HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	鈴木, 卓; 原田, 隆; 八鍬, 利郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 15(2), 118-123
Issue Date	1987-01-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12055
Type	departmental bulletin paper
File Information	15(2)_p118-123.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

鈴木　卓・原田　隆・八鍬利郎

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学教室)

(昭和61年3月28日受理)

Studies on Freeze-preservation of Fruit Tree Germplasm

I. Survival of pear leaf bud apices frozen in Liquid N_2

Takashi SUZUKI, Takashi HARADA and Toshiro YAKUWA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒　言

近年，各種の作物の遺伝子源または生殖質を保存しておくために，植物体の一部分を超低温条件下で凍結保存する方法が研究されつつある。とくに果樹においては，栄養繁殖を行うことから栄養体を長期安定的に凍結保存することの意義は極めて大きい。果樹の凍結保存については，枝[7),8),9)]，茎頂[1),2),3),5),6)]及びカルス[4),10)]を用いた研究が報告されているが，遺伝的安定性や大量増殖技術への応用を考える場合，茎頂を用いる方法がより効率的であると考えられる。本研究は，ナシ茎頂の凍結保存技術を確立することを目的として，秋から冬にかけての茎頂の耐凍性の変化や凍結媒液中の凍害防御物質の濃度等について検討を行い，冬季の材料を用いて適切な方法で処理した場合は，液体窒素中で凍結した後融解した茎頂が生存し生長することを確認したので，その結果について報告する。

材料及び方法

I. 初冬期における茎頂の耐凍性

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60年を経過したセイヨウナシ (*Pyrus communis* L.) 'フレミッシュ・ビューティー' と 'バートレット', ニホンナシ (*Pyrus serotina* REHDER var. *culta* REHDER) '長十郎' 及びチュウゴクナシ (*Pyrus ussuriensis* MAXIM. var. *sinensis* KIKUCHI) '身不知' の各5樹から，1985年10月29日，11月18日及び12月3日に，腋生の葉芽をもつ1年生の発育枝を任意に採取した。材料の調製は以下のようにして行った。すなわち，枝を各節ごとに切断し樹皮と外側のりん片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1mm，葉原基を4個程度有するもの) を無菌的に取り出し，実験に供した。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，シャーレ中の培養基 (寒天7g/ℓのみを含む) に一時的に置床した。

2. 凍結媒液処理　凍結媒液は蒸留水のみとし，口径15mmのスピッツ管へ0.2mℓずつ分注した後，120°C，1.1kg/cm² で約10分間加圧滅菌を行った。材料を凍結媒液中に浸漬させた後，直ちに凍結処理を行った。

3. 茎頂の凍結及び融解　茎頂はスピッツ管1本当たり6個とし，管内の蒸留水中に浸漬して，凍結処理を行った。冷却は，スピッツ管を浸漬したアルコールバス中にドライアイスを少しずつ投入する方法で行い，まず0°Cに5分間置いた後，0.5°C/minの割合で冷却した。途中，−3°Cで凍結媒液に植氷を行った。0°Cに5分間置いた材料は，そのまま植物体再生用培養基へ植え込んだ。また凍結した材料は，途中所定の温度 (−5°C及び−10°C) に5分間置いた後，各々38°Cの温水中で急速融解し，植物体再生用培養基へ植え込んだ。

4. 植物体再生及び調査　植物体再生用培養基は，MS培地にしょ糖30g/ℓ，寒天7g/ℓ及びBA 1mg/ℓ

を添加し，pHを5.7に調整したものを用い，口径20mmの試験管に10mℓずつ分注した。培養は，25°C，1日16時間照明（白色蛍光灯，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2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たものを生存個体とし，褐変していたものを壊死個体とした。

