

ガラス化法およびビーズガラス化法を用いた 培養植物茎頂の超低温保存

¹岩手大・院・連合農学, ²岩手大・農・寒冷バイオシステム研究センター
³獨東北農研センター, ⁴山形県立園芸試, ⁵安代町花き開発センター

田中 大介^{1,2}, 新野 孝男³, 五十鈴川寛司⁴, 日影 孝志⁵, 上村 松生^{1,2}

Cryopreservation of *In Vitro*-Grown Plant Apical Shoot Tips by Vitrification and Encapsulation-Vitrification

Daisuke TANAKA^{1,2}, Takao NIINO³, Kanji ISUZUGAWA⁴,
Takashi HIKAGE⁵ and Matsuo UEMURA^{1,2}

¹United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka 020-8550

²Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550

³National Agricultural Research Center for Tohoku Region, Fukushima, 960-2156

⁴Yamagata Prefectural Horticultural Experimental Station, Sagae 991-0043

⁵Ashiro-cho Floricultural Development Center, Ashiro 028-7553

In vitro-grown apical shoot tips of *Gentiana* were successfully cryopreserved by vitrification (V) and encapsulation-vitrification (EV) protocols. We optimized and compared the V and EV protocols. Although both protocols resulted in a relatively high survival rate, the EV protocol seemed to have several distinct advantages. First, the survival rate of shoot tips cryopreserved by the EV protocol was much greater than that by the V protocol under optimized conditions. Second, the range of optimum treatment period by vitrification solution (PVS2 solution) was considerably wider with the EV protocol than with the V protocol. Third, after rewarming from liquid nitrogen temperature, the cryopreserved shoot tips showed more vigorous growth for the EV protocol than the V protocol. With the optimum EV protocol, we succeeded to cryopreserve shoot tips from 10 different lines of *Gentiana* and uniformly obtained high survival rate. Thus, the EV protocol appears to be promising for cryopreservation of a wide range of plant germplasm.

リンドウは竜胆と呼ばれ根は、古来より漢方の健胃薬として利用され、神農本草経中品にも収載されてきた¹⁾。現在、園芸作物としての切花・鉢物は岩手県を代表する経済的に大きな産業の一つとして位

置付けられている²⁾。

リンドウは一般に実生によって繁殖されているが、育種母本となる親株自身の遺伝的特性を維持することは難しい^{2,3)}。交雑して育成した系統の品質を育種面から評価するまでには3~4年かかるため、育種母本(F₁育種用親株および優良系統)を長期間、維持・保存しておく必要がある。リンドウの系統維持には組織培養が広く用いられているが、組織培養にはウイルスフリー株を得る事ができる²⁾という利点がある反面、人的・経済的な負担、雑菌混

第48回低温生物工学会研究報告14.

[Key words : Cryopreservation, Cold acclimation, Dehydration tolerance, Vitrification, Encapsulation-Vitrification ; 超低温保存, 低温馴化, 脱水耐性, ガラス化法, ビーズガラス化法]

(70)

入、体細胞変異などのマイナス面も多い⁴⁾。そこで、長期間安定した状態で多くの系統を保存する簡便な方法の確立が望まれている。本研究では、*ex situ* 保存法として注目されているガラス化法にアルギン酸ビーズ包埋法を組み合わせ、簡便で生存率の高いリンドウ遺伝資源超低温保存法を開発することを試みた。

リンドウ (*G. scabra* Bunge, 系統名 山形302) 茎頂を供試材料に、ガラス化法とビーズガラス化法を用いて、生存率等の結果およびさまざまな処理の効果を比較した。なお、本実験では報告されているガラス化液の中から、多くの植物種の保存に成功している PVS2 液⁵⁾ を用いた。

通常ガラス化法【Fig. 1：低温馴化（5℃，3週間）→前培養（0.3M ショ糖含有 MS 培地：5℃，24時間）→脱水耐性付与処理（2M グリセロール＋0.4M ショ糖：25℃，20分）→ガラス化液処理（PVS2 液：25℃，30分）→液体窒素処理→加温処理（38℃）】を用いて保存した結果、比較的高い生存率（76.7±4.1%）を得た。さらに、ビーズガラス化法【Fig. 2：前培養した茎頂を 2M のグリセロールを含むアルギン酸ビーズに包埋した後ガラス化液で処理して保存】を試みたところ、①ガラス化液処理時間を厳密に決定する必要がないなど操作を簡便にすることができた、②非常に高い生存率（93.3±

