リンゴの冬芽の液体窒素中での凍結保存

酒井 昭・西山保直

(北海道大学低温科学研究所) (北海道農業試験場)

Freezing Storage of Winter Buds of Apple Twigs in Liquid Nitrogen

Akira SAKAI and Yasunao NISHIYAMA*

The Institute of Low Temp. Sci., Hokkaido University, Sapporo

** Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Sapporo*

Summary

A long-term preservation of germplasm of fruit trees is becoming increasingly important. This study was designed to develop a routine method for long-term preservation of apple dormant buds in liquid nitrogen. One-year-old twigs of apple (*Malus pumila* Miller var. *McIntosh Red*) were collected in late December and were subjected to an artificial hardening regime which consisted of holding samples at -3°C for 20 days, -5°C for 5 days and -10°C for 3 days to induce maximum hardness. After hardening the twigs enclosed in polyethylene bags were cooled at 5°C increments each day to -30°C , and then to -90°C in 10°C increments at two hours intervals. At selected test temperatures during this procedure, twig samples were removed from the freezer after 16 hrs and thawed in air at 0°C .

In apple twigs, major differences between the hardness of different tissues were observed. The least hardy tissues are the xylem and pith which are marginally hardy to -40°C . The cortex and leaf buds are most hardy tissues, resisting to -90°C . Twigs prefrozen to different temperatures from -15 to -50°C were immersed in liquid nitrogen for 2 hrs, and were then rewarmed slowly in air at 0°C . In the twigs prefrozen to -40°C , little or no injury was observed in the leaf buds and cortex. When the leaf buds from the twigs immersed in liquid nitrogen for 2 hrs were grafted on the two-year-old seedlings, most of the buds normally developed and continued their shoot growth. Thus, this prefreezing method is applicable to the long-term preservation of leaf buds of apple twigs in liquid nitrogen.

緒 言

将来の育種の素材としての果樹の野生種を始め、多くの品種や系統を長年月果樹園にて栽培して保持することは、経済的にも労力的にも容易なことではない。そのため有用生殖質、ことに穂木の長期凍結保存に関する技術の開発が、国内でも、外国でも強く望まれている。

1961年のFAOおよび1963年の国連の会議で、国際協力事業として農業上の有用植物の遺伝子源を収集し、人工的に長期保存することが決定された。そして1967年につづいて1973年にFAOとIBPの共催で、遺伝子源保存に関する農業部会の技術会議がローマで開かれ、

1976年6月21日 受理

北海道大学低温科学研究所業績第1776号

本研究は昭和49年及び50年度農林水産業特別試験研究費補助金(超低温利用による有用生殖質の長期凍結保存)をうけて行ったものである。

種子、花粉、根、塊茎、枝、組織、培養細胞などの長期凍結保存の方法が検討された(1)。生物材料を長期保存するためには液体窒素(-196°C)か、液化天然ガス(約 -163°C)中で凍結保存することが有利である。花粉や種子(19)とちがい、果樹の枝を液体窒素中で生存させることはむづかしい。酒井は耐凍性の高いヤナギやポプラの枝を -20 — -30°C の温度までゆっくり凍結して細胞内の凍る水をできるだけ除いたのち、液体窒素(10, 11)や液体ヘリウム(-269°C)の中に入れ、ついで 0°C の空中で融解して、これらの枝を凍結後生存させることに成功した(13)。生物を室温から液体窒素中に入れて急速冷却する時には、すべての細胞は細胞内凍結をおこして死ぬ(17)。そのため液体窒素中に入れるまえに、あらかじめ細胞内の水を細胞外凍結でできる限り除いておくことが必要で、この方法を予備凍結法とよんでいる(10, 12,

15). 耐凍性がとくに高いシラカバ、ヤナギ、ポプラなどとは違い、リンゴの枝は -40°C 以下に冷却すると木部が凍害をうけるので、枝全体を液体窒素中で生存させることはできない(8, 9). しかし、リンゴの芽は -70°C 以下に凍結しても生存していると思われる。冬芽を液体窒素中で凍結保存し、芽接してクローンをうるためには芽やじん皮組織の凍害が最も少ない冷却方法や予備凍結温度をきめることが必要である。

