HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	果樹における生殖質の凍結保存に関する研究：（第２報） リンゴ茎頂を凍結し融解した場合の生存に及ぼす凍結温度並びに材料の採取時期及び低温（０℃）保存の影響
Author(s)	鈴木, 卓; 宮田, 英明; 原田, 隆; 八鍬, 利郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(3), 295-300
Issue Date	1989-03-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12106
Type	bulletin (article)
File Information	16(3)_p295-300.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農邦文紀要 16(3): 295～300, 1989

果樹における生殖質の凍結保存に関する研究

(第2報) リンゴ茎頂を凍結し融解した場合の生存に及ぼす凍結温度並びに材料の採取時期及び低温 (0°C) 保存の影響*

鈴木　卓・宮田英明
原田　隆・八鍬利郎
(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座)

(平成元年1月20日受理)

Studies on Freeze-preservation of Fruit Tree Germplasm

II. Influences of freezing temperature and the collecting time and low temperature (0°C) storage of plant materials on survival of apple leaf bud apices excised, frozen and thawed artificially

Takashi SUZUKI, Hideaki MIYATA, Takashi HARADA and Toshiro YAKUWA
(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒　言

栄養繁殖性植物の長期的かつ実用的な遺伝子源保存技術として，茎頂を液体窒素中で凍結保存する方法が注目されており[15,16]，果樹についてもこの方法が数種で検討され始めている[1,4,8,9,12,13,14]。

果樹生殖質の凍結保存の材料として茎頂を用いる場合，野外から採取したもの[1,3,4,6,9,13,14]と *in vitro* の培養体から取り出したもの[2,5,7,8,10,12]の二つがある。このうち，野外の材料についてみると，凍結保存の成否はいずれも材料である茎頂の耐凍性と密接に関連しており[3,6,13,14]，リンゴでは耐凍性の高い冬の茎頂は液体窒素中でも比較的容易に生存するのに対し，耐凍性の低い夏の茎頂は液体窒素中で生存させることが極めて難しい[3,6]。また，*in vitro* で維持・増殖中の培養体から茎頂を取り出し材料とする場合も，予め培養体を容器ごと低温順化させるなどの方法により材料の耐凍性を高める必要がある[2,5,7]。

このように，耐凍性は茎頂の凍結保存を成功させる上で非常に重要な要因となっている。本研究では，この耐凍性の変化に関連して，野外から採取した茎頂に凍害防御物質処理や脱水などの人為的操作を加え凍結・融解した場合に，採取時期の違いに伴って生じる茎頂の生存率の変化を調査した。また，耐凍性の高い時期に採取し0°Cで低温保存した材料を同様の方法で凍結・融解した場合の，保存期間の変化に伴う茎頂の生存率の変動についても併せて調査した。

材料及び方法

1. 材料の調製

北海道大学農学部附属農場に栽植されている17年を経過したリンゴ (*Marus pumira* MILL. var. *domestica* SCHNEID.) 'サマーランド' 及び 'スパータン' の各2樹を実験に用いた。1987年3月19日から11月12日にかけて，Fig. 1に示す各実験日 (5月27日を除く) に休眠枝または新梢 (6月12日以降) を任意に採取した。また，3月19日には休眠枝を大量に採取し，ポリエチレン製の袋に入れて0°Cで保存しておき，実験の都度取り出して用いた。材料の調製は以下のようにして行った。すなわち，枝は腋生葉芽 (萌芽直後は新梢の頂芽) 一つをもつ節ごとに切断し，樹皮と外側のりん片葉5～6枚を除去した後，70% エタノールに数秒間浸漬し，次に次亜塩素酸

