



Title	数種園芸作物の培養体組織を用いた凍結保存技術の開発ならびに凍結保存後の再生植物体における成長促進現象の解析
Author(s)	嘉見, 大助
Citation	北海道大学大学院農学研究院邦文紀要, 29(1), 1-56
Issue Date	2007-03-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/20109
Type	bulletin (article)
File Information	29-1-1.pdf



[Instructions for use](#)

数種園芸作物の培養体組織を用いた凍結保存技術の開発ならびに 凍結保存後の再生植物体における成長促進現象の解析

嘉 見 大 助

(北海道大学大学院農学研究院 生物資源生産学専攻 園芸学教室)

Establishment of cryopreservation protocol and analysis of vigorous growth of regenerates after cryopreservation in *in vitro*-cultures of some horticultural crops

Daisuke KAMI

(Laboratory of Horticultural Science, Division of Bioresources and Products Science,
Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, 060-8589, Japan)

目 次		生存性に及ぼす凍結・融解法の 影響
緒 言	2	第1項 高い生存率を実現する凍結・ 融解法の検討
第1章 数種北方系果樹の培養体組織を用 いた凍結保存技術の開発	3	第2項 ビーズ乾燥法の改良による生 存率の向上
第1節 アロニア培養体組織の凍結生存 性に及ぼす凍結・融解法の影響	3	第3項 他の品種を用いた改良ビーズ 乾燥法の有効性の検証
第1項 高い生存率を実現する凍結・ 融解法の検討	4	第5節 ブルーベリー培養体組織の凍結 生存性に及ぼす凍結・融解法の 影響
第2項 ビーズ乾燥法の改良による生 存率の向上	7	第1項 高い生存率を実現する凍結・ 融解法の検討
第2節 サンザシ培養体組織の凍結生存 性に及ぼす凍結・融解法の影響	8	第2項 ビーズ乾燥法の改良による生 存率の向上
第1項 高い生存率を実現する凍結・ 融解法の検討	9	第3項 他の品種を用いた改良ビーズ 乾燥法の有効性の検証
第2項 ビーズ乾燥法およびビーズガ ラス化法の改良による生存率 の向上	11	第6節 第1章の考察
第3節 ハスカップ培養体組織の凍結生 存性に及ぼす凍結・融解法の影 響	11	第2章 凍結保存後の再生植物体における 成長促進現象の追跡とその原因の 解析
第1項 高い生存率を実現する凍結・ 融解法の検討	12	第1節 凍結保存後の再生植物体の成長 促進現象の追跡
第2項 ビーズ乾燥法の改良による生 存率の向上	14	第1項 緩速予備凍結法で凍結保存し たアスパラガス再生植物体に おける成長促進現象の解析
第4節 クランベリー培養体組織の凍結		1. 凍結温度の影響
		2. Me ₂ SO の薬害の可能性の検討

.....	27
3. 凍結保存後の成長促進現象の品 種および雌雄間差	28
第2項 凍結保存法の違いが再生植物 体の成長促進に及ぼす影響	
1. アスパラガス	30
2. ホースラディッシュ	31
第2節 アスパラガス組織の生存様式に 及ぼす凍結保存法の影響ならび に生存組織の成長に伴う細胞内 微細構造の変化	33
第3節 凍結保存後のホースラディッシュ 生存組織における DNA マイク ロアレイによる遺伝子発現の解 析	35
第4節 第2章の考察	41
第3章 総合考察	44
摘 要	46
謝 辞	48
引用文献	48
Summary	55

緒 言

植物組織の超低温凍結保存は、植物遺伝資源の長期安定的な保存技術として最も有望な方法であり、酒井ら¹⁾がヤナギの冬芽を液体窒素中で凍結保存することに成功して以来、様々な植物組織を材料として研究が行われてきた。また、その方法についても、当初のプログラムフリーザーを用いた緩速予備凍結法 (Slow-prefreezing method)²⁾⁻⁴⁾に加えて、ガラス化法 (Vitrification method)⁵⁾⁻⁹⁾、ビーズ乾燥法 (Encapsulation-dehydration method)¹⁰⁾⁻¹²⁾およびビーズガラス化法 (Encapsulation-vitrification method)¹³⁾⁻¹⁶⁾などが次々に開発され、応用の幅は拡大している。凍結保存法の発展に伴い、寒帯・温帯に生息する植物にとどまらず、熱帯の植物でも凍結保存が可能になりつつある¹⁷⁾⁻²²⁾。

北海道大学では、これまで主として北方圏に生息する園芸作物の凍結保存技術の開発に取り組み、イチゴ²⁾、アスパラガス⁴⁾、メキャベツ²³⁾、ナシ²⁴⁾、ブドウ²⁵⁾、リンゴ、オウトウ、ハスカッ

プ²⁶⁾、サルナシ²⁷⁾について凍結保存の成功例を報告している。一方、アロニア、サンザシ、クランベリーおよびブルーベリーの凍結保存には成功しておらず、ハスカップについても耐凍性が高い野外の茎頂を用いた成功例があるのみで、例えば培養体組織の凍結保存には成功していない。そこで本論文の第1章では、これまで成功例のないこれら北方系果樹の培養体組織を用い、実用に耐え得る90%の生存率を目標に凍結保存法の検討と改良を行った。

次に、植物の凍結保存技術は、前述のとおり遺伝資源保存が主眼であるため、これまで生存率の向上を目標に研究が行われ²⁸⁾⁻³⁴⁾、凍結保存後の再生植物体の成長量や成長速度には関心が向けられてこなかった。そのような凍結保存研究に一石を投じたのが、北海道大学の鈴木らの論文である³⁵⁾。鈴木らは、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.)の培養体組織の凍結保存研究中に、緩速予備凍結法で凍結保存した組織からの再生植物体が、凍結保存しなかった対照区の再生植物体に比べてシュート数および発根率とともに上昇することを報告したのである。筆者は、この鈴木らの論文に触発され、成長促進現象の詳細を解明することによって、植物の凍結保存技術のどこに成長促進の要因があるのかを明らかにしたいと考えた。

そこで本研究の第2章では、まずアスパラガスの凍結保存後の再生植物体の成長促進に焦点をあて、凍結温度、凍害防御物質の種類、アスパラガスの雌雄性および品種の違いによる成長量の差を測定した。次に、成長促進現象が認められた緩速予備凍結法に加えて、新しい凍結保存法であるガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いた場合にも成長促進現象が認められるか否かを検討した。さらに、北海道の特産野菜の一つで、上記4種の凍結保存法の適用が可能なホースラディッシュ (*Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. Et Scherb.)の培養体組織を用い、凍結保存後の成長促進現象がアスパラガス以外の植物にも認められるのか否かを調査し、それらの結果を第2章・第1節にまとめた。

第2章・第2節および第3節では、上記の研

究において明確な成長促進現象が確認されたアスパラガスおよびホースラディッシュを用い、次の2点に焦点を合わせて成長促進現象を追跡した。

その1つは、成長促進現象を示した凍結法(緩速予備凍結法)と成長促進現象を示さなかった凍結法(ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法)で凍結保存したアスパラガスの生存組織を用いて、透過型電子顕微鏡による組織の生存様式や細胞内の変化を経時的に観察し、成長促進に密接に関連する細胞内微細構造の変化を観察し、その結果を第2章・第2節にまとめた。

もう1つは、ホースラディッシュの生存組織を用いたDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の解析である。ホースラディッシュはアブラナ科植物であり、DNAレベルの解析が完了しているシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L.)の遺伝子情報が活用できるという利点がある。本研究では、成長促進現象が認められた方法(緩速予備凍結法)と認められなかった方法(ガラス化法および対照区)において再生植物体のmRNAの発現量を測定することで、両者の特徴を浮き彫りにすることを考えた。DNAマイクロアレイ法を用いて遺伝子の発現数、発現強度および発現パターンを調査し、それらの変化を凍結保存法との関連で比較し、第2章・第3節にまとめた。

最後に、第3章では、第1章および第2章で得られた結果について総合的に考察を加えた。

第1章 数種北方系果樹の培養体組織を用いた凍結保存技術の開発

果樹の種苗生産は、従来、接木や挿木などの栄養繁殖により行われている。種子繁殖では品種の性質を維持できないことならびに単為結果性などの特徴を有し、種子繁殖できないタイプも存在することが理由である。近年は、組織培養技術の発達に伴い、*in vitro*でクローンを大量繁殖する技術が確立されており、北海道大学大学院農学研究院園芸学研究室(以下、北大園芸学研究室)では、ブルーベリーやハスカップに代表される北方系果樹の組織培養法による種

苗生産技術の開発に取り組んだ経緯がある^{36)–39)}。また、組織培養技術を育種に応用する研究も行われ、胚培養によりサンザシ種間雑種⁴⁰⁾や、コルヒチン処理によりハスカップおよびアロニアの倍数体がそれぞれ作出されている⁴¹⁾⁴²⁾。これらの貴重な培養体の維持は、通常継代培養によって行われているが、培養変異を生じやすく、系統を安定して保存することが難しいため、長期安定的な遺伝資源保存法である凍結保存技術の確立が必要となった。しかしながら、北方系果樹の培養体組織を用いた凍結保存技術の研究は発展途上にあり、検討例は少ない状況にあった。鈴木²⁶⁾はハスカップについて、緩速予備凍結法を用いて冬季に野外から採取した茎頂の凍結保存に成功したが、培養体組織ではほとんど生存しなかったことを報告しており、北方系果樹の培養体組織の凍結保存が特に難しい点を指摘している。

他方、近年は凍結保存の基本的技術に関する目覚ましい進歩があり、従来型の緩速予備凍結法に加えてガラス化法、ビーズ乾燥法およびビーズガラス化法など新しい原理に基づく方法が次々に開発され、耐凍性が低い熱帯性植物についてもこれらの方法を用いた凍結保存の成功例が報告されるようになった^{17)–22)}。

そこで本章では、これら新しい凍結保存法をベースにして、アロニア、サンザシ、ハスカップ、クランベリーおよびブルーベリーなど北方系果樹培養体組織の凍結保存技術の開発を目指し、さまざまな凍結・融解および前処理の条件について検討した。

第1節 アロニア培養体組織の凍結生存性及び凍結・融解法の影響

アロニア(学名:*Aronia melanocarpa* Elliott, 英名:black chokeberry)は、北米原産のバラ科果樹で、日本には30年ほど前にロシア経由で伝来した。現在、果実が比較的大粒のロシア型と、原種に近いアメリカ型の2タイプが存在する。果実のアントシアニン含有率が極めて高く^{43)–45)}、機能性食材として注目を集めている。北大園芸学分野では、アメリカ型およびロシア型両方の組織培養系を作出し、クローン大量増殖技術を確立したほか³⁸⁾、コルヒチン処理

により倍数性個体の作出にも成功した⁴²⁾。これらの倍数性個体は、大粒果を着生する品種の育種素材として大変貴重である反面、種類が多く培養変異を起こしやすいので、培養体組織の凍結保存方法の確立が強く求められている。

アロニア培養体組織の凍結保存に関する研究報告は、これまでのところ見あたらない。一般に耐凍性が低い培養体組織の凍結保存に緩速予備凍結法が適さない事実を踏まえ、本節では、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いたアロニア培養体組織の凍結保存について検討した。この場合、組織の生存に及ぼすガラス化処理時間、シリカゲル乾燥処理時間および含水率の影響を検討するとともに、組織の生存に及ぼすビーズおよびローディング液へのグリセリン添加の影響を明らかにしようとした。

第1項 高い生存率を実現する凍結・融解法の検討

本項では、アロニア培養体組織の凍結保存技術の確立を目標に、近年開発された3種類の凍結保存法の実用性について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

北大園芸学研究室で継代・維持されているアロニア(ロシア型)の継代1か月後の培養体を5°C、暗所で2週間低温馴化後、シュート先端部から解剖顕微鏡下で無菌的に摘出した茎頂(横径約1mm)を材料とした。継代培養は、鈴木ら³⁸⁾の報告に従い、MS(Murashige and Skoog)培地⁴⁶⁾に6-benzylaminopurine(BA)1.0 μM、ショ糖3%および寒天0.7%を添加した培養基(pH 5.7)を用い、25°C、1日16時間照明(白色蛍光灯、60 μE/m²/s)の条件下で行った。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。前培養の効果については、多くの研究報告がある^{19)47)–50)}。前培養は、MS培地にショ糖0.4Mおよび寒天0.7%を添加した培養基(pH 5.7)を用い、25°C、暗所で、24時間行った。

(3) 凍結・融解処理

a) ガラス化法

Sakai et al.⁶⁾に従い、処理を行った。材料を、0.4Mショ糖および2.0Mグリセリンを含むローディング液(Loading solution)に20分間浸漬後、Plant Vitirification Solution 2液(以下PVS2液と省略)を満たした5ml容クライオバイアル(Greiner bio-one社製、No.124275)の中に入れ、0°Cで、0.5~2時間処理した。PVS2の組成は、Sakai et al.⁶⁾の通りである。この場合、PVS2液の劣化を防ぐため、30分ごとにPVS2液を交換した。PVS2液処理後の材料は液体窒素(以下LN)に投入する方法により凍結し、LN中に1時間静置した。次に、保存後のクライオバイアルを温水(38°C)に入れる方法により材料を急速融解した。クライオバイアルからPVS2液を取り除き、1.2Mショ糖を含むMS液体培地で20分間洗浄後、再生培地に植え込んだ。なお、PVS2液処理後にLN凍結しない区を設け、処理対照とした。

b) ビーズガラス化法

Matsumoto et al.¹³⁾に従って、処理を行った。材料1つを含む3%(w/v)アルギン酸ナトリウム溶液(1.0Mグリセリンを含む)の液滴を、マイクロピペットを用いてグリセリン1.0Mを含む0.1M塩化カルシウム溶液に滴下し、直径約4mmのビーズを作製した(Fig.1)。ビーズはローディング液(1.0Mグリセリンおよび0.8Mショ糖を含むMS液体培地)に25°Cで16時間浸漬後、PVS2液を満たした5ml容クライオバイアルの中に入れ、0°Cで、1~6時間処理した。この場合、PVS2の劣化を防ぐため、30分ごとにPVS2液を交換した。PVS2液処理後の材料をLNに投入する方法により凍結し、LN中に1時間静置した。次に、保存後のクライオバイアルを温水(38°C)に入れる方法により材料を急速融解した。クライオバイアルからPVS2液を取り除き、1.2Mショ糖を含むMS液体培地で20分間洗浄後、再生培地に植え込んだ。なお、PVS2液処理後にLN凍結しない区を設け、処理対照とした。

c) ビーズ乾燥法

Fabre and Dereuddre¹⁰⁾に従って、処理を

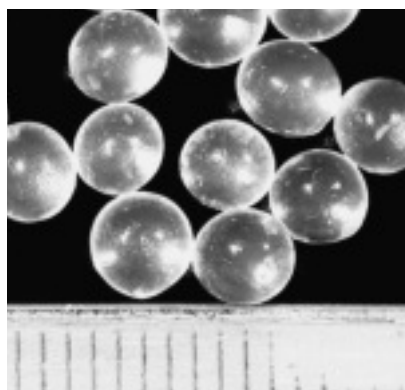


Fig. 1. Appearance of encapsulated shoot apices of black chokeberry. The intervals between scales represent 1cmm in length.

行った。材料1つを含む3%アルギン酸ナトリウム溶液を、マイクロピペットを用いて0.1M塩化カルシウム溶液に滴下し直径約4mmのビーズを作製後、ローディング液(0.8Mショ糖を含んだMS液体培地)に25°Cで16時間浸漬した。次に、直径12cmのシャーレ内のシリカゲル50g上に、ろ紙(定性ろ紙No.1)1枚を敷き、その上でビーズを1~8時間乾燥した。さらに、ビーズを5ml容クライオバイアルに入れ、LNに投入する方法により凍結し、LN中に1時間静置した。LNから取り出したクライオバイアルを温水(38°C)に入れる方法により材料の急速融解を行い、再生培地に植え込んだ。なお、乾燥処理後にLN凍結しない区を設け、処理対照とした。

(4) 培養

植物体再生のための培養は、本項(1)に記した継代培養と同一の培地および培養条件で行った。

(5) 調査

a) 生存率

培養30日後に、長さ5mm以上のシュートを有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり15茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

b) ビーズ含水率

ビーズ乾燥法で、乾燥処理後のビーズ含水率を調査した。ビーズ含水率は、ビーズ生重およ

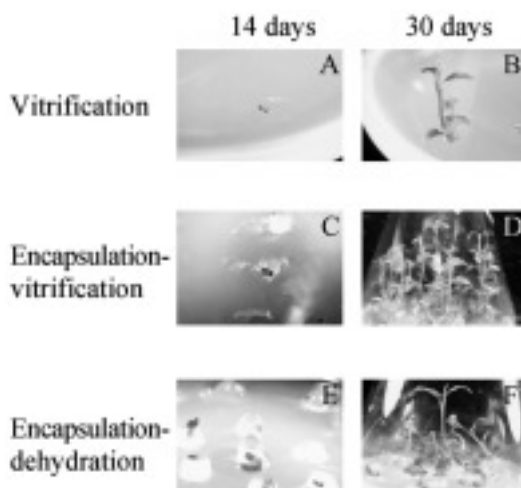


Fig. 2. Plant regeneration from surviving shoot apices of black chokeberry excised from *in vitro*-cultures and cryopreserved in liquid nitrogen (LN) using vitrification (A, B), encapsulation-vitrification (C, D) and encapsulation-dehydration (E, F), thawed and cultured. Photographs were taken after 14 (A, C, E) and 30 days (B, D, F) of culture.

びビーズを75°Cの乾燥機を用いて48時間乾燥した後のビーズ乾重から、以下に示す計算式①に基づいて算出した。

$$\text{ビーズ含水率(\%)} = (\text{ビーズ生重} - \text{ビーズ乾重}) / \text{ビーズ生重} \times 100 \cdots \text{①}$$

なお、1区あたり15ビーズを用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

結果および考察

凍結保存後に生存したアロニア培養体茎頂は、いずれも培養14日前後から葉を展開し始め、培養30日後頃にはシュートを形成した(Fig. 2)。この場合、再生植物体の成長は凍結保存法の影響を受け、培養14日後において、ビーズ乾燥法で凍結保存した茎頂の成長はガラス化法およびビーズガラス化法のそれより優れていた。しかし、培養30日後におけるシュートの形状に、顕著な差は認められなかったことから、組織の生存に及ぼす各種凍結保存法の影響については、培養30日後に行った。

ガラス化法およびビーズガラス化法で凍結した組織の生存に及ぼすガラス化液(PVS2液)処

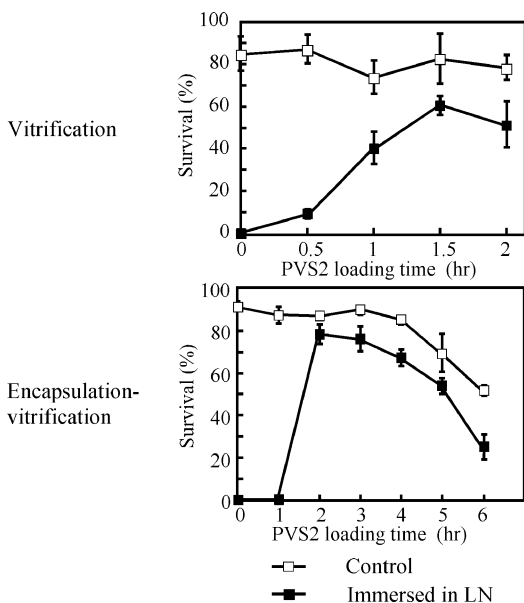


Fig. 3. Effects of PVS2 loading time for vitrification and encapsulation-vitrification on survival of black chokeberry shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

理時間の影響を Fig. 3 に示した。凍結保存後の生存率は、いずれも PVS2 液処理により増大した。この場合、生存率は PVS2 液処理時間の影響を受け、ガラス化法では 1.5 時間処理、ビーズガラス化法では 2 時間処理後の材料で最高値（ガラス化法、60.0%；ビーズガラス化法、77.8%）を示し、その後漸減した。特に、ビーズガラス化法において、処理対照区の生存率が処理 4 時間後以降低下したことは、4 時間以上のガラス化液処理により組織が傷害を受ける危険性があることを示している。この傷害の原因が、極度の脱水によるものか、あるいは PVS2 試薬の薬害によるものかについては、本実験の結果のみから判断することはできない。いずれにしても、ガラス化法およびビーズガラス化法を用いて凍結保存する場合の至適 PVS2 液処理時間は、それぞれ 1.5 および 2 時間であることがわかった。

次に、ビーズ乾燥法で凍結した組織の生存およびビーズ含水率に及ぼす乾燥時間の影響を Fig. 4 に示した。凍結保存後の生存率は、乾燥時

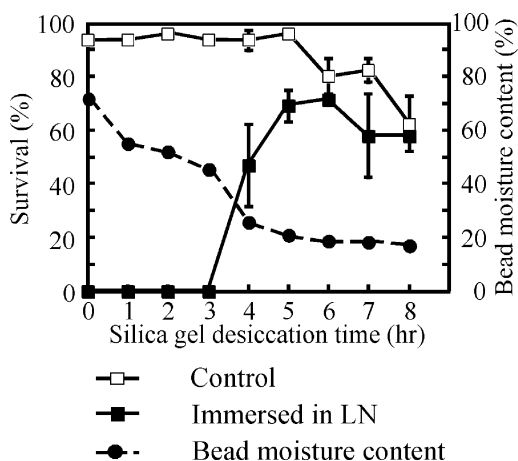


Fig. 4. Effects of silica gel desiccation time for encapsulation-dehydration on survival of black chokeberry shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

間の影響を受けて変化した。すなわち、乾燥 0～3 時間処理まで 0%であった生存率は、その後漸増し、乾燥 6 時間処理で 71.1%の最高値を示した後、わずかに低下した。この場合、ビーズ含水率も大きく変化した。当初約 70%以上であったビーズ含水率は、乾燥処理により漸減し、生存茎頂が得られるようになった処理 4 時間以降、30%以下の低い値となった。従って、生存茎頂を得るには、ビーズ含水率を 30%以下に低下させる必要があると考えられる。また、処理対照区における生存率が処理 5 時間以降低下したことは、5 時間以上の乾燥処理により組織が傷害を受ける危険性があることを示している。以上の結果から、アロニア培養体茎頂をビーズ乾燥法により凍結保存する場合の至適乾燥時間は、凍結保存後の生存率が最も高く、なおかつ乾燥に伴う組織の傷害程度が小さい、6 時間であると判断した。

上記 3 つの凍結保存法は、いずれも至適条件下で 60%以上の生存率を示し、従来難しいとされる培養体組織の凍結保存に有効であることが明らかになった。しかし、ガラス化法およびビーズガラス化法における、処理温度の設定および操作が煩雑である点、ならびに Fig. 2 の培養 14 日後の培養体に見られるように、PVS2 で処理

した培養体の初期生育は比較的不良である点は好ましくない。その意味で、アロニア培養体茎頂の凍結保存にはビーズ乾燥法が適していると考えられる。

第2項 ビーズ乾燥法の改良による生存率の向上

第1項において、アロニア培養体茎頂の凍結保存には、操作の簡便性や安定した生存率の観点から、ビーズ乾燥法が優れていると判断した。しかし生存率は約71%と、実用化には不十分な値である。Matsumoto and Sakai¹¹⁾はビーズ（アルギン酸ナトリウム溶液および塩化カルシウム溶液）やローディング液にグリセリンを添加することで、凍結保存後の生存率が向上したことを報告し、これを修正ビーズ乾燥法（Modified encapsulation-dehydration）と定義している⁵⁾。そこで、本項ではビーズ乾燥法における生存率の向上を目指し、修正ビーズ乾燥法について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

植物材料は、前項に準じて、低温馴化後のアロニア培養体の茎頂を使用した。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、前項に準じて、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解は、前項のビーズ乾燥法に準ずる方法で行った。本項では、以下に示す3つの項目について検討した。

a) 組織の生存に及ぼすビーズおよびローディング液へのグリセリン

添加の影響

グリセリン1.0 Mを添加したビーズに材料を封入する区、グリセリン1.0 Mを添加したローディング液でビーズを16時間の浸漬処理した区および両方の処理を行う区の3処理区を設けた。また、ビーズおよびローディング液の両方にグリセリンを添加しない区を設け、対照とした。処理後、材料をシリカゲルで6時間乾燥処理し、LNへ投入した。LN中に1時間保存した材料を、クライオバイアルごと、温水(38°C)

に入れる方法により、急速融解した。

b) 組織の生存に及ぼすグリセリン濃度の影響

ビーズとローディング液の両方にグリセリンを0.5, 1.0 および2.0 M 加えてビーズを作製した。その他の条件は、本項 a) と同様である。

c) 組織の生存に及ぼすビーズ乾燥時間の影響

グリセリン添加によって、乾燥処理時間が短縮できるか否かを検討するため、ビーズとローディング液の両方にグリセリン1.0 Mを添加した。処理後、2, 4 および6時間乾燥処理を施し、LNへ投入した。その他の条件は、本項 a) と同様である。

(4) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(5) 調査

培養30日後に、長さ5 mm以上のシュートを有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり15茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

結果および考察

修正ビーズ乾燥法における組織の生存に及ぼすビーズまたはローディング液へのグリセリン添加の影響をTable. 1に示す。ビーズにグリセリンを添加した区(Table. 1A, 55.6%)の生存率は、対照区のそれに比べて低かったのに対し、ローディング液にグリセリンを添加した区の生存率は、86.7%と対照区より高かった。さらに、ビーズおよびローディング液の両方にグリセリンを添加した区における生存率は、95.5%と最も高い値を示した。この値は、前項で示した通常のビーズガラス化法で得られた生存率の最高値を大きく上回った。従って、ビーズ乾燥法を用いてアロニア培養体茎頂を凍結保存する場合、ビーズとローディング液の両方にグリセリンを添加することが有効であることが明らかになった。

次に、添加するグリセリンの濃度について検討した(Fig. 5)。生存率は、グリセリンの濃度によって変化し、グリセリン1.0 M添加区が至適となった。

Table 1. Effects of glycerol added in beads and/or loading solution on survival of black chokeberry shoot apices cryopreserved using encapsulation-dehydration.

