

タカネマンテマ (*Silene wahlenbergella*) の大量増殖

西川 浩己 清藤 城宏

Mass Propagation of Takanemantema (*Silene wahlenbergella*) by Tissue Culture

Hiroki NISHIKAWA and Kunihiro SEIDO

Summary : *In vitro* mass propagation techniques of *Silene wahlenbergella* were studied. Apical buds and terrestrial stems isolated from aseptically germinated seedlings were used as culture materials. They were cultured in MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 0.5 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA were effective for multipleshoot formation in primary culture and multipleshoot formation continuously occurred on the same media in sub-culture. For rooting, elongated shoots obtained in sub-culture were transplanted to MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and they successfully rooted. Regenerated plantlets were acclimated by transplanting to pots filled with vermiculite.

要旨 : タカネマンテマの組織培養による大量増殖方法の検討を行った。無菌播種して育成した実生から得られた頂芽と地上茎を培養し、MS培地にBAPを5 mg/lとNAAを0.1 mg/lを組み合わせて添加した処理区で初代培養した場合、多芽体の誘導に効果があった。また、得られたシュートを同様の培地で継代培養することにより、継続して多芽体が誘導された。増殖したシュートをNAAを1 mg/l添加した培地に移植したところ、容易に発根した。再生した幼植物体は、パーミキュライトをつめたポットに移植し、順化することに成功した。

1 はじめに

日本列島は豊かな野生植物相を有し、約7,000種が生育している。しかし、近年、自生地の破壊、不法採取、野生動物の食害等により、多数の種が絶滅の危険にさらされている(中部森林管理局2007、岩槻1992、環境庁編2000、名取1999)。

山梨県には、南アルプスを中心として固有の高山植物種が多数知られているが、これらにも同様に個体数の減少等が認められ、絶滅が危惧されている。そこで、山梨県では「高山植物の保護に関する条例」を制定し、これらの保護に努めている(山梨県環境局景観自然保護課1985)。

タカネマンテマ (*Silene wahlenbergella*) は、ナデシコ科の多年生植物で北半球寒帯に分布し、我が国の南アルプスは本種の分布の南限にあたり(北川1982)、植物地理学的に貴重である。本種は山梨県高山植物保護条例で特定高山植物に指定されているが、自生地では個体数が減少し環境省「レッドデータブック」では絶滅危惧

IB類にランクされ、絶滅の危険性が極めて高い(環境庁2000)。本種は実生と株分けで繁殖可能であるが、実生の発芽率(西川1992)、株分けの増殖率はあまり高くない。無菌発芽(亀井2008)においては、次亜塩素酸ナトリウム浸漬処理が有効であることが報告されているが、限定された増殖材料からの大量の増殖は困難な状況にある。そこで本研究では、タカネマンテマの保護・増殖に資するため、組織培養による大量増殖法について検討し、一連の増殖手順を明らかにすることができたので報告する。

なお、本研究に用いた種子は、「山梨県高山植物の保護に関する条例」に基づき許可を得て採取した。

2 材料および方法

実験には、山梨県南アルプス市北岳の標高2,500 m付近で採取した種子を4℃、乾燥状態で3ヶ月保存後、供試した。種子は、中性洗剤で10分間洗浄後、水道の流水で15分間すすいだ。その後、70%エタノール中で1

分間、ついで有効塩素量1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で15分間、それぞれマグネチックスターラーを用いてかくはんしながら表面殺菌をおこなった。滅菌水で洗浄後、ショ糖無添加のMS培地 (Murashige and Skoog 1962) に寒天10 g/lを加え、pHを5.6に調整した培地上に置床した。培養条件はすべての実験について $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、昼光蛍光灯で照度5,000 lux、16時間/日照明とした。発芽した実生を3ヶ月間育成し (図-1)、実験に供試した。

