

## シロクローバにおける茎頂培養と茎頂組織の低温長期保存

山田 敏彦・福岡 壽夫\*

(東北農業試験場・\*九州東海大学)

Shoot Tip Culture and Low Temperature Storage of Shoot Tip in White Clover

Toshihiko YAMADA and Hisao FUKUOKA\*

(Tohoku National Agricultural Experiment Station・\*Kyushu Tokai University)

### 1 は し が き

シロクローバは他殖性植物で、遺伝的にヘテロなため、合成品種の母本や優良な遺伝子型を保存する場合に、種子でなく栄養体で保存する必要がある。これまでは栄養体を圃場及びポットで保存してきたが、モザイク病などの感染により維持が困難になり、有用な遺伝子型の消失がたびたびあった。ウイルスを除去する有効な手法として、茎頂分裂組織を小さく切り取って、寒天培地などで無菌的に培養し、幼植物を育成する方法がある。シロクローバでの茎頂培養法は、これまで Barnett *et al.*<sup>1)</sup>, Cheyne and Dale<sup>3)</sup>により試みられている。

ところで、最近、栄養体の長期保存法として、培養中の組織・幼植物を低温下で保存する *in vitro* 低温保存法が注目されている。この方法の利点として、①多くの遺伝資源を狭いスペースで保存できる、②ウイルス、病原菌、害虫の感染を受けない、③植え継ぎする頻度が少なくなる、④優良遺伝子型の大量増殖が可能になるなどがあげられる。シロクローバでは Bhojwani<sup>2)</sup> が実生由来の 1 mm 程度の茎頂組織を 5℃ の低温下で 10 か月間保存したところ、かなり高い生存率であったと報告している。また、Cheyne and Dale<sup>3)</sup> は予備実験として、6-8 週間の茎頂培養により育成した幼植物を 2-6℃ で 15-18 か月間保存している。

本研究ではシロクローバの茎頂培養法及び茎頂組織の *in vitro* 低温保存法について検討した。

### 2 実 験 方 法

供試材料として圃場及びポットで生育させたシロクローバ(品種名: フィア)のランナーの先端の茎頂を用いた。

#### (1) 茎頂培養法

5 cm 程度の長さで採取したランナーから葉や二次ランナーを取り除き、70% エタノールで 1 分間、更に界面活性剤 Tween20 を数滴含む 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 10 分間、表面殺菌を行った。その後、滅菌水でよく洗い、簡易解剖メスを用いて実体顕微鏡で 0.2-1.0 mm の茎頂組織を摘出した。培地は、MS、B5 及び一部修正した White の培地について比較したほか、培地への植物ホルモンの添加について検討した。培養器は直径 25 mm、長さ 150 mm の試験管を使用した。培地に茎頂組織を置床後、25℃、16 時間日長にセットした恒温器で培養を行った。

#### (2) 茎頂組織の *in vitro* 低温保存法

(1) の方法で摘出した 0.5 mm 程度の茎頂組織を培地に置床し、25℃ で 7 日間培養したのち、3℃ の暗黒条件下で保存した。その後、3 か月ごとに培養器を取り出し、25℃、16 時間日長の恒温器で培養した。1 か月後に生存率の調査を行った。

### 3 結 果 及 び 考 察

#### (1) 茎頂培養法

Barnett *et al.*<sup>1)</sup> は、シロクローバの茎頂培養用培地として、MS を基本培地とし、5% ショ糖を加えた培地が適していると報告している。本研究では 5% ショ糖を含む MS、B5 及び一部修正した White の 3 種類の培地について比較した。培養する茎頂組織の大きさと幼植物再生率には、密接な関係があり、組織が小さくなるに従い、再生率が低下した。0.5 mm 以上の大きさの茎頂組織では 3 種類の培地のいずれにおいても 50% 以上の再生率を示した。しか

