

第I章 緒言

植物遺伝資源とは自然界に存在する全ての植物全体と、それらを構成する遺伝子を指す。人類はこれらの植物を利用し、人類にとって有用な多くの作物を開発してきた。このため、これら植物全体は石油や鉱物と同様に、人類が利用する「資源」の一部であると言える。開発された作物は多収性、高品質、耐病性など、農業上、重要な形質を目標にさらに改良され続けている。このように育成された品種の栽培面積は増加するが、その一方で、目的以外の品種は除かれていく傾向がある。このため、生産性は低い、有用な遺伝形質を持つ野生種や在来種は年々減少し、絶滅する危険性が高い。農業分野に限定した狭義の遺伝資源は、このような作物の種、品種を指し、北海道立植物遺伝資源センターは穀類、豆類など、1999年現在、2万点以上の遺伝資源を保存している。これらの減少する遺伝資源には耐病性などの未知の遺伝子を含むと考えられ、「資源」として残すことは、将来の品種改良に利用するためにも重要である。

作物の保存は育種材料としてすぐに利用できる短期保存、短期保存材料を維持するための中期保存、半永久的に保存する長期保存に分けられ、各々に適した条件で保存することが必要である。種子で繁殖する主な穀類などの作物は、短期保存(4℃)、中期保存(-1℃)、無酸素状態でさらに低温(-10℃)にした長期保存など(植物遺伝資源センター)、保存する目的に応じて種子の貯蔵温度を変えることで、比較的容易に保存することができる。しかし、主に栄養体(塊茎、塊根、ランナーなど)で繁殖する、栄養繁殖性作物は多くの場合、遺伝的に固定していないため種子での形質の保存は不可能である。このため、栄養繁殖性作物は、植物体を圃場で栽培して保存する(圃場保存、Field gene bank)か、虫害やウイルス病を防ぐために網室でポット栽培して保存(網室保存)されている(図I-1)。北海道立農業試験場においても道南農試でイチゴ、北見農試でパレイショの品種改良が実施されており、それぞれの試験場の圃場や、網室で各種遺伝資源が保存されている。

栄養繁殖性作物を短期保存として圃場で保存する際の長所は、1)特性調査を保存と同時に行うことが可能で、2)有望な品種系統を交配親として即時に利用できることである。しかし、中～長期保存として圃場保存

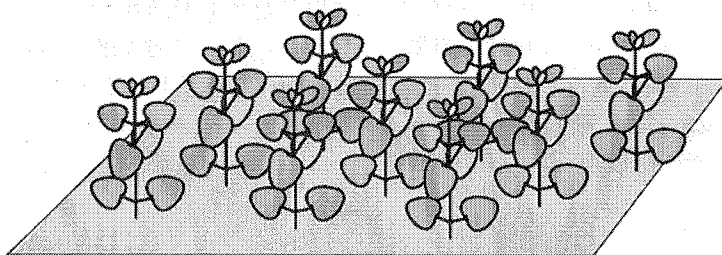
するには、1)多くの圃場面積を要し、2)植え替え、病虫害や雑草の防除作業などの管理労力が膨大なものとなり、また、3)病虫害や気象災害による貴重な遺伝資源の消失の危険性が高い。このため、栄養繁殖性作物の中～長期保存法として、ガラスやプラスチック容器内で無菌的に植物体を培養する保存法(インビトロ保存)が開発され、イチゴ、パレイショ、キャッサバ、リンゴなど多くの主要作物がこの方法で保存されている。このインビトロ保存は成長点培養した植物体を無菌状態で培養し、人工環境下で継代培養して保存する方法である。また、継代培養の回数を少なくするために、0~10℃の冷温下や高浸透圧培地など、生育抑制状態で保存される。インビトロ保存は栄養繁殖性作物にとって重要な問題であるウイルスの除去を同時に行うことが可能であるため、国際的な遺伝資源の送付、交流にも利用されている。しかし、この保存方法を用いると病虫害や気象条件による貴重な遺伝資源の消失の危険性はなくなるが、継代培養のための労力、雑菌混入による消失、体細胞変異による変異の発生の危険性が残されている。さらに人工環境を維持するための電気代などの経費や多くの培養系を保存するために大きな培養室の必要性及び培養室の事故による保存材料の全滅の危険性などの問題もある。従って貴重な遺伝資源を安全、低コスト、低面積で長期保存する方法の開発が必要である。

植物の細胞や組織を-150℃以下で保存する超低温保存は、液体窒素以外に経費はかからず、停電などによる温度上昇などの事故も発生せず、限られた面積に多くの遺伝資源を保存することが可能である。また、液体窒素を利用した約-150℃以下の温度では生物の生理・生化学活性はほぼ完全に停止しているため、変異の発生のおそれがない。以上の点から、栄養繁殖性作物の長期安定保存には、超低温保存が最も適した方法である。しかし、その実用化のためには簡便で経費のかからない方法の開発が必要となる。

