

絶滅危惧種ナガボナツハゼの組織培養による増殖

山本茂弘・山田晋也・袴田哲司

農林技術研究所森林・林業研究センター

In vitro micropropagation from axillary buds of endangered tree species,

Nagabonatu haze (*Vaccinium sieboldii*)

Shigehiro Yamamoto, Shinya Yamada and Tetsuji Hakamata

Forestry and Forest Products Research Institute/Shizuoka Pref. Res. Inst. of Agri. and Forest

Abstract

Nagabonatu haze (*Vaccinium sieboldii* Miq.) is a deciduous shrub in Japan that is found growing at low altitudes in the limited region from the Shizuoka Prefecture west to the east part of Aichi Prefecture. It is listed as endangered species because the growth ground and the number of individuals have decreased remarkably due to the ruin of the hometown mountains in recent years. Therefore, individual propagation technology is needed to preserve it as a means for protection and conservation of the species. In this study, an efficient micropropagation condition using tissue culture that used axillary buds was examined. For the shoot elongation, a more suitable pH and the kind of plant hormones for the medium were examined. Moreover, the possibility of subculture was examined. For the rooting of the shoots the suitable kind of sugar and the density, the addition of plant hormones, and the kind of medium support material were also examined. It became clear there was a difference in the number of elongate shoots and the rooting rate of the shoots between individuals. An environmental acclimation was done, and the plantlets were able to be promoted outdoors. A technology that efficiently reproduced the plantlets by tissue culture was established from a lot of individuals in the present study. As a result, it appears to be useful for this kind of protection and conservation.

キーワード：ナガボナツハゼ，絶滅危惧種，組織培養，伸長，発根，順化

I 緒 言

ナガボナツハゼは、ツツジ科スノキ属に属し、静岡県西部から愛知県東部の日当たりの良い痩せた低山地に生育する高さ2m程度になる落葉低木である¹⁾が、生育地では定期的な下刈りにより、ほとんどの個体の高さはせいぜい1.0m程度である。近年、里山の荒廃、宅地造成や盗掘等により生育箇所数、個体数ともに著しく減少している。そのため、環境省のレッドリストによると絶滅危惧IA類(ごく近い将来における野生での絶滅の危険性がきわめて高いもの)に指定されている²⁾。本県の主な生育地である浜松市内では、1本から数十本の個体が数箇所に分布している。本種は株状になるものが多く、1箇所に数株

が群生する場合には個体数の把握が難しいため、株ごとに遺伝子解析を試みたところ、浜松市内の個体数は、合計約100個体が確認されたのみである(山田未発表)。また、観察によると、結実には年による豊凶が見られ、結実年でも結実数が少ない上、果実内には少数の種子しかなく、生育地には若い芽生えはほとんど見られない。このため個体数の増加は難しい状況と思われる。さらに付近には近縁のナツハゼが多数生育していることが多く、雑種を生じる可能性もある。その上、生育地の所有者の土地利用の意向や盗掘・伐採等による親株消失の恐れもある。なお、今のところ遺伝的多様性は山野に普通に見られるナツハゼと同程度に高いことが知られている³⁾。

このようなことから本種を護るためには、本種を生育地の環境を含めて早急に保護・保全するとともに、個体消失に備えて現存する個体のクローン苗木を確保・増殖しておくことが必要と考えられる。しかし、挿し木に関する報告は無く、前述したようにほとんどの個体は十分な挿し穂が得られないほどの大きさであることや、近縁のナツハゼではさし木が困難である³⁾ことから挿し木によるクローン苗木増殖は難しいと思われる。そのため組織培養技術を利用した増殖技術の確立が有効と考えられる。ナガボナツハゼの組織培養については、これまで、筆者らが腋芽の伸長に適した培地の種類等について検討し、シュートの伸長と発根により幼植物体が得られることを報告している¹⁰⁾が、シュート伸長量・発根率、発根個体数とも低く、継代培養、順化条件についても十分明らかではなかったため、より効果的な培養・増殖条件の検討が必要であった。

そこで本研究では、腋芽の組織培養による効率的な幼植物体再生を試みるため、先の報告¹⁰⁾で検討しなかった腋芽からのシュート伸長に適した培地の酸度(pH)及び植物ホルモンの種類と濃度、継代培養条件並びに発根性向上のため、発根培地の糖の種類と濃度及び植物ホルモンの有無、培地支持体の種類を検討した。また幼植物体の順化方法について検討した。

