

# タカネマンテマ (*Silene wahlenbergella*) の大量増殖系の確立と 種子生産能力の調査

亀井忠文

(山梨県立笛吹高等学校)

**要約** タカネマンテマの組織培養による大量増殖系および屋外栽培方法を確立した。培養部位は生長期の根元に派生する分枝シュート腋芽の茎頂組織が適当だった。培養確立および大量増殖のためのシュート塊誘導はMS処方 (Murashige・Skoog, 1962) に BA (N<sup>6</sup>-benzyladenine) 0.5 mg/l~1.0 mg/l 添加でシュート発生が優れた。根毛を多数有する不定根の誘導には 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.5 mg/l 添加がきわめて有効であった。順化および屋外における栽培は容易だった。

開花期間や種子生産能力について栽培中の50個体を調査した。甲府盆地での開花日は平均4月18日、開花最終日は平均5月16日、開花期間は平均29.5日だった。1蒴果あたり平均145.0個の種子が得られた。1個体には平均861.3個の種子ができた。50個体から計41,466個採種できた。

## Establishment of Multiplication System and Survey on Seed Productivity for Takane-mantema (*Silene wahlenbergella*) from Minami-Alps mountains, Yamanashi Prefecture

Tadafumi KAMEI

(Yamanashi Prefectural Fuefuki High School)

**Abstract** Multiplication system for Takane-mantema (*Silene wahlenbergella*) was established by tissue culture. For the explant in primary culture, we used the shoot apex of the ramification axillary bud or seedling *in vitro*. Many shoots in primary culture were obtained in MS medium supplemented with BA 0.5-1.0 mg/l. Multiple shoots were obtained in the same MS medium as primary culture. Roots with many root hairs were effectively developed in MS medium supplemented with 2,4-D 0.5 mg/l. Acclimation and the outdoor cultivation were easily accomplished.

Flowering period and the seed productivity were investigated for 50 plants in a cultivation condition. The day of first flowering, the day of final flowering and flowering period were recorded for each plant. Average the day of first flowering, the day of final flowering and flowering period in Koufu Basin were April 18, May 16 and 29.5 days, respectively. 145.0 seeds were produced, on average, in a capsule, and 861.3 seeds were produced, on an average, in a plant. (Total seeds number in 50 plants was 41,466.)

### 1. 緒言

南アルプス(赤石山脈)は地史的にたいへん古く、氷期に遙か北方から日本列島に進入し、その後の温暖化で取り残された周北極要素の植物など、植物地理学的に貴重な植物を多数産する。

しかし、近年北岳山頂付近などの高山域においても酸性雨が観測され、気温の上昇が指摘されるなど、これら植物の生育環境が劣化してきている<sup>1,2)</sup>。また、最近ではニホンジカの食害が南アルプスの全域にわたって深刻化しつつあるという<sup>3)</sup>。

筆者は以上のような状況を意識しつつ南アルプス高山域に生育し絶滅が危惧されるいくつかの植物種について、保全・増殖技術の開発とその教材化を進めてきた<sup>4)</sup>。

タカネマンテマ (*Silene wahlenbergella*) は、ナデシコ科 (Caryophyllaceae) の多年草で、我が国では北岳など南アルプス北部の高山域のみに生育し、当地の個体群は世界的には分布の南限となっている。本種は環境省「レッドリスト」<sup>5)</sup> で絶滅危惧 I A 類にランクされ、個体数は100個体以下と推定されており絶滅寸前である。

