

シクラメンの組織培養による大量増殖

第2報 つぼみ内組織からの増殖

大橋一夫・峯岸長利・米内貞夫

I 緒言

シクラメンの組織培養では、シクラメンの内生菌が培養の大きな妨げになっている。筆者らは内生菌回避のために無菌実生苗からの増殖法を開発し前報で報告した。シクラメンの組織培養の研究は当初、培養部位として塊茎組織が主に利用されていた。これは塊茎組織が高い器官分化能を持っているためである。開花株の塊茎組織は内生菌が多く、株の高温処理、抗生物質等を培地に入れる等工夫がなされたが培養は困難であった。1978年Geier²⁾は葯を培養し、器官分化を確認している。その後、三浦ら³⁾も葯の基部を培養して肥大カルスを得、葉および胚様体の形成を確認している。一方、安藤ら¹⁾は20℃の暗黒で葉柄部を伸ばした黄化葉柄を培養し、馴化苗を得ている。また大越ら⁶⁾は花卉を培養し根の分化に成功したが、芽の分化は見られなかった。

Geier および三浦らの葯の培養、大越らの花卉の培養の結果を見ると開花株のつぼみ内組織は無菌であることが明らかである。筆者らはこれらの組織を含めて他のつぼみ内組織での培養を検討し、多くのつぼみ内組織（花柱、子房壁、葯基部、花卉）から出芽させ、出た芽の葉柄部を続けて培養し塊茎組織を誘導後、塊茎分割で増殖できることを明らかにしたので報告する。

II 試験方法

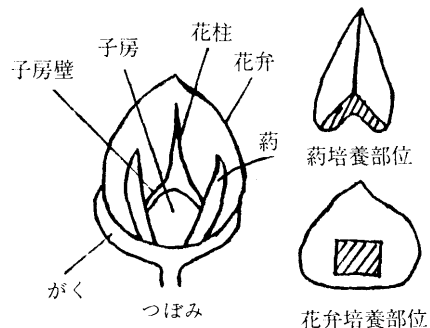
1. 花柱の培養

品種ショパンの開花株を用い、長さ8~15mmのつぼみを70%エタノールで20秒、有効塩素1

%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分殺菌、滅菌水で3回洗浄後、花柱を摘出し第1表の5種の培地（基本組成は1/3MS無機塩、MSビタミン、ショ糖3%、ゲルライト0.3%、pH5.6、以下の試験は植物生長調節物質を除いて基本組成は全て同じ）で培養した。培養は25℃の暗黒下で行い置床53日後に肥大程度、出芽組織片数、出芽数を調査した。第1培地を用いた培養で出芽した芽の葉柄部分を約3mmに切断し、NAA0.02、BA0.2mg/lの培地に置床した。第2回継代培養からは、芽を付けたまま2~3分割し、同じ培地に置床しこれを7代培養まで繰り返した。また4回目及び5回目培養時に出芽した葉柄を約5mmの長さに切断し、同じ培地に置床した。培養はすべて20℃の暗黒下で行い、培養期間は第2表のとおり21~34日である。

2. その他のつぼみ内組織の培養

花柱の培養が可能なので、その他のつぼみ内組織の培養を検討した。品種リスト、シューベルト、ショパン、ヒュールパークの開花株を用い長さ8~15mmのつぼみを花柱培養と同じく殺菌、滅菌水で洗浄後、花柱、子房、子房壁、葯基部



第1図 つぼみ内組織の培養部位

第1表 花柱の培養

培地 番号	植調物質濃度 (mg/ℓ)			置床数	肥大程度			出芽組 織片数 (%)	出芽 本数	平均 出芽 本数
	NAA	BA	adenin		5 mm 以上	3～ 4.9mm	2.9mm 以下			
1	0.1	1.0	—	18	3	6	9	4(22)	11	0.6
2	0.1	1.0	100	19	14	2	3	3(16)	9	0.5
3	0.1	1.0	200	18	6	7	5	3(17)	6	0.3
4	0.1	1.0	400	15	1	4	10	0(0)	0	0
5	0.1	2.0	—	19	5	8	6	0(0)	0	0

部、花卉、がくを摘出し(第1図参照) NAA0.1, BA1.0mg/ℓの培地に置床した。置床47日目に同じ培地に継代移植した。培養は25℃の暗黒下で行い、移植41日後(置床88日後)に出芽組織片数、出芽数を調査した。

また別に品種ショパンの花弁を用い第6表に示した植調物質濃度の高い3種の培地に置床して、出芽の可否を検討した。培養は25℃の暗黒下で行い、置床89日後に出芽組織片数、出芽数を調査した。

