

フウランの増殖における AOPP* の効果

奈良教育大学 教育学部

箕作和彦

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 小田雅行

(1) はじめに

フウラン (*Neofinetia falcata* H. H. Hu) は、常緑樹の樹皮や岩場などに着生する単茎性のラン科植物で (図-1)、関東地方南部から沖縄までの山野に分布する。開花期は6~7月で、花は白色で芳香がある。本種は観賞用として江戸時代から栽培され、近年では葉の形状や模様、花の形や色、根の色によって品種に分けられ、特に変異品種は富貴蘭とよばれ園芸的価値が高い。

フウランの増殖は、主に株分けであったが、無菌播種技術が開発されてからは、種子繁殖による増殖が行われるようになった。しかし、種子

増殖では後代の形質にばらつきが生じる。そのため、優良形質をもつ個体の増殖には栄養繁殖が不可欠であり、大量増殖が可能な組織培養法の確立が望まれる。

これまで、フウランの組織培養については、小花を外植体とする方法¹⁾や幼植物体を培養する方法²⁾が報告されている。幼植物体の培養では、培養組織の褐変問題を克服する方法として暗黒処理が有効であることが明らかになっている。褐変は、植物の二次代謝でフェノール物質の生合成が関係する。そこで、フウランの組織培養において、フェノール物質の生合成をより簡便にコントロールした組織培養による増殖方法について検討した。

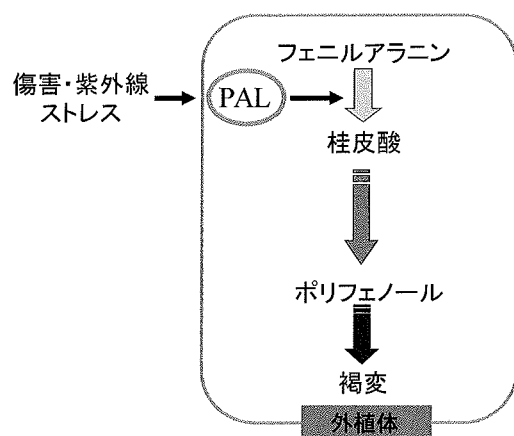


図-1 フウラン

(2) 組織培養における褐変問題

植物体は傷害により、フェニルプロパノイド代謝系の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニリアーゼ (PAL) やポリフェノールオキシダーゼなどの防御応答関連のタンパク質を誘導することが知られている。培養組織の褐変は、細胞の壊死を引き起こして植物体の再分化を困難にする。褐変は、ポリフェノール類の蓄積によるもので、ほとんどはシキミ酸経路によって合成されるフェニルアラニンからフェニルプロパノイド代謝経路を経て生合成される。フェニルアラニンは、フェニルプロパノイド代謝経路の

* AOPP: L-2-アミノオキシ-3-フェニルプロピオン酸



PAL: フェニルアラニンアンモニアリラーゼ

図-2 フェニルプロパノイド代謝経路

律速酵素である PAL によって桂皮酸に変換され、桂皮酸からフェノール物質が生合成される (図-2)。そこで、PAL の働きを抑制して、フェニルプロパノイド代謝経路におけるフェノール物質の生合成を止めることができれば、褐変を抑制できると考えた。

(3) AOPP の濃度と効果

暗黒処理に替わる簡便で増殖効率の高いフウランの増殖法を開発するために、フェノール物

質代謝系の上位にあるフェニルアラニンアンモニアリラーゼ (PAL) の拮抗阻害剤として、L-2-アミノオキシ-3-フェニルプロピオン酸 (AOPP) を 0, 0.01, 0.1, 1.0 mM および BA と NAA を添加した培地でフウランの幼植物上部を培養して、褐変および不定芽形成に及ぼす影響を調べた。

フウランの幼植物上部は、AOPP が 0 および 0.01 mM ですべて生存し、0.1 mM で 77% が生存し、1.0 mM ではすべて枯死した (表-1)。褐変率は AOPP が 0 mM で 70% と最も高かったが、濃度が高くなるにつれて低くなり、1.0 mM では 3% になった。不定芽の形成は、0, 0.01, 0.1 mM で生存した外植体のすべてで認められ、それらの形成数は 0.01 mM で平均 7.2 個と最も多くなり、0.1 mM で 3.3 個および 0 mM で 2.4 個と少なかった。なお、外植体における不定芽形成は、培養 4 週間後から観察でき、培養 8 週間後には多芽体を形成した (図-3)。以上より、AOPP は培地に添加する濃度を高くすると、褐変率を顕著に抑制できるが生存率を低下させ、0.01 mM で不定芽形成を促進できることが分かった。

