

第V章 その他の作物の培養茎頂を用いた超低温保存

北海道立農業試験場におけるバレイショの品種開発は、1957年から根室支場（現根釧農業試験場）で始まり、1998年に北見農業試験場に移転し、現在も継続して実施されている。当初は耐冷性のでん粉原料用、飼料用品種の育成が主な育種目標であったが、新たな外来害虫であるジャガイモシストセンチュウなどの線虫抵抗性や、そうか病などの新病害に対する耐病性、でん粉以外の加工原料としての加工適性など、育種目的は多様化してきている。従って、それに伴う遺伝資源の数も484点（1998年）に達し、現在も増加しつつある。

同様に、イチゴの品種開発は北海道立道南農業試験場において実施されており、「きたえくぼ」などの新品种が開発されている。イチゴの育種目標としては生食用が中心であるが、耐病性の付与の他、加工用品種など育種目標として掲げられており、それに伴う遺伝資源の数も105点（1998年）に達している。

ヤマノイモはナガイモ(*Dioscorea opposita* THUMB.)とジネンジョ(*D. japonica* THUMB.)の総称で、ナガイモはその形状から長形種であるナガイモ群、扁形種であるイチョウイモ群、塊形種であるツクネイモ群に分類されている。北海道では主に道東で栽培されているが、栽培種は本州からの移入によるものである。このため、北海道立十勝農業試験場は北海道に適したナガイモの品種改良を開始するために、各地から遺伝資源を収集している。その中にはナガイモだけではなく、ウイルス病抵抗性を導入するためのジネンジョも含まれており、遺伝資源の数は増加している。以上の作物の遺伝資源は圃場や網室で保存されている。しかし、土壤凍結害を回避するために春植え、秋収穫の繰り返しが、ウイルス病防除など、労力面で多大な負担となっている。これら作物の超低温保存は、緩速予備凍結法を除くとバレイショでビーズ乾燥法(Fabreら、1990; Bouafiaら、1996)、ヤマノイモの属するヤマイモ(Takagiら、1998)でガラス化法が報告されているにすぎない。そこで、ハッカを用いた実験で操作性に優れたビーズ乾燥法をバレイショとイチゴで比較すると共に、ビーズガラス化法をバレイショ、イチゴ、ヤマノイモに適用し、これらの作物に対する超低温保存法の最適な条件を検討した。また、このビーズガラス化法の熱帯性作物の超低温保存への適用性について検討するため、タイのKasetsart大学で保存されていたキャッサバを使用し、実験を行った。さらに、長期保

存実験、保存した作物の生育とDNAレベルで変異の発生について検討した。

1. 材料とその培養法

ここではバレイショ、イチゴなどの安定した超低温保存法を確立するため、インビトロ培養系を作出し、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方法を最初に検討した。

(1) 植物体の維持及び材料の増殖

1) バレイショ

「男爵薯」を主に使用した。暗黒化で伸長した茎から頂芽や腋芽を切り取り、定法で滅菌後、0.088Mショ糖、0.5g/l カザミノ酸、2.5 g/l ジェランガムを含むMS培地に置床した。培養は23℃、16時間日長、光量子束密度50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で行った。

植物体が頂芽を含めて5節に生育した後(図V-1、約12cm)、頂芽を切りとり、同じ培地に2週間毎に植え継いで植物体を維持した。同様の方法で計14品種を培養し、品種間差の実験に用いた。

実験材料にはハッカと同様に腋芽由来の茎頂を利用した。腋芽の誘導は、植物体の継代培養の際に頂芽以外の葉と約1cm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、植物体と同じ条件で節培養した(図V-2)。1日間節培養した後に、それらを1~3週間、4℃、12時間日長、光量子束密度20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で低温処理した。低温処理しない場合、節を同じ培地で2~9日間培養し、腋芽を生育させた。実体顕微鏡下で葉原基5枚程度(約1mm)の茎頂を摘出し、実験に用いた。

2) イチゴ

北海道立道南農業試験場から分譲を受けた「きたえくぼ」を主に使用した。温室で生育した植物体からランナーの先端部分を切り出し、定法で滅菌後、0.088Mショ糖、0.5g/l カザミノ酸、2.5 g/l ジェランガム、MS培地の無機成分を1/2とした培地(以下、1/2MS培地)に置床した。培養は23℃、16時間日長、光量子束密度50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で行った。再生した植物は同じ培地に1ヶ月毎に植え継いで植物体を維持した。同様に他の5品種、「Aiko」、「盛岡16号」、「女峰」、「とよのか」、「Summer berry」を品種間差の実験に用いた。

実験材料としての茎頂を大量に得るため、2mg/l BAPを含む1/2MS培地に植物体を移植し、同条件で培養して多芽体を誘導した(Karthaら、1980、図V-3)。多芽体は4℃、12時間日長、光量子束密度20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ で

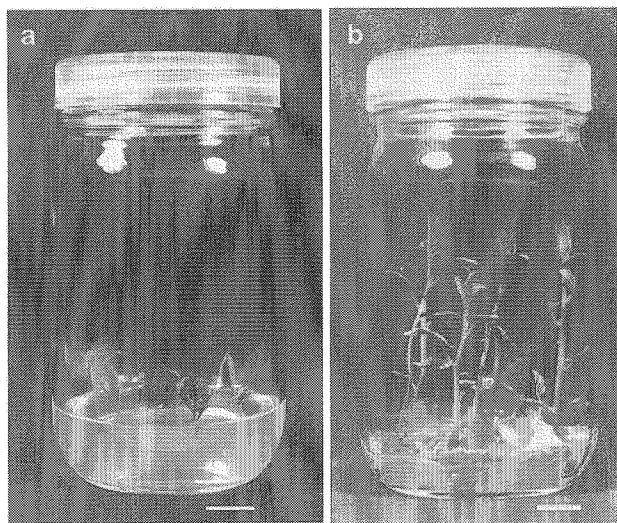


Fig. V-1 In vitro plantlets of potato.

a: Apical buds for subculture; b: Plantlets after 2 weeks subculture. White bars indicate 1cm.

