

組織培養によるムニンツツジの大量増殖法の確立

澁澤直恵

キーワード：組織培養，ムニンツツジ，大量増殖

緒言

ムニンツツジ (*Rhododendron boninese* Nakai) は、東京都小笠原諸島の固有種であり、同諸島返還直後の調査では、数株が確認されていた（下園，1987）。しかし、現在は、同諸島父島のツツジ山に1本の野生株が現存しているのみである。そのため、早急に人工増殖などによる保護、増殖が必要になっている。東京都では、現地植生の回復を図るために、「小笠原諸島固有種ムニンツツジの保護増殖事業」を実施し、東京都農業試験場においては「組織培養法によるムニンツツジの大量増殖方法の開発」を分担した。

ツツジ科植物の組織培養については、シャクナゲ (Anderson, 1984), アザレア (Fordham, 1982), レンゲツツジ (飯塚ら, 1995), アゲボノツツジ (yoshizawa, 1998) などの知見があるが、ムニンツツジについては、現在までに組織培養に関する報告はない。そこでムニンツツジの発芽種子および挿し木苗の茎頂を培養材料として培地条件を検討し、大量増殖方法を確立したので報告する。

材料および方法

1. 発芽種子の培養に用いる培地の検討

(1) 初代培地

ムニンツツジの種子の発芽は、以下の方法で行った。2001年6月、小笠原諸島父島においてムニンツツジ野生株から開裂数日前の莢を採取した。採取2日後に東京都農業試験場において種子を取り出し、70%エチルアルコール5分間、次に有効塩素1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で8分間殺菌し、滅菌水で洗浄した。無菌播種用培地は Murashige and Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog, 1962) にシ

ョ糖 20g/l を加え、pH5.8 に調整し、グラランガム 3 g/l を加えて作成した。この培地に種子を播種し、27°C, 4000lx, 16 時間日長で培養した。以降、培養は同様の温度、光条件にて行った。播種後 35 日目の発芽種子を BTM (Chalupa, 1984), Anderson (Anderson, 1984), WPM (Lloyd, 1981) 培地に、ベンジルアデニン (BA), キネチン (Kin), チジアズロン (TDZ), ナフタレン酢酸 (NAA) を表 1 により組み合わせて添加し、グラランガム 3 g/l を加えた培地に置床した。以降、すべての培地に支持体としてグラランガム 3 g/l を加えた。初代培地条件の評価は、培養開始 8 週間後に生存した個体数と発生した分枝数を基準とした。

(2) 発根培地

BTM 培地に BA1.0ppm および Kin0.1ppm を添加した初代培地において生育した培養植物を供試し、分枝を切り分けて発根培地に移植した。発根培地として、塩濃度を 1/2 濃度にした BTM, Anderson, WPM の 3 種類の培地を用い、それぞれに支持体としてグラランガム 3 g/l を添加した。発根培地の評価は、継代 12 週間後の発根個体数と分枝数を基準とした。

2. 茎頂の培養に用いる培地の検討

(1) 初代培地および継代培地

温室内で栽培しているムニンツツジの頂芽を含む新梢 2~3 cm を 2001 年 3~5 月に採取した。葉を摘除し、中性洗剤で 10 分間洗浄後、流水で洗剤を落とす。次に 70%エチルアルコール 1 分間、有効塩素 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液 3 分間の順に殺菌処理し、滅菌水で洗浄した。その後、2~3 mm の頂芽を切り出し、初代培地に置床した。初代培地としては、TDZ または BA と Kin を表 3 により添加した WPM 培地を用いた。初代培地の評価は、置床

12 週間後の生存個体数を基準とした。

各初代培地で生存していた個体を供試し、継代培地に置床した。継代培地としては TDZ, NAA, BA, Kin を表 4 により添加した WPM 培地を用いた。継代培地の評価は、継代 12 週間後の各個体の分枝数を基準とした。

(2) 発根培地

BA1.0ppm と Kin0.1ppm を添加した WPM 培地で増殖した個体を供試し、株元で切り分け、発根培地に移植した。発根培地として、1.0ppm または 0.1ppm のインドール酪酸 (IBA) を添加した BTM, WPM 培地を用いて比較した。また、IBA1.0ppm を添加し、BTM, WPM 培地の塩濃度を標準濃度にした培地と 1/2 濃度にした培地を用いて比較した。発根培地の評価は、移植 12 週間後の発根個体数を基準とした。

