

琉球大学学術リポジトリ

ラン科植物の生長環における protocorm の形成と発育に関する研究(農学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 上里, 健次, UeSato, Kenji メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4184

ラン科植物の生長環における protocorm
の形成と発育に関する研究

上 里 健 次*

Kenji UESATO : Studies on the formation and development of
protocorm in growth cycle of orchids

目 次

第1章 緒 論	3
第2章 種子発芽における protocorm の形成と発育	4
第1節 緒 言	4
第2節 protocorm の形成とその発育	5
I 実験材料および方法	5
II 実験結果	6
1 <i>Cattleya</i> 類における protocorm の形成と発育	6
2 <i>Cattleya</i> 類における異常形 protocorm の形成	7
3 <i>Cattleya</i> 類における幼苗の形態変化	7
第3節 protocorm の発育と物理的要因	8
I 実験材料および方法	8
II 実験結果	9
1 <i>Cymbidium</i> における protocorm の発育と物理的要因	9
2 <i>Dendrobium</i> における protocorm の発育と物理的要因	10
3 <i>Phalaenopsis</i> における protocorm の発育と物理的要因	11
第4節 protocorm の発育と化学調節	12
I 実験材料および方法	12
II 実験結果	13
1 <i>Cattleya</i> 類の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響	13
2 <i>Cymbidium</i> の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響	15
3 <i>Cymbidium</i> の protocorm の発育に及ぼす gibberellic acid の影響	15
4 <i>Dendrobium</i> の異常形 protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響	16
5 <i>Phalaenopsis</i> の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響	17
6 <i>Vanda</i> の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響	18

* 琉球大学農学部農学科
琉球大学農学部学術報告 25 : 1 ~ 76 (1978)

第5節 考察	19
第3章 茎頂組織における protocorm の形成	20
第1節 緒言	20
第2節 protocorm の呼称について	20
第3節 <i>Cymbidium</i> の茎頂組織における protocorm の形成	21
I 実験材料および方法	21
II 実験結果	21
第4節 <i>Cattleya</i> 類の茎頂組織における protocorm の形成および組織褐変の防止	22
I 実験材料および方法	22
II 実験結果	23
1 <i>Cattleya</i> 類の茎頂組織における protocorm の形成	23
2 組織の褐変防止に対する ascorbic acid 添加の影響	24
第5節 <i>Phalaenopsis</i> の花梗側芽の伸長および同側芽からの protocorm の形成	25
I 実験材料および方法	25
II 実験結果	25
1 花梗側芽の伸長におよぼす BA 処理の影響	25
2 <i>Phalaenopsis</i> における花梗側芽からの protocorm の形成	26
第6節 考察	27
第4章 諸器官における protocorm の形成	28
第1節 緒言	28
第2節 茎における protocorm の形成	28
I 実験材料および方法	28
II 実験結果	28
第3節 葉における protocorm の形成	30
I 実験材料および方法	30
II 実験結果	30
第4節 shoot tip の発育と protocorm の形成	32
I 実験材料および方法	32
II 実験結果	32
第5節 根端組織における protocorm 形成の可能性	33
I 実験材料および方法	33
II 実験結果	34
第6節 考察	35
第5章 茎頂組織から形成された protocorm ならびに幼植物の発育	36
第1節 緒言	36
第2節 栄養系よりの protocorm の発育に影響を与える物理的要因	36
I 実験材料および方法	36
II 実験結果	37
第3節 栄養系よりの protocorm ならびに幼植物の発育と化学的要因	38
I 実験材料および方法	38
II 実験結果	39
1 <i>Cattleya</i> 類の幼苗の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響	39

2 <i>Cymbidium</i> の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響	41
第4節 考察	43
第6章 総括	44
第7章 摘要	48
謝辞	49
引用文献	49
Summary	57
Explanation of plates	59
Plates	59

第1章 緒 論

ラン科植物は、砂漠や極寒地など極端な環境条件の地域を除く世界各地に、広く分布している。しかも、地生種 (terrestrial orchid) のみならず、岩石や樹木などへ付着する着生種 (epiphytic orchid) も見られ、一部には葉をもたず土中でその生長環の大部分を経過する腐生種 (saprophytic orchid) も含まれるなど、きわめて種生態分化の著しい特異的な植物群である。また、ラン科植物は他科植物群に比較して、生長環の多くの部分に生理的および生態的特異性を有している。とくに、発育初期のステージにおいて常に形成される protocorm は、その中心的存在である。protocorm は種子発芽時に形成されるラン科植物に特有の器官とされ、その形成の開始をもって種子発芽の開始と見るのが一般である。

ランの種子発芽に関する研究は古くから多くの報告があり、それら研究の流れはおおよそ次のようにまとめられる。まず、19世紀末から今世紀の初めにかけて、ラン菌との共生発芽 (symbiotic germination) に関連した一連の研究が見られる^{5, 12, 13, 20}。次いで、無機塩類および糖を加えた寒天培地で人工無菌胚培養による発芽方法が、1920年代に Kundson⁵⁹ によって開発され無菌発芽 (asymbiotic germination) として注目を集めた。ラン栽培における種子発芽はその後無菌発芽法が主流となり、窒素^{54, 71, 92, 93, 108, 141, 142}、その他無機塩類^{54, 60, 62, 66, 138}、糖類^{27, 30, 60, 138, 141}、ビタミン類^{7, 87}、植物生長調整物質^{35, 54} および天然果汁添加物^{4, 6, 26, 54, 129} の影響など、培地組成の検討を中心に pH、温度、光条件などの発芽環境に関する研究^{28, 37, 62, 128, 142} も含めて、数多くの研究が進められてきた。

一方、Morel⁷⁴ による *Cymbidium* のウイルスフリー化を意図した研究は、ランの茎頂組織利用による栄養繁殖法の可能性を示唆するものとして注目され、その後の Morel^{75, 76, 77} および Wimber^{135, 136} の研究で実用化への基礎がたためられた。*Cymbidium* についてはさらに Sagawa ら¹⁰¹、Wilfret¹³³、Koch⁶³、上田および鳥潟^{121, 122, 123} らの培養法の改善およびその生理学的解明の研究に発展した。当初茎頂培養が困難視された *Cattleya* 類についても Scully¹⁰⁵、Lindemann ら⁶⁹、Reinert および Mohr⁹⁵、Champagnat および Morel¹⁴、市橋および加古⁴¹、石井ら⁴⁷ の報告が見られ、現在ではかなりの規模で実用化されている。そのほか、*Dendrobium* および *Paphiopedilum* についても、Intuwong および Sagawa ら⁴⁴、Sagawa ら¹⁰²、Kim ら⁵⁸、Mosich ら⁷⁹、Stewart および Button¹¹⁰ らの報告によってようやく成果が見られるようになった。また上記の種類とは生長様式が異なる単茎性の種類についても、*Phalaenopsis* で Tse ら¹¹⁸、Intuwong および Sagawa⁴³、Scully¹⁰⁴ らの報告があり、*Vanda* では Teo ら¹¹⁸、*Rhynchostylis* では Vajrabhaya ら¹³⁰ の報告が見られる。その他 *Miltonia*、*Phaius*、*Licaste*、*Odontoglossum* などについても成功例が

見られ⁷⁷⁾、ラン科植物における茎頂培養法の利用は、同じ遺伝子組成をもつ株の増殖にきわめて重要な位置を占めるようになった。茎頂組織以外の器官についても、葉組織で Ball ら⁹⁾ Churchill ら^{16, 17, 19)}、Champagnat ら¹⁵⁾、田中ら¹¹²⁾の報告があり、根端組織利用の試みも Churchill ら¹⁸⁾によってなされている。これらの一連の研究は、ラン科植物の形態形成における特異性を改めてクローズアップすることとなった。

ラン科植物の生活環を概観して目につくことは、他科の植物と比較してかなり異なった発育様式を随所に示すことである。すなわち胚形成過程、種子発芽における protocorm の存在、protocorm から幼苗に至る発育の過程、およびその過程における増殖への発育転換など、初期発育に限っても特異的現象はかなり多い。このことは、ラン科植物の初期発育が他科の植物と異なる意味で進化の解明に重要な示唆を与えるものといえよう。またラン科植物の茎頂組織培養における初期発育に protocorm 様物体の形成が見られ、これが種子発芽時の protocorm ときわめて類似の形態形成を示すことは、多数の研究例で認められている。しかしながら、これら両起原の protocorm については単なる現象の記述のみで終っており、ラン科植物の生長環における位置づけの解明には手がつけられていない。

ここで生長環の概念について簡単に説明しておく。一般の生物学で使われる生活環においては、受精および還元分裂などの核相の交番が基本的に含まれるが、生長環はこれとは別に、シュートにおける栄養生長を中心とした植物の諸発育相を対象に、上本によって考えだされたものである¹²⁴⁾。積上げ方式で不可逆的進行を示す植物の発生を個体発生(胚発生)と分枝発生に分けて考え、分枝発生をその出発点から分枝の終着点、いわゆる開花までの過程としてとらえ、これを一つのサイクル(環)とする植物の生長に対する説明法の一つである。

本研究は、これまでややもすると別個に扱われてきた種子からの幼苗形成と、茎頂組織など他の栄養系からの幼苗形成を、protocorm の形成および発育との関連でとらえ、それらのラン科植物の生長環の中における位置づけの再検討を目的に行なったものである。

なお、本研究は昭和43年4月から同47年の半ばまで九州大学農学部園芸学教室で行なった実験と、その後昭和50年末までに琉球大学農学部園芸学研究室において実施した実験をもとにまとめた。

第2章 種子発芽における protocorm の形成と発育

第1節 緒言

ラン科植物の種子(胚)発芽時の特異性として、protocorm のステージが存在することは古くから知られており¹³⁾、これは無菌発芽法が行なわれるようになってからは、試験管内において普通に観察されるようになった。しかも、protocorm の形成およびその発育の様相は、その役割とともにラン科植物の生育を論ずる上で最も重要なキイポイントであり、同時に高度に進化したラン科植物を特徴づけるものとして、重要な意味をもつものと考えられる。しかるに、protocorm の形成とその役割については、ラン科植物の培養および生理的研究において軽視されているきらいがあり、種子発芽に関する研究では protocorm の発育過程は省略し、幼苗の形成をもって指標としているものが多い。

ラン科植物は種類が多く、それぞれに多様な生長様式を示すが、その中には植物進化の一方の頂点に位置するといわれる着生種が含まれている⁴⁰⁾。ラン科植物の分類は現在でもなお流動的で人によって見解が異なるが、おおまかに見て園芸的に重要な着生種のほとんどの種類は、Dressler および Dodson による *Epidendroideae* のグループに含まれる²⁵⁾。ここではその中から数種を選び、protocorm の形成とその後の発育の様相を種々の環境要因との関連において比較検討した。

第2節 protocorm の形成とその発育

I 実験材料および方法

本研究における培地作成、および無菌培養法に関する一連の手順を第1図に示した。培養容器は主として100mlの三角フラスコを、また実験の対象によっては200ml三角フラスコおよび25, 30mm口径の試験管を使いわけた。容器内のガス交換は、ゴム栓に2倍の長さのガラス管をさし込み、それに綿をつめた状態で行なった。試薬は加熱によって変性するものを除いて、すべてオートクレーブ滅菌前に溶解させ、その後培地のpHが5.2~5.3となるよう0.1N KOHおよび0.05N HClを使用して調整した。滅菌中のpH値の変化は若干見られるが、ことさらに滅菌後の補正は行なわなかった。培地の滅菌消毒はオートクレーブの1.20 kg/cm², 20分間で行なった。

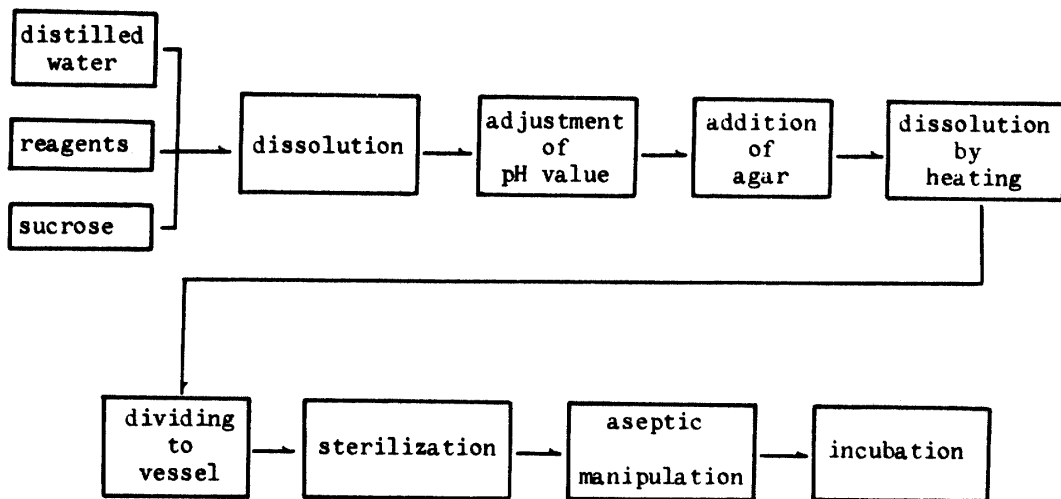


Fig. 1. General program of experimental method employed in this study. Cultures were kept under the continuous illumination with plant growth lamps, at 1000 lux intensity. The temperature was maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

本研究で使用した Knudson C, Murashige and Skoog (MS) および Reinert and Mohr (RM) 培地のそれぞれの成分組成は第1表に示した。なお、Knudson C 培地には Nitsch の微量要素液⁸⁶⁾を1 ml/ℓの割合で添加して使用した。この微量要素液のℓ当たりの各試薬の量は次のとおりである。H₂SO₄ (gr. 1.83) 0.5 ml, MnSO₄ · 4H₂O 3000 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 500 mg, H₃BO₃ 500 mg, CuSO₄ · 5H₂O 0.25 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 25 mg, CoCl₂ · 6H₂O 25 mg。寒天の添加量は、それぞれ1 ℓ当たり Knudson C および RM 培地で12 g, MS 処方の培地で13 gとし、また蔗糖はすべて1 ℓ当たり20 gの濃度で使用した。無菌培養は25 ± 2 °Cの恒温室で行ない、光条件は植物育成用ランプを光源に、約1000 lx照度の昼夜連続照明とした。

本実験は *Brassolaehocattleya* を用いて、ラン科植物の種子発芽時における protocorm の形成と、その後の発育の様相を調査するために行なったものである。材料には *Blc. Normans Bay 'Lucile'* の自殖によって得られた種子を用いた。は種に際しての種子の消毒には、Wilson 氏液¹⁸⁴⁾ (次亜塩素酸カルシウム10 g/140 ml 蒸留水のろ過液) を主とした用いた。

たまで経過した。は種後12週目の幼葉が形成された状態のものは、plate I-4 に示した。根の発生は種後15週目で初めて見られたが、その発生部位は protocorm 上の幼葉に近い部分であった。

ラン科植物の種子発芽における protocorm の形成と、その後の発育の様相および遅速は種類によって異なる。すなわち、*Phalaenopsis* および *Vanda* では protocorm の形態および幼芽形成の様相が若干異なったが、*Cymbidium* および *Dendrobium* など他の多くの種類では *Cattleya* 類の protocorm に類似した形態を示し、またその後の幼苗への発育も同様の経過であった。

2 *Cattleya* 類における異常形 protocorm の形成

protocorm から生じた幼芽は発達して幼苗に至るが、1個の protocorm から単数の幼苗が形成されるのが普通である。しかしながら、条件によってはこの過程で protocorm 自体が肥大生長を続行し、いわゆる、変形した異常な形態をもつ protocorm を形成する場合がある (plate I-5)。このような protocorm の異常化がさらに進行すると、一見してカルス組織に類似した protocorm 集合体に至る。この集合体の形成は、個体の増殖にとってきわめて効率的である (plate I-6) のみならず、後述の、茎頂組織よりのカルス様 protocorm 集合体の形成と対比すれば、ラン科植物の生長環を統一的に見る上で重要なキイポイントを見出すことができる。

Brassolaeliocattleya の種子発芽時における異常形 protocorm の形態を、その程度によって便宜的に2段階に分けて調査し、結果を第2表に示した。植物生長調整物質を添加した場合には異常形 protocorm の形成は一般的であるが、Knudson C の基本培地においても、発芽個体の約10%の割合で異常形 protocorm が認められ、その中の2.5%は plate I-5 に示すようなかなり異常化の進んだものであった。これらは容易に protocorm 集合体へ発達することが確認された。

3 *Cattleya* 類における幼苗の形態変化

Table 2. Percentages of abnormal protocorms appearing in germination of *Brassolaeliocattleya* seeds

Test tube number	Number of normal protocorms	Number of abnormal protocorms			
		slightly		fairly	
		total	ratio	total	ratio
1	265	17	5.9 %	4	1.4 %
2	243	23	8.4	7	2.6
3	289	15	4.8	8	2.6
4	190	25	11.3	7	3.3
5	307	29	8.5	5	1.5
6	186	20	9.3	9	4.2
7	311	18	5.4	5	1.5
8	157	17	9.4	7	3.9
9	285	32	9.8	10	3.1
10	320	23	6.6	6	1.7
mean	250	22	7.7	7	2.4

- N. B. 1. Selfed seeds of *Blc.* Normans Bay 'Lucile' were used.
 2. Culture medium ; Knudson C.
 3. Culture period ; 20 weeks.

protocorm から幼苗へ至る発育の過程で、幼苗の形態および最初の発根の位置は、培養条件によって大きく影響されることが明らかとなった。*Brassolaeliocattleya* の幼苗における形態変化を、密植の程度および移植の有無との関連で調査し、結果を第3表にまとめた。調査は上記の試験区のそれぞれに、は種培地のまま継続培養したものおよび1回移植区を設け、それぞれ50個体を対象に行なった。培養にはKnudson C培地を用い、移植区における移植作業は15週目に行ない、これを含めて培養期間は30週とした。根の発生位置の調査に当たっては protocorm から直接発根しているものを0とし、幼苗の茎部から発根しているものは、それぞれ protocorm の接点からの距離を測定した。

第3表に示したように、密植区と疎植区との間では草丈と最初の発根の位置に著しい差が見られ、同時に幼苗の示す形態にも大きな違いが認められた。疎植区における根の発生位置は protocorm そのものにおいて見られるのに対し (plate II-7), 密植区におけるそれは異常伸長した幼葉の茎部に多く、平均で protocorm より4.1 mmはなれた位置であった (plate II-8)。また、両区間における根の発生位置と同様、発根数の差においても著しいものがあった。密植状態における幼苗は、相互の競合現象のために茎部が異常に伸長して初期発根のチャンスが失われ、その結果、発根位置の上位への移行を余儀なくされたものと推定される。発根の位置が上昇した苗は自立栄養への移行がスムーズに行なわれず、植物全体のバランスを欠き、その結果、初期生育の大幅な遅延が見られた。総じて密植区における幼苗は継続培養区、移植区ともに、疎植区と比較して有意な差のもとに異常伸長を伴う徒長苗となった。

Table 3. Growth responses of plantlets to the density of planting and transplanting in *Brassolaeliocattleya*

Plot	Degree of density	Plant height	Stem length	Number of roots	Stem length up to first rooted position	Fresh weight
	/cm ²	mm	mm	mm	mm	mg
A	24.2	13.0 ± 0.7	7.2 ± 0.5	0.4	4.1 ± 0.9	11.1 ± 1.2
B	12.3	9.6 ± 0.5	4.2 ± 0.4	0.7	2.6 ± 0.5	18.2 ± 1.7
C	4.7	11.4 ± 0.8	3.4 ± 0.4	1.0	0.3 ± 0.2	29.7 ± 2.2
D	1.6	10.7 ± 0.7	2.6 ± 0.3	1.3	0.2 ± 0.2	35.4 ± 2.8

- N. B. 1. Plots A and B; non-transplanting, plots C and D; transplanted at the end of 15th weeks from sowing.
 2. Plantlets of *Blc.* Normans Bay 'Lucile' were used.
 3. Culture medium; Knudson C.
 4. Culture period; 30 weeks.
 5. 50 samples were used in each plot.

第3節 protocorm の発育と物理的要因

I 実験材料および方法

実験の材料には、寒天培地において無菌的に発芽させて得た protocorm を使用した。供試した種類は、*Cymbidium* Rosanna 'Pinkie' × *Cym.* sp., *Dendrobium* Asahi (*Phalaenopsis*

type)の自殖系, および *Phalaenopsis* Doreen × *Phal.* Mount Kaala の3種である。*Cymbidium* では個々の protocorm に種々の物理的処理を加え, それぞれの個体における新しい protocorm の再生力を調査した。試験区には幼芽の生長方向にそって縦および横に2分割した区, 中央部の維管束を赤熱した針で破壊した区, および押しつぶして球形を破壊した区のそれぞれ固体(寒天)および液体培地条件を設定した。これらの試験にはMS処方培地を使用した, さらにRM培地を加えて, protocorm を内部柔組織および表層部に分け, それぞれの小切片における protocorm の再生力も調査した。培地にはそれぞれ NAA 1.0 ppm および kinetin 0.1 ppm を添加して使用し, 培養は6週間および一部では10週間行なった。液体培養には1分間1回転の回転培養器を使用した。

Dendrobium および *Phalaenopsis* では種子から形成された protocorm を材料に横断2分割の試験区を作り, それぞれ基部と先端部における protocorm の形成状態および発育の様相を調査した。供試切片数は両区とも *Dendrobium* で125個体, *Phalaenopsis* で50個体前後を用い, 培地はRM処方の培地を使用して前者は5週間, 後者は6週間培養した。

II 実験結果

1 *Cymbidium* における protocorm の発育と物理的要因

Cymbidium の protocorm は典型的な球形態をもち, 他属のものに比べて大型であることに特徴づけられるが, 幼芽および幼苗形成の過程は *Cattleya* 類とほぼ同様である。すなわち, 横径に対する肥大が最大限に達した後は, 中央部に形成された幼芽の生長に発育の中心が移り, 単数の幼苗が形成される。protocorm の内部における維管束は, 幼芽形成時にはすでに明確であった (plate II-9, 10)。*Cymbidium* の protocorm に種々の物理的処理を加えた実験の結果は第4表および第5表にまとめた。

Table 4. Effects of some mechanical treatments for protocorms on the formation of new protocorm in *Cymbidium*

Treatment	Condition of culture medium	Number of explants examined	Number of protocorms per explant	Number of shoots per explant	Fresh weight per explant
Distal halves	Solid	12	0.4	1.0	45.4 mg
Proximal halves	Solid	12	3.4	0	52.5
Vertically severed halves	Solid	10	1.3	0.1	41.8
	Liquid	10	1.2	0.1	43.4
Protocorms destructed	Solid	10	2.2	0.9	85.0
vascular bundle	Liquid	10	4.1	0	103.2
Protocorms crushed down	Solid	11	1.0	0.1	43.3
	Liquid	11	1.6	0	48.3

- N. B. 1. Protocorms of *Cym.* Rosanna 'Pinkie' × *Cym.* sp. were used.
 2. Culture medium; M & S, contained NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.
 3. Culture period; lower two group: 10 weeks, others: 6 weeks.

Table 5. Differences in the formation of protocorms between the external layer and the internal parenchyma tissues of protocorms in *Cymbidium*

Treatment	Culture medium	Condition of culture medium	Number of explant examined	Number of protocorms per explant	Number of shoots per explant	Fresh weight per explant
External layer	M&S	Solid	14	0.9	0.1	35.8 mg
		Liquid	16	0.5	0	18.2
	R & M	Solid	10	0.5	0	24.0
		Liquid	12	0.2	0.1	46.3
Internal parenchyma	M&S	Solid	10	0.1	0	23.0
		Liquid	10	0	0	0
	R & M	Solid	10	0.1	0.1	27.5
		Liquid	10	0	0	0

- N. B. 1. Protocorms of *Cym. Rosanna* 'Pinkie' × *Cym. sp.* were used.
 2. Culture medium ; contained respectively NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.
 3. Culture period ; 6 weeks.

protocorm は機械的処理を受けても枯死することなく、きわめて強い再生力をもつことが認められた (plate II - 11, 12)。培地に添加された NAA および kinetin の影響も一部に受けているものと思われるが、横断切片の先端部に比較して、とくに基部切片および維管束を破壊された区における protocorm 形成数の多いことが特徴的であった。また、固体培地においては幼苗への発育が速やかに行なわれるのに対して、液体培地 (回転培養) では protocorm の形成数が相対的に多いことを認めた。

protocorm の内部柔組織および表層部の培養結果は、第5表に示したように表層部からの個体形成が多いのに対し、内部柔組織からの形成数はわずかであった。また、液体培地における形成数が少ない傾向を認めたが、培養切片が小さいために塩類濃度の高い MS 培地の液体条件に適応し得なかったものと思われる。protocorm は切断などの機械的障害に対してきわめて強い再生力を示すが、その際に表層部が重要な役割をもつことが認められた。また本実験においては、新しい個体発育の初期にすべて protocorm が形成されることを認めたが、ラン科植物の生長環における protocorm の役割を示すものとして興味深い。

2 *Dendrobium* における protocorm の発育と物理的要因

Dendrobium の protocorm を対象にした切断培養の結果は第6表にまとめた。新 protocorm 形成数、シュート形成数および発根数でそれぞれの発育の様相を示したが、切断された protocorm の先端部と基部とではきわめて対照的な結果が得られた。すなわち、先端部では対照区と同様、幼苗として

の伸長生長が見られた (plate III-14) のに対し、基部切片においては平均 14.7 個もの新しい protocorm の形成が見られた (plate III-13)。切断されない protocorm は中央先端部に存在する幼芽の支配力が強く、下位部分における幼芽形成は皆無であった。切断された基部切片においては、他科植物に見られる頂芽を摘除した場合と同様、その側芽にあたる protocorm の基部に新しい分裂生長域が同時に多数形成され、それらがまず新しい protocorm に発育するものと考えられる。

Table 6. Differences of growth between the parts of severed protocorms in *Dendrobium* (*Phalaenopsis* type)

Treatment	Number of explants examined	Death ratio	Total number of protocorms	Number of protocorms per explant	Total number of shoots	Number of shoots per explant	Number of roots per explant
Control	50	0%	9	0.2	54	1.1	2.9
Distal part	50	0	35	0.7	61	0.5	2.1
Proximal part	50	10.4	736	14.7	5	0.1	0

- N. B. 1. Protocorms of selfed *Den.* Asahi were used.
 2. Culture medium ; R & M.
 3. Culture period ; 5 weeks.

3 *Phalaenopsis* における protocorm の発育と物理的要因

Protocorm を横断 2 分割して培養した結果は第 7 表に示した。*Phalaenopsis* は単基性の生長様式

Table 7. Differences of growth between the parts of severed protocorms in *Phalaenopsis*

Treatment	Number of explants examined	Death ratio	Total number of protocorms	Number of protocorms per explant	Total number of shoots	Number of shoots per explant
Control	50	0%	3	0.1	52	1.0
Distal part	52	0	8	0.2	58	1.1
Proximal part	45	8.9	152	3.4	8	0.2

- N. B. 1. Protocorms of *Phal.* Doreen × *Phal.* Mount Kaala were used.
 2. Culture medium ; R & M.
 3. Culture period ; 6 weeks.

