

シクラメンの組織培養による大量増殖

大橋一夫・小松田美津留・峯岸長利・米内貞夫

I 緒言

栃木県には110戸余のシクラメン生産農家があり、約70万鉢が京浜方面を中心に出荷されている。本県産シクラメンの特色は大鉢仕上げにあり、年末のギフトに主として利用されている。このため、実生から開花までの栽培期間は1年2ヵ月を要し、極めて所要労力の高い作物となっている。

シクラメンの繁殖は実生により行われるが、遺伝的にヘテロ性が強いので、花色や葉斑に変異幅のある品種が多い。特に最近需要度の高いパステル系や変り咲きの品種にこの傾向が顕著で、生産上問題となっている。固定を目的として純系に誘導すると内婚劣勢の現象を呈し、草勢が劣化することが知られている^{1,8)}。戻し交配による回避も、試みられているが固定は難しい。一方、中間形質を示す交配組合せ品種を利用すると比較的形質が固定され、雑種強制により草勢も旺盛になることから、F₁ハイブリット品種も普及しているが、需要動向にマッチした優良品種が少ない。

このようなシクラメン栽培の現状の中で栄養繁殖により増殖できれば、株の形質は揃い、出荷時の商品価値は高まるものと期待される。栄養繁殖の方法としては、他の塊茎植物（サトイモ、コンニャク等）で行われている分球や木子形成による増殖が考えられるが、シクラメンではこれらの現象がなく、栄養繁殖の難しい植物である。シクラメンを栄養繁殖させる試みとして中山¹¹⁾は塊茎分割による増殖を、狩野ら⁵⁾は葉ざしによる増殖を行っているが、増殖率の点からみると、採種母株維持に利用できる程度

で、商業的に栄養繁殖苗を供給するまでには至っていない。

栄養繁殖を目的とした研究のもう一つの流れに組織培養がある。これは西ドイツのMayer⁸⁾が1956年に報告した塊茎組織片培養に始まる。その後、Stichel⁷⁾、Okumotoら¹²⁾、Loewenberg⁷⁾、Geier³⁾が同じように塊茎組織の培養を行っている。シクラメンは内生菌が多くこれが組織培養を行う上での大きな妨げになっている。特に塊茎組織は内生菌密度が高く抗生物質を利用せずには培養できない。しかし一般に抗生物質は、シクラメン組織の器官分化にも抑制的に働くので容易に使用することができない。そこで、無菌組織獲得のためいろいろの工夫がなされ、大越ら¹⁶⁾は花卉の培養を行い、安藤ら²⁾は暗黒で葉柄部分を徒長させた黄化葉柄利用による増殖法を試み、Geier⁴⁾及び三浦ら⁹⁾は薬を用いた増殖法を試みている。しかしこれらの方法では商業的に大量の苗を生産するには増殖率がまだ低いと考えられる。筆者らは、種子殺菌による無菌実生苗からの増殖を検討し、塊茎組織を用いた大量増殖法を開発したので報告する。

II 無菌実生苗の作出

組織培養の材料として種子を殺菌し無菌の実生苗を養成する。

1. 試験方法

1) 供試材料

F₁ (ショパン×ソフト・リラ・アイ)、ショパン及びあけぼのの3品種の種子を用いた。

2) 殺菌方法

第1表 殺菌種子播種30～39日後の生育調査結果

試験 番号	品 種	出芽 培地	調査日 日後	播種数 粒	正常生育 数 (%)	不発芽種子 数 (%)	発根せず 粒 (%)	雑菌汚染 数 (%)
1	ショパン×ソフト・リラ・アイ	M S	31	50	47(94.0)	2(4.0)	0(0)	1(2.0)
2	〃	〃	36	100	94(94.0)	4(4.0)	0(0)	2(2.0)
3	〃	〃	38	50	47(94.0)	3(6.0)	0(0)	0(0)
4	ショパン	1/3MS	39	147	139(94.6)	4(2.7)	4(2.7)	0(0)
5	〃	〃	30	50	46(92.0)	2(4.0)	1(2.0)	1(2.0)
6	あけぼの	〃	30	50	47(94.0)	2(4.0)	1(2.0)	0(0)
計及び平均				447	420(94.0)	17(3.8)	6(1.3)	4(0.9)

Anderson ら¹⁾の方法を用い、種子を滅菌水に24時間浸漬後、有効塩素5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で1分間殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。

3) 培養法

第1表のとおり6回の培養を行った。試験1～3はM S培地¹⁾(ショ糖3%, ゲルライト0.2%, pH 5.6)を用いた。培地は25mm径試験管に10mlずつ分注した。種子は試験管当たり1粒播種した。試験4～6は上記培地の無機塩濃度を1/3に、ゲルライトを0.3%にした培地を用い同様に試験管当たり1粒播種した。培養は20℃で行い、初期暗黒(30～32日)で、その後試験1～3は15時間/日照明、試験4～6は12時間/日照明で培養した。

2. 結果及び考察

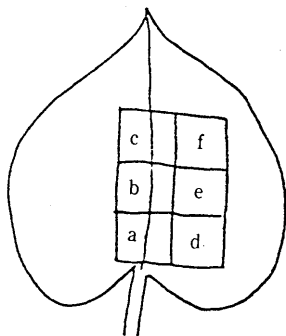
殺菌種子は30日程度で子葉が展開を開始し、正常に生育した種子の割合は、品種による差はほとんどなく、92.0～94.6%であった。6回の試験の平均値は94.0%であった。発芽しなかった種子は3.8%であり、発根しなかった種子は1.3%であった。雑菌により汚染した種子は0～2.0%であり、平均値は0.9%であった。また6回の試験のうち3回はまったく雑菌汚染がなかった(第1表)。得られた無菌実生苗を写真1に

示した。

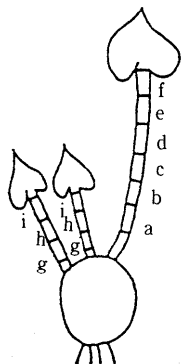
Anderson らはシクラメン栽培において種子の発芽が不均一な点を改善するために種子に多くの処理を加えている。その中で24時間水浸漬後、有効塩素5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に20秒～1分浸漬し播種するのが有効であり、推奨している。水浸漬を行わないで、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液1分浸漬では、23%の雑菌汚染があるが、水浸漬を併用することにより、雑菌汚染は3～5%に低下している。本試験の結果では、雑菌汚染率は0.9%でありAnderson らの成績よりも良好な結果が得られている。また木嶋⁶⁾は、有効塩素0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液1時間処理で完全に殺菌できている。一般に次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いる殺菌では有効塩素1～0.5%で15～20分処理を常用とするが、シクラメンにおいてはこの殺菌時間では不十分なことを示唆している。本試験では長時間処理による殺菌剤の組織内浸透による影響を回避するため24時間水浸漬後の高濃度(5%)、短時間(1分)処理を行った。