表 1 シロクローバの茎頂培養用培地組成

	(mg/l)	
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	720	し、MS や B5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	培地では一部の
KCl	65	幼植物が途中で
KNO <sub>3</sub>	80	肥料焼けを起こ
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	300	したことから、シ
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16.5	ロクローバの場
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27.8	合、無機塩類濃
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3	度の低い White
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	22.3	の培地の方が適
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	8.6	していると思わ
KI	0.83	れた。一般には
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6.2	0.2-0.3 mm 程度
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.025	の茎頂組織を培
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.025	養すれば、ほぼす
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.25	べてのウイルスを
ミオイノシトール	100	除去することが
ニコチン酸	0.5	できるといわれ
塩酸ピリドキシン	0.5	ている <sup>4)</sup> 。一部
塩酸チアミン	0.1	修正した White
グリシン	2	の培地にインド
ショ糖	50,000	ール-3-酢酸
IAA	0.1	(IAA) を 0.1
寒天 (Bacto)	8,000	mg/l 添加するこ

とにより、0.2~0.3 mm 程度の極小茎頂組織からも 50% 以上の幼植物を再生することができた。その培地組成は表 1 のとおりである。

(2) 茎頂組織の *in vitro* 低温保存法

表 1 に示した培地上で培養中の茎頂を 3℃ の低温下で一定期間保存したのちに、25℃ で培養を行った。1 か月後に生存率を調査したところ、茎頂は高い生存率を示し(表 2)、幼植物を再生させることができた(写真 1)。この結果、*in vitro* 低温保存により、茎頂組織を高い生存率で、少なくとも 1 年間は保存できることが明らかになった。

表 2 低温保存後の茎頂の生存率

保存期間	供試個体数	生存個体数
3 カ月	10	9
6 カ月	10	9
9 カ月	10	9
12 カ月	10	9

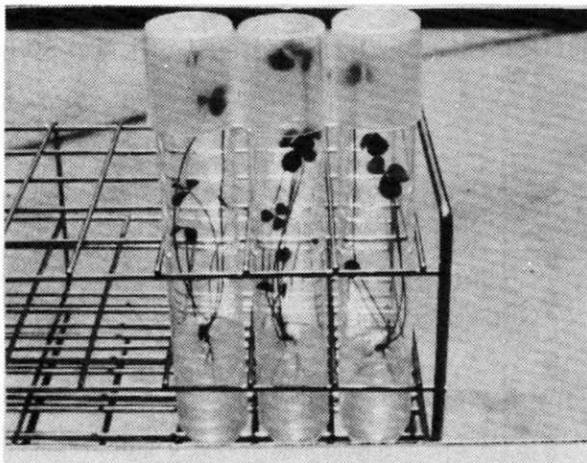


写真 1 茎頂を 3℃ の低温で 1 年間保存した後、25℃ で培養して再生させた幼植物

今後、*in vitro* 低温保存法により組織をどの程度の期間保存できるかについて検討する必要がある。更に、より長期に及ぶ栄養体の遺伝資源の保存を考える上で、液体窒素を利用した超低温(-196℃)での保存法を確立することが必要となろう。

4 要 約

(1) シロクローバの茎頂培養用培地としては、一部修正した White の培地に、5% ショ糖、0.1 mg/l IAA を添加したものが適し、0.2-0.3 mm 程度の茎頂組織から効率的に幼植物を再生させることができた。

(2) 培地に置床した茎頂組織を 3℃ の低温条件下で 1 年間保存したのちに、25℃ で培養したところ、茎頂組織は高い生存率を示し、幼植物を再生させることができた。

引 用 文 献

- 1) Barnett, O.W. ; Gibson, P.B. ; Seo, A. 1975. A comparison of heat treatment, cold treatment and meristem tip-culture for obtained virus-free plants of *Trifolium repens*. Plant Dis. Rep. 59 : 834-837.
- 2) Bhojwani, S.S. 1981. A tissue culture method for propagation and low temperature storage of *Trifolium repens* genotypes. Phy-siol. Plant. 52 : 187-190.
- 3) Cheyne, V.A. ; Dale, P.J. 1980. Shoot tip culture in forage legumes. Plant Sci. Lett. 19 : 303-309.
- 4) 森 寛一. 1979. 茎頂組織培養(原田 宏・駒嶺穆編, 植物細胞組織培養). 理工学社. p.119-160.