

9 7 2 2 耐塩性カンキツ台木の育種と早期評価のためのセラミック灌水装置の開発

助成研究者：仁藤 伸昌 (佐賀大学 農学部)

共同研究者：小島 孝之 (佐賀大学 農学部)

アジア地域で安定したカンキツ栽培を行うには、台木の利用は必須である。佐賀大学ではカンキツ類の遺伝資源を収集・保存し、耐塩性台木育成のための基礎研究を行っている。本研究では耐塩性台木の育成に関して次の3課題の研究を行った。

1. ミカン亜科植物の耐塩性に関する研究

材料には、熱帯雨林原産の *Glycosmis pentaphylla* と *Murraya koenigii* およびオーストラリア中央部原産の *Eremocitrus glauca* の葉切片から誘導したカルスを用いた。NaCl 0, 0.01, 0.1, 1.0 および 2.0% を添加した培地でカルスを培養し、成長を調査した。

供試した材料間で NaCl 濃度に対する反応に差が見られた。*G. pentaphylla* のカルスは 0.01% の NaCl 添加により成長が促進されたが、それ以上の濃度では抑制された。*M. koenigii* では低濃度の NaCl によりカルス成長が抑制され、1.0% 以上の濃度では成長は極度に抑制された。*E. glauca* は NaCl に対する耐性が強く、高濃度の NaCl の添加では成長は抑制されたものの、他の2種より成長率は高かった。NaCl はカルスの成長だけではなく、形態形成にも影響を及ぼした。*M. koenigii* のカルスは、NaCl 無添加の培地では淡緑色で成長したカルスが 0.1% 以上の NaCl では白色で増殖するようになった。NaCl を 0.01% 添加した培地では胚の形成が見られた。NaCl がカルスからの胚発生を誘導することが明らかになった。

また、*Eremocitrus glauca* のカルスを用いて、CaCl₂ 0.1% を基本とし、NaCl 1.0 および 2.0% を添加した培地でカルスを培養したところ、2.0% の高濃度でもカルスの成長を維持することができた。Ca²⁺ が耐塩性に対し NaCl と相乗効果があることを明らかにした。

2. *Eremocitrus glauca* のプロトプラストからの胚発生と植物体再生

オーストラリア原産で、典型的な乾生植物(xerophyte)であると同時に -24℃ の低温にも耐え、塩類集積土壌やホウ素欠乏土壌での生存が可能である *E. glauca* において、成功率は低かったが、プロトプラストから植物体再生までの系を確立することができた。培地の組成の検討や培養条件の改善によって効率の向上が可能である。細胞融合による新しい植物体作出の可能性が高まった。

3. 多孔質セラミックパイプ地下給液栽培システムの開発

多孔質セラミックパイプを給液資材とした栽培システムを試作し、塩類土壌におけるホウレンソウの栽培試験を行った。その結果、本システムでは塩類土壌においても植物栽培が可能となることが示唆された。

9722 耐塩性カンキツ台木の育種と早期評価のためのセラミック灌水装置の開発

助成研究者：仁藤 伸昌 (佐賀大学 農学部)

共同研究者：小島 孝之 (佐賀大学 農学部)

1. 研究目的

アジア地域ではカンキツは重要な栄養源のひとつであるが、栽培形態は極めて粗放で、栽培されている品種は取り木により繁殖した自根樹である。カンキツ栽培において安定した良品質生産を維持するためには台木の利用は必須である。しかし、台木の育種は、時間がかかること、育成のために広大な圃場が必要なこと、適当な遺伝資源がないなどの理由により非常に遅れている。

アジア地域に適したカンキツの台木育種の大きな目標のひとつに耐塩性がある。佐賀大学では22属53種のカンキツ類の遺伝資源を収集・保存し、育種のための基礎研究を行っている。既に人工交配や細胞融合により種間雑種や属間雑種を作り、台木としての評価を行っている。また、塩類集積土壌地域が原生と思われるミカン亜科植物に関しても育種素材としての利用の可能性の検討を進め、将来は細胞融合や体細胞変異による育種を目指している。そのための基礎的研究として単細胞からの植物体再生能の増進について研究を進めている。

