

コナラの育種に関する研究

1993年度～1995年度 (県単)

平 山 一 木
竹 内 英 男

要 旨

コナラは、すでに組織培養技術を利用し、萌芽枝の腋芽からの植物体の再生に成功している。しかし、増殖率・発根率・順化後の成長等多くの問題を残している。

これらの問題点を解決するため、表面殺菌法、植え付け部位、培地の簡略化の3点について検討を行った。その結果、表面殺菌法では、超酸化水を利用することにより従来の次亜塩素酸ナトリウムと同等の表面殺菌効果を発揮するとともに、培養中の成長をよくする効果があることがわかった。植え付け部位について、頂芽と腋芽を比較した結果、初代培養での増殖率は頂芽の方がよい結果を示したが、頂芽由来のものは発根率が0%で、培養には適さないと思われた。

培地の簡略化のため、液体肥料を薄めた培地での初代培養を試みたが、従来のB T M培地による培養と比べると、成績は劣るものの培養の可能性があることがわかった。

I. 目 的

食用きのこ栽培用としての優良なコナラを選抜するとともにバイオテクノロジーを利用して大量増殖法を確立する。

すでにコナラの組織培養は、腋芽を培養することによって、増殖・発根・順化の過程を経て植物体再生に成功している。しかし、増殖率・発根率・順化後の成長等多くの問題を残している。本研究ではコナラ組織培養の効率化、及び発根率の向上、順化後の成長向上を目的とした。

II. 材 料

本センター試験林内で、きのこ栽培に適した個

体を、通直性・成長の良さ・樹皮の厚さ等から選抜したものうち、1クローン、1個体を材料とした。また、実験にはこれらの材料を玉切り、水挿し後発生した萌芽枝を用いた。

III. 方 法

1. 表面殺菌法の検討

培養作業の効率化と培養中の増殖率を高めるため、材料の滅菌に、超酸化水あるいは超アルカリ水を用いた。培地は、B A P 0.5mg/lを加えたB T M培地を使用した。ショ糖濃度は3%、寒天濃度は0.8%とした。また、エタノールのみを用いたものを対照区とした。

2. 植え付け部位の検討

コナラの組織培養において、植え付ける材料を頂芽と腋芽に分け、それらが培養に難易の違いを生じるのか検討した。萌芽枝の葉のない先端部分の芽を含む部分を頂芽とし、葉の付け根についている芽を腋芽とした。表面殺菌は、70%エタノールで1分間、次いで2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分間行った。初代培養にはB T M培地にホルモンとしてB A Pを0.1~5.0mg/l、N A Aを0~0.1mg/l加えた培地を用いた。初代培養後、移植可能なシュートについては継代培地あるいは発根培地へ移植した。継代培養には初代培養と同じ培地を用い、発根培養には濃度2分の1のB T M培地に、I B Aを0.1~0.5mg/l、I A Aを0.1~0.5mg/l、活性炭を4g/l加えた培地を用いた。

発根した植物体は、寒天を洗い流し、パーミキュライトを詰めた鉢に移植した。移植後数日はビーカーをかぶせ湿度を保ち順化を行った。

3. 培地の簡略化の検討

培養作業の省力化を検討するため、培地成分を簡略化した初代培地におけるシュート伸長量を比較した。また、培地成分の簡略化は培養作業の効率化とともに、従来の培養苗よりも順化後の成長がよくなることも期待した。

初代培地には、市販の肥料4種類(A、B、C、D)を使い、それぞれ1000倍と500倍に薄めた培地、市販の粉末培地、それとB T M培地の計10種類の培地を用いた。4つの市販の肥料のうち3つは液体肥料で1つは粉末肥料で、それぞれの肥料の保証成分量は表-1のとおりであった。B T M培地は、これまで本センターで行なってきたコナラの初代培養でのシュート伸長には最も良好な培地であったのでこれを対照とした。

また、それぞれの培地にはB A P 0.5mg/lを加え、ショ糖濃度は3%、寒天濃度は0.8%とした。

また、表面殺菌は70%エタノールで1分間、有効塩素濃度1~2%の次亜塩素酸ナトリウムで5分~10分間行った。

表-1 市販肥料の保証成分量(%)

	N	P	K
A (液体)	5.0	10.0	5.0
B (液体)	4.5	4.5	3.0
C (液体)	5.5	7.0	7.0
D (粉末)	6.5	6.0	19.0

IV. 結果及び考察

1. 表面殺菌法の検討

従来から行っているエタノールと次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌法との違いを汚染率及び1か月培養後の平均シュート長で比較した。その結果は表-2に示した。

まず、汚染率で比較すると、エタノールだけによる殺菌法以外はすべて汚染率10%以下で、従来の次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌法と遜色ないことがわかった。

次に、平均シュート長で比較すると、超酸化水と超アルカリ水を組み合わせて使った場合は、従来の次亜塩素酸ナトリウム使用による場合よりも悪くなったが、超酸化水単独による殺菌法では次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌法よりも良くなった。しかも、超酸化水単独による殺菌法では、10分よりも20分と長時間殺菌した方が、成長が良くなった。このことから、超酸化水は従来の方法と同等の表面殺菌効果を示すとともに、成長を促進する効果があると言える。しかし、なぜそのような効果があるのか、まだわかっておらず、検討の余地がある。