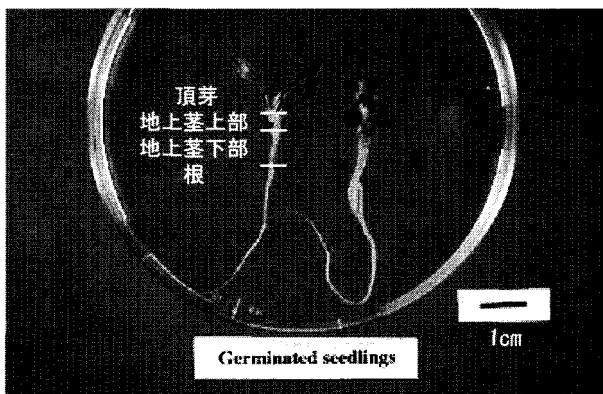


図-1 供試した無菌発芽した実生

1) 初代培養

上述の無菌実生 (頂芽までの長さ約1.5 cm) を供試し、頂芽、地上茎および根からのシュートの伸長および多芽体誘導のための培地条件について検討した。培養にはMS培地にBAP (6-Benzylaminopurine) 0、1、5、10、15 mg/lとNAA (1-Naphthaleneacetic acid) 0.1 mg/lの濃度でそれぞれ、単独あるいは組み合わせて添加した計10種類の処理区を用意した。これらの培地にショ糖30 g/l、寒天10 g/lを加え、pHはオートクレープ前に5.6に調整した。無菌実生は茎軸と葉柄を切断し、頂芽、地上茎上部、地上茎下部および根の切片に分割後、それぞれ培地に置床した。処理区毎の培養数は5とした。培養により、シュートが得られたが、本研究では、切断および計測が可能な、長さが5 mm以上のものについて測定した。以下、長さ5 mm以上のシュートをシュートと呼ぶ。初代培養開始50日後に培地に置床した切片からシュートの形成 (置床した1本以上のシュートが得られた切片の数/置床した切片の数) を調査した。

2) 継代培養

初代培養で誘導された長さ5 mm以上のシュートを1本ずつに切り分けて、継代培地に置床した。継代培養

の材料として初代培養で多芽体形成がみられた8処理区で得られたシュートを用い、それぞれを同組成の培地で継代して、多芽体誘導を検討した。処理区毎の培養数は10とした。継代培養開始から50日後に、それぞれシュートを切り取って収穫シュートとし、シュート数とシュート長を調査した。

3) 継代培養の安定性

継代培養で安定した増殖が可能か調査するために、1回目の継代培養で増殖効率の高かった6処理区を選抜し、継代培養を4回継続して実施した。処理区毎の培養数は25とした。それぞれの継代培養開始から40日後に、シュートを切り取って収穫シュートとし、シュート数を調査した。

4) 発根

上述の継代培養を5回実施して得られたシュートを発根培地に移植した。発根に対するNAA添加の効果を調査するために0、0.1、1 mg/lを加えた3種類の培地を用意した。継代培養で添加したBAP、NAAの影響を調査するため、発根培地に移植する材料として、シュートの増殖が良好であった4処理区のシュートを用い、計12処理区を設けた。処理区毎の培養数は20とし、それぞれ40日後に発根率を調査した。

5) 順化

50日間発根培地で培養した後、幼植物体の順化を行った。幼植物体を培地から抜き取り、水中で根についた培地を落とし、口径7.5 cmの高さ6.5 cmのビニール製ポットにパーミキュライト約100 cm³を培養土として植え付けた。パーミキュライトに十分吸水させた後、透明なビニール袋で覆いこれらをシャーレの上に置いた。灌水はシャーレの中に行った。40日後、ビニール袋を取り外した。

3 結果および考察

1) 初代培養

培養開始から50日後の調査結果を表-1に示した。BAP、NAA無添加区では、頂芽はそのまま伸長し、培養開始10日頃から、地上茎から芽の分化が認められた。これらの芽からは1本のシュートが伸長し、培養開始15日頃には発根するシュートも観察された。NAA 0.1 mg/l添加区においても、BAP、NAA無添加区と同様

表-1 初代培養において培地に添加した BAP、NAA の濃度が無菌実生の組織の成長に及ぼす影響

BAP 濃度 (mg/l)	NAA濃度 (mg/l)	頂芽	地上茎 上部	地上茎 下部	根
0	0	4/5	4/5	3/5	0/5
0	0.1	4/5	4/5	2/5	0/5
1	0	4/5	5/5	1/5	0/5
1	0.1	4/5	5/5	0/5	0/5
5	0	5/5	5/5	0/5	0/5
5	0.1	4/5	5/5	0/5	0/5
10	0	4/5	5/5	0/5	0/5
10	0.1	5/5	5/5	0/5	0/5
15	0	4/5	5/5	0/5	0/5
15	0.1	4/5	4/5	1/5	0/5

