

## 第IV章 ハッカ培養茎頂を用いた超低温保存法の検討

インビトロの植物体で維持、増殖したハッカの培養茎頂を用いて、近年開発された、プログラムフリーザーを必要としない、操作が簡便な4種類の超低温保存法（ガラス化法、ビーズガラス化法、ビーズ乾燥法、簡易凍結法）をハッカに適用して、各保存法の利点や問題点を比較した。そして、ハッカ遺伝資源の超低温保存を実用化するための最適な方法とその条件を検討した。

### 1. ビーズガラス化法

#### (1) 実験方法

塩化カルシウムを含まない MS 培地の無機成分に、0.4M ショ糖、2%アルギン酸ナトリウムを加えた溶液（ビーズ液）に茎頂を移し、2ml の滅菌したピペットでビーズ液と共に1個の茎頂を吸い上げた。これをゲル化剤として0.1M塩化カルシウムを、浸透脱水耐性付与剤として0.4、0.8、1.2M ショ糖またはこれらの濃度のショ糖と2Mグリセリンを加えたMS液体培地(pH5.8)に滴下して茎頂をアルギン酸ゲルに包埋した。同時に、25℃で1時間振とう(45rpm)して茎頂に浸透脱水耐性を付与した。その後、ビーズをPVS2液により0℃で1~6時間脱水した。脱水された10~15個のビーズを2mlのクライオチューブに入れ、約1mlのPVS2液[30%(w/v)グリセリン、15%(w/v)エチレングリコール、15%(w/v)ジメチルスルフォキシド、0.4M ショ糖、MS培地、pH5.8]を加えた後、液体窒素に投入して急速冷却した（冷却速度；約200℃/分）。液体窒素中に最低1時間保存後にクライオチューブを取り出し、38℃のウォーターバス中で急速に温めた。その後、クライオチューブ中のPVS2液を除き、1.2Mのショ糖溶液（希釈液）で10分間、2回洗浄し、前述の条件で培養した（図IV-1）。

以上の方法で液体窒素処理した茎頂の茎葉形成率に及ぼす、①低温処理の効果、②前培養の効果、③茎頂の生育ステージの影響、④浸透脱水耐性剤の効果、⑤PVS2液による脱水時間の影響、⑥希釈液のショ糖濃度の影響、及び⑦種間差について検討した。なお、茎葉形成率は2週間培養後に正常な茎葉を形成した茎頂数を調査し、用いた全茎頂数に対するその比率(%)で表した。実験は10~15個の茎頂を用い、3反復で実施した。

#### 1) 低温処理の効果

前処理として4℃、12時間日長（光量子束密度

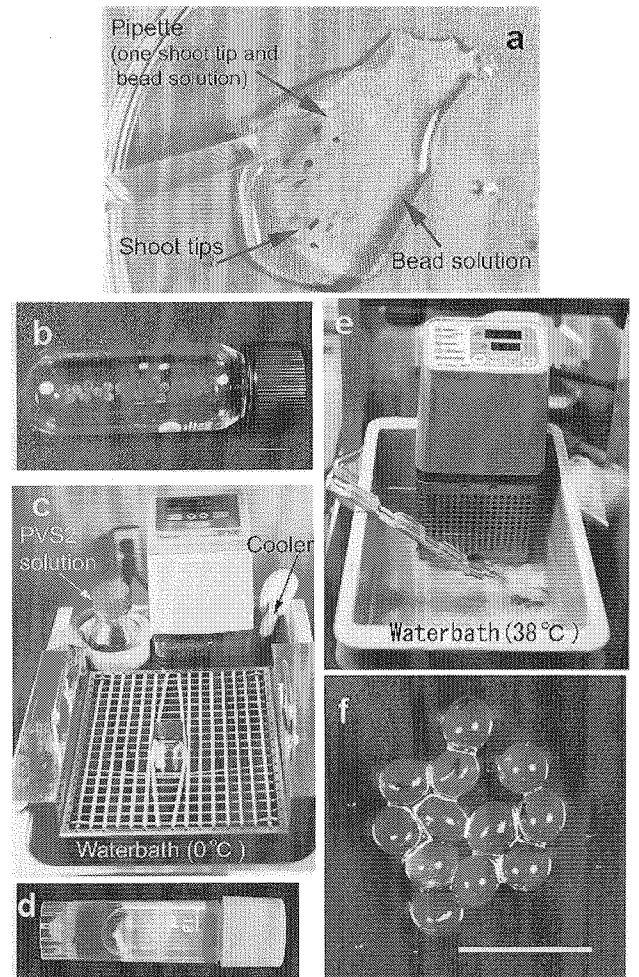


Fig. IV-1 Procedures of encapsulation-vitrification method.

a: Shoot tips in the beads solution; b: During encapsulation and osmoprotection; c: Dehydration with PVS2 solution; d: Encapsulated shoot tips and PVS2 solution in cryotube just before a plunge into liquid nitrogen; e: Rapid warming in water bath; f: Encapsulated and cryopreserved shoot tips.

White bars (b, f): 1 cm.

20 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>·s)で低温処理した節由来の腋芽と低温処理しない節由来の腋芽からそれぞれ摘出した茎頂について、液体窒素処理後の茎葉形成率を比較した。

#### 2) 前培養の効果

前培養とそのショ糖濃度が浸透脱水耐性に及ぼす影響を検討するため、0.3Mと0.088Mのショ糖を含むMS培地で16時間前培養した茎頂と、前培養しない茎頂の液体窒素処理後の茎葉形成率を比較した。

#### 3) 節位と節培養期間の効果

頂芽直下の節を第1節とし、その下の第2、第3節に分けて、それぞれ低温処理し、液体窒素処理後の茎

葉形成率を比較した。また、低温処理しない節の節培養期間（3、5、7日）と液体窒素処理後の茎葉形成率を比較した。

#### 4) 浸透脱水耐性付与剤の効果

浸透脱水耐性付与剤として、0.4 M、0.8 M、1.2 M ショ糖±2 M グリセリン（各々、0.1 M 塩化カルシウムを含むMS液体培地）を用い、液体窒素処理後の茎葉形成率を比較した。PVS2液の脱水時間は3時間とした。

#### 5) PVS2液による最適な脱水時間の検討

低温処理した節由来の茎頂は0.4 M ショ糖+2 M グリセリン溶液で、低温処理しない節由来の茎頂は0.8 M ショ糖+2 M グリセリン溶液（共に0.1 M 塩化カルシウムを含むMS液体培地）で1時間処理して、茎頂に浸透脱水耐性を付与した。その後、PVS2液で0℃、0~6時間脱水してから液体窒素処理し、処理後の茎葉形成率を比較した。液体窒素未処理の実験は1反復で行った。

#### 6) 希釈液の最適なショ糖濃度の検討

低温処理しない節由来の茎頂をアルギン酸ゲルに包埋し、0.8 M ショ糖+2 M グリセリン溶液（0.1 M 塩化カルシウムを含むMS液体培地）で1時間処理して、浸透脱水耐性を付与した。その後、PVS2液により0℃で3時間脱水し、液体窒素処理した。液体窒素処理後、クライオチューブを急速に加温し、PVS2液を廃棄後に0、0.4、0.8、1.2、1.6 M ショ糖を含む希釈液でビーズを洗浄し、茎葉形成率を比較した。

