

# 組織培養によるシクラメン *Cyclamen* *persicum* Mill. 塊茎様体形成法

小林 直 恵

## I 諸 言

シクラメンの増殖は、多くの場合、種子繁殖によって行っていることから、同一品種内であっても個体間に形質の差が生じやすい。そのため、クローン集団を得ることを目的とした組織培養法の開発が、盛んに行われている<sup>3)</sup>。現在、実用化されている手法の主なもの、外植体から直接、またはカルスを経由して形成した不定芽を利用する方法である。この方法では、不定芽の葉を展開させ、発根を促し、鉢上げした順化苗の段階に仕立てあげる必要がある。最近、不定胚誘導系や、塊茎様体誘導系に関する研究がいくつか報告されてきている<sup>1) 2) 8)</sup>。これらの手法により生じた塊茎様体は、ジャガイモで試みられているようなマイクロチューバーとして利用できる可能性がある。マイクロチューバーは種子と同様に扱えることから、培養、順化の行程を大幅に簡便化でき、輸送性や貯蔵性を改善できる。本報では、塊茎様体のマイクロチューバーとしての利用法の開発を将来的な目的として、塊茎様体の形成、増殖、再生に関する検討を行ったのでここに報告する。

## II 材料および方法

### 1. 塊茎様体形成反応の検討

#### 1) 品種、ステージ、培養部位と培養反応

“ピュアホワイト、ビクトリア、バーバーク” (第一園芸) の3品種を用いて、品種間の培養反応の差を検討した。各品種とも、播種後約10カ月の成株から、葉長約5cmの成葉を、70%エタノール(1分間)、1%アンチホルミン(20分間)で殺菌処理し、滅菌水で3回リンスを行

った後、1cm角に切断して培地に置床した。培地は、島田ら<sup>1) 2)</sup>の不定胚誘導用培地(LS基本培地、2,4-D 1.0ppm, Kinetin 0.1ppm添加、ショ糖5%)を用いた。培養は、特にことわりのない限り、すべて20℃暗黒条件で行った。培養3カ月目のカルス形成外植体数、塊茎様体形成外植体数、組織片あたりの塊茎様体形数を調査した。

ステージと培養反応との関係を調べるため、若株の培養反応を調査し、前記成株の実験結果と比較した。若株としては、“ピュアホワイト、バーバーク”を試験管内ホルモンフリー培地に無菌播種し、播種後4カ月目の、本葉が3枚程度展開した試験管内苗を用いた。培養部位と培養反応の関係についても調べるため、外植体として葉身と葉柄を用いた。葉身および葉柄を約1cmに切断し、前記の培地に置床した。培養後3カ月目のカルス形成外植体数、塊茎様体形成外植体数を調査した。

ステージと培養反応の関係については、“ピュアホワイト”を用いて、葉長別の検討を行った。葉長4.0、5.5、6.0cmの成葉各3葉を前記の方法に従って殺菌し、葉身の半分を格子状に切断して、前記の培地に置床した。培養後4カ月目の塊茎様体形成外植体数、シュート形成塊茎様体数、根形成塊茎様体数を調査した。また、培養部位と培養反応との関係を調べるために、塊茎様体を形成した葉身の部位を検討した。加えて、斑の入った葉長5.5cmの“ピュアホワイト”の成葉について、斑の外側の部位、斑の部位、斑の内側の部位に分けて置床し、塊茎様体形成率を比較し、傍証とした。

#### 2) 培養初期におけるストレス処理の効果

塊茎様体形成に対する培養初期ストレス付与

効果の有無を検討した。供試材料としては、葉長約 5.0 cm の“ピュアホワイト”を用いた。殺菌した材料を切断し、前記の培地に置床した後温度処理を行った。温度処理としては、3 日間 4℃ にさらす低温処理と、3 時間 40℃ にさらす高温処理を行った。温度処理を行った後は、20℃ 暗黒条件で培養を行った。部分的飢餓処理として、5% ショ糖のみを含む 0.8% 寒天培地で 1 週間培養した後、前記の培養を行った。培養 4 カ月目に、塊茎様体形成外植体数とシュート形成外植体数を調査した。

