

クライオプレートを用いた栄養繁殖性作物遺伝資源の
超低温保存法に関する研究

山本伸一

目次

緒言.....	1
第1章 アルミニウム製クライオプレートを用いた超低温保存法の開発....	10
材料および方法.....	11
結果.....	17
考察.....	28
第2章 クライオプレート法その他植物への応用.....	31
第1節 ミント.....	32
材料および方法.....	33
結果.....	36
考察.....	47
第2節 イチゴ.....	49
材料および方法.....	50
結果.....	54
考察.....	58
第3節 熱帯産クワ.....	60
材料および方法.....	61
結果.....	64
考察.....	69

第4節 バレイショ.....	70
材料および方法.....	72
結果.....	76
考察.....	82
第3章 クライオプレート法の標準化プロトコル.....	85
第4章 クライオプレート法の事業化の可能性.....	90
材料および方法.....	91
結果.....	94
考察.....	99
第5章 総合考察.....	104
摘要.....	116
謝辞.....	122
引用文献.....	123

緒言

人類の誕生以来、我々の日々の生活は衣食住すべての面で、生物の持つ多様性を巧みに利用しながら、生物素材にその多くを依存してきた。現在までに利用されている生物種はもとより、現在では分子遺伝学的手法の進展により、生物の持つ DNA 等の遺伝情報を活用し役立てることが原理的に可能となり、すべての生物が何らかの価値を内在する「遺伝資源」と考えられるようになった。生物多様性から人類が利用できる属性としての遺伝資源の価値は将来の利用可能性からかんがみて多様であるほど好ましいと考えられ、その多様性を維持保全することが重要である。その一方で工業化や人口増加を原因とする過度の開発や地球温暖化等による環境劣化の影響等により、生態系における生物の多様性が減少する傾向が続いていると同時に私たちの生活の基盤となる食料および農業において直接利用される作物遺伝資源の多様性は近代育種の導入と農業の集約化に伴い、急速に消失している。例えば地域的な特徴と多様性を包含した在来品種は、商品的な生産の発展と地域間の品種の交流によって急速に失われてきた(池橋 2000)。つまり、育種において利用されなくなった素材が消失し、改良品種の導入によって、多様性を内在している在来品種の栽培が行われなくなるなどの遺伝的浸食が進んでいる(白田 2009)。品種の画一化が進展すると、遺伝的脆弱性が高まって作物の栽培上の安定性が失われ病虫害による大きな被害に見舞われる危険性がある(鵜飼 2003)。

このような状況の下、「生物多様性の保全」、「生物多様性の構成要素の持続可能な利用」と「遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分」を目的とする生物多様性条約 (Convention on Biological Diversity, CBD) が 1992 年に国連環境開発会議(地球サミット)において議決された。すなわち、CBD では

「遺伝資源の保有国に対して主権的権利を認め」、「事前同意と相互合意に基づいて初めて作物遺伝資源へアクセスが可能となる」とともに、「その利用により生ずる利益は公正かつ衡平に遺伝資源の提供者に配分を行う」こととされた。これにより、従来の「植物遺伝資源は人類の共有財であり、原則無制限で利用できる」との基本理念に基づき、いずれの作物遺伝資源に対しても誰でもが自由にアクセスすることを理想としてきた状況が一転した。そのため CBD 発効(1993)以降は作物遺伝資源に関する共同研究や国際的なやりとりの手続きが煩雑になるとともに、多くの作物遺伝資源の保有国は主権的権利を主張し、国外への持ち出しや共同探索・収集を制限している。一方、国連食糧農業機関(FAO)は持続的農業の発展と食料安全保障の観点から食料および農業に関する遺伝資源の育種利用などを円滑に進めるため、2001年総会において食料農業植物遺伝資源条約(International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, ITPGR)が採択された。条約は2004年に発効したが、日本は批准しておらず、加入に向けた準備を現在行っている。ITPGRでは、作物リストに掲載された35の主要作物と29属の牧草種のうち、締約国が管理するとともに権限を有するものであり、パブリックドメインにある遺伝資源については、単一の標準材料移転契約(Standard Material Transfer Agreement, SMTA)に従って交換することができると規定されている(大川ら2010)。しかしながら現況では、ITPGRは米国、中国、ロシアや日本等が加入していないことに加え、上記の作物リスト以外の遺伝資源についてはSMTAの対象外のため、十分に機能しているとは言い難い。このため、CBDの条件下でのアクセスが必要となるが、原産国の遺伝資源に関する国内法の整備状況などによりアクセス条件に関する合意が得られない場合が多く、新たな遺伝資源へのアクセスが非常に困難になっている。

このような背景のもと、すでに収集・保存されている遺伝資源を将来世代に

向けて安全に長期間維持することが今後の我が国の作物育種研究および品種育成に必要となっている。いいかえれば、植物をはじめとする微生物、動物細胞など生物遺伝資源を長期間、安定的かつ安全に保存することは、生物学や農学等ライフサイエンスの生物の多様性に基づく学術研究基盤(知的基盤)を整備するという観点からも非常に重要である。

遺伝資源の保存は生息域内(*in situ*)保存と生息域外(*ex situ*)保存の2種に大別される。植物に関しては世界各国の植物園・ジーンバンクなどの遺伝資源保存施設が遺伝資源の生息域外保存にあたる。この保存では、遺伝資源を滅失することなく維持することが重要で、安全で信頼性のある長期保存システムが不可欠である。一般的に微生物および動物細胞では超低温での保存が行われているのに対して、多くの植物、例えば穀物では通常種子と呼ばれる乾燥と低温に耐える種子を生成し、低温かつ低湿度に保った貯蔵室で簡単に保存できる。野生種ではミレニアムシードバンクのような植物園を中心とする保存施設、食料農業遺伝資源である作物では世界各国のジーンバンクなどで保存が進められている。しかしながら植物の中には種子による保存が困難もしくは不適切なものがあり、乾燥や低温のいずれか一方もしくは双方に耐性がない種子(難貯蔵性種子)を作る種や栄養繁殖により種苗が生産される栄養繁殖性の植物遺伝資源では、生きた株として保存する必要がある。栄養繁殖性作物は無性的に栄養体を増殖して利用するイモ類、果樹などの作物である。特にこれらの作物では遺伝的なヘテロ性が高く、種子で保存し再生した場合には遺伝的分離により元の優良な性質が失われてしまうことが多い。

農業生物資源研究所遺伝資源センターは日本における農業分野の植物・微生物・動物遺伝資源保存のセンター機能を果たし、国内の参画研究所との連携により農業生物資源ジーンバンク事業を運営している。現在、植物遺伝資源はイ

ネ、麦類、豆類や雑穀類を中心として約 21 万 5 千点を保存している。このうち栄養繁殖性遺伝資源は約 3 万 5 千点含まれており、イモ類、果樹、花卉、桑および茶などの作物を中心に保存遺伝資源の約 16%を占めている。この率は、諸外国のジーンバンクが約 10%であるのに比べて高い水準である。これらの遺伝資源は通常圃場や防虫網室を含む温室等で栽培して維持されているが、安全で信頼性のある長期保存に関しては問題点が存在している。圃場や温室における栽培では育種などの直接利用や特性調査などを保存しながら行うことができるというメリットはあるが、保存のために広大なスペースが必要なことや栽培管理の手間がかかる点など維持管理コストが高く、自然災害や病虫害による滅失のリスクに常に晒されている点が問題点としてあげられる。インビトロ (*In vitro*) での組織培養による容器内の保存も短・中期の保存法として可能であるが、無菌株で維持されるため突発的な自然災害や病虫害による消失は免れる反面、継代の手間やコスト、長期培養での体細胞変異の発生の可能性など長期保存には問題がある。

これらの問題点を解決する方法として、茎頂など植物体の一部を -135°C 以下の温度領域で保存を行う超低温保存法があり、ここ 20 年間以上にわたり多くの手法の開発が続けられてきている。超低温保存法は最小限のスペースと維持管理ですむことなどから将来世代への植物遺伝資源の長期保存には最重要のツールとなりつつある。超低温保存法には以下のような利点がある。例えば、450 リットルの液体窒素 (LN) タンクに約 1,000 点の遺伝資源が保存できるため、必要最小限のスペースでよい。操作は遺伝資源を保存するときだけ行えばよい。試料が超低温で保存されている限り、細胞のすべての生理活性は停止状態となり、遺伝的安定性が保たれたまま長期保存できる。また、維持管理は他の保存法に比べ遙かに容易である。これらの特質により、超低温保存は圃場バンクや

培養容器内での保存法の代替手段として栄養繁殖性作物の長期保存に適した方法といえる。現在この超低温保存法は、絶滅危惧植物や希少植物の保存、残存作物や未活用作物、培養細胞、体細胞胚、遺伝子組換え体を含む新しく開発された作物の長期保存への利用にも適していると考えられている。

近年、新しい技術としてガラス化法、ビーズガラス化法およびドロップレット法等の超低温保存技術が報告されており、超低温保存される種が過去 10～15 年間で著しく増加している (Reed 2008b)。このガラス化法に基づく保存プロトコルは、分裂組織やインビトロ培養された体細胞胚に対しても適用できる応用範囲の広い超低温保存法である。ガラス化法を用い、最適化された条件の下で処理し保存した材料では、LN からの回復後に高い生長が認められている。しかし、実験的保存レベルにとどまっており、事業として超低温保存を行うにあたっては、簡便で信頼性の高い超低温保存法の開発が必要で、室温から LN へ、またその逆の材料の直接的移動を可能にし、超低温保存された材料の簡易な使用を可能にするプロトコルが必要である。

超低温保存では水分を含む細胞や組織の生命力を維持するために、LN 中での冷却時に起こる致命的な細胞内凍結を避けることが必須となる。このため以下の水溶液の相転移に関する知見から、LN 中で超低温保存する細胞や組織は LN に投入される前に十分に脱水されている必要がある。水溶液の液相－固相転移には 2 種のタイプがある。その一つ、氷形成は液体から氷の結晶への相転移(凍結)であり細胞を破壊するが、もう一方のガラス化は液体から非結晶のガラス状態への相転移であり、結晶化を防ぎ、細胞の破壊を回避することが可能である。高濃度のショ糖やグリセリン等を含んだ凍害防御溶液は粘度が高いため水分子は動きづらいうえ氷核もできにくく、非常に低い温度まで過冷却するため、このまま素早く冷却すれば、非結晶のガラス状態になる。すなわち、ガラス化は

高張な凍害防御溶液が過冷却され、さらに急速に冷却されて氷晶を形成することなく最後に不安定的なガラス状態に固化する物理的現象であるといえる (Fahy *et al.* 1984)。ガラス状態は不安定な固体状で、分子拡散を必要とするすべての化学反応を止めるので、それにより遺伝的安定性を保持しながら半永久的に保存することが可能となる (Burke 1986)。

従来の緩速予備凍結方法では、約-30℃まで緩速で温度を下げることで凍害防御溶液と器官の外部を凍結して器官内の組織から器官外脱水し、組織の凍結していない部分の細胞内濃度を高め、その後の LN での迅速な冷却により、ガラス化させている。そのため一部の組織だけがガラス化する「部分的なガラス化法」と呼ばれている。一方、器官の細胞と組織を凍害防御剤の高張溶液（ガラス化液、7~8 M）にさらすことによって器官全体を脱水し、LN に直接浸漬することによってガラス化液とともに凍結することなくガラス状態を達成する手法が開発されている (Sakai *et al.* 1990)。この手法は、「完全ガラス化法」（器官とガラス化液の両方がガラス化するため）と呼ばれ、従来の緩速凍結法から区別されている。現在までに開発された超低温保存法は、部分ガラス化、完全ガラス化法を含めて、LN に浸漬する前の材料の脱水方法に基づいて 4 つのカテゴリーに分けることができる (Sakai 1995)。

1. 緩速予備凍結法：[凍結脱水]

緩速予備凍結法では組織を凍害防御剤で処理し、-30℃程度までプログラムフリーザーでゆっくりと冷却し生じた細胞外凍結を利用し、脱水する。その後 LN に投入して急冷し、細胞をガラス化させる。この手法は温帯の落葉性果樹の越冬芽や培養細胞などの耐凍性の高い組織に有効である。

2. ガラス化法(ビーズガラス化法・ドロップレット法含む)：[浸透脱水]

ガラス化法では凍害防御剤での脱水耐性付与処理、高濃度のガラス化液によ

る浸透脱水、LN による急速冷却、急速加温、ガラス化液の除去および再生育の工程からなる。組織からの均一な脱水が可能であるため、茎頂、懸濁細胞や体細胞胚などに適用されている。ビーズガラス化法はアルギン酸ゲルに包埋した組織からガラス化法と同様浸透脱水して超低温保存する。

3. ビーズ乾燥法：[空気乾燥および浸透脱水]

ビーズ乾燥法は人工種子製造において開発された。茎頂などをアルギン酸ビーズに包埋し、高濃度のショ糖を含む液体培地で前培養した後、クリーンベンチ内の風もしくはシリカゲルによって、水分含量を20%程度まで下げ、LNにより急速冷却する。ビーズ内の溶液が乾燥により濃縮し、内部にある茎頂組織が脱水される。

4. 乾燥法：[空気乾燥]

乾燥法は乾燥耐性を誘導した外植体をクリーンベンチ内で空気乾燥し、液体窒素に投入して急速冷却する単純な方法であるが、適用範囲は乾燥耐性を誘導できる種に限られる。

以上の手法のうち、冬芽を利用した緩速予備凍結法による超低温保存(Fukui 2011)とガラス化法による培養茎頂の超低温保存が農業生物資源ジーンバンク事業で利用されている。しかしながら、日本も含め各国ジーンバンクでの超低温保存の利用はあまり進んでいない。その理由の一つとしてこれまで開発されてきた方法は、実験室レベルでの手法で、事業として大規模に超低温保存を行うための手法とはなっていなかったという点があげられる。

また、現在までにジーンバンク等において実施されている栄養繁殖性作物種の培養茎頂を用いた超低温保存についても、現状では温帯地域の作物を中心としたものに限られる傾向がある。一部バナナやキャッサバなど熱帯作物も保存されているが、バレイショ(国際バレイショセンター：CIP、ライプニッツ植物

遺伝作物学研究：IPK)、ニンニク(韓国農業生命工学研究院：NIAB)やワサビ(島根県農業研究センター)など温帯性作物が多く(Table 1)、熱帯作物にも広く応用できる手法が望まれている。

本研究では、超低温保存を大量の処理が必要な事業レベルで行うための、迅速かつ簡便に実施することのできる標準的な手法の確立を目指して以下のような手順で行った。①超低温保存に適したアルミニウム製の専用プレート(クライオプレート)を考案し、新規の超低温保存法(クライオプレート法)を開発する。②開発したクライオプレート法の適用作物種の拡大を図るために、香料作物のミント、果菜類であるイチゴ、木本植物のクワ、根茎性作物のバレイショを用いて適用試験を行う。③クライオプレート法の最適処理条件決定のためのガイドラインとなる標準化プロトコルを提案する。④長期保存事業へのクライオプレート法の可能性を検討する。最後に以上の結果をふまえ、クライオプレート法の長期保存への有効性、有用性、今後の改良方向について議論を加える。

本クライオプレート法の有効性を確認できれば、栄養繁殖性遺伝資源の域外保存を極めて効率的かつ経済的に行うことが可能になり、私たちの生活に重要な植物遺伝資源の保存にとどまらず、生物多様性の保全のための大きな技術開発となりうる。

Table 1. 世界的な栄養繁殖性植物遺伝資源の超低温保存の現状(2008)

Table 1. Cryopreserved clonal plant genetic resources around the world

Dormant buds

National Center for Genetic Resources Preservation at Fort Collins (USA)	Apple	2,201
	Pear	100
AFOCEL (France)	European elm	101
NIAS (Japan)	Mulberry	1,283

***In vitro* meristems**

IPK (Germany)	Potato	1,017
CIP (Peru)	Potato	345
Katholieke Universiteit Leuven (Belgium)	Banana	409
CIAT (Columbia)	Cassava	95
National Clonal Germplasm Repository (USA)	<i>Rubus</i> and <i>Ribes</i>	57
NIAB (Korea)	Garlic	300
NIAS (Japan)	Mat rush	40
Shimane Agricultural Research Center (Japan)	Wasabi	40

AFOCEL : Association Forêt Cellulose

NIAS : National Institute of Agrobiological Sciences

IPK : Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung

CIP : Centro Internacional de la Papa

CIAT : Centro Internacional de Agricultura Tropical

NIAB : National Institute of Agricultural Biotechnology

第1章 アルミニウム製クライオプレートを用いた超低温保存法の開発

超低温保存法は保存場所や保存処理の労力および保存中の管理が最小限ですむため、植物遺伝資源の長期保存に理想的な方法である。超低温保存の技術は世界中の研究所で利用され、近年その保存数は増加している (Niino 2006)。しかしながらジーンバンクにおける超低温保存技術の利用は限られた状況でしか認められないのが現状である。現在最も新しい手法はガラス化法と LN(-196 °C) 中への直接投入を組み合わせたドロップレット法である。この方法では外植片と冷却時に LN、あるいは加温時に利用する溶液が直接接触し、急速冷却と急速加温が容易にできるため (Kim *et al.* 2009b)、高い再生育が認められる。この手法を用いてバナナ (Panis *et al.* 2005)、ニンニクおよびキク遺伝資源の日常的な超低温保存に利用されつつある (Kim *et al.* 2009a, b)。しかしながらこの手法は熟練した操作技術が必要であり、脱水耐性付与処理や脱水処理等の煩雑な操作手順を含み、試料のアルミニウムフویل片への移し替えやフویل片のクライオバイアルへの移し替えもしなければならない。そのため、大規模な超低温バンクを可能にするためにはより単純化された利用者に使いやすい超低温保存手順が必要と考えられる。

本章では効率的で容易な超低温保存法の確立を目的として、ガラス化法による超低温保存が最も困難な植物の一つであるジョチュウギク培養茎頂を用いて (Hitmi *et al.* 1999)、茎頂をその上に固定した状態で処理ができ、簡単に移動作業、かつ LN への投入、加温作業が行うことのできる超低温保存用のアルミニウム製のプレート (クライオプレート) を試作し、これを用いた保存法を開発する。それによって栄養繁殖性遺伝資源のジーンバンクにおける超低温保存が促進されることが期待される。

材料および方法

植物材料と組織培養

本研究で使用した材料はジョチュウギク (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.) で、日本国内で栽培される薬用植物の一つであり、天然の殺虫剤であるピレスリンを生産する多年生草本である。1940年代には工芸作物として世界の生産額の90%を占めるほど栽培されていたが、化学合成ピレスロイドが工業生産されるようになって産業用の栽培はなくなり、わずかに観賞用に栽培されているに過ぎない(御前 2004)。農業生物資源ジーンバンク事業では40系統を圃場で栽培維持しており、超低温保存が維持コストの削減のために求められている。

植物体は農業生物資源ジーンバンク事業のサブバンクである農業・食品産業技術総合研究機構の近畿中国四国農業研究センターで圃場にて保存されている系統を用いた。主に用いた系統は「28v-75」で、他に6系統のジョチュウギクを品種試験の目的で供試した。

茎頂部は圃場からのサンプル株より切りとり、70%エタノールに1分間、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度2%)に10分間浸漬することで表面殺菌を行い、滅菌水で2回洗浄した。この外植片から茎頂部(1 mm × 1 mm)を切り出して、培養ビン(80 mm φ × 100 mm)内で60 mlの固形培地上で培養した。培地はムラシゲ・スクーグ培地(MS培地, Murashige and Skoog, 1962)の無機塩類を半分にした1/2 MS培地に、3%(w/v)ショ糖、0.2 mg/l ベンジルアミノプリン(BA)、0.2%(w/v)ポリビニルピロリドン(PVP)および0.9%(w/v)寒天(和光純薬)を添加したものである(Niino 2006)。50日間の培養後、上記

1/2MS 固形培地の新しい培養ビンに移植した。その後培養植物体を 2 ヶ月毎に 3%ショ糖, 0.2 mg/l BA、0.2%PVP および 0.9%寒天を添加した通常濃度の MS 固形培地に継代して維持した。培養条件は 25°C、16 時間日長とし、白色蛍光灯下 ($52 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) で行った (標準条件)。

植物試料の前処理と前培養

培養中の植物体よりシュート (長さ約 5 mm) を切り出し、シャーレ (90 mm ϕ \times 20 mm) 内の MS 固形培地に植え付け、3 週間標準条件で培養した後、0.5 M ショ糖, 0.2 mg/l BA、0.2%PVP および 0.9%寒天を添加した通常濃度の MS 固形培地に移植し、5°C、白色蛍光灯下 ($26 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) 8 時間日長の条件下で 20 から 40 日間低温処理を行った。その後茎頂部 (1~1.5 \times 1 mm) をシュートから切り出し、同培地・同低温処理条件下で 2 日間前培養した。

改変ガラス化法

前培養した茎頂を 2 ml のクライオチューブ (Wheaton Science Products, NJ, USA) に入れ、2 M グリセロールと 0.6~1.6 M のショ糖を溶解した液体 MS 基本培地を含むローディング液 (Loading Solution; LS 液, Nishizawa *et al.* 1992) 1 ml で脱水耐性付与処理を 25°C、30 分間行った。LS 液を除いた後、茎頂を植物ガラス化液である PVS2 (Plant Vitrification Solution 2, Sakai *et al.* 1990) 液または、PVS7M 液を 1 ml 用いて 25°C で様々な時間で脱水処理した。植物ガラス化液は処理の間に一度新しいものと置換した。LN 浸漬直前に植物ガラス化液を取り除いた後、茎頂を含むクライオチューブを、キャップをしないままでクライオチューブを固定するクライオケーンを用いて直接 LN 中に沈め、30 分以上そのまま保持した。

PVS2液は液体MS基本培地 (pH 5.8) に0.4 Mショ糖、30% (w/v) グリセロール、15% (w/v) エチレングリコールおよび15% (w/v) ジメチルスルフォキシド (DMSO) を溶解したもので、合計モル数とガラス転移温度はそれぞれ8.0 M、約-115 °C であり、PVS7M液は液体MS基本培地 (pH 5.8) に0.6 Mショ糖、30% (w/v) グリセロール、および19.5% (w/v) エチレングリコールを溶解したもので、合計モル数とガラス転移温度はそれぞれ7.0 M、約-118°Cである。両ガラス化液とも滅菌のため使用前にオートクレーブをかけた。ガラス転移温度は示差走査熱量測量計 (Q200, TA Instruments, Japan) により計測した。

再生育時には、クライオチューブをLNより取り出して、チューブ内のLNを捨て、15秒後に2 mlの1 Mショ糖液をクライオチューブに直接注ぎ、室温で急速加温した。1 Mショ糖液は液体MS基本培地液に1 Mショ糖を溶解したものである。その後茎頂を15分間室温に置き、通常のMS固形培地に植え付けた。加温後の再生育率は25°C、標準条件での4週間の培養後に正常に発育したシュート数を数えることで評価した。また、各実験処理では共通して10個の茎頂を用いて3反復で実施した。反復結果は平均±標準誤差で示した。統計解析はTukeyの方法 (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/tukey.html>) により行い、有意差 ($P < 0.05$) は異なる文字で表示した。

アルミニウム製のクライオプレートを用いたガラス化法 (クライオプレート法)

簡単な手順で安定した再生育の得られる、信頼性のあるガラス化法を策定するため、アルミニウム製のクライオプレートを開発した。本プレートの作成の目的は、①茎頂をプレート上に固定し、②プレートを用いてLS液、PVS液処理を行う、③プレートを用いてLNへの出し入れを行うことができる、ものを開発することである。そのため本実験ではアルミニウムを用いて2 mlクライオチュー

ブにあわせた10個の凹みを持つ、凹み直径の異なる2種類のクライオプレート(7 mm × 37 mm × 0.5 mm, Figure 1-1A)を作成した。クライオプレートNo. 1は凹みの直径が1 mmで深さ0.5 mm (Figure 1-1A 左)、またNo. 2は凹みの直径1.5 mm、深さ0.75 mm (Figure 1-1A 右)とした。クライオプレートは大陽日酸株式会社に特注し、製作した。

これらのクライオプレートを用いた保存法の各段階の手順は以下のように考案した。

1. アルミニウム製のクライオプレートを90 mm φシャーレに置き、アルギン酸ナトリウム液(No. 1は1 μ l、No. 2は2 μ l)をアルミニウムプレートの凹みにマイクロピペットで滴下する。アルギン酸ナトリウム液はカルシウムフリーのMS液体培地に2% (w/v)のアルギン酸ナトリウムおよび0.4 Mのショ糖を含んだものである。
2. 前培養した茎頂を凹みに一つずつ、実験用メスの刃の先端を用いて置き、わずかに茎頂を押しつけて茎頂がプレートの凹みにぴったりとはまるようにする。
3. その後、アルギン酸ナトリウム液(1 μ l)を茎頂に注ぎ、茎頂をアルギン酸ナトリウム液で完全に覆うようにする。クライオプレートNo. 2ではこの処置は省略してもよい。
4. カルシウム液(約0.3 ml)をアルミニウムプレートの茎頂を乗せた部分に滴下してプレート上の全ての茎頂を覆うようにする。15 分間静置して十分にゲルを固化させる (Figure 1-1B)。カルシウム液は MS 基本培地に 0.1 M 塩化カルシウムと 0.4 M ショ糖を溶解したものである。
5. カルシウム液をマイクロピペットで静かにクライオプレートから除く。茎頂はアルギン酸ゲルにより凹みに固着する (Figure 1-1J, K)。
6. 茎頂を乗せたクライオプレートを約 20 ml の LS 液を入れた 25 ml ピペット

