



ワサビ培養茎頂の超低温保存に関する研究

松本, 敏一

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1997-03-11

(Date of Publication)

2013-11-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2120

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3129883>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002120>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

ワサビ培養茎頂の超低温
保存に関する研究

平成9年1月

松本敏一

目次

第1章 緒論	-----	1
第2章 材料と保存後に形成したワサビ植物体の生育条件	-----	8
第3章 ガラス化法によるワサビ培養茎頂の超低温保存		
1. 実験方法	-----	13
1) ガラス化法の手順		
2) 前培養条件の検討		
3) ローディング液の検討		
4) ガラス化液の検討		
5) P V S 2 液の処理条件の検討		
6) ガラス化法の前培養におけるグリセリン添加効果		
2. 結果	-----	16
3. 結論	-----	18
第4章 アルギン酸ビーズ乾燥法によるワサビ培養茎頂の 超低温保存		
1. 実験方法	-----	36
1) アルギン酸ビーズ乾燥法の手順		
2) ビーズの最適含水率と前培養及び前処理用しよ糖濃度の検討		
3) 糖とグリセリンの混合液による乾燥耐性付与		
4) ビーズ及びビーズ内茎頂のガラス転移点		
2. 結果	-----	38
3. 結論	-----	40

第5章	ビーズ・ガラス化法によるワサビ培養茎頂の超低温保存	
1.	実験方法	55
1)	ビーズ・ガラス化法の手順	
2)	P V S 2 液の処理条件の検討	
2.	結果	57
3.	結論	58
第6章	異なる4種類の超低温保存法の比較	
1.	実験方法	68
1)	4種類の異なる液体窒素保存法の比較	
2)	茎頂の光学顕微鏡による組織学的観察	
2.	結果	69
3.	結論	70
第7章	超低温保存された茎頂から再生した植物における遺伝的 変異の有無の確認	
1.	実験方法	80
1)	再生したワサビ植物体の生育調査による検討	
2)	再生したワサビが生産する二次代謝産物の定量分析	
3)	R A P D - P C Rによる変異の確認	
2.	結果	82
3.	結論	82
第8章	総合考察	
1)	植物の超低温保存の原理と特徴	90
2)	ガラス化法	91
3)	アルギン酸ビーズ乾燥法	94

4) ビーズ・ガラス化法	-----	95
5) 超低温保存後に再生した植物の遺伝的変化	-----	95
6) 超低温保存の将来展望	-----	97
摘要	-----	100
謝辞	-----	102
引用文献	-----	103

第1章 緒論

ワサビ (*Wasabia japonica* MATSUMURA) は、アブラナ科 (*Cruciferae*) に属する半陰性の常緑多年草で、我が国では九州から北海道に至る各地の山間地の溪流に沿って自生している。その生育は、砂礫の多い清冷な溪流を好み、生育温度は 8~18℃で根茎部の温度が 18℃以上になると腐敗病や墨入病が増加するため、日中の最高気温を 30℃以下に保つ必要がある。一般にワサビと呼ばれるものには沢ワサビと畑ワサビの 2 種類があるが、その区別は栽培上の違いであって、植物学的には同種である。しかし、その品質は大きく異なり、沢ワサビがはるかに優っている。

ワサビの辛味成分は、アリルからし油を主体とする揮発性のからし油類であり、ワサビをすりおろしたり細かく刻むことによって酵素 (myrosinase) の作用により細胞内にあるからし油配糖体 (sinigrin) が加水分解されて生成される (小嶋 1981)。ワサビは、根茎に辛み成分が最も多く含まれるため (平佐ら 1995)、主として根茎が利用され、刺身や寿司等の香辛料として日本料理には欠くことのできない存在である。また、生ワサビとして商品価値の少ないくずもの、分けつ茎及び葉はワサビ漬けとして利用され、中山間地の特産品として出荷されている。さらに、漢方薬としての効能もあり、その根を局所に塗ってリュウマチ、神経症の痛み止めとして用いられる。

ワサビの主な生産県は長野、静岡、島根であり、産業が少ない中山間地における貴重な特産物となっている。沢ワサビの栽培条件は非常に厳しく、さらに生産量も少ないため値段が高い。したがって、土地集約的、労働集約的な面から見ても、極めて有利な作物と言える。しかし、最近の水害等の天災によるワサビ田の環境の悪化、また、墨入病、軟腐病、萎縮病のワサビ 3 大病害による品種の退化現象、あるいはウイルス病による収量低下と品質悪化が深刻化している。

ワサビの苗生産は、従来、株分けによる栄養繁殖及び実生繁殖で行われてきた。株分け法は、ウイルス感染や墨入病等の種苗伝染性病害が伝染しやすく、増殖率も低い。また、

実生繁殖では遺伝的純度が低いことによる形質の分離が問題となる。そこで、最近では組織培養を利用した増殖が導入されるようになってきた（堀 1986, 細木ら 1986, 1988, 松本・山本 1987, 大塚 1988, 山田・春木 1992）。この方法では、増殖率が極めて高い上に、莖頂培養によりウイルスフリー化も同時に可能である。したがって、優良系統のワサビの無病苗がクローン増殖されるため、生育が揃いやすいことから市場評価の高い商品を得ることが期待できる。

従来、ワサビは交配による組織的な育種は行われていなかったが、近年、交配育種の研究が進められ、1996年に‘大神2号’、‘羅漢2号’の2品種が新たに島根県から品種登録された。これら品種改良を効率的に行うためには、様々な形質を持つ多くの育種素材が必要である。育種素材の保存方法として、種子保存と栄養体保存がある。このうち、種子での保存が最も容易な長期保存法として古くから行われてきたが、その遺伝形質を後代に確実に伝えるためには、それを遺伝的に固定させることが不可欠となる。しかし、多くの永年性植物がそうであるように、栄養繁殖性の植物は固定されていないものがほとんどであるため、種子での形質の保存は極めて困難である。さらに、ワサビ、クリ、ワイルドドライス、ニガウリ等の recalcitrant 種子と呼ばれる難貯蔵性種子は、通常の方法では保存できない（中村 & Sathiyamoorthy 1990, 中村 1993a, b, 1994）。したがって、これらの植物は通常は栄養体で保存されるが、これには圃場栽培による保存、環境制御下での栽培による保存、及び組織培養による保存の3種類の方法が考えられる。

圃場栽培による保存は、経済栽培を続けながらその圃場の片隅で維持していく方法である。したがって、保存可能な数量に限りがあるだけでなく病虫害の発生や天災等の自然災害で圃場が壊滅し、貴重な遺伝資源が消失する危険を常に持っている。

環境制御下での保存は、エアコン等により温度制御された温室内の良好な栽培環境で主に鉢栽培によりウイルスフリーで維持されているため、枯死の危険は圃場より低い。しかし、それ故、その維持コストは莫大なものとなり、収容植物数が限定される。

最後に、組織培養による試験管内保存であるが、近年のバイオテク研究により目覚ましく

進歩し、ほとんどの植物で茎頂培養系が確立されている。したがって、試験管内で保存している幼植物を必要に応じて順化させ、供給することができる。これは温室での保存と同じく環境制御下で維持されるが、保存形態が鉢栽培に比べ試験管内培養であるため保存スペースが格段に小さくなるのが大きなメリットである。したがって、1サンプル当たり
に要する保存コストもそれに依りて低くなることから実用的な保存法とされ、多くの栄養繁殖性作物がこの方法で保存されている。しかし、これには定期的な培地更新が不可欠であるためそれに要す労力も無視できない。さらに、保存が長期になるほど人件費、光熱費等が膨大なものとなり、さらに、保存スペースにも限りがある。また、継代培養が長期にわたると、コンタミする危険性があるだけでなく遺伝的変異の発生も無視できなくなる。そこで、近年、植物の培養細胞や組織を約-150℃以下の温度で長期保存する超低温保存(cryopreservation)が注目されてきた。この方法は、保存対象が極めて小さいため省スペース化や保存に要する経費の低減が可能となり、さらに超低温下では生化学的作用がほとんど停止するため保存中の生理的、遺伝的変化が最小限に抑えられる(酒井 1992)。

植物の細胞・組織を液体窒素温度で生存させるためには、液体窒素温度への急速冷却中に起こる致命的な細胞内凍結を回避することが不可欠である(Sakai & Yoshida 1967)。そのため、細胞・組織をあらかじめ凍結水を十分に脱水しておくことが必要である。

超低温保存法はその脱水方法により、次の4つに大別される(酒井 1991)。

①凍結脱水：緩速予備凍結法(Slow-prefreezing method)

②浸透-凍結脱水：簡易凍結法(Simple freezing method)

③浸透脱水：ガラス化法(Vitrification method)

④乾燥：a, 乾燥法(Air drying method)

b, ビーズ乾燥法(Encapsulation-dehydration method)

これらの保存法の生存戦略は、Fig. 1-1 で示す。

①緩速予備凍結法は、まず、茎頂、不定胚、カルス、懸濁細胞等(以下、茎頂等)をグリセリン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エチレングリコール等の凍害防御剤であら

かじめ処理し、凍結耐性を付与する。つぎに、 -7°C 付近で過冷却状態の媒液に植水を行って凍結させ、細胞外凍結を起こさせる。続いて、プログラムフリーザーを用いて $0.3\sim 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度でゆっくりと -40°C まで冷却すると、その過程で細胞内の凍結水（自由水）を十分に脱水することができる。これにより、液体窒素中に急速冷却することで致死的な細胞内凍結を回避できる（酒井編 1987）。

②簡易凍結法は、室温で凍害防御剤で処理された細胞・組織の浮遊液を -30°C のフリーザー（気相）に直接移し、そこに約1時間置いた後、液体窒素に投入する。この場合、細胞・組織の浮遊液は自発凍結を起こし、細胞・組織は細胞外凍結で凍結脱水される（Sakai ら 1991b, Nishizawa ら 1992）。

③ガラス化法は、莖頂等を室温または 0°C の濃厚なガラス化液に浸漬することで浸透脱水し、室温または 0°C から直接、液体窒素中に急速冷却して細胞及び媒液をガラス化させる（Sakai ら 1990）。

④乾燥法はさらに2種類に分けられ、組織をそのまま風乾させる乾燥法は、アブシジン酸（Dereuddre ら 1990, Febre & Dereuddre 1990, Shimonishi ら 1991, 吉永・山川 1994）や糖（Uragami ら 1990）で乾燥耐性を付与してからシリカゲルまたはクリーンベンチで乾燥させる方法と、もう一つは組織をアルギン酸のゲルビーズに包埋し、約 0.8 M のしょ糖液に浸漬した後に風乾して、ビーズ中の糖濃度を高めながら組織を浸透脱水するアルギン酸ビーズ乾燥法がある。いずれの方法でも含水率 $20\sim 18\%$ （FW）程度まで脱水した後、液体窒素に投入する。

これらの方法で共通していることは、それぞれの処理により十分脱水後、液体窒素に急速冷却されることによって、細胞や組織は細胞内凍結を回避してガラス化するため、超低温下に冷却後も生存できる。なお、ガラス化（Vitrification）とは、物理現象で凍害防御剤の濃厚な粘性の高い水溶液は急速に冷却する時（ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上）、 -70°C 以下まで容易に過冷却し、約 -110°C で非結晶質のガラス（glass solid）に相転移する。この温度をガラス転移点と言い、この相転移に際しては氷晶は形成されない。しかし、このガラスを昇温

する時、ガラス転移点で過冷却の液体になった後、約 -70°C でガラス化液中に含まれる水が凍結を開始する (Fahy ら 1984)。しかし、昇温過程での凍結はガラスを 40°C の温水中で急速に温めることによって回避できる。これらの超低温保存法では、細胞・組織を予め十分に脱水した後、液体窒素中に冷却して細胞・組織をガラス化させて生存させ、それらを約 -150°C 以下のガラス転移点以下の温度に維持して、安定的な保存をはかる。

従来の緩速予備凍結法は操作が煩雑で時間がかかり、その上、高価なプログラムフリーザーを必要とする (酒井 1987)。さらに莖頂では、この方法で液体窒素温度に冷却するとカルス化し、二次的に植物を再生することが多いため、遺伝的変異を生じやすい難点があった (Haskins & Kartha 1980, Towill 1984, 1988)。そこで、莖頂では、ガラス化法 (Sakai ら 1990, Yamada ら 1991) による浸透脱水またはアルギン酸ビーズ乾燥法 (De-reuddre ら 1990) による風乾で、室温または 0°C で十分に脱水してから液体窒素中に急速冷却する新しい方法が開発された。そして、これらの方法の開発によって、超低温保存された植物の数が過去数年間に著しく増加した。

ワサビの組織培養による大量増殖技術については多くの報告があり (堀 1986, 細木ら 1986, 1988, 松本・山本 1987, 大塚 1988, 山田・春木 1992)、この技術を用いて増殖センターや民間企業では組織培養による種苗増殖を行っている。これには、それぞれの産地に適するワサビの品種・系統が必要となるため増殖母本はかなりの数に達し、これらを変異させることなく長期間維持保存することが不可欠となる。また、より商品価値の高い新品種を育成していくことも重要となり、品種改良の幅を広げるためにも多くの育種素材を収集する必要がある。現在のところ、超低温保存法がこれらの目的を達成するのに最も適した長期保存法と考えられる。現在のところ、ワサビ種子における超低温保存に関する報告 (中村 & Sathiyamoorthy 1990) はあるが、ワサビの莖頂の超低温保存の成功例は国内外でも報告が全くない。

そこで、本研究ではワサビ培養莖頂を用いて効率的なワサビの超低温保存法について検討した。その結果、90%以上のシュート形成率が得られるガラス化法や莖頂をアルギン酸

ビーズに包埋してガラス化液で脱水するビーズガラス化法を開発した。なお、超低温保存後に形成された植物体は茎頂ドームから直接再生していることが確認され、また、生育調査や辛み成分の前駆体である二次代謝物の定量及びPCRによるDNAレベルでの調査の結果、遺伝的変異の発生は認められなかった。

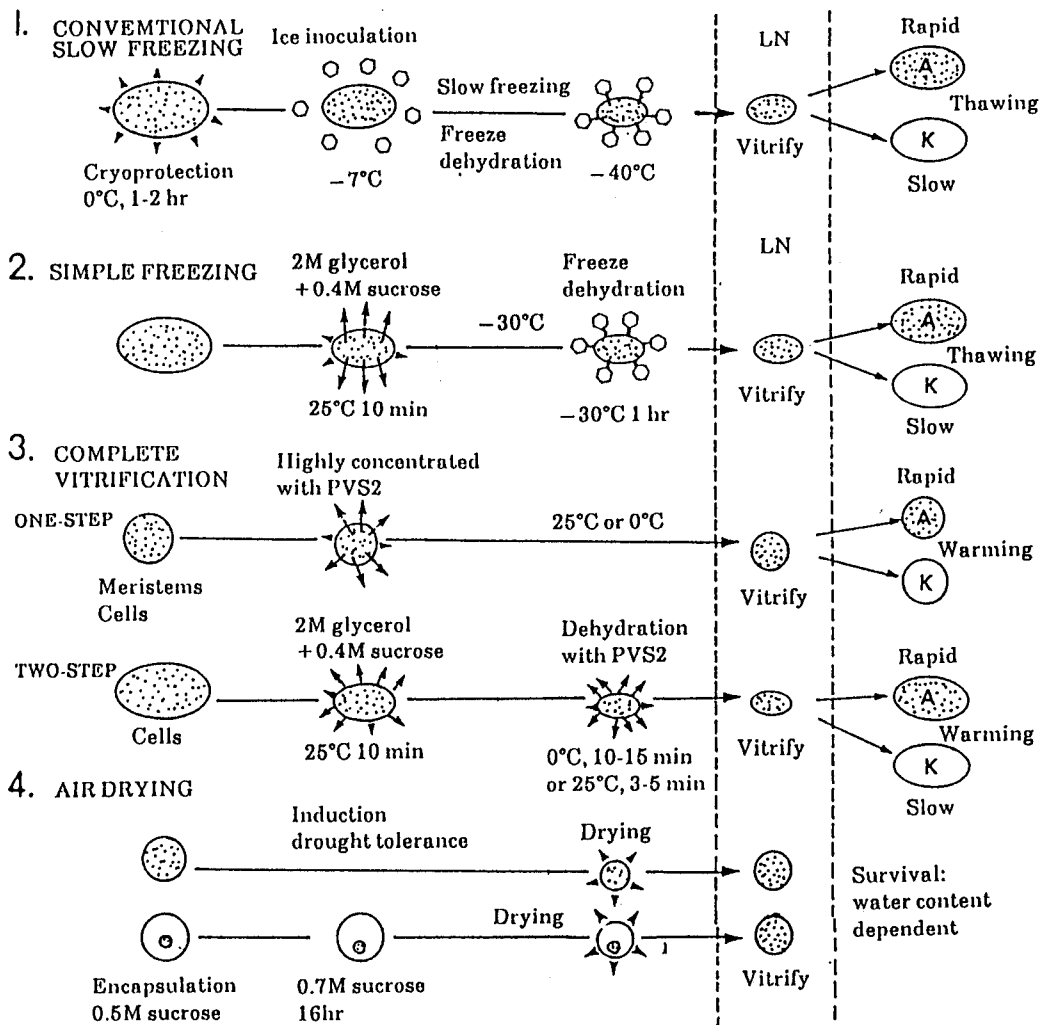


Fig.1-1. Cryogenic strategies for survival of cultured cells and meristems cooled to -196°C. (Sakai 1993)

A: alive; K; killed.

第2章 材料と保存後に形成したワサビ植物体の生育条件

1)材料の無菌化

本研究の培養材料として、ワサビ‘島根3号’を主として用いた。まず、材料の無菌化は、山田・春木(1992)の報告に準じて Fig. 2-1 に示す手順で行った。すなわち、当試験場のガラス温室内で育成中の株より発生した花茎 (Fig. 2-2) の腋芽を用い、花茎の一部を付けた腋芽を十分水洗後、70%エタノールで30秒間、さらに有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム液で10分間浸漬して表面殺菌を行った。次に、滅菌水で3回すすいでから腋芽を硝酸カリウムと硝酸アンモニウムを1/2に希釈した Murashige & Skoog培地 (1962)(以下 1/2MS)にベンジルアミノプリン (BA) 0.1 mg/l添加し、0.2% Gellan gumで固化した培地を入れた試験管 (径11 mm) に置床した。培養条件は、20°C、 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、16時間日長とし、35~40日間隔で上記の培地で継代培養を行った。30日間の継代培養後、草丈が30~50mmに生長したワサビのシュート (Fig. 2-3) から、葉原基1~3枚を付けた頂芽の茎頂基部を直径約1 mm、高さ約1 mmの大きさに摘出して (Fig. 2-4)、以下の本研究における超低温保存処理に供試した。

2)超低温保存後に形成したシュートからの植物体再生と順化

それぞれの方法で液体窒素保存した茎頂は再培養用培地に置床すると、上記の条件で約30日後に草丈5~10 mm、展葉が2枚程度のシュートに再生した。これらのシュートは伸長を促進させるため、さらに約30日間、同一条件で継代培養した。草丈が20 mm程度になったシュートは、ホルモンフリーの1/2MS固形培地を70 ml 入れた200 ml 容メリクロンフラスコに移植して、継代培養と同一条件で30~40日間培養した。ワサビはこの処理で容易に発根でき、十分な根量になった幼植物体はバーミキュライトを入れた育苗箱に植えて22°C、湿度70%、 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の12時間日長条件下で順化させた。ワサビ培養苗の順化は比較的容易で、ほぼ全てが活着できた。約30日間の順化が終了したワサビ苗はガラス温室内に移され、直射日光が当たらないよう遮光して25~15°Cで栽培した。

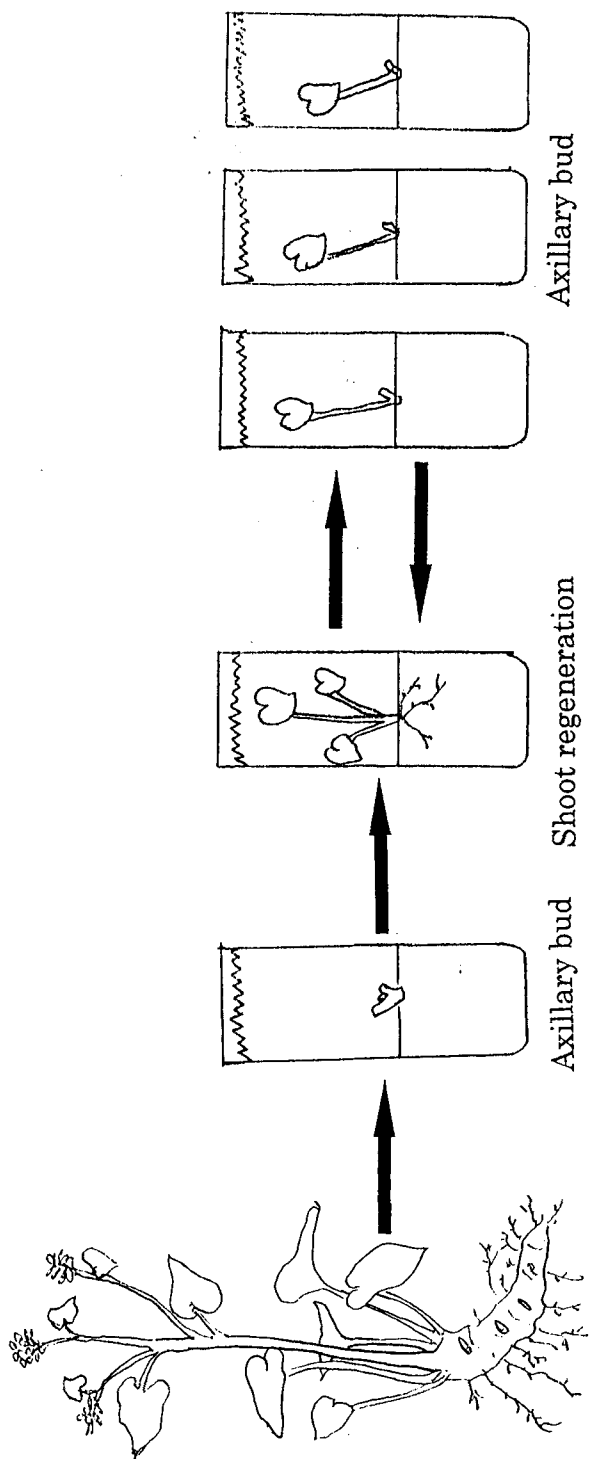


Fig.2-1. Procedure for mass propagation of wasabi shoots in vitro. (Yamada & Haruki 1992, modified)



Fig.2-2. Flower stalks of wasabi with axillary buds.



Fig.2-3. In vitro-grown shoots of wasabi.
Developed shoots cultured on 1/2MS medium supplemented
with 0.1 mg/l BA after 30 days of culture.

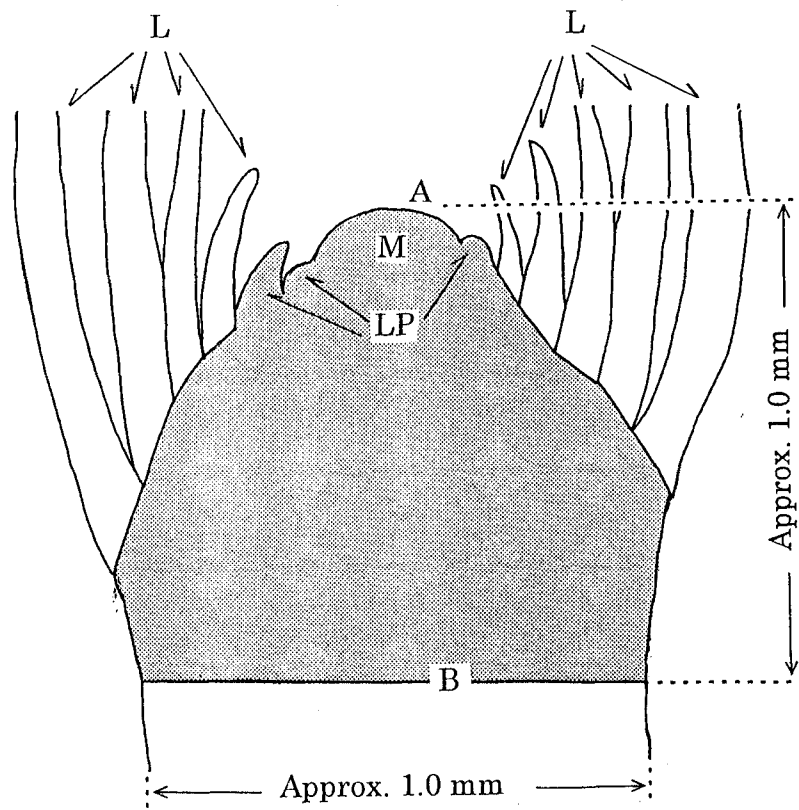


Fig.2-4. Longitudinal section of an excised apical meristem of wasabi.

L: leaf, M: meristematic dome, LP: leaf primordia.

(A) upper and (B) lower ends of an excised apical meristem.