* 文部省科学研究費補助金 (一般A), 課題番号61440010による研究成果

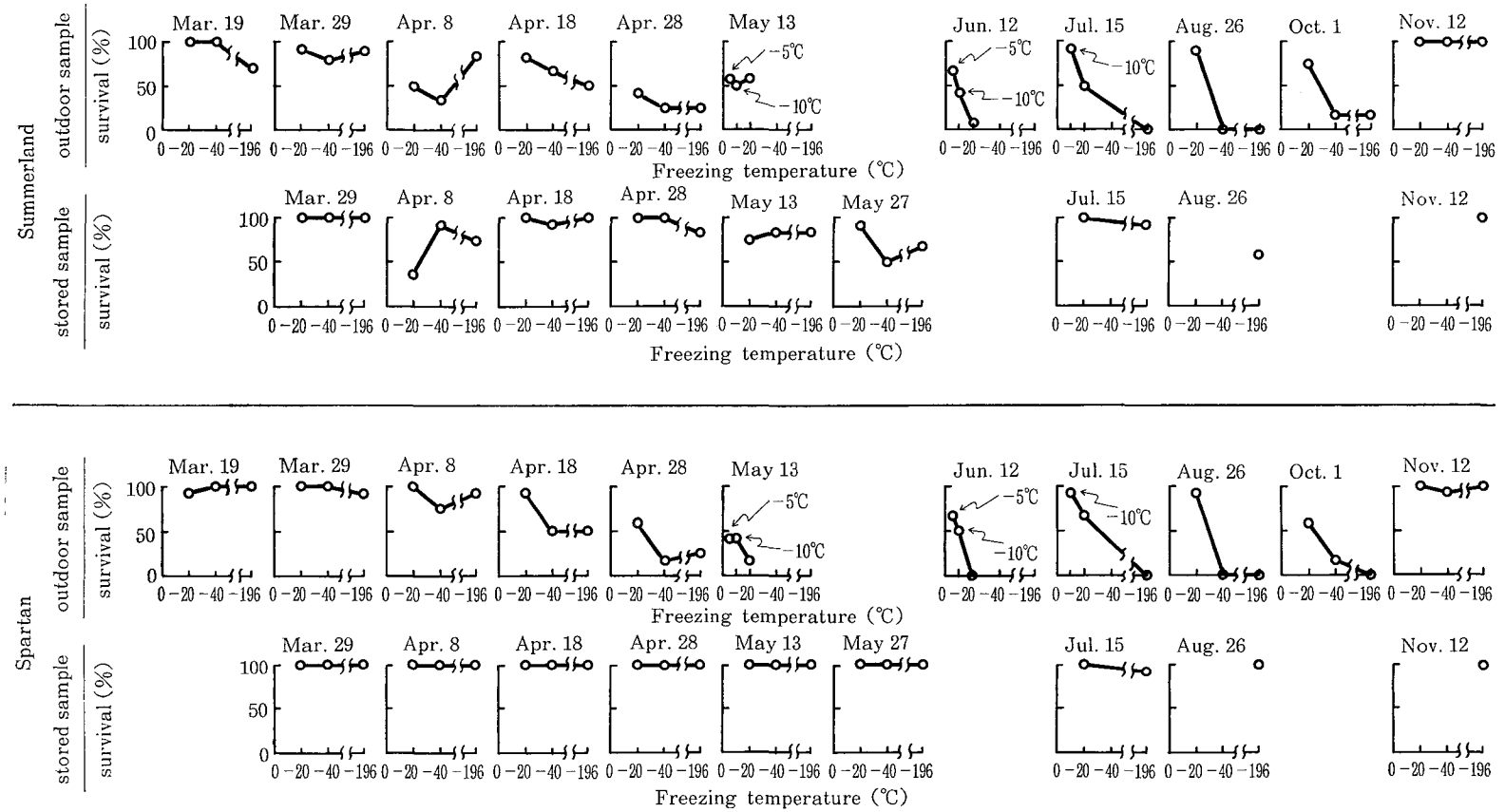

Fig. 1. Seasonal changes in survival rates of apple leaf bud apices frozen at various minimum temperatures of −5° to −196°C.

Samples were collected from March 19 through November 12. Stored samples were collected on March 19 and stored at 0°C until the days indicated above each figure. Experiments of freezing, thawing and culturing samples were carried out on the same days as the sampling dates. The horizontal solid line separates figures of cv. 'Summerland' (upper) and of 'Spartan' (lower).

ナトリウム溶液(有効塩素1%, Tween 20を0.01%となるように添加)で，約10分間表面殺菌を行った。その後，解剖顕微鏡下で茎頂(横径約1 mm，葉原基4個程度を有する)を無菌的に取り出し，実験材料とした。取り出した茎頂は，凍結媒液処理を行うまでの乾燥を防ぐため，シャーレ内の培養基(寒天7 g/ℓのみを含む)に一時的に置床した。