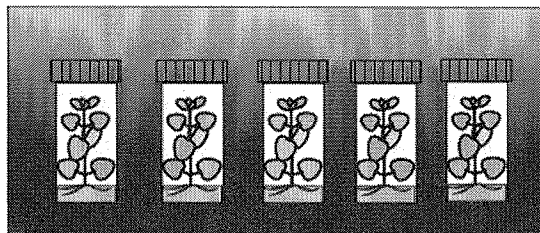
超低温保存する植物の組織には、細胞や胚、そして茎頂が用いられている。カルスや振とう培養した細胞を用いると、それらから再分化した植物体には体細胞変異が発生する確率が高いが、茎頂から直接成長した植物体には変異発生の確率が低い。このように茎頂は、遺伝的安定性、高い個体再生能、高い脱水耐性能力など、優れた特性を持つため、遺伝資源の超低温保存に

Conservation Strategy of Plant Germplasm

1. Seed bank (orthodox seed at -10 to -20 °C)
2. Vegetatively propagated plants
 - 1) Field gene bank (as a whole plant)



- 2) *In vitro* conservation (short to medium term)



- 3) Cryopreservation (long term at -150 to -196 °C)
 Orthodox seeds, very hardy buds,
in vitro apices, somatic embryos, cultured cells

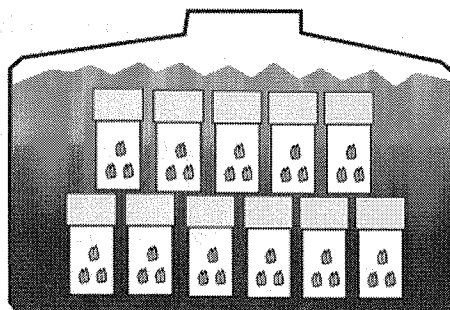


Fig. I-1 Conservation strategy of plant germplasm.

適した組織として広く利用されている (Kantha, 1985)。また、超低温保存する組織が頂芽や腋芽などのように大きすぎると後述するように、超低温保存に必要な組織の十分な脱水、急速冷却が不可能となる。

茎頂を用いた超低温保存は、約 10 年前までは高価なプログラムフリーザーを使用し、 -40°C まで緩速に冷却して凍結脱水した後、液体窒素処理していた (緩速予備凍結法)。この方法は数時間を要し、複雑な操作が必要であった。その上、単細胞とは異なり、多細胞からなる茎頂は均一に凍結脱水されないため、分裂組織の生き残りの細胞数が少なく、カルス化する傾向が指摘された (Kantha ら、1980)。そのため、この緩速予備凍結法は茎頂の超低温保存には広く利用されていなかった。しかし、1990 年頃に、茎頂を室温または 0°C で

脱水した後、直接液体窒素中に冷却するガラス化法 (Sakai ら、1990 ; Langis ら、1990)、ビーズ乾燥法 (Dreudre ら、1990) が開発された。これらの方法は簡便であり、茎頂のような多細胞組織にも利用できる。

本研究は、これら新たに開発された超低温保存法によって、北海道立農業試験場で圃場保存または網室保存されているバレイショ、イチゴなどを超低温保存するための具体的な方法を確立した。また、本研究で確立した超低温保存法の熱帯性作物や培養細胞への適用の可能性も併せて検討した。

第II章 超低温保存の原理と分類

1. 超低温保存の原理

液体窒素の温度 (-196°C) で茎頂などを生かして保存するためには、室温または 0°C から -196°C への急速な冷却中に起こる致命的な細胞内凍結を防ぐことが不可欠である (Sakai & Yoshida, 1967)。このため、細胞内の溶質の濃度を高め、急速冷却中に細胞液をガラス化させることが必要である。この液体からガラスに相転移する温度をガラス転移温度 (T_g) と呼ぶ。ガラス化後はこれ以下の温度を維持することによって細胞内に氷晶が形成されることなく、細胞や組織を安定して保存することができる。

グリセリンやエチレングリコールなどを含んだ濃厚な水溶液は -130°C 以下に急速冷却すれば凍結しないでガラス化する (vitrification)。すなわち、水溶液は氷晶を形成せず、すなわち、凍結せずに無定形の透明な固体 (ガラス) になる (図 II-1)。図 II-2 は濃厚な水溶液の相変化のダイアグラムである (Fahy ら, 1984)。 T_m 曲線は濃度と融点の関係を示し、 T_h は同質氷核形成温度で、その曲線は水溶液が過冷却できる最低温度と濃度の関係を示す。比較的低濃度の水溶液 (図 II-2 の I) を室温から -120°C 以下に急冷すれば、 T_h 曲線以下の温度で必ず凍結が起こるため、ガラス化させることは不可能である (青の実線)。しかし、 T_h 曲線と T_g 曲線が交わる濃度 (約 60%) より高濃度 (III、IV) の水溶液は室温から -120°C 以下に急冷すれば、冷却中に凍結は起きず、 T_g 以下の温度でガラス



Fig. II-1 Vitrified or ice crystallized PVS2 solution.