II 材料及び方法

1 腋芽からのシュート伸長

(1) 伸長培地 pH の検討

培地 pH はこれまで、pH5.8¹⁰⁾としていたが、ツツジ科植物は酸性土壌を好むものが多い¹¹⁾ことから、より低い培地 pH の腋芽からのシュート伸長に及ぼす影響について検討した。2009年5月上旬に、静岡県浜松市自生の10個体(表1)から長さ約10cmの当年枝を1本又は2本採取した。表面殺菌のため、葉を切除し、70%エタノールで1~3分間、1%塩素濃度の次亜塩素酸ナトリウムで3~5分間、3%過酸化水素水で5~10分間浸漬した後、滅菌水で濯いだ。外植体として、腋芽を含む長さ1~2cmの茎軸を用いた。培地の基本組成には、表2に示すWoody Plant培地(WP培地)⁹⁾を用い、6-ベンジルアミノプリン(BAP)0.25mg/Lを添加し、培地pHを4.8、5.3、5.8の3水準に調整した3種類の伸長培地に、各個体から3~4本、計34本ずつ挿し付けた。測定は20日後に、伸長したシュートの葉腋から先端までの長さ及び長さ5mm以上の葉の枚数を計測した。

(2) 植物ホルモンの種類の検討

これまで植物ホルモン(サイトカイニン)としてBAPのみ検討したが¹⁰⁾、腋芽からのシュート伸長に適したサイトカイニンの種類を検討するため、2009年5月中旬に、試験1(1)で用いた10個体を含む16個体(表1)から同様に外植体の調整を行った。WP培地にBAP、ゼアチン、2-イソペンテニルアデニン(2iP)の3種類を各0.5mg/Lの濃度及びゼアチンについてはさらに1.0mg/Lの濃度で加えた4種類の伸長培地に、外植体を各個体から1~3本、計32本ずつ挿し付けた。測定は20日後に、シュート長及び葉数を試験1(1)と同様に計測した。

(3) 継代培養

試験1(1)、(2)の試験に用いた外植体を初代培養開始から2か月後、ゼアチン0.5mg/Lを添加したWP培地に外植体を切り分けずに移植し、以後1か月ごとに同じ組成の培地に継代培養を繰り返した。測定は初代培養から約8か月後に、腋芽1個から伸長したシュートの本数を数えた。シュートは葉腋から先端までの長さが2cm以上のものとした。

表1 シュート伸長試験に用いた個体の大きさ(単位:m)

個体	高さ	株張	試験	個体	高さ	株張	試験
S1	1.0	1.0	①②	S10	0.6	0.3	②
S2	0.7	0.7	①②	H1	0.5	1.7	①②
S3	0.7	0.5	①②	H2	0.6	1.2	①②
S4	0.5	0.3	②	H3	0.5	1.5	①②
S6	0.5	0.3	②	H4	0.3	2.5	①②
S7	0.6	0.7	①②	H5	1.0	3.0	①②
S8	0.5	0.5	②	P1	0.7	1.2	①②
S9	0.6	1.5	②	P2	0.6	1.7	②

株張: およその直径。①、②: それぞれ試験(1)、(2)に供した

表2 WP培地の基本組成(mg/L)

組成	濃度	組成	濃度
NH ₄ NO ₃	400	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.25
K ₂ SO ₄	990	Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.25
CaCl ₂ ・2H ₂ O	96	H ₃ BO ₃	6.2
Ca(NO ₃) ₂ ・4H ₂ O	556	ニコチン酸	0.5
MgSO ₄ ・7H ₂ O	370	塩酸ピロドキシン	0.5
KH ₂ PO ₄	170	塩酸チアミン	1.0
FeSO ₄ ・7H ₂ O	27.8	ミオイノシトール	100
Na ₂ EDTA ¹⁾	37.3	L-グリシン	2
MnSO ₄ ・4H ₂ O	22.3	ショ糖	20000
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	8.6	寒天	8000

2 シュートの発根

(1) 発根に適する糖の種類の検討

発根培地の糖としてこれまで用いていたショ糖¹⁰⁾のほか、トレハロースの添加について検討した。バーミキュライトを支持体とするWP培地(バーミキュライト培地とする)に、3-インドール酪酸(IBA)0.5mg/Lと1-ナフタレン酢酸(NA)0.02mg/Lを添加し、ショ糖又はトレハロースを20mg/Lで加えた発根培地を作成した。なお、添加した植物ホルモ

ンはシラカンバで発根性の良かった植物ホルモンの組合せ¹⁾を用いた。2009年7月下旬に、伸長試験で用いた6個体から伸長したシュートを切り取り、各個体から1~4本、計14本ずつ挿し付けた。

また、糖の濃度の検討のため、トレハロース20g/L又は10g/Lを添加した植物ホルモンを含まない2種類のパーミキュライト培地を作成し、2009年9月下旬と10月下旬に、12個体から切り取ったシュートを、各個体から1~5本ずつ、各培地に計25本ずつ挿し付けた。

