



Title	アスパラガス野外茎頂の凍結保存における前処理の影響
Author(s)	実山, 豊; 鈴木, 卓; 原田, 隆 他
Citation	低温生物工学会誌, 41(2), 50-57
Issue Date	1995-12-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64525
Rights	利用は著作権の範囲内に限られる
Type	journal article
File Information	Cryobiology and cryotechnology41-2_50-57.pdf



低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 41, No. 2, 50~57, 1995.

【原著論文】

アスパラガス野外茎頂の凍結保存 における前処理の影響

北海道大学農学部, *北海道大学低温科学研究所

実山 豊, 鈴木 卓, 原田 隆, 藤川清三*

Effects of Pretreatments on Cryopreservation in Asparagus Shoot Apices

Yutaka JITSUYAMA, Takashi SUZUKI, Takashi HARADA and Seizo FUJIKAWA*

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

*Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo 060

Shoot apices of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) can be successfully cryopreserved (by freezing at a rate of 0.5°C/min in the presence of 8% DMSO and 0.2 M sorbitol) after pretreatments either by preculture in media containing 0.5 M glucose for 2 days or by cold acclimation at 0°C for 20 days. In the present study, we examined the effects of pretreatments for subsequent successful cryopreservation of the shoot apices. Freezing tolerance, as revealed by LT₅₀ under equilibrium-freezing, was -20°C in both specimens with pretreatment by 0.5 M glucose and by cold acclimation, while LT₅₀ was -7°C in control specimens. Both pretreatments produced distinct cellular ultrastructural changes as observed with ultra-thin section electron microscopy. Number of plastids rich in starch granules increased in precultured specimens, whereas those poor in the starch granules increased in cold acclimated specimens. Occurrence of freezing injury by equilibrium-freezing, as observed with a freeze-fracture replica technique, was associated with formation of aparticle domains with accompanying fracture-jump lesions in the plasma membranes, not only in precultured specimens with 0.5 M glucose and in cold acclimated specimens, but also in control specimens.

(Received October 16, 1995 ; Accepted November 9, 1995)

緒 言

植物は、自然界で低温にさらされると耐凍性を示すようになるが、この過程は低温馴化として知られ、様々な代謝変化を伴うことが知られている¹⁾。低温馴化中の植物体内における変化として、糖類²⁾、可溶性タンパク質³⁾の増加、原形質膜の構造変化⁴⁾、及び細胞内微細

構造の変化として、液胞の増加と小型化⁵⁾、ゴルジ体付近の微小胞の増加⁶⁾、ERの小型化⁵⁾と増加⁷⁾などが報告されている。耐凍性はこれら複合的な低温馴化の過程を経て得られる。

一方、耐凍性の低い植物組織細胞を凍結保存するためには、何らかの前処理が必要である。凍結前処理として人為的低温処理、短日処理、乾燥処理、ABA処理及び凍害防御剤処理などがあげられる。凍害防御剤による前処理は最も一般的な方法であるが、植物組織の場合、動物細胞と異なり凍害防御剤が細胞内に透過しにくいと、時間をかけて凍害防御剤を細胞内に浸透させる前培養という方法がとられている⁸⁾。

[Key words : Shoot apices, Cryopreservation, Freezing tolerance, Ultrastructural changes ; 茎頂, 凍結保存, 耐凍性, 微細構造変化]

(8)

野外アスパラガスから摘出した茎頂は、前処理として、0℃、20日間の低温処理⁹⁾または、0.5Mグルコース添加培地で2日間前培養¹⁰⁾を行った後、8% DMSOを含む凍結媒液中に2時間浸漬した試料を0.5℃/minで-40℃まで予備凍結した場合、初めて液体窒素中での凍結保存が可能となる。最初のアスパラガス茎頂の凍結保存は、1981年に琴らによって報告されたが¹¹⁾、その際、4% DMSO および3%スクロースを含んだ培地での前培養を行っている。その後、前培養地中のDMSOの効果が小さいこと、並びに前培養培地中の糖の種類と濃度はグルコース0.5Mが適していることなどが指摘され¹²⁾、現在の凍結保存系となった。細胞膜非透過型凍害防御剤である糖や糖アルコールを含んだ培地での前培養は、アスパラガス茎頂以外にも、種々の植物の凍結保存において有効であることがよく知られているが、その効果は未だに解明されていない¹³⁾。

本研究は、アスパラガス茎頂の凍結保存における0.5 M グルコース添加培地での前培養の役割の解明を目的として、組織細胞の形態的变化に注目し、低温処理試料との比較を試みたものである。