## 2. 塊茎様体増殖法の検討

### 1) 液体回転培養法による増殖法の検討

基本培地を L S 培地、ショ糖濃度を 5% とした培地に、植物ホルモンとして BA と Kinetin, NAA と 2,4-D, BA と NAA, Kinetin と 2,4-D の組み合わせについて 0.01, 1.0 ppm ずつ組み合わせて添加し、25 区の処理区を設定した。各区、10 ml ずつ 3 本の試験管に分注し、塊茎様体を 1 球ずつ置床して回転培養を行った。培養 3 カ月目の増殖程度を 0 (増殖無)、1 (増殖数 20 倍以下)、2 (増殖数 20 倍以上) の 3 段階で評価した。さらに、増殖した塊茎様体の肥大程度を 1 (外植体と同程度)、2 (外植体よりも肥大) の 2 段階で評価した。

### 2) 高濃度オーキシン添加の効果

増殖率をさらに向上させる方法の存在を確認するため、他の増殖経路の有無を検討した。

#### (1) 固体培地における高濃度オーキシンの効果

基本培地を L S 培地、ショ糖濃度を 5% とした培地に、2,4-D を 1, 5, 10 ppm 添加した処理区を設け、塊茎様体を置床し、培養反応を調査した。

#### (2) 液体振とう培養における高濃度オーキシンの効果

基本培地を L S 培地、ショ糖濃度を 5% とした培地に、2,4-D 1 ppm, 5 ppm, NAA 1 ppm, 5 ppm を添加した 4 処理区を設け、30 ml ずつ 3 フラスコに分注した。1 フラスコにつき塊茎様体 3 個ずつを置床し、培養 4 カ月目に結果を調査した。

### 3) 増殖の形態的観察

塊茎様体を形成中の培養物を、培地ごとスライドグラスに移し、発生初期の微小な塊茎様体の顕微鏡観察を行った。

## 3. 塊茎様体再生法の検討

基本培地を L S 培地、ショ糖濃度を 5% とした培地に、BA と Kinetin を 0, 0.1, 1.0, 5.0 ppm ずつ組み合わせて添加した処理区を設け、塊茎様体を置床した。置床 4 カ月後の結果を調査し、塊茎様体形成が良好な培養条件を決定した。高濃度オーキシン処理により増殖した球状体を同様なホルモン処理区に置床し、培養反応をみた。

なお、2, 3 の塊茎様体は、“ピュアホワイト”から誘導したのを用いた。

## Ⅲ 結 果

### 1. 塊茎様体形成反応の検討

#### 1) 品種, ステージ, 培養部位と培養反応

“ピュアホワイト”の成葉を培養したところ、培養開始後約 1 カ月半で、外植体組織片から黒色の硬いカルスが誘導された。このカルスからは塊茎様体が発生、増殖し、さらにシュートや根の伸長がみられた (第 1 図)。基部がカルスと連絡しているものと分離しているものが混在していた。

“ピュアホワイト”では、組織切片からのカルス形成および塊茎様体形成は良好であり、組織片あたり塊茎様体形成数も多かった。これに

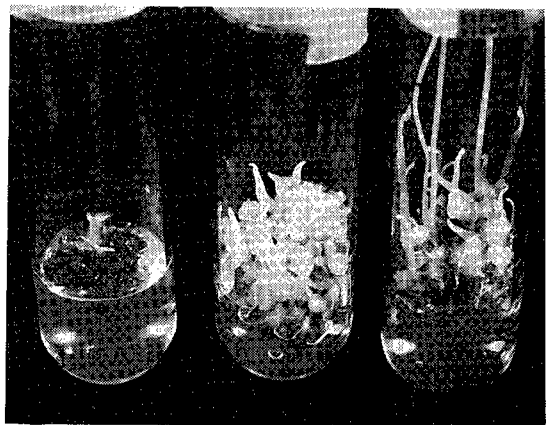


図 1 図 塊茎様体の形成

対し，“ビクトリア”と“バーバーク”ではカルス形成，塊茎様体形成が悪く，特に“バーバーク”では塊茎様体が全く形成されなかった（第1表）。

“ピュアホワイト”では，若株の葉身からのカルスおよび塊茎様体形成率は，成葉とほとんど変わらなかったが，若株の葉柄からの形成率

は，成株，若株両者の葉身より高くなる傾向があった。若株の葉身では“バーバーク”のカルス形成率は上がったが，塊茎様体の形成は認められなかった。若株の葉柄では，“バーバーク”のカルス形成率はさらに上がったが，塊茎様体の形成は認められなかった（第2表）。