(2) 植物ホルモンの有無の検討

発根に対する植物ホルモンの有無の影響を検討するため、WP培地にIBA 0.5mg/LとNAA 0.02mg/Lを添加したものと、植物ホルモンを含まない2種類のパーミキュライト培地を作成した。培地の糖としてトレハロース20g/Lを添加した。2009年8月下旬に9個体から切り取ったシュートを、各個体から1~5本ずつ、各培地に計20本ずつ挿し付けた。

(3) 発根培地支持体の検討

発根にはこれまでパーミキュライトを支持体とした培地を用いてきたが、更に適した培地支持体の検討のため、支持体としてパーミキュライトのほか、0.8%寒天、鹿沼土(細粒)、ピートモス(酸度未調整)を用いた。それぞれパーミキュライト培地、寒天培地、鹿沼土培地、ピートモス培地とする。培地には糖としてトレハロース10g/Lを加え、植物ホルモンを含まないWP培地を作成した。2009年11月中旬から12月上旬にかけて8個体から切り取ったシュートを、各個体から1~5本ずつ、各培地に計20本ずつ挿し付けた。挿し付け後25日ごとに発根率を調査した。培地支持体の種類による培地pHの違いを見るため、滅菌後、各培地から搾った液体のpHを測定した。

また、パーミキュライト培地と鹿沼土培地については、2010年1月中旬から3月中旬にかけて9個体から切り取ったシュートを、各個体から1~23本ずつ、各培地に計75本ずつ挿し付けた。この試験では発根の状態を詳しく調べると共に、挿し付け5~6か月後にシュート基部のカルス直径を測定した。

(4) 個体別発根率

個体別の発根率を調べるため、供試個体数及び挿し付けシュート数の多い試験2(3)において、植物ホルモン無添加、トレハロース10g/Lを加えたパーミキュライト培地及び鹿沼土培地に供試したものから、それぞれ5本以上の挿し付け数のある個体の発根率を調べた。

試験2(1)~(3)では挿し付けるシュートの長さを20mmとし、個体による発根性の違いが予想されたため、各試験の各培地へは複数の個体を用いて、各培地ごとにその

本数や状態(太さ、葉の大きさ・枚数等)が偏らないように留意した。発根の調査は2~3日ごとに行い、試験管のガラス面に根の伸長を確認した日を記録した。

以上、継代培養以外は口径25mm、長さ150mmのガラス試験管を用い、培地10mL(パーミキュライト培地、鹿沼土培地、ピートモス培地では各支持体10mLに寒天を含まない培地液量10mL)を注いだ。継代培養では、容量200mLのガラスビン又は容量400mLのポリカーボネート製の培養器を用いそれぞれ20mL、35mLの寒天培地を注いだ後、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。培地のpHは、試験1(1)以外は5.3に調整した。培養条件は、蛍光灯照明による約5000Lx、16時間日長、室温約25℃に保ち管理した。

3 幼植物体の順化

(1) 室内での順化

2(1)の試験で発根した幼植物体55本を、発根培地挿し付け5.5~8.5ヵ月後の2010年4月8日に試験管から取り出し、水道水で根を軽く洗い流した。赤玉土、パーミキュライト及びピートモスを3:1:1の容積比で混合した用土を用い、口径60mmのビニールポットに移植した。次に、これを透明な蓋つきのプラスチック製の容器に入れて、空調された室内の約5000Lx、16時間日長下で、7日間密閉状態(容器内の温度26.5±1.9℃、湿度100%)に置いた後、さらに7日間ふたをずらした状態(同温度23.8±1.6℃、湿度85±17%)に置いた。その後、約80%遮光した屋外の網室内に移し、ミストかん水による管理を行った。なお、幼植物体付近の温湿度を1時間ごとに記録した。ポットに移植90日後の幼植物体の健全性を3段階(枯死、部分枯れ、健全又は新たに伸長)で表した。

(2) 屋外での順化

試験2(3)の幼植物体は、発根培地挿し付け6.5~7ヵ月後の2010年6月17日にパーミキュライト培地由来(12本)と鹿沼土培地由来(17本)に分け、試験3(1)と同様に植え付け、プラスチック製容器に入れて、網室に移し8日間密閉状態(容器内の温度22.6±2.9℃、湿度100%)に置いた後、ふたをずらした状態(同温度25.4±3.4℃、湿度93±10%)に12日間置いた。ポットに移植20日後、幼植物体の健全性を同様に3段階で表した。

Ⅲ 結 果

1 腋芽からのシュート伸長

(1) 伸長培地pHの検討

どのpHの培地でも外植体挿し付け後約1週間で腋芽が膨らみ、葉が開き、やがてシュートの伸長が始まった。

各培地 pH ごとの、培養開始から 20 日後の腋芽の伸長状況を図 1 に示す。雑菌による汚染率は約 52% であり、集計から除いた。各培地の個体数は 8~9 個体、残存本数は計 16~17 本であった。雑菌汚染のため、培地により個体及び本数構成が多少異なったが、特定の個体の伸長等が突出することは見られなかった。シュート長は 3.4~5.6mm、葉数は 3.5~4.9 枚となり、ともに培地 pH5.3 で最も大きな値となった。Scheffe の多重検定の結果、シュート長、葉数とも有意な処理間差は認められなかった。

