

16. 超低温ガラス化法によるタロ遺伝資源保存法の開発

〔要約〕熱帯性作物であるタロの遺伝資源について、超低温ガラス化法を用いた茎頂の長期保存技術を開発した。本技術は、種内の異なった系統への汎用性も高く、平均87%の生存率が安定して得られた。

国際農林水産業研究センター 沖縄支所 国際共同研究科			連絡先	09808 (2) 2306			
部会名	国際農業	専門	遺伝資源	対象	いも類	分類	国際

〔背景・ねらい〕

熱帯・亜熱帯地域に多い栄養繁殖性作物の遺伝資源は従来圃場で保存されているが、自然災害等による消失の防止および労力・時間の節減のため、省力的かつ安全な試験管内長期保存法の実用化が大いに望まれている。植物遺伝資源の長期保存法として有望な液体窒素を使った保存技術の多様化と簡易化が進み、保存できる植物種数が寒帯・温帯性の作物を中心に飛躍的に増加してきた。しかしながら、熱帯作物については成功例もごく限られており、基礎技術の開発が必要である。

本研究では、熱帯・亜熱帯地域の重要な食用作物のひとつであるタロの茎頂を材料とし、超低温ガラス化法による保存法の諸条件を検討して、実用性の高い長期保存法の基礎技術の確立を目指した。

〔成果の内容・特徴〕

1. 無菌培養したタロ (*Colocasia esculenta* (L.) Schott. var. *antiquorum*, 品種エグイモ) の植物体から切り出した茎頂を材料に、超低温ガラス化法による保存法の諸条件を詳しく検討し、図1に示した方法が最も有効であると結論された。この方法により、液体窒素中で保存した後のタロ (品種エグイモ) 茎頂の生存率の平均は100% (6茎頂, 3反復の結果) であった。
2. 特に、タロでは、ショ糖濃度を高めた培地で育成 (コンディショニング) した植物体から切り出した茎頂を用いると、通常の培地 (30 g/l) で育成した場合に比べ、液体窒素で保存した後の生存率が向上するばかりでなく、安定する点が注目された (表1)。
3. 同じサトイモ科の作物である *Xanthosoma* の2系統に同じ方法を適用したところ、120 g/l のショ糖によるコンディショニングは適当ではなく、その効果には種間差がみられた (表1)。
4. 本方法で液体窒素中に保存したタロの茎頂 (写真右) は、カルスを形成することなく、MS 基本培地上で容易に茎葉および根を再生した。処理した茎頂から得られた植物体を無処理のものと比較・観察したが、形態的異常は認められなかった (写真左)。

〔成果の活用面・留意点〕

本研究では、熱帯性作物であるタロの茎頂の超低温保存に初めて成功した。ここで確立した超低温保存の基礎技術は、生存率が高く安定しており、タロ (*Colocasia esculenta*) 遺伝資源への汎用性も高く、長期保存法としてジーンバンク等での実用化検討試験に値する。

〔具体的データ〕

植物材料の調整 ↓ ガラス化 ↓ 融解 ↓ 再培養	①植物材料の増殖	: イモから得た幼芽を滅菌し、MS 培地 (ショ糖30 g/l) で増殖する。
	②コンディショニング	: 無菌培養した植物体 (茎長2-3 cm) をショ糖120 g/l を含む MS 培地に移植して1ヵ月培養する。
	③茎頂の切り出し	: 葉原基1-2枚を含む生長点 (0.5-0.8mm) を切り出す。
	④茎頂の前培養	: 0.3M ショ糖を含む MS 培地で16時間培養する。
	⑤ローディング	: 前培養した茎頂を2Mグリセリン+0.4Mショ糖で20分間、25℃で処理する。
	⑥ガラス化処理	: ローディングした茎頂をPVS2 (30%グリセリン+15%DMSO+15%エチレングリコール+0.4Mショ糖) で10分間、25℃で処理する。液体窒素に直接浸漬する (手法の開発試験では1時間浸漬)。
	⑦融解	: 40℃の温水中で急速融解する。
	⑧融解後の処理	: 1.2Mショ糖に10分間浸漬後、滅菌した濾紙を敷いた0.3Mショ糖を含む MS 培地上に1日静置する。
	⑨植物体の再生	: 0.1Mショ糖を含む MS 培地に移しかえ培養する。茎葉の再生を生存の指標とする。

