



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。



氏名・（本籍）	まつもととしかず 松本敏一	（島根県）
博士の専攻分野の名称	博士（農学）	
学位記番号	博ろ第36号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成9年3月11日	
学位論文題目	ワサビ培養茎頂の超低温保存に関する研究	

審査委員	主査 教授 安田 武司		
	教授 土田 廣信	教授 加藤 征史郎	

論文内容の要旨

永年性作物のワサビは、栄養体で遺伝資源と言われる品種、系統等の保存を行っている。その方法として、圃場での栽培、環境制御下での栽培及び組織培養による保存の3種類に大別される。しかし、圃場での保存は天災や病虫害で遺伝資源が消失する危険性があり、温室等の環境制御下での保存は維持コストに問題がある。一方、組織培養による方法は、比較的少ないスペースで保存が可能であるため多くの永年性作物の保存に用いられているが、定期的な培地更新が不可欠で保存が長期になるとそれに要する経費は膨大なものとなり、保存スペースにも限界がある。さらに、培養中に発生する遺伝的変異の可能性も無視できない。したがって、これらの方法は、短期的あるいは中期的な遺伝資源保存法にしかなり得ない。そこで、近年、植物の細胞や組織を主に液体窒素（-196℃）を使用した-150℃以下の温度で保存する超低温保存法が注目されてきた。この方法は、保存対象が小さいため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活性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ことから極めて有効な長期保存法と言われている。

本研究では、遺伝的変異の発生の可能性が最も少ない茎頂を用い、つぎの3つの方法では超低温保存に成功した。①グリセリンを主体とした濃厚な凍害防御剤（ガラス化液）で室温または0℃で細胞内の凍結水を除去した後、液体窒素中に急冷するガラス化法（Vitrification）、②アルギン酸塩のゲルビーズ（径5mm）中に茎頂を包埋して風乾するアルギン酸ビーズ乾燥法（Encapsulation/Dehydration）、及び③同じくビーズ（径3mm）中に包埋した茎頂をガラス化液で脱水するビーズ・ガラス化法（Encapsulation/Vitrification）で超低温保存に成功した。さらに、超低温保存後に再生したワサビ植物体には実用上問題となる遺伝的変異は認められないことを明らかにした。

第1章では、植物細胞、組織における超低温保存法の現状を概括し本研究の目的を述べ、第2章では、材料として用いるワサビ培養茎頂の無菌的摘出法と材料の増殖法、及び超低温保存後の茎頂の培用法について示した。

第3章では、ガラス化法の最適処理条件を明らかにした。ワサビ茎頂のガラス化法は、0.3Mしょ

糖を含む固形培地で20℃、約16時間の前培養及び2 Mグリセリンと0.4Mしょ糖の混合液による25℃、20分間のローディング処理が茎頂の脱水耐性を高める上で最も効果があった。また、PVS 2液による細胞内の凍結水の除去には25℃、10分間、または0℃、50分間の処理が最適であった。これらの条件下で処理を行った後、-196℃の超低温で保存された茎頂のシュート形成率は90%以上に達した。

第4章では、アルギン酸ビーズ乾燥法の最適処理条件を明らかにした。この方法で最も重要なことは、ビーズ中の茎頂の乾燥耐性を高めることにある。従来の方法では0.8Mしょ糖液で16時間処理をしていたが、この方法では十分に高い乾燥耐性、耐凍性を誘導できなかった（シュート形成率：約60%）。そこで本研究では、0.8Mしょ糖と1 Mグリセリンの混合液を使用することにより、シュート形成率を約20%高めることに成功した。また、この方法は他の材料にも有効であることが明らかにされている。

第5章は、ビーズ・ガラス化法の最適処理条件を明らかにした。ガラス化法は、シュート形成率が高いが注意深い操作が必要であるために多量の茎頂を同時に処理することが困難である。一方、アルギン酸ビーズ乾燥法は、操作が比較的容易であるため多量の茎頂を処理することが可能であるが、一般的にシュート形成率がガラス化法より20%程度低い。そこで、茎頂をアルギン酸塩のゲルビーズ中に包埋してガラス化法で脱水するビーズ・ガラス化法を試みた。PVS 2液による脱水の最適条件は、25℃では30分間、0℃では80～130分間であった。これら最適条件では、90%以上の高いシュート形成率が得られた。この方法は、液交換が極めて容易になるため、茎頂より小さい懸濁細胞や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思われる。

第6章では、上記の方法を用いて、液体窒素冷却後の茎頂のシュート形成率、必要な乾燥時間、再生植物の生育速度及び茎頂のシュート形成過程を観察し、それぞれ比較を行った。シュート形成率の比較では、アルギン酸ビーズ乾燥法（約60%）を除いて他の3つの方法ではシュート形成率はほぼ90%またはそれ以上になった。さらに、その再生速度もアルギン酸ビーズ乾燥法より早かった。しかし、改変ビーズ乾燥法（0.8Mしょ糖と1 Mグリセリンの混合液によるビーズの浸漬処理）では、シュートの再生速度はガラス化法等とほぼ同程度となった。つぎに、ガラス化法及びアルギン酸ビーズ乾燥法で液体窒素冷却したワサビ茎頂について組織学的観察を行った結果、ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法で液体窒素冷却された茎頂は、それらのドームはともにカルス經由しないで茎頂から直接シュートが形成されることを確認した。

