

Fig. V-12 Shoot formation of encapsulated and vitrified meristem of strawberry after 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 kitaek

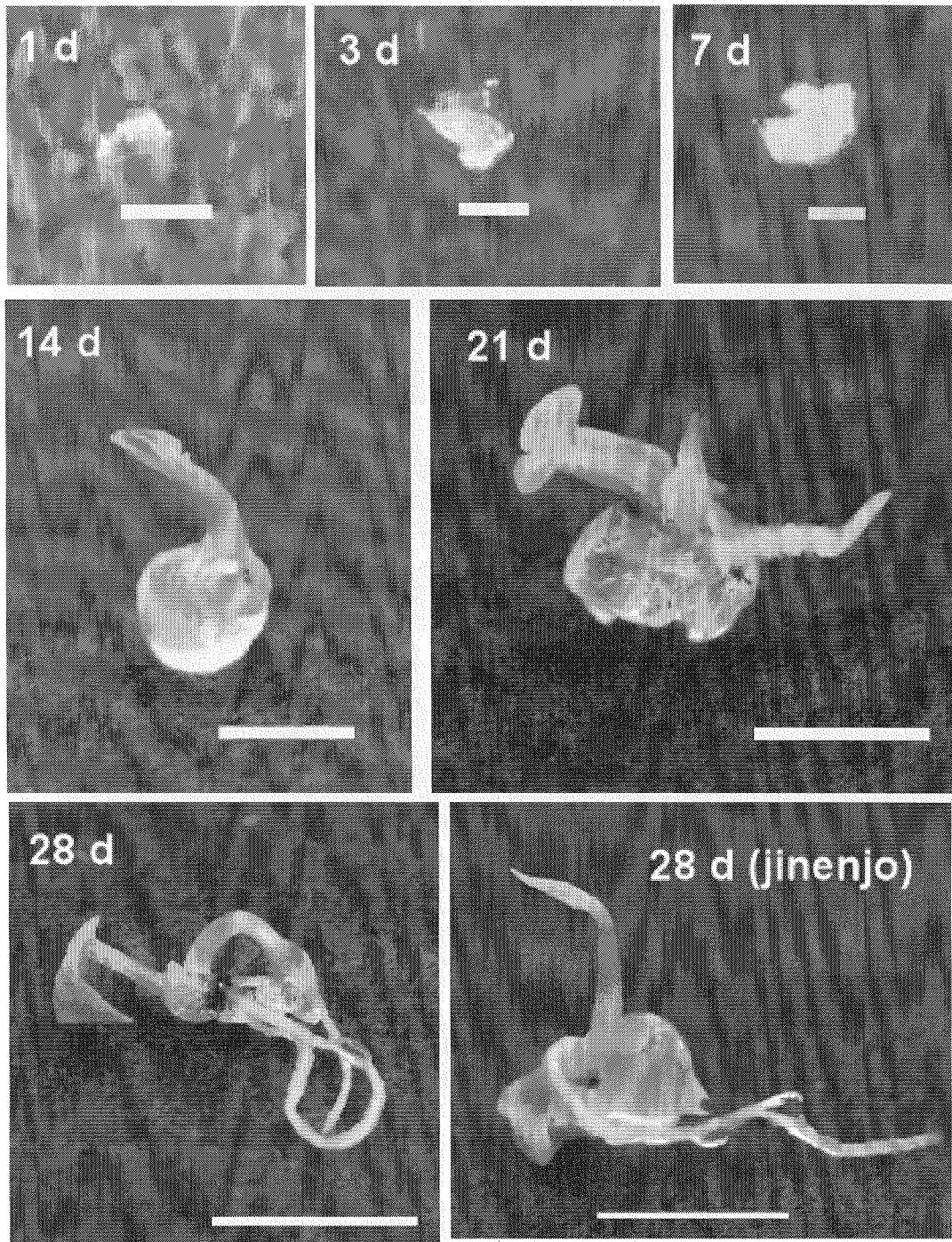


Fig. V-13 Shoot formation of encapsulated and vitrified shoot tip of Chinese yam cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Days on each photo indicate the period of incubation after cryopreservation. White bars indicate: 1-7 d, 1 mm; 14-21d, 5 mm; 28d, 1 cm. Nagaimo (*D. opposita* THUMB.) tokachi except 28d (jinenjo), jinenjo (*D. japonica* THUMB.) ishii



