シクラメン野生種における体細胞胚形成

古川一実・柿原文香・加藤正弘

愛媛大学農学部植物育種学研究室 790-8566 愛媛県松山市樽味 3-5-7

Somatic Embryogenesis in Seven Wild *Cyclamen* Species

Kazumi FURUKAWA, Fumika KAKIHARA and Masahiro KATO

Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ehime University, 3-5-7
Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan

Abstract

Embryogenesis in seven *Cyclamen* species, i. e. *C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. persicum*, *C. purpurascens*, and *C. rohlfsianum* was investigated by using petioles and leaves of mature plants as explants. Two culture protocols were used for callus induction: 1) Linsmaier and Skoog (LS) medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2, 4-D, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kinetin, $50.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sucrose, and $2.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gellan gum, and 2) Modified Murashige and Skoog (MS) medium containing $5.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2, 4-D, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kinetin, $60.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sucrose, and $3.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gellan gum. Callus was initially formed in all species from both petiole and leaf explants, excluding the leaf explants of *C. hederifolium* and *C. coum*. *Cyclamen cilicium* showed a low callusing rate, and produced somatic embryos on both callus induction media. After callus multiplication, the calli were transferred into medium, excluding the plant growth regulators, to induce somatic embryos. Somatic embryos were induced in *C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum* and *C. rohlfsianum*; unipolar tuber-like bodies were formed in *C. purpurascens* through shaking the culture; and adventitious roots were produced in *C. persicum*. Somatic embryogenesis and organogenesis were not observed from the calli of *C. hederifolium*. In *C. graecum* and *C. coum*, somatic embryos were induced in liquid media, and the embryos of *C. graecum* developed like microtubers. In *C. purpurascens*, unipolar tuber-like bodies were formed from compact calli, but did not grow into plantlets. Induction of somatic embryogenesis was successful in 4 *Cyclamen* species. The outcomes of this study demonstrate that micropropagation through somatic embryogenesis is possible in some *Cyclamen* species.

Keywords: *Cyclamen*, *in vitro* preservation, somatic embryogenesis, callus, tissue culture, microtuber.

緒 言

サクラソウ科シクラメン属(*Cyclamen*)には20種が存在し、フランス南西部から地中海沿岸にかけて自生している¹⁾。鉢物として重要なシクラメンの園芸品種は、*Cyclamen persicum* 1種のための種内交雑と変異から成立

したとされている。一方、シクラメンの野生種は、園芸品種にはない耐寒性、秋咲き性、耐病性などの形質や、園芸品種とは異なる特徴的な芳香性や葉の形を有し、今後のシクラメンの改良に重要な遺伝資源である。実際に、野生種と園芸品種との交雑による種間雑種作出が成功しており¹⁻⁵⁾、ますます今後のシクラメンの改良に野生種が使われることが推察される。しかしながら野生種は、開発による自生地の減少や乱獲のため絶滅の危機にさらされており、ワシントン条約で国際的な商取引を規制された希少植物でもある¹⁾。さらにはシクラメンの繁殖様

2001年6月11日受付
2001年9月5日受理

式は種子繁殖であり、自然状態では株分けや挿し木、分球といった栄養繁殖は起こらない。また、中には難結実性を示す種も存在するため、その保全は必要に迫られている。よって、シクラメン野生種の遺伝資源の保全と優良個体の増殖のためには組織培養による大量増殖法が有効であると考えられる。

近年、成功しているシクラメン園芸品種の組織培養には大きく分けて二つの手法が用いられている。一つは不定芽による増殖法⁶⁻¹³⁾であり、もう一つは体細胞胚誘導による増殖法である^{8,14-19)}。中でも体細胞胚増殖では Kreuger ら (1995)²⁰⁾ や Wilnkelmann ら (1998)²¹⁾ が液体培養による大量増殖も可能であることを報告している。一方、シクラメン野生種の組織培養に関する報告は Karam and Al-Majathoub (2000)²²⁾ が野生種の *C. persicum* の不定芽を誘導したもののみであり、これまでの研究対象は園芸品種がほとんどであった。よって、筆者らはシクラメン野生種を対象に、不定芽形成よりも大量増殖が可能なおよび植物体形成が簡便であることから、体細胞胚誘導を試みた。その結果、本実験においていくつかの野生種で体細胞胚の形成が初めて認められた事を報告する。