II. −5°C～−30°C下での凍結後の茎頂の生存に及ぼす凍結媒液中のDMSO濃度の影響

1. 材料の調製 Iで用いたのと同じ'身不知'樹から，1985年9月7日に材料を採取した。材料は，採取後直ちに実験に供した。材料の調製方法はIと同様である。

2. 凍結媒液処理 凍結媒液は，蒸留水にしょ糖30 g/ℓと凍害防御物質として，dimethyl sulfoxide (DMSO)を0, 4, 8, 12, 16及び20% (v/v)の濃度で添加したものを用い，Iと同様の方法で分注及び滅菌を行った。茎頂はスピッツ管1本当たり6個ずつとし，凍結媒液中に2時間浸漬した。

3. 茎頂の凍結及び融解 凍結処理温度は0°，−5°，−10°，−20°及び−30°Cに設定し，DMSO濃度と組み合わせて計30区で実験を行った。植氷は−3°Cで行い，凍結しない濃度区では，さらに−5°C及び−10°Cにおいても植氷を行った。冷却方法はIと同様で，所定の温度に5分間保った後，38°Cの温水中で急速融解した。融解後直ちに，Iで述べた方法により植物体再生用培養基へ植え込んだ。

4. 植物体再生及び調査 植物体再生用培養基の作製方法，培養条件及び調査方法はIに準じたが，1区当たりの組織片数は20とした。

III. 液体窒素中で凍結した茎頂の生存

1. 材料の調製 Iと同じ4品種の実験樹から，1986年1月29日に材料を採取した。材料の調製方法はIと同様である。

2. 凍結媒液処理 凍結媒液は，蒸留水にしょ糖30 g/ℓとDMSO 8% (v/v)を添加したものを用い，IIと同様の方法で凍結媒液処理を行った。

3. 茎頂の凍結及び融解 茎頂はIIと同様の方法で凍結処理を行った。植氷は−5°Cで行った。凍結温度は，−20°C，−40°C及び−40°Cまで予備凍結を行った後瞬間的に液体窒素中へ入れ急速冷却を行った3区を設けた。凍結した材料は，−20°Cと−40°Cに5分間保ち，液体窒素中には1時間浸漬した。融解は38°Cの温水中における急速融解を行い，直ちに植物体再生用培養基へ植え込んだ。

4. 植物体再生及び調査 植物体再生用培養基の作製方法，培養条件及び調査方法は，すべてIに準じた。

結果及び考察

I. 初冬期における茎頂の耐凍性

各材料採取時期における耐凍性はFig. 1に示したとおりで，10月29日と11月18日の材料は同様の傾向を示した。すなわち，0°Cでは各品種とも90%以上が生存していた。しかし，−5°Cでは'長十郎'は10月，11月の材料ともに42%の生存率を示したが，他の品種ではほとんど生存しなかった。12月3日の材料では，品種に関らず0°C，−5°C及び−10°Cのいずれの温度においても，90%以上の高い生存率を示した。以上のことから，ナシ茎頂の耐凍性は11月下旬から12月上旬にかけ

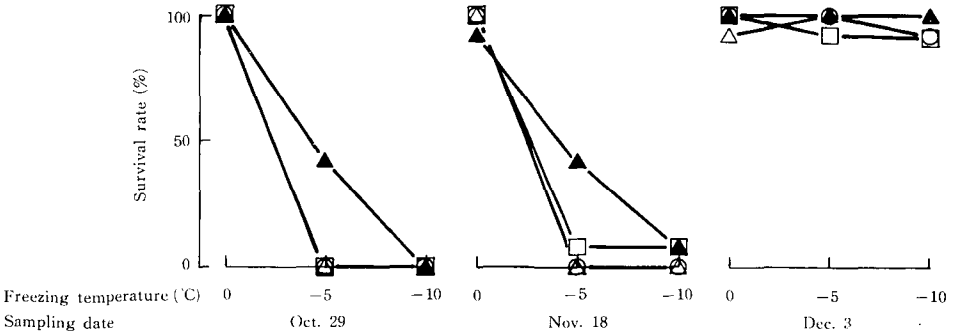

Fig. 1. Freezing resistance of pear leaf bud apices excised from late October through early December. Sterile distilled water is used as freezing solution. Cooling rate is 0.5°C/min. Media for regrowth culture contain MS medium, 1 mg/ℓ BA, 30 g/ℓ sucrose and 7 g/ℓ agar. Symbols represent pear cultivars: ○——○, Flemish Beauty; △——△, Mishirazu; □——□, Bartlett; ▲——▲, Chōjurō.