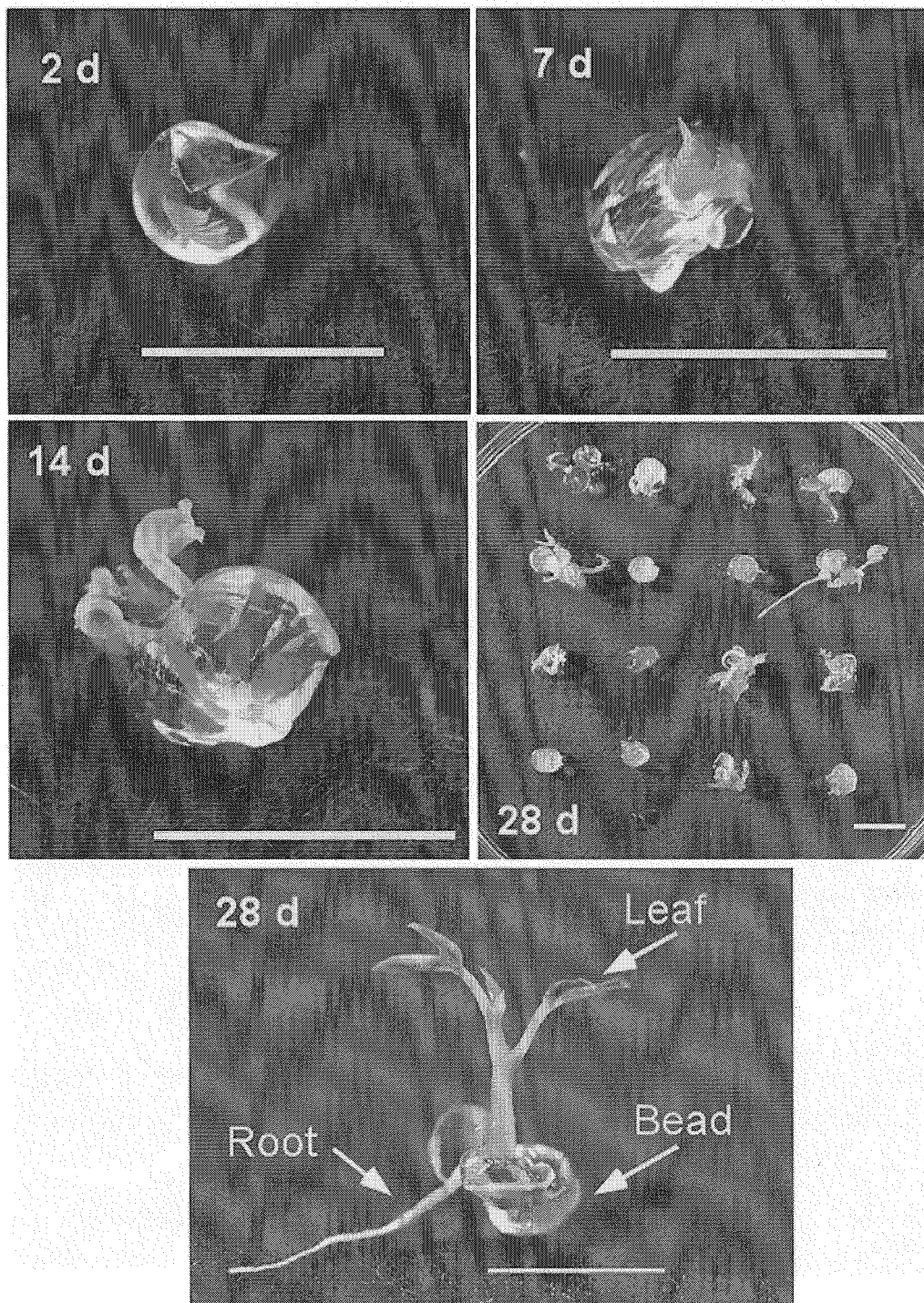


Fig. IV-14 Shoot formation of encapsulated and vitrified shoot tip of cassava after cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Days on each photo indicate the period of incubation after cryopreservation. White bars: 1 cm. Cultivar AMM22.

