

組織培養によるコナラの増殖技術の開発

川尻秀樹 茂木靖和

目	次
はじめに	19
1 材料と方法	20
1.1 供試材料の通年化	20
1.2 組織培養	20
1.2.1 供試材料	20
1.2.2 材料の殺菌方法	20
1.2.3 増殖に用いる組織の選択	21
1.2.4 植え付け前処理	21
1.2.5 培養培地	21
1.2.6 発根培地	22
1.2.7 植物培養条件	22
1.2.8 環境順化条件	22
2 結果と考察	22
2.1 供試材料の通年化	22
2.1.1 切り枝からのシュートの発生誘導	22
2.2 組織培養	24
2.2.1 材料の殺菌方法	24
2.2.1.1 殺菌剤及び殺菌方法	24
2.2.1.2 降雨時採取材料の殺菌	26
2.2.2 増殖に用いる組織の選択	26
2.2.2.1 剥皮枝条の培養	26
2.2.2.2 冬芽の培養	27
2.2.2.3 腋芽の培養	29
2.2.3 植え付け前処理	30
2.2.4 外植体の培養に適した培地組成	30
2.2.4.1 基本培地と培地支持体	30
2.2.4.2 培地鉄源	30
2.2.4.3 カルシウム含量	32
2.2.4.4 微量成分と植物成長ホルモン	33
2.2.4.5 大量増殖法	34
2.2.5 発根培地	35
2.2.5.1 発根促進ホルモン	35
2.2.5.2 活性炭施用	35
2.2.6 植物培養条件	38
2.2.6.1 光環境	38
2.2.6.2 温度	38
2.2.7 環境順化条件	38
2.2.7.1 簡易な環境順化法	38
2.2.7.2 順化室での順化方法	38
まとめ	39
引用文献	40
参考資料	40

はじめに

近年、岐阜県産シイタケ原木の供給量は年々低下の傾向にあり、他県からの移入原木に頼るところが大きい。本県での平成3年度のシイタケ原木供給実績は、2,734,932本で、この内県内産の割合が62%の1,702,082本であった。全供給量の内、38%が福島県、長野県、山梨県等からのコナラを主体とした移入原木である。本県で、シイタケ原木として取り扱われている樹種は、コナラが全供給量の約97%と大半を占め、次いでクヌギ、ミズナラとなっている。

一方、植菌本数は原木の減少や価格の高騰が影響して、年々減少している。今後は、原木の生産可能林が更に減少すると考えられるため、原木生産には以前の薪炭林施業地をシイタケ原木林に切り替える必要がある。シイタケ原木林を造成するには、原木林として優良な形質を持つ林が望まれ、その優良形質個体の増殖が重要となる。

しかし、コナラ・クヌギはサシキや接ぎ木が困難であり、優良形質個体の保存・増殖が難しい。また、実生苗生産は結実が不安定であるため、計画的な増殖が進め難く、優良形質個体の保存・安定供

給には問題がある。そこで、コナラの組織培養による種苗増殖の可能性を検討した。また、組織培養に際しては、培養手法の開発とともに、材料の確保が重要であるため、屋外から良好な材料が得られない冬期に、コナラの枝を水さしして、緑枝を効率的に誘導する方法を検討したので報告する。

この研究を進めるにあたり、終始貴重な助言を頂いた林業センター 中川 一 主任専門研究員、および研究実施に御尽力頂いた寒冷地林業試験場 中村 基 主任専門研究員、県林政課 鈴木 勝 副検査監、県森林整備課 中林 幹夫 技術課長補佐の各位に深謝の意を表します。

なお、本報告は昭和61年度～平成2年度にかけて実施した地域バイテク（国庫補助事業）の中で、コナラの組織培養による種苗の増殖法を検討したものである。

1. 材 料 と 方 法

1.1 供試材料の通年化

コナラは冬期、落葉するため、成長しつつある緑枝を培養材料として用いることができる時期が限られる。そこで、落葉期に枝を採取し、これを水さしすることによって、そこから新しい枝や芽の発生を誘導するための条件・促進方法を検討した。

供試材料は、岐阜県林業センター実験林内に生育する樹齢34年生成木（樹高13.5m、胸高直径34cm）から平成元年12月22日、平成2年1月7日、1月28日、2月8日の4回枝を採取した。採取した枝は、12月22日と1月7日には直径、長さが1.5cm、1.5mの枝4本と1.0cm、1.0mの枝4本、合計8本ずつ、1月28日と2月8日には2.0cm、1.5mの枝4本と1.0cm、1.0mの枝4本、合計8本ずつである。枝は試験に際し、殺菌用にベノミル50%水和剤（ベンレート水和剤）と殺虫用にMEP50%乳剤（スミチオン乳剤）の500倍液を噴霧して、薬剤の風乾後供試した。

試験は、一般の実験室内（光条件自然光のみ500～5,000Lux、温度なりゆき4～17℃、湿度30～45%）と人工気象室内（光条件5,000Lux16時間日長、温度20℃恒温、湿度95～99%）で、各々15リットルポリバケツに水道水を深さ20cmに張り、1バケツ当たり4本の枝を水さしして、毎日水を取り替えて実施した。

人工気象室内でのホルモン等の噴霧処理は、ジベレリン（以下、GA₃）0.2～4ppm、6-ベンジルアミノプリン（以下、BAP）0.5～5ppm、およびハイポネックス（5-10-5）1,000倍液の混合液を2日に一度、噴霧器で4本当たり100ミリリットル噴霧した。

1.2 組織培養

1.2.1 供試材料

組織培養に用いる組織（以下、外植体）は成長期には当年生、もしくは2年生の枝の剥皮したもの（以下、剥皮枝条）、葉柄腋芽（以下、腋芽）を用いた。冬期の成長休止期には当年生、もしくは2年生の枝と冬芽（頂芽・側芽の両方）を用いた（図-1参照）。

1.2.2 材料の殺菌方法

殺菌剤として、70%エタノールと3%過酸化水素水、1%次亜塩素酸、0.3%昇汞を組合わせて、薬剤の選択、殺菌処理時間について検討した。なお、殺菌に用いた外植体は4年生実生苗の腋芽（6～7月採取）と冬芽（11～1月採取）

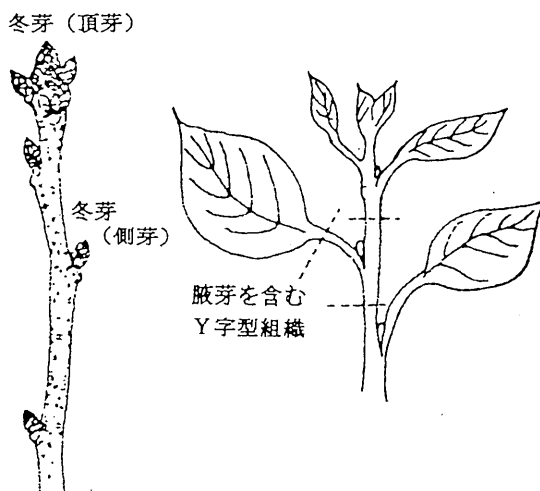


図-1 供試材料

である。殺菌方法は晴天が3日以上続いた場合に採取した材料と、6～7月及び11～1月の降雨時に採取した材料との2水準で検討した。

1.2.3 増殖に用いる組織の選択

剥皮枝条、冬芽、腋芽の部位および採取時期別の培養の難易を検討した。培養は蛍光灯照明下照度5,000Lux16時間日長、温度23℃恒温、湿度40%の培養室で実施した。