Ⅲ 増 殖

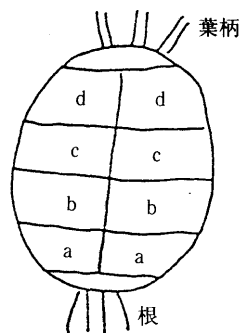
無菌実生苗組織を用いた培養法を検討し、効率的な増殖法を確立する。



第1図 葉身の分割方法



第2図 葉柄の分割方法



第3図 塊茎の分割方法

1. 試験方法

1) 出芽に及ぼす無機塩濃度、植物生長調節物質（植調物質）濃度、光及び培養組織部位の影響

(1) 供試材料の養成

品種ショパン×ソフト・リラ・アイF₁を無菌播種（第1表試験番号2）し30日間20℃暗黒で培養した。その後20℃15時間／日照明の条件で培養し約2ヵ月ごとにMS培地に植継いで、葉が2～3枚展開している実生苗の葉身、葉柄及び塊茎を用いた。塊茎の大きさは縦横とも約8～10mm径であった。

(2) 材料の調製

葉身は第1図のように主脈を含む部位、主脈を含まない部位の6部分で約8mm角に切断した。葉柄は第2図のように第1葉の葉柄を長さ約8mmで6片に、第2葉及び第3葉の葉柄を長さ約8mmで3片にそれぞれ上部より切断した。残りの下部は培養に使用しなかった。塊茎は第3図のように出葉上端部と発根下端部を切り取り、横に4分割、縦に4分割、計16分割した。

(3) 培地

第2表のとおり無機塩濃度をMS及び1/3MSの2種、植調物質を6-Benzylaminopurine (BA) 1mg/ℓ単独、1-Naphthaleneacetic

Acid (NAA) 0.1, BA 1mg/ℓ共存、その1/5濃度のBA 0.2mg/ℓ単独及びNAA 0.02, BA 0.2mg/ℓ共存の4種、計8種の培地を用いた。ショ糖3%, ゲルライト0.2%, pH 5.6とし、100ml三角フラスコに40ml分注した。なおpHは1.0, 0.1及び0.01Nの塩酸と苛性ソーダ溶液を用いて調整した。

(4) 培養法

切断した組織片を1区当たり葉身は各部2片ずつ計12片、葉柄は第1葉の葉柄1本（6片）、第2、第3葉の葉柄各1本（6片）の組織片計12片、塊茎は図の各部（a, b, c, d）3片ずつ計12片を4個の三角フラスコにそれぞれ6

第2表 使用培地の植調物質濃度

培地 番号	植調物質濃度 mg/ℓ	
	NAA	BA
1	—	0.2
2	0.02	0.2
3	—	0.02
4	0.02	0.02
5	0.002	0.02
6	—	—

片ずつ置床した。培養は20℃暗所及び15時間／日照明の2水準で行った。

(5) 調査

置床35日目に発芽数を調査した。

2) 塊茎組織からの増殖

(1) 初代増殖

品種ショパンの無菌播種(第1表の試験番号

4) 46日後の塊茎(縦約5～6mm, 横約3～4mm)の出葉上端部及び発根下端部を切り捨て、横に3分割、縦に2分割、計6分割した。培地は1/3 MS 無機塩、MS ビタミン、ショ糖3%, ゲルライト0.3%, pH 5.6で培養した(以下この報告ではすべて1/3 MS 無機塩培地ではゲルライト0.2%で凝固不十分であったため0.3%に増量した。

BA 0.2mg/ℓの培地に69種子分の塊茎組織片を置床した。培養は20℃の暗所で行い29日後に出芽数を調査した。出芽した塊茎組織片のうち径15mm程度以上の大きさに生育した組織片については2分割し、基本培地のみで植調物質無添加の発根培地に置床し、20℃、12時間／日照明(以下明所と記す)で培養した。

(2) 第2代増殖

初代発根培地置床後52日目の発根苗の葉柄及び根とその付近(近傍)を切り捨てた塊茎を6分割してBA 0.2mg/ℓ単独及びNAA 0.02, BA 0.2mg/ℓ共存の培地に置床した(6種子由来)。それぞれ明所、暗所で培養し、置床28日後に出芽数を調査した。NAA, BA 共存培地を用いて出芽した塊茎組織片は初代増殖の時と同じ基本培地に置床し、20℃の明所で培養した。

(3) 第3代～第6代増殖

第2代増殖培養において肥大した組織片(出芽した葉柄はすべて元の部分から切り捨てた)を平均10分割してNAA 0.02, BA 0.2mg/ℓの培地に置床しこの操作を第6代まで繰り返した。

第3代増殖は6種子に由来する組織について増殖した。第4代～第6代増殖はそのうち1種子に由来する組織についてのみ増殖した。培養はすべて暗所で行った。発根はすべてNAA 0.2mg/ℓ添加の発根培地を用い20℃の明所で行った。

3) 葉身、葉柄、根の組織を用いた増殖

(1) 初代増殖

前述した2)の塊茎を用いた増殖試験における塊茎組織由来増殖苗(初代増殖において発根培地に置床し67日経過した苗)の葉身、葉柄、根を用い、葉身は約8mm角に、葉柄、根は長さ約8mmに切り、培地にはBA 0.2mg/ℓ単独及びNAA 0.02, BA 0.2mg/ℓ共存の2種の培地を用い、20℃の暗所、明所で培養した。葉身、葉柄組織からの出芽は32日目に、根組織からの出芽は47日目に調査した。

(2) 第2代増殖

葉身、葉柄由来組織は初代増殖においてNAA 0.02, BA 0.2mg/ℓ共存の培地で肥大出芽した組織を、根由来組織はBA 0.2mg/ℓ単独の培地で肥大出芽した組織を用い、それぞれの芽を切捨て、厚さ1～2mmに切断してBA 0.2mg/ℓ単独の培地で出芽誘導した。培養は暗所で行い、葉身、葉柄は29日後に、根は31日後に出芽状況を調査した。

(3) 第3代増殖

第2代増殖において葉身、葉柄、根組織が肥大して出芽した芽をすべて切り取り4～6分割して葉身、葉柄由来組織はNAA 0.02, BA 0.2mg/ℓ共存の培地で、根由来組織はBA 0.2mg/ℓ単独の培地を用い20℃の暗黒で培養した。出芽状況を30日後に調査した。

