

第VI章 ニンジン培養細胞等の超低温保存

これまで植物の茎頂をビーズガラス化法で超低温保存するための諸条件について検討してきた。しかし、ビーズガラス化法は茎頂だけではなく、細胞や毛状根を保存することも可能である。この方法を用いることで微少な組織をアルギン酸ゲルに包埋して超低温保存できるため、遠心器などの使用を最低限に抑えることが可能であり、材料に与えるストレスを最小限にすることができる(松本ら、1996)。

培養細胞のガラス化法による超低温保存法に関する近年の研究には、アスパラガスの embryogenic な細胞 (Uragami ら、1989 ; Nishizawa ら、1992)、オレンジの珠心胚由来の細胞 (Sakai ら、1990、1991a; Kobayashi ら、1990)、タバコの培養細胞 (Reinoud、1996)、Catharanthus (Bachiri ら、1995) などがあり、ビーズ乾燥法はニンジン不定胚 (Dereuddre ら、1991a; b)、コーヒーの不定胚 (Hatanaka ら、1994)、簡易凍結法はアスパラガスの embryogenic 細胞 (Nishizawa ら、1992)、オレンジの珠心胚由来の細胞 (Sakai ら、1991b) での例が報告されている。

ここではニンジンの培養細胞、不定胚を用いてビーズガラス化法による超低温保存の諸条件を検討した。

1. 材料及び実験方法

(1) 供試材料

品種「5寸」を使用した。種子を70%エタノールで1分間、20%次亜塩素酸ナトリウム(実効塩素5%)で15分間表面殺菌後に滅菌水で2回洗浄した。これら種子は0.058M ショ糖、2.3 g/l ジェランガムを含むMC固形培地(Masuda ら、1980)に播種した。培地はpH5.8に調整後に121℃、10分間オートクレーブし、プラスチックシャーレ(直径90mm x 高さ20mm)に20ml分注した。培養は25℃、光量子束密度50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ 、16時間日長で行った。発芽した植物体の胚軸を0.2 mg/l 2,4-Dを含む上記培地に移植し、同じ条件で2週間培養してカルスを誘導した。このカルスを0.058M ショ糖、0.2mg/l 2,4-Dを含むMC液体培地に移して、25℃、連続照明下(光量子束密度20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$)、90rpmで回転培養した。継代培養は14日毎に直径300 μm 以下の細胞を集め、PCV(Packed Cell Volume)で20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ となるように新鮮培地に加えて行った。実験材料には、培養した細胞を500、75、45 μm の篩に通し、直径が45~75 μm の単細胞または小さい細胞塊(以下、小細胞塊)を集めて使用した。

不定胚は7~10日間継代培養した細胞から直径100 μm 以下の細胞を選別し、それらを2,4-Dを含まないMC液体培地で3回洗浄後に、同じ培地に移し、同じ条件で培養して誘導した。誘導された不定胚は実体顕微鏡下でステージ別に選別し、実験に用いた。

(2) 細胞の超低温保存法

直径45~75 μm の小細胞塊を約700rpm、30秒間遠心し、沈殿した細胞容量を測定した。上清を捨て、ビーズ液を沈殿に加え、PCVを20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ とし、攪拌した。滅菌したパスツールピペット(1ml)でビーズ液と共に小細胞塊を吸い上げ、0.1M塩化カルシウムを含むMS液体培地に滴下して小細胞塊をビーズに包埋した。これらのビーズ(直径3mm)を0.3Mショ糖、0.2mg/l 2,4-Dを加えたMC液体培地1mlに対して1個を移し、同じ条件で24時間、前培養した。前培養したビーズを0.4Mショ糖、2Mグリセリンを含むMS液体培地に移し、25℃、30分間処理して細胞に浸透脱水耐性を付与した。

PVS2液による脱水、加温、洗浄の諸条件は、前述の茎頂のビーズガラス化法と同様である。洗浄後はプラスチックシャーレの0.058Mショ糖、0.2 mg/l 2,4-D、2.3 g/l ジェランガムを含むMC固形培地に置床し、25℃、連続照明下で培養した。

以上の方法で液体窒素処理されたニンジン細胞の生存率に及ぼす、①前培養の効果、②浸透脱水耐性剤の効果、③PVS2液による最適な脱水時間、④細胞の生育ステージの影響、⑤希釈液のショ糖濃度の影響を検討した。

液体窒素処理した細胞は、0.2 mg/l 2,4-Dを含むMC固形培地で1日間培養してからFDA染色を行った(Widholm、1972)。1処理につき400個以上の細胞について生存細胞数を蛍光顕微鏡で調査し、全体の細胞数に対する生存細胞の割合(%)を生存率とした。比較の細胞として、実験に用いた同じ小細胞塊をアルギン酸ゲルに包埋しただけで、他は無処理の細胞を用い、同様に生存率を調査した。実験は3反復で実施した。

1) 前培養の効果

0.058M、0.3 Mのショ糖を含むMC液体培地で16~72時間前培養した細胞と、前培養しない細胞の液体窒素処理後の生存率を比較した。

2) 浸透脱水耐性付与剤の効果

0.3 Mのショ糖を含むMC液体培地で24時間前培養した後、細胞に浸透脱水耐性を付与するために、0.4Mショ糖、0.8 Mショ糖±2Mグリセリンの混合液で25℃、

30 分間処理した。これらの細胞を含むビーズを PVS2 液により 0°C、60 分間浸透脱水し、液体窒素中に冷却し、液体窒素処理後の生存率を比較した。

3) PVS2 液による最適な脱水時間の検討

0.3 M のショ糖を含む MC 液体培地で 24 時間前培養した後、0.4 M ショ糖と 2 M グリセリンの混合液で浸透脱水耐性を付与した細胞を PVS2 液により 0°C で 0~90 分間処理して浸透脱水してから液体窒素中に冷却し、液体窒素処理後の生存率を調査した。液体窒素未処理区の実験は 1 反復で行った。

4) 細胞の生育ステージの影響

継代培養開始から 5 日、10 日、15 日後の細胞を、それぞれ液体窒素処理し、生存率を比較した。

5) 希釈液のショ糖濃度の効果

細胞を包埋したビーズを液体窒素処理後、急速加温し、ショ糖濃度が 0、0.4、0.8、1.2、1.6 M の異なる希釈液で 10 分間、2 回洗浄し、細胞の生存率を比較した。

(3) 不定胚の超低温保存法

液体窒素処理したニンジン不定胚の生存率に及ぼす浸透脱水耐性付与剤の効果と PVS2 液による最適な脱水時間を検討した。誘導された不定胚を実体顕微鏡下でステージ別（球状胚、心臓型胚、魚雷型胚）に選別した。これらの不定胚にビーズ液を加え、滅菌したパスツールピペット（1ml）でビーズ液と共に 1~2 個の不定胚を吸い上げ、0.1 M 塩化カルシウムの他、必要に応じて浸透脱水耐性付与剤を含む MS 液体培地に滴下した。25°C、30 分間の処理中に不定胚をビーズ（直径 3mm）に包埋すると同時に、浸透脱水耐性を付与した。PVS2 液による脱水は 25°C で行い、液体窒素処理後の加温は茎頂と同様に行った。加温したビーズはプラスチックシャーレの 0.058 M ショ糖、2.3 g/l ジェランガムを含む MC 固形培地に置床し、25°C、連続照明下で培養した。

生存率は MC 固形培地で培養 1 週間後に正常に成長した不定胚数を調査し、全体の不定胚数に対する比率（%）で表した。実験は 3 反復で行った。

1) 浸透脱水耐性付与剤の効果

浸透脱水耐性を付与するために 0.4 M ショ糖 ± 2 M グリセリン溶液を用い、液体窒素処理後の不定胚の生存率を比較した。

2) PVS2 液の最適な脱水時間の検討

各ステージの不定胚に適した浸透脱水耐性を付与し、25°C で 0~120 分間脱水した後に液体窒素処理し、それらの生存率を比較した。液体窒素未処理区の実験は 1 反復で行った。

2. 実験結果

(1) 細胞の超低温保存法

供試した細胞塊は 1~4 個の細胞からなり、希に 10 個程度の細胞からなる細胞塊が混じっていた（図 VI-1-a）。個々の細胞は液胞の発達した長楕円形やひも状の細胞が多く、色素体などは認められなかった。ビーズに包埋した細胞はわずかに原形質分離を起こし、24 時間の前培養後もこの状態は保たれていた。0.4 M ショ糖 + 2 M グリセリンで浸透脱水耐性を付与することにより細胞の脱水が進み、原形質分離が進んだ。これらの細胞を PVS2 液でさらに脱水することで原形質分離はさらに進み、細胞質は縮小した（図 VI-1-b、c、VI-2-a）。液体窒素処理後、生存した細胞は正常に原形質復帰するが、死細胞は細胞質が凝固、縮小していた。また、その状態で細胞膜が破壊されている細胞が観察された（図 VI-2-b）。

0.3 M ショ糖を含む MC 液体培地で 24 時間、前培養することで、前培養しない小細胞塊に比較して明らかに生存率は高くなったが（図 VI-3）、0.058 M ショ糖での前培養にはほとんど効果は認められなかった。このため、これ以降の実験では 0.3 M ショ糖を含む MC 液体培地で 24 時間の前培養を実施した。

浸透脱水耐性付与剤はショ糖のみでは効果は低く、2 M グリセリンを加えることで生存率が著しく向上した（表 VI-1）。

0°C での PVS2 液による脱水は、60 分間で生存率が最も高くなった（図 VI-4）。脱水を 25°C で行った場合には、30 分間の処理で生存率は最も高くなったが、0°C 処理に比較してその生存率は低くなった（データ未掲載）。

継代培養後の日数と生存率の関係を調査したところ、細胞が指数増殖期に当たる 5 日目の細胞で生存率は高く、培養期間が長くなるにつれ生存率は低下した（図 VI-5）。

希釈液のショ糖濃度を高くすると生存率は向上する傾向があり、1.2 M で生存率は最も高くなった（図 VI-6）。顕微鏡観察によれば、低いショ糖濃度（0、0.4 M）で処理し、急速に吸水させた場合、細胞膜や細胞壁が破裂した細胞や、細胞質が変成凝固し、縮小したままで原形質復帰しない細胞が多く認められた。これに対し、ショ糖濃度が 0.8 M および 1.2 M で処理され、緩慢に吸水させた細胞には、正常に原形質分離した細胞が多くなった。しかし、最高濃度の 1.6 M 溶液で処理された細胞には異常な原形質分離をする細胞が増加した。