第3章 ガラス化法によるワサビ培養茎頂の超低温保存

植物の超低温保存法は、緒論で述べたように脱水方法で4種類に分類される。この方法は、茎頂等を凍害防御剤であるガラス化液に浸漬することにより、細胞内にガラス化液をある程度浸透させ、同時に細胞の凍結水を除去し、液体窒素中に急速冷却してガラス化させる。ガラス化法では茎頂や不定胚等の多細胞からなる構造体を室温または0℃で一様に脱水でき、しかも特殊な機器を必要としないことから、最近、多くの作物で成功例が報告されている。この方法は、処理時間が短く操作が簡単で、保存後のシュート形成率も高いことが大きな特徴である。そこで、ワサビ培養茎頂を用いて、ガラス化法による超低温保存法の最適処理条件を検討した。

1. 実験方法

1) ガラス化法の操作手順

ワサビ培養茎頂におけるガラス化法は、Fig. 3-1 に示すように次の7つの手順から成る。

- (a) 0.3 Mのしょ糖を含む1/2MS固形培地での20℃、 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の8時間日長で、約16時間の前培養（予備的な脱水耐性の付与）
- (b) 2 Mグリセリンと 0.4 Mしょ糖の混合液で25℃、20分間のローディング処理（脱水耐性の付与）
- (c) PVS 2液による25℃または0℃での浸透脱水（凍結水の除去）
- (d) 液体窒素中への急速冷却（ガラス化）
- (e) 40℃温水での急速加温（脱ガラス化）
- (f) 1.2 Mしょ糖液による20～30分間の洗浄・希釈（アンローディング；ガラス化液の除去と急激な再吸収による傷害の回避）
- (g) 再培養

なお、前培養条件は 20°C 、 $60\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、8時間照明で16時間、ローディング処理は 25°C で20分間、P V S 2液の処理温度は 0°C または 25°C で適当な時間行った。また、アンローディング処理は 25°C で20分間行った。P V S 2液は、Sakaiら(1990)のガラス化液を用いた (Table 3-1)。P V S 2液による脱水処理は、1.8 ml容クライオチューブに10個の茎頂を入れ、それに 1.8 mlのP V S 2液を加えて行った。途中1回、新鮮な液に交換し、所定の時間脱水処理した。その後、新しいP V S 2液 1 mlに茎頂を浸して直接液体窒素中に投入し、急速冷却した (冷却速度: 約 $280^{\circ}\text{C}/\text{min}$)。急速加温は、クライオチューブを 40°C のウォーターバスに直接入れて行った (昇温速度: 約 $250^{\circ}\text{C}/\text{min}$)。つぎに、茎頂は、B A $0.1\text{mg}/\text{l}$ と3%しょ糖を含む $1/2\text{MS}$ 固形培地に置床し、通常の条件で培養し、翌日新しい培地に移植した。なお、シュート形成率は、置床後21日後に正常なシュートを形成した茎頂を、用いた茎頂の百分率で表した。各実験は、1区10茎頂を使用し、3~4回反復した。

2) 前培養条件の検討

前培養における最適しょ糖濃度を明らかにするため、 $1/2\text{MS}$ 固形培地に異なる濃度のしょ糖を添加し、ガラス化法で液体窒素温度に冷却された茎頂のシュート形成率が比較された。なお、本実験では、2 Mグリセリンと 0.4 Mしょ糖液でローディング処理し、P V S 2液処理条件は 0°C 、50分間とした。

3) ローディング条件の検討

異なるローディング液を用いて、それらの効果を比較した。使用したローディング液は Table 3-3 で示すとおり、0.4 Mしょ糖液； 1, 2 M グリセリン + 0.4 M しょ糖液； 2 Mグリセリン； 1.5 M グリセリン + 0.4 M しょ糖 + 5% DMSO液； 60, 50, 40% P V S 2液の8種類の溶液で、それぞれのシュート形成率を比較した。なお、前培養のしょ糖濃度は 0.3 M とし、P V S 2液の処理条件は 25°C 、10分間とした。

4) ガラス化液の検討

Table 3-4 に示す7種類のガラス化液を用い、それらの液に前培養及びローディング処理後の茎頂を25℃、10分間処理した後、液体窒素中に冷却し、それぞれのシュート形成率を比較した。なお、前培養しょ糖濃度は0.3 M、ローディング液は2 Mグリセリンと0.4 Mしょ糖の混合液を用いた。

5) P V S 2 液の処理条件の検討

0.3 Mしょ糖で前培養した後、2 M グリセリンと 0.4 M しょ糖の混合液で25℃で20分間ローディング処理した後、P V S 2 液で25℃で0～30分間、または0℃で0～60分間の浸透脱水を行い、最適処理時間を求めた。

6) ガラス化法の前培養におけるグリセリン添加効果

ガラス化法において高いシュート形成率を得るために、より効果のある前培養条件を見出すためしょ糖とグリセリンの組み合わせを検討した。

まず、0.3 Mしょ糖と0.1, 0.3, 0.5, 1.0 Mの異なる濃度のグリセリンを添加した固形培地でワサビ茎頂を20℃で約16時間、前培養し、ガラス化法で液体窒素冷却後のシュート形成率を比較した。なお、ローディング処理は行わず、P V S 2 液処理条件は、25℃で10分間とした。また、前培養しょ糖濃度についても0, 0.1, 0.3, 0.5 Mでそれぞれ0.5 Mグリセリンと組み合わせ、最適条件を検討した。

つぎに、0.3 M しょ糖、または0.3 M しょ糖 + 0.5 M グリセリン添加培地で16時間前培養した茎頂、及び前培養なしの茎頂について、液体クロマトグラフにより茎頂組織に含まれる糖とグリセリン濃度の定量を行った。茎頂は、それぞれの培地に切り口を下に向けて置床し、培地の付着を防ぐため分析前に接地していた基部の厚さ 0.2～0.3 mm の部分を切除した。つぎに、30個の茎頂は新鮮重を計測後、同じ重さの蒸留水を加えてホモジナイザーで粉碎した。さらに、遠心分離後にその残渣を0.45 μm のH P L C用クロマトディ

スクで濾過し、蒸留水で希釈して最終濃度25%にし、分析用サンプルとした。液体クロマトグラフは、MILLIPORE製の Waters 410、カラムは和光純薬製のWAKOPAK 10186（充填剤Wakosil 5 NH₂）、溶離液はアセトニトリル／蒸留水（75:25）（v/v）を用いて流量 1 ml/min の条件で分析を行った。なお、各区とも分析は4反復行い、糖とグリセリンは新鮮重または乾物重当たりのモル濃度で表し、乾物重は100個の茎頂を80℃で約10時間乾燥して求めた。

2. 結果

Fig. 3-2 は、ガラス化法で液体窒素に冷却されたワサビ茎頂のシュート形成率に及ぼす前培養しょ糖濃度の影響を示したものである。しょ糖濃度 0.3Mで前培養した区で最も高いシュート形成率、約95%が得られた。また、前培養期間が3日間になるとシュート形成率がかなり低下した（Table 3-2）。0.3 Mしょ糖の前培養区、または2 Mグリセリンと0.4 Mしょ糖の混合液によるローディング処理区ではシュート形成率は60~70%であったが、これら2つの処理を併用すると100%となった（Table 3-2）。

つぎに、ワサビ茎頂のガラス化法における超低温保存に最も適するローディング液の検討を行った。90%近いシュート形成率が得られたのは、Table 3-3 に示すように、2 Mグリセリンと0.4 Mしょ糖の混合液で処理した区であった。したがって、この液が供試したローディング液として最適であることが明らかとなった。

前培養、ローディング処理した後のワサビ茎頂に7種類のガラス化液で脱水を行い、最も適するガラス化液を検討した。Table 3-4 で示すように、液体窒素に冷却後に90%以上のシュート形成率が得られたガラス化液は、しょ糖濃度が0.4 Mの場合にはPVS2液のみであった。

PVS2液における25℃および0℃での最適処理時間を検討した。Fig. 3-4 で示すように、25℃では10分間、0℃では30~60分間で90%以上の高いシュート形成率が得られた。

液体窒素に冷却後、再培養した茎頂はほぼ全体が緑色を維持し（Fig. 3-5）、速やかに生

育をはじめた。再培養21日後には展葉が2枚程度見られ (Fig. 3-6), 60日後には完全な植物体に再生した (Fig. 3-7)。これらは正常に生育し, 形態的変異は観察されなかった。

品種間差を検討するため, 本実験で用いた‘島根3号’以外に‘さんべ’, ‘いわみ’, ‘羅漢2号’について, この最適処理条件でガラス化法による超低温保存を行った。それらのシュート形成率は若干の品種による差は認められたものの, いずれも約80%以上であった (Table 3-5)。

つぎに, グリセリンとしょ糖を含む培地での前培養について検討した。この実験では, ローディング処理は行わなかった。0.3 Mしょ糖培地に 0.5 M及び1 Mのグリセリンを添加した培地で前培養された茎頂は, 80%以上のシュート形成率を示した (Table 3-6)。また, 0.5 Mグリセリン溶液に 0, 0.1, 0.3及び0.5 Mのしょ糖を添加した培地で前培養された茎頂のシュート形成率は, 0.3 Mしょ糖添加区が最も高く, 約82%であった (Table 3-7)。つぎに, グリセリン以外の凍害防御剤として 0.5 Mのエチレングリコール, あるいはDMSOを 0.4 Mしょ糖と組み合わせてその効果を比較検討したが, グリセリンより低いシュート形成率であった (Table 3-8)。なお, 0.3 Mしょ糖と 0.5 Mグリセリンを含む培地で前培養後, ローディング処理をしてもシュート形成率は高くなり, 付加的効果は認められなかった (Table 3-9)。結局, 前に示した 0.3 Mしょ糖培地で前培養後, ローディング処理した場合のシュート形成率 (100%) を越えることはできなかった。

前培養された茎頂組織に含まれる各種の糖, グリセリン量を液体クロマトグラフで定量した。0.3 Mしょ糖で前培養された茎頂に含まれるしょ糖濃度は, 無処理の場合と比べ約30倍, ブドウ糖及び果糖の濃度は約2倍に高まっていたが, それ以外の糖, ソルビトール等の糖アルコールの含有量は極めて少なく, 検出できなかった (Fig. 3-3a)。0.3 Mしょ糖+0.5 Mグリセリンで前培養された茎頂組織は, 0.3 Mしょ糖区と比べ上記3種類の糖濃度の含有率は10~20%低かったが, グリセリン濃度は約 0.38 M含まれていた。また, 茎頂の乾物重当たりの各種の糖, グリセリンの濃度を示した (Fig. 3-3b)。

3. 結論

ガラス化法によるワサビ培養茎頂の超低温保存における最適処理条件を決定した。すなわち、ワサビ培養茎頂のガラス化法による超低温保存の最適処理条件は、0.3 Mしょ糖添加培地による16時間の前培養、2 Mグリセリンと 0.4 Mしょ糖の混合液による25℃、20分間のローディング処理、及び25℃、10分間、または0℃、30～60分間のPVS 2液処理区であることが明らかとなった。なお、0.3 Mしょ糖培地に 0.5 Mグリセリンを添加して前培養したとき、ローディング処理なしでも80%程度のシュート形成率が得られたが、上記の 0.3 Mしょ糖培地での前培養とローディング処理によるシュート形成率を越えるまでには至らなかった。

Table 3-1. Component of PVS2 solution.

Glycerol	30% (w/v)
Ethylene Glycol	15% (w/v)
DMSO	15% (w/v)
Sucrose	0.4 M

Dessolved in MS liquid medium (pH 5.8)
(Sakai et al. 1990)

Table 3-2. Effects of preculturing and loading on the shoot formation of wasabi apical meristems cooled to -196°C by vitrification.

Period of preculture (day)	Loading	Shoot formation (% ± S.E.)
—	—	10.0 ± 1.4
—	+	73.3 ± 2.4
1	—	61.2 ± 2.7
1	+	100
3	—	25.1 ± 2.7
3	+	40.0 ± 2.7

Apical meristems following preculturing and loading were dehydrated with PVS2 at 25°C for 10 min. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN₂. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

Table 3-3. Effect of loading treatment on the shoot formation of wasabi apical meristems cooled to -196°C by vitrification.

Loading solution	Shoot formation (%±S.E.)
0.4 M suc ¹	20.0± 0
0.4 M suc + 1.0 M gly ²	40.0± 5.8
0.4 M suc + 2.0 M gly	86.3± 3.2
2.0 M gly	46.7± 8.8
40% PVS2 ³	50.0± 11.5
50% PVS2	80.0± 5.8
60% PVS2	33.3± 14.5
0.4 M suc + 1.5 M gly + 1.5 M DMSO	80.0± 5.8

Precultured meristems with 0.3 M sucrose for 16 hr were loaded with various solutions for 20 min at 25°C before being dehydrated with PVS2 solution at 25°C for 10 min prior to a plunge into LN₂. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. ¹ sucrose, ² glycerol, ³ 40% of the stock PVS2 solution.

Table 3-4. Effect of vitrification solution of wasabi apical meristems cooled to -196°C by vitrification.

Vitrification solution	Shoot formation (% ± S.E.)
0.4 M suc ¹	
+ 40% gly ² + 20% EG ³	76.7 ± 3.3
+ 40% gly + 15% EG	30.0 ± 10.0
+ 35% gly + 20% EG	53.3 ± 3.3
+ 20% gly + 40% EG	76.7 ± 6.7
+ 35% gly + 15% EG + 5% DMSO	50.0 ± 5.8
+ 30% gly + 15% EG + 15% DMSO (PVS2)	92.5 ± 2.5
40% suc + 40% gly (PVS3)	30.0 ± 0

Precultured meristems with 0.3 M sucrose for 16 hr were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C before being dehydrated with various vitrification solutions at 25°C for 10 min prior to a plunge into LN₂. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates. ¹ sucrose, ² glycerol (w/v %), ³ ethylene glycol(w/v %).

Table 3-5. Shoot formation of vitrified apical meristems from four cultivars of wasabi cooled to -196°C.

Cultivar	Shoot formation (% \pm S.E.)
Shimane No.3	92.2 \pm 1.7
Iwami	78.5 \pm 2.9
Sanbe	81.8 \pm 2.7
Rakan No.2	84.9 \pm 2.6

Precultured meristems with 0.3 M sucrose for 16 hr were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C before being dehydrated with PVS2 at 0°C for 50 min prior to a plunge into LN₂. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

Table 3-6. Effect of glycerol concentration in combination with 0.3M sucrose on the shoot formation of wasabi meristems cooled to -196°C by vitrification.

Glycerol conc. (M)	Shoot formation (%±S.E.)
0	55.0±5.0
0.1	65.0±6.5
0.3	76.7±6.7
0.5	88.3±4.8
1.0	82.5±7.5

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose plus various concentrations of glycerol for 16 hr at 20°C, then dehydrated with PVS2 at 25°C for 10 min without loading treatment. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN₂. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates.

Table 3-7. Effect of sucrose concentration in combination with 0.5 M glycerol on the preculturing of wasabi meristems cooled to -196°C by vitrification.

Sucrose conc. (M)	Shoot formation (%±S.E.) glycerol concentration (M)	
	0	0.5
0	3.3± 3.3	10.0± 5.8
0.1	20.0± 11.5	26.7± 8.8
0.3	50.0± 5.8	82.5± 4.8
0.5	33.3± 3.3	46.7± 12.0

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with various concentrations of sucrose and glycerol for 16 hr at 20°C, then dehydrated with PVS2 at 25°C for 10 min without loading treatment. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN₂. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates.

Table 3-8. Effect of different cryoprotectants in combination with 0.3 M sucrose on the shoot formation of wasabi meristems cooled to -196°C by vitrification.

Cryoprotectants	Shoot formation (%±S.E.)	
	Preculture time (hr)	
	4	16
0.3 M suc + 0.5 M EG	3.3±3.3	23.3±14.5
0.3 M suc + 0.5 M DMSO	26.7±3.3	56.7± 8.8
0.3 M suc + 0.5 M gly	30.0±5.8	80.0± 5.8
0.3 M suc + 0.5 M gly + 0.5 M DMSO	33.3±3.3	56.7±18.6

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose plus cryoprotectants for 16 hr at 20°C, then dehydrated with PVS2 at 25°C for 10 min without loading treatment. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN₂. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates.

Table 3-9. Effects of preculturing and loading treatment on the shoot formation of wasabi apical meristems cooled to -196°C by vitrification.

Preculture	Loading treatment	Shoot formation (%±S.E.)
0.3 M suc	-	61.2±2.7
0.3 M suc + 0.5 M gly	-	85.0±2.9
0.3 M suc	+	97.5±0.4
0.3 M suc + 0.5 M gly	+	83.3±3.3

Precultured meristems were loaded with a mixture of 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C and treated with PVS2 for 10 min at 25°C prior to a plunge into LN₂. Material; Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates.

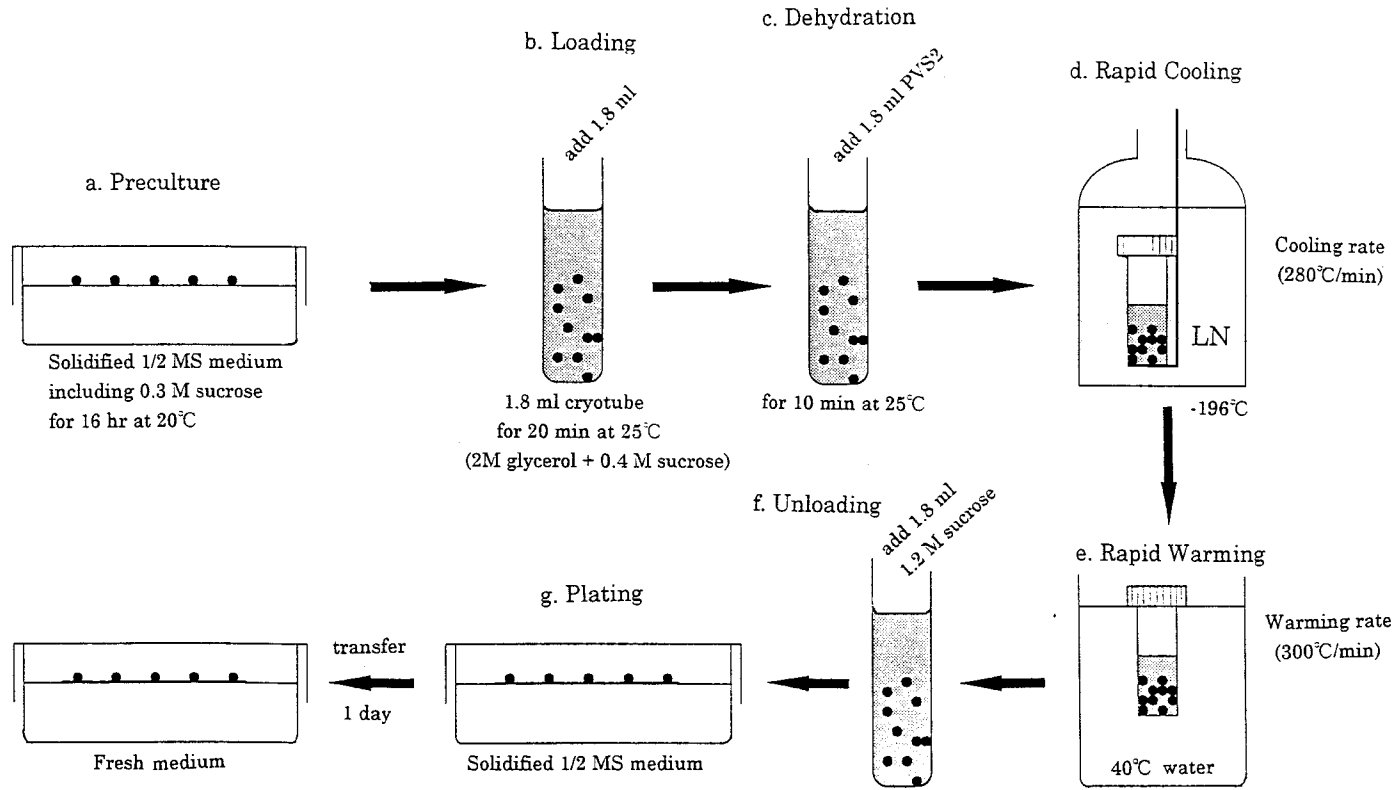


Fig.3-1. Procedure for vitrification of wasabi meristems

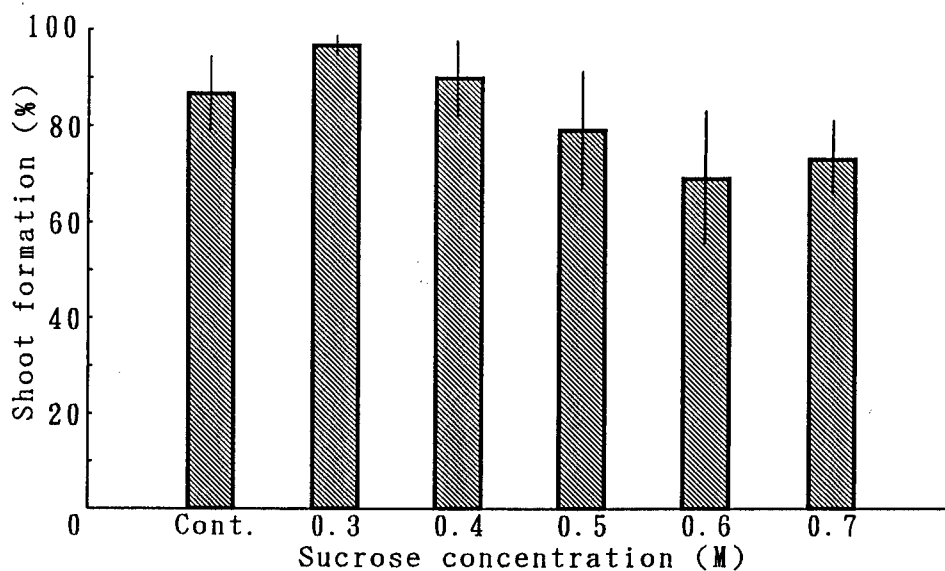


Fig. 3-2. Effect of preculture by different concentrations of sucrose on the shoot formation of apical meristems cooled to -196°C by vitrification. Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with various concentrations of sucrose for 16-20 hr at 20°C , then loaded with a mixture of 2 M glycerol and 0.4 M sucrose before dehydration with PVS2 at 0°C for 50 min. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN_2 . Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. The vertical bars represent standard error.

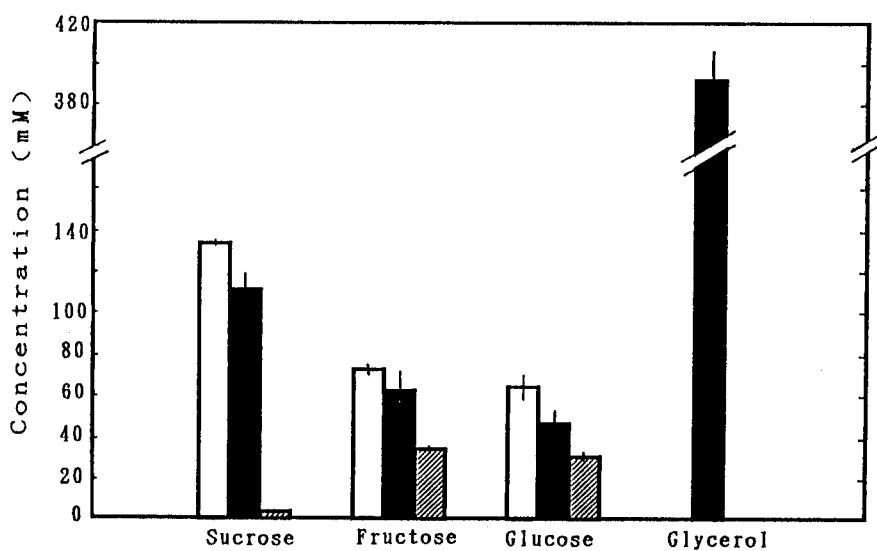


Fig. 3-3a. Sugar and glycerol contents of meristems precultured with 0.3 M sucrose (□), a mixture of 0.3 M sucrose plus 0.5 M glycerol (■) for 16 hr at 20°C. (▨): non-precultured.

Sugar and glycerol concentrations were expressed with a fresh weight basis. Material: Shimane No.3. The vertical bars represent standard error.

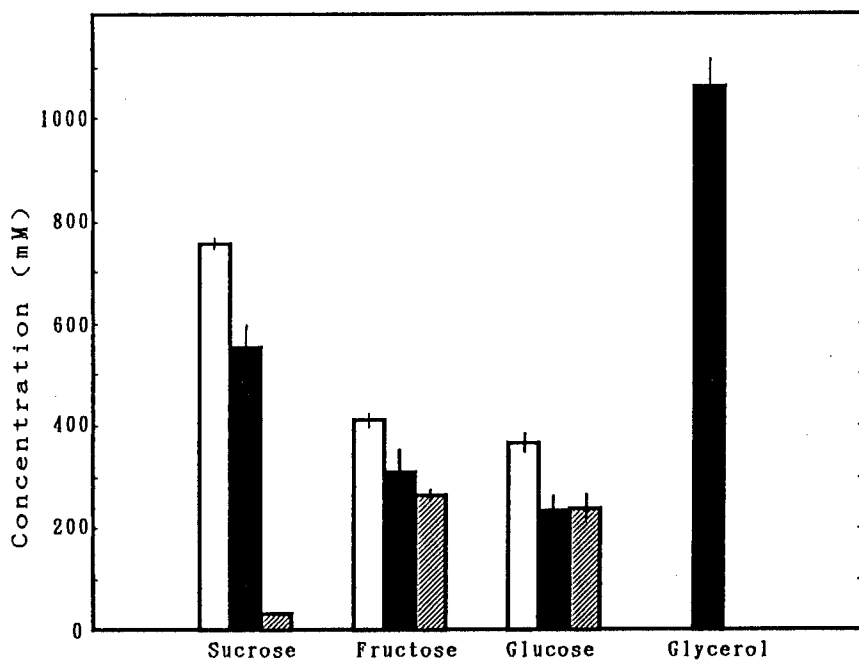


Fig. 3-3b. Sugar and glycerol contents of meristems precultured with 0.3 M sucrose (□), a mixture of 0.3 M sucrose plus 0.5 M glycerol (■) for 16 hr at 20°C. (▨): non-precultured.

Sugar and glycerol concentrations were expressed with a dry weight basis. Material: Shimane No.3. The vertical bars represent standard error.