(4) 出芽組織片からの発根

葉身、葉柄については第2代増殖で出芽した組織片を、根については初代増殖においてBA 0.2mg/ℓ単独培地で出芽した組織片を用い、約15mm以上に肥大したものは2分割して、NAA

第3表 各組織片からの出芽に及ぼす無機塩濃度、植調物質濃度及び光の影響

培地 番号	培地組成			培 養 部 位 及 び 光 条 件						各培地 平 均
	MS無機 塩濃度	植調物質mg/ℓ		明 所			暗 所			
		N A A	B A	葉 身	葉 柄	塊 茎	葉 身	葉 柄	塊 茎	
1	標準	—	1.0	7.7(46.2)	1.8(10.8)	0.8(6.4)	0.0(0.0)	2.5(15.0)	0.8(6.4)	2.3(14.1)
2	標準	1.0	1.0	15.0(90.0)	3.9(23.4)	0.0(0.0)	9.4(56.4)	6.7(40.2)	0.0(0.0)	5.8(35.0)
3	標準	—	0.2	0.8(4.8)	2.8(16.8)	0.6(4.8)	0.0(0.0)	0.8(4.8)	4.3(34.4)	1.5(10.9)
4	標準	0.02	0.2	0.6(3.6)	3.4(20.4)	0.0(0.0)	3.6(21.6)	2.3(13.8)	2.5(20.0)	2.1(13.2)
MS標準培地での明暗所別平均				3.1(18.9)			2.7(17.7)			2.9(18.3)
5	1/3	—	1.0	0.3(1.8)	0.0(0.0)	0.6(4.8)	2.1(12.6)	0.0(0.0)	0.7(5.6)	0.6(6.2)
6	1/3	0.1	1.0	11.0(66.0)	1.1(6.6)	0.0(0.0)	4.2(25.2)	4.8(28.8)	0.0(0.0)	3.5(21.1)
7	1/3	—	0.2	0.0(0.0)	5.7(34.2)	1.1(8.8)	3.5(21.0)	9.3(55.8)	10.8(86.4)	5.0(34.4)
8	1/3	0.02	0.2	0.6(3.6)	1.8(10.8)	1.1(8.8)	3.0(18.0)	7.1(42.6)	2.3(18.4)	2.7(17.0)
1／3 MS培地での明暗所別平均				1.9(12.1)			4.0(26.2)			3.0(19.6)
BA1.0培地（1，2，5，6）の平均										3.1(19.1)
BA0.2培地（3，4，7，8）の平均										2.8(18.9)
全 体 平 均				2.5(15.5)			3.4(22.0)			3.0(19.0)

注1. 上段の数字は各培地での1組織片当り平均出芽数、総出芽数÷置床数(12)である

注2. () 内数字は、増殖率=平均出芽数÷2×1種子由来実生組織置床数(葉身12, 葉柄12, 塊茎16)である

の濃度が0, 0.02, 0.2, 2.0mg/ℓの4種の培地に置床し20℃の明所で培養した。出芽調査は葉身、葉柄は45日後に、根は42日後に行った。

4) 葉身、葉柄、塊茎、根組織の培養に用いる植調物質の最低濃度の検討

(1) 供試材料

Ⅱの無菌実生苗作出試験(第1表の試験5, 6)における播種後68日目の無菌実生苗を用いた。

(2) 培養法

葉身は縦2分割、横3分割、計6分割、塊茎は縦2分割、横3分割、計6分割、根は上下に分割し、それぞれ数本まとめて計6ブロックとした。種子の違い及び組織部位の違いによる差が少なくなるように組み合わせで第2表に示した6種の培地に置床した。培養は20℃の暗黒で

行い、置床30日後に重量を調査した。

2. 結果及び考察

1) 出芽に及ぼす無機塩濃度、植調物質濃度、光及び培養組織部位の影響

試験の結果を第3表に示した。無機塩濃度の比較では、全体でMS無機塩、1/3 MS無機塩がそれぞれ平均で2.9本、3.0本の平均出芽数(全出芽数÷置片組織片数)でほぼ同じであった。しかし明所の平均出芽数はMS標準無機塩で3.1本あり、1/3 MS無機塩の1.9本に比較して1.2本多かった。逆に暗所の平均出芽数は1/3 MS無機塩で4.0であり、標準無機塩濃度の2.7本に比較して1.3本多かった。

植調物質濃度の比較では第1, 第2, 第5, 第6のBA 1.0mg/ℓを含む培地の平均出芽数は3.1本で、その1/5濃度に当たる第3, 第4,

第7, 第8培地の平均出芽数は2.8本であって, 0.3本程度の差であった。高濃度での植調物質による変異の発生を抑制することを考えると, 1/5濃度の植調物質でも十分と考えられる。

光の出芽に対する影響を見ると, 全体では暗所の方が平均出芽数で0.9本多かった。明所では葉身からの出芽が平均4.5本と多く, 特に第2, 第6培地 (NAA 0.1, BA 1.0mg/ℓ) での平均出芽数がそれぞれ15.0本, 11.0本と多かった。暗所では葉柄からの出芽が多く, 平均の出芽数で4.2本であった。暗所で出芽の多い培地は, 葉身の第2培地, 葉柄の第7培地, 塊茎の第7培地であり, それぞれ9.4本, 9.3本, 10.8本であった。

各培地の全体の比較では第2培地 (5.8本), 第7培地 (5.0本), 第6培地 (3.5本), 第8培地 (2.7本) の順に出芽数が多かった。

以上のことから効率的な増殖は, 葉身を第2培地にて明所で, 葉柄及び塊茎を第7培地にて暗所で培養したときに得られる。平均2本の芽をつけて出芽組織片を分割するとすれば, それぞれの組織を最も適した条件で培養したときの1種子からの総増殖率は, 葉身組織を第2培地の明所で培養すると90.0倍, 葉柄組織を第7培地の暗所で培養すると55.8倍, 塊茎組織を第7培地の暗所で培養すると86.4倍となり, 合計232.2倍となる。

第4表は組織の切断部位の違いによる出芽を調査した結果である。葉身からの出芽率 (置床した組織片のうち出芽が認められた組織の割合) は主脈を含む部分 (a, b, c,) 及び主脈を含まない部分 (d, e, f) 間にほとんど差がなく, 元の部分と先の部分にもほとんど差がなかった。このことにより葉身は全体的に増殖のための材料として使用できるとみられる。