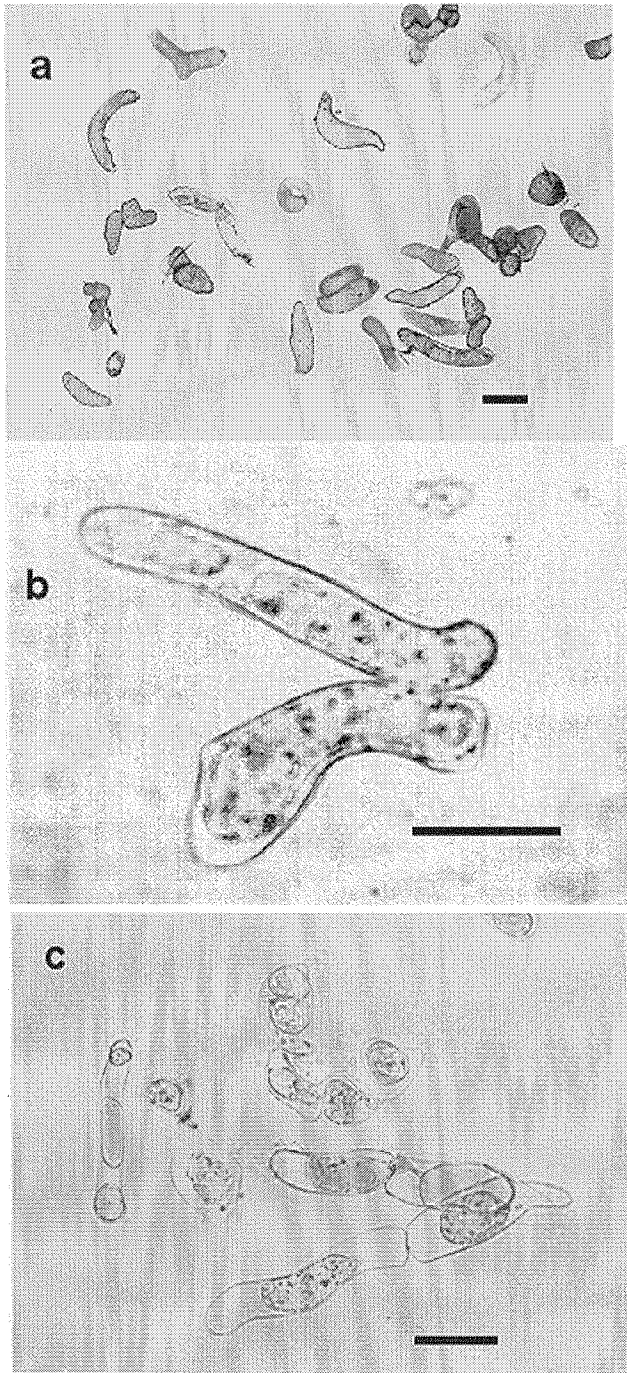


Fig. VI-1 Carrot cells at each step of treatment for encapsulation vitrification method (1).

a: Cells filtrated for cryopreservation; b: Precultured cells;
c: Precultured and osmoprotected cells (plasmolysed).
Bars : 10 μ m.

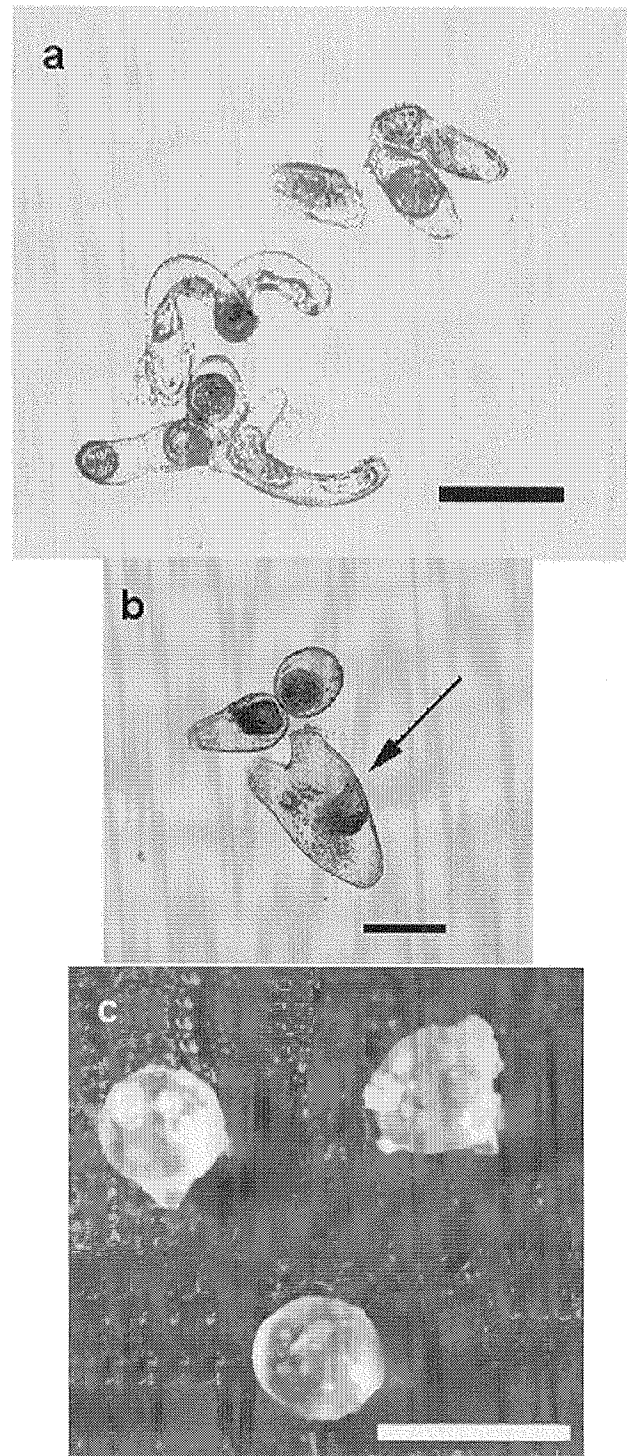


Fig. VI-2 Carrot cells at each step of treatment for encapsulation-vitrification method (2).

a: Dehydrated cells with PVS2 solution (plasmolysed);
b: Cryopreserved cells by encapsulation-vitrification method
(plasmolysed by 1.2M sucrose);
c: Cells grown in beads 10 days after plating. Bars a,b: 10 μ m,
c:5 mm.

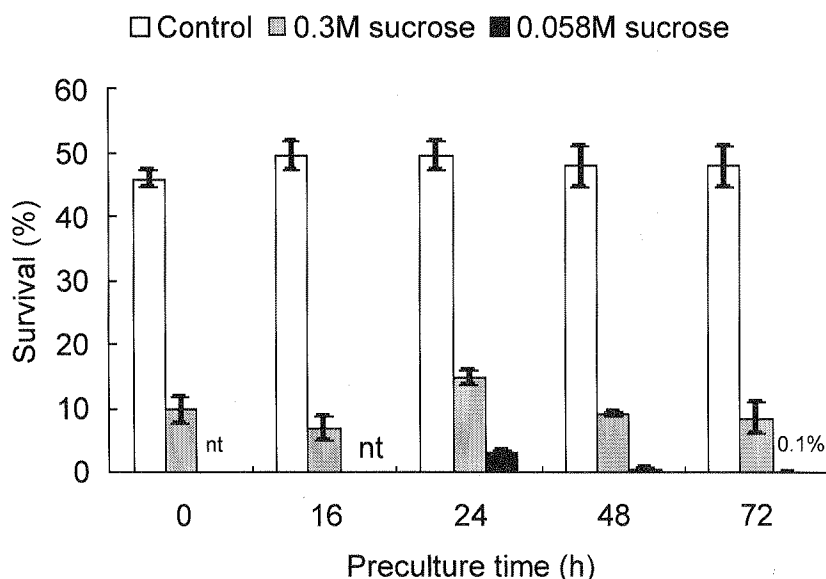


Fig. VI-3 Effect of preculture period on survival of encapsulated-vitrified carrot cells cooled to -196°C .

Single cells and cell clusters of 45-75 μm in diameter (fine cells) were collected from 5-day-old cell suspension by filtrating it through three sieves (pore diameter, 500, 75 and 45 μm). They were centrifuged (about 700 rpm, 30 sec) and the supernatant fluid was removed. Then, the mixture of 2% sodium alginate and 0.4M sucrose was added to the precipitate at a final cell density of 20 $\mu\text{l/ml}$ packed cell volume. They were encapsulated in 0.1 M calcium chloride and 0.4M sucrose. These encapsulated cells into alginate beads were precultured at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 0 to 72 h in MC medium containing 0.3M sucrose and 0.2 mg/l 2,4-D. These encapsulated cells were osmoprotected with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min before dehydration with PVS2 solution at 0 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h (orange bar charts). Gray bars indicate the cell survival which were precultured in MC medium containing 0.058M sucrose. Blue bars (control) indicate the survival of cells without any treatments except encapsulation. Treated and control beads were incubated on MC medium containing 0.058M sucrose, 0.2 mg/l 2,4-D and 2.3 g/l gellan gum at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Survival was determined using FDA staining and expressed as the percentage of FDA positive cells of the total number of cells (over 400). Material: carrot cultivar gosun. The bars indicate standard error.

Table VI-1 Effect of osmoprotectant on survival of encapsulated-vitrified cells of carrot cooled to -196°C .

Osmoprotectant	Survival (% \pm SE)	
	+ Liquid nitrogen	Control
None	0.5 \pm 0.5	46.0 \pm 1.5
0.4M sucrose	6.4 \pm 5.2	46.0 \pm 1.5
0.8M sucrose	1.9 \pm 1.0	54.7 \pm 2.6
0.4M sucrose+2M glycerol	14.8 \pm 1.1	46.0 \pm 1.5
0.8M sucrose+2M glycerol	7.1 \pm 3.6	54.7 \pm 2.6

The mixture of 2% sodium alginate and 0.4M sucrose was added to fine cells (45-75 μm in diameter) at a final cell density of 20 $\mu\text{l/ml}$ packed cell volume. They were encapsulated in 0.1M calcium chloride. These encapsulated cells into alginate beads were precultured at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h in MC medium containing 0.3M sucrose and 0.2 mg/l 2,4-D, and then treated with each osmoprotectant at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min before dehydration with PVS2 solution at 0 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. Control: cells without any treatment except encapsulation. Treated and control beads were incubated on MC medium with 0.058M sucrose, 0.2 mg/l 2,4-D and 2.3 g/l gellan gum at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Survival was determined using FDA staining and expressed as the percentage of FDA positive cells of the total number of cells (over 400). Material: carrot cultivar gosun. SE stands for standard error.

