

タカネビランジ (*Silene keiskei* var. *akaisialpina*) の大量増殖

西川浩巳*・井出雄二**

*山梨県林業技術センター
(〒400 山梨県甲府市岩窪町 688)

**東京大学農学部附属演習林研究部
(〒113 東京都文京区弥生 1-1-1)

(1993年5月19日受付)

(1993年9月8日受理)

タカネビランジの組織培養による大量増殖方法の検討を行った。培養温度は20°Cが最適であった。無菌播種して育成した実生から得られた頂芽あるいはえき芽を0.5 mg/l BAPを含むMS固体培地で培養し、ホルモンフリーのMS固体培地で発根させ、土壤に順化した。1年間の理論的な生産可能順化苗数は、1種子から450万本得られる計算となった。

1. 緒 言

日本列島は豊かな野生植物相を有し、シダ植物、種子植物合わせ約5,300種が生育している。これらのうち約1,800種は日本固有の植物である。しかし、近年、自生地の破壊、採取等により、多数の種が絶滅の危険にさらされている¹⁻³⁾。

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⁴⁾。

タカネビランジ (*Silene keiskei* var. *akaisialpina*) は、南アルプスの高山帯に生育するナデシコ科の多年生植物で日本固有種である。しかし近年、自生地では個体数が減少し、保護、増殖の必要性が高まっている。本種は実生と株分けで繁殖可能であるが、実生の発芽率⁵⁾、株分けの増殖率はあまり高くなく、大量の増殖が困難な状況にある。

そこで本研究では、タカネビランジの保護、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、山梨県中巨摩郡北岳の標高2,500 m付近で1991年9月中旬に採取した種子を4°C、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、それぞれマグネチクスタ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⁶⁾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±2°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、実験に供試した。

(1) 初代培養

上述の無菌実生（長さ約4 cm）50本を供試し、頂芽およびえき芽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、培養温度について検討した。なお、本研究においては頂芽とえき芽を区別せず、両者をこみにして扱った。以下これらを単に芽と呼ぶ。

培養にはMS培地にBAP (6-Benzylaminopurine)を0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/lを添加した計7種類の培地を用いた。これらの培地にショ糖30 g/l、寒天8 g/l

