〈日本茶業技術協会技術賞受賞研究〉

チャ遺伝資源の超低温保存

静岡県茶業試験場

倉貫 幸一

(平成6年12月7日受理)

Cryopreservation of Genetic Germplasms in Tea Plants

Yukikazu KURANUKI

Shizuoka Tea Experiment Station

チャの品種育成を効率的に進めるために、育種素材となる遺伝資源を多く保有していることは大変重要なことである。

現在、自然環境は色々な面で破壊され、植物の貴重な遺伝資源は喪失の浮き目に曝されている。チャにおいても同様であり、在来園の放棄・改植、他の使用目的のために壊され、遺伝資源は減少の一途である。しかし、現在のチャ遺伝資源の保存は圃場で行われており、大量の遺伝資源を保存するためには圃場規模と多くの手間を必要とする一方、病害や寒害による喪失と実生混入の危険性をはらんでいる。

イネ、ムギ等¹⁾の多くの一年生作物では液体窒素を用いた長期保存方法が確立し、実際に保存がなされている。アブラヤシ、ココナッツ等の熱帯性の大きな種子でも胚軸を摘出して保存する方法^{2,3,4)}が確立されている。栄養繁殖作物でも器官を用いた保存方法⁵⁾が確立されている。

チャの遺伝資源の保存について、種子を1°Cで密封貯蔵すれば6年間発芽力を維持できることを安間ら⁶⁾が、さらに武田ら⁷⁾は-80°Cで2日間保存できることを報告しているが、液体窒素を用いた超低温保存については報告されてない。

ここでは種子と培養茎頂の超低温保存について紹介します。

1. 種子の保存

(1)完全な種子^{8,9)}

チャ種子の最低生存温度は表1に示す通り-7.5°Cで、処理温度が低くなるにつれて細菌の汚染が激しくなった。種子の水分含量と発

表1 チャの種子の最低生存温度

形 態	最低生存温度(°C)
種 子	- 7.5
摘出胚軸	-20.0
子葉切片	-20.0

注) “やぶきた”の種子を使用した。

処理は-3°Cで凍結・植水後12時間以上放置し、-5、-7.5、-10、-12.5、-15、-20と-25°Cで段階的に各温度で1日間凍結し、それぞれの温度で取り出した。

図1 種子の水分含量と発芽との関係

芽率の関係は図1に示す通りであった。新鮮な種子から水分含量を乾物重当たりで50%まで減少させても発芽率の低下は見られなかったが、水分含量が50%以下になると発芽率は急激に低下し、20%以下になると生存は確認できなかった。

示差熱分析（冷却過程中的の相変化—ここでは水の凍結—を調べる）の結果は図2に示す通りであった。示差熱温度は新鮮な種子で約-8℃、水分含量50%までは-12℃以上と大きな差はなかったが、水分含量が30%以下になると急激に低下し、20%で約-23℃に、それ以下の水分含量では出現しなかった。

一般に recalcitrant seed は種子が大きく、低温と乾燥に耐えられないことは chin ら¹⁰⁾により指摘されている。チャの種子は大きく、低温と乾燥に弱いことから、recalcitrant seed と考えられ、そのままでの超低温保存は困難であると推察された。

(2)種子から摘出した胚軸と子葉切片^{8,9)}

摘出胚軸と子葉切片の最低生存温度は表1に示すように-20℃であり、完全な種子よりも

図2 種子の水分含量と示差熱温度との関係

低温に耐えることができた。

ア) 摘出胚軸

摘出胚軸はシリカゲルを使い乾燥し、その水分含量と生存との関係は図3の上を示す通りである。胚軸の水分含量が15%以上の場合の生存率はほぼ100%と高く、水分含量が15%より減少すると生存率が低下し、水分含

図3 胚軸の水分含量と乾燥後からびに液体窒素浸漬後の生存との関係

上図は乾燥のみの生存を、下図は乾燥そして液体窒素に浸漬後の生存を示す。

量5%で生存率は50%になった。

各水分含量の胚軸における液体窒素処理後の生存との関係は図3の下に示す通り、胚軸の水分含量が60%以上では生存するものがなく、水分含量が50%以下で生存が確認され、水分含量が30~15%でほぼ100%の生存を示した。さらに水分を減少させると生存率が低下し、水分含量が5%で60%の生存率を示した。