て急激に増大し，12月上旬には −10°C 以下の低温にも耐えられるようになるものと考えられる。片野[2] ならびに KATANO and ISHIHARA[3] は，リンゴの茎頂を用いた凍結保存の研究で，耐凍性の高い時期の材料を用いれば，茎頂を液体窒素中で生存させることは比較的容易であると報告しており，本実験の結果から12月上旬以降の冬季の材料が，凍結保存に適しているのではないかと考えられる。

II. −5°C～−30°C 下での凍結後の茎頂の生存に及ぼす凍結媒液中の DMSO 濃度の影響

Fig. 2 に茎頂の生存に及ぼす DMSO 濃度の影響を示した。DMSO 無添加区の材料は，0°C において 100% 生存していたが，−5°C 以下ではほとんど生存できなかった。一方，DMSO を添加した区における茎頂の生存率は，−5°C で無添加区に比べすべて高い値を示した。特に DMSO 4% 及び 8% の濃度区の材料は，他の濃度区の材料がすべて死滅した −10°C 以下の温度においても比較的高い生存率を示し，−30°C でもわずかに生存する個体が認められた。また，DMSO 16% 及び 20% の濃度区の 0°C における生存率は 20% 以下の低い値であったが，これは，DMSO 濃度が高過ぎるために，茎頂が薬害を受けて壊死したことによるものと考えられる。したがって，本実験の結果から，DMSO にはナシ茎頂の凍害に対する防御作用が認められ，その際の至適濃度は 4～8% であると考えられる。

MORIGUCHI ら[5] は，本実験と同様ニホンナシ茎頂の凍結後の生存に及ぼす凍結媒液中の DMSO 濃度の影響について検討を行い，20～30% の濃度においても良好な結果を得ている。しかし，本実験が9月上旬の材料で検討しているのに対し，MORIGUCHI らは，品種及び凍結媒液中の糖の有無については異なるものの，耐凍性の高い12月中旬の材料を用いており，材料の生理的性質の違いが，DMSO の凍害防御物質としての効果の発現に影響

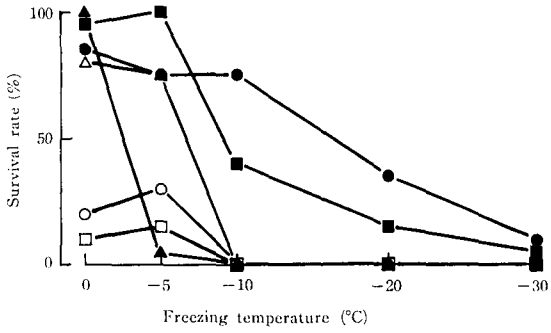

Fig. 2. Effects of DMSO concentrations and freezing temperature on survival of pear leaf bud apices frozen at 0° to −30°C. Cultivar is 'Mishirazu'. The apices, excised on Sep. 7, are immersed for two hours in freezing solution containing 30 g/ℓ sucrose and DMSO. Cooling rate is 0.5°C/min. Media used for regrowth of apices contain MS medium, 1 mg/ℓ BA, 30 g/ℓ sucrose and 7 g/ℓ agar. Data are obtained after 2 weeks. Symbols represent DMSO concentrations in percent (V/V): ▲——▲, no DMSO; ●——●, 4; ■——■, 8; △——△, 12; ○——○, 16; □——□, 20.