PVS2 solution contained 30%(w/v) glycerol, 15%(w/v) ethylene glycol and 15%(w/v) dimethyl sulfoxide in MS medium with 0.4M sucrose (pH 5.8).

Left side: Frozen PVS2 solution cooled slowly (about $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) to -196°C .

Right side: Vitrified PVS2 solution cooled rapidly (about $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$) to -196°C .

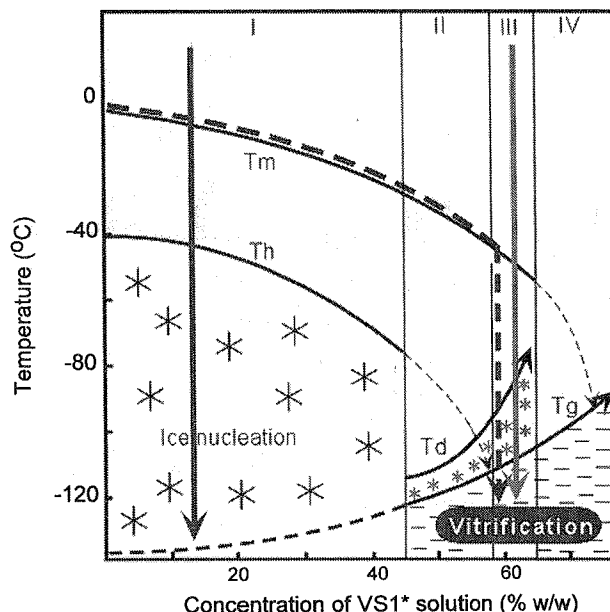


Fig. II-2 Phase diagram of vitrification solution (after Fahy et al., 1984).

* VS1 solution contained 20.5% Dimethyl sulfoxide, 15.5% acetamide and 10.6% propylene glycol.

T_m : Melting temperature; T_h : Homogenous nucleation temperature; T_g : Glass transition temperature; T_d : Temperature of initiation of freezing during warming process.

化する。II の濃度範囲の水溶液はガラス状態が不安定である。 T_d は急速冷却して固化したガラスが緩慢に昇温される ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 際に、脱ガラス化に伴って、水溶液中の水が凍結を始める温度を示す。

緩速予備凍結法は、 T_m 曲線に沿って細胞内の濃度が高まり、約 -40°C まで凍結脱水後、液体窒素中に急冷して細胞をガラス化させる (破線)。これに対して、近年開発されたガラス化法は、 25°C または 0°C の温度で細胞を濃厚なガラス化液で浸透脱水後、その温度から直接液体窒素中に急冷して細胞をガラス化させる (右の実線)。いずれにせよ、細胞を液体窒素中に冷却後、生存させるためには、細胞に含まれる溶質の濃度をガラス化しうる濃度 (図 II-2 の III) まで高める必要がある。

図 II-3 の上の青線は、ガラス化液の一種である 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) 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) 0.1ml を $80^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した際の示差走査熱量計による熱の出入り示し

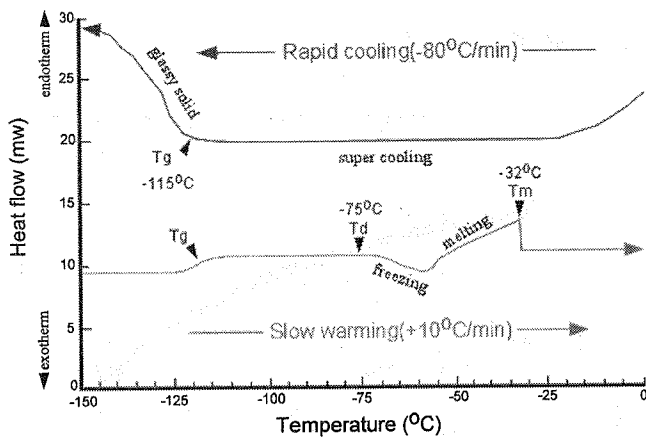


Fig. II-3 Differential scanning calorimetry record of PVS2 solution (Sakai et al. 1990).

Tg: Glass transition temperature; Tm: Melting temperature; Td: Temperature of initiation of freezing during warming process.

