

ワサビ培養茎頂の超低温保存に関する研究

松本 敏一¹⁾

Studies on Cryopreservation of *In Vitro*- grown Apical Meristems of Wasabi (*Wasabia japonica* MATSUMURA)

Toshikazu Matsumoto

目 次

第I章 緒 言	1	2. 結 果	13
第II章 材料と保存後に形成したワサビ植物体 の生育条件	4	第V章 ビーズ・ガラス化法によるワサビ培養 茎頂の超低温保存	
第III章 ガラス化法によるワサビ培養茎頂の超 低温保存		1. 実験方法	16
1. 実験方法	6	1) ビーズ・ガラス化法の手順	
1) ガラス化法の手順		2) PVS2液の処理条件の検討	
2) 前培養条件の検討		2. 結 果	18
3) ローディング液の検討		第VI章 異なる4種類の超低温保存法の比較	
4) ガラス化液の検討		1. 実験方法	19
5) PVS2液の処理条件の検討		1) 4種類の異なる超低温保存法の比較	
6) ガラス化法の前培養におけるグリセリ ン添加効果		2) 茎頂の光学顕微鏡による組織学的観察	
2. 結 果	8	2. 結 果	21
第IV章 アルギン酸ビーズ乾燥法によるワサビ 培養茎頂の超低温保存		第VII章 考 察	23
1. 実験方法	11	1 植物の超低温保存の原理と特徴	
1) アルギン酸ビーズ乾燥法の手順		2 ガラス化法	
2) ビーズの最適含水率と前培養及び前処 理用ショ糖濃度の検討		3 アルギン酸ビーズ乾燥法	
3) グリセリン添加による乾燥耐性付与		4 ビーズ・ガラス化法	
4) ビーズ及びビーズ内茎頂のガラス転移 点の測定		5 超低温保存後に再生した植物の遺伝的変 化	
		6 超低温保存の将来展望	
		第VIII章 摘 要	28
		引用文献	28
		Summary	

1) 作物部生物工学科

第 I 章 緒 言

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

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

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

ワサビの苗生産は、従来、株分けによる栄養繁殖及び実生繁殖で行われてきた。株分け法は、ウイルス感染や墨入病等の種苗伝染性病害が伝染しやすく、苗の増殖率も低い。また、実生繁殖では遺伝的純度が低いことから形質の分離が

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

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

圃場栽培による遺伝資源の保存は、経済栽培が成り立たない系統であっても、除草、薬剤散布といった通常の栽培管理を必要とする。したがって、保存可能な数量に限りがあるだけでなく、病虫害の発生や天災等の自然災害で圃場が壊滅し、貴重な遺伝資源が消失する危険を常に持っている。

環境制御下での保存は、エアコン等により温度制御された温室内の良好な栽培環境で主に鉢栽培によりウイルスフリーで維持されているため、枯死の危険は圃場より低い。しかし、それ

ゆえ、その維持コストは莫大なものとなり、収容植物数が限定される。

最後に、組織培養による試験管内保存であるが、近年のバイオテック研究により目覚ましく進歩し、かなりの種類の植物で茎頂培養系が確立されている。したがって、試験管内で保存している幼植物を必要に応じて順化させ、供給することができる。これは温室での保存と同じく環境制御下で維持されるが、保存形態が鉢栽培に比べ試験管内培養であるため保存スペースが格段に小さくなるのが大きなメリットである。したがって、1サンプル当たり要する保存コストもそれに依りて低くなることから実用的な保存法とされ、多くの栄養繁殖性作物がこの方法で保存されている(松本, 1996)。しかし、これには定期的な培地更新が不可欠であるためそれ

に要す労力も無視できない。さらに、保存が長期になるほど人件費、光熱費等が膨大なものとなり、さらに、保存スペースにも限りがある。また、継代培養が長期にわたると、操作上の不注意による雑菌混入や混種の危険性があるだけでなく遺伝的変異の発生も無視できなくなる。そこで、近年、植物の培養細胞や組織を-150℃以下の温度で長期保存する超低温保存(cryo-preservation)が注目されてきた。この方法の特徴は、保存対象が極めて小さいため省スペース化や保存に要する経費の低減が可能となり、さらに超低温下では生化学的作用がほとんど停止するため保存中の生理的、遺伝的変化が最小限に抑えられるとされている(酒井, 1992)。

植物の細胞・組織を液体窒素温度(-196℃)で生存させるためには、液体窒素浸漬による急速

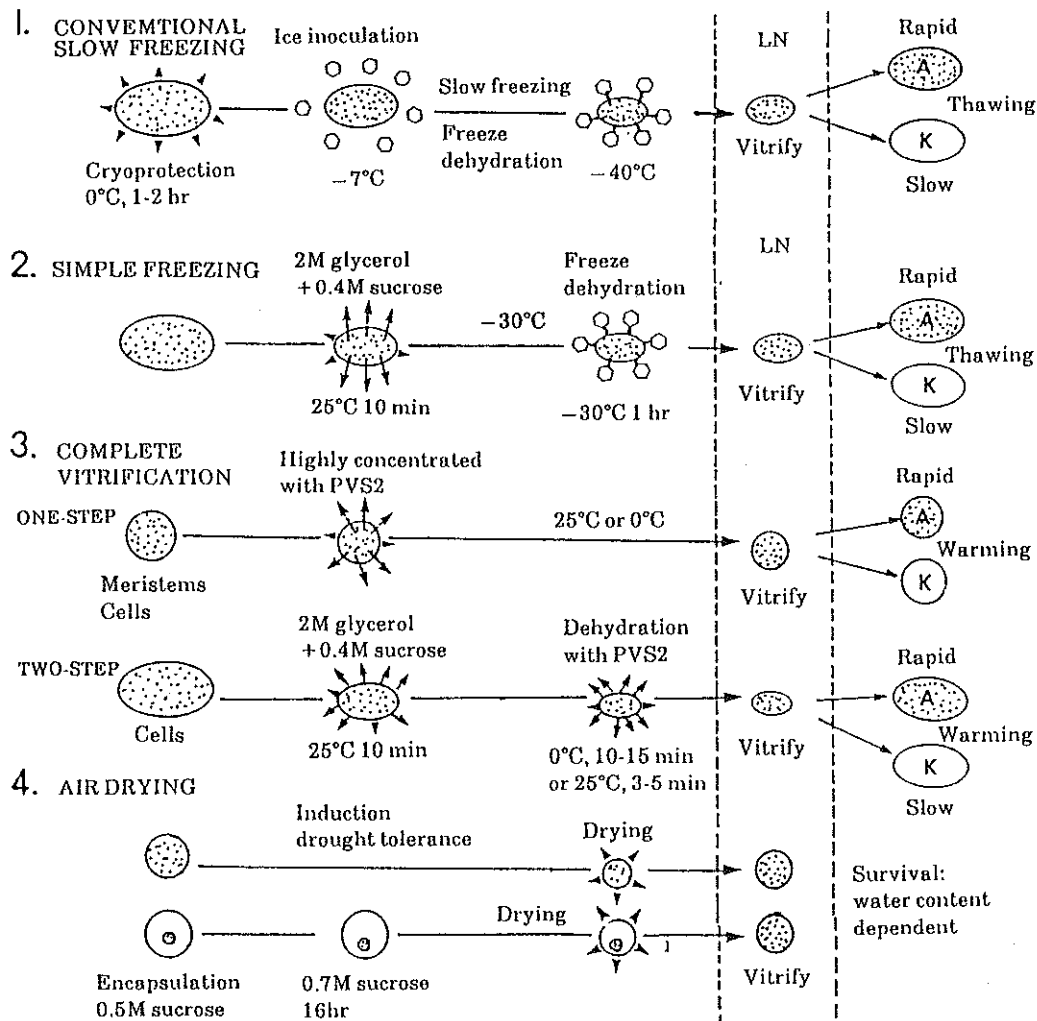


Fig.1 Cryogenic strategies for survival of cultured cells and meristems cooled to -196°C. (Sakai, 1993)
A: alive; K: killed.

冷却中に起こる致命的な細胞内凍結を回避することが不可欠である(Sakai・Yoshida, 1967)そのため、細胞・組織内の凍結水をあらかじめ十分に脱水しておくことが必要となる。

超低温保存法はその脱水方法により、次の4つに大別される(Fig.1)(酒井, 1991)。

1. 凍結脱水：緩速予備凍結法(Slow-pre freezing method)
2. 浸透－凍結脱水：簡易凍結法(Simple freezing method)
3. 浸透脱水：ガラス化法(Vitrification method)
4. 乾燥： a, 乾燥法(Air drying method)
b, ビーズ乾燥法(Encapsulation-dehydration method)

1. 緩速予備凍結法では、まず、茎頂、不定胚、カルス、懸濁細胞等(以下、茎頂等)をグリセリン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エチレングリコール等の凍害防御剤であらかじめ処理し、凍結耐性を付与する。次に、 -7°C 付近まで冷却したところで過冷却状態の媒液に植氷を行って凍結させ、その中の茎頂等に細胞外凍結を起こさせる。続いて、プログラムフリーザーを用いて $-0.3\sim 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度でゆっくりと -40°C まで冷却すると、その過程で細胞内の凍結水(自由水)を十分に脱水することができる。これにより、液体窒素中に急速冷却することで致命的な細胞内凍結を回避できる(酒井, 1987)。

2. 簡易凍結法では、室温で凍害防御剤の処理をした茎頂等の入った浮遊液を -30°C のフリーザーに直接移し、そこに約1時間置いた後、液体窒素に投入する。この場合、茎頂等の入った媒液は自発凍結を起こし、茎頂等は細胞外凍結で凍結脱水される(Sakaiら, 1991b; Nishizawaら, 1992)。

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

4. 乾燥法はさらに2種類に分けられる。一つは、組織(主に胚)をそのまま風乾させる乾燥法

で、アブシジン酸(Dereuddreら, 1990; Fabre・Dereuddre, 1990; Shimonishiら, 1991; 吉永・山川, 1994)や糖(Uragamiら, 1990)で乾燥耐性を付与してからシリカゲルまたはクリーンベンチで乾燥させる方法である。もう一つは、茎頂等をアルギン酸のゲルビーズに包埋し、約 0.8 M のショ糖液に浸漬した後、風乾して、ビーズ中の糖濃度を高めながら組織を浸透脱水するアルギン酸ビーズ乾燥法である。いずれの方法でも含水率 $20\sim 18\%$ (FW)程度まで脱水した後、直接液体窒素中に入れて保存する。

これらの方法で共通していることは、それぞれの処理により十分脱水した後、液体窒素中に入れることで急速冷却される。その結果、細胞や組織の細胞内凍結が回避され、細胞内がガラス化するため、ガラス転移点以下の超低温下で生存可能となる。なお、凍害防御剤等の濃厚な粘性の高い水溶液を急速に冷却する過程で($-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 以上)それらは -70°C 以下まで容易に過冷却するが、約 -110°C で非結晶質の固体であるガラス(glass solid)に相転移する。この物理現象が、ガラス化(Vitrification)である。この相転移の温度をガラス転移点と言い、この時には水晶は形成されない。しかし、このガラス状態の固体を昇温する時、ガラス転移点を上回る温度で過冷却の液体になった後、約 -70°C でガラス化液中に含まれる水が凍結を開始する(Fahyら, 1984)。しかし、この昇温過程での凍結は、ガラス化した組織と媒液を 40°C の温水中で急速に温めることによって回避できる。これらの超低温保存法では、細胞・組織をあらかじめ十分に脱水した後、液体窒素中で急速冷却して細胞・組織をガラス化させることで凍結による傷害を回避できる。そして、それらをガラス転移点以下の温度に維持することで、安定的な長期保存が可能となる。

従来の緩速予備凍結法は、操作が煩雑で時間がかかり、その上、高価なプログラムフリーザーを必要とする(酒井, 1987)。さらに、この方法で超低温保存した茎頂は、再生過程でカルス化しやすかったことから、再生した植物に遺伝的変異が発生する可能性を指摘された(Haskins・Kantha, 1980; Towill, 1984,

1988). そこで、茎頂では、ガラス化法(Sakaiら, 1990; Yamadaら, 1991)による浸透脱水またはアルギン酸ビーズ乾燥法(Dereuddreら, 1990)による風乾で、室温または0℃で十分に脱水してから液体窒素中に急速冷却する新しい方法が開発された。これらの方法の開発によって、超低温保存された植物の数がその後、著しく増加した(酒井, 1996)。

ワサビの組織培養による大量増殖技術については多くの報告があり(堀, 1986; 細木ら, 1986, 1988; 松本・山本, 1987; 大塚, 1988; 山田・春木, 1992), この技術を用いて増殖センターや民間企業では組織培養による種苗増殖を行っている。これには、苗生産を行っているそれぞれの増殖母本を変異させることなく長期間維持保存することが不可欠となる。また、より商品価値の高い新品種を育成していくことも重要となり、品種改良の幅を広げるためにも多くの育種素材を収集・保存していく必要がある。ワサビのような栄養繁殖作物の遺伝資源保存法としては、超低温保存法が最も適した長期保存法と言われている(酒井, 1996)。

現在のところ、ワサビ種子における超低温保存に関する報告(中村・Sathiyamoorthy, 1990)はあるが、ワサビ茎頂の超低温保存の成功例は国内外でも報告が全くない。そこで、本研究ではワサビ培養茎頂を用いて効率的なワサビの超低温保存法について検討した。

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

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

島根大学名誉教授内藤隆次博士、同稲葉久仁雄博士、同教授山村宏博士、同植田尚文博士、同細木高志博士、同板村裕之博士、鳥取大学教

授高橋国昭博士(前島根県農業試験場次長)、岡山大学助教授村井保博士(前島根県農業試験場病虫科長)、元島根県農業試験場長山根国男博士、農林水産省農業生物資源研究所生物工学部長大澤勝次博士には、研究遂行上、貴重な助言と激励を頂いた。

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

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

第Ⅱ章 材料と保存後に形成したワサビ植物体の生育条件

1 材料の培養法

本研究の供試材料として、ワサビ‘島根3号’を主として用いた。まず、材料の無菌化は、山田・春木(1992)の報告に準じて Fig.2 に示す手順で行った。すなわち、当試験場のガラス温室内で育成中の株より発生した花茎(Fig.3)の腋芽を用い、花茎の一部を付けた腋芽を十分水洗後、70%エタノールで30秒間、さらに有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム液で10分間浸漬して表面殺菌を行った。次に、滅菌水で3回すすいでから腋芽を硝酸カリウムと硝酸アンモニウムを1/2に希釈したMurashige & Skoog培地(1962)(以下、1/2 MS)にベンジルアデニン(BA) 0.1 mg/l添加し、0.2%ゲランガムで固化した培地を入れた試験管(直径18 mm)に置床した。

培養条件は、20℃、60 μ mol m⁻² s⁻¹、16時間日長とし、35~40日間隔で上記の培地で継代培養を行った。30日間の継代培養後、草丈が30~

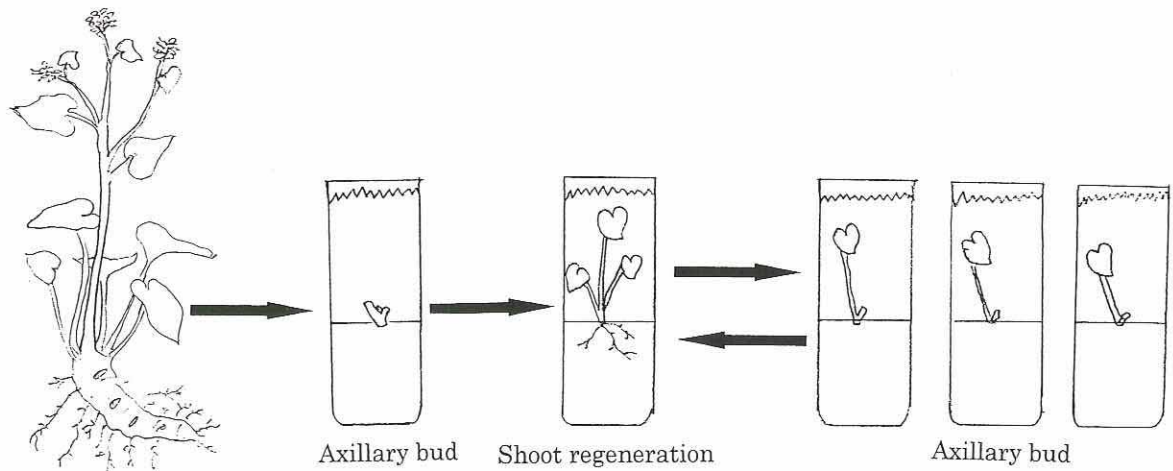


Fig. 2 Procedure for mass propagation of wasabi shoots in vitro. (Yamada · Haruki 1992, modified)



Fig. 3 Flower stalks of wasabi with axillary buds.



