

ガラス化法によるリンドウの超低温保存技術の開発

佐久間 光 子

(福島県農業試験場)

Cryopreservation of *In Vitro* Plantlets of Gentian by Vitrification

Mitsuko SAKUMA

(Fukushima Prefecture Agricultural Experiment Station)

1 は じ め に

リンドウ (*Gentiana spp.*) は宿根草であるが、挿し芽などの栄養繁殖が困難であるため、鉢物を除き種子 (実生) によって増殖されている。しかし、 F_1 品種を除き、実生の場合個体の形質は遺伝的に固定されていないのバラツキが大きく、商品の均一性の面で問題となっている。また、 F_1 育種では、リンドウは自殖によって弱勢化が起きるため、親系統の形質を変化させず維持することが重要である。これまでは、系統内の個体ごとに自殖し維持してきたが、形質が分離したり、また病虫害などで遺伝資源をなくすことも多かった。

そこで、リンドウの優良系統及び F_1 採採用親株を長期的に維持・保存するため、処理期間が短く簡易なガラス化法による超低温保存技術を検討した。

2 試 験 方 法

(1) 試験材料

通気膜のついたプラントボックスで、 20°C 、18時間照明下で2ヶ月間培養したリンドウ (*G. triflora* $\times$ *G. scabra*) の腋芽を含んだ節組織 (約2 mm) を用いた。

(2) 超低温保存の方法 (図1)

供試材料を調整した後、高糖濃度の MS 培地で2日間前培養した後、室温 (25°C) でガラス化液 (PVS 2 : グリセリン30% (W/V) + エチレングリコール15% (W/V) + DMSO 15% (W/V) + ショ糖0.4M) で処理し、液体窒素に投入し保存した。その後、液体窒素から取り出し、 38°C の温水中で急速に温め、1.2 M ショ糖の MS 培地で洗浄し、ろ紙をしいた培地で1日間培養後、通常の発根培地に移植して培養した。培養30日後、腋芽が伸長した切片数を調査しその割合を腋芽伸長率 (%) とした。

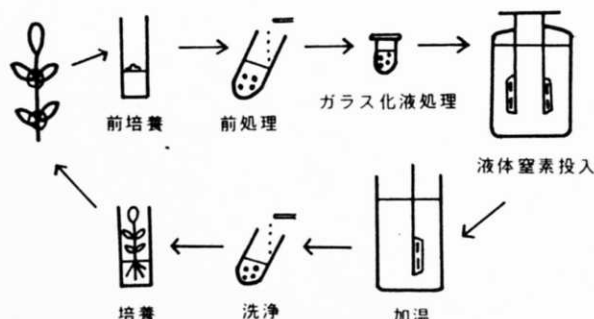


図1 超低温保存の方法

(3) 前培養培地のショ糖濃度の検討

前培養培地のショ糖濃度について検討するため、0, 0.3, 0.5, 0.7M ショ糖添加 MS 培地で2日間培養後、ガラス化液に60分間室温 (25°C) で処理し、液体窒素に投入し、保存後、腋芽伸長率を調査した。

(4) 前処理液の検討

浸透性の高いガラス化液の影響を緩和するため、事前に希釈した液で処理する方法 (前処理) について検討した。

0.3M ショ糖添加培地で2日間前培養した後、3種類の前処理液、40%PVS 2, 60%PVS 2, 2 M グリセリンと0.4M ショ糖の混合液にそれぞれ20分間浸漬、その後ガラス化液に45分室温 (25°C) で処理し液体窒素に投入、保存後、腋芽伸長率を調査した。

(5) ガラス化液の処理時間の検討

前処理液の検討の結果、腋芽伸長率が高かった2 M グリセリンと0.4M ショ糖の混合液を用いて前処理の有無と、適正な脱水量を得るためのガラス化液の処理時間について検討した。

3 試験結果及び考察

(1) 前培養培地のショ糖濃度の検討

ショ糖 0 M で腋芽伸長率が11%, 0.3M で44%, 0.5M で28%, 0.7M で6%となり、0.3M がもっとも高かった (表1)。

表1 前培養培地のショ糖濃度の影響

ショ糖濃度 (M)	腋芽伸長率 (% $\pm$ S. E.)
0	11 $\pm$ 0
0.3	44 $\pm$ 8
0.5	28 $\pm$ 11
0.7	6 $\pm$ 0

注. 供試個体数: 9 個体 2 反復

(2) 前処理液の検討

前処理を行わなかった対照区の腋芽伸長率が28%であったのに対し、40%PVS 2 で61%, 60%PVS 2 で56%, 2 M グリセリンと0.4M ショ糖混合液で78%となり、前処理の効果が認められた。3種類の前処理液では、2 M グリセリンと0.4M ショ糖の混合がもっとも再生後の伸長率が高かった (表2)。

表 2 前処理液の種類

前処理液	腋芽伸長率 (%±S. E.)
なし	28±17
40% P V S 2	61± 8
60% P V S 2	56±11
2 M グリセリン+0.4M ショ糖	78±11

注. 供試個体数: 9 個体 2 反復

(3) ガラス化液の処理時間の検討

図 2 に示すように、ガラス化液処理時間 30～75 分の間で前処理の効果が高かった。さらに、前処理を行った中では、45 分間処理が最も腋芽伸長率が高く、75% であった。

4 ま と め

以上の結果、0.3M ショ糖添加 MS 培地で 2 日間前培養した後、2 M グリセリンと 0.4M ショ糖の混合液で 20 分間前処理を行い、さらにガラス化液に 45 分間処理し液体窒素で保存する方法が再生後の腋芽伸長率が高く実用的であった。

この技術を利用することにより、優良系統や圃場での変異個体を長期的に保存できると考えられる。

引用文献

1) Matsumoto, T. ; Sakai, A ; Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro* apical meristem of Wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell

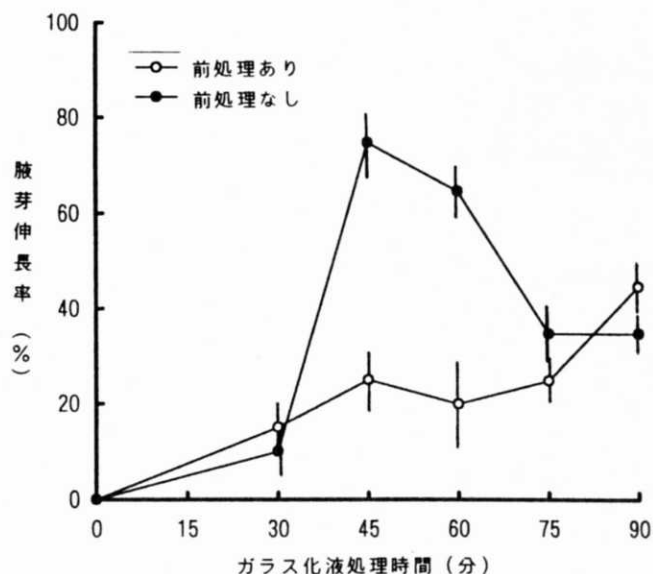


図 2 前処理とガラス化液処理時間別腋芽伸長率

Rep. 13 : 442-446.

2) Niino, T. ; Sakai, A. ; Yakuwa, H. ; Nojiri, K. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. Plant Cell, Tissue and Org. Cul. 28 : 261-266.
3) Yamada, T. ; Sakai, A. ; Matsumura, T. ; Higuchi, S. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. Plant Sci. 78 : 81-87.