シンビジウムの茎頂外植体からの器官形成に関する形態学的研究¹

金 奎 元・加古 舜治

名古屋大学農学部 464 名古屋市千種区

Morphological studies on organ formation in the *Cymbidium* shoot apex culture *in vitro*

Kiu Weon KIM and Shunji KAKO

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-Ku, Nagoya 464

Summary

Seasonal changes in shoot development and in organ formation activities of shoot apex explants in vegetative phase were examined throughout the year in *Cymbidium*. Protocorm-like bodies (PLB) formation of shoot apices excised with two leaf primordia was morphologically observed under light microscope. The activities of shoot elongation, leaf differentiation, and PLB formation changed parallel with each other throughout the year. The activities remarkably increased in April and reached maxima in June. The activities decreased slightly in August and thereafter remained unchanged until the next March. Then, they decreased remarkably in August and disappeared in September. Definitely from the axillary region and adventitiously from the basal region, PLBs were formed. In the former case they were called "definite PLBs" and in the latter case "adventitious PLBs".

緒 言

前報で、シンビジウムの茎頂培養においては、その外植体の大きさや採取時期によって器官形成能が相違することを推察した(7)。一般に茎頂培養においては、栄養生長の初期から活発な時期にかけて採取した場合に器官やカルスの形成能が高い。すなわち、オレンジ(1)、アスパラガス(4)、レタス(8)などでは栄養生長がおう盛なときに採芽したものは器官形成能が高く、休眠期に採芽した場合には低い。シンビジウムの完成したシュート(主茎)には、その基部に偽球茎といわれる長だ円形の球状の茎がある。偽球茎は先端に頂芽を、各葉腋部に腋芽をもっている。腋芽は下位側のものほどよく発達しており、最下位の2~3個は栄養芽で、その上の2~3個は花芽である。この花芽よりさらに上位の腋芽は発育の程度が弱く、普通の栽培条件下ではそれ以上は発達しない。このようなシュートが完成するまでは頂芽は細胞分裂活性をもっており、頂芽優勢によって腋芽の生長は抑制されている。シュートが完成したのち頂芽の細胞分裂活性が失われ、その結果頂芽優勢による抑制がなくなり、栄養芽と花芽の発育が始まる。

しかし、完成したシュートに限ってみると、前述の花

芽より上位の腋芽も適当な条件下で無菌培養すると花芽または栄養芽として発育するか、あるいはプロトコーム状球体(PLB)を形成する(17)。

シンビジウムの栄養茎頂外植体からの PLB 誘導は極めて容易である(7, 10, 18, 19)。この PLB を適当な環境下で培養すると新しい PLB と個体を形成し、新しい PLB はまた PLB と個体を形成する。*in vitro* ではこのような過程が繰り返されている(3, 9, 13)。しかし、増殖の出発点となる最初の PLB が茎頂外植体から誘導される過程で、どのような組織学的・細胞学的変化を経るのか、さらにこの過程で PLB にどのような生理的諸特性が与えられるのかは不明のままである。これらの問題点を明らかにすることは細胞・組織の分化の究明はもちろん、栄養繁殖、育種、及びウイルス・フリー株の生産などの応用の面からも重要な意味があると思われる。このような目的で、アスパラガス(5)、カーネーション(15)などの園芸植物で茎頂外植体から器官形成にいたるまでの過程が形態学的・組織学的に観察されている。しかしシンビジウムでは、Wilfret (18) が茎頂外植体の切り取り方によって PLB 形成能が異なることを示し、Morel (11) が PLB 形成位置について言及しているにすぎない。

¹ 1982年8月4日 受理

そこで、本研究では栄養茎頂外植体の採取時期による器官形成能の差異を調べることによってその生理的意味を推察し、茎頂外植体から PLB の誘導される初期過程を形態学的に明らかにしようとした。