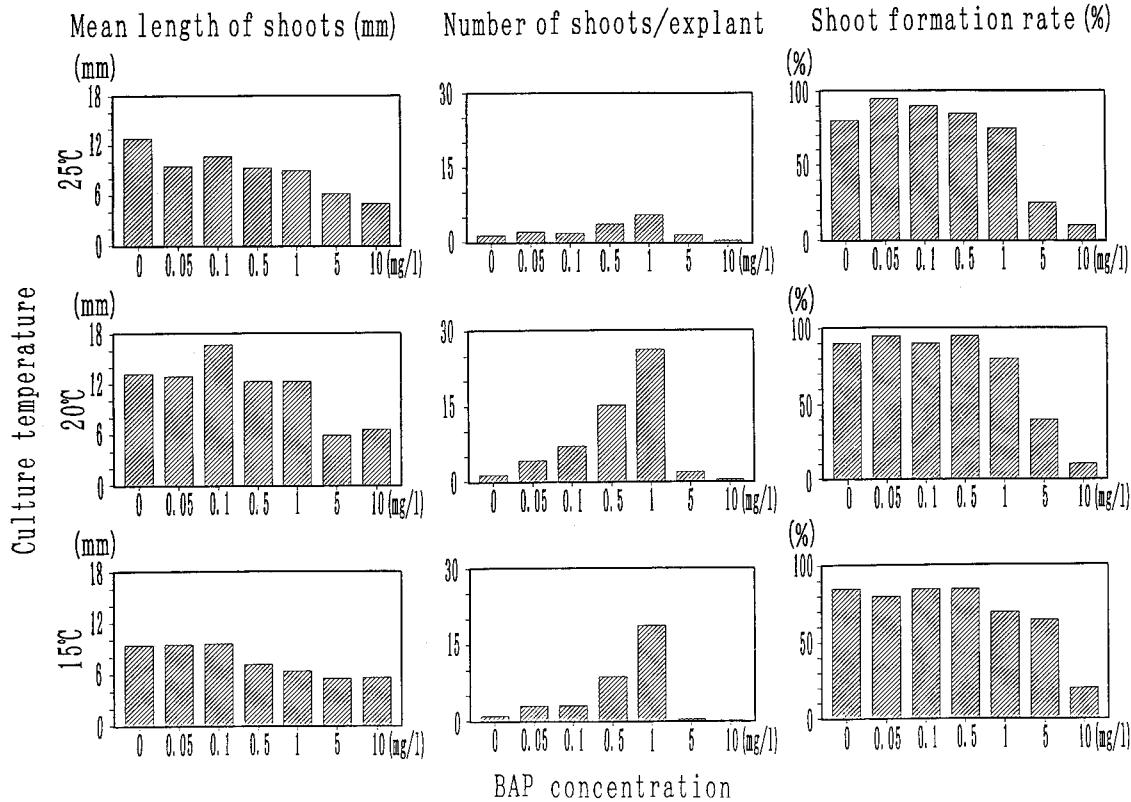


Fig. 1 Effects of BAP concentrations and culture temperatures on shoot formation primary culture of apical and axillary buds from aseptically germinated seedlings of *Silene keiskei* var. *akaishiiplina*. After 50 days culture. Shoot lengths and number of shoots were measured and counted on the shoots elongated over 5 mm in length.

*l*を加え、pHはオートクレーブ前に5.6に調整した。芽は、茎軸と葉柄を切断し5~7 mmの長さに調整後、培地に置床した。培養温度は、15°C, 20°C, 25°Cの3区を設定した。また、処理区毎の培養数は20とした。培養により芽からシートが得られたが、本研究では、切断および計測が容易にできる、長さが5 mm以上のものについて測定した。以下、長さ5 mm以上のシートをシートと呼ぶ。

初代培養開始50日後に1個の芽から得られたシート本数、シート長およびシート形成率(置床した1本以上のシートが得られた芽の数/置床した芽の数×100)を調査した。

(2) 繼代培養

初代培養で誘導されたシートから初代培養開始時と同様に、芽を含む茎切片を長さ5~7 mmに調整した。一方、5 mm未満の集合体が形成されていた場合には、これを5~7 mm角に切断して、継代培地に置床した。継代培養の材料として初代培養でシート形成率の高かった4区(BAP 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/l)で得られたシ

ートを用いた。それぞれを、BAPを0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/l添加した培地に継代し、計16区を設けた。処理区毎の培養数は10とした。培養温度は20°Cとし、それぞれ40日後にシート数とシート長を調査した。

(3) 発根

初代培養で得られたシートを切断して得られた芽を5~7 mmの長さに調製し、発根培地に移植した。発根に対するショ糖濃度の影響を調査するために15 g/l区と30 g/l区を設けた。また、オーキシン添加の効果を調査するためにNAA(1-Naphthaleneacetic acid), IBA(3-Indolebutyric acid)をそれぞれ0, 0.01, 0.1, 1 mg/lを加えた7種類の培地を用意した。さらに初代培養において培地に添加したBAP濃度の発根に及ぼす影響を調査するために、発根培地に移植する材料として、シート形成率の高かった4区(BAP 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/l)のシートを用い、計56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。

また、継代培養で得られたシートからの発根を確認

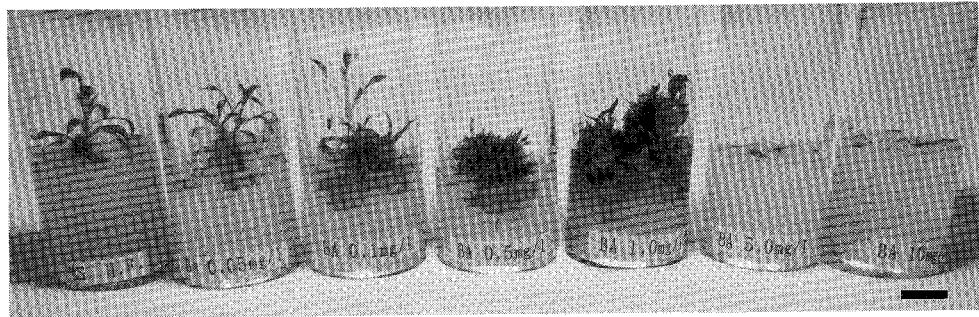


Fig. 2 Shoot formation from apical and axillary buds of aseptically germinated seedlings of *Silene keiskei* var. *akaishalpina* 50 days after the beginning of primary culture.

