

シュッコンカスミソウ茎頂組織のガラス化法による凍結保存

花田 裕美・宮本 芳城・藤岡 唯志¹

農林水産総合技術センター 暖地園芸センター

Cryopreservation of apical materials of *Gypsophila panniculata* L. by vitrification

Hiromi Hanada, Yoshiki Miyamoto and Tadashi Fujioka¹

*Horticultural Experiment Center
Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries*

緒 言

シュッコンカスミソウは、和歌山県の花き生産において重要な品目であり、平成11年度には全国1位の生産量を誇っている。栽培品種としては‘ブリストル・フェアリー’の栽培面積が最も多い。しかし、最近は種苗メーカーから発表された新品種‘雪ん子’、‘ニューフェイス’などの栽培面積も増加している。また、和歌山県で育成した品種として、‘クリスタル・クイーン’（宮本、1993）と‘紀州パール’（宮本、1997）が報告されている。

シュッコンカスミソウの品種や系統数は新品種の発表に伴い、年々増加している。しかし、これらの維持や保存は、ビニールハウス等の施設で親株を栽培することにより行われており、品種や系統の維持には多大な労力と施設が必要とされている。また、シュッコンカスミソウは宿根性の多年草であるが、和歌山県では、毎年株の更新を行う一年生として栽培されている。そのため、毎年、種苗生産が必要となり、親株の維持にも多大な労力と施設が必要となっている。

親株の組織を保存する方法は、小さな容器で品種や系統を維持することができるため、品種の維持に必要であった施設や労力を大幅に削減することが可能である。しかし、組織培養などの継代培養による保存法では培養中に遺伝的変異（培養変異）が生じることが知られており、品種や系統を維持する方法としては不適当である。

凍結保存法は、細胞に変化を生じることなく、長期間に渡って保存する方法の一つであり、一度凍結保存させた組織は、液体窒素中（-196°C）で半永久的に保存が可能であると報告されている（酒井・小林、1990；山田、1992）。ホワイトクローバー（Yamada et.al., 1991）、ワサビ（Matsumoto et.al., 1994）、ワケギ（Koumura et.al., 1994）の茎頂およびネーブルオレンジの珠心胚細胞（Sakai et.al., 1990）では、ガラス化法（酒井・小林、1990；Sakai et.al., 1991）による凍結保存法で高い生存率が維持されることが報告されている。このガラス化法とはガラス化液（PVS2：グリセリン30%（w/v）+エチレングリコール15%+DMSO15%+0.4M ショ糖）の作用により組織内の脱水が進行し、組織を直接液体窒素で保存した場合でも細胞内に大きな結氷ができず、組織を生存させる凍結保存法である（酒井・小林、1990）。

そこで、本試験ではシュッコンカスミソウの茎頂を長期間保存するため、ガラス化法による凍結保存法の検討を行った。なお、本試験は、地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業「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」のなかで実施したものである。

¹現在：農業試験場

材料および方法

試験1 ガラス化法による凍結保存のための最適条件

材料は、ガラス網室で育苗したシュッコンカスミソウ ‘プリストル・フェアリー’ の茎頂（約1mm）を供試した。

凍結保存法は、酒井ら（1990）が開発したガラス化法に従い行った。凍結保存を行った茎頂は1.2Mショ糖を添加したMurashige and Skoog（以下MS）液体培地で2回洗浄した後、生育培地（1/2MS+BA0.5mg/literの寒天培地、ショ糖3%，pH5.8）の上に置いたろ紙上に置床した。翌日、ろ紙を置いた新しい生育培地に植え替えを行い、20°C、16時間照明下（3,000lux）で培養した。培養10日後、緑色の茎頂は生存、白色は枯死として生存率を調査した。

本試験では、シュッコンカスミソウの凍結保存に最適な処理条件を明らかにするため、以下の3つの試験を行った。

1) 前培養期間およびPVS2の処理温度

茎頂の前培養はMS基本寒天培地（ショ糖0.5M、pH5.8）を用い、前培養期間を2, 3, 4, 10日の4区を行った。また、PVS2で茎頂組織を浸漬処理する時の処理温度が生存率に及ぼす影響を調べるため、25°Cと0°Cの2区を行った。0°C区に用いたPVS2は冷凍で保存し、25°C区のPVS2は室温で保存した。PVS2の処理時間はYamada et.al. (1991)の方法に従い、25°Cでは5分間、0°Cでは15分間とし、1茎頂当たりの処理液量は0.75mlとした。

2) 前培養期間、PVS2の処理温度および処理液量

前培養期間は0, 2, 3, 4日間の4区、1茎頂当たりの処理液量は0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.60mlの6区、PVS2の処理温度は25°Cで5分間、0°C15分（処理液量0.05, 0.10, 0.20ml）および0°C30分（処理液量0.15, 0.30, 0.60ml）とし、それぞれの組み合わせについて生存率を調査した。1区15茎頂を供試し、2反復で行った。

