

シクラメンの無菌実生からの不定器官形成の品種間差異

筒井政道・高村武二郎・田中道男

VARIETAL DIFFERENCES IN ADVENTITIOUS
ORGANOGENESIS FROM THE ASEPTIC SEEDLING
OF CYCLAMEN

Masamichi TSUTSUI, Takejiro TAKAMURA and Michio TANAKA

Varietal differences in the adventitious organogenesis of cyclamen were investigated. Both in primary culture and subculture for shoot formation, there were varietal differences in the shoot formation on 1/3 MS medium containing $1.0 \mu\text{M}$ N^6 -benzyladenine (BA). Varietal differences in root formation of the adventitious shoots were also observed. These results suggest that the varietal differences in adventitious organogenesis should be confirmed for the production of cyclamen by the micropropagation.

Key Words : cyclamen, varietal differences, adventitious shoot, organogenesis.

緒 言

現在、シクラメン (*Cyclamen persicum* Mill.) は営利的には種子繁殖されているが、一般に発芽が遅く不均一である。また、シクラメンの採種は自家受粉と他家受粉のいずれにおいても可能であるが、自家受粉ではその繰り返しによって花数の減少を伴う内婚弱勢がおり、他家受粉では内婚弱勢は回避できるものの、形質固定が困難である。これらのことから、優良形質をもつ個体もしくは遺伝的に安定した交雑親の栄養繁殖が長年望まれてきた⁽¹⁾。ところが、シクラメンは子球形成を行わず、分球や株分けも極めて困難である。また、狩野・佐藤⁽²⁾によって葉芽のカッティングによる繁殖法が、中山⁽³⁾によって塊茎のノッチングによる不定芽誘導が報告されているが、営利的な繁殖方法としては利用し難いものであった。そこで、他の方法として *in vitro* での組織培養による大量増殖、すなわちマイクロプロパゲーションが試みられてきた。

当初、シクラメンの組織培養においては、内生雑菌による母株組織の汚染が大きな問題であった。しかしながら、黄化葉柄^(4,5,6)や無菌実生組織^(7,8,9,10)を外植体として用いることによって微生物汚染が回避できることが報告され、シクラメンのマイクロプロパゲーションへの期待が高まっている。

ところが、このマイクロプロパゲーションにおける植物体再生能力はすべてのシクラメン栽培品種に均一に存在するわけではなく、品種・系統もしくは個体によっても大きく異なっており^(11,12)、このような植物体再生能の品種間差異は、種苗生産を目的としたマイクロプロパゲーションにおいて問題点となることは明らかである。そこで本研究では、多数のシクラメン栽培品種・系統を供試し、不定芽形成による植物体再生能の品種間差異を調査し、シクラメンのマイクロプロパゲーションを用いた種苗生産について考察した。

材料および方法

1. 無菌実生塊茎からの不定芽形成の品種間差異

シクラメン19品種・系統の種子をTAKAMURA et al⁽⁹⁾の方法に準じて無菌播種し、得られた子葉展開直後(播種50~60日後)の無菌実生塊茎を上下に2分割、さらにそれぞれを4分割した計8切片を外植体とした。

培地には、 $1.0 \mu\text{M}$ BA, $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ショ糖および $3.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ジェランガムを添加し、無機塩濃度のみを1/3にしたMS培地⁽¹³⁾を用いた。培養は20℃、暗黒下で行い、置床56日後に不定芽形成数を調査した。

2. 不定芽の発根における品種間差異

それぞれの品種・系統の不定芽を形成した塊茎切片を継代培養せず、さらに20℃、16時間日長 ($34 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) で28日間培養を行った後、葉を分化した不定芽の一つ一つを基部に約1mm角の組織をつけて切り出した。これらの不定芽を $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ショ糖および $3.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ジェランガムを添加した植物生長調整物質無添加の1/3MS培地に置床し、56日間培養した。培養は20℃、16時間日長 ($34 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) で行った。

3. 継代培養における不定芽形成の品種間差異

葉を分化した不定芽を切り出した後の塊茎切片を、前述の $1.0 \mu\text{M}$ BAを添加した1/3MS培地に移植した。培養条件は、初代培養に準じた。

結果および考察

1. 無菌実生塊茎からの不定芽形成の品種間差異

各品種・系統の不定芽形成率は6~99%、不定芽数は1外植体あたり2.0~11.1と広い範囲に及び、いずれにおいても品種・系統間で、0.1%レベルで有意差が認められた(第1表)。また、それぞれ‘アンネック’および‘ピュアホワイト’から育成されたAN2およびPW2は、原品種との間で不定芽形成率、不定芽数ともに明らかな差異が認められた。