0～2 週間低温処理した。

実体顕微鏡下で多芽体から葉原基 1～2 枚程度（約 1mm）の茎頂を摘出し実験に用いた。

3) ヤマノイモ

北海道立十勝農業試験場から分譲されたナガイモ「十勝」を主に使用した。担根体（Rhizophore）から萌芽した茎葉の頂芽節を切り出し、定法で滅菌後、0.088M ショ糖、0.5g/l カザミノ酸、2.5 g/l ジェランガム、0.2 mg/l BAP、10 μ g/l NAA を含む MS 培地（以下、CY 培地）に置床した。培養は 25℃、光量子束密度 96 μ mol/m²・s、16 時間日長で行った。再生した植物体は植物成長調節物質を含まない CY 培地に移植し、同条件で 3 週間毎に頂芽節を除く節を節培養して植物体を維持した。同様にツクネイモ「中村系統」、ジネンジョ「石井系統」を種間差の実験に用いた。

実験材料は継代培養時の頂芽節を用いた。頂芽節を 0.3 M ショ糖、0.5 g/l カザミノ酸、2 g/l ジェランガムを含む MS 培地でナガイモ、ツクネイモは 7～10 日、ジネンジョは 10～14 日培養した（前処理）。実体顕微鏡下で葉原基 1 枚（約 1～1.5mm）の茎頂を摘出して実験に用いた。

4) キャッサバ

タイの Kasetsart 大学から分譲された「AMM22」のインビトロ培養系を主に使用した。0.088M ショ糖、0.5g/l カザミノ酸、100mg/l ミオイノシトール、1mg/l チアミン塩酸塩、2.5 g/l ジェランガム、0.1 mg/l Ag₃、20 μ g/l BAP、10 μ g/l NAA を加えた MS 培地（Charoensubら、1999。以下、CA 培地）を用いた。培養は、25℃、

16 時間日長、光量子束密度 96 μ mol/m²・s で行った。植物体が頂芽を含めて 4 節に生育（約 3cm）した後、頂芽を切り取り、約 4 週間毎に植え継いで植物体を維持した。同様に品種名「CM-3281-4」を品種間差の実験に用いた。

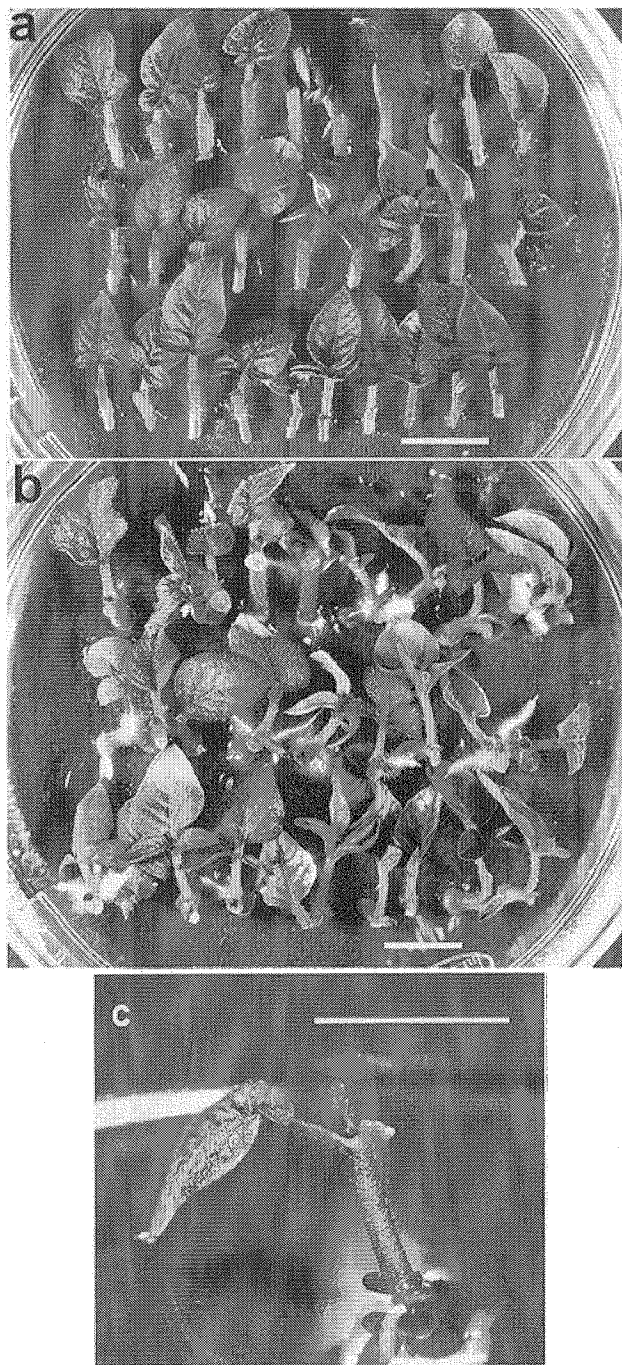


Fig. V-2 Mass propagation of axillary shoot tips of potato in vitro.

a: Nodal segments excised from 2 weeks old plantlets on MS medium; b: Nodal segments after 5 days culture. All nodal segments have an axillary bud; c: A nodal segment with an induced axillary bud after 5 days culture. Bars in a, b: 1 cm. Bar in c: 5 mm.

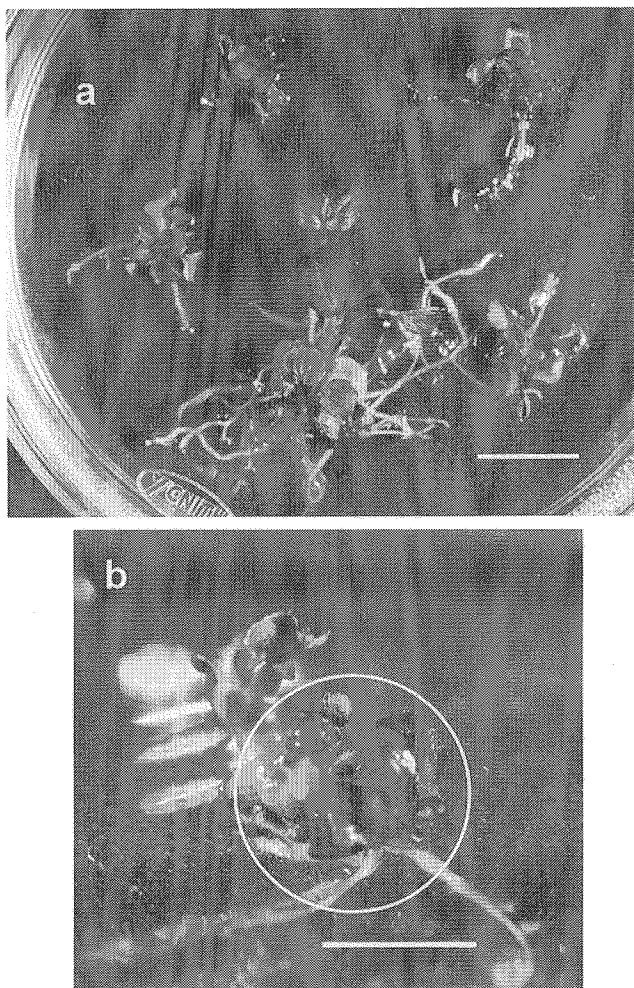


Fig. V-3 Mass propagation of meristems of strawberry in vitro.

a: Plantlets after 3 weeks culture on 1/2MS medium supplemented with 2mg/l BAP;
b: A plantlet with meristematic clump (in circle). White bars indicate 1 cm. Cultivar kitaekubo.

