

# 液体窒素温度で冷却させたミズメ腋芽の生存について

宮崎県林業総合センター 三樹 陽一郎

## 1. はじめに

ミズメ (*Betula grossa* Sieb. et Zucc.) は主に家具材として利用されており、その優良苗木の生産に対しては組織培養による増殖法が検討されているが、育種における多数の系統株の長期管理及びその後における優良株の保持に対する培養植物体の保存法については十分な検討まで至っていない。<sup>2,3,4)</sup>

培養植物の細胞・組織を長期的に保存を行う方法の一つについて液体窒素で冷却する保存法が考えられる。この方法は従来の継代培養に比べ遺伝的变化を起こさずに長期保存が可能で、費用、労力等の低減も図れる特徴がある。今回はその中でもフリーザーを必要とせず操作が煩雑でないガラス化法による保存<sup>5)</sup>の可能性について基礎的資料を得るため、ミズメ腋芽を用いて凍害防御剤による薬害及び液体窒素温度で処理した場合の生存について調べたので報告する。

なお、実験に際して森林総合研究所組織培養研究室の木下勲氏により御助言をいただいた。ここに厚く感謝の意を表する。

## 2. 材料および方法

実験は図-1に示す手順で行った。

### (1) 材料の調製

実験には実生苗の新梢腋芽を外植体とし、シュート伸長用の培地で継代培養している植物体を用いた。この時の培地はWPM<sup>6)</sup>にBAPI.0mg/ℓ, Sucrose20g/ℓ, Gellan Gum2g/ℓを添加したもので、培養条件は温度25℃, 照度5,000lux, 明期16時間, 暗期8時間で2カ月培養したものである。

ハードニングは上記の培養条件のうち温度5℃に設定して、さらに2カ月間の培養を行ったもので、その後、シュートから腋芽を2mm程に切出した。併せてハードニングしていない腋芽も材料として用意した。

### (2) 凍害防御剤の薬害試験 (図-1, A)

① 腋芽を入れた1.5mℓクライオチューブに凍害防

御剤を1mℓ添加し、温度25℃で1, 15, 30分の3水準の時間で浸透処理を行った。凍害防御剤はPVS2<sup>9)</sup>〔グリセリン30% (w/v), エチレングリコール15% (w/v), DMSO (ジメチルスルホキシド) 15% (w/v)を0.4MのSucroseを含むWPM培地に溶かしたもの〕を使用した。

② クライオチューブに凍害防御剤だけを除去、残った腋芽を1.2MのSucroseを含んだWPM液体培地で洗浄した後、腋芽を固形培地上に移して培養した。この時の培地及び培養条件は上記のシュート伸長用と同様で、2週間培養後に目視により腋芽の生長・緑化度を調査して生死判定を行った。

### (3) 液体窒素による処理 (図-1, B)

① 上記(2)-①と同様にした。

② クライオチューブを-196℃の液体窒素の中に入れ急速冷却、そのまま1時間浸漬した。

③ 同チューブを37℃の温水に移し、急速融解させた。

④ 上記(2)-②と同様にした。

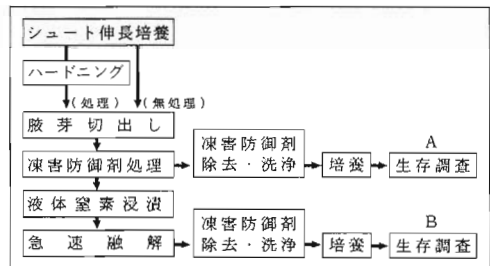


図-1 実験フロー図

## 3. 結果と考察

### (1) 凍害防御剤による薬害の状況

凍害防御剤の浸透処理時間に対する腋芽の生存状況を図-2に示した。生存個体は緑色を呈し、中には葉が展開してシュートが伸長しているものもあった。死滅

個体は褐変化し、その後に変化は認められなかった。

凍害防御剤の処理時間が1分の場合にはハードニングの有無に関わらず全ての腋芽が生出し、この時点では葉害は生じていないと考えられる。しかし、15、30分の処理時間になるとハードニングしていない腋芽の生存率は著しく低下し、30分では平均が50%以下になった。これに対してハードニングした腋芽は90%程度の高い生存率を維持した。

このことから、ハードニングを施した腋芽は凍害防御剤の葉害に対する耐性を有していると推察され、一定時間内での凍害防御剤の処理であれば液体窒素浸漬前での損失を低減できると考えられる。

(2) 液体窒素処理した腋芽の生存状況

液体窒素に浸漬後、2週間培養して腋芽の生存及びシュート形成を調査した結果を表-1に示した。培養当初にすべての腋芽の表面は褐変化し、ハードニング無処理区の腋芽はその後にも変化がなく、生存個体は認められなかった。一方、ハードニング処理区では培養約1週間後に腋芽の茎頂部から緑色の組織を形成している生存個体がいくつか確認できた。しかし、凍害防御剤の処理時間と生存率の関係についてはどの処理区においても生存率が40%以下で明確な傾向は得られず今後の課題となった。

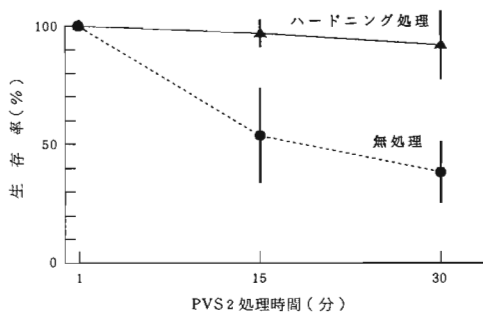


図-2 凍害防御剤の処理時間がミズメ腋芽の生存率に及ぼす影響

表-1 液体窒素処理後におけるミズメ腋芽の生存状況

ハードニング	PVS2 処理時間	供試数	生存数 (%)	シュート形成数 (%)
無処理	1分	18	0(0)	0(0)
	15分	18	0(0)	0(0)
	30分	18	0(0)	0(0)
処 理	1分	18	7(38.9)	5(27.8)
	15分	18	6(33.3)	4(22.2)
	30分	17	5(29.4)	3(17.6)

また、生存した個体の中にはシュートが伸長するものもあり、さらに1カ月培養したところ異常な形態は認められなかった(写真-1)。

以上のことから液体窒素温度の条件下でも腋芽を生存させておく一つの手段として、ハードニングとガラス化法を用いた手法が有効であると考えられる。

4. おわりに

今回の実験からミズメ腋芽の液体窒素を利用した保存について可能性が得られたが、これを実用レベルにするには高い生存率と再現性が求められる。このため、ハードニングの期間、凍害防御剤の成分及び浸透処理時間等について検討を重ねる必要がある。

引用文献

- (1) LLOYD, G. et al. : Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30, 421~427, 1980
- (2) 三樹陽一郎 : 日林九支研論, 47, 97~98, 1994
- (3) ————— : 日林九支研論, 48, 55~56, 1995
- (4) 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編 : 木本植物の増殖と育種, 農業図書, 東京, 1989
- (5) 酒井 昭 : 化学と生物, 30(7), 441~448, 1992
- (6) SAKAI A et al. : Plant Cell Rep. 9, 30~33, 1990



写真-1 液体窒素処理後に再生したシュート (培養42日目)