材料および方法

1. 材 料

愛媛大学農学部ガラス温室で育成しているシクラメン野生種7種の成株を供試材料に用いた (Table 1)。

2. 外植体の滅菌

外植体には、成株の葉柄および葉身を用いた。前処理として雑菌汚染抑制のために硝酸銀処理を行った。展開

葉を摘出し、葉柄の基部を $2.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 硝酸銀水溶液に浸し16時間吸水させた。その後、葉全体の表面殺菌として70% エタノール中に30秒間浸した後、 $64.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 次亜塩素酸カルシウム溶液 (有効塩素 3.8~4.5%) に展着剤 (ヤマト展着剤) を数滴加えたもので15分間殺菌した。滅菌水で3回すすいだ後にクリーンベンチ内で葉柄および葉身をそれぞれ、5mm, $5 \times 5 \text{ mm}$ に切断し外植体とした。

3. カルスおよび体細胞胚誘導

カルスおよび体細胞胚誘導のいずれにおいても、培地はすべて50mlのUMサンプル瓶 (柏洋硝子株式会社) に20mlずつ分注し、アルミホイルでキャップした。液体培養は、gellan gumを除いた培地を20ml分注した50mlの三角フラスコを用いて80r.p.m.の水平回転円振とうにて行った。培地のpHはオートクレープ前に5.8に調節した。オートクレープ条件は120°Cで20分間、1気圧下とした。培養は特に記載のない限り20°C、暗黒下で行い、継代は40~50日間隔で行った。

カルス誘導には次の二つの培地 (LS培地および修正MS培地) を用いた。

(1) LS 培地

Linsmaier and Skoog (1965)²³⁾ の培地に $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kinetin, $50.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sucrose, および $2.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gellan gum を添加したものをを用いた (Otani and Shimada, 1991)¹⁴⁾。

(2) 修正 MS 培地

Murashige and Skoog (1962)²⁴⁾ の培地の主成分のうち、 NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および KH_2PO_4 の濃度を半分にした修正MS培地に5.0

表 1 供試材料
Table 1 Plant materials

Species	Source	No. of plants
<i>Cyclamen cilicium</i>	Yoshioka Nursery (Japan)	2
<i>C. coum</i>	Ashwood Nurseries (U. K.)	1
<i>C. graecum</i>	Hiroshima Botanical Garden (Japan)	1
	Saitama Agr. Forest. Res. Cen. ¹⁾	1
<i>C. hederifolium</i>	Hiroshima Botanical Garden (Japan)	1
	Garden Bureau ²⁾	1
	Yoshioka Nursery (Japan)	2
<i>C. persicum</i>	Kazuo Mori	1
<i>C. purpurascens</i>	Ashwood Nurseries (U. K.)	2
	Yoshioka Nursery (Japan)	2
<i>C. rohlfsianum</i>	Hiroshima Botanical Garden (Japan)	1
	Saitama Agr. Forest. Res. Cen.	1

¹⁾ Saitama Agriculture and Forestry Research Center, Horticultural Research Branch (Japan)

²⁾ Garden Bureau (shop in the Jindai Botanical Garden in Japan)

mg・l⁻¹ 2, 4-D, 0.1 mg・l⁻¹ kinetin, 60.0 g・l⁻¹ sucrose, 3.0 g・l⁻¹ gellan gum および 10.0% (v/v) ココナッツミルクを添加したものを用いた。ココナッツミルク(輸入元: 有紀トレーディング株式会社)は Sterivex™-GV (Millipore 0.22 μm Filter Unit) により吸引濾過滅菌した後、オートクレーブ滅菌の後の培地に無菌的に添加した。

カルスは、体細胞胚誘導培地に移植し体細胞胚形成を促した。体細胞胚誘導培地には、上記の2種類のカルス誘導培地からそれぞれ植物成長調節物質を除いた固形培地および液体培地を用いた。なお、得られたカルスには不定根を形成したカルスも認められたが、用いるカルスの状態を均一にするため、体細胞胚誘導には供試しなかった。

4. 植物体育成

体細胞胚を、修正 MS 培地に 30.0 g・l⁻¹ sucrose お

よび 3.0 g・l⁻¹ gellan gum を添加した培地に移植し、25°C, 約 1600-2000 lux (光合成光子束密度 20~30 μmol/m/s) の蛍光灯照明下で 16 時間日長で培養した。

