

茎頂培養法によるエゾヤマザクラの大量増殖

佐藤孝夫*

In vitro mass propagation from shoot-tip culture of *Prunus sargentii*

Takao SATOH*

抄 録

茎頂培養法を用いたエゾヤマザクラ成木からの大量増殖技術を確立するため、初代培養で得られたシュートを用いて継代培養を試み、シュートの大量増殖に適した成長調節物質の濃度を検討した。材料には約30年生の1個体を用い、2月に採取した休眠芽から茎頂を無菌的に摘出し、寒天培地に置床した。初代培養でのシュート増殖率が最も高かった処理は、3種類の成長調節物質（IBA, BAP, GA₃をそれぞれ0.1, 4, 4mg/100ml）を同時に添加したWPM培地（シヨ糖20g/100ml）で1ヵ月間培養した後、BAP濃度のみを0.5mg/100mlまたは1mg/100mlに減じた培地で培養した場合で、シュート増殖率は約4倍であった。次に初代培養で得られたシュートの腋芽を2, 3個含む節部切片に切り分けて継代培養を行った。継代を重ねてもシュート増殖率が比較的高かった処理は、BAPを0.5, 1mg/100ml, GA₃を4, 8mg/100mlとしたWPM培地（シヨ糖20g/100ml）で2週間培養した後、BAP濃度のみを半分に減じた培地でさらに2週間培養した場合で、腋芽から効率的にシュートを増殖することができた。この方法で継代培養を10代続けた結果から試算すると、1個の茎頂から1年間に数百億本のシュートが培養できることになる。また、継代3, 4および10代目のシュートの発根率はいずれも高い値を示しており、エゾヤマザクラの大量増殖が技術的には可能になった。

はじめに

エゾヤマザクラ（オオヤマザクラ, *Prunus sargentii* Rehder）は北海道における最も代表的なサクラであり、環境緑化樹として親しまれ、広く各地に植栽されている。エゾヤマザクラには開花量や花の大きさ、花色のほか、開花時期や開花期間などにも個体間に差があることが明らかにされている（佐藤ほか, 1991, 1993）。したがって環境緑化樹としてエゾヤマザクラを植栽する場合には、開花特性に優れた鑑賞価値の高い個体が望まれる。このような優良な個体を大量に増殖する方法として、最近は組織培養を用いた増殖方法が検討されている。サクラ属でも組織培養による個体の再生にはいくつかの成功例が報告されており（KATANO 1987, 酒谷ら 1987, 千木 1988・1990, 福島 1990, 原口 1990 など）、筆者もエゾヤマザクラ, チシマザクラ, サトザクラのいくつかの品種で、茎頂から植物体の再生に成功している（1988, 1992a, b）。これまでのところ、外植体の表面殺菌は98%以上可能であり、発根も70%以上と高く、順化にも成功しているものの、大量増殖にはまだ成功していない。また他のサクラ類でも大量増殖に関する報告例は見当たらない。苗木を安定的にかつ安く提供するためには、大量増殖技術を

* 北海道立林業試験場 Hokkaido Forestry Research Institute, Bibai, Hokkaido 079-01

[北海道林業試験場研究報告 第31号 平成6年3月, Bulletin of the Hokkaido Forestry Research Institute, NO. 31. March, 1994]

確立することが必要である。そこで、節部切片を継代培養して、シュートを大量に増やすための培地の成長調節物質の濃度を検討し、さらに継代培養で得られたシュートの発根率についても調べたので報告する。

材料と方法

(1) 材料の調整

実験材料として、これまでの報告(1988, 1991)と同じように、北海道立林業試験場の構内に植栽されているエゾヤマザクラの成木(約30年生, 樹高11m, 胸高直径30cm)1個体を用いた。茎頂の採取時期は筆者の結果(1991)をもとに、2月17~19日にこの母樹から小枝を採取し、小枝を各節ごとに切断した。そして流水で1時間洗浄した後、70%エタノールで30秒間、次いで次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)で10分間表面殺菌を行った。その後滅菌水で3回洗浄し、実体顕微鏡下で無菌的に葉芽内から茎頂(横径約1mm)を取り出して培養した。供試した茎頂数は、1培地各10個とした。

(2) 培地および成長調節物質の濃度

実験に使用した培地は、Woody plant medium(以下、WPMとする)(LLOYD et al., 1980)で、各成分量は表-1に示した。これにショ糖20g/l、寒天8g/lを加えた。また筆者(1988)および酒谷ら(1987)の結果を参考に、成長調節物質としてインドール酪酸(以下、IBAという)をすべての培地に0.1mg/lずつ添加し、さらに6-ベンジルアミノプリン(以下、BAPという)とジベレリン(以下、GA₃という)の濃度を変えて添加した。培地はpHを5.7に調整し、50ml容三角フラスコまたは250ml容培養瓶に20mlずつ分注した後、121℃、1.2kgf/cm²で20分間加圧滅菌した。

