

草本並びに木本植物の茎頂培養と培地組成との関係

片野 学・見田 良彦・栗原 浩
(九州東海大学農学部)Shoot-tip culture of several species of herbaceous and woody plants
on different formula of mediumManabu KATANO, Yoshihiko KENDA and Hiroshi KURIHARA
(Fac. of Agric., Kyushu Tokai Univ.)

著者の一人, KATANO¹²⁾は, 1985年, 九州東海大学農学部構内に植栽されていた推定10年生のヤマザクラの芽より茎頂を摘出し培養を試みた結果, 培地中の植物ホルモン, とくにサイトカイニン濃度の多少にかかわらずMURASHIGE & SKOOG (1962¹³⁾, 以下, MSと略称)の無機塩の処法では茎頂の生育は認められなかったが, MS処法に比べ, 各無機イオンの濃度が低く処法されているGAMBORG (1966³⁾, 以下, Gamと略称, 第1表)の処法を用いると, 茎頂は生育し, さらにシュートの増殖, 発根が容易に達成することを明らかにし, 茎頂培養法を確立する上では無機塩組成にも着目することが重要であることを指摘した。一方, 先に著者等は, イネ¹⁰⁾やコムギ¹¹⁾の茎頂は, サイトカイニンを添加せず, インドール酪酸 (IBA) などのオーキシンを単独で使用しても茎葉の生育とともに発根が認められることを追試した。本研究は草本並びに木本植物など維管束植物の茎頂培養法で用いる培地組成のうち, 茎頂の生育, シュートの増殖や発根などに好適な無機塩濃度の多少や植物ホルモンの組成と, 例えば, 植物種の系統分類学上の位置との間に何らかの関係が見出せるか否かを知るために実験を開始した。本報告は, その端緒として, 数種の草本並びに木本植物を用いて実験を行った結果の概要である。

実験材料および方法

1987年度, 九州東海大学農学部構内あるいはその近辺に自生または植栽されていた種子植物16科22属22種の植物 (第2表) より茎頂を含む茎端約1 cm内外を採集し, 70%エタノールとTween20, 0.1%加用, 有効塩素1%液で殺菌した。その後, 葉原基数枚を含む高さ約1 mmの茎端 (以下, 茎頂と呼ぶ) を摘出し, 第3表に示した様に, 無機塩処法はMSとGamの2種類, 植物ホルモンは6

ーベンジルアミノプリン (BAP, 1 mg/ℓ) と IBA (0.2 mg/ℓ) の2種類をそれぞれ単独に添加した4種類の培地に置床した。継代あるいは発根にも上記4種類の固形培地を使用した。培養はいずれも25°C, 24時間日長, 照度約3,000lux条件下で行った。

結 果

1. 初代培養

第2表には初代培養における茎頂の生存および雑菌発生の様相を一覧した。まず, 材料植物はすべて屋外で生育したものであり, 茎頂培養系確立の第1段階は材料殺菌法である。材料植物の形状を観察し, 70%エタノールおよび1%有効塩素液における浸漬時間は, これまでの経験則に準じて設定した結果, 供試22種の植物中, 雑菌発生のために茎頂がすべて枯死することではなく, 最も高い雑菌発生率はヒメジョオン (68%), 次いで, リンゴ

第1表 MSおよびGamborg (1966) 無機塩濃度
(mg/ℓ) の比較

Ions	MS	Gamborg	MS
			Gamborg
NH ₄ ⁺	355	52	6.83
K ⁺	783	543	1.44
Na ⁺	—	21	—
Ca ²⁺	120	41	2.93
Mg ²⁺	36	24	1.50
NO ₃ ⁻	2458	613	4.01
H ₂ PO ₄ ⁻	121	63	1.92
HPO ₄ ²⁻	—	24	—
SO ₄ ²⁻	144	246	0.59

