天然記念物の梅護寺珠数掛桜（*Prunus lannesiana* Wils. cv. Juzukake-zakura）の茎頂培養法による増殖と若木の獲得

笠原俊策[1]・韓　東生[2]・新美芳二[2*]

（平成19年７月２日受付）

要　約

天然記念物、梅護寺（新潟県京ヶ瀬村、（現）阿賀野市）の珠数掛桜を保存するために、組織培養法による若木の獲得を試みた。Murashige（1974）が提唱した方法に従って行った。

１．無菌個体の確立のために１mg/L BAを添加したWPM培地（Lloyd and McCown, 1980）で異なる時期に摘出した茎頂を培養したところ、９月に採取した葉芽がシュートが最もよく形成した。

２．シュートを形成した培養物は0.5mg/L BAと３mg/L GA_3を添加したWPM培地に移植すると新たに複数のシュート（分枝）を形成し、シュートの生長もよかった。

３．試験管内で形成されたシュートが独立栄養個体（苗）となるために必要な発根と順化法を検討した：⑴３cm以上に伸長したシュートは発根を誘導するために５mg/L IBAを添加したWPM培地で7日から21日間培養して発根前処理を行った；⑵処理したシュートは、①ホルモンフリーのWPM培地に移植する（“試験管内発根法”）か、②培土の入ったイチゴパック内で挿し木を行った（“挿し木直接発根法”）。その結果、“試験管内発根法”で得られた苗はポットに移植後の生育が不良で枯死し、“挿し木直接発根法”で得られた苗は活着がよく、培養開始から４年後には開花した。“挿し木直接発根法”の実施時期は鉢上げした苗木の管理方法を考えると６月が最適であった。

新大農研報, 60:33-38, 2007

キーワード：ジュズカケザクラ、茎頂培養、増殖、挿し木直接発根法

梅護寺の珠数掛桜は八重咲きのサトザクラの種類であり、その名は越後配流中の親鸞聖人にまつわる伝説に由来し、「越後七不思議」の一つとして知られている（野田, 1977）。新潟県京ヶ瀬村（現在、阿賀野市）の梅護寺にある珠数掛桜は昭和２年に国の天然記念物に指定された。このサクラは、10cm以上もある長い花序と60から90枚花弁をもつ淡ピンク色の花が特徴で、植物学上にもきわめて貴重なものである。しかし、近年、梅護寺珠数掛桜の親木は病原菌の感染により衰弱し、その保存のために若木の獲得が緊急の課題となっている。母樹と同じ遺伝形質を得るためには栄養繁殖が不可欠である。サクラの栄養繁殖は挿木や接木で行われ場合があるが、発根や活着が困難である場合が多い（齋藤ら, 2004）。一方、組織培養による苗木の生産は、一般に挿木や接木等の方法に比べて、母樹に与える損傷やストレスが小さく、天然記念物のような貴重な樹木の場合は有効な方法といえる。特に茎頂培養による増殖法の利点としては、母樹の遺伝的形質を継承すると共に、無病後代を生産する可能性もある。

茎頂培養によるサクラの植物体再生と増殖についてはすでにいくつかの種について報告されている（酒谷と天野, 1987；河合, 1993；佐藤, 1994, 1999；田中, 1995, 2001）が、培養生育は茎頂の採取時期によって異なる（佐藤, 1992）。本研究では、茎頂培養による梅護寺の珠数掛桜の増殖システムの確立と若木の獲得を目的とし、Murashige（1974）の提唱した⑴無菌培養物の確立、⑵増殖方法の検討、⑶発根・順化方法、の手順に従って行い、外植体の採取時期と植物成長調節物質の影響等を検討した。