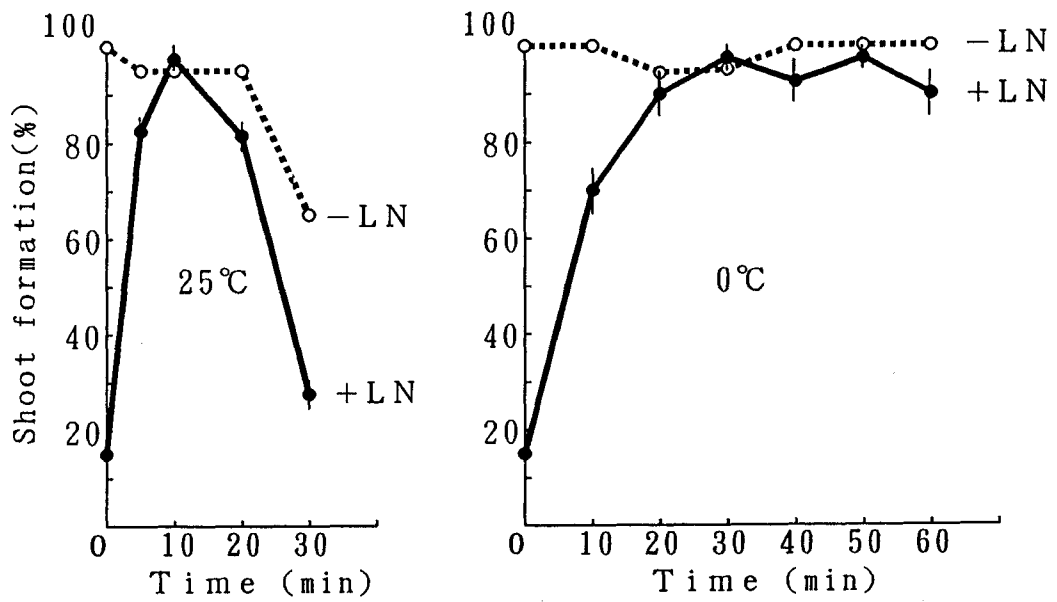


Fig. 3-4. Effect of exposure time to PVS2 at 0 or 25°C on the shoot formation of apical meristems of wasabi cooled to -196°C by vitrification. Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16-24 hr at 20°C, then loaded with a mixture of 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 20°C before dehydration with PVS2. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. The vertical bars represent standard error.

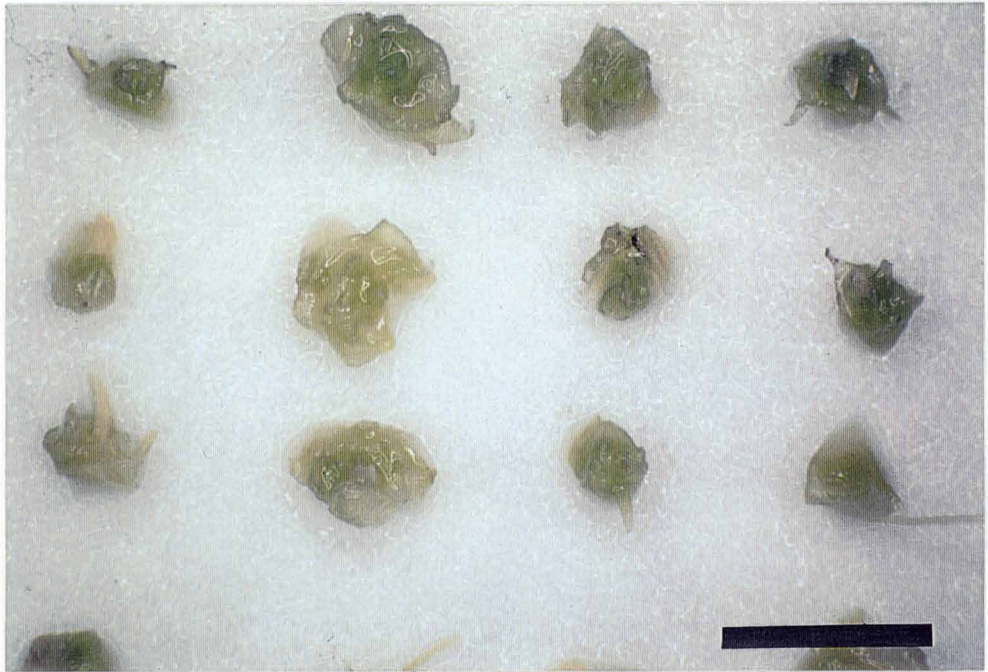


Fig.3-5. Apical meristems cooled to -196°C by vitrification 3 days after reculture.

Material: Shimane No.3. Bar = 2 mm.



Fig.3-6. Shoots developed from apical meristems cooled to -196°C by vitrification 21 days after reculture.

Material: Shimane No.3. Bar = 10 mm.



Fig.3-7. A plantlet developed from an apical meristem cooled to -196°C by vitrification 60 days after reculture.

Material: Shimane No.3. Bar = 10 mm.

第4章 アルギン酸ビーズ乾燥法によるワサビ培養茎頂の超低温保存

アルギン酸ビーズ乾燥法は、径約5 mmのアルギン酸塩のゲルビーズ中に茎頂を包埋し、これを0.8 Mしょ糖液で処理した後に乾燥させ、液体窒素中に冷却させる方法である。そのため、ガラス化法と同様に特殊な機器を使用する必要がないことから、最近、多くの植物の茎頂、不定胚等で成功例が報告されている。この方法の特徴は、操作が比較的簡易であるため、同時に多量の材料を処理することが可能である。しかし、その欠点として、茎頂を液体窒素保存するとその後のシュート形成率がガラス化法と比べ低い場合が多い。本章では、アルギン酸ビーズ乾燥法によるワサビ茎頂の超低温保存への応用について検討した。

1. 実験方法

1) アルギン酸ビーズ乾燥の操作手順

ビーズ乾燥法は、Fig. 4-1 に示すように、次の7つの手順から成る。

- (a) 0.3 Mのしょ糖を含む1/2MS 固形培地で20°C、 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の8時間日長で、約16時間の前培養（予備的な脱水耐性の付与）
- (b) 茎頂をアルギン酸のゲルビーズに包埋
- (c) 0.8 Mしょ糖液で20°C、16時間処理（乾燥耐性の誘導）
- (d) シリカゲルによるビーズの乾燥（凍結水の除去）
- (e) 液体窒素中への急速冷却（ガラス化）
- (f) 40°C温水中で急速加温（脱ガラス化）
- (g) 再培養

なお、ビーズの作成は、茎頂を3%(w/v)アルギン酸ナトリウム溶液に入れ、1 mlプラスチックシリンジを用いて、100 mM塩化カルシウム溶液に滴下して約30分間固化させ、1個の茎頂を含む径約5 mmのビーズを作成した (Fig. 4-2)。また、ビーズの作成に必要な2

種類の溶液は、0.4 Mしょ糖及び1/2M S培地成分を含み、pHを5.8に調整した。つぎに、ビーズの表面を濾紙で軽く拭き、0.8 Mしょ糖を含む1/2M S液体培地中で、20℃、約16時間処理して乾燥耐性を誘導した。ビーズの乾燥は、シャーレに50 gの乾燥したシリカゲルを入れ、その上に敷いた濾紙上にビーズを置き、シャーレの蓋をしてからパラフィルムで密封した (Fig. 4-3)。適正な含水率まで乾燥したビーズ (Fig. 4-4) は、10個ずつ 1.8 ml 容のクライオチューブに入れて液体窒素で冷却した (冷却速度：約280℃/min)。急速加温は、クライオチューブを40℃のウォーターストックに直接入れて行った (昇温速度：約250℃/min)。つぎに、ビーズは、BA 0.1 mg/lと3%しょ糖を含む1/2M S固形培地に置床し、通常の条件で培養した。なお、シュート形成率は、置床後21日後に正常なシュートを形成した茎頂を、用いた茎頂の百分率で表した。各実験は、1区10茎頂を使用し、3～4回反復した。

2) ビーズの最適含水率、前培養及び前処理しょ糖濃度の検討

ビーズの最適含水率を決定するため、0.3 Mしょ糖培地で約16時間の前培養し、アルギン酸塩のゲルビーズで包埋して0.8 Mしょ糖液で前処理したワサビ茎頂は、シリカゲルで含水率11～31% (新鮮重比) まで乾燥させ、液体窒素保存後のシュート形成率を調査した。なお、ビーズの含水率は、新鮮重比として示し、つぎの式で求めた。

$$\text{ビーズの含水率 (\%)} = (\text{新鮮重} - \text{乾物重}) / \text{新鮮重} \times 100$$

なお、ビーズはそれぞれ1個の茎頂を含み、その乾物重は80℃で100時間の乾燥後に計測した。

茎頂の前培養しょ糖濃度を0.3, 0.5, 0.7 Mで、また、乾燥前の前処理はしょ糖濃度0.6, 0.8, 1.0 Mで行い、それぞれ新鮮重比18～19%まで乾燥させ、液体窒素で保存して、最適処理条件を検討した。

3) グリセリン添加による乾燥耐性付与

0.8 M しょ糖を含む1/2MS 液体培地による25℃, さらにより高い乾燥耐性付与するためそれぞれ 0.5, 1.0, 1.5 Mのグリセリンを添加して25℃, 16時間処理した. つぎに, ビーズは, シリカゲルで約7時間乾燥された後, 液体窒素中に冷却された. ビーズの含水率を測定し, それぞれの液体窒素冷却, 及び未冷却のシュート形成率を比較した.

4) ビーズ及びビーズ内の茎頂のガラス転移点

0.8 M しょ糖溶液, 及び0.8 M しょ糖と1 Mグリセリンの混合液で16時間処理した後, それぞれ19%, 22%の含水率まで乾燥させた茎頂入りのビーズをガラス転移点測定に供試した. ビーズ全体, ビーズのみ及びその内部の茎頂のみの3種類の試料を11~34 mgとり, 径7mmの耐圧アルミニウムセルに入れ, 示差走査熱量計(島津DSC50)にセットした. これをDSC内で5℃/minで-130℃まで冷却し, 3℃/minで昇温する際の過程でガラス転移点を測定した.

2. 結果

1) ビーズの最適含水率と前培養及び前処理用しょ糖濃度の検討

アルギン酸ビーズ乾燥法における最適含水量を決定するため, ビーズを11~31% (新鮮重比)の範囲に乾燥し, 液体窒素温度に急速冷却後のシュート形成率を求めた. Fig. 4-5に示すように, 液体窒素浸漬区(+LN)ではビーズの含水率18~20%の茎頂で最高のシュート形成率, 約65%を示した. 一方, 液体窒素未浸漬区(-LN)では含水率約22%以下でシュート形成率が急に低下した.

茎頂は, ビーズ中に包埋する前に0.3~0.7 Mの異なる濃度のしょ糖を含む1/2MS 固形培地で20℃, 約16時間前培養した. Table 4-1で示すように, 最も高いシュート形成率(約67%)は, 0.3 M しょ糖濃度で前培養した茎頂で得られた. しかし, 0.5 M以上のしょ糖濃度で前培養された茎頂のシュート形成率は低下し, 無処理ではすべて枯死した.

つぎに、ビーズ中に包埋後に行う約16時間の前処理におけるしょ糖濃度を 0.6, 0.8, 1.0 Mで比較した。その結果、液体窒素保存後の最も高いシュート形成率(約68%)は、0.8 Mしょ糖で処理された茎頂で得られた。しかし、この濃度以外では極めて低いシュート形成率しか得られなかった (Table 4-2)。

以上の結果から、ワサビ‘島根3号’における培養茎頂のアルギン酸ビーズ乾燥法の液体窒素保存での最適処理条件は、しょ糖濃度 0.3 Mでの前培養；ビーズ包埋された茎頂を0.8 Mしょ糖で16時間処理；ビーズの含水率は18~20% (乾燥時間：約7時間)が適することが明らかとなった。これらの条件で、‘島根3号’以外の3品種のワサビを用いて品種間差を検討した。Table 4-3 で示すように、‘島根3号’と同等かそれ以上のシュート形成率(60~75%)となった。液体窒素に冷却後、再培養した茎頂は、2~3日後にはその基部が白変し茎頂ドームのみが緑色を残していた (Fig. 4-6)。しかし、21日後には展葉したシュートが得られ (Fig. 4-7)、60日後には発根した植物体に再生した (Fig. 4-8)。

2) グリセリン添加による乾燥耐性付与

乾燥耐性付与の目的で行う 0.8 Mしょ糖液による16時間の処理において、グリセリンを添加したところシュート形成率が高くなることが明らかになった。すなわち、グリセリンの添加濃度は1 Mが最も適し、この時のシュート形成率は約80%となり、0.8 Mしょ糖の単独処理の場合と比べると約15%高くなった (Table 4-4)。また、グリセリンを添加して処理された茎頂に必要な乾燥時間は、0.8 Mしょ糖単独処理と同様で7時間であったが、含水率は約21~22%としょ糖単独処理と比べ2~3%高くなった。

3) ビーズ及びビーズ内の茎頂のガラス転移点

乾燥前に0.8 Mしょ糖液で処理された場合、ビーズと茎頂の混合 (B + M)、ビーズのみ (B)、茎頂のみ (M) のガラス転移点は、それぞれ-40°C、-35°C、-30°Cであった (Fig. 4-9)。また、0.8 Mしょ糖に1 Mのグリセリンを添加して処理の場合には、それぞ

れのガラス転移点は、 -60°C 、 -60°C 、 -55°C となり (Fig. 4-10) , しょ糖単独処理と比べるとグリセリン添加のためガラス転移点がより低下した。

ビーズ及び莖頂のガラス転移と -80°C 等の液体窒素より高い温度における長期保存に関しては、今後研究する予定である。

4. 結論

ワサビ莖頂のアルギン酸ビーズ乾燥法は、 0.3 M しょ糖培地での前培養、 0.8 M しょ糖液での16時間の前処理、含水率 $18\sim 20\%$ まで乾燥後に液体窒素中で冷却した場合に、約 65% のシュート形成率が得られた。それに対し、 0.8 M しょ糖と 1 M のグリセリンの混合液で処理後に乾燥して液体窒素中に冷却した場合、シュート形成率が高くなった。これは、グリセリンが莖頂組織内に浸透して保水性が高くなったため、乾燥ストレス耐性が高まったことによると推察される。

Table 4-1. Effect of preculture on the shoot formation of encapsulated apical meristems cooled to -196°C.

Conc. of sucrose	Shoot formation (% ± S.E.)
Non-treated	0
0.3 M	67.7 ± 10.7
0.5 M	46.5 ± 18.5
0.7 M	12.5 ± 3.5

Precultured meristems were encapsulated with alginate gel beads with 0.4 M sucrose, and then treated with 0.8 M sucrose at 20°C for 16 hr before dehydration and cooling to -196°C. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

Table 4-2. Effect of sucrose treatment on shoot formation of encapsulated dried meristems cooled to -196°C.

Conc. of sucrose	Shoot formation (% ± S.E.)
Non-treated	0
0.6 M	17.5 ± 3.5
0.8 M	68.3 ± 10.4
1.0 M	25.0 ± 7.1

Precultured meristems were encapsulated with alginate gel beads with 0.4 M sucrose, and then treated with various concentrations of sucrose at 20°C for 16 hr before dehydration and cooling to -196°C.

Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

Table 4-3. Shoot formation of four cultivars of encapsulated dried apical meristems of wasabi cooled to -196°C.

Cultivars	Shoot formation (% \pm S.E.)
Shimane No.3	67.1 \pm 8.9
Daijin No.2	75.5 \pm 8.7
Mazuma	75.0 \pm 5.0
Sanbe	62.5 \pm 7.5

Precultured apical meristems were encapsulated with alginate gel beads with 0.4 M sucrose, and then treated with 0.8 M sucrose at 20°C for 16 hr before dehydration and cooling to -196°C. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

Table 4-4. Effect of glycerol concentration in combination with 0.8 M sucrose on the shoot formation of encapsulated dried wasabi meristems cooled to -196°C.

Sucrose (M)	Glycerol (M)	Shoot formation (% ± S.E.)
0.8	0	64.9 ± 7.9
0.8	0.5	65.2 ± 2.9
0.8	1.0	79.1 ± 4.8
0.8	1.5	74.1 ± 9.8
0	1.0	0

Precultured meristems were encapsulated with alginate gel beads with 0.4 M sucrose, and then treated with sucrose plus various concentrations of glycerol at 20°C for 16 hr before dehydration and cooling to -196°C. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

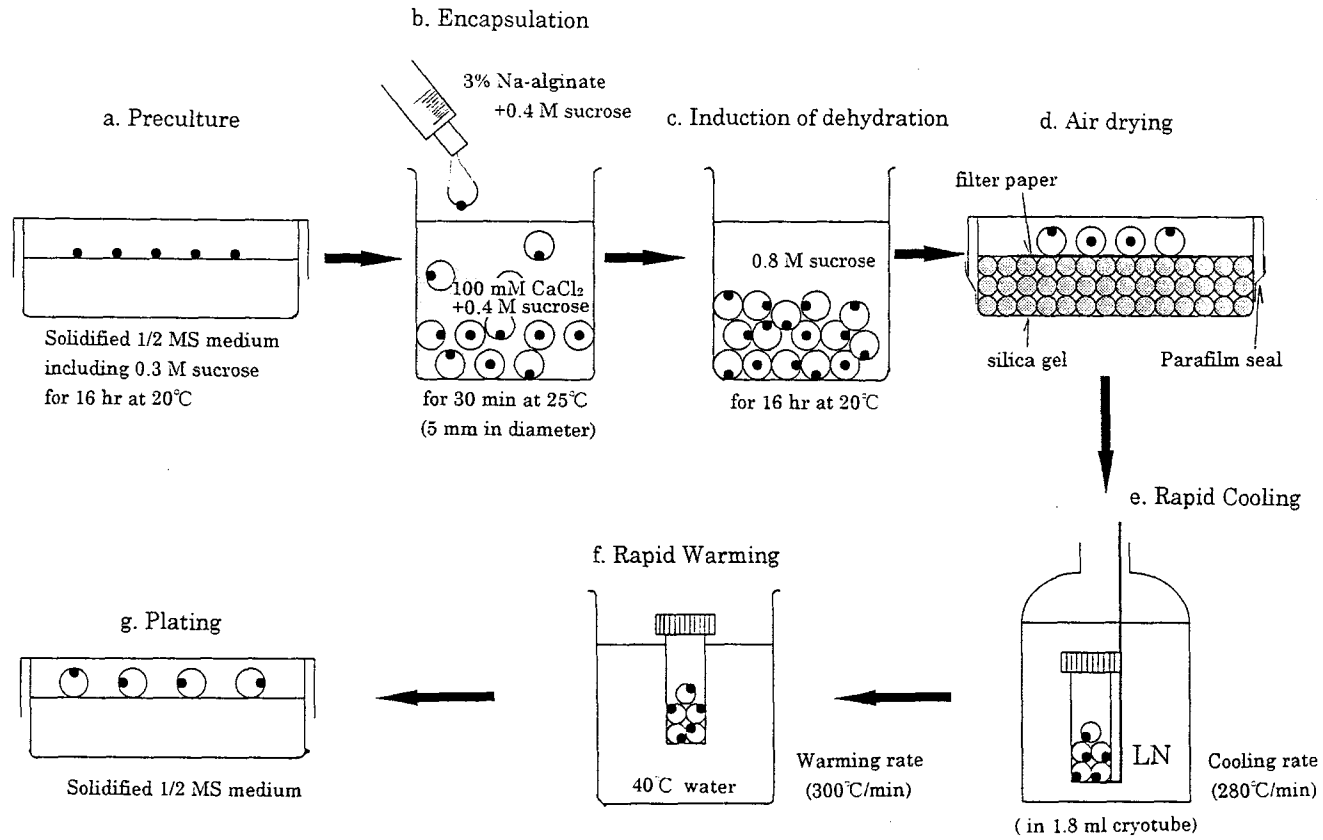


Fig.4-1. Procedure for encapsulation/dehydration of wasabi meristems

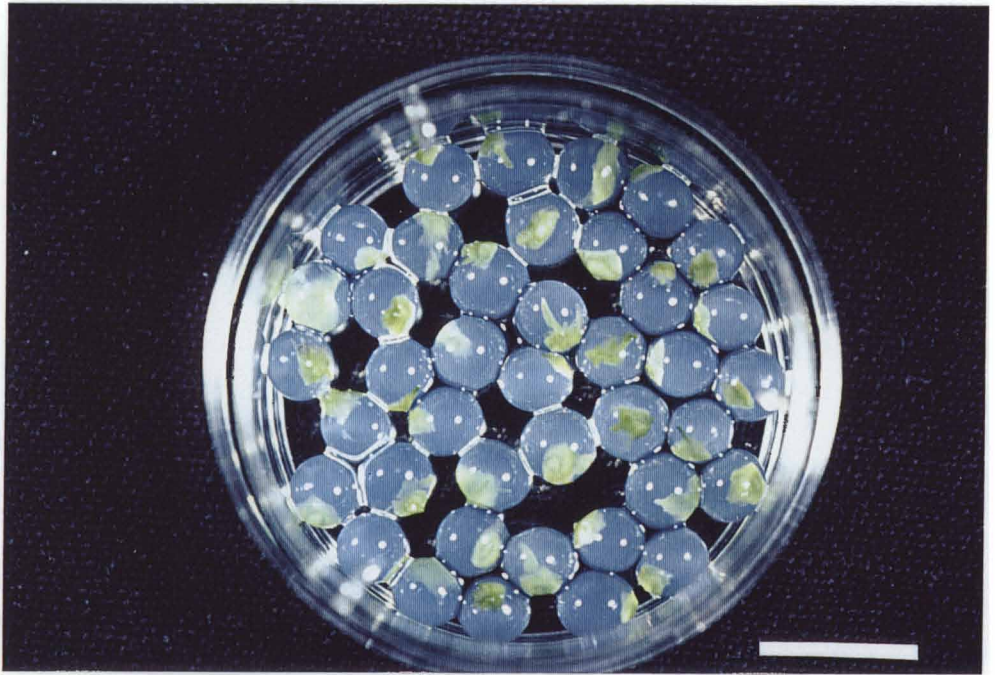


Fig.4-2. Encapsulated wasabi meristems into alginate-gel beads.
Bar = 10 mm.

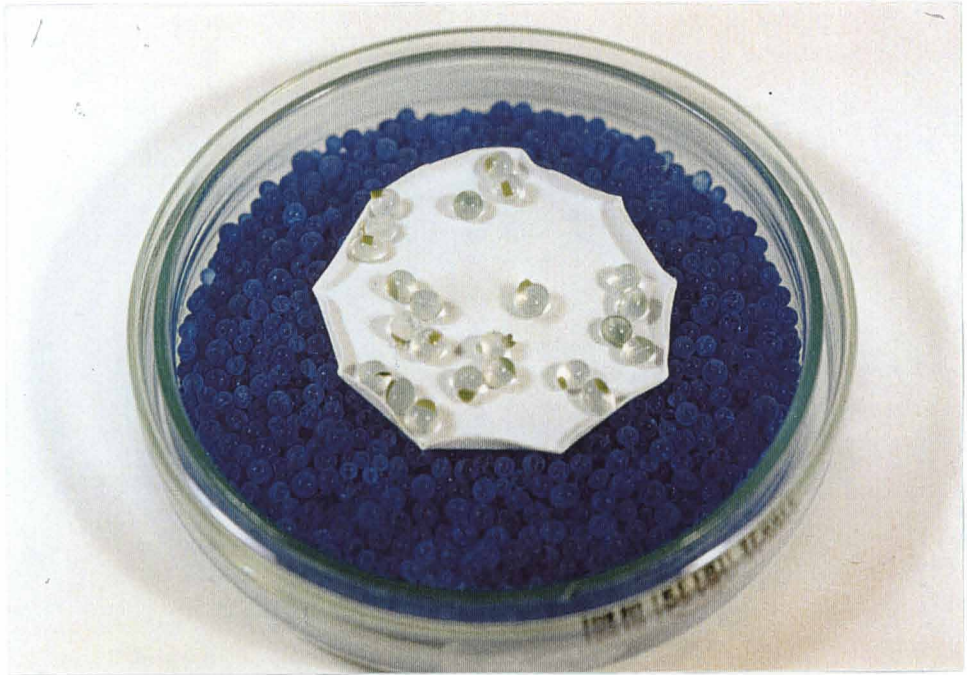


Fig.4-3. Method of dehydration of alginate-gel beads.

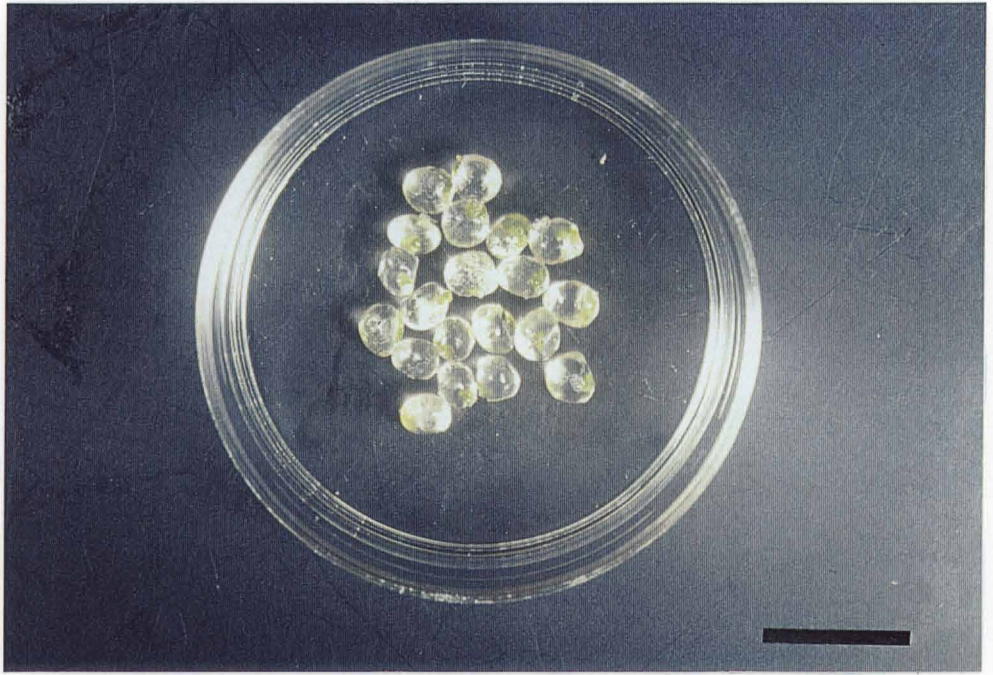


Fig.4-4. Encapsulated meristems into alginate-gel beads after dehydration.