第1表 成葉葉身のカルス，塊茎様体形成の品種間差異

品 種	組織切片数			組織片当り塊茎様体形成数
	置床	カルス形成	塊茎様体形成	
ピュアホワイト	50	39(78.0%)	20(40.0)	27.5
ビクトリア	35	4(11.4)	1(2.9)	2
バーバーク	49	2(4.1)	0(0.0)	0

第2表 若葉葉身・葉柄のカルス，塊茎様体形成の品種間差異

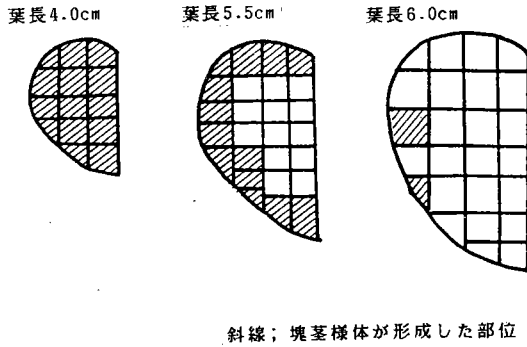
品 種	葉 身			葉 柄		
	組織切片数			組織切片数		
	置床	カルス形成	塊茎様体形成	置床	カルス形成	塊茎様体形成
ピュアホワイト	50	37(74.0%)	18(36.0)	16	13(81.3)	9(56.3)
バーバーク	23	4(17.4)	0(0.0)	16	11(68.8)	0(0.0)

“ピュアホワイト”で葉長4.0cmの外植体を培養した場合は，全ての組織片から塊茎様体が形成され，さらにシュート形成，発根がみられた。5:5，6.0cmと葉長が大きくなるにしたがい，塊茎様体形成率，シュート形成率，発根率ともに低下する傾向が認められた（第3表）。

培養部位との関係について検討した結果，葉長4.0cmの外植体を培養した場合は，葉身全体から塊茎様体が形成されたが，葉長が大きくなり，塊茎様体形成能が低下するのに従って，塊茎様体形成部位が，葉身周辺部に片寄る傾向が認められた（第2図）。葉長5.5cmの外植体に

第3表 葉長と塊茎様体，シュート形成および発根との関係

葉長(cm)	組織切片数			
	置床	塊茎様体形成	シュート形成	発根
4.0	42	42(100%)	42(100)	42(100)
5.5	81	32(39.5)	25(30.9)	24(29.6)
6.0	75	5(6.7)	2(2.7)	5(6.7)



第 2 図 培養部位と塊茎様体形成との関係

ついて、帯斑部分と斑の外側、内側に分けて培養した結果、斑の外側、すなわち葉身周辺部の塊茎様体形成率が高い傾向が認められた (第 4 表)。

第 4 表 培養部位と塊茎様体形成の関係

培養部位	組織切片数	
	置床	塊茎様体形成
斑 外 側	8	5(62.5)
斑 部 分	9	0 (0.0)
斑 内 側	3	1(33.3)

2) 培養初期ストレス処理効果の検討

培養初期に低温処理、高温処理を行った場合、塊茎様体形成率およびシュート形成率は低下することなく、無処理区に比べ形成率がやや高くなる傾向があった (第 5 表)。

第 5 表 塊茎様体、シュート形成に対する培養初期温度処理の影響

処理条件	組織切片数		
	置床	塊茎様体形成	シュート形成
4℃(3日)	16	10(62.5%)	8(50.0)
40℃(3時間)	16	11(68.8)	8(50.0)
無処理	28	15(53.6)	12(42.9)

5%ショ糖のみを含む塩類無添加培地に1週間置床処理した後に、培養を開始した場合は、無処理区に比べ、塊茎様体形成率、シュート形成率が低下せず、やや高くなる傾向が認められた (第 6 表)。

第 6 表 塊茎様体、シュート形成に対する培養初期飢餓処理の影響

処理条件	組織切片数		
	置床	塊茎様体形成	シュート形成
塩類無添加(1週間)	18	12(66.7%)	2(11.1)
無処理	32	15(46.9)	3 (9.4)

2. 塊茎様体増殖法の検討

1) 液体回転培養法による増殖法の検討

回転培養の結果、6 処理区で塊茎様体の増殖がみられ、他の処理区では増殖しなかった。BA 0.1ppm の区と、BA 1.0+NAA 0.1 ppm の区で特に増殖程度が良好であった。液体培地では、全体的に膨潤、肥大した塊茎様体が生じやすかった。増殖がみられた処理区のうち、BA 0.1ppm の区のみは、膨張肥大が起こらず、大ききの揃った球形の比較的硬く緻密な塊茎様体が増殖した (第 7 表)。