材料及び方法

１．植物材料と殺菌方法

平成15年４月から９月までの間に、新潟県京ヶ瀬村（現阿賀野市）の梅護寺にある樹齢約50年のジュズカケザクラ（*Prunus lannesiana* Wils. cv. Juzukake-zakura）より新梢や枝を３回採取し、その先端部の芽や腋芽を培養に使用した。１回目は４月29日の開花期新梢25本、２回目は７月30日の成長を停止した新梢10本、３回目は９月24日の葉芽と花芽を分化した枝３本を用いた。採取した植物材料は葉を取り除き、腋芽（又は芽）部分が先端となるように３cm位の長さに調整した（図１）。調整した材料は、中性洗剤を含ませたスポンジで汚れを落とし、水道水で水洗した。その後、以下の手順で滅菌した：

４月　　７月　　９月

図１．異なる時期に採取した外植体.

[1]新潟県立加茂農林高等学校

[2]新潟大学農学部

* 代表著者：himesa@agr.niigata-u.ac.jp

①70％エタノール液に十数秒間浸漬；②オスバン50倍液に10分間浸漬；③ピューラックス6倍希釈液（有効塩素1％含有）に10分間浸漬；④クリーンベンチ内で、滅菌水で3回、10分間以上洗浄。

２．無菌培養物の確立

殺菌した材料（腋芽、葉芽、花芽）を、穴の開いたゴム栓に虫ピンで固定し、実体顕微鏡下でメスを用いて鱗片を取り除き、茎頂部を取り囲む葉原基を外側から順次取り除いた。そのあと、葉原基が3から5枚残った0.5～1mm前後の頂端部をブレードホルダーメスで摘出し、培地に置床した。

培養培地は木本植物用培地（Woody plant medium、以下WPMとする）（Lloyd and McCown, 1980）を用いた。培地にBA 1mg／L、ショ糖30g／L、ゲランガム2g／Lを添加し、pHを5.8に調整した。培地は16 mlずつ管ビン（25 mm × 120 mm）に分注し、オートクレーブで115℃、15分間滅菌した。培養物は25℃、14時間照明（白色蛍光灯、約3000 LX）の培養室で培養した。

３．増殖培養

３-１．増殖実験

茎頂培養4週後に, 生き残った培養物を“無菌培養物の確立”で用いた同一組成の新鮮培地（但し、ゲランガム2.5g／Lに変更）に移植し、さらに8週間培養した。そのあと、発達したシュートはメスで約1cmの長さに切断し、同一組成の新鮮培地に移植した。この操作を3から4回繰り返した。

３-２．好適ホルモン濃度の実験

シュート増殖に適したホルモン濃度を決定するために、3-1で得られたシュートは長さ約1.5cm、葉を2から3枚もつ外植体に調整され、WPM培地にBA 0.5～1mg／L、GA_3 0～4.5mg／L、ショ糖30g／Lおよびゲランガム2.5g／Lを添加した培地で培養された。シュート形成数およびシュート長に基づき好適濃度が決定された。

これら二つの実験で供試した培養物はいずれも25℃、14時間照明（白色蛍光灯、約3000LX）の培養室で培養した。

４．発根

増殖培地（WPM培地 + ショ糖3％ + ゲランガム2.5％ + BA 0.5mg/L + GA_3 3mg/L）で7～8週間培養したあと、約3cmに伸長したシュートを切り取り、これらのシュートの発根が二つの方法で検討された。

⑴“挿し木直接発根法”

シュートはIBA 0～10mg／L、ショ糖20g／L、ゲランガム2.5g／Lを含むWPM培地で7日間培養し、発根のための前処理を行った。この前処理の好適濃度（IBA 5mg/L）を決定後、発根に適した前処理期間を決定するため、シュートを0から21日間の試験管内で培養した。前処理されたシュートは発根実験のために後述する方法で挿し木された。

⑵“試験管内発根法”

シュートはIBA 5mg／L、ショ糖20g／L、ゲランガム2.5g／Lを含むWPM培地で7日間培養したあと、ホルモンフリーWPM培地で培養した。培養物は25℃、14時間照明（白色蛍光灯、約3000 LX）の培養室で培養した。