材料及び方法

1. 茎頂の耐凍性の調査

1994年12月下旬に、北海道大学農学部附属農場に定植してあるアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) ‘メリーワシントン500W’の定植8年目の株を掘り上げて温室内に入れ、1995年3月下旬まで順次発生させた若茎から茎頂(長さ約1.5mm)を無菌的に摘出して材料とした。糖前培養処理は、窒素源を二分の一に修正した Murashige-Skoog の培地(修正MS培地)にグルコース0.5 M を添加し、pH5.7に調整後、寒天7 g/l を添加したものをを用い、26℃、16時間日長(60μE/m²/s、白色蛍光灯)の条件下で2日間行った(糖前培養)。また、摘出後全く処理を施さない茎頂を対照として用いた(無処理)。低温処理は、温室内で萌芽させた株を0℃の低温庫に移し、20日間置くことにより行い、その若茎から摘出した茎頂を用いた(低温処理)。これらの茎頂を-3℃から-20℃までの各温度で平衡凍結させ(凍結媒液は、無処理茎頂及び低温処理茎頂には蒸留水を、糖前培養茎頂には前培養培地と同組成の液体培地を使用、冷却速度は約0.02℃/min、-3℃で植氷)、38℃温水中で融解後、植物体再生用培地(修正MS培地にスクロース30g/l、NAA 0.1mg/l、kinetin 0.1mg/l を添加し、pH5.7に調整後、寒天7 g/l を添加したもの)に置床後、26℃、16時間日長(60μE/m²/s、

白色蛍光灯)の条件下で培養し、培養4週間後に生存固体数を調査して生存率を求めた。耐凍性は生存率50%のときの温度(LT₅₀)を以て表示した。

2. 超薄切片法

前処理による細胞内微細構造の変化を観察するために、Hepler ら¹⁴⁾の方法を参考にした以下の方法にしたがい、超薄切片を作成した。試料を前固定液(2% glutaraldehyde, 0.05 M cacodylate buffer (pH7.4), 10 mM CaCl₂)に浸漬し、2時間室温に静置して固定を行った。更に0.05 M cacodylate buffer (pH7.4)で洗浄後、後固定液(2% OsO₄, 0.8% potassium ferrocyanide, 10 mM CaCl₂)に試料を浸漬し、4時間室温に静置して固定を行った。水洗後に2% uranyl acetate 水溶液に2時間浸漬した。その後、ethanol および propylene oxide で脱水し、Spurr 樹脂に包埋後、70℃で3日間、樹脂を重合させた。次に、ライヘルト・ウルトラカット OmU4 を用いて超薄切片(厚さ0.3 μm)を作成し、二重染色(2% uranyl acetate, 0.5% lead citrate)を行い、JEM-1200EX 透過型電子顕微鏡(加速電圧100kV)で観察した。オルガネラ数の計測は、超薄切片の電子顕微鏡写真から任意に抽出した細胞の写真(10枚以上)について行った。また、樹脂包埋試料から準超薄切片(厚さ0.5 μm)を作成し、染色液(0.5% toluidine blue, 0.1% Na₂CO₃)で染色後、光学顕微鏡で観察した。

3. Freeze-fracture replica 法

平衡凍結した試料を、所定の温度に達した時点で、液体窒素で冷却した液体フロン中(-150℃)に浸漬し、急速凍結固定した。対照として、無処理試料、低温処理試料及び糖前培養試料を室温から急速凍結固定した。これらの試料からJED-7000フリーズ・エッチング装置を用いてレプリカを作成し¹⁵⁾、JED-1200EX透過型電子顕微鏡(加速電圧100kV)で観察した。

4. 全糖及びデンプンの定量

試料内の全糖及びデンプン含量の測定は Anthron 法を用いて行った。試料約100mgに10% TCA(trichloro acetic acid)を添加し、0℃乳鉢中で摩砕後、3,000 rpm で15分間遠心分離した。沈殿物に80% ethanol を加え遠心分離し、再び80% ethanol を加えて同様に遠心分離した後、ethyl ether を加えて遠心分離し、風乾後に52%過塩素酸を添加して遠心分離を行った。TCA