5. 組織学的観察

パラフィン切片法により、組織学的観察を行った。体細胞胚を FAA (37% formaldehyde solution: 80% ethanol: acetic acid, 1:8:1, v/v) で固定した後、アルコールシリーズで脱水し、パラフィン中に包埋した。パラフィン試料をマイクロトームで厚さ 20 μm の連続切片にし、Heidenhein の鉄みょうばんヘマトキシリン染色法により染色した後、光学顕微鏡下で観察した。

結果および考察

1. カルス誘導

7 種のシクラメン野生種について、成株の葉柄および

表 2 シクラメン野生種における葉柄および葉身からのカルス形成
Table 2 Callus formation from petiole and leaf explants in *Cyclamen* wild species

Type of explant	Species	Medium	No. of explants inoculated	No. of explants contaminated	No. of healthy explants	No. of explants forming callus (%)
					(a)	(b/a)
Petiole	<i>C. cilicium</i>	LS	86	19	67	19
		Modified MS	74	0	74	13
	<i>C. coum</i>	LS	72	0	72	59
		Modified MS	54	9	45	41
	<i>C. graecum</i>	LS	109	9	100	74
		Modified MS	84	8	76	48
	<i>C. hederifolium</i>	LS	178	29	149	2
		Modified MS	187	121	66	25
	<i>C. persicum</i>	LS	35	0	35	34
		Modified MS	34	13	21	21
	<i>C. purpurascens</i>	LS	144	44	100	69
		Modified MS	147	40	107	57
Leaf	<i>C. cilicium</i>	LS	78	21	57	45
		Modified MS	73	9	64	51
	<i>C. coum</i>	LS	107	5	102	4
		Modified MS	107	21	86	3
	<i>C. graecum</i>	LS	99	0	99	0
		Modified MS	57	1	56	52
	<i>C. hederifolium</i>	LS	232	72	160	83
		Modified MS	208	148	60	48
	<i>C. persicum</i>	LS	231	24	207	0
		Modified MS	227	95	132	0
	<i>C. purpurascens</i>	LS	48	4	44	21
		Modified MS	48	5	43	31
	<i>C. rohlfsianum</i>	LS	236	110	126	70
		Modified MS	216	162	54	19
		LS	108	0	108	89
		Modified MS	108	108	0	0

図1 (A) 修正 MS 培地上での *C. cilicium* の葉柄由来カルスからの体細胞胚形成 (B) LS ホルモンフリー培地上での *C. graecum* の葉柄由来カルスからの体細胞胚形成 (C) LS 液体培地中における *C. persicum* の不定根形成 (D) LS 液体培地中における *C. purpurascens* の葉身由来カルスからの一極性塊茎様体形成 (E) LS 液体培地中における *C. graecum* のマイクロチューバー状に肥大した体細胞胚 (F) *C. graecum* (20 μ m 切片) の早期心臓型胚様の体細胞胚 Bar=40 μ m (G) *C. cilicium* から誘導された様々なステージの体細胞胚 Bar=1 cm (H) 芽と根を持つマイクロチューバー状に成長した *C. graecum* の体細胞胚 Bar=1 cm (I) マイクロチューバー状に成長した *C. graecum* の体細胞胚からの植物体形成 (J) *C. cilicium* の体細胞胚からの植物体形成

Fig. 1 (A) Somatic embryos derived from the petiole explant of *C. cilicium* on the modified MS medium. (B) Somatic embryos derived from the petiole explant of *C. graecum* on the LS medium. (C) Adventitious roots from the explants of *C. persicum* in the LS liquid medium (somatic embryo-induction medium). (D) Unipolar tuber-like bodies derived from the leaf explants of *C. purpurascens* in the LS liquid medium. (E) Microtubers derived from the somatic embryos of *C. graecum* on the LS medium. (F) An early heart shaped somatic embryo of *C. graecum* (20 μ m section). Bar=40 μ m (G) Various ages of somatic embryos of *C. cilicium*. Bar=1 cm (H) Somatic embryos of *C. graecum* grown like microtubers have both buds and roots in the liquid culture. Bar=1 cm (I) Plantlets from somatic embryos of *C. graecum* grown like microtubers on the modified MS liquid medium. (J) Plantlets from the somatic embryos of *C. cilicium* on the modified MS solid medium.