５．移植と管理方法

“挿し木直接発根法”では、挿し木用の培土はバーミキュライトとピートモスを等量混合したあと水を加え、オートクレーブで滅菌、放冷のあと、イチゴパックに詰めた。試験管内で前処理されたシュートはその基部1cmくらいを培土に真直ぐに差し込んだ。シュートと培土が馴染むように洗浄瓶でその周辺に潅水した後、1000倍希釈スミブレンド殺菌剤を噴霧し、イチゴパックのフタを閉じた。植物は25℃、14時間照明の順化室（白色蛍光灯、約3000 LX）に置き、挿し木8週間後に掘り上げ、発根した個体はポリポットに植え付けた。鉢上げ用土は、赤玉土（小粒）：軽石（小粒）＝8：2（容量）で混合して準備し、6cmまたは9cm黒ポリポットに植え付け、十分に潅水した。

“試験管内発根法”では、発根促進培地で発根した植物体は根がよく伸びた培養8週間後に試験管から取り出し、シュートに付着した培地を洗い落とし、ポリポットに植え付けた。鉢上げ用土は挿し木直接発根法で用いた用土と同じ組成のものを用いた。

これらの二つの方法で鉢上げされたシュートは鉢上げ後に十分な潅水を行い、乾燥を防ぐためフードで覆いをして、ダイオミラー（遮光率70％）で遮光した温室（10月から4月まで18℃から20℃に設定）で1ヶ月間栽培した。そのあと無加温パイプハウスで栽培した。ポリポットで栽培した苗は生育に応じて4.5号または5号プラスチック鉢に植え替えた。用土は、赤玉土（小粒）：軽石（小粒）：腐葉土＝7：2：1（容量）の割合で混合し、元肥としてマグアンプKを少量施与した。

結果

１．無菌個体の獲得

各培養時期における外植体の種類とその培養結果は表1に示した。4月の新梢腋芽の茎頂培養では生存率は約75％、培養物は0.5～1cm位に肥大したが、シュート形成はなかった。7月の採取の新梢腋芽の茎頂培養では、生存率が約66％、そのうちの半数がシュートを形成した。9月に培養した葉芽は生存率が80％で、生存個体はすべてシュートを形成した（図2）。花芽は生存率が約66％で、そのうちの67％がシュートを形成した。

この結果から、無菌個体の獲得には9月に採取した葉芽から摘出した茎頂がよいことが明らかになった

２．増殖

２-１．継代培養による増殖

初代培養（表1）でシュートを形成した培養物は同一組成培地で再培養するとシュートを高頻度で形成し、よく伸長した。一方、シュートを形成しないで肥大したのみの培養物の多くは枯死し、生存した少数の個体は直径5～8mmぐらいの球形の多芽体のようなものを形成した。しかし、これらの多芽体状培養物は、異なる植物成長調節物質濃度を含む数種類の培地に6～8回移植したが、いずれもシュートを形成しなかった（デー

図2．9月に採取した葉芽の茎頂から発達したシュート（培養12週間）.

表１．初代培養における外植体の採取時期による培養結果

採取時期（月・日）	部位	置床数	汚染数	生存数	シュート形成数
4・29	腋芽	65	13（21.7）*	49（75.4）	0（0）
7・3	腋芽	15	2（13.3）	10（66.7）	5（50.0）
9・24	葉芽	5	1（20.0）	4（80.0）	4（100）
	花芽	9	0（0）	6（66.7）	4（66.7）

BA 1 mg／L、ショ糖 30 g／L およびゲランガム 2.5 g／L を含む WPM 培地で８週間培養.
*（ ）の数字は％を示す.

