

‘ヒリュウ’の組織培養による増殖法と簡易発根法

能塚一徳・鶴丈和¹⁾・堀江裕一郎²⁾
(果樹苗木分場)

カンキツ台木に用いられているカラタチの1系統である‘ヒリュウ’の多芽体を得、組織培養による増殖法及び増殖した後に得られるシートを穂木とした場合の簡易発根法を検討した。シートは挿し木後2週間で一次根の形成が完了し、その後は二次根が形成され、挿し穂を長く取るほど根の生育は良かった。挿し穂に適したシートを効率的に得るには、NAAは添加せず、BAを0.3ppm添加したMT培地が適していた。‘ヒリュウ’挿し木用土にはUCソイルが適していたが、手間、コスト等の実用性を考慮すると滅菌した畑土壤か水田土壤が適していると考えられた。大量の苗を得るために実用化試験では、畑土壤に挿し木した1,222本のうち76.7%で新梢が伸長し、枯死個体はわずか3.7%であった。

[キーワード：カンキツ、台木、ヒリュウ、組織培養、大量増殖]

Propagation and Simple Rooting Method of ‘ Flying Dragon’ by Tissue Culture. NOTSUKA Kazunori, Yuichiro HORIE and Takekazu TSURU (Fukuoka Agricultural Research Cennter, Chikushino Fukuoka 818 – 8549,Japan) Bull.Fukuoka Agric.Res.Cent. 20 : 71 – 74 (2001)

Multistolons of ‘flying dragon’ which is a system of the trifoliate orange for the citrus rootstock were propagated *in vitro*, and used for examination of simple cutting mesod. Following the cutting of shoots obtained from multistolonns, the first root formation finished after 2 weeks, and followed the growth of secondary roots. The growth of roots were better in long shoots. MT medium added BA in 0.3ppm was suitable for obtain of shoots for cutting. The UC soil was suitable for the soil for the ‘flying dragon’ cutting, when the labor and the cost are considered, sterilized field soil is practicable and seem to suitable. In the feasibility study for getting the large rooted cuttings, cuttings planted in field soil were extended in inside 76.7 % of the 1222, and the plant death individual was slight 3.7%.

[Key Word : Citrus, Rootstock, Flying dragon,Tissue culture, Mass propagation]

緒 言

日本のカンキツの主要台木は‘中葉系カラタチ’であるが、近年、低樹高省力栽培に適したわい性台木や高品質果実生産が可能な台木を使用した苗木の要望が強くなっている。カラタチの1系統である‘ヒリュウ’は、わい化と高品質化の効果を兼ね備えた台木として注目され^{6),10)}、近年では‘ヒリュウ’台カンキツを高うねマルチ栽培により土壤水分を制御し、高糖度化を図る方法が検討されている⁵⁾。

カラタチは多はい性であるため遺伝的に均一な珠心はい実生が多く得られるが、一般に用いられている‘中葉系カラタチ’では約20%の交雑はいが混在する³⁾。‘ヒリュウ’も多はい性であるが、‘中葉系カラタチ’よりも珠心はいの数が少ないため、交雑はいの割合は約50%と高い¹³⁾。苗木生産者は、生育が揃い、しかも遺伝的に均一な珠心はい由来の‘ヒリュウ’台木を確保するため、実生を移植する時点で生育不良個体や‘ヒリュウ’特有の棘や枝が湾曲しない、判別が容易な個体を淘汰している。しかし、‘ヒリュウ’実生個体群には生育が良く、しかも棘と枝が湾曲する交雑個体も約10%程度が含まれていることがアイソザイム分析によって判明している¹²⁾が、これらを肉眼で判別することは困難である。また、これらの交雑個体を判別するために大量の台木をアイソザイム分析にかけて選別することは、労力やコスト的に不可能である。

近年、均一な‘ヒリュウ’台木を増殖するために挿し木

による栄養繁殖が試みられているが、ほ場の母樹から採穂する慣行法では‘ヒリュウ’の発根率は低い⁹⁾。HARADAら²⁾は組織培養で増殖したカラタチを試験管内で発根させると発根率が高いことを報告しているが、本法では挿し木に無菌操作が必要であり、10a当たり約2万本を植え付けるカンキツ苗木生産への実用化は不可能である。また、堀江ら⁴⁾は組織培養によって増殖した多芽体のシートを試験管外のロックウール等に挿し木する方法を報告している。しかし、この方法はまだ多くの労力と資材費を要し、コスト面で実用的ではない。