#### 7) 種間差

用いた3種のハッカ、「Spearmint common」、「しゅうび」、「えぞ」について、液体窒素処理後の茎葉形成率を比較した。

#### (2) 実験結果

低温処理にかかわらず、0.088 Mまたは0.3 M ショ糖の培地で前培養した茎頂の茎葉形成率は、前培養しない茎頂に比較して低かった（図IV-2）。これらのことから、ハッカの超低温保存において、前培養は逆効果であるため、これ以降の実験では前培養をしないこととした。

23℃で3日、5日、7日間、節培養した後、それらの節から生じた腋芽から茎頂を摘出し、液体窒素処理後の茎葉形成率を比較したが、これらの間に差は認められなかった（データ未掲載）。また、腋芽を誘導する節位（頂芽からの位置）と、そこから誘導した腋芽茎頂の液体窒素処理後の茎葉形成率にも差が認められなかった（データ未掲載）。これらのことから、今回実験した範囲内においては、茎頂の生育ステージは液体窒素処理後の茎葉形成率に影響しないことが明らかになった。

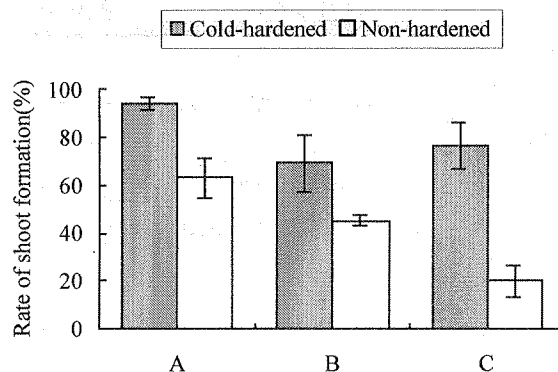


Fig. IV-2 Effects of preculture and sucrose concentration on the rate of shoot formation of encapsulated vitrified axillary shoot

tips of mint with or without cold-hardening.

A: axillary shoot tips without preculture.

B: axillary shoot tips precultured on MS medium supplemented with 0.088 M sucrose.

C: axillary shoot tips precultured on MS medium supplemented with 0.3 M sucrose.

Axillary shoot tips with or without cold-hardening were precultured at 23 °C for 16 h. Precultured and non-treated shoot tips were suspended in 2 % sodium alginate, 0.4 M sucrose and inorganic components of MS medium ( $\text{Ca}^{2+}$  free), and then encapsulated and osmoprotected with 2 M glycerol, 0.4 M sucrose and 0.1 M calcium chloride (for cold hardened shoot tips) or 2 M glycerol, 0.8 M sucrose and 0.1 M calcium chloride (for non-hardened shoot tips) at 25 °C for 1 h before dehydration with PVS2 solution at 0 °C for 3 h. Material: mint cultivar spearmint common. The bars indicate standard error.

0.4 M ショ糖と2 M グリセリンの混合溶液で浸透脱水耐性を付与した場合、低温処理しない茎頂は茎葉形成率が低かったが、低温処理の期間を1週間にのぼすと茎葉形成率は高くなり、2週間でそれは最高になった。しかし、3週間処理では低温処理の効果はそれ以上高まらなかった。これらのことから、ハッカ茎頂の液体窒素処理後の茎葉形成率に対して低温処理は著しく有効であった（図IV-3）。

低温処理の有無にかかわらず、浸透脱水耐性を付与しなかった茎頂は全て枯死した。しかし、ショ糖溶液で処理することでわずかに茎葉を形成する茎頂が認められた。また、ショ糖溶液にグリセリンを加えることで、茎葉形成率はショ糖のみの溶液に比べて高くなった。効果の高いショ糖濃度は、低温処理した茎頂で0.4 Mが最高の茎葉形成率を示した。また、低温処理しない茎頂ではショ糖濃度を0.8 Mに上げることで高まった（表IV-1）。

液体窒素未処理の茎頂でも、PVS2液による長時間の脱水により茎葉形成率は低下したが、低温処理により

茎頂の PVS2 液による浸透脱水耐性は向上した。また、含まれるシヨ糖濃度が液体窒素処理後の茎葉形成率に低温処理の有無にかかわらず、PVS2 液中での最適な脱水時間は 3 時間であった (図 IV-4)。及ぼす影響を検討した結果、シヨ糖濃度 1.2M で茎葉形成率が最も高く、その標準誤差も小さくなった (図 IV-5)。

ビーズから PVS2 液などを洗浄するための希釈液に

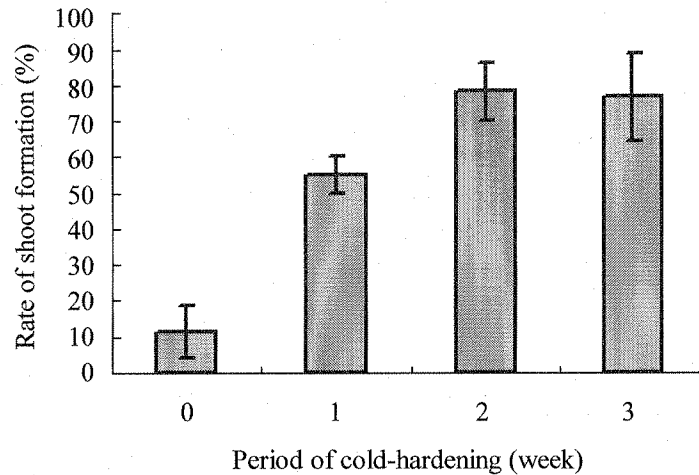


Fig. IV-3 Effect of cold hardening period on the rate of shoot formation of encapsulated vitrified axillary shoot tips of mint cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Nodal segments were cold hardened at  $4^{\circ}\text{C}$  under 12 h photoperiod for the indicated periods. Excised axillary shoot tips were encapsulated and osmoprotected with a mixture of 2 M glycerol, 0.4 M sucrose and 0.1 M calcium chloride before being dehydrated with PVS2 solution for 3 h at  $0^{\circ}\text{C}$ . These encapsulated dehydrated shoot tips were plunged into liquid nitrogen and held there for at least 1 h. Material: mint cultivar spearmint common. The bars indicate standard error

Table IV-1 Effects of osmoprotectant and cold-hardening on the shoot formation of encapsulated vitrified axillary shoot tips of mint cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Osmoprotectant	Shoot formation (% $\pm$ SE)	
	Cold-hardened	Non-hardened
None	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
0.4 M sucrose	19.0 $\pm$ 19.0	16.7 $\pm$ 16.7
0.8 M sucrose	9.1 $\pm$ 9.1	5.6 $\pm$ 5.6
1.2 M sucrose	29.5 $\pm$ 5.8	11.1 $\pm$ 7.7
0.4 M sucrose + 2 M glycerol	87.0 $\pm$ 8.9	17.6 $\pm$ 13.6
0.8 M sucrose + 2 M glycerol	48.3 $\pm$ 13.0	63.0 $\pm$ 8.5
1.2 M sucrose + 2 M glycerol	65.0 $\pm$ 3.5	37.2 $\pm$ 13.1