をもつ種類で, protocorm の形態および幼芽の形成に他属のものと若干の違いが見られるが, その一部に幼芽が形成されることおよび1個体当たり単数の幼苗が形成されることなど, 本質的な protocorm 発育の様相は同様である。分割された protocorm 切片からの幼苗形成は, 先端部においては当初から存在していた幼芽(頂芽)がそのまま生長を続けて幼苗になり(plate III-16), 分割されない対照区とはほぼ同様の発育を示したのに対し, 基部切片においては多数の新しい protocorm の形成が認められた(plate III-15)。これは *Dendrobium* の protocorm の場合と同じく, これまでの頂芽的な部分がなくなったために複数個の生長域が新しく形成され, それぞれが同時に発育を開始したことによるものと思われる。幼苗の萌芽に先立つ protocorm の形成も *Dendrobium* と同様明確であった。

第4節 protocorm の発育と化学調節

I 実験材料および方法

通常の方法によって種子を無菌発芽させ, そこで得られた protocorm および幼苗を実験の材料に供用した。取扱った種類は, 1) *Blc. Normans Bay 'Lucile'* の自殖系, 2) *Lc. Princess Margaret* × *Lc. Bonanza 'giant'*, 3) *Cym. Rosanna 'Pinkie'* × *Cym. sp.*, 4) *Den. King Gerorge* × *Den. sp.*, 5) *Phal. Doris* × *Phal. Hollywood* の自殖系, および 6) *Vanda teres* の5属6種である。ラン科植物の protocorm から初期幼苗のステージまでは外的要因の影響を受けやすく, とくに植物生長調整物質に対してはきわめて敏感に対応する。ここではその中で auxin および cytokinin の及ぼす影響を, NAA, 2, 4-D, kinetin および 6-benzyladenine (BA) について検討した。Knudson C および MS の処方の基本培地とし, 上記植物生長調整物質の組合わせ添加によって種々の試験区を設定し, 培養体の発育の様相をもとに比較検討した。発育の様相は, 伸長生長(幼苗へ向けての生長)と増殖生長の2相に分けてとらえ, それぞれ草丈と protocorm およびシュートの形成数を指標にした。なお protocorm とシュートの区別は幼葉の判別の明確さを基準にして行なった。

Cattleya 類では, 種後10週を経過した protocorm (前述の実験材料1)を対象に, その後の発育に及ぼす 2, 4-D および BA の影響を調査した。供試数は1試験区当たり約120個体とし, 培養期間は30週間とした。調査は得られた幼苗の形態をもとに次の4つの段階に分けて行なった。1) protocorm 期: 置床時の protocorm のままの形態から殆ど発達していないもの, およびわずかに幼芽の形成が認められるもの。2) 出芽期: 形成された幼芽の伸長が明確なものから, 幼葉が見られるものまでを含む。3) 出葉期: 完全葉の展開が明確に認められるもので発根していないもの。4) 出根期: 発根を経て完全な幼苗になったもの。以上の区分のものに, さらに枯死数および全体に占める異常形幼苗の形成割合を含めて結果を整理した。また, auxin および cytokinin のそれぞれの種類の異なった物質による影響をみるため, *Cattleya* 類の他の種類(実験材料2)のは種後30週の幼苗を材料に, NAA および kinetin を使用して発育に及ぼす影響を調査した。1試験区当たり20個体を置床し, 培養は20週間行なった。

Cymbidium では種子から形成された protocorm (実験材料3)を対象に, その後の発育に及ぼす NAA および kinetin の組合わせによる影響を調査した。実験は植物生長調整物質の効果をさらに明確にとらえるために, 固体培地のほかに液体培地での試験も平行して行なった。培養は8週間行ない, 各試験区当たりの供試数は10個体とした。また *Cymbidium* では gibberellic acid (GA, 半井化学製造)の影響をみるために, Knudson C を基本培地として 1, 5, 10, 50 および 100 ppm の濃度区を作り, protocorm を1試験区当たり10個体ずつ置床して12週間培養し, 生育反応を調査した。

Dendrobium では, 種子発芽時に形成された異常形 protocorm (実験材料4)を対象に, NAA

および BA 添加の影響を調査した。Knudson C を基本培地に両物質を組合わせて試験区を作り、各区 10 個体ずつ 8 週間培養した。

Phalaenopsis では、は種後 15 週を経過した protocorm (実験材料 5) を材料とし、その後の発育に及ぼす NAA および kinetin の影響を調査した。基本培地には Knudson C を使用し、各試験区 20 個体を対象にして 15 週間の培養を行なった。

Vanda ではは種後 15 週を経過した protocorm (実験材料 6) を材料に、その後の発育に及ぼす 2, 4-D および BA の影響を調査した。基本培地には MS 培地を使用し、各試験区とも約 30 個体ずつ 30 週間の培養を行なった。

II 実験結果

1 *Cattleya* 類の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響

Brassolaeliocattleya の protocorm の発育に及ぼす 2, 4-D および BA の影響は第 2 図にまとめた。両物質を含まない基本培地区における生育は、5% 程度の枯死率が含まれているものの全体にほぼ

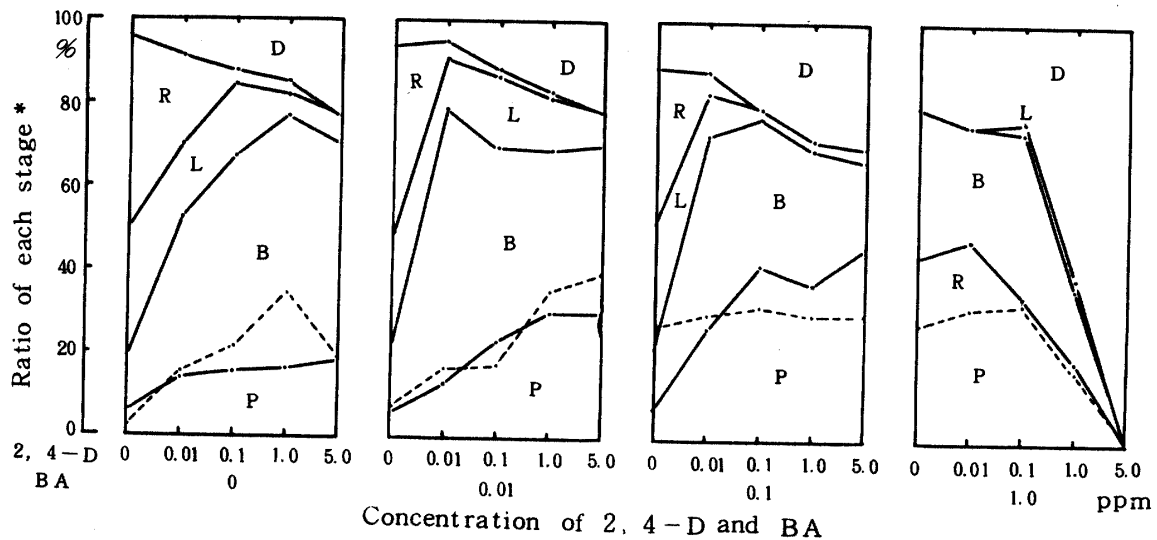


Fig. 2. Effects of 2, 4-D and 6-benzyladenine on the development of protocorms into plantlets in *Brassolaeliocattleya*

N. B. 1. Protocorms of selfed *Blc.* Normans Bay 'Lucile' were used.

2. Basal medium : M & S.

3. Culture period : 30 weeks.

4. *P : protocorm stage, B : budding stage,

L : leafing stage, R : rooting stage,

D : death, dotted line : abnormal plantlets.

順調な幼苗への発育を示した。発根を経て完全な幼苗になったものが約 50% あり、完全葉を展開したもののまで含めると 80% の高率であった。2, 4-D 単独添加区においては、濃度が高くなるにつれて生育が遅れ、出葉期のままの幼苗の割合が多くなり、展開葉および根をもつ幼苗が少なくなる傾向が認められた。単独添加区においては、0.1 ppm 濃度までは対照区とほぼ同様の傾向を示した。しかしその個々

については、出根期に達したものでも、その基部にはカルス様の組織の形成が見られる(plate III-17)など、異常な形態を示す幼苗の増加が認められた。2, 4-D および BA の同時添加の影響としては、それぞれの濃度が高くなるにつれて、低発育レベルの個体の占める割合が増加する傾向と、それに平行して枯死数が増加する傾向が認められた。protocorm から幼苗にかけてのステージで増殖へ移行する、いわゆる protocorm 集合体の形成も 2 物質の添加濃度が高くなるほど多くなり、2, 4-D 5.0 ppm および BA 0.1 ppm 添加区においては約40%がこのような幼苗であった。すなわち、*Brassolaeliocattleya* の protocorm の発育に対する 2, 4-D および BA の影響は、幼苗への伸長生長を抑制して増殖への発育に方向転換させる作用が認められたといえよう。

protocorm よりさらに発育が進んだステージである幼苗に対する、NAA および kinetin の影響を調査した結果は第3図に示した。基本培地区においては、幼苗の伸長生長を続行するのみであったのに対し、kinetin の単独添加区においては顕著な増殖効果が認められた。その典型的な形態は、一見してカルス組織に類似した多数の幼芽を有する、いわゆる protocorm 集合体の形成をとおしての増殖であった。NAA 単独添加区においては増殖効果は殆どなく、むしろ発根数の増加を伴った伸長生長促進の効果が認められた。NAA と kinetin を同時に添加した区においては、それぞれの濃度が高くなるにつれて増殖効果および伸長生長促進の効果がともに見られたが、前者に対しては kinetin の濃度に平行して、また後者に対しては NAA の濃度に平行して効果が現われる点が特徴的であった。

以上、*Cattleya* 類に対する 2 つの実験は種類および protocorm の齢、また使用した auxin および cytokinin の種類がそれぞれ異なるにもかかわらず、いずれも auxin による伸長生長促進の効果、および cytokinin による増殖効果がかなり明確に認められたといえよう。

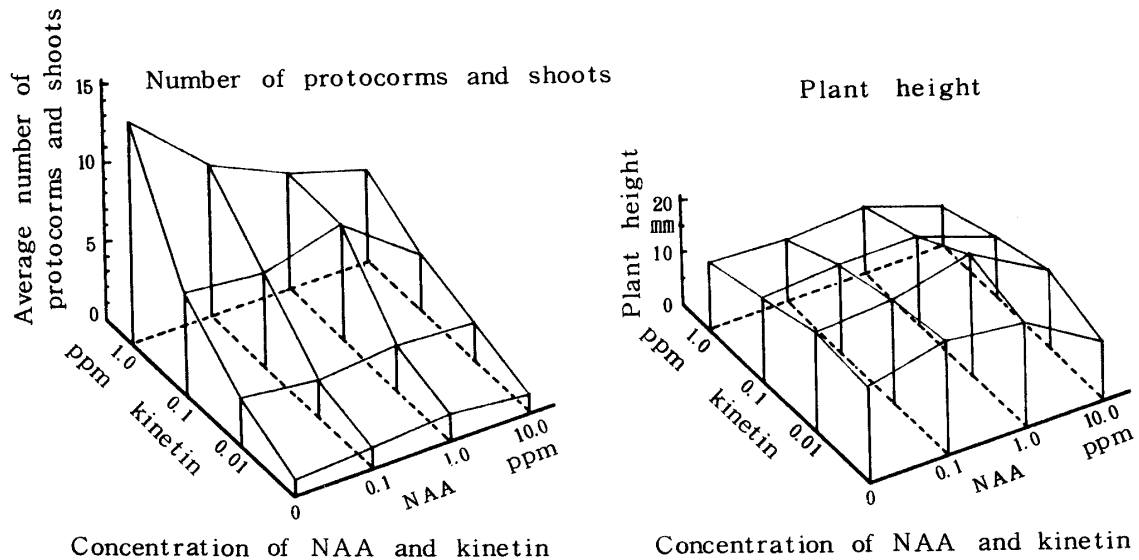


Fig. 3. Effects of NAA and kinetin upon the growth of plantlets in *Laeliocattleya*

- N. B. 1. Plantlets of *Lc.* Princess Margaret \times *Lc.* Bonanza 'Giant' were used.
 2. Basal medium: Knudson C.
 3. Culture period: 20 weeks.

2 *Cymbidium* の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響

調査結果は第4図に示した。基本培地区では伸長生長を示すのみであったのに対して、NAAを添加した培地では高濃度区で異常形幼苗 (plate IV-20) の出現率が高かった。kinetin 単独添加の影響は protocorm の増殖効果に特異的に認められた。NAA および kinetin 併用区では、NAA の主効果として認められたシュートの伸長生長への効果がやや抑制されたが、protocorm の増殖に対しては、むしろ相乗的促進効果が認められた。液体培地においては、総体的に各生長調整物質の濃度増加に伴う幼苗への伸長生長、ならびに protocorm 増殖への効果が一段と強く示された。また、固体培地において形成された protocorm 集合体の個々の protocorm は明確に区別して見られた (plate IV-19) のに対し、液体培地では分枝状の増殖を示した (plate IV-21)。

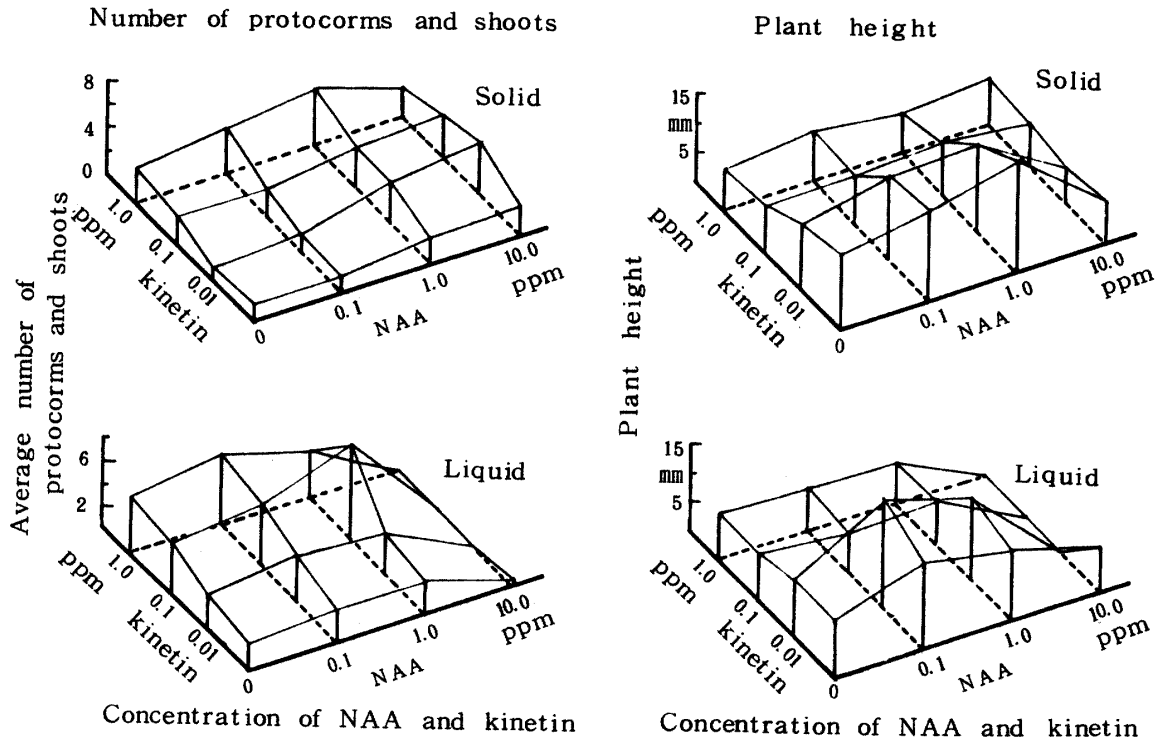


Fig. 4. Effects of NAA and kinetin upon the growth of protocorms in *Cymbidium*

N. B. 1. Protocorms of *Cym. Rosanna* 'Pinkie' × *Cym. sp.* were used.

2. Basal medium: Knudson C.

3. Culture period: 8 weeks.

4. Cultures were grown on solid medium (upper) and in liquid medium (lower).

3 *Cymbidium* の protocorm の発育に及ぼす gibberellic acid の影響

植物の生長ならびに発育に対する、培地に添加されたGAの影響については多数の報告が見られるが、ラン科植物への応用例は少なく、とくに protocorm に対する直接の試験例は僅少である。ただ、

protocorm 自体は他の植物に見られない特有の器官であるので、その対応の仕方を明らかにすることは興味ある問題と考えられる。試験の結果は第5図に示した。GA添加の効果は主として幼芽の伸長生長促進に見られ (plate IV-22), 萌芽数の増加など増殖への効果は全く見られなかった。草丈の伸長に対してはきわめて顕著な効果が認められ、置床時が分化期に該当していたと思われる上位から2節目においてとくに目立っていた。

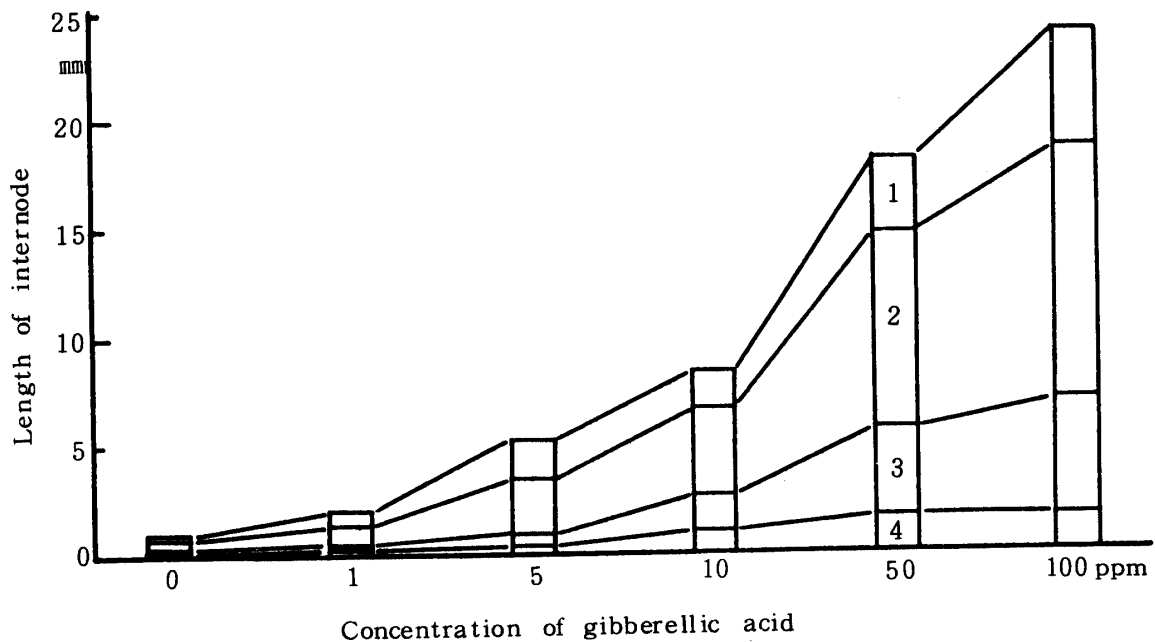


Fig. 5. Effect of gibberellic acid upon the internode elongation of seedlings in *Cymbidium*

- N. B. 1. Seedlings of *Cym. Rosanna* 'Pinkie' × *Cym. sp.* were used.
 2. Basal medium : Knudson C.
 3. Culture period : 12 weeks.
 4. Each number in column showed the internode from tip to base.

4 *Dendrobium* の異常形 protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響

本実験で使用した *nobile* type の *Dendrobium* は、種子発芽時に異常形 protocorm (protocorm 集合体の前段階) の形成率が高く、植物生長調整物質を含まない Knudson C 培地における 20 週時の調査では、13.7% であった。これら異常形 protocorm を供用して、NAA および BA 添加の及ぼす影響を調査した結果は第6図にまとめた。NAA 単独添加の影響としては、低濃度における伸長生長促進の効果が著しく、高濃度では致死的作用が目立った。BA の増殖に及ぼす効果は大きく、1.0 ppm 区においてはシュート数で平均30個以上の高い値を示した。NAA および BA を同時に添加した場合には、BA 単独ほどではないが増殖に対してかなり高い効果が見られ、より発育の健全な苗が形成され得る点で、BA 単独の区よりも有効と判断された。なお、本実験で使用した材料は異常形 protocorm であるため、置床時においてすでに複数のシュートを形成する能力を有しており、植物生長調整物質とく

に BA の添加された培地では、これらをもとにさらに増殖し、また対照区では逆にその中の少数の幼芽のみが発育して幼苗となり、大部分の幼芽原基は未発育のまま消滅したものである。

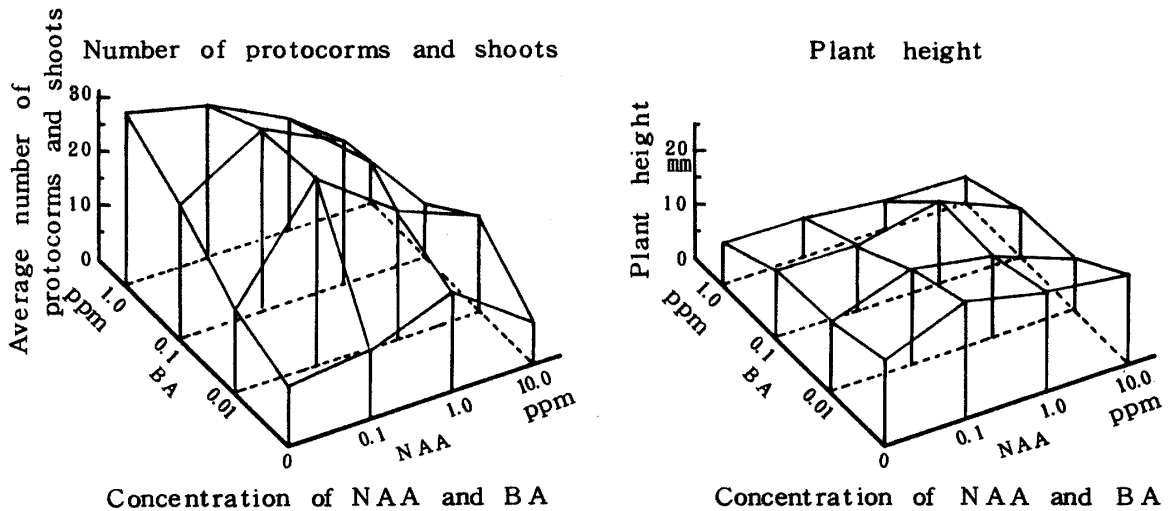


Fig. 6. Effects of NAA and 6-benzyladenine upon the growth of abnormal protocorms in *Dendrobium*

- N. B. 1. Abnormal protocorms of *Den.* King George \times *Den.* sp. (*nobile* type) were used.
 2. Basal medium: Knudson C.
 3. Culture period: 8 weeks.

5 *Phalaenopsis* の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響

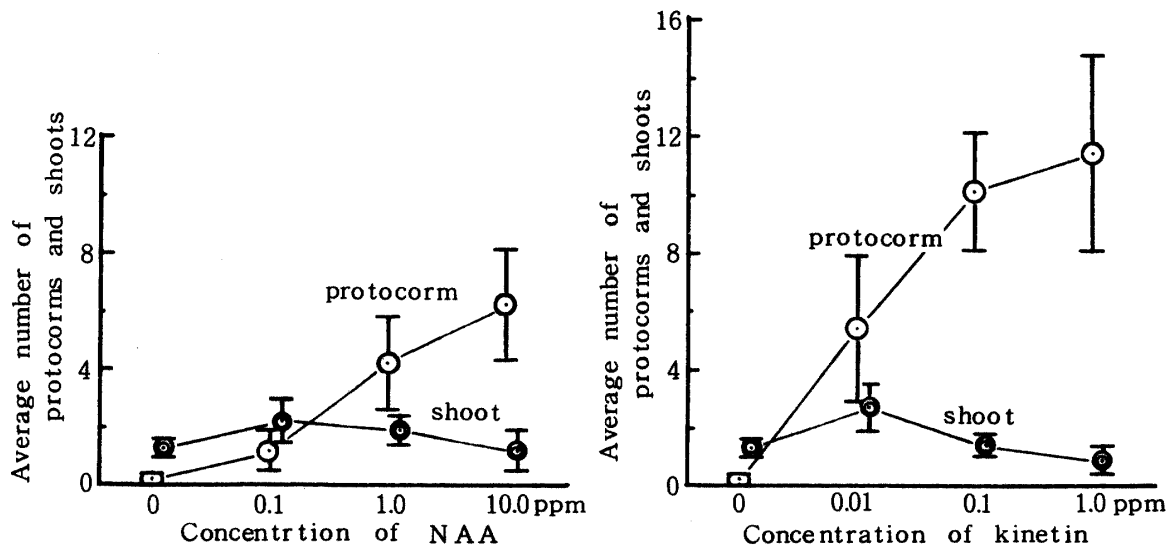


Fig. 7. Effects of NAA and kinetin upon the multiplication of protocorms in *Phalaenopsis*

- N. B. 1. Protocorms of selfed *Phal.* Doris \times *Phal.* Hollywood were used.
 2. Basal medium: Knudson C.
 3. Culture period: 15 weeks.

Phalaenopsis の protocorm を対象に NAA および kinetin の発育に対する影響を調査した結果は第7図に示した。protocorm の形成では NAA および kinetin の両区とも、培地への添加濃度が増すにつれてその数が急速に増加し、とくに kinetin の区において顕著であった。protocorm から幼苗へかけての正常な発育は、protocorm の先端部に形成される幼芽が単数の場合に多く見られ、いわゆる伸長生長を中心とするのに対し、auxin および cytokinin を含む培地における protocorm は増殖方向への発育を示すことが認められた。増殖発育の様相としては、protocorm の各部位に形成される新しい生長域が、それぞれ新しい protocorm に発育し (plate IV-23)、さらに幼苗へ発育する一連の過程で示された。シュートの形成では、NAA および kinetin の両区とも濃度が高くなってそれほど増加せず、生長の程度も対照区とほぼ同様である。

6 *Vanda* の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響

Vanda の protocorm を材料に 2,4-D および BA の影響を調査した結果は第8図および plate V に示した。基本培地に置床された protocorm はつぎつぎと出葉する、いわゆる幼苗としての伸長生長を示したのに対し、2,4-D 単独添加の培地においては、低濃度区における幼苗の生長促進効果および高濃度区における増殖効果が明確であった。増殖は大部分幼苗の下位部における protocorm 集合体の形成をとおして見られた。BA 単独添加の及ぼす影響は 0.1 ppm 区では殆ど見られなかったが、1.0 ppm 区においては顕著な増殖効果が見られ、その protocorm 形成数は1個体当たりおよそ40個であった。しかも、それらは幼芽の突出がわずかに認められるか、あるいは肉眼では幼芽の判別ができない、いわゆる protocorm 前期の発育程度を示すものが多い点で特徴的であった (plate V-27, 28)。2,4-D および BA が同時に添加された培地においても、カルスに類似した protocorm 集合体の形成は多く、中には個々の protocorm が根を有する幼苗に生長した、いわゆる幼苗の集合体を示すものも見られた。総じて *Vanda* は増殖への移行が容易であり、しかもその効率がきわめて高い種類であると判断された。

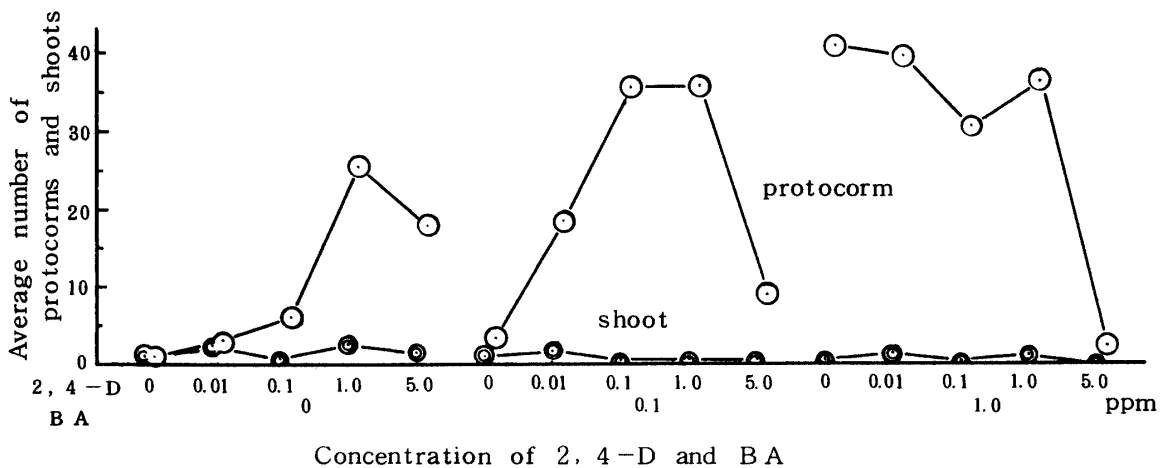


Fig. 8. Effects of 2,4-D and 6-benzyladenine on the development from protocorm to plantlet in *Vanda*

- B. 1. Protocorms of *Vanda teres* were used.
2. Basal medium : M & S.
3. Culture period : 30 weeks.

