

コランの胚発生過程ならびに種子形成と発芽について

長島時子

恵泉女学園短期大学園芸生活学科 259-1103 神奈川県伊勢原市

Embryogenesis, and Seed Formation and Germination in *Cymbidium koran* Makino

Tokiko Nagashima

Department of Horticulture, Keisen Junior College, Isehara, Kanagawa 259-1103

Summary

Embryogenesis of *Cymbidium koran* Makino, a terrestrial orchid native to Japan, and the germination ability of its seed *in vitro* was investigated.

1. Ovaries started to elongate soon after pollination and they reached full size in 140 days after pollination (DAP).

2. The ovule began to differentiate after pollination and formed an 8-nuclei embryo sac between 240 and 250 DAP. Ovule formation occurred 70 days DAP. Double fertilization was observed in the ovules 90 to 100 days DAP, the fertilized polar nuclei divided into four to eight endosperm nuclei.

3. The tetrad proembryo was recognized as C₁ type according to Veyret's classification, and progressed to the compound, modified J type (*Polystachya microbambusa* type) and F type (*Coelogyne parishii* type) after the tetrad stage. The main spherical part of the mature embryo was derived from the apical 'ca' cells of proembryos, and the embryonic tube was derived from 'cb' cells.

4. The percentage of seeds which germinated varied depending on the stage of embryo development. Both seed germination and subsequent rhizome growth are superior when the seeds are cultured at the completion of embryogenesis. The best medium for seed germination is the "T" medium among the four (Hg, HI, MT and T) tested. The Percentage of seed germination in seeds after embryogenesis was completed was markedly reduced in all four media.

Key Words: orchids, seed germination, embryogenesis, medium, rhizome.

緒言

ラン科植物の場合、受粉後から胚発生が完了するまでの所要日数は種により異なり、比較的短いモジズリでは13~14日、また、長いパンダでは250日となっている(長島, 1979, 1989, 1993 a).

さらに、ラン科植物の種子の発芽は種類により難易性がある(伊藤ら, 1976; 澤・難波, 1976; 長島, 1982 a, 1982 b, 1983, 1985 a, 1985 b, 1993 b). *Cymbidium* 属には、熱帯性(おもに園芸品種)と温暖性(シュンラン、カンラン、ホウサイランなど)の種がある。一般に、温暖性の種は種子の発芽が困難であり、発芽率を高めるために種々の方法が試みられている。未熟種子を用いたり(澤・難波, 1976; 長島, 1993 b)、暗所培養を行ったり(萩屋・藤田, 1968; 長島, 1993 b)、種子の KOH

水溶液処理や水浸処理を行い(加古, 1968; 三位・加古, 1974) 種子の発芽率が高められたとの報告がある。しかし、熱帯性の *Cymbidium* 属のような高い種子の発芽率には至っていない。

本研究は、種子発芽に関する報告例がほとんどみられない温暖性 *Cymbidium* 属の難発芽性の一種であるコラン (*Cymbidium koran* Makino) を供試した。胚珠および胚の形成過程を組織学的に観察し、また種子形成過程と種子の発芽能との関係を明らかにするとともに、種子発芽培地の検討を行った。

材料および方法

材料は、赤玉土・鹿沼土・桐生砂(4:2:4)の混合土に屋内で鉢植えとして栽培した。元肥としてマグアンプ K (W. R. グレース社製: 中粒) を径 15 cm の鉢に約 5 g 施し、追肥として受粉後 Hyponex (N:P:K=6.5:6:19) 1,000 倍液を 10 日おきに灌水をかねて施した。供試材料は、1993 年 9 月 21 日に受粉し、開花中

1997 年 1 月 31 日 受付. 1997 年 11 月 26 日 受理.