Bar = 10 mm.

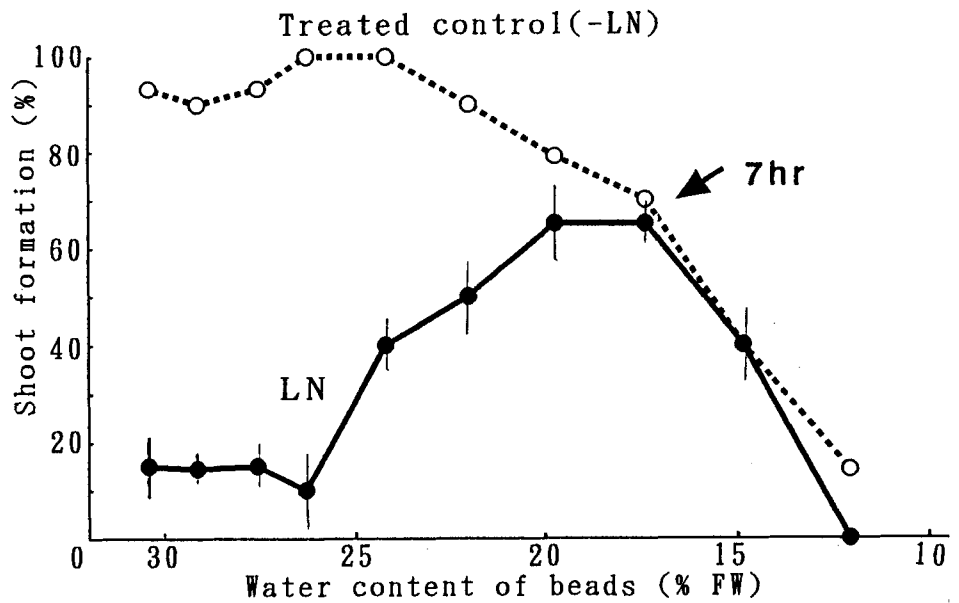


Fig.4-5. Effect of water content on shoot formation of alginate-coated meristems cooled to -196°C .

Apical meristems precultured on solidified $1/2$ MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and then treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. -LN means treated control without cooling to LN_2 . The vertical bars represent standard error.

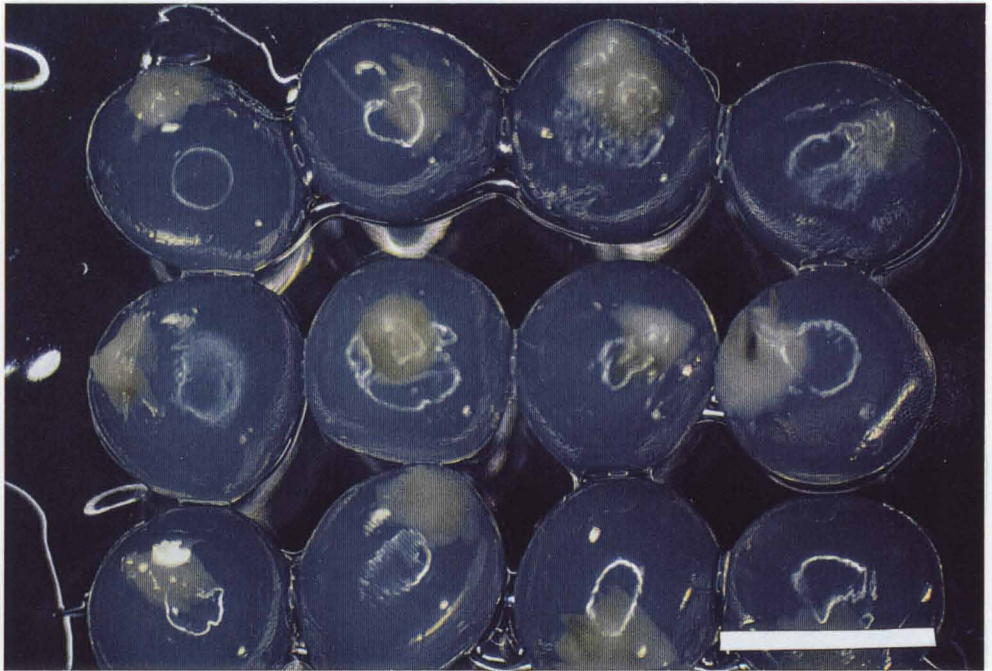


Fig.4-6.Three days after recultue of the encapsulated dried meristems cooled to -196°C .

Apical meristems precultured on solidified $1/2$ MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and then treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No.3. Bar = 5 mm.

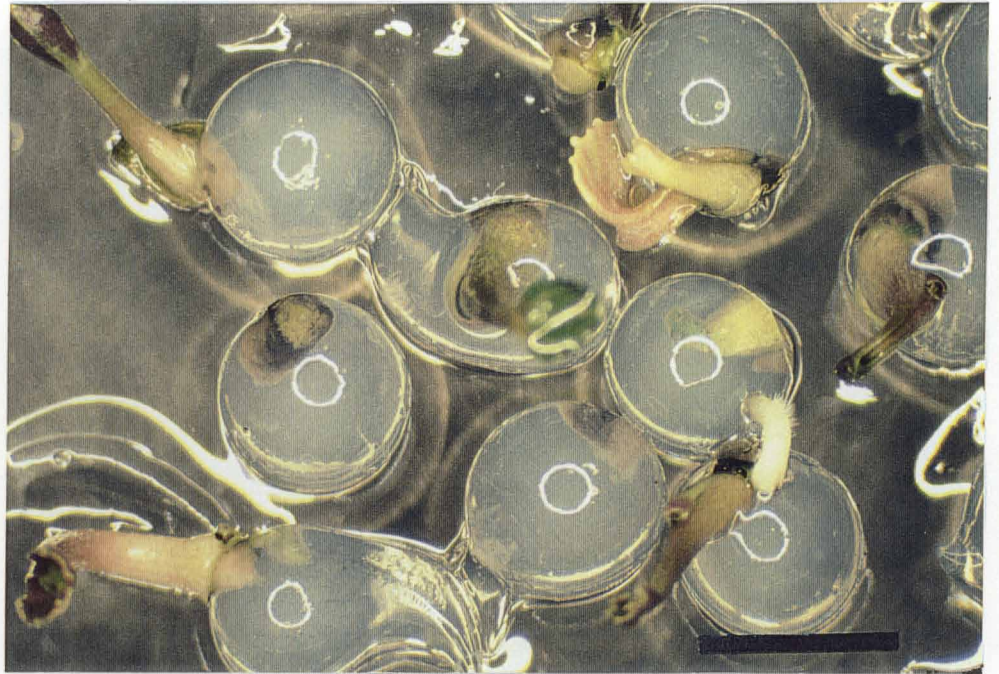


Fig.4-7. Developed shoots 21 days after reculture of encapsulated dried meristems cooled to -196°C .

Apical meristems precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and then treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No.3. Bar = 5 mm.

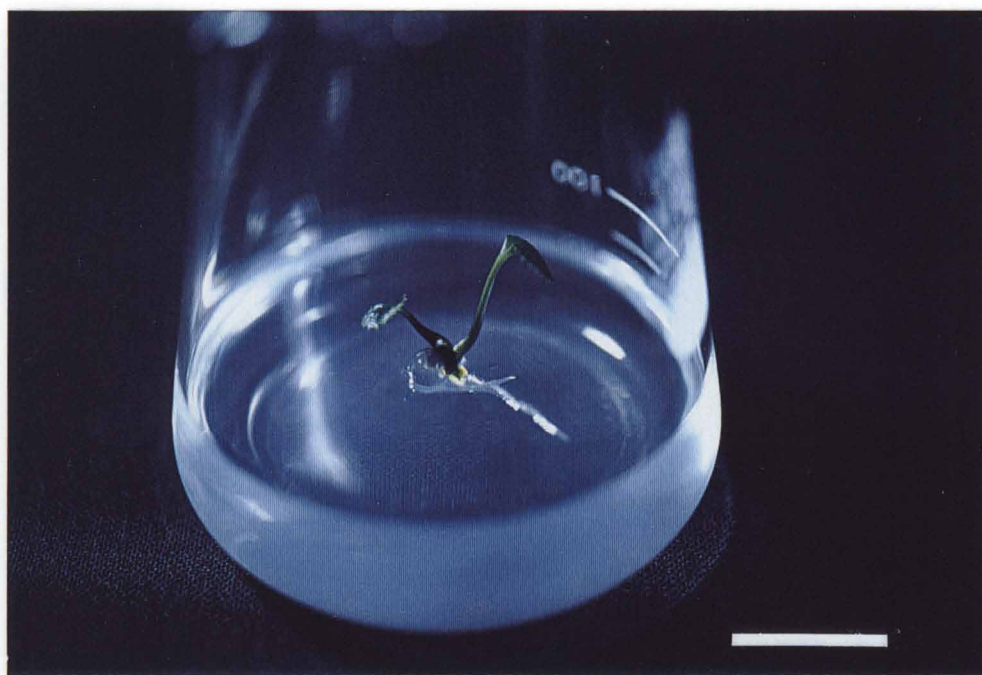


Fig.4-8. A plantlet regeneration from alginate-coated dried meristems cooled to -196°C .

Apical meristems precultured on solidified $1/2$ MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No.3. Bar = 20 mm.

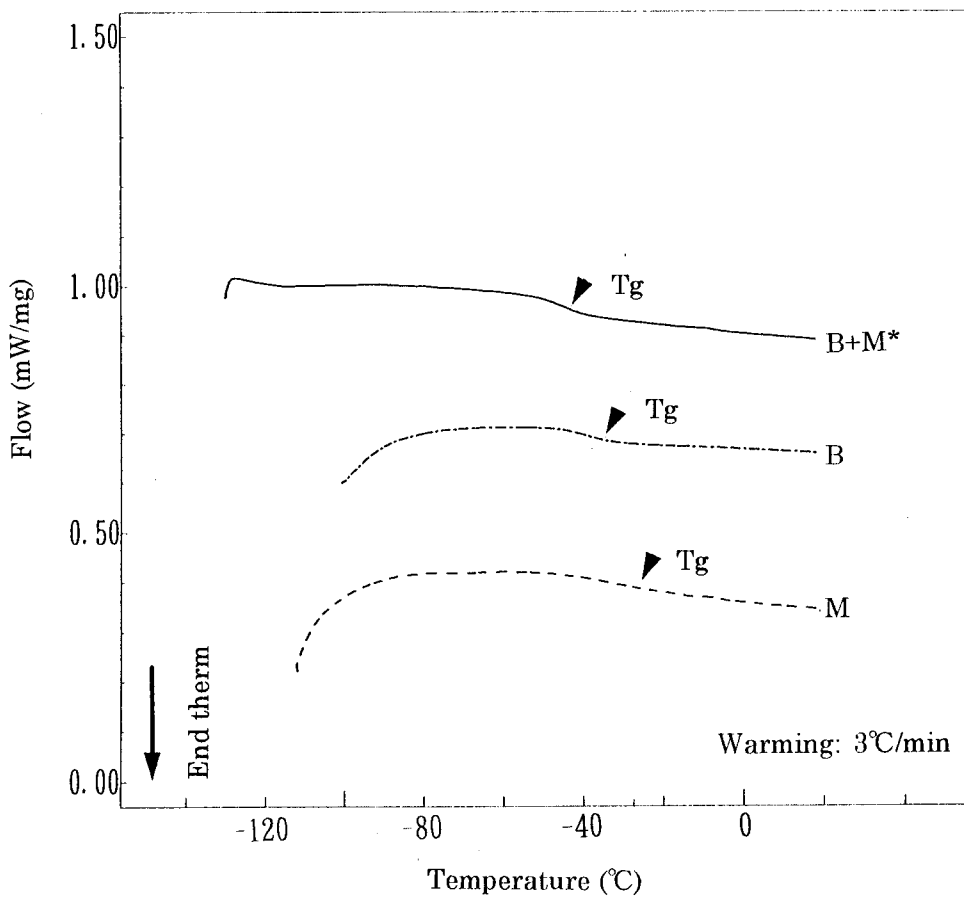


Fig.4-9. Differential scanning calorimetry (DSC) record warming process of the encapsulated dried alginate-beads with or without meristems and the meristems picked out from the beads of wasabi cooled to -130°C (cooling rate: $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Beads containing meristems were treated with 0.8 M sucrose for 16 hr at 20°C , and then dried to 18%(FW) on silica gel prior to a plunge into LN_2 . These dried beads with (B+M) or without (B) meristems, and the meristems (M) which were picked out from the beads were warmed at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Tg: glass transition temperature. Material: Shimane No.3.

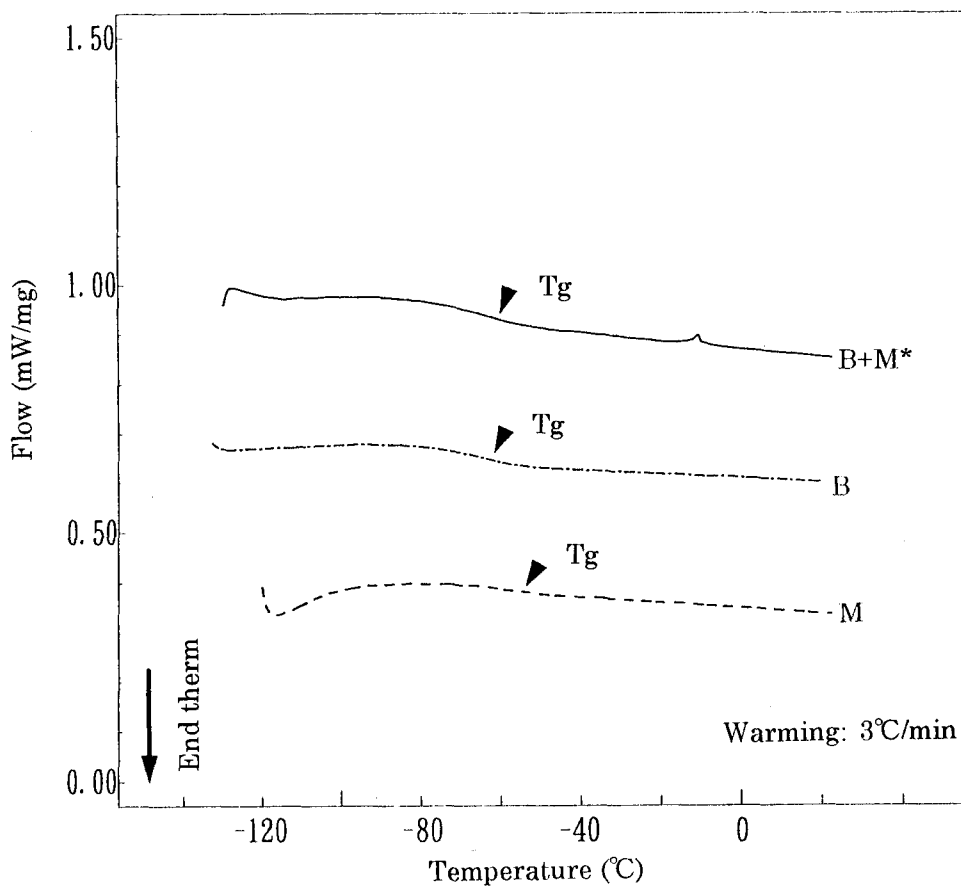


Fig.4-10. DSC record warming process of the encapsulated dried alginate-beads with or without meristems and the meristems picked out from the beads of wasabi cooled to -130°C (cooling rate: $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Beads containing meristems were treated with 0.8 M sucrose plus 1 M glycerol for 16 hr at 20°C , and then dried to 18%(FW) on silica gel prior to a plunge into LN_2 . These dried beads with (B+M) or without (B) meristems, and the meristems (M) which were picked out from the beads were warmed at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Tg: glass transition temperature. Material: Shimane No.3.

第5章 ビーズ・ガラス化法によるワサビ茎頂の超低温保存

緩速予備凍結法，簡易凍結法，ガラス化法，アルギン酸ビーズ乾燥法の4種類の超低温保存法のうち，現在，茎頂の超低温保存に有効とされる手法は，ガラス化法及びアルギン酸ビーズ乾燥法である．これらの2つの手法は，室温又は0℃で細胞の凍結水の大部分を除去してから液体窒素に冷却する方法であるため，茎頂ドーム組織には凍結による傷害が少なく，そこから直接シュートを形成する．ガラス化法はアルギン酸ビーズ乾燥法と比較して，茎頂の脱水時間が短く，操作が簡単で，その上，シュート形成率が高いという利点をもっている．しかし，ガラス化法で高いシュート形成率を得るためには適正な脱水処理が必要であるが，この方法では同時に多量の茎頂を処理することが困難である．本章では，この問題点を解決するため，アルギン酸塩のゲルビーズに包埋された茎頂をガラス化液中で浸透脱水する新しい手法のビーズ・ガラス化法を検討した．

1. 実験方法

1) ビーズ・ガラス化法の操作手順

ビーズ・ガラス化法は，Fig. 5-1 に示すとおり，次の7つの手順から成り，ガラス化法の場合と同様にPVS2液で浸透脱水を行った．

- (a) 0.3 Mのしょ糖を含む1/2MS固形培地での20℃， $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の8時間日長で，約16時間の前培養（予備的な脱水耐性の付与）
- (b) ビーズ包埋とローディング処理（2 Mグリセリン+0.4 Mしょ糖液，25℃，30分間）
（脱水耐性の付与）
- (c) PVS2液による浸透脱水（凍結水の除去）
- (d) 液体窒素中に急速冷却（冷却速度：約280℃/min）（ガラス化）
- (e) 40℃温水中で急速加温（昇温速度：約300℃/min）（脱ガラス化）
- (f) 1.2 Mしょ糖液による30分間の希釈・洗浄（アンローディング；ガラス化液の除去と

急激な再吸収による傷害の回避)

(g) 再培養

ビーズの作成は、ガラス化法で効果のあったローディング液の組成、すなわち 2 M グリセリンと 0.4 M しょ糖液及び塩化カルシウムを除いた 1/2 M S 培地を添加した 3 % アルギン酸ナトリウム溶液を 1 ml の注射器に入れた。この液を注射針から押し出して滴下寸前にこの中に 1 個の莖頂をピンセットで入れた後、1/2 M S 培地及びローディング液の組成が入った 100 mM 塩化カルシウム溶液に滴下して 1 個の莖頂を含む径約 3 mm のビーズを作成した (Fig. 5-2)。ビーズは、100 ml 容のビーカーで約 30 分間の凝固反応をさせた後、50 ml の P V S 2 液に置き換え、25°C または 0°C で異なる時間浸透脱水した。なお、ビーズの入ったビーカーは、100rpm の旋回振とう培養器上に置き、20 分後に新しい P V S 2 液と交換した。0°C で処理する場合は、Fig. 5-3 のように、クラッシュアイスを入れた容器を浸透培養器上に置き、ビーカーに蓋をしてから水中に入れた。つぎに、1.8 ml 容のクライオチューブに脱水後の 10 個のビーズと新しい P V S 2 液を 0.7 ml 入れ、液体窒素中で冷却した (冷却速度: 約 280°C/min)。急速加温は、クライオチューブを 40°C のウォーターバスに直接入れて行った (昇温速度: 約 250°C/min)。つぎに、莖頂は、B A 0.1mg/l と 3 % しょ糖を含む 1/2 M S 固形培地に置床し、通常の条件で培養し、翌日新しい培地に移植した。なお、シュート形成率は、置床後 21 日後に正常なシュートを形成した莖頂を、用いた莖頂の百分率で表した。なお、各実験とも、1 区 10 莖頂を用い、3 ~ 4 回反復した。

2) P V S 2 液の処理条件の検討

0.3 M しょ糖で前培養した後、2 M グリセリンと 0.4 M しょ糖の混合液で 25°C で 20 分間ローディング処理した後、P V S 2 液で 25°C で 0 ~ 70 分間、または 0°C で 0 ~ 150 分間の浸透脱水を行い、最適処理時間を求めた。

2. 結果

Table 5-1 で示すように、比較した5種類のローディング液では2 Mグリセリンと0.4 Mしょ糖の混合液で最も高いシュート形成率(96%)を示した。しかし、グリセリンの代わりにエチレングリコールで処理した場合、シュート形成率は75%に低下し、また0.4 Mしょ糖のみでは15%のさらに低いシュート形成率を示した。以上のことから、ビーズ・ガラス化法でも、ローディング液はガラス化法の場合と同様、2 Mグリセリンと0.4 Mしょ糖の混合液のローディング処理が高いシュート形成率を示すことが明らかとなった。

つぎに、ビーズ・ガラス化法における25°Cまたは0°CでのPVS2液の最適処理時間を検討した。25°Cでは30分間、0°Cでは80~130分間のPVS2液で処理した茎頂では、90%以上のシュート形成率が得られた(Fig. 5-4)。

ビーズ・ガラス化法に最も適したガラス化液を検討した結果、90%以上のシュート形成率は、PVS2液及びPVS3液(Nishizawaら1994)で処理された茎頂で得られた(Table 5-2)。しかし、エチレングリコールを基本とするガラス化液はグリセリンを基本とするガラス化液に比べシュート形成率が低く、しかもその数値の変動が大きかった。

ビーズ・ガラス化法におけるビーズの大きさ(径5 mmと3 mm)とシュート形成率の関係について検討した。その結果、径5 mmのビーズ中でガラス化された茎頂は、-196°Cに冷却後のシュート形成率が約65%で、これは径3 mmのビーズの場合のシュート形成率(約90%)と比べると25%程度低かった(データ省略)。なお、径5 mmのビーズは液体窒素中に冷却後、40°Cまでの昇温時に、ビーズの中心部分が凍結した。

最適条件で脱水し、液体窒素に冷却後、昇温された茎頂は、ガラス化法の場合と同様に脱色することなく置床3日後でも緑色を維持していた(Fig. 5-5)。これらは、カルスを形成することなく茎頂から直接シュートを形成した(Fig. 5-6)。そして、ホルモンフリーの1/2MS固形培地に移植後、ほとんど全てのシュートが発根して正常な植物体になり、これらは容易に順化できた。また、再生した植物における形態的異常は観察されなかった。

品種間差を検討するため、本実験で用いた‘島根3号’以外に‘真妻’、‘さんべ’、

‘大神2号’について、上述の最適処理条件でガラス化法による超低温保存を行った。それらのシュート形成率は若干の品種による差は認められたものの、いずれも90%前後であった (Table 5-3)。

3. 結論

前培養、ローディング処理してからガラス化法で-196℃に冷却されたワサビ茎頂は、90%以上の高いシュート形成率を示した。この方法では、茎頂をビーズに包埋するためその取扱いが極めて容易となることから、多量の茎頂を均一に脱水することが可能となる。また、茎頂より小さい材料である毛状根、懸濁細胞等を材料に用いる場合は、ビーズ・ガラス化法で処理することにより最も煩雑な液交換が容易となることから、その適用範囲は今後さらに広がる可能性もあると考えられる。

Table 5-1. Effect of loading solution on shoot formation of encapsulated vitrified meristems cooled to -196°C.

Loading solution (30 min)	Shoot formation (% \pm S.E.)
2M gly + 0.4M suc	96.7 \pm 2.9
2M EG + 0.4M suc	75.0 \pm 5.0
2M EG + 0.4M suc (15 min)	0
1.5M EG + 0.4M suc	50.0 \pm 10.0
0.4M suc	15.0 \pm 5.0
Non-treated	0

gly, glycerol; EG, ethylene glycol; suc, sucrose; Precultured meristems on 1/2 solidified MS medium supplemented with 0.3 M sucrose were encapsulated in alginate-gel beads with each loading solution. These encapsulated meristems were dehydrated with PVS2 solution at 0°C for 100 min prior to a plunge into LN₂. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Materials: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for each of four replicates.

Table 5-2. Effect of vitrification solution on shoot formation of encapsulated vitrified meristems cooled to -196°C.

Vitrification solution	Shoot formation (% ± S.E.)
PVS2	93.3 ± 5.8
PVS3 ¹ (50% gly + 50% suc)(w/v%)	93.3 ± 5.8
PVS3 ² (40% gly + 40% suc)(w/v%)	97.5 ± 2.5
60% EG + 60% suc (w/v%)	0
50% EG + 50% suc (w/v%)	61.7 ± 31.8
40% EG + 40% suc (w/v%)	80.0 ± 16.3
40% EG + 15% sorbitol + 5.5% BSA ³ (w/w%)	53.3 ± 15.3
50% PG + 0.4M suc (w/v%)	0

1,2; PVS3 (Nishizawa et al. 1993), 3; Langis and Steponkus solution (1991). Precultured meristems on 1/2 solidified MS medium supplemented with 0.3 M sucrose were encapsulated in alginate-gel beads with a mixture of 2M glycerol and 0.4M sucrose for 30 min and then dehydrated with each vitrification solution at 0°C for 100 min prior to a plunge into LN₂. Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for each of four replicates.

Fig. 5-3. Shoot formation of four cultivars of wasabi meristems cooled to -196°C by encaosulation/dehydration.

Cultivars	Shoot formation ($\% \pm \text{S.E.}$)
Shimane No.3	93.3 ± 5.8
Mazuma	93.3 ± 5.8
Sanbe	86.7 ± 5.8
Daijin No.2	93.3 ± 5.8

Precultured meristems on 1/2 solidified MS medium supplemented with 0.3 M sucrose were encapsulated in alginate-gel beads with a mixture of 2M glycerol and 0.4M sucrose for 30 min and then dehydrated with PVS2 solution at 0°C for 100 min prior to a plunge into LN_2 . Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Approximately 10 meristems were tested for each of four replicates.

