

## 法輪寺桜の腋芽培養による増殖

板鼻直榮 (森林総研林育セ)・橋本光司 (森林総研林育セ関西)

要旨：京都市嵐山の法輪寺境内にある法輪寺桜の腋芽培養による増殖を試みた。1月下旬に枝を採取し、試験に供するまで+5℃で保存した。2月上旬に表面殺菌を行った後、芽りんを切除した腋芽5個を摘出し、BAP5 $\mu$ Mを添加したMS培地に植え付けた。その後、1回移植した後、4週間隔で4回、腋芽から成長した多芽体の分割と移植を繰り返した。5回目の移植後に多芽体数は、約300個となり、腋芽数の60倍に達した。7月中旬に多芽体を発根用の培地に移植した。1か月後に多芽体の65~95%が発根し、赤色光下のIBA5 $\mu$ Mを添加したMS培地で発根及びシュートの伸長が良好であった。発根した幼植物をポットに移植後プラスチック製コンテナに入れて密閉し、徐々に開口部を広げることにより、幼植物の9割を順化できた。桜の腋芽培養による増殖では、一般に伸長したシュートを発根させる方法が用いられているが、法輪寺桜は多芽体を増殖し、発根とシュートの伸長を同時に行う方法により増殖することが可能であった。

キーワード：法輪寺桜、ハウリンジザクラ、腋芽培養、多芽体、増殖

## I はじめに

法輪寺桜は、京都市嵐山の法輪寺境内にある八重咲きの桜である。法輪寺によると、法輪寺桜は後水尾天皇(在位1611~1629年)が訪れた際に、見事な桜をご覧になり名付けられた桜で、現存する法輪寺桜は、先代の住職の代に三好学博士により増殖されたものとされ、樹齢は約90年と推定される。近年、この桜の樹勢が衰えてきていることから、法輪寺から林木育種センター関西育種場に後継苗の増殖が要請された。そこで、脇芽培養を試みた結果、多数のクローン苗を増殖できた。

## II 材料と方法

## 1. 材料の採取と貯蔵

後継苗の増殖を要請された法輪寺桜は、胸高直径40cm、樹高約10mの個体であり、この個体から、2007年1月23日に枝を採取した。既に、樹勢を回復するための処置を実施中であり、充実した枝は少なく、採取できた枝は数本のみであった。採取した枝はクール便で林木育種センターに送付し、試験に供するまで+5℃

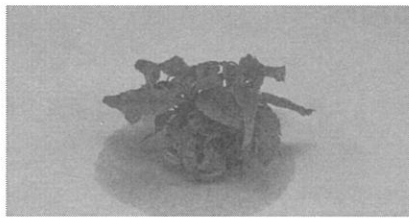
で保存した。

## 2. 初代培養・増殖

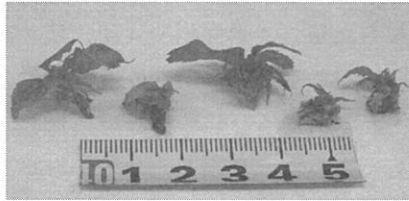
2月5日に枝の表面殺菌を行った後、芽りんを切除した腋芽5個を摘出し、BAP5 $\mu$ Mを添加したMS培地(3)に植え付けた。表面殺菌は、①塩化ベンザルコニウム液による枝の洗浄、②枝を1~2芽を付けて切断後70%エタノールによる5分間の洗浄、③5%過酸化水素水による5分間の洗浄、④滅菌水による3回の洗浄の手順で行った。培養器には直径30mm、長さ120mmの管瓶を用い、培地量は20mlとした。

腋芽は1cm以上のシュートに伸長することなく、複数の芽と短いシュートからなる多芽体に成長した。約4週後の3月7日に、培養した多芽体を移植した。その後、3月30日から6月中旬まで4回4週間隔で多芽体の分割(写真-1)と移植を繰り返した。この間、培地は初代培養と同じBAP5 $\mu$ Mを添加したMS培地とした。また、培養器には200mlの培養瓶を用い、培地量は40mlとした。培養は、温度25℃、白色蛍光灯によるPPFD(光合成光量束密度)約60 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s、16時間日

Naoci ITAHANA (Forest Tree Breed. Center, For. and Forest Prod. Res. Inst., Ishi 3809-1 Juohcho Hitachi Ibaraki 319-1301) and Kohji HASHIMOTO (Kansai Reg. Breed. office, Forest Tree Breed. Center, For. and Forest Prod. Res. Inst., Uetsukinaka 1043 Shoo Okayama 709-4335) In vitro propagation of *Prunus lannesiana* cv. Horinji from axillary buds.