イングリザーバー(Matrix Tech. Co. NH, USA)に漬け、25°Cで30分間脱水耐性付与処理を行う。LS液は液体MS基本培地に2Mグリセロールおよび0.6~1.6Mのショ糖を溶解させたものである。

7. その後クライオプレートから取りだし、約20 mlのPVS2液もしくはPVS7M液を入れた25 mlピペッティングリザーバーに入れ、25°Cで脱水する(Figure 1-1C)。

8. 脱水後クライオプレートを取り出し、クライオケーンに装着した2 mlのクライオチューブに入れ、キャップをしないままLN中に直接投入し、30分以上保持する(Figure 1-1D-F)。

9. 再生育時には、クライオチューブをLNより取り出して、茎頂の固着したクライオプレートをクライオチューブから取り出し、2 mlの1Mショ糖液を分注したクライオチューブ内に入れ急速加温する(Figure 1-1G-I)。その後クライオプレート上の茎頂を15分間室温で保持し、MS固形培地に植え付ける。加温後の再生育率は25°C、標準条件での4週間の培養後に評価した。

冷却および加温速度の測定

冷却と加温の速度は白金測温素子センサーとデータ収集機器により測定した。温度信号はウェーブサーモ NR-1000(Keyence Co., Osaka, Japan)を用いてメモリーカードに記録した。

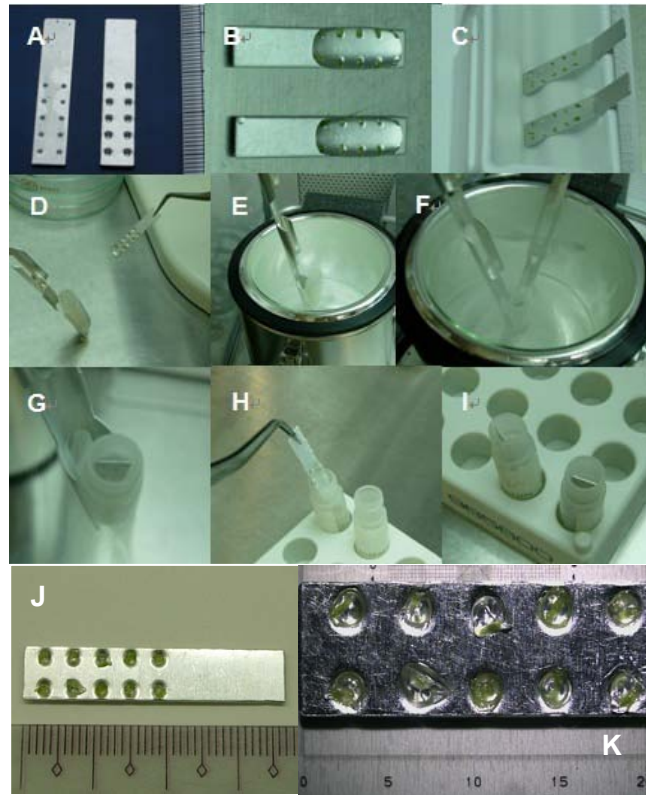


Figure 1-1. アルミニウム製のクライオプレートを用いた超低温保存法の手順

Figure 1-1. Procedure of cryopreservation using aluminum cryo-plate

- A: Aluminum cryo-plate No.1 (left) and No.2 (right)
- B: Calcium solution is mounted on the cryo-plate
- C: Dehydration by PVS7M
- D: The cryo-plate is set into 2 ml cryotube
- E, F: Immersion into LN and keep in it
- G-I: Taking out of LN, rewarming and dilution
- J-K: Cryo-plate with shoot tips, the scale is in mm.

結果

改変ガラス化法の最適手順の決定

ドロップレット法では超低温保存される茎頂は LS 液や PVS2 液による処理の後アルミニウムフォイルの断片 (Strip) 上に移し替える必要がある。改変ガラス化法では茎頂植物ガラス化液を取り除いたクライオチューブ内にそのまま残し、蓋をせずに直接 LN に沈める手法である。

低温順化処理日数と前培養の条件は、予備試験では、低温順化が 20～40 日で、前培養は 0.5 M ショ糖添加 MS 培地で 2 日行うことで超低温保存後に再生育が得られたため、この条件を本実験では採用した (データ未掲載)。

改変ガラス化法の手順は以下の通りとした。低温順化処理後の茎頂をシュートから切り出し、0.5 M ショ糖、0.2 mg/l BA、0.2% PVP を添加した MS 固形培地上で 2 日間前培養した。PVS2 液および PVS7M 液への最適処理時間を決めるため、前培養した茎頂を LN 浸漬する前にそれぞれの植物ガラス化液で異なる時間処理した。植物ガラス化液による処理時間は、茎頂の脱水が時間の経過とともに進むため、加温後の再生育率に大きく影響する (Table 1-1)。その為ガラス化液での処理時間が再生育に及ぼす影響について検討した。その結果、再生育率の最大値は PVS7M 液で 25℃、50 分間処理した区で得られた。一方、PVS2 液で処理したものの再生育率は全てかなり低かった。

ガラス化液による脱水に対する耐性を付与するため、低温順化処理および前培養した茎頂は LS 液で 25℃、30 分間脱水耐性付与処理を行う。本実験では LS 液中のショ糖濃度が再生育に及ぼす影響について検討した。その結果、超低温保存した茎頂の再生育率の最大値は 1.4 M のショ糖を含む LS 液で得られた (Table 1-2)。

これらの結果から、ジョチュウギク培養茎頂の超低温保存のために最適な改変ガラス化法は以下の通りである。

1. 5 mm のシュートを培養株から切り出し、通常の MS 培地に植え、標準条件下で 25°C、3 週間培養する。
2. シュートを 0.5 M ショ糖, 0.2 mg/l BA、0.2%PVP および 0.9%寒天を添加した MS 固形培地上で 5°C、20~40 日間低温処理を行う。
3. その後茎頂部(1~1.5 × 1 mm)をシュートから切り出し、同培地で 5°C、2 日間前培養する。
4. 前培養した茎頂を2 mlのクライオチューブに入れ、2 Mグリセロールおよび 1.4 Mショ糖を含むLS液1 ml中で25°C、30分間脱水耐性付与処理する。
5. その後茎頂をPVS7M液1 mlを用いて25°Cで30分間脱水処理する。PVS7Mは処理中に一度新しい液と置換する。
6. 脱水後、クライオチューブからPVS7M液を除去し、処理した茎頂を含むクライオチューブを、キャップをしないままクライオケーンを用いて直接LN中に沈める。

しかしながら、この手法はいまだに LS、PVS 液の交換等の操作が多く、ドロップレット法のようにアルミフویلに移し替える操作はないものの、処理液中に茎頂が浮遊しているため、茎頂がダメージを受けたり、なくなったりすることがある。そのため、ジーンバンクでの超低温保存を促進するために、このような欠点を取り去ることのできる新しい手法を開発する必要がある。

クライオプレート法

超低温保存法では、すべてのスタッフが簡単に保存作業を実施できるような手順の標準化を図るべきである。標準化への最初の段階として、2 種類のアルミ

ニウム製のプレートを、ガラス化法のすべての手順をその上で行うことのできるように試作・考案し、クライオプレートと新称した。クライオプレート No. 1 は 1 mm の直径を持つ凹みを、No. 2 は直径 1.5 mm の直径の凹みをそれぞれ 10 個ずつ付けている。超低温保存する茎頂はアルギン酸ナトリウム液を介して凹みに固着させる。茎頂を載せたクライオプレートはただプレートを動かすことにより LS 液や PVS 液で処理ができ、LN 保存まで行える。この手法が可能になれば試料の亡失や破砕ならびに処理中の煩雑なピペット操作も避けることができる。再生育には LN が満たされたクライオチューブからクライオプレートを取り出し、クライオチューブに入れた 2 ml の 1 M ショ糖液に浸漬する。プレート上の試料の冷却速度および加温速度はそれぞれ 79.5°C/秒および 75.4°C/秒であった。

このように、このクライオプレート法では、茎頂はアルギン酸ゲルにより包埋され、プレートに固着する。そのため、茎頂は処理の間クライオプレートにしっかりと固着している。7 人の作業者が 2 種のクライオプレートのどちらが扱いやすく、クライオプレート上の固着した茎頂を良好に保持できるかを試験した。その結果は非常に明解で、ほぼすべての No. 1 プレートの試験で 1 個以上の茎頂入りアルギン酸ゲルが処理の間に溶液中で外れ、再加温後にほとんどのアルギン酸ゲルがクライオプレートから遊離した。しかしながら、No. 2 プレートでは、LS 液、PVS 液による処理はもとより、再加温後でさえ、溶液中に外れてしまう茎頂入りのアルギン酸ゲルはほとんど見られなかった。茎頂をクライオプレートに固着するためには直径 1.5 mm の凹みと 2 μ l 程度のアルギン酸ナトリウム液が必要であることが明確となった。このため、以後はクライオプレート No. 2 を実験に用いた。

クライオプレート法では上記に示したように茎頂は薄いアルギン酸ゲルにより包まれている。PVS7M 液への最適処理時間について、改変ガラス化法の実験で

最適であった処理時間がクライオプレート法にも適用できるかどうかの試験を行った。その結果、超低温保存した茎頂を PVS7M 液で 40 分間脱水することで最も高い再生育率が得られた (Table 1-3)。

また、最適 LS 液処理時間の実験から、超低温保存した茎頂を 2 M グリセロールおよび 1.4 M のショ糖を含む LS 液で 30 分および 60 分間処理することで最も高い再生育率が得られた (Table 1-4)。

これらの結果をもとに定めたジョチュウギク培養茎頂の最適なクライオプレート法は以下の通りである。

1. 5 mm のシュートを培養株から切り出し、固形 MS 培地に植え、25°C で 3 週間培養する。
2. その後シュートを 0.5 M ショ糖添加 MS 培地上で 5°C、8 時間明期で 20~40 日間低温処理を行う。
3. 茎頂 (1-1.5 × 1 mm) をシュートから摘出し、0.5 M ショ糖添加 MS 培地上で 5°C、2 日間前培養する。
4. 前培養した茎頂を 10 個の凹み (直径 1.5 mm、深さ 0.75 mm) を持つアルミニウム製のクライオプレート No. 2 (7 mm x 37 mm x 0.5 mm) の上に置き、アルギン酸ゲルで固着させる。
5. 茎頂付きのクライオプレートを、2 M グリセロールおよび 1.4 M ショ糖を含む LS 液を 20 ml 入れた 25 ml のピペッティング容器に入れ、25°C で 30~60 分間静置する。
6. その後クライオプレートを LS から取りだし、20 ml の PVS7M 液を入れた 25 ml ピペッティング溶液に入れ、25°C で 40 分間、静置する。
7. 脱水後クライオプレートを取り出し、2 ml のクライオチューブに入れ、LN 中に直接沈め、30 分間以上保持する。

8. 再生育のため、クライオチューブを LN より取り出して、茎頂を乗せたクライオプレートクライオチューブから取り出し、2 ml クライオチューブに分注した 1 M ショ糖液 2 ml に浸漬する。その後クライオプレート上の茎頂を 15 分間室温で保持し、固形の通常 MS 培地に植え付ける。

この最適手順を用いて、ジョチュウギク 6 系統の培養茎頂の再生育率を検討した。その結果、再生育率はすべての系統で比較的高く、65~90%の範囲で、6 系統の平均は 76.7%であった (Table 1-5)。生存した茎頂は置床後 3 日以内に再生育を始め、カルス形成を伴わずに正常なシュートに生育した (Figure 1-2)。

Table 1-1. 改変ガラス化法により超低温保存された茎頂の再生育における 2 種の PVS 液の処理時間の影響

Table 1-1. Effect of exposure time to two PVSs on regrowth of cryopreserved shoot tips by modified vitrification

Exposure time to PVSs	Regrowth (% \pm SEM)	
	PVS2	PVS7M
40 min	16.7b \pm 5.8	50.0a \pm 10.0
50 min	26.7b \pm 5.8	53.3a \pm 5.8
60 min	13.3b \pm 5.8	20.0b \pm 10.0

Note: Shoots were cold-hardened at 5 °C for 37 d. Shoot tips were excised, precultured for 2 d at 5 °C on MS with 0.5 M Suc and loaded in 2 M glycerol +1.2 M Suc solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVSs for 40-60min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates.

Table 1-2. 改変ガラス化法により超低温保存された茎頂の再生育における LS 液のショ糖濃度の影響

Table 1-2. Effect of concentration of sucrose in LS solution on regrowth of cryopreserved shoot tips by modified vitrification

Concentration of sucrose in LS	Regrowth (%)
0.6 M	25.0b ± 5.8
0.8 M	30.0b ± 8.2
1.0 M	37.5ab ± 12.6
1.2 M	40.0ab ± 8.2
1.4 M	55.0a ± 10.0
1.6 M	30.0b ± 8.2

Note: Shoots were cold-hardened at 5°C for 30 d. Shoot tips were excised, precultured for 2 d at 5 °C on MS with 0.5 M Suc, loaded in each LS solutions for 30 min at 25 °C and exposed to PVS7M for 50 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates.

Table 1-3. アルミニウムクライオプレート No. 2 を用いて超低温保存された茎頂の再生育における 2 種の PVS7M 液の処理時間の影響

Table 1-3. Effect of exposure time to PVS7M on regrowth of cryopreserved shoot tips using aluminum cryo-plate No.2

Exposure time to PVSs	Regrowth (% \pm SEM)	
	Treated Control	LN
30 min	80.0a \pm 10.0	40.0b \pm 10.0
40 min	76.7a \pm 5.8	76.7a \pm 11.5
50 min	60.0ab \pm 10.0	50.0b \pm 10.0
60 min	60.0ab \pm 0.0	40.0b \pm 10.0
70 min	40.0bc \pm 10.0	20.0bc \pm 0.0

Note: Shoots were cold-hardened at 5°C for 30 d on MS with 0.5 M Suc. Shoot tips were excised, precultured for 2 d at 5 °C on MS with 0.5 M Suc, loaded in 2.0 M glycerol and 1.4 M Suc solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS7M for 30-70 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates.

Table 1-4. アルミニウムクライオプレート No. 2 を用いて超低温保存された茎頂の再生育における LS 液の処理時間の影響

Table 1-4. Effect of exposure time to LS solution on regrowth of cryopreserved shoot tips using aluminum cryo-plate No.2

Exposure time to LS Regrowth (% \pm SEM)	
30 min	73.3a \pm 5.8
60 min	80.0a \pm 10.0
90 min	36.7b \pm 5.8

Note: Shoots were cold-hardened at 5°C for 35 d on MS with 0.5 M Suc. Shoot tips were excised, precultured for 2 d at 5 °C on MS with 0.5 M Suc, loaded in 2.0 M glycerol and 1.4 M Suc solution for 30-90 min at 25 °C and exposed to PVS7M for 40 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates.

Table 1-5. アルミニウムクライオプレート No.2 を用いて超低温保存された
ジョチュウギク 6 系統の再生育率

Table 1-5. Regrowth of cryopreserved shoot tips from dalmatian
chrysanthemum lines using aluminum cryo-plate No.2

Line	Regrowth (%)
19v-KO4	65.0 ± 7.1
41v-2	65.0 ± 7.1
26v-84	75.0 ± 7.1
28v-173	80.0 ± 10.0
29v-289	85.0 ± 7.1
36v-34	90.0 ± 10.0

Note: Shoots were cold-hardened at 5°C for 30 d on MS with 0.5 M Suc. Shoot tips were excised, precultured for 2 d at 5 °C on MS with 0.5 M Suc, loaded in 2.0 M glycerol and 1.4 M Suc solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS7M for 40 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the two or three replicates.



Figure 1-2. 加温後再生育したジョチュウギク

Figure 1-2. Appearance of *in vitro*-grown dalmatian chrysanthemum post-thaw regrowth
Regenerated plant 5 d (left) and 30 d (right) after plating.

考察

ドロップレット法を含む既存のガラス化法では、通常、微小な茎頂をクライオチューブ内で溶液に浮遊させて処理するため、ピペッティングや移し替えの間に茎頂が損傷を受けたり、亡失したりすることがしばしば見られた。さらにガラス化法では最適処理時間が短いため、正確な時間管理を必要としていた。ドロップレット法では脱水処理した茎頂を、LN への浸漬の直前にアルミニウム細片に移し替える作業があり、煩雑な操作が必要であった。このような手順はジーンバンクでの超低温保存の利用促進の足かせとなっていた可能性がある。

本研究で開発したアルミニウム製のクライオプレートを用いたガラス化法、すなわちクライオプレート法には以下のような利点が考えられる。

1. 処理操作は茎頂を乗せたクライオプレートを移動するだけで実行できるため、この手法中での茎頂の操作は、非常に簡単に迅速に行うことができる。
2. 茎頂の損傷や亡失の可能性が他の手法に比べ非常に少ない。
3. 茎頂がクライオチューブ内で浮遊したり、内壁に張り付いたりすることがないので、LS 液や PVS 液処理が確実にできる。
4. 冷却や加温の手順も非常に簡単にクライオプレートを LN や 1.0 M ショ糖溶液に浸けるだけで行うことができる。このことは急速冷却と急速加温が可能であることを示している。
5. このクライオプレート法により、より高い再生育率を得ることができる。
6. この新しい手法はほかの手法に比べて労力が遙かに少ない。
7. 茎頂の取り付けを短期間練習することによりすべての職員がこの手法を行うことができる。

ガラス化法では前処理、前培養、脱水耐性付与処理、植物ガラス化液への処

理、加温後の操作などの多くの手順があるが、超低温保存を成功させるにはいくつかのポイントがある (Niino *et al.* 2003, 2007)。一つは、どのような超低温の実験でも、超低温保存する材料は、脱水耐性の獲得や活発な再生育のために生理学的に最適な状態でなければならない (Dereuddre *et al.* 1988, Withers 1979)。特に Hirai and Sakai (1999b) はガラス化法による凍結保存の成功は PVS2 液に対する脱水耐性を誘導するために行う LS 液による処理に依存することを示している。ビーズガラス化法によるバレイシヨの超低温保存において、LS 液 (2 M グリセロールおよび 0.6 M シヨ糖の混合液) が PVS2 液への浸透脱水耐性を増大させる効果があるとしている。また Hirai and Sakai (2003) は、カンシヨの超低温保存において、よりシヨ糖濃度の濃い LS 液 (1.6 M) による長時間の脱水耐性付与処理 (25°C、3 時間) が PVS2 液への脱水耐性の増大に必要なことを報告している。さらに、Kim *et al.* (2009b) はドロップレット法の新しい LS 液を開発する中で、脱水耐性付与処理は強制的な脱水とガラス化の前に、浸透圧の急激な変化の緩和剤として働き、また組織や細胞の生理的適応を誘発させる可能性を報告している。また、植物ガラス化液の毒性に敏感である植物種には、その毒性を軽減するために適切な LS 液を選択すべきであると指摘した。

ジョチュウギクの場合、PVS7M 液に対する脱水耐性を増大させるには高い濃度のシヨ糖を含む LS 液が効果的であった。LS 液で処理された分裂組織細胞は、浸透的に脱水され、かなりの程度まで原形質分離している可能性がある (田中 2004)。これらの細胞はその後、ガラス化に必要な最適細胞質濃度に濃縮される場所まで植物ガラス化液により脱水される (Hirai and Sakai 1999b)。ガラス化により最適な超低温保存を行うためのキーポイントは、注意深く制御された脱水手順および植物ガラス化液処理中の化学毒性や過剰な浸透圧ストレスによる傷害の防止である。このクライオプレート法では、超低温保存する茎頂がア

ルギン酸ゲルで包まれ、それが PVS2 液の直接の毒性を緩和している可能性も考えられる。

以上本章では効率的で容易な超低温保存法の確立を目的として、ジョチュウギク培養茎頂を用いて、茎頂をプレート上に固定した状態で処理ができ、簡単に移動作業、かつ LN への投入、加温作業が行えるアルミニウム製のクライオプレートを試作し、これを用いた保存法であるクライオプレート法を開発することができた。

第2章 クライオプレート法その他植物への応用

前章においてアルミニウム製のプレートを考案し、それを用いたガラス化法を開発してクライオプレート法と命名した。この手法は以下のような多くの利点を持つ超低温保存手法である。1) 操作中の茎頂の損傷や亡失がほとんど認められない、2) クライオチューブ内で浮遊や内壁への粘着がないためにLSやPVS2による確実な処理が可能である、3) 冷却や加温のためにはプレートをただ浸すだけでよいため、急速冷却、加温が可能である。4) 熟練していないスタッフでもクライオプレートへの茎頂の固着を少し練習すれば容易に実行でき、失敗が少ない等がある。一方、クライオプレート法をジーンバンク等で実践的に利用できる手法とするためには、できるだけ多様な植物材料で応用ができることを示すことが肝要である。

本章では香料作物であるミントのほか、果菜類の代表例としてイチゴ、果樹などの木本性作物の代表例として熱帯産クワ、また根茎性作物であるイモ類を代表してバレイショを用いてそれぞれの作物を超低温保存するための条件の最適化を行い、クライオプレート法の広範な作物種への適用可能性を検証する。超低温保存の文献がある植物については、この情報を確認することにより、均質に揃った培養茎頂を作成する方法、低温順化や前培養が必要かどうか等がある程度推定することができる。また、簡単な予備実験を行うことにより、加温後再生育する条件をある程度予測することが重要であり、その点に留意して検討した。

第1節 ミント

ミント (*Mentha spp.*) は日本ではL-メントール(薄荷脳)を抽出する香料作物として1960年代まで盛んに大規模商業栽培が行われていたが、現在ではハーブ用として小規模に栽培されているにすぎない(木島 1989)。ミント培養茎頂の超低温保存は初めに緩速予備凍結法(Towill 1988)で成功し、これに続いてガラス化法(Towill 1990)、ビーズガラス化法(Hirai and Sakai 1999a)およびドロップレット法(Senula *et al.* 2007)が開発されている。Uchendu *et al.* (2008)は緩速予備凍結法、PVS2を用いたガラス化法およびビーズガラス化法がミントコレクションの保存に適していると報告している。また、ミント遺伝資源の超低温保存には、健全な培養植物体、低温順化处理、オーキシンを含まない培地上での回復が必要だとされている。一方、ミントは培養器内での増殖がよく、比較的容易にガラス化法が適用できる種であるため、応用例のパイロットケースとして適している。本節では前章において開発したクライオプレート法を用いてミント培養茎頂への適用を目的として材料の作成から再生育までのすべてのステップを再検討するとともに、その処理条件の最適化を図った。

材料および方法

植物材料と組織培養

本研究で使用したミント遺伝資源は農業生物資源ジーンバンク事業(現在 157 系統を圃場保存)のサブバンクである農業・食品産業技術総合研究機構の近畿中国四国農業研究センターの圃場に保存されている系統を用いた。主に用いた系統はハッカ「福山自生」である。他に 16 系統のミントも品種試験の目的で供試した。

組織培養により培養シュートを作るために、圃場で採取した株から切り取った茎頂部を、70%エタノールに 30 秒間、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 2%)に 5 分間浸漬することで表面殺菌を行い、滅菌水で 2 回洗浄した。表面殺菌後に茎頂とその基部を含む茎頂部(1 mm × 1 mm)を切り出して、培養ビン(20 mm φ × 87 mm)内で 6 ml の固形 MS 培地上で培養した。培地は 3% (w/v) ショ糖および 0.4% (w/v) ジェランガムを含む MS 培地を用いた。初代培養は 30 日間行い、健全なシュートを新しい培養ビン(80 mm φ × 100 mm)内の 60 ml の MS 固形培地に移植し、以後 2 ヶ月毎に MS 固形培地に継代して維持した。培養は 25°C、16 時間日長とし、白色蛍光灯下(52 μmol/m²s)で行った(標準条件)。

植物試料の準備と前培養

斉一な材料を得るため、側芽をつけたシュート(長さ約 5 mm)を切り出しシャーレ(90 mm φ × 20 mm)内の上記 MS 固形培地 20 ml に植え付け、生育状態により 1~2 週間、標準条件で培養した(Figure 2-1A)。その後基部を含む茎頂部(1-1.5 mm × 1 mm)をシュートから摘出し、30 g/l (0.088 M) もしくは 0.3 M シ

ヨ糖を含むMS培地上で25°C、2日間前培養した(Figure 2-1B)。

ミントのクライオプレート法最適条件の検討

クライオプレート法のそれぞれの手順は前章と同様である。使用したアルミニウム製のクライオプレートは前章のNo. 2で、大きさは7 mm × 37 mm × 0.5 mmで、直径1.5 mm、深さ0.75 mmの凹みを10個持つ。以後の実験においてはすべてこのクライオプレートを使用した。