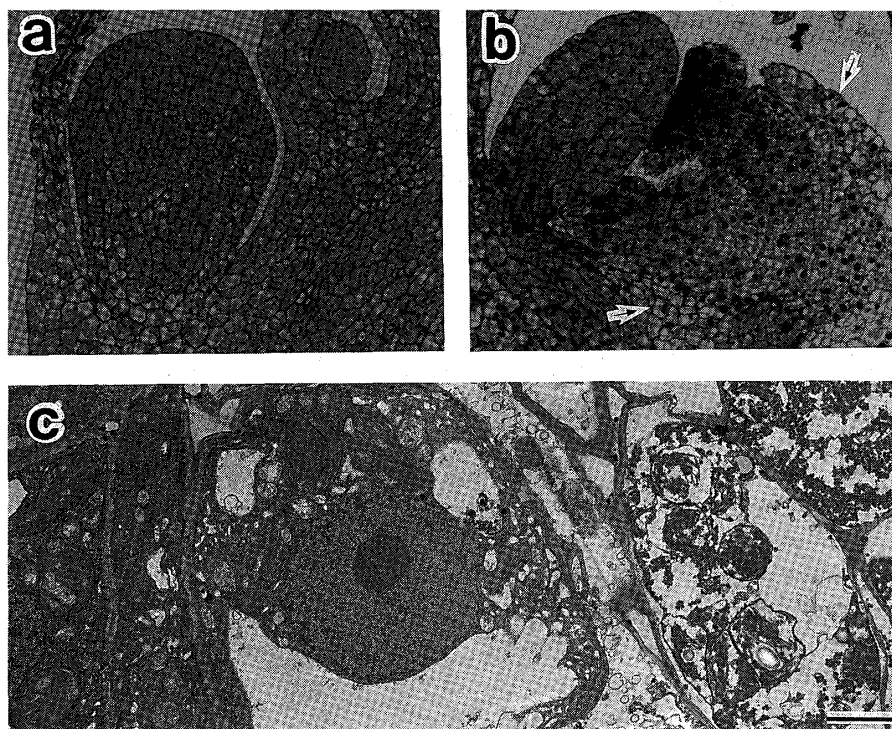


Fig.1. Light (a and b) and electron (c) micrographs of asparagus shoot apex. (a) Freshly isolated shoot apex without pretreatments. (b) Shoot apex precultured on medium with 0.5 M glucose. Arrows indicate dead cells. (c) An ultra-thin section showing a part of shoot apex cells precultured on medium with 0.5 M glucose. Both survived (left side) and dead (right side) cells were observed. Bar represents 2 μ m.

及び ethanol の上清を全糖抽出溶液、過塩素酸の上清をデンプン抽出溶液とし、各上清に0.2% Anthron-90% H_2SO_4 を加え、100℃で10分間加熱後、OD₆₂₅で比色定量した。

結果及び考察

1. 茎頂組織における糖前培養の影響

アスパラガス茎頂の樹脂切片を光学顕微鏡で観察した結果、無処理茎頂及び低温処理茎頂では全細胞が生存していた (Fig.1-a)。これに対し、糖前培養茎頂では培養中に半数以上の細胞が死滅することが観察された (Fig.1-b)。生存部位はドーム状組織または葉原基に多かった。また、死滅細胞は原形質分離を起こしており、細胞内構造は著しく変化していた (Fig.1-c)。

糖前培養により茎頂細胞の一部に害が発生することを示したが、糖無添加培地で同様に前培養処理を行った茎頂でも死滅細胞が観察されており¹⁹⁾、細胞の死滅した原因が糖による浸透圧ストレスだけではないことを示唆している。死滅の原因として、茎頂摘出自体の影響が考えられる。

5% DMSO 添加培地でエンドウの茎頂を前培養し

た試験では、凍結融解後のドーム状組織は死滅していたが、選択的に生存した葉原基から発生したドーム部位から個体再生することが示されている¹⁷⁾。この試験では、細胞の死滅した原因が前培養によるのか、凍結によるのかは明らかにされていない。凍結融解後にドーム状組織が凍害を受けている例は種々の植物でみられており^{18,19,20)}、ドーム状組織が凍害に対して、特に高い抵抗性を備えているわけではないことがうかがえる。

2. 茎頂の耐凍性に及ぼす凍結前処理の影響

無処理茎頂、低温処理茎頂及び糖前培養茎頂の耐凍性を調査したところ、無処理茎頂におけるLT₅₀は-7℃であったが、糖前培養を行うと、LT₅₀は-20℃を示した。低温処理茎頂における耐凍性増大の傾向も糖前培養茎頂の場合とほぼ一致し、LT₅₀は-20℃を示した (Fig.2)。

凍結前処理により僅かでも耐凍性の増大が認められた細胞では、その後の凍結保存に用いる DMSO やグルコースなどの凍害防御剤の効果が顕著になることが示唆されているが²¹⁾、このことは、低温処理及び糖前培

(10)

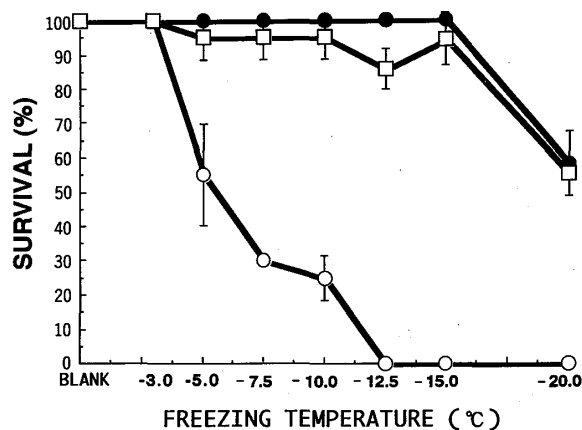


Fig. 2. Effects of equilibrium-freezing temperatures on survival of shoot apices. ○, Control specimen; □, cold acclimated specimen; ●, specimen precultured on medium with 0.5 M glucose. Survival was investigated after 4 weeks of culture. "Blank" means a normal culture without freezing. Vertical bars represent SE.

