

学 位 論 文 題 名

栄養繁殖性作物のビーズガラス化法による
超低温保存に関する研究

学位論文内容の要旨

作物の在来種、野生種などは耐冷性、耐病性など未知の遺伝子を含むと考えられ、「遺伝資源」として残すことは、将来の品種改良に利用するためにも重要である。種子で繁殖する主な穀類などの作物は、保存する温度などを変えることで短期保存（特性調査や交配母本として利用）、中期保存（短期保存用種子の増殖用）及び長期保存（半永久保存）とも、比較的容易に行うことができる。しかし、栄養繁殖性作物は植物体を圃場やポット栽培して保存されるため、中期～長期の保存には、1) 多くの圃場面積を要し、2) 植え替え、病虫害や雑草の防除作業などの管理労力が膨大なものとなり、3) 病虫害や気象災害による貴重な遺伝資源の消失の危険性が高い。このため、栄養繁殖性作物の中～長期保存法としてインビトロ保存法（無菌組織培養法）が開発されたが、この方法では継代培養のための労力、雑菌混入による消失、体細胞変異による変異の発生の危険性が依然、残されている。従って貴重な遺伝資源を安全、低コスト、低面積で長期保存する方法の開発が必要であり、そのためには植物の細胞や組織を -150°C 以下で保存する超低温保存が最も適した方法である。しかし、その実用化のためには簡便で経費のかからない超低温保存法の開発が必要となる。

茎頂を用いた超低温保存は、1990年頃に、茎頂を室温または 0°C で脱水した後、直接液体窒素中に冷却保存する、簡便で、茎頂のような多細胞組織にも利用できる、ガラス化法（Sakaiら、1990；Langisら、1990）、ビーズ乾燥法（Dreuddreら、1990）などが開発された。本研究では、これら新たに開発された超低温保存法の有効性を検討し、北海道立農業試験場で圃場保存または網室保存されているバレイショ、イチゴなどの茎頂を超低温保存するための具体的な方法としてビーズガラス化法を確立した。さらに本研究の超低温保存法は熱帯性作物や培養細胞にも適用可能であることを実証した。

1. 茎頂標本の大量増殖

超低温保存の実験には大量の茎頂を必要とするため、組織培養による増殖を試みた。頂芽組織は継代培養に使用し、残された節を培養し、誘導された腋芽由来の茎頂（ハッカ、バレイショ、キャッサバ）などを超低温保存の実験に用いた。この増殖法によって均一で生育の良好な茎頂を大量に得ることができた。

2. 各種の超低温保存法の比較

近年開発された、簡便な超低温保存法（ビーズガラス化法、ビーズ乾燥法、ガラス化法、簡易凍結法）を、ハッカ培養茎頂を用いて比較検討した。ガラス化法は茎頂をガラス化液（PVS2

液)に直接浸し、その急速な脱水障害のため、茎葉形成率は低く、操作も煩雑であった。ビーズ乾燥法の操作は簡便であったが、ショ糖溶液処理のみでは茎頂に十分な脱水耐性を付与することはできず、茎葉形成率はガラス化法と同じ程度であった。簡易凍結法では生存する個体を得ることはできなかった。これらに比べビーズガラス化法は茎頂をアルギン酸ゲルで包埋するため、ガラス化液による急速な脱水障害を防ぐことが可能で、操作も簡便であった。ビーズガラス化法で超低温保存したハッカ茎頂の茎葉形成率は著しく改善された。また、操作性に優れたビーズガラス化法とビーズ乾燥法をバレイショ、イチゴを用いて比較した場合も、茎葉形成率、加温後の生育ともにビーズガラス化法によって超低温保存した茎頂が優れていた。

