HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | クロミノウグイスカグラ栽培化の基礎としての低温遭遇に伴う樹体成分の変化ならびに耐凍性の変動に関する研究 |
| Author(s) | 今西, 弘幸 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(農学) |
| Dissertation Number | 甲第5170号 |
| Issue Date | 2000-03-24 |
| DOI | https://doi.org/10.11501/3168735 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/51656 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | 000000353927.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# クロミノウグイスカグラ栽培化の基礎としての低温遭遇に伴う樹体成分の変化ならびに耐凍性の変動に関する研究

農学専攻　博士後期課程

今西弘幸

# クロミノウグイスカグラ栽培化の基礎としての低温遭遇に伴う樹体成分の変化ならびに耐凍性の変動に関する研究

農学専攻　博士後期課程

今西　弘幸

# 目　次


緒　言　1

第１章　クロミノウグイスカグラの生育地域と耐凍性　4
　第１節　生育地域と耐凍性の変化　4
　第２節　凍結・融解後の枝組織に発生する凍害の組織学的観察　13
　第３節　組織間の耐凍性の差異　26
　第４節　第１章の考察　29

第２章　クロミノウグイスカグラ野外茎頂の耐凍性の変化　33
　第１節　野外茎頂の耐凍性の季節的変動　33
　第２節　TTC還元法によって評価した茎頂および茎の耐凍性の変化　39
　第３節　第２章の考察　47

第３章　クロミノウグイスカグラ野外茎頂における含水率および内生物質の変化　49
　第１節　野外茎頂における含水率の季節的変動　49
　第２節　野外茎頂における可溶性糖質の季節的変動　50
　第３節　野外茎頂における遊離アミノ酸の組成および含量の季節的変化　54
　第４節　第３章の考察　58

第４章　*In vitro* 実験系によるクロミノウグイスカグラ耐凍性の検証　63
　第１節　培養植物体およびカルスの低温馴化処理に伴う耐凍性の変化　63
　第２節　培養植物体およびカルスの脱馴化処理に伴う耐凍性の変化　78
　第３節　組織学的観察　94
　第４節　第４章の考察　96

第５章　クロミノウグイスカグラ培養植物体における内生物質の変動　99
　第１節　培養植物体およびカルスの低温馴化に伴う内生物質の組成および含量の変化　99
　　Ⅰ　可溶性糖質の組成および含量の変化　99

Ⅱ　遊離アミノ酸の組成および含量の変化　102
Ⅲ　タンパク質の組成の変化　106
第２節　培養植物体およびカルスの脱馴化に伴う内生物質の組成および含量の変化　112
Ⅰ　可溶性糖質の組成および含量の変化　116
Ⅱ　遊離アミノ酸の組成および含量の変化　118
Ⅲ　タンパク質の組成の変化　122
第３節　第５章の考察　122

第６章　総合考察　126

摘要　132

謝辞　140

引用文献　141

# 緒　言

近年、ブルーベリー（*Vaccinium spp.*）、ラズベリー（*Rubus spp.*）などの小果樹類の栽培が注目されており、特に、クロミノウグイスカグラ（*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*）は、日本においては北海道に自生している野生の小果樹として注目されてきている。クロミノウグイスカグラはスイカズラ科に属する潅木性木本植物で、千島、サハリン、カムチャツカ、東シベリア、中国東北部などに自生している。北海道内では勇払原野、根釧原野などの湿原および羊蹄山、大雪山、日高山脈などの高山帯に自生し、古くから食用とされてきた（佐藤，1985）。近年、この果実の加工品が特産品として人気を集め、栽培化が進みつつあり、栽培面積および生産量が増加した。現在では、北海道内において栽培されている小果樹の中で最大の面積を占めているが（農林水産省農産園芸局果樹花き課，1999）、品種改良はそれほど行われておらず、栽培品種として種苗登録されているのは‘ゆうふつ’（平４．１．16．第3033号）一品種のみであり（田中ら，1991）、優良系統の収集および保存ならびに新品種の育成が望まれている。

北海道のような寒冷地における果樹栽培では、冬季の低温が厳しく、果樹栽培地域においても－30℃前後の低温に遭遇することもしばしばあり、凍害が多発し、枝先端部、枝分岐部、主幹地際部などが凍害を被りやすく、特に、小果樹では枝の先端部が凍死して枯れる、いわゆる先枯れ現象が発生するなど、樹体に大きな損傷を与えるほか病害虫の侵入口となり、栽培・生産を妨げる大きな障壁となっている。したがって、低温に対する果樹の耐性を知ることは、凍害予防品種選択などの点で栽培上有益であるのみでなく、育種の面においても、耐寒性形質の導入など重要な役割を果たすものと考えられる。凍害を防止し、寒冷地における小果樹の栽培を進展させるためには、小果樹の耐凍性獲得機構について研究するこ

とが不可欠である。

可食性のスイカズラ（*Lonicera altaica, L. caerulea, L. kamschatica, L. stenantha* など）の収集および保存は、アメリカ合衆国農務省National Clonal Germplasm Repositoryで行われているものの、栽培特性や環境適応能に関する研究は行われていない。ロシア共和国では、可食性のスイカズラ（*L. altaica, L. edulis, L. pallasii, L. regeliana, L. turczaninowii*など）が新しい小果樹として注目され、研究されている（Plekhanova，1988；Plekhanova，1990）。日本においては、クロミノウグイスカグラの自生地、栽培特性および育種に関する報告はあるが（佐藤・梶，1984；佐藤，1985；田中ら，1994；田中，1996）、寒冷地におけるクロミノウグイスカグラの安定的生産および栽培地域を拡大する際の重要な条件となる耐凍性については、これまでに詳細な報告がみられないので、これらの点について検討する必要があると考えられる。

つぎに、植物の低温馴化とくに耐凍性の獲得過程についてみると、夏から冬にかけての気温の低下に感応して植物細胞内で多様な変化が起こっており、低温馴化・耐凍性獲得の現象を理解するためには、季節変化に伴う植物体内の物質代謝の変化や、それを制御している仕組みを知る必要があり、このような基礎的事象を把握することは、確実な果樹栽培技術を構築する上で特に重要であると考えられる。

まず、物質的な変化についてみると、低温馴化に伴って、糖、生長調節物質、タンパク質、脂質等の組成および含量に変化がみられるとの報告がある（Sakai・Larcher，1987）。また、デンプンが糖や糖アルコールに変化し、細胞の浸透価が高くなることが知られており（Sakai，1962）、冬に蓄積される糖の種類は、植物によって異なるが、スクロース、フルクトース、ラフィノースなどであると報告されている（Sakai・Yoshida，1968；Hinsley ら，1992；Wiemken・Ineichen，

1993）。つぎに、生長調節物質についてみると、耐凍性が高くなるとともにABAが増加すること（Chen ら，1979）、ABAを外与するとタンパク質が誘導されること（Dallaire ら，1994；Welbaum ら，1997）、さらに、耐凍性の高まりに対応してリン脂質の増加および細胞膜のリン脂質構成脂肪酸の不飽和化が起こることなどの事例が報告されている（Yoshida・Uemura，1984；Palta ら，1993）。

元来、低温遭遇、低温馴化、耐凍性の変化などは自然環境下で生育している植物体で起こっている事象であるが、これらを研究対象として、実験的に探究する場合には、条件の設定、結果の調査・解析に困難を伴うことが多い。このようなことから、組織培養系において得られる培養植物体を用いた研究が行われており（Chen・Gusta，1983；Gordon-Kamm・Steponkus，1984）、自然界で起こっている種々の複合的な応答を解析的に把握するために非常に有効な方法である。組織培養法によって得た植物体を耐凍性の研究に用いることの利点として、遺伝的にも環境条件についても常に斉一な材料を得ることができること、ならびに人為的操作（低温馴化処理等）が容易で、再現性が高いことがあげられる。

クロミノウグイスカグラについては、野外から採取した茎頂を用いて初代培養を行うことにより、容易に培養系を確立できるほか、培養体シュートを分割して継代培養を行うことにより、幼植物を得ることが可能であり、培養植物体の維持・増殖を図ることができる（鈴木ら，1987）。

本研究は、野外で生育しているクロミノウグイスカグラに発生する凍害について組織学的に観察するとともに、茎頂を用いて、耐凍性の変動、含水率および内性物質の変化などについて調べたほか、*in vitro*培養系を用いて検証し、クロミノウグイスカグラの凍害回避および栽培化を促進する場合のほか、耐寒性品種を育成する場合にも役立つ基礎的事象を探究し、知見を提起したものである。

# 第１章　クロミノウグイスカグラの生育地域と耐凍性

クロミノウグイスカグラの栽培地域を拡大するためには、耐凍性について検討しておくことが必要である。ここでは、寒冷地域におけるクロミノウグイスカグラ栽培の基礎となる耐凍性の変化について調査するとともに、生育地域による耐凍性の差異について検討した。

## 第１節　生育地域と耐凍性の変化

本節では、北海道内各地で生育しているクロミノウグイスカグラの耐凍性とその地域の気象特性について調査した。

### １．材料および方法

#### （１）材料の採取

1998年10月から1999年３月にかけて、札幌市（北海道大学農学部附属農場）、美唄市（北海道立林業試験場）、音威子府村（北海道大学農学部附属演習林中川地方演習林）、大樹町（圃場）および苫小牧市（勇払原野）の各地で生育しているクロミノウグイスカグラ（*Lonicera caerulea* var. *emphyllocaryx*）から、地域ごとに５樹を選び、それぞれの樹から当年枝を４本ずつ採取した。採取した枝は、長さ10～20cm、直径２～４mmで、頂芽および腋芽を６～10個［３～５節（対生）］もつものである。

#### （２）気温および積雪深の観測と集計

1998年10月から1999年３月までの札幌市、美唄市、音威子府村、大樹町および苫小牧市における日最高気温、日最低気温および積雪深の変動について調べた。

この場合、気象庁のアメダスによるデータを用いたが、札幌市の気温については、北海道大学農学部附属農場における観測値（北海道大学農学部附属農場気象観測報告による）を用いた。

（3）耐凍性の調査

凍結・融解は、Fig. 1-1に示した方法により、－10、－20、－30および－40℃の4段階に温度を調整したフリーザー中で凍結したのち、0℃で融解した。その後、温室内において、50ml容三角フラスコの中に入れた10mlの蒸留水中に、枝の下部約1cmを浸漬するようにして、水挿しを行った。4週間後に、萌芽率を調べるとともに、電解質漏出量を測定した。芽の生死の判定に当たっては、展葉した芽を生存しているものとして、萌芽率（%）＝（萌芽した枝数／供試した枝数）×100の式によって算出した。また、電解質漏出量の測定には電気伝導度計（HORIBA, B-173）を用い、電解質漏出率は、Evert・Weiserの方法（1971）によって算出した。耐凍性は、供試試料の50%が生存しているときの温度を示す$LT_{50}$（lethal temperature of 50% survival）（Bittenbender・Howell Jr., 1974）を指標として評価した。なお、10月および11月に採取した材料については、休眠を解除させるため、5℃に4週間おいたのち凍結処理を行った。

## 2．結果

（1）気温および積雪深

札幌地域では、Fig. 1-2に示したように、最低気温は11月になってから徐々に下がり、11月上旬には0℃以下になる日もあり、12月から2月までの間は、－10℃以下になる日が多く、1999年1月28日には－15.1℃となった。平均気温は、冬季には－4℃を中心にして変動するが、3月以降になると10℃以上に上昇する日もあった。札幌地域では、11月中旬に積雪がみられ、積雪深は、翌年1月中旬か

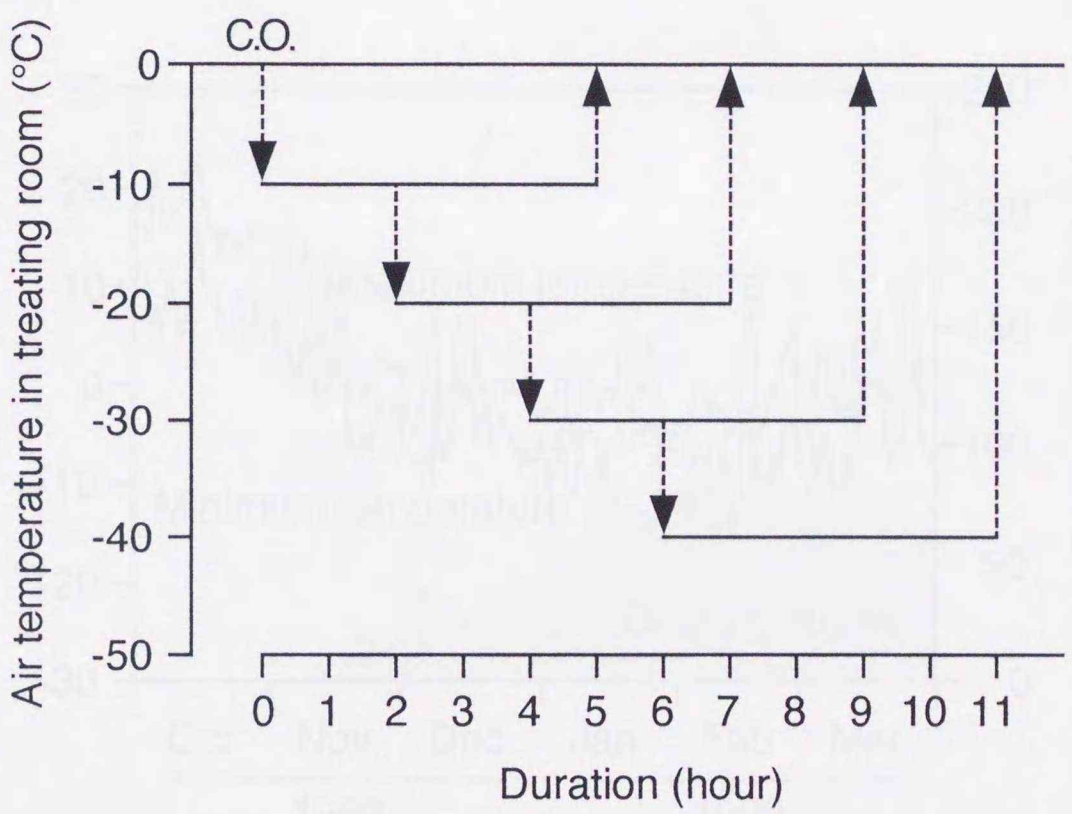



Fig. 1-1. Diagram of freezing-thawing procedures. C.O. means onset of cooling. Solid lines represent temperatures and durations that treat plant materials; dotted lines, transferring the materials to the temperature.

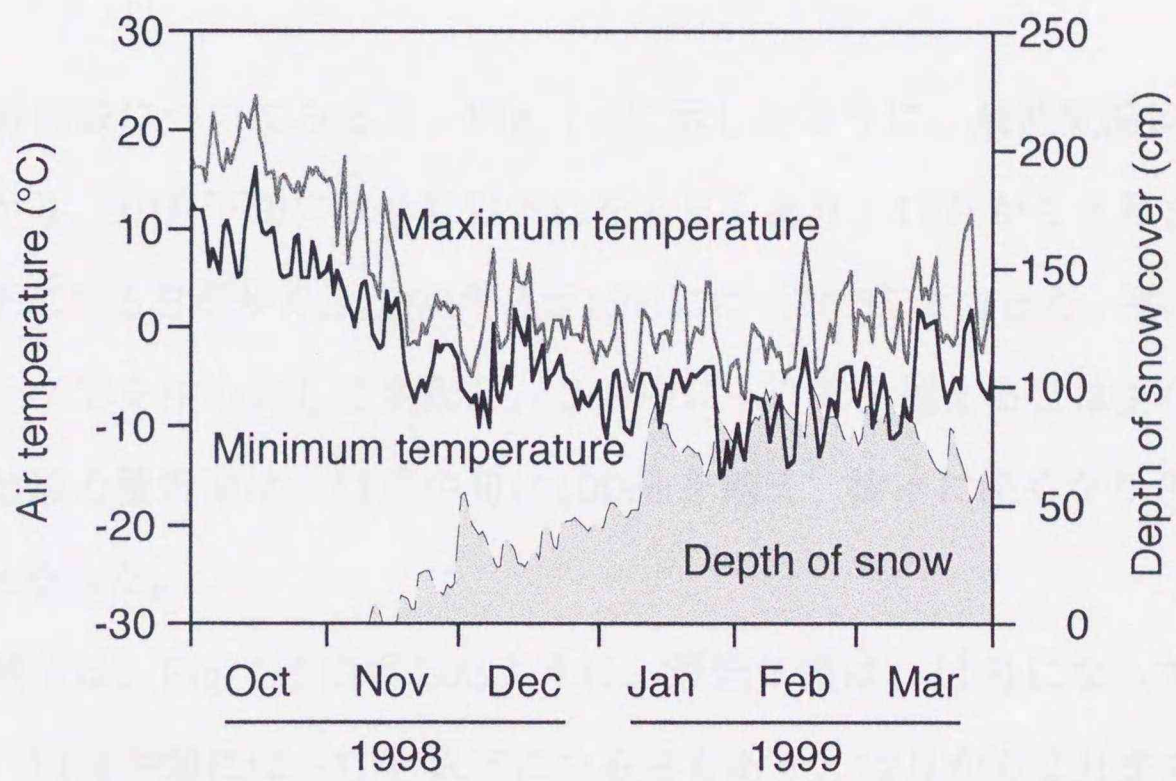



Fig. 1-2. Changes in daily maximum or minimum air temperature and depth of snow cover at Sapporo from October, 1998 to March, 1999.

ら３月中旬まで80cm前後で推移した。

美唄地域では、Fig. 1-3に示したように、最低気温は11月になってから徐々に下がり、11月上旬には０℃以下になる日もあり、12月から２月までの間は、－10℃以下になる日が多く、1999年２月３日には－23.6℃となった。平均気温は、冬季には－６℃を中心にして変動した。美唄地域においては、11月上旬に積雪がみられ、積雪深は、翌年１月上旬から３月下旬まで100cmから150cmの範囲で変動した。

音威子府地域についてみると、Fig. 1-4に示したように、最低気温は、10月に徐々に下がり、10月下旬には０℃以下になる日もあり、12月から２月までの間、－15℃以下になる日が多く、1999年２月19日には－26.3℃となった。平均気温は、冬季には－７℃を中心にして変動し、３月中にも０℃を越える日は少なかった。音威子府地域の積雪深は、11月中旬に100cmを越え、徐々に深くなり３月12日には239cmとなった。

大樹地域では、Fig. 1-5に示したように、最低気温は、11月になってから徐々に下がり、11月中旬には－10℃以下になる日もあり、12月から２月までの間は、－15℃以下になる日が多く、1999年２月15日には－23.6℃となった。平均気温は、冬季には、－７℃を中心にして変動するが、３月以降には０℃以上に上昇する日もあった。大樹地域においては、11月上旬に積雪がみられ、積雪深は、翌年１月上旬から３月中旬まで40cm前後で推移した。

苫小牧地域についてみると、Fig. 1-6に示したように、最低気温は11月になってから徐々に下がり、11月中旬には０℃以下になる日もあり、12月から２月までの間は、－10℃以下になる日が多く、1999年２月３日には－14.3℃となった。平均気温は、冬季には、－３℃を中心にして変動するが、２月以降には０℃以上に上昇する日もあった。また、この地域では積雪深として記録されるほどの積雪は

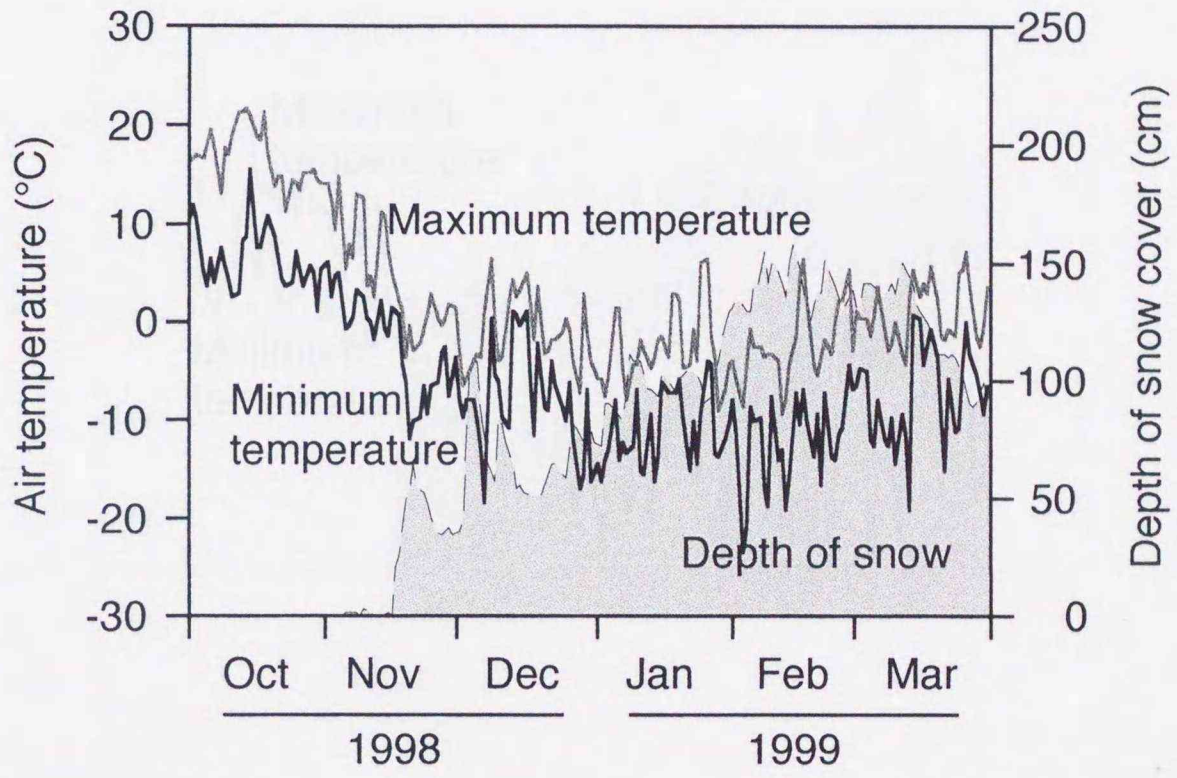



Fig. 1-3. Changes in daily maximum or minimum air temperature and depth of snow cover at Bibai from October, 1998 to March, 1999.

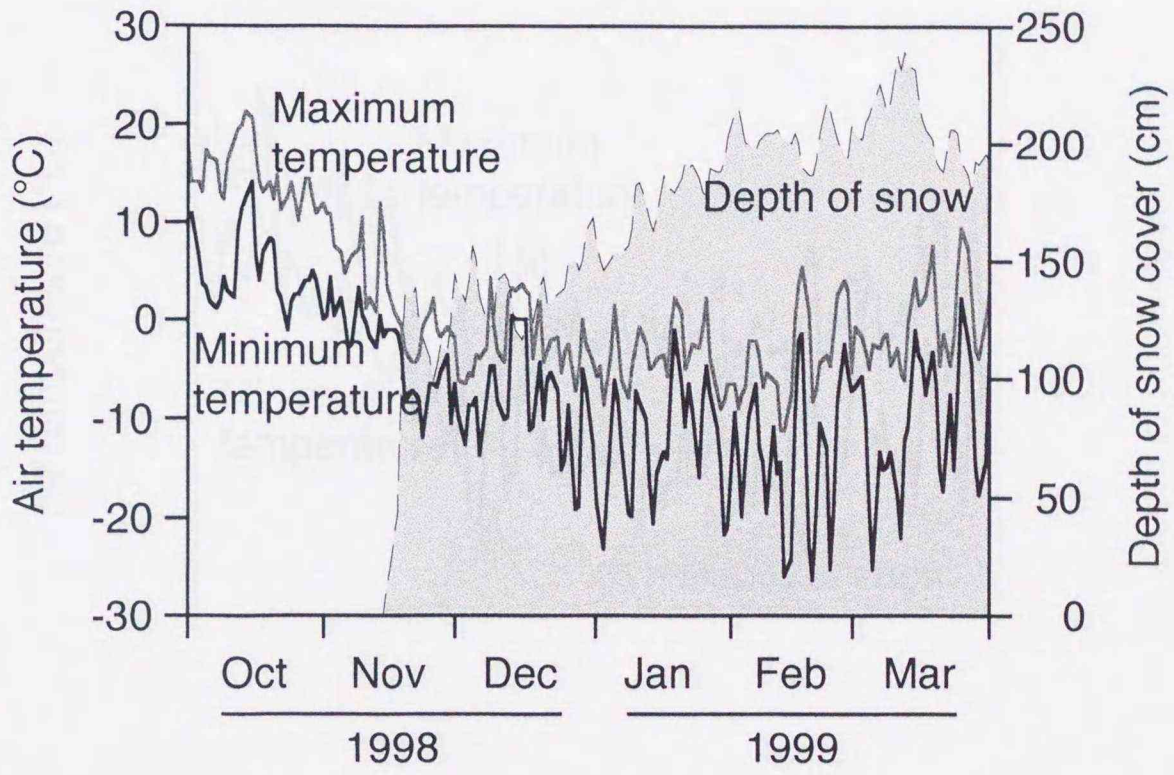



Fig. 1-4. Changes in daily maximum or minimum air temperature and depth of snow cover at Otoineppu from October, 1998 to March, 1999.

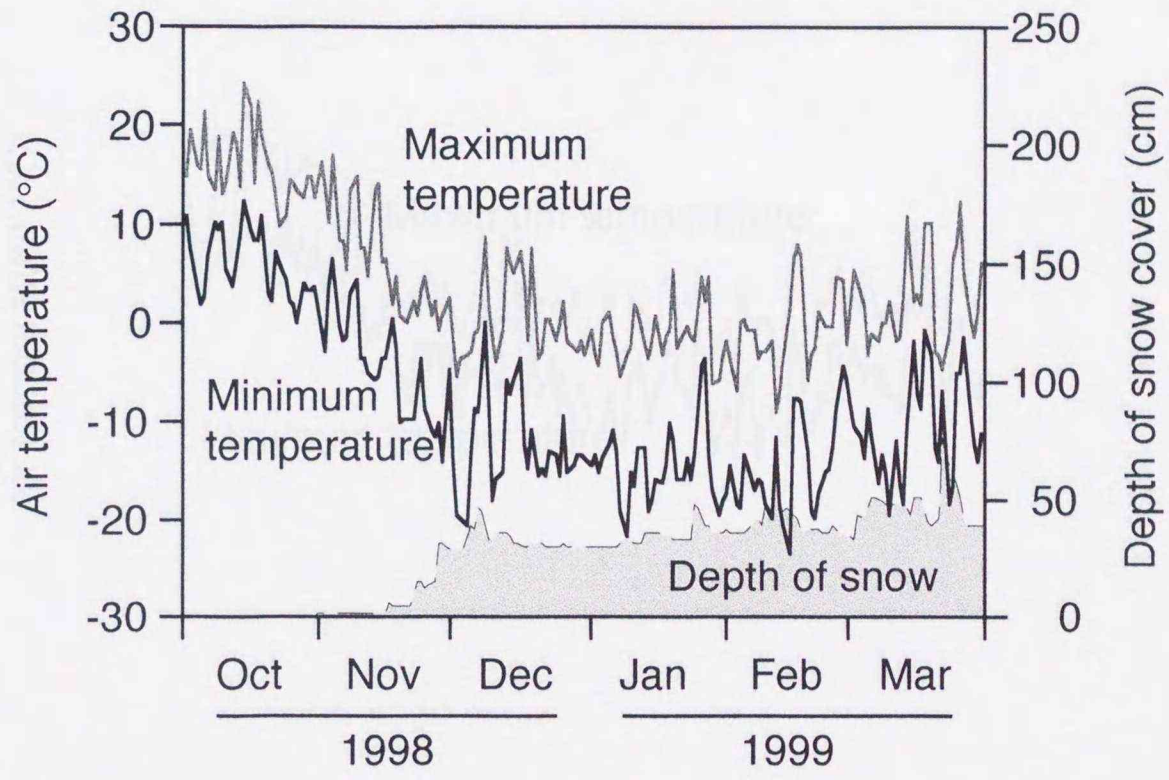



Fig. 1-5. Changes in daily maximum or minimum air temperature and depth of snow cover at Taiki from October, 1998 to March, 1999.

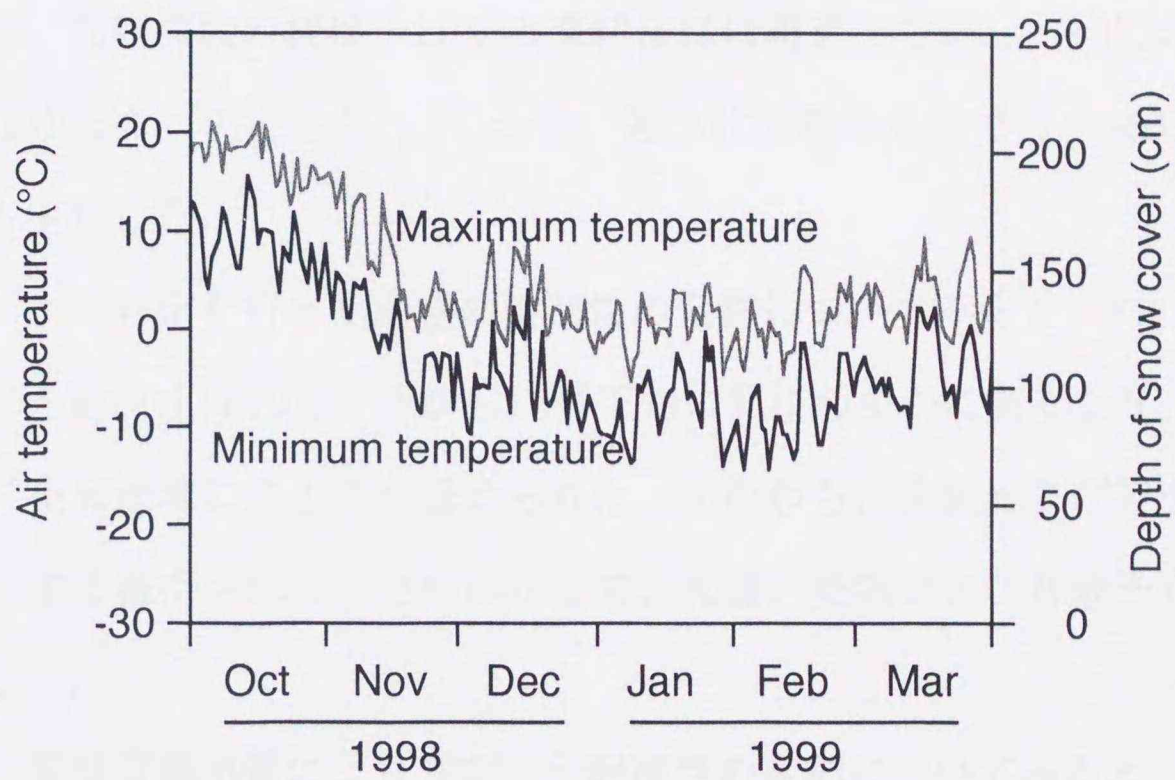



Fig. 1-6. Changes in daily maximum or minimum air temperature and depth of snow cover at Tomakomai from October, 1998 to March, 1999.

認められなかった。

（2）耐凍性の変動

10月下旬に採取した枝についてみると、札幌で採取した枝は－10℃の凍結後に生存し萌芽したが、－40℃の凍結後には凍死したものがみられ、音威子府で採取した枝は、－40℃の凍結後でも多くのものが生存した（Fig. 1-7）。12月下旬になると、札幌採取のものでは、－40℃の凍結後に萌芽した（Fig. 1-8）。翌年2月下旬では、札幌採取の枝は－10℃の凍結後には萌芽したが、－30℃の凍結には耐えられなかった（Fig. 1-9）。しかし、苫小牧採取のものでは－40℃の凍結後においても生存した。

萌芽率による判定を行った場合の耐凍性の変動についてみると、Fig. 1-10に示したように、耐凍性は10月下旬から12月下旬の間にわずかに高くなり、翌年2月下旬には、生育地域による差が認められた。すなわち、大樹および苫小牧では耐凍性が高いまま維持されていたのに対して、札幌、美唄および音威子府では耐凍性が低くなった。

つぎに、電解質漏出量により判定した耐凍性の変動についてみると、10月下旬から12月下旬までは高いままほとんど変化せず、翌年2月下旬に顕著に減少した（Fig. 1-11）。この場合、生育地域による差は認められなかった。

## 第2節　凍結・融解後の枝組織に発生する凍害の組織学的観察

本節では、光学顕微鏡を用いた観察により、凍結・融解後のクロミノウグイスカグラ枝組織における凍害発生状況について、組織学的に観察した。

### 1．材料および方法

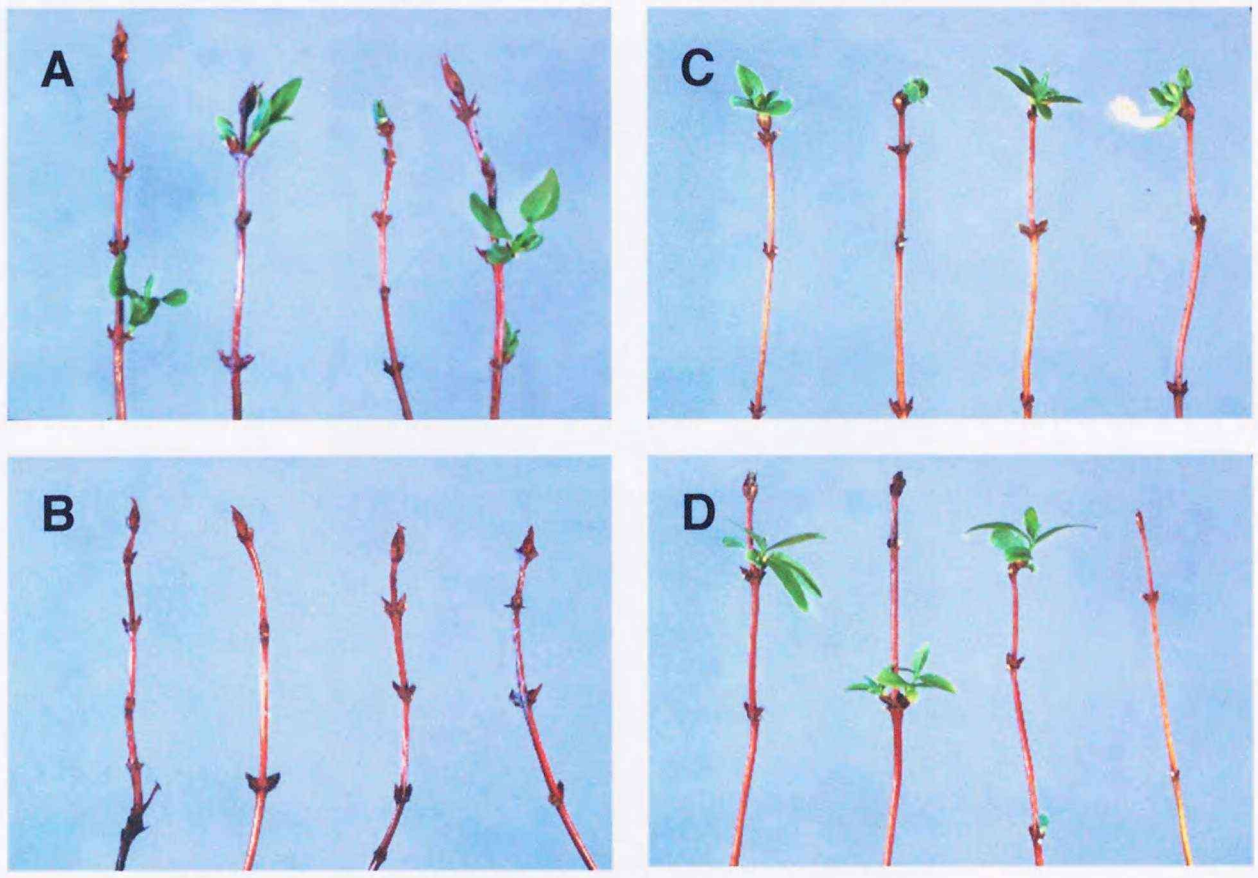



Fig. 1-7. Sprouting of dormant buds of *L. caerulea* twigs frozen and thawed. Samples collected from Sapporo on November 4 (A and B) and from Otoineppu on November 6 (C and D). Freezing temperature is -10˚C (A and C) or -40˚C (B and D).

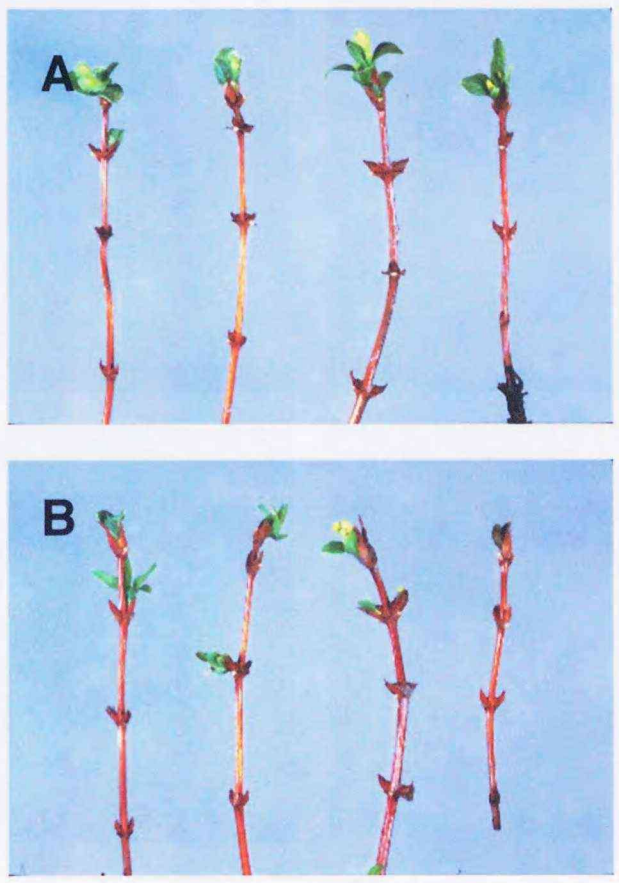



Fig. 1-8. Sprouting of dormant buds of *L. caerulea* twigs frozen and thawed. Samples collected from Sapporo on December 23. Freezing temperature is -10˚C (A) or -40˚C (B).

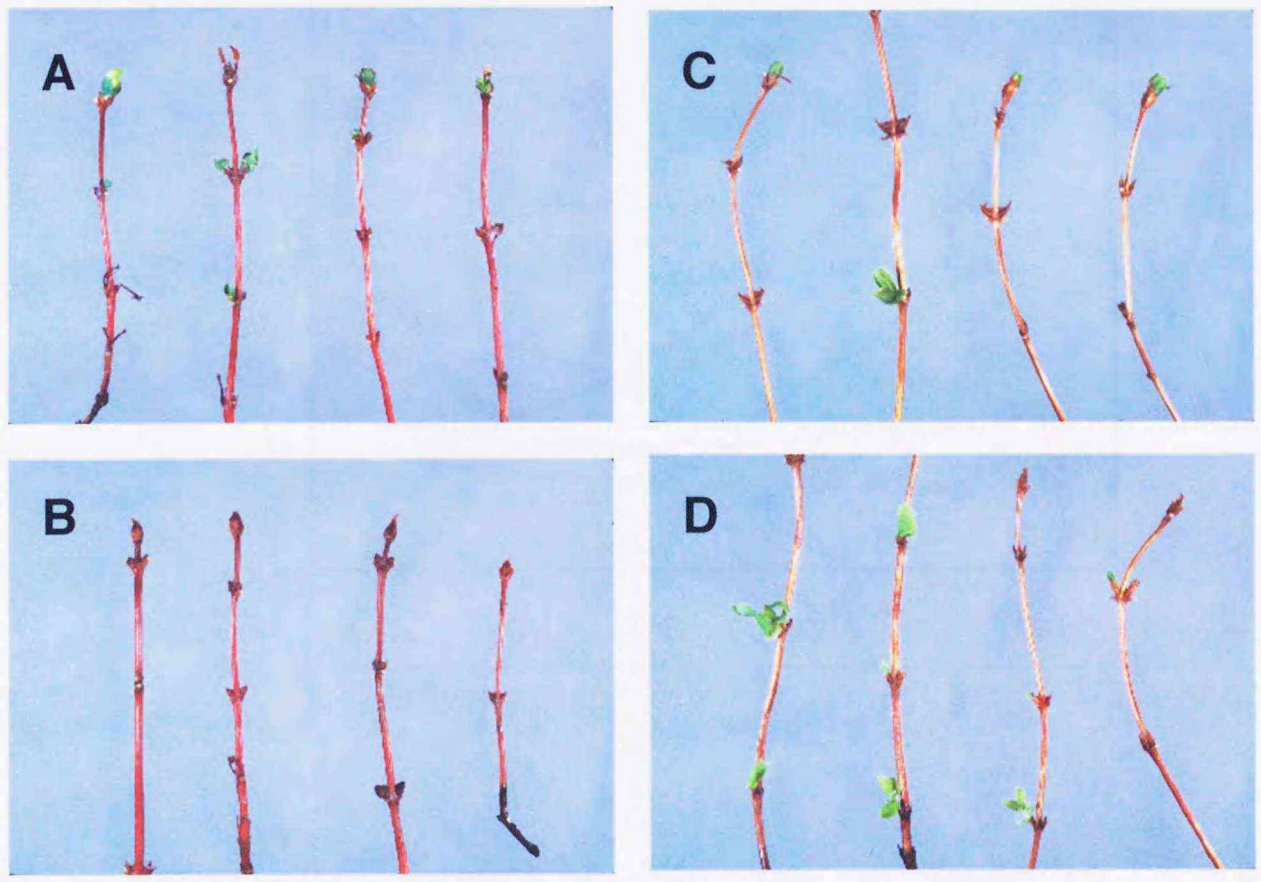



Fig. 1-9. Sprouting of dormant buds of *L. caerulea* twigs frozen and thawed. Samples collected from Sapporo on March 1 (A and B) and from Tomakomai on February 25 (C and D). Freezing temperature is -10˚C (A and C), -30˚C (B) or -40˚C (D).