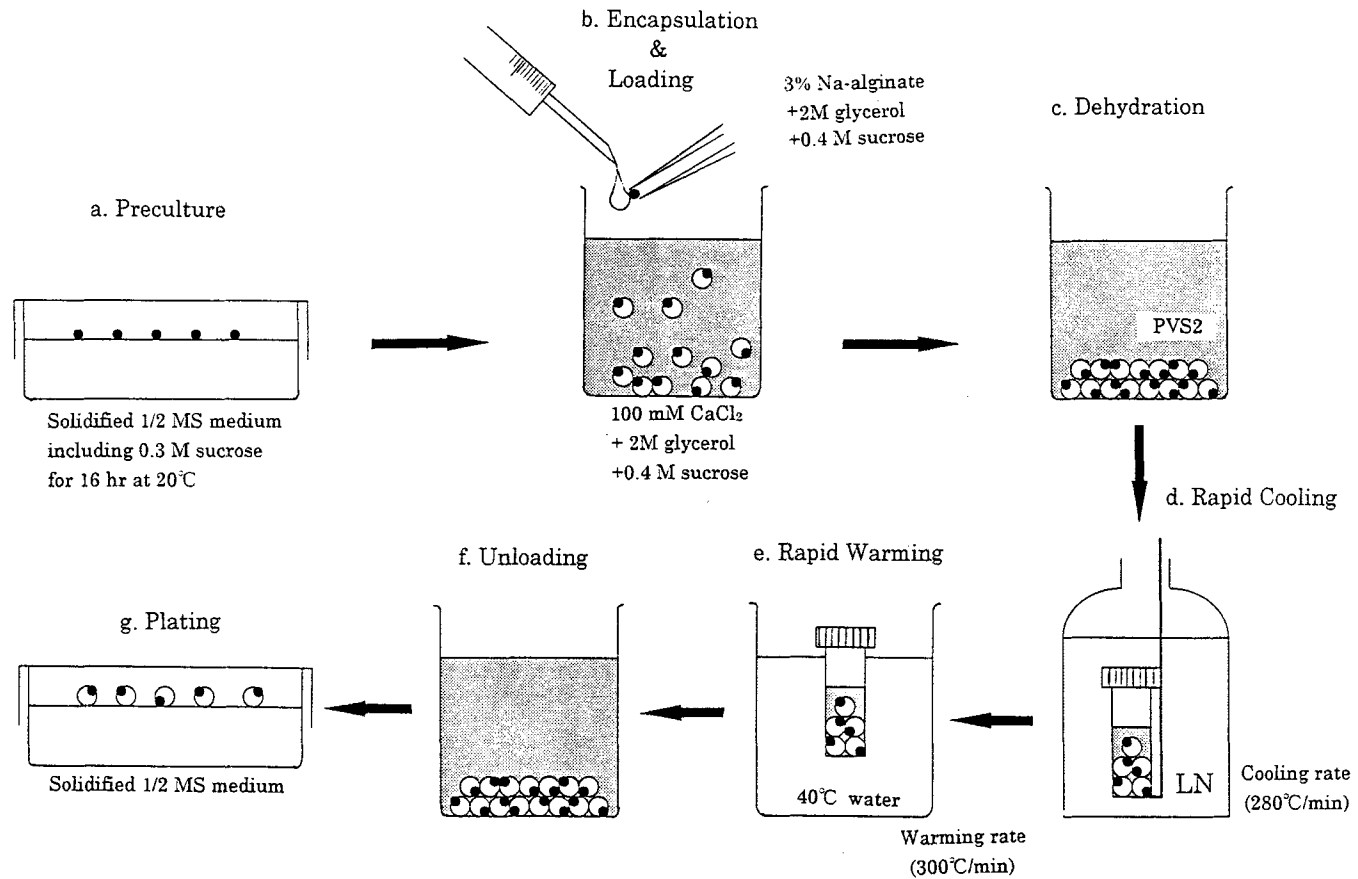


Fig.5-1. Procedure for encapsulation/vitrification of wasabi meristems

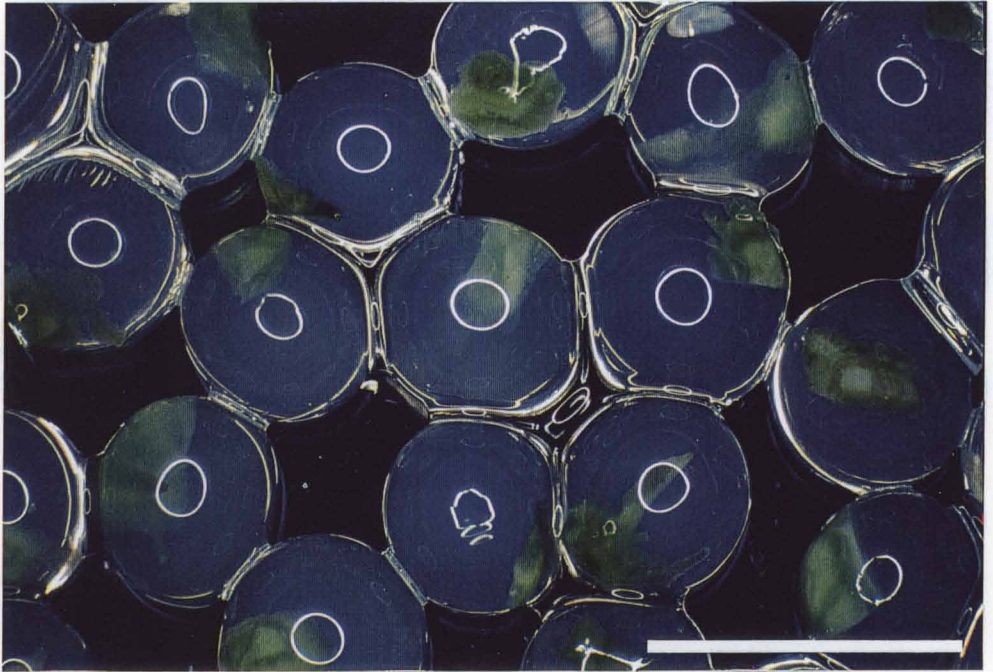


Fig.5-2. Encapsulated apical meristems into alginate-coated beads of containing a loading solution.

Bar = 5 mm.

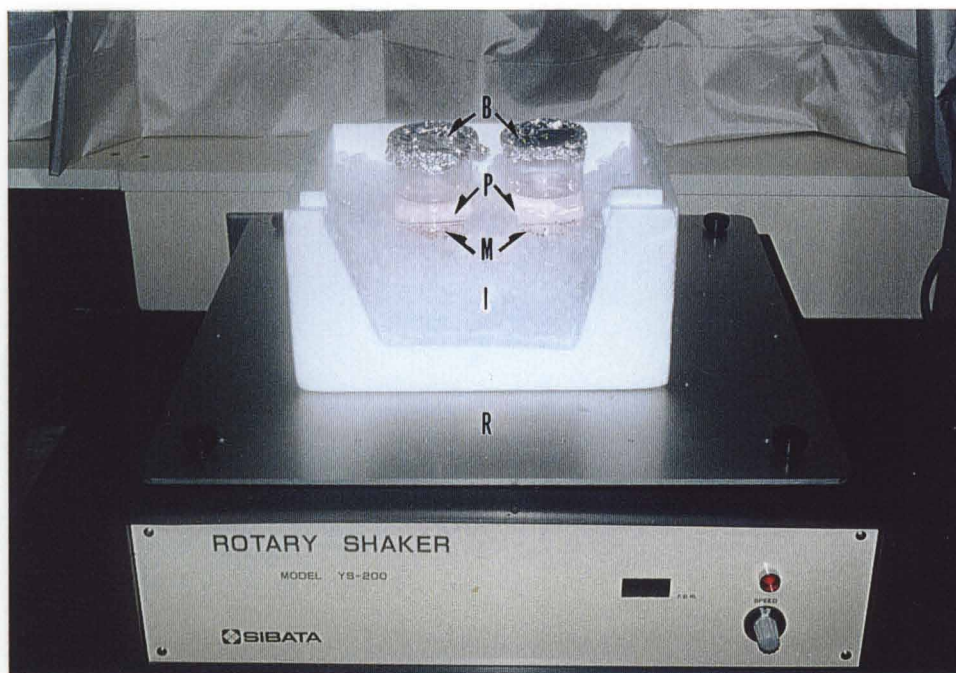


Fig.5-3. Encapsulated meristems were dehydrated with a 50-ml PVS2 solution at 0°C in a 100-ml beaker at 100 rpm on a rotary shaker.

B: a 100 ml beaker, P: PVS2 solution, M: encapsulated meristems, I: crashed ice, R: a rotary shaker.

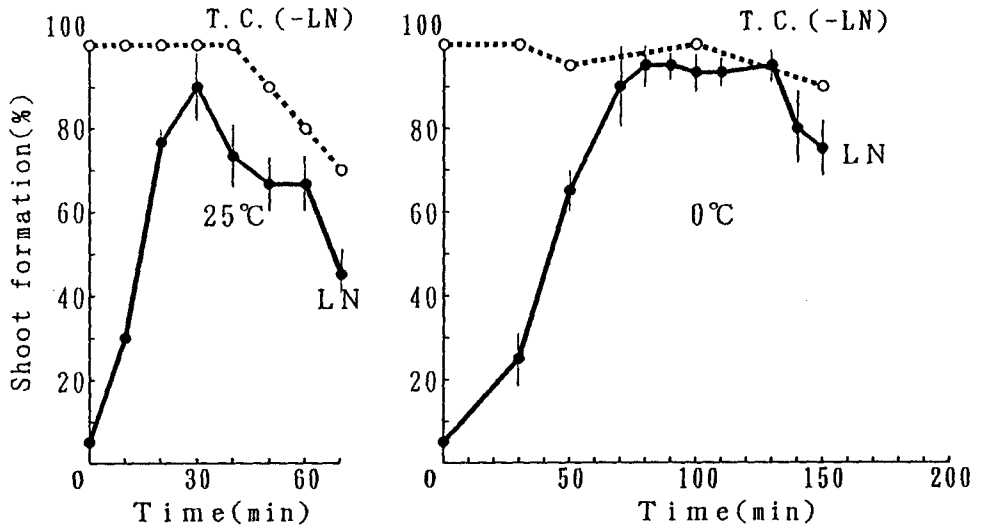


Fig.5-4. Effect of exposure time to PVS2 at 25°C or 0°C on the shoot formation of encapsulated vitrified apical meristems of wasabi cooled to -196°C.

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C, and then encapsulated and loaded with a mixture of 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 30 min at 20°C before dehydration with PVS2. Material: Shimane No.3. -LN means treated control without cooling to LN₂. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. The vertical bars represent standard error.

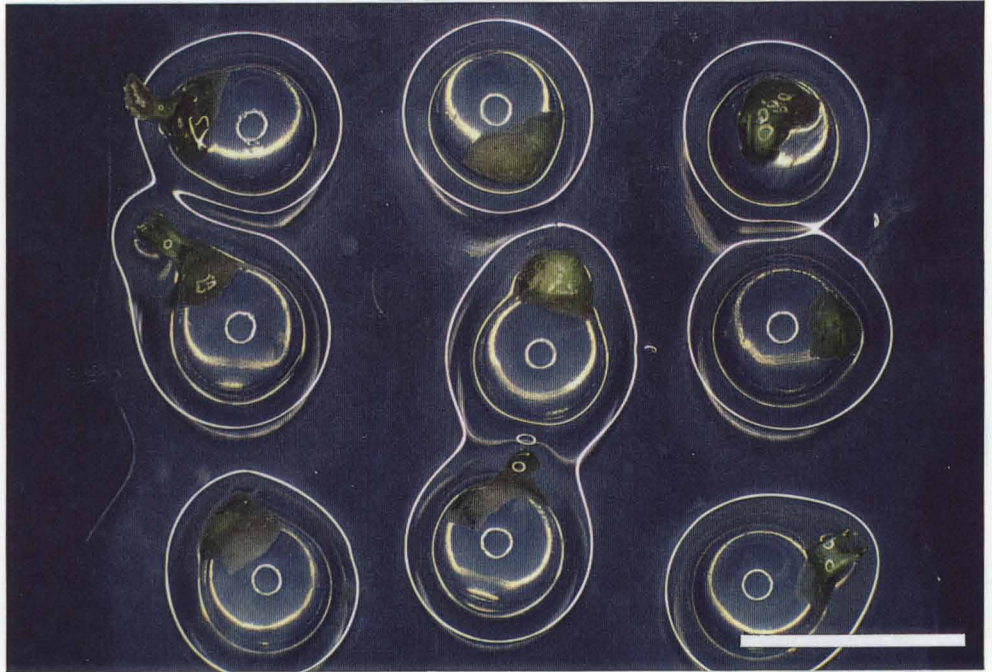


Fig.5-5. Encapsulated vitrified meristems cooled to -196°C 3 days after reculture.

Material: Shimane No.3. Bar = 5 mm.

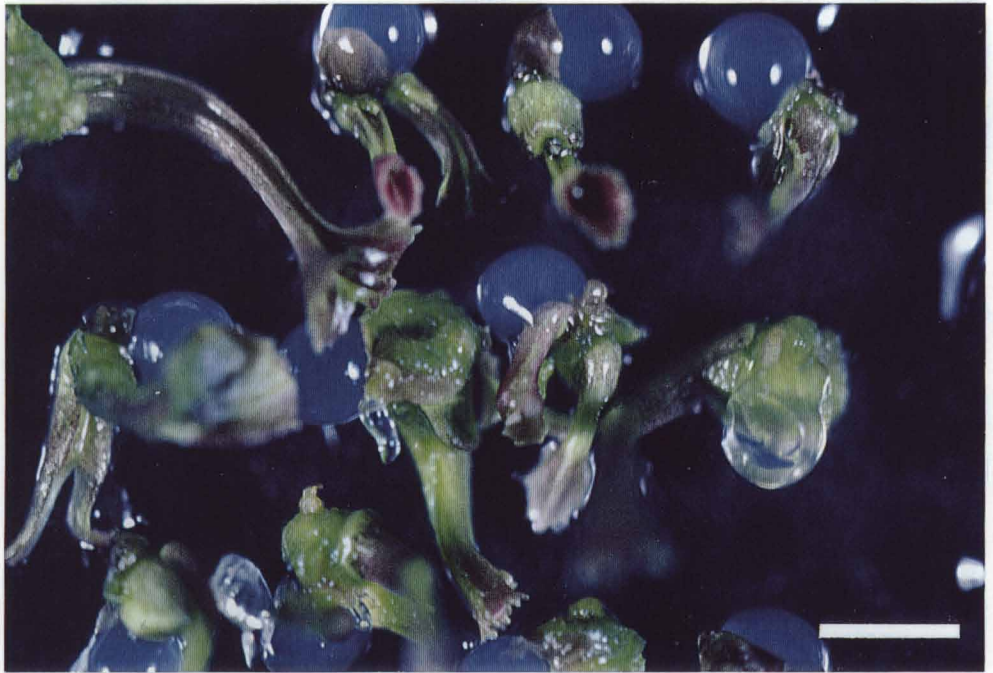


Fig.5-6. Shoot formation from encapsulated vitrified meristem cooled to -196°C 21 days after reculture.

Material: Shimane No.3. Bar = 5 mm.

第6章 4種類の異なる超低温保存法の利点と問題点の比較

及び冷却後の茎頂組織の顕微鏡観察

緒論で述べたように、超低温保存法は脱水方法によりいくつかの方法に分けられるが、脱水耐性を付与する方法と脱水方法の違いにより茎頂組織に対するシュート形成率に差がでると考えられる。本章では、ワサビ培養茎頂を用い、ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法、改良ビーズ乾燥法及びビーズ・ガラス化法の4種類の異なる方法で液体窒素温度に冷却された茎頂のシュート形成率と再生植物の生育などを比較検討した。

多くの場合、液体窒素冷却後のシュート形成率は、ガラス化法がアルギン酸ビーズ乾燥法より高いことが多い。そこで、この2つの異なる方法で液体窒素中に冷却された茎頂組織の再生過程、傷害部位等について光学顕微鏡でそれぞれ観察して比較した。

1. 実験方法

1) 4種類の異なる超低温保存法における利点と問題点の比較

各超低温保存法は、つぎの処理条件で行った。

- ① ガラス化法：ローディング処理（2 Mグリセリン+0.4 Mしょ糖液，25℃，20分間処理），PVS 2液処理（25℃，10分間処理）。
- ② アルギン酸ビーズ乾燥法：乾燥耐性付与（0.8 Mしょ糖液で20℃，16時間処理），ビーズの含水率 約19%（FW）。
- ③ 改良ビーズ乾燥法：乾燥耐性付与（1 Mグリセリン添加の 0.8 Mしょ糖液で20℃，16時間処理），ビーズの含水率 約22%（FW）。
- ④ ビーズ・ガラス化法：PVS 2液処理（0℃，100分間処理）。

以上の4種類の超低温保存法で液体窒素温度へ冷却後、正常に形成したシュートの率と最も高いシュート形成率の得られる乾燥時間、及び再培養21日後のシュートの草丈を測定

した。

2) 茎頂組織の顕微鏡観察

ガラス化法及びビーズ乾燥法で茎頂を液体窒素中に冷却し、再生培地に置床した茎頂を7日毎に21日目まで再生過程を観察し、また再培養時から2日毎に6日目まで縦断切片の観察を行った。さらに、茎頂組織の生存部位、及び傷害部位を明らかにするため、再培養1日後の茎頂組織を Widholm (1972) の方法に準じて、0.1%フルオレセインジアセテート (FDA) 及び 0.1%フェノサフラニン (PS) により2重生体染色し、厚さ約 0.1 mm の縦断切片を作成して蛍光顕微鏡で観察した。なお、FDAでは紫外線照射により生細胞は蛍光染色され、PSでは死細胞は赤色染色される。また、茎頂の再生過程の観察についての組織の固定、樹脂包埋、染色及びプレパラートの作成は、Fig. 6-1 で示す方法で行った。

2. 結果

1) 異なる超低温保存法の比較

ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法、改良ビーズ乾燥法及びビーズ・ガラス化法の4種類の方法で液体窒素に冷却した茎頂のシュート形成率は、Table 6-1 に示すように、ガラス化法とビーズ・ガラス化法で90%以上となったのに対し、ビーズ乾燥法では65%と約25%低かった。しかし、1 Mグリセリン添加した0.8 Mしょ糖液で処理された改良ビーズ乾燥法ではシュート形成率が約10%高くなり、78%になった。また、必要な乾燥時間については、ガラス化法が10分間と最も短く、次いで100分間のビーズ・ガラス化法で、アルギン酸ビーズ乾燥法は420分間と最も長かった。一方、形成したシュートの生育は、4種類の保存法のうち、ガラス化法とビーズ・ガラス化法が同程度で最も早く、次いで改良ビーズ乾燥法となり、アルギン酸ビーズ乾燥法における生育が最も緩慢であった。これについては、ササユリの培養茎頂を用いた実験でも同様な傾向が認められた (Table 6-2)。

2) 液体窒素温度に冷却後の茎頂組織の顕微鏡観察

ガラス化法で液体窒素に冷却した茎頂について、その再生過程を経時的に観察した写真が Fig. 6-2 である。再培養から 1 日後の茎頂は、ほぼ組織全体が緑色を維持しており、速やかにシュート形成を開始した。さらに、茎頂からのシュートの形成過程をその縦断切片で観察したところ、カルスを経由することなく茎頂から直接シュートを形成していることが明らかとなった (Fig. 6-3)。また、再培養 1 日後の茎頂を FDA と PS で染色し、その縦断切片を蛍光顕微鏡で観察したところ強い FDA 活性が認められ、茎頂組織のほぼ全体が生存していることが確認された (Fig. 6-4A)。一方、赤く染色される枯死細胞はわずかであった。

アルギン酸ビーズ乾燥法では、Fig. 6-5 で示すように、再培養から 1 日後で茎頂の基部が白変しはじめ、茎頂ドーム以外の細胞の生存は少なかった。さらに、再培養 7 日後でも茎頂の生育は緩慢で、14 日後で 2 枚の葉原基の伸長が見られた。茎頂の縦断切片の観察でも、再培養 4 日後までは茎頂の生育はほとんど見られず、6 日後で葉原基の生育がわずかに開始した (Fig. 6-6)。また、このシュート形成過程の観察でも、シュートはカルスを経由することなく、ドームから直接形成していることが確認できた (Fig. 6-6)。茎頂組織の生存部位は、茎頂ドーム部分では強い FDA 活性が認められたが、それ以外の部分ではかなりの部分が枯死していた (Fig. 6-4B)。

3. 結論

ワサビ培養茎頂を用いて、ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法、改変ビーズ乾燥法、及びビーズ・ガラス化法の 4 種類の超低温保存法の利点と問題点を比較検討した。その結果、茎頂を保存対象にする場合は、シュート形成率、必要乾燥時間及び形成したシュートの生育速度のいずれについても、ガラス化法が最も優れていた。しかし、ガラス化法では多量の茎頂を同時に処理することは困難であるという問題がある。したがって、用いる材料の特性を考慮して、それぞれの保存法を適用する必要があると考えられる。

ガラス化法がアルギン酸ビーズ乾燥法よりシュート形成率が高くその生育速度も早い原因は、茎頂組織の生存部位の大きさの違いにあることが示された。しかし、2種類のいずれの方法でも、シュートはカルス経由でなく茎頂ドームから直接形成していることが明らかとなった。したがって、こうして形成したシュートには変異の発生が少ないものと考えられる。

Table 6-1. Shoot formation, shoot length and time used for dehydration of wasabi meristems cooled to -196°C by four different cryogenic protocols.

Cryogenic protocol	Shoot formation (% \pm S.E.)	Shoot length (mm)	Time used for dehydration (min)
Vitrification ^a	97.5 \pm 1.0	10.6 \pm 4.0	10 at 25 $^{\circ}\text{C}$
Encapsulation/Dehydration ^b	67.1 \pm 8.9	6.3 \pm 3.6	420 at 25 $^{\circ}\text{C}$
Revised Encapsulation/Dehydration ^{b*}	79.1 \pm 4.8	9.0 \pm 2.6	420 at 25 $^{\circ}\text{C}$
Encapsulation/Vitrification ^a	96.7 \pm 2.9	12.2 \pm 3.6	100 at 0 $^{\circ}\text{C}$

(a)Precultured meristems were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min, and then dehydrated with PVS2 before cooling in LN₂. (b)Precultured meristems were encapsulated with alginate gel beads, and then treated with 0.8 M sucrose or plus 1 M glycerol* at 20 $^{\circ}\text{C}$ for 16 hr before dehydration and cooling to -196°C . Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Mterial: Shimane No.3.

Table 6-2. Shoot formation and bulblet growth of apical meristems of lily cooled to -196°C by three different cryogenic protocols.

Cryogenic protocol	Shoot formation	Bulblet growth		
		width (mm size ± S.E.)	length (mm size ± S.E.)	fresh weight (mg ± S.E.)
Vitrification ¹	92.3 ± 1.7	2.5 ± 0.4	5.2 ± 0.8	41.2 ± 15.3
Encapsulation/dehydration ²	66.7 ± 5.8	2.3 ± 0.7	5.1 ± 1.1	36.1 ± 21.4
Encapsulation/vitrification ³	93.8 ± 4.8	2.8 ± 0.1	6.2 ± 1.1	41.8 ± 20.8

Cold-hardening: 0°C for 21 days, Preculturing: 0.3M sucrose for 1 day. 1,2: Loading treatment with 2M glycerol and 0.4M sucrose before being dehydrated with PVS2 for 50 min¹ or 100 min² at 0°C prior to a plunge into LN₂. 3: Treatment with 0.8M sucrose for 16 hr prior to air drying for about 7 hr (water content: 24%). Bulblet growth: 50 days after reculture. Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thumb.).

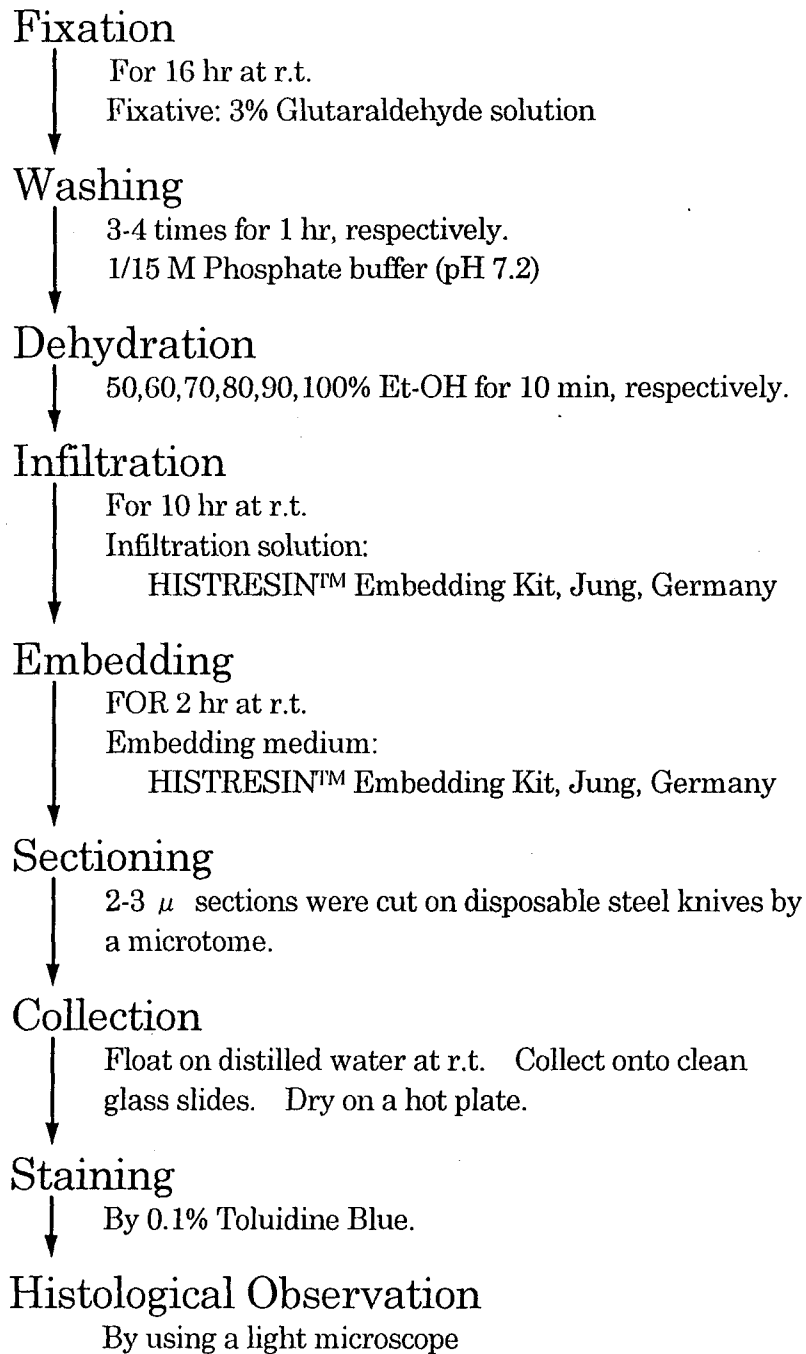


Fig.6-1. Procedure for histological observation of meristems.