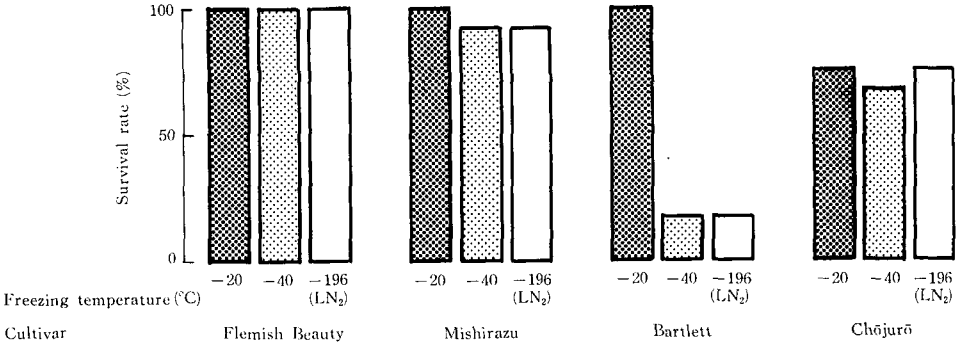

Fig. 3. Survival of pear leaf bud apices frozen to −20°, −40° and −196°C (LN_2). All apices, excised on Jan. 29, are immersed in freezing solution containing 30 g/ℓ sucrose and 8% (V/V) DMSO prior to cooling. Apices are cooled down to −20° or −40°C at 0.5°C/min. Rapid cooling of LN_2-immersion is made at approximately 400°C/min immediately after prefreezing (cooling rate, 0.5°C/min; freezing temperature, −40°C). Rapid rewarming of immersing in warm water at 38°C is applied.

を及ぼしたものと考えられる。したがって，DMSOの最適濃度を知るためには，時期ごとのさらに詳細な検討が必要であろう。

III. 液体窒素中で凍結した茎頂の生存

Fig. 3に凍結後の茎頂の生存に及ぼす凍結処理温度及び品種間差の影響について示した。この場合，IIの実験結果や片野[2]及びMORIGUCHIら[5]の報告を参考に，凍結媒液中のDMSO濃度は8%(v/v)とした。

'フレミッシュ・ビューティー'では，−20°C，−40°C及び液体窒素中で凍結した材料のすべてが生存し，'身不知'においてもすべて90%以上の高い生存率を示した。Fig. 4に，液体窒素に浸漬し生存していた茎頂の状態を示した。また'長十郎'は，各処理区とも70%前後の値を示した。したがって，'フレミッシュ・ビューティー'，'身不知'及び'長十郎'の3品種に関しては，茎頂の液体窒素中での凍結保存は，比較的容易に行えるのではないかと考えられる。一方，'バートレット'では−20°Cで生存率100%であったが，−40°C及び液体窒素中における生存率は20%以下に低下した。このように，耐凍性の極めて高い1月下旬の材料を用い，凍害防御物質を添加しているにも関らず，液体窒素中で生存する個体が少なかったことから，'バートレット'の凍結保存についてはさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

酒井と西山[8]ならびにSAKAI and NISHIYAMA[9]は，本実験で用いたのと同じナシの品種を用いて，発育枝の液体窒素中における凍結保存の可能性について検討を行い，'フレミッシュ・ビューティー'と'身不知'は可能であるが，'長十郎'と'バートレット'は不可能であると報告している。本実験の結果もこれと同様に品種間差が認められたが，'長十郎'の液体窒素中における生存率がかなり高いとともに，'バートレット'においても低率ながら生存個体が認められた。これは，凍結媒液中にDMSOやしょ糖を添加したことが原因とも考えられ，今回生存率の低かった'バートレット'においても，DMSOのほか他の凍害防御物質の種類や濃度を検討することにより，液体窒素中における高率の生存を可能にすることができるものと考える。

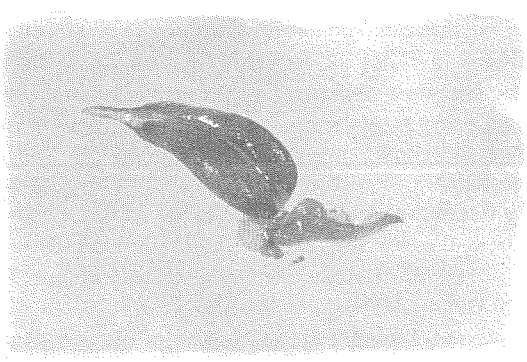

Fig. 4. A leaf bud apex of pear ('Flemish Beauty') that survived LN_2-immersion following prefreezing of cooling to −40°C, and has been cultured for 1 month on medium containing MS medium, 30 g/ℓ sucrose, 1 mg/ℓ BA and 7 g/ℓ agar.