本実験で形成された不定芽には、すでに葉を分化している不定芽と葉を分化していない不定芽の2種類が見られた。このうち葉を分化していない不定芽は調査時にはすでに枯死しているか、継代培養を行っても葉を分化することなくそのまま休止もしくは枯死する傾向がみられた。このことより *in vitro*でのクローン増殖には、葉を分化した不定芽のみが利用可能と思われる。中山⁽³⁾は、表皮面に多数発生した突起の多くは連絡維管束の形成まで進まず、途中で座止し、休眠状態となったとしている。しかしながら、本実験で形成された不定芽では葉の分化、未分化に関わらず維管束の形成が認められたことから(データ未掲載)、葉を分化していない不定芽の生長休止もしくはそれらが枯死する原因は、連絡維管束の形成以外の要因が関与していると考えられる。なお、この葉を分化した不定芽の割合においても品種・系統間に差異がみられ、‘ライラック’のように不定芽形成数、葉を分化した不定芽の割合がともに高い値を示す品種からPW2のように形成数が少なくてもそのほとんどが葉を分化している品種や‘アンネック’、‘ベートーベン’、BF2、‘テーブルミニ’およびVC2のように形成された不定芽のほとんどが葉を分化していない品種まで存在した。

高村ら⁽¹²⁾は、シクラメンの無菌実生組織からの不定器官形成において、F₁個体の不定芽形成能力は、交雑の正逆を問わずその両親の間もしくは両親のいずれかとほぼ同程度であることを報告している。これらのことより、本実験で観察されたシクラメンの不定芽形成能力の品種・系統間差

異には、遺伝的要因が関与していることが推測される。

WAINWRIGHT and HARWOOD⁽⁷⁾は、塊茎外植体では不定芽の形成部位に極性があり、葉柄が創始していたのと同じ側から生じており、ほとんどの不定芽は、塊茎の頂端分裂部位から生じているとしている。また、中山⁽⁸⁾は、塊茎のノッチングにおいて、塊茎頭部切除の位置によって不定芽の形成位置が異なることを示し、1/6区では切断面のみで、1/3区および1/2区では切断面と切断面周縁部の両位置で形成され、さらに2/3区では切断面、切断面周縁部および表皮の3カ所で形成されたとしており、この原因が切断面の茎根遷移部への接近にあるのか、不定芽形成の極性的性質の乱れによるものなのかは不明であるとしている。本実験では、無菌実生塊茎を上下2分割、さらにそれぞれを4分割した8切片を外植体としており、塊茎の上部切片および下部切片に関係なく不定芽が形成されていた（データ未掲載）。また、外植体が肥大しその切断面全体から多数の不定芽を形成している品種、切断面の周縁部より不定芽を形成している品種、および切断面の一部から不定芽形成している品種の3種類が認められた。以上のことより、塊茎外植体における不定芽の形成範囲においても極性とは別に品種・系統による差異が存在する可能性がある。

Table 1. Varietal differences in morphological response on 1/3 MS medium with 1.0 μ M BA in the seedling (tuber) tissue culture of cyclamen.

Cultivar or Strain ²	No. of explants cultured	No. of explants forming shoots	Percent explants forming shoots	No. of shoots per explant	Percent shoots with leaf
'Anneke'	88	81	92	11.1 \pm 0.7	17
AN2	88	13	15	7.1 \pm 2.1	46
'Beethoven'	88	61	69	7.8 \pm 0.5	14
'Bonfire'	88	61	69	9.1 \pm 0.7	25
BF2	96	62	65	7.1 \pm 0.5	18
'Early Purple'	88	73	83	6.9 \pm 0.4	22
'Kage Yellow'	88	17	19	2.8 \pm 0.4	34
'Golden Boy'	48	10	21	4.4 \pm 1.0	52
'Largo'	56	53	95	6.6 \pm 0.6	42
'Lilac'	80	51	64	8.5 \pm 0.5	82
'Miyoshi 550'	72	56	78	6.6 \pm 0.4	41
'Pierce'	104	76	73	5.6 \pm 0.4	20
'Pure White'	96	82	85	6.7 \pm 0.4	46
PW2	88	5	6	2.0 \pm 0.5	80
PW3	96	95	99	6.3 \pm 0.3	58
'Table Mini'	96	25	26	6.6 \pm 1.3	9
'Victoria'	72	37	51	6.9 \pm 0.6	34
VC2	96	59	61	7.0 \pm 0.7	10
VC3	88	60	68	8.7 \pm 0.5	45