キーワード: 茎頂培養, 草本植物, 木本植物, 培地組成

第2表 初代培養、莖頂の生存および雑菌発生の様相

植物名	科 目	実験日 月・日	殺菌時間(分)** A-B	供試数	生存数	枯死数	雑菌 発生数	生存率 (%)	枯死率 (%)	雑菌発 生率(%)
イヌマキ	マキ科	12.5	5-8	20	19	0	1	100	0	5
クヌギ	ブナ科	6.22	5-5	69	18	46	5	28	72	7
ドクダミ	ドクダミ科	5.8*	3-5	20	0	20	0	0	100	0
イタドリ	タデ科	4.26*	3-5	20	0	20	0	0	100	0
ゲンノショウコ	フウロソウ科	4.28*	3-5	20	0	20	0	0	100	0
サンショウ	ミカン科	5.12	3-5	40	5	26	9	16	84	23
ジャガイモ	ナス科	12.3	3-5	20	20	0	0	100	0	0
コモチマンネングサ	ベンケイソウ科	4.18	3-3	20	20	0	0	100	0	0
ヤマザクラ	バラ科	12.9	5-5	20	8	10	2	100	0	10
イチゴ	バラ科	11.16	3-5	20	7	10	3	41	59	18
ヤブイバラ	バラ科	5.4	5-5	40	31	2	7	94	6	17
マルバフユイチゴ	バラ科	12.12	5-5	20	12	4	4	75	25	20
リンゴ	バラ科	8.8	5-5	20	8	1	11	89	11	55
クズ	マメ科	7.29	5-5	20	18	0	2	100	0	10
カワラマツバ	アカネ科	4.22	5-5	20	20	0	0	100	0	0
ヨモギ	キク科	2.21	5-5	40	33	1	6	97	3	15
ヒメジョオン	キク科	4.18	5-5	40	13	0	27	100	0	68
セイタカアワダチソウ	キク科	4.29	3-3	20	15	1	4	94	6	20
ミズカヤツリ	カヤツリグサ科	5.14	2-3	20	16	1	3	94	6	15
サトイモ	サトイモ科	8.6	5-5	8	6	0	2	100	0	25
ハウチャクソウ	ユリ科	5.1*	2-3	20	0	20	0	0	100	0
モジズリ	ラン科	10.1	3-5	20	2	15	3	12	88	15

注) 生存率=生存数/(供試数-雑菌発生数)×100, 枯死率=枯死数/(供試数-雑菌発生数)×100,
 雑菌発生率=(雑菌発生数/供試数)×100, *: 花芽形成が明らかであった植物, **: Aは70%エタノール,
 Bは1%有効塩素液中における殺菌時間(分)を示す。

(55%)であったが、他の20種の植物の場合には、いずれも30%以下となり、材料殺菌方法は大むね妥当であると判断された。

つぎに、材料採集時にすでに花芽形成が終了していたドクダミ、イタドリ、ゲンノショウコおよびハウチャクソウの4種では、培養に用いた4種類の培地(第3表)の如何にかかわらず、莖頂の生存は認められなかった。

さらに、莖頂の生存が認められた18種について莖頂生育の良否と4種類の培地組成との関連をみると(第4表)、クヌギはGam+BA、サンショウはMS+BAでのみ生育していたが、ヤマザクラ(KATANO¹²⁾とは異なる樹)、ヤブイバラ、クズ、ミズガヤツリおよびモジズリの5種では無機塩の種類を問わず、IBA添加区では生存はみられず、BA添加区で生育していた。これら7種以外の11種についてみると、無機塩の如何にかかわらずIBA添加区で生育が良好であったコモチマンネングサと

第3表 無機塩および植物ホルモンの組合せ(培地記号)

無機塩 植物ホルモン	Murashige & Shoog (64)	Gamborg (66)
BAP (1mg/ℓ)	MB	GB
IBA (0.2mg/ℓ)	MI	GI

注) ミナ・イノシトール(100mg/ℓ)、塩酸チアミン(1mg/ℓ)、およびショ糖(30g/ℓ)を共通とし、pHを5.7~5.8に調整後、ジェランガム(2g/ℓ)とした。

イヌマキの2種を除く、ジャガイモ、イチゴ、マルバフユイチゴ、リンゴ、カワラマツバ、ヨモギ、ヒメジョオン、セイタカアワダチソウ、サトイモの9種では植物ホルモンとしてBA添加区の方が莖頂の生育が良好で、と