そこで、組織培養と簡易な発根・順化法を組み合わせて均一な形質の‘ヒリュウ’を低成本で増殖する方法について試験を行い、新しい知見が得られたので報告する。

材料及び方法

‘ヒリュウ’の多芽体は、無菌条件下で播種した実生のはい軸の切片をNAA0.5ppm、BA1.0ppm、ショ糖50g／Lを添加したMT培地で培養して形成した不定芽から得た。各試験に用いた挿し穂は、‘ヒリュウ’の多芽体をNAA0.1ppm、BA1.0ppm、ショ糖30g/Lを添加したMT培地⁹⁾で継代培養後、2~4ヶ月以内に発生したシートを用いた。多芽体の培養と挿し木に用いた人工気象器は気温25℃、照度約5,000lxで16時間照明とした。発根調査は、挿し穂の切り口及び茎部から発生した一次根と一次根から発生した二次根について行った。

1 穗し穂の調整と発根

1) 発根量の経時的变化

挿し木に用いたシートは長さを30mmに揃え、発根を促進するためにIBA150ppm水溶液で一昼夜切り口

1) 現南筑後地域農業改良普及センター

2) 現農業技術課

を浸漬処理し、カンキツの培養土であるUCソイルミックス⁹⁾の上にロックウール(3×3×3cm)を並べ、十分に加湿した後に個々に1本ずつ挿してラップで挿し木床を密封した。

発根の経時的变化は、挿し木後1, 2, 4, 6, 8週間に各区15本を供試して、発根率、一次根及び二次根に形成される二次根の数と長さを調査した。

2) 挿し穂の長さと発根

挿し穂に用いるシートの長さは10, 20, 30, 50mmの4水準とし、発根量の経時的变化と同じ方法で挿し木した。供試本数は各区20本、50mm区では8本とし、発根調査は挿し木後15日に発根率、根数及び根長について行った。

3) IBA処理と発根

試験区は発根を促進するためのIBA処理として、IBA水溶液の一昼夜浸漬濃度を150ppmと500ppmの2水準、IBA粉剤(1%)による挿し木直前の切り口への塗布処理及び無処理の計4区とし、長さ15~25mmのシートを各区20本供試した。挿し木床はロックウールを用い、挿し木床ラップで密封した。調査は挿し木後15日に発根率、根数及び根長について行った。

2 シート形成培地のホルモン組成の影響

発根しやすく生育の良いシートを確保するためのホルモン添加の影響をみるため、シ糖を30g/ℓ添加したMT培地にNAAが0と0.1ppmの2水準、BAが0, 0.1, 0.3, 1.0ppmの4水準の組み合わせで合計8区とした。材料は多芽体の頂芽を継代培地で13日間培養した均質な多芽体を1区に15個用いた。調査は置床後44日を行い、長さが2mm以上のシートの数と長さを測定した。

3 挿し木用土の種類と発根

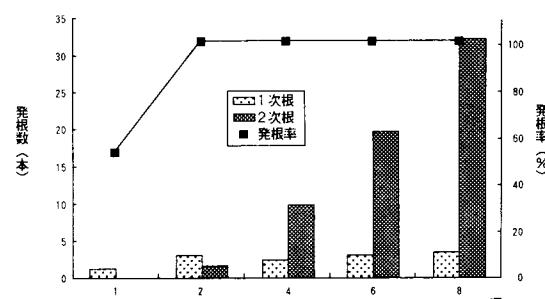
1) 挿し木用土の検討

直径15cm、深さ20cmのビニルポットに約半分の深さまで用土を入れ、十分加湿した後に1区1ポットに20本を挿し木した。ポットはラップで密封して保湿と水分蒸散防止を図り、発根調査までかん水は行わなかった。挿し穂の長さは15~25mmとし、切り口にはIBA粉剤(1%)を塗布した。

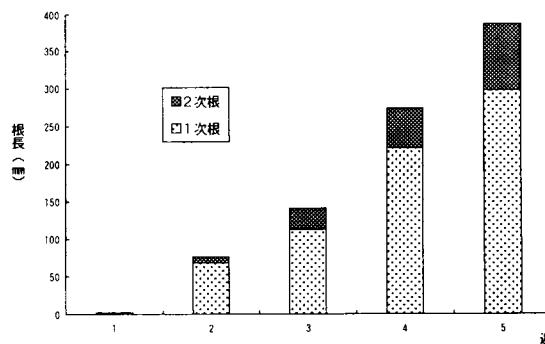
挿し木用土はUCソイルミックス上にロックウールを敷き詰める堀江ら⁴⁾の方法を対照区とし、一般に挿し木用土として用いられているパーライト、バーミキュライト及び細粒川砂の3区、UCソイルミックス単用区の計5区とした。発根調査は挿し木後15日に行った。

