落葉果樹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 Hardy Deciduous Fruit Trees in Liquid Nitrogen

Akira SAKAI and Yasunao NISHIYAMA*

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

**Hokkaido National Agricultural Station, Sapporo*

Summary

A long-term preservation of germplasm of fruit trees is becoming important. This study was designed to develop a routine method for long-term preservation of hardy deciduous fruit buds in liquid nitrogen. Dormant shoots of apple (Akane, Red Gold, Jonathan, Fuji, Starking Delicious, Golden Delicious), pear and Japanese pear (Chōjurō, Hokusei, Mishirazu, Bartlett, Flemish Beauty), currant (London Market), raspberry (Latham), blueberry (Harbert), gooseberry (Oregon Champion) were collected in early January and were subjected to an artificial hardening regime which consisted of holding samples at -5°C for 14 days, -10°C for 3 days to induce maximum hardiness. After hardening the twigs enclosed in polyethylene bags were cooled at 5°C increments each day to -30°C , and then to -70°C in 10°C increment at two hours intervals. Twigs frozen to selected test temperatures were thawed in air at 0°C . Twigs prefrozen to -40°C or -50°C were immersed in liquid nitrogen for 2 hours, and were then rewarmed slowly in air at 0°C . In the twigs of apple (Akane, Red Gold, Jonathan, Fuji, Starking Delicious, Golden Delicious), pear (Mishirazu, Hokusei, Flemish Beauty) currant (London Market), gooseberry (Oregon Champion), little or no injury were observed in the leaf buds and cortex, when immersed in liquid nitrogen after prefreezing to -40° or -50°C . Thus, this pre-freezing method is applicable to the longterm cryopreservation of leaf buds of these hardy deciduous fruit trees in liquid nitrogen.

緒 言

将来の育種素材として果樹の野性種を始め、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(1)。

前報(9)において、リンゴ(旭)の枝を液体窒素中で生存させるための冷却及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、最もよい結

果がえられた。また、 -40°C まで予備凍結後、液体窒素温度まで冷却した新梢の芽を芽接したところ、活着率は約80%で、活着した多くの芽は正常に生長した(1)。なお、最近1年間液体窒素中に貯蔵した芽も正常であることを確認した。

本研究は、旭以外のリンゴの品種や耐凍性の高いリンゴ以外の落葉果樹の冬芽を液体窒素中で凍結保存できるか否かを調べたものである。

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飯塚宗夫教授に謝意を表します。

材料と方法

北海道農業試験場果樹園に栽培されているつぎの落葉果樹を実験材料として用いた。リンゴ(品種：あかね；Red Gold；紅玉；ふじ；Starking Delicious；Golden

1977年5月13日 受理

北海道大学低温科学研究所業績第1781号。

本研究は昭和51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)をうけて行なったものである。

Delicious), ナシ (品種: 長十郎; 身不知; 北星; Bartlett; Flemish Beauty) 及び小果樹類, Currant (London Market); Raspberry (Latham); Blueberry (Herbert); Gooseberry (Oregon Champion).

リンゴ及びナシは8~10年生, 小果樹類は5~8年生のものより, いずれも1年生の発育枝を1月上旬に採集し, 10~20cmの長さに切って用いた. 新梢の耐凍性, すなわち凍結に耐える能力を高くするために, 枝をポリエチレンの袋に入れ, -5°Cに14日間, -10°Cに3日間おいた(2,6). その後, 1日に5°Cずつ温度を下げて-30°Cまで冷却した. なお, どの樹種も同一凍結処理温度にそれぞれ5本の枝を用いた. -40°Cから-90°Cまで冷却する場合にはディ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まで冷却した. 液体窒素中に入れる場合には, 新梢におもりをつけ, 糸で吊して投入し, 所定温度まで予備凍結後(3,4,5), 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.

第1表 リンゴの新梢の耐凍性

品 種	温 度 (°C)	発 芽 割 合 発芽えき芽数/ 調査えき芽数	被害程度		液体窒素中 での凍結保 存の可能性
			韌皮 組織	木部	
あ か ね	-30	13/13 (100)	-	-	可能(芽)
	-40	11/11 (100)	-	+	
	-50	9/10 (90)	-	+	
	-70	7/8 (87)	-	+	
	-40→LN	14/14 (100)	-	+	
Red Gold	-50→LN	11/11 (100)	-	+	〃
	-30	10/10 (100)	-	-	
	-70	15/15 (100)	-	+	
	-40→LN	12/12 (100)	-	+	
紅 玉	-50→LN	14/14 (100)	-	+	〃
	-30	8/10 (80)	-	-	
	-70	12/12 (100)	-	+	
	-40→LN	11/14 (79)	-	+	
ふ じ	-50→LN	9/11 (82)	-	+	〃
	-30	11/11 (100)	-	-	
	-70	13/13 (100)	-	+	
	-40→LN	13/13 (100)	-	+	
Starking Delicious	-50→LN	12/12 (100)	-	+	〃
	-30	9/9 (100)	-	-	
	-70	10/10 (100)	-	+	
	-40→LN	17/17 (100)	-	+	
Golden Delicious	-50→LN	14/17 (82)	-	+	〃
	-30	7/7 (100)	-	-	
	-70	14/14 (100)	-	+	
	-40→LN	18/18 (100)	-	+	
	-50→LN	15/15 (100)	-	+	〃