培養条件は初代培養、継代培養および発根試験とも気温25℃、約3000lux、日長16時間の人工気象室内で行った。

1) 初代培養の方法と成長調節物質の濃度

初めの1ヵ月間はBAPまたはBAPとGA₃の両方を含む培地(以下、初期培地という)で培養した。その後、GA₃を含まない培地ではBAPの濃度を下げてGA₃を加えた培地へ、またGA₃を含む場合は主にBAPの濃度だけを下げた培地(以下、移植培地という)へ移植し、さらに1ヵ月間培養してシュート数を調査した。初期培地での成長調節物質の濃度はBAPを1, 2, 3, 4mg/l添加した培地、およびBAPとGA₃を0.5, 1, 2, 4mg/lずつ同量添加した計8通りである。また移植培地ではBAPを0.5, 1, 2mg/lとGA₃を0.5, 1, 2, 4mg/lを組み合わせて添加した。初期培地と移植培地の組み合わせは表-2のとおりであり、それぞれの培地におけるシュート数を4月18日に調べた。そして伸長したシュートは次に示す継代培養の実験に用い、シュートを切りとった残りの培養体は同成分の培地へ移植し、さらに約1ヵ月後(5月20日)にシュート数を調査した。各シュートは同様に継代培養を行い、残りの培

表-1 Woody plant medium(WPM)の成分組成

成分	量 (mg/l)
NH ₄ NO ₃	400
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	556
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
K ₂ SO ₄	990
CaCl ₂ · 2H ₂ O	96
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
myo-Inositol	100
Thiamine · HCl	1
Nicotinic acid	0.5
Prydoxine · HCl	0.5
Sucrose	20,000
Agar	8,000

表-2 初代培養における成長調節物質の濃度とシュートの増殖率

初期培地	移植培地	供試数	増殖率 (倍)			合計	シュート数の範囲 (本)
			4月18日	5月20日	6月6日		
B1*	B0.5G1**	10	0.2	0.2	-***	0.4	0~2(0~1)****
B1	B0.5G2	10	0.2	0.2	-	0.4	0~2(0~1)
B1	B0.5G4	10	0.9	0.6	-	1.5	0~5(0~3)
B1	B1G2	10	0.2	1.9	-	2.1	0~11(0~1)
B2	B0.5G1	10	0.3	0.1	-	0.4	0~1(0~1)
B2	B0.5G2	10	0.5	0.2	-	0.7	0~3(0~1)
B2	B0.5G4	10	0.6	0.7	-	1.3	0~4(0~1)
B2	B1G1	10	0.1	1.2	-	1.3	0~4(0~1)
B2	B1G2	10	0.6	3.0	1.6	5.2	0~12(0~2)
B2	B1G4	10	1.6	2.4	1.5	5.5	0~14(0~4)
B3	B0.5G1	10	0	0.2	-	0.2	0~1(0)
B3	B0.5G2	10	0.3	0	-	0.3	0~1(0~1)
B3	B0.5G4	10	0.8	0.4	-	1.2	0~2(0~1)
B3	B1G1	10	0	1.7	-	1.7	0~5(0)
B3	B1G2	10	1.2	1.6	0.7	3.5	0~9(0~4)
B3	B1G4	10	2.0	2.9	1.2	6.1	0~14(0~6)
B3	B2G4	10	0.6	2.1	1.5	4.2	0~15(0~2)
B4	B0.5G1	10	0.2	0.2	-	0.4	0~1(0~1)
B4	B0.5G2	10	0.2	0.2	-	0.4	0~2(0~1)
B4	B0.5G4	10	1.1	1.4	-	2.5	0~12(0~3)
B4	B1G1	10	0	0.8	-	0.8	0~3(0)
B4	B1G2	10	0.6	1.5	1.1	3.2	0~8(0~1)
B4	B1G4	10	1.8	2.4	1.3	5.5	0~12(0~4)
B4	B2G2	10	0	1.4	-	1.4	0~5(0)
B4	B2G4	10	1.0	3.6	2.1	6.7	1~16(0~6)
B0.5G0.5	B0.5G0.5	10	0.2	0.8	-	1.0	0~4(0~1)
B0.5G0.5	B0.5G1	10	1.0	1.2	-	2.2	0~8(0~2)
B1G1	B0.5G1	10	0.5	0.5	-	1.0	0~3(0~1)
B1G1	B1G1	10	0.6	3.0	-	3.6	0~11(0~1)
B2G2	B0.5G2	10	2.2	2.9	0.8	5.9	1~10(0~5)
B2G2	B1G2	10	1.8	7.3	3.0	12.1	9~15(0~5)
B4G4	B0.5G4	10	4.3	2.6	0.9	7.8	2~13(2~6)
B4G4	B1G4	9	4.2	6.1	3.3	13.6	10~18(0~7)