育成された植物体の台木としての評価のひとつに耐塩性を加えることが必要であるが、効率的な栽培システムの開発は不十分である。本学では、多孔質セラミックパイプを用いて塩類土壌での灌漑システムの開発と実証の研究を進めている。このシステムを用いれば、高濃度の塩類集積土壌であってもごく少量の水を供給することで作物を栽培できる可能性がある。

本研究においてはミカン亜科植物の単細胞からの植物体再生の増進方法の調査およびセラミックパイプによる塩類集積土壌の植物栽培装置の開発に関する基礎研究を行った。

1. ミカン亜科植物の耐塩性に関する研究

緒言

ミカン亜科植物は、東アジアを中心に熱帯雨林からオーストラリア中北部の乾燥地帯にまで広く分布している。果実として経済的に流通されている属は、カンキツ属とキンカン属に限られているが、他の属の植物は現地での生活に密着し、香辛料、薬用、材木、家畜

飼料, 森林再生素材, その他家事などに広く利用されている。これらの植物材料は将来的にはカンキツ育種の素材としての利用の期待がもたれている。本研究では, カルスを用いて塩類耐性と耐塩性台木育種のための基礎資料を得るために細胞レベルでの調査を行った。

材料および方法

材料には, 熱帯雨林原産の *Glycosmis pentaphylla* と *Murraya koenigii* およびオーストラリア中央部原産の *Eremocitrus glauca* のカルスを用いた。カルスは成熟した葉切片から誘導し, Murashige and Tucker (1969) (MT)培地にシヨ糖 50g/l と寒天 1g/l を添加した培地で1ヶ月間隔で継代培養し維持した。

NaCl 濃度がカルスの成長に及ぼす影響を調査するために MT+シヨ糖 50g/l+ジェルライト 0.25g/l に NaCl 0, 0.01, 0.1, 1.0 および 2.0% を添加した培地でカルスを4週間培養した。また, *Eremocitrus glauca* のカルスを用いて, Ca^{2+} と高濃度の NaCl がカルスの成長に及ぼす影響を調査した。MT+シヨ糖 5g/l+ジェルライト 0.25g/l+ CaCl_2 0.1% に NaCl 1.0 および 2.0% を添加した培地でカルスを4週間培養した。培地の pH は 5.7 とした。

カルスは1週間間隔で同一組成の新しい培地に移植した。培養条件は, 光強度がシャーレ上面で $52.9 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16時間明期, 8時間暗期とし, 温度は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。

結果および考察

供試した材料間で NaCl 濃度に対する反応に差が見られた(Fig.1)。 *G. pentaphylla* のカルスは 0.01% の NaCl 添加により成長が促進され, 0.1% では無添加に対し, 86.3% の成長がみられた。しかし, 1.0% と 2.0% の添加では, それぞれ 54.9% と 49.2% の成長であった。 *M. koenigii* では低濃度の NaCl 添加によりカルス成長に抑制が見られ, 1.0% 以上の濃度では成長は極度に抑制された。 *E. glauca* は NaCl に対する耐性が強く, 高濃度の NaCl の添加により成長は抑制されたものの, 他の2種より成長率は高かった。原産地の環境を反映しているものと思われる。

NaCl はカルスの成長だけでなく, カルスの形態形成にも影響を及ぼした。 *M. koenigii* のカルスは特徴的な成長を示し, NaCl 無添加の培地では淡黄色から淡緑色で成長していたカルスが培地の NaCl 濃度が 0.1% 以上になると白色で増殖するようになった。NaCl を 0.01% 添加した培地では胚の形成が見られた。NaCl がカルスからの胚発生を誘導することが明らかになった。本研究によって得られた知見をもとに‘吉田’ネーブルオレンジのカルスを NaCl を添加した培地で培養したところ, 14.1% の高い胚発生率が得られた。