2) 実用に適した用土の検討

挿し木は前項と同じ方法で行った。用土はUCソイルミックス単用を対照とし、実用化に向けて水田土壌(細粒灰色低地土《CL》、田主丸町大字田主丸)、畑土壌(表層腐食質黒ボク土《LiC》、田主丸町大字石垣)、園芸培土(発売元:全農、N=200, P=700, K=100mg/ℓ)及びハイポネックス液肥(発売元:ハイポネックスジャパン、N:P:K=5:10:5%)の500倍液で加湿したUCソイルミックスを供試した。さらに、水田土壌、畑土壌及び園芸培土は高温高圧による滅菌処理区を加え、合計8区を設けた。発根調査は挿し木後18日を行った。



第1図 発根率及び根数の経時的变化



第2図 根長の経時的变化

さらに、ハウス内の挿し木床の実用化試験は用土としてUCソイルミックスと畑土壌を用いた。挿し木は天窓と側窓を開放したガラスハウス内に、各区85cm×155cmのビニルフィルム上に滅菌した用土で深さ約10cmの挿し木床を設置し、挿し木の直前に十分にかん水した。挿し穂は切り口にIBA粉剤(1%)で塗布処理し、UCソイルミックス区1, 196本、畑土壌区1, 222本を供試して、1997年6月24日から7月2日の間に3回に分けて挿し木を行った。挿し木後は挿し木床にトンネルを設置し、ビニルで被覆して密封し、さらにビニルの上を遮光率40%の寒冷紗で覆って遮光した。挿し木後40日から60日にかけて徐々にビニルフィルムを除去して順化した。8月27日にハイポネックス(N:P:K=5:10:5%)の500倍液を挿し木当たり3ℓ施用し、発根後の生育を10月13日に調査した。

結果及び考察

1) 挿し穂の調整と発根

1) 発根量の経時的变化

組織培養で増殖した‘ヒリュウ’の挿し木後の根の生育経過を第1図と第2図に示した。組織培養で増殖した‘ヒリュウ’のシートの発根は極めて良好で、発根率は挿し木後1週間で50%を超え、2週間後には100%に達した。2週間後以降は一次根の発生数の増加は認められず、二次根の発生数が急増し、特に挿し木後6週間以降は二次根の発生数の増加及び伸長が著しく、総根長の調査が困難であった。このことから、本試験以降の発根調査は、発根率が確定し、根長の調査が容易な挿し木後約2週間の時点を行った。

2) 挿し穂の長さと発根

挿し穂の長さと発根状況との関係を第1表に示した。ほ場の母樹から採取した‘ヒリュウ’の枝を用いた慣行法

第1表 組織培養 'ヒリュウ' の挿し穂の長さと発根

穗長 (mm)	供試数 (本)	発根率 (%)	根 数(本)		根 長(mm)		計
			一次	二次	一次	二次	
10	20	95	2.2 ^a	0	25.9	0	25.9 ^a
20	20	95	2.4 ^a	0.3	58.1	0.5	58.6 ^a
30	20	95	2.7 ^a	0.1	72.9	0.1	73.0 ^a
50	8	100	3.6 ^a	2.0	100.4	2.0	102.4 ^a

1) Tukeyの検定により5%レベルで異文字間には有意差がある。

第2表 組織培養 'ヒリュウ' の発根に及ぼすIBA処理の影響

IBA処理	発根率 (%)	根 数(本)		根 長(mm)		計
		一次	二次	一次	二次	
粒剤・1%	90	2.1 ^a	0	28.2	0	28.2 ^a
水溶液・150ppm	90	2.6 ^a	0.1	32.1	0.1	32.2 ^a
水溶液・500ppm	80	1.6 ^a	0.2	19.6	0.3	19.9 ^a
無処理	95	1.9 ^a	0	19.6	0	19.6 ^a