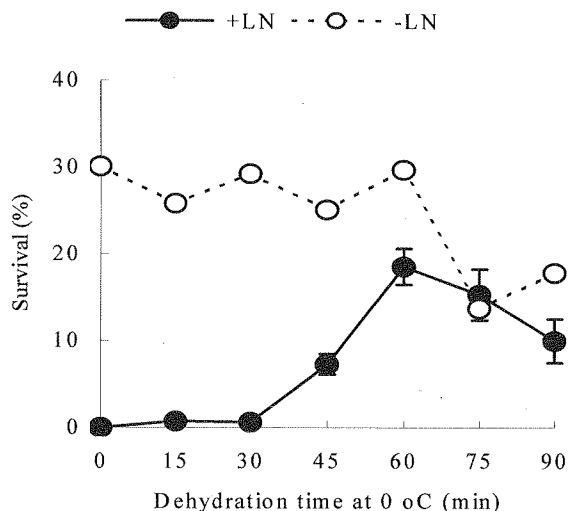


Fig. VI-4 Effect of exposure time to PVS2 solution at 0 °C on survival of encapsulated-vitrified carrot cells cooled to -196 °C.

The mixture of 2% sodium alginate and 0.4M sucrose was added to fine cells (45-75 μm in diameter) at a final cell density of 20 $\mu\text{l/ml}$ packed cell volume. They were encapsulated in 0.1M calcium chloride. These encapsulated cells into alginate beads were precultured at 25 °C for 24 h in MC medium containing 0.3M sucrose and 0.2mg/l 2,4-D and then osmoprotected with 2M glycerol plus 0.4M sucrose at 25 °C for 30 min. They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for various lengths of time prior to a plunge into liquid nitrogen (—, +LN). -LN(- - -): same treatment without cooling to -196 °C.

Treated beads were incubated on MC medium containing 0.058M sucrose, 0.2 mg/l 2,4-D and 2.3 g/l gellan gum at 25 °C for 24 h. Survival was determined using FDA staining and expressed as the percentage of FDA positive cells of the total number of cells (over 400).

Material: carrot cultivar gosun. The bars represent standard error.

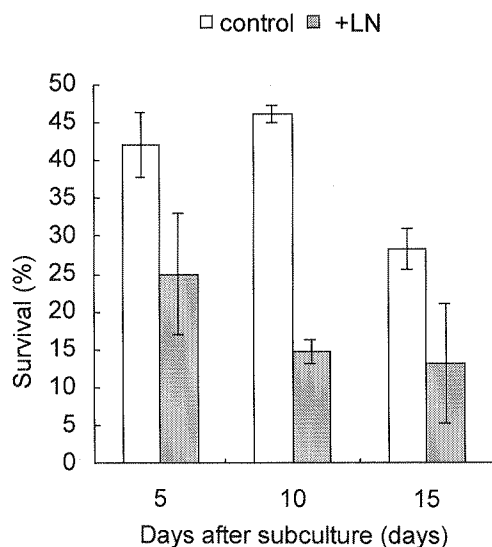


Fig. VI-5 Effect of growth stage of culture on survival of encapsulated-vitrified carrot cells cooled to -196 °C.

Fine cells (45-75 μm) were collected at 5, 10 and 15 days after subculture, respectively. The mixture of 2% sodium alginate and 0.4M sucrose was added to them at a final cell density of 20 $\mu\text{l/ml}$ packed cell volume. They were encapsulated in 0.1M calcium chloride. These encapsulated cells into alginate beads were precultured at 25 °C for 24 h in MC medium containing 0.3M sucrose and 0.2mg/l 2,4-D. and then osmoprotected with 2M glycerol plus 0.4M sucrose at 25 °C for 30 min. They were dehydrated with PVS2 solution at 0 °C for 1h prior to a plunge into liquid nitrogen. Blue bars (control) indicate the survival of cells without any treatments except encapsulation.

Treated and control beads were incubated on MC medium containing 0.058M sucrose, 0.2 mg/l 2,4-D and 2.3 g/l gellan gum at 25 °C for 24 h. Survival was determined using FDA staining and expressed as the percentage of FDA positive cells of the total number of cells (over 400).

Material: carrot cultivar gosun. The bars represent standard error.

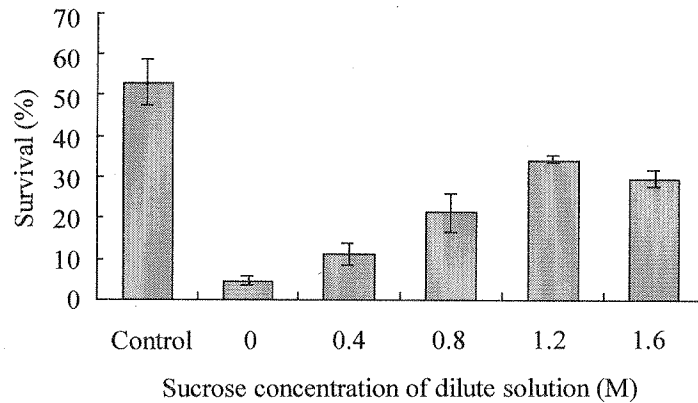


Fig. VI-6 Effect of sucrose concentration of dilute solution on survival of encapsulated-vitrified carrot cells cooled to -196°C .

The mixture of 2% sodium alginate and 0.4M sucrose was added to fine cells (45-75 μm in diameter) at a final cell density of 20 $\mu\text{l/ml}$ packed cell volume. They were encapsulated in 0.1M calcium chloride. These encapsulated cells into alginate beads were precultured at 25°C for 24 h in MC medium containing 0.3M sucrose and 0.2mg/l 2,4-D and then osmoprotected with 2M glycerol plus 0.4M sucrose at 25°C for 30 min. They were dehydrated with PVS2 solution at 0°C for 1h prior to a plunge into liquid nitrogen. After cryopreservation, they were rewarmed in water bath at 38°C for 1-2 min and washed by dilute solutions containing various concentrations of sucrose twice each for 10 min before incubation. Control indicates survival of cells without any treatments except encapsulation.

Treated and control beads were incubated on MC medium containing 0.058M sucrose, 0.2 mg/l 2,4-D and 2.3 g/l gellan gum at 25°C for 24 h. Survival was determined using FDA staining and expressed as the percentage of FDA positive cells of the total number of cells (over 400).

Material: carrot cultivar gosun. The bars represent standard error.

Table VI-2 Effect of osmoprotection on survival of encapsulated-vitrified embryos at different stages of carrot cooled to -196°C .

Osmoprotectant	Survival (% \pm SE)		
	Globular	Heart-shaped	Torpedo-shaped
None	52.8 \pm 6.7	70.5 \pm 13.8	59.3 \pm 3.0
0.4 M sucrose	39.4 \pm 3.1	44.6 \pm 9.5	69.5 \pm 3.9
0.4M sucrose+2M glycerol	42.8 \pm 1.7	62.3 \pm 8.0	60.9 \pm 8.0

Cells under 100 μm in diameter were washed with 2,4-D free MC medium for 3 times and suspended in the same medium. They were cultured at 25°C for 10-14 days to induce embryos. Globular, heart-shaped and torpedo-shaped embryos were selected and encapsulated. These encapsulated embryos were osmoprotected with 2 different solutions at 25°C for 30 min. They were dehydrated with PVS2 solution at 25°C for 1h prior to a plunge into liquid nitrogen. Treated beads were incubated on MC medium containing 0.058M sucrose and 2.3 g/l gellan gum at 25°C for 7 days. Survival was expressed as the percentage of embryos which grew normally of the total number of embryos.

Material: carrot cultivar gosun. SE stands for standard error.

処理した細胞の胚形成能力は維持されていたことが明らかになった（データ未掲載）。

（2）不定胚の超低温保存法

不定胚は表VI-2に示した通り、PVS2液による脱水に極めて強く、特に球状胚は0.4M ショ糖や0.4M ショ糖

+2M グリセリン処理による浸透脱水耐性向上の効果はなく、かえって生存率が低下した。心臓型胚や魚雷型胚でもこれら溶液による浸透脱水耐性向上の効果は極めて低かった。このため、これ以降の実験では、球状胚ではこの処理を行わず、心臓型胚、魚雷型胚は、

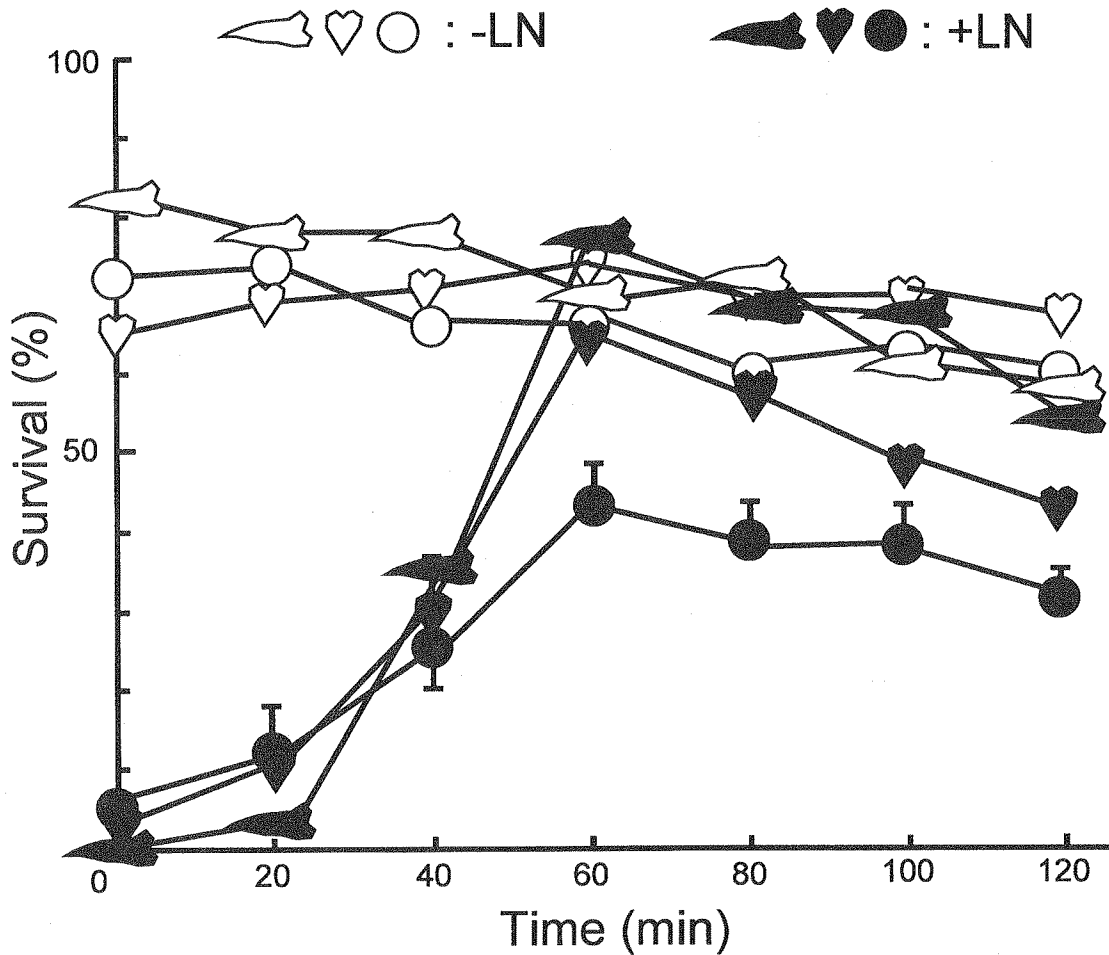


Fig VI-7 Effect of exposure time to PVS2 solution at 25 °C on survival of encapsulated-vitrified carrot embryos cooling to -196 °C.