くに、イチゴ、リンゴ、クズの3種についてはMS+B Aで最良の生育を示した。

2. 継代培養

初代培養が確立したシュート（茎葉原基と呼ぶ）を、初代培養で使った培地と同様の培地上に置床し、継代培養を繰り返し行った。継代培養の良否をシュートの増加に着目して観察を行った結果は第4表の通りであり、初代培養における結果とほぼ同様であった。

3. 発根

継代培養により節間伸長が認められた13種のシュート基部を截断し、4種類の培地に挿して発根実験を行った。その結果(第5表)、クヌギ、サンショウおよびクズの3種では発根は認められなかったが、ジャガイモ、イチゴおよびミズカヤツリの3種ではすべての培地で発根していた。一方、コモチマンネングサ、ヤブイバラ、カワラマツバ、ヨモギ、ヒメジョオン、セイタカアワダチソウの6種では無機塩の種類にかかわらずIBA添加区でのみ発根が認められたが、ヤマザクラの場合にはIBA添加区とともにGam+BAでも発根していた。

第4表 初代培養における茎葉原基の形成並びに継代培養におけるシュートの増加と培地組成との関係

植 物 名	初 代 培 養				継 代 培 養			
	茎葉原基の形成				シュートの増加			
	MB	MI	GB	GI	MB	MI	GB	GI
イヌマキ	+	+	+	+	-	+	+	+
クヌギ	-	*	+	-	-	*	+	-
サンショウ	+	-	-	-	+	*	*	*
ジャガイモ	+	+	+	+	+	+	+	+
コモチマンネングサ	+	+	+	+	+	+	+	+
ヤマザクラ	+	-	+	-	+	*	+	*
イチゴ	+	+	+	+	+	+	+	+
ヤブイバラ	+	-	+	-	+	-	+	-
マルバフユイチゴ	+	+	+	+	+	-	+	+
リンゴ	+	+	+	+	+	*	+	*
クズ	+	-	+	-	+	-	+	-
カワラマツバ	+	-	+	+	+	-	+	+
ヨモギ	+	+	+	+	+	+	+	+
ヒメジョオン	+	+	+	+	+	+	+	+
セイタカアワダチソウ	+	+	+	+	+	+	+	+
ミズカヤツリ	+	-	+	-	+	-	+	-
サトイモ	+	+	+	-	+	+	+	-
モジズリ	+	-	+	-	+	*	-	*

注) - : 不可, + : 不良, + : 普通, + : 良好,

* : データ無し, 培地名は第3表参照。

考 察

屋外で自生あるいは植栽されていた草本並びに木本植物22種を用い、培地組成を変更して茎頂培養を試みた結果は以上の通りであった。以下、若干の考察を行ってみたい。

第1. 植物の茎頂培養は、伝統的な繁殖法のひとつである挿し木法に準じ、茎端を約1mm内外に短縮し、無菌条件下で培養し、再び植物体を再生する方法である。茎頂培養法は、再生植物体に遺伝的変異を伴うことなく⁴⁾、種苗のマイクロ繁殖法として、また、無病植物体の作出のための重要な手段⁵⁾として、さらには、液体室素中における凍結保存法の確立とあいまって植物遺伝子源のコンパクトな保存法¹⁴⁾、加えて、プロトプラストの単離を容易ならしめる植物体の育成法⁹⁾として有効な実験系である。茎頂培養の研究史は、すでに1950年代に、小麦の花芽形成研究に茎頂培養的な手法を適用した石原によって概括⁷⁾されている。1970年代前半に至る期間、茎頂培養の成功例は草本植物に限定されており、木本植物では困難で

第5表 培地組成の違いによる発根状態について

植 物 名	発 根 の 有 無			
	MB	MI	GB	GI
	MB	MI	GB	GI
クヌギ	-	*	-	-
サンショウ	-	*	*	*
ジャガイモ	+	+	+	+
コモチマンネングサ	-	+	-	+
ヤマザクラ	-	+	+	+
イチゴ	+	+	+	+
ヤブイバラ	-	+	-	+
クズ	-	-	-	-
カワラマツバ	-	+	-	+
ヨモギ	-	+	-	+
ヒメジョオン	-	+	-	+
セイタカアワダチソウ	-	+	-	+
ミズカヤツリ	+	+	+	+