Treatment	Addition of glycerol ^z		Survival ^x (%)
	Bead	Loading solution ^y	
A	+	-	55.6±8.9 a
B	-	+	86.7±0.0 b
C	+	+	95.6±2.2 b
Control	-	-	66.7±3.9 a

^z Supplemented with (+) or without (-) 1.0M glycerol.

^y Encapsulated specimens were dehydrated for 6 hrs on silica gel.

^x Values represent mean±SE of three determinations. The differences in any two mean values labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

また、グリセリン 1.0 M を添加したビーズの乾燥時間について検討したところ、6 時間処理が有効であることがわかった (Fig. 6)。この場合、グリセリンの添加による生存率の向上は、乾燥 2 および 4 時間処理区の生存率もそれぞれ 35.5% および 75.5% と、処理対照区のそれを上回ったことから裏付けられた。

以上のことから、Matsumoto and Sakai¹¹⁾ の報告と同様に、アロニア培養体茎頂においてもグリセリンを利用した修正ビーズ乾燥法は、凍結保存後の生存率の向上に有効であることがわかった。特に、ビーズおよびローディング液の両方にグリセリン 1.0 M を添加し、シリカゲルで 6 時間乾燥処理を行うことで、凍結保存後の生存率 95.5% と、最も有効であることがわかった。

第 2 節 サンザシ培養体組織の凍結生存性に及ぼす凍結・融解法の影響

サンザシ (学名 *Crataegus* spp., 英名 hawthorn) は、北半球の冷温帯に広く分布するバラ科木本植物で、日本にもクロミサンザシ (*C. chlorosarca* Maxim), アラゲアカサンザシ (*C. maximowiczii* Schneid) およびエゾサンザシ (*C. jozana* C. K. Schneid) 等が自生している。日本では、街路樹として利用されているに過ぎ

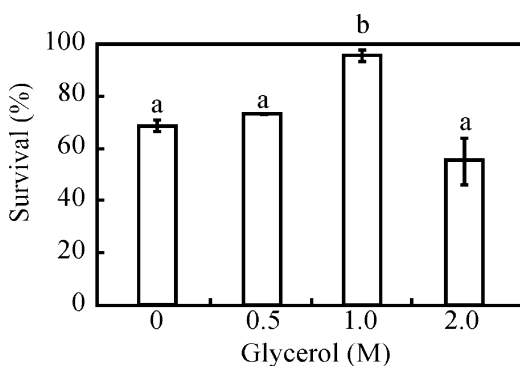


Fig. 5. Effects of concentrations of glycerol added to both beads and loading solution (LS) on survival of cryopreserved black chokeberry shoot apices. All specimens were treated with LS for 16 hrs desiccated on silica gel for 6 hrs, and immersed in LN for 1 hr. Values represent mean±SE of three determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

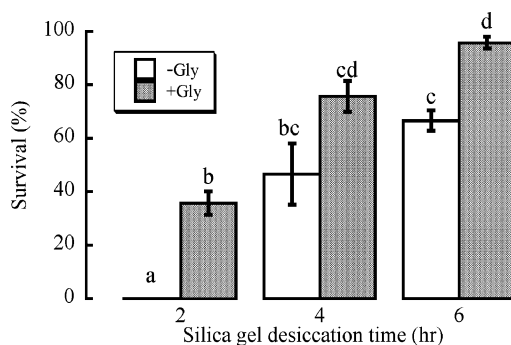


Fig. 6. Effects of silica gel desiccation time on survival of cryopreserved black chokeberry shoot apices encapsulated in beads with 1.0M glycerol. All specimens were cryopreserved for 1 hr in LN. Values represent mean±SE of three determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

ないが、中国では、オオミサンザシ (*C. pinnatifida* Bge) の果実を生食、菓子や果実酒などの原料として利用している。近年、石ら⁵²⁾ が数種サンザシ果実の成分を調べたところ、アラゲ

アカサンザシ果実に機能性成分が豊富に含まれていることを報告した。このことを受けて、石ら⁴⁰⁾は、野生のサンザシを有用な果樹と見なし、胚培養を用いてサンザシ種間雑種の作出に成功した。これら雑種培養体は、育種素材として大変貴重である反面、種類が多く培養変異を起しやすいため、培養体組織を凍結保存する方法の確立が強く求められている。

サンザシ組織の凍結保存に関する研究報告は、これまでのところ見あたらない。そこで本節では、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いてサンザシ培養体組織の凍結保存技術の確立を検討した。この場合、生存率に及ぼすガラス化液処理時間、シリカゲル乾燥処理時間および含水率の影響を検討するとともに、組織の生存に及ぼすビーズおよびローディング液へのグリセリン添加の影響を明らかにしようとした。

第1項 高い生存率を実現する凍結・融解法の検討

本項では、サンザシ培養体組織の凍結保存技術の確立を目標に、近年開発された3種類の凍結保存法の実用性について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

北大園芸学研究室で継代・維持されているオオミサンザシ（以降、サンザシと表記）の継代1か月後の培養体を5°C、暗所で2週間低温馴化後、シュート先端部から解剖顕微鏡下で無菌的に摘出した茎頂（横径約1mm）を材料とした。継代培養は、石ら³⁸⁾の報告に従い、MS培地にBA 0.1 mg/l、ショ糖 3%および寒天 0.7%を添加した培養基(pH 5.7)を用い、25°C、1日16時間照明（白色蛍光灯、60 μE/m²/s）の条件下で行った。

(2) 前培養

前培養は、前節・第1項と同様に、MS培地にショ糖 0.4 M および寒天 0.7%を添加した培養基(pH 5.7)を用い、25°C、暗所で、24時間行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解（ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法）は、いずれも前節・第1

項と同様の方法で行った。

(4) 培養

植物体再生のための培養は、本項(1)に記した継代培養と同一の培地および培養条件で行った。ビーズ乾燥法では、培養14日後にアルギン酸ビーズから茎頂を取り出して、新しい培地に移植した。

(5) 調査

a) 生存率

ビーズ乾燥法においては、培養54日後（移植40日後）に、ビーズガラス化法においては、培養60日後に、長さ5mm以上のシュートを有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に4回行い、結果を平均値±SEで表した。

b) ビーズ含水率

ビーズ乾燥法で、乾燥処理後のビーズ含水率を調査した。調査は、前節・第1項に準ずる方法で行った。1区あたり20ビーズを用いる実験を独立に4回行い、結果を平均値±SEで表した。

結果および考察

凍結保存後に生存したサンザシ培養体茎頂は、いずれも培養14日前後から葉を展開し始めた。この場合、ガラス化法およびビーズガラス化法では、シュート形成までに60日を要した。また、ビーズ乾燥法では、予備実験において培養14日後以降、ほとんどの茎頂はビーズを突き破ることができず、そのまま枯死・褐変した。そこで本実験では、培養14日後に茎頂をアルギン酸ビーズから取り出し、新しい培地に移植する必要があった。これにより、移植40日後には完全なシュートが形成された（Fig. 7）。そのため、組織の生存に及ぼす各種凍結保存法の影響については、ガラス化法およびビーズガラス化法では培養60日後に、ビーズ乾燥法では培養54日後（移植40日後）に調査を行った。

ガラス化法およびビーズガラス化法で凍結した組織の生存に及ぼすガラス化液（PVS2液）処理時間の影響をFig. 8に示した。ガラス化法では、PVS2液処理時間の長短にかかわらず、生存率が12.5%以下と低く、サンザシ培養体茎頂の

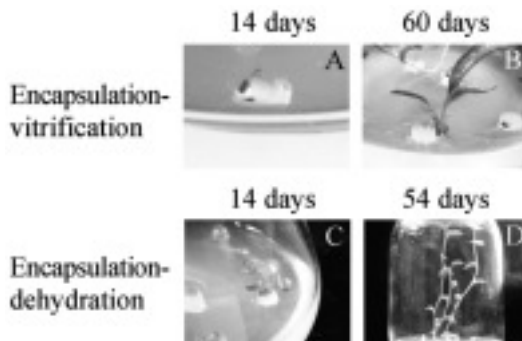


Fig. 7. Plant regeneration from surviving shoot apices of hawthorn excised from *in vitro*-cultures and cryopreserved using encapsulation-vitrification (A, B) and encapsulation-dehydration (C, D). Photographs were taken after 14 days of culture (A, C). In encapsulation-vitrification, specimens regenerated shoots after 60 days of culture (B). In encapsulation-dehydration, specimens were subcultured into fresh medium after 14 days of culture and regenerated shoots 40 days after subculturing (D).

凍結保存にガラス化法は適さないことがわかった。一方、ビーズガラス化法における凍結保存後の生存率は、いずれも PVS2 液処理により増大した。この場合、生存率は PVS2 液処理時間の影響を受け、4 時間処理後の材料で最高値 62.5% を示し、その後ほぼ一定の値にとどまった。従って、ビーズガラス化法を用いて凍結保存する場合の至適 PVS2 液処理時間は、4 時間であることがわかった。

次に、ビーズ乾燥法で凍結した組織の生存およびビーズ含水率に及ぼす乾燥時間の影響を Fig. 9 に示した。凍結保存後の生存率は、乾燥時間の影響を受けて変化した。すなわち、乾燥 0～3 時間処理まで 0% であった生存率は、その後漸増し、乾燥 6 時間処理で 65.0% の最高値を示した後、わずかに低下した。この場合、ビーズ含水率も大きく変化し、当初約 70% 以上であったビーズ含水率は、乾燥処理により漸減し、生存茎頂が得られるようになった処理 4 時間以降、20% 以下の低い値となった。従って、生存茎頂を得るには、ビーズ含水率を 20% 以下に低下させる必要があると考えられる。また、処理

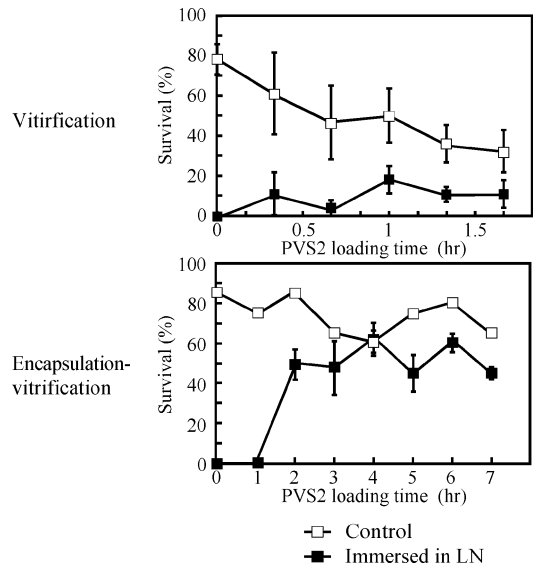


Fig. 8. Effects of PVS2 loading time for vitrification and encapsulation-vitrification on survival of hawthorn shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of four determinations.

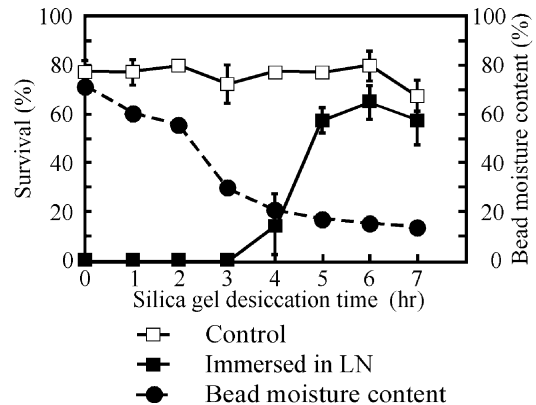


Fig. 9. Effects of silica gel desiccation time for encapsulation-dehydration on survival of hawthorn shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of four determinations.

対照区における生存率が処理 6 時間以降に低下したことは、6 時間以上の乾燥処理により組織が傷害を受ける危険性があることを示している。以上の結果から、サンザシ培養体茎頂をビーズ乾燥法により凍結保存する場合の至適乾燥時間は、凍結保存後の生存率が最も高く、なおかつ

乾燥に伴う組織の傷害程度が小さい、6時間であると判断した。

上記3つの凍結保存法は、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法において、至適条件下で60%以上の生存率を獲得することができ、アロニア同様、従来難しいとされる培養体組織の凍結保存に有効であることが明らかになった。ビーズガラス化法とビーズ乾燥法を比較すると、処理時間が短い点およびビーズから茎頂を摘出する必要がない点において、ビーズガラス化法が有利であると思われるが、処理温度の設定および操作が簡便である点において、ビーズ乾燥法が優れていた。従って、サンザシ培養体茎頂の凍結保存において、ビーズガラス化法とビーズ乾燥法の優劣を決めることはできなかった。

第2項 ビーズ乾燥法およびビーズガラス化法の改良による生存率の向上

第1項において、サンザシ培養体茎頂の凍結保存には、ビーズ乾燥法およびビーズガラス化法が優れていると判断した。しかし、生存率はどちらも60%台と、実用化には不十分な値である。前節において、ビーズおよびローディング液にグリセリンを添加する修正ビーズ乾燥法を用いて、凍結保存後のアロニア培養体茎頂の生存率が向上することを明らかにした。そこで、本項ではビーズ乾燥法およびビーズガラス化法における生存率の向上を目指し、凍結保存後のサンザシ培養体茎頂の生存に及ぼす、ビーズおよびローディング液へのグリセリン添加の影響について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

植物材料として、前項と同様に、低温馴化後のサンザシ培養体の茎頂を使用した。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、前項に準じて、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解は、前項のビーズ乾燥法およびビーズガラス化法に準ずる方法で行った。この場合、ビーズとローディング液の両方にグリセリンを

0.5, 1.0 および 2.0 M の濃度で添加した。また、どちらにもグリセリンを添加しない区を設け、対照とした。ローディング液へのビーズ浸漬時間は16時間とし、その後シリカゲルで6時間乾燥処理するか（ビーズ乾燥法）、または4時間PVS2液処理し（ビーズガラス化法）、LNへ投入した。LN中に1時間保存した材料を、クライオバイアルごと温水（38°C）に入れる方法により、急速融解した。

(4) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(5) 調査

ビーズ乾燥法では、培養54日後（移植40日後）に、ビーズガラス化法では、培養60日後に、長さ5mm以上のシュートを有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に4回行い、結果を平均値±SEで表した。

結果および考察

ビーズ乾燥法およびビーズガラス化法における、組織の生存に及ぼすビーズおよびローディング液へ添加するグリセリン濃度の影響について検討した（Fig. 10）。凍結保存後の生存率は、いずれもグリセリンの濃度の影響を受けて変化し、ビーズ乾燥法ではグリセリン0.5M添加区、ビーズガラス化法ではグリセリン1.0M添加区の材料で最高値（ビーズ乾燥法、82.5%；ビーズガラス化法、60.0%）を示した。両者を比較すると、修正ビーズ乾燥法における生存率は、ビーズガラス化法のそれに比べて高いことが明らかになった。以上のことから、アロニア培養体茎頂と同様に、サンザシ培養体茎頂においてもグリセリンを利用した修正ビーズ乾燥法は、凍結保存後の生存率の向上に有効であることがわかった。特に、ビーズおよびローディング液の両方にグリセリン0.5Mを添加し、シリカゲルで6時間乾燥処理を行うことで、凍結保存後の生存率82.5%と、最も有効であることがわかった。

第3節 ハスカップ培養体組織の凍結生存性に及ぼす凍結・融解法の影響

ハスカップ（学名 *Lonicera caerulea* L. var. *emphylocalyx* Nakai, 英名 blue honeysuckle）

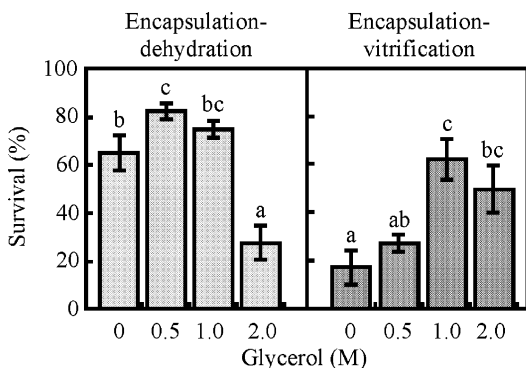


Fig. 10. Effects of concentrations of glycerol added to both beads and loading solution (LS) on survival of hawthorn shoot apices cryopreserved using encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. All specimens were treated with LS for 16 hrs, desiccated on silica gel for 6 hrs (encapsulation-dehydration) or loaded to PVS2 for 4 hrs (encapsulation-vitrification), and immersed in LN for 1 hr. Values represent mean \pm SE of four determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

は、北海道に自生するスイカズラ科の果樹で、アイヌ民族が古くから果実を食用や染料の原料として利用していたことが知られている。近年、北海道では果実がジャム、ジュース、ワインおよび菓子などの原料として利用されており、一般的な果樹として定着している。また、田中と田中⁵³⁾の研究により、果実に機能性成分が豊富に含まれていることが明らかとなり、健康食品の原料として注目を集めている。北大園芸学研究室では、ハスカップの組織培養系を作出し、*in vitro*でのクローン大量増殖技術を確立したほか³⁶⁾、コルヒチン処理により倍数体作出にも成功した⁴¹⁾。これらの倍数性個体は、大粒果を着生する品種の育種素材として大変貴重である反面、種類が多く培養変異を起こしやすいので、培養体組織を凍結保存する方法の確立が強く求められている。

ハスカップ組織の凍結保存は、鈴木²⁶⁾が緩速

予備凍結法により、冬季に野外から採取した茎頂を用いて成功したが、培養体茎頂ではほとんど生存個体が得られなかったことを報告している。しかし、低温馴化後の培養体茎頂を材料として、わずかに生存個体を獲得していることから、凍結保存法および前処理の方法を工夫すれば、生存率が高まる可能性がある。

そこで本節では、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いてハスカップ培養体茎頂の凍結保存技術の確立を検討した。この場合、生存率に及ぼすガラス化液処理時間、シリカゲル乾燥処理時間および含水率の影響を検討するとともに、組織の生存に及ぼすローディング液へのグリセリン添加の影響を検討した。加えて、Bernald et al.⁵⁵⁾の報告を参考に、ローディング液へのサリチル酸添加の影響を検討した。

第1項 高い生存率を実現する凍結・融解法の検討

本項では、ハスカップ培養体組織の凍結保存技術の確立を目標に、近年開発された3種類の凍結保存法の実用性について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

北大園芸学研究室で継代・維持されているハスカップの継代1か月後の培養体を5°C、暗所で2週間低温馴化後、シュート先端部から解剖顕微鏡下で無菌的に摘出した茎頂(横経約1 mm)を材料とした。継代培養は、鈴木ら³⁶⁾の報告に従い、MS培地の無機塩およびアミノ酸・ビタミンの濃度を1/2に希釈したもの(以降1/2 MSと表記)にBA 10.0 μ M, gibberellic acid (GA₃) 1.0 μ M, ショ糖3%および寒天0.7%を添加した培養基(pH 5.7)を用い、25°C、1日16時間照明(白色蛍光灯, 60 μ E/m²/s)の条件下で行った。

(2) 前培養

前培養は、本章・第1節の第1項と同様に、材料の凍結抵抗性を高めるために、1/2 MS培地にショ糖0.3 Mおよび寒天0.7%を添加した培養基(pH 5.7)を用い、25°C、暗所で、24時間行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解（ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法）は、いずれも第1節・第1項と同様の方法で行った。ただし、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法におけるローディング液のショ糖濃度は0.75 Mに設定した。

(4) 培養

植物体再生のための培養は、本項(1)に記した継代培養と同一の培地および培養条件で行った。

(5) 調査

a) 生存率

ガラス化法およびビーズ乾燥法においては培養30日後に、ビーズガラス化法においては培養60日後に、長さ5 mm以上のシュートを有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

b) ビーズ含水率

ビーズ乾燥法で、乾燥処理後のビーズ含水率を調査した。調査は、第1節・第1項に準ずる方法で行った。各処理区についてビーズ20個を用いる測定を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

結果および考察

ガラス化法およびビーズ乾燥法における、生存茎頂は、培養5日後頃から緑色に変化し、培養14日後からシュート形成を開始した。さらに、培養30日後にはシュートが約2 cmまで伸長した。一方、ビーズガラス化法では、培養30日後までに茶色のカルスが形成され、培養60日後にはカルスから不定芽形成が確認された (Fig. 11)。

ガラス化法およびビーズガラス化法で凍結した組織の生存に及ぼすガラス化液 (PVS2 液) 処理時間の影響を Fig. 12 に示す。凍結保存後の生存率は、いずれも PVS2 液処理により増大した。この場合、生存率は PVS2 液処理時間の影響を受け、ガラス化法では1時間処理、ビーズガラス化法では4時間処理後の材料で最高値 (ガラス化法, 50.0%; ビーズガラス化法, 28.9%) を示し、その後漸減した。特に、ガラ

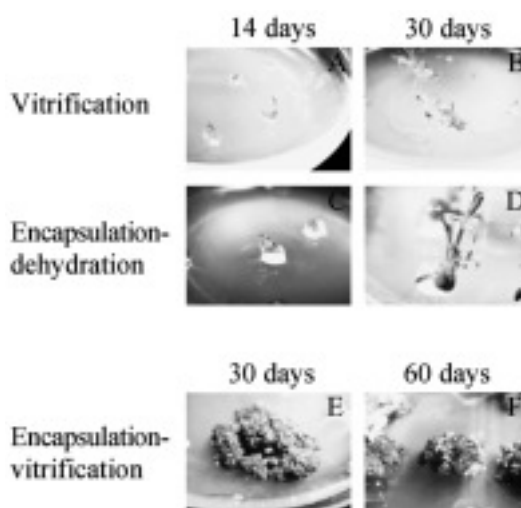


Fig. 11. Plant regeneration from surviving blue honeysuckle shoot apices excised from *in vitro*-cultures and cryopreserved using vitrification (A, B), encapsulation- dehydration (C, D) and encapsulation-vitrification (E, F). Photographs were taken after 14 (A, C) and 30 days (B, D) of culture. In encapsulation-vitrification, encapsulated specimens formed callus after 30 days of culture (E) and formed adventitious shoots on callus after 60 days of culture (F).