Fig.6-2. Shoot developed from a meristem cooled to -196°C by vitrification.

1 day (A), 7 days (B), 14 days (C) and 21 days (D) after reculturing, respectively. Bars indicate 2 mm in A and B, 5 mm in C and D.

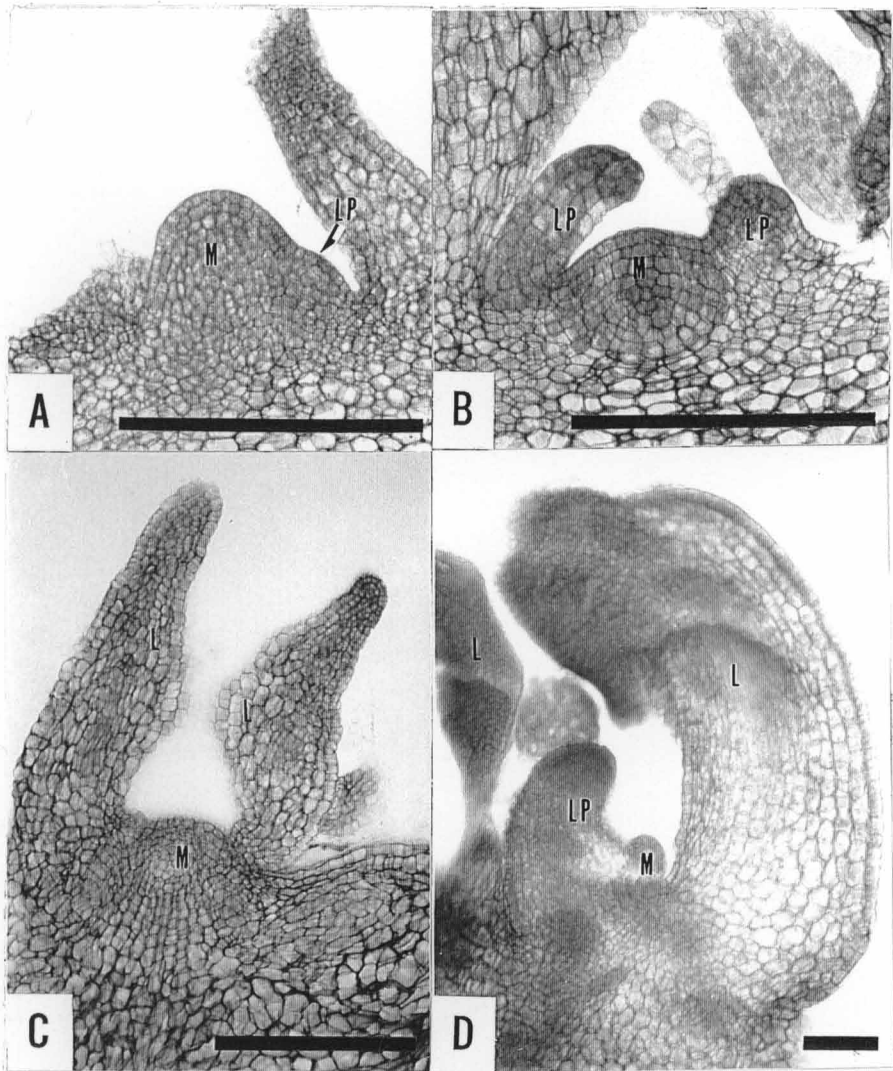


Fig.6-3. Longitudinal section of wasabi meristems cooled to -196°C by vitrification. Immediately after thawing (A), 2 days (B), 4 days (C) and 6 days (D) after reculturing, respectively. M:meristematic dome, LP: leaf primordium, L: regenerated leaf. Bar = 0.5 mm.

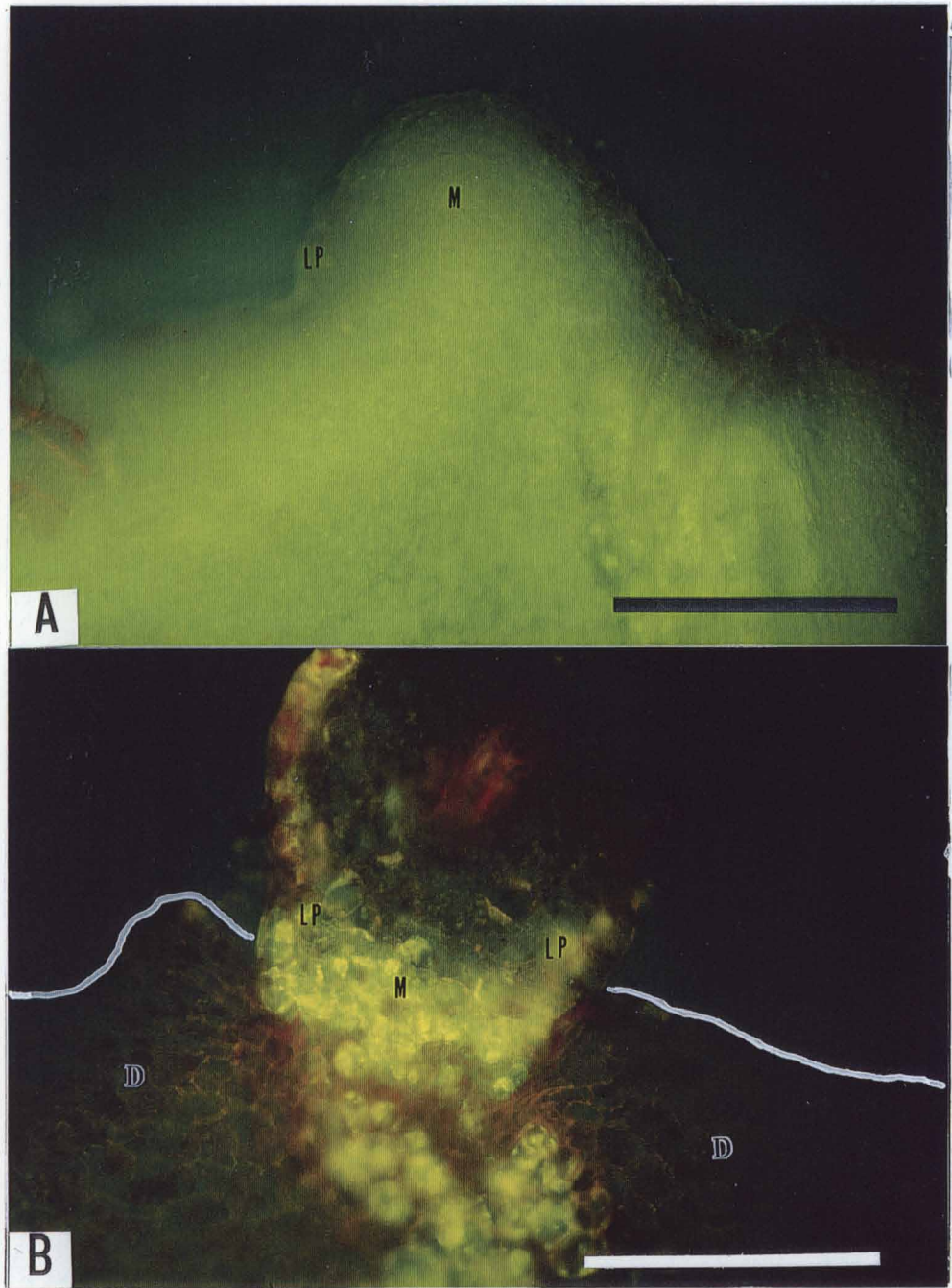


Fig.6-4. Longitudinal section (0.1 mm) through the meristematic dome of vitrified (A) and encapsulated dried meristem (B) 1 day of reculture stained with fluorecein diacetate and phenosafranine.

M: meristematic dome area. LP: leaf primodium. D: dead cells area.

Bar = 0.2 mm.

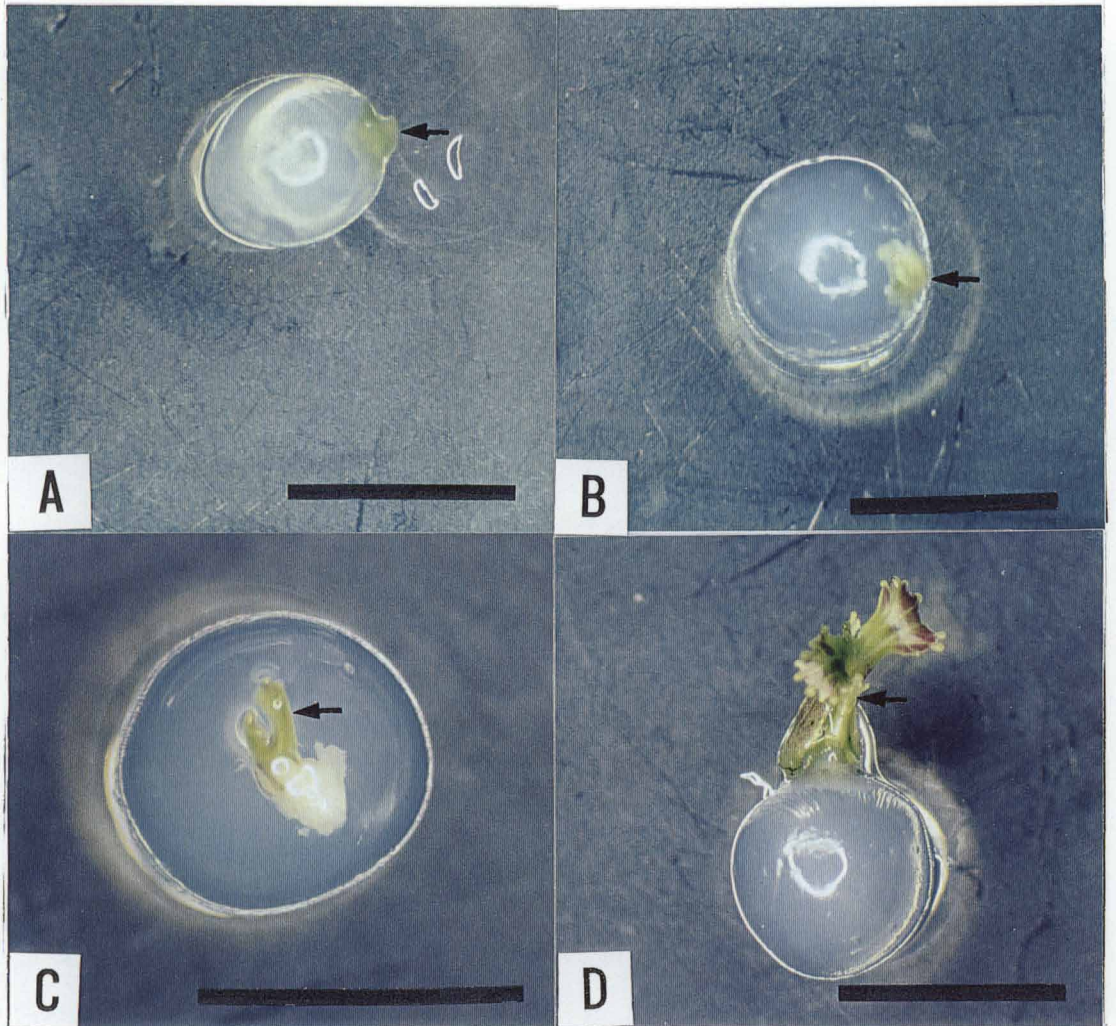


Fig.6-5. Shoot developed from a meristem cooled to -196°C by encapsulation/dehydration.

1 day (A), 7 days (B), 14 days (C) and 21 days(D) after reculturing, respectively. Arrow: A, B; meristem. C, D; shoot formation.

Bar = 5 mm.

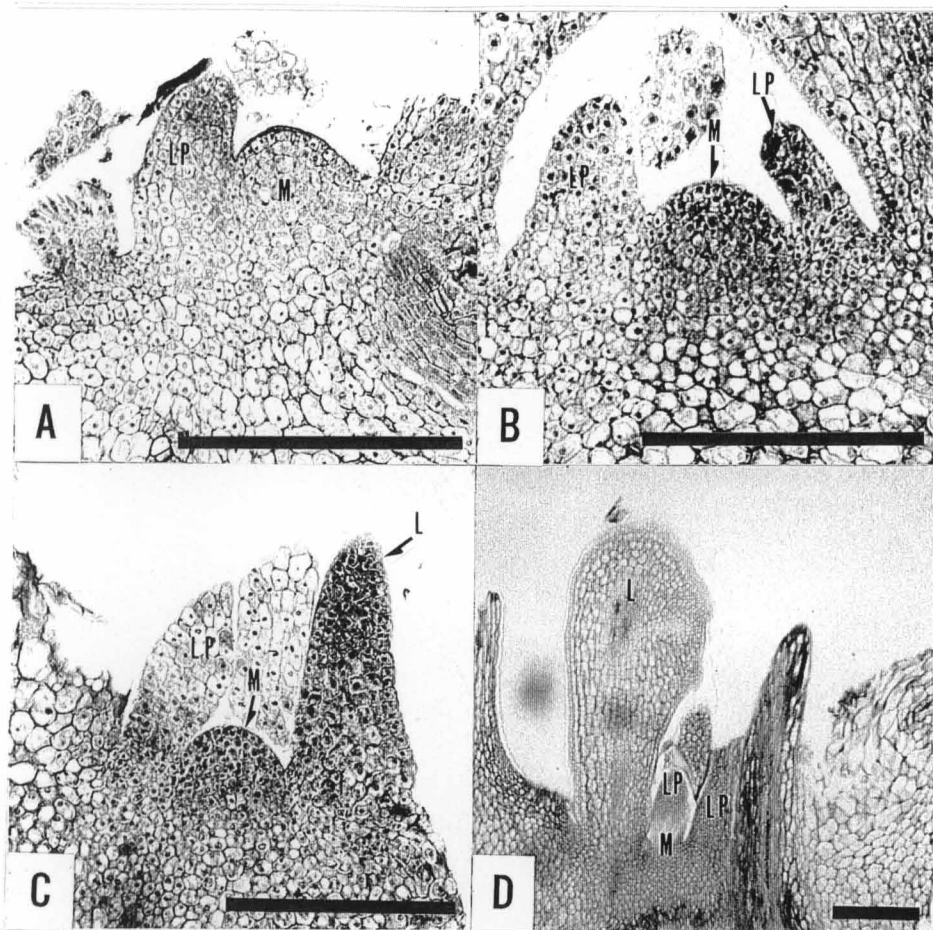


Fig.6-6. Longitudinal section of wasabi meristems cooled to -196°C by encapsulation/dehydration.

Immediately after thawing (A), 2 days (B), 4 days (C) and 6 days (D) after reculturing, respectively. M:meristematic dome, LP: leaf primordium, L: regenerated leaf. Bar = 0.5 mm.

第7章 超低温保存された茎頂から再生した植物における遺伝的変異の有無の確認

植物における超低温保存の遺伝的変異に関して多くの研究がなされ、特に最近はDNAレベルでの変化を調べた報告が多い (Benson & Hamill 1991, Kobayashi ら 1994, Yoshimatsu ら1996)。現在のところ、適正な方法で超低温保存された細胞・茎頂からの再生植物では、遺伝的変異がないことが認められている。本章では、ガラス化法で液体窒素に冷却後に再生したワサビの植物体について、生育調査及び二次代謝産物である sinigrin の定量分析で変異の発生の有無を検討した。また、PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki ら 1985) は遺伝子レベルでの植物間の識別が比較的簡便に行える手法で最近多くの報告があるが、本実験ではさらに有効な方法である RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)-PCR (Williams ら 1990) を用いて、変異の発生の有無を検討した。なお、RAPD-PCRはゲノム上の特有の塩基配列を必要とせず、異なったプライマーを用いることで多様なPCR増幅産物を得ることができ、さらにオープンリーディングフレーム領域以外の表現形質でない領域の違いも識別可能である (杉山ら 1995)。

1. 実験方法

1) 再生したワサビ植物体の生育調査

ガラス化法で液体窒素に冷却したワサビ茎頂 (+LN), ガラス化処理のみで未冷却の茎頂 (-LN) 及び無処理の茎頂 (Control) を再培養し、再生した植物体を第2章で述べた条件で30日間培養した。ホルモンフリー培地でさらに60日間培養して発根させた植物は、バーミキュライトに移植、さらに30日間の順化を行った。これら2つの段階で株数、展葉枚数及び草丈について生育調査が行われた。なお、株数には分けつ芽を含め、展葉枚数は完全に展開した葉を数え、草丈は株元から葉の先端までとした。

2) 再生したワサビが生産する2次代謝産物の定量分析

順化30日後のワサビ(+LN, -LN, Control)の展開直後の葉(縦径約5 cm)の中心部からコルクボーラーを用いて径10 mmの切片を摘出し, Fig. 7-1 で示すように平佐ら(1995)の方法に準じて sinigrin の定量を行った. 各サンプルは, 新鮮重を計測した後, プラスチックチューブに入れ密封し, オートクレーブで110°C, 30分間の熱処理を行った. つぎに, 35 mMのリン酸緩衝液(pH6.0)を入れてホモジナイザーで粉碎し, 遠心分離して残渣を除去した. この粗抽出液にリン酸緩衝液を足して正確に5 mlに調整し, 0.45 μm のHPLC用クロマトディスクで濾過し, このinjection用サンプルを高速液体クロマトグラフ(HPLC)の定量用チューブに1 ml入れた. なお, 分析はMILLIPORE製Waters LC-Model 1, カラムはWako製W35C18(4 mm×200 mm)を用いた. カラム温度は35°C, 溶離液は, アセトニトリル/pH 6.0の10 mMリン酸緩衝液(15:85) (v/v)で 2 mM Tetra-butylammonium Hydroxideを添加した. sinigrinの定量は, 流量1 ml/min, 検出波長 226 nm で行い, Waters 805 データステーションで解析した. なお, 各区とも分析は3反復した.

3) RAPD-PCRによる変異の有無の確認

杉山ら(1995)の方法に準じて, RAPD-PCRにより+LN, -LN, Control のワサビの葉切片から抽出したDNAを電気泳動で生じるバンドパターンを比較した. まず, sinigrinの定量と同様な条件の葉を0.3gに調整し, 液体窒素中で粉碎後, セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)法(渡部・杉浦 1989)によりDNAを抽出した. このDNAを鋳型としPCRを行い, RAPD法に必要なDNAを合成した(Fig. 7-2). PCRの反応は, A T T O製 ZYMOREACTER II. DNA Thermal Cycler™ (Perkin-Elmer)を用いて, Table 7-1 で示す反応液組成で, 熱変性は94°Cの45秒間, アニーリングは40°Cの1分間, 伸長反応は72°Cの1分間でサイクル数50回で行った. つぎに, 1×TAE緩衝液(0.4 mM Tris-酢酸 pH 8.0, 10 mMエチレンジアミン四酢酸)を用いた1.5%アガロースゲル電気泳動によりPCR産物を分離し, (50V, 約1時間), エチジウムブロマイドによ

る染色及び紫外線照射によって、バンドパターンを検出した。なお、プライマーは20種類の合成プライマー（#110, #121, #122, #123, #124, #126, #127, #128, #130, #131, #133, #134, #135, #136, #139, #140, #141, #142, #143, #144）を、電気泳動の分子量マーカーはTOYOBOの1Kベースラダーを用いた。

2. 結果

1) 再生したワサビ植物体の生育調査

順化30日後では、Control区のシュートの生育が約16mmと最も良好で、-LN区ではほぼ同程度であったが、+LN区ではControl区の2/3程度の草丈であった（Table 7-2）。また、葉数、株数についてもほぼ同様な傾向を示した。

2) 再生したワサビ植物体が生産する2次代謝産物（sinigrin）の定量分析

葉身に含まれる sinigrin 含量は、Table 7-3 で示す通り -LN 区が最も高く、ついで Control 区で、+LN 区が最も少なかったが、それらの差は顕著でなかった。

3) RAPD-PCRによる変異の有無の確認

上記の20種類のプライマーを用いてPCRを行い、検出できたバンドパターンを+LN区、LN区及びControl区で比較したところ、用いた全てのプライマーに関してバンドパターンに差は認められなかった（Fig. 7-3a, b）。

3. 結論

ガラス化法で液体窒素に冷却された茎頂からのシュート形成とその生育は、無処理区と比べ遅れが見られたが、その差は次第に縮まっていた。このことから、約2ヶ月間の育苗期間中にはかなり回復し、3年後の収穫時にはその差は消失して生産物にはほとんど影響が残らないものと思われる。また、ワサビの2次代謝産物の一つである sinigrin につい

ては、顕著な差は認められなかった。さらに、RAPD-PCRによる遺伝子レベルで検討を行ったところ、20種類のプライマーでも各バンドパターンに差が見られなかった。

以上のことから、ワサビ茎頂は超低温保存による実用上問題となる変異の発生は少ないものと推察される。

Table 7-1. The composition of PCR reaction.

Temprate DNA	1 μ l
100 μ M Primer	1 μ l
10 \times PCR buffer	5 μ l
25 mM MgCl ₂	5 μ l
25 mM dNTPs	0.25 μ l
<i>Taq</i> Polymerase	0.25 μ l

Add distilled water to final volume 50 μ l

(Sugiyama et al. 1995)

Table 7-2. Shoot growth of wasabi meristems cryopreserved by vitrification (+LN), treated control (-LN) and non-treated (Cont.) 30 days after acclimatization.

	Shoot length (mm size)	No. of leaf	No. of shoot
+LN*	10.5 ± 1.2	6.3 ± 0.6	1.5 ± 0.2
-LN	14.5 ± 0.4	8.0 ± 0.4	1.6 ± 0.1
Cont.	15.9 ± 0.4	10.2 ± 0.5	1.8 ± 0.1

*Precultured meristems were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose at 25°C for 20 min, then dehydrated with PVS2 before cooling in LN₂. Each value represent (mean ± S.E.).
Material: Shimane No.3.

Table 7-3. The concentration of sinigrin in the leaves of wasabi cryopreserved by vitrification (+LN), treated control (-LN) and non-treated (Cont.) 30 days after acclimatization.

	Conc. of sinigrin (mg/g \pm S.E)
+LN*	1.99 \pm 0.08
-LN	2.51 \pm 0.07
Cont.	2.25 \pm 0.07

*Precultured meristems were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose at 25°C for 20 min, and then dehydrated with PVS2 before cooling in LN₂. The regenerated shoots were cultured on solidified 1/2 MS medium for about 60 days, and then acclimated for 30 days. Material: Shimane No.3.