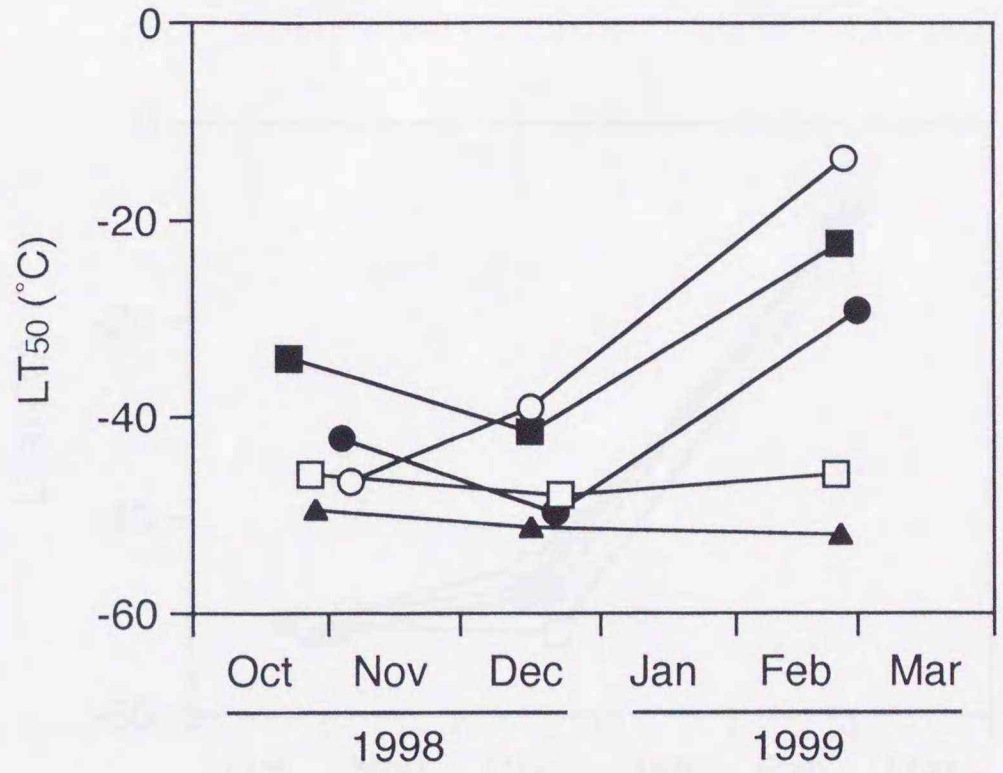



Fig. 1-10. Seasonal changes in freezing tolerance of twigs evaluated by bud sprouting in *L. caerulea*. ●, Sapporo; ■, Bibai; ○, Otoineppu; □, Taiki; ▲, Tomakomai. $LT_{50}$ (lethal temperature 50) means the temperature at which 50% of samples survive, and is evaluated by Bittenbender and Howell Jr.'s method (1974).

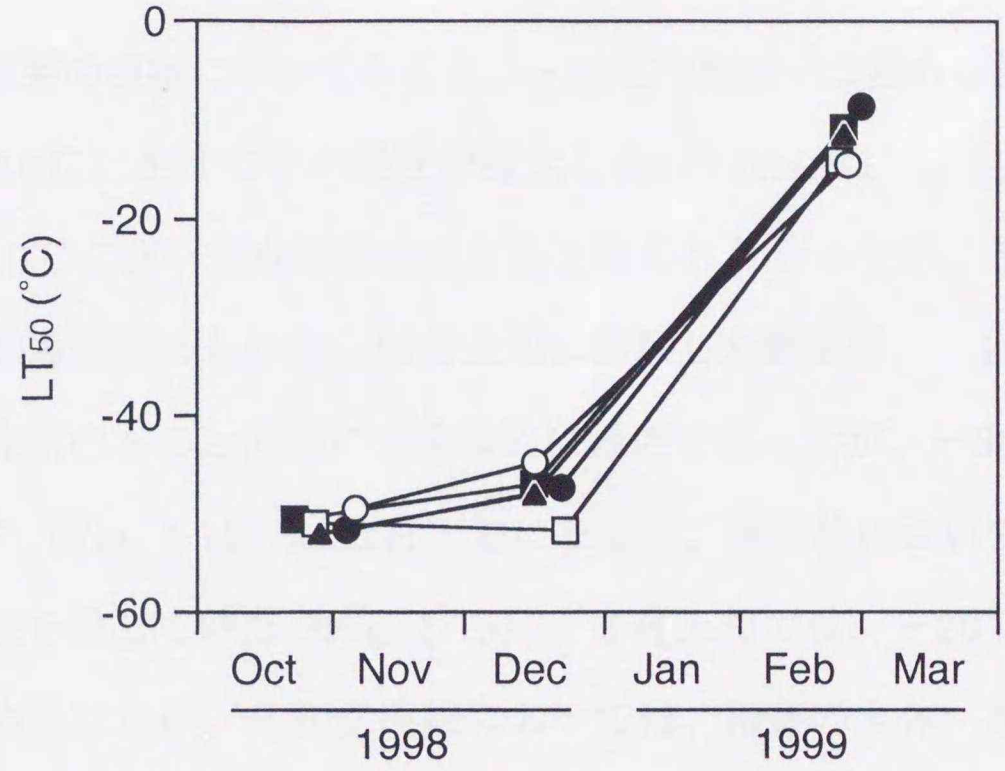



Fig. 1-11. Seasonal changes in freezing tolerance of twigs based on electrolyte leakage in *L. caerulea*. ●, Sapporo; ■, Bibai; ○, Otoineppu; □, Taiki; ▲, Tomakomai. $LT_{50}$ was elucidated in Fig. 1-10.

北海道大学農学部附属農場の圃場で生育している株から本章第１節と同様に枝を採取し、同じ凍結・融解処理を行った。滑走式ミクロトームおよび剃刀を用いて試料を作製し、腋芽および茎の断面の観察を行った。凍害の程度は腋芽および茎の褐変度により判定した。

## ２．結果

11月上旬の腋芽の凍害についてみると、－20℃の凍結では認められなかったが、－30℃から－40℃にかけてその程度が拡大した（Table 1-1）。12月下旬採取のものでは、－40℃においても凍害はほとんどみられなかったが、３月上旬には、－30℃以下で顕著に認められた。11月上旬に採取した腋芽は、－10℃の凍結後においても、未凍結のものと同様に、全体的に緑色であったが、－30℃では腋芽の基部が褐変した（Fig. 1-12）。12月下旬になると、凍結後においても未凍結の場合と同様に緑色を呈していた（Fig. 1-13）。３月上旬では、－20℃凍結後でも緑色で活力が認められたが、－30℃凍結においては、腋芽の全体、基部および皮層が褐変した（Fig. 1-14）。

つぎに、茎についてみると、Table 1-1に示したように、腋芽と同様に凍害が現れ、褐変などの変化がみられた。すなわち、11月上旬になると、－20℃では凍害は認められなかったが、－30℃でわずかにみられ、－40℃では皮層から維管束形成層にかけての傷害が大きかった。12月下旬では、凍害はほとんどみられなかったが、３月上旬には、－30℃以下で傷害が顕著に現れた。11月上旬に採取した茎は、未凍結のものと同様に、－10℃の凍結後では全体的に緑色であったが、－30℃になると皮層の一部が、－40℃では皮層の大部分が褐変した（Fig. 1-15）。12月下旬のものでは、－40℃においても全体的に緑色を呈しており傷害は認められなかった（Fig. 1-16）。３月上旬では、－20℃で皮層が褐変し、－30℃以下にな

Table 1-1. Seasonal changes in freezing injury evaluated by browning of axillary buds and stems of *L. caerulea* at Sapporo.

| Freezing temperature (°C) | Freezing injury[z] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | November 6 | | December 23 | | March 1 | |
| | Bud | Stem | Bud | Stem | Bud | Stem |
| Nonfrozen | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| -10 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| -20 | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + |
| -30 | + | + | ++ | ++ | – | – |
| -40 | + | – | ++ | ++ | – | – |

[z]++, no browning; +, 1-50 % browning; –, 50-100 % browning.

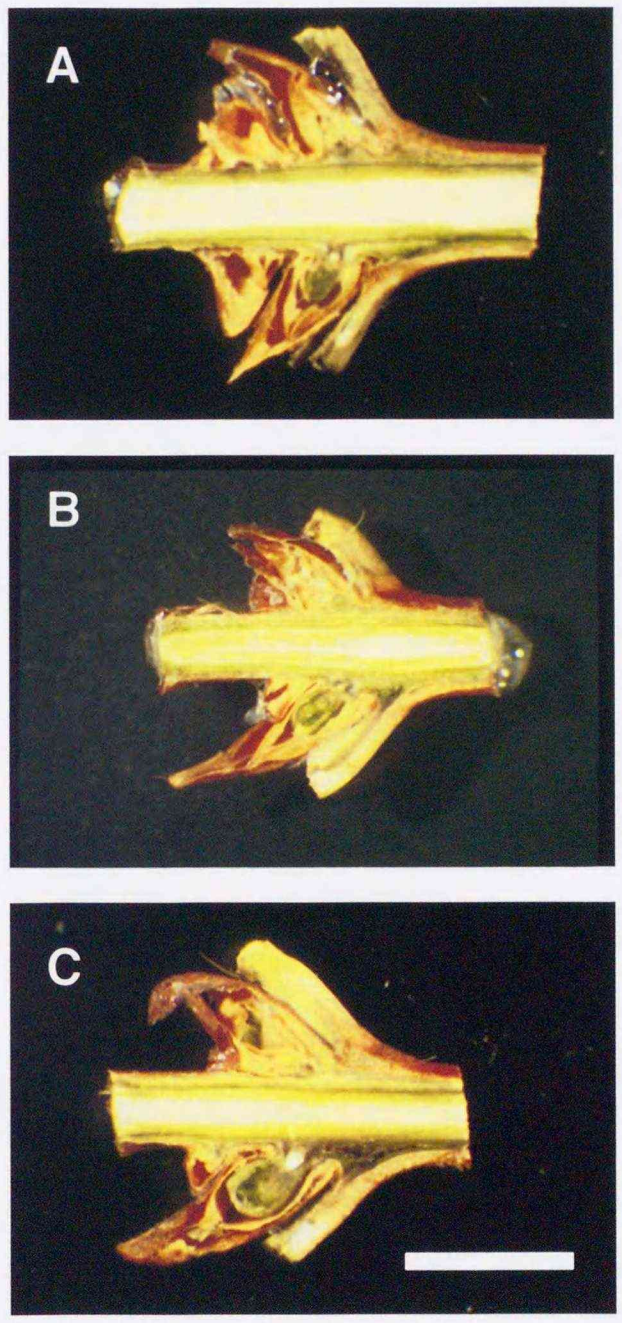



Fig. 1-12. Longitudinal sections of nodal portions of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on November 4. A: Nonfrozen, B: frozen at -10°C, C: at -30°C. Bar = 1 cm

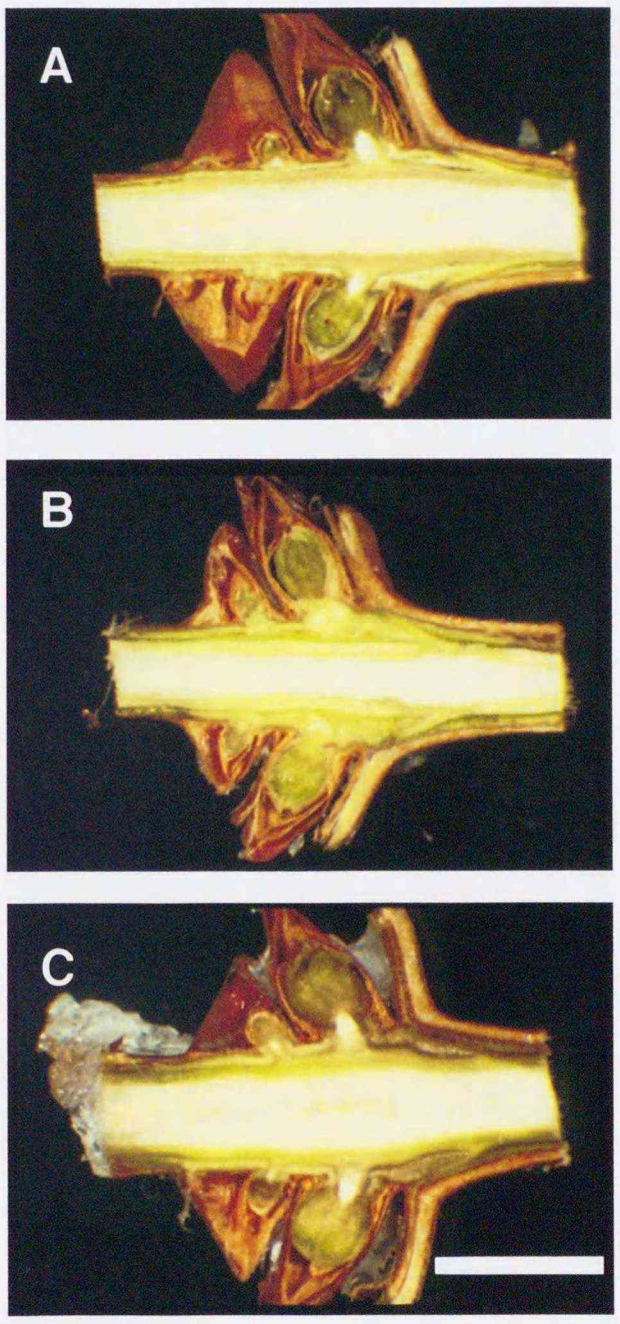



Fig. 1-13. Longitudinal sections of nodal portions of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on December 23. A: Nonfrozen, B: frozen at -10˚C, C: at -40˚C. Bar = 1 cm

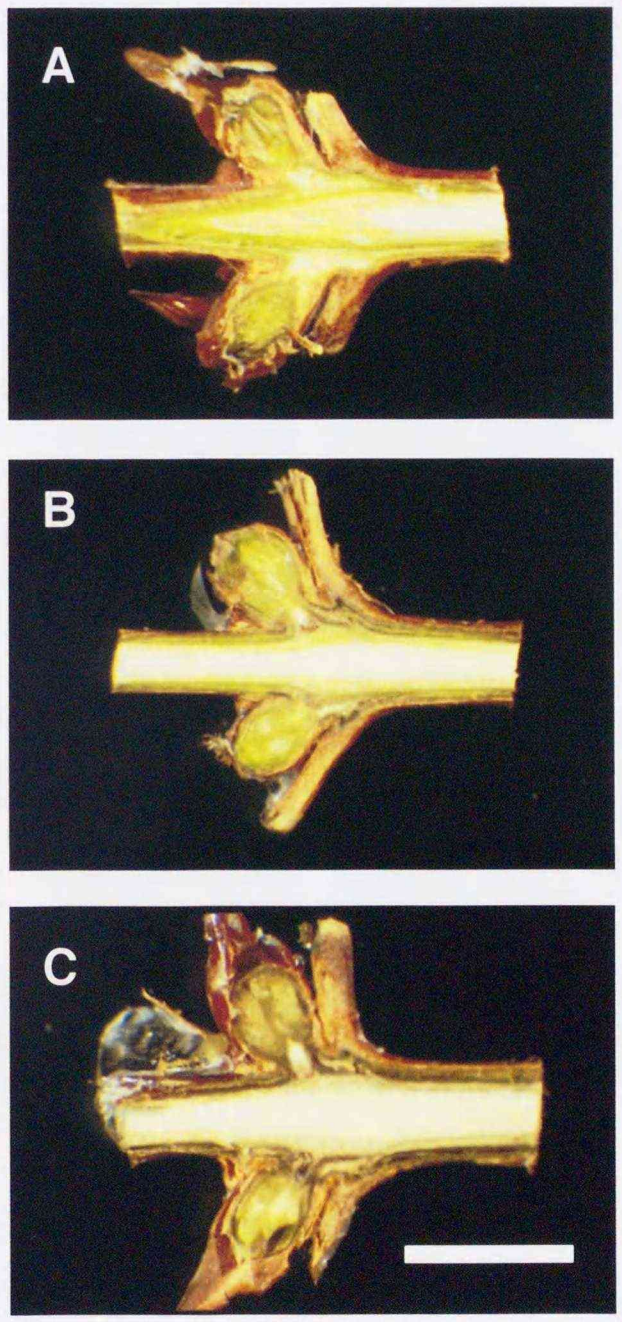



Fig. 1-14. Longitudinal sections of nodal portions of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on March 1. A: Nonfrozen, B: frozen at -20˚C, C: at -30˚C. Bar = 1 cm

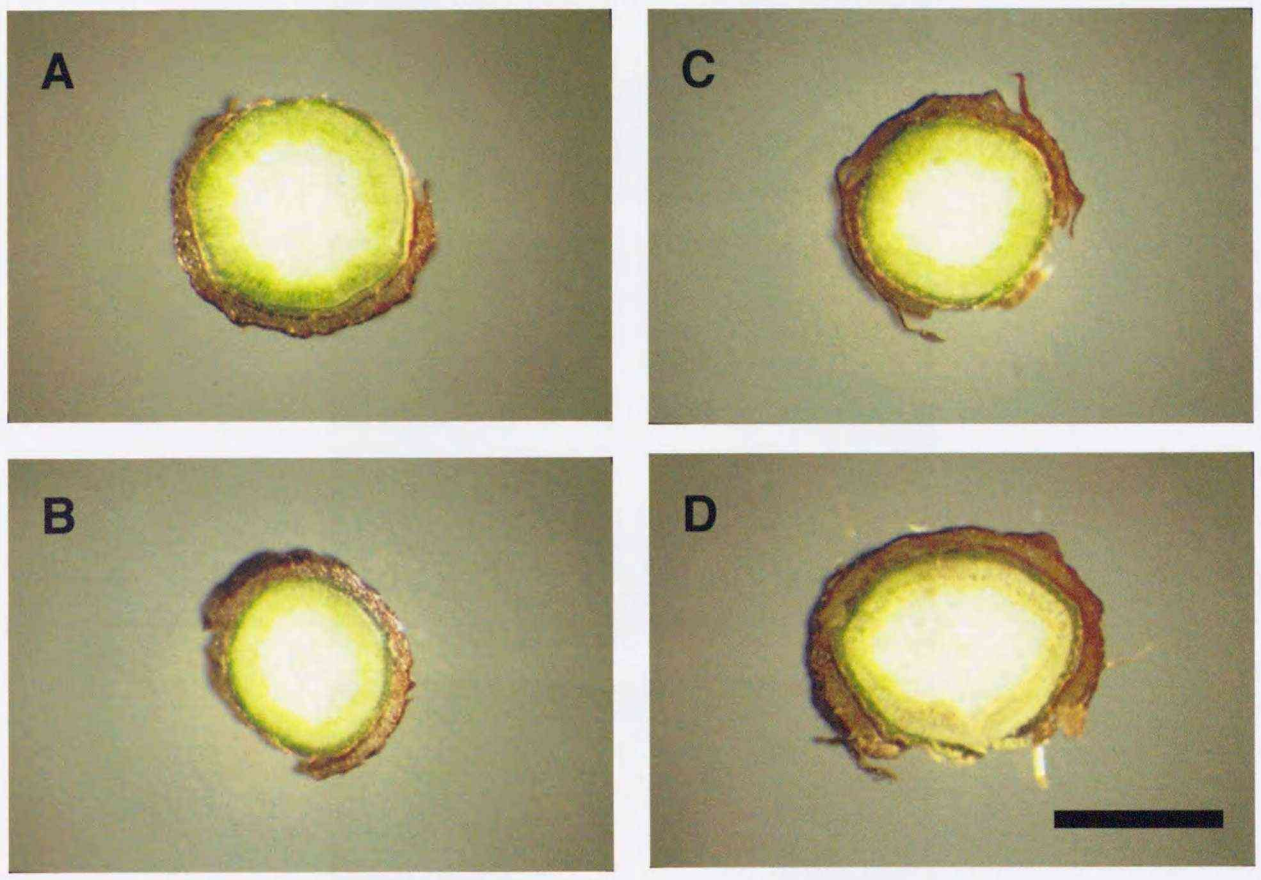



Fig. 1-15. Cross sections of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on November 4. A: Nonfrozen, B: frozen at -10˚C, C: at -30˚C, D: at -40˚C. Bar = 5 mm

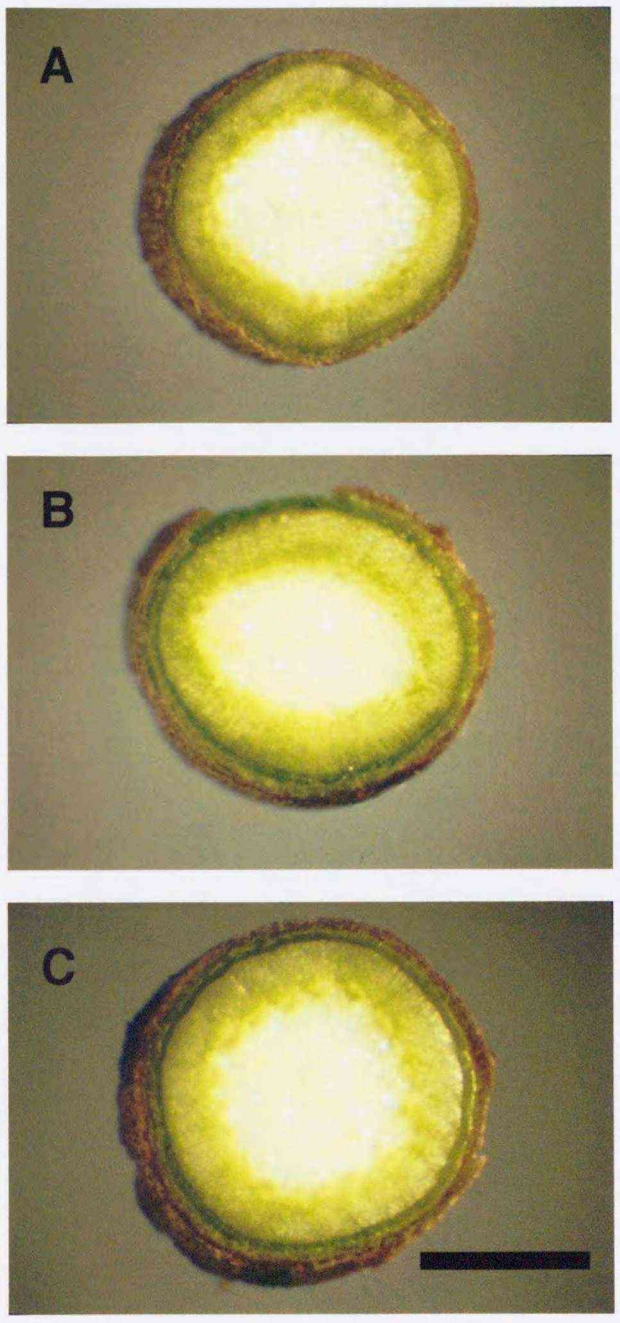



Fig. 1-16. Cross sections of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on December 23. A: Nonfrozen, B: frozen at -10˚C, C: at -40˚C. Bar = 5 mm

ると皮層および維管束形成層が褐変した（Fig. 1-17）。

## 第３節　組織間の耐凍性の差異

本節では、TTC還元法により、クロミノウグイスカグラ組織の耐凍性について検討した。

### １．材料および方法

1999年３月１日に北海道大学農学部附属農場から材料を採取し、本章第２節と同様の方法で凍結・融解処理および切片を作製し、塩化2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride；TTC）還元法により観察した（Towill・Mazur，1975）。TTC還元法は以下の手順で行った。

１）0.6％TTCを含む50 mMリン酸緩衝液（$Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$, pH7.5）に組織片を浸漬した。

２）水流アスピレーターで脱気したのち、26℃の暗所で15時間保温した。

３）反応後に、組織を蒸留水で２回洗浄した。

### ２．結果

未凍結および－10℃凍結後の腋芽、腋芽の基部および茎の形成層周辺が赤く発色し、生存していることが確認された（Fig. 1-18）。－20℃凍結後では、腋芽では赤くなったが、形成層の発色程度は弱く、腋芽の基部ではやや褐色化した。－30℃になると、枝は緑色のままで、腋芽の基部は褐色化し、外側に位置する葉原基の一部が赤く発色せず凍死していることがわかった。

つぎに、茎の横断面についてみると、未凍結および－10℃凍結後のものでは、

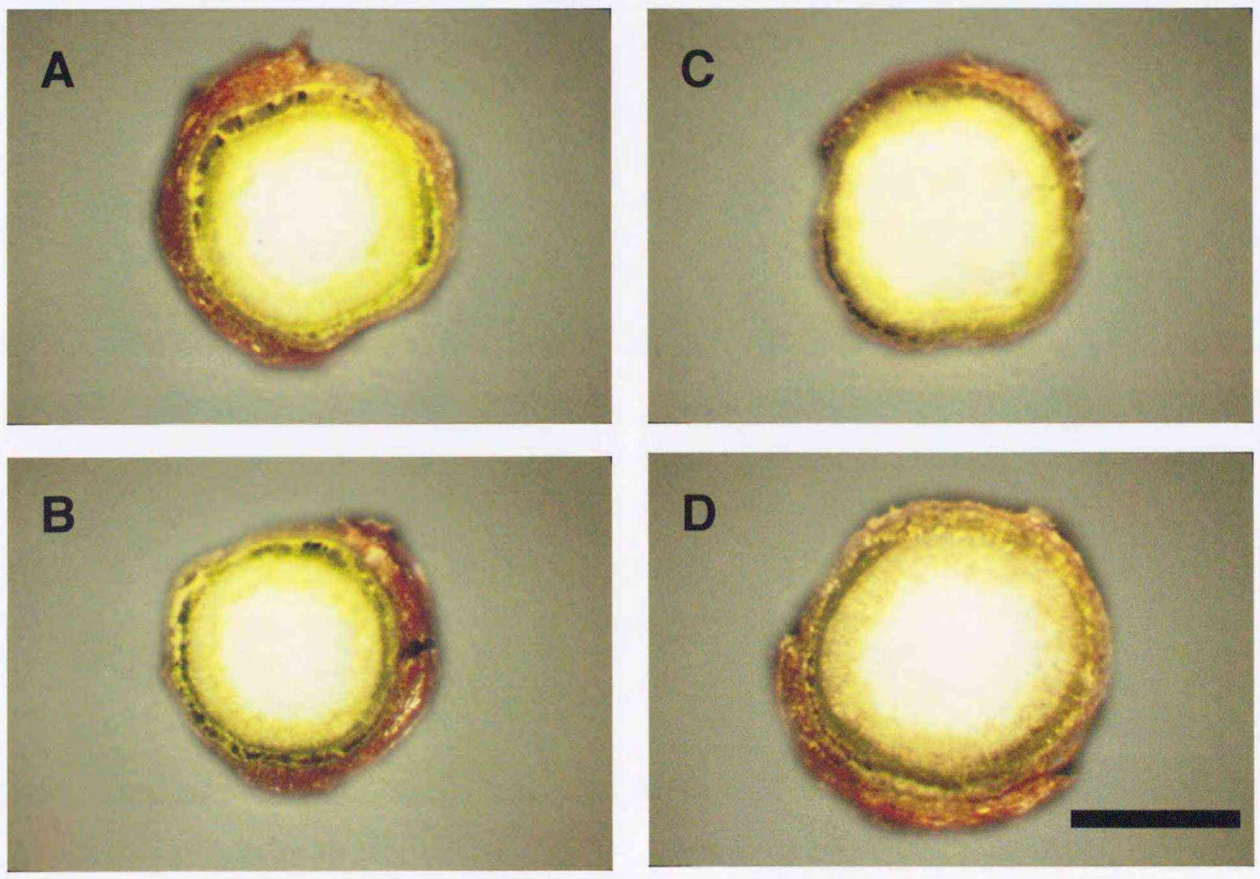



Fig. 1-17. Cross sections of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on March 1. A: Nonfreezing, B: frozen at -10˚C, C: at -20˚C, D: at -30˚C. Bar = 5 mm

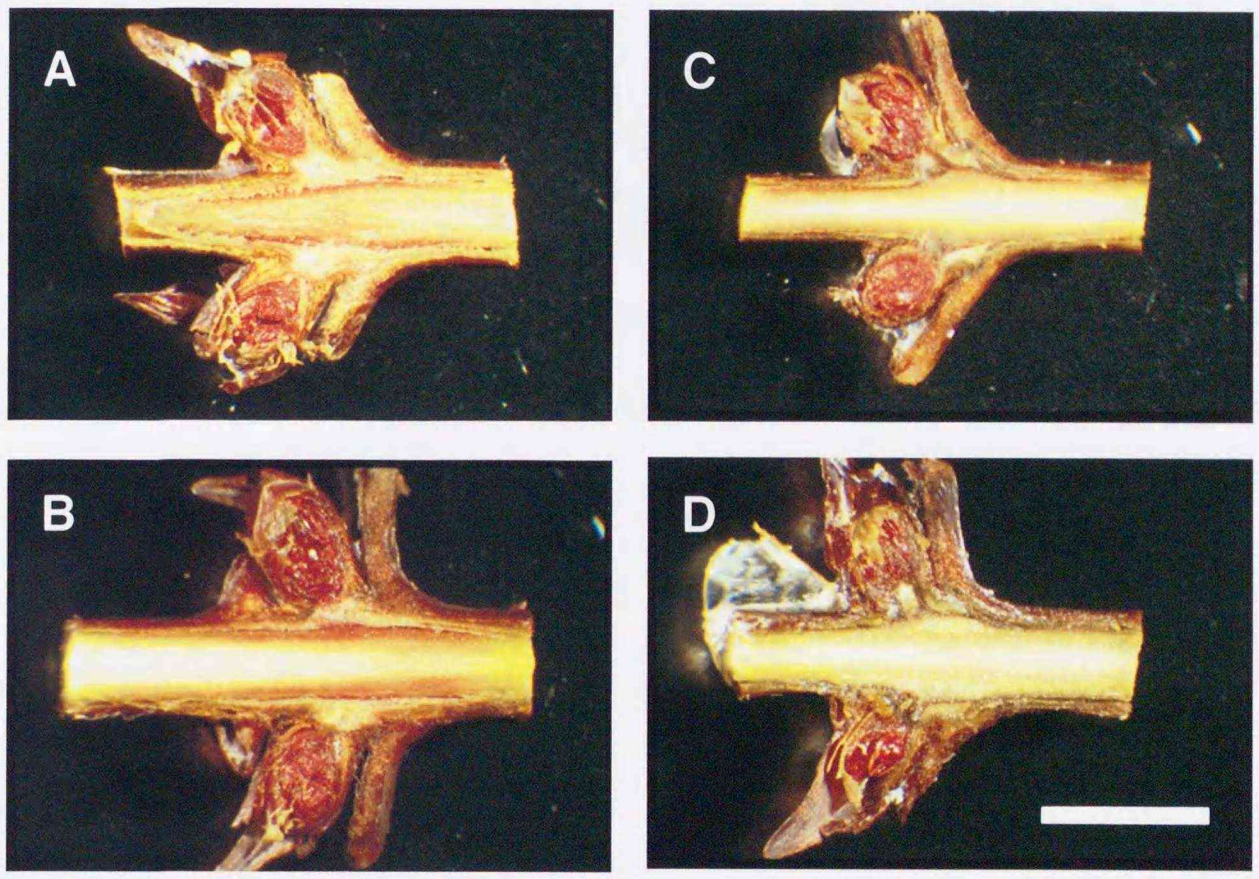



Fig. 1-18. Longitudinal sections of nodal portions of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on March 1. Red-colored parts indicate tissues survived and reduced by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. A: Nonfrozen, B: frozen at -10˚C, C: at -20˚C, D: at -30˚C. Bar = 1 cm

維管束形成層および表皮の直下が赤色となっていた（Fig. 1-19）。しかし、－20℃および－30℃で凍結したものにおいては、皮層から維管束形成層にかけて褐変が認められた。

## 第４節　　第１章の考察

気温についてみると、北海道では、11月上旬から翌年３月下旬にかけて、最低気温が低く、低温期間が長いが、特に道北地区の音威子府村および道東地区の大樹町では、気温が低くなる時期が早く、最低気温が－20℃を下回る日が多かった。一方、美唄市および音威子府村は、積雪量が多く、日によって気温の変動が激しいことが特徴である。また、大樹町および苫小牧市の太平洋岸地域では、積雪が少なく、一日の中での寒暖の差が大きいことが特徴であった。

音威子府村および大樹町では、他地域に比べると気温が早く低下するため、植物体の低温馴化が早い時期から起こり、10月下旬から11月上旬に採取した材料の耐凍性が高かった。ポプラ（*Populus gelrica*）およびヤナギ（*Salix sachalinensis*）においては、耐凍性を高めるのに効果的な温度の存在することがわかっており（酒井，1964；Sakai，1966）、クロミノウグイスカグラにおいてもそのような温度域があり、その範囲に入っていた地域で生育していたものでは耐凍性が高くあらわれたものと思われる。

12月の音威子府村および美唄市ならびに翌年２月の音威子府村、美唄市および札幌市で採取したものの耐凍性は、同時期の他地域のものと比較して低かったが、これは、この地域の積雪量が多いことによると思われる。すなわち、この時期の樹体が雪に埋没しており、雪が多量の空気を含み、熱の伝導を妨げるため（和泉・藤岡，1975）、植物体は積雪によって強い冷え込みと乾燥から守られている

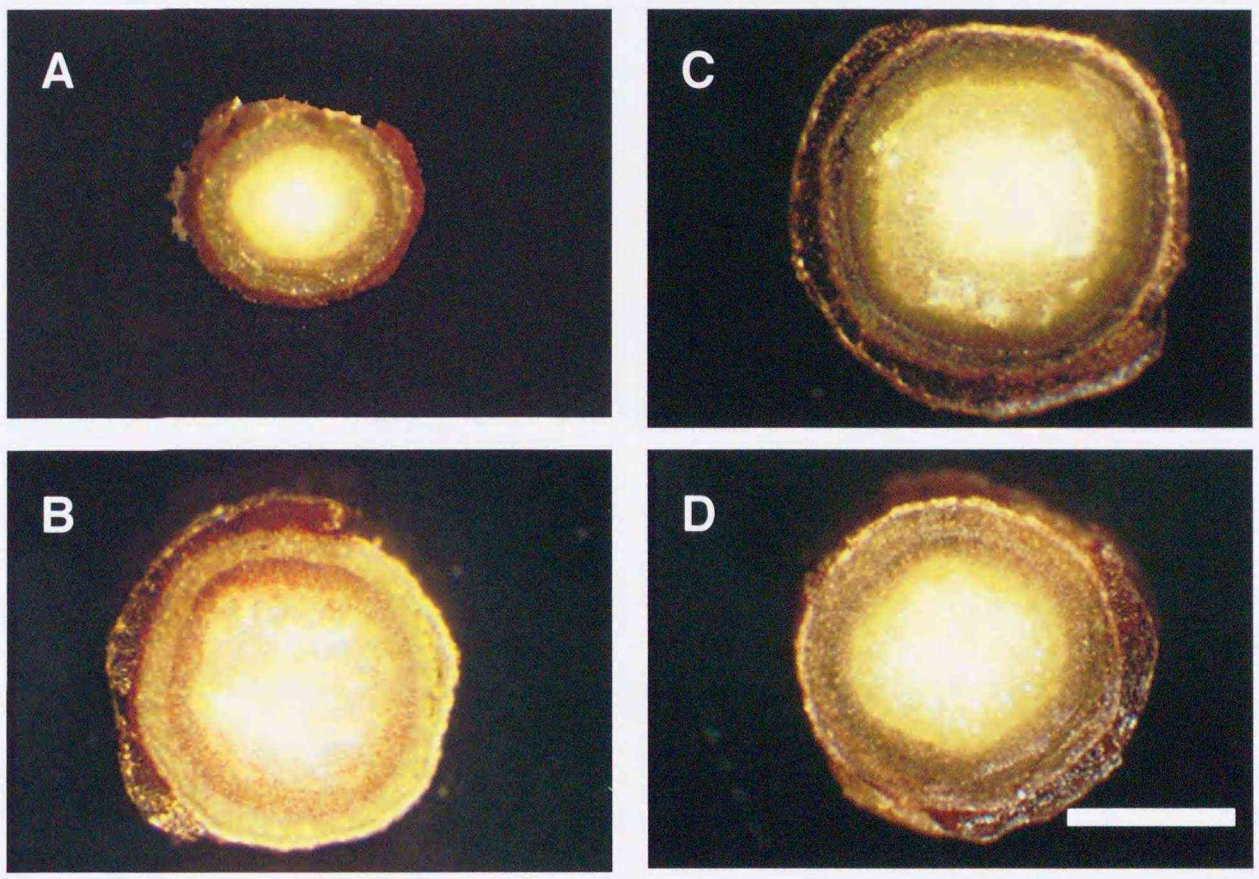



Fig. 1-19. Cross sections of *L. caerulea* twigs collected from Sapporo on March 1. Red-colored parts indicate tissues survived and reduced by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. A: Nonfrozen, B: frozen at -10°C, C: at -20°C, D: at -30°C. Bar = 5 mm

（Sakai，1968）ものと考えられる。このことは、逆に、その地域の気温より耐凍性が低い状態でも越冬できることを意味しており、耐凍性をさらに高める必要性がないので、自己の最大限界耐凍性まで達していないものと推測される。一方、2月の大樹町および苫小牧市においてクロミノウグイスカグラの耐凍性が高いまま維持されていたのは、この地域では積雪量が少なく、樹体が低温の外気にさらされていたため、脱馴化が進まなかったことによると思われる。

耐凍性の測定法についてみると、萌芽率による測定と電解質漏出量法による測定との間に差異がある場合もみられた。組織および細胞の耐凍性を測定する場合に電解質漏出量法がしばしば用いられるが（Guyら，1985；Arora・Wisniewski，1995）、本実験の結果から、芽という器官を含む枝全体の耐凍性の測定を目的としている場合には、両者を併用して判定する必要があるものと考えられる。

針葉樹の冬芽においては、厳寒期に器官外凍結による氷晶の析出によって、クラウンと主軸の先端との間に空隙が認められるとの報告（Sakai，1979）があるが、クロミノウグイスカグラにおいても、11月上旬の芽は小さく、鱗片葉と葉原基との間に空隙がみられた。11月上旬においてもクロミノウグイスカグラの芽が比較的高い耐凍性を有していたのは、器官外凍結によって脱水された水を保持する空間があることによると考えられる。一方、12月下旬から翌年3月上旬までの間に採取したものでは、鱗片葉と葉原基との間に空隙がほとんど認められなかったのは、クロミノウグイスカグラの芽が秋季から冬季にかけて充実度を増し、耐凍性を高めていると推測される。

11月上旬に採取した腋芽では、－30℃で基部が褐変し、－40℃で茎の皮層から維管束形成層にかけての部位が褐変し始めたことから、枝の水挿しにおける萌芽率の低下は、芽以外の部位が凍結傷害を受けたことに起因していると思われる。褐変度によってみた場合、12月下旬および翌年3月上旬に採取したものでは、部