ス化法およびビーズガラス化法において、処理対照区の生存率がそれぞれ処理1時間および処理5時間後以降低下したことは、長時間のガラス化液処理により組織が傷害を受ける危険性があることを示している。この傷害の原因が、極度の脱水によるものか、あるいは PVS2 試薬の薬害によるものかについては、本実験の結果のみから判断することはできない。いずれにしても、ガラス化法およびビーズガラス化法を用いて凍結保存する場合の至適 PVS2 液処理時間は、それぞれ1および5時間であることがわかった。ただし、ビーズガラス化後の生存組織において、カルス経由でシュートが形成され、さらに水浸状を呈したものが多く見受けられた。遺伝資源保存の観点から、カルス経由の植物体再生および再生した培養体組織の水浸状化は好ましくない。そのため、ハスカップ培養体

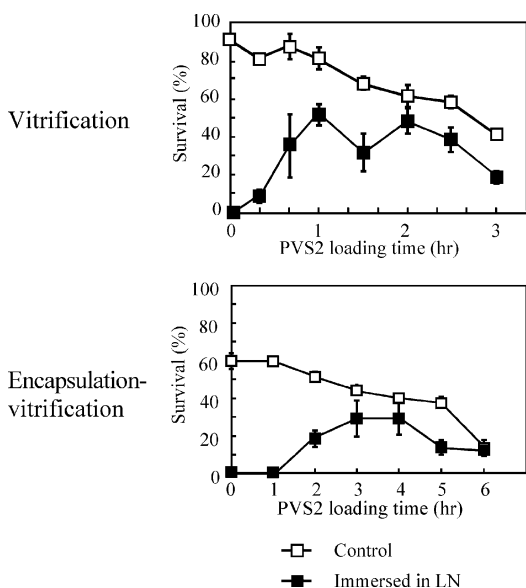


Fig. 12. Effects of PVS2 loading time for vitrification and encapsulation-vitrification on survival of blue honeysuckle shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

茎頂の凍結保存にビーズガラス化法は適さないと判断した。

次に、ビーズ乾燥法で凍結した組織の生存およびビーズ含水率に及ぼす乾燥時間の影響を Fig. 13 に示した。凍結保存後の生存率は、乾燥時間の影響を受けて変化した。すなわち、乾燥 0～2 時間処理まで 0% であった生存率は、その後漸増し、乾燥 4 時間処理で 93.3% の最高値を示した後、わずかに低下した。この場合、ビーズ含水率も大きく変化し、当初約 70% 以上であったビーズ含水率は、乾燥処理により漸減し、生存茎頂が得られるようになった処理 3 時間以降、30% 以下の低い値となった。従って、生存茎頂を得るには、ビーズ含水率を 30% 以下に低下させる必要があると考えられる。また、処理対照区における生存率が処理 5 時間以降低下したことは、5 時間以上の乾燥処理により組織が傷害を受ける危険性があることを示している。以上の結果から、ハスカップ培養体茎頂をビーズ乾燥法により凍結保存する場合の至適乾燥時間は、凍結保存後の生存率が最も高く、なおか

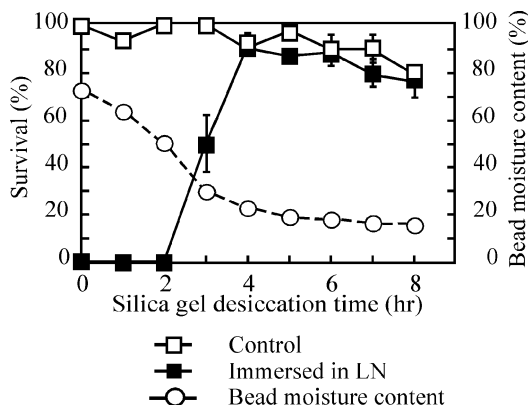


Fig. 13. Effects of silica gel desiccation time for encapsulation-dehydration on survival of blue honeysuckle shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

つ乾燥に伴う組織の傷害程度が小さい、6 時間であると判断した。

上記 3 つの凍結保存法のうち、ガラス化法およびビーズ乾燥法において、ともに至適条件下で生存率が 50% 以上を示し、鈴木²⁶⁾ が難しいと指摘したハスカップ培養体茎頂の凍結保存に有効であることがわかった。特に、ビーズ乾燥法において 93.3% と、高い生存率が得られたため、ハスカップ培養体茎頂の凍結保存にはビーズ乾燥法が適していると判断した。

第 2 項 ビーズ乾燥法の改良による生存率の向上

前項において、ハスカップ培養体茎頂の凍結保存に、ビーズ乾燥法が優れていると判断した。しかし、ビーズ乾燥法において低温馴化など、処理に時間がかかるという欠点がある。そこで、ビーズ乾燥法における処理時間の短縮を検討するため、低温馴化を行わない培養体茎頂を用いた場合の前処理の方法について調査した。すなわち、本章・第 1 節および第 2 節で明らかにしたグリセリンを用いる修正ビーズ乾燥法に加え、Bernald et al.⁵⁵⁾ が Persian lilac 胚軸組織で報告したサリチル酸添加が生存率に及ぼす影響について検討した。

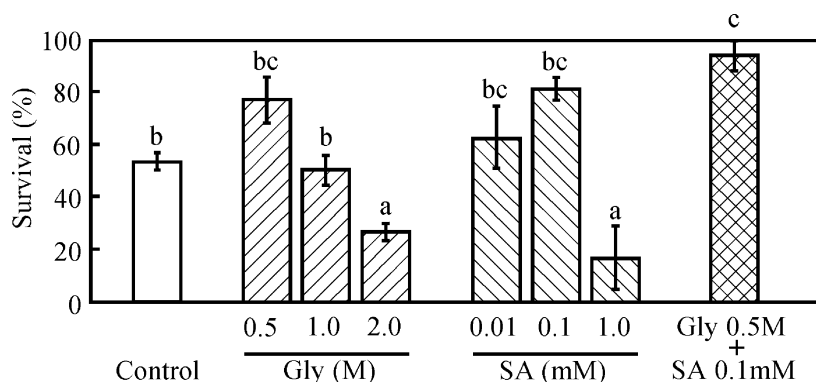


Fig. 14. Effects of glycerol (Gly) and/or salicylic acid (SA) added to loading solution on survival of blue honeysuckle shoot apices cryopreserved using encapsulation-dehydration. All specimens were immersed in loading solution for 16 hrs, and dehydrated on silica gel for 4 hrs, then immersed in LN for 1 hr. Values represent mean \pm SE of three determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

材料および方法

(1) 植物材料

植物材料は、前項に準じ、ハスカップ培養体の茎頂を使用した。今回は、材料に低温馴化を施さずに以後の操作を行った。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、前項に準じて、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解は、前項のビーズ乾燥法に準ずる方法で行った。この場合、ローディング液にグリセリンを0.5, 1.0 および2.0 M, またはサリチル酸0.01, 0.1 および1.0 mM の濃度で添加した。また、グリセリンを添加しない区を設け、対照とした。ローディング液へのビーズ浸漬時間は16時間とし、その後シリカゲルで4時間乾燥処理し、LNへ投入した。LN中に1時間保存した材料を、クライオバイアルごと温水(38°C)に入れる方法により、急速融解した。

(4) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(5) 調査

培養30日後に、長さ5 mm以上のシュート有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値 \pm

SEで表した。

結果および考察

ビーズ乾燥法における、茎頂の生存に及ぼすローディング液へ添加するグリセリンまたはサリチル酸濃度の影響をFig. 14に示す。低温馴化を行わなかった材料の生存率53.3%は低温馴化した材料のそれ(93.3%, Fig. 13)より低下した。しかし、グリセリンまたはサリチル酸を添加した区において、生存率が増大した。この場合、生存率は、その濃度によって変化し、単独で添加した場合、グリセリンにおいて0.5 M区(生存率76.7%)で、サリチル酸では0.1 mM区(生存率80.6%)で至適となった。さらに、グリセリン0.5 Mおよびサリチル酸0.1 mMを混合して添加したところ、生存率が93.3%と、最も高い生存率が得られた。この値は、2週間の低温馴化後の材料を用いた場合と同様の値であった。

以上のことから、グリセリンおよびサリチル酸を利用したビーズ乾燥法は、ハスカップ培養体茎頂の凍結保存に有効な手段であることがわかった。本研究では、この方法を従来の修正ビーズ乾燥法(Modified encapsulation-dehydration)と区別するため、改良ビーズ乾燥法(Revised encapsulation-dehydration)と呼ぶこととする。ローディング液にグリセリン0.5 Mとサリチル酸0.1 mMを混合して添加

し、シリカゲルで4時間の乾燥処理を行うことで、低温馴化を行わなくても、凍結保存後のハスカップ培養体茎頂を、93.3%の高率で生存させることが可能であることが明らかになった。

第4節 クランベリー培養体組織の凍結生存性に及ぼす凍結・融解法の影響

クランベリー(学名 *Vaccinium macrocarpon* Ait., 英名 cranberry)は、北米の湿地帯に生息するツツジ科スノキ属の落葉低木で、その果実はジャムやリキュールに利用され、貴重な果樹として栽培化されている。また、近年の研究により、果実はアントシアニンを豊富に含み、機能性食材として注目を集めている⁵⁶⁾⁵⁷⁾。

近年は、組織培養に関する研究が行われ⁵⁸⁾、北大園芸学研究室においても *in vitro* 培養を利用した種苗の大量増殖技術の開発に成功した。これら培養体は、継代培養によって維持されているが、1~2か月に1回の植え継ぎを必要とし手間がかかるほか、コンタミネーションにより培養体が消失する危険性がある。そのため、継代培養とは別に、クランベリー培養体組織を長期間安定的に保存する方法の確立が強く求められている。

クランベリーの遺伝資源保存について、種子、枝および培養体組織を低温保存する方法が報告されているが⁵⁹⁾、凍結保存の成功例は報告されていない。しかし、Shibli et al.¹²⁾ がビーズ乾燥法を用いて、同じツツジ科スノキ属の *Vaccinium pahalae* 培養細胞の凍結保存に成功したことから、クランベリー培養体組織においても凍結保存技術の確立が可能であると思われる。そこで本節では、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いて、クランベリー培養体組織の凍結保存について検討した。すなわち、生存率に及ぼすガラス化処理時間、シリカゲル乾燥処理時間および含水率の影響を検討するとともに、前節の結果を踏まえ、生存率に及ぼすローディング液へのグリセリンおよびサリチル酸添加の影響を検討した。

第1項 高い生存率を実現する凍結・融解法の検討

本項では、クランベリー培養体組織の凍結保存技術の確立を目標に、近年開発された3種類

の凍結保存法の実用性について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

北大園芸学研究室で継代・維持されているクランベリー‘Early Black’の継代1か月後の培養体を5°C、暗所で2週間低温馴化後、シュート先端部から解剖顕微鏡下で無菌的に摘出した茎頂(横経約1mm)を材料とした。継代培養は、Marcotrigiano and McGlew⁵⁸⁾の報告に従い、クランベリー用培地(多量要素をAnderson培地、微量要素およびビタミン類をMS培地の組成として調整したもの)にN⁶-(2-Isopentenyl)adenine (2ip)1.5 μM、ショ糖3%および寒天0.7%を添加した培養基(pH 5.0)を用い、25°C、1日16時間照明(白色蛍光灯、60 μE/m²/s)の条件下で行った。

(2) 前培養

前培養は、本章・第1節の第1項と同様に、クランベリー用培地にショ糖0.4 Mおよび寒天0.7%を添加した培養基(pH 5.0)を用い、25°C、暗所で、24時間行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解(ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法)は、いずれも本章・第1節の第1項と同様の方法で行った。

(4) 培養

植物体再生のための培養は、本項(1)に記した継代培養と同一の培地および培養条件で行った。

(5) 調査

a) 生存率

培養120日後に、長さ5 mm以上のシュートを有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

b) ビーズ含水率

ビーズ乾燥法で、乾燥処理後のビーズ含水率を調査した。調査は、第1節・第1項に準ずる方法で行った。なお、1区あたりビーズ20個を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

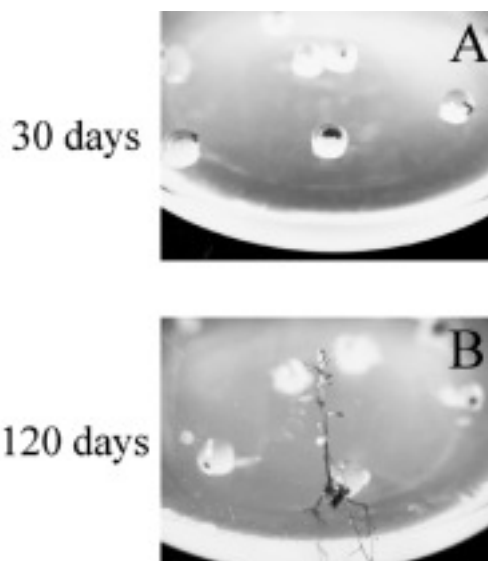


Fig. 15. Plant regeneration from surviving shoot apices of cranberry excised from *in vitro*-cultures and cryopreserved using encapsulation-dehydration. Photographs were taken after 30 (A) and 120 days (B) of culture.

結果および考察

凍結保存後に生存したクランベリー培養体茎頂は、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法において、培養 14 日頃から緑色に変化し、さらに、培養 30 日前後にはアルギン酸ビーズ内で茎頂が肥大していることを確認した。しかし、その後急速な成長は認められず、培養 90 日後頃から茎頂は再び成長を開始し、培養 120 日後には、両方法において完全なシュートを形成した (Fig. 15)。そこで、組織の生存に及ぼす各種凍結保存法の影響については、培養 120 日後に調査した。

ガラス化法およびビーズガラス化法で凍結した組織の生存に及ぼすガラス化液 (PVS2 液) 処理時間の影響を Fig. 16 に示した。ガラス化法では、PVS2 液処理時間の長短にかかわらず、生存茎頂が得られなかったことから、クランベリー培養体組織の凍結保存にガラス化法は適さないことがわかった。一方、ビーズガラス化法における凍結保存後の生存率は、いずれも PVS2 液処理により増大した。この場合、生存率は PVS2 液処理時間の影響を受け、4 時間処理

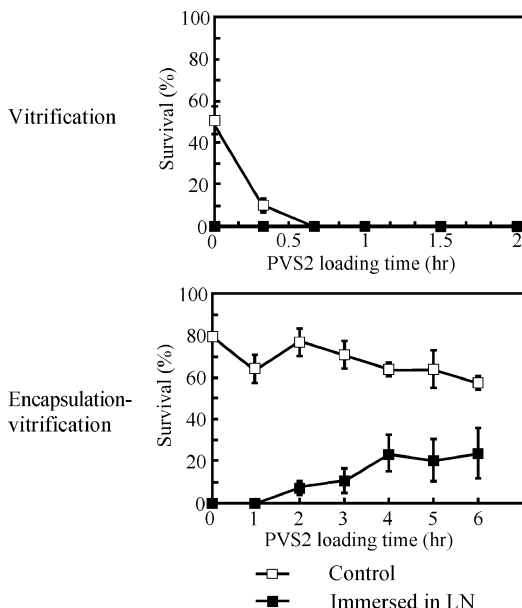


Fig. 16. Effects of PVS2 loading time for vitrification and encapsulation-vitrification on survival of cranberry shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

後の材料で最高値 (23.3%) を示し、その後ほぼ一定の値で推移したため、ビーズガラス化法を用いて凍結保存する場合の至適 PVS2 液処理時間は、4 時間であることがわかった。

次に、ビーズ乾燥法で凍結した組織の生存およびビーズ含水率に及ぼす乾燥時間の影響を Fig. 17 に示した。凍結保存後の生存率は、乾燥時間の影響を受けて変化した。すなわち、乾燥 1 時間処理以降、生存率が漸増し、乾燥 6 時間処理において 33.3% の最高値を示した後、わずかに低下した。この場合、ビーズ含水率も大きく変化し、当初約 70% 以上であったビーズ含水率は、乾燥処理により漸減し、生存率が 20% 以上になった処理 3 時間以降、30% 以下の低い値となった。従って、生存茎頂を得るには、ビーズ含水率を 30% 以下に低下させる必要があると考えられる。また、処理対照区における生存率が処理 6 時間以降低下したことは、6 時間以上の乾燥処理により組織が傷害を受ける危険性があることを示している。以上の結果から、クランベリー培養体茎頂をビーズ乾燥法により凍

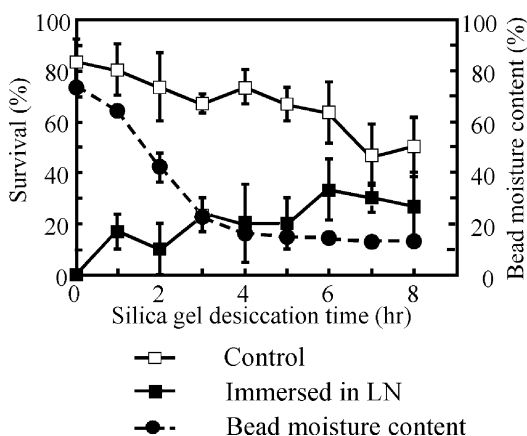


Fig. 17. Effects of silica gel desiccation time for encapsulation-dehydration on survival of cranberry shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

結保存する場合の至適乾燥時間は、凍結保存後の生存率が最も高く、なおかつ乾燥に伴う組織の傷害程度が小さい、6時間であると判断した。

上記3つの凍結保存法のうち、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法はともに、20%以上の生存率を示した。この場合、ビーズガラス化法とビーズ乾燥法を比較すると、ビーズ乾燥法はビーズガラス化法に比べて、生存率が高く、処理温度の設定および操作が簡便である点で優れていた。そのため、クランベリー培養体茎頂の凍結保存にはビーズ乾燥法が適していると判断した。

第2項 ビーズ乾燥法の改良による生存率の向上

前項において、クランベリー培養体茎頂の凍結保存にはビーズ乾燥法が優れていることが判明した。しかし生存率は33.3%と実用化には不十分な値であった。前節の結果を踏まえ、本項ではビーズ乾燥法における生存率の向上を目指し、修正および改良ビーズ乾燥法について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

前項に準じ、低温馴化後のクランベリー培養体から取り出した茎頂を使用した。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、前項に準じて、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解は、前項のビーズ乾燥法に準ずる方法で行った。修正および改良ビーズ乾燥法の詳細は、以下のとおりである。

a) 修正ビーズ乾燥法

ビーズおよびローディング液の両方にグリセリン (0.5, 1.0 および 2.0 M) を添加した。また、いずれにもグリセリンを添加しない区を設け、対照とした。ローディング液へのビーズ浸漬時間は16時間とし、処理後シリカゲルで6時間乾燥処理し、LNへ投入した。LN中に1時間保存した材料を、クライオバイアルごと温水 (38°C) に入れる方法により、急速融解した。

b) 改良ビーズ乾燥法

ローディング液にグリセリン (0.5, 1.0 および 2.0 M) またはサリチル酸 (0.01, 0.1 および 1.0 mM) を添加した。また、グリセリンおよびサリチル酸を添加しない区を設け、対照とした。その他の条件は a) と同様である。

(4) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(5) 調査

培養120日後に、長さ5 mm以上のシュートを有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値 \pm SE で表した。

結果および考察

凍結保存後の組織の生存に及ぼす修正ビーズ乾燥法の影響を Fig. 18 に示す。生存率は、グリセリンの濃度によって変化し、グリセリン 0.5 M 添加区で至適となった。この場合、1.0 M 以上のグリセリン添加区で生存率が低下した原因として、組織が過度の脱水傷害および薬害を受けたことが考えられる。

次に、凍結保存後の組織の生存に及ぼす修正ビーズ乾燥法の影響を Fig. 19 に示す。本実験では前の実験 (Fig. 18) とは異なり、ローディング液にのみグリセリンを添加したが、グリセ

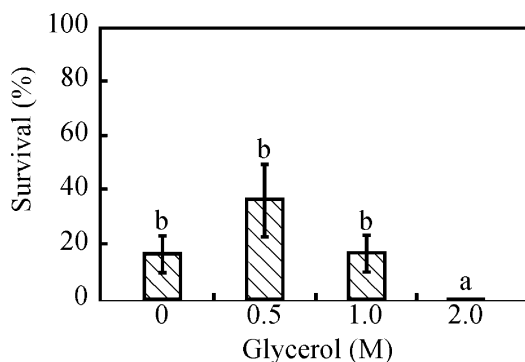


Fig. 18. Effects of concentrations of glycerol added to both beads and loading solution for encapsulation-dehydration on survival of cryopreserved cranberry shoot apices. All specimens were treated with loading solution for 16 hrs, desiccated on silica gel for 6 hrs, and immersed in LN for 1 hr. Values represent mean \pm SE of three determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

リン 0.5 M 添加区の生存率は、Fig. 18 での同濃度のそれと同じ値を示したことから、グリセリンは、ビーズよりローディング液へ添加した場合に、より効果を発揮することがわかった。また、サリチル酸 0.05 mM 単独添加区の生存率 (48.3%) は、グリセリン 0.5 M 単独添加区のそれを上回ったので、両者を混合して添加したところ、86.7% とさらに生存率が高まった。以上のことから、クランベリー培養体茎頂においてグリセリンおよびサリチル酸を併用した改良ビーズ乾燥法は、凍結保存後の生存率の向上に有用であることがわかった。

第3項 他の品種を用いた改良ビーズ乾燥法の有効性の検証

前項において、改良ビーズ乾燥法を用いてクランベリー 'Early Black' 培養体茎頂の凍結保存技術を確立することができた。しかし、技術の汎用性については未検討である。そこで本項では、'Early Black' に加えた 4 品種の培養体を用いて同様の検討を行い、技術の汎用性を確認しようとした。

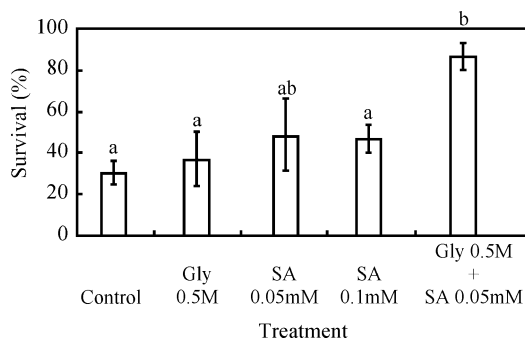


Fig. 19. Effects of glycerol (Gly) and/or salicylic acid (SA) added to loading solution for encapsulation-dehydration on survival of cryopreserved cranberry shoot apices. All specimens were treated with loading solution for 16 hrs, desiccated on silica gel for 6 hrs, and immersed in LN for 1 hr. Values represent mean \pm SE of three determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

材料および方法

(1) 植物材料

クランベリー 'Canadian C. P.', 'Early Black', 'Howes' および 'Stevens' の低温馴化後の培養体茎頂を材料とした。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、本節・第1項に準じて、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解は、本節・第1項のビーズ乾燥法に準ずる方法で行った。材料をビーズに封入後、グリセリン 0.5 M およびサリチル酸 0.05 mM を添加したローディング液に 16 時間浸漬した。その後、シリカゲルで 6 時間乾燥し、LN へ投入した。LN 中に 1 時間保存した材料を、クライオバイアルごと温水 (38°C) に入れる方法により、急速融解した。

(4) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(5) 調査

培養 120 日後に、長さ 5 mm 以上のシュート

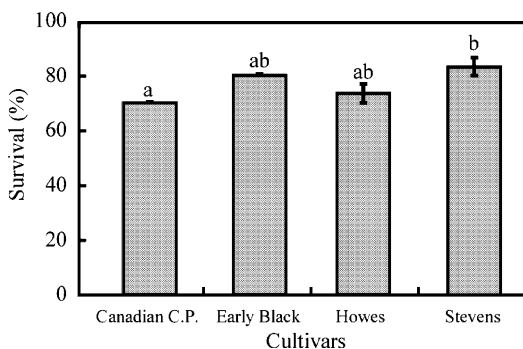


Fig. 20. Varietal differences in survival of cryopreserved cranberry shoot apices using revised encapsulation-dehydration. All specimens were treated with loading solution supplemented with 0.5M Gly and 0.05mM SA for 16 hrs, desiccated on silica gel for 6 hrs, and immersed in LN for 1 hr. Values represent mean \pm SE of three determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

を有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値 \pm SE で表した。

結果および考察

改良ビーズ乾燥法における、生存率の品種間差を Fig. 20 に示す。生存率は70~83.3%と高く、全品種で凍結保存が可能であることが明らかになった。

以上のことより、品種に関係なくクランベリー培養体茎頂の凍結保存には、グリセリンとサリチル酸を併用した改良ビーズ乾燥法が有効であることが明らかになった。

第5節 ブルーベリー培養体組織の凍結生存性に及ぼす凍結・融解法の影響

ブルーベリー (学名 *Vaccinium* spp., 英名 blueberry) は、北米の寒冷地に広く分布するツツジ科スノキ属の落葉果樹で、ハイブッシュブルーベリー (*V. corybossum* L. など)、ローブッシュブルーベリー (*V. angustifolium* Ait.) およびラビットアイブルーベリー (*V. ashei* Reade など) に分けられる。北大園芸学研究室では、

ハイブッシュブルーベリーの組織培養系の確立に成功し³⁷⁾, *in vitro* 培養を利用した種苗の大量増殖が可能になっている。これら培養体は、継代培養によって維持されているが、1~2か月に1回の植え継ぎを必要とし手間がかかるほか、コンタミネーションにより培養体が消失する危険性がある。通常の継代培養とは別に、ブルーベリー培養体組織を長期間安定的に保存する方法の確立が強く求められている。

ブルーベリーの遺伝資源保存については、クランベリーと同様に、種子、枝および培養体組織を低温保存する方法が報告されている⁵⁹⁾。凍結保存に関しては、鈴木²⁶⁾が緩速予備凍結法を用いて、培養体茎頂および野外から採取した茎頂の両方で凍結保存を試みたところ、生存個体がほとんど得られなかったことを報告している。しかし、低温馴化によってわずかに生存個体が得られたことから、凍結保存法および前処理の改良により生存率が高まる可能性がある。

そこで本節では、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いてブルーベリー培養体組織の凍結保存技術の確立を検討した。すなわち、生存率に及ぼすガラス化液処理時間、シリカゲル乾燥処理時間および含水率の影響を検討するとともに、前節の結果を踏まえ、生存率に及ぼすローディング液へのグリセリンおよびサリチル酸添加の影響を検討した。

第1項 高い生存率を実現する凍結・融解法の検討

本項では、ブルーベリー培養体組織の凍結保存技術の確立を目標に、近年開発された3種類の凍結保存法の実用性について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

北大園芸学研究室で継代・維持されているハイブッシュブルーベリー 'Rancoccas' の継代1か月後の培養体を5°C、暗所で2週間低温馴化後、シュート先端部から解剖顕微鏡下で無菌的に摘出した茎頂 (横径約1mm) を材料とした。継代培養は、鈴木らの報告³⁷⁾に従い、ブルーベリー用培地に2ip 10 μ M, GA₃ 1.0 μ M, ショ糖3%および寒天0.7%を添加した培養基 (pH 5.7) を用い、25°C、1日16時間照明 (白

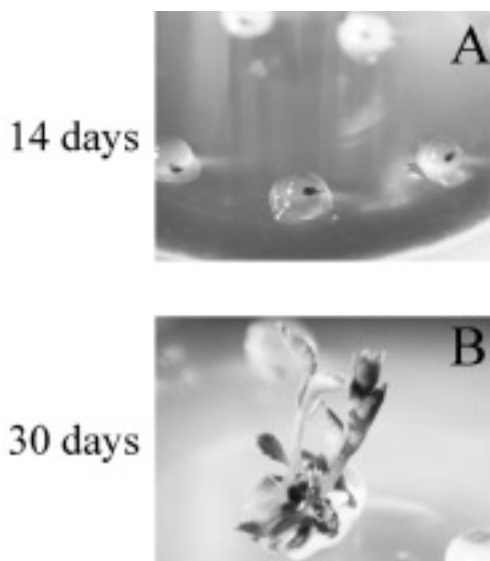


Fig. 21. Plant regeneration from surviving blueberry shoot apices excised from *in vitro*-cultures and cryoreserved using encapsulation-dehydration. Photographs were taken after 14 (A) and 30 days (B) of culture.