表-1 フウランの幼植物上部培養における芽形成に及ぼす AOPP の影響

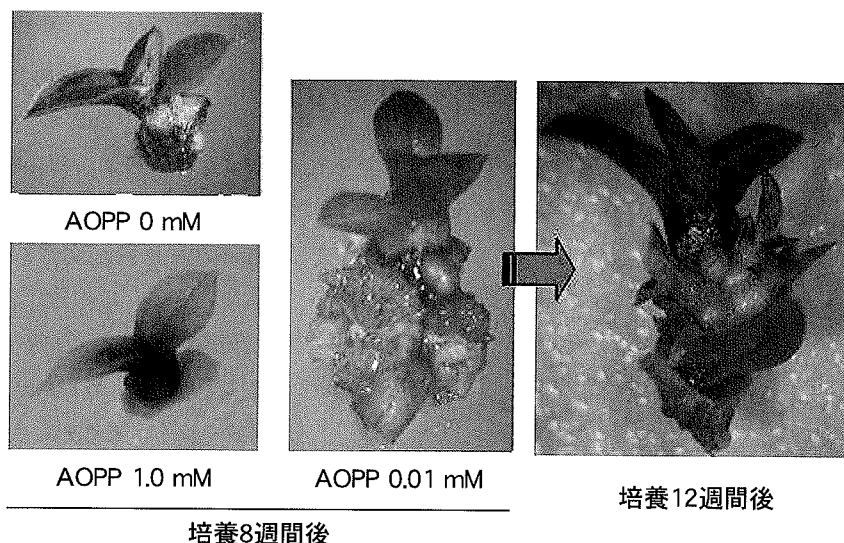
AOPP 濃度 (mM)	褐変率 (%)	生存率 (%)	芽形成率 (%)	1 外植体あたりの 芽形成数 ^z
0	70	100	100	2.4 ± 0.3 ^{by}
0.01	27	100	100	7.2 ± 0.7 ^a
0.1	17	77	100	3.3 ± 0.8 ^b
1.0	3	0	0	0 ^c

n=30

培養 8 週間後に調査

^z 平均 ± 標準誤差

^y Tukey の多重検定より異なるアルファベット間に有意差あり。



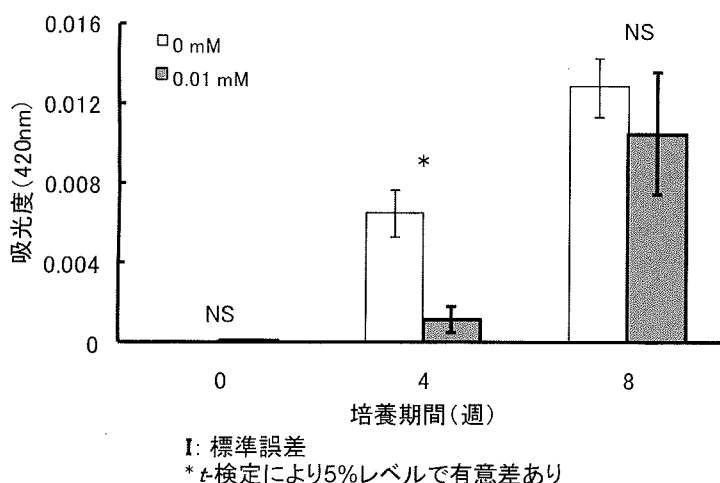
図－3 フウランの幼植物上部培養における不定芽形成の様子

(4) 培地の褐変程度

組織培養中の外植体の褐変は、外植体から置床している培地に褐変物質が浸出して、培地が褐色に変わることによって視覚的に認識できる。しかし、褐変率だけでは、褐変の程度についての評価ができなかった。そこで、Park ら³⁾の *Doritaenopsis* の組織培養に関する報告に従い、培地の褐変程度について調査した。褐変程度は、培養開始前、培養