Fig. 4 In vitro-grown shoots of wasabi. Developed shoots cultured on 1/2 MS medium supplemented with 0.1 mg/l BA after 30 days of culture.

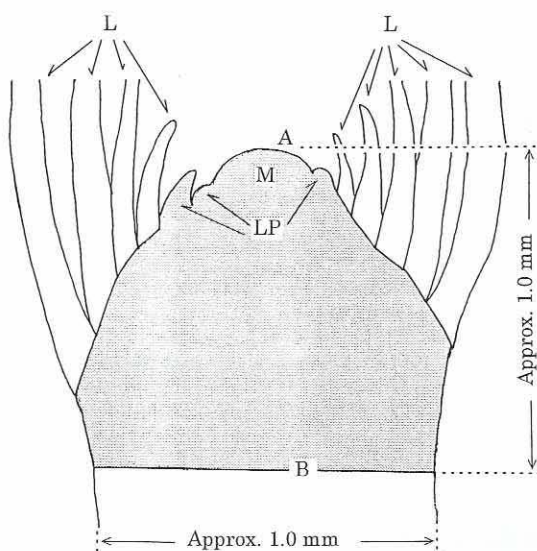


Fig. 5 Longitudinal section of an excised apical meristem of wasabi. L: leaf, M: meristematic dome, LP: leaf primordia. (A) upper and (B) lower ends of an excised apical meristem.

50 mmに生長したワサビのシュート (Fig. 4) から、葉原基 1～3 枚を付けた頂芽の茎頂近傍組織を直径約 1 mm、高さ約 1 mm の大きさに摘出して (Fig. 5)、以下の本研究における超低温保存実験に供試した。

2 超低温保存後に形成したシュートからの植物体再生と順化

それぞれの方法で液体窒素保存した茎頂は、材料育成用培地と同じ成分の再培養用培地に置床すると、上記の条件で約 30 日後に草丈 5～10 mm、展葉が 2 枚程度のシュートに再生した。これらのシュートは伸長を促進させるため、さらに約 30 日間、上記条件で継代培養した。草丈が 20 mm 程度になったシュートは、ホルモンフリーの 1/2 MS 固形培地を 70 ml 入れた 200 ml 容メリクロナフラスコに移植して、継代培養と同一条件で 30～40 日間培養した。ワサビはこの処理

で容易に発根でき、十分な根量になった幼植物体は、パーミキュライトを入れた育苗箱に植えて湿度70%で22℃、 $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の12時間日長、暗黒下で17℃の条件で順化させた。ワサビ培養苗の順化は比較的容易で、ほぼ全てが活着できた。約30日間の順化が終了したワサビ苗はガラス温室内に移し、直射日光が当たらないよう遮光して25~15℃で栽培した。

第三章 ガラス化法によるワサビ培養茎頂の超低温保存

植物の超低温保存法は、緒言で述べたように脱水方法で4種類に分類される。この方法は、茎頂等を凍害防御剤であるガラス化液に浸漬することにより、細胞内にガラス化液をある程度浸透させ、同時に細胞の凍結水を除去し、液体窒素中に入れることで急速冷却してガラス化させる。ガラス化法では茎頂や不定胚等の多細胞からなる構造体を室温または0℃で一様に脱水でき、しかも特殊な機器を必要としないことから、最近、多くの作物で成功例が報告されている(酒井, 1996)。この方法は、処理時間が短く操作が簡単で、保存後のシュート形成率も高いことが大きな特徴である。そこで、ワサビ培養茎頂を用いて、ガラス化法による超低温保存法の最適処理条件を検討した。

Table 1 Components of PVS2 solution.

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

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

1. 実験方法

1) ガラス化法の操作手順

ワサビ培養茎頂におけるガラス化法は、Fig.6 に示すように次の7つの手順からなる。

- 0.3 Mのショ糖を含む1/2 MS固形培地で20℃、 $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の8時間日長で、約16時間の前培養(予備的な脱水耐性の付与)
- 2 Mグリセリンと0.4 Mショ糖の混合液で25℃、20分間のローディング処理(脱水耐性の付与)
- PVS2液による25℃または0℃での浸透脱水(凍結水の除去)
- 液体窒素中での急速冷却(ガラス化)、1時間以上保存
- 40℃温水での急速加温(脱ガラス化)
- 1.2 Mショ糖液による約20分間の洗浄・希釈(アンローディング; ガラス化液の除去と急激な再吸収による傷害の回避)
- 再培養

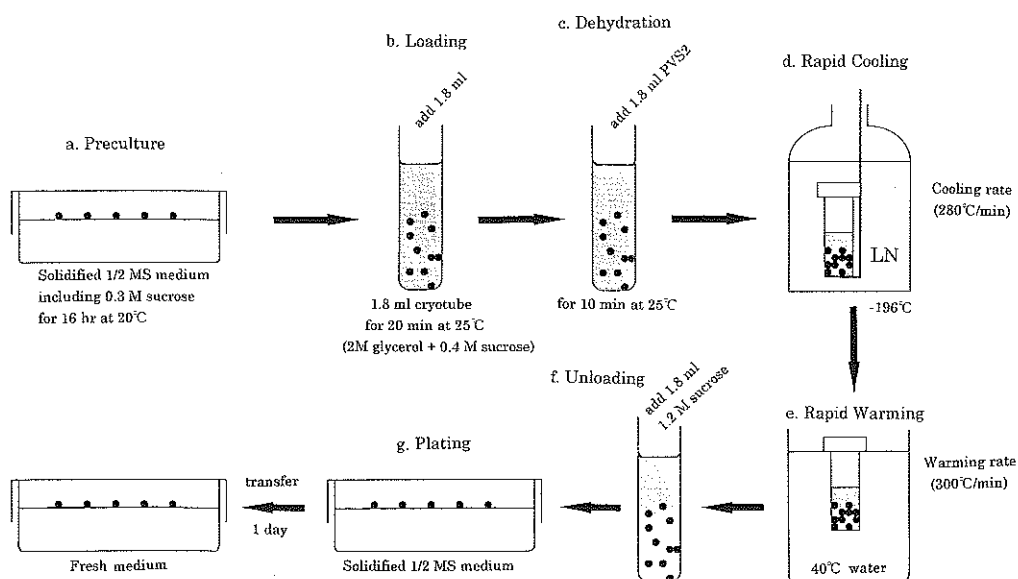


Fig. 6 Procedure for vitrification of wasabi meristems.

P V S 2 液は, Sakaiら(1990)のガラス化液を用いた(Table 1). P V S 2 液による脱水処理は, 1.8 ml容クライオチューブに10個の茎頂を入れ, それに 1.8 mlのP V S 2 液を加えて行った. 途中1回, 新鮮なP V S 2 液に交換し, 所定の時間脱水処理した. その後, 新しいP V S 2 液 1 mlに茎頂を浸してから直接液体窒素中に投入し, 急速冷却した(冷却速度: 約280°C/min). 急速加温は, クライオチューブを40°Cのウォーターバスに直接入れて行った(昇温速度: 約250°C/min). 次に, BA 0.1 mg/lと3% ショ糖を含む1/2 MS固形培地に茎頂を置床し, 通常の条件で培養し, 翌日新しい培地に移植した. なお, シュート形成率は, 置床後21日後に正常なシュートを形成した茎頂を, 供試した茎頂の百分率で表した. 各実験とも, 1区10茎頂を使用し, 3~4回反復した.

2) 前培養条件の検討

前培養における最適ショ糖濃度を明らかにするため, 1/2 MS固形培地に異なる濃度のショ糖を添加し, ガラス化法で液体窒素温度に冷却した茎頂のシュート形成率を比較した. なお, 本実験では, 2 Mグリセリンと0.4 Mショ糖液でローディング処理し, P V S 2 液処理条件は0°C, 50分間とした.

3) ローディング条件の検討

異なるローディング液を用いて, それらの効果を比較した. 使用したローディング液はTable 3で示すとおり, 0.4 Mショ糖液, 1 Mグリセリン+0.4 Mショ糖液, 2 Mグリセリ

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

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

Apical meristems following preculturing and loading were dehydrated with PVS2 for 10 min at 25°C and immersed in LN. Preculturing: 0.3 M sucrose at 20°C; loading: a mixture of 2 M glycerol and 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

ン+0.4 Mショ糖液, 2 Mグリセリン液, 1.5 Mグリセリン+1.5 M DMSO+0.4 Mショ糖液, 40, 50, 60% P V S 2 液の8種類の溶液で, それぞれのシュート形成率を比較した. なお, 前培養のショ糖濃度は0.3 Mとし, P V S 2 液の処理条件は25°C, 10分間とした.

4) ガラス化液の検討

茎頂を0.3 Mショ糖培地で20°C, 16時間の前培養及び2 Mグリセリン+0.4 Mショ糖液で25°C, 20分間のローディング処理した後, Table 4に示す7種類のガラス化液で, 25°C, 10分間の浸漬による脱水処理した. その後, 直ちに液体窒素中で急速冷却した. 液体窒素中で

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

Loading solution	Shoot formation (% ± S.E.)
0.4 M suc ¹	20.0 ± 0
0.4 M suc +1.0 M gly ²	40.0 ± 5.8
0.4 M suc +2.0 M gly	86.3 ± 3.2
0.4 M suc +3.0 M gly	93.3 ± 3.3
0.4 M suc +4.0 M gly	86.7 ± 3.3
2.0 M gly	46.7 ± 8.8
40% PVS2 ³	50.0 ± 11.5
50% PVS2	80.0 ± 5.8
60% PVS2	33.3 ± 14.5
0.4 M suc +1.5 M gly +1.5 M DMSO	80.0 ± 5.8

Precultured meristems with 0.3 M sucrose for 16 hr were loaded with various solutions for 20 min at 25°C before being dehydrated with PVS2 solution for 10 min at 25°C prior to a plunge into LN.

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

¹ sucrose, ² glycerol, ³ 40% of the stock PVS2 solution.

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

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

Precultured meristems with 0.3 M sucrose for 16 hr were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C before being dehydrated with various vitrification solutions for 10 min at 25°C prior to a plunge into LN.

Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture.

Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

¹ sucrose, ² glycerol(w/v%), ³ ethylene glycol(w/v%)

1時間以上保存した後、40℃温水で急速加温し、それぞれのシュート形成率を比較した。

5) P V S 2 液の処理条件の検討

ガラス化液の検討実験と同様に、茎頂は前培養とローディング処理した後、P V S 2 液で25℃で0～30分間、または0℃で0～60分間の浸透脱水を行い、最適処理時間を決定した。

6) ガラス化法の前培養におけるグリセリン添加効果

ガラス化法において高いシュート形成率を得

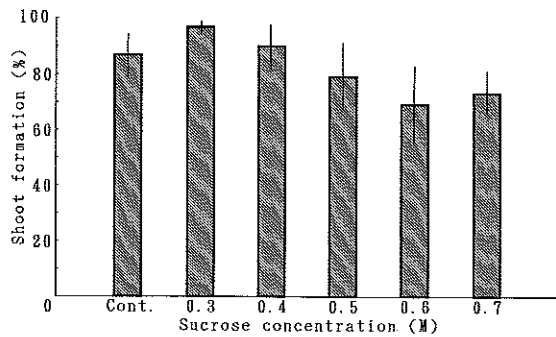


Fig. 7 Effect of preculture by different concentrations of sucrose on the shoot formation of apical meristems cooled to -196°C by vitrification.

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with various concentrations of sucrose for 16–20 hr at 20°C , then loaded with a mixture of 2 M glycerol and 0.4 M sucrose before dehydration with PVS2 at 0°C for 50 min. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. The vertical bars represent standard error.

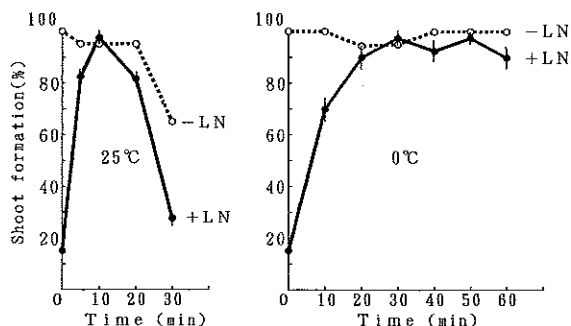


Fig. 8 Effect of exposure time to PVS2 at 0 or 25°C on the shoot formation of apical meristems of wasabi cooled to -196°C by vitrification.

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16–24 hr at 20°C , then loaded with a mixture of 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 20°C before dehydration with PVS2. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. The vertical bars represent standard error.

るために、より効果のある前培養条件を見出すためショ糖とグリセリンの組み合わせを検討した。

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

次に、0.3 Mショ糖、または0.3 Mショ糖+0.5 Mグリセリン添加培地で16時間前培養した茎頂、及び前培養なしの茎頂について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により茎頂内に含まれる糖とグリセリンの定量を行った。茎頂は、それぞれの培地に切り口を下に向けて置床し、培地の付着を防ぐため分析前に接地していた基部の厚さ 0.2–0.3 mm の部分を切除した。次に、30個の茎頂は新鮮重を計測後、同じ重さの蒸留水を加えてホモジナイザーで粉碎した。さらに、遠心分離後にその上澄み液を $0.45\ \mu\text{m}$ の HPLC用クロマトディスクでろ過し、蒸留水で希釈して茎頂の新鮮重に対する最終濃度を25%にし、分析用サンプルとした。用いた HPLCは、MILLIPORE製の Waters 410、カラムは和光純薬製の WAKOPAK 10186 (充填剤 Wakosil 5 NH₂)、溶離液はアセトニトリル/蒸留水(75:25) (v/v)を用いて流量 1 ml/min の条件で分析を行った。なお、各区とも分析は4反復行い、糖とグリセリンは新鮮重または乾物重当たりのモル濃度で表し、乾物重は100個の茎頂を 80°C で約10時間乾燥して求めた。

2. 結 果

Fig. 7 は、ガラス化法で液体窒素に冷却したワサビ茎頂のシュート形成率に及ぼす前培養ショ糖濃度の影響を示したものである。ショ糖濃度 0.3 Mで前培養した区で最も高いシュート形成率、約95%が得られた。また、前培養期間が3日間になるとシュート形成率がかなり低下した。0.3 Mショ糖の前培養区、または2 Mグリセリンと0.4 Mショ糖の混合液によるローデ



Fig.9 Apical meristems cooled to -196°C by vitrification 3 days after reculture.
Material: Shimane No.3. Bar = 2 mm.



Fig.10 Shoots developed from apical meristems cooled to -196°C by vitrification 21 days after reculture.
Material: Shimane No.3. Bar = 10mm.