剥皮枝条とは野外で採取した小枝を表面殺菌して、クリンベンチ内で殺菌したメスを用いて、表皮を削り剥ぎ取ったものである。材料を採取した親木は4年生実生苗と実験林内の30年生成木で、採取時期は5月と12月である。殺菌方法は70%エタノール(2分)、0.3%昇汞(3分)で、使用した培地はAndersonで、ホルモンとしてBAP 0.5ppm添加して用いた。

冬芽の培養は11月～2月にかけて、4年生および30年生の個体から採取して行った。冬芽の培養培地はWPMで、これにBAP 0.2ppm、12月と1月はBAP 0.2ppm、GA₃ 0.5ppm添加して行った。殺菌方法は70%エタノール(2分)、1%次亜塩素酸(5分)とした。培地置床にあたっては、冬芽の芽鱗をメスでほとんど剥ぎ取り、約1.0mmの成長点近傍組織に切り出して、培地に置床した。

腋芽の培養は5月～8月にかけて、3、4、30、31、32年生の個体の当年伸長した緑枝を切りとり、腋芽と葉柄を含むY字型の組織に調整した。これを70%エタノール(2～3分)、1%次亜塩素酸(3～5分)で殺菌し、クリンベンチ内で滅菌水で3回すすいで培地に置床した。使用した培地は1/2WPM、WPM、BTM、1/2Andersonで、ホルモンはBAP 0.2～0.5ppm、GA₃ 0.5ppm、NAA(α-ナフタレン酢酸) 0.002ppmを単用もしくは混用した。

1.2.4 植え付け前処理

初代培地にさしつける前に殺菌及びエチレン発生抑制を目的として前処理を実施した。使用した薬剤は炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、過マンガン酸カリ、硝酸銀で、各々の水溶液に組織の基部を浸漬して、その後の培養経過を観察した。

前処理の方法は初代培養に際し、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、過マンガン酸カリを3%の水溶液として、硝酸銀を0.1%水溶液として、それに外植体の基部を10秒間浸漬処理して、滅菌ろ紙上で風乾して培地に置床した。

1.2.5 培養培地

培養に用いた基本培地は、WP培地(6)、BT培地(2)、Anderson培地(1)、MS培地(8)、IS培地(9)の5種類の培地で、コナラの組織培養に適する基本培地を検索した。

培地支持体としては一般的である寒天のほか、ジェランガム、バーミキュライトでの成長差を検討した。培地成分としては鉄源、カルシウム含量、微量成分、植物成長ホルモンを検討し、また、大量増殖を目的として、回転培養による冬芽の苗条原基法についても検討した。

培地鉄源の検討はWP培地を基本として、鉄源の種類(Fe-EDTA、FeSO₄・7H₂O)、使用する鉄源の量(1.4、2.8、27.8、50ppm)をかえて検討した。

カルシウム含量の検討はWP培地のCa量を基本、2倍、5倍、10倍に変化させ、腋芽を培養して検討した。基本のWPMにはCaCl₂・2H₂Oが96ppmと、Ca(NO₃)₂・4H₂Oが556ppm溶解しており、純粋なCaのみで120.6ppmとなる。培地中に添加するCa源としてはCaCl₂・2H₂OとCa(NO₃)₂・4H₂Oが考えられるが、本試験ではCaCl₂・2H₂OをCa源として用いた。なお、培地にはホルモンとしてBAP 0.2～0.4ppm、GA₃ 0.5～1.0ppmを添加して試験した。

微量成分・ホルモンの検討はWP培地を基本として実施した。微量成分はFMN(フラビンモノヌクレオチドナトリウム)を5ppm、10ppm、L-トリプトファンを10ppm添加して検討した。ホルモンとしてはBAP 0.2、0.5、1ppm、NAA 0.02ppm、IAA 0.1ppm単用、もしくは併用して検討した。

大量増殖法の検討は11～12月にかけて、冬芽を有効塩素1%アンチホルミンで5分間殺菌し、顕微鏡下で成長点近傍組織を切り出して外植体として、回転培養に供した。使用培地はWP培地とBT培地で、ホルモン条件はBAP 0.2、0.5、2ppm、GA₃ 0、0.05、0.5ppmを組み合わせて用いた。また、

培地支持体はジェランガムと液体培地を用いた。

1.2.6 発根培地

初代培養、継代培養で、約2cmに伸長したシュートを切り取り、発根培地に置床して、発根に適した基本培地・濃度、ホルモン条件等を検討した。なお、発根試験は1/2WP培地を基本として、発根過程を1つの培地による方法と2種類の培地による2段階法の2方法について検討した。発根促進ホルモンはIBA、NAAを組み合わせて発根を試みた。また、培地の支持体（寒天、ジェランガム、バーミキュライト）の有無、活性炭の有無についても検討した。

1.2.7 植物培養条件

培養室内の光環境と温度条件を検討した。光環境については、光源から25cm離れたところで1,500Luxと5,000Luxの2水準とした。使用した蛍光管は40Wで、ランプの銘柄はナショナルのバルック、バルックデイ、ハイライト、ホモルクス（植物育成用）、日立のハイルミック、東芝のFLR白色、葉タバコ用ランプの7種類を取り混ぜて検討した。なお、基本培地は1/2WPMで、ホルモンはBAP 0.2ppm単用のものと、GA₃ 0.5ppm添加の2水準で実施した。

温度条件は15、20、25、30℃の4条件で腋芽培養のシュート伸長量を検討した。なお、基本培地は1/2WPMで、ホルモンはBAP 0.2ppm単用で実施した。

1.2.8 環境順化条件

発根したコナラは根に付着した支持体を水で洗い流し、それをバーミキュライトを培土とした鉢に移植して順化を試みた。なお、順化方法はポリプロピレンボックスによる簡易な順化方法と順化室による順化方法を検討した。

簡易な環境順化法は、ポリプロピレン製収納ボックス（W40×D60×H50cm）を材料として、発根個体の順化を試み、シュートの伸長状況、根の発生・伸長状況を観察した。順化条件は、ボックス内に20W蛍光灯照明（照度1,000Lux、24時間日長）をつけ、底面に水をはり（湿度なりゆき）、そこに設置されたマルチポットに移植して実施した。なお、順化試験は平成2年2月5日から開始し、ボックス内の温度は照明からの発熱により、約20℃に保たれた。

順化室での順化法は、照度 5,000～8,000Lux、16時間日長の条件下で温度、湿度、風速を変化できる順化室で、順化の試験を実施した。湿度は70、80、90、99%とし、順化室内の設定温度18℃と23℃の2水準で比較した。

2. 結果と考察

2.1 供試材料の通年化

2.1.1 切り枝からのシュートの発生

実験室内で枝を水さし結果が表-1である。表中の「冬芽展開・・・」は、枝先端部の冬芽が膨らみ、新葉が2枚以上展開することであり、その平均日を示した。「新芽の発生（10個）・・・」は、潜伏芽や不定芽が樹皮を破って平均10個発生し、新葉が2枚以上展開することであり、その平均日を示した。また、「緑枝伸長（平均10cm）・・・」は、最も伸長した緑枝10個が平均10cmに伸長することであり、その平均日を示した。

水さした枝は、冬芽展開までに14日、新芽の発生までに20.3日、緑枝伸長に33.5日を要した。光・温度・湿度のコントロールできない実験室では、伸長した緑枝の茎、葉ともに比較的硬く、濃緑色であった。これは実験室内の光量が乏しい割には、伸長に約一ヶ月を要しているためと推測される。