位による凍結傷害の差異は認められなかった。しかし、TTC還元法によると、3月上旬に採取した材料においても、－20℃凍結で部位による差異が認められたことから、この方法は凍結傷害の判定に有効な手段の一つであることが示唆された。

# 第２章　クロミノウグイスカグラ野外茎頂の耐凍性の変化

永年性植物の組織の耐凍性が冬に高くなることは、一般的によく知られた現象である（鈴木，1993）。クロミノウグイスカグラについても、冬季の野外茎頂は高い耐凍性を備えており、夏季に野外から採取した茎頂の耐凍性は著しく低いことが明らかになっている（川口ら，1992）。しかし、クロミノウグイスカグラの耐凍性の変動の時期および期間については明らかにされていない。

本章では、野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性の変動をより詳細に明らかにするため、凍結・融解後に培養した茎頂の生存率に及ぼす茎頂採取時期および凍結温度の影響について調査した。また、茎頂および茎の耐凍性の変動を比較するため、凍結・融解後の茎頂および茎の生存をTTC還元法によって評価した。

## 第１節　野外茎頂の耐凍性の季節的変動

本節では、野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性の変動をより詳細に明らかにするため、1993年４月から1994年８月までの１年半にわたり約１か月ごとに、凍結・融解後の茎頂の生存率に及ぼす茎頂採取時期および凍結温度の影響について調査した。

### １．材料および方法

#### （１）気温の変動

1993年４月～1994年８月に北海道大学農学部附属農場で観測された日最高気温および日最低気温を集計し、これらの変動をFig. 2-2に示した。気温測定値は、北

海道大学農学部附属農場気象観測報告にあるものを用いた。

（2）茎頂の耐凍性の調査

1）植物材料の調製

北海道大学農学部附属農場に栽植されているクロミノウグイスカグラ10株から、Table 2-1に示す各採取日に、休眠枝または発育枝を採取した。これらの腋生葉芽2つを含む各節を約2cmの長さに切断し、その外側の鱗片葉および樹皮を剥離したのち、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素1％、溶液100mlあたりTween20を数滴添加）で10分間表面殺菌し、滅菌水で約10回洗浄し、湿潤ろ紙を敷いた滅菌シャーレ内に置いた（Fig. 2-1）。つぎに、解剖顕微鏡（Olympus, SF 10）下で葉芽の茎頂（横径約1mm、長さ約1mm、葉原基4個程度を有するもの）を無菌的に摘出して、材料とした。なお、材料は、凍結処理を行うまでの乾燥を防ぐため、シャーレ内の培地（寒天7g/lのみを含む）上に一時的に置床した。

2）凍結および融解

1ml容ストロー精液管に満たした蒸留水中に材料を6個ずつ入れ、口をポリビニールアルコール（PVA）で封じ、プログラムフリーザー（TABAI, MINI-SUBZERO MC-710）を用いて0.42℃／分の冷却速度で、Table 2-1に示す各温度まで冷却し（－3℃で植氷）、それぞれの温度で12分間保持した。なお、凍害防御物質の影響を排除するため、凍結媒液は蒸留水とした。また、凍結・融解後の生存率についても調べるため、同様の方法で－40℃まで予備凍結した材料を液体窒素中（－196℃）に浸漬し、1時間保持した。融解は、いずれの場合もストローごと材料を37℃の温水中に投入する方法（急速融解法）により行った。

3）培養および調査

融解した材料をクリーンベンチ内でストローから無菌的に取り出し、直ちに植物体再生用培地［Murashige & Skoogの培地（1962）の全成分の濃度を1/2とした

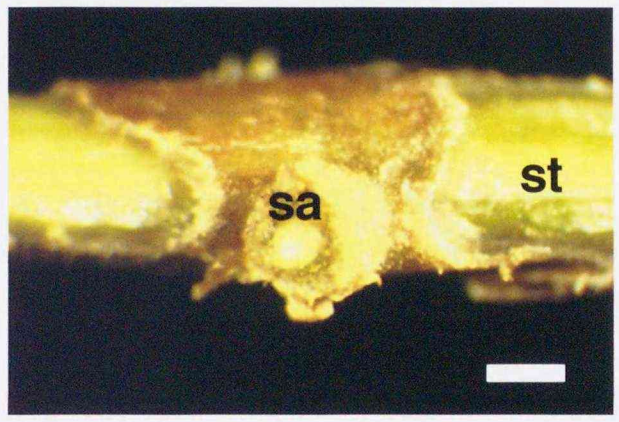



Fig. 2-1. Anatomized shoot apex of *L. caerulea*. sa, shoot apex; st, stem. Bar = 1 mm

培地に、ジベレリン酸（gibberellic acid, $GA_3$）１μM、$N^6$-ベンジルアデニン（$N^6$-benzyladenine, BA）１μMおよびスクロース30g/lを添加し、ｐＨ5.7に調整した後、寒天７g/lを添加したもの］に植え、25℃、16時間日長（白色蛍光灯、4,000lx）の条件下で培養した。培養開始４週間後に、シュートの伸長が認められたものを生存個体とし、$LT_{50}$を指標として耐凍性を評価した。

## 2．結果

### （1）気温の変動

Fig. 2-2に示したように、北海道大学農学部附属農場の最低気温は、４月から８月にかけ上昇した後、10月になってから徐々に下がり、10月下旬には０℃以下になる日もあった。冬季には、平均気温は－３℃を中心にして変動するが、４月中旬には10℃以上に上昇する日もあった。最低気温は、12月から２月までの間、－10℃以下になる日が多く、1994年１月29日には－16.2℃となった。1994年３月および４月の最低気温は低めに推移した。

### （2）茎頂の耐凍性の季節的変動

凍結・融解後の茎頂の生存率には、茎頂採取時期および凍結温度による差が認められた（Table 2-1）。すなわち、1993年４月の茎頂は、－20℃の凍結後に66.7%の高い生存率を示したが、６月の茎頂では、未凍結区の生存率も33.3%と極めて低く、－５℃の凍結に耐えることができなかった。８月および９月には、－５℃凍結区で生存個体が得られたが、－15℃以下の凍結区では生存個体は得られなかった。しかし、９月以降では、気温の低下に伴って耐凍性が高くなり、10月には－15℃凍結区で66.7%、11月には－30℃凍結区で75.0%と、低温でも高い生存率が得られるようになり、12月および翌年の１月、２月および３月の茎頂は、－40℃で凍結した場合にも高い生存率を示した。しかし、４月の茎頂は、－40℃

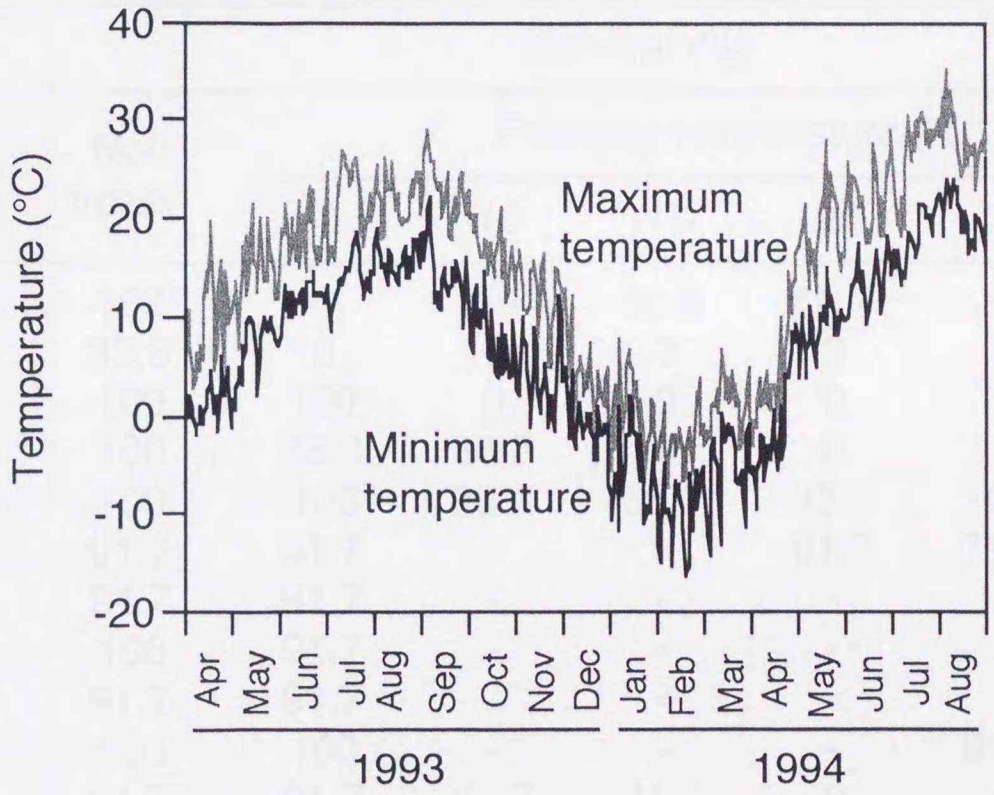



Fig. 2-2. Seasonal changes in daily maximum and minimum temperatures at Sapporo from April, 1993 to August, 1994.

Table 2-1. Seasonal changes in survival rates of *L. caerulea* shoot apices frozen at various temperatures[z].

| Sampring date | | Survival (%) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Non frozen | Freezing temperature (°C) | | | | | |
| | | | -5 | -10 | -15 | -20 | -30 | -40 |
| 1993, | 23 Apr. | 100 | -[y] | 75.0 | 50.0 | 66.7 | 0 | - |
| | 27 Jun. | 33.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | 20 Aug. | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| | 29 Sep. | 100 | 83.3 | 33.3 | 0 | 0 | 0 | - |
| | 31 Oct. | 100 | 100 | 33.3 | 66.7 | 33.3 | 16.7 | 0 |
| | 28 Nov. | 91.7 | 91.7 | - | - | 91.7 | 75.0 | 25.0 |
| | 16 Dec. | 91.7 | 91.7 | - | - | - | - | 75.0 |
| 1994, | 24 Jan. | 100 | 91.7 | - | - | - | - | 58.3 |
| | 18 Feb. | 91.7 | 91.7 | - | - | - | - | 66.7 |
| | 16 Mar. | 100 | 100 | - | - | - | 91.7 | 66.7 |
| | 19 Apr. | 91.7 | 91.7 | 41.7 | 41.7 | 0 | 0 | 0 |
| | 17 May | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| | 21 Jun. | 50.0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| | 19 Jul. | 100 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| | 23 Aug. | 100 | 100 | 0 | 0 | - | - | - |

[z]Freezing solution, distilled water; cooling rate, 0.42/min; thawing, at 38°C in water bath. Data base on 12 shoot apices.
[y]Not tested.

以下の凍結には耐えられなくなり、一部の茎頂が－15℃の凍結後に生存したのみであり、5月、6月および7月の茎頂は－5℃の凍結にも耐えられなくなった。

これらの調査に基づいて、茎頂の耐凍性の季節的変化をより客観的に表わすため、各採取日における$LT_{50}$の値を求めた（Fig. 2-3）。$LT_{50}$は、1993年6月～9月および1994年4月～8月には、－5℃以上の高い値を示したが、1993年10月から12月にかけて徐々に低下し、1993年12月から翌年3月まで－40℃以下の低い値を維持したのち、3月から4月にかけて急激に高くなった（Fig. 2-4）。このことから、茎頂の耐凍性が8月から11月にかけて徐々に増大し、3月から4月にかけて急速に低下することが明らかとなった。

つぎに、－196℃の凍結・融解後の茎頂の生存率についてみると、$LT_{50}$の値が－17.5℃以下となった10月から翌年3月までの生存率は、50.0％、75.0％、58.3％、83.3％、91.7％および83.3％と高い値を示し、$LT_{50}$が－9.2℃となった4月においては、生存個体は得られなかった（Fig. 2-5）。

この結果から、野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性は、夏季に低く、8月から11月にかけて徐々に高まり、冬季に高い状態を維持した後、春季に急速に低下することが明らかになった。また、耐凍性が高い時期（10月から翌年3月）の茎頂は、－196℃の凍結に耐えたが、耐凍性が低くなると（4月）－196℃の凍結に耐えられなくなることがわかった。

## 第2節　TTC還元法によって評価した茎頂および茎の耐凍性の変化

本節では、TTC還元法を用いることにより、クロミノウグイスカグラの茎頂および茎の耐凍性の変動について比較検討した。

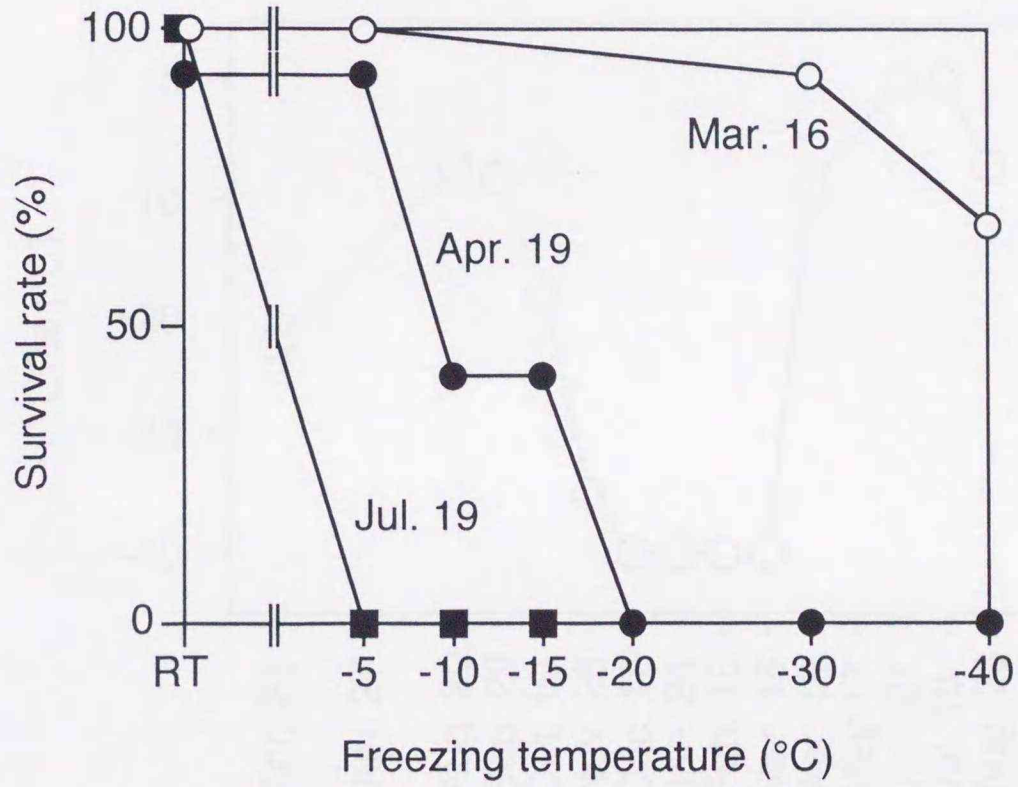



Fig. 2-3. Changes in survival rates of shoot apices of *L. caerulea* after exposure to various freezing temperatures. Typical patterns in shoot apices harvested from twigs on March 16, April 19 and July 19 are shown. Survival rates were determined by a regrowth test. Percentage of test apices survival from n=12. RT, room temperature.

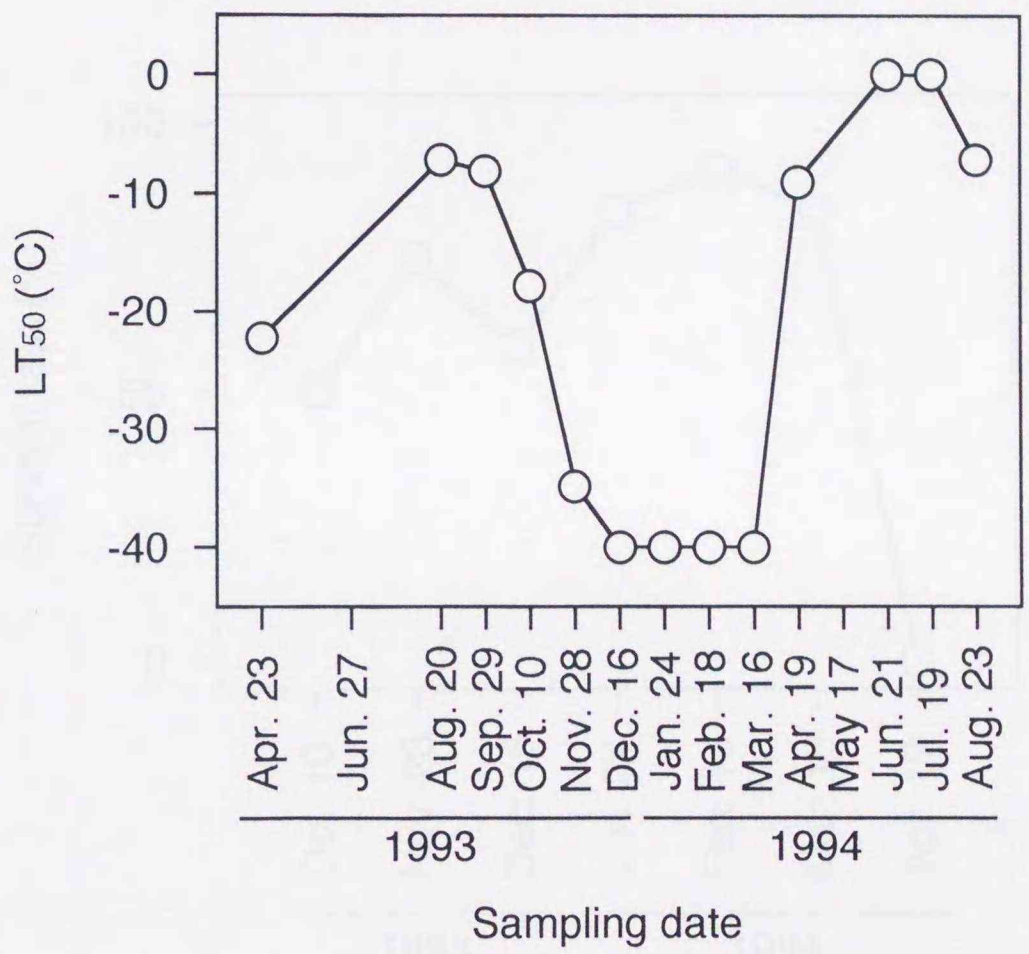



Fig. 2-4. Seasonal changes in $LT_{50}$ of shoot apices from field-grown *L. caerulea* twigs. $LT_{50}$ (lethal temperature 50) means the temperature at which 50% of samples survive, and was evaluated by Bittenbender and Howell Jr.'s method (1974).

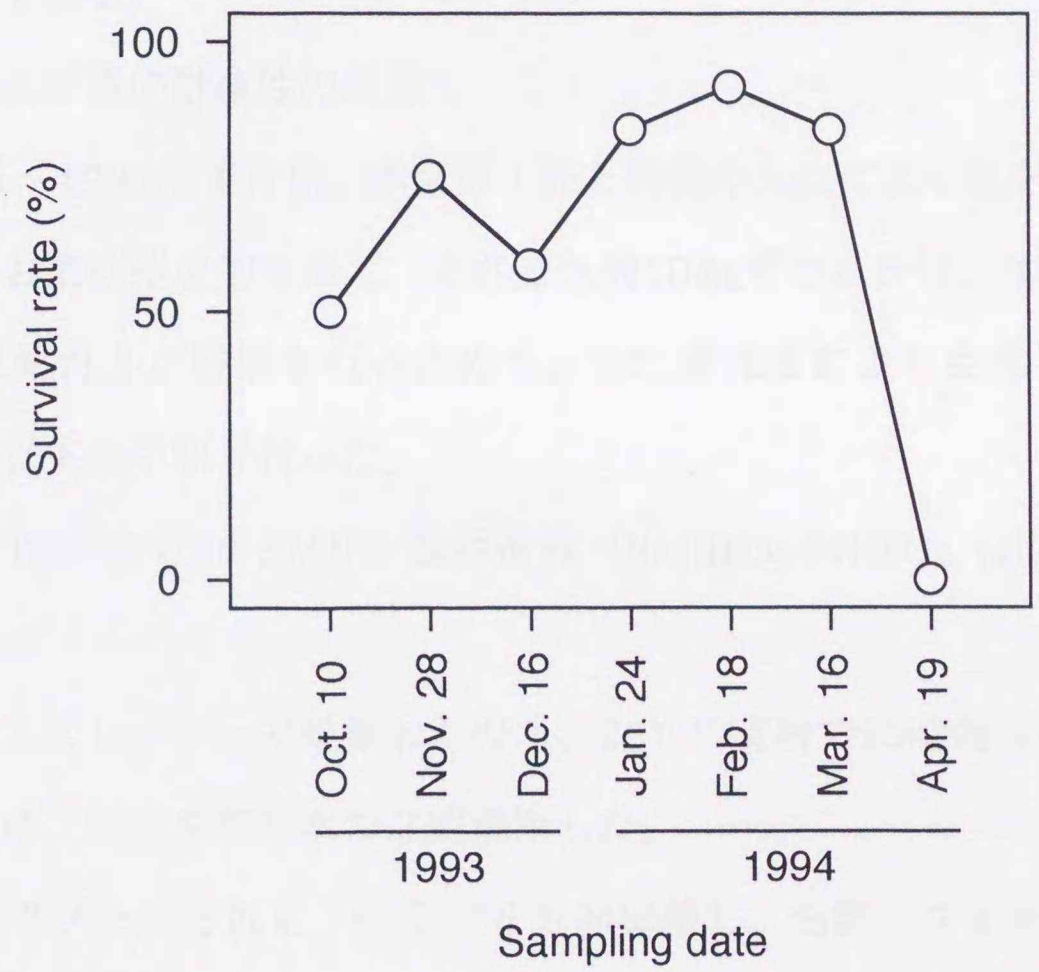



Fig. 2-5. Survival rate of shoot apices from field-grown *L. caerulea* twigs after exposure to -196˚C. Samples were cooled down at 0.42°C/min to -40°C and immersed in liquid nitrogen.

1．材料および方法

（1）気温の変動

1996年９月～1997年４月に北海道大学農学部附属農場で観測された日最高気温および日最低気温を集計し、これらの変動をFig. 2-6に示した。気温測定値は、北海道大学農学部附属農場気象観測報告にあるものを用いた。なお、1996年12月は欠測値となっている。

（2）茎頂および茎の耐凍性の調査

1996年９月～1997年４月に、本章第１節と同様の方法により枝を採取した。これらの茎頂部および茎を切り出し、それぞれ約10mgずつに分け、本章第１節と同様の方法で凍結および融解を行ったのち、TTC還元法により生死を判定した。TTC還元法は以下の手順で行った。

１）0.6％TTCを含む50 mMリン酸緩衝液（$Na_2HPO_4$-$KH_2PO_4$, pH7.5）に組織片を浸漬した。

２）水流アスピレーターで脱気したのち、26℃の暗所で15時間保温した。

３）反応後に、組織を蒸留水で２回洗浄した。

４）95％エタノールを加え、80℃で５分間保持し、色素（フォルマザン）を抽出した。

５）抽出液の485nmにおける吸光度を測定した。

６）生存率の算出

生存率 ＝［（AFt－AFo）／（At－Ao）］×100

AFt：凍結した切片の抽出液の吸光度

AFo：凍結した切片の煮沸後における抽出液の吸光度

At：未凍結の切片の抽出液の吸光度

Ao：未凍結の切片の煮沸後における抽出液の吸光度

耐凍性の評価は、Spearman-Kärber法によって求められた$LT_{50}$を指標とした（Bittenbender・Howell Jr., 1974）。

## 2. 結果

### （1）気温の変動

Fig. 2-6に示したように、北海道大学農学部附属農場の最低気温は、10月から徐々に下がり、10月下旬には0℃以下になる日もあった。冬季には、平均気温は－3℃を中心にして変動するが、3月以降には10℃以上に上昇する日もあった。最低気温は、12月から2月までの間、－10℃以下になる日が多く、1999年1月22日には－12.7℃となった。

### （2）茎頂および茎の耐凍性の変動

TTC還元法によって評価したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性の変化についてみると、Fig. 2-7に示したように、1996年9月から10月にかけて強くなり、1996年10月～翌年1月には－52℃前後の極めて低い温度にも耐えられる状態を維持した後、1月から3月にかけて徐々に弱くなった。つぎに、茎の耐凍性の変化についてみると、1996年10月から12月にかけて徐々に強くなり、1996年12月から翌年1月までは－53℃～－55℃の極めて低い温度に遭遇しても生存できる状態を維持した後、1月から4月にかけて弱くなった。

茎頂の耐凍性と茎のそれとの差異についてみると、秋季から冬季にかけての耐凍性が増大する時期においては、茎頂の耐凍性のほうが早く増大することがわかった。冬季間の耐凍性の強い時期には、茎頂および茎の耐凍性には顕著な差異はみられなかったが、冬季から春季にかけての耐凍性が弱くなる時期には、茎頂の耐凍性のほうが強い状態で推移した。

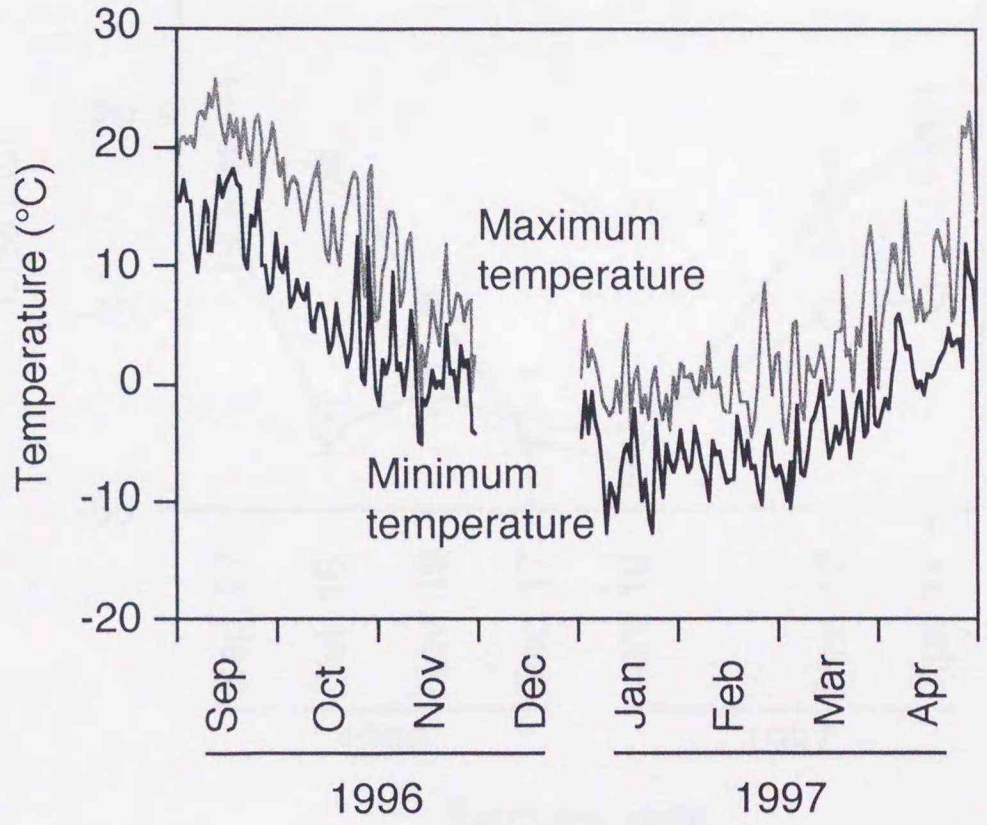



Fig. 2-6. Changes in daily maximum and minimum temperatures at Sapporo from September, 1996 to April, 1997.

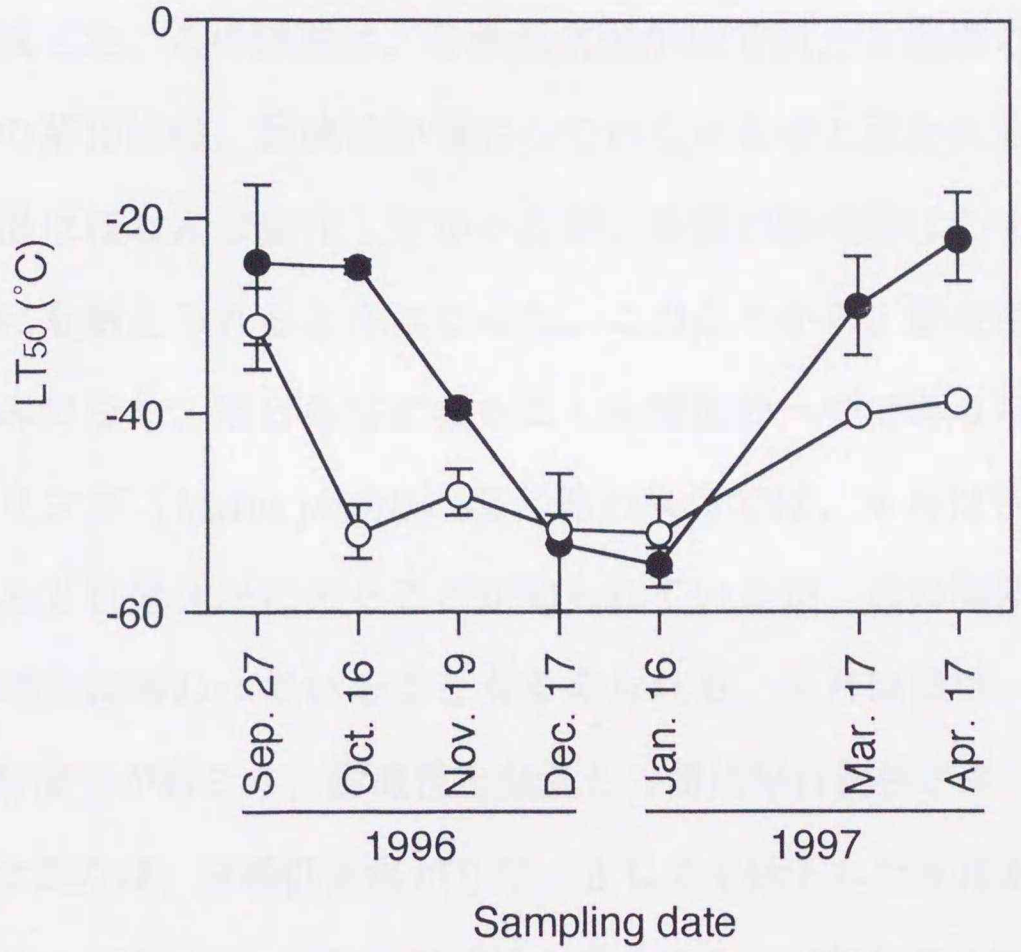



Fig. 2-7. Seasonal changes in $LT_{50}$ determined by TTC reduction test in shoot apices from field-grown *L. caerulea* twigs. $LT_{50}$ was obtained similar with Fig. 2-4.

## 第３節　第２章の考察

クロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性の季節的な変動について調査した結果、枝の伸長生長期および果実の発育期にあたる５～７月の時期の茎頂は、凍結・融解後に全て死滅した。この時期は、日最低気温が10℃以上と温暖であり、生長期にある植物体の茎頂には、耐凍性が備わっていないものと思われる。８月になると、日最低気温はほとんど変化しなかったが、茎頂の耐凍性はわずかに高まり、－５℃の凍結にも耐えられるようになった。このことから、耐凍性の増大には、気温の低下のみでなく、短日条件になることも要因の一つである可能性が示唆される。また、リンゴ（*Malus pumila*）など他の果樹では、７月は枝の伸長が停止し、８月になると自発休眠に入ることが知られているが、この時期の芽の充実程度が耐凍性の増大に関わっていることも考えられる。９月以降は、気温の低下とともにさらに耐凍性が高まり、耐凍性と気温との間に平行関係がみられた。特に、耐凍性が増大するのは、日最低気温が０℃～５℃まで低下した９月から11月であった。多年生植物の茎頂では、冬季に耐凍性が高まることが報告されており（Sakai, 1966；Katano，1986；Ezawaら，1989）、クロミノウグイスカグラ茎頂でも、12月から翌年３月にかけての冬季には－40℃以下の低温に耐えられる非常に高い耐凍性を備えていた。また、３月から４月にかけて耐凍性が急速に低下したが、これは、それまで０℃より低かった日最低気温が、５℃以上になったためであり、気温の影響を受けたものと考えられる。

リンゴ、ナシ（*Pyrus spp.*）などでは、耐凍性の高い時期の材料は、凍結・融解後の生存率が高いとの報告があり（Katanoら，1983；鈴木ら，1987）、クロミノウグイスカグラの茎頂でも、11月から翌年３月までは－30℃以下でも生存できる

高い耐凍性を示した。また、この時期の－196℃の凍結後の生存率は58.3％～91.7％となり、他の植物における結果と同様であった。この場合、注目すべきことは、1993年11月、1994年１月、２月および３月において、超低温（－196℃）凍結後の茎頂の生存率のほうが、－40℃で凍結した茎頂の生存率よりも高い値を示したことである。この理由は明らかではないが、融解過程における融解速度の差異などがその理由であると考えられる。すなわち、－40℃からの融解速度に比べて液体窒素（－196℃）からの融解速度がより急速であり、氷晶生成温度域を通過するときに受ける組織の傷害程度が少なかったものと推測される。

イネ（*Oryza sativa*）、アルファルファ（*Medicago sativa*）においても、耐凍性の検定にTTC還元法が用いられており（Anthonyら，1997；Monroy，1993）、本実験において、クロミノウグイスカグラの耐凍性評価にも応用できることが確認された。TTC還元法による耐凍性の評価については、培養法を用いた再生法による耐凍性の評価と同様に、耐凍性が秋季から冬季にかけて高まり、冬季には高いまま維持され、冬季から春季にかけて減少することが明らかになった。また、茎頂の耐凍性は茎のそれよりも早く増大し、春季においてもより高い状態を維持した。クロミノウグイスカグラにおけるTTC還元法による耐凍性の判定は、培養再生法による場合に比べて、冬季の高い時期以外の時期では、耐凍性がやや強く評価されたものの、同じ植物組織についての相対的な比較には十分に利用できるものと考えられる。

# 第３章　クロミノウグイスカグラ野外茎頂における含水率および内生物質の変化

第２章では、野外茎頂における耐凍性の季節的変動、低温馴化および脱馴化について調べ数種の知見が得られた。つぎに、気象条件の変化に伴う植物の耐凍性の獲得および消失の機構を明らかにするためには、気象条件の変化が植物の組織内成分に及ぼす影響について調査することが必要である。

第２章第１節において、気象条件の変化、特に最低気温の変化に応じて耐凍性が顕著に変わることがわかった。しかし、耐凍性の変化と気象条件の変化に伴う植物体組織内成分の変化については明らかになっていない。クロミノウグイスカグラにおいては気温の変化により耐凍性が大きく変動するが、これを植物体における数種の組織内成分含量との関連において調査した報告はみられない。本章では、クロミノウグイスカグラの耐凍性の変化と組織内成分含量との関連について調べた。

## 第１節　野外茎頂における含水率の季節的変動

本節では、野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性と組織内含水率との関連について検討した。

### １．材料および方法

#### （１）材料の調製

Fig. 3-1に示す各採取日に、クロミノウグイスカグラの休眠枝または発育枝を取り、第２章第１節と同様の方法で茎頂（横径約２mm、長さ約２mm、葉原基８個

程度を有するもの）を取り出して用いた。調製後の材料は、乾燥による傷害を抑えるため、シャーレ内に敷いた湿潤ろ紙上に置いて０℃に保管した。

（２）水分測定

材料約200mgを70℃のオーブン内で３日間乾燥させたのち、乾物重を測定し、生体重との差から含水率を算出した。

２．結果

1994年４月に55％であった茎頂の含水率は、６月には82％に増加したが、８月になると70％に減少し、その後漸減して、翌年の1995年１月には、52％の最も低い値となった（Fig. 3-1）。続いて、２月および３月（57％）から漸増して５月には72％の高い値を示し、その後は減少し７月には58％になった。このように、茎頂含水率の変動は、1993年と1994年の間で異なったが、５月から６月にかけて比較的高いということが共通する特徴であった。また、耐凍性が高い10月から翌年３月までの時期の含水率は他の時期のそれと比べて低いことが明らかになった。

## 第２節　野外茎頂における可溶性糖質の季節的変動

本節では、野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性と組織内成分含量との関連について検討するため、特に組織内遊離糖含量を測定した。

１．材料および方法

（１）材料の調製

Fig. 3-2に示す各採取日に、本章第１節と同様の方法によりクロミノウグイスカグラの枝から茎頂を取り出して材料とした。

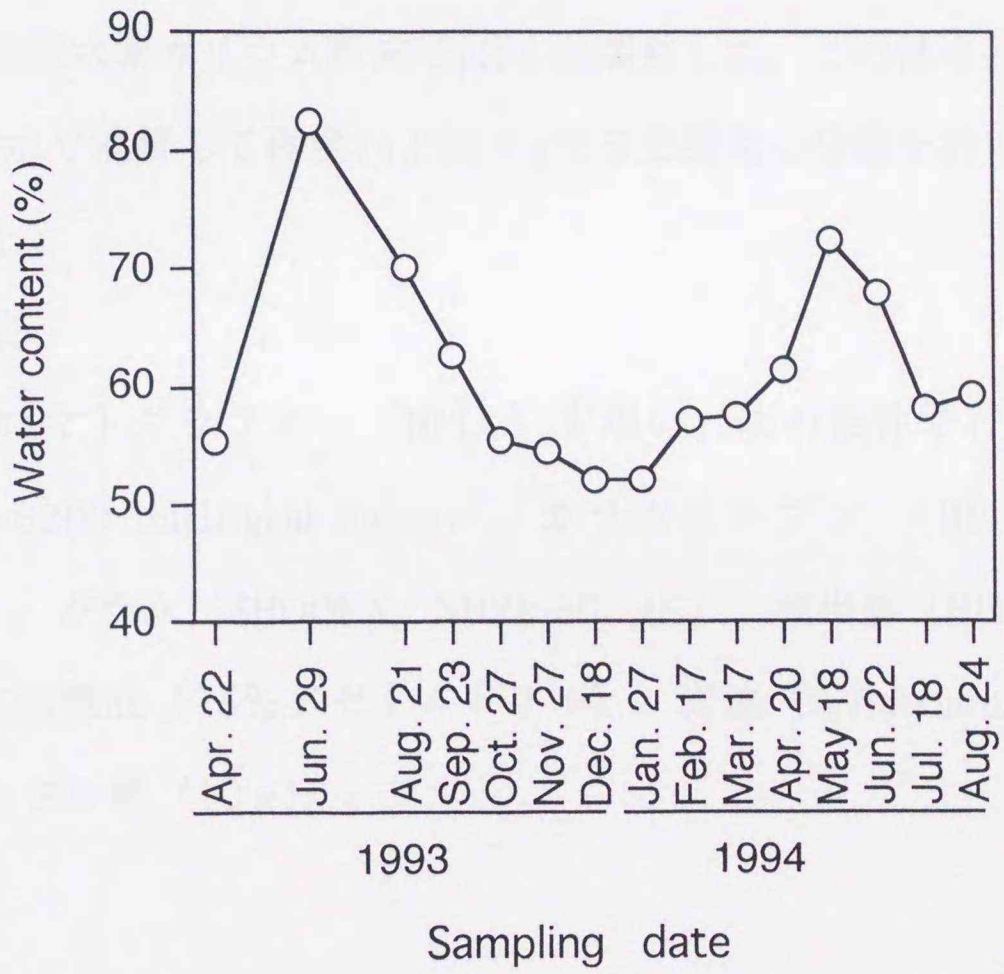



Fig. 3-1. Seasonal changes in water content of shoot apices of *L. caerulea*.