4週間後および8週間後に、AOPPを0および0.01 mM 添加した培地の吸光度を測定して求めた。

AOPP を添加しない場合、培養開始から培地の褐変が観察され、培養期間が長くなると褐変程度も増加した (図－4)。一方、0.01 mM の AOPP では、培養開始から4週間後までほとんど褐変せず、培養8週間後では増加した。以上より、AOPP 処理は、外植体が不定芽を形成す



図－4 フウランの幼植物上部培養における培地の褐変程度に及ぼす AOPP の影響

る培養4週間後まで培地の褐変を抑制することが明らかになった。

(5) 外植体の総フェノール含量

植物体におけるAOPPの影響を明らかにするために、Krishnaら⁴⁾のマンゴーの組織培養に関する報告に従い、外植体の総フェノール含量について調査した。培養開始前、培養4週間後および8週間後に、AOPPが0および0.01 mMの培地で培養した外植体の総フェノール含量を測定した。

外植体の総フェノール含量は、AOPPを添加しない場合、培養4週間後に $2.03 \text{ mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$ 、培養8週間後に $2.28 \text{ mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$ となり、培養期間が長くなると増加した(図-5)。一方、0.01 mM AOPPを添加すると、培養開始から4週間後まで総フェノール含量はほとんど変化せず $1.46 \text{ mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$ で低い水準を維持した。しかし、培養8週間後では無添加の外植体と同程度の $2.23 \text{ mg} \cdot \text{g FW}^{-1}$ に増加した。以上より、AOPP処理は、外植体が不定芽を形成し始める培養4週間後まで、総フェノール含量の増加を抑制することが明らかになった。

(6) まとめ

ラン科植物の *Cattleya*, *Rhyncostylis* や *Vanda* の葉片培養では、外植体の褐変により生存率が低くなると報告されている^{5,6,7)}。また、組織培養における褐変は、ラン科植物だけでなく果樹、森林樹など多くの植物で認められており、それらの組織培養では多くの抑制法が開発されている。さらに、*Cattleya* の茎頂培養では、外植体から培地に浸出した褐変物質がフェノール物質であることが明らかになっている⁵⁾。したがって、フウランの組織培養における組織の褐変もフェノール物質によるものと考えられた。

本研究では、外植体におけるフェノール物質の生合成を止めれば、組織の褐変を抑制できると考え、フェニルプロパノイド代謝経路における律速酵素のPALを拮抗的に阻害するAOPPの利用を試みた。AOPPによるPALの拮抗阻害作用については、イチゴ⁸⁾、リンゴ⁹⁾、シソ¹⁰⁾およびレタス¹¹⁾などで、フェノール物質の生成を抑制することが明らかにされている。