葉柄からの出芽率は葉身に近い部分で高く, 特に葉身のすぐ下の部分からの出芽率は f 75.0%, i 65.6% で, その他の部分の37.5~53.1%

第4表 組織部位の違いによる出芽への影響

組織	部位	置床数	出芽組織片数 (%)
葉身	a	32	14 (43.8)
	b	32	15 (46.9)
	c	32	14 (43.8)
	d	32	16 (50.0)
	e	32	14 (43.8)
	f	32	16 (50.0)
葉柄	a	16	6 (37.5)
	b	16	8 (50.0)
	c	16	7 (43.8)
	d	16	8 (50.0)
	e	16	8 (50.0)
	f	16	12 (75.0)
	g	32	15 (46.9)
	h	32	17 (53.1)
	i	32	21 (65.6)
塊茎	a	48	5 (10.4)
	b	48	11 (22.9)
	c	48	13 (27.1)
	d	48	17 (35.4)

より高く, 利用部位としてすぐれていると思われる。塊茎からの出芽は上部で35.4%であるが, 下部では10.4%で低く, 利用部位として上部が適しているといえる。

本試験で, 各組織ごとに適した出芽培養条件がほぼ明らかにできた。

2) 塊茎組織からの増殖

(1) 初代増殖

第5表のとおり初代増殖では29日目で置床したショパン414塊茎組織片の94%で出芽し, 組織片当たりの平均出芽数は11.1本であった。出芽塊茎組織片からの発根率は第5表のとおり106日目で96%であった。塊茎組織からの出芽状況を写真に示した。

(2) 第2代増殖

シクラメンの組織培養による大量増殖

第5表 初代増殖における無菌実生塊茎組織からの出芽及び発根

出 芽		発 根		
置床数	出芽塊茎組織片数	出芽率%	平均出芽数	置床数 発根数 発根率%
414	389	94	11.1	778 746 96

注. 出芽は29日後, 発根は106日後に調査

第6表 第2代増殖における塊茎組織片からの出芽に及ぼす植物調節物質及び光の影響

培地 番号	植調物質濃度		明 所				暗 所			
	N A A mg/ℓ	B A mg/ℓ	置床数	出芽数	出芽率 %	平均 出芽数	置床数	出芽数	出芽率 %	平均 出芽数
1	—	0.2	18	12	67	4.7	18	9	50	10.7
2	0.02	0.2	18	18	100	5.5	18	18	100	10.5

第7表 第2代増殖における出芽塊茎組織片からの発根率の変化(%)

置床数	16日後		47日後		61日後		98日後	
	発根数	発根率	発根数	発根率	発根数	発根率	発根数	発根率
30	2	7	10	33	15	50	28	93

第8表 分割増殖における出芽及び発根

分割 回数	出		芽					発 根				
	植調物質濃度mg/ℓ		培養期 間 日 数	置床 数	出芽 数	出芽 率%	平 均 出芽率	植調物質濃度	培養期 間 日 数	置床 数	発根 数	発根 率%
	N A A	B A										
3	0.02	0.2	29	52	37	71	9.9	0.2	48	28	25	89
4	0.02	0.2	32	53	47	89	8.6	0.2	38	13	13	100
5	0.02	0.2	21	120	87	73	6.2	0.2	42	60	52	87
6	0.02	0.2	28	126	79	63	5.3	0.2	45	38	56	64

第6表のとおり第2代増殖ではBA 0.2mg/ℓの単独培地では出芽率67%及び50%であったが, 第2培地(NAA 0.02, BA 0.2 mg/ℓ共存)ではすべての塊茎組織片で出芽し, その数は明所で5.5, 暗所で10.5本あり, 暗所での培養が適していることを示した. このことから, 発根誘導試験には, NAA 及び BA 共存培地と, 暗所で養成した組織を用いたところ, 第7表のとおり, 発根培地移植後98日目, 93%の出芽塊茎組織片が発根した.

(3) 第3代～第6代増殖

第3代増殖以降さらに, 塊茎組織の分割を繰り返しながら培養を続けると, 出芽数は第3代～第5代までは89～71%であったが, 第6代増殖では63%に下がった. また平均出芽数も, 第3代増殖では9.9芽を認めたが, 第6代増殖では5.3芽になった. 第2代増殖までは発根培地に植調物質の入らない基本培地組成を用い, 90%以上の塊茎組織が発根するのに約100日要したので, 発根を促進するためNAAを0.2mg/ℓ添加した培地を用いたところ, 発根期間を約半分以下に短縮することができた. 第6代増殖

第9表 葉身、葉柄、根組織片からの出芽に及ぼす光、植調物質の影響（初代増殖）

置床 部位	植調物質濃度		明 所				暗 所			
	N A A mg/ℓ	B A mg/ℓ	置床組 組織片数	出芽組 組織片数	出芽率 %	平 均 出芽数	置床組 組織片数	出芽組 組織片数	出芽率 %	平 均 出芽数
	—	0.2	26	10	38	3.7	21	8	38	4.2
葉身	0.02	0.2	23	7	30	3.6	22	5	23	3.5
	—	0.2	22	8	36	3.7	23	15	65	7.2
葉柄	0.02	0.2	21	5	24	1.9	23	11	48	5.9
	—	0.2	※	0	—	0	※	9	—	6.8
根	0.02	0.2	※	0	—	0	※	5	—	4.2

注. ※根の置床組織片数は1個体分の根を置床し、数は不明

第10表 葉身、葉柄、根肥大分割片からの第2、3代増殖における出芽

由来 組織	第2代増殖				第3代増殖				
	置床組 組織片数	出芽組 組織片数	出芽率 %	平 均 出芽数	置床組 組織片数	肥大組織 片数(%)	出芽組 組織片数	出芽率 %	平 均 出芽数
葉身	66	56	85	5.2	91	31(34)	11	12	0.36
葉柄	72	47	84	8.7	73	50(68)	30	41	0.82
根	12	4	33	3.7	40	12(30)	0	0	0.0

での発根率とは64%と、第5代増殖までの100～87%に比べて著しく低下した（第8表）。

3) 葉身、葉柄、根組織を用いた増殖

(1) 初代増殖

葉身、葉柄、根ともBA 0.2mg/ℓの培地がNAA 0.02, BA 0.2mg/ℓの培地よりも4～17%多く出芽した。明所と暗所を比較すると、葉身では出芽率23～38%で大差ないが、葉柄では暗所の方が2倍近く出芽し、根は明所ではまったく出芽がみられなかった。（第9表）。