Fig.11 A plantlet developed from an apical meristem cooled to -196°C by vitrification 60 days after reculture.
Material: Shimane No.3. Bar = 10mm.

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

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

Precultured meristems with 0.3 M sucrose for 16 hr were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C before being dehydrated with PVS2 for 50 min at 0°C prior to a plunge into LN_2 . Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

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

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

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose plus various concentrations of glycerol for 16 hr at 20°C , then dehydrated with PVS2 for 10 min at 25°C without loading treatment. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN_2 . Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture.

Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates.

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

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

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with various concentrations of sucrose and glycerol for 16 hr at 20°C , then dehydrated with PVS2 for 10 min at 25°C without loading treatment. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN_2 . Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates.

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

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

Apical meristems were precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose plus cryoprotectants for 16 hr at 20°C , then dehydrated with PVS2 for 10 min at 25°C without loading treatment. Sufficiently dehydrated meristems were plunged into LN_2 . Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates.

イング処理区ではシュート形成率は60~70%であったが、これら2つの処理を併用すると100%となった(Table 2).

次に、ワサビ茎頂のガラス化法における超低温保存に最も適するローディング液の検討を行

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

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

Precultured meristems were loaded with a mixture of 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C and treated with PVS2 for 10 min at 25°C prior to a plunge into LN_2 . Material; cv. Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for three or four replicates.

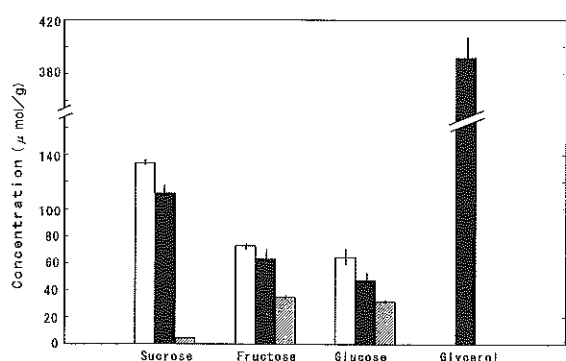


Fig. 12 Sugar and glycerol contents of meristems precultured with 0.3 M sucrose (□), a mixture of 0.3 M sucrose plus 0.5 M glycerol (■) for 16 hr at 20°C . (▨): non-precultured. Sugar and glycerol concentrations were expressed with a fresh weight basis. Material: Shimane No.3. The vertical bars represent standard error.

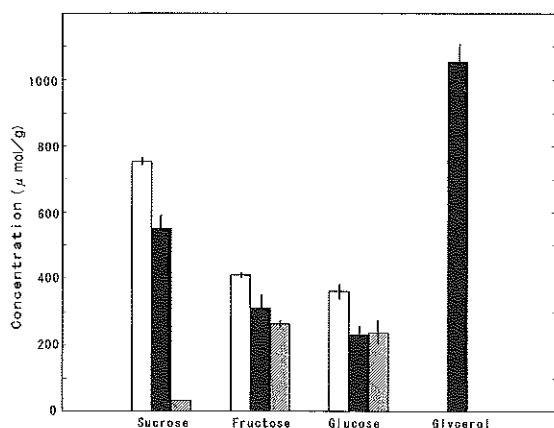


Fig. 13 Sugar and glycerol contents of meristems precultured with 0.3 M sucrose (□), a mixture of 0.3 M sucrose plus 0.5 M glycerol (■) for 16 hr at 20°C . (▨): non-precultured. Sugar and glycerol concentrations were expressed with a dry weight basis. Material: Shimane No.3. The vertical bars represent standard error.

った。90%近いシュート形成率が得られたのは、Table 3に示すように、2 Mグリセリンと0.4 Mシヨ糖の混合液で処理した区であった。した

がって、この液が供試したローディング液として最適であることが明らかとなった。

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

PVS2液における 25°C および 0°C での最適処理時間を検討した。Fig. 8で示すように、 25°C では10分間、 0°C では30~60分間で90%以上の高いシュート形成率が得られた。

液体窒素に冷却後、再培養した茎頂はほぼ全体が緑色を維持しており(Fig. 9)、速やかに生育を開始した。再培養21日後には展葉が2枚程度見られ(Fig. 10)、60日後には完全な植物体に再生した(Fig. 11)。これらは正常に生育し、形態的変異は観察されなかった。

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

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

前培養した茎頂に含まれる各種の糖、グリセ

リン量をHPLCで定量した。0.3 Mシヨ糖で前培養した茎頂に含まれるシヨ糖濃度は、無処理の場合と比べ約30倍、ブドウ糖及び果糖の濃度は約2倍に高まっていたが、それ以外の糖、ソルビトール等の糖アルコールの含有量は極めて少なく、検出できなかった(Fig.12)。0.3 Mシヨ糖+0.5 Mグリセリンで前培養した茎頂は、0.3 Mシヨ糖区と比べ上記3種類の糖濃度は10~20%低かったが、グリセリンは約 $380 \mu\text{mol/g}$ 含まれていた。また、茎頂の乾物重当たりの各種の糖、グリセリンの濃度は、Fig.13に示すように新鮮重の場合とほぼ同様な傾向であった。

第IV章 アルギン酸ビーズ乾燥法によるワサビ培養茎頂の超低温保存

アルギン酸ビーズ乾燥法は、直径約5 mmのアルギン酸塩のゲルビーズ中に茎頂を包埋し、これを0.8 Mシヨ糖液で処理した後に乾燥させ、液体窒素中に冷却させる方法である。そのため、ガラス化法と同様に特殊な機器を使用する必要がないことから、最近、多くの植物の茎頂、不定胚等で成功例が報告されている(酒井, 1996)。この方法の特徴は、操作が比較的簡易

であるため、同時に多量の材料を処理することが可能である。しかし、その欠点として、茎頂を液体窒素保存するとその後のシュート形成率がガラス化法と比べ低い場合が多い。本章では、アルギン酸ビーズ乾燥法によるワサビ茎頂の超低温保存への応用について検討した。

1. 実験方法

1) アルギン酸ビーズ乾燥法の手順

ビーズ乾燥法は、Fig.14に示すように、次の7つの手順からなる。

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

なお、ビーズの作成は、茎頂を3%(w/v)アルギン酸ナトリウム溶液に入れ、1 mlプラスチック

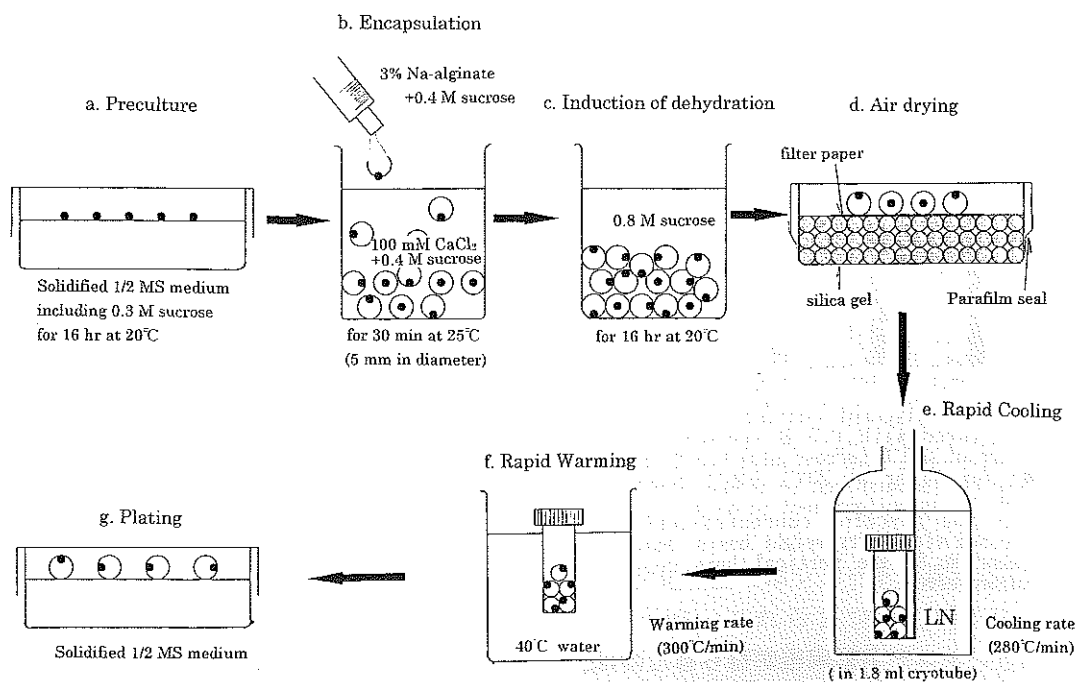


Fig.14 Procedure for encapsulation/dehydration of wasabi meristems

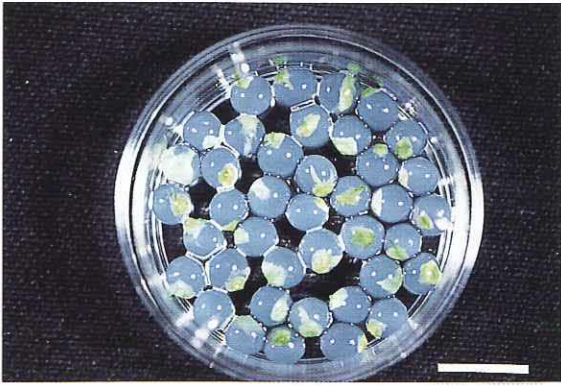


Fig. 15 Encapsulated wasabi meristems into alginate-gel beads. Bar = 10 mm.

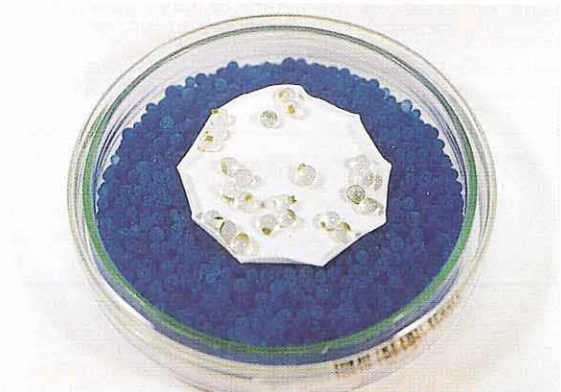


Fig. 16 Method of dehydration of alginate-gel beads.



Fig. 17 Encapsulated meristems into alginate-gel beads after dehydration. Bar = 10 mm

ックシリンジを用いて、100 mM塩化カルシウム溶液に滴下して約30分間固化させ、1個の茎頂を含む直径約5 mmのビーズを作成した(Fig. 15)。また、ビーズの作成に必要な2種類の溶液は、0.4 Mシヨ糖及び1/2 MS培地成分を含み、pH 5.8に調整した。次に、ビーズを0.8 Mシヨ糖を含む1/2 MS液体培地中で、20℃、約16時間処理して乾燥耐性を誘導した。ビーズの乾燥は、シャーレに50 gの乾燥したシリカゲルを入れ、その上に敷いたろ紙上にビー

ズを置き、シャーレのふたをしてからパラフィルムで密封した(Fig. 16)。適正な含水率まで乾燥したビーズ(Fig. 17)は、10個ずつ1.8 ml容のクライオチューブに入れて液体窒素で冷却した(冷却速度：約280℃/min)。急速加温は、クライオチューブを40℃のウォーターバスに直接入れて行った(昇温速度：約250℃/min)。次に、ビーズは、BA 0.1 mg/lと3%シヨ糖を含む1/2 MS固形培地に置床し、ガラス化の実験と同様な条件で培養した。なお、シュート形成率は、置床後21日後に正常なシュートを形成した茎頂を、用いた茎頂の百分率で表した。各実験は、1区10茎頂を使用し、3~4回反復した。

2) ビーズの最適含水率と前培養及び前処理シヨ糖濃度の検討

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

ビーズの含水率(%)

$$= (\text{新鮮重} - \text{乾物重}) / \text{新鮮重} \times 100$$

なお、ビーズはそれぞれ1個の茎頂を含み、その乾物重は80℃で100時間乾燥した後計測した。

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

3) グリセリン添加による乾燥耐性付与

作成したビーズは、0.8 Mシヨ糖を含む1/2 MS液体培地により25℃で16時間の前処理を行うが、より高い乾燥耐性付与するため0.8 Mシヨ糖液に0.5, 1.0, 1.5 Mのグリセリンをそれぞれ添加した。次に、ビーズは、シリカゲル上で約7時間の乾燥後、液体窒素中で急速冷却した。前述の方法でビーズの含水率を測定し、それぞれの含水率における液体窒素冷却、及び

未冷却のシュート形成率を比較した。

4) ビーズ及びビーズ内の茎頂のガラス転移点の測定

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

2. 結 果

1) ビーズの最適含水率と前培養及び前処理用ショ糖濃度の検討

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

茎頂は、ビーズ中に包埋する前に0.3~0.7 Mの異なる濃度のショ糖を含む1/2 MS固形培

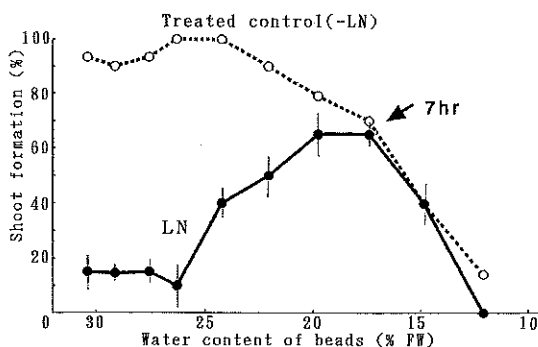


Fig. 18 Effect of water content on shoot formation of alginate-coated meristems cooled to -196°C . Apical meristems precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and then treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No.3. Approximately 10 meristems were tested for four replicates. -LN means treated control without cooling to LN. The vertical bars represent standard error.

地で 20°C 、約16時間前培養した。Table 10で示すように、最も高いシュート形成率(約68%)は、0.3 M ショ糖濃度で前培養した茎頂で得られた。しかし、0.5 M以上のショ糖濃度で前培養した茎頂のシュート形成率は低下し、無処理ではすべて枯死した。

次に、ビーズ中に包埋後に行う約16時間の前処理におけるショ糖濃度を0.6, 0.8, 1.0 Mで比較した。その結果、液体窒素保存後の最も高いシュート形成率(約68%)は、0.8 M ショ糖で

Table 10 Effect of preculture on shoot formation of encapsulated dried meristems cooled to -196°C .

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

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

Table 11 Effect of sucrose treatment on shoot formation of encapsulated dried meristems cooled to -196°C .

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

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

Table 12. Shoot formation of four cultivars of wasabi cooled to -196°C by encapsulation/dehydration.

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

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



Fig.19 Three days after reculture of the encapsulated dried meristems cooled to -196°C . Apical meristems precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and then treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No. 3. Bar = 5 mm.



Fig.20 Developed shoots 21 days after reculture of encapsulated dried meristems cooled to -196°C . Apical meristems precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and then treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No.3. Bar = 5 mm.

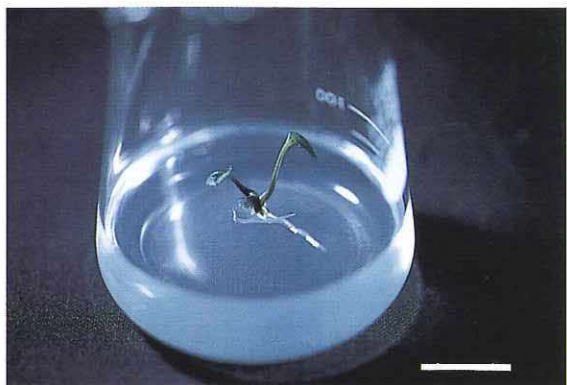


Fig.21 A plantlet regeneration from alginate-coated dried meristems cooled to -196°C . Apical meristems precultured on solidified 1/2 MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C were encapsulated into alginate-beads and treated with 0.8 M sucrose solution for 16 hr at 20°C before dehydration. Material: Shimane No.3. Bar = 20 mm.

