

ビーズガラス化法(Encapsulation-Vitrification 法) によるユリ培養茎頂の超低温保存

松本敏一*・酒井 昭**・高橋千昭***・山田員人*

*島根県農業試験場

(〒693 出雲市芦渡町 2440)

** (〒001 札幌市北区麻生町 1-5-23)

***横田町役場

(〒699-18 島根県仁多郡横田町 1037)

(1995年3月4日受付)

(1995年11月11日受理)

培養中のユリ鱗片上に形成した不定芽を 0°C で約 21 日間、低温馴化(Cold-hardening)した後、茎頂を約 1 mm 角の大きさで摘出した。次に、この茎頂を 0.3 M ショ糖を含む MS 固形培地に置床し、16~24 時間、前培養した。更に、2 M グリセリンと 0.4 M ショ糖を含むアルギン酸ビーズで包埋してから、ガラス化液(PVS 2 液)で 0°C、100 分間の脱水によりビーズガラス化した。その後、液体窒素中で急速冷却し、40°C の温水で急速に加温した結果、約 95% のシュート形成率を示した。茎頂をビーズで包埋した後、乾燥するビーズ乾燥法と比べ、ビーズガラス化法では、脱水時間が著しく短縮されるほか、シュート形成率が 20~30% 高く、その上、小球の生体重が重いという利点がある。しかもビーズガラス化法は、ビーズ包埋しない従来のガラス化法と比べて、多量の茎頂を同時に処理することが可能である。以上のことから、ユリにおいてもビーズガラス化法は、効率的で実用的な茎頂の超低温保存法になり得ると考えられる。

1. 緒言

遺伝資源を長期間、安定して保存する方法として、近年、茎頂を用いた超低温保存法が注目されている¹⁾。これは、遺伝的変異が最も少ないとされる茎頂を用いて、液体窒素あるいは -135~-150°C の超低温フリーザー内で保存する方法である。超低温下では細胞の生化学的活性がほとんど停止するため保存中の生理的、遺伝的変化が最小限に抑えられ²⁾、また、比較的小さいスペース、低コストでの長期保存が可能となる等の利点がある。

超低温保存法は、液体窒素に冷却する前の脱水方法により、ガラス化法、乾燥法、緩速予備凍結法、簡易凍結法の 4 通りに大別できる^{1,2)}。茎頂の超低温保存では、これらのうち、ガラス化法と乾燥法で多くの成功例が報告されている¹⁻¹⁷⁾。著者らは、短時間で処理が可能なガラス化法でワサビ³⁾、ユリ⁴⁾培養茎頂の液体窒素保存法に成功したが、この方法では、注意深い脱水処理が必要

で多量の茎頂を均一に同時に処理できない難点がある。そこで、ワサビの培養茎頂を材料に、ガラス化法を改良したビーズガラス化法(Encapsulation-Vitrification 法)を発表した¹⁸⁾。この方法では、茎頂を 2 M グリセリン + 0.4 M ショ糖液でアルギン酸ビーズに包埋し、濃厚なガラス化液(PVS 2 液⁹⁾)によりビーズを脱水する方法である。このビーズガラス化法は、ワサビ培養茎頂の保存に極めて有効で、液体窒素処理後のシュート形成率が 90% 以上に達した。そこで、本研究は、ユリの培養茎頂を用いて、ガラス化法⁴⁾、ビーズ乾燥法^{12,15)}およびビーズガラス化法¹⁸⁾の 3 つの方法で液体窒素保存後のシュート形成率と再生シュートの生育について比較し、ビーズガラス化法の有効性を検討した。

2. 実験材料および方法

(1) 材料

供試材料は、無菌培養中のササユリ(*Lilium*

japonicum Thunb.)を主として用いた。また、ササユリと比較するため、‘サクユリ’(*L. auratum* var. *platyphylum* Baker), ‘スターゲザー’(*L. hybrid* cv. ‘Star gazer’), ‘サマードレス’(*L. parkmanii* cv. ‘Summer dress’), ‘カノコユリ’(*L. speciosum* Thunb.), ‘峰の雪’(*L. speciosum* cv. ‘Kraetzeri’)の5種類のユリも実験に用いた。

(2) 鱗片培養による不定芽の誘導

約5 mm角に調整したユリの鱗片をホルモンフリーのMS培地¹⁹⁾で培養し、約30日後に不定芽を形成した鱗片を0°C、16時間日長(2,000 lux)で約21日間、低温馴化(Cold-hardening)処理をした。処理後、2~3枚展葉した不定芽から約1 mm角に茎頂を摘出し、0.3 M ショ糖を含むMS+0.2% ゲランガム培地上で25°C、16時間日長(3,000 lux)下で16~24時間、脱水・凍結耐性を付与するため前培養した。