(2) 第2代増殖

第10表のとおり葉身、葉柄組織片からの出芽はそれぞれ85%、84%と高く、根組織片では33%と低かった。平均出芽数は葉柄組織片で多く8.7本であった。

(3) 第3代増殖

葉身、葉柄、根由来組織は第3回の分割で、出芽率が下がり、葉身12%、葉柄41%、根0%であった。平均出芽数も1本以下で極端に低下

第11表 出芽組織片からの発根

培地	由来 組織	組織 片数	発根組 組織片数	発根 率%	周辺が崩れた 発根組織片率%
	葉身	14	0	0	—
NAA	葉柄	17	0	0	—
0	根	4	2	50	0
	葉身	24	1	4	0
NAA	葉柄	13	2	15	0
0.02	根	4	2	50	0
	葉身	21	11	52	0
NAA	葉柄	12	7	58	0
0.2	根	2	2	100	0
	葉身	13	8	62	50
NAA	葉柄	32	29	91	55
2.0	根	7	6	86	83

注. 周辺の崩れた発根組織片率は発根組織片だけの率である

した（第10表）。塊茎組織を用いた増殖は高率で出芽し安定しているが、これに比べて葉身、葉

シクラメンの組織培養による大量増殖

柄、根の組織を用いての増殖は出芽率が不安定でかつ低く、効率が悪いと判断される。

(4) 出芽組織片からの発根

根由来出芽組織片は、NAAの入っていない培地でも50%発根し、0.2及び2.0mg/ℓでは100及び86%発根した。葉身、葉柄はNAAのない培地では発根せず、低濃度のNAAでは発根率が低かった。NAAの濃度を2.0mg/ℓまで高めると発根率は高まるが肥大組織周辺の一部がカルス状になり崩れる組織片が認められ、その率は発根組織の50～83%に達した(第11表)。

4) 植調物質濃度を下げた時の葉身、葉柄、塊茎、根組織の肥大状況(重量増加)

葉身、葉柄、塊茎組織はショパン、あけぼの共に第12、13表のBA 0.2mg/ℓを含む第1、第2培地で重量倍率が高かった。根組織はBA 0.2mg/ℓまたはBA 0.02mg/ℓにNAA 0.02mg/ℓを含む第2、4培地で重量倍率が高く、BA 0.2mg/ℓ単独の第1培地では低かった(第13表)。これらのことより、BA 0.2mg/ℓの単独培地(根では不適)かBA 0.2、NAA 0.02

mg/ℓのこれまでの試験で用いた培地(No 1, No 2)が、組織の肥大には適しており、これらよりも植調物質濃度を下げると組織肥大が悪くなることが明らかになった。

IV 組織培養株の栽培

培養容器内で増殖養成した個体の馴化方法の検討をするとともに、馴化株を用いて栽培し、栽培特性を把握する。

1. 試験方法

(1) 供試材料

供試材料には、Ⅲの塊茎組織を用いた増殖試験で得られた培養苗を用いて馴化試験を行い、その材料をそのまま栽培用に供した。馴化に供試した苗を写真3に示した。

(2) 馴化

分割増殖試験の進行にともなって、馴化試験を第14表のとおり、昭和62年9月7日、63年3月7日、6月7日の3回行った。まず培養苗の根を流水で十分に洗い培地を落としてから、第15表に示した成分組成のシクラメン用培土に植

第12表 葉身及び葉柄培養組織の重量調査

品 種	培地No	植調物質mg/ℓ		葉 身			葉 柄		
		NAA	BA	置床重量 mg	30日後の重量 mg	30 日 後 の 重 量 倍 率	置床重量 mg	30日後の重量 mg	30 日 後 の 重 量 倍 率
シ ョ パ ン	1	—	0.2	8.9	332.8	37.4±13.5*	5.0	81.6	17.4± 6.0*
	2	0.02	0.2	7.6	262.0	70.1±87.7	4.4	96.5	21.4± 6.6
	3	—	0.02	7.8	73.7	11.1± 5.0	4.4	40.7	8.5± 4.4
	4	0.02	0.02	9.2	86.4	9.6± 2.5	4.6	42.8	9.4± 3.9
	5	0.002	0.02	9.2	58.9	7.1± 3.1	4.7	36.7	8.3± 4.1
	6	—	—	8.5	39.8	5.1± 1.7	4.6	20.1	4.3± 1.3
あ け ぼ の	1	—	0.2	10.7	336.5	31.0±11.9	4.3	89.0	21.3± 6.6
	2	0.02	0.2	9.6	392.3	39.1±13.4	3.9	122.8	45.7±30.4
	3	—	0.02	11.6	68.3	6.1± 2.2	4.0	38.9	10.7± 6.0
	4	0.02	0.02	10.9	88.3	9.5± 4.0	4.1	25.2	6.4± 1.5
	5	0.002	0.02	11.7	73.7	6.7± 1.8	4.2	38.8	10.6± 4.3
	6	—	—	10.7	32.0	3.2± 0.9	4.0	18.6	4.6± 1.3

注. ※母平均の信頼限界95%

第13表 塊茎及び根培養組織の重量調査

品 種	培地No	植調物質mg/ℓ		塊 茎			根		
		N A A	B A	置床重量 mg	30日後の重量 mg	30 日 後 の 重 量 倍 率	置床重量 mg	30日後の重量 mg	30 日 後 の 重 量 培 率
シ ョ パ ン	1	—	0.2	4.3	138.3	38.2±13.5*	4.5	28.3	6.3± 2.3*
	2	0.02	0.2	3.3	169.5	64.6±24.0	3.7	166.9	51.0±20.1
	3	—	0.02	3.6	52.9	18.4± 9.7	3.1	16.0	5.8± 2.1
	4	0.02	0.02	4.4	49.1	11.5± 2.4	5.0	44.0	9.3± 6.2
	5	0.002	0.02	5.2	50.1	12.0± 5.8	3.8	16.5	3.9± 1.2
	6	—	—	4.5	23.5	6.2± 1.7	3.0	10.8	3.6± 1.5
あ け ば の	1	—	0.2	4.9	111.8	24.7± 9.6	3.2	33.8	10.6± 4.9
	2	0.02	0.2	5.8	113.5	21.8± 5.3	3.5	99.6	31.6±12.3
	3	—	0.02	5.2	49.1	11.6± 4.9	3.1	15.3	5.4± 2.6
	4	0.02	0.02	5.6	47.5	10.1± 4.1	3.5	57.0	16.5± 5.9
	5	0.002	0.02	5.4	56.5	14.6± 8.5	2.9	18.6	5.8± 2.1
	6	—	—	4.9	21.0	4.9± 1.2	3.1	30.3	11.3± 4.2

注. ※母平均の信頼限界95%

え付けた。培土の組成は第1回の馴化出しから鉢替4号プラ鉢までNo1（落葉堆肥：モミガラ堆肥：ピートモス＝3：2：1），第1回馴化5号プラ鉢以降第2回馴化出しから定植7号プラ鉢までNo2（落葉堆肥：モミガラ堆肥：牛ふん堆肥＝2：1：1），第3回は馴化出しから定植まで，No3（赤土：落葉堆肥：モミガラ堆肥＝4：3：1，ようりん4g/ℓ）の培土である。