* : B1 はWPMにBAP1mg/lとIBA0.1mg/lを添加, 以下同じ

** : B0.5G1 はWPMにBAP0.5mg/lとGA₃1mg/l, IBA0.1mg/l添加, 以下同じ

*** : 未調査, 以下同じ

**** : () 内は4月18日におけるシュート数の範囲

養体は再び同成分の培地へ移植し, 約2週間後(6月6日)にシュート数を調査した。なお, ここでのシュートとは, 1cm以上伸長したものとした。

2) 継代培養の方法と成長調節物質の濃度

初代培養で得られたシュートを, 1本ごとに1~2芽程度を含む長さ3~5mmごとの節部切片に切断した。そして, 各シュート1本分の節部切片を, 継代培養での初期培地の入った培養瓶1本に置床した。供試数は1培地当たり5~20本とし, 2週間後に移植培地に移し, 1ヵ月後にそれぞれの節部切片から新たに伸長したシュート数を調査した。さらにそのシュートから再び節部切片を取り継代培養を行った。これを繰り返すことにより, 培養開始からの1年間に10代の継代培養を行った。また, シュートを切り取った残りの培養体は同成分の培地へ移植し, さらに2~3週間ごとに調査した。

継代1代目では, 初期培地にはBAP0.5, 1, 2, 4mg/lとGA₃を0, 2, 4mg/l, 移植培地にはGA₃の濃度はそのままBAPだけを0.5または1mg/lの濃度で添加し, これらを組み合わせ合計20種類の培地を用いた。継代2代目以降は新たな培地を加えながらシュート増殖率の高い培地を検索した。その結果, WPMおよび全量を半分にしたWPM(以下, 1/2WPMとする)に, BAP0.25~4mg/l, GA₃0~8mg/lを組み合わせ添加し, 合計35通りの培地についてシュート増殖率を検索した。

なお, 1代目の継代培養においては, 初期培地ではBAPの濃度を原則として初代培養と同じものと

したが、得られたシュート数が少なかったものについては、一部は初代培養の培地とは異なったものを用いた。継代2代目以降は1代目と同じ初期培地および移植培地の組み合わせで培養したが、新たな培地を検討する場合はBAP濃度が同じ培地から得られたシュートを用いた。ただし、9代目では一部で8代目のBAP濃度を半分に減じたものも用いた。

また、反復もかねて表-2の5月20日に得られたシュートを用いた培養（以下、2回目の継代培養という）および表-3の6月6日に得られたシュートを用いた培養（以下、3回目の継代培養という）もあわせて行った。

3) 発根試験

継代3代目と4代目および10代目のシュートを用いて、発根試験を行った。発根用の培地にはこれまでの結果（佐藤，1988）をもとにバーミキュライトに成長調節物質を加えないWPM，および濃度を半分にしたWPMを用い，これにシュートを無菌的にさしつけた。供試したシュート数は20～75本である。発根の調査は試験開始から2ヵ月後に行った。

結 果

(1) 初代培養

初代培養における初期培地および移植培地の種類と平均のシュート増殖率を表-2に示した。

初期培地にBAPのみを添加した場合，BAPが 1 mg/l ではいずれの培地に移植してもシュート増殖率は低かった。しかしBAPを 2 mg/l 入れたときは，BAPを 1 mg/l に減じてGA₃を2または 4 mg/l 加えた培地でのシュート増殖率は高かった。また初期培地に 3 mg/l を添加したときはBAP 1 mg/l にGA₃ 4 mg/l を加えた培地， 4 mg/l のときはBAP1または 2 mg/l にGA₃ 4 mg/l を加えた培地に移植するとシュート増殖率は高かった。これらの培地では培養開始から約3ヵ月半後のシュート増殖率は5倍を越えた。このように初期培地において，BAPを $2\sim 4\text{ mg/l}$ の濃度で添加し，1ヵ月後に 1 mg/l に減じ，GA₃を 4 mg/l 添加した培地に移植するとシュート増殖率が高いといえる。

また，初期培地にBAPの量と同じ量のGA₃を添加した場合でも，BAPおよびGA₃を高濃度で添加した培地でのシュート増殖率は高い。すなわち，BAPとGA₃を 4 mg/l で添加した培地で1ヵ月間培養し，BAPを 0.5 または 1 mg/l の培地に移植すると2ヵ月後のシュート増殖率は平均4.2～4.3倍であり，約3ヵ月半後には最大13.6倍に達し，最も多いものは1茎頂から18本のシュートが得られた。

このように初期培地にGA₃を添加したほうが，添加しない場合よりもシュート増殖率は高く，とくに培養開始から2ヵ月後のシュート増殖率は明らかに高かった。したがってエゾヤマザクラの初代培養には，WPMにBAPとGA₃を 4 mg/l 程度の濃度で添加し，1ヵ月後にBAPだけを 0.5 mg/l または 1 mg/l に減じることによって，多くのシュートが早く得られることが明らかになった。なお，1茎頂から繰り返しシュートの採取が可能であったが，1回目よりも2回目のほうがシュート数は増加するものが多いが，3回目は2回目よりも減少する傾向がみられた。