摘出した胚軸は低温に強く、乾燥にも強いことが明らかとなり、さらに水分含量を30~15%に乾燥した胚軸は、液体窒素に浸漬しても100%近く生存していたことから、液体窒素中で超低温保存できることが明らかとなった。

イ) 子葉切片

子葉切片はシリカゲルを使い乾燥し、その水分含量と生存との関係は図4の上を示す通りである。水分含量が30%以上の子葉切片は50%以上の生存を示した。水分含量が30%から少なくなるにつれて生存率が低下して10%の水分含量で生存率は0%になった。各水分含量の子葉切片における液体窒素処理後の生存との関係は図4の下に示す通り、水分含量約30%で生存が認められるけれども他の水分含量では全く生存がなかった。液体窒素処理前の各水分含量に対する子葉切片の生存曲線は完全な種子と同様であることから、種子が乾燥に弱い原因は大部分を占める子葉

図4 子葉切片の水分含量と乾燥後ならびに液体窒素浸漬後の生存との関係

上図は乾燥のみの生存を、下図は乾燥そして液体窒素に浸漬後の生存を示す。

が乾燥に弱いことに起因している。

ウ) 胚軸の乾燥方法

シリカゲルを使い水分含量を調節する方法は、多くの材料を扱う場合に不向きである。そこでクリーンベンチ内で乾燥する時間を調査した結果、表2に示す通りである。乾燥時間が60分以内では生存率が低く、しかも生育が異常なものが多かった。90分と120分の乾燥で生存率は100%で生育が正常であった(写真1)ことから、胚軸の乾燥はクリーンベンチ内で120分程度が適していた。

(3)胚軸の回復培養¹¹⁾

胚軸は2mm程度と小さく、生育させるためには無菌的に培養しなければならない。液体

表2 胚軸のクリーンベンチ内での乾燥時間と液体窒素処理後の生存

項 目	クリーンベンチ内(分)				
	30	45	60	90	120
水分含量(%)	52	46	33	20	18
生 存(%)	40	70	80	100	100
正 常(%)		20	40	100	100
異 常(%)	40	50	40		

注) 水分含量は乾物重当たりで示した。

正常は摘出胚軸が正常に生育し、異常は胚軸のカルス化と芽や根が生育しないことである。

写真1 胚軸の乾燥・超低温保存後の植物体の回復
乾燥はクリーンベンチ内で行い、
D-30、D-45、D-60、D-90、D-120はそれぞれ、30分、45分、60分、90分間行った。

室素中で超低温保存した胚軸から植物体に回復させる胚軸培養の培地は、1/2 MS を基本として IBA 0.01 mg/ℓ, BA 1.0 mg/ℓ の組合せが最適であった。

(4)種子の採取時期¹¹⁾

9 月上旬～10 月下旬に採取した種子を 12 月中旬に胚軸を摘出し、乾燥処理とさらに液体窒素浸漬処理をしたものの生存率は表 3 に示す通りである。その結果 10 月中旬と下旬の種子が充実した時期に採取したものから摘出した胚軸の生存率が高く、しかも生育が健全であった。

(5)種子から摘出した胚軸の超低温保存の手順

表 3 各時期の採取種子から12月14日に摘出した胚軸の生存率(%)

採種日 月 日	摘出時 の生存	乾燥処理 のみ	液体窒素 処理
9. 4	3		
9.13	15		
9.25	100	40	5
10. 2	100	15	25
10.14	100	100*	95*
10.22	100	100*	100*

注) *は健全な生育を示した。
調査は2週間後に行った。

図 5 胚軸の超低温保存の手順

は図 5 に示す通りである。

2. 培養茎頂の保存

(1) 培養系への材料の導入と増殖^{12,13,14)}

茎頂の超低温保存は各々の操作を無菌的に行うので、野外の材料を培養系に導入しなければならない。

野外から培養系への導入には茎頂培養がある。茎頂培養培地は、1/2 MS を基本として IBA 0.01 mg/l, BA 1.0 mg/l と GA₃ 1.0 mg/l の組合せが最適であった。

