



HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|------------------|---|
| Title | 園芸作物組織の超低温保存に関する基礎的研究 |
| Author(s) | 鈴木, 卓; SUZUKI, Takashi |
| Citation | 北海道大学農学部邦文紀要, 18(2), 165-217 |
| Issue Date | 1993-03-10 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/12150 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 18(2)_p165-217.pdf |



園芸作物組織の超低温保存に関する基礎的研究*

鈴木 卓

(北海道大学農学部園芸学講座)

(平成4年9月17日受理)

Basic Studies on Super-Low-Temperature Cryopreservation of Horticultural Plant Tissues

Takashi SUZUKI

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,

Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

目 次

| | | | |
|---|-----|--|-----|
| I. 緒 言 | 166 | F. アスパラガス茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生 | 181 |
| II. 液体窒素凍結・融解後における茎頂の生存と植物体再生 | 167 | 1. 液体窒素凍結・融解後の茎頂の生存に及ぼす凍結媒液中のDMSO及び糖の影響 | 181 |
| A. リンゴ茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生 | 167 | 2. 液体窒素凍結・融解後の茎頂の生存に及ぼす前培養の影響 | 184 |
| 1. 凍結・融解後のリンゴ茎頂における生存率及び植物体再生率の品種間差 | 167 | III. 茎頂の耐凍性と超低温凍結生存性 | 185 |
| 2. 植物体再生に及ぼす凍結温度の影響 | 168 | A. 耐凍性と超低温凍結生存性 | 185 |
| 3. 生存個体からの植物体再生率の向上 | 170 | B. 茎頂の耐凍性及び凍結生存性の変化 | 186 |
| B. ナン茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生 | 172 | IV. 凍結生存性の制御 | 189 |
| 1. 予備凍結・融解後のナン茎頂の生存に及ぼす凍結媒液中のDMSO濃度の影響 | 172 | A. 凍結生存性に及ぼすハードニングの影響 | 189 |
| 2. 液体窒素凍結後のナン茎頂の生存とその品種間差 | 173 | B. 凍結生存性に及ぼす前培養の影響 | 190 |
| 3. 液体窒素凍結・融解後のナン茎頂からの植物体再生 | 173 | 1. ハスカップ及びブルーベリー培養体シュート節部の凍結・融解後の生存に及ぼす前培養の影響 | 190 |
| C. オウトウ茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生 | 174 | 2. アスパラガス小側枝茎頂の凍結・融解後の生存に及ぼす前培養の影響 | 191 |
| D. ハスカップ茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生 | 177 | V. 凍結生存性の相違と内生成分 | 192 |
| 1. 野外のハスカップ植物体から採取した茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生 | 177 | A. 内生成分の季節的変動 | 193 |
| 2. ハスカップ培養体シュート節部組織片の凍結・融解後の生存に及ぼすハードニングの影響 | 178 | 1. ナン茎頂における内生成分の季節的変動 | 193 |
| E. ブルーベリー茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生 | 179 | 2. ハスカップ茎頂における内生成分の季節的変動 | 196 |
| | | B. 凍結生存性の異なる組織間での内生成分の相違——アスパラガス培養体シュートの節部及び節間部における凍結生存性の相違と内生成分—— | 197 |
| | | C. 前培養に伴う内生成分の変動 | 198 |
| | | 1. アスパラガス若茎小側枝茎頂の前培養における内生成分の変動 | 199 |
| | | 2. ハスカップ培養体節部切片の前培養における内生成分の変動 | 201 |
| | | VI. 植物組織の凍結生存性と凍結・融解後の生存 | |

* 本報は北海道大学審査学位論文の一部である。

| | |
|---|-----|
| 状態 | 201 |
| A. 野外から採取した茎頂組織の構造の季節的 差異 | 201 |
| B. 野外から採取した茎頂の液体窒素凍結・融 解・培養後の組織の生存状態 | 203 |
| C. 培養組織の凍結生存性と凍結・融解後の生 存状態 | 205 |
| VII. 総合考察 | 207 |
| VIII. 摘 要 | 210 |
| 引用文献 | 212 |
| Summary | 215 |

I. 緒 言

近年、植物遺伝資源を大切に保存しておくことの必要性が強く認識されるようになった。園芸作物のうち、果樹のほとんどは主に栄養繁殖により種苗を増殖しているほか、野菜、花卉の中にも栄養繁殖性の作物が少なくない。これらの作物の品種、系統は種子による維持・保存は不可能なため、栄養体を栽培することにより維持・保存されている。たとえば、リンゴやナシなどの果樹では収集した枝を穂木として接木を行い、得られた植物体を圃場に栽植して維持・保存しているし、ジャガイモ等の芋類は毎年親芋を圃場に植え付けて栽培することによって品種・系統の維持を図っている。これらの作業には莫大な経費と労力を必要とし、常に病虫害及び自然災害などの被害を受ける危険性もあるので、品種・系統を保存するための、より簡便、省力的かつ安全性の高い技術の開発が強く望まれている^{89,90)}

このような状況のもとで、近年、組織培養法を利用して植物のもつ遺伝子源を保存する試みが行われるようになった。その一つは、0℃前後の低温で培養体の生長を抑制することによって保存しようとする生長抑制法^{34,39,43)}であり、もう一つは、植物体の一部である微小な組織を超低温下（液体窒素、液体ヘリウムなどの中）で凍結した状態で保存し、必要ときに融解して組織培養法により植物体を再生させる凍結保存法である⁶³⁾。前者は、1～2年を周期として継代培養を繰り返す必要があるため、比較的短期間の保存に適用されるのに対し、後者は中・長期的な保存を目的にしている点が異なっている。このうち、品種、系統及び野生種など遺伝子源の保存を目的にする場合には、長期的で変異を起こす危険性が少ない超低温凍結保存が適していると考えられる。

凍結保存技術は、動物では精液及び卵細胞をはじめとして、各種培養細胞の保存法として実用化されており、植物においても遊離細胞を凍結保存した場合の生死についてはこれまでに多くの研究が行われてきた^{4,5,10,33,49,65)}しかし、凍結・融解後の植物体再生を考慮した植物組織の凍結保存については、研究が始まったところであり未だ実用化に至っていない^{56,68)}植物組織の凍結保存については、野外の植物体から取り出した茎頂、腋芽生長点部組織、培養体シュート組織、不定胚、苗条原基及びカルスなどを凍結し、融解・培養後に細胞・組織の生存を確認し、生存組織から植物体を再生させた事例が報告されている^{2,3,6,12,13,15,17,22,23,25,30,32,37,44,45,51,52,57,58,59,60,61,70,71,76,78,79,85,87,91)}このうち、カルスは遺伝的変異を伴うことがあり、不定胚も誘導の経路によっては遺伝的安定性に欠けることが懸念される。したがって、品種または系統の保存・維持を行う場合の凍結保存用植物材料としては、個体再生において効率が高くかつ安定性のある茎頂が最も適していると考えられる。

この場合、野外の植物体から採取した茎頂と、それらの *in vitro* 培養によって得た茎頂とがあり、それぞれに長所短所がある。すなわち、野外の茎頂がもつ特質としては、冬季に採取すれば自然条件下において獲得した高い耐凍性をもっており、凍結・融解後における生存の可能性が高いことである。しかし、野外の植物材料を用いる場合には材料採取時期が限定されるほか、ウィルスやマイコプラズマ等の病原体に汚染されている可能性があり、また組織を無菌的に取り出すために殺菌操作が必要となる。この点 *in vitro* 培養によって増殖した材料を用いる場合には、季節を選ぶことなく年間を通じて材料の採取が可能であり、材料の殺菌操作も必要がないという利点がある。しかし、*in vitro* 培養の材料が常に高い耐凍結性をもっているとは限らず、野外の植物材料には必要がない前処理を必要とすることも有り得る。このような観点から本研究では、野外の植物体から採取した茎頂と培養体の茎頂の両方を供試した。

植物組織の超低温凍結保存技術は、次に示す三つの基本的な技術から成り立っている。すなわち、①植物材料の‘凍結生存性’（凍結・融解後に生存する性質）を向上させるための凍結前処理法、②凍結法と融解法、並びに③融解後の植物体再生法の三つで

ある³⁰⁾

まず II. において、実際に組織を凍結させ、融解した場合の茎頂の生存と植物体再生について各作物の反応特性を明らかにすると共に、凍結保存技術を実用化に結び付けるための重要な諸事項について検討した。材料としては組織培養により茎頂からの植物体再生が可能な5種の果樹(リンゴ、ナシ、オウトウ、ハスカップ及びブルーベリー)のほかに、アスパラガスを加え、主として茎頂自身の有する耐凍性の植物の種類、季節による差、凍結法、融解法、融解後培養中の組織の生存、シュートの生長、発根、植物体の再生などについての各作物の反応の相違点などを明らかとした。

次に III. では、茎頂自身が本来有する耐凍性と人為的な凍結を行った場合の凍結生存性との関係を明らかにするため、ナシの茎頂を用いて凍結後の生存率の季節的変動について追求した。

IV. においては、*in vitro* で養成したシュートの茎頂や、野外においても高い耐凍性をもつことのできない植物の茎頂などを凍結保存の材料とする場合に必要不可欠な、人為的な凍結生存性を高めるための前処理として、前培養やハードニングについて検討し、ある種の作物には極めて有効であることを明らかとした。

V. では、凍結生存性の異なる組織間で内生成分を比較し、凍結生存性の変動と平行して組織内成分にいかなる変化が生じているかを明らかにするとともに、凍結生存性を人為的に制御する場合の指標を得る目的で、凍結生存性と内生成分との関連性について実験した。

VI. においては、凍結・融解後の組織を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて組織構造的に観察し、組織構造の違いと凍結生存性との関連について検討した。

最後に VII. において II. から VI. までの結果に基づいて総合的に考察を加えた。

II. 液体窒素凍結・融解後における茎頂の生存と植物体再生

予備凍結法による茎頂の凍結保存技術を確立するうえでの問題点を明らかにするとともに、植物の特性の種類による相違点を見出すことを目的として、保存する植物材料の耐凍性の変動、凍結法、融解法、凍結・融解後の植物体再生などについて探求し

た。

A. リンゴ茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生

筆者はリンゴの茎頂培養を、1年を通して行い、冬季に採取したリンゴ茎頂は初代培養の材料として適していることを明らかにしている²⁹⁾ また、冬季の茎頂は耐凍性が高く凍結保存の材料に適していると言われている³⁴⁾ そこで、II-A では冬季の茎頂を用いて液体窒素中での凍結実験を行い、融解後の生存及び植物体再生について検討した。

1. 凍結・融解後のリンゴ茎頂における生存率及び植物体再生率の品種間差

a. 材料及び方法

1) 材料の調製 北海道大学農学部附属農場余市果樹園に栽植してあるリンゴ (*Malus pumila* MILL.) を用いた。1987年2月4日に‘ふじ’、‘スーパータン’、‘旭’、‘スターキング・デリシャス’の4品種、2月18日に‘コートランド’、‘サマーランド’、‘サマーレッド’の3品種、2月24日に‘むつ’、‘エンパイア’、‘スペンサー’、‘きたかみ’、‘インペリアル’の5品種から休眠枝を採取し、茎頂を無菌的に取り出して実験に用いた。すなわち、枝は腋生葉芽1つをもつ節ごとに切断し、樹皮と外側のりん片葉5~6枚を除去したのち、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%、界面活性剤 Tween-20 を0.01%となるように添加)で、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4個程度を有する)を無菌的に取り出した。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7g/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、蒸留水にスクロース30g/lとDMSO8%(V/V)を添加した凍結媒液を、120℃、1.1kg/cm²で10分間加圧滅菌後、注射器を用いて1ml容ストロー精液管(直径4mm、長さ12cm、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のち、室温で2時間静置した。

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℃から-40℃まで0.5℃/minの冷却速度で冷却することにより予備凍結を行った。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℃で自動的に植水を行った。-40℃まで冷却した材料は、ストローごと液体窒素(-196℃)中へ入れ急速冷却(約500℃/min)を行い、液体窒素中には1時間浸漬した。融解は、ストロー精液管を38℃の温水中へ投入することによる急速融解(約400℃/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培地にスクロース30 g/l、BA 1 mg/l及び寒天7 g/lを添加し、pH 5.7に調整したものをを用い、100 ml容三角フラスコに20 mlずつ分注した。培養は、25℃、1日16時間照明(白色蛍光灯、約4,000 lx)の条件下で行い、各処理温度区当りの組織片数は12とした。植え込みから1か月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死滅個体とした。また、培養2か月後にロゼット状培養体形成個体数を調査した。

b. 結果及び考察

Table 1に液体窒素凍結・融解後のリンゴ茎頂の生存及びロゼット状培養体形成における品種間差を示した。液体窒素凍結後の茎頂の生存率は、品種にかかわらずいずれも100%近くのきわめて高い値を示した。したがって、冬季に野外より採取した耐凍性の高い茎頂を、液体窒素凍結後に生存させることは容易であると考えられる。一方、生存個体におけるロゼット状培養体形成率はいずれも20%以下であり、生存した茎頂から植物体が再生する割合は、品種によらずかなり低いことが明らかになった。

形成されたロゼット状培養体は、再生に用いたものと同様の組成の培地に移植することにより容易にシュートが伸長し、これを発根培地に移植することにより、Fig. 1に示すような再生植物体を得ることができた。

2. 植物体再生に及ぼす凍結温度の影響

a. 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してある18年生リンゴ'スパータン'から1988年3月1日に休眠枝を採取し、腋生葉芽から茎頂

Table 1. Varietal differences in survival and rosette formation of apple leaf bud apices frozen in liquid N₂, thawed and cultured.²

| Cultivar | Survival of shoot apex | | Rosette formation of shoot apex | |
|--------------------|------------------------|-----|---------------------------------|----|
| | Surviving/treated | % | Rosette-forming/surviving | % |
| Fuji | 12/12 | 100 | 2/12 | 17 |
| Spartan | 12/12 | 100 | 2/12 | 17 |
| McIntosh Red | 12/12 | 100 | 1/12 | 8 |
| Starking Delicious | 12/12 | 100 | 2/12 | 17 |
| Cortland | 11/12 | 92 | 1/11 | 9 |
| Summerland | 12/13 | 92 | 1/12 | 8 |
| Summerred | 9/9 | 100 | 0/9 | 0 |
| Mutsu | 14/14 | 100 | 2/14 | 14 |
| Empire | 13/13 | 100 | 0/13 | 0 |
| Spencer | 11/15 | 73 | 1/11 | 9 |
| Kitakami | 8/8 | 100 | 0/8 | 0 |
| Imperial | 15/15 | 100 | 0/15 | 0 |

²Survivals were defined after 1 month of culture; rosette formations, after 2 months. Freezing solution: distilled water +8% DMSO +30 g/l sucrose. Prefreezing: cooled down to -40℃ at 0.5℃/min. Thawing: ultrarapidly thawed by immersion into a warm water at 38℃. Culture medium: MS medium +1 mg/l BA +30 g/l sucrose +7 g/l agar; pH, 5.7.

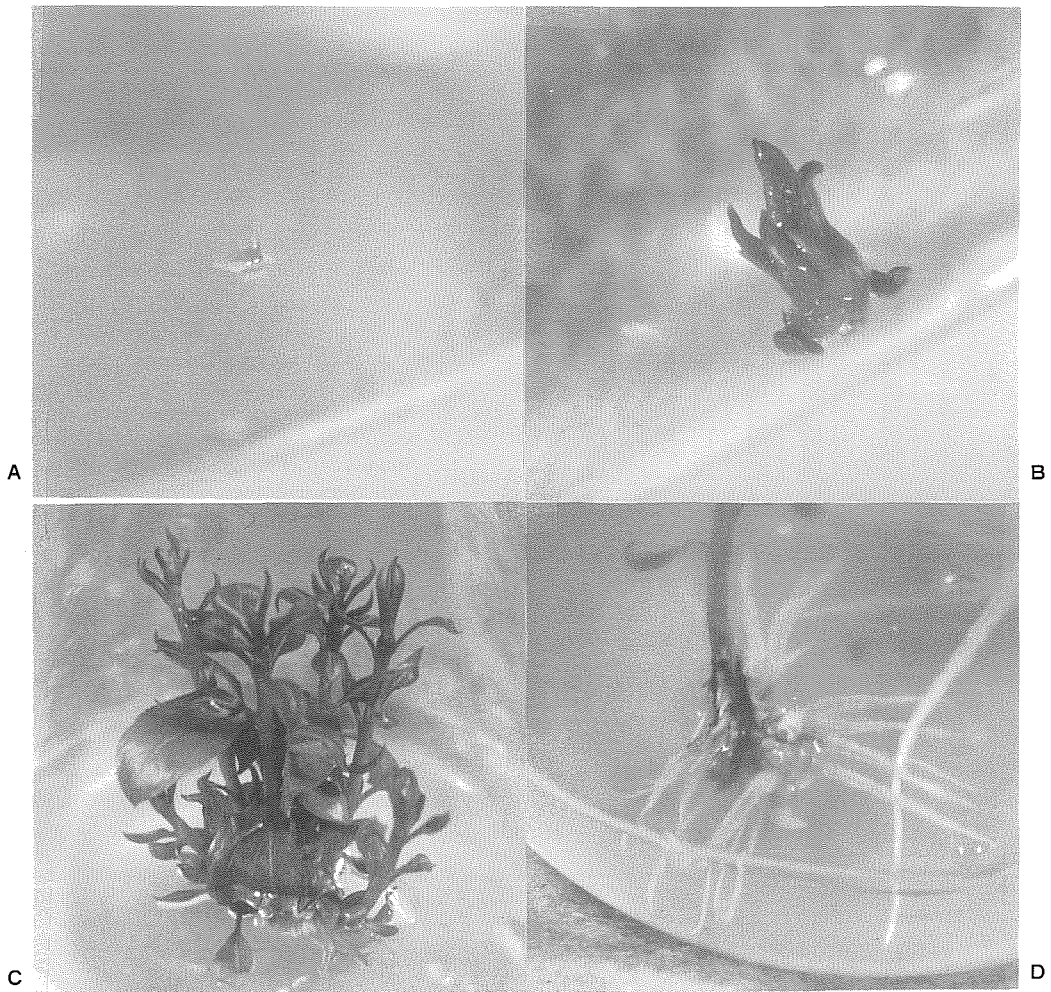


Fig. 1. Plant regeneration of apple leaf bud apices frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured *in vitro*. A, a leaf bud apex survived (after one week of culture); B, a rosette developed from an apex (after one month of culture); C, shoots formed from a rosette (after two months of culture); D, roots formed on the bottom of shoot (after one month of subculture). Plant materials were collected from 'spartan.'

(横径約 1 mm) を無菌的に取り出して用いた。植物材料の調製は、A-1 と同様の方法により行った。

2) 凍結媒液処理 凍結媒液処理の方法は、A-1 と同様である。

3) 茎頂の凍結及び融解 凍結及び融解は、A-1 と同様に行った。実験区は、凍結温度を -10°C 、 -20°C 、 -40°C 及び -196°C (液体窒素浸漬) とした 4 区とし、他に対照区と 0°C まで冷却した 2 区を加えた。

4) 培養及び調査 培養条件は A-1 と同じである。なお、各処理温度区当りの組織片数は 30 とし

た。植え込みから 1 か月後及び 2 か月後に、展開葉数、最大葉の葉長及びシュート形成の有無について調査した。

b. 結果及び考察

凍結・融解した茎頂は培養 1 か月後までにすべて緑色を呈し、生存率はいずれも 100% であった。一方、生存した茎頂の生長には凍結温度による差が認められ、最大葉の葉長を比較すると、 -20°C 以上の温度区では培養 2 か月後に 12~14 mm の値を示したのに対し、 -40°C 以下の温度区では 7 mm 以下であった (Fig. 2)。これは、 -20°C から -40°C にか

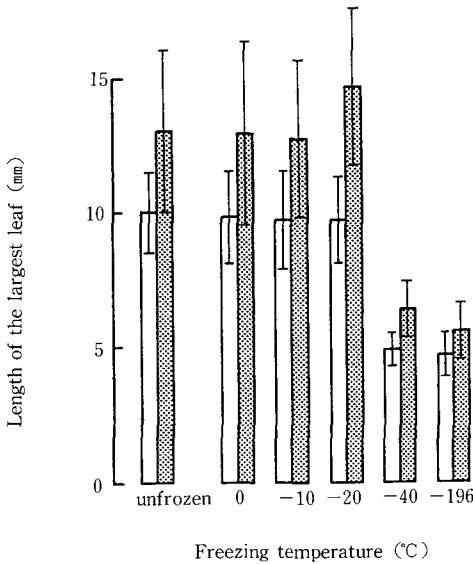


Fig. 2. Effect of freezing temperature on the length of the largest leaf developed from apple leaf bud apices frozen in liquid nitrogen. Stained and non-stained bars represent the culture duration of one and two months, respectively. Vertical lines represent SD. "Unfrozen" means a normal culture of shoot apices.

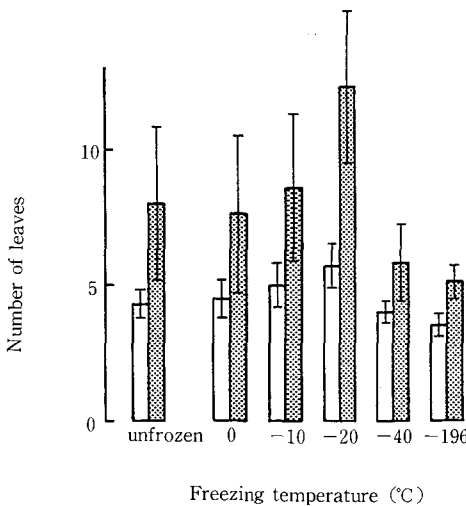


Fig. 3. Effect of freezing temperature on the number of leaves developed from apple leaf bud apices frozen in liquid nitrogen. Stained and non-stained bars represent the culture duration of one and two months, respectively. Vertical lines represent SD. "Unfrozen" means a normal culture of shoot apices.

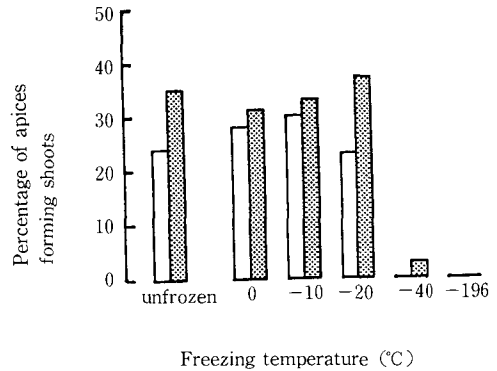


Fig. 4. Effect of freezing temperature on shoot formation of apple leaf bud apices frozen in liquid nitrogen. Stained and non-stained bars represent the culture duration of one and two months, respectively. "Unfrozen" means a normal culture of shoot apices.

ての冷却の過程で葉原基がある程度の凍害を受けたためと考えられる。また、展葉数にも同様の傾向が認められた(Fig. 3)。用いた茎頂の葉原基の数が4枚程度であることから考えると、 -40°C 以下の凍結では頂端分裂組織が凍害を受け、融解した茎頂を培養しても、新しい葉の形成がほとんど行われていないものと考えられる。このことは、Fig. 4に示すように植物体再生率の差によっても裏付けられ、 -40°C 以下の温度区では再生個体はほとんど得られなかった。

3. 生存個体からの植物体再生率の向上

凍結保存技術の実用化を考える上で植物体再生率を高めることが不可欠である。A-2で、液体窒素凍結後の茎頂からの植物体再生率が低い理由は、茎頂が凍害を受けているためであると推測された。そこで、培養体の葉から不定芽を形成させシュート形成を促す技術を応用して、凍結後に生存した組織の生長を促し植物体再生率を向上させる培養方法について検討した^{29,35)}

a. 材料及び方法

‘スパータン’から1989年2月15日に採取した茎頂を用いた。凍結及び融解の方法は、A-1と同様である。培養には、①MS培地にスクロース30g/l、BA 1mg/l及び寒天7g/lを添加しpH 5.7に調整したもの、並びに②MS培地にスクロース30g/l、カザミノ酸1g/l、NAA 0.1mg/l、Thidi-

azuron (TDZ) 10^{-6} M 及び寒天 7 g/l を添加し pH 5.7 に調整したものの 2 種類の培養基を用いた。培養条件として、1)①の培養基を用い 25°C 、 $4,000 \text{ lx}$ 、1日16時間照明の条件下で2か月間培養を続けたもの、2)②の培養基を用い 25°C 、暗所で2か月間培養した後さらに①の培養基へ移植し1)の培養条件下で培養を続けたものの2通りを設定して比較した。

b. 結果及び考察

融解した茎頂を1)で述べた従来の茎頂培養法で培養した場合のシュート形成率はわずか3%であったが、TDZを含む培地で培養した区では、供試個体の40%でシュートが得られた (Fig. 5 及び Fig. 6)。なお、ここで用いた TDZ の濃度は、増田らの報告³⁵⁾を参考にして未凍結の茎頂を用いて行った予備実験の結果から決定したものである。増田らは TDZ を用いて培養シュートの葉の外植片から高率でシュートを形成させており、凍結後の茎頂からの植物体再生にもこの方法はかなり期待できるものと考えられる。

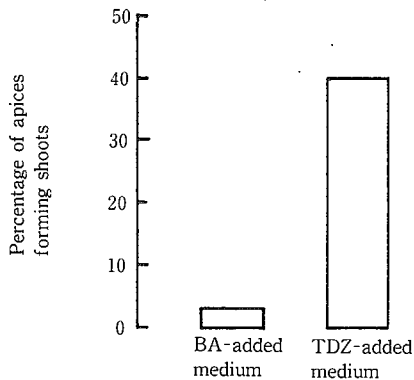


Fig. 5. Effect of the kinds of cytokinin added in culture media on shoot formation of apple leaf bud apices frozen in liquid nitrogen. BA-added medium: a plant-regeneration medium containing MS medium, 30 g/l sucrose and 1 mg/l BA (observed after 2 months of culture under light). TDZ-added medium: a plant-regeneration medium containing MS medium, 30 g/l sucrose, 1 g/l casamino acids, 0.1 mg/l NAA and 10^{-6}M TDZ (observed after 2 months of a BA-added medium-using culture under light, which follows 2 months of a TDZ-added medium-using culture in the dark).

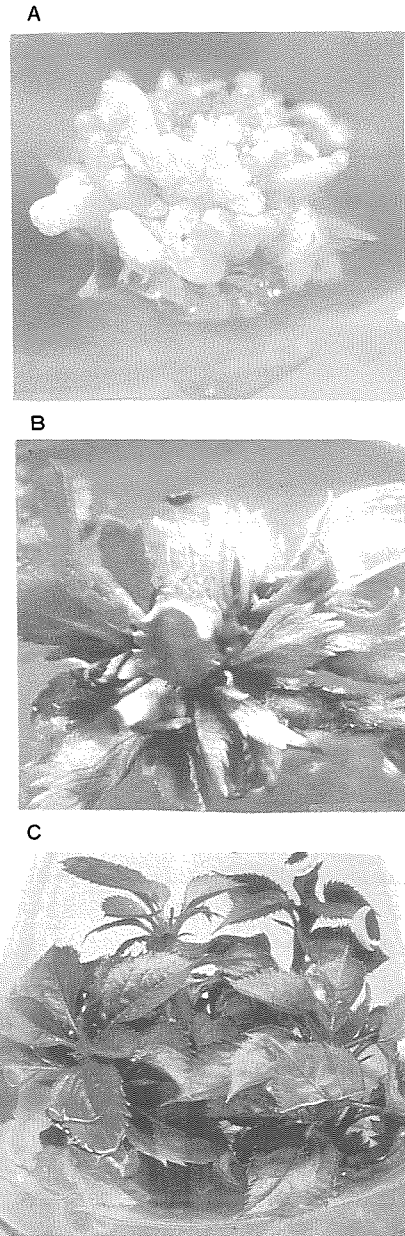


Fig. 6. Plant regeneration of apple leaf bud apices frozen in liquid nitrogen and cultured on the TDZ-added medium. A, multiple buds formed from leaf bud apices (after 2 months of culture in the dark); B, shoot elongation from multiple buds (one month after the transfer from the TDZ-added medium to the BA-added medium); C, shoots proliferated on the BA-added medium (two months after the transfer to the BA-added medium). Plant materials were derived from 'spartan.'