Cells under 100 μ m in diameter were washed with 2,4-D free MC medium for 3 times and suspended in the same medium. They were cultured at 25 °C for 10-14 days to induce embryos. Globular, heart-shaped and torpedo-shaped embryos were selected and encapsulated. These encapsulated heart-shaped and torpedo-shaped embryos were osmoprotected with a mixture of 2M glycerol and 0.4M sucrose at 25 °C for 30 min. The encapsulated globular embryos without osmoprotection and encapsulated and osmoprotected heart-shaped and torpedo-shaped embryos were dehydrated with PVS2 solution at 25 °C for 1h prior to a plunge into LN. Treated beads were incubated on MC medium containing 0.058M sucrose and 2.3 g/l gellan gum at 25 °C for 7 days. Survival was expressed as the percentage of embryos which grew normally of the total number of embryos. Material: carrot cultivar gosun. Bars indicate standard error.

▶ : torpedo-shaped embryos ♥ : heart-shaped embryos
 ○ : globular embryos

効果はわずかではあるが、0.4 M ショ糖 + 2 M グリセリンで処理した。

液体窒素後の細胞は、ビーズ内で順調に生育し (図 VI-2-c)、それらビーズを 2,4-D を含んだ MC 液体培地に移して回転培養することで容易に増殖した。これら増殖した細胞を 2,4-D を含まない MC 液体培地で洗浄、培養すると不定胚が誘導されたことから、液体窒素

PVS2 液による最適な脱水時間を 25°C で検討した結果、生存率には差があるものの、不定胚の全てのステ

ージで 60 分間が適していた (図 VI-7)。

超低温保存した各ステージの不定胚は順調に生育し、1 週間で魚雷型胚、心臓型胚は幼植物に、また球状胚は魚雷型胚～幼植物に成長した (図 VI-8)。

3. 考察

作物の茎頂で超低温保存法として利用できるビーズガラス化法はニンジン培養細胞、不定胚でも有効であ

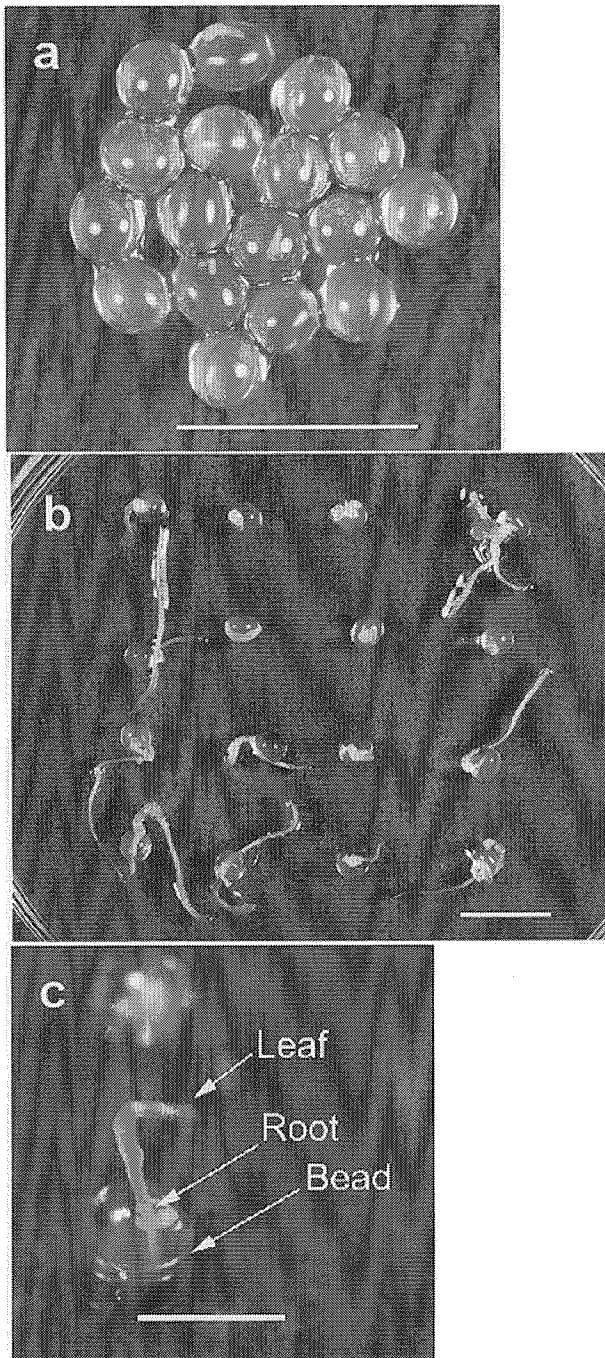


Fig. VI-8 Direct shoot formation of carrot embryos cryopreserved by encapsulation-vitrification.

- a: Encapsulated and vitrified torpedo-shaped embryos of carrot;
 b, c: Shoot formation from heart-shaped embryos 7 days after incubation.
 White bars in a,b indicate 1 cm, white bar in c indicates 5 mm.

ることが明らかになった。

Catharanthus の培養細胞は、1.0 M ショ糖を含む培地で前培養した場合、前培養期間が 1 日間では、細胞

は原形質分離した状態のままであるので、乾燥耐性は低い。しかし、前培養を 3 日以上行うことでショ糖が細胞膜内に浸透して原形質復帰し、ビーズ乾燥法によ

る超低温保存後の生存率が高くなることが報告されている (Bachiri ら、1995)。ニンジン細胞は 0.3 M ショ糖を含む培地で 1 日間、前培養することで生存率は向上した。Bachiri らの方法においては、高濃度のショ糖で前培養することによって細胞に乾燥耐性を付与している。これに対し、ビーズガラス化法 (ガラス化法) は、前培養に続いて浸透脱水耐性付与剤で部分的に脱水し、原形質分離を起こさせ、併せて高濃度な PVS2 液に対する浸透脱水耐性を高めた。

Reinoud (1996) はタバコの培養細胞を 0.33 M マニトールの高張な培地で 1 日間前培養することで液体窒素処理後の生存率が高まることを報告している。この前培養により培養細胞は、細胞内にマニトールを取り込み、高ストレス下で増加する ABA を媒介とした一連の変化が起こる。その結果、プロリンや 2 種のストレスタンパク質が増加し、培養細胞の PVS2 液に対する浸透脱水への耐性が向上すると考え、同時にこれらストレスタンパク 2 種の遺伝子を単離した。高張な培地での前培養が、細胞の PVS2 液による浸透脱水耐性を向上させる要因としては、取り込まれた糖や糖アルコールの作用及びストレス下で ABA を介在して起こるストレスタンパク質の生成などが考えられているが、脱水や乾燥耐性に関する機作に関しては、今後解明されるべき点が多い。

培養細胞の液体窒素処理後の生存率は、一般に指数増殖期の細胞が最も高いと報告されている (Sugawara ら、1974; Withers、1978; 川原ら、1996)。本研究のニンジン細胞でも、継代培養開始 5 日後の細胞の生存率が高く、指数増殖期が終わりに近づいた 10 日以降の細胞の生存率は低下した。増殖期の細胞は盛んに分裂しているため、細胞の大きさも小さく、細胞質に富み、液胞は発達していない。これらのことから、指数増殖期の細胞は脱水が容易であると共に、脱水への耐性を獲得しやすいことが、高い生存率の要因であると推測される。

加温後にビーズを洗浄する希釈液に 1.2M のショ糖を使用するのは、強く浸透脱水されて濃縮された細胞が急激に吸水することによる害を避けるためである。低濃度のショ糖溶液 (0.4M) で希釈して、急激に吸水させると細胞膜だけでなく、細胞壁までが破裂する細胞が認められた。また、ショ糖を含まない液で希釈し

た処理区には、細胞質が変成、凝固したと考えられる細胞が多く認められた。

細胞に比較して不定胚は PVS2 液による浸透脱水に極めて強く、浸透脱水耐性を付与する必要はほとんどなかった。これは不定胚を構成する細胞が指数増殖期にある細胞のように、盛んに分裂を繰り返す小細胞からなるためであると推測できる。

培養細胞や不定胚を超低温保存する場合、細胞の収集、洗浄、脱水など、多くの過程で遠心分離器が必要

となるが、ビーズガラス化法においては、遠心分離器はビーズに細胞を包埋する際に1度使用するだけである。このことからビーズガラス化法は、従来の緩速予備凍結法だけでなく、ガラス化法、簡易凍結法に比較しても操作が非常に簡便になる。また、不定胚をビーズに包埋することで、将来は人工種子としての利用も可能となることから、ビーズガラス化法は培養細胞、不定胚等の超低温保存に最適な方法(図VI-9、10)であると考えられる。