2. 凍結媒液処理

茎頂の凍害を軽減し生存率を高めるため，凍結媒液処理を行った。すなわち，蒸留水にショ糖30 g/ℓとDMSO 8%(V/V)を添加した凍結媒液を，120°C, 1.1 kg/cm² で10分間加圧滅菌後，注射器を用いて1 mℓ容ストロー精液管(直径3.5 mm，長さ12.3 cm，富士平工業製)中へ吸い取り，この中へ予め取り出しておいた茎頂を浸漬した。茎頂の数は精液管1本当たり6個とし，ポリビニルアルコール(重合度500)でストロー精液管を封じた後，室温に2時間放置した。

3. 茎頂の凍結及び融解

凍結媒液処理終了後，ストロー精液管をプログラムフリーザー(HOXAN CRYOEMBRYO-HPA)の冷却槽上に並べ，0.5°C/minの速度で冷却を行った。この場合，冷却槽の温度と凍結媒液内の温度に差が生じる恐れがあるため，同じ組成の凍結媒液を入れたストロー精液管を別に用意し，この中に銅—コンスタンタン熱電対を入れて，試料の入っている他のストローと一緒に冷却することにより，凍結媒液内の温度変化を正確に測定した。冷却の途中，−3°Cで自動植氷が行われた。凍結温度区としては，−5°，−10°，−20°，−40°Cの区及び−40°Cまで予備凍結を行った後瞬間的に液体窒素(−196°C)中へ入れ急速冷却(400°C/min)を行った区の計5区を設けた。凍結した材料は−5°，−10°，−20°及び−40°Cに各々10分間保ち，液体窒素中には30分間浸漬した。融解は，ストロー精液管を38°Cの温水中へ投入することによる急速融解(500°C/min)を行い，融解後直ちに茎頂をストローより取り出し，植物体再生用培養基へ植え込んだ。

4. 培養及び調査

植物体再生用培養基は，MS培地にショ糖30 g/ℓ及びBA 1 mg/ℓを添加し，pHを5.7に調整した後寒天7 g/ℓを添加したものを用い，100 mℓ容三角フラスコに20 mℓずつ分注した。培養は，25°C，1日16時間照明(白色螢光灯，約4,000 lx)の条件下で行い，各処理温度区当たりの組織片数は12とした。植え込みから4週間後に茎頂の生存について調査を行い，全体または大部分が緑色を呈しているものを生存個体とし，褐変しているものを壊死個体とした。

結果及び考察

1. 茎頂の耐凍性の季節的変化

Fig. 1に3月から11月にかけて野外より採取した茎頂及び3月下旬に採取し0°Cで保存した茎頂の凍結・融解後の生存率を示した。このうち，液体窒素処理区のもののみについてFig. 2に示した。Fig. 2で，鎖線は野外より採取した茎頂を液体窒素中で凍結した後融解した場合の生存率の変化を示している。'サマーランド'は，3月19日から4月8日まで67%以上の高い生存率を示した後，4月18日に50%，4月28日に25%まで低下し，真夏の7月15日及び8月26日には0%となった。その後，10月1日に17%まで回復し，11月12日の材料ではすべて生存し生存率100%であった。同様に'スパータン'は，3月19日から4月8日まで92%以上の非常に高い生存率を示したが，4月18日に50%，4月28日に25%まで低下し，7月15日から10月1日の期間は全く生存しなかった。しかし，11月12日の材料は再び高い生存率を示した。以上のことから，これら2品

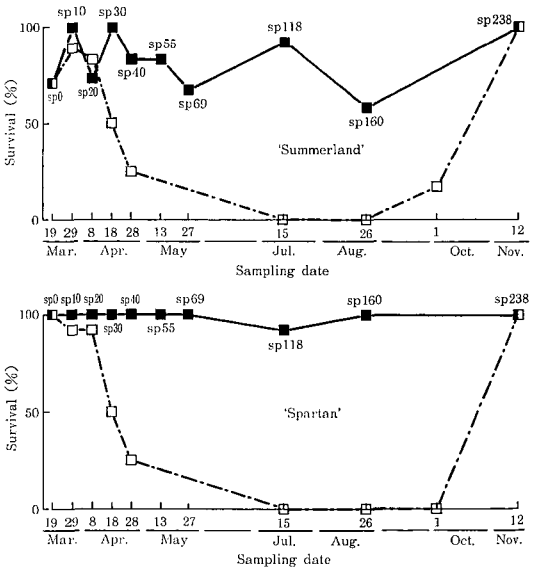

Fig. 2. Seasonal changes in survival rates of apple leaf bud apices frozen in liquid N_2.