B. ナシ茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生

1. 予備凍結・融解後のナシ茎頂の生存に及ぼす凍結媒液中の DMSO 濃度の影響

予備凍結法によるナシ茎頂の凍結保存技術を確立する基礎として、dimethyl sulfoxide (DMSO) の凍害防御効果、すなわち凍結媒液中の DMSO 濃度について検討した。

a. 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してある中国ナシ (*Pyrus ussuriensis* MAXIM var. *sinensis* KIKUCHI) の実生と推定される‘身不知’の2樹から、1985年9月7日及び1986年3月29日に休眠枝を採取し、腋生葉芽から無菌的に茎頂を取り出して実験に用いた。植物材料の調製方法は、A-1と同様である。

2) 凍結媒液処理 凍結媒液は、蒸留水にスクロース 30 g/l 及び DMSO を 0, 4, 8, 12, 16 及び 20% (V/V) の濃度で添加したものをを用い、スピッツ管へ 0.2 ml ずつ分注したのち茎頂を6個ずつ浸漬し2時間静置した。

3) 茎頂の凍結及び融解 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投入する方法で行い、まず0℃に5分間置いたのち、0.5℃/minの割合で冷却した。途中、-3℃(凍結しない区では-5℃及び-10℃で再度)で凍結媒液に植水を行った。材料は、途中所定の温度(0, -5, -10, -20, -30及び-40℃)に5分間置いたのち次の冷却過程に入る方法により、目的の温度まで冷却した。凍結したものについては各々38℃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) 培養及び調査 植物体再生用培養基は、MS培地にスクロース 30 g/l、寒天 7 g/l、及び BA 1 mg/l を添加し pH を 5.7 に調整したものをを用い、口径 20 mm の試験管に 10 ml ずつ分注した。培養は、25℃、1日16時間照明(白色蛍光灯、約 4,000 lx)の条件下で行い、各処理区当りの組織片数は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死滅個体とした。

b. 結果及び考察

Fig. 7 に凍結後の茎頂の生存に及ぼす凍結媒液

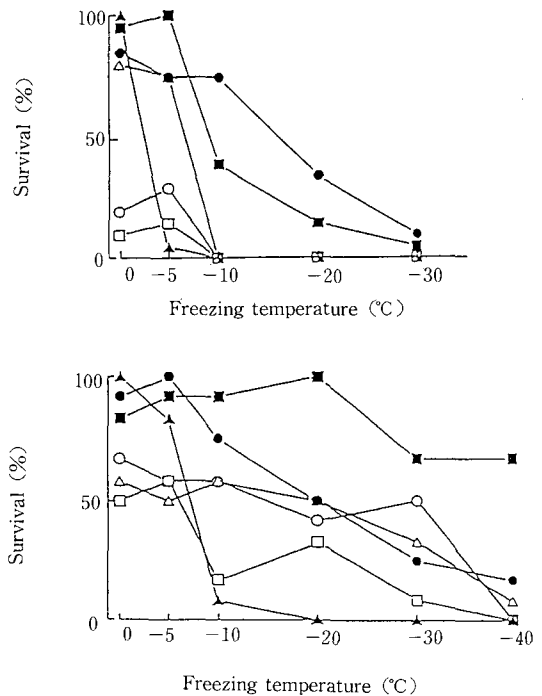


Fig. 7. Effects of freezing temperatures and DMSO concentrations in freezing solution on survival of pear leaf bud apices frozen, thawed and cultured. Marks represent the concentrations of DMSO: ▲, 0%; ●, 4%; ■, 8%; △, 12%; ○, 16%; □, 20%. Samples were collected on 7th September (upper) and 29th March (lower), respectively. Surveyed after 4 weeks of culture.

中の DMSO 濃度の影響を示した。

夏季(9月)に採取した植物材料は、DMSO無添加の場合0℃において100%生存していたが、-5℃以下ではほとんど生存しなかった。また、DMSOを添加した区における茎頂の生存率は-5℃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%区では、他の濃度区ですべて死滅した-10℃以下の温度においても比較的高い生存率を示し、-30℃でもわずかに生存する茎頂が認められた。また、DMSO 16%及び20%の濃度区は未凍結の0℃において生存率20%以下の低い値を示したが、これは、DMSO濃度が高すぎるために茎頂が薬害を受けて壊死したためであると考えられる。

一方、晩冬(3月)に採取した茎頂(Fig. 7下)はDMSO無添加の場合でも-5℃で高い生存率を示し、夏の材料に比べわずかに耐凍性が高いことがわ

かった。さらに、DMSO添加区では無添加区に比べ低温で生存する茎頂の割合が増加し、特にDMSO 8%区は -40°C で約70%の生存率を示した。また、夏の材料を用いた場合DMSOの高濃度添加区において薬害が認められたが、冬の材料を用いた場合には薬害が小さかった。

以上のように、DMSOにはナン茎頂の凍害を防御する作用が認められ、その際の至適濃度は夏季と冬季で異なることが明らかとなった。また、夏季と冬季で茎頂の凍結生存性に違いが認められた理由として、茎頂自身が本来有している耐凍性が季節により異なることが推測された。

2. 液体窒素凍結後のナン茎頂の生存とその品種間差

B-1において茎頂の凍結生存性を調査したところ、冬季に採取した茎頂は凍害防御物質で処理したのち緩速冷却を行うことで -40°C の凍結に耐えることが明らかとなった。そこで、冬期間に採取した茎頂を用いて液体窒素中での凍結を試みた。

a. 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してある西洋ナン (*Pyrus communis* L.) ‘フレミッシュ・ビューティ’と‘パートレット’、日本ナン (*Pyrus pyrifolia* NAKAI var. *culta* NAKAI) ‘長十郎’及び中国ナン (*Pyrus ussuriensis* MAXIM var. *sinensis* KIKUCHI) の実生と推定される‘身不知’の各2樹から1986年1月29日に茎頂を採取した。茎頂の調製方法はA-1と同様である。

2) 凍結媒液処理 凍結媒液は、B-1の結果を参考にして、蒸留水にスクロース30 g/l及びDMSO 8% (V/V)を添加したものをを用いた。凍結媒液処理の方法はB-1と同様である。

3) 凍結及び融解 凍結はB-1と同様の方法で行い、凍結温度は、 -20°C 、 -40°C 及び -40°C まで予備凍結を行ったのちすばやく液体窒素中へ入れ急速冷却を行った3区を設けた。途中 -5°C で植水を行った。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 の温水中で行い、融解した茎頂を直ちに植物体再生用培養基へ植え込んだ。

4) 培養及び調査 植物体再生に関する培養条件及び調査方法は、すべてB-1と同様である。

b. 結果及び考察

凍結・融解後の茎頂の生存に及ぼす凍結温度の影響とその品種間差について検討した結果(図省略)、『フレミッシュ・ビューティ』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。また『長十郎』は、各処理区とも70%前後の値を示した。従って、『フレミッシュ・ビューティ』、『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、『パートレット』では -20°C で生存率100%であったが、 -40°C 及び液体窒素凍結後の生存率は20%以下に低下した。すなわち -20°C から -40°C への冷却過程で、茎頂が凍害を受けたものと考えられる。このように耐凍性が高いと考えられる1月下旬の材料を用い、凍害防御物質を用いているにもかかわらず、液体窒素凍結後に生存する個体が少なかったことから、『パートレット』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。

3. 液体窒素凍結・融解後のナン茎頂からの植物体再生

B-2と同様の方法により液体窒素凍結・融解を行った茎頂からの植物体再生について検討した。

a. 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してある西洋ナン‘フレミッシュ・ビューティ’、‘パートレット’及び‘ブランデー・ワイン’、日本ナン‘長十郎’及び中国ナンの実生と推定される‘身不知’の各2樹から1987年1月~4月にかけてTable 2に示す植物材料採取日に茎頂を採取した。茎頂の調製方法はA-1と同様である。

2) 凍結媒液処理 凍結媒液処理の方法は、A-1と同様である。

3) 凍結及び融解 凍結及び融解の方法は、A-1と同様である。

4) 培養及び調査 植物体再生過程における培養条件及び調査方法は、すべてA-1と同様である。

b. 結果及び考察

液体窒素凍結・融解後のナン茎頂の生存率及びロゼット状培養体形成率の植物材料採取時期及び品種に伴う変動をTable 2に示した。生存率には、品種により差が認められた。すなわち、冬季の1月及び

Table 2. Seasonal, varietal changes in survival and rosette formation of pear leaf bud apices frozen in liquid N₂.²

| Shoot apex-collecting time ^y | Cultivar | Survival of shoot apex | | Rosette formation of shoot apex | |
|---|----------------|------------------------|-----|---------------------------------|----|
| | | Surviving/treated | % | Rosette-forming/surviving | % |
| 21/Jan. | Chojuro | 14/14 | 100 | 4/14 | 29 |
| | Mishirazu | 16/16 | 100 | 2/16 | 13 |
| | Flemish Beauty | 14/14 | 100 | 1/14 | 7 |
| | Bartlett | 2/16 | 13 | 0/ 2 | 0 |
| | Brandy Wine | 2/14 | 14 | 0/ 2 | 0 |
| 18/Feb. | Chojuro | 12/12 | 100 | 4/12 | 33 |
| | Mishirazu | 13/13 | 100 | 4/13 | 31 |
| | Flemish Beauty | 12/13 | 92 | 2/12 | 17 |
| | Bartlett | 1/12 | 8 | 0/ 1 | 0 |
| | Brandy Wine | 2/13 | 15 | 0/ 2 | 0 |
| 9/Mar. | Mishirazu | 15/15 | 100 | 1/15 | 7 |
| | Flemish Beauty | 15/15 | 100 | 3/15 | 20 |
| | Bartlett | 2/14 | 14 | 0/ 2 | 0 |
| | Brandy Wine | 0/14 | 0 | | |
| 16/Mar. | Flemish Beauty | 8/13 | 62 | 1/ 8 | 13 |
| 7/Apr. | Flemish Beauty | 9/16 | 56 | 1/ 9 | 11 |
| | Brandy Wine | 3/16 | 19 | 0/ 3 | 0 |

² Conditions of freezing solution, prefreezing, thawing, culture medium and observing time are the same as in Table 1.

^y Plant materials were collected in 1987.

2月の材料についてみると、‘長十郎’、‘身不知’及び‘フレミッシュ・ビューティ’の3品種ではいずれも100%近いきわめて高い生存率を示したが、‘バートレット’及び‘ブランデー・ワイン’ではいずれも20%以下の低い値であった。この結果は、B-2の結果とも一致していた。このように、冬季のナシ茎頂の凍結生存性には品種間差が認められ、品種によっては、さらに技術の詳細な検討と改良が必要であると考えられる。この点は、リンゴと大きく異なっていた。また、春先の3月16日及び4月7日に採取した‘フレミッシュ・ビューティ’茎頂の生存率は50~60%と冬季(1,2月)の材料に比べて低く、材料採取時期による差が認められたが、これは、茎頂自身が本来有している耐凍性の違いに起因しているものと考えられる。

一方、生存個体におけるロゼット状培養体形成率は、生存率の高かった‘長十郎’、‘身不知’及び‘フレミッシュ・ビューティ’のいずれも40%以下と低く、生存した茎頂から植物体が再生する割合は、品種によらずかなり低いことが明らかになった。

形成されたロゼット状培養体は、再生に用いたも

のと同様の組成の培地に移植することにより容易にシュートを伸長し、これを発根培地に移植することにより、Fig. 8に示すような再生植物体を得ることができた。

C. オウトウ茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生

オウトウ数品種の冬芽から取り出した茎頂を用いて液体窒素凍結後に再生個体を得ることを試みた。

a. 材料及び方法

1) 材料の調製 北海道余市町に栽植されているオウトウ (*Prunus avium* L.) ‘ナポレオン’、‘早生北光’、‘ジャブレー’、‘北光’、‘佐藤錦’、‘レッドグローリー’及びオウトウ実生並びに北海道大学農学部附属農場に栽植されている‘マザード’及び‘ウルスター’から1987年2月20日及び3月4日に休眠枝を採取し、茎頂を無菌的に取り出して実験に用いた。茎頂の調製方法は、A-1のリンゴの場合と同様である。

2) 凍結媒液処理 凍結媒液は、リンゴやナシの場合を参考にして、蒸留水にスクロース 30 g/l 及び DMSO 8% (V/V) を添加したものをを用いた。茎

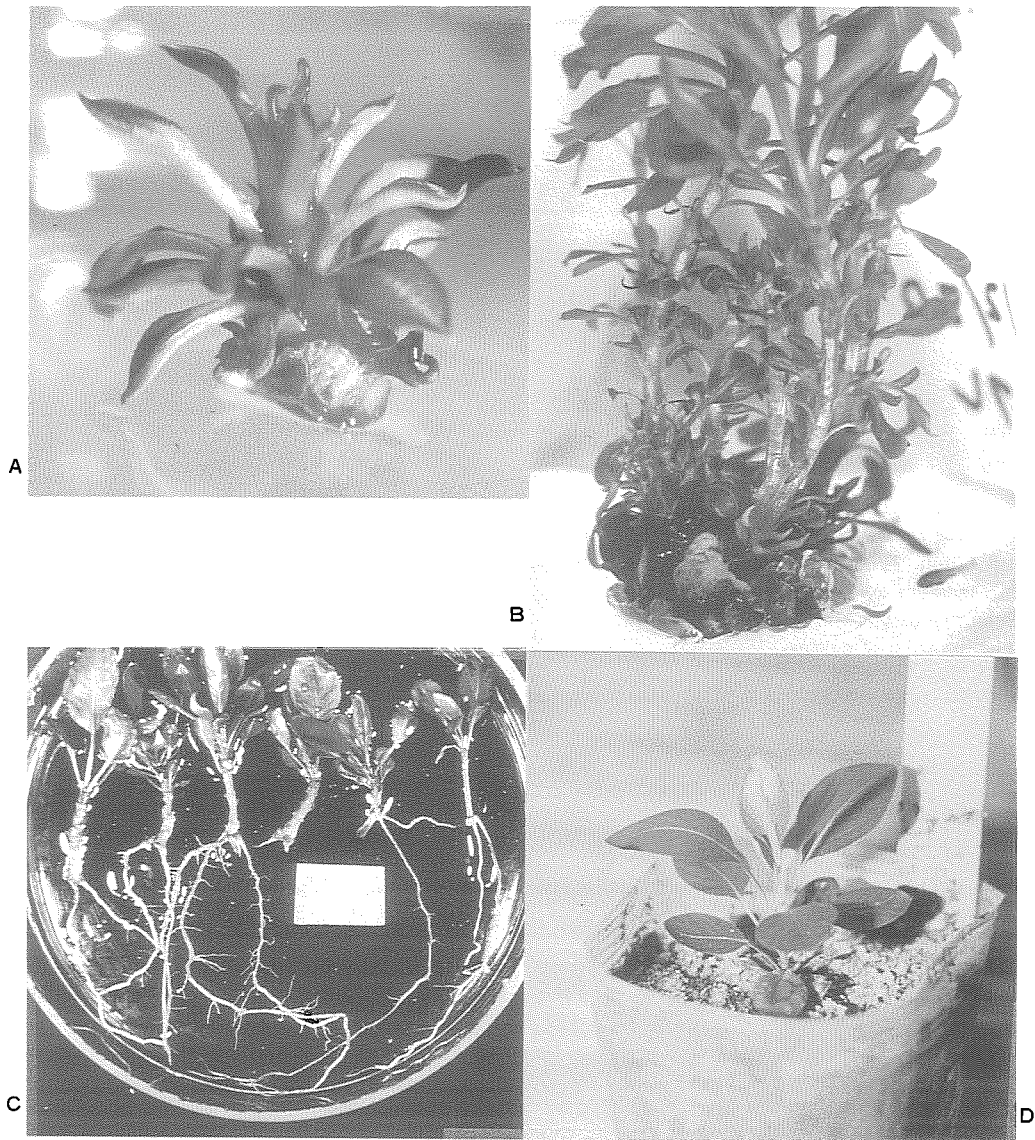


Fig. 8. Plant regeneration of pear leaf bud apices frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured *in vitro*. A, a rosette developed from an apex (after one month of culture); B, shoots formed from a rosette (after two months of culture); C, roots formed on the bottom of shoot (bottoms of shoots were treated with 100 ppm IBA and then set in vermiculite, after one month of culture); D, a regenerated plant in a pot. Plant materials were derived from 'Flemish Beauty.'

頂の数はストロー精液管1本当たり5~8個とした。他はA-1と同様である。

3) 凍結及び融解 茎頂の凍結及び融解の方法は、すべてA-1と同じである。

4) 培養及び調査 培養は、基本培地組成をMS培地成分濃度の $\frac{1}{2}$ としたものにスクロース 30 g/l, BA 1 mg/l 及び寒天 7 g/l を添加し、pH 5.7 に調

整した培養基を用い、25℃、4,000 lx、1日16時間照明の条件下で行った。培養2週間後及び1か月後に茎頂の生存について調査を行い、緑色を呈したものを生存個体とし、褐変したものを死滅個体とした。

b. 結果及び考察

オウトウ各品種の液体窒素凍結後の生存率は

Table 3. Varietal differences in survival, shoot formation and rooting of sweet cherry leaf bud apices frozen in liquid N₂, thawed and cultured.²

| Cultivar | Survival of shoot apex | | | | Shoot formation | | No. of shoot apices rooting | No. of plants potted |
|--------------|------------------------|-----|----------------------|----|------------------|----|-----------------------------|----------------------|
| | 2 weeks ^y | | 1 month ^y | | Shooting/Treated | % | | |
| | Surviving/Treated | % | Surviving/Treated | % | | | | |
| Napoleon | 16/16 | 100 | 5/16 | 31 | 0/16 | 0 | 0 | 0 |
| Wase-hokkou | 11/13 | 85 | 0/13 | 0 | 0/13 | 0 | 0 | 0 |
| Jabouley | 13/13 | 100 | 1/13 | 8 | 1/13 | 8 | 0 | 0 |
| Hokkou | 12/12 | 100 | 5/12 | 42 | 1/12 | 8 | 0 | 0 |
| Sato-nishiki | 9/10 | 90 | 7/10 | 70 | 0/10 | 0 | 0 | 0 |
| Redglory | 13/13 | 100 | 5/13 | 39 | 0/13 | 0 | 0 | 0 |
| Seedling | 14/14 | 100 | 9/14 | 64 | 6/14 | 43 | 2 | 1 |
| Mazzard | 15/16 | 94 | 12/16 | 75 | 2/16 | 13 | 1 | 1 |
| Ulster | 13/15 | 87 | 5/15 | 33 | 0/15 | 0 | 0 | 0 |

² Freezing solution: distilled water +8% DMSO +30 g/l sucrose. Prefreezing: cooled down to -40°C at 0.5°C/min. Thawing: ultrarapidly thawed by immersion into a warm water at 38°C. Culture medium: MS medium +1 mg/l BA +30 g/l sucrose +7 g/l agar; pH, 5.7. Shoot apices were collected on 20th February or 4th March, 1987.

^y The duration of culture.

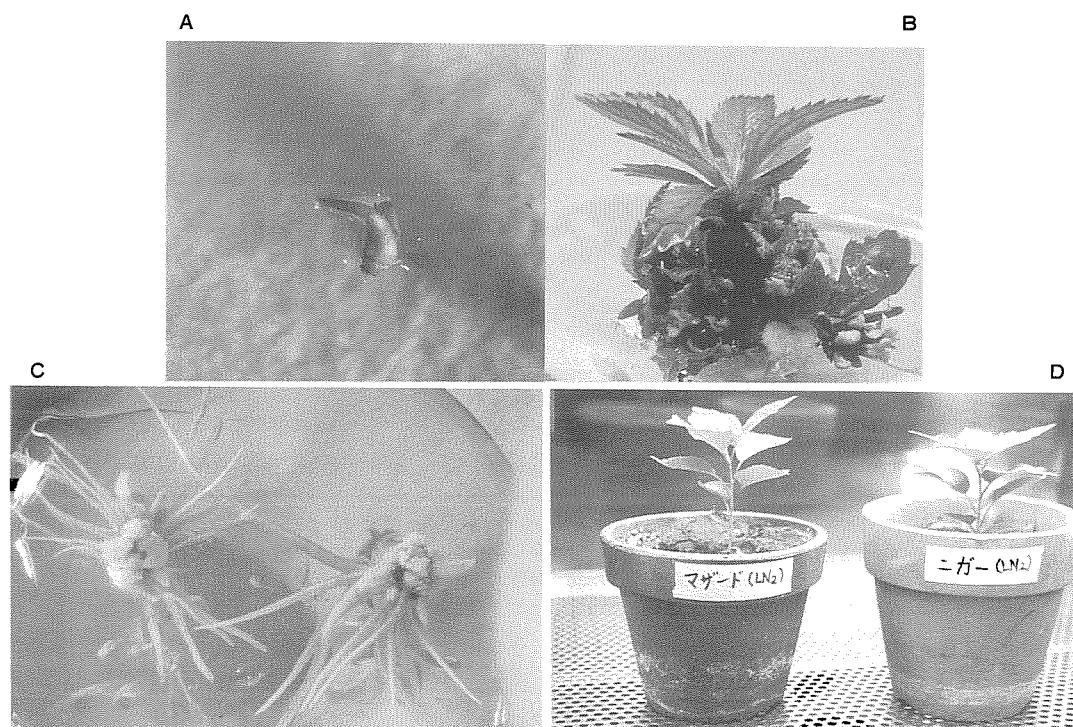


Fig. 9. Plant regeneration of sweet cherry leaf bud apices frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured *in vitro*. A, a leaf bud apex survived (after 3 weeks of culture); B, elongated shoots from a rosette (after 2 months of culture); C, roots formed on the bottom of shoot (after three months of culture); D, a regenerated plant of 'Mazzard' (left) and a seedling (right).

Table 3 のとおりで、2週間後ではいずれも85%以上の比較的高い値であったのに対し、1か月後になると‘早生北光’、‘ジャブレー’などで著しく低下した。また、‘ジャブレー’、‘北光’、オウトウ実生及び‘マザード’においては2か月後までに、生存している茎頂からのシュート形成が認められ、このうち実生と‘マザード’では3か月後までに発根個体が得られた。これを鉢上げしたところ、Fig. 9 に示すような再生植物体を得ることができた。

以上のように、オウトウで凍結後に再生植物が得られたのは数品種に限られていた。しかし、凍結から1か月後の生存率はいずれの品種も高い値を示していることから、植物体再生過程での品種間差は、凍結生存性の差というよりはむしろ茎頂の植物体再生能の差である可能性が大きく、今後は植物体再生培養過程におけるより適した培養条件を見出す必要があるものと考えられる。

D. ハスカップ茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生

野外から採取した茎頂及び *in vitro* で増殖したシュート節部の腋芽の茎頂を用いて、液体窒素凍結・融解後に再生植物体を得ることを試みた。

1. 野外のハスカップ植物体から採取した茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生

a. 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してあるハスカップ (*Lonicera caerulea* L. var. *emphylocalyx* NAKAI) 1株から、Table 4 の植物材料採取日に休眠枝を採取し、各枝の腋芽から無菌的に取り出した茎頂(横径約1mm, 葉原基4個程度を有する)を材料とした。

2) 凍結媒液処理 取り出した茎頂を Table 4 に示す組成の凍結媒液中に浸漬し(1ml 容ストロー精

Table 4. Effects of freezing temperature, freezing solution and plant material-collecting time on survival and shoot formation of blueberried honeysuckle leaf bud apices frozen in liquid N₂, thawed and cultured.^z

| Shoot apex-collecting time | Freezing solution | Rate of surviving (shooting) apices ^y | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|--|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|------------------|
| | | Freezing temperature (°C) | | | | | |
| | | -5 | -10 | -20 | -40 | -40→-196 ^y (LN) | +20→-196 (LN) |
| 1987 | | | | | | | |
| 20/Mar. | 30 g/l sucrose +8% DMSO | 8/ 8 (100) | 8/ 8 (100) | 8/ 8 (100) | 8/ 8 (100) | 6/ 7 (86) | |
| 15/Oct. | 30 g/l sucrose | | | 0/12 (0) | 0/12 (0) | 0/12 (0) | |
| | 30 g/l sucrose +8% DMSO | | | 5/12 (42) | 1/12 (8) | 2/12 (17) | |
| | 30 g/l sucrose +16% DMSO | | | 0/12 (0) | 2/12 (17) | 1/12 (8) | |
| | 30 g/l sucrose +24% DMSO | | | 1/12 (8) | 2/12 (17) | 1/12 (8) | |
| 11/Nov. | water | | | 5/12 (42) | 3/12 (25) | 2/ 9 (22) | |
| 1990 | | | | | | | |
| 12/Jan. | water | | 11/12 (92) | 12/12 (100) | 12/12 (100) | 10/12 (83) | |
| 29/Jan. | water | | | | | 24/24 (100) | |
| 11/Feb. | water | | | | | | 5/12 (42) |

^z Defined after 1 month of culture.

^y Surviving (shooting) apices/treated apices; Values in parentheses show percentages of the rates.

^x “-40→-196” represent that the sample apices (contained in straws with freezing solution) are precooled down to -40°C and then immersed into liquid N₂.

液管使用)2時間静置した。詳細は、A-1と同様である。

3) 凍結及び融解 冷却は、プログラムフリーザー (HOXAN CRYOEMBRYO-HPA) を用いて $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の割合で行った。途中、所定の温度で自動的に植水を行い、 -5°C に15分間、 -10°C 、 -20°C 及び -40°C に各々10分間保ったのち、融解し個体再生用培地を用いて培養した。液体窒素には -40°C から浸漬し、処理は1時間行った。なお、1990年2月11日に採取した茎頂については、取り出した茎頂を3つずつクライオチューブ (1.8 ml 容) 内の1 ml 蒸留水中に浸漬したのち、室温 (20°C) から直接液体窒素 (-196°C) 中に浸漬する処理区を設けた。融解は、所定の温度まで凍結した材料を 38°C の温水中へ浸漬する方法により行った。

4) 培養及び調査 植物体再生用培養基は、MS培地に、 $\text{BA } 10^{-6}\text{M}$ 、 $\text{GA}_3 10^{-6}\text{M}$ 、スクロース 30 g/l 及び寒天 7 g/l を添加し、 $\text{pH } 5.5$ に調整したものをを用いた。培養は、 25°C 、1日16時間照明 (白色蛍光灯、約 $4,000\text{ lx}$) の条件下で行った。培養1か月後に調査を行い、緑色を呈しているものを生存個体とした。

b. 結果及び考察

茎頂の生存率には茎頂採取時期の違いによる差が認められ (Table 4)、3月20日採取の茎頂を用いて DMSO 8%、スクロース 30 g/l を含む凍結媒液中で凍結した場合、いずれの温度区においても高い生存率を示したのに対し、10月15日の茎頂を同じ組成の凍結媒液中で凍結してもそれほど高い生存率は得られなかった。また、10月15日の茎頂についてみると、凍結媒液中に DMSO が無添加の場合生存個体が得られず、DMSO 添加区で生存個体が得られたことは、DMSO の凍害防御効果があったことを示しているものと考えられる。さらに、11月11日の材料では、凍結媒液として水のみを用いたにもかかわらず、液体窒素処理区においても生存個体が得られ、真冬の1月29日に採取した茎頂は同じく水だけで凍結した場合にも100%の生存率が得られたことから、ハスカップ茎頂の耐凍性は11月から1月にかけて著しく高くなるものと考えられる。なお、この場合生存個体はすべてシュートを形成し発根したため、鉢上げを行い Fig. 10 のような再生個体を得た。

以上のように、ハスカップでは耐凍性の高い冬季

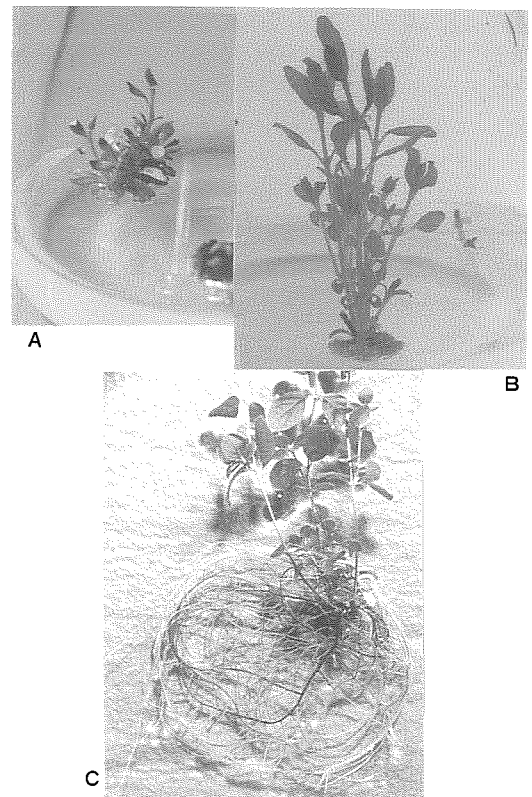


Fig. 10. Plant regeneration of blueberry honey-suckle leaf bud apices frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured *in vitro*. A, a rosette developed from an apex (after one month of culture); B, shoots elongated from a rosette (after 2 months of culture); C, roots formed on the bottom of shoots (after 3 months of culture).