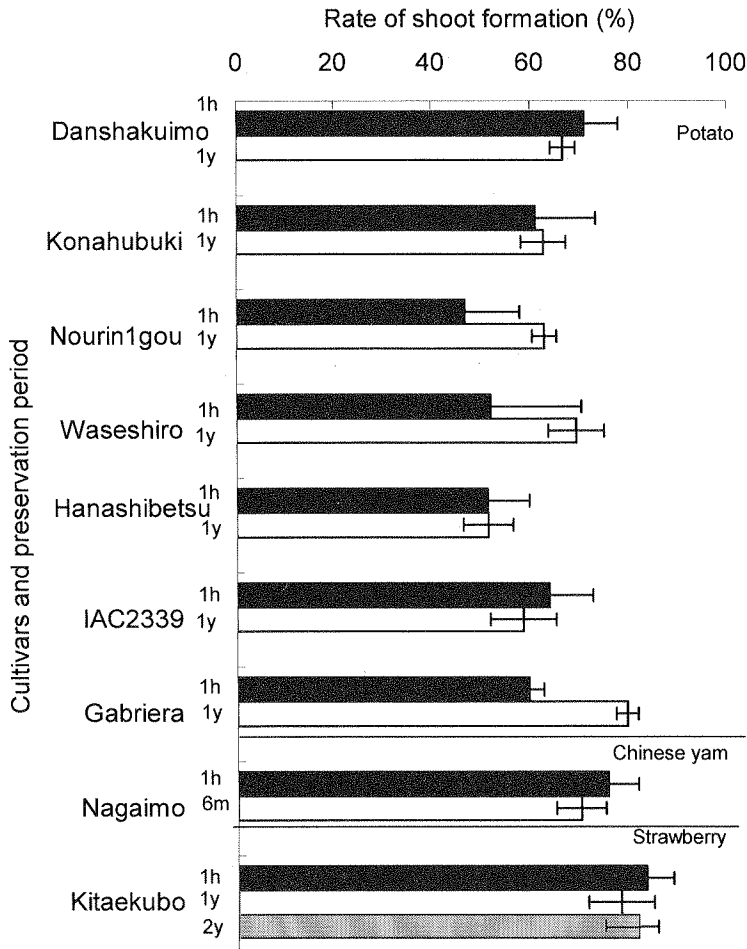


Fig. V-15 Comparison of the rate of shoot formation of encapsulated and vitrified shoot tips cryopreserved for 1h to 2 years.

Shoot tips were suspended in 2 % sodium alginate and 0.4 M sucrose and then encapsulated and osmoprotected. They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for prior to a plunge into liquid nitrogen and kept there for 1h or 6 months to 2 years. Nagaimo; cultivar tokachi.

Approximately 10 shoot tips were tested in each of 3 replicates. The bars represent standard error.