Bar in the photograph indicates 10 mm.

するため、各培地(16区)で得られた芽をホルモンフリー、ショ糖30g/lの培地に移植した。処理区毎の培養数は30とし、移植後10, 20, 30日に発根率を調査した。

(4) 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8cmの高さ7cmのビニール製ポットにバーミキュライト約200cm³を培養土として植え付けた。バ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。30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**Fig. 1**に示した。いずれの温度区とも、培養開始7日頃から芽の伸長が認められた。ホルモンフリー区では、ほとんどの芽が1本のシートを形成し、培養開始15日頃には発根するシートも観察された。BAP 0.05mg/lおよび0.1mg/lを含む培地では、芽からまず1本のシートが伸長し、その基部のえき芽から、二次的にシートが伸長するのが観察された。これらの区でもシートの発根が認められた。BAP 0.5mg/lおよび1mg/lを含む培地では、芽からシートが伸長し、そのシートの基部のえき芽から多数の芽が増殖し、多芽体を形成した。BAP 5, 10mg/lを含む培地では、培養開始10日頃から褐変する個体が観察されはじめ、培養開始30日頃には、約40%の個体が褐変枯死した。すなわち、高濃度のBAPの添加は芽の伸長、多芽体の形成に阻害的に働いた。

シートの長さについてみると、15°C区ではシートの伸長量が少なく、平均シート長はどのBAPを含

む培地でも10mm以下となった。

20°C区では、BAP 0.1mg/lを含む培地において、16.7mmと最も良い成長を示した。BAP 0, 0.05, 0.5, 1mg/lを含む培地間ではシートの長さはほとんど変わらなかった。一方、BAP 5, 10mg/lを含む培地ではシートは他のBAPの培地に比べ著しく短かった。

25°C区では、ホルモンフリーの培地において、シートの長さが12.9mmと最も良い成長を示した。BAP 0.05~1mg/lを含む培地では、0.1mg/lの培地がやや勝り、その他はほとんど変わらなかった。BAP 5, 10mg/lでは20°C区同様、シートの長さは他に比べ著しく短かった。

シート本数は、いずれの温度区ともBAP 1mg/lを含む培地において最大となり、1mg/lまではBAPの濃度が上がるにつれて増加する傾向を示した。また、BAP 5, 10mg/lを含む培地では、シート本数は他に比べて著しく少なかった。培養温度別にみると15°Cでは、シート本数の最も多いBAP 1mg/lを含む培地でも平均5.6本と少なかった。20°C区では、多数のシートが得られたが、25°C区では、20°C区に比べやや少なかった。

シート形成率はいずれの温度区とも、0.5mg/l以下のBAPを含む培地において80%を超えた。また、20°C区のBAP 1mg/lを含む培地でも80%を超えた。1mg/l以上のBAPを含む培地では、BAP濃度が高くなるにつれてシート形成率は低下した。

このように、初代培養ではシート長、シート数、シート形成率いずれにおいても培養温度20°C区が最適であった。**Fig. 2**に20°Cにおけるシートの形成状況を示す。

代表的な高山植物であるコマクサの培養でも、20°Cが有効であり⁷⁾、レブンアツモリソウは、23±1°Cで培養されている⁸⁾。これらと本研究の結果から、高山植物

Table 1. Effects of BAP concentrations of the subculture media on shoot formations from apical and axillary buds obtained by primary culture^{*1}.

BAP concentration of primary culture (mg/l)	BAP concentrations of subculture media (mg/l)				
	0.05	0.1	0.5	1.0	
Shoot length ^{*2} (mm)	0.05	13.4±1.4	21.6±1.5	12.8±0.9	7.4±0.4
	0.1	16.0±1.8	17.0±0.6	9.5±0.4	7.0±0.2
	0.5	15.6±1.6	17.4±1.5	8.4±0.4	7.0±0.2
	1.0	15.6±1.5	23.7±1.7	7.9±0.4	7.2±0.2
Number of shoots ^{*3}	0.05	3.0±0.5	3.5±0.3	7.3±2.0	13.9±3.5
	0.1	3.3±0.5	3.6±1.0	11.0±1.2	17.4±2.7
	0.5	3.5±0.5	3.5±0.7	10.5±1.6	18.5±1.0
	1.0	4.5±0.6	8.0±1.1	10.7±1.4	29.3±4.0

*1 50 days after transplanting to the subculture media.