の茎頂を用いしかるべき手順で凍結・融解を行えば、かなり高い確率で再生植物体を得られることから、現段階でも凍結保存の実用化は充分可能であると考えられる。

2. ハスカップ培養体シュート節部組織片の凍結・融解後の生存に及ぼすハードニングの影響

継代培養により得られた多数のハスカップ培養体シュートから節部組織片を切り出し、凍結媒液の組成 (DMSO 濃度並びに糖の種類及び濃度) 及び冷却速度を変えた種々の条件の下に液体窒素中での凍結を試みたが、融解後に生存・再生個体は1個体も得られなかった。そこで、茎頂が凍結に耐える最低限界温度を明らかにするため、茎頂の生存に及ぼす凍

結温度の影響について検討し、併せて茎頂の生存に及ぼすハードニングの影響についても検討した。

a. 材料及び方法

1) **材料の調製** 1986年8月に初代培養を行いシュートを得た。その後、15回ほど継代・増殖を繰り返して得られた多数の培養体シュート（継代後3か月を経過したもので、発根が認められるもの）から、節部切片（長さ約5mm、腋芽2つを有する）を切り出して用いた。この場合、一部の植物材料にハードニングを行った。すなわち、切り出す前のシュートをプラスチックごと恒温器に入れ、5℃、1日8時間照明（白色蛍光灯、約4,000 lx）の条件下で15または30日間培養した。

2) **凍結媒液処理** 凍結媒液は、D-1及び予備実験の結果を参考にして、蒸留水にDMSO 12%及びスクロース0.3Mを添加したものをを用いた。その他の条件は、A-1に準じた。

3) **凍結及び融解** 凍結及び融解の方法は、A-1と同様である。なお、冷却速度は0.5℃/minとし、凍結温度として-7、-10、-15、-20、-40℃及び-40℃から液体窒素（-196℃）中へ浸漬した区を設け、他に対照として凍結媒液処理を行ったのみの区を設けた。1区当り18組織片を用いた。

4) **培養及び調査** 培養条件は、D-1と同様である。培養10週後に、生存個体数を数え生存率を算出した。なお、節部の茎頂が緑色を呈しているものを生存個体とした。

b. 結果及び考察

茎頂の生存に及ぼす凍結温度及びハードニングの影響をFig. 11に示した。茎頂の生存率は、-7~-20℃で凍結した区において60~90%と比較的高い値を示したのに比べ、-40℃区では22%と低く、液体窒素凍結後には生存個体は得られなかった。したがって、液体窒素凍結・融解後に生存個体が得られない理由は、予備凍結（緩速冷却）過程のうち-20℃から-40℃の冷却の過程で腋芽茎頂が凍害を受けたことによるものと推測される。一方、ハードニングを施した材料からは、液体窒素凍結・融解後に少ないながら生存個体が得られたが、ハードニング期間の長短による生存率の差は認められなかった。なお、生存個体はすべてシュートを形成した。

以上の結果、培養体の腋芽茎頂は冬季の野外の茎頂のような強い凍結生存性は有していないが、ハードニングを行うことでわずかに凍結生存性が高ま

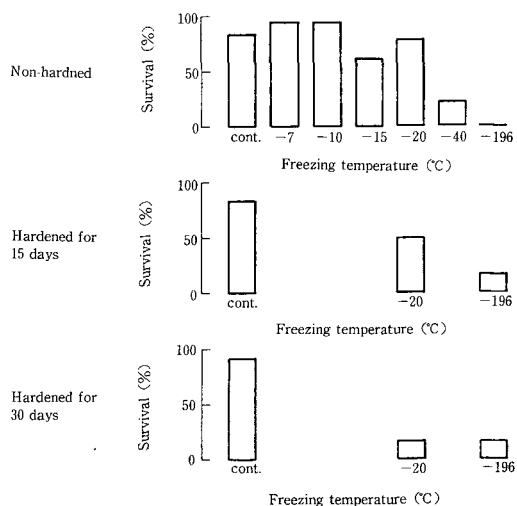


Fig. 11. Effects of freezing temperatures and hardening on survival of blueberried honeysuckle nodal segments obtained in tissue culture, frozen, thawed and cultured. Hardened at 5℃. Control represents the materials treated with freezing solution for 2 hours and unfrozen.

り、液体窒素中での凍結に耐える個体が出現するものと考えられる。

E. ブルーベリー茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生

ブルーベリーの茎頂培養では初代培養の成功率がきわめて低いため、⁷²⁾野外から採取した茎頂は凍結保存の材料として不相当であると考えられる。そこで、*in vitro*で養成した培養体シュートから節部組織片（腋生葉芽をもつ）を切り出し、凍結媒液の組成及び予備凍結過程における冷却速度を変え、液体窒素中での凍結を試みたが、ハスカップの場合と同様、生存個体を得ることができなかったため、II-Dのハスカップと同様に、ハードニングの影響について検討した。

a. 材料及び方法

ハイブッシュブルーベリー (*Vaccinium corymbosum* L.) ‘ランコカス’及び‘コンコード’の培養体シュート（継代後3か月を経過し、発根しているもの）から、節部切片（長さ約5mm、腋芽2つを有する）を切り出して用いた。また、D-2のハスカップと同様の方法により‘ランコカス’の一部の材料にハードニングを行った。

凍結媒液処理, 茎頂の凍結, 融解, 培養及び調査の方法は, D-2と同様である。なお, 個体再生及びシュートの増殖に用いた培養基の組成は, MURASHIGEとSKOOGの無機塩類のうち KNO_3 及び $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を除き, 他のすべての無機塩類の濃度を $\frac{1}{2}$ とし, KNO_3 570 mg/l, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 278 mg/l 及びLINSMAYERとSKOOGのビタミン類を通常濃度で添加したものを基本培地とし, これに $2\text{iP } 10^{-5}\text{M}$, $\text{GA}_3 10^{-6}\text{M}$, スクロース 30 g/l 及び寒天 7 g/l を添加したもの (pH 5.7) である。また, 切片数は, 1区 18とした。

b. 結果及び考察

茎頂の生存に及ぼす凍結温度及びハードニングの影響を Fig. 12 に示した。生存率は, ‘ランコカス’ 及び ‘コンコード’ のいずれも -7°C で凍結した区において 70~90% と高い値を示したのに対し, -10°C ~ -40°C 凍結区では 50% 以下と低く, -20°C 以下の凍結区では特に低かった。また, 液体窒素凍結後に生存個体は得られなかった。したがって, ブルーベリー培養体シュートの腋芽茎頂は, ハスカップのそれと比べさらに凍結生存性が低く, -10°C 以下の冷却の過程で腋芽茎頂が凍害を受けるものと推

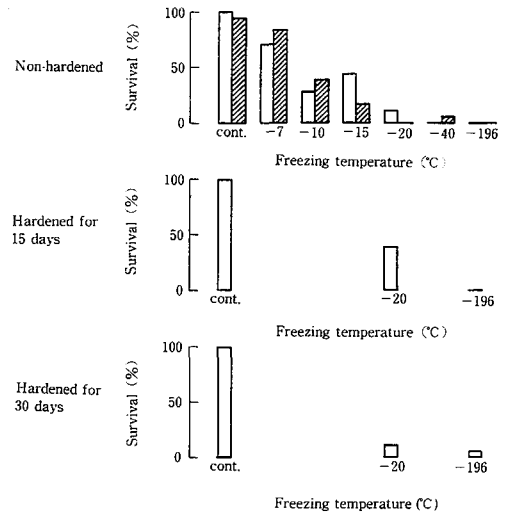


Fig. 12. Effects of freezing temperatures and hardening on survival of blueberry nodal segments obtained in tissue culture, frozen, thawed and cultured. Stained and non-stained bars represent ‘Concord’ and ‘Rancocas’, respectively. Hardened at 5°C . Control represents the materials treated with freezing solution for 2 hours and unfrozen.

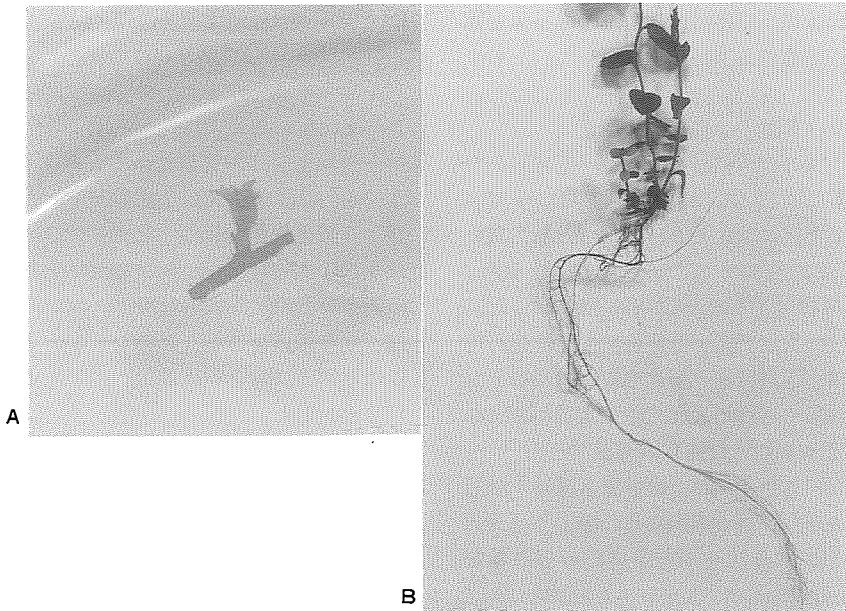


Fig. 13. Plant regeneration of blueberry nodal segments frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured *in vitro*. A, expanded leaves derived from survived tissues (after 3 weeks of culture); B, elongated roots derived from the bottom of shoots. The cultivar was ‘Rancocas.’

測される。一方、ハードニングを行った‘ランコカス’の茎頂からは、液体窒素凍結後にわずかに生存個体が得られた。この場合、生存個体が得られたのは30日間ハードニングを行ったものに限られていたが、生存個体数が少ないため、最も適したハードニング期間を明らかにすることはできなかった。なお、ハスカップと同様、生存個体はすべてシュートを形成したので、発根を促し再生個体を得た (Fig. 13)。

以上の結果、ブルーベリー培養体の腋芽茎頂はハスカップのそれより凍結生存性は低いが、ハードニングを行うことでわずかに凍結生存性が高くなり、液体窒素中での凍結に耐える個体が出現したものと考えられる。

酒井と西山⁵⁹⁾は、数種の本木性果樹の冬枝の耐凍性を調査し、ブルーベリー茎頂の耐凍性はリンゴなどに比べて低く、液体窒素中で凍結したのちに再生個体の得られる可能性は低いと指摘している。しかし、本実験で冬季の野外の茎頂より耐凍性ははるかに低いと考えられる培養体の茎頂を用いて、液体窒素凍結後に再生個体を得ることができたことは、凍結媒液処理、緩速冷却、ハードニング等の人為的操作に負うところが大きいと考えられ、これらの条件をさらに検討することで、個体再生率を向上させることが可能になるものと考えられる。

F. アスパラガス茎頂の凍結・融解後の生存及び植物体再生

北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座においては、1979年からアスパラガス組織の凍結保存に関する研究を行っており、野外から採取したアスパラガス若茎の小側枝茎頂を材料に液体窒素中での凍結を試み、融解後に高率で再生個体を得るのに成功した³⁰⁾。また、夏季に採取した茎頂を材料に用いた場合、前処理を行わずに凍結・融解操作を行うと凍死するが、DMSO及びグルコースを含む寒天培地上で2日間前培養を行ってから凍結すれば生存することを報告している¹⁹⁾。したがって、アスパラガスの野外の茎頂を液体窒素凍結・融解後に生存させる技術は、ほぼ確立されたものと考えられる。

しかし、野外から採取した茎頂は、ウィルスまたはマイコプラズマ等の病原体に汚染されている可能性があるため、それらを排除する意味でいったん *in vitro* 培養系を確立し、病害感染の有無のスク

リーニングを行ったのち凍結保存の材料とするのが望ましい。一方、アスパラガスの茎頂培養法はすでに確立されており、野外から採取した小側枝茎頂からのシュート形成及び *in vitro* におけるシュートの増殖は比較的容易に行うことができる。そこでII-Fでは、新たに *in vitro* で養成したシュートの節部切片を凍結する場合の諸条件について検討した。また、野外の材料と *in vitro* の材料を用いる場合とを比較し、両者の相違点を明らかにすることにより、凍結・融解に伴う組織の生存の機構についての知見を得ようとした。

1. 液体窒素凍結・融解後の茎頂の生存に及ぼす凍結媒液中のDMSO及び糖の影響

a. 材料及び方法

1) 材料の調製 1989年5月12日に北海道大学農学部附属農場より採取したアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) ‘メリーワシントン500W’の若茎から無菌的に小側枝茎頂を取り出し、*in vitro* 培養によりシュートを得た。さらに5回ほど継代・増殖を繰り返して得られた多数の培養体シュート (継代後2か月を経過したもの) から、長さ約5mmの節部切片 (1節を含む) を切り出して用いた。シュートを得るための培養は、初代培養及び継代培養のいずれにおいても、MS培地の窒素源を $\frac{1}{2}$ に減じた培地を基本とし、NAA 0.1 mg/l、カイネチン 0.1 mg/l、スクロース 30 g/l 及び寒天 7 g/l を添加したのち、pH 5.8に調整した培養基を用い、25°C、4,000 lx (1日16時間照明) の条件下で行った。

2) 凍結媒液処理 DMSO及び糖類の凍害防御効果を調べるため、蒸留水にDMSO及び糖類 (グルコース、スクロース及びソルビトール各0.2 M) を Fig. 14に示す組合せで添加した凍結媒液を作製した。また、凍結媒液中のソルビトールの適濃度を調べる実験では、凍結媒液中のDMSO濃度は8% (V/V) とし、ソルビトールを Fig. 17に示す0.1~1.0 Mの濃度で添加した。凍結媒液処理の方法は、A-1に準じ、ストロー精液管1本当たり6~8切片ずつ浸漬した。

3) 凍結及び融解 凍結及び融解の方法は、A-1と同様である。

4) 培養及び調査 植物体再生用培養基の組成及び培養条件は、初代及び継代培養の場合と同様であ

る。茎頂数は1区当り32とした。植え込みから30, 60及び90日後に生存, シュート形成, シュート数, 最大シュート長及び発根について調査を行い, 葉腋部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死滅個体とした。また, 長さ5 mm以上のシュートを形成しているものをシュート形成個体とし, 長さ10 mm以上の白色根を形成しているものを発根個体とした。

b. 結果及び考察

液体窒素凍結・融解後の節部腋芽茎頂の生存, シュート形成及び発根をFig. 14~16に示した。これらはいずれも培養60日後の結果である。

生存率(Fig. 14)は凍結媒液中のDMSO濃度の影響を受け, 糖類添加の有無にかかわらずDMSO無添加区ではほとんど生存個体が得られなかった。また, DMSOの適濃度幅には糖類添加の有無により差が認められた。すなわち凍結媒液中に糖類を添加せずDMSOのみを添加した場合, DMSO濃度は12%に至適となり8~16%の範囲で70%前後の高い生存率が得られたが, ソルビトールを添加した区ではさらに生存率が高く, DMSOの適濃度域は4~20%と広がった。一方, グルコースまたはスクロースを添加すると, グルコースのDMSO 8%添加区で高い値を示したほかいずれも糖類無添加区より低かった。なお, 生存個体で生き残るのはいずれも葉腋部のみで, それ以外の組織は死んで白色化した。生存個体におけるシュート形成率(Fig. 15)は, 生存率の低い区でばらつきが認められるものの, ほとんどが60~80%の高い値を示した。この場合も, 糖類添加の有無によりわずかながら差が認められ, ソルビトールを添加した区では広いDMSO濃度域において80%前後の高いシュート形成率を示した。特に注目されることは, 凍結・融解後の生存個体における発根率(Fig. 16)が, 未凍結区における発根率(5%程度)に比べるとはるかに高い値であったことである。特に, DMSO 12%添加区はいずれも60%前後の高い値を示した。この場合も, ソルビトール添加区は, 他の区に比べ適濃度幅が広がった。

以上のように培養体シュートの節部組織を凍結・融解後に生存させるためには, 凍結媒液中へのDMSOの添加が不可欠であることは明らかで, その至適濃度は糖の添加の有無にかかわらず8~16%程度と考えられ, 野外の茎頂を材料とした結果³⁰⁾

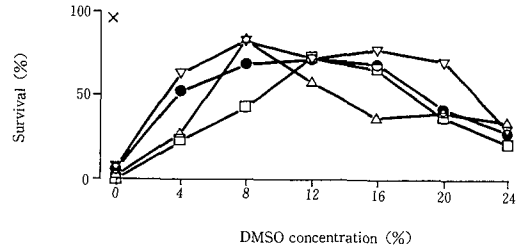


Fig. 14. Effects of DMSO concentrations and kinds of sugar in freezing solution on survival of asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. Marks represent the kinds of sugar added: ●, no sugar; △, 0.2 M glucose; ▽, 0.2 M sorbitol; □, 0.2 M sucrose. Cross represents the plant material unfrozen.

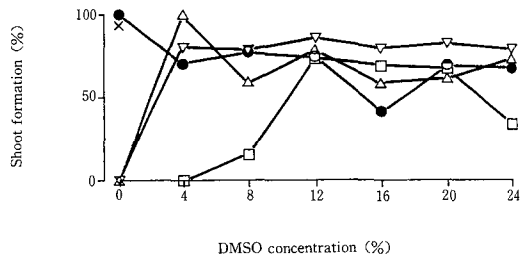


Fig. 15. Effects of DMSO concentrations and kinds of sugar in freezing solution on shoot formation of asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. Marks are the same as in Fig. 14.

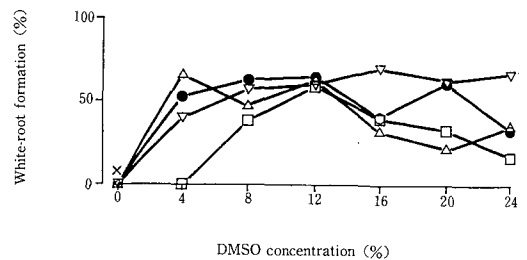


Fig. 16. Effects of DMSO concentrations and kinds of sugar in freezing solution on root formation of asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. Marks are the same as in Fig. 14.

と一致した。しかし, 夏に採取した野外の茎頂を材料とする場合, 前培養を行わないと生存率が極めて低いことに比べ, 培養体シュートでは, 前培養を行う必要がないことが明らかになった。

また, 糖類単独による凍害防御効果は認められな

かったが、DMSO とともにソルビトールを添加することにより凍害防御補助効果が認められたため、ソルビトールの適濃度について検討した結果が Fig. 17 である。この場合、ソルビトール無添加区を設けなかったため、Fig. 14 の結果をこの図に引用してある。DMSO 濃度が8%の凍結媒液中で、ソルビトールが示す凍害防御補助効果の至適濃度は0.3 M であった。したがって、糖類に関しては、DMSO とともにソルビトール0.2~0.3 M を凍結媒液中に添加することにより、生存率、シュート形成率及び発根率がいずれも向上することがわかった。

次に、生存個体における生長速度を未凍結個体のそれと比較するため、生存率、シュート形成率及び発根率がいずれも安定して高かった DMSO 12% 添加区について、シュート数及び最大シュート長の経時的变化を示したのが Fig. 18 及び Fig. 19 である。凍結区のシュート数は、培養30日後では未凍結区のそれに比べいずれも小さい値を示したが、培養60日後以降未凍結区と同じかそれよりも大きくなった。同様に、凍結区の最大シュート長は、培養30日後では未凍結区のそれに比べいずれも小さい値を示したが、培養90日後には未凍結区と同じかそれよりも大きくなった。この理由の一つとしては、Fig. 16 から明らかのように、凍結した節部組織片からの発根率が、未凍結組織片に比べ著しく高いことがあげられる⁸⁹⁾ すなわち、根からの養分吸収量が増加し、地上部のシュートの生長量が増加したものと考えられる。また、この場合にも糖類添加の有無による差が認められ、培養90日後におけ

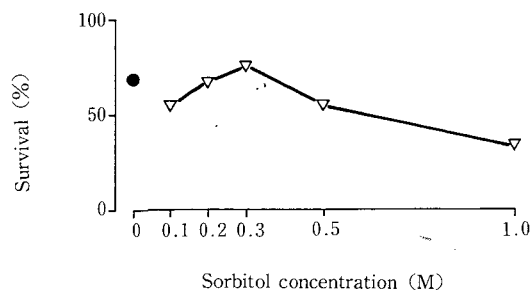


Fig. 17. Effect of sorbitol concentrations in freezing solution on survival of asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. DMSO (8%) was added in freezing solution uniformly. A datum of mark ● is referred to Fig. 14.

るソルビトール添加区のシュート数及びシュート長はいずれも糖類無添加 (DMSO 単独添加) 区に比べ大きな値を示したのに対し、グルコースまたはスクロース添加区のそれは無添加区に比べ小さかった。

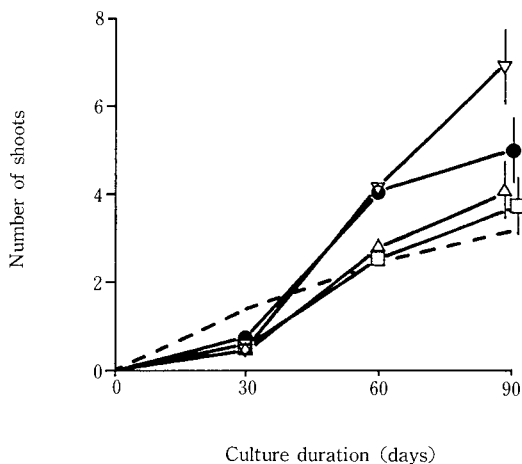


Fig. 18. Changes in the number of shoots derived from asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen associated with culture duration. Marks are the same as in Fig. 14. Broken line represents the plant material unfrozen. Vertical lines represent SE. Surveyed on shoot-forming plant materials.

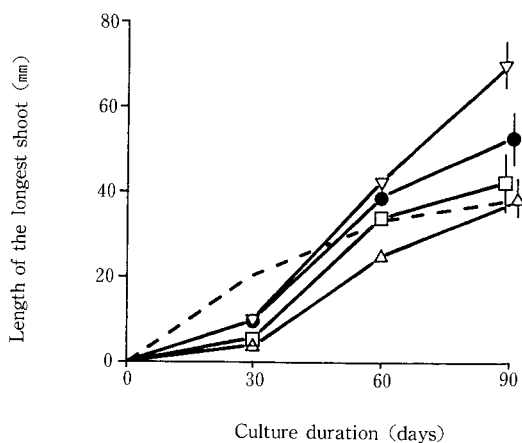


Fig. 19. Changes in the length of the longest shoot derived from asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen associated with culture duration. Marks are the same as in Fig. 14. Broken line represents the plant material unfrozen. Vertical lines represent SE. Surveyed on shoot-forming plant materials.

ソルビトール添加区の生長が良好であった理由として、ソルビトールが生存細胞数の増加あるいは凍結により細胞が受けるダメージの軽減を促していること等が考えられる。なお、ソルビトール添加区にお

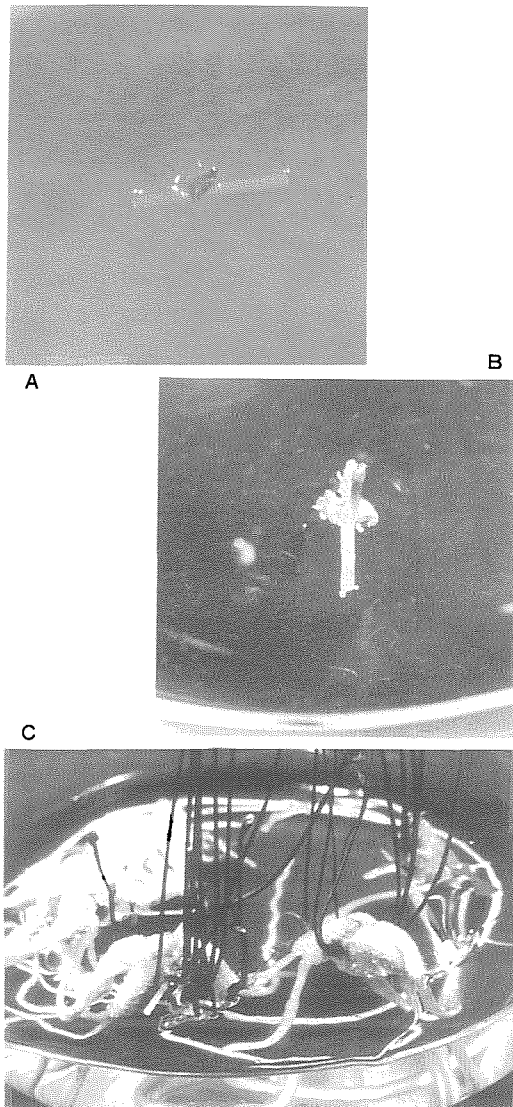


Fig. 20. Plant regeneration of asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured *in vitro*. A, survived lateral bud (after 2 weeks of culture); B, elongated shoots derived from a survived lateral bud (after 1 month of culture); C, white roots emerging from the bottom of shoots (after 3 months of culture). The cultivar was 'Mary Washington 500 W.'

ける再生個体の形状を Fig. 20 に示した。

2. 液体窒素凍結・融解後の茎頂の生存に及ぼす前培養の影響

a. 材料及び方法

1) 材料の調製 F-1 と同じ培養体シュートから、長さ約 2 mm の節部切片 (以下短切片とする) 及び長さ約 5 mm の節部切片 (以下長切片とする) を切り出して用いた。

2) 前培養 前培養の培地は、野外の茎頂の場合を参考に、MS 培地にグルコース 30 g/l 及び DMSO を 0, 4, 8, 12, % (V/V) の濃度で添加し、pH 5.7 に調整後寒天 7 g/l を添加したものをを用いた。また、長切片の植え込みの方法として、全体を寒天培地上に置床する場合 (以下横植えとする) と基部を培地に差し込む場合 (以下縦植えとする) の 2 つについて検討した。

3) 凍結媒液処理 凍結媒液は、蒸留水に DMSO 12% 及びグルコース 0.2 M を添加したものをを用いた。凍結媒液処理の方法は、A-1 に準じた。

4) 凍結及び融解 凍結及び融解の方法は、A-1 と同様である。

5) 培養及び調査 培養及び調査の方法は F-1 と同様である。なお、1 区当り 24 組織片とした。植え込みから 60 日後に生存、シュート形成及び発根について調査を行った。

b. 結果及び考察

液体窒素凍結・融解後のアスパラガス培養体節部切片の生存及び植物体再生に及ぼす前培養の影響を Fig. 21 に示した。この場合、前培養を行ったのち凍結を行わなかった節部切片の生存率はいずれも高く、前培養が原因で節部切片が死滅することはなかった。凍結・融解後の生存率についてみると、*in vitro* で養成したアスパラガスの茎頂は、本来前培養を行わなくても凍結・融解後に高い生存率を示すという F-1 の結果が確認された。また、前培養を行うことによる生存率の向上は認められなかった。特に、長切片を DMSO を添加した培地で前培養した区の生存率は、植え込み方法によらず前培養を行わなかった区より低い値を示した。次に、生存個体におけるシュート形成率は、切片の長さ及び植え込み方法に関係なく、DMSO 8~12% の前培養培地を用いた区では、前培養を行わなかった区より低かった。生存個体の発根率には、前培養に伴う明確な差

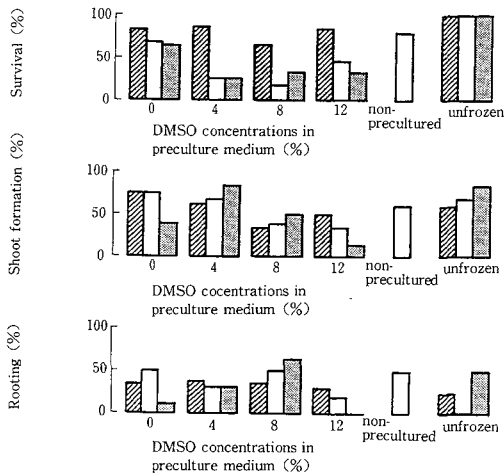


Fig. 21. Effect of preculture on survival and organ formation (shoot and root) of asparagus nodal segments frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. Bars represent the shape of plant materials: stripe, short segments (2 mm); non-stained, long segments (5 mm) inoculated on the media horizontally; stained, long segments (5 mm) inserted in the media vertically. Unfrozen plant materials which was precultured were transferred to regrowth media immediately. Glucose (30 g/l) was added in preculture media uniformly.