第5節 考 察

ラン科植物は、幼芽および幼根の分化を見ない低発達レベルの幼胚の状態では種子形成を完了する。しかしながら、これは一般の種子生理学でいう未成熟胚とも異なり、その幼胚と幼苗との間に protocorm ステージをもち、しかもこれは発芽以降数週間にわたる肥大生長による発達ののち、中央部に幼芽を形成し、幼植物の発育母体となる。protocorm はそもそも種子発芽時に形成され、ラン菌との共生状態をもち、しかも通常の植物体として未分化の球形器官に与えられた名称である。しかしながら、現実には種子が吸水し肥大を開始した直後の protocorm と、幼芽形成時の protocorm とでは形態的にも機能的にも大きな差が見られる。これらのことをふまえて、本章では protocorm を横への肥大生長が行なわれる前期と、明確な幼苗が形成され発育の中心がそこへ移行する後期に分け、狭義の意味の protocorm としては前者を、広義の意味としての protocorm には前後期を当てて本研究を遂行した。

ラン科植物の初期発育は、必須的なステージである protocorm を経て幼苗に至るといふ、他科植物に見られないワンステップを経た後の縦への伸長生長が一般的であるが、このほかに protocorm のステージのまま多数の幼芽をもつ protocorm のかたまり（protocorm 集合体）を形成する、いわゆる横への増殖に向かう発育が人工培地上で見られることを示した。*Cattleya* 類および *Vanda* ではとくにこのような現象が顕著に現われる。この方向への発育が進行した protocorm は一見すると、カルス組織に類似した形態を示すが、詳細に観察すると多数の protocorm（大部分は幼芽の形成が明確に認められる）の集まったものであることがわかる（plate V-27 参照）。ラン科植物の protocorm 集合体は単一 protocorm における伸長生長への一般的な方向から、ある外的要因によって増殖方向へ発育転換する過程のワンステップとして、その形成が見られる。これらのことは、ランの種子発芽に関するこれまでの報告では具体的な経過として示されていない。本章における各種の実験からその過程と影響する要因との関係が明らかとなり、ラン科植物の protocorm は、本来このような性質をもつことが示唆された。植物生長調整物質などの添加物質を含まない基本培地上で、発芽個数のかなりの割合（*Brassolaeliocattleya* で 10.1%、*Dendrobium* で 13.7%）を異常形 protocorm が占めたことは、このことを示す好例と考えられる。

protocorm の増殖方向への発育転換に影響する刺激の種類は、本実験ではほぼ明らかとなった。すなわち、*Cymbidium*、*Dendrobium* および *Phalaenopsis* の protocorm は、幼芽を有する先端部と幼芽をもたない基部に2分すると、例外なく前者においては個体生長（伸長生長）を示し、後者においては個体増殖の現象が見られることを示した。これは他科植物のシュートの発育において普通に見られる頂芽優勢の現象と一面において一致し、protocorm 上における側芽発生の位置的関係の強さを示しているといえよう。また増殖への発育過程で、幼苗形成に先立って常に protocorm のステージが存在することは、ラン科植物の特異性を示してはなはだ興味深い。すなわちラン科植物における protocorm の形成は、種子発芽時のみに限定されるものでなく、栄養系における新個体発育の開始時にも形成されることを示唆するものである。換言すれば、ラン科植物の生長環のスタートの特殊性を示す基本的な形態であり、必須的に各生長環の初めに protocorm というワンステップを置いて、次の正常な生長環に向かうことが示されているといえよう。さらに、液体回転培養においては固体培養に比較して増殖へ向けての発育傾向が強く現われたが、これは液体培地において終始動かされることにより、極性を失って幼苗への発育が抑制され、そのために増殖へ移行したものと考えられる。

protocorm の発育の方向の決定に強く影響する主要因の一つに auxin および cytokinin など、植物生長調整物質の消長があげられる。本実験で行なわれた *Cattleya* 類、*Cymbidium*、*Phalaenopsis* および *Vanda* の protocorm ならびに *Dendrobium* の異常形 protocorm に対する auxin と cytokinin の組み合わせ実験の結果から、おおよそ次のようなことがいえる。すなわち auxin 類添加の影響としては、

草丈の増加で示されたように主として個体の縦の伸長生長に対する促進効果が見られた。ただ、その適域濃度の範囲は狭く、その範囲を越えると幼苗の奇形化が促され、さらに濃度が高くなると致死効果として作用することが示された。protocorm および幼苗の奇形化には、しばしば protocorm 内における新しい生長域の形成、および幼苗の葉腋における幼芽の形成が付随して見られ、一部において cytokinin と同じ増殖効果をもつことも示された。一方、cytokinin 添加の影響としては伸長生長に対する効果は見られず、もっぱら横への増殖に対する効果のみが示された。とくに増殖機能を潜在的にもつ protocorm に対しては、その各部位における新しい生長域の形成に強く作用し、*Cattleya* 類、*Phalaenopsis* および *Vanda* の protocorm における 10~40 倍の増殖結果として示された。auxin および cytokinin が同時に培地に添加された場合には、前者による伸長生長促進の効果と後者による増殖効果が混在して見られた。総体的に、低濃度添加の培地においては、伸長生長と増殖の両発育相にバランスのとれた発育を示し、高濃度の場合には増殖方向への発育および幼苗の奇形化が強く現われたことが注目される。また GA の及ぼす影響としては protocorm および萌芽数の増加など、増殖への効果は全く見られず、他科植物において一般に見られる単なる節間伸長に対する促進効果を見たにすぎなかった。

第3章 茎頂組織における protocorm の形成

第1節 緒言

茎頂組織の培養による栽培ランの増殖法は、Morel の報告⁷⁸⁾ を契機に多数の研究結果^{14, 41, 78, 95, 101, 105, 121, 133, 135)} を見ている。ラン科植物は既述のように種間、さらには属間交雑の成功率の高いことから遺伝的にヘテロな種、あるいは品種が多数を占め、実生繁殖による形質分離が著しい。しかも、とくに重要な種あるいは品種ほど極端なヘテロ性を有しており、その実生系における形質分離のひん度が高く、またその幅も広いのが特異性といえる。したがって、これらの種あるいは品種の維持には、従来から株分けなどの栄養繁殖のみが許容されているが、その能率はきわめて低い。したがって茎頂培養法は、それらの対応策としてきわめて重要視されてきた。

茎頂培養法は、端的に言えば極性をもった分裂の盛んな茎頂組織を無菌的に摘出し、効率よく増殖させる栄養的繁殖技術の一つである。注目すべき点は、その際種子発芽時に形成される protocorm と同様の器官形成と発育経過を常にたどることで、これは protocorm like body と呼ばれることが多い。本章では茎頂繁殖に際して、その組織の摘出から活着および protocorm like body の形成、さらに幼苗が得られるまでの過程を環境要因との関連づけを行ないながら検討した。

第2節 protocorm の呼称について

本論に入る前に protocorm like body と protocorm の関連について、形態学的ならびに発生学的観点から考察を加えたい。

protocorm は、前述のようにラン科植物の種子発芽時に、ラン菌との共生状態に入るとともに胚が肥大し、主として球形となったステージを対象に名づけられた比較的古い術語である。無菌的胚培養が行なわれるようになってからは、発芽時に見られる球形組織によって構成された器官のステージに対しての使用が黙認された格好となっているが、他のステージとの厳密な区別、および前後のステージとの境界はともに不明瞭である。一方、protocorm という術語のもつ本来の意味は corm に至る前段階を意味し、かなり初期の形態的に未分化のものに限定されるニュアンスをもつものと解される。しかしながら現実には発育中の protocorm においては、幼芽の分化が明白に認められず、しかも球形を示す期間は

きわめて短く、例えば *Cattleya* 類では3～4週間程度である。以降のステージの大部分は、幼芽およびそこに形成される幼苗を伴っている。すなわち、通常 protocorm として扱われている期間は、具体的にはかなり異なった複数の発育ステージを含んでいると解してよい。前章（第2章）では、種子発芽に際して外見上未分化の胚と、葉および根を有する完全な幼植物体との間に位置するステージをすべて protocorm と見なし、さし当たって形態的に未分化の前期を狭義の protocorm、また全期間を対象にした場合を広義の protocorm として使い分けた。

種子発芽時に形成される protocorm のこれらの問題点に加えて、近年になって茎頂組織利用の繁殖の過程においても、種子発芽の場合と殆ど同様の protocorm 様の物体が形成されることが明らかとなった。それらは初期の報告⁽⁷⁴⁾で protocorm like body として扱われ、以降はそのまま継承されているが、研究者によっては単に protocorm として扱われ、また *Cattleya* 類の茎頂組織培養において見られるような、形態的に不明瞭なものに対してはカルスと呼ぶ場合もあり、その呼称は著しく混乱しているといつてよい。茎頂組織の培養に際しては、活着促進のために往々にして添加される auxin あるいは cytokinin の作用により、比較的早い時期に幼植物の形態が変化するために、直接の比較は困難であるが、種子発芽時の protocorm の発育と茎頂培養に際して初期に現われる protocorm like body とは本質的には同じ発育の様相を示し、前章に述べた広義の protocorm の範ちゅうに入れてしかるべきものと思われる。これらのことをふまえて、本論文では茎頂組織から幼植物が形成される過程で生ずる肥大形態を示すものは、種子から形成される protocorm の後期に該当するものとして、すべて広義の protocorm とした。なお、Morel の最近の綜説⁽⁷⁸⁾では、茎頂組織より形成されたものを protocorm として扱っていることを付記しておく。

第3節 *Cymbidium* の茎頂組織における protocorm の形成

I 実験材料及び方法

材料には *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist', *Cym.* Theruma *Cym.* Westholme 'Eary Tan' を供用した。4～8mm の長さに生長した若いシュートを採取し、一連の滅菌消毒 (Wilson 氏液⁽¹³⁴⁾ を使用) を施したのち、頂芽をおよそ3mm立方の大きさに摘出して培養組織片とした。培養は NAA 1.0 および kinetin 0.1 ppm を添加した Knudson C の固体培地で行ない、培養期間は既述 (第2章) の培養条件下で6週間とした。

II 実験結果

培地に置床された組織は、初めの1～2週間では切断面のキュアリングとそれに続く組織自体の増大が起こり、次の3～4週間で組織の一部に突起物が形成され、この部分はその後さらに発達して球形を示し、幼芽の形成部を中央上面にもった protocorm へと発達した。6週間の培養期間における protocorm の形成の様相は第8表にまとめた。1茎頂組織当たりの protocorm 形成数は全体に3個以下の例が多いが、中には全く形成されていないものおよび9個の同時形成を見たものが含まれるなど変異に富んでいた。組織上の protocorm が形成される位置は、培地に接した下位部分に多く、次いで横の部分に見られ、また中央上位部における形成も2例見られた。形成された protocorm の大きさは3mm立方以下のものが大部分で、とくに1～2mm立方のものが多数を占めた。一般に形成数が少数の場合に球形の明確な、また大型の protocorm が形成され、一度に多数形成される場合には小型で非球形のものが多かった。

以上のように *Cymbidium* の茎頂組織における protocorm の形成の様相は個体間差が大きいことが

確認された。これらのことは、組織摘出時におけるメス操作の機械的影響、あるいは個々のシュートの生育状態の差、芽の大きさおよび活力など、サンプリングエラーの集積の結果生じたものと思われる。

Table 8. Aspects of the protocorm formation on the culture of apical meristem tissues in *Cymbidium*

1. Number of protocorms formed and number of explants examined.		2. Position formed protocorms, number of explants, and number of formed protocorms.			3. Size of formed protocorms and number of protocorms.	
Number of protocorms	Number of explants	Position	Number of explants	Total number of protocorms	Size	Total number of protocorms
0	7	Upper part	2	2	smaller than	
1	3				2 mm ³	27
2	9	Middle side	12	16	2 - 3	14
3	4				3 - 4	13
4	1	Lower part	17	41	grater than	
6	1				4	5
7	1					
9	1					

- N. B. 1. Shoots of *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist', *Cym.* Theruma and *Cym.* Westholme 'Early Tan' were used.
 2. Culture medium; Knudson C, contained NAA 1.0, kinetin 0.1 ppm.
 3. Culture period; 6 weeks.

第4節 *Cattleya* 類の茎頂組織における protocorm の形成および組織褐変の防止

I 実験材料および方法

実験材料には、*Blc.* Memoria Crispin Rosales および *Lc.* Sargon の開花株において発生したシュートを供用した。実験は2つに分けて行なった。その一つは、幼苗形成に対するシュートの頂芽および側芽の位置間の差異、ならびに protocorm 形成の様相を中心とした幼苗形成の過程を調査するために行なった。他の一つは、*Cattleya* 類の組織培養で多発する組織の褐変に伴う活着抑制現象の対処策として、抗フェノール酸化酵素系物質の一つと考えられる ascorbic acid の応用効果を調査した。本実験で行なった一連の操作過程を記述すると次のとおりである。(1) シュートの採取; 温室栽培中の母株から5月に長さ5cmの新芽から、本葉の先端がわずかに現われた、およそ10cmのものまでを採取した。(2) 茎頂および側芽組織の摘出; 鞘葉を除去したのち、Wilson 氏液で10分間消毒し、滅菌水で洗浄後摘出した。摘出はカミソリの刃を使用して、側芽は芽を包む包葉を含めて原型のままの状態で、また、頂芽は2mm立方の大きさを基準に行なった。(3) 滅菌水による浸漬; 培養に先立って褐変物質除

去を目的に摘出組織を30分間滅菌水に浸漬した。(4) 液体培養；培養の初期3週間は各組織切片を液体回転培養に附した。褐変物質による培地の汚濁が著しくなると培地の更新を行なったが、その回数は平均3回程度であった。(5) 固体培養；3週間の液体培養後は固体培地に移して培養を続行した。この場合にも培地の褐変が著しいものは培地を更新し、その際に組織表面の枯死包葉を除去した。(6) 組織の分割；包葉のついた側芽は、培養中に分割した方が枯死包葉の影響が除去されて幼葉形成によいので、固体培養の3週目に2片に切断した。なお頂芽組織も条件をそろえるために切断処理を加えた。

本実験ではRMの処方にNAA 1.0 ppm および kinetin 0.1 ppm を添加した液体ならびに固体培地を使用した。液体培養の条件およびその他の培養条件は前章に記述したとおりである。

Cattleya 類の摘出組織の褐変防止を目的とした ascorbic acid の処理実験では、1, 10, 50, 100, および 500 ppm の試験区を設定し、側芽を対象に行なった。操作は前述した操作過程にそって進めたが、液体培地の更新は行なわなかった。なお、ascorbic acid の培地への添加に当たってはミリポアフィルター (0.22 m μ 孔径) によるろ過滅菌法を採用した。

II 実験結果

1 *Cattleya* 類の茎頂組織における protocorm の形成

Brassolaeliocattleya のシュートの頂芽および側芽組織を対象に、幼苗形成に対する各芽の位置による差異およびその発育の様相を調査し、第9表に示した。全般に活着率が低いのは消毒不十分による汚染も含めて、*Brassolaeliocattleya* の茎頂組織培養の困難性を示すものといえよう。側芽の位置による活着率の差異は、下位部の側芽ほどその率が高く、頂芽に近い上位の側芽は期待したほど良好な結果

Table 9. The formation of protocorms and the survival of tissues in progress of aseptic culture of apical meristem tissues in *Brassolaeliocattleya*

Plot	Node number from top	Number of explants at start	After 3 weeks		After 6 weeks		Number of pieces after severed	After 16 weeks		Number of explants formed protocorm
			alive	dead	alive	dead		alive	dead	
Terminal bud		14*	6	8 (4)	1	5 (4)	2	0	2	0
	1	10	4	6 (2)	1	3 (2)	2	1	1	0
Lateral bud	2	14	8	6 (2)	2	6 (3)	4	2	2	1
	3	15	9	6 (3)	4	5 (3)	8	6	2	2
	4	15	10	5 (2)	4	6 (2)	8	7	1	3

- N. B. 1. * shows the number of samples at each period and () shows the contamination by bacteria or fungi.
 2. During former 3 weeks all samples were grown at liquid culture condition.
 3. Shoots of *Blc. Memoria Crispin Rosales* were used.
 4. Culture medium ; R & M, contained NAA 1.0, kinetin 0.1 ppm

を示さなかった。一般に *Cattleya* 類の側芽は下位のものほど大型で活力が強く、上位になるにつれて活力が劣り、最上位の側芽はとくに小型である。本実験で採用した側芽を原型のまま液体培養に附す培養方法においては、それぞれの芽の活力が成否を左右する主要因となることを実験結果は示していると思われる。培養組織から幼植物が形成される様相は、当初から識別される幼芽がいくつか集まった不定形の組織塊を示し、*Cymbidium* において形成される明確な球状形態の protocorm とは若干異なっていた。しかし幼芽の形成に先立ってやや不明瞭ではあるが肥大した球状の物体が認められ (plate VI-30)、広義の protocorm の範ちゅうに含まれるものと判断された。ただ、protocorm としての形態が不明確であったのは、活着率を高めるために添加された NAA および kinetin の影響が、とくに *cattleya* 類で強く現われるものとも考えられる。なお16週までに枯死しなかった培養体は、その後20%の割合で幼植物を形成した。

2 組織の褐変防止に対する ascorbic acid の影響

Cattleya 類の組織培養中に多発する褐変現象の主要因とされているフェノール物質の酸化を抑えるために添加した ascorbic acid の影響は、第10表にまとめた。調査は便宜的に、培養液の浸出物によ

Table 10. Effect of ascorbic acid added to the liquid culture for preventing browning of the meristem culture in *Cattleya* alliance

Cultivar	Conc. of ascorbic acid	Number of explants	Browning grade and number of tissues				Index numbers
<i>Lc.</i> Sargon	0 ppm	16	卅 14,	卅 2			3.9
	1	12	卅 12				4.0
	10	12	卅 9,	卅 3			3.8
	50	12	卅 10,	卅 2			3.9
	100	12	卅 8,	卅 3,	+ 1		3.6
	500	12	卅 5,	卅 6,	+ 1		3.3
<i>Blc.</i> M C R	0	11	卅 6,	卅 5			3.6
	1	6	卅 4,	卅 2,			3.7
	10	6	卅 2,	卅 2,	+ 3		3.0
	50	6	卅 1,	卅 1,	+ 4		2.5
	100	6		卅 1,	+ 2,	± 1, - 2	1.3
	500	6		卅 1,	+ 1,	± 2, - 2	1.2

N. B. 1. Index numbers were calculated following basis, 卅 : 4, 卅 : 3, + 2, ± : 1 and - : 0.

2. Basal medium ; R & M, contained NAA 1.0, and kinetin 0.1 ppm.

3. Culture period ; 3 weeks.

4. *Blc.* M C R ; *Blc.* Memoria Crispin Rosales.

る着色度および透明度を5段階に分け、それぞれ0から4までの数字を対応させて指標を作り、これを基準に行なった。*Lc. Sargon*に対しては効果はそれほど認められなかったが、*Blc. Memoria Crispin Rosales*に対しては効果は明らかであった。とくに100および500 ppm区では、3週間にわたる液体培養でも培地の汚濁による影響は見られず培養の経過は順調であった。種類によって褐変の程度に差異を生じたのは、石井ら⁴⁷⁾が述べているように植物体内における褐変物質が時期的に夏季に多いこと、および不定季咲を示す*Lc. Sargon*の生長周期の特性によるものと考えられる。

第5節 *Phalaenopsis*の花梗側芽の伸長および同側芽からの protocorm の形成

I 実験材料および方法

*Phalaenopsis*は単茎性の生長様式をもつ種類であるため、茎頂組織を摘出することは困難なので、本実験では花梗の側芽を対象にした。*Phal. Dos Pueblos Phal. Mount Kaala Phal. Dos Pueblos* × *Phal. Mount Kaala* および *Phal. Mount Kaala* × *Phal. Doris*の4種を供用して2つの実験を行なった。その1つでは、花梗側芽の伸長開始に対するBAの塗布処理の効果を調査した。開花中の花梗において開花節より先端の部分を切除したのち、下位節位の側芽を対象に第11表に示した処理区を設け、BAの3000 ppmラノリンペーストを塗布し、処理後5週目に調査した。なお切除した直下の節では、通常でも芽の伸長が見られるので処理対象からはずした。他の実験では、花梗側芽を対象に2つの試験区を設定し、*in vitro*での幼苗形成の様相を調査した。試験区にはすでに開花した花梗の下位にある、いわゆる開花後の花梗の芽と、BA処理によって伸長した花梗における蕾形成時の、いわゆる開花前の花梗の芽の2区を設定し、活着に及ぼす芽の齢による差異を調査した。側芽の採芽方法、培地の処方および培養方法は*Cattleya*類の項で記述したとおりである。

II 実験結果

1 花梗側芽の伸長に及ぼすBA処理の影響

*Phalaenopsis*の花梗の下位節位にある側芽を対象にBA処理した結果は第11表に示した。最上位にある側芽は、それより上位の開花した部分が切除されたために、BA処理の対象外であったにもかかわらず、ほぼ40%の割合で萌芽した。実験の対象にした上位より2節目以下の芽では、BA処理と無処理区との間に著しい差が見られ、後者の区で萌芽を見たものは皆無であった。処理節位の中で第2節の萌芽割合は平均47%であり、下位節位芽の萌芽数に比べると著しく大であった。ただし、無処理の場合には全く萌芽しない下位節においても、処理区では若干の萌芽が見られた。しかも無処理第1節位芽の萌芽より、BA処理第2節位芽の方が萌芽開始が早かったことを含せて考えれば、花梗側芽の萌芽に対するBA処理の効果は、きわめて顕著であったと判断される。

Table 11. Effects of 6-benzyladenine on the sprouting of buds on flower stems in *Phalaenopsis*

Treatment	Number of samples	Number of sprouted buds					Number of non-sprouted buds
		node 1st	node 2	node 3	node 4	node 5th	
Control	8	3	0	0	0		5
Alternate nodes	13	5	<u>6</u>	0	<u>2</u>	0	4
Lower 2 nodes	9	3	0	0	<u>2</u>	<u>0</u>	5
Upper 2 nodes	8	2	<u>4</u>	<u>0</u>	0		4
all nodes	9	3	<u>4</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	3

- N. B. 1. Flower stems of *Phal.* Dos Pueblos, *Phal.* Mount Kaala, *Phal.* Mount Kaala × *Phal.* Dos Pueblos and *Phal.* Mount Kaala × *Phal.* Doris were used.
2. Underline shows the treated node with B A at 3000 ppm lanolin paste.
3. Surveyed at 5 weeks after treatment.

2 *Phalaenopsis* における花梗側芽からの protocorm の形成

前項の実験によって得られた花梗側芽の中で、再び花梗として発育した未開花花梗(2次花梗)の側芽、すなわち若齢側芽と、すでに開花した1次花梗の側芽、すなわち齢の進んだ側芽とを比較材料に幼植物形成に対する培養実験を行ない、その結果を第12表にまとめた。表に示されているように、初期3

Table 12. The formation of protocorms and the survival of tissues in progress of aseptic culture of flower stem buds in *Phalaenopsis*

Plot	Number of explants at start	After 3 weeks		After 6 weeks		After 16 weeks		Number of explants formed protocorm
		alive	dead	alive	dead	alive	dead	
Bud of post-flowering	23*	18	5 (4)	3	15 (7)	2	1	1
Bud of pre-flowering	17	15	2 (2)	7	8 (8)	5	1	4

- N. B. 1. * shows the number of samples at each period and () shows the contamination by bacteria or fungi.
2. Flower stem buds of *Phal.* Dos. Pueblos, *Phal.* Mount Kaala and *Phal.* Mount Kaala × *Phal.* Dos Pueblos were used.
3. Culture medium; R & M, contained NAA 1.0, kinetin 0.1 ppm.

週間の液体培養期間中に齢の進んだ側芽は20%が枯死し、それ以降の固体培地での培養期間を加えて6週目では85%に達し、幼芽の形成を見たものはわずかに8%にすぎなかった。それに対し若齢側芽では約30%に幼芽の形成が見られ、繁殖能率上著しい差異を生じた。花梗側芽組織からの幼苗形成の様相では、活着後幼芽の形成が速やかに起こり、protocormのステージ自体は *Brassolaeliocattleya* の場合と同じくやや不明瞭であった。しかし一部においては幼芽形成の前段階に球形態を示す物体は確認され (plate VI-31)、いわゆる広義の protocorm に属するものと判断された。また初期に形成される protocorm および幼芽数は比較的多いにもかかわらず、組織当たりの幼苗の形成数が少ない結果を見たが、これは1幼芽のみが旺盛に発育し、他は発育不良になったためであり、単茎性の生長習性をもつ *Phalaenopsis* の特異性が示されたものと考えられる。

第6節 考 察

ラン科植物にとって、茎頂培養法がとくに重要な栄養繁殖法であることはすでに記したが、本章では茎頂組織から幼植物が形成される際の初期発育過程の様相を、とくに protocorm の形成に焦点をしばり、*Cymbidium*、*Cattleya* 類および *Phalaenopsis* を供用して再検討を試みた。Morel はランの茎頂組織培養に関する最初の報告⁷⁴⁾で、その初期に形成される球形物体を protocorm like body としている。しかしながら、本章の諸実験例や他の多くの研究者の報告^{68, 95, 101, 133, 135)}を検討すれば、これが種子起原の protocorm (前期、後期は別として) ときわめて類似したものであり、生理的に同一の機能をもつ器官であると見なされる。本章の初めにこれら protocorm を同一視することを述べたが、これら protocorm が環境条件の変化に最も強く対応できる形態であること、また幼芽形成後の幼苗の生長をより安定的ならしめる機能をもつことにも、それぞれ共通点を見ることができる。しかも幼苗は、種子起原あるいは茎頂組織起原を問わず、protocorm 頂部の幼芽として発育し、母体となっていた protocorm とは別の器官であり、さらには別の生長環に導入された個体と見なされた。すなわち、新個体分離へのワンステップ的で特殊な生長サイクルをもつ器官として考えることができる。このような protocorm の形成は、*Cymbidium* のほかに *Cattleya* 類および *Phalaenopsis* の茎頂組織や側芽組織からの幼苗形成の際にも認められることが、本章の実験で確認された。ただ茎頂組織培養に際して、*Brassolaeliocattleya* および *Phalaenopsis* で protocorm の球形態が不明瞭であったことの原因は、その培養初期に組織の活着率を向上させるために加えられた auxin および cytokinin が影響を及ぼし、そのために球形を示す期間が短くなり、幼芽をもつ形態への移行が早くなったものと推定される。いずれにしても、幼芽形成の初期に protocorm のステージが存在することは、ラン科植物にとって本質的なことと考えられる。

Cattleya 類の茎頂培養の実用化に際して、問題点の一つとして考えられる組織の褐変現象と、それに伴う活着率低下は、その原因が組織中に含まれているフェノール系物質の酸化によるとされている^{45, 50, 68, 90)}。本章では、これらの物質の酸化に拮抗作用をもつと考えられる ascorbic acid を使用して、*Cattleya* 類の茎頂培養時に添加し、その効果を検討した。その結果、種類によってはかなりの効果が認められ、さらにシュートの発育状態および他の培養条件との組み合わせなどを検討すれば、一層の効果が期待されよう。

Phalaenopsis は主要な単茎性のランであり、生長様式は *Cattleya* 類および *Cymbidium* などの複茎性ランと若干異なるが、それにもかかわらず、その生長環の初期に protocorm を形成することは、ラン科植物の共通点をもつものとして注目される。普通栽培においても花梗側芽が往々にして高芽苗になることは、これまでにもたびたび指摘されてきた。その場合にも形態的には不明瞭であるが、試験管内の場合と同様に protocorm を経ているものと推定される。これに似た現象で protocorm の形成が

最も明確なものは、*Dendrobium*の高芽形成時に見られる。*Phalaenopsis*の組織培養の材料に利用される花梗側芽は、開花後のものを直接利用するよりも、その芽を一度伸長させ、その2次花梗に形成される若齡側芽を利用することが能率的で、活着率の向上に役立つことが明らかとなった。

第4章 諸器官における protocorm の形成

第1節 緒言

ラン科植物の発育生理における特異性は、既述のとおり protocorm を中心にした初期発育時とくに顕著に見られる。すなわち、その特異性は protocorm が種子発芽時は勿論のこと、茎頂培養に際して新個体形成へのワンステップ的な母体としての機能のほかに、それ自体が直接的な増殖機能をもつことであった。これらがすべて広義の protocorm に属すべきことも前章で論議した。すでに述べた茎頂組織よりの幼植物形成に加えて、最近では葉組織における個体形成の研究も進められ、*Cymbidium*¹³⁵⁾、*Epidendrum* および *Cattleya* 類^{9, 15, 16, 17)}、*Phalaenopsis* および *Vanda*¹¹²⁾ では茎頂組織の場合と同様、幼植物の形成を認め、また根端組織を利用の試みもなされるようになった¹⁸⁾。しかしながら、ランの生長環をふまえての総合的な検討はなされておらず、また芽からの幼植物への移行が確認されやすい茎節についての報告は皆無である。本章では新個体形成の母材料の如何を問わず、それらの関連性を明らかにするために、茎、葉および根などの諸器官を対象に、各種条件下における protocorm および幼植物形成の様相を検討し、同時にラン科植物の生長環における protocorm の形成意義についても、再度検討を試みた。

第2節 茎における protocorm の形成

I 実験材料および方法

実験材料には、あらかじめ密植および低照度条件下において異常伸長させた *in vitro* 幼苗(第2章参照)から茎を採取して用いた。茎がそれほど伸長しない *Cattleya* 類では、先端部および基部を除いた中位部の2~3mm長の茎切片を供用し、大幅な節間の伸長が見られる *Cymbidium* では葉鞘の発生部位を便宜的に節とみなし、その部位を中心とした切片を供試材料とした。また *Cymbidium* では節間部が長く、かつ比較的若い組織に限って節間部分も対象にした。供試種は *Cattleya* 類では *Lc. Princess Margaret* × *Lc. Bonanza 'Giant'* を、*Cymbidium* では *Cym. San Francisco 'meadow Mist'* および *Cym. Rosanna 'Pinkie'* × *Cym. sp.* をあてた。培地には RM および MS の処方 に NA A 1.0 および kinetin 0.1 ppm を添加したものを使用し、培養は *Laeliocattleya* で5週、*Cymbidium* では8週間行なった。調査は、幼葉の判別ができるものをシュート、これに至らないものを protocorm として分け、それぞれ伸長生長に対する発育過程の2相および増殖の指標として示した。

II 実験結果

Laeliocattleya および *Cymbidium* の *in vitro* 幼苗の茎における幼植物形成の様相は、第13表に示した。*Laeliocattleya* および *Cymbidium* とも、全般にかなりの高率で幼植物の形成が見られたが、MS 処方に比較して RM 処方の培地に若干多い傾向が認められた。茎の切片にはそれぞれ葉の多少に応じて芽の原基があり、それらが発達して幼苗が形成されるのが一般であるが、その発育過程の初期に、まず protocorm が形成されることが *Laeliocattleya* および *Cymbidium* の両種で明確に認められた。

Table 13. The protocorm and shoot formation on stems of plantlets in *Laeliocattleya* and *Cymbidium*

Material	Culture medium	Number of		Number of explants formed protocorm	Percentage of explants formed protocorm	Number of explants formed shoot	Percentage of explants formed shoot	Fresh weight per explant
		explants examined	Death ratio					
<i>Laeliocattleya</i> Stems	R & M	72	42.4%	40	56.9%	4	5.6%	13.9 mg
	M&S	41	76.4	18	43.9	13	31.7	12.7
Nodes	R & M	109	18.3	71	65.1	18	16.5	105.3
	M&S	100	43.0	44	44.0	13	13.0	108.3
<i>Cymbidium</i>								
Internodes	R & M	67	89.6	3	4.5	0	0	11.5
	M&S	40	87.5	2	5.0	0	0	13.0