Significance

Strain $P < 0.001$ $P < 0.001$ $P < 0.001$

²AN, BF, PW and VC were bred from 'Anneke', 'Bonfire', 'Pure White' and 'Victoria', respectively.

2. 不定芽の発根における品種間差異

置床した外植体の発根率は8~91%と品種・系統によって大きく異なっており、不定芽形成と同様に発根率にも品種・系統間差異が認められた(第2表)。このことから、不定芽によるクローン苗増殖では、順化前の発根段階においても用いる品種・系統によって発根率が異なることを考慮する必要があると思われる。なお、狩野・佐藤⁽²⁾は、*in vivo*におけるシクラメンの葉ざし繁殖において発根は90%で見られると報告しており、また、葉柄につける球茎片は9~10mmの大きなものが良いとしている。本実験では、1mm程度のわずかな組織をつけて不定芽を切り出しており、それが発根率に影響した可能性も推測される。したがって、不定芽の調整法によっては、発根率が上昇する可能性もある。

Table 2. Varietal differences in the rooting of shoots.

Cultivar or Strain ²	No. of explants cultured	No. of explants forming roots	Percent explants forming roots
'Anneke'	64	58	91
AN2	26	6	21
'Beethoven'	53	11	19
'Bonfire'	54	25	45
BF2	34	6	15
'Early Purple'	80	58	73
'Kage Yellow'	32	18	71
'Golden Boy'	29	22	76
'Largo'	38	10	27
'Lilac'	72	55	76
'Miyoshi 550'	48	22	46
'Pierce'	77	69	88
'Pure White'	51	35	74
PW2	12	1	8
PW3	70	58	83
'Table Mini'	57	8	11
'Victoria'	48	20	42
VC2	66	11	14
VC3	63	46	73

Significance
Strain $P < 0.001$

²AN, BF, PW and VC were bred from 'Anneke', 'Bonfire', 'Pure White' and 'Victoria', respectively.

3. 継代培養における不定芽形成の品種間差異

継代培養における不定芽形成率は、9~100%と品種によって大きく異なり、品種・系統間に差異がみられた(第3表)。初代培養時と比較するとAN2, 'カゲイエロー' および 'テーブルミニ' のように不定芽形成率が40%以上増加した品種・系統が認められるなど多くの品種で不定芽形

成率が高くなった一方、PW2では継代培養を行っても不定芽形成率が10%に満たなかった（第1表、第3表）。1外植体あたりの不定芽形成数および葉を分化した不定芽の割合も、全体的には初代培養と比較して増高する傾向がみられたが、品種・系統によっては同程度またはむしろ低い値を示した。

Table 3. Varietal differences in shoot formation after subculture.

Cultivar or Strain ^z	No. of explants cultured	No. of explants forming shoots	Percent explants forming shoots	No. of shoots per explant	Percent shoots with leaf
'Anneke'	64	64	100	24.6±1.4	31
AN2	64	35	55	24.8±3.2	31
'Beethoven'	64	60	94	13.0±1.1	44
'Bonfire'	80	53	66	11.1±1.0	52
BF2	72	52	72	14.5±1.5	37
'Early Purple'	80	75	94	9.4±0.6	71
'Kage Yellow'	56	35	63	4.7±0.6	45
'Golden Boy'	32	12	38	15.4±3.4	58
'Largo'	45	39	98	12.7±1.2	46
'Lilac'	64	47	73	8.1±0.7	67
'Miyoshi 550'	48	48	100	17.5±1.4	60
'Pierce'	88	71	81	13.6±1.0	56
'Pure White'	64	60	94	9.8±0.9	62
PW2	80	7	9	8.9±2.2	47
PW3	80	79	99	12.1±0.8	51
'Table Mini'	88	66	75	19.7±1.9	44
'Victoria'	56	28	50	6.8±0.7	77
VC2	88	81	92	17.1±2.0	49
VC3	80	60	75	10.8±0.9	44

Significance

Strain	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$
--------	-------------	-------------	-------------

^zAN, BF, PW and VC were bred from 'Anneke', 'Bonfire', 'Pure White' and 'Victoria', respectively.