3) 1茎頂当たりのPVS2処理液量

前培養4日、0°Cで30分間のPVS2処理を行う条件で、1茎頂当たりの最適処理液量が生存率に及ぼす影響について調査した。処理液量は0.04, 0.08, 0.12, 0.16および0.20mlの5区とし、各区10茎頂を供試した。

試験2 凍結保存における生存率の品種間差異

‘パーフェクタ’、‘ニューフェイス’および‘プリストル・フェアリー’の3品種の茎頂を用い、試験1と同様にガラス化法による凍結保存を行い、品種間差異の有無を検討した。凍結保存の条件は、前培養期間4日間、PVS2の処理温度0°C、処理時間30分、1茎頂当たりの処理液量0.05mlとし、1区15茎頂を供試した。

試験3 凍結保存苗の開花特性

試験1で生存した茎頂を、BA0.5mg/literを添加した1/2MS寒天培地（ショ糖3%，pH5.8）に置床し、20°C、16時間照明下（3,000lux）で培養した。継代培養は1ヶ月に1回行った。茎頂から生育した植物体は、1/2MSホルモンフリー培地で発根させた後、順化を行った。順化苗を親株として挿し芽を行い、凍結保存苗を育苗した。凍結保存苗と一般増殖苗を1993年9月10日ガラス温室に定植し、開花時期、切り花長、開花節位、節間長および茎径を調査した。

結果および考察

試験1 ガラス化法による凍結保存のための最適条件

1) 前培養期間およびPVS2処理温度

PVS2処理温度が25°Cの場合、前培養期間2日の生存率は5.5%，3日33.3%，4日37.5%，そして10日

では53.7%と前培養期間が長くなるに従い生存率が上昇する傾向にあった。処理温度が0°Cの場合、前培養2日の生存率は26.7%，3日53.3%，4日40.0%，10日71.4%と4日目を除き、25°Cと同様の傾向を示した（第1表）。また、PVS2処理後、凍結保存を行わなかった対照区（control 1）の生存率は100%であり、PVS2処理による悪影響は認められなかった。

前培養期間が長くなるに従い生存率が上昇する傾向について、ショ糖0.5Mと濃度が高い培地で前培養を行うことで浸透圧により茎頂内の水分が培地に取られ、細胞内の残存水分がガラス化できる程度まで減少したためと推測された。

PVS2の処理温度では、前培養期間に関係なく25°C区に比べ、0°C区で高い生存率が示され（第1表）、ホワイトクローバーの報告と一致した（Yamada et.al., 1991）。しかし、アスパラガスでは、25°C区と0°C区で同程度の高い生存率を示している（Nishizawa et.al., 1993）。また、ワサビでは、処理温度25°Cで10分間処理の場合は、0°C区と同様に高い生存率を示しているが、処理時間が10分を越えた場合、急激な生存率の低下が報告されている（Matsumoto et.al., 1994）。そして、ホワイトクローバーも同様に、処理時間が5分を過ぎた場合、生存率の低下が報告されている（Yamada et.al., 1991）。このことから、シュッコンカスミソウでは、処理温度25°C区の場合、5分間の処理時間は最適処理時間で無かつたため、生存率が低かったと考えられた。

第1表 前培養期間およびPVS2処理温度と茎頂組織の生存率の関係

前培養期間	25°C・5分間			0°C・15分間		
	処理茎頂数	生存数	生存率(%)	処理茎頂数	生存数	生存率(%)
2日	18	1	5.5	15	4	26.7
3日	15	5	33.3	15	8	53.3
4日	16	6	37.5	15	6	40.0
10日	15	8	53.7	15	10	71.4
control 1 ¹⁾	10	10	100.0	10	10	100.0
control 2 ²⁾	5	0	0.0	5	0	0.0

1茎頂当たりPVS2処理液量：0.75ml

1) 前培養期間2日、PVS2液処理後、液体窒素保存無し

2) 前培養期間2日、PVS2液の代わりに蒸留水で処理し、液体窒素に保存

2) 前培養期間、PVS2処理温度および処理液量

前培養期間、PVS2処理温度および1茎頂当たりPVS2処理液量の組み合わせを検討した（第2表）。処理温度25°Cの場合、前培養を4日行い1茎頂当たりの処理液量が0.05mlの区では86.7%と高い生存率を示した。一方、0°Cで30分処理の場合、前培養を4日行い処理液量が0.05mlと0.10mlで86.7%，0°Cで15分処理区の場合、前培養を4日行い処理液量0.15mlでは86.7%と共に高い生存率を示し、0°Cの場合、前培養を4日行い処理液量0.15ml以下の区では全て高い生存率が示された。しかし、前培養を4日行い0°C30分処理で液量0.20mlの区では20%，0°C15分で液量0.30mlの区では20%，0°C15分で処理液量0.60mlの区では5.0%と低い生存率を示した。すなわち、処理温度0°Cにおいて高生存率の組み合わせは、前培養4日で処理液量0.05～0.15mlであることが確認された。