(2) 継代培養

1代目の継代培養で初期培地と移植培地の成長調節物質の濃度の組み合わせは合計20種類であり，各培地における平均シュート増殖率を表-3に示した。1ヵ月後のシュート増殖率は，BAP 1 mg/l とGA₃ 4 mg/l を添加した培地からBAPだけを 0.5 mg/l に減じた培地へ移植したものが10.8倍であり，約2ヵ月後までの合計でも19.2倍と最も高かった。

次いで，1ヵ月後のシュート増殖率ではBAPとGA₃が 4 mg/l の培地からBAPだけを 0.5 mg/l に減じた培地が高く，また約2ヵ月後までの合計ではBAP 0.5 mg/l とGA₃ 2 mg/l を添加した培地

が高かった。繰り返しシュートの採取が可能であったが、培養期間が長くなるとシュート増殖率は減少する傾向にあった。なお、一部に初代培養における初期培地の BAP または GA3 の濃度が異なるものを継代培養では同じ培地に培養したが、初代培養における BAP 濃度と継代 1 代目におけるシュート増殖率には差は認められなかった。

表-3 1 代目の継代培養における成長調節物質の濃度とシュートの増殖率

初期培地	移植培地	供試数	増殖率 (倍)				シュート数の範囲 (本)
			5月17日	6月6日	6月20日	合計	
B0.5G2		5	6.4	5.6	6.2	18.2	15~21(3~10)*
B0.5G4		10	7.0	3.0	2.8	12.8	6~18(~14)
B1		10	1.1	—	—	1.1	1~2
B1	B0.5G4	10	3.7	—	—	3.7	0~8
B1G2	B0.5G2	10	6.3	4.2	2.8	13.3	8~22(3~12)
B1G2		14	4.0	1.8	—	5.8	2~14(0~9)
B1G4	B0.5G4	10	10.8	5.1	3.3	19.2	1~26(1~16)
B1 G4		14	7.0	2.5	3.3	12.8	4~17(2~13)
B2		10	1.0	—	—	1.0	0~2
B2	B0.5G4	10	3.2	—	—	3.2	0~8
B2G2	B0.5G2	10	2.3	—	—	2.3	1~4
B2G2	B1G2	10	1.3	—	—	1.3	0~3
B2G4	B0.5G4	10	6.6	4.4	3.0	14.0	0~22(0~12)
B2G4	B1G4	10	4.7	1.7	—	6.4	0~19(0~13)
B4	B0.5G4	10	0.6	—	—	0.6	0~3
B4	B1G4	10	0.3	—	—	0.3	0~3
B4G2	B0.5G2	10	1.3	—	—	1.3	0~3
B4G2	B1G2	10	1.5	—	—	1.5	0~4
B4G4	B0.5G4	15	8.6	3.3	2.6	14.5	0~27(0~13)
B4G4	B1G4	15	5.0	3.5	3.2	11.7	1~21(0~9)

* : 5月17日におけるシュート数の範囲

注 : 継代 1 代目では、原則として初期培地の BAP および GA3 の濃度が初代培養と同じものを用いたが、一部は初代培養とはことなつたものを用いた。

表-4 継代培養 (1 回目) における主な成長調節物質の濃度とシュート増殖率

初期培地	移植培地	1ヶ月後のシュート増殖率									
		1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10代目
B0.25G2		—	—	3.6	—	—	—	—	—	—	—
B0.5G2		6.4	4.3	8.9	—	—	—	—	—	—	—
B1G2	B0.5G2	6.3	5.3	—	—	—	—	—	—	—	—
B1G2		4.0	0.8	—	—	—	—	—	—	—	—
B0.25G4		—	—	5.6	5.4	2.5	—	—	—	—	—
B0.5G4	B0.25G4	—	—	11.2	7.4	5.4	5.3	—	—	—	—
B0.5G4		7.0	7.7	10.6	8.4	5.4	5.6	—	—	—	—
B1G4	B0.25G4	—	—	6.3	5.3	6.6	8.8	—	—	—	—
B1G4	B0.5G4	10.8	11.7	6.3	9.5	8.0	7.4	10.0	3.9	5.0	4.0
B1G4		7.0	2.1	—	—	—	—	—	—	—	—
B2G4	B0.5G4	6.6	2.9	—	—	—	—	—	—	—	—
B2G4	B1G4	4.7	3.4	3.1	—	—	—	—	—	—	—
B4G4	B0.5G4	8.6	3.1	—	—	—	—	—	—	—	—
B4G4	B1G4	5.0	1.9	—	—	—	—	—	—	—	—
B0.25G8		—	—	—	3.7	3.2	—	—	—	—	—
B0.5G8	B0.25G8	—	—	—	8.7	9.3	10.3	12.2	12.5	12.3	14.7
B0.5G8		—	—	—	9.2	8.1	8.9	—	—	—	—
B1G8	0.25G8	—	—	—	10.0	9.6	12.8	11.9	8.4	8.6	11.1
B1G8	B0.5G8	—	—	—	8.1	9.0	15.5	11.8	9.7	10.2	9.4
B0.25G4**		—	—	—	2.2	—	—	—	—	—	—
B0.5G4**	B0.25G4**	—	—	—	7.0	2.4	—	—	—	—	—
B0.5G4**		—	—	—	4.1	—	—	—	—	—	—
B1G4**	B0.25G4**	—	—	—	5.5	2.8	—	—	—	—	—
B1G4**	B0.5G4**	—	—	—	6.3	1.8	—	—	—	—	—