(3) ガラス化法

ガラス化処理は、ユリ培養茎頂を用いた Matsumoto *et al.*⁴⁾による方法に従い、前培養した茎頂を2 M グリセリンと0.4 M ショ糖液(ローディング液¹⁰⁾)で20分間処理した後、0°Cで50分間のガラス化液(PVS 2液⁶⁾)に置換して脱水した。PVS 2液は、30%(w/v)グリセリン、15%(w/v)エチレングリコール、15%(w/v)DMSOおよび0.4 M ショ糖を含み、pH 5.8に調整した。次に、1.8 ml 容クライオチューブに脱水後の10個の茎頂と新しいPVS 2液を1 ml 入れ、直接、液体窒素中で急速冷却し(冷却速度:約-280°C/min.)、そこに1時間以上保存した。

液体窒素中に保存した茎頂は、40°Cの温水中で急速加温(2分間)した後、PVS 2液を直ちに除去し、代わりに1.2 M ショ糖液を入れて、25°Cで20分間置いた。その後、茎頂は、濾紙2枚を敷いたホルモンフリーのMS+0.2% ゲルライト培地上に置床し、翌日新しい濾紙を敷いた新しい培地に移植して、再培養した。

各試験とも、概ね1区10個体とし、それぞれ3~4反復した(以下の実験同様)。

(4) ビーズガラス化法

ビーズの作成は、2 M グリセリンと0.4 M ショ糖液(ローディング液¹⁰⁾)および塩化カルシウムを除いたMS培地を添加した2% アルギン酸ナトリウム溶液を1 mlの注射器に入れ、針から液を押し出す際に1個の茎頂を封入し、通常の濃度のMS培地およびローディング液が入った100 mM 塩化カルシウム溶液に滴下して直径3 mmのビーズを作成した。

ビーズは、100 mlのビーカー内で25°C、約30分間

の凝固反応をした後、50 mlのPVS 2液に置き換え、25°Cまたは0°Cで浸透脱水した。なお、ビーズの入ったビーカーは、100 rpmの旋回振とう培養器上に置き、20分後に新しいPVS 2液と交換した。次に、1.8 ml 容クライオチューブに脱水後の10個のビーズと新しいPVS 2液を0.7 ml 入れ、直接、液体窒素中で急速冷却し、そこに1時間以上保存した。

以後、加温と再培養はガラス化法と同様であるが、ビーズガラス化法では、1.2 M ショ糖液の浸漬時間は30分間とし、再培養時の培地上の濾紙と翌日の培地更新は不要である。

再培養28日後に正常にシュートを形成している茎頂数の調査を行い、全処理茎頂に対する正常にシュートを形成した茎頂を百分率でシュート形成率として示した。

(5) ビーズ乾燥法

ビーズの作成は、前に述べたビーズガラス化法と同様であるが、ビーズ乾燥法では2 M グリセリンを含まない。なお、この方法では、1個の茎頂を含む直径5 mmのビーズを用いた。ビーズは、乾燥前に0.8 M ショ糖を含むMS液体培地中に25°C、16時間の浸漬処理を行った^{12,15)}。次に、乾燥したシリカゲルを50 g入れたガラスシャーレに濾紙を置き、その上にビーズ20個を置き、パラフィルムで密封して室温(25°C)で乾燥させた。1時間毎にシリカゲルをかき混ぜ、含水率が約24%になるまでビーズを乾燥させた。なお、含水率は(ビーズの新鮮重-乾物重)/ビーズの新鮮重×100で算出した。

1.8 ml 容クライオチューブに乾燥したビーズをそれぞれ10個入れ、前述した様に、液体窒素中に入れて急速冷却し、1時間以上置いた。以後、ビーズガラス化法と同様に再培養し、シュート形成率を調べた。なお、ビーズ乾燥法の再培養もビーズガラス化法と同様に濾紙と翌日の培地更新は必要としない。また、加温、再培養条件はビーズガラス化法と同様であるが、加温後の1.2 M ショ糖液処理は不要である。

(6) 茎頂の染色観察

ビーズガラス化法により液体窒素保存後、再培養を行った3日目のササユリ茎頂について、再生状況を顕微鏡で観察した。ビーズから摘出した茎頂は、Widholm *et al.*²⁰⁾の方法により、0.01%のフルオレセインジアセテート(FDA)および0.01%のフェノサフラニン(PS)の染色液に5~10分間浸漬し、その厚さ約20 μmの縦断切片を蛍光顕微鏡で観察し、生存部位の確認を行った。

Table 1. Effects of preculturing and encapsulation with loading on the shoot formation of cold-hardened lily meristems cooled to -196°C .