*2 Average length of elongated shoots which were over 5 mm.

*3 Average number of shoots over 5 mm in height/bud.

Ten apical axillary buds were used in each treatment.

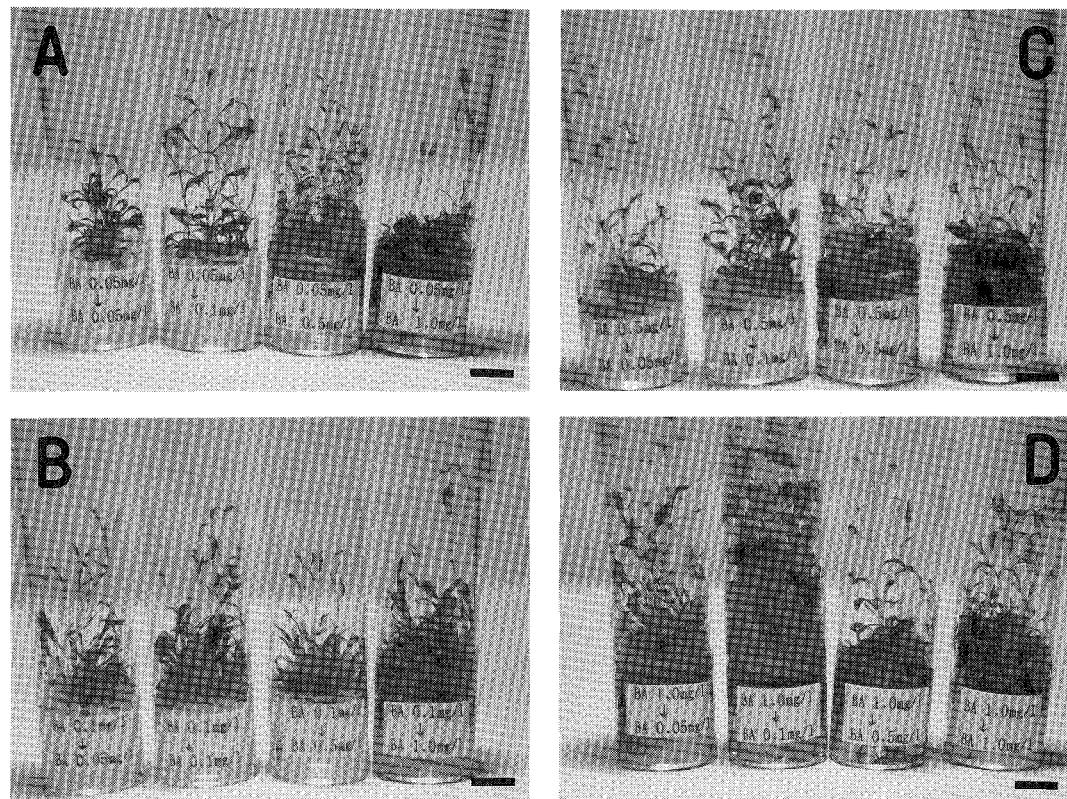


Fig. 3 Shoot elongations 50 days after transplanting of apical and axillary buds from primary culture with different concentrations of BAP.

BAP concentrations to the subculture media were 0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 mg/l respectively. Explants used in the subculture originated from different primary culture media, containing 0.05(A), 0.1(B), 0.5(C) and 1.0 mg/l(D) respectively. Bar in the photograph indicates 10 mm.