3. ビーズガラス化法による超低温保存

ビーズガラス化法で最も重要な点は、1) 茎頂がガラス化できる程度までPVS2液(30%(w/v)グリセリン、15%(w/v)エチレングリコール、15%(w/v)ジメチルスルフォキシド、0.4M ショ糖、MS 培地、pH5.8)、(Sakai ら、1990)により脱水すること、2) 予めこの浸透脱水に茎頂が十分に耐えられる能力を付与することの2点である。前者はPVS2液で0℃、2～4時間、浸透脱水することにより最高の結果が得られた。後者は、①茎頂を摘出する植物体を「前処理」として4℃で2～3週間培養する低温処理または高濃度のショ糖培地で7～10日間培養するショ糖馴化、②摘出した茎頂を高濃度のショ糖培地で16時間培養する「前培養」、③ショ糖とグリセリンの混合液で茎頂を処理する「浸透脱水耐性付与」、これら3つの方法を作物毎に適宜組み合わせることで、茎頂にPVS2液に対する浸透脱水耐性を付与することができ、ハッカ、バレイショ、イチゴ、ヤマノイモのビーズガラス化法による超低温保存に最適な条件を明らかにした。また、本方法は若干の変更によって、温帯作物だけではなく、熱帯作物であるキャッサバにも適用することができ、計5作物、28品種で平均66.3%の茎葉形成率を得た。本方法を用いて超低温保存した茎頂の保存を、1時間(全作物)、6ヶ月間(ヤマノイモ)、1年間(バレイショ、イチゴ)、2年間(イチゴ)試みたが、保存期間の長さはそれらの茎葉形成率に影響を与えないことが明らかになった。

ビーズガラス化法は茎頂だけではなく、ニンジン等の培養細胞や不定胚にも応用することができた。細胞や不定胚はアルギン酸ゲルで包埋することにより、細胞収集のための遠心分離などの操作が最小となり、操作性は従来の方法より向上した。

4. 遺伝的安定性

ビーズガラス化法で超低温保存した茎頂を加温開始から順化、圃場における生育を調査した。加温直後の生育は迅速、旺盛であり、生育した茎葉は茎頂の分裂組織から直接伸長した。次に順化後の圃場での外観や生育(草丈)、収穫物(塊茎、果実)の外観、重量には超低温保存した植物体と対照区の植物体の間に差が認められず、草丈、重量の変異係数にも差はなかった(バレイショ、イチゴ、ヤマノイモ)。さらに、200種のDNAプライマーを用いてRAPD分析した結果からも両者の間に差は認められなかった(バレイショ、ヤマノイモ、キャッサバ)。従って超低温保存した作物に実用上問題となるような変異は発生しないことから、超低温保存により品種の特性を長期間、安定して保持できることが明らかになった。

濃厚な溶液を急速に冷却することで生じるガラス状態を利用して、作物の茎頂などを液体窒素の温度(-196℃)で保存することが可能となった。ハッカ、イチゴ、ヤマノイモを用いて茎葉形成率が高く、変異の発生がない超低温保存法の報告はこれまでになく、また、バレイショ、

キャッサバ、ニンジン¹⁾の培養細胞、不定胚をビーズガラス化法により超低温保存に成功した最初の例となった。超低温保存後の変異に関しても、圃場での生育を調査した報告は極めて少ないが、3作物の生育と2作物の収穫物を調査し、変異の発生が無いことを確認できた。

ビーズガラス化法は、栄養繁殖性作物の遺伝資源を、長期保存するために適した方法である。本方法が圃場保存、インビトロ保存と共に、今後の植物遺伝資源の超低温保存事業に活用されることを期待している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎
副 査 教 授 大 澤 勝 次
副 査 教 授 藤 川 清 三
副 査 助教授 幸 田 泰 則