* : 継代数

** : 全量を 1/2 にした WPM

注 : 初代培養 (表-2) で 4 月 18 日に得られたシュートを用いた。

初代培養と 1 代目と継代培養の BAP 濃度の関係については表-3 参照。

2 代目以降は 1 代目と同じ初期培地および移植培地の組合せで培養したが、新たに検討した培地では BAP 濃度が同じ培地から得られたシュートを用いた。

大量増殖を行う場合には早期に多数のシュートが得られ、それを継代していくことが望ましい。そのため、その後は継代培養を重ねながら、節部切片を置床して1ヵ月後におけるシュート増殖率の高いBAPおよびGA₃濃度の組み合わせを検索した。主な培地でのシュート増殖率を表-4に示す。GA₃を2mg/ℓに加えた培地では4mg/ℓに加えた培地よりも全般にシュート増殖率が低いことから、4代目以降は供試しなかった。また、初期培地でBAPとGA₃が4mg/ℓのものは、継代1代目のシュート増殖率は高かったものの、2代目以降では低かったために、4代目以降では供試しなかった。

そこで、4代目ではさらに高いシュート増殖率を目指し、GA₃は4mg/ℓのほかにも8mg/ℓの濃度にした培地、および1/2WPMを検討したが、1/2WPMでのシュート増殖率はWPMよりも低く、しかも培養体が水浸状(ガラス化)になるものも多く見られた。7代目以降は表中に示した4種類の培地だけを供試した。GA₃4mg/ℓの培地では8代目以降になるとシュート増殖率は減少したが、GA₃8mg/ℓのほうはいずれも高かった。また、8代目での初期培地のBAP濃度が1mg/ℓであったものの一部を9代目以降では0.5mg/ℓの初期培地に移したところ、初期培地のBAP濃度が1mg/ℓのものよりもシュートのシュート増殖率は高かった(図-1参照)。継代を重ねるにつれてBAP濃度は1mg/ℓよ

