

人工培地上における *Cyclamen coum* Mill. の花粉発芽

高村武二郎・石塚栄治

In Vitro Germination of Pollen Grains in *Cyclamen coum* Mill.

Takejiro Takamura and Eiji Ishizuka

Summary

To promote the *in vitro* germination of *Cyclamen coum* pollen grains, effect of boric acid and calcium chloride on the germination of pollen grains was investigated. The effect of the stigma with style of *Cyclamen* plants on the *in vitro* germination was also investigated. The *in vitro* germination rate was improved in medium with $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ boric acid and $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ calcium chloride. The stigma with style placed on a medium also promoted the *in vitro* germination. The stigma with style of *C. coum* was more effective for the *in vitro* germination as compare to that of *C. persicum* and *C. repandum*.

Key Words : *Cyclamen coum*, pollen, germination, boric acid, calcium chloride, stigma

緒 言

シクラメン属植物には22種が存在するが⁽¹⁾, シクラメン園芸品種は, *Cyclamen persicum* 1種のみから成立している. しかしながら, シクラメン属の中には*C. persicum* にない有用形質を有する種が存在し. これら有用形質の園芸品種への導入によりシクラメンの変異の拡大が期待されている. これまでにいくつかの種間雑種が作出されているが⁽²⁻⁷⁾, 種間雑種個体を高い確率で得るためには, 種子親個体の選抜とともに⁽⁷⁾, 受精能力の高い花粉の選抜が有効である. また, シクラメン属植物では種により開花期が異なるため, 開花期が異なる種間の交雑では花粉の貯蔵が必要な場合があり, 貯蔵後の花粉稔性の確認が必要となる. したがって, 人工培地上での花粉発芽条件が確立していれば, 受精能力の高い花粉の選抜や貯蔵花粉の稔性確認が容易になるものと考えられ, シクラメン園芸品種では, 糖のみを添加した培地上で $10 \sim 25^\circ\text{C}$ で培養することにより容易に花粉が発芽することが報告されている⁽⁸⁾.

*C. coum*は*C. hederifolium*とならんで, 強健で育てやすい種とされており⁽¹⁾, 屋外栽培用のシクラメンとして有望な遺伝資源と考えられる. しかしながら, 高村ら⁽⁹⁾は, シクラメン野生種の人工培地上での花粉発芽を試み

たところ, 多くのシクラメン属植物の花粉はショ糖のみを添加した寒天培地で容易に発芽したものの, *C. coum*は人工培地上での花粉発芽が難しく, ショ糖のみを添加した寒天培地では, 培養温度を変化させても発芽率は改善できなかったと報告している. そこで本研究では, 人工培地上での*C. coum*花粉の発芽条件の確立を目的として, 人工培地上での*C. coum*花粉の発芽に及ぼすホウ酸(BO_3), 塩化カルシウム(CaCl_2)およびシクラメン属植物の柱頭添加の影響を調査した.

材料および方法

1. 人工培地上での花粉発芽率の個体間差異

10株の*C. coum*を供試した. 直径9 cm, 厚さ2 cmのプラスチックシャーレに, 10%ショ糖を添加した1%寒天培地(以下, 基本培地とする)を注入し, 開花当日の新鮮花粉を置床した. 本実験では, カバーガラス(18×18 mm, 厚さ0.12~0.17 mm)の縁に花粉をつけ, 寒天培地上に線状に致傷する方法⁽¹⁰⁾を用いた. 置床後, ふたをし, パラフィルムで密閉したシャーレを 20°C 暗黒下で12時間培養した. 検鏡には光学顕微鏡を用いて花粉発芽率を調査した. いずれの株においても300個の花粉を調査した. また, 花粉をアセトカーミンで染色し, その染色率も調査した.

