

栄養繁殖性作物のビーズガラス化法による 超低温保存に関する研究*

技術吏員 農学博士 平井 泰**

目 次

第Ⅰ章 緒言	1
第Ⅱ章 超低温保存の原理と種類	3
1. 超低温保存の原理	3
2. 超低温保存法の種類	4
(1) 緩速予備凍結法	4
(2) 簡易凍結法	4
(3) ガラス化法	4
(4) 乾燥法	4
(5) ビーズ乾燥法	6
第Ⅲ章 ハッカの培養と材料の養成	7
1. 材料とその培養法	7
(1) 植物体の維持	7
(2) 実験材料の増殖など	8
2. 液体窒素処理後の培養条件	8
第Ⅳ章 ハッカ培養茎頂を用いた超低温保存法の検討	9
1. ビーズガラス化法	9
(1) 実験方法	9
(2) 実験結果	9
(3) 考察	10
2. ビーズ乾燥法	16
(1) 実験方法	16
(2) 実験結果	17
(3) 考察	17
3. 簡易凍結法	18
(1) 実験方法	18
(2) 実験結果	19
(3) 考察	19
4. ガラス化法	19
(1) 実験方法	19
(2) 実験結果	19
(3) 考察	19
5. 異なる超低温保存法での茎葉形成率の比較	20
第Ⅴ章 その他の作物の培養茎頂を用いた超低温保存	21
1. 材料とその培養法	21
(1) 植物体の維持及び材料の増殖	21
(2) 液体窒素処理後の培養条件	23
2. 超低温保存法の検討	24
(1) 実験方法及び結果	24

(2) 考察	24
3. 超低温保存後の作物	36
(1) 超低温保存された作物の生育	36
(2) 超低温保存された作物の RAPD 分析	36
(3) 実験結果	36
(4) 考察	38
第VI章 ニンジン培養細胞等の超低温保存	40
1. 材料及び実験方法	40
(1) 供試材料	40
(2) 細胞の超低温保存法	40
(3) 不定胚の超低温保存法	41
2. 実験結果	41
(1) 細胞の超低温保存法	41
(2) 不定胚の超低温保存法	45
3. 考察	46
第VII章 総合考察	50
摘 要	54
Summary	55
謝 辞	56
引用文献	57

* 北海道大学審査学位論文

**北海道立植物遺伝資源センター(現北海道立中央農業試験場、069-1395 北海道夕張郡長沼町東 6 線北 15 番地)

略語集

試薬関係

BAP: ベンジルアミノプリン。植物成長調節物質のサイトカイニンの 1 つ。

2,4-D: ジクロロフェノキシ酢酸。植物成長調節物質のオーキシンの 1 つ。

DMSO: ジメチルスルフォキシド。

EG: エチレングリコール。

FDA: フルオレゼイン-2-アセテート。細胞の生死を判定する蛍光染色用試薬。

GA3: ジベレリン酸の一種。植物成長調節物質のジベレリンの 1 つ。

IAA: インドール酢酸。植物成長調節物質のオーキシンの 1 つ。

LN: 液体窒素。

NAA: ナフタレン酢酸。植物成長調節物質のオーキシンの 1 つ。

PCV: Packed Cell Volume。単位量の培地に含まれる細胞の体積を示す。

PEG: ポリエチレングリコール。

方法など

PCR: polymerase chain reaction。2 本鎖 DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、相補鎖の伸長というステップを 1 サイクルとして繰り返し、プライマー間の DNA を増幅していくこと。操作の簡便さと増幅する DNA 断片の特異性により、多くの用途に用いられている。

PVS2 液: ガラス化液の 1 つ。植物細胞の超低温保存のために開発された、濃厚な脱水液。30%(w/v)グリセリン、15%(w/v)エチレングリコール、15%(w/v)ディメチルスルフォキシド、0.4M ショ糖、MS 培地、pH5.8 (Sakai ら、1990)。

RAPD 分析: Random Amplified Polymorphic DNA (多様な PCR 産物により検出される DNA 多型) により、個体間などの DNA 構造を比較するための分析方法。