の培養では、培養温度として20°C付近が適當ではないかと考えられた。

この結果に基き、継代培養では培養温度は20°Cとした。また、シートの伸長にはBAP 0.1 mg/lを含む培地が有効であり、シートの増殖にはBAP 1 mg/lを含む培地が有効であると結論された。

(2) 継代培養

継代培養におけるシートの形成状況をTable 1に示した。継代培養では、初代培養と同様に培養開始7日頃から芽の伸長が認められた。BAP 0.05 mg/l および 0.1 mg/l を含む培地では、芽からシートが伸長し、その基部のえき芽から新たなシートが形成され、伸長するのが観察された。これらの区では伸長したシートからの発根が認められた。BAP 0.5 mg/l および 1 mg/l を含む培地では、芽からシートが伸長し、その基部のえき芽から多芽体が形成された(Fig. 3)。どの初代培地に由来する外植体でも、シート長はBAP 0.1 mg/l を含む培地で、シート数はBAP 1 mg/l を含む培地で最大値を示した。これらの傾向は初代培養の場合と同様であり、継代培養では、継代培地のBAP濃度がシートの伸長、増殖に直接影響し、初代培地のBAP濃度の影響は少なかった。このことからシートの伸長、増殖の調節は、継代培養の培地を選択することにより可能であると考えられた。

(3) 発根

初代培養により得られたシートの芽からの発根状況をTable 2およびFig. 4に示した。処理区間に植付材料に起因するばらつきがみられるが、全体としてみると、ショ糖量に関係なく発根率は、NAA 1 mg/l を含む場合に他に比べ著しく劣っていた。初代培養においてBAP 0.05, 0.1 mg/l を含む培地を用いた場合には、発根率が高い傾向を示した。一方、初代培養においてBAP 0.5, 1 mg/l を含む培地を用いた場合には発根率がやや低かった。すなわち発根においては、オーキシンの効果より初代培養におけるBAP濃度の影響が強く働くものと考えられた。一方、低濃度のBAPで培養されたシートの発根は、ショ糖量 15 g/l の場合よりも 30 g/l の方が若干高く、発根培地に添加するショ糖量としては 30 g/l が適当と考えられた。

またオーキシンの効果はこの実験からは明確にできなかつたが、ホルモンフリーの培地で十分な発根が認められることから、発根培地としてはホルモンフリーのMS培地を用いることが適当と判断した。

継代培養で得られた芽の発根状況をTable 3に示した。どの処理区においても移植後5日でシートの伸長が、

7日で発根がみられ始めた。20日後と30日後の発根率を比較すると、このあいだの変化は極めてわずかであり、発根可能な芽では移植後20日間で発根がほぼ完了することが明らかになった。

初代、継代培養のどちらもBAP 1 mg/l を含む培地で培養されたシートから得られた芽では発根が抑制された。また、発根培地に移しても再び多芽体を形成し、これらの多芽体から伸長したシートが発根するものが観察された。一方、継代培養でBAP濃度を低くした場合や、初代培養でBAP 0.05, 0.1 mg/l 区から継代した場合は、発根率が高く、多芽体の形成も見られなかった。

これは、高濃度のBAPを含む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ことによるものと考えられた。

(4) 順化

発根培地では芽からそのままシートが伸長し、発根した個体のほとんどが順化可能であった。一方、多芽体から伸長したシート塊が発根したものは、分割しないでそのまま順化に移した場合、褐変枯死するものが多くみられた。これらのことから、順化を効率的に行うには低濃度BAPで継代したシートから得られた幼植物体を用いることが適当と考えられた。

一方、根から寒天を落とす作業中に、根を切断した個体をバ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単な方法について検討の余地があると考えられる。

また、順化後、6ヶ月間育苗した培養苗の中には開花する個体が観察された(Fig. 5)。

同じナデシコ科のカーネーションの培養について、藤野ら⁹は、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。一方、Davisら¹⁰は、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と報告している。また、武田¹¹は、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が、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している。

タカネビランジでは、NAAを添加せずにBAPのみで多芽体を誘導でき、しかも形態異常や白化は認められなかつた。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た。

更に、朱ら¹²は、組織培養での種苗の大量増殖法で、コスト高となる最も大きな要因は、増殖時の継代培養お

Table 2. Interactions between BAP concentrations of the primary culture media and IBA, NAA and sucrose concentrations of the rooting media on root formation from apical and axillary buds obtained by primary culture^{*1}.