Symbols are as follows: □, samples collected on each sampling date; ■, samples collected on March 19 and stored at 0°C. Figures following 'sp' (days of storage periods) near closed squares stand for periods of storing the March 19-collected samples.

種に限ると，リンゴ茎頂の耐凍性の変化に大きな品種間差は認められず，リンゴ茎頂の耐凍性は，北海道においては4月中旬頃から徐々に失われ，夏の間はきわめて低くなり，10月中・下旬頃から回復して冬には再び高くなるものと考えられる。

リンゴ茎頂の耐凍性に関連して，西山ら[11]はリンゴの切り枝を用いて耐凍性の季節的変化を調べ，リンゴの枝は北海道においては12月下旬から2月上旬まで高い耐凍性を持っていることを報告している。また，片野ら[3]及びKATANO[6]は，本実験と同様に野外から採取したリンゴ'ふじ'の枝から茎頂を摘出し，水又は10% DMSO溶液を凍結媒液として凍結実験を行い，凍結・融解後の生死を指標として，茎頂の耐凍性の変化を調査している。

西山ら[11]は，凍結・融解した枝を水挿しして萌芽が認められるか否かにより生死を判定し，耐凍性の指標としている。しかし，これは器官としての枝全体の耐凍性を追った結果を示しており，厳密な意味で茎頂組織の耐凍性を示しているとは言えない。この点についてKATANO[6]も，萌芽の有無は枝の中で最も凍害を受け易い組織の生死により決められると指摘している。従って，KATANO[6]や本実験のように，枝から茎頂だけを摘出し凍結・融解後の生存を調べる方法は，茎頂の耐凍性を表わすためのより確実な方法であると考えられる。

またKATANO[6]は，凍結媒液として水を用いた場合と10% DMSO溶液を用いた場合とで，差があることを指摘している。すなわち，岩手県においてリンゴ茎頂の耐凍性は，水を凍結媒液として調査した場合，3月下旬頃低下し始め夏の間低い値を保った後11月上旬頃回復して冬期間は高い値を保つのに対し，10% DMSO溶液を凍結媒液とした場合，4月中旬頃低下し始め9月下旬から11月上旬にかけて上昇することを明らかにした。本実験では，凍結媒液としてDMSO 8%及びショ糖30 g/ℓを添加した溶液を用いたが，KATANO[6]の10% DMSO溶液を用いた結果と本実験の結果は，地域，品種，年次等を異にするにもかかわらずよく一致した。この場合茎頂の耐凍性を表わす上で，KATANO[6]は1区当たり3～4個の茎頂を材料として凍結・融解後の生死を調べその閾値をもって耐凍性の指標としての温度を決定したが，本実験では耐凍性を表わす指標として茎頂の生存率を用いている点が異なっている。耐凍性を把握する場合の判定方法については，いろいろな方法があるが，さらに適切な方法についての検討が必要であると考えられる。

野外における*in vivo*の茎頂の耐凍性を論じる場合，凍結媒液中にDMSOなどを添加せず，水だけを凍結媒液とする方法がより正確な方法であると考えられる。しかし，凍結保存技術の確立を目指す場合，凍害防御物質を取り込ませることにより凍害が軽減されることや，材料採取時期によっては，凍害防御物質を与えても茎頂を液体窒素中で生存させることができない場合があることなどの事実を踏まえ，凍害防御物質を与えた条件下での細胞・組織の凍結に対する生存可能な低温限界を知ることは非常に重要となる。特に，凍結保存技術を普遍的技術として多くの作物や野生種に対し適用しようと考えるならば，耐凍性が低く凍結・融解後の生存が困難な植物に対しての耐凍性の付与を考える必要があり，この場合凍害防御物質の耐凍性増大に及ぼす作用機作を明らかにすることが重要となる。その基礎として，本実験のように凍害防御物質を与えた条件下で材料の耐凍性の季節的変化を明らかにしておくことは，大きな意義があるものと考えられる。いずれにおいても，将来この領域における研究が進展した場合，自然条件下において生じ植物体の属性となっている'耐凍性'と，凍結保存という特定の目的を持った技術の確立を前提として脱水或は凍害防御物質の投与など人為的操作を加えた条件下での'低温生存能力'とは，別の概念として捉える必要が生ずるであろうと想像される。