第 7 表 塊茎様体増殖がみとめられたホルモン条件と塊茎様体増殖、肥大程度

ホルモン条件(ppm)	増殖程度	肥大程度
無添加	1	2
NAA 0.1 2,4-D 1.0	1	2
BA 0.1	2	1
BA 1.0 NAA 0.1	2	2
BA 1.0 NAA 1.0	1	2
Kin 0.1 2,4-D 0.1	1	2

増殖程度指数；

1 増殖数20倍以下, 2 増殖数20倍以上

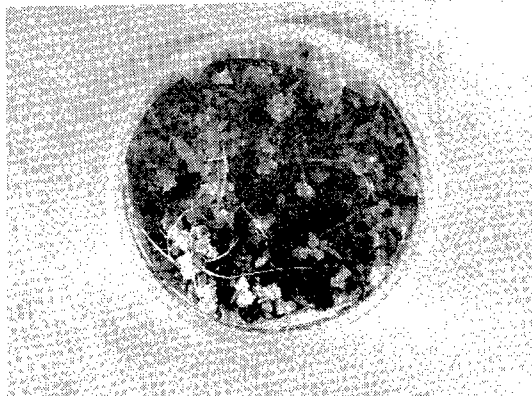
肥大程度指数；

1 外植体と同程度, 2 外植体よりも肥大

## 2) 高濃度オーキシン添加効果の検討

(1) 固体培地における高濃度オーキシン効果  
塊茎様体を2,4-D 1 ppmの培地に継代移植した結果、柔らかいカルスが発生し、カルスから塊茎様体が形成、増殖した。しかし、再度継代したところ、同カルスの発生はみられなくなり、塊茎様体はシュートを形成しながら肥大成長するようになった。塊茎様体の増殖は、ほとんど生じなくなった。

塊茎様体を2,4-D 5 ppmの培地に移植したところ、置床後1カ月目に柔らかいカルスが発生し、さらに2カ月後、半透明な球状体が集合したように見えるカルスと不透明な球状体が多数増殖した。このカルスおよび球状体は、継代を繰り返しても、同様に増殖した(第3図)。



第3図 高濃度オーキシン処理により誘導されたカルス

一部の球状体からはシュート形成や発根が認められた。

塊茎様体を2,4-D 10 ppmの培地に移植したところ、置床後2週間目に柔らかいカルスが発生し、さらに2カ月後、半透明な球状体が集合したように見えるカルスが多数増殖した。このカルスは、継代を繰り返しても、同様に増殖した。