注) - : 発根無し, + : 発根有り, * : データ無し

あった。70年代後半になると、木本における成功例が登場し始めるが、その要因を、石原は、培地組成に求め、MS培地（無機塩、ショ糖、有機補助物質を含む）の多用とともに、サイトカイニンの使用を最も重要な一因と論じ、サイトカイニンの必須性はリング茎端の生長要因に関する一連の研究を展開したイギリス、East Malling試のJONESらの業績に求められるとした。いずれにしても、木本植物の茎頂の養分要求性は、タバコ、ニンジン、コリウス、ノウゼンハレンなどの草本植物の茎頂をMS無機塩類、myo-イノシトール（100mg/ℓ）、塩酸チアミン（0.4mg/ℓ）、インドール酢酸（IAA, 1~2mg/ℓ）およびショ糖（30g/ℓ）を含む培地上で培養後、植物体再生を可能にしたSMITH・MURASHIGE（1970）の業績とは異なるものではないかという点が、果樹類を中心に木本植物の茎頂培養の成功例が次々と報告されるにつれて次第に明らかにされてきた。木本植物の場合、タバコのカルス培養によって明らかにされたMS処法の無機塩組成では濃度が高すぎるのではないかという反省が、年間生育量の小さなツツジ類やブルーベリー（ツツジ科）などで始まっていた。多数の観賞用花木類を手懸けたBENGOCHEA（1983）は、培地組成のうち無機塩類（MSとGam）、炭素源（ショ糖とブドウ糖）並びに合成サイトカイニンであるBAP濃度（0.05~3.0μmol）の組み合わせを変更する必要性を提唱した。KATANOは、この報文を参考にして、無機塩類をMSからGamに変更することにより、ヤマザクラの茎頂から植物体再生が可能になるという実験結果を得、茎頂培養においては無機塩の濃度に注目すべきであることを示した¹²⁾。そこで、SMITH・MURASHIGEやBENGOCHEAの研究をさらに発展させ、多数の維管束植物を研究対象にし、無機塩類としてはMSとGam、植物ホルモンとしてはBAP（1mg/ℓ）とIBA（0.2mg/ℓ）の各2種類を組み合わせた4種類の培地で茎頂培養を試み、茎頂の養分要求性に植物系統分類学上並びに植物生態学上の諸知見との間に何らかの関連性が見出せるか否かを明らかにする目的で本研究を開始したのである。

第2. 1987年度、大学構内および近辺に自生あるいは植栽されていた16科22属22種（草本：15種、木本：7種）の茎頂培養を実験した結果、材料採集時に花芽形成が終了していた4種を除く18種で初代並びに継代培養を行い得た。この場合、初代並びに継代培養における茎頂の養分要求性、換言すれば、茎葉原基の形成とシュートの増加に及ぼす培地組成の影響はほぼ同様であった（第4表）。得られた結果のうち、まず草本植物11種についてみると、クズ、ミズガヤツリおよびモジズリの3種では無機塩の種類にかかわらず、IBA添加区では初代培養は

確立されず、BAP添加区でのみシュートの増殖も認められ、SMITH・MURASHIGEの結果と異なっていた。他の8種についてみると、4種類の培地で初代培養が、それぞれ、確立されていたが、無機塩の種類を問わず、コモチマンネングサはIBA添加区でシュートの増殖は著しかったが、他のジャガイモ、イチゴ、カワラマツバ、ヨモギ、ヒメジョオン、セイタカアワダチソウおよびサトイモではBAP添加区がIBA添加区よりシュートの増殖は大であった。コモチマンネングサを除き、初代並びに継代培養においてBAP添加区の方がより良好なシュートの生育を示した10種について、無機塩に着目して、さらに検討すると、イチゴとクズでは、Gamに比べMSの方が明らかに生育が良好となっていたが、他の9種の場合には、無機塩濃度の多少の影響は少なかった。これら草本植物11種における茎頂の養分要求性は植物ホルモンの種類により強く支配されており、IBA要求性植物とBAP要求性植物の二群に大別できるのではないかとと思われる。

