

液体窒素中で保存したクワ冬芽の生存

八 鍬 春 美・岡 成 美

(農業生物資源研究所遺伝資源部)

Survival of Mulberry Buds Stored in Liquid Nitrogen

Harumi YAKUWA and Seibi OKA

(Department of Genetic Resources, National Institute of Agrobiological Resources)

1 ま え が き

植物遺伝資源は新しい農業生物資源開発のための不可欠の素材であり、これを長期にわたり安全に保存し、いつでも取出して利用できるようにしておくことは極めて重要である。栄養繁殖性の植物遺伝資源は通常成木の状態で保存されているため、広い圃場面積と多くの管理労力を要する上、病虫害の面でも多くの問題がある。こうした問題を解決するため昭和48年から昭和52年まで5か年にわたり「永年性木本作物の有用生殖質の長期保存と利用に関する研究」が実施された¹⁾。その成果の中で器官と個体の低温保存に関するものでは、ブドウの穂木は $-5^{\circ}\text{C} \sim -3^{\circ}\text{C}$ で5年、生存率11%、ナシの穂木は $-3^{\circ}\text{C} \sim +1^{\circ}\text{C}$ で5年、生存率51%、という結果が得られた。そのほかリンゴ、カンキツ類、チャ、クワ等で同様の試験が行われているが、いずれも保存期間が長くなるに従って生存率が低下する傾向があった。その原因の一つは雑菌の増殖であるが、穂木の貯蔵前に殺菌剤処理を行っても腐敗防止には多くの効果を期待できなかった。そこで器官、組織等の超低温貯蔵法を開発し、効率的な長期安定貯蔵技術の確立を図る必要がある。液体窒素中での木本作物の生存に関し、酒井²⁾はクワの皮層組織やコリヤナギ、ポプラの枝を用いて、これらの植物を超低温で生存させる予備凍結温度は -30°C 前後であることを明らかにしている。また、横山³⁾らはクワ冬芽を用い -30°C まで予備凍結後、液体窒素に15日間置き 0°C の温度で融解処理を行ったところ、さし木及び接木では枯死したが、培養において芽の生存を確認した。著者らは桑品種の保存を行っているが、その超低温による長期保存を目的として、予備凍結条件に関する試験を二、三試みたのでその概要を報告する。

2 試 験 方 法

(1) 試験1 予備凍結後さし木及び分離培養

供試した枝条は1986年1月20日に採取し、基部より25cmの長さの枝条を1区当たり5本ずつ用いた。枝条は厚さ0.03mmのポリエチレンの袋に入れて密封し、表1に示す条件で予備凍結を行った。凍結処理後ポリエチレン袋より取り出した枝条を 35°C の温水中で5分間融解、風乾後 2°C の恒温器で保護した。生死を判定するため各区2芽1節間の枝条

10本ずつを砂ざしするとともに10芽ずつ分離培養を行った。培養には果糖2%、BA/mg/lを含むMS培地を用いた。なお、寒天濃度は0.6%である。

表1 予備凍結条件 (試験1)

項目 區別	温 度 ($^{\circ}\text{C}$)				生死の判定	
	0	-10	-20	-30	挿し木	培 養
1	—	—	—	—	○	◎
2	—	→1日	—	—	○	◎
3	—	—	→1日	—	●	◎
4	—	—	—	→1日	●	◎
5	—	→1日	→1日	—	●	◎
6	—	→1日	→1日	→1日	●	◎

注. 1) 挿し木月日 61.1.27 ~ 30日

2) ●は不発芽, ○は発芽, ◎は生存

表2 予備凍結処理冬芽の挿し木及び培養後の生長

項目 區別	新 梢 長 (cm)	葉 数 (枚)	発根状況		培養後30日			生長度合				シ ユ ー ト 長 均 (cm)
			根 基 (本)	カル ス (本)	汚 染	生 存	枯 死	4	3	2	1	
1	5.6	5.0	1.4	0.1	2	8	0	4	2	1	1	3.1
2	3.4	3.3	0.7	0.8	2	8	0	2	5	0	1	1.8
3	—	—	—	—	0	9	1	1	2	6	0	1.0
4	—	—	—	—	0	5	5	0	0	0	5	0
5	—	—	—	—	0	7	3	2	0	4	1	2.3
6	—	—	—	—	1	9	0	7	1	1	0	1.9