新梢を融解後, 室温で1ヶ月間水挿してから, 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), + (強度) であらわした. LN: 指示温度まで予備凍結後液体窒素中に2時間入れたもの. 品種間の差がほとんど認められなかったので, あかね以外の品種については, -40°Cと-50°Cで凍結した結果を省略した.

新梢や芽の被害を判定するため, 凍結, 融解した新梢を約20°Cの室温で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(±), 強度(+)としてあらわした. 葉芽の被害を知るために発芽の割合も調べた.

結 果

リンゴの6品種の新梢を-30°Cから-70°Cまでの異なる温度で凍結した結果, どの品種の枝も-40°C以下まで凍結した場合には, 木部が褐変したが, 韌皮組織には褐変が認められなかった(第1表). -40°C及び-50°Cまで予備凍結後, 液体窒素中に入れた枝についても, 同じ結果がえられた. また, 発芽率はいずれもほぼ80%以上であった. これらのいずれの新梢も-40°Cまたは-50°Cまで予備凍結後, 液体窒素中に入れた場合, 芽や韌皮組織が生存していたので, これらの冬芽は液体窒素中で凍結保存することが出来るものと思う.

ナシについて同様な実験を行なった. 第2表に示したように, 長十郎とBartlettでは-40°C以下まで冷却した場合, 木部だけでなく韌皮組織も褐変したし, 発芽率も著しく低かった. しかし, 身不知, 北星, Flemish Beautyの3品種は-40°C及び-50°Cまで予備凍結後液体窒素中に入れたのちも, 韌皮組織が生存しており, 発芽率もほぼ80%以上であった. したがって, これら3品種の冬芽は液体窒素中で凍結保存することが出来る

第2表 ナシの新梢の耐凍性

種類及び品種	温 度 (°C)	発 芽 割 合 発芽えき芽数/ 調査えき芽数	被害程度		液体窒素中 での凍結保 存の可能性
			韌皮 組織	木部	
日本ナシ 長 十 郎	-30	12/12 (100)	-	-	不 可 能
	-40	2/11 (18)	±	+	
	-50	3/12 (25)	±	+	
	-70	0/10 (0)	+	+	
	-40→LN	0/10 (0)	+	+	
日本ナシ 身 不 知	-50→LN	0/14 (0)	+	+	可能(芽)
	-30	17/17 (100)	-	-	
	-70	14/15 (93)	-	+	
	-40→LN	11/11 (100)	-	+	
日本ナシ 北 星	-50→LN	13/15 (87)	-	+	可能(芽)
	-30	10/10 (100)	-	-	
	-70	16/16 (100)	-	+	
	-40→LN	7/9 (78)	-	+	
西洋ナシ Bartlett	-50→LN	16/18 (89)	-	+	不 可 能
	-30	12/12 (100)	-	-	
	-70	5/15 (33)	+	+	
	-40→LN	2/15 (13)	+	+	
西洋ナシ Flemish Beauty	-50→LN	0/18 (0)	+	+	可能(芽)
	-30	13/13 (100)	-	-	
	-70	11/11 (100)	-	+	
	-40→LN	15/15 (100)	-	+	
	-50→LN	17/17 (100)	-	+	〃

新梢を融解後, 室温で1ヶ月間水挿してから, 発芽及び組織の被害を調べた. 被害程度の表示は第1表に同じ. LN: 第1表に同じ.

第3表 小果樹類の新梢の耐凍性

種類及び品種	温 度 (°C)	発芽割合(%) 発芽えき芽数/ 調査えき芽数	被害程度		液体窒素中 での凍結保 存の可能性
			韌皮 組織	木部	
カラント London Market	-25	7/ 7 (100)	—	—	可 能 (さし穂)
	-30	8/ 8 (100)	—	—	
	-40	10/10 (100)	—	—	
	-50	12/12 (100)	—	—	
	-60	6/ 6 (100)	—	±	
	-70	11/11 (100)	—	±	
	-40→LN -50→LN	14/14 (100) 8/ 8 (100)	—	±	
ラスベリー Latham	-40	10/10 (100)	—	—	可能(芽)
	-70	10/10 (100)	±	+	
	-40→LN	9/ 9 (100)	+	+	
	-50→LN	9/ 9 (100)	+	+	
ブルーベリー Herbert	-20	5/ 5 (100)	—	—	不 可 能
	-25	9/ 9 (100)	—	—	
	-30	12/12 (100)	—	—	
	-40	1/16 (6)	+	+	
	-50	0/12 (0)	+	+	
	-60	4/11 (36)	+	+	
	-40→LN -50→LN	0/12 (0) 2/ 8 (25)	+	+	
グースベリー Oregon Champion	-30	7/ 7 (100)	—	—	可 能 (さし穂)
	-40	10/10 (100)	—	—	
	-50	14/14 (100)	—	—	
	-70	14/14 (100)	—	±	
	-40→LN	7/ 7 (100)	—	±	
	-50→LN	9/ 9 (100)	—	±	