実験材料としてハッカと同様に腋芽由来の茎頂を用いた。腋芽を大量に得るために、継代培養時に頂芽以外の葉と約 6mm の茎からなる節を同条件で節培養し、生育ステージがⅢとなった腋芽 (図 V-4、e) から葉原基 3 枚 (約 1.5mm) の茎頂を摘出、調整した。

(2) 液体窒素処理後の培養条件

1) バレイショ

0.088M ショ糖、0.5g/l カザミノ酸、2.5 g/l ジェランガム、1mg/l GA_3 、10 μ g/l BAP、1 μ g/l NAA を含む MS 培地 (以下、P 培地) で 16 時間培養後、植物成長調節物質を 0.5 μ g/l GA_3 とした培地 (以下、PG 培地) に移植した。培養条件は継代培養、節培養と同様である。

2) イチゴ

植物体の維持と同じ 1/2MS 培地を使用した。培養条

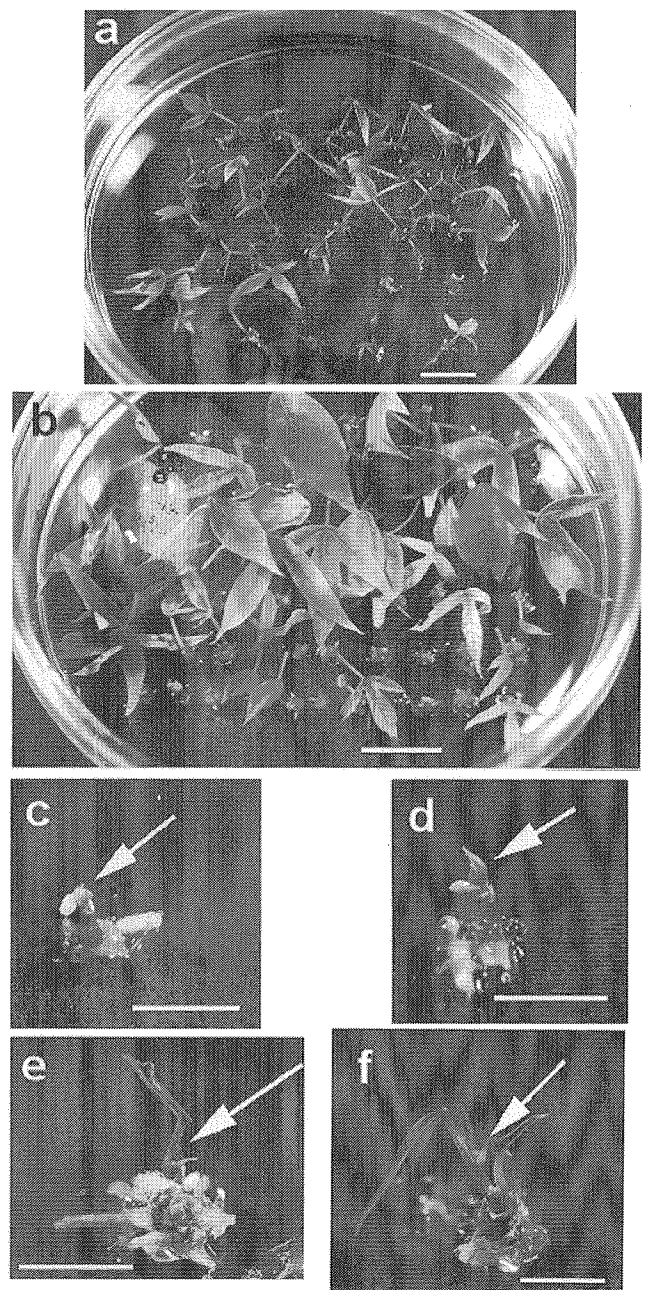


Fig. V-4 Mass propagation and induced axillary buds of cassava in vitro.

a: Plantlets after 10 days subculture; b: Nodal segments after 2 weeks culture; c-f: Induced axillary bud after 4 weeks culture (stage I-IV, respectively). White bars : 1 cm. Cultivar: AMM22.

件は継代培養と同様である。

3) ヤマノイモ

ナガイモは 1 日、ツクネイモ、ジネンジョは 4~6 日間、CY 培地で培養し、その後に植物成長調節物質を含まない同培地に移植して培養した。培養条件は継代培養、前処理と同様である。

4) キャッサバ

CA 培地で1日間培養後に、植物成長調節物質を含まない同培地に移植した。培養条件は継代培養、節培養と同様である。

2. 超低温保存法の検討

(1) 実験方法及び結果

ビーズガラス化法による超低温保存後の茎頂の茎葉形成率に及ぼす、前処理、前培養、浸透脱水耐性剤の効果、PVS2 液による最適な脱水時間、培養条件などを各作物で検討した。その結果、各作物に最適な条件は表V-1、図V-5~8に示す通りで、バレイショ14品種、イチゴ6品種(図V-9)、ヤマノイモ3点、キャッサバ2品種(図V-10)を超低温保存することができた。超低温保存したいずれの作物も保存後の生育は早く、分裂組織などに異常はなく、正常な茎葉を伸長した(図V-11~14)。このことから、再生した茎葉は分裂組織から直接伸長したものであることが明らかである。

