

シバ類・暖地型牧草の遺伝資源保存技術の開発 第1報 ビーズ乾燥法によるシバ茎頂組織の超低温保存

南 公宗・澤井 晃 (鹿児島県農業試験場大隈支場)

Tomohiro MINAMI and Akira SAWAI :

Conservation of lawngrass and warm-season grasses genetic resources

1. Cryopreservation of shoot apices of lawngrass by encapsulation-dehydration

圃場における遺伝資源や育種素材の栽培保存は、その維持管理のために圃場確保や多大な労力と費用を要するほか、病虫害や気象災害により消滅する危険性もある。省力的で安全性の高い保存法として、ビーズ乾燥法、ビーズガラス化法等による超低温保存があり、今日、多数の植物種で成功している。ここでは、シバ茎頂組織のビーズ乾燥法による超低温保存について検討した。

1. 試験方法

圃場で栽培中の2系統(長崎農No.2;山川町,火の神公園No.3;枕崎市)を供試した。MS培地を基本培地(pH5.8)に、茎頂培養には30g/l ショ糖, 8g/l 寒天を、ビーズ前処理には0.1~0.8M ショ糖, 6g/l 寒天を、ビーズ再培養には0.1M ショ糖, 6g/l 寒天を添加した固形培地を用いた。採取したランナーを有効塩素約2%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌した後、葉原基1~2枚を付けた茎頂を摘出した。培養期間は3, 6, 9日間とし、培養条件は26℃, 3600lx・16時間照明とした。ビーズ包埋は茎頂を2%アルギン酸ナトリウム溶液(0.1M ショ糖添加のMS培地で調整)に混入し、ピペットで茎頂を1個ずつ、0.1M 塩化カルシウム溶液(同上)に滴下した。ビーズ硬化のために約30分間静置した後、滅菌水で3回洗浄した。茎頂組織に乾燥耐性を付与するためにビーズをビーズ前処理培地に2日間置床した後、シリカゲルを入れた容器内(第1図の注釈)で乾燥させ、1.8ml 容クライオチューブに入れ、液体窒素に1時

間以上浸漬した。融解は40℃前後の温水中に30秒間浸漬することで行った。ビーズの再培養はビーズが培地中に埋没するように置床し、暗黒条件下で2日間、その後は26℃, 3600lx・16時間照明条件下で行った。茎頂組織の生存は置床3週間目までに緑色を呈し、生長がみられたものを評価した。

2. 結果および考察

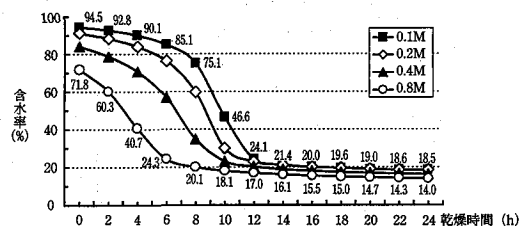
ビーズ乾燥法による超低温保存の研究報告によると、含水率15~25%にした場合に高い生存率が得られている。本シリカゲル容器でのビーズの含水率の減少速度は、前処理培地のショ糖濃度の違いで異なった(第1図)。ショ糖濃度が茎頂組織の乾燥耐性付与に及ぼす影響を第1表に示した。0.2M および0.4M ショ糖区の18時間乾燥ではいずれも枯死したが、0.8M ショ糖区では半数近くが生存し、さらに12時間乾燥で90%以上が生存したことから、0.8M ショ糖濃度が妥当と考えられた。前培養期間の延長により茎頂組織は伸長したため、前培養3日間および6日間では高い生存率を保持し、両区に大差はなかったものの、9日間で著しく低下した(第2表)。茎頂組織の微生物汚染を確認する上で6日間前後が妥当と考えられた。液体窒素に浸漬した茎頂組織は、10~12時間乾燥(含水率20%前後)で生存率が高かった(第2図)。

以上のことから、ビーズ乾燥法によるシバ茎頂組織の超低温保存が可能であった。今後、さらなる生存率向上のための処理法の検討や再生植物体の生理的・遺伝的形質について確認する必要がある。

第2表 茎頂組織の生存に及ぼす前培養期間の影響

前培養期間(日)	茎頂組織長(mm)	含水率(%)	液体窒素浸漬	生存率(%±SD)
3	0.5~1.0	18.6	—	100
6	0.8~1.0	17.3	+	83.3±10.6
9	1.0~1.5	17.5	+	85.4±3.0
			+	100
			+	45.8±11.8

注) a) 供試材料:長崎農No.2 b) 16茎頂/処理区×2反復の平均値で評価した c) —:液体窒素未浸漬 +:12時間乾燥後に液体窒素浸漬 d) 前処理はショ糖0.8M添加培地で2日間行った

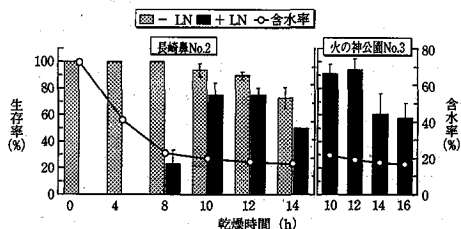


第1図 異なるショ糖濃度で前処理したビーズの乾燥に伴う含水率の経時的変化
注) a) ビーズ乾燥装置は、大型シャーレ(φ15cm)に3個の小型シャーレ(φ6cm)を入れ、その隙間に乾燥シリカゲル90gを入れた装置を使用した b) 16個のビーズ(茎頂を含まない)を置床したアルミ小皿を小型シャーレに入れて、大型シャーレの蓋をしてパラフィルムで密封した c) 含水率はビーズの重量を2時間置床に測定し、その後、103℃で16時間乾燥して、乾燥重を測定することで算出した d) 測定値は3反復の平均値 e) ビーズの前処理は2日間とした

第1表 茎頂組織の乾燥耐性付与に及ぼすショ糖濃度の影響

ショ糖濃度(M)	乾燥時間(h)	含水率(%)	生存率(%±SC)
0.2	12	23.9	77.6±0.8
	18	20.8	0
0.4	12	20.0	73.1±3.9
	18	17.6	0
0.8	12	18.5	92.3±3.9
	18	15.8	45.8±4.2

注) a) 供試材料:長崎農No.2 b) 本試験は13茎頂/処理区×2反復の平均値で評価した c) 茎頂の前培養は6日間、前処理期間は2日間とした d) ビーズは液体窒素に浸漬せずに再培養を行った



第2図 乾燥処理に伴うビーズの含水率の程度が茎頂組織の生存に及ぼす影響