は認められなかった。

以上のことから、*in vitro* で養成したアスパラガスの茎頂は、野外の茎頂を凍結する場合と同様の前培養培地を用いても生存・再生率が向上することはなく、逆に高濃度の DMSO を添加した前培養培地で前培養を行うと生存・再生率が低下することが明らかになった。したがって、*in vitro* の茎頂を用いる場合のより適した前培養条件については、さらに検討する必要がある。

III. 茎頂の耐凍性と超低温凍結生存性

II. において、野外から採取した茎頂を凍結する場合、茎頂自身が自然条件の下で獲得した耐凍性が、凍結保存における凍結・融解後の生存に大きく関与していることが示唆された。特に、木本性の果樹では、液体窒素凍結後に生存個体を得ることができたのは、いずれも冬季に野外から採取した材料を用いた場合で、夏季の材料を用いて生存個体を得ることはできなかった^{24,25,27}。また、草本性のアスパラ

ガスについても、冬季に根株を圃場から掘り上げて温室内に移した株から萌芽した若茎の茎頂を用いる場合には、前培養を行わなくても高率で生存個体を得ることができる^{19,20}。そこで III. では、茎頂自身が本来有する耐凍性と人為的な凍結を行った場合の凍結生存性との関係を明らかにするため、ナシの茎頂を用いて凍結後の生存率の季節的変動について調査した。

A. 耐凍性と超低温凍結生存性

III-A では、ナシ茎頂の耐凍性及び液体窒素凍結後の生存率の季節的変動について調べた。

a. 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してある西洋ナシ‘フレミッシュ・ビューティ’及び‘バートレット’、日本ナシ‘長十郎’及び中国ナシの実生と推定される‘身不知’の各 2 樹を用い、1990 年 8 月 29 日から 1991 年 1 月 24 日にかけて Fig. 22 に示す各実験日に休眠枝を採取し、腋生の葉芽から茎頂（横径約 1 mm、葉原基 4 個程度を有するもの）を無菌的に取り出し、供試材料とした。取り出した茎頂は、凍結媒液処理を行うまでの間の乾燥を防ぐため、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 凍結媒液の組成は、以下のとおりである。

a) 耐凍性の調査：蒸留水

b) 液体窒素凍結後の生存率の調査：蒸留水にスクロース 30 g/l と DMSO 8% (V/V) を添加したもの

凍結媒液処理の方法は、II-A-1 のリンゴの場合と同様である。なお、耐凍性を調査する実験では 2 時間の凍結媒液浸漬時間を短縮し、浸漬直後に冷却を開始した。

3) 凍結及び融解 材料の凍結及び融解は、II-A-1 に準じ以下のようにして行った。

a) 耐凍性の調査：材料をプログラムフリーザーを用い、0.5°C/min の冷却速度で、-2.5、-5、-10、-15 及び -20°C まで冷却し、所定の温度に 10 分間保ったのち、38°C の温水中で融解した。

b) 液体窒素凍結後の生存率の調査：プログラムフリーザーを用い、0.5°C/min の冷却速度で -40°C まで予備凍結（途中 -3°C で植水）を行った材料を、液体窒素中に浸漬し急速冷却（約 500°C/min）

を行い、液体窒素中に1時間浸漬したのち、38℃の温水中で融解(約400℃/min)した。

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 培養及び調査の方法は、II-A-1と同様である。なお、1区当りの組織片数は12とし、調査は植え込みから4週間後に行った。

b. 結果及び考察

茎頂の耐凍性とは、本来 *in vivo* の茎頂が自然条件下で示す耐凍能力を指し、芽から摘出した茎頂を人為的に凍結した場合の凍結生存性とは区別して考えなければならない。しかし、野外における *in vivo* の茎頂の耐凍性を正確に捉えることは現実には難しく、その意味で摘出した茎頂を水中で凍結し融解後に培養した場合の生死を指標として茎頂の耐凍温度を推定するという KATANO²⁷⁾の方法は極めて実際的な方法であると考えられる。

本実験ではこの方法を用いて1990年8月から翌年1月にかけてナン茎頂の耐凍性(LT₅₀)を調査し、併せて液体窒素凍結・融解・培養後の生存率の季節的変動を調査して Fig. 22 に示した。

‘フレミッシュ・ビューティ’の耐凍性は9月下旬まで-2.5℃であったが、10月下旬には-5℃となり、12月上旬から1月下旬にかけては-10℃から-15℃と耐凍性が高くなった。‘長十郎’及び‘身不知’では10月下旬は-5℃であったが、11月下旬には-10℃となり1月下旬には-20℃まで耐凍性が

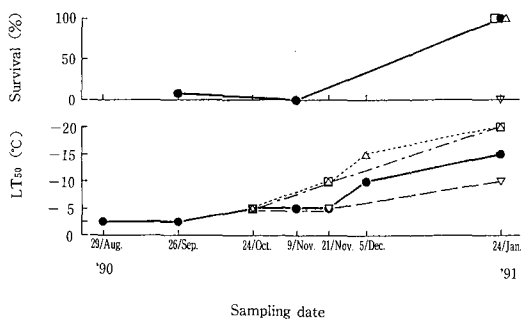


Fig. 22. Seasonal changes in freezing resistance and survival rates after freezing in liquid nitrogen of pear leaf bud apices excised. Symbols represent cultivars: ●, *Pyrus communis* L. 'Flemish Beauty'; ▽, *Pyrus communis* L. 'Bartlett'; △, *Pyrus ussuriensis* MAXIM var. *sinensis* KIKUCHI 'Mishirazu'; □, *Pyrus pyrifolia* NAKAI var. *culta* NAKAI 'Chojuro.'

高くなった。‘パートレット’は10月下旬から11月下旬まで-5℃で、1月下旬には-10℃となり、他品種に比べると低い値であった。

また、‘フレミッシュ・ビューティ’の液体窒素凍結・融解後の生存率は、耐凍性が-5℃以下であった9月及び11月の材料では極めて低かったが、耐凍性が-15℃に高まった1月の材料では100%であった。さらに各品種とも耐凍性が高い1月下旬の材料を用いて液体窒素凍結を行ったところ、‘長十郎’、‘身不知’及び‘フレミッシュ・ビューティ’の3品種は100%の生存率を示したのに対し、耐凍性の低い‘パートレット’は生存個体が得られなかった。

以上のことから、品種間差及び年次間変動を考慮する必要はあるもののナン茎頂の耐凍性は概ね10月下旬頃から高くなり始め11月下旬から12月上旬にかけて急激に高まるものと考えられる。また、厳寒期の1月の茎頂の耐凍性には品種間差が認められ、‘長十郎’及び‘身不知’が-20℃と最も高く、続いて‘フレミッシュ・ビューティ’が-15℃で‘パートレット’は-10℃と低かった。

次に、茎頂の耐凍性と凍害防御物質処理後に液体窒素凍結・融解・培養した茎頂の生存率とを比較すると、厳寒期の1月においても耐凍性が他品種より低い‘パートレット’は、液体窒素凍結後の茎頂の生存率も低いことが確認された。また、‘フレミッシュ・ビューティ’の液体窒素凍結後の生存率は、耐凍性がまだ十分に高まっていない9月及び11月の材料では低いが、耐凍性が高まった1月の材料では高いことが確認された。

これらのことから、液体窒素凍結後の茎頂の生存率は、品種または季節の違いに伴う茎頂の耐凍性の違いと関連性の高いことが明らかになった。

B. 茎頂の耐凍性及び凍結生存性の変化

III-Aにおいて、野外から採取した茎頂を液体窒素中で凍結した場合の生存率に、茎頂が本来有している耐凍性が大きく関与することが明らかになった。また、筆者ら⁷⁵⁾はリンゴ茎頂を同一条件で1年を通して凍結した場合の生存率の季節的変動を調査し、茎頂の凍結・融解後の生存率が茎頂自身に有する耐凍性の変動に伴い変化することを明らかにした。そこで、III-Bでは同様の観点から、ナンの数品種について、液体窒素中で凍結・融解した茎頂の生存率の季節的変動を調査した。また、冬季に採取

した材料を低温で保存した場合の、保存期間の長さに伴う生存率の変動についても併せて調査した。

a. 材料及び方法

1) 茎頂の凍結生存性の季節的変動

a) **材料の調製** 北海道大学農学部附属農場に栽植してある西洋ナシ‘フレミッシュ・ビューティ’、日本ナシ‘長十郎’及び中国ナシの実生と推定される‘身不知’の各2樹を用い、1988年2月6日から1989年1月19日にかけてFig. 23に示す各採取日に腋生の葉芽をもつ休眠枝または新梢(9月19日以降)を任意に採取し、茎頂(横径約1mm、葉原基4個程度を有するもの)を取り出して直ちに凍結処理を行った。材料の調製方法は、II-A-1と同様である。

b) **凍結媒液処理** 茎頂を液体窒素中で凍結する際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。凍結媒液は、蒸留水にスクロース30g/l及びDMSO8%(V/V)を添加したものをを用いた。凍結媒液処理の方法は、II-A-1のリンゴの場合と同様である。

c) **凍結及び融解** 材料の凍結及び融解の方法は、II-A-1と同様である。

d) **培養及び調査** 培養及び調査の方法は、II-A-1に準じた。なお、各処理温度区当りの組織片数は12とし、植え込みから4週間後に茎頂の生存について、8週間後にロゼット状培養体形成について調査を行った。

2) 低温保存した休眠枝茎頂の凍結生存性

a) **材料の調製** 1)と同じ3品種を用い、1988

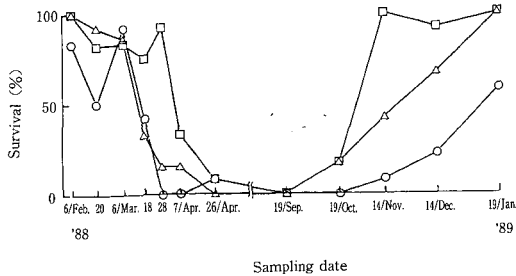


Fig. 23. Seasonal changes in survival rates of pear leaf bud apices frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. Symbols represent cultivars: ○, *Pyrus communis* L. 'Flemish Beauty'; △, *Pyrus ussuriensis* MAXIM var. *sinensis* KIKUCHI 'Mishirazu'; □, *Pyrus pyrifolia* NAKAI var. *culta* NAKAI 'Chojuro.'

年2月27日に休眠枝を大量に採取し、ポリエチレン製の袋に入れて0℃で保存しておき、Fig. 25に示す実験日に、冷蔵中の休眠枝を取り出して茎頂を採取し、凍結実験に用いた。材料の調製方法は、II-A-1と同様である。

b) **凍結媒液処理** 凍結媒液処理の方法は、II-A-1と同じである。

c) **凍結及び融解** 凍結及び融解の方法は、II-A-1と同じである。

d) **培養及び調査** 培養及び調査の方法は、II-A-1と同じである。

b. 結果

1) 茎頂の凍結生存性の季節的変動

Fig. 23に1988年2月から翌年1月にかけて野外から採取したナシ茎頂の液体窒素凍結・融解・培養後の生存率を示した。‘フレミッシュ・ビューティ’の生存率は2月6日から3月6日まで50%以上の比較的高い値を示したが、その後低下し3月28日から10月19日にかけてはほとんど生存しなかつ

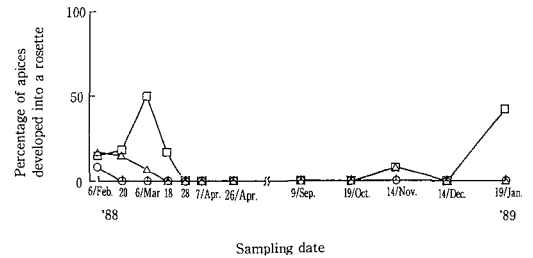


Fig. 24. Seasonal changes in plant regeneration of pear leaf bud apices frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. Symbols are the same as in Fig. 23.

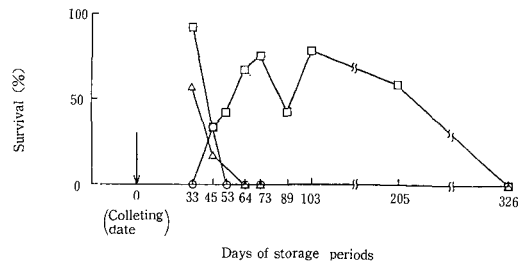


Fig. 25. Seasonal changes in survival rates of pear leaf bud apices stored at 0°C and frozen in liquid nitrogen, thawed and cultured. Symbols are the same as in Fig. 23. An arrow indicates the date (February 27, 1988) of collecting twigs for storage.

た。しかし、11月14日以降再び生存率が上昇し、翌年1月の材料では50%以上の高い値となった。‘身不知’では同じく2月6日から3月6日まで80%以上の高い値を示したのち徐々に生存率が低下し、4月26日から9月19日までの材料は生存しなかった。しかし、10月19日以降生存率が上昇し、1月19日の材料では生存率が100%となった。‘長十郎’の生存率は他の2品種に比べ遅い時期(3月28日)まで75%以上の高い値を示したのち低下し、4月26日から9月19日まで極めて低い値であった。その後10月19日から再び上昇し、11月14日には早くも100%となりそのまま1月まで高い値を維持した。

Fig. 24にはロゼット状培養体形成率の季節的変動を示した。‘フレミッシュ・ビューティ’では2月6日の材料でわずかながらロゼット状培養体が認められ、‘身不知’でも2月6日~3月6日と11月14日の材料で低率ながらロゼット状培養体を形成した。‘長十郎’は他の2品種に比べ、ロゼット状培養体形成率が全般に高く、3月6日の材料では用いた茎頂の半数がロゼット状培養体を形成した。しかし、いずれの品種においてもロゼット状培養体形成率は生存率に比べてかなり低かった。

2) 低温保存した休眠枝茎頂の凍結生存性

2月27日に採取し0°Cで保存しておいた材料の保存期間に伴う液体窒素凍結・融解・培養後の生存率の変動をFig. 25に示した。‘フレミッシュ・ビューティ’では低温保存開始から45日後の材料で33%の生存率が得られたのみで、保存期間がそれより長くなると生存個体は得られなかった。‘身不知’では33日間保存した材料で60%近くの生存率が得られたもののそれ以上保存すると減少し、保存64日以上では生存個体が得られなかった。一方、‘長十郎’では冷蔵開始から205日目までいずれも生存個体が得られ、205日目の材料でも生存率が60%近くの比較的高い値を維持していた。しかし、300日を超えると生存個体は得られなかった。

c. 考 察

III-Aにおいて、液体窒素凍結・融解後の茎頂の生存率は、茎頂自体が本来有している耐凍性の強弱に大きく左右されることが明らかとなった。この考えに基づいてIII-Bの結果を考察すると、III-Bにおいて認められた茎頂の生存率の変動は茎頂の耐凍性の変動を反映しているものであると考えられる。す

なわち、ナン茎頂の耐凍性は、リンゴ⁷⁵⁾と同様に冬期間高い値を維持したのち春先に低下し、夏の間きわめて低い値を示し、その後初冬に再び増加して冬期間再度高い値を示すものと考えられる。

しかし、リンゴとは異なり茎頂の耐凍性の維持され易さには品種間差が認められることも明らかとなった。すなわち液体窒素凍結後の生存率を見ると、初冬の上昇が早く春先の低下が遅い‘長十郎’では、枝を0°Cで保存した場合にも生存個体の得られる期間が他品種に比べて長く、調査した4品種の中では最も耐凍性が維持されやすいものと考えられる。なお、‘長十郎’の耐凍性が増大する時期が他品種に比べ早いことは、1985年にも観察していることから再現性があるものと考えられる⁷⁴⁾次に、‘身不知’と‘フレミッシュ・ビューティ’を比べると、秋口の生存率上昇は‘身不知’の方がやや早く、生存率低下時期はほぼ同じで、0°Cの低温保存により生存個体の得られる期間もほぼ同じであった。なお、0°Cで8か月間保存したリンゴの枝から摘出した茎頂は、液体窒素凍結後においても生存率100%であったことから⁷⁵⁾ナン茎頂の耐凍性保持能力は、リンゴ茎頂のそれよりも小さいと考えられる。

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、水のみ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知見を踏まえ、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するならば、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、大きな意味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‘低温生存性’とは、別の概念として捉える必要が生ずるのであろうと考えられる。このことから、本研究では、前者のような通常の耐凍性と区別し、後者のような性質を‘凍結生存性’と称することにする。

次に、液体窒素凍結・融解・培養後の植物体再生の指標となるロゼット状培養体形成率は、‘長十郎’で最も高い値を示したが、冬期間生存率の高かった3品種全体について極めて低い値であった。この値は、通常のナン茎頂培養におけるロゼット状培養体形成率と比べても明らかに低い値であることから、II-Aで述べたように、液体窒素凍結及び融解の過程で茎頂組織が凍害を受けたものと考えられる。

IV. 凍結生存性の制御

III.において、茎頂の凍結・融解後の生存に茎頂自身の耐凍性が大きく関与していることが明らかになった。しかし、*in vitro*で養成したシュートの茎頂や野外においても高い耐凍性をもつことのできない植物の茎頂などを凍結保存の材料とする場合には、材料に人為的な操作を施し材料の凍結生存性を予め高める必要がある。

この点について、II.でアスパラガスの野外の茎頂では、前培養を行うことにより凍結生存性が著しく高まることを報告した。また、ハスカップ及びブルーベリーでは、培養シュートにハードニングを施すことにより、液体窒素凍結・融解後に生存個体を得ることに成功している。そこで、IV.では、アスパラガス、ハスカップ及びブルーベリーの培養シュートの茎頂を材料として、茎頂の凍結生存性を制御するいくつかの方法について検討した。

A. 凍結生存性に及ぼすハードニングの影響

IV-Aでは、ハスカップ及びブルーベリーの培養体シュート節部組織片の凍結生存性に及ぼすハードニングの影響について調べた。

a. 材料及び方法

1) 実験材料 II-D, Eで用いたものと同じハスカップ及びブルーベリー(‘ランコカス’及び‘コンコード’)の培養体シュートを用いた。

2) ハードニング 凍結に先立ち、培養体にハードニングを行った。すなわち、培養体(継代後約2か月を経過しシュートを有するもの)をプラスチック

と5℃、1日8時間照明(白色蛍光灯、約4,000 lx)の条件下に移し、1~4週間培養した。

3) 材料の調製 ハードニング終了後、シュートから節部組織片(長さ約5 mm, 2節を有する)を切り出し、凍結した。

4) 凍結媒液処理 凍結媒液は蒸留水を用い、材料を浸漬後直ちに凍結を行った。凍結媒液処理の方法は、II-A-1に準じた。

5) 凍結及び融解 凍結は、プログラムフリーザーを用いて0.2℃/minの冷却速度で、II-A-1と同様の方法で行った。なお、凍結温度として-2.5, -5.0, -7.5及び-10.0℃まで凍結した4区を設け、他に対照として凍結媒液処理を行ったのち凍結を行わなかった区を設けた。

6) 培養及び調査 培養及び調査の方法は、II-D, Eと同様である。なお、1区当たり24個体を材料に用い、同じ実験区につき2回実験を行った。

b. 結果及び考察

Fig. 26にハスカップ節部組織片の凍結・融解後の生存に及ぼす凍結温度及びハードニングの影響を示した。ハードニングを行わない場合、節部組織は-2.5℃の凍結には耐えるが、-5.0℃以下の凍結にはほとんど耐えなかった。一方、ハードニングを行った組織の多くは、処理期間に関係なく-5.0℃の凍結に耐え、-7.5℃または-10.0℃で凍結した場合にも生存個体が得られた。

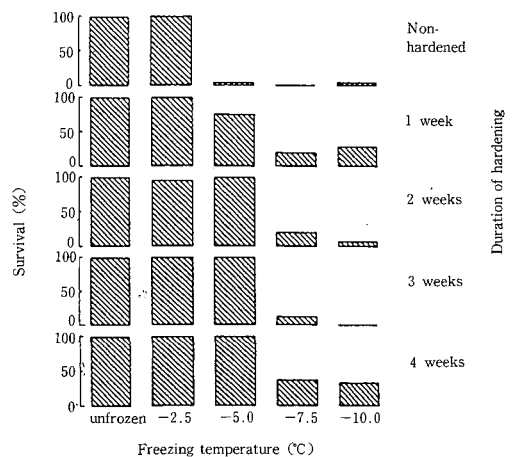


Fig. 26. Effects of freezing temperature and hardening on survival of blueberry nodal segments obtained through tissue culture, frozen in liquid N₂, thawed and cultured.

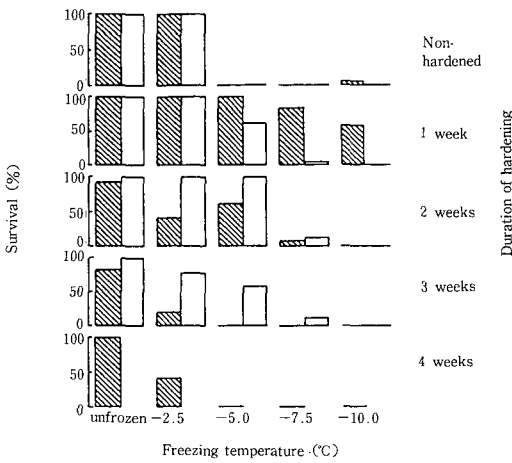


Fig. 27. Effects of freezing temperature and hardening on survival of blueberry nodal segments obtained through tissue culture, frozen in liquid N₂, thawed and cultured. Stripe and non-stained bars represent 'Rancocas' and 'Concord,' respectively.

Fig. 27 にブルーベリー節部組織片の凍結・融解後の生存に及ぼす凍結温度及びハードニングの影響を示した。品種にかかわらず、ハードニングを行わない節部組織は-2.5℃の凍結に耐えたが、-5.0℃以下の凍結には耐えなかった。一方、ハードニングを行った組織の耐凍温度には、処理期間の長さに伴う差が認められた。すなわち、'ランコカス'では、ハードニング1週間後の凍結生存性が最も高く材料の多くが-7.5℃の凍結に耐えたが、2週間後になると凍結生存性が低下し、3週間後以降-5.0℃の凍結に耐える個体は得られなかった。また、'コンコード'では、1~2週間後の凍結生存性が高く材料の多くが-5.0℃の凍結に耐えたが、3週間後になると-2.5℃及び-5.0℃で凍結した区において生存率が低下し、材料の劣化が推測された。

B. 凍結生存性に及ぼす前培養の影響

1. ハスカップ及びブルーベリー培養体シュート節部の凍結・融解後の生存に及ぼす前培養の影響

a. 材料及び方法

1) 材料の調製 II-D, E で用いたものと同じハスカップ及びブルーベリーの培養体シュート(継代後約2か月を経過したもの)から節部組織片(長

さ約5mm, 2節を有する)を切り出し、実験に用いた。

2) 前培養凍結に先立ち、前培養を行った。前培養の培養基は、MS培地の濃度を半に減じ、スクロース(0.4Mまたは1.0M)及びDMSO(5%または10%)を組み合わせて添加したもの(pH未調整)、寒天7g/lを添加したものを用いた。

3) 凍結媒液処理 凍結媒液は蒸留水を用い、材料を浸漬後直ちに凍結を行った。凍結媒液処理の方法は、II-A-1に準じた。

4) 凍結及び融解 凍結は、プログラムフリーザーを用いて0.2℃/minの冷却速度で、II-A-1と同様の方法で行った。なお、凍結温度として-2.5, -5.0, -7.5及び-10.0℃の4区を設け、他に対照として凍結媒液処理を行ったのち凍結を行わなかった区を設けた。

5) 培養及び調査 培養及び調査の方法は、IV-Aと同様である。

b. 結果及び考察

Fig. 28 にハスカップ節部組織の凍結・融解後の生存に及ぼす凍結温度及び前培養の影響について示した。Fig. 28 から、前培養を行わない組織は-2.5℃の凍結には耐えるが、-5.0℃以下の凍結にはほとんど耐えなかった。一方、前培養を行った組織の耐凍温度は、前培養培地中のDMSO及びスク

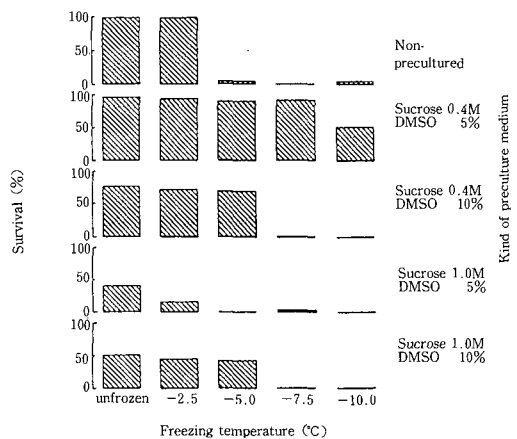


Fig. 28. Effects of freezing temperature and preculture on survival of blueberry nodal segments obtained through tissue culture, frozen in liquid N₂, thawed and cultured.

ロース濃度の影響を受けた。すなわち、スクロース 0.4 M と 1.0 M を添加した区を比較した場合、1.0 M 添加区は 0.4 M 添加区に比べ未凍結区(前培養のみを行った区)の生存率が低かった。これは、高糖濃度培地上で前培養を行うことにより、組織が強度に脱水され、凍結前の組織の生存率が低下したものと考えられる。さらに、スクロースを 0.4 M 添加した条件下において DMSO 10% 添加区は DMSO 5% 添加区に比べいずれの凍結温度区においても生存率が低かったことから、10% DMSO は前培養に用いる濃度としては高すぎるものと考えられる。また、スクロース 0.4 M 及び DMSO 5% を添加した培地で前培養を行った場合、 -7.5°C で凍結した個体の 100% 近くが生存し、 -10.0°C で凍結した場合にも半数以上の個体が生存したことから、この培地は用いた 4 種類の前培養培地のうち最も材料の凍結生存性を高める培地であると考えられる。

Fig. 29 にブルーベリー(‘ランコカス’)節部組織の凍結・融解後の生存に及ぼす凍結温度及び前培養の影響を示した。前培養を行わない場合の節部組織は、 -5.0°C 以下の凍結に耐えなかった。一方、前培養を行った組織には -5.0°C 及び -7.5°C の凍結に耐えるものが認められた。しかし、前培養を行ったのち凍結を行わなかった区の生存率はいずれも 50% 以下で、前培養も凍結も行わなかった区の生存率が 100% であったことに比べると著しく低い値を

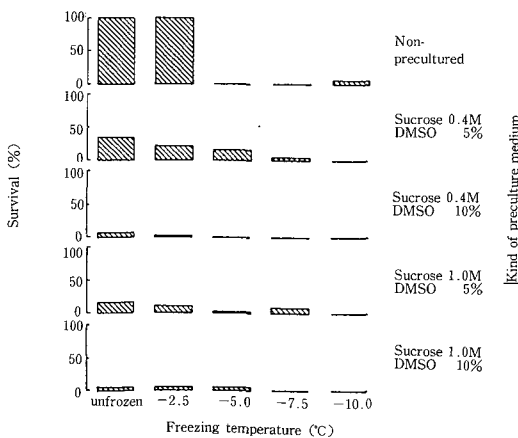


Fig. 29. Effects of freezing temperature and preculture on survival of blueberry nodal segments obtained through tissue culture, frozen in liquid N_2 , thawed and cultured. The cultivar was ‘Rancocas.’

