

# クライオプレートを用いたステビア腋芽の凍結保存に関する研究

生物資源科学専攻 作物生産生物学講座 園芸学 星原 悠希

## 1. はじめに

ステビア (*Stevia rebaudiana*) は、南アメリカを原産とするキク科の草本植物であり、低カロリーの甘味料を産する作物として飲料や食品に幅広く用いられる。凍結保存は、有用な遺伝資源を長期保存するために開発されたが、従来法においては作業の煩雑さや操作者の熟練度が保存性に影響することが問題視されていた。近年、アルミ製のクライオプレートを用いた手法の効率化と簡便化が図られ、一度に多くの試料を均一に処理できるようになった。本研究では、クライオプレートを用いたステビア腋芽の凍結保存系の確立を目的として、より高い植物体再生率につながる凍結前処理条件を検討した。また、凍結下の組織細胞の構造や細胞内氷晶を低温走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM) で観察し、凍結保存の成否にかかわる植物ガラス化液 (PVS2) の処理効果について検証した。

## 2. 方法

継代培養 1 か月後のステビア培養物から腋芽を切り出し (長さ約 2 mm)、0.4 M のソルビトールと 0.1 M のスクロースを添加した 1/2 MS 培地にて、1 日間の前培養を行った。前培養後の試料は、クライオプレートに固着し、1.4 M のスクロースを添加したローディング液に 30 分浸漬して脱水耐性を付与した後、ガラス化液 (PVS2) による浸透脱水、あるいはクリーンベンチの風乾による乾燥で脱水した。PVS2 処理は処理温度と時間、風乾は時間を変えて処理区を設けた。脱水した各試料は液体窒素で凍結後、1.0 M のスクロース液中で融解した。融解後の試料は再生培地に移植し、40 日目に再生率を算出した。なお、脱水処理後に凍結を行わない未凍結区を設け、凍結区の処理対照とした。また、PVS2 処理した試料と未処理の試料を SEM 用の金属ホルダーに固着し、液体窒素で凍結固定した。凍結試料は Cryo-SEM 内で割断し、腋芽分裂組織の凍結下の割断面構造を観察した。

## 3. 結果と考察

1) **植物体再生** 常温条件下で PVS2 処理した際は、時間の経過に伴い再生率が直線的に減少し、90 分以上の処理で凍結区・未凍結区の腋芽はほぼ死滅した。このことから、長時間の PVS2 浸漬は組織に対し害作用が非常に大きいことが推察された。そこで、氷温条件下で PVS2 処理したところ、凍結区 90 分で 50% の再生率を得ることができた。氷温下での処理は浸透脱水を緩やかにし、組織への害作用を低減できたと考えられる。また、風乾による脱水処理では、凍結区 90 分で 47% の再生率を得ることができた。

2) **凍結細胞の観察** PVS2 未処理の細胞では、細胞内に大量の氷晶が形成されており、致命的な傷害の発生が推察された。一方で、PVS2 処理後の細胞では氷晶の発生が認められず、約半数の細胞は原形質分離を起こしていた。このことから PVS2 処理は、細胞を強い脱水ストレスに晒しながらも、細胞内氷晶形成を抑制することで、凍結融解後の再生率の向上に寄与していることが推察された。