表２．ショート増殖および伸長に及ぼす BA と GA_3濃度の影響

BA	GA_3	培養シュート数	得られた総シュート数	増殖率	平均シュート長	シュート数
(mg/L)		(A)	(B)	(A/B)	(mm)	(>25 mm)
0.5	0	20	55	2.8	11.2	5（9.1）*
0.5	1.5	17	48	2.8	11.6	4（8.3）
0.5	3.0	20	54	2.7	12.3	8（14.8）
0.5	4.5	20	40	2.0	11.8	3（7.5）
1.0	0	20	82	4.1	9.6	3（3.7）
1.0	1.5	20	107	5.4	8.9	4（3.7）
1.0	3.0	20	79	4.0	8.4	1（1.3）
1.0	4.5	20	92	4.6	9.8	3（3.3）

ショ糖 30 g／L およびゲランガム 2.5 g／L を含む WPM 培地で７～８週間培養 .
*（ ）の数字は％を示す.

表３．IBA 濃度が挿し木直接発根法における発根率、平均根数および平均根長に及ぼす影響

IBA (mg/L)	挿し木数	発根個体数	発根率（%）	平均根数	平均根長 (cm)
0	10	6	60	1.4	2.8
2.5	10	9	90	6.8	5.5
5.0	10	10	100	9.1	9.2
7.5	10	8	80	7.8	6.1
10	10	10	100	8.1	8.1

本試験は、H18 年２月 10 日に挿し木、４月６日に調査を行った .

表４．発根誘導培地での培養日数が挿し木直接発根法における発根率、平均根数および平均根長に及ぼす影響

日数（日）	挿し木数	発根個体数	発根率（%）	平均根数	平均根長 (cm)
0	5	3	60	0.8	1.4
3	5	4	80	6.0	3.4
7	5	5	100	8.6	7.3
10	5	5	100	9.2	6.1
14	5	5	100	9.0	5.4
17	5	2	40	2.6	2.3
21	5	5	100	6.4	6.6

本試験は、H18 年４月９日に挿し木、７月 23 日に調査を行った.

タは省略）。

シュートは7～8週間ごとに新鮮な増殖培地で培養を繰り返すと、シュートの腋芽から新しいシュートが形成され、分枝するシュートもあった。しかし、水浸状のシュートのみを多数形成するものもあり、これらのシュートは再培養中に廃棄した。

２-２．好適ホルモン濃度

BA と GA_3 濃度とその組み合わせがシュート形成数およびシュート長に及ぼす影響を調べた結果、GA_3 に比べ BA の影響が顕著であった（表２）。0.5mg/L BA では、増殖率が 2.0～2.8 となり、平均シュート長が 12 mm 前後であった。1 mg/L BA では、4.0～5.4 といった高い増殖率を示したが、平均シュート長が 10 mm 以下であった。GA_3 濃度はシュートの増殖率と伸長に大きな影響はなかったが、0.5mg/L BA と 3 mg/L GA_3 の組み合わせでは 25 mm 以上に伸長したシュートの割合が一番高かった。

苗木を得るためには発根させる必要があり、よく伸長したシュートが望ましいことから、増殖培地は WPM 培地＋ショ糖３％＋ゲランガム 2.5％＋BA 0.5mg/L＋GA_3 3 mg/L がよいと判断した。

３．発根および鉢上げ後の生育

３-１．"挿し木直接発根法"での発根

挿し木直接発根法では発根誘導培地中の IBA 濃度が培土に挿し木したシュートの発根に大きな影響を及ぼした（表３）。IBA 無添加（対照区）でも発根は起こったが、根の数が少なく、枯死した個体が多かった。一方、5 および 10mg/L IBA 添加区では発根率が 100％で、前者は平均根数と根長も一番高かった。また 5 mg/L IBA を含む培地 0 から 21 日間培養したあと挿し木をしたところ、7，14 と 21 日間処理区では発根率が 100％であった。しかし根数と根長を考慮して、7 日間の前処理培養がよいと判断した（表４）。