本報告の一部は、平成 8 年度 (1996) 園芸学会春季大会で発表した。

の子房および受粉10日後から260日まで10日ごとに経時的に子房を、1回当たり2~3個ずつ採取した。種子形成過程の組織学的観察を行うために、子房の頂部より5~50 mmの部分長さ約5 mmごとに切断し、FAAで固定した。開花中から受粉後180日までの子房については、組織学的観察のみを行った。パラフィン切片の作成と染色は既報(長島, 1982 a)に準じた。

発芽試験には、受粉後190日より260日の子房を用いた。子房の殺菌はクリーンベンチ内で行い、70%エタノールで1分間表面殺菌し、さらに子房全体を数秒間火炎滅菌した。子房の頂部より5~30 mmの部分ピンセットでかきとり、下記の試験管当たり100~130個ずつ播種した。各区当たりの播種数は約1,300~1,500個とした。発芽調査は播種後20日から播種後80日までおこなった。発芽用の培地の検索には、Hyponex (N:P:K=6.5:6:19)にGA₃ 1 mg/lを添加した培地(以下、Hg培地)またはヘチマ水10%を添加した培地(以下、HI培地)、Murashige and Tucker培地(Murashige・Tucker, 1969)にNAA 1 mg/lを添加した培地(以下、MT培地)およびT処方の培地(Tsutsui・Tomita, 1990)にNAA 1 mg/lを添加した培地(以下、T培地)の計4種類を使用した。ショ糖濃度は、Hg培地およびHI培地では3%、MT培地では2%およびT培地では1%とし、それぞれゲルライト4.5 g/lを添加し、pH 5.4~5.6に調整した。培地の滅菌はオートクレーブ(121°C, 1 Kg/cm²で15分間)で行った。培地約8 mlをφ18×180 ml試験管に分注し、斜面培地とした。培養温度は25°C±2°Cで、リゾーム形成までは暗所培養し、リゾーム形成後は明所(16時間照明, 2,300 lx)培養した。

結 果

1. 子房の生長

コランの子房は受粉時、長さ20 mm、幅2 mmで受粉後5日ごろから伸長肥大を開始した。子房の長さは受粉後70日ごろまでに約57 mm、子房の幅は受粉後140日ごろまでに約14 mmとなり、それぞれ一定の大きさに達し、生長を停止した(第1図)。

2. 胚珠および胚の形成過程

コランの開花中は胚珠原基の分化が開始された状態であった(第2図1)。受粉後60日ごろ胚の母細胞が分化した(第2図2)。胚珠は、受粉後70日ごろに完成し(第2図3, 3')、胚のうは8核で、卵装置、3個の反足細胞および2個の極核をもっていた。受粉後90~100日ごろに重複受精が観察され(第2図4)、受精卵は受粉後120~130日ごろから胚発生を開始し、内珠皮の崩壊が始まった(第2図5)。受粉後170日ごろから胚、胚柄および胚管(4~6本)が明確となり(第2図6, 7)胚発生は、受粉後240~250日ごろに完了した(第2図8)。胚乳核は受精後4~8個に増殖し、受粉後240日ごろに消失した(第2図8)。

コランの受精後の胚発生過程をみるとシュンランとほぼ同様であった(長島, 1993 a; 第3図, 以下、個々の構成細胞は、同図に示した名称で呼ぶことにする。詳細は長島, 1982 a, 1982 bを参照)。