養を行ったアスパラガス茎頂の凍結保存（凍結媒液として8% DMSO を使用）における生存率の向上と一致する。

アスパラガス茎頂では、糖前培養中にグルコースが植物組織内へ浸透するという報告²⁰⁾があるが、一方、著者らの予備実験において、短時間のグルコースでの前培養は凍結融解後の生存率を向上させないという結果も得られている（未発表）。今回調査した茎頂組織内の全糖含量の測定は、無処理茎頂に比べ糖前培養茎頂では約6倍に増加した（データ未掲載）。これらの結果は、細胞内へのグルコースの移動、または、培地の高浸透圧に対応して細胞内に内生的に蓄積された糖²²⁾が耐凍性増大に寄与していることを示唆している。低温馴化時の細胞内における可溶性糖類の蓄積が種々の植物で確認されており^{6,7,23)}、糖類の蓄積と耐凍性獲得との密接な関係を示唆している。細胞内での糖の増加という点で、低温馴化と糖前培養処理の効果は一致する。

3. 細胞微細構造に及ぼす凍結前処理の影響

(1) 細胞内の構造変化

細胞内微細構造に及ぼす前培養の影響を調査するために、超薄切片による観察を行った。アスパラガス茎頂のドーム状組織には小型の細胞が緻密に並んでおり、細胞内には生長した細胞のように大きな central vacuole はみられなかった。

無処理茎頂の組織・細胞では、非常に密な細胞質中

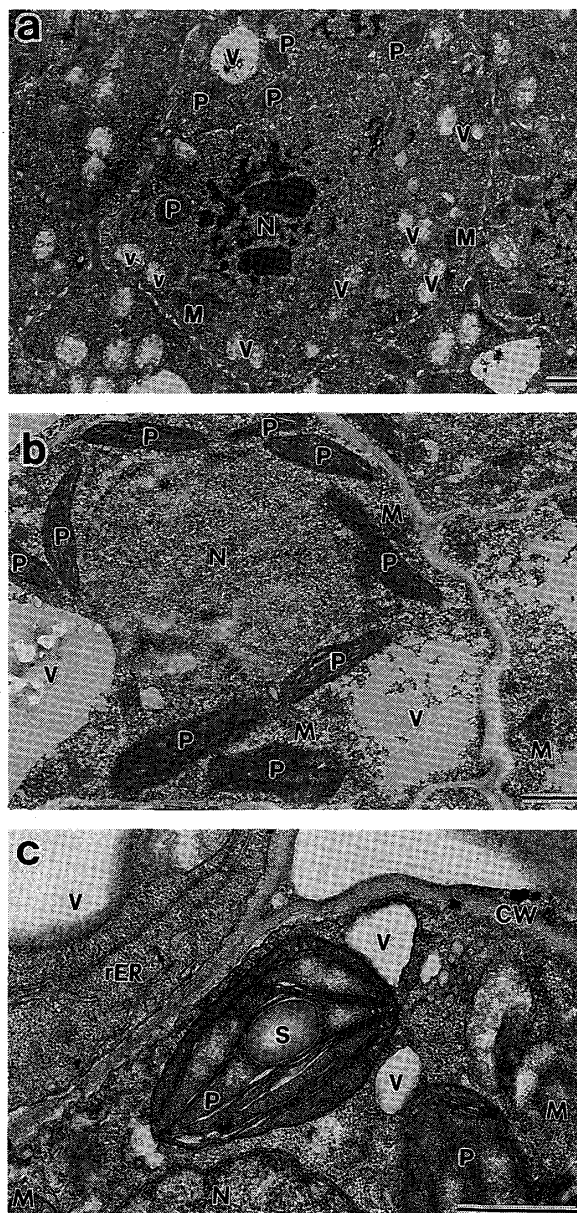


Fig. 3. Ultra-thin section electron micrographs showing a part of shoot apex cells. a, Control specimen; b, cold acclimated specimen; c, specimen precultured on medium with 0.5 M glucose. Plastids (P), starch granules (S), rough endoplasmic reticulum (rER), mitochondria (M), nucleus (N), cell wall (CW). Bars represent 1 μ m.

に小型化した液胞及び小型で楕円形のプラスチドが認められた。プラスチドは1細胞切片当たり平均2.9個認められ、デンプン粒はほとんど含まれていなかった (Fig.3-a)。

低温処理茎頂の組織・細胞には大型で棒状のプラスチドが増加しており、1細胞切片当たり6.7個のプラスチドが見られ、無処理茎頂と同様に、ほとんどのプラ

スチド内にはデンプン粒は含まれていなかった。これとともに、ミトコンドリアの増加がみられたが、rER、液胞の数は減少していた (Fig.3-b)。低温馴化により耐凍性が著しく増大する木本植物の細胞では一般に、低温馴化に伴い液胞の増加と小型化、細胞膜の folding, vesicle 状構造の増加などが観察されている²⁵⁾。更に、低温馴化した *Populus euramericana* cv Gelrica の冬芽の組織・細胞ではプラスチドの増加を示唆する結果が得られている²⁶⁾。アスパラガスと同じ草本植物の *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) では、4℃、2日間の低温処理より耐凍性は-5.7℃から-9.4℃となり、若干増大するが、耐凍性の高い木本植物に見られるような顕著な細胞微細構造の変化は起こらず、paramural body, ER, ゴルジ体付近の微小胞の増加のみが観察されている⁷⁾。