結 果

1. 発芽種子の培養に用いる培地の検討

(1) 初代培地

置床数に対する生存数の割合が 70% 以上であったホルモン条件は、BTM または WPM 培地に TDZ1.0ppm および NAA0.01ppm を添加した区と、WPM 培地に TDZ0.1ppm および NAA0.01ppm を添加した区の 3 条件であった (表 1)。分枝の発生程度については BTM 培地に BA1.0ppm および Kin0.1ppm を添加した場合が最も良好であり、生存個体 30 個中 18 個体で、分枝が 50 本以上発生した (図版 I-1)。なお、同培地での生存率は 60% であった。

表 1 発芽種子の初代培地条件と生育

培地	ホルモン条件 (ppm)	置床数 (個) (A)	生存数 (個) (B)	B/A×100 (%)	分枝発生程度別個体数 (個)		
					25 本未満	25~50 本	50 本以上
BTM	BA 1.0 + Kin 0.1	50	30	60	7	5	18
	BA 1.0 + NAA 0.01	25	5	20	4	0	1
	TDZ 1.0+NAA 0.01	25	21	84	19	2	0
	TDZ 0.1+NAA 0.01	25	12	48	5	4	3
Anderson	BA 1.0 + Kin 0.1	50	2	4	0	2	0
	BA 1.0 + NAA 0.01	25	0	0	0	0	0
	TDZ 1.0+NAA 0.01	25	17	68	13	4	0
	TDZ 0.1+NAA 0.01	25	11	44	7	2	2
WPM	BA 1.0 + Kin 0.1	50	10	20	6	2	2
	BA 1.0 + NAA 0.01	25	8	32	3	2	3
	TDZ 1.0+NAA 0.01	25	24	96	10	7	7
	TDZ 0.1+NAA 0.01	25	22	88	9	11	2

(2) 発根培地

発根培地について検討した結果、いずれの培地の場合でも置床した個体はすべて生存し、また発根した個体数の割合も高かった (表 2)。その中で特に生長が良好で分枝の発生が多く認められた培地は、

1/2BTM 培地または 1/2WPM 培地を用いた場合であり、分枝数が 100 本以上になった個体数は、1/2BTM 培地では置床数 16 個体中 8 個体 (50%)、1/2WPM 培地では置床数 16 個体中 9 個体 (56%) であった。

表 2 発芽種子の発根培地における生育

培地	置床数 (個)	生存数 (個) (A)	発根個体数 (個) (B)	B/A×100 (%)	分枝発生程度別個体数 (個)		
					50 本未満	50~100 本	100 本以上
1/2 BTM	16	16	14	88	4	4	8
1/2 Anderson	16	16	15	94	3	8	5
1/2 WPM	16	16	16	100	2	5	9

2. 茎頂の培養に用いる培地の検討

(1) 初代培地および継代培地

茎頂の培養の初代培地について検討した結果、置床数に対する生存数はWPM培地にTDZを0.1または1.0ppm添加した培地で高くなった(表3)。BA1.0ppmとKin0.1ppmの条件で初代培養した場合、生存した個体数の割合は47%であった。

表3 茎頂の培養における初代培地条件と生育

ホルモン条件 ^a (ppm)	置床数	生存数	B/A×100
	(個)(A)	(個)(B)	(%)
TDZ 1.0	44	31	71
TDZ 0.1	27	21	78
BA 1.0 + Kin 0.1	17	8	47

a) 培地はWPM培地を用いた。

継代培地については、BA1.0ppm、Kin0.1ppmで初代培養して得られた個体を初代培地と同一条件で継代した結果、生長が良好で、置床したすべての個体で100本以上の分枝が発生し順調に伸長し、奇形芽は発生しなかった(表4)。TDZを用いて初代培養を行った場合はTDZ1.0ppmを添加した培地に継代した結果、すべての個体が奇形化し、分枝の発生も認められなかった。また、その後TDZを除去した培地に継代した場合でも分枝の発生および伸長が悪く、100本以上の分枝が発生した個体はなかった。

(2) 発根培地

IBAの濃度を変えて比較した結果、1.0ppmでは0.1ppmよりも発根が良好であった。特にBTM培地IBA1.0ppmを添加した条件で、発根個体数が

表4 茎頂の培養における初代および継代培地条件と生育

ホルモン条件(ppm)		継代培養数 (個)	奇形芽発生 個体数(個)	分枝発生程度別個体数 (個)		
初代培地 ^a	継代培地 ^a			50本未満	50~100本	100本以上
TDZ 1.0	TDZ 1.0 + NAA 0.01	21	21	0	0	0
	NAA 0.01	10	0	9	1	0
TDZ 0.1	TDZ 0.1 + NAA 0.01	13	0	13	0	0
	NAA 0.01	8	0	4	4	0
BA 1.0 + Kin 0.1	BA 1.0 + Kin 0.1	8	0	0	0	8

a) 培地はWPM培地を用いた。

表5 茎頂由来培養物における培地およびIBA濃度別生育

培地	ホルモン条件	置床数 (個)(A)	発根個体数		B/A×100 (%)
	(ppm)		(個)(B)	(%)	
BTM	IBA 1.0	12	9	75	
	IBA 0.1	11	2	18	
WPM	IBA 1.0	13	6	47	
	IBA 0.1	6	1	17	

