

クワ培養茎頂の凍結保存に関する試験 (予報)

—培地条件と前処理が予備凍結茎頂の生存に及ぼす影響—

新野 孝男・八 鍬 春 美・野 尻 邦 雄・岡 成 美

(農業生物資源研究所遺伝資源第二部)

Cryopreservation of Mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) Shoot Tips
Excised from *in vitro* Shoots (Preliminary report)

—Effect of media condition and prefreezing treatment on survival
and shoot formation of shoot tips after prefreezing—

Takao NIINO, Harumi YAKUWA, Kunio NOJIRI and Seibi OKA

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

1 は じ め に

栄養繁殖作物遺伝資源をより少ない面積で効率的に保存する方法として、「試験管内保存」が注目されている。本試験ではクワ培養茎頂の凍結保存を目的として、予備凍結段階でのより生存率の高い培地条件、凍結前処理、凍結防御剤としての糖の種類を検討した。

2 試 験 方 法

材料は約40日間隔で継代している「剣持」の培養茎頂である。継代培地はMS基本培地に1 mg/ℓ BAとショ糖2.5%を加え、pH5.6に調整したもので寒天濃度は0.8%である。培養は、30mlの培地を入れた100mlの広口培養フラスコで行った。茎頂(先端1~2 mm程度)の凍結はクライオチューブ(2 ml)に凍害防御剤として10% DMSOと糖の溶液をあわせて、0.3mlの液を加えて行った。凍結方法は材料を0℃、-10℃、-20℃、-30℃、(-40℃)の各温度に調節した低温庫内に30分ずつ置いて予備凍結を行った。植氷は-10℃で-40℃に冷やした99%エタノールに浸漬して行った。融解は約37℃の温水中で急速に行い、茎頂を水洗してから上記培地に植付けた。培養条件は25℃、16L-8D、3,000luxで行った。

試験1: -20℃まで冷却した茎頂を、MS基本培地中の硝酸アンモニウム(NH₄NO₃)濃度を規定量の×1, 1/2, 1/4, 1/16, 0とした培地で培養した場合の生存及びシュート形成率を検討した。

試験2: 種々の濃度のショ糖液に茎頂を5℃で一晩浸漬後、各濃度のショ糖に10% DMSOを加えて-20℃、-30℃まで冷却した場合の生存及びシュート形成率を検討した。

試験3: 凍害防御剤として、10% DMSOに加えて果糖、ブドウ糖、ショ糖、ソルビトールの4種の糖類を0.5モル(M)加え、-30℃まで冷却した茎頂の生存及びシュート形成率を検討した。

調査は植付後60日目に行った。

3 試験結果及び考察

MS基本培地中のNH₄NO₃濃度については、表1に示すように、×1濃度では生存率、シュート形成率が低下する傾向があった。×1/2~1/16の濃度では、すべての茎頂が生存しており、シュートの形成率も高かった。一方、NH₄NO₃を全く除いた場合は×1濃度とほぼ同様な成績であった。また、NH₄NO₃がない、あるいは少ない濃度のものほどカルスの形成が多かった。

表1 クワ培養茎頂の予備凍結後の培養における
NH₄NO₃濃度と生存率、シュート形成率

MS培地中の 無機要素NH ₄ NO ₃ の濃度	個体数	生 存 個 体 (生存率)	シュート形成個体 (シュート形成率)
1	10	8 (80%)	2 (20%)
1/2	10	10 (100%)	6 (60%)
1/4	10	10 (100%)	4 (40%)
1/16	10	10 (100%)	6 (60%)
0	10	8 (80%)	3 (30%)

注. 予備凍結温度: -20℃
凍 結 防 御 剤: 10% DMSO
調 査: 植付後60日

予備凍結前に5℃で一晩ショ糖液に浸漬する処理をした場合の結果は、図1(-20℃)、図2(-30℃)に示した。-20、-30℃のいずれの温度でも、ショ糖濃度が0、0.1及び1Mでは生存しなかったが、0.25、0.5、0.75 Mではかなり高い生存率を示し、シュート形成する個体も見られた。

凍害防御剤として10% DMSOとともに各種の糖を加えて、-30℃まで凍結した結果を表2に示した。10% DMSOのみの場合、生存個体は全くみられなかった。糖類を添加した場合、ショ糖は全く効果がなかったが、果糖で70%、ブドウ糖、ソルビトールでは100%の生存率が得られ、更にシュート形成も比較的高い値が示された。