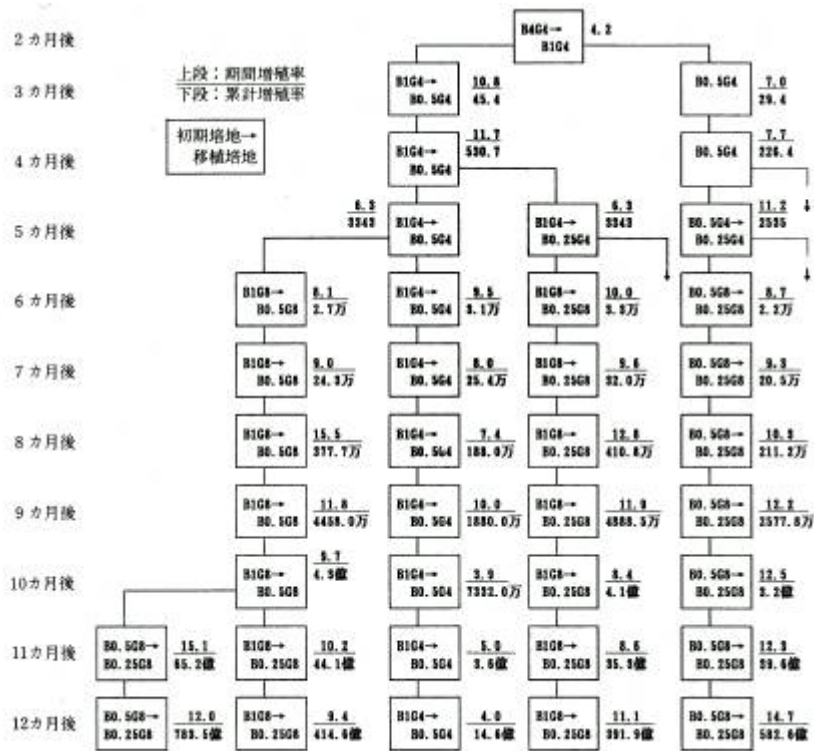


図-1 成長調節物質の濃度と増殖率の推移

表一五 継代培養（2回目）における主な成長調節物質の濃度とシュート増殖率

初期培地	移植培地	1ヶ月後のシュート増殖率（倍）								
		1*	2	3	4	5	6	7	8	9代目
B0.25G2		—	3.5	—	—	—	—	—	—	—
B0.25G4		—	6.4	3.8	—	—	—	—	—	—
B0.5G2		4.5	3.8	—	—	—	—	—	—	—
B0.5G4	B0.25G4	—	—	5.6	3.9	8.0	—	—	—	—
B0.5G4		5.7	6.9	4.7	2.9	4.7	—	—	—	—
B1G2	B0.5G2	3.9	0.8	—	—	—	—	—	—	—
B1G2		0.8	—	—	—	—	—	—	—	—
B1G4	B0.25G4	—	—	6.3	4.7	5.9	—	—	—	—
B1G4	B0.5G4	8.1	6.2	10.2	5.2	8.3	8.8	4.3	—	—
B1G4		6.8	—	—	—	—	—	—	—	—
B2G4	B0.5G4	2.1	4.9	—	—	—	—	—	—	—
B2G4	B1G4	1.7	—	—	—	—	—	—	—	—
B4G4	B0.5G4	1.8	1.7	—	—	—	—	—	—	—
B4G4	B1G4	2.4	—	—	—	—	—	—	—	—
B0.25G8		—	—	3.0	—	—	—	—	—	—
B0.5G8	B0.25G8	—	—	—	6.3	11.0	12.5	11.1	7.4	10.4
B0.5G8		—	—	4.4	4.9	7.9	—	—	—	—
B1G8	B0.25G8	—	—	—	8.6	14.0	11.4	9.3	9.4	9.5
B1G8	B0.5G8	—	—	6.9	7.8	13.0	11.7	8.7	8.5	12.5
B0.25G4**		—	—	1.8	—	—	—	—	—	—
B0.5G4**		—	—	2.0	—	—	—	—	—	—
B1G4**	B0.5G4**	—	—	3.0	—	—	—	—	—	—

*：継代数

**：全量を1/2にしたWPM

注：初代培養（表一）で5月20日に得られたシュートを用いた。

初代培養と1代目の継代培養のBAP濃度の関係については表一三参照。

2代目以降は1代目と同じ初期培地および移植培地の組合せで培養したが、あらたに検討した培地ではBAP濃度が同じ培地から得られたシュートを用いた。

表一六 継代培養（3回目）における主な成長調節物質の濃度とシュート増殖率

初期培地	移植培地	1ヵ月後のシュート増殖率（倍）							
		1*	2	3	4	5	6	7	8代目
B0.25G2		3.0	2.5	—	—	—	—	—	—
B0.25G4		6.0	7.4	4.2	—	—	—	—	—
B0.5G2	B0.25G2	—	5.4	—	—	—	—	—	—
B0.5G2		5.7	2.3	—	—	—	—	—	—
B0.5G4	B0.25G4	—	10.5	7.9	7.3	7.2	—	—	—
B0.5G4		8.7	10.2	7.0	7.7	6.8	—	—	—
B1G2	B0.5G2	2.2	—	—	—	—	—	—	—
B1G4	B0.25G4	—	9.6	7.0	5.5	9.2	—	—	—
B1G4	B0.5G4	8.9	5.9	8.1	9.0	9.6	4.1	5.2	—
B1G4		—	6.9	—	—	—	—	—	—
B2G4	B0.5G4	3.0	—	—	—	—	—	—	—
B4G4	B0.5G4	5.4	—	—	—	—	—	—	—
B4G4	B1G4	4.6	—	—	—	—	—	—	—
B0.5G8	B0.25G8	—	—	—	6.6	9.6	7.9	8.9	12.5
B0.5G8		—	—	—	6.4	9.9	—	—	—
B1G8	B0.25G8	—	—	—	6.9	10.0	7.7	8.1	8.1
B1G8	B0.5G8	—	—	—	8.8	15.4	14.2	10.9	7.4
B0.25G4**		—	—	3.0	—	—	—	—	—
B0.5G4**	B0.25G4**	—	—	7.1	—	—	—	—	—
B0.5G4**		—	—	2.2	—	—	—	—	—
B1G4**	B0.25G4**	—	—	4.3	—	—	—	—	—
B1G4**	B0.5G4**	—	—	3.1	—	—	—	—	—

*：継代数

**：全量を1/2にしたWPM

注：1回目の1代目の継代培養（表一三）で6月6日に得られたシュートを用いた。

継代培養は同じ初期培地および移植培地の植組合せで培養したが、あらたに検討した培地ではBAP濃度が同じ培地から得られたシュートを用いた。

りも $0.5\text{mg}/\text{L}$ のほうがシュート増殖率が高い傾向にあった。

それぞれの継代における1ヵ月後の平均のシュート増殖率およびそれらを積算した累計のシュート増殖率の推移を図-1に示した。理論的な値ではあるものの、茎頂採取から6ヵ月後に数万倍、8ヵ月後には数百万倍、そして12ヵ月後には数百億倍、最大783億5558万倍に増加すると試算された。