Axillary shoot tips excised from nodal segments with or without cold-hardening ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3 weeks) were encapsulated in alginate-gel beads and then treated by osmoprotectant at  $25^{\circ}\text{C}$  for 1 h. These encapsulated shoot tips were dehydrated with PVS2 solution at  $0^{\circ}\text{C}$  for 3 h prior to a plunge into liquid nitrogen. Shoot formation (%): percent of shoot tips that produced normal shoots 2 weeks after plating. Material: mint cultivar spearmint common. Approximately 10 shoot tips were treated in each of 3 replicates

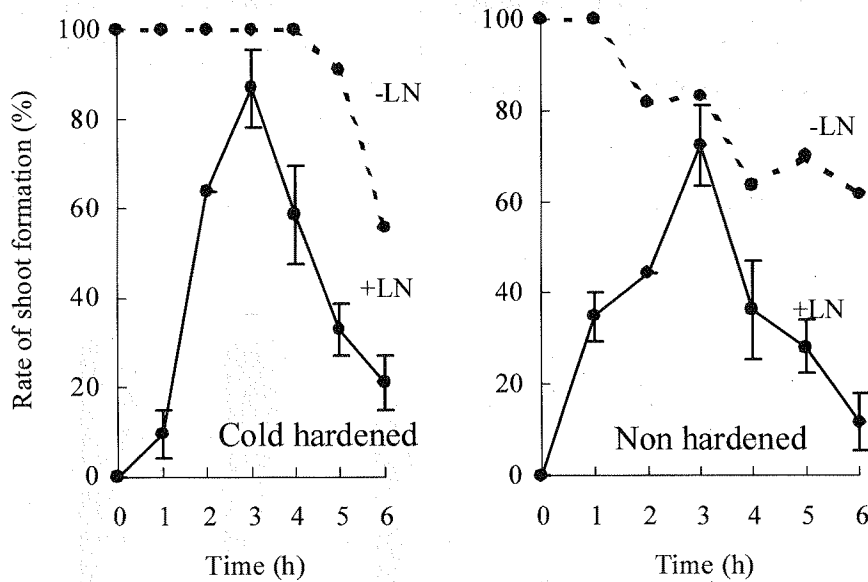


Fig. IV-4 Effect of exposure time to PVS2 solution at 0 °C on the rate of shoot formation of encapsulated vitrified axillary shoot tips of mint cooled to -196 °C.

Cold-hardened (4 °C, 3 weeks) or non-hardened axillary shoot tips were suspended in calcium-free MS inorganic medium supplemented with 2 % sodium alginate and 0.4 M sucrose, and then encapsulated and osmoprotected with a mixture of 2 M glycerol, 0.4 M sucrose and 0.1 M calcium chloride in MS medium (for cold-hardened shoot tips) or 2 M glycerol, 0.8 M sucrose and 0.1 M calcium chloride in MS medium (for non-hardened shoot tips). They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for various lengths of time prior to a plunge into liquid nitrogen(—, +LN). Approximately 10 shoot tips were tested in each of 3 replicates. -LN (- - -): the same treatment without cooling to -196 °C. The bars represent standard error. Material: mint cultivar spearmint common..

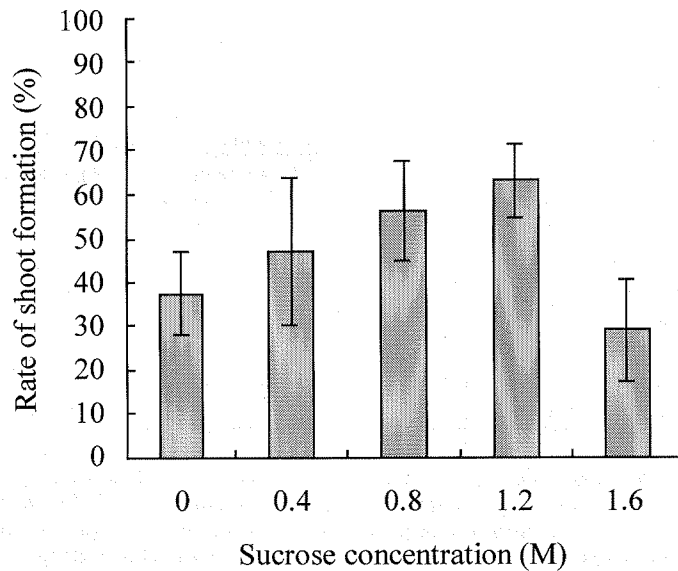


Fig. IV-5 Effect of sucrose in dilute solution on the rate of shoot formation of encapsulated vitrified axillary shoot tips of mint cooled to -196 °C.

Non-hardened axillary shoot tips were suspended in 2 % sodium alginate, 0.4M sucrose and inorganic components of MS medium (CaCl<sub>2</sub> free), and then encapsulated and osmoprotected with a mixture of 2 M glycerol, 0.8 M sucrose and 0.1 M calcium chloride in MS medium. They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for 3h prior to a plunge into liquid nitrogen. Rewarmed beads were washed by dilute solutions containing various concentrations of sucrose twice each for 10 min. The bars represent standard error. Material: mint cultivar spearmint common

本方法で超低温保存した茎頂は培養1日後から成長を開始し、2週間で正常な茎葉を展開した(図IV-6)。これは無処理の茎頂培養と同様の成長速度であり、この急速な成長から、展開した茎葉はカルス化した細胞から二次的に分化したのではなく、分裂組織から直接伸長してきたものであることが明らかである。

同様の方法で「spearmint common」の他、2種のハッカを超低温保存した結果、茎葉形成率は高く、この方法はハッカの他の種への適用性が高いものと考えられる(図IV-7)。

### (3) 考察

ビーズガラス化法は茎頂をアルギン酸ゲルに包埋する。ビーズ化することで茎頂は直接PVS2液に触れないため、ガラス化法に比較して緩速に脱水され、急激な脱水害を回避できる。また、茎頂をビーズ化することで、微細な茎頂の取り扱いや浸透脱水耐性付与剤やPVS2液などの溶液の交換が容易になる。その他の点で、ビーズガラス化法はガラス化法と同様であり、①PVS2液で脱水すること、②PVS2液による脱水害を回避すること、③液体窒素処理した茎頂の培養法の3点が重要となり、主に以下のステップで構成される。