示した。したがって、ブルーベリーでは、前培養を行うことにより組織の凍結生存性がわずかに高まるが、同時に凍結を行う前の組織の生存能力が低下することが明らかになった。

2. アスパラガス小側枝茎頂の凍結・融解後の生存に及ぼす前培養の影響

II-F において前述したように、野外から採取したアスパラガス若茎の小側枝茎頂を液体窒素中で凍結し融解後に生存個体を得るためには、DMSO 及び糖を含む培地上で 2 日間前培養を行う必要がある。しかし、DMSO または糖のいずれの成分が材料の凍結生存性を高めているのかについては明らかではない。そこで、IV-B-2 では前培養を行う場合の DMSO 及び糖の作用性を明らかにするため、前培養培地中の DMSO 濃度並びに糖の種類と濃度について検討した。

a. 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してあるアスパラガス‘メリーワシントン 500 W’の若茎(1991 年 6 月から 7 月にかけて圃場より採取)から小側枝茎頂(横径約 1 mm)を無菌的に取り出し用いた。

2) 前培養 前培養には、MS 培地に DMSO または糖を Fig. 30~32 に示す各濃度で添加したものを用いた。この場合 DMSO 及び糖の相互効果を排除するため、DMSO 及び糖は各々単独で前培養培地中に添加した。培養条件は、 25°C 、1 日 16 時間照明(白色蛍光灯、約 4,000 lx)とし、2 日間行った。なお、1 区当りの茎頂数は 36 とした。

3) 凍結媒液処理 前培養終了後、直ちに凍結媒液処理を行った。凍結媒液は、蒸留水に DMSO 12% (V/V) 及びグルコース 0.2 M を添加したものを、ストロー精液管に満たした凍結媒液中に材料を浸漬後、2 時間静置した。

4) 凍結及び融解 凍結及び融解の方法は II-A-1 に準じて行った。

5) 培養及び調査 培養及び調査の方法は II-F に準じ、培養開始から 1 か月後に茎頂の生存について調査を行った。

b. 結果及び考察

液体窒素凍結・融解後の茎頂の生存に及ぼす前培養培地中の DMSO 濃度の影響を Fig. 30 に示した。前培養を行わなかった区及び DMSO を添加しない

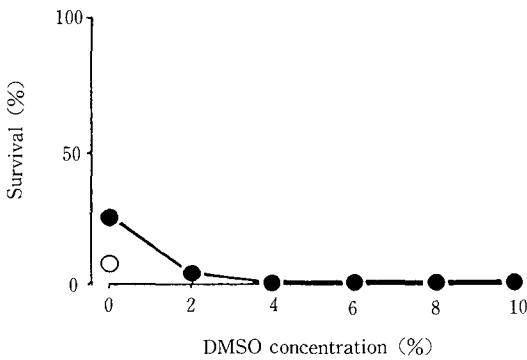


Fig. 30. Effect of DMSO concentration added in preculture media on survival of asparagus shoot apices frozen in liquid N_2 , thawed and cultured. An open circle represents the rate for non-precultured and frozen apices.

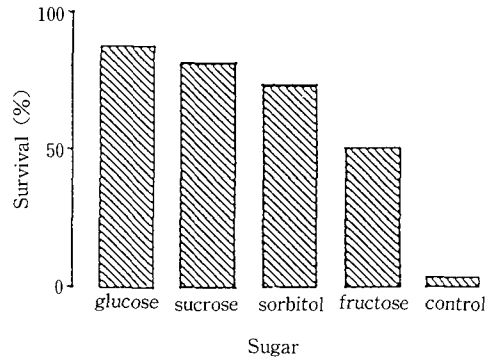


Fig. 31. Effect of the kinds of sugar added in preculture media on survival of asparagus shoot apices frozen in liquid N_2 , thawed and cultured. Control represents the rate for non-precultured and frozen apices. Concentration of each sugar was 0.2 M.

培地で前培養を行った区において液体窒素凍結・融解後にわずかながら生存個体が得られたのに比べ、DMSOを添加した培地で前培養を行った区における茎頂の生存率はいずれも極めて低い値であった。したがって、前培養培地中のDMSOは茎頂の凍結生存性を高めることはなく、逆にやや阻害的に作用するものと考えられる。

次に、前培養培地中に添加した糖の種類の影響を見ると (Fig. 31), 前培養を行わなかった対照区に比べ糖を添加した区では糖の種類にかかわらず高い生存率を示した。特に、グルコース添加区における生存率は86%と用いた4種類の糖の中では最も高い値を示したことから、前培養培地中のグルコース濃度についてさらに検討した結果がFig. 32である。Fig. 32で茎頂の生存率はグルコース0.2~0.6 M添加区において50%以上と高く、0.4 Mで至適(89%)となった。しかし、グルコース無添加区及び高濃度(0.8~1.0 M)添加区における生存率は低かった。したがって、前培養培地中にグルコースを0.2~0.6 Mの濃度で添加することにより、茎頂の凍結生存性を高めることが可能なことが明らかになった。

従来当研究室においては、前培養培地中に5% DMSO及び30 g/lグルコースを添加することで野外から採取したアスパラガス茎頂の凍結生存性を高めてきたが、ここに述べた結果から前培養培地中の糖が茎頂の凍結生存性を高める主要因であることが明らかになった。しかし、DMSO及び糖と一緒に

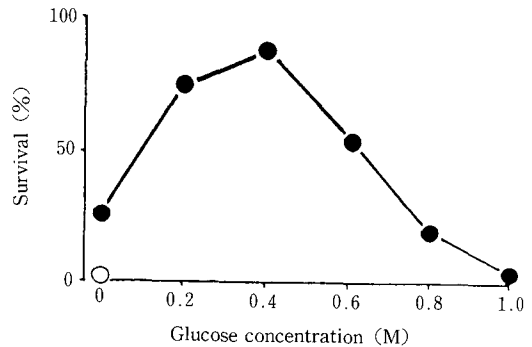


Fig. 32. Effect of glucose concentration added in preculture media on survival of asparagus shoot apices frozen in liquid N_2 , thawed and cultured. An open circle represents the rate for non-precultured and frozen apices.

添加した場合に相乗効果を発揮することも考えられ、この点についてはさらに検討する必要がある。

V. 凍結生存性の相違と内生成分

III. 及びIV. において、植物組織の凍結生存性は、組織自身が本来有する耐凍性の季節的変動並びにハードニング及び前培養などの人為的操作に伴い、大きく変化することを明らかにした。V. では、凍結生存性の異なる組織間で内生成分を比較し、凍結生存性の変動と平行して組織内成分にいかなる変化が生じているのかを明らかにするとともに、凍結生存性を人為的に制御する場合の指標を得ようとした。

A. 内生成分の季節的変動

III. においてナン茎頂の耐凍性には季節的変動及び品種間差が認められることが明らかになった。また、II. でハスカップの野外の茎頂の耐凍性は夏季と冬季で著しく異なることが確認された。そこで、V-A ではこれらの作物について茎頂の内生成分の季節的変動を調査し、耐凍性の変動との因果関係について検討するため、特に細胞の浸透価に関与するとみられる含水量、遊離糖含量及び遊離アミノ酸含量を、野外から採取した茎頂について調べた。

1. ナン茎頂における内生成分の季節的変動

a. 材料及び方法

1) 含水量の測定 西洋ナン‘フレミッシュ・ビューティ’1樹を用い、休眠枝の腋生葉芽から Fig. 33 に示した各実験日に茎頂 200 mg (長さ 1~1.5 mm, 葉原基 6 個程度を有するもの 150~200 個に相当) を切り出し、乾燥器を用いて 70℃ で 3 日間乾燥したのち、生重及び乾重の差から

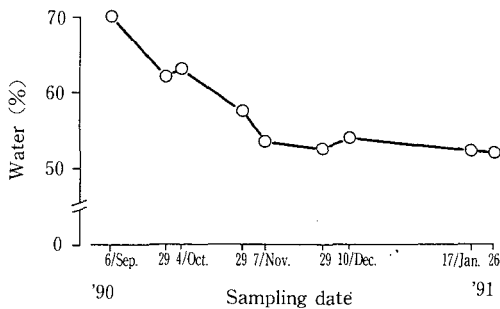


Fig. 33. Seasonal changes in water contents of pear leaf bud apices. The cultivar was ‘Flemish Beauty.’

含水量を求め、含水率を算出した。

2) 遊離糖の分析 西洋ナン‘フレミッシュ・ビューティ’, ‘パートレット’及び‘ブランドー・ワイン’, 日本ナン‘長十郎’並びに中国ナンの実生と推定される‘身不知’各 2 樹から Table 5~9 に示す各実験日に茎頂各 200 mg (前述と同様) を切り出したのち、0.2 N 過塩素酸 2 ml, 海砂 B 200 mg 及び内部標準物質としてラクトース 20 μmol を含む溶液 1 ml を添加し、0℃ で乳鉢を用いてホモジュナイズした。さらに、この抽出残渣を純水 1 ml で共洗いで抽出液に加え、4℃, 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄液を炭酸水素カリウム (KHCO₃) 粉末で pH 4 に調整した。次に、この上澄液を凍結乾燥して 0.5 ml に濃縮したのち、再び遠心分離した上澄液を試料とした。分析は高速液体クロマトグラフィ (カラム: アミノカラム <旭化成 NH₂P-50>, 溶出液: 75% アセトニトリル, 検出器: 示差屈折率計 <日立 L-3300 型>) を用い、30℃ (カラムオープン <日立 L-5020 型> 使用) で行った。1 回の分析に用いた試料の量は 10 μl とした。

3) 遊離アミノ酸の分析 上記と同様の実験樹から Table 10 及び Table 11 に示す各実験日に茎頂 200 mg (前述と同様) を切り出したのち、0.2 N 過

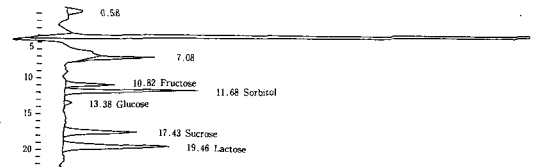


Fig. 34. An example chromatogram of sugar analysis on pear leaf bud apices. The cultivar was ‘Flemish Beauty.’ Plant materials were collected on 31st January, 1991.

Table 5. Seasonal changes in sugar contents of ‘Flemish Beauty’ pear leaf bud apices.

| Sugar | Sugar contents (μmol/g fw) | | | | | | | |
|----------|----------------------------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|
| | Collecting date | | | | | | | |
| | 25/Sep. | 4/Oct. | 25/Oct. | 6/Nov. | 23/Nov. | 9/Dec. | 16/Jan. | 31/Jan. |
| Fructose | 21.8 | 32.8 | 42.0 | 55.5 | 85.2 | 52.0 | 63.7 | 65.3 |
| Sorbitol | 43.5 | 67.9 | 76.0 | 112.2 | 113.3 | 102.9 | 155.7 | 149.6 |
| Glucose | — ² | — | — | 10.1 | 9.0 | 6.3 | 8.6 | 11.0 |
| Sucrose | 6.8 | 21.5 | 21.0 | 33.1 | 37.6 | 38.6 | 39.5 | 65.1 |
| Total | 72.1 | 122.2 | 139.0 | 210.9 | 245.1 | 199.8 | 267.5 | 291.0 |

² Nondetected.

塩素酸 2 ml, 海砂 B 200 mg 及び内部標準物質として D, L-ノルロイシン 0.25 μmol を含む溶液 1 ml を添加し, 0°C で乳鉢を用いてホモジエナイズした。さらに, この抽出残渣を純水 1 ml で共洗いで抽出液に加え, 4°C, 14,000 rpm で5分間遠心分離を行い, 上澄液を炭酸水素カリウム (KHCO_3) 粉末で pH 4 に調整後再度遠沈し, 得られた上澄液を試料とした。分析は, 高速アミノ酸自動分析装置〈日立 835 型〉を用いてニンヒドリン法により行い,

Table 6. Seasonal changes in sugar contents of 'Bartlett' pear leaf bud apices.

| Sugar | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) | | | | |
|----------|---|---------|--------|---------|---------|
| | Collecting date | | | | |
| | 25/Oct. | 23/Nov. | 9/Dec. | 16/Jan. | 28/Jan. |
| Fructose | 35.3 | 80.0 | 100.4 | 78.9 | 74.4 |
| Sorbitol | 62.7 | 146.9 | 156.1 | 244.4 | 218.5 |
| Glucose | 20.2 | 20.3 | 14.9 | 33.1 | 28.2 |
| Sucrose | 35.5 | 49.8 | 48.0 | 62.3 | 57.5 |
| Total | 153.7 | 297.0 | 319.4 | 418.7 | 378.6 |

Table 7. Seasonal changes in sugar contents of 'Chojuro' pear leaf bud apices.

| Sugar | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) | | | |
|----------|---|---------|---------|--------|
| | Collecting date | | | |
| | 25/Oct. | 24/Nov. | 11/Dec. | 3/Feb. |
| Fructose | 42.0 | 102.5 | 101.1 | 90.7 |
| Sorbitol | 56.5 | 118.8 | 126.0 | 143.5 |
| Glucose | — ^z | — | 4.5 | — |
| Sucrose | 18.9 | 39.3 | 65.0 | 63.5 |
| Total | 117.4 | 260.6 | 296.6 | 297.7 |

^z Nondetected

1回の分析に用いた試料の量は 250 μl とした。

b. 結果及び考察

‘フレミッシュ・ビューティ’ 茎頂の含水率の秋から冬にかけての変動を Fig. 33 に示した。初秋の9月6日の茎頂で70%あった含水率は漸次減少し, 11月初旬には50%近い値となり, その後1月下旬にかけて同様の値を推移した。細胞が凍死する主たる原因の一つとして細胞内凍結による細胞の物理的な損傷が考えられるが, 秋から冬にかけて茎頂の含水率が低下することは細胞内凍結を引き起こす細胞内の自由水が減少することを意味しており, これが茎頂の耐凍性が高まる一つの要因になっているのではないかと考えられる。

次に, ナン茎頂の糖分析のクロマトグラムの一例を Fig. 34 に示した。Fig. 34 から明らかなように, 本実験でナン茎頂から検出できた単糖類, 二糖類及び糖アルコールはフラクトース, グルコース, スクロース及びソルビトールの4種類であった。各品種における茎頂の糖含量の季節的変動を見ると (Table 5~8), これら4種の糖類のうちソルビ

Table 8. Seasonal changes in sugar contents of 'Mishirazu' pear leaf bud apices.

| Sugar | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) | | | |
|----------|---|---------|---------|---------|
| | Collecting date | | | |
| | 25/Oct. | 24/Nov. | 11/Dec. | 28/Jan. |
| Fructose | 32.9 | 62.3 | 58.7 | 77.8 |
| Sorbitol | 71.2 | 104.0 | 143.0 | 150.8 |
| Glucose | — ^z | — | 3.4 | 5.9 |
| Sucrose | 10.0 | 40.3 | 52.1 | 50.3 |
| Total | 114.1 | 206.6 | 257.2 | 284.8 |

^z Nondetected

Table 9. Varietal differences in sugar contents of pear leaf bud apices collected in winter.

| Sugar | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) | | | | |
|----------|---|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| | Cultivar and Collecting date | | | | |
| | Flemish Beauty 31/Jan. | Bartlett 28/Jan. | Brandy Wine 5/Feb. | Chojuro 3/Feb. | Mishirazu 28/Jan. |
| Fructose | 65.3 | 74.4 | 98.7 | 90.7 | 77.8 |
| Sorbitol | 149.6 | 218.5 | 229.1 | 143.5 | 150.8 |
| Glucose | 11.0 | 28.2 | 19.6 | — ^z | 5.9 |
| Sucrose | 65.1 | 57.5 | 64.7 | 63.5 | 50.3 |
| Total | 291.0 | 378.6 | 412.1 | 297.7 | 284.8 |

^z Nondetected.

Table 10. Seasonal changes in amino acid contents of 'Flemish Beauty' pear leaf bud apices.

| Amino acid | Amino acid contents (n mol/g fw) | | | | | |
|-----------------|----------------------------------|---------|--------|--------|---------|---------|
| | Collecting date | | | | | |
| | 7/Sep. | 27/Sep. | 5/Oct. | 8/Nov. | 13/Nov. | 30/Jan. |
| Asp | 302 | 538 | 561 | 1,317 | 1,623 | 2,271 |
| Thr | 292 | 304 | 324 | 2,939 | 2,802 | 648 |
| Ser | 1,196 | 1,261 | 1,820 | 2,951 | 3,666 | 762 |
| Glu | 642 | 730 | 847 | 1,707 | 1,536 | 2,555 |
| Gly | 173 | 126 | 263 | 169 | 182 | 78 |
| Ala | 293 | 235 | 348 | 407 | 297 | 279 |
| Cys/2 | 89 | 104 | 118 | 149 | 92 | 111 |
| Val | 100 | 109 | 140 | 841 | 899 | 231 |
| Met | — ^z | — | — | — | — | — |
| Ile | 35 | 39 | 558 | 407 | 477 | 113 |
| Leu | 41 | 51 | 62 | 153 | 197 | 114 |
| Tyr | 44 | 30 | 60 | 37 | 17 | 30 |
| Phe | 24 | 45 | 54 | 57 | 57 | 131 |
| Lys | 39 | 35 | 47 | 40 | 49 | 127 |
| His | 46 | 40 | 75 | 288 | 435 | 281 |
| Arg | 32 | 63 | 33 | 909 | 2,356 | 1,552 |
| Pro | — | — | — | 57 | 42 | — |
| Total | 3,348 | 3,710 | 5,310 | 12,428 | 14,727 | 9,283 |
| NH ₃ | 1,209 | 1,148 | 1,315 | 824 | 714 | 821 |

^z Nondetected.

トールの含有率が季節及び品種を問わず最も高く、続いてフラクトース、スクロース、グルコースの順に高かった。また、糖含量には季節による変動が認められ、品種にかかわらずいずれの糖類も秋から冬にかけて漸増の傾向を示した。このうち「フレミッシュ・ビューティ」では、4種の糖類の総量で比較すると1月31日は9月25日の約4倍の値を示した。前述した「フレミッシュ・ビューティ」の含水率(9月29日が62%, 1月26日が52%)から9月25日及び1月31日の材料の浸透価を推定すると、9月25日が0.12 M, 1月31日が0.56 Mとなり、約5倍に増加している。同様に、1月下旬から2月上旬にかけて採取した「バートレット」, 「長十郎」及び「身不知」の糖の総量は、10月25日の材料と比べ2倍以上の値を示した。さらに、冬季の茎頂の糖含量を品種間で比較したのがTable 9である。II. 及びIII. において耐凍性が高く液体窒素凍結・融解後の生存率も高かった「フレミッシュ・ビューティ」, 「長十郎」及び「身不知」の糖含量は総量で300 $\mu\text{mol/g fw}$ 弱の値であったのに比べ、耐凍性が低く液体窒素凍

結・融解後の生存率も低い「バートレット」及び「ブランデー・ワイン」は400 $\mu\text{mol/g fw}$ 前後の高い値を示し、両者に差が認められた。この場合、特にソルビトール含量の差が大きかった。

次に、茎頂のアミノ酸含量の季節的変動について、「フレミッシュ・ビューティ」茎頂について検討した結果をTable 10に示した。個々のアミノ酸で変動の様子は異なるが、比較的増減の激しかったアミノ酸について考察すると以下ようになる。すなわち、初秋(9月7日)の材料に多く含まれていたセリンは、11月まで漸増したのち1月に激減し、トレオニン及びアルギニン(11月に急増したのち1月に減少した)。アミノ酸の総含量も、9月から11月にかけて増加したが1月には減少した。一方、アスパラギン酸及びグルタミン酸含量は、9月から1月にかけて徐々に増加し、耐凍性の変動とよく一致を示した。このように、耐凍性が高い材料にアスパラギン酸及びグルタミン酸が多く含まれているという傾向は、品種間を比較した場合にも認められ(Table 11)、耐凍性が高い「フレミッシュ・ビュー

Table 11. Varietal differences in amino acid contents of pear leaf bud apices collected in winter.

| Amino acid | Amino acid contents (n mol/g fw) | | | | |
|-----------------|----------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| | Cultivar and Collecting date | | | | |
| | Flemish Beauty 31/Jan. | Bartlett 28/Jan. | Brandy Wine 5/Feb. | Chojuro 3/Feb. | Mishirazu 28/Jan. |
| Asp | 2,271 | 843 | 589 | 3,051 | 2,055 |
| Thr | 648 | 621 | 288 | 1,267 | 727 |
| Ser | 762 | 393 | 79 | 233 | 127 |
| Glu | 2,555 | 1,544 | 967 | 1,819 | 1,621 |
| Gly | 78 | 118 | 37 | 70 | 69 |
| Ala | 279 | 260 | 125 | 239 | 227 |
| Cys/2 | 111 | 79 | 73 | 124 | 113 |
| Val | 231 | 193 | 113 | 188 | 168 |
| Met | — ^z | 18 | — | 23 | — |
| Ile | 113 | 104 | 22 | 121 | 89 |
| Leu | 114 | 96 | 28 | 69 | 79 |
| Tyr | 30 | 48 | 39 | 26 | — |
| Phe | 131 | 153 | 112 | 67 | 124 |
| Lys | 127 | 145 | 25 | 81 | 88 |
| His | 281 | 60 | 41 | 174 | 117 |
| Arg | 1,552 | 491 | 342 | 844 | 301 |
| Pro | — | 42 | — | 113 | 48 |
| Total | 9,283 | 5,208 | 2,880 | 8,509 | 5,953 |
| NH ₃ | 821 | 799 | 679 | 707 | 1,566 |

^z Nondetected.

ティ', '長十郎' 及び '身不知' は, 耐凍性の低い 'バートレット' 及び 'ブランデー・ワイン' に比べて アスパラギン酸及びグルタミン酸含量が高かった。しかし, これらのアミノ酸が, 直接茎頂の耐凍性に関与するものであるか否かは今後さらに検討しなければならない。また, 冬季の全アミノ酸含量は夏季に比べて相対的に高いことから, 冬季の茎頂は夏季に比べて細胞が充実しているものと考えられる。

以上のように, 茎頂の含水率の減少並びに遊離糖及び遊離アミノ酸含量の増加に伴う細胞の浸透価の高まりが, 茎頂の耐凍性増大の一因であると考えられる。しかし, 耐凍性の低い 'バートレット' 及び 'ブランデー・ワイン' の糖含量が耐凍性の高い品種のそれに比べ高かったように, 糖含量の大小は耐凍性の高低を説明する一つの要因であって, これですべてを説明することは難しいものと考えられる。

2. ハスカップ茎頂における内生成分の季節的変動

a. 材料及び方法

1) 含水量の測定 北海道大学農学部附属農場に栽植してあるハスカップ3株の新梢または休眠枝の腋芽から, 1991年2月21日, 6月25日及び10月16日に茎頂200mg(長さ1~1.5mm, 葉原基6個程度を有するもの150~200個に相当)を切り出し, 70℃で3日間乾燥したのち, 生重及び乾重の差から含水量を測定し, 含水率を算出した。反復は, 2月及び6月が3回, 10月が2回とした。

2) 遊離糖及び遊離アミノ酸の分析 上記と同じ実験日に同一の実験樹から茎頂200mg(茎頂150~200個に相当)を切り出し材料とした。分析試料の作製及び分析方法は, A-1のナンの場合と同様である。反復は, 2月及び6月が3回, 10月が2回とした。

b. 結果及び考察

ハスカップ茎頂の含水率の季節的変動を Table 12 に示した。2月に60%余りであった含水率は, 6

月になると70%まで増加し、秋口の10月には再び減少する傾向が認められた。したがって、冬季の茎頂の耐凍性が高い要因として、細胞内の含水量が少ないことが考えられる。

次に、糖含量についてみると (Table 13), ハスカップ茎頂から検出できた糖はフラクトース、グルコース及びスクロースの3種類であり、ナンとは異なりソルビトールは検出されなかった。このうち、フラクトース及びグルコース含量は季節に伴う変動が小さかったのに対し、スクロース含量には大きな差が認められた。すなわち、冬季 (2月) に160 $\mu\text{mol/g fw}$ 余りあったスクロース含量は、夏季 (6月) になると20 $\mu\text{mol/g fw}$ まで減少し、秋季 (10月) には再び増加して90 $\mu\text{mol/g fw}$ 以上となった。糖含量の総和及び含水率から浸透価を推定すると、2月が0.34 M, 6月が0.06 M となり、冬季の茎頂は夏季に比べ著しく浸透価が高かった。

次に、アミノ酸含量の季節的変動をみると (Table 14), ナンと同様にハスカップにおいても冬季にはアスパラギン酸及びグルタミン酸含量が高かったほか、アラニン含量も高かった。また、全アミノ酸含量で比較しても、冬季は夏季の約3倍の値を示した。

以上のように、ハスカップの茎頂でもナンと同様に冬季の含水率の減少並びに遊離糖及び遊離アミノ酸の蓄積が認められたことから、浸透価の高まりが茎頂の耐凍性増大を促す一つの要因になっているものと考えられる。

B. 凍結生存性の異なる組織間での内生成分の相違—アスパラガス培養体シュートの節部及び節間部における凍結生存性の相違と内生成分—

II-Fにおいて、アスパラガスの培養体シュートを規定の方法を用いて液体窒素中で凍結すると、節部は生存し節間部は凍死することが明らかとなった。そこで、これら凍結生存性の異なる2つの組織間における内生成分の違いを明らかにするため、遊離アミノ酸、遊離糖及び水分含量について調査した。

a. 材料及び方法

1) 含水量の測定 *in vitro* で継代・増殖を繰り返しているアスパラガス 'メリーワシントン 500 W' のシュート (継代後約2か月を経過したもの) から節部 (長さ約1 mm) 及び節間部組織 (長さ約5 mm)

Table 12. Seasonal changes in water contents of blueberried honeysuckle leaf bud apices.

| Collecting date | Water (%) ^z |
|-----------------|------------------------|
| 21/Feb. | 61.2±1.7 |
| 25/Jun. | 70.6±2.7 |
| 16/Oct. | 64.8±2.3 |

^z Average ± SE.

Table 13. Seasonal changes in sugar contents of blueberried honeysuckle leaf bud apices.

| Sugar | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) ^z | | |
|----------|--|----------|-----------|
| | Collecting date | | |
| | 21/Feb. | 25/Jun. | 16/Oct. |
| Fructose | 7.5±5.1 | 10.5±2.5 | 25.6±15.8 |
| Glucose | 26.8±3.6 | 11.6±4.4 | 26.3±20.2 |
| Sucrose | 163.3±4.8 | 20.0±6.0 | 93.7±35.2 |
| Total | 207.7±5.4 | 42.1±7.1 | 145.6±0.7 |

^z Average ± SE.

Table 14. Seasonal changes in amino acid contents of blueberried honeysuckle leaf bud apices.

| Amino acid | Amino acid contents (n mol/g fw) ^z | | | |
|-----------------|---|-----------|-------------|-----|
| | Collecting date | | | |
| | 21/Feb. | 25/Jun. | 16/Oct. | |
| Asp | 3,070± 752 | 432± 57 | 2,414± | 339 |
| Thr | 779± 154 | 829±285 | 1,290± | 191 |
| Ser | 43± 43 | 399± 31 | 174± | 174 |
| Glu | 3,893± 758 | 813± 49 | 2,397± | 683 |
| Gly | 26± 13 | 50± 12 | 58± | 8 |
| Ala | 1,232± 93 | 325± 35 | 632± | 185 |
| Cys/2 | 304± 33 | 171± 86 | 127± | 18 |
| Val | 209± 24 | 232± 74 | 269± | 52 |
| Met | — ^y | 37± 37 | 18± | 18 |
| Ile | 36± 18 | 79± 20 | 102± | 18 |
| Leu | 58± 5 | 67± 16 | 95± | 42 |
| Tyr | — | 42± 21 | 25± | 25 |
| Phe | 151± 61 | 143± 90 | 54± | 25 |
| Lys | 148± 34 | 28± 16 | 141± | 60 |
| His | 317± 137 | 92± 28 | 62± | 21 |
| Arg | 837± 207 | 20± 11 | 162± | 91 |
| Pro | 208± 48 | 104± 50 | 96± | 26 |
| Total | 11,312±1,680 | 3,862±543 | 8,113±1,973 | |
| NH ₃ | 1,040± 319 | 671±225 | 609± | 90 |

^z Average ± SE.