同様に、7種の木本植物についてみると、ヤマザクラとヤブイバラでは無機塩の種類にかかわらず、IBA添加区では初代培養の確立は認められず、BAP添加区でのみ茎頂は生育していたが、ヤマザクラではGamが、ヤブイバラではMSの方が良好な生育を示した。次に、マルバフユイチゴとリングの場合、初代培養では4種類の培地、いずれでも茎頂は生存していたが、IBA添加区に比べBAP添加区の方がより良好な生育を示し、継代培養時におけるシュートの増加数からみると、マルバフユイチゴではGam、リングではMSの方が多数のシュートを形成していた。また、サンショウの場合にはMS+BAP区でのみ初代培養時に茎頂が生存していた。一方、4種類の培地で初代培養が確立していたイヌマキの場合をみると、上記4種とは異なり、継代培養におけるシュートの増加にはBAPよりIBAの方がより強く影響を及ぼしていたのであり、草本植物の場合と同様に、木本植物においても植物ホルモンの要求性によって二群に分かれる可能性があることを示唆している。しかし、植物ホルモンと無機塩に関する茎頂の養分要求性は、草本植物に比べ木本植物ではより複雑ではないかという結果であった。これらの結果は、陸上植物の出現以来、維管束植物群が登場し、中生代末葉における地球の寒冷化と乾燥化という物理的環境の変化に対する植物の適応戦略の一環として木本植物の草本化が達成されたとする浅間¹⁾の見解、すなわち、木本植物の進化の歴史は草本植物に比べ、極めて長期間に及ぶ可能性があり、木本植物茎頂の養分要求性が草本植物に比較し、より複雑な構成を伴っている背後には、これら植物系統進化史との関連性があると

考えざるをえない。

加えて、今回の実験で初代培養が確立した18種のうち、植物分類学上同一の科に属するものをみると、バラ科は5種、キク科は3種であった。バラ科5種は草本1種と木本4種から成っていたが、いずれもBAP添加区がIBA添加区に比較し茎頂やシュートの増殖は良好であったが、無機塩に着目すると、イチゴ、ヤブイバラとリンゴはMS、ヤマザクラとマルバフユイチゴではGamの方がより良好であり、同一の科に属する植物においても茎頂の無機塩要求性は二群に分かれていた。しかしながら、キク科3種、すなわち、ヨモギ(多年生)、ヒメジョオンとセイタカアワダチソウ(2年生)は、いずれも畑地雑草であり、これら3種における茎頂の養分要求性をみると、MS、Gamなどの無機塩にかかわらず、BAP添加区で、茎頂やシュートの生育が良好であり、茎頂の養分要求性はバラ科5種に比べれば極めて均質なものとなっていた。植物系統分類学上のキク科の位置は、双子葉植物中、最上位に配置されており¹⁾、一方、バラ科は、より早く分化した群¹⁵⁾との関連性を示唆している。

第3. シュート、とくに、節間伸長を伴ったシュートからの発根もまた興味深い分野である。著者等が得た茎頂培養における知見をまとめると、通常の挿し木発根の容易なリンゴ台木：マルバカイドウ(石原・片野、未発表)、挿し木発根が困難なリンゴ台木M26⁹⁾、リンゴ品種：ふじ¹⁰⁾、さらに、挿し木発根が容易な西洋ブドウ(片野・未発表)などの圃場条件下における、挿し木発根の難易性は、試験管内で培養したシュートの場合、培地にIBA添加で発根、IBA無添加(植物ホルモンなし)で発根、BAP添加(リンゴ台木および品種では発根せず)でも発根(西洋ブドウ)の順に符合する。初代並びに継代培養を経て、発根実験を行った13種中、クヌギ、サンショウとクズでは発根は認められなかったが、10種でシュートからの発根を確認した。ジャガイモ、イチゴおよびミズガヤツリではBAP添加区でも発根が認められたが、コモチマンネングサ、ヤブイバラ、カワラマツバ、ヨモギ、ヒメジョオンおよびセイタカアワダチソウでは、無機塩の種類が如何にかかわらず、IBA添加区でのみ発根していた。一方、ヤマザクラの場合、IBA添加区とともに、Gam+BAP区でも発根していた。キク科畑地雑草3種における発根にかかわる養分要求性は、初代並びに継代培養の場合と同様に、IBA添加区でのみ発根していた。