以下の手順に従い、ミントの培養茎頂をクライオプレート法によって超低温保存するための条件検討を行った。

1. アルギン酸ナトリウム液(2.5 μ l)をアルミニウムプレートの凹みにマイクロピペットで滴下する。今回のアルギン酸ナトリウム液はカルシウムフリーのMS液体培地に2% (w/v)のアルギン酸ナトリウムのみを添加したもの(アルギン酸ナトリウム液)とさらに0.4 Mのショ糖を加えたもの(0.4 Mショ糖添加アルギン酸ナトリウム液)の2種類を使用した。
2. 前培養した茎頂を凹みに一つずつ、実験用メスの刃の先端を用いて置き、わずかに茎頂を押しつけて茎頂がプレートの凹みにぴったりとはまるようにする。
3. 塩化カルシウム溶液(約0.3 ml)を茎頂が配置されているアルミニウムプレートの部分に茎頂が覆われるように滴下し注ぎ、完全に重合するまで15分間処理する。カルシウム溶液はアルギン酸ナトリウム液にはMS基本培地に0.1 M塩化カルシウム液を、0.4 Mショ糖添加アルギン酸ナトリウム液には0.4 Mショ糖を添加した塩化カルシウム液を使用した。
4. マイクロピペットで静かに吸引することによりクライオプレートからカルシウム溶液を除去する。

5. 茎頂が固着したクライオプレートに約20 mlのローディング溶液(LS液)を入れた25 mlピペッティングリザーバーに漬け、25°Cで30分間脱水耐性付与処理を行う。LS液は液体MS基本培地に2 M グリセロールおよび0.6~1.2 M のショ糖を溶解させたものである。
6. クライオプレートをLS液から取りだし、約20 mlのPVS2液を入れた25 mlピペッティングリザーバーに移し替え、25°Cで10~60分間、脱水処理する。
7. 脱水後、クライオプレートをクライオケーンに装着した2 mlのクライオチューブに移し、LN中に直接沈め、30分間以上保持した。

再生育時には、クライオチューブをLNより取り出して、茎頂を乗せたクライオプレートをクライオチューブから2 mlの1 M ショ糖液の入った2 ml クライオチューブに直接浸漬し、急速加温した。アルギン酸ゲルと茎頂は、室温で15分間この溶液中で保持し、次いで固体MS培地に置床した。加温後の再生育率は25°C、標準条件での2週間の培養後にシュートが正常に生育した外植体の数を計数することで評価した。各実験処理区はそれぞれ10茎頂3反復で試験し、反復結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計分析は、Web サイト (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/tukey.html>) 上でプログラムを介してTukeyテストで行い、有意差 ($P < 0.05$) を示した。

結果

前処理と前培養

超低温保存した茎頂を高い確率で再生育させるためには均一で健全な材料の準備が不可欠である。ミントでは、均一な材料を得るため、腋芽から1~2週間培養した茎頂を用いた。このことにより発育ステージが均一で活力のあるシュートを得ることができた(Figure 2-1A)。茎頂の大きさはその基部を含み、長さ1~1.5 mm、幅1 mmとし、茎頂分裂組織は葉原基により部分的に覆われたものとした(Figure 2-1B)。

低温順化および高濃度のショ糖培地上での前培養について、ミントでは4℃、12時間日照で3週間(Hirai and Sakai1999a)もしくは22℃・8時間明期と-1℃・16時間暗期サイクル3週間(Uchendu and Reed 2008)による低温順化が報告されている。しかし、本研究で使用したミントの系統では低温順化を行わなくても、高い再生育率が得られた。また、前培養は30 g/lもしくは0.3 Mショ糖を添加したMS培地上で25℃、1日で十分であった(Table 2-1)。

クライオプレート法

1) 茎頂のクライオプレートへの固着

クライオプレート法の最初の手順は90 mm φシャーレにアルミニウム製のクライオプレートを置くことから始まり、2.5 μlのアルギン酸ナトリウム液をアルミニウムプレートの凹みにマイクロピペットで滴下した(Figure 2-1C)。0.4 Mショ糖のアルギン酸ナトリウム液への添加はミント培養茎頂の加温後の再生育には特に影響がなく、その有無に関わらず高い再生育率が得られた(Table 2-2)。このため以後は0.4 Mショ糖のアルギン酸ナトリウム液への添加はミントでは行

わなかった。

その後前培養した茎頂を凹みに一つずつ、実験用メスの刃の先端を用いて置き、わずかに茎頂を押しつけて茎頂がプレートの凹みにおさまるようにした (Figure 2-1D)。もしアルギン酸ナトリウム液が足りなければ、追加で茎頂に注いでもよい。

続いて、カルシウム液 (約0.3 ml) を茎頂が配置されているアルミニウムプレートの部分に茎頂が完全に覆われるように静かに注ぎ、完全に重合するまで15分間静置した。アルギン酸がゲル化した後、クライオプレートからカルシウム溶液をマイクロピペットで静かに吸引することにより、茎頂はアルギン酸ゲルを介してクライオプレートのそれぞれの凹みに固着した (Figure 2-1F)。ミント茎頂のサイズは長さ1~1.5 mmにするべきで、このサイズであればクライオプレートの凹みにしっかりと固着した。しかしこれより長い茎頂ではしばしばクライオプレートから落下し、短いものでは操作中に損傷する可能性があった。

2) 脱水耐性付与処理および脱水処理

茎頂を固着させたクライオプレートは、次に約20 mlのLS液 (Nishizawa *et al.* 1992) を入れた25 mlピペッティングリザーバーに浸した。茎頂はこのようにして25°Cで30分間脱水耐性付与処理を行った (Figure 2-1G)。脱水耐性付与処理においてはLS液のショ糖濃度が加温後の再生育に影響するため、ショ糖濃度を0.6、0.8、1.2 Mに変えて加温時の再生育を検討した。その結果、超低温保存した茎頂の再生育率の最大値は0.8 Mもしくは1.2 Mのショ糖を含むLS液で25°C、30分間、脱水耐性付与処理を行うことで得られた (Table 2-3)。

その後クライオプレートをLS液から取りだし、約20 mlのPVS2液を入れた25 mlピペッティングリザーバーに置き脱水処理を行った (Figure 2-1G)。PVS2液処理

は、25℃で行えば時間とともに素早く脱水が進むため、最適処理時間を決定することが重要である(Niino *et al.* 2007)。今回のクライオプレート法では茎頂は薄いアルギン酸ゲルにより包まれているため、各々の材料ごとに処理時間を決定する必要がある。10～60分間のPVS2液処理と加温後の再生育を検討した結果、茎頂の再生育率の最大値は25℃、20～30分間脱水でほぼ100%の値が得られた(Figure 2-3)。

3) 液体窒素への浸漬と再加温

PVS2液処理後、クライオプレートをPVS2液から取り出し、ろ紙によりPVS2液の液滴を除去した。LN中に茎頂を固着したクライオプレートを直接投入するため、クライオケーンに装着した蓋をしていない2 mlのクライオチューブを使用した。この際、プレート上の茎頂がクライオチューブの縁等に接触しないように注意して入れる必要がある。また、LNへの投入は素早く行い、クライオチューブ全体が浸されたことを確認する必要がある。長期保存においては、茎頂を載せたクライオプレートとLNをいれたクライオチューブに蓋をしてLNタンクに保存すべきである。実験の場合は、LNに投入して最短でも30分間以上保持した(Figure 2-1H)。

再生育時には、クライオチューブをLNより取り出して(Figure 2-2A)、茎頂を乗せたクライオプレートをクライオチューブから取り出し(Figure 2-2B)、1 M ショ糖液 2 ml を分注したクライオチューブに直接、室温で浸漬した(Figure 2-2C)。茎頂をこの溶液中で 15 分間保持し、その後クライオプレートの凹みからアルギン酸ゲルに包まれた茎頂を取り外し、固形のMS培地上に移した(Figure 2-2D)。

前処理、前培養および上記 1)～3)で検討した結果をまとめると、ミント培養茎頂の最適なクライオプレート法の手順は以下の通りである。

1. 脇芽のついたシュートを 1～2 週間、25°C で培養。
2. 茎頂を切り出し、30 g/l ショ糖入り MS 培地で、1 晩前培養。
3. 2%アルギン酸ナトリウム液と 0.1 M 塩化カルシウム液で茎頂をプレート上に固着。
4. 0.8 M ショ糖の添加された LS 液で 25°C、30 分処理。
5. PVS2 液で 25°C、20 分処理し、LN 浸漬。
6. 1 M ショ糖液に直接浸漬し加温、15 分処理後、培地に置床。

他の系統・品種への適用

以上のように決定した最適手順を用いて、ミント 16 系統から切除した茎頂に対して適用試験を行った。再生育率はすべての系統で比較的高く、73～100%の範囲で、16 系統の平均は 88%であった (Table 2-4)。茎頂は置床後 3 日以内に生育を再開し、カルス形成を伴わずに正常なシュートに発育した (Figure 2-2-E, F)。

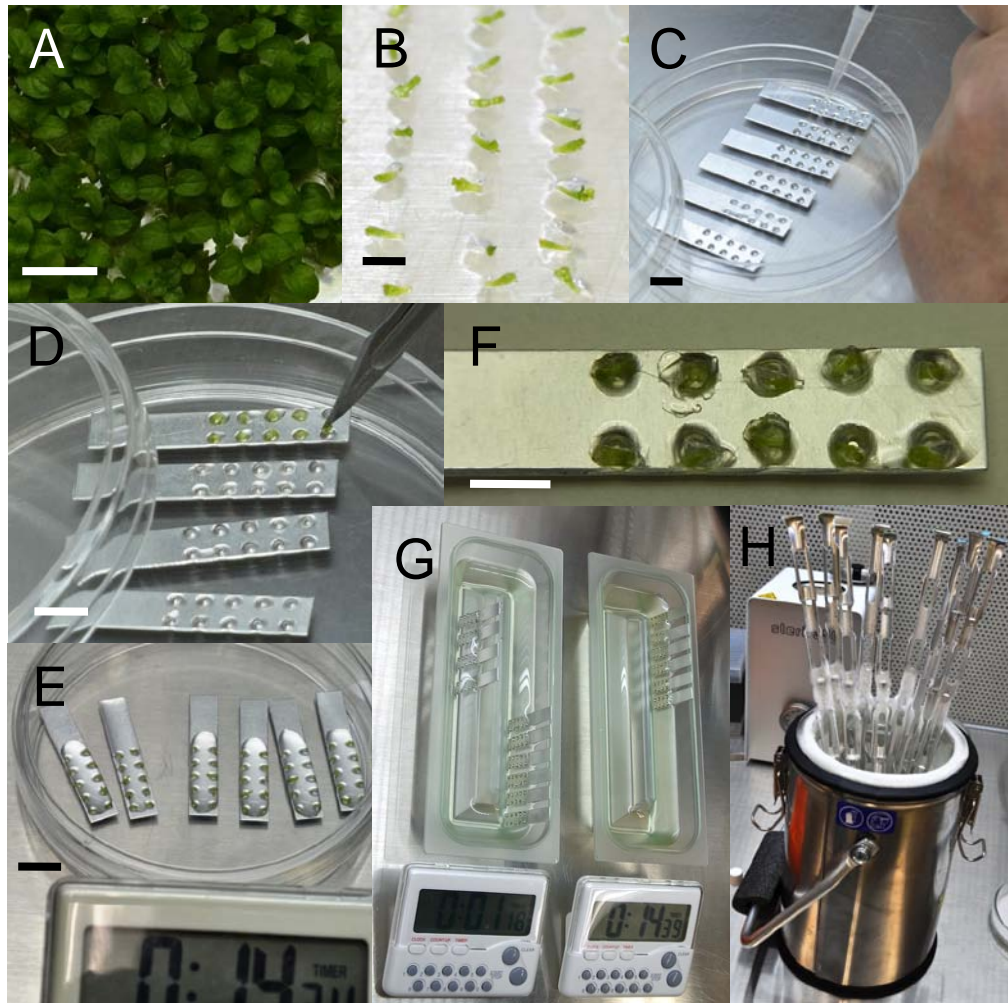


Figure 2-1. アルミニウム製のクライオプレートを用いたガラス化法(クライオプレート法)の手順 (1)

Figure 2-1. Procedure of vitrification method using aluminum cryo-plates (1)

A: Mint plantlet, B: Mint shoot tips prepared for cryopreservation, C: Na-alginate solution poured into the wells of cryo-plate, D: Shoot tips placed in the well, E: Calcium solution mounted on the cryo-plate for polymerization of the gel, F: Shoot tips adhered to cryo-plate, G: Osmoprotection in LS (left) and dehydration in PVS2 (right), H: Immersion into LN. Bars in photos indicate 10 mm (A, C, D, E), 5 mm (F) and 2 mm (B), respectively.

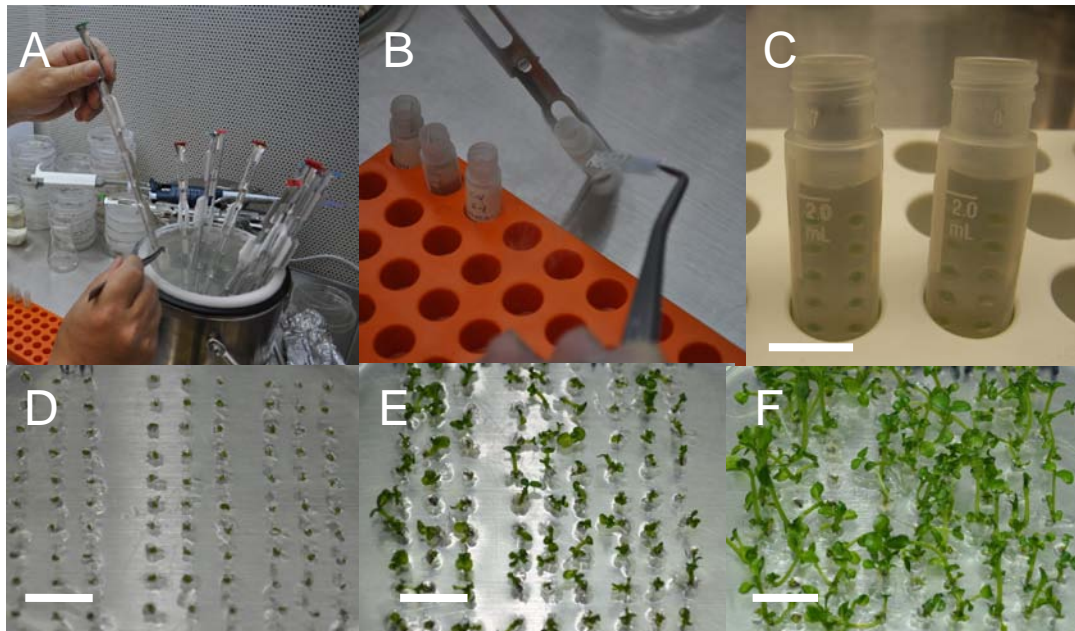


Figure 2-2. クライオプレート法の手順 (2)

Figure 2-2. Procedure of vitrification method using aluminum cryo-plates (2)

A: Removal of cryo-plate from cryotube filled with LN, B: Immersion of the cryo-plate to 1 M sucrose solution in cryotube for rewarming, C: Incubation for 15 min for dilution of PVS2, D-F: Regrowth of mint shoots on the MS medium, 0 day (D), 8 days (E) and 14 days (F) after plating. Bars in photos indicate 10 mm (C, D, E and F).

Table 2-1. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたミント茎頂の再生育における前培養培地のショ糖濃度の影響

Table 2-1. Effect of sucrose concentration in MS medium on regrowth of cryopreserved mint shoot tips using aluminum cryo-plates

Concentration of sucrose in MS	Regrowth (% ± SEM)
30 g/l (0.088 M)	93.3a ± 5.8
0.3 M	100.0a ± 0.0

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d at 25°C on MS with 30 g/l (0.088 M) or 0.3 M sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25°C and exposed to PVS2 for 20 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) using the Tukey Test.

Table 2-2. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたミント茎頂の再生育におけるアルギン酸ゲル中のショ糖の影響

Table 2-2. Effect of sucrose in alginate gel on regrowth of cryopreserved mint shoot tips using aluminum cryo-plates

Addition of 0.4 M sucrose in alginate gel	Regrowth (% ± SEM)
sucrose +	93.3a ± 5.8
sucrose -	93.3a ± 11.5

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d at 25°C on MS with 30 g/l M sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25°C and exposed to PVS2 for 20 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Different letters indicate significant differences (P<0.05) using the Tukey Test.

Table 2-3. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたミント茎頂の再生育におけるLS液のショ糖濃度の影響

Table 2-3. Effect of concentration of sucrose in LS solution on regrowth of cryopreserved mint shoot tips using aluminum cryo-plates

Concentration of sucrose in LS	Regrowth (% ± SEM)
0.6 M	86.7a ± 11.5
0.8 M	100.0a ± 0.0
1.2 M	100.0a ± 0.0

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d at 25°C on MS with 30 g/l sucrose, loaded in each LS solution for 30 min at 25°C and exposed to PVS2 for 20 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Different letters indicate significant differences (P<0.05) using the Tukey Test.

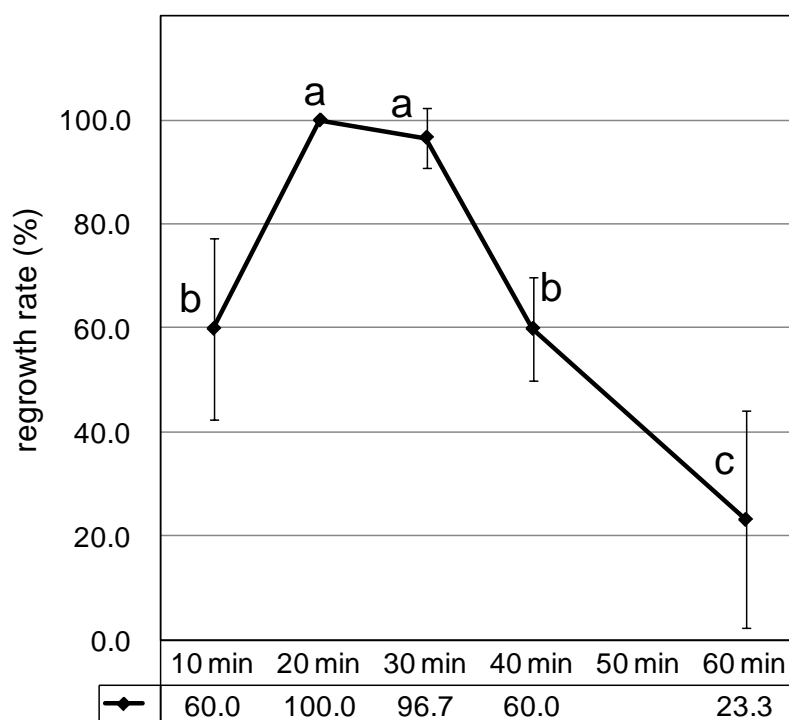


Figure 2-3. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたミント茎頂の再生育における PVS2 液による処理時間の影響

Figure 2-3. Effect of exposure time to PVS2 solution on regrowth of cryopreserved mint shoot tips using aluminum cryo-plates

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d at 25°C on MS with 30 g/l sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25°C and exposed to PVS2 for 10 - 60 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Data on the bottom row indicates average regrowth. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) using the Tukey Test.

Table 2-4. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたミント16系統の再生育率

Table 2-4. Regrowth response of cryopreserved shoot tips from mint lines using aluminum cryo-plates

Line name and scientific name		Regrowth (% ± SEM)		
Okayama kagaminojisei	<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes, Pharm.	83.3	±	11.5
Aoguki1	<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes, Pharm.	76.7	±	11.5
Sanbi	<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes, Pharm.	86.7	±	15.3
Ryokubi	<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes, Pharm.	83.3	±	5.8
Wasenami	<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes, Pharm.	83.3	±	5.8
Aoguki2	<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes, Pharm.	100.0	±	0.0
Shuubi(0)	<i>M. arvensis</i> var. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes, Pharm.	86.7	±	5.8
Sukkochi supeaminto	<i>M. spicata</i> L.	80.0	±	10.0
<i>M. piperita</i> L (1)	<i>M. × piperita</i> L.	100.0	±	0.0
<i>M. piperita</i> L (2n=72)	<i>M. × piperita</i> L.	93.3	±	5.8
<i>M. piperita</i> L (2)	<i>M. × piperita</i> L.	90.0	±	0.0
Chirimen hakka	<i>M. crispata</i> L	86.7	±	15.3
	<i>M. arvensis</i> L.	93.3	±	5.8
	<i>M. × rotundifolia</i> (L.) Huds.	73.3	±	11.5
Supeaminto	<i>M. spicata</i> L.	93.3	±	5.8
Himehakka	<i>M. japonica</i> (Miq.) Makino	90.0	±	10.0

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d at 25°C on MS with 30 g/l sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose for 30 min at 25°C and exposed to PVS2 for 20 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates

考察

ガラス化法では前処理、前培養、脱水耐性付与、PVS2液(Sakai *et al.* 1990)による脱水、加温後の操作などの手順が超低温保存を成功させる上で主なポイントである(Niino *et al.* 2007)。超低温保存される茎頂は脱水耐性の獲得のため、生理学的に最適な状態でなければならない(Withers 1979, Dereuddre *et al.* 1988)。ミントでは、腋芽から1~2週間培養した茎頂を用いることにより発育ステージが均一で活力のあるシュートを得ることができた。また、どのように茎頂を摘出するかも非常に重要な要因であり、Thinh *et al.* (2000)は、タロイモ(*Colocasia esculenta* (L.) Schott)のガラス化における茎頂分裂組織の周りの構造の重要性を報告している。すなわち、葉原基に部分的に覆われた頂端分裂組織が、葉原基に完全に覆われているものや覆われていないものに比べ、最も超低温保存に好適な外植体だとしている。本研究のミントにおいても茎頂分裂組織は葉原基により部分的に覆われたものとしたが、この分裂組織構造により操作中の過度の脱水および直接の傷害を回避することができたと考えられる。

低温順化およびショ糖濃度を高くした培地での試料の前培養は、温帯種および熱帯種の複数種において加温後の再生育を改善する効果を持つことが実証されている(Sakai *et al.* 2008)。イグサ(*Juncus decipens* (Buchenau) Nakai)では、低温順化の最適期間は5℃、8時間日照で30~80日である。また再生育を増加させるためにもっとも効果的な前培養期間は0.3 Mショ糖添加培地で5℃、2日間である(Niino *et al.* 2007)。同様にミントでもその有効性が認められていたが(Hirai *et al.* 1998, Uchendu and Reed 2008)、今回使用したミントの系統では低温順化を行わなくても高い再生育率が得られた。また、高濃度のショ糖を添加した培地による前培養は必ずしも行う必要がなく、30 g/lショ糖を添加

した通常のMS培地上で前培養を行うこととした。

PVS2液による脱水処理時間の検討において、一般的にLN保存後の再生育率は脱水時間とともに上昇して最大値を得た後、降下する。ガラス化法ではそのピークがピンポイントとなる傾向があるが、本研究ではクライオプレート法によるミントでの最大値は20-30分と幅のある値となった(Figure 2-3)。このことは、アロニア (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) の茎頂にドロップレット法を適用した場合にも見られ(Tanaka *et al.* 2011)、脱水時間が多少短くても冷却・加温速度が速く、ガラス化が進行できるためだと考えられる。したがって、クライオプレート法では冷却および加温速度がドロップレット法と同じ水準であると考えられる。

また、ミント16系統の最適処理条件下での再生育率が73~100%、平均88%と、非常に高い結果が得られており (Table 2-4)、クライオプレート法により単一の条件で異なる種を含む多様なミント遺伝資源に適用できることを示すことができた。

現在、29系統のミントを液相のLNタンク中に置き、実践的な超低温保存をすでに進めている。今回の試みにより、クライオプレート法は、非常に体系的であり、かつ時間を節約できる手法であることを実証できた。このため、クライオプレート法はジーンバンクで大規模な超低温バンクを促進するために有望であると考えられる。

第2節 イチゴ

イチゴ (*Fragaria × ananassa* Duch.) 遺伝資源は農業生物資源ジーンバンク事業において 496 品種・系統が維持され、通常、圃場や防虫網室内で生体株として保存されている。イチゴの圃場保存では、定期的な植え替え、他の系統からのランナーによる混入の可能性、自然に拡散するウイルスまたはウイルス様疾患などが主要な課題となっている。イチゴ茎頂の超低温保存は Kartha *et al.* (1980) により最初に報告されており、生存率を低下させることなく 28 年間 LN 中でイチゴ分裂組織を超低温保存するのが可能であることが明らかにされている (Karen and Kartha 2009)。その後従来の緩速凍結法 (Reed and Hummer 1995) やビーズ乾燥法 (Navatel and Capron 1997)、ビーズガラス化法 (Hirai *et al.* 1998)、ガラス化法 (Niino *et al.* 2003) およびドロップレット法 (Pinker *et al.* 2009) を用いて超低温保存を行った論文が発表されている。これらの論文を参考にしながら、クライオプレート法の適用試験を行った。