に芽から1本のシュートを形成し、発根するシュートが観察された。BAPを単独、あるいはBAPとNAAを組み合わせて添加した処理区では頂芽から1本のシュートが伸長し、その基部から二次的にシュートが伸長し多芽体を形成した。また、地上茎上部からは複数の芽の分化し、それらが伸長して多芽体を形成した。根からは芽の分化は起こらず、やがて褐変枯死した。地上茎下部においても、BAP、NAA無添加区を除き、芽の分化はまれにしか起こらず、やがて褐変枯死した(図-2)。

本研究の範囲ではいずれの濃度のBAPを単独、ある

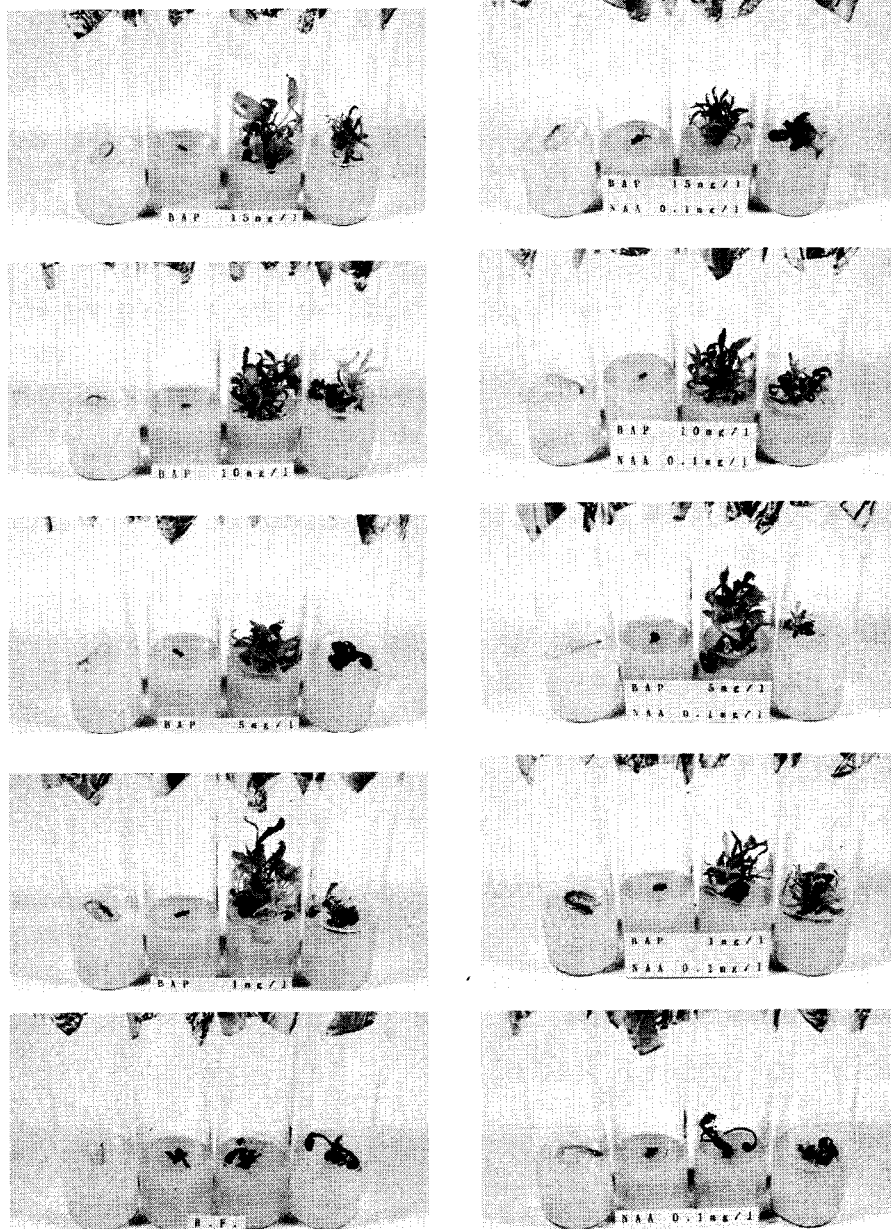


図-2 初代培養50日後における無菌実生組織の生育状況
左から 根 地上茎上部 地上茎下部 頂芽
試験管の直径は25mm

いは NAA と組み合わせて添加した場合、シュートの増殖に有効であった。同じナデシコ科の高山植物であるタカネビランジの培養については BAP のみで多芽体を誘導でき、形態異常や白化は認められていない。しかし、初代培養、継代培養に BAP 1 mg/l を含む培地を用いた場合、発根率が低下することが認められている (西川・井出 1993)。また、カーネーションの培養について、NAA と BAP を各 1 mg/l 添加した培地で多芽体を育成している (藤野ら 1971)。一方で、BAP を添加した場合、葉条の形態的な異常や白化を引き起こす可能性があることが報告されている (Davis ら 1977)。また、多芽体形成時の BAP 添加によって培養容器内での生育は早い、葉条がいくぶん軟弱に育つ傾向があるため鉢上げ率が低下すると報告されている (武田 1989)。これらのことから BAP を単独、あるいは NAA と組み合わせて添加した 8 処理区で継代培養を実施し、継代培養および発根での増殖において、初代培養における処理区を選択することとした。

2) 継代培養