- N. B. 1. Plantlets of *Lc.* Princess Margaret × *Lc.* Bonanza 'Giant',
Cym. San Francisco 'Meadow Mist' and *Cym.* Rosanna 'Pinkie'
 × *Cym.* sp. were used.
2. Each medium contained NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.
3. Culture period; *Laeliocattleya*: 5 weeks, *Cymbidium*: 8 weeks,

とくに *Cymbidium* では、球形の明瞭な大型の protocorm が茎節あたりほぼ 1 個の割合で示された (plate VI-33)。それに対して *Laeliocattleya* では幼芽が速やかに形成され、また個体によっては複数の幼芽が同時に形成されるなど、増殖方向への発育を平行させた様相が一般的であった。しかし一部では明確な球形を示す protocorm も認められ (plate VI-32)、生長環の初期における protocorm の形成は *Laeliocattleya* の茎においても同様であることが示された。

Cymbidium においては茎の節位部のほかに、節間部分においても数%の割合で protocorm および根の形成がそれぞれ別個に見られた (plate VII-37)。これは茎の節間部に芽および根の原基がそれぞれ latent bud (蔭芽) として存在することを示すものであり、分断されたために独自の発達を余儀なくされ、それぞれの形成を見たものと考えられる。*Cymbidium* の茎において節位および節間の区別が不明瞭であることは、茎の縦断切片において明らかであり (plate VII-36)、節間部における protocorm 形成の特異性はこのことに起因しているものと思われる。

Cymbidium の茎節から protocorm および幼苗が形成される過程で、幼苗への発育が早いものは小型の protocorm を形成し、逆に幼苗への移行が遅いものでは、より大型の protocorm が形成される傾向を認めた。また表には示していないが、液体回転培養では幼苗への伸長生長が阻害され、球形の形態に変化した protocorm が大型状に形成される傾向が見られる (plate VI-34) など、protocorm の形態および肥大は環境条件に影響されやすいことが認められた。

第3節 葉における protocorm の形成

I 実験材料および方法

Cattleya 類, *Cymbidium*, *Phalaenopsis* および *Vanda* のそれぞれ幼苗の葉組織を対象に, 幼植物形成の様相について観察調査した。*Cattleya* 類では *Lc. Bonanza 'Giant'* の幼苗を材料に上位から1~2枚の若齢葉を対象にして, それぞれ葉身と葉鞘の分離ならびに非分離区を設けた。培地には, NAA1.0およびkinetin0.1ppmを添加したRM培地を使用し, 培養期間は5週間とした。*Cymbidium* は *Cym. San Francisco 'Meadow Mist'* の幼苗の上位1~2枚の葉を対象に, 葉身および葉鞘に分けた試験区を設定し, 他は *Laeliocattleya* と同様の条件設定を行なった。*Phalaenopsis* は *Phal. Doreen x Phal. Mount Kaala* の葉身, *Vanda* は *V. teres* の葉の先端部およそ3mmの長さを対象に試験区を設定した。*Phalaenopsis* および *Vanda* の場合には, RMおよびMS処方 of 固体培地のみを用い, 培養期間は20週間とした。

II 実験結果

Laeliocattleya ならびに *Cymbidium* の葉を対象に protocorm の形成をみた実験の結果は第14表に示した。*Cymbidium* では実験期間中に protocorm の形成は全く見られなかったが, *Laeliocattleya* ではかなりの割合で形成を認めた。protocorm の形成は葉鞘区および葉身と葉鞘を分離しない区に

Table 14. The formation of protocorms on leaves and sheaths in *Laeliocattleya* and *Cymbidium* plantlets under solid and liquid culture conditions

Material	Condition of culture medium	Number of explants examined	Death ratio	Number of explants formed protocorm	Percentage of explants formed protocorm	
<i>Laeliocattleya</i>	Leaves	Solid	106	90.6%	2	1.9%
		Liquid	112	0	0	0
	Sheaths	Solid	107	76.6	14	13.1
		Liquid	105	0	12	11.4
	Non-divided ones	Solid	112	67.9	16	14.3
		Liquid	108	0	23	21.3
<i>Cymbidium</i>	Leaves	Solid	150	0	0	100
		Liquid	150	0	0	84.7
	Sheaths	Solid	75	0	0	100
		Liquid	75	0	0	96.0

- N. B. 1. Plantlets of *Lc. Bonanza 'Giant'* and *Cym. San Francisco 'Meadow Mist'* were used.
 2. Culture medium ; R & M, contained NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.
 3. Culture period ; *Laeliocattleya* : 5 weeks, *Cymbidium* : 10 weeks.

において多数見られ、葉身の試験区には殆ど見られなかった。葉身および葉鞘の非分離区を含めて、protocorm の形成位置は例外なく葉鞘部の下位切断面に沿った部分であり、しかもその内側に集中していた (plate VII-39, 40)。葉身における protocorm の形成は、100 例中わずかに 2 例に見られたにすぎないが、その場合の形成位置も葉鞘に接する葉身の下位切断部であった (plate VII-38)。これらのことは葉鞘における維管束、いいかえれば、形成層の存在が protocorm の形成と密接にかかわっていることを示すものといえよう。本実験で得られた protocorm に関して注目すべきことは、外部形態的に幼芽をもたない未分化の状態を示し、また発育生理的に protocorm 自体の肥大生長のみが進行する、いわゆる protocorm 前期の範ちゅうに属すべきものが形成されたことである。固体および液体培地間における protocorm 形成数には差は見られなかったが、培養切片の枯死数では対照的な差異が得られた。すなわち、液体培地では 5 週間の培養期間中における葉切片の枯死は全く見られず、葉身からのカルス様の組織の形成も一部において認められた (plate VIII-42)。Cymbidium の場合には、固体培地に置床された葉片はすべてそのままの形で枯死し、液体培地において若干数見られた枯死しない葉組織においても、形態的变化は全く見られず、これらも 10 週目ではすべて枯死した。

Phalaenopsis および *Vanda* の葉身を材料に幼植物の形成をみた実験の結果は第 15 表に示した。両種とも、枯死切片および形態に何ら変化のない切片が大部分を占めたが、幼植物の形成を見た切片が数%含まれ、それらの形成初期の形態は *Laeliocattleya* の場合と同様、protocorm の範ちゅうに入るのであった。両種とも複数の個体が同時に形成されたこと、および比較的長時日をかけて形成されたことに、*Laeliocattleya* と比較して特異性が見られた。また protocorm 形成の場所においても、*Phalaenopsis* では葉身の中央表面部分および葉縁部に (plate VIII-43)、また、*Vanda* では最基部の切断部分および先端部 (plate VIII-44) に見られたように、*Laeliocattleya* の場合とは若干異なった様相を示した。処方培地間においては RM 培地に若干多い傾向が見られた。

Table 15. Different mode of formation of protocorms on leaves of *Phalaenopsis* and *Vanda* Plantlets under aseptic condition

Material	Culture medium	Number of explants examined	Death ratio	Number of explants formed protocorm	Percentage of explant formed protocorm	Total number of protocorms
<i>Phalaenopsis</i>	R & M	75	6.7 %	2	2.7 %	12
	M & S	75	44.0	0	0	0
<i>Vanda</i>	R & M	104	83.7	4	3.8	43
	M & S	105	92.4	1	1.0	14

N. B. 1. Leaves of *Phal.* Doreen x *Phal.* Mount Kaala and leaf tips (about 3 mm length) of *Vanda teres* were used.

2. Each medium contained NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.

3. Culture period ; 20 weeks.

第4節 shoot tip の発育と protocorm の形成

I 実験材料および方法

無菌的に育苗された *Laeliocattleya* および *Cymbidium* 幼苗の摘出された茎頂組織および葉を有したまま分離された先端部を対象に, protocorm の形成および幼苗への発育の様相を調査した。実験材料には *Lc. Princess Margaret* × *Lc. Bonanza 'Giant'* および *Cym. Rosanna 'Pinkie'* × *Cym. sp.* の幼苗を供用した。培地は NAA 1.0 および kinetin 0.1 ppm を添加した RM および MS 処方 of 固体ならびに液体培地を使用し, 培養は 10 週間行なった。

II 実験結果

無菌幼苗の茎頂組織および葉を有する幼苗先端部を材料に, 幼植物形成の様相を調査した結果は第16表および第17表に示した。摘出された茎頂組織では, 固体および液体の両試験区とも枯死切片が大部分を占め, 幼植物の再生は全般に低い割合で見られたに過ぎなかった。枯死率が高いのは置床切片が小さいこと, および摘出操作時における機械的損傷の程度が大きいことのためと思われる。幼植物の形成に当たって注目すべきことは, plate VIII-45 および 46 に示すような球形態の明確な protocorm がその初期に見られたことである。このことは茎切片の場合と同様, 初期発育におけるワンステップとしての protocorm の存在を示す具体例の一つといえよう。

葉をつけたまま分離した幼苗の先端部においては, 固体および液体地間にきわめて対照的な発育の差異が認められた。すなわち, 固体培地に置床された先端部切片は新根を発生させて幼苗となる, いわゆる, 他科植物に見られるさし木繁殖と同様の様相を示したのに対し, 液体培地においては *Laeliocattleya* および *Cymbidium* とも葉および根の発生が阻害され, 基部が異常に肥大する特異形態を示すことが

Table 16. The formation of protocorms and shoots on the apical tissues of *Laeliocattleya* plantlets under a variety of culture conditions

Treatment		Number of explants examined	Death ratio	Number of explants formed protocorm	Percentage of explants formed protocorm	Number of explants formed shoot	Percentage of explants formed shoot	Fresh weight per explant
R & M	Solid	25	76.0 %	7	28.0 %	4	16.0 %	48.8 ^{mg}
	Liquid	25	92.0	3	12.0	1	4.0	61.9
M & S	Solid	15	86.7	2	13.3	1	6.7	52.5
	Liquid	28	89.3	3	10.7	1	3.6	74.3

- N. B. 1. Plantlets of *Lc. Princess Margaret* × *Lc. Bonanza 'Giant'* were used.
 2. Each medium contained NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.
 3. Culture period ; 10 weeks.

Table 17. Growth responses of shoot tips of plantlets in *Laeliocattleya* and *Cymbidium* under a variety of culture conditions

Material	Treatment	Number of explants examined	Total number of protocorms	Number of protocorms per explant	Total number of shoots	Number of shoots per explant	Fresh weight per explant
<i>Laeliocattleya</i>	R&M Solid	18	3	0.2	20	1.1	83.5 ^{mg}
	R&M Liquid	20	13	0.7	42	2.1	162.0
	M&S Solid	21	5	0.2	23	1.1	65.3
	M&S Liquid	20	15	0.8	20	1.0	130.9
<i>Cymbidium</i>	R&M Solid	30	6	0.2	39	1.3	128.5
	R&M Liquid	34	58	1.7	33	1.1	182.0
	M&S Solid	30	9	0.3	40	1.3	126.0
	M&S Liquid	34	78	2.3	36	1.2	207.8

- N. B. 1. Plantlets of *Lc.* Princess Margaret × *Lc.* Bonanza 'Giant' and *Cym.* Rosanna 'Pinkie' × *Cym.* sp. were used.
 2. Each medium contained NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.
 3. Culture period ; 10 weeks.

認められた (plate IX-47, 48)。これは発育の方向性を失わせる液体回転の培養条件に対応してとられた形態で、増殖方向へ発育転換した結果を示すものであり、とくに *Cymbidium* では球形態を示す protocorm の形成が明確であった。なお固体培地における先端部切片よりの幼苗形成に際しては、単数状態での発育が一般であるが、一部においては基部側芽に由来する萌芽も見られ、*Cymbidium* ではその際にまず protocorm を形成することが明確に認められた。

第5節 根端組織における protocorm 形成の可能性

I 実験材料および方法

Cattleya 類および *Cymbidium* の根端組織を利用した幼植物形成の可能性を、とくに auxin および cytokinin との組み合わせ添加の影響の面から検討した。*Cattleya* 類は *Lc.* Princess Margaret × *Lc.* Bonanza 'Giant' の根端およそ 3 mm を切りとって用い、*Cymbidium* では *Cym.* Rosanna 'Pinkie' × *Cym.* sp. および *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist' の根端約 4 mm を対象にした。培地は Knudson C, RM および MS の固体および液体培地を使用した。auxin は NAA および 2, 4-D を、また cytokinin は kinetin および BA を種々に組合わせて試験区を設定した (第18表参照)。培養期間は液体培地では 10 週間、その他で 20 週間とし、また一部では 50 週まで延長して発育

の様相を調査した。

II 実験結果

Laeliocattleya では対照区および R M の固体培地において伸長した切片が見られただけで、殆どの切片はそのままの形で枯死した。それに対して *Cymbidium* では肥大および伸長するものが多数見られ、それらの調査結果は第 18 表にまとめた。Knudson C の対照区および植物生長調整物質の濃度が低い R M 培地では、伸長を示した個体が大部分であったのに対して、他の殆どの試験区では先端部が肥大するかあるいは枯死するものが大部分であった。先端部が肥大したものはさらに培養を続行すると不定形の組織塊を形成するに至った。このようにして形成された組織塊は、きわめて緩慢な肥大生長を示す

Table 18. Effects of auxin and cytokinin on the growth of root tips of plantlets in *Cymbidium* under a variety of culture media and conditions

Culture medium	Condition of culture medium	Concentration of growth regulators	Number of explants examined	Percentage of explants swelled	Percentage of explants elongated	Percentage of explants dead
	Solid	0 ppm	0ppm ¹ 5	0	93.3	6.7
Knudson C	Solid	NAA 10	22	31.5	9.1	59.1
		NAA 10, kinetin 1	20	45.0	10.0	45.0
		2, 4-D 5,	21	28.6	0	71.4
		2, 4-D 5, BA 1	22	40.9	0	59.1
	Liquid	NAA 10,	16	37.5	18.7	43.8
		NAA 10, kinetin 1	15	53.0	13.7	33.3
		2, 4-D 5,	15	40.0	6.7	53.3
		2, 4-D 5, BA 1	15	33.3	0	66.7
M & S	Solid	NAA 10,	20	50.0	5.0	45.0
		NAA 10, kinetin 1	20	45.0	0	55.0
		2, 4-D 5,	20	35.0	15.0	50.0
		2, 4-D 5, BA 1	20	30.0	5.0	65.0
R & M	Solid	NAA 1, kinetin 0.1	22	4.5	91.0	4.5
	Liquid	NAA 1, kinetin 0.1	10	10.0	80.0	10.0

N. B. 1. Root tips (about 4 mm length) of *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist' and *Cym.* Rosanna 'Pinkie' × *Cym.* sp. were used.

2. Culture period; Liquid media: 10 weeks, others: 20 weeks.

ことに特徴づけられるが、50週間の培養においても不定芽形成のきざしは全く見られなかった (plate IX-52)。これらの組織塊は、形態的にむしろ他科植物群に見られるカルスに類似しており、生長速度を相対的にとられるならば、カルスの定義に合致するものであり、これはラン科植物のカルス形成を代表する事例と考えられる。

以上のように実験的には根端組織よりの幼植物の形成は得られなかったが、他方では、*Phalaenopsis* の開花株の根において幼植物の形成がまれに見られる (plate IX-51) ことから、根端組織における幼植物の形成およびそれに付随する protocorm の形成は必ずしも否定されるものではないと考えられる。

第6節 考 察

種子から形成される protocorm の形態およびその発育過程は第2章で、また茎頂組織から形成される protocorm の形態およびその発育過程については第3章で論議し、それらはいずれもラン科植物にとって本質的には同じ protocorm (広義の解釈としての) 相に属すべきことを明らかにした。本章ではこれらのことをさらに強く裏づけるために、複茎性ランとして *Laeliocattleya* および *Cymbidium* を、また単茎性ランとして *Phalaenopsis* および *Vanda* を供用し、いずれもその幼植物の栄養体各器官あるいは組織を材料にして、新しい幼植物の形成と protocorm の関連づけを行なった。

茎節に対する各種条件下での幼植物形成実験は、*Laeliocattleya* および *Cymbidium* の複茎性ランのみを供用したが、いずれも60%から80%の高率で protocorm およびそれから発育した幼苗の形成が見られ、普通には用いられない茎組織が繁殖器官として十分供用されることが示された。しかもすべての例でその初期に球形態の明確な protocorm のステージを経ることを確かめた。茎頂組織培養で形成される protocorm の形態には、とくに *Laeliocattleya* で見られたように、当初から幼芽および protocorm の集合体の形成が多かったこと (第3章参照) と比較すると、密接した側芽が物理的に分離されて、互いに独立した状態で protocorm 形成に進むため、単独的な protocorm の形成に役立ち、典型的な球体を呈するようになったと考えられる (plate VI-32, 33)。 *Cymbidium* においては分離された茎の節の位置が外見上不明瞭なために、場合によっては節間部分として切り離した切片からも protocorm の形成が見られた。

葉組織からの幼植物の形成については、*Cymbidium* で Wimber¹³⁵⁾、*Cattleya* 類および *Epidendrum* で Champagnat¹⁵⁾、Ball⁹⁾、Churchill^{16, 17)}、*Phalaenopsis* および *Vanda* で田中¹¹²⁾ の報告があり、繁殖母体としての利用のきっかけはすでになされている。本実験でも *Cymbidium* を除く他の3種で、葉組織から幼植物形成の行なわれることが確認され、これらの報告と一致した。しかも本実験でとくに重要なことは、幼苗形成の初期に明確な protocorm の形成を見たことにあり、当初からすでに芽を有する茎節と異なり、ラン科植物の新個体発生、すなわち新生長環形成に際しての protocorm 相の必須性をより強く示唆するものとして注目される。protocorm が形成される部位は *Laeliocattleya* では葉鞘部に、また *Phalaenopsis* および *Vanda* では葉身部でとそれぞれ異なっていた (plate VII-39, 40 および plate VIII-43, 44) が、全体に切断面に接した場所に多く、とくに *Laeliocattleya* では葉鞘の中央部下に集中し、維管束分化との関連性が示唆された。

無菌幼苗の茎頂組織から幼植物が形成される過程においても、protocorm の形成は認められた。一般に *Cattleya* 類では成株から生ずるシュートの茎頂組織および幼苗の茎頂組織を問わず、新個体の発育開始を見たものは速やかに幼芽を形成するのが普通で、球形態を示す protocorm の期間は短く、肉眼による識別の機会が少ない。それにもかかわらず、本実験で明確な球形態の protocorm (plate VIII-45, 46) を示したことは、既述のとおり protocorm が種子発芽時だけでなく、栄養系における増殖発育時においても必須のステージであることの実例であり、注目に値しよう。

総じて、ラン科植物は他科植物に比較してカルスを経ないで繁殖に利用できる器官が多く、しかもそれらの初期に必ず protocorm を経過することが、発育特性として示されたといえる。本章において明らかにされたように、多くの器官から生ずる protocorm で、すでに存在する芽に由来するときはその頂部に幼芽をもった、いわゆる後期 protocorm の形態を示すのに対し、葉などのように芽の原基をもたない部位に形成される場合には、幼芽が明確でなくより未分化の形態、すなわち前期 protocorm の形態を示す。さらに、幼芽の伸長生長に好適な条件下では、protocorm は小型で速やかに幼苗へ発育するのに対し、液体回転培養のように、極性を必要とする伸長生長に不適な条件下では、より大型の protocorm が形成されるなど、環境に対応して合理性をもつことも示されたといえよう。

最後に、根端組織の培養によって形成された組織塊は、単子葉植物の根という、通常では新個体発生の見られない器官に由来するものであり、その特性から見て、ラン科植物においてカルス組織が形成されるただ一つの具体例と考えられる。なお、*Phalaenopsis* の根においてまれに幼植物が形成されることがあるが、その際に経過すると思われる protocorm のステージと上述したカルス組織の関連、さらに、本研究では扱わなかったが *Cymbidium* の地生種に見られるリゾーム形成との関係の検討については機会を改めたい。

第5章 茎頂組織から形成された protocorm ならびに 幼植物の発育

第1節 緒言

茎頂組織およびその他の栄養器官から形成された protocorm の、その後の発育に対する生理学および形態学的検討は、ラン科植物の発育特性の解明のみならず、遺伝的にヘテロ性の強いランの効率的な繁殖の応用面にも寄与できる筈である。また、栄養的組織および器官から成形された protocorm の発育と、種子起原の protocorm における発育過程の様相の比較検討は、ラン科植物の生長環における protocorm の位置づけ、および役割を論ずる上で欠かせないことからである。本章では、栄養器官に由来する protocorm および幼植物の発育に対する物理的および化学的な外的要因の影響を、伸長生長相および増殖生長相の発育の面から、前者には protocorm 形成の容易な *Cymbidium* を、後者には幼植物の発育面で比較しやすい *Cattleya* 類および *Cymbidium* を用いて検討を加えた。

第2節 栄養系よりの protocorm の発育に影響を与える物理的要因

I 実験材料および方法

実験材料には茎頂組織起原の *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist' の protocorm を供用した。本実験では形態、大きさおよび幼芽の発育程度をそろえて採取した protocorm を対象に種々の機械的処理を施し、主として protocorm の再生など増殖効率への影響を調査した。切断処理の試験区は、幼芽の伸長方向に直角に横断して基部と先端部に分けたもの、および伸長方向に平行に2切、4切、8切したもの、ならびに protocorm の皮層部を含まない内部柔組織のみの試験区を設定した。なお、内部柔組織の切片の大きさは、皮層部を主とする8切した切片とはほぼ同じ大きさ(1mm³)とした。protocorm を切断しない試験区では、幼芽形成部を下に向けて逆位置に固定した区、および中央部を縦走する維管束組織を赤熱した鉄の針先で破壊した区、さらに強く押しつぶして組織汁液を浸出させた区をそれぞれ設定し、protocorm の再生に際して示される反応を調査した。培養はMS処方の固体培地で行ない、その期間は4週間とした。

II 実験結果

機械的切断処理を施された *Cymbidium* の protocorm における幼植物形成の様相は、第19表に示した。まず、protocorm を横断して2分した先端部および基部の双方の発育の様相を比較すると、前者では既存の幼芽の伸長生長が続行するだけで、対照区と全く同様の発育を示したのに対し、後者では複

Table 19. Effects of a variety of methods on the formation of new protocorms in *Cymbidium*

Treatment	Number of explants examined	Death ratio	Total number of protocorms	Number of protocorms per explant	Total number of shoots	Number of shoots per explant	Fresh weight per explant
Control	100	0 %	32	0.3	102	1.0	47.1 ^{mg}
Distal halves	107	2.8	171	1.6	50	0.5	44.6
Proximal halves	101	3.6	276	2.7	20	0.2	50.9
Cut in 2 pieces	106	3.8	307	2.9	19	0.2	51.4
Cut in 4 pieces	148	7.4	340	2.3	3	0	35.8
Cut in 8 pieces	217	31.3	412	1.9	2	0	16.5
Parenchyma pieces	96	87.5	19	0.2	0	0	7.9

- N. B. 1. Protocorms of *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist' were used.
 2. Culture medium ; M & S.
 3. Culture period ; 4 weeks.

数の新しい protocorm が形成されるなど、個体増殖の方向へ発育が進むのが認められた (plate X-53)。幼芽の形成位置を中心に protocorm を縦に2, 4および8等分割した試験区においては、それぞれ培養切片が小さくなるにつれて枯死率は高くなる傾向が見られたが、その値は8分割区でも30%前後と総じて低率であった。培養切片当たりの protocorm 形成数は、むしろ切断試験区に多く、8分割された小切片においても平均2個前後の値が得られた。一方、内部柔組織のみを取り出して置床した試験区では、ほぼ全体の90%の切片が枯死したにもかかわらず、残りの切片における protocorm の形成は明確に認められた (plate X-54)。protocorm 形成の部位は、皮層部がすぐれていることは一般的であったが、内部柔組織の試験区では、とくに中央部の維管束に沿った組織部位に認められた。

protocorm の上下を逆位置に固定した試験区、および protocorm の維管束を破壊した区ならびに押しつぶし処理を加えた区の各試験区における幼植物形成の様相は、第20表に示した。逆位に置床された protocorm は、寒天内に埋没された幼芽が湾曲して正常な伸長生長を示すのに時日を要し、その間に protocorm 自体の肥大が起こり、それに付随して新しい protocorm の形成が見られた (plate X-55)。つまり、protocorm 頂部の幼芽の伸長生長に不適当な条件下におかれた protocorm は増殖方向へ発育転換することを示す例として興味深い。維管束を破壊された試験区では、protocorm 形成数および生体重ともに対照区に比較して大きな値が得られた。個体発育の中心となる幼芽および維管束が破壊されたために protocorm の各部位に新しい生長域が形成され、それらが protocorm に発達した結果と考えられる (plate X-56)。押しつぶし処理を加えられた protocorm は、各部位にきわ

Table 20. Effects of mechanical treatments on the formation of new protocorms in *Cymbidium*

Treatment	Number of explants examined	Total number of protocorms	Number of protocorms per explant	Total number of shoots	Number of shoots per explant	Fresh weight per explant
Control	100	32	0.3	102	1.0	47.1 ^{mg}
Upside down of protocorms	106	297	2.8	43	0.4	65.4
Destruction of vascular bundle tissues	102	469	4.6	16	0.2	77.1
Crush down of protocorms	102	847	8.3	3	0	48.9

- N. B. 1. Protocorms of *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist' were used.
 2. Culture medium; M&S.
 3. Culture period; 4 weeks.

めて多くの新しい protocorm を形成し、その数は処理前の protocorm 1 個体当たり平均 8 個前後の値を示した (plate X-57)。調査の時点では他の処理区に比較して形成された新 protocorm はすべて小型であり、また発育の進んだシュートの形成が殆ど見られないという特異性を示した。これは protocorm の繁殖器官としての機能が特殊な条件によって如何もなく発揮された例として注目される。

総じて、*Cymbidium* の protocorm は切断処理およびその他の機械的処理に対してきわめて強い再生機能を有すること、またその再生に対しては皮層部の存在が重要な条件となること、および protocorm から幼苗に向けての伸長生長が妨害されるとただちに増殖の方向へ発育転換することが本実験で明らかとなった。

第3節 栄養系よりの protocorm ならびに幼植物の発育と化学的要因

I 実験材料および方法

無菌培養で増殖させた茎頂組織起原の幼苗および protocorm を対象に、それらの初期発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響を調査した。材料は *Cattleya* 類では *Lc.* Bonanza 'Giant' および *Lc.* Eva Robinson 'Ingham' の、2 枚の展開葉をもつシュートの先端部分および protocorm 集合体を用いた。protocorm 集合体は NAA 5.0 および kinetin 1.0 ppm を添加した MS 培地でおよそ 30 週を経て形成されたものを供用した (plate XI-60)。*Cymbidium* では *Cym.* San Francisco

'Meadow Mist' の茎頂組織より増殖された protocorm を用いた。培地は MS の処方を基本に 2, 4-D および BA を組合わせて試験区を設定し、また一部では NAA および kinetin を添加した RM 培地も使用した。 *Laeliocattleya* の幼苗および *Cymbidium* の protocorm を対象にした試験では、1 試験区当たり 20 個体ずつを供用し、培養期間はそれぞれ前者で 15 週間、後者で 20 週間とした。また protocorm 集合体を供用した試験では、およそ 3 mm 立方の大きさの切片を対象に、1 試験区当たり 25 個体ずつを 20 週間培養した。

II 実験結果

1 *Cattleya* 類の幼苗の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響

Laeliocattleya の茎頂組織起原の幼苗の先端部分を対象に、その後の発育に及ぼす 2, 4-D および BA の影響は第 9 図にまとめた。培地に置床された幼苗先端部は、基本培地では発根を経て正常な幼苗となる、いわゆる伸長生長（個体発育）の続行を示したのに対し、2, 4-D の添加された培地においては、低濃度でわずかに生長促進の効果が認められたものの、総じて幼苗の奇形化への移行が顕著に見られた。BA の影響は主として増殖への発育相の転換効果において見られ、0.1 ppm 前後にそのピークが示された。両物質が同時に添加された培地では、総体的に増殖効果が顕著である反面、個々の幼苗の示す形態は根の伸長停止および先端部の肥大、ならびに基側芽の萌芽を伴った茎の肥大現象などを示し、伸長生長に対しては抑制効果が強く示された (plate XI-58)。

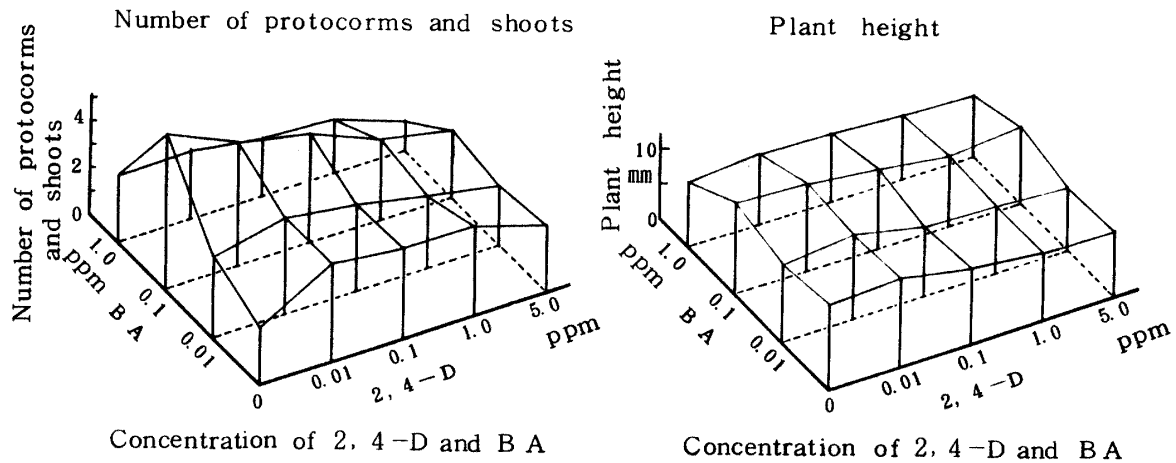


Fig. 9. Effects of 2, 4-D and 6-benzyladenine upon the growth of Plantlets in *Laeliocattleya*

- N. B. 1. Shoot tips having 2 leaves of plantlet in *Lc. Bonanza* 'Giant' were used.
 2. Basal medium: M&S.
 3. Culture period: 15 weeks.