無菌的な材料の増殖を行うために、MS を基本培地として IBA 0.01 mg/l, BA 1.0 mg/l, GA₃ 10.0 mg/l の組合せが最適で 2 か月で 7 倍の増殖を示した。

(2) 低温順化¹⁵⁾

超低温保存のためには供試する材料の耐凍性を高めることが大切である。増殖培地で増殖した材料を 1/2 MS のホルモンフリー培地で約 2 か月間培養して、10°C または 20°C の 8 時間照明 / 5°C の 16 時間暗黒の条件下で低温順化を行った。低温順化期間と超低温保存後の生存率、植物体再生率との関係は図 6 に示す通りである。生存率は 5 週間後から急激に上昇し、植物体再生率は 8 週間後に最大となった。この結果から、低温順化期間は 5~8 週間が適していた。

図 6 低温順化期間と超低温保存後の茎頂の生存との関係

10°C 8 時間照明 / 5°C 16 時間暗黒の条件下で順化を行った。

PVS 2 処理は 0°C 20 分間である。液体室素浸漬時間は 1 時間以上である。

(3) ガラス化法^{16,17)}

ア) 前培養 (5°C 暗黒下)

低温順化した培養植物から茎頂を摘出し、PVS 処理の前に行う培養培地のショ糖濃度と生存との関係を見たものが図 7 である。植物体再生率は 0.2 M で高かった。

前培養期間と植物体再生率との関係は図 8 に示す通りである。生存率、植物体再生率は

図 7 前培養培地のショ糖濃度と液体室素浸漬後の茎頂の生存との関係

10°C 8 時間照明 / 5°C 16 時間暗黒の条件下で順化を行った。

前培養期間は 1 日である。

PVS 2 処理は 0°C 20 分間である。液体室素浸漬時間は 1 時間以上である。

図 8 前培養期間と液体室素浸漬後の茎頂の生存との関係

20°C 8 時間照明 / 5°C 16 時間暗黒の条件下で順化を行った。

PVS 2 処理は 0°C 20 分間である。液体室素浸漬時間は 1 時間以上である。

前培養地は 0.2 M ショ糖 + 1/2 MS である。

図9 PVSの処理時間と液体窒素浸漬後の茎頂の生存との関係

20°C 8時間照明/5°C 16時間暗黒の条件で順化を行った。
前培養期間は1日である。
液体窒素浸漬時間は1時間以上である。

写真2 ガラス化法による茎頂の超低温保存後の植物体の回復(処理後2ヵ月)

図10 茎頂の超低温保存の手順

前培養 2 日間でそれぞれ 80%, 60% と最高となった。

イ) PVS 2 の処理条件

PVS2(グリセリン30%W/V+DMSO15%W/V+エチレングライコール15%W/V+0.4 M ショ糖+1/2 MS) の処理温度は 20°C より 0°C が適していた。処理時間と植物体再生率との関係は図 9 に示す通りである。植物体再生率は 70 と 80 分間で 30% 以上と高かった。

ウ) 液体窒素浸漬, 融解と回復処理

PVS 2 処理後, 茎頂をクリオチューブに入れ直接液体窒素中で 1 時間以上浸漬した。融解は 30°C の湯で急速に行い, 1.2 M ショ糖+1/2 MS の液体培地で 10 分間洗浄して茎頂培養培地¹²⁾に植え付け植物体の回復を図った(写真 2)。

エ) ガラス化法による茎頂の超低温保存の手順は図 10 に示す通りである。

3. 今後の問題

超低温保存は多くの遺伝資源を永久的に保存できる技術であるが, 再生個体に変異がないことと生存率が高いことが望ましい。

完熟した種子から摘出した胚軸は乾燥後の水分含量を 30~15% に調整すれば, 100% 近い生存率を示し, 生育も健全であった。しかし, 変異の可能性の有無については遺伝的に同一な不定胚を誘導して超低温保存前後における変異発生調査をする必要がある。さらに, 在来茶樹を対象として種子を利用して遺伝資源の保存のために, 1 地域当たりの保存個体数をどれくらいの規模すればよいのか明らかにする必要がある。