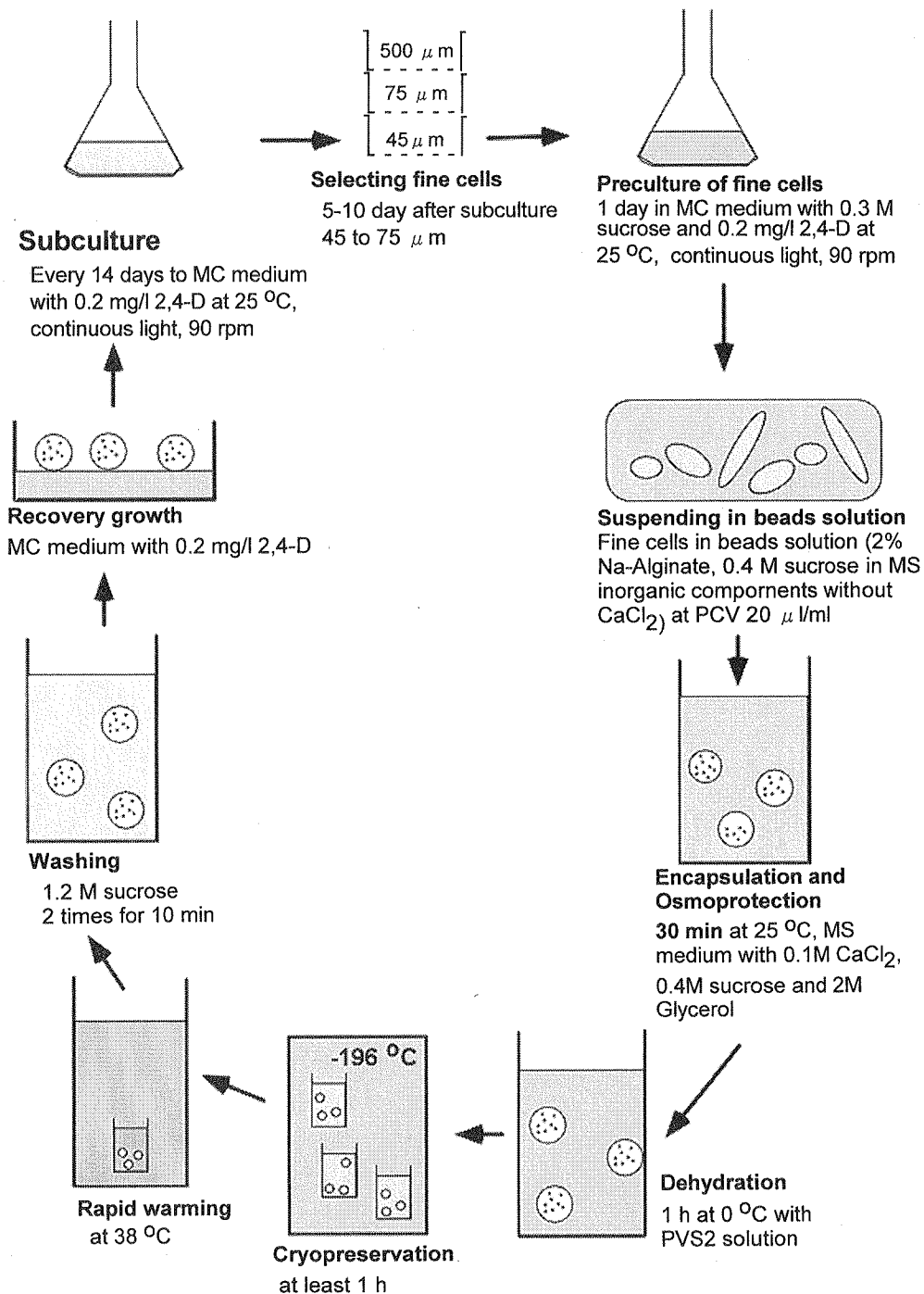


Fig. VI-9 Scheme of encapsulation-vitrification method for cryopreservation of carrot cells.

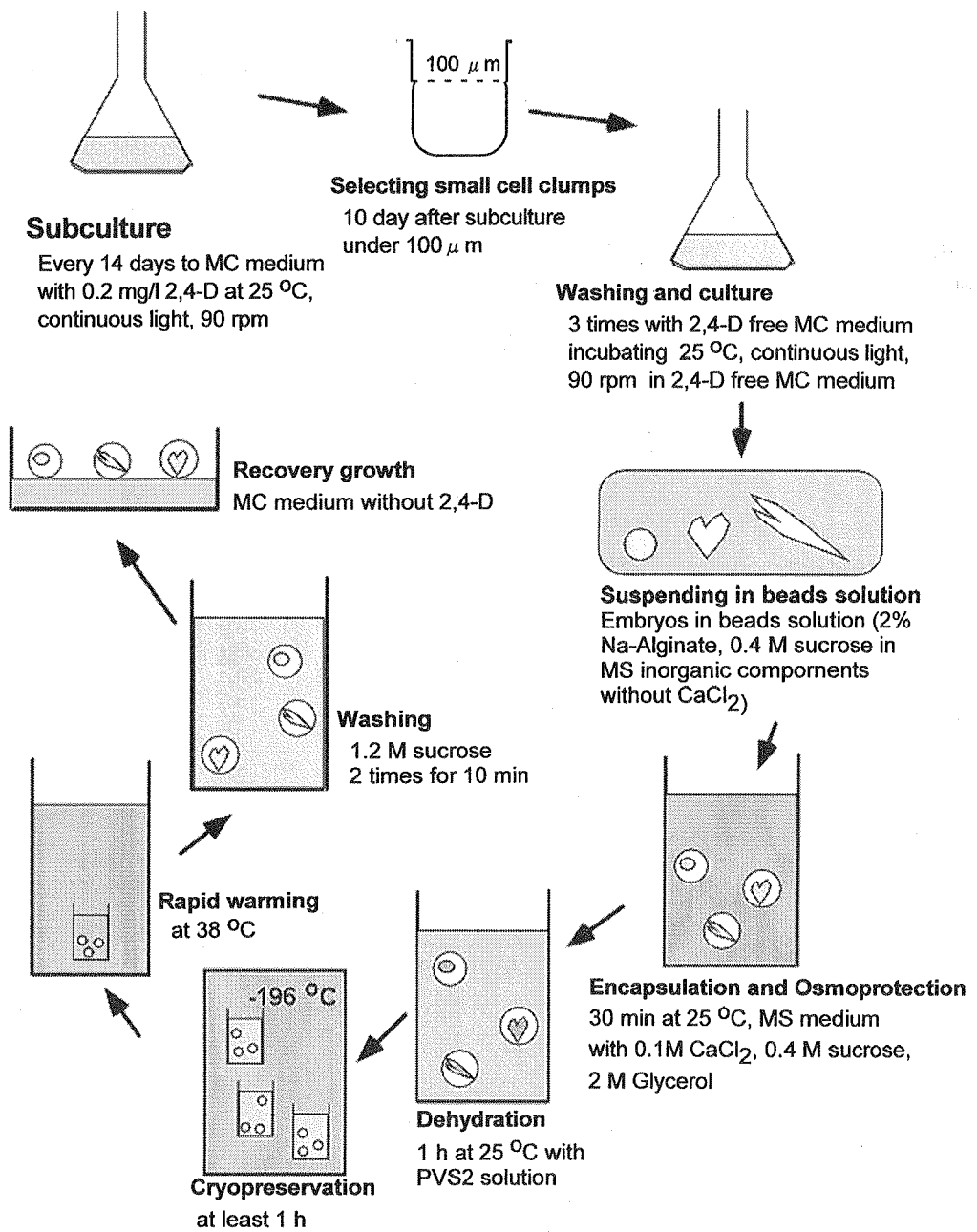


Fig.VI-10 Scheme of encapsulation-vitrification method for cryopreservation of carrot embryos.

第VII章 総合考察

植物遺伝資源の長期保存は次世代の食料や生活を支えるために必要である。そのためには小面積で経費がかからず、安全で簡便な保存法を開発しなくてはならない。この保存法としては、液体窒素を利用した約 -150°C 以下での超低温保存が理想的であると考えられる。1990年頃に、従来の緩速予備凍結法に代わり、新しい超低温保存法、すなわちガラス化法 (Sakai ら、1990; Langis ら、1990) とビーズ乾燥法 (Dreuddre ら、1990) が開発された。これらの新しい超低温保存法は、室温または 0°C で細胞内の凍結水を濃厚なガラス化液か糖溶液で十分に浸透脱水してから液体窒素に冷却し、茎頂細胞をガラス化させて生存させる。これらの簡便化された方法の開発によって、過去10年間に超低温保存される植物の種類は飛躍的に増加した。

茎頂を液体窒素の温度 (-196°C) で生かし、保存するためには、急速冷却中に起こる致命的な細胞内凍結を避けることが不可欠である。そのためには茎頂内の凍結水を予め取り除いておく必要がある。ガラス化法やビーズガラス化法は、約8Mの高濃度なガラス化液 (PVS2液) を 25°C または 0°C で処理して茎頂内の凍結水を浸透的に脱水する。こうして必要十分に脱水された茎頂は、液体窒素処理後に高い茎葉形成率を示した。本研究で用いたビーズガラス化法は、Matsumoto ら (1995) がワサビ培養茎頂で用いた方法で、アルギン酸ゲルで茎頂を包埋し、ガラス化法と同様の処理を行う。その操作は簡単であるため、多くの茎頂を同時に扱うことが可能で、茎葉形成率が高く、茎頂だけではなく毛状根や培養細胞などへの応用が可能である (Matsumoto ら、1995)。本研究ではビーズガラス化法

を用いて作物の培養茎頂だけではなく、ニンジンの培養細胞や不定胚でも超低温保存を行った。そして各々の作物や組織毎に最適なビーズガラス化法による超低温保存法を明らかにした。

ビーズガラス化法だけではなく、いずれの超低温保存法でも共通して重要な点は、①茎頂を液体窒素中に急冷する前に、茎頂がガラス化できる程度まで脱水すること、②そして、この強度の脱水に耐える能力を予め茎頂に付与しておくことの2点である。ビーズガラス化法においては、前者は 0°C で2~4時間、PVS2液で浸透脱水することで最高の結果が得られた。後者の、どのようにして茎頂にPVS2液に耐える高い脱水耐性付与するかは、ガラス化法、ビーズガラス化法の最大

の問題点である。本研究では、①茎頂を摘出する植物体を、 4°C で1~3週間培養する低温処理、高濃度のシヨ糖培地で7~10日間培養するシヨ糖馴化の前処理、②摘出した茎頂を高濃度のシヨ糖培地で16時間培養する、前培養及び③シヨ糖とグリセリンの混合液で茎頂を処理する、浸透脱水耐性付与の3つの方法を作物毎に適宜組み合わせ、PVS2液に対する浸透脱水耐性を高めた (表VII-1)。

前処理として低温処理の効果が高かった作物はイチゴ、ハッカ (表V-1) であった。同様な低温処理の有効性はユリ (Matsumoto ら、1995b)、スターチス (高橋ら、1995) の他、リンゴ、ナシ (Niino ら、1992a)、クワ (Niino ら、1992b) などで報告されている。一方、パレイシヨ、ヤマノイモには低温処理の効果は認められなかった (表V-1)。ヤマノイモ前処理として頂芽節を0.3Mシヨ糖を含む培地で7~10日間培養することにより、茎葉形成率は高くなった。一般に熱帯性作物は

低温処理が難しく、低温処理による浸透脱水耐性を付与することができなかった。このことが熱帯性作物を超低温保存する際の問題点であった。しかし、Thin (1997) は熱帯性作物の一つであるタロイモの植物体を高濃度のシヨ糖培地 (0.3~0.9M) で1ヶ月間培養すること (シヨ糖馴化) で液体窒素処理後の茎葉形成率が高まることを報告している。植物体を低温処理すると、糖や、ABA を介したプロリンやストレスに対応したタンパク質が増加することが報告 (Chen & Gusta、1983) されているが、この点で、低温処理と高濃度のシヨ糖培地での培養との間に関連性が認められる。しかし、ハッカやパレイシヨにはシヨ糖馴化の効果は認められず (データ未掲載)、作物の種に最適な条件で前処理を行う必要がある。

シヨ糖とグリセリンの混合溶液で茎頂に浸透脱水耐性を付与する処理はほとんどの作物で有効で、ビーズガラス化法にとって欠かせない処理である (Thin ら、2000)。0.4Mシヨ糖と2Mグリセリンの混合液 (LS液) は、最初にオレンジの細胞の簡易凍結法で使われ (Sakai ら、1991b)、ついでNishizawa ら (1992、1993) がアスパラガスのembryogenic cellを用い、その効果を確認した。茎頂においては、ワサビ (Matsumoto ら、1994; 1995) で最初に使われ、その後、スターチス (Matsumoto ら、1998)、タロイモ (Takagi ら、1997)、パイナップル、ラン (Thin、1997) など、多くの作物

Table VII-1 Optimal conditions of encapsulation-vitrification method for all crops tested in this study.