さらにKATANO[6]は，10% DMSO溶液を凍結媒液とした場合，7～10月にかけて耐凍性が漸増したことについても報告しているが，この傾向は本実験においても認められ，例えば−20°Cで凍結・融解した茎頂の生存率(Fig. 1)は，いずれの品種も6月中旬の材料を用いた場合著しく低い値であったが，7～8月にかけて高い値へと変化した。このことは，液体窒素処理区において生存個体の得られなかった夏期にあっても，わずかながら茎頂の耐凍性に関わる生理的変化が生じていたことを示すものと考えられる。この場合，6月中旬はリンゴの枝の生長が最も盛んな時期であり，枝の伸長は7月中旬～8月上旬にかけて停止することから，枝の生長，発育又は休眠と茎頂の耐凍性の変化との間に，何らかの関連があることが推測される。

2. 低温(0°C)保存による耐凍性の維持

Fig. 2において，実線は3月下旬に野外より採取し0°Cで低温保存した枝から取り出した茎頂を液体窒素中で凍結した後融解した場合の生存率の変化を示している。低温保存した茎頂の生存率は，3月から11月までは'サマーランド'で58%以上，'スパータン'で92%以上の高い値であった。これは3月下旬の材料が持つ耐凍性が0°Cでの保存により11月上旬まで維持されたことを

示している。さらに，この傾向は −40°C 及び −20°C 区においても同様であった (Fig. 1)。したがって，リンゴでは耐凍性が高い時期の枝を 0°C で低温保存することにより，7か月以上の長期間茎頂の耐凍性が維持されることが明らかになった。これにより，耐凍性が高い時期に採取した材料を低温保存しておくことにより，凍結保存に用いることができる材料を周年確保できることがわかった。

枝を低温保存することによって茎頂の耐凍性の変化を調べた報告は，これまでのところ見られない。本実験では，耐凍性の高い時期の材料を低温保存することにより耐凍性が維持される期間を調べたが，耐凍性の低い時期の休眠枝や新梢を低温保存することにより耐凍性を高めることが可能かどうか，或は低温保存温度はどの程度が最適かなどについてさらに検討したい。今後，凍結保存の材料として *in vitro* の培養物を用いることが重要視されると考えられるため，培養物のハードニング処理に関連して，低温保存による茎頂の耐凍性の変化を調べておくことは非常に重要になるものと考えられる。

摘　　要

リンゴの腋生葉芽から取り出した茎頂を凍結・融解し培養した場合の生存率の変化を調査した。結果の概要は以下のとおりである。

1. 野外より採取したリンゴ茎頂を DMSO 8%，ショ糖 30 g/ℓを含む凍結媒液と共に凍結・融解した場合の生存率は，品種にかかわらず，北海道においては4月中旬頃から徐々に低下し，夏の間極めて低い値を示した後，10月中・下旬頃から回復して冬には再び高い値を示した。

2. 3月19日に採取し 0°C で低温保存した休眠枝から茎頂を取り出し同様の条件で凍結・融解した場合の生存率は，3月から11月中旬まで高い値を維持していた。このことから，耐凍性の高い冬期の枝を 0°C で低温保存することにより，凍結保存の材料を周年確保できることが明らかとなった。

3. 野外の芽が持つ‘耐凍性’と，凍害防御物質処理や脱水などの人為的操作を加えた場合に茎頂が示す‘低温生存能力’とを，異なる概念として捉える必要が生じるものと考えられる。

