

シクラメンの組織培養による大量増殖

第3報 不定胚利用による増殖

大橋一夫・和久井隆・米内貞夫

I 緒言

前報までに塊茎組織の分割による増殖について報告した。塊茎分割による増殖は塊茎の分割作業を繰り返し、最終的に発根させて馴化苗とするがこの過程で手間がかかる。より効率的な増殖法として不定胚を利用した増殖法があり、商業ベースで大量の苗を低価格で短期間に生産するには適していると考えられる。

1958年、Steward⁹⁾らはニンジン⁹⁾の培養で最初に不定胚分化の現象を観察している。その後、この分野の研究が進むにつれて不定胚を誘導できる植物の種類も多くなってきている。1987年、池田ら¹⁾は葉片からの不定胚を利用することによりウドを増殖できることを示し、現在では増殖苗が販売されようとしている。

最近、シクラメンにおいても不定胚を利用した増殖法の研究が進んできている。不定胚を利用した増殖の利点として短期間で大量に増殖できることに加えて、実生と同じ形態の幼植物が得られ従来の実生の栽培体系に導入しやすい点が挙げられる。シクラメンの不定胚はMorel⁵⁾およびFersingら⁴⁾の研究に始まる。彼らは培養により不定胚に類似した形態の組織を観察している。その後1984年にWicartら¹¹⁾は葉身、葉柄、子房を培養し不定胚を得て、実生との組織学的比較を行って不定胚から生育した幼植物が実生からの幼植物と非常に似ていることを確認している。また1992年にKiviharjuら³⁾は葯および子房から不定胚を誘導して増殖を行っている。国内では1989年に島田ら⁸⁾が葉身を用いて不定胚系で増殖できることを示しており、同じ年に石

坂ら²⁾はシクラメンと野性種の種間雑種個体でできた不定胚から雑種を増殖している。また同じ年に大谷ら⁷⁾は葉片より誘導したembryogenicなカルスからプロトプラストを単離、培養し不定胚を経て植物体を得ている。

筆者らは不定胚利用による増殖法を検討し、根の組織を利用したときに効率的に増殖できることを明らかにしたのでその詳細を報告する。

II 利用組織の検討

不定胚を誘導できる組織を検索する。

1. 試験方法

置床材料として品種ショパンNo12のつぼみ内組織(花柱、子房壁、花卉、葯、胎座)および同系統の培養株の組織(葉身、葉柄、塊茎、根)を用い、MS、ショ糖6%、pH5.6、ゲルライト0.2%を基本組成とし、2,4-D1.0および2,4-D1.0、BA0.1mg/ℓを添加した2種類の培地に置床した。置床30日後にカルス形成数および肥大組織片数を調査し、同一組成で植調物質無添加の培地に移植した。培養はすべて25℃、暗黒下で行った。カルス移植27日後に幼植物形成数を調査した。

2. 結果および考察

胎座および根に軟らかなカルスの形成がみられ、根を2,4-D1.0、BA0.1mg/ℓの培地に置床したときにのみ不定胚が形成し、19個(置床数に対し95%)の幼植物を形成した。つまり、根組織⇨軟カルス⇨不定胚⇨幼植物の流れである。置床した根組織は置床15日目頃から切断面よりカルス化し、しだいに根全体がカルス化してきた。誘導したカルスは無色透明であり、ピンセ

第1表 培養部位別のカルス化及び不定胚形成

培養部位	培地 mg/ℓ		置床数	カルス形成数		肥大組 織片数	不定胚系 幼植物形 成数(%)
	2,4-D	BA		軟カルス	硬カルス		
花柱	1.0	—	18	0	0	0	0(0)
	1.0	0.1	18	0	0	13	0(0)
子房壁	1.0	—	16	0	0	0	0(0)
	1.0	0.1	17	0	0	15	0(0)
花弁	1.0	—	16	0	0	0	0(0)
	1.0	0.1	16	0	0	2	0(0)
葯	1.0	—	18	0	0	0	0(0)
	1.0	0.1	17	0	0	3	0(0)
胎座	1.0	—	16	16	0	0	0(0)
	1.0	0.1	17	17	0	0	0(0)
葉身	1.0	—	20	0	2	0	0(0)
	1.0	0.1	20	0	0	20	0(0)
葉柄	1.0	—	20	0	0	0	0(0)
	1.0	0.1	20	0	0	20	0(0)
塊茎	1.0	—	20	0	0	0	0(0)
	1.0	0.1	20	0	16	0	0(0)
根	1.0	—	20	20	0	0	0(0)
	1.0	0.1	20	20	0	0	19(95)

ットでかく崩れる程度の軟らかさであり、特に2,4-D 単独の培地ではより軟らかい。これらの軟カルスは水分を多く含んでいる状態である。移植後カルスはやや黒変しカルス表面に幼植物を形成した。葉身、塊茎からは硬いカルスを形成したが、幼植物を形成しなかった(第1表)。

以上のことから、根の組織を利用すれば不定胚經由で幼植物が得られることを確認した。

Ⅲ 根組織の効率的培養法の検討

前試験で幼植物の得られた根組織を用いて、さらに効率の高い培養法を検討する。

1. 試験方法

(1) 無機塩濃度、培養温度および移植時期の検討

品種ショパンNo12の培養株の根を1~2mmに切断し、MS無機塩(ゲルライト0.2%)、1/3MS無機塩(ゲルライト0.3%)を基本組成とし、それぞれに2,4-D1.0, BA0.1mg/ℓ, ショ糖6%を加えpH5.6とした2種類の培地を用い、20℃および25℃の暗黒下で培養した。培養物を14, 21, 28および35日後に同じMSおよび1/3MSの植調物質無添加培地に移植し、その後28日目に幼植物形成数を調査した。

(2) ショ糖濃度の検討

品種ショパンNo12の根を1~2mmに切断し、90mm径シャーレに1箇所10~20切片をまとめて計9箇所置床した。用いた培地は、MS無機塩、2,4-D 1.0, BA0.1mg/ℓ, ゲルライト0.2%にショ糖濃度3, 6, 9, 12および15%を加えpH5.6に調整した5種の培地である。形成したカルスを30日後に植調物質無添加で同じショ糖濃度のMS培地に移植し、その後28日目に幼植物形成数を調査した。培養はすべて25℃, 暗黒下で行った。

(3) 植調物質の種類と濃度の検討

品種ショパンNo10, No12の根を1~2mmに切断し、MS, ショ糖9%で植調物質の種類と濃度の異なる10種の培地(第3表)で培養した。誘導されたカルスを植調物質無添加の同じ基本組成のMS培地に移植し、25℃, 暗黒下で培養した。根を置床し32日後にカルス形成数を調査し、カルス移植27日目に幼植物形成数を調査した。

2. 結果および考察

(1) 無機塩濃度、培養温度および移植時期の検討

MS培地を用い、25℃培養で28日後に移植したとき最も分化率が高く、18片置床に対し21個(117%)の幼植物を形成した(第2表)。前報

シクラメンの組織培養による増殖

第2表 不定胚系幼植物形成に及ぼす無機塩濃度、培養温度及び移植時期の影響

無機塩濃度	培養温度	移植時期 日	置床数	不定胚系幼植物形成数 (%)
1/3M S	20℃	14	18	0(0)
		21	18	0(0)
		28	18	0(0)
	25℃	35	18	0(0)
		14	18	0(0)
		21	18	0(0)
		28	18	0(0)
		35	18	2(11)
		35	18	2(11)
M S	20℃	14	18	0(0)
		21	18	1(6)
		28	18	2(11)
		35	18	10(56)
	25℃	14	18	1(6)
		21	18	10(56)
		28	18	21(117)
		35	18	17(94)
		35	18	17(94)