^y Nondetected.

各 200 mg を切り出し、70°C で3日間乾燥したのち、生重及び乾重の差から含水量を測定し、含水率を算出した。反復は節部で7回、節間部で9回とした。

2) 遊離糖及び遊離アミノ酸の分析 1)と同様の試料 200 mg を切り出して用いた。分析試料の作製及び分析の方法は、V-A-1と同様である。実験は、節部及び節間部について各々5回ずつ反復し、その平均値から各アミノ酸及び糖の濃度を算出した。

b. 結果及び考察

アスパラガス培養体シュートの節部及び節間部組織中のアミノ酸含量を Fig. 35 に示したが、検出されたアミノ酸は、いずれの組織においても17種類であった(このうちシステインは2分子が結合してシスチンとして検出されるため、Cys/2 と表示してある)。節部と節間部とを比較すると、いずれのアミノ酸についても含量は節部の方が節間部より高かった。特に差が大きかったのは、比較的少量に含まれているプロリンとアルギニンで、節部の含量は節間部のそれに比べ2~3倍であった。検出された全アミノ酸含量で比較しても、節部では節間部に比べ約2倍であった。耐凍性ととの関連が指摘されているプロリン及びアルギニン⁵³⁾が節部に多く含まれていたことは、節部の細胞の強い凍結生存性との関連を示唆している。

次に、Fig. 36 に節部及び節間部組織中の糖含量を示した。本実験で検出できた単糖及び2糖類はフラクトース、グルコース及びスクロースの3種類であった。これらの含量は、いずれも節部の方が節間部より高かった。

また、節部及び節間部組織の含水率はいずれも80%前後で著しい差は認められなかった (Table 15)。

以上のように、節部組織中の遊離アミノ酸及び糖の含量は節間部に比べて高く、節部組織は充実し浸透係も高い細胞で構成されているものと考えられる。すなわち、細胞・組織の凍結生存性を高める要因の一つとして、細胞・組織中の可溶性成分の濃度が高いことが考えられる。したがって、細胞内の可溶性物質の含有量を人為的に高めることができれば、凍結・融解後の組織の生存率を高めることも可能になるものと考えられる。

C. 前培養に伴う内生成分の変動

IV. においてアスパラガス若茎小側枝の茎頂また

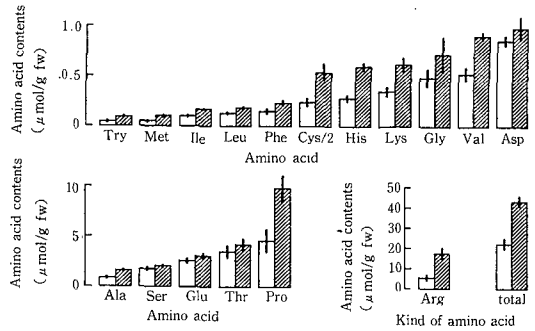


Fig. 35. Amino acid contents in nodal and internodal tissues of asparagus shoots obtained through *in vitro* culture. Stained and non-stained bars stand for nodes and internodes, respectively. Vertical lines represent SE.

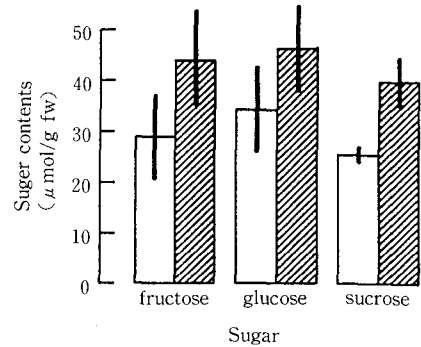


Fig. 36. Sugar contents in nodal and internodal tissues of asparagus shoots obtained through *in vitro* culture. Stained and non-stained bars stand for nodes and internodes, respectively. Vertical lines represent SE.

Table 15. Water content in node and internode of asparagus shoots obtained through *in vitro* culture.

| Tissue | Water (%) ^z |
|-----------|------------------------|
| Node | 78.9±0.5 |
| Internode | 80.4±0.6 |

^z Average ± SE.

はハスカップ培養体シュートの節部切片の凍結に際しては、前培養を行うことで材料の凍結生存性が高まることを明らかにした。そこで、V-Cでは前培養が組織・細胞の凍結生存性を高める要因を明らかにするため、前培養に伴う植物材料内生成分の変動について調べた。

1. アスパラガス若茎小側枝茎頂の前培養における内生成分の変動

a. 材料及び方法

1) 材料の調製 1991年8月28日及び9月2日に圃場より採取した‘メリーワシントン500W’の若茎から、小側枝茎頂を切り出して用いた。また、10月下旬に圃場から掘り上げた根株を温室内で加温し伸長させた若茎から、11月25日及び27日に茎頂を採取し材料とした。

2) 前培養 材料の一部について、前培養を行った。8月28日及び9月2日の前培養は、IV-B-2の結果を参考にしてMS培地、グルコース0、0.6及び1.0 M、寒天7g/lを含み(DMSO無添加)、pH 5.7に調整した3種類の培養基を用い、25°C、4,000 lx、1日16時間照明の条件下で2日間行った。また、11月25日及び27日の前培養は、上記と同様の寒天培養基(糖はグルコースを0、0.5及び1.0 M添加)の表面にろ紙を敷き、その上に茎頂を置床する方法で2日間行った。

3) 遊離糖及び遊離アミノ酸の分析 切り出した茎頂200 mgを分析試料とした。なお、前培養を行った茎頂については、培養基より取り出した茎頂の表面を蒸留水で2、3回洗浄し乾いたろ紙で水を切ったのち、生重200 mgを秤量し分析に用いた。分析試料の作製並びに糖及びアミノ酸の分析方法は、V-A-1のナシの場合と同様である。

4) 含水量の測定 茎頂200 mgを70°Cで3日間乾燥したのち、生重及び乾重の差から含水量を測定し、含水率を算出した。

b. 結果及び考察

8月28日に採取した材料から糖類はほとんど検出されなかった(Table 16)。一方、前培養を行った茎頂のうちグルコース無添加の培地で前培養を行った茎頂からも、糖類はほとんど検出されなかったが、グルコース添加培地で前培養を行ったものからは高濃度のグルコースが検出された。したがって、前培養を行うことにより茎頂が培養基中のグルコースを吸収したものと判断された。また、前培養後の茎頂の糖含量は培養基中の糖濃度の影響を受け、グルコース1.0 M添加培地で前培養を行ったものの方が、0.6 M添加培地を用いた場合に比べ糖含量が高かった。この結果は11月下旬に行った追試験の結果からも裏付けられた(Table 17)。IV.で述べたようにアスパラガス若茎の小側枝茎頂を用い

Table 16. Changes in sugar contents of asparagus shoot apices precultured.^z

| Sugar | Shoot apex before preculture ^y | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) | | |
|----------|---|---|-------|-------|
| | | Shoot apex after preculture | | |
| | | Glucose concentration in preculture media (M) | | |
| | | 0 | 0.6 | 1.0 |
| Fructose | — ^x | — | 12.1 | 50.6 |
| Glucose | — | — | 212.6 | 428.5 |
| Sucrose | — | 1.3 | 95.6 | 41.1 |
| Total | — | 1.3 | 320.3 | 520.2 |

^z Preculture: 2 days.

^y Collected on 28th August.

^x Nondetected.

Table 17. Changes in sugar contents of asparagus shoot apices precultured.^z

| Sugar | Shoot apex before preculture ^x | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) ^y | | |
|----------|---|--|------------|------------|
| | | Shoot apex after preculture | | |
| | | Glucose concentration in preculture media (M) | | |
| | | 0 | 0.5 | 1.0 |
| Fructose | 3.7±3.7 | — ^w | 24.5±1.2 | 37.8±5.3 |
| Glucose | 5.0±0.8 | 5.4±5.4 | 178.2±7.7 | 424.7±5.4 |
| Sucrose | 17.7±2.4 | 6.5±1.1 | 153.5±1.8 | 242.3±2.4 |
| Total | 26.3±5.3 | 11.9±4.4 | 356.2±10.7 | 704.7±13.0 |

^z Preculture: 2 days.

^y Average ± SE.

^x Collected from spears on 27th November elongating on a crown which was dug up from field and grown in a greenhouse.

^w Nondetected.

て前培養を行う場合の培地のグルコースの適濃度は0.2~0.6 Mであるが、本実験の結果0.6 Mよりも1.0 M添加培地で前培養を行ったものの方が糖含量が高いことがわかった。したがって、糖含量そのものが茎頂の凍結耐性を担う一つの要因であるとすれば、茎頂の凍結生存性を高めるための至適糖含量があるものと考えられる。

また、高濃度のグルコースが検出された前培養後の茎頂では、前培養前にほとんど検出されなかったフラクトース及びスクロースも高濃度で検出されたことから、前培養により吸収された糖は植物組織内で他の糖に転化しているものと考えられる。

次に、前培養に伴う組織の浸透価を調査するた

め、11月の追試験と平行して含水率を測定した結果がTable 18である。前培養前の茎頂の含水率85.8%に比べ、糖無添加の培地で前培養したものの含水率は89.6%に増加した。一方、グルコース0.5 Mまたは1.0 Mを添加した培養基で前培養した材料の含水率は各々74.3%及び72.8%となり、前培養前の材料に比べると10%近く減少した。この含水率の結果とTable 17に示した糖含量の総量から組織の浸透価を推定し、前培養に伴う浸透価の変動を調査した結果(Table 19)、前培養後の組織の推定浸透価の上昇は、前培養培養基中のグルコース濃度の上昇とはほぼ平行関係にあることが明らかになった。

さらに、前培養に伴うアミノ酸含量の変動について調査した結果がTable 20である。この場合、個々のアミノ酸について一定の傾向は認められなかったので全アミノ酸含量で各区を比較したところ、前培養前の茎頂に比べグルコース無添加の培養基で前培養した茎頂のアミノ酸含量は著しく低下していた。一方、グルコースを添加した培養基で前培養した茎頂では、アミノ酸含量の低下割合が小さかった。この理由として、グルコース添加の系ではグルコースを代謝してアミノ酸の合成を行っているため、細胞で消費されるアミノ酸を補充できるが、グルコース無添加の系ではエネルギー源のグルコースがないためにアミノ酸を合成することができず、細胞内のアミノ酸は代謝されるために顕著な減少がおきるものと考えられる。

以上のことから、前培養がアスパラガス茎頂組織の凍結生存性を高める要因は、培養基と組織の浸透価の差を補うために組織の脱水及び糖の吸収が同時平行的に進行し、結果的に組織内の浸透価が高まる

Table 18. Changes in water contents of asparagus shoot apices precultured.^z

| Glucose concentration in preculture media (M) | Water of shoot apices (%) ^y |
|---|--|
| 0 | 89.6 ± 0.4 |
| 0.5 | 74.3 ± 0.4 |
| 1.0 | 72.8 ± 1.0 |
| Nonprecultured ^x | 85.8 ± 1.8 |

^z Preculture: 2 days.

^y Average ± SE.

^x Shoot apices are analyzed prior to preculture. Collected on 25th November (see Table 17).

ことにあるのではないかと考えられる。また、前培養培養基中に添加するグルコースに至適濃度(0.4 M)が認められた理由として、組織が凍結生存性を獲得する上で、至適浸透価が存在することが考えら

Table 19. Changes in osmotic values estimated by water and sugar contents of cells of asparagus shoot apices precultured.^z

| Glucose concentration in preculture media (M) | Osmotic value of shoot apex cells (M) ^y |
|---|--|
| 0 | 0.013 |
| 0.5 | 0.479 |
| 1.0 | 0.995 |
| Nonprecultured ^x | 0.031 |

^z Preculture: 2 days.

^y Estimated by the equation of total sugar ($\mu\text{mol/g fw}$)/water (%) $\times 10^{-1}$.

^x Shoot apices are analyzed prior to preculture.

Table 20. Changes in amino acid contents of asparagus shoot apices precultured.^z

| Amino acid | Amino acid contents (n mol/g fw) | | | |
|-----------------|---|---|--------|--------|
| | Shoot apex before preculture ^y | Shoot apex after preculture | | |
| | | Glucose concentration in preculture media (M) | | |
| | | 0 | 0.6 | 1.0 |
| Asp | 2,364 | 126 | 677 | 302 |
| Thr | 3,997 | 617 | 3,953 | 2,195 |
| Ser | 4,829 | 390 | 2,229 | 2,455 |
| Glu | 10,956 | 286 | 4,051 | 2,411 |
| Gly | 656 | 140 | 505 | 516 |
| Ala | 8,184 | 175 | 6,969 | 5,947 |
| Cys/2 | 710 | 120 | 565 | 612 |
| Val | 4,049 | 322 | 1,797 | 1,431 |
| Met | 144 | 19 | 84 | 65 |
| Ile | 508 | 119 | 338 | 360 |
| Leu | 931 | 131 | 601 | 594 |
| Tyr | 357 | 34 | 227 | 307 |
| Phe | 939 | 49 | 287 | 393 |
| Lys | 897 | 431 | 691 | 652 |
| His | 598 | 32 | 168 | 170 |
| Arg | 938 | 360 | 401 | 622 |
| Pro | 5,803 | 58 | 5,000 | 4,943 |
| Total | 46,860 | 3,409 | 28,543 | 23,975 |
| NH ₃ | 1,589 | 1,594 | 2,297 | 2,715 |

^z Preculture: 2 days.

^y Collected on 2nd September.

れる。すなわち、これよりも高い浸透価を組織が有した場合、極度の脱水または高濃度の糖による代謝異常を引き起こし、組織の凍結生存性が低下するのではないかと考えられる。また、DEREUDREら⁷⁾は、ナン培養体シュート節部切片の凍結保存における前培養について検討し、0.75 Mのスクロース添加培地が前培養に最も適していたことを報告しているが、この凍結生存性に関する至適浸透価は植物材料の違いにより若干異なるものと考えられる。

2. ハスカップ培養体節部切片の前培養における内生成分の変動

a. 材料及び方法

1) 材料の調製 II-Dで用いたものと同じハスカップの培養体シュート（継代後約2か月を経過したもの）から節部切片（長さ約5 mm, 2節を有する）を切り出して用いた。

2) 前培養 前培養はIV-B-1の結果を参考にしてMS培地の濃度を $\frac{1}{2}$ に減じた基本培地に、スクロース0.4 M及びDMSO 5%を添加したのち、寒天7 g/lを添加した培養基を用い（pH未調整）、25°C, 1日16時間照明（白色蛍光灯, 約4,000 lx）の条件下で2日間行った。

3) 遊離糖の分析 切り出した節部切片200 mgを分析材料とした。なお、前培養を行ったものについては、培養基から取り出したものの表面を蒸留水で2, 3回洗浄し乾いたろ紙で表面の水を吸い取ったのち、生重200 mgを秤量し分析に用いた。分析試料の作製並びに糖分析の方法は、V-A-1のナンの場合と同様である。

4) 含水量の測定 切片200 mgを70°Cで3日間乾燥したのち、生重及び乾重の差から含水量を測定し、含水率を算出した。

b. 結果及び考察

前培養に伴う糖含量の変動をTable 21に示した。前培養前の切片に比べ、前培養を行った切片からは高濃度のスクロースが検出された。したがって、ハスカップ培養体の茎組織も前培養を行うことにより培養基中の糖を吸収したのと考えられる。また、IV.においても前培養培養基中の添加物質の効果については、DMSOよりはむしろスクロースが組織の凍結生存性を高める要因になっていたものと考えられる。さらに、前培養に伴う含水率の変動を調べた結果、前培養前の組織では含水率72.2%であ

Table 21. Changes in sugar contents of blueberried honeysuckle modal segments precultured.

| Sugar | Sugar contents ($\mu\text{mol/g fw}$) | |
|----------|---|---------|
| | Preculture ² | |
| | Nontreated | Treated |
| Fructose | 16.9 | 22.4 |
| Glucose | 21.8 | 22.8 |
| Sucrose | 36.3 | 169.1 |
| Total | 75.0 | 214.3 |

² Preculture media contains half strength of MS salts, 5% DMSO, 0.4 M sucrose and 7 g/l agar. Cultured at 25°C, 16 hour illumination/day (approximately 4,000 lx) for 2 days.

たが、前培養後の組織の含水率は69.5%に低下した。したがって、推定される浸透価は前培養前で0.10 Mであり前培養後では0.31 Mとなり、前培養に伴って組織中の浸透価が高くなることが明らかになった。

VI. 植物組織の凍結生存性と凍結・融解後の生存状態

凍結・融解後の組織から効率的な植物体再生を促す条件を明らかにするためには、凍結・融解後の組織の生存状態を確認する必要がある。VI.では、野外及び*in vitro*で養成した植物組織の凍結前後の構造を観察し、組織構造の違いと凍結生存性との関連について検討した。

A. 野外から採取した茎頂組織の構造の季節的差異

III.において、リンゴ及びナン茎頂の耐凍性は季節により著しく変動し、野外から採取した茎頂を凍結保存の材料として用いる場合には、耐凍性が高い冬のものほど凍結生存性が高いことを明らかにした。VI-Aでは、耐凍性の季節的変動による組織の凍結生存性の差異が、いかなる組織学的変化に起因するのかについて明らかにするため、夏季及び冬季に採取したナン茎頂の組織構造を比較した。

a. 材料及び方法

西洋ナン‘フレミッシュ・ビューティ’の休眠枝または発育枝を1989年12月10日及び1990年5月9日に採取し、腋芽または頂芽から茎頂（横径約1 mm, 葉原基4個程度を有するもの）を切り出して

用いた。12月10日に採取した材料は、2.5%グルタールアルデヒド・0.1 M リン酸バッファーで2日間前固定したのち、1%オスミウム酸・0.1 M リン酸バッファーで2時間後固定し、エタノールシリーズ及びプロピレンオキシドを用いて脱水後スパー樹脂に包埋した。また、5月9日の材料については3.7%ホルマリン・1%グルタールアルデヒド・0.1 M リン酸バッファーの固定液中に約2か月間保存したのち、前述と同様の手順で後固定、脱水及び樹脂包埋を行った。切削はウルトラミクロトーム(Reichert-Nisse社製, Ultracut-N)を用いてガラスナイフにより行い、超薄切片(厚さ50~70 nm)を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(日立H-800)で観察した⁶⁹⁾

b. 結果及び考察

ナン茎頂の組織構造の季節的差異をFig. 37に、頂端分裂組織を形成している細胞の拡大図をFig. 38に示した。夏季(5月)の茎頂では、組織内の細

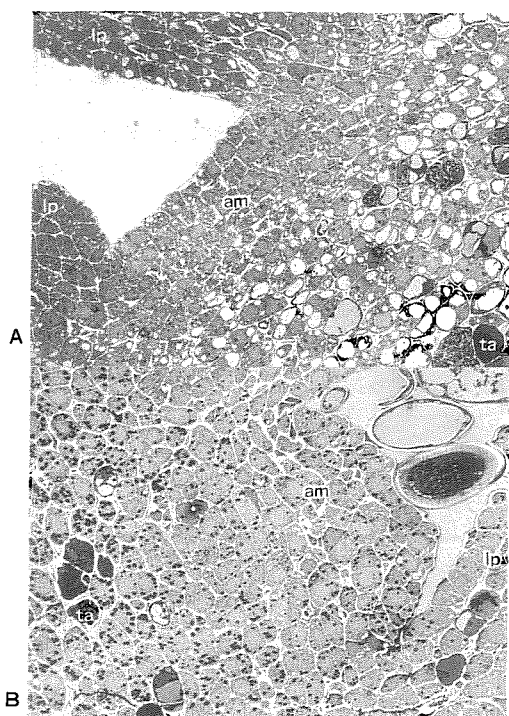


Fig. 37. Transmission electron micrographs of a pear ('Flemish Beauty') leaf bud apex. Plant materials were collected on 9th May, 1991(A) and 10th December, 1990 (B), respectively. lp, leaf primordium; am, apical meristem; ta, tannin cell.

胞の大きさにばらつきがみられた。すなわち、頂端分裂組織の表層から5~6層を構成している細胞は、ほかの細胞に比べて小さく緻密であったのに対し、これより下層の細胞では液胞が発達し、細胞が生長過程にあるものと考えられた。また、葉原基を構成する細胞も縦に長く、液胞が発達しているところから、同じく生長過程にある細胞と考えられる。

一方、冬季(12月)の茎頂では細胞間の大きさのばらつきが小さく、頂端分裂組織の表層部と内部でほとんど差は認められなかった。頂端分裂組織を構成する細胞の大きさは、夏のそれに比べわずかながら大きかった。また、液胞が小胞化しており、細胞質中のprotein-lipid body (PLB, タンパク質及び脂肪を含む顆粒)^{1,54,56)}の蓄積が夏の細胞に比べ多かった。なお、PLBが冬の細胞で濃く夏の細胞で薄く染色される理由は、固定方法の違いによることも考えられるが、SAGISAKAら⁵⁶⁾が指摘するように、季節によりPLBの成分が変化するためではな

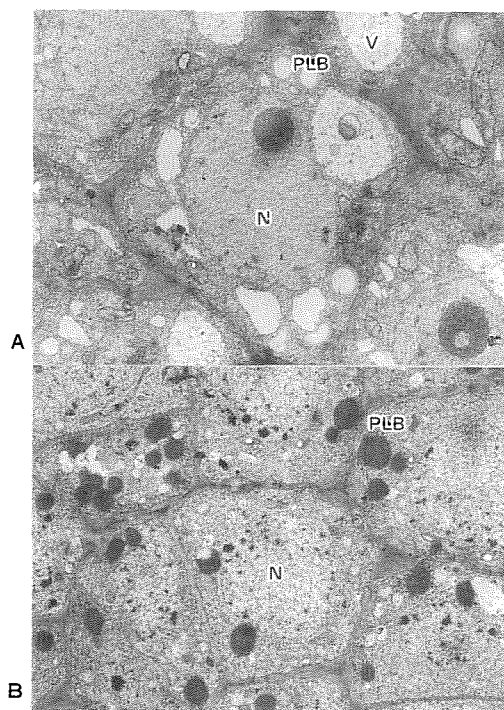


Fig. 38. Transmission electron micrographs of apical meristematic cells of a pear leaf bud apex. For the cultivar and sampling dates, see Fig. 37. PLB, protein-lipid body; N, nuclear; V, vacuole.

いかと考えられる。頂端分裂組織表層部の緻密な細胞同士を比較しても、冬の細胞は夏の細胞に比べ液胞が小さく、PLBを多く含むことが観察された (Fig. 38)。

V.で述べたように‘フレミッシュ・ビューティ’茎頂の含水率は、夏から冬にかけて70%から50%へ減少しているが、これは組織学的にみると液胞の小胞化に伴うものであると考えられる。したがって、冬季の茎頂では組織内の含水量が少なく、これが冬季の茎頂の耐凍性が高い要因の1つではないかと考えられる。

B. 野外から採取した茎頂の液体窒素凍結・融解・培養後の組織の生存状態

凍結保存技術を実用化するためには、凍結・融解後の組織から変異のない植物体を効率的に再生させることが重要である。しかし、II.でも述べたように凍結・融解後の植物体再生率は必ずしも高いわけではなく、その率は植物種あるいは組織の違いなど凍結に用いる植物材料の性質によりまちまちである。したがって、植物体再生率の高低が生ずる原因を明らかにすることが、凍結保存技術の普遍化をはかる上できわめて重要であると考えられる。II.で述べたように、冬季に野外から採取したリンゴまたはナシ茎頂をしかるべき手順により液体窒素中で凍結し融解・培養を行った場合、生存率は極めて高いが植物体再生率は低いことを明らかにした。VI-Bでは、この原因を探るため凍結・融解・培養後のリンゴ茎頂を顕微鏡を用いて観察し、組織の生存の状態を明らかにしようとした。

a. 材料及び方法

北海道大学農学部附属農場に栽植してある18年生リンゴ‘スパータン’の休眠枝腋生葉芽から、1990年2月24日に茎頂(横径約1mm、葉原基4個程度を有するもの)を無菌的に取り出し、II-A-1と同様の方法により液体窒素凍結、融解及び培養を行った。すなわち、1ml容ストロー精液管に満たした凍結媒液(蒸留水にDMSO 8%(V/V)及びスクロース 30 g/lを添加したもの)中に材料を2時間浸漬し、プログラムフリーザーを用いて0.5°C/minの冷却速度で-40°Cまで予備凍結したのち、液体窒素中に1時間浸漬した。融解は、38°Cの温水中に浸漬する急速融解とした。培養は、MS培地にBA 1 mg/l、スクロース 30 g/l及び寒天 7 g/lを添加し

た培養基(pH 5.7)を用い、25°C、1日16時間照明(白色蛍光灯、約4,000 lx)の条件下で5日間行った。この材料を3.7%ホルマリン・1%グルタルアルデヒド・0.1 Mリン酸バッファー中で約2か月間固定したのち、1%オスミウム酸・0.1 Mリン酸バッファーで2時間後固定し、エタノールシリーズ及びプロピレンオキシドを用いて脱水し、スーパー樹脂に包埋した。切削は、VI-Aと同様の方法で行い、準超薄切片(厚さ200~300 nm)を0.4%トルイジンブルー・ホウ砂1%溶液で染色して光学顕微鏡で観察した。さらに、同じ試料の頂端分裂組織近傍にメッサ型トリミングを施したのち、超薄切片(厚さ50~70 nm)を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(日立H-800)で観察した。

b. 結果及び考察

液体窒素凍結・融解・培養後の茎頂組織の光学顕微鏡及び電子顕微鏡による観察像を、Fig. 39及び

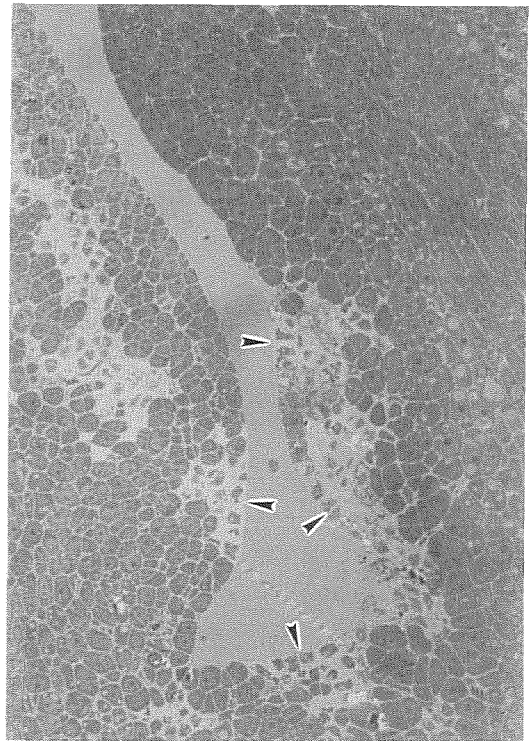


Fig. 39. Light micrograph of an apple ('spartan') leaf bud apex collected in winter, frozen in liquid N₂, thawed and cultured for 5 days. Arrow heads indicate the dead tissues caused by intracellular freezing.