学 位 論 文 題 名

栄養繁殖性作物のビーズガラス化法による 超低温保存に関する研究

本論文は、総頁数 132 頁からなる邦文で表7、図 54、引用文献 59 を含み 7 章から構成されている。別に 4 編の参考論文が添えられている。

在来種、野生種などの遺伝資源は、未知の遺伝子を含むと考えられ、これらを保存することは将来の品種改良に利用するためにも重要である。栄養繁殖性作物は、植物体を圃場やポットに栽培して保存されているが、安全性、低コスト、低面積で長期保存する方法の開発が必要であり、そのためには植物の細胞や組織を -150°C 以下で保存する超低温保存が最も適した方法である。しかし、その実用化には簡便で経費のかからない方法の開発が必要となる。植物の超低温保存の研究は、1990 年頃に、茎頂のような多細胞組織を室温または 0°C で脱水した後、直接液体窒素中に冷却する操作の容易なガラス化法や、ビーズ乾燥法が開発された。本論文は、これら新たに開発された超低温保存法が、北海道立農業試験場で圃場保存または網室保存されているバレイショ、イチゴなど栄養繁殖性作物資源を超低温保存するための具体的な方法を探求しビーズガラス化法を確立した。ここで確立した超低温保存法が熱帯性作物や培養細胞にも適用可能であることを検討したもので、主な結果は次のごとくである。

1. 超低温保存法の比較

超低温保存法には緩速予備凍結法、簡易凍結法、ガラス化法、ビーズ乾燥法がある。近年開発された、プログラムフリーザーを必要としない超低温保存法を、ハッカの培養茎頂を用いて比較した結果、ビーズ乾燥法、ガラス化法の茎葉再生率が高いこと、そして操作のしやすさの点では、ビーズ乾燥法が優れていることを明らかにした。これらの結果に基づいて操作が容易で茎葉再生率の高いビーズガラス化法を考案した。

2. ビーズガラス化法とビーズ乾燥法の比較

ビーズガラス化法は植物の茎頂をあらかじめアルギン酸ゲルに包埋することによって茎頂の組織細胞のガラス化液(PVS2液)による急激な脱水作用を避ける細胞順化をすることができ、かつ操作が容易となる。このことから本方法で超低温保存した茎頂の茎葉再生率は、同じ処理を行うガラス化法より高くなった。ビーズ乾燥法も茎頂をゲルに包埋する事で操作は容易になるが、ショ糖のみでは茎頂に十分な脱水凍結耐性を付与することができず、茎葉再生率はビーズガラス化法に劣った。ガラス化法は茎頂を直接取扱うため、操作に時間を要した。簡易凍結法では生存する茎頂が認められなかった。

ビーズガラス化法とビーズ乾燥法をバレイショ、イチゴでの茎頂を用いて比較し、茎葉再生率、加温後の生育ともビーズガラス化法によって超低温保存した茎頂が優れていたことを明らかにした。

3. ビーズガラス化法による超低温保存法の確立

ハッカ、バレイショ、イチゴ、ヤマノイモ茎頂のビーズガラス化法による超低温保存に最適な前処理の条件を明らかにした。また、この方法は若干の変更によって、温帯作物だけではなく熱帯作物であるキャッサバにも適用できることを明らかにした。

4. 遺伝的安定性

超低温保存された遺伝資源は、保存後に変異の発生がないことが重要である。ビーズガラス化法で超低温保存した茎頂の加温直後の生育から圃場に移植後における生育を調査した。その結果、加温直後の生育は迅速、旺盛であり、生育した茎葉は茎頂の分裂組織から直接伸長したこと、順化後の生育(バレイショ、イチゴ、ヤマノイモ)は液体窒素処理と無処理の間に差は認められなかったことを明らかにした。次ぎに、それら再生植物体(バレイショ、ヤマノイモ、キャッサバ)を200種のDNAプライマーを用いてRAPD分析した結果、液体窒素処理と無処理の間に変異が認められないことを明らかにした。

5. 培養細胞、不定胚への応用

ビーズガラス化法はニンジン培養細胞、不定胚にも適用でき、処理時間が短く、操作は従来の方法より優れていることを明らかにした。

以上のように、本論文は栄養繁殖性作物の長期、安定保存を可能とし、それぞれの作物に最適な条件を明らかにした。この成果は学術的、実用的に高く評価されるばかりでなく、植物細胞の凍結への順化機構の解明に重要な手がかりをあたえるものである。

よって審査員一同は、平井泰が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。