たものである。PVS2 液の融点 T_m は -32°C 、ガラス転移温度 T_g は -118°C であるが、比較的早く冷却した時には -100°C 以下まで過冷却した後、ガラス化（吸熱反応）する。ガラス化した PVS2 液を $10^\circ\text{C}/\text{min}$ の緩速昇温させると（図 II-3、下の実線）、脱ガラス化に続いて約 -75°C （加温時に凍結が開始する温度、 T_d ）で PVS2 液中の水が凍結し（発熱反応）、続いて融解する（発熱反応）。しかし、ガラス化した水溶液を急速に温めれば T_d での凍結を防ぐことができる。ガラス化した水溶液を、緩速に温めても凍結させないためには、図 II-2 の IV の範囲まで水溶液の濃度を上げることが必要である。水溶液の濃度を高めると T_d が高くなり、 T_m が低くなり、両者の温度差が小さくなる。このため、IV の濃度範囲においては緩慢に昇温しても、昇温中に凍結は起きづらい。しかし、この高濃度まで耐えられる植物の種や組織は限られてくる。

これまでに多くの超低温保存法が報告されているが、どの方法でも細胞がガラス化するまで濃縮してから液体窒素中に急冷している。従って超低温保存法は脱水方法によって次の 5 つに分類される (Sakai, 1993)。

2. 超低温保存法の種類 (図 II-4)

(1) 緩速予備凍結法 (Conventional pre-slow freezing method)

脱水方法：細胞外凍結

組織を凍害防御剤で処理し、氷核を形成させた後、約 -40°C までプログラムフリーザーで緩速 ($0.3 \sim 0.5^\circ\text{C}$

/分) に冷却し、細胞外凍結で凍結脱水する (図 II-5)。その後、液体窒素に投入して急冷し、細胞をガラス化させる。この方法を用いると細胞内はガラス化するが細胞外は凍結しているため、部分的ガラス化と呼ばれている。

(2) 簡易凍結法 (Simple freezing method)

脱水方法：細胞外凍結

培養細胞を 2M グリセリンと 0.4M ショ糖の溶液に浸漬して凍結耐性を付与した後、 -30°C のフリーザーの気相部に直接移して、自発凍結させる。そして細胞外凍結で十分に脱水後、液体窒素に投入する。この方法はプログラムフリーザーを使用しない簡便な緩速予備凍結法である。この方法も部分的ガラス化である。

(3) ガラス化法 (Vitrification method)

脱水方法：浸透脱水

浸透脱水耐性を付与 (osmoprotection) 後に PVS2 液など、濃厚なガラス化液で室温または 0°C で十分脱水後に液体窒素に投入する (図 II-5)。ガラス化法の最大の特徴は、組織が均一に、効率的に脱水されるために生存率が高く、生育が早いことである。その他、緩速予備凍結法に比較して、脱水時間が大幅に短縮でき、操作が簡便である。この方法は細胞も細胞外の溶液もガラス化するため、完全ガラス化と呼ばれる。

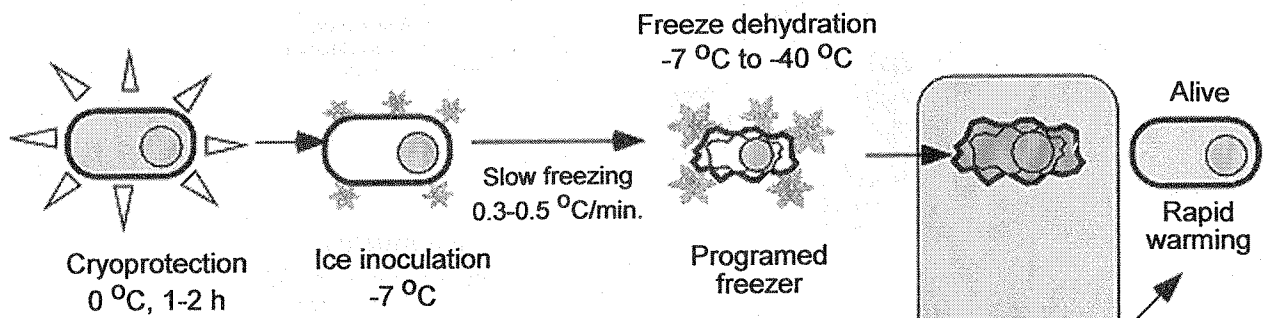
茎頂などの組織をアルギン酸ゲルに包埋するビーズガラス化法 (Encapsulation-vitrification method, Matsumoto ら、1995) はガラス化法の一つであり、組織がアルギン酸ゲルに包埋されることによって操作がより簡便になり、組織にガラス化液が直接触れないため、急激な脱水による害を防ぐことができる。この方法は茎頂だけではなく不定胚、細胞、毛状根、藻類などの微細な材料の保存にも利用できる。

(4) 乾燥法 (Air drying method)