の塊茎分割の増殖では1/3MS無機塩がM S 無機塩よりも優っていたが、不定胚の形成にはM S 無機塩が適していることが明らかになった。

(2) ショ糖濃度の検討

ショ糖濃度9%のとき最も高い不定胚の分化を示し、置床カルス33に対し69個(209%)の幼植物を形成した(第3表)。

(3) 植調物質の種類と濃度の検討

ショパンNo10は第4培地で(2,4-D 1.0, B A 0.01mg/l), ショパンNo12は第5培地(2,4-D 1.0, B A 0.1mg/l)で最も高い率で幼植物を形成し、それぞれ29個(161%), 34個(189%)であった。同じショパンの2品種でも適したB A濃度に違いがある。幼植物の形成には2,4-D が効果を示し、N A AはショパンNo12を第7培地に置床したとき、置床した根組織に対し

第3表 不定胚系幼植物形成に及ぼすショ糖濃度の影響

ショ糖濃度	置床カルス数	植物分化数 (%)
3%	28	4(14)
6%	35	43(123)
9%	33	69(209)
12%	25	10(40)
15%	23	8(35)

て72%の幼植物が形成されただけであった。またB A添加の効果は高く、2,4-D およびN A A単独の培地では全く幼植物を形成しなかった。2,4-D濃度でみると1.0mg/l添加が、5.0mg/l添加よりも高い幼植物形成数であった(第4表)。

以上の結果から品種ショパンではM S基本組成、ショ糖9%, 2,4-D 1.0, B A 0.01~0.1mg/lの培地でカルスを誘導し、28日後に同培地の植調物質フリーの培地に移植すれば28日後に最大の幼植物が得られることがわかった。

IV 不定胚、幼植物形成に及ぼす品種、系統(遺伝的形質)の影響

前試験において品種ショパンのNo10およびNo12での幼植物形成に差があったので、品種、系統による不定胚および幼植物形成の違いを検討する。

1. 試験方法

M S基本組成に2,4-D 1.0, 3.0, 5.0mg/l, B A 0.1mg/l, ショ糖9%, ゲルライト0.2%を添加しpH5.6に調製した3種培地を用いて7品種、14系統の根を置床し25℃の暗黒下で培養し

第4表 根からの不定胚系幼植物形成に及ぼす植調物質の種類および濃度の影響

培地No	植調物質濃度 mg/l			ショパンNo10			ショパンNo12		
	N A A	2,4-D	B A	置床数	カルス形成数	幼植物数(%)	置床数	カルス形成数	幼植物数(%)
1	1.0	—	—	18	4	0(0)	18	5	0(0)
2	1.0	—	0.1	18	4	0(0)	18	11	0(0)
3	—	1.0	—	18	16	0(0)	18	13	0(0)
4	—	1.0	0.01	18	18	29(161)	18	18	9(50)
5	—	1.0	0.1	18	18	9(50)	18	18	34(189)
6	5.0	—	—	18	15	0(0)	18	16	0(0)
7	5.0	—	0.5	18	18	0(0)	18	18	13(72)
8	—	5.0	—	18	15	0(0)	18	18	0(0)
9	—	5.0	0.05	18	18	5(28)	18	18	5(28)
10	—	5.0	0.5	18	18	2(11)	18	18	6(33)

た。置床31日目にカルス化程度を調査後、形成したカルスをMS組成、ショ糖9%、植調物質フリーの培地に移植し、25℃暗黒で培養した。移植21日目に不定胚形成数を調査し、形成した不定胚を1/3MS無機塩、MSビタミン、ショ糖3%、植調物質フリー、ゲルライト0.3%、pH5.6の培地に置床後、20℃の暗黒下で培養し、12日目に幼植物形成数を調査した。

2. 結果および考察

ショパン3系統およびシューベルトでは2,4-D濃度が高くなるとともに、カルスの生育は劣り、1.0mg/lの培地でのカルス化が最も良好で、置床した根がすべて10mm以上のカルスに生育した。あけぼのは3濃度とも置床した根が10mm以上のカルスに生育した。バツハでは2,4-D 1.0mg/lの1個のみ9.9mm未満であるが他はいずれとも10mm以上のカルスを形成した。F₁ローズピンクでは2,4-D濃度が高くなるとともに10mm以上のカルスが少なくなった。黄色-16Tでは3種培地とも全くカルスを形成しなかった。ビクトリアでは一部を除いて総じて10mm以上のカルスを形成し、2,4-D 1.0mg/lの培地で形成したカルスは硬い粒状のカルスであった(第5表)。

不定胚形成は、ショパン3系統では2,4-D 3.0mg/lの培地が高く、1カルス当たりの平均数で見るとNo2、No10、No12でそれぞれ1.2、10.6、14.2個であった。あけぼの2では2,4-D 5.0mg/lの培地でのみ不定胚を形成し、1カルス当たり5.1個であった。シューベルトはどの培地でも不定胚を形成しなかった。バツハ2は2,4-Dの濃度が高くなるとともに不定胚の形成は多くなり、特に5.0mg/lで多く、1カルス当たり35.0個であった。F₁ローズピンクの不定胚形成は供試品種系統のなかで最も多く、特に2,4-D 3.0mg/lの培地で1カルス当たり121.0個の不定胚を形成した。ビクトリアの系統は総じて不定胚の形成が少ないが、その中でNo10の不定胚形成がやや高く、2,4-D 5.0mg/lの培地で1カルス

当たり不定胚形成数8.3個を示した。黄色-16は全く不定胚を形成しなかった(第6表)。

幼植物形成についてはショパン3系統中No12で多く2,4-D 1.0mg/lの濃度で84.2%で最大であった。あけぼのでは2,4-D 5.0mg/lの培地で幼植物形成率10.9%を示した。バツハ2、F₁ローズピンクでは幼植物形成率は2,4-D濃度の低いほど高く2,4-D 1.0mg/lの培地でそれぞれ最大値34.8%、41.8%であった。ビクトリアでは2,4-D 5.0mg/lの培地での幼植物形成が多く、No10で最大値11.0個を示した(第7表)。

以上のことからカルス形成には2,4-D濃度の影響は比較的少ないが、相対的には低い方がよく、不定胚形成は高い方が、幼植物形成は低い方がよい。多くの幼植物を得るのが目的であるので幼植物形成数で見ると2,4-D 3.0、5.0mg/lがそれぞれ計で1596、1565個であり高い。品種、系統による差は大きい総じてパステル系の品種は2,4-D 3.0mg/lが、ビクトリアは2,4-D 5.0mg/lが適していると考えられる。

V 誘導された不定胚の形状と幼植物形成能の関係

不定胚形成能の高い品種F₁ローズピンクを用いて、さらに効率的な培養法を検討するために、不定胚の形状を調査し、幼植物に生育しやすい不定胚の形状を検討する。

1. 試験方法

F₁ローズピンクの無菌培養個体の根を1~2mmに切断し、約10~20片を1塊としてMSおよびN6培地のショ糖をそれぞれ6、9%加えた4種の培地を設け、固化剤としてゲルライトをMS培地には0.2%、N6培地には0.25%を用い、植調物質として2,4-Dを3.0mg/l、BAを0.1mg/l添加した培地に置床した。なおpHは5.6とした。25℃暗黒下でカルスを誘導し、置床39日目に形成したカルスをそれぞれ植調物質フリーの培地に移植し同じ環境で培養した。移植15

シクラメンの組織培養による増殖

第5表 2,4-D濃度が品種および系統のカルス形成におよぼす影響

2,4-D濃度 品種及び系統	1.0mg/ℓ			3.0mg/ℓ			5.0mg/ℓ		
	置床数	9.9mm未満	10mm以上	置床数	9.9mm未満	10mm以上	置床数	9.9mm未満	10mm以上
ショパン10	9	—	9	9	3	6	9	1	8
〃 12	9	—	9	9	9	—	9	3	5
〃 2	9	—	9	9	2	6	9	5	4
あけぼの2	9	—	9	9	—	9	9	—	9
シュベルト1	9	—	9	9	2	6	9	5	4
バッハ2	9	—	8	9	—	9	9	—	9
F ₁ ローズピンク2	9	—	9	9	—	1	8	—	2
黄色-16	9	9	—	9	9	—	9	9	—
ビクトリア1	9	—	9	9	—	9	9	—	9
〃 3	9	—	9	9	—	9	9	—	1
〃 7	9	—	9	9	—	9	9	—	9
〃 10	9	—	9	9	—	9	9	—	9
〃 23	9	—	9	9	—	1	8	—	9
〃 26	9	—	9	9	—	9	9	—	9

