

ニンニク茎頂の超低温保存後の植物体再生

庭田 英子・柳野 利哉・森行 勝也

(青森県畑作園芸試験場)

Growth of Cryopreserved Garlic Shoot Tips

Eiko NIWATA, Toshiya YANAGINO and Katsuya MORIYUKI

(Aomori Field Crops and Horticultural Experiment Station)

1 はじめに

ニンニク (*Allium sativum* L.) は種子ができないため、長期間の種の保存が不可能であった。1992年筆者は、茎頂がガラス化法により高率に超低温保存が可能であることを明らかにし、はじめて長期保存の可能性が見いだされた³⁾。筆者はこのとき液体窒素保存の前処理法としてガラス化法と予備凍結法を比較検討し、植物体再生率において前者が優ることを認めた。今回は、それらの超低温保存個体を試験管外に取り出し、実際の種苗再生を試みたので、ここに報告する。

2 材料及び方法

(1) 試験材料

倉庫内で貯蔵した「福地ホワイト」のリン片から茎頂を、基盤部分0.5mm厚、葉原基3枚程度を付けて(約2mm角)切り出し、実験に供した。

(2) 試験方法

1) 前培養 Murashige-Scoog培地¹⁾ (ショ糖3%, ゲルライト0.2%, pH5.8) を用い、20℃, 12時間照明下で2日間培養した。

2) 凍結保護剤処理から液体窒素への挿入まで

a. ガラス化法; 保護剤としてPVS2⁵⁾ (30% gricerol, 15%, ethylene glycol, 15% DMSO & 0.4M sucrose をMS培地に溶解) に室温で10~20分間浸漬後、液体窒素中に容器毎に挿入し、保存した。

b. 予備凍結法; 保護剤としてショ糖10%+DMSO10%+グリセロール5%に室温で30分間浸漬後、-8℃で植氷、-0.3℃/分で-35℃まで予備凍結^{2) 4)} 後、容器毎に液体窒素中に挿入し、保存した。

3) 回復の方法 液体窒素中に1~2時間静置後に30℃の温湯中で速やかに昇温させ、3%ショ糖溶液を用いて約15分かけてゆっくり保護剤を8~10倍まで希釈した後、MS培地+GA₃0.5mg/ℓに移植した。再生した植物体をガラス室内に移し、パーライトで1か月間順化した後床土で育成した。

対照として、保護剤浸漬も凍結処理もしない区(無処理)と、保護剤浸漬のみで液体窒素に挿入しない区(保護剤処理不凍結)を設けた。

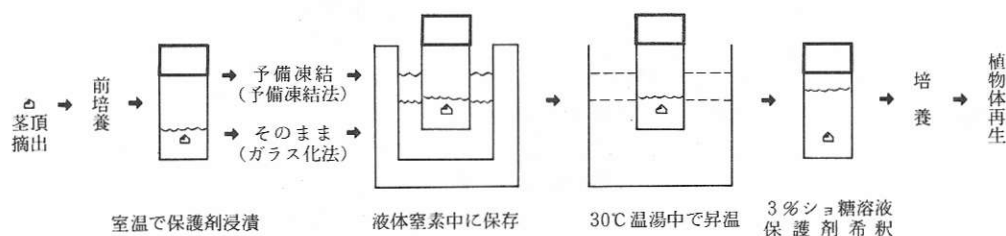


図1 超低温保存のフローチャート

3 結果及び考察

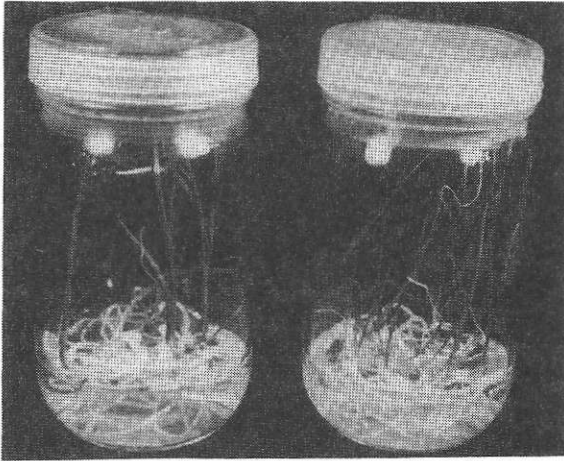
無処理及び保護剤処理不凍結の茎頂はすべてが正常に生長し、保護剤による生育への影響は認められなかった。また、凍結前処理方法に関係なく、液体窒素保存後の生存率は100%であった。しかし、植物体の獲得率は前処理によって大きく異なり、ガラス化法では試験管内及び順化後の個体獲得率が100%であったのに対し、予備凍結法による個体のそれは、それぞれ、58.3%, 33.3%であった(表1)。