本論文は植物の有用生殖質の液体窒素中での長期凍結保存を可能にする研究の一部として、リンゴの芽を用いて行ったものである。

材料及び方法

実験材料は北海道農業試験場果樹園における8年生のリンゴ樹(品種: 旭, *McIntosh Red*)より、1年生の発育枝を12月下旬に採集し、約20 cmの長さに切つて用いた。枝の耐凍性、すなわち凍結に耐える能力を最大に高めるために、枝はポリエチレンの袋に入れ、 -3°C に20日間、 -5°C に12日間、 -10°C に3日間おいた(2, 12, 14)。その後、1日に 5°C ずつ温度を下げて -30°C まで冷却した。所定温度に枝を1日間おいたのち、 0°C の空中に取り出して融解した。 -40°C から -90°C まで冷却する場合にはデープフリーザーを用い、2時間に 10°C ずつ温度を下げて所定温度にまで冷却した。枝はおもりをつけ、糸に吊して液体窒素中に入れ、2時間後に 0°C の空中に取り出して融解した。なお、枝を液体窒素中に入れるばあいには、あらかじめ -15°C ～ -50°C の異なる温度まで予備凍結した(10, 12, 15)。

枝や芽の被害を判定するため凍結、融解した枝を温室で約1ヶ月間水挿し、各組織の褐変の程度から被害を判定した。そして、その程度を健全(―)、軽度(±)、中度(+), 強度(++)としてあらわした。芽の被害を知るために発芽の割合も調べた。また、凍結融解した枝の芽の生存を確認するため、温室に用意した鉢植のデリシャス実生2年生樹へ、芽接をおこなった。

実験結果

-25°C から -90°C までの異なる温度でリンゴの枝を凍結したとき、表1に示すように、芽とじん皮組織はほとんど害をうけないが、木部やずいの組織は -40°C 以下では凍害をうけ褐変していた(表1)。つぎに、 -15°C から -50°C までの異なる温度で予備凍結してから液体窒素中に2時間入れた場合、 -25°C 以下の温度まで予備凍結した枝では芽とじん皮組織には被害が認められなかったが、木部はいずれも凍害のため褐変していた。枝の葉跡(leaf scar)は -30°C ～ -40°C まで予備凍結したものの被害が最も軽かったが、 -15°C および -25°C また

表1 リンゴの冬の枝の耐凍度

材料: 旭の1年生発育枝

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	発 芽 割 合		枝 の 被 害**		
	調査えき 芽 数	発芽したえ き芽数(%)	枝の葉跡	じん皮 組 織	木 部
-25	29	29(100)	—	—	—
-30	18	17(94)	±	—	—
-40	15	13(87)	±	—	++
-50	18	16(89)	+	—	++
-60	12	12(100)	+	—	++
-70	19	19(100)	+	—	++
-90	14	14(100)	++	—	++

* 枝を融解後室温で1カ月水挿してから、発芽及び組織の被害を調べた。

** 被害程度は組織の褐変の度合を調べて判定し、—(健全), ±(軽度), +(中度), ++(強度)であらわした。

表2 液体窒素中で2時間冷却されたリンゴの枝の被害

材料: 旭の1年生発育枝

予備 凍結 温度* ($^{\circ}\text{C}$)	発 芽 割 合		枝 の 被 害**		
	調査えき 芽 数	発芽したえ き芽数(%)	枝の葉跡	じん皮 組 織	木 部
-16	6	0(0)	++	++	++
-25	6	6(100)	++	—	++
-30	11	9(82)	±	—	++
-40	8	8(100)	±	—	++
-50	6	4(67)	++	—	++

* 枝は液体窒素中に入れるまえに各温度に16時間おかれた。

** 枝の被害の表示は表1に同じ。

表3 液体窒素中で冷却されたリンゴの枝の芽のはめつきによる活着

処 理	芽 接 数	活 着 数		未活着数 (%)
		発芽した もの(%)	発芽しな かったもの (%)	
未 処 理	6	4(67)	2(33)	0(0)
液体窒素処理*	30	16(54)	7(23)	7(23)

* -40°C まで予備凍結後液体窒素中に2時間入れておいたもの、活着調査は芽接56日後に行った。

は -50°C まで予備凍結してから液体窒素中に入れたものの被害は著しかった(表2)。この実験からリンゴの芽を液体窒素中で生存させ、これを芽接してクローンをうるためには -30°C ～ -40°C の温度まで予備凍結することが必要のようである。 -40°C まで予備凍結後、液体窒素中に2時間入れておいた枝の芽を芽接したが、活着率は54%で未処理の対照のその約80%であった(表3)。活着した芽の大部分は発芽し、接木3ヶ月後に新梢は約30 cmの長さに達した(図1)。なお、液体窒素中に1ケ年入れておいたものも正常に発芽、展葉した。