Crop name (cultivar)	Preconditioning	Preculture	Osmoprotection (25°C)	PVS2 (0°C)	No. of tested cultivars
Mint (Spearmint common)	Cold hardening (4 °C, 2weeks)	None	2M glycerol +0.4 M sucrose (60 min)	3h	3
Potato ((Danshakuimo)	None	0.3M sucrose (23 °C, 16 h)	2M glycerol +0.6 M sucrose (+PGRs)(90min)	3h	14
Strawberry (Kitaekubo)	Cold hardening (4 °C, 2weeks)	0.088M sucrose (23 °C, 16 h)	2M glycerol +0.4M sucrose (60 min)	2h	6
Chinese yam (Nagaimo, tokachi)	0.3M sucrose (25 °C, 7-10 d)	None	2M glycerol +0.6M sucrose (+PGRs)(90 min)	4h	3
Cassava (AMM22)	None	0.3M sucrose (25°C, 16 h)	2M glycerol +0.6M sucrose (+PGRs)(60 min)	4h	2
Carrot cells (Gosun)	None	0.3 M sucrose (25 °C, 24h)	2M glycerol +0.4 M sucrose (30 min)	1h	1
Carrot embryos	None	None	2M glycerol +0.4 M sucrose (30 min)	1h (25 °C)	1

PGRs stands for plant growth regulators.

で LS 液はガラス化法による超低温保存に用いられている。本研究においても LS 液はイチゴ、低温処理したハッカで有効であったが、バレイショ、キャッサバ、ヤマノイモではその効果は不十分であった。このため、LS 液のショ糖濃度を更に高くし、処理時間を長くした上で、浸透脱水耐性付与剤にそれぞれの茎頂培養に必要な植物成長調節物質を加えることによって浸透脱水耐性を高めることができた。浸透脱水耐性を付与する際に、植物成長調節物質を加えることの有効性は、現在までに報告はなく、その作用機作は不明である。また、低温処理しないハッカ茎頂においては LS 液のショ糖濃度を上げることで、低温処理に近い効果が認められ、浸透脱水耐性剤の濃度を上げることはある程度、低温処理の代わりになりうる事が示唆された。

茎頂を用いた超低温保存法の実験に用いるために、ほぼ均一で生育の良好な茎頂を大量に準備する必要があり、そのための培養方法の確立が不可欠である。液体窒素処理後に高い茎葉形成率を得るためには、上述の処理で高い浸透脱水耐性を付与でき、保存後に旺盛に成長する茎頂を使用しなくてはならない。本研究ではこうした茎頂を大量に得るために、まず植物体の頂芽を切り取り、新しい培地に植え込んで、継代培養を行うことにより材料を確保した。植物体は頂芽を切り取ると頂芽優勢が崩れ、下位節から腋芽が発生する。この性質を利用し、節培養により得られた腋芽をハッカの実験材料に用いた。ハッカは互生葉序であるため 1 節から 2 つの腋芽を得ることができたので、多くの実験を効率よく行うことができた。しかも節培養を、直径 9cm のプラスチックシャーレで比較的高密度 (50

～100 節)で行うことにより、腋芽の大きさや発育のステージをかなり均一に揃えることができた(図 III-2)。また、こうした節培養によって、大量の腋芽の中から生育の良好な腋芽を選択することができ、常に高い茎葉形成率を得ることができた。この節培養はハッカ以外のバレイショなどにも応用することができた。

実験に用いた温帯性作物のイチゴ、ハッカ、バレイショ、ヤマノイモと熱帯性作物であるキャッサバは、培養茎頂を使用すれば、ほぼ同じ方法(図 VII-1)で超低温保存後、60～80%の高い茎葉形成率を得ることができた。このことから、熱帯性作物を培養して得られた植物体の茎頂は、温帯性作物と同じように、超低温保存に必要な高い浸透脱水耐性を有していることを示している。ニンジン培養細胞でも、盛んに分裂している指数増殖期の細胞が高い浸透脱水耐性を示したことから、茎頂の分裂組織の細胞は、均一で、盛んに分裂し、細胞質に富み、その上ほとんど液胞が発達していないことが、高い浸透脱水耐性を誘導する上で極めて重要と考えられる。また、茎頂は植物体を分化する能力を持ち、遺伝的に安定性が高く、無病化(ウイルスフリー化)できるほか、高い浸透脱水耐性を示す能力を持っているため、植物遺伝資源保存のためには優れた組織である。

浸透脱水耐性を付与し、PVS2 液で十分に脱水された茎頂は液体窒素中に急冷され、ガラス化する。ガラス化した茎頂は液体窒素内で安定した状態で保存されており、半年～2年間保存しても茎葉形成率は低下せず、再生した茎葉にも異常は認められなかった。また、液体窒素処理後の茎頂は、分裂組織の多くの細胞が生存

Scheme of successful cryopreservation by encapsulation vitrification

Inducing dehydration tolerance to PVS2 solution for meristems

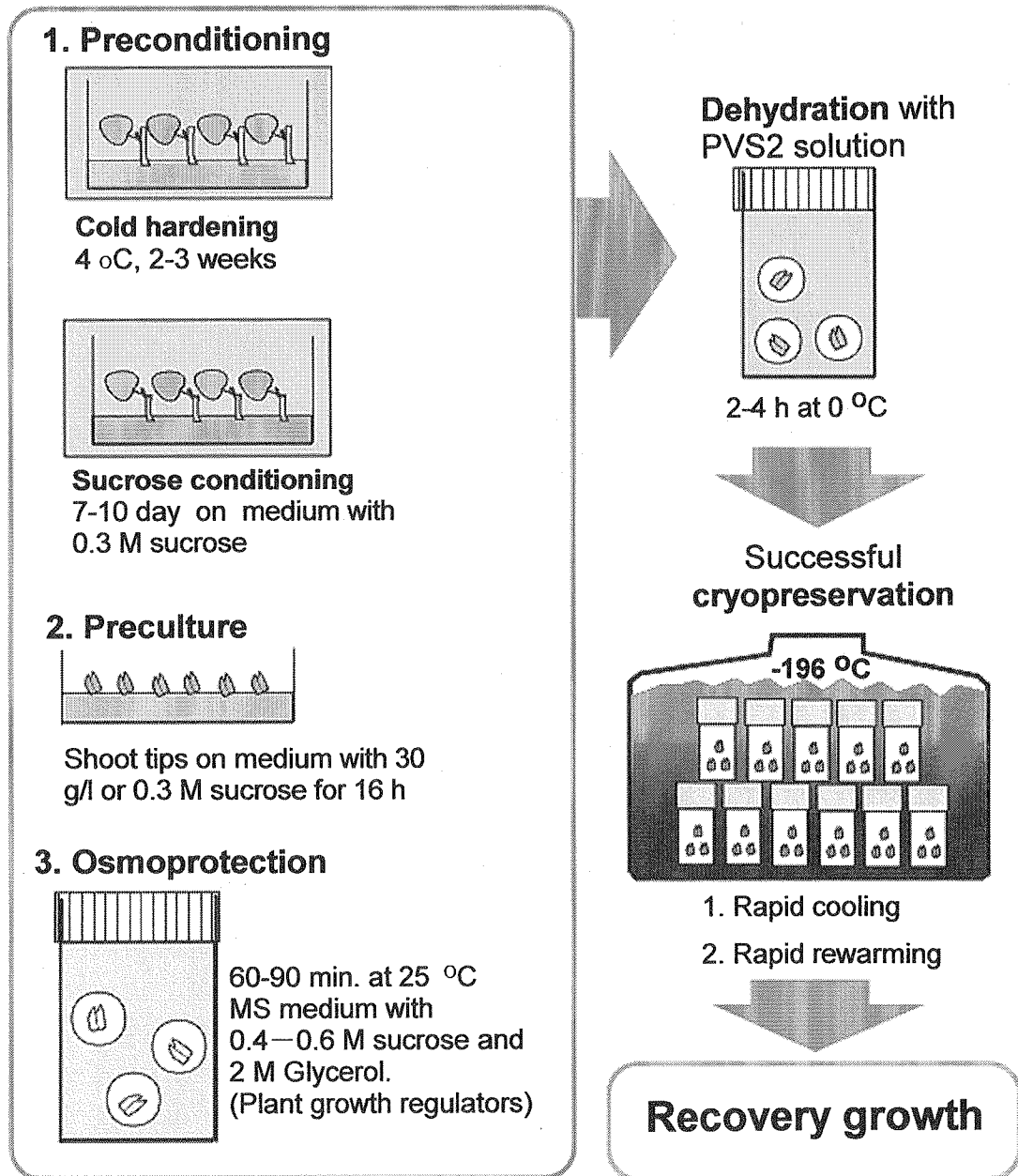


Fig. VII-1 Scheme of cryopreservation by encapsulation-

していたと考えられ、急速加温、洗浄後に培養すると分裂組織から直接茎葉が伸長した。そして、その生育は迅速かつ旺盛であることから、超低温保存することによる変異の発生はないと考えられた。

ガラス化法により超低温保存した植物体の外観調査で、異常個体の発生がないことが、ナシ(Niino, 1992a)、

クワ (Niino, 1992b)、クローバ (Yamada ら、1991) などで報告されている。しかし、超低温保存した作物の圃場における生育調査を行った研究例は少ない。スターチス (高橋ら、1996) には、超低温保存後の草丈、葉数などに差は認められていないが、droplet 法で超急速冷却したバレイショには草丈に変異が認められて

いる (Harding ら、1994)。しかし、droplet 法により超低温保存されたパレイショは茎葉形成率が低い。これは茎頂の脱水が不十分であるため、液体窒素処理後の茎頂分裂組織の生存細胞数が少なくなり、これら生存細胞がカルス化し、2次的に再分化した可能性が高く、これが変異の原因であると考えられる。これに対してスターチスはガラス化法で超低温保存されており、茎葉形成率も 76%と高い。本研究で、圃場での生育調査に用いた 3 作物 8 点の茎葉形成率は 73.8%と高く、再生した茎葉は分裂組織から直接伸長してきたことを、顕微鏡で観察、確認している。そして、これら作物の圃場での生育調査の結果、超低温保存と液体窒素未処理の植物体の間に差は認められなかった。