第6表 2,4-D濃度が品種および系統の不定胚形成におよぼす影響

初代 2,4-D濃度 品種及び系統	1.0mg/ℓ			3.0mg/ℓ			5.0mg/ℓ		
	置床数	不定胚 形成数	1カルス当たり 不定胚形成数	置床数	不定胚 形成数	1カルス当たり 不定胚形成数	置床数	不定胚 形成数	1カルス当たり 不定胚形成数
ショパン10	9	0	0	9	95	10.6	9	52	5.8
〃 12	9	19	2.1	9	128	14.2	9	86	9.6
〃 2	9	0	0	9	11	1.2	9	0	0
あけぼの2	9	0	0	9	0	0	9	46	5.1
シュベルト1	9	0	0	9	0	0	9	0	0
バッハ2	9	138	15.3	9	225	25.0	9	315	35.0
F ₁ ローズピンク2	9	325	36.1	9	1089	121.0	9	965	107.2
黄色-16	9	0	0	9	0	0	9	0	0
ビクトリア1	9	0	0	9	0	0	9	0	0
〃 3	9	0	0	9	0	0	9	8	0.9
〃 7	9	0	0	9	0	0	9	10	1.1
〃 10	9	0	0	9	48	5.3	9	75	8.3
〃 23	9	0	0	9	0	0	9	2	0.2
〃 26	9	0	0	9	0	0	9	6	0.7

第7表 2,4-D濃度が品種および系統の幼植物形成におよぼす影響

初代 2,4-D濃度 品種及び系統	1.0mg/ℓ		3.0mg/ℓ		5.0mg/ℓ	
	置床数	幼植物 形成数 (%)	置床数	幼植物 形成数 (%)	置床数	幼植物 形成数 (%)
ショパン10	—	—	95	24 (25.3)	52	10 (19.2)
〃 12	19	16 (84.2)	128	44 (34.4)	86	18 (20.9)
〃 2	—	—	11	2 (18.2)	—	—
あけぼの2	—	—	—	—	46	5 (10.9)
シュベルト1	—	—	—	—	—	—
バッハ2	138	48 (34.8)	225	56 (24.9)	315	60 (19.0)
F ₁ ローズピンク2	325	136 (41.8)	1089	305 (28.0)	965	204 (21.1)
黄色-16	—	—	—	—	—	—
ビクトリア1	—	—	—	—	—	—
〃 3	—	—	—	—	8	1 (12.5)
〃 7	—	—	—	—	10	2 (20.0)
〃 10	—	—	48	12 (25.0)	75	11 (14.7)
〃 23	—	—	—	—	2	0 (0.0)
〃 26	—	—	—	—	6	3 (50.0)

第8表 カルス誘導培地での無機塩組成、シヨ糖濃度の不定胚形成に及ぼす影響

培地No	無機塩 組成	シヨ糖 濃度	2,4-D mg/ℓ	BA mg/ℓ	置床数	芽を持った 不定胚の形成数	1カルス当たり芽を持った 不定胚の形成数
1	MS	9%	3.0	0.1	18	825	45.8
2	〃	6%	〃	〃	18	585	32.5
3	N6	9%	〃	〃	18	395	21.9
4	〃	6%	〃	〃	18	58	3.2

日目に芽を分化した不定胚の形成数を調査した。根の置床数は各区とも18である。

F₁ローズピンクの無菌培養個体の根を切断し、MS, ショ糖9%, 2,4-D 3.0, BA 0.1mg/l, pH5.6, ゲルライト0.2%の培地に置床し25℃暗黒下でカルスを誘導し、置床37日目に形成したカルスをまったく同じ組成の植調物質フリーの培地に移植し、同様の25℃暗黒下で培養した。移植21日目に形成した不定胚の形状別個数を調査した。形成した不定胚を1/3MS, ショ糖3%, 植調物質フリー, pH5.6, ゲルライト0.3%の培地に移植後、20℃暗黒で15日間培養し、正常幼植物形成数を調査した。不定胚数は36個のカルスに形成した数である。

前試験で形成した不定胚の一部を1/3MS, ショ糖3%, 植調物質フリー, pH5.6を基本組成としてゲルライト濃度が0.3%, 0.6%の2種の培地に不定胚の形状により芽を分化した胚(胚の一方が尖った芽になっている), 楕円形胚(ラクビーボールの様に楕円形をしている), 球状胚(球形をした胚), 不定形胚(球形が歪み表面に凹凸のある胚)に分けて移植した。培養は20℃暗黒下で行い、移植15日目に幼植物形成数を調査した。

2. 結果および考察

カルス誘導培地での無機塩組成, ショ糖濃度を検討した結果、MS培地では平均39.2個、N6培地では12.6個の不定胚を形成し、MS無機塩組成が適していることを示した。またショ糖濃度の差ではMS, N6とも6%より9%の方が高率を示し、とくにMS, ショ糖9%の培地を用いたとき芽を分化した不定胚の形成数が最大で、1カルス当たり45.8個であった(第8表)。今まで用いていた培地が最良であり改善は加えられなかった。

MS, ショ糖9%の培地を用いたときの形状別不定胚の個数を調査すると、芽を分化した不定胚は47.8個、楕円形不定胚は16.1個、球状不

定胚は47.4個、不定形胚は73.5個であった。芽を分化した不定胚はカルスの表面に多く、不定形胚はカルスの内部に多かった(第9表)。

ゲルライト濃度0.3%, 0.6%の幼植物形成培地を用いて不定胚の形状別に不定胚の生育を調査した。芽を分化した不定胚では、正常幼植物数はゲルライト0.3%で多く、置床不定胚の53.2%であった。楕円形胚ではゲルライト0.3%が15.2%, ゲルライト0.6%で16.4%とほぼ同じであった。球状胚ではゲルライト0.3%は11.2%, ゲルライト0.6%で8.4%でありゲルライト0.3%で多かった。不定形胚ではゲルライト0.3%は4.8%, ゲルライト0.6%では7.6%でありゲルライト0.6%で多かった。発根のみの個体数、および水浸状の個体数はどの形状の不定胚でもゲルライト0.3%で多かった。未生育数はすべての形状の不定胚でゲルライト0.6%の培地で多かった。ゲルライト0.6%の培地では根の伸長が抑えられ、塊茎部分の肥大も少なく、全体的に小さな幼植物となる傾向があった。不定胚生育培地としてはゲルライト0.6%よりは0.3%が適している。しかし水浸化を抑えるためにはゲルライト濃度を少し高める必要があるように推測された(第10表)。また芽を分化した胚、楕円形胚、球状胚の順に正常幼植物への形成率が異なるのは球状胚楕円形胚芽を分化した胚の順に生育するために、球状胚の移植では現在用いている移植培地が球状胚の生育には不適合なために正常幼植物形成率が下がるとも考えられる。

1枚のシャーレで9個のカルスを培養するので、1枚のシャーレで形成した不定胚を幼植物形成培地(ゲルライト0.3%)に移植するとすると、1つのシャーレで1664個の不定胚を移植し331の正常幼植物が得られることになる。しかし移植する労力を考慮すると、芽を分化した不定胚のみを移植すれば約1/4の労力(1664個に対し430個の移植, 25.9%)で331個に対して229個(69.2%)の正常幼植物が得られる。したがっ

シクラメンの組織培養による増殖

第9表 形成された不定胚の形状別割合

不定胚の形状別種類	形成不定胚数 36カルス	9カルスあたり 不定胚数1シャーレ	1カルスあたり 不定胚数	形状別割合 %
芽を分化した胚	1722	430	47.8	25.9
楕円形胚	580	145	16.1	8.7
球状胚	1706	427	47.4	25.6
不定形胚	2646	662	73.5	39.8