現在, ガラス化法による茎頂の超低温保存での植物体再生率は 60% 程度であるが, 今後植物再生率を向上させるために, アルギン酸ビーズ乾燥法の利用やまったく新しい手法を開発する必要がある。

引用文献

- 1) Stanwood, P. C. (1985): Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In Cryopreservation of Plant Cells and Organs, K. K. Kartha, ed, CRC press, Inc. Boca Raton, Florida. pp199~226.
- 2) Grout, B. W. W., K. Shelton and H. W. Pritchard (1984), Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation, Ann. of Botany, 52, 381~384.
- 3) Chin, H. F., B. Krishnapillay and Y. L. Hor(1989): A note on the cryopreservation of embryos from young coconuts (*Cocos nucifera* var. MAWA), Pertanika, 12,183~186.
- 4) Chin, H. F., B. Krishnapillay and Z. C. Alang (1988): Cryopreservation of Veitchia and Howea palm embryos, Cryoletters, 9, 372~379.
- 5) Sakai, A. (1985): Cryopreservation of shoot-tips of fruit trees and herbaceous plants. In Cryopreservation of Plant Cells and Organs, K. K. Kartha, ed. CRC press, Inc. Boca Raton, Florida. pp135~158.
- 6) 安間 舜・渡邊 明(1958): チャの有用生殖質の長期保存, 茶試研報, 19, 29~57.
- 7) 武田善行・武弓利雄・池田奈実子・安間舜(1990): チャ生殖質の長期保存—種子と花粉—, 茶研報, 71, 29~35.
- 8) Kuranuki, Y. and S. Yoshida (1990): Freeze preservation of tea seeds anthe excised embryos in liquid nitrogen after desiccation. Proc. of the Annual Meeting and 30th Symposium Japanese Society of Plant Physiologists Tokyo, p71.
- 9) Kuranuki, Y. and S. Yoshida (1991): Cryopreservation of tea seeds and the excised embryogenic axes in liquid nitrogen, Proceedings of the International Symposium on Tea Science (1991,Shizuoka), pp419~422.
- 10) Chin, H. F., Y. L. Hor and M. B. Mohdlassim (1984): Identification of recalcitrant

- seeds. Seed Sci & Technol, 12, 429
～436.
- 11) 倉貫幸一(1992): チャ胚軸培養における
採取時期, 摘出胚軸の乾燥並びに植物生長
調節物質の効果, 茶研報, 76, 1～5.
- 12) 倉貫幸一・柴田真里子(1992): チャの茎
頂培養における植物生長調節物質の濃度の
違いが生育に及ぼす影響, 静岡茶試研報,
16, 1～6.
- 13) 柴田真里子・倉貫幸一(1993): チャの試
験管内挿木における培養条件の改良(1)MS
培地の基本成分の希釈度ならびにWP培地
との比較, 茶研報, 77, 39～45.
- 14) 倉貫幸一・柴田真里子(1993): チャの試
験管内挿木における培養条件の改良(2)植物
生長調節物質の最適条件の検討, 茶研報,
77, 47～55.
- 15) 倉貫幸一・酒井 昭(1992): 培養チャ芽
の低温順化期間がLM₂処理後の生存に及
ぼす影響, 育雑, 42, 別冊1, 330～331.
- 16) 倉貫幸一・酒井 昭(1991): Vitrifica-
tion(ガラス化)法による培養チャ芽の凍結
保存, 育雑, 別冊2, 184～185.
- 17) Kuranuki, Y. and A. Sakai (1994):
Cryopreservation of *in vitro*-grown
shoot tips of tea(*Camellia sinensis*) by
vitrification, 31st Annual Meeting Pro-
gram and Abstracts Kyoto, Society
for Cryobiology, p87.