2. 花粉発芽に及ぼす BO_3 , CaCl_2 および柱頭の影響

基本培地上で花粉発芽が認められなかった株のうち3株 (*C. coum*-2, 3および4) を供試した. これらの株の開花当日の新鮮花粉を0, 20, 100または500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の BO_3 , および0, 60, 300または1500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の CaCl_2 を組み合わせて添加した基本培地に置床し, 花粉発芽に及ぼす BO_3 および CaCl_2 の影響を調査した. また, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BO_3 および300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 を添加した, または無添加の基本培地にあらかじめ*C. coum*, *C. persicum* ‘アンネツケ’または*C. repandum*の柱頭を, 花柱をつけた状態で置床し, その後柱頭から1 cmの位置に花粉を置床して, 花粉発芽に及ぼす培地への柱頭置床の影響を調査した. 花粉の置床方法および培養条件は, 前述の実験と同様とした. いずれの株においても各処理区300個の花粉を調査した.

結果および考察

供試した*C. coum*株のいずれにおいても花粉粒のアセトカーミン染色率は90%以上であったが, 基本培地上での花粉発芽率は低く, 26.1%の花粉が発芽した1株以外はいずれも5%以下の発芽率であり, 7株では発芽した花粉が認められなかった(第1表). なお, これらの株で自家受粉を行ったところ, いずれの株においてもほとんどの花で結実が認められ, 種子も得られた(データ未掲載). したがって, これらの株の花粉の多くは, 発芽能力を有しているものの, ショ糖のみを添加した寒天培地上では, 発芽が著しく抑制されるものと示唆される. 本研究の基本培地と同様の培地で低いながらも*C. coum*花粉の発芽が認められたことが報告されているが⁽⁹⁾, 本研究の結果, *C. coum*のショ糖のみを添加した寒天培地上での花粉発芽には個体間差異があり, 個体によっては著しくその発芽が抑制されるものと考えられる.

Table 1. *In vitro* pollen germination of *C. coum* on media without BO_3 and CaCl_2 .

Individuals	Percent pollen grains stained with acetocarmine ^z	Percent pollen grains germinated ^y
<i>C. coum</i> -1	92.2±0.6	2.9±1.7
<i>C. coum</i> -2	91.1±1.4	0
<i>C. coum</i> -3	90.8±0.9	0
<i>C. coum</i> -4	90.0±2.5	0
<i>C. coum</i> -5	90.4±2.2	0
<i>C. coum</i> album-1	91.3±0.6	26.1±4.9
<i>C. coum</i> album-2	90.4±2.9	0
<i>C. coum</i> album-3	90.2±0.4	2.8±1.6
<i>C. coum</i> album-4	91.1±1.8	0
<i>C. coum</i> album-5	93.1±0.7	0

^{z,y} Mean ± SE (n=3)

ホウ素とカルシウムは, 無機元素の中でも花粉の発芽に促進的に働くとしてされており⁽¹¹⁾, アマリリスでは, ホウ素化合物による花粉発芽の促進が報告されている⁽¹²⁾. そこで*C. coum*の花粉発芽に及ぼす BO_3 および CaCl_2 の影響を調査した結果, BO_3 および CaCl_2 のいずれもが, *C. coum*の花粉発芽に有意に影響することが示された(第2表). BO_3 無添加の培地では, CaCl_2 をいずれの濃度で添加した場合でも花粉の発芽が認められなかった. 一方, CaCl_2 無添加の培地では, BO_3 を添加した培地で花粉の発芽が認められたものの, その値は4.7%以下と低かった. また, BO_3 の濃度にかかわらず高濃度(1500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)の CaCl_2 は花粉の発芽を抑制したが, CaCl_2 の最適濃度は BO_3 の濃度により異なり, *C. coum*の人工培地上での花粉発芽において, 培地に添加する BO_3 と CaCl_2 の濃度の影響に相互作用があるものと思われた. 最も高い花粉発芽率は, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BO_3 と300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 を添加した処理区で示され, BO_3 と CaCl_2 を組み合わせることで, *C. coum*の人工培地上での花粉発芽率を向上できることが示された. しかしながら, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BO_3 と300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 を添加した処

Table 2. Effects of BO_3 and CaCl_2 on pollen germination in *C. coum*.

Concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		Percent pollen grains germinated ^z
BO_3	CaCl_2	
0	0	0
0	60	0
0	300	0
0	1500	0
20	0	3.4±1.8
20	60	12.2±1.1
20	300	6.4±1.5
20	1500	0
100	0	1.0±1.0
100	60	12.1±2.1
100	300	22.6±3.6
100	1500	4.1±2.6
500	0	4.7±2.5
500	60	9.8±3.3
500	300	11.0±3.4
500	1500	2.7±1.0
<i>Significance</i>		
BO_3		$P < 0.001$
CaCl_2		$P < 0.001$
Interaction		$P < 0.001$

^z Mean ± SE (n=3)

Table 3. Effects of stigma with style on the pollen germination in *C. coum*.

Cocentration (mg·L ⁻¹)		Stigma + style	Percent pollen grains germinated ²
BO ₃	CaCl ₂		
0	0	—	0
0	0	'Anneke'	8.1 ± 2.1
0	0	<i>C. coum</i>	11.9 ± 1.4
0	0	<i>C. repandum</i>	6.0 ± 1.4
100	300	—	21.8 ± 4.3
100	300	'Anneke'	42.9 ± 3.5
100	300	<i>C. coum</i>	71.0 ± 4.4
100	300	<i>C. repandum</i>	39.4 ± 1.0

Significance

BO ₃ + CaCl ₂	P < 0.001
Stigma + style	P < 0.001
Interaction	P < 0.001

² Mean ± SE (n=3)

理区でも花粉発芽率は22.6%であり、この処理区でも花粉発芽の抑制は完全には解消されていないものと推測された。オーニソガラムでは、シヨ糖培地中にホウ素とカルシウムに加えて、マグネシウムやマンガンまたは亜鉛を組み合わせて添加した場合に花粉発芽が促進されたと報告されており⁽¹³⁾、*C. coum*花粉の人工培地上での花粉発芽を促進するためには、ホウ素とカルシウム以外に花粉発芽を促進する物質を培地に添加する必要があるものと考えられた。

ペチュニアの柱頭の粘液中に10種類以上のアミノ酸が含まれていたと報告されているように⁽¹⁴⁾、柱頭分泌液には種々の成分が含まれており、花粉の付着を容易にするだけでなく花粉の発芽と伸長を促す働きがあると考えられている⁽¹¹⁾。イチジクでは、柱頭分泌液を添加した人工培地で花粉発芽が促進されることが報告されており⁽¹⁵⁾、ダイコンでは、柱頭、花柱、子房、胚珠などの器官を人工培地に添加することにより花粉発芽が促進され、特に若い柱頭の添加による促進効果が高かったことが報告されている⁽¹⁶⁾。*Cyclamen*属植物では柱頭が小さいため、本研究では柱頭に花柱が付いた状態（柱頭+花柱）で培地に置床し、*C. coum*花粉発芽の促進を試みた結果、培地への100 mg·L⁻¹ BO₃と300 mg·L⁻¹ CaCl₂の添加の有無

にかかわらず、柱頭+花柱置床区で花粉の発芽が認められた（第3表）。特に、100 mg·L⁻¹ BO₃と300 mg·L⁻¹ CaCl₂を添加した培地においては、柱頭+花柱を置床することにより花粉の発芽が著しく促進された。岩波⁽¹¹⁾は、異なる種の柱頭分泌液を培地に添加した場合には花粉発芽がむしろ阻害される場合もあるとしているが、本研究においては、*C. coum*以外の園芸品種の‘アンネッケ’または*C. repandum*の柱頭+花柱を置床した場合にも*C. coum*の花粉発芽が促進された。しかしながら、*C. repandum*または園芸品種の‘アンネッケ’の柱頭+花柱を置床した場合と比較して、*C. coum*の柱頭+花柱を置床した場合に明らかに高い花粉発芽率を示し、花粉と同種の*C. coum*の柱頭+花柱を置床することにより、発芽がより促進されるものと考えられた。