Lc. Eva Robinson 'Ingham' の幼苗の先端部を対象にした、2, 4-D および BA の発育に及ぼす影響は第 10 図に示した。幼苗の伸長生長に対する影響は、2, 4-D および BA の低濃度区でわずかに促進効果が認められたが、高濃度区においては殆ど差異はなかった。これに対して増殖に対する効果は、2, 4-D および BA の高濃度区で顕著に認められた (plate XI-59)。増殖を示した培養体の形態は、基部が肥大発育してカルス組織に類似した protocorm 集合体を形成するもの、および腋芽

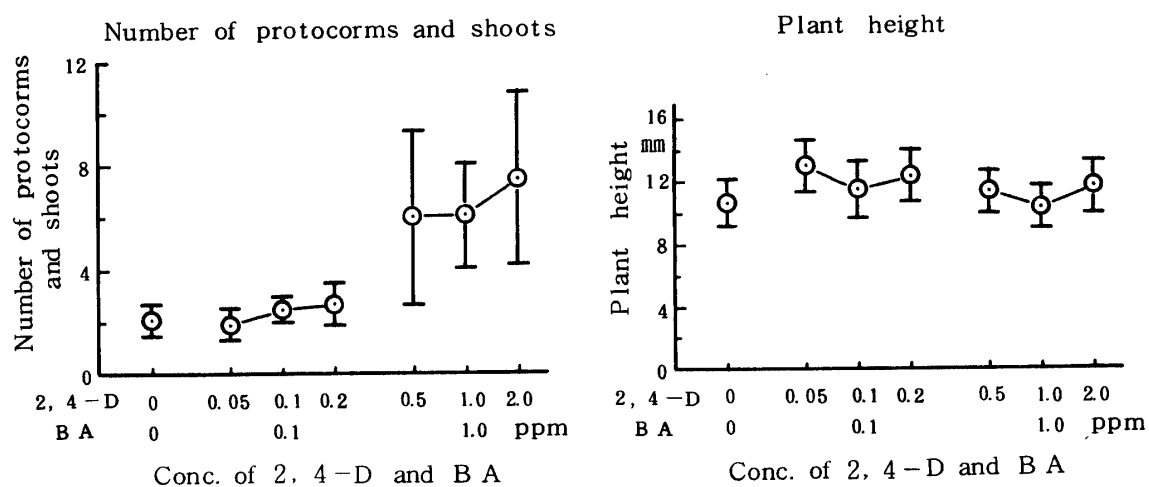


Fig. 10. Effects of 2, 4-D and 6-benzyladenine upon the growth of plantlets in *Laeliocattleya*

- N. B. 1. Shoot tips having 2 leaves of plantlet in *Lc. Eva Robinson* 'Ingham' were used.
 2. Basal medium : M & S.
 3. Culture period : 15 weeks.

がそれぞれ萌芽して不定芽叢を示すものが普通であった。

Laeliocattleya の根を有する正常な幼苗を対象に、その後の発育に及ぼす NAA および kinetin の影響は第 21 表に示した。NAA および kinetin を含まない培地では幼苗としての発育が続行するのに対し、両物質が添加された培地においては、増殖へ向けての発育が誘起されることが示された。40 週間の培養で 1 個体当たり 14~16 個と大幅に増加したが、増加の様相は幼苗の腋芽が萌芽し、その萌芽した

Table 21. Effects of NAA and kinetin on the growth of plantlets in *Laeliocattleya*

Culture medium	Addition of growth regulators	Number of explants examined	Number of shoots per explant	Plant height	Number of roots per explant
R & M	with	50	16.1 ± 1.6	19.3 ± 0.7 ^{mm}	1.8
	without	50	1.3 ± 0.2	22.9 ± 1.6	7.4
M & S	with	40	14.5 ± 1.8	20.7 ± 1.4	1.3
	without	40	2.6 ± 0.5	18.4 ± 1.2	6.8

- N. B. 1. Growth regulators ; NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.
 2. Plantlets of *Lc. Bonanza* 'Giant' were used.
 3. Culture period ; 40 weeks.

シュートからさらに次の萌芽が誘起される形で進行する，幾何級数的な増加の傾向が認められた(plate XII-64)。これらの幼苗の中で，初期に萌芽したものはかなり長期間の培養を経たにもかかわらず，増殖が連続するためかいずれも若齢時のシュートの形態を示すにとどまったことが注目される。

Laeliocattleya の protocorm 集合体を対象にして，その後の発育に対する NAA および kinetin の影響を調査した結果は第22表とまとめた。両物質を含まない培地では，protocorm 集合体の個々の幼芽がそれぞれ発根を経て幼苗を形成し，これは全体として，いわゆる幼苗の集合体の形態を示した。これに対して両物質を添加した培地では，初めに置床したものとほぼ同じ形態の protocorm 集合体としての発達を示すものが多く，他には幼苗へと伸長生長を開始するものも多く見られた(plate XII-65)。これは新しい培地に置床された protocorm 集合体の切片が活着して発育を開始する過程で，まず幼芽の伸長生長が優先的に引き起こされることと，植物生長調整物質の添加濃度が前の培地より若干低いことによるものと思われる。そしてまた一方では，NAA および kinetin の非添加培地で，大部分が伸長生長に向かうのに依然として protocorm 集合体の形態で増殖を続けるものが一部で見られ，さきの現象と合わせて，protocorm 集合体のもつ方向性に対する生理的不安定さが示されていると考えられる。

Table 22. Effects of NAA and kinetin on the development of protocorm aggregates in *Laeliocattleya*

Culture medium	Addition of growth regulators	Number of explants examined	Number of explants formed protocorm aggregate	Number of explants formed shoot	Number of shoots per explant
R & M	with	25	12	13	21.5
	without	25	8	17	24.8
M & S	with	25	14	11	20.8
	without	25	4	21	25.4

N. B. 1. Protocorm aggregates (about 3 mm cube) of *Lc. Bonanza* 'Giant' were used.

2. Growth regulators ; NAA 1.0 and kinetin 0.1 ppm.

3. Culture period : 20 weeks.

2 *Cymbidium* の protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響

Cymbidium の protocorm を対象に 2, 4-D および BA の，その後の発育に及ぼす影響を調査した結果は第11図に示した。protocorm から幼苗へ向けての発育に対する効果は，わずかに 2, 4-D の低濃度区で見られたのみで全般に抑制効果が強く，とくに 2, 4-D が 1.0 ppm 以上になると BA の有無にかかわらず枯死個体の急激な増加が見られた。これに対し，増殖に対する効果は BA が含まれるすべての試験区に顕著で，とくにその 1.0 ppm 区では protocorm およびシュートの形成数は平均 27 個の多数に達した。なお，本実験で得られた protocorm の形態は，*Cymbidium* で通常見られる個々の protocorm の分離しやすい形態とは異なり，むしろ *Cattleya* 類および *Vanda* で見られる protocorm 集合体に類似したもので，protocorm よりも幼芽の突出が明確な点で特異的であった。

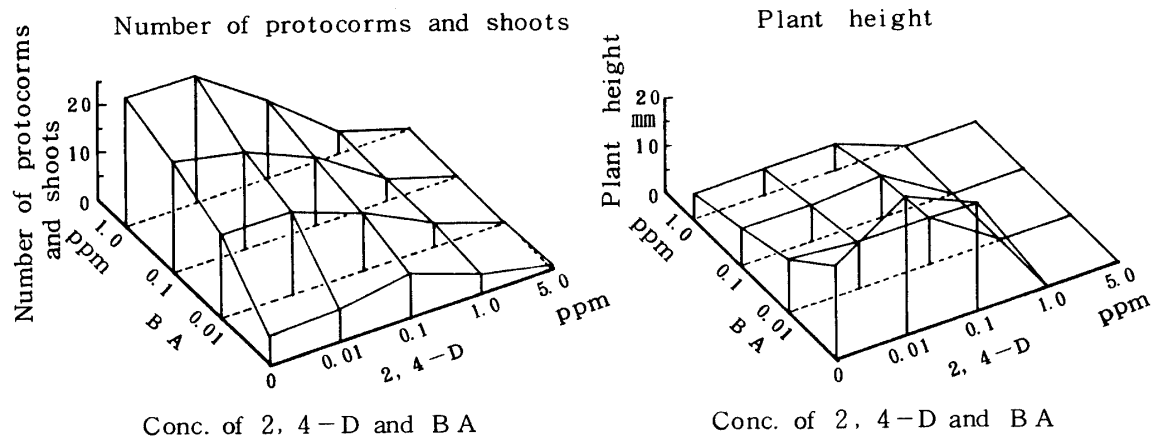


Fig. 11. Effects of 2, 4-D and 6-benzyladenine upon the growth of protocorms in *Cymbidium*

- N. B. 1. Protocorms of *Cym.* San Francisco 'Meadow Mist' were used.
 2. Basal medium : M & S.
 3. Culture period : 20 weeks.

Cym. Pearl Bel の protocorm を対象に、2, 4-D および BA の他の組合わせによる試験の結果は第12図に示した。幼苗へ向けての伸長生長に対しては、両物質の低濃度添加区でわずかに大きな値を示したものの、全体に有意な差は認められなかった。これに対し増殖発育に対する効果は、BA の 1.0 ppm と 0.5, 1.0, 2.0 ppm の 2, 4-D を共存させた試験区で顕著に認められた。また多くの場合、伸

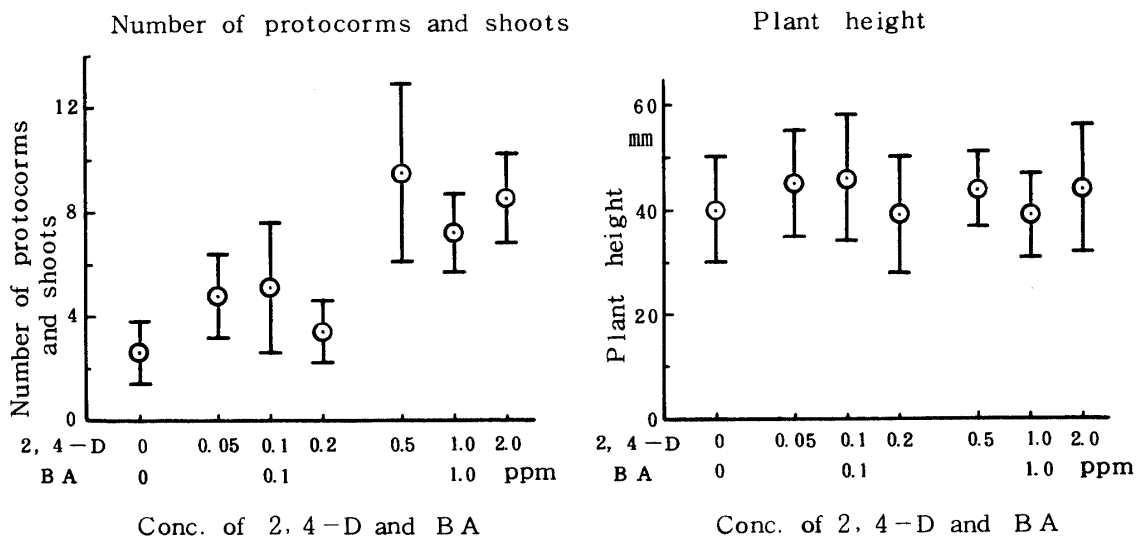


Fig. 12. Effects of 2, 4-D and 6-benzyladenine upon the growth of protocorms in *Cymbidium*

- N. B. 1. Protocorms of *Cym.* Pearl Bel were used.
 2. Basal medium : M & S.
 3. Culture period : 20 weeks.

長生長相および増殖生長相に対する適条件はそれぞれ相反して示されたのに対し、ここで得られた結果は、これらが同時に見られた点で特異性が示された。

第4節 考 察

本章では茎頂組織およびその他の栄養器官より形成された protocorm および若齢幼苗の、その後の発育の様相を物理的および化学的刺激条件に対応させて検討した。とくに *Cattleya* 類を初めとするランの重要品種はヘテロ性が強いために、栄養系に起原をもつ幼苗の発育は実用的にも重要な意味をもつものである。初期発育の様相を伸長生長相と増殖生長相の2面でとらえることは、すでに第2章で述べた。

protocorm の発育に対する物理的条件の影響は protocorm の形成が最も典型的な *Cymbidium* を供用して調べた。protocorm を縦および横方向に切断処理を施して設定した試験区の中で、protocorm の再形成は、これらの皮層部を含むすべての切断切片において明確に認められた。とくに8分割されたおよそ1mm立方の小さな切片においても再生率は比較的高く、このことは protocorm の繁殖器官としての機能を強く示すものといえよう。また内部柔組織の切片においても維管束に沿った部位に protocorm の形成は単独状態で認められ、しかもここで形成されたものは、皮層部で形成された protocorm が総じて球形の不明瞭なものであったのに比して、より均衡のとれた球形を示す protocorm であった。このように protocorm 形成には、皮層部および維管束が深く関与し、これを含めて protocorm 自体の増殖機能の確実性が理解されよう。protocorm の上頂部および基部に横切断された分離切片では、前者は主として幼苗へ向けての伸長生長の続行を示すのに対し、後者では増殖生長を示すことが確認された。これは第2章で既述のとおり、protocorm 内に上頂部の幼芽を中心にきわめて強い位置的序列の関係が存在し、新個体の形成はこれによって支配されているためである。protocorm の中央部を縦走する維管束を赤熱した針で破壊した試験区で、増殖の結果が高率で得られたことも同じ理屈で説明される。protocorm がきわめて増殖に適した器官であることを示す確認は、押しつぶされてその大部分の組織汁液が浸出した protocorm において、最も高率で新しい protocorm を再生したことであろう。つまり、上記のように protocorm 形成に最も適した皮層部および維管束が残っているためと考えられる。また上下を逆にして寒天上に置床された protocorm は、幼苗へ向けての伸長生長が抑制される間に protocorm の肥大および変形化が起り、増殖方向への発育を示したことは、環境に対する適応形態の一つで、すかさず増殖機能の活動が開始された結果と考えられ、発育生理的にきわめて興味深い。

化学的要因に対しては、本章では auxin および cytokinin の影響を protocorm および幼苗を供用して検討した。*Cymbidium* の protocorm および *Laeliocattleya* の幼苗頂部に対して、それぞれ2種類を対象に2, 4-D および BA の組合わせの影響を調査した結果、発育に及ぼす影響は、総じて2, 4-D による伸長生長相の促進と BA による増殖生長相促進の効果が認められた。しかし2, 4-D の適域濃度の範囲は狭く、1.0 ppm を越えると植物体の奇形化が誘起され、枯死株の増加が目立った。BA の増殖に対する効果はきわめて強く、2, 4-D との併用によってもその効果は持続され、場合によっては相乗効果となってあらわれた。

auxin および cytokinin は protocorm や初期幼苗ばかりでなく、発根を経て完全な幼苗として発育中のものに対してもきわめて強力に作用することが示された。*Laeliocattleya* では幼苗の各腋芽が萌芽し、それらが生長してさらに萌芽をくり返すなどの経過を示し、結果的には40週間の培養期間を経たにもかかわらず、若齢時の幼苗の形態を示すものが大部分を占めるという特異性が指摘された。一方、protocorm 集合体の形成および維持に対しては、auxin および cytokinin が主要因として作用する。protocorm 集合体の維持すなわち増殖生長には、両物質の培地への添加を必要とし、これら両物質を含まない培地においては、いっせいに幼苗に向けて発育することが本実験においても確認された。

栄養器官から形成された protocorm および幼苗の発育の様相と、種子起原の protocorm の発育の様相(第2章参照)を比較すると、後者においては殆ど単数個体の発育であるのに対し、前者では複数個の幼苗の同時発育の点などにわずかな差異が見られるだけで、本質的には全く同様の発育経過である。したがって、protocorm のステージを両起原のそれぞれにあてて区別する必要のないことを前章で述べたが、その後の発育ステージの場合も全く同様である。

第6章 総括

ラン科植物における protocorm の形成は、種子発芽後の発育初期において示される発生学的特性として、かなり以前から注目されてきたが、1960年以降、新たな栄養繁殖の手段として茎頂組織培養法が採用されるようになってからは、その発育初期においても同様の現象が認められ、種子からの protocorm に対して protocorm like body と称している。種子(胚)に起原をもつ protocorm と茎頂組織に起原をもつそれとの間における類似点と相違点を、形態学および生理学的観点から明確にし、同時にラン科植物の初期発育に対する新しいとらえ方を試み、かつ実際に応用することは現時点での急務であるのみならず、ラン科植物の合理的繁殖技術の安定と向上のためにもきわめて重要なことと思われる。本研究は以上の点から protocorm の形成と発育の過程を種々の外的および内的条件下で検討し、ラン科植物の生長環における初期発育相の実態を新しい観点でとらえることを目的として行なったものである。

1 種子発芽における protocorm の形成

本研究の対象として取り扱った *Cattleya* 類, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* および *Vanda* の5属は勿論のこと *Epidendrum*, *Aerides*, *Arundina*, *Blechnum*, *Calanthe*, *Phaius*, *Rhynchostylis* などの他の諸属においても、種子発芽に際しての protocorm の形成は明確であった。protocorm の存在はすでに19世紀の中頃からラン菌との共生発芽との関連で⁽¹³⁾, また無菌発芽が行なわれるようになってからは⁽⁵⁹⁾, *in vitro* において常に認められている。ラン科植物の種子は胚乳組織をもたず、幼芽および幼根の分化をみない、発育初期のレベルの胚のみで構成されている。protocorm はこの幼胚と自立栄養が可能となる幼苗との間のギャップを埋める器官、すなわち種々の生理機能を果たす役割をもち、一つの生長サイクル的発育を示す器官として、ラン科植物にのみそなわった特殊な発育形態のものといえよう。したがって protocorm はもともと corm の前段階というニュアンスをもち、かつラン菌と共生状態にある特殊球状物体を対象にしているが、現在ではむしろ *in vitro* で形成される同様の物体に対しての使用例が多いといえる。しかもその生育の方向(個体の生長あるいは個体の増殖)は、本研究の各章に示したように外的および内的条件の影響を受けやすく、形態的にも生理的にもかなりの幅をもたせることが必要と思われる。

protocorm の生長および発育は、その過程における生理的機能および形態的な変化と関連して考えられねばならない。protocorm の前段階はその数100程度の細胞によって形成される発達の初期レベルの幼胚であり、極性はその当初から不変である。protocorm の形態的分化は、その上頂部に突出する幼芽の形成期を境にして前期と後期に分けることができる。一方、幼芽を形成し幼苗を発育させた protocorm は普通しばらくの間、同じ形態を維持したのち枯死する。しかしながら枯死前に幼苗から切り離されるか、あるいは植物生長調整物質などを含む培地に移されると、再び分裂活動を開始し、横への発育、すなわち増殖を開始する。

このように一つの独立的なサイクル生長周期として、protocorm は発生生理学的にも、また形態的にもかなり広範なステージに区分することが必要となる。本研究では、その一方法として前期および後期に分けたわけである。栄養器官の組織に起原をもつ protocorm と異なり、種子に起原をもつ protocorm では、前期 protocorm にあてはめられる期間を経て後期 protocorm へと生長し、しかるのち幼芽の形成

が外部形態的に明確に認められ、幼苗へと発育していくのが普通の過程である。ただし、その際に植物生長調整物質のバランスの変化などの環境の変化によって、種子由来の protocorm もそれ自体が個体増殖に向かうことを明らかにしたのは本研究が初めてである。

2 栄養器官における protocorm の形成

ラン科植物の茎頂組織培養に際して protocorm 様物体が形成されることは、茎頂培養に関する多くの報告^{41, 74, 95, 101, 104, 133, 135})において認められており、本研究でも *Cymbidium*, *Cattleya* 類および *Phalaenopsis* のそれぞれ茎頂組織、側芽組織および花梗側芽組織で、同様の事象が明確に認められた。葉組織を培養の材料にした場合、*Cattleya* で Champagnat^{14, 15})、*Phalaenopsis* および *Vanda* で田中¹¹²)、*Cymbidium* で Wimber¹³⁵) によってそれぞれ protocorm 様物体が形成されることが報告されているが、本研究では *Cymbidium* を除く他の3種で protocorm の形成が明確に認められた。その他無菌幼苗における茎頂組織、茎の節位および節間部分、根端組織および protocorm 自体を対象に培養実験を行ない、根端部を除く殆どの材料で protocorm の形成を確認することができた。これらの protocorm は殆ど後期 protocorm に相当するものであるが、中には *Laeliocattleya* の葉鞘および葉身で形成された例のように、外部形態的および発育生理的な観点から、種子からの protocorm と全く同じ前期 protocorm に該当するものも認められた。

一般には、摘出された茎頂組織より形成される protocorm は、種子から形成される protocorm の場合と違って、組織自体に密接して存在する複数の芽（側芽を含む）原基が相互に影響するとともに、活着促進のために添加される植物生長調整物質などの影響を受けて、形態的にやや不明確な形、すなわち protocorm 集合体および早期に幼苗へ移行した形態として見られた。これに対して茎節の芽、葉および葉鞘組織から形成される protocorm は、それぞれが物理的にはなれた位置に分離しており、互いに間隔をもって典型的な球体 protocorm を形成した。また茎節の側芽のように、すでにある程度生育の進んでいる芽から protocorm が形成される場合には、幼芽の形成が当初から見られるのに対し、葉面や葉鞘のように芽の原基をもたない部位からは、形態的にも発育生理的にも前期 protocorm に相当するものの形成が多い傾向が見られた。すなわち、ラン科植物における protocorm は新しい生長周期の初期に必須的に形成されるものであり、種子起原のものとの栄養系起原のものとの区別はあえて必要でないと考えられる。

3 protocorm の発育 - 伸長生長と増殖 -

protocorm は芽および根の分化をみない特殊な器官であり、種々の外的および内的条件に敏感に反応する。その結果としてあらわれる発育様相の多様性は、ラン科植物の初期生育における特異性を示していて興味深い。protocorm の発育は大きく分けて、伸長生長相と増殖生長相の二面の発育相でとらえることができる。伸長生長は数週間にわたる protocorm の肥大生長ののち、上頂部において形成された幼芽に発育の中心が移行し、その後は幼苗の発達へ向けて生長するのが一般的な発育経過である。これに対して増殖生長相は、主として後期 protocorm のステージにおいて増殖方向へ発育転換した、形態的には protocorm 集合体の形成で代表される個体の増殖へ向けての発育相である。増殖方向への発育転換は、外的な条件による場合が多いが protocorm 自体のもつ潜在的な特性と考えられる。この具体的例証は、protocorm に対する機械的刺激の実験結果で明確にされた（第2章および第5章）。また一方では、種子発芽時に数%の割合で含まれる異常形 protocorm の形成もこの好例である。protocorm 集合体の形成は、*Cattleya* 類および *Vanda* における植物生長調整物質の処理試験に見られたように、幾何級数的に増加するのが一般的である。また形態的には、*Cymbidium* のように個々の protocorm が明確な球形態を示すものから、*Cattleya* 類のように個々の protocorm はわずかな突出物として認められるにすぎず、互いに固く連結して塊状を呈し、他科植物において形成されるカルス組織に類似の形態を示すものまで、幅広い多様性が示された。

protocorm 集合体は、研究者によってその呼称がまちまちでカルス⁶⁸⁾、カルス様⁹⁵⁾、protocorm¹⁵⁾、あるいは protocorm 様^{74, 105, 133, 135)} などといわれている。しかし一見、カルスに見える *Cattleya* 類や *Vanda* などの protocorm 集合体は、生物学的にカルスの条件として規定されている、1) ゆ合組織、2) 無方向(無極性)、3) 無定形、4) 迅速な生長、のいずれの条件にも該当せず、すべて幼芽の分化を伴っての増加であるので、これは単なる protocorm 集合体として扱うべきである。ただし、第4章に示したように、根端組織の培養に際しては全く protocorm を形成せず、上記カルスの諸規定に該当する細胞塊の形成を認めた。したがってラン科植物では、茎葉組織からは protocorm が形成されやすく、protocorm の形成されない根組織などでカルスを形成する発育特性をもつといえよう。

protocorm の増殖方向への発育転換は、protocorm に対する物理的(機械的)処理および化学的処理(auxin, cytokinin の利用など)によって、きわめて容易に誘導されることを示した。protocorm はその上頂部に幼芽が形成されると、その方向への伸長生長を強く示すが、幼芽が機械的損傷を受けるとただちに protocorm 内に新たな分裂生長域が形成される。新生長域の形成は、あたかも普通のシュートの頂芽と側芽との位置的關係と同様の現象として見ることができ、しかもその序列はきわめて明らかであることが示された(第2章および第5章)。すなわち頂芽を含む部分は縦への伸長生長(幼苗形成)への力が強く、下位部は横への増殖への力が強いことが protocorm の特徴である。protocorm の切断処理など、物理的刺激による発育の転換は一時的で、その後の発育は伸長生長にもどる(すなわち、一旦 protocorm 群として個体増殖し、その後幼苗形成に移る)のに対し、植物生長調整物質処理における増殖への発育は、総じてかなり長期にわたることが認められた。

植物生長調整物質の初期発育に及ぼす影響としては、auxin 類の伸長生長および cytokinin 類の増殖生長に対する促進作用がそれぞれうきばりにされた。auxin の中で NAA および 2, 4-D の伸長生長促進に対する適域濃度は概して低く、その範囲を越えると植物体の奇形化および致死作用への効果が強くあらわれ、一部においてはその過程で増殖生長への転換も認められた。摘出された組織切片の活着に対する auxin および cytokinin の効果については、研究者によって一致せず、とくに cytokinin は不必要である^{41, 95)}ともいわれている。一般に植物生長調整物質類の影響は、置床される材料の大きさ、活性、採取部位および種類によって大きく異なり、各報告の結果の不一致の大きな要因と考える。

4 protocorm の生長環に果たす機能的役割

protocorm は胚から幼植物が形成される時のみでなく、植物体の各部位における新たなサイクルの発育開始の際にも、その器官の発育開始に先だてて形成される器官であることを論議してきた。このように protocorm は、ラン科植物の生長環の初期段階において形成される、生理的および生態的にきわめて重要な役割をもつ一つの器官である。protocorm のもつ主役割の一つは、幼苗の発育母体であり、幼苗形成に先だてて養分の貯蔵器官としての側面をもつ肥大生長が見られる。protocorm はクロロフィルおよび仮根毛を有し、エネルギー源として糖の添加はある程度必要とするものの、その発育は自立栄養的で肥大も比較的早い。一方、栄養器官、とくに側芽が幼苗に発育する過程で見られる protocorm の肥大の程度は、幼苗の生長に好適な条件下では小さく、液体条件などの不適な条件下では大きくなることを示したが、このことは protocorm のもつ幼苗の発育母体としての役割を示し、しかも環境に対してきわめて弾力性のある対応の仕方をするものとして注目される。

protocorm のもつもう一つの重要な役割は、繁殖器官としての機能である。protocorm のステージにおいて、増殖方向への発育転換が、種々の条件により比較的容易に誘導されることを示したが、このことはとりもなおさず protocorm に増殖機能が存在することを意味するものである。とくに、機械的に切断された小さな皮層部切片においても幼苗の再生に確実性があること、および auxin, cytokinin などによる幼苗の増加数がきわめて多いことなどは、protocorm のもつ繁殖機能の強力さを示すもの

といえよう。protocormは無傷のまま、しかも化学成分が適当な培地に置床されると、単一の幼苗へと生長するだけで増殖生長は全く示さないが、分割されたとき、とくに上下に分割された基部切片における増殖の程度はきわめて高い。多数の protocorm が形成される様相は、原則として同時形成であるが、一部が優先して形成されると個体数が減少するなど、それらの示す位置的関係は明確である。これは他科植物の側芽の伸長における位置的関係と類似の現象であり、これらのことから類推すると、protocormは茎(すなわち1生長環を示す)の変形とみることもできよう。他方、*Cymbidium*の変形した protocorm において見られる維管束の分岐、および液体回転培養で見られた protocorm の分枝状の発育の様相なども、同様の観点から protocorm が一種の茎的器官であることの例証として考えられよう。