4.1%）を得ることができた、③生存茎頂は、加温後の再培養培地上で非常に早い時期から再生を開始した、などの利点が見出された。リンドウ近縁種 (*G. scabra*, *G. triflora*, *G. makinoi*) および、その交配系統で試験した結果、ガラス化法では材料によって生存率の差異が大きいものに対して、全供試材料で、ビーズガラス化法は高い生存率を示し、加温処理後の生育も非常に早いことが確認された。

ガラス化法を基礎とした超低温保存法は、(脱水耐性を付与すると同時に)凍結を起こしにくい含水率まで細胞を脱水し、液体窒素に投入することにより急速冷却することで組織を生存させる。すなわち脱水によって細胞質における溶質濃度を高め、急速冷却中に細胞内の水を氷形成を伴わないガラス状態にすることで細胞の傷害を回避させている⁶⁾。一般に植物細胞は凍結中の細胞内における氷形成によって傷害を受けることが知られており、細胞内の水が氷を形成することなくガラス状態になることで細胞の生存が超低温で可能になることが報告されている⁷⁾。

超低温保存法として用いられているガラス化法は試料が直接ガラス化液に触れるため、操作が簡単で処理時間が短い利点がある反面、ガラス化液による急激な脱水が原因となり、保存目的とする供試材料ごとの最適処理時間を厳密に検討する必要がある。事実、Niino らはスリランカのイモ (Innara) 資源を

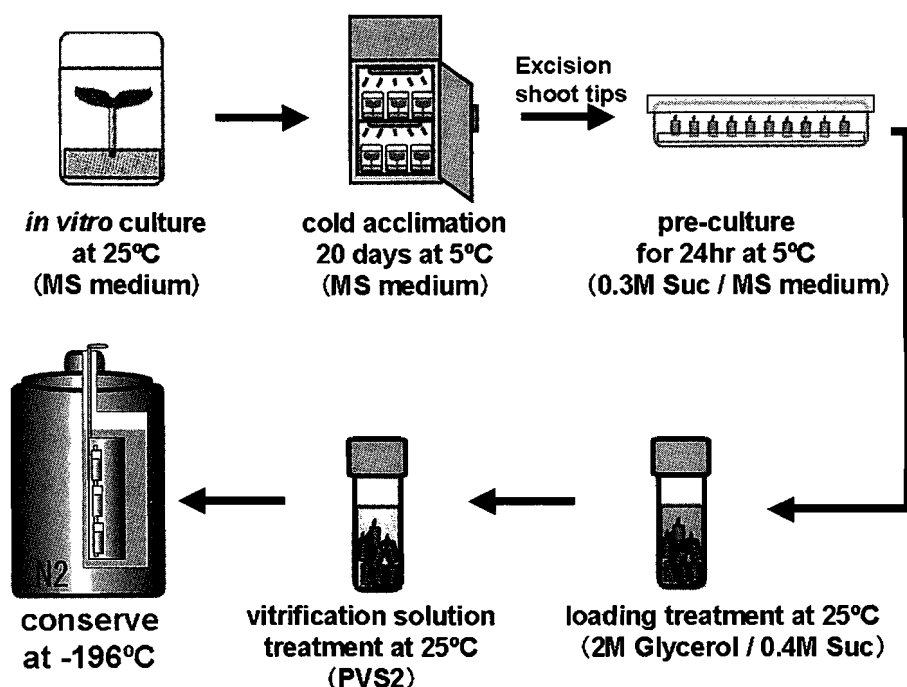


Fig. 1. Schematic presentation of vitrification protocol for cryopreservation of plant apical shoot tips.