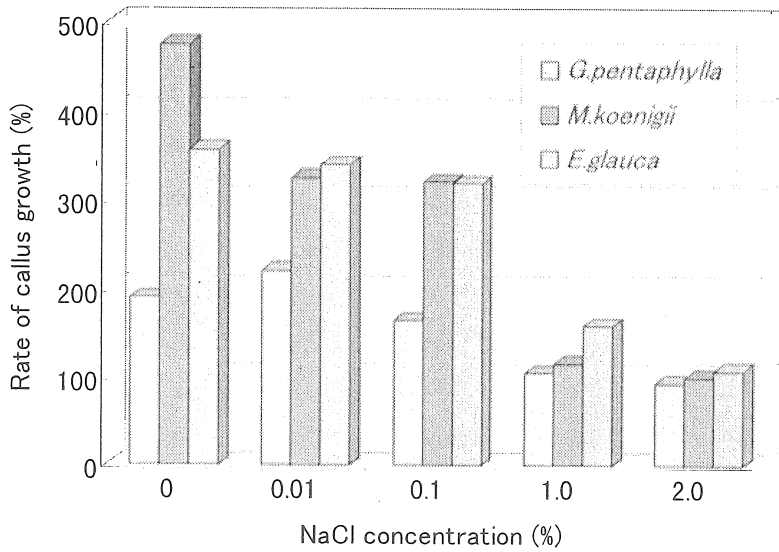


Fig.1. Effect of NaCl concentration on the callus growth of orange subfamily plants.

E. glauca のカルスを CaCl_2 と NaCl を含む培地で培養したところ、1.0%添加では影響は見られなかったが、2.0%の高濃度ではカルスの褐変を抑制し、成長を維持することができた(Fig. 2)。 Ca^{2+} が耐塩性に対し NaCl と相乗効果があることを明らかにした。

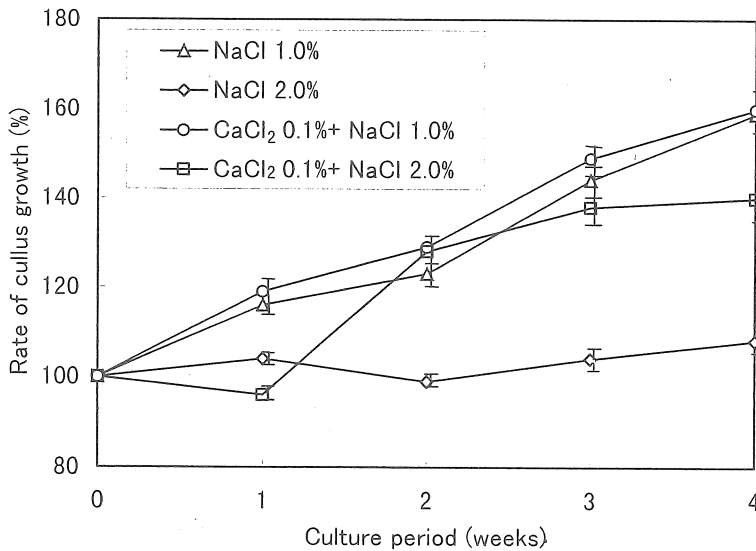


Fig. 2. Effects of CaCl_2 on the callus growth of *Eremocirus glauca* cultured in the high concentration of NaCl.

2. *Eremocitrus glauca* のプロトプラストからの胚発生と植物体再生

緒言

Eremocitrus glauca はオーストラリア原産で、典型的な乾生植物(xerophyte)であると同時に -24°C の低温にも耐え、塩類集積土壌やホウ素欠乏土壌での生存が可能である。*E. glauca* は、真正カンキツ類に属しカンキツ類との交配親和性も証明され、台木育種の素材として期待できる。近年カンキツ育種においては細胞融合による体細胞雑種の育成がひとつの手法として用いられるようになってきた。細胞融合を用いるためには単細胞あるいはプロトプラストからの植物体再生の系を確立することが必要である。本種はさし木による発根が困難であり、接ぎ木の活着のカルス形成も弱い特徴があるので、プロトプラストからの植物体再生の系の確立の検討は有意義なものである。