### (2) 液体振とう培養における高濃度オーキシン効果

塊茎様体をNAA 5 ppmの条件下で振とうした結果、塊茎様体が増殖し、継代を繰り返しても同様に増殖した。増殖した塊茎様体は、やや

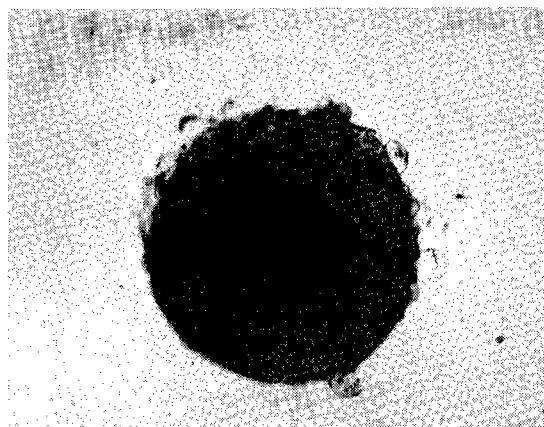
肥大し、膨潤化していた(第4図)。



第4図 振とう培養によって増殖した塊茎様体

## 3) 増殖の形態的観察

培養物の顕微鏡観察の結果、突起状の細胞が周囲にある小球状体が認められた(第5図)。不定胚形成時に出現する心臓型胚や魚雷型胚は認められなかった。



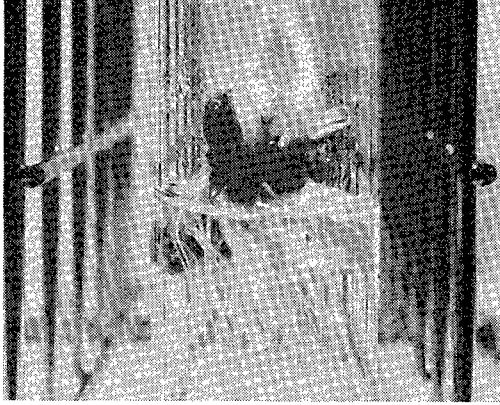
第5図 塊茎様体増殖過程の顕微鏡像

## 3. 塊茎様体再生方法の検討

ホルモン無添加培地に置床した塊茎様体が、シュートの形成と伸長が最も良好であった(第6図)。BA 0.1 ppmやKinetin 0.1 ppmの条件下でもシュートが形成されたが、多芽化と塊茎様体の変形肥大が起り、塊茎様体がいびつになる傾向があった。

2,4-D 5 ppmの固体培地において形成された球状体を、ホルモン無添加培地に置床したところ、半透明な球状体からは半透明な奇形芽

が伸長したが、一部、正常な芽が生じる球状体も存在した。不透明な球状体からは、正常に芽が伸長し、塊茎様体に類似した形態を示した。



第6図 塊茎様体からのシュート伸長

#### IV 考 察

##### 1. 塊茎様体形成反応

###### 1) 品種、ステージ、培養部位と培養反応

培養環境の差だけでなく、培養物の成長段階や遺伝子型が、培養反応に対して影響を及ぼすということは、一般的に認められている<sup>3)</sup>。また、発芽種子の子葉や若い葉は、古い葉では消失してしまつた分化能を保持しているということも昔から知られている<sup>3)4)</sup>。これらを参考にし、本実験の結果について考察した。

###### (1) 品種との関係

“ピュアホワイト”では、成葉でも若葉でも塊茎様体形成は比較的良好であったが、“ビクトリア”と“バーバーク”では形成率が悪く、特に“バーバーク”では全く形成されなかった。“バーバーク”では、分化能力が高いと考えられている若葉の葉身や葉柄でも、カルス形成率は高くなるが、塊茎様体は形成されなかった。このように、用いた塊茎様体形成法では、形成能力の品種間差が強くてることが判明した。大橋ら<sup>5)</sup>は、高濃度の2, 4-D(1.0~5.0ppm)と低濃度のBA(0.01~0.5ppm)を組み合わせたMS培地で、根から不定胚経由の塊茎様体を誘導しているが、この場合も分化率には品種、系統間差異があり、また、“ビクトリア”の分化

率は低い。しかしながら、“ビクトリア”、“バーバーク”ともに他の培養方法では、比較的効率よく不定芽の分化が起こることから<sup>6)</sup>、さらに詳細に培養環境の検討を行えば、これらの品種についても効率的に塊茎様体を形成できる可能性があるかと推察される。

###### (2) ステージとの関係

“ピュアホワイト”において、葉身からの塊茎形成は、成葉(葉長5.0cm)でも若葉でもほとんど変わらなかった。Hawkesら<sup>7)</sup>は、外植体の播種後日数と、外植体である若葉身の不定芽形成能との関係を調査し、播種後1カ月の葉身は形成能が低く、2~4カ月目の葉身は同程度に形成能が高く、5カ月目の葉身では形成能が低下することを明らかにした。このことから、若葉身が、分化能力が低いステージにあるとは考えにくい。また、第3表に示したように、成葉であっても、葉長4.0cm程度のもものでは、塊茎様体形成率が100%であった。これらの結果から考えると、塊茎様体を形成させる場合は、単純に若い葉身を用いると良いとはいえず、葉長4.0cm程度の成葉を用いると良いと考えられた。

###### (3) 培養部位との関係

第2表に示すように、“ピュアホワイト”では、葉柄からも比較的良好に塊茎様体が誘導された。本実験では、葉柄の塊茎様体形成能は、葉身よりも高かった。葉柄は培養反応が良いので、多くの培養系で利用されている<sup>6)8)9)</sup>。栃木県農業試験場の報告<sup>9)</sup>では、実生苗からの不定芽形成能について、暗黒条件の培養では葉柄の分化能が葉身より高かったとしている。岐阜県農業総合研究センター<sup>10)11)12)13)</sup>でも、葉柄を用いた塊茎様体形成について一連の研究を行っている。

葉身については、齢が進み塊茎様体形成能が低下するにつれて、塊茎様体形成部位が葉身周辺部に移行する傾向があった。実生苗の葉身では、培養による出芽率は葉身の部位で差が無いと報告されている<sup>9)</sup>。これらのことから、実生苗の葉や展開後まもない成葉のような培養による分化能が高い材料では、部位による分化能の