栄養繁殖性作物の超低温保存の実用化に必要とされる、実験レベルでの保存の他、長期保存実験を実施した結果、ビーズガラス化法により半年間(ヤマノイモ、1種)、1年間(バレイショ、7品種)、1~2年間(イチゴ、1品種)超低温保存した際の茎葉形成率は、1時間保存のそれと差がなく(図V-15)、再生した植物体にも外観的な異常は認められなかった。イチゴの保存材料を多芽体由来の茎頂ではなく、ランナーから直接摘出した茎頂を用いた場合でも、茎葉形成率に差は認められなかった(表V-2)。以上の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、キャッサバ培養茎頂の超低温保存にも適用できることが明らかになった。

ビーズ乾燥法はバレイショで前培養の期間を48時間とした他の操作は、バレイショ、イチゴともにハッカと同様に行った。ビーズガラス化法とビーズ乾燥法を比較した結果、茎葉形成率はイチゴの1品種を除いてビーズガラス化法が優り(図V-9)、保存後の生育はビーズガラス化法が明らかに優る結果となった(図V-16、イチゴに関してはデータ未掲載)。

(2) 考察

ハッカで茎葉形成率が高く、操作が簡便なビーズガラス化法とビーズ乾燥法をバレイショ、イチゴに適用し、比較した結果、イチゴの1品種を除いて茎葉形成率はビーズガラス化法が高く、保存後の生育も優れていることが明らかになった。このため、ヤマノイモ、キャッサバにはビーズガラス化法のみを適用した。

ビーズガラス化法の各段階での特徴は以下の通りであった。バレイショには低温処理は不要で、前培養、保存後の培養に使用する植物成長調節物質と、浸透脱水耐性付与でのショ糖濃度を0.6 Mに上げること、その処理時間を90分とすること、前培養と同様の植物成長調節物質を加えることが有効であった。イチゴはハッカと同様に前処理として植物体を4℃で低温処理することが有効であった。ヤマノイモは前処理として茎頂を摘出する前に頂芽節を0.3Mショ糖を含む培地で7~10日間培養する、ショ糖馴化に有効であり、バレイショと同様に浸透脱水耐性付与時と保存後の培養における植物成長調節物質の添加の効果は大きかった。キャッサバはヤマノイモと同様に植物成長調節物質の効果が認められた。また、供試する茎頂を摘出する腋芽の生育ステージ(図V-4)の選択が重要で、各々の液体窒素処理後の茎葉形成率はⅠ: 37.8 $\pm$ 3.3%; Ⅱ: 44.4 $\pm$ 5.6%; Ⅲ: 82.0 $\pm$ 2.6%; Ⅳ: 64.0 $\pm$ 3.4%であった。

Table V-1 Optimal conditions of encapsulation-vitrification method for potato, strawberry, Chinese yam and cassava.

Crop name (cultivar)	Preconditioning	Preculture	Osmoprotection (25°C)	PVS2 (0°C)
Potato (Danshakuimo)	None	0.3M sucrose 1mg/l GA ₃ , 0.01mg/l BAP, 0.001mg/l NAA (23 °C, 16 h)	2M glycerol+0.6M sucrose 1mg/l GA ₃ , 0.01mg/l BAP, 0.001mg/l NAA (90min)	3h
Strawberry (Kitaekubo)	Cold hardening (4 °C, 2weeks)	0.088M sucrose (23 °C, 16 h)	2M glycerol+0.4M sucrose (60 min)	2h
Chinese yam (Nagaimo, tokachi)	0.3M sucrose (25 °C, 7-10 d)	None	2M glycerol+0.6M sucrose 0.2mg/l BAP, 0.1mg/l NAA (90 min)	4h
Cassava (AMM22)	None	0.3M sucrose 0.1mg/l GA ₃ , 0.02mg/l BAP, 0.01mg/l NAA (25°C, 16 h)	2M glycerol+0.6M sucrose 0.1mg/l GA ₃ , 0.02mg/l BAP, 0.01mg/l NAA (60 min)	4h