摘　要

ナシの遺伝子源あるいは生殖質の凍結保存技術を確立するため，セイヨウナシ(*Pyrus communis* L.)'フレミッシュ・ビューティー'と'バートレット'，ニホンナシ(*Pyrus serotina* REHDER var. *culta* REHDER)'長十郎'及びチュウゴクナシ(*Pyrus ussuriensis* MAXIM. var. *sinensis* KIKUCHI)'身不知'の発育枝の腋生の葉芽から取り出した茎頂(横径約1 mm，葉原基を4個程度有するもの)を用い，茎頂の生存に及ぼす耐凍性，凍結媒液中のDMSO濃度ならびに液体窒素中における凍結について検討を行った。凍結に先立ち，茎頂は凍結媒液(既述濃度のDMSOとしょ糖30 g/ℓを添加)へ20°Cで2時間浸漬し，凍害防御物質(DMSO)を浸透させた。冷却方法は以下のとおりである。すなわち，スピッツ管中の凍結媒液に浸漬した茎頂は，毎分0.5°Cの割合で−20°Cまたは−40°Cまで冷却し，5分間その温度に保った。液体窒素(−196°C)浸漬処理は，上述の方法で−40°Cまで予備凍結した後，直接液体窒素へ浸漬する方法(冷却速度，約400°C/min)で行い，液体窒素中に1時間保った。凍結した茎頂は，38°Cの温水中で急速融解し，植物体再生用培養基(MS培地，しょ糖30 g/ℓ，BA 1 mg/ℓ及び寒天7 g/ℓを添加)へ植え込み，25°C，1日16時間照明(約4,000 lx，白色螢光灯)の条件下で培養した。

1. 茎頂の耐凍性は，蒸留水中で冷却した後の茎頂の生存率により測定した。10月27日及び11月18日に採取した茎頂の生存率は，以下のとおりである。すなわち，0°Cでは，本実験で用いた全品種において高い値(90%以上)を示した。−5°Cでは，'長十郎'は42%の生存率を示したが，他の品種は10%以下の小さな値しか示さなかった。一方，12月3日に採取した茎頂は，−10°Cの凍結で，全品種とも90%以上の高い生存率を示した。このことは，11月下旬から12月上旬にかけて

の低温が,茎頂の耐凍性を増大させたことを示している。

2. 凍結媒液浸漬処理（しょ糖30 g/ℓ及び0～20%のDMSOを添加，20°C，2時間）は，9月上旬の茎頂の−5°～−30°C凍結後の生存率を増加させた。この場合，DMSOの至適濃度は4～8%(v/v)であり，16%以上では茎頂に薬害が認められた。

3. 液体窒素中で凍結した茎頂の生存率は，'フレミッシュ・ビューティー'が100%，'身不知'が92%，'長十郎'が75%及び'バートレット'が17%であった。'バートレット'において，生存率が−20°Cの100%から−40°Cの17%へ低下したことは，−20°Cから−40°Cへの冷却過程で,茎頂が凍害を受けたことを示している。

'フレミッシュ・ビューティー'，'身不知'及び'長十郎'の茎頂の凍結保存技術確立は実現可能であるが,'バートレット'においては，諸条件についてさらに研究する必要があるものと考えられる。