材料および方法

植物材料

イチゴ品種「ベニフジ」の組織培養茎頂を主に実験に用いた。この他、品種・系統試験のためにイチゴ15品種を供試した。これらイチゴ培養茎頂は気相のLNタンクに2003～2004年に実験的にガラス化法で超低温保存したものを加温・再生育させて得た(Niino *et al.* 2003)。今回用いた15品種・系統の再生育率は30～90%であった。再生育した茎頂は培養フラスコ(80 mm ϕ × 100 mm)に用意した0.2 mg/l (BA)、1 g/l (PVP)、2.5% (w/v) ショ糖および8 g/l 寒天末を添加してpH 5.8に調製したMS培地(Niino *et al.* 2003)上で培養し、1ヶ月以内に正常に生育した。その後シュートは2ヶ月毎に上記MS培地で継代して維持した。培養は25°C、16時間日長とし、白色蛍光灯下(52 μ mol/m²s)で行った(標準条件)。

前処理と前培養

斉一な材料を得るため、短いシュート(長さ約5 mm)を分割してシャーレ(90 mm ϕ × 20 mm)内の上記MS固形培地20 mlに植え付け、生育状態により2-3週間、標準条件で培養した(Figure 2-4A)。その後シュートを5°C、8時間日長(26 μ mol/m²s)の条件下で3～4週間低温処理を行った。低温順化の後、基部を含む茎頂部(長さ1.5～2.0 mm × 幅0.5～1.0 mm)をシュートから摘出し、2 Mグリセロールおよび0.3 Mショ糖を含むMS培地上で5°C、1～2日間、前培養した(Figure 2-4B ; 新野ら 2003)。

クライオプレート法の手順

クライオプレート法の手順は基本的にはジョチュウギク、ミントの場合と同様に行った。すなわち、2% (w/v) のアルギン酸 Na 溶液 2.0~2.5 μ l をクライオプレートのそれぞれの凹みに滴下し、その上に前培養した茎頂を一つずつ置き (Figure 2-4C)、0.1 M 塩化カルシウム液 (約 0.3 ml) を茎頂が配置されているアルミニウムプレートの部分に滴下し、ゲル化するまで 15 分間処理する (Figure 2-4D)。このことにより、茎頂はアルギン酸ゲルを介してクライオプレートのそれぞれの凹みに固着する。

茎頂が固着したクライオプレートを、液体 MS 基本培地に 2 M グリセロールおよび 0.6~1.2 M のショ糖を含む LS 液 (Nishizawa *et al.* 1992) を約 20 ml 入れた 25 ml ピペッティングリザーバーに静置し (Figure 2-4E)、25°C で 30~90 分間脱水耐性付与処理を行う。

クライオプレートを LS 液から取りだし、約 20 ml の PVS2 液 (Sakai *et al.* 1990) を入れた 25 ml ピペッティングリザーバーに入れ、25°C で 30~60 分間、脱水する。

脱水後、クライオプレートをクライオケーンに装着した 2 ml のクライオチューブに移し、LN 中に直接沈め、最低 30 分間保持する (Figure 2-4F)。

再生育時には、クライオチューブを LN より取り出して、茎頂を乗せたクライオプレートをクライオチューブから移し替えて、2 ml の 1 M ショ糖液を分注したクライオチューブに浸漬した (Figure 2-4G)。茎頂を室温で 15 分間この溶液中で保持した後、上記の固体 MS 培地に移した (Figure 2-4H)。

また、最適条件を決定した後、他のイチゴ 15 品種・系統を用いて適用試験を行った。

データ解析

加温後の再生育は 25°C、標準条件での 5 週間の培養後に外植体の数を計数す

ることで評価した。再生育は正常なシュート伸長と生育、発根したことを意味している。各実験処理においてそれぞれ 10 茎頂 3 反復で試験し、反復結果は平均値 ± 標準誤差で示した。また、統計分析は、Web サイト上でプログラムを介して Tukey テストで行い、有意差 ($P < 0.05$) を異なる文字で示した。

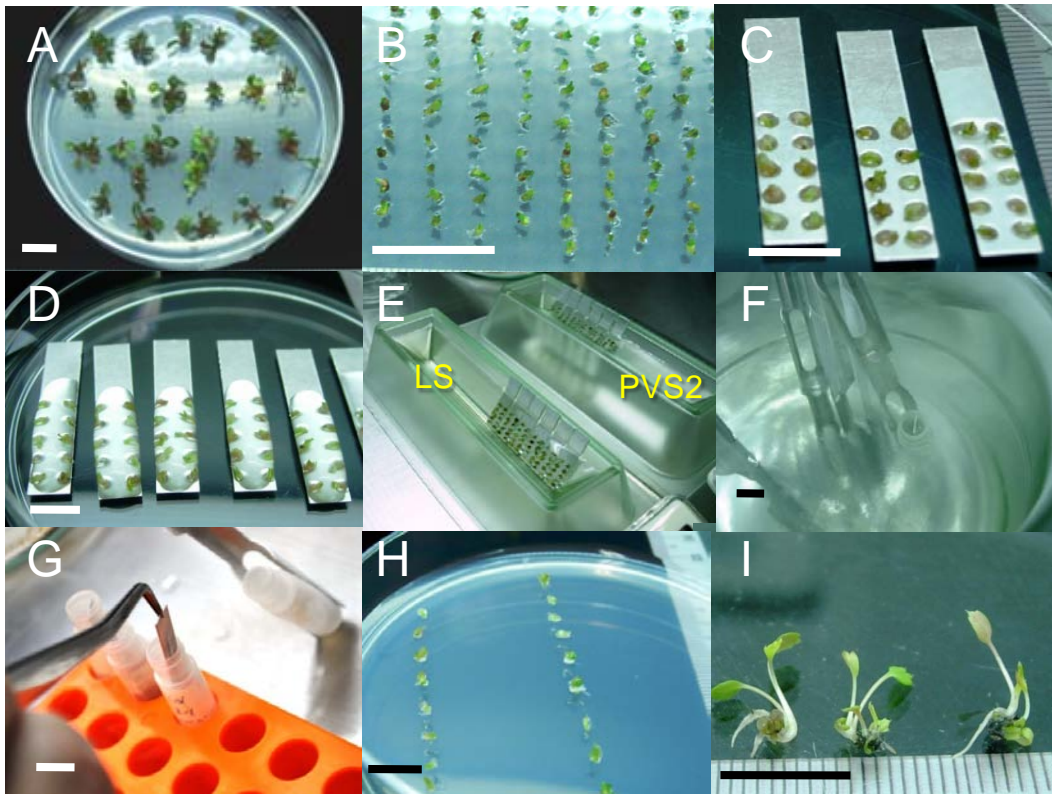


Figure 2-4. クライオプレート法の手順および超低温保存後のイチゴ培養体

Figure 2-4. The V-Cryo-plates procedure and appearance of *in vitro*-grown strawberry after cryopreservation

A: Shoot after cold-hardening, B: Preculture on the MS medium with 0.3 M sucrose and 2 M glycerol after excision, C: Shoot tips mounted on the aluminium plates, D: Hardening of the alginate gel, E: Treatment by LS (left) and PVS2 (right), F: Storage of cryotubes on the canes in LN, G: Removal from LN and warming in 1 M sucrose solution (2 ml), H: Plating the vitrified shoot tips with gel, I: Regenerated plantlets 20 days after plating (cv. Cavalier). Bars in photos indicate 10 mm.

結果

手順の最適化

イチゴの場合には、前処理、低温処理および前培養条件については、ほとんど Niino *et al.* (2003)を参考にして行うことができた。そのため、PVS2 液および LS 液への処理時間と LS 液のショ糖濃度の条件検討を行うことで、イチゴをクライオプレート法で超低温保存するための最適条件を決定した。その結果、再生育率の最大値は 2 M グリセロールに 0.3 M ショ糖を添加した MS 培地での 2 日間の前培養と PVS2 液に 50 分の脱水処理で得られた (Table 2-5)。また、脱水耐性付与処理については 0.8 M ショ糖を含む LS 液に 30 分処理することで最も高い効果が得られた (Table 2-6)。

以上の結果からイチゴ培養茎頂におけるクライオプレート法の最適手順を以下のように決定した。①5℃で3~4週間の低温順化。②茎頂の切り出し後、0.3 M ショ糖と 2 M グリセロールを添加した培地で 5℃、2 日間前培養。③アルギン酸ナトリウム液と塩化カルシウム液で茎頂をプレートに固着。④ 0.8 M ショ糖を添加した LS 液で 25℃、30 分間脱水耐性付与処理。⑤PVS2 液で 25℃、50 分間脱水処理し、LN 浸漬。⑥ 1 M ショ糖液に直接浸漬し加温、15 分間の処理後、培地に置床。

品種適応試験

次に、得られた最適条件を用いて、他のイチゴ 15 品種・系統の再生育率を検討した。その結果、再生育率はすべての品種で非常に高く、70~97%の範囲で 15 品種・系統の平均値は 81%であった (Table 2-7)。茎頂は置床後 10 日以内に生育を再開し、カルス形成を伴わずに正常なシュートに発育した (Figure 2-4I)。

Table 2-5. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたイチゴ茎頂の再生育における PVS2 液処理時間と前培養日数の影響

Table 2-5. Effect of different exposure time to PVS2 and preculture days on regrowth of cryopreserved shoot tips using the aluminum cryo-plate

Exposure time by PVS2	Regrowth (% \pm SEM)			
	Preculture 1 day		Preculture 2 day	
30 min	36b	\pm 6	50b	\pm 10
40 min	46b	\pm 6	63ab	\pm 6
50 min	67a	\pm 6	80a	\pm 10
60 min	43b	\pm 6	53b	\pm 6

Note: Shoot tips of strawberry (variety name: Benifuji) treated as follows: *In vitro* shoots were hardened at 5°C for 25 days; Precultured for 2 days at 5°C on MS with 0.3 M sucrose + 2 M glycerol; Loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25°C; Exposed to PVS2 for 30-60 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Different letters indicate significant differences (P<0.05).

Table 2-6. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたイチゴ茎頂の再生育における 2 M グリセロールおよび 0.8 M ショ糖含有 LS 液による処理時間および LS 液のショ糖濃度の影響

Table 2-6. Effect of different exposure times to LS (2M Glycerol and 0.8 M Suc) and concentration of sucrose in LS on the regrowth of cryopreserved shoot tips using the aluminum cryo-plate

Concentration of sucrose in LS	Exposure time by LS	Regrowth (% ± SEM)
0.8 M	30 min	83a ± 5
	60 min	77ab ± 5
	90 min	60c ± 8
0.6 M	30 min	77ab ± 5
1.0 M	30 min	67bc ± 5

Note: Shoot tips of strawberry (variety name: Benifuji) treated as follows: In vitro shoots were hardened at 5°C for 25 days; Precultured for 2 days at 5°C on MS with 0.3 M sucrose + 2 M glycerol; Loaded in 2.0 M glycerol and 0.6-1.0 M sucrose solution for 30-90 min at 25°C; Exposed to PVS2 for 50 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Different letters indicate significant differences (P<0.05).

Table 2-7. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたイチゴ15系統の再生育率

Table 2-7. Regrowth of cryopreserved shoot tips of 15 strawberry cultivars using the aluminum cryo-plate

Cultiver name	Regrowth (% \pm SEM)
Aiberry	70 \pm 10
Akashi	77 \pm 6
Blackmore	90 \pm 10
Benifuji	80 \pm 0
Benihime	80 \pm 10
Benihoman	83 \pm 6
Benisuzume	70 \pm 10
Cambridge Favorite	80 \pm 10
Cavalier	93 \pm 6
Hatsukuni	97 \pm 6
Morioka 16gou	77 \pm 6
Takane	80 \pm 10
Tohoku 15 gou	87 \pm 6
Tohoku 18 gou	70 \pm 10
Uzushio	80 \pm 10

Note: Shoot tips of strawberry cultivars treated as follows: *In vitro* shoots were hardened at 5°C for 21 days; Precultured for 2 days at 5°C on MS with 0.3 M sucrose + 2 M glycerol; Loaded in 2.0 M glycerol and 0.8M sucrose solution for 30 min at 25°C; Exposed to PVS2 for 50 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates.

考察

クライオプレート法を新しい植物材料に応用する際、主要なチェック項目は前処理、前培養、LS液による脱水耐性付与およびPVS2液による脱水である。どの超低温保存法でも、超低温保存する細胞と組織は、脱水耐性の獲得と旺盛な生育の回復のために、生理学的に健全な状態でなければならない。

茎頂の前処理は、斉一で、活力のある実験用の茎頂を得るために必要である。このため、同じステージの小さな茎頂から2~3週間育成したシュートを超低温保存のための材料とした。低温順化処理は多くの植物で効果的であり、高い再生率を得るために必要である(Hirai *et al.* 1998; Navatel and Capron 1997, Niino *et al.* 2003; Reed and Hummer 1995)。さらに、高濃度のショ糖を添加したMS培地上での前培養は、PVS2液に対する脱水耐性の誘導に効果がある(Niino *et al.* 2007)。イチゴ茎頂の0.3 Mショ糖と2 Mグリセロール(Niino *et al.* 2003)や5% DMSO(Reed and Hummer 1995)を添加した培地による前培養により高いレベルが得られている。今回のクライオプレート法のプロトコルの開発において、文献からの前処理および前培養の情報が不可欠であることが改めて確認された。すなわち、イチゴの場合5°Cで3~4週間の低温順化と0.3 Mショ糖と2 Mグリセロールでの5°Cでの2日間の前培養を、クライオプレート法の手順として最終的に採用した。

効果的な脱水耐性付与処理が加温後の生長を改善するために不可欠だと考えられる。LS液は凍結脱水処理や脱水処理に対する耐性を誘導するのに非常に効果的である(Nishizawa *et al.* 1992; Sakai *et al.* 2008)。Kim *et al.* (2009)は新しいLS液をドロップレット法用に開発した時に、脱水耐性付与処理が浸透圧ストレスの中和剤として働き、脱水とガラス化に対する組織や細胞の生理的

適応を誘導することを示している。LS 液のショ糖濃度は 0.6 M (バレイショのビーズガラス化法 ; Hirai and Sakai 1999)、 0.8 M (ミントのクライオプレート法 ; 本稿第 2 章第 1 節)、 1.4 M (カーネーションのクライオプレート法 ; Sekizawa *et al.* 2011)、 1.4 M (ジョチュウギクのクライオプレート法 ; 本稿第 1 章) および 1.6 M (カンショのビーズガラス化法 ; Hirai and Sakai 2003) とかなり高濃度のショ糖が現在使われている。イチゴの場合は、2 M グリセロールと 0.8 M ショ糖を含む LS 液による 30 分の脱水耐性付与処理により最高の再生率が得られた。これらの結果は最適な LS 液のショ糖濃度は種特異的であることを意味している。

ガラス化による超低温保存が成功するための最後のポイントが、注意深く管理された脱水手順および、PVS2 液による処理中の化学毒性や過度の浸透圧ストレスによる傷害の予防である。クライオプレート法は、クライオプレートに茎頂が固着しているため、この手順を他の手法より簡単に制御することが可能である。イチゴの場合、適切な PVS2 液に対する処理時間は 25°C で 50 分であった。これはガラス化法で用いられるのと同じ処理時間であった (Niino *et al.* 2003)。これらの結果により、ガラス化法で開発された処理条件は、茎頂のサイズや発育段階を変えない限りクライオプレート法に適用できる可能性が示唆された。

クライオプレート法は茎頂を付着させたクライオプレートを溶液から別の溶液へ移し替えるだけですべての処理が実行可能であるため、また急速冷却・急速加温が可能であるため、不十分な脱水、材料の損傷や亡失および操作時の困難性などの欠点を克服できる可能性が考えられる。以上のようにクライオプレート法はイチゴ遺伝資源の実践的な超低温保存法として十分利用できると結論した。

第3節 熱帯産クワ

クワ (*Morus* spp.) はカイコの飼料として養蚕に利用されるとともに、近年は食用目的に果実が利用されるなど新規用途開発が進められており、多様性を保持したクワ遺伝資源の重要性が高まっている。農業生物資源ジーンバンク事業では、ヤマグワ、ログワ及びカラヤマグワ系などの品種・系統 1,470 点が、圃場や栽培ポットで植物体として保存されている(白田ら 2007)。しかし、圃場保存等は、栽培に伴う作業や維持コストの問題、さらには病虫害、自然災害による滅失の危険性などの問題が依然残っている。Niino(2000)は、これらの問題を解決し、長期保存を可能とする方法として超低温保存法を提案し、圃場保存のバックアップとして超低温保存を遺伝資源保存に取り入れることを推奨した。これを受け、同事業ではクワの休眠芽を利用した超低温保存法(新野ら 1991)を実施した。耐寒性のある休眠芽を形成する温帯産の品種・系統については、2002年度より超低温保存を開始し、2008年度までに1,283点をLNタンクの気相中(約 -160°C)に保存した(Fukui *et al.* 2011)。しかし、残った品種・系統については熱帯、亜熱帯地域から導入したもので、休眠芽を形成しない。そのため、これらの品種・系統には休眠芽を利用した超低温保存法を利用できない。

培養茎頂を用いたクワの超低温保存法については、緩速予備凍結法(新野 1990; 新野・岡 1990)、ビーズ乾燥法(Niino and Sakai 1992)、ガラス化法(Niino *et al.* 1992)がすでに実験室レベルで開発されたが、事業レベルの保存法としては確立されていない。また、熱帯・亜熱帯地域から導入した品種・系統については、ガラス化法である程度の再生育が得られることも示されていた(Niino and Sakai 1992)。本節においては、クライオプレート法の熱帯・亜熱帯地域から導入した品種・系統への適用可否を検討し、その手順の最適化を図った。

材料および方法

供試材料

供試材料は農業生物資源研究所のハウス内にポット保存している品種・系統を用いた。主に用いた系統は「奄美 07」である。他に 12 品種・系統を品種試験の目的で供試した。クワ枝条の採集は 2010 年 6 月に行い、側芽の初期培養を行った。すなわち、収穫した枝から枝部をつけた約 5 mm 長の側芽を切り出し、70%エタノールに 1 分間、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 2 %)に 10 分間浸漬することで表面殺菌をした。滅菌水で 2 回洗浄した後、この外植片から茎頂(1~1.5 × 1.0 mm)を切り出して培地に置床し、約 2 カ月間の初代培養を行った。初代培養培地は MS 培地をもとに、無機塩類を半分にした 1/2 MS 培地に、30 g/l ショ糖、1.0 mg/l BA および 0.8%寒天を添加したものである。培養は培地を 8 ml ずつ入れた管びんにて行った。茎頂が伸びた時点で、BA を除いた上記 1/2MS 培地(継代培地)に移して継代培養し、材料とした。培養条件は 25°C、16 時間日長とし、白色蛍光灯下(52 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)で行った。

クライオプレート法

クライオプレート法の手順は原則的に前節までに示した方法に従った。

クワの場合、材料の調整は健全で発育段階の揃った茎頂を得るために、側芽のついた外植片(長さ約 5 mm)を継代培地(90 mm ϕ シャーレ)に植え付け、2~3 週間培養をした(Figure 2-5a)。前処理は、側芽から生育したシュートより茎頂(1~1.5 × 1.0 mm)を切り出し、0.3 M ショ糖、0.2 mg/l BA を添加した MS 培地上で 25°C 1 晩、前培養した(Figure 2-5b)。

前培養した茎頂は、プレートの凹みに第 2 章で示したように固着させた

(Figure 2-5c, d)。ただし、クワ茎頂は木本植物で、ミントやイチゴのような草本植物より硬い場合が多かったため、アルギン酸ナトリウム液量を $2.5\sim 3.0\ \mu\text{l}$ に増量して使用した。

脱水耐性付与処理はプレートをLS液に 25°C で30分間浸漬して行った (Figure 2-5e, f)。LS液は2Mグリセロールと $0.6\sim 1.2\ \text{M}$ ショ糖を含むMS基本培地液で、浸漬処理を行った。脱水処理はPVS2液で、 25°C で40~60分間プレートを浸漬することで行った (Figure 2-5f)。脱水した茎頂は、クライオケーンに挟んだ空の2mlクライオチューブにプレートごと入れ (Figure 2-5g)、蓋をしないままクライオチューブを直接LN中に浸漬することで超低温処理した (Figure 2-5h)。

再生育させる際は、クライオチューブをLN中からひき上げ、その中に収めであったプレートを、ピンセットを用いて取り出し、1Mショ糖添加MS基本培地2mlを入れたクライオチューブ内に投入し加温した (Figure 2-5i)。室温下1Mショ糖液に15分間の浸漬・洗浄の後、クライオチューブから取り出した茎頂は、ゲルのついたままプレートから取り外し、初代培養培地に置床した (Figure 2-5j, k, l)。上述した条件で培養し、再生育率は培養1ヶ月後にシュートが正常に伸長したものを数えて計算した。

「奄美07」での最適処理条件が決定した後は、その手順を用いて他の12品種・系統の再生育状況を調査した。実験は基本的には10茎頂3反復で行い、成績は平均値 \pm 標準誤差で示し、統計分析はTukeyテスト ($P < 0.05$) で行った。

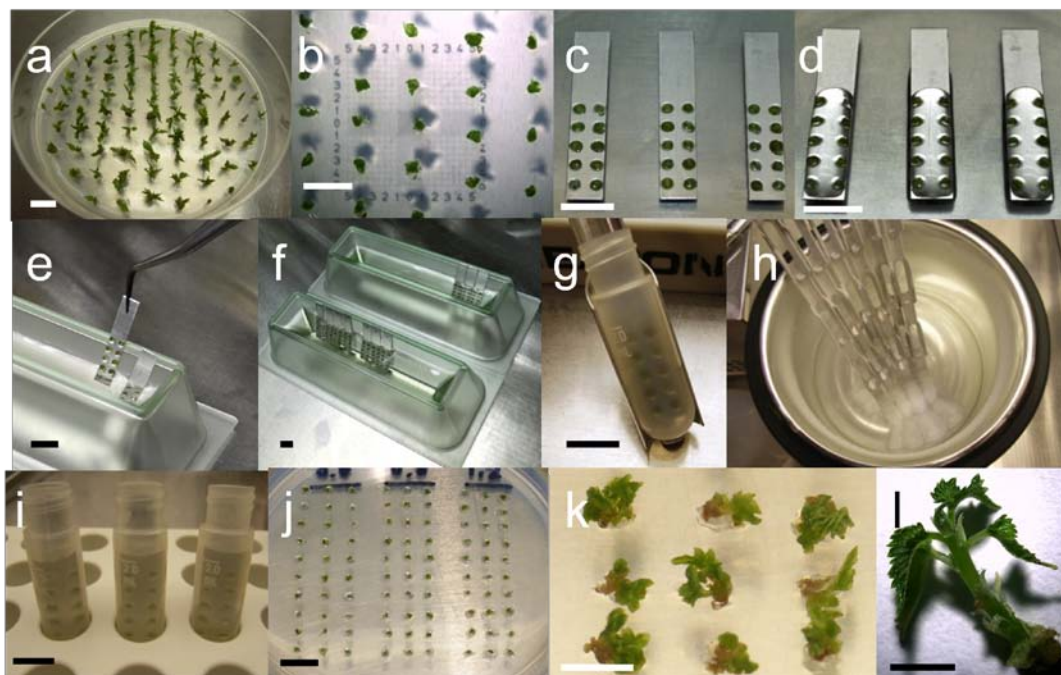


Figure 2-5. 熱帯産クワにおけるクライオプレート法の手順

Figure 2-5. Procedure of cryopreservation using aluminum cryo-plate. a: Mulberry plantlet, b: Mulberry shoot tips prepared for cryopreservation, c: Shoot tips placed in the well with Na-alginate solution, d: Calcium chloride solution mounted on the cryo-plate for polymerization of the gel, e: Manipulation of cryo-plate with shoot tips, f: Osmoprotection in LS (bottom) and dehydration in PVS2 (above), g: Cryo-plate placed in cryotube on cryocane, h: Immersion and storage in LN, i: Immersion and incubation of the cryo-plate to 1 M sucrose solution in cryotube for rewarming, j,k and l: Regrowth of mulberry shoots on the medium, 0 day (j), 20 days (k) and 60 days (l) after plating. Bars in photos indicate 10 mm (a, c, d, e, f, g, i, j) and 5 mm (b, k, l), respectively.