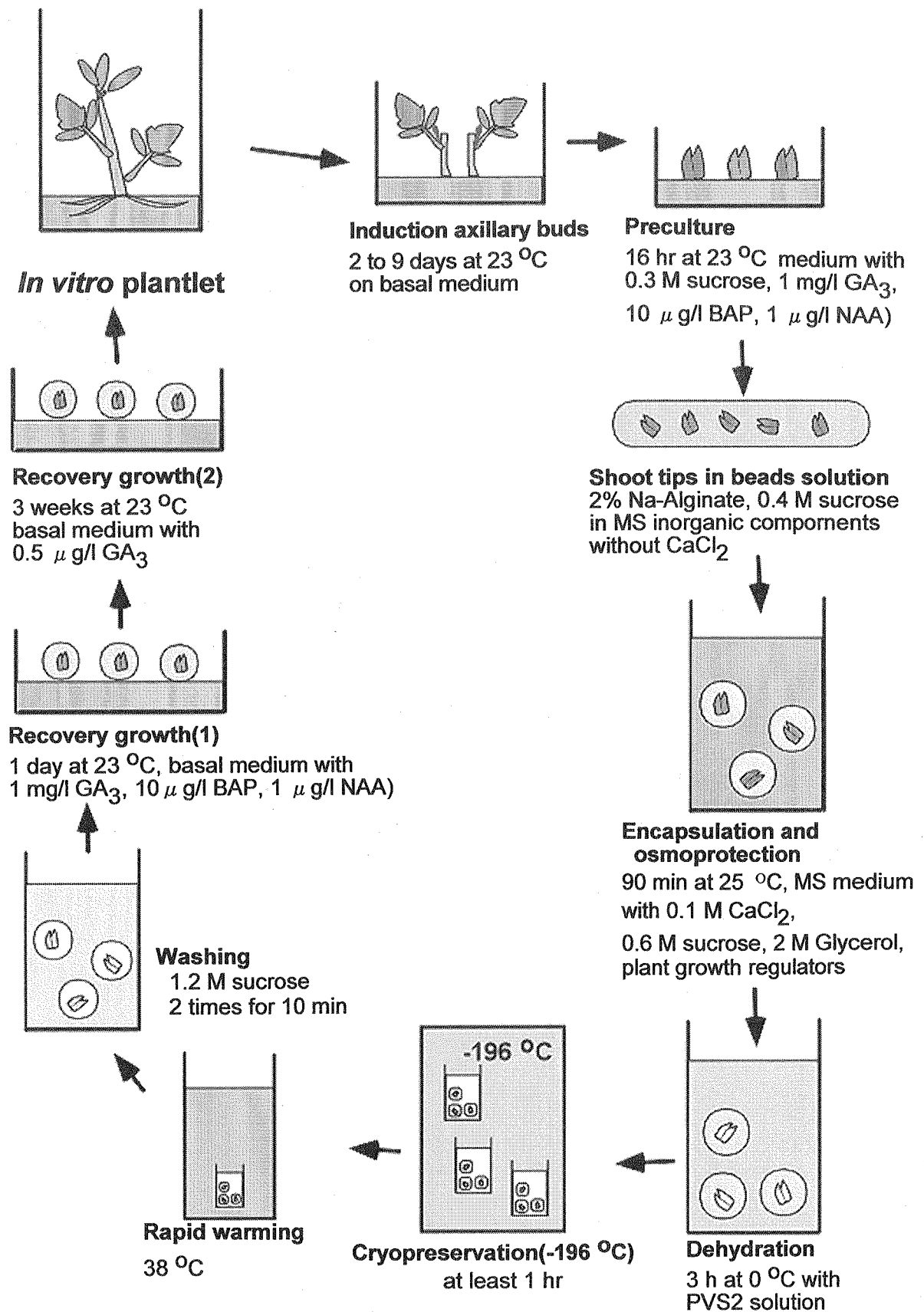


Fig. V-5 Scheme of encapsulation-vitrification method for cryopreservation of potato.

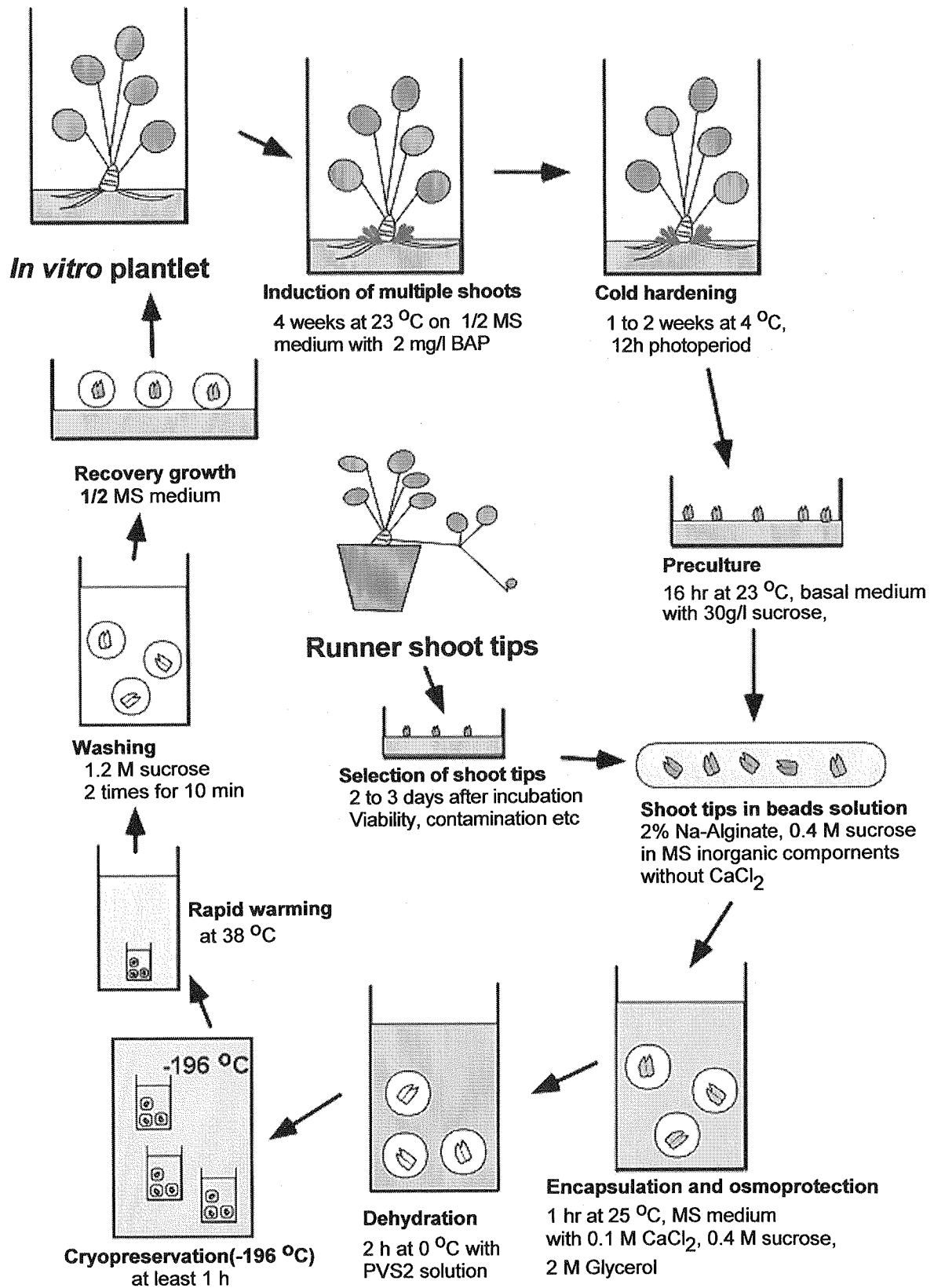


Fig. V-6 Scheme of encapsulation-vitrification method for cryopreservation of strawberry