本研究の結果、培地に100 mg·L⁻¹ BO₃および300 mg·L⁻¹ CaCl₂を添加し、さらに*C. coum*の柱頭+花柱を花粉と同時に置床することにより、*C. coum*花粉の人工培地上での花粉発芽が著しく促進されることが明らかとなった。この条件を用いて、*C. coum*でも人工培地上での花粉発芽能力の検定が可能になるものと考えられる。

摘 要

本研究では、人工培地上での*C. coum*花粉の発芽促進を目的として、人工培地上での*C. coum*花粉の発芽に及ぼすホウ酸 (BO₃)、塩化カルシウム (CaCl₂) およびシクラメン属植物の柱頭添加の影響を調査した。その結果、100 mg·L⁻¹ BO₃および300 mg·L⁻¹ CaCl₂を培地に添加することにより花粉の発芽が促進された。さらに、花柱をつけたシクラメン属植物の柱頭を花粉と同時に置床することにより、人工培地上での花粉発芽が促進された。また、*C. persicum*や*C. repandum*の花柱付き柱頭を用いた場合よりも、*C. coum*の花柱付き柱頭を用いた場合に花粉発芽がより促進された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な御助言を賜った香川大学農学部名誉教授田中道男博士に深く感謝の意を表す。

引用文献

- (1) Grey-Wilson, C.: *Cyclamen*, Timber Press, Portland (2002).
- (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, 353-356 (1992).
- (3) Ishizaka, H. and Uematsu, J.: Production of 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) Eward, A.: Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. *Plant Breeding*, 115, 162-166 (1996).
- (6) 澁澤直恵, 小川謙司: 胚珠培養法を用いた *Cyclamen persicum* Mill. と *C. rohlfsianum* Aschers. および *C. persicum* と *C. libanoticum* Hildebr. の種間雑種の作出. *東京農試研報*, 27, 9-15 (1997).
- (7) 高村武二郎, 山田理恵子, 田中道男: シクラメン園芸品種 (*Cyclamen persicum* Mill.) と *C. purpurascens* Mill. の種間雑種作出に及ぼす種子親の遺伝子型の影響. *香川大学農学部学術報告*, 54, 45-48 (2002).
- (8) 高村武二郎, 中尾友美, 田中道男: 人工培地上でのシクラメン花粉の発芽に及ぼす光および温度の影響. *香川大学農学部学術報告*, 48, 39-46 (1996).
- (9) 高村武二郎, 尾美静恵, 田中道男: 人工培地上におけるシクラメン野生種の花粉発芽. *園芸学会雑誌*, 65 (別2), 68-69 (1996).
- (10) 岩波洋造: 花粉学大要. 風間書房, 東京 (1976).
- (11) 岩波洋造: 花粉学. 講談社, 東京 (1976).
- (12) Stanley, R. G. and Lichtenberg, E. A.: The effects of various boron compounds on *in vitro* germination of pollen. *Physiol. Plant.*, 16, 337-346 (1963).
- (13) Brewbaker, J. L. and Kwack, B. H.: The essential role of calcium ion in pollen tube growth. *Amer. J. Bot.*, 50, 859-865 (1963).
- (14) Konar, R. N. and Linskens, H. F.: Physiology and biochemistry of the stigmatic fluid of *Petunia hybrida*. *Planta*, 71, 372-387 (1966).
- (15) 栗村光男, 正田耕二, 比良松道一: 柱頭分泌液を利用した人工培地におけるイチジク花粉の発芽. *園学雑誌*, 63, 739-743 (1995).
- (16) Matsubara, S. and Miki, N.: Germination promoters of radish pollen cultured *in vitro*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 61, 79-84 (1992).

(2013年10月31日受理)