Preculture	Loading	Shoot formation (%±S. E.)
—	—	26.7±5.8
+	—	35.0±5.8
—	+	57.5±5.0
+	+	87.5±9.6

Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thunb.). Cold-hardening: 0°C for 28 days. Preculturing: 25°C for 1 day on solidified MS medium supplemented with 0.3 M sucrose. Loading: treated with a mixture of 2 M glycerol and 0.4 M sucrose for 20 min. at 25°C ; Dehydration: exposure to PVS 2 for 100 min. at 0°C prior to a plunge into liquid nitrogen(LN). Shoot formation(%): percent of meristems producing normal shoots 28 days after plating. Approximately 10 meristems were tested for each of four replicates.

3. 結果および考察

(1) ビーズガラス化法における前培養とローディングの効果

ビーズガラス化法でシュート形成率に及ぼす前培養と 2 M グリセリン + 0.4 M ショ糖液(ローディング液)による処理の影響を調べた。Table 1 に示すように、前培

Table 2. Effect of the period of cold-hardening on the shoot formation of encapsulated vitrified meristems cooled to -196°C following dehydration with PVS 2.

Period of cold-hardening (days)	Shoot formation (%±S. E.)
0	56.0± 5.5
7	81.7± 2.4
14	82.5± 4.5
21	93.0± 6.1
28	90.0±10.0

Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thunb.). Preculturing: Bulb-scale segments with adventitious buds were cold-hardened at 0°C under 16 h photoperiods for various lengths of time. Excised meristems were precultured at 25°C for 1 day on solidified MS medium supplemented with 0.3 M sucrose. Loading: treated with a mixture of 2 M glycerol and 0.4 M sucrose for 20 min. at 25°C ; Dehydration: exposure to PVS 2 for 100 min. at 0°C prior to a plunge into LN. Shoot formation(%): percent of meristems producing normal shoots 28 days after plating. Approximately 10 meristems were tested for each of four replicates.

養とローディング処理の両処理をした茎頂ではシュート形成率は 87.5% と高率であったのに対し、両処理共しなかった無処理区は 26.7% と低かった。また、単独処

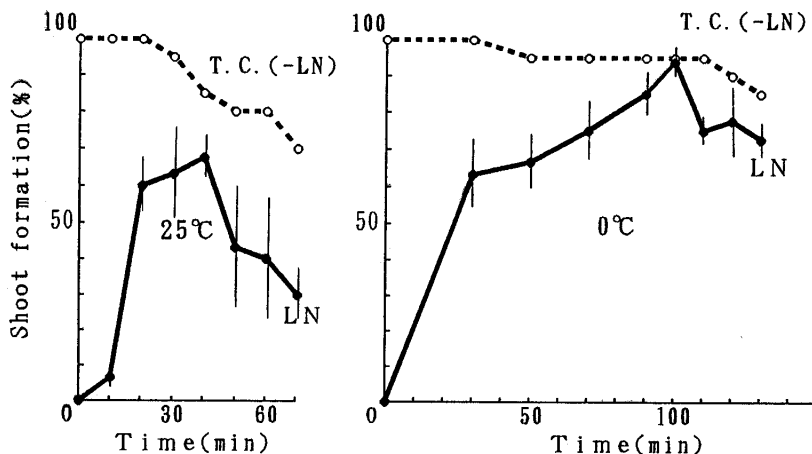


Fig. 1 Effect of exposure time to PVS 2 at 0 or 25°C on the shoot formation of meristems cooled to -196°C by encapsulation-vitrification.

Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thunb.)

Cold hardened at 0°C for 21 days and excised meristems were precultured on agar MS medium supplemented with 0.3 M sucrose for 1 day and then loaded with a mixture of 2 M glycerol and 0.4 M sucrose for 30 min. at 25°C . Meristems following preculture and loading were treated with PVS 2 at 25 or 0°C for various lengths of time before being immersed into LN (●). Approximately 10 meristems were tested for each of four replicates. Bar represents standard error. Treated control (○): same as treated with PVS 2 without cooling to -196°C .