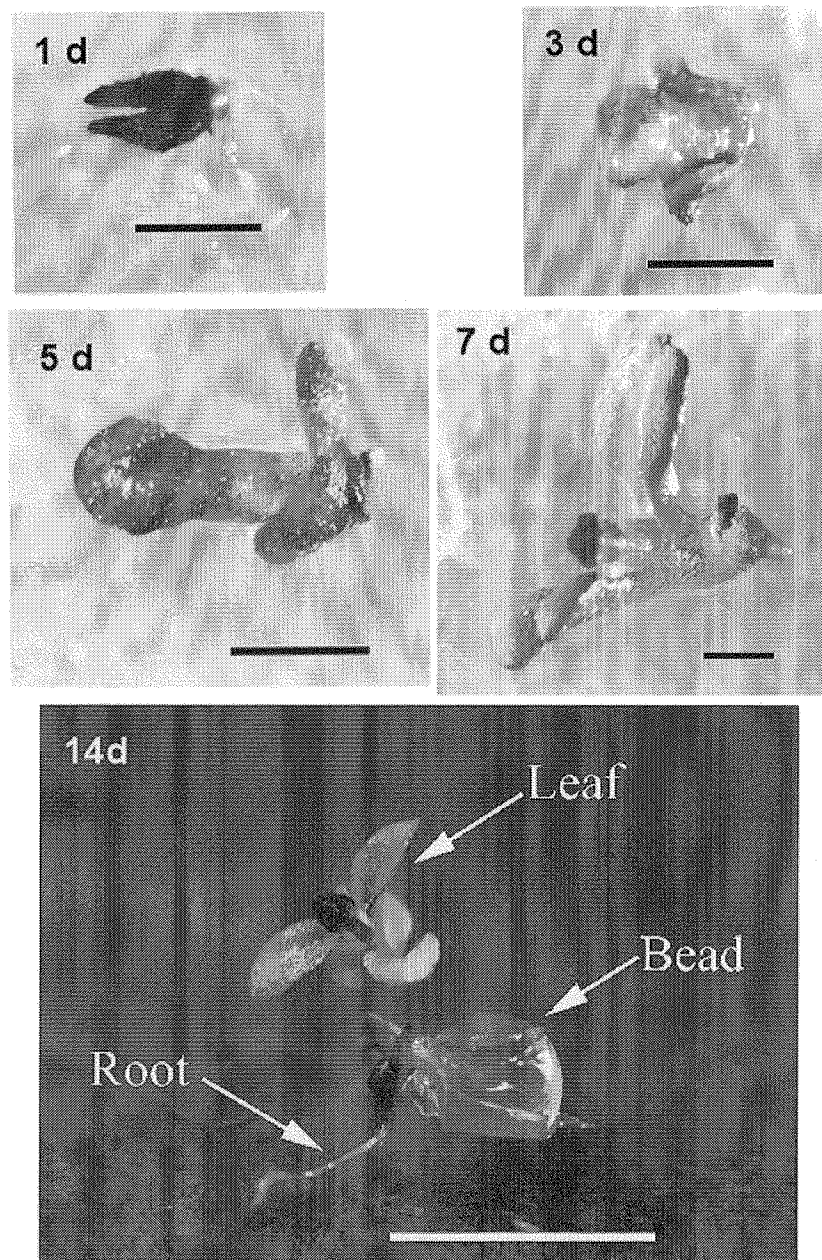


Fig. IV-6 Direct shoot development from encapsulated and vitrified shoot tip of mint cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Days on each photo indicate the period of incubation after cryopreservation. Black bars : 1 mm, white bar: 1 cm, cultivar spearmint common.

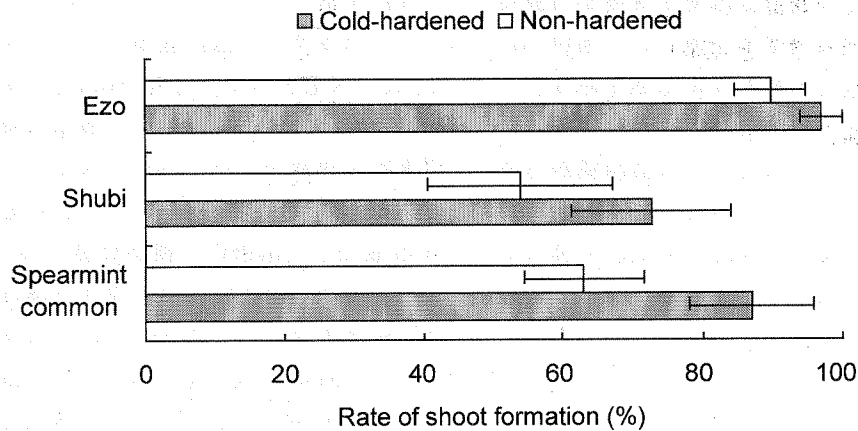


Fig. IV-7 Rate of shoot formation of encapsulated vitrified axillary shoot tips of three *Mentha* species cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Cold-hardened ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3 weeks) or non-hardened axillary shoot tips were encapsulated in alginate beads and then osmoprotected with a mixture of 2 M glycerol, 0.4 M sucrose and 0.1 M calcium chloride in MS medium (for cold-hardened shoot tips) or 2 M glycerol, 0.8 M sucrose and 0.1 M calcium chloride in MS medium (for non-hardened shoot tips). They were dehydrated with PVS2 solution at  $0^{\circ}\text{C}$  for 3h prior to a plunge into liquid nitrogen. Approximately 10 shoot tips were tested in each of 3 replicates. The bars represent standard error.

#### 1) 前処理 (preconditioning)

植物体を低温処理 ( $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ ) することで、茎頂の PVS2 液による浸透脱水への耐性を向上させることが報告されている (Matsumoto ら、1995b; Niino ら、1992a; 1992b、高橋ら、1995) が、ハッカでも低温処理の効果は高かった。前処理として低温処理の他に、植物体を高濃度のショ糖培地で培養するショ糖馴化 (sucrose conditioning) があり、低温処理の困難な熱帯性作物に用いられているが (Takagi ら、1997; Thinh、1997)、ハッカには効果は認められなかった (データ未掲載)。

#### 2) 使用する茎頂

前処理された植物体から茎頂を実体顕微鏡下で摘出するが、超低温保存に最適な葉原基の枚数や茎頂の大きさには作物間の差が大きい。Thinh ら (1999) は熱帯性単子葉作物で、分裂組織を覆う葉原基が多すぎる場合には、分裂組織と PVS2 液の接触が不十分なため、十分に脱水されないこと、逆にまた葉原基が 1 枚の場合には、PVS2 液が分裂組織に直接接触し、葉害または脱水害が発生しやすいことを報告している。分裂組織を覆う葉原基の枚数、大きさは作物間の差が大きく、特に茎頂表面が毛やパラフィンで覆われている作物や、葉原基が分裂組織を強く覆う単子葉作物は、摘出する茎頂を小さくすることが必要である。これに対して葉原基が薄い作物や、分裂組織が葉原基で緩く覆われている作物は摘出する茎頂を大きくすることが必要である。ハッカの茎頂を葉原基数  $0\sim 4$  枚に調整し、液体窒

素処理後の茎葉形成率を比較したところ、葉原基数 4 枚、約 1mm 程度の茎頂で茎葉形成率が高く、材料として適していることが明らかになった (データ未掲載)。また、茎頂を摘出する腋芽の節位や腋芽の誘導日数による茎葉形成率の差は用いた範囲内においては認められなかった。

#### 3) 前培養 (Preculture)

摘出した茎頂の浸透脱水耐性を高めるため、多くの植物で茎頂は高濃度のショ糖を含む培地で前培養されている (Yamada ら、1991; Hatanaka ら、1992; Niino ら、1992)。草本作物は、主に 0.3M のショ糖を含む培地で 1~2 日間前培養される。しかし、前培養の必要性は作物によってかなり異なることが知られており、ハッカでは前培養は液体窒素処理後の茎葉形成率を逆に低下させることが明らかになった。

#### 4) 茎頂のビーズへの包埋と浸透脱水耐性付与処理

本方法を用いると、茎頂のビーズへの包埋と同時に茎頂に浸透脱水耐性を付与できる。浸透脱水耐性を付与するためにショ糖が主に使われてきたが、グリセリンを加えた溶液の方がより高い効果が認められ、特に 0.4 M ショ糖 + 2 M グリセリンの混合溶液 (LS 液、Matsumoto ら、1994) は多くの作物で、その有効性が報告されている。ハッカでもショ糖溶液にグリセリンを加えることで茎葉形成率は向上した。また、低温処理した茎頂は、ショ糖濃度は 0.4M で十分な浸透脱水耐性を付与できたが、低温未処理の茎頂ではショ糖濃度