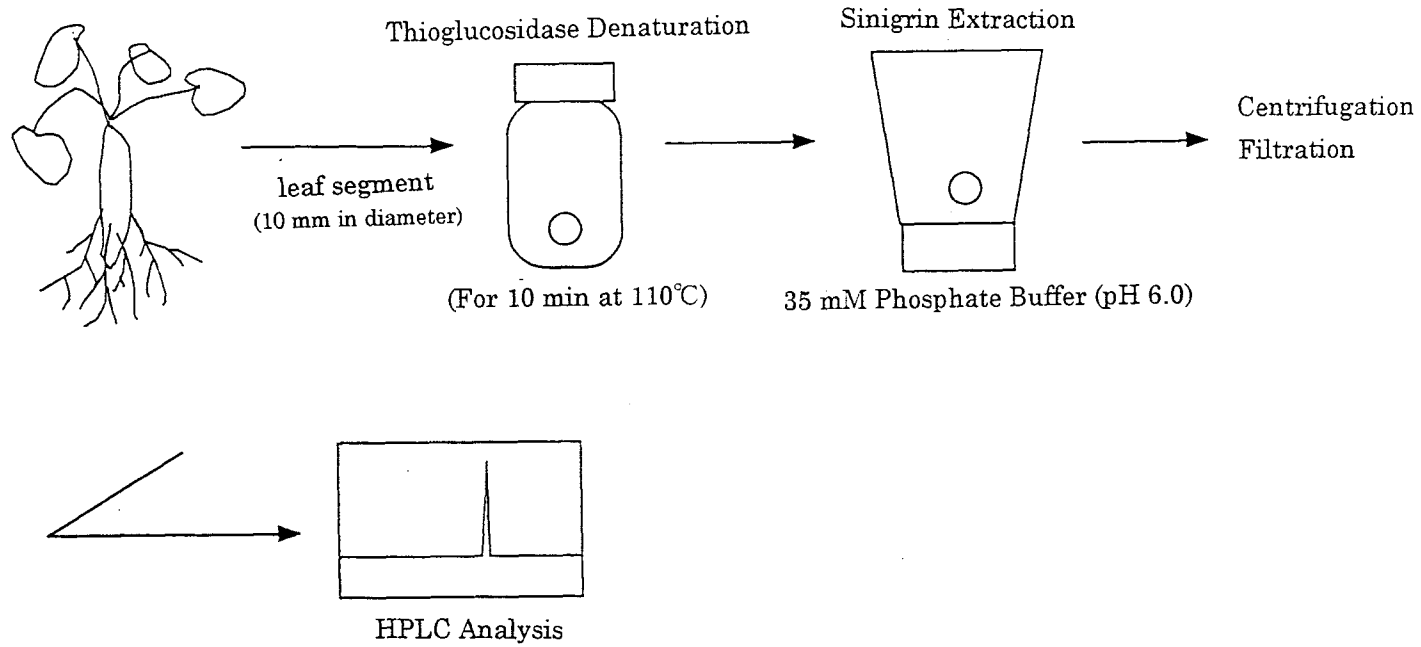


Fig.7-1. Procedure for analysis of synigrin by using HPLC. (Hirasa et al. 1995)

Eluate: (10 mM Phosphate Buffer (pH 6.0) : Acetonitrile = 85:15) + 2 mM Tetra-n-butylammonium Hydroxide;
Column: Wako WS5C18 (4 mm × 200 mm); Flow speed: 1 ml/min, Column temp.: 35°C;
Detector: UV 226 nm

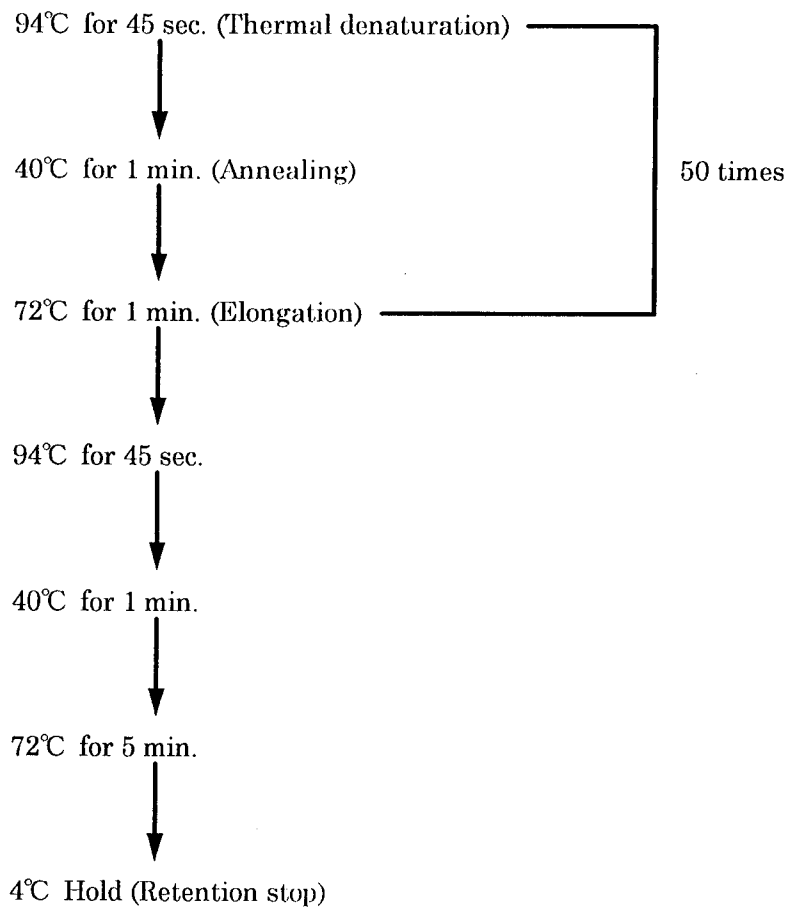
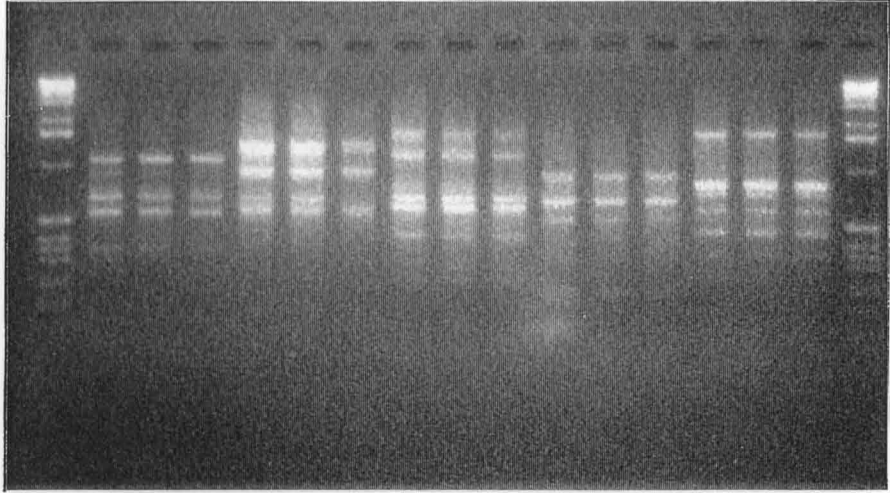


Fig. 7-2 .Temperature conditions for PCR. (Sugiyama et al. 1995)

#110 #121 #122 #123 #124



#126 #127 #128 #130 #131

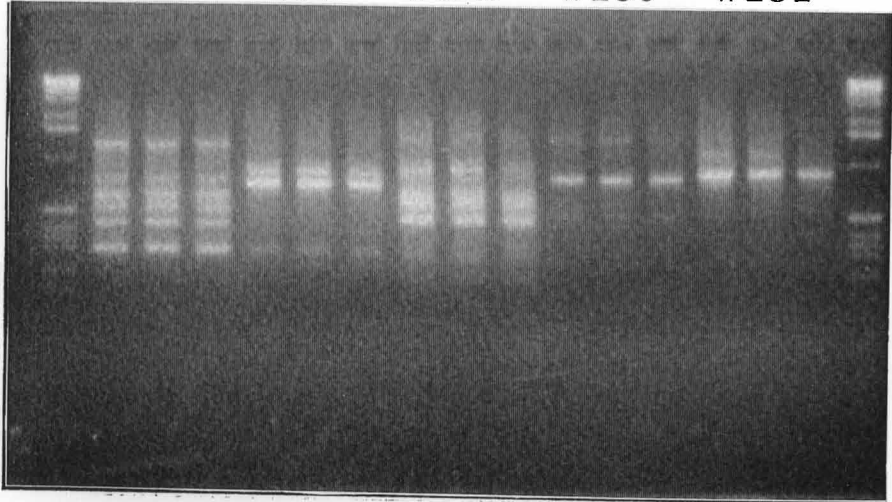
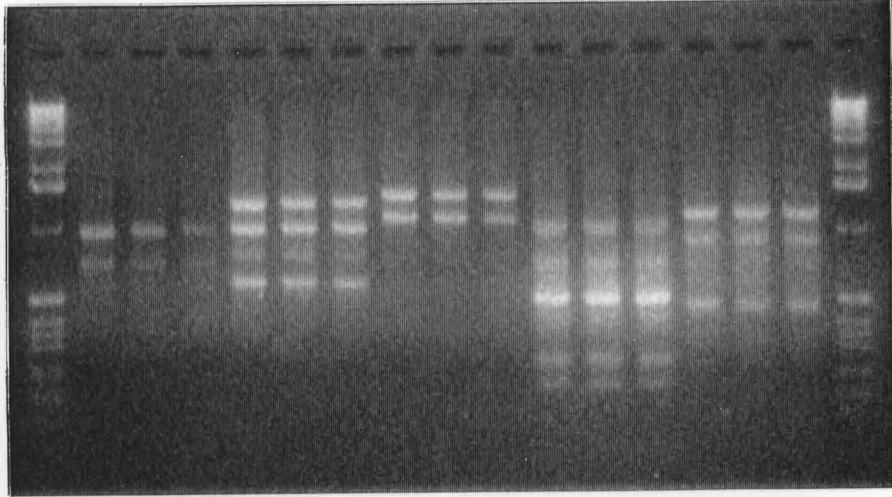


Fig.7-3a. RAPD bands from wasabi plants non-treated (left lane), treated control (middle lane) and cryopreserved by vitrification (right lane).
Primer: #110 ~ #131, Material: Shimane No.3.

#133 #134 #135 #136 #139



#140 #141 #142 #143 #144

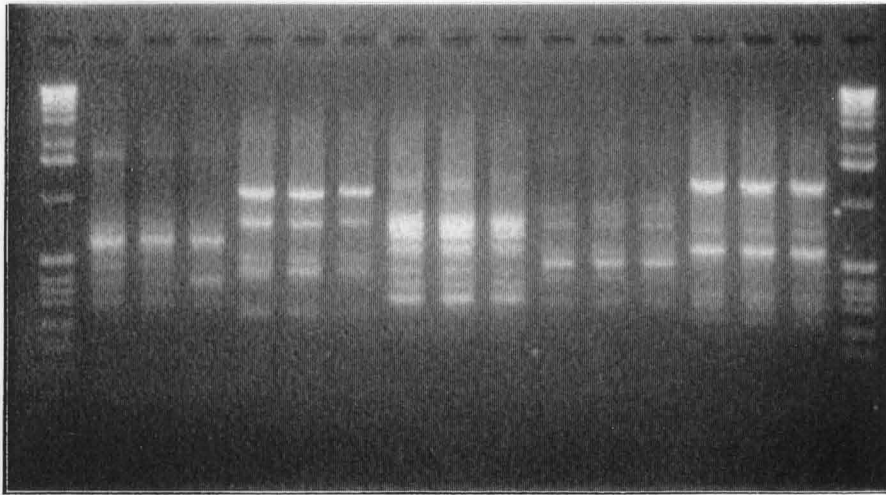


Fig.7-3b. RAPD bands from wasabi plants non-treated (left lane), treated control (middle lane) and cryopreserved by vitrification (right lane).
Primer: #133 ~ #144, Material: Shimane No.3.

第8章 総合考察

1) 植物の超低温保存の原理と特徴

植物の培養細胞を液体窒素温度で保存し再生植物を得た最初の成功は Nag & Street (1973) である。彼らは、液体窒素温度に冷却したニンジンの培養細胞から植物体を再生させた。また、茎頂の超低温保存では、Seibert (1976) がカーネーションで始めて成功し、その後、イチゴ、バレイショ、エンドウ等、多くの植物で報告された。しかし、その後の組織学的観察により液体窒素冷却後の茎頂ドームの細胞は傷害を受けて、他の部位の生き残った細胞が増殖してカルスを形成し、そこから二次的に不定芽を形成することが Haskins & Kartha (1980) 及び Towill (1984) によって報告された。すなわち、再生した植物はカルスを經由していることから遺伝的変異の発生する可能性が指摘された。そのため、これ以降、茎頂の超低温保存の研究はほとんど中断された。その後、1990年に Sakai らがガラス化法を、同年に Dereuddre らがアルギン酸ビーズ乾燥法を発表した。プログラムフリーザー等の高価で特殊な機器を必要としないこれらの簡便な方法の開発により、茎頂の超低温保存の成功例が著しく増加した(酒井 1996)。これらの方法の共通点は、細胞外凍結により $-5\sim-40^{\circ}\text{C}$ の低い温度で長時間かけて凍結脱水するのではなく、室温または 0°C で細胞内の凍結水を除去してから、それらの温度から直接液体窒素中に冷却してガラス化させることである。このため、茎頂ドームの大部分の細胞は傷害を受けずカルスを經由しないで茎頂から直接シュートが形成される。

液体窒素温度で茎頂を生存させるためには、液体窒素温度への急速冷却中におこる危険な細胞内凍結を回避することが必要である (Sakai & Yoshida 1967)。そのため、細胞や組織は冷却前に細胞内の凍結水を十分に取り除く必要がある (Sakai 1993)。この脱水方法は、ガラス化法及びその改良法であるビーズ・ガラス化法では凍害防御剤の高濃度液(ガラス化液)による浸透的脱水で、アルギン酸ビーズ乾燥法では乾燥によるビーズ内の糖液の濃縮に伴う浸透脱水による (Fig. 8-1)。しかし、それぞれの方法に共通していることは、組織・細胞をガラス化し得る水分含量まで室温または 0°C で脱水してから液体窒素

中に急冷することにより媒液および茎頂の細胞をガラス化させ、細胞内凍結を回避させて生存させることにある。そして、それら細胞・組織をガラス転移点（PVS2液では約 -115°C ）以下の温度に保つことでそれらのガラス状態を維持でき、細胞の生化学的作用をほとんど停止させる（酒井 1991）。したがって、超低温保存では保存中の生理的、遺伝的变化が最小限に抑えられるため、安全に長期間の保存が可能となる。

2) ガラス化法

Yamada ら（1991）は、PVS2液を用いたガラス化法による超低温保存では液体窒素冷却後でも茎頂ドーム組織に傷害がほとんど発生せず、カルスを経由することなく茎頂から直接シュートが形成することを明らかにした。この方法を用いて、植物の茎頂では、ミント（Towill ら 1990）、白クローバー（Yamada ら 1991）、リンゴ及びナシ（Niino ら 1992a）、クワ（Niino & Sakai 1992）、アスパラガス（Kohmura ら 1992）、キク（深井 1992）、ワケギ（Kohmura ら 1994）、チャ（Kuranuki & Sakai 1995）、ニンニク（Niwata 1995）、リンドウ（佐藤ら 1995）等で成功例が報告された。また、アメリカのコネル大学では、エチレングリコールを主体としたガラス化液でストローを用いた方法でカーネーション（Langis ら 1990）、ジャガイモ（Schnabel-Preikstas ら 1992a）、キク（Schnabel-Preikstas ら 1992b）等の成功例が報告された。さらに、本研究では5品種のワサビ（Matsumoto ら 1994）、6種類のユリ（Matsumoto ら 1995a）、5品種のスターチス（Matsumoto ら 1996）で超低温保存に成功した。

ガラス化法で茎頂を超低温下で生存させるためには、まず茎頂に脱水あるいは凍結耐性を付与した後に、凍害防御剤の高濃度のガラス化液中で処理することが重要である。この処理中に、ある程度凍害防御剤を内部に浸透させると同時に浸透脱水させる。そして、液体窒素に入れて比較的速く冷却（ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上）すると粘性の高いガラス化液は約 -80°C 以下まで過冷却した後、約 -115°C 以下で凍結（Crystalization）しないで、不定形のガラス（Vitrification）状態となる（Fahy ら 1984; Sakai ら 1990, 1991a）。ガラス化液であ

る P V S 2 液 (Sakai ら 1990) または P V S 3 液 (Nishizawa ら 1993) においてグリセリンをその主成分としているのは、グリセリンが細胞内に浸透しにくいことから薬害が起こりにくい状態で脱水が進行するためである。一方、エチレングリコールや D M S O は細胞内に浸透しやすいため、これらを主成分とする高濃度のガラス化液を用いて室温で処理すると薬害を生じやすい。そのため、0℃で、しかも短時間で処理する方法がとられている。したがって、グリセリンを主体としたガラス化液は、植物組織のガラス化液として有望であると判断される。

P V S 2 液は緩慢に昇温すると、その中に含まれる水が約-70℃で凍結することで同時に茎頂も凍結するが、液体窒素温度から40℃の温水中に入れて急速に昇温させることによって、昇温過程で起こる危険な凍結を回避できる (Sakai ら 1991a)。脱水耐性の低い細胞や組織を直接、高濃度 (約 7.8 M) のガラス化液で処理すると脱水ストレスや薬害により傷害を受けるため、高い生存率やシュート形成率が得られない場合が多い。これを回避するために、0℃に冷却した P V S 2 液で処理したり、P V S 2 液を段階的に高める方法がとられた (Reinoud ら 1995)。一方、前培養や凍害防御剤によるローディング処理での脱水及び凍結耐性の付与が考えられる。ローディング処理は、細胞や茎頂をガラス化液に浸漬する前に、あらかじめ糖とグリセリン等の凍害防御剤の混合液で処理して耐性を付与すると同時に細胞、組織をある程度脱水しておく。アスパラガスの embryogenic cell を用いて Nishizawa ら (1992, 1993) によってローディング液が検討され、2 M グリセリンと 0.4 M しよ糖の混合液がガラス化法でアスパラガスの細胞を生存させるのに最も高い効果があることが明らかにされた。さらに最近、タバコ、ブドウ、シロイヌナズナ等の培養細胞の簡易凍結法でもこの液の有効性が明らかにされた (Sakai ら 1991a, 川原・秋田 1996)。本研究では、茎頂を用いたガラス化法でローディング処理によって、初めてワサビ (5 品種)、ユリ (6 種類) 及びスターチス (5 品種) の超低温保存に成功し、それらのシュート形成率は 90% 以上に達した。なお、これらの茎頂でも 2 M グリセリンと 0.4 M しよ糖の混合液がローディング液として最適であった。この混合液によるローディング

処理は、耐性が低い茎頂、体細胞不定胚、細胞等をガラス化法で生存させるために必要であった。グリセリンはエチレングリコールやDMSOと比べ、cell suspensionでは透過しにくい(Sakai 1991)、葉挿し(Sakai 1962)または茎頂(Dereudre 1991)を糖を含む固形培地上で培養すると維管束を通り細胞内に蓄積する。本研究では、16時間、0.3 Mしょ糖と0.5 Mグリセリンで前培養した茎頂組織内には約0.28 Mの糖と約0.4 Mのグリセリンがそれぞれ増加していることが確認された。また、アルギン酸ビーズ乾燥法による超低温保存において、ワサビ茎頂を包埋したビーズを1 Mグリセリンを含む0.8 Mしょ糖液で前処理したところ、シュート形成率は4時間処理では低かったが16時間処理で高くなった。これらのことから、前処理中にグリセリンが組織内に徐々に浸透することで、乾燥耐性や耐凍性が高まると推察される。しかし、現在のところ、このローディング液の作用機構についてはほとんど明らかにされていない。

高濃度の糖を含む培地上での前培養は、ガラス化法以外の超低温保存法でも多く用いられ、0.3~0.7 Mのしょ糖添加培地で茎頂等を16~24時間処理する方法である(Uragami ら 1989,1990, Towill ら 1990, Pence 1991, Kohmura ら 1992,1994, Hatanaka ら 1994, Niino ら 1992a,b, Niino & Sakai 1992, Matsumoto ら 1994,1995a,b,1996, Matsumoto & Sakai 1995, 松本ら 1996b, Suzuki ら 1994)。本研究においてワサビ茎頂ではガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法ともに、しょ糖0.3 Mで約16時間の前培養が適していることが明らかとなった。高濃度のしょ糖を含む固形培地上で前培養することにより細胞内に糖が大量に増加する(Uragami ら 1990, Dereudre ら 1988, Dereudre 1991a,b)が、糖の増加がなぜ脱水耐性や凍結耐性を高めるかについては、植物培養細胞・茎頂ではほとんど基礎的研究がされていない。なお、越冬植物は秋から冬にかけて成熟に伴う耐糖性の増加につれて、糖、糖アルコール及び蛋白質の増加、液胞の小胞化、膜脂質の増加、さらにそれらの脂肪酸分子種の不飽和化が知られている(酒井 1995)。今後、培養茎頂を用いたこのような基礎研究が行われることを期待している。

3) アルギン酸ビーズ乾燥法

ガラス化法と同様に、最近多くの報告があるアルギン酸ビーズ乾燥法は、Dereuddre ら (1990) がナシ、Febre & Dereuddre (1990) がバレイショでの成功例を報告した後、Niino & Sakai (1992) が改良を加えた。これにより、植物の茎頂ではリンゴ・ナシ・クワ (Niino & Sakai 1992)、コーヒー (Hatanaka ら 1994)、キウイフルーツ (Suzuki ら 1994)、アスパラガス (Ghosh & Sen 1994)、チャ (Kuranuki & Sakai 1995, 青島 1995)、リンドウ (菊池ら 1995)、ユリ (Matsumoto & Sakai 1995) 及びスターチス (Matsumoto ら 1996) 等、多くの成功例が報告されている。また、体細胞不定胚をABAまたは前培養で乾燥耐性を付与させた後、乾燥させる方法でメロン (下西ら 1994)、カンショ (吉永・山川 1994) 等で成功例が報告されている。ビーズ乾燥法の特徴は、アルギン酸塩のビーズに包埋した茎頂を高濃度しょ糖液で処理して乾燥耐性とそれに続く急速冷却に対する耐性を付与することにある。耐性を付与した後に、ビーズを風乾する乾燥過程でビーズ中の糖濃度が次第に高まり、やがて飽和、さらに過飽和濃度に達する。続いて、液体窒素中で冷却することによって、ビーズ及びその内部の茎頂をガラス化させる。この方法の長所としては、操作が比較的簡単であり、同時に多量の茎頂を処理できる点である。一方、脱水処理に数時間を要し、一般に保存後のシュート形成率が低く、さらにその再生速度が遅いという欠点がある。なお、Dereuddre ら (1990) は、液体窒素から取り出し室温で加温後、培地に置床し、一日後に茎頂をビーズから摘出している。スターチス茎頂では、ビーズに包埋したまま培養を続けると再生したシュートには水浸状の発生が多かったが、ビーズから茎頂を取り出して培養したところ、茎頂の多くは正常に生育した (Matsumoto ら 1996)。したがって、ビーズに包埋のままである培養は、植物の種類によってはその後の生育に著しい障害を引き起こす可能性があるため、そうした植物では茎頂をビーズから取り出して培養することが必要となる。

ワサビ茎頂を用いた本研究において、アルギン酸ビーズ乾燥法はガラス化法と比べシュート形成率が低かったが、乾燥処理前に 0.8 Mしょ糖に 1 Mグリセリンを添加した液で処

理したところ、液体窒素冷却後のシュート形成率が15%以上高まり、再生したシュートの初期生育が通常のビーズ乾燥法より良好であった。このグリセリン添加による改良ビーズ乾燥法の効果はワサビ以外の植物でも確認され、ササユリ茎頂 (Matsumoto & Sakai 1995)、スターチス茎頂 (Matsumoto ら 1996) でシュート形成率が高くなったことが報告されている。しかし、スターチス茎頂では、0.5 Mのグリセリンの添加が適していた (松本ら 1996a)。したがって、0.8 Mしょ糖に添加する最適グリセリン濃度は植物によって異なるが、この改良ビーズ乾燥法は、今後、多くの植物で応用可能であると思われる。

4) ビーズ・ガラス化法

ガラス化法を改変したビーズ・ガラス化法で -196°C に冷却されたワサビ茎頂のシュート形成率はガラス化法とほぼ同程度 (約90%) で、ビーズ乾燥法よりも30%程度高い値を示した。これと同様な結果が、ユリ (松本ら 1996b) やスターチスの培養茎頂 (Matsumoto ら 1996) でも得られた。このビーズ・ガラス化法では、脱水時間がガラス化法並に短く、また処理された茎頂の生育がビーズ乾燥法より著しく速かった (Matsumoto ら 1995b)。また、茎頂をビーズに包埋するビーズ・ガラス化法では、煩雑な操作であるガラス化液の交換が容易となるため、多量の茎頂を同時にほぼ均一に脱水することが可能となる。さらに、ビーズ・ガラス化法では茎頂がビーズに包埋されているため、ガラス化法と比べるとPVS2液の浸透脱水による組織へのストレスは少なく、その結果、ガラス化法よりシュート形成率が高くなったと推察される。このようにビーズ・ガラス化法は、いくつかの利点を持っていることから、今後、有望で実用的な方法に成り得ると考えられる。

5) 超低温保存後に再生した植物の遺伝的変化

超低温保存後に再生した植物体の組織・細胞に生じる遺伝的変異の発生に関する報告は、数多く出されているが、ここでは主に茎頂を用いた場合に限定する。一般に、茎頂の超低温保存では、適正な条件で処理され高い生存率やシュート形成率が得られた場合は遺伝的

変異は認められない。しかし、不適當な処理で超低温保存され、シュート形成率が30%以下の低い場合は、茎頂の再生能力が極めて低くなるため多くの茎頂はカルス化し、シュートを形成した茎頂もその生育が著しく遅れる (Towill 1984)。そのため、超低温保存された茎頂からの遺伝的変異に関しては、適正条件下で合理的な方法で超低温保存された材料について論議することが必要と思われる。Seitz & Reinhard (1987) は、緩速予備凍結法で超低温保存されたオタネニンジンの培養細胞について、再培養後経時的に比較したところ、新鮮重、乾物重には差がなかったと報告している。また、木本類の培養茎頂においては、ガラス化法で超低温保存された5品種のリンゴ及び5品種のナシ (Niino 1992a)、13品種のクワ (Niino 1992b)、8品種のオウトウ (田代ら 1995a, b) やアルギン酸ビーズ乾燥法で超低温保存されたリンゴ及びナシ (Niino & Sakai 1992) でも形態的な異常個体は見出されなかった。また、Yamada ら (1991) は、3種類のシロクローバー茎頂をガラス化法で超低温保存し、再生個体には形態的変異を認められなかった。我が国では超低温保存された植物の生育調査は少ないが、筆者らはガラス化法で超低温保存されたスターチス茎頂の生育調査をおこない、それらの表現形質を比較した (高橋ら 1996)。すなわち、茎頂から再生した植物体は、順化から5か月後の開花期までの1か月毎の調査では、ガラス化法で液体窒素に冷却区、未冷却区、無処理区において、株数、草丈、展葉枚数、葉の横径縦径比の4項目については、顕著な差は認められなかった。さらに、開花時の花茎、花弁の大きさ及び、花の形状や花色には有為な差は認められなかった。

最近、超低温保存された培養細胞や茎頂についてのDNAレベルでの変化の検討が多く報告されている。Harding (1991) は、超低温保存されたバレイショの茎頂をRFLPで比較したが、対照区と比べ変化はなかったと報告した。Kobayashi ら (1994) は、エレクトロポレーションにより形質転換したネーブルオレンジの珠心胚由来の培養細胞と対照の無処理の細胞をガラス化法で1年間、液体窒素保存した (生存率: 約90%)。昇温後、これらの培養細胞はサザンブロット法で分析した結果、導入した遺伝子を保持し、DNAの変異が生じていなかったことを示した。また、Yoshimatsu ら (1996) は、オタネニンジン毛

