

研究課題：ゲル化ドロップレットガラス化法によるばれいしょ培養茎頂の超低温保存法
(659261)

担当部署：中央農試 基盤研究部 細胞育種科

協力分担：なし

予算区分：外部資金(ジーンバンク事業)

研究期間：2007～2009年度(平成19～21年度)

1. 目的

アルミホイル上に微量の溶液と脱水などの処理をした茎頂を置き、液体窒素中で急速に冷却するドロップレット法をばれいしょの培養茎頂に適用し、実用的な超低温保存の諸条件を確立する。確立した手法(ゲル化ドロップレットガラス化法と命名)を、多くのばれいしょ栽培種や野生種に適用し、その優位性を確認する。なお、本課題は農業生物資源ジーンバンク事業委託課題(植物遺伝資源の超低温保存)として実施した。

2. 方法

- 1) 「男爵薯」を用いてドロップレット法、ガラス化法など室温(25℃)での各超低温保存法の生存率、操作性などを比較する。生存率は加温、再培養3週間後に正常な茎葉を伸長した茎頂の割合で表し、操作性は処理に要する時間や茎頂に直接接触する回数などで評価する。
- 2) 「男爵薯」で確立し、その優位性を確認したゲル化ドロップレットガラス化法をばれいしょ栽培種や野生種に適用する。

3. 成果の概要

- 1) 従来のドロップレット法の操作性をアルギン酸ナトリウム溶液のドロップレット内に茎頂を固定することで改良し、生存率をPVS2液の使用により向上させ、全ての処理を室温(25℃)で実施することが可能なゲル化ドロップレットガラス化法(図1)を開発した。
- 2) 室温(25℃)におけるゲル化ドロップレットガラス化法、ドロップレット法、ドロップレットガラス化法と従来の手法(ガラス化法、ビーズガラス化法)により超低温保存したばれいしょ「男爵薯」の生存率は、ゲル化ドロップレットガラス化法とドロップレットガラス化法は同程度に高く、ガラス化法、ビーズガラス化法は低く、ドロップレット法では生存する個体は得られなかった(図2)。これは温度降下速度や不十分な脱水と脱水耐性向上処理が原因である。
- 3) これら5手法の操作性を比較した結果、ゲル化ドロップレットガラス化法はビーズガラス化法と同程度であったが、他の手法では茎頂の取り扱いに時間を要した。
- 4) 室温で実施したゲル化ドロップレットガラス化法は、脱水耐性向上処理条件、脱水時間を変えることで、供試した26点のばれいしょ栽培品種・系統の内24点で60%以上の生存率を得た(図3)。これは氷温(0℃)におけるビーズガラス化法による品種比較試験の生存率(14点供試。平成12年度研究参考事項)と同程度であった。また、本手法により超低温保存した6点の野生種は、5点で60%以上、1点で約40%の生存率を示した。