材料および方法

1) カルス誘導

E. glauca の展開葉を 2-4mm 角に細切し、MT+ショ糖 50g/l+ジェルライト 2.5g/l を基本培地とし、2,4-D 0.0, 0.01, 0.1 および 1.0mg/l と Malt extract 0.0, 300, 600 および 900mg/l を組み合わせた培地に置床した。30 日間隔で同一組成の新しい培地に移植した。培地の pH は 5.7 とし、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光強度は $35.3\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、16 時間明期とした。

2) プロトプラスト単離

プロトプラスト単離に先立ち約 1g のカルスを MT+乳糖 50mg/l の液体培地に移植し、 25°C 、 $17.7\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件下で 6 日間 120rpm で振とう培養した。酵素液の組成は、0.4% macerozyme R-10 (ヤクルト)、0.2% cellulase Onozuka (ヤクルト) および 0.1% driselase (協和発酵) であり、浸透圧調整には 0.7M ソルビトールを用いた。25rpm の振とうで 14 時間の酵素処理後、MT 基本培地で洗浄し、プロトプラストを回収した。

3) プロトプラスト培養

プロトプラスト数を $3\text{-}4\times 10^4/\text{ml}$ に調整し、MT+ソルビトール 0.6M+ジェルライト 0.1% の培地にアデニン 0.0, 10.0, 20.0, 30.0mg/l および 40.0 と Malt extract 0, 400, 600 および 800mg/l を添加した培地で培養した。最初の 40 日間は 25°C 暗黒下で、その後は $35.3\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、16 時間日長で培養した。細胞分裂を開始しコロニーを形成した割合を調査した。細胞壁の再生は Calcofluor 染色により、細胞の生存は、FDA 染色で確認した。

4) 胚の誘導と発達

プロトプラストから再生したカルスを選び出し、MT+ショ糖 50g/l+ジェルライト 2.5g/lに移植した。30日間隔で3回継代培養を行った後、MT+乳糖 50g/l+ジェルライト 2.5g/lの培地に移植し、胚の誘導を促進した。30日間培養し、再度MT+ショ糖 50g/l+ジェルライト 2.5g/lを基本培地にし、ベンジルアデニン 0.0, 0.01, 0.1, 1.0 および 10.0mg/lとGA₃ 0.0, 0.01, 0.1, 1.0 および 10.0mg/lを添加した培地で培養し、胚の形成を調査した。

5) 胚からの植物体再生

球状の胚様体をGA₃ 0.0, 0.01, 0.1, 1.0 および 10.0mg/lとカイネチン 0.0, 0.01, 0.1 および 1.0mg/lを組み合わせ添加した培地に移植した。基本培地はMT+ショ糖 50g/l+ジェルライト 2.5g/lとした。

結果および考察

葉片からの最も高いカルス誘導率は、0.1mg/l 2,4-Dと600mg/l Malt extractの培地で得られた(Table 1)。

Table 1. Effects of 2,4-D and malt extract on percentage of callus formation of *Eremocitrus glauca*.

2,4-D (mg/l)	Malt Extract (mg/l)			
	0.0	300	600	900
0.0	16.7a ^z	18.3a	18.3a	21.7a
0.01	21.7ab	25.0ab	35.0ab	26.7a
0.0	30.0b	36.7b	50.0c	36.7b
1.0	23.3ab	33.3b	23.3a	18.3a

^z: Means within a column followed by the same letter are not significantly different at P=0.05. Among concentrations of malt extract are not significantly different at P=0.05.

Table 2. Effects of adenine and malt extract on percentage on plating efficiency of *Eremocitrus glauca* protoplasts.

Adenine (mg/l)	Malt Extract (mg/l)			
	0	400	600	800
0.0	17.9a ^z	23.7a	24.9a	24.1a
10.0	24.1b	28.6b	29.6b	30.5b
20.0	25.0	29.2b	29.0b	28.3b
30.0	31.8c	34.0c	36.0c	31.2b
40.0	15.3a	27.6b	28.2b	21.7a

^z: Means within a column followed by the same letter are not significantly different at P=0.05. Among concentrations of malt extract are not significantly different at P=0.05.