（2）遊離糖含量の測定

1）試料作製法

材料約200mgに、海砂（30～50メッシュ）200mg、0.2N過塩素酸2mlおよび内部標準物質として20mMラクトース1mlを添加したのち、0℃の乳鉢中で磨砕した。この抽出液に、純水1mlで共洗いした残渣を加え、高速冷却遠心分離機（HITACHI, 20PR-5）を用いて、4℃、14,000×gで5分間遠心分離を行ったのち、上清を取り、炭酸水素カリウム粉末でpH 4に調整した。この液を凍結乾燥したのち、0.5mlの純水で溶解して再度14,000×gで5分間遠心分離を行い、その上清を分析試料とした。

2）糖分析法

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用い、次の条件で行った。ポンプ（HITACHI, L-6200 Intelligent Pump）、カラムオーブン（HITACHI, L-5020 Column Oven）、カラム（SHODEX, NH2P-50 4E）、検出器（HITACHI, L-3300 RI Monitor）、溶離液（75%アセトニトリル）、流速（0.7ml/min.）、温度（30℃）およびサンプル量（10μl）。

2．結果

クロミノウグイスカグラ茎頂からは5種類の糖、すなわち、フルクトース、グルコース、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースが検出された（Fig. 3-2）。

糖の総含量についてみると、4月には105.0μmol/g FWであったが、6月には32.4μmol/g FWに減少し、さらに、8月から翌年1月まで漸増して、1月には164.3μmol/g FWの高い値を示した。その後5月まで漸減して78.3μmol/g FWになり、再び増加して8月には157.8μmol/g FWとなった。

つぎに、糖の組成についてみると、フルクトースおよびグルコースの含量は季

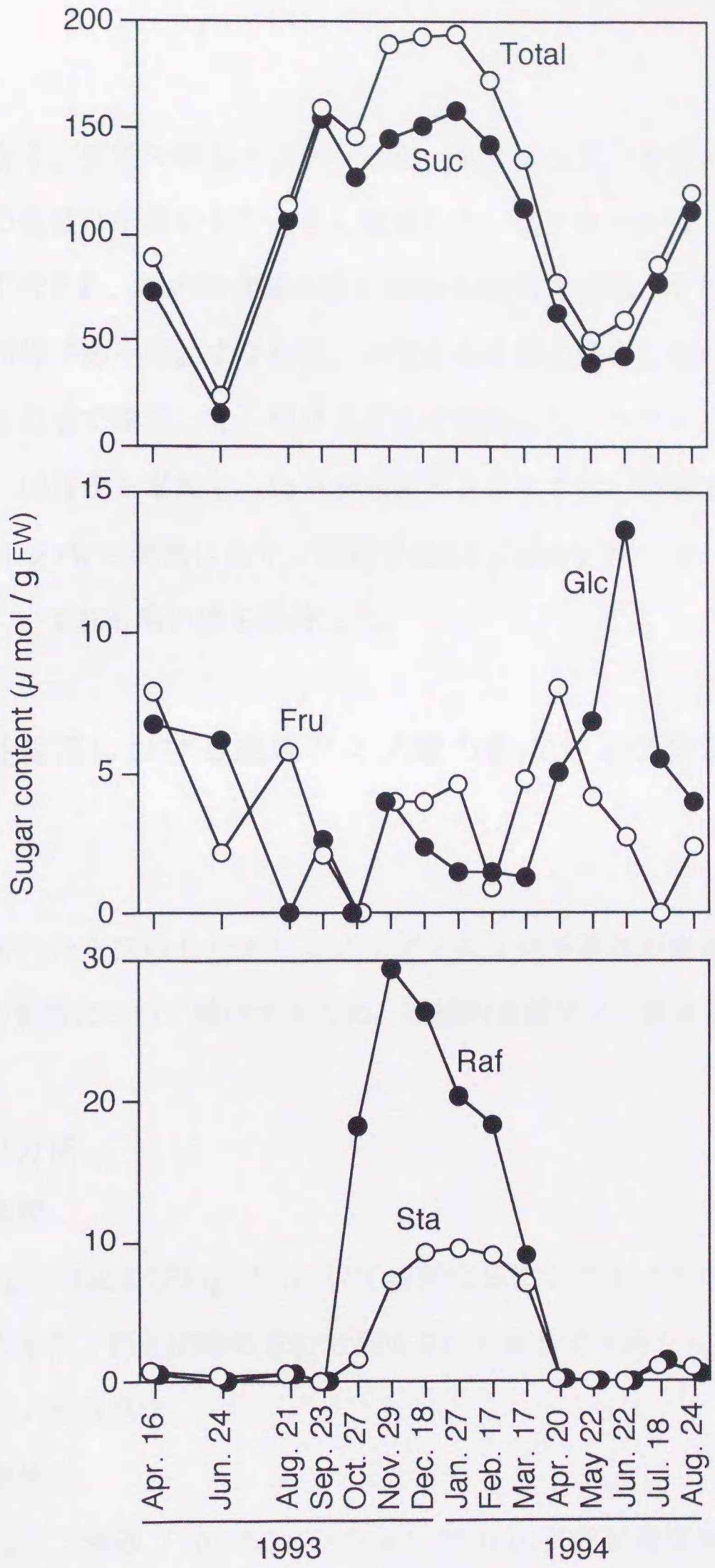



Fig. 3-2. Seasonal changes in sugar content in shoot apices of *L. caerulea*. Fru, fructose; Glc, glucose; Suc, sucrose; Raf, raffinose; Sta, stachyose; Total, the sum of these sugars.

節を問わず少なく、変動の幅も小さかったが、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースの含量は季節により大きく変動した。スクロースは、可溶性少糖類の中で最も多く含まれ、糖の総含量の約50%から90%を占め、その変動は糖の総含量の変動と同様であった。すなわち、4月から6月に減少したのち、翌年1月まで漸増し、5月まで漸減して、再び8月まで増加した。ラフィノースおよびスタキオースは、10月から増加し、11月から翌年3月までは、前者では9.0 $\mu$ mol/g FW～29.4 $\mu$ mol/g FWの範囲にあり、後者では7.1 $\mu$ mol/g FW～9.5 $\mu$ mol/g FWの範囲にあって、いずれも高い値を維持した。

## 第3節　野外茎頂における遊離アミノ酸の組成および含量の季節的変化

本節では、野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性に及ぼす組織内成分含量の影響について検討するため、組織内遊離アミノ酸含量を測定した。

### 1．材料および方法

#### （1）材料の調製

Fig. 3-3、Fig. 3-4およびFig. 3-5に示す各採取日にクロミノウグイスカグラの枝を採取し、本章第1節と同様の方法で茎頂を取り出して材料とした。

#### （2）遊離アミノ酸の測定

1）試料作製法

材料約200mgに、海砂（30～50メッシュ）200mg、0.2N過塩素酸2 mlおよび内部標準物質として0.25mM D,L-ノルロイシン1 mlを添加したのち、0℃の乳鉢中で磨砕した。この抽出液に純水1 mlで共洗いした残渣を加え、高速冷却遠心分

離機（HITACHI, 20PR-5）を用いて、4℃、14,000×gで5分間遠心分離を行い、上清を試料とした。

2）アミノ酸分析法

アミノ酸の分析については、高速アミノ酸自動分析計（HITACHI, 835）を用い、次の条件で行った。カラム（4mm×250mm（#2617））、流速（0.275ml/min.）、発色方法（ニンヒドリン法）。

## 2．結果

遊離アミノ酸の総量を茎頂採取時期別にみると、4月は37μmol/g FWであったが、6月には5μmol/g FWにまで減少し、9月になると11μmol/g FWまで増加した（Fig. 3-3）。しかし、糖の場合とは異なり、その後、10月から翌年1月にかけて、耐凍性の変化と一致するような変動は認められず、アミノ酸の総量はそのままの状態で2月まで7～9μmol/g FWの低い値を維持した。その後、3月（18μmol/g FW）および4月（36μmol/g FW）に増加した後、5月には24μmol/g FWと減少した。6月および7月には6μmol/g FWおよび7μmol/g FWの低い値を示したが、8月には16μmol/g FWと増加した。

個々のアミノ酸についてみると、トレオニンおよびセリンに変動がみられたが、3月から5月にかけての春季に増加し、その他の時期には量的変化はみられなかった（Fig. 3-3）。プロリン含量は、3月から4月に増加し、1.4μmol/g FWから3.6μmol/g FWとなり、冬季には増加しなかった。また、アルギニンについてみると、季節的変動はほとんど認められなかった（Fig. 3-4）。つぎに、アルギニンと同様に塩基性アミノ酸であるヒスチジンおよびリシンについてみると、ヒスチジンは3月から5月までの間にわずかに増加したが、その他の時期には変動することはなく、リシンはアルギニンと同様に季節的変動を示さなかった。酸性アミノ酸で

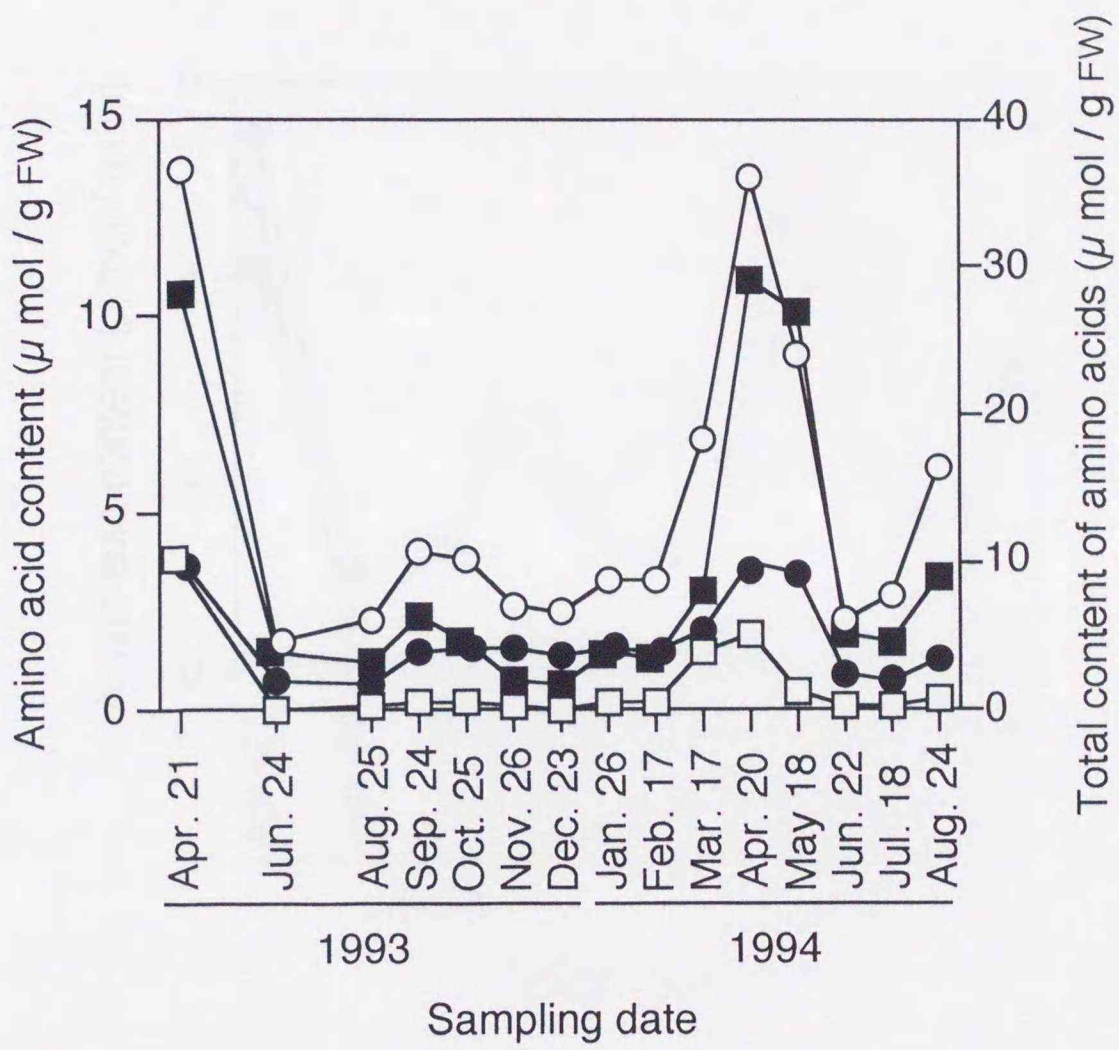



Fig. 3-3. Seasonal changes in free amino acid content and the total content of amino acids in shoot apices of *L. caerulea*. ■, threonine; ●, serine; □, proline; ○, the total content of amino acids.

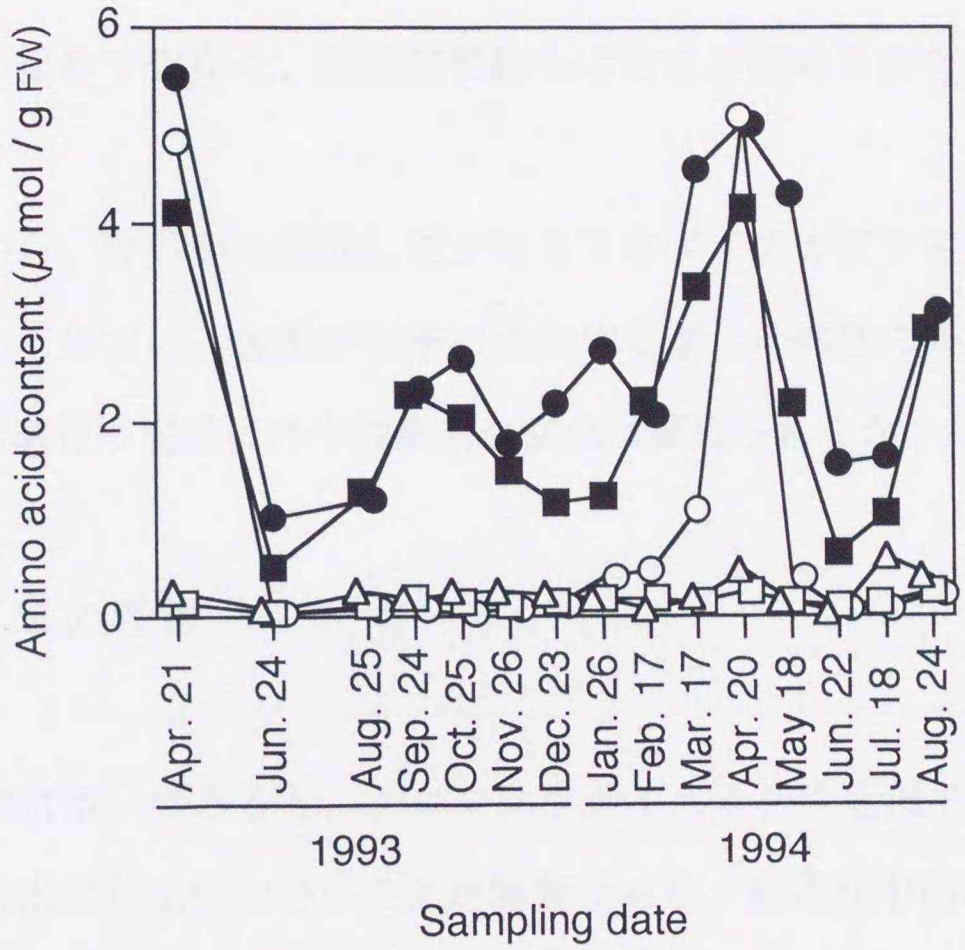



Fig. 3-4. Seasonal changes in contents of acidic and basic amino acids in shoot apices of *L. caerulea*. ■, aspartic acid; ●, glutamic acid; □, lysine; ○, histidine; △, arginine.

あるアスパラギン酸およびグルタミン酸についてみると、両者とも6月および7月に減少し、秋季から冬季にかけて2 μmol/g FW前後の値を示した後、春季に約4 μmol/g FWに増加した。アラニン、バリン、イソロイシンおよびロイシンは、春季にやや増加したほか他の時期にはほとんど変化しなかった（Fig. 3-5）。グリシン、システイン、メチオニン、チロシンおよびフェニルアラニンについては、検出された量が極めて少なく、季節的変動もほとんど認められなかった（資料未掲載）。

以上の結果から、野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂に含まれるアミノ酸の多くのものでは、含量が春季に増加するが、その他の時期には大きな変動は示さず、耐凍性の変動に伴う特徴的な変化は認められなかった。

## 第4節　第3章の考察

（1）含水率についてみると、クロミノウグイスカグラ茎頂では、5月から6月にかけての含水率が比較的高いことが特徴であり、耐凍性が高い10月から翌年3月にかけての含水率は他の時期のそれと比べて低く推移することが明らかとなった。低温馴化に伴い含水率が低下することが木本植物、サボテン類（*Opuntia spp.*）などについて報告されており（酒井，1957；Goldstein・Nobel，1994）、本研究で用いたクロミノウグイスカグラにおいても、夏季から冬季にかけての低温馴化期に含水率が低下しており、含水率の低下と耐凍性増大との相関には有意性が認められる。なお、1993年9月ならびに1994年の4月、7月および8月の茎頂では耐凍性が低く（$LT_{50} \geqq -5$℃）、1994年2月および3月の茎頂では耐凍性が高い（$LT_{50} \leqq -40$℃）にもかかわらず、含水率はいずれも60%前後の比較的小さい値であった。このことは、これらの時期においては、含水率以外の要因が耐凍性に

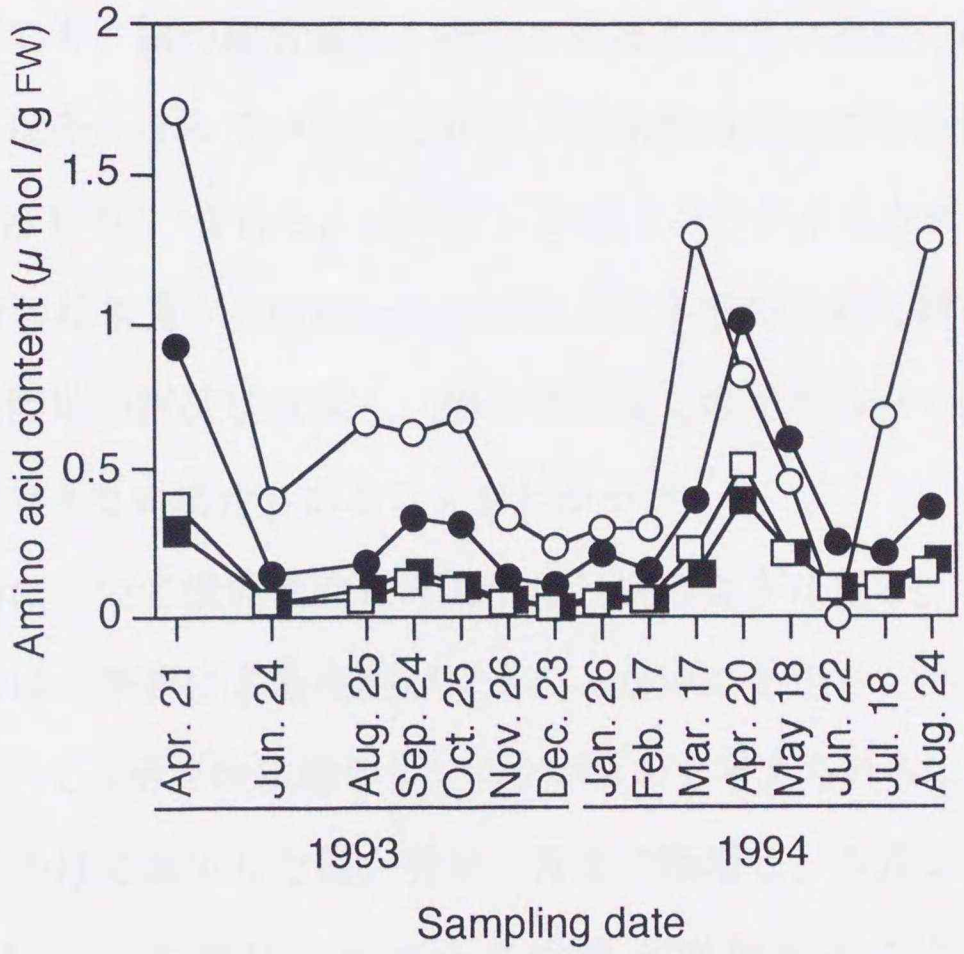



Fig. 3-5. Seasonal changes in content of minor amino acids in shoot apices of *L. caerulea*. ○, alanine; ●, valine; □, isoleucine; ■, leucine.

影響を及ぼしているものと考えられる。

（2）つぎに、糖の総含量についてみると、1993年８月から翌年１月まで漸増したのち減少し、４月から６月にかけては低い値で推移した。木本植物の枝組織や草本のシバにおいては冬季に可溶性糖の総含量が増加することが報告されており（Sakai，1962；Sakai・Yoshida，1968；Rogersら，1975）、クロミノウグイスカグラにおいても、糖の総含量は、概して耐凍性の低い時期には少なく、耐凍性の高い時期には多くなっていた。しかし、耐凍性の向上に可溶性糖が関与していないとする報告もあり（Fryら，1991）、クロミノウグイスカグラにおいても、８月～10月の糖の総含量が100μmol/g FW以上と冬季のそれと同様に多いにもかかわらず、その時期の耐凍性は低く、糖の総含量との対比のみで耐凍性の変動を説明することができない場合もあることがわかった。

糖含量の変動について構成糖別に考察すると次のようになる。グルコースおよびフルクトースは、季節による変動がほとんどないことから、クロミノウグイスカグラ茎頂においては耐凍性に関与していないものと考えられる。スクロースは、４月から６月にかけて減少した後、翌年１月まで漸増し、５月まで漸減して、再び８月に増加した。冬季にスクロース含量が増加することが草本のシバ（*Eremochloa ophruoides*）で報告されており（Fryら，1993）、クロミノウグイスカグラについては、スクロース含量も糖の総含量と同様に、夏季よりも冬季に多かった。しかし、８月から10月のスクロース含量が100μmol/g FW以上と冬季と同様に多いにもかかわらず、その時期の耐凍性は低かった。このことから、糖の総含量の場合と同様に、スクロース含量が、耐凍性の増大に密接に関与しているとは必ずしも断定できない。

一方、ラフィノースおよびスタキオースについてみると、10月から増加し、11月から翌年３月まで、高い値を維持した。このように、少糖類（オリゴ糖）に分

類されるラフィノースおよびスタキオースの含量が多い時期と耐凍性が高い時期とは極めてよく一致した。ラフィノースおよびスタキオースのようなラフィノース類が耐凍性に関与しているとする報告があり（Hinsleyら，1992；Wiemken・Ineichen，1993；Castonguay，1995；Flinn・Ashworth，1995）、本研究でも、この傾向が顕著に認められたため、植物組織の耐凍性向上とラフィノース類との間に何らかの関連があるものと推察される。

なお、今後は、耐凍性の向上と糖との関連については、総含量または種類別含量のいずれにおいても、その時点における可溶性糖の含量のみでなく、リグニンおよびペクチンなどの構造物質をも含めて把握する必要があると考えられる。

（3） Sagisaka・Araki（1983）は、木本植物のアミノ酸含量の季節変化について調査し、耐凍性の高くなる冬季に、①アルギニンのみが蓄積されるもの、②プロリンのみが蓄積されるもの、③アルギニンおよびプロリンが蓄積されるものに分類している。本研究の対象としたクロミノウグイスカグラにおいては、プロリンおよびアルギニンの冬季の蓄積は認められず、いずれにも分類されなかった。しかし、プロリンをはじめトレオニン、セリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸などの多くのアミノ酸について、春季の蓄積がみられた。また、これらのアミノ酸は初秋の９月にわずかながら増加した。このことから、クロミノウグイスカグラ茎頂においては、４月に蓄積されたアミノ酸は、５月および６月の枝葉の生長に利用され、９月に蓄積されたアミノ酸は、茎頂組織の充実や花芽分化のために費やされているものと推測され、耐凍性と直接的に関連している変化ではないと思われる。しかし、茎頂組織を充実させることにより、間接的に耐凍性増大に関与していると考えられ、今後さらに検討する必要がある。

以上のことから、クロミノウグイスカグラの野外茎頂の耐凍性増大に関与する要因として、組織内における含水率の低下、糖含量の増加、糖濃度の増大および

糖組成の変化が考えられる。特に、糖の中でもラフィノース類の含量の変動と耐凍性の変化が極めてよく一致したためラフィノース類の含量の増減がクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性増大と密接に関連していると推測される。

# 第4章　*In vitro* 培養系によるクロミノウグイスカグラ耐凍性の検証

近年、培養植物体の組織・細胞を用いて行った低温適応についての研究結果が報告されている（Chen・Gusta，1983；Gordon-Kamm・Steponkus，1984；Orrら，1985；Leborgneら，1995a）。培養植物体の組織を用いる研究では、野外の材料を用いる場合に比べて、均一な材料が適時に得られ、取扱いが容易であるなどの利点が挙げられる。クロミノウグイスカグラ培養植物体の組織の凍結生存性を向上させるには、植物体の低温処理および高濃度の糖添加培地による試料の前培養を行うことが効果的であるとの報告がある（鈴木ら，1992）。*In vitro*培養系で生長する培養植物体は、野外の自然条件下で生長する植物体と比べて、組織内成分ならびに細胞・組織の構造および生理的特性が異なる部分もあるが、培養植物体組織と野外から採取した材料との間の共通性または異質性を踏まえることにより、耐凍性に関与する要因を探究する場合の有効な材料となり得る。

本章では、クロミノウグイスカグラ*in vitro*培養系において形成された植物体の組織およびカルスを用いて、低温馴化処理および脱馴化処理を行い、温度処理に伴う耐凍性の変動について検討した。

## 第1節　培養植物体およびカルスの低温馴化処理に伴う耐凍性の変化

本節では、低温馴化処理に伴う耐凍性の変化について調べるため、培養植物体の節部切片、節間部切片およびカルスを用いて、凍結・融解後における生存率の調査およびTTC還元による耐凍性の検定を行った。

## 1．材料および方法

### （1）培養植物体の作出

北海道大学農学部附属農場に栽植されているクロミノウグイスカグラから、第2章第1節と同様の方法で茎頂を摘出したのち、植物体再生用培地（MS培地の全成分を1/2とした培地に、$GA_3$ 1 $\mu$M、BA 1 $\mu$Mおよびスクロース30g/lを添加し、pH5.7に調整したのち、寒天7 g/lを添加したもの）に置床し、25℃、16時間日長（白色蛍光灯、4,000lx）の条件下で培養した（初代培養）。つぎに、初代培養で得られた培養植物体シュートの節部切片を初代培養と同様の条件下で継代培養することにより増殖を繰り返し、大量の培養植物体を得ることができた。これらのうち、継代後4か月を経過し発根している植物体を実験に用いた（Fig. 4-1A）。

### （2）カルスの誘導および維持・増殖

本節（1）で得られたクロミノウグイスカグラ培養植物体から、節部を切り出し、カルス生長用培地（植物体再生用培地の$GA_3$ 1 $\mu$MおよびBA 1 $\mu$Mを除き、BA 10 $\mu$Mおよびnaphtaleneacetic acid 10 $\mu$Mを添加したもの）に置床し、本節（1）と同様の条件下で培養することによりカルスを誘導した。つぎに、得られたカルスの切片をカルス生長用培地に置床し、同様の条件下で継代培養することにより維持・増殖させた。これらのカルスのうち、移植後1か月を経過したものを用いた（Fig. 4-1B）。

### （3）培養植物体およびカルスの低温馴化ならびに植物材料の調製

培養植物体の低温馴化は、培養容器ごと5℃、8時間日長（白色蛍光灯、4,000lx）の条件下に移して7日間経過してから、さらに0℃、8時間日長の条件下に移し、13日間培養することにより行った。対照として継代培養と同様の条件

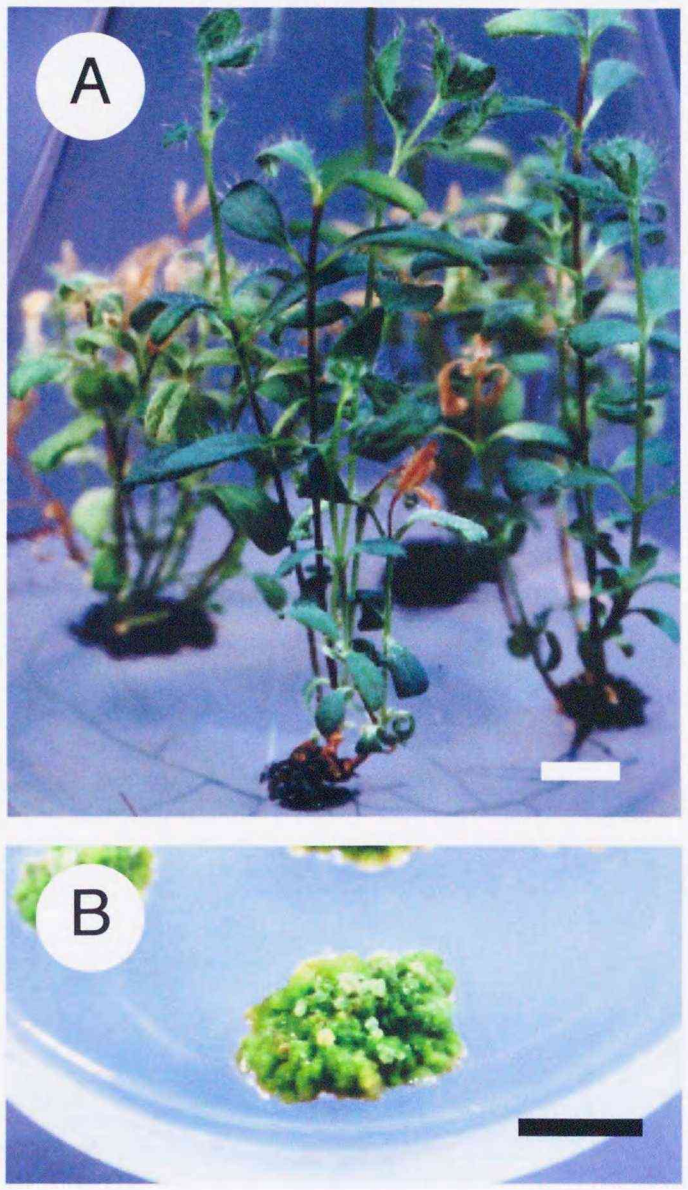



Fig. 4-1. Growing plantlets (A) and proliferating calli (B) of *L. caerulea* in culture system. Bar = 5 mm

下（25℃、16時間日長、4,000lx）で生長させたものを用いた。これらの培養植物体のシュートから腋芽２つを含む節部切片（長さ約５mm）および節間部切片（長さ約５mm）を切り取り、実験材料とした。また、カルスの低温馴化は、カルスを培養容器ごと５℃、８時間日長の条件下に移して20日間行った。このカルスから、約３mm立方に調製したものを材料に用いた。また、カルスについては、維持・増殖の場合と同じ条件下で培養したものを対照とした。

（４）再生法による耐凍性の調査

１）凍結および融解の手順

低温馴化処理の期間と耐凍性獲得との関連についての調査では、節部切片、節間部切片およびカルスを－7.5℃まで冷却し（予備実験によってこの温度まで冷却することが適切であることを確認している）、30分間保持した。また、低温馴化完了時における耐凍性について検討した場合には、Fig. 4-5、4-6および4-7に示す各温度まで冷却し、それぞれの温度で30分間保持した。その他の凍結・融解などの手順は、第２章第１節と同様の方法で行った。

２）培養および調査

節部切片については、腋芽からシュートが伸長したものを生存と判定して、次の式により生存率を算出した。

節部切片の生存率（%）＝（シュート形成切片数／供試切片数）×100

節間部切片については、カルス形成が認められたものを生存と判定し、以下の式によりカルス形成指数を算出した。

節間部切片におけるカルス形成指数 ＝［（D－C）／（B－A）］×100

A：無凍結処理切片の培養前における生重

B：無凍結処理切片の培養後における形成カルスを含む全生重

C：凍結処理切片の培養前における生重

D：凍結処理切片の培養後における形成カルスを含む全生重

カルスについては、培養過程におけるカルスの増殖により生存を判定し、以下の式によりカルス増殖指数を算出した。

カルス増殖指数＝［（d－c）／（b－a）］×100

a：無凍結処理カルスの培養前における生重

b：無凍結処理カルスの培養後における生重

c：凍結処理カルスの培養前における生重

d：凍結処理カルスの培養後における生重

なお、調査はいずれも培養開始6週間後に行った。

（5）TTC還元法による耐凍性の調査

0.2℃／分の冷却速度で冷却し（－3℃で植氷）、所定の温度で取り出した。その他は、第2章第2節と同様の方法で行った。

2．結果

（1）培養植物体およびカルスの耐凍性に及ぼす低温馴化期間の影響

1）低温馴化処理を行った区（以下低温馴化処理区）の節部切片および低温馴化処理していない区（以下対照区）の節部切片を用いて、馴化処理期間と耐凍性（－7.5℃における生存率）との関連について調べた結果をFig. 4-2に示した。対照区の生存率は、処理期間の長短に関わらず0％から21％と低い値であったのに

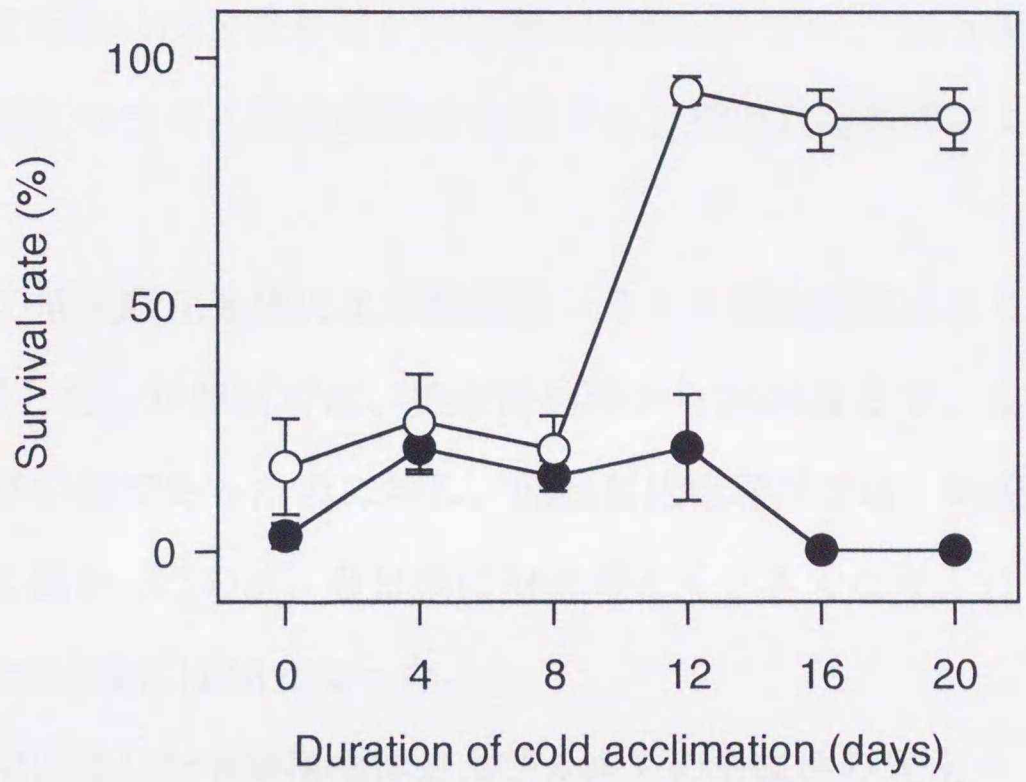



Fig. 4-2. Effect of cold acclimation duration on survival rate of *L. caerulea* lateral buds that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. ○, cold acclimation at 5°C for seven days and sequentially at 0°C; ●, nonacclimation. Nodal segments with lateral buds were frozen at -7.5°C. Survival rate means the ratio of shoot-forming segments to all segments used. Vertical bars represent standard errors.

対し、低温馴化処理区では処理開始時から８日後までは27％以下と低かったが、処理12日後以降では88％以上と著しく高くなった。

２）つぎに、節間部切片についてみると、Fig. 4-3に示したように、低温馴化処理区では処理期間が長くなるにつれ耐凍性（カルス形成指数により評価）が増大し、カルス形成指数は12日後および16日後では約50となり、20日後には73になった。一方、対照区のカルス形成指数は10以下と、低温処理期間によらず小さいまま推移した。

３）カルスの低温馴化処理による耐凍性（カルス増殖指数により評価）の変化をFig. 4-4に示した。対照区では、処理開始時から20日後まで、カルス増殖指数３から７と小さい値であったのに対し、低温馴化処理区では、処理開始時から４日後までは４と低かったのが、８日後に56と著しく大きくなり、12日後には85、16日後で69、20日後には58となった。

（２）低温馴化処理した培養植物体およびカルスの耐凍性の変化

１）再生法により耐凍性を評価した場合

i）再生法によって評価した節部切片の生存率（シュート形成率により評価）についてみると、Fig. 4-5に示したように、低温処理開始14日後においては、対照（無低温馴化処理）区では、０℃以上の冷却温度域において100％を示したものの、－５℃では76％、－7.5℃で39％、－10℃以下では21％以下となった。一方、低温馴化処理区では、－５℃において94％の生存率を示し、－7.5℃で85％、－10℃および－12.5℃でも67％となり、－５℃～－12.5℃の範囲でも高い値を示した。

ii）つぎに、節間部切片についてみると、Fig. 4-6に示したように、処理14日後における耐凍性（カルス形成指数により評価）は、対照区では、冷却温度０℃以上の温度域でカルス形成指数84以上と大きかったものの、０℃より低い温度域で

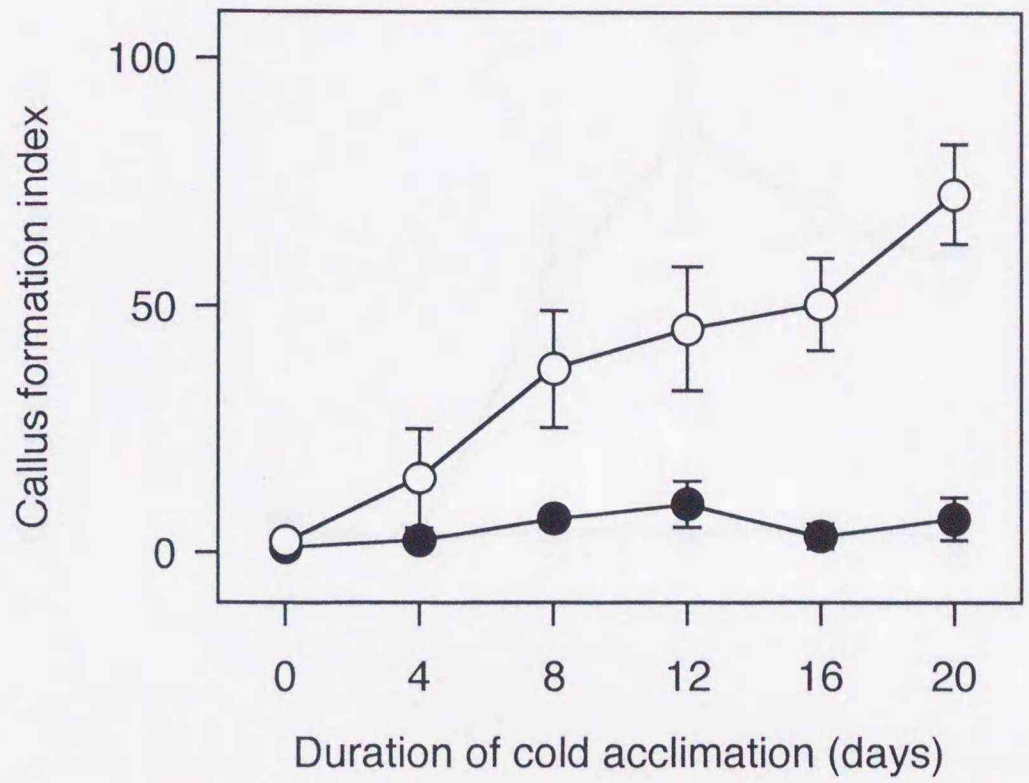



Fig. 4-3. Effect of cold acclimation duration on callus formation index of *L. caerulea* internodes that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. ○, cold acclimation at 5°C for seven days and sequentially at 0°C; ●, nonacclimation. Internodal segments were frozen at -7.5°C. Callus formation indices were calculated by the equation described in Materials and Methods. Vertical bars represent standard errors.