（3） 栽培管理及び調査

馴化の時期及び鉢替の時期を第14表に示した。第2回到馴化に出した培養株及び前年10月5日に播種したショパン実生株を用いて解体し，主芽数，側芽数，葉数，葉重，花らい数，塊茎重，根数，根重を調査し第16表に示した。

2） 葉身，葉柄，根由来増殖苗の栽培

（1） 供試材料

増殖試験のうち2. - 3）の葉身，葉柄，根組織を用いて得られた培養苗を供試した。

（2） 馴化

培養した苗の根を流水で十分に洗い培地を落

とし，No2のシクラメン用培土を用いて植え付けた。

（3） 調査

開花株率を調査し，第17表に示した。

2. 結果及び考察

1） 塊茎組織由来増殖苗の栽培

馴化過程では加湿操作を行わなくとも通常の灌水で萎ちょうしなかった。馴化の状況を写真4に示した。しかし，第1回目馴化出しは，6ヵ月目頃から塊茎が腐敗して，枯死株が多発した。馴化後の開花株率は10%にとどまった。第2回目以降の馴化は生育障害が少なく67～100%の株が開花した（第17表）。

第1回目馴化の生育障害の原因としては，馴化の時に用いた培土の硝酸態窒素過剰，リン酸不足によると考えられる（第15表）。

馴化後は普通栽培に準じて養成を進め開花に至らせた。すなわち第1回目の9月初旬に馴化に出した株の開花始めは10月上旬，第2回目の3月初旬出し株は11月下旬，第3回目の6月初旬出し株は12月上旬であった。

シクラメンの組織培養による大量増殖

第14表 馴化出し及び鉢替え時期（月／日）

馴化回数	馴化出し	鉢上げ3号 ポット	鉢替4号 プラ鉢	鉢替5号 プラ鉢	鉢替6号 プラ鉢	鉢定植7号 プラ鉢
第1回	9／7	11／17	2／8	4／11	6／13	8／26
第2回	3／7		4／7	6／16		8／29
第3回	6／7		7／11		8／18	10／12

第15表 使用用土の成分組成（mg／乾土100g）

No	NO ₃ -N	NH ₄ -N	P ₂ O ₅	CaO	K ₂ O	MgO	pH	EC
1	75.0	0.3	8.7	322	150	147	5.7	0.92
2	10.3	1.2	78.0	403	120	141	6.2	0.42
3	7.0	15.0	78.0	380	101	114	6.5	0.27

注. EC の単位は ms / cm

第16表 組織培養苗と実生苗の生育比較（月／日）

調査項目	単位	鉢上げ時4／7		鉢替時6／16		定植時8／29		開花時1／5	
		培養	実生	培養	実生	培養	実生	培養	実生
主芽数	個	6.8	1.0	7.6	1	7.1	1	7.2	1
側芽数	個	0	0	8.5	3.1	36.6	23.3	66.8	30.4
総芽数	個	6.8	1	16.1	3.1	43.7	28.3	74.0	31.4
葉数	枚	18.3	5.3	45.1	36.7	112.3	82.1	172.5	122.5
葉重	g	5.4	2.3	32.7	42.9	164.0	165.7	315.2	203.2
花らい数	本	0	0	5.7	2.0	96.3	74.5	121.4	87.1
塊茎重	g	2.2	1.1	19.4	9.4	23.3	18.2	59.0	46.6
根数	本	7.2	9.2	38.0	36.8	69.2	67.9	124.3	85.4
根重	g	3.0	4.8	17.4	22.5	48.1	79.3	97.7	98.3

注1. 調査個体は各10株、芽の数は未完成芽を含み、葉数は未展開葉を含む、花らい数はがく片形成以上

2. 培養苗は第2回（3月7日）馴化、実生苗は10月5日播種、供試品種ショパン

生育量の調査には第2回馴化（3/7）株を供し、対照には10月5日播きの株をそれぞれ10株用いた。培養株は芽数の多いことに特徴があり、総芽数は全生育期間を通じ実生株より多く、特に開花時期には実生株が30芽であるのに、その約2倍の70芽以上であった。葉数、花らい数も実生株より全生育期間を通じ多く、生育後半にその差は大きくなって、開花時には実生株の140%に達した。葉は8月までの生育前半は実生株と差が少なく、開花期に入ると培養株の方が重く、155%になった。根数は8月までは実生株

と差が少なく、開花期には培養株の方が多くなった。根重は実生株の方が重く、特に8月に差が大きかった。しかし開花期に入るとどちらも約98gで差がなくなり、細根が多発していることを表わしている（第16表）。

6回分割増殖後、第3回目に馴化した株の開花状況を写真5に示した。一種子に由来する培養株は花色が揃い、葉斑も揃っていた。その開花状況をみるため2株並べて写真6に示した。

実生株と培養株の生育期間を比較すると、実生株は昭和62年10月5日に播種で63年12月開花

第17表 馴化後の成株率

馴化回数	馴化始め	分割回数	馴化苗数	開花株数	開花株率%
第1回	9月7日	1	241	24	10
		1	114	76	67
第2回	3月7日	2	15	13	87
		3	25	23	92
		4	13	13	100
		5	45	43	96
第3回	6月7日	6	47	46	98

なので約14カ月の生育期間となる。一方培養苗は出芽した塊茎織片を発根培地に移植した時を起点とすると発根するまでに60日（2ヵ月）、3月7日に馴化に出したとき開花は12月で馴化から出荷まで約9ヵ月を要し、合計11ヵ月の生育期間となる。苗購入者にとっては実質9ヵ月となり、培養苗は実生苗よりも生育期間を短縮できると言える。

2) 葉身、葉柄、根由来増殖苗の栽培

発根培地に含まれる NAA 濃度別開花株率は、NAA 0.02及び0.2mg/ℓ 添加培地で60%、NAA 2.0mg/ℓ 添加培地で58%とほとんど差がなかった。組織別開花株率は葉柄70%、葉身50%、根33%で、葉柄の開花株率が高かった（第18表）。

また塊茎組織由来の株も含めて、どの組織由来の株でも同一種子を出発材料とした株は花色、葉班が揃って、変異の発生は認められなかった。したがってクローン増殖技術として実用化を図れるものと思われる。

第18表 葉身、葉柄、根組織由来培養苗の開花株率

由来組織	N A A 0		N A A 0.02		N A A 0.2		N A A 2.0		組 織 別 計	
	馴化数	開花株率%	馴化数	開花株率%	馴化数	開花株率%	馴化数	開花株率%	馴化数	開花株率%
葉 身	—	—	1	100	7	43	8	50	16	50
葉 柄	—	—	2	100	6	83	22	64	30	70
根	2	50	2	0	2	50	3	33	9	33
培地別計	2	50	5	60	15	60	33	58	55	58