糖前培養茎頂の組織・細胞でもプラスチドの増加が認められ、1細胞切片当たり平均4.1個のプラスチドが見られた (Fig.3-c)。プラスチド内にはデンプン粒が存在し、定量的にもデンプン含量が前培養前の1.3倍に増加することが示された (データ未掲載)。また、プラスチド以外のオルガネラについても、ミトコンドリア、層状のrER、小型化した液胞の著しい増加が認められた (Fig.3-c)。野外で生育する *Populus × canadensis* Moench の木部柔細胞内におけるデンプンの集積量は11月に最大に達した後、1月には最小となり、この時期にスクロース、ラフィノース、スタキオースなどの糖が細胞内に増加する²⁷⁾。デンプンから糖への転換は越冬する植物が耐凍性を獲得するために必要不可欠な生理的变化である。一方、アスパラガスでは、一般の樹木とは越冬の様式が異なり、低温に遭遇した場合、地上部 (茎葉) の生成物質の大部分が急速に地下部へ転流して貯蔵され、茎葉は枯死して地下部のみが越冬する。しかし、本実験の糖添化培地での茎頂の前培養のように、地下部を伴わず、また低温に遭遇しない場合には、外与の糖をデンプンに転換する代謝系のみが働き、プラスチド内にデンプンが蓄積されたものと推定される。また、これにより全体的に炭水化物が過剰となり、細胞内の浸透圧を増大させるものと考えられる。層状 rER の増加などの細胞内微細構造変化も、この転換に関連して起こる構造変化の1つであると考えられる。

(2) 原形質膜の構造変化

Arabidopsis thaliana L. (Heyn) では、低温馴化細胞の原形質膜及びオルガネラ膜上に黒色の小粒体

(membraglobuli) が形成されることが報告されている⁷⁾。アスパラガスでは低温処理茎頂細胞、糖前培養茎頂細胞ともにこのような構造は確認されなかった。この membraglobuli の形成については *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) でのみ報告されており、植物組織一般に当てはまる現象とは考えにくい。

超薄切片による観察では、低温及び糖前処理によるアスパラガス茎頂組織細胞の原形質膜の構造変化は認められなかった。しかし、freeze-fracture replica の観察では、両前処理後に、原形質膜 EF 面の膜内タンパク粒子の単位面積当たりの密度が減少することが明らかになった (無処理茎頂の0.6~0.8倍に減少)。同様の变化は、低温馴化したキクイモのカルス²⁸⁾や冬コムギの葉組織²⁹⁾の原形質膜でも認められている。しかし、糖前培養がどのような機構により原形質膜の構造変化をもたらすかは不明である。

4. 平衡凍結による生体膜微細構造の変化

前処理の違いによって平衡凍結時の生体膜微細構造変化に差異が生じるかどうかを確かめるため、freeze-fracture replica 法を用い観察した (Figs.4, 5)。無処理茎頂細胞では、茎頂の生存率が低下し始める-5℃で平衡凍結することにより原形質膜及びオルガネラ膜において膜内タンパク粒子の凝集と fracture-jump lesions が観察された (Fig.4)。これらの変化は低温になるほど出現頻度が高くなった。この膜構造変化は生体膜同士の異常接近が原因であると推定されている³⁰⁾。

一方、低温処理及び糖前培養茎頂の原形質膜には、茎頂生存率が高い-12.5℃までの平衡凍結では構造変化は起こらなかった。しかし、生存率が低下し始める-15℃から-20℃までの凍結により、膜内タンパク粒子の凝集と fracture-jump lesions が出現した。これらの結果は、無処理、低温処理及び糖前培養茎頂ともに、凍結傷害の発生が原形質膜の構造変化と関連があることを示唆する。これとともに、糖前培養及び低温処理茎頂が、同一の凍結温度で、原形質膜に同一の構造変化を示すことは興味深い。この一致が低温処理により糖前培養と同程度の糖が細胞内に蓄積された結果であるか、或は、低温馴化により引き起こされたその他の生理的变化との複合的な効果によるのかについては今後検討する必要がある。

オルガネラ膜における膜内タンパク粒子の凝集と fracture-jump lesions は、原形質膜の構造変化の発生温度よりもやや高い平衡凍結温度で出現する傾向が認

(12)