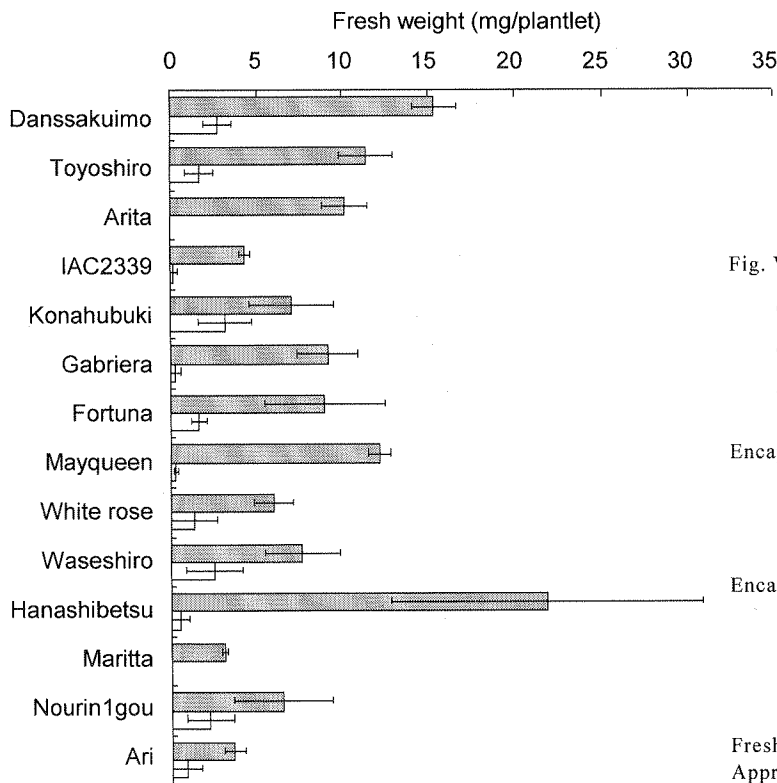


Fig. V-16 Growth in the fresh weights of plantlets developed from encapsulated-vitrified or encapsulated-dehydrated shoot tips of 14 potato cultivars after cooled to -196 °C.

Encapsulation-vitrification (■): Shoot tips were suspended in 2 % sodium alginate and 0.4M sucrose and then encapsulated and osmoprotected. They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C prior to a plunge into liquid nitrogen.

Encapsulation-dehydration (□): Shoot tips were encapsulated in alginate beads and then precultured in MS liquid medium supplemented with 0.8M sucrose. They were dehydrated in petri dishes containing 50 g dried silica-gel at 25 °C prior to a plunge into liquid nitrogen.

Fresh weight was measured 3 weeks after rewarming. Approximately 10 shoot tips were tested in each of 3 replicates. The bars represent standard error.

Table V-2 The rate of shoot formation of encapsulated and vitrified strawberry shoot tips excised from different tissues cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Origin of shoot tips	Rate of shoot formation (% $\pm$ SE)
Multiple shoots	62.4 $\pm$ 1.2
Runner end	70.3 $\pm$ 0.3
Runner segment	67.2 $\pm$ 4.3

Shoot tips were excised from runner ends or runner segments and multiple shoots of non-hardened plants. The shoot tips excised from runner were incubated for 2-3 days to select non-contaminated shoot tips. They were suspended in 2 % sodium alginate and 0.4 M sucrose and then encapsulated and osmoprotected by 2 M glycerol, 0.4 M sucrose and 0.1 M calcium chloride solution for 1 h at  $25^{\circ}\text{C}$ . Beads were dehydrated with PVS2 solution for 2 h at  $0^{\circ}\text{C}$  prior to a plunge into liquid nitrogen. Material: strawberry cultivar kitaekubo. SE stands for standard errors

### 3. 超低温保存後の作物

ビーズガラス化法で超低温保存した茎頂は、保存後の生育は旺盛で、順調に茎葉を形成した。このことから、超低温保存による変異の発生はないものと考えられるが、さらに確認するため、超低温保存した茎頂と液体窒素処理以外は同じ処理をした茎頂由来の植物体を順化後、またはバレイショではマイクロチューバーを形成後、圃場に移植して、その生育を調査すると共に、DNA レベルでの比較を行った。

#### (1) 超低温保存された作物の生育

##### 1) バレイショ

ビーズガラス化法で超低温保存した「男爵薯」の植物体を高濃度のショ糖を含むMS固形培地(100g/l ショ糖、0.5g/l カザミノ酸、2.5g/l ゲルライト、pH 5.8)に移植し、 $23^{\circ}\text{C}$ 、暗黒下で1~2ヶ月、マイクロチューバーを誘導した。誘導されたマイクロチューバーを休眠打破のため1ヶ月間 $4^{\circ}\text{C}$ 、暗黒下で低温処理した後、8cmポットに播種後、温室内で6週間栽培し、萌芽個体を1999年6月22日に圃場へ移植した。生育調査は収穫期(9月28日)に実施し、塊茎は収穫後10日間乾燥させ、調査した。なお、通常の種いもから栽培した植物体を参考区として使用した(参考区の播種期は5月14日、収穫期は9月15日)。