これらの挿し木したシュートの生育を観察したところ、挿し木後 7 日にシュートの基部が肥大し、一部の個体では 5 mm くらいに伸長した根が確認された。その後、根数の増加や根の伸長がすすみ、挿し木後 8 週ごろに根系の発達はほぼ完了した（図３）。シュートの生育は、挿し木後 6～10 週の間に葉数の増加やシュートの伸長が顕著であった（図４）。

３-２．鉢上げ後の生育

"試験管内発根法" で発根したシュートの根はもろくて折れやすく、すべての鉢上げ後に枯死した。

４．順化後の生育

挿し木 8 週間後に苗木を掘り取り鉢上げした。鉢上げ時期は鉢上げ後の苗木生育に影響した（図５）。11 月の鉢上げでは苗木の伸長や根の生育が劣ったものの、生存率が 88％であった。12 月では生存率が約 30％であったが、シュートの伸長と根の生育が良好であった。1 月と 2 月の鉢上げでは、生存率が最も低く、シュートがほとんど伸長せず、生育が最も劣った。3～10 月の鉢上げにおいては、6 月では生存率が 96％で一番高く、シュートの伸長も優れた。7 月以降では生存率が 64％以上で

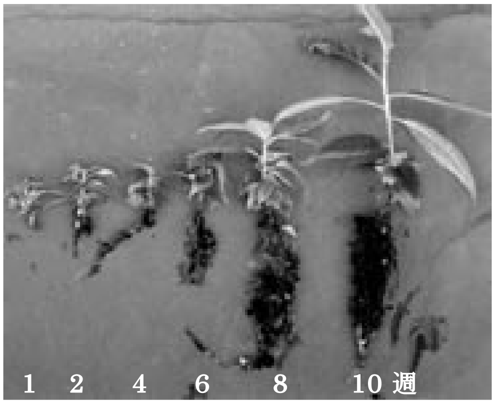

図３．挿し木後のシュート発育の経時的変化.

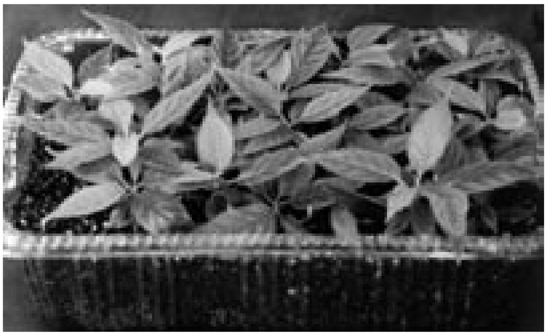

図４．挿し木後２ヶ月シュートの成長.

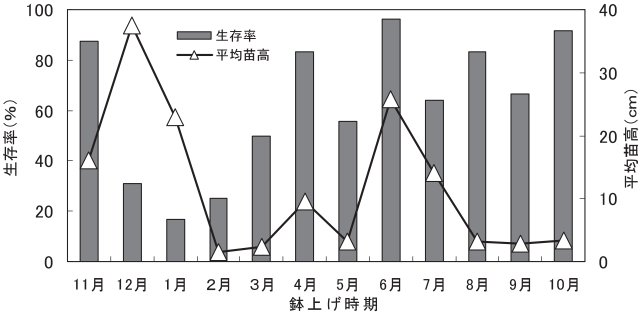

図５．鉢上げ時期が苗木の生存および成長に及ぼす影響（鉢上げ時期：平成16年11月～平成17年10月；調査日：平成18年２月10日）.

図６．鉢上げ後２年目の苗木の生育様子（平成18年12月）.