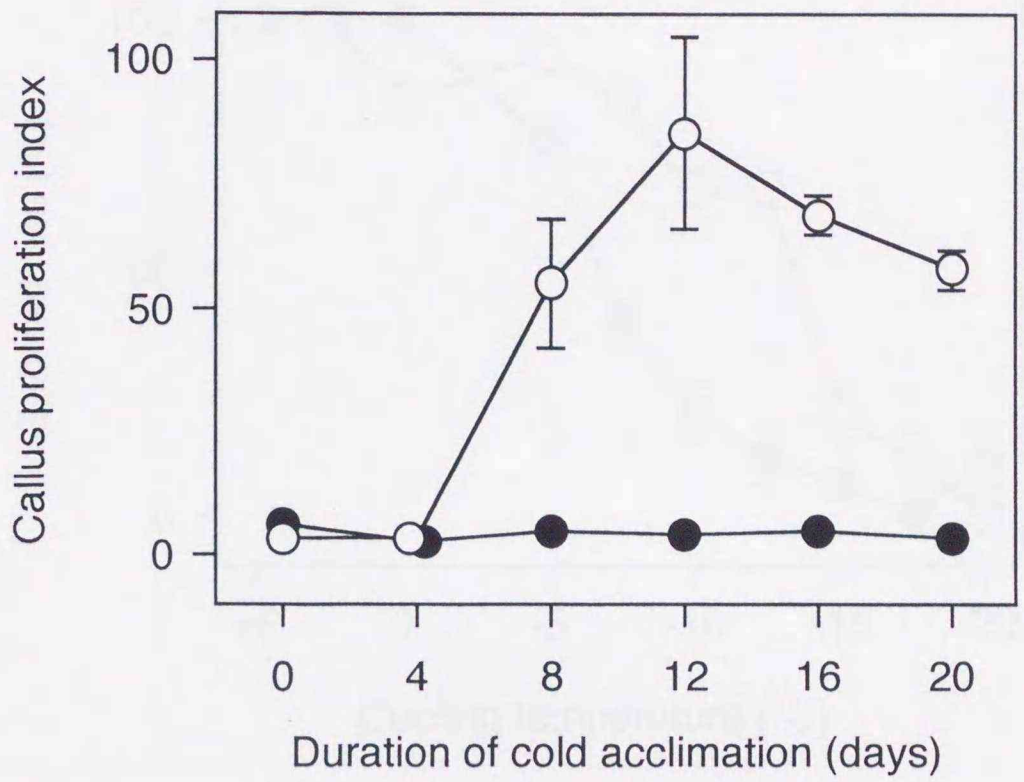



Fig. 4-4. Effect of cold acclimation duration on callus proliferation index of *L. caerulea* callus that were excised from cold-acclimated or nonacclimated calli growing *in vitro*, frozen, thawed, and cultured. ○, cold acclimation at 5°C for seven days and sequentially at 0°C; ●, nonacclimation. Callus segments were frozen at -7.5°C. Cullus proliferation indices were calculated by the equation described in Materials and Methods. Vertical bars represent standard errors.

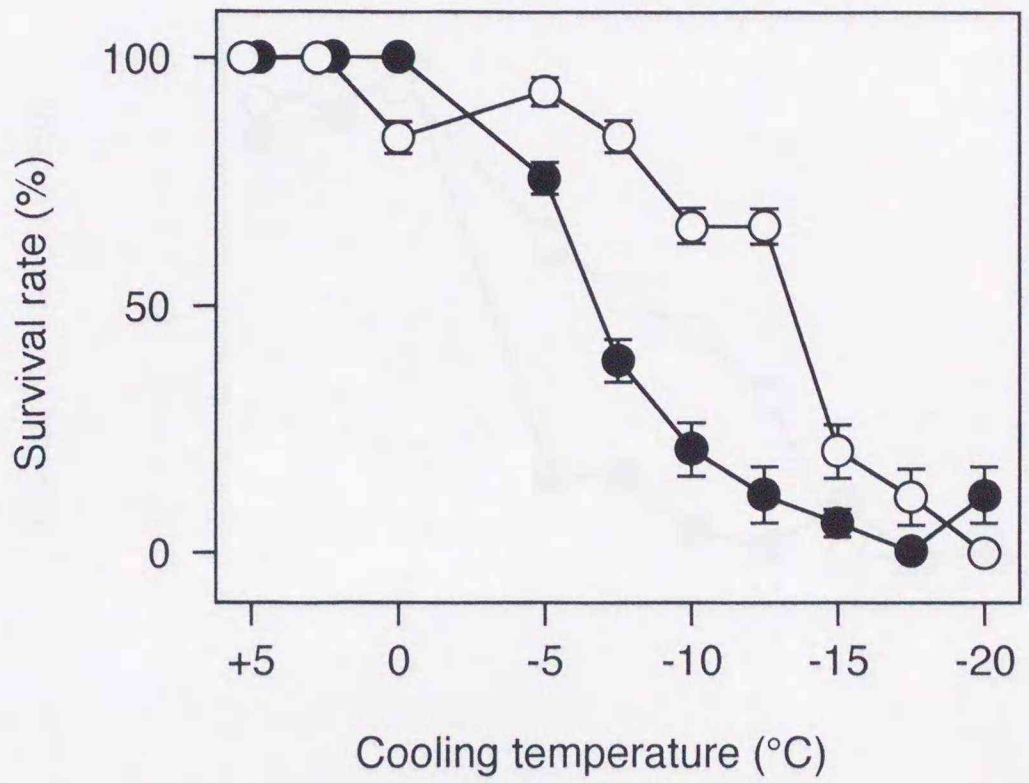



Fig. 4-5. Effect of cold acclimation on survival rate of *L. caerulea* lateral buds that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. Nodal segments with lateral buds from nonacclimated (●) or cold-acclimated (at 5°C for 7 days and then at 0°C for additional 7 days) (○) plantlets were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate means the ratio of shoot-forming segments to all segments used. Vertical bars represent standard errors.

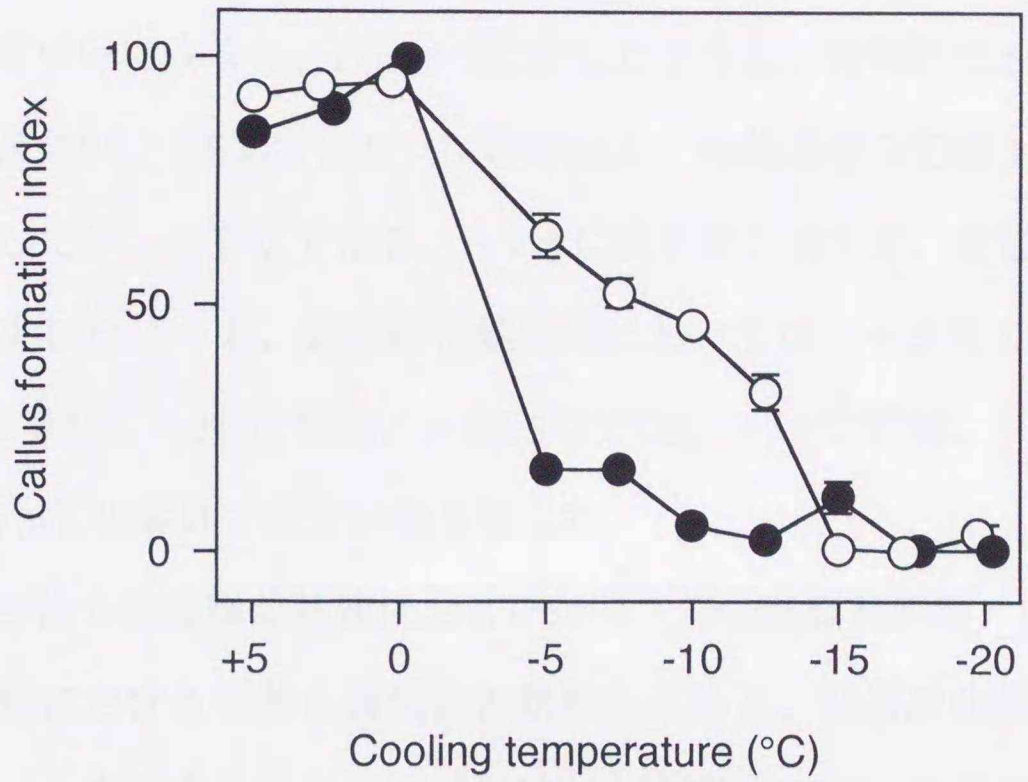



Fig. 4-6. Effect of cold acclimation on callus formation index of *L. caerulea* internodes that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. Internodal segments from nonacclimated (●) or cold-acclimated (at 5°C for 7 days and then at 0°C for additional 7 days) (○) plantlets and cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Callus formation indices were calculated by the equation described in Materials and Methods. Vertical bars represent standard errors.

は急激に小さくなり、－５℃および－７.５℃で17、－10℃以下では11以下であった。これに対し、低温馴化処理した節間は、－12.5℃の冷却温度範囲まで生存した組織片があり、－５℃でカルス形成指数65、－7.5℃で53、－10℃で47、－12.５℃で33であった。

iii）カルスについてみると、Fig. 4-7に示したように、対照区においては、５℃でカルス増殖指数94、2.5℃で100、０℃で81と、冷却温度０℃以上の温度域では大きい値を示したが、－５℃では３、－7.5℃以下で１以下と、０℃より低い温度域で急速に減少した。一方、低温馴化処理区においては、－５℃でカルス増殖指数74、－7.5℃で75、－10℃で32、－12.5℃で18、－15℃で12、－17.5℃で１と－５℃から－7.5℃の範囲で大きい値を示した。

iv）処理14日後の低温馴化処理区および対照（無低温馴化処理）区の－7.5℃で凍結した各材料における培養６週間後の状態をみると、低温馴化後の節部は、３～７cmのシュートを形成したが（Fig. 4-8A）、対照区では、生長がみられず褐変した（Fig. 4-8B）。低温馴化処理した節間部切片は、切り口周辺から旺盛なカルス形成が起こり、生重25mgから86mgのカルスを形成した（Fig. 4-8C）。一方、対照（無低温馴化処理）区の節間部切片は、褐変し、カルス形成はみられなかった（Fig. 4-8D）。低温馴化処理を行ったカルスは、生き残った細胞が活発に分裂し、生重121mg～225mgの大きさまで増殖した（Fig. 4-8E）。低温馴化処理を行っていないカルスは褐変して死んだ（Fig. 4-8F）。

２）TTC還元法により耐凍性を評価した場合

i）培養植物体およびカルスの生存率に及ぼす凍結温度および低温馴化の影響についてTTC還元法によって評価した。低温馴化処理14日後における節部の耐凍性をFig. 4-9に示した。対照区の節部は、０℃以上の冷却温度域で生存率87％以上と高かったものの、０℃より低い温度域では急激な生存率の低下がみられ、－３

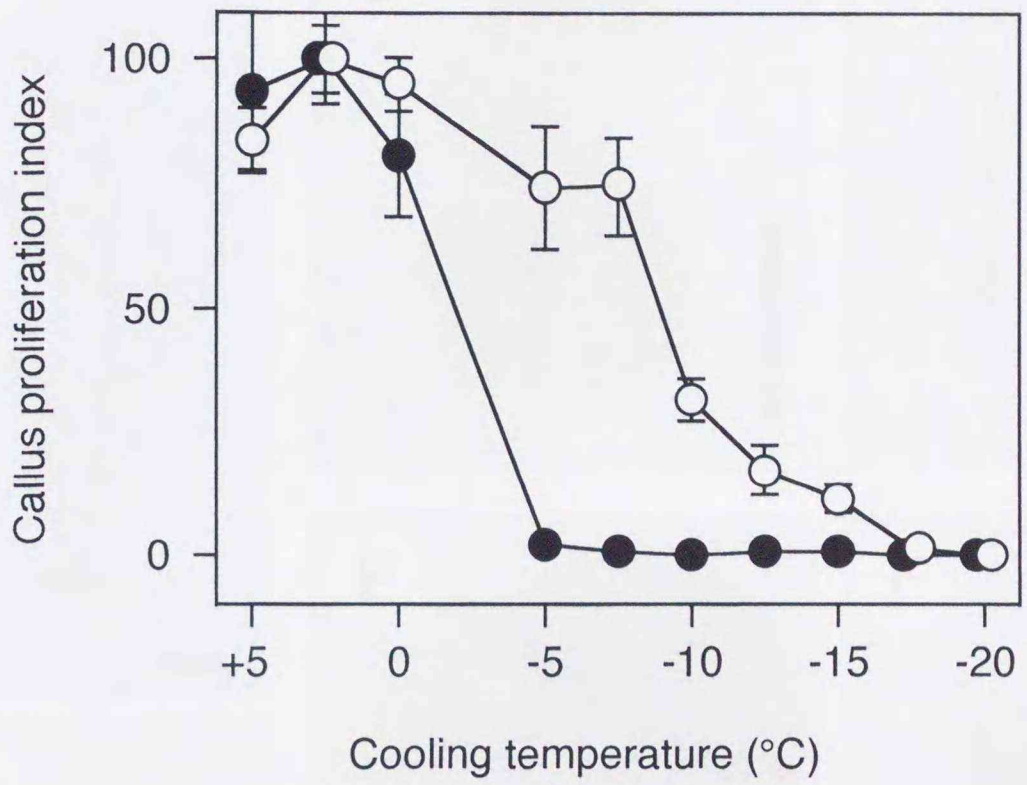



Fig. 4-7. Effect of cold acclimation on callus proliferation index of *L. caerulea* calli that were excised from cold-acclimated or nonacclimated calli growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. Callus segments from nonacclimated (●) or cold-acclimated (at 5°C for 14 days) (○) calli and cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Callus formation indices were calculated by the equation described in Materials and Methods. Vertical bars represent standard errors.

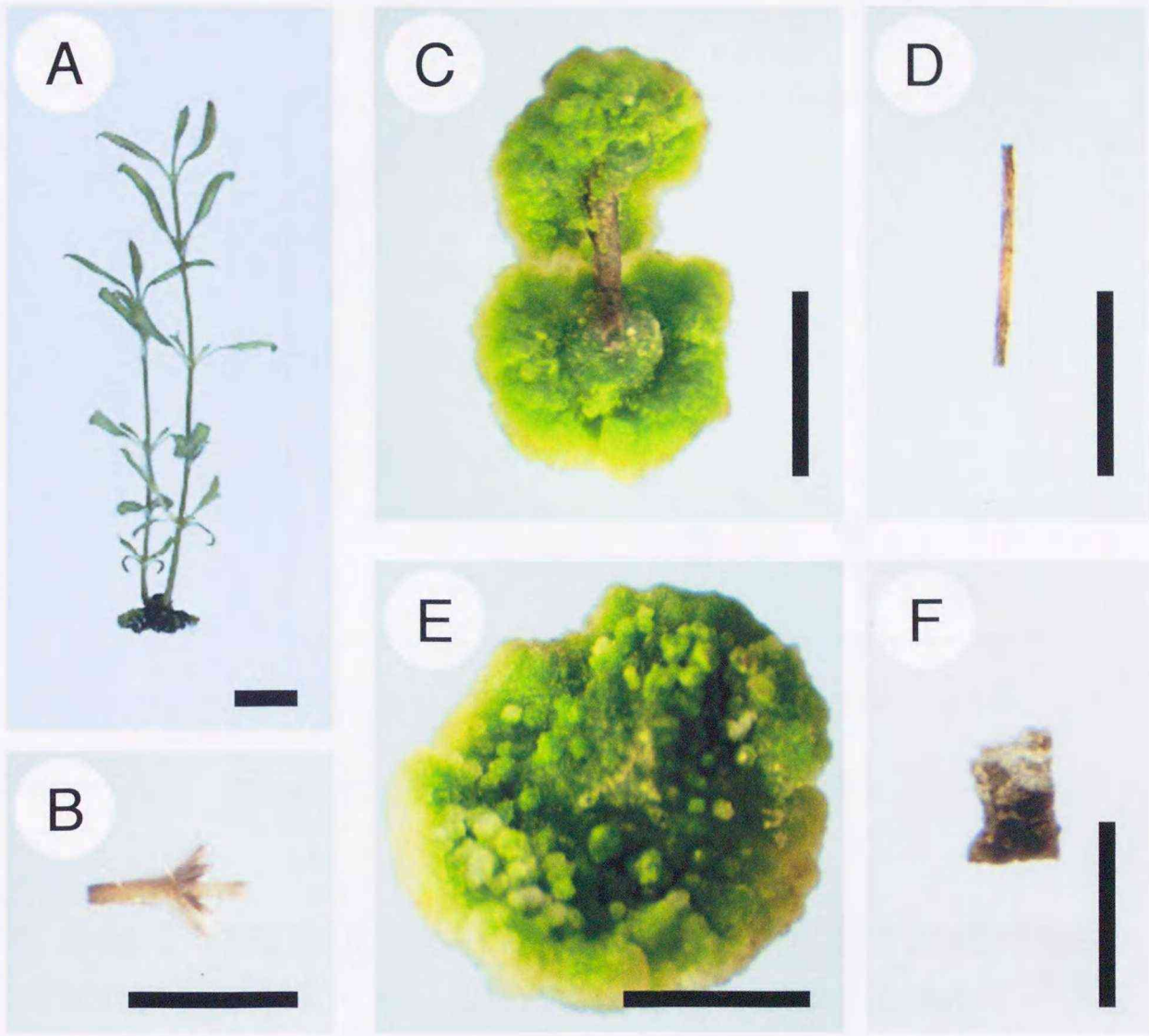



Fig. 4-8. States in the process of culture of *L. caerulea* nodes, internodes and calli that were cold-acclimated for two weeks before cooling treatment, or nonacclimated. Cold-acclimated node (A), internode (C) and callus (E) grew or proliferated. Nonacclimated node (B), internode (D) and callus (F) did not survive. Bar = 5 mm

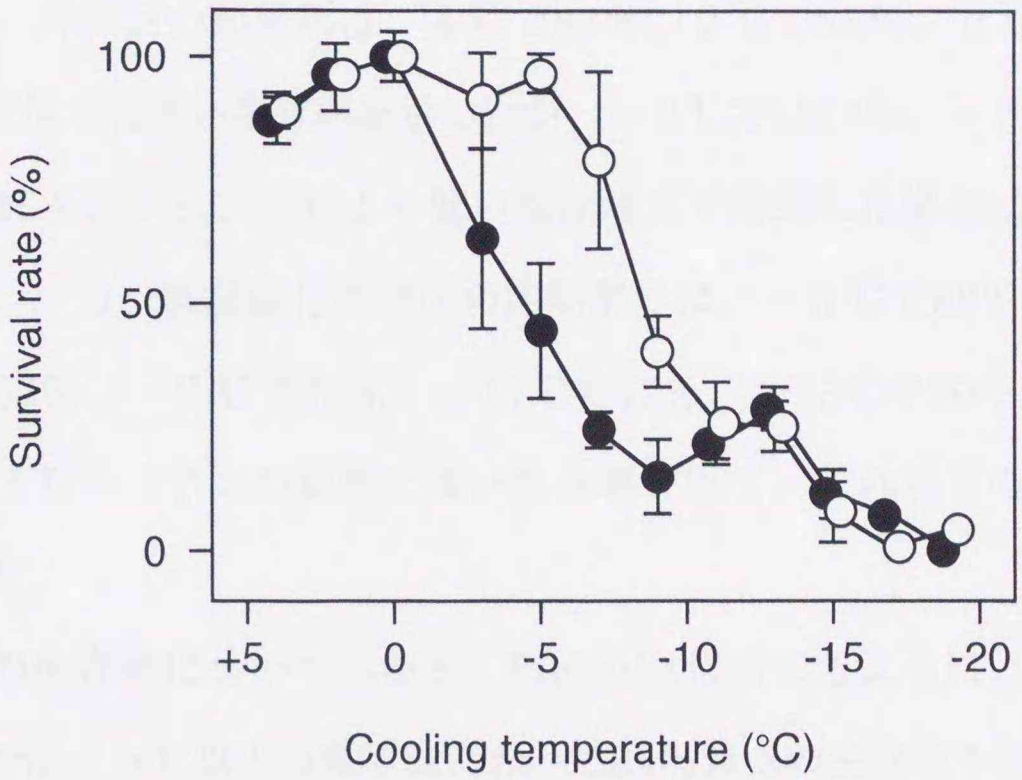



Fig. 4-9. Survival of nodal segments from cold-acclimated or nonacclimated *L. caerulea* plantlets through TTC reduction test. Nodal segments from nonacclimated (●) or cold-acclimated (at 5°C for 7 days and then at 0°C for additional 7 days) (○) plantlets (growing in culture system) were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate was evaluated by TTC reduction test after thawing. Vertical bars represent standard errors.

℃で64％であったのが、－５℃で44％、－７℃以下では29％以下となった。低温馴化処理した節部は、－７℃まで冷却した場合にも79％以上の高い値を示し、－９℃で40％、－11℃以下で26％以下であった。

ii）低温馴化処理区および対照（無低温馴化処理）区の節間部の生存率をFig. 4-10に示した。対照区の節間部は、４℃で87％、２℃で88％、０℃で100％と、０℃以上の温度域では高い生存率を示したが、－３℃では39％、－５℃では44％、－７℃以下で26％以下と、０℃より低い温度域まで冷却した場合には急速に生存率が低下した。一方、低温馴化処理区の節間部では、－３℃で88％、－５℃で96％、－７℃で69％、－９℃で33％、－11℃で42％、－13℃で20％、－15℃で９％となり、－３℃～－７℃の範囲で高い生存率を示し、それ以下の温度域では生存率が低下した。

iii）カルスの生存率についてみると、Fig. 4-11に示したように、対照（無低温馴化処理）区では、０℃以上の温度域において84％以上の生存率を示したものの、－３℃において32％、－５℃において35％、－７℃で８％、－９℃以下では24％以下と低かった。一方、低温馴化処理区のカルスの生存率は、－３℃において87％であり、－５℃で94％、－７℃で75％、－９℃で57％、－11℃～－19℃では26％以上の比較的高い値を示した。

## 第２節　培養植物体およびカルスの脱馴化処理に伴う耐凍性の変化

本節では、脱馴化処理に伴う耐凍性の変化を明らかにするため、低温馴化により耐凍性が高くなっている培養植物体およびカルスに対して脱馴化処理を行い、凍結、融解したのち、再生法およびTTC還元法により調査した。

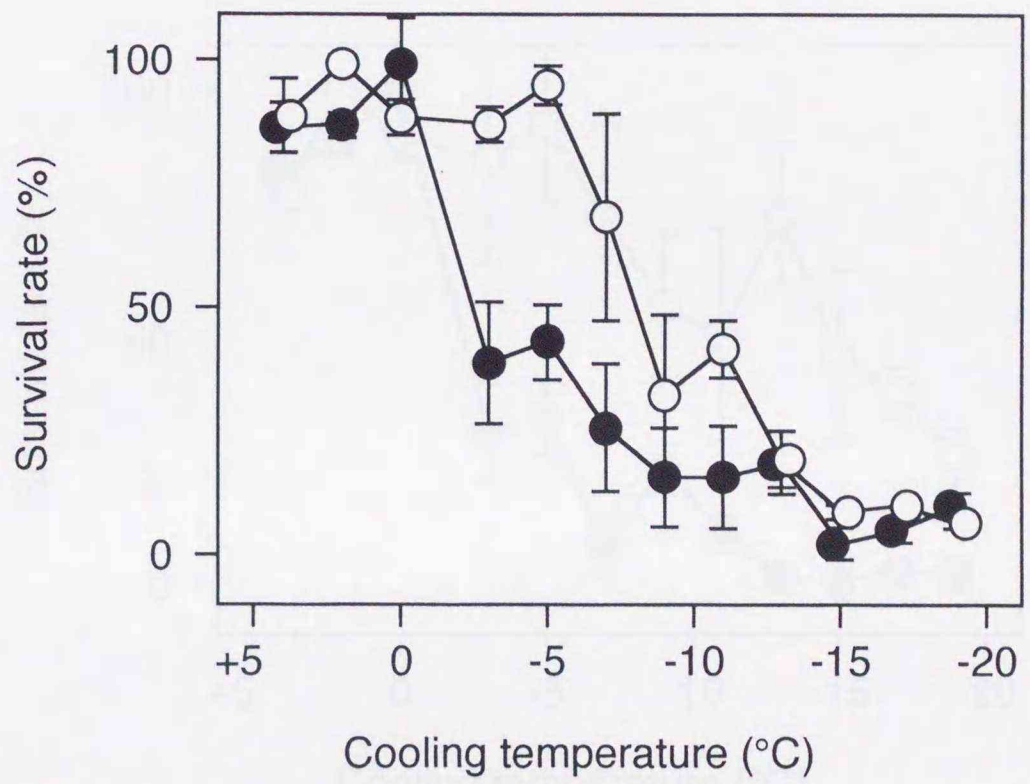



Fig. 4-10. Survival of internodal segments from cold-acclimated or nonacclimated *L. caerulea* plantlets through TTC reduction test. Internodal segments from nonacclimated (●) or cold-acclimated (at 5°C for 7 days and then at 0°C for additional 7 days) (○) plantlets (growing in culture system) were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate was evaluated by TTC reduction test after thawing. Vertical bars represent standard errors.

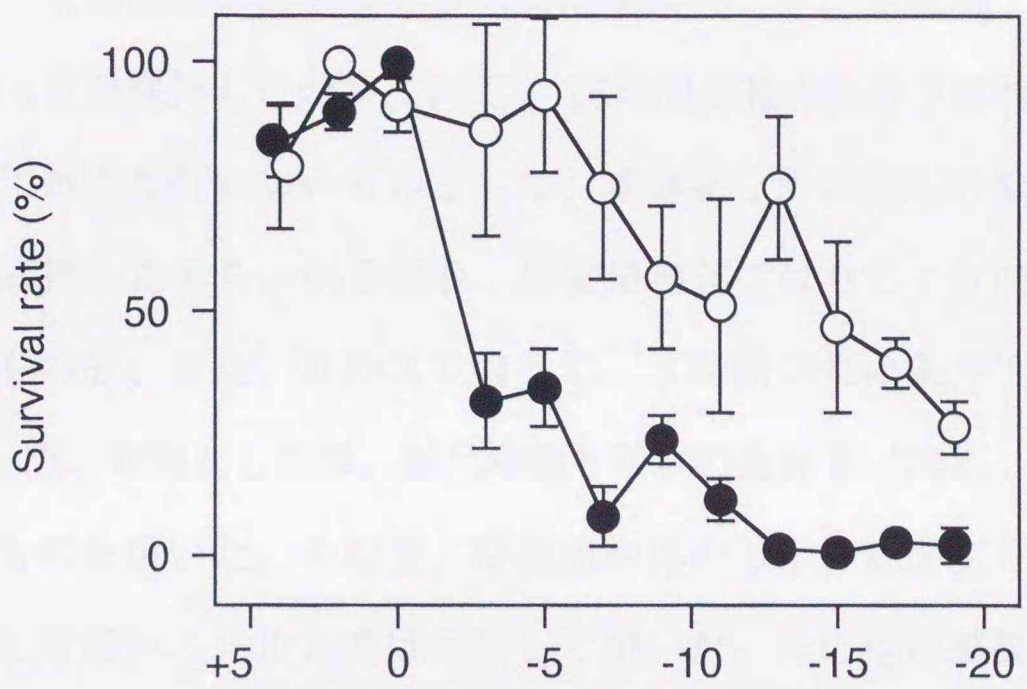



Fig. 4-11. Survival of callus segments from cold-acclimated or nonacclimated *L. caerulea* calli through TTC reduction test. Callus segments from nonacclimated (●) or cold-acclimated (at 5°C for 14 days) (○) calli (growing in culture system) were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate was evaluated by TTC reduction test after thawing. Vertical bars represent standard errors.

1．材料および方法

（1）培養植物体およびカルスの脱馴化法ならびに植物材料の調製

本章第1節と同様の方法で得た培養植物体およびカルスを用い、本章第1節で述べた14日間の低温馴化処理を行ったものおよび無処理のもの（対照）を用いた。脱馴化処理は、培養植物体およびカルスを培養容器ごと、本章第1節に記した低温馴化条件に14日間保持したのち、25℃、16時間日長の条件下に移すことにより行った。脱馴化処理を行わないものとして、本章第1節に記した低温馴化条件において14日間保持したのち、引き続き、培養植物体では0℃、8時間日長の条件下で保持したものを、また、カルスでは5℃、8時間日長の条件下で保持したものを用いた。一方、対照としては、継代培養と同様の条件下（25℃、16時間日長）で生長させたものを用いた。その後、培養植物体からは、節部切片および節間部切片を切り出して用い、カルスでは分割して用いた。その他の調製法は、本章第1節と同様に行った。

（2）耐凍性の調査

耐凍性の評価は、本章第1節と同様の方法で、再生法およびTTC還元法により行った。

2．結果

（1）培養植物体およびカルスの耐凍性に及ぼす脱馴化処理期間の影響

1）節部切片についてみると、脱馴化処理した区（以下脱馴化処理区）、脱馴化処理しない区（以下無脱馴化処理区）ならびに低温馴化処理および脱馴化処理のいずれも行わない区（以下対照区）における節部切片の耐凍性（−7.5℃における生存率）の脱馴化処理期間による変化をFig. 4-12に示した。脱馴化処理区の生存率は、処理2日後から8日後にかけて徐々に低下し、処理8日後および12日後

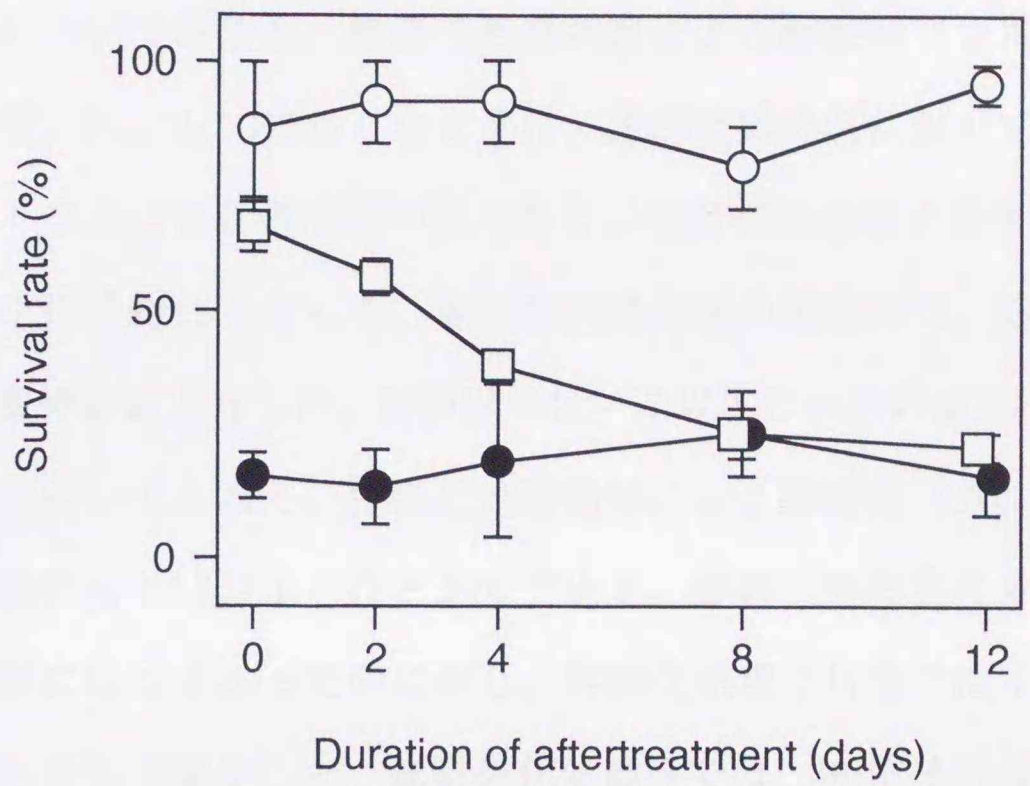



Fig. 4-12. Effect of deacclimation duration on survival rate of *L. caerulea* lateral buds that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. O, cold-acclimation after 14-day cold-acclimation; ●, nonacclimation after nonacclimation; □, deacclimation after 14-day cold-acclimation. Nodal segments with lateral buds were cooled down to -7.5°C. Survival rate means the ratio of shoot-forming segments to all segments used. The survival rates at zero-day duration of aftertreatment stand for values at the end of pretreatment. Vertical bars represent standard errors.

においては、対照（無低温馴化処理）区と同程度の耐凍性となった。無脱馴化処理区の生存率は、80％以上の高い値を維持し、対照区の生存率は、14％～25％と低い値となった。

2）節間部についてみると、脱馴化処理期間による耐凍性（カルス形成指数で評価）の変化は、Fig. 4-13に示したように、脱馴化処理区においては、脱馴化処理の期間が長くなるにつれ耐凍性が低くなり、生存率は処理８日後および12日後ではカルス形成指数約15となった。無脱馴化処理区の耐凍性は、処理期間が長くなるにつれて緩やかに上昇した。対照区では、７以下の小さい値で推移した。

3）カルスについてみると、脱馴化処理期間による耐凍性（カルス増殖指数で評価）の変化はFig. 4-14に示したとおりである。脱馴化処理区のカルス増殖指数は、処理開始時には56であったのに対し、脱馴化処理２日後では４、処理４日後以降が３～４と著しく減少した。無脱馴化処理区では、60前後の値を維持し、高い耐凍性を保持していた。対照区では、処理開始時から12日後まで３から６と小さい値で推移した。

（2）脱馴化処理した培養植物体およびカルスの耐凍性

1）再生法により耐凍性を評価した場合

本節（1）の結果から、培養植物体の脱馴化完了に要する期間を８日間と判断し、脱馴化処理８日後における培養植物体の生存率（シュート形成率により評価）に及ぼす凍結温度および脱馴化処理の影響について再生法によって調べた。

i）処理８日後における節部切片の耐凍性は、Fig. 4-15に示したように、脱馴化処理区においては、０℃以上の冷却温度域では97％から100％の生存率を示したが、－５℃において72％、－7.5℃で39％、－10℃以下では25％以下と冷却温度が低下するにしたがい生存率が低下した。対照区では、０℃以上の冷却温度域においては、生存率が94％～97％を示したが、－５℃において58％、－7.5℃で28

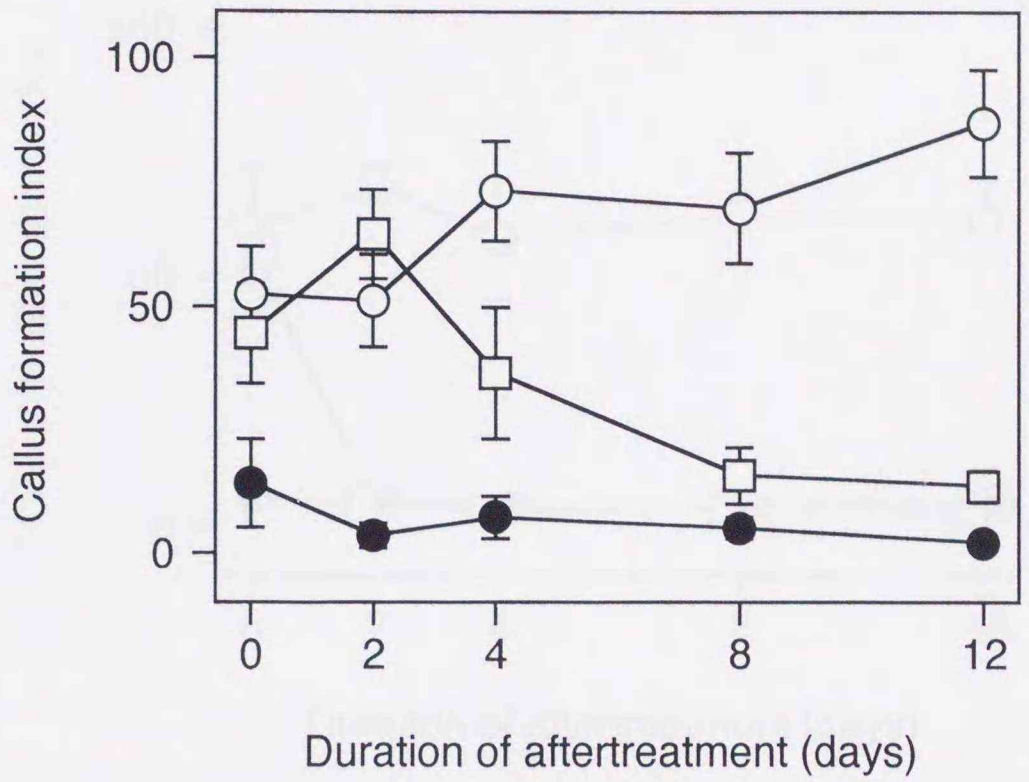



Fig. 4-13. Effect of deacclimation duration on callus formation index of *L. caerulea* internodes that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. ○, cold-acclimation after 14-day cold-acclimation; ●, nonacclimation after nonacclimation; □, deacclimation after 14-day cold-acclimation. Internodal segments were cooled down to -7.5°C. Callus formation indices were calculated by the equation described in Materials and Methods. The callus formation indices at zero-day duration of aftertreatment stand for values at the end of pretreatment. Vertical bars represent standard errors.

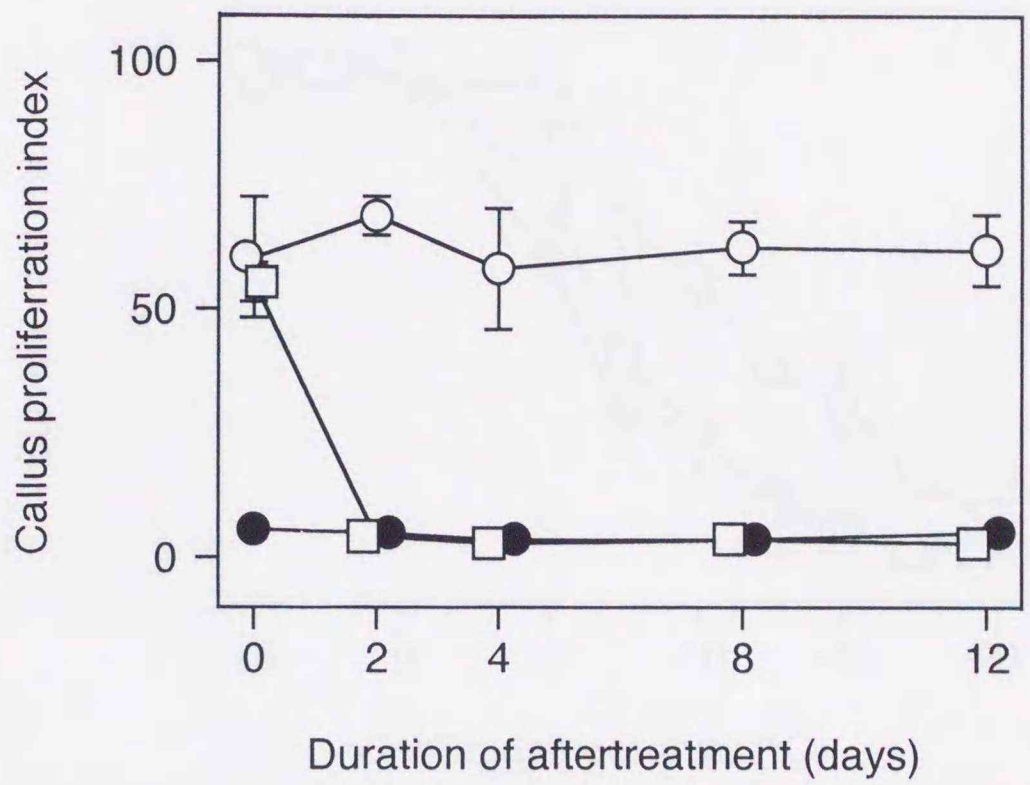



Fig. 4-14. Effect of deacclimation duration on callus proliferation index of *L. caerulea* callus that were excised from cold-acclimated or nonacclimated calli growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. ○, cold-acclimation after 14-day cold-acclimation; ●, nonacclimation after nonacclimation; □, deacclimation after 14-day cold-acclimation. Callus segments were cooled down to -7.5°C. Callus proliferation indices were calculated by the equation in Materials and Methods. The callus proliferation indices at zero-day duration of aftertreatment stand for values at the end of pretreatment. Vertical bars represent standard errors. Absence of a bar indicates that the standard error is smaller than the symbol.