##### 2) イチゴ

ビーズガラス化法で超低温保存した6品種の植物体を、 $23^{\circ}\text{C}$ 、16時間日長で1ヶ月培養後に、パーミキュライトを入れたイチゴパック内で順化させ、1997年5月5日(「サマーベリー」は同年9月15日)に圃場へ移植した。1998年(「サマーベリー」は1999年)の収穫期から調査を開始し、収穫後に草丈を調査した。

##### 3) ヤマノイモ

ビーズガラス化法で超低温保存したナガイモ「十勝」の植物体を、 $25^{\circ}\text{C}$ 、16時間日長で1ヶ月培養後に8cmポットへ移植し、温室内で6週間栽培した。順化した個体を1999年6月22日に圃場へ移植し、10月18日に草丈を調査した。

#### (2) 超低温保存した作物の RAPD 分析

超低温保存後(+LN)に圃場へ定植した植物体(バレイショ、ヤマノイモ、イチゴ)またはインビトロの植物体(ハッカ、キャッサバ)と液体窒素処理以外は同じ処理をした茎頂(-LN)由来の植物体(主に葉、葉柄)から市販の抽出キット(ISOPLANT)を用いてDNAを抽出し、Operon社のA, G, H, I, J, K, N, O, Q, Rの1-20、計200のプライマーと宝酒造のTaqを用いてPCRに供試し(Williamsら、1990)、その産物をRAPD分析した。なお、マーカーとして宝酒造の100bp DNAラダーを使用した。

#### (3) 実験結果

##### 1) 超低温保存した幼植物体の生育

バレイショの幼植物体は順調にマイクロチューバーを形成し、その生重は超低温保存したものと、同未処理のものとの間に差は認められなかった(表V-3)。

イチゴ(「きたえくぼ」など6品種)は順化後の圃場での活着、越冬に問題はなく、順調に生育した。「サマーベリー」以外は定植の翌年から開花し、収穫が可能であった。

ヤマノイモ(ナガイモ「十勝」)も順化後、圃場へ定植したが、短日条件(塊茎形成条件)であったためか地上部が枯葉した。8月下旬から生育を開始したが、貧弱な生育のまま調査期を迎えた。

ハッカ、キャッサバ各1品種は順調に生育し、ハッカは3週間後に、キャッサバは2ヶ月後に4~5節の植物体に成長し、根を分化したが、気温と圃場での都合

Table V-3 Average weight and its coefficient of variation of microtubers developed from cryopreserved (+) or non-treated control (-) plantlets

Liquid nitrogen treatment	Average weight (mg)	Coefficiency of variation (%)	Maximum (mg)	Minimum (mg)
+	231.3	77.3	677.7	33.7
-	262.4	75.4	661.7	61.6

Cryopreserved shoot tips of potato by encapsulation vitrification were incubated for 1 month at 23 °C under 16h photoperiod. Microtubers were induced by transferring plantlets to sucrose enriched MS medium, incubating at 23 °C in the dark. Non-treated control plantlets: same treatment except cooling to -196 °C. Material: potato cultivar danshakuimo.