本報においては、組織培養による大量増殖系の確立や個体の種子生産能力の調査など、筆者がこれまでに明らかにし報告した本種の増殖や栽培に関する一連の知見を整理すること

とする。

なお、実験に用いた材料はすべて環境省および山梨県の許可を得て採種、発芽させて得た実生個体またはそれを元に増殖した個体である。

### 2. 実験方法

#### 2-1 組織培養による大量増殖系の確立<sup>6)</sup>

##### (1) 培養部位の選定と無菌培養系の確立

この実験では、本種の組織培養の培養部位として、花茎腋芽の茎頂組織、株の根元から派生する分枝シュートの頂芽の茎頂組織、そして子葉の展開した無菌培養実生のいずれが適当か調べた。花茎腋芽と分枝シュートは、茎頂組織を含む切片を10 mm長程度に調整した後、いずれも0.1% Tween20を滴下した次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 水溶液 (有効塩素1.0%) に15分間浸漬・攪拌して表面殺菌した後、クリーンベンチに持ち込み滅菌水で3回洗浄を行った。茎頂組織を双眼実体顕微鏡下で0.5~1.0 mm程度の大きさに摘出しそれぞれ培地に置床した。実生は無菌的に供試培地に継代培養した。培地は Murashige・Skoog<sup>7)</sup> の処方 (以下、MS処方という) を基本とし、ショ糖20 g/l と BA (N<sup>6</sup>-benzyladenine) 0.1, 0.5 および 1.0 mg/l の各濃度で添加した計3種類とし、pH5.6に調整した後固化剤としてゲルライトを3 g/l 添加しオートクレーブで加圧滅菌 (121℃,

20分間、1.2 kg/cm<sup>2</sup>した後冷却した。培養条件は恒温培養室内において温度20±2°C、白色蛍光灯24時間照明下で試験を行った。それぞれ20個ずつ供試した。培地置床後30日目に各培地における外植体の生存状況や生育状況(平均シュート発生本数)を比較観察し本種の組織培養に適した培養部位とその好適培地を判定した。なお「シュート」とは、ここでは本葉2、3枚以上を有する不定芽をさすものとした。

**(2)シュート塊の形成と分割増殖**

大量増殖を目的として、1)で得られた本葉2、3枚を有するシュートを1本ずつに切り分け、それからのシュート塊(多芽体)の誘導を試みるため、引き続き先述の3種類の培地に継代培養した。培養条件も同一とした。継代後30日目に各培地におけるシュート塊の形成状況(平均シュート発生本数)を比較観察し、好適培地を判定した。それぞれ20個ずつ供試した。

**(3)不定根の誘導・順化と大量増殖系の確立**

不定根の誘導を目的として、2)で得られたシュート塊(シュート3~5本有する組織塊)を1個ずつ、基本培地・培養条件を一切変えずに植物ホルモンの部分のみ改変した不定根誘導培地に置床した。供試培地には、植物ホルモン無添加およびNAA(α-Naphthaleneacetic acid)と2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)をそれぞれ0.1、0.5および1.0 mg/lの各濃度で添加した計7種類を用いた。それぞれ20個ずつ供試した。置床後30日目に各培地における不定根の誘導・形成状況(平均不定根本数、根毛発生程度)を比較観察し、好適培地を判定した。

十分に発根した培養個体を培養ビンから出し、根を損傷しないように注意しながら流水で固化剤を洗い流し、湿った用土を詰めたポリポットに植えた。用土は前報<sup>1)</sup>のタカネビランジ栽培用のものとした。湿度を保つためポリポットごとビニル袋で覆い10日間培養室内に置いた。その後通常栽培に移行し生存状況を観察した。

**2-2 種子生産能力の調査<sup>2)</sup>**

2008年8月北岳で採種した種子を無菌播種して苗に養成し、本校附属農場(山梨県笛吹市)にて鉢植え栽培してきた個体のうち50個体を任意に抽出し実験に用いた。各個体ごとに開花初日・開花最終日・開花期間を記録し、さらに花茎の本数、蒴果の着果数および1蒴果あたりの種子数を数え、この植物の種子生産能力の特性を調べた。調査は、2010年年春から夏にかけて行った。開花日の調査は、50個体からランダムに1個ずつ花を選び合計50個の花で行った。「開花初日」とは5枚の花弁が完全に開いた日とした。「開花最終日」とは受粉・受精を終えた萼筒が真上を向き、その後蒴果の頂部が裂けはじめた日とした。「開花期間」とは開花日から開花最終日までの日数とした。花茎本数および蒴果の着果数は直接観察により確認した。採種時期は蒴果頂部が裂け2 mmくらいの穴ができて中の種子が見えた日とし、種子数はすべての蒴果について数えた。

**3. 結果**

**3-1 組織培養による増殖系の確立**

**(1)培養部位の選定と無菌培養系の確立**

タカネマンテマの組織培養による大量増殖系の確立を試みた。培養部位の培養結果は図1のとおりだった。分枝シュートの頂芽茎頂組織または無菌播種で得た実生では、MS処方にBA0.5および1.0 mg/l添加の範囲で、前者が平均シュート発生本数13.7および16.8本、同様に後者が14.4および14.8本であった。BA0.1 mg/lでは、どちらも本数が8本程度と少なかった。なお、花茎腋芽ではシュート発生本数が著しく少なかった。