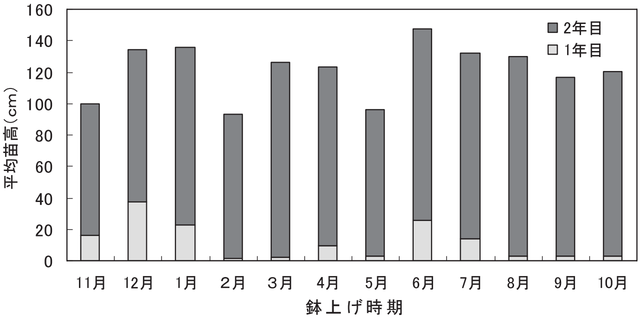

図７．異なる鉢上げ時期における苗木の成長（鉢上げ時期：平成16年11月～平成17年10月；調査：平成18年12月）．

あったが、鉢上げ後シュートの伸長が劣った（図５）。順化後２年目の生育は鉢上げ時期によって平均で84～127cm伸長した（図６）。そのなかで、６月に鉢上げされたものの生育が一番よかった（図７）。

考察

茎頂の採取時期によって外植体の生存率に大きな差異は確認されなかったが、シュート形成率が異なり、９月の葉芽を培養すると一番よいことがわかった（表１）。一方、北海道にあるエゾヤマザクラの茎頂培養において、２～３月または６月頃に採取した茎頂はシュート増殖がよいことが報告されている（佐藤，1992）。この結果は本実験結果と異なるが、これは種の違いや培養時の外植体の生理的状態の違いが関係していると考えられる。

ナラノヤエザクラの組織培養において、シュートの成長にはBAが必要であり、GA_3はシュートの伸長に有効である（酒谷と天野，1987）。また、サクラ亜属の他の樹種においても、BAとGA_3をさまざまな濃度で組み合わせることによってシュート増殖を促進する可能性が示唆されているが、樹種や個体によって最適濃度が異なる（佐藤，1994；1999）。サクラの増殖を行う場合、シュート形成を促し高い増殖率を追求する一方、発根に適したシュートを得ることが望ましい。本研究において、ジュズカケザクラのシュート増殖および伸長に及ぼすBA濃度の影響が明らかになった。１mg/L BAに比べて、0.5mg/L BAでは増殖率が低下したが、シュートの伸長がよかった。GA_3の添加はシュートの増殖および伸長に対する明確な促進効果が認められなかったが、0.5mg/L BAと３mg/L GA_3の組み合わせではシュートの伸長が一番よかった。

本研究は、“試験管内発根法”で得られた植物体の順化が困難であったため、“挿し木直接発根法”について検討した。その結果、５mg/L IBAを添加した発根誘導培地で７～14日培養したシュートは挿し木後に最もよい発根を示した。この方法は、発根と順化を同時に行うことができることから、組織培養によるサクラ苗生産の効率化につながると思われる。また、鉢上げ時期を検討したところ、１年中行うことが可能であるが、苗木の生存率や生育の面から、最適時期が６月頃であることがわかった。シダレザクラにおいても、培養苗の順化は春から夏にかけて行われるのがよいとされている（田中，2001）。５月の乾燥期や梅雨明け後の７～９月の高温期に鉢上げしたものは生存率や成長が低下したことから、この時期の鉢上げは湿度や温度などに対する注意が必要であろう。また、12～２月の冬期間に生存率が劣り、この時期の順化も避けるべきであると考えられた。

以上のことから、梅護寺の珠数掛桜の培養は次の手順で行えばよいことがわかった：⑴９月頃に葉芽から摘出した茎頂を１mg/L BAを添加したWPM培地（Lloyd and M cCown, 1980）上で、明条件（白色蛍光灯約3000 LX）、８週間培養；⑵よく伸長したシュートは0.5mg/L BAと３mg/L GA_3を添加したWPM培地に移植し、新たに複数のシュートを形成させる；⑶約３cmのシュートをIBA ５mg／L、ショ糖20ｇ／L、ゲランガム2.5ｇ／Lを含むWPM培地で７日間培養；⑷⑶で処理したシュートはバーミキュライトとピートモスを等量混合したあと水を加え、オートクレーブで滅菌、放冷した培土を含むイチゴパック内で挿し木する；（５）発根した苗は赤玉土（小粒）：軽石（小粒）＝８：２（容量）からなる用土で栽培する。