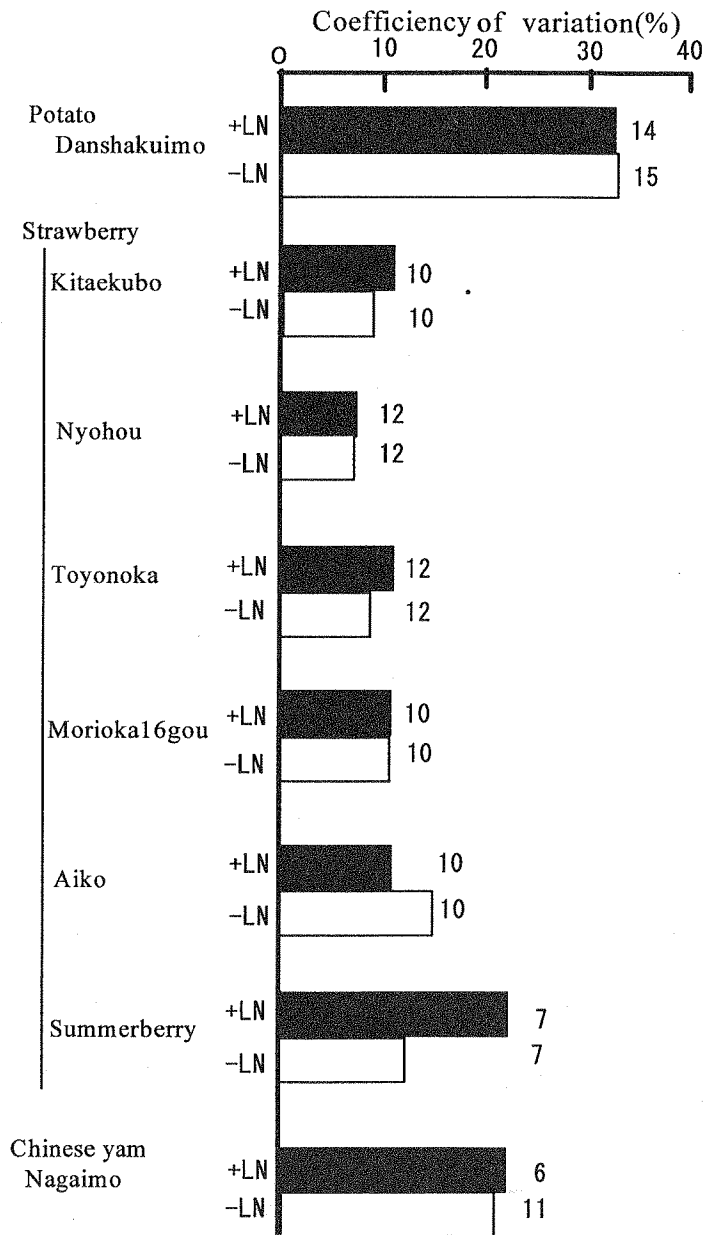


Fig. V-17 Coefficient of variation of plant height of cryopreserved (+LN) or non-treated control plant (-LN).

Cryopreserved plantlets by encapsulation vitrification and non-treated control plantlets were cultivated in the field and their plant heights were measured on (potato, Chinese yam) or after (strawberry) their harvest periods. Nagaimo; cultivar tokachi. Numbers in the figure indicate the numbers of tested plants.

上、移植することはできなかった。

2) 超低温保存した作物の圃場での生育

圃場で栽培した全ての作物で、超低温保存した植物体と未処理の植物体の間に、外観上の差は認められず(データ未掲載)、収穫期の草丈と、その変異係数には明らかな差は認められなかった(図V-17)。また、収穫したバレイショ塊茎(図V-18)、イチゴ果実(データ未掲載)の重量、外観にも差は認められず、ビーズガラス化法で超低温保存した作物には形態的な変異は発生していないことが明らかになった。

3) RAPD 分析

ハッカを除くいずれの作物でも DNA は抽出できたが、イチゴでは PCR 産物はいずれのプライマーでも認められなかった(図V-19)。バレイショ「男爵薯」、ヤマノイモ(ナガイモ)「十勝」、キャッサバ「AMM22」は各々、145、98、190 のプライマーで PCR 産物が確認された。

それぞれのバンドを液体窒素処理、未処理で比較したところ、バンドの濃淡に差はあるものの、明らかな差は認められず、ビーズガラス化法で超低温保存した作物には RAPD 分析によっても変異の発生は確認されなかった(図V-20)。