(2) 植物ホルモンの種類の検討

各培地ごとの、培養開始から 20 日後の腋芽の伸長状況を図 2 に示す。雑菌による汚染率は約 39% であり、集計から除いた。各培地の個体数は 12~14 個体、各培地の残存本数は 18~22 本であった。雑菌汚染のため、培地により個体及び本数構成が多少異なったが、特定の個体の伸長等が突出することは見られなかった。シュート長は 4.6~6.2mm、葉数は 4.8~6.2 枚となり、ともにゼアチンを 0.5 及び 1.0mg/L 添加した培地で最も大きな値となった。Scheffe の多重検定の結果、シュート長、葉数とも有意な処理間差は認められなかった。

(3) 継代培養

初代培養開始から約 2 か月後、シュート基部付近の葉の腋芽が伸長をはじめ、新たなシュートを形成し、さらに腋芽が伸長することにより多数のシュートが伸長した(図 3)。初代培養開始から 8 か月後の腋芽 1 個から伸長した長さ 2cm 以上のシュート数を表 3 に示す。

培養した 16 個体のうち、2 個体は雑菌汚染により消失したが、14 個体でそれぞれ 1~16 本の外植体の継代培養ができた(表 3)。各個体の外植体から伸長した長さ 2cm 以上のシュート数の平均値は、3.5~15.3 本と個体によりシュート数は大きく異なった。分散分析の結果、シュート数には 5%水準で有意な個体間差が認められた。

2 シュートの発根

(1) 発根培地の糖の種類の見直し

発根培地に添加する糖の種類の違い及びトレハロースの濃度ごとに、挿し付け 25 日間隔で集計した発根率を、それぞれ図 4、図 5 に示す。

トレハロースでは挿し付け 50 日後で発根が認められ、ショ糖に比べて発根が早くはじまる傾向がうかがわれた(図 4)。しかし、トレハロースでは 125 日以降の発根シュート数が増加しなかったのに対し、ショ糖では 125 日以降も増加した。200 日後の発根率はトレハロース 43%、ショ糖 57%とショ糖のほうが高かった(図 4)。

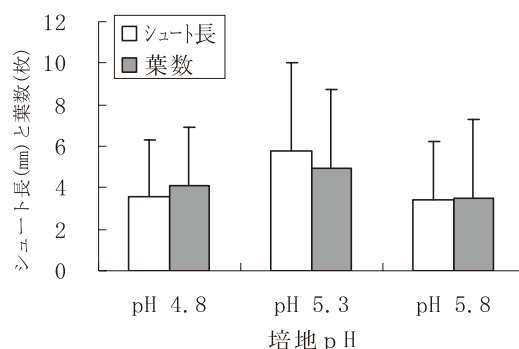


図 1 培地 pH と腋芽の伸長状況 (20 日後)

エラーバーは標準偏差を示す。
Scheffe の多重検定による処理間差はない。

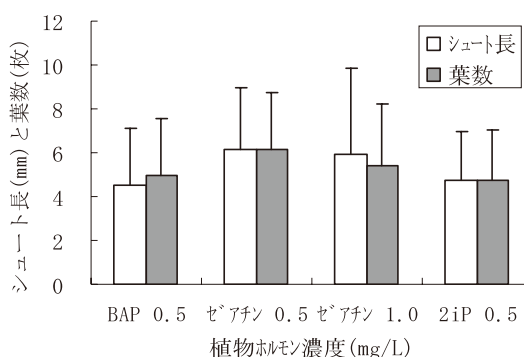


図 2 培地の植物ホルモンと腋芽の伸長状況 (20 日後)

エラーバーは標準偏差を示す。
Scheffe の多重検定による処理間差はない。

表 3 継代培養による各個体の平均シュート数
(初代培養開始から 8 か月後)

個体	外植体数(本)	シュート数(本)	個体	外植体数(本)	シュート数(本)
S1	1	4.0	H1	7	9.1±6.6
S3	6	9.3±4.1	H2	15	5.3±3.9
S4	3	15.3±8.5	H3	2	3.5±0.7
S6	6	5.0±2.2	H4	2	7.5±0.7
S7	13	12.2±8.0	H5	16	8.1±4.3
S9	8	11.4±7.0	P1	14	11.6±9.3
S10	2	3.5±0.7	P2	13	6.6±3.8



図 3 継代培養により伸長したシュート
(初代培養開始から約 8 か月後)