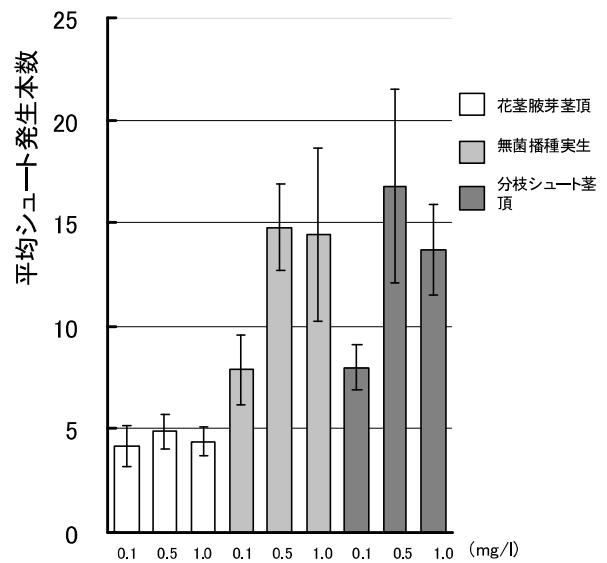


図1 タカネマンテマ組織培養における外植体およびBA添加濃度がシュート発生に及ぼす効果  
基本培地MS処方、20±2°C、3000lx、24時間照明、各区20個供試。置床30日後に調査。縦棒は標準誤差。

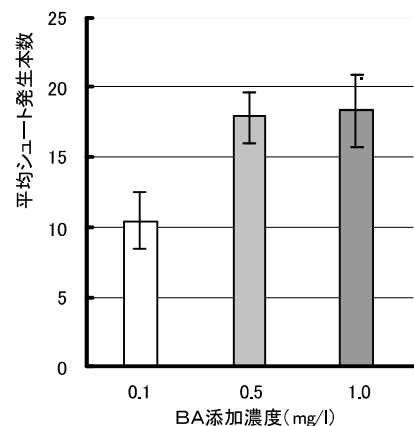


図2 タカネマンテマ組織培養におけるBA添加濃度とシュート発生本数

各区20個供試。置床30日目に調査。縦棒は標準誤差。培養条件は図1と同じ。

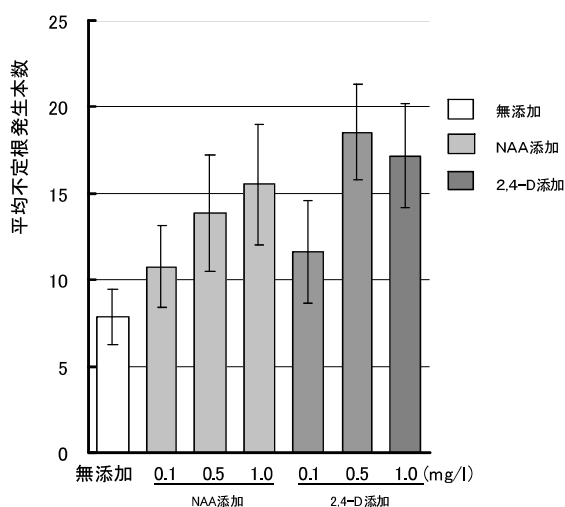


図3 タカネマンテマ組織培養におけるオーキシンの添加濃度と不定根誘導状況 (NAAおよび2,4-D) 添加濃度と不定根誘導状況  
各区20個供試、置床後30日目に調査。縦棒は標準誤差。培養条件は第5図と同様。



図4 屋外栽培中の培養起源個体(笛吹高等学校附属農場)

た。  
(2)シュート塊の形成と分割増殖

分枝シュートから得たシュートの増殖率を上げるための培養条件は、平均シュート発生本数から調べ、BA0.1 mg/l添加で10.5本、0.5 mg/l添加で17.9本、1.0 mg/l添加で18.4本であった。本種の大量増殖のためのシュート塊誘導にもBA0.5~1.0 mg/l添加の範囲が適していた(図2)。

(3)不定根の誘導・順化と大量増殖系の確立

不定根はいずれの試験区でも観察された(図3)。不定根誘導状況は、2,4-D 0.5および1.0 mg/l添加の範囲が良好で18.6および17.2本、次いでNAA 0.5および1.0 mg/l添加の範囲でもよく発根した。無添加でも7.9本の発根が見られた。なお、2,4-D 0.5 mg/l添加区では、根毛を無数に有する細根が多数誘導され、不定根誘導には2,4-D 0.5 mg/l添加区が有効であった。