Ⅲ 結果及び考察

花柱の培養では第1培地(NAA0.1, BA1.0mg/ℓ)で出芽が多かった(写真1参照)。Adeninを100mg/ℓ添加することにより肥大は大きくなるが、出芽は第1培地よりやや劣った。Adeninをさらに高濃度に添加すると肥大、出芽ともに劣った。またBA濃度を2.0mg/ℓに高めると肥大はするがまったく出芽しなかった(第1表)。三浦らは葯基部の培養においてアデニンを100mm添加することにより葉の再分化が高くなることを確認しているがこの試験ではアデニン添加の効果は見られなかった。原因としては品種および培養組織が違うことが考えられる。

出芽した芽の葉柄部分を分割し培養すると、元の部分が肥大し塊茎に類似した組織となる。初代培養では出芽組織片の率は14%と低いが、継代培養を繰り返すことにより出芽組織片数は多くなり7代培養では99%の組織で出芽し、平均出芽本数も13.1本と多かった(第2表)。使

第2表 葉柄肥大部の分割培養での出芽

培養 回数	培養 日数	置床 数	出芽組織 片数(%)	平均出 芽本数
1	34	14	2(14)	0.4
2	31	31	12(39)	3.2
3	26	20	11(55)	4.7
4	29	40	30(75)	5.8
5	30	58	57(98)	12.4
6	21	120	112(93)	12.7
7	28	280	278(99)	13.1

用した培地および培養法は実生の塊茎組織を培養したときと同じであり、葉柄部分を培養して一度塊茎組織ができてしまえば塊茎組織の培養法が適用できることがわかった。続いて4回目培養時および5回目培養時に出芽した葉柄部を培養した場合には出芽組織片数の率は高くとも96%であり、平均出芽本数はそれぞれ6.2および6.1本であった(第3表)。これらのことから塊茎組織からでた葉柄と花柱から出芽した葉柄には差があり、塊茎組織の分割培養を繰り返すことにより出芽した芽の葉柄は、培養による出芽能力が次第に高まるものと考えられる。観察結果でも花柱組織からの芽は伸びが少なく切断した時の形が円形でなく偏平であったり角ばったものが多く、色はやや黒ずんでいる。一方塊茎組織からの芽は伸びが良く、切断面が円形であり色は淡い桃色であり先端部に近くなるにつれて色が濃くなり紫色となってくる。

花柱組織を培養し、出芽した芽の葉柄部分をさらに培養することにより、塊茎組織を誘導し

シクラメンの組織培養による増殖

第3表 葉柄の培養

培養回数	材 料 (第2表参照)	培養 日数	置床 数	出芽組織 片数(%)	平均出 芽本数
1	4回目培養時 出芽した葉柄	30	54	52(96)	6.2
2	5回目培養時 出芽した葉柄	21	99	95(96)	6.1

て増殖できることが明らかになったので、次につばみ内の他の組織の培養を行った。まず培養時の雑菌汚染率をみると花柱が9.8%と最も低く、次に葯基部(13.2%)、花弁(16.8%)、子房壁(18.9%)、子房(30.0%)の順に汚染率が高くなる。がくはすべて雑菌に汚染された(第4表)。がく組織までは内生菌が生息しているものと考えられる。このことからがく組織と子房組織との間に内生菌の進入を遮断する機能が存在すると推察される。花柱組織の汚染率が低いのは、内生菌のいるつばみの基部表面から離れており、組織を摘出するとき、これらに触れにくいためと思われる。

花柱組織からの試験で最も出芽組織の多かった培地であるNAA0.1, BA1.0mg/ℓを用いつばみ組織(花柱、子房壁、葯基部、花弁、子房)の培養では、葯基部での出芽が多く5品種平均で出芽組織片率55%、平均出芽本数1.4本であっ

第5表 つばみ内組織の培養

組織部位	品 種	置床数	出芽組織 片数(%)	出芽本数			平均出芽 本 数	
				5 mm以上	3 ~ 4 mm	2 mm以下		
花 柱	リスト	30	8(27)	0	6	6	12	0.4
	シューベルト	10	1(10)	0	0	4	4	0.4
	バッハ	12	6(50)	2	10	12	24	2.0
	ショパン	12	3(25)	1	2	4	7	0.6
	フェールパーク	10	1(10)	0	0	3	3	0.3
	計	74	19(26)	3	18	29	50	0.7
子 房 壁	リスト	50	26(52)	4	4	20	28	0.6
	シューベルト	17	10(59)	1	2	12	15	0.9
	バッハ	17	2(12)	0	2	1	3	0.2
	ショパン	19	3(16)	0	5	3	8	0.4
	フェールパーク	15	0(0)	0	0	0	0	0
	計	118	41(35)	5	13	36	54	0.5
葯 基 部	リスト	132	74(56)	7	70	118	195	1.5
	シューベルト	42	19(45)	0	7	26	33	0.8
	バッハ	51	39(76)	13	28	57	98	1.9
	ショパン	48	25(52)	2	11	27	40	0.8
	フェールパーク	42	15(36)	0	33	39	72	1.7
	計	315	172(55)	22	149	267	438	1.4