カルス 1g からは約 10^6 個のプロトプラストが単離でき、直径は 20-30 μ m、生存率は 85%であった。培養 5 日後から細胞壁の再生が見られ、最初の細胞分裂は 13 日後であった。30 - 40 日後には肉眼で観察できるまでのコロニーになり、カルス塊に成長した。コロニー形成に効果的な培地組成は、30mg/l アデニンと 600mg/l Malt extract の組合せであった (Table 2)。

カルスをさらに成長させ、乳糖添加の培地で胚発生を誘導した。カルスは compact になり、緑色の胚様体が形成された。動物性の糖がカンキツ類カルスの胚発生の引き金になることは興味深いことであるが、その機構はまだ明らかにされていない。誘導された胚

様体が胚に発達するためにはショ糖添加の培地に 0.01mg/l BA と 0.1mg/l GA₃ を添加した培地が効果的であった (Table 3)。

胚から完全な幼植物体に成長させるためには GA₃ とカイネチンの組合せが効果的であった (Table 4)。

Eremocitrus glauca において、プロトプラストから植物体再生までの系を確立することができたが、成功率は低かった。本植物は他のミカン亜科植物種に比べ、成長速度が遅く、挿し木の不定根形成率も極めて低く、接ぎ木の際のカルス形成力も弱い。培地の組成の検討や培養条件の改善によって効率を高める可能性は期待できそうである。一連の系を確立したことにより、細胞融合の可能性が高まった。

Table 3. Effects of BA and GA₃ on percentage of development of protoplast-derived embryo of *E. glauca*.

BA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)				
	0.0	0.01	0.1	1.0	10.0
0.0	23.3a ^z	23.3a	30.0a	23.3a	13.3a
0.01	33.3ab	73.3b	80.0b	50.0b	20.0b
0.1	43.0b	76.7b	63.3c	43.0b	20.3b
1.0	36.7b	33.3a	60.0c	43.3b	15.0ab
10.0	5.7c	0.0d	10.0d	3.3c	0.0c

^z: Means within a column followed by the same letter are not significantly different at P=0.05. Among concentrations of GA₃ are not significantly different at P=0.05.

Table 4. Effects of GA₃ and kinetin on percentage of shoot formation from protoplast derived embryo of *E. glauca*.

GA ₃ (mg/l)	Kinetin (mg/l)			
	0.0	0.01	0.1	1.0
0.0	46.2a ^z	46.0a	55.7a	42.0a
0.01	62.3b	48.0a	50.3a	28.0b
0.1	63.7b	60.7b	51.0a	35.6a
1.0	71.2b	88.7c	73.0b	32.0ab
10.0	45.0a	35.0d	27.0c	18.3c

^z: Means within a column followed by the same letter are not significantly different at P=0.05. Among concentrations of kinetin are not significantly different at P=0.05.

3. 多孔質セラミックパイプ地下給液栽培システムの開発

緒言

作物栽培法は、土耕と養液栽培の二つに大別される。土耕の培地となる土壌は、速効性、遅効性、緩効性の養分を保持し、保水力、緩衝力及び微生物の働きなど作物の生育にとって有用な各種の機能を持っている。また、養液栽培では、培養液の成分と濃度を調整することにより作物の生育を制御することが可能である。そこで、本研究では、塩類集積土壌における作物栽培装置の開発を目的とし、多孔質セラミックスを給液資材として採用することで土耕と養液栽培を組み合わせた折中型の栽培システムを試作し、塩類土壌における栽培実証試験を行った。

材料及び方法

本研究で使用した多孔質セラミックスは、長さ 120mm、外径 25mm、孔隙率 40%、気孔径 平均 $10\mu\text{m}$ 、孔径分布が均一のパイプ状のものである（以下、セラミックパイプとする）。セラミックパイプは、パイプ内部が負圧状態の時はパイプ周辺の水をパイプ内部へ吸収し、内部が加圧状態であればパイプから水が放出される。従って、パイプ内部を負圧状態にすれば土中水分の回収による土壌改良に利用することが可能であり、加圧状態にすれば給液資材として利用することが可能となる。Fig. 3に栽培システムの概略図を示した。本システムは、セラミックパイプを土中に埋設した栽培ベッドを設置し、その上部と下部に養液タンクを設け、培養液を上部タンクから下流タンクへ自然流下させて栽培ベッ

