

## ガラス化法による交雑ポプラ茎頂の超低温保存

共生基盤学専攻 バイオマス転換学講座 資源植物創成学 川村浩平

### 1. 緒言

植物の遺伝資源保存の方法として、圃場保存、種子保存、培養保存が代表的なものとして挙げられるが、それぞれ長所と短所が存在する。そのため、植物種や系統によっては、上記3種の方法とは異なる安定的かつ簡便な保存方法の適用が求められる場合がある。そこで、樹木の遺伝資源保存のため、モデル樹木の一種である交雑ポプラの野生株とその形質転換株の茎頂を用い、比較的簡便なガラス化法による超低温保存を試みた。本研究では、超低温保存前のガラス化液処理条件ならびに超低温保存後の再生条件について検討し、当該品種に適した保存条件の設定を行った。

### 2. 方法

材料には、交雑ポプラ (*Populus tremula* × *P. alba*) の野生株と、小胞体 (ER) 局在性の緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する形質転換株を用いた。23°C 16時間日長で3~6週間 1/2 Murashige and Skoog (MS) 培地で生育させた個体を5°C暗所に移して3週間の低温馴化処理を行った後、茎頂を切り出し、0.4 M スクロースを添加した 1/2 MS 培地で2日間の前培養を行った。その後、脱水耐性付与のためにローディング液 (2 M グリセロール, 0.4 M スクロース, 1/2 MS 液体培地) による前処理を施し、ガラス化液である PVS2 (30%グリセロール, 15%エチレングリコール, 15%ジメチルスルホキシド, 0.4 M スクロース, 1/2 MS 液体培地) あるいは PVS3 (50%グリセロール, 50%スクロース, 1/2 MS 液体培地) で設定時間処理してから液体窒素に浸漬することで超低温保存を行った。次に、液体窒素中で1時間保存した茎頂を42°Cの温水中で急速昇温してから洗浄した後、再生培地に置床して培養開始後3週間時点で緑色を呈している茎頂を生存とみなして生存率を評価した。また、培養開始後6週間以内にシュート再生した茎頂の割合を再生率として評価した。さらに、再生培地にサイトカイニンやオーキシン等を添加することで再生率の向上を目指した。

### 3. 結果と考察

はじめに野生株を用いてガラス化液処理時間と処理温度の条件検討を行った。その結果、4°Cに維持した PVS2 で90分間の処理を行うことで、保存後の茎頂の生存率は約80%に達した。この条件を形質転換株に適用しても同様の結果が得られた。しかし再生率はいずれも約20%であった。そこで、再生培地に植物ホルモンを添加して再生率の向上を目指した。予備試験において高い効率でシュート誘導が起こった 1 μM ゼアチン (サイトカイニン的一种) を添加した培地に超低温保存後の茎頂を置床したところ、再生率が約90%に向上した。また、インドール酪酸 (IBA, オーキシンの一種) やポリビニルピロリドン (PVP) を添加したところ、1 μM IBA と 1 g/L PVP を同時に培地に加えることで90%以上の茎頂が発根し、再生率も約70%に上昇した。これにより、再生培地の組成を改変することで超低温保存後の茎頂の再生率が十分に高まることがわかった。また、液体窒素中での保存期間を1時間から1週間に延長した場合でも生存率や再生率に影響はなかった。さらに、保存後に再生した個体の GFP 蛍光の観察を行ったところ、保存前の個体と比較して細胞内の ER 分布や蛍光強度に差異は見られなかった。以上の結果から、ガラス化液処理条件ならびに再生条件を適切に設定することで、当該交雑ポプラ品種の茎頂を用いた超低温保存が可能となり、樹木の遺伝資源を保存するために参考になるものと思われる。