引 用 文 献

1. 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
2. 片野 学：リンゴ茎頂の耐凍性の季節変化について，園学要旨，昭57秋，2-3. 1982
3. KATANO, M. and ISHIHARA, A.: Survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen, *HortScience*, **18**(5): 707-708. 1983
4. 黒田治之・西山保直：リンゴ培養カルスの液体窒素中での凍結保存，北海道農試研報，**136**: 15-21. 1983
5. MORIGUCHI, T., AKIHAMA, T. and KOZAKI, I.: Freeze-preservation of dormant pear shoot apices, *Japan. J. Breed.*, **35**: 196-199. 1985
6. 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，育雑**35**巻別冊2，150-151. 1985
7. 酒井 昭・西山保直：リンゴ冬芽の液体窒素中での凍結保存，園学雑，**46**(2): 169-172. 1977
8. 酒井 昭・西山保直：落葉果樹の冬芽の液体窒素中での凍結保存，園学雑，**47**(1): 27-30. 1978
9. SAKAI, A. and NISHIYAMA, Y.: Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen, *HortScience*, **13**(3): 225-227. 1978
10. PIENIAŹEK, J., HOLUBOWICZ, T., MACHNIK, B. and KASPRZYK, M.: Apple stem callus frost tolerance and growth modification by adding solbitol and some growth regulators to the medium, *Acta Hortic.*, 81: 91-95. 1978

Summary

To establish freeze-preservation method of genetic resources or germplasms of pear, freezing resistance, optimal DMSO concentration in freezing solution, survival of LN_2-immersed materials were examined using axillary leaf bud apices (approximately 1 mm in diameter, with 3-4 leaf primordia) excised from current shoots of *Pyrus communis* L. ('Flemish Beauty' and 'Bartlett'), *Pyrus serotina* REHDER var. *culta* REHDER ('Chōjurō') and *Pyrus ussuriensis* MAXIM. var. *sinensis* KIKUCHI ('Mishirazu'). Cryoprotectant (DMSO) penetration into the apices prior to freezing was made at 20°C through two-hour immersion in freezing solution (containing prescribed DMSO concentrations and 30 g/ℓ sucrose). Cooling procedures were as follows: the apices, contained in a tapered tube together with freezing solution, were cooled gradually to −20°C or −40°C at 0.5°C/min, and left for 5 minutes; freezing treatments in liquid N_2 (−196°C) were made by direct immersion (cooling rate, 400°C/min; following the prefreezing to −40°C according to the procedure described above) and by subsequent one-hour leav ing in LN_2. The apices were thawed through rapid rewarming of immersion into warm water at 38°C, and then cultured on a regrowth medium (containing MS medium, 30 g/ℓ sucrose, 1 mg/ℓ BA and 7 g/ℓ agar) at 25°C under 4,000 lx (16-hour daily illumination).

1. Freezing resistance of the apices were determined in terms of survival resulting from their cooling down together with water. Survivals of the apices sampled on Oct. 27 or Nov. 18 were as follows: high survival rates (above 90%) were obtained with cooling to 0°C in all cultivars tested in this experiment; with cooling to −5°C, 'Chōjurō' showed a survival rate of 42%, while the other cultivars gave slight survivals of less than 10%. On the other hand, in samples on Dec. 3, all the cultivars showed high survival rates of more than 90% with freezing to −10°C. These facts indicate that the low temperature from late November through early December increases a freezing resistance of the samples.

2. Pretreatment of immersing the apices in freezing solution (containing 30 g/ℓ sucrose and

0-20% DMSO) at 20°C for 2 hours resulted in survival rate heightening of early September-collected samples frozen to −5°～−30°C. In this case, 4 to 8% (V/V) of DMSO were optimal, and more than 16% of it gave an injurious effect to the apices.

3. Four-cultivar's apices frozen in LN_2 showed the following survival rates: 'Flemish Beauty', 100%; 'Mishirazu', 92%; 'Chōjurō', 75%; 'Bartlett', 17%, respectively. Additionally, in 'Bartlett', survival-rate decrease from 100% (at −20°C) to 17% (at −40°C) suggests that the apices sustain freezing injury in cooling process between −20°C and −40°C.

Freeze-preservation method of apices of 'Flemish Beauty', 'Mishirazu' and 'Chōjurō' will be established in the near future, whereas that of 'Bartlett' seems to need further studies on various conditions.