葉身の切片から LS 培地と修正 MS 培地の 2 種類の培地を用いてカルスを誘導した。カルス形成は早いもので置床 10 日目から見られた。カルス形成率は種により様々であった (Table 2)。ほとんどの種で、葉身よりも葉柄で高いカルス形成率が認められた。*C. hederifolium* は他種と比較して明らかに低いカルス形成率を示した。*C. hederifolium* および *C. coum* の葉身を LS 培地で培養した場合、外植体はすべて褐変枯死した。しかし、*C. coum* においては、そのほかの区では 80-90% のカルス形成率を示した。この様な培地間における大きな差異は *C. coum* のみで見られた。形成されたカルスの形態は種により様々で、褐色、黄色、白色もしくは透明を呈し、カルスの質も硬質なものや水浸状のもの、もしくはもろく崩れ易い、いわゆるフライアブル (friable) なものが認められた。また、*C. persicum* のカルスのほとんどは継代培養中に不定根を旺盛に形成した。これらの結果は種に特異的な傾向であることが推察される。

以前よりシクラメンの組織培養において内生菌による雑菌汚染が問題視されている^{6,10,11,19,25)}。本実験においても例外ではなく、バクテリアとカビによる両方の汚染が生じた。硝酸銀処理を施したにもかかわらず数種のシクラメンの初代培養において高い雑菌汚染が生じ、特に葉身で多発した。成株を材料に用いたときの有効な雑菌汚染防止策として黄化葉柄の利用が報告されている^{11,19)}。本実験では材料の都合上行えなかったが、高い雑菌汚染率を考慮すると、今後適用していく必要があると考えられる。

2. 体細胞胚誘導過程における形態形成

得られた葉柄および葉身由来のカルスを、植物成長調

節物質を除いた体細胞胚誘導培地に移植した。その結果、(1) 体細胞胚は *C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, および *C. rohlfianum* において形成され、(2) 一極性塊茎様体の形成が *C. purpurascens* のカルスにおいて見られ、(3) 不定根の形成は *C. persicum* および *C. coum* において見られた。(4) *C. hederifolium* では体細胞胚形成などの形態形成は全く観察されず、カルスも増殖しなかった。

(1) 体細胞胚の形成

体細胞胚形成が見られたいずれの種においても、フライアブルなカルスが黒変化し表面に多数の球状の白い構造物を形成した (Fig. 1A, B)。また、液体培地中では培地が赤色に濁り多数の球状の白い構造物が浮遊していた。これらの構造物はカルスからピンセットで容易に単離でき、また、パラフィン切片法を用いた組織学的観察からカルスとの維管束による連絡は無かった。加えて種子胚に似た構造をしており体細胞胚であることを確認した (Fig. 1F, G)。よって、透明あるいは褐色でフライアブルな形状のカルスは、体細胞胚を形成する、いわゆるエンブリオジェニックカルスであることが確認された。この結果は Otani and Shimada (1991)¹⁴⁾ の記述している園芸品種 ‘テーブル ミニ ライラックローズ’ における葉身由来のエンブリオジェニックカルスの形態と同様であった。

C. cilicium から形成されたフライアブルなカルスはあまり増殖せず小さいままであったが、カルス誘導培地上で、36 日目に体細胞胚を形成した (Fig. 1A)。体細胞胚を形成したのは葉柄由来のカルスで LS、修正 MS 両方の培地上であった。カルス誘導培地上で体細胞胚を形

表 3 シクラメン野生種における葉柄由来カルスからの体細胞胚誘導
Table 3 Somatic embryogenesis from petiole callus of wild *Cyclamen* species

Culture method	Species	Medium	No. of inoculated calli	No. of calli producing somatic embryo	No. of calli producing unipolar tuber-like body	No. of calli rooted
Static culture	<i>C. cilicium</i>	LS	12	5	0	1
		Modified MS	6	6	0	0
	<i>C. coum</i>	LS	11	0	0	0
		Modified MS	15	0	0	5
	<i>C. graecum</i>	LS	16	2	0	5
		Modified MS	23	11	0	2
	<i>C. hederifolium</i>	Modified MS	16	0	0	0
	<i>C. persicum</i>	LS	4	0	0	2
		Modified MS	14	0	0	3
	<i>C. purpurascens</i>	LS	25	0	2	9
		Modified MS	21	0	0	2
	<i>C. rohlfsianum</i>	LS	9	0	0	4
		Modified MS	20	1	0	0
Liquid culture	<i>C. cilicium</i>	LS	1	0	0	0
	<i>C. coum</i>	Modified MS	3	1	0	0
	<i>C. graecum</i>	LS	12	1	0	0
		Modified MS	25	17	0	2
	<i>C. persicum</i>	LS	2	0	0	0
		Modified MS	6	0	0	2
	<i>C. purpurascens</i>	LS	12	0	1	1
		Modified MS	7	0	1	0
	<i>C. rohlfsianum</i>	LS	2	0	0	0
		Modified MS	3	0	0	0