以上の点からゲル化ドロップレットガラス化法はすべての処理を室温(25℃)で実施可能であり、ばれいしょ栽培種、野生種を安定して超低温保存することが可能である。

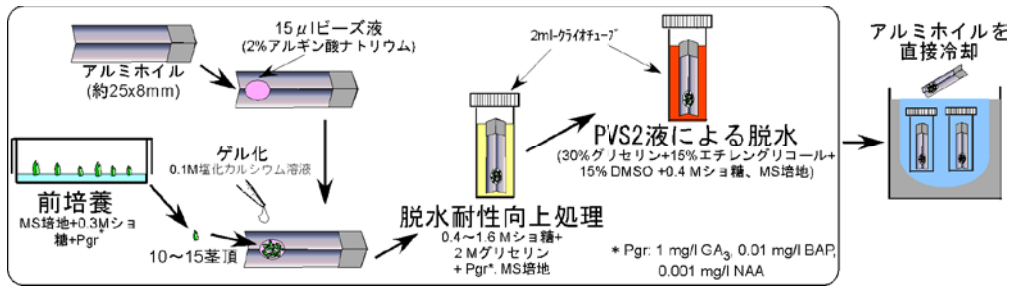


図1 ゲル化ドロップレットガラス化法

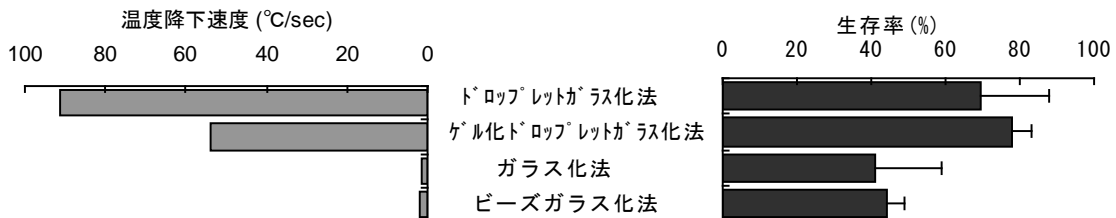


図2 各超低温保存法の生存率、温度降下速度
注. 供試材料はばれいしょ「男爵薯」。ドロップレット法は生存率0%の為省略。

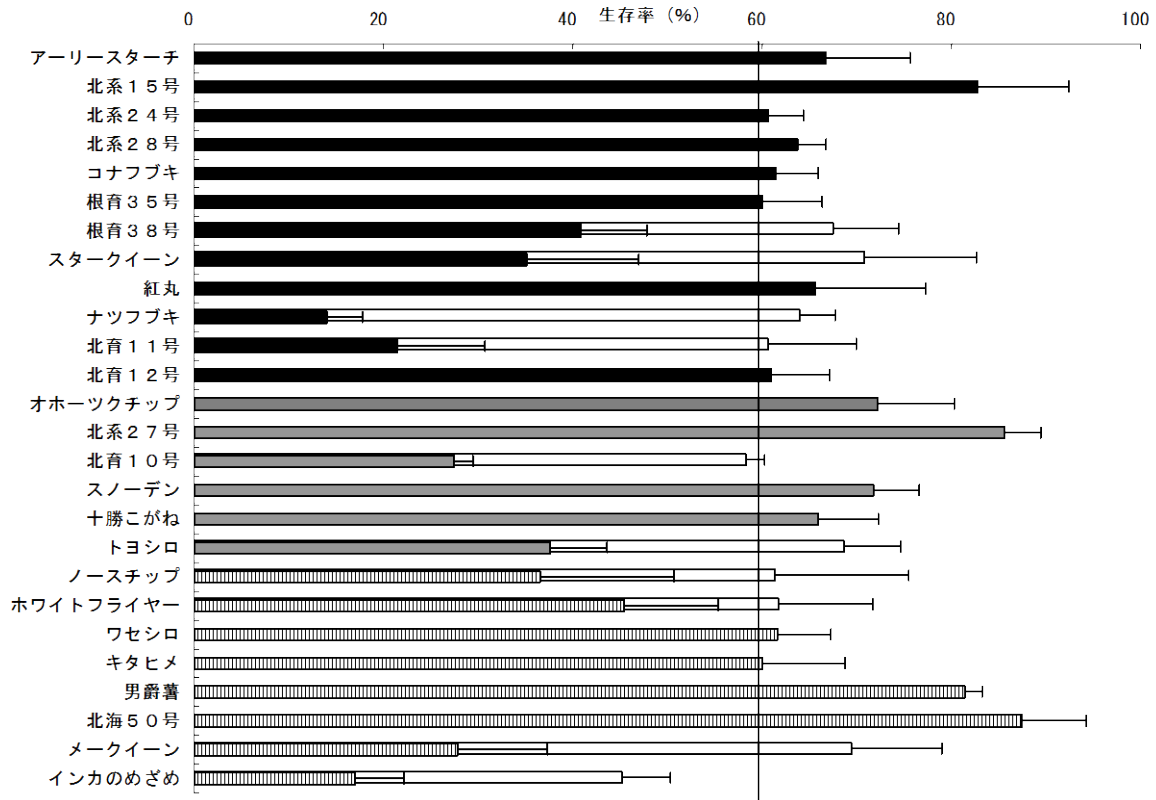


図3 ばれいしょ各品種・系統のゲル化ドロップレットガラス化法の生存率

注. 黒(でん原用)、灰(加工用)、縦線(生食用)のバーは「男爵薯」と同じ条件(前培養後にアルミホイル上に固定した茎頂を 1.2M ショ糖+2M グリセリン+Pgr(MS 培地)で 60 分間処理後に PVS2 液で 60 分間脱水、25°C)で超低温保存した際の生存率、白抜きバーは改良した条件(脱水耐性向上処理剤、その時間や脱水時間)で超低温保存した際の生存率。細線は標準誤差。Pgr は 1 mg/l GA₃、0.01mg/l BAP、0.001mg/l NAA。

4. 成果の活用面と留意点

ゲル化ドロップレットガラス化法はほ場で保存されているばれいしょ遺伝資源の実用的な長期安定保存に寄与できる。

5. 残された問題とその対応

ばれいしょ 2 倍体 (野生種を含む) の植物体の培養条件の検討