理については、前培養が35%であったのに対し、ローディング処理では57.5%となった。このことから、凍害防御効果については、ローディング処理は前培養に比べシュート形成率の向上により効果的であることが明らかとなった。

(2) ビーズガラス化法における低温馴化期間の影響

ビーズガラス化法でシュート形成率に及ぼす0°Cでの低温馴化の影響を調べた。Table 2に示すように、シュート形成率は、低温馴化の期間が21日までは長くなるにつれて少しずつ高くなった。

(3) ビーズガラス化法における脱水温度と

脱水時間の影響

低温馴化し、0.3 M ショ糖添加のMS固形培地で16~24時間、前培養したササユリ茎頂をビーズに包埋した後に、高張なPVS2液で25°Cまたは0°Cで異なる時間脱水後に液体窒素に入れて冷却された茎頂のシュート形成率をFig. 1に示した。シュート形成率が最も高かったのはPVS2液で0°C、100分間処理した場合で、そのシュート形成率は95%であった。一方、25°C処理では最も高いシュート形成率は40分間処理の70%であった。このように、PVS2液の処理温度は0°Cが適していたが、これについてはガラス化法⁹⁾でも同様な傾向を認めている。この原因は、25°Cでは0°Cに比べPVS2液による脱水が急速に行われるため、それにより茎頂組織に傷害が生じるためと推察される。

(4) 再培養後の生長

ビーズガラス化法により液体窒素中に保存した後、再培養を行ったササユリ茎頂は、3日後にはほとんどの組織が白変したが、3-4日後からシュートの再生が見られた(Fig. 2)。再培養3日後の茎頂をFDAとPSによる

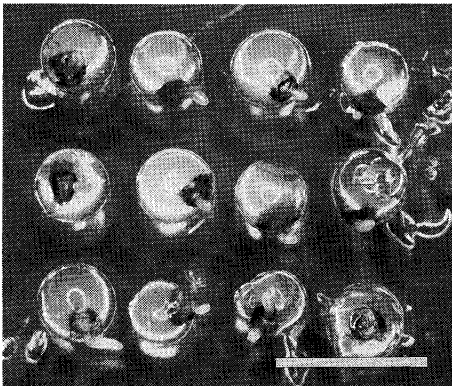


Fig. 2 Shoot formation of cryopreserved meristems by encapsulation - vitrification, 3 days after reculture.
Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thunb.) Bar=5 mm

2重染色により観察したところ、茎頂の大部分は枯死していたものの、茎頂ドームの生存が確認され、そこからシュートが再生していた(Fig. 3)。したがって、再生植物はカルス経由でないことが明らかとなったことから、超低温保存後の変異の発生は極めて少ないと判断される。

培養15日後には発根も見られ、その後シュートは順調に生育し、培養50日後には小球を形成した(Fig. 4)。

(5) ビーズガラス化法における種・品種間差

ササユリ以外の5種類のユリの栽培種について、ビーズガラス化法で液体窒素保存後のシュート形成率を調べた。Table 3に示すように、実験に用いた全種・品種において、低温馴化処理でシュート形成率が著しく高くなった。しかし、シュート形成率は種・品種間でかなり

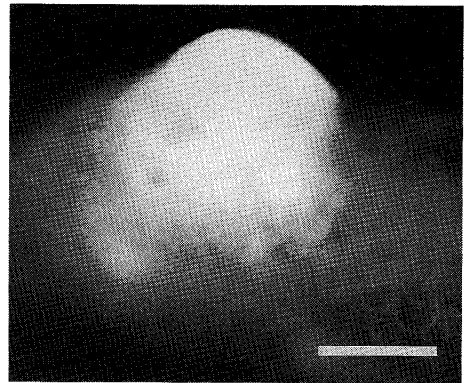


Fig. 3 Longitudinal section through the meristematic dome of encapsulated vitrified meristems after 3 days of reculture stained with fluorecein diacetate and phenosafranin.

Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thunb.) Bar=0.1 mm

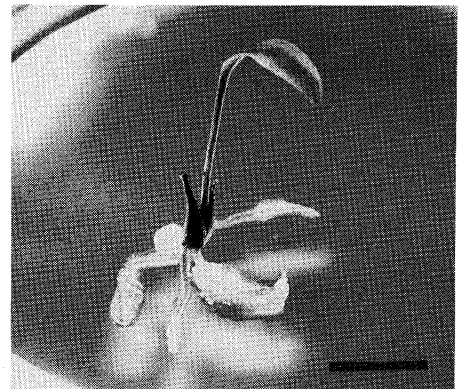


Fig. 4 Plantlet developed from a meristem cooling to -196°C by encapsulation-vitrification 50 days after reculture.
Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thunb.) Bar=20 mm

Table 3. Shoot formation of two species and three cultivars of lily meristems from two species and three cultivars of lily cooled to -196°C .