3. 種子形成過程と種子発芽との関係

受粉後190日以降、経時的に子房を採取し、培地に播種した。種子の発芽率は(第1表)、受粉後190日に播種した場合Hg培地で93.3%の高い発芽率を示した。

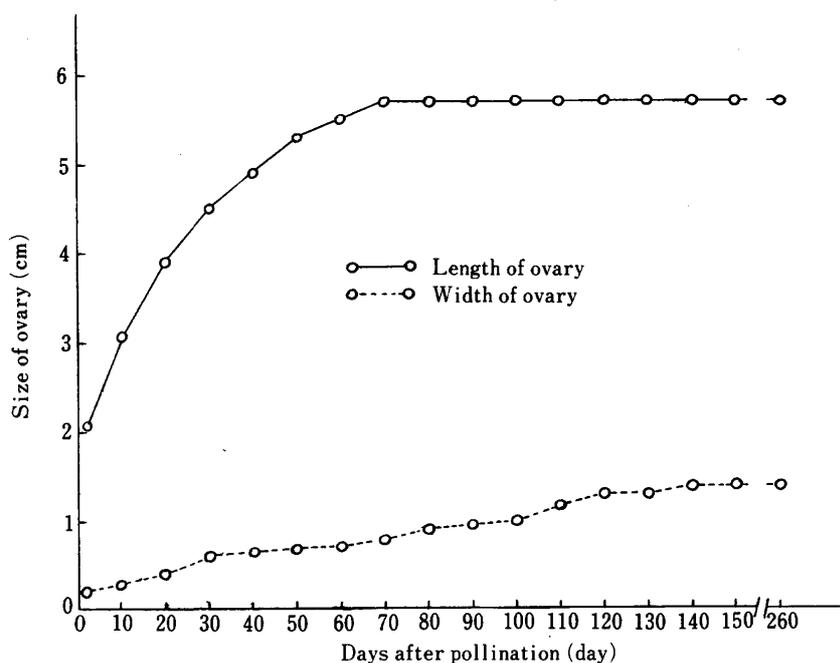


Fig. 1. Growth curves of the ovary of *Cymbidium koran*.