を 0.8M に高めることで、ある程度の茎葉形成率を得ることができた。この結果は、高濃度のショ糖とグリセリンの混合溶液の処理で、低温処理をある程度代用できることを示唆している。

#### 5) PVS2 液による脱水

PVS2 液はショ糖 0.4 M、グリセリン約 3.26 M、エチレングリコール約 2.42 M、DMSO 約 1.92 M の合計約 8 M の濃厚な溶液で、その作用は、茎頂の細胞間隙に入り、浸透的に細胞を脱水すると考えられる。Matsumoto (2000) はワサビ茎頂を PVS2 液で脱水し、液体窒素に冷却する直前に縦断切片を作成し、その細胞が強く原形質分離していたことを観察している。しかし、必要以上に長時間、PVS2 液で処理すると、茎頂や細胞が傷害を受けるため、生育が阻害される。また、PVS2 液処理時間が短く、脱水が不十分である時には、急速冷却中に致死的な細胞内凍結を起こし、ガラス状態にならない。ガラス化法（ビーズガラス化法）においては、細胞が傷害を起こさず、ガラス化できる濃度まで脱水されることが必要である。そのため、最高の茎葉形成率を得るためには、最適な脱水時間とその温度を決めることが重要である。松本ら (1996) はビーズガラス化法での脱水温度を 25℃ と 0℃ で比較し、0℃ の方が茎葉形成率は高く、安定していると報告している。これは 25℃ での処理は脱水が急激に進みすぎるため、ビーズとそのビーズ内にある茎頂の脱水程度にばらつきが生じるためではないかと推測されている。また、浸透脱水に敏感なパイナップルやバナナでは 0℃ で時間をかけて脱水することで高い茎葉形成率を得ている (Thin et al. 2000)。次ぎに PVS2 液による脱水時間であるが、ガラス化法においては 25℃ で 10~40 分間、0℃ で 30~100 分間の場合が多いが、ビーズ化した際の報告例は少ない。適正な脱水時間は茎頂の特性やそれを包埋するビーズの大きさなどによって異なるが、ハッカは脱水温度 0℃ で 3 時間の脱水時間が最も茎葉形成率が高くなった。

PVS2 液で脱水後は、急速冷却のために液体窒素に直接投入する。PVS2 液を約 1ml、ビーズを 10~15 個 (計約 1.5~1.8ml) を含んだ 2ml のクライオチューブを用いると、その冷却速度は約 200℃/分である。Harding ら (1994) はバレイショ茎頂の超低温保存法として、極微量の凍害防御剤と茎頂をアルミ箔上におき、室温から直接、液体窒素中で冷却し、毎分 1000℃ 以上の速度で超急速冷却する方法 (Droplet method) を報告している。これは茎頂の含水率が高いため、超急速に冷却することが不可欠であるからである。しかし、PVS2 液で十分に脱水されたハッカ茎頂を含むビーズは、毎

分 200℃ の冷却速度で液体窒素中に冷却すれば、それらのビーズはガラス化したことを確認した (図 IV-8)。

#### 6) 加温、洗浄

液体窒素処理後、38℃ のウォーターバス中にクライオチューブを入れて急速に温めた後、ショ糖溶液で 10 分間、2 回洗浄を行ったが、その際のショ糖濃度はハッカで 1.2M での茎葉形成率が高く、0.4M や 1.6M では低くなった (図 IV-5)。高張なショ糖溶液で洗浄する目的は、PVS2 液で強く脱水された細胞を低張な溶液で処理して急速に吸水させることによる被害を防ぐことにある (Iijin, 1933)。超低温保存で一般的に用いられている 1.2M ショ糖溶液がその条件に適していると考えられる。

#### 7) 液体窒素処理した茎頂の培養

液体窒素処理後、加温、洗浄した茎頂は、その作物に応じた培養条件で茎葉を再生させる必要がある。ビーズ乾燥法においては培養中に茎葉を伸長させるため、茎頂をビーズから摘出することが必要であったが (Fabre ら、1990)、松本らはアルギン酸ナトリウム濃度を下げることで、この必要性をなくしている。本実験のハッカにおいても、アルギン酸ナトリウム濃度を 2% とすることで、ビーズ乾燥法、ビーズガラス化法とも超低温保存されたビーズ中の茎頂は、正常な茎葉を伸長させた (図 IV-6、14d)。

以上に示したハッカのビーズガラス化法による超低温保存の最適な条件をとりまとめた結果を図 IV-9 に図示した。

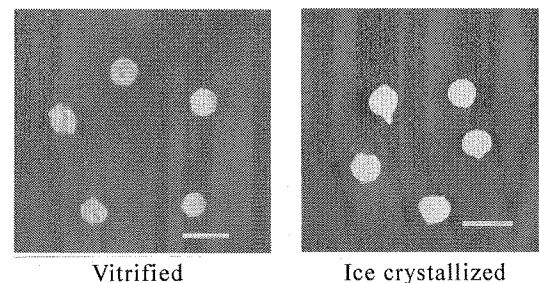


Fig. IV-8 Vitrified or ice crystallized beads cooled to -196 °C.

Alginate beads were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for 3 h prior to a plunge into liquid nitrogen (left side) or directly plunged into liquid nitrogen without dehydration (right side).