分割前



分割後

写真-1. 多芽体の分割の例



写真-2. 発根量の区分

発根が認められかつ写真の「少」かそれ以下の根量を「少」、写真の「多」かそれ以上の根量を「多」、これら以外の根量を「中」とした。

長下で行った。分割移植の際に、移植した多芽体数を記録した。

### 3. 発根・順化

脇芽の培養を開始後約6か月を経過した7月15日に、多芽体を3種の発根用の培地に移植し、2種の光条件下で培養した。発根用にはIBAを $5\mu\text{M}$ 添加したMS培地、オーキシン無添加のMS培地及び1/4の濃度に希釈したMS培地にIBA $5\mu\text{M}$ を添加した培地を用いた。培養器には200mlの培養瓶を用い、培地量は40mlとした。光条件は、冷陰極管によるPPFD約 $70\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の赤色光と白色蛍光灯によるPPFD(光合成光量束密度)約 $60\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の白色光とし、温度及び日長はいずれも $25^\circ\text{C}$ 、16時間とした。培養瓶1本には多芽体を4個を植え付け、培地と光条件の組み合わせごとに20個(5瓶)、全体で120個の多芽体を培養した。発根培地に移植してから1か月後の8月17日に、目視による発根量(写真-2)とシュート長を調査した。

8月19日に発根した幼植物を、市販の園芸用土(富士見園芸、有機栄養たっぷり培養土)を入れたポリエチレンポットに移植し、十分灌水した。その後、ポットをプラスチックコンテナに入れて蓋を閉じ、温度 $25^\circ\text{C}$ 、白色蛍光灯によるPPFD約 $60\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、16時間日長下に置いた。1週間後に蓋を僅かに開き、その後開口部を徐々に広げた。順化を開始してから約1か月後の9月21日に、活着数及び苗長を調査した。

## III 結果と考察

### 1. 初代培養・増殖

雑菌に汚染された脇芽は認められなかった。初代培養では、脇芽は葉を展開し多芽体に成長したが、1cm以上のシュートには成長しなかった。そこで、1回目の継代培養を行った。しかし、初代培養と同様に1cm以上のシュートへの成長は認められなかった。このため、まず、多芽体を増殖することとし、多芽体の分割と移植を繰り返した。図-1に多芽体の増殖経過を示す。多芽体数は次第に増加した。5回目の移植後に、多芽体数は全体では302個に達し、脇芽1個から47個~84個、平均60個の多芽体を増殖することができた。なお、発根した多芽体が4回目の継代培養前に1個、5回目の継代培養前に3個認められた。

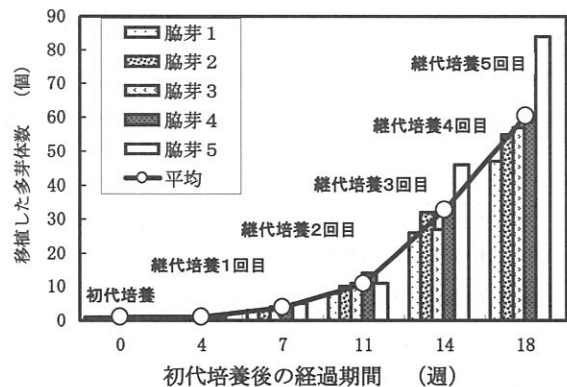


図-1. 脇芽培養による多芽体の増殖

### 2. 発根・順化

多芽体の発根は、移植後1週間後から認められた。また、発根した多芽体では、旺盛なシュートの伸長が認められた(写真-3)。表-1に発根培地に移植後1か月の多芽体の発根数及びシュート長を示す。発根し、根、茎及び葉からなる幼植物に成長した多芽体は、全

表-1. 多芽体の発根数及びシュート長

光質	培地	培養数	発根数	発根率 (%)	発根量			平均シュート長
					少	中	多	
赤色光	MS+IBA5	20	19	95 <sup>a</sup>	5	7	7	23.0 <sup>x</sup>
	MS	20	19	95 <sup>a</sup>	6	9	4	17.2 <sup>y</sup>
	1/4MS+IBA5	20	13	65 <sup>b</sup>	5	5	3	10.0 <sup>z</sup>
白色光	MS+IBA5	20	19	95 <sup>a</sup>	6	7	6	16.8 <sup>y</sup>
	MS	20	18	90 <sup>a</sup>	7	7	4	11.2 <sup>z</sup>
	1/4MS+IBA5	20	17	85 <sup>a</sup>	6	6	5	10.4 <sup>z</sup>
計		120	105	87.5	35	41	29	14.7

1/4MS: 1/4の濃度に希釈したMS培地を示す。

IBA5: IBAを5 $\mu$ M添加したことを示す。

ab: 異なる文字はカイ2乗検定で5%水準で有意差があることを示す。

xyz: 異なる文字はDuncanの多重検定で5%水準で有意差があることを示す。

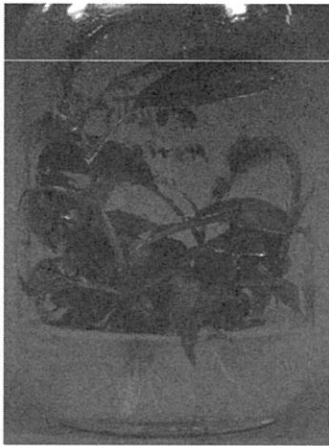


写真-3. 発根しシュートが伸長した多芽体

体で105個 (88%) と多く、赤色光下のIBAを5 $\mu$ M添加したMS培地、植物ホルモン無添加のMS培地及び白色光下のIBAを5 $\mu$ M添加したMS培地では、中以上の発根量にランクされた多芽体が13個以上と多かった。一方、赤色光下のMS/4培地では他の場合に比較して発根数は5%水準で有意に少なかった。