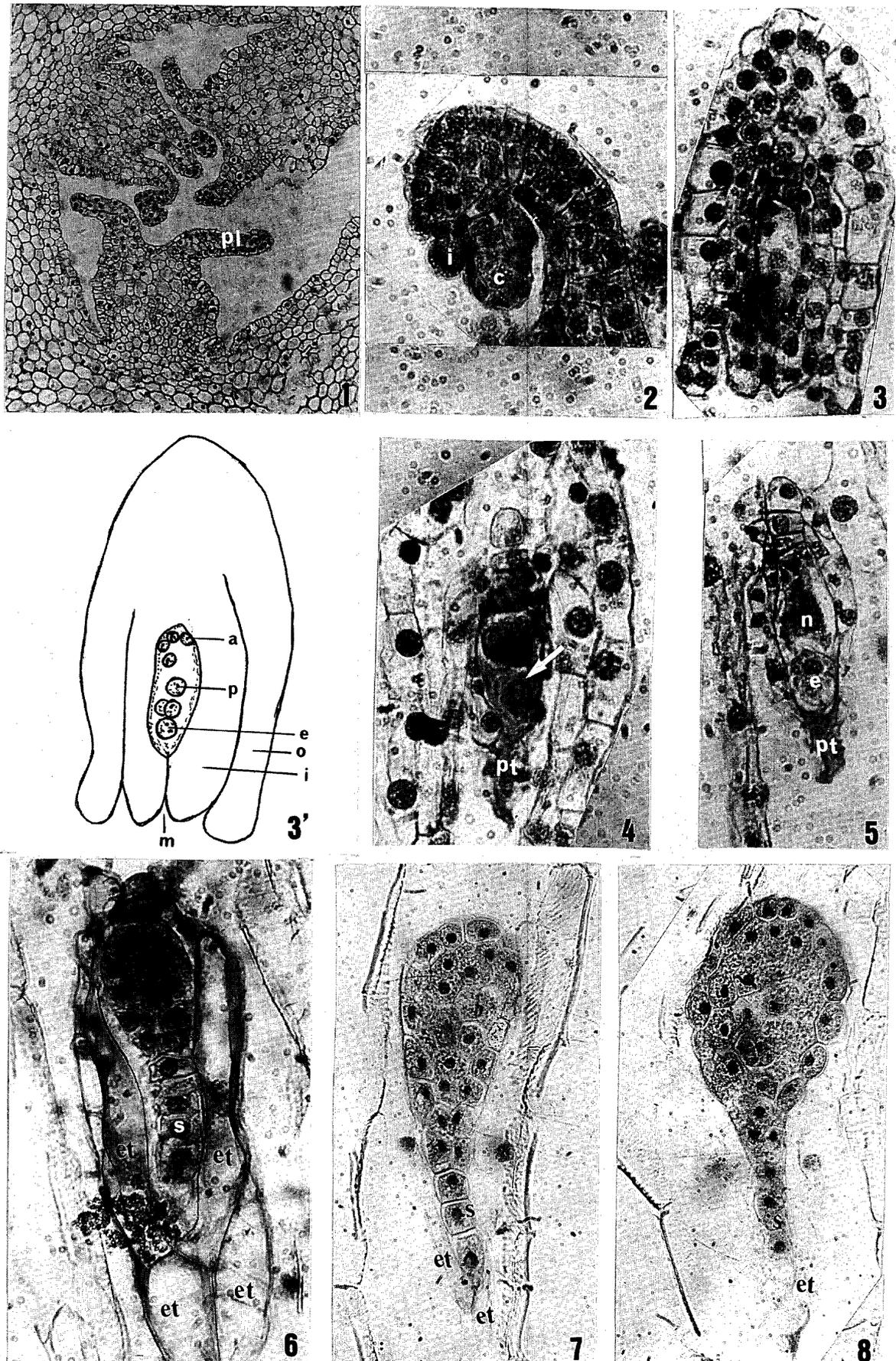


Fig. 2. Photomicrographs depicting stages in ovule formation and embryogenesis in *Cymbidium koran*.

1. Non-pollinated; start of ovule primordium differentiation ($\times 100$), 2. 60 days after pollination (DAP); differentiation of embryo sac mother cell and inner integument ($\times 400$), 3. 70 (DAP); completion of ovule formation ($\times 400$), 3' a line drawing of 3, 4. 100 (DAP); fertilization (arrow; $\times 400$), 5. 130 (DAP); start of embryogenesis and lysis of inner integument ($\times 400$), 6. 190 (DAP); embryo, suspensor and embryonal tube clearly recognizable ($\times 400$), 7. 220 (DAP); nuclei of endosperm has disappeared ($\times 280$), 8. 240 (DAP); completion of embryogenesis ($\times 280$).

pl, placenta; c, embryo sac mother cell; i, inner integument; a, antipodal cell; p, polar nucleus; e, egg apparatus; o, outer integument; m, micropyle; n, endosperm nuclei; s, suspensor; et, embryonal tube.

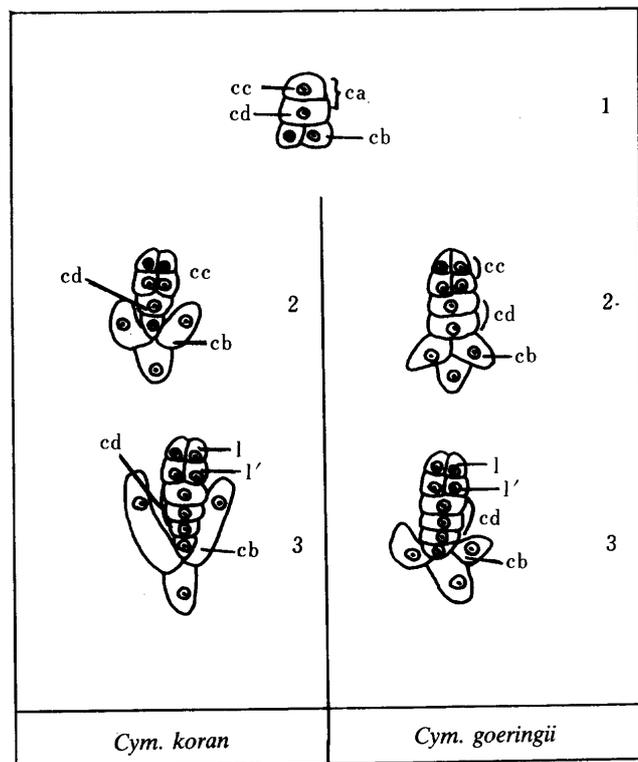


Fig. 3. Tetrad to octant stages of embryogenesis in *Cymbidium koran* and *Cymbidium goeringii*.