Matsumoto et.al. (1994) はワサビにおいてPVS2処理温度0°Cの場合、処理時間30～50分間で高い生存率を報告している。同様に Nishizawa et.al. (1993) はアスパラガスにおいて10～60分間で高い生存率が維持されることを報告している。本試験では、処理温度0°C15分処理で処理液量0.15mlの区と0°C30分処理で処理液量0.10mlの区において生存率に大きな差異は認められず、25°Cの場合と異なり0°Cでは最適処理時間は広範囲であることが示唆された。

第2表 PVS2の処理温度、時間、1茎頂組織当たりの液量および前培養期間が生存率におよぼす影響

処理温度 および処理時間	処理液量 (ml/1茎頂)	前培養期間	生存率(%)			
			0日	2日	3日	4日
25°C・5分	0.05		13.3	73.3	40.0	86.7
	0.10		60.0	53.3	40.0	73.3
	0.15		40.0	40.0	60.0	50.0
	0.20		26.6	26.6	20.0	80.0
	0.30		40.0	10.0	20.0	40.0
	0.60		20.0	10.0	20.0	20.0
0°C・30分	0.05		53.3	86.7	53.3	86.7
	0.10		53.3	80.0	46.7	86.7
	0.20		20.0	56.7	40.0	20.0
0°C・15分	0.15		40.0	40.0	86.7	86.7
	0.30		40.0	20.0	40.0	20.0
	0.60		20.0	20.0	20.0	5.0

供試茎頂数：15個／区×2

3) 1茎頂当たりのPVS2処理液量

1茎頂当たりのPVS2処理液量と茎頂の生存率について調査した結果、1茎頂当たりの処理液量0.04ml～0.16ml区では、高い生存率(80～100%)が得られたが、0.20ml区では20%と急激に低下した(第3表)。すなわち、1茎頂当たりの処理液量が多い場合、凍結保存後の解凍に時間を要し、細胞内に結氷が生じるため、生存率が低下したと推察された。この細胞内の結氷ができる臨界点が本試験では0.16mlと0.20mlの間にあることが示唆され、凍結保存では、1茎頂当たりのPVS2処理液量が生存率に大きな影響を及ぼすことが確認された。

以上の結果より、シュッコンカスミソウ茎頂における凍結保存は、4～10日前培養を行い、PVS2処理温度0°C、1茎頂あたり0.04～0.16mlの処理液量で15～30分間浸漬処理を行うことにより、高い生存率が維持されることが認められた。

試験2 凍結保存における品種間差異

凍結保存を行った3品種の生存率は、「プリストル・フェアリー」75.0%、「パーフェクタ」83.3%、「ニューフェイス」80.0%であり、品種間の生存率に大きな差異は認められなかった(第4表)。この結果、本保存法がカスミソウの多くの品種に応用可能であると考えられた。ワサビ(Matsumoto et.al., 1994)やワケギ(Kohmura et.al., 1994)の凍結保存では、同種内の品種において全て高い生存率が報告されている。しかし、ホワイトクローバーでは、同属異種の3品種で凍結保存を行った場合、生存率が異

第3表 1茎頂当たりのPVS2処理液量による茎頂組織の生存率

PVS2処理液量(ml)	生存率(%)
0.04	100.0
0.08	80.0
0.12	80.0
0.16	90.0
0.20	20.0

前培養期間:4日 PVS2処理温度:0°C
PVS2処理時間:30分 供試茎頂数:10個

第4表 ガラス化法による凍結保存におけるカスミソウ3種類の生存率

品種名	生存率(%)
パーフェクタ	83.3
ニューフェイス	80.0
プリストルフェアリー	75.0

前培養期間:4日 PVS2処理温度:0°C
PVS2処理時間:30分 処理液量:0.05ml/茎頂
供試茎頂数:15個

なることが報告されている (Yamada et.al., 1991)。すなわち、同属同種の場合は凍結保存の条件を他の品種に応用することが可能であるが、同属異種では利用が難しいことが示唆された。