NAA, IBA concentrations of the rooting media (mg/l)	sucrose concentrations of the rooting media (g/l)	root formation rate (%) ^{*2}				
		BAP concentrations to the primary culture media				
		0.05	0.1	0.5	1.0	(mg/l)
0	30	100	90	65	75	
NAA 0.01	30	60	90	10	85	
NAA 0.1	30	90	90	80	85	
NAA 1.0	30	40	70	0	0	
IBA 0.01	30	80	95	65	—	
IBA 0.1	30	95	90	30	95	
IBA 1.0	30	100	90	60	80	
0	15	95	75	65	95	
NAA 0.01	15	75	95	45	85	
NAA 0.1	15	80	55	40	95	
NAA 1.0	15	25	50	0	0	
IBA 0.01	15	80	90	95	85	
IBA 0.1	15	85	80	85	90	
IBA 1.0	15	90	100	65	70	

*140 days after transplanting to the rooting media.

*2(Number of apical and axillary buds formed plantlet/Number of apical and axillary buds inoculated) × 100.

— : unexamined

Twenty apical and axillary buds were used in each treatment.

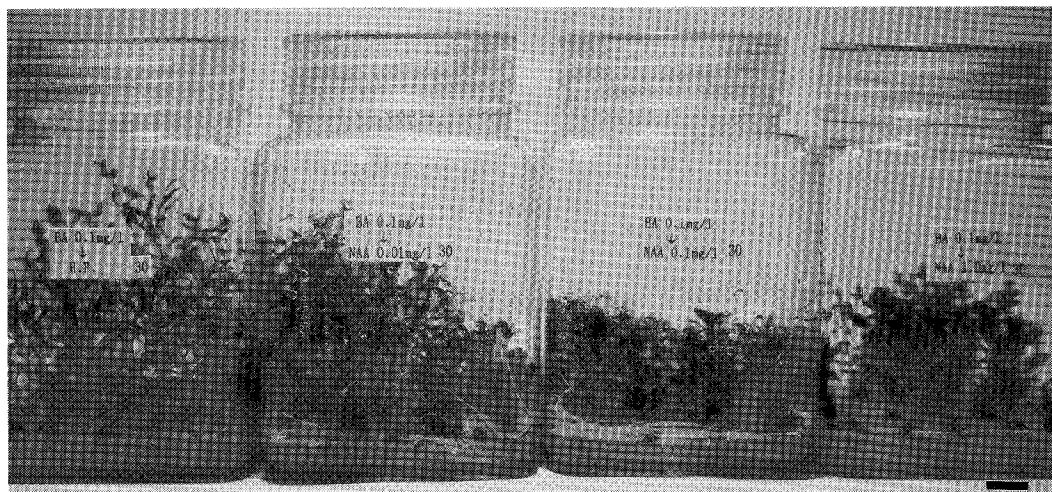


Fig. 4 A Shoot elongations and root development from apical and axillary buds obtained from primary culture 40 days after transplanting to rooting media.

Apical and axillary buds were obtained from the medium containing 0.1 mg/l of BAP. Rooting media contained 0, 0.01, 0.1 and 1.0 mg/l of NAA respectively. Bar in the photograph indicates 10 mm.

および順化時の培養体の手による分割であるとしている。本種においても、BAP 1 mg/l を含む培地で培養した場合、5~7 mm の長さのショットが多数見られ、これらの分割に労力を要したが、BAP 0.5 mg/l では形成され

たショット数は少ないものの容易に分割可能であった。

以上のことから、現状においては培地に添加する BAP 濃度は 0.5 mg/l 程度が実用上適当と考えられた。しかし、BAP 1 mg/l で形成された多数の芽を別の低

Table 3. Effects of BAP concentrations of the media for primary culture and for subculture on root formation^{*1}.

BAP concentrations of the primary cul- ture media (mg/l)	BAP concentrations of the subculture media (mg/l)	root formation rate (%) ^{*2}												
		0.05			0.1			0.5			1.0			
		days after the start of culture	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
0.05			60	100	100	50	100	100	30	97	100	27	93	100
0.1			40	100	100	47	100	100	37	97	97	47	93	97
0.5			60	100	100	33	97	100	7	97	100	47	93	97
1.0			83	100	100	50	93	97	63	93	93	20	57	63

*1 Rooting medium was MS containing 30 g/l sucrose and the pH of the medium was adjusted to 5.6 and 10 g/l agar was added before autoclaving.