処理した茎頂で得られた。しかし、この濃度以外では極めて低いシュート形成率しか得られなかった(Table 11)。

以上の結果から、ワサビ‘島根3号’における培養茎頂のアルギン酸ビーズ乾燥法の液体窒素保存での最適処理条件は、茎頂をシヨ糖濃度 0.3 M で前培養、ビーズ包埋した茎頂を 0.8 M シヨ糖で 16 時間の前処理、ビーズの含水率を 18 ~ 20% まで乾燥(約 7 時間)が適することが明らかとなった。この条件で、‘島根3号’以外の 3 品種のワサビを用いて品種間差を検討した。Table 12 に示すように、‘島根3号’と同等かそれ以上のシュート形成率(60~76%)となった。液体窒素で冷却後、再培養した茎頂は、2 ~ 3 日後にはその基部が白変し茎頂ドームのみが緑色を残していた(Fig.19)。しかし、21 日後には展葉したシュートが得られ(Fig.20)、60 日後には発根した植物体に再生した(Fig.21)。

2) グリセリン添加による乾燥耐性付与

乾燥耐性付与の目的で行う 0.8 M シヨ糖液による 16 時間の処理において、グリセリンを添加したところシュート形成率が高くなることが明らかになった。すなわち、グリセリンの添加濃度は 1 M が最も適し、この時のシュート形成率は約 80% となり、0.8 M シヨ糖の単独処理の場合と比べると約 15% 高くなった(Table 13)。また、グリセリンを添加して処理した茎頂で必要な乾燥時間は、0.8 M シヨ糖単独処理と同様で約 7 時間であったが、含水率は約 21~22% とシヨ糖単独処理と比べ 2 ~ 3 % 高くなった。

3) ビーズ及びビーズ内茎頂のガラス転移点の測定

乾燥前に 0.8 M シヨ糖液で処理した場合、ビーズと茎頂の混合(B+M)、ビーズのみ(B)、茎頂のみ(M)のガラス転移点は、それぞれ -40°C 、 -35°C 、 -30°C であった(Fig.22)。また、0.8 M シヨ糖に 1 M のグリセリンを添加した場合には、それぞれのガラス転移点は、 -60°C 、 -60°C 、 -55°C となり(Fig.23)、シヨ糖単独処理と比べるとグリセリン添加のためガラス転移点より低下した。

Table 13 Effect of glycerol concentration in combination with 0.8 M sucrose on the shoot formation of wasabi meristems cooled to -196°C by encapsulation/dehydration.

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

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

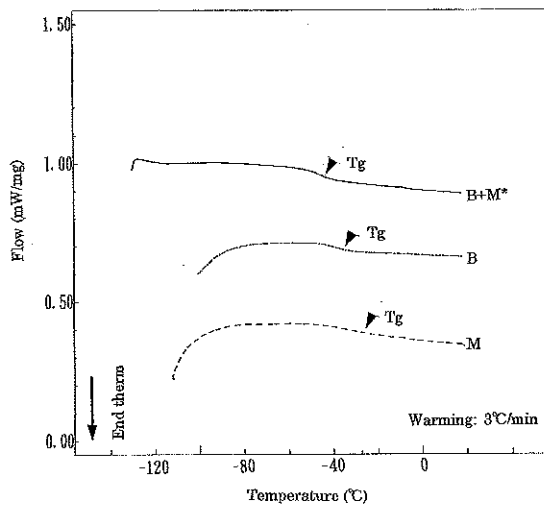


Fig. 22 Differential scanning calorimetry (DSC) record warming process of the encapsulated dried alginate-beads with or without meristems and the meristems picked out from the beads of wasabi cooled to -130°C (cooling rate: $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Beads containing meristems were treated with 0.8 M sucrose for 16 hr at 20°C , and then dried to 18% (FW) on silica gel prior to a plunge into LN_2 . These dried beads with (B+M) or without (B) meristems, and the meristems (M) which were picked out from the beads were warmed at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Tg: glass transition temperature. Material: Shimane No. 3.

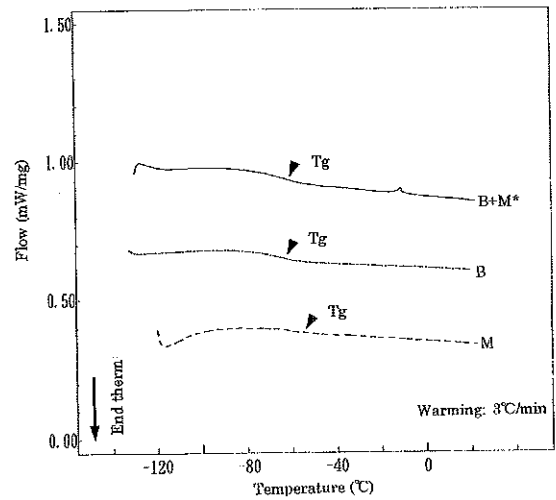


Fig. 23 DSC record warming process of the encapsulated dried alginate-beads with or without meristems and the meristems picked out from the beads of wasabi cooled to -130°C (cooling rate: $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Beads containing meristems were treated with 0.8 M sucrose plus 1 M glycerol for 16 hr at 20°C , and then dried to 18% (FW) on silica gel prior to a plunge into LN_2 . These dried beads with (B+M) or without (B) meristems, and the meristems (M) which were picked out from the beads were warmed at $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Tg: glass transition temperature. Material: Shimane No. 3.

ム組織には凍結による傷害が少なく、そこから直接シュートを形成する。ガラス化法はアルギン酸ビーズ乾燥法と比較して、茎頂の脱水時間が短く、操作が簡単で、その上、シュート形成率が高いという利点をもっている。しかし、ガラス化法で高いシュート形成率を得るためには適正な脱水処理が必要であるが、この方法では同時に多量の茎頂を処理することが困難である。本章では、この問題点を解決するため、アルギン酸塩のゲルビーズに包埋された茎頂をガラス化液中で浸透脱水する新しい手法のビーズ・ガラス化法を検討した。

第V章 ビーズ・ガラス化法によるワサビ茎頂の超低温保存

緩速予備凍結法、簡易凍結法、ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法の4種類の超低温保存法のうち、現在、茎頂の超低温保存に有効とされる手法は、ガラス化法及びアルギン酸ビーズ乾燥法である。これらの2つの手法は、室温又は 0°C で細胞の凍結水の大部分を除去してから液体窒素に冷却する方法であるため、茎頂ド-

1. 実験方法

1) ビーズ・ガラス化法の手順

ビーズ・ガラス化法は、Fig. 24に示すとおり、次の7つの手順からなり、ガラス化法の場合と同様にPVS2液で浸透脱水を行った。

(a) 0.3 Mのショ糖を含む1/2 MS固形培地の 20°C 、 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の8時間日長で、約16時間の前培養(予備的な脱水耐性の付与)

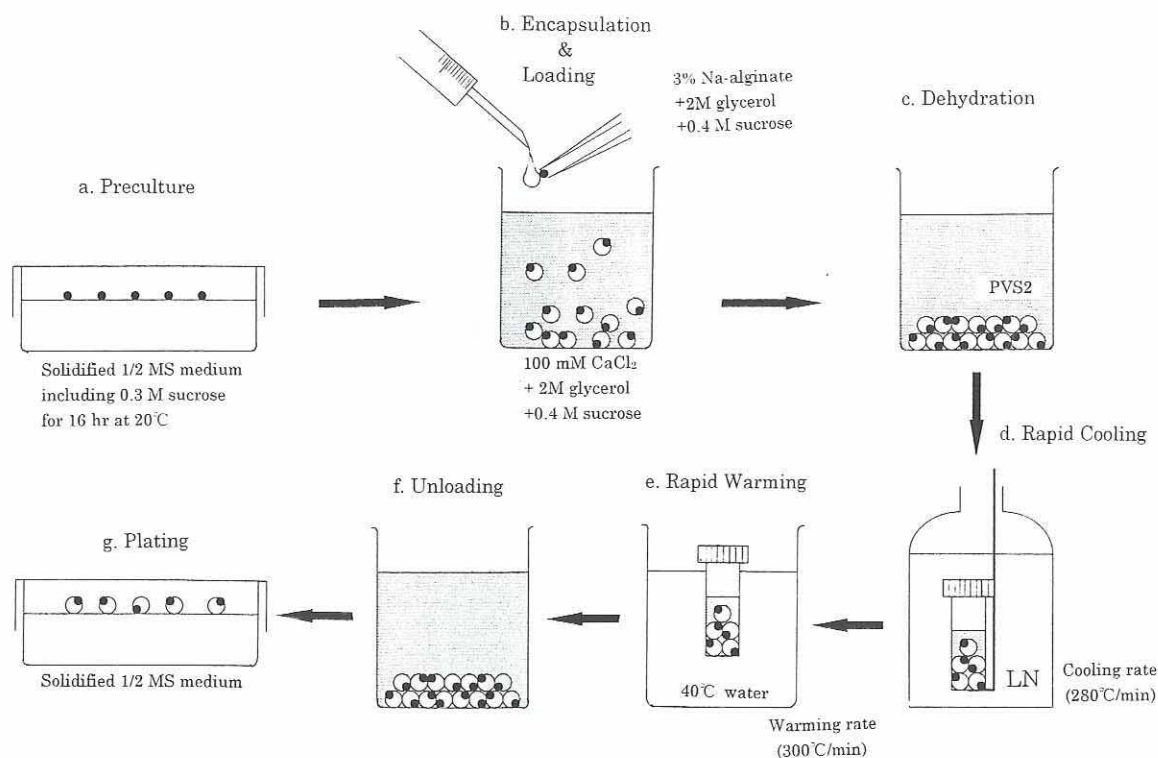


Fig. 24. Procedure for encapsulation/vitrification of wasabi meristems

(b) ビーズ包埋とローディング処理(2 Mグリセリン+0.4 Mシヨ糖液, 25°C, 30分間) (脱水耐性の付与)

(c) P V S 2 液による浸透脱水(凍結水の除去)

(d) 液体窒素中に急速冷却(冷却速度:約280°C/min)(ガラス化), 1時間以上保存

(e) 40°C温水中で急速加温(昇温速度:約300°C/min)(脱ガラス化)

(f) 1.2 Mシヨ糖液による30分間の希釈・洗浄(アンローディング; ガラス化液の除去と急激な再吸収による傷害の回避)

(g) 再培養

ビーズの作成は, 次の手順で行った. まず, ガラス化法で効果のあったローディング液(2 Mグリセリンと0.4 Mシヨ糖の混合液)と塩化カルシウムを除いた1/2 MS培地を含む3%アルギン酸ナトリウム溶液を作成した. 次に, この液を1 mlの注射器に採取し, 注射針から押し出して滴下寸前にこの中に1個の茎頂をピンセットで入れた後, 1/2 MS培地及びローディング液の入った100 mM塩化カルシウム溶液に滴下して直径約3 mmのビーズを作成した(Fig. 25). ビーズは, 100 ml容のビーカーで20~30分間の凝固反応をさせた後, 50 mlのP V



Fig. 25 Encapsulated apical meristems into alginate-coated beads of containing a loading solution. Bar = 5 mm

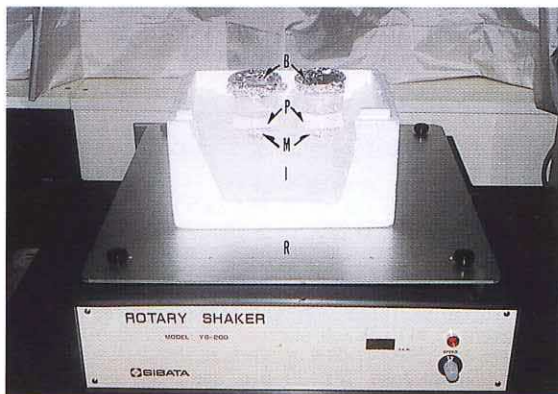


Fig. 26 Encapsulated meristems were dehydrated with a 50 ml PVS2 solution at 0°C in a 100 ml beaker at 100 rpm on a rotary shaker. B: a 100 ml beaker, P: PVS2 solution, M: encapsulated meristems, I: crashed ice, R: a rotary shaker.

Table 14 Effect of loading solution on shoot formation of encapsulated vitrified meristems cooled to -196°C .

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

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

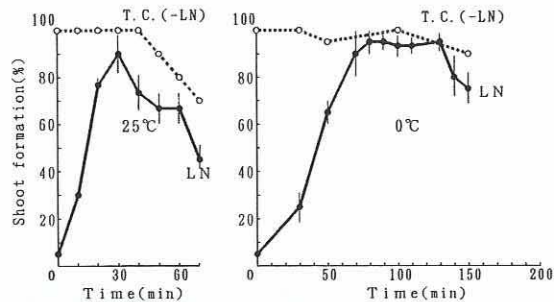


Fig. 27 Effect of exposure time to PVS2 at 25°C or 0°C on the shoot formation of encapsulated vitrified apical meristems of wasabi cooled to -196°C .

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

Table 15 Effect of vitrification solution on shoot formation of encapsulated vitrified meristems cooled to -196°C .

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

^{1,2}: PVS3 (Nishizawa et al., 1993),

³: Langis and Steponkus solution (1991).

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

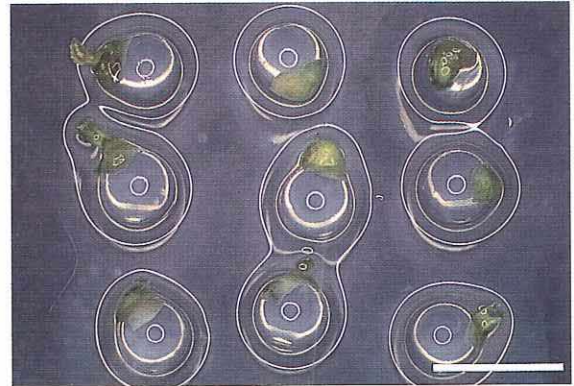


Fig. 28 Encapsulated vitrified meristems cooled to -196°C 3 days after reculture. Material: Shimane No.3. Bar = 5 mm.



Fig. 29 Shoot formation from encapsulated vitrified meristem cooled to -196°C 21 days after reculture. Material: Shimane No.3. Bar = 5 mm.

Table 16 Shoot formation of four cultivars of wasabi meristems cooled to -196°C by encapsulation/vitrification.