表7 茎頂由来培養物における基本培地別分枝発生程度

培地 ^a	置床数 (個)	分枝発生程度別個体数(個)		
		10本未満	10~20本	20本以上
1/2 BTM	10	0	3	7
1/2 WPM	10	0	7	3

a) ホルモン条件はIBA1.0ppmとした。

表6 茎頂由来培養物における培地濃度別生育

培地 ^a	置床数	発根個体数		B/A×100 (%)
	(個)(A)	(個)(B)	(%)	
BTM	12	9	75	
1/2 BTM	10	10	100	
WPM	13	6	47	
1/2 WPM	10	10	100	

a) ホルモン条件はIBA1.0ppmとした。

最も多く、発根率は75%であった(表5)。さらにBTMおよびWPM培地の塩濃度を変えてIBA1.0ppmを添加した場合、いずれの培地においても塩濃度を1/2濃度にしたほうが発根が良好であり、置床した全ての個体で発根が認められた(表6)。なお、1/2BTM培地と1/2WPM培地における分枝発生程度は1/2BTM培地を用いたほうが良好であった

(表7)。また、発根が良好であった個体は順調に順化、生育した(図版I-2)。

考 察

本研究において、ムニンツツジの発芽種子から大量増殖を図るには、生存率、分枝発生程度および発根程度を総合的に考察すると、初代培地としてBTM培地にBA1.0ppmおよびKin0.1ppmを添加した培地、継代培地として1/2BTMまたは1/2WPM培地が適することを明らかにした。さらに、ムニンツツジの茎頂の培養によって大量増殖を図るには、初代培地としてBA1.0ppm、Kin0.1ppmを添加したWPM培地、発根培地として1/2BTM培地にIBA1.0ppmを添加した培地が適することを明らかにした。

ツツジ科植物に関して、Anderson (1984) はシャクナゲの茎頂の培養ではAnderson培地が適しているとし、飯塚ら (1995) もレンゲツツジを用いて同様の結果を得ている。一方、アケボノツツジの茎頂の培養ではBrand and Kiyomoto (1997) およびYoshizawa et al. (1998) はWPM培地が適しているとした。本研究においては、発芽種子の初代および継代培養ではAnderson培地を用いた場合よりも、他の木本培養用培地であるWPMまたはBTM培地を用いたほうが分枝の発生が良好であった。ツツジ科植物の組織培養ではBTM培地を用いた報告はない。本研究では、発芽種子の初代培養と継代培養では、BTM培地における分枝の増殖はWPM培地の場合と同等またはそれ以上であることが明らかになった。これらの結果から、ムニンツツジの培養では基本培地としてAnderson培地よりもBTMまたはWPM培地が適切である。

茎頂の培養におけるサイトカイニン類の効果について、Anderson (1984)、飯塚ら (1995)、Yoshizawa et al. (1998) は2iPの添加が分枝の増殖に効果的であると報告している。飯塚ら (1995) は、レンゲツツジの培養ではBAの添加は分枝の増殖に対して効果がないことを示している。一方、Kamenicka et al. (1998) は *Rhododendron forrestii* の培養ではBA添加効果は2iP添加効果と同等またはそれ以上であるとしている。本研究では、発芽種子の培養と

茎頂の培養においてBA1.0ppmとKin0.1ppmを添加した条件で分枝が多く得られている。このことから、ムニンツツジではサイトカイニン類であるBAとKinの複合添加によって分枝が良好に増殖することが明らかになった。Briggs et al. (1994) 高い活性を持つサイトカイニン類であるTDZは、ツツジ科植物の培養に用いた場合、芽が奇形化すると報告している。ムニンツツジの茎頂の培養においても高濃度のTDZを添加した培地では芽の奇形が認められた。また、分枝の増殖に対して効果がないことから、ムニンツツジの培養ではサイトカイニン類としてのTDZの利用は不適切であると考えられた。