結果

手順の最適化

クライオプレート法は前節までで示したように茎頂の調製、茎頂の切り出しと前培養、脱水耐性付与処理、脱水処理、LN 保存及び再生育の各ステップからなる。手順の最適化においては、最初の段階として脱水耐性付与のための LS 液の濃度と PVS2 液による脱水時間の検討が必要である。これにより約 70%以上の再生育率が得られた場合には、この方法を最適条件として採用し、他の品種・系統への適用試験を次の段階として行った。

クワの場合、LS 液に含まれるショ糖濃度の試験では 0.6 M、0.8 M、1.2 M 間では有意な差はなく、いずれも高い再生育率を示した (Table 2-8)。そのためここでは再生育培養 1 ヶ月後に目視にて最も再生育の早い 0.6 M ショ糖を採用した。次に、PVS2 液による脱水時間では、40~60 分間の内では有意な差が見られなかった (Table 2-9)。特に、40 分、50 分処理とも高い再生育率を示したが、やはり目視にて 1 ヶ月後の最も再生育の早い 50 分処理を最適条件とした。

最適手順と品種・系統試験

クワのクライオプレート法の最適手順は以下のように決定した。①側芽から生育したシュートより、茎頂 (1~1.5×1.0 mm) を切り出し、0.3 M ショ糖および 0.2 mg/l BA を添加した MS 培地上で 25℃ 1 晩、前培養する。②凹みに 2% アルギン酸ナトリウム液を約 2.5 μl 注ぎ、その上に前培養した茎頂を置き、その後 0.1 M 塩化カルシウム液をプレート上に覆い 15 分間保持してゲルを固化させる。③塩化カルシウム液を取り除き、プレートに固着した茎頂を 0.6 M ショ糖を含

む LS 液を入れたリザーバーの中で 25°C、30 分間浸漬して脱水耐性付与処理を行う。④PVS2 液で満たしたリザーバーにプレートに移し、25° C で 50 分間脱水処理する。⑤脱水後、プレートを空の 2 ml クライオチューブに移し、アルミニウムケーンを用いて直接 LN 中に浸漬し、30 分以上保持する。⑥再生育はクライオチューブを LN から取り出し、プレートを 1 M ショ糖液、2 ml を入れたクライオチューブ内に投入、加温し、15 分間その中で保持する。その後、プレートを取り出し、茎頂を、ゲルをつけたままプレートから外し初代培養培地に置床する。

この手法を用いて、日本の亜熱帯産の「奄美 10」をはじめ、タイ、インド、台湾、コスタリカ、エジプト、インドネシア原産のクワ培養茎頂の超低温保存実験を行った。その結果、再生育率は 73~93% で平均 87% であった (Table 2-10)。再生育させた茎頂は、7 日以内に生育が確認でき、約 20 日でシュートの伸長が見られた (Figure 2-5k, 1)。

Table 2-8. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存された熱帯産クワ茎頂の再生育における LS 液中のショ糖濃度の影響

Table 2-8. Effect of concentration of sucrose in LS solution on regrowth of cryopreserved shoot tips using aluminum cryo-plates

Concentration of sucrose in LS	Regrowth (% ± SEM)
0.6 M	96.7a ± 5.8
0.8 M	100.0a ± 0.0
1.2 M	96.7a ± 5.8

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 day at 25 °C on MS with 0.3 M sucrose and BA, loaded in 2.0 M glycerol and 0.6 -1.2 M sucrose solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS2 for 50 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Responses with the same letter are not significantly different at P=0.05 by Tukey test.

Table 2-9. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存された熱帯産クワ茎頂の再生育における PVS2 液による処理時間の影響

Table 2-9. Effect of exposure time to PVS2 solution on regrowth of cryopreserved shoot tips using aluminum cryo-plates

Exposure time to PVS2	Regrowth (% \pm SEM)
40 min	100.0a \pm 0.0
50 min	96.7a \pm 5.8
60 min	90.0a \pm 10.0

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 day at 25 °C on MS with 0.3 M sucrose and BA, loaded in 2.0 M glycerol and 0.6 M sucrose solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS2 for 40 - 60 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Responses with the same letter are not significantly different at P=0.05 by Tukey test.

Table 2-10. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存された熱帯産クワ 12 系統の再生育率

Table 2-10. Regrowth of cryopreserved shoot tips from 12 mulberry lines using aluminum cryo-plates

Line	Scientific name	Country	Regrowth (% ± SEM)		
Amami 10	<i>M. acidosa</i> Griff.	Japan	86.7	±	5.8
Local K	<i>M. acidosa</i> Griff.	India	93.3	±	5.8
Gejira	<i>M. alba</i> L.	Egypt	83.3	±	5.8
M.australis	<i>M. australis</i> Poir	Indonesia	76.7	±	5.8
Costarica	<i>M. celtidifolia</i> Kunth	Costa Rica	96.7	±	5.8
Taiso 3	<i>M. formosensis</i> Hotta	Taiwan	80.0	±	17.3
Ber S799	<i>M. indica</i> L.	India	83.3	±	15.3
Chiang Kam	<i>M. rotunbiloba</i> Koidz.	Thailand	73.3	±	5.8
Keekai	<i>M. rotunbiloba</i> Koidz.	Thailand	86.3	±	15.2
Tonkin	<i>M. rotunbiloba</i> Koidz.	Thailand	86.7	±	11.5
Keaw(♀)	<i>M. rotunbiloba</i> Koidz.	Thailand	93.3	±	5.8
Jark	<i>M. rotunbiloba</i> Koidz.	Thailand	96.7	±	5.8

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 day at 25 °C on MS with 0.3 M sucrose and BA, loaded in 2.0 M glycerol and 0.6 M sucrose solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS2 for 50 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Responses with the same letter are not significantly different at P=0.05 by Tukey test.

考察

アルミニウムは実用可能な金属の中で熱伝導率が最も高いものの一つである(理科年表 2011)。クライオプレート法ではアルギン酸ゲルを介してではあるが、アルミニウムプレート面に茎頂が固着しているため、高い冷却・加温効果が得られる。また、直接 LN や 1 M ショ糖液に浸漬することで急速冷却、急速加温が可能となっている。このことは、ミントにおいて観察されたのと同様に、PVS2 液による処理時間が 40~60 分の場合には、いずれも高い再生育率を示した点からもその効果が窺える (Table 2-9)。すなわち、脱水が多少不十分であるとしても冷却・加温速度が速いため、ガラス状態を経て生存すると考えられる。

本実験は、休眠芽を利用した超低温保存法を用いることができない熱帯、亜熱帯地域から導入したクワの超低温保存を目的として行った。これらのクワに対しては最初に茎頂培養を確立し、その後生育段階のそろった健全な茎頂を準備する必要がある。このため側芽を培養することで材料を作成し、クライオプレート法で実験を行った。その結果は、12 品種・系統すべてで 70% 以上の再生育率を得ることができ、クライオプレート法が多様な熱帯・亜熱帯産のクワの培養茎頂の超低温保存に利用できることが示された。しかし、一部クワの中には茎頂培養が十分確立できないものもあり、それらの系統については培地のさらなる改良が必要である。

以上のことから、最適化したクライオプレート法は、熱帯・亜熱帯産のクワ遺伝資源の超低温保存のための標準的な技術としてジーンバンク事業に利用できる結論した。

第4節 バレイショ

バレイショ (*Solanum tuberosum* L.) は南米アンデス地域原産で現在では世界各地で栽培され、人類にとってもっとも主要な作物の一つであり、3.24 億トン (FAOSTAT 2010) 生産されている。日本でも最も重要なイモ類として約 246 万トン (平成 21 年) が生産され (農林水産省 2011)、青果用としての利用の他、ポテトチップスなどの加工食品用やデンプン原料として利用されている。農業生物資源ジーンバンク事業では近縁野生種を含め 1,946 点が圃場栽培で保存されているが、圃場での保存では毎年の植え付け、管理、収穫など栽培に伴う作業など維持管理コストや人為的なミスによる混入、さらに病虫害や自然災害による滅失の危険性など問題点が多く、低コストで安定的に長期保存が可能な超低温保存によるバックアップ体制の確立が望まれる。

培養茎頂によるバレイショの超低温保存法は植物の超低温保存研究の初期より多くの研究が行われ、バレイショが戦略的作物として重要である欧州を中心とした複数のジーンバンクで実際的な保存が進められている。バレイショの超低温保存は 1977 年に 2 段階冷却法と超急速冷凍法から始まった (Bajaj 1977; Grout and Henshaw 1978; Towill 1981a; Towill 1981b)。最初のプロトコルはプログラムフリーザーを使う必要があるため時間がかかり、結果は低い生存率にとどまった。その後プロトコルが改良され、ジメチルスルフォキシド (DMSO) 液滴法 (Schäfer-Menuhr *et al.* 1994) やビーズ乾燥法 (Fabre and Dereuddre 1990)、ガラス化法 (Golmirzaie and Panta 1997)、ビーズガラス化法 (Hirai and Sakai 1999)、ドロップレット法 (Halmagyi *et al.* 2005)、ゲルドロップレット法 (Hirai 2011) などの新しい手法が開発された。これらのプロトコルによりバレイショの超低温保存による結果は生存および再生育率という点で改善され、

現在複数のジーンバンクでバレイショの超低温保存コレクションを構築するために利用されている。しかしながら、ペルーの国際バレイショセンター(CIP)の収蔵点数約 7,400 点に対して超低温コレクションが 446 点、もっとも進んでいるドイツのライプニッツ植物遺伝作物学研究所(IPK)でも 6,013 点のうち 1,119 点(18.6%)と、低い割合にとどまっている(Kaczmarczyk 2011)。この理由として、既存の手法では茎頂を扱う熟練した操作技術が必要であり、脱水耐性付与処理や脱水処理等において煩雑な操作手順を含み、特にドロップレット法では試料のアルミニウムフویل片への移し替えやフویل片へのクライオバイアルへの移し替えもしなければならない。それ故、大規模な処理にはあまり向いておらず、年間約 50 点程度の保存が限界である(Jenderek, 私信)。バレイショの超低温保存コレクションの飛躍的な拡大を可能にするためには簡単でシステムティックな超低温保存法が必要と考えられる。

本節においては、上記の要請に応えることができるクライオプレート法のバレイショへの適用を検討するとともにその手順の最適化を図った。

材料および方法

供試材料

供試材料は農業生物資源ジーンバンク事業で保存されているバレイショ遺伝資源から、インビトロ保存されている 13 品種を用いた。主に用いた系統は「さやか」である。他に 12 品種・系統を品種試験の目的で供試した。培養植物の維持は MS 培地に、30 g/l ショ糖、0.321g/l 塩化カルシウムおよび 0.4% (w/v) ジェランガムを添加したものである。培養は培地を 60 ml ずつ入れた培養ビン (80 mm ϕ \times 100 mm) にて行った。継代は 2 ヶ月毎に新しい培地にシュート先端部を切り取って維持し、材料とした。培養条件は 20°C、連続明期とし、白色蛍光灯下 (105 μ mol/m²s) で行った。

超低温保存法の手順

クライオプレート法をバレイショに適用するにあたり、Hirai (2011) が報告したゲルドロップレット法を参考としてガラス化法における最重要要因である脱水関係の処理において暫定的な条件を得て、再生育の可否を確認し、その後に最適条件の検討に移った。暫定的な脱水条件は、脱水耐性付与処理を 1.2 M ショ糖含有 LS 液で 60 分間、25°C で行い、脱水処理を PVS2 液で 60 分間、25°C で行った。結果は 90% 以上の非常に高い再生育率であったが、脱水耐性付与および脱水処理だけで合計 2 時間と長時間かかるため、大規模処理に適するよう脱水処理時間および脱水耐性付与処理の時間短縮を検討した。

最初に、健全で発育段階の揃った茎頂を得るために、側芽のついた外植片 (長さ約 5 mm) を継代用の培地 (90 mm ϕ シャーレ) に植え付け、2~3 週間培養をした。側芽から生育したシュート (Figure 2-6a) より、茎頂 (1.5 \times 0.5 mm) を切

り出し、0.3 M ショ糖を添加した MS 培地上で 25°C 1 晩、前培養した (Figure 2-6b)。茎頂のサイズ検討のためには 0.5、1.0 および 1.5 mm (直径 0.5 mm) の各長さの茎頂を切り出しクライオプレート法に供試した。

前培養した茎頂は、アルミニウムプレートの凹みにアルギン酸ゲルで前節までと同様に固着させた (Figure 2-6c)。

脱水耐性付与処理はプレートを LS 液に 25°C で 30 分間浸漬して行った (Figure 2-6d)。LS 液は 2 M グリセロールと 0.8、1.2 および 1.6 M ショ糖を含む MS 基本培地液で、これを 25 ml ピペッティングリザーバー (NSG Precision Co.) に約 20 ml 入れて浸漬処理に用いてショ糖濃度および処理時間の検討を行った。脱水処理は同型のリザーバーに PVS2 液を約 20 ml 入れ、25°C で 0~90 分間プレートを浸漬することで処理時間の検討を行った (Figure 2-6d)。脱水した茎頂は、クライオケーンに挟んだ空の 2 ml クライオチューブにプレートごと入れ (Figure 2-6e)、蓋をしないままクライオチューブを直接 LN 中に浸漬することで超低温処理した (Figure 2-6f)。

再生育時にはクライオチューブを LN 中からひき上げ、その中に収めてあったプレートを、ピンセットを用いて取り出し、1 M ショ糖添加 MS 基本培地 2 ml を入れたクライオチューブ内に投入し加温した (Figure 2-6g)。室温下 1 M ショ糖液に 15 分間の浸漬・洗浄の後、クライオチューブから取り出した茎頂は、メスの先端を用いてゲルのついたままプレートから取り外し、上記培地に置床した (Figure 2-6h, i)。再生育のための培養条件は上述した継代培養の条件と同様である。

再生育培養 2 週間後に、シュートが正常に伸長したものを数えて計算し、再生育率とした。

「さやか」での最適処理条件が決定した後は、その方法を用いて他の 12 品種・

系統の再生育状況を調査した。実験は基本的には10茎頂3反復で行い、成績は平均値 ± 標準誤差で示し、統計分析はTukeyテスト ($P < 0.05$) で行った。

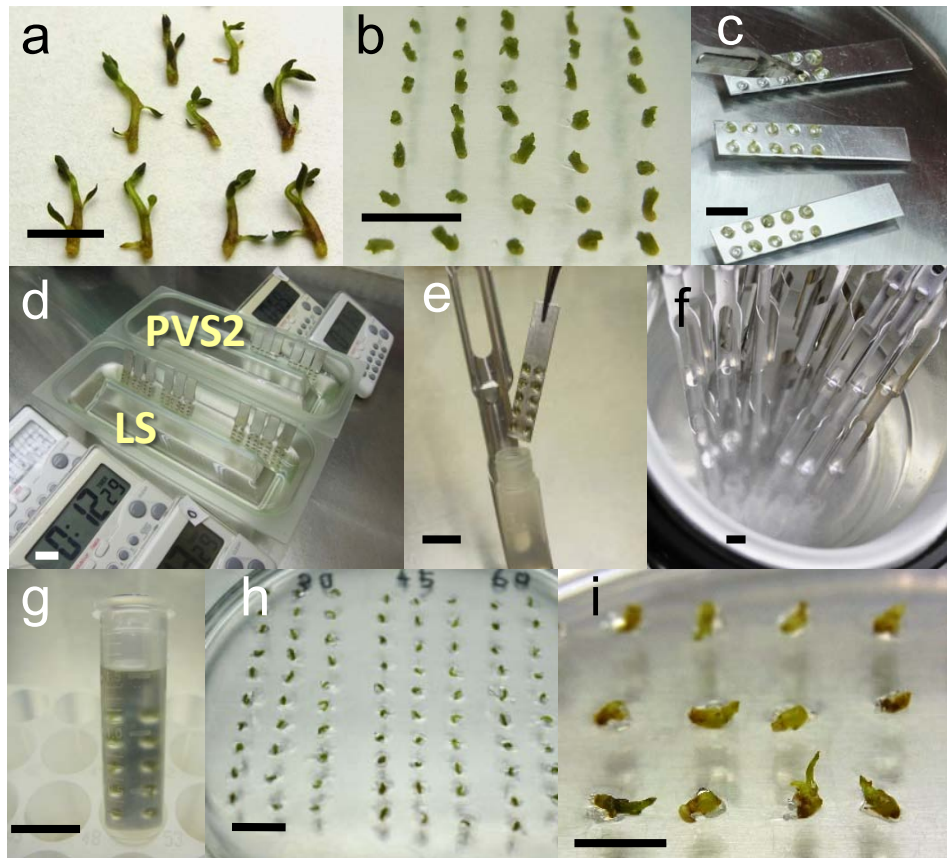


Figure 2-6. バレイショにおけるクライオプレート法の手順

Figure 2-6. Procedure of cryopreservation of potato shoot tips using aluminum cryo-plate.

a: Potato plantlet, b: Potato shoot tips prepared for cryopreservation, c: Shoot tips placed in the well with Na-alginate solution, d: Osmoprotection in LS (bottom) and dehydration in PVS2 (above), e: Cryo-plate placed in cryotube on cryocane, f: Immersion and storage in LN, g: Immersion and incubation of the cryo-plate to 1 M sucrose solution in cryotube for rewarming, h and i: Regrowth of mulberry shoots on the medium, 0 day (h), and 15 days (i) after plating. Bars in photos indicate 10 mm.

結果

手順の最適化

ガラス化法をベースとするクライオプレート法において再生育率に最も強く影響を与える脱水処理、つまり PVS2 液への処理時間の実験では、0～15 分間に再生育率が上昇しピークに達した後、60 分まではほぼすべての材料が再生育し、その後再生育率が低下した (Figure 2-7)。15～60 分までは有意な差が見られなかったが、時間短縮が可能でかつ加温後の生育がよい 30 分間の処理を最適条件とした。

次に、脱水耐性付与処理における LS 液に含まれるシヨ糖濃度および浸漬時間の試験ではすべての処理区で有意な差はなく、いずれも高い再生育率を示した (Table 2-11)。この中で再生育がよく、短時間で処理の可能な 0.8 M シヨ糖含有 LS 液で 30 分間の処理を採用した。

さらに、切り出す茎頂のサイズによる再生育への影響も合わせて検討した。長さ 0.5、1.0、1.5 mm で茎頂を摘出したが、いずれのサイズでも再生育率は非常に高くほぼすべての茎頂が再生育し、有意差は認められなかった (Table 2-12)。しかしながら、このサイズ範囲では大きいほど前培養やクライオプレートへの固着作業などの取扱いが容易で、急速加温後の生育も旺盛であったため、1.5 mm 長の茎頂を用いることとした。

最適手順および品種試験

以上の結果から定めたバレイシヨにおけるクライオプレート法の最適手順は次の通りである。なお、前処理としての低温順化処理は特に必要ではなかった。

①側芽から生育したシュートより、茎頂 (1.5 × 0.5 mm) を切り出し、0.3 M シ

ヨ糖を添加した MS 培地上で 25°C 1 晩、前培養する。②プレートの凹みに 2% アルギン酸ナトリウム液を 2.5 μ l 注ぎ、その上に前培養した茎頂を置き、その後 0.1 M 塩化カルシウム液をプレート上に覆い 15 分間保持してゲルを固化させる。③塩化カルシウム液を取り除き、プレートに固着した茎頂を 0.8 M ショ糖を含む LS 液を入れたリザーバーの中で 25°C、30 分間浸漬して脱水耐性付与処理を行う。④PVS2 液で満たしたリザーバーにプレートを移し、25 °C で 30 分間脱水処理する。⑤脱水後、プレートを空の 2 ml クライオチューブに移し、アルミニウムケーンを用いて直接 LN 中に浸漬し、30 分以上保持する。⑥再生育はクライオチューブを LN から取り出し、プレートを 1 M ショ糖液、2 ml を入れたクライオチューブ内に投入、加温し、15 分間その中で保持する。その後、プレートを取り出し、ゲルをつけたまま茎頂をプレートから外し継代培地に置床する。

この手法を用いて、近縁野生種の後代で 2 倍体系統の「インカのめざめ」をはじめとするバレイショ 12 品種の培養茎頂を用いて超低温保存実験を行った。その結果、再生育率は 93~100% で平均 98.9% であった (Table 2-13)。再生育させた茎頂はカルス化することなく、約 5 日で茎頂付近の生育が確認でき、約 10 日でシュートの伸長が見られた (Figure 2-6i)。

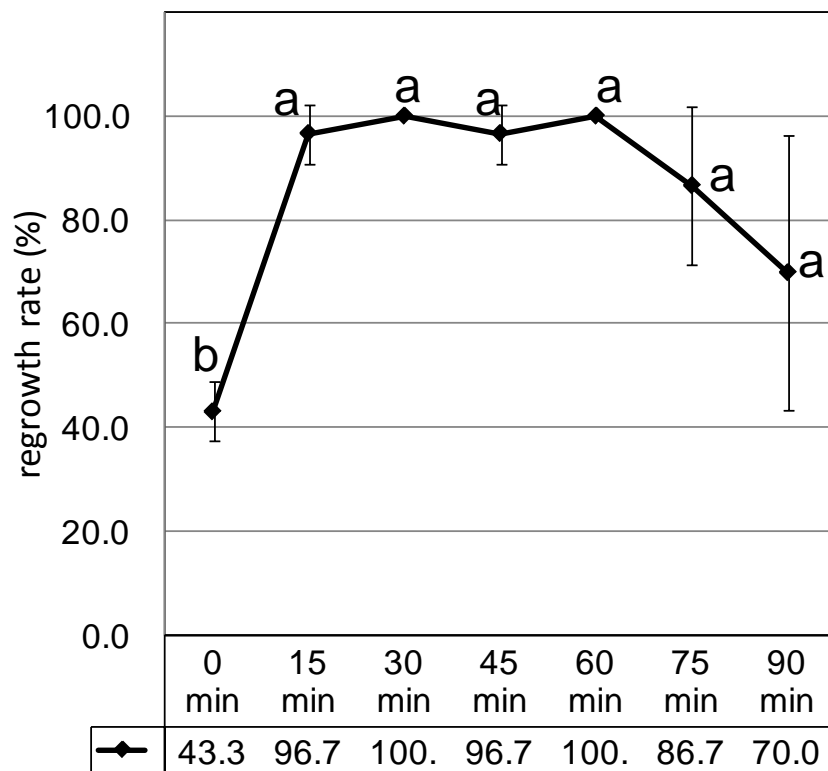


Figure 2-7. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたバレイシヨ茎頂の再生育における PVS2 液による処理時間の影響

Figure 2-7. Effect of exposure time to PVS2 solution on regrowth of cryopreserved potato shoot tips using aluminum cryo-plates

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d at 25°C on MS with 0.3 M sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25°C and exposed to PVS2 for 10 - 60 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Data on the bottom row indicates average regrowth. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) using the Tukey Test.

Table 2-11. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたバレイシヨ茎頂の再生育における LS 液の処理時間および LS 液中のシヨ糖濃度の影響

Table 2-11. Effect of exposure time to LS solution and sucrose concentration of LS on regrowth of cryopreserved potato shoot tips using aluminum cryo-plates

Concentration of suc. and exposure time	Regrowth (% ± SEM)	
1.2 M 30 min	96.7a	± 5.8
1.2 M 60 min	96.7a	± 5.8
0.8 M 30 min	100.0a	± 0.0
1.6 M 30 min	100.0a	± 0.0

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 day at 25 °C on MS with 0.3 M sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 - 1.2 M sucrose solution for 30 or 60 min at 25 °C and exposed to PVS2 for 30 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Responses with the same letter are not significantly different at P=0.05 by Tukey test.

Table 2-12. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたバレイシヨ茎頂の再生育における摘出する茎頂サイズの影響

Table 2-12. Effect of size of excised shoot tips on regrowth of cryopreserved potato shoot tips using aluminum

Size of excised shoot tips	Regrowth (% ± SEM)
0.5mm	100.0a ± 0.0
1.0mm	100.0a ± 0.0
1.5mm	96.7a ± 5.8

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 day at 25 °C on MS with 0.3 M sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS2 for 30 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Responses with the same letter are not significantly different at P=0.05 by Tukey test.

Table 2-13. アルミニウムクライオプレートを用いて超低温保存されたバレイシヨ 12 系統の再生育率

Table 2-13. Regrowth of cryopreserved shoot tips from 12 potato varieties using aluminum cryo-plates

Variety name	Regrowth (% \pm SEM)		
OhoutsukuChip	93.3	\pm	5.8
Kitahime	96.7	\pm	5.8
May Queen	96.7	\pm	5.8
Natsufubuki	100.0	\pm	0.0
Snowden	100.0	\pm	0.0
Danshakuimo	100.0	\pm	0.0
Waseshiro	100.0	\pm	0.0
Tokachi Kogane	100.0	\pm	0.0
Snowmarch	100.0	\pm	0.0
Howaitofuraiya	100.0	\pm	0.0
Inca-no-Mezame	100.0	\pm	0.0
North Chip	100.0	\pm	0.0

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 day at 25 °C on MS with 0.3 M sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS2 for 30 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates.