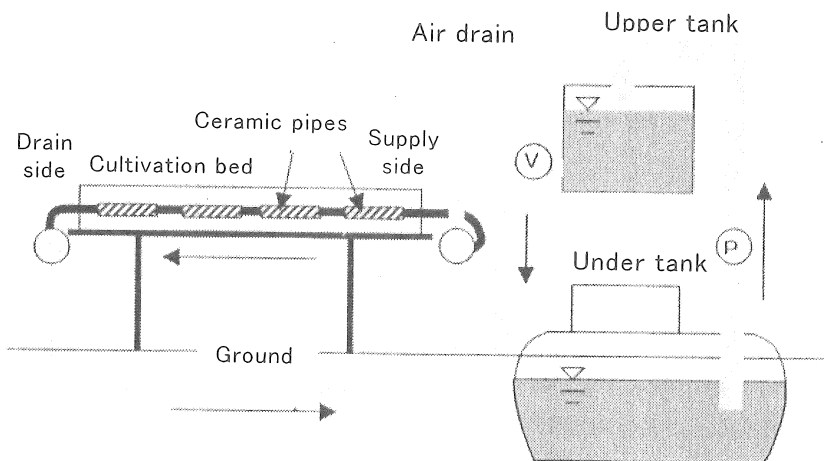


Fig. 3 Cultivation system by porous ceramic

ドに通水する仕組みである。下部タンクに溜まった培養液は、ポンプにより上部タンクへ汲み上げて循環させた。

栽培ベッドの概略図を Fig. 4 に示した。栽培ベッドは、幅 16cm、高さ 13cm、長さ 90cm の箱型の硬質塩ビ製で、栽培ベッド中に、下層培地を 4cm の深さに入れ、その上にビニールチューブで連結したセラミックスを配置し、上層培地を 6cm の厚さで覆土した。ベッドに使用した培地は、下層に有明海干潟より採取した潟土、上層に佐賀県富士町で採取したマサ土（潟土区）を用いた。また、上下層ともにマサ土を用いた試験区を対照区（山土区）として設置し、同時に栽培試験を行った。

土壌に含まれるナトリウムイオン (Na^+) は、キャピラリー・イオンクロマトグラフ (Quanta4000, Waters Co.) を用いて測定した。

供試作物は、ホウレンソウ（品種：メガトン *Spinacia oleracea* L）とし、2回の栽培試験を行った。培養液は、大塚ハウス肥料1号及び2号を3:2の割合（大塚A処方）で調製した。培養液の調整は電気伝導度を基準とし、植物の生育ステージに従って、0.8 mS（生育初期）～2.3 mS（生育後期）の範囲で、徐々に濃度を高くした。

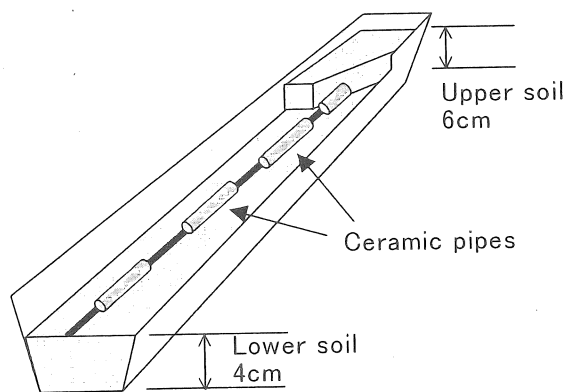


Fig. 4. Cross section of cultivation bed by ceramic pipes.