次に、人工気象室内で枝を水さした結果が表-2である。水さした枝は、無処理の場合、冬芽展開までに9日、新芽の発生までに15日、緑枝伸長に20日を要した。同じ条件下でホルモン等を噴霧処理した場合、冬芽展開までに4日、新芽の発生までに8日、緑枝伸長に13日を要しただけであった。緑枝

表-1 実験室内での水さし枝からの緑枝の発生

実験開始日(月/日)	12/22	1/7	1/28	2/8	平均
冬芽展開までの所要日数	14日	13日	16日	13日	14日
新芽の発生(10個)までの所要日数	19	20	23	19	20.3
緑枝伸長(平均10cm)までの所要日数	30	36	37	31	33.5

表-2 人工気象室内での水さし枝からの緑枝の誘導

誘導状況	無 処 理			ホルモン等噴霧処理		
	所要日数 (日)	日照時間 (時間)	積算温度 (℃)	所要日数 (日)	日照時間 (時間)	積算温度 (℃)
冬芽の展開まで	9	144	180	4	64	80
新芽の発生(10個)まで	15	240	300	8	128	160
緑枝伸長(平均10cm)まで	20	320	400	13	208	260

注)数値は1月7日と28日に開始した試験の平均値。

伸長を実験室の場合と比較すると、無処理の場合、人工気象室では約2/3に短縮され、特にホルモン等を噴霧処理した場合、約1/3に短縮された。一般に樹木の成長は日照条件よりも積算温度の影響を受け易いことから、人工気象室内での日数が短縮された主要因は積算温度と考えられる。

また、伸長した緑枝について見ると、実験室内で伸長した緑枝は10cm程度に伸長すると、頂芽から萎凋したが、人工気象室内では30cm以上に達する緑枝も見られた。これは実験室内の湿度が30~45%と低いのに対し、人工気象室は湿度95~99%と高い条件で試験を実施したためである。このため、一般の室内では冬期に15cm以上の緑枝は得られにくいと考えられる。

人工気象室内での無処理とホルモン等噴霧処理した場合の緑枝の発生本数、合計伸長量を表-3に示した。水さし20日後の合計発生本数・伸長量は各々16本の枝から、無処理で36本、337cm、ホルモン等噴霧処理で92本、1,096cmとなった。無処理とGA₃、BAP、ハイポネックスのホルモン等噴霧処理を比較すると、噴霧処理によって発生本数・伸長量ともに約3倍に増加した。

次に、水さし30日後の緑枝の伸長量・葉数・節間長を表-4に示した。なお、「葉数」は伸長した緑枝に着生している展開葉の枚数、「節間長」は伸長した緑枝に着生している葉の下から上に5枚目までの節間の平均値である。

表から水さし30日後の伸長量は実験室で8.8cm、人工気象室の無処理で13.8cm、ホルモン等噴霧処理で15.5cmと伸長量が増しており、ホルモン等噴霧処理は実験室内の約2倍の伸長量を示した。平均葉数は各々順に、7枚、9.1枚、12.3枚となり、ホルモン処理はよく伸長するため葉の着生枚数も多くな

表-3 ホルモン処理の有無による緑枝の発生本数と伸長量

水さし後の経過日数		4 日	9 日	11日	15日	18日	20日	合計伸長量 (cm)
供給材料	1.5cm×1.5m の枝4本	1 本 (10本)	12本 (35本)	14本 (39本)	20本 (56本)	22本 (66本)	22本 (67本)	242 (871)
	1.0cm×1.0m の枝4本	0 (5)	5 (15)	7 (16)	13 (20)	14 (22)	14 (25)	95 (225)
計		1 (15)	17 (50)	21 (55)	33 (76)	36 (88)	36 (92)	337 (1,096)

注)上段は無処理、下段()はホルモン等の噴霧処理。なお、数値は12月22日と1月7日に開始した試験の合計値

表-4 水さし30日後の緑枝の伸長量・葉数・節間長

項 目	平 均 伸長量 (cm)	平 均 葉 数 (枚)	平 均 節間長 (mm)
処 理			
実験室内	8.8	7	13.0
人工気象室 (無処理)	13.8	9.1	17.1
(ホルモン処理)	15.5	12.3	37.8

注)平均節間長は緑枝の下方の葉から上へ5枚目までの節間の平均値

った。一般に、コナラの組織培養では外植体として、腋芽を含むY字型の組織を用いるため、葉の枚数が材料組織片の数の増加を意味する。また、平均節間長は実験室で13.0mm、無処理で17.1mm、ホルモン処理で37.8mmとホルモン等噴霧処理することによって節間長が飛躍的に伸びたと言える。節間長が長ければ大きな組織を培養材料として提供できることになり、操作性が良い。

以上のように、組織培養用の材料を確保する点からは、冬期に簡単な方法で短期間に、大量の緑枝を得られることは極めて重要である。本試験はコナラの枝を水さしし、一般の室内に相当する実験室や人工気象室を利用することによって、更にホルモン処理することによって冬芽や潜伏芽等の休眠打破を図ったものである。この水さし枝処理で発生した緑枝を材料として現在培養中である

が、従来のように野外で採取した緑枝を直接培養した場合に比較すると、雑菌汚染率は非常に低くなった。

成木を材料として組織培養する場合、伸長しつつある緑枝を材料とするのが一般的であるが、野外で採取した緑枝は雑菌汚染率が高く、自然条件下では緑枝の採取できる時期に限られる。このため、クヌギでは雑菌汚染からの回避策の一つとして、接ぎ木苗をハウス内で育成し、そこから材料を得る方法(4,5)や、成木の玉切り丸太からの萌芽枝を利用する方法(1,2,3)がとられている。しかし、接ぎ木苗の養成が難しい点や丸太の取扱が面倒な点から、より簡単に効率の良い材料の確保を目的とした枝の水さししによる緑枝の誘導は有効な手段である。

2.2 組織培養

2.2.1 材料の殺菌方法

2.2.2.1 殺菌剤及び殺菌方法

初代培養材料を野外から採取する場合、一般的には採取前日まで3日以上降水がない場合に採取する

と雑菌汚染率が少ないと言われている。そこで3日以上晴天の続いた時に材料を採取して、4種類の水溶液で殺菌処理し、その後の雑菌汚染率を比較した結果が表-5である。

材料とした外植体は6~7月の腋芽と1月の冬芽である。「生存率、雑菌汚染率」は培養30日後の結果で、生存していても雑菌に侵されているものや、雑菌以外の要因で褐変枯死した個体も観察された。なお、殺菌した個体はクリンベンチ内で滅菌水で3回以上水洗して、培養に供した。また、培養に用いた基本培地はWP培地である。

表-5 晴天時採取材料の殺菌方法

外植体	処 理 個体数	殺 菌 手 法 (処理時間)	生存率	雑 菌 汚染率	備 考
腋 芽	100	70%エタノール(2分) 1%次亜塩素酸(5分)	95	15	
腋 芽	100	70%エタノール(2分) 1%次亜塩素酸(15分)	94	12	
腋 芽	100	70%エタノール(2分) 3%過酸化水素水(10分)	80	35	
腋 芽	100	70%エタノール(2分) 0.3%昇汞水(3分)	95	5	
冬 芽	50	70%エタノール(2分) 1%次亜塩素酸(5分)	40	68	
冬 芽	50	70%エタノール(2分) 1%次亜塩素酸	75	25	芽鱗を剥いで殺菌処理した。
冬 芽	30	70%エタノール(2分) 3%過酸化水素(10分)	40	60	
冬 芽	30	70%エタノール(2分) 0.3%昇汞水(3分)	66	7	芽鱗を剥いで殺菌処理した。