Fig. 40 に示した。Fig. 39 及び Fig. 40 で、濃く染色されている生存組織の中に、矢印で示したような凍死した細胞群を観察することができた。すなわち、凍死細胞は、葉原基の表層部、内部または頂端分裂組織の表層部などに集中的に存在し、細胞内凍結が組織中で部分的に生じていたことを裏付けていた。凍死細胞と生存細胞を比較すると、生存細胞の細胞質が濃く染色されているのに対し、凍死細胞の細胞質はいずれも原形質分離を起こしたような状態で細胞壁から分離し、収縮して細胞中央部に存在していた (Fig. 41)。これは、大塚と酒井⁴⁶⁾が報告しているように、凍結の過程で細胞内部に大きな氷晶が多数形成され、細胞質のオルガネラが物理的に破壊されたことによるものと考えられる。HASKINS and KARTHA¹⁶⁾も、エンドウ茎頂の凍結・融解後の組織を観察し、本実験と同様に生存細胞及び凍死細胞が組織中にまとまって分布していることを観察し

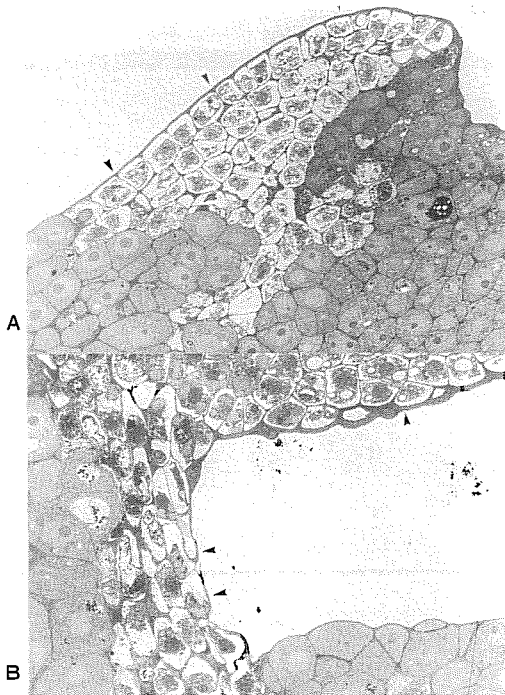


Fig. 40. Transmission electron micrographs of an apple leaf bud apex collected in winter, frozen in liquid N₂. Cultured for 5 days after thawing. A, a part of a leaf primordium; B, apical meristem. Arrow heads indicate the dead tissues caused by intracellular freezing.

ている。したがって、液体窒素凍結・融解後の茎頂組織におけるこの細胞の生存状態は普遍性がある現象と考えられ、ある細胞に細胞内凍結が生じると、周囲の細胞の細胞質でも氷晶生成が連続的に促されるものと考えられる。また、いくつかの試料について観察した結果、頂端分裂組織が細胞内凍結を起こして死滅している場合が多く、これが II. に示したような、茎頂の生存率が高くても植物体再生率が低い原因の一つになっているものと考えられる。

さらに、生存細胞の細胞質中にはミトコンドリア⁵⁹⁾やプラスチドなどの多数のオルガネラが観察され、粗面小胞体も発達していたことは、生存細胞中ではその後の生長に向け活発に代謝系が働いていることを示すものであると考えられる (Fig. 42 及び Fig. 43)。

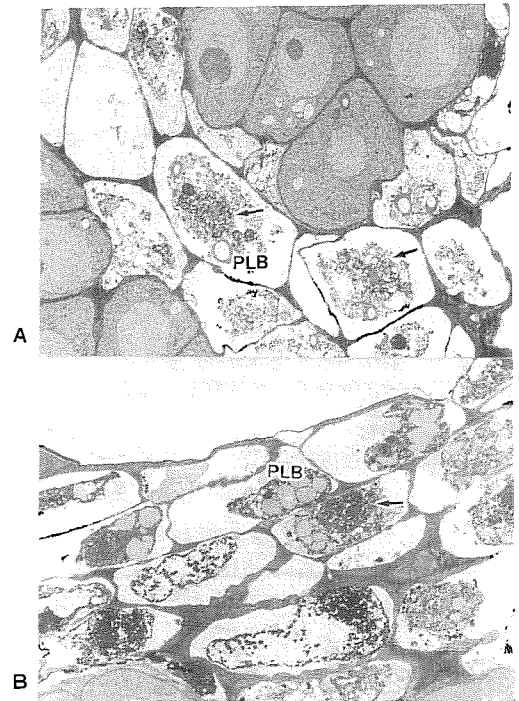


Fig. 41. Transmission electron micrographs of an apple leaf bud apex collected in winter, frozen in liquid N₂ (zoomed Fig. 40). Cultured for 5 days after thawing. A, a part of a leaf primordium; B, apical meristem; PLB, protein-lipid body. Arrows indicate the remains of broken nucleus caused by intracellular freezing.

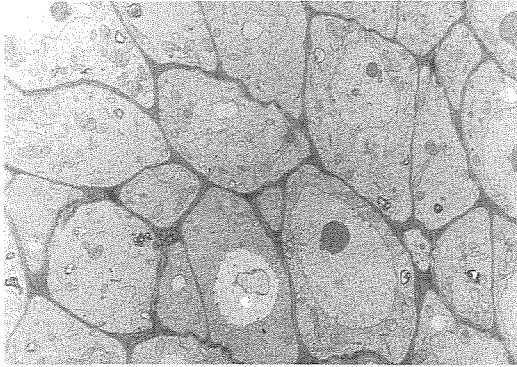


Fig. 42. Transmission electron micrograph of survived cells of an apple leaf primordium frozen in liquid N₂. A fair number of organelles could be seen in the cells.

C. 培養組織の凍結生存性と凍結・融解後の生存状態

II. においてアスパラガス培養体シュートを液体窒素中で凍結し融解後に高率で生存及び再生個体を得たが、この場合生存するのは節部の細胞・組織で、節間部の細胞・組織は凍死することを明らかにした。VI-C では、凍結前後の節部組織・細胞を観察し、凍結後の組織の生存状態並びに組織間における凍結生存性の差異について明らかにしようとした。

a. 材料及び方法

II-F と同様のアスパラガス‘メリーワシントン 500 W’の培養体シュートから長さ約5 mmの節部切片(1節をもつ)を切り出し、12% DMSO 及び0.2 M グルコースを含む凍結媒液中に2時間浸漬したのち、プログラムフリーザーを用い、0.5°C/min で-40°Cまで冷却した(途中-7°Cで植水)。その後直ちに液体窒素中に入れ1時間浸漬した。融解は温水(38°C)中に浸漬する急速融解とし、融解した材料は植物体再生用培養基(MS培地の窒素源濃度を1/2に減じた培地を基本とし、スクロース30 g/l, NAA 0.1 mg/l 及びカイネチン0.1 mg/l を添加しpH 5.8に調整したのち、寒天7 g/l を添加したものに)に置床し、25°C, 1日16時間照明(白色蛍光灯, 約4,000 lx)の条件下で培養した。培養5日目に、節部組織片(長さ約1 mm)を切り出し観察試料とした。試料は、2.5%グルタルアルデヒド・0.1 M リン酸バッファーで2日間前固定したのち、1%オスミウム酸・0.1 M リン酸バッファーで2時間後固定

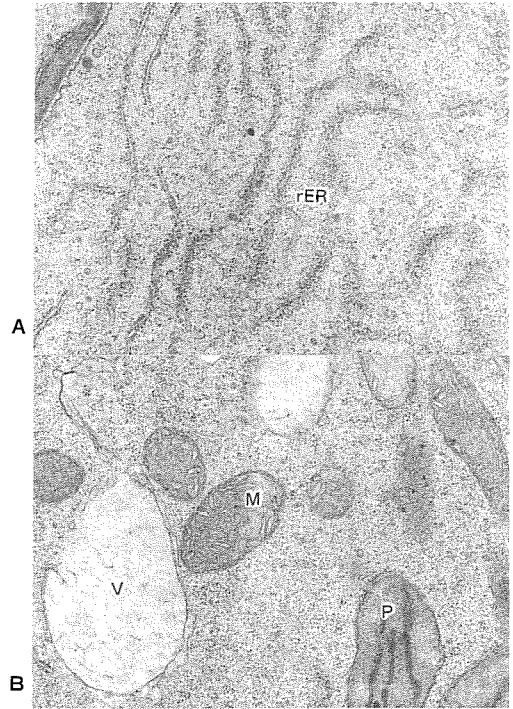


Fig. 43. Transmission electron micrographs of cytoplasm of an apple leaf primordium cell survived after freezing in liquid N₂. rER, rough surface endoplasmic reticulum; M, mitochondrion; P, plastid; V, vacuole.

し、エタノールシリーズ及びプロピレンオキシドを用いて脱水後スパー樹脂に包埋した。切削は、VI-A のナシの場合と同様の方法で行い、準超薄切片(厚さ200~300 nm)をParagon染色液(Paragon C & C社製)で染色して光学顕微鏡で観察した。さらに、同じ試料の頂端分裂組織近傍にメッサ型トリミングを施したのち、超薄切片(厚さ50~70 nm)を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(日立H-800)で観察した。

b. 結果及び考察

Fig. 44 に示すように観察した節部組織片には、りん片葉の内側に腋芽を形成しているもの。擬葉を形成しているもの及び擬葉と腋芽を形成しているものの3種類が認められた。腋芽の生長点部組織(ドーム状組織)の細胞は、茎、擬葉及びりん片葉の細胞に比べると特に小さく、球状で緻密になっており、液胞はあるが分裂し小胞となっていた(Fig. 45)。核の大きさは他の細胞のものとほぼ同じであ

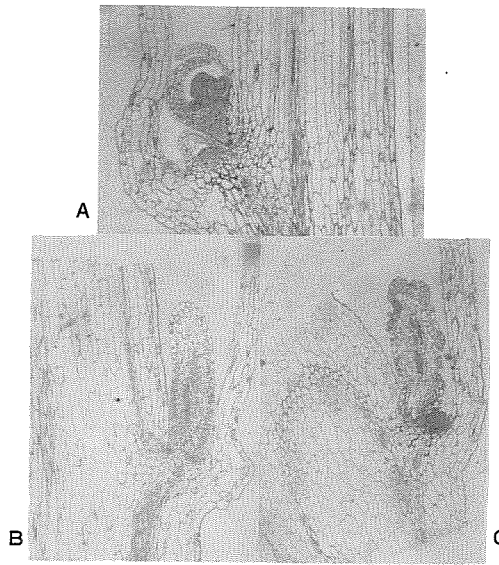


Fig. 44. Structure of a nodal tissue of an asparagus shoot obtained through *in vitro* culture. A, axillary bud; B, cladophyll; C, axillary bud and cladophyll.

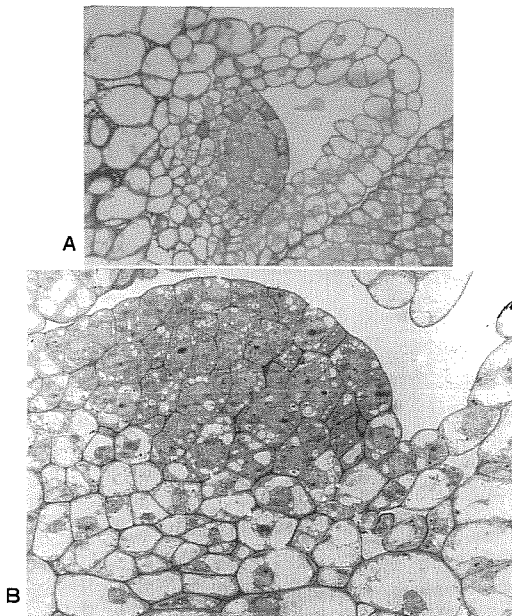


Fig. 45. Structure of an axillary bud of an asparagus shoot obtained through *in vitro* culture. A, light micrograph; B, transmission electron micrograph.

り、葉緑体はそれほど発達しておらず、プロプラスチドが観察された (Fig. 46)。一方、りん片葉及び茎の細胞はいずれも大きく、液胞が著しく発達し、葉緑体やミトコンドリア等のオルガネラは液胞の周囲にわずかに点在していた。また、擬葉の細胞は、ドーム状組織の細胞より大きいがりん片葉及び茎の細胞よりはるかに小さい、緻密な細胞で構成されており、細胞質に葉緑体が発達しその内部には多数のデンプンが観察された (Fig. 47)。

次に、液体窒素中で凍結したのを融解して培養した組織をみると、生存細胞は、細胞質が濃く染色され、凍死した細胞と明確に区別することができた (Fig. 48~50)。腋芽のドーム状組織、並びに擬葉をもっている材料については擬葉の表層部及び中心部の緻密な細胞が生存していることがわかった。生存細胞の細胞質中にはリンゴの場合と同様に多数のオルガネラが観察され、活発に物質代謝を行ってい

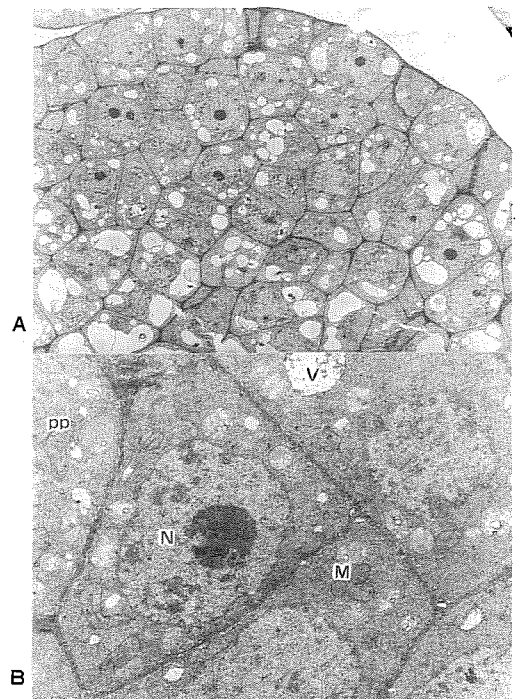


Fig. 46. Transmission electron micrographs of the dome of an asparagus axillary bud excised from *in vitro*-grown shoot. A, longitudinal section of a dome-shaped apical meristem; B, zoomed; M, mitochondrion; N, nuclear; pp, proplastid; V, vacuole.

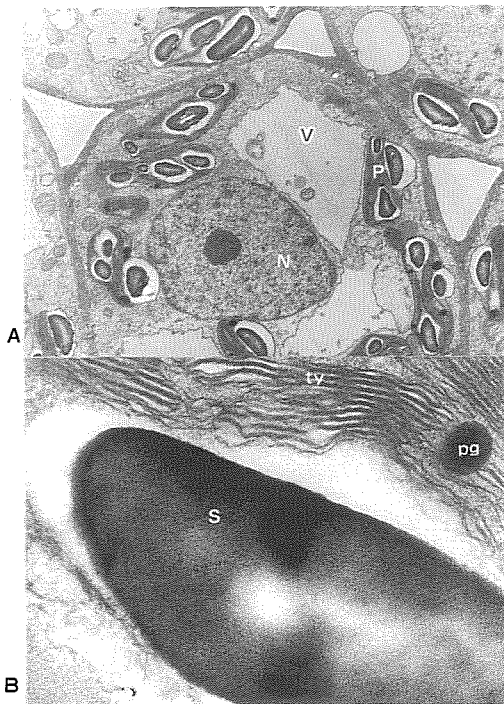


Fig. 47. Transmission electron micrographs of an asparagus cladophyll cell formed at a node of *in vitro*-grown shoot. A, structure of cladophyll cell; B, zoomed figure of a plastid; N, nuclear; P, plastid; pg, plastoglobuli; S, starch; ty, thylakoid; V, vacuole.

る細胞であることを裏付けていた(Fig. 51)。また、凍死した細胞は、リンゴの場合と同様に細胞質が収縮した痕跡を残しており、葉緑体ではチラコイド膜構造が破壊されていた(Fig. 52)。

以上のことから、アスパラガス培養体シュート組織には凍結耐性の差が認められ、未成熟のドーム状組織及び擬葉組織の凍結生存性が高く、りん片葉や茎を構成する比較的成熟した細胞の凍結生存性は低いものと考えられる。これには、細胞内の液胞の発達程度が関係しているものと考えられる。また、アスパラガスでは凍結・融解後において、生存個体当りの植物体再生率が高い(II-F-1)が、これは茎頂部のドーム状組織が完全に生き残るためであると考えられ、リンゴやナンなどと大きく異なる点であると考えられる。

VII. 総合考察

植物組織の凍結保存技術を確立するためには、ま

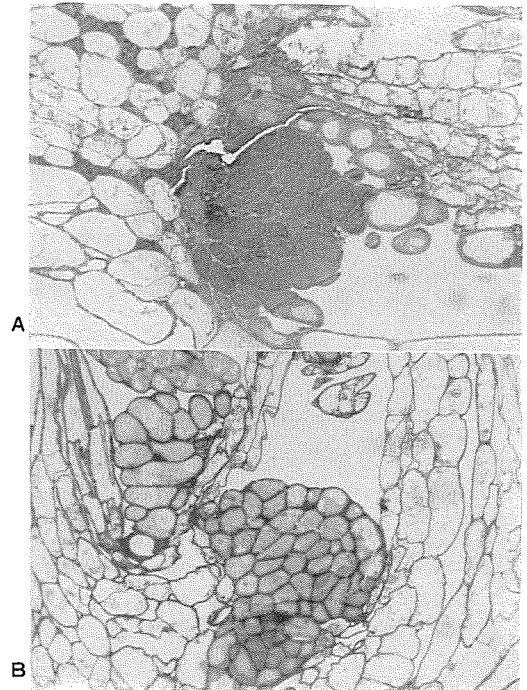


Fig. 48. Light micrographs of the dome-shaped apical meristem of an asparagus axillary bud frozen in liquid N_2 , thawed and cultured. Darkly- and non-stained cells were survived and died, respectively.

ず個々の材料について凍結・融解後の組織から植物体を再生させるための培養系を開発することが不可欠である。本研究で用いた6種の園芸作物については、いずれも野外から採取した茎頂の初代培養における植物体再生率は概して低く、培養体組織からの再生率は高いという特徴を有している。一方、II. 及び III. で明らかにしたように、冬季の野外の茎頂は高い耐凍性を有し凍結保存に適した材料であるのに比べ、培養体組織の耐凍性は著しく低い。したがって、凍結保存の材料を選択する場合には、個々の作物の培養及び凍結過程における感性性の違いを考慮する必要がある。

次に、II. で検討した凍結・融解の過程についてみると、QUATRANO⁴⁹⁾は植物培養細胞の凍結保存では、凍結媒液へのDMSOの添加が効果的であることを報告し、他にもDMSOの凍害防御効果に関する報告が多い(6,10,12,13,22,23,25,30,38,61,78,79)。本研究でも、予備凍結過程における凍結媒液中の濃度についてア

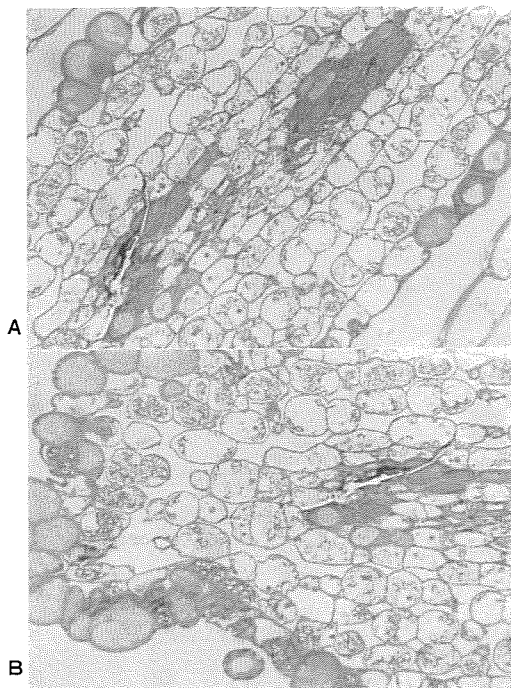


Fig. 49. Light micrographs of an asparagus cladophyll tissue frozen in liquid N_2 , thawed and cultured. Darkly- and non-stained cells were survived and died, respectively. A, central tissue; B, terminal tissue.

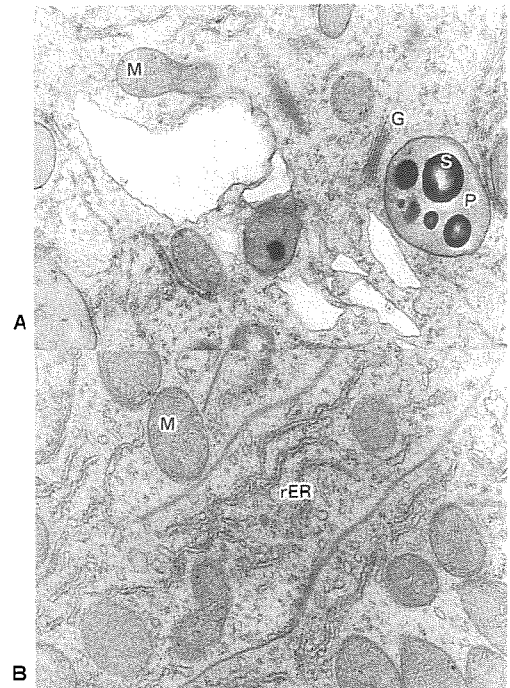


Fig. 51. Transmission electron micrographs of cytoplasm of an asparagus dome cell survived after freezing in liquid N_2 . rER, rough surface endoplasmic reticulum; G, Golgi body; M, mitochondrion; P, plastid; S, starch.

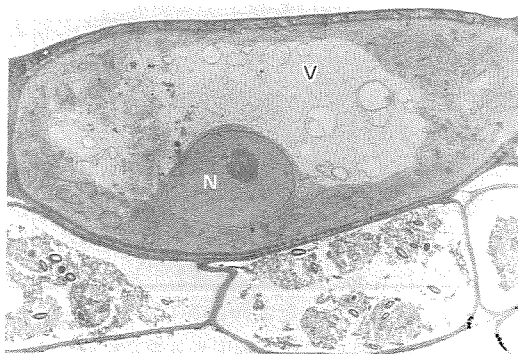


Fig. 50. Transmission electron micrograph of asparagus cladophyll cell (surface) survived after freezing in liquid N_2 . N, nuclear; V, vacuole.

スバラガス及びニンを用いて検討したが、適濃度はいずれも8~12%程度と考えられた。DMSOの凍害防御の作用機作は不明であるが、森川ら⁴⁰⁾は、DMSOは高い細胞内浸透性及び高い親水性を有す

るため、細胞内に浸透したDMSO分子が親水構造を保持する一方で、細胞水の構造を変化させ細胞構造を保護するものと推測している。本研究において、凍結媒液中の最適DMSO濃度が作物の種類にかかわらず10%前後の値を示したことや、DMSOを前培養培地に添加した場合には効果がみられず凍結媒液に加えた場合のみ効果が認められたことなどは、DMSOが氷晶の生成過程に与する物質であることを示すものであると考えられる。また、FINKLE and ULRICH¹⁰⁾は2種以上の凍害防御物質を組み合わせることで凍害防御効果が高まったと報告しているが、本研究においても、アスパラガスでは凍結媒液にDMSOとともにソルビトールを添加することが効果的であったことから、これも氷晶生成過程に関係のある現象であると推測される。

凍害防御物質と関連して、最近SAKAIら⁶⁵⁾は、DMSO、グリセリン及びエチレングリコールを混合した溶液中に浸漬した柑橘の珠心胚を、一定時間

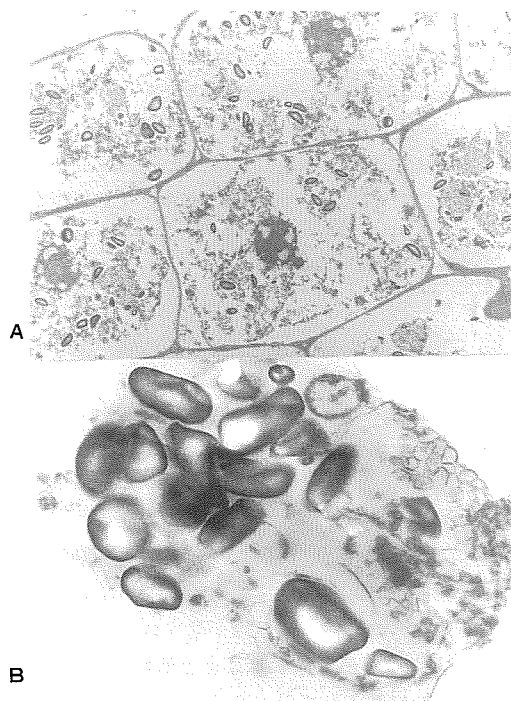


Fig. 52. Transmission electron micrographs of dead cells of an asparagus cladophyll frozen in liquid N_2 , thawed and cultured. A, whole cell; B, destroyed structures of plastid and starch.

経過後に直接液体窒素中に投入する方法（ガラス化法）により高率で再生個体を得ることに成功し、酒井と浦上^{64,81}はアスパラガス培養体シュート節節を用いて、また、新野ら⁴¹はナシ培養体シュートを用いて同様の結果を得ている。この方法は、凍害防御物質を組織中に浸透させるとともに組織の脱水を促進するので、薬害抵抗性の高い植物組織を用いる必要があるが、従来の予備凍結法と比べて方法論的に異なるので、今後検討すべき方法であると考えられる。また、凍結の方法についても、プログラムフリーザーを用いない簡便凍結法や超急速凍結法などいくつかの方法が考えられており、これらの方法についても検討が必要である^{8,66,67,68,78,83}。

次に、植物組織の凍結生存性に影響を及ぼすいくつかの要因について考察すると次のとおりである。凍結前処理の方法については、石原ら²¹片野ら²⁶及び KUO and LINEBERGER³¹がハードニングを行ったリンゴ培養体シュートの茎頂を液体窒素中で凍結し、融解後にシュートを形成させることに成功

している。ABA を添加した培養基を用いて前培養を行い、細胞・組織の凍結生存性を高めたことも報告されている^{5,26} DEREUDDRE ら⁷は、ナシ培養体シュートの茎頂を 0.75 M のスクロースを含む培地で前培養したのち、液体窒素凍結を行い融解後に生存個体を得ており、浦上ら⁸²は、*in vitro* のアスパラガスシュート節節切片を用いて前培養後に乾物重が増加したことを報告している。同様の報告は、クローバー茎頂⁹²及びリンゴ茎由来カルス⁴⁷についても行われている。本研究においても III. で茎頂の耐凍性が凍結生存性と密接に関係していることを明らかにし、IV. ではハードニング及び前培養などの凍結前処理が凍結生存性を高めることを明らかにした。

茎頂の耐凍性が冬季に高まることは多くの木本植物において観察されており^{18,42}その過程には複雑な代謝機構が関与しているといわれている⁶² 吉田⁹³は、ニセアカシアの皮層部組織中の物質変動を調査し、耐凍性の増大は糖含量及び浸透価の高まりによると報告している。低温馴化と糖類の変動については、RAESE ら⁵⁰及び WALLNER ら⁸⁴がそれぞれリンゴの枝及びナシ培養細胞について報告している。江澤⁹は、ブドウ茎頂の糖含量の季節的変動を調査し、冬季の茎頂の糖含量が夏季のそれに比べて増加していることを報告し、茎頂の耐凍性の大小と糖含量の高低を関連づけて考察している。本研究でもナシ及びハスカップ茎頂について同様の検討を行った結果、これらの報告と同様の傾向が認められた。すなわち、ナシではソルビトール、ハスカップではスクロースと糖の形態は異なっていたが、V. で述べたように糖含量の増加及び含水率の減少に伴う細胞の浸透価の高まりが、自然条件下における茎頂の耐凍性の増大を促す要因の一つとなっているものと考えられる。

糖濃度及び細胞の浸透価が組織の凍結生存性に影響を及ぼすことは、前培養によって凍結生存性が高くなったアスパラガス及びハスカップの組織において、糖含量が高まっていたことから裏付けられる。この場合、アスパラガスでは、前培養培地に添加する糖については至適濃度が存在し、前培養後の組織の浸透価は前培養培地のそれとほぼ一致していたことから、凍結生存性が高くなるための至適浸透価が存在するものと考えられる。浸透価が高すぎて生存率が低下する理由としては、極度の組織の脱水

または糖代謝の異常に伴う生理活性の低下などが考えられる。

V. ではさらに組織中の遊離アミノ酸組成と凍結生存性との関係についても検討したが、ナンヤハスカップの冬季の茎頂におけるアミノ酸含量の総量は、夏季の茎頂に比べて高く、これも冬季の茎頂の耐凍性を高めている要因の一つであると考えられる。SAGISAKA and ARAKI⁵³⁾ は、多年生植物の低温馴化に伴い組織中のプロリン及びアルギニン含量が高まることを報告し、PURVIS and YELENOSKY⁴⁸⁾ もグレープフルーツで同様の結果を得ており、WITHERS and KING⁸⁸⁾ はプロリンが優れた凍害防御物質であると報告している。本研究においても、凍結生存性の高いアスパラガス培養体シュート節部組織中のプロリン及びアルギニン含量が高いことが明らかになり、これらのアミノ酸と凍結生存性との関連性を示唆していると考えられるが、アミノ酸の代謝系は季節により複雑に変化していることや、植物の種類によって代謝経路に違いがあることなどから³⁶⁾凍結生存性とアミノ酸組成については今後さらに検討を加える必要があるものと考えられる。