図1 本研究で確立したタロ茎頂の超低温ガラス化法による保存法の手順

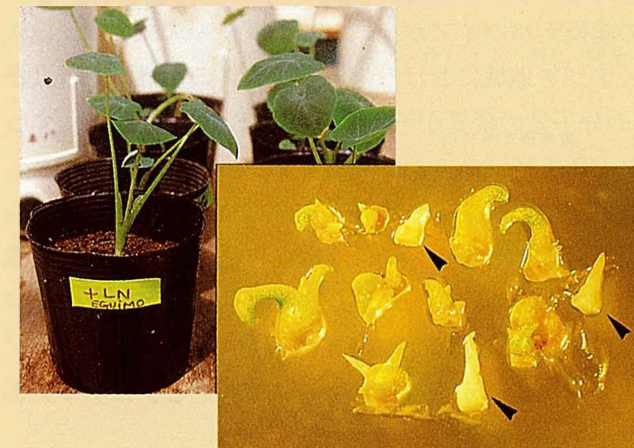


写真 右: 液体窒素処理・融解後7日目のタロの茎頂。生存した茎頂は緑色を帯び、生育を開始している。白色の茎頂は生存しなかったもの (矢印)。
左: 液体窒素中で保存した茎頂から得られた植物体。

表1 ショ糖によるコンディショニングが液体窒素中に保存したサトイモ科 (*Araceae*) 作物の茎頂の生存率に及ぼす影響

英名	種名	2n	系統名	原産国	液体窒素中に保存後の生存率 (% ± SE)	
					コンディショニング培地のショ糖濃度 ^x 30 g/l	120 g/l
Taro	<i>Colocasia esculenta</i> var. <i>antiquorum</i>	3x=42	Eguimo	日本	65.7 ± 5.4	100.0 ± 0.0
Taro	<i>Colocasia esculenta</i> var. <i>esculenta</i>	2x=28	Dodare	日本	60.0 ± 7.5	100.0 ± 0.0
Tanier	<i>Xanthosoma nigra</i>	2x=26	Kabira	日本	73.3 ± 11.3	83.3 ± 2.7
				日本	61.1 ± 5.4	95.3 ± 3.2
				ベトナム	58.3 ± 10.9	66.6 ± 5.4
				ベトナム	67.5 ± 7.1	75.0 ± 4.2
Tanier	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	2x=26	Alotau	パプアニューギニア	61.9 ± 8.3	42.8 ± 4.4
Tanier	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	2x=26	Alotau	パプアニューギニア	66.6 ± 6.4	40.0 ± 7.1

²: 超低温ガラス化法の諸条件は図1に示すとおり。^y: 約6茎頂, 3反復の平均, ^x: 所定濃度のショ糖を含む培地で1ヵ月間植物体を培養した (30 g/l が通常の培地に使われるショ糖濃度)。

〔その他〕

研究課題名: 栄養繁殖性熱帯作物遺伝資源の特性評価と長期保存法の確立

予算区分: 国際農業プロ〔栄養繁殖性〕

研究期間: 平成4~11年度

研究担当者: 高木洋子・Nguyen Tien Thinh・仙北俊弘・八島茂夫

発表論文等:

- 1) 高木洋子 (1996). タロとパパイヤのガラス化法による超低温保存. 組織培養 22 (9): 376-380.
- 2) Takagi, H. et al. (1997). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of vitrification procedure. Plant Cell Report 16: 594-599.