注) 基本培地としてWP培地を用いた結果

腋芽は0.3%昇汞3分処理したもので雑菌汚染率5%と最も低く、殺菌処理時間も70%エタノールと合わせても5分しか要していない。最も雑菌汚染率の高い3%過酸化水素水の雑菌汚染率は35%で、これは外植体に過酸化水素の気泡が付着し易いため、表面殺菌が充分に出来なかったためと考えられる。1%次亜塩素酸の雑菌汚染率は5分、15分の各々の処理で、15%、12%と処理時間による差はほとんど見られなかった。

殺菌力、処理時間から判断すると、0.3%昇汞が優れているが、水銀廃液の処理が面倒なこと、危険が伴うことを考えると、70%エタノール（2分）と1%次亜塩素酸（5分）の殺菌方法が適当であると考えられる。

冬芽はそのまま殺菌した個体と葉原基を包んでいる芽鱗を剥ぎ、外見上緑色になるまでにして殺菌処理した個体の2種類で実施した。雑菌汚染率の低いのは腋芽の場合と同様に、0.3%昇汞水を用いた場合で7%であった。しかし、昇汞水の場合、殺菌処理した外植体が培養中に褐変枯死する個体が27%見られた。次に、1%次亜塩素酸（5分）で芽鱗を剥いだものと、そのままのものの雑菌汚染率を比較すると、芽鱗を剥いだものが25%、そのままのものが68%と明らかな違いが認められる。

以上のことから、冬芽の芽鱗を剥いだものを材料とすれば、70%エタノール（2分）と1%次亜塩素酸（5分）の殺菌方法が適当であると考えられる。

2.2.1.2 降雨時採取材料の殺菌方法

降雨時に野外から材料を採取すると、一般に雑菌汚染率が高く、培養には適さない。しかし、貴重な優良木が入手できる時期が晴天時とは限らないため、降雨時に外植体を採取し、殺菌方法を検討した結果が表-6である。

材料とした外植体は6~7月の腋芽・頂芽と、11~1月の冬芽である。「生存率、雑菌汚染率」は培養30日後の結果で、生存していても雑菌に侵されているものや、雑菌以外の要因で褐変枯死した個体も観察された。また、一部の殺菌剤はデシケーター内で、760mmHg減圧下で作用させた。3%過酸化水素水と1%次亜塩素酸には界面活性剤（ツィーン20）を0.1%添加して処理した。なお、殺菌した個体はクリンベンチ内で滅菌水で3回以上水洗して、培養に供した。また、培養に用いた基本培地はAnderson培地である。

殺菌剤に3%過酸化水素水、1%次亜塩素酸を用いた場合、処理時間を15分にしても、晴天時ほどの殺菌効果はなく、50%以上の雑菌汚染率を示した。また、減圧下で殺菌処理した場合も、雑菌汚染率は50%以上と高い値を示した。

0.3%昇汞水を用いた場合は、雑菌汚染率が10%以下と低くなった。ただし、昇汞水の処理時間が5分、6分の場合、雑菌汚染率が5%以下と低い反面、組織の生存率も10%以下と低くなった。これは、組織が痛んで壊死したものと考えられる。0.3%昇汞水3分処理では、雑菌汚染率が低く、かつ組織の生存率も50%以上と高くなった。特に、減圧下で殺菌処理したものは、雑菌汚染率5%以下と低く、生存率も70%以上と高くなった。

以上のように、組織培養に供する外植体は、基本的には晴天時に採取するのが適当であるが、やむをえず、降雨時に採取する場合は、70%エタノール（3分）、0.3%昇汞水減圧下（3分）程度の殺菌が有効と考えられる。ただし、使用した殺菌水の取扱い、および水銀廃液の処理に注意する必要がある。

2.2.2 増殖に用いる組織の選択

2.2.2.1 剥皮枝条の培養

剥皮枝条培養30日後の経過が表-7である。表の「残存数」とは雑菌に侵されることなく残った本数で、「カルス形成」とは剥皮枝条に細胞塊を形成しているもので、「不定芽」とは剥皮枝条から発生してきたシュートを意味する。

供試本数に対して残存数が少ないのは、枝の表面の殺菌が完了していても、形成層に雑菌が残っているため、剥皮の段階で汚染されるからである。4年生と30年生を比較すると残存数、カルス形成本数とも4年生の方が良い。また、採取時期で比較すると成長休止期の12月より成長期の5月の方が良く、

表-6 降雨時採取材料の殺菌方法

樹 種	外 植 体	数量	殺 菌 手 法	生存率	雑菌汚染率
コナラ	腋 芽	20	70%エタノール (3分) 3%過酸化水素水 (15分)	35%	60%
〃	冬 芽	30	70%エタノール (3分) 3%過酸化水素水 (減圧下15分)	43	66
〃	腋芽、頂芽	30	70%エタノール (3分) 1%次亜塩素酸 (15分)	40	56
〃	冬 芽	20	70%エタノール (3分) 1%次亜塩素酸 (減圧下15分)	45	50
〃	腋芽、頂芽	30	70%エタノール (3分) 0.3%昇汞水 (5分)	10	3
〃	冬 芽	20	70%エタノール (3分) 0.3%昇汞水 (6分)	5	5
〃	腋芽、頂芽	20	70%エタノール (3分) 0.3%昇汞水 (減圧下3分)	70	5
〃	冬 芽	20	70%エタノール (3分) 0.3%昇汞水 (減圧下3分)	75	5
〃	冬 芽	20	70%エタノール (3分) 0.3%昇汞水 (3分)	50	10

注) 基本培地としてANDERSONを用いた結果

特に5月に採取した4年生木はカルス形成量も多い。不定芽は5月に採取した4年生木でのみ、2本発生した。30年生よりも4年生、12月よりも5月採取の方がカルス形成、不定芽発生で優っているのは、成長が旺盛な若齢木で、かつ成長期に材料を採取したためと考えられる。しかし、コナラの剥皮枝条は増殖率に乏しく、有効な手段ではないと考えられる。

なお、4年生木の12月採取、30年生木の5月、12月採取では、クリンベンチで剥皮中に木部が褐変してくるものが多く見られた。これは褐変物質であるポリフェノール物質がその後の培養に影響を与えて残存数を減少させたものと考えられる。

2.2.2.2 冬芽の培養

冬芽培養20日後の経過が表-8である。表の「冬芽の発育状況(本)」は3段階に分けられ、培地置床後、変化の見られないものを「変化なし」、冬芽が膨らんだものを「膨らみ」、冬芽が展開し

表-7 剥皮枝条の培養経過(30日後)

採取時期	親木年齢	供試本数	残存数	カルス 形成本数	カルス 形成量	不定芽 の発生	備 考
5月	4年生	40	23	15	+++	2本	——
12月	4年生	50	18	3	—	なし	剥皮中に褐変
5月	30年生	40	16	4	—	なし	剥皮中に褐変
12月	30年生	50	8	0	—	なし	剥皮中に褐変

注) 基本培地として Anderson を用いた結果、
カルス形成の全くないもの - ~ -+++ カルス形成が多いもの

表-8 冬芽の培養経過(20日後)

採取時期	親木年齢	供試数 (個)	残存数 (個)	冬芽の発育状況(個)			培地ホルモン (ppm)	培地支持体
				変化なし	膨らみ	展開		
11月	4年生	30	25	6	19	0	BAP 0.2	ジェランガム
12月	30年生	30	28	2	20	6	BAP 0.2 GA ₃ 0.5	ジェランガム
1月	4年生	30	29	2	15	12	BAP 0.2 GA ₃ 0.5	ジェランガム
1月	4年生	20	18	5	13	0	BAP 0.2 GA ₃ 0.5	液 体
2月	30年生	30	24	4	14	6	BAP 0.2	ジェランガム
2月	30年生	20	16	5	11	0	BAP 0.2	液 体