成したのはこの種のみであった。カルスをホルモンフリーに移植した場合も多数の体細胞胚を形成した (Table 3, 4)。*C. cilicium* はカルス形成率は低い、体細胞胚形成率は高いといえる。

C. graecum ではカルス移植後 1 から 2 ヶ月目にかけて LS および修正 MS の両方の培地において体細胞胚を形成した (Table 3, Fig. 1B)。液体培地中で得られた体細胞胚は肥大し、球状のマイクロチューバー状の形態を呈し (Fig. 1E) やがて芽と根の原基を形成した (Fig. 1H)。前述の *C. cilicium* の固形培地で得られた体細胞胚を液体培地に移植して水平円振とうを行っても二次胚の形成のみでこのような肥大は見られなかった。*C. graecum* で得られたマイクロチューバー状形態形成は、小林 (1992)²⁶⁾ により誘導されたシクラメン園芸品種「ピュアホワイト」の二極性の塊茎様体と形態的に良く類似していた。この塊茎様体形成について小林 (1992)²⁶⁾ は、培地中のオーキシンレベルの緩やかな低下によって不完全な体細胞胚誘導系となり、最終的な形成体として塊茎様体が形成されたと考察している。本実験の *C. graecum* においてはオーキシンの存在するカルス誘導培地からホルモンフリーである体細胞胚誘導培地へ移植したときに、

なんらかの種特異的なホルモン減少への反応があったと考えられる。

C. rohlfsianum では、移植後 5 ヶ月目に固形培地上で体細胞胚の形成が認められた (Table 3)。*C. coum* では、カルス移植後約 9 ヶ月目に液体培地中で体細胞胚形成がわずかに認められた。しかし、固形培地に移植しても体細胞胚は芽や根を形成するに至らなかった (Table 3)。

(2) 一極性塊茎様体の形成

C. purpurascens においては体細胞胚誘導培地に移植して 16 日目より硬質のカルスが黒変化し、カルスの表面に白色の塊茎に似た構造物を形成した (Table 3, 4, Fig. 1D)。この構造物は前述の体細胞胚とは明確に異なっており、カルスと接着した基部が肥大している外見から一極性塊茎様体と称した。これらは、カルスと連結していたため分離することは困難であった。また、植物体育成用の固形培地に移植しても不定根の形成のみで植物体へは至らなかった。

こういった構造物については、高村ら (1995)¹²⁾ も園芸品種から形成された「シュートあるいは体細胞胚とはやや外見が異なる塊茎様塊体」の形成を報告している。また、Wicart ら⁸⁾ の実験においても一極性の塊茎様体や

表 4 シクラメン野生種における葉身由来カルスからの体細胞胚誘導
Table 4 Somatic embryogenesis from leaf callus of wild *Cyclamen* species

Culture method	Species	Medium	No. of inoculated calli	No. of calli producing somatic embryo	No. of calli producing unipolar tuber-like body	No. of calli rooted
Static culture	<i>C. cilicium</i>	LS	8	2	0	3
		Modified MS	10	0	0	4
	<i>C. coum</i>	Modified MS	17	0	0	1
		LS	14	0	0	3
	<i>C. graecum</i>	Modified MS	38	0	0	2
		LS	1	0	0	0
	<i>C. persicum</i>	Modified MS	21	0	0	7
		LS	17	0	5	4
	<i>C. purpurascens</i>	Modified MS	12	0	0	4
		LS	15	0	0	5
Liquid culture	<i>C. rohlfsianum</i>	LS				
	<i>C. graecum</i>	LS	8	0	0	2
	<i>C. persicum</i>	LS	1	0	0	0
	<i>C. purpurascens</i>	LS	7	0	2	0
		Modified MS	1	0	1	0