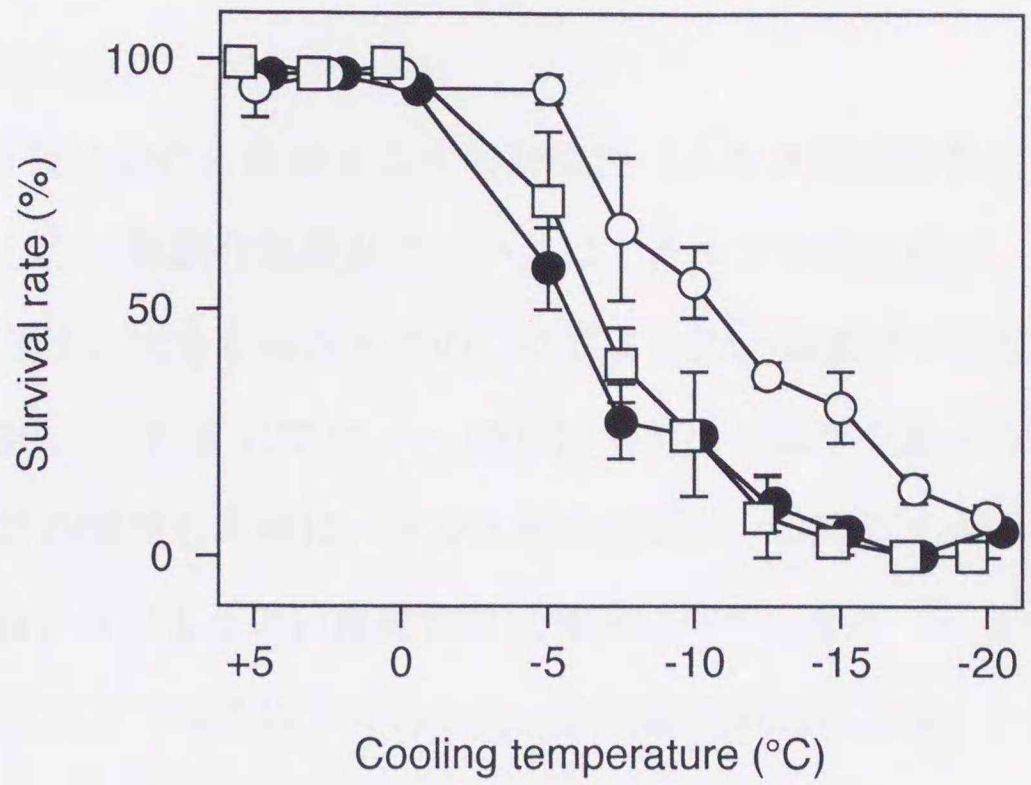



Fig. 4-15. Effect of deacclimation on survival rate of *L. caerulea* lateral buds that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. ○, cold-acclimation at 0°C for 8 days after 14-day cold-acclimation; ●, nonacclimation for 8 days after nonacclimation; □, deacclimation for 8 days after 14-day cold-acclimation. Nodal segments with ateral buds were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate means the ratio of shoot-forming segments to all segments used. The survival rates at zero-day duration of aftertreatment stand for values at the end of pretreatment. Vertical bars represent standard errors.

%、－10℃以下では25%以下となり、脱馴化処理区と同様に、冷却温度が低下するに従って生存率が低下した。一方、無脱馴化処理区の節部切片では、生存率が－5℃において95%、－7.5℃で67%、－10℃で56%、－12.5℃でも37%となり、高い生存率を示した。

ii）処理8日後における節間部切片の耐凍性（カルス形成指数により評価）をFig. 4-16に示した。脱馴化処理区においては、カルス形成指数が、0℃以上の冷却温度域で90以上と大きかったものの、0℃より低い温度域では急激に小さくなり、－5℃で50、－7.5℃で17、－10℃以下では7以下であった。対照（無低温馴化処理）区の節間も同様に、カルス形成指数は、0℃以上の冷却温度域で大きかったものの、0℃より低い温度域では急激に小さくなり、－5℃および－7.5℃で19、－10℃以下では7以下であった。無脱馴化処理区では、－10℃の冷却温度範囲までカルス形成指数は大きく、－5℃で87、－7.5℃で61、－10℃で64、－12.5℃で11であった。

iii）脱馴化完了時におけるカルスの耐凍性（カルス増殖指数により評価）についてFig. 4-17に示した。本節（1）の結果から、カルスの脱馴化完了に要する期間を4日間と判断し、4日間の脱馴化処理を行ったカルスにおける凍結・融解後の増殖に及ぼす冷却温度および脱馴化処理の影響について再生法によって調べた。無脱馴化処理区のカルスは－12.5℃の冷却温度範囲まで生存するものがあったが、脱馴化処理4日間のカルスでは、増殖指数が5℃および2.5℃で１００と大きかったものの、0℃以下の温度域では冷却温度に従って急激に減少し、0℃で87、－5℃で14、－7.5℃以下では4であった。

2）TTC還元法により耐凍性を評価した場合

つぎに、培養植物体およびカルスの生存率に及ぼす凍結温度および脱馴化処理の影響についてTTC還元法によって調べた。脱馴化処理期間は再生法の場合と同

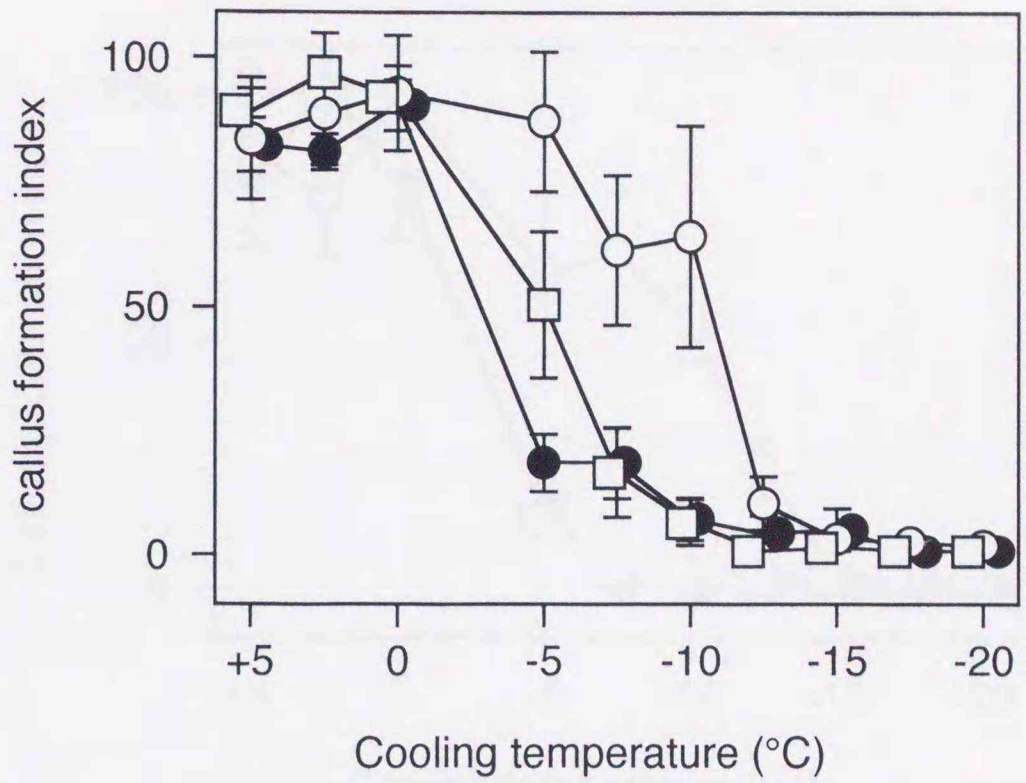



Fig. 4-16. Effect of deacclimation on callus formation index of *L. caerulea* internodes that were excised from cold-acclimated or nonacclimated plantlets growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. ○, cold-acclimation at 0°C for 8 days after 14-day cold-acclimation; ●, nonacclimation for 8 days after nonacclimation; □, deacclimation for 8 days after 14-day cold-acclimation. Internodal segments were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Callus formation indices were calculated by the equation described in Materials and Methods. The callus formation indices at zero-day duration of aftertreatment stand for values at the end of pretreatment. Vertical bars represent standard errors.

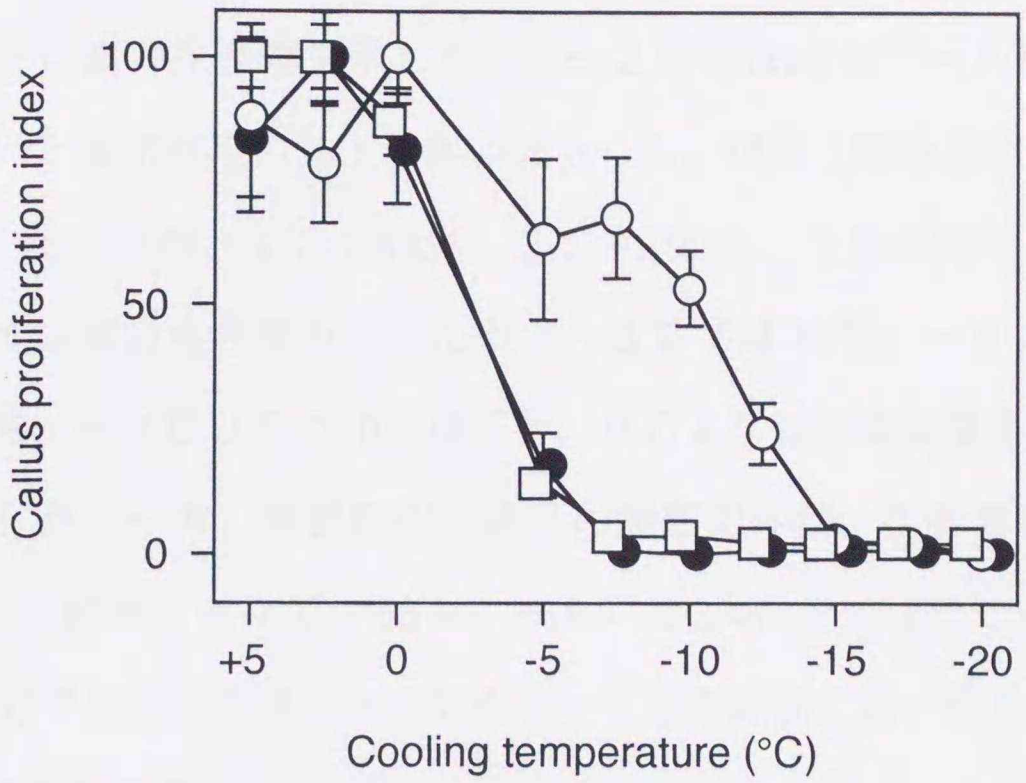



Fig. 4-17. Effect of deacclimation on callus proliferation index of *L. caerulea* calli that were excised from cold-acclimated or nonacclimated calli growing *in vitro*, frozen, thawed and cultured. ○, cold-acclimation at 0°C for 4 days after 14-day cold-acclimation; ●, nonacclimation for 4 days after nonacclimation; □, deacclimation for 4 days after 14-day cold-acclimation. Callus segments were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Callus prolirferation indices were calculated by the equation described in Materials and Methods. The callus prolirferation indices at zero-day duration of aftertreatment stand for values at the end of pretreatment. Vertical bars represent standard errors.

様に、培養植物体においては８日間、カルスにおいては４日間とした。

i）脱馴化処理区、無脱馴化処理区および対照（無低温馴化処理）区の節部切片の生存率をFig. 4-18に示した。脱馴化処理区の節部切片は、０℃以上の冷却温度域では84％以上の高い生存率を示したが、－３℃では65％、－５℃では39％、－７℃では19％と凍結温度の低下に伴い低下した。対照（無低温馴化処理）区の節部切片では、生存率が、４℃で88％、２℃で100％、０℃で69％となり、０℃以上の温度域では高い生存率を示したが、－３℃では30％、－５℃では36％、－７℃では30％、－９℃以下で10％以下と、０℃より低い冷却温度域では急速に生存率が低下した。一方、無脱馴化処理区の節部切片は、生存率が、－３℃で100％、－５℃で80％、－７℃で55％、－９℃で28％、－11℃で23％、－13℃で23％、－15℃で18％となり、－３℃から－７℃の範囲で高い値を示したが、それ以下の温度域で生存率が低下した。

ii）脱馴化処理８日間の節間部切片の耐凍性は、Fig. 4-19に示したように、脱馴化処理区では、生存率が、２℃以上の冷却温度域において96％以上の値を示したものの、０℃以下では急激に減少し、０℃で72％、－３℃で63％、－５℃で38％、－10℃では36％、－12.5℃以下では18％以下であった。対照（無低温馴化処理）区の生存率は、０℃以上の冷却温度域において76％以上の値を示したものの、－３℃において43％、－５℃において40％、－７℃で33％、－９℃以下では16％以下と低かった。一方、無脱馴化処理区の節間部切片では、－３℃において89％となり、－５℃で75％、－７℃で52％、－９℃で37％と比較的高い生存率を示した。

iii）処理４日後におけるカルスの耐凍性をFig. 4-20に示した。脱馴化処理区のカルスでは、生存率が、０℃以上の冷却温度域で88％以上と高かったものの、０℃より低い温度域では急激に減少し、－３℃で83％であったが、－５℃で23％、

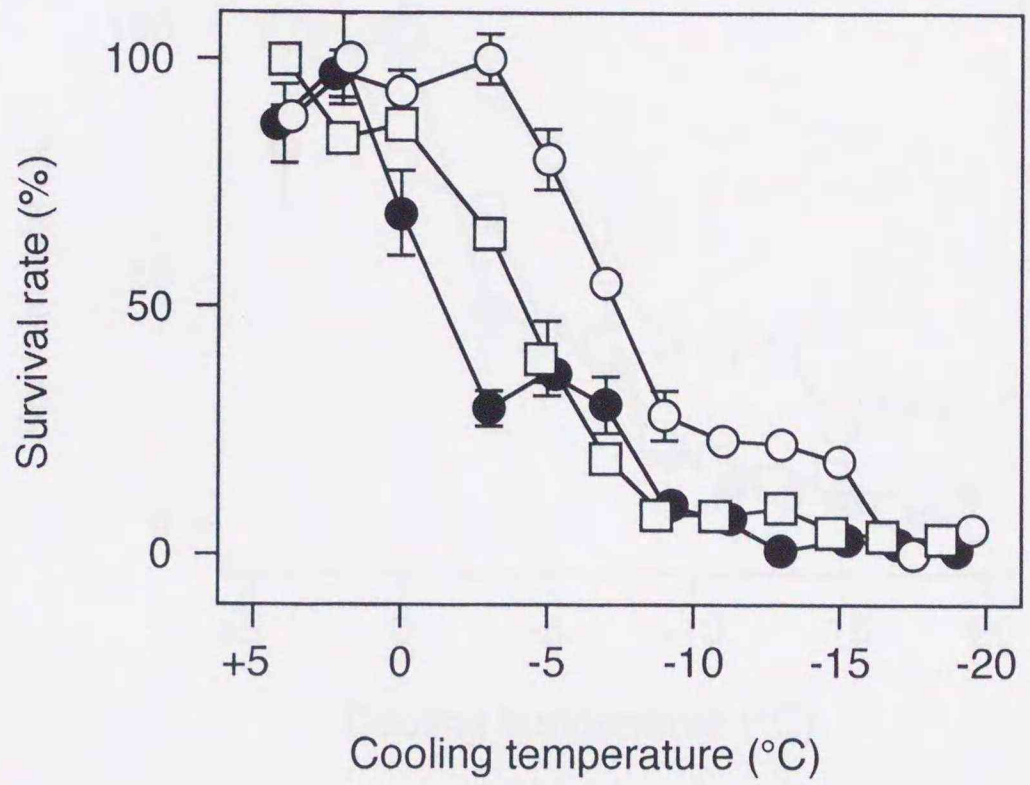



Fig. 4-18. Survival of nodal segments from deacclimated, cold-acclimated or nonacclimated *L. caerulea* plantlets through TTC reduction test. Nodal segments from nonacclimated after nonacclimation (●), cold-acclimated (at 0°C for 8 days after 14-day cold-acclimation) (○) or deacclimation (at 25°C for 8 days after 14-day cold-acclimation) (□) plantlets (growing in culture system) were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate was evaluated by TTC reduction test after thawing. Vertical bars represent standard errors.

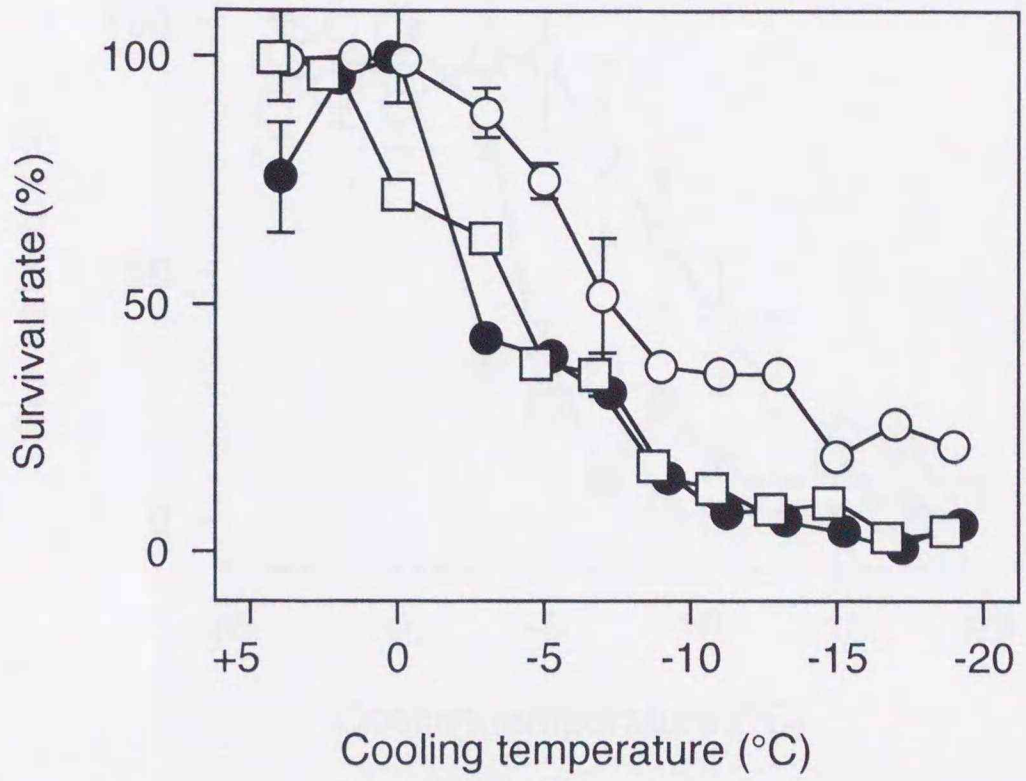



Fig. 4-19. Survival of internodal segments from deacclimated, cold-acclimated or nonacclimated *L. caerulea* plantlets through TTC reduction test. Internodal segments from nonacclimated after nonacclimation (●), cold-acclimated (at 0°C for 8 days after 14-day cold-acclimation) (○) or deacclimated (at 25°C for 8 days after 14-day cold-acclimation) (□) plantlets (growing in culture system) were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate was evaluated by TTC reduction test after thawing. Vertical bars represent standard errors.

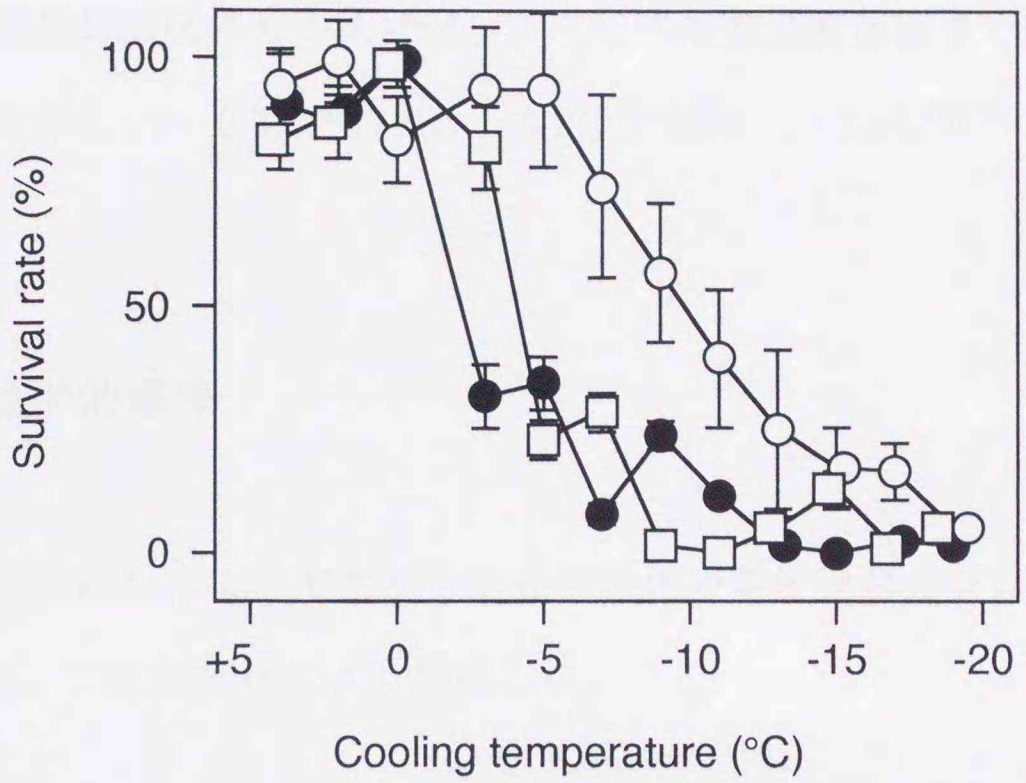



Fig. 4-20. Survival of callus segments from deacclimated, cold-acclimated or nonacclimated *L. caerulea* calli through TTC reduction test. Cullus segments from nonacclimated after nonacclimation (●), cold-acclimated (at 0°C for 4 days after 14-day cold-acclimation) (○) or deacclimated (at 25°C for 4 days after 14-day cold-acclimation) (□) calli (growing in culture system) were cooled down to the temperatures indicated in abscissa. Survival rate was evaluated by TTC reduction test after thawing. Vertical bars represent standard errors.

－7℃で29%、－9℃以下では13%以下であった。対照区のカルスでは、生存率が、脱馴化処理区と同様に0℃以上の冷却温度域で高かったものの、－3℃で32%、－5℃で35%、－7℃以下では24%以下と0℃より低い温度域では低い値であった。無脱馴化処理区のカルスでは、－7℃の冷却温度範囲まで生存率は75%以上の高い値を示し、－9℃で57%、－11℃で40%、－13℃以下で26%以下であった。

## 第3節　組織学的観察

本節では、低温馴化によって生ずる培養植物体の各組織およびカルスの耐凍性の差異について、TTC還元法により観察した。

### 1．材料および方法

本章第1節と同様の方法で得た培養植物体およびカルスを、本章第1節に記した14日間の低温馴化処理および対照（無低温馴化処理）条件下においたのち材料として用いた。第1章第3節と同様にTTC還元法を用いたのち、ミクロトーム（堂阪イーエム, DTK-1000）で観察用の切片を作製し、観察した。

### 2．結果

低温馴化した培養植物体の芽は、茎頂部およびその周辺の葉原基が赤く発色し、生存していることが確認されたが、対照（無低温馴化処理）区の芽では、茎頂ドーム状組織のみが赤くなったが、その他の部位は発色しなかった（Fig. 4-21AおよびB）。茎についてみると、低温馴化処理によって維管束形成層および表皮の直下の細胞がやや赤く発色した（Fig. 4-21CおよびD）。カルスについてみると、対照

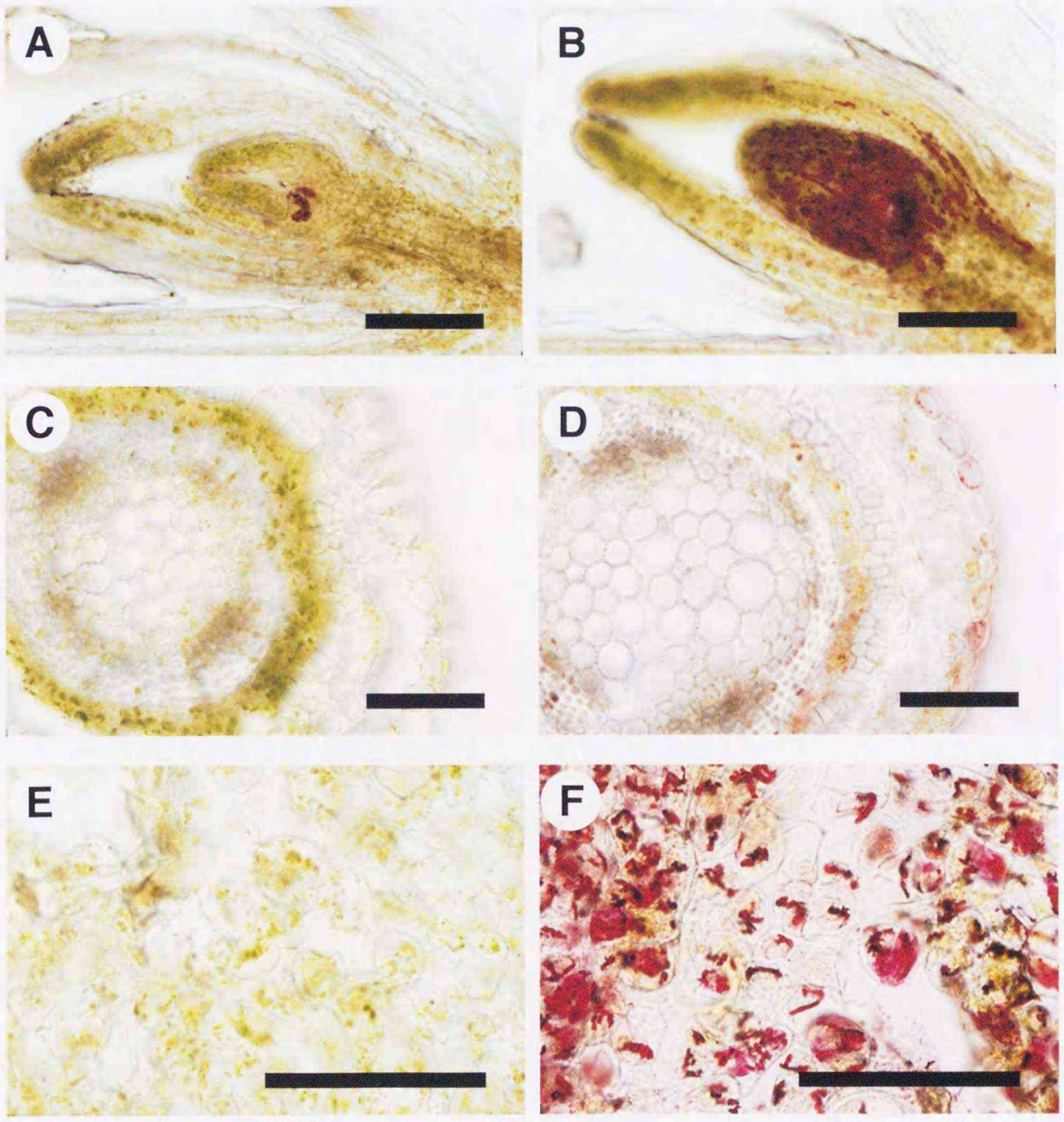



Fig. 4-21. Sections of cold-acclimated or nonacclimated nodes (A, B), internodes (C, D) and calli (E, F) of *L. caerulea* that were frozen down to -7.5°C, thawed and examined by TTC test. A, C, E: nonacclimated; B, D, F: cold-acclimated. Bar = 300 $\mu$m

区では緑色のままであったのが、低温馴化処理により、全体的に細胞が赤く発色した（Fig. 4-21EおよびF）。

## 第４節　第４章の考察

（１）クロミノウグイスカグラ培養植物体およびカルスの耐凍性に及ぼす低温馴化処理期間の影響について調査した結果、節部切片においては、処理８日後から12日後にかけて著しく生存率が上昇した。節間部切片においては処理期間が長くなるにつれて馴化が進み、処理８日後以降で対照（無低温馴化処理）区との間に差異が認められた。カルスでは処理４日後から12日後にかけて耐凍性が増大した。このことから、基準として用いた－7.5℃における生存率から判断する限り、培養植物体およびカルスのいずれにおいても、低温馴化処理開始12日後以降に低温耐性が付与されたものと推察される。

（２）つぎに、低温馴化が完了したと判断される低温馴化処理14日後における耐凍性について調べた結果、節部切片においては、－12.5℃以上の冷却温度範囲で高い生存率（シュート形成率）が得られた。また、TTC還元法によると、－３℃～－９℃の冷却温度において、低温馴化処理区の生存率が対照区のそれより高くなった。節間部切片では、－５℃から－12.5℃の冷却温度において低温馴化による耐凍性の増大効果がみられ、TTC還元法による判定でも、－３℃から－７℃の冷却温度範囲において、低温馴化処理区と対照区との間に耐凍性の差異が認められた。カルスにおいても低温馴化処理による耐凍性の向上がみられ、－7.5℃以上の冷却温度範囲で、大きな差がみられた。また、TTC還元法による判定では０℃より低い冷却温度域で低温馴化処理区と対照区との間に著しい耐凍性の差がみられた。したがって、14日間の低温馴化処理により、クロミノウグイスカグラ培

養植物体およびカルスの耐凍性が向上することが確認された。

（3）野外で生育しているモモ（*Prunus persica*）、セイントオーガスティングラス（*Stenotaphrum secundatum*）、ユーカリ（*Eucalyptus*）、ツツジ（*Rhododendron*）、ブドウ（*Vitis vinifera*）およびカキ（*Diospyros kaki*）などにおいては、秋季から冬季の低温馴化によって耐凍性が増大することがわかっている（Aroraら，1992；Maierら，1994；Almeidaら，1994；Anisko・Lindstrom，1996；Hamman Jr.ら，1996；Kangら，1997）。また、培養組織および培養細胞においても低温馴化処理により耐凍性が高くなることが報告されており（Gordon-Kamm・Steponkus，1984；Leborgneら，1995a）、クロミノウグイスカグラ培養植物体およびカルスにおいても低温馴化処理により耐凍性が高くなり、低温馴化が起こることが明らかになった。

（4）クロミノウグイスカグラ培養植物体の耐凍性に及ぼす脱馴化処理期間の影響について調べた結果、節部切片および節間部切片においては脱馴化処理８日後において対照（無低温馴化処理）区と同様の耐凍性を示した。クロミノウグイスカグラカルスにおいては処理２日後においてすでに脱馴化効果が現れ始め、基準として用いた−7.5℃まで冷却したときの生存率から判断する限り、処理開始８日後には、低温馴化処理によって高くなった耐凍性が完全に消失することがわかった。これらのことから、培養植物体およびカルスにおいては、脱馴化処理開始８日後には、低温馴化処理によって付加された低温耐性が失なわれると判断される。

一方、脱馴化完了時（生存率の変化から判断して、培養植物体においては脱馴化処理開始８日後、カルスにおいては４日後とした）における耐凍性について調査した結果、脱馴化した節部切片、節間部切片およびカルスでは対照区と同様の傾向がみられ、０℃以上の冷却温度範囲で高い生存性が認められたが、０℃より低い温度域になると著しく生存性が低下した。

これらのことから、ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）、エンドウ（*Pisum sativum*）、ケンタッキーブルーグラス（*Poa pratensis*）、ルタバガ（*Brassica napus*）、キャベツ（*Brassica oleracea*）およびモモなどにおける実験結果（Fennell・Li，1985；Welbaumら，1997；Gustaら，1980；Bootheら，1995；佐々木ら，1993；Arora・Wisniewski，1995）と同様に、クロミノウグイスカグラの培養植物体およびカルスにおいても、脱馴化処理により、獲得した耐凍性が失われ、脱馴化が起こることが明らかになった。

（5）クロミノウグイスカグラ培養植物体（節部切片および節間部切片）およびカルスの－7.5℃凍結後における生死についてTTC還元法を用いて調べたところ、低温馴化処理を行っていないものの組織・細胞は緑色のままであり、低温馴化処理により耐凍性が高くなり、生存している細胞・組織では赤く発色するなど、その差異が明確にみられたことから、この場合には、TTC還元法は、凍結傷害を判定する場合の有効な手段であることがわかった。

# 第５章　クロミノウグイスカグラ培養植物体における内生物質の変動

第２章および第３章では、野外から採取した茎頂の耐凍性および内生成分の季節的変動などについて調査し、低温馴化および脱馴化について数種の知見が得られた。続いて、第４章では、培養植物体組織およびカルスの低温馴化および脱馴化に関する実験系を作出し、いくつかの知見を得た。環境条件変化による植物の耐凍性の変化に関与する要因を明らかにするためには、環境条件を容易に制御することのできる*in vitro*培養系での組織内成分含量に及ぼす影響について調査することが必要である。

本章では、培養体組織における耐凍性の発現および消失と内生物質変動との関連について、低温馴化処理—脱馴化処理実験系を用いて調べた。

## 第１節　培養植物体およびカルスの低温馴化に伴う内生物質の組成および含量の変化

本節では、低温馴化に伴う耐凍性の変化と内生物質変化との関連について検討するため、低温馴化した培養植物体およびカルスの含水率、可溶性糖質および遊離アミノ酸について調査した。さらに、カルスについては、タンパク質の組成の変化についても調査した。

### Ⅰ　可溶性糖質の組成および含量の変化

#### １．材料および方法

（1）低温馴化の方法および植物材料の調製

第4章第1節と同様の方法によって得た培養植物体およびカルスを用いて、14日間の低温馴化処理を行った。低温馴化処理は、第4章第1節と同様の条件下、すなわち、培養植物体を培養容器ごと5℃、8時間日長（白色蛍光灯、4,000lx）の条件下に移して1週間経過させ、さらに0℃、8時間日長の条件下に移すことにより行った。また、カルスの低温馴化は、カルスを培養容器ごと5℃、8時間日長の条件下に移すことによって行った。また、対照としては、培養植物体およびカルスのいずれにおいても、25℃、16時間日長（4,000lx）で培養したものを用いた。

（2）水分含量の測定

組織100～400mgを水分気化装置（Mitsubishi Chemical Corpolation, VAPORIZER VA-06）の中に入れ、組織中の水分を気化させたのち、電量滴定式水分測定装置（Mitsubishi Chemical Corpolation, MOISTUREMETER CA-06）を用いて気化した水分の量を測定し、生体重を基に含水率を算出した。

（3）可溶性糖質の分析

組織約200mgを用いて、第3章第2節と同様の方法で試料の作製および可溶性糖質の分析を行った。

2．結果

（1）水分含量の変化

培養植物体シュート組織の含水率は、低温馴化処理の前後において約67%の値を示し（Table 5-1）、低温馴化処理の前後における含水率の変化はみられなかった。カルスの含水率は、低温馴化処理前で78%、低温馴化処理後で77%であり、含水率は処理によってほとんど変化しなかった（Table 5-1）。

Table 5-1. Effect of cold acclimation on water content in shoots and calli of *L. caerulea*.

| Sample | Treatment | Water content (%) |
|---|---|---|
| Shoot | Nonacclimation | 67.3 |
| | Cold-acclimation[z] | 67.0 |
| Callus | Nonacclimation | 77.6 |
| | Cold-acclimation[y] | 77.4 |

[z]Shoots were excised from in-vtro cultured plantlets that werecold-acclimated at 5°C for 7 days, and then at 0°C for additional 7 days.
[y]Calli in flasks were cold-acclimated at 5°C for 14 days.

（2）可溶性糖質

培養植物体の節部組織からは4種類の糖、すなわち、フルクトース、グルコース、スクロースおよびラフィノースが検出された（Table 5-2）。糖質の総含量は、低温馴化処理によりそれほど変化しなかった。つぎに、糖質の種類別にみると、フルクトース、グルコースおよびスクロース含量には、低温馴化処理によって大きな変動は認められなかった。しかし、ラフィノースは、低温馴化処理開始8日後から少量検出され、12日後に顕著に増加したのち、微増に転じ、20日後には2.8 $\mu$ mol/g FWとなった。

培養植物体の節間部組織の低温馴化に伴う可溶性糖質含量の変動についてみると、Table 5-3に示したように、糖質の総含量については低温馴化処理に伴う顕著な変化は認められなかった。つぎに、糖質の種類別にみると、フルクトース、グルコースおよびスクロースの含量は、低温馴化処理に伴って変化しなかったものの、ラフィノースについては、低温馴化処理による蓄積がみられ、処理開始8日後から16日後にかけて増加し、20日後には4.4 $\mu$ mol/g FWとなった。

カルスにおいては、スクロースおよびラフィノースについて低温馴化処理に伴う変化がみられた（Table 5-4）。すなわち、スクロース含量は処理期間が長くなるに従って増加し、ラフィノースは処理開始12日後から20日後に蓄積が認められた。フルクトースおよびグルコースの変動は大きかったが、低温馴化処理に伴う変化は認められなかった。糖質の総含量は、低温馴化処理期間が長くなるに従って増加した。

## Ⅱ　遊離アミノ酸の組成および含量の変化

### 1．材料および方法

Table 5-2. Changes in soluble carbohydrate contents in nodal segments of *L. caerulea* nonacclimated and cold-acclimated.

| Treatment | Duration (Days) | Soluble sugar content ($\mu$mol/g fw) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fructose | Glucose | Sucrose | Raffinose | Total |
| Nonacclimation[z] | 0 | 1.2 ± 1.2[x] | 0.0 ± 0.0 | 14.1 ± 0.5 | 0.0 ± 0.0 | 15.3 ± 0.8 |
| | 4 | 1.2 ± 1.2 | 0.0 ± 0.0 | 23.7 ± 2.9 | 0.0 ± 0.0 | 24.8 ± 2.3 |
| | 8 | 3.6 ± 3.0 | 2.2 ± 1.1 | 31.5 ± 2.0 | 0.0 ± 0.0 | 37.4 ± 5.5 |
| | 12 | 3.2 ± 3.2 | 2.4 ± 1.3 | 19.0 ± 1.8 | 0.0 ± 0.0 | 24.7 ± 4.0 |
| | 16 | 0.3 ± 0.3 | 0.0 ± 0.0 | 31.6 ± 7.4 | 0.0 ± 0.0 | 31.9 ± 7.3 |
| | 20 | 0.0 ± 0.0 | 1.0 ± 1.0 | 31.9 ± 3.0 | 0.0 ± 0.0 | 32.9 ± 2.6 |
| Cold-acclimation[y] | 0 | 1.3 ± 1.3 | 2.4 ± 2.4 | 23.9 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 27.6 ± 2.0 |
| | 4 | 0.8 ± 0.8 | 1.5 ± 1.5 | 27.4 ± 1.2 | 0.0 ± 0.0 | 29.7 ± 2.5 |
| | 8 | 3.6 ± 2.5 | 2.1 ± 2.1 | 30.3 ± 4.7 | 0.1 ± 0.1 | 36.1 ± 7.2 |
| | 12 | 1.2 ± 1.2 | 0.0 ± 0.0 | 37.7 ± 6.5 | 2.0 ± 0.3 | 40.9 ± 6.7 |
| | 16 | 0.9 ± 0.9 | 0.0 ± 0.0 | 44.5 ± 2.8 | 2.3 ± 0.4 | 47.6 ± 4.0 |
| | 20 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 27.9 ± 1.9 | 2.8 ± 0.4 | 30.7 ± 2.3 |

[z]Nonacclimated at 25°C under a 16-h daylength.
[y]Cold-acclimated at 5°C for 7 days and sequentially at 0°C under a 8-h daylength for the durations indicated above.
[x]Mean (± SE) of three replications.

Table 5-3. Changes in soluble carbohydrate contents in internodal segments of *L. caerulea* nonacclimated and cold-acclimated.

| Treatment | Duration (Days) | Soluble sugar content (μmol/g fw) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fructose | Glucose | Sucrose | Raffinose | Total |
| Nonacclimation[z] | 0 | 0.7 ± 0.7[x] | 0.9 ± 0.9 | 31.6 ± 0.8 | 0.0 ± 0.0 | 33.2 ± 2.2 |
| | 4 | 3.2 ± 3.2 | 0.0 ± 0.0 | 26.3 ± 4.6 | 0.0 ± 0.0 | 29.5 ± 7.8 |
| | 8 | 0.0 ± 0.0 | 0.8 ± 0.8 | 18.7 ± 5.7 | 0.0 ± 0.0 | 19.4 ± 5.6 |
| | 12 | 0.5 ± 0.5 | 1.2 ± 1.2 | 15.6 ± 0.5 | 0.0 ± 0.0 | 17.3 ± 1.0 |
| | 16 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 31.1 ± 9.6 | 0.0 ± 0.0 | 31.1 ± 9.6 |
| | 20 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 31.4 ± 2.7 | 0.0 ± 0.0 | 31.4 ± 2.7 |
| Cold-acclimation[y] | 0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 33.4 ± 2.4 | 0.0 ± 0.0 | 33.4 ± 2.4 |
| | 4 | 4.3 ± 4.3 | 0.0 ± 0.0 | 26.8 ± 6.1 | 0.0 ± 0.0 | 31.1 ± 4.3 |
| | 8 | 1.3 ± 1.3 | 0.0 ± 0.0 | 37.0 ± 7.4 | 0.2 ± 0.2 | 38.4 ± 7.8 |
| | 12 | 0.8 ± 0.8 | 0.0 ± 0.0 | 35.5 ± 4.2 | 1.3 ± 0.3 | 37.6 ± 4.2 |
| | 16 | 1.0 ± 1.0 | 0.0 ± 0.0 | 44.0 ± 0.8 | 3.0 ± 0.2 | 48.0 ± 0.7 |
| | 20 | 1.2 ± 1.2 | 0.0 ± 0.0 | 36.8 ± 6.4 | 4.4 ± 0.4 | 42.4 ± 6.9 |

[z]Nonacclimated at 25°C under a 16-h daylength.
[y]Cold-acclimated at 5°C for 7 days and sequentially at 0°C under a 8-h daylength for the durations indicated above.
[x]Mean (± SE) of three replications.