材料及び方法

植物材料、培地、外植体の調製並びに消毒、及び培養条件などは前報(7)と同じである。採芽時期すなわち栄養芽の齢によって器官形成能がどのように変化するかを1979年4月から1年間にわたって調べた。毎月月上旬にシュートの偽球茎の頂芽と基部側の腋芽を母株から切り離し、それぞれの茎頂を外植体として用い、毎回約20個を置床し、その外植体の発育状態と器官形成能を調査した。外植体の大きさは葉原基数で3枚(3LP)とし、生長調節物質無添加の培地で90日間培養した。なお培養に先立ちシュートや腋芽の発育状態を見るために、それぞれの母株についてその大きさと葉数を測定した。萌芽(sprouting)の時期についてはまだ十分確認していないが、4月時点での解剖学的所見から本報では仮りに3月をその時期とした。活着率、活着所要日数、PLB形成率及び PLB 形成所要日数などを調べた。活着の判定は外植体組織のほぼ半分以上が緑色化した時とし、肉眼で PLB と判定できる時期(直径約1mm)を PLB 形成時期とした。外植体の活着能力と PLB 形成能力を活着係数と PLB 形成係数で表した: 活着(PLB 形成)係数=活着(PLB 形成)率(%) / 活着(PLB 形成)所要日数。

形態学的な観察のための茎頂外植体は、若いシュートの腋芽を用い、葉原基数2枚(2LP)の大きさとした。1980年6月4日から6月6日の間に母株から切り離し、上記と同様な培地に置床した。置床前の外植体と置床後の培養体を5日ごとに9回にわたり採取し、FAA(ホルマリン:酢酸:50%(v/v) エタノール=5:5:90 v/v/v)で固定した。固定した材料は、常法によりエタノールとn-ブタノールシリーズで脱水後、パラフィン(58±1°C)包埋した。その後マイクロームで厚さ10μmの切片とした。ハイデンハインの鉄ヘマトキシリン-サフラニンの2重染色をした後、カナダバルサムで封じ、永久標本を作成して光学顕微鏡観察を行った。

結 果

茎頂外植体からの器官形成が採芽時期によってどのように変化するかを調べるために、まず母株の発育状態を1年間にわたって調査した(第1図)。昨年に生長し完成したシュートの基部に生じている腋芽は1979年4月ごろから伸長生長を開始し、8月には約1.5cmに達し、その後翌年1980年の3月までは生長が止まり、4月から10

月まで急速に生長し新しいシュートとなってくる。それ以後草丈の伸長は次第に低下しやがて停止していった。葉数増加をみると、4月にはすでに4枚の葉(葉原基)をもっていたものが、その後8月までに新たに7枚前後の葉を分化した。8月から翌年の2月ごろまではほぼ一定で、葉数増加の傾向は認められなかった。しかし、3月から再び葉を分化し、その数は6月までに5枚程度に達したがその後葉数の増加は認められなかった。このように腋芽は4月から8月までが主な発育期で、この期間中に最もよく発達し、その後翌年2月までは発達が休止状態となり、3月から再び発育能を回復し、シュートとして伸び始めるとともに葉を分化する。このシュートの頂芽の葉の分化活性は6月には停止に向うようになり、それ以後再び活性をとり戻すことはないようであった。

活着率(第2図)は、腋芽の生長初期である4月にはやや低いようであったが、翌年4月まではどの時期でも約90%以上の高い活着率を示した。翌年5月から活着率は低くなって、8月には50%にまで低下し、9月以後はすべて褐変枯死した。活着能力は活着率とはほぼ同じ傾向を示した。すなわち、外植体の齢が最も若い4、5月ではやや低く、6、7月に最も高く、その後やや低下し翌年3月までは同じ程度だが、新しいシュートになる4月からは急速に低下し、9月からは活着能力を完全に失ってしまった。

PLB 形成率(第3図)は、腋芽の生長期に当たる4月から7月にかけて最も高く、活着したすべての外植体が PLB を形成した。しかし、8月から翌年3月までの腋芽の休止期では80~90%の形成率で、やや低下した。さらに腋芽がシュートとして伸び始める翌年4月からの

Fig. 1. Seasonal changes in number of leaves and plant height of the shoot and axillary bud of *Cymbidium* X *Sazamami* 'Haru-no-umi' *in vitro*. Values shown are means of 20 samples each their standard errors (vertical bars, SEM). If no error bar is shown, the SEM is less than 0.2 of the value presented.

Fig. 2. Effects of explant age on greening of *Cymbidium* shoot apices with 3 leaf primordia. The explants were cultured for 90 days *in vitro*. Culture conditions; Murashige and Skoog solid medium, pH 5.2, $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 hours light at 2 klx from white fluorescent lamp. The explantation of shoot apices was carried out on each sampling day in Fig. 1.