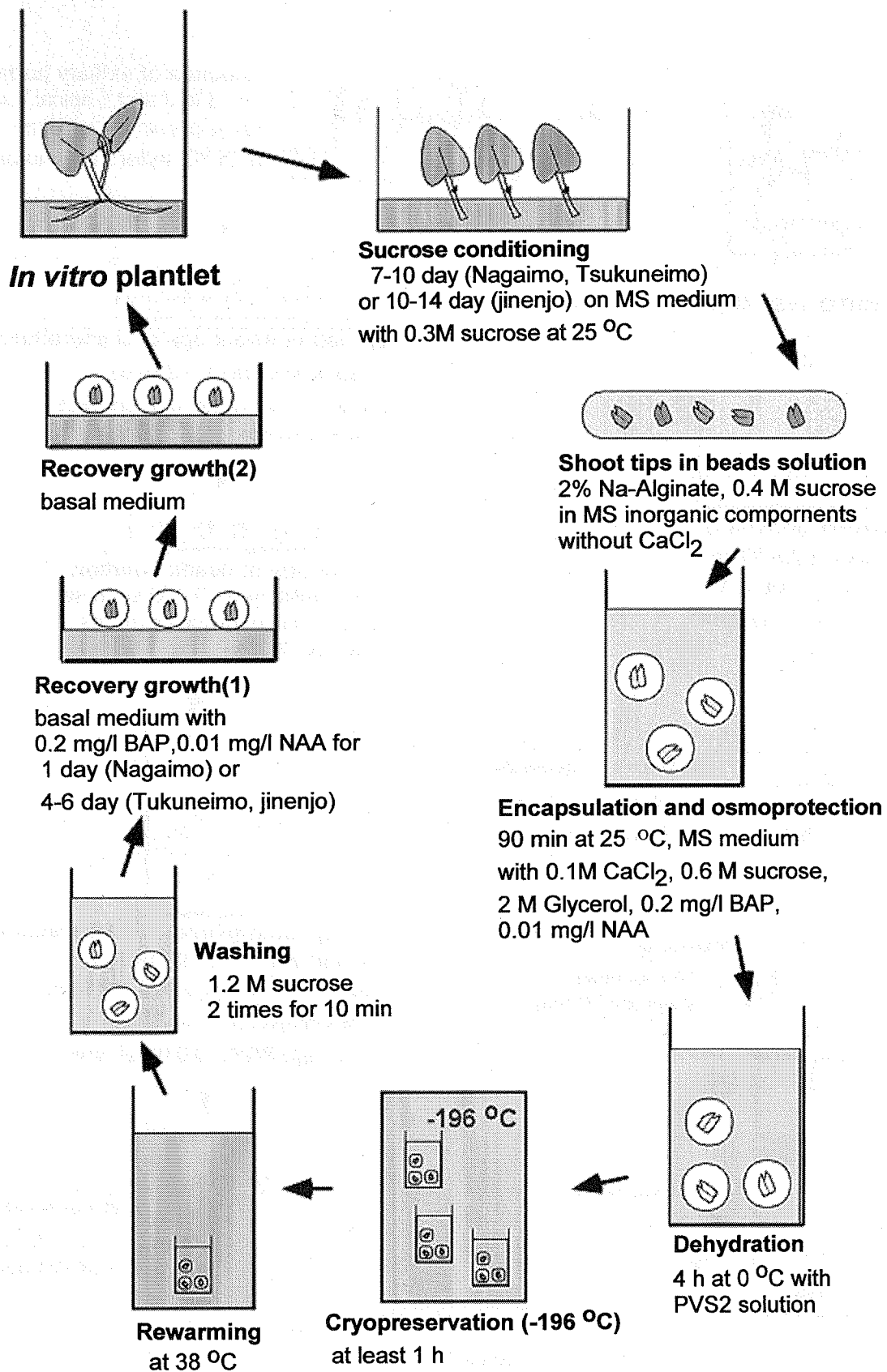


Fig. V-7 Scheme of encapsulation-vitrification method for cryopreservation of Chinese yam

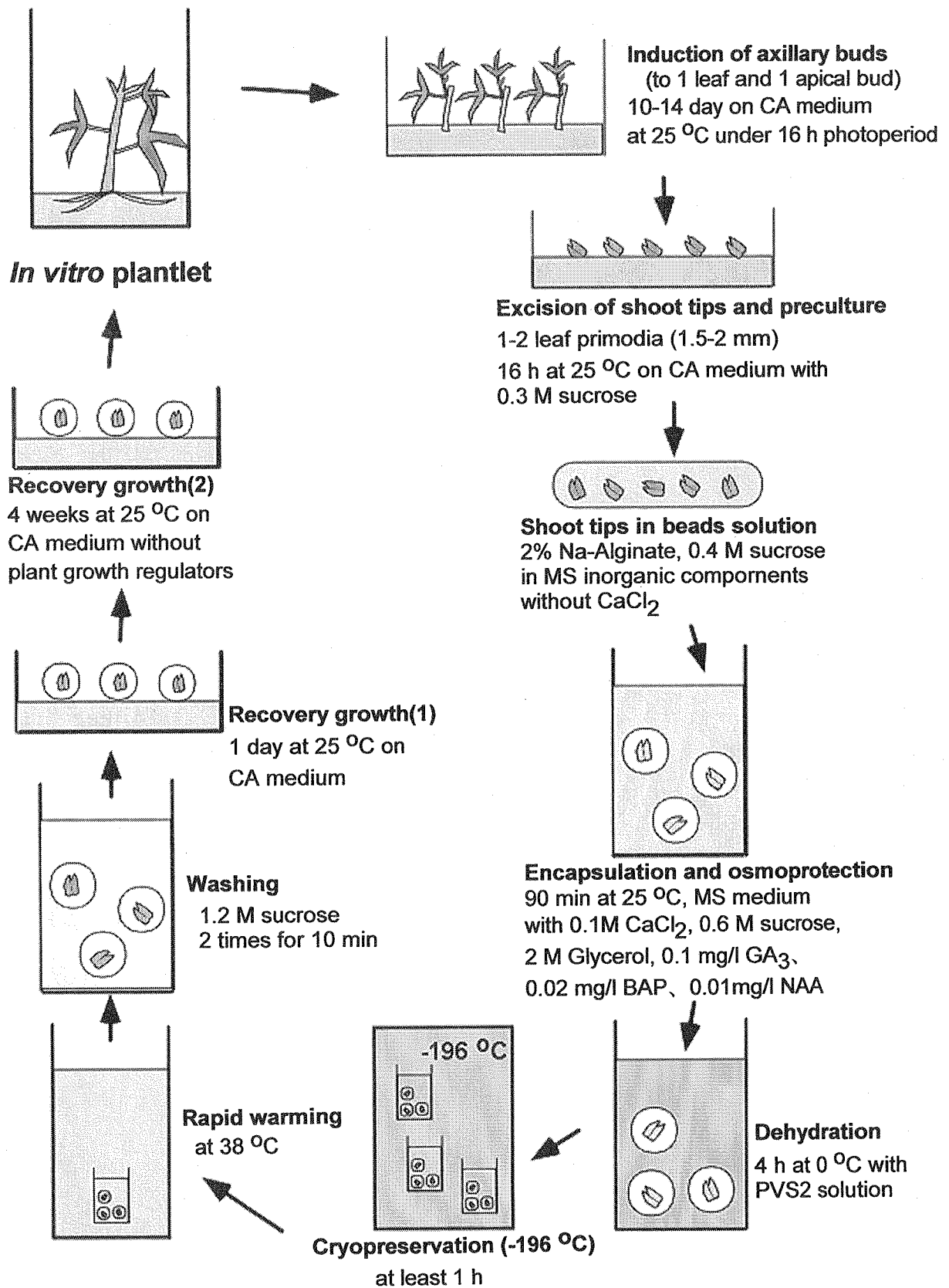


Fig. V-8 Scheme of encapsulation-vitrification method for cryopreservation of cassava