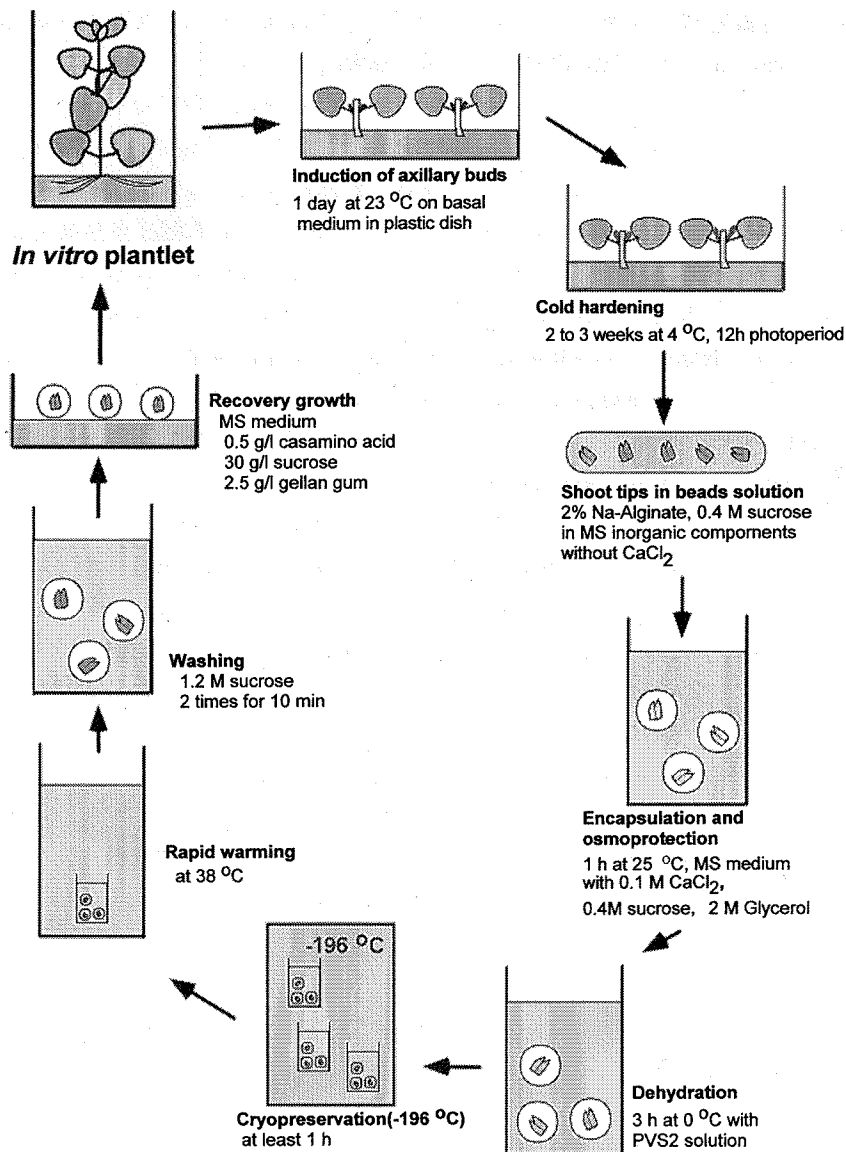


Fig. IV-9 Scheme of encapsulation-vitrification method for cryopreservation of mint.

## 2. ビーズ乾燥法

### (1) 実験方法

ビーズガラス化法と同様に、ビーズ液に茎頂を入れ、0.1 M 塩化カルシウムと 0.4 M ショ糖溶液に滴下し、茎頂をアルギン酸ゲルに包埋した。このビーズ中に包埋された茎頂に脱水耐性を付与するため、0.8 M ショ糖を含む MS 液体培地に移し、25°C で 16 時間、90rpm で振とうし、前培養した。その後、一定個数のビーズ (20~30 個) を乾燥したシリカゲル (関東化学、青、

中粒) 50g を入れた 12cm シャーレ内のろ紙 (ADVANTEC 社、No.2、90mm) 上に移し、25°C で 3 時間乾燥した。乾燥した 10~15 個のビーズをクライオチューブに移し、液体窒素中で急速冷却した。1 時間以上保存した後、クライオチューブを 38°C のウォーターバス中で急速に温めた。3 分間後にビーズをプラスチックシャーレの基本培地に置床し培養した (図 IV-10)。茎葉形成率はビーズガラス化法と同じ方法で算出した。実験は 10~15 個の茎頂を用い、3 反復で実施した。



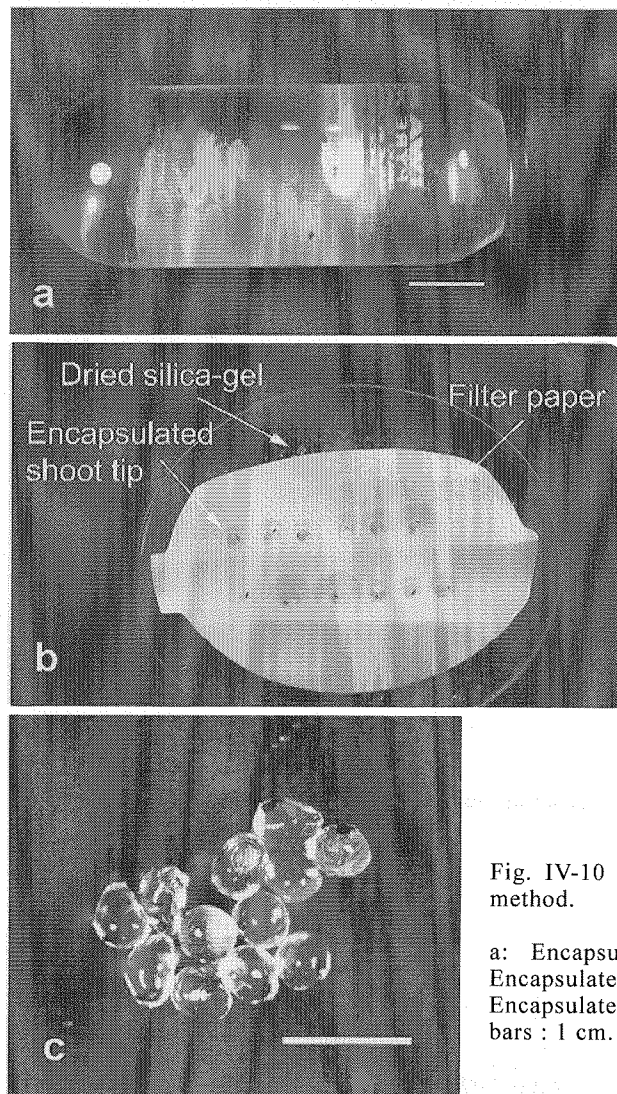


Fig. IV-10 Procedures of encapsulation dehydration method.

a: Encapsulated and precultured shoot tips; b: Encapsulated shoot tips before air-drying; c: Encapsulated and cryopreserved shoot tips. White bars: 1 cm.

### 1) ビーズ、茎頂の含水率

乾燥時間とビーズの含水率の推移を調査した。含水率は生重と、105℃で3時間乾燥後の乾燥重から生重ベースで算出し、反復なしで実施した。

### 2) 種間差

ビーズ乾燥法で超低温保存した、3種の茎葉形成率を比較した。

#### (2) 実験結果

ビーズの含水率(約80%)は前培養で約9%減少し、乾燥中はかなり急激(約20%/h)に減少し、3時間後に約25%に達した。その後のビーズの含水率は20%前後で変化しなかった(図IV-11)。

ビーズ乾燥法で超低温保存したハッカの3種は、い

ずれの種でも茎葉形成率はビーズガラス化法より低いが、ビーズガラス化法と異なり、前処理として植物体を4℃で低温処理することが茎葉形成率に及ぼす効果は一様ではなかった。また、「えぞ」は低温処理なしでは生存する個体は得られなかった(図IV-12)。

### (3) 考察

ビーズ乾燥法はショ糖以外の特殊な凍害防御剤を必要とせず、処理に必要な時間も前培養を除くと、ビーズガラス化法と同程度で、加温後の洗浄の必要もない。そのため、操作性はビーズガラス化法と同程度である。しかし、実験に用いたいずれの種でもビーズ乾燥法で超低温保存された茎頂はビーズガラス化法に比べ茎葉形成率が著しく低かった。

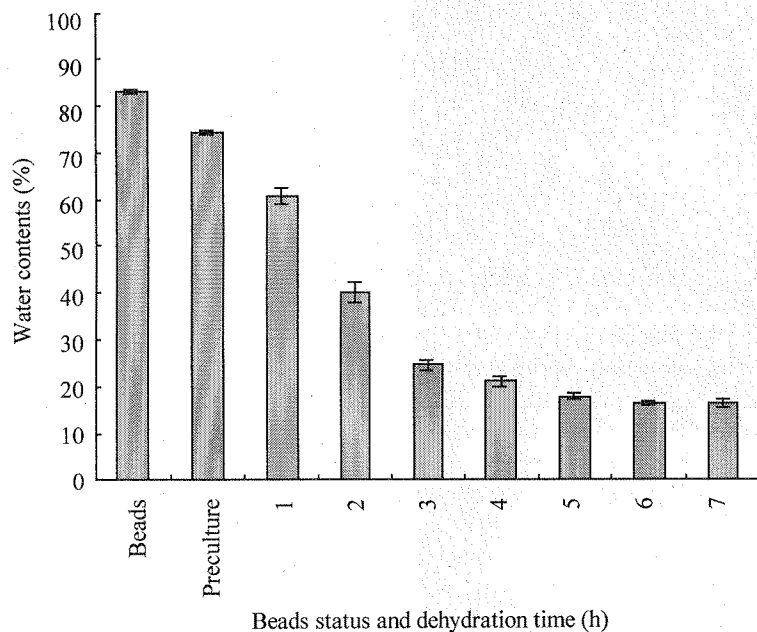


Fig. IV-11 Change in water content (FW) of beads with shoot tips during dehydration process.