次に、VI. で考察した凍結生存性と組織の構造との関連についてみると、冬季の茎頂では液胞の小胞化が多くみられ、細胞内の含水率は夏季から冬季にかけて減少したことを裏付けていた。細胞内の自由水が減少することは、細胞が凍害を受けにくくなることを意味しており、これも耐凍性増大の一因であると考えられることができる。

HASKINS and KARTHA¹⁶⁾ は、液体窒素凍結・融解後のエンドウ茎頂組織を顕微鏡で観察した結果、凍結・融解後の茎頂のドーム状組織が凍害を受けていたことを報告しており、GROUT and HENSHAW¹⁴⁾ はジャガイモで、FUKAI and OE¹¹⁾ はキクで同様のことを観察している。本研究において凍結・融解後のリンゴ茎頂を観察したところ、頂端分裂組織及び葉原基の一部に凍害が生じていたことが明らかになった。これは、HASKINS and KARTHA の観察結果と一致した。このことから、II. でリンゴ及びナン冬芽の茎頂を液体窒素凍結した場合に、融解・培養後の生存率は高いがロゼット状培養体形成率が低い傾向がみられたのは、八鍬と岡⁹⁰⁾も推測しているように、茎頂が凍害を受けて、植物体再生を行うのに十分な機能を失うことが原因

であると考えられる。一方、アスパラガス培養体シュート節部切片では、ドーム状組織がほぼ完全に生存することを観察した。これはアスパラガスの培養体シュート節部組織が凍結・融解後に極めて高い生存及び植物体再生率を示すことを裏付けるものであった。この場合、ドームがほぼ完全に生き残るのは、その組織が極めて緻密な細胞で構成され、しかも含水率が低く、浸透係が高いことが原因であると思われる。

従って、今後多くの作物について、液体窒素中で凍結し融解した茎頂からの植物体再生率を高めるには、ドーム状組織が生き残る条件を見つけ出すか、生存した葉原基等の組織・細胞から植物体を再生させる培養条件（たとえば TDZ を培地に添加する培養法など）を開発することが重要であるものと考えられる。また、稲葉²⁰⁾は、液体窒素凍結・融解後のアスパラガス若茎小側枝茎頂の組織を観察し、茎頂にはいくつものドーム状組織が含まれており、このうちのいくつかが生存することを観察しているが、凍結保存の材料としては、このような緻密な細胞で構成されているドーム状構造を数多く有する組織（アスパラガスの高密度多芽状集塊⁷¹⁾など）を用いることが望ましいと考えられる。

以上のように本研究では、園芸作物の品種・系統の保存・維持のための確実で効率の高い方法として、凍結生存性及び個体再生能のある植物組織の超低温凍結保存法に着目し、植物材料の耐凍性の変化、前処理による凍結生存性の向上、組織・細胞における形態的特徴及び内生成分の消長と凍結生存性、凍結・融解過程における諸条件と組織の生存並びに融解後の *in vitro* 培養による組織からの個体再生などについて明らかにするとともに、植物組織超低温凍結保存法を確立するための基礎を提起した。このことは将来における各種園芸作物及びその品種の保存・維持にとって極めて意義深く、裨益するところが大きいと考えられる。

VIII. 摘 要

園芸作物の品種、系統（遺伝資源）を長期間に亘って保存維持するための有効な方法として、植物組織の超低温凍結保存技術を確立するための基礎的研究を行った。内容の概要は以下のとおりである。

1. 液体窒素凍結・融解後における茎頂の生存と植物体再生

(1) 冬季に野外から採取したリンゴ、ナシ、オウトウ及びハスカップの茎頂から液体窒素凍結・融解・培養後に再生植物体を得ることに成功した。凍結媒液中に8~10%のDMSOを添加すると生存率が高まった。また、植物体再生率はハスカップで極めて高く、他の作物では低かった。

(2) 液体窒素凍結・融解後のリンゴ茎頂をThidi-azuron (TDZ)を加えた培養基を用いて培養することにより、植物体再生率を向上させることに成功した。

(3) 液体窒素凍結・融解後のナシ茎頂の生存率には品種間差が認められた。すなわち、'フレミッシュ・ビューティ'、'身不知'及び'長十郎'で高く、'パートレット'及び'ブランデーワイン'で低かった。

(4) アスパラガス培養体節部切片はDMSO 8~16%を含む凍結媒液を用いて予備凍結を行うことにより、液体窒素凍結・融解後に高い生存率(70~80%)を示したが、ハスカップ及びブルーベリーの培養体節部切片からは生存個体がほとんど得られなかった。

2. 茎頂の耐凍性と超低温凍結生存性

(1) 野外の茎頂の属性である'耐凍性'と人為的な前処理・凍結・融解操作に伴って茎頂が示す'凍結生存性'との間には、平行関係が認められた。

(2) リンゴ及びナシ茎頂の凍結生存性には、耐凍性の変動に伴う季節の変動が認められ、凍結生存性は夏季に低く冬季に高いことが実証された。リンゴはナシに比べ、凍結生存性の高い期間が長く、ナシ茎頂の凍結生存性の変動には品種間差のあることが明らかになった。

3. 凍結生存性の制御

(1) ブルーベリー及びハスカップ培養体シュートの凍結生存性は、ハードニング(0℃, 1~2週間)により高くなった。

(2) ハスカップ培養体節部切片の凍結生存性は、前培養(DMSO 5%, スクロース 0.4 Mを含む培地で2日間)により高くなった。

(3) アスパラガス小側枝茎頂の凍結生存性に及ぼす前培養においては、培地中の糖が組織の凍結生存性を高めること並びに至適糖濃度は、グルコースの場合0.4 Mであることが明らかになった。また、前培養培地中のDMSOは凍結生存性を低下させるので添加しないほうがよいことがわかった。

4. 凍結生存性の相違と内生成分

(1) ナシ及びハスカップ茎頂の内生成分の季節的変動を調べた結果、含水率は夏季に高いが冬季に低くなり、糖及び遊離アミノ酸含量は夏季に低く冬季に高いことが明らかになった。

(2) アスパラガス培養体シュートの節部組織及び節間部組織中の内生成分について調べた結果、糖及び遊離アミノ酸含量は凍結生存性の高い節部において高く、凍結生存性の低い節間部において低いこと並びに含水率は、僅かに節間部が高いことが実証された。

(3) アスパラガス若茎小側枝茎頂及びハスカップ培養体シュート節部切片を用いて、前培養に伴う組織内成分の変動を調査した結果、前培養後の組織は培地中の糖を吸収し組織・細胞内の水を排出していることが示唆された。

(4) 糖含量及び含水率から推定した前培養後のアスパラガス茎頂の浸透価が、前培養培養基に添加した糖濃度から推定した浸透価とほぼ一致したことから、前培養は植物組織内の浸透価を高めることにより組織の凍結生存性を高めているものと推測される。

5. 植物組織の構造と凍結生存性

(1) 夏季と冬季に採取したナシ茎頂の構造を比較すると、冬季の茎頂は夏季の茎頂に比べて液胞が小胞化し、PLB (protein-lipid body, タンパク質及び脂肪を含む顆粒)の蓄積が多く、緻密な構造を有していた。

(2) 液体窒素凍結・融解後のリンゴ茎頂を観察した結果、頂端分裂組織及び葉原基の一部に細胞内凍結により死滅した細胞集塊を見出すことができた。リンゴ茎頂の凍結・融解後の生存率が高い場合でも植物体再生率が低い理由は、凍結・融解過程で生じたこれら一部の細胞の死によって、茎頂が組織としての機能を失ったことによるものと推測される。

(3) アスパラガス培養体シュート節部組織は、凍結生存性が高いが、液体窒素凍結・融解後に生存するのは腋芽のドーム状組織及び擬葉の一部の細胞で、これらは緻密な細胞で構成されていた。特に、ドームを構成する細胞は小さく細胞質で満たされており、液胞は未発達であった。

本研究によって得られたこれらの結果及び知見は、多種に及ぶ園芸作物の品種・系統を保存維持する場合の効率と安全性の高い超低温凍結保存技術の

重要な基礎を提起するとともに、その実用化に裨益するところが大きいものと考えられる。

謝 辞

本論文は、平成4年1月に学位請求論文として取りまとめたものの一部である。

本研究を行うに当り、終始懇篤な御指導と御助言をいただき、本論文の取りまとめに当っては御校閲の労を賜った北海道大学農学部教授八畝利郎博士に対して深甚なる感謝の意を表す。また、懇篤な御指導と御校閲の労をとられた北海道大学農学部教授筒井澄博士、同低温科学研究所教授匂坂勝之助博士、同農学部助教授原田隆博士、並びに貴重な御助言をいただいた同農学部附属農場助教授今河茂博士に衷心より感謝申し上げる。

また、研究の遂行に際し、絶大なる御協力と御援助をいただいた北海道大学農学部及び同附属農場の各位、並びに果樹蔬菜園芸学講座卒業生諸氏に深い感謝の意を表す。

引用文献

- ASADA, M., Y. H. AHN and S. SAGISAKA: Changes in parenchyma cells of poplar xylem during transition from growing to wintering stages. *Plant Cell Physiol.* **29** (2): 243-246. 1986
- 芦屋直登, 田中隆登, 谷口研至, 宮川秀樹: *Haplopappus gracilis* (2n=4)の組織培養苗条原基の凍結保存に関する細胞遺伝学的研究. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. **10**: 208. 1987
- BANNIER, L. J. and P. L. STEPONKUS: Cold acclimation of chrysanthemum callus cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **101** (4): 409-412. 1976
- BUTENKO, R. G., A. S. POPOV, L. A. VOLKOVA, N. D. CHERNYAK and A. M. NOSOV: Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of *Dioscorea deltoidea* and *Panax ginseng* cells in liquid nitrogen. *Plant Sci. Lett.* **33**: 285-292. 1984
- CHEN, T. H. H. and L. V. GUSTA: Absciscic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant Physiol.* **73**: 71-75. 1983
- DEREUDRE, J., J. FABRE and C. BASSAGLIA: Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Reports.* **7**: 170-173. 1988
- DEREUDRE, J., C. SCOTTEZ, Y. ARNAUD et M. DURON: Effets d'un durcissement au froid des vitroplants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurre Hardy) sur la resistance des apex axillaires a une congelation dans l'azote liquide. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **310** (3): 265-272. 1990
- DEREUDRE, J., C. SCOTTEZ, Y. ARNAUD et M. DURON: Resistance d'apex caulinaires de vitroplants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurre Hardy), enrobés dans l'alginat, a une deshydratation puis a une congelation dans l'azote liquide: effet d'un durcissement préalable au froid. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **310** (3): 317-323. 1990
- 江澤辰広: ブドウ茎頂の凍結保存に関する基礎的研究. 昭和63年度北海道大学修士論文. 1989
- FINKLE, B. J. and J. M. ULRICH: Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. *Plant Physiol.* **63**: 598-604. 1979
- FUKAI, S. and M. OE: Morphological observation of chrysanthemum shoot tips cultured after cryoprotection and freezing. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **59** (2): 383-387. 1990
- GROUT, B. W. W. and G. G. HENSHAW: Freeze-preservation of potato shoot tip cultures. *Ann. Bot.* **42**: 1227-1229. 1978
- GROUT, B. W. W., R. J. WESTCOTT and G. G. HENSHAW: Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiology.* **15**: 478-483. 1978
- GROUT, B. W. W. and G. G. HENSHAW: Structural observations on the growth of potato shoot-tip after thawing from liquid nitrogen. *Ann. Bot.* **46**: 243-248. 1980
- HARADA, T., A. INABA, T. YAKUWA, and T. TAMURA: Freeze-preservation of apices isolated from small heads of brussels sprouts. *HortSci.* **20** (4): 678-680. 1985
- HASKINS, R. H. and K. K. KARTHA: Freeze preservation of pea meristems: cell survival. *Can. J. Bot.* **58** (8): 833-840. 1980
- 本間義之, 石川雅也, 杉山慶太, 大沢勝次: メロン体細胞不定胚および受精胚の超低温保存. 育学雑. **39** 別1: 14-15. 1989
- 今河茂, 三野義男, 加野田誠, 足立文義, 本堂

- 知彦, 田村 勉, 酒井 昭: 北海道における主要果樹の耐凍性. 北海道園芸研究談話会報. **12**: 44-45. 1979
19. 稲葉 彰, 原田 隆, 八嶽利郎: アスパラガス若茎小側枝茎頂の凍結保存. 園学要旨. 昭60春: 212-213. 1985
20. 稲葉 彰: メキャベツ及びアスパラガス組織の凍結保存. 昭和60年度北海道大学修士論文. 1986
21. 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
22. KARTHA, K. K., N. L. LEUNG and O. L. GAMBORY: Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. *Plant Sci. Lett.* **15**: 7-15. 1979
23. KARTHA, K. K., N. L. LEUNG and K. PAHL: Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **105** (4): 481-484. 1980
24. 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
25. KATANO, M. and A. ISHIHARA: Survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen. *HortSci.* **18**: 707-708. 1983
26. 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
27. KATANO, M.: Seasonal changes of freezing tolerance of apple shoot-tips. *Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ.* **5**: 1-5. 1986
28. 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. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. **10**: 210. 1987
29. 小林俊夫, 増田哲夫, 別所英男, 小森貞男, 土屋七郎: リンゴの細胞培養と個体の再生化に関する研究(第3報)葉外植片からの不定芽形成に及ぼす黄化処理の効果. 果樹試報 C. **16**: 15-21. 1989
30. KUMU, Y., T. HARADA and T. YAKUWA: Development of a whole plant from a shoot tip of *Asparagus officinalis* L. frozen down to -196°C . *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **61** (3): 285-294. 1983
31. KUO, C. and R. D. LINEBERGER: Survival of *in vitro* cultured tissue of 'Jonathan' apples exposed to -196°C . *HortSci.* **20**: 764-767. 1985
32. 黒田治之, 西山保直: リンゴ培養カサの液体窒素中での凍結保存. 北海道農試研報. **136**: 15-21. 1983
33. LATTA, R.: Preservation of suspension culture of plant cells by freezing. *Can. J. Bot.* **49**: 1253-1254. 1971
34. MARINO, G., P. ROSATI and F. SAGRATI: Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* **5**: 73-78. 1985
35. 増田哲男, 吉田義雄, 別所英男: リンゴの細胞培養と個体の細分化に関する研究(第1報)リンゴ葉外植片からの不定芽形成. 果樹試報 C. **14**: 1-10. 1987
36. MEZA-BASSO, L., M. ALBERDI, M. RAYNAL, M. FERRERO-CADINANOS and M. DELSENY: Changes in protein synthesis in rapeseed (*Brassica napus*) seedlings during a low temperature treatment. *Plant Physiol.* **82**: 733-738. 1986
37. MORIGUCHI, T., T. AKIHAMA and I. KOZAKI: Freeze-preservation of dormant pear shoot apices. *Japan. J. Breed.* **35**: 196-199. 1985
38. 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
39. 森口卓哉, 山木昭平, 小崎 格: ブドウ培養組織の *in vitro* での保存について. 園学要旨. 昭62秋: 88-89. 1987
40. 森川弘道, 深尾偉晴, 永嶋伸也, 鈴木栄一郎, 山田康之: 植物培養細胞凍結過程のNMR法による解析—不凍水量とコロニー形成率の関係. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. **9**: 51. 1985
41. 新野孝男, 酒井 昭, 八嶽春美, 野尻邦雄: リンゴ, ナシ等の培養茎頂のビトリフィケーション法による液体窒素保存. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. **12**: 217. 1991
42. 西山保直, 宮下揆一, 村上準市, 中島二三一, 橋昌司: 果樹の種類および品種と耐凍性ならびに耐凍性に関する諸要因について. 北海道農業試験場彙報. **100**: 20-28. 1972
43. 野口裕司, 山川 理, 望月龍也: 低温培養によるイチゴ植物体の長期保存. 園学雑. **60** 別2: 218-219. 1991
44. 岡 成美, 八嶽春美, 新野孝男: 液体窒素中で凍結したナシ冬芽からのシュート再生. 園学要旨. 昭63秋: 96-97. 1988
45. 岡 成美, 野尻邦雄, 新野孝男: 液体窒素中で凍結したブドウカサからの植物体再生. 園学雑. **58** 別2: 44-45. 1989
46. 大塚宏二, 酒井 昭: 急速冷却した植物細胞内のできる氷の電子顕微鏡的研究. 低温科学 生物篇.

- 25: 21-28. 1967
47. PIENIAZEK, J., T. HOLUBOWICZ, B. MACHNIK, and M. KASPRZYK: Apple stem callus frost tolerance and growth modification by adding sorbitol and some growth regulators to the medium. *Acta Hortic.* **81**: 91-95. 1978
48. PURVIS, A. C. and G. YELENOSKY: Sugar and proline accumulation in grapefruit flavedo and Leaves during cold hardening of young trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **107** (2): 222-226. 1982
49. QUATRANO, R. S.: Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethylsulfoxide. *Plant Physiol.* **43**: 2057-2061. 1968
50. RAESE, J. T., M. W. WILLIAMS and H. D. BILLINGSLEY: Cold hardiness, sorbitol, and sugar levels of apple shoots as influenced by controlled temperature and season. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **103** (6): 796-801. 1978
51. REED, B. M. and H. B. LAGERSTEDT: Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. *HortSci.* **22** (2): 302-303. 1987
52. REED, B. M.: Survival of *in vitro*-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortSci.* **25** (1): 111-113. 1990
53. SAGISAKA, S. and T. ARAKI: Amino acid pools in perennial plants at the wintering stage and at the beginning of growth. *Plant Cell Physiol.* **24** (3): 479-494. 1983
54. SAGISAKA, S. and M. ASADA: Cytochemical evidence for the occurrence in plants of a novel microbody that contains peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **27** (8): 1599-1602. 1986
55. SAGISAKA, S., M. ASADA and H. KURODA: Dormancy breaking is followed by mitochondria proliferation in poplar and apple trees in milieu of midwinter. *Plant Cell Physiol.* **30** (1): 79-84. 1989
56. SAGISAKA, S., M. ASADA and Y. H. AHN: Ultrastructure of poplar cortical cells during the transition from growing to wintering stages and vice versa. *Trees.* **4**: 120-127. 1990
57. SAKAI, A. and Y. SUGAWARA: Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* **14**: 1201-1204. 1973
58. 酒井 昭, 西山保直: リンゴの冬芽の液体窒素中での凍結保存. *園学雑.* **46** (2): 169-172. 1977
59. 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
60. SAKAI, A. and Y. NISHIYAMA: Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *HortSci.* **13** (3): 225-227. 1978
61. SAKAI, A., M. YAMAKAWA, D. SAKATA, T. HARADA and T. YAKUWA: Development of whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196°C . *Low Temp. Sci. Ser. B.* **36**: 31-38. 1979
62. 酒井 昭: 植物の耐凍性と寒冷適応—冬の生理・生態学—. 学会出版センター. p 127-154. 1982
63. 酒井 昭: 植物の茎頂の凍結保存の現状と問題点. 凍結保存—動物・植物・微生物—. 朝倉書店. p 200-206. 1987
64. 酒井 昭, 浦上敦子: Vitrification (ガラス化) 法によって培養細胞を液体窒素中で生存させる試み. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. **11**: 89. 1989
65. SAKAI, A., S. KOBAYASI and I. OIYAMA: Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports.* **9**: 30-33. 1990
66. 酒井 昭: 植物培養細胞・組織の液体窒素中での保存. 組織培養. **16** (13): 490-494. 1990
67. 酒井 昭, 小林省蔵, 浦上敦子: 植物培養細胞の2つの簡易液体窒素保存法. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. **12**: 216. 1991
68. 酒井 昭: 植物培養細胞, 組織, 胚の超低温保存に関する研究の現状と動向. 農業および園芸. **66** (11): 1223-1229. 1991
69. 酒井俊男: 超薄切片法と染色. *J. Clin. Electron Microscopy.* **21** (Suppl.), S 37-S 51. 1989
70. SEIBERT, M.: Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C . *Science.* **191**: 1178. 1976
71. SEIBERT, M. and P. J. WALTHAM: Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. *Plant Physiol.* **59**: 1043-1076. 1977
72. 鈴木 卓, 神田啓臣, 八鍬利郎, 今河 茂: 園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究(第7報)無菌培養によるブルーベリーのシュートの増殖と発根. 北大農邦文紀要. **16** (2): 221-229. 1988
73. 鈴木 卓, 中山晃延, 八鍬利郎, 今河 茂: リンゴ及びナンの茎頂培養における材料採取時期と茎頂生長との関係. 北大農農場研報. **27**: 79-84. 1991
74. 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ン茎頂の生存. 北大農邦文紀

- 要. 15 (2): 118-123. 1987
75. 鈴木 卓, 宮田英明, 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. 北大農邦文紀要. 16 (3): 295-300. 1989
76. 谷口研至, 船越秀史, 岩井雄次, 酒井 昭, 田中隆荘: ハプロパプス (*Haplopappus gracilis*) の苗条原基を用いた凍結保存. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. 11: 90. 1989
77. 長久 逸, 甲村浩之, 池田好伸: アスパラガス高密度多芽状集塊の誘導と植物体再生. 広島県立農業試験場報告. 54: 25-31. 1991
78. UEMURA, M. and A. SAKAI: Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Cell Physiol.* 21: 85-94. 1980
79. 上村松生, 酒井 昭: エンドウ生長点の液体窒素中における生存. 園学要旨. 昭56春: 206-207. 1981
80. 上松松生: 成長点の凍結保存法. 植物組織培養の技術. 朝倉書店. p154-159. 1983
81. 浦上敦子, 酒井昭, 佐藤 裕, 永井信: Vitrification (ガラス化) によるアスパラガス培養体の液体窒素中での生存. 園学雑. 58別2: 246-247. 1989
82. 浦上敦子, 佐藤 裕, 永井 信, 酒井 昭: アスパラガス培養シュート切片の乾燥処理による液体窒素中での生存. 北海道園芸研究談話会報. 24: 58-59. 1990
83. URAGAMI, A., A. SAKAI and M. NAGAI: Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports.* 9: 328-331. 1990
84. WALLNER, S. J., M. WU and S. J. ANDERSON-KRENGEL: Changes in extracellular polysaccharides during cold acclimation of cultured pear cells. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111 (5): 769-773. 1986
85. WATANABE, K., M. MITUDA and Y. YAMADA: Retention of metabolic and differentiation potentials of green *Lavandula vera* callus after freeze-preservation. *Plant Cell Physiol.* 24 (1): 119-122. 1983
86. 渡辺慎一, 鈴木 卓, 原田 隆, 八鍬利郎: アスパラガス培養体節部切片からの発根に及ぼす凍結処理の影響. 園学雑. 59別2: 342-343. 1990
87. WITHERS, L. A.: Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.* 63: 460-467. 1979
88. WITHERS, L. A. and P. J. KING: Proline: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 64: 675-678. 1979
89. 八鍬春美, 岡 成美: 組織培養による栄養繁殖性作物の遺伝資源保存(1). 農業および園芸. 62 (12): 1343-1347. 1987
90. 八鍬春美, 岡 成美: 組織培養による栄養繁殖性作物の遺伝資源保存(2). 農業および園芸. 63 (1): 17-22. 1988
91. 八鍬春美, 岡 成美: 液体窒素中で保存したクワ枝条の冬芽培養による個体再生. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. 10: 209. 1989
92. 山田敏彦, 酒井 昭, 松村哲夫, 樋口誠一郎: シロクロローバ茎頂組織における超低温保存法の開発. 植物組織培養シンポジウム講演要旨. 12: 218. 1991
93. 吉田静夫: 植物の低温障害 (冷害) の機構. 化学と生物. 28 (1): 2-3. 1990

Summary

Studies were carried out in order to obtain data for establishing a routine method of the super-low-temperature cryopreservation of tissues (to be used as genetic resources) of some horticultural crops, apple (*Malus pumila* MILL.), pear (*Pyrus communis* L., *P. pyrifolia* NAKAI var. *culta* NAKAI and *P. ussuriensis* MAXIM var. *sinensis* KIKUCHI), sweet cherry (*Prunus avium* L.), blueberried honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *emphyllocalyx* NAKAI), blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) and asparagus (*Asparagus officinalis* L.).

The results obtained are summarised as follows.

- Survival and plantlet regeneration of shoot apices after liquid-N₂ freezing and thawing
 - Apices excised from winter buds of apple, pear, sweet cherry and blueberried honeysuckle survived and regenerated plantlets after freezing (with a freezing solution containing 8~10% DMSO) in liquid N₂. Percentage of plantlet regeneration was high in blueberried honeysuckle, but low in the other plants.
 - The media supplemented with thidiazuron instead of BA increased the plantlet regeneration rate of apple leaf bud apices frozen in liquid N₂.
 - Varietal differences were recognized in the

survival rates of winter-excised pear leaf bud apices frozen in liquid N₂. The survival rates were high in 'Flemish Beauty', 'Mishirazu' and 'Chojuro', but low in 'Bartlett' and 'Brandy Wine'.

4) Asparagus nodal segments, obtained in subculture and frozen in liquid N₂ with freezing solution containing 8~16% DMSO, showed high rates (70~80%) of survival and shoot formation. In blueberried honeysuckle and blueberry, an application or no application of hardening showed a little or no survival, respectively.

2. Comparison of 'freezing resistance' and 'super-low-temperature freezing survivability' of shoot apices

1) Discrimination between the two concepts, 'freezing survivability (FS)' and the routinely used 'freezing resistance (FR)' is necessary, because the former includes artificial essentials (penetration of a synthesized cryoprotectant such as dimethyl sulfoxide, specialized cooling techniques, etc). In this study, seasonal changes of the super-low-temperature freezing survivability (SLT-FS) paralleled that of FR.

2) In apices of apple and pear, the SLT-FS varied with seasonal changes of the FR, and was low in summer and high in winter. The SLT-FS of apple apices was maintained at a high level for a much longer period than that of pear; varietal difference in SLT-FS evidently existed in pear shoot apices.

3. Artificial control of freezing resistance

1) In blueberry and blueberried honeysuckle FR of shoots obtained in subculture increased with a hardening at 0°C for 1-2 weeks.

2) In blueberried honeysuckle nodal segments FS became much higher when precultured on the media containing 5% DMSO and 0.4 M sucrose.

3) SLT-FS increased in asparagus shoot apices excised from spears and precultured on a medium with MS constituents and sugar; in the case of glucose, the optimal concentration was 0.4 M. DMSO addition to the medium was useless, because of decreasing the SLT-FS.

4. Water, sugar and free-amino acid contents in several horticultural plant tissues in relation to seasons, portions and artificial treatments

1) From summer to winter sugar and free-amino acid contents of pear and blueberried honeysuckle leaf bud apices increased with the increase of FR, but the water content decreased.

2) A comparison of the nodal tissue with an internodal tissue in asparagus shoots formed through tissue culture showed that sugar and free-amino acid contents were higher in the former, thus resulting in a high level of SLT-FS. Water contents were slightly lower in the former than in the latter.

3) Tissues of asparagus shoot apices and blueberried honey suckle nodal segments absorbed sugars added to the media and eliminated water for two days of preculture.

4) In asparagus shoot apices excised from spear, the osmotic value of cells after preculture approximately corresponded to an estimated osmotic value calculated according to sugar concentrations in media. This fact indicates that the osmotic value increase in the preculture raised the SLT-FS of the tissue.

5. Histological observations of frozen and / or unfrozen shoot apices excised from intact plants or *in vitro* cultures

1) In a microscopical observation of cells of pear leaf bud apices, a fair number of large vacuoles were seen in summer cells, but no vacuoles and many protein-lipid bodies in winter cells. Small, uniform cells compactly existed in the winter apices.

2) In apple shoot apices, frozen in liquid N₂ and thawed, a mass of cells killed from intracellular freezing was observed partially in apical meristem and leaf primordia. Consequently, in apple shoot apices frozen at a super low temperature, plantlet regeneration rates were frequently low even in the case of high survival rates, because the death mentioned above made the shoot apices lose its physiological function or structural organization.

3) A high SLT-FS of asparagus shoot apices derived from the cultures was mainly due to the high survivability of partial, specified cells in the apical meristem (*dome tissue*) of axillary buds or in the particular portion of cladophylls. It was noteworthy that those cells were small, filled with cytoplasm, and showed uncompleted vacuoles.

Results obtained in this study provide basic knowledges and facilitate the establishment of an efficient, reliable cryopreservation method of various clones and / or varieties of horticultural plants.