注) 培地支持体の「液体」とはジェランガムを除いた状態のものである

たものを「展開」とした。

6回の試験のうち冬芽の展開したのは3回あり、最も多いもので30個中、12個が展開した。これは4年生木から1月に採取した冬芽をBAP 0.2、GA₃ 0.5ppm、ジェランガムの条件で培養したものである。親木の年齢、採取時期、GA₃の有無による差はあまり認められないが、ジェランガムによる固形培地と液体培地では、固形培地の方がよく展開した。展開した冬芽はどれも、培養25日後頃から褐変枯死し、その後継代しても伸長は認められなかった。

冬芽の培養は芽鱗の剥き取りが難しく、作業効率が悪く、かつ展開以上の成長が見られないことから有効な手段ではない。

2.2.2.3 腋芽の培養

腋芽培養45日後のシュートの伸長経過が表-9である。表の「無変化」とはY字型組織を置床後、雑菌もシュート伸長も見られない個体である。また、平均シュート発生数、平均シュート長はシュートを形成した個体の平均値と標準偏差を示した。カルス形成は培地内でY字型基部に形成された細胞塊の多少を表現した。

シュート形成は材料の採取時期、親木の年齢による差はほとんど見られない。平均シュート発生数は1/2WPMで5本、WPMで2.2~5本、BTMで1.9~2.9本、1/2Andersonで9本となっている。1/2Andersonは発生数は多いが、シュートから発生する葉が細長く、萎縮しているものが見られた。また、培地上で伸長した組織が半透明の脆弱な組織となる、いわゆる組織のガラス化が進行しているものもあり培地として適当でない。

平均シュート長は1.1~2.2cmと発根培地に移植可能なシュートに伸長している。カルス形成は少ないものの、「中」を示したものが3回あり、採取時期、親木年齢、培地、ホルモン等の関係は判然としない。

表-9 腋芽培養によるシュートの伸長経過（培養45日後）

採取時期	親木年齢	供試本数	使用培地	ホルモン (ppm)	45日後の経過			シュート形成した団体		カルス形成
					雑菌汚染	無変化	シュート形成	平均シュート発生数	平均シュート長	
5月	3年生	40	WPM	BAP 0.5	5本	7本	28本	5.0±2.1本	1.9±1.2 ^{cm}	少
6月	4年生	50	BTM	BAP 0.5	11	6	33	1.9±1.8	2.2±0.9	中
6月	4年生	50	WPM	BAP 0.2 GA ₃ 0.5	9	5	36	2.2±0.8	1.7±1.6	中
5月	30年生	40	WPM	BAP 0.5	5	6	29	3.1±0.9	1.1±0.7	少
6月	31年生	50	BTM	BAP 0.5	7	5	38	2.9±1.3	1.7±1.2	少
7月	31年生	50	WPM	BAP 0.2 GA ₃ 0.5	13	15	22	3.1±0.9	1.1±1.5	少
7月	31年生	50	WPM	BAP 0.2 GA ₃ 0.5	4	10	36	4.0±2.2	1.9±0.5	少
8月	32年生	20	1/2WPM	BAP 0.5 NAA0.02	3	6	11	5.0±3.2	2.1±0.3	中
8月	32年生	20	1/2Anderson	BAP 0.5 GA ₃ 0.5	3	2	15	9.0±5.8	1.5±0.8	少

表-10 前処理がシュート伸長・発生量に及ぼす影響

処 理	接種数	汚染率	シュート伸長量	平均シュート数
	本	%	mm	本
炭酸ナトリウム	25	30	11.7	3.4
クエン酸ナトリウム	25	70	10.0	1.0
過マンガン酸カリ	25	80	11.1	1.6
硝酸銀	50	40	15.6	2.9
無 処 理	50	80	10.0	1.8

注) 培養開始後40日後の結果、基本培地はWPM

以上のように、腋芽は剥皮枝条、冬芽の培養より操作過程、シュート発生が容易であり、成長期であれば野外から簡単に多くの材料を採取可能である。また、冬季は枝の水さしによって緑枝を誘導すれば、腋芽の培養が周年可能となる。

2.2.3 植え付け前処理

基本培地としてWPM培地を用いて40日間培養した結果が表-10である。雑菌汚染率は、炭酸ナトリウム、硝酸銀処理が各々30、40%と他に比べて低くなっている。シュート伸長量は、きわだった効果は認められないが硝酸銀処理したもののみ、他に比べて約1.5倍の伸長量を示した。平均シュート数は炭酸ナトリウム、硝酸銀処理が各々3.4本、2.9本と他に比べて多くなっている。

このことから、硝酸銀処理は切り花栽培で実証されているように、殺菌と老化物質であるエチレンの発生を抑制する両面から効果があると考えられる。

以上のことから、汚染率が低く、シュート伸長が良く、発生シュート数の多い、硝酸銀処理がもっとも有効であると考えられる。なお、硝酸銀の廃液処理には充分注意する必要がある。

2.2.4 外植体の培養に適した培地組成

2.2.4.1 基本培地と培地支持体

5~6月に4年生親木から材料を採取し、腋芽培養を試みた結果が表-11である。基本培地として5種類、培地支持体として3種類の組み合わせによる培養30日後の雑菌汚染率、生存率、生存個体の平均伸長量を比較した。なお、ホルモン条件はBAPの単用、もしくはGA₃との併用によった。

雑菌汚染率は5種類の基本培地間であまり差がないが、3種類の支持体間ではバーミキュライトが寒天、ジェランガムに比較して幾分高くなっている。

生存率はWPMで55~80%、BTMで50~67%、Andersonで60~70%と高い値を示した。一方、1/2MSは33~37%、ISは20~33%と前記の基本培地に比較して低い生存率にとどまった。支持体別に見ると、WPM、BTM、Andersonはジェランガム > 寒天 > バーミキュライトの順であるが、1/2MS、ISではそのような傾向は見られなかった。

生存個体の平均伸長量は生存率同様、WPM、BTM、Andersonで良く、約1cm伸長しているが、1/2MS、ISは0.3~0.6cmとあまり伸長しなかった。支持体別に見ると、どの基本培地でも寒天、ジェランガムに比較してバーミキュライトが若干少ない傾向が見られる。但し、Andersonでは正常な葉型より細長いものが多く、かつ、葉色も黄緑~黄色のものが多く見られた。これに対し、WPMやBTMでは正常な葉型・葉色を示した。

以上のことから、コナラの腋芽培養に適した基本培地はWPM、BTM、Andersonで、若干ではあるがWPMが良く、支持体としてはジェランガム、寒天が適していると考えられる。

2.2.4.2 培地鉄源

培地にさしつけた外植体は、基部からタンニン等のポリフェノール物質が溶出し易い、そのため培

表-11 基本培地と培地支持体別の腋芽培養経過(30日後)