第10表 不定胚から幼植物への生育に及ぼすゲルライト濃度の影響

不定胚の形状	ゲルライト 0.3%					ゲルライト 0.6%				
	置床数	正常幼植 物数(%)	発根のみ 数(%)	水浸数 (%)	未生育数 (%)	置床数	正常幼植 物数(%)	発根のみ 数(%)	水浸数 (%)	未生育数 (%)
芽を分化した胚	250	133(53.2)	43(17.2)	70(28.0)	5(2.0)	250	121(48.4)	25(10.0)	43(17.2)	61(24.4)
楕円形胚	250	38(15.2)	138(55.2)	53(21.2)	21(8.4)	250	41(16.4)	91(36.4)	32(12.8)	86(34.4)
球状胚	250	28(11.2)	151(60.4)	36(14.4)	35(14.0)	250	21(8.4)	82(32.8)	19(7.6)	123(49.2)
不定形胚	250	12(4.8)	146(58.4)	41(16.4)	51(20.4)	250	19(7.6)	115(46.0)	21(8.4)	95(38.0)

て労力まで考えると芽を分化した不定胚だけを利用するのが効率的であると考えられる(第11表)。

VI 品種ビクトリアの培養

品種ビクトリアの培養法を検討する。

1. 試験方法

無菌実生の塊茎分割により増殖した無菌個体の根(ビクトリアNo3, 26)を滅菌水で洗浄し、濾紙で吸水後、2~3mmに切断し、植調物質に2,4-DおよびBAを用い濃度の異なる4種培地(第12表)に置床した。培養は20℃および25℃暗黒下で行い、置床29日目にカルス化程度を調査した。

形成したカルスを置床31日目に同組成の植調物質フリーの培地に移植し、同環境で培養後、移植26日目に不定胚形成数を調査した。

さらに、形成した不定胚をMSおよび1/3MSを用いショ糖濃度をそれぞれ3, 6%を加えて調製した4種培地に移植し不定胚誘導までの同温度、暗黒下で培養し、移植18日目に正常幼植物形成数を調査した(第14表)。

第11表 1シャーレ当たりの幼植物形成数

	不定胚の形状				計
	芽を分化した胚	楕円形胚	球状胚	不定形胚	
1シャーレ当たり不定胚置床数	430	145	427	662	1664
正常幼植物形成率 %	53.2	15.2	11.2	4.8	19.9
1シャーレ当たり正常幼植物形成数	229	22	48	32	331
形成幼植物の割合	69.2	6.6	14.5	9.7	100.0

注. 幼植物形成培地のゲルライト濃度を0.3%とした計算値

再度、前試験で成績の良かった組成のMS, ショ糖9%, 2,4-D 5.0, BA 0.05, pH5.6, ゲルライト0.2%の培地にビクトリアNo3, No26の根を置床後、20℃および25℃暗黒下でカルスを誘導した。

25℃で形成したカルスを根置床29日目に同組成で植調物質フリーの培地に移植し、移植39日目に不定胚形成数および芽を分化した不定胚数を調査した。さらに形成した不定胚を1/3MS, ショ糖3%, pH5.6, ゲルライト0.3%, BAを0.01, 0.1, 1.0mg/l加えた3種の培地に移植

し20℃暗黒下で培養した。培養13日目に生育状況を調査した。

20℃で形成したカルスを根置床29日目にMS, ショ糖9%, pH5.6, ゲルライト0.2%で, TIBA (2,4,5-tri-iodo benzoic acid) を2.5, 5.0, 7.5, 10.0mg/ℓ 添加した培地に移植し, 移植39日目に不定胚形成数, 芽を分化した不定胚数を調査した。芽を分化した不定胚を1/3MS, ショ糖3%, pH5.6, ゲルライト0.4%, 植調物質フリーの培地に移植し20℃暗黒下で15日間培養後, 正常幼植物形成数を調査した。

2. 結果および考察

25℃の培養では供試培地すべてでカルスの形成をみたが20℃では2,4-D 1.0mg/ℓ に対しBA 0.01および0.1mg/ℓ 添加した培地でのNo3系統が供試18に対しそれぞれ4および2個カルス化しなかった。また2,4-D 1.0mg/ℓ に対しBA 0.01および0.1mg/ℓ 添加した培地では20℃, 25℃とも10mm以上のカルスに肥大しなかった。2,4-D を5.0mg/ℓ, BA を0.05および0.5mg/ℓ としたNo3, No4の培地では, すべて10mm以上のカルスを形成し, No3のBA 0.05mg/ℓ 培地で形成したカルスは軟らかで, No4のBA 0.5mg/ℓ 培地で形成したカルスはやや硬いカルスであった(第12表)。

植調物質フリーに継代後の不定胚形成をみると, 初代培地にNo1, No2培地を用いて培養したものは2系統とも20℃, 25℃での培養で全く不定胚を形成しなかった。2,4-D 5.0, BA 0.05

mg/ℓ としたNo3培地では2系統とも不定胚形成数が多く, 25℃では1カルス当たりビクトリアNo3, No26でそれぞれ2.7, 1.4個の不定胚を形成した。20℃ではそれぞれNo3, No26でそれぞれ1.4, 4.0個の不定胚を形成した。2,4-D 5.0, BA 0.5mg/ℓ としたNo4培地では25℃のビクトリアNo3, No26で1カルス当たり不定胚形成数がそれぞれ0.9, 0.2個, 20℃のNo3, No26でそれぞれ0.4, 0.1個と低かった(第13表)。

25℃で形成した不定胚からの正常幼植物形成率は1/3MS, ショ糖6%のNo2培地で最大で, ビクトリアNo3, No26でそれぞれ31.3%, 27.3%であった。20℃でもNo2培地での正常幼植物形成率が高くビクトリアNo3, No26でそれぞれ37.5%および40.7%であった。培養温度で比較すると20℃がすべての区で優っていた(第14表)。No2培地は正常幼植物を形成する率が高く, 供試組成の中では最適とみることができる。しかし根の伸長はNo1培地よりも劣っていた。

芽を分化した不定胚の形成数を調査するために再度行った試験の25℃暗黒の培養ではNo3で1カルス当たり不定胚形成数14.1個であり, No26では12.1個であった。そのうち芽を分化した不定胚は1カルス当たりNo3, No26でそれぞれ4.0, 4.1個であった(第15表)。

不定胚の生育に及ぼすBAの影響をみると, No3, No26ともに芽と根を分化した正常幼植物数はBA 0.01mg/ℓ の培地で24.2%であるが, 濃度が高くなるにつれて少なくなり1.0mg/ℓ で

第12表 ビクトリアの培養における植調物質および温度がカルス化におよぼす影響

系統No	25℃									20℃								
	No 3			No26			No 3			No26								
	培地	置床数	9.9mm未満	10mm以上	置床数	9.9mm未満	10mm以上	置床数	9.9mm未満	10mm以上	置床数	9.9mm未満	10mm以上					
1	1	0.01	18	—	18	—	27	—	27	—	18	4	14	—	27	—	27	—
2	1	0.1	18	—	18	—	27	—	27	—	18	2	16	—	27	—	27	—
3	5	0.05	18	—	—	18	27	—	—	27	18	—	—	18	27	—	—	27
4	5	0.5	18	—	—	18	27	—	—	27	18	—	—	18	27	—	—	27

シクラメンの組織培養による増殖

第13表 ビクトリアの培養における植調物質および温度が不定胚形成におよぼす影響

No	初代培地			25℃						20℃					
	2,4-D	BA	置床数	No 3			No26			No 3			No26		
				不定胚形成数	1カルス胚形成数	1カルス当たり不定胚形成数	置床数	不定胚形成数	1カルス胚形成数	置床数	不定胚形成数	1カルス胚形成数	置床数	不定胚形成数	1カルス胚形成数
1	1	0.01	18	0	0	27	0	0	18	0	0	27	0	0	
2	1	0.1	18	0	0	27	0	0	18	0	0	27	0	0	
3	5	0.05	18	48	2.7	27	38	1.4	18	25	1.4	27	108	4.0	
4	5	0.5	18	16	0.9	27	5	0.2	18	8	0.4	27	3	0.1	