二極性の塊茎様体の形成を報告しており、この両者は区別されている。更に Wicart ら⁸⁾によるとシクラメンの組織培養においては幾つかの形態形成経路が存在するとされている。形態的観察から、本実験で *C. purpurascens* に形成された一極性塊茎様体は Wicart ら⁸⁾によって示された形成経路の内、根分裂組織の発達→塊茎の発達→根のみ持つ一極性塊茎様体と言う経路を経て形成されたことが推察される。

(3) 不定根の形成

C. persicum の体細胞胚誘導培地に移植したカルスのほとんどは、いずれの培地上においても不定根を多数形成した (Fig. 1C)。

以上のように、体細胞胚形成、体細胞胚の肥大に続くマイクロチューバー状の形態形成、一極性塊茎様体形成および不定根形成など、種により特異的と思われる体細胞胚形成や形態形成が認められ、種によりホルモン条件への反応が異なることが推測される。高村ら¹²⁾および Takamura and Tanaka¹⁹⁾も、体細胞胚形成や不定器官形成にはシクラメン園芸品種内の系統間でさえ差異があると報告している。シクラメンでは野生種、園芸品種のいずれも種や系統によって体細胞胚形成や形態形成に多少の差異が生ずると考えられる。

また、本実験において使用した二つの培地のうち、LS 培地は Otani and Shimada (1991)¹⁴⁾がシクラメン園芸品種「テーブル ミニ ライラックローズ」の葉身からの体細胞胚誘導に成功した培地であり、修正 MS 培地は、東京都農業試験場においてシクラメン野生種 *C. purpurascens* の薬培養からの体細胞胚誘導に成功した

培地である (渋沢：未発表)。本実験では葉柄および葉身を用いたが、それぞれの培地におけるカルス形成率は種により様々であり、一貫した傾向は認められなかった。体細胞胚形成においては、培地間よりも外植体間で差異が認められ (Table 3, 4)、体細胞胚形成は培地成分よりも種の能力に依存したものと考えられる。

本実験において種間における体細胞胚形成能などの違いが調査されたとともに、*C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, *C. rohlfsianum* の4種において体細胞胚形成に初めて成功した。得られた体細胞胚およびマイクロチューバーは植物育成培地上で現在育成中である (Fig. 1I, J)。

摘 要

7種の *Cyclamen* 野生種 (*C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. persicum*, *C. purpurascens*, *C. rohlfsianum*) の成株から採取した葉柄および葉身を外植体とし、カルス経由の体細胞胚誘導を試みた。カルス誘導には2種類の培地を用いた。一つは Linsmaier and Skoog (1965)²³⁾の培地に $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kinetin, $50.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sucrose, および $2.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gellan gum を添加したものである。もう一つは Murashige and Skoog (1962)²⁴⁾の培地の主成分のうち、 NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および KH_2PO_4 の濃度を半分にした修正 MS 培地に、 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 2, 4-D, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ kinetin, $60.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sucrose, $3.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gellan

gum および 10.0% (v/v) ココナッツミルクを添加したものである。形成されたカルスは、カルス誘導培地からそれぞれのホルモンを除いた体細胞胚誘導培地へ移植し、体細胞胚形成を促した。

C. hederifolium および *C. coum* の葉身からはカルスは得られなかった。それ以外の種においてはカルス形成が見られ、ほとんどの種において葉身よりも葉柄で高いカルス形成率が認められた。さまざまな色および形態のカルスが得られ、それは種に特異的であった。*C. cilicium* のカルスのみ、カルス誘導培地上で、すでに体細胞胚を形成した。カルスをホルモンフリーの体細胞胚誘導培地に移植した後、体細胞胚形成(*C. cilicium*, *C. coum*, *C. graecum*, および *C. rohlfsianum*)、体細胞胚におけるマイクロチューバー状の肥大(*C. graecum*)、一極性塊茎様体形成(*C. purpurascens*)および不定根の形成(*C. persicum*)などが認められた。*C. hederifolium* は、最も低いカルス形成率を示し、ホルモンフリー培地でもカルス増殖や形態形成は全く認められなかった。

謝 辞

本実験を行うに当たり、広島市植物公園と埼玉県農林総合研究センター園芸支所の石坂宏博士より貴重なシクラメン野生種を分譲していただいた。また、東京都農業試験場の渋沢(小林)直恵氏と小川謙司氏(現 東京都庁)からは実験に関して大変有益なアドバイスを頂いた。これらのご協力に心より御礼申し上げる。