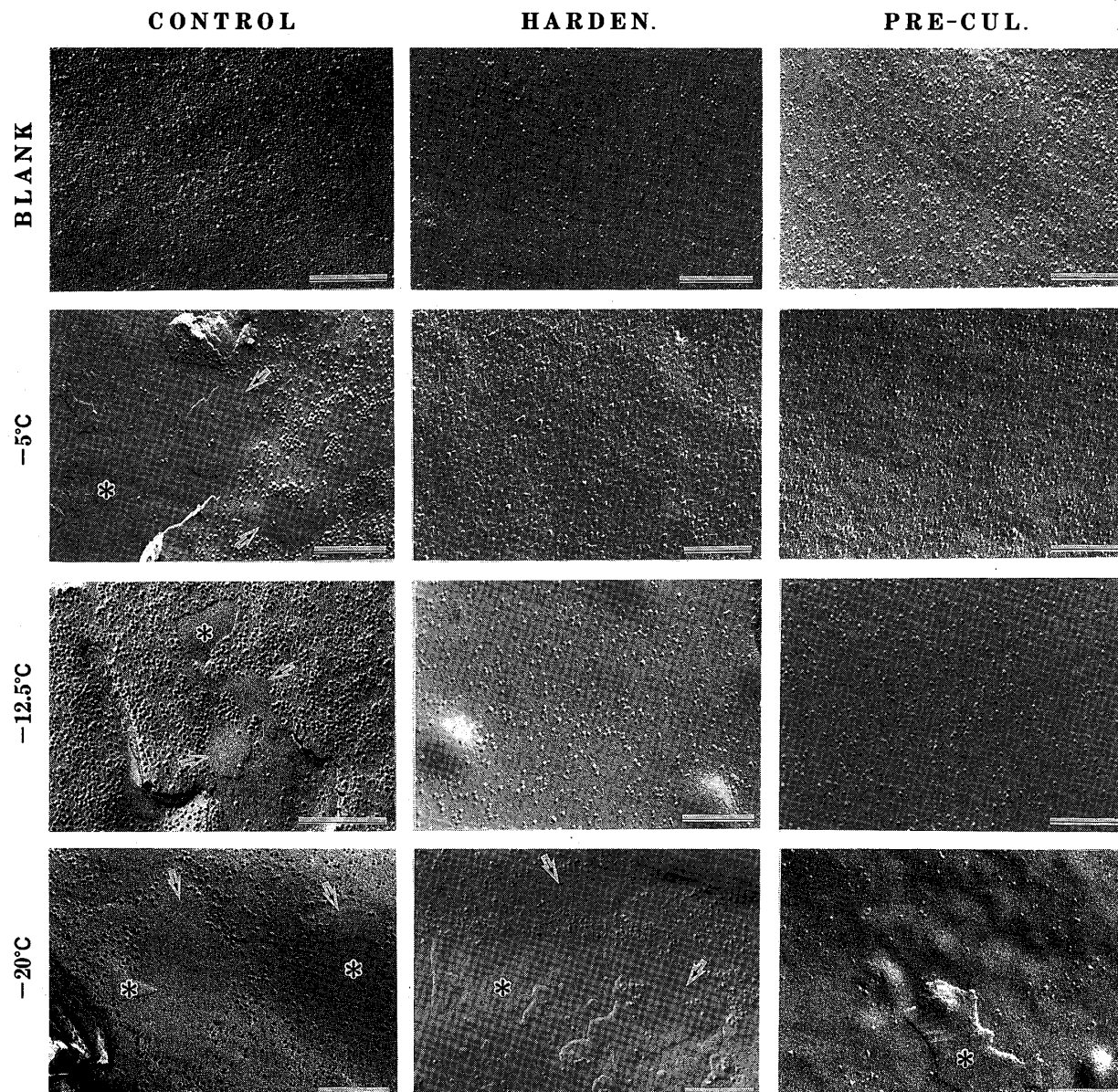


Fig.4. Freeze-fracture electron micrographs showing structural changes in plasma membranes of shoot apex cells by equilibrium-freezing. "CONTROL" means fresh specimen, "HARDEN." means cold acclimated specimen and "PRE-CUL." means specimen precultured on medium with 0.5 M glucose. "Blank" means structure without freezing. Arrows point out aparticle domains. Asterisks show fracture-jump lesions. Bars represent 200 nm.

められた (Figs.4,5). また、傷害の発生したオルガネラ膜では、原形質膜では見られなかった膜内タンパク粒子の結晶化 (Fig.6) が観察された。

オルガネラ膜の構造変化の発生温度は茎頂のカルス化が始まる温度とほぼ一致することが示されており³¹⁾、このことから、オルガネラ膜の構造変化は組織・細胞の分化機能に何らかの影響を及ぼしているものと思われる。リンゴ・ナシの冬芽茎頂は、凍結融解後の生存率が高いにもかかわらず、ロゼット状培養体の形成率は低い²⁰⁾。これは、茎頂組織が軽度の凍害を受けて

植物体再生を行うのに十分な機能を失うことによると推測されている²⁰⁾。

ま と め

本研究では、アスパラガス茎頂における0.5M グルコース添加培地での前培養による耐凍性増大の機構を明らかにするため、糖前培養または低温処理後の茎頂における耐凍性の変動と構造的変化との関連について検討した。