表-2 コナラ初代培養における殺菌方法の検討

エタノール	殺菌方法 (分)			供試数	汚染数	汚染率 (%)	平均シュート長 (mm)
	次亜塩素酸ナトリウム	超酸化水	超アルカリ水				
1	10	—	—	63	0	0	24
1	—	10	—	18	0	0	30
1	—	20	—	12	1	8	38
1	—	15	15	24	0	0	13
2	—	—	—	6	1	17	33

※エタノールは70%、次亜塩素酸ナトリウムは有効塩素濃度1%

2. 植え付け部位の検討

頂芽、腋芽を初代培地に植え付けて40日～50日後にシュートの伸長量を調査し、移植可能なものは移植した。結果を表-3に示した。

頂芽と腋芽の比較をすると、平均シュート数は、どの培地を用いた場合でも頂芽の方が腋芽よりも多くおよそ2～3倍程度であった。このことは、もともと頂芽周辺には多くの芽が密集していることによると考えられる。

また、平均シュート長では腋芽の方が頂芽よりも多く同じく2倍程度であった。シュートの数が多くなればそれぞれのシュートは小さくなってしまふ。そこで、増殖率をあらゆる平均移植数で比較してみると、頂芽の方が腋芽よりも3割～5割程度大きな数字を示している。このことより、増殖率の点では腋芽よりも頂芽の方が優位であると

考えられる。

次に、培地に加えるホルモン濃度による違いを比較してみると、BAPを0.1あるいは0.5mg/l加えた培地が、平均シュート数、平均シュート長、平均移植数ともに良好であった。

これらのシュートは、合計して、継代培地へ65本、発根培地へ82本移植した。発根培地へ移植した結果については表-4に示した。合計で6本が発根し、順化した。これらはすべてIBAを0.5mg/l加えた培地で、しかも腋芽由来のものであり、頂芽由来のものは発根しなかった。

このように、頂芽由来のものからの順化苗が得られなかったため、頂芽由来と腋芽由来のものとの順化後の苗の成長を比較するまでには至らなかった。

表-3 初代培地 (BTM培地) におけるコナラ頂芽及び腋芽からのシュート形成状況

ホルモン濃度 (mg/l)		植付本数		平均シュート数		平均シュート長 (mm)		平均移植数	
BAP	NAA	頂芽	腋芽	頂芽	腋芽	頂芽	腋芽	頂芽	腋芽
0.1	0.0	3	10	3.0	0.8	9.9	21.4	3.7	2.5
0.5	0.0	3	9	3.7	1.2	10.7	20.8	3.7	2.6
1.0	0.0	0	11	—	2.7	—	12.7	—	1.4
5.0	0.0	2	10	4.5	2.0	8.3	12.8	1.5	1.5
0.1	0.1	3	9	1.3	0.6	10.5	17.4	1.3	0.7
0.5	0.1	5	6	3.4	1.5	6.9	11.7	1.6	1.0
1.0	0.1	2	9	3.5	1.2	5.1	13.5	1.5	0.9
5.0	0.1	4	7	2.3	1.1	6.6	8.5	1.0	0.7

表一 4 発根培地 (1 / 2 B T M培地) におけるコナラ頂芽及び腋芽由来のシュートの発根率

ホルモン濃度 (mg / l)		植付本数		発根本数		発根率 (%)	
IBA	IAA	頂芽	腋芽	頂芽	腋芽	頂芽	腋芽
0.1	0.1	8	20	0	0	0.0	0.0
0.1	0.5	6	15	0	0	0.0	0.0
0.5	0.1	4	14	0	4	0.0	28.6
0.5	0.5	4	11	0	2	0.0	18.2

3. 培地の簡略化の検討

植え付け1ヶ月後にシュートの発生量及び伸長量を調査した。その結果を表一5に示した。市販肥料による培養の可能性の有無を検討するため、10mm以上のシュートの割合で比較した。B T Mが58%であるのに対して、濃度2分の1のM Sで16%、Dの500倍で28%、Dの1000倍で19%、その他では10%以下であった。このように、市販肥料のDが良好であった。しかもシュート自体も健全なものが多くB T M培地のものともあまり遜色ないものもあった。

以上のことから、今回は初代培養でのシュート

伸長量を比較しただけであったが、従来から行ってきたB T M培地と比べて市販の肥料を薄めた培地は、増殖率は落ちるものの、培養の可能性があったことがわかった。

今後、供試数を増やして培地をスクリーニングするとともに、伸長したシュートを発根培地へ移植し発根、順化についても検討したい。このような簡単な培地を使っても植物体再生が可能ならば、培地を作るときの手間が省けると同時に、培養中にあまり多くの成分が入ってないので、順化後外に出した時に養分変化が少なくてすみ、成長が悪くなることを防ぐ可能性がある。

表一 5 液体肥料培地によるコナラ初代培養におけるシュートの状況

培地	植付本数	10mm以上のシュート発生		シュート長 (mm)		
		本数	率 (%)	平均	最小	最大
A1000倍	36	0	0.0	6.7	5	9
A 500倍	36	3	8.3	8.5	5	14
B1000倍	36	0	0.0	6.5	6	7
B 500倍	36	0	0.0	7.0	5	9
C1000倍	36	2	5.6	8.3	6	15
C 500倍	36	0	0.0	6.5	5	8
D1000倍	36	7	19.4	9.2	5	19
D 500倍	36	10	27.8	10.6	5	30
BTM	48	28	58.3	15.3	5	28
1/2MS	49	8	16.3	9.0	6	17