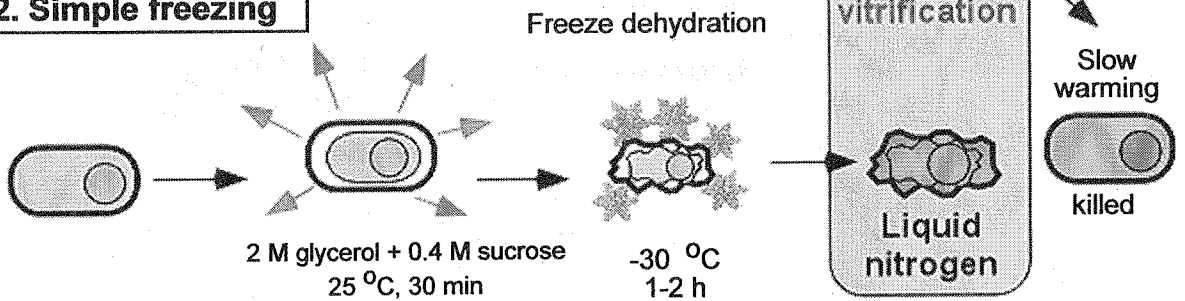
脱水方法：空気乾燥

高濃度のショ糖溶液や ABA などで乾燥耐性を誘導し、乾燥後に液体窒素に投入する。サツマイモやメロンなどの細胞、不定胚 (Shimonishi ら、1991)、アスパラガスの腋芽 (Uragami ら、1990) で用いられている方法で、細胞はガラス化している。乾燥期間は 3 日程度と、かなり長時間を要すること、乾燥耐性を誘導できる作物が現状では限られていること、乾燥後の組織が脆くなり、慎重な操作が必要であることなどが問題である。