また、2回目の継代培養および3回目の継代培養においても、いずれも同じような培地でのシュート増殖率が高く(表-5, 6)、理論的には2回目の継代培養では9代目までで数十億倍、3回目の継代培養では8代目までで数億倍に増加が見込まれ、累計のシュート増殖率でも大きな差はなかった。このことから、本実験においてシュートの大量増殖が可能であることが実証される。

(3) 継代回数と発根率

継代3代目と4代目および10代目のシュートの発根率を表-7に示した。発根率は最も低いものでも継代3代目の1/2WPMの70%であり、最も高いのは4代目の1/2WPMの100%であった。また、継代3代目および4代目のWPMと1/2WPMでの発根率を比較すると、前者が89%、後者が86%であり、両者の間には明確な差は認められなかった。

一方、継代10代目の発根率は76%であり、3代目および4代目に比べるとやや減少している。しかし、これは実用上は十分な発根率であり、継代数が多くなっても高い発根率を維持していることがわかった。

考 察

(1) 成長調節物質の濃度とシュート増殖率

サクラ亜属の組織培養において、より高いシュート増殖率を望む場合、これまで基本培地とその成分濃度および添加する成長調節物質の種類と濃度(酒谷ら1987, 千木1990, 福島1990, 原口1990など)、茎頂の採取時期(佐藤, 1991)などいくつかの検討がなされてきている。しかし今回の表-2や表-3などからも明らかのように、添加する成長調節物質の種類や濃度のわずかな違いなどによってシュート増殖率が著しく異なっており、シュート増殖率の高い培地も見いだされた。

すなわち今回供試したエゾヤマザクラの場合、初代培養においてはWPMにBAPとGA₃を $4\text{mg}/\text{L}$ 添加し、1ヵ月後にBAPだけを $0.5\text{mg}/\text{L}$ または $1\text{mg}/\text{L}$ に減じた培地に移植するとシュート増殖率は高い。継代培養ではWPMにBAP $0.5\text{mg}/\text{L}$ または $1\text{mg}/\text{L}$ とGA₃ $4\text{mg}/\text{L}$ を添加した培地で2週間培養した後、BAPだけを初期培地の半分に減じた培地で増殖すると良い。その際、シュート増殖率があまり高くないときはGA₃の濃度を高くし、 $8\text{mg}/\text{L}$ 程度添加すると良いと考えられる。このことは、ナラノヤエザクラの場合(酒谷ら, 1987)よりも初代培養におけるBAP濃度はかなり高く、サクラ亜属でも種類によって最適BAP濃度は異なるものと思われる。一般にBAPは不定芽の形成に、GA₃はシュートの伸長に関与しているとされる。そのため初期培地では高い濃度のBAPで不定芽を形成させ、移植培地ではGA₃でシュートを伸長させてきた(酒谷ら, 1987)。今回の実験結果では、初期培地に高濃度のBAPとGA₃を添加したものは、BAPだけのものに比べて明らかにシュート増殖率が高いことから、初期培地においてGA₃の存在下でBAPの不定芽形成がより活発になって多数の不定芽が形成さ

表-7 シュートの発根試験

培地	供試数	発根数	発根率	備考
WPM	20本	17本	85%	継代3代目
1/2WPM*	20	14	70	〃
WPM	20	16	80	継代4代目
1/2WPM	20	16	80	〃
WPM	30	29	97	継代4代目
1/2WPM	30	30	100	〃
1/2WPM	75	57	76	継代10代目

*: 全量を半分にしたWPM

れ、移植培地に移して BAP の濃度を下げることによって GA₃ の作用が強く働くために不定芽が伸長し、高いシュート増殖率が得られるのではないかと考えられる。しかし、BAP の濃度が高いままで継代培養を続けるとやがてシュート増殖率は低下し、しかも水浸状になる傾向がみられる。これは継代するうちに BAP が樹体内に蓄積され、その影響が出るためと思われ、継代培養では初代培養よりも BAP 濃度を下げた方がシュート増殖率は高くなると考えられる。

このようなことから、エゾヤマザクラの茎頂培養法による大量増殖では、成長調節物質の種類と濃度を的確に組み合わせることによって高いシュート増殖率が得られることになる。このことは、他のサクラ亜属の樹種においても、基本培地に WPM を用いて、成長調節物質とくに BAP と GA₃ の濃度の組み合わせを検索することによって、高いシュート増殖率が得られる可能性を示唆している。