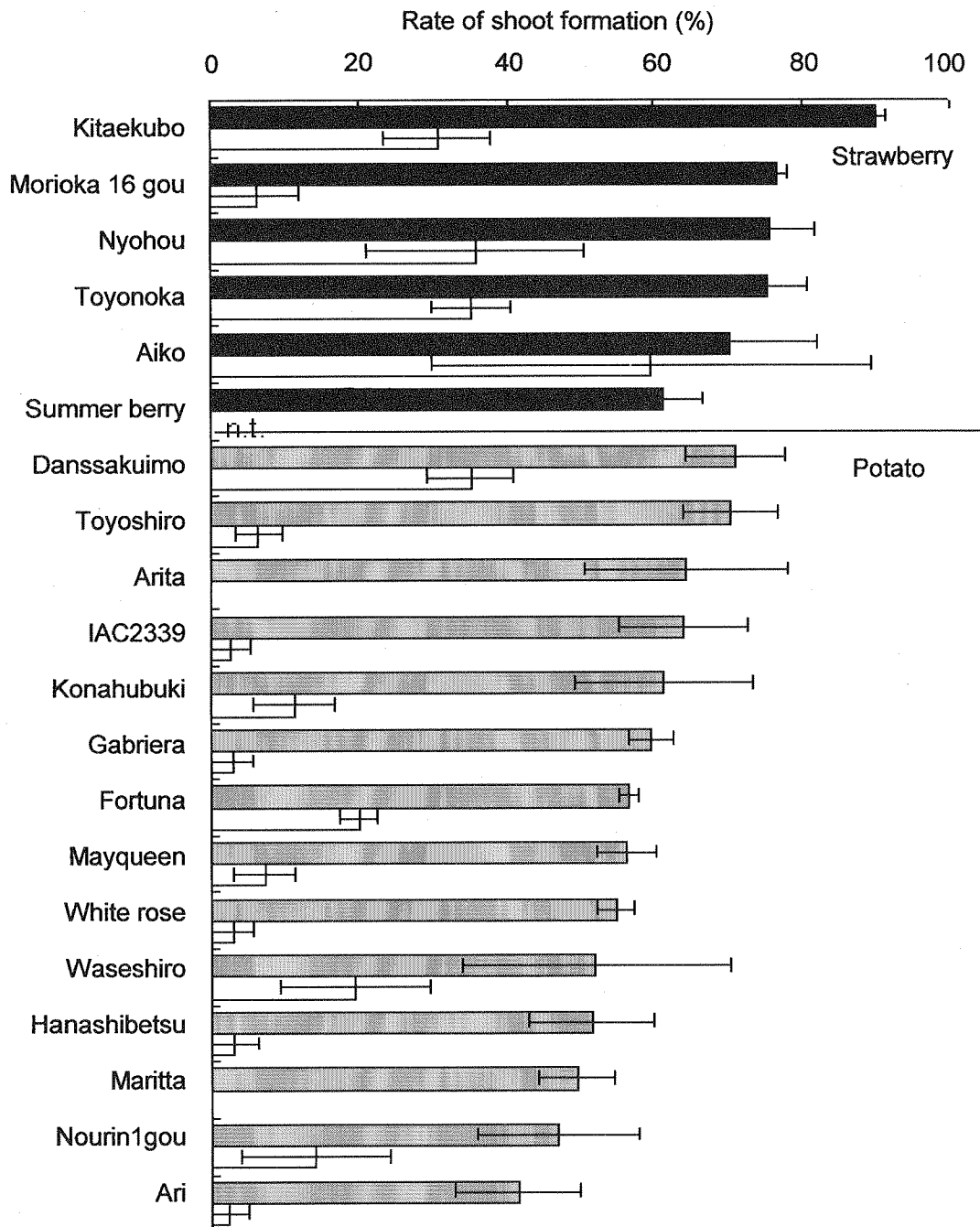


Fig. V-9 Comparison of the rate of shoot formation of encapsulated-vitrified or encapsulated-dehydrated shoot tips of 6 strawberry and 14 potato cultivars cooled to -196°C .

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

Encapsulation-dehydration (▨): Pretreated axillary shoot tips were encapsulated in alginate beads and then precultured in MS liquid medium supplemented with 0.8M sucrose for 16h (strawberry) or 48 h (potato). They were dehydrated in Petri dishes containing 50 g dried silica-gel at 25°C prior to a plunge into liquid nitrogen.

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

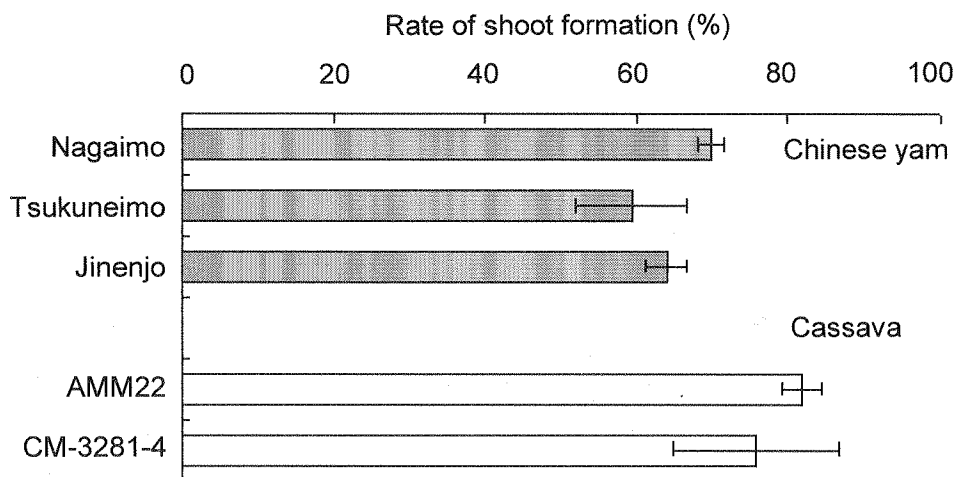


Fig. V-10 Rate of shoot formation of encapsulated-vitrified shoot tips of 3 Chinese yam lines and 2 Cassava cultivars cooled to -196°C .