5 ラン科植物の生長環における protocorm の位置

種子発芽時に形成される protocorm と、種子以外の諸器官から形成される protocorm を、ラン科植物の生長環との関連でとらえて模式化し第13図に示した。protocormのステージを发育生理上および形態学的相違のもとに区分すると、主として横への肥大発育が行なわれる前期と、幼芽および幼苗へ

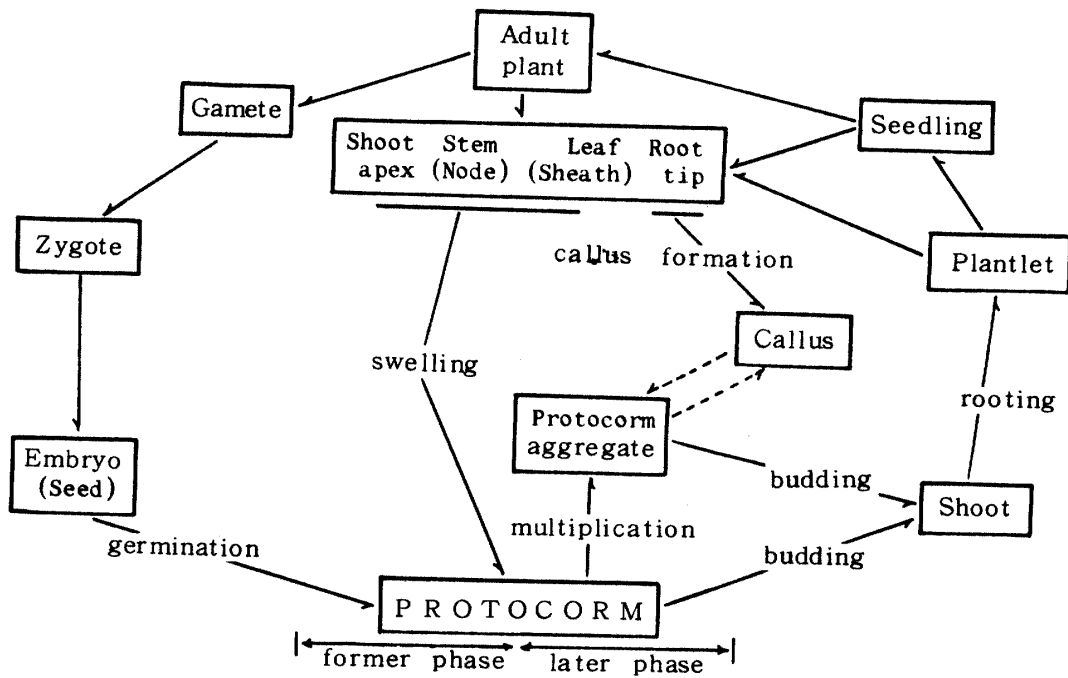


Fig. 13. Schematic diagram on the formation and development of protocorm in the life cycle of orchid. —; shows recognized pathway in this study and -----; shows unknown pathway at present

の発育が主となり protocorm そのものの発育は従となる後期に分けられる。後期 protocorm も幼芽の発育と protocorm の発育が平行する時期と、 protocorm の発育が停止し、ほぼ静止状態にある終期に分けることも可能である。これらの過程をすべて含めて protocorm の定義を広義にあてはめることによって、各種の栄養器官における protocorm (like body) も包含され、ラン科植物における初期発育過程の実態に即した整理を可能にすると考えられる。

shoot は protocorm の出芽したものであるが、発育の大部分はその母体である protocorm に依存

しており、さらに発根を経て完全に自立状態になったものが plantlet である。各種栄養器官から幼苗が形成される場合にも、まず肥大して protocorm となり、出芽して plantlet になる過程は一般的である。また一見、直接に出芽して plantlet へ移行するように見える分枝があるが、これらも特殊な条件に置くことによって、明確な protocorm の形成が見られよう。*Dendrobium* の高芽形成の初期に必ず見られる肥大現象(一種の protocorm)は、このことを裏づけている。これらのことから、ラン科植物の生長環における protocorm の形成は本質的であり、形態的にカルスに類似している protocorm 集合体も protocorm の範ちゅうに入れることによって、広義の protocorm が一つの器官として確認される。他方、callus は根組織においてのみ形成されることを示したが、他の器官および protocorm 集合体においても、さらに条件が整ったときには形成されるものと考えられる。

第7章 摘 要

ラン科植物の種子発芽時に形成される protocorm の発育の過程を形態学的および生理学的に検討し、合わせて栄養器官ならびに組織からの個体発育の過程も同様に検討し、ラン科植物それぞれの生長環における protocorm の位置づけを試みた。実験材料には *Cattleya* 類、*Cymbidium*、*Dendrobium*、*Phalaenopsis* および *Vanda* をあて、胚ならびに組織の培養には無菌培養の手法を適用して、種々の外的および内的条件とを関連づけながら検討した。それらの結果をまとめると、およそ次のとおりである。

1 種子起原の protocorm は、形態学ならびに生理学的に整理すると、球体に向けての肥大発育が行なわれる分化程度の低い前半と、高度に分化してすでに生長しつつある幼芽を伴う後半の両ステージに分けられる。*Cattleya* 類など種類によっては、後半のステージに入っても幼芽の発育が進まず、肥大生長と増殖のみが続行して、一見カルス様の異常形 protocorm となるものが含まれるが、基本培地の *Brassolaeliocattleya* におけるその形成割合は2.4%であった。

2 *Cattleya* 類ならびに *Cymbidium* の茎頂組織、および *Phalaenopsis* の花梗側芽組織の培養において、いわゆる protocorm like body の形成を認めた。これらを形態学的および生理学的に、種子起原の protocorm と比較検討した結果、ほぼ同じものと判断し、広義の protocorm とすることを提案した。

3 *Cattleya* 類の茎頂組織培養には時期的に組織の褐変現象が付随して見られ、活着率低下の原因となっているが、培地への ascorbic acid 添加処理によってある程度改善されることを示した。

4 *Phalaenopsis* の花梗側芽組織を培養する場合には、その側芽を再度伸長させ、そこで二次的に形成される開花前の若齢側芽組織を利用することによって、活着率が向上することを示した。

5 *Laeliocattleya* および *Cymbidium* の無菌幼植物から茎節切片を採取して培養し、それらが幼植物に発育する過程の第一段階に protocorm のステージが存在することを確認した。

6 *Laeliocattleya*、*Phalaenopsis* および *Vanda* の葉組織を培養し、芽の原基を有しないこれらの部位から個体発生が行なわれる際にも、protocorm のステージを経ることを確認した。

7 *Laeliocattleya* および *Cymbidium* の無菌幼植物から採取した茎頂組織、および葉を有する幼苗先端部の培養においても、protocorm の形成を確認した。

8 根端組織の培養においては、*Cymbidium* に限って不定形のカルス様の組織が形成されたが、幼芽の形成には至らなかった。

9 栄養器官に形成される protocorm は、一般に茎頂組織のように複数の芽原基が隣合って位置する場合には、多数の幼芽を伴う球形態の不明瞭な形態を示すのに対し、相互の位置間に隔たりがある茎節の側芽、または葉の原基を有しない葉組織などの場合には、典型的な球形態を示すことを確認した。

10 幼芽の伸長生長に好適な条件下では protocorm は小さく、速やかにシュートへ移行するのに対

し、液体培地のように幼芽の発育に不適な条件下では肥大の程度が大きく、かつ protocorm のステージにとどまる期間の長いことを確認した。この傾向は正常位に対して逆位に置床された protocorm の発育においても認められた。

11 切断などの機械的処理に対する protocorm の再生力がきわめて強いことを示した。その場合、皮層組織が重要な機能を有することを認めた。

12 横断により2分割された protocorm の幼芽を有する上頂部切片は、一般の protocorm と同じく幼苗へ向けての発育を示すのに対して、基部切片は多数の protocorm を同時に形成し、一時的な増殖生長を示すことを確認した。

13 protocorm の発育に及ぼす auxin および cytokinin の影響を見るため、NAA, 2, 4-D, kinetin および BA を組合わせて実験し、およそ次のような傾向を確認した。一般に auxin による伸長生長促進の効果は顕著であったが、その適域濃度範囲は狭く、NAA で 5.0 ppm, 2, 4-D で 1.0 ppm を越えると植物体の奇形化および枯死株の増加が見られた。cytokinin の効果としては増殖効果が著しく、kinetin および BA 間では後者の効果がやや強く認められた。また auxin と cytokinin の併用による相乗効果は増殖に対して、とくに顕著であった。

以上の結果をふまえて、ラン科植物における protocorm の意義、およびその生長環における protocorm の位置づけを次のようにまとめた。protocorm はラン科植物に特異的な一つの生長環をもつ器官であって、protocorm のステージには未分化の球形態を示すものから幼芽を伴うものまで含まれ、しかも種子起原の場合は勿論のこと、栄養器官、組織から形成される、いわゆる protocorm like body も含めることができる。その中で、種子発芽直後の未分化のステージを狭義の protocorm とし、その他栄養器官から形成されるものを含めて、肥大を示すすべてのステージを広義の protocorm とすることができる。protocorm はラン科植物の新しい生長環の出発点に常に形成されるもので、繁殖機能および幼植物に対する栄養貯蔵の機能をもつ特殊器官であるといえる。

謝 辞

本研究は九州大学農学部上本俊平教授の指導のもとにまとめたものである。終始ご懇切にご指導していただいたことに対し、謹んで感謝の意を表す。また九州大学農学部片山平教授、同脇本哲教授、同藤枝国光助教授には論文をまとめるに当たって多大のご教示をいただいた。ここに深謝の意を表す。さらに福島栄二九州大学農学部名誉教授、元琉球大学農学部教授には、本研究遂行上多大のご助言、ご鞭達をいただいた上、原稿校閲の労も賜わった。ここに謹んで感謝の意を捧げる。また岩手大学農学部岩佐正一教授、鹿児島大学農学部松尾英輔助教授には、実験計画の当初において多大のご助言をいただいた。記して感謝の意を表す。なお九州大学農学部園芸学研究室所属の皆様には、実験の実施に当たって種々ご協力いただいたことを記して謝意としたい。

引 用 文 献

1. ALBERTS, A. A. 1953 Use of fish emulsion for the germination of orchid seed, *The Orchid Journal*, 2: 464~466
2. ALVAREZ, M. R., and Y. SAGAWA. 1965 A histochemical study of embryo development in *Vanda* (*Orchidaceae*), *Caryologia*, 18: 241~249
3. ALVAREZ, M. R. 1968 Quantitative changes in nuclear DNA accompanying postgermination embryonic development in *Vanda* (*Orchidaceae*), *Amer. Jour.*

- Bot., **55** : 1036 ~ 1041
4. ARDITTI, J. 1966 The effects of tomato juice and its fractions on the germination of orchid seeds and on seedling growth, Amer. Orch. Soc. Bull. **35** : 175 ~ 182
 5. _____ 1967 Factors affecting the germination of orchid seeds, Bot. Rev., **33** : 1 ~ 97
 6. _____ 1968 Germination and growth of orchid on banana fruit tissue and some of its extract, Amer. Orch. Soc. Bull., **37** : 112 ~ 116
 7. BAHME, R. B. 1949 Nicotinic acid as a growth factor for certain orchid embryos, Science, **109** : 522 ~ 523
 8. BAKER, R., and D. J. PHILLIPS 1962 Obtaining pathogen-free stock by shoot tip culture, Phytopathology, **52** : 1242 ~ 1244
 9. BALL, E. A., J. ARDITTI, and M. E. CHURCHILL 1971 Clonal propagation of orchids from leaf tips. The Orchid Review **79** : 281 ~ 288
 10. BERTSCH, W. 1967 A new frontier ; orchid propagation by meristem tissue culture, Amer. Orch. Soc. Bull., **36** : 32 ~ 37
 11. BOSE, T. K., and T. P. MUKHERJEE 1974 Effect of growth substances on seedling growth and differentiation from callus of *Vanda in vitro* culture, The Orchid Review, **82** : 148 ~ 149
 12. BREDDY, N. C. and W. H. BLACK 1954 Orchid mycorrhiza and their application to seedling raising, The Orchid Journal, **3** : 57 ~ 61
 13. BURGEFF, H. 1959 Mycorrhiza of orchids. In : The Orchids, ed. by. C. L. Withner, The Ronald Press Co., New York, pp., 361 ~ 395
 14. CHAMPAGNAT, M., et G. MOREL 1969 Multiplication vegetative des *Cattleya* a partir de bourgeons cultives *in vitro*, Soc. Bot. Fr. Memoires 111~132
 15. _____, _____, et B. MOUNETOU 1970 La multiplication vegetative des *Cattleya* a partir de jeunes feuilles cultivees aseptiquement *in vitro*, Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 12 Ser., Vol. II : 97 ~ 114
 16. CHURCHILL, M. E. E. A. BALL, and J. ARDITTI. 1970. Production of plants from seedling leaf tips, Orch. Dig., **34** : 271 ~ 273
 17. _____, J. ARDITTI, and E. A. BALL 1971 Clonal propagation of orchid from leaf tips, Amer. Orch. Soc. Bull., **40** : 109 ~ 113
 18. _____, E. A. BALL, and J. ARDITTI 1972 Tissue culture of orchids. II. Methods for root tips, Ibid., **41** : 726 ~ 730
 19. _____, _____, _____ 1973 Tissue culture of orchids. I. Methods for leaf tips, New Phytol., **72** : 161 ~ 166
 20. CURTIS, J. T. 1939 The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. Amer. Jour. Bot., **26** : 390 ~ 399
 21. _____ 1943 Germination and seedling development in five species of *Cypripedium L.*, Ibid., **30** : 199 ~ 206
 22. _____ 1947 Undifferentiated growth of orchid embryos on media containing barbiturates, Science, **105** : 128

23. ———, and M. A. NICHOL 1948 Culture of proliferating orchid embryos *in vitro*, Bull. Torrey Bot. Club, **75** : 358 ~ 373
24. DAVIES, P. J. 1973 Current theories on the mode of action of auxin, Bot. Rev., **39** : 139 ~ 171
25. DRESSLER, R. L., and C. H. DODSON. 1960 Classification and phylogeny in the orchidaceae, Ann. Missour Bot. Gard., **47** : 25 ~ 68
26. ERNST, R. 1967a Effect of select oranic nutrient additives on growth *in vitro* of *Phalaenopsis* seedlings, Amer. Orch. Soc. Bull., **36** : 694 ~ 704
27. ——— 1967b Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed, Ibid., **36** : 1068 ~ 1073
28. ——— 1974 The use of activated charcoal in asymbiotic seedling culture of *Paphiopedilum*, Ibid., **43** : 35 ~ 38
29. ——— 1965 Studies in asymbiotic culture of orchids, Ibid., **44** : 12 ~ 18
30. ———, J. ARDITTI, and P. L. HEALEY 1971 Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides, Amer. Jour. Bot., **58** : 827 ~ 835
31. FONNESBECH, M. 1972 Growth hormones and propagation of *Cymbidium in vitro*, Physiol. Plant., **27** : 310 ~ 316
32. ——— 1974 The influence of NAA, BA and temperature on shoot and root development from *Begonia* X *Cheimantha* petiole Segments grown *in vitro*, Ibid., **32** : 49 ~ 54
33. FRIES, N. 1960 The effect of adenine and kinetin on growth and differentiation of *Lupinus*, Ibid., **13** : 468 ~ 481
34. GAMBORG, O. L., F. CONSTABEL, and J. P. SHYLUK 1974 Organogenesis in callus from shoot apices of *Pisum sativum*, Ibid., **30** : 125 ~ 128
35. HADLEY, G., and G. HARVAIS 1968 The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*, New Phytol., **67** : 441 ~ 445
36. HARVAIS, G., and G. HADLEY 1967a The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza, Ibid., **66** : 205 ~ 215
37. ———, ——— 1967b The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures, Ibid., **66** : 217 ~ 230
38. HILL, G. P. 1968 Shoot formation in tissue cultures of *chrysanthemum* "Bronze Pride", Physiol. Plant., **21** : 386 ~ 389
39. HUNT, P. F. 1973 The position of the orchid family in the plant kingdom and its special characteristics, In : Orchidaceae pp. 9 ~ 13 The Bourton Press
40. HUSSEY, G. 1975 Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*, Jour. Exp. Bot., **26** : 253 ~ 262
41. 市橋正一, 加古舜治 1973 カトレヤの茎頂培養による栄養繁殖法に関する研究, 第1報 茎頂組織の活着と生育に及ぼす要因について, 園学雑, **42** : 264 ~ 270

42. INTUWONG, O., and Y. SAGAWA 1973 Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescences, *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **42** : 209~215
43. _____, _____ 1974 Clonal propagations of *Phalaenopsis* by shoot-tip culture, *Ibid.*, **43** : 893~895
44. _____, _____ 1975 Clonal propagation of *Dendrobium* Golden Wave and other *nobile* types, *Ibid.*, **44** : 319~322
45. 石原愛也 1965 ニンジンの貯蔵根起源のカルス培養, とくにカルスの生長と器官の形成について, 日作紀, **34** : 225~233
46. _____ 1966 ニンジンの貯蔵根起源のカルスの生長およびカルスにおける器官形成に関する組織学的観察, 同上, **34** : 431~439
47. 石井實, 正山征洋, 上本俊平, 西岡五夫, 藤枝国光 1976 カトレヤの組織培養に関する研究, 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
48. ISRAEL, H. W. 1963 Production of *Dendrobium* seedlings by aseptic culture of excised ovaries, *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **32** : 441~443
49. _____, and Y. SAGAWA 1964 Post-pollination ovule development in *Dendrobium* orchids. II. Fine structure of the nucellar and archesporial Phases, *Caryologia*, **17** : 301~316
50. Ito, I. 1955 Germination of seeds from immature pod and subsequent growth of seedlings in *Dendrobium nobile* Lindl, *Sci. Rpts. Saikyo Univ. Agr.*, **7** : 35~42
51. 伊藤五彦 1968 ランの子房培養と種子形成, ラン科植物の種子形成と無菌培養, 鳥潟博高編 誠文堂新光社, pp. 77~92
52. KAKO, S. 1968 The development of the seed in *Dendrobium nobile* Lindl, 同上, pp. 65~76
53. 加古舜治 1968 シュンラン種子の発芽に関する研究, 同上, pp. 174~237
54. KANO, K. 1965 Studies on the media for orchid seed germination, *Mem. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, No. **20**
55. 狩野邦雄 1968 ランの無菌発芽培養基に関する研究, ラン科植物の種子形成と無菌培養, 鳥潟博高編, 誠文堂新光社, pp. 95~152
56. KANO, K. 1968 Acceleration of the germination of so-called "hard-to-germinate" orchid seeds, *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **37** : 690~698
57. KAUL, K., and P. S. SABHARWAL 1972 Morphogenetic studies on *Haworthia* : establishment of tissue culture and control of differentiation *Amer. Jour. Bot.*, **59** : 377~385
58. KIM, K. K., J. T. KUNISAKI, and Y. SAGAWA. 1970 Shoot tip culture of *Dendrobiums*. *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **39** : 1077~1080
59. KNUDSON, L. 1922 Non-symbiotic germination of orchid seeds, *Bot. Gaz.*, **73** : 1~25
60. _____ 1924 Further observations on non-symbiotic germination of orchid seeds, *Ibid.*, **77** : 212~219

61. ——— 1950 Germination of seeds of *Vanilla*, Amer. Jour. Bot., **37** : 241~247
62. ——— 1951 Nutrient solutions for orchids, Bot. Gaz., **112** : 528~532
63. KOCH, L. 1973 Vergleich Zweier Verfahren zur Vermehrung von *Cymbidium*-Protocormen Gartenbauwissenschaft, **38** : 419~426
64. KOHL, H. C. 1962 Notes on the development of *Cymbidium* from seed to plantlet, Amer. Orch. Soc. Bull., **31** : 117~120
65. KOTOMORI, S., and T. MURASHIGE 1965 Some aspects of aseptic propagation of orchids, Ibid., **34** : 484~489
66. LAWRENCE, D., and J. ARDITTI. 1964 A new medium for the germination of orchid seeds, Ibid., **33** : 766~768
67. LEE, T. T., and F. SKOOG 1965 Effects of substituted phenoles and bud formation and growth of tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., **18** : 386~402
68. LINDEMANN, E. G. P. 1967 Growth requirements for meristem culture of *Cattleya*, Ph. D. thesis, Rutgers Univ.
69. LINDEMANN, E. G. P., J. E. GUNCKEL, and O. W. DAVIDSON 1970 Meristem culture of *Cattleya*, Amer. Orch. Soc. Bull., **39** : 1002~1004
70. LINSMAIER, E. M., and F. SKOOG 1965 Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., **18** : 100~127
71. LUGO, H. L. 1955 The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla Planifolia*, Amer. Jour. Bot., **42** : 679~684
72. 前田英三 1967 イネの胚起源カルスの組織学的研究, 日作紀, **36** : 369~376
73. ——— 1968 イネの胚起源カルスにおける継代培養と器官形成, 同上, **37** : 51~58
74. MOREL, G. M. 1960 Producing virus free *Cymbidiums*, Amer. Orch. Soc. Bull., **29** : 495~497
75. ——— 1964 Tissue culture, a new means of clonal propagation of orchids, Ibid., **33** : 473~478
76. ——— 1965 Clonal propagation of orchids by meristem culture, *Cymbidium* Soc. News, **20** : 3~11
77. ——— 1971 The principles of clonal propagation of orchids Proc. 6th World Orchid Conf., 101~106
78. ——— 1974 Clonal multiplication of orchids. In : The Orchids, ed. by C. L. Withner, John Wiley & Sons, New York, pp. 169~222
79. MOSICH, S. K., E. A. BALL, and J. ARDITTI 1974 Clonal propagation of *Dendrobium* by means of node cultures, Amer. Orch. Soc. Bull., **43** : 1055~1061
80. MURASHIGE, T., and F. SKOOG 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., **15** : 473~497
81. ——— 1965 Effects of stem-elongation retardants and gibberellin on callus growth and organ formation in tobacco tissue culture, Ibid., **18** : 665~673

82. _____ 1974 Plant propagation through tissue cultures, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25** : 135 ~ 166
83. 中野寛, 前田英三 1974 イネカサの茎葉形成過程に関する形態学的研究, *日作紀*, **43** : 151 ~ 160
84. NARAYANASWAMI, S., and K. NORSTOG 1964 Plant embryo culture, *Bot. Rev.*, **30** : 587 ~ 628
85. NIIMOTO, D. H., and Y. SAGAWA 1962 Ovule development in *Phalaenopsis*, *Caryologia*, **15** : 89 ~ 97
86. NITSCH, J. P. 1951 Growth and development *in vitro* of excised ovaries, *Amer. Jour. Bot.*, **38** : 566 ~ 577
87. NOGGLE, G. R., and F. L. WYND 1943 Effects of vitamins on germination and growth of orchid, *Bot. Gaz.*, **104** : 455 ~ 459
88. OKAZAWA, Y., N. KATSURA, and T. TAGAWA 1967 Effects of auxin and kinetin on development and differentiation of potato tissue cultured *in vitro* *Physiol. Plant.*, **20** : 862 ~ 869
89. 王博仁, 鳥瀧博高 1968 ランの生長点および種子発芽の形態学的研究, ラン科植物の種子形成と無菌培養, 鳥瀧博高編, 誠文堂新光社, pp. 247 ~ 263
90. _____, _____ 1968 ランの生長点培養による無性繁殖法, 同上, pp. 264 ~ 270
91. PODDUBNAJA-ARNOLD, V. A 1959 Study of fertilization and embryogenesis in certain angiosperms using living material, *Amer. Naturalist*, **93** : 161 ~ 169
92. RAGHAVAN, V. 1964 Effects of certain organic nitrogen compounds on growth *in vitro* of seedlings of *Cattleya*, *Bot. Gaz.*, **125** : 260 ~ 267
93. _____, and J. G. TORREY 1964 Inorganic nitrogen nutrition of the embryos of the seedlings of the orchid, *Cattleya*, *Amer. Jour. Bot.*, **51** : 264 ~ 274
94. RAO, P. S., W. HANDRO, and H. HARADA 1973 Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem culture of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*, *Physiol. Plant.*, **28** : 458 ~ 463
95. REINERT, R. A., and H. C. MOHR 1967 Propagation of *Cattleya* by tissue culture of lateral bud meristem, *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **91** : 664 ~ 671
96. RICARDO, M. J., and M. R. ALVAREZ 1971 Ultra structural changes associated with utilization of metabolite reserves and trichome differentiation in the protocorm of *Vanda*, *Amer. Jour. Bot.*, **58** : 229 ~ 238
97. ROBB, S. M. 1957 The culture of excised tissue from bulb scales *Lilium speciosum* Thunb., *Jour. Exp. Bot.*, **8** : 348 ~ 352
98. RUDOLPH, M. J., E. A. BALL, and J. ARDITTI 1972 Tissue culture of orchid III. Does orthochlorophenoxy acetic acid select for or induce anthocyanin production ?, *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **41** : 1074 ~ 1078
99. SAGAWA, Y. 1961 Vegetative propagation of *Phalaenopsis* by stem cuttings, *Ibid.*, **30** : 808 ~ 809

100. ———, and H. W. ISRAEL 1964 Post-pollination ovule development in *Dendrobium* orchids. I. Introduction, *Caryologia*, **17** : 53~64
101. ———, T. SHOJI, and T. SHOJI 1966 Clonal propagation of *Cymbidiums* through shoot meristem culture, *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **35** : 118~122
102. ———, and ——— 1967 Clonal propagation of *Dendrobium* through shoot meristem culture, *Ibid.*, **36** : 856~859
103. 沢 完, 鳥潟博高 1968 *Cymbidium* 種子の無菌発芽と発芽生態に関する研究, ラン科植物の種子形成と無菌培養, 鳥潟博高編, 誠文堂新光社, pp. 153~173
104. SCULLY, R. M. 1966 Stem propagation of *Phalaenopsis*, *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **35** : 40~42
105. ——— 1967 Aspects of meristem culture in the *Cattleya* alliance. *Ibid.*, **36** : 103~108
106. SHUSHAN, S. 1959 Developmental anatomy of an orchid, *Cattleya* x *Trimos*. In : *The Orchids*, ed, by C. L. Withner, The Ronald Press Co., New York, pp. 45~72
107. SKOOG, F., and C. TSUI 1948 Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*, *Amer. Jour. Bot.*, **35** : 782~787
108. SPOERL, E. 1948 Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos, *Ibid.*, **35** : 88~95
109. STEWARD, F. C., and M. O. MAPES 1971 Morphogenesis in aseptic cell cultures of *Cymbidium*, *Bot. Gaz.*, **132** : 65~70
110. STEWART, J., and J. BUTTON 1975 Tissue culture studies in *Paphiopedilum*, *Amer. Orch. Soc. Bull.*, **44** : 591~599
111. STICHEL, V. E. 1959 Gleichzeitige Induktion von Sprossen und Wurzeln an *In Vitro* Kultivierten Gewebestücken von *Cyclamen persicum*, *Planta*, **53** : 293~317
112. 田中道男, 長谷川晴, 五井正憲 1975 単茎性ラン科植物の組織培養による栄養繁殖法に関する研究, 第1報, *Phalaenopsis* および *Vanda* の葉組織からのプロトコーム状球体の形成について, *園学雑*, **44** : 47~58
113. TEO, C. K. H., J. T. KUNISAKI, and Y. SAGAWA 1973 Clonal propagation of strap-leaved *Vanda* by shoot-tip culture *Amer. Jour. Soc. Bull.*, **42** : 403~405
114. THOMPSON, R. P. 1971 Excision of a *Cymbidium* meristem : photographed in color, *Ibid.*, **40** : 580~584
115. THORPE, T. A., and T. MURASHIGE 1970 Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures, *Can. Jour. Bot.*, **48** : 277~285
116. 鳥潟博高, 沢 完, 志佐誠 1965 ラン種子の無菌発芽に関する研究, 第1報 *Cymbidium* 種子の発芽および発育について, *園学雑*, **34** : 63~70
117. TRAN THANH VAN, M. 1974 Growth and flowering of *Cymbidium* buds

- normally inhibited by apical dominance, Jour. Amer. Soc. Sci, 99 : 450 ~ 453
118. TSE, A. T. Y., R. J. SMITH, and W. P. HACKETT 1971 Adventitious shoot formation on *Phalaenopsis* nodes, Amer. Orch. Soc. Bull., 40 : 807 ~ 810
119. TSUKAMOTO, Y., K. KANO, and T. KATSUURA 1963 Instant media for orchid seed germination, Ibid., 32 : 354 ~ 355
120. 上田博, 鳥潟博高 1968 ラン科植物の生長点組織培養, ラン科植物の種子形成と無菌培養, 鳥潟博高編, 誠文堂新光社, pp. 271 ~ 283
121. ———, ——— 1968 *Cymbidium* の生長点培養における器官形成 第1報 連続照明下における培養基添加物の与える影響について, 園学雑, 37 : 240 ~ 248
122. ———, ——— 1969 *Cymbidium* の生長点培養における器官形成 第2報 暗培養における生長物質の与える影響について, 同上, 38 : 188 ~ 193
123. UEDA, H., and H. TORIKATA 1972 Effects of light and culture medium on adventitious root formation by *Cymbidium* in aseptic culture, Amer. Orch. Soc. Bull., 41 : 322 ~ 327
124. 上本俊平 1973 花き類の生長サイクル, 植物調整物質の園芸的利用, 高橋信孝, 広瀬和栄, 佐藤幹夫, 斉藤隆, 上本俊平共著, 誠文堂新光社, pp. 238 ~ 240
125. 上里健次 1973 *Cattleya* 幼苗の生育に及ぼす培地における窒素形態の影響, 琉球大学農学報, 20 : 1 ~ 12
126. ——— 1974 *Dendrobium nobile* 幼苗の生育に及ぼす培地における窒素形態の影響, 同上, 21 : 73 ~ 81
127. ——— 1975 *Cattleya* 幼苗の生育に及ぼす培地における炭素源の影響, 同上, 22 : 79 ~ 84
128. VACIN, E. F., and F. W. WENT 1949a Some pH changes in nutrient solutions, Bot. Gaz., 110 : 605 ~ 613
129. ———, and ——— 1949b Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seed, Ibid., 111 : 175 ~ 183
130. VAJRABHAYA, M., and T. VAJRABHAYA 1970 Tissue culture of *Rhynchostylis gigantea*, a monopodial orchid, Amer. Orch. Soc. Bull., 39 : 907 ~ 910
131. VEYRET, Y. 1974 Development of the embryo and the young seedling stages of orchids. In : The Orchids, ed. by C. L. Withner, John Wiley & Sons, New York, pp. 223 ~ 265
132. WIRTH, M., and C. L. WITHNER 1959 Embryology and development in the *Orchidaceae*. In : The Orchids, ed. by C. L. Withner, The Ronald Press Co., New York, pp. 155 ~ 188
133. WILFRET, G. J. 1966 Formation of protocorm-like bodies on excised *Cymbidium* shoot tips, Amer. Orch. Soc. Bull., 35 : 823 ~ 827
134. WILSON, J. K. 1915 Calcium hypochlorite as a seed sterilizer, Amer. Jour. Bot., 2 : 420 ~ 427
135. WIMBER, D. 1963 Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem, Amer. Orch. Soc. Bull., 32 : 105 ~ 107
136. ——— 1965 Additional observations on clonal multiplication of *Cymbi-*

- dium* through culture of shoot meristems, Cym. Soc. News, **20** : 7~10
137. WITHNER, C. L. 1959 Germination of "*Cypripedium*", Orch. Jour., **2** : 473~477
138. ———— 1959 Orchid physiology. In : The Orchids, ed. by C. L. Withner. The Ronald Press Co., New York, pp. 315~360
139. ———— 1974 Developments in orchid physiology. In : The Orchids, ed. by C. L. Withner, John Wiley & Sons, New York, pp. 129~168
140. 山田康之 1967 植物におけるカルス誘導と組織培養, 植物の化学調節, **2** : 7~14
141. YATES, R. C., and J. T. CURTIS 1949 The effect of sucrose and other factors on the shoot-root ratio of orchid seedlings, Amer. Jour. Bot., **36** : 390~394
142. ZEIGLER, A. R., T. J. SHEEHAN, and R. T. POOLE 1967 Influence of various media and photoperiod on growth and amino acid content of orchid seedlings, Amer. Orch. Soc. Bull., **36** : 195~201

Summary

Attempts to make clear morphologically and physiologically the role and significance of protocorm formation to the life cycle of orchid, by the studies on the developmental procedure of protocorms which have originated from embryos and also on the processes of plantlet formation from vegetative organs, were made. As the materials *Cattleya* alliance, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* and *Vanda* were used. Experiments relating to embryo and tissue cultures were carried out using the aseptic culture techniques under various external and internal conditions. The outline of obtained results is as follows;

1. Development of protocorms originated from embryo could be divided into two consecutive phases according to the morphological and physiological standpoints. In the former phase protocorms showed only thickening growth, remaining at relatively lower level of their differentiation, and in the latter phase they became to be provided with growing buds in their apical parts. With some genera as *Cattleya* alliance and *Dendrobium*, in some protocorms even in their latter phase of development the growth of shoot did not progress no more and there occurred exclusively multiplication growth along with continued thickening of them, resulting in abnormal callus-like protocorms. The ratio of such abnormal protocorm formation under standard cultural medium in *Brassolaelicattleya* remained at 2.4%.