Briggs et al. (1994) は高濃度のIBA添加が発根に効果的であるとしている。今回、茎頂の培養では高濃度のIBA添加が発根を促進したことから、ムニンツツジでもIBAは発根に効果があることが明らかになった。

ツツジ科植物の培養はほとんどが茎頂を供試材料として行われており、発芽種子の培養例はみられなかった (Anderson, 1984, 飯塚ら, 1995, Yoshizawa et al., 1998)。優良な個体を増殖する場合は、茎頂を供試し、培養することによって優良個体のクローン集団を得ることができる。このためムニンツツジの原木の維持に関しては茎頂の培養によるクローン苗の作出が有用である。しかしながら、本研究において原木の維持だけでなく、新たな自生地を創出するための試験植栽用苗の提供を行うことが大きな目的であり、そのためには遺伝的に多様な個体群を供試することが生態系の保護の上で望ましい。種子は遺伝的に多様であり、多様性に富む集団を作出するための増殖用供試材料として有効である。

本研究の結果から、ムニンツツジでは、発芽種子あるいは茎頂を用いて組織培養による大量増殖が可能なが明らかになった。今後、本研究で明らかにした方法により作出した苗を有効利用することにより試験植栽に用いる苗を効率的に提供することが可能となり、小笠原諸島固有種ムニンツツジの保護および植生回復に多大に貢献できると考える。

摘 要

ムニンツツジの組織培養による増殖方法を検討し、

生長および発根が良好な培養条件を明らかにした。

1. 発芽種子の培養では、初代培地として BTM に BA1.0ppm および Kin0.1ppm を添加した培地、継代培地として 1/2BTM または 1/2WPM 培地が適していた。
2. 茎頂の培養では、初代培地として BA1.0ppm, Kin0.1ppm を添加した培地、発根培地として 1/2BTM 基本培地に IBA1.0ppm を添加した培地が適していた。

引用文献

- Anderson, W.C. (1984) A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109(3) : 343-347.
- Brand, M.H. and R. Kiyomoto (1997) The induction of tissue proliferation-like characteristics in vitro cultures of *Rhododendron* 'Montego'. Hortscience. 32(6) : 989-994.
- Briggs, B.A., S.M. McCulloch and L.A. Caton (1994) In vitro propagation of *Rhododendron*. Acta Horticulturae. 364 : 21-26.
- Chalupa, V. (1984) In vitro propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). Biologia Plant. (Praha). 26 : 374-377.
- Fordham, I. (1982) Axillary and adventitious shoot proliferation of exbury azaleas. In Vitro. 17 : 738-739.
- 飯塚正英, 木村康夫. (1995) 2相培養によるレンゲツツジの大量増殖. 群馬農試研報 1 : 1-4.
- Kamenicka, A., J. Valka and G. Vizarova (1998) A comparative study of different cytokinins on the formation of *Rhododendron forrestii* Balf. Ex Diels. Axillary shoots in vitro. Acta Physiologiae Plantarum. 20(2) : 167-171.
- Lloyd, G., B. Mccow, (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Proc. Inc. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30 : 421-427.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- 下園文雄 (1987) 絶滅に瀕する小笠原固有植物の育成・増殖研究報告書. 東京大学理学部附属植物園. pp.13-14
- Yoshizawa, N., A. Watanabe, Y. Wakita and S. Yokota (1998) Plant regeneration from the mass of shoot primordia in *Rhododendron pentaphyllum* Maxim. var. *nikoense* Komatsu. Plant Biotechnology 15 : 71-75.

Summary

Naoe Shibusawa (2004) : Micropropagation of *Rhododendron boninese* Nakai by tissue culture. Bull. Tokyo Metro. Agric. Exp. Sta. 32 : 93-99. (Received November 17, 2003 ; Accepted February 20, 2004)

Key words : tissue culture, *Rhododendron boninese* Nakai, micropropagation

The method of micropropagation of *Rhododendron boninese* Nakai by tissue culture has been examined, and the good medium for growth of shoot and root was found. In the case of the culture of seeds which germinated, BTM medium supplemented with BA 1.0ppm and Kinetin 0.1ppm was found to be suitable for shoot primordia obtained. As for subculture, the 1/2BTM or 1/2 WPM medium was found to be suitable. In the case of culturing shoot apex, medium supplemented with BA 1.0ppm and Kinetin 0.1ppm was found to be suitable for shoot primordia obtained.

As for subculture, the 1/2BTM medium supplemented with IBA 1.0ppm was found to be most suitable for root formation.

図版 I



1. ムニンツツジ培養苗



2. ムニンツツジ順化苗