考察

バレイショ 遺伝資源に対してクライオプレート法を適用できることが確認され、その最適条件を得ることができた。この節の冒頭でも触れたように、これまで数多くのバレイショの超低温保存法が研究されているが、バレイショにクライオプレート法を初めて適用するために、文献情報としてドロップレット法の改良法であるゲルドロップレット法(Hirai 2011)より暫定的に脱水関係処理等の各種条件を参考にして予備実験を行った。ゲルドロップレット法では、アルミフォイルの短冊上で15 μ lのアルギン酸ナトリウム液に10~15個の茎頂を入れてカルシウム溶液でゲル化し、その後の脱水等の処理を行っており、ゲルで茎頂を固着し操作性の改良を図っている点と直接液体窒素で冷却が可能な点でクライオプレート法と類似している。予備実験の結果は再生育率87~100%と実用に値するレベルではあったが、脱水耐性付与と脱水処理で2時間と長時間かかるため、その短縮化を中心に最も再生育率の低かった「さやか」を用いてクライオプレート法の最適条件を決定した。

超低温保存法で最も再生育率に影響を与えるのが脱水処理であるが、PVS2液による処理時間の再生育率への影響は、一般的に脱水時間の増加とともに再生育率が上がってピークに達し、再生育率がその後になる。本研究でも同様の結果になったが、再生育率がピークになる処理時間が15~60分と幅広い範囲となるのがクライオプレート法の特徴といえる。また、脱水0分でも43%程度の再生育率が認められたことから、LS液による脱水耐性付与処理により部分的に脱水が起こり、LN保存後に生存し再生育したことがわかる。このことは熱伝導率が非常に高いアルミニウムで作られたクライオプレートを用いることで、不十分な脱水の元でも、細胞に致命的な氷晶の発生を回避することのできる十分

に急速な冷却および加温速度が得られたことを示唆している。冷却・加温速度が遅い場合、脱水が足りなければ細胞内凍結が起こり、生存することは不可能である。クライオプレート法の場合は PVS2 液による最適脱水時間の幅が広いことから、十分な脱水に達していなくても LN 保存後に高い再生育率が得られることが推測され、バレイショの実験でも実証された。

茎頂のサイズの検討実験では 0.5 mm からクライオプレートの直径と同じ長さの 1.5 mm まで 0.5 mm 刻みの大きさのものを供試したが、このサイズ範囲ではいずれの大きさでもほぼすべての茎頂が茎葉を伸長させた。しかしながら、その生育状況には差が見られ、1.5 mm 長の茎頂が最も旺盛な生育を示した。また、茎頂の摘出時とクライオプレートに前培養培地から移し替える際に 0.5 mm 長の茎頂では非常に繊細な作業が必要であり、大きくなるほど容易に取り扱えたため、1.5 mm 長の茎頂を摘出することとした。なお、摘出した茎頂の形状は茎頂ドーム組織に葉原基を 2~4 個程度残してその下部を長くとするようにした。

均一で活性の高い材料を使用することが超低温保存を成功させる重要な要素の一つである。側芽を強光下、20℃で 2~3 週間生育させることにより揃いがよく生育旺盛な材料を得ることができた。ここから茎頂ドーム組織の下部を長めに切り取った 1.5 mm の茎頂部を用いて最適条件で超低温保存を行うことで、野生種由来の 2 倍体品種「インカのめざめ」を含む 12 品種で平均 98.9%と驚異的な再生育率を得ることができた。脱水等の条件を変えずに同一のプロトコルで多様なバレイショ 遺伝資源を扱えることから、多数の品種を保存しなければならない事業的な超低温保存にとって極めて有効であると考えられる。

以上のように多様なバレイショ 遺伝資源の大規模な超低温保存にクライオプレート法が利用できると結論した。

以上、本章ではクライオプレート法を最適化するためには、低温順化处理の有無、前培養条件の設定、切り出す茎頂の大きさ、LS 液のショ糖濃度の検討と処理時間、PVS2 液の処理時間を決定する必要があった。これらの条件は以前に出版された超低温保存の文献を参考にし、最適化のための実験を行うことで、より効果的に決定できる。今回行ったミント、イチゴ、熱帯産クワ、バレイショではそれぞれ平均で 88%、81%、87%、99%の高い再生育率が得られ、上記の条件の最適化が重要であることが実証できた。

第3章 クライオプレート法の標準化プロトコル

Reed *et al.* (2004)は、研究室間で超低温保存に成績にばらつきが生じるのは培養系、技術的な手順や操作者の技量によるためだと報告している。同様に Keller *et al.* (2008)は超低温保存の成績の差はスタッフのスキルや能力の違いだけでなく、使用機器や、手順や操作の誤解から生じると報告している。今回、クライオプレート法は操作者の技量と技術的な手順の問題を減少させるために企図されたもので、クライオバンク事業の促進を目的に開発した。

超低温保存を成功させるために重要な要因は、各ステップの技術的な作業内容を明確にすることである(Sakai *et al.* 2008)。各々の手順については、個人的なコミュニケーションや技術研修(Keller *et al.* 2008)、さらには、マニュアル類などから明確に理解することができる(Rao *et al.* 2006, Reed 2008a)。

そこで本章では、クライオプレート法が他機関においても容易に保存事業として多くの作物種に用いられる手法となることを目指して、クライオプレート法の一般的な手順を示すフローチャートを、ミントを一例として作成し、作業内容を明確化させるとともに、新しい植物種に適用させる際のガイドラインとなる実験手順を提案する。

クライオプレート法の実験フローチャート

クライオプレート法は、超低温保存する材料の調製、前処理、茎頂の摘出、前培養、茎頂のクライオプレートへの固着、脱水耐性付与処理、植物ガラス化液による脱水処理、保存および再生育などの段階を含んでいる(Figure 3-1)。試料自体は脱水耐性の獲得のため、生理学的に最適な状態でなければならない。すなわち、健全で、最適なサイズ、生育段階および構造になっている必要があ

る。ミントの場合は長さ1~1.5 mm、幅1 mmとし、茎頂分裂組織は葉原基により部分的に覆われたものが良好であった。

低温順化处理と高濃度のショ糖による前培養もまた超低温保存の成功に効果的である。しかしながら、これらの処理は植物種によっては不必要な場合もあり(Sakai *et al.* 2008)、本研究で供試したミントでは低温順化や高濃度培地での前培養は必要がなかった(Table 2-1)。

一方、効果的な脱水耐性付与処理は加温後の生育を改善するためには不可欠であり、LS液は凍結乾燥もしくは脱水への耐性を誘導するのに非常に効果的である(Nishizawa *et al.* 1992)。LS液はタロイモ(Takagi *et al.* 1997)およびイチゴ(Hirai and Sakai 2003)においてPVS2液への脱水耐性を増大することが知られている。カンショ茎頂では1.6 Mのショ糖を2 Mグリセロールと組み合わせることで、脱水耐性を高めることができる(Hirai *et al.* 1998)。ミントの場合には、0.8 Mもしくは1.2 Mショ糖と2 Mグリセロールの組み合わせがいずれも、脱水耐性付与効果をあげることができた(Table 2-3)。また、ガラス化による超低温保存を成功させるためには、注意深く制御しながらPVS2液による脱水処理を行うことと、処理中の化学毒性や過剰な浸透圧ストレスによる傷害を防止することが必要である。クライオプレート法では、この処置をクライオプレートの移動のみで行うことができるため、他の手法よりも非常に容易に制御することが可能である。また、急速冷却・加温が可能のため、ガラス化法のようにPVS2液処理の最適時間が点状のピークになることが、ほとんどない。ミントの場合では、PVS2液への最適処理時間は20~30分と比較的広い幅があった。また、熱帯産クワ、バレイショの試験においても同様の傾向が認められ、最適処理時間に幅があることがこの手法の一つの特徴である。

標準化プロトコルの提案

クライオプレート法を新たな植物種に適用させるためには、文献においてその植物種の組織培養や超低温保存法に関する情報を得ることから始めるが、その後の条件検討の段階においてマニュアル化された実験指針があればさらに効率的に試料の無駄なく当該種の最適処理条件を得ることができる。本研究で用いた5種作物においては手順を最適化するためには低温処理の有無、前培養条件の設定、LS液のショ糖濃度と処理時間、PVS2液の処理時間などの処理条件を決定する必要があった。(Table 3-1)。

以上をふまえて、クライオプレート法の最適条件を決定するための標準化プロトコルを以下に提案する。まず、最初のステップとして、一部のパラメータを固定して予備実験を行う。その手順は以下の通りである。

- 1) 低温順化せずにシュートから茎頂を摘出する。
- 2) 茎頂を5℃もしくは25℃で1日、0.3 Mショ糖を添加したMS培地上で前培養する。
- 3) 茎頂を0.8 Mのショ糖および2.0 Mグリセロールを含むLS液中で25℃、30分間脱水耐性付与処理を行う。
- 4) 茎頂をPVS2液に25℃で20～50分間処理して脱水する。

この方法で、茎頂の再生育率を液体窒素処理の有無と合わせて調べる。

上記の予備実験で、生存が認められない場合は以下の順序で調査する。

- 1) 低温処理したシュートを使い、低温順化期間を決定する。
- 2) 前培養の期間もしくは、前培養培地のショ糖濃度を検討する。

一方、生存する茎頂がある場合、PVS2液への処理時間、LS液のショ糖濃度と浸漬時間および前培養条件を最適化する(Figure 3-1)。これらの試行により当該植物種の最適手順を効率的に得ることができる。

以上本章では他の植物種に適用する際の実用的なガイドラインを示した。



Figure 3-1. クライオプレート法の実験フローチャート

Figure 3-1. The flowchart of general procedure of V-Cryo-plate method

Key points in this study for optimal protocol are in bold type.

(The English version of this figure can be found in Cryoletter 33: 12-23 (2012).)

Table 3-1. 5作物におけるクライオプレート法の最適条件の比較

Table 3-1. Comparison of the optimal conditions for V-cryo-plate method among 5 crops

Step	Check point	Dalmatian Chrysanthemum	Mint	Mulberry	Strawberry	Potato
Preconditioning	Culture of lateral buds or apical shoots Necessity of cold acclimation	Apical shoots 5 °C, 20- 40 days, 0.5Msuc	Lateral buds Needless	Lateral buds Needless	Lateral buds 5 °C, more than 3 weeks	Lateral buds Needless
Shoot tips to be cryopreserved	Size of shoot tips Structure around meristem dome	1.0-1.5 mm L × 1.0 mm W	1.0-1.5 mm L × 0.5-1.0 mm W	1.0-1.5 mm L × 0.5-1.0 mm W	1.5-2.0 mm L × 0.5-1.0 mm W	1.5 mm L × 1.0 mm W
Preculture	Sucrose concentration in medium Duration and temperature of preculture	0.5 M Suc. 5 °C, 2 days	30 g/l Suc. 1 day	0.3 M Suc. + 0.2 mg/l BA 1 day	0.3 M Suc. + 2 M Glycerol 5 °C, 2 days	0.3M Suc. 1 day
Osmoprotection	Sucrose concentration of LS solution (2 M Glycerol +) Duration of loading	1.4 M Suc. 30 - 60 min	0.8 M Suc. 30 min	0.6 M Suc. 30 min	0.8 M Suc. 30 min	0.8 M Suc. 30 min
Dehydration	Duration in PVS2 Treatment temperature 25 °C or 0 °C PVS2, PVS3 or other PVSs	PVS7M, 25 °C, 40 min	PVS2, 25 °C, 20 min	PVS2, 25 °C, 50 min	PVS2, 25 °C, 50 min	PVS2, 25 °C, 30 min

Regrowth Avr.

77%

88%

87%

81%

99%

第4章 クライオプレート法の事業化の可能性

第3章まででクライオプレート法を開発し、多様な植物遺伝資源の保存に応用ができることを示すとともに、標準化プロトコルを提案した。国内外のジーンバンクにおいて栄養繁殖性作物遺伝資源の長期安定保存が現在強く望まれているが、システムティックに超低温保存ができる体制と手法は必ずしも確立していない。その原因として既存の超低温保存法では、日常業務として大量のサンプルを扱うことができなかつた点や高度な技術が必要で職人的な技術者の養成が必要であった点があげられる。本研究のクライオプレート法を開発した目的の一つはそれらの困難さを解消することである。また、多くの保存施設において、事業レベルで保存が進められるには、技術移転の容易さが必要である。本章ではクライオプレート法と他の超低温保存法を比較検討するとともに、大量のサンプルを短時間で処理でき、容易に技術を伝えられるかという点について検証を行う。

材料および方法

植物材料

供試資料として超低温保存法の比較では第2章第4節で用いたバレイショ品種「さやか」、異なる操作者による再生育率の検討では第2章第1節で用いたミント「福山自生」、および第2章第3節で用いた熱帯産クワ「奄美07」、さらに長期保存手順の検討では第2章第2節で用いたイチゴ品種「ベニフジ」のそれぞれインビトロで継代した培養茎頂を用いて実験を行った。

既存の手法との比較

クライオプレート法が従来の超低温保存法である、ドロップレット法、ビーズガラス化法およびガラス化法と比べ、作業効率がどのくらいよいのか、また、再生育がよいのかという点について検討を行った。脱水耐性付与および脱水の各処理条件は、クライオプレート法では第3章第3節で示した最適処理条件を用いて、他の手法はHirai(2011)の文献を参考として以下のように行った。茎頂サイズは長さ1 mmとし、前培養は0.3 M ショ糖含有MS培地で25°C、1晩で行った。

ドロップレット法では前培養を終えた茎頂10個を2 mlのクライオチューブに移し、1.2 M ショ糖含有LS液1 mlで25°C、45分間脱水耐性付与処理を行った後、茎頂の損傷・亡失に注意しながらLS液を捨て、PVS2液1 mlにより25°C、45分の脱水処理を行った。脱水処理の後、2.5 μ lのPVS2液滴を2.0 mm×7 mmのアルミフォイルの短冊(アルミ片)に10個付着させ、茎頂を一つずつ液滴内に置き、茎頂を付着させたアルミ片ごと直接LNに入れ急速冷却した。加温はあらかじめクライオチューブに分注した室温の1.0 M ショ糖溶液に茎頂のついたア

ルミ片を素早く投入し 10 分後に新しい 1.0 M ショ糖溶液で液交換して計 20 分間洗浄を行い、培地上に置床した。

ビーズガラス化法では 2%アルギン酸ナトリウム液に前培養した茎頂を入れ、茎頂を一つずつアルギン酸ナトリウム液とともにマイクロピペットで吸い上げ、0.1M 塩化カルシウム溶液に滴下し 15 分間静置してゲルを固め、直径 3 mm 程度の茎頂入りのアルギン酸ビーズを作成した。このビーズを 50 ml の遠沈管に入れた 1.4 M ショ糖添加 LS 液 20 ml で緩やかに振蕩しながら 25°C、4 時間脱水耐性付与処理を行った。次に LS 液を除き、PVS2 液 20 ml で 25°C、60 分間、途中 30 分で液交換して脱水処理した。その後ビーズ 10 個を 2 ml クライオチューブに移し替え LN 中で急速冷却した。再生育には、38°Cの温水中で 2 分間急速加温して、PVS2 液を除去後、1.0 M ショ糖溶液を 2 ml 加え、10 分後に新しい 1.0 M ショ糖溶液と交換して計 20 分間洗浄を行い、ビーズごと培地上に置床した。

ガラス化法では前培養を終えた茎頂 10 個を 2 ml のクライオチューブに移し、1.0 M ショ糖添加 LS 液 1 ml で 25°C、45 分間脱水耐性付与処理を行った後、茎頂の損傷・亡失に注意しながら LS 液を捨て、PVS2 液 1 ml により 25°C、60 分間、途中 30 分で液交換して脱水処理を行った。その後 0.3 ml の PVS2 液とともに LN 中で急速冷却した。再生育時には 38°Cの温水中で 2 分間急速加温して、PVS2 液を除去した後 1.0 M ショ糖溶液を 2 ml 加え、10 分後に新しい 1.0 M ショ糖溶液と交換して計 20 分間洗浄を行い、茎頂を培地上に置床した。

異なる操作者による再生育の比較

組織培養の経験はあるがクライオプレート法を全く行ったことのない操作者 4名に、茎頂の摘出から超低温保存した茎頂の培地への置床までの手順を行わせ、その結果を比較することにより、超低温保存後の再生育に差がないかを検討し

た。超低温保存の手順としてはミント(第2章)および熱帯産クワ(第3章第2節)それぞれの最適条件を適用したクライオプレート法を用いた。すなわち、茎頂を切り出してそれぞれの条件で前培養を行い、アルギン酸ゲルにより茎頂をプレートに固着させ、LS液で脱水耐性付与処理を行い、PVS2液により脱水処理を行ってLNに保存する。その後、1Mショ糖溶液に浸漬して加温し、それぞれの再生育培地に置床してその再生育を観察した。

クライオプレート法における長期保存手順の検討

ジーンバンクにおける超低温保存の事業化のためには、液体窒素に保存するまでにかかる時間が短ければ、効率よく保存が可能である。長期保存では通常1品種あたり100個(10クライオプレート/チューブ)の茎頂と長期の再生育モニターとして用いるために追加的なサンプル30~50個を保存する。そこで、イチゴ品種「ベニフジ」の培養茎頂150個を切り出して前培養した後、15枚のクライオプレートに茎頂を固着させるステップからLN浸漬までに必要な時間を計測し、できるだけ短い時間でLN中に収納する方法について検討した。

結果

超低温保存手法による再生育の比較ではクライオプレート法で 96.7%と非常に高い再生育率が認められた一方、ドロップレット法で 30.0%、ビーズガラス化法で 55.0%、ガラス化法で 53.3%の再生育率と有意な差が認められた (Table 4-1)。本研究の結果からクライオプレート法により他の手法よりも遙かに高い再生育率が得られ、クライオプレート法の有効性が実証された。

植物の組織培養の経験はあるがクライオプレート法を含む超低温保存を全く行ったことのない 4 人のスタッフにクライオプレート法の一連の作業を実演して教授した後、茎頂を摘出し前培養する段階から超低温保存、再生育までの手順をすべて単独で行ってもらい、再生育の結果を比較した。その結果はミントで 83~97%、熱帯クワで 93~100%と、いずれも高い再生育率を示した。また操作者による有意な差は見られなかった (Table 4-2, 4-3)。このことから熟練していない技術者でもこの手法を容易に採用し、広く適用できることが示された。

また、大量保存のために必要な時間の検討では、15 枚のプレートを 3 つのグループに分けて、最初のグループの待ち時間に他のグループのプレートを処理することにより、より効率的な作業が可能となった。イチゴの場合、150 個の茎頂のクライオプレートへの取り付けから LN 保存までの過程に必要な時間は約 2 時間程度であった (Figure 4-1)。

Table 4-1. 超低温保存法の違いによるバレイショ培養茎頂の超低温保存後の再生育の比較

Table 4-1. Comparison of regrowth of cryopreserved shoot tips by different cryopreservation procedures

Procedure	Regrowth (% ± SEM)		
Droplet	30.0b	±	5.8
Encapsulation Vitrification	55.0b	±	5.8
Vitrification	53.3b	±	6.4
V-Cryo-plate	96.7a	±	5.8

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d on MS with 30 g/l Sucrose and 0.29 mM CaCl₂. And then they were loaded and dehydrated.

· Droplet: LS sol. with 1.0 M Suc. 45 min. and PVS2 60 min.

· Encapsulation vitrification: LS sol. with 1.4 M Suc. 4 hrs. and PVS2 60min. (encapsulated in 3 mm Na alginate beads)

· Vitrification: LS sol. with 1.2 M Suc. 45 min. and PVS2 45 min.

· V-Cryo-plate: LS sol. with 0.8 M Suc. 30 min. and PVS2 30 min.

All treatments were carried out at 25 C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates.

Table 4-2. 実験を行う技術者の違いによるミント培養茎頂の超低温保存後の再生育への影響

Table 4-2. Effect of persons conducted experiment on regrowth of cryopreserved shoot tips of mint “Fukuyamajisei” using aluminum cryo-plates

Operator	Regrowth (% ± SEM)
A	93.3a ± 5.8
B	96.7a ± 5.8
C	96.3a ± 6.4
D	83.3a ± 5.8

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 d at 25°C on MS with 30 g/l sucrose, loaded in 2.0 M glycerol and 0.8 M sucrose solution for 30 min at 25°C and exposed to PVS2 for 20 min at 25°C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) using the Tukey Test.

Table 4-3. 実験を行う技術者の違いによる熱帯産クワ培養茎頂の超低温保存後の再生育への影響

Table 4-3. Effect of person conducted experiment on regrowth of cryopreserved shoot tips of mulberry using aluminum cryo-plates

Operator	Regrowth (% ± SEM)
A	93.3a ± 5.8
B	96.7a ± 5.8
C	100.0a ± 0.0
D	93.3a ± 5.8

Note: Shoot tips were excised, precultured for 1 day at 25 °C on MS with 0.3 M sucrose and BA, loaded in 2.0 M glycerol and 0.6 M sucrose solution for 30 min at 25 °C and exposed to PVS2 for 50 min at 25 °C. Ten shoot tips were tested for each of the three replicates. Different letters indicate significant differences (P < 0.05) using the Tukey Test.

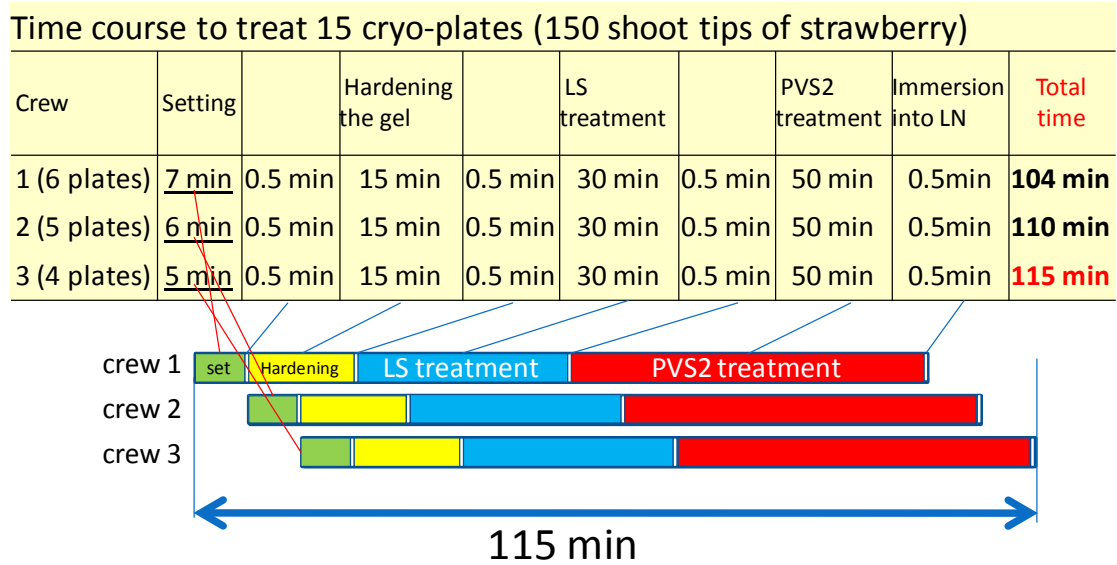


Figure 4-1. 15 枚のクライオプレートを扱う際の時間経過図

Figure 4-1. Schematic representation of time course to treat 15 cryo-plates using 150 strawberry shoot tips

考察

ガラス化法は PVS2 液などの高張液により材料を浸透脱水し、LN で急速冷却して液ごと材料をガラス化させて保存する方法である (Sakai *et al.* 1990)。この手法を使うことで細胞内に致命的な氷晶を形成させることなく細胞を生存させることができる。これまでガラス化法およびその応用形態であるドロップレット法やビーズガラス化法により多くの植物種で超低温保存が成功している (新野ら 2006)。

クライオプレート法もその基本原理はガラス化法に立脚しているが、本研究では再生育率を指標として、これら既存の手法とクライオプレート法の比較を行った。その結果はクライオプレート法による再生育率が他の方法よりも有意に高く、操作性も高かった (Table 4-1)。クライオプレート法での茎頂の冷却速度が 75°C/秒程度 (第 1 章) であるのに対し、ガラス化法およびビーズガラス化法ではクライオチューブ内で PVS2 液やアルギン酸ゲルとともに冷却されるため、LN に投入後、クライオチューブ壁を通して冷却される。茎頂の冷却速度は 1~2°C/秒 (Hirai 2011) とあまり早くない。このことから茎頂が冷却・加温される間に氷晶のできる確率が高くなり、再生育に影響していると考えられる。

ガラス化法およびドロップレット法においては、茎頂は処理液中に浮遊しており、液の交換時に損傷や亡失の可能性が高く、脱水過程においてはガラス化液の処理時間を正確にコントロールする必要があり、慎重かつ迅速な作業が必要である。また、ドロップレット法では LN 浸漬の直前に脱水した茎頂をアルミフォイルの短冊に移動する操作があり、これを手早く行うためには非常に熟練した技術が必要である。ドロップレット法での冷却速度が 91°C/秒 (Hirai 2011) と高いにもかかわらず今回の実験で再生育率が低かったのは、脱水により茎頂

組織が軟弱になり扱いにくくなっているため、移動中の損傷により再生育率が低くなった可能性が考えられる。さらに、ビーズガラス化法ではアルギン酸ゲルで茎頂を包んでしまうため、茎頂の操作中の損傷が少なく操作性がよいが、ビーズを介して脱水耐性付与および脱水処理を行うため多くの時間(5 時間)がかかった。また、加温後に脆くなり崩れるビーズがあり、扱いにくくなったり、なかには茎頂ごと破断して損傷したりしているものが散見された。これらに比べクライオプレート法は茎頂をアルギン酸ゲルで薄く包むとともにプレートに固着させており、ビーズガラス化法とドロップレット法の長所を併せ持ち、処理過程を効率的にしている点が特徴といえる。そのため、茎頂に直接触れるのはプレート上に固着する時のみに限ることができ、後の操作は容易で短時間に行えた。また、茎頂自体の損傷や亡失の可能性を大きく減少させることができるとともに処理時間の正確な管理が可能となり、高い再生育率につながったと考えられる。