色蛍光灯, 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) の条件下で行った。

(2) 前培養

前培養は、本章・第1節の第1項と同様に、ブルーベリー用培地にショ糖 0.4 M および寒天 0.7% を添加した培養基 (pH 5.7) を用い、25°C, 暗所で、24 時間行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解 (ガラス化法, ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法) は、いずれも本章・第1節の第1項と同様の方法で行った。

(4) 培養

植物体再生のための培養は、本項(1)に記した継代培養と同一の培地および培養条件で行った。

(5) 調査

a) 生存率

培養 30 日後に、長さ 5 mm 以上のシュートを生有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1 区あたり 10 茎頂を用いる実験を独立に 3 回行い、結果を平均値 \pm SE で表した。

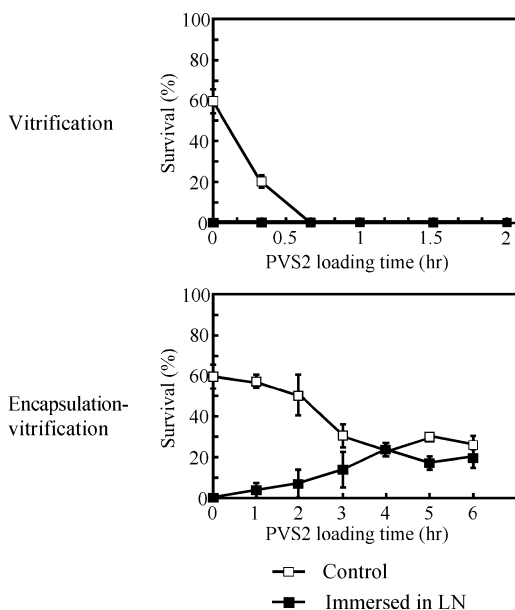


Fig. 22. Effects of PVS2 loading time for vitrification and encapsulation-vitrification on survival of blueberry shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

b) ビーズ含水率

ビーズ乾燥法で、乾燥処理後のビーズ含水率を調査した。調査は、本章・第1節の第1項に準ずる方法で行った。なお、1 区あたりビーズ 20 個を用いる実験を独立に 3 回行い、結果を平均値 \pm SE で表した。

結果および考察

凍結保存後に生存したブルーベリー培養体茎頂は、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法において、培養 14 日前後から葉を展開し始め、培養 30 日後頃にはシュートを形成した (Fig. 21)。培養 30 日後におけるシュートの形状に、顕著な差は認められなかったことから、組織の生存に及ぼす各種凍結保存法の影響については、培養 30 日後に行った。

ガラス化法およびビーズガラス化法で凍結した組織の生存に及ぼすガラス化液 (PVS2 液) 処理時間の影響を Fig. 22 に示した。ガラス化法では、PVS2 液処理時間の長短にかかわらず、生存茎頂が得られなかったことから、ブルーベ

リー培養体組織の凍結保存にガラス化法は適さないことがわかった。一方、ビーズガラス化法における凍結保存後の生存率は、いずれもPVS2液処理により増大した。この場合、生存率はPVS2液処理時間の影響を受け、4時間処理後の材料で最高値(23.3%)を示し、その後ほぼ一定の値で推移したため、ビーズガラス化法を用いて凍結保存する場合の至適PVS2液処理時間は、4時間であることがわかった。

次に、ビーズ乾燥法で凍結した組織の生存およびビーズ含水率に及ぼす乾燥時間の影響をFig. 23に示した。凍結保存後の生存率は、乾燥時間の影響を受けて変化した。すなわち、乾燥0～3時間処理まで0%であった生存率は、その後漸増し、乾燥6時間処理で26.7%の最高値を示した後、わずかに低下した。この場合、ビーズ含水率も大きく変化し、当初約70%以上であったビーズ含水率は、乾燥処理により漸減し、生存茎頂が得られるようになった処理4時間以降、20%以下の低い値となった。従って、生存茎頂を得るには、ビーズ含水率を20%以下に低下させる必要があると考えられる。また、処理対照区における生存率が処理6時間以降低下したことは、6時間以上の乾燥処理により組織が傷害を受ける危険性があることを示している。以上の結果から、ブルーベリー培養体茎頂をビーズ乾燥法により凍結保存する場合の至適乾燥時間は、凍結保存後の生存率が最も高く、なおかつ乾燥に伴う組織の傷害程度が小さい、6時間であると判断した。

上記3つの凍結保存法のうち、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法はともに、20%以上の生存率を示した。この場合、ビーズガラス化法とビーズ乾燥法を比較すると、処理時間が短い点から見れば、ビーズガラス化法が有効であると思われるが、ビーズ乾燥法はビーズガラス化法に比べて、処理温度の設定および操作が簡便である点で優れていたため、ブルーベリー培養体茎頂の凍結保存にはビーズ乾燥法が適していると判断した。

第2項 ビーズ乾燥法の改良による生存率の向上

前項において、ブルーベリー培養体茎頂の凍

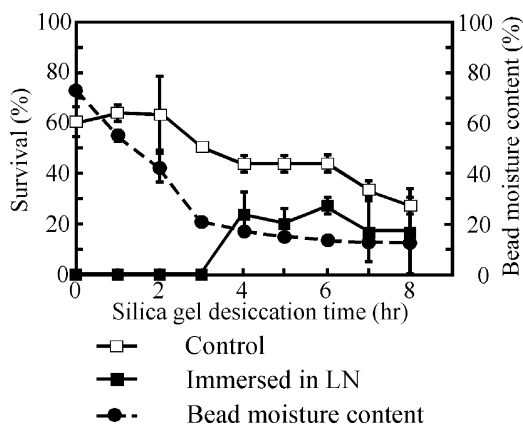


Fig. 23. Effects of silica gel desiccation time for encapsulation-dehydration on survival of blueberry shoot apices with or without immersion in LN. Values represent mean \pm SE of three determinations.

結保存では、ビーズ乾燥法を用いることで生存個体を得ることができたが、生存率が26.7%と低く、更なる改良が必要となった。前節において、グリセリンおよびサリチル酸を併用する改良ビーズ乾燥法を用いて、クランベリー培養体茎頂の凍結保存に成功した。本項では、改良ビーズ乾燥法における、ローディング液へのグリセリンおよびサリチル酸添加が組織の生存に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

植物材料は、前項に準じ、低温馴化後のブルーベリー培養体の茎頂を使用した。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、前項に準じて、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解は、前項のビーズ乾燥法に準ずる方法で行った。作製したビーズをグリセリン(0.5および1.0 M)またはサリチル酸(0.05および0.1 mM)を添加したローディング液に16時間浸漬した。また、ローディング液にグリセリンおよびサリチル酸を添加しない区を設け、対照とした。処理後、シリカゲルで6時間乾燥処理し、LNへ投入した。LN中に1時間保存し

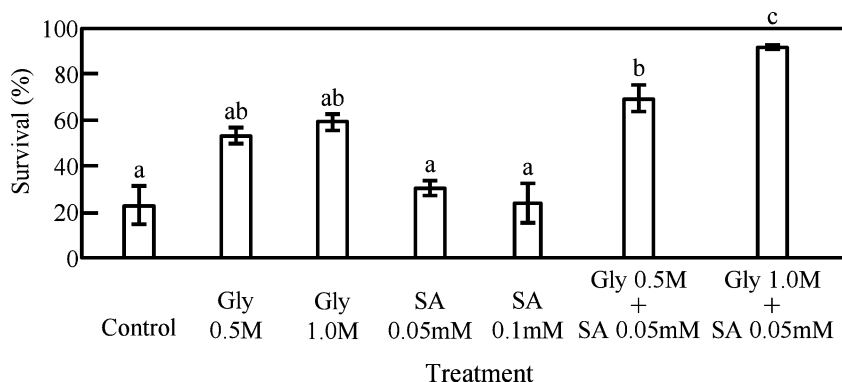


Fig. 24. Effects of glycerol (Gly) and/or salicylic acid (SA) added to loading solution on survival of cryopreserved blueberry shoot apices using encapsulation-dehydration. All specimens were treated with loading solution for 16 hrs, desiccated on silica gel for 6 hrs, and immersed in LN for 1 hr. Values represent mean±SE of three determinations. The differences in mean values of any two columns labeled with different letters are statistically significant (Tukey's HSD at $p < 0.05$).

た材料を、クライオバイアルごと温水（38℃）に入れる方法により、急速融解した。

(4) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(5) 調査

培養30日後に、長さ5mm以上のシュート有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

結果および考察

改良ビーズ乾燥法における、組織の生存に及ぼすローディング液に添加したグリセリンおよびサリチル酸の影響をFig. 24に示す。生存率は、サリチル酸単独添加区において、最高でも30.0%と低かった。一方、グリセリン単独添加区では最高で60.0%と比較的高く、グリセリン添加による生存率の向上が認められた。さらに、サリチル酸0.05mM+グリセリン1.0Mを併用した区の生存率は、90.0%と最も高い値を示し、両試薬の併用が有効であることがわかった。以上のことから、ブルーベリー培養体茎頂の凍結保存には、改良ビーズ乾燥法は有効であり、特に、ローディング液にグリセリン1.0Mおよびサリチル酸0.05mMを添加し、乾燥6時間処理を行う方法が適していることが明らかになった。

第3項 他の品種を用いた改良ビーズ乾燥法の有効性の検証

前項において、改良ビーズ乾燥法を用いてブルーベリー‘Rancoccas’培養体茎頂の凍結保存技術を確立することができた。しかし、技術の汎用性については未検討である。そこで本項では、‘Rancoccas’に加えて‘Concord’の培養体を用いて同様の検討を行い、技術の汎用性を確認しようとした。

材料および方法

(1) 植物材料

ハイブッシュブルーベリー‘Rancoccas’および‘Concord’の低温馴化後の培養体茎頂を材料とした。

(2) 前培養

材料の凍結抵抗性を高めるために、本節・第1項に準じて、材料全てに糖添加培地を用いて前培養を行った。

(3) 凍結・融解処理

凍結・融解は、本節・第1項のビーズ乾燥法に準ずる方法で行った。材料をビーズに封入後、グリセリン1.0Mおよびサリチル酸0.05mMを添加したローディング液に16時間浸漬した。その後、シリカゲルで6時間乾燥し、LNへ投入した。LN中に1時間保存した材料を、クライオバイアルごと温水（38℃）に入れる方法により、急速融解した。

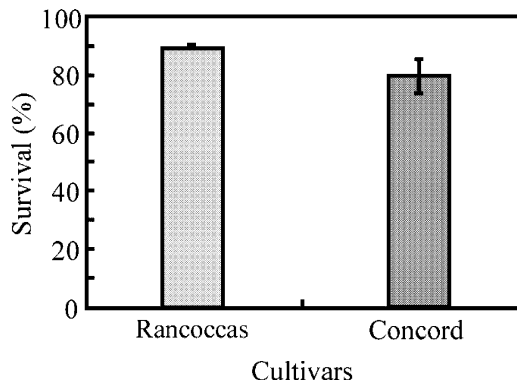


Fig. 25. Varietal differences in survival of cryopreserved blueberry shoot apices using revised encapsulation-dehydration. All specimens were treated with loading solution containing 1.0M glycerol and 0.05mM salicylic acid for 16 hrs, desiccated on silica gel for 6 hrs, and immersed in LN for 1 hr. Values represent mean \pm SE of three determinations.

(4) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(5) 調査

培養30日後に、長さ5mm以上のシュート有する再生植物体を生存個体として調査し、生存率を算出した。なお、1区あたり10茎頂を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値 \pm SEで表した。

結果および考察

改良ビーズ乾燥法における、生存率の品種間差をFig. 25に示す。生存率は‘Rancoccas’が90.0%、‘Concord’が80.0%と高かった。

以上のことより、品種にかかわらずブルーベリー培養体茎頂の凍結保存には、グリセリンとサリチル酸を併用した改良ビーズ乾燥法が有効であることが明らかになった。

第6節 第1章の考察

本章の目的は、従来凍結保存が困難であった5種類の北方系果樹の培養体組織を材料として、有効な凍結保存法を確立することである。本研究では、近年報告されている新しい3種類の方法（ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法）を用いて、これら培養体組織の

凍結保存を検討した。

第一に、5種類の植物材料を植物分類学的に類別し、比較すると以下ようになる。バラ科に属するアロニアおよびサンザシはともに、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いた場合62.5~77.8%の比較的高い生存率を示した。同じバラ科のイチゴ、リンゴおよびナシでも凍結保存の研究が進んでいることから、バラ科植物は凍結保存が比較的容易なグループであると考えられる。スイカズラ科に属するハスカップはビーズ乾燥法を用いて生存率93.3%を示し、バラ科と同様に凍結保存が容易なグループであることが予想される。一方、ツツジ科に属するクランベリーおよびブルーベリーは、凍結法にかかわらず、いずれも最高値で33.3%および26.7%の低い生存率しか得られなかったことから、ツツジ科植物は一般に凍結保存が難しいグループであることが予想される。従って、同じ北方圏に生息する植物においても、凍結保存の難易に差があり、植物分類学上の類縁関係は、凍結保存の可否にも影響を及ぼすものと考えられる。

第二に、3種類の凍結保存法を比較すると、5種類の培養体組織において安定して生存個体が得られたのは、ビーズ乾燥法であった。この場合、生存率に最も強く影響を及ぼす要因は、乾燥処理時間、すなわち組織内の含水率であり、検討した全ての材料において、含水率が20%前後の時に生存率が最高となった。この値は、ビーズ乾燥法に関する他の報告¹¹⁾⁶⁰⁾⁻⁶³⁾およびその他の乾燥法における報告⁶⁴⁾⁶⁵⁾と同様であることから、20%前後の含水率が凍結保存に適していると考えられる。この原因として、含水率20%前後の組織内では、残存する溶液が凍結時にガラス状を呈しているという報告があることから⁶³⁾⁶⁶⁾、細胞内溶液のガラス化によって、細胞内凍結が生じにくくなり、凍結傷害が軽減されたものと考えられる。しかし、凍結保存しにくいクランベリーおよびブルーベリーはもとより、凍結保存が比較的容易なアロニアおよびサンザシについても、従来のビーズ乾燥法では実用化に不十分な生存率しか得られなかった。そこで、本研究ではビーズ乾燥法の改良によって

生存率を高める必要があった。

凍結保存における材料の前処理法として、従来、低温馴化³⁰⁾⁶⁷⁾、アブシジン酸(ABA)⁶⁸⁾または高濃度の糖を含む培地での前培養^{19)47)–50)}が有効であることが報告されている。また、ビーズ乾燥法における改良法として、ビーズおよびローディング液にグリセリン¹¹⁾⁵¹⁾やサリチル酸⁵⁵⁾を各々単独で添加した方法が報告されている。グリセリンの凍害防御効果は古くから知られていて、グリセリンは重要な凍害防御物質として、動植物を問わず凍結保存に広く用いられている⁵⁾⁶⁾¹³⁾¹⁴⁾²²⁾⁶⁹⁾⁷⁰⁾。また、ビーズ乾燥法におけるグリセリンの作用機作に関し、Matsumoto and Sakai¹¹⁾は、グリセリンがビーズの硬化を防ぎ、乾燥時の収縮による組織・細胞の圧迫傷害を回避させていると指摘した。また、サリチル酸は、植物組織の病害抵抗性や耐凍性との関連で報告が多く^{71)–73)}、Tasgin et al.⁷⁴⁾は、サリチル酸で処理したコムギの葉の耐凍性が増大したことを報告している。さらに、Bernarld et al.⁵⁵⁾は、Persian lilac 胚軸の凍結保存において、ビーズおよびローディング液にサリチル酸を添加することにより、生存率が高まったことを報告している。

本研究では、これらの報告を受け、ビーズ乾燥法におけるローディング液に凍害防御物質としてグリセリンを添加するとともに、組織のストレス抵抗性を高めるためにサリチル酸を添加した。その結果、グリセリンまたはサリチル酸を単独で添加した場合には生存率の著しい向上は認められなかったのに対し、両試薬を併用添加することにより、生存率が飛躍的に上昇することを見出した。特に、従来の方法では低い生存率しか得られなかったツツジ科のクランベリーおよびブルーベリー培養体組織においても、85%以上の高い生存率を再現性良く実現することができた。

しかしながら、両試薬を併用することにより、なぜこれほどまでに生存率が高まったのであろうか。サリチル酸は、植物組織の様々なストレス抵抗性発現に関与すると言われているが、ローディング液に浸漬された植物組織中で、短期間にストレス抵抗性が誘導されたとは考えに

く。他方、サリチル酸は、人体の角質層などに浸透しやすく、高濃度で用いた場合には腐食性を示すため、疣を除去する塗り薬に添加され使用されている。したがって、細胞・組織の膜系に作用しその浸透性を変化させている可能性がある。また、グリセリンは有用な凍害防御物質ではあるが、Me₂SOなどに比べると高分子で粘性が高いため、細胞・組織への浸透性が悪いことが一つの特徴である。これらの試薬を混合して使用することにより、凍結保存する植物細胞における細胞膜・壁の浸透性がサリチル酸によって増大し、その結果グリセリンが細胞内へ浸透できるようになり、細胞・組織の生存率が飛躍的に高まった可能性が考えられる。

第2章 凍結保存後の再生植物体における成長促進現象の追跡とその原因の解析

植物組織の凍結保存は、植物遺伝資源保存技術の一つとして位置付けられている。そのため、研究の最重要課題は、凍結保存した組織の生存率を向上させ、植物体の再生率を高め、遺伝的に同一のクローン個体を再生させることである。その実現のために、凍結媒液の組成および低温馴化などの凍結前処理について、様々な検討が行われてきた^{5)6)19)20)30)47)–50)67)68)70)}。その結果、ガラス化法やビーズ乾燥法など、今日用いられている複数の凍結保存法が確立されるに至ったわけだが、視点を変えると、生存率以外の指標に着目して、各凍結保存法を評価した例は皆無に等しい。

Suzuki et al.³⁵⁾は、緩速予備凍結法を用いて凍結保存したアスパラガス培養体組織から再生した植物体において、凍結処理を施さなかった組織のそれよりも発根率が向上し、その後の成長が旺盛になる現象を見出し、凍結保存後の植物体の生育と凍結・融解操作との関連について言及した。しかし、成長促進現象と最も密接に関連する凍結・融解の過程の意義については明らかにされておらず、そのメカニズムについても未解明のまま残されている。

第2章ではこの点に着目し、まず第1節の第1項において、アスパラガス培養体組織を緩速予備凍結する際の諸条件について検討すると

もに、品種および雌雄を変えて実験を行い、再生植物体に見られる成長促進現象の普遍性を確認しようとした。次に、第1節の第2項では、緩速予備凍結法とそれ以外の凍結保存法（ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法）を再生植物体の成長という観点から比較し、各々の凍結保存法の特徴を浮き彫りにしようと考えた。この場合、凍結保存後の再生植物体における成長促進はアスパラガス特有の現象か、あるいはそれ以外の植物にも起こりうるのかとの疑問点を明らかにするため、これらの凍結保存法によって生存個体が得られるホースラディッシュ培養体組織を用いて、アスパラガスと同様の検討を行い、両者を比較した。

また、第2節において、凍結保存後の再生植物体における成長促進現象を細胞・組織レベルで理解するため、各々の方法で凍結保存したアスパラガス組織を透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope；TEM）を用いて観察し、生存細胞の微細な特徴を明らかにしようとした。さらに、第3節では、凍結保存後の再生植物体に見られる成長促進現象を分子生物学の観点から理解するため、成長促進が見られた緩速予備凍結区および成長促進が見られなかったそれ以外の区においてホースラディッシュ生存組織の遺伝子発現パターンをDNAマイクロアレイ法（DNA microarray）を用いて網羅的に解析し、その特徴を凍結保存法との関連で比較しようと考えた。

最後に、第4節において第1節～第3節で得られた結果について総合的に考察を加えた。

第1節 凍結保存後の再生植物体の成長促進現象の追跡

第1項 緩速予備凍結法で凍結保存したアスパラガス再生植物体における成長促進現象の解析

本項では、緩速予備凍結法で凍結保存したアスパラガス組織からの再生植物体における成長促進現象の普遍性とその原因を明らかにする目的で凍結温度、凍害防御物質の組成ならびに品種および雌雄を変えて検討を行った。

1. 凍結温度の影響

アスパラガス再生植物体に見られる成長促進

現象が液体窒素温度（ -196°C ）に依存するのか、あるいは凍結過程に原因があるのかという点については不明である。そこで、緩速予備凍結（ -40°C ）後 LN 浸漬を行わずに融解・培養した区における再生植物体の成長を、LN 浸漬区のそれと比較した。

(1) 植物材料

北大園芸学研究室で継代・維持されているアスパラガス（*Asparagus officinalis* L. cv. Mary Washington 500W）の継代3か月後の培養体シュートから、無菌的に切り出した節部切片（長さ約2 mm）を材料とした。継代培養は、Kumu et al.⁴⁾の報告に従い、MS 培地の無機塩組成のうち、窒素成分の濃度を半分に減じた培地に kinetin 0.1 mg/l, 1-naphthalene acetic acid (NAA) 0.1 mg/l, ショ糖 3% および寒天 0.7% を添加した培養基 (pH 5.7) を用い、 25°C 、1日16時間照明（白色蛍光灯、 $60\ \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ）の条件下で行った。

(2) 凍結・融解処理

材料の凍結・融解は、Suzuki et al.³⁵⁾に従い、緩速予備凍結法を用いて行った。すなわち、材料を12% (v/v) Me_2SO 溶液で満たした1 ml 容量ストロー精液管（長さ12.3 cm、口径3.5 mm；富士平工業製）に12個ずつ入れ、ポリビニルアルコール（重合度500）でストロー精液管の端を封じた後、 20°C で2時間静置した。さらに、材料をストロー精液管ごとプログラムフリーザー（Cryoembryo-HPA；ホクサン製）の冷却板上に並べ、 0°C から -40°C まで $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した。この際、 -8°C で植水を行い、 -8°C に30分間保持した。 -40°C に達した材料をLNに投入し、LN中に1時間静置した。融解は、LNから取り出したストロー精液管を温水（ 38°C ）に入れることによる、急速融解とした。なお、ストロー内の溶液の温度変化については、銅-コンスタンタン熱電対（Chino製、EB 22005 温度記録計）を用いてモニタリングした。

本実験では、凍結区として -40°C まで緩速予備凍結後 LN に投入した -196°C (LN) 区および -40°C まで緩速冷却後 LN に投入せずに融解し培養した -40°C 区の2区を設けた。また、材料を凍結せずに継代培養しただけの区を設

け、対照区とした。

(3) 培養

植物体再生のための培養は、本項の植物材料に記した継代培養と同一の培養条件で行った。

(4) 調査

培養 30, 60 および 90 日後に、長さ 5 mm 以上伸長したシュートを有する再生植物体をシュート形成個体として調査し、植物体あたりのシュート数ならびに発根率を調査した。なお、1 区あたり 48 個の節部切片を用いる実験を独立に 3 回行い、結果を平均値±SE で表した。

結果および考察

アスパラガス再生植物体の成長に及ぼす凍結温度の影響を Fig. 26 に示す。シュート数は -196°C 区および -40°C 区のいずれにおいても同様に増加し、培養 30 日後には対照区のそれと変わらなかったが、次第に対照区より多くなり、培養 90 日後には対照区の 2 倍以上の値を示した。

発根率は、-196°C 区および -40°C 区のいずれも培養 30 日後以降、対照区のそれよりも高い値を示し、培養 90 日後には対照区の約 2 倍の値を示した。

以上のことより、アスパラガス再生植物体の成長促進現象は、-196°C 区のみならず -40°C 区でも認められたことから、その発生要因は -40°C までの緩速予備凍結の過程にあるものと考えられる。

2. Me₂SO の薬害の可能性の検討

緩速予備凍結法では、一般に凍害防御物質としてジメチルスルホキシド (Me₂SO) が用いられるが、Me₂SO に弱い毒性があり、これが植物の成長に影響を及ぼすことが知られている³³⁾。本研究では、凍結媒液に添加した Me₂SO が成長促進現象を引き起こした可能性を検証するため、Me₂SO 以外の凍害防御物質としてトレハロースおよびラフィノースに着目し、これらを用いて緩速予備凍結法により凍結した組織における、再生植物体の成長量の変化を調査した。

材料および方法

(1) 植物材料

本節・第 1 項に準じ、アスパラガス培養体シュートから切り出した節部切片を材料とし

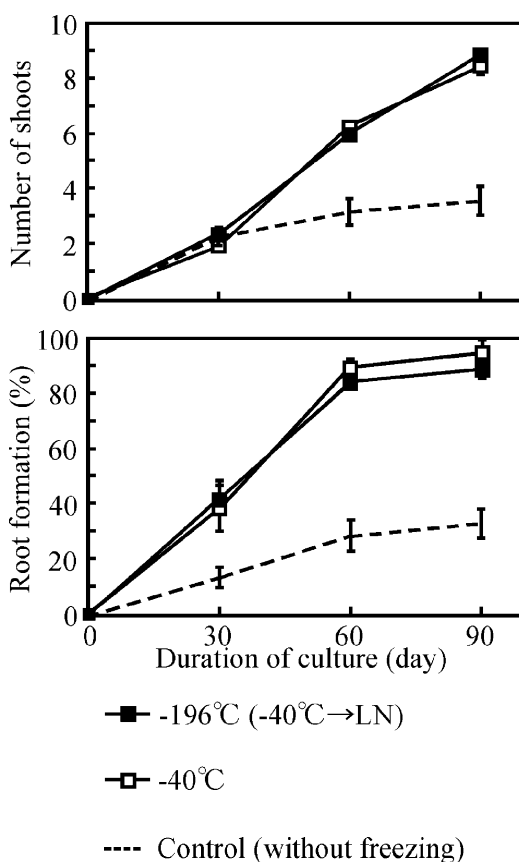


Fig. 26. Effects of slow-prefreezing with or without immersion in LN (-196°C) on the growth of asparagus regenerates. Slow-prefreezing was performed at a rate of 0.5°C/min from 0 to -40°C with freezing solution containing 12% (v/v) Me₂SO. Thawing was made in warm water at 38°C. Values show mean±SE of three determinations.