継代培養開始から 50 日後の調査結果を表-2 に、シュートの形成状況を図-3 に示した。いずれの処理区でも、移植したシュートが伸長し、その基部から二次的にシュートが伸長し多芽体が形成された。BAP 5 mg/l を添加した処理区では、シュートの伸長、増殖が促進され、NAA を組み合わせて添加した場合にはさらに促進され、シュート長、シュート本数とも最大値を示した。しかし、それ以上高濃度で添加した場合にはシュートの伸長、増殖には阻害的に働いた。特に BAP 15 mg/l を添加した処理区では、NAA と組み合わせて添加した場合においても移植したシュートの伸長量が少なく、また二次的に形成されたシュートについても 5~7 mm の比較的短いシュートが増殖した。すなわち、高濃度の BAP の添加はシュートの伸長、多芽体の形成には阻害的に働いた。これらのことから 2 回目からの継代培養では、BAP 15 mg/l を添加した処理区の削除を選択した。

表-2 継代培養において培地に添加した BAP、NAA の濃度がシュートの伸長・増殖に及ぼす影響

	NAA濃度 (mg/l)	BAP濃度 (mg/l)			
		1	5	10	15
シュート長(mm)	0	10.9	13.9	11.4	8.5
	0.1	11.9	14.3	10.2	9.1
シュート本数	0	6.1	12.2	10.3	6.8
	0.1	8.3	13.5	9.8	6.7

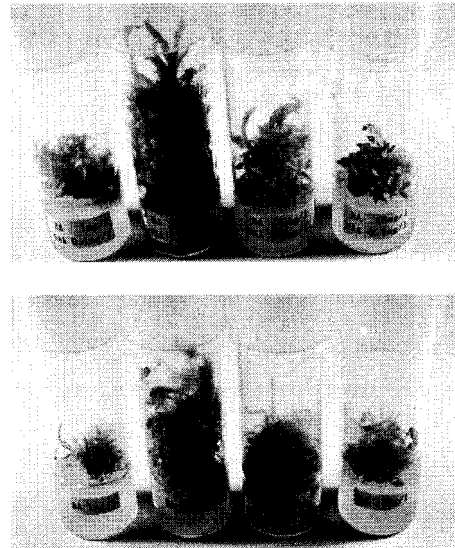


図-3 継代培養における 50 日後における多芽体の生育状況
試験管の直径は 25 mm

3) 継代培養の安定性

初回の継代培養と同様に移植したシュートが伸長し、その基部から二次的にシュートが伸長し、多芽体が形成された (図-4)。いずれの継代培養においても、初回の継代培養と同様に BAP 5 mg/l を添加した処理区では、シュートの伸長、増殖が促進され、NAA と組み合わせて添加した場合にはさらに促進され、シュート本数