以上、1987年度における実験結果は、供試植物数が、わずかに16科22属22種であったが、茎頂やシュートの発根にかかわる養分要求性には木本と草本、あるいは同一科内の植物においても極めて複雑なものであることを

知った。茎頂培養は葉原基数枚を含む頂端分裂組織を含む植物体の一器官の無菌的培養の世界にしかすぎないが、生物進化には「生物体の一つの器官の変化が、必然的に、他の器官の変化をひきおこす」という「関連の法則」が認められるという井尻⁹⁾の説を拡大解釈するならば、茎頂培養の成否を決定する茎頂の養分要求性に関する研究は植物系統進化史と植物の適応戦略という分類学と生態学にかかわる植物個体の生活に関して、興味深い植物学上の根本問題と深く結びつく世界と考えざるをえない。今後は、科や属、さらには目や綱、門という今日の分類学によって区分される植物体を材料に研究を遂行することが肝要であると思われる。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、研究助成金を支給下さった東海大学総合研究機構に謝意を述べさせていただく次第である。

引用文献

- 1) 浅間一男 1975. 被子植物の起源. 三省堂, 東京.
- 2) B ENGOCHIA, T. 1983. Culture of ornamental trees. in J. H. DODDS (ed.) Tissue culture of trees. AVI Pib. Comp. Inc., Connecticut. 51—55.
- 3) GAMBORG, O. L. 1966. Aromatic metabolism in plants II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension culture of plant cells. Can. J. Bot. 44: 791—799.
- 4) GEORGE, E. F. and P. D. SHERRINGTON 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited, UK. 387—468.
- 5) HOLLINGS, M. 1965. Disease control through virus free stock. Ann. Rev. Plant Pathology 3: 367—398.
- 6) 井尻正二 1982. 井尻正二選集 第2巻 人間. 大月書店, 東京.
- 7) 石原愛也 1980. 果樹の茎頂培養と繁殖への応用. 農及園 55: 1090—1094, 1216—1222.
- 8) ISHIHARA, A. and M. KATANO 1982. Propagation of apple cultivars and rootstocks by shoot-tip culture. Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. 733—734.
- 9) JAMES, D. J. 1983. Isolation and fusion of protoplasts from apple and cherry trees. Ann. Rep. East Malling Stn. for 1982: 150—151.
- 10) 片野 学・石原愛也 1980. 茎頂培養によるリンゴ“ふじ”の大量繁殖、とくにシュートの発根について. 園芸学会昭和55年春季大会研究発表要旨: 142—143.
- 10) 片野 学・相島 稔・岩井真二 1986. 水稻の茎頂

- 培養並びに茎頂の耐寒・耐凍性について, 予報, 日作紀 55, 別号 1 : 130—131.
- 11) 片野 学・都築美広・師岡清重 1986. 冬小麦茎頂の耐凍性について, 予報, 日作九支報 53 : 55—56.
- 12) KATANO, M. 1987. Propagation of Japanese cherry (*Prunus jamasakura* Sieb. ex Koidz.) by shoot-tip culture. Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ. 6 : 1—4.
- 13) MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473—497.
- 14) 酒井 昭編著 1987. 凍結保存—動物・植物・微生物. 朝倉書店, 東京.
- 15) 佐竹義輔 1967. 植物の分類—基礎と方法. 第一法規, 東京.
- 16) SMITH, R. H. and T. MURASHIGE 1970. In vitro development of the isolated shoot apical meristems of angiosperms. Amer. J. Bot. 57 : 562—568.