ガラス化法によって保存された個体は昇温処理後速やかに正常な生育を開始したが、予備凍結法による個体は一旦カルス化し、発生したシュートも極めて貧弱なものであった(写真1)。さらに、再生個体の順化及び鉢上げ後、ガラス化法の個体は無処理個体とほとんど差がなくすべて正常に生育しているのに対し、予備凍結法の個体は試験管内からの生育の遅延を回復できず、鉢上げ2か月後の生育差は明らかであった(写真2)。

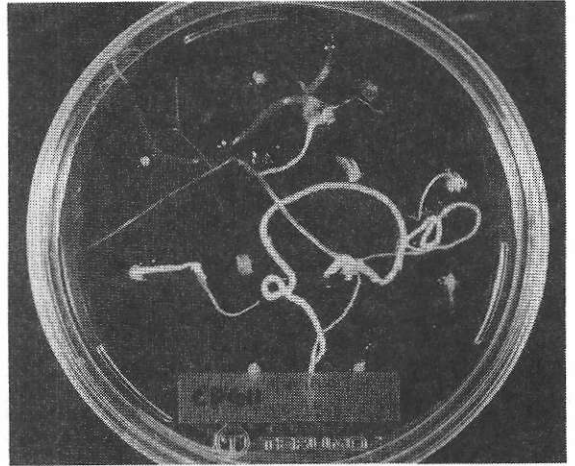
以上より、ニンニク茎頂はガラス化法による超低温保存後も100%が再生し、かつ、正常に生育することが明かとなった。超低温保存の前処理法としてのガラス化法は、保護剤の毒性が強いために適応できる植物種や細胞に限られるが、ここで供したニンニク茎頂のように保護剤に耐えられるものは、ガラス化法が予備凍結法より植物体に対する障害は少ないと考えられた。

表1 前処理法別の超低温保存後の生育

処 理	供試数	生存数	カルス 化 した 数	試 管 植 物 再 生 数	鉢 上 後 生 育 数
無 処 理	4	4	0	4	4
保護剤処理不凍結	5	5	0	5	5
ガラス化法	12	12	0	12	12
予 備 凍 結 法	12	12	10	7	4



無処理個体 ガラス化法による再生個体

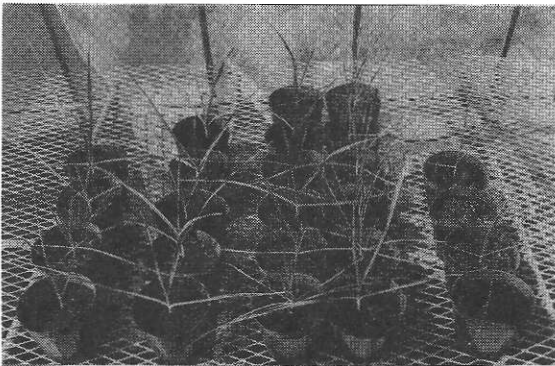


予備凍結法による個体

写真1 超低温保存個体の試験管内での生育状況

引用文献

- 1) Murashige, T. ; Scoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 2) 庭田 英子, 小川 理恵, 石川 雅也, 大澤 勝次. 1991. メロン体細胞不定胚の超低温保存. *育種* 40 (別1): 188-189.
- 3) _____. 1992. ニンニク茎頂の超低温保存. *育種* 42 (別1): 326-327.
- 4) 小川 理恵, 庭田 英子, 石川 雅也, 大澤 勝次. 1991. メロン苗条原基の超低温保存. *育種* 40 (別1): 190-191.
- 5) Sakai, A.; Kobayashi, S.; Oiyama I. 1990. *J. Plant Physiol.* 137: 465-470.



無処理 保護剤処理 ガラス化による 予備凍結法による
個 体 不凍結個体 保存個体(2列) 保存個体

写真2 超低温保存個体のガラス室での生育状況
(鉢上げ後2か月)