2. Occurrence of abnormal protocorms which are called sometimes as protocorm-like bodies, was observed by a number of workers in the apical tissues of shoots in *Cattleya* alliance and *Cymbidium* and also in bud tissues of flower stems in *Phalaenopsis*. Comparing those protocorms with those originated from embryos morphologically and physiologically, it was safely concluded that these two forms of protocorms are quite the same essentially.

3. The browning of tissues occurred with the apical tissue culture in *Cattleya* alliance and it may have caused an unfavorable result in obtaining plantlet. Such inferior situation could

be improved to some extent by the addition of ascorbic acid into culture medium.

4. With the artificial culture of the bud tissue of flower stem in *Phalaenopsis*, an improved new method was established by using still younger buds which have arisen on the newly elongated flower stem resulted through cutting off the old flowering upper part.

5. With the culture of stem pieces which were prepared from plantlet grown *in vitro* in *Laeliocattleya* and *Cymbidium*, existence of protocorm stage was clearly recognized as the first step of progress toward shoot formation.

6. With the culture of leaf tissue not bearing any bud primordia which were prepared from plantlet grown *in vitro* in *Laeliocattleya*, *Phalaenopsis* and *Vanda*, existence of protocorm stage was clearly recognized as the first step of progress toward shoot formation.

7. With the culture of apical tissues and shoot tips having a few leaves which were prepared from plantlet grown *in vitro* in *Laeliocattleya* and *Cymbidium*, the initial formation of protocorms was clearly observed.

8. With the culture of root tips prepared from plantlet grown *in vitro*, the formation of callus-like tissue was recognized exclusively in *Cymbidium*, but not producing any shoots at all.

9. As concerned with the formation of protocorm, a general tendency was recognized. Protocorms formed on the apical tissues having numerous adjoining bud primordia became to take somewhat complicated non-spherical forms bearing numerous buds on them. On the contrary, protocorms always took regular spherical form when they have arisen laterally on the stems having numerous buds attached at regular interval or arisen on the leaf tissues having no bud primordia.

10. Protocorm formed under optimal condition of shoot growth was, in general, smaller in size and developed into shoot quickly, but the one formed under unfavorable condition, such as liquid medium, usually took larger size, remaining as such protocorm stage for longer duration. Such situation was also recognized with the growth response of protocorms kept upside down on the culture medium.

11. Reproductive power of protocorm against the mechanical treatment such as severance by cutting appeared comparatively large. As concerned with this, it was recognized that cortex tissue seemed to have a vital function.

12. As concerned with behavior of growth of protocorm divided by transversal severance, it was recognized that growth of distal half pieces tended to develop toward plantlets as same as in the non-severed intact protocorms. However, the proximal ones set in the multiplication process producing a large number of protocorms simultaneously.

13. Experiments to get effects of auxin and cytokinin upon the growth of protocorms were carried out using NAA, 2,4-D, kinetin and BA. Results are summarized in the following. In general, promotive effect of auxin for the growth toward plantlet was prominent, but the range of optimal concentration was rather narrow. Exceeding addition of both more than 5.0 ppm NAA and of more than 1.0 ppm 2,4-D caused abnormality of

growth or induced death to many plantlets. Connected with the effect of cytokinin on the growth of protocorms, multiplication was prominent somewhat more effective with B A as compared with kinetin. On the other hand, the additive effect of simultaneous application of both auxin and cytokinin was obtained especially on multiplication.

From the results stated above, the function and significance of protocorm in the life cycle of orchid will be summarized as follows; protocorm is an organ peculiar to orchid and it appears after germination of seed as a special developmental stage of life cycle in that form. Protocorms take various stages of forms, such as undifferentiated spherical form, spherical one provided with certain shoots, and as the protocorm-like body produced exclusively on the vegetative organ or tissue. Stages of protocorm may be divided into two categories, that is, the former one in the narrow sense and the latter one in the broad sense. Protocorm in the narrow sense is one correspond to the undifferentiated spherical stage occurring immediately after germination. While protocorms in the broad sense will cover all the protocorms at their thickening stages, including those in the later stage in the narrow sense, and, moreover, those originated from vegetative organs. Thus it may be duly concluded that protocorms are always formed at the starting point of the renewed life cycle in orchid and that they have propagative function and execute the role of nutrient storage organs for growing shoots.

Explanation of plates

Plate I

1. Protocorms formed at 4 weeks after germination of seeds in *Brassolaeliocattleya*. x 40. See further explanation in the text.
2. A protocorm formed at 5 weeks after germination in *Brassolaeliocattleya*. x 30. Budding point is clearly recognized at the top of protocorm, locating just opposite to the position of suspensor at embryo stage.
3. A protocorm formed at 6 weeks after germination in *Brassolaeliocattleya*. x 30. The thickening growth has reached to its full extent, and the bud in central portion is starting to form shoot.
4. Protocorms formed at 12 weeks after germination in *Brassolaeliocattleya*. x 10. Primary leaves are clearly distinguishable.
5. A protocorm of abnormal type formed at 12 weeks after germination in *Brassolaeliocattleya*. x 20. Growth of central shoot did not occurred, consequently thickening growth to horizontal direction (multiple growth) is in progress. Each abnormal protocorm will become to the protocorm aggregate under the continued culture in the same medium.
6. An abnormal protocorm having a number of young buds at 30 weeks after germination in *Brassolaeliocattleya*. x 10.

Plate II

7. Forms of plantlets grown up from protocorms at the end of 30 weeks culture, those protocorms being once transplanted to the new medium at 15 weeks after germination. x 8. Primary roots are produced from the body of protocorm. See explanation in Table 3.
8. Forms of plantlets cultured continuously on the same medium throughout 30 weeks with an excessive density (24.2 plantlets/cm²) in *Brassolaeliocattleya*. x 8. Primary roots are produced, in turn, from the abnormally elongated stems grown up from protocorms.
9. Longitudinally sliced section of protocorm in *Cymbidium*. x 75. Bundle sheath is obviously recognized along the vertical center line. Division of bundle sheath is not detected in the protocorms of regularly global form.
10. Showing the bundle sheath in section of protocorm transversely sliced in *Cymbidium*. x 150.
11. Formation of new protocorms on the halfly divided protocorms by longitudinal severance in *Cymbidium*. x 5. See explanation in Table 4.
12. Formation of new protocorms on the crushed protocorms in *Cymbidium*. x 5. Note the protocorm stages clearly distinguishable previous to the development of shoot.

Plate III

13. Behavior of growth on the proximal half pieces of protocorm by transversal severance in *Dendrobium*. x 8. Multiplication by protocorm formation can be obviously recognized previous to the development of shoot. See explanation in Table 6.
14. Behavior of growth on the distal half pieces of protocorm by transversal severance in *Dendrobium*. x 8. Development of these pieces is the quite same as with the intact protocorms.
15. Behavior of growth on the proximal half pieces of protocorm by transversal severance in *Phalaenopsis*. x 8. Multiplication by protocorm formation can be obviously recognized previous to the development of shoots. See explanation in Table 7.
16. Behavior of growth on the distal half pieces of protocorm by transversal severance in *Phalaenopsis*. x 8. Development of these pieces is the quite same as with the intact protocorms.
17. An abnormal plantlet formed in medium containing 0.1 ppm 2,4-D and 6-benzyladenine (B A) in *Brassolaeliocattleya* at 30 weeks after inoculation. x 10. It is obvious that the basal part of protocorm shows the multiple growth. See explanation in Fig. 2.
18. Transverse section of an abnormal plantlet in *Brassolaeliocattleya* under the above mentioned condition. x 20.

Plate IV

19. Protocorm aggregates formed at 8 weeks after inoculation in medium containing 1.0

- ppm NAA and 1.0 ppm kinetin. x 5. See explanation in Fig. 4.
20. Plantlets formed in medium containing 10.0 ppm NAA. x 4. Abnormal acceleration of rooting is noticeable.
 21. Behavior of growth on the protocorm in liquid medium containing 1.0 ppm NAA and 0.1 ppm kinetin. x 10. Branching and thickening of protocorm are obvious.
 22. Effect of G A on the development of protocorm in *Cymbidium*. x 1.2. Protocorms were cultured in medium containing 100 ppm G A for 12 weeks. See explanation in Fig. 5.
 23. Protocorm aggregates formed in medium containing 1.0 ppm kinetin at 15 weeks after inoculation in *Phalaenopsis*. x 15. See explanation in Fig. 7.

Plate V

24. Plantlets formed at 20 weeks after germination in *Vanda*. x 10. Occurring positions of shoot and root are obviously recognized at distal and middle part of protocorms, respectively.
25. Effect of 2,4-D on the development in *Vanda*. x 0.5. Each number shows as follows, 1; control, 2; 0.01, 3; 0.1, 4; 1.0, 5; 5.0 ppm 2,4-D. See explanation in Fig. 8.
26. Effect of 2,4-D and B A on the development in *Vanda*. x 0.5. Plots of different concentrations of 2,4-D are arranged as same as above. In addition all plots were added with 0.1 ppm B A uniformly. Formation of protocorm aggregates is clearly discernible.
27. A protocorm aggregate of *Vanda* formed in the medium containing 1.0 ppm 2,4-D and 1.0 ppm B A. x 5. It roughly appears to be a callus, but it differs definitely from the latter morphologically in forming shoots, that is, in showing a certain directional growth from the start.
28. A protocorm aggregate formed in the medium containing 5.0 ppm 2,4-D in *Vanda*. x 40.

Plate VI

29. Protocorms formed on a cultured apical tissue in *Cymbidium*. x 4.
30. Protocorms and shoots formed on an apical tissue in *Brassolaeliocattleya*. x 4.
31. Protocorms formed on the cultured bud-tissue formed laterally on the flower stem in *Phalaenopsis*. x 8.
32. A protocorm formed on the stem section of a plantlets in *Laeliocattleya*. x 30. Thickening stage previous to growth of shoot is clearly discernible. See explanation in Fig. 13.
33. A protocorm formed on the stem section of a plantlet in *Cymbidium*. x 10. Protocorm stage is the same as above.
34. Behavior of protocorm in shoot formation on the stem section having several nodes in *Cymbidium*. x 15. Left; in solid medium, right; in liquid medium. Protocorms formed

on solid medium showed quicker growth of shoots, differing in their growing speeds between upper and lower nodes. In liquid medium protocorms showed, in contrast, larger growth in size, not showing any difference between upper and lower nodes.

Plate VII

35. A section of protocorm longitudinally sliced in *Cymbidium*. x 30. Such protocorm is formed from severed pieces of a stem.
36. Sections of stem longitudinally sliced in *Cymbidium*. x 10. Nodes such as recognizable in other monocot forms can not be detected.
37. Protocorms formed on the internode of stem of a plantlet in *Cymbidium*. x 20.
38. Protocorm formation on the leaf in *Laeliocattleya*. x 10. The protocorm arised from lower and inner part combined with leaf sheath. See explanation in Table 14.
39. Protocorm formation on a basal part of leaf where differentiation of leaf brade and sheath did not occur in *Laeliocattleya*. x 8.
40. Protocorm formation on the leaf sheath in *Laeliocattleya*. x 8.

Plate VIII

41. Protocorm formation on the leaf sheath in *Laeliocattleya*. x 30. Showing a symmetrically spherical protocorm.
42. Formation of the callus like bodies arising in leaf tissues of sheath and brade, not producing any one protocorm. x 5.
43. Protocorms and plantlets formed on a leaf in *Phalaenopsis*. x 4. See explanation in Table 15.
44. Protocorms formed on leaves in *Vanda*. x 8.
45. Protocorm formed on the apical tissue of a plantlet cultured *in vitro* in *Laeliocattleya*. x 40. See explanation in Table 16.
46. The same as above. x 40. Protocorm stage previous to shoot formation is clearly observed.

Plate IX

47. Growth of shoot tips of plantlets (having 2 leaves) under both cultural conditions in *Laeliocattleya*. x 1.2. Left; in solid medium, right; in liquid medium. Thickening of stem in liquid medium is clearly observed. See explanation in Table 17.
48. Growth pattern of shoot tips of plantlets (having 2 leaves) under both cultural conditions in *Cymbidium*. x 1.5. Left; in solid medium, right; in liquid medium.
49. Growth of root tip of a plantlet (ca. 3 mm in length) cultured in Knudson C medium containing 5.0 ppm 2,4-D and 1.0 ppm B A in *Cymbidium* for 20 weeks. x 8. See explanation in Table 18.
50. The same as above. x 20. Showing a callus like tissue formed by 50 weeks culture.

51. Seedlings produced on the developing root in *Phalaenopsis stuartiana*. x 2. Adventitious buds are arising consecutively from various parts of roots.

Plate X

52. Behavior of growth of intact protocorms in *Cymbidium*. x 1.2. These protocorms are developing quickly toward the plantlet stage. See explanation in Table 19.
53. Behavior of growth of the transversely cut halves of protocorms in *Cymbidium*. x 1. Left (C); distal halves, right (D); proximal halves.
54. Behavior of formation of protocorms on the cut pieces of parenchyma and of cortex tissues. x 1.2. Left (I); pieces of internal parenchyma, right (J); pieces of cortex tissues. Both kinds of pieces were prepared as of roughly the same size of about 1.0 mm³.
55. Behavior of growth of protocorms which were kept upside down on agar medium. x 1.5. See explanation in Table 20. On account of a certain suppression to growth of shoot, more thickening and enlargement of protocorms in size have resulted.
56. Behavior of growth of protocorms which were damaged to destruct their inner vascular bundles with the red heated needle. x 1.5.
57. Behavior of growth of protocorms which received the crush down treatment. x 1.5.

Plate XI

58. Growth of apical shoots of plantlets having 2 leaves in medium containing 0.1 ppm 2,4-D and 0.1 ppm B A in *Laeliocattleya*. x 1.3. See explanation in Fig. 10.
59. Effect of 2,4-D and B A on the growth of apical shoots of plantlets having 2 leaves in *Laeliocattleya*. x 0.5. See explanation in Fig. 9. Combined concentration of 2,4-D and B A with each plot is depicted in the figure.
60. Protocorm aggregates used in the experiment, compiled in Table 22, in *Laeliocattleya*. x 40. These tissues were formed in the culture of M S medium containing 5.0 ppm NAA and 1.0 ppm kinetin for 30 weeks.
61. Microscopic section of protocorm aggregate sliced longitudinally. x 75. Many bundle sheaths are clearly recognized.
62. Protocorm aggregates originated from the apical shoot of a plantlet in *Laeliocattleya*. x 15. These are induced in the culture of M S medium containing 1.0 ppm 2,4-D and 1.0 ppm B A for 30 weeks.
63. A protocorm aggregate formed after still more longer culture for 50 weeks with the above material. x 20. These aggregates are quite resemble morphologically the callus but their growth is extremely slow and they all died out after the continued successive culture through divided pieces.

Plate XII

64. Effect of NAA and kinetin on the growth of normal plantlets in *Laeliocattleya*. x 0.6. See explanation in table 21. Left; control, right; plot of 1.0 ppm NAA and 0.1 ppm kinetin.
65. Effect of NAA and kinetin on the growth of protocorm aggregates in *Laeliocattleya*. x 0.6. Left; control, right; plot of 1.0 ppm NAA and 0.1 ppm kinetin. Effects of those growth regulators have remained to some extent throughout the change of medium.
66. Effect of 2,4-D (0.1 ppm) on the growth of protocorms in *Cymbidium*. x 0.8. See explanation in Fig. 11. Concentration of 0.1 ppm will suffice to induce prominent effect.
67. Effect of 2,4-D and B A on the growth of protocorms in *Cymbidium*. x 0.5. See explanation in Fig. 12.
68. Typical behavior of protocorm multiplication in *Cymbidium*. x 10. By the suppression of growth of shoot toward plantlet, a large number of small protocorms of ca. 1mm cube in size, are produced along the surface of old parental protocorm. Those small protocorms are all quite similar morphologically to those formed from seeds.
69. Typical behavior of protocorm multiplication in *Cymbidium*. x 8. All newly formed protocorms take symmetrically spherical forms, but somewhat larger in size as compared to those as above stated.

PLATE I

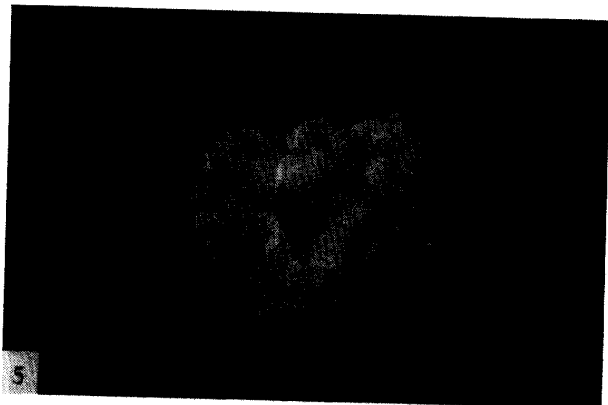
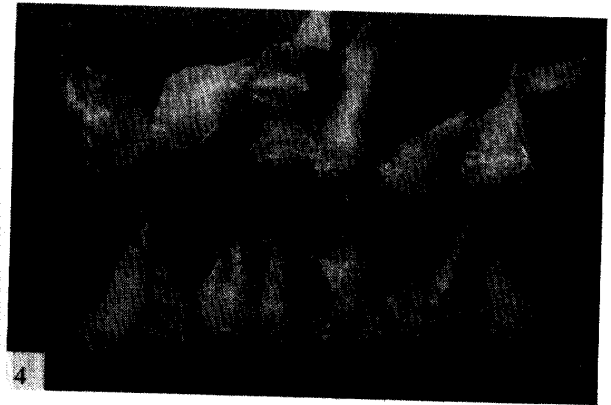
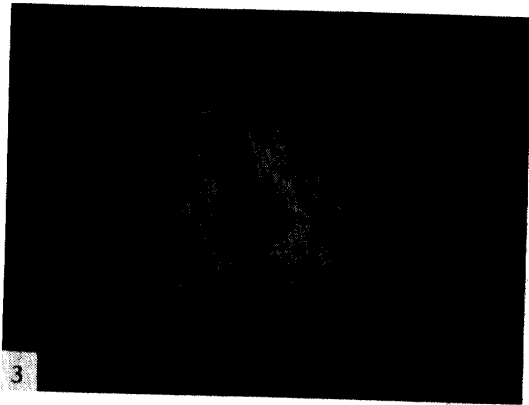
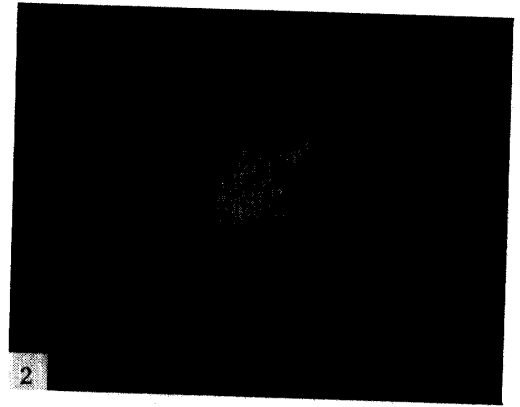
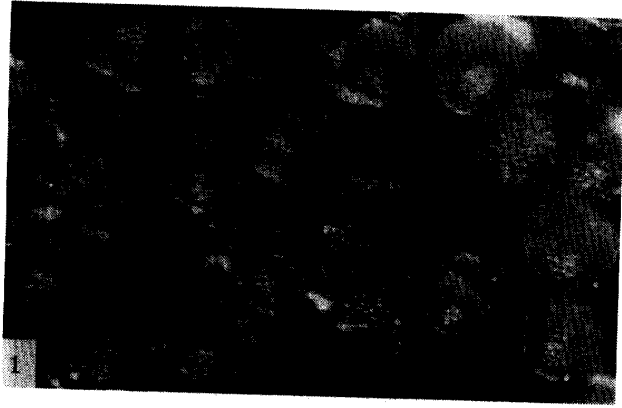


PLATE II

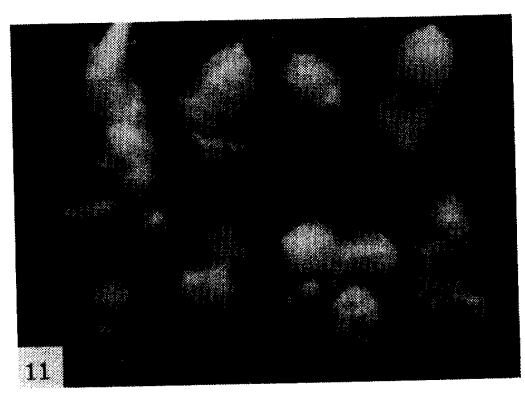
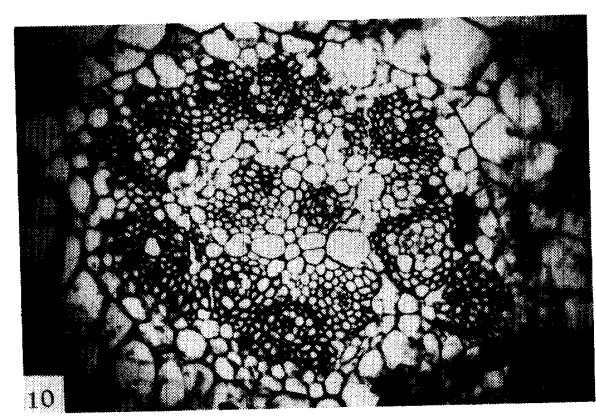
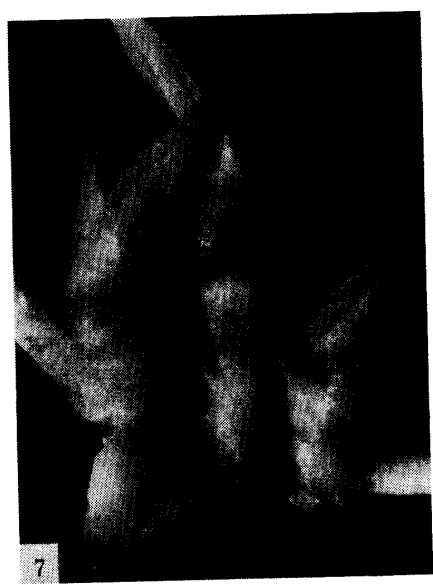


PLATE III

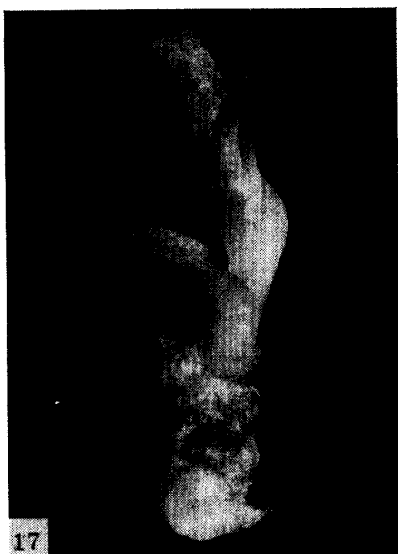
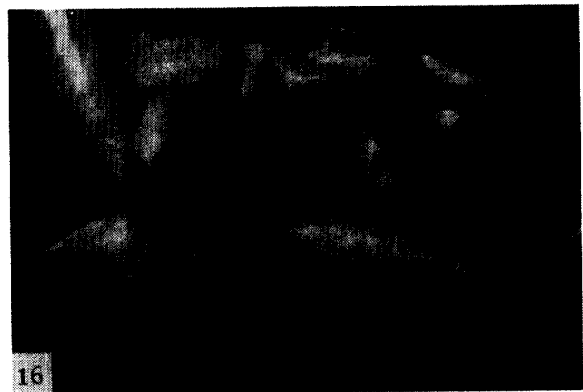
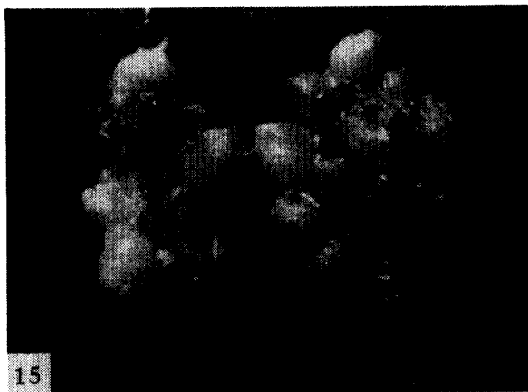
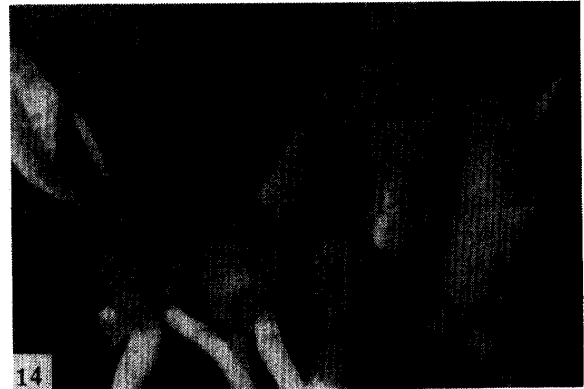
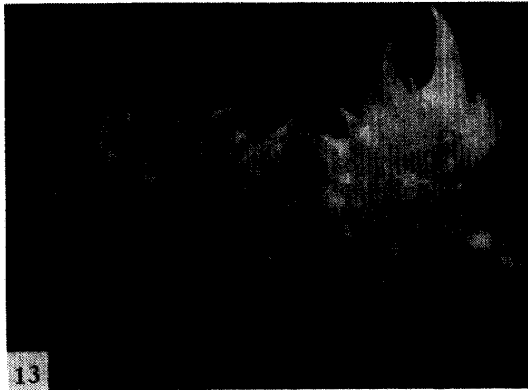