勾配は生じないが、齢が進むとともに葉の中央部から分化能が消失し始めると考えられた。第4表の実験結果も、これを支持する。本実験では、斑の部分からは塊茎様体が誘導されなかったが、他の実験区で一部斑からも塊茎様体が誘導されたことがあるため、斑と分化能との関係はさらに検討を要する。

## 2) 培養初期ストレス処理効果

不定胚誘導の際、高浸透圧ストレスや高濃度次亜塩素酸ナトリウム処理などのストレスを前処理として外植体に付与することにより、不定胚が誘導されることがある。この場合、ストレス誘導性タンパク質が関与すると考えられている<sup>14)</sup>。ストレス誘導性タンパク質は、温度処理等でも生じる。本実験で採用した培養系は、基本的には不定胚誘導系である。先に述べたように、培養の初期段階で外植体に温度ストレスや飢餓処理を与えることによって、塊茎様体の形成率が向上する傾向がみられた。従って、培養初期ストレス処理が、塊茎様体形成にも効果をもつ可能性があることが、本実験結果から示唆された。

## 2. 塊茎様体増殖法

塊茎様体をクローンのマイクロチューバーとして用いるという当初の目的を達成するためには、塊茎様体が、①効率よく増殖する、②良質のマイクロチューバーとしての特質を備える等の条件を満たす必要がある。増殖率については、岐阜県農業総合研究センターで開発された方法<sup>11)</sup>、すなわちマイクロチューバー増殖率が2カ月で約20倍であることを参考にして考察した。良質なマイクロチューバーの定義はいくつか考えられるが<sup>15)</sup>、本報では形態と乾燥耐性に関して考察を加えた。

### 1) 液体回転培養法による増殖法の検討

BA 0.1ppmの区とBA 1.0+NAA 0.1ppmの区で20倍以上の増殖率がみられ、比較的良好な増殖率であると考えられた。液体回転培養を行った場合、一般的に塊茎様体が膨張肥大する傾向があった。膨張肥大化すると、塊茎様体はいびつになる。いびつなマイクロチューバーを用いると、苗や成株の仕立ての際に悪影響がで

と考えられる。また、マイクロチューバーは、保存性を備え、圃場での取扱いができるものを開発する必要があるため、乾燥耐性は必要条件である。液体培養により膨張肥大したものは、乾燥耐性が低いと考えられる。従って、膨張肥大の起こりにくく、形の整った球形の塊茎様体を増殖したBA 0.1ppmの処理区が、最も適する増殖条件であると考えられた。

### 2) 高濃度オーキシン添加効果

#### (1) 固体培地における高濃度オーキシンの効果

初代培地と同じ2, 4-D 1.0ppm培地において、塊茎様体の継代による増殖ができず、ホルモン無添加の場合に生じるようなシュート伸長が起こったのは、ホルモン条件に対する組織の“慣れ”によるものであろう。高濃度ホルモン条件で塊茎様体に生じた柔らかいカルスから誘導された球状体は、増殖効率も良く、シュート形成、発根が誘導されることから、マイクロチューバーとしての利用を今後検討する必要がある。

#### (2) 液体振とう培養における高濃度オーキシンの効果

液体振とう培養では、高濃度オーキシン条件下で良好な増殖が起こったが、膨張肥大が見られることから、マイクロチューバーとしての直接的な利用は困難である。膨張肥大を抑制する方法の開発が必要である。

以上のように、3種類の系で、塊茎様体および球状体の良好な増殖が認められた。今後これらの増殖系を比較、検討することにより優良なマイクロチューバー増殖系を確立できる可能性がある。

### 3) 増殖の形態的観察

培養物の形態観察の結果、カルスから分離している塊茎様体は、微小な時期から球形の組織として発生しており、肥大、成長して塊茎様体になると考えられた。また、塊茎様体の発生が正常な不定胚形成系を経っていないことも明らかとなった。