Species or cultivar	Shoot formation(% \pm S. E.)	
	Hardening	Non-hardening
Golden-banded lily (<i>L. auratum</i> var. <i>platyphyllum</i> Baker)	82.5 \pm 5.0	43.3 \pm 5.8
'Star gazer' (<i>L. hybrid</i> cv. 'Star gazer')	70.0 \pm 10.0	33.3 \pm 5.8
'Summer dress' (<i>L. parkmanii</i> cv. 'Summer dress')	87.1 \pm 11.5	40.0 \pm 10.0
Showy lily (<i>L. speciosum</i> Thunb.)	68.1 \pm 9.0	40.0 \pm 10.0
'Kraetzeri' (<i>L. speciosum</i> cv. 'Kraetzeri')	57.5 \pm 8.7	36.7 \pm 5.8

Precultured meristems were encapsulated with loading solution and were then dehydrated with PVS 2 for 100 min. at 0°C prior to a plunge in LN. Preculturing: 0.3 M sucrose at 25°C for 1 day. loading: a mixture of 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min. at 25°C . Cold-hardening: 0°C for 28 days. Approximately 10 meristems were tested for each of four replicates.

Table 4. Shoot formation and bulblet growth of apical meristems cooled to -196°C by three different cryogenic protocols.

Cryogenic protocol	Shoot formation (% \pm S. E.)	Bulblet growth		
		width (mm size \pm S. E.)	length (mm size \pm S. E.)	fresh weight (mg \pm S. E.)
Vitrification* ¹	92.3 \pm 1.7	2.5 \pm 0.4	5.2 \pm 0.8	41.2 \pm 15.3
Encapsulation-vitrification* ²	93.8 \pm 4.8	2.8 \pm 0.1	6.2 \pm 1.1	41.8 \pm 20.8
Encapsulation-dehydration* ³	66.7 \pm 5.8	2.3 \pm 0.7	5.1 \pm 1.1	36.1 \pm 21.4

Material: Japanese lily (*L. japonicum* Thunb.). Cold-hardening: 0°C for 21 days; Preculturing: 0.3 M sucrose for 1 day.

*¹ Loading treatment with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose before being dehydrated with PVS 2 for 50 min.*¹ or 100 min.*² at 0°C prior to a plunge into LN.

*³ Treatment with 0.8 M sucrose for 16 h prior to air drying for about 7 hr (Water content: 24%). Bulblet growth: 50 days after reculture.

異なり、'サマードレス'が87.1%で最も高く、'峰の雪'が57.5%で最も低率であった。一方、本研究と同一の種・品種で比較したガラス化法¹⁾において、低温馴化処理の効果が認められたのは'サマードレス'およびサユリのみであった。更に、低温馴化処理後のほとんどの種・品種において、そのシュート形成率はビーズガラス化法がガラス化法より高い値となった。また、これは、ワサビ^{3,18)}でも同様な傾向が認められた。したがって、ビーズガラス化法は従来の方法ではシュート形成率が低い場合でも、それを向上させる可能性があると考えられる。

(6) ガラス化、ビーズガラス化、ビーズ乾燥法の比較

ガラス化法、ビーズガラス化法、ビーズ乾燥法の異なる3つの超低温保存法で処理した茎頂のシュート形成率と小球の生育を比較した。Table 4に示すように、シ

ュート形成率はガラス化法とビーズガラス化法がほぼ同じで、ビーズ乾燥法より約30%も高かった。また、小球の生体重はこれら2法がビーズ乾燥法より重かった。このように、ビーズガラス化法とガラス化法では、シュート形成率と再生小球の生体重はほぼ同程度となったが、処理時間はガラス化法が50分間短かった。しかし、扱う対象がガラス化法では1mmの茎頂であるのに対し、ビーズガラス化法は3mmのビーズであるため、各処理時の液交換が極めて容易となり、その結果、多量の茎頂を処理することが可能となる。