耐凍性については、低温処理茎頂及び糖前培養茎頂

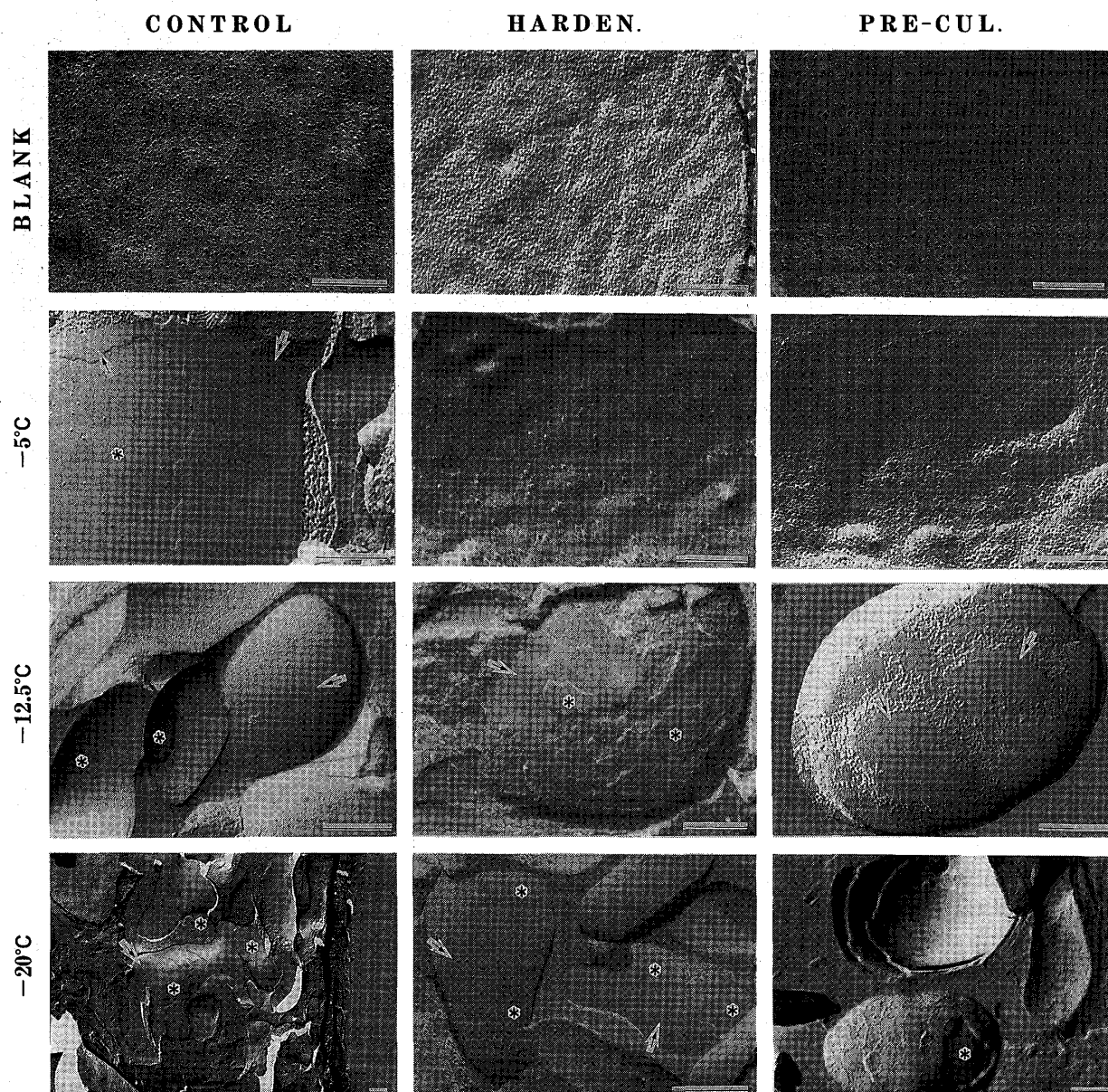


Fig. 5. Freeze-fracture electron micrographs showing structural changes in organelle membranes of shoot apex cells by equilibrium-freezing. Symbols are the same as in Fig.4. Bars represent 200 nm.

において、同様に LT_{50} が -20°C 以下となった。また、平衡凍結温度に対応する生体膜の構造変化についても、両者の間に違いは認められなかった。しかし、細胞内微細構造の変化は、糖前培養茎頂と低温処理茎頂とでは異なり、糖前培養処理を行った場合、デンプン粒を持ったプラスチドの増加などの変化が観察された。

これらの結果から、低温処理と糖前培養は異なった機構で耐凍性の増大に関与しているものと推察される。また、耐凍性の増大は、生体膜、特に原形質膜の傷害防御と深い関連のあることが示唆されたが、これ

らの前処理は、この傷害の発生を抑制する効果があるものと思われる。この抑制機構については更に詳細な検討が必要である。

参 考 文 献

- 1) Levitt, J. : Responces of Plants to Environmental Stress, vol 1., Academic Press, New York, p. 497 (1980) .
- 2) Koster, K. L. and D. V. Lynch : Plant Physiol., **98**, 108 (1992) .
- 3) Guy, C. L. : Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **41**, 187 (1990) .