考 察

酒井(1958)はクワの枝の薄片を -10°C ～ -70°C の異な

図1 -40°C で予備凍結後2時間液体窒素中に入れておいた芽の接木後の展葉と生長状態。

A: 接木50日後, B: 接木3ヵ月後

る温度および液体酸素 (-183°C) 中で貯蔵し、一定期間毎に取出して皮層細胞の生存率を調べたが、 -15°C — -20°C の温度範囲においたものは最も早く害をうけ、 -10°C 以上および -30°C 以下においたものは、いずれも少なくとも22日間の貯蔵では被害がほとんど認められないことを見出した(11)。酒井らはリンゴの枝を-3, -5, -10, -15, -20 および -30°C の各温度で1年間凍結貯蔵し、被害程度を調べたが、 -3°C においたものは全く健全であったが、 -5°C — -20°C の中間温度で凍結貯蔵したものは害をうけていた。しかし、 -30°C で貯蔵したものでは木部は害をうけていたが、芽やじん皮組織はまったく正常であった(酒井・西山 未発表)。小崎格らは 5°C — -5°C の異なる温度でナシの枝を2年間貯蔵したが、 0°C — -3°C の温度で貯蔵した場合にもっともよい結果をえている(未発表)。 0°C — -3°C 、または -30°C — -70°C の温度で何年間貯蔵できるかまだ明らかにされていないが、少なくとも3年位は貯蔵できるものと思われる。最近、Mullinら(1976)はイチゴの分裂組織小片を 4°C 、暗黒の条件で無菌的に6ケ年間貯蔵することに成功した(6)。酒井(1960)はヤナギやポプラの枝を液体窒素中に3ヶ月間入れておいても、6ヶ月間入れておいても融解後正常に展葉、発根することも明らかにしている(12)。植物の場合には、何年間も液体窒素中で貯蔵した報告はないようである。しかし、動物細胞、ことに精液やガン細胞は凍害防御物質で処理後、何年間も液体窒素中で貯蔵されている。リンゴの芽はおそらくは数年~10年間位は液体窒素中で貯蔵できると思われるが、未だ明らかでなく、今後に残された課題である。

動物のガン細胞では液体窒素中で凍結保存しても少な

くとも染色体には変化がおこらないことが確められている(3, 4)。Nag and Street (1973) は液体窒素中に3日間貯蔵したニンジンの培養細胞を融解後再分化させることに成功した。そして再分化したニンジンは形態的にも、染色体にもなんの変化もおきていないことが調べられている(7)。

ポプラ、ヤナギのような非常に耐凍性が高く -15°C まで予備凍結後、液体窒素中に入れても生存できるものでは、 -10°C — -15°C まで予備凍結後液体窒素中に入れ、ついで 35°C — 40°C の温水中で急速融解しても生存しているが、リンゴの枝では -40°C まで予備凍結後液体窒素中に入れ、ついで 0°C の空中でゆっくり融解させた場合に芽の被害が最も少なかった。本実験の芽接で活着率は無処理の対象と比較し80%程度であったが、これは芽接の時期が厳冬期に温室で行ったためで、芽接の方法を改良することにより活着率をさらに高めることは可能である。

リンゴの枝を -10°C — -15°C まで予備凍結後、液体窒素中に入れた場合には、細胞内にまだ凍りうる水が残っているため、この温度範囲から液体窒素中に入れて急速冷却すると、液体窒素温度まで冷却される間に細胞内凍結をおこして細胞は死ぬ(17)。また、 -50°C 以下まで予備凍結した場合には、これらの温度までの冷却中に木部の組織が著しく害されるため、枝の葉跡がその二次的影響をうける。そのため枝の葉跡が害をうけず、しかも細胞内の水が充分に脱水される温度、すなわち -30°C — -40°C まで予備凍結することが、リンゴの芽を液体窒素中で生存させるのに必要である。リンゴを始め多くの温帯性落葉広葉樹は芽やじん皮組織が -70°C 以下の凍結に耐えるものが多いが、木部は -35°C — -45°C の温度で被害をうけるものが多い(21)。枝の木部の中の大部分の水は -5°C — -10°C の温度で凍るが一部の水は -35°C — -45°C までかなり安定して過冷却していることが知られている(8, 9)。リンゴの場合、 -30°C に1ヶ月おいてもこの水は凍らないし、凍害も生じないが、枝を -30°C から -45°C まで冷却するとこの水が凍結し、木部の放射組織が害されることが確められている。スグリ、フサスグリ、リンゴの各種台木など、リンゴと同程度またはそれより耐凍性の高い果樹は、本論文で用いた予備凍結法で比較的容易に液体窒素中で長期間凍結保存できるものと思われる。なお、リンゴより耐凍性の低い果樹は凍害防御物質(18)であるジメチルスルホキシド(DMSO)を、適当な方法で芽の細胞に侵透させ、耐凍性を高めれば液体窒素中での凍結保存も困難でないものと思われる。多くの果樹の有用生殖質を長期間保存するためには、DM