試験3 凍結保存苗の開花特性

凍結保存を行った茎頂由来の凍結保存苗の開花調査を行った (第5表)。切り花長、節間長、茎径では、一般増殖苗と同程度であり、凍結保存による形態的な影響は認めらず、凍結保存法は遺伝的な変化をおこさないという酒井と小林 (1990) の報告と一致した。しかし、開花については、一般増殖苗と比較して開花始めで3日、開花終わりで7日早く、開花期間は一般増殖苗より4日間短い結果を示し、開花の揃いが良くなる傾向が認められた。宮本・小畠 (2000) はシュッコンカスミソウの苗を60日間2°Cで冷蔵した冷蔵苗の場合、開花が早くなり、開花の揃い良くなることを報告している。冷蔵苗と凍結保存苗が同様の傾向を示したことから、シュッコンカスミソウの開花促進に必要な低温の感受は幼苗期だけでなく、茎頂期でも可能であることが示唆された。そして、本試験では凍結保存を行った (液体窒素中で保存した) 茎頂は、開花促進に必要な低温を感受し、凍結保存苗で開花促進が行われたのではないかと推察された。

以上の結果より、シュッコンカスミソウは凍結保存法を利用することにより、品種・系統および親株の維持や保存を効率的に行うことが可能であることが明らかとなった。また、凍結保存苗の栽培を行った場合、形態的な変異は認められず、本試験で行った凍結保存法はシュッコンカスミソウの保存技術として利用可能であることが確認された。今後、品種の保存や効率的な種苗生産技術に本技術は利用可能であると考えられた。

第5表 シュッコンカスミソウにおける凍結保存苗の生育開花特性

苗の種類	供試数	切り花時期(月日)		切り花長 (cm±S.D.)	開花節位 (節±S.D.)	節間長 (cm±S.D.)	茎径 (mm±S.D.)
		始め	終わり				
凍結保存苗	10	11.11	11.21	73.0±1.5	12.9±1.2	10.2±0.3	4.8±0.2
一般増殖苗	10	11.14	11.28	74.6±2.2	11.7±1.2	10.4±0.3	5.0±0.3

S.D. : 標準偏差

供試品種: ‘プリストルフェアリー’

定植: 1993年9月10日、電照: 1993年10月1日より実施

凍結保存苗: 凍結保存を行った茎頂を順化した後、挿し芽を行い増殖

摘要

本研究はシュッコンカスミソウを長期間保存する手法として、茎頂組織のガラス化法を用いた凍結保存法について検討を行った。

凍結保存法は、前培養期間は4日～10日、PVS2浸漬処理温度は0°C、処理時間は15～30分、1茎頂当たりのPVS2処理液量は0.04～0.16mlの条件で行うことにより80%以上の高い生存率が保持されることが明らかとなった。また、本法はシュッコンカスミソウの多くの品種において利用可能であることが確認された。そして、凍結保存後の茎頂由来の凍結保存苗は一般苗と比べ形態的な変異は認められなかった。このことから、本法はシュッコンカスミソウの茎頂を長期間保存する方法として利用できることが確認された。

引用文献

- Kohmura, H., Y.Ikeda and A. Sakai. 1994. Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (*Allium wakegi* A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration.Cryo - Letters.15:289 - 29.

- Matsumoto,T., A. Sakai and K. Yamada.1994. Cyryopreservation of invitro — grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Reports.13:442 — 446.
- 宮本芳城. 1993. 試験管内選抜による宿根カスミソウの低ロゼット性系統‘クリスタル・クイーン’の育成. 近畿中国地域における新技術. 25: 128—133
- 宮本芳城. 1997. 宿根カスミソウ新品種‘紀州パール’の育成. 近畿中国地域における新技術. 29: 187—191.
- 宮本芳城・小畠利光. 2000. シュッコンカスミソウの苗冷蔵による促成栽培. 和歌山農林水技セ研報1: 37—42.
- 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.
- Sakai, A. S. Kobayashi and I. Oyama. 1991. Survival by vitrification of Nucellar cells of Navel Orange cooled to — 196°C. J. Plant Physiol. 137:465 — 470.
- 酒井昭・小林省藏. 1990. Vitrification(ガラス化)による植物培養細胞の液体窒素保存法. 細胞培養. 16: 409—411.
- Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura and S. Hifuchi. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*T trifolium repens L.*) by vitrification. Plant Science. 78: 81 — 87.
- 山田康之. 1992. 植物分子・細胞工学マニュアル. 細胞の凍結保存. P. 173—180. 講談社. 東京.

Summary

Apical meristems of *Gypsophila paniculata* L. were successfully cryopreserved by vitrification. Excised apical meristems were precultured at 20°C for 4 to 10 days on agar — MS medium containing 0.5M sucrose, then 0.05 — 0.15ml PVS2 (highly concentrated cryoprotective solution) was added per apical meristem. The PVS2 — treated meristems were incubated at 0°C for 15 — 30 min.

This approach produced approximately 80% survival of the meristems of three cultivars of *Gypsophila paniculata* L.. The plants produced from the vitrified meristems were to all appearances normally formed.