PLATE IV

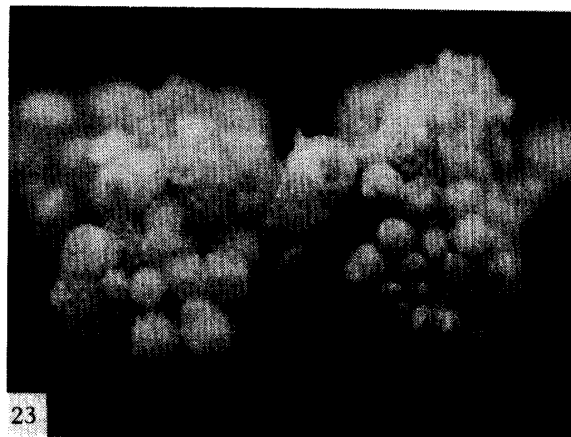
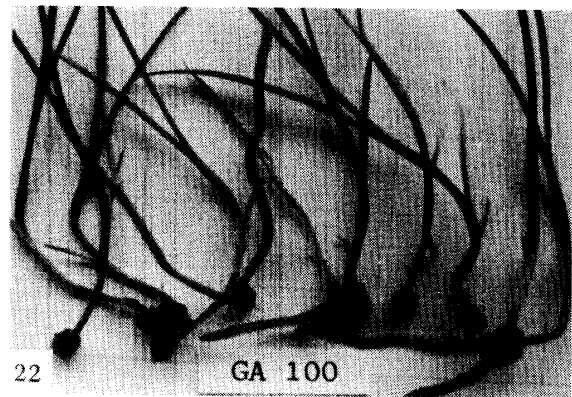
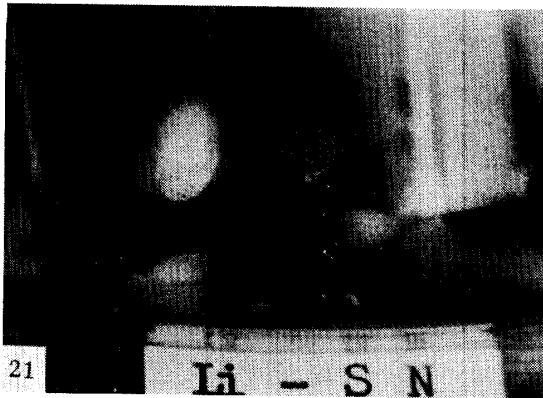
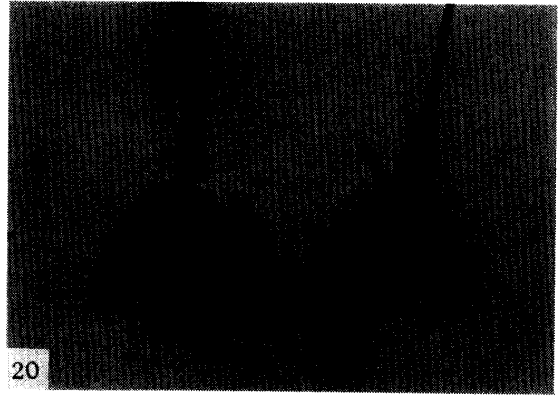
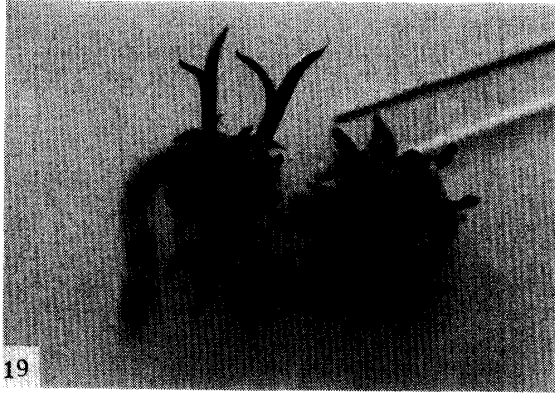


PLATE V

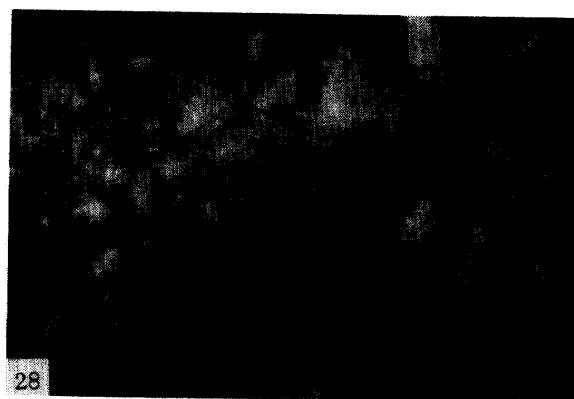
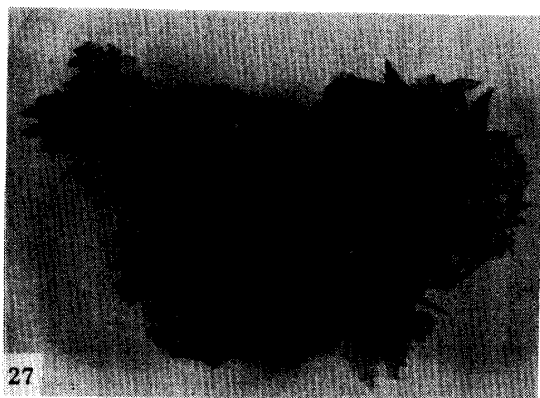
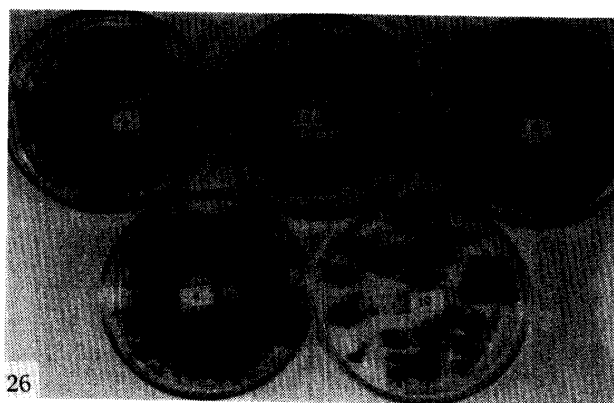
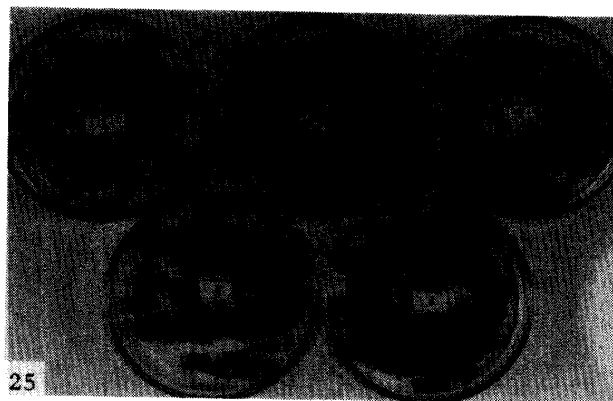


PLATE VI

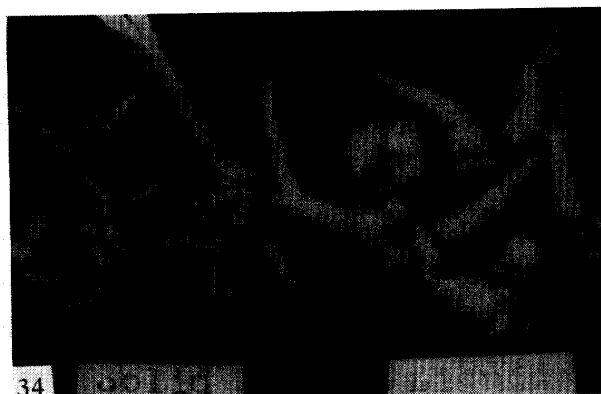
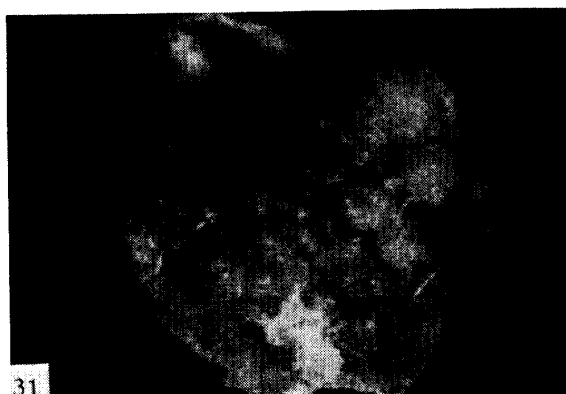
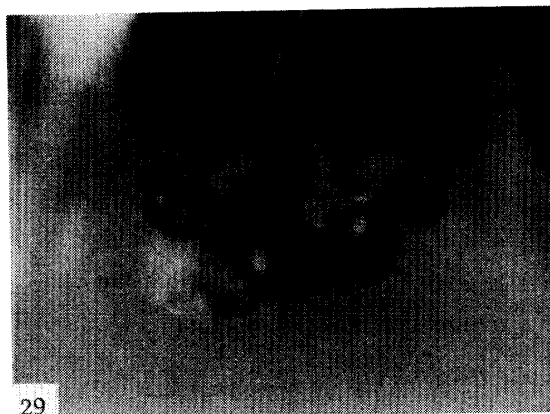


PLATE VII

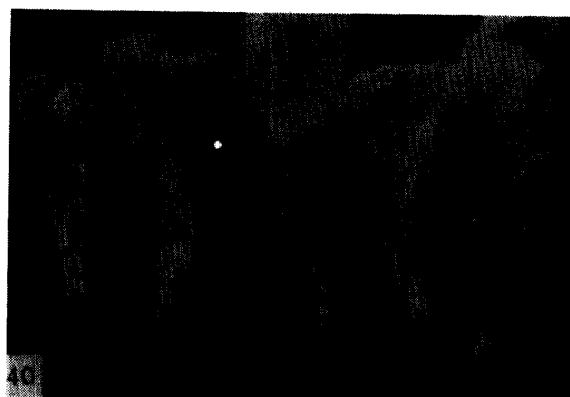
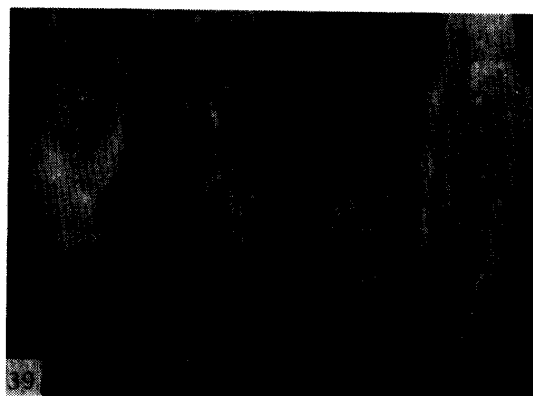
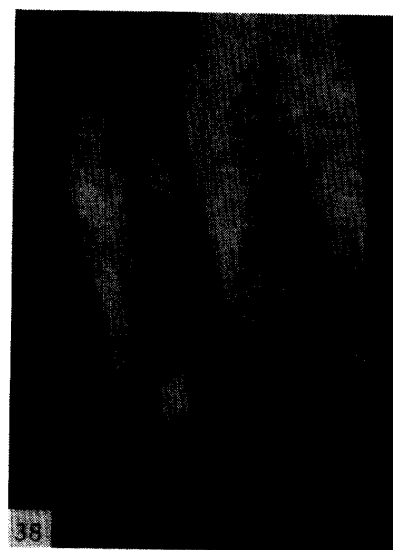
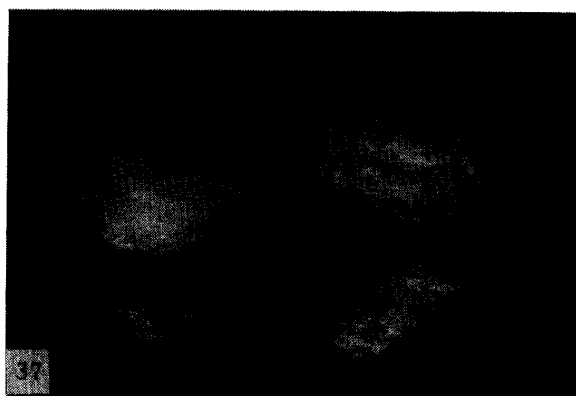
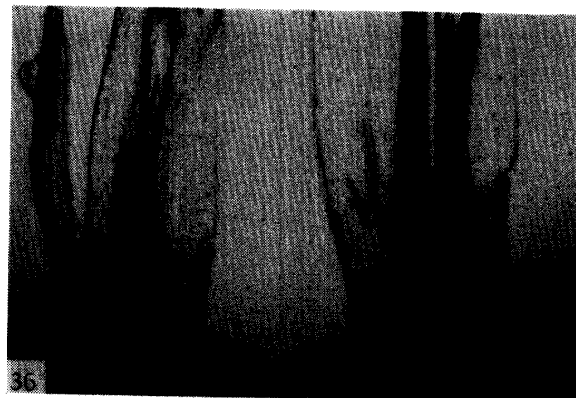
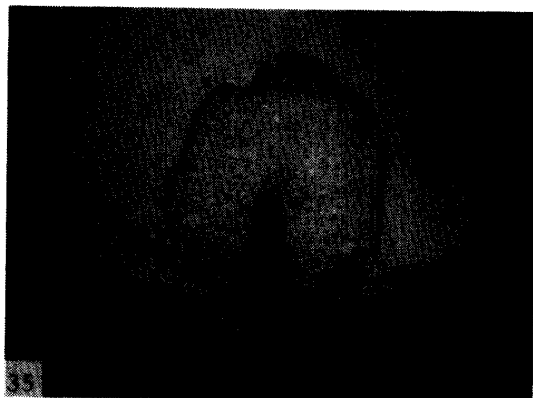


PLATE VIII

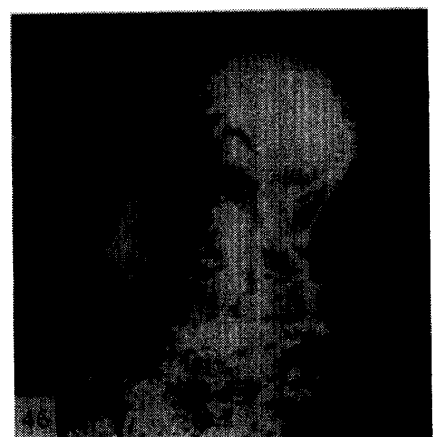
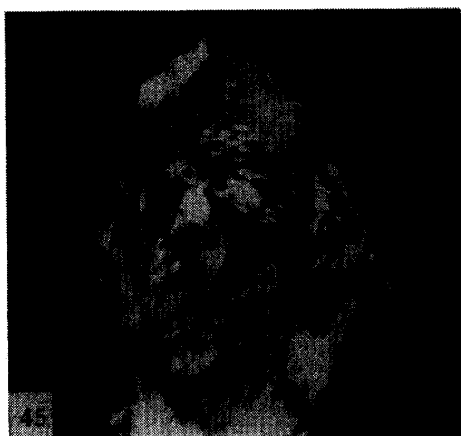
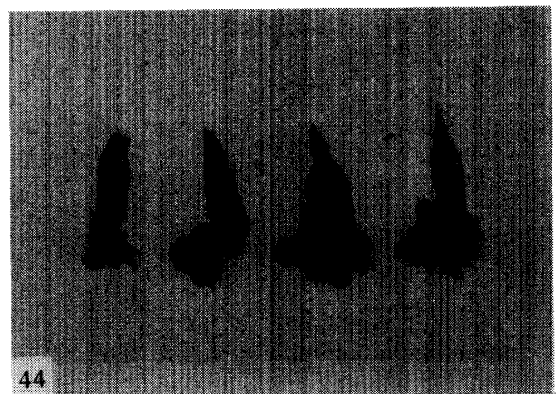
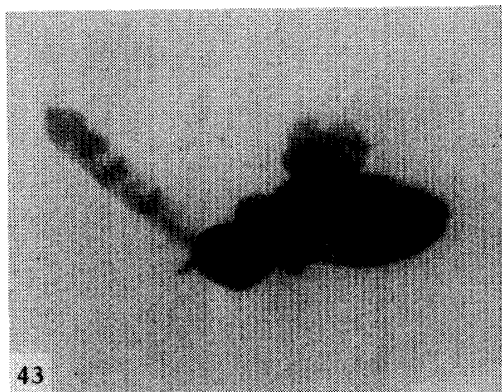
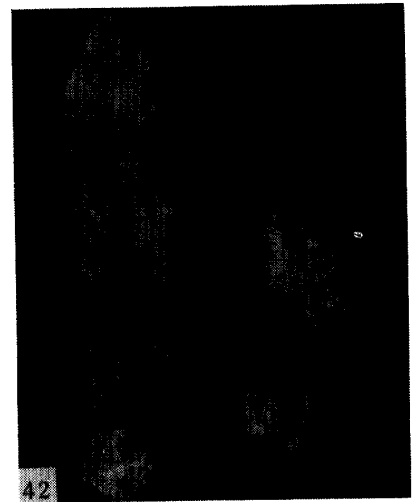
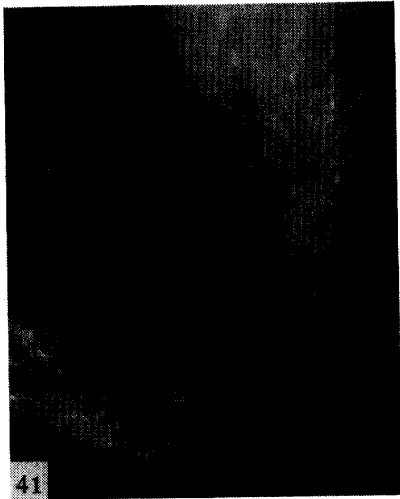


PLATE IX

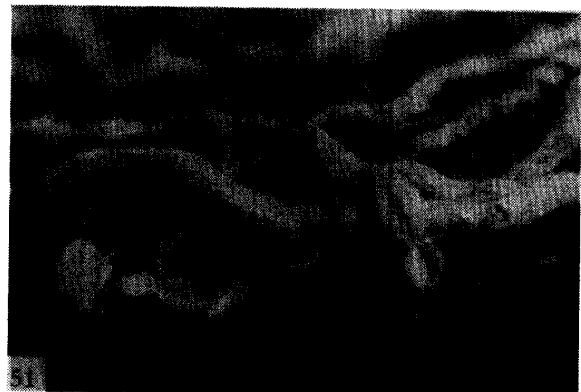
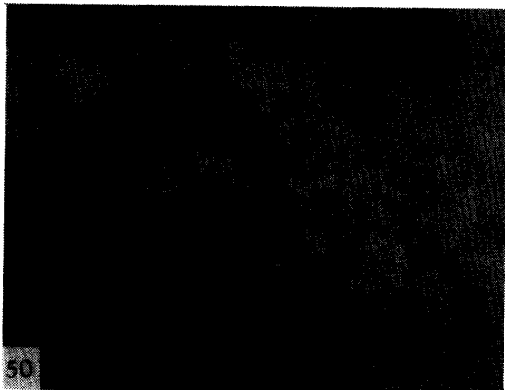
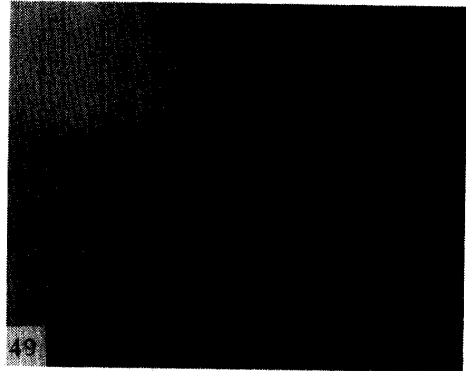
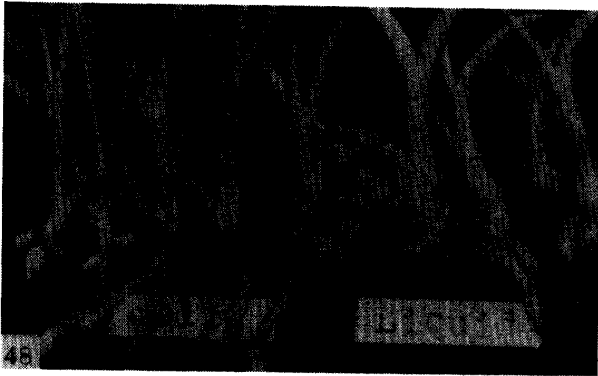
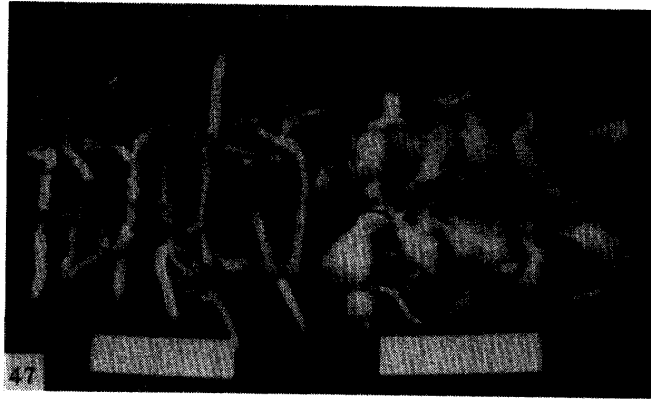


PLATE X

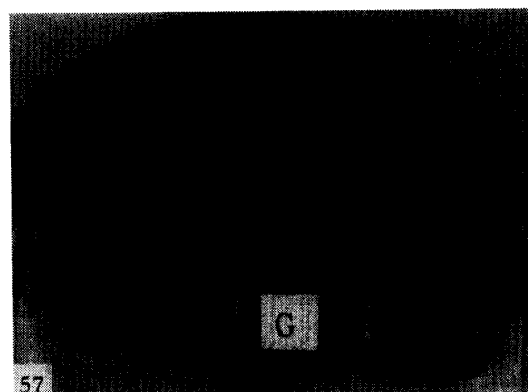
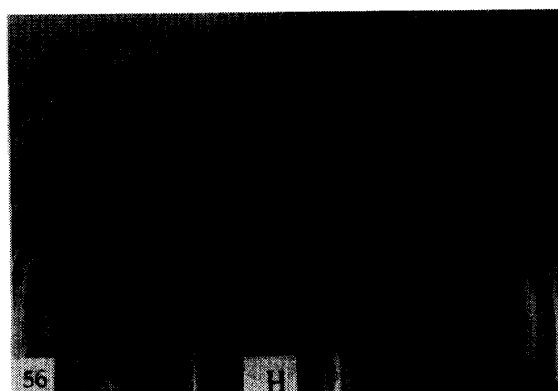
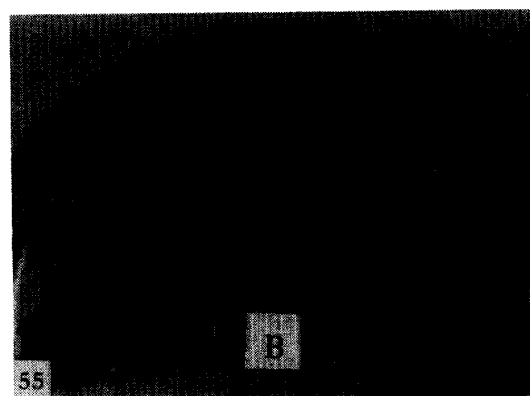
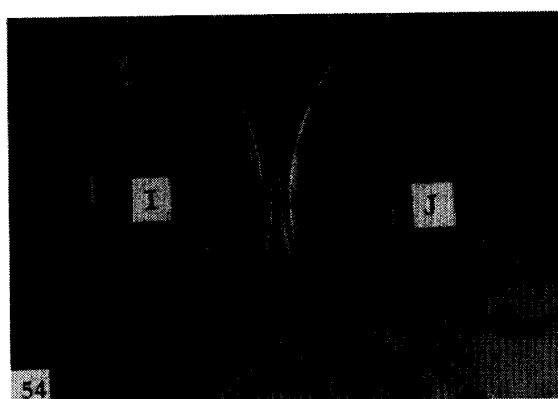
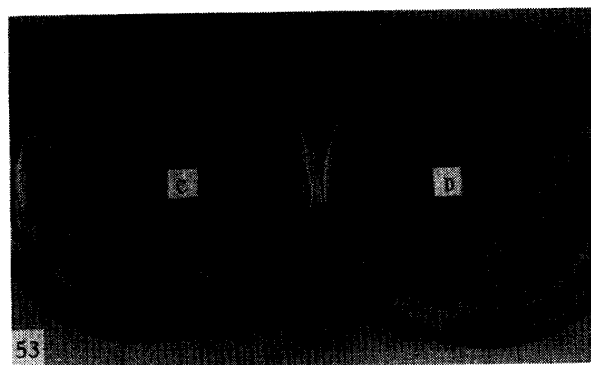
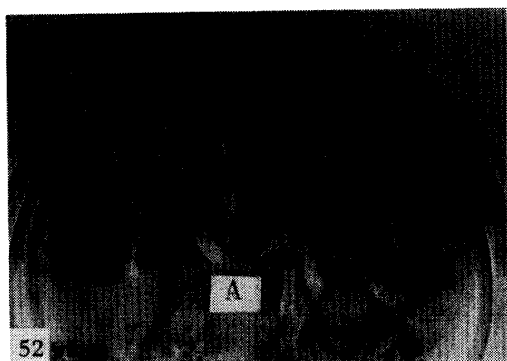


PLATE XI

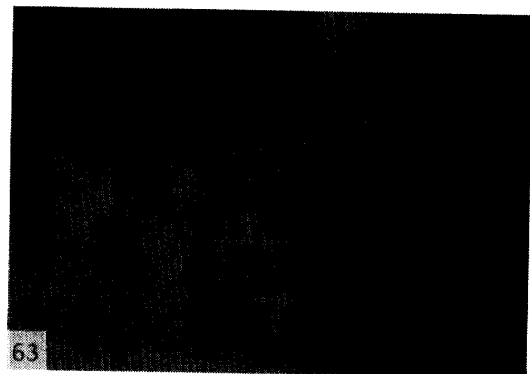
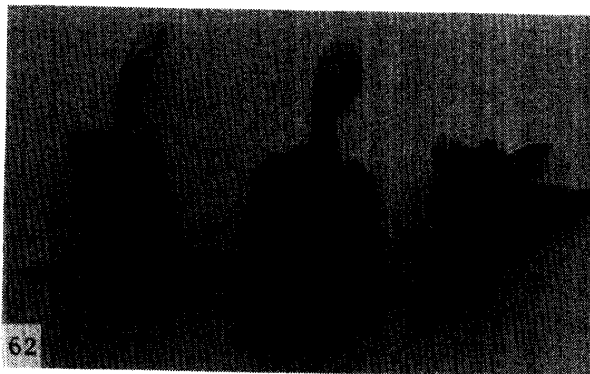
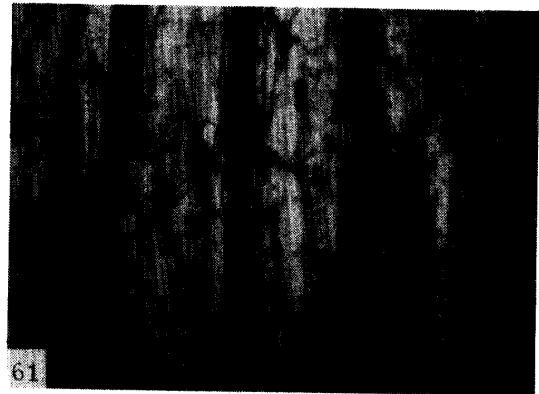
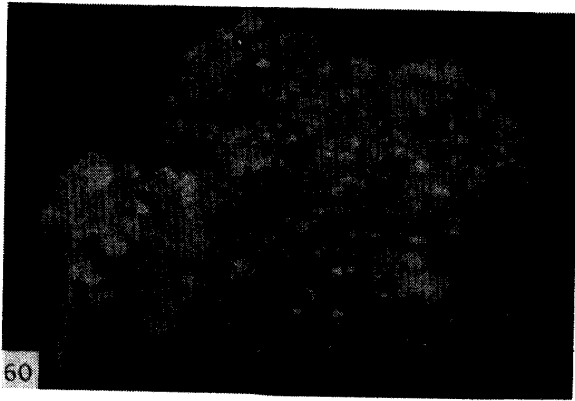
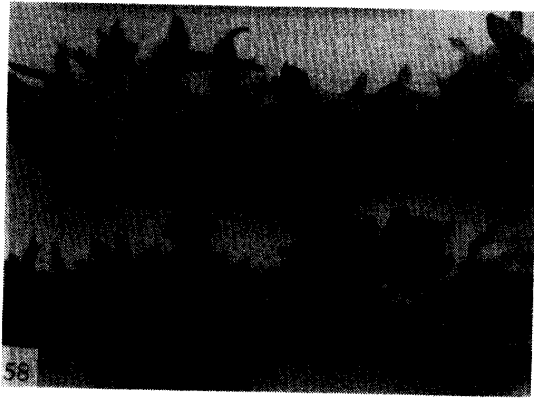


PLATE XII