謝辞

この度、国指定の天然記念物、梅護寺の珠数掛桜の保護事業に参加する機会を与えていただきました関係機関の皆様、阿賀野市教育委員会の遠藤慎之介氏、古沢妥史氏、樹木医佐藤賢一氏、そしてご高配いただいた県立加茂農林高等学校歴代校長の佐藤尚氏および吉野十三男氏に心から厚くお礼申し上げます。

引用文献

河合昌孝．1993．組織培養を利用した佛隆寺のモチヅキザクラの後継樹養成の試み．*奈良県森林技術センター林業資料,* **8**:12-13.

Lloyd, G.B. and B.H. McCown. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.,* **30**: 421-427.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **25**: 135-166.

野田光蔵．1977．越後七不思議．pp. 170-172. *新潟県大百科事典（上）*．新潟日報事業社．新潟．

齋藤直彦・渡邉次郎・五十嵐正徳・古川成治・川上鉄也・壽田智久．2004．希少樹種を含む樹木の遺伝資源の保存に関する研究．*福島県林業研究センター研究報告*，**37**: 1-18.

佐藤孝夫．1992．組織培養でサクラをふやす．*光珠内季報* **87**: 17-19.

佐藤孝夫．1994．茎頂培養法によるエゾヤマザクラの大量増殖．*北林試研報*，**31**: 77-86.

佐藤孝夫．1999．茎頂培養法によるチシマザクラ優良個体の大量増殖．*北林試研報*，**36**: 1-9.

酒谷昌孝・天野孝之．1987．組織培養によるナラノヤエザクラ（*Pruns leveilleama* Koehne cv. antiqua）の増殖．*奈良県森林技術センター研究報告*，**17**: 26-31.

田中正臣．1995．腋芽培養によるシダレザクラの繁殖（第１報）改変ＭＳ培地による培養及び馴化・育苗．*奈良県森林技術センター研究報告*，**25**：12-17.

田中正臣．2001．腋芽培養によるシダレザクラの繁殖（第２報）発根培地の検討および馴化・育苗中の培養苗の成長経程について．*奈良県森林技術センター林業資料*，**16**：15-20.

Plantlet Production by Shoot-tip Culture of a Protected Cherry-blossom Tree, *Prunus lannesiana* Wils. cv. Juzukake-zakura

Shunsaku KASAHARA[1], Dong-Sheng HAN[2] and Yoshiji NIIMI [2*]

（Received July 2, 2007）

Summary

According to the method proposed by Murashige (1974), a system for the production of young trees by shoot-tip culture was developed for the *Prunus lannesiana* Wils. cv. Juzukake-zakura. In Stage Ⅰ (*Establishment of the aseptic culture*), when shoot-tips were cultured on WPM media supplemented with 1 mg l^{-1} BA, explants excised from foliar buds in September were superior in survival and shoot formation to others excised at different times. In Stage Ⅱ (*Multiplication of propagula*), a rapid increased number of shoots and the growth were attained in the medium with 0.5 mg l^{-1} BA and 3 mg $l^{-1}GA_3$. In Stage Ⅲ (*Preparation for reestablishment of plants in soil*), first, about 3-cm long shoots were cultured on WPM with 5 mg l^{-1} IBA for 7 days to stimulate rooting, transplanted into a strawberry packing container with vermiculite and peat moss (1:1v/v), and put them in a acclimatizing room in the 14-hour light condition at 25 ℃ for 8 weeks. June was the best time to transplant rooted plants into pots, and the plants bloomed 4 years after the onset of shoot tip culture.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 60:33-38, 2007

Key words : *Prunus lannesiana* Wils. cv. Juzukake-zakura, shoot-tip culture, propagation, cutting-rooting method

[1]Niigata Prefectural Kamo Agricultural and Forestry High School

[2]Faculty of Agriculture, Niigata University

*Corresponding author：himesa@agr.niigata-u.ac.jp