トレハロースの 10g/L と 20g/L で発根性への影響を比較したところ、ともに挿し付け 50 日後以前から発根が認められ、100 日後以降は横ばいとなった。200 日後の発根率は、前者では 80%、後者では 72% と 10g/L でトレハロースを加えた場合の発根率がやや高かった(図 5)。

(2) 植物ホルモンの効果の検討

発根培地に添加する植物ホルモンの有無について、挿し付け 25 日間隔で集計した発根率を、図 6 に示す。

発根率は、挿し付け 100 日後までは植物ホルモンを含まない培地のほうがやや高かったものの、その後は横ばいとなった。一方、IBA 0.5mg/L と NAA 0.02mg/L の添加培地では初期の発根率は低かったものの、175 日後まで発根率が増加した。200 日後の発根率は植物ホルモンを含まない培地で 50%、植物ホルモン添加培地では 80% と高い値となった。

(3) 発根培地支持体の検討

発根培地の支持体ごとの、各発根培地での挿し付け状況を図 7 に、挿し付け 25 日間隔で集計した発根率を図 8 に示す。発根率は寒天培地、ピートモス培地ではともに 5% と低かった。バーミキュライト培地、鹿沼土培地での発根率はそれぞれ 60%、85% と高く、特に後者では 75 日後までの初期に多く発根した。各培地の酸度は、寒天培地 pH4.9、バーミキュライト培地 pH5.8、鹿沼土培地 pH5.6、ピートモス培地 pH2.8 であり、ピートモス培地では酸性が強かった。

バーミキュライト培地と鹿沼土培地との発根性の詳細な比較のため、挿し付け 25 日間隔で集計した発根率を、図 9 に示す。バーミキュライト培地、鹿沼土培地ともに挿し付け 50~75 日まで発根率は増加したがそれ以後は緩やかな増加又は横ばいとなった。150 日後の発根率は、バーミキュライト培地では 60%、鹿沼土培地では 52% と大きな違いは無かったが、鹿沼土培地では比較的初期に多くのシュートが発根する傾向がうかがわれた(図 9)。

なお、バーミキュライト培地と鹿沼土培地で発根後約 3 か月の代表的な幼植物体の状態を図 10 に示す。根の長さや量といった発根状態はどちらも大きな違いはないものの、鹿沼土培地ではシュート基部に平均直径 $4.7 \pm 3.3\text{mm}$ のカルスが形成された。一方、バーミキュライト培地でのカルスは $2.1 \pm 0.6\text{mm}$ と小さかった。

(4) 個体別発根率

5 本以上の挿し付け数のある個体の発根率を表 4 に示す。平均発根率はバーミキュライト培地 54.2%、鹿沼土培地では 52.7% と同程度であった。各個体の発根率は、バーミキュライト培地では 29~100%、鹿沼土培地では 29~

89% と個体による発根率の違いが大きく、また、培地により発根率が大きく異なる個体も見られた。

なお、発根培地へのシュート挿し付け 200 日後、本研究で発根試験に供試した S1, S2, S8, H3 以外の 12 個体すべてで幼植物体が得られた。

3 幼植物体の順化

(1) 室内での順化

ポット移植 90 日後の幼植物体の健全性を 3 段階で表し、表 5 に示す。また、順化後の状況を図 11 に示す。55 本のうち枯死は 2 本のみと少なく、61.8% の幼植物体は健全又は良好に生育した。

(2) 屋外での順化

ポット移植から 20 日後の幼植物体の健全性を表 6 に示す。発根培地別にみると、バーミキュライト培地で発根させた幼植物体は、「健全又は伸長」の割合が 75.0% と多く、良好に生育していたのに対し、鹿沼土培地で発根させた幼植物体はその割合が 29.4% と低かった。また、鹿沼土培地で発根させた幼植物体の基部にはポット移植時に平均直径 4.5mm のカルスが形成されていた。