Table 5-4. Changes in soluble carbohydrate contents in callus segments of *L. caerulea* nonacclimated and cold-acclimated.

| Treatment | Duration (Days) | Soluble sugar content (μmol/g fw) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fructose | Glucose | Sucrose | Raffinose | Total |
| Nonacclimation[z] | 0 | 20.9 ± 4.6[x] | 28.4 ± 22.1 | 49.3 ± 5.0 | 0.0 ± 0.0 | 98.6 ± 27.9 |
| | 4 | 9.7 ± 5.8 | 20.9 ± 20.9 | 45.8 ± 2.8 | 0.0 ± 0.0 | 76.5 ± 13.6 |
| | 8 | 15.0 ± 9.4 | 25.3 ± 24.6 | 35.4 ± 2.0 | 0.0 ± 0.0 | 75.6 ± 16.4 |
| | 12 | 11.8 ± 6.4 | 13.4 ± 12.1 | 33.2 ± 1.5 | 0.0 ± 0.0 | 58.4 ± 5.5 |
| | 16 | 14.3 ± 8.0 | 21.4 ± 16.3 | 32.4 ± 1.8 | 0.0 ± 0.0 | 68.1 ± 8.0 |
| | 20 | 13.3 ± 6.9 | 0.8 ± 0.4 | 32.7 ± 1.9 | 0.0 ± 0.0 | 46.8 ± 9.0 |
| Cold-acclimation[y] | 0 | 25.9 ± 6.2 | 45.1 ± 38.7 | 33.9 ± 1.1 | 0.0 ± 0.0 | 104.8 ± 45.6 |
| | 4 | 10.1 ± 5.5 | 7.8 ± 1.8 | 67.6 ± 0.7 | 0.0 ± 0.0 | 85.5 ± 3.7 |
| | 8 | 25.5 ± 19.1 | 23.9 ± 15.5 | 80.8 ± 5.2 | 0.0 ± 0.0 | 130.2 ± 35.7 |
| | 12 | 15.3 ± 7.7 | 17.0 ± 9.4 | 105.7 ± 1.0 | 0.4 ± 0.1 | 138.4 ± 13.6 |
| | 16 | 19.7 ± 9.9 | 82.7 ± 61.4 | 114.3 ± 4.1 | 0.5 ± 0.0 | 217.3 ± 67.6 |
| | 20 | 65.2 ± 55.2 | 41.2 ± 33.4 | 124.2 ± 7.4 | 0.5 ± 0.2 | 231.1 ± 81.8 |

[z]Nonacclimated at 25°C under a 16-h daylength.
[y]Cold-acclimated at 5°C for 7 days and sequentially at 0°C under a 8-h daylength for the durations indicated above.
[x]Mean (± SE) of three replications.

（1）低温馴化の方法および植物材料の調製

材料の調製および低温馴化処理は、本章第1節Iと同様の方法で行った。

（2）遊離アミノ酸の分析

組織約200mgを用いて、第3章第3節と同様の方法で試料の作製および遊離アミノ酸の分析を行った。

2．結果

培養植物体節部組織の遊離アミノ酸含量をTable 5-5に示した。総含量を比べると、対照（無低温馴化処理）区が198μmol/g FW、低温馴化処理区が187μmol/g FWであり、アミノ酸の総含量は、低温馴化処理によってほとんど変化しなかった。アミノ酸の組成も、総含量の場合と同様に、低温処理によってほとんど変化せず、トレオニン、アルギニンおよびグルタミン酸含量の多いのが特徴であった。

培養植物体節間部における遊離アミノ酸の総含量には、低温馴化処理によって減少し、対照区で179μmol/g FW、低温処理区で154μmol/g FWであった（Table 5-6）。アミノ酸の種類別にみたところ、アルギニンおよびトレオニン含量が低温馴化処理後に減少した。

カルスの遊離アミノ酸含量についてみると、Table 5-7に示したように、総含量を比べると、対照区で57μmol/g FW、低温馴化処理区で66μmol/g FWであり、低温馴化処理後にやや増加した。アミノ酸の種類別にみたところ、低温馴化処理後にトレオニン含量が増加した。

Ⅲ　タンパク質の組成の変化

1．材料および方法

Table 5-5. Effects of cold acclimation on free amino acid contents in nodal segments of *L. caerulea*.

| Amino acid | Content ($\mu$mol/g fw) | |
|---|---|---|
| | Nonacclimated | Cold-acclimated[z] |
| Aspartic acid | 3.0 | 3.2 |
| Glutamic acid | 15.5 | 17.3 |
| Lysine | 1.4 | 0.8 |
| Arginine | 61.0 | 50.7 |
| Histidine | 1.0 | 0.7 |
| Asparagine | 0.0 | 0.0 |
| Glutamine | 0.0 | 0.0 |
| Serine | 1.0 | 1.2 |
| Threonine | 111.7 | 110.1 |
| Tyrosine | 0.3 | 0.1 |
| Glycine | 0.0 | 0.0 |
| Alanine | 0.9 | 0.8 |
| Valine | 0.6 | 0.4 |
| Leucine | 0.7 | 0.3 |
| Isoleucine | 0.6 | 0.2 |
| Proline | 0.1 | 0.0 |
| Phenylalanine | 0.0 | 0.1 |
| Methionine | 0.0 | 0.0 |
| Tryptophane | 0.0 | 0.0 |
| Cysteine | 0.5 | 0.4 |
| Total | 198.1 | 186.5 |

[z]Plantlets in flasks were cold-acclimated at 5°C under a 8-h daylength for 7 days and then at 0°C under a 8-h daylength for additional 7 days.

Table 5-6. Effects of cold acclimation on free amino acid contents in internodal segments of *L. caerulea*.

| Amino acid | Content (μmol/g fw) | |
|---|---|---|
| | Nonacclimated | Cold-acclimated[z] |
| Aspartic acid | 2.4 | 2.5 |
| Glutamic acid | 11.2 | 12.5 |
| Lysine | 2.2 | 1.4 |
| Arginine | 87.2 | 68.9 |
| Histidine | 1.1 | 0.8 |
| Asparagine | 0.0 | 0.0 |
| Glutamine | 0.0 | 0.0 |
| Serine | 0.7 | 0.8 |
| Threonine | 70.6 | 64.7 |
| Tyrosine | 0.3 | 0.2 |
| Glycine | 0.0 | 0.0 |
| Alanine | 0.8 | 0.6 |
| Valine | 0.6 | 0.3 |
| Leucine | 0.7 | 0.3 |
| Isoleucine | 0.5 | 0.2 |
| Proline | 0.0 | 0.0 |
| Phenylalanine | 0.2 | 0.1 |
| Methionine | 0.0 | 0.0 |
| Tryptophane | 0.0 | 0.0 |
| Cysteine | 0.4 | 0.3 |
| Total | 178.8 | 153.7 |

[z]Plantlets in flasks were cold-acclimated at 5°C under a 8-h daylength for 7 days and then at 0°C under a 8-h daylength for additional 7 days.

Table 5-7. Effects of cold acclimation on free amino acid contents in calli of *L. caerulea*.

| Amino acid | Content ($\mu$mol/g fw) | |
|---|---|---|
| | Nonacclimated | Cold-acclimated[z] |
| Aspartic acid | 2.6 | 3.5 |
| Glutamic acid | 5.4 | 5.7 |
| Lysine | 0.5 | 0.5 |
| Arginine | 33.0 | 35.2 |
| Histidine | 0.4 | 0.4 |
| Asparagine | 0.0 | 0.0 |
| Glutamine | 0.0 | 0.0 |
| Serine | 0.8 | 0.8 |
| Threonine | 10.9 | 17.9 |
| Tyrosine | 0.1 | 0.1 |
| Glycine | 0.1 | 0.1 |
| Alanine | 1.6 | 0.6 |
| Valine | 0.4 | 0.2 |
| Leucine | 0.3 | 0.2 |
| Isoleucine | 0.3 | 0.2 |
| Proline | 0.0 | 0.0 |
| Phenylalanine | 0.2 | 0.1 |
| Methionine | 0.1 | 0.0 |
| Tryptophane | 0.0 | 0.0 |
| Cysteine | 0.3 | 0.1 |
| Total | 57.1 | 65.8 |

[z]Calli in flasks were cold-acclimated at 5°C under a 8-h daylength for 14 days.

（1）低温馴化したカルスからのタンパク質の抽出

第4章第1節と同様の方法で得たカルスを材料として用いた。試料の調整に先立ち、第4章第1節と同様の方法で、カルスに対し低温馴化処理を行った。また、対照として、25℃、16時間日長（4,000lx）で培養したカルスを用いた。

タンパク質の抽出は次のように行った。あらかじめ液体窒素を加えて冷却した乳鉢に、カルス切片1gを入れ、磨砕したのち、タンパク質抽出緩衝液（Table 5-8）3mlを加え均質化した。これを4℃、14,000×gで15分間遠心分離し、得られた上清に4倍量のアセトンを加えたのち、−30℃で1～2時間冷却してタンパク質を沈殿させた。遠心分離（10℃、3,500×g、10分間）して回収したタンパク質の沈殿は、10mlの75％アセトンを加えて10分間静置したのち、75％アセトンを除去した。さらに、同量の無水アセトンを加え、10分間静置することにより洗浄した。つぎに、アセトンを除去し、タンパク質の沈殿を水流アスピレーターを用いて完全に乾燥させた。

（2）二次元電気泳動

低温馴化後のカルスから抽出したタンパク質の組成を二次元電気泳動により調べた。二次元電気泳動の一次元目をO'Farrellら（1977）の方法に基づいて非平衡pH勾配電気泳動とし、二次元目をLaemmli（1970）の方法に基づいてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とした。

1）非平衡pH勾配電気泳動（NEpHGE）

乾燥したタンパク質の沈殿を非平衡pH勾配電気泳動用試料緩衝液（Table 5-8）600μlに溶解し、遠心分離（4℃、3,500×g、10分間）して得られた上清を試料とした。NEpHGE用のゲル（Table 5-8）を内径1mm、長さ11cmのガラス管内に作り、ゲルの上に試料100μlを入れ、さらに、その上に試料保護液（Table 5-8）10μlを入れた。上部泳動液として20mM $H_3PO_4$、下部泳動液として100mM NaOH

Table 5-8. Composition of buffer system for nonequilibrium pH gradient electrophoresis.

| Ingredient | Concentration of ingredients | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Extraction buffer | Sample buffer | Gel | Sample overlay solution |
| Urea | 8M | 8.5M | 8M | 6M |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl[z] | 10mM | - | - | - |
| Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt | 3mM | - | - | - |
| Nonidet P-40[y] | 2%(w/v) | 2%(w/v) | 2%(w/v) | 2%(w/v) |
| 2-mercaptoethanol | 5%(v/v) | 5%(v/v) | - | 5%(v/v) |
| Completex | 0.1tablet/ml | 0.1tablet/ml | - | - |
| Selvalyt 3/10[w] | - | 2%(v/v) | - | 2%(v/v) |
| Selvalyt 3/7[v] | - | - | 2%(v/v) | - |
| Acrylamide | - | - | 4%(w/v) | - |
| N,N'-methylenebisacrylamide | - | - | 0.2%(w/v) | - |
| Riboflavin | - | - | 0.00058%(w/v) | - |
| N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine | - | - | 0.066%(v/v) | - |
| Ammonium peroxodisulfate | - | - | 0.01%(w/v) | - |

[z]pH 7.6.
[y]Surfactant, Nakarai chemicals.
[x]Protease inhibitor cocktail tablets, Boehringer mannheim.
[w]Carrier ampholyte, pH range 3 to 10, Serva.
[v]Carrier ampholyte, pH range 3 to 7, Serva.

を用い、500Vで5時間泳動した。電気泳動終了後、ガラス管から試料を取り出し、二次元目の電気泳動ゲルにのせた。一次元目の泳動が終了したゲルを保存する場合には、−45℃で凍結し、乾燥しないように試験管内に封入して保存した。

2）SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE)

平衡化緩衝液（Table 5-9）に浸漬し平衡させた一次元目のゲルをSDS-PAGE用のゲル（Table 5-9）にのせ、0.5%アガロース溶液（Table 5-9）で固定した。泳動用の緩衝液としてTable 5-9に示したものを用い、1枚のゲル（14cm×14cm×1mm）あたり25mAで泳動した。ブロモフェノールブルーがゲルの下端から約5mm上の所に達した時点で泳動を終了し、クマジーブリリアントブルー R-250によりタンパク質を染色した。ゲルはTable 5-10に示す染色液1に8時間、染色液2に8時間、脱色液に1日間、いずれも約35回／分で振とうしながら浸漬した。

2．結果

低温馴化したカルスから抽出したタンパク質の電気泳動像には、低温馴化していないものには存在しないかあるいは量的に極めて少ないスポットがいくつか認められた。一方、低温馴化することによって消失したスポットも認められた（Fig. 5-1）。このうち、低温馴化したカルスから抽出したタンパク質でみられた等電点（*pI*）5.4、分子質量42kDa（以下42kDaタンパク質）のスポットは、量的にも多いものであった。

## 第2節　培養植物体およびカルスの脱馴化に伴う内生物質の組成および含量の変化

本節では、脱馴化に伴う耐凍性の変化と内生物質変化との関連について検討す

Table 5-9. Composition of buffer system for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

| Ingredient | Concentration of ingredients | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Equilibrium buffer | Resolving gel | Stacking gel | Agarose solution | Running buffer |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl[z] | 62.5mM | - | 125mM | 62.5mM | - |
| Sodium laurylsulfate | 4%(w/v) | 0.1%(w/v) | 0.1%(w/v) | 4%(w/v) | 0.1%(w/v) |
| 2-mercaptoethanol | 5%(v/v) | - | - | 5%(v/v) | - |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl[y] | - | 375mM | - | - | - |
| Acrylamide | - | 9.7%(w/v) | 3.6%(w/v) | - | - |
| N,N'-methylenebisacrylamide | - | 0.27%(w/v) | 0.1%(w/v) | - | - |
| Ammonium peroxodisulfate | - | 0.075%(w/v) | 0.075%(w/v) | - | - |
| N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine | - | 0.05%(v/v) | 0.075%(v/v) | - | - |
| Agarose | - | - | - | 0.5%(w/v) | - |
| Bromophenol blue | - | - | - | 2.5%(v/v) | - |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane | - | - | - | - | 25mM |
| Glycine | - | - | - | - | 192mM |

[z]pH 6.8.
[y]pH 8.8.

Table 5-10. Composition of staining solution and destaining solution.

| Ingredient | Concentration of ingredients | | |
|---|---|---|---|
| | Staining Solution 1 | Staining Solution 2 | Destaining Solution |
| 2-propanol | 25%(v/v) | 10%(v/v) | - |
| Acetic acid | 10%(v/v) | 10%(v/v) | 10%(v/v) |
| Coomassie brilliant blue R-250 | 25mg/l | 50mg/l | - |

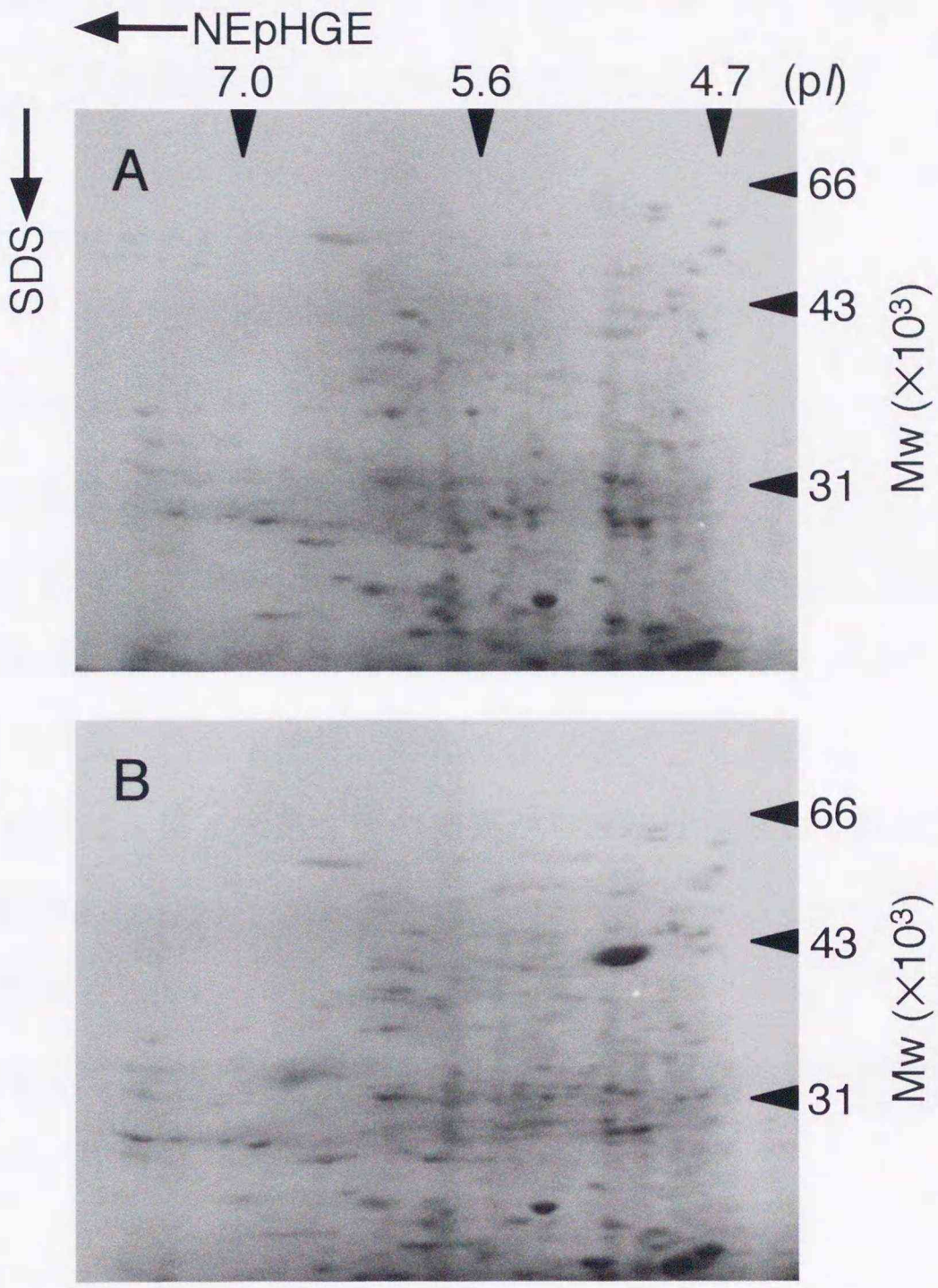



Fig. 5-1. Electrophoretograms of proteins extracted from cold-acclimated *L. caerulea* callus. A: Proteins were extracted from calli incubated for 14 days at 25°C under 16-h daylength; B: Proteins were extracted from calli incubated for 14 days at 5°C under 8-h daylength.

るため、第４章の耐凍性の調査に基づいて、脱馴化した培養植物体およびカルスの含水率、可溶性糖質および遊離アミノ酸について調べた。さらに、カルスについては、タンパク質の組成の変化についても調べた。

## Ⅰ　可溶性糖質の組成および含量の変化

### １．材料および方法

#### （１）脱馴化の方法および植物材料の調製

本章第１節で述べた低温馴化処理後に、脱馴化処理を行った。脱馴化処理は、第４章第２節と同様の条件下、すなわち、培養植物体およびカルスを培養容器ごと25℃、16時間日長（白色蛍光灯、4,000lx）の条件下に移すことにより行った。脱馴化処理の期間は、第４章第２節の結果から、培養植物体では８日間、カルスでは４日間とした。

#### （２）可溶性糖質の分析

組織約200mgを用いて、第３章第２節と同様の方法で試料の作製および分析を行った。

### ２．結果

培養植物体およびカルスの可溶性糖質含量に及ぼす脱馴化処理の影響についてみたところ、Table 5-11に示したように、節部組織および節間部組織では、フルクトース含量はほとんど変化せず、スクロース含量および糖質の総含量がやや減少した。また、ラフィノースは、脱馴化処理後には、検出不可能な量まで減少した。一方、カルスでは、フルクトース、グルコースおよびスクロースの含量が減少し、それに伴い総含量が減少した。ラフィノースは、脱馴化処理後には検出さ

Table 5-11. Changes in soluble carbohydrate contents in nodal, internodal segments and callus of *L. caerulea* deacclimated.

| Sample | Treatment | Soluble sugar content (μmol/g fw) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fructose | Glucose | Sucrose | Raffinose | Total |
| Node | Nondeacclimation[z] | 0.5 | 0.0 | 36.2 | 2.6 | 39.3 |
| | Deacclimation[y] | 1.2 | 0.0 | 31.8 | 0.0 | 33.0 |
| Internode | Nondeacclimation[z] | 1.1 | 0.0 | 40.4 | 3.7 | 45.2 |
| | Deacclimation[y] | 0.5 | 0.0 | 37.0 | 0.0 | 37.5 |
| Callus | Nondeacclimation[x] | 33.4 | 46.9 | 119.3 | 0.5 | 200.1 |
| | Deacclimation[w] | 28.5 | 28.4 | 81.5 | 0.0 | 138.4 |

[z]Nondeacclimated at 5°C for 8 days under a 8-h daylength after 14-day cold-acclimation.
[y]Deacclimated at 25°C for 8 days under 16-h daylength after 14-day cold-acclimation.
[x]Nondeacclimated at 5°C for 4 days under a 8-h daylength after 14-day cold-acclimation.
[w]Deacclimated at 25°C for 4 days under 16-h daylength after 14-day cold-acclimation.

れなかった。

## Ⅱ　遊離アミノ酸の組成および含量の変化

### 1．材料および方法

#### （1）脱馴化の方法および植物材料の調製

材料の調製および脱馴化処理は、本章第2節Ⅰと同様の方法で行った。

#### （2）遊離アミノ酸の分析

組織約200mgを用いて、第3章第3節と同様の方法で試料の作製および分析を行った。

### 2．結果

節部組織の遊離アミノ酸含量の変化に及ぼす脱馴化処理の影響についてみると、Table 5-12に示したように、アミノ酸の総含量を比べると、無脱馴化処理区では181 $\mu$ mol/g FW、脱馴化処理区で200 $\mu$ mol/g FWであり、脱馴化処理後にやや増加した。アミノ酸組成については、脱馴化処理の前後において顕著に増減したものはみられなかった。

培養植物体節間部組織の遊離アミノ酸総含量は、脱馴化処理後にやや増加し、無脱馴化処理区で154 $\mu$ mol/g FW、脱馴化処理区で187 $\mu$ mol/g FWとなった（Table 5-13）。アミノ酸の種類別にみたところ、アルギニンおよびトレオニン含量が脱馴化処理後に増加した。

カルスの遊離アミノ酸含量は、Table 5-14に示したように、総含量を比べると、無脱馴化処理区で65 $\mu$ mol/g FW、脱馴化処理区で54 $\mu$ mol/g FWであり、脱馴化処理によってアミノ酸の総含量がやや減少した。

Table 5-12. Effects of deacclimation on free amino acid contents in nodal segments of *L. caerulea*.

| Amino acid | Content (μmol/g fw) | |
|---|---|---|
| | Nondeacclimated[z] | Deacclimated[y] |
| Aspartic acid | 3.2 | 3.1 |
| Glutamic acid | 17.1 | 15.6 |
| Lysine | 0.8 | 1.4 |
| Arginine | 50.1 | 61.5 |
| Histidine | 0.7 | 1.0 |
| Asparagine | 0.0 | 0.0 |
| Glutamine | 0.0 | 0.0 |
| Serine | 1.2 | 1.0 |
| Threonine | 105.9 | 113.1 |
| Tyrosine | 0.1 | 0.2 |
| Glycine | 0.0 | 0.0 |
| Alanine | 0.8 | 0.9 |
| Valine | 0.4 | 0.6 |
| Leucine | 0.3 | 0.6 |
| Isoleucine | 0.2 | 0.6 |
| Proline | 0.0 | 0.1 |
| Phenylalanine | 0.1 | 0.0 |
| Methionine | 0.0 | 0.0 |
| Tryptophane | 0.0 | 0.0 |
| Cysteine | 0.4 | 0.5 |
| Total | 181.3 | 200.2 |

[z]Plantlets in flasks were cold-acclimated at 5°C under a 8-h daylength for 8 days after 14-day cold-acclimation.
[y]Plantlets in flasks were deacclimated at 25°C under a 16-h daylength for 8 days after 14-day cold-acclimation.

Table 5-13. Effects of deacclimation on free amino acid contents in internodal segments of *L. caerulea*.

| Amino acid | Content (μmol/g fw) | |
|---|---|---|
| | Nondeacclimated[z] | Deacclimated[y] |
| Aspartic acid | 2.5 | 2.6 |
| Glutamic acid | 12.3 | 12.1 |
| Lysine | 1.5 | 2.2 |
| Arginine | 69.8 | 87.2 |
| Histidine | 0.8 | 1.2 |
| Asparagine | 0.0 | 0.0 |
| Glutamine | 0.0 | 0.0 |
| Serine | 0.8 | 0.7 |
| Threonine | 63.9 | 77.6 |
| Tyrosine | 0.2 | 0.4 |
| Glycine | 0.0 | 0.0 |
| Alanine | 0.6 | 0.4 |
| Valine | 0.3 | 0.6 |
| Leucine | 0.4 | 0.7 |
| Isoleucine | 0.2 | 0.5 |
| Proline | 0.0 | 0.1 |
| Phenylalanine | 0.1 | 0.2 |
| Methionine | 0.0 | 0.0 |
| Tryptophane | 0.0 | 0.0 |
| Cysteine | 0.3 | 0.3 |
| Total | 153.9 | 186.9 |

[z]Plantlets in flasks were cold-acclimated at 5°C under a 8-h daylength for 8 days after 14-day cold-acclimation.
[y]Plantlets in flasks were deacclimated at 25°C under a 16-h daylength for 8 days after 14-day cold-acclimation.

Table 5-14. Effects of deacclimation on free amino acid contents in calli of *L. caerulea*.

| Amino acid | Content (μmol/g fw) | |
|---|---|---|
| | Nondeacclimated[z] | Deacclimated[y] |
| Aspartic acid | 3.6 | 2.6 |
| Glutamic acid | 5.4 | 4.9 |
| Lysine | 0.6 | 0.6 |
| Arginine | 35.6 | 31.3 |
| Histidine | 0.4 | 0.4 |
| Asparagine | 0.0 | 0.0 |
| Glutamine | 0.0 | 0.0 |
| Serine | 0.8 | 0.8 |
| Threonine | 17.3 | 10.8 |
| Tyrosine | 0.1 | 0.1 |
| Glycine | 0.1 | 0.1 |
| Alanine | 0.6 | 1.1 |
| Valine | 0.2 | 0.4 |
| Leucine | 0.2 | 0.3 |
| Isoleucine | 0.2 | 0.3 |
| Proline | 0.0 | 0.0 |
| Phenylalanine | 0.1 | 0.2 |
| Methionine | 0.0 | 0.1 |
| Tryptophane | 0.0 | 0.0 |
| Cysteine | 0.1 | 0.3 |
| Total | 65.4 | 54.2 |

[z]Calli in flasks were cold-acclimated at 5°C under a 8-h daylength for 4 days after 14-day cold-acclimation.
[y]Calli in flasks were deacclimated at 25°C under a 16-h daylength for 4 days after 14-day cold-acclimation.

Ⅲ　タンパク質の組成の変化

1．材料および方法

（1）脱馴化したカルスからのタンパク質の抽出

カルスを、本章第1節と同様の方法で低温馴化処理した。このカルスを試料として用い、本章第2節Ⅰと同様の方法で脱馴化処理を行い、本章第1節Ⅲに述べた方法によりタンパク質を抽出した。本実験では、脱馴化処理を行わないカルスを対照とした。

（2）二次元電気泳動

本章第1節Ⅲと同様の方法で二次元電気泳動を行った。

2．結果

脱馴化したカルスから抽出したタンパク質の電気泳動像には、低温馴化したものには存在しないかあるいは量的に極めて少ないスポットがいくつか認められた。一方、脱馴化することによって消失したスポットも認められた。このうち、脱馴化したカルスのタンパク質にも42kDaタンパク質が認められたものの、量的には減少した（Fig. 5-2）。

第3節　第5章の考察

本研究で低温馴化に伴う含水率の変化について調べたところ、クロミノウグイスカグラの培養植物体組織においては、低温馴化処理に伴う含水率の変化は認められなかった。Goldstein・Nobel（1994）は、人工気象箱内で行った低温処理に

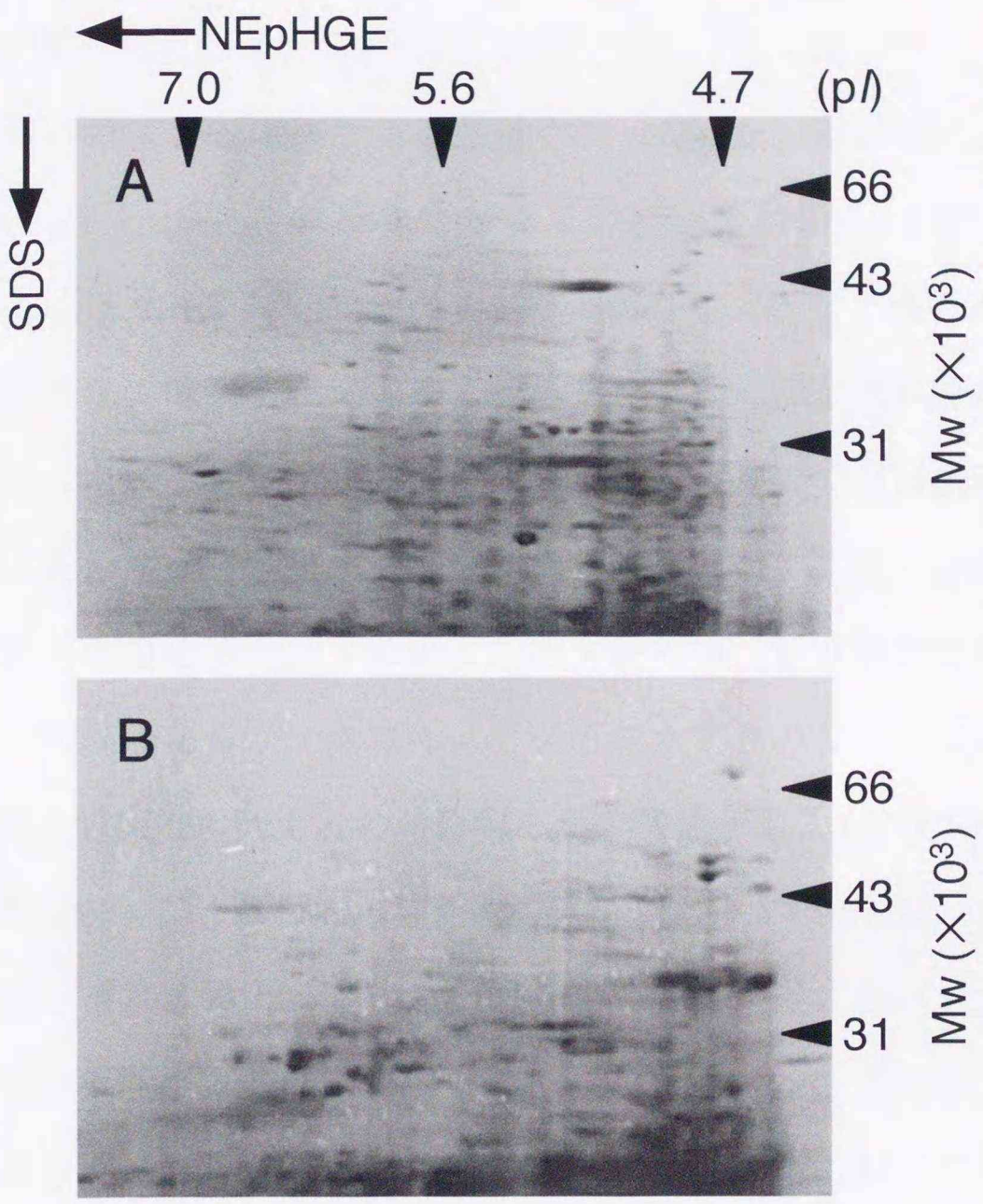



Fig. 5-2. Electrophoretograms of proteins extracted from deacclimated *L. caerulea* callus. A: Proteins were extracted from calli incubated for 18 days at 5°C under 8-h daylength; B: Proteins were extracted from calli incubated for 4 days at 25°C under 16-h daylength after 14-day cold-acclimation.

伴い含水率が低下することを報告している。このことから、本実験では低温馴化処理によって含水率がそれほど変化しなかったが、ここで用いた培養系においては、他の要因が関係したと考えられる。

低温馴化に伴い糖含量が増加することはクワ（*Morus australis*）、ニセアカシア（*Robinia pseudoacacia*）、針葉樹など多くの植物で認められている（酒井，1957；吉田・酒井，1967；Parker，1959）。クロミノウグイスカグラの培養植物体組織においては、低温馴化処理および脱馴化処理に伴う糖質の総含量の変化は認められなかったが、クロミノウグイスカグラのカルスでは、低温馴化処理に伴い糖質の総含量が増加し、脱馴化処理により減少した。このことから、クロミノウグイスカグラの培養植物体では糖質の総含量の増加が耐凍性の向上に関与したと考えるには無理があるが、クロミノウグイスカグラのカルスにおいては糖質の総含量の増加と耐凍性の向上との間に何らかの関連があるものと考えられる。

Stushnoffら（1993）は、数種の木本植物の低温馴化に伴い糖組成に変化が生じ、ラフィノース類が増加するとしている。また、培養体組織において、ラフィノースの蓄積により耐凍性が高まるとの報告がある（Leborgneら，1995b）。本研究で用いたクロミノウグイスカグラの培養植物体およびカルスにおいても、対照（無低温馴化処理）区で検出されなかったラフィノースが、低温馴化処理後の材料から特異的に検出され、脱馴化処理後の材料では検出されなかったことから、クロミノウグイスカグラの培養植物体およびカルスの耐凍性向上とラフィノースの蓄積との間に何らかの関連があると推測される。

つぎに、遊離アミノ酸の変動についてみると、クロミノウグイスカグラの培養植物体およびカルスにおいては、低温馴化処理および脱馴化処理の前後においてアミノ酸の総含量の顕著な変動は認められなかった。また、アミノ酸の種類別にみても低温馴化処理および脱馴化処理の前後において著しい変動は認められなかっ

た。このことから、本実験における処理ではアミノ酸含量に大きな変化が及ばず、耐凍性の向上に他の要因が関与したものと考えられる。

クロミノウグイスカグラのカルスにおけるタンパク質組成の変化についてみると、低温馴化処理前後において、タンパク質の組成に大きな差異は認められなかった。しかし、p*I* 5.4、分子質量42kDaのタンパク質（42kDaタンパク質）について変化がみられ、周囲のスポットと比較して、低温馴化処理後において顕著に濃く現れ、脱馴化処理後には薄くなった。Guy・Haskell（1987）は、ホウレンソウに低温馴化処理を行い特異的に発現するタンパク質を分離し、これが耐凍性増大と関連することを報告している。42kDaタンパク質は低温馴化によって特異的に出現したことから、クロミノウグイスカグラのカルスの低温馴化と何らかの関連があるものと思われる。

以上のことから、クロミノウグイスカグラの培養植物体およびカルスの低温馴化および脱馴化は、ラフィノースに何らかの関連があるものと思われる。このほか、クロミノウグイスカグラのカルスにおいては、42kDaタンパク質タンパク質にある種の関連があるものと考えられる。

# 第６章　総合考察

寒冷地におけるクロミノウグイスカグラの安定生産および栽培地域の拡大を図る場合、まず、生育地域の気象の特性とその果樹の耐凍性・地域適応性との関連についての検討が必要になる。

（１）北海道内数箇所の地域におけるクロミノウグイスカグラ（*Lonicera caerulea* var. *emphyllocaryx*）の耐凍性の変化について調査した結果、道北および道東地域では秋季から冬季にかけての早い時期に耐凍性が獲得され、道央地域では耐凍性の獲得時期が遅れるという特徴がみられた。これは、各地域における最低気温が異なり、これが主な環境要因となって、耐凍性獲得の程度に差異が生じたものと考えられる。ヤナギ（*Salix sachalinensis*）では、同一個体から採取した挿し木苗を異なる地域で生育させた場合、耐凍性は、越冬している場所の温度にほぼ対応した変化をみせる（Sakai，1970）。一方、同一種内でも品種・系統が異なれば、遺伝的な差異に起因する耐凍性についても違いがみられる（Bridgerら，1995；Leborgne，1995a；Araraら，1997；Castonguayら，1993）。したがって、本研究において、耐凍性が比較的低く評価された樹についても、早い時期から最低気温が低下する地域においては、耐凍性の高まりが早くなる可能性があるので、栄養繁殖によって増やした樹を用いて、異なる地域で耐凍性の変動について検討する必要があると思われる。

冬季から春季にかけてのクロミノウグイスカグラの耐凍性は、音威子府村および美唄市では、他地域と比較して低く、また、大樹町および苫小牧市においては、耐凍性が高いまま維持された。これらの差異が、単に外気温の違いによるものであれば、音威子府および大樹における耐凍性のほうが高い状態で維持されるものと考えられる。しかし、実際には、積雪層の深い地域では耐凍性が低く、積雪層

の浅い地域では耐凍性が高かったことから、獲得した耐凍性の維持には、最低気温よりもむしろ積雪層の深さが大きな影響を及ぼすものと考えられる。植物は積雪によって強い寒さと乾燥から守られていることが報告されており（Sakai，1968；酒井ら，1969）、本研究においても、生育地域の外気温の影響が小さく現れたものと推察される。

（2）凍結傷害を組織学的に観察することにより耐凍性の差異を検討すると、節部においては、腋芽の基部および皮層の耐凍性は比較的低く、頂端分裂組織およびその周辺の葉原基の耐凍性は高かった。茎では、まず皮層に凍害が現れたのち、温度が低くなるに従って維管束形成層へと被害が拡大した。また、TTC還元法による観察においても、腋芽の基部および外側に位置する葉原基が赤く発色せず、すでに死んでいる冷却温度でも腋芽の頂端分裂組織およびその周辺の葉原基は赤く発色し生存していた。培養植物体を用いたTTC還元法による組織学的観察においても、茎頂ドーム状組織およびその周辺の葉原基が赤く発色し生存している冷却温度では、鱗片葉および皮層は生存できなかった。アザレア（*Rhododendron spp.*）では、冷却中に器官外凍結が起こり、小花の水分が減少し鱗片中の水分が増加して小花が生存することが報告されている（Ishikawa・Sakai，1981）。本研究の結果から判断して、クロミノウグイスカグラにおいても同様の機構によって茎頂ドーム部位が生存したものと考えられる。しかし、この場合の生存が、過冷却または器官外凍結に起因するものであるかについては明らかになっておらず、今後、示差熱分析による詳細な検討が必要であると思われる。

（3）同一個体の中でも、外的条件に対する耐凍性の発現が比較的鋭敏な茎頂を対象として、クロミノウグイスカグラの耐凍性の季節的変動について調べたところ、秋季から冬季にかけて高くなり、冬季には非常に高い耐凍性を有することが明らかとなったが、この耐凍性の増大は、主として、日最低気温の低下による

ものと考えられる。一方、耐凍性を効率よく高める温度が存在する（酒井，1964；Sakai，1966）といわれており、また、その温度は季節によっても変わるとされている（Sakai，1966；Howell・Weiser，1969）。本研究においては、最低気温が5℃以下になると耐凍性の増大が認められたが、その時期に、より高い温度あるいはより低い温度に遭遇した場合の耐凍性の変化については不明であるため、クロミノウグイスカグラ茎頂の効率的な耐凍性獲得についてはさらに調査することが必要である。