その後の順化・屋外栽培においては、タカネビランジと同じ方法<sup>10)</sup>で問題なかった。ただし、やや乾燥に弱い傾向が見られたので、湿度保持に注意する必要がある。増殖個体の栽培の様子を図4に掲げる。

表1 タカネマンテマの開花時期(2010)<sup>4)</sup>

項目	最も早い個体	最も遅い個体	平均
開花初日 <sup>5)</sup>	4月7日	4月20日	4月18日
開花最終日 <sup>6)</sup>	5月6日	5月27日	5月16日
開花期間(日) <sup>7)</sup>	22.5	35.0	29.5

<sup>4)</sup>50個体供試。<sup>5)</sup>5弁が完全に開いた日。<sup>6)</sup>受粉・受精を終え蒴果の頂部が裂けはじめた日。<sup>7)</sup>開花初日から開花最終日までの期間。

表2 花・蒴果および種子の数(2010)<sup>8)</sup>

1個体あたり平均花茎発生本数	2.7本
1花茎あたり平均蒴果数	2.2個
1蒴果あたり平均種子数	145.0個
1個体あたり平均種子数	861.3個

<sup>8)</sup>50個体供試

以上の実験結果を組み合わせるにより、本種の組織培養による大量増殖系を確立した。

3-2 種子生産能力の調査

まず、栽培中のタカネマンテマ50個体の開花初日・開花最終日・開花期間は表1のようだった。

開花初日は、最も早い花で4月7日、最も遅い花で4月30日、平均4月18日だった。開花最終日は、最も早い花で5月6日最も遅い花で5月27日、平均で5月16日だった。1つの花の開花期間は平均29.5日だった。花茎は実験に用いた50個体から計133本得られた。1個体あたり平均2.7本ということになる。蒴果は50個体から計286個得られた。花の数は1花茎あたり平均2.2個だった。種子は50個体から計41,466個得られた。1蒴果あたり平均では145.0個の種子が得られた(表2)。

4. 考察

タカネマンテマ(*Stene wahlenbergella*)は環境庁2000年版「レッドデータブック」<sup>11)</sup>で絶滅危惧IB類(EN)にリストされ、生育地7メッシュ中3メッシュで現状不明、現存する4メッシュではそれぞれ数十個体が確認され総計約100個体と推定された。平均減少率は約50%、20年後の絶滅確立は約50%とされた。その後2007年IA類に格上げされた<sup>9)</sup>。個体数減少の主因は園芸用の採集で、本種に関しては今のところシカによる食害の報告はないが、登山客の踏みつけの影響などが指摘されている。

本種の増殖法については、西川ら<sup>9)</sup>が組織培養を試み順化に至ったと報告している。著者ら<sup>10)</sup>はNaClO水溶液浸漬による種子の休眠打破と無菌播種による実生個体獲得法並びに屋外栽培法について報告した。また本報で紹介したように、生育期に根元に多数生じるシュート(「分枝シュート」と呼称)の腋芽茎頂組織の培養によるきわめて効率よい大量増殖系を独自に開発した<sup>6)</sup>。安定的な種子繁殖法・栄養繁殖法(組織培養)の完成により、実生苗獲得が周年可能となり、一応絶滅回避のための技術は確立できたと考えている。

さらに本種の種子生産能力の調査結果<sup>8)</sup>について紹介し

た。1個体あたりの種子生産能力等を明らかにしたが、原報<sup>8)</sup>ではこれら栽培個体で得たデータをもとに、南アルプス野生個体群において毎年発芽する種子の定着状況について推測した。それは個体群の存続に殆ど寄与しない程度であり、キタダケノウより遙かに絶滅の危険性が高くより深刻であると結論づけた。著者はほぼ毎年北岳にて調査を行っているが、山頂付近の稜線上でこの貴重な植物を見つけることは最近ではきわめて稀である。鳳凰三山を中心に分布するタカネビランジは個体数が多いが、北岳のタカネマンテマは正に絶滅寸前状態といえる。著者は本報で紹介したような本種の絶滅回避のための技術開発のほか、現在本種の育種的可能性を探っており、将来的には優良個体を選抜して流通させることができれば、野生個体の盗掘の抑止力になるものと考えている。