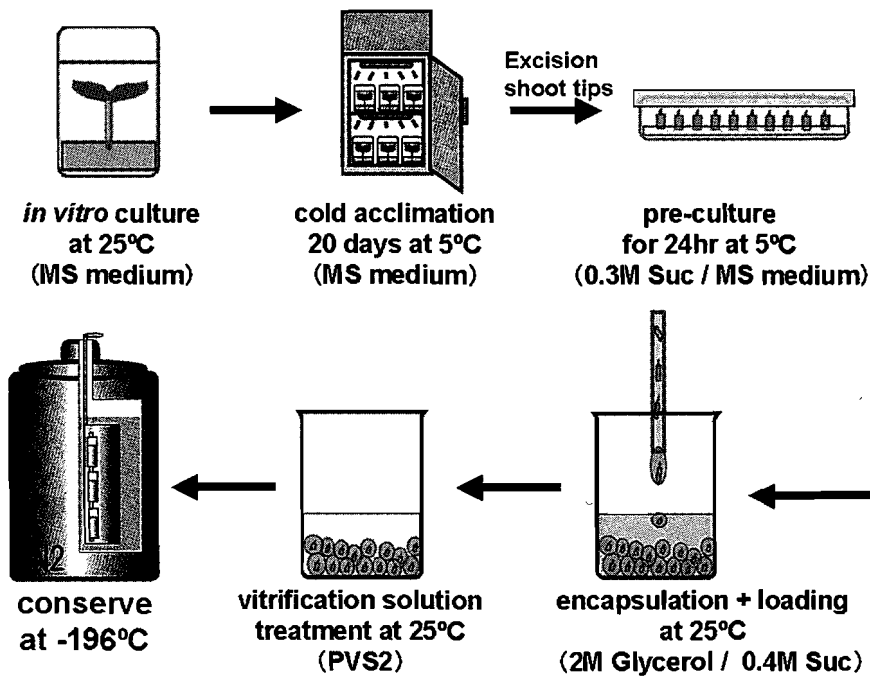


Fig. 2. Schematic presentation of encapsulation-vitrification protocol for cryopreservation of plant apical shoot tips.

ガラス化法によって保存することに成功したが、最適 PVS2 液処理時間とその前後 2 分の生存率は約 13% 変化することが観察された⁸⁾。

一方、ビーズガラス化法は、アルギン酸ビーズに試料を包埋することで、比較的緩速に脱水されるため、ガラス化法と比較してやや長い処理時間が必要なものの、高い生存率が得られた。さらに、脱水が比較的緩やかに起こるため最適 PVS2 液処理時間も厳密に決定しなくても高い生存率を得ることができるという利点を有していた。すなわち、最適処理時間の幅を厳密に決定する必要がない。また、莖頂をピンセットで取り扱う際の操作上の技術的問題から起こる傷害の危険性を軽減できる。それらの利点を生かし、大量の莖頂を同時に扱うことが容易になる。さらに、ビーズガラス化法で保存した莖頂は、再生育初期から旺盛な生育を開始し、その後の生育が速かったことや、カルスの形成なしに再生育が観察されたことから、莖頂に与える傷害は軽いものと考察された。

また、本実験で用いたビーズガラス化法では、グリセロールをアルギン酸ゲルに混入すること、及び、ビーズ作成処理と脱水耐性付与処理を同時に行うことにより、手順を簡便にしている⁹⁾。これらの点は、超低温保存技術を実際に普及させることを容易にすると考えられる。

以上の結果から、2 M グリセロールを含むアルギン酸ビーズを用いたビーズガラス化法を用いた超低温保存法は、実際の育種現場で利用可能な技術として普及可能であると考えられる。今後、数多くのリンドウ育種素材を保存していく予定である。また、今後増え続けると考えられる遺伝子組み替え植物は、安全性が確保されるまでは慎重に取り扱わなければならない¹⁰⁾。それらの、確実な保存法としてもビーズガラス化法を用いた超低温保存法は有効な手段であると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、岩手県安代町花き振興協議会からの援助によって行われた。

参 考 文 献

- 1) 近藤：「四季の山野草」，緒方出版，東京，pp.281 (1983)。
- 2) 吉池：「リンドウ」，初版，誠文堂新光社，東京，p.177 (1992)。
- 3) 菊池：「植物育種学」，角田共著，5 版，文永堂出版，東京，p. 278 (1997)。
- 4) Reed, B.M. : CryoLetters, 97 (2001)。
- 5) Sakai, A, S. Kobayashi and I. Oiyama : Plant Cell Rep, 9, 30 (1990)。
- 6) Sakai, A. : JIRCAS Int. Agri. Series No.8, pl (2000)。

(72)

- 7) Sakai, A. : Nature, 185, 393 (1960).
8) Niino, T., A.Hettiarachchi, J. Takahashi and P.K Samarajeewa : CryoLetters, 21, 349 (2000).
9) Matsumoto, T., A. Sakai and K. Yamada : Plant Cell Rep, 13, 442 (1994).
10) 環境庁自然保護局：「多様な生物との共生をめざして」, 環境庁編, 大蔵省印刷局, 東京, pp.53 (1997).