(4) 考察

圃場に定植したバレイショは、液体窒素処理、未処理の植物体とも、通常の種いもから栽培した植物体(参考区)より生育は劣り、変異係数も大きくなった(参考区: 草丈 63.1cm、変異係数 16.1%、塊茎の平均 1 個重 117.0g、変異係数 23.9%)。これは液体窒素処理、未処理区の種いもの大きさが劣り、揃いも悪いことが原因と考えられた。また、他の作物でも同様の傾向があると考えられる。しかし、バレイショ、イチゴなど、調査を実施したいずれの作物においても、超低温保存区、液体窒素未処理区の間で植物体の外観や草丈とそ

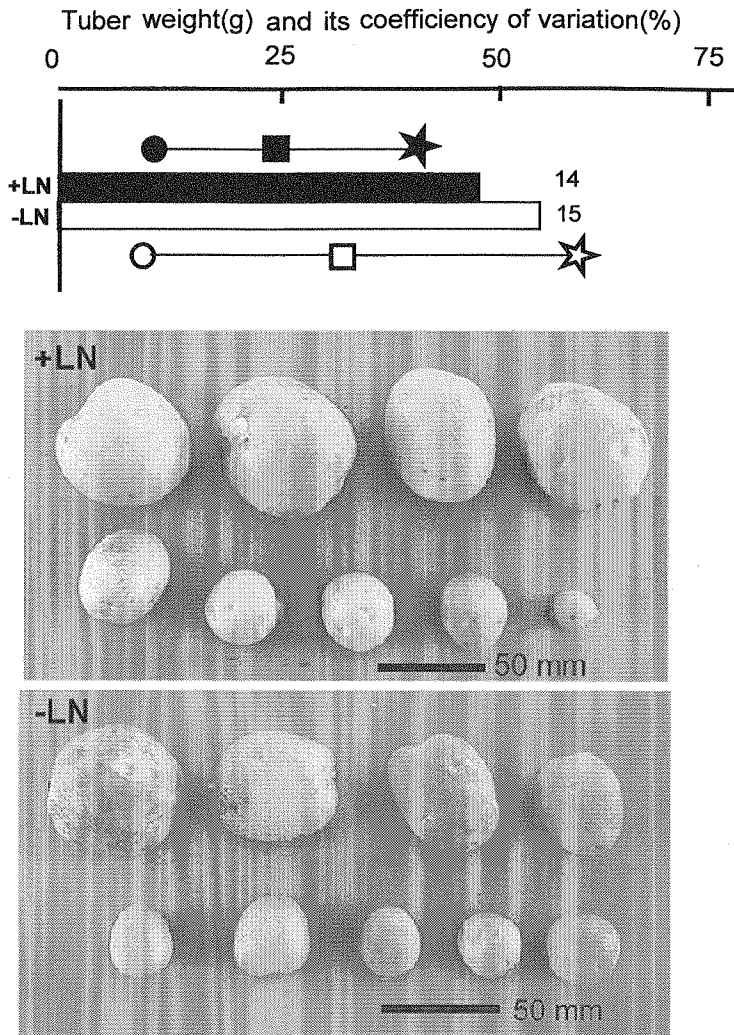


Fig. V-18 Tubers developed from cryopreserved (+) or non-treated control plants (-) and the coefficient of variation of their weights.

Bar graphs show the coefficient of variation and figures in the graph indicate the number of tested plant. ○, □, ☆ show the minimum, average and maximum weights of tubers, respectively. Photos under the graph show tubers harvested from cryopreserved (+LN) or non-treated control (-LN) plants.