引用文献

- 1) Grey-Wilson, C.: *Cyclamen*. B. T. Batsford Ltd., London, pp. 1-192 (1997)
- 2) Ishizaka, H. and Uematsu, J.: Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton. by ovule culture, *Japan J. Breed.*, 42: 353-366 (1992)
- 3) Ishizaka, H. and Uematsu, J.: Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture, *Euphytica*, 82: 31-37 (1995)
- 4) Ishizaka, H.: Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* and *C. graecum*, *Euphytica*, 91: 109-117 (1996)
- 5) 小林直恵, 小川謙司: 胚珠培養による *Cyclamen persicum* Mill. と *C. rohlfsianum* Aschers. および *C. libanoticum* Hildebr. の種間雑種作出, 育種学雑誌, 44 別冊 2: 85 (1994)
- 6) Geier, T.: Morphogenesis and plant regeneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*, *Acta Horticulturae*, 78: 167-174 (1977)
- 7) Okumoto, H. and Takabayashi, S.: Aseptic culture of cyclamen tuber tissue, *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 38: 178-187 (1968)
- 8) Wicart, G., Mouras, A. and Lutz, A.: Histological study of organogenesis and embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. tissue cultures: Evidence for a single organogenetic pattern, *Protoplasma*, 119: 159-167 (1984)
- 9) 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)
- 10) 三浦泰昌: シクラメン, 樋口春三監修: 植物組織培養の世界, 柴田ハリオ硝子株式会社, pp. 171-174 (1988)
- 11) Murasaki, K. and Tsurushima, H.: Improvement on clonal propagation of cyclamen *in vitro* by the use of etiolated petioles, *Acta Horticulturae*, 226: 721-724 (1988)
- 12) 高村武二郎, 筒井政道, 田中道男: シクラメン組織培養における形態形成の品種間差異と 2, 4-D 添加培地を用いた不定芽形成, 園芸学雑誌, 64 別冊 1: 530-531 (1995)
- 13) Takamura, T., Tsutsui, M. and Tanaka, M.: Micropropagation of Yellow-flowered cyclamen through adventitious organogenesis in medium containing 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 48 (1): 33-38 (1996)
- 14) Otani, M. and Shimada, T.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Cyclamen persicum* Mill. leaf cultures, *Plant Tissue Culture Letters*, 8: 121-123 (1991)
- 15) 大橋一夫, 和久井 隆, 米内貞夫: シクラメンの組織培養による増殖 第 3 報 不定胚利用による増殖, 栃木県農業試験研究報告, 39: 57-74 (1992)
- 16) Kiviharju, E., Tuominen, U. and Tormala, T.: The effect of explant material on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 187-194 (1992)
- 17) 原田牧人, 遊佐吉雄: 不定胚によるシクラメン(ビクトリア)の大量増殖法, 宮城県農業センター研究報告, 60 (1994)
- 18) Takamura, T., Miyajima, I. and Matsuo, E.: Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. 'Anneke' from aseptic seedlings, *Plant Cell Reports*, 15: 22-25 (1995)
- 19) Takamura, T. and Tanaka, M.: Somatic embryogenesis from the etiolated petiole of cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), *Plant Tissue Culture Letters*, 13: 43-48 (1996)
- 20) Kreuger, M., Postma, E., Brouwer, Y. and G. J. van Holst: Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* in liquid medium, *Physiol. Plant.*, 94:

- 605-612(1995)
- 21) Wilnkemann, T., Hohe, A. and Schwenkel, H-G. : Establishing embryogenic suspension cultures in *Cyclamen persicum* 'Purple Flamed', Adv. Hort. Sci., 12 : 25-30(1998)
- 22) Karam, N. S. and Al-Majathoub, M. : In vitro shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill, Scientia Horticulturae, 86 : 323-333(2000)
- 23) Linsmaier, E. M. and Skoog, F. : Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 18 : 100-127(1965)
- 24) Murashige, T. and Skoog, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15 : 473-497(1962)
- 25) 三浦泰昌, 尾上洋一, 北浦健生 : シクラメンの生育時期による汚染微生物の変動と組織培養における防除法について, 園芸学雑誌 58 別冊 2 : 516-517(1989)
- 26) 小林直恵 : 組織培養によるシクラメン *Cyclamen persicum* Mill.塊茎様体形成法, 東京都農業試験場研究報告, 24(1992)