基本培地	ホルモン(ppm)		支持体	供試 本数	培養経過		生存個体の 平均伸長量 (cm)
	BAP	GA ₃			雑菌汚染 %	生存率 %	
WPM	0.2	0.5	寒天	30本	13%	73%	1.1 ± 0.9
"	0.2	0.5	ジェランガム	30	17	80	1.3 ± 1.3
"	0.2	—	バーミ キュライト	20	20	55	1.1 ± 0.8
BTM	0.2	0.5	寒天	30	23	63	1.1 ± 0.7
"	0.2	0.5	ジェランガム	30	17	67	1.1 ± 0.6
"	0.2	0.5	バーミ キュライト	20	30	50	0.8 ± 0.8
Anderson	0.5	0.5	寒天	30	17	67	1.0 ± 0.8
"	0.5	0.5	ジェランガム	30	17	70	1.1 ± 0.9
"	0.5	—	バーミ キュライト	20	20	60	0.9 ± 0.3
MS	0.5	0.5	寒天	30	10	33	0.5 ± 0.6
"	0.5	0.5	ジェランガム	30	10	37	0.6 ± 0.6
"	0.5	0.5	バーミ キュライト	20	10	35	0.4 ± 0.5
IS	0.5	0.5	寒天	30	17	20	0.4 ± 0.3
"	0.5	0.5	ジェランガム	30	13	33	0.3 ± 0.3
"	0.5	—	バーミ キュライト	20	35	25	0.3 ± 0.2

注) 使用した腋芽の親木は4年生である。

地中の鉄源と鉄-タンニン反応を起こし、培養植物の成長に悪影響を及ぼすと言われている。そこで、WP培地を基本として、鉄源の種類、量によって、残存率、伸長量に差がでるかどうかを検討した結果が、表-12である。なお、試験に用いた組織は腋芽と頂芽で、培養30日後の結果である。

鉄源がまったく無い培地では、さしつけ基部からのポリフェノール物質の溶出がみられないが、表に見られるように、シュートの平均伸長量が0~2mmと、ほとんど伸長しなかった。鉄源としてのFe

-EDTAと $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を比較すると、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を27.8ppm入れた培地ではシュートの平均伸長量が2回とも5mmであった。これに対し、 Fe-EDTA はどの使用濃度でも、7~15mmと、明らかにシュート伸長量に差がみられた。つぎに、 Fe-EDTA の使用濃度についてみると、3水準での試験では、2.8ppmの培地でシュートの伸長量が最も良かった。

以上のことから、基本のWPMは培地鉄源として、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を用いているが、 Fe-EDTA に鉄源を置き換えて2.8ppm程度使用するのが、培地成分調整上も、コナラのシュート伸長上も良いと考えられる。

2.2.4.3 カルシウム含量

培養中に外植体の成長組織が褐変するものは、Ca欠乏による場合が多いと言われている。そこで、

表-12 鉄源の種類と量の違いによる培養経過

基本培地	使用鉄原	使用部位	供試本数	残存率	平均伸長率
			本	%	mm
1/2 WPM	FeEDTA 50mg/l	頂芽	10	0	0
"	"	腋芽	25	92	10
"	"	頂芽	10	10	10
"	FeEDTA 2.8	腋芽	15	93	10
"	FeEDTA 1.4	"	20	50	7
"	無	"	20	55	0
"	FeSO_4 27.8	"	20	40	5
1/4 WPM	FeEDTA 2.8	"	20	40	15
"	"	"	25	40	8
"	"	頂芽	10	10	15
"	FeEDTA 1.4	腋芽	20	50	10
WPM	FeSO_4 27.8	"	20	40	5
"	FeEDTA 1.4	"	20	60	12
"	FeEDTA 2.8	"	20	50	12
"	無	"	20	70	2

WPMのCa量を变化させ、腋芽を培養した結果が表-13である。

表から培養24日後の伸長量、不定芽数とも、Ca2倍が各々2.9cm、4.3個と最大で、濃度別にみるとCa2倍>基本>5倍>10倍の順となり、高濃度では基本濃度よりも低い結果となった。

また、Ca2倍の培地でも、ジェランガムや寒天等の支持体のない液体培地の方が、組織の伸長が著しかった。但し、組織が液体中に浸漬しているため、伸長しても液体中に浸漬した葉は、そのほとんどが萎縮したものとなり、液面より上方の葉のみが正常なものとなった。液体培地で伸長させた茎や芽は、赤色を帯びたものが多くみられるのが外観的特徴であった。

2.2.4.4 微量成分と植物成長ホルモン

腋芽を材料として、基本培地組成成分以外の添加物・ホルモン濃度がシュートの伸長・数に及ぼす影響を調査した結果が表-14である。

BAPの濃度を1.0、0.5、0.2ppmの3水準で比較したところ、濃度が0.5ppmでシュート数3.1本と最大で、0.2ppmでシュート伸長量17mmと最大になった。

BAP濃度が0.2ppmまたは0.5ppmで良い結果となったため、これに、NAAを0.02ppm併用処理したところ伸長量5mm、シュート数1.1本、1.5本とBAP単用施用より劣る結果となった。IAAを濃度0.1ppmで単用施用したところ、伸長量・数に効果がみられなかった。これに、添加物として、アミノ酸の一種であるL-トリプトファンを10ppm施用したところ、シュート数に変化はみられないが、伸長量が約1.5倍に増大した。L-トリプトファンはIAA（インドール酢酸）の前駆体であるため、ホルモンの効果が補足されたと推測される。

IAA施用処理は有効でないため、BAPとNAAを組合せた培地に、FMNを添加し伸長量・シュート数を調査した。ホルモンとしてBAP 0.2ppm、NAA 0.02ppm入った培地にFMNを5、10ppm施用した結果、シュート数では差がないものの、伸長量が10ppmで5ppmの約1.5倍となった。また、F

表-13 培地中のCa量の違いによる成長差（WPM）

	Ca 基本	Ca 2 倍	Ca 5 倍	Ca 10 倍
供 試 本 数	60本	60	60	60
伸 長 量	2.4cm 0.5~6.2	2.9 0.5~10.0	1.5 0.5~5.0	1.1 0.5~4.5
不 定 芽	3 個 0~8	4.3 0~8	1.8 0~3	2.2 0~4

注) 試験は2回繰り返しによる。培養開始から24日後

平均値

最低~最大

MN無添加の培地ではシュート数、伸長量とも添加培地に比較して、低い値を示した。次に、ホルモンをBAP0.2ppm単用とし、FMN10ppm施用で培養したところ、NAAが入った培地と比較して伸長量21mm、シュート数4本と共に増加した。

以上のことから、シュートの伸長・発生には、ホルモンとしてBAP0.2~0.5ppm、培地添加物としてFMN、L-トリプトファンを各々10ppm施用すると有効であると考えられる。

2.2.4.5 大量増殖法

冬芽由来の苗条原基作出を試みた結果が表-15である。使用した材料が11~12月の冬芽由来の成長点近傍組織であったためか、回転培養ではシュートの伸長、苗条原基の発生には至らなかった。最も良い結果の出た培地は、BTMの液体培地で、BAP0.5、GA₃0.5ppmを添加したものであった。し

表-14 植物ホルモンと添加物がシュートの伸長とシュート数に及ぼす影響

培地	ホルモン濃度 BAP NAA IAA			添加物濃度 FMN L-トリプトファン			平均長 (min~max)	平均本数 (min~max)	培養期間
	ppm			ppm			m	本	日
1/2WPM	1.0	—	—	—	—	—	8 0~18	1.8 1~3	40
"	0.5	—	—	—	—	—	10 5~20	3.1 1~4	40
"	0.2	—	—	—	—	—	17 3~32	2.5 1~4	40
"	0.5	0.02	—	—	—	—	5 0~7	1.1 1~2	50
"	0.2	0.02	—	—	—	—	5 0~7	1.5 1~2	50
1/4WPM	—	—	0.1	—	—	—	9 0~15	1 1	30
1/4WPM	—	—	0.1	—	10	—	15 0~25	1 1	30
1/2WPM	0.2	0.02	—	10	—	—	15 5~30	3.1 1~6	40
"	0.2	0.02	—	5	—	—	11 5~25	2.9 1~4	40
1/4WPM	0.2	—	—	10	—	—	21 0~40	4.0 1~7	40