体細胞変異の発生の検出には、外観的な調査だけではなく、生化学的、分子生物学的な調査も重要である (Harding、1996)。近年、遺伝子増幅装置の普及、DNA 抽出や PCR 関連試薬のキット化など、DNA の分析が容易に行えるようになって来ている。その中でも最も単純な RAPD 分析 (多様な PCR 産物により検出される DNA 多型を利用した分析) を、200 種のプライマーを用いて実施した。PCR 産物が得られた 3 作物 (パレイショ、ヤマノイモ、キャッサバ) の RAPD 分析の結果、超低温保存と液体窒素未処理の間に明らかな差は認められなかった。

超低温保存した茎頂の生育と、それらから得られた植物体の圃場での生育、そしてそれら植物体の RAPD 分析に、液体窒素処理と未処理の間に差は認められなかったことから、ビーズガラス化法により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ていないと考えられる。

異なる 4 つの超低温保存法を、ハッカの培養茎頂を用いて、比較、検討した。超低温保存した茎頂の茎葉形成率は、ビーズガラス化法が最も高く、ガラス化法、ビーズ乾燥法と続き、簡易凍結法は 0%であった。松本 (1997) は、ビーズガラス化法とガラス化法を比較して、ビーズに包埋された茎頂は、PVS2 液が均等に処理されること、それらのストレスが少なくなることから、茎葉形成率は同程度か、ガラス化に優ると報告している。ハッカはビーズガラス化法で超低温保存した茎頂の茎葉形成率は、明らかにガラス化法を上回った。これは、茎頂をゲルに包埋することで茎頂の PVS2 液による急速な脱水害を防ぐことができること、さらにガラス化法に比較して処理中に直接茎頂に触れる機会が少なくなり、茎頂に傷害が起きにくいことによるもの

と考えられる。多量の茎頂を扱う必要がある、超低温保存事業 (ジーンバンク等) においては、その保存作業のしやすさも重要となる。その点についてビーズガラス化法、ガラス化法、ビーズ乾燥法を比べると、ガラス化法が最も操作しづらく、ビーズ乾燥法とビーズガラス化法は同程度に優れていた。ガラス化法は、茎頂をティッシュペーパーで包むことで操作はかなり容易になる。しかし、アルギン酸ゲルで茎頂を包埋するビーズガラス化法、ビーズ乾燥法に比べると依然、慎重な操作が必要であった。

茎葉形成率が高いビーズガラス化法と、茎葉形成率が比較的高く、作業性に優れたビーズ乾燥法をイチゴとパレイショで比較した結果、茎葉形成率だけではなく、培養中の生育もビーズガラス化法が優れていた。同様にワサビ (Matsumoto ら、1994 ; 1995a)、ユリ (Matsumoto ら、1995b) でも超低温保存後の茎葉形成率、生育ともガラス化法、ビーズガラス化法で保存した茎頂がビーズ乾燥法のそれに優ることが報告されている。これらのことから、比較した超低温保存法の中では、茎葉形成率の高さ、生育の旺盛さ、作業のしやすさはビーズガラス化法が最も優れていた。

4 種類の作物の茎頂で確立したビーズガラス化法をニンジン培養細胞、不定胚に応用した結果、茎頂と同様の方法で超低温保存することができた。実験の過程において、細胞レベルで前培養、浸透脱水耐性剤、PVS2 液による浸透脱水の効果を観察することができたが、各々の作用機作は不明であり、今後の検討課題である。

細胞、不定胚をアルギン酸ゲルに包埋することで、超低温保存の操作性は従来の方法より著しく向上した。これらのことから、ビーズガラス化法は遠心分離を要する材料 (培養細胞、毛状根、藻類、微生物など) の超低温保存にも適した方法であると考えられる。

以上のことから、ビーズガラス化法は、栄養繁殖性作物の遺伝資源を、長期保存するために適した方法であると考えられる。本方法が圃場保存、インビトロ保存と共に、今後の栄養繁殖性作物の超低温保存事業に活用されることを期待している。また、作物だけではなく、温帯から熱帯地域の絶滅危機種に含まれる栄養繁殖性植物の超低温保存 (長期保存) にも応用され、地球レベルの自然保護に寄与できれば幸いである。

摘 要

栄養繁殖性作物の長期安定保存には、超低温保存が最適である。本研究ではハッカ、バレイショなど、栄養繁殖性作物の超低温保存法を確立することを目的とした。

ハッカの腋芽を含む切片の組織節培養により増殖し、側芽由来の茎頂を材料として近年開発された超低温保存法（ビーズガラス化法、ガラス化法、ビーズ乾燥法、簡易凍結法）の条件を検討し、茎葉形成率（個体再生率）などを比較した。

ハッカで高い茎葉形成率を示したビーズガラス化法をバレイショ、イチゴ、ヤマノイモ、キャッサバに適用し、それぞれに適した条件を検討した。また、超低温保存した後の変異の発生について、加温直後から順化させた植物体の圃場における生育までを観察、調査した。さらに超低温保存した後の再生植物体と液体窒素処理しない植物体との両者の RAPD 分析を実施し、遺伝子レベルでの比較を行った。

1. ビーズガラス化法は茎頂をアルギン酸ゲルに包埋する事で茎頂の PVS2 液による急激な脱水害を避けることができ、かつ操作が簡便となる。このことから本方法で超低温保存した茎頂の茎葉形成率は、同じ処理を行うガラス化法より高くなった。ビーズ乾燥法も茎頂をゲルに包埋する事で操作は簡便になるが、シヨ糖のみでは茎頂に十分な脱水耐性を付与することができず、茎葉形成率はビーズガラス化法に劣った。ガラス化法は茎頂を直接扱うため、操作に時間を要した。簡易凍結法では生存する茎頂は認められなかった。

2. バレイショ、イチゴの培養茎頂を用いてビーズガラス化法とビーズ乾燥法を比較した結果、茎葉形成率、加温後の生育ともビーズガラス化法によって超低温保存した茎頂が優れていた。

3. ハッカ、バレイショ、イチゴ、ヤマノイモの培養茎頂をビーズガラス化法により超低温保存するための、前処理、前培養、浸透脱水耐性付与剤、PVS2 液による最適な脱水時間、加温後の培養条件などを明らかにした（表）。また、本方法は前処理の方法など、若干の変更によって温帯作物だけではなく、熱帯作物であるキャッサバにも適用することができた。これら5作物のべ28点の平均茎葉形成率は66.3%であった。本方法を用いて超低温保存した茎頂の茎葉形成率は、その保存期間を1時間（全作物）から6ヶ月間（ヤマノイモ）、1年間（バレイショ、イチゴ）、2年間（イチゴ）と延ばしても一定であった。

4. ビーズガラス化法で超低温保存した茎頂の加温直後の生育は迅速、旺盛であり、生育した茎葉は茎頂の分裂組織から直接伸長した。順化後の植物体の外観と草丈（バレイショ、イチゴ、ヤマノイモ）及び収穫した塊茎（バレイショ）、果実（イチゴ）の外観と重量には液体窒素処理と無処理の間に変異は認められなかった。また、それら植物体を200種のDNAプライマーを用いてRAPD分析した結果、超低温保存と無処理の植物体の間に明らかな差は認められなかった（バレイショ、ヤマノイモ、キャッサバ）。こ

れらのことから、超低温保存した作物に実用上問題となる変異は発生していないことが明らかになった。

5. ビーズガラス化法はニンジン培養細胞、不定胚にも適用でき、浸透脱水耐性付与などの処理時間は短く、操作性に優れていた。

以上のことからビーズガラス化法は栄養繁殖性作物の茎頂だけではなく、細胞や不定胚にも適用が可能であり、栄養繁殖性植物の遺伝資源の長期保存に利用できる。

表 本研究で用いた作物のビーズガラス化法による超低温保存の最適条件など

作物名 (品種名)	前処理	前培養	浸透脱水耐性付与剤 と処理時間 (25℃)	PVS2 (0℃)	供試点数
ハッカ (Spearmint common)	低温処理 (4℃, 2週間)	無し	2Mグリセリン+0.4Mシヨ糖 (60分)	3時間	3
バレイショ (男爵薯)	無し	0.3Mシヨ糖 (+PGR) (16時間)	2Mグリセリン+0.6Mシヨ糖 (+PGR), (90分)	3時間	14
イチゴ (きたえくぼ)	低温処理 (4℃, 2週間)	0.088Mシヨ糖 (16h)	2Mグリセリン+0.4Mシヨ糖 (60分)	2時間	6
ヤマノイモ (ナガイモ十勝)	シヨ糖馴化 0.3Mシヨ糖(25℃, 7-10日)	無し	2Mグリセリン+0.6Mシヨ糖 (+PGR), (90分)	4時間	3
キャッサバ (AMM22)	無し	0.3Mシヨ糖 (+PGR) (16時間)	2Mグリセリン+0.6Mシヨ糖 (+PGR), (60分)	4時	2
ニンジン培養細胞 (五寸)	無し	0.3Mシヨ糖 (24時間)	2Mグリセリン+0.4Mシヨ糖 (30分)	1時間	1
ニンジン不定胚 (五寸)	無し	無し	2Mグリセリン+0.4Mシヨ糖 (30min)または無し	1時間 25℃	魚雷型、心臓型 または球状胚

PGR: 各々の作物の培養に適した植物成長調節物質

Summary

Cryopreservation of plant germplasm in liquid nitrogen appears to be a logical choice for long-term storage of vegetatively propagated crops with the minimum requirements for space and maintenance. The purpose of this research is to establish a practical protocol for the cryopreservation of vegetatively propagated crops such as mint, potato, strawberry etc.

The proper protocols for cryopreservation recently developed by four different cryogenic procedures, i.e. the encapsulation-vitrification method, the vitrification method, the encapsulation-dehydration method and the simple freezing method, were determined to evaluate the rate of shoot formation and compared by using axillary shoot tips of mint (*Mentha spicata* L.), which were mass-propagated by nodal segment culture.

The encapsulation-vitrification method, which showed the best results with mint, was applied to germplasm of potato, strawberry, Chinese yam and cassava. Genetic stability after cryopreservation by this method was confirmed by the direct observation of growth of cryopreserved shoot tips, and by comparing the growth rates of cryopreserved and non treated control plants in the field experiments and by using RAPD analysis of genomic DNA.

1. The rate of shoot formation of axillary shoot tips of mint cryopreserved by encapsulation-vitrification method was the highest rate among those of four cryogenic procedures. Because the alginate gel capsule could protect the shoot tips from rapid dehydration with PVS2 solution, cryopreserved shoot tips by the encapsulation vitrification method produced higher rate of shoot formation than that by the vitrification method. Because shoot tips treated only with sucrose solution were not sufficiently tolerant to dehydration, the rate of shoot formation of the shoot tips cryopreserved by the encapsulation-dehydration method was lower than that by the encapsulation-vitrification method. There were no survived shoot tips showed after cryopreservation by the simple freezing method.

2. The cryopreserved shoot tips of potato and strawberry by the encapsulation vitrification method produced the higher rate of

shoot formation and the ready recovery growth than those of cryopreserved by the encapsulation dehydration method.