PLB 形成率は、シュートの発育につれて減少し、9月には PLB 形成能力が消失した。PLB 形成能力は腋芽の生長期のなかでも6月が最も高く、それ以後10月までは急速に低下し翌年3月に至るまではほぼ同じような水準を示し、8月には最も低くなって9月には置床後90日が経過しても PLB 形成が見られなかった。

形成された PLB (第4図) はその先端に葉状突起を生じ、その後シュートとして発達して一つの個体になるか、または新たに PLB が形成された。新たに形成された PLB はさらに同様の過程を繰り返し、個体あるいは PLB を形成した。

そこで、PLB 形成能力が最も高い時期である6月に

Fig. 3. Effects of explant age on protocorm-like bodies (PLB) formation of *Cymbidium* shoot apices with 3 leaf primordia. The explants were cultured for 90 days *in vitro*. Culture conditions are the same as in Fig. 2. The explantation of shoot apices was carried out on each sampling day in Fig. 1.

分離した茎頂外植体からの PLB 形成過程を調べるために、培養前から培養後45日間にわたり5日ごとにその形態学的な変化を観察した。培養前の外植体の茎頂分裂組織はドーム状をなし、2層の外衣(tunica)が内体(corpus)を囲み、外衣、内体並びに周辺分裂組織帯(peripheral meristem zone)を構成する細胞は比較的小さく、染色度が高い。一方内体の中心部分の細胞は比較的大きく、液胞化しており、染色度も低い。しかし中心母細胞帯、周辺分裂組織帯、髄状分裂組織帯などの明確な区別は認められなかった(第5-A図)。外植体は培養日数が経過するにつれ長軸方向の生長を行うとともに、基部側の肥大生長も行った。しかし、長軸生長よりも肥大生長がより優先的に進んだ。長軸生長においてはとくに葉原基の伸長が著しく、これは細胞の伸長と肥大に起因

Fig. 4. Formation and development of protocorm-like bodies (PLB) in the *Cymbidium* shoot apices with 3 leaf primordia *in vitro*. A. Excised shoot apices developing into PLB after 90 days in culture. B. The young shoot (YS) formed from PLB after 120 days in culture. C. PLB developed into a whole plant and into some new PLB after 150 days in culture. S: shoot, R: root.

Fig. 5. Formation of protocorm-like bodies (PLB) from excised *Cymbidium* shoot apex *in vitro*.

- A. Median longitudinal section showing shoot apex with apical meristem (AM) and 2 leaf primordia (LP).
- B. The explant cultured for 5 days. Note enlargement and vacuolation (V) of cells in basal region.
- C. The large explant cultured for 5 days. Note initiation of new leaf primordia (NLP).
- D. The explant cultured for 20 days. Note definite formation of PLB in axillary region.
- E. The explant cultured for 35 days. Note adventitious formation of PLB in basal region and small size of apical dome.
- F. The explant cultured for 45 days. Note initiation of new leaf primordia in PLB.
- G. The explant cultured for 45 days. Note beginning of the growth of adventitious PLB in basal region.

したものであるが、同時に細胞数の増加にも依存していた。一方肥大生長の場合は、とくに外植体の基部側の細胞の肥大が大きく、この基部は培養日数が経過するにつれ、おのおのの細胞の肥大が大となり、細胞の分裂像は認められず、液胞化が進んでいた(第5-B, C図)。最も若い葉原基の向軸側の基部と茎頂ドームの外周基部とが合一した位置、すなわち葉腋部に相当する部位では、次の葉原基の初生突起を生じるために、その外衣と周辺分裂組織帯の外側で、細胞分裂像がかなり高い頻度で観察された(第5-C図)。培養5日後には置床時比較的大きな葉原基をもっていた外植体では、すでに次の新しい葉原基の形成がみられ、また大きい葉原基の葉腋には腋芽の初生突起がみられた。この腋芽のうちにシュートとして発達せず、PLBとなった(第5-D図)。また葉数