表-15 培地、ホルモン別の冬芽展開率

培 地 ホル モン	B A P 2.0ppm		B A P 0.5ppm		B A P 0.2ppm	
	ppm		ppm		ppm	
	G A ₃ 0.5	G A ₃ 0.05	G A ₃ 0.5	G A ₃ なし	G A ₃ 0.5	G A ₃ 0.05
W P M	20%	0	—	—	0	20
B T M	—%	—	10	0	20	10
BTM (液体)	—%	—	60	—	—	—

注) 供試本数各10個、液体培地以外はゼランガム2g/1使用

かし、この培地でも、外植体の内60%の冬芽が展開したのみで、その後中心から褐変してしまった。

以上のように、コナラ冬芽を外植体とした苗条原基法による大量増殖は不可能であった。

2.2.5 発根条件

2.2.5.1 発根促進ホルモン

1/2WP培地を基本培地として、IBA、NAAを組み合わせて発根を試みた結果が表-16である。なお、ここでは発根培地に移植する以前の初代・継代培養中の培地ホルモンについても検討した。

発根率が50~60%を示しているホルモンの組み合わせは、IBA 0.1、0.5ppmである。また、その場合の初代・継代培養中の培地ホルモンはBAP 0.2~1.0ppmである。次に発根率の高い20%を示したホルモンの組み合わせは、NAA 0.02ppmもしくは、IBA 0.1とNAA 0.02ppmである。この場合の初代・継代培養中の培地ホルモンもBAP 0.5~1.0ppmであった。発根率が0~10%のものについてみると、初代・継代培養中の培地ホルモンとして、NAA、IAAの施用であった。

次に上記のように、伸長したシュートを発根培地に移植して根の発生を促す1段階法でなく、発根させるための処理を2回行う2段階法を検討した。1/2BTM培地を基本として、発根促進ホルモンであるオーキシンの高濃度施用(1,2週間)の後、ホルモンフリー培地に移植した結果が表-17である。IBA 1ppm、NAA 1ppm、2ppmの2週間施用では20~50%の発根個体が得られたが、オーキシンの1週間施用およびIBA 2ppm2週間施用では発根個体は得られなかった。このことから、2段階法による場合は、1~2ppmのオーキシン施用なら2週間程度処理する必要があった。ホルモンの種類による発根差は判然としなかったが、このようにして得られた発根個体はフリー培地移植後、地上部の上長成長が停止する傾向が見られた。フリー培地では活性炭の添加されたものの発根が良い傾向が見られた。

以上のように、発根過程を1つの培地で行う場合は、IBA 0.1~0.5ppm、または、NAA 0.02ppmもしくは、IBA 0.1とNAA 0.02ppm程度の低濃度のホルモン処理が良い。発根過程を2段階に分けて行う場合は、IBA 1ppm、NAA 1~2ppmの培地に2週間植え付けた後、活性炭入りのホルモンフリー培地に入れると良い。

2.2.5.2 活性炭施用

培地に添加する活性炭(10g/1、粉炭)の分散・沈殿が、発根に及ぼす影響を調査した結果が表-18である。なお、「分散」とは培地作成時に粉状の活性炭が培地全体に均等に分散して、黒色の培地になったもので、「沈殿」とは活性炭が培地底面に沈殿した状態のものである。ここでは発根だけでなく、活性炭のシュート伸長・発生数に及ぼす影響についても調査した。

表からシュートの伸長量やシュート数は活性炭の分散・沈殿に影響されないが、発根率においては、

分散で50%の発根率であるのに対し、沈澱では僅かに3%であった。

以上のことから、コナラの発根には現在のところ、IBA 0.1~0.5ppm、活性炭10g/l（分散）施用が良く、特に、初代・継代培養中にホルモンとしてBAP単用した方がよい。

また、根が差し付け基部から側方に発生するだけで、実生苗でみられるような直根は観察されず、発根本数も少なかった。今後は、より確実に発根数の多い発根条件の検討が必要である。

表-16 発根条件の検討

初代・継代培地ホルモン BAP NAA IAA			発根培地ホルモン IBA NAA		発根率 (%)
ppm			ppm		
1.0	—	—	0.5	—	50
1.0	—	—	—	0.02	20
0.5	—	—	0.1	0.02	20
0.5	—	—	0.1	—	50
0.2	—	—	0.5	—	60
0.2	—	—	0.1	—	60
0.5	0.02	—	0.5	—	0
0.5	0.02	—	—	0.02	0
0.2	0.02	—	0.5	—	0
0.2	0.02	—	0.5	0.02	0
—	—	0.1	0.5	—	10
—	—	0.1	0.5	0.02	0

注) 1/2WP培地を発根培地として使用

表-17 2段階法による発根率

処理 7-1-1 培地	IBA 1ppm		IBA 2ppm		NAA 1ppm		NAA 2ppm	
	1週間	2週間	1週間	2週間	1週間	2週間	1週間	2週間
1/2BTM 活性炭入り	0%	50%	0%	0%	0%	35%	0%	20%
1/2BTM 活性炭なし	—	10%	—	0%	—	10%	—	5%

注) ホルモン処理培地は1/2BTMを使用

表-18 活性炭がシュート伸長・数および発根に及ぼす影響

使用培地	活 性 炭	供試本数	伸 長 量	シュート数	発 根 率	平均発根数
初代培地	分 散	50 本	18 mm	2.6 本	0 %	0 本
“	沈 澱	60	20	2.4	0	0
発根培地	分 散	60	5	1	50	1.6
“	沈 澱	60	5	1	3	1

注) 初代培地とは、シュート伸長・シュート発生を目的とした培地で、発根培地は、発根を目的とした培地である。

表-19 照度条件とシュート伸長量

照 度 条 件	供試本数	培養期間	シュート伸長量	備 考
1,500 Lux	100本	35 日	1.0±0.5 mm	
	100本	35 日	1.1±1.0 mm	GA, 0.5 PPM 添加
5,000 Lux	100本	30 日	2.9±3.1 mm	
	100本	30 日	2.9±4.5 mm	GA, 0.5 PPM 添加

注) 基本培地として1/2 WPM, BAP0.2ppm, 2回繰り返しのによる。

2.2.6 植物培養条件の検討

2.2.6.1 光環境

7種類のランプでの培養結果にはほとんど差が認められなかった。そこで、これらのランプを取り混ぜて、照度別の腋芽培養シュートの伸長量を比較した結果が表-19である。

シュートの伸長量は1,500Lux照明下で1.0~1.1cmであるのに対し、5,000Lux照明下では2.9cmと、約3倍の成長量を示した。また、BAP 0.2ppm、GA₃ 0.5ppm添加培地では成長量にバラツキがみられ、シュートの徒長したものが多く見られた。

以上のことから、蛍光灯照明は植物育成用というような特殊な蛍光管でなくとも、一般の蛍光管で充分である。また、照度条件は1,500Luxより5,000Luxの高照度の方がシュート伸長上有効であった。

2.2.6.2 温度

15~30℃まで5℃刻みで、4水準の温度を設定して腋芽培養シュートの伸長量を比較した結果が表-20である。

培養期間は約30日であるが、温度が高くなるにつれてシュート伸長量は大きくなっており、15℃と30℃では3倍以上の伸長差が見られる。しかし、30℃では雑菌汚染率が30%と、ほかの設定温度条件の場合より高い結果となった。