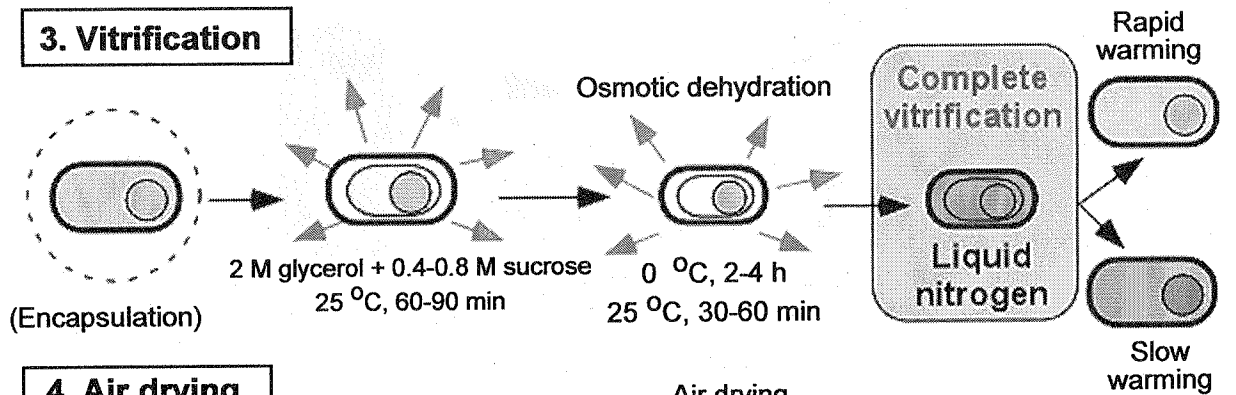
1. Conventional slow freezing



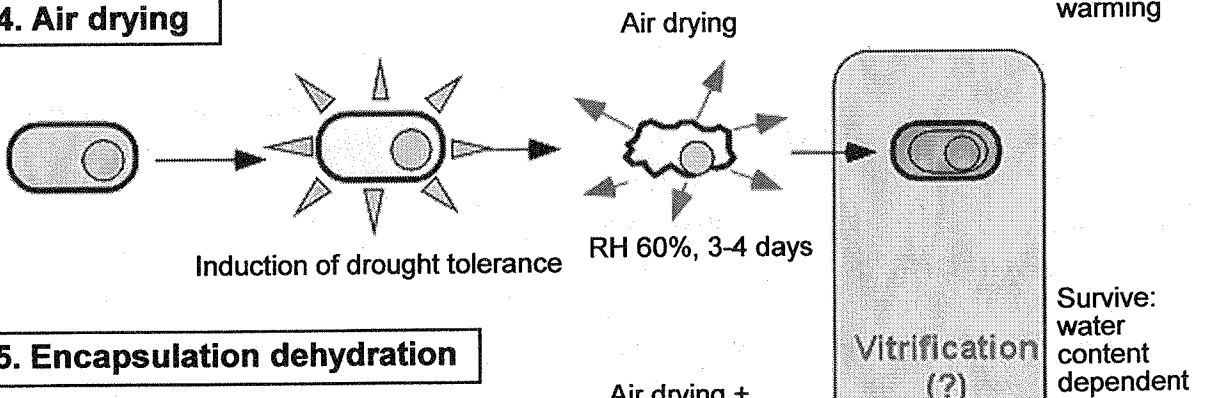
2. Simple freezing



3. Vitrification



4. Air drying



5. Encapsulation dehydration

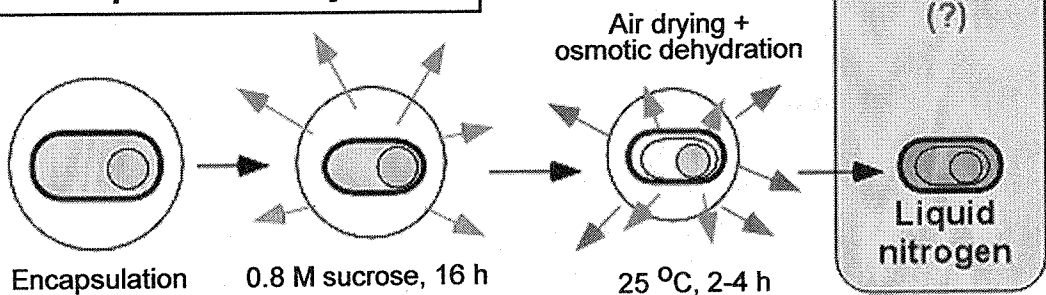


Fig. II-4 Cryogenic strategies for survival of cultured cells and meristems cooled to -196°C (Sakai, 1993, modified).

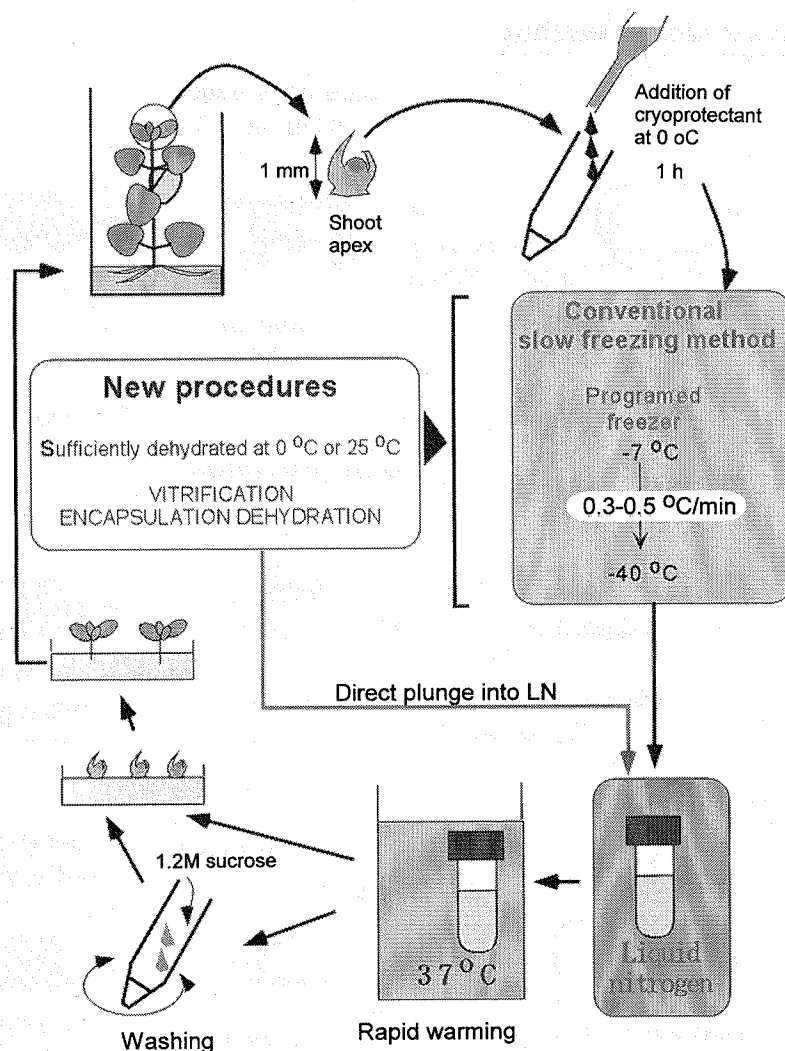


Fig. II-5 A scheme of conventional slow freezing method and new procedures

(5) ビーズ乾燥法 (Encapsulation-dehydration method) 脱水方法: 浸透脱水、空気乾燥

茎頂などをアルギニン酸ビーズに包埋し、0.8M ショ糖溶液で前培養して脱水耐性を付与し、乾燥後に液体窒素に投入する (図 II-5)。この方法はビーズ中のショ糖液が乾燥中に次第に濃縮されるため、ビーズ内部の茎頂が浸透脱水される。茎頂は十分に脱水された後、急速冷却中にガラス化する。

以上のことから、すべての超低温保存法で共通した重要なことは、①材料をあらかじめガラス化する程度まで十分に脱水、濃縮すること、②脱水による生育傷害が起こらないように、脱水もしくは乾燥耐性をあらかじめ材料に付与することの2点に集約できる。超低温保存は栄養繁殖性遺伝資源の保存にとって重要な保存法であり、その実用化のためには、以上の2点を満