SO による芽の耐凍性を高める実験を推進することが必要である。酒井・菅原はポプラのカルスやサイカモアの振盪培養細胞(20, 22)を, Latta(5)や Nag and Street (7) はタバコの培養細胞を液体窒素中で生存させることに成功した。現在, ニンジンやポプラなど限られた材料しか培養細胞を再分化させることができないが, 将来, 果樹の培養細胞も再分化させることができるようになれば, これらを液体窒素中で長期間凍結保存することも比較的容易になるであろう。

摘 要

果樹の有用生殖質の長期保存を可能にするために, まずリンゴの一年枝を液体窒素温度まで冷却後生存させる方法について検討した。

1. リンゴの枝は約 -40°C 以下まで冷却すると, 木部が凍害をうけるが, 芽やじん皮組織は -90°C まで冷却しても害をうけない。そのため, リンゴの芽を約 -70°C 以下の低温で凍結保存することが可能である。
2. リンゴの枝を液体窒素中で生存させるための冷却および加温方法と予備凍結温度を検討した。その結果, -40°C まで予備凍結してから液体窒素中に入れ, 0°C の空中で融解した場合に, もっともよい結果がえられた。
3. -40°C まで予備凍結後, 液体窒素温度まで冷却した枝の芽を芽接したところ, 活着率は約 80% で, 活着した多くの芽の新梢の生長は正常であった。
4. 今後, 液体窒素中でのリンゴの芽の生存期間について調べることが必要である。

本研究を企画された果樹試験場中川行夫技官, 四国農業試験場内田忠雄技官及び千葉大学園芸学部飲塚宗夫教授に謝意を表します。

引用文献

1. FRANKEL, O. H. and J. G. HAWKES. 1974. Crop genetic resources for today and tomorrow. International Biological Programme 2. Cambridge. University Press, Cambridge. 492 p.
2. カレン・スレノビッチ・ボゴシヤン・酒井 昭, 1969. ブドウの耐凍性. 低温科学, 生物篇, 27: 125—142.
3. KIMURA, Y. and Y. KIKUCHI. 1961. Cytological studies of tumors, XXXVII. Chromosome conditions of animal tumors after deep freezing. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI. Zool. 14: 576—588.
4. HISADA, Y. 1967. Cytological studies of tumors. XLV. A chromosome study in lines of MTK-sarcoma III produced the inoculation of rapidly frozen tumor cells. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI. Zool. 16: 136—141.
5. LATTA, R. 1971. Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. Can. J. Bot. 49: 1253—1254.
6. MULLIN, R. H. and D. E. SCHLEGAL. 1976. Cold storage maintenance of strawberry meristem plants. Hortscience. 11: 100—101.
7. NAG, K. K. and H. E. STREET. 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. Nature 245: 270—272.
8. QUAMME, H. A., C. STUSHNOFF and C. J. WEISER. 1972. The relationship of exotherms to cold injury in apple stem tissues. Amer. Soc. Hort. Sci. 97: 608—613.
9. QUAMME, H. A., C. J. WEISER and C. STUSHNOFF. 1973. The mechanism of freezing injury in xylem of winter apple twigs. Plant Physiol. 51: 273—277.
10. 酒井 昭. 1956. 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇 14: 17—23.
11. ————. 1958. 植物の細胞外凍結による害 I. 連続的凍結状態において速く害が現われる温度範囲. 低温科学, 生物篇 16: 35—39.
12. SAKAI, A. 1960. Survival of the twig of woody plants at -196°C . Nature 185: 393—394.
13. 酒井 昭. 1962. 液体ヘリウム中での木の生存. 低温科学, 生物篇 20: 121—122.
14. ————. 1964. 木本類の耐凍性増大過程 X. 一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.
15. SAKAI, A. 1965. Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperatures and degree of frost hardiness. Plant Physiol. 40: 882—887.
16. ————. and S. YOSHIDA. 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. Cryobiology 5: 160—174.
17. ————. K. ÔTSUKA and S. YOSHIDA 1968. Mechanism of survival in plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and rewarming. Cryobiology 4: 165—173.
18. ————, and Y. SUGAWARA. 1973. Survival of poplar callus at super-low temperature after cold acclimation. Plant and Cell Physiol. 14: 1201—1204.
19. ————, and M. NOSHIRO. 1974. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. p. 317—326. In International Biological Programme Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow (edited, J. G. Hawkes). Cambridge University Press, Cambridge.
20. 酒井 昭. 1975. 植物培養細胞による遺伝子の凍結保存. 化学と生物 13: 637—639.
21. ————. 1975. 日本における常緑および落葉広葉樹の耐凍度とそれらの分布との関係. 日生態会誌 25: 101—111.
22. SUGAWARA, Y. and A. SAKAI. 1974. Survival of suspension cultured Sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. Plant Physiol. 54: 9—11.