超低温保存の結果は設備、操作技法の差、操作者の技術の差、培養システム等の差に依存している(Reed *et al.* 2004, Keller *et al.* 2008)。クライオプレート法は操作者の技術格差や技術上の困難さ等の問題を減少させることを目的として開発し、可能な限り煩雑な操作を少なくしている。本研究ではクライオプレートを採用することにより、実際に操作性が飛躍的に向上したため、茎頂の取付けの専門技術を短期間練習して習得すれば、茎頂操作に不慣れな習熟度の低い技術者によってもガラス化処理が容易に可能となり、高い再生育率を得ることができた(Table 4-2, 4-3)。茎頂を利用した超低温保存を行う場合、小さく傷みやすい茎頂を取り扱う高度な技術を教えなければならなかったため、その技術の継承や他機関への技術移転は手法の有用性の割には容易に進まなかったと考えられる。クライオプレート法では茎頂を切り出した後には茎頂に直

接接触するのが茎頂をプレートに固着させる時に限られ、その後はプレートを操作するため溶液処理や LN 浸漬および加温処理が容易である。また、加温処理後の培地への置床も薄いアルギン酸ゲルに包まれているため、超低温保存後の極めて軟弱な茎頂に直接触れることなく操作できる点が習熟度の低い技術者によっても高い再生育率が得られるポイントであったと考えられる。

第 2 章第 2 節のイチゴの最適手順を用いて、大量保存にかかる時間を計測したところ、前培養後の茎頂のプレートへの固着から LN 浸漬まで、150 個の茎頂を 15 枚のプレートに一度に取り付けることは困難であるが、3 つのグループに分けて、アルギン酸ゲルの固化を待つ時間を利用して、別のグループの茎頂をプレートに固着させる作業を行うよう工夫して、結果的に 2 時間以内で処理することができた。これにより 1 人の作業者により 1 日 2~3 品種の保存が可能でありジーンバンクでの事業としての大量保存を考えると、既存の手法よりも効率よく保存できることが実証された。

クライオプレート法を使って、実際に液相の LN タンクに長期保存するための手順は以下のようにマニュアル化している。①クライオプレート法で処理し、LN 浸漬した後、クライオプレートと LN が入ったクライオチューブに蓋をする (Figure 4-2A, B)。②蓋をしたクライオチューブをクライオケーンに付けたまま、デュワーびんに入れ、LN タンク室に運ぶ (Figure 4-2C)。③長期保存用 LN タンク用の長いクライオケーンにクライオチューブを収納して LN タンクのキャニスター内に保存する (Figure 4-2D, E)。④それぞれの品種について一つのクライオケーンを割り当て、100 個の茎頂 (クライオプレート 10 枚) を保存するとともに、生存モニター用のクライオプレートも必要に応じて LN 中に保存する (Figure 4-2F)。⑤LN タンク内は保存場所の位置情報が正確にわかるようにするとともに、収納された茎頂の情報、チューブ数、収納年月日、保存条件等のデータベース

化をする。

現在ミント 29 系統、イチゴ 30 品種を含む約 150 点の遺伝資源について、クライオプレート法により液相の LN タンク内での事業保存を開始している。

以上本章では、クライオプレート法が他の超低温保存法に比べ、効率的で高い再生育率を得られることが実証された。また、誰でも実施可能で技術継承が容易であり、大量保存に適していることが示された。

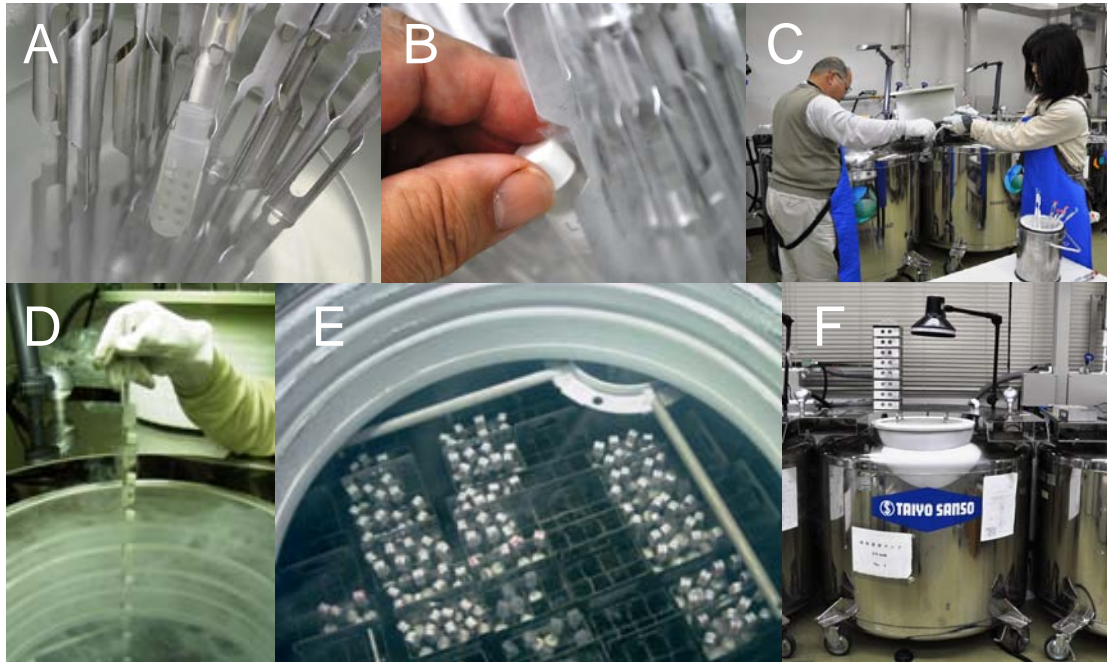


Figure 4-2. クライオプレート法による長期保存法

Figure 4-2. Long term storage procedure by V-Cryo-plate method
 A: Immersion of cryotube including treated cryo-plate into LN, B: Capping of cryotube with LN, C: After capping, cryotube with LN and a cryo-plate settled on a long cryo-cane, D: 10 cryotubes are held on a cryo-cane, E: Cryo-canes are stored into canisters (16 cryo-canes /canister), F: 450L LN tank (108 canisters/tank; Taiyo Nippon Sanso Co.).

第5章 総合考察

温暖化などグローバルな地球環境の変化や人口増加を起因とする過度の開発や利用をはじめとする種々の要因により生物の多様性は減少の一途をたどっており、生物資源が滅失の危機にさらされている(生物多様性条約事務局 2010)。なかんずく、人間の生活に直結する食料および農業に関する植物遺伝資源、すなわち作物遺伝資源も経済性の高い品種への置換、農業システムの変換、砂漠化や塩類集積などの農地の劣化など多くの要因によりその多様性が減少しており、遺伝的浸食がおきている (FAO 1996)。現在、急激な人口増加に伴う食料、環境、エネルギーなどの問題を解決するために、革新的な農作物の育種開発が急務とされているが、その素材は近縁野生種等を含む多様な遺伝資源である。育種素材さらにはライフサイエンスの研究基盤として作物遺伝資源の多様性を確保し続けるために、これら多様な遺伝資源の長期間、安定的かつ安全な保存が重要となっている。

植物遺伝資源の保存法は生息域内保存と生息域外保存の 2 種に大別される。前者は農家圃場での維持栽培や近縁野生種の自生地環境保全など現在取り組みが進められているものの、定まった手法はなく試行錯誤が続いている。後者では国際研究機関や各国の植物園、ジーンバンクなどで保存が図られており、現在総計で約 740 万点の遺伝資源が保存されている (FAO 2010)。植物遺伝資源の多くは穀物などのように低温乾燥状態で保存できる普通種子を形成するため、種子で保存する方法が確立されており、世界各国の保存施設で長期保存が進められている。ノルウェー北極圏に建設され 2008 年に運用が開始されたスヴァールバル世界種子貯蔵庫もこのような普通種子の永続的なバックアップ保存を目的として作られた(中川原 2008)。一方、低温もしくは乾燥に弱い難貯蔵性種子

を作る種や種子による増殖が適さない果樹やイモ類など栄養繁殖性の作物では、植物の栄養体そのものを保存しなければならない。このような作物は一般的に圃場で生体保存されているが、保存のための広大な土地や定期的な維持管理などのコストが高く、突発的な自然災害や病虫害による滅失の危険性があるなど問題点が多い。他の手段として組織培養によるインビトロでの生長抑制保存も可能であるが、この場合でも定期的な継代が必要であり、その管理費用は高く、雑菌汚染や体細胞変異、想定外の停電などの危険性があり、安全な長期保存には問題が多い。これらの代替え手段として、植物体の一部を -135°C 以下で保存する超低温保存が有望である。LN を用いて保存を行う場合にはLN タンク等の施設への初期投資は必要なものの、貯蔵スペースと維持管理は最低限で済み、細胞の生理活性が停止しているため遺伝的安定性が保たれるなどの利点がある。さらには、LN が失われない限りにおいて、停電などの突発的なアクシデントにも強いという点は東日本大震災を経験した現在では現実味のある非常に重要なメリットであると考えられる。

植物の超低温保存は Sakai (1956) によるクワの小枝を用いた LN 保存成功の報告以降、数多くの研究が行われ、1970 年代後半にはプログラムフリーザーを用いた緩速予備凍結法による温帯果樹の休眠芽や旺盛に生育する茎頂の超低温保存法などが開発された。さらに 1990 年代以降には高張な植物ガラス化液により浸透脱水を行うガラス化法を基礎とする手法やアルギン酸ゲルに包埋して乾燥脱水するビーズ乾燥法など茎頂の保存に適した保存法が開発され、超低温保存可能な種が著しく増加している (Reed 2008a)。しかしながら、ジーンバンクにおける大規模事業のための実践的な超低温保存の適用は未だに極めて限られている。これは大規模な試料の保存において、超低温保存の広範な利活用を妨げる問題点があるためだと考えられる。これらの問題点は、1) 茎頂を適切に扱う

ための高度な技術の必要性；2) 操作中の茎頂の損傷や亡失の可能性；3) 同時に多くの茎頂を扱う困難性；4) 急速冷却、急速加温の実現性などである。そのため、組織培養と超低温保存の高度化した標準的な技術が超低温貯蔵の信頼性を高めるために必要である。従って、より効率的かつシステムティックなガラス化手法を開発することとした。

本研究では第 1 章において最初に従来手法で問題となる茎頂の扱いを簡便に行えるよう、茎頂を乗せるためのプレートを開発した。素材としては熱伝導率の高い、純度の高いアルミニウム(99.5%以上)を利用した。クライオプレートは2 ml のクライオチューブに適合するよう厚さ 0.5 mm アルミニウム板の 7 mm × 37 mm の小片を用い、10 個の凹みをプレス加工で成形した。凹みは直径 1 mm と 1.5 mm のものを特注で作製したが、アルギン酸ゲルに包まれた茎頂の保持程度から直径 1.5 mm の凹み(深さ 0.75 mm)のプレートを採用し、以後の研究に用いた。パイロットケースとしてジョチュウギクの培養茎頂を用いて手法の開発を行った。ガラス化法の原理に基づく手法であるため、実験手順は以下のような各段階に分けて行った。組織培養の確立、前処理、茎頂の切り出し、前培養、クライオプレートへの固着、LS 液による脱水耐性付与、植物ガラス化液による脱水、LN への投入および保存、急速加温および再生育培地への植え付けである。超低温保存を成功に導くために、鍵となる要素は低温順化などの前処理、前培養、LS 液による脱水耐性付与、PVS 液処理による脱水、および加温後の操作である(Sakai *et al.* 2008)。予備試験および改変ガラス化法の試験から、低温順化処理および前培養の条件と脱水耐性付与処理には 1.4 M ショ糖を含む LS 液および脱水処理には PVS7M 液がそれぞれの処理に適していることが明らかになったため、クライオプレート法でも同様の前処理と前培養条件、さらに 1.4 M ショ糖を含む LS 液および PVS7M 液を用いて、ジョチュウギクのクライオプレート

法における最適条件が決定できた。また、この最適手順により、ジョチュウギク 6 系統の再生育率は平均で 76.7%と高く、他系統への適用も可能であることが示唆された。改変ガラス化法との比較から、クライオプレート法で非常に効率的かつ効果的に超低温保存を行えることが明らかとなった。

植物の超低温保存でよく用いられる保存法はガラス化法であり、ここにはドロップレット法やビーズガラス化法も含まれる。この手法は、PVS2 液のような高張液で材料を強制的に脱水し、その後、液とともに急速冷却することで材料と液を完全にガラス化させる方法で、完全ガラス化(perfect vitrification)法と呼ばれている。この手法を使うことで細胞内に致命的な氷晶を形成させることなく細胞を生存させることができる。事実、これまでに 100 種以上の植物でこの方法による超低温保存が成功している(新野ら 2006)。しかし、一般的なガラス化法においては、微小な茎頂は処理液中に浮遊しており、ピペットによる液の交換にあたり損傷や亡失の可能性が高かった。また、脱水過程においてガラス化液の処理時間を正確にコントロールしなければならなかった。さらに、ドロップレット法では LN 浸漬の直前に脱水した茎頂をアルミフォイルの短冊上のガラス化液の液滴に移動する必要がある(Kim *et al.* 2009)。この繁雑な作業を手早く行うためには非常に熟練した技術が必要とされていた。

今回用いたクライオプレート法はビーズガラス化法とドロップレット法の長所を取り入れるとともに処理過程をより効率的にした点に特徴がある。すなわち、柔弱な茎頂をアルギン酸ゲルで包むとともに硬いアルミニウムプレートに固着させる方法を採用している。これにより、脱水耐性付与、脱水、LN 中への投入、加温の処理操作はプレートを移動することによって行うことができる。このため、茎頂自体の損傷や亡失の可能性を大きく減少させることができた。このアルミニウムプレートを用いることで、茎頂に直接触れるのはプレート上

に固着する時のみに限ることができた。したがって、その後の操作は容易で短時間に行うことができ、処理時間の正確な管理が可能となった。

栄養繁殖性作物と一括りにしても、その内容は草本性のイモ類、木本性の果樹など、多種多様である。そのため、開発された手法が様々な植物種に広く適用できることを提示する必要がある。そこで、第 2 章ではミント、イチゴ、熱帯産クワおよびバレイショを供試材料としてクライオプレート法の応用を試みた。

ガラス化法では前処理、前培養、脱水耐性付与、PVS2 液による脱水、加温後の操作などの手順が重要なポイントとなる。超低温保存される茎頂は十分な脱水耐性を得るため、生理学的に最適な状態である必要がある。すなわち、再生育時に旺盛な生育の回復を生み出すためには均一で健全な材料の準備が不可欠である。そのため、実験に用いる均一で健全な茎頂を得るための茎頂の前処理が重要である。低温順化处理は多くの植物種では有効に働くが、本研究で用いたミントでは低温順化は特に必要なく、側芽を含むシュートを 1~2 週間培養した茎頂を材料とした。クワ、バレイショにおいても同様に低温順化は必要がなかった。次に、高濃度のショ糖を添加した MS 培地での前培養と脱水耐性付与処理が PVS2 液に対する浸透脱水耐性の誘導に有効である (Niino *et al.* 2003; Niino *et al.* 2007)。イチゴにおいては 0.3 M ショ糖に 2 M グリセロールを添加した MS 培地、ジョチュウギクでは 0.5 M ショ糖添加 MS 培地、その他ミント、クワ、バレイショでは 0.3 M ショ糖添加 MS 培地による前培養が有効であった。

バレイショのビーズガラス化法による超低温保存では 0.6 M の LS 液が PVS2 液に対する脱水耐性の増大に有効であることが示されている (Hirai and Sakai 1999)。また、カンショではより高いショ糖濃度 (1.6 M) の LS 液とより長時間 (25℃、3 時間) の処理の両方が、脱水耐性増大に必要であった (Hirai and Sakai

2003)。Kim ら(2009b)はドロップレット法の新しいLS液を開発する中で、脱水耐性付与処理は強制的な脱水処理とガラス化現象を前にして浸透圧の緩和剤として、また組織や細胞の生理的適応を誘発する可能性を示している。また、植物ガラス化液のDMSO等の化学物質毒性に敏感である植物種には、その毒性を軽減するために適切なLS液を選択すべきであると指摘している。ミントの場合、0.8 Mもしくは1.2 Mショ糖を含むLS液の30分間の処理で再生育率を効果的にあげることができた。超低温保存を成功させるために最も重要な要因は、慎重に制御しながらPVS2液による脱水処理を行うことと、処理中の化学毒性や過剰な浸透圧ストレスによる傷害を防止することである。クライオプレート法では、この処置をほかの手法よりも非常に容易に制御することが可能である。ミントの場合では、PVS2液への最適処理時間は20～30分と広い範囲を示した。アロニアの茎頂にドロップレット法を適用した場合にも同様の例が見られた(Tanaka *et al.* 2011)ことから、クライオプレート法では冷却および加温速度がドロップレット法と同じ水準であると考えられる。実際に第1章で計測されたプレート上の試料の冷却および加温速度はそれぞれ79.5°C/秒および75.4°C/秒であった。

ジーンバンクや植物園などの保存機関において標準的なプロトコルとして利用されるためには、クライオプレート法を新規の植物種に適用する際の実用的なガイドラインがあることが望ましい。第2章までに供試した植物種それぞれの最適処理条件は作物特異的ではあるが、他のガラス化手法と同様、前処理、前培養、脱水耐性付与処理、および脱水処理が最も重要な条件であった(Table 3-1)。そのため、第3章では上記の結果をふまえ、新たな種に適用する際の標準化プロトコルを以下のように提案した。

- 1) 低温順化せずにシュートから茎頂を摘出する。

- 2) 茎頂を 5°C もしくは 25°C で 1 日、0.3 M ショ糖を添加した MS 培地上で前培養する。
- 3) 茎頂を 0.8 M のショ糖および 2.0 M グリセロールを含む LS 液中で 25°C、30 分間脱水耐性付与処理を行う。
- 4) 茎頂を PVS2 液により 25°C で 20~50 分間処理して脱水する。

この方法により、茎頂の再生育率を LN 処理の有無と合わせて調べることにより、大まかに生存する条件が明らかになる。もし生存が認められない場合、さらに以下の順序で調査する。

- 1) 低温処理したシュートを使い、低温順化期間を決定する。
- 2) 前培養の期間もしくは、前培養培地のショ糖濃度を検討する。

もし生存する茎頂がある場合、PVS2 への処理時間、LS のショ糖濃度と浸漬時間および前培養条件を最適化する (Figure 3-1)。

本研究では、それぞれの作物種における最適条件の下で、再生育率の平均は、ミント 16 品種での 88%、イチゴでは 15 品種で 81%、熱帯クワでは 12 系統で 87%、バレイショに至っては 12 品種で 99% とほぼすべての茎頂が再生育する驚異的な結果が得られた (Table 3-1)。ジョチュウギク 6 系統での 77% と合わせ、この標準化されたガイドラインに基づくことによりさらに広範な作物種でクライオプレート法が適用可能であることを示唆している。実際、花卉作物であるカーネーションでもクライオプレート法により 4 品種で平均 95% と極めて高い再生育率が得られている (Sekizawa *et al.* 2011)。これにより農業生物遺伝バンク事業で保存されている栄養繁殖性作物遺伝資源のうち、ジョチュウギク、ミント、イチゴ、熱帯産クワ、バレイショおよびカーネーション合わせて 3,300 点の事業保存化の基礎が整えられたといえる。

今後、作物遺伝資源における応用にとどまらず、種子を形成できない実験植

物や植物培養細胞の保存、絶滅危惧植物の保全、クライオセラピーによるウイルスフリー化への応用、さらには藻類や植物以外の生殖質保存への応用が期待される。例えばカルスや懸濁培養細胞などの植物培養細胞は通常、一定期間毎に定期的な植え替え作業を繰り返す継代培養法で培養しながら維持保存されている。しかし、この方法での保存は植物体への再分化能や物質生産能の低下、細胞自体の変化が起こることが知られている。一方、植物細胞や組織を -135°C 以下に長期保存しても遺伝的变化がほとんど起きないことも明らかにされつつあり、クライオプレート法により超低温保存が進むことが望まれる。

第4章の4名の作業者による結果の比較からミントおよび熱帯クワの再生育の差を検討した試験では、組織培養の経験はあるがクライオプレート法を全く行ったことのない作業者に、茎頂の摘出から超低温保存した茎頂の培地への置床までの手順を行わせた。その結果はミントで83~97%、熱帯クワで93~100%と、いずれも高い再生育率を示した。また操作者による有意な差は見られなかった (Table 4-2, 4-3)。このことは、クライオプレート法が操作者の技術や技術上の困難さなどの問題を軽減することを目的として開発したため、茎頂の取付けの専門技術を短期間練習して習得すれば、茎頂操作に不慣れな習熟度の低い技術者によっても実施することができ、技術移転が容易に進められる可能性を示唆している。

また、農業生物ジーンバンク事業ではクライオプレート法を用いて実践的な超低温貯蔵が進められており、2011年4月から現時点ですでに液相のLNタンク内に約150点の遺伝資源が貯蔵されている。この試みではクライオプレート法は体系的にかつ時間節約的に実施されている。第4章のイチゴの例で示したように15枚のプレート、つまり、150個の茎頂についてクライオプレートへの取付けからLN保存までの過程に必要な時間は約2時間以内に処理することがで

き、より効率的な遺伝資源の超低温保存が可能となった (Figure 4-1)。この手法はジーンバンクにおける大規模超低温バンクの設立促進に非常に有望であると考えられる。

超低温保存された茎頂が長期保存期間中に活性を維持していることは非常に重要である。今回の実験では茎頂を LN 中に少なくとも 30 分以上保持した。本研究ではこのように実験的に短時間保存した茎頂を再生育させているが、一度ガラス状態にして保存してしまえば、LN 中の -196°C で安全に維持されている場合は大きな生存率の低下は起こらないと推察される。LN 中で3~5年程度、長期間保存した場合でも、短時間のモデル実験と同様の再生育が得られている (Niino *et al.* 2000)。予備凍結法により -160°C で貯蔵されたクワの休眠芽(冬芽)では、約12年経過後でも生存率98%と高いことが示されている (Fukui *et al.* 2011)。また、ワサビ茎頂の -150°C での保存においても保存直後、2年目および10年目の生存率には顕著な差が認められていない (Matsumoto *et al.* in press)。

また、超低温で長期保存する場合、元の性質を保ったまま安定的に保存することが求められる。保存中の細胞の代謝や生理活性は停止するため、遺伝的な変異の発生は起こらないものと考えられている。しかしながら、初期の緩速凍結法で茎頂を保存した場合、再生育後に体細胞変異の発生が見られたことがあった (Haskins and Kartha 1980)。これは部分ガラス化により頂端分裂組織の細胞全体ではなく一部細胞が生存してカルス化してから生育が始まったため変異が起こったものと考えられる。ガラス化法などにより急速冷却して均一にガラス化が起こる場合は、加温後の再生育時にカルス形成を経ることなく頂端分裂組織が全体的にそのまま生長するため、変異が起きにくいとされている (松本 1999)。平井(2001)はビーズガラス化法により超低温保存したバレイショ、イチゴは未処理区のものと同様に生育や外観に明らかな差は認められず、RAPD 分析におい

ても調査の範囲内で DNA 上の変化が認められなかったことを報告している。また、10 年間超低温保存したワサビ培養茎頂の再生育後の RAPD 分析においても、調査範囲内で変異が認められなかった (Matsumoto *et al.* in press)。

農業生物資源ジーンバンク事業では圃場コレクションは原則的に二重保存体制をとって維持している。しかし、例外も存在しており、クワ、イグサ、サトイモなどのように一つのサブバンクで維持されているものがある。超低温保存は圃場保存のバックアップとして滅失に対する保険と考えるべきである (Reed 2001)。このため、我々は超低温保存すべきコレクションの優先順位を、コレクションから失われる可能性が増大している「リスクの高い」作物種に与えるべきであると考えている。同時に、保存にあたっては貯蔵プロトコル(材料の形態を含む)、長期モニタリングシステムおよびデータベースの確立等を行い、超低温保存される作物のために最も実践的な手段を採用する必要があると考えられる。

超低温保存のコストに関しては、Hummer and Reed (2000)は、コーバリスレポジトリにおける温帯果樹遺伝資源 1 点あたりの年間の維持コストは、圃場では 77 米ドル、インビトロの生長抑制貯蔵では 23 米ドル、超低温保存では最初の保存開始コストとして 1 点あたり 50~65 米ドルが加わるが年間では 1 米ドルと概算している。LN の価格や LN タンクおよび他の設備は国により異なるが、間違いなく長期間の超低温保存下での管理コストは限りなくゼロに近い。

植物材料の低温生物学研究のめざましい進展や技術開発が直近 20 年間で行われたにもかかわらず、植物遺伝資源の保存法としての超低温保存は微生物や動物培養細胞のコレクションに比べて、未だに限られたものとなっている。植物材料のための超低温保存法は、ほとんどが経験的な、試行錯誤のアプローチにより開発されてきた。たとえ秀逸なプロトコルが確立しても、種や品種、組織