(14)

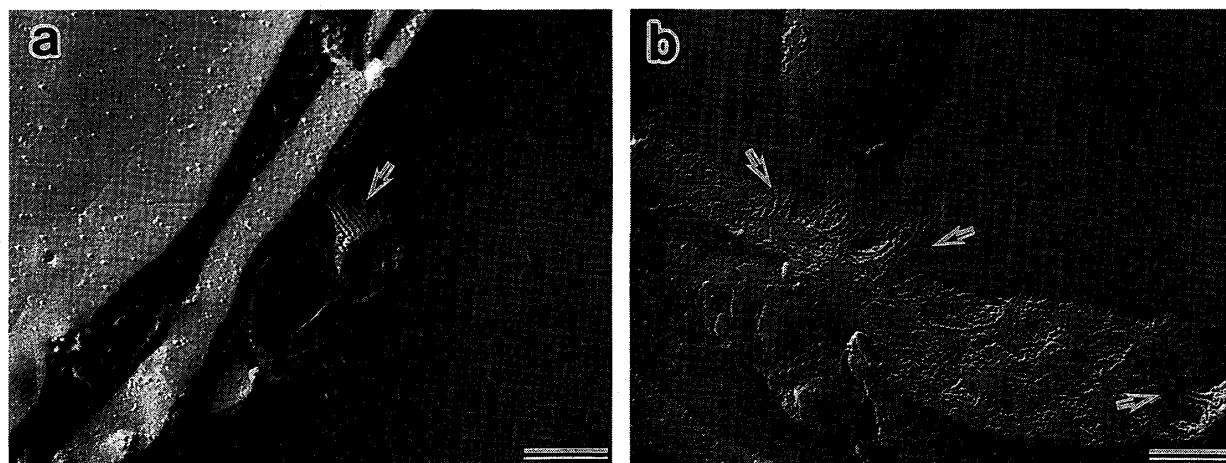


Fig. 6. Freeze-fracture electron micrographs showing a part of organelle membranes in shoot apex cells, precultured with 0.5 M glucose and frozen to -12.5°C . Arrows point out crystallization of IMPs (intramembrane particles) on tonoplasts. Bars represent 200 nm.

- 4) Steponkus, P. L. : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 543 (1984) .
- 5) Pomeroy, M. K. and D. Siminovitch : *Can. J. Bot.*, **49**, 787 (1971) .
- 6) Asada, M., Y. H. Ahn and S. Sagisaka : *Plant Cell Physiol.*, **29**, 243 (1988) .
- 7) Ristic, Z. and E. N. Ashworth : *Protoplasma*, **172**, 111 (1993) .
- 8) 菅原 : 「凍結保存」酒井編, 第3刷, 朝倉書店, 東京, p.170 (1992).
- 9) 稲葉 : 北海道大学農学部修士論文, p.55 (1985).
- 10) 金子 : 北海道大学農学部修士論文, p.26 (1992).
- 11) 琴, 原田, 八鍬 : 園芸学会研究発表要旨 (昭和56年度春季大会), **204** (1981).
- 12) 金子, 鈴木, 原田, 八鍬 : 園学雑, **61**, 別1, 236 (1992).
- 13) 高橋 : 「凍結保存」酒井編, 第3刷, 朝倉書店, 東京, p.15 (1992).
- 14) Hepler, P. K. : *Eur. J. Cell Biol.*, **26**, 102 (1981).
- 15) Fujikawa, S.: *In* "Electron Microscopy in Biology-A Practical Approach-", J. R. Harris, ed., IRL Press, Oxford, p.173 (1991) .
- 16) 実山, 鈴木, 原田, 藤川 : 北海道園芸研究談話会報, **28**, 70 (1995).
- 17) Haskins, R. H. and K. K. Kartha : *Can. J. Bot.*, **58**, 833 (1980) .
- 18) Grout, B. W. W. and G. G. Henshaw : *Ann. Bot.*, **46**, 243 (1980) .
- 19) Fukai, S. and M. Oe : *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **59**, 383 (1990) .
- 20) 鈴木 : 北海道大学農学部邦文紀要, **18**, 165 (1993).
- 21) 酒井 : 低温科学, **B19**, 1 (1961).
- 22) Stewart, G. R.: *In* "Biochemistry of Plants, vol. 5.", B.J.Mifflin, ed., Academic Press, New York, p.609 (1980) .
- 23) Sauter, J. J. and B. V. Cleve : *J. Plant. Physiol.*, **139**, 19 (1991) .
- 24) Sakai, A and W. Larcher : *Frost Survival of Plant*, Springer-Verlag, New York, p.114 (1987) .
- 25) 酒井 : 「植物の耐凍性と寒冷適応」, 第3刷, 学会出版センター, 東京, p.112 (1985).
- 26) Sagisaka, S.: *Plant Physiol.*, **99**, 1657 (1992) .
- 27) Sauter, J. J. and S. Kloth : *Protoplasma*, **137**, 45 (1987) .
- 28) Sugawara, Y. and A. Sakai : *In* "Plant cold hardiness and freezing stress, vol. 1.", P. H. Li and A. Sakai, eds., Academic Press, New York, p.197 (1978) .
- 29) Zhou, B. L., K. Arakawa, S. Fujikawa and S. Yoshida : *Plant Cell Physiol.*, **35**, 175 (1994) .
- 30) 藤川 : 植物細胞工学, **4**, 319 (1992).
- 31) 実山, 鈴木, 原田, 藤川 : 園学雑, **64**, 別2, 296 (1995).