1) Tukeyの検定により5%レベルで異文字間には有意差がある。

第3表 シュート形成培地のホルモン組成の影響

ホルモン組成(ppm)	NAA	BA	シュート数(本)		シュートの長さ(mm)		最大
			総計	10mm以上	総計	平均	
0.0	0.0	0.0	3.5 ^a	1.8 ^a	41.5 ^a	11.9 ^a	20.0 ^a
		0.1	7.1 ^a	1.7 ^a	51.0 ^a	7.2 ^a	21.0 ^a
		0.3	12.7 ^a	2.6 ^a	83.2 ^a	6.6 ^a	19.7 ^a
		1.0	17.5 ^a	1.3 ^a	79.9 ^a	4.6 ^a	11.8 ^a
0.1	0.1	0.0	5.3 ^a	1.4 ^a	37.3 ^a	7.0 ^a	16.3 ^a
		0.1	7.3 ^a	1.9 ^a	57.3 ^a	7.9 ^a	20.0 ^a
		0.3	12.1 ^a	2.0 ^a	73.9 ^a	6.1 ^a	18.1 ^a
		1.0	23.3 ^a	1.1 ^a	94.3 ^a	4.1 ^a	9.7 ^a

1) Tukeyの検定により5%レベルで異文字間には有意差がある。

2) シュート形成培地にはMT培地を用いた。

3) 基礎の長さが2mm以上をシュートと判定した。

による挿し木では発根が悪いと報告されているが¹⁾、組織培養で増殖したシュートの発根率はいずれの区においても95%以上で極めて高かった。同様の現象はブルーベリー²⁾やカキ¹¹⁾で報告されており、組織培養によるシュートの幼若化が発根率を高めたものと考えられる。

挿し穂が長いほど一次根の発生数が多く、総根長も大きくなり、50mm区では発根数が3本以上、総根長が100mm以上となった。しかし、本試験では挿し木後の生育がおう盛な長い穂を多数得ることが困難であったことから、台木としての養成期間の短い挿し木苗を得るために長いシュートを効率的に、多量に確保する組織培養の培地の検討が必要となった。

3) IBA処理と発根

挿し木後の発根を促進するためのIBA処理法について検討した結果を第2表に示した。発根率は80%~95%と高かったが、処理区間差は認められなかった。また、一次根の発根数はIBA150ppm水溶液区が2.6本と多くなる傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。総根長はIBA水溶液150ppm処理区で32.2mmと無処理区よりも長くなった。

このようにIBA水溶液150ppm処理により発根後の根の伸長が促進されたが、IBA水溶液処理は挿し穂を束ね、立てた状態で切り口を一昼夜浸漬するために操作が煩雑で、苗木生産現場では実用的ではないと考えられる。一方、IBA粉剤(1%)処理区は根数、根長ともにIBA水溶液150ppm処理区に近い効果が得られ、粉剤処理は処理剤の調整が不要で、水溶液の浸漬処理に比べて操作が容易なことから、実用の可能性が高いと考えられる。

2 シュート形成培地のホルモン組成の影響

長い挿し穂は発根数が多く、総根長も長くなることから、組織培養により生育の良好なシュートを得るための

第4表 組織培養 'ヒリュウ' の発根に及ぼす挿し木用土の影響

用土名	発根率 (%)	根 数(本)		根 長(mm)		計
		一次	二次	一次	二次	
細粒川砂	100	1.8 ^a	0.1	24.7 ^a	0.2	24.9
バーミキュライト	100	1.9 ^a	0	26.4 ^a	0	26.4
パーライト	100	1.7 ^a	0	25.2 ^a	0	25.2
UCソイルミックス	100	1.6 ^a	0.8	48.3 ^a	2.0	50.3
ロックウール	100	2.1 ^a	0.1	45.6 ^a	0.1	45.7

1) Tukeyの検定により5%レベルで異文字間には有意差がある。

第5表 組織培養 'ヒリュウ' の発根に及ぼす挿し木用土と滅菌

用土名	滅菌 処理	発根率 (%)	根 数(本)		根 長(mm)		計
			一次	二次	一次	二次	
園芸培土	無	40	0.6 ^a	0.2	8.7	0.6	9.3 ^a
	有	65	0.9 ^a	0	13.6	0	13.6 ^a
水田土壤	無	65	1.2 ^a	0	12.7	0	12.7 ^a
	有	90	1.7 ^a	0.3	39.9	0.9	40.8 ^a
畑土壤	無	90	1.3 ^a	0	22.1	0	22.1 ^a
	有	95	1.8 ^a	0.5	39.6	2.2	41.8 ^a
UCソイル+HPX	有	85	1.4 ^a	2.6	57.2	5.7	62.9 ^a
	有	95	1.4 ^a	2.3	45.1	9.0	54.1 ^a