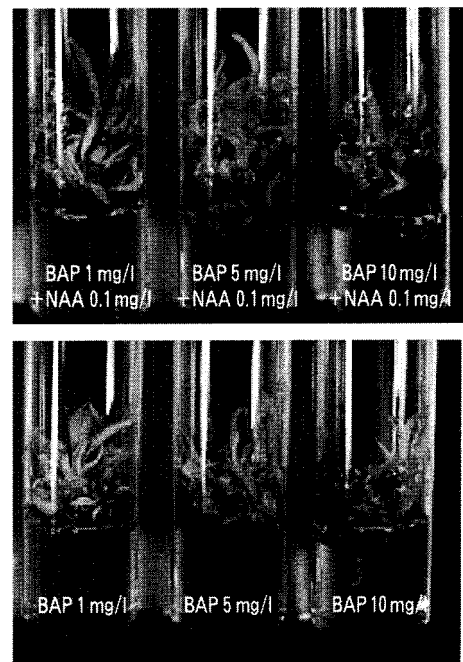


図-4 継代培養を 5 回繰り返して誘導された多芽体の生育状況
試験管の直径は 25 mm

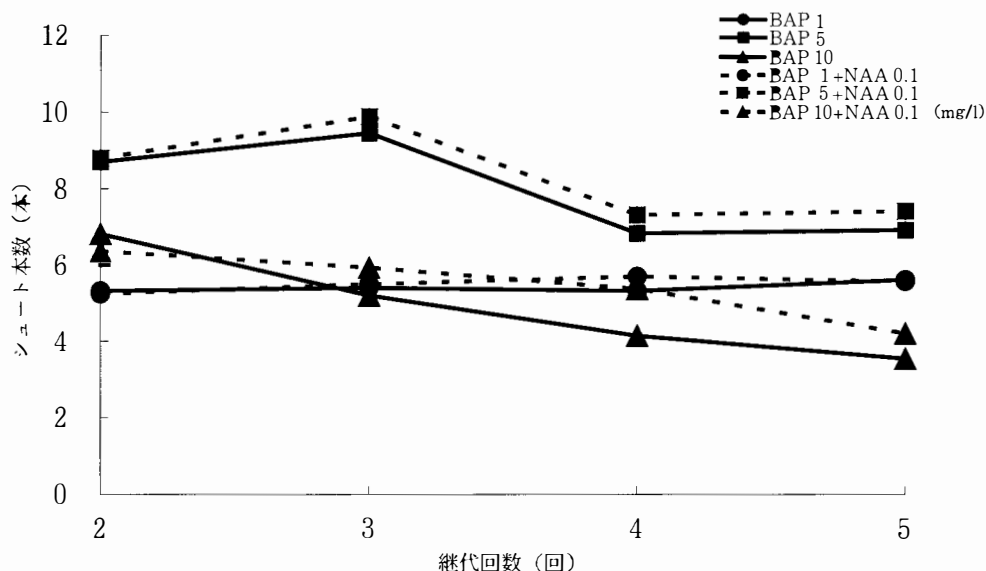


図-5 継代培養において添加したBAP、NAAの濃度がシュートの増殖に及ぼす影響

は最大値を示した (図-5)。データは示さないが、初回の継代培養と継代培養を繰り返した場合でのシュートの長さは、ほとんど変わらなかったことを確認している。BAP 10 mg/l を添加した処理区では、NAA と組み合わせて添加した場合においても二次的に形成されたシュート数が減少し、多芽体の形成には阻害的に働いた。これらのことから継代培養では、BAP 10 mg/l を添加した処理区の削除を選択した。

4) 発根

継代培養により得られたシュートからの発根状況を、表-3および図-6に示した。いずれの処理区においても移植後10日頃から発根がみられ始めた。また、発根培地に移植したシュートは多芽体を形成するものがみられたが、発根が阻害されることはなかった。発根培地に添加したNAAの効果では、処理濃度により発根率の著しい差は認められなかった。しかし、継代培養でBAP 5 mg/lのみを添加した処理区で培養されたシュートで

は、発根が抑制された。これは、BAPのみが添加された培地で継代培養を繰り返した場合、植物体内にBAPが蓄積され、発根培地に移植した後もその影響が残るものと考えられた。継代培養でNAAが添加された処理区では、発根率の低下は認められなかった。これらのことから、発根においては継代培養におけるNAA添加の影響が強く働くものと考えられた。発根培地に添加したNAAの効果は明確ではなく、ホルモンフリーの培地で十分な発根が認められたが、BAPの影響を抑えるため、発根培地としてはNAA 1 mg/lを添加したMS培地を用いることが適当と判断した。