1, Tetrad stage; 2, Quadrant stage; 3, Octant stage. Elongation of 'cb' cells is slower in *Cymbidium goeringii* than *Cymbidium koran*. ca, apical cell of two-celled proembryo; cb, basal cell of the two-celled proembryo; cc, the upper daughter cell of ca; cd, the lower daughter cell of ca.

その時の平均発芽日数は70日で、発芽後の幼植物の発育も良好であった。なお、発芽率をみるとHg・HI培地では受粉後190日~200日の種子において、また、MT培地およびT培地では受粉後220日~260日の種子において、それぞれ種子の発芽率が比較的高い傾向を示した(第1表)。受粉後260日の胚発生完了段階の種子の発芽率は、いずれの培地でも受粉後日数の少ない種子に比べ最も低かった(第1表)。なお、発芽後の発育様相をみると、種子の形成過程および培地の種類と無関係に発芽後4~7日でリゾームの形成が観察された(第1表)。リゾーム形成率をみると(第1表)、いずれの培地も受粉後240日が最も高く、MT培地では12.5%、次いでT培地の11.5%であった。

考 察

エビネ属およびその近縁属、野生ランおよび園芸品種の計23属47種を対象として、筆者が観察した受粉後から受精までの日数と受粉後から胚発生完了までの日数との関係について得られた結果より、受粉後から受精までの所要日数と胚発生完了までの所要日数とは、相関係数 $r=0.902$ であり、両者は極めて高い相関関係があることが明らかである(長島, 1989)。

本研究のコランの場合、受粉後から受精までの所要日数は90~100日であり、胚発生完了までの所要日数は受粉後240~250日であった。受粉後から受精まで、その後胚発生完了まで、の各所要日数はコランと同属のハウサイランでは前者が120日、後者は210日、カンランでは140日、230日であり、コランは受粉後から受精まで

Table 1. Relationship between developmental stage of an embryo and seed germination in *Cymbidium koran*.

Days after pollination	Developmental stage of an embryo ^z	Percentage of germination and rhizome formation (%) Medium ^y				Average days to germinate (days) ^v Medium			
		Hg	HI	MT	T	Hg	HI	MT	T
190	OI	93.9 a (2.0) a	86.2 b (2.0) a	31.8 c (1.5) b	17.8 d ^x (1.0) c ^w	70 d	70 d	70 d	75 d
200	I	67.1 b (5.5) a	80.9 a (5.8) a	14.9 d (3.6) b	27.1 c (3.9) b	60 c	60 c	62 c	62 c
220	BC	13.1 b (6.5) b	12.4 b (6.5) b	12.3 b (7.5) a	29.5 a (7.5) a	39 a	39 a	40 a	42 a
240	C	41.7 c (7.5) c	40.7 c (7.3) c	70.3 b (12.5) a	91.2 a (11.5) a	42 a	42 a	40 a	38 a
260	AC	1.5 c (1.5) c	1.4 c (1.5) c	6.2 b (5.5) a	12.5 a (5.1) b	52 b	52 b	50 b	58 b

^z OI; From octant stage to intermediary stage, I; Intermediary stage, BC; Before completion of embryogenesis, C; Completion of embryogenesis, AC; After completion of embryogenesis.
^y Hg; Hyponex with GA₃ 1 mg/l, HI; Hyponex with loofah water 10 %, MT; Murashige and Tucker with NAA 1 mg/l and T; Tsutsui and Tomita with NAA 1 mg/l.
^x Duncan's multiple range test at 5 % level based on days after pollination in the column; a same letter is not significant.
^w Percentage of rhizome formation. Duncan's multiple range test at 5 % level based on days after pollination in the column; a same letter is not significant.
^v Duncan's multiple range test at 5 % level based on days after pollination in the column; a same letter is not significant.