形態が異なれば、違った反応を示す傾向があるため、すべての材料に採用することはできない。

遺伝資源保全の目的で、超低温保存の大規模な利用ができる広汎に適用可能なプロトコルをさらに改良するためには、超低温保存への植物組織の耐性或感受性の根底をなす生物物理や代謝プロセスを理解するための基礎研究が必要である。特に超低温および脱水耐性の理解と脱水耐性の誘導への前処理についての基礎研究が熱帯植物の超低温保存の将来的な開発のためには不可欠である。今後の研究では 1)超低温保存される材料の遺伝的完全性についての研究、および 2)超低温保存研究があまり進んでいない難貯蔵性種子を産生する種や熱帯植物のための技術開発もまた必要だと考えられる。

今回開発したクライオプレート法は以下の利点があると結論できる。

1. 操作は茎頂を付着させたクライオプレートを動かすだけで実行できるため手順内での茎頂の扱いは非常に簡便で迅速である。
2. 茎頂の損傷や脱落の可能性が他の手法よりも非常に低い。
3. 脆弱な茎頂をクライオチューブ内で浮遊させたり、内壁に付着させたりすることなく LS 液や PVS 液で処理できる。
4. 冷却と加温の過程が LN や 1.0 M ショ糖液にクライオプレートを浸すだけで非常に簡単に行うことができる。
5. クライオプレート法により高い再生育率が得られる可能性が高い。
6. この手法は他の手法よりも遙かに容易である。
7. 茎頂の取り付けを少し訓練することにより、誰でもこの手法を行うことができる。

これらの利点から、クライオプレート法はジョチュウギク、ミント、イチゴ、クワ、バレイショなどの作物遺伝資源の非常に実践的な超低温保存法であると

結論できる。また、クライオプレート法は他種植物の超低温保存にも少しの改良で適用可能だと考えられる。特にミント、クワ、バレイショで見られたように低温順化が必要なく、高い再生育が認められたこと、急速冷却・加温を可能にしたことから、今後熱帯性植物への適用が充分可能であると考えられる。以上のことから、クライオプレート法が今後の我が国のジーンバンク事業において超低温保存を促進するために大きな貢献をすると結論できる。さらに、世界各国の超低温ジーンバンクの設立の進捗に貢献することを確信している。

摘要

植物、微生物、動物細胞など生物遺伝資源を長期間、安定的に安全に保存することは、ライフサイエンスの学術研究基盤を支える生物多様性を維持する上で非常に重要である。微生物および動物細胞では超低温での保存が一般的であるが、植物の場合多くの種で種子による保存が行われており、野生種ではミレニアムシードバンク、食料農業遺伝資源である作物では世界各国のジーンバンクで保存が進められている。しかし、植物の中には種子による保存が困難もしくは不適切なものがあり、その一例として、無性的に栄養体を増殖して利用するイモ類、果樹などの栄養繁殖性作物があげられる。その遺伝資源は通常圃場栽培で維持される。そのため、保存用の圃場や栽培管理の手間など維持管理コストが高く、天候災害や病虫害による滅失のリスクに常にさらされているなど、長期間にわたる保存には問題点がある。組織培養による容器内の保存も可能であるが、この場合も継代の手間やコスト、長期培養での体細胞変異の発生の可能性など長期保存には問題がある。一方、茎頂など植物体の一部を -135°C 以下の超低温で保存する手法は維持管理の容易さや遺伝的安定性が保たれることなどから、低コストで安定的に保存が可能な長期保存に適する方法であり、現在まで多くの研究が行われている。しかしながら、日本も含め各国ジーンバンクでの実際の利用はあまり進んでいない。その理由の一つとして、開発されてきた方法は実験室レベルでの手法で、大規模に超低温保存を行う事業保存に適していなかった点があげられる。本研究では超低温保存を事業レベルで行うため、迅速かつ簡便に実施できる標準的な手法の確立を目指して、アルミニウム製のプレートを用いた新規の超低温保存法を開発するとともに、その適用作物種の拡大を図るためにその応用と標準化とを試み、長期保存への利用を検証した。

1. アルミニウム製クライオプレートを用いた超低温保存法の開発

超低温保存用のアルミニウムの小片を考案してクライオプレートと新称し、これを用いた超低温保存法の開発を行った。クライオプレートは、この上に茎頂を固着させ脱水処理等の溶液処理を簡便にするため、および急速冷却・加温を可能にするために考案した。クライオプレートは凹みの直径の異なる 2 種類を作成し、固着作業、処理時の茎頂の脱落等を考慮し、作業のしやすいものを選択した。ジョチュウギクの培養茎頂を用いて処理条件を検討し最終的に開発した超低温保存法は以下の通りである。茎頂は 0.5 M ショ糖を添加した MS 培地上で 5°C、20-40 日間低温順化した。茎頂とその基部を含む茎頂部を培養シュートより切り出し、0.5 M ショ糖を含む MS 培地上で、5°C で 2 日間前培養した。前培養した茎頂部は 10 穴の凹み(直径 1.5 mm、深さ 0.75 mm)を持つクライオプレート(7 mm × 37 mm × 0.5 mm)に置き、アルギン酸ゲルで埋め込んだ。脱水耐性付与は茎頂を固着したクライオプレートを 1.4 M ショ糖を含むローディング液(LS 液)に 30 分間浸漬して行った。脱水は植物ガラス化液の PVS 7M 液に移し替え、40 分間浸漬して行った。液体窒素(LN)で急速凍結した後、クライオプレートに固着した茎頂を 1 M ショ糖溶液に投入して加温し再生育させた。この方法を用いて系統「28v-75」の超低温保存した茎頂の再生育率は 77%に達した。このプロトコルはジョチュウギクの他の 6 系統にも適用でき、65~90%と高い再生育率を得た。以上の結果から新規の超低温保存法は操作性に優れ、急速冷却・加温が可能などの利点があり、事業用途で実用的に利用可能と考えられ、クライオプレート法と命名した。

2. クライオプレート法その他植物への応用

前章において開発したクライオプレート法の応用可能性を検討するために、ミント、イチゴ、熱帯産クワ、バレイショの培養茎頂を用いて、手法の適用可否および、最適処理条件の検討を行った。

1) ミント

香料作物の代表例として、超低温保存の比較的容易なミント培養茎頂を用いて各手順の最適処理条件の検討を行い、以下の手法を確立した。①最終継代後 25°Cで7~14日間培養したシュートから茎頂部を摘出し、25°Cで1日前培養した。②前培養した茎頂をクライオプレートに置き、アルギン酸ゲルに埋め込んだ。③脱水耐性付与として茎頂を固着したプレートを0.8 M ショ糖を含むLS (0.8 M LS) 液に25°Cで30分間浸漬した。④脱水処理は同プレートを植物ガラス化液であるPVS2液に25°Cで20分間浸漬した。⑤その後、同プレートをクライオチューブに移動し、蓋はせず直接LN中に投入し保存した。⑥再生育時にはLN中から、同プレートを取り出し、室温で1 M ショ糖溶液に浸して行き、茎頂を培地に置床し培養した。この方法を用いたところ、系統「福山自生」の超低温保存した茎頂の再生育率は90%以上に達した。この最適化した条件は他の16点のミントにも適用でき、73~100%と高い再生育率を達成した。

2) イチゴ

果菜類における実施例確立のため、イチゴを用いてクライオプレート法の適用を検討した。低温処理後に摘出したイチゴ培養茎頂を試料として、PVS2液による脱水処理時間および前培養期間と再生育の関係を検討するとともに、脱水耐性付与処理におけるLS液のショ糖濃度と処理時間の再生育への影響について検討した。その結果最適条件は、前培養が5°Cで2日間、脱水耐性付与処理は0.8 M LS液に25°Cで30分間、また脱水処理はPVS2液に25°Cで50分間となった。得られた最適条件を利用して15点のイチゴ遺伝資源のLN保存後の再生育

を検討した結果、再生育率は70～97%で平均81%であった。

3) 熱帯産クワ

木本植物における代表例として、熱帯・亜熱帯原産のクワについてクライオプレート法の手順の最適化を検討した。工程中で最も再生育に影響を与える脱水処理における PVS2 液への浸漬時間と脱水耐性付与処理での LS 液ショ糖濃度の再生育への影響を調査した。系統「奄美 07」から剖出し前培養した培養茎頂を用いた結果では、脱水耐性付与処理は 0.6 M LS 液に 25℃で 30 分間浸漬して行い、PVS2 液で 25℃、50 分間脱水処理することで、LN 保存後の培養により 100% 近い再生育率が得られ、最適条件とした。この条件を利用して 12 点のクワ遺伝資源の超低温保存後の再生育を調査した結果、再生育率は 73～97%で平均 87% であった。

4) バレイショ

根茎性作物での実施例確立のため、全世界で最も重要なイモ類であるバレイショについてクライオプレート法の適用を検討した。低温処理を行わなくても 0.3 M ショ糖を加えた MS 培地で 25℃、1 日前培養することで良好な結果が得られたため、茎頂の大きさ、LS 液のショ糖濃度と PVS2 処理時間を検討し、1.5 mm で茎頂を切り出し、0.8 M LS 液中で 30 分、PVS2 液で 30 分処理する条件を最適条件とした。この最適条件により 12 点のバレイショ遺伝資源の超低温保存後の再生育を検討した結果、再生育率は 93～100%で平均 99%であった。

以上の結果から、クライオプレート法は、前培養、脱水耐性付与処理、脱水処理を中心とした条件を最適化することにより高い再生育率が得られ、広範な作物種に適用できることが実証された。

3. クライオプレート法の標準化プロトコル

前章までに各作物種での手法を最適化するためには低温処理の有無、前培養条件の設定、LS液のショ糖濃度と処理時間、PVS2液の処理時間を決定する必要があることを述べた。そこで、新規に他種植物へ応用するためのガイドラインとなる標準化プロトコルを以下のように提案した。上記のパラメーターを固定した予備実験を行い、LN保存後の生存がない場合は低温順化を行い、その期間を決めるとともに前培養条件を検討し、再生育が得られる条件を決定する。LN保存後の生存が見られた場合には、脱水処理および脱水耐性付与処理の最適条件を検討する。これにより、効率的な最適条件の決定が可能になると期待される。

4. クライオプレート法の事業保存の可能性

クライオプレート法が多くの作物種に適用可能であり、標準化できることが示されたため、長期保存事業への組込の検討を行った。クライオプレートにより習熟度の低い技術者によっても容易にガラス化処理が可能となることが確かめられた。さらに、長期保存のための設備、器具等を検討し、長期保存作業が容易に簡単にできる体制を構築した。クライオプレート法は他の手法に比べ様々な面で長所が見られた。特に再生育率については他の手法に比べ高く、この理由としては急速冷却・加温が可能なが考えられた。一方、クライオプレートを用いることにより、1回の操作で多くの茎頂が処理でき、かつLS液およびPVS2液の溶液処理における操作が容易になり、操作中に茎頂が受ける損傷が軽減され高い再生育率を得ることができた。以上の結果から、クライオプレート法は、ジーンバンク等における遺伝資源の標準的な超低温保存プロトコルとして実用的に利用可能であると考えられた。

以上を要するに、本研究では栄養繁殖性作物の培養茎頂を簡便かつ大規模に超低温保存できる保存法を開発した。すなわち、茎頂を固着させることができるアルミニウム製のクライオプレートを考案して新規の超低温保存法を開発し、クライオプレート法と命名した。また、ミント、イチゴ、熱帯産クワおよびバレイショ等を材料として手法の適用を検討した結果、各々の手順の最適条件を得て実際非常に高い再生育率を得ることができた。従来法と比べ再生育率が高く、操作性に優れ、急速冷却・加温が可能であることを明らかにし、標準的なプロトコルを示した。さらにクライオプレート法による長期保存法の実践に向け、マニュアル化を行った。以上のように、今回開発したクライオプレート法がジーンバンク等における事業保存に十分利用可能であることを証明し、事業化を開始した。

謝辞

本論文の作成に当たり終始懇篤なるご教示とご校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科教授・難波成任博士に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文のご校閲の労をおとりいただき、ご助言を賜りました同研究科教授・柴田道夫博士、同研究科特任准教授・大島研郎博士ならびに同研究科特任准教授・山次康幸博士に心より厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり終始懇切なるご指導を賜るとともに、本論文の作成に当たり多大なるご教示を賜りました農業生物資源研究所・保存情報研究ユニット上級研究員・新野孝男博士に対し、衷心より厚く御礼申し上げます。

研究の推進と取り纏めに十分なご理解とご支援を賜りました農業生物資源研究所・遺伝資源センター長・河瀬眞琴博士に謹んで感謝の意を表します。

島根大学生物資源科学部准教授・松本敏一博士、パキスタン国立農業研究センター科学技官・Tariq Rafique 博士ならびに農業生物資源研究所保存情報研究ユニット主任研究員・福井邦明博士には多くの有益なご助言を頂きました。ここに心より感謝の意を表します。

また、実験にご協力いただいた種苗管理センター・関沢健太郎氏ならびに農業生物資源研究所・小山朗夫博士、市橋隆壽氏、西内明子氏、野原尚子氏、石倉教子氏、岸本奈津美氏に心からの感謝の意を表します。

なお、本研究の遂行に当たり多くの方々からご協力と御激励をいただきました。ここに感謝の意を表します。

引用文献

- Bajaj, Y.P.S. (1977) Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at -196°C . *Crop Improv.*, 4: 48-53.
- Burke, M.J. (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In A.C. Leopold, ed. *Membrane, metabolism and dry organisms*, Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, pp.358-364.
- Dereuddre, J., Fabre, J. and Bassaglia, C. (1988) Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus cryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different-aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Rep.*, 7: 170-173.
- Fabre, J. and Dereuddre, J. (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters*, 11: 423-426.
- Fahy, G.M., MacFarelane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T. (1984) Vitrification as an approach to Cryopreservation. *Cryobiol.*, 21: 407-426.
- FAO (1997) *The State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, FAO-UN, Rome, Italy, p.511.
- FAO (2010) *The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, FAO-UN, Rome, Italy, p.370.
- FAOSTAT (2010) Available at:
<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Accessed on 25 Sep. 2012. [World total production of Potatoes was 324,420,782t.]

- Fukui, K., Shirata, K., Kashif, I.M. and Niino, T. (2011) Cryopreservation of mulberry winter buds in Japan. *Acta Hort. (ISHS)*, 908: 483-488.
- Golmirzaie, A.M. and Panta, A. (1997) Advances in potato cryopreservation by vitrification. *CIP Program Report*. pp.71-76.
- Grout, B.W.W. and Henshaw, G.G. (1978) Freeze preservation of potato shoot-tip cultures. *Ann Bot.*, 42: 1227-1229.
- Halmagyi, A., Deliu, C. and Coste, A. (2005) Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method. *CryoLetters*, 26: 313-322.
- Haskins, R. H. and Kartha, K. K. (1980) Freeze preservation of pea meristems : Cell survival. *Can. J. Bot.*, 58: 833-840.
- 平井 泰 (2001) 栄養繁殖性作物のビーズガラス化法による超低温保存に関する研究. 北海道立農業試験場報告, 99: p.1-58.
- Hirai, D. (2011) Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm. *CryoLetters*, 32: 287-296.
- Hirai, D. and Sakai, A. (1999a) Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. *Plant Cell Rep.*, 19: 150-155.
- Hirai, D. and Sakai, A. (1999b) Cryopreservation of in vitro grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Res.*, 42: 153-160.
- Hirai, D. and Sakai, A. (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep.*, 21: 961-966.

- Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S. and Sakai, A. (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, 101: 109-115.
- Hitmi, A., Barthomeuf, C. and Sallanon, H. (1999) Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. *CryoLetters*, 20: 109-120.
- Hummer, K.E. and Reed, B.M. (2000) Establishment and operation of a temperate clonal field genebank. In F. Engelmann, ed. *Management of field and in vitro germplasm collections*. IPGRI, Rome, pp.29-31.
- 池橋 宏 (2000) 訂正追補 植物の育種と遺伝, 養賢堂, p.278.
- Kaczmarczyk, A., Rokka, V.M. and Keller E.R.J. (2011) Potato shoot tip cryopreservation. A Review. *Potato Res*, 54: 45-79.
- Kartha, K.K., Leung, N.L. and Pahl, K. (1980) Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 105: 481-484.
- Karen, L.C. and Kartha, K.K. (2009) Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years. *CryoLetters*, 30: 41-46.
- Keller, E.R.J., Kaczmarczyk, A. and Senula, A. (2008) Cryopreservation for genebanks - a matter between high expectations and cautious reservation. *CryoLetters*, 29: 53-62.
- 木島正夫 (1989) ハッカ属. 園芸植物大辞典 第3巻, 小学館, p.577-580.
- Kim, H.H., Yoon, J.W., Pak, S.U., Lee, S.C., Baek, H.J., Cho, E.G. and Engelmann F. (2009a) Development of alternative loading solutions in

- droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30: 291-299.
- Kim, H.H., Yoon, J.W., Shin, D.J., Ko, H.C., Gwag, J.G., Cho, E.G. and Engelmann F. (2009b) Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30: 320-334.
- 国立天文台(編) (2010) 理科年表 平成 23 年, 丸善, p. 411.
- 松本敏一 (1999) ワサビ培養茎頂の超低温保存に関する研究. 島根農試研報, 32: 1-34.
- Matsumoto, T., Akihiro, T., Maki, S., Mochida, K., Kitagawa, M., Tanaka, D., Yamamoto, S. and Niino, T. (2012) Genetic stability assessment of long-term cryopreservation of plant by morphological, biochemical and molecular analysis *CryoLetters*, (in press).
- 御前明良 (2004) 除虫菊の栽培史と蚊取線香 その2. 経済理論, 319: 47-61.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- 中川原捷洋 (2008) 「スパールバル国際種子保管庫」がオープン, 研究ジャーナル, 31: 54.
- Navatel, J. and Capron, M. (1997) Cryopreservation of alginate-coated strawberry axillary buds. *Acta Hort.*, 439: 659-662.
- 新野孝男 (1990) クワ培養茎頂の液体窒素保存. 日蚕雑, 59: 135-142.
- Niino, T. (2000) Cryopreservation of deciduous fruits and mulberry trees. In M.K. Razdan and E.C. Cocking eds. *Conservation of plant genetic resources in vitro Vol. 2 Applications and limitations*, Science Publishers, Enfield, pp.195-223.

- Niino, T., Seguel, I. and Murayama, T. (2000) Cryopreservation of vegetatively propagated species (mainly mulberry). *In* F. Engelmann and H. Takagi eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm*, JIRCAS (Japan) and IPGRI (Italy), pp.194-199.
- Niino, T. (2006) Developments in plant genetic resources cryopreservation technologies. *In* J.H. Kang ed. *Effective Genebank Management in APEC Member Economies*. NIAB, Korea, pp.197-217.
- 新野孝男, 岡成美 (1990) 培養したクワ茎頂からの液体窒素保存後の植物体再生. 日蚕雑, 59: 111-117.
- Niino, T. and Sakai, A. (1992) Cryopreservation of alginate coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci.*, 87: 199-206.
- 新野孝男, 八鍬春美, 野尻邦雄, 酒井昭 (1991) クワ冬芽の改良液体窒素保存方法. 日蚕雑, 60: 394-399.
- 新野孝男, 平井泰, 松本敏一, 田中大介(編) (2006) 植物超低温保存マニュアル, 農業生物資源研究所, つくば, p.208.
- Niino, T., Sakai, A., Enomoto, S., Magosi, J. and Kato, S. (1992) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *CryoLetters*, 13: 303-312.
- Niino, T., Tanaka, D., Tantely, R.R., Fukui, K. and Shirata, K. (2007) Cryopreservation of basal stem buds of *in vitro*-grown mat rush (*Juncus* spp.) by vitrification. *CryoLetters*, 28: 197-206.
- Niino, T., Tanaka, D., Ichikawa, S., Takano, J., Ivette, S., Shirata, K. and Uemura, M. (2003) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical shoot

- tips of strawberry by vitrification. *Plant Biotech.*, 20: 75–80.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y. and Matsuzawa, T. (1992) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *CryoLetters*, 13: 379–388.
- 農林水産省 (2011) 平成 21 年産 野菜生産出荷統計, 農林統計協会, p. 18.
- 大川雅央, 新野 孝男, 白田 和人, 長峰司 (2010) 食料農業植物遺伝資源条約の標準材料移転契約における金銭的利益配分に関する考察. 熱帯農業研究, 3: 70–78.
- Panis, B., Piette, B. and Swennen, R. (2005) *Plant Science*, 168: 45–55.
- Pinker, I., Halmagyi, A. and Olbricht, K. (2009) Effects of sucrose preculture on cryopreservation by droplet-vitrification of strawberry cultivars and morphological stability of cryopreserved plants. *CryoLetters*, 30: 202–211.
- Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. and Larinde, M. (2006) *Manual of Seed Handling in Genebank*. Bioversity International, Rome.
- Reed, B.M. (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters*, 22: 97–104.
- Reed, B.M. (2008a) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer LLC, New York, p. 513.
- Reed, B.M. (2008b) Cryopreservation – practical considerations. In B.M. Reed, ed. *Plant Cryopreservation, A Practical Guide*, Springer LLC, New York, pp. 3–14.

- Reed, B.M. and Hummer, K. (1995) Conservation of germplasm of strawberry (*Fragaria* species). In Y.P.S. Bajaj, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Cryopreservation of Plant Germplasm I*. Springer-Verlag, Berlin, pp.323-343.
- Reed, B.M., Kovalchuk, I., Kushnarenko, S., Meier-Dinkel, A., Schoenweiss, K., Pluta, S., Straczynska, K. and Benson, E.E. (2004) Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. *CryoLetters*, 25: 341-352.
- Sakai, A. 1956. Survival of plant tissue at superlow temperatures. *Low Temp. Sci. Ser. B*, 14: 17-23.
- Sakai, A. 1995. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In Y.P.S. Bajaj, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 32, cryopreservation of plant germplasm I*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.53-69.
- Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9: 30-33.
- Sakai, A., Hirai, D. and Niino, T. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In B.M. Reed, ed. *Plant Cryopreservation, A practical guide*, Springer LLC, New York, NY, pp.33-58.
- Schäfer-Menuhr, A., Schumacher, H.M. and Mix-Wagner, G. (1994) Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der

- Meristeme in flüssigem Stickstoff. *Landbauforsch Völkenrode*, 44: 301-313.
- 生物多様性条約事務局(編) (2010) 地球規模生物多様性概況第 3 版(GB03), 環境省, p. 94.
- Sekizawa, K., Yamamoto, S., Rafique, T., Fukui, K. and Niino, T. (2011) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminum cryo-plates. *Plant Biotechnol.*, 28: 401-405.
- Senula, A., Keller, J., Sanduijav, T. and Yohannes, T. (2007) Cryopreservation of cold-acclimated mint (*Mentha* spp.) shoot tips using a simple vitrification protocol. *CryoLetters*, 28: 1-12.
- 白田和人 (2009) 生物資源をめぐる国際情勢の変化に対応した作物遺伝資源の保全技術の改良とジーンバンク活動の改善に関する研究. *農業生物資源研究所研究資料第 8 号*, p. 1-96.
- 白田和人, 新野孝男, 長峰司 (2007) 遺伝資源をめぐる国際情勢とわが国におけるクワ, カイコ遺伝資源の保存—農業生物資源ジーンバンク事業の紹介—. *蚕糸・昆虫バイオテック*, 76: 41-47.
- Takagi, H., Thinh, N.T., Islam, O.M., Senboku, T. and Sakai, A. (1997) Cryopreservation of invitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep.*, 16: 594-599.
- 田中大介 (2004) 植物遺伝資源の長期保存技術としての超低温保存法に関する研究. 博士論文, 岩手大学, pp. 1-118.
- Tanaka, D., Matsumoto, T., Nishiuchi, A. and Niino, T. (2011) A comparison

- of vitrification and droplet vitrification procedures for the cryopreservation of *in vitro* grown black chokeberry shoot tips. *Acta Hort. (ISHS)*, 908: 325-330.
- Thin, N.T., Takagi, H. and Sakai, A. (2000) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. In F. Engelmann and H. Takagi eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm*, JIRCAS (Japan) and IPGRI (Italy), pp.227-232.
- Towill, L.E. (1988) Genetic considerations for germplasm preservation of clonal materials. *Hort. Science*, 23: 839-841.
- Towill, L.E. (1990) Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9: 178-180.
- Towill, L.E. (1981a) *Solanum tuberosum*-a model for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuberbearing *Solanum* species. *Plant Sci. Lett.*, 20: 315-324.
- Towill, L.E. (1981b) Survival at low temperatures of shoot-tips from cultivars of *Solanum tuberosum* group Tuberosum. *CryoLetters*, 2: 373-382.
- Uchendu, E.E. and Reed, B.M. (2008) A comparative study of three cryopreservation protocols for effective storage of *in vitro*-grown mint (*Mentha* spp.). *CryoLetters*, 29: 181-188.
- 鵜飼保雄 (2003) 植物育種学: 交雑から遺伝子組換えまで, 東京大学出版会, p. 455.
- Withers, L.A. (1979) Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.*, 63: 460-467.