結果及び考察

栽培開始から約2ヶ月経過後の草丈を比較すると、1回目の栽培においては、潟土区 10.9cm、マサ土区 22.7cm、2回目の栽培においては、潟土区 23.2cm、マサ土区 19.5cm となったが、両試験区における有意差は確認されなかった。1回目の栽培試験において、潟土区の栽培を続けた結果、これから約1ヶ月後に、ホウレンソウの出荷規格（20～25cm）を満たす草丈となった。1回目の栽培において潟土区の生育が遅れた点を除けば、ホウレンソウの生育障害は確認されなかった。

栽培試験開始前における潟土の Na^+ 濃度は 2.95%, マサ土は 0.002% (18.8ppm) であった。潟土区における土壌表面 (地表面から深さ 3 cm) の Na^+ 濃度を測定すると 1 回目の栽培試験終了時は 0.16% であったが, 2 回目終了時には 1.32% となり, 土壌表面に塩の析出が確認された (Figure 5)。このような状態であっても, ホウレンソウの栽培が可能であったことから, セラミック地下給液法を利用した栽培システムでは, 塩分を含む土壌においても植物栽培が可能であることが示唆された。

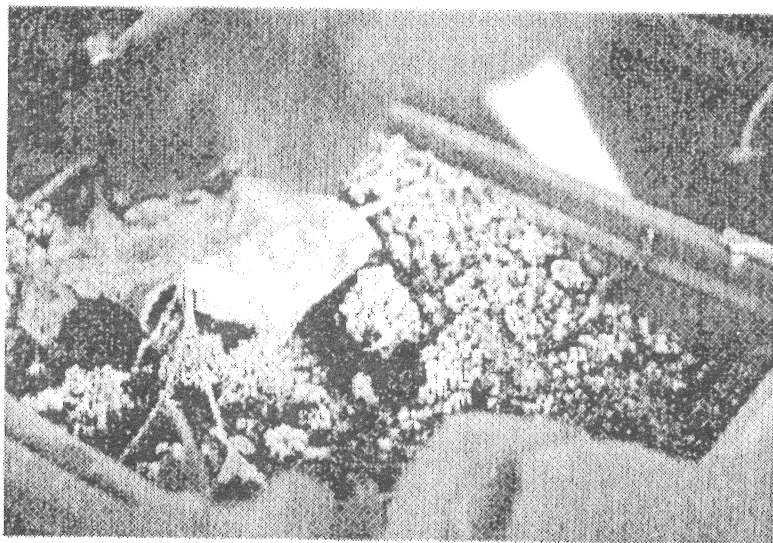


Fig. 5. Picture of salt crystallization on the surface of soil after 2nd cultivation.

Improvement of salt tolerance rootstock of citrus and development of ceramic pipe irrigation system for early evaluation.

Nobumasa NITO and Takayuki KOJIMA
Saga University, Faculty of Agriculture

Summary

The use of rootstock is prerequisite for the stable cultivation of *Citrus* in Asian countries. The basic research on the improvement of citrus rootstock has been carried out using orange subfamily plants maintained at Saga University. The present research consists of following three topics.

1. Salt tolerance of orange subfamily plants.

Calli induced from leaf segment of *Glycosmis pentaphylla*, *Murraya koenigii* and *Eremocitrus glauca* were transferred to the medium containing NaCl at the concentration of 0, 0.01, 0.1, 1.0 and 2.0%. The growth of callus of *M. koenigii* was seriously inhibited by the addition of NaCl. While, callus of *E. glauca* had the trait resistant to NaCl at the concentration of 1.0%. NaCl also involved in the morphogenesis of callus cells. Chlorophyll in the callus at the low concentration of NaCl disappeared on the medium at the high concentration of NaCl. NaCl at 0.01% stimulated the embryo formation. The callus of *E. glauca* could grow at 2.0% NaCl in the medium containing Ca^{2+} ion, indicating the synergistic effects between NaCl and Ca ion.

2. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Eremocitrus glauca*.

A sequence from protoplasts to a plant via somatic embryogenesis was established for *E. glauca*. This efficient protoplast-to-plant system for this species could facilitate the transfer of nucellar cytoplasmic genes from this species into cultivated *Citrus* through protoplast fusion.

3. Development of new cultivation system with under-ground irrigation by porous ceramic pipes.

New cultivation system by porous ceramic pipes as irrigation material was experimented and applied to cultivate spinach (*Spinacia oleracea* L) in saline soil. Consequently, this system accomplished to grow spinach and might be elucidated the possibility of cultivation in saline soil.