なお、著者らは本種と同属で同じく南アルプス固有種のタカネビランジ (*Silene akaisialpina*) について、安定的な種子繁殖や組織培養を含む栄養繁殖法による大量増殖法並びに屋外栽培法<sup>10,12)</sup>を報告した他、本種の受粉様式(雄性先熟する多殖性植物)を突き止め<sup>6)</sup>、DNAマーカーを利用した狭義のタカネビランジとシロバナタカネビランジを識別する手法<sup>13)</sup>を報告した。

本報で紹介したタカネマンテマやタカネビランジの種子繁殖、組織培養による大量増殖、屋外栽培に関するデータは、本研究の目的の一つであるシカ食害からの個体の緊急避難技術として、万が一の場合に十分活用できるものと考えられる。

さらにこれらの技術は、エゾマンテマ *S. foriosa*、カムイビランジ *S. hidaka-alpina*、チシママンテマ *S. repens* var. *latifolia*、スガワラビランジ *S. stenophylla* (以上、絶滅危惧 I A 類)、カラフトマンテマ *S. repens*、アオモリマンテマ *S. aomorensis*、オオビランジ *S. keiskei*、アポイマンテマ *S. repens* var. *apoiensis*、テバコマンテマ *S. yanoei* (以上、絶滅危惧 II 類) など<sup>11)</sup>、同属の絶滅危惧植物や他のなでしこ科植物の保全・増殖への応用が可能と思われる。

## 引用文献

- 1) 日本高山植物保護協会: JAFPA, No.39:2-3 (2002)
- 2) 名取俊樹: 日本生態学会誌, 49:301-305 (1999)
- 3) 元島清人: 増沢編著: 高山植物学, 共立出版, 東京, p.414-420 (2009)
- 4) 亀井忠文: 山梨県における絶滅危惧植物の保全や増殖技術の確立とそれを教材とする農業高等学校における学習指導法の開発に関する研究(東京農工大学大学院博士学位論文). 144pp (2010)
- 5) 環境省: [http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb\\_top.html](http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_top.html)(2007)
- 6) 亀井忠文, 吉田智彦, 和田義春: 日本農業教育学会誌, 40:93-104 (2009)
- 7) Murahige and Skoog: *Physiol.Plant.*, 15: 473-497.(1962)
- 8) Kamei, T., Y. Takahashi and T. Yoshida: *Japan. J. Agric. Educ.*, 42:49-53 (2011) (in press)
- 9) 西川浩己, 清藤城宏: 山梨県森林総合研究所研究報

告, No.28:1-9 (2009)

- 10) 亀井忠文, 吉田智彦: 日本農業教育学会誌, 39:33-42 (2008)
- 11) 環境庁: 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生植物 8 (維管束植物) (2000)
- 12) 亀井忠文: 山梨科学アカデミー会報, 第22号: 54-74 (2006)
- 13) 亀井忠文, Ly Tong, 吉田智彦, 和田義春: 日本農業教育学会誌, 40:67-81 (2009)

## 成果発表状況

### 学会誌等掲載

- 1) 亀井忠文, 吉田智彦: 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, 日本農業教育学会誌, 39:33-42 (2008)
- 2) 亀井忠文, Ly Tong, 吉田智彦, 和田義春: DNAマーカーを利用した絶滅危惧植物タカネビランジ (*Silene akaisialpina*) における鳳凰三山と北岳産個体の識別とその教材化, 日本農業教育学会誌, 40:67-81 (2009)
- 3) 亀井忠文, 吉田智彦, 和田義春: 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2報)タカネビランジの受粉様式の解明およびタカネマンテマの組織培養による大量増殖系の確立. 日本農業教育学会誌, 40:93-104 (2009)
- 4) 亀井忠文, 吉田智彦, 和田義春: 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3報)南アルプス産ツリガネニンジン属 (*Adenophora Fischer*) 2種の組織培養による増殖法の検討, 日本農業教育学会誌, 40:105-113 (2009)
- 5) 亀井忠文, 吉田智彦, 和田義春: 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農業高等学校における教材化(第4報)微細繁殖法によるキタダケデンドラの増殖技術の確立, 日本農業教育学会誌, 41:1-10 (2010)
- 6) Kamei, T., Y. Takahashi and T. Yoshida: Conservation and Multiplication of Endangered Plants in Yamanashi Prefecture and Its Application for Teaching in Agricultural High School V. A survey on the Seed Productivity of Takane-mantema (*Silene wahlenbergella*). *Japan. J. Agric. Educ.*, 42:49-53 (2011) (in press)