About 20 beads were precultured by MS liquid medium supplemented with 0.8M sucrose for 16 h at 25 °C. All beads were transferred to petri dishes containing 50g dried silica-gel for various lengths of time. These dehydrated beads were dried up at 105 °C for 3 h.

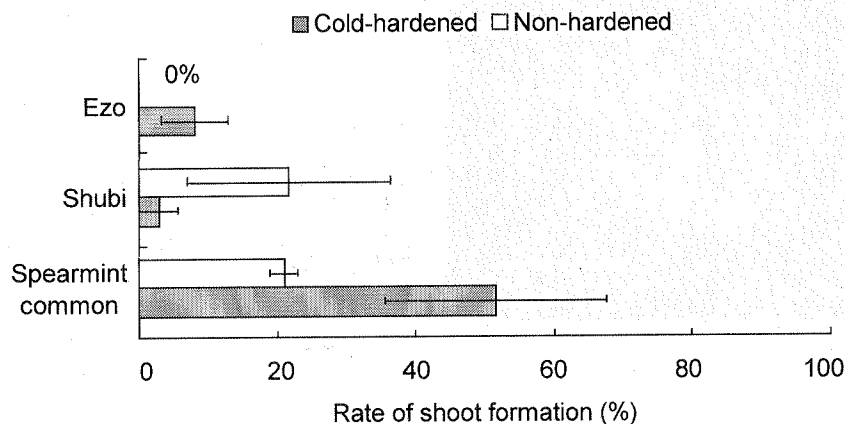


Fig. IV-12 Rate of shoot formation of encapsulated-dehydrated axillary shoot tips of three *Mentha* species cooled to -196 °C by encapsulation dehydration.

Cold-hardened (4 °C, 3 weeks) or non-hardened axillary shoot tips were encapsulated in alginate beads and then precultured in MS liquid medium supplemented with 0.8 M sucrose at 23 °C for 16 h. They were dehydrated in petri dishes containing 50 g dried silica-gel at 25 °C for 3 h prior to a plunge into liquid nitrogen. Approximately 10 shoot tips were tested in each of 3 replicates. The bars represent standard error.

### 3. 簡易凍結法

#### (1) 実験方法

低温処理した茎頂を約 2cm<sup>2</sup>のティッシュペーパーにくるみ、1.8mlのクライオチューブに移し、0.4 M ショ糖と 2 M グリセリンを含むMS液体培地を 1ml 加えた (図IV-13)。このクライオチューブを-30℃のフリーザーの気相部に入れ、1~2時間凍結脱水した後、液体窒素に投入した。最低1時間、液体窒素中で

保存後、クライオチューブを 38℃のウォーターバスに入れ、急速に温めた。クライオチューブ内の溶液を捨て、1.2 M ショ糖溶液で 10 分間、2 回洗浄し、プラスチックシャーレの同じ培地に置床した。茎頂を 24 時間後に同じ新鮮培地に移し培養した。茎葉形成率はビーズガラス化法と同じ方法で算出した。実験は 10~15 個の茎頂を用い、3 反復で実施した。

## (2) 実験結果

低温処理、凍結脱水時間にかかわらず(1、2時間、データ未掲載)生存する茎頂は認められなかった。

## (3) 考察

培養細胞で用いられている簡易凍結法をハッカ茎頂に適用することはできなかった。これは培養細胞と比較して茎頂は体積が大きいため、溶液が凍結する間に茎頂内が十分に脱水されなかったためと考えられる。

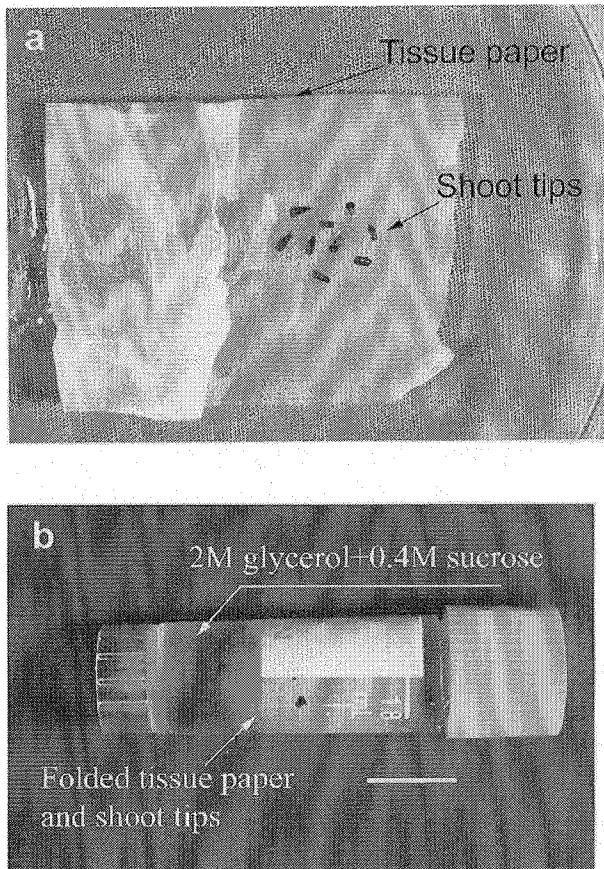


Fig. IV-13 Procedures of simple freezing method and vitrification method.

a: shoot tips on a tissue paper; b: shoot tips in 2M glycerol + 0.4M sucrose solution before cooling (simple freezing method) or dehydration with PVS2 solution (vitrification method). White bar indicates 5mm.