V 総合考察

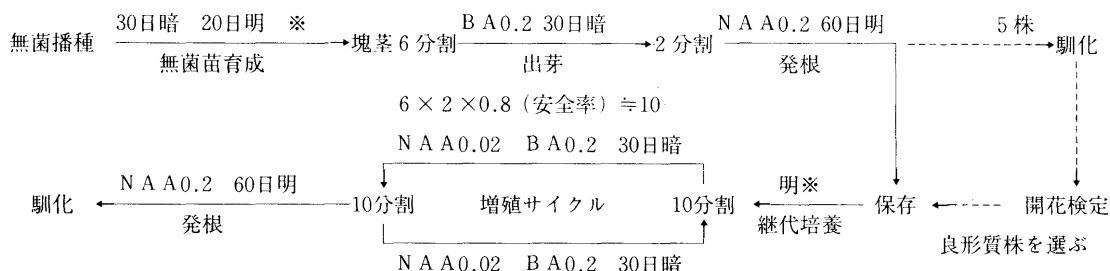
シクラメンの組織培養は世界各国で色々試みられているが、安定して大量に生産できる技術はまだ開発されていない。この理由としては次のような点があげられる。①組織内に内生菌が共生しており、培養できる組織部位が限られている。②組織から不定芽を誘導することもできても、生長点が不定芽の元に有るため、塊茎を付けた状態で発根させ苗をつくらなければならない。

内生菌回避のためには花卉や黄化葉柄の培養が試みられている。また、つぼみ内には内生菌が分布していないことに着目してつぼみ内組織である葯の培養も試みられている。しかし、これらの組織は塊茎組織に比べて器官分化が一般に難しいのが現状である。開花株の葉身、葉柄、花柄なども培養できるが安定して無菌化できない。

そこで本研究では内生菌回避のために種子を表面殺菌して無菌の苗を作り、これらの組織を利用しようと考えた。まず無菌の実生苗を作出するために殺菌種子を播種した。447粒播種して無菌化出来なかった種子は0.9%と少なく、播種した種子のうち94%が試験材料として使用できる実生苗に生育し、本試験で用いた Anderson の殺菌法は無菌実生を得るのに適していた。

各組織（葉身、葉柄、塊茎）の培養条件を検討し、それぞれの組織に適した培養法を明らかにした。無菌実生苗を第3葉展開まで養成した

シクラメンの組織培養による大量増殖



第4図 シクラメンの組織培養による増殖法の手順模式図

注. ※印は植調物質を含まず

後、部位別に分割培養し、出芽した組織に平均2本の芽を付けて切り分け1株とすると、1つの実生苗から232個の出芽組織を作出できる。この増殖率はクローン植物養成の増殖率として低い。そこで、高率の増殖率をはかるため、肥大組織片から出芽した芽をすべて切り落とし、分割と出芽を繰り返した。この操作が可能であれば、増殖率は急激に高くすることが期待できるが、塊茎組織を用いた場合には6回分割増殖で出芽率が63%に低下し、葉身、葉柄、根組織では3回分割増殖でそれぞれ12%、41%、0%に下がった。このことから、培養組織片の分割による増殖には限界があるが、塊茎組織を用いた増殖が他の組織よりも、有利なことは明らかである。

塊茎組織を用いた増殖法を模式図にして第4図に示したが、無菌接種して約50日で無菌苗ができ、塊茎を6分割して置床すると約30日で出芽する。これに芽を付けたままで2分割して発根培地に移植すると約60日で発根する。安全率を80%とみると10株の苗になる。これらの実生苗の形質は不明であるため開花検定に半分の5株を馴化、栽培して、開花した時点で良質株を選抜する。残りの5株は培養容器内で継代培養

して維持しておき、選抜株と同じクローンの維持株の塊茎を分割、置床して増殖に入る。保存株からの増殖率を試算すると、培養維持している5株の塊茎を10分割して培養すると30日毎に10倍になり1回目に50株、同じようにして2回目で10分割すると500株、3回目で5,000株、4回目で50,000株、5回目で500,000株になる、5回目での出芽率を60%、発根率を60%（第8表、第6代増殖）とみると $500,000 \times 0.6 \times 0.6 = 180,000$ 苗が得られる。この増殖に要する期間は増殖サイクルに $30日 \times 5 \text{ (回)} = 150日$ 、発根に60日で計210日である。塊茎組織は30日で10分割するまでに生育肥大すると考えられる。第13表をみると塊茎組織の重量は30日で品種ショパンでは64倍になり品種あけぼのでは21倍になることが明らかであり、30日毎の10分割増殖が十分に可能であることを示している。

この試験で得られた組織培養苗の大きな特徴の一つとして実生苗に比べて馴化の時点で芽の数が6.8個と多いことがあげられる。このため葉数及び花らい数が全生育期間を通じて実生株より多く、短期間に大鉢に仕上げることができる。6月に馴化に出して12月に開花になるが、7号鉢に仕上げ12月に開花するには生育量が若

干不足なので、馴化期を早めて4月～5月に出すのが良いと考えられる。4月馴化を考えると発根に60日、18,000株の出荷では増殖サイクルに30日×4回＝120日、計180日（6ヵ月）要するので前年の10月に増殖開始となり、実生株栽培の播種期と一致させられる。さらに冬期の暖房を全く要せず栽培可能となり、有利性が認められる。

また培養株は花色、葉斑などの遺伝的形質が揃っているので出荷時の商品価値は高まり、栽培の面では栽培期間の短縮により投下労力も低減され、形質の均一性からみて栽培法が平準化されるものと思われる。

Ⅵ 摘 要

種子を殺菌、培養して無菌の苗を作出し葉身、葉柄、塊茎、根組織からの増殖法を検討した。

1. 447粒の種子を殺菌、培養して、94%の正常な無菌実生苗を作出し、増殖試験に供試した。

2. 無菌実生苗の葉身、葉柄、塊茎、根組織から出芽させるのに適した培養法を見いだした。出芽肥大した各組織を繰り返して分割、培養し、葉身、葉柄、根組織では3回目の分割増殖で出芽が急激に低下することがわかった。塊茎組織を利用した増殖法が最も増殖効率が良く、分割を繰り返しながら増殖すると、7ヵ月で約18万株に増殖できると試算された。