新梢を融解後、室温で1ヶ月間水挿してから、発芽及び組織の被害を調べた。被害程度の表示は第1表に同じ。LN：第1表に同じ。

ものと思う。

耐凍性の高いカラント、ラスベリー、ブルーベリー及びグースベリーの枝について、リンゴやナシと同様な実験を行なった。第3表に示したように、カラント (London Market)、グースベリー (Oregon Champion) では液体窒素中での凍結保存が可能であるが、ブルーベリー (Herbert) は不可能である。ラスベリー (Latham) は-40°及び-50°Cで予備凍結後、液体窒素中に入れた場合、韌皮組織が凍害をうけたが芽は生存していた。

考 察

温帯性落葉樹は耐凍性の高さにもとづいて3つに分類される(8)。すなわち、芽、韌皮組織、木部のいずれもが、すくなくとも-70°C以下の凍結に耐えるもの(A)、芽、韌皮組織は約-70°C以下の凍結に耐えるが、木部は-40°C以下で害を受けるもの(B)、芽、韌皮組織及び木部のどの組織も-30~-40°C以下の凍結に耐えないもの(C)である。用いた材料ではカラント (London Market)、グースベリー (Oregon Champion) はAに、リンゴ、ナシ (身不知, Flemish Beauty) はBに、ナシ (長十郎, Bartlett)、ブルーベリー (Herbert) はCに属する。液体窒素温度まで冷却後、生存させうる新梢は、すくなくとも-70°Cまでの緩慢凍結に耐えるもの

で、Cに属する樹種は液体窒素中で生存させえない。液体窒素に浸したのち植物を生存させるのに必要な予備凍結温度は植物の種類によってかなり異なる。一般に、耐凍性の高いものは予備凍結のていどは少なくてよい(5)。使用した果樹については-40°~-50°Cまで予備凍結した場合により結果がえられている。

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。リンゴ (旭) の芽の場合、すくなくとも1年間貯蔵したものは正常であった。現在、リンゴの枝をさらに長期貯蔵中である。

耐凍性の低い果樹は凍害防御物質(7)のジメチール・スルホキシド (DMSO) を適当な方法で芽の細胞に浸透させ、耐凍性を高めることができれば、これらの芽を液体窒素中で凍結保存することも困難でなくなるものと思う。果樹の有用生殖質を液体窒素中で長期間凍結保存するためには、DMSOによる芽の耐凍性を高める実験を推進することがどうしても必要である。

摘 要

果樹の有用生殖質の長期保存を可能にするために、リンゴ、ナシ及び落葉小果樹の新梢を-40°及び-50°Cまで予備凍結した後、液体窒素温度まで冷却した。融解後1ヶ月間、室温で水挿して発芽率及び新梢組織を調べた。

1. リンゴの6品種 (あかね, Red Gold, 紅玉, ふじ, Starking Delicious, Golden Delicious), ナシの3品種 (身不知, 北星, Flemish Beauty) 及びカラント (London Market), グースベリー (Oregon Champion) の葉芽及び韌皮組織は液体窒素温度まで冷却後生存していた。これらのものはいずれも冬芽を液体窒素中に凍結保存し、芽接で増殖させうるものと思う。

2. これらの新梢を液体窒素中で凍結保存するには、厳寒期に枝を採集し、-3°~-10°Cの温度に約20日間おいて耐凍性を充分に高め、ついで-40°~-50°Cの温度まで予備凍結してから液体窒素中に入れるのがよい。

引用文献

- 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.
- カレン・スレノビッチ・ポゴジャン・酒井 昭. 1969. ブドウの耐凍性. 低温科学, 生物篇 27: 125—142.
- 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.
- SAKAI, A. 1960. Survival of the twig of woody plants at -196°C. Nature, 185: 393—394.

5. ———. 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.
6. ———. 1966. Studies of frost hardiness in woody plants. II. Effect of temperature on hardening. *Plant Physiol.*, 41 : 353—359.
7. ———. and S. YOSHIDA. 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology* 5 : 160—174.
8. 酒井 昭. 1975. 日本における常緑及び落葉広葉樹の耐凍性とそれらの分布との関係. *日生態会誌*. 25 : 101—111.
9. ———. 西山保直. 1977. リンゴの冬芽の液体窒素中での凍結保存. *園学雑*. 46 : 169—172.