フウランの幼植物上部を培養して、褐変および不定芽形成に及ぼすAOPPの影響を調べたところ、0.01 mM AOPPを添加した培地で外植体

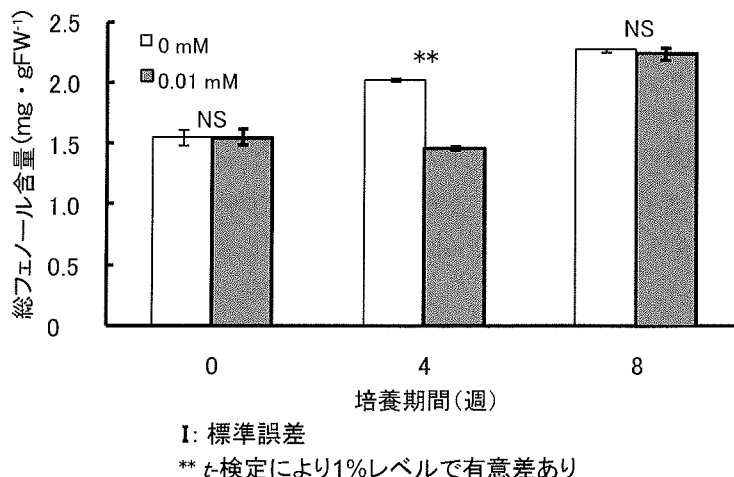


図-5 フウランの幼植物上部培養における外植体の総フェノール含量に及ぼす AOPP の影響

は全て生存し、外植体当たりの不定芽形成は7.2個と最も多くなった。この数値は、島崎¹⁾が報告している平均3個よりも多かったため、AOPPの添加によってフウランの増殖効率を向上できた。また、0.01 mM AOPPを添加した培地では、褐変程度および総フェノール含量が培養開始から4週間後まで低く維持され、その後増加した。フウランの外植体では、培養4週間前後に不定芽の形成が確認できたので、褐変により再分化が困難な組織は、再分化まで褐変を抑制すると不定芽を形成できると考えられた。一方、AOPPの濃度が高くなると褐変を抑えることはできるが、枯死する外植体が増加した。これは高濃度のAOPPが、フェニルプロパノイド代謝経路をほとんど止めてしまい、外植体が切断ストレスに対応できなくなるからではないかと考えられた。すなわち、AOPPを培地に添加するときは、外植体の生育限界を超えない濃度を検討する必要がある。

以上より、フウランの幼植物を0.01 mM AOPPを添加した培地で培養すると、全ての外植体が生存し、不定芽を誘導して多芽体の形成を促せることが明らかになった。また、培地および外植体の褐変は培養期間が長いほど著しいが、AOPPを添加すると外植体に不定芽形成がみられる培養4週間後まで抑制された。したがって、フウランの組織培養において、AOPPは培地に添加するだけで簡便に効率よく不定芽形成を促進できる大変有効な物質と考えられる。

(7) おわりに

本研究で開発したAOPPによる褐変抑制法は、多くの植物に存在する二次代謝経路に働きかける手法であるため、他の植物の組織培養で増殖効率を高めることができると考えられた。

現在、ラン科植物ではウチョウランやサギソウ、野菜ではトマトやナス、樹木ではユーカリの組織培養および挿し木繁殖においてAOPPの効果を確認している。今後、さらに対象植物を増加して、AOPPによる再分化促進および大量増殖法の確立について拡大して適用する。

引用文献

- 1) 島崎一彦. 1993. フウラン (*Neofinetia falcata* Hu) の小花からのプロトコーム様球体の誘導と植物体の再生. 植物組織培養. 10 (1): 75-77.
- 2) Mitsukuri, K., et al. 2009. Effects of explant source and dark-preconditioning on adventitious bud formation in *Neofinetia falcata* H. H. Hu in vitro. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78: 252-256.
- 3) Park, S., et al. 2006. Increased ethylene and decreased phenolic compounds stimulate somatic embryo regeneration in leaf thin section cultures of *Doritaenopsis* hybrid. J. Plant Biol. 49: 358-363.
- 4) Krishna H., et al. 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horti. 118: 132-138.
- 5) Ishii, M., et al. 1979. A new biologically active phenolic from *Cattleia trianaei*. Phytochemistry 18: 1211-1213.
- 6) Vij, S. P., et al. 1984. Propagation of *Rhynchostylis retusa* BL. (Orchidaceae) by direct organogenesis from leaf segment cultures. Bot. Gaz. 145: 210-214.
- 7) Seeni, S., et al. 1992. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera*

imschootiana Rolfe (Orchidaceae). Plant

Cell Tiss. Org. Cult. 29: 167-172.

8)Edahiro, J., et al. 2006. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture.

Biosci. Bioengi. 102:8-13.

9)Ju Z. G., et al. 1995. Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentration and anthocyanin accumulation in apple. Scientia Horti. 61:

215-226.

10)Ishikura N., et al. 1983. The influence of some inhibitors on the formation of caffeic acid in cultures of *Perilla* cell suspensions. Bot. Mag. Tokyo. 96: 111-120.

11)Peiser G., et al. 1998. Phenylalanine ammonia-lyase inhibitors do not prevent russet spotting lesion development in lettuce midribs. J. American Soci. Horti. Sci. 123: 687-691.

豊かな稔りに...



確かな技術で、ニッポンの米作りを応援します。

安全な米をたくさん収穫するために
環境作務、健康（安全確保）、
経済発展、夢の実現を大切にします
石原は「食の安全」を大切にします



高葉齢のノビエにすぐれた効き目！
フルセトスルフロン



石原の新規水稻除草剤

スゲダチ 1キロ粒剤

フルチャージ 1キロ粒剤
ジャンボ

フルフォース 1キロ粒剤

フルイニング 1キロ粒剤

タイスエドル 1キロ粒剤

アンカマン DF

ハードパンチ DF



石原産業株式会社
石原バイオサイエンス株式会社

〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目4番14号

ホームページ <http://www.iskweb.co.jp/ib/>