このことから、シュート伸長を目的とした培養設定温度は、30℃が最も適していると考えられる。

2.2.7 環境順化条件

2.2.7.1 簡易な環境順化法

ポリプロピレン製収納ボックスで順化させたコナラは、順化開始から10日でシュートが伸長し始め、14日間で約10cm伸長した。その後、20日間成長休止して、順化開始から45日目頃から再び成長を開始し、8日間で14cm伸長した。つまり、順化を開始してから53日間で、24cm伸長成長した。また、この間の根の成長を観察したところ、順化当初、6cmであった根が53日間で20cmに伸長した。しかし、順化以前に発生した根が伸長するだけで、新しい根や既に発生している根からの細根発生はみられなかった。

2.2.7.2 順化室での順化方法

順化室の温度条件は、庫内設定温度18℃の場合、順化培土の土中温度が24℃（照明点灯下）となり、コナラの葉が落葉してしまった。設定温度23℃の場合の土中温度は30℃（照明点灯下）となり、植物体には変化は見られなかった。コナラの順化を考えた場合は、落葉させた方が良いのか、落葉しないようにすべきか今後の課題である。

表-20 培養温度とシュート伸長量

培養温度	供試本数	培養期間	シュート伸長量	雑菌汚染率
15℃	50本	30日	0.7±0.5mm	4%
20℃	50本	30日	1.6±1.4mm	16%
25℃	50本	29日	1.9±2.5mm	8%
30℃	70本	29日	2.5±3.8mm	30%

庫内設定温度23℃下で、庫内湿度を70%、80%、90%、99%の4水準で順化率を比較した結果が表-21である。なお、供試個体数は各々10本である。

湿度70～80%では順化植物の葉に萎凋現象が認められ、1週間程度で枯死してしまった。逆に、99%では、培土上にカビの発生したものがあったが、90%ではそうした現象は認められなかった。現在のところ、供試本数が少ないため順化のスケジュール等については判然としないが、23℃では湿度90%程度が適していると考えられる。

表-21 湿度条件と順化率

湿度条件	順化率	順化中の変化
70%	0%	葉の萎凋、枯死
80%	0%	葉の萎凋、枯死
90%	50%	変化無し
99%	10%	培土にカビ発生

注)照度5,000～8,000ルクス16時間日長、室温23℃、順化30日

ま と め

1. 材料の通年化

- 1.1 コナラの枝を水さしすることによって、冬期でも緑枝を得られることが分かった。
- 1.2 人工気象室で枝を水さしして、ホルモン等の噴霧処理することによって、より多くの緑枝発生が見られた。
- 1.3 水さしで得られた緑枝は雑菌汚染率が低く、外植体として適している。

2. 組織培養

- 2.1 外植体の殺菌方法は70%エタノールと1%次亜塩素酸、0.3%昇汞（減圧下）を組み合わせると、降雨時に採取した外植体でも培養可能である。
- 2.2 増殖に用いる外植体は、材料の多さ、作業の簡易さ、増殖のし易さ等の点から、腋芽が良い。
- 2.3 植え付け前処理は、0.1%硝酸銀処理が有効である。
- 2.4 培養に用いる基本培地はWPMが適している。
- 2.6 培地支持体はジェランガムが適している。
- 2.7 培地鉄源はFe-EDTAを用いた方が簡単でよい。
- 2.8 培地カルシウム量はWPM基本含有量の2倍程度が良い。
- 2.9 培地微量成分としてはFMNやL-トリプトファン添加が有効である。
- 2.10 不定芽誘導のホルモンはBAPとGA₃を組み合わせると良い。
- 2.11 発根は1/2WPMで低濃度IBA単用、もしくは、高濃度のIBAとNAA添加培地と活性炭入りのホルモンフリー培地による2段階法が良い。
- 2.12 発根を目的とした活性炭施用は、活性炭の分散施用が良い。
- 2.13 発根個体の多くは、根がさし付け基部から側方に発生するだけで、実生苗でみられるような直根は観察されない。
- 2.14 培養の光環境は、5,000Lux程度が良い。
- 2.15 培養の温度は、シュート伸長を目的とする場合、30℃程度の高温で最も成長が良い。
- 2.16 順化湿度は90%程度が適しているが、コナラは順化が難しく、より効率の良い順化スケジュールの検討が必要である。
- 2.17 コナラの組織培養は増殖率が乏しく、採算性等の多くの問題があり事業化は困難な現状にある。しかし、こうした技術は、貴重な遺伝資源の保存（例えば、天然記念物や優良木）を目的とした事業には導入可能であり、今後より一層研究を推進する予定である。

引用文献

- (1) ANDERSON, W. C. (1975) Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25 : 129~135.
- (2) CHALUPA, V. (1981) Commun. Inst. For. Czechoslov. 12 : 255~271.
- (3) 伊東祐道・松尾文昭 (1988) クヌギ丸太からの萌芽発生の制御. 39回日林関西支講 : 25~28.
- (4) 伊東祐道・松尾文昭 (1988) クヌギの組織培養による増殖. 39回日林関西支講 : 229~232.
- (5) 伊東祐道 (1989) クヌギ成木の組織培養に用いる外植体採取の通年化. 林木の育種151. 9~14.
- (6) LLOYD, G. B. & MCCOWN, B. H. (1980) Plant Prop. Soc. 30 : 421~427.
- (7) 森 格良・余吾初徳 (1988) 39回日林関西支講. 21~24.
- (8) MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962) Physiol. Plant. 15 : 473~497.
- (9) SAITO, A. & IDE, Y. (1985) In vitro Plantlet Regeneration from Adventitious Buds Induced by Petiole Culture in Japanese White Birch. J. Jap. For. Soc. 67 : 373~375
- (10) 佐々木義則・正山征洋 (1988) 日林九支研論集41 : 63~64.

参考資料

参考資料-1 使用した基本培地

組 成 培 地	B T M (ppm)	Anderson (ppm)	M S (ppm)	W P M (ppm)	I S (ppm)
K ₂ SO ₄	860			990	
NH ₄ NO ₃	165	400	1,650	400	680
(NH ₄) ₂ SO ₄	240				
尿素					10
KNO ₃	190	480	1,900		170
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	370	370	370	370	370
Na H ₂ PO ₄ · H ₂ O		380			
KH ₂ PO ₄	170		170	170	80
CaCl ₂ · 2H ₂ O	44	440	440	96	140
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	640			556	710
Mn SO ₄ · 4H ₂ O	22.3	19.6	22.3	22.3	8
	(H ₂ O)	(H ₂ O)		(H ₂ O)	(2H ₂ O)
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	6.2	
Zn SO ₄ · 7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6	9
KCl					140
Fe-EDTA					5.6
KI	0.15	0.30	0.83		0.8
Cu SO ₄ · 5H ₂ O	0.25	0.025	0.025	0.25	0.75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.02	0.025	0.025		
Fe SO ₄ · 7H ₂ O	27.8	55.7	27.8	27.8	
Na ₂ -EDTA	37.3	74.5	37.3	37.3	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	6.2	3.2
ニコチン酸	0.5		0.5	0.5	0.8
塩酸ピリドキシン	0.5		0.5	0.5	0.1
塩酸チアミン	1		0.1	1	0.1
ミオイノシトール	100		100	100	100
L-グリシン	2		2	2	
L-グルタミン	2				
L-リジン					100
sym-ジフェニルウレア					3
フマル酸					1
アスコルビン酸					1
L-チロシン					10
ショ糖 (サッカロース)			30,000	20,000	20,000