（4）低温馴化期間の長短と耐凍性の発現との関連についてみると、Zhaoら（1995）により、バンクスマツ（*Pinus banksiana*）では、5℃で2～4週間処理すると耐凍性が向上すると報告されており、Uemura・Yoshida（1984）のライムギ（*Secale cereale*）を用いた研究においても、10日から30日間の低温馴化処理により耐凍性が向上することが確認されている。本研究では、低温馴化処理開始12日から16日後に耐凍性が向上した。一方、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）、ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）およびカラタチ（*Poncirus trifoliata*）では、低温馴化が急速に行われたとの報告があり（Gilmourら，1988；Guyら，1987；Tignor，1997）、シロイヌナズナでは、4℃で処理するとわずか12時間後に耐凍性の増大が認められることから、耐凍性増大に要する低温馴化処理の期間は、植物種によって異なるものと思われる。本研究では、培養植物体の節間の耐凍性は節部のそれよりもやや弱いなど器官・組織により耐凍性に差異があること、ならびに、低温馴化処理期間が長くなるにつれて耐凍性が向上し続けたことなどから、同一植物でも組織や器官によって気温変化に対する感応が異なるものと考えられる。

（5）本研究の結果によると、耐凍性の高い組織では、ラフィノースおよびスタキオースのようなラフィノース類が蓄積するという共通した特徴がみられ、組

織中の可溶性糖質組成が耐凍性に影響を及ぼしていることが明らかになった。このことは、植物の耐凍性にラフィノース類が関与しているとする最近の報告（Hinesleyら，1992；Flinn・Ashworth，1995）とも一致している。木本植物においては、低温馴化中に蓄積される糖質の種類は植物種によって様々である（Fischer・Höll，1991；Stushnoffら，1993）が、Sauter・van Cleve（1991）は、蓄積される糖質の種類が、糖質の総含量よりも重要な要因であるとしている。本研究では、自然条件下で生育しているクロミノウグイスカグラの茎頂は－196℃で凍結しても生存しており、そのラフィノース含量は、培養植物体の節部のそれの約10倍に達することがわかった。本研究において、培養植物体と野外で生長した植物体との間において、ラフィノースおよびスタキオースの含量に差異が認められたが、これは、耐凍性の差異と密接に関連しているものと推察される。また、クロミノウグイスカグラでは、培養植物体の低温馴化は16日以内で完了し、これは野外の植物体が自然条件下で最大の耐凍性を獲得するのに必要な期間と比較してはるかに短いことが明らかになった。細胞が最大の耐凍性を獲得するには、細胞外凍結による氷晶の発達に伴う細胞内の脱水に耐えなければならない（Sakai・Larcher，1987）。低温馴化に伴って起こる細胞内の変化は、培養植物体を低温条件に遭遇させた場合には不完全で、自然条件下では、これが非常にゆっくり進行するため、植物細胞が脱水に耐えるものと思われる。

低温ストレスに感応して、遊離アミノ酸の中でもとりわけプロリンが増加することが確認されており（Ait Barka・Audran，1997；Galiba，1994；Koster・Lynch，1992）、また、プロリンの蓄積がオオムギ（*Hordeum vulgare*）のハードニングには必要であると報告されている（Murelliら，1995）が、本研究においては、プロリンが、低温馴化に伴って蓄積されず、耐凍性の低下する春季に多くなったことから、発育枝の伸長生長に利用されるものと思われる。一方、本研究では、

耐凍性が高まるのに先駆けて酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸の蓄積がみられたことから、今後、これらのアミノ酸と低温馴化との関係について検討する必要があるものと思われる。

（6）タンパク質についてみると、本研究の結果から、クロミノウグイスカグラでは、等電点5.4、分子質量42kDaタンパク質（以下42kDaタンパク質）が、凍結時における細胞内の微細構造や分子の保護、および低温下での脱水に対する抵抗性の増大に役立っているものと推察される。このことは、シロイヌナズナおよびホウレンソウにおいて、いくつかのタンパク質分子種が、低温に感応して新たに生成されるとの報告があること（Welinら，1994；Guyら，1985）、ブルーベリー（*Vaccinium*, section *Cyanococcus*）の花芽においては、0℃～7℃の低温にさらされた時間の増加に伴い、3種のポリペプチドが増加し、これらのポリペプチドは、デハイドリンあるいはデハイドリン様タンパク質であることが確認されていること（Muthalif・Rowland，1994）、シロイヌナズナでは、凍結防御効果を有するタンパク質の存在が示唆されていること（Linら，1990）などからも類推される。したがって、クロミノウグイスカグラの42kDaタンパク質と不凍タンパク質（Griffithら，1992）、凍害防御タンパク質（Siegら，1996）およびLate embryogenesis abundant（LEA）様タンパク質（Gilmourら，1992；Lin・Thomashow，1992；Salzmanら，1996）との関連についてさらに検討することが必要である。

（7）寒冷地における安定的な果樹栽培に役立つ新品種育成および栽培技術の確立を図る場合、耐凍性のある品種・系統の検索と育成が必要になるが、このような育種目的を実現するためには、凍結傷害に対する抵抗性をもつ母材を入手することが必要である。これまで多くのクロミノウグイスカグラの育種および利用に関する研究が行われてきており（田中・渡辺，1986；中島・千葉，1988；田中

ら，1990；田中ら，1991；田中ら，1994；田中，1996）、この場合、遺伝資源の収集と保存、栽培による生育特性の把握が不可欠である（酒井，1995）。

遺伝資源の保存についてみると、耐凍性の高いものほど、液体窒素中（－196℃）に入れても生存できる可能性が大きいことがわかっており（酒井，1963；Sakai，1965）、本研究においても、耐凍性を示すLT$_{50}$の値が－17.5℃以下となる10月～翌年３月に採取した材料を用いて、液体窒素浸漬による超低温下での凍結保存を行った場合、凍結・融解後に高い生存率を示したことから、優良形質を有するクロミノウグイスカグラの収集と保存にあたっては、冬季の野外植物体から採取した茎頂を凍結保存するのが最も効果的であると考えられる。

以上のように、本研究の成果は、クロミノウグイスカグラの耐凍性獲得に関するいくつかの基礎的知見を提起し、栽培および品種育成の面において利用できるとともに、耐凍性発現機構の探究にも役立つものと考えられる。

# 摘　要

クロミノウグイスカグラ（*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*）の栽培化、栽培地域の拡大、品種改良などを図る際の基礎となる（1）生育地域と耐凍性との関連（2）耐凍性の季節的変動（3）耐凍性の変化と内生糖質との関連（4）培養系による耐凍性の検証（5）低温馴化処理に伴う内生物質の変化について検討した。

1．クロミノウグイスカグラ生育地域と耐凍性

（1）生育地域と耐凍性の変化

1）萌芽率により耐凍性の地域間差について調べると次のとおりである。耐凍性は、10月下旬から12月下旬にかけて高くなり、翌年2月下旬には、生育地域による差が認められた。すなわち、大樹町および苫小牧市では耐凍性が高いまま維持されていたのに対して、札幌市、美唄市および音威子府村では耐凍性が弱くなった。これは、その地域の気温と積雪量に関連していることがわかった。

2）組織からの電解質漏出量の変化についてみると、10月下旬～12月下旬では少なく推移したが、翌年2月下旬に多くなり、生育地域による差は認められなかった。

（2）凍結・融解後の枝組織に発生する凍害の組織学的観察

1）11月上旬に採取した腋芽では、－30℃で芽の基部が褐変した。12月下旬の腋芽では凍結・融解後においても緑色を呈し生存していた。3月上旬のものは、－20℃凍結では緑色で生存していたが、－30℃においては頂端分裂組織、葉原基、芽の基部および皮層が褐変した。

2）11月上旬に採取した茎は、未凍結のものと同様に－10℃の凍結後において

も全体的に緑色であったが、－30℃で凍結すると、皮層の一部が、－40℃では皮層の大部分が褐変した。12月下旬の茎では、未凍結と同様に－40℃凍結においても全体的に緑色を呈した。３月上旬採取のものでは、－20℃で皮層が褐変し、－30℃以下において皮層および維管束形成層が褐変した。

（３）組織間の耐凍性の差異

１）腋芽のTTC還元による発色についてみると次のとおりである。未凍結および－10℃凍結後の頂端分裂組織、葉原基、芽の基部および茎の形成層周辺が発色し生存した。－20℃の凍結後では、頂端分裂組織およびその周辺の葉原基は生存したが、形成層ではTTC還元による発色は弱まり、芽の基部はやや褐色した。－30℃凍結では、芽の基部は褐色し、茎の組織および葉原基の一部が壊死した。

２）TTC還元により茎の組織についてみると、未凍結および－10℃の凍結後では、維管束形成層および表皮の直下が生存したが、－20℃および－30℃の凍結においては、皮層から維管束形成層にかけて壊死した。

２．クロミノウグイスカグラ野外茎頂の耐凍性の変化

（１）野外茎頂の耐凍性の季節的変動

野外から採取したクロミノウグイスカグラ茎頂の耐凍性は、８月から11月にかけて徐々に高まり、冬季に極めて高い状態を維持したのち、春季に急速に低下することが明らかになった。また、耐凍性が高い時期（10月から翌年３月）の茎頂は超低温（－196℃）の凍結後にも生存したが、耐凍性が低くなると（４月）生存できないことが明らかとなった。

（２）TTC還元法によって評価した茎頂および茎の耐凍性の変化

１）TTC還元法によって評価した茎頂の耐凍性は、９月から10月にかけて強くなり、10月から翌年１月まで極めて強い状態を維持したのち、１月から３月にか

けて弱くなった。

2）茎の耐凍性についてみると、10月から12月にかけて徐々に高くなり、12月～翌年1月極めて高い状態を維持したのち、1月から4月にかけて弱くなった。

3）植物体の部位による耐凍性の差異は次のとおりである。茎頂の耐凍性は、茎のそれよりも、早い時期に強くなることが明らかになった。冬季間の耐凍性の強い時期には、茎頂と茎との間に、耐凍性の顕著な差異はみられなかったが、冬季から春季にかけての耐凍性が弱くなる時期には、茎頂の耐凍性が茎のそれより高かった。

3．クロミノウグイスカグラ野外茎頂における含水率および内生物質の変化

（1）野外茎頂における含水率の季節的変動

野外茎頂の含水率は、5月から6月にかけての耐凍性が弱い時期には高く、耐凍性が強い10月～翌年3月には、他の時期のそれと比べて低く推移することが明らかになった。

（2）野外茎頂における可溶性糖質の季節的変動

1）可溶性糖質の総含量についてみると、8月から翌年1月まで漸増し、その後減少して、4月から6月にかけて低い値で推移した。

2）可溶性糖の種類別にみた含量の季節的変動は次のとおりである。フルクトースおよびグルコース含量は季節を問わず含量が少なく、変動の幅も小さかったが、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースの含量は季節により大きく変動した。スクロースは、可溶性少糖類の中で最も多く含まれ、糖の総含量の50%～90%を占め、その季節的変動は可溶性糖質の総含量の変動と同様であった。すなわち、4月から6月に減少したのち、翌年1月まで漸増し、5月まで漸減して、再び8月まで増加した。ラフィノースおよびスタキオースの含量は、10月から増加

し、11月から翌年３月まで高い値を維持した。

（３）野外茎頂における遊離アミノ酸の組成および含量の季節的変化

１）遊離アミノ酸の総含量についてみると、９月から翌年２月まで低い値で推移し、３月および４月に増加した。

２）遊離アミノ酸の種類別にみた含量の季節的変動は次のとおりである。トレオニン、セリンおよびプロリンの含量は、春季に増加したが、その他の時期にはあまり変化しなかった。また、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸の含量は、春季に増加したほか、耐凍性が高まる時期に先駆けてやや増加した。

４．*In vitro* 実験系によるクロミノウグイスカグラ耐凍性の検証

（１）培養植物体およびカルスの低温馴化処理に伴う耐凍性の変化

１）低温馴化期間の影響についてみると次のとおりである。低温馴化処理をした節部切片の耐凍性は、処理開始12日後以降に著しく高くなった。節間部切片の耐凍性（カルス形成指数により評価）は、低温馴化処理の期間が長くなるにつれて増大した。カルスの耐凍性（カルス増殖指数で評価）は、低温馴化処理開始８日後に著しく高くなり、12日後以降は高い状態を維持した。低温馴化処理をしていない場合（対照）では、いずれの材料においても、耐凍性は低く推移した。

２）低温馴化処理と培養植物体およびカルスの耐凍性との関連は次のとおりである。低温馴化処理を行った場合の耐凍性についてみると、節部切片では、－５℃～－12.5℃の凍結後に高い生存率を示し、節間部切片では、－12.5℃の凍結後でも生存する（カルスを形成する）ものがあり、カルスでは、－５℃～－7.5℃の凍結後にも生存し、大きいカルス増殖指数を示した。対照（無低温馴化処理）区の材料においては、０℃以上の冷却温度域では高い生存性を示したが、０℃より

低い冷却温度域では急に生存できなくなった。

3）TTC還元法によって評価した耐凍性は次のとおりである。低温馴化処理した場合の耐凍性についてみると、節部切片では、－7℃の凍結後にも高い生存率を示し、節間部切片では、－3℃～－7℃の冷却後にも高い生存率を示し、カルスでは、－3℃～－19℃の凍結後にも比較的高い生存率を示した。対照（無低温馴化処理）区の材料は、0℃以上の冷却温度域で高い生存率だったが、0℃より低い冷却温度域での凍結後には、生存率が急激に低下した。

（2）培養植物体およびカルスの脱馴化処理に伴う耐凍性の変化

1）脱馴化期間の影響についてみると次のとおりである。節部切片についてみると、脱馴化処理した（脱馴化処理区）ものの凍結・融解後の生存率は、処理開始2日後から8日後にかけて徐々に低下し、処理8日後および12日後に、低温馴化処理および脱馴化処理の双方をしていない（対照区）ものと同程度となった。節間部切片においては、脱馴化処理の期間が長くなるにつれ耐凍性（カルス形成指数で評価）が減少し、処理開始8日～12日後には、対照（無低温馴化処理）区と同程度になった。カルスについては、カルス増殖指数は処理2日後に著しく低下した。脱馴化処理していない（無脱馴化処理区）材料では、節部切片、節間部切片およびカルスのいずれにおいても、高い生存性を維持していた。

2）脱馴化処理と培養植物体およびカルスの耐凍性との関連は次のとおりである。節部切片についてみると、脱馴化処理を8日間行ったものの凍結・融解後における生存率は、0℃以上の冷却温度では高かったが、－5℃以下では冷却温度が低くなるに従って低下した。つぎに、脱馴化処理区の節間部切片についてみると、0℃以上の冷却温度域で高いカルス形成指数（耐凍性の指標）が得られたものの、0℃より低い冷却温度域では急激な指数の減少がみられた。脱馴化処理4日間のカルスでは、5℃～2.5℃の冷却では、高い増殖指数が得られたものの、0

℃以下の温度域では冷却温度の低下に従ってカルス増殖指数が急激に低下した。いずれの材料においても、対照（無低温馴化処理）区の生存傾向は、脱馴化処理区のものと類似していた。また、いずれの材料においても、無脱馴化処理区では、－5℃から－10℃の冷却温度範囲で、脱馴化処理区および対照区に比べて高い生存性を示した。

3）TTC還元法により評価した場合の耐凍性の変化は、次のとおりである。節部切片についてみると、脱馴化処理区では、0℃以上の冷却温度域では高い生存率を示したが、0℃より低い冷却温度域では温度が低くなるに従って生存率が低下した。つぎに、節間部切片についてみると、脱馴化処理区では、生存率が、2℃以上の冷却温度で96%以上を示したものの、0℃以下の温度域では冷却温度が低くなるにつれて、急激に低した。カルスについてみると、脱馴化処理区では、0℃以上の冷却温度域で高い生存率が得られたものの、0℃より低い冷却温度域では急激に生存率が低下した。対照（無低温馴化処理）区の材料では、脱馴化処理区のものと同様の生存率の変動がみられた。一方、無脱馴化処理区の材料では、－3℃～－9℃の冷却で比較的高い生存率を示した。

（3）組織学的観察

低温馴化した培養植物体の芽は、茎頂部およびその周辺の葉原基の生存性が高いことが確認されたが、対照（無低温馴化処理）区の芽では、茎頂のドーム状組織のみが生存したが、その他の部位は生存しなかった。茎についてみると、低温馴化処理によって維管束形成層および表皮の直下が生存していた。カルスでは、対照区のものは生存しなかったが、低温馴化処理を行うと、組織全体の細胞が生存するようになった。

5．クロミノウグイスカグラ培養植物体における内生物質の変動

（1）培養植物体およびカルスの低温馴化に伴う内生物質の組成および含量の変化

1）可溶性糖質の組成および含量の変化

節部切片および節間部切片における可溶性糖質の総含量については、低温馴化処理に伴う顕著な変化は認められなかった。糖質の種類別にみると、フルクトース、グルコースおよびスクロースの含量には、低温馴化処理によって大きな変動は認められなかった。しかし、低温馴化処理開始８日後にはラフィノースが少量検出され、処理12日後から顕著に増加したのち、20日後まで増加し続けた。

カルスにおいては、スクロースおよびラフィノースの含量が低温馴化処理に伴って変化した。すなわち、スクロース含量は処理期間が長くなるにつれて増加し、ラフィノースは処理開始12日後から20日後にかけて蓄積した。フルクトースおよびグルコースは大きく変動したが、低温馴化処理に伴う変化は認められなかった。また、可溶性糖質の総含量は、低温処理期間が長くなるのに伴い増加した。

2）遊離アミノ酸の組成および含量の変化

節部切片、節間部切片およびカルスにおける遊離アミノ酸の総含量についてみると、低温馴化処理の前後において顕著に変化しなかった。また、アミノ酸の組成も総含量の場合と同様に、低温馴化処理前後における著しい変化は認められなかった。

3）タンパク質の組成の変化

低温馴化処理したカルスから抽出したタンパク質には、等電点5.4、分子質量42kDa（42kDaタンパク質）のスポットが認められた。

（2）培養植物体およびカルスの脱馴化に伴う内生物質の組成および含量の変化

1）可溶性糖質の組成および含量の変化

節部切片および節間部切片では、フルクトース含量はほとんど変化せず、スク

ロース含量および可溶性糖質の総含量がやや減少した。ラフィノースは、脱馴化処理によって検出不可能な量まで減少した。カルスでは、フルクトース、グルコースおよびスクロースの含量が減少し、それに伴い可溶性糖質の総含量が減少した。ラフィノース含量は、脱馴化処理後には検出されなかった。

2）遊離アミノ酸の組成および含量の変化

節部切片および節間部切片の遊離アミノ酸の総含量は、脱馴化処理後においてやや増加した。アミノ酸の種類別に含量をみたところ、脱馴化処理の前後において顕著に増減したものはみられなかった。カルスにおける遊離アミノ酸の総含量は、脱馴化処理によってやや減少した。

3）タンパク質の組成の変化

脱馴化したカルスから得たタンパク質にも42kDaタンパク質が認められたが、量的には減少した。

以上のような本研究の成果は、クロミノウグイスカグラの耐凍性の発現および消失に関する基礎的知見を提起し、栽培化および品種育成ならびに耐凍性発現機構の探究に寄与するものと考えられる。

# 謝　辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始懇篤なる御指導と御校閲の労を賜った北海道大学大学院農学研究科教授　原田　隆博士、同教授　千葉誠哉博士、北海道大学大学院地球環境科学研究科助教授　藤川清三博士ならびに北海道大学大学院農学研究科助教授　増田　清博士に対し深く感謝の意を表します。

北海道大学大学院農学研究科助手　鈴木　卓博士には本研究について多くの有益な御教示をいただいた。

北海道大学農学部附属演習林中川地方演習林助教授　野田真人博士、同技官　奥田篤志氏には、貴重な植物材料の採取に御協力をいただいた。ここに記して厚く御礼申し上げます。

北海道立林業試験場　佐藤孝夫氏、塚田晴朗氏、JA大樹町　牧田　巌氏、大樹町　前崎義昭氏には実験の遂行上多大な御協力をいただいた。

本研究の一部は北海道大学農学部附属農場において行われたが、北海道大学農学部附属農場技官　田村春人氏、同　中野英樹氏には栽培管理や実験方法等について御指導をいただいた。また、北海道大学農学部技官　笠井　登氏には実験の遂行上、多くの御助言と御指導をいただいた。さらに、北海道大学農学部事務官　小野朋子氏には多くの激励の御言葉と御協力をいただいた。

本研究には近藤友宏氏、岩川浩二郎氏、谷口和範氏、高田久美子氏をはじめ北海道大学農学部園芸学講座および園芸緑地学講座園芸学分野の大学院ならびに学生諸氏の御協力に負うところが大きかった。

秋田県立大学短期大学部の千葉和夫教授をはじめとする教員および職員の各氏には、特段の御理解と御配慮をいただいた。

以上の各位に対し、ここに衷心より感謝の意を表します。

# 引用文献


Ait Barka, E. and J. C. Audran. 1997. Response of champenoise grapevine to low temperatures: Changes of shoot and bud proline concentrations in response to low teperatures and correlations with freezing tolerance. J.Hort. Sci. 72: 577-582.

Almeida, M. H., M. M. Chaves and J. C. Silva. 1994. Cold acclimation in eucalypt hybrids. Tree Physiol. 14: 921-932.

Anisko, T. and O. M. Lindstrom. 1996. Seasonal changes in cold hardiness of *Rhododendron* L. ' Catawbiense Boursault ' grown under continuous and periodic water stress. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121: 301-306.

Anthony, P., K. C. Lowe, J. B. Power and M. R. Davey. 1997. Synergistic enhancement of the postthaw growth of cryopreserved rice cells by oxygenated perfluorocarbon and pluronic F-68. Cryobiology. 35: 201-208.

Arora, R., M. E. Wisniewski and R. Scorza. 1992. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) I. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of bark and xylem tissues. Plant Physiol. 99: 1562-1568.

Arora, R. and M. E. Wisniewski. 1995. Ultrastructural and protein changes in cell suspension cultures of peach associated with low temperature-induced cold acclimation and abscisic acid treatment. Plant Cell Tissue Organ Culture. 40: 17-24.

Arora, R., L. J. Rowland and G. R. Panta. 1997. Chill-responsive dehydrins in blueberry: are they associated with cold hardiness or dormancy transitions?

Physiol. Plant. 101: 8-16.

Bittenbender, H. C. and G. S. Howell Jr. 1974. Adaptation of the Spearman-Kärber method for estimating the T50 of cold stressed flower buds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 187-190.

Boothe, J. G., M. D. de Beus and A. M. Johnson-Flanagan. 1995. Expression of a low-temperature-induced protein in *Brassica napus*. Plant Physiol. 108: 795-803.

Bridger, G. M., D. E. Falk, B. D. McKersie and D. L. Smith. 1995. Crown freezing tolerance and field winter survival of winter cereals in eastern Canada. Crop Sci. 35: 150-157.

Castonguay, Y., P. Nadeau and S. Laberge. 1993. Freezing tolerance and alteration of translatable mRNAs in alfalfa (*Medicago sativa* L.) hardened at subzero temperatures. Plant Cell Physiol. 34: 31-38.

Castonguay, Y., P. Nadeau, P. Lechasseur and L. Chouinard. 1995. Ddifferential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness. Crop Sci. 35: 509-516.

Chen, H. H., P. Gavinlertvatana and P. H. Li. 1979. Cold acclimation of stem-cultured plants and leaf callus of solanum species. Bot. Gaz. 140: 142-147.

Chen, T. H. H. and L. V. Gusta. 1983. Abscisic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. Plant Physiol. 73: 71-75.

Dallaire, S., M. Houde, Y. Gagne, H. S. Saini, S. Boileau, N. Chevrier and F. Sarhan. 1994. ABA and low temperature indece freezing tolerance via distinct regulatory pathways in wheat. Plant Cell Physiol. 35: 1-9.

Evert, D. R. and C. J. Weiser. 1971. Relationship of electrical conductance at two

frequencies to cold injury and acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. Plant Physiol. 47: 204-208.

Ezawa, T., T. Harada and T. Yakuwa. 1989. Studies on freeze-preservation of fruit tree germplasm III Freeze-preservation of grape shoot tips. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 64: 51-55.

Fennell, A. and P. H. Li. 1985. Rapid cold acclimation and deacclimation in winter spinach. Acta Hort. 168: 179-183.

Fischer, C. and W. Höll. 1991. Food reserves of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) I. Seasonal changes in the cargbohydrate and fat reserves of pine needles. Trees. 5: 187-195.

Flinn, C. L. and E. N. Ashworth. 1995. The relationship between carbohydrates and flower bud hardiness among three *Forsythia* taxa. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 607-613.

Fry, J. D., N. S. Lang and R. G. P. Clifton. 1991. Freezing resistance and carbohydrate composition of 'Floratam' St. Augustinegrass. HortScience. 26: 1537-1539.

Fry, J. D., N. S. Lang, R. G. P. Clifton and F. P. Mier. 1993. Freezing tolerance and carbohydrate content of low-temperature-acclimated and nonacclimated centipedegrass. Crop Sci. 33: 1051-1055.

Galiba, G. 1994. *In vitro* adaptation for drought and cold ahardiness in wheat. Plant Breeding Review, 12: 115-162.

Gilmour, S. J., R. K. Hajela and M. F. Thomashow. 1988. Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 87: 745-750.

Gilmour, S. J., N. N. Artus and M. F. Thomashow. 1992. cDNA sequence analysis

and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 18: 13-21.

Gordon-Kamm, W. J. and P. L. Steponkus. 1984. Lmellar-to-hexagonal$_{II}$ phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6373-6377.

Goldstein, G. and P. S. Nobel. 1994. Water relations and low-temperature acclimation for cactus species varying in freezing tolerance. Plant Physiol. 104: 675-681.

Griffith, M., P. Ala, D. S. C. Yang, W.-C. Hon and B. A. Moffatt. 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. Plant Physiol. 100: 593-596.

Gusta, L. V., J. D. Butler, C. Rajashekar and M. J. Burke. 1980. Freezing resistance of perennial turfgrasses. HortScience. 15: 494-496.

Guy, C. L., K. J. Niemi and R Brambl. 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3673-3677.

Guy, C. L. and D. Haskell. 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. Plant Physiol. 84: 872-878.

Guy, C. L., R. L. Hummel and D. Haskell. 1987. Induction of freezing tolerance in spinach during cold acclimation. Plant Physiol. 84: 868-871.

Hamman Jr., R. A., I.-E., Dami, T. M. Walsh and C. Stushnoff. 1996. Seasonal carbohydrate changes and cold hardiness of Chrdonnay and Riesling grapevines. Amer. J. Enol. Vitic. 47: 31-36.

Hinsley, L. E., D. M. Pharr, L. K. Snelling and S. R. Funderburk. 1992. Foliar

raffinose and sucrose in four conifer species: relationship to seasonal temprature. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 852-855.

Howell, G. S. and C. J. Weiser. 1969. The environmental control of cold acclimation in apple. Plant Physiol. 45: 390-394.

Ishikawa, M. and A. Sakai. 1981. Freezing avoidance mechanisms by supercooling in some *Rhododendron* flower buds with reference to water relations. Plant Cell Physiol. 22: 953-967.

和泉　薫・藤岡敏夫. 1975. 積雪の変態と熱伝導の研究Ⅰ. 低温科学, 物理篇. 33: 99-102.

Kang, S. K., H. Motosugi, K. Yonemori and A Sugiura. 1997. Exothermic characteristics of dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) in relation to cold hardiness. HortScience. 32: 840-843.

Katano, M., A. Ishikawa and A. Sakai. 1983. Survival of apical meristems from winter apple twigs cooled to the temperature of liquid nitrogen. HortScience. 18: 707-708.

Katano, M. 1986. Seasonal changes of freezing tolerance of apple shoot tips. Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ. 5: 1-5.

川口武泰・鈴木　卓・原田　隆・八鍬利郎. 1992. ハスカップ茎頂の耐凍性並びに糖、遊離アミノ酸及び水分含量の季節的変動. 園学雑. 61別1: 166-167.

Koster, K. L. and D. V. Lynch. 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye. Plant Physiol. 98: 108-113.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Leborgne, N., C. Teullières, B. Cauvin, S. Travert and A. M. Boudet. 1995a.

Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along an annual cycle in the field and during induced frost-hardening in controlled conditions. Trees. 10: 86-93.

Leborgne, N., C. Teulieres, S. Travert, M.-P. Rols, J. Teissie and A. M. Boudet. 1995b. Introduction of specific carbohydrates int *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. Eur. J. Biochem. 229: 710-717.

Lin, C., W. W. Guo, E. Everson and M. F. Thomashow. 1990. Cold acclimation in *Arabidopsis* and wheat. Plant Physiol. 94: 1078-1083.

Lin, C. and M. Thomashow. 1992. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated Arabidopsis cor15 and characterization of the cor15 polypeptide. Plant Physiol. 99: 519-525.

Monroy, A. F., F. Sarhan and R. S. Dhindsa. 1993. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. Plant Physiol. 102: 1227-1235.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Arevised medium for rapid growth and bio assays with tabaccotissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Maier, F. P., N. S. Lang and J. D. Fry. 1994. Freezing tolerance of three St. Augustingrass cultivars affected by stolon carbohydrate and water content. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119: 473-476.

Murelli, C., F. Rizza, f. Marinone, A. Dulio, V. Terzi and L. Cattivelli. 1995. Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley. Physiol. Plant. 94: 87-93.

Muthalif, M. M. and L. J. Rowland. 1994. Identification of dehydrin-like proteins responsive to chilling in floral buds of blueberry (*Vaccinium*, section

*Cyanococcus*). Plant Physiol. 104: 1439-1447.

中島二三一・千葉和彦. 1988. 北海道における小果樹類の栽培実態と加工現状について. 北海道園芸研究談話会報. 21: 54-55.

農林水産省農産園芸局果樹花き課. 1999. 平成９年産果樹栽培状況等調査.

O'Farrell, P. Z., H. M. Goodman and P. H. O'Farrell. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell. 12: 1133-1142.

Orr, W., J. Singh and D. C. W. Brown. 1985. Induction of freezing tolerance in alfalfa cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 4: 15-18.

Palta, J. P., B. D. Whitaker and L. S. Weiss. 1993. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of Solanum species. Plant Physiol. 103: 793-803.

Parker, J. 1959. Seasonal variations in sugars of conifers with some observations on cold resistance. Forest Sci. 5: 56-63.

Plekhanova, M. N. 1988. The nature of winter damage to fareastern blue honeysuckle species when introduced in the north-western part of the USSR. Всесоюзный Н ИИ Ратениеводства Имени Н И Вавилова. 119: 114-121.

Plekhanova, M. N. 1990. Genetic resources of sea buckthorn, blue honeysuckle, viburnum, actinidia and schizandra in the USSR and their utilization. North Amer. Fruit Explorers' Pomona. 23: 8-12.

Rogers, R. A., J. H. Dunn and C. J. Nelson. 1975. Cold hardening and carbohydrate composition of 'Meyer' zoysia. Agron. J. 67: 836-838.

Sagisaka, S. and T. Araki. 1983. Amino acid pools in perennial plants at the wintering stage and at the beginning of growth. Plant Cell Physiol. 24:

479-494.

酒井　昭. 1957. 木本類の耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係（1）. 低温科学, 生物篇. 15: 17-29.

Sakai, A. 1962. Studies on the frost-hardiness of woody plants. I. The causal relation between sugar content and frost-hardiness. Cont. Inst. Low Temp. Sci. Ser. B. 11: 1-40.

酒井　昭. 1963. 超低温における植物の生存Ⅲ. 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係. 低温科学, 生物篇. 21: 1-16.

酒井　昭. 1964. 木本類の耐凍性増大過程Ⅹ. 枝の耐凍性を効果的に高める温度. 低温科学, 生物篇. 22: 29-50.

Sakai, A. 1965. Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frostnhardiness. Plant Physiol. 40: 882-887.

Sakai, A. 1966. Studies of frost hardiness in woody plants II. Effect of temperature on hardening. Plant Physiol. 41: 353-359.

Sakai, A. 1968. Mechanism of desiccation damage of forest trees in winter. Contr. Inst. Low Temp. Sci. Ser. B. 15: 15-35.

Sakai, A. and S. Yoshida. 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. Cryobiology. 5: 160-174.

酒井　昭・渡辺富夫・山根玄一. 1969. 道東地方における林木の冬の乾燥害. 日林誌. 54: 111-117.

Sakai, A. 1970. Freezing resistance in willows from different climates. Ecology. 51: 485-491.

Sakai, A. 1979. Freezing avoidance mechanism of primordial shoots of very hardy

conifer buds. Low Temp. Sci. B 37: 1-9.

Sakai, A. and W. Larcher. 1987. Frost survival of plants: Responses and adaptation to freezing stress, Ecological Studies 62. Springer-Verlag, Berlin and New York.

酒井　昭. 1995. 植物の分布と環境適応. 朝倉書店.

Salzman, R. A., R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, E. N. Ashworth and B. P. Bordelon. 1996. Programmed accumulation of LEA-like proteins during desiccation and cold acclimation of overwintering grape buds. Plant Cell Environ. 19: 713-720.

佐々木英和・市村一雄・辻　顕光・小田雅行. 1993. キャベツ幼植物の低温順化・脱順化による糖とデンプン含量、タンパク質組成の変化. 園学雑. 62別2 62: 330-331.

佐藤孝夫・梶　勝次. 1984. クロミノウグイスカグラ・ケヨノミの分布と生育実態. 昭和59年度林業技術研究発表大会. 62-63.

佐藤孝夫. 1985. 北海道におけるクロミノウグイスカグラ・ケヨノミについて. ワイルドライフレポート. 2: 47-51.

Sauter, J. J. and B. van Cleve. 1991. Biochemical and ultrastructural results during starch-sugar-conversion in ray parenchyma cells of *Populus* during cold adaptation. J. Plant Physiol. 139: 19-26.

Sieg, F., W. Schröder, J. M. Schmitt and D. K. Hincha. 1996. Purification and characterization of a cryoprotective protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage. Plant Physiol. 111: 215-221.

Stushnoff, C., R. L. Remmele Jr., V. Essensee and M. McNeil. 1993. Low temperature induced biochemical mechanisms: implications for cold acclimation and de-acclimation. NATO ASI Ser. I 16: 647-657.

鈴木　卓・原田　隆・八鍬利郎. 1987. 果樹における生殖質の凍結保存に関する研

究（第１報）液体窒素中における凍結後のナシ茎頂の生存. 北大農邦文紀要. 15: 118-123.

鈴木　卓・川口武泰・原田　隆・八鍬利郎. 1992. ハスカップ及びブルーベリー培養体シュート節部切片の凍結耐性並びに内生成分に及ぼす低温馴化及び前培養の影響. 園学雑. 61別１: 168-169.

鈴木　卓. 1993. 園芸作物組織の超低温保存に関する基礎的研究. 北大農邦文紀要. 18: 165-217.

田中静幸・渡辺久昭. 1986. クロミノウグイスカグラの特性と栽培について（第２報）栽培株の着果および結実状態. 北海道園芸研究談話会報. 19: 56-57.

田中静幸・柿崎昌志・渡辺久昭. 1990. クロミノウグイスカグラの特性と栽培（第４報）自家結実性の系統間差異. 23: 56-57.

田中静幸・柿崎昌志・渡辺久昭・峰岸恒弥・松井文雄・村松裕司・小賀野隆一・成田秀雄・岩崎暁生. 1991. ハスカップの新育成系統‘HC1’について. 園学雑. 60別２: 124-125.

田中静幸・柿崎昌志・渡辺久昭・峰岸恒弥・松井文雄・村松裕司・小賀野隆一・成田秀雄・岩崎暁生. 1994. ハスカップ新品種「ゆうふつ」の育成について. 北海道立農試集報. 67: 29-41.

田中静幸. 1996. ハスカップ果実の離脱性の測定. 北農. 63: 268-271.

Tignor, M. E., F. S. Davies and W. B. Sherman. 1997. Rapid freeae acclimation of *Poncirus trifoliata* seedlings exposed to 10 ℃ and long days. HortScience. 32: 854-857.

Towill, L. E. and P. Mazur. 1975. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Can. J. Bot. 53: 1097-1102.

Uemura, M. and S. Yoshida. 1984. Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). Plant Physiol. 75: 818-826.

Welbaum, G. E., D. Bian, D. R. Hill, R. L. Grayson and M. K. Gunatilaka. 1997. Freezing tolerance, protein composition, and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress. J. Expt. Bot. 48: 643-654.

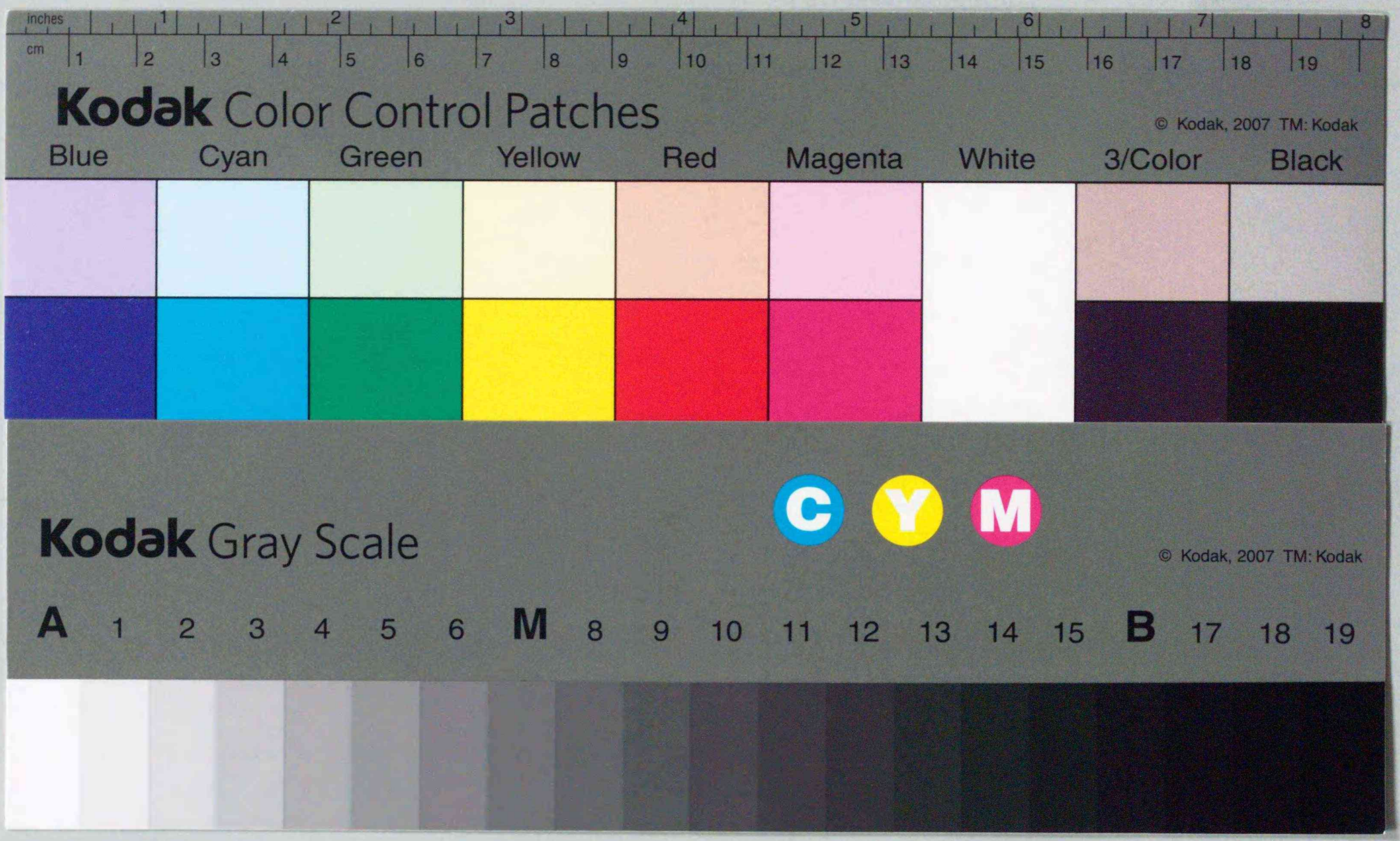
Welin, B. V., A. Olson, M. Nylander and E. T. Palva. 1994. Characterization and differential expression of dhn/lea/rab-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol., 26: 131-144.

Wiemken, V. and K. Ineichen. 1993. Effect of temperature and photoperiod on the raffinose content of spruce roots. Planta. 190: 387-392.

吉田静夫・酒井　昭. 1967. 木本類の耐凍性の増大過程XII. ニセアカシアの幹の耐凍性と物質変動との関係. 低温科学, 生物篇. 25: 29-44.

Yoshida, S. and M. Uemura. 1984. Protein and lipid compositions of isolated plasma membranes from orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) and changes during cold acclimation. Plant Physiol. 75: 31-37.

Zhao, S., S. J. Colombo and E. Blumwald. 1995. The induction of freezing tolerance in jack pine seedlings: the role of root plasma membrane $H^+$-ATPase and redox activities. Physiol. Plant. 93: 55-60.


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19