

宿根カスミソウ茎頂組織の超低温保存法

1. はじめに

宿根カスミソウの系統、品種の維持には多大な労力と施設が必要である。そのため、少スペースで長期間保存ができる技術の開発が望まれている。ここでは、ガラス化法(1990 酒井ら)により茎頂組織を超低温保存するため、前培養期間、凍害防止剤(PVS2液)の処理温度及び処理液量が超低温保存を行った茎頂組織の生存率と超低温保存後の生育開花特性に及ぼす影響について検討した。

2. 試験方法

約1mmの宿根カスミソウの茎頂組織をショ糖0.5Mを含むMS寒天培地に置床し、4℃の明条件下で前培養を行った。前培養を行った茎頂組織を2mlバイアルに入れ、0℃と室温(25℃)のPVS2液(グリセリン30%+エチレングリコール15%+DMSO 15%+0.4%ショ糖)で15分間処理した後、液体窒素で超低温保存を行った。その後、30℃で溶解し、ショ糖1.2Mを含むMS液体培地で2回洗浄した。洗浄後、BA0.5mg/lを含むMS寒天培地に滅菌ろ紙を敷き、そこに超低温保存を行った茎頂組織を置床した。翌日、滅菌ろ紙と培地を交換し培養を行った。緑色の茎頂組織を生存個体とし、10日後に生存率を調査した。

3. 結果の概要

①前培養期間と生存率には、明確な関係が見られなかったが、4日間前培養を行った室温区では高い生存率が確認された。(表1)。

②PVS2液処理が0℃、15分処理の場合、25℃、6分処理の区より明らかに生存率が高かった(表1)。

③1茎頂当たりのPVS2処理液量を0.04mlから0.20mlについて、前培養期間4日間、処理温度0℃、処理時間30分間の条件で調べた結果、0.16mlまでの生存率は80%以上であったが、0.20mlでは20%と急激な生存率の低下が見られた。そのため、最適PVS2処理液量は0.04mlから0.16mlまでであることがわかった。

④前培養を3日前行い、0℃のPVS2液0.16mlで15分間処理後、超低温保存を行った超低温保存苗の生育特性は一般増殖苗と同程度であり、超低温保存の影響は特に認められなかった(表3)。

⑤以上のことから、前培養期間を3日間以上

行い、処理温度0℃、処理時間30分間、1茎頂当たりの処理液量0.04mlから0.16ml以下で超低温保存を行うと、87~100%の生存率が維持でき、花型、草型について、特に大きな差異が認められず、有効であることが確認された。

3. おわりに

本法を用いると、保存に要する労力、経費は従来の栽培維持法に比べて大幅に軽減でき、さらに極めて少スペースで多数の個体の保存が可能であると思われた。

(育種部 花田 裕美)

表1 ガラス化法による超低温保存の前培養期間および1茎頂組織当たりのPVS2処理液量が生存率におよぼす影響

PVS2処理温度 及び処理時間	処理液量 (ml)	前培養期間(日)			
		0	2	3	4
25℃ 6分間	0.05	13.3	73.3	40.0	86.7
	0.10	100.0	53.3	40.0	66.7
	0.15	40.0	40.0	60.0	50.0
	0.20	84.2	28.6	20.0	73.3
	0.30	40.0	0.0	20.0	40.0
0℃ 30分間	0.05	20.0	0.0	20.0	20.0
	0.10	53.3	86.7	46.7	86.7
	0.20	93.3	80.0	46.7	86.7
0℃ 15分間	0.15	20.0	57.1	40.0	0.0
	0.30	40.0	40.0	100.0	100.0
	0.60	40.0	20.0	40.0	20.0
	0.60	20.0	20.0	20.0	0.0

表2 1茎頂組織当たりのPVS2処理液量と生存率

PVS2処理液量	生存率
0.04 (ml)	100.0 (%)
0.08	80.0
0.12	80.0
0.16	90.0
0.20	20.0

注) 供試品種: プリストルフェアリー
前培養期間4日、PVS2処理温度0℃、処理時間30分間

表3 宿根カスミソウにおける超低温保存苗の生育開花特性

苗の種類	供試数	切り花時期(月日)		切花長 (cm)	開花節位 (節)	節間長 (cm)	茎径 (mm)
		始め	終わり				
超低温保存苗	10	11.11	11.21	73.0	12.9	10.2	4.8
一般増殖苗	10	11.14	11.28	74.6	11.7	10.4	5.0

注) 供試品種: プリストルフェアリー、定植: 9月10日
電照: 10月1日より実施
超低温保存苗: 超低温保存を行った茎頂を生育、順化した後、挿し芽を行い生産した苗

表4 ガラス化法による超低温保存における宿根カスミソウ3品種の茎頂組織生存率

品 種	生存率 (%)
パーフェクター	83.3
ニューフェイス	80.0
プリストルフェアリー	75.0

注) 前培養期間4日、PVS2処理温度0℃、処理時間30分間、処理液量0.05ml