(2) 効率的な大量増殖の方法

実際の作業では、まず目標とする苗木の本数を決め、それに順化率と発根率をかけたものが、茎頂培養法によって得たいシュートの本数となる。初代培養や継代培養における最初のシュートの増加率が高ければ、シュートを取った残りの培養体を培養して増殖している間にさらに増殖が可能である。したがって、茎頂の培養開始から 1 番最初に得られるシュート数が多いほど、そして継代培養においても最初に得られるシュート数が多いほど短期間に大量のシュートが得られる。そのため、図-1 では最初に 1cm 以上伸長したシュートのみシュート増殖率を示しているが、実際の増殖では 1cm 未満の短いシュートもできるだけ採取して継代培養を行うと、より増殖は高まる。さらに、シュートを採取したあとの残りの培養体の中で、小さくて細かな葉がたくさん出ているものは不定芽が多いので、新たな同成分の培地に移植すると、初代培養で 2 週間～1 ヶ月、継代培養では 2 週間程度で新たなシュートが伸びてくる。さらにそれを継代培養することによりシュート増殖率が高まるので、シュート数が著しく少なくなるまで繰り返し培養を行うと良い。このような方法で増殖を行っていくことによって、目標とする本数の増殖を短期間に行うことができると考えられる。

また、このように継代を重ねたシュートを発根させても高い発根率を維持していることがわかった。したがって継代培養で大量に増殖したシュートを用いても発根が容易であるといえ、シュートからの発根にはほとんど問題はないものと思われる。

おわりに

今回エゾヤマザクラ 1 個体からではあるが、茎頂培養法による大量増殖が可能になった。また、発根率も高く、一部はすでに順化にも成功している。しかし、供試材料の条件を一定にするために同一個体のみで実験を行っているので、今後は他の個体でも同じような培地で大量増殖が可能かどうかを検討する必要がある。

さらに、サクラ亜属で道内に自生するカスミザクラ、ミネザクラおよびその変種のチシマザクラ、また各地で植栽されているサトザクラの多数の園芸品種についても大量増殖の方法を検討していく予定であり、鑑賞価値の高いサクラ類の増殖を目指しているところである。

文 献

- 福 島 勉 1990 ヤマザクラの腋芽培養による植物体再生. 101 回日林論 : 477-478
原口雅人 1990 カバザクラ 850 年生老木の冬芽および腋芽の培養. 101 回日林論 : 481-482
片 野 学・入江亮次 1990 ソメイヨシノの茎頂培養ならびに茎頂液体窒素中における凍結保存. 組織培養の植物科学・産業への利用. 日本植物組織培養学会第 2 回組織培養コロキウム

- LLOYD, G. B. & MCCOWN, B. H. 1980 Commercially-feasible micropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc., 30, 421-427
- Manabu KATANO 1987 Propagation of Japanese cherry (*Prunus jamasakura* Sieb. et Koidz.) by use Shoot-tip culture. Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ. 6, 1-4
- 酒谷昌孝・天野孝之 1987 組織培養によるナラノヤエザタラ (*Prunus leveilleana* Koehne cv. *antiqua*) の増殖. 奈良県林業試験場報告 17: 26-31
- 佐藤孝夫 1988 茎頂培養によるエゾヤマザクラ成木からの植物体再生. 36回日林北支論: 84-86
- 佐藤孝夫 1991 エゾヤマザクラの組織培養における茎頂の採取時期と増殖率. 39回日林北支論: 17-19
- 佐藤孝夫・斎藤晶・梶勝次 1991 全道から収集したエゾヤマザクラの特性(I) - 選抜個体の成長, 樹形および開花状況 -. 北林試研報 29: 33-38
- 佐藤孝夫 1992a 茎頂培養によるチシマザクラ成木からの植物体再生. 40回日林北支論: 113-115
- 佐藤孝夫 1992b 組織培養でサクラをふやす. 光珠内季報 87: 21-24
- 佐藤孝夫・梶勝次 1993 全道から収集したエゾヤマザクラの特性(II) - 開花特性 -. 北林試研報 30: 68-73
- 千木容 1988 試験管内微笑さし木によるサクラ亜属の幼植物体の再生. 36回日林中支論: 5-6
- 千木容 1990 組織培養によるサクラ亜属の幼植物体再生の効率化(II) 腋芽培養による大量増殖. 100回日林論: 513-514

Summary

Axillary leaf bud apices (approximately 1mm) were taken from *Prunus sargentii* (about 30-year-old) shoots in mid-February. They were cultured on the agar-solidified media containing woody plant medium (WPM), 20g/l of sucrose, 8g/l of agar and growth regulators (0.1mg/l of IBA, BAP, GA₃) added combinationally. In primary culture, when they were cultured on the medium supplemented with 4mg/l of BAP and 4mg/l of GA₃ during one month and transferred to the medium containing 0.5 or 1mg/l of BAP and 4mg/l of GA₃, the best growth and the largest number of shoots of 10mm or longer were obtained. In subculture, when segments containing 2 or 3 axillary buds obtained from shoots on primary culture were cultured on the medium supplemented with 0.5 or 1mg/l of BAP and 4 or 8mg/l of GA₃ during two weeks and transferred to the medium containing 0.25 or 0.5mg/l of BAP and 4 or 8mg/l of GA₃, the best growth and the largest number of shoots of 10mm or longer were obtained. It was calculated from the results of serial ten times subculture that the number of shoots propagated from one axillary bud was over seventy billions for about one year.

And 70~100% of shoots on the rooting medium containing WPM and 20g/l of sucrose were occurred root induction.