*2 (Number of apical and axillary buds formed plantlet/Number of apical and axillary buds inoculated) × 100.

Thirty apical and axillary buds were used in each treatment.

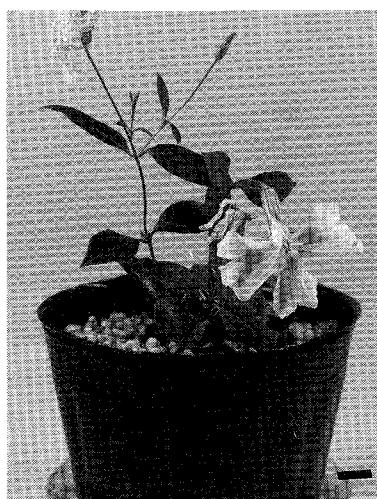


Fig. 5 Plantlet was successfully acclimated and flowered on vermiculite.

Bar in the photograph indicates 10 mm.

濃度の BAP を含む培地へ継代培養し、シュートを伸長させた後、発根培地へ移植する方法も増殖効率の向上に有効かと考えられる。今後、この点については検討してゆきたい。

本研究の結果から、タカネビランジ苗の大量増殖のためには、培養温度 20°C で BAP を 0.5 mg/l 添加した MS 培地上で、順芽およびえき芽の初代培養、継代培養を行い、ホルモンフリーの 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。

この方法によると、1 年間に無菌発芽、初代培養および 6 回の継代培養が可能である。そこで、無菌播種苗 1 本から 1 年間に得られる理論的な得苗数は、頂芽とえき芽の数 (3) × 初代培養の増殖数 (15) × 継代培養の増

殖数 (10^6)、すなわち 450 万本となる。

西村¹³⁾は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を提案している。今後、タカネビランジの培養苗の利用方法について検討していくたい。

文 献

- 1) 我が国における保護上重要な植物種及び群落に関する研究委員会種分科会編, 1989. 「我が国における保護上重要な植物種の現状」日本自然保護協会・世界自然保護基金日本委員会.
- 2) 大場秀章, 1992. 環境研究, 85: 62-74.
- 3) 岩槻邦男, 1992. 林木の育種, 162: 10-13.
- 4) 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.
- 5) 西川浩己, 1992. 林木の育種, 164: 11.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 7) 浜崎 浩, 1991. 第 12 回植物組織培養学会大会・シンポジウム講演要旨集, p. 134.
- 8) 松田史代, 山本繁次, 飯野拓也, 野口 修, 関口治良, 関根 正, 大久保彦, 清水俊行, 1989. レブンアツモリソウの増殖と誕生, p. 28-33, 三心堂.
- 9) 藤野守弘, 藤村 良, 浜田国彦, 1971. 園学昭 46 春研発表 302-303.
- 10) Davis, M. J., R. Baker, J. J. Hanan, 1977. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 102: 48-53.
- 11) 武田恭明, 1989. 園芸植物の器官と組織の培養, p. 134-139, 誠文堂新光社.
- 12) 朱 玉, 矢澤 進, 浅平 端, 1992. 植物組織培養, 9: 190-195.
- 13) 西村繁夫, 1992. 植物組織培養, 9: 58.

Summary

Mass Propagation of Takanebiranji (*Silene keiskei* var. *akaisialpina*) by Tissue Culture

Hiroki NISHIKAWA* and Yuji IDE**

* Yamanashi Forest Research and Extension Institute,

688 Iwakubo, Kofu, 400 Japan

**Research Division of the University Forests, Faculty of Agriculture,

the University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku Tokyo, 113 Japan

In vitro mass propagation techniques of takanebiranji (*Silene keiskei* var. *akaisialpina*) were studied. Apical and axillary buds 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 of BAP for primary culture. Apical and axillary buds were isolated from the shoots elongated in primary culture. They were subcultured in the same MS medium as the primary culture. Apical and axillary buds obtained in primary culture and subculture were transplanted to the MS rooting medium and successful plantlet regeneration was attained. Regenerated plantlets were transplanted to pots filled with vermiculite for acclimation. Theoretically 4.5×10^7 acclimated plantlets will be obtained in a year by 6 subcultures of apical and axillary buds from a single seed.