1) Tukeyの検定により5%レベルで異文字間には有意差がある。

2) UCソイル+HPXはハイボネックス(N:P:K=5-10-5)の500倍液。

3) 園芸培土(N=200, P=700, K=100mg/l)は市販品。
水田土壤は福岡県田主丸町内、畠土壤は当分場のカキば場より採取。

ホルモン組成の検討を行い、その結果を第3表に示した。NAA添加は無添加区とシュート数及び長さに差がなく、効果は認められなかった。一方、BA添加によるシュート形成への影響は大きく、培地中のBA濃度が高いほどシュートの総数や長さが増加した。また、長さが10mm以上のシュートの数はNAA無添加のBA0.3ppm区で2.6本と最も多かったが、個体差が大きく処理区間に有意差は認められなかった。最大シュート長はBA濃度が0, 0.1, 0.3ppm区では約20mmで有意差は認められなかったが、BA1.0ppm区では短かった。

以上のことから、継代培養している多芽体から多くの挿し木用シュートを効率的に得るには、NAAを添加せず、BA0.3ppmを添加したMT培地が適していると判断された。

3 挿し木用土の種類と発根

1) 挿し木用土の検討

挿し木後の発根が優れた低コストで実用性の高い挿し木用土を探索するため、ロックウールを用いる堀江ら⁴⁾の方法と一般に用いられている各種用土を用いた場合の発根状況を第4表に示した。発根率は全ての区で100%と高く、用土の違いによる差は認められなかった。また、一次根数は1.6~2.1本の範囲で、処理区間に有意な差は認められなかった。総根長はUCソイルミックス区とロックウール区で長く、一般の挿し木用土の細粒川砂区、バーミキュライト区、パーライト区では最も長いUCソイルミックス区の約半分の長さであった。

ロックウールは多孔質であるため他の用土と比べて酸素が充分に供給され、シュートの切り口の細胞分裂が促進されて発根数が多くなったと推察される。一般に用いられている挿し木用土のバーミキュライトやパーライトはロックウールと同様に多孔質であるが、一次根数はロックウール区とほぼ同数であったものの根長が短かった。これは、用土に肥料成分が含まれていないため、発根後の根の伸長が悪くかった。一方、UCソイルミックス単用区では土質が緻密であり、酸素供給が不十分なため発根数は最も少かったものの、用土に添加するマグネ

シウムなどの微量元素が根の伸長を促したと推察された。

これらのことから、組織培養で増殖した‘ヒリュウ’の実用的な挿し木用土は、多孔質で肥料成分を含み、安価で調整の手間がかからないものを検討する必要があると考えられた。

2) 実用に適した用土の検討

組織培養で増殖した‘ヒリュウ’のシートを用いた挿し穂の発根数が多く、根の伸長が優れ、安価で入手できる挿し木用土の種類と滅菌処理が発根に及ぼす影響について検討した結果を第5表に示した。発根率は用土の種類で異なり、UCソイルミックス区と滅菌処理した畑土壤区で95%と最も高かった。市販の園芸培土では、発根率は滅菌処理の有無にかかわらず65%以下で供試した用土の中では最も低くかった。また、園芸培土は水に浸漬すると、フェノール物質と思われる褐色の液体が浸出したことから、この物質が発根と根の生育を阻害したのではないかと考えられた。水田土壤の発根率は滅菌処理しない区が65%で雑草や苔が繁茂したが、滅菌処理区では90%と高く雑草等は発生しなかった。一方、畑土壤では滅菌処理の有無にかかわらず発根率は高かったが、滅菌しない区では雑草等の繁茂がみられたことから、水田や畑の土壤を挿し木用土として用いる場合には滅菌処理が必要である。

発根数は、UCソイルミックス区でハイポネックス液肥による加湿の有無にかかわらず1.4本、滅菌処理した水田土壤と畑土壤ではそれぞれ1.7本、1.8本と多い傾向がみられたが有意差は認められなかった。総根長はUCソイルミックスをハイポネックス液肥で加湿した区が最も長く、次いでUCソイルミックス単用区、滅菌処理した水田土壤と畑土壤区の順に短くなった。しかし、これらの4区間では有意差が無いことから、組織培養で増殖した‘ヒリュウ’の挿し木の用土として水田土壤と畑土壤は実用的に有効と考えられる。