の所要日数がやや短く、胚発生完了までの所要日数がやや長い傾向がみられた (長島, 1993 a)。

コランの胚発生過程はシュンランのそれとほぼ同様であった (長島, 1982 b, 1993 a) が、シュンランとの相違は、8細胞期 (quadrant stage, 第3図2) および16細胞期 (octant stage, 第3図3) での 'cb' 細胞の伸長はシュンランに比較して速かったが、胚発生完了までの所要日数はシュンランでは120日 (長島, 1982 b, 1993 a), コランでは250日であり、コランの胚発生はきわめて緩慢であった。

Veyret (1974) の提唱したラン科植物の胚発生過程の分類に従って検討してみると、コランと同属のシュンラン、ホウサイラン、カンランおよび園芸品種の *Cymbidium* 'Inasa' とほとんど同様の胚発生を示した (長島, 1993 a)。前胚の4細胞期 (第3図1) は、C₁型 (Veyret, 1974) に属するものとみられる。また、4細胞期から胚発生完了までの胚発生過程は、胚発生型からみてJ型 (子葉が未分化で、胚管を有する *Polystachya microbambusa* 型) とF型 (子葉が未分化で、胚柄を有する *Coelogyne parishii* 型) の変異した型の混合型ではないかと考えられる (Veyret, 1974; 長島, 1993 a)。

さらにコランの完成した胚は、おもに4細胞期のca細胞から由来しており、cb細胞から胚管が形成された。エビネ属の種、パフィオペディラムおよびガンゼキランのそれぞれの胚は、胚管は形成されないがコランと同様におもにca細胞から由来していた (長島, 1982 a, 1982 b, 1984, 1993 a)。

コランの胚発生過程と種子発芽との関係をみると、筆者がすでに観察したエビネ属およびその近縁属、野生ランおよび園芸品種の23属47種 (長島, 1989) と同様な傾向を示した。すなわち、各種ランの最高種子発芽率と受粉後から胚発生完了までの所要日数との相関関係は極めて高く ($r=0.941$; 長島, 1989), 胚発生完了前後において最も高い発芽率を示す傾向がみられた。コランはT培地で、胚発生完了時の受粉後240日において最も高い発芽率91.2%を示し、発芽後の発育も良好であったが、受粉後日数と発芽率との関係には有意差は認められなかった (第1表)。播種後から種子発芽までの所要日数をみると、受粉後200日までの未熟種子では長く、胚発生完了前後 (受粉後220日~240日) において短い傾向が、培地組成にかかわらず認められた (第1表)。

コランの種子の発芽率について培地を比較してみると、受粉後日数別において、培地間での有意差が認められた (第1表)。190日および200日種子では、T培地よりもHg・HI培地で発芽率が高く、種子の発育時期により、発芽および発芽後の発育に対して要求する培地組成が異なる可能性が示唆された。本研究からは、その原因を究明することはできず、今後に残された課題である。

種子の発芽率、平均発芽日数およびリゾーム形成率を総合的にみても、コランでは発芽の好適培地は、供試4培地間ではT培地で、播種の適期は胚発生完了直後の受粉後240日ではないかと推察される (第1表)。

摘 要

コランを供試し、胚珠形成および受精後の種子形成過程を組織学的に観察するとともに、暗所培養を行い種子形成過程と種子発芽との関係を追究した。

1. 子房の大きさは、受粉すると急速に増加し、受粉後140日ごろに一定となった。

2. 胚珠形成は、受粉後70日ごろに完了した。重複受精は、受粉後90~100日ごろに行われ、胚のう核は8個観察された。受粉後から胚発生完了までの所要日数は240~250日であった。なお、受精後の胚乳核は4~8個が観察された。