た。

(2) 凍害防御物質

Me₂SO を含め、有機溶媒は一般に弱い薬害を有するため、本研究では、凍害防御物質として、生体内に存在する糖類に着目した。その中でも、凍害防御効果が比較的大きいことが確認されている⁷⁵⁾トレハロース (1.0 M) およびラフィノース (0.6 M) を凍結媒液に用いた。材料の凍結および融解は、本節・第 1 項に準じて緩速予備凍結法により行った。なお、本実験では、-40°C 冷却区 (Cooled to -40°C) のほか、対照

区 (Control) および凍害防御物質に浸漬しただけの処理対照区 (Treated control) を設けた。

(3) 培養

植物体再生のための培養は、本節・第1項に記した継代培養と同一の培養条件で行った。

(4) 調査

本節・第1項に準じて、植物体あたりのシュート数および発根率を調査した。

結果および考察

アスパラガス組織の生存率は、トレハロース添加区が20.2%、ラフィノース添加区が35.2%と Me_2SO を用いた場合より低かったが、生存組織片からはいずれも再生植物体を得られたことから、再生植物体の成長量の変化を Fig. 27 に示した。再生植物体のシュート数は、培養60日後以降、対照区および処理対照区を上回り、

培養90日後にはそれらの2.2~3.0倍の値を示した。また、発根率も培養60日後以降、対照区および処理対照区よりも高い値を示すようになり、培養90日後における発根率(トレハロース添加区, 100%; ラフィノース添加区 91.1%)は、対照区および処理対照区の1.8~3.3倍の値であった。これらの数値は、 Me_2SO を凍結媒液に添加した場合のそれ (Fig. 26) に匹敵するものであり、凍害防御物質として Me_2SO を用いない場合にも、凍結保存後の再生植物体に成長促進が見られることが明らかになった。したがって、この成長促進現象は Me_2SO の薬害が原因で生ずるものではないと考えられる。

3. 凍結保存後の成長促進現象の品種および雌雄間差

本研究では、これまでアスパラガスの 'Mary

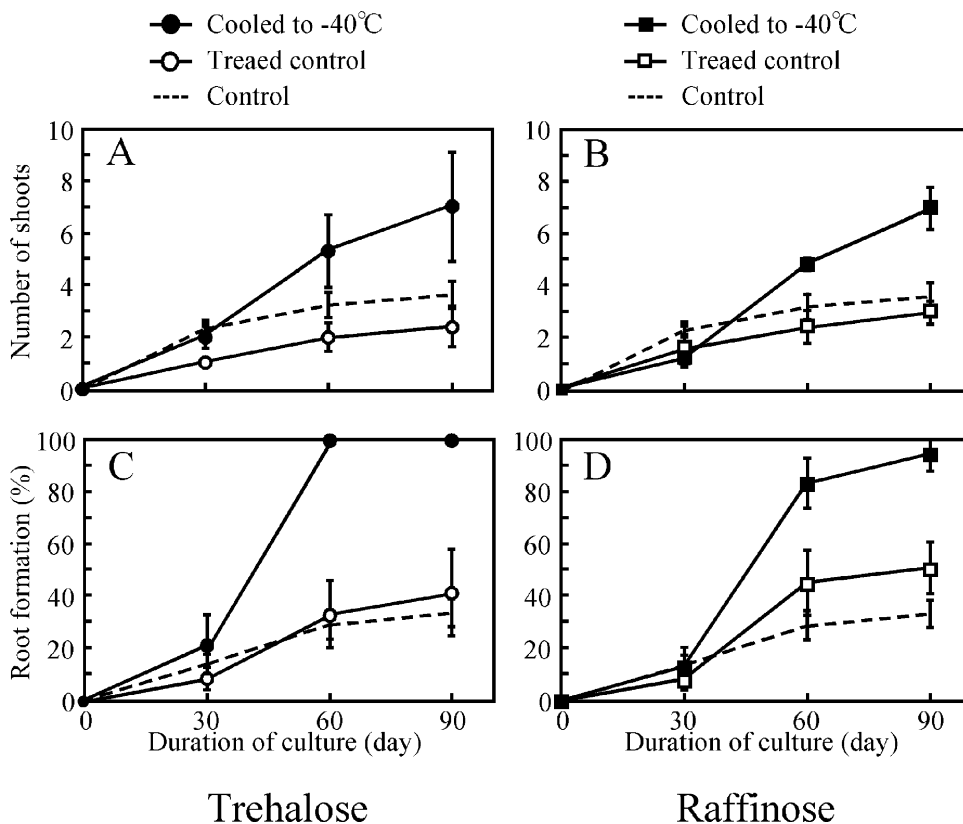


Fig. 27. Time course changes of the growth of asparagus regenerates obtained from slow-prefrozen specimens. Slow-prefreezing was performed at a rate of 0.5°C/min from 0 to -40°C with a freezing solution containing 1.0M trehalose (A, C) or 0.6M raffinose (B, D). Values show mean \pm SE of three determinations.

Washington 500W' のみを材料として使用してきた。したがって、'Mary Washington 500W' 以外の品種を用いて、凍結保存後の成長促進現象を確認していない。同様に、雌雄間差についても未検討の課題として残されている。そこで、アスパラガスの多数の品種ならびに雌株および雄株を用いて従来と同様の検討を行った。

材料および方法

(1) 植物材料

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場に栽植されている15年生アスパラガス('Gold schatz', 'Ruhm von Braunschweig', 'Viking', '瑞洋 [Zuiyoh]')の雌株、雄株ならびに超雄株'ZM19'から、茎頂を無菌的に取り出し、本節・第1項の方法で培養した。培養1か月後のシュートから切り出した節部切片を材料とした。

(2) 凍結・融解処理

凍結・融解の方法は、本節・第1項に準じ、緩速予備凍結法を用いて行った。処理区として、凍結保存区(Cryopreserved)のほか、継代培養

のみを行った対照区を設けた。

(3) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(4) 調査

本節・第1項に準じて、培養90日後に植物体あたりのシュート数および発根率を調査した。一区あたり12個の節部切片を用いる実験を独立に3回行い、結果を平均値±SEで表した。

結果および考察

凍結保存後の再生植物体の成長量を品種および雌雄間で比較した結果をTable.2に示す。植物体あたりのシュート数は、対照区において1.1~4.2本と品種・雌雄ならびに凍結保存区において6.0~10.9本と、品種および雌雄で差が見られたが、凍結保存区において対照区の2.6~5.5倍の値を示した。

発根率も、対照区で2.8~47.2%ならびに凍結保存区で71.3~100%と、品種や雌雄で差はあったが、凍結保存区において対照区の2.1~25.5倍の値を示した。

凍結保存後の再生植物体は、雌雄にかかわら

Table. 2. Varietal and sexual differences in the growth of asparagus regenerates in slow-prefreezing cryopreservation.

Cultivar	Sex	Cryopreservation	Number of shoots	Root formation (%) ^z
Gold schatz	Male	Control	2.6 ± 0.7 ^y	16.7 ± 8.3 ^y
		Cryopreserved	7.9 ± 1.7	100 ± 0
	Female	Control	2.0 ± 0.3	27.8 ± 5.6
		Cryopreserved	6.7 ± 0.9	90.6 ± 3.3
Ruhm von Braunschweig	Male	Control	2.4 ± 0.2	13.9 ± 13.9
		Cryopreserved	8.4 ± 0.9	89.8 ± 6.5
	Female	Control	1.1 ± 0.4	2.8 ± 2.8
		Cryopreserved	6.0 ± 0.9	71.3 ± 6.5
Viking	Male	Control	1.8 ± 0.4	47.2 ± 7.3
		Cryopreserved	7.4 ± 1.6	97.0 ± 3.0
	Female	Control	2.8 ± 0.4	16.7 ± 4.8
		Cryopreserved	8.1 ± 0.8	80.5 ± 5.4
Zuiyoh	Male	Control	1.7 ± 0.5	41.7 ± 4.8
		Cryopreserved	8.7 ± 1.0	100 ± 0
	Female	Control	2.1 ± 0.3	16.7 ± 8.3
		Cryopreserved	6.9 ± 1.1	95.2 ± 4.8
Zuiyoh	Supermale	Control	4.2 ± 0.4	30.6 ± 2.8
		Cryopreserved	10.9 ± 3.3	100 ± 0

^zNumber of specimens formed root / Number of surviving specimens × 100 (%)

^yValues represent mean ± SE of three determinations.

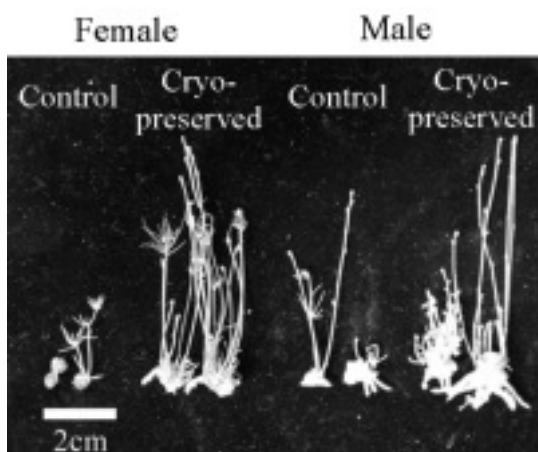


Fig. 28. Sexual differences in the growth of asparagus regenerates in slow-prefreezing cryopreservation. Photographs were taken after 90 days of culture. Cultivar, 'Ruhm von Braunschweig'.

ず、シュートおよび根を旺盛に形成していた (Fig. 28)。

以上のことより、品種や雌雄に関係なく、凍結保存後のアスパラガス再生植物体は旺盛な成長を示したことから、成長促進現象はアスパラガスに共通に認められる現象であることがわかった。

第2項 凍結保存法の違いが再生植物体の成長促進に及ぼす影響

前項において、緩速予備凍結法を用いた凍結保存が再生植物体の成長を促進する現象がアスパラガスでは普遍的であることが確認された。しかし、第1章で検討した緩速予備凍結法以外の凍結保存法が同様の作用を有するかについては未検討である。また、アスパラガス以外の材料については、これまで全く検討がなされていない。そこで本項では、アスパラガスのほか新たにホースラディッシュ培養体を材料とし、緩速予備凍結法に加えて、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いて凍結保存を行い、各凍結法が再生植物体の成長に及ぼす影響について検討した。

1. アスパラガス

材料および方法

(1) 植物材料

本節・第1項に従い、アスパラガス培養体のシュートから切り出した節部切片を材料とした。

(2) 凍結保存法

緩速予備凍結法、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法の4つの方法を用いた。また、節部切片を継代培養しただけの対照区を設けた。凍結法の詳細は、以下の通りである。

a) 緩速予備凍結法

本節・第1項に準じて行った。

b) ガラス化法

第1章の第1節・第1項に準じて行った。PVS2 浸漬時間は、第1章の実験結果を踏まえて1時間とした。

c) ビーズガラス化法

第1章の第1節・第1項に準じて行った。PVS2 浸漬時間は、第1章の実験結果を踏まえて4時間とした。

d) ビーズ乾燥法

第1章の第1節・第1項に準じて行った。シリカゲル乾燥処理時間は、第1章の実験結果を踏まえて6時間とした。

(3) 培養

培養条件は、本節・第1項と同様である。

(4) 調査

本節・第1項に準じて、植物体あたりのシュート数および発根率を調査した。

結果および考察

凍結保存後の生存率は、緩速予備凍結法で67.4%、ガラス化法で38.1%、ビーズガラス化法で82.5%およびビーズ乾燥法で67.5%を示し、凍結保存法によって異なったが、いずれも再生植物体が得られた。これら再生植物体のシュート数および発根率に及ぼす凍結保存法の影響を Fig. 29 に示す。緩速予備凍結区のシュート数は、培養60日後以降他の凍結区のそれを上回り、培養90日後には1.6~1.8倍の値を示した。また、各凍結保存区における培養30日後の発根率は、8~42%を示し、処理区間に

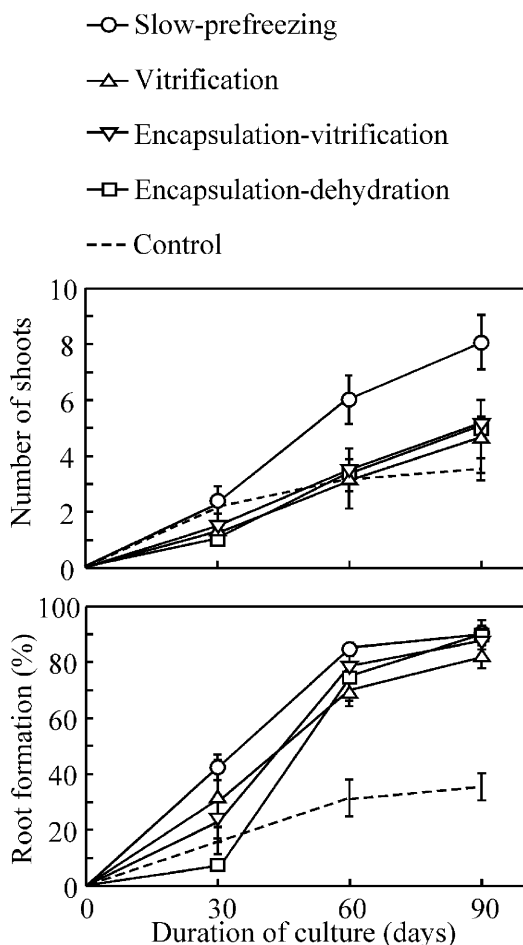


Fig. 29. Effects of cryopreservation methods on the growth of asparagus regenerates. Values show mean \pm SE of three determinations.

ばらつきが見られたが、培養 60 日後以降、70% 以上の高い値となり、いずれも対照区と比べて 2.3~2.9 倍の数値であった。培養 90 日後のアスパラガス再生植物体の様子を Fig. 30 に示す。緩速予備凍結区は、1つの節部切片から形成したシュート数が多く、シュートは明るい緑色を呈しており、対照区に比べて発根も旺盛であることがわかる。その他の凍結保存区においても発根は旺盛であったが、シュート数は緩速予備凍結区に比べて少なく、シュートの色も暗い緑色や紫色を呈していた。

以上のことより、アスパラガス再生植物体の発根率は、凍結法にかかわらず凍結保存後に高

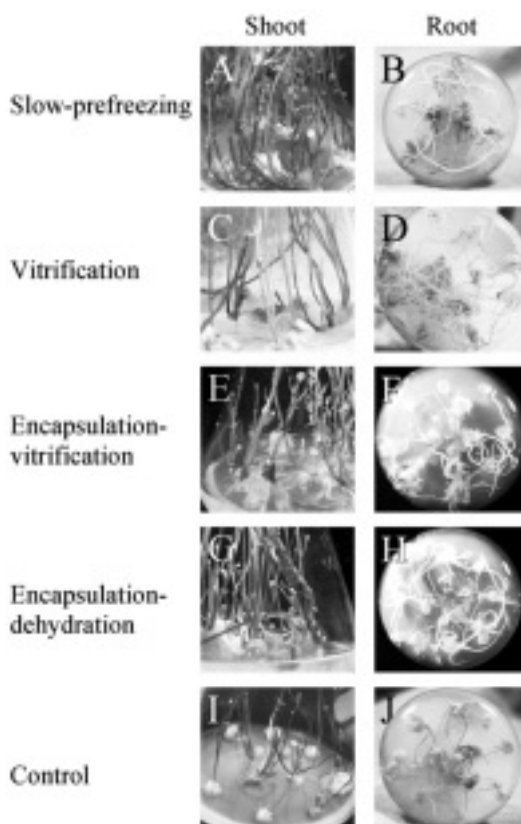


Fig. 30. Comparison of the growth of asparagus regenerates in four different cryopreservation methods. Photographs were taken after 90 days of culture. Slow-prefreezing (A, B); Vitrification (C, D); Encapsulation-vitrification (E, F); Encapsulation-dehydration (G, H); Control (I, J).

くなること、ならびにシュート数は緩速予備凍結区のみで増加することがわかった。したがって、緩速予備凍結法に見られたシュート数の増大は、発根率の上昇に伴うものではないと考えられる。

2. ホースラディシュ

材料および方法

(1) 植物材料

金印わさびオホーツク(株)から分譲を受け、北大園芸学研究室で1年間継代・維持しているホースラディシュ (*Armoracia rusticana* P. Gaertn., B. Mey. Et Scherb. cv. Hakuho) の継代3か月後の培養体から解剖顕微鏡下で無菌

的に取り出した茎頂(横径約1 mm)を材料とした。継代培養は、MS培地にBA 0.1 mg/l, ショ糖3%および寒天0.7%を添加した培養基(pH 5.7)を用い、25°C, 1日16時間照明(白色蛍光灯, 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)の条件下で行った。

(2) 凍結保存法

緩速予備凍結法, ガラス化法, ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法の4つの方法を用いた。また, 茎頂を継代培養しただけの対照区を設けた。緩速予備凍結法は, 0.6 M ラフィノースを含むMS固形培地に, 暗所で2日間の前培養を行った。凍結法の詳細は, 以下の通りである。

a) 緩速予備凍結法

本節・第1項に準じて行った。

b) ガラス化法

第1章の第1節・第1項に準じて行った。PVS2浸漬時間は, 第1章の実験結果を踏まえて1時間とした。

c) ビーズガラス化法

第1章の第1節・第1項に準じて行った。PVS2浸漬時間は, 第1章の実験結果を踏まえて6時間とした。

e) ビーズ乾燥法

第1章の第1節・第1項に準じて行った。シリカゲル乾燥処理時間は, 第1章の実験結果を踏まえて6時間とした。

(3) 培養

植物体再生のための培養は, 本項の植物材料に記した継代培養と同一の培養条件で行った。

(4) 調査

培養30, 60および90日後に, 長さ5 mm以上伸長したシュートを有する再生植物体をシュート形成個体として調査し, 植物体あたりの葉数ならびに根数を調査した。なお, 1区あたり32茎頂を用いる実験を独立に3回行い, 結果を平均値 \pm SEで表した。

結果および考察

凍結保存後の生存率は, 緩速予備凍結法で13.3%, ガラス化法で33.3%, ビーズガラス化法で76.0%およびビーズ乾燥法で59.8%を示し, 凍結法ごとに異なっていたが, いずれも再生植物体が得られた。再生植物体の成長量に及

ぼす凍結保存法の影響をFig. 31に示す。葉数は, 緩速予備凍結区における培養60日後以降, 他の凍結区を上回り, 培養90日後には2.2~2.9倍の値を示した。発根は, 再生した全ての植物体において確認された。この場合, アスパラガスとは異なり, 根は分枝せずにいずれもシュート基部から発生していたため, 再生植物体の成長量の指標として根数を調査した。根数は葉数と同様の傾向を示し, 培養60日後以降, 緩速予備凍結区が他の凍結区を上回り, 培養90日後には1.9~2.9倍の値を示した。

以上のことより, ホースラディッシュにおいて

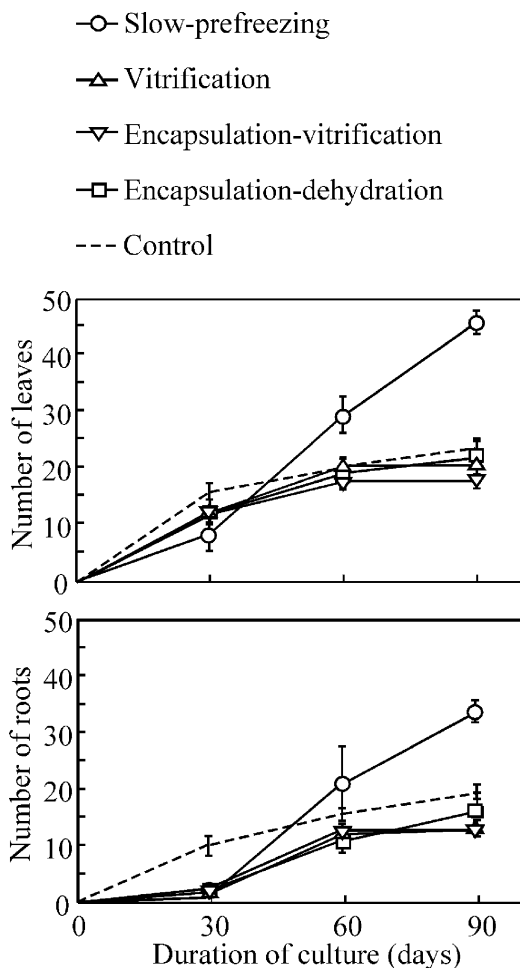


Fig. 31. Effects of cryopreservation methods on the growth of horseradish regenerates. Values show mean \pm SE of three determinations.

もアスパラガスと同様に緩速予備凍結法による凍結保存のみが再生植物体の成長量を増大させることが明らかになった。

第2節 アスパラガス組織の生存様式に及ぼす凍結保存法の影響ならびに生存組織の成長に伴う細胞内微細構造の変化

前節において、アスパラガスおよびホースラディッシュ培養体組織における凍結保存後の成長促進現象は、緩速予備凍結法で凍結保存した場合にのみ生じることがわかった。この原因を解明するために、本節では再生初期における緩速予備凍結法で凍結保存した生存細胞・組織の特徴を組織・細胞学の視点から明らかにしようと考えた。

すなわち、緩速予備凍結法を含む4種類の方法で凍結保存したアスパラガス組織の生存様式をTEMを用いて経時的に観察し、方法間の違いを検討した。

材料および方法

(1) 植物材料

第2章・第1節の第2項に準じ、緩速予備凍結法、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法により凍結保存し、融解直後(0日)および融解後に1, 3, 5および10日間培養したアスパラガス節部切片から切り出した莖頂(横径約1mm)を材料とした。また、凍結せずに培養した区を設け、対照(Control)とした。この場合、対照区では、培養5日後にシュートが伸長したので、莖頂はシュートから取り出した莖頂を用いた。

(2) 組織標本作製とTEM観察

材料の固定方法は、Suzuki et al.³⁵⁾に従い、以下のように行った。材料を1.0% グルタルアルデヒド、3.7% ホルムアルデヒドおよび0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)で前固定し、さらに1% オスミウム酸を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)で、2時間の後固定を行った。さらにその後、エタノールシリーズおよびプロピレンオキサイドで脱水処理した試料をSpurr樹脂に包埋した。切削は、ウルトラマイクローム(Reichert-Nissei社製, Ultracut-N)を用いて厚さ100nmの超薄切片を作製した。作製後、酢酸ウランとクエン酸鉛を用いて二重染色を行

い、TEM(Hitachi製, H-800)を用いて、加速電圧90kVの条件下で観察した。

(3) ミトコンドリアおよびプラスチドの数の調査

各凍結保存法における培養3, 5および10日後の生存細胞の像を倍率2000倍で撮影した。写真内にある平均的な大きさの細胞10個を任意に選び、細胞の中に存在するミトコンドリアおよびプラスチドの数を計測した。調査は、各処理区について3つの異なる試料を用いて独立に3回行い、結果を平均値で表した。

結果および考察

凍結・融解直後の組織における細胞の生存状態を凍結保存法ごとに比較し、Fig. 32に示した。組織中には、いずれの凍結法を用いた場合にも、生存細胞と死細胞が混在して観察された。死細胞が、凍結・融解のどの過程で生じたのかについては不明であるが、凍結保存後の組織における細胞の生存パターンには、凍結保存法と関連する顕著な差は認められなかった。そこで、生存細胞内の構造を詳細に観察したところ(Fig. 33)、凍結保存した材料のうち、緩速予備凍結区の生存細胞でのみ、原形質膜の内側に多くの小胞が形成されていることを確認した。

次に、培養に伴う生存細胞の構造変化を経時的に観察したところ、緩速予備凍結区の培養3日後の生存細胞内で特異的に、針状物質を内包した膜状構造物が確認された(Fig. 34)。また、細胞内のオルガネラに着目すると、培養3日後まで処理区間に顕著な差は見られなかったが、培養5日後以降、緩速予備凍結区の細胞に多数のミトコンドリアおよび発達した小胞体が観察された(Fig. 35)。そこで、細胞内のミトコンドリア数を測定し比較したところ、培養5および10日後の緩速予備凍結区でミトコンドリア数が顕著に増加し、他処理区の2倍以上の数であることがわかった(Fig. 36)。なお、この場合プラスチド数に大きな差は認められなかった。

以上述べたとおり、凍結保存後の生存細胞における変化を調査した結果、緩速予備凍結区の細胞内に、他の凍結区および対照区とは異なるいくつかの特徴的变化が起きていることがわかった。実山⁷⁶⁾は、アスパラガス莖頂組織を緩

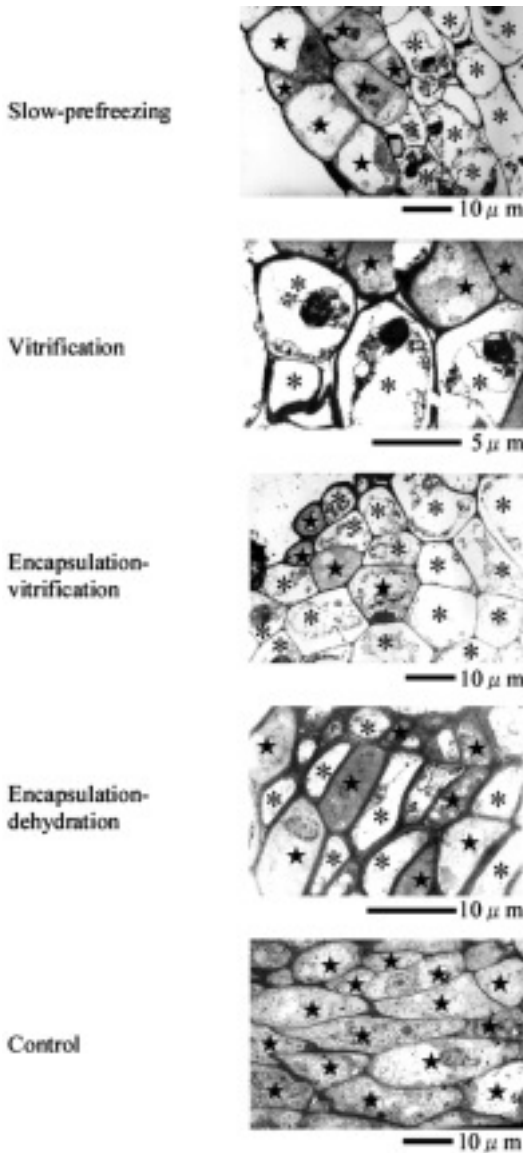


Fig. 32. Ultrastructural differences in asparagus meristematic tissue cryopreserved using four methods. Photographs show a tissue just after thawing. Control represents sample without freeze-thawing. Asterisks (*) and stars (★) indicate dead and surviving cells, respectively.