Chinese yam

Preconditioned apical shoot tips were suspended in 2 % sodium alginate and 0.4 M sucrose and then encapsulated and osmoprotected with a mixture of 2 M glycerol, 0.6 M sucrose, 0.1 M calcium chloride and plant growth regulators at 25°C for 90 min. They were dehydrated with PVS2 solution at 0°C for 4h prior to a plunge into liquid nitrogen. Nagaimo (*Dioscorea opposita* THUNB.): cultivar Tokachi, Tsukuneimo (*D. opposita* THUNB.): cultivar Nakamura, Jinenjo (*D. japonica* THUNB.): cultivar Ishii.

Cassava

Precultured axillary shoot tips were suspended in 2 % sodium alginate and 0.4 M sucrose and then encapsulated and osmoprotected with a mixture of 2 M glycerol, 0.6 M sucrose, 0.1 M calcium chloride and plant growth regulators at 25°C for 1h. They were dehydrated with PVS2 solution at 0°C for 4h prior to a plunge into liquid nitrogen.

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

植物成長調節物質は液体窒素処理後の生存率には影響はないが(データ未掲載)、茎頂が正常な茎葉を伸長させるために必要であると考えられる。しかし、植物成長調節物質が浸透脱水耐性付与時に働くのか、細胞内に残存して加温後に働くのかは不明である。

ビーズガラス化法により、茎頂に十分な浸透脱水耐性を付与し、適度に脱水された茎頂は、液体窒素に冷却した後もその分裂組織の多くの細胞が生存し、このため、加温、培養した際に分裂組織から直接茎葉が伸長すると考えられる。実験に供試したいずれの作物でも、超低温保存後、培地に置床した茎頂の生育は早く、従来の茎頂培養したものと成長の差は見られなかった。また、その生育に異常は認められなかった。これらのことから再生した植物体はカルスなどから再分化したのではなく、茎頂の分裂組織から直接、成長してきたものであると推察される。

以上のことから、ビーズガラス化法は各段階の条件を多少、変えることによって、ハッカだけではなく、パレイショ、イチゴ、ヤマノイモ、さらに熱帯性作物

であるキャッサバにも適用できた。従って本方法は、これら作物の超低温保存事業にも利用できると考えられる。

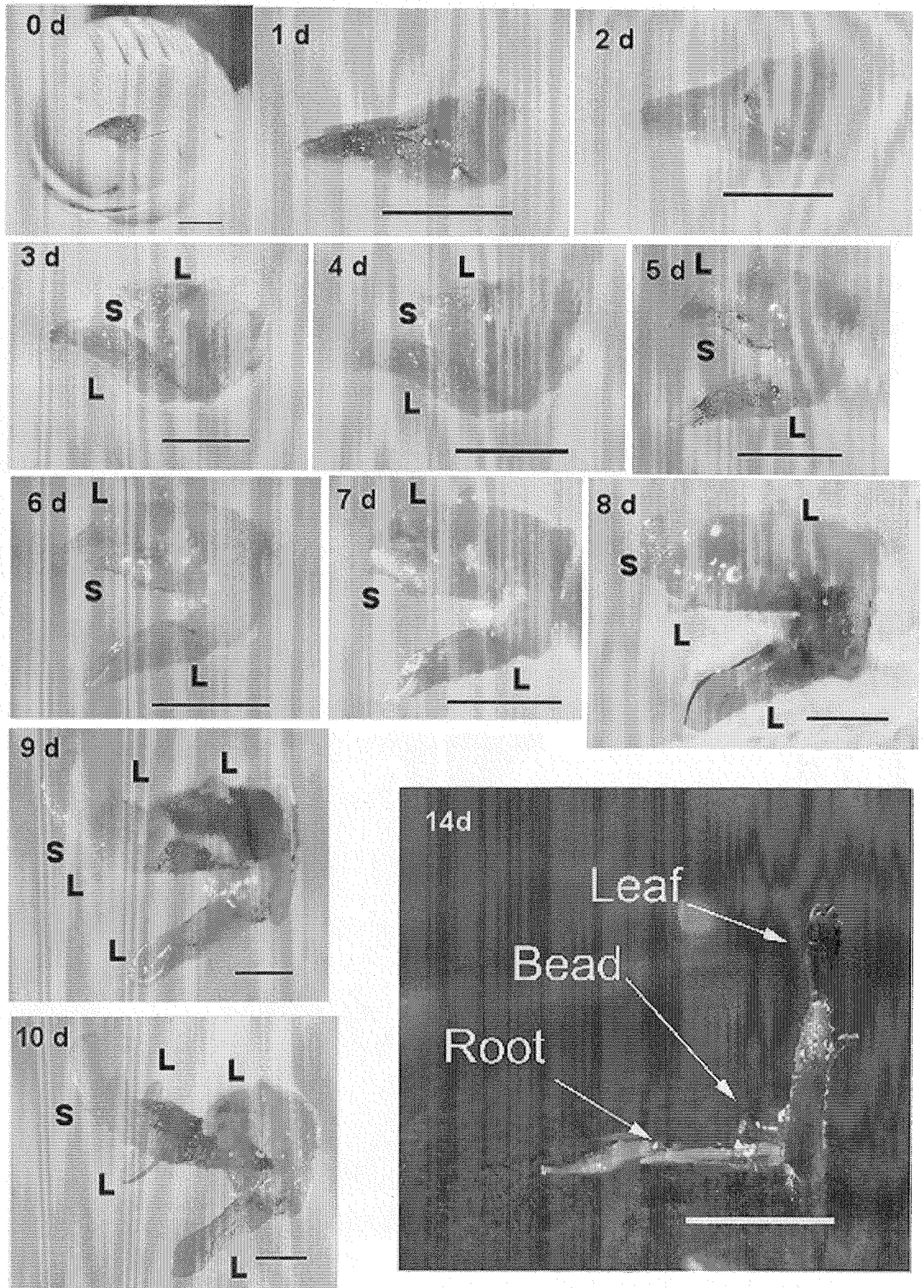


Fig. V-11 Shoot formation of encapsulated and vitrified shoot tip of potato cooled to -196°C .

Days on each photo indicate the period of incubation after cryopreservation. S: shoot; L: leaf; black bars: 1 mm; white bar: 1 cm. Cultivar danshakuimo. ubo.