シュート長は、全体では5~45mm、平均14.7mmであり、赤色光下のIBA5 $\mu$ Mを添加したMS培地で最も長く、発根していない多芽体、発根量が少の多芽体は、シュートが短い傾向が認められた。また、光質及び培地を要因とした分散分析の結果、シュート長は、光質間、培地間とも5%水準で有意差が認められた。シダレザクラでは、白色光下及び青色光下に比較して、赤色光

表-2. 幼植物の順化後の活着数及び苗高

発根量	移植数	活着数	活着率 (%)	苗高 (cm)	
				平均	標準偏差
多	29	29	100 <sup>a</sup>	6.7 <sup>x</sup>	2.1
中	41	40	98 <sup>a</sup>	5.0 <sup>x</sup>	2.5
少	35	24	69 <sup>b</sup>	3.8 <sup>y</sup>	2.4
計	105	93	89	5.2	2.6

ab: 異なる文字はカイ2乗検定で5%水準で有意差があることを示す。

xy: 異なる文字はDuncanの多重検定で5%水準で有意差があることを示す。



写真-4. 順化した腋芽由来のクローン苗

下でシュートが長く伸長したことが報告されている(5)。また、スギでは赤色光が発根に有効であり、平均発根率は白色光下で33%、赤色光下で60%と報告されている(10)。法輪寺桜では、発根率は全体に高く、光質間の差は認められなかったが、シュート長では光質間の差が認められた。発根した多芽体はシュートを伸長しやすいことから、シュート長の光質間の違いは、赤色光のシュートの伸長促進と発根促進の効果の反映と考えられる。

順化を開始してから1か月後の幼植物の活着数及び苗高を表-2に示す。発根量中又多の幼植物は、ほぼ100%が活着し、平均で5cm以上の苗に成長した。これらと比べて、発根量少の幼植物は、活着率、苗高とも

やや5%水準で有意に低かった。苗高を調査した直後に(写真-4),ポットをガラス温室に移動した。ガラス温室では,9月下旬までに新たに枯死した幼植物は1個体のみであった。

以上のように,法輪寺桜の腋芽を培養した結果,腋芽から成長した多芽体の分割・移植を繰り返すことにより,多芽体を大量に増殖できること,多芽体は赤色光下のIBA5 $\mu$ Mを添加したMS培地で高い頻度で発根するとともにシュートを伸長すること,幼植物を容易に順化できることが分かった。

クローン増殖を目的とする桜の腋芽培養では,1~数cmに伸長したシュートを発根処理の対象としている(1,2,4,5,6,7,8,9)。一方,法輪寺桜では,多芽体を処理対象とした。前者は伸長させてから発根させる方法であり,後者は逆に発根させてから伸長させる方法といえる。シュートの伸長しにくい品種では,発根させてから伸長させる方法は,クローンを増殖するための選択枝のひとつになると考えられる。

#### IV おわりに

順化した法輪寺桜のクローン苗のうち一部は,現在も温室で育成中であり,10月中旬現在では30cm前後の苗高に成長している。これらの苗木は来年3月に法輪寺に返す予定である。

#### 引用文献

- (1)原口雅人(1994)カバザクラ850年生老木の腋芽培養—各培養ステージの再検討—。日林関東支論 45: 57~58.
- (2)川尻秀樹・茂木靖和・中川一(1996)老齡貴重木の組織培養I—「中将姫誓願ザクラ(国指定天然記念物)」の冬芽培養について—。岐阜県林業センター研報 25: 9~16.
- (3)Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantum* 15: 473-497
- (4)中村健太郎(2003)夢はバイオの花見—京都・醍醐寺“土牛の桜”のクローン増殖—。林木の育種 206: 26~28.
- (5)岡田恭一(2004)サクラの増殖および成長促進方法の検討—市販の入浴剤から発生させたCO<sub>2</sub>を添加した事例—。林木の育種 212: 30~34.
- (6)酒谷昌孝・天野孝之(1987)組織培養によるナラノヤエザクラ(*Prunus Leveilleana* Koehne cv. *antiqua*)の増殖。奈良県林試研報 17: 26~31.
- (7)佐々木揚(1998)優良木からの種苗増殖技術の開発—カスミザクラの組織培養による増殖—。秋田県林業技術センター研報 5: 1~64.
- (8)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。北海道林試研報 36: 1~9.
- (9)千木容(1995)組織培養によるマメザクラの増殖。日林中部支講 43: 107~108.
- (10)坪村美代子・谷口 亨・近藤禎二・藤澤義武・渋澤直恵(2007)雄性不稔スギ「爽春」の組織培養における効率的な発根法の開発。日本植物細胞分子生物学大会要旨集 25: 97.