は培養日数が経過するにつれ増加した。

PLBは葉腋部と外植体の基部側外周の節間部で形成され、伸長と肥大の両生長を継続した。最初のPLB形成は、最下位の葉原基の葉腋部から生じ、培養後5日目にその初生突起が観察された。また、外植体基部側の節間部からのPLB形成は25日目の培養体で認められた。この場合、まず外植体基部の肥大と伸長生長が起こり、内部組織の細胞配列が不定形となり、ややカルス状となる。しかし、基部側の外周付近の一部が次第に球状にふくれ上がり、PLBの初生突起となった(第5-E図)。前記の葉腋部に生じるPLBが葉原基の向軸側での形成であり、その形成部位も腋芽が生じる位置に限定されているのに対し、この初生突起は葉原基の背軸側で形成され、形成部位も葉原基の中央脈上の直下にできる場合が多く、また節間の外周に沿って比較的不特定の位置にも形成された。いずれの場合も、ほぼ球状のPLBとなったのち、その先端に葉状突起を生じ(第5-F, G図)、前記と同様な過程を繰り返す(第4図)。

考 察

茎頂外植体の分離の適期は、一般に栄養生長の開始期からその活発な時期とされている。オレンジの芽の形成は春に始まる。この芽を1年間にわたり採取し培養すると、培養後芽が発育を開始するまでの所要日数は、母樹

の栄養生長期では短かく、休眠期に向うにつれて長くなり、翌春の萌芽期に入ると急速に短くなる(1)。このような例はアスパラガス(4)、レタス(8)、スイセン(16)などでも見られ、栄養生長期でないとき、あるいは休眠期に茎頂を採取すると、培養中の発育は不良とされている。

シンビジウムの茎頂を用いた本研究においても、他の植物と同様に、栄養生長、特に葉の分化が活発な時期に器官形成能が最も高いという結果が示された。すなわちシュートの発育期である5月から7月までの間は腋芽の生長期、特に葉の分化期でもあり、この時期に腋芽から茎頂を採取すると、PLB形成能は高かった。一方、9月から翌年2月までは、シュートの発育と腋芽の生長の停止期であり、この時期に採取するとPLBの形成能は相対的に低い結果となった。このような現象は茎頂分裂組織の細胞分裂活性と関連するように考えられる。

栄養生長が盛んに進んでいる腋芽から採取した2LPの茎頂外植体を培養すると、直ちに生長を始めるが、最初の段階では長軸生長よりも肥大生長の速度がやや大きく、その後長軸生長の方が相対的に優位に進み始める。しかし、茎頂で葉原基が形成されても、節間生長が伴っていないから長軸生長の程度は小さい。また、茎頂外植体は培養日数が増すにつれ、ある一定数の葉原基は分化するがその後分化しなくなり、茎頂の大きさも小さくなった。このように、シンビジウムの茎頂培養において長軸生長の小さい理由として、茎頂分裂組織の細胞分裂活性の有限性と節間の伸長生長が小さいことが考えられる。

アスパラガス(5)、カーネーション(15)の茎頂外植体を適当な条件下で培養するとカルスをほとんどつくり、外植体が長軸生長を行うとともに、その腋芽がシュートとなり、腋芽から腋芽へと仮軸分枝型の増殖を繰り返す。しかし、シンビジウムの場合は、腋芽から生じるPLBは少なく、むしろ不定芽的に生じるPLBが多いようである。PLB形成に因与する細胞は表皮細胞とその内側5層目ぐらいまでの細胞であるようにみえた。これはRutkowski(14)の見方と一致している。茎頂培養による栄養繁殖法は、外植体自体がそのまま1個の個体に発育し、定芽による繁殖と同じになるため、節間などその他の培養に比べ、再生個体の遺伝的な安定性が高いとされている(2,12)。このような定芽を用いた繁殖過程は最も自然なものであるが、突然変異の発生頻度は低くはなから考えられるが、茎頂培養によって繁殖された各種の植物で突然変異の発生が実際面において大きな問題になっている。これは、一つにはカルスまたはPLB

の形成という脱分化過程を経て再分化が行われるためであると考えられる。このように考えると本実験で示したように、同じPLBでも定芽的なものと不定芽的なものがある場合には、その違いにより、突然変異の起きやすさが異なるのかもしれない。ともあれ、不定芽的なPLB形成能の高いシンビジウムも突然変異が起こる可能性が高い(6)のでさらに仔細な実験を行う必要があると思われる。