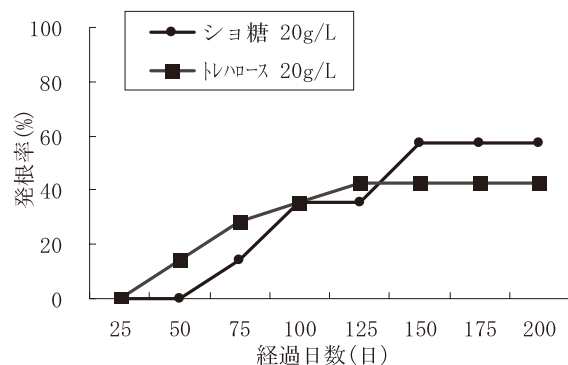


図 4 発根培地の糖の種類と発根率

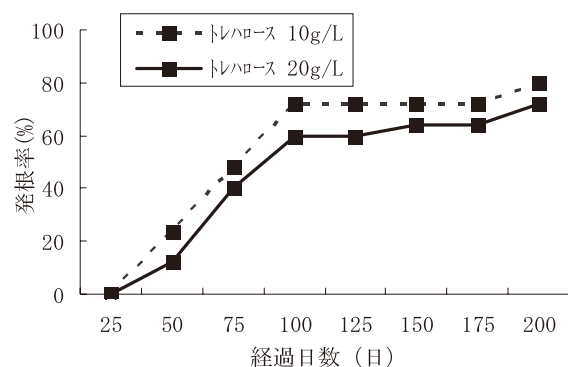


図 5 発根培地のトレハロース濃度と発根率

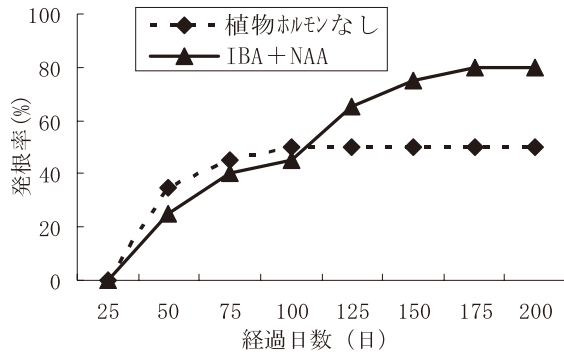


図6 発根培地の植物ホルモンの有無と発根率

表4 各個体の発根率(150日後)

個体	パーミキュライト培地		鹿沼土培地	
	挿し付け数(本)	発根率 (%)	挿し付け数(本)	発根率 (%)
S7	15	80	16	50
S9	6	100	6	50
H1	7	29	7	29
H2	6	33	7	43
H4	21	29	21	29
P1	26	69	27	89
P2	5	40	5	80
平均		54.2		52.7
標準偏差		28.7		23.6



図7 発根培地支持体に挿し付けたシュート

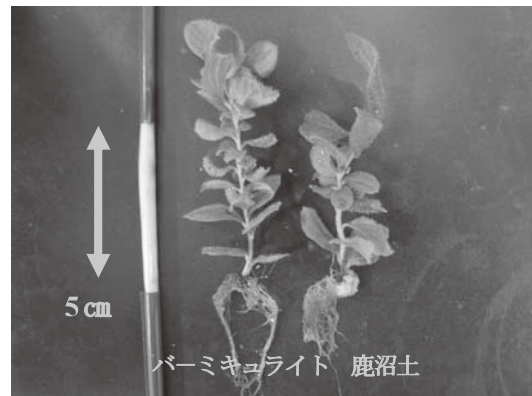


図10 パーミキュライト培地と鹿沼土培地での発根状況(約3か月後)

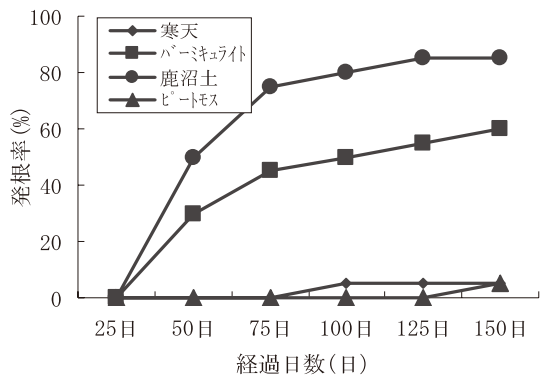


図8 発根培地の支持体と発根率(150日後)

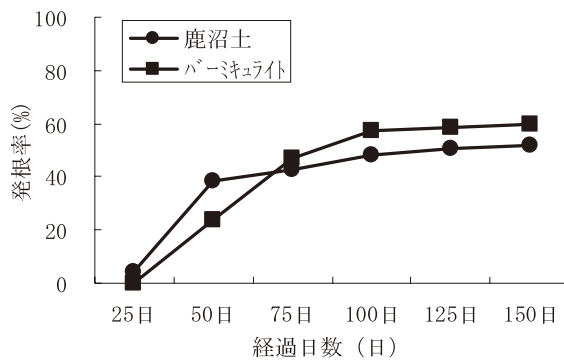


図9 パーミキュライト培地と鹿沼土培地の発根率

表5 順化後の幼植物体の健全性(移植90日後)

健全性	幼植物体数(本)	本数割合 (%)
枯死	2	3.6
部分枯	19	34.5
健全又は伸長	34	61.8

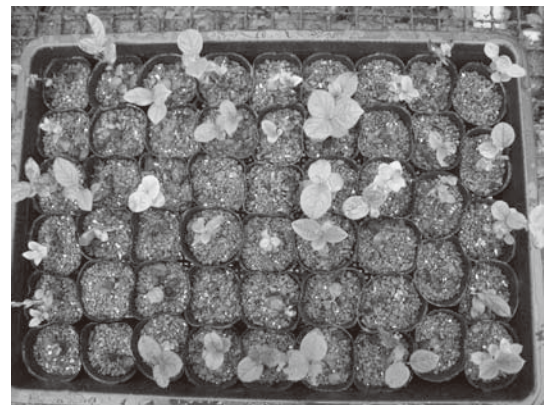


図11 順化後の幼植物体(ポット移植90日後)