状根をガラス化法で超低温保存し再生した毛状根について、二次代謝産物の ginsenoside 含量とそのパターンを比較したところ液体窒素で冷却及び未冷却の毛状根の間には有為な差は認められなかった。オタネニンジンの培養細胞を用いた Seitz & Reinhard (1987) も同様な結果を示し、さらに、PCR法によりT-DNAの存在を調査したところ、両者にはともにT_L及びT_R-DNAの存在が確認されたことから、変異の発生は認められなかったと報告している。Paulet ら (1993) は、サトウキビ茎頂を用いたビーズ乾燥法で、カルス経由でなく茎頂から直接シュートを形成していることを認め、さらにDNAフィンガープリントプローブを用いた解析でも遺伝的に安定であることを示した。また、カサランサスの培養細胞を用いた Chen ら (1984)、オレンジの体細胞不定胚を用いた Marin ら (1993)、サトウキビ茎頂を用いた Paulet ら (1993)、エンゲルマントウヒの培養細胞を用いた Cyr ら (1994) もDNAレベルあるいは生化学的解析で検討した結果、超低温保存して再生させた植物には変異が発生していないことを報告している。本研究においても、ガラス化法で液体窒素温度へ冷却されたワサビ茎頂、PVS2液処理のみの未冷却区、無処理の対照区の3種類の再生植物について、RAPD-PCRによりDNAレベルで変異の有無を検討したところ、使用した20種類のプライマーではそれぞれのバンドパターンには差は認められなかった。一方、液体窒素で冷却後に再生したシュートには無処理区と比べ若干の生育遅延が見られ、ワサビが生産する二次代謝産物の一つである sinigrin の含有量もやや少なかった。しかし、これらは植え付けから3年間の栽培期間で十分回復可能と推察される。したがって、これら多くの明らかにされた事実から、少なくとも適正な方法で超低温保存された茎頂から再生した植物体では、実用上問題となる遺伝的変異の発生の可能性は少ないと結論される。

6) 超低温保存の将来展望

栽培品種やその近縁の有用形質を持つ野生種は、将来の作物の育種事業における遺伝資源として必要不可欠である。特に、種子で保存できない栄養繁殖性植物の保存が重要であ

る。その保存形態として、今のところ圃場での栽培による維持や環境制御された温室内におけるウイルスフリー植物の保持、*in vitro* 植物の継代培養または生育抑制条件での培養による保存等が行われている。これらの方法は短期的あるいは中期的な保存法で、いわゆる Working または Active collection である。それに対し、超低温保存法は長期的な安定した Base collection と位置づけられる。本研究では、超低温保存の保存材料として培養茎頂を用いた。その理由として、滅菌の必要がなく、micropropagation が容易で多量の材料が確保しやすく、特に茎頂は再生植物に遺伝的変異の生じる可能性が最も少ない。さらに、超低温保存下では保存試料に起こる遺伝的な変異の発生は最小限に抑えられることが大きな長所である。したがって、超低温保存法は、今後、遺伝資源の保存、実験材料の保存等においてますます重要となるであろう。しかし、現在の茎頂を用いた超低温保存技術は、多くの温帯植物に対してはかなり適用範囲が拡大してきたが、熱帯植物の茎頂に対してはほとんど適用できない。それに対し、培養細胞、体細胞不定胚では熱帯植物に対しても、ガラス化法やビーズ・ガラス化法がある程度適用できることは興味深い。温帯植物の培養茎頂では、cold-hardening が preconditioning として有効であるが、熱帯植物では13℃以下の冷温に対して敏感であるため、この処理が困難である。したがって、Cold-hardening に代わる熱帯性の *in vitro* 植物の preconditioning に関する基礎研究がこの問題を解決する鍵と思われる。今後は、超低温保存下で起こる可能性のある変異発生のメカニズムをさらに詳細に調査し、超低温保存法の安全性を実証していく必要があると考えられる。

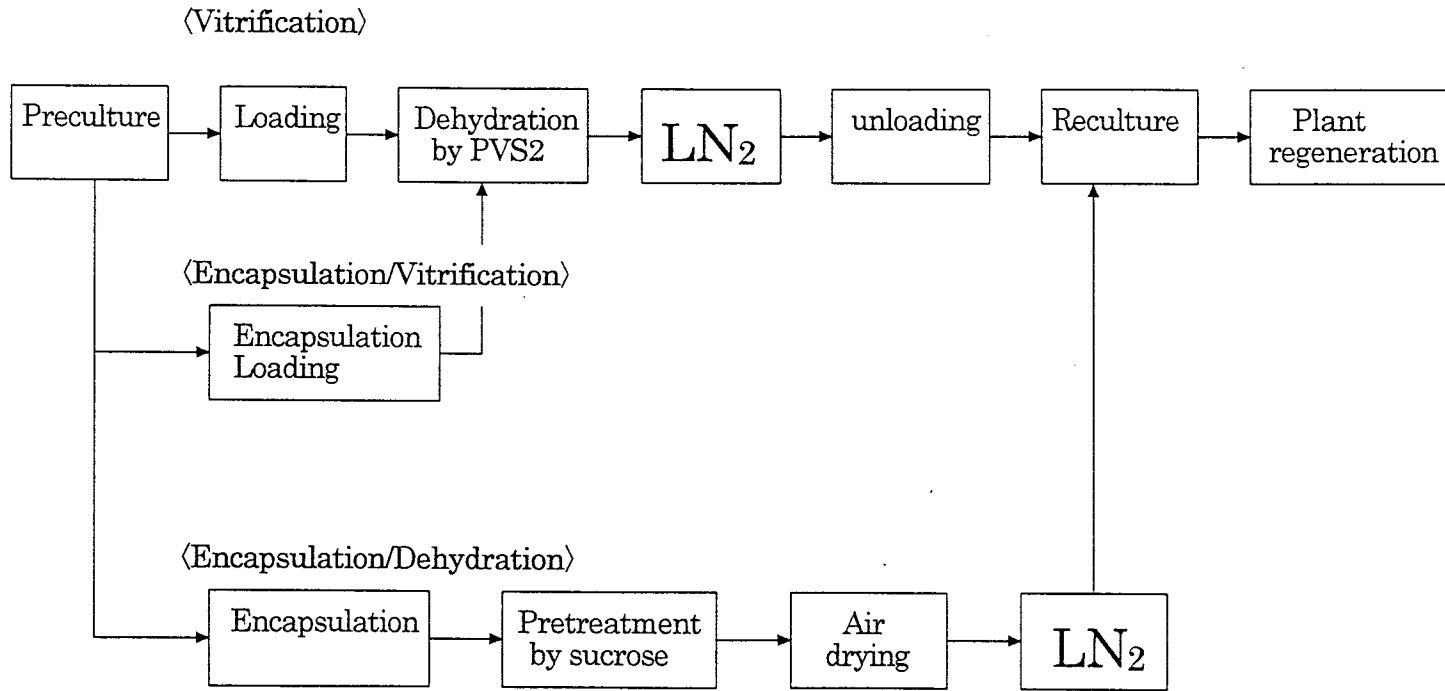


Fig.8-1. Cryogenic procedures for wasabi meristems cooled to -196°C

摘要

ワサビ培養茎頂の超低温保存法を確立するため、第3章ではガラス化法、第4章ではアルギン酸ビーズ乾燥法、第5章ではビーズ・ガラス化法の最適処理条件を明らかにした。また、第6章では上記3種類の超低温保存法の利点と問題点を明らかにし、第7章では超低温保存後の再生植物に実用上問題となる変異の発生がないことを明らかにした。

1. ワサビ培養茎頂を用いて、ガラス化法の最適処理条件を明らかにした。0.3Mしょ糖培地による前培養と2Mグリセリンと0.4Mしょ糖の混合液によるローディング処理を加えたところ、PVS2液の最適処理条件でシュート形成率が90%以上になった。また、0.3Mしょ糖の前培養において0.5Mのグリセリンを添加したところ、ローディング処理なしでも約80%のシュート形成率が得られた。

2. ビーズ乾燥法の最適条件について検討した。慣行法では液体窒素保存後のシュート形成率が約65%であったが、乾燥前に0.8Mしょ糖と1Mグリセリンの混合液で処理することによって約85%のシュート形成率を得た。したがって、ガラス化法よりシュート形成率が低いとされていたアルギン酸ビーズ乾燥法において、シュート形成率を約20%向上させるしょ糖の存在下でのグリセリンの効果についての知見を得た。

3. 茎頂をアルギン酸ビーズに包埋して行うガラス化法の改変型であるビーズガラス化法を開発した。これにより、ガラス化法の最大の欠点である液交換の煩雑さが解消された。また、この方法は茎頂より小さい懸濁細胞、毛状根を材料に用いる場合、さらに効果的な方法になりうると考えられる。

4. ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法及びビーズガラス化法におけるシュート形成率、必要な乾燥時間及び再生植物の生育速度について比較を行ったところ、ガラス化法及びビーズガラス化法における超低温保存後のシュート形成率及び再生速度はいずれもビーズ乾燥法より優っていた。

5. ガラス化法及びアルギン酸ビーズ乾燥法で超低温保存したワサビ茎頂の再生過程をF D A及びフェノサフラニンによる染色観察，光学顕微鏡による茎頂ドームとその周辺の細胞の生存性について組織学的観察を行った。その結果，ガラス化法，アルギン酸ビーズ乾燥法ともカルス経由しないで茎頂から直接シュートが形成されることが明らかになった。また，アルギン酸ビーズ乾燥法はガラス化法よりシュート形成率が低い，ガラス化法で再生した茎頂は組織の大部分が生存していたのに対して，アルギン酸ビーズ乾燥法の茎頂はドーム近傍組織のみ生存していた。したがって，アルギン酸ビーズ乾燥法での低いシュート形成率及びその再生過程の遅れは，生存茎頂部位の大きさから説明できるものと考えられる。

6. ガラス化法で超低温保存後に再生した植物体で，遺伝的変異の発生の有無について，生育調査，ワサビの二次代謝物としての辛み成分の分析及びR A P D - P C RによるD N Aレベルで検討を行った。その結果，液体窒素保存後に再生した植物体は，生育調査では若干生育の遅れが認められ，また，辛み成分の前駆体であるsinigrin含量も若干低かった。しかし，ワサビは3年間の栽培後に収穫されるため，収穫時にはその差は殆ど無くなると考えられる。R A P Dによる変異の確認では，20種類のプライマーで比較したところそれぞれのバンドパターンに差は認められなかった。したがって，超低温保存後に再生したワサビには，実用上問題となるような遺伝的変異の発生はないものと考えられる。

本研究で改良したガラス化法とアルギン酸ビーズ乾燥法は，数種類のワサビ，ユリ及びスターチスの超低温保存に適用できた。これらの方法が，さらに多くの植物の超低温保存に応用されることを期待している。

謝辞

本論文を作成するにあたり、神戸大学教授安田武司博士から御校閲の労と懇切な御指導を賜った。また、神戸大学農学部長加藤征史郎博士、同教授土田廣信博士には御校閲の労と有益な御助言を賜った。

本研究の遂行にあたり、北海道大学名誉教授酒井昭博士には研究開始時より終始適切な御助言と懇切な御指導、御激励を頂き、さらに本論文の御校閲を賜った。拓殖大学助教授仁木輝緒博士には組織学的観察に関して、また、東京水産大学教授高井陸雄博士、同助教授鈴木徹博士にはガラス転移点の測定に関して懇切な御指導と御協力を頂いた。

島根県農業試験場長山田員人博士（前生物工学科長）には適切な御指導と御協力、及び終始御激励を頂いた。また、作物部長古山光夫氏、生物工学科長名古洋治氏には本研究遂行上の便宜と御指導、御激励を頂いた。さらに、生物工学科主任研究員春木和久氏、同杉山万里氏、同研究員近重克幸氏、他科員各位には有益な御助言と御協力を頂き、また、横田町役場農業振興課高橋千昭氏には生物工学科研修生としての2年間に多くの御協力を頂いた。

島根県農業試験場に配属後は、島根大学名誉教授内藤隆次博士、同教授山村宏博士、同植田尚文博士、同稲葉久仁雄博士、同細木高志博士、同助教授板村裕之博士、鳥取大学教授高橋国昭博士（前島根県農業試験場次長）、岡山大学助教授村井保博士（前島根県農業試験場病虫科長）、元島根県農業試験場長山根国男博士、農林水産省農業生物資源研究所生物工学部長大澤勝次博士には、研究遂行上、貴重な御助言と御激励を頂いた。

なお、本研究の一部は、平成3年度から5ヶ年間、農林水産省地域バイオテクノロジー実用化研究開発事業「培養苗の順化率の向上と保存技術による計画的種苗生産システムの開発」による助成を受けた。

ここに上記の各位、並びに関係各位に心から感謝申し上げます。

引用文献

青島洋一, 1995, アルギン酸ビーズ乾燥法によるチャ多芽体の超低温保存,
第14回植物組織培養学会大会, 講演要旨集: p.66.

Benson, E. E., and J. D. Hamill, 1991, Cryopreservation and post freeze
molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta
vulgaris* and *Nicotiana rustica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.*, 24:
163-172.

Chen, T. H. H., K. Kartha, N. L. Leung, W. G. W. Kurz, K. B. Chatson,
and F. Constabel, 1984, Cryopreservation of alkaloid-producing cell
cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus*), *Plant Physiol.*, 75:
726-731.

Cry, D. R., W. R. Lazaroff, S. M. A. Grimes, G. Quan, T. D. Bethune, D.
I. Dunstan, and D. R. Roberts, 1994, Cryopreservation of interior
spruce (*Picea glauca engelmanni* complex) embryogenic cultures, *Plant
Cell Rep.*, 13: 574-577.

Dereuddre, J., J. Fabre, and C. Bassaglia, 1988, Resistance to freezing
in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo)
apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro
plantlets, *Plant Cell. Rep.*, 7: 170-173.

Dereuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud, and M. Duron, 1990, Resistance of
alginate-coated axillary shoot tips of pea tree (*Pyrus communis* L.
cv Beurre Hardy) in vitro plantlets to dehydration and subsequent
freezing in liquid nitrogen: Effects of previous cold hardening, *C. R.
Acad. Sci. Paris*, t. 310, Serie III: 317-323.

Dereuddre, J., S. Blandis, and N. Hassen, 1991a, Resistance of alginate-
coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation

and freezing in liquid nitrogen: 1. Effects of preculture, *Cryo-Letters*, 12: 125-134.

Dereuddre, J., N. Hassen, S. Blandin, and M. Kaminski, 1991b, Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. Thermal analysis. *Cryo-Letters*, 12: 135-148.

Febre, J., and J. Dereuddre, 1990, Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *solanum* shoot-tips, *Cryo-Letters*, 11: 413-426.

Fhay, G. M., D. R. Macfarlane, C. A. Angell, and H. T. Meryman, 1984, Vitrification as an approach to cryopreservation, *Cryobiology*, 21: 407-426.

深井誠一, 1992, ダイアンサスおよびキク属植物における茎頂の凍結保存に関する研究, 香川大農紀要, 56: 1-79.

Ghosh, B., and S. Sen, 1994, Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker, *Plant Cell Rep.*, 13: 381-385.

Haskins, R. H., and K. K. Kartha, 1980, Freeze preservation of pea meristems: Cell survival, *Canadian J. of Botany*, 58(8): 833-840.

Hatanaka, T., T. Yasuda, T. Yamaguchi, and A. Sakai, 1994, Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee (*Coffea canephora*) after cooling in liquid nitrogen, *Cryo-Letters*: 15, 47-52.

Harding, K., 1991, Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation, *Euphytica*, 55: 141-146.

- 平佐聡尚・春木和久・山田員人, 1995, ワサビからし油配糖体の高速液体クロマトグラフ (H P L C) を利用した定量法, 島根農試研報, 29: 153-157.
- 堀 秀隆, 1986, ワサビ苗の試験管内大量培養法, 植物バイオテクノロジー, 現代化学, 増刊5: 118-123.
- 細木高志・角田和美・浜田守彦・瀬尾光弘, 1986, ワサビの組織培養による増殖, 農業及び園芸, 61: 995-996.
- 細木高志・白石一剛・岩井元康・稲葉久仁雄, 1988, ワサビの組織培養の増殖, 農業及び園芸, 63: 653-654.
- 川原良一・秋田和子, 1996, 培養細胞の簡易凍結法による超低温保存, 組織培養, 22(9): 348-352.
- 菊池幹之・八代 昇, 1995, ビーズ乾燥法を用いたリンドウ節組織腋芽の超低温保存, 第14回植物組織培養学会大会, 講演要旨集: p. 74.
- Kobayashi, S., A. Sakai, T. Ohgawara, and Y. Nakamura, 1994, Stable maintenance of an integrated gene in nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) under storage in LN₂, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 63(3): 553-558.
- Kohmura, H., A. Sakai, S. Chokyu, and T. Yakuwa, 1992, Cryopreservation of in vitro-cultured multiple bud clusters of asparagus (*Asparagus officinalis* L. cv. Hiroshimagreen (2n=30) by the techniques of vitrification, Plant Cell Rep., 11: 433-437.
- Kohmura, H., Y. Ikeda, and A. Sakai, 1994, Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (*Allium wakegi* A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration, Cryo-Letters, 15: 289-298.
- 小嶋 操, 1981, ワサビの科学(3), 農業及び園芸, 56: 964-968.
- Kuranuki, K., and A. Sakai, 1994, Cryopreservation of *in vitro*-grown

- shoot tips of tea (*Camellia sinensis*) by vitrification, *Cryo-Letters*, 16: 345-352.
- Langis, R., B. J. Schnabel-Preikstas, E. D. Earle, and P. L. Steponkus, 1990, Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification, *Cryobiol.*, 27: 657-658.
- Marin, M. L., Y. Gogorcena, J. Ortiz, and N. Duran-Vila, 1993, Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatment, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 34: 27-33.
- 松本 理・山本雄慈, 1987, ワサビの花茎及び根茎組織の培養による試験管内大量繁殖, *近畿中国農業研究*, 73: 22-27.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada, 1994, Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration, *Plant Cell Rep.*, 13: 442-446.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada, 1995a, Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily (*Lilium japonicum*) by vitrification, *Plant Cell Tiss. Org. Cul.*, 41: 231-241.
- Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi, and K. Yamada, 1995b, Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method, *Cryo-Letters*, 16: 189-196.
- Matsumoto, T., and A. Sakai, 1995, An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to -196°C, *Cryo-Letters*, 16: 299-306.
- 松本敏一・酒井 昭・名古洋治, 1996a, アルギン酸ビーズ乾燥法におけるグリセリン添加しよ糖処理によるシュート形成率の向上, 第5回植物細胞分子生物シンポジウム, 講演要旨集, p. 57.

- 松本敏一・酒井 昭・高橋千昭・山田員人, 1996b, ビーズガラス化法 (Encapsulation-Vitrification法)によるユリ培養茎頂の超低温保存, 植物組織培養, 13(1): 29-34.
- Matsumoto T., C. Takahashi, A. Sakai, and Y. Nako, 1996, Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different cryogenic procedures, Plant Science, unpublished.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloon, 1987, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-chain reaction, In "Methods in enzymology" (ed. Wu, R.), vol. 155: p. 335-350.
- Murashige, T., and F. Skoog, 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nag, K. K., and H. E. Street, 1973, Carrot embryogenesis from frozen cultured cells, *Nature*, 245: 270-272.
- 中村俊一郎, P. Sathiyamoorthy, 1990, ワサビ種子の貯蔵に関する研究, 園学雑, 59(3): 579-587.
- 中村俊一郎, 1993a, Recalcitrant 種子(1), 農業及び園芸, 68(11): 1160-1164.
- 中村俊一郎, 1993b, Recalcitrant 種子(2), 農業及び園芸, 68(12): 1272-1274.
- 中村俊一郎, 1994, Recalcitrant 種子(3), 農業及び園芸, 69(6): 659-660.
- Niino T., A. Sakai, H. Yakuwa, and K. Nojiri, 1992a, Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 28: 261-266.
- Niino T., A. Sakai, S. Enomoto, J. Magoshi, and S. Kato, 1992b, Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification, *Cryo-Letters*, 13: 303-312.

- Niino, T., and A. Sakai, 1992, Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry, *Plant Science*, 87 : 199-206.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, and T. Matsuzawa, 1992, Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method, *Cryo-Letters*, 13: 379-388.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, and T. Matsuzawa, 1993, Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91: 67-73.
- Niwata, E., 1995, Cryopreservation of apical meristems of garlic (*Allium sativum* L.) and high subsequent plant regeneration. *Cryo-Letters*, 16: 102-107.
- 大塚寿夫, 1988, ワサビの増殖法, 農業及び園芸, 63: 185-189.
- Paulet, F., F. Engelmann, and J. C. Glaszmann, 1993, Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration, *Plant Cell Rep.*, 12: 525-529.
- Pence, V. C., 1991, Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*, *Plant Cell Rep.*, 10: 144-147.
- Reinoud, P. J., E. W. M. Schrijnemakers, F. v. Iren, and J. W. Kijne, 1995, Vitrification and a heat-shock treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two-step freezing, *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* 42: 261-267.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim, 1985, Enzymatic amplification of β -globin

genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354.

Sakai, A., 1962, Studies on the frost-hardiness of woody plants: 1. The casual relation between sugar content and frost-hardiness, *Contribution from the Institute of Low Temp. Sci. Ser. B.*, No.11: 1-40.

Sakai A., and S. Yoshida, 1967, Survival of plant tissue at super-low temperature VI. Effects of cooling and rewarming rates on survival. *Plant Physiol.*, 42: 1695-1701.

酒井 昭, 1987, 植物の茎頂の凍結保存, 凍結保存 —動物・植物・微生物— (酒井 昭編), p.179-220. 朝倉書店, 東京.

Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama, 1990, Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osp. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification, *Plant Cell Rep.*, 9: 30-33.

Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama, 1991a, Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C, *J. Plant Physiol.*, 137: 465-470.

Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama, 1991b, Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method, *Plant Sci.*, 74: 243-248.

Sakai A., 1993, Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristems cooled to -196°C, *JICA GRP. REF.*, 6: 5-26.

酒井 昭, 1991, 植物培養細胞、組織、胚の超低温保存に関する研究の現状と動向, *農業及び園芸*, 66: 1223-1229.

酒井 昭, 1992, 植物培養細胞・組織・胚の超低温保存, *化学と生物*, 30(7): 441-448.

- 酒井 昭, 1995, 低温順化に伴う物質の変動, 植物の分布と環境適応. 熱帯から局地・砂漠へ, p.113-117, 朝倉書店, 東京.
- 酒井 昭, 1996, 植物の培養細胞・組織の超低温保存, 植物組織培養, 13(1): 1-6.
- 佐藤光子・八代 昇・酒井 昭, 1995, ガラス化法を用いたリンドウ節組織腋芽の超低温保存, 第14回植物組織培養学会大会, 講演要旨集: p.73.
- Schnabel-Preikstas, B., E. D. Earle, and P. L. Steponkus, 1992a, Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification, *Cryobiol.*, 29: 738-739.
- Schnabel-Preikstas, B., E. D. Earle, and P. L. Steponkus, 1992b, Cryopreservation of *chrysanthemum* shoot tips by vitrification, *Cryobiol.*, 29: 739.
- Seibert, M., 1976, Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C, *Science*, 191: 1178-1179.
- Seitz, U., and E. Reinhard, 1987, Growth and ginsenoside patterns of cryopreserved *Panax ginseng* cell culture, *J. Plant Physiol.*, 131: 215-223.
- Shimonishi, K., M. Ishikawa, S. Suzuki, and K. Oosawa, 1991, Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method, *Japan J. Breed.*, 41: 347-351.
- 下西 恵・軽部 稔・樽本 勲, 1994, 予備凍結法によるサツマイモ不定胚の超低温保存, 育学雑, 44(2): p.288.
- 杉山万里・春木和久・山田員人, 1995, R A P D - P C R を利用したワサビクロン間の識別, 島根農試研報, 29: 109-123.
- Suzuki, M., T. Niino, and T. Akiyama, 1994, Cryopreservation of shoot

tips of kiwifruit seedlings by the alginate encapsulation-dehydration technique, *Plant Tiss. Cul. Lett.*, 11(2): 122-128.

高橋千昭・松本敏一・酒井 昭・山田員人, 1995, スターチス培養細胞のガラス化法による超低温保存, 第14回植物組織培養学会大会, 講演要旨集: p.70.

高橋千昭・松本敏一・酒井 昭・名古洋治, 1996, 異なる3種類の方法によるスターチス培養茎頂の超低温保存と再生植物の生育, 第5回植物細胞分子生物シンポジウム, 講演要旨集, p.56.

田代浩夫・新野孝男・鈴木光輝・比留間直也, 1995a, ビトリフィケーション法によるサクラ、オウトウの培養茎頂の超低温保存 1. ハードニング及び脱水処理時間, 第14回植物組織培養学会大会, 講演要旨集: p.119.

田代浩夫・新野孝男・大内 進・馬越 淳・秋濱友也, 1995b, ビトリフィケーション法によるサクラ、オウトウの培養茎頂の超低温保存 2. 前培養及び品種, 第14回植物組織培養学会大会, 講演要旨集: p.120.

Towill, L. E., 1984, Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups andigena, phureja, stenotomum, tuberosum and other tuber-bearing *Solanum* species. *Cryo-Letters*, 5: 319-326.

Towill, L. E., 1988, Genetic considerations for germplasm preservation of clonal materials, *HortScience*, 23(1): 91-95.

Towill, L. E., 1990, Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification, *Plant Cell Rep.*, 9: 178-180.

Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai, and T. Takahashi, 1989, Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification, *Plant Cell Rep.*, 8: 418-421.

Uragami, A., A. Sakai, and M. Nagai, 1990, Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in

vitro, Plant Cell Rep., 9: 328-331.

渡部 格・杉浦昌彦, 1989, ゲノムDNAの単離・精製, クローニングとシーケンシング, 農村文化社, 東京: 252-271.

Widholm, J. M., 1972, The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells, Stain Technology, 47(4): 189-194.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey, 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res., 18: 6531-6535.

山田員人・春木和久, 1992, ワサビの茎頂培養による大量増殖法, 島根農試研報, 26: 85-95.

Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura, and S. Higuchi, 1991, Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification, Plant Science, 78: 81-87.

Yoshimatsu, K., H. Yamaguchi, and K. Shimomura, 1996, Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation, Plant Cell Rep., 15: 555-560.

吉永 優・山川 理, 1994, 乾燥法によるカンショ胚様体の凍結保存, 育学雑, 44(2): p.290.