速予備凍結法により凍結保存した場合の細胞の凍結状態を Cryo-SEM を用いて詳細に観察し、細胞が凍結脱水に伴い収縮すると同時に、細胞外に形成された氷晶によって押しつぶされ、著

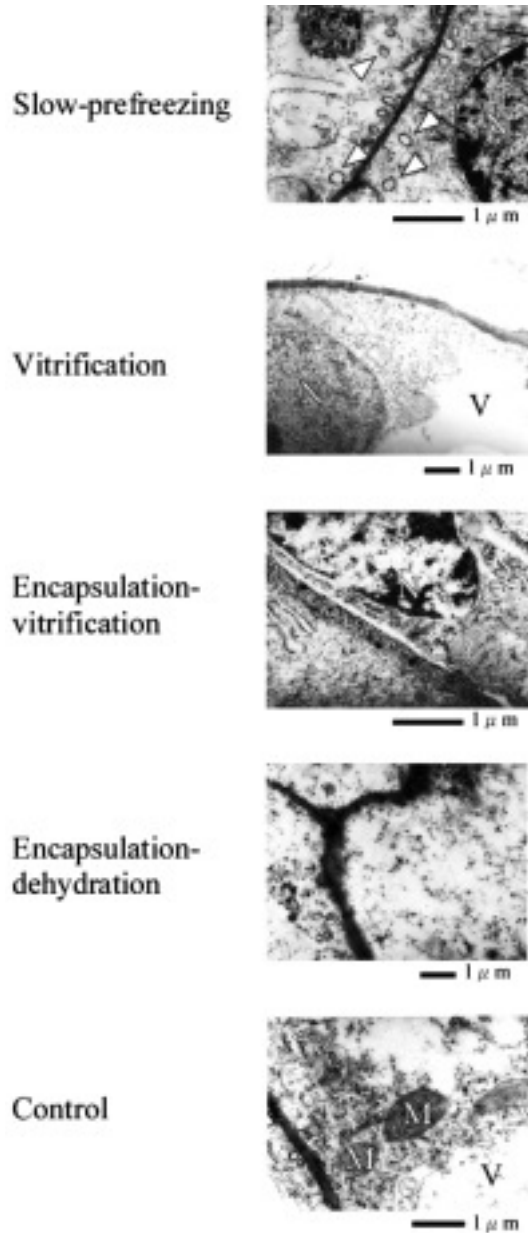


Fig. 33. Ultrastructural differences in asparagus surviving cells cryopreserved using four different methods. Photographs show cells just after thawing. Control represents sample without freeze-thawing. Arrowheads show vesicles. P, Plastid; M, mitochondrion; N, nucleus; V, vacuole.

しく変形していることを観察している。従って、本実験において緩速予備凍結区における融解直

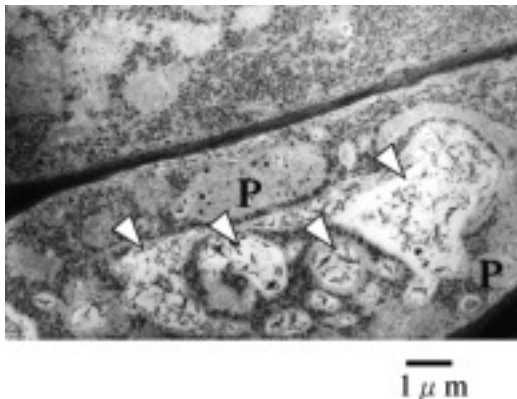


Fig. 34. Vesicular structures (arrowheads) containing needle-like materials in a surviving cell after slow-prefreezing cryopreservation and then cultured for 3 days. P, Plastid.

後の生存細胞内に認められた小胞は、細胞の凍結脱水・収縮の過程で原形質膜から遊離して形成された膜状構造である可能性が考えられる。また、Sakai⁷⁷⁾は、緩速予備凍結法は他の凍結保存法と比べて細胞内凍結を生じる危険性が高いことを指摘しているが、培養3日後の生存細胞内に見られた針状物質を含む膜状構造は、軽度の細胞内氷晶形成や細胞の圧迫変形などが原因で細胞内に生じた傷跡を、細胞自体が修復している過程と見ることもできる。いずれにしても、成長促進現象との関連から、緩速予備凍結区に特有のこれら2つの細胞内微細構造の変化については、注目する必要がある。また、緩速予備凍結区のアスパラガス生存細胞中で、培養5日後以降ミトコンドリアが顕著に増加し、小胞体が著しく発達していること、他の凍結保存法を用いた場合にはこの現象が見られないことが、本研究により初めて明らかになった。凍結保存後の成長促進現象が認められるのが緩速予備凍結区だけであることを考慮すると、培養5~10日後における細胞内のミトコンドリア数の増加と、成長促進現象には関連があると思われる。

第3節 凍結保存後のホースラディッシュ生存組織におけるDNAマイクロアレイによる遺伝子発現の解析

緩速予備凍結法とその他の凍結保存法の違いを分子生物学の視点から明らかにしようと考え

た。すなわち、ホースラディッシュを材料に、再生植物体の遺伝子発現パターンをDNAマイクロアレイ法により調査し、成長促進現象が見られた緩速予備凍結法とその他の方法を比較しようとした。

材料および方法

(1) 植物材料

緩速予備凍結法またはガラス化法を用いて凍結保存し、凍結・融解後に生存・再生したホースラディッシュ培養体(培養14日後)から茎頂(直径約1mm)を切り出し、これを各処理区につき1,000個程度(約1g)集めて材料とした。この場合、ビーズに封入した茎頂をビーズから取り出すのが困難であったため、ビーズ乾燥法およびビーズガラス化法は処理区から除外した。凍結・融解および培養の方法は、いずれも第2章・第1節の第2項に示したとおりである。凍結区の対照(Control)として、凍結せずに継代培養し14日が経過した培養体の茎頂を用いた。また、各処理区における遺伝子発現量の変化を知り、それらを比較するための基準材料(Blank)として、凍結・融解および培養操作を行う前の組織から切り出した茎頂を用いた。

(2) RNA抽出

各材料からのRNA抽出は、Kawakami et al.⁷⁸⁾の方法に従って行い、抽出した全RNA(1μg/μl)は-80°Cで保存した。RNAの純度および濃度を、分光光度計(タイテック社製、BPM-10Bio-6CHP)を用いて確認し、以下の実験では各試料中のRNA量を一致させた。この場合、RNA純度を示す指標として、波長260nmにおける吸光度の極大値を波長280nmにおける吸光度の極小値で割った値を用い、この数値が1.8~2.1にある試料を使用した。

(3) 蛍光色素標識cRNAの作製およびDNAマイクロアレイ分析

蛍光色素標識cRNAの作製からDNAマイクロアレイ分析までの手順は、Fig. 37に示すとおりで、全てAgilent社のプロトコールに基づき、専用キットを用いて行った。すなわち、全RNAから精製したmRNAを鋳型に一本鎖cDNAを作製し、さらに2本鎖cDNAを得た。続いて2本鎖cDNAから蛍光色素のCyanine

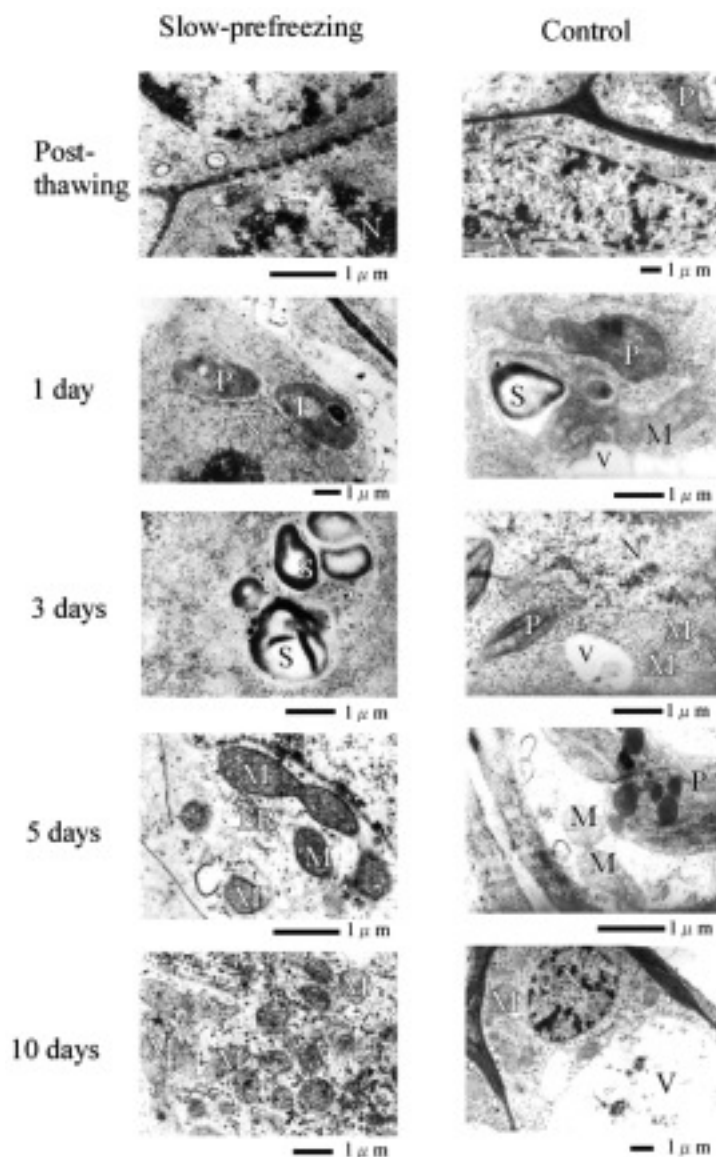


Fig. 35. Ultrastructural changes in asparagus surviving cells after slow-prefreezing cryopreservation. Days show culture duration. Control represents samples without freeze-thawing. ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondrion; N, nuclear; P, plastid; S, starch; V, vacuole.

3 (Cy-3) または Cyanine 5 (Cy-5) で標識した cRNA を合成後、DNase で DNA を分解し、蛍光色素標識 cRNA を精製した。Cy-3 および Cy-5 は、蛍光照射下で各々赤および緑に発色する試薬で、cRNA 中では有機塩基のシトシンにラベルされている。なお、Cy-3 および Cy-5 が等量ずつ存在すると、黄色く発色する。

DNA マイクロアレイに先立ち、上記の方法

で作製した各処理区の試料と Blank の試料を等量ずつ混合した。Blank は、遺伝子発現 (cRNA 生成量) の変化を見る基準である。すなわち、ある一つの遺伝子について、処理区と Blank における発現量 (当初の mRNA 量を反映する蛍光色素標識 cRNA の量) が同じであれば、黄色く発色するし、発現量が異なれば、赤または緑に色が片寄ることになる。また、発現

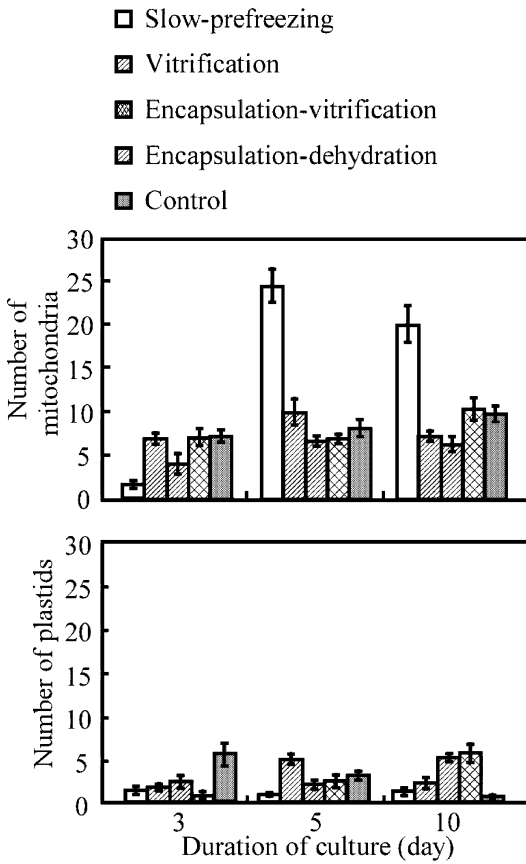


Fig. 36. Effects of cryopreservation procedures on the number of mitochondria and plastids in asparagus surviving cells. Values show mean \pm SE of three determinations.

遺伝子の強度は、発色輝度の濃淡で表れることになる。なお、蛍光色素の種類を処理区と Blank で入れ替えて分析すること（カラスワッピング）により、cRNA 作製やハイブリダイゼーションなどに伴って生じる実験誤差の程度を確認した。

(2) 発現遺伝子の解析

DNA マイクロアレイ分析で得られた蛍光発色の輝度をもとに、各遺伝子の発現量解析を行った。解析には、専用ソフトの Feature Extraction (Agilent 社) を使用し、各遺伝子の発現量を数値化した。この場合、発色の過程で生じたゴミの沈着や蛍光色素の取り込み不良などが原因で、カラスワッピングにおいて 5%

以上の誤差が認められた遺伝子については、解析から除外した。また、発色が基準値以下の遺伝子については、遺伝子発現が認められなかったものとし、解析から除外した。解析は、以下の 3 項目について行った。なお、発現強度が Blank のそれよりも大きい遺伝子を Upregulated gene, 小さい遺伝子を Downregulated gene と読んで区別した。また、処理区における発現強度が、95%以上の確率で Blank のそれと異なる遺伝子の数についても併せて調査した。

次に、遺伝子発現パターンを 3 処理区（緩速予備凍結区、ガラス化区および Control）間で比較し、その類似性を明らかにするため、各遺伝子の発現強度を指標としてクラスター解析を行った。また、緩速予備凍結区で特異的に発現している遺伝子を特定し、その特徴に基づいて分類を行った。これらの遺伝子が持つ特徴に関する情報は、インターネット上のウェブサイト (<http://www.Arabidopsis.org>) にある「The Arabidopsis Information Resource」を利用して入手した。

2. 結果および考察

a) 遺伝子の発現強度に及ぼす凍結保存法の影響

ホースラディッシュの cRNA は、シロイヌナズナの DNA とよくハイブリダイズし、マイクロアレイ上で様々に発色したことから (Fig. 38), ホースラディッシュ遺伝子の塩基配列は、近縁種であるシロイヌナズナのそれと類似すると考えられる。ただ、その相同性は各遺伝子ごとに異なるので、ハイブリダイゼーションの程度（発色輝度）が、単純に遺伝子発現量を反映しているとは言えない。しかし、個々の遺伝子について、発色輝度を指標に処理区間の発現強度を比較し、その差を論じることは可能である。また、本実験で用いたシロイヌナズナのマイクロアレイ上に配置された 60 mer の塩基配列は、いずれも遺伝子本体の配列を多く含んでいる（周辺領域をあまり含まないように設計されている）ことから、種間の変異（塩基配列の違い）は比較的小さいものと推測される。従って、Blank に対する各処理区の遺伝子発現強度の差は、

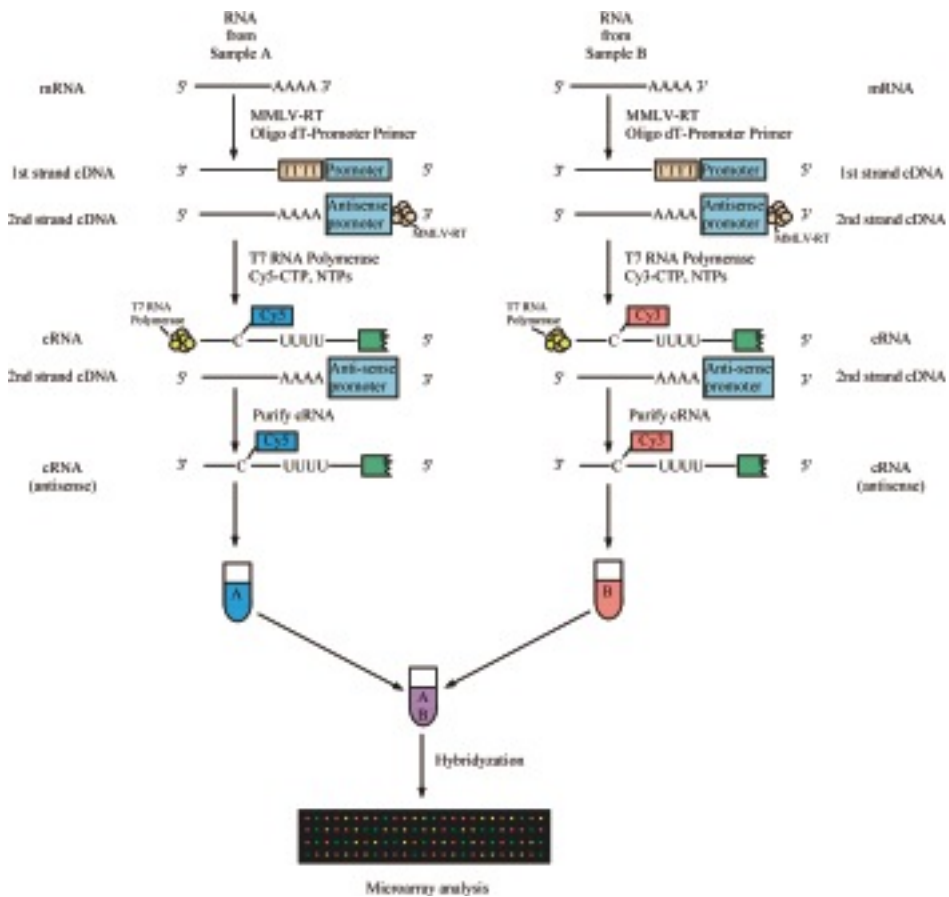


Fig. 37. A flow chart of DNA microarray.

個々の凍結保存法がホースラディッシュ再生植物体の遺伝子発現に及ぼす影響を見るための指標になりうる。

そこで、各処理区の遺伝子発現強度を Blank のそれと比較し、Fig. 39 に示した。Fig. 39 は、縦軸が各処理区の、横軸が Blank のそれぞれ遺伝子発現強度を表し、赤色および緑色のプロットは、発現強度が処理区および Blank で大きかった遺伝子をそれぞれ示している。図中の赤色の 2 直線は、処理区の発現強度/Blank の発現強度 (T/B 比) が 2 倍または 1/2 倍である境界 (棄却率 $p < 0.05$) を示し、2 本の直線で挟まれた範囲の外側に行くほど、発現強度の差が大きい遺伝子であることを表している。この図から、各処理区における遺伝子発現強度の分布を読みとることができる。まず、緑色プロットで示した Downregulated gene のばらつきに、処

理区間で大きな違いが見られなかった。次に、赤色プロットで示した Upregulated gene のばらつきには処理区間で違いが認められ、緩速予備凍結区はガラス化区および Control と比べて、特に大きな T/B 比を持つ遺伝子の数は少なかった。一方、発現強度に違いがあった遺伝子の数に着目すると、Downregulated gene 数に処理区間で大きな違いは認められないのに対し、Upregulated gene 数は緩速予備凍結区で多いことが判明した (Table. 3)。すなわち、統計的な有意差が認められた遺伝子数で見ると、緩速予備凍結区の Upregulated gene 数は 5,191 個で、他の 2 区のそれ (3,799 個および 4,020 個) より 1,000 個以上多かった。このうち、発現強度が Blank の 2 倍以上あった遺伝子数で見ても、緩速予備凍結区の Upregulated gene 数は 1,738 個と、他の 2 区のそれ (1,617 および

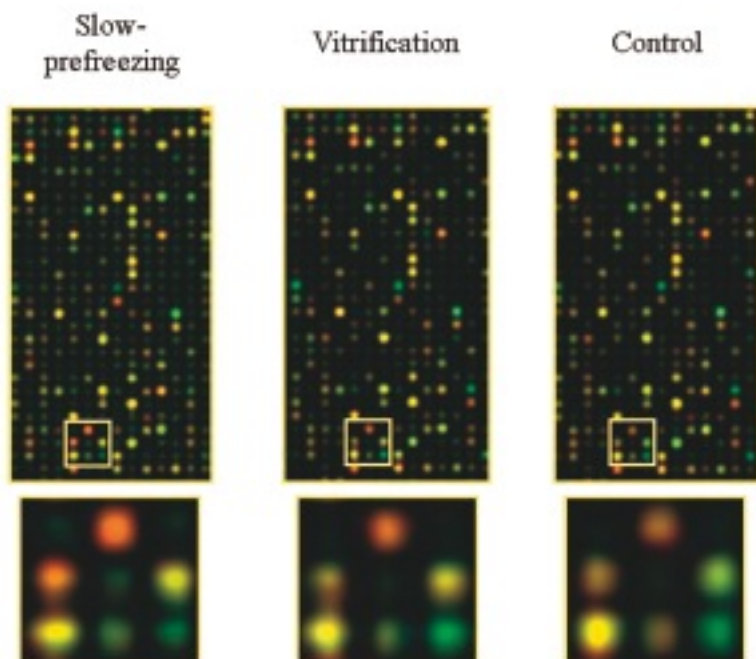


Fig. 38. Color images of gene expressions of horseradish plantlets regenerated after cryopreservation. Red plots indicate genes that are strongly expressed in treatment compared to untreated apices. Green ones show genes expressed higher in untreated apices. In each treatment, lower figures are the same gene plots magnified from squares in upper figures.

1,638 個) より 100 個以上多いことがわかった。従って、緩速予備凍結区では、Upregulated gene 数が他の 2 区に比べて多いが、それらの T/B 比は比較的小さいという特徴を有することが明らかになった。

b) 遺伝子発現パターンの類似性

前述の通り、ハイブリダイゼーションの程度（発色輝度）が遺伝子発現量を反映しているとは言えないので、異なる遺伝子間の発現強度を比較することはできない。しかし、個々の遺伝子について、発色輝度の違いをもとに処理区間の発現強度を比較することは可能である。この原理に基づき、各処理区における遺伝子発現パターンをクラスター解析し、その類似性を 3 処理区間で比較した (Fig. 40)。この場合、95% 以上の確率で処理区または Blank に発色が認められた遺伝子全てを調査対象とした。クラスター解析によって得られる遺伝子発現パターンの類似性は、相関係数として表され、相関係数が 1 に近いほど発現パターンの類似性が高いことを意味している。クラスター解析の結果、ガ

ラス化区と Control の相関係数が 0.878 であったのに対し、緩速予備凍結区と他の 2 区との相関係数は 0.771 と低かった。これは、緩速予備凍結区の材料が、3 処理区のうちで最も異なる遺伝子発現パターンを示したことを意味している。

c) 特異的な発現が認められた遺伝子

成長促進現象が認められた緩速予備凍結区では Upregulated gene の数および強度に特徴があったことから、特に T/B 比が 3 倍以上の Upregulated gene に着目し、各処理区における発現遺伝子数を集計した結果が、Fig. 41 である。これらの遺伝子のうち、各処理区に単独で発現していた遺伝子（緩速予備凍結区、37 個；ガラス化区、27 個；Control、109 個）について、個々の遺伝子を特定し、その特徴に基づき分類を試みた (Fig. 42)。その結果、緩速予備凍結区に特異的な遺伝子には、核関連遺伝子が多く、葉緑体関連遺伝子が少ないという特徴のあることがわかった。これら緩速予備凍結区に特異的な 37 個の遺伝子をリストアップしたのが、

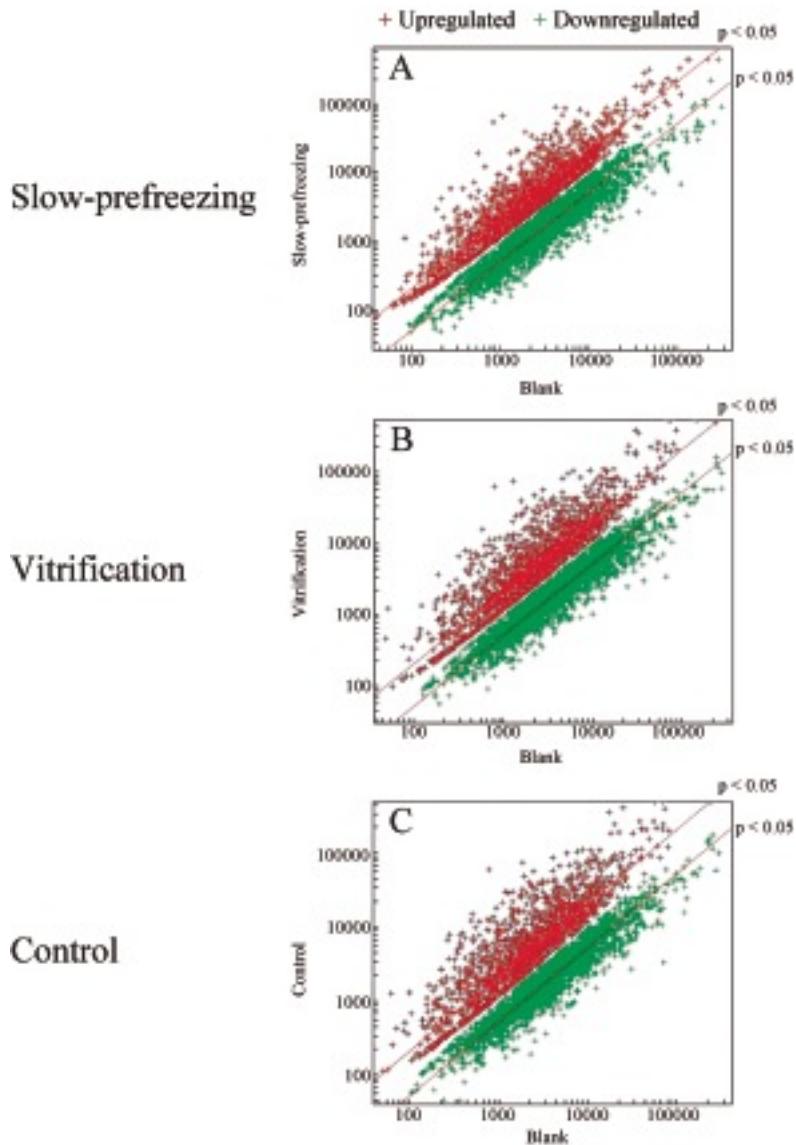


Fig. 39. Regulation patterns of horseradish RNA transcripts of regenerates after cryopreservation. A, Slow-prefreezing; B, Vitrification; C, Control. Plots out of red oblique lines showed that gene expressions were higher or lower than those of untreated apices statistically ($p < 0.05$).