方法の有効性は、必要な処理時間よりも液体窒素処理後の正常なシュートの形成率の高さで判断されるべきであろう。本研究のユリやワサビ¹⁸⁾においてもビーズガラス化法のシュート形成率はビーズ乾燥法よりも20~30%高かった。こうした事実から、ビーズガラス化法は茎頂の超低温保存のための一つの有力な方法となり得ると考

えられる。

今後は、脱水耐性を高める方法と葉害が少なく、効果的に脱水できる溶液の検討をさらに進める必要がある。

謝 辞

本研究の一部は、平成3~7年度農林水産省地域バイオテクノロジー実用化研究開発促進事業「培養苗の順化率の向上と保存技術による計画的種苗生産システムの開発」による助成を受けた。

文 献

- 1) Sakai, A., 1993. JICA GRP REF No. 6, 5-26.
- 2) 酒井 昭, 1992. 農業及び園芸, **66(11)**: 1223-1229.
- 3) Matsumoto, T., A. Sakai, K. Yamada, 1994. Plant Cell Rep., **13**: 442-446.
- 4) Matsumoto, T., A. Sakai, K. Yamada, 1995. Plant Cell Tiss. Org. Cul., **41**: 237-241.
- 5) Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai, T. Takahashi, 1989. Plant Cell Rep., **8**: 418-421.
- 6) Sakai, A., S. Kobayashi, I. Oiyama, 1991. J. Plant Physiol., **137**: 465-470.
- 7) Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura, S. Higuchi, 1991. Plant Sci., **78**: 81-87.
- 8) Kohmura, H., A. Sakai, S. Chokyu, T. Yakuwa, 1992. Plant Cell Rep., **11**: 433-437.
- 9) Niino, T., A. Sakai, H. Yakuwa, K. Nojiri, 1992. Plant Cell Tiss. Org. Cul., **28**: 261-266.
- 10) Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, T. Matsuzawa, 1993. Plant Sci., **91**: 67-73.
- 11) 庭田英子, 1994. 青森園試研報, **8**: 7-16.
- 12) Dreuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud, M. Duron, 1990. C. R. Acad. Sci. Paris Serie III, **310**: 317-323.
- 13) Fabre, J., J. Dereuddre, 1990. Cryo-Letters, **11**: 413-426.
- 14) Plessis, P., C. Leddet, J. Dereuddre, 1991. C. R. Acad. Sci. Paris, Serie III, **313**: 373-380.
- 15) Niino, T., A. Sakai, 1992. Plant Sci., **87**: 199-206.
- 16) Suzuki, M., T. Niino, T. Akiyama, 1994. Plant Tissue Culture Letters, **11(2)**: 122-128.
- 17) Hatanaka, T., T. Yasuda, T. Yamaguchi, A. Sakai, 1994. Cryo-Letters, **15**: 47-52.
- 18) Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi, K. Yamada, 1995. Cryo-Letters, **16**: 189-196.
- 19) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **137**: 465-470.
- 20) Widholm, J. M., 1972. Stain Technol., **47**: 189-194.

Summary

Cryopreservation of *In vitro*-grown Apical Meristems of Lily (*Lilium* L.) by Encapsulation-Vitrification Method

Toshikazu MATSUMOTO*, Akira SAKAI**, Chiaki TAKAHASHI***
and Kazuto YAMADA*

* Shimane Agricultural Experiment Station, Ashiwata 2440, Izumo, Shimane 693, Japan

** Asabu-cho 1-5-23, Kita-ku, Sapporo 001, Japan

*** Yokota Town Office, Yokota 1037, Nita, Shimane 699-18, Japan

Alginate-coated apical meristems derived from bulb scale segments of Japanese lily (*Lilium japonicum* Thunb.) were successfully cryopreserved following dehydration by vitrification solution.

Regenerated shoots on bulb scale segments were cold-hardened on solidified MS medium at 0°C for about 21 days. The excised meristems were precultured on solidified MS medium containing 0.3 M sucrose at 25°C for 1 day, and were then trapped into alginate-coated beads containing 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose. These encapsulated meristems were dehydrated with a highly concentrated vitrification solution (PVS 2) for 100 min. at 0°C prior to being plunged into liquid nitrogen. The average rate of shoot formation after rapid warming was about 95%. It was higher by as much as 25% than the meristems cryopreserved by encapsulation-dehydration technique. Shoot formation using the encapsulation-vitrification procedure was compared in five other lilies. All lilies tested obtained a high rate of shoot formation.

The encapsulation-vitrification method is easy to handle and greatly shortens the time used for dehydration. Thus, this method can be useful for cryopreserving meristems.