第7章では、ガラス化法で超低温保存後に再生した植物体における遺伝的変異の有無について、生育調査、ワサビの二次代謝産物であるsinigrinの定量分析及びRAPD-PCRによるDNA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ほとんど無くなると考えられる。RAPD-PCR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と結論した。

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。

論文審査の結果の要旨

栄養繁殖植物や種子を長期に保存できない植物種は多く、それらは圃場、または温室などの環境制御下での栽培、また無菌的に組織培養により植物遺伝資源の保存がなされている。しかし、天災や病害虫、維持コスト、また、培養中の遺伝的変異等の問題が起こり、長期的な保存には問題が多い。永年性作物であるワサビは、栄養繁殖性で、地域の特産として多くの品種、系統等があるが、その保存は栄養体で行なわれているのが現状である。そこで、植物の細胞や組織を液体窒素による超低温保存法の適用を考え、遺伝変異発生の可能性が最も少ない茎頂を材料とし、種々の方法を試み、ビーズ・ガラス化法での超低温保存を他の植物に先がけて成功させた。論文は、8章で構成されている。

第1章では、超低温保存の現状を概括し本研究の目的と意義を、第2章では、材料として用いるワサビ茎頂の無菌的摘出と培養法について述べている。第3章以下で、超低温保存法を、超低温処理後40℃温水で昇温処理し1.2Mしょ糖液で30分おいたのち培養しその正常な植物体再生率を基準として検討している。

第3章では、まず、ガラス化法を検討している。凍結に耐えない茎頂を-150℃以下の温度で生存させるためには冷却に際して起こる致命的な細胞内凍結を防ぐため、ガラス化させる必要がある。凍結あるいは脱水耐性を付与するため、グリセリンを主体とした濃厚な凍害防止剤で室温または0℃で細胞内の凍結水を除去した後、液体窒素中に急冷するガラス化の最適法を確立している。ワサビ茎頂では、0.3Mしょ糖を含む固形培地で、20℃、60時間の前培養及び2Mグリセリンと0.4Mしょ糖混合液による25℃、20分のローディング処理が、茎頂の脱水耐性を高める上で最も効果的であり、また、細胞内凍結水除去には、30%グリセリン、15%エチレングリコールと15%DMSOの混合溶液(PVS2液)で0℃、50分処理が最適であることを示した。最適条件下における再生率は90%以上であった。

第4章では、アルギン酸塩のゲルビーズ中に茎頂を包埋して風乾するアルギン酸ビーズ乾燥法の最適条件を明らかにした。この方法では、ビーズ中の茎頂の乾燥耐性を高めることが重要であり、0.8Mしょ糖と1Mグリセリンの混合液により茎頂の再生率が高まることを認めた。ゲルビーズで茎頂を包埋するため小さな茎頂の取り扱いに有利であり大量の処理が可能であるが、超低温処理後のシュート再生率は、ガラス化法より劣った。

第5章では、前2章の方法を複合し、アルギン酸ビーズ中に包埋した茎頂をガラス化液で脱水するビーズ・ガラス化法を検討している。ビーズ包埋と同時に2Mグリセリンと0.4Mしょ糖混合液により脱水耐性を付与し、PVS2液の脱水時間を検討して、90%以上の高いシュート再生率を持つ超低温保存法を確立している。液交換が極めて容易となり、茎頂よりも小さい材料にも有効であるとしている。

第6章では、異なる超低温保存法の利点と問題点を比較し、シュート再生率、乾燥時間、再生シュートの生育速度のいずれもガラス化法が優れていたが、多数の茎頂を同時に処理することは困難であり、その点、ビーズ・ガラス化法が有効であるとしている。また、再生過程を経時的に顕微鏡観察し、シュートが茎頂生長点から形成され、生長点が破壊されていないことを認めている。

第7章では、超低温保存後に再生した植物体の生育調査、ワサビの二次代謝産物であるsinigrin含量について検討した。超低温処理茎頂の再生の初期の生育速度は無処理に比べ劣るが、培養中に次第に回復し、sinigrin含量には顕著な差は認められなかった。また、RAPD-PCRにより、20種類のプライマーで比較したが変異は認められなかった。

第8章で本研究をまとめ、ワサビの方法が、ユリ、スターチスにも適用できたことを示し、今後の

課題について言及している。

本研究は、ワサビ茎頂を材料として超低温保存法を研究したものであり、保存法を持たない多くの栄養繁殖植物種にも応用の途をひらき、植物遺伝資源の保護・保存分野の発展にとって価値ある集積であると認める。よって、学位申請者松本敏一は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。