第14表 ビクトリアの培養における培地の無機塩濃度、ショ糖濃度および温度が幼植物形成におよぼす影響

No	培地			25℃				20℃			
	基本組成	ショ糖	置床数	No 3		No26		No 3		No26	
				正常幼植物形成数(%)	置床数	正常幼植物形成数(%)	置床数	正常幼植物形成数(%)	置床数	正常幼植物形成数(%)	
1	1/3M S	3%	16	2(12.5)	11	1(9.1)	8	2(25.0)	27	3(11.1)	
2	〃	6%	16	5(31.3)	11	3(27.3)	8	3(37.5)	27	11(40.7)	
3	M S	3%	16	1(6.3)	11	0(6.3)	8	1(12.5)	27	2(7.4)	
4	〃	6%	16	1(6.3)	11	1(9.1)	8	1(12.5)	27	4(14.8)	

第15表 ビクトリアの培養における形成した不定胚の内、芽を分化した不定胚の割合

系統番号	置床数	不定胚形成数	芽を分化した不定胚数	1カルス当たり不定胚形成数	1カルス当たり芽を分化した不定胚数	芽を分化した不定胚の率(%)
No 3	9	127	36	14.1	4.0	28.3
No26	27	327	110	12.1	4.1	33.6

第16表 ビクトリアの培養における不定胚の生育におよぼす BA の影響

培地組成	No 3 率(%)						No26 率(%)					
	移植不定胚数	芽と根あり	芽のみあり	根のみあり	芽、根ともなし	黒変	移植不定胚数	芽と根あり	芽のみあり	根のみあり	芽、根ともなし	黒変
0.01	33	8(24.2)	2(6.1)	14(42.4)	9(27.3)	0(0.0)	12	1(8.3)	0(0.0)	8(66.7)	3(25.0)	0(0.0)
0.1	33	1(3.0)	3(9.1)	8(24.2)	7(21.2)	12(36.4)	12	0(0.0)	0(0.0)	5(41.7)	3(25.0)	4(33.3)
1.0	33	0(0.0)	2(6.1)	3(9.1)	3(9.1)	25(75.8)	—	—	—	—	—	—

第17表 ビクトリアの培養における不定胚および芽を分化した不定胚の形成におよぼす TIBA の影響

系統番号	カルス移植培地	置床数	不定胚形成数	芽を分化した不定胚数	1カルス当たり不定胚形成数	1カルス当たり芽を分化した不定胚数
No 3	フリー	27	1863	360	69	13.3
No26	フリー	9	721	108	80	12.0
〃	TIBA2.5 mg/ℓ	9	725	88	81	9.7
〃	〃 5.0	9	921	51	102	5.7
〃	〃 7.5	9	1038	25	115	2.8
〃	〃 10.0	9	1215	0	135	0.0

はまったく生育しなかった。また根のみ分化した個体数はB Aの濃度が高くなるにつれて少なくなる傾向があり、芽のみ形成した個体は2～3個でB A濃度の差による影響は認められなかった、以上のことから形成した不定胚の培養にB Aは適していないと考えられる。またB Aは根の形成を抑える働きをもつとみられた。さらにB A濃度が高くなるにつれて黒変して生育停止する不定胚が多くなった(第16表)。

芽を分化した不定胚の形成を調査するために再度行った20℃暗黒での培養では、ビクトリアNo3は1カルス当たり不定胚形成数は69個であり1カルス当たり芽を分化した不定胚形成数は13.3個であった。No26では1カルス当たり不定胚形成数は80個であり、そのうち1カルス当たり芽を分化した不定胚形成数は12.0個であった。TIBAを添加することにより1カルス当たり不定胚形成数は増加したが、1カルス当たり芽を分化した不定胚形成数は減少した(第17表)。

20℃暗黒下での培養における芽を分化した不定胚からの正常幼植物形成率はNo3、No26でそれぞれ24.4%、36.0%であった(第18表)。

以上の結果から、ビクトリアの不定胚利用による増殖には20℃、25℃での培養を総合して考えると、20℃での培養が優っている。MS、シヨ糖9%、2,4-D 5.0、B A 0.05、pH5.6、ゲルライト0.2%の培地に根を細断して置床し、20℃暗黒下で29日間培養してカルスを形成する。形成したカルスをMS、シヨ糖9%、pH5.6、ゲルライト0.2%、植調物質フリーの培地に移植し20℃暗黒下で39日間培養し、形成した不定胚を1/3MS、シヨ糖3～6%、pH5.6、ゲルライト0.3%、植調物質フリー培地に移植することにより15日で幼植物に生育する。

Ⅶ 不定胚の液体培養

液体培養による効率的培養法を検討する。

1. 試験方法

第18表 ビクトリアの培養における芽を分化した不定胚からの幼植物形成

系統	不定胚置床数	正常幼植物形成数(%)
No3	360	88(24.4)
No26	272	98(36.0)

ビクトリアNo3、No26の無菌個体の根を2～3mmに切断し10～20本を一塊としてMSにシヨ糖9%、2,4-D 5.0、B A 0.05mg/ℓ、ゲルライト0.2%を加えてpH5.6に調製した培地に置床後、20℃暗黒下で培養しカルスを誘導した。形成したカルスを29日目に同組成の植調物質フリーの培地に移植し20℃暗黒下で培養した。移植39日目に形成した不定胚を1/3MS、ゲルライト0.3%、pH5.6を基本組成としてシヨ糖濃度6および9%、TIBAを0および1mg/ℓ、B A 0.01、0.1、1.0mg/ℓをそれぞれ組み合わせた12種の培地を100ml容三角フラスコに40ml分注して、フラスコ1本あたり20個移植した。培養は20℃暗黒で80rpmの円振とうとした。培養12日目に芽と根の形成を調査した。

F₁ローズピンクおよびバッハの根を2～3mmに切断し、MS、シヨ糖9%、2,4-D 3.0、B A 0.1mg/ℓ、pH5.6、ゲルライト0.2%の培地に置床後、25℃暗黒下で39日間培養してカルスを誘導し、形成したカルスをカルス誘導培地と同じ組成で植調物質フリーの培地に移植して25℃暗黒下で培養した。18日目に形成した不定胚を液体培養の試験材料とした。1/3MS、シヨ糖3%、pH5.6を基本組成としてTIBA1.0mg/ℓおよびココナツウォーター(CW)の有無を組み合わせた4種の液体培地を100ml三角フラスコに40ml分注した。フラスコ1本にカルス1個分の不定胚をカルスとともに移植し、20℃暗黒下で80rpmの円振とう培養した。各培地ともフラスコ3本を供試した。

前試験同様の不定胚を材料として、1/3MS、シヨ糖3%、pH5.6、植調物質フリーの液体培地

シクラメンの組織培養による増殖

第19表 ビクトリアの液体培養での不定胚からの幼植物形成におよぼす
シヨ糖濃度, TIBA, BAの影響

培地組成 mg/ℓ			No 3				No26			
シヨ糖	TIBA	BA	培養不 定胚数	根のみ あり	芽のみ あり	芽と根 あり	培養不 定胚数	根のみ あり	芽のみ あり	芽と根 あり
6%	0	0.01	20	20	—	—	20	18	—	—
6%	0	0.1	20	8	—	1	20	—	—	—
6%	0	1.0	20	—	—	—	20	—	—	—
6%	1	0.01	20	—	1	—	20	7	—	1
6%	1	0.1	20	—	1	—	20	—	—	1
6%	1	1.0	20	—	2	—	20	—	1	—
6%計			120	28	4	1	120	25	1	2
9%	0	0.01	20	20	—	—	20	17	—	—
9%	0	0.1	20	9	—	1	20	7	—	1
9%	0	1.0	20	—	—	—	20	—	—	—
9%	1	0.01	20	—	—	—	20	—	—	—
9%	1	0.1	20	—	—	—	20	—	2	—
9%	1	1.0	20	—	1	—	20	—	—	—
9%計			120	29	1	1	120	24	2	1
全 計			240	57	5	2	240	49	3	3