## 3. 塊茎様体の再生方法

前述したように、苗や成株の仕立てが良好になるためには、塊茎様体は形が整った球形で、芽の原基と根の原基が各一つずつある二極性で

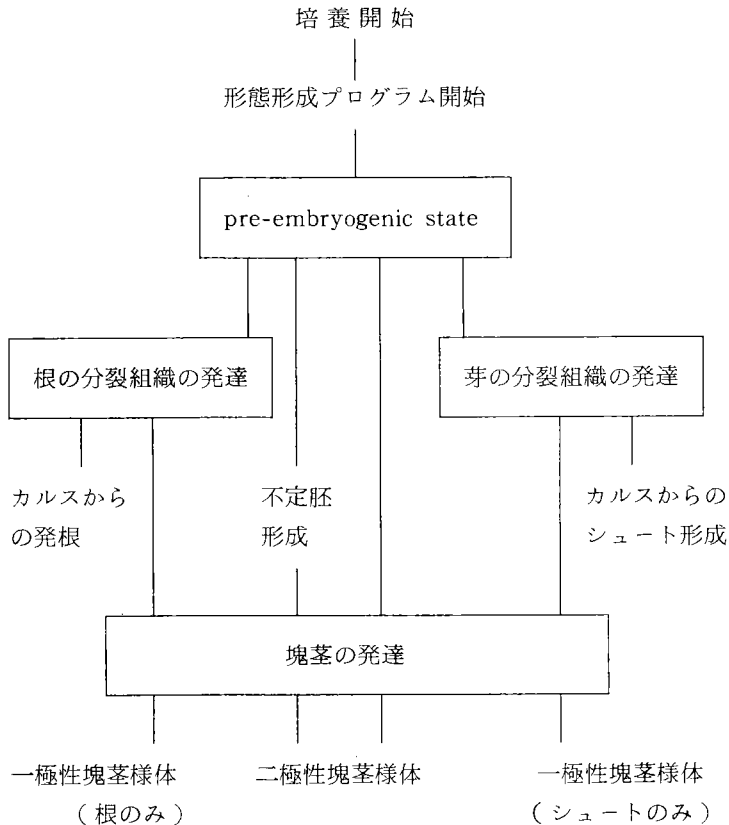
あることが望ましい。従って、ホルモン無添加条件での再生が最適であると考えられた。高濃度オーキシンの処理により形成された球状体も再生能力があることから、塊茎様体として利用できることが確認できた。

4. 総合考察

本実験で用いた初代培養の培地は、不定胚誘導系のものであるが、培養後1カ月目のホルモン無添加培地への継代を行っていない点が異なっている。培地のオーキシンレベルが徐々に低下することによって、不完全な不定胚誘導系となり、不定胚誘導系での最終的な形成体としての塊茎様体が、直接的に生じたと考えられた。

また、培養によって形成された塊茎様体には、

カルスから分離しシュートと根を形成している二極性のものと、カルスに連絡している一極性のものが混在していた。この現象については、Wicartら<sup>16)</sup>の説がある。Wicartらは、Geierの方法による shoot budと root, Morelの方法による tuber-like structure, Fersingの方法による embryo-like structureを比較し、これらは全く別のものであるが第7図のような関係にあるとしている。すなわち、すべての再生物はpre-embryo-genic stateから生じており、somatic embryoができる経路で早期に塊茎形成が起これると二極性の塊茎様体ができる。また、一つの分裂組織が退化すると一極性になるが、このとき早期に塊茎が形成されると一極性の塊茎様体



第7図 シクラメン組織培養における形態形成経路 (Wicart 1984 より改変引用)



になり、早期に塊茎形成能が消失すると shoot bud や root が形成されるとしている。これらの転換点は微妙なバランスによるものであり、制御条件の安定性がかなり高い状態でないと、様々な形態が混在すると考えられる。

本報では、塊茎様体の形成、増殖、再生に関して諸知見を得た。今後は、これらの現象について詳細に追究し、塊茎様体形成の制御条件を確立するとともに、マイクロチューバーとしての利用に向けて、さらに検討を加えていく必要がある。

## V 摘 要

現在、シクラメンは種子繁殖により増殖しているのに、形質がばらつきやすいことが問題となっている。そのため、組織培養によるクローン苗作出法が数多く研究されている。本報では、組織培養によって作出された塊茎様体をマイクロチューバーとして利用することを将来的な目的とし、塊茎様体の形成、増殖、再生に関する実験を行った。

塊茎様体形成率には品種間差異があり、ステージや培養部位によっても影響を受けることが確認できた。また、形成率には、培養初期ストレス処理が促進効果をもつ可能性が示唆された。