Table. 4である。特に注目されるのが、表中にAで示した2つのオーキシン関連遺伝子、表中にBで示した4つのストレス関連遺伝子、および表中にCで示した2つの生体防御関連遺伝子の存在である。本章第1節で示したように、緩速予備凍結区のホースラディッシュ培養体は、培養30日を過ぎてから急速に成長量が増大したが、培養14日後の細胞中でオーキシン関連遺伝子

2つが特異的に発現していたことは、成長促進との関連で興味深い。また、ストレスや生体防御関連遺伝子が発現していた事実は、緩速予備凍結区の材料が、凍結保存の過程においてより強度のストレスを受け、その状態からの回復を図るためにこれらの遺伝子を活発に発現していたことが示唆される。

Table. 3. The number of upregulated or downregulated gene expressions compared with ones of untreated apices in each treatments.

Treatment	Total examined genes	No. of genes without expression alternation	No. of genes with significant expression alternation	
			Upregulated	Downregulated
Slow-prefreezing	21,389	11,362	5,191 (1,738) ^z	4,836 (2,255) ^z
Vitrification	21,389	12,864	3,799 (1,617)	4,726 (2,242)
Control	21,389	12,526	4,020 (1,634)	4,843 (2,277)

^zThe numbers of upregulated or downregulated gene expressions are differenced significantly from ones of untreated apices at $p < 0.05$

第4節 第2章の考察

第2章では、Suzuki et al.³⁵⁾が報告した凍結保存後の再生植物体における成長促進現象を検証するとともに、組織・細胞学および分子生物学の手法を用いて、原因の解明を目指した。

第1節では、まずアスパラガス組織を用いて Suzuki et al.³⁵⁾の追試を行い、緩速予備凍結法のどの過程で成長促進が引き起こされるのかを

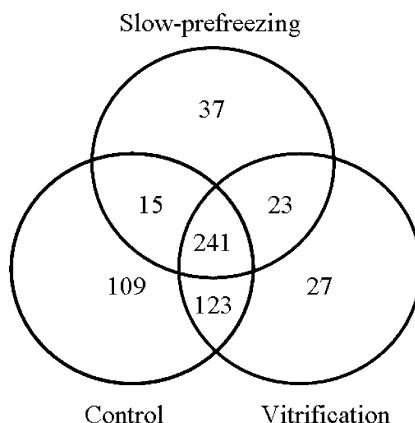


Fig. 41. The number of genes that are common or independent between cryopreservation treatments. Genes of cryopreserved regenerates were selected from ones expressed 3 times higher than ones of untreated apices.

明らかにしようとした。その結果、 -40°C まで冷却後、液体窒素(-196°C)に浸漬せずに融解した材料にも成長促進が確認されたことから、

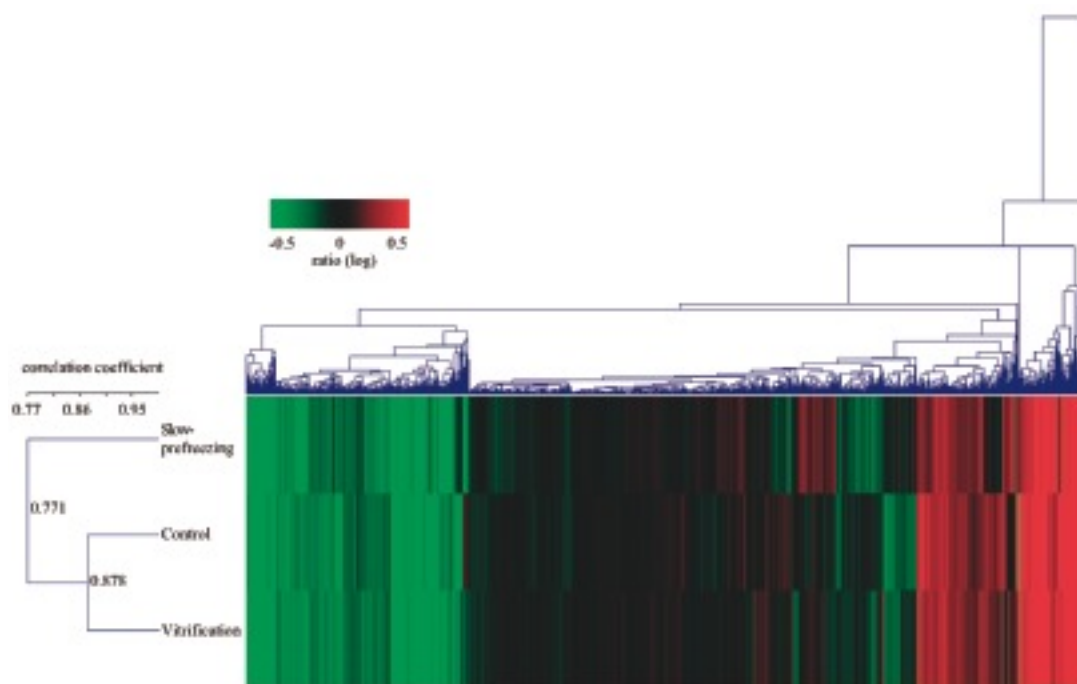


Fig. 40. Cluster analysis of gene expression patterns of horseradish regenerates after cryopreservation using slow-prefreezing and vitrification.

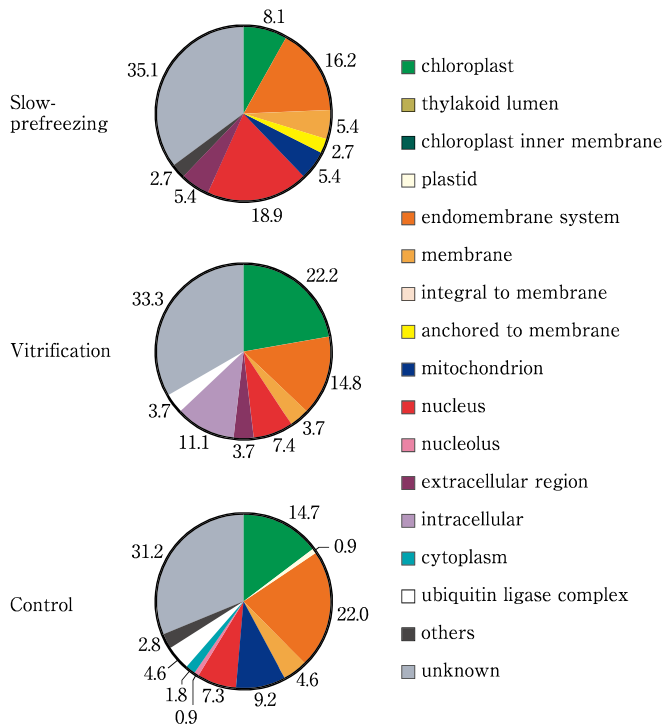


Fig. 42. Pie charts showing the cellular component of expressed horseradish genes that were induced by cryopreservation procedures. Genes were selected from ones that were separately expressed 3 times higher than ones of untreated apices.

成長促進を引き起こす原因は緩速予備凍結の過程にあることがわかった。また、凍結媒液の組成にも注目し、ラフィノースおよびトレハロースを用いて凍結したところ、 Me_2SO を用いた場合と同様に成長促進が認められたことから、凍結媒液の組成と成長促進現象は直接関連しないことがわかった。次に、成長促進現象をより幅広い材料を用いて検証するため、アスパラガスの多くの品種ならびに雌株および雄株を用いて同様の実験を行ったところ、いずれの材料を用いた場合にも凍結保存後に顕著な成長促進が認められたことから、凍結保存後の成長促進はアスパラガスについては普遍的現象であると考えられる。さらに、緩速予備凍結法に加え、第1章で検討した新しい凍結保存法を再生植物体の成長という視点から比較するため、アスパラガスおよびホースラディッシュの培養体組織を材料に検討を行った。その結果、いずれも緩速予備凍結法を用いて凍結保存した場合にのみ再生

植物体の成長促進が見られ、その他の方法を用いた場合には成長促進が認められなかった。これにより、アスパラガスに加えてホースラディッシュでも成長促進が認められ、それは緩速予備凍結法によってのみ引き起こされる現象であることが明らかとなった。

第2節および第3節では、第1節で明らかになった緩速予備凍結法が成長促進現象を誘起する原因を探るため、緩速予備凍結法とその他の方法で凍結保存した組織の状態を、組織・細胞学および分子生物学的手法を用いて調査した。まず、各種の方法で凍結保存したアスパラガス組織をTEMを用いて観察し比較したところ、いずれの凍結法を用いた場合にも、組織中に生存細胞と死細胞が混在することがわかった。各々の凍結法において、死細胞が凍結保存のどの段階で生じたのか不明であるが、凍結保存後の組織はいずれも傷害を受けていることが明らかになった。従来、緩速予備凍結法は組織の傷

Table 4. Genes expressed independently at 3times in horseradish regenerates cryopreserved using slow-prefreezing. Gene annotation and categorization were determined by Arabidopsis Information Resource. AGI, *Arabidopsis* Genome initiative.

AGI No.	Gene annotation	Fold change	Cellular component
AT1G03590.1	protein phosphatase 2C family protein	3.6	mitochondrion
AT1G47980.1	expressed protein	5.0	endomembrane system
AT1G50460.1	putative similar to hexokinase 1	3.3	mitochondrion
AT1G55210.1	disease resistance response protein-related	B 4.5	endomembrane system
AT1G70510.1	homeobox protein knotted-1 like 2	4.1	nucleus
AT1G70670.1	caleosin-related family protein	3.1	unknown
AT1G74430.1	myb family transcription factor	3.1	nucleus
AT1G80390.1	auxin-responsive AUX/IAA family protein	A 3.5	nucleus
AT3G11930.1	universal stress protein family protein	B 3.4	unknown
AT3G15990.1	putative similar to sulfate transporter	3.5	membrane
AT3G16330.1	expressed protein	3.5	unknown
AT3G19690.1	pathogenesis-related protein	B 3.6	extracellular region
AT3G44550.1	putative similar to acyl CoA reductase	3.6	unknown
AT3G61270.1	expressed protein	5.0	unknown
AT4G00150.1	scarecrow-like transcription factor 6	3.3	chloroplast
AT4G10500.1	2OG-Fe (II) oxygenase family protein	3.1	chloroplast
AT4G14130.1	xyloglucan: xyloglucosyl transferase, putative	C 3.4	endomembrane system
AT4G14900.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	3.2	unknown
AT4G21930.1	expressed protein	3.8	unknown
AT4G22470.1	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	3.1	endomembrane system
AT4G27520.1	plastocyanin-like domain-containing protein	3.9	anchored to membrane
AT4G30140.1	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	4.4	endomembrane system
AT4G31470.1	pathogenesis-related protein	B 5.6	extracellular region
AT4G32850.1	nucleotidyltransferase family protein	3.0	unknown
AT4G36360.1	beta-galactosidase, putative	C 3.8	others
AT4G37750.1	ovule development protein aintegumenta	3.8	nucleus
AT5G03840.1	terminal flower 1 protein	3.2	unknown
AT5G16230.1	acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase, putative	3.5	chloroplast
AT5G22500.1	acyl CoA reductase, putative	5.4	unknown
AT5G25890.1	auxin-responsive protein	A 3.5	nucleus
AT5G46710.1	zinc-binding family protein	3.7	unknown
AT5G57390.1	ovule development protein	3.1	nucleus
AT5G58390.1	peroxidase	3.6	endomembrane system
AT5G60200.1	Dof-type zinc finger domain-containing protein	3.6	unknown
AT5G63850.1	amino acid transporter 4, putative	4.2	membrane
AT5G65790.1	myb family transcription factor	3.1	nucleus
AT5G66280.1	GDP-D-mannose 4, 6-dehydratase, putative	4.4	unknown

A ; Genes involved in auxin activity.

B ; Genes involved in stress response.

C ; Genes involved in biological defense.

害を引き起こしやすい凍結法であるといわれ⁷⁷⁾⁷⁹⁾, 実際にも多くの材料について凍結保存後の組織中に生存細胞と死細胞が混在することが観察されている²⁸⁾³⁵⁾⁸⁰⁾。従って、緩速予備凍結区で起きた成長促進現象は、成長力の強い細胞だけが生き残ったことが原因である可能性も考えられた。しかし、本研究で他の凍結法を用いた

場合にも組織レベルの傷害は確認されており、細胞選抜が原因で成長促進が起きた可能性は低いと考えられる。

次に、生存細胞内の微細構造を詳細に観察した結果、緩速予備凍結区に特有の現象が複数確認された。すなわち、①融解直後の生存細胞の原形質膜付近に認められた小胞、②培養3日後

の生存細胞に認められた針状物質を内包する膜状構造物、ならびに③培養5～10日後の生存細胞に認められたミトコンドリア数の増加および小胞体の発達である。緩速予備凍結法は、緩速予備凍結時の細胞外氷晶生成に伴う細胞の凍結脱水を基本原理とするが、この過程で細胞は収縮すると同時に細胞外の氷晶に狭まれて極度に変形している⁷⁶⁾。他方、ガラス化法およびビーズガラス化法は不凍液による浸透的脱水を、ビーズ乾燥法は乾燥による脱水を各々基本原理とし、これが各凍結保存法の特徴となっている。第1節で明らかにしたように、成長促進現象は緩速予備凍結により誘起されていることから、細胞の凍結脱水過程が成長促進現象の発現と密接に関連すると考えられる。すなわち、培養初期の細胞では、凍結脱水に伴う細胞の変形で受けた原形質膜および細胞内部の損傷部位を袋状の膜系に閉じ込めて外へ排出するとともに、原形質に小胞体およびミトコンドリアを発達させ、物質合成を盛んに行ったと見ることができ

る。緩速予備凍結区における代謝活性の変化は、遺伝子発現の面からも裏付けられた。すなわち、ホースラディッシュの培養14日後の生存細胞における遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて調査したところ、緩速予備凍結区の遺伝子発現は、ガラス化区およびControlと比べていくつかの点（Upregulated geneの数および強度、ならびに遺伝子発現パターン）で異なっていた。培養14日後の細胞内では培養30日後以降に顕著となる成長促進に向けた準備が始まっており、これが遺伝子発現の差として表れたものと考えられる。また、緩速予備凍結区では特異的に、2つのオーキシン関連遺伝子の強い発現が確認された。オーキシンは細胞分裂、細胞伸長ならびに不定根形成を促すことが知られており、オーキシン関連遺伝子の顕著な発現は成長促進現象と密接に関連するものと考えられる。特に、緩速予備凍結区のホースラディッシュ再生植物体の根数が他処理区のそれより多かった事実は、この仮説を裏付けている。

以上述べたように、緩速予備凍結区の生存細胞の特徴と成長促進現象を関連させて考察した

が、なぜ成長促進が起きたのかという点については、推測の域を出ない。本研究で培養初期の細胞内で多数のミトコンドリアが確認された。

ミトコンドリアは、内呼吸により多くのATPを生み出す、いわばエネルギーの生産工場である。事実、エネルギーの消費が多いと思われる根端分裂細胞で細胞あたりのミトコンドリア数の増加が観察され⁸¹⁾⁸²⁾、トウモロコシの葯形成初期において、細胞内のミトコンドリア数が20～40倍に増加していたという報告もある⁸³⁾。緩速予備凍結区の生存細胞は、傷害箇所を緊急に修復するためミトコンドリア数を急速に増加させてエネルギーを得ようとしたが、修復完了後においても多数のミトコンドリアが細胞内に残った結果、物質代謝およびエネルギー生産が容易になり、細胞・組織の成長促進にプラスに作用したのではないかと考える。

第3章 総合考察

本論文は、第1章および第2章で示した2つの内容で構成されている。第1章では、最近開発された新しい凍結法を用いて、従来の方法では困難とされてきた北方系果樹培養体組織の凍結保存について、実用に耐え得る技術の開発を目指した。第2章では、Suzuki et al.³⁵⁾によって報告された凍結保存後の再生植物体の成長促進現象に着目し、これを検証するとともにその原因の探究を目指した。第1章および第2章は内容が大きく異なるので、本章では、最初に両者を独立させて考察する。

第1章では、まず新しい3種類の凍結保存法を用いて、各材料の生存・再生個体の獲得を試みた。その結果、材料を問わずビーズ乾燥法が凍結保存法として優れていることがわかった。その理由として、凍結保存後の生存・再生率が高いことは勿論のこと、条件設定の容易さや操作の簡便性に優れる点などが挙げられる。すなわち、ガラス化法やビーズガラス化法では、ガラス化溶液の温度管理や交換に手間がかかるし、緩速予備凍結法ではプログラムフリーザーという専用の機器を必要とするが、ビーズ乾燥法では通常の実験室で使用する程度の簡単な器具さえあれば十分であり、用いる試薬の種類も

少ない。

しかし、従来のビーズ乾燥法を用いても、植物体再生率には材料ごとに大きな違いが認められた。すなわち、バラ科のアロニアおよびサンザシならびにスイカズラ科のハスカップで植物体再生率が高かったのに対し、ツツジ科のブルーベリーおよびクランベリーで低かった点が特徴的であった。前者はいずれも組織培養系の確立が容易なグループに属し、後者はそれが難しいグループに属している。従って、組織培養の難易と植物体再生率には密接な関係があると思われる。その理由の1つは、組織培養が容易な材料では、凍結保存後に生存した細胞からの植物体の再生が容易なのに対し、組織培養しにくい材料では、生存細胞からの植物体再生が難しく、その結果として植物体再生率が低く抑えられたと考えられる。

これらの再生率が低かった材料では、組織のダメージをより小さく保ち、植物体再生率を向上させる工夫が必要であった。そこで、ビーズ乾燥法を改良するため、グリセリンおよびサリチル酸を用いて種々の検討を行った。グリセリンおよびサリチル酸は、従来単独で使用され、ビーズ乾燥法でもその効果が認められている試薬である。本研究では、両者を初めて併用し、ビーズおよびローディング液に混合添加することにより、従来法では成績が悪かったブルーベリーおよびクランベリーの再生率を、実用化レベル（85%以上）まで一気に高めることに成功した。これは、グリセリンとサリチル酸の相乗効果によるものと考えられ、グリセリンの細胞内への浸透性をサリチル酸が改善した結果、高い再生率が実現できたものと推測できる。このグリセリンとサリチル酸を併用する方法を、本研究では「改良ビーズ乾燥法」と名付け、優れた凍結保存法として、いまだに凍結保存が難しいとされる植物材料への幅広い適用を提案したいと思う。

次に、第2章で検討した凍結保存後の再生植物体における成長促進現象について考察する。本研究では、アスパラガスの多くの品種において成長促進現象の存在が確認されたほか、新たにホースラディッシュにおいてもその現象の存在

が明らかになった。この場合、緩速予備凍結法のほか、第1章で用いたガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を加え、凍結保存方法の違いが再生植物体の成長に及ぼす影響を調査した。その結果、成長促進現象は、緩速予備凍結法を用いた場合にのみ確認され、緩速予備凍結の過程と密接に関係していることが想定された。

そこで、何故、緩速予備凍結後に再生した植物体の成長のみが促進されるのか、その原因について以下の3つの説に沿って考えてみることにする。第一は根系発達説である。Suzuki et al.³⁵⁾は、アスパラガスの再生植物体は発根率が高まった結果、根系が発達して養分吸収能が向上し、地上部（シュート）の成長も促進されたと考えた。しかし、本研究で緩速予備凍結法以外の3つの凍結法について検討した結果、いずれも発根率が高くなったにもかかわらず、地上部の成長促進現象は認められなかった。従って、成長促進現象を根系発達説だけで説明することはできない。第二は細胞選抜説である。凍結時に成長力が強い細胞だけが生き残り、そこから植物体が再生したために成長が旺盛になったとする考え方で、Wang et al.⁸⁴⁾、Brison et al.⁸⁵⁾、Haggman et al.⁸⁶⁾および Hellot et al.⁸⁷⁾によって支持されている。本実験で、4種類の方法で凍結保存したアスパラガス組織の特徴をTEMを用いて詳細に観察したところ、何れの方法を用いた場合にも組織内に生存細胞と死細胞が混在して観察され、緩速予備凍結法だけに特徴的な組織の生存様式を確認することはできなかった。従って、成長促進現象を細胞選抜説だけで説明することもできない。第三は、凍結傷害反応説である。凍結・融解の過程で細胞に生じた傷害が刺激となって組織の成長力が向上したという考え方で、Tremblay and Tremblay⁸⁸⁾⁸⁹⁾、Biahoua and Bonneau⁹⁰⁾および Wang et al.⁹¹⁾により提唱されている。緩速予備凍結法では緩速予備凍結に伴い細胞が凍結脱水を受け収縮するとともに、細胞間隙に生成した氷晶の圧迫によって変形している様子が実山⁷⁵⁾によって報告されている。本研究では、緩速予備凍結法で凍結したアスパラガス組織の生存細胞

中に幾つかの特徴的な形態変化を確認した。特に、融解直後の細胞の原形質膜周辺に小胞が形成され、培養3日後には細胞中の損傷部位を修復していると思われる袋状の構造物が観察された。さらに、培養期間を経た細胞では、ミトコンドリアおよび小胞体が発達し、ホースラディッシュにおいては遺伝子発現にも特異的な変化が現れた。一方、緩速予備凍結以外の凍結法を用いた場合には、このような一連の変化は認められなかった。これらの事実は、凍結脱水・収縮の過程で細胞に特異的に生じた傷害が刺激となつて、その後の細胞の成長が促進されたとする考えを支持するものである。従つて、緩速予備凍結法は、緩速予備凍結の手順そのものが一つの大きな特徴となり、他の方法とは異なる作用性を有していると言うことができる。

最後に、今後の凍結保存研究の方向性について論じたい。本論文の第1章では、植物の遺伝資源保存に資する有効な凍結保存技術開発を目標に検討を行った。この場合、最も重要な達成目標は植物体再生率の向上であり、本研究ではビーズ乾燥法がこの目的を実現するために、最も優れた方法であることを明らかにした。さらに、ビーズ乾燥法を改良することにより、実用化可能な技術開発を実現することができた。植物遺伝資源の保存技術としては、さらに簡便で汎用性が高く、効率的な技術へと改良を加えることが重要である。一方、第2章では、凍結保存後の生存細胞・組織の活性に着目して検討を行った。この場合、第1章とは異なり、緩速予備凍結法を用いた場合に再生植物体の成長が旺盛になることがわかった。畜産および医学の分野では、卵子、精液、血液などの細胞に加え、臍臓ランゲルハンス島などの組織の凍結保存が重要な研究テーマであるが、この場合、凍結保存した細胞・組織自体の活性をいかにして高く保つかが重要なポイントとなる。例えば、心臓など臓器の凍結保存が将来可能になつても、保存後の臓器の活性が低下してしまつては意味がない。凍結保存した細胞・組織自体の活性を高く保つ凍結保存法を開発することが肝要である。本研究で明らかにしたように、凍結保存法は生存細胞の成長に影響を及ぼすことから、凍

結保存した細胞・組織の活性を高める凍結保存技術の開発を視野に、今後の研究を進める必要がある。これと関連して、VenkataramanとWesterman⁹²⁾は、白血球細胞のサイトカイン生産能が凍結保存後に高まることを報告し、その後もこれを支持する結果が次々に報告されている^{93)~97)}。サイトカインは、インターフェロンやTNF (Tumor Necrotic Factor) など動物の免疫系を担う物質の総称で、花粉アレルギー、多発性硬化症およびアトピー性疾患などの治療薬として期待されている。凍結保存技術を利用して、サイトカイン生産性を高めることが可能となる日が来るかも知れない。同様な考え方は植物においても成立し、植物色素など二次代謝産物の生産性向上に凍結保存技術を応用することも可能である。

以上述べたとおり、凍結保存の研究は、保存する材料およびその目的によって用いる手法が大きく異なることが予想されるため、今後は本研究で明らかにした点を十分に考慮し、研究を進める必要がある。本論文が、凍結保存後の細胞・組織の活性および成長量に焦点をあてた研究の端緒として位置付けられるなら本望である。

摘 要

本研究は、園芸作物の培養体組織の凍結保存技術の確立および凍結保存後の成長促進現象に関する基礎的な知見を得ることを目的として、数種凍結保存法による凍結保存後の生存率の差異および再生植物体の特性について検討したものである。

1. 数種北方系果樹の培養体組織を用いた凍結保存技術の開発
 - (1) バラ科に属するアロニアおよびサンザシはともに、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法を用いた場合に62.5~77.8%の生存率を示したことから、凍結保存が比較的容易なグループであると考えられた。さらに、グリセリンをビーズおよびローディング液に添加する「修正ビーズ乾燥法」を用いて、生存率をそれぞれ95.5%および82.5%まで高めることに成功した。

(2) スイカズラ科に属するハスカップはビーズ乾燥法を用いて生存率 93.3%を示したことから、バラ科のアロニアおよびサンザシと同様に凍結保存が容易なグループであることが考えられた。さらに、アロニアおよびサンザシで明らかにした「修正ビーズ乾燥法」から、グリセリンおよびサリチル酸を併用した「改良ビーズ乾燥法」を用いることによって、低温馴化の期間を短縮することができた。

(3) ツツジ科に属するクランベリーおよびブルーベリーは、凍結法にかかわらず、いずれも最高値で 33.3%および 26.7%の低い生存率しか得られなかったことから、一般に凍結保存が難しいグループであることが考えられた。生存率を高めるために「修正ビーズ乾燥法」を用いたが、十分な生存率が得られなかった。そこで、「改良ビーズ乾燥法」を用いた結果、生存率をそれぞれ 86.7%および 90.0%まで高めることに成功した。