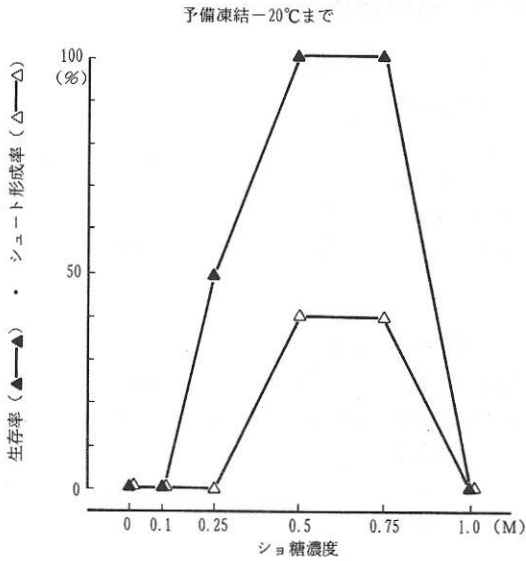


図1 クワ培養茎頂の予備凍結前処理が生存率, シュート形成率に及ぼす影響

注. 前処理は一晩各濃度のシュロ糖液に浸漬

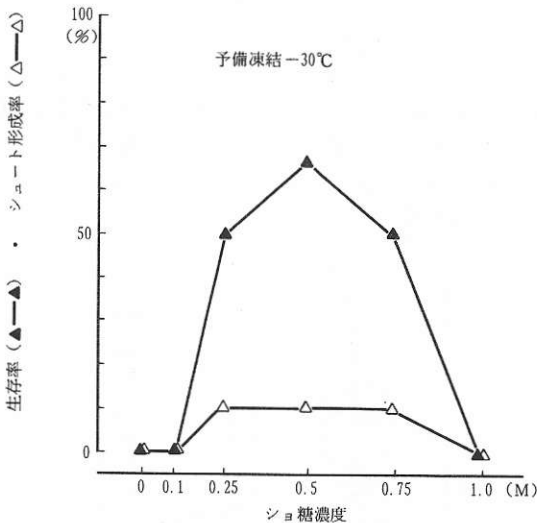


図2 クワ培養茎頂の予備凍結前処理が生存率, シュート形成率に及ぼす影響

注. 前処理は一晩各濃度のシュロ糖液に浸漬

表2 凍害防御剤としての糖の種類が予備凍結したクワ培養茎頂の生存, シュート形成率に及ぼす影響

種 類	個体数	生 存 個 体 (生存率)	シュート形成 (シュート形成率)
果 糖	10	7 (70 %)	3 (30 %)
ブドウ糖	10	10 (100 %)	2 (20 %)
シュクロース	10	0 (0 %)	0 (0 %)
ソルビトール	10	10 (100 %)	3 (30 %)
—	10	0 (0 %)	0 (0 %)

注. 予備凍結温度 -30℃

凍 害 防 御 剤 10% DMSO + 0.5M糖

以上の結果から, 茎頂を0.5M程度の糖類に一晩浸漬した後, 凍害防御剤として10%DMSO+糖類を用いて予備凍結を行い, 融解後の継代培養用MS培地の NH_4NO_3 濃度を $\times 1/2$ 以下にするのがよいことがわかった。

この結果をもとに, 培養茎頂の先端を0.5Mソルビトールに一晩浸漬し, 10%DMSOと0.5Mソルビトールを凍害防御剤として-30℃あるいは-40℃まで予備凍結を行い, 液体窒素に浸漬 (少なくとも1時間以上置いた) 後, 急速融解して, NH_4NO_3 濃度を $1/2$ にした培地で培養した。その結果, 予備凍結温度が-30℃からの場合には生存する個体はみられなかった。しかし, -40℃からでは, 6/123及び1/100の確率で生存する個体がみられた。しかし, シュート形成する個体はほとんどなく, 結果も不安定であった。今後, より安定した生存率, シュート形成率を示す凍結条件をさがす必要が認められた。

4 ま と め

予備凍結段階で, 凍結茎頂の生存率を高めるための検討を行った。

その結果, 茎頂を5℃で0.5Mの糖類 (シュロ糖, ソルビトール) に一晩浸漬すること, 凍害防御剤として10% DMSOと糖類 (ソルビトール, 果糖, ブドウ糖) を併用すること, 融解後の継代培養用MS培地の NH_4NO_3 濃度を $\times 1/2$ 以下にすることが予備凍結した茎頂の生存に一定の効果があることがわかった。