## 4. ガラス化法

### (1) 実験方法

低温処理した茎頂を約  $2\text{cm}^2$  のティッシュペーパーにくるみ、1.8ml のクライオチューブに移し、それに0.4Mショ糖と2Mグリセリンを含むMS液体培地を1ml加え、25℃で20分間処理し、浸透脱水耐性を付与した(図IV-13)。ついで、その溶液を捨て、約1mlのPVS2

液を加えた。0℃で脱水後に液体窒素に投入した。最低1時間、液体窒素内で保存後、クライオチューブを38℃の温水中に入れ、急速に温めた。クライオチューブ内のPVS2液を捨て、1.2Mショ糖溶液を約1ml加え、10分間、2回洗浄した。プラスチックシャーレの基本培地上に滅菌したろ紙を敷き、その上に洗浄した茎頂を置床した。24時間培養後に、PVS2液などの影響を除くため、同じ新鮮培地に移し、培養を続けた。茎葉形成率はビーズガラス化法と同じ方法で算出した。実験は10~15個の茎頂を用い、3反復で実施した。

PVS2液による最適な脱水時間を検討するため、浸透脱水耐性付与はクライオチューブに0.4Mショ糖と2Mグリセリンの混合液を加え、25℃で20分間処理した。その後、クライオチューブ内の溶液を捨て、PVS2液を約1ml加え、0℃で0~120分間脱水処理し、茎葉形成率を比較した。液体窒素処理しない比較は1反復で行った。

### (2) 実験結果

PVS2液による脱水処理を25℃で0~60分間行った際には茎葉形成率は極めて低くなった(データ未掲載)ため、0℃で実施した。その結果、100分間脱水した茎頂の茎葉形成率が高くなった(図IV-14)。

### (3) 考察

ガラス化法は液中の茎頂をピンセットかピペットで取り扱うが、慎重な操作が必要であり、茎頂を傷つける危険性がある。特に溶液を何回も交換する場合には、面倒な操作を繰り返さなくてはならない。Thin(1999)は茎頂をティッシュペーパーで包むことでガラス化法の操作性を向上させた。しかし、ガラス化法では、茎頂を摘出する際、ティッシュペーパーで包む際、加温、洗浄後にろ紙上に置床する際と、新鮮培地に移植する際の4回、直接茎頂に触れる必要がある。これはビーズガラス化法、ビーズ乾燥法の1~2回に比較して多く、操作性には問題が残る。また、ガラス化法は茎頂を培地上のろ紙に置床し、1日間培養後に新鮮な培地に移す必要がある。これは茎頂組織内に残留したPVS2液が生育に影響を与えることを回避するためであるが、ビーズガラス化法、ビーズ乾燥法ではその必要はなく、この点からもガラス化法の操作は煩雑で、大量の茎頂を同時に扱うことが困難である。さらにガラス化法により超低温保存された茎頂の茎葉形成率は、本実験ではビーズガラス化法より劣った。ガラス化法は浸透脱水耐性付与やPVS2液による脱水時間はかなり短い、操作性、保存後の茎葉形成率の点からビーズガラス化法に劣る結果となった。

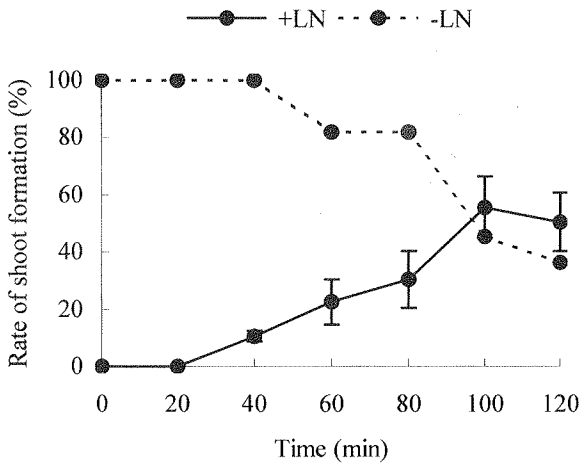


Fig. IV-14 Effect of exposure time to PVS2 solution at 0 °C on the rate of shoot formation of vitrified axillary shoot tips of mint cooled to -196 °C.

Non-hardened axillary shoot tips were osmoprotected with a mixture of 2 M glycerol plus 0.8 M sucrose at 25 °C for 20 min and then dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for various lengths of time prior to a plunge into liquid nitrogen (—, +LN). Approximately 10 shoot tips were tested in each of 3 replicates. -LN (- - -): same treatment without cooling to -196 °C. The bars represent standard error. Material: mint cultivar spearmint common.

5. 異なる超低温保存法での茎葉形成率の比較

これまでに検討した簡易凍結法、ビーズガラス化法、ビーズ乾燥法、ガラス化法の4つの異なる方法で品種「spearmint common」の茎頂を液体窒素処理した結果を図IV-15に示した。茎葉形成率はビーズガラス化法が最も高く、安定してした。これに次いでガラス化法とビーズ乾燥法が同程度で、簡易凍結法においては茎葉形成は認められなかった。

茎頂をビーズに包埋しないガラス化法においては、茎頂にPVS2液による急激な脱水害が生じやすいこと、また、茎頂をピンセットなどで直接触れる機会がビーズガラス化法、ビーズ乾燥法より多く、取扱いが煩雑であることから、現状ではビーズガラス化法が茎葉形成率、取扱の容易さで最も優れ、ハッカ遺伝資源の保存にはビーズガラス化法による超低温保存が優れていることが明らかになった。また、ビーズ乾燥法については、さらに検討することが必要である。

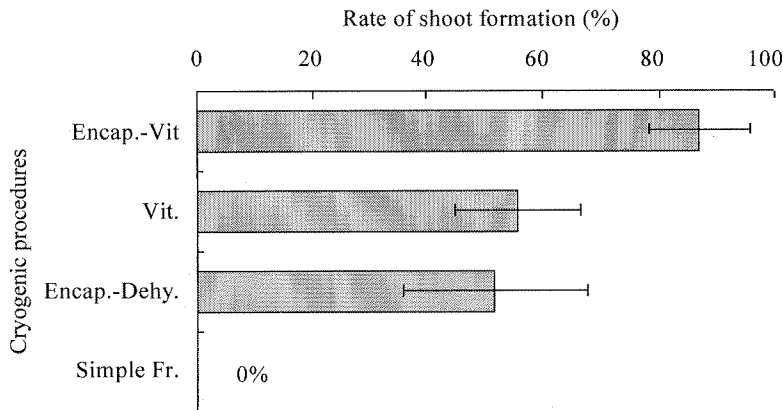


Fig. IV-15 Rate of shoot formation of axillary shoot tips of mint cooled to -196 °C by four different cryogenic procedures.

Encapsulation-vitrification: Cold-hardened (4 °C, 3 weeks) axillary shoot tips were encapsulated in alginate beads and then osmoprotected with a mixture of 2M glycerol, 0.4M sucrose and 0.1M calcium chloride in MS medium at 25 °C for 1 h. They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for 3h prior to a plunge into liquid nitrogen.

Vitrification: Cold-hardened (4 °C, 3 weeks) axillary shoot tips were osmoprotected with a mixture of 2M glycerol, 0.4 M sucrose in MS medium at 25 °C for 20 min. They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for 100 min prior to a plunge into liquid nitrogen.

Encapsulation-dehydration: Cold-hardened (4 °C, 3 weeks) axillary shoot tips were encapsulated in alginate beads and then precultured in MS medium supplemented with 0.8 M sucrose at 25 °C for 16 h. They were dehydrated with dried silica-gel at 25 °C for 3 h prior to a plunge into liquid nitrogen.

Simple freezing: Cold-hardened (4 °C, 3 weeks) axillary shoot tips were osmoprotected with a mixture of 2M glycerol and 0.4 M sucrose in MS medium and then directly transferred to a freezer at -30 °C. They were slowly freeze-dehydrated at -30 °C for 2 h prior to a plunge into liquid nitrogen.

Approximately 10 shoot tips were tested in each of 3 replicates. The bars represent standard error. Material: mint cultivar spearmint common.