表 6 発根培地と順化後の幼植物体の健全性
(移植 20 日後)

健全性	パーミキュライト培地		鹿沼土培地	
	幼植物 体数 (本)	本数割合 (%)	幼植物 体数(本)	本数割合 (%)
枯死	0	0	0	0
部分枯	3	25.0	12	70.6
健全又は伸長	9	75.0	5	29.4

IV 考 察

本研究から、ナガボナツハゼ腋芽の組織培養において、シュートの伸長に適した培地の pH、植物ホルモンについて検討したところ、ともに処理間に統計的な有意差は認められなかったものの、伸長の良さ、葉数の多さから、培地酸度に関しては pH5.3 が、培地に添加する植物ホルモンとしてはゼアチンが適する可能性がうかがわれた。一般に培地の pH は 5.7~5.8 に調整されることが多いが⁹⁾、ナガボナツハゼの培地 pH としては、やや酸性の pH5.3 が適する可能性があると思われる。

培地の pH、植物ホルモンの検討に用いた 16 個体のうち 14 個体について、0.5mg/L のゼアチンを添加した培地での継代培養が可能で、ほとんどの個体で複数のシュートが伸長したことから、組織培養によるナガボナツハゼの保存の可能性が明らかとなった。個体別のシュート数には統計的な差が認められ、シュート増殖のしやすさには個体による違いのあることがうかがわれた。

シュートの発根に適した培地条件を検討したところ、培地に添加する糖として、トレハロースではショ糖と比べて初期の発根が早まる傾向が認められたが、挿し付け 200 日後の発根率はショ糖が上回り、糖の種類によって発根性が異なる可能性がうかがわれた。トレハロースの濃度については、10g/L の濃度の方が 20g/L の濃度よりやや高い発根率となった。シラカンバの発根についても高濃度では発根率が低く、根の本数も少ないことから、根の原基の形成が多少阻害されると考えられており²⁾、ナガボナツハゼでも高濃度の糖の添加により同様の発根阻害が起きたことが予想される。植物ホルモンとして IBA 0.5mg/L と NAA 0.02mg/L を添加した場合、200 日後の発根率は無添加を上回ったが、初期の発根率は無添加が添加培地を上回った。植物ホルモンの添加により発根率が高まり、植物ホルモンを含まない発根培地では、発根期間が早まる可能性がうかがわれた。発根期間を短縮し、発根率を高めるためには、糖の種類や濃度、植物ホルモ

ンの添加の必要性、組合せや濃度等の検討が必要と思われる。

発根培地の支持体として、寒天及びピートモスでは低い発根率となった。一般にツツジ科植物は酸性の土壌を好むものが多く¹¹⁾、また、ツツジ類では挿し木用土の pH は 4.0 くらいが適するといわれる⁹⁾。ナガボナツハゼについても酸性の伸長培地が適すると予想し、酸性の鹿沼土及びピートモスを支持体に用いた。しかし、ピートモス培地では培地滅菌後の pH が 2.8 と強い酸性になり、発根に阻害的となったと考えられる。寒天培地で低い発根率となったことは、発根にとって培地 pH のみではなく、パーミキュライトや鹿沼土といった通気性の良いことも発根条件であると考えられる。パーミキュライト培地と鹿沼土培地との発根性を比較したところ、鹿沼土培地では、150 日後の発根率はパーミキュライト培地と同等以上で、発根状態には両者に違いは見られなかった。鹿沼土培地では早期に発根する傾向がうかがわれ、培地支持体として鹿沼土が適すると思われた。しかし、鹿沼土培地の発根苗の基部には比較的大きなカルスが形成される傾向が見られた。幼植物体の順化後の健全性の低さは、カルスにより移植後の根の活着・生育の妨げとなった⁷⁾と考えられるため、順化まで含めた安全で効率的なクローン苗木の確保のためには、鹿沼土よりパーミキュライトが発根培地の支持体として適すると思われる。

屋内及び野外での順化条件の検討から、幼植物体の順化は、室内で 2 週間程度、高湿度条件を維持した後、または、梅雨時の湿度の高い時期には、幼植物体をポットに移植後、野外の網室等の栽培施設で、遮光条件下で灌水を十分行えば比較的容易に順化が行えると思われた。