の変異係数に差は認められなかった。さらに超低温保存した植物体の遺伝子レベルでの変異を確認するために、RAPD 分析を実施した。市販の DNA 抽出キットを用いることでハッカを除く全ての植物体から DNA を抽出することができた。PCR は限られた条件でのみらの作物における RAPD 分析の結果から、今回供試し、バンドが現れたプライマーの範囲内において、超低温実施したため、イチゴでは PCR 産物が得られなかったが、バレイショ、ヤマノイモ、キャッサバでは半数以

上のプライマーで PCR 産物を得ることができた。これ保存した植物体に変異は発生していないものと考えられるが、さらに RFLP などによる遺伝子レベルでの確認の他、生化学的な検討も必要である。

ビーズガラス化法で超低温保存した作物には実用上問題となるような変異は発生しなかったことから、ビーズガラス化法はバレイショ、イチゴ、ヤマノイモ、キャッサバの超低温保存に適していることが明らかになった。

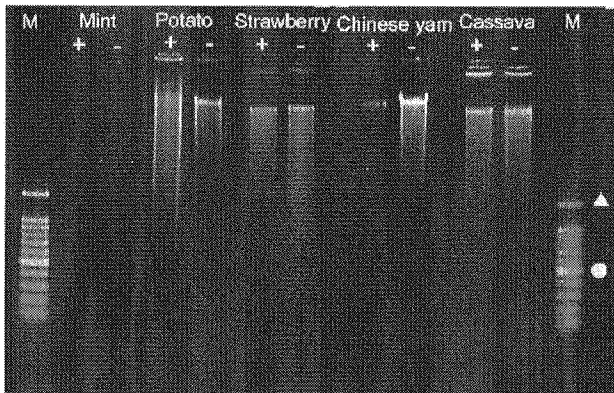


Fig. V-19 Extracted DNA from cryopreserved (+) or non-treated control plants (-).

DNA of leaves or petioles were extracted with ISOPLANT kit. ○, △ indicate 500bp, 1500bp band, respectively.

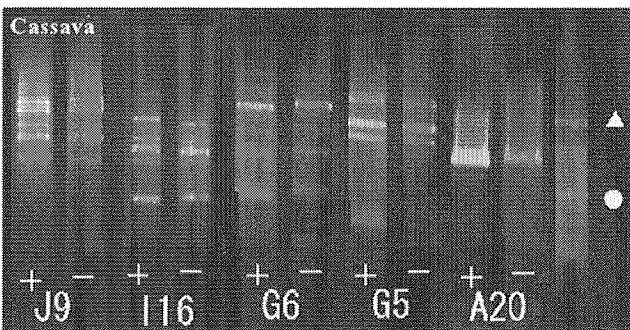
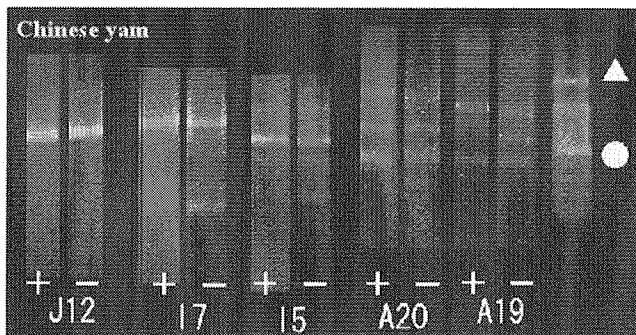
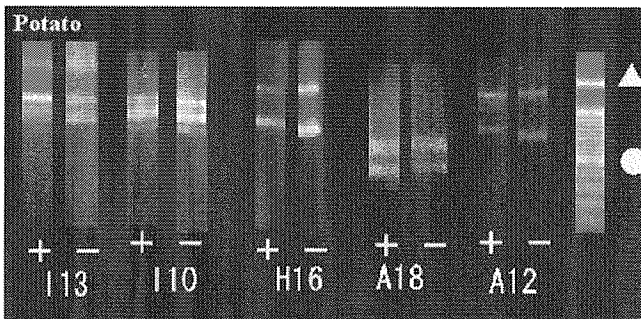


Fig. V-20 RAPD analysis of cryopreserved (+) and non-treated control plants (-) of potato (danshakuimo), Chinese yam (nagaimo-tokachi) and cassava (AMM-22).

○:500 bp; △:1500bp. Names in each photo indicate oligonucleotides supplied by Operon technologies, inc.