このように、BA添加培地での継代培養による不定芽形成にも品種・系統間差異が存在することが明らかとなった。また、継代培養を行っても効率よく不定芽を得ることのできない品種・系統が存在することから、*in vitro*での不定芽形成を利用した種苗生産においては、初代培養でしか効率よく増殖できない品種・系統、継代培養を行うことによってさらに効率よく増殖できる品種・系統を選別する必要があると思われる。

本研究の結果、シクラメンの無菌実生からの不定器官形成による植物体再生能に大きな品種・系統間差異が存在することが明らかになった。したがって、マイクロプロパゲーションによる種苗生産を実用化するためには、対象となる品種・系統の不定芽形成能を把握し、増殖が確実に行える個体のみを増殖するか、目的の個体に合った最適の培養法を選択する必要がある。また、シクラメンの不定器官形成能は一つの形質とも考えられ、マイクロプロパゲーションが容易で優良形質をもつ個体を育成することにより、シクラメンの育種および種苗生産の著しい効率化が期待される。

摘 要

シクラメンの無菌実生塊茎からの不定芽形成および得られた不定芽の発根の品種・系統間差異を調査した。初代培養, 継代培養のいずれにおいても $1.0 \mu\text{M}$ BAを添加した $1/3$ MS培地上での不定芽形成に品種・系統間差異が存在した。また, 発根培地上での不定芽の発根においても品種・系統間差異が認められた。したがって, マイクロプロパゲーションによるシクラメンの種苗生産のためには, 対象となる品種・系統の不定器官形成能の把握が必要と考えられた。

引 用 文 献

- (1) TAKAMURA, T. and MIYAJIMA, I. : Micropropagation of *Cyclamen persicum* Mill. In Y.P.S. Bajaj. (ed.), Biotechnology in Agriculture and forestry, vol. 40. High-tech and micropropagation VI, pp. 96-112, Springer-Verlag, Berlin (1997).
- (2) 狩野邦雄, 佐藤義機 : シクラメンの葉ざし繁殖法. 農業および園芸 42 : 1526-1528 (1967).
- (3) 中山昌明 : 塊茎分割によるシクラメンの栄養繁殖 (第2報) シクラメン塊茎の再生に及ぼす頭部切除の位置及び分割の大きさの影響. 園学雑., 49 : 228-234 (1980).
- (4) ANDO, T. and MURASAKI, K. : *In vitro* propagation of cyclamen by the use of etiolated petioles. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.* 32 : 1-5 (1983).
- (5) MURASAKI, K. and TSURUSHIMA, H. : Improvement on clonal propagation of *Cyclamen* *in vitro* by the use of etiolated petioles. *Acta Hort.* 226 : 721-724 (1988).
- (6) TAKAMURA, T. and TANAKA, M. : Somatic embryogenesis from etiolated petioles of cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) *Plant Tissue Culture Letters* 13 : 43-48 (1996).
- (7) WAINWRIGHT, H. and HARWOOD, A. C. : *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue. *J. Hort. Sci.* 60 : 397-403 (1985).
- (8) HAWKES, H. Y. and WAINWRIGHT, H. : *In vitro* organogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. seedling tissue. *Acta Hort.* 212 : 711-714 (1987).
- (9) TAKAMURA, T., MIYAJIMA, I. and MAEHARA, T. : Seedling selection and micropropagation for the breeding of yellow-flowered cyclamen cultivars. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 37 : 265-271 (1993).
- (10) TAKAMURA, T., MIYAJIMA, I., MATSUO, E. : Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. 'Anneke' from aseptic seedlings. *Plant Cell Reports* 15 : 22-25 (1995).
- (11) HOFFMANN, M. and PREIL, W. : *In-vitro* culture of leaf explants from different *Cyclamen persicum* idiotypes. *Gartenbauwissenschaft* 52 : 145-148 (1987).
- (12) 高村武二郎, 宮島郁夫, 松尾英輔 : シクラメンの無菌実生からの不定器官形成の品種間差異について. 園学雑. 62 (別1) : 436-437 (1993).
- (13) MURASHIGE, I. and SKOOG, F. : A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497 (1962).

(1998年6月30日受理)