個体により、継代培養でのシュートの伸長数、発根培地での発根率及び発根に適した培地支持体等に個体差のあることがうかがわれた。そのため、今後は、多くの個体について、より確実・安定・効率的な個体の確保、保存が行えるよう、汎用的な培養条件の検討とともに、組織培養の難しい個体については個体ごとに培養条件を検討する必要があると思われる。また、順化後の苗の育成方法については未解明なため検討する必要がある。

ナガボナツハゼの保護のためには、自生する個体・集団の分布や生育状況を把握し、自生地を含めて保全するとともに、遺伝子解析による遺伝的地域性や多様性等の詳細な情報を考慮し、現地外保存あるいは現地個体が失われた場合のその個体の里帰り等に役立てるため、組織培養により増殖した個体について、遺伝的に異なる地域個体の区別及びその地域の遺伝的多様性が十分保たれる個体数を確保しておく等の個体管理を行う必要がある。

る。本試験を通じて供試した 16 個体のうち 14 個体で継代培養が可能であり、発根培地に挿し付けた 12 個体すべてで発根し幼植物体が得られ、幼植物体の順化条件も明らかになった。これにより、組織培養によるナガボナツハゼの増殖や保存が可能となり、遺伝的地域性・多様性確保のための個体管理に役立つことが期待できる。

V 摘 要

絶滅危惧種であるナガボナツハゼの個体消失に備え、保護・保全に資するため、腋芽を用いた組織培養による個体増殖条件を調べた。伸長に適した培地の pH、植物ホルモンの種類、各個体の継代培養の可能性・シュート増加数の違いを調べた。発根については、培地に添加する糖の種類と濃度、植物ホルモンの添加効果、培地支持体の種類及び個体による発根率の違いを調べた。また、幼植物体の野外への順化条件を調べた。その結果次のことがうかがわれた。

- 1 腋芽からのシュート伸長には培地酸度として pH5.3 が適する可能性がうかがわれた。
- 2 シュート伸長にはゼアチン 0.5 又は 1.0mg/L の添加が適する可能性がうかがわれた。
- 3 ゼアチン 0.5mg/L を添加した培地で多くの個体の継代培養が可能であった。シュートの増加数には個体による違いが見られた。
- 4 シュートの発根期間を早めるにはトレハロースが、発根率を高めるにはショ糖が適する可能性がうかがわれた。また、トレハロースの濃度により発根率が異なることが示唆された。
- 5 IBA 0.5mg/L と NAA 0.02mg/L の添加により発根率が高まり、植物ホルモンを含まない発根培地では、発根期間が早まる可能性がうかがわれた。
- 6 発根培地の支持体としてはパーミキュライト又は鹿沼土が適すると思われた。鹿沼土では発根期間が短縮されるものの、基部にカルスが形成され、順化効率の低下に繋がる傾向がうかがわれた。
- 7 幼植物体の順化は、湿度の調整などにより 2 週間で容易に行えた。
- 8 本試験で供試した 16 個体のうち、14 個体で継代培養が可能で、12 個体で幼植物体が再生でき、組織培養による個体の確保・保存に役立つことが示された。

endangered species *Vaccinium sieboldii* and *Vaccinium ciliatum* (Ericaceae). *Plant Syst Evol* 287: 75~84.

- 2) 井出雄二(1987) : シラカンバの組織培養による個体大量増殖法に関する研究. 静岡県林研報 16, 56pp.
- 3) 関西地区林業試験研究機関連絡協議会育苗部会編 (1980) : 樹木のふやし方ータネ・ホとりから苗木まで一, 農林出版, 東京, 340pp.
- 4) 北村四郎・村田源(1979) : 原色日本植物図鑑・木本編 II, 保育社, 大阪, 545pp.
- 5) Lloyd, G. and McCown, B. (1980) : Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Inc. Proc. Int. Prant Prop. Soc.* 30, 421~427.
- 6) 町田英夫(1975) : さし木のすべて, 誠文堂新光社, 東京, 261pp.
- 7) 森下義郎・大山浪雄(1972) : 造園木の手引きーさし木の理論と実際, 地球出版, 東京, 367pp.
- 8) 環境省(2007) : 哺乳類、汽水・淡水魚類、昆虫類、貝類、植物 I 及び植物 II のレッドリストの見直しについて, 平成 19 年 8 月 3 日報道発表資料, 環境省.
- 9) 竹内正幸・中島哲夫・古谷力編集(1984) : 植物組織培養の技術, 朝倉書店, 東京, 227pp.
- 10) 山本茂弘・袴田哲司・横山 峰幸(2009) : 絶滅危惧種ナガボナツハゼの組織培養による植物体再生, 第 120 回日本森林学会大会講演会要旨集, Pb1-22.
- 11) 安田薫(1973) : 植木園芸ハンドブック, 養賢堂, 東京, 827pp.

引用文献

- 1) Hirai, M., Yoshimura, S., Ohsako, T., Kubo, N., (2010) : Genetic diversity and phylogenetic relationships of the