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

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

S 2 液に置き換え、 25°C で0~70分間、 0°C で0~150分間浸透脱水した。なお、ビーズの入ったビーカーは、100 rpmの旋回振とう培養器上に置き、20分後に新しいPVS2液と交換した。 0°C で処理する場合は、Fig. 26のように、クラッシュアイスを入れた容器を振とう培養器上に置き、ビーズとPVS2液が入ったビーカー

ーにアルミ箔でふたをしてからその水中に入れた。次に、1.8 ml容のクライオチューブに脱水後の10個のビーズと新しいPVS 2液を0.7 ml入れ、液体窒素中で冷却した(冷却速度：約280°C/min)。急速加温は、クライオチューブを40°Cのウォーターバスに直接入れて行った(昇温速度：約250°C/min)。次に、茎頂は、BA 0.1 mg/lと3%ショ糖を含む1/2 MS固形培地に置床し、前述の条件で培養し、翌日新しい培地に移植した。なお、シュート形成率は、置床後21日後に正常なシュートを形成した茎頂を、用いた茎頂の百分率で表した。なお、各実験とも、1区10茎頂を用い、3~4回反復した。

2) PVS 2液の処理条件の検討

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

2. 結 果

Table 14に示すように、比較した5種類のローディング液では2 Mグリセリンと0.4 Mショ糖の混合液で最も高いシュート形成率(96%)を示した。しかし、グリセリンの代わりにエチレングリコールで処理した場合、シュート形成率は75%に低下し、また0.4 Mショ糖のみでは15%とさらに低いシュート形成率を示した。以上のことから、ビーズ・ガラス化法でも、ローディング液はガラス化法の場合と同様、2 Mグリセリンと0.4 Mショ糖の混合液のローディング処理が高いシュート形成率を示すことが明らかとなった。

次に、ビーズ・ガラス化法における25°Cまたは0°CでのPVS 2液の最適処理時間を検討した。25°Cでは30分間、0°Cでは80~130分間のPVS 2液で処理した茎頂では、90%以上のシュート形成率が得られた(Fig. 27)。

ビーズ・ガラス化法に最も適したガラス化液を検討した結果、90%以上のシュート形成率は、PVS 2液及びPVS 3液(Nishizawaら、1994)で処理した茎頂で得られた(Table 15)。しかし、エチレングリコールを基本とするガラ

ス化液はグリセリンを基本とするガラス化液に比べシュート形成率が低く、しかもその数値の変動が大きかった。

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

最適条件で脱水し、液体窒素に冷却後、昇温した茎頂は、ガラス化法の場合と同様に脱色することなく置床3日後でも緑色を維持していた(Fig. 28)。これらは、カルスを形成することなく茎頂から直接シュートを形成した(Fig. 29)。その後、ホルモンフリーの1/2 MS固形培地に移植後、ほとんど全てのシュートが発根して正常な植物体になり、これらは容易に順化できた。また、再生した植物における形態的異常は観察されなかった。

品種間差を検討するため、本実験で用いた‘島根3号’以外に‘真妻’‘さんべ’‘大神2号’について、上述の最適処理条件でガラス化法による超低温保存を行った。それらのシュート形成率は品種による若干の差は認められたものの、いずれも90%前後であった(Table 16)。

第VII章 異なる4種類の超低温保存法の比較

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

多くの場合、液体窒素冷却後のシュート形成率は、ガラス化法がアルギン酸ビーズ乾燥法より高いことが多い。そこで、この2つの異なる

方法で液体窒素で冷却した茎頂の再生過程，傷害部位等について光学顕微鏡でそれぞれ観察して比較した。

1. 実験方法

1) 4種類の異なる超低温保存法の比較

各超低温保存法は，つぎの処理条件で行った。

(1) ガラス化法：ローディング処理(2 Mグリセリン+0.4 Mショ糖液，25℃，20分間処理)，

P V S 2 液処理(25℃，10分間処理)。

(2) アルギン酸ビーズ乾燥法：乾燥耐性付与(0.8 Mショ糖液で20℃，16時間処理)，ビーズの含水率 約19% (FW)。

(3) 改良ビーズ乾燥法：乾燥耐性付与(1 Mグリセリン添加の 0.8 Mショ糖液で20℃，16時間処理)，ビーズの含水率 約22% (FW)

(4) ビーズ・ガラス化法：P V S 2 液処理(0℃，100分間処理)。

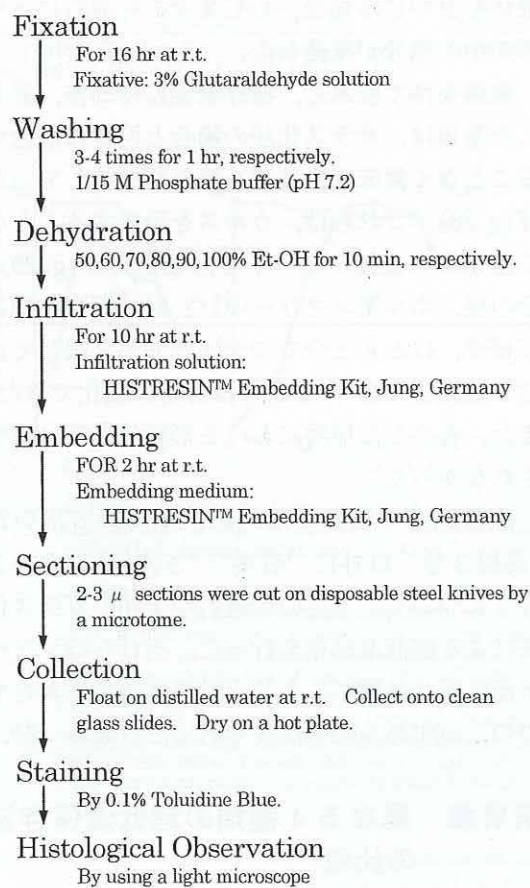


Fig. 30 Procedure for histological observation of meristems.

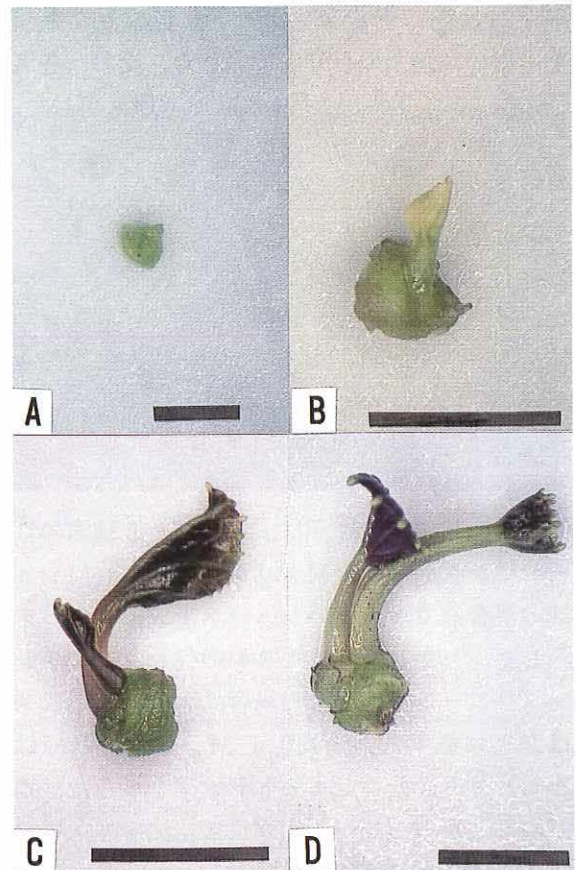


Fig. 31 Shoot developed from a meristem cooled to -196°C by vitrification. 1 day (A), 7 days (B), 14 days (C) and 21 days (D) after reculturing, respectively. Bars indicate 2 mm in A and B, 5 mm in C and D.

Table 17 Shoot formation, shoot length and time used for dehydration of wasabi meristems cooled to -196°C by four different cryogenic protocols.

Cryogenic protocol	Shoot formation (%±S.E.)	Shoot length (mm)	Time used for dehydration (min)
Vitrification ¹	97.5 ± 1.0	10.6 ± 4.0	10 at 25°C
Encapsulation/Dehydration ²	67.1 ± 8.9	6.3 ± 3.6	420 at 25°C
Revised Encapsulation/Dehydration ^{2*}	79.1 ± 4.8	9.0 ± 2.6	420 at 25°C
Encapsulation/Vitrification ¹	96.7 ± 2.9	12.2 ± 3.6	100 at 0°C

¹: Precultured meristems were loaded with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C, and then dehydrated with PVS2 before cooling in LN₂.

²: Precultured meristems were encapsulated with alginate gel beads, and then treated with 0.8 M sucrose or plus 1 M glycerol* at 20°C for 16 hr before dehydration and cooling to -196°C .

Shoot formation (%): percent of meristems that produced normal shoots 21 days after reculture.

Material: Shimane No. 3.

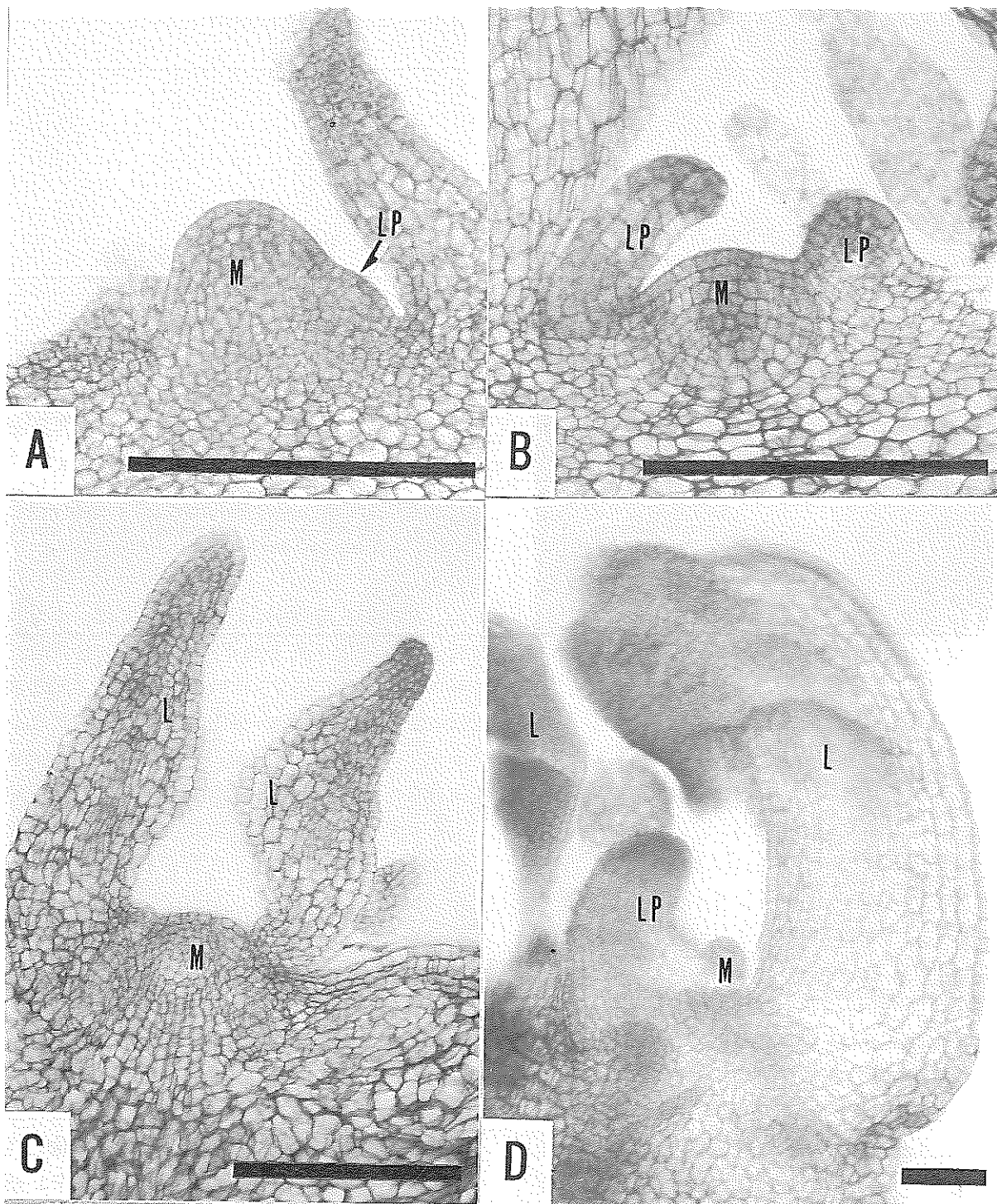


Fig.32 Longitudinal section of wasabi meristems cooled to -196°C by vitrification. Immediately after thawing (A), 2 days (B), 4 days (C) and 6 days (D) after reculturing, respectively. M: meristematic dome, LP: leaf primordium, L: regenerated leaf. Bar = 0.5 mm.

以上の4種類の超低温保存法で液体窒素中で急速冷却後、正常なシュートの形成率と最も高いシュート形成率の得られる乾燥(脱水)時間、及び再培養21日後のシュートの草丈を測定した。

2) 茎頂の光学顕微鏡による組織学的観察

ガラス化法及びビーズ乾燥法で茎頂を液体窒素中に冷却し、再生培地に置床した茎頂を7日毎に21日目まで再生過程を観察し、また再培養時から2日毎に6日目まで縦断切片の観察を行った。さらに、茎頂の生存部位及び傷害部位を明らかにするため、再培養1日後の茎頂を

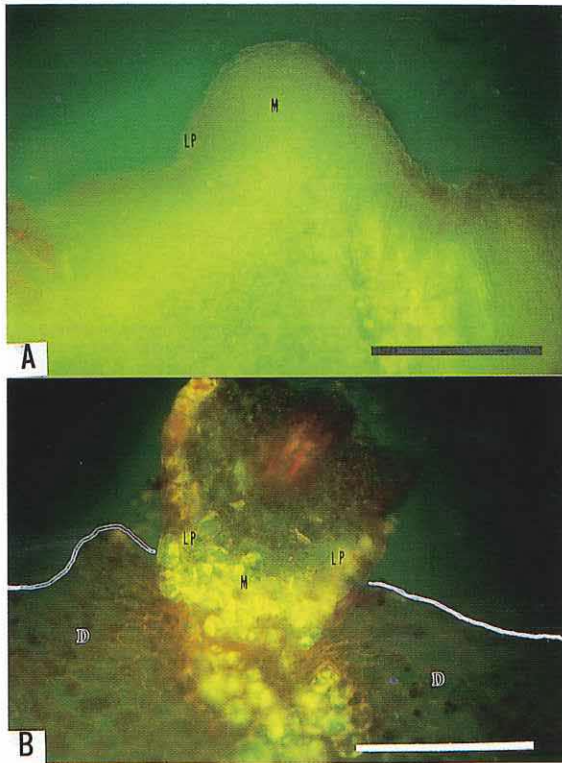


Fig. 33 Longitudinal section (0.1 mm) through the meristematic dome of vitrified (A) and encapsulated dried meristem (B) 1 day of reculture stained with fluorecein diacetate and phenosafranin. M: meristematic dome area. LP: leaf primodium. D: dead cells area. Bar = 0.2 mm.

Widholm(1972)の方法に準じて、0.1%フルオレセインジアセテート(FDA)及び0.1%フェノサフラニン(PS)により2重生体染色し、厚さ約0.1 mmの縦断切片を作成して蛍光顕微鏡で観察した。なお、FDAでは紫外線照射により生細胞は蛍光染色され、PSでは死細胞は赤色染色される。また、茎頂の再生過程の観察についての組織の固定、樹脂包埋、染色及びプレパレードの作成は、Fig. 30 で示す方法で行った。

2. 結果

1) 4種類の異なる超低温保存法の比較

ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法、改良ビーズ乾燥法及びビーズ・ガラス化法の4種類の方法で液体窒素に冷却した茎頂のシュート形成率は、Table 17 に示すように、ガラス化法とビーズ・ガラス化法で約97%となったのに対し、ビーズ乾燥法では約67%と30%ほど低かった。しかし、1 Mグリセリン添加した0.8 Mシヨ糖液で処理した改良ビーズ乾燥法ではシュート形成率が12%高くなり、約79%になった。ま

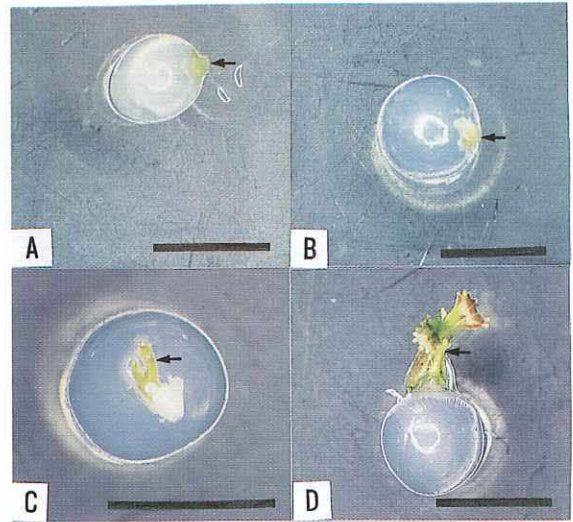


Fig. 34. Shoot developed from a meristem cooled to -196°C by encapsulation/dehydration. 1 day (A), 7 days (B), 14 days (C) and 21 days (D) after reculturing, respectively. Arrow: A, B; meristem. C, D; shoot formation. Bar = 5 mm.

