

クワ培養シュートの低温保存

岡 成美・八鍬 春美

(農業生物資源研究所遺伝資源第二部)

Preservation of Mulberry Shoots Cultured *In Vitro* at Low Temperatures

Seibi OKA and Harumi YAKUWA

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

1 はじめに

多くの植物で種苗の増殖に組織培養を利用するための研究が行われるようになった。通常はシュートの増殖率をいかに高めるかが重要で、そのための最適培養条件を確立することが研究課題となるが、むしろシュートの生長速度をできるだけ抑えることが要求される場面も考えられる。例えば、種苗の増殖においては、親株を維持しながら子株を増やすという方法がとられるが、培地の準備、移植作業労力の配分などの事情から、一時的に継代期間を延長せざるを得ないことも起こり得る。こうした場合、シュートの継代適期を逃すとその後の生長に悪影響がでることがあるので、シュートの生長を抑制して、最適条件で継代作業を行えるようにすることは有用な方策である。

また、遺伝資源の保存のために、試験管の中で組織、器官を保存することも試みられるようになってきた。それには、できるだけ組織の生長を抑えて遺伝的変異の発生頻度を低め、同時に継代の手間を省くことが要求される。

培養組織の生長を抑制する最も簡便な方法は、培養温度を下げることである。そこで、クワの培養シュートを低温条件下で保存する試験を行った。

2 材料及び方法

(1) 供試品種 剣持

(2) 材料の養成

MS + 1 mg/lBA + 2.5% しょ糖 + 0.8% 寒天培地を用い、25℃ (16L/8D) で4~6週間ごとに継代したシュートから保存材料を採取した。

(3) 保存培地

100mlのフラスコに寒天培地 (30ml) 又は液体培地 (5ml) を入れ、すべてアルミフイルで封をした。

(4) 保存条件

1) 種々の温度におけるシュートの保存

MS + 1 mg/lBA + 2.5% しょ糖 + 0.8% 寒天培地に、シュート先端部から採取した幼葉を含む茎頂 (長さ 8-10mm) を1フラスコ当たり10本植え、0℃ (24D) ; 5℃ (24D) ; 5℃ (8L/16D) ; 10℃ (16L/8D) ; 25℃ (16L/8D) の各温度及び光条件下に置いた。光強度は3,500~4,000lx (25℃) ; 1,000~1,500lx (10℃) ; 1,200lx (5℃) であった。16, 32, 48, 64週後に、材料を新鮮な

MS + 1 mg/lBA + 2.5% しょ糖 + 0.8% 寒天培地に移植し、25℃ (16L/8D) で培養した。4週後、葉の形態、色調の正常なシュートが再生した個体を調査し、シュート再生率を求めた。

2) 材料の採取部位及び保存培地の形態

長さ 2~3mmの茎頂及び2~3mmの節間を含む側芽を材料とした。保存培地として、MS + 1 mg/lBA + 2.5% しょ糖 + 0.8% 寒天培地及び同組成の液体培地 (静置) を用い、1フラスコ当たり、30個以上の材料を入れた。5℃ (24D) で保存し、1, 3, 5か月にシュートを取り出し、25℃ (16L/8D) で3週間培養してシュート再生率を求めた。なお、再生培地の寒天濃度は1.6%とした。

3) 材料の採取部位と光条件

2) で用いたのと同じ材料及寒天培地を用い、5℃で24D又は8L/16Dの異なる光条件下で6か月間保存した後、シュートを再生させた。

3 結果及び考察

(1) 種々の温度におけるシュートの保存

1) 保存中のシュートの生長

シュートの生長抑制は10℃以下の温度でみられ、特に0~5℃では保存開始時からほとんど生長しなかった。0℃では16週で既にはほとんどの材料は、先端部が黒変して枯死した。25℃では16週後にはフラスコ一杯にシュートが生長し、その下部の葉がほとんど枯れたが、先端部のみは緑色を呈した。しかし、32週間までにはシュート全体が枯死した。5~10℃では保存中に次第に緑色が失われたが、その程度は10℃で最も著しく、5℃ (24D) で最も退色の早さが遅かった。

保存中に培地の乾燥が問題になる場合があるが、アルミフイルだけを容器のシール材料とした今回の試験では、保存期間内に特別目立つほどの培地量の減少はみられなかった。

2) 保存材料からのシュート再生

5~10℃以下の温度では、再生率は32週でも60%以上を示し、その後64週まで次第に低下した (図1)。この間に5℃ (24D) 区で最もシュート再生率が高く、この区で材料の緑色保持期間が長かったことに対応していた。