3. これらの出芽組織片を発根させ培養苗を育成し、馴化、栽培して開花させた。開花株の花色、葉斑はどの組織由来の株でも、均一に揃っていた。

4. 組織培養株は芽の数が多く、葉数、花らい数も実生株より多かった。

本研究を行うにあたり、農業試験場生物工学部の方々に有益な御助言を賜った。ここに記して厚く感謝の意を表する次第である。

引用文献

1. Anderson, R. G. and R. E. Widmer (1975) J. Amer. Soc. Hort. Sci 100(6) : 597-601
2. 安藤敏夫・村崎公明 (1983) 千葉大園学報 32 : 1-5
3. Geier, T. (1977) Acta Horticulturae 78 : 167-174
4. Geier, T. (1978) Z. Pflanzenphysiol. Bd. 90 s 245-256
5. 狩野邦夫・佐藤義機 (1967) 農及園 42 (10) : 1526-1528
6. 木嶋利夫 (1987) 栃木農試研報 34 : 1-175
7. Loewenberg, J. R. (1969) Canadian J. Botany 47 : 2065-2067
8. Meyer, L. (1956) Planta 53 : 293-317
9. 三浦泰昌ら (1986) 神奈川農総研生物工学試験成績書 : 11-18
10. Murashige, T. and F. Skoog (1962) Physiol. Plant 15 : 473-497
11. 中山昌明 (1983) 信州大学農学部紀要 20 (1) 9-82
12. Okumoto, H. and S. Takabayasi (1968) J. Japan. Soc. Hor. Sci. 38(2) : 68-77
13. 大橋一夫・土沢美津留・峯岸長利・米内貞夫 (1987) 園学要旨昭62春(花き) : 420-421
14. 大橋一夫 (1988) 園学要旨昭63春(花き) : 398-399
15. 大橋一夫・峯岸長利・米内貞夫 (1989) 園学雑58別1 (花き) : 434-435
16. 大越一雄 (1985) 昭60花き試験成績概要 (千葉県) : 23-26
17. Stichel, E. (1959) Planta 53 : 293-317
18. Wellensiek, S. J. (1965) Euphytica 14 : 237-238

シクラメンの組織培養による大量増殖

In vitro mass propagation of *Cyclamen persicum* Mill.

(1) Mass propagation with seedling tissues.

Kazuo Ohashi , Nagatoshi Minegishi , Mitsuru Komatsuda and Sadao Yonai

Summary

Surface disinfected seeds of *Cyclamen persicum* Mill. cv Syopan×Soft lira eye F₁, Syopan and Akebono were germinated aseptically. Frequency of successful growth to normal seedlings was 94% .

The seedlings were then dissected, and leaf blade sections, petiole sections, tuber blocks and root sections were cultured *In vitro*. Culture methods for each tissue were examined, and it became clear that tuber tissues were the most efficient explants for mass propagation of *Cyclamen* as the following. Tuber tissues of the seedlings divided into six pieces, cultured on shoot differentiation medium containing 1/3 MS salt, MS vitamins, 3% sucrose, 0.3% gerlite, 0.02mg/1 NAA, 0.2mg/1 BA at pH 5.6, and incubated in the dark. Proliferated tuber cultures were subdivided into 6 pieces (or about 10 pieces at following 4 times) and sub-cultured at the same medium. Subsequently, tuber tissues with produced shoots were transferred to the root differentiation medium the same composition as shoot differentiation medium but containing only 0.2mg/1 NAA under the light. The efficiency of the production of nursery plants was calculated at 180,000 from one seedling in 7 months.

The nursery plants were acclimated and grown ordinary method. Flower colour and leaf blade marking were uniform among plants propagated from any tissues of one seedling. The plants propagated by this method produced a large number of buds, leaf blades, and flower buds than the plants developed from seedlings.

〔 Bull. Tohigi Agr.
Exp. Stn. No.36 : 93~108 〕

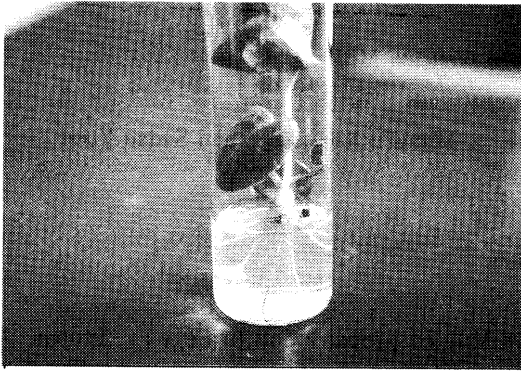


写真1 無菌実生苗（品種ショパン）

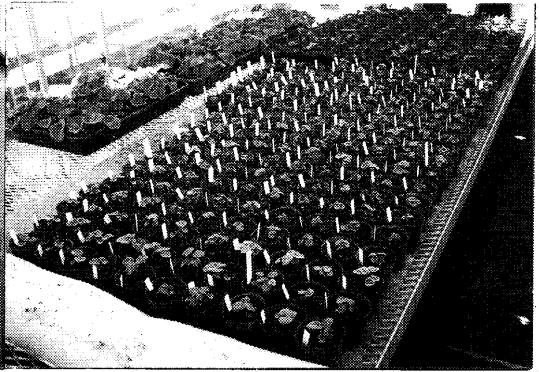


写真4 馴化（第6代増殖）



写真2 塊茎組織からの出芽（初代増殖）



写真5 開花（第6代増殖）

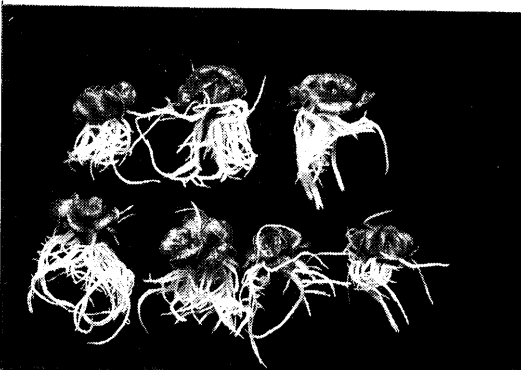


写真3 馴化苗（初代増殖）

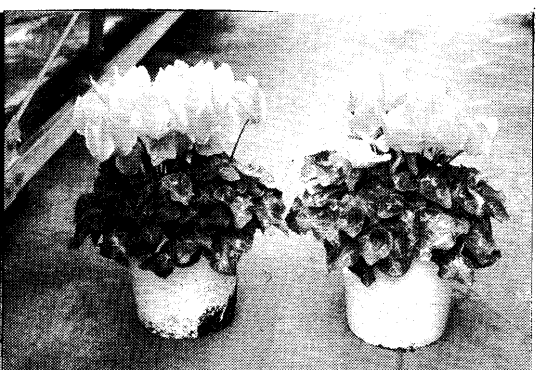


写真6 開花株（第6代増殖）