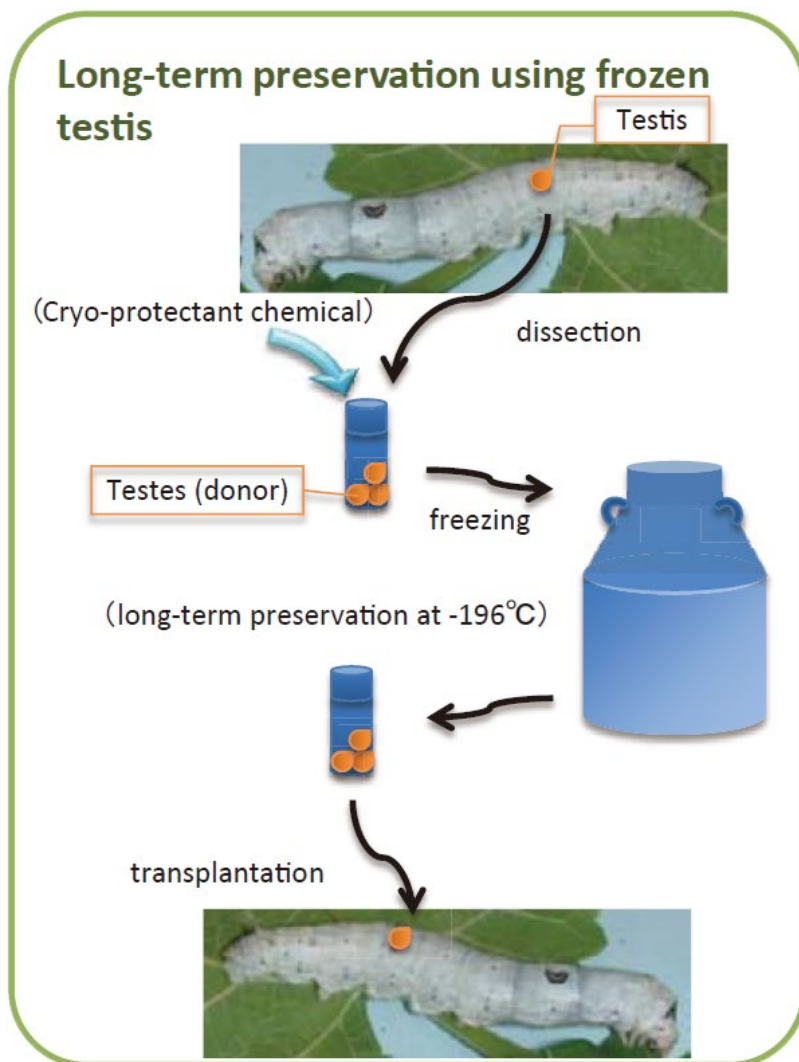


Focus	Development of cryopreservation methods of the silkworm
PI	Yutaka Banno Graduate School of Agriculture, Kyushu University
Period	FY2014
Overview	<p>Preservation of silkworm strains is currently being carried out at the egg stage due to the dormancy of <i>Bombyx mori</i> at that life history stage. However, the period of viable preservation is limited to just one year. The development of safe and long-term preservation methods for a variety of silkworm strains has been an outstanding issue. Cryopreservation is currently used for ovaries as part of the NBRP's second phase of activities, but there is still a need to develop further improvements for the preservation of the male silkworm genome. The main focus of our research is the development of long-term preservation methods for male silkworm germplasms. Specifically, we are developing technologies for long-term cryopreservation of male germ cells (spermatogonia/spermatocytes) by building upon cryopreservation technologies developed originally for silkworm ovaries. To test one method planned for the preservation of male germ cells, we plan to extract the spermatogonia/spermatocytes from the selected strain by utilizing a miniscule glass tube. We will then freeze the extracted germ cells using liquid nitrogen and then transplant the thawed cells into a host silkworm's testes for preservation. Following this, we plan to collect the transplanted germ cells from the host testes. The other planned preservation method involves the extraction and freezing of undifferentiated larvae testes that are then thawed and transplanted into a host. To facilitate the simultaneous preservation of male and female germplasms, as well as fertilized eggs, we are considering the implementation of a new freezing method called CAS (Cells Alive System).</p>
Progress	<p>(written in Japanese)</p> <p>計画した3つの方法で技術開発の可能性を追究した。その結果、精巣組織全体を用いた凍結保存が、目標とした雄側の生殖質保存技術の開発に有効であるという成果を得た。生殖細胞(精原・精母細胞)、CAS冷却装置を用いた方法では凍結後に生存する個体を得ることが出来なかった。目標とする技術開発が可能となった精巣組織全体の長期保存技術について以下にその概要を述べる。試験では、2～4齢期において、雄の幼虫体内から精巣を摘出し、液体窒素下に凍結保護剤と共に凍結保存した。その後、融解した精巣をホスト(宿主)幼虫へ移植した(上図参照)。供試した系統のうち、約半数の系統では凍結保存した精巣由来の子孫を得ることが可能であった。予備試験や過去の研究者の成果においては最大で1割程度の成功率であったので今回得られた成果は予想を超える高い成功率であった。高い成功率をあげることができた理由は、精巣摘出と移植の時期を発育初期から開始した点であると考えている。一般に、より未分化な状態の精巣が、高い凍結耐性を持つことが他の事例で示されている。但し、カイコの</p>



<p>場合、2 齡以前の精巢は、大きさが 1 mm 未満であって、微細操作が困難で、実用的には 3 齡初期が適当であった。本プログラムで得た成果を基に改良を加え、成功率は高くなっており、実用も可能な技術となり、この方法を用いた保存も開始している。</p>