第4表 つばみ内組織培養での雑菌汚染率

組織部位	供試数	雑菌汚染数(%)
花 柱	295	29 (9.8)
子 房 壁	238	45 (18.9)
葯 基 部	521	69 (13.2)
花 弁	250	42 (16.8)
子 房	100	30 (30.0)
が く	50	50 (100.0)

第6表 花弁の培養

培地 番号	植調物質濃度 (mg/ℓ)			置床 数	出芽組織 片数(%)	出芽 数	平均出 芽本数
	IAA	NAA	BA				
1	10		0.1	27	1(4)	2	0.1
2	20		0.5	25	2(8)	4	0.2
3		2.0	2.0	28	8(29)	64	2.3

た。子房壁は35%、0.5本、花柱は26%、0.7本であった。品種で比較するとバッハは花柱、葯基部で出芽が多く、シューベルトは子房壁で多かった。品種により培養に適した組織が異なることを示している(第5表)。花弁及び子房ではまったく出芽しなかった。

花弁組織はNAA0.1, BA1.0mg/ℓの培地を用いて出芽しなかったため、さらに第6表の3種培地で培養したが、植調物質としてNAA2.0, BA2.0

mg/ℓの培地を用いたときに29%の花弁組織で出芽し、平均出芽本数は2.3本であった(第6表)。大越らも花弁組織を培養しNAA, BAおよびアデニンを組み合わせて培養しているが、芽の分化は見られていない。本試験との違いは品種と基本培地にMSを使用している点である。

以上のことから、開花株のつぼみ内組織である花柱、子房壁、葯基部、花弁組織から増殖できることが明らかになった。

IV 摘要

1. 花柱組織から出芽させ、出芽した芽の葉柄部分を培養して塊茎組織を誘導した。誘導した塊茎組織を繰り返し分割培養することにより増殖できることが明らかになった。

2. その他のつぼみ内組織(子房壁、葯基部、花弁、子房、がく)を培養し、がく組織は内生菌に汚染されており培養が不可能であること、

子房壁、葯基部、花弁からは出芽することがわかった。

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助言を賜った。ここに記して感謝の意を表する次第である。

引用文献

1. 安藤敏夫ら(1983) 千葉大園学報32:1-5
2. Geier, T. (1978) Z. Pflanzenphysiol. Bd. 90s:245-256
3. 三浦泰昌ら(1986) 神奈川農総研生物工学試験成績書:473-497
4. 大橋一夫ら(1989) 栃木農試研報36:93-108
5. 大橋一夫ら(1990) 園学雑59別1:530-531
6. 大越一雄(1985) 昭60花き試験成績概要(千葉県):23-26

In vitro mass propagation of *Cyclamen persicum* Mill

(2) Propagation from organs in flower buds

Kazuo OOHASHI, Nagatoshi MINEGISHI and Sadao YONAI

Summary

The methods of propagation from organs in flower buds were examined. Styles, ovaries, ovary walls, anthers, petals and calyxes were removed from flower buds aseptically after disinfection of flower buds. Of these organs styles, ovary walls, anthers were efficient explants for tissue culture. Explants were cultured on shoot differentiation medium containing 1/3MS salts, MS vitamins, 3% sucrose, 0.3% gerlite, 0.1mg/ℓ NAA, 1.0mg/ℓ BA at pH 5.6, incubated in the dark at 25°C for 47 days, and subcultured with the same medium for 41 days. The percentages of shoot formation tissues were 26, 35, 55% in styles, ovary walls, anthers, respectively. Petal explants were cultured on shoot differentiation medium containing 1/3MS salts, MS vitamins, 3% sucrose, 0.3% gerlite, 2.0mg/ℓ NAA, 2.0mg/ℓ BA at pH 5.6 and incubated in the dark at 25°C for 89 days. The percentage of shoot formation tissues was 29%.

Bull. Tochigi Agr. Exp.
Stn. No.39:53~56(1992)