引 用 文 献

1. 江澤辰広・原田　隆・八鍬利郎： ブドウ茎頂の凍結保存に関する研究，園学要旨昭62秋：86–87. 1987
2. 石原愛也・小保内康弘・伊藤芳樹・小林俊仁： リンゴ *in vitro* 培養シュート茎頂の凍結保存に関する2，3の実験，園学要旨昭62春：172–173. 1987
3. 片野　学・石原愛也・酒井　昭・上村松生： リンゴ茎頂の耐凍性ならびに液体窒素中における凍結保存について，園学要旨昭57春：86–87. 1982
4. KATANO, M. and ISHIHARA, A.: Survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen, *HortSci.*, **18**(5): 707–708. 1983
5. 片野　学・石原愛也・酒井　昭： リンゴ培養シュート茎頂の液体窒素中における凍結保存，育学雑 **34** (別1)：212–213. 1984
6. KATANO, M.: Seasonal changes of freezing tolerance of apple shoot tips, *Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ.*, **5**: 1–5. 1986
7. 小林俊仁・石原愛也・酒井　昭： アブシジン酸を利用したリンゴ *in vitro* 培養シュートの液体窒素中での凍結保存，第10回植物組織培養シンポジウム講演要旨集：210. 1987
8. KUO, C. and LINEBERGER, R. D.: Survival of *in vitro* cultured tissue of 'Jonathan' apples exposed to −196°C, *HortSci.*, **20**(4): 764–767. 1985
9. MORIGUCHI ,T., AKIHAMA, T. and KOZAKI, I.: Freeze-preservation of dormant pear shoot apices, *Japan. J. Breed.*, **35**: 196–199. 1985
10. 森口卓哉・小崎　格： ブドウ培養茎頂の凍結に及ぼす凍害防御物質の効果について，育学雑 **35** (別2)：150–151. 1985
11. 西山保直・宮下揆一・村上準市・中島二三一・橘　昌司： 果樹の種類及び品種と耐凍性，ならびに耐凍性に関与する諸要因について，北海道農試彙報，**100**：20–28. 1972
12. REED, B. M. and LAGERSTEDT, H. B.: Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen, *HortSci.*, **22**(2): 302–303. 1987
13. 鈴木　卓・原田　隆・八鍬利郎： 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，北大農邦文紀要，**15**(2)：118–123. 1987
14. 鈴木　卓・原田　隆・八鍬利郎： オウトウ及びクロミノウグイスカグラ茎頂の液体窒素中における凍結と融解後の植物体再生，園学要旨昭63秋：100–101. 1988
15. 八鍬春美・岡　成美： 組織培養による栄養繁殖作物の遺伝資源保存 (1)，農業および園芸，**62**(12)：1343–1347. 1987
16. 八鍬春美・岡　成美： 組織培養による栄養繁殖作物の遺伝資源保存 (2)，農業および園芸，**63**(1)：17–22. 1988

Summary

Seasonal changes in survival rates of apple (*Marus pumira* MILL. var. *domestica* SCHNEID., cv. 'Summerland' and 'Spartan') leaf bud apices aseptically frozen, thawed and cultured were examined. Cryoprotectant (DMSO) penetration into the apices prior to freezing was made at 20°C through two-hour immersion in a freezing solution containing 8% DMSO and 30 g/ℓ sucrose. Samples contained in 1-mℓ plastic tube (12.3 cm in length, 3.5 mm in diameter) together with freezing solution were cooled gradually to −5°, −10°, −20° or −40°C at a rate of 0.5°C/min with a programing freezer. Cooling rates were monitored by measuring temperatures of both the plastic tube and gas in a chamber with thermocouples. Freezing treatments of plunging the tube into liquid nitrogen, following cooling to −40°C (prefreezing as described above) were made by direct immersion at a rate of 400°C/min. Samples kept at each temperature for 10 minutes or held in LN_2 for 30 minutes were thawed quickly by warming in 38°C water, then cultured on a regrowth medium (containing MS medium, 30 g/ℓ sucrose, 1 mg/ℓ BA and 7 g/ℓ agar; pH 5.7) at 25°C under 4,000 lx (16-hour daily illumination).

1. Survival rates of apices frozen in liquid N_2, collected from field-grown trees in Sapporo (Hokkaido, Japan), gradually decreased from mid April (about 50%), regardless of the varieties, and showed 0% in summer. Thereafter, it appeared that the survival rate gradually increased from mid to late October and were maintained at high levels (100%) in winter. Seasonal changes in survival rates resulting from −20°C and −40°C freezing were similar to those in LN_2 (−196°C) freezing. However, the survival rate in −20°C freezing slightly increased from July through August.

2. Survival rates of apices excised from winter twigs collected on March 19 and stored at 0°C maintained a high level (more than 50%, except for the results at −20°C on April 8) from March to mid November at −20°, −40° and −196°C freezing, regardless of the varieties. Results obtained from this experiment using apple shoot apices suggests that in apple, low temperature (0°C) storage of appropriate portions of the plant, such as sizable twigs, could realize a year-round supply of plant materials (ex. shoot apices) available for freeze-preservation. We may speculate that the results will be the same in other kinds of plants.

3. It was considered that the necessity of discriminating the concept of 'superlow temperature-surviving ability' from 'freezing resistance' conventionally used exsisted, because the former included artificial essentials of penetration of a synthesized cryoprotectant such as Dimethyl sulfoxide and of specialized cooling techniques.