処理区

Fig. 1 Effect of 'Chitosan H' on organogenesis in PLB cultures of *C. finlaysonianum*.

a : control, b : Chitosan H 5 g/l, bars=10 mm

で有意に増加した。シュート形成は全ての処理区で認められ、シュート形成数は 3 g/l 区で無添加区の約 6 倍の値 (2.5) を示した。'キトラゼ' を添加して全処理区でシュートからの発根は認められなかった。培養体の新鮮重は 1 および 3 g/l 区で大きい値を示し、3 g/l 区で最大値を示した。

以上の結果からキトサンである 'キトサン H' および 'キトラゼ' の添加によって PLB 形成が促進され、形成数は無添加区と比較して各々約 3.2 倍および 2.5 倍に増加することが示された。シュート形成は 'キトサン H' および 'キトラゼ' とともに高濃度の添加区を除き著しく促進された。'キトサン H' 5~10 g/l 区ではシュートの発根も認められた。キトサンの土壌混和処理による根部の生長におよぼす影響についてはハツカダイコン、カンショ、ニンジン等の作物で生長促進効果が確認されている¹⁾。また、培地へのキトサン添加によるキチナーゼ、キトサナーゼ等の酵素の生成誘導については多くの報告がある^(6,8,11,15)が、植物体の生長におよぼす影響についての報告は少ない¹⁶⁾。また、*in vitro* においてキトサンがシュートの発根に及ぼす影響については報告されていない。シンビジウムの PLB の形成促進およびシュート形成の誘導は、一般的に培地にオーキシンやサイトカイニンなどホルモンを添加することで行ってきた¹⁷⁾。しかし、サイトカイニンによってシュートの発根が著しく阻害される種¹⁸⁾では、順化可能な植物体を得ることが難しい。シンビジウムの PLB からシュートを誘導する過程において、植物ホルモン無添加の培地でもキトサンを添加すれば容易にシュート形成が誘導できることが明らかになった。また、シュートの発根も促進されることが示されたのでキトサンを利用することによるシンビジウムの苗生産効率向上の可能性が示唆された。

引用文献

- 1) 次田隆志：農業資材，キチン，キトサン研究会編，キチン，キトサンハンドブック，技報堂出版，pp. 440-458 (1995)
- 2) Ohta, K., Atarashi, H., Shimatani, Y., Matsumoto, S., Asao, T. and Hosoki, T. : Effects of chitosan with or without nitrogen treatments on seedling growth in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. cv. Kairyuu Wakamurasaki, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 69 : 63-65 (2000)
- 3) Du, J. M., Gemma, H., Iwahori, S. and Du, J. M. : Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit, Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 66 : 15-22 (1997)
- 4) Reddy, M. V. B., Angers, P., Castaigne, F. and Arul, J. : Chitosan effects on blackmold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes, Journal of the American Society for Horticultural Science, 125 : 742-747 (2000)
- 5) Reddy, M. V. B., Belkacemi, K., Corcuff, R., Castaigne, F. and Arul, J. : Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit, Postharvest Biology and Technology, 20 : 39-51 (2000)
- 6) Chowdhury, A. K. and Sinha, A. K. : Increase resistance in chickpea plants to *Fusarium*-wilt following treatment with chitosan, Journal of Mycopathological Research, 38 : 105-108 (2000)
- 7) Chirkov, S. N., Ilina, A. V., Surgucheva, N. A., Letunova, E. V., Varitsev, Y. A., Tatarinova, N. Y. and Varlamov, V. P. : Effect of chitosan on systemic viral infection and some defense responses in potato plants, Russian Journal of Plant Physiology, 48 : 774-779 (2001)
- 8) Hirano, S. and Hayashi, M. : Chitosan and its derivatives as an activation of plant cell in the callus formation of cabbage leaves, Polym. Mater. Sci. Eng., 57 : 38-42 (1987)
- 9) Rasmussen, H. N. : Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 142-172 (1995)
- 10) Perterson, R. L. and Currah, R. S. : Synthesis of mycorrhizae between protocorm of *Goodyera repense* (Orchidaceae) and *Ceratobasium cereale*, Candian Journal of Botany, 68 : 1117-1125 (1990)
- 11) Funk, C. and Brodelius, P. : Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*, Phytochemistry, 29 : 845-848 (1990)

- 12) Murashige, T. and Skoog, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15 : 473-493 (1962)
- 13) 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)
- 14) Kano, K. : Studies on the media for orchid seed germination. *Mem. Fac. Agric. Kagawa Univ.* 20 : 1-68 (1965)
- 15) Tanahashi, T. and Zenk, M. H. : Elicitor induction and characterization of microsomal protopine-6-hydroxylase, the central enzyme in benzophenanthridine alkaloid biosynthesis, *Phytochemistry*, 29 : 1113-1122 (1990)
- 16) Sauerwein, M., Flores, H. E., Yamazaki, T. and Shimomura, K. : *Lippia dulcis* shoot cultures as a source of the sweet sesquiterpene hernandulcin, *Plant Cell Reports*, 9 : 663-666 (1991)
- 17) Matsui, T., Kawai, K. and Samata, Y. : Effect of N⁶-benzylaminopurine and α -naphthaleneacetic acid on the organogenesis of *Cymbidium*, *Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ.* 10 : 99-106 (1970)
- 18) Rücker, W. : Einfluss von Cytokininen auf Wachstum und Differenzierung in vitro kultivierter Protokorme von *Cymbidium*, *Zeit. Pflanzenphysiol.*, 72 : 338-351 (1974)