

# アスパラガスの Embryogenic Callus 及び胚様体の凍結保存

中島寿亀・國武久登・森 欣也・田中政信 (佐賀県農業試験研究センター)

Toshiki NAKASHIMA, Hisato KUNITAKE, Kinya MORI and Masanobu TANAKA :  
Cryopreservation of embryogenic callus and somatic embryoid on asparagus

アスパラガスの培養細胞や組織の長期保存法を確立し、安定的な種苗生産システムを構築するために、Embryogenic Callus(以下 E. C. と記す)及び胚様体の液体室素による凍結保存を検討した。

## 1. 試験方法

(1) E. C. の凍結保存: 材料として品種「ハイデル」の未熟胚由来の E. C. を用いた。まず緩速予備凍結法 (予備凍結温度  $-40^{\circ}\text{C}$ , 冷却速度  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 凍結触媒 DMSO16%), 簡易凍結法 (前培養 Sucrose 0.7M, 凍害防御剤処理10分) 及びガラス化法 (前培養 Sucrose 0.7 M, PVS2液処理10分) の各々により凍結保存を行い、融解1か月後の生存率を調査した。次に簡易凍結法において、前培養時の Sucrose 濃度 (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 M) と凍害防御剤の処理時間 (3, 5, 10, 20, 30分) を検討した。凍害防御剤は 2, 4-D 2 mg/l を添加した MS 培地に Glycerin 2 M, Sucrose 0.4M を加えたものとした。

(2) 胚様体の凍結保存: 材料として前述の E. C. から誘導した胚様体を用いた。まず試験1に準じて3手法による凍結保存を行い、融解1か月後の植物体再生率を調査した。次にガラス化法において、PVS 2液の処理時間 (1, 5, 10, 15, 20, 30, 60分) と前培養時の Sucrose 濃度 (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0M) を検討した。PVS 2液は 1/2 MS 培地に Glycerin 30%, Ethylene Glycol 15%, DMSO 15%, Sucrose 0.4M を加えたものとした。いずれの試験も前培養は2日間、液体室素内の保存期間は1日、融解は  $35^{\circ}\text{C}$  温水中、凍害防御剤除去はろ紙上で2日間とし、培養1か月後に生存率及び生育様相を調査した。

## 2. 結果及び考察

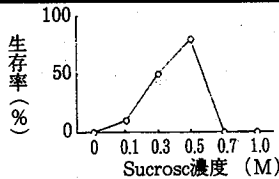
(1) 凍結保存法の試験の結果、凍結・融解後の E. C. は、緩速予備凍結法及びガラス化法で全て枯死したが、簡易凍結法では約2週間後から一部に E. C. の増殖が認められ、1か月後の生存率は75%であった(第1表)。また、前培養時の Sucrose 濃度試験の結果、E. C. の生存率は0.5M 区で80%と最も高率であり、その前後では低率であった(第1図)。さらに、凍害防御剤の処理試験の結果、E. C. の生存率は10~30分処理区で80%以上の高率であり、処理時間が短い区では低率であった(第2図)。生存した E. C. は、再分化培地に移植することにより胚様体を形成し、植物体を再生した。

(2) 凍結保存法の試験の結果、凍結・融解後の胚様体は、緩速予備凍結法及び簡易凍結法では全て枯死したが、ガラス化法では約1週間後から発根がみられ、1か月後の植物体再生率は17%であった(第2表)。また、PVS 2液の処理試験の結果、胚様体の生存率は15分処理区で55%と最も高く、処理時間が短い区ではほとんどの胚様体が枯死した(第3図)。生存した胚様体には、根あるいはシュートのみを伸長するものや奇形化するものが多く、正常に植物体を再生した胚様体は、30分処理区で15%であった。さらに、前培養時の Sucrose 濃度試験の結果、胚様体の生存率は0.3~0.5M 区で約80%と高率であり、その前後では低率であった(第4図)。正常に植物体を再生した胚様体は、0.5及び0.7M 区で15%と、前試験と同様に低率であった。

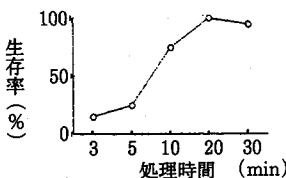
以上のように、E. C. は簡易凍結法で、また胚様体はガラス化法で凍結保存することにより生存が可能であった。

第1表 3種類の凍結保存法により凍結した Embryogenic Callus の生存率

凍結保存法	供試数	生存数	生存率 (%)
緩速予備凍結法	4	0	0
簡易凍結法	4	3	75
ガラス化法	4	0	0



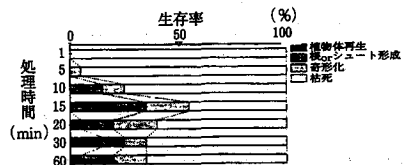
第1図 前培養時の Sucrose 濃度がカサスの生存率に及ぼす影響



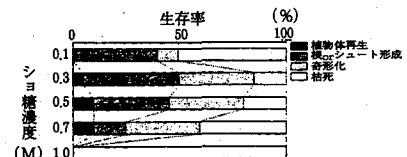
第2図 凍害防御剤の処理時間がカサスの生存率に及ぼす影響

第2表 3種類の凍結保存法により凍結した胚様体の植物体再生率

凍結保存法	供試数	再生数	再生率 (%)
緩速予備凍結法	12	0	0
簡易凍結法	12	0	0
ガラス化法	12	2	17



第3図 PVS 2液の処理時間が液体室素保存後の胚様体の生存率に及ぼす影響



第4図 前培養時のシヨ糖濃度が液体室素保存後の胚様体の生存率に及ぼす影響