た、必要な乾燥(脱水)時間については、ガラス化法が10分間と最も短く、次いで100分間のビーズ・ガラス化法で、アルギン酸ビーズ乾燥法は420分間と最も長かった。一方、形成したシュートの生育は、4種類の保存法のうち、ガラス化法とビーズ・ガラス化法が同程度で最も早く、次いで改良ビーズ乾燥法となり、アルギン酸ビーズ乾燥法における生育が最も緩慢であった。これについては、ササユリの培養茎頂を用いた実験でも同様な傾向が認められた(松本ら、1996)。

2) 茎頂の光学顕微鏡による組織学的観察

ガラス化法により液体窒素中で冷却した茎頂について、その再生過程を経時的に観察した写真を Fig. 31に示した。再培養から1日後の茎頂は、ほぼ組織全体が緑色を維持しており、速やかにシュート形成を開始した。さらに、茎頂からのシュートの形成過程をその縦断切片で観察したところ、カルスを経由することなく茎頂から直接シュートを形成していることが明らかとなった(Fig. 32)。また、再培養1日後の茎頂をFDAとPSで染色し、その縦断切片を蛍光顕微鏡で観察したところ強いFDA活性が認められ、茎頂のほぼ全体が生存していることが確認された(Fig. 33)。一方、赤く染色される枯死細胞はわずかであった。

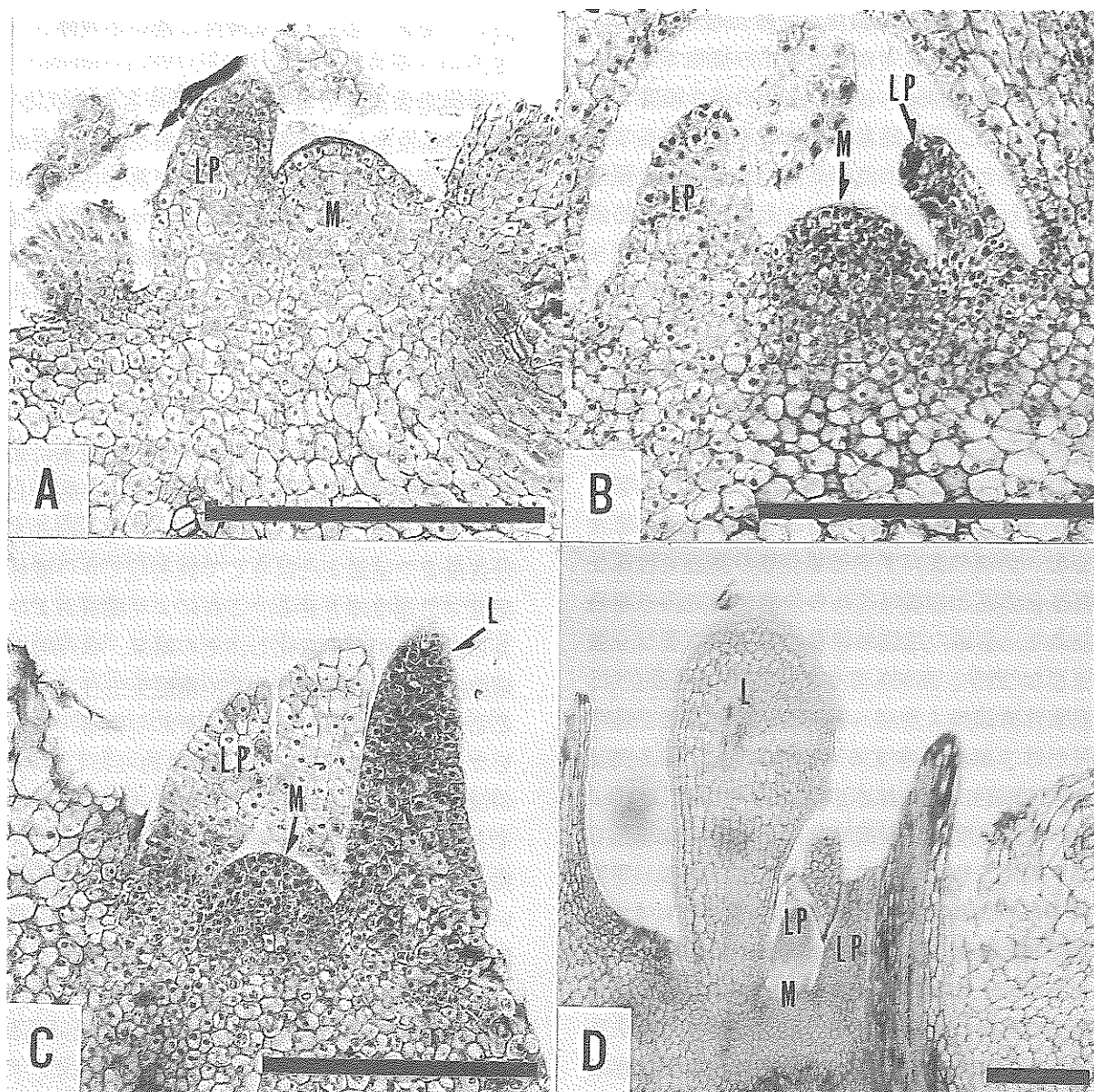


Fig. 35 Longitudinal section of wasabi meristems cooled to -196°C by encapsulation/dehydration. Immediately after thawing (A), 2 days (B), 4 days (C) and 6 days (D) after reculturing, respectively. M: meristem dome, LP: leaf primordium, L: regenerated leaf. Bar = 0.5 mm.

アルギン酸ビーズ乾燥法では、Fig. 34 で示すように、再培養から1日後で茎頂の基部が白変しはじめ、茎頂ドーム以外の細胞の生存は少なかった。さらに、再培養7日後でも茎頂の生育は緩慢で、14日後で2枚の葉原基の伸長が見られたのみであった。茎頂の縦断切片の観察でも、再培養4日後までは茎頂の生育はほとんど見られず、6日後で葉原基の生育がわずかに開始した(Fig. 35)。また、このシュート形成過程の観察でも、シュートはカルスを経由することなく、ドームから直接形成していることが確認できた。茎頂の生存部位は、茎頂ドーム部分で

は強いFDA活性が認められたが、それ以外の部分ではかなりの部分が枯死していた(Fig. 33)。

第七章 考 察

1 植物の超低温保存の原理と特徴

植物の培養細胞を液体窒素温度で保存し再生植物を得た最初の成功は Nag・Street(1973)である。彼らは、液体窒素温度に冷却したニンジンの培養細胞から植物体を再生させた。また、茎頂の超低温保存では、Seibert(1976)がカー

ネーションで始めて成功し、その後、イチゴ、バレイショ、エンドウ等、多くの植物で報告された(酒井, 1996)。しかし、その後の組織学的観察により、液体窒素冷却後の茎頂ドームの細胞は傷害を受けて、他の部位の生き残った細胞が増殖してカルスを形成し、そこから二次的に不定芽を形成することが Haskins・Kantha(1980)及びTowill(1984)によって報告された。すなわち、再生した植物はカルスを經由していることから遺伝的変異の発生する可能性が指摘された。そのため、これ以降、茎頂の超低温保存の研究はほとんど中断された。その後、1990年に Sakaiらがガラス化法を、同年に Dereuddreらがアルギン酸ビーズ乾燥法を発表した。プログラムフリーザー等の高価で特殊な機器を必要としないこれらの簡便な方法の開発により、茎頂の超低温保存の成功例が著しく増加した(酒井, 1996)。これらの方法の共通点は、細胞外凍結により $-5\sim-40^{\circ}\text{C}$ の低い温度で長時間かけて凍結脱水するのではなく、室温または 0°C で細胞内の凍結水の大部分を除去した後、それらの温度から直接液体窒素で急速冷却してガラス化させることである。これにより、茎頂ドームの大部分の細胞は傷害を受けないため、カルスを經由することなく茎頂から直接シュートが形成される。したがって、従来の超低温保存法で再生した植物と比べると、ガラス化法及びアルギン酸ビーズ乾燥法で再生した植物体に

おいて変異の発生する危険性は低いと判断される。

液体窒素温度で茎頂を生存させるためには、液体窒素温度への急速冷却中におこる危険な細胞内凍結を回避することが必要である(Sakai・Yoshida, 1967)。そのため、細胞や組織は冷却前に細胞内の凍結水を十分に取り除く必要がある(Sakai, 1993)。この脱水方法は、ガラス化法及びその改良法であるビーズ・ガラス化法では凍害防御剤の高濃度液(ガラス化液)による浸透脱水で、アルギン酸ビーズ乾燥法では乾燥によるビーズ内の糖液の濃縮に伴う浸透脱水による(Fig. 36)。しかし、それぞれの方法に共通していることは、組織・細胞をガラス化し得る水分含量まで室温または 0°C で脱水してから液体窒素で急速冷却させる。これにより媒液および茎頂の細胞がガラス化し、その結果、致命的な細胞内凍結を回避できるため細胞を生存させることが可能となる。そして、それら細胞・組織をガラス転移点(PVS 2液では約 -115°C)以下の温度に保つことでそれらのガラス状態を維持できる。なお、液体窒素等の超低温下でガラス化した細胞の生化学的作用はほとんど停止していると言われる(酒井, 1991)。したがって、超低温保存では保存中の生理的、遺伝的変化が最小限に抑えられるため、安全に長期間の保存が可能となると考えられている。

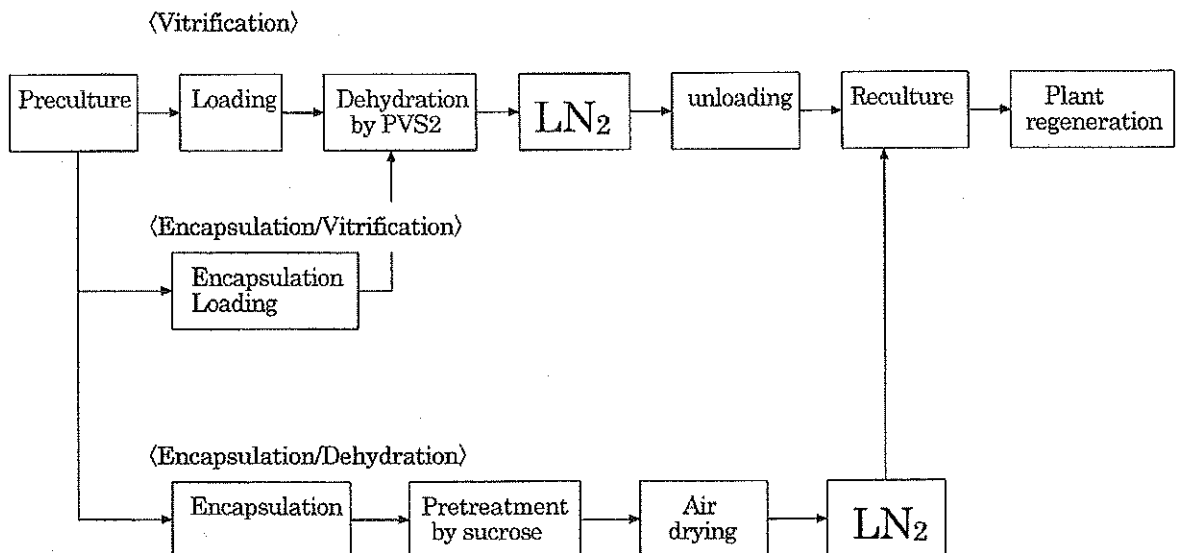


Fig. 36 Cryogenic procedures for wasabi meristems cooled to -196°C

2 ガラス化法

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

ガラス化法で茎頂を超低温下で生存させるためには、まず茎頂に脱水あるいは凍結耐性を付与した後に、凍害防御剤の高濃度のガラス化液中で処理することが重要である。この処理中に、ある程度凍害防御剤を内部に浸透させると同時に浸透脱水させる。そして、液体窒素に入れて急速に冷却(10℃/min以上)すると粘性の高いガラス化液は約-80℃以下まで過冷却した後、約-115℃で凍結(Crystallization)しないで、不定形の固体であるガラス(Vitrification)状態となる(Fahyら, 1984; Sakaiら, 1990, 1991a)。ガラス化液であるPVS2液(Sakaiら, 1990)またはPVS3液(Nishizawaら, 1993)においてグリセリンをその主成分としているのは、グリセリンが細胞内に浸透しにくいことから薬害が起こりにくい状態で脱水が進行するためである。一方、エチレングリコールやDMSOは細胞内に浸透しやすいため、これらを主成分とする高濃度のガラス化液を用いて室温で処理すると薬害を生じやすい。そのため、0℃で、しかも短時間で処理する方法がとられている。したがって、グリセリンを主体としたガラス化液は植物の細胞・組織に用いるガラス化液として有望であると考えられる。

PVS2液は緩慢に昇温すると、その中に含まれる水が約-70℃で凍結することで同時に茎頂も凍結するため細胞に傷害が生じる。そこで、液体窒素温度から40℃の温水中に入れて急速に昇温させることによって、昇温過程で起こる危険な凍結を回避できる(Sakaiら, 1991a)。脱水耐性の低い細胞や組織を直接、高濃度(約7.8 M)のガラス化液で処理すると脱水ストレスや薬害により傷害を受けるため、高い生存率やシュート形成率が得られない場合が多い。これを回避するために、0℃に冷却したPVS2液で処理したり、PVS2液を段階的に高める方法がとられた(Reinoudら, 1995)。一方、生存率を高めるには、前培養や凍害防御剤によるローディング処理での脱水耐性及び凍結耐性の誘導が考えられる。ローディング処理は、細胞や茎頂をガラス化液に浸漬する前に、あらかじめ糖とグリセリン等の凍害防御剤の混合液で処理して耐性を付与すると同時に細胞、組織をある程度脱水しておくことで脱水耐性も誘導する。アスパラガスのembryogenic cellを用いてNishizawaら(1992, 1993)はローディング液の検討を行い、2 Mグリセリンと0.4 Mショ糖の混合液がガラス化法でアスパラガスの細胞を生存させるのに最も高い効果があることを明らかにした。さらに最近、タバコ、ブドウ、シロイヌナズナ等の培養細胞の簡易凍結法でもこの液の有効性が明らかにされた(Sakaiら, 1991a; 川原・秋田, 1996)。本研究では、ガラス化液による脱水前にローディング処理を組み込んだ2段階ガラス化法によってワサビ培養茎頂の超低温保存に成功した。この方法を用いて、ユリ(松本ら, 1995), バナナ(Thin, 1997), ブドウ(Matsu-motoら, 1998b)及びスターチス(Matsumotoら, 1998c)の培養茎頂、さらにスターチスの苗条原基(Matsumotoら, 1997), オタネニンジンの毛状根(Yoshimatsuら, 1996)を用いたガラス化法による超低温保存の成功例が相次いで報告された。なお、これらの茎頂でも2 Mグリセリンと0.4 Mショ糖の混合液がローディング液として最適であったことから、この液は多くの植物への適応範囲が広いと考えられる。この混合液によるローディング処理は、耐性が低い茎頂、体細胞不定胚、細胞等をガラス