3. The optimal conditions of each steps of the encapsulation-vitrification method, such as the preconditioning, the preculture, the osmoprotection and the period of dehydration with PVS2 solution, for the shoot tips of mint, potato, strawberry,

Chinese yam and cassava were described in the table below. An average rate of shoot formation of the 28 cultivars of five crops was 66.3%. The duration periods of cryopreservation, for one hr (all crops), 6 month (Chinese yam), 1 year (potato and strawberry) and 2 years (strawberry), did not effect the rates of shoot formation.

4. The successfully cryopreserved shoot tips resumed the growth just after rewarming and the shoot developed directly without intermediary callus formation. No morphological abnormalities were observed in the cryopreserved plants in the field.

Little differences were observed between cryopreserved and non-treated control plants in their plant heights (potato, strawberry and Chinese yam), tuber weights (potato) and fruits weight (strawberry) and in their coefficients of variations. The results of RAPD analysis using 200 primers did not detect any differences between cryopreserved and non-treated plants of potato, Chinese yam and cassava. Thus, it is clear that the genetic variations would not occur in plant germplasm during cryopreservation by the encapsulation-vitrification method.

5. Carrot cells and somatic embryos of every growth stages were also successfully cryopreserved by the encapsulation-vitrification method.

The newly developed encapsulation-vitrification method proposed in this study appears a promising method for the long-term storage of not only shoot tips of vegetatively propagated crops but also cultured cells and somatic embryos.

Table: Optimal conditions of encapsulation-vitrification method for all crops tested in this study.

Crop name (cultivar)	Preconditioning	Preculture	Osmoprotection (25°C)	PVS2 (0°C)	No. of tested cultivars
Mint (Spearmint common)	Cold hardening (4°C, 2weeks)	None	2M glycerol + 0.4 M sucrose (60 min)	3h	3
Potato (Danshakuimo)	None	0.3M sucrose (23°C, 16 h)	2M glycerol + 0.6 M sucrose (+PGRs), (90min)	3h	14
Strawberry (Kizakubo)	Cold hardening (4°C, 2weeks)	0.088M sucrose (23°C, 16 h)	2M glycerol + 0.4M sucrose (60 min)	2h	6
Chinese yam (Nagaimo, tokachi)	0.3M sucrose (25°C, 7-10 d)	None	2M glycerol + 0.6M sucrose (+PGRs), (90 min)	4h	3
Cassava (AMM22)	None	0.3M sucrose (25°C, 16 h)	2M glycerol + 0.6M sucrose(+PGRs), (60 min)	4h	2
Carrot cells (Gosun)	None	0.3 M sucrose (25°C, 24h)	2M glycerol + 0.4 M sucrose (30 min)	1h	1
Carrot embryos	None	None	2M glycerol + 0.4 M sucrose (30 min)	1h (25°C)	1

PGRs stands for plant growth regulators.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、北海道大学名誉教授酒井昭博士には、終始熱烈なご指導と叱咤激励を賜った。酒井先生のご指導がなければ、本研究、本論文が成就することはなかった。ここに深甚に感謝の意を表す。元北海道立植物遺伝資源センター佐々木宏氏には、常に無言のご支持と植物遺伝資源に関するご教授を賜った。また、元北海道立植物遺伝資源センター臨時農業技能員大槻規子氏には、研究遂行上多くのご協力と励ましを賜った。彼女の助力がなければ本研究を遂行することはできなかつた。ここに改めて感謝の意を表す。農林水産省技術会議主任情報官高木洋子博士、農林水産省東北農業試験場栽培生理研究室長新野孝夫博士、島根県立農業試験場主任研究員松本敏夫博士には終始多大なご協力と激励を賜った。北海道立北見農業試験場主任研究員伊藤武氏、北海道立十勝農業試験場園芸科長（現北海道立花・野菜技術センター主任研究員）日下孝人氏、同研究職員温水（黒崎）友紀氏、北海道立道南農業試験場園芸科長（現北海道立花・野菜技術センター専門技術員）川岸康司氏、北海道立中央農業試験場研究職員（現北海道立北見農業試験場）木口忠彦氏、北海道グリーンバイオ研究所松村健博士、ホクレン農業総合研究所在原章弘氏には研究遂行上のご便宜を賜った。以上の各位に感謝の意を表す。最後に本論文の校閲の労をとられた、北海道大学大学院農学研究科教授喜久田嘉郎博士、同教授大澤勝次博士、同教授藤川清三博士、同助教授幸田泰則博士の各位に対し、深甚なる謝意を表す次第である。

引用文献

- Bachiri Y., C. Gazeau, J. Hansz, C. Morisset and J. Dereuddre. 1995. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43: 241-248.
- Bouafia S., N. Jelti, G. Lairy, A. Blanc, E. Bonnel and J. Dereuddre. 1996. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. *Potato Research*, 39:69-78.
- Charoensub R., S. Phansiri, A. Sakai and W. Yongmanitchai. 1999. Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tips cooled to -196 °C. *Cryo-Letters*, 20:89-94.
- Chen T. H. H. and Gusta L. V. 1983. Abscisic acid induced freezing tolerance in cultured plant cells. *Plant Physiol.*, 73:71-75.
- Dereuddre J., S. Blandin and N. Hassen. 1990. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear 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. Blandin 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-Letters*, 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-Letters*, 12:135-148.
- Fabre J. and J. Dereuddre. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters*, 11: 413-426.
- Fahy G. M., D. R. McFarlane, C. A. Angel and H. T. Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiol.*, 21:407-426.
- Harding K. and E. E. Benson. 1994. A study of growth, flowering and tuberization in plants derived from cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum*. *Cryo-Letters*, 15:59-66.
- Harding K. 1996. Approaches to assess the genetic stability of plants recovered from *in vitro* culture. pp. 135-168. In: *In-vitro Conservation of Plant Genetic Resources* (M. N. Normah, M. K. Narimah, M. M. Clyde eds.). University Kebangsaan, Malaysia.
- 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-Letters*, 15:47-52.
- Hirai D., K. Shirai, S. Shirai and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in-vitro* grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation vitrification. *Euphytica*, 101:109-115.
- Hirai D. and A. Sakai. 1999. Cryopreservation of *in-vitro* grown axillary shoot tips meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. *Plant Cell Rep.*, 19:156-160.
- Hirai D. and A. Sakai. 1999. Cryopreservation of *in-vitro* grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Res.*, 42:153-160.
- Hirai D. and A. Sakai. 2000. Cryopreservation of *in-vitro* grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. pp. 205-211 In: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm* (F. Engelmann and H Takagi, eds.) JIRCAS Int. Agri. Series No.8, IPGRI, Tsukuba, Japan.
- Iijin W. S. 1933. Über den Kältetod der Pflanzen und seine Ursachen. *Protoplasma*, 20:105-124.
- Kartha K.K. 1985. Meristem culture and germplasm preservation. pp. 115-134 In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs* (Kartha K. K. ed.). CRC press, Boca Raton.
- Kartha K. K., L. Leung and K. Pahl. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105(4): 481-484.
- 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.
- Kobayashi S., A. Sakai, T. Ohgawara and Y. Nakamura. 1994. Stable maintenance of an integrated gene in nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb.) under storage in LN2. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 63(3): 553-558.
- Langis R., B. J. Schnabel-Preikstas, E. D. Earle and P. H. Steponkus. 1990. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips by vitrification. *Cryobiol.*, 27: 657-658.
- Masuda K., Y. Kikuta and Y. Okazawa. 1981. A revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, 60:183-193.
- 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, C. Takahashi and K. Yamada. 1995a. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryo-Letters*, 16:189-196.
- Matsumoto T., A. Sakai and K. Yamada. 1995b. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 41:237-241.
- Matsumoto T. and A. Sakai. 1995c. An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled -196 °C. *Cryo-Letters*, 16:299-306.
- 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.
- Matsumoto T. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-cultured meristems of wasabi. pp. 212-216 In: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm* (F. Engelmann and H Takagi, eds.) JIRCAS Int. Agri. Series No.8, IPGRI, Tsukuba, Japan.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15:473-497.

- 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-Letters*, 13:303-312.
- 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-Letters*, 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-Letters*, 16:102-107.
- Reed B. M. 1990. Survival of *in vitro*-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortSci.*, 25: 111-113.
- Reed B. M. 1999. *In vitro* storage conditions for mint germplasm. *HortSci.*, 34(2): 350-352.
- Reinoud P. 1996. Cryopreservation of tobacco suspension cells by vitrification. In *Doctoral Paper*, Rijks Leiden University. pp. 1-95.
- Sakai A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plants cultured cells and meristems cooled to -196 °C. JICA Genetic resources projects REF. No. 6:5-26.
- Sakai A., S. Kobayashi and I. Oiyama 1990. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* 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. and S. Yoshida. 1967. Survival of plant tissue at super-low temperatures. VI. Effect of cooling and rewarming rates on survival. *Plant physiology*, 42:1695-1701.
- Shimonishi K., M. Ishikawa, S. Suzuki and K. Osawa. 1991. Cryopreservation of melon somatic embryos by a desiccation method. *Japan J. Breed.*, 41:347-351.
- Sugawara Y. and A. Sakai. 1974. Survival of suspension-cultured sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiol.*, 54:722-724.
- Takagi H., N. T. Thinh, O. M. Isulam, T. Senboku and A. Sakai. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep.*, 16:594-599.
- Takagi H., N. T. Thinh and P. M. Kyesmu. 1998. Cryopreservation of vegetatively propagated tropical crops by vitrification. pp. 485-494 In: *Proceedings of International Symposium of Biotechnology, Tropical and Subtropical Species*. (R. A. Drew, ed.). *Acta Hort.*, 461, ISHS
- 高橋 千昭、松本 敏一、酒井 昭、名古 洋治. 1995. スターチス培養細胞のガラス化法による超低温保存. 第14回植物組織培養学会大会講演要旨集, pp. 70.
- 高橋 千昭、松本 敏一、酒井 昭、名古 洋治. 1996. 異なる3種類の方法によるスターチス培養茎頂の超低温保存と再生植物の生育. 第5回植物細胞分子生物シンポジウム講演要旨集, pp. 56.
- Thinh N. T., 1997. Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. *Doctoral Thesis*, Dep. of Agronomy, Kobe University, pp. 1-187.
- Thinh N. T., H. Takagi and S. Yashima. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp) by vitrification method. *Cryo-Letters*, 20:163-174.
- Thinh N. T., H. Takagi and A. Sakai. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. pp. 227-232 In: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm* (F. Engelmann and H Takagi, eds.) JIRCAS Int. Agri. Series No.8, IPGRI, Tsukuba, Japan.
- 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 axially 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 determining viability of cultured plant cell. *Stain Technol.*, 47:189-194.
- Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18:6531-6535.
- Withers L. A. 1978. The freezing preservation of synchronously dividing cultured cells of *Acer pseudoplatanus* L.. *Cryobiol.*, 15:87-92.
- 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.