(4) 以上の結果、北方系果樹の培養体組織の茎頂を用いた凍結保存技術としては、本研究で明らかにしたグリセリンおよびサリチル酸を併用した「改良ビーズ乾燥法」を用いることで、成績の悪いクランベリーおよびブルーベリーにおいても 85%以上の生存率を示した。このように高い生存率を示す凍結保存技術はこれまでなく、改良ビーズ乾燥法の実用性が認められた。

2. 凍結保存後の再生植物体の成長促進現象の追跡

(1) アスパラガス培養体組織の節部切片を緩速予備凍結法で凍結保存した後の、再生する植物体の成長促進現象に焦点を合わせて、その成長促進現象を追跡した。まず、凍害防御物質 Me_2SO の影響の有無を検討するため、凍害防御物質として Me_2SO とともにトレハロース 1.0 M またはラフィノース 0.6 M を用いたところ、三者とも、 -40°C で凍結した後再生させた植物体では、シュート数および発根率が大幅に上昇した。このことから、凍結保存後の成長促進現象は Me_2SO の効果によるものではないと判断した。

(2) アスパラガスの 9 種類の株（雄株 4 品種各

1 株、雌株 4 品種各 1 株、超雄株 1 品種 1 株）に由来する培養体組織の節部切片を用いて、緩速予備凍結法で凍結保存後の再生植物体の成長を調査したところ、供試品種の違いや雌雄の違いによる影響を受けず、全ての区において再生植物体の成長は促進された。このことから、緩速予備凍結法を用いた凍結保存後の再生植物体の成長促進現象は、アスパラガスに共通して認められる現象であることが明らかとなった。

(3) 凍結保存法の違いとアスパラガス再生植物体の成長促進現象を、緩速予備凍結法、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法と比較したところ、緩速予備凍結法においてのみ成長促進現象が認められ、他の凍結保存法では認められなかった。このことから、アスパラガス再生植物体の成長促進現象は、緩速予備凍結法による凍結保存法においてのみ認められる現象であることが判明した。

(4) ホースラディッシュ培養体茎頂を用いた凍結保存後の再生植物体の成長促進現象について同様の検討を行ったところ、ガラス化法、ビーズガラス化法およびビーズ乾燥法では成長が旺盛にならず、緩速予備凍結法でのみ、再生植物体の成長が旺盛になった。

(5) 以上のことから、凍結保存後の再生植物体の成長促進現象は、アスパラガスとホースラディッシュに共通に認められ、その成長促進が認められる方法は緩速予備凍結法に限られる現象であることが明らかになった。

3. 緩速予備凍結法が凍結保存後の再生植物体の成長を促進する原因の解析

(1) アスパラガス培養体組織の節部切片を用いて、凍結保存後の生存細胞を透過型電子顕微鏡で経時的に観察した。成長促進現象が認められた緩速予備凍結区の細胞内にも、細胞膜周辺の小胞や針状物質を内包する膜状構造物が多数観察された。さらに、培養 5 日後以降にはミトコンドリアの数が他の処理区の 2 倍以上になった。以上のことから、緩速予備凍結区の生存細胞は凍結脱水・収縮の過程で細胞に特異的に生じた傷害が刺激となって、ミトコンドリアの数を急速に増加させた結

果, エネルギー生産が容易となり, その後の成長促進にプラスに作用した可能性が示唆された。

- (2) ホースラディッシュ組織の凍結保存後の遺伝子発現を同じアブラナ科植物のシロイヌナズナの知見を活用して検討した。成長促進を示した緩速予備凍結区の Upregulated gene の数は, 成長促進を示さなかったガラス化区および対照区のそれと比較して明らかに増加していた。その一方, それらの T/B 比(処理区の発現強度/Blank の発現強度) は比較的小さいという特徴を有していた。次に, 各処理区における遺伝子発現パターンの類似性を比較したところ, 緩速予備凍結区が3処理区のうちで最も異なる遺伝子発現パターンを示すことがわかった。
- (3) 緩速予備凍結区に特異的に発現しているホースラディッシュの遺伝子のうち, T/B 比が3倍以上の Upregulated gene 37 個に注目したところ, オーキシン関連遺伝子2個, ストレス関連遺伝子4個, 生体防御関連遺伝子2個が確認された。以上のことから, 成長促進現象はオーキシン関連遺伝子の顕著な発現と密接に関連することが予想された。また, ストレスや生体防御関連遺伝子が発現していた事実は, 緩速予備凍結区の方法では, 凍結保存の過程においてより強度の傷害を受け, その状態からの回復を図るためにこれらの遺伝子が活発に発現していたことが示唆された。

謝 辞

本論文の作成にあたり, 終始懇篤なる御教示を賜るとともに御校閲の労を賜った北海道大学大学院農学研究院助教授鈴木 卓博士, 同研究院教授大澤勝次博士, 同研究院教授藤川清三博士ならびに同研究院教授三上哲夫博士に対し, 深甚なる感謝の意を表します。

本研究で組織観察実験を行うに際し, 御指導, 御協力を頂いた北海道大学農学研究院技官笠井登氏, 同生物組織解析センター技官伊藤秀章氏に謹んで感謝の意を表します。DNA マイクロアレイ実験では, 明治大学農学部植物分子生理学研究室助教授川上直人博士ならびに同研究室

今村 茜氏に, RNA 抽出・精製からデータの解析まで種々の御指導を頂いた。ここに記して厚く御礼申し上げる次第です。

ホースラディッシュ培養体は, 金印わさびオホーツク(株) 澄子研究員から御提供頂いた。心より感謝の意を表します。また, アスパラガスの各品種および雌株・雄株を用いた実験では, 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場技官田村春人氏, 同技官中野英樹氏の御世話になりました。御二人の御協力に感謝申し上げます。

最後に, 本研究を遂行する過程で, 数多くの助言と激励を頂いた園芸学研究室の大学院生ならびに学部学生諸氏に感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 酒井 昭. 1956. 超低温における植物組織の生存. 低温科学生物篇. 14, 17-26.
- 2) Sakai, A., M. Yamakawa, D. Sakata, T. Harada and T. Yakuwa. 1978. Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196°C . Low Temperature Science Series B. 36. 31-38.
- 3) Kartha, K. K., N. L. Leung and K. Pahl. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. Journal of the American Society for Horticultural Science. 105. 481-484.
- 4) Kumu, Y., T. Harada and T. Yakuwa. 1983. Development of a whole plant from a shoot tip of *Asparagus officinalis* L. frozen to -196°C . Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University. 61. 285-294.
- 5) 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 Reports. 8. 418-421.
- 6) Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells

- of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*. 9. 30-33.
- 7) Niino, T., A. Sakai, H. Yakuwa and K. Nojiri. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 28. 261-266.
 - 8) 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 Reports*. 13. 442-446.
 - 9) Pennycooke, J. C. and L. C. Towill. 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports*. 19. 733-737.
 - 10) Fabre, J., and J. Dereuddre. 1990. Encapsulation Dehydration — A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters*. 11. 413-426.
 - 11) Matsumoto, T. and A. Sakai. 1995. An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to -196°C . *Cryo-Letters*. 16. 299-306.
 - 12) Shibli, R. A., M. A. L. Smith and M. A. Shatnawi. 1999. Pigment recovery from encapsulated-dehydrated *Vaccinium pahaetae* (ohelo) cryopreserved cells. *Plant Tissue, and Organ Culture*. 55. 119-123.
 - 13) Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi and K. Yamada. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryo-Letters*. 16. 189-196.
 - 14) Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of strawberry (*Fragaria* \times *ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica*. 101. 109-115.
 - 15) Hirai, D., and A. Sakai. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Reports*. 19. 150-155.
 - 16) Paul, H., G. Daigny and B. S. Sangwan-Norreel. 2000. Cryopreservation of apple (*Malus* \times *domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Reports*. 19. 768-774.
 - 17) Assy-Bah, B. and F. Engelmann. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-Letters*. 13. 117-126.
 - 18) Dumet, D., F. Engelmann, N. Chabrilange, Y. Duval and J. Dereuddre. 1993. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-Letters*. 14. 243-250.
 - 19) Panis, B., N. Totte, K. V. Nimmen, L. A. Withers and R. Swennen. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Science*. 121. 96-106.
 - 20) Panis, B., H. Strosse, S. Van den Hende and R. Swennen. 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *Cryo-Letters*. 23. 375-384.
 - 21) Escobar, R. H., G. Mafla and W. M. Roca. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports*. 16. 474-478.
 - 22) Hirai, D. and A. Sakai. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Reports*. 21. 961-966.

- 23) Harada, T., A. Inaba, T. Yakuwa and T. Tamura. 1985. Freeze-preservation of apices isolated from small heads of Brussels sprouts. *HortScience*. 20. 678-680.
- 24) 鈴木 卓, 稲川 裕, 原田 隆, 八鍬利郎. 1987. 果樹における生殖質の凍結保存に関する研究 (第1報) 液体窒素中における凍結後のナシ茎頂の生存. 北海道大学農学部邦文紀要. 15. 118-123.
- 25) Ezawa, T., T. Harada and T. Yakuwa. 1984. Studies on freeze-preservation of fruit tree germplasm. — Freeze-preservation of grape shoot tips. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 64. 51-55.
- 26) 鈴木 卓. 1993. 園芸作物組織の超低温保存に関する基礎的研究. 北海道大学農学部邦文紀要. 18. 165-217.
- 27) 劉 永立, 鈴木 卓, 笠井 登, 原田 隆. 1988. サルナシ (*Actinidia arguta*) 培養体シュート側芽の凍結後の生存に及ぼす低温馴化および凍結媒液処理の影響. 園芸学会雑誌. 67. 562-566.
- 28) Grout, B. W. W., and G. G. Henshaw. 1980. Freeze-preservation of potato shoot tip cultures. *Annals of Botany*. 42. 1227-1229.
- 29) Kartha, K. K., N. L. Leung and L. A. Mroginski. 1982. *In vitro* responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), *Z. Pflanzenphysiol.* 107. 133-140.
- 30) Kuo, C. C. and R. D. Lineberger. 1985. Survival of *in vitro* cultured tissue of 'Jonathan' apples exposed to -196°C . *HortScience*. 20. 764-767.
- 31) Reed, B. N. and H. B. Lagerstedt. 1987. Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. *HortScience*. 22. 302-303.
- 32) Fukai, S. and M. Oe. 1990. Morphological observations of chrysanthemum shoot tips cultured after cryoprotection and freezing. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 59. 383-388.
- 33) Fukai, S. 1990. Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. *Scientia Horticulturae*. 45. 167-174.
- 34) Kohmura, H., A. Sakai, S. Chokyu and T. Yakuwa. 1992. Cryopresewrvation of *in vitro*-cultured multiple bud clusters of asparagus (*Asparagus officinalis* L. cv Hiroshimagreen (2n=30)) by the techniques of vitrification. *Plant Cell Reports*. 11. 433-437.
- 35) Suzuki, T., K. Kaneko, T. Harada and T. Yakuwa. 1998. Enhanced formation of roots and subsequent promotion of growth of shoots on cryopreserved nodal segments of *Asparagus officinalis* L. *Cryobiology*. 36. 194-205.
- 36) 鈴木 卓, 稲川 裕, 原田 隆, 八鍬利郎, 今河 茂. 1986. 園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 (第5報) クロノミウグイスカズラの茎頂培養. 北海道大学農学部邦文紀要. 15. 104-110.
- 37) 鈴木 卓, 神田啓臣, 八鍬利郎, 今河 茂. 1988. 園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 (第7報) 無菌培養によるブルーベリーのシュートの増殖と発根. 北海道大学農学部邦文紀要. 16. 221-229.
- 38) 鈴木 卓, 佐々木克司, 大沼由理, 原田 隆. 2000. 茎頂培養によるアロニア (*Aronia melanocarpa* Elliot) の栄養繁殖. 園芸学会雑誌. 69 (別1). 215.
- 39) 石 嶺, 鈴木 卓, 佐藤孝夫, 大澤勝次. 2003. 茎頂培養によるサンザシ属 (*Crateagus* spp.) 3種の栄養繁殖. 園芸学会雑誌. 72 (別1). 381.
- 40) 石 嶺, 村田奈芳, 佐藤孝夫, 鈴木 卓, 大澤勝次. 2004. 胚培養によって育成したサンザシ属 (*Crateagus* L.) の種間雑種. 園芸学会雑誌. 73 (別1). 391.
- 41) 鈴木 卓, 佐々木克司, 大沼由理, 原田 隆, 大澤勝次. 2000. ハスカップ *in vitro* 培養体から倍数体を作成するためのコルヒチン処理条件の検討. 園芸学会雑誌. 69 (別

- 2), 299.
- 42) 植野畑真希, 藤本しず子, 嘉見大助, 鈴木卓, 大澤勝次. 2003. コルヒチン添加培地によるアロニア4倍体の作出. 園芸学会雑誌. 72. (別1). 375.
- 43) 石井現相. 2001. 新しい耐寒性小果樹アロニアの機能性成分 — 北方圏の四季を彩る注目のベリー —. 化学と生物. 39. 390-392.
- 44) 田中常雄, 田中 彰. 2001. アロニアの化学成分含量と特性値. 日本食品科学工学会誌. 48. 606-610.
- 45) Zheng, W. and S. Y. Wang. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51. 502-509.
- 46) Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15. 473-497.
- 47) Suzuki, T., K. Kaneko and T. Harada. 1997. Increase in freezing resistance of excised shoot tips of *Asparagus officinalis* L. by preculture on sugar-rich media. Cryobiology. 34. 264-275.
- 48) Jitsuyama, Y., T. Suzuki, T. Harada and S. Fujikawa. 1997. Ultrastructural study on mechanism of increased freezing tolerance due to extracellular glucose in cabbage leaf cells. Cryo-Letters. 18. 33-44.
- 49) Jitsuyama, Y., T. Suzuki, T. Harada and S. Fujikawa. 2001. Loading process of sugars into cabbage petiole and asparagus shoot apex cells by incubation with hypertonic sugar solutions. Protoplasma. 217. 205-216.
- 50) Jitsuyama, Y., T. Suzuki, T. Harada and S. Fujikawa. 2002. Sucrose incubation increases freezing tolerance of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cell suspensions. Cryo-Letters. 23. 103-112.
- 51) Sakai, A., T. Matsumoto, D. Hirai and T. Niino. 2000. Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. Cryo-Letters. 21. 53-62
- 52) 石 嶺, 田中 彰, 田中常雄, 佐藤孝夫, 鈴木 卓, 大澤勝次. 2004. 東アジア原産サンザシ属 (*Crateagus*) 3種における果実内化学成分の特徴. 園芸学研究. 4. 333-338.
- 53) 田中常雄, 田中 彰. 1998. ハスカップの品種・系統別化学成分含量と特性値. 日本食品科学工学会誌. 45. 129-133.
- 55) Bernald, F., H. Shaker-Bazarnov and B. Kaviani. 2002. Effects of salicylic acid on cold preservation and cryopreservation of encapsulated embryonic axes of Persian lilac (*Melia azedarach* L.). Euphytica. 123. 85-88.
- 56) Bilyk, A. and G. M. Sapers. 1986. Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 34. 585-586.
- 57) Rimando, A. M., W. Kalt, J. B. Magee, J. Dewey, J. R. Ballington. 2004. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52. 4713-4719.
- 58) Marcotrigiano, M. and S. P. McGlew. 1991. A two-stage micropropagation system for cranberries. Journal of the American Society for Horticultural Science. 116. 911-916.
- 59) Ballington, J. R. 2001. Collection, Utilization, and preservation of genetic resources in *Vaccinium*. HortScience. 36. 213-220.
- 60) Gonzalez-Arno, M. T., F. Engelman, C. Urrea, M. Morenza and A. Rios. 1998. Cryopreservation of citrus apices using

- the encapsulation-dehydration technique. *Cryo-Letters*. 24. 177-182.
- 61) Gonzalez-Arno, M. T., J. Juarez, C. Ortega, L. Navarro and N. Duran-Vila. 2003. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. *Cryo-Letters*. 24. 85-94.
- 62) Shatnawi, M. A. and K. A. Johnson. 2004. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of 'Christmas bush' (*Ceratopetalum gummiferum*) shoot tips. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant* 40. 239-244.
- 63) Sherlock, G., W. Block and E. E. Benson. 2005. Thermal analysis of the plant encapsulation-dehydration cryopreservation protocol using silica gel as desiccant. *Cryo-Letters*. 26. 45-54.
- 64) Uragami, A., A. Sakai and M. Nagai. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. *Plant Cell Reports*. 9. 328-331.
- 65) Norman, M. N. and M. Vengadasalam. 1992. Effects of moisture-content on cryopreservation of *Coffea* and *Vigna* seeds and embryos. *Cryo-Letters*. 13. 199-208.
- 66) Block, W., 2003. Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germplasm. *Cryobiology*. 47. 59-72.
- 67) Chang, Y. J., R. E. Baker and B. M. Reed. 1999. Cold acclimation improves recovery of cryopreserved grass (*Zoysia* and *Lolium* sp.). *Cryo-Letters*. 21. 107-116.
- 68) Na, H. Y., and K. Kondo. 1996. Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. *Plant Science*. 118. 195-201.
- 69) Polge, C., A. U. Smith and A. S. Parkes. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164. 166.
- 70) 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.
- 71) Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants, *Annual Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. (USA)*. 43. 439-463.
- 72) Janda, T., G. Szalai, I. Tari and E. Paldi. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*. 208. 175-180.
- 73) Kovtun, Y., W. L. Chiu, G. Tena and J. W. L. Sheen. 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*. 30. 157-161.
- 74) Tasgin, E., O. Atici and B. Nalbantoglu. 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Regulation*. 41. 231-236.
- 75) Suzuki, T., D. Kami, K. Oosawa and L. E. Mcgann. 2005. Cryoprotection in plant tissues related to reduced volume expansion of cryoprotectant solution. *Cryo-Letters*. 26. 159-168.
- 76) 実山 豊. 1996. アスパラガス茎頂の凍結保存に関する諸要因についての基礎的研究. 北海道大学大学院農学研究科平成7年度修士論文.
- 77) Sakai, A. 1993. JICA Genetic resources projects REF, 6. pp 5-26.
- 78) Kawakami, N., C. Kawabata and K. Noda. 1992. Differential changes in levels of messenger-RNAs during maturation of wheat seeds that are susceptible and

- registant to preharvest-sprouting. *Plant and Cell Physiology*. 33. 511-517.
- 79) 酒井 昭. 1987. 植物の茎頂の凍結保存とその問題点 凍結保存—動物・植物・微生物—. pp 200-206. 朝倉書店.
- 80) Haskins, R. H. and K. K. Kartha. 1980. Freeze preservation of pea meristems: cell survival. *Canadian Journal of Botany*. 58. 833-840.
- 81) Kuroiwa, T., M. Fujie and H. Kuroiwa. 1992. Synthesis of mitochondrial DNA occurs actively in a specific region just above the quiescent center in the root meristem of *Pelargonium zonale*. *Journal of Cell Science*. 101. 483-493.
- 82) Fujie, M., H. Kuroiwa, S. Kawano and T. Kuroiwa. 1993. Studies on the behavior of organelles and their nucleoids in the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* (L.) Col. *Planta*. 189. 443-452.
- 83) Lee, S. J. and H. E. Warmke. 1979. Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. *American Journal of Botany*. 66. 141-148.
- 84) Wang, Z. Y., G. Legris, J. Nagel, I. Potrykus and G. Spangenberg. 1994. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions in *Festuca* and *Lolium* species. *Plant Science*. 103. 93-106.
- 85) Brison, M., M. de Boucaud, A. Pierronnet and F. Dosba. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with *Plum Pox Potyvirus*. *Plant Science*. 123. 189-196.
- 86) Haggman, H. M., L. A. Ryyananen, T. S. Aronen and J. Krajnakova. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots Pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54. 45-53.
- 87) Helliot, B., B. Panis, Y. Poumay, R. Swennen, P. Lepoivre and E. Frison. 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports*. 20. 1117-1122.
- 88) Tremblay, L. and F. M. Tremblay. 1991. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B. S. P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 27. 95-103.
- 89) Tremblay, L. and F. M. Tremblay. 1995. Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 42. 39-46.
- 90) Biahoua, A. and L. Bonneau. 1999. Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Reports*. 19. 185-190.
- 91) Wang, Q., R. Gafny, N. Sahar, I. Sela, M. Mawassi, E. Tanne and A. Perl. 2002. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science*. 162. 551-558.
- 92) Venkataraman, M., and M. P. Westerman. 1990. Cryopreservation enhances interleukin-1 production in human mononuclear-cells. *Cryobiology*. 27. 137-142.
- 93) Venkataraman, M. 1992. Cryopreservation-induced enhancement of interleukin-2 production in human peripheral-blood mononuclear-cells. *Cryobiology*. 29. 165-174.
- 94) Venkataraman, M. 1994. Effects of cryopreservation of immune-responses. 7. Freezing induced enhancement of IL-6 production in human peripheral-blood mononuclear-cells. *Cryobiology*. 31. 468-477.

- 95) Venkataraman, M. 1995. Effects of cryopreservation on immune responses. 8. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human peripheral blood mononuclear cells. *Cryobiology*. 32. 528-534.
- 96) Wang, S. Y., M. L. Hsu, C. H. Tzeng, H. C. Hsu and C. K. Ho. 1998. The influence of cryopreservation on cytokine production by human T lymphocytes. *Cryobiology*. 37. 22-29.
- 97) Kvarnstrom, M., M. C. Jenmalm, C. Ekerfelt. 2004. Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology*. 49. 157-168.

Summary

Studies were carried out in order to obtain data for establishing a routine method of super-low-temperature cryopreservation of *in vitro*-tissues of some horticultural crops and to investigate vigorous growth of regenerates after cryopreservation.

The results obtained may be summarized as follows.

1. Establishment of cryopreservation method for *in vitro*-culture of small fruit trees
 - 1) Shoot apices of black chokeberry and hawthorn (Rosaceae) were both successfully cryopreserved utilizing encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification (survival rate, 62.5~77.8%). Further, the apices markedly increased the survival rate (black chokeberry, 99.5%; hawthorn, 82.5%) when cryopreserved using 'Modified encapsulation-dehydration' in which glycerol was added into beads and loading solution (LS).
 - 2) Shoot apices of blue honeysuckle (Caprifoliaceae) were successfully cryopreserved utilizing encapsulation-dehydration (survival rate, 99.3%). In addition, it was shown that the 16-hour immersion of alginate-coated apices in LS supplemented with 0.5 M glycerol and 0.1 mM salicylic acid resulted in a high survival rate (99.3%), and made it possible to shorten reduce the cold acclimation duration period. In this study, the encapsulation-dehydration method using glycerol and salicylic acid was named 'Revised encapsulation-dehydration'.
 - 3) Shoot apices of both cranberry and blueberry (Ericaceae) were unsuccessfully cryopreserved (the highest survival rate, cranberry, 33.3%; blueberry, 26.7%) regardless of cryopreservation methods. Moreover, the survival rate did not rise in the case of cryopreservation using 'Modified encapsulation-dehydration'. However, it was shown that the survival rate remarkably increased (cranberry, 86.7%; blueberry, 90.0%) when cryopreserved using 'Revised encapsulation-dehydration'.
2. Vigorous growth of regenerates after cryopreservation
 - 1) Vigorous growth of asparagus plantlets was found in those that had regenerated from slow-prefrozen nodal segments obtained from *in vitro* cultures. At first, the growth of regenerates slow-prefrozen with freezing solution containing 1.0 M trehalose or 0.6 M raffinose was compared with that in the case of 12% Me₂SO in order to study the effect of Me₂SO. As a result, the number of shoots and the ratio of root formation in regenerates frozen at -40°C were vastly increased regardless of the composition of the freezing solution.
 - 2) The growths of regenerates from 9 kinds of asparagus plants (4 males and 4 females from each of 4 cultivars; 1 supermale) were compared mutually. The number of shoots and the ratio of root formation in regenerates after cryopreservation using slow-prefreezing were prominently in-

- creased regardless of cultivar and sex.
- 3) The growths of asparagus regenerates cryopreserved using 4 methods (slow-prefreezing, vitrification, encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration) were compared mutually. In culture after cryopreservation, regenerates cryopreserved using slow-prefreezing grew more vigorously than ones cryopreserved using other methods and the control.
 - 4) The growths of horseradish regenerates cryopreserved using 4 methods were also compared mutually. A vigorous growth of regenerates was only observed after slow-prefreezing cryopreservation in the same way as asparagus.
3. Analysis of the reason why the slow-prefreezing method induces vigorous growth of regenerates after cryopreservation
- 1) Cells surviving in asparagus shoot apices derived from cultures after cryopreservation were observed daily by transmission electron microscope. Microscopical observation of cells cryopreserved using slow-prefreezing revealed a fair number of small vesicles existing near the membrane (just after thawing) and vesicular structures (after 3 days). In addition, the number of mitochondria increased two-fold of that of other cryopreservation methods since 5 days of culture.
 - 2) Gene expression of cryopreserved tissues of horseradish was examined utilizing DNA microarray. The number of upregulated genes and the expression intensities of slow-prefrozen regenerates which showed vigorous growth increased remarkably compared with that of cryopreserved ones experiencing vitrification and the control. However, it was characterized that the expression intensities of upregulated genes in slow-prefrozen regenerates were peculiarly lower than those of other treatments, whereas the gene expression patterns of slow-prefrozen regenerates showed a large difference compared with those of other treatments..
 - 3) In horseradish, the examination of 37 upregulated genes, which were separately expressed in slow-prefrozen regenerates and indicated the expression intensity more 3-times compared with that of untreated apices, resulted in confirming 2 genes relating to auxin activity, 4 genes to stress response and 2 genes to biological defence.