化法で生存させるために非常に効果的であった。グリセリンはエチレングリコールやDMSOと比べ、懸濁細胞では透過しにくい(Sakai, 1991)、葉挿し(Sakai, 1962)または茎頂(Dereuddre, 1991)を、糖を含む固形培地上で培養すると維管束を通り細胞内に蓄積する。本研究では、約16時間0.3 Mショ糖と0.5 Mグリセリンで前培養した茎頂内には約 $280 \mu\text{mol/g}$ の糖と約 $380 \mu\text{mol/g}$ のグリセリンがそれぞれ増加していることを確認した。また、アルギン酸ビーズ乾燥法による超低温保存において、ワサビ茎頂を包埋したビーズを1 Mグリセリンを含む0.8 Mショ糖液で前処理したところ、その処理時間における液体窒素保存後のシュート形成率は4時間では低かったが16時間で高くなった。さらに、著者らは、糖やグリセリンの茎頂内への取り込みに伴って乾燥耐性誘導に関するプロリンの生合成量が高まることを明らかにした(Matsumotoら, 1998a)。これらことから、前処理中にグリセリンが組織内に徐々に浸透することで、細胞の乾燥耐性や凍結耐性が高まると推察される。しかし、現在のところ、ローディング液における作用機構についてはほとんど明らかにされていない。

高濃度の糖を含む培地上での前培養は、ガラス化法以外の超低温保存法でも多く用いられ、0.3~0.7 Mのショ糖添加培地で茎頂等を16~24時間処理する方法である(Uragamiら, 1989, 1990; Towillら, 1990; Pence, 1991; Kohmuraら, 1992, 1994; Hatanakaら, 1994; Niinoら, 1992a, b; Niino・Sakai, 1992; Matsumotoら, 1994, 1995a, b, 1996, 1997, 1998a, b, c; Matsumoto・Sakai, 1995; 松本ら, 1996b; Suzukiら, 1994)。本研究において、ワサビ茎頂ではガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法ともに、ショ糖0.3 Mで約16時間の前培養が適していることを明らかにした。高濃度のショ糖を含む固形培地上で前培養することにより細胞内に糖が大量に増加する(Uragamiら, 1990; Dereuddreら, 1988; Dereuddre, 1991a, b)が、糖の増加がなぜ脱水耐性や凍結耐性を高めるかについては、植物培養細胞・茎頂ではほとんど基礎的研究がされていない。なお、越冬植物は秋から冬にかけて成熟に伴う凍結耐性の増加に

つれて、糖、糖アルコール及び蛋白質の増加、液胞の小胞化、膜脂質の増加、さらにそれらの脂肪酸分子種の不飽和化が知られている(酒井, 1995)。今後、培養茎頂を用いたこのような基礎研究で、細胞における耐性誘導機構の解明が期待される。

3 アルギン酸ビーズ乾燥法

ガラス化法と同様に、最近多くの報告があるアルギン酸ビーズ乾燥法は、Dereuddreら(1990)がナシ、Fabre・Dereuddre(1990)がバレイショでの成功例を報告した後、Niino・Sakai(1992)が改良を加えた。これにより、植物の茎頂ではリンゴ・ナシ・クワ(Niino・Sakai, 1992)、コーヒー(Hatanakaら, 1994)、キウイフルーツ(Suzukiら, 1994)、アスパラガス(Ghosh・Sen, 1994)、チャ(Kuranuki・Sakai, 1995; 青島 1995)、リンドウ(菊池ら, 1995)、ユリ(Matsumoto・Sakai, 1995)及びスターチス(Matsumotoら, 1998c)等、多くの成功例が報告されている。また、体細胞不定胚をABAまたは前培養で乾燥耐性を付与させた後、乾燥させる方法でメロン(下西ら, 1994)、カンショ(吉永・山川, 1994)等で成功例が報告されている。ビーズ乾燥法の特徴は、アルギン酸塩のビーズに包埋した茎頂を高濃度ショ糖液で処理して乾燥耐性とそれに続く急速冷却に対する耐性を付与することにある。耐性を付与した後に、ビーズを風乾する乾燥過程でビーズ中の糖濃度が次第に高まり、やがて飽和、さらに過飽和濃度に達する。続いて、液体窒素中で冷却することによって、ビーズ及びその内部の茎頂をガラス化させる。この方法の長所としては、操作が比較的簡単であり、同時に多量の茎頂を処理できる点である。一方、脱水処理に数時間を要し、一般に保存後のシュート形成率が低く、さらにその再生速度が遅いという欠点がある。なお、Dereuddreら(1990)は、液体窒素から取り出し室温で加温後、培地に置床し、一日後に茎頂をビーズから摘出している。スターチス茎頂では、ビーズに包埋したまま培養を続けると再生したシュートには水浸状の発生が多かったが、ビーズから茎頂を取り出して培養したところ、茎頂の多くは正常に生育した(Matsumoto

ら, 1998c). したがって, ビーズに包埋のままでの培養は, 植物の種類によってはその後の生育に著しい障害を引き起こす可能性があるため, そうした植物では茎頂をビーズから取り出して培養することが必要となると考えられる.

ワサビ茎頂を用いた本研究において, アルギン酸ビーズ乾燥法はガラス化法と比べシュート形成率が低かったが, 乾燥処理前に 0.8 M ショ糖に 1 M グリセリンを添加した液で処理したところ, 液体窒素冷却後のシュート形成率が 15% 以上高まり, 再生したシュートの初期生育が通常のビーズ乾燥法より良好であった. このグリセリン添加による改良ビーズ乾燥法の効果はワサビ以外の植物でも確認され, ササユリ茎頂(Matsumoto・Sakai, 1995), スターチス茎頂(Matsumotoら, 1998c)でシュート形成率が高くなったことが報告されている. しかし, スターチス茎頂では, 0.5 M のグリセリンの添加が適していた(Matsumotoら, 1998c). したがって, 0.8 M ショ糖液に添加する最適グリセリン濃度は植物によって異なるが, この改良ビーズ乾燥法は, 今後, 多くの植物で応用可能であると思われる.

4 ビーズ・ガラス化法

ガラス化法を改変したビーズ・ガラス化法で -196°C に冷却されたワサビ茎頂のシュート形成率はガラス化法とほぼ同程度(約90%)で, ビーズ乾燥法よりも30%程度高い値を示した. これと同様な結果が, ユリ(松本ら, 1996b)やスターチスの培養茎頂(Matsumotoら, 1998c)でも得られた. このビーズ・ガラス化法では, 脱水時間がガラス化法なみに短く, また処理した茎頂の生育がビーズ乾燥法より著しく速かった(Matsumotoら, 1995b). また, 茎頂をビーズに包埋するビーズ・ガラス化法では, 煩雑な操作であるガラス化液の交換が容易となるため, 多量の茎頂を同時にほぼ均一に脱水することが可能となる. さらに, ビーズ・ガラス化法では茎頂がビーズに包埋されているため, ガラス化法と比べるとPVS2液の浸透脱水による組織へのストレスは少なくなり, その結果, ガラス化法よりシュート形成率が高くなったと推察される. また, 茎頂より小さい材料である毛状根や

懸濁細胞等を用いる場合は, このビーズ・ガラス化法を用いることにより, 操作中で最も煩雑な液交換が極めて容易になる.

このようにビーズ・ガラス化法は, いくつかの利点を持っていることから, 今後, 有望で実用的な超低温保存法になり得ると考えられる.

5 超低温保存後に再生した植物の遺伝的変化

超低温保存後に再生した植物体の組織・細胞に生じる遺伝的変異の発生に関する報告は, 数多く出されている. 一般に, 茎頂の超低温保存では, 適正な条件で処理され高い生存率やシュート形成率が得られた場合は遺伝的変異は認められていない. しかし, 不適当な処理で超低温保存され, シュート形成率が30%以下の低い場合は, 茎頂の再生能力が極めて低くなるため多くの茎頂はカルス化し, シュートを形成した茎頂もその生育が著しく遅れると言われる(Towill, 1984). そのため, 超低温保存した茎頂から再生した植物の遺伝的変異に関しては, 適正条件下で合理的な方法で超低温保存された材料について論議することが必要と思われる. Seitz・Reinhard(1987)は, 緩速予備凍結法で超低温保存したオタネニンジンの培養細胞について再培養後経時的に比較したところ, 新鮮重, 乾物重には差がなかったと報告している. また, 木本類の培養茎頂においては, ガラス化法で超低温保存した5品種のリンゴ及び5品種のナシ(Niino, 1992a), 13品種のクワ(Niino, 1992b), 8品種のオウトウ(田代ら, 1995a, b)やアルギン酸ビーズ乾燥法で超低温保存されたリンゴ及びナシ(Niino・Sakai, 1992)でも形態的な異常個体は見出されなかった. また, Yamadaら(1991)は, 3種類のシロクローバー茎頂をガラス化法で超低温保存したところ, 再生個体には形態的変異が認められなかったと報告している. 我が国では超低温保存後に再生した植物の生育調査に関する報告は少ない. 筆者らは, スターチスを用いて, ガラス化法で処理後, 液体窒素で冷却, 処理のみで未冷却及び無処理の茎頂の3種類のグループから再生させた植物について, それぞれ生育調査を行いその表現形質を比較した(松本, 1996). 再生した植物体は, 順化から5か月後の開花期までの1か月毎の調査

では、ガラス化法で液体窒素に冷却区、未冷却区、無処理区において、株数、草丈、展葉枚数、葉の横径縦径比の4項目については、顕著な差は認められなかった。さらに、開花時の花茎、花卉の大きさ及び、花の形状や花色にも特に差は認められなかった。したがって、少なくとも表現型が変わるほどの変異は発生しないと推察される。

最近、超低温保存した培養細胞や茎頂についてのDNAレベルでの変化の検討が多く報告されている。Harding(1991)は、超低温保存したバレイショの茎頂をRFLPで比較したが、対照区と比べ変化はなかったと報告した。Kobayashiら(1994)は、エレクトロポレーションによって形質転換したネーブルオレンジの珠心胚由来の培養細胞と対照の無処理の細胞をガラス化法で1年間、液体窒素保存した(生存率、約90%)。昇温後、これらの培養細胞はサザンブロット法で分析した結果、導入した遺伝子を保持し、DNAの変異が生じていなかったことを示した。また、Yoshimatsuら(1996)は、オタネニンジン毛状根をガラス化法で超低温保存し再生した毛状根について、二次代謝産物のginsenoside含量とそのパターンを比較したところ液体窒素で冷却及び未冷却の毛状根の間には有意な差は認められなかったと報告している。オタネニンジンの培養細胞を用いたSeitz・Reinhard(1987)も同様な結果を示し、さらに、PCR法によりT-DNAの存在を調査したところ、両者にはともにTL及びTR-DNAの存在が確認されたことから、変異の発生を認めていない。Pauletら(1993)は、サトウキビ茎頂を用いたビーズ乾燥法で、カルス経路でなく茎頂から直接シュートを形成していることを確認し、さらにDNAフィンガープリントプローブを用いた解析でも遺伝的に安定であることを示した。また、カサランサスの培養細胞を用いたChenら(1984)、オレンジの体細胞不定胚を用いたMarinら(1993)、サトウキビ茎頂を用いたPauletら(1993)、エンゲルマントウヒの培養細胞を用いたCyrら(1994)もDNAレベルあるいは生化学的解析で検討した結果、超低温保存して再生した植物には変異が発生していないことを報告している。

したがって、これら多くの明らかにされた事実から、適正な方法で超低温保存された茎頂から再生した植物体では、少なくとも実用上問題となる遺伝的変異の発生の可能性は少ないと判断してよいと考えられる。

6 超低温保存の将来展望

栽培品種やその近縁の有用形質を持つ野生種は、将来の作物の育種事業における遺伝資源として必要不可欠である。特に、種子で保存できない栄養繁殖性植物の保存が重要である。その保存形態として、今のところ圃場での栽培による維持や環境制御された温室におけるウイルスフリー植物の保持、培養植物の継代培養または生育抑制条件での培養による保存等が行われている。これらの方法は短期的あるいは中期的な保存法で、いわゆるワーキングまたはアクティブコレクションに分類される。それに対し、超低温保存法は長期的な安定したベースコレクションに位置づけられてる(岡, 1990)。本研究では、超低温保存の保存材料として培養茎頂を用いた。その理由として、滅菌の必要がなく、クローンの大量増殖が容易で多量の材料が確保しやすい(松本, 1996a)。また、茎頂から直接再生した植物は、遺伝的変異の生じる可能性がほとんどないとされている(斎藤, 1990)。さらに、超低温保存下では保存試料に起こる遺伝的な変異の発生は最小限に抑えられることが大きな長所である(酒井, 1992)。したがって、超低温保存法は、今後、遺伝資源の保存、実験材料の保存等においてますます重要となるであろう。しかし、現在の茎頂を用いた超低温保存技術は、多くの温帯植物に対してはかなり適用範囲が拡大してきたが、熱帯植物の茎頂に対してはほとんど適用できない。それに対し、培養細胞、体細胞不定胚では熱帯植物に対しても、ガラス化法やビーズ・ガラス化法がある程度適用できることは興味深い。温帯植物の培養茎頂では、低温順化が前培養処理として有効であるが、熱帯植物では13℃以下の冷温に対して敏感であるため、この処理が困難である。したがって、低温順化に代わる熱帯性の培養植物の前培養処理に関する基礎研究がこの問題を解決する鍵と思われる。今後は、超低温保存下で起こる可能

性のある変異発生のメカニズムをさらに詳細に調査し、超低温保存法の安全性を実証していく必要があると考えられる。

第Ⅷ章 摘 要

ワサビ培養茎頂の超低温保存法を確立するため、4種類の超低温保存法、すなわち、ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法、改良ビーズ乾燥法及びビーズ・ガラス化法における最適処理条件を明らかにし、それらの利点と問題点を比較した。

1. ワサビ培養茎頂を用いて、ガラス化法の最適処理条件を明らかにした。0.3 Mシヨ糖培地による20℃、16時間の前培養と2 Mグリセリンと0.4 Mシヨ糖の混合液による20分間のローディング処理により、液体窒素保存後のシュート形成率が90%以上に向上した。また、0.3 Mシヨ糖の前培養において0.5 Mのグリセリンを添加したところ、ローディング処理なしでも約80%のシュート形成率が得られた。

2. ビーズ乾燥法の最適条件について検討した。従来の方法では液体窒素保存後のシュート形成率が約65%であったが、乾燥前に0.8 Mシヨ糖と1 Mグリセリンの混合液で処理することによってシュート形成率が15%程度高くなり、約80%となった。これは、ワサビ茎頂がシヨ糖とグリセリンにより乾燥耐性が高まったことを示唆している。

3. 茎頂をアルギン酸ビーズに包埋して行うガラス化法の改変型であるビーズ・ガラス化法を開発した。この方法は、次の2つの長所を持っている。まず第1に、ガラス化法における液交換の煩雑さが解消された。第2に、この方法は茎頂より小さい懸濁細胞、毛状根を材料に用いる場合、さらに効果的な方法になりうる。

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

5. ガラス化法及びアルギン酸ビーズ乾燥法

で超低温保存したワサビ茎頂の再生過程をFD A及びフェノサフランニンによる染色観察、光学顕微鏡による茎頂ドームとその周辺の細胞の生存性について組織学的観察を行った。その結果、ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法ともカルス経由しないで茎頂から直接シュートが形成されることが明らかになった。また、アルギン酸ビーズ乾燥法はガラス化法よりシュート形成率が約30%低かった。これはガラス化法で再生した茎頂は組織の大部分が生存していたのに対して、アルギン酸ビーズ乾燥法の茎頂はドーム近傍組織のみ生存していたことに起因する。したがって、アルギン酸ビーズ乾燥法での低いシュート形成率及びその再生過程の遅れは、生存茎頂部位の大きさから説明できるものと考えられる。