たしながら、より操作が簡便で、短時間に多くの材料を扱うことができ、しかも保存後の茎葉形成率が高く、生育が旺盛で、変異が発生しない方法を確認する必要がある。

第三章 ハッカの培養と材料

ハッカの栽培種には日本ハッカ (*Mentha arvensis* L. var. *piperascens* Malinvand)、セイヨウハッカ (*M. piperita* L., Peppermint)、ミドリハッカ (*M. spicata* L., Spearmint) とペニロイヤルミント (*M. pulegium* L.) があり、日本ハッカは日本、ブラジル、中国で、セイヨウハッカはアメリカ、ロシア、東欧で、ミドリハッカはアメリカなどで栽培されている。ハッカは主に menthol、menthone などの精油とハッカ脳の原料として栽培され、薬用、香料、清涼剤として用いられてきたが、現在では合成品が主流となり、特に国内での栽培は激減している。北海道は第2次世界大戦前までハッカの世界最大の産地として、特に北見地域で栽培が続けられてきたが、現在では観賞用として一部で栽培が続けられているにすぎない。

北海道立遺伝資源センターは 1999 年現在、35 点のハッカを圃場で保存しているが、地下茎やほ伏する地上茎による隣接区への侵入や、さび病による草勢の劣化などの問題がある。そのため新たな保存方法を開発する必要がある。海外においては、ハッカの遺伝資源は圃場保存の他、インビトロ保存が主に行われている。インビトロ保存は MS 培地の窒素源を半減し、4℃、12 時間日長で 36 ヶ月間、低温感受性の種は同様の培地で 25℃、18 ヶ月間、継代培養なしで保存できることが報告されている (Reed, 1999)。ハッカのガラス化法による超低温保存は Towill により 1990 年に報告されている。前培養した茎頂をエチレングリコール、DMSO、PEG8000 により 3 段階で脱水し、75℃/分で急速冷却する方法がとられている。しかしこの方法を用いると液体窒素処理後の茎葉形成率が 32~75% とばらつきが大きく、カルス形成なども確認され、解決すべき問題点が多い。

ここではハッカの安定した超低温保存法を確立するため、無菌培養系を作出し、その植物体を維持すると共に、実験材料の茎頂を大量に増殖する手法を検討した。

1. 材料とその培養法

(1) 植物体の維持

実験材料として、北海道立植物遺伝資源センターで圃場保存しているハッカ (*Mentha spicata* L.) 品種名「spearmint common」を主に使用した。圃場で生育している植物体から頂芽を切り取り、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。この材

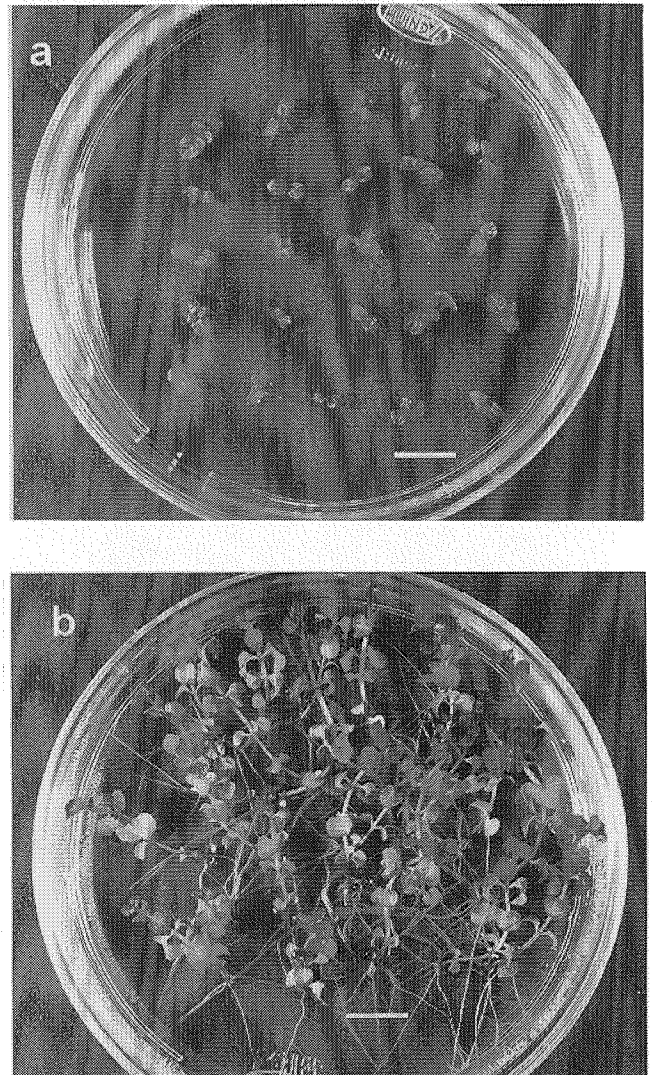


Fig. III-1 In vitro plantlets of mint.

a: apical buds for subculture; b: Plantlets after 3 weeks-subculture. White bars indicate 1cm.