3. 胚発生過程の様相は以下のものであった。すなわち、4細胞期はC₁型に、4細胞期以降の胚発生過程はJ型 (*Polystachya microbambusa* 型) とF型 (*Coelogyne parishii* 型) の変異した型の混合型に類似していた。胚はおもに4細胞期のca細胞から形成され、cb細胞から胚管が形成された。

4. エビネ属およびその近縁の属同様、胚発生完了時に発芽率、発芽後のリゾーム形成率のいずれも高くなり、平均発芽日数も早かった。播種培地としては供試4培地間ではT培地が優れていた。また、胚発生完了以降、種子の発芽率は、いずれの培地においても極めて低かった。

謝 辞 本研究の実験データーに対し貴重な助言を賜った弘前大学農学部の富田正徳博士に衷心よりお礼を申し述べる。

引用文献

- 萩屋 薫・藤田哲子. 1968. シュンランの種子発芽に及ぼす光と温度の影響. 鳥瀧博高編: ラン科植物の種子形成と無菌培養. p. 238~244. 誠文堂新光社. 東京.
- 伊藤五彦・三位正洋・加古舜治. 1976. 難発芽性ラン種子の発芽問題. 鳥瀧博高編: 増補・ラン科植物の種子形成と無菌培養. p. 314~323. 誠文堂新光社. 東京.
- 加古舜治. 1968. シュンランの種子発芽に関する研究. 鳥瀧博高編: ラン科植物の種子形成と無菌培養. p. 174~237. 誠文堂新光社. 東京.
- 三位正洋・加古舜治. 1974. ニオイエビネの種子発芽に関する研究. 第1報. は種前水洗処理と光条件の影響. 園学要旨. 昭49秋: 326~327.
- Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. Proc. First Int. *Citrus* Symposium. 3: 1155~1161.
- 長島時子. 1979. 二, 三のラン科植物の種子形成および発芽に関する研究. 恵泉短大紀要. 12: 77~111.
- 長島時子. 1982 a. シラン及びエビネの種子形成, ならびに種子発芽について. 園学雑. 51: 82~93.
- 長島時子. 1982 b. シュンラン及びパフィオペディラムの種

- 子形成, ならびに種子発芽について. 園学雑. 51 : 94~105.
- 長島時子. 1983. 二, 三の野生ランの種子形成及び種子発芽について. 園学要旨. 昭 58 秋 : 360~361.
- 長島時子. 1984. キリシマエビネ, ニオイエビネおよびアミエビネの種子形成並びに種子発芽について. 園学雑. 53 : 176~186.
- 長島時子. 1985 a. キエビネ, カランセ・エルメリ及びトクサランの種子形成, 並びに種子発芽について. 園学雑. 54 : 231~241.
- 長島時子. 1985 b. 数種のラン科植物の種子形成及び種子発芽について. 園学要旨. 昭 60 秋 : 378~379.
- 長島時子. 1989. ウチョウランの胚発生並びに種子形成と発芽について. 園学雑. 58 : 187~194.
- 長島時子. 1993 a. ラン科植物の生殖器官の形成に関する研究. —エビネ属を中心に—. 恵泉短大紀要. 26 : 1~85.
- 長島時子. 1993 b. ラン科植物の胚発生過程と発芽との関係に関する研究. 園学雑. 62 : 581~594.
- 澤 完・難波道子. 1976. カンランの生長点培養, 無菌発芽. 鳥潟博高編: 増補・ラン科植物の種子形成と無菌培養. p. 296~301. 誠文堂新光社. 東京.
- Tsutsui, K. and M. Tomita. 1990. Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling growth of two orchid species. *Lindleyana*. 5 : 134~139.
- Veyret, Y. 1974. Development of the embryo and the young seedling stages of orchid. p. 223~265. In: C. L. Withered(ed.) *The Orchid Scientific Studies*. John Wiley and Sons. New York.