注. 1) 培養開始 61.2.6

2) 培養芽数 各区10芽

(生長度合) 1……生存確認

2……開葉(小)

3……開葉(大)

4……シュート形成

(2) 試験2 予備凍結後液体窒素(-196°C) 処理

供試した枝条は1986年3月5日に採取し、基部より120cmで切断し厚さ0.02mmのポリエチレンの布に包み 2°C で保護した。枝条から冬芽を含む約2cmの枝片を切断し、キャニスターに入れ表3に示す条件で予備凍結を行い、更に液

体窒素処理を行った。凍結処理後の融解は35℃の温水中で20分間とした。生死の判定は各区15芽ずつ冬芽培養法で行った。

表3 予備凍結条件(試験2)

項目 区別	温 度 (℃)				LM2
	0	-10	-20	-30	
1					→1日
2		→1日			→1日
3		→1日	→1日		→1日
4		→1日	→1日	→1日	→1日

表4 LN2処理冬芽の培養後の生長

項目 区別	培養後 30日目			生存度合				シ ユ ー ト 長 均 (cm)	葉 数 (枚)
	汚 染	生 存	枯 死	4	3	2	1		
1	0	0	15	0	0	0	0	0	0
2	0	11	4	1	6	3	1	1.8	4.0
3	1	9	6	4	5	0	0	0.8	3.8
4	3	11	4	4	7	0	0	1.9	6.0

注. 1) 培養開始 61.3.22
2) 培養芽数 各区15芽

3 試験結果及び考察

試験1の結果を表1に示した。さし木では3区以降は不発芽となったが、培養においてはすべての区で生存が認められた。さし木において無処理区と2区ではすべて発芽がみられたが、無処理区の発芽開葉が整一であったのに対して、2区は1～4日遅れの発芽で不整であった。さし木後14日目で解体調査した結果を表2に示したが、平均新梢長

及び葉数のいずれにおいても2区が劣った。培養において2区の0℃より-10℃1日間接触では培養後30日目において枯死がみられなかったが、クワは耐凍性が高いといわれていることから、-10℃1日くらいでは凍害はおきないものと思われる。0℃より直接-20℃、-30℃まで凍結した場合においては、一部細胞内凍結をおこしているものと思われる。第6区のように-30℃まで段階的に下げた場合に生存率100%、シュート形成率78%と最も良好な結果が得られた。

試験2の結果を表4に示した。培養30日後における生存率をみると、1区の0℃から直接液体窒素処理した場合にはすべて枯死したが、ほかの3区では60%～70%の生存率であった。生存した個体の生長度合をみると2区では1芽のシュートがみられたが全般的に生長は不揃いであった。3区と4区ではそれぞれ4芽ずつシュートがみられたが、平均シュート長及び葉数においては4区が優る結果であった。

以上の試験から桑冬芽を枝とともに凍結する方法でも、適当な予備凍結条件を与えることにより、液体窒素処理後冬芽からシュートを再成できることが明らかとなった。しかし、その後試験を反覆すると生存率が極めて低くなる場合もあった。安定した生存率及びシュート再生率を得るには予備凍結の速度あるいは融解速度等について更に検討するとともに、あらかじめ冬芽のみを分離してから凍結に移す方法も実施する必要がある。

引 用 文 献

- 1) 農林水産技術会議事務局. 1980. 永年性木本作物の有用生殖質の長期保存と利用に関する研究. 研究成果 125: 29-59
- 2) 酒井昭. 1963. 超低温における植物の生存. III. 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係. 低温科学 生物編 21: 1-17
- 3) 横山忠治, 岡 成美. 1983. 超低温におけるクワ冬芽の生存. 日蚕雑 52: 363-364.