摘 要

Cymbidium × *Sazanami* 'Haru-no-umi' を材料とし、シュートの発育過程の経時的変化及び栄養茎頂外植体の採取時期による器官形成能の変化を調べると同時に、茎頂外植体からプロトコム状球体(PLB)が誘導される初期形成過程を形態学的に観察した。シュートの伸長生長の最も盛んな時期は4月から8月までで、この時期には腋芽の葉の分化も最も活発であった。茎頂外植体のPLB形成能はこの期間中に最も高かった。その後、9月から翌年2月までは主茎の伸長生長もなく、腋芽の発達も停止した。この期間中のPLB形成能は前者より低い。なお葉の分化が停止する8月にはPLB形成能が急速に低下し9月以降は完全に失われた。PLBは腋芽から定芽的に形成されるものと、節間部から不定芽的に形成されるものがあった。前者は後者よりその形成時期が早かったが、その数は後者よりも少なかった。なお、前者を定芽的PLB、後者を不定芽的PLBと呼ぶことにした。

謝 辞 本論文の作成に当たり校閲の労をいただいた杉山 晃先生、光学顕微鏡の使用に当たり貴重な御助言をいただいた大野 始先生、ならびに種種御配慮をいただいた山本幸男教授に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

1. ALTMAN, A. and R. GOREN. 1974. Growth and dormancy cycles in *Citrus* bud cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant.* 30: 240—245.
2. D'AMATO, F. 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. p. 343—357. In: J. REINERT and Y. P. S. BAJAJ (eds.) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer-Verlag, Berlin.
3. FONNESBECH, M. 1972. Growth hormones and propagation of *Cymbidium* in vitro. *Physiol. Plant.* 27: 310—316.
4. FONNESBECH, M., A. FONNESBECH and N. BRED-MOSE. 1977. Development of *Asparagus plumosus* shoot tips grown in vitro. *Physiol.*

- Plant. 40 : 73—76.
5. HASEGAWA, P. M., T. MURASHIGE and F. H. TAKATORI. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cytohistological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98 : 143—148.
 6. 加古舜治. 1979. ランのメリクロンの変異について. 新花卉. 103 : 84—87.
 7. 金 奎元・加古舜治. 1982. シンビジウム茎頂外植体の器官形成に及ぼす植物生長調節物質の影響. 園学雑. 51 : 106—114.
 8. KOEVARY, K., L. RAPPAPORT and L. L. MORRIS. 1978. Tissue culture propagation of head lettuce. HortScience. 13 : 39—41.
 9. 楠元 守. 1980. 器内培養された *Cymbidium* protocorm の増殖と器官形成における品種間差異と生長調節物質の影響. 園学雑. 48 : 510—518.
 10. MOREL, G. M. 1964. Tissue culture—A new means of clonal propagation of orchids. Amer. Orch. Soc. Bull. 33 : 473—478.
 11. MOREL, G. M. 1972. Morphogenesis of stem apical meristem cultivated in vitro: Application to clonal propagation. Phytomorphology 22 : 265—277.
 12. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25 : 135—166.
 13. RÜCKER, W. 1974. Einfluss von Cytokinin auf Wachstum und Differenzierung *in vitro* kultivierter Protokorme von *Cymbidium*. Z. Pflanzenphysiol. 72 : 338—351.
 14. RUTKOWSKI, E. 1971. How meristems multiply. Amer. Orch. Soc. Bull. 40 : 616—622.
 15. SHADE, M and T. MURASHIGE. 1977. Hormonal requirements of excised *dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem in vitro. Amer. J. Bot. 64 : 443—448.
 16. STONE, O. M. 1973. The elimination of viruses from *Narcissus tazetta* cv. Grand Soleil d'or, and rapid multiplication of virus-free clones. Ann. appl. Biol. 73 : 45—52.
 17. TRAN-THANH-VAN, M. 1974. Growth and flowering of *Cymbidium* buds normally inhibited by apical dominance. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99 : 450—453.
 18. WILFRET, G. J. 1966. Formation of protocorm-like bodies on excised *Cymbidium* shoot tips. Amer. Orch. Soc. Bull. 35 : 823—827.
 19. WIMBER, D. E. 1963. Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. Amer. Orch. Soc. Bull. 32 : 105—107.