本研究で改良したガラス化法とアルギン酸ビーズ乾燥法は、数種類のワサビ、ユリ及びビスタースの超低温保存に適用できた。

引用文献

- 青島洋一(1995)アルギン酸ビーズ乾燥法によるチャ多芽体の超低温保存. 第14回植物組織培養学会大会講演要旨集, 66.
- Benson, E. E. and J. D. Hamill(1991) Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* 24, 163-172.
- Chen, T. H. H., K. Kartha, N. L. Leung, W. G. W. Kurz, K. B. Chatson and F. Constabel(1984) Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physiol.* 75, 726-731.
- Cry, D.R., W. R. Lazaroff, S. M. A. Grimes, G. Quan, T. D. Bethune, D. I. Dunstan and D.R. Roberts(1994) Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex) embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.* 13, 574-577.
- Dereuddre, J., J. Fabre and C. Bassaglia

- (1988) Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. *Plant Cell. Rep.* 7, 170-173.
- Dereuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud and M. Duron(1990) Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pea tree (*Pyrus communis* L. cv Beurre Hardy) in vitro plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: Effects of previous cold hardening. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 310, Serie III, 317-323.
- Dereuddre, J., S. Blandis and N. Hassen, (1991a) Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. Effects of preculture. *Cryo-Lett.* 12, 125-134.
- Dereuddre, J., N. Hassen, S. Blandin and M. Kaminski(1991b) Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. Thermal analysis. *Cryo-Lett.* 12, 135-148.
- Fabre, J., and J. Dereuddre(1990) Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *solanum* shoot-tips. *Cryo-Lett.* 11, 413-426.
- Fhay, G.M., D. R. Macfarlane, C. A. Angell and H. T. Meryman(1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiol.* 21, 407-426.
- 深井誠一(1992) ダイアンサスおよびキク属植物における茎頂の凍結保存に関する研究. 香川大農紀要 56, 1-79.
- Ghosh, B. and S. Sen(1994) Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. *Plant Cell Rep.* 13, 381-385.
- Haskins, R. H. and K. K. Kartha(1980) Freeze preservation of pea meristems: Cell survival. *Canadian J. of Botany* 58 (8), 833-840.
- Hatanaka, T., T. Yasuda, T. Yamaguchi and A. Sakai(1994) Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee (*Coffea canephora*) after cooling in liquid nitrogen. *Cryo-Lett.* 15, 47-52.
- Harding, K.(1991) Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55, 141-146.
- 平佐聡尚・春木和久・山田員人(1995) ワサビからし油配糖体の高速液体クロマトグラフ(HPLC)を利用した定量法. 鳥根農試研報 29, 153-157.
- 堀秀隆(1986) ワサビ苗の試験管内大量培養法. 植物バイオテクノロジー, 現代化学, 増刊 5, 118-123.
- 細木高志・角田和美・浜田守彦・瀬尾光弘, (1986) ワサビの組織培養苗による増殖. 農及園, 61, 995-996.
- 細木高志・白石一剛・岩井元康・稲葉久仁雄, (1988) ワサビの組織培養の増殖. 農及園 63, 653-654.
- 川原良一・秋田和子(1996) 培養細胞の簡易凍結法による超低温保存. 組織培養 22(9), 348-352.
- 菊池幹之・八代昇(1995) ビーズ乾燥法を用いたリンドウ節組織腋芽の超低温保存. 第14回植物組織培養学会大会講演要旨集, 74.
- Kobayashi, S., A. Sakai, T. Ohgawara and Y. Nakamura(1994) Stable maintenance of an integrated gene in nucellar cells of navel orange(*Citrus sinensis* Osb.) under storage in LN₂. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63(3), 553-558.
- Kohmura, H., A. Sakai, S. Chokyu and T. Yakuwa(1992) Cryopreservation of in vitro-cultured multiple bud clusters of asparagus (*Asparagus officinalis* L. cv. Hiroshima green (2n=30) by the techniques of vitrification. *Plant Cell Rep.* 11, 433-437.

- Kohmura, H., Y. Ikeda and A. Sakai(1994) Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (*Allium wakegi* A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Cryo-Lett.* 15, 289-298.
- 小嶋操(1981) ワサビの科学(3), 農及園 56, 964-968.
- Kuranuki, K. and A. Sakai(1995) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of tea (*Camellia sinensis*) by vitrification. *Cryo-Lett.* 16, 345-352.
- Langis, R., B. J. Schnabel-Preikstas, E. D. Earle and P. L. Steponkus(1990) Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification. *Cryobiol.* 27, 657-658.
- Marin, M. L., Y. Gogorcena, J. Ortiz and N. Duran-Vila(1993) Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatment. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34, 27-33.
- 松本理・山本雄慈(1987) ワサビの花茎及び根茎組織の培養による試験管内大量繁殖. 近畿中国農研 73, 22-27.
- Matsumoto, T., A. Sakai and K. Yamada (1994) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 13, 442-446.
- Matsumoto, T., A. Sakai and K. Yamada (1995a) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily (*Lilium japonicum*) by vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* 41, 231-241.
- Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi and K. Yamada(1995b) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryo-Lett.* 16, 189-196.
- Matsumoto, T. and A. Sakai(1995) An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to -196°C . *Cryo-Lett.* 16, 299-306.
- 松本敏一(1996a) 温帯作物の培養茎頂のガラス化法とビーズ乾燥法. 組織培養 22(9), 357-360.
- 松本敏一(1996b) 植物組織の液体窒素下での生存. 冷凍 71, 1227-1232.
- 松本敏一・酒井昭・高橋千昭・山田員人(1996) ビーズガラス化法(Encapsulation-Vitrification法)によるユリ培養茎頂の超低温保存. 植物組織培養 13(1), 29-34.
- 松本敏一(1997) 植物培養茎頂のVitrification法による超低温保存. 低温生物工学会誌 43(1), 26-33.
- Matsumoto T., C. Takahashi, A. Sakai and Y. Nako(1997) Induction of *in vitro* cultured masses of shoot primordia of hybrid statice and its cryopreservation by vitrification. *HortScience* 32, 309-311.
- Matsumoto T., A. Sakai and Y. Nako(1998a) A novel preculturing for enhancing the survival of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196°C by vitrification. *Cryo-Lett.* 19, 27-36.
- Matsumoto T., A. Sakai and Y. Nako(1998b) Cryopreservation of *in vitro*-cultured axillary shoot tips of grape (*Vitis vinifera*) by vitrification. The Symposium & 1998 Spring Meet. of Japan Soc. Hort. Sci. Abstract, 78.
- Matsumoto T., C. Takahashi, A. Sakai and Y. Nako(1998c) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. *Scientia Horticulturae*, 76, 105-114.
- Murashige, T. and F. Skoog(1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- Nag, K. K. and H. E. Street(1973) Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature* 245, 270-272.

- 中村俊一郎・P. Sathiyamoorthy(1990) ワサビ種子の貯蔵に関する研究. 園学雑 59(3), 579-587.
- 中村俊一郎(1993a) Recalcitrant 種子(1). 農及園 68(11), 1160-1164.
- 中村俊一郎(1993b) Recalcitrant 種子(2). 農及園 68(12), 1272-1274.
- 中村俊一郎(1994) Recalcitrant 種子(3). 農及園 69(6), 659-660.
- Niino T., A. Sakai, H. Yakuwa and K. Nojiri(1992a) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 28, 261-266.
- Niino T., A. Sakai, S. Enomoto, J. Magoshi and S. Kato(1992b) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification. Cryo-Lett. 13, 303-312.
- Niino, T. and A. Sakai(1992) Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. Plant Science 87, 199-206.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano and T. Matsuzawa(1992) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. Cryo-Lett. 13, 379-388.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano and T. Matsuzawa(1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Science 91, 67-73.
- Niwata, E.(1995) Cryopreservation of apical meristems of garlic (*Allium sativum* L.) and high subsequent plant regeneration. Cryo-Lett. 16, 102-107.
- 大塚寿夫(1988) ワサビの増殖法. 農及園63, 185-189.
- 岡成美(1990) 培養組織を用いた遺伝資源保存. 組織培養の植物科学・産業技術への応用. 日本組織培養学会第2回植物組織培養コロキウム, p.30-33.
- Paulet, F., F. Engelmann and J. C. Glaszmann(1993) Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. Plant Cell Rep. 12, 525-529.
- Pence, V. C.(1991) Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. Plant Cell Rep. 10, 144-147.
- Reinoud, P. J., E. W. M. Schrijnemakers, F. V. Iren and J. W. Kijne(1995) Vitrification and a heat-shock treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two-step freezing. Plant Cell Tiss. Org. Cul. 42, 261-267.
- 斎藤猛雄(1990) 野菜の大量増殖法(1)茎頂培養法. 野菜の組織・細胞培養と増殖(最新バイオテクノロジー全書編集委員会編) p.41-49. 農業図書, 東京.
- Sakai, A.(1962) Studies on the frost-hardiness of woody plants: 1.The casual relation between sugar content and frost-hardiness. Contribution from the Institute of Low Temp. Sci. Ser. B., No.11, 1-40.
- Sakai A. and S. Yoshida(1967) Survival of plant tissue at super-low temperature VI. Effects of cooling and rewarming rates on survival. Plant Physiol. 42, 1695-1701.
- 酒井昭(1987) 植物の茎頂の凍結保存, 凍結保存—動物・植物・微生物—(酒井昭編) p.179-220. 朝倉書店, 東京.
- Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama, (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osp. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9, 30-33.
- Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama (1991a) Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C . J. Plant Physiol. 137,

- 465-470.
- Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama, (1991b) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Sci.* 74, 243-248.
- Sakai A. (1993) Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristems cooled to -196°C . *JICA GRP. REF.* 6, 5-26.
- 酒井昭(1991)植物培養細胞、組織、胚の超低温保存に関する研究の現状と動向 農及園 66, 1223-1229.
- 酒井昭(1992)植物培養細胞・組織・胚の超低温保存. *化学と生物* 30(7), 441-448.
- 酒井昭(1995)低温順化に伴う物質の変動, 植物の分布と環境適応. 熱帯から局地・砂漠へ, p.113-117, 朝倉書店, 東京.
- 酒井昭(1996)植物の培養細胞・組織の超低温保存. *植物組織培養* 13(1), 1-6.
- 佐藤光子・八代昇・酒井昭(1995)ガラス化法を用いたリンドウ節組織腋芽の超低温保存. 第14回植物組織培養学会大会講演要旨集, 73.
- Schnabel-Preikstas, B., E. D. Earle and P. L. Steponkus(1992a) Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification. *Cryobiol.* 29, 738-739.
- Schnabel-Preikstas, B., E. D. Earle and P. L. Steponkus(1992b) *Cryopreservation of chrysanthemum* shoot tips by vitrification. *Cryobiol.* 29, 739.
- Seibert, M. (1976) Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C . *Science* 191, 1178-1179.
- Seitz, U. and E. Reinhard(1987) Growth and ginsenoside patterns of cryopre-served *Panax ginseng* cell culture. *J. Plant Physiol.* 131, 215-223.
- Shimonishi, K., M. Ishikawa, S. Suzuki and K. Oosawa(1991) Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method. *Japan J. Breed* 41, 347-351.
- 下西恵・軽部稔・樽本勲(1994) 予備凍結法によるサツマイモ不定胚の超低温保存. *育学雑* 44(2), 288.
- Suzuki, M., T. Niino and T. Akiyama(1994) Cryopreservation of shoot tips of kiwi-fruit seedlings by the alginate encapsulation-dehydration technique. *Plant Tiss. Cul. Lett.* 11(2), 122-128.
- 田代浩夫・新野孝男・鈴木光輝・比留間直也(1995a) ビトリフィケーション法によるサクラ, オウトウの培養茎頂の超低温保存 1. ハードニング及び脱水処理時間. 第14回植物組織培養学会大会講演要旨集, 119.
- 田代浩夫・新野孝男・大内進・馬越淳・秋濱友也(1995b) ビトリフィケーション法によるサクラ, オウトウの培養茎頂の超低温保存 2. 前培養及び品種. 第14回植物組織培養学会大会講演要旨集, 120.
- Thinh, N.T. (1997) Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical Monocots by vitrification. Doctoral Thesis, Dep. of Agronomy, Kobe University, Kobe. pp.1-187.
- Towill, L. E. (1984) Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups andigena, phureja, stenotomum, tuberosum and other tuber-bearing *Solanum* species. *Cryo-Lett.* 5, 319-326.
- Towill, L. E. (1988) Genetic considerations for germplasm preservation of clonal materials. *HortScience* 23(1), 91-95.
- Towill, L. E. (1990) Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9, 178-180.
- Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai and T. Takahashi(1989) Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.* 8, 418-421.
- Uragami, A., A. Sakai and M. Nagai(1990) Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. *Plant Cell Rep.* 9, 328-331.
- Widholm, J. M. (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for

- deter-mining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47(4), 189-194.
- 山田員人・春木和久(1992) ワサビの茎頂培養による大量増殖法. 島根農試研報 26, 85-95.
- Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura and S. Higuchi(1991) Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Science* 78, 81-87.
- Yoshimatsu, K., H. Yamaguchi and K. Shimomura(1996) Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryo-preservation. *Plant Cell Rep.* 15, 555-560.
- 吉永優・山川理(1994) 乾燥法によるカンショ胚様体の凍結保存. 育学雑 44(2), 290.

Summary

In order to establish an efficient and reliable cryopreservation technique for *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica* MATSUMURA) cooled to -196°C , optimum treatment conditions for 4 different protocols; Vitrification, Encapsulation/dehydration, revised Encapsulation/dehydration and Encapsulation/vitrification were investigated and compared.

1. The optimum conditions for vitrification of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi cooled to -196°C were investigated. Preculturing with 0.3 M sucrose for 16 hr at 20°C combined with a loading treatment of 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C was extremely effective in increasing the rate of shoot formation (>90%) after being immersed to LN_2 . Preculturing with 0.3 M sucrose plus 0.5 M glycerol without loading treatment increased the rate of shoot formation to approximately 80%.
2. The former method of encapsulation/dehydration for wasabi meristems produced only about 65% of shoot formation after being immersed into LN_2 . However, in this study, the shoot formation was about 15% increased (to 80%) by providing a treatment containing a mixture of 0.8 M sucrose plus 1 M glycerol for 16 hr at 20°C before dehydration. It was suggested that the presence of glycerol and sucrose increased the dehydration tolerance of wasabi meristems.
3. An encapsulation/vitrification method, that is modified vitrification technique using encapsulated meristems, was developed. This method provides two advantageous. First, the difficulty in switching between mixtures for each treatment phase is virtually eliminated. Second, this method is extremely effective for handling for smaller explants such as cells suspension and hairy roots.

4. The rate of shoot formation after being immersed into LN₂, time required for dehydration, and recovery speed of regenerated plants among vitrification, encapsulation/dehydration and encapsulation/vitrification were compared. Observations indicated that vitrification and encapsulation/vitrification methods were superior to encapsulation/dehydration in all three areas.

5. The growing processes of wasabi meristems cryopreserved by vitrification and encapsulation/dehydration was compared by FDA/PS staining and histological observation. It was observed that shoots formed directly from meristems without intermediary callus formation. Nearly the entire area of meristems cryopreserved by vitrification were revived and eventually produced a high rate of shoot formation. However, the level of shoot formation of the encapsulation/dehydration method was about 30% lower than that of the vitrification method. This is due to the fact that only the meristematic dome revived.

Therefore, the lower rate of shoot formation of encapsulation/dehydration may be due to the small size of the revived area after immersion into LN₂.

Vitrification, encapsulation/vitrification and the revised encapsulation/dehydration developed in this study were successfully applied techniques for the cryopreservation of wasabi, lily and statice.