第20表 液体培地中の TIBA および CW が不定胚の幼植物形成におよぼす影響

培地No	培地組成		F ₁ ローズピンク				バツハ			
	TIBA	CW	芽のみ	根のみ	芽と根と分化	正常幼植物	芽のみ	根のみ	芽と根と分化	正常幼植物
1	—	—	8.3	80.3	21.7	3.3	2.7	66.3	13.7	2.0
2	○	—	3.3	32.7	9.0	0.0	2.3	14.7	4.7	0.0
3	—	○	12.0	125.7	31.7	2.7	17.7	86.7	17.3	0.0
4	○	○	2.3	12.7	7.3	0.0	3.3	14.7	3.0	0.0

注. 三角フラスコ1本当たりの数字, TIBA濃度1.0mg/ℓ, CW濃度10%v/v

第21表 液体培養による不定胚からの幼植物の形成におよぼす培養法の影響

培養方法	F ₁ ローズピンク				バツハ			
	芽のみ	根のみ	芽と根と分化	正常幼植物	芽のみ	根のみ	芽と根と分化	正常幼植物
振とう培養	0.0	135.7	6.3	1.0	0.0	89.7	7.7	2.0
ロータリーカルチャー	1.7	88.0	11.3	2.7	1.7	44.3	11.0	3.7
静置	0.0	13.3	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0

を用い, フラスコ1本当たりカルス1個分の不定胚をカルスとともに移植し, 第21表の3種の培養法で20℃暗黒下で培養し, 移植8日目に生育した不定胚の調査をした

2. 結果および考察

予備試験において液体培養では根の形成が多く芽の生育が抑えられる傾向があったので根の形成を抑制し, 芽の形成を促進するためにTIBA, BAおよびCWを添加した.

ビクトリア不定胚の液体培養におけるシヨ糖濃度の影響をみると, No3系統で芽および根の両者を形成した個体数は6%, 9%でどちらも

1個体のみであり, No26ではそれぞれ2および1個体で低頻度であった. TIBAの添加により根の形成を抑制する傾向がみられた. またBAも濃度が濃くなるとともに根の形成を抑制する傾向がみられた. しかし不定胚は液体培養によりすべて水浸状となり, ビクトリア不定胚の培養には液体培養は適していないと判断された(第19).

F₁ローズピンク, バツハの液体培養では両品種ともTIBAを添加した培地は芽と根を形成した個体が少なくなった. 水浸状でない正常幼植物はTIBAを添加するとまったく形成されなかった.

CWを添加すると水浸状の芽と根を形成した個体数は増加したが、水浸状でない正常幼植物数は減少した。これらの結果よりTIBAおよびCWは正常な幼植物を形成させるのには阻害的である。無添加の培地でも芽と根を形成した幼植物はF₁ローズピンクで21.7個、バハハで13.7個である。しかし正常な幼植物はそれぞれ3.3、2.0個である。つまり水浸化を防ぐ方法が見出すことができれば液体培養は不定胚増殖に非常に有効である（第20表）。

F₁ローズピンク、バハハの液体培養を振とう培養、ロータリーカルチャー培養、静置培養の3種の培養法で検討した結果、ロータリーカルチャー培養が浸とう培養、静置培養よりも水浸状の芽と根を分化した幼植物、正常幼植物の形成は多くなった（第21表）。

これらの試験結果から液体培養は水浸化が培養の大きな障害になっており、現在の段階ではシクラメンの培養には適していないと判断される。

Ⅷ 高次胚の利用による増殖の検討

高次胚を利用した簡易な増殖法を検討する。

1. 試験方法

ショパンNo12, ショパンNo2, あけぼのの根由来不定胚をMS, ショ糖6%, pH5.6, ゲルライト0.2%, 植調物質フリーの培地に置床し、20℃暗黒下で培養した。置床45日目に置床不定胚が生育した幼植物の基の部分に2次胚を形成した幼植物数を調査した。

前試験で塊茎基部に形成した2次胚を切り取り、同じ組成の培地に置床し、20℃暗黒下で培養した。置床30日目に幼植物の基の部分に3次胚を形成した幼植物数を調査した。

前試験で形成した3次胚を切り取り、MS, pH5.6, ゲルライト0.2%, 植調物質フリーでショ糖濃度を3, 6, 9%に設定した3種の培地に置床し20℃暗黒下で培養した。置床32日目に

4次胚を形成した幼植物数を調査した。

形成した4次胚をMS, ショ糖6%, pH5.6, ゲルライト0.2%, 植調物質フリーの培地で5回継代培養し、MS, ショ糖9%, pH5.6, ゲルライト0.2%, 植調物質フリーの培地で再度高次胚を形成させ、単独で分離した高次胚を1/3MS, ショ糖3%, pH5.6, ゲルライト0.3%, 植調物質フリーの培地を用い20℃暗黒下で培養し、置床23日目に幼植物形成数を調査し、同時に20℃明所に移し、32日目に正常幼植物形成数を調査した。

2. 結果および考察

不定胚を20℃暗黒で培養すると、置床不定胚が発育して置床15日には幼植物に生育する。さらにそのまま1ヵ月間、20℃暗黒で培養を継続すると2次胚を形成した。供試3品種に若干の差があるが11.1～19.4%の不定胚が2次胚を形成した（第22表）。2次胚は先が数本に分かれており基の部分は塊茎組織に付着している。

2次胚を再度培養すると、基の部分が肥大し頂端が分かれた形態を示し、さらに基の部分に細かな3次胚を高率（77.8～93.8）で形成した。肥大した部分は多くの胚の基の部分が集合した形態を示した（第23表）。

3次胚をショ糖濃度を変えて培養すると6%で3品種とも4次胚の形成が高かった（62.5～87.5%）。9%では3次胚の生育が遅く、基の部分は黒変し数個ある3次胚がそれぞれ分離し単独に分けられた。3%では芽が長く伸長した（第24表）。

高次胚をショ糖9%の培地で培養し、単独に分離した胚を培養すると、ショパンNo12, ショパンNo2, あけぼのそれぞれ55.6, 28.9, 42.2%が幼植物に生育した。しかし、明所に移してさらに培養を続けると、塊茎の基の部分に多量の小さな高次胚を形成し、そのまま苗として利用できない形態を示した。正常幼植物はショパンNo12の2個（4.4%）のみであった（第25表）。

シクラメンの組織培養による増殖

第22表 2次胚の形成

品種および系統	不定胚置床数	2次胚形成幼植物数(%)
ショパン12	36	7(19.4)
ショパン2	36	4(11.1)
あけぼの	36	6(16.7)

第23表 2次不定胚の培養

品種および系統	置床2次不定胚数	3次胚形成幼植物数(%)
ショパン12	15	12(80.0)
ショパン2	9	7(77.8)
あけぼの	16	15(93.8)

第24表 ショ糖濃度が3次不定胚の培養におよぼす影響

品種および系統	ショ糖濃度%	不定胚置床数	4次胚形成幼植物数(%)
ショパン12	3	16	8(50.0)
〃	6	16	14(87.5)
〃	9	16	6(37.5)
ショパン2	3	16	6(37.5)
〃	6	16	10(62.5)
〃	9	16	3(18.8)
あけぼの	3	16	7(43.8)
〃	6	16	13(81.3)
〃	9	16	2(12.5)

第25表 分離高次胚からの幼植物育成

品種および系統	分離胚の置床数	幼植物形成数(%)	正常幼植物形成数(%)
ショパン12	45	25(55.6)	2(4.4)
ショパン2	45	13(28.9)	0(0.0)
あけぼの	45	19(42.2)	0(0.0)

区 不定胚により増殖した株の生育特性

1. 試験方法

品種ショパンNo10及びNo12の根を2~3mmに切断し、MS組成にショ糖9%, 2,4-D 1.0, BA 0.1mg/l, ゲルライト0.2%を加えてpH5.6に調製したカルス誘導培地で培養後、カルス誘導培地と同じ組成で植調物質フリーの不定胚形成培地に形成したカルスを移植した。それぞれ25℃暗黒で培養後、形成した不定胚を1/3MS, ショ糖3%, 植調物質フリー, ゲルライト0.3%, pH5.6の培地を用い20℃暗黒で幼植物を形

高次胚を形成した個体は塊茎組織の周辺部に胚が集合し、この胚がもとの塊茎組織と結合したまま不定形の塊状組織となってくるので苗として利用できないと判断される(第25表)。