塊茎様体は、BA 0.1 ppm の LS 液体回転培養によって良好に増殖した。また、高濃度のオーキシンを添加した固体培地へ塊茎様体を継代した結果、柔らかいカルスの形成を経て、球状体を含む球状カルスが誘導された。塊茎様体は、高濃度のオーキシンを含む振とう培養によっても増殖した。ホルモン無添加の培地で、塊茎様体は良好にシュートを形成し、伸長した。塊茎様体のマイクロチューバーとしての利用可能性に関しては、今後更に追求したい。

## IV 引用文献

1. 島田多喜子・大谷基泰 1990. シクラメンの体細胞不定胚による大量増殖 園学別 1 : 574-575.
2. Otani, M & T. Simada 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Cyclamen persicum* Mill. leaf culture. Plant Tissue Culture Letters, 8 (2) : 121-123.
3. Geier, T., H.W. Kohlenbach and G. Reuther, 1990. In "Handbook of Plant Cell Culture Vol. 5" (Ammirato, P.V., D.A. Evans, W.R. Sharp, Y.P.S. Bajaj ed. by), eds., Macmillan, New York, pp. 352-374.
4. Hill, A.W. 1920. Studies in seed germination: Experiments with *Cyclamen*. Ann. Bot. 34 : 417-429.
5. 大橋一夫ら 1991. シクラメンの組織培養による増殖(第5報)不定胚系による増殖園学別 1 : 444-445.
6. Murasaki, K. & H. Tsurushima 1988. Improvement on clonal propagation of *Cyclamen* in vitro by the use of etiolated petioles. Acta horticulturae 226 : 721-724.
7. Hawkes, H.Y. & H. Wainwright 1987. In vitro organogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. seedling tissue. Acta Horticulturae 212 : 711-714.
8. 篠田環ら 1989. 液体振とう培養によるシクラメン葉柄・根からの植物体再生 園学別 2 : 114-115.
9. 大橋一夫, 小松田美津留, 峯岸長利, 米内貞夫 1989. シクラメンの組織培養による大量増殖 栃木農試研報 36 : 93-108.
10. 篠田環ら 1987. 柄物シクラメン優良系統の急速大量増殖法—液体振とう培養による葉柄からの塊茎様器官の誘導— 開発研究部試験成績書(岐阜県) : 55-56.
11. 篠田環ら 1988. 柄物シクラメン優良系統の急速大量増殖法—同調培養系の検討— 開発研究部試験成績書(岐阜県) : 69-70.
12. 篠田環ら 1989. 柄物シクラメン優良系統の急速大量増殖法 不定芽形成時のGA<sub>3</sub>処理効果 生物工学試験成績書(岐阜県) : 53-54.

13. 篠田環ら 1990. 柄物シクラメン優良系統の急速増殖法 多芽体分割法による増殖法 生物学試験成績書 (岐阜県) : 25-26.
14. 鎌田博, 原田宏 1989. 「植物遺伝情報の変換—細胞・分子レベルの植物育種をめざして—」 高橋萬右衛門監修 岡田吉美 木下俊郎 鈴木昭憲 山田康之 編 : p.173-195. 秀潤社.
15. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編. 1990. 野菜の組織・細胞培養と増殖 (最新バイオテクノロジー全書 2). p.124-127. 農業図書.
16. Wicart, G., Mouras, A., & Lutz, A., & Lutz, A. 1984 Histological study of organogenesis and embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. tissue cultures : Evidence for a single organogenetic pattern. *Protoplasma* 119 : 159-167.

Tuber-like Structures Induction of *Cyclamen*, *Cyclamen persicum* Mill. by Tissue Culture

Naoe KOBAYASHI

Summary

*Cyclamen persicum* Mill. is propagated commercially by seed, which results in a heterogeneous population of seedlings. Therefore many attempts have been made to establish clonal propagation using tissue culture. In this study I investigated about induction, propagation and regeneration of tuber-like structures for the future purpose of using them as micro-tubers.

It was confirmed that the induction rate of tuber-like structures was different between their varieties and affected by the growing stage and the part (or segment) of explants. Furthermore it was suggested that stress treatments at culture initiation had positive effect on the induction rate. Tuber-like structures presented a good propagation on liquid LS medium with 0.1 ppm BA by rotary culture. When tuber-like structures were recultured to solid medium containing high concentration of auxin, globular calli with globular body were induced through the formation friable calli. Tuber-like structures were propagated on liquid medium containing high concentration of auxin by shaking culture. Shoot formation and elongation occurred on the medium without growth regulators.

The availability of tuber-like structure as micro-tuber has to be studied continuously in future.