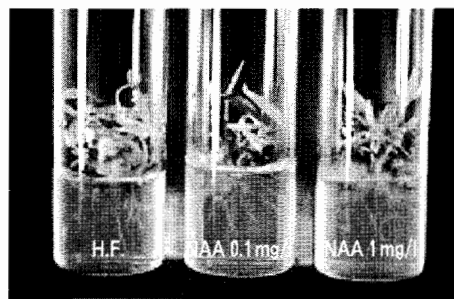


図-6 発根培地に移植40日後のシュートの発根状況
試験管の直径は25mm
継代培地はBAP 5 mg/lとNAA 0.1 mg/lを組み合わせて添加したMS培地

表-3 継代培養において培地に添加したBAP、NAAの濃度がシュートの発根に及ぼす影響

NAA濃度 (mg/l)	発根率 (%)			
	継代培養で添加したBAP、NAAの濃度 (mg/l)			
	BAP1	BAP5	BAP1+NAA0.1	BAP5+NAA0.1
0	86	50	80	84
0.1	80	44	78	82
1	88	64	84	84

5) 順化

発根培地で発根した個体のほとんどが順化可能であった。順化後、9ヶ月間育苗した培養苗の中には開花する

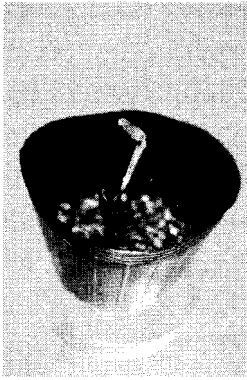


図-7 順化の過程を終了し、室内で生育し、開花した培養苗
ビニールポットの口径は7.5 cm

個体が観察された(図-7)。

一方、根から支持体を落とす作業中に、根を切断した個体をパーミキュライトにさしつけたものでも発根し、同時に順化する場合がみられた。このことから、発根と順化を同時に行う簡便な方法について検討の余地があると考えられる。

本研究の結果から、タカネマンテマ苗の大量増殖のためには、BAP 5 mg/l と NAA 0.1 mg/l を組み合わせて添加した MS 培地上で、無菌実生の頂芽、地上茎上部を初代培養し、得られたシュートを継代培養して増殖し、NAA 1 mg/l を添加した MS 培地で発根させた後、順化するのが適当であると提案できる。

絶滅危惧種の保護に関連して、その種を大量に増殖して、現地で販売することが提案されている(西村 1992)。今後、保全対策や増殖事業において、タカネマンテマの培養苗の利用方法について検討していきたい。

引用文献

- 中部森林管理局(2007):平成18年度 南アルプスの保護林におけるシカ被害調査報告書
- Davis, M. J., R. Baker and J. J. Hanan (1977): Clonal Multiplication of Carnation by Micropropagation, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 102: 48-53
- 藤野守弘、藤村 良、浜田国彦(1971):カーネーションの茎頂培養におけるムラシゲとスクーグ培地の利用、園学昭 46 春研発要 302-303
- 岩槻邦男(1992):植物遺伝資源と植物分類学、林木の育種 162: 10-13
- 亀井忠文、吉田智彦(2008):山梨県における絶滅危惧植物の保全および増殖技術の開発とその教材化(第1報)南アルプスにおけるマンテマ属絶滅危惧植物の教材化、日農教誌 39(1): 33-42
- 環境庁編(2000):我が国における絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—8(維管束植物 I)、自然環境研究センター
- 北川政夫(1982):ナデシコ科 Caryophyllaceae、日本の野生植物 II、平凡社
- Murashige T. and Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497
- 名取俊樹(1999):南アルプス北岳に遺存するキタダケソウの現状と将来、日本生態学会誌 49: 301-305
- 西川浩己(1992):高山植物の組織培養による増殖、林木の育種、164: 11
- 西川浩己、井出雄二(1993):タカネピランジの大量増殖、植物組織培養、10(3): 281-288
- 西村繁夫(1992):バイオナーサリーと絶滅危惧植物、植物組織培養、9(1): 58
- 山梨県環境局景観自然保護課(1985):山梨県高山植物の保護に関する条例