以上のことからシクラメンの増殖には高次胚の利用は不適であると判断された。

第26表 No. 10の苗の形状による区分

区No	苗の状態	供試個体数
1	A2	4
2	A3	1
3	B1	11
4	B2	15
5	B3	9
6	C2	2
7	C3	4

第27表 No. 12の苗の形状による区分

区No	苗の状態	供試個体数
1	A1	3
2	A2	45
3	A3	4
4	B1	59
5	B2	69
6	B3	50
7	C1	23
8	C2	65
9	C3	75
10	D2	5

注. 記号の説明

A: 塊茎が丸く直径が5mm未満

B: 塊茎が丸く直径が5mm以上

C: 塊茎が不定形で大きい

D: 塊茎が肥大していない

1: 展開葉がない

2: 展開葉が1~2枚

3: 展開葉が3枚以上

第28表 使用用土の成分組成

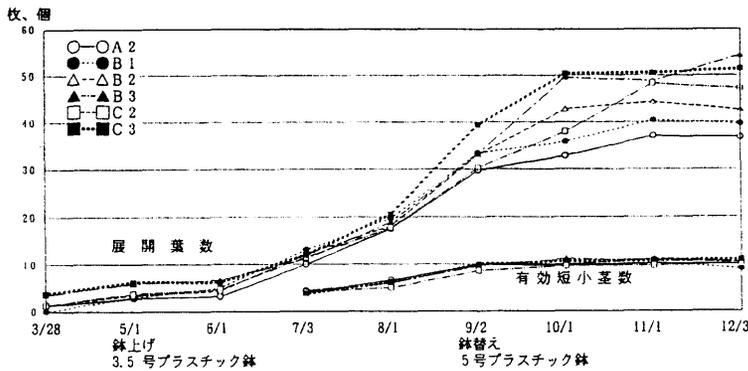
NO ₃ -N	NH ₄ -N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgOppm	pH	ECmS/cm
2.5	0.5	2.5	100	25	10	6.9	0.66

注. 分析は溶脱液を用いて迅速養分テスト法で行った

第29表 順化後の成株率

系統	区No	分解調査株数	枯死株数	成株数	成株率%	開花株数	開花株率%
No10	1	0	2	2	50	2	100
	2	0	0	1	100	1	100
	3	0	5	6	55	6	100
	4	0	0	15	100	15	100
	5	0	0	9	100	9	100
	6	0	0	2	100	2	100
	7	0	0	4	100	4	100
No12	1	0	3	0	0	0	0
	2	25	1	19	95	19	100
	3	0	0	4	100	4	100
	4	25	4	30	88	28	93
	5	25	2	42	95	35	83
	6	25	1	24	96	14	58
	7	0	11	12	52	11	92
	8	25	11	29	73	23	79
	9	25	3	47	94	25	53
	10	0	5	0	0	0	0

注. 成株数および開花株数は、12月3日に調査した
成株率=成株数÷(供試株数-分解調査株数)

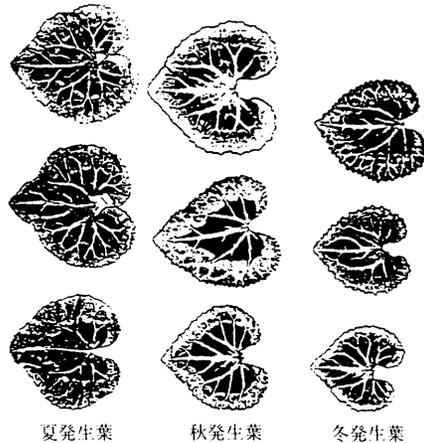


第1図 ショパン No. 12の展開葉数および有効短小茎数の推移

成させた。

1991年3月28日に馴化苗をフラスコから出し水洗後、200穴セルトレイに植付けた。用土には、過剰な水溶性の無機養分を除いたメトロミックス350 (EC0.2~0.3mS/cm) を用いた。植付けから7日間は晴天時に1日5回、細霧かん水を行った。

4月11・18・25日に、窒素20%-リン酸20%-カリ20%の葉面散布専用液肥を200倍に希釈して、1㎡当たり25mlの割合で散布した。5月1日に3.5号プラスチック鉢に鉢上げした。用土は、ピートモス、バーク堆肥、赤土、籾殻堆



第2図 ショパンNo12の1株内での葉斑の葉齢別変化

肥および木炭を3:2:3:3:0.5の配合比(vol比)に、ようりん3g/lを加えたもの(第28表参照)を用いた。給水は、鉢底に不織布片(長さ90×幅15mm)の先端10mm程度を差し込み、といからのひも底面給水方式で行った。施肥は、6月1日から窒素18%-リン酸18%-カリ18%の液肥を4,000倍に希釈して常時供給した。9月2日に、同用土で5号プラスチック鉢に鉢替えし、その後同様に管理した。11月1日から窒素12%-リン酸25%-カリ25%の液肥を3,000倍に希釈して常時供給した。

苗は、塊茎の大きさ、形で4段階に、展開葉数で3段階に分けて植付けた。供試個体数を第26、27表に示した。その後の生育を毎月5株ずつ分解調査し、その経過を第2図に示した。

2. 結果および考察

成株率は、ショパンNo10のA2及びB1が、50及び55%だったが、それ以外はすべて成株になり開花した。ショパンNo12は、A1及びD2を除いて52~100%の範囲だったが、率の低い区は、馴化初期に数回乾燥させたことに原因がある(第29表)。また、5月1日に鉢上げ以後、1ヵ月間施肥しなかったため、養分が欠乏し初期生育が滞った。

塊茎の形の違いによる生育の差は、初期展開葉数が1~2枚の区でC2、B2及びA2の順に多く、塊茎が丸くなくても大きい方が生育がよかった。また、初期展開葉数は、B3、B2およびB1の差に見られるように、葉数の多い方がその後の生育がよかった。しかし、展開葉数と有効短小茎数の関係から、量的生長に差はみられたが、質的生長に差はなかった(第1図)。

葉斑および花色は、その発生時期や肥料濃度で変化するが、ショパンNo12の葉斑は、第2図のとおりであった。全株とも概ねその範囲にあり、葉斑の変異は認められなかった。また、花色は、開花初期はやや色が濃くJHSカラーチャートでNo9506、最盛期がNo9205、後期はやや色が

褪せてNo9203であったが、変異はなかった。

X 総合考察

不定胚を利用した増殖法は短期間に大量の苗を供給でき非常に有利な増殖法である。シクラメンの苗を組織培養で供給する場合、苗の生産費が問題になるが、この増殖法を利用すれば苗のコストを下げることができると考えられる。

現在筆者らがin vitroで維持している系統の中で最も分化効率の良い系統を増殖するとすれば、90mm径のシャーレに置床した根から最終的に約200の馴化苗が得られる。in vitroで維持している1個体の苗の根を利用して約5枚のシャーレに置床できるので、1個体の維持個体から約1,000個体に増殖することができる。この1,000倍に増殖する期間はカルス誘導に30日、不定胚形成に30日、幼植物形成に15日で計75日である。培養を開始して2ヵ月半で馴化に出すことができる。

しかし、不定胚を利用した増殖にも2つの課題がある。1つは変異の問題である。不定胚を形成させるためにカルスを誘導するが、カルスを經由すると変異が起きやすいと言われている。実際、Kiviharjuらは葯および子房からカルス經由で不定胚を形成後、幼植物を得ている。これらの幼植物を栽培し開花させた結果では5~30%の個体が葉が円筒形に巻いてしまう奇形であり、これらの個体は開花しなかった。筆者らの試験ではこれらの奇形はみられず、葉斑、花色ともに均一であった。この違いは培養法の違いにあると考えている。Kiviharjuらは2,4-D 1.0mg/lの培地を用いて、カルスを16~24週間培養した後不定胚を誘導している。長期間カルスの状態を維持するのが原因と考えられる。実際16週間の場合には奇形株率は5%であり、24週間では30%であった。筆者らの培養法では2,4-Dを含むカルス誘導培地には4~5週しかカルスを置いていない。