ハウス内でUCソイルミックスと畑土壤に挿し木した‘ヒリュウ’の発根後の生育経過を第6表に示した。挿し木後約100日時点に新梢伸長が認められた個体は、UCソイルミックス区で76.7%、畑土壤区で74.6%、枯死率はそれぞれ3.3%と3.7%で、処理間に差は認められなかった。

これらのことから、施肥等の調整が不要な水田土壤や畑土壤を滅菌処理した用土は、‘ヒリュウ’の組織培養で増殖したシートの安価で実用的な挿し木用土と判断された。

また、UCソイルミックスをハイポネックスで加湿した区では、挿し木後わずか18日目で3.3mmのシートの伸長が認められたことから、挿し木後できるだけ早い時期に接ぎ木が可能な大きさの台木に生育させるためには、挿し木直後の施肥が必要であり、今後発根後における施肥体系の検討が必要と考えられる。

引用文献

- DANOS, E., PLATA, M. I., GAGLIANO, E. E. and A. I. MAYDANA (1994) Vegetative Propagation

第6表 ハウス内挿し床における組織培養
‘ヒリュウ’挿し木苗の生育

用土	新梢伸長		生存		枯死		合計
	個体数	率(%)	個体数	率(%)	個体数	率(%)	
UCソイルミックス	918	76.7	239	20.0	39	3.3	1,196 100.0
畑土壤	912	74.6	265	21.7	45	3.7	1,222 100.0

1) Z: 生存しているが新梢の伸長が認められない個体。

2) 施肥はハイポネックス(5-10-5)の500倍液を各区3L。

- of Citrus Rootstock and Scion Cultivars by Rooting of Stem Cuttings. International Society of Citriculture : 321 - 322.
- HARADA, H. and Y. MURAI (1996) Clonal Propagation of Poncirus trifoliata through Culture of Shoot Primodia. J. Hort. Sci. **71** (6) : 887 - 892.
 - HIRAI, M., I. KOZAKI and I. KAJIURA (1986) The Rate of Inbreeding of Trifoliata Orange and Some Characteristics of the Inbred Seedling. Japan. J. Breeding. **36** : 138 - 146.
 - 堀江裕一郎・鶴丈和・草野成夫 (1996) 組織培養カラタチの発根法とカンキツ台木への利用. 福岡農総試研報 **15** : 64 - 67.
 - 堀江裕一郎・松本和紀・原実・大庭義材 (2000) 高うねマルチ栽培における‘ヒリュウ’台カンキツ3品種の生育、収量および果実品質. 福岡農総試研報 **19** : 94 - 97.
 - 河瀬憲次 (1995) わい性台木ヒリュウの利用と栽培. 果樹台木の特性と利用 : 148 - 152.
 - LYRENE, P.M.(1981) Juvenility and Production of Fast-rooting Cuttings from Blueberry Shoot Cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **106** : 396 - 398.
 - MURASHIGE, T. and D. P. H. TUCKER (1969) Growth Factor Requirements of Citrus Tissue Culture. Proc. Ist. Int. Citrus Symp, 1155 - 1161.
 - 佐々木篤 (1986) 鉢育苗及び鉢植樹によるカンキツウイルス無病樹の品種特性短期評価法試験 第1報 培養土、植木鉢、鉢替え方法の検討. 広島果試研報 **11** : 9 - 21.
 - 高原利雄・緒方達志・河瀬憲次・岩垣功・村松昇・小野祐幸・吉永勝一・広瀬和栄・山田淋雄・高辻豊二・内田誠 (1994) 大谷伊予柑の生育と果実品質に及ぼす各種台木の影響. 果樹試報 **26** : 39 - 60.
 - TAO, R., J. ITO and A. SUGIURA (1994) Comparison of Growth and Rooting Characteristics of Micropropagated Adult Plants and Juvenile Seedlings of Persimmon (*Diospyros kaki* L.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. **63** : 537 - 541.
 - 若菜章・一色司郎・白石真一・花田信章・安河内幸一 (1990) ヒリュウに出現する極矮性実生の起源と特性. 園学雑. **59**(別2) : 12 - 13.
 - 吉田俊雄・牧田洋子 (1993) カラタチ‘飛龍’の自家受粉により得られた実生の遺伝的変異・園学雑. **62**(別1) : 556