

ワサビ培養茎頂の超低温保存に関する研究

松本敏一

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、ガラス化法の実験条件を明らかにした。0.3M ショ糖培地による 20 度 C、16 時間の前培養と 2M グリセリンと 0.4M ショ糖の混合液による 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、0.3M ショ糖の前培養において 0.5M のグリセリンを添加したところ、ローディング処理なしでも約 80% のシュート形成率が得られた。

2. ビーズ乾燥法の実験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 0.8M ショ糖と 1M 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、ワサビ茎頂がショ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良型であるビーズ-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。また、この方法は茎頂より小さい懸濁細胞、毛状根を材料に用いる場合、さらに効果的な方法になりうると考えられる。

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

5. ガラス化法及びアルギン酸ビーズ乾燥法で超低温保存したワサビ茎頂の再生過程を FDA 及びフェノサフラニンによる染色観察、光学顕微鏡による茎頂ドームとその周辺の細胞の生存性について組織学的観察を行った。その結果、ガラス化法、アルギン酸ビーズ乾燥法ともカルス経路を介さずに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、ユリ及びスターチスの超低温保存に適用できた。