(2) 材料の採取部位及び保存培地の形態

保存材料は茎頂の方が側芽よりシュート再生率が高かつ

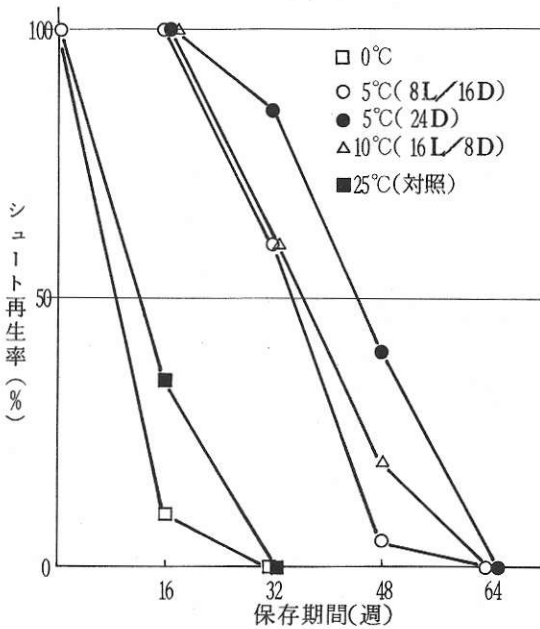


図 1 低温保存後のクワシュートの再生率

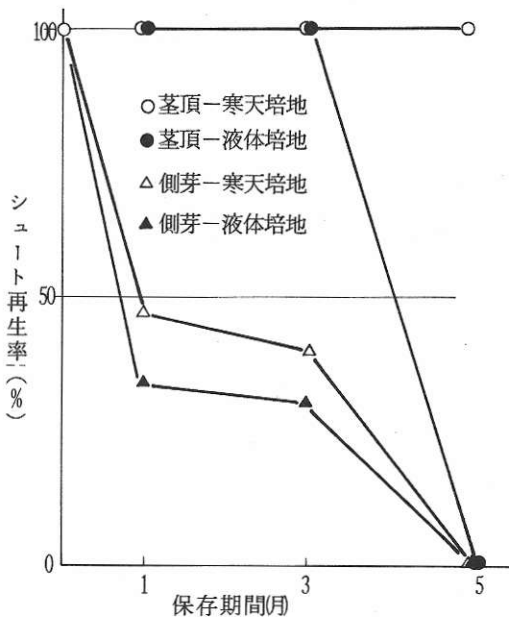


図 2 保存材料の採取部位と培地の種類

た(図2)。これは側芽からはしばしばvitrificationを起した異常なシュート又は葉が形成されたからである。側芽からのシュート形成におけるvitrificationは高濃度寒天の使用により軽減される¹⁾ため、この試験では寒天濃度を1.6%としたが、それでもなお茎頂を用いた方が良い結果が得られた。

培地の形態については、茎頂を材料とした場合3か月の保存期間であれば、液体培地と寒天培地のいずれでも100%のシュート再生率を得た。しかし、液体培地で5か月保存した材料からは、シュートが再生しなかった(図2)。

(3) 材料の採取部位と光条件

茎頂及び側芽のいずれの材料も、24Dで保存した方が8L/16Dで保存するよりも、また側芽よりも茎頂を材料とした方がシュート再生率が高かった(図3)。これらの結果はいずれも(1)、(2)の結果を再確認するものであり、茎頂-寒天-5℃(24D)の組み合わせで、少なくとも半年間は100%クワ培養シュートの保存ができることが分かった。

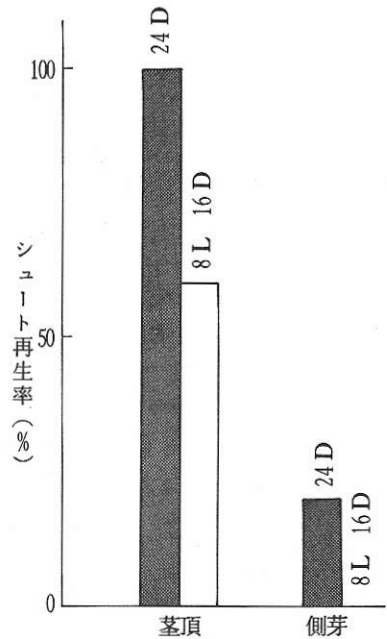


図 3 材料の採取部位と光条件

4 ま と め

クワ培養シュートの低温保存を試みた。0℃ではあまりにも温度が低すぎて早期に枯死したが、5～10℃で32週保存した材料では60%以上の再生率を得た。光条件は8L/16Dより24Dの方が適し、側芽より茎頂の方が高い再生率を示した。以上の結果に基づき、5℃(24D)条件で半年間冷蔵した茎頂から、100%シュートが再生した。3か月以内の短期間であれば保存培地に液体培地を使用することも可能と考えられた。

引用文献

- 1) 岡 成美, 八嶺春美. 1987. 培養クワシュートの増殖における高濃度寒天培地によるvitrificationの防止. 東北蚕糸研究報告 12: 48.