もう1つの課題は品種および系統により不定胚形成に大きな差があることである。この課題を克服するために、筆者らは今後多くの品種、系統の中から不定胚による増殖が容易で、かつ優良な形質を持つ系統を選抜しようとしている。このことにより栽培の場に均一な苗を大量に提供することが可能になると考えている。

Ⅺ 摘 要

不定胚を利用した増殖法を検討し根組織から増殖できることが明らかになった。

1. 利用組織として花柱、子房壁、花弁、葯、胎座、葉身、葉柄、塊茎、根を検討し、根組織からのみ不定胚を利用して増殖できることを確認した。

2. 根組織を用いた効率的培養法を検討し、MS基本組成にシヨ糖9%、2,4-D 3.0~5.0mg/ℓ、BA 0.1mg/ℓ、ゲルライト0.2%を添加した培地を用い、25℃暗黒でカルスを誘導し、同組成の植調物質フリーの培地に移植すれば不定胚が形成され、不定胚を1/3MS組成にシヨ糖3%、植調物質フリー、ゲルライト0.3%を添加した培地に移植し20℃暗黒で培養すると幼植物が形成する。

3. 形成した不定胚を形状別に分けると芽を分化した胚、楕円状胚、球状胚、不定形胚がそれぞれ25.9、8.7、25.6、39.8%であった。芽を分化した胚から53.2%と最も高率で幼植物を形成した。

4. 品種ビクトリアを20℃および25℃の暗黒で培養した。ビクトリアは25℃よりも20℃での培養が適していることが明らかになった。

5. 不定胚の液体培養を検討し、多量の幼植

物が形成されるが水浸状となり、現在の段階では液体培養はシクラメンの培養には適していない。

6. 高次胚を利用した増殖を検討し、高次胚から幼植物を得たが、幼植物の基の部分に多量の高次胚を形成し正常の幼植物の形成は少なかった。

7. 不定胚利用により増殖した苗を馴化、栽培し花色、葉斑が揃い変異のないことを確認した。

本研究を行うにあたり、農業試験場生物工学部、花き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. 池田ら (1987) 園学要旨. 秋:262-263
2. 石坂宏ら (1989) 第11回植物組織培養シンポジウム要旨:107
3. E. Kiviharju, etc. (1992) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28:187-194
4. J. Fersing, etc. (1982) Pépin. Hort. Maraichers 224:27-30
5. G. Morel (1975) Pépin. Hort. Maraichers 158:25-28
6. 大橋一夫ら (1991) 園学雑60別1:444-445
7. 大谷基泰ら (1989) 育雑39別2:22-23
8. 島田多喜子ら (1989) 園学雑58別1:574
9. F. C. Steward, etc. Amer. J. Bot. (1958), 45:705-708
10. 和久井隆ら (1992) 園学雑61別1:432-433
11. Wicart, G., etc. (1984) Protoplasma. 119:159-167

In vitro mass propagation of *Cyclamen persicum* Mill

(3) Propagation from root tissues via somatic embryo

Kazuo OOHASHI, Takashi WAKUI and Sadao YONAI

Summary

Embryogenesis was studied using styles, ovary walls, petals, anthers, placentas, leaf blades, petioles, tubers, roots. Somatic embryos were obtained using roots tissues. The numbers of young plants obtained via embryos from roots of 14 cultivars were examined with the three kinds of medium containing MS salts, 9% sucrose, 0.2% gerlite, 1, 3, 5 mg/2, 4-D, and 0.1mg/BA. The 305 young plants were obtained on one petri dish when the roots of F₁ Rose Pink variety were cultured with the medium containing MS salts, 9% sucrose, 0.2% gerlite, 3.0mg/2, 4-D, and 0.1mg/BA.

The roots of Victoria varieties were cultured at 20 °C and 25 °C in the dark by using medium containing MS salts, 9% sucrose, 5.0mg/2, 4-D, 0.05mg/BA, 0.2% gerlite at pH5.6. The culture at 20 °C was suitable for Victoria varieties.

The embryos induced from two varieties of Victoria, F₁ Rose Pink, and Bach were cultured in liquid medium. But the number of normal young plants obtained were small because of vitrification.

The secondary embryos were formed at the base of young plant's tuber by long culture of embryos at 20 °C in the dark. The propagation method was examined by using high-dimensional embryos of Chopin and Akebono. High-dimensional embryos were propagated well on the medium containing MS salts, 6% sucrose, 0.2% gerlite at pH 5.6. Of the young plants obtained for acclimatization, the number of normal plants was small owing to numerous high-dimensional embryos formed in the lower part of tuber.

The young plants obtained were acclimated and grown. Flower colour and leaf blademarking were uniform among plants propagated via somatic embryo.

[Bull. Tochigi Agr. Exp.
Stn. No.39 : 57~74 (1992)]

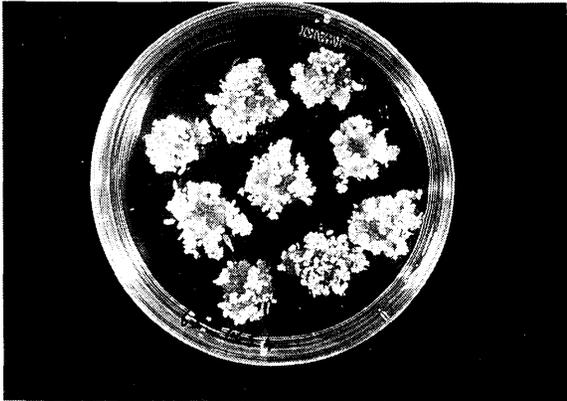


写真1 カルスから形成した不定胚



写真2 写真1の拡大

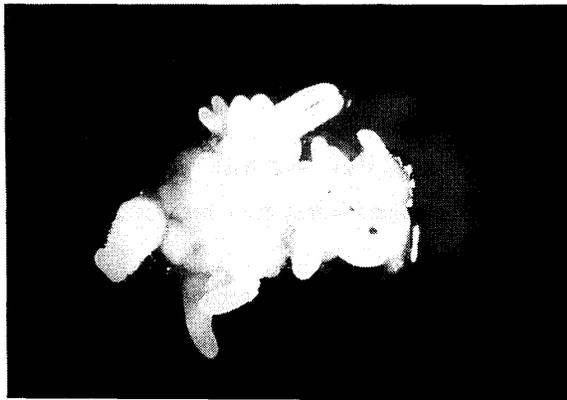


写真3 高次胚

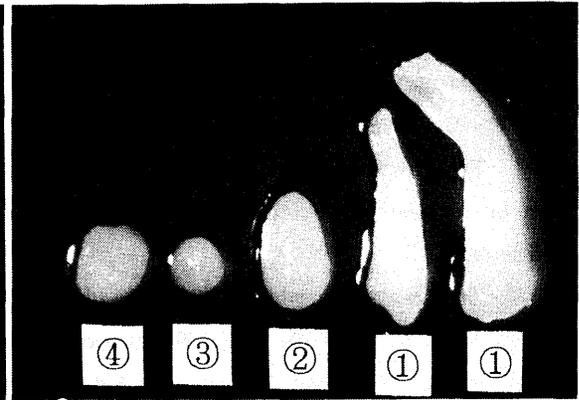


写真4 不定胚 ① 芽を分化した胚
② 楕円状胚
③ 球状胚
④ 不定形胚

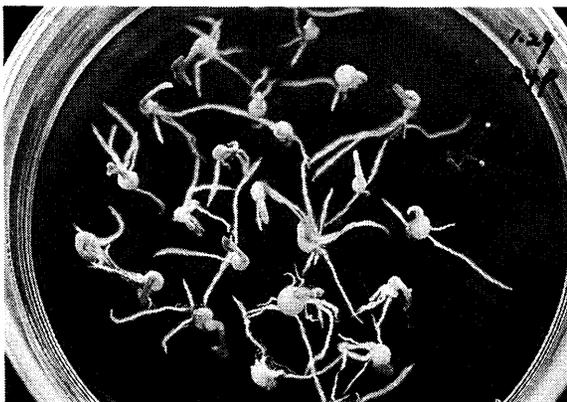


写真5 形成した幼植物



写真6 開 花