料から茎頂 (葉原基 2 枚、約 0.8mm) を切り出し、0.088 M ショ糖、0.5g/l カザミノ酸 (Difco 社)、2.5g/l ジェランガム (関東化学) を含む Murashige-Skoog 培地 (Murashige ら、1962。以下、基本培地) に置床した。培地は pH5.8 に調整後に 121℃、10 分間オートクレープし、培養試験管 (直径 25mm x 高さ 120mm) に 10 ml またはプラスチックシャーレ (直径 90mm x 高さ 20mm) に 20 ml 分注した。培養は 23℃、16 時間日長、光量子束密度 96μmol/m²・s で実施した。

植物体が頂芽を含めて 4 節、約 6cm に生育後、頂芽を切り取り、新培地に植え継いで植物体を維持し種間差の実験に用いた。

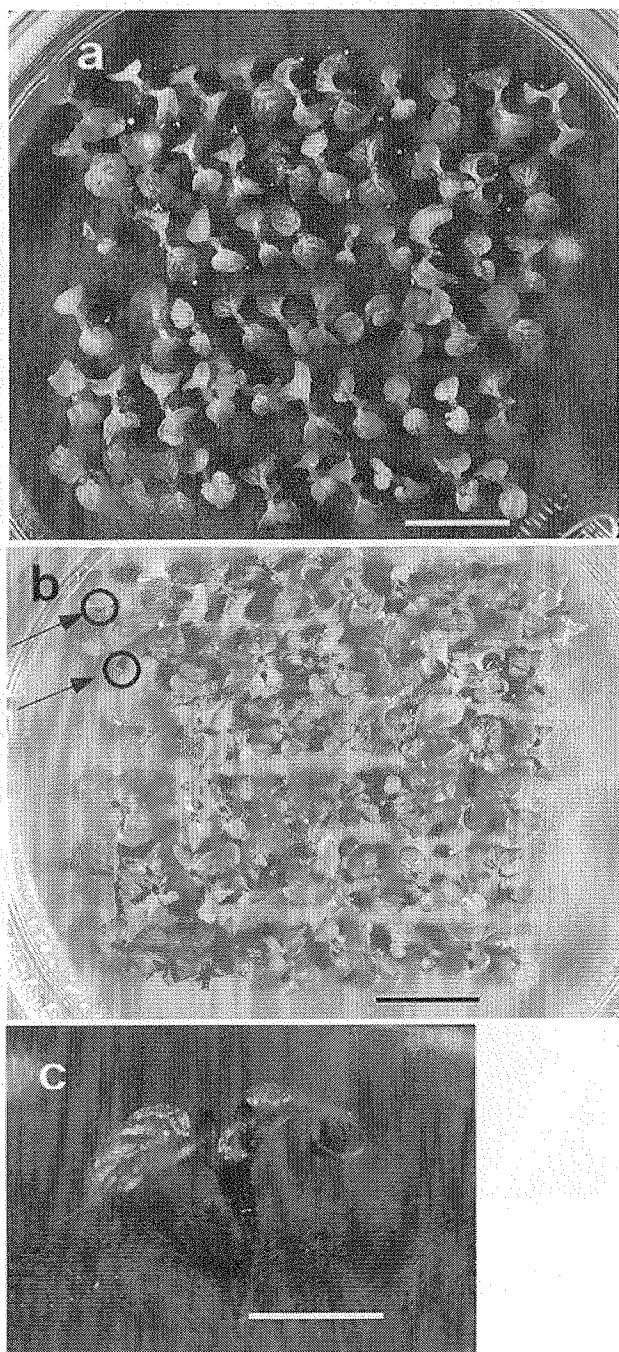


Fig. III-2 Mass propagation of axillary shoot tips of mint in vitro.

a: Nodal segments from 2-week-old plantlets just after transferring to MS medium;
 b: Nodal segments after 3 day-culture. Two axillary buds (in circle) were growing;
 c: Nodal segment and induced 2 axillary buds. Bars in A, B: 1cm; C: 5 mm.

piperascens Malinvaud)と品種名「えぞ」(*M. arvensis* L. var. *aqrestis* (Sole) Smith.)を同様に培養して超低温保存実験の材料には腋芽由来の茎頂を使用した。頂芽由来の茎頂は使用できる数が限られ、また、頂芽は植物体の維持に用いるためである。腋芽を誘導するために、植物体の継代培養の際に、1対の葉と約8mmの茎からなる節をプラスチックシャーレの同じ培地に植え、上記の条件で培養した(図III-2、節培養、Nodal segment culture)。1日間培養して腋芽を誘導した後に、これらの節を4℃で1~3週間低温処理した(12時間日長、光量子束密度 $20\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)。低温処理しない場合は、節を植物体と同じ条件で3~7日間培養し、腋芽を生育させた。実体顕微鏡下で、葉原基4程度をつけた茎頂(約1mm)を摘出し、実験に用いた。

2. 液体窒素処理後の培養条件

液体窒素処理した茎頂は、プラスチックシャーレの基本培地に置床し、上記の培養条件で培養した。

(2) 実験材料の増殖など

図III-1)、その後は3週間毎に同様に植え継ぎを行った。他の2種、品種名「しゅうび」(*M. arvensis* L. var.