

シクラメンの不定胚利用による大量増殖

1. 試験のねらい

シクラメンの組織培養で不定胚の形成を利用して、大量にクローン苗を生産する技術を開発する。このことにより、優秀な遺伝的形質を持つシクラメン苗を大量に生産者に提供できる。

2. 試験方法

- (1) 不定胚を形成できる組織をまず検討した。材料として品種ショパン[®]12のつぼみ内組織（花柱、子房壁、花弁、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。培養はすべて25℃暗黒下で行った。
- (2) 根組織を用いてさらに効率的な培養法を検討した。まず無機塩濃度、培養温度及び移植時期を検討した。品種ショパン[®]12の培養株の根を1~2mmに切断し、MS（ゲルライト0.2%）1/3MS無機塩（ゲルライト0.3%）を基本培地とし、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℃及び25℃の暗黒下で培養した。14、21、28及び35日後にMS、1/3MSの基本培地に移植した。
- (3) 不定胚形成に及ぼすショ糖濃度を検討した。品種ショパン[®]12の培養株の根を1~2mmに切断し、MS、2, 4-D1.0、BA0.1mg/ℓ、ゲルライト0.2%にショ糖濃度3、6、9、12及び15%を加えpH5.6に調整した5種の培地に置床した。30日後に誘導されたカルスを同じショ糖濃度のMS基本培地に移植した。培養はすべて25℃、暗黒下で行った。
- (4) 植調物質の種類及び濃度を検討した。品種ショパン[®]10、[®]12の培養株の根を1~2mmに切断し、表-4の10種の培地（ショ糖濃度9%）で培養した。誘導されたカルスをMS基本培地に移植した。培養はすべて25℃、暗黒下で行った。

3. 試験結果および考察

- (1) 置床組織の検討では、軟カルスの形成が見られたのは胎座及び根であった。根を2, 4-D1.0、BA0.1mg/ℓ添加した培地に置床したときのみ不定胚を分化し、19個（置床数に対し95%）の幼植物に生育した。葉身、塊茎からは硬いカルスを形成したが、幼植物は分化しなかった（表-1）。
- (2) 無機塩濃度、培養温度及び移植時期の検討では、MS培地を用い、25℃で培養し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%）の幼植物を分化した（表-2）。
- (3) ショ糖濃度の検討では、ショ糖濃度9%のとき最も高い分化を示し、置床カルス33に対し69個（209%）の幼植物ができた（表-3）
- (4) 植調物質の種類及び濃度の検討では、ショパン[®]10は第4培地で、[®]12は第5培地で最も高い率で幼植物が分化し、それぞれ29個（161%）、34個（189%）であった（表-4）。

4. 成果の要約

培養株の根を用い、軟カルスを経て不定胚を分化させ、さらにこれを培養して増殖できることを明らかにした。
（担当者 生物工学部 大橋一夫）

表一 1 培養部位別のカルス及び不定胚形成

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 幼植物分 化数(%)
	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)

注)置床30日後カルス形成数調査、移植27日後幼植物分化数調査

表一 2 不定胚系幼植物体分化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	不定胚系幼植物分化数(%)
1/3MS	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)	
		MS	20℃	14	18
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)	

注)カルス移植28日後幼植物分化数調査

表一 3 不定胚系幼植物分化に及ぼすショ糖濃度の影響

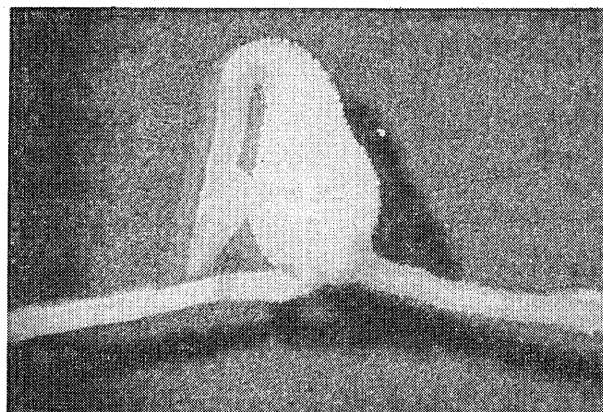
ショ糖濃度	置床カルス数	幼植物分化数(%)
3%	28	4(14)
6%	35	43(123)
9%	33	69(209)
12%	25	10(40)
15%	23	8(35)

注)カルス移植28日後幼植物分化数調査

表一 4 根からの不定胚系植物誘導に及ぼす植調物質濃度の影響

培地 %	ショ糖9% 植調物質濃度 mg/ℓ			%10			%12		
	NAA	2,4-D	BA	置床数	カルス形成数	幼植物分化数(%)	置床数	カルス形成数	幼植物分化数(%)
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)

注)置床32日後カルス形成数調査、カルス移植27日後幼植物分化数調査



写真一 2 不定胚より分化した幼植物