

香 川 大 学 農 学 部 紀 要

第 56 号

1992年10月

MEMOIRS OF FACULTY OF AGRICULTURE
KAGAWA UNIVERSITY

No. 56, October 1992

ダイアンサスおよびキク属植物における
茎頂の凍結保存に関する研究

深 井 誠 一

香 川 大 学 農 学 部

香川県木田郡三木町

FACULTY OF AGRICULTURE, KAGAWA UNIVERSITY

Miki-chô, Kagawa-ken, Japan

香 川 大 学 農 学 部 紀 要

第 56 号

1992年10月 発行

各研究室の業績を発表するため、本学部は“香川大学農学部学術報告”と“紀要”を発行している。この“紀要”は研究の完成した比較的長い論文を発表するために発行されている。既刊の標題は最後の i - v 頁に記載されている。“学術報告”および“紀要”の交換または寄贈については、香川県木田郡三木町 香川大学農学部（〒761-07）あて照会されたい。

Memoirs of Faculty of Agriculture, Kagawa University

No. 56, October, 1992

The Faculty of Agriculture, Kagawa University publishes “Technical Bulletin” (Gakuzyutu Hōkoku) and “Memoirs” (Kiyō), and latter contains extended treatises. The titles of each number of “Memoirs” are printed on the pages i to v inside back cover. Correspondence concerning the exchange of publications should be directed to Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-chō, Kagawa-ken, 761-07, Japan.

ダイアンサスおよびキク属植物における 茎頂の凍結保存に関する研究

深 井 誠 一

Studies on the cryopreservation of shoot tips of
Dianthus and *Chrysanthemum*

Seiichi Fukai

目 次

緒 言	1
共通する材料および方法	2
第1章 2段階凍結法による茎頂の凍結保存	5
第1節 凍害防御剤と処理方法の検討	5
1. ダイアンサス茎頂に対する凍害防御剤の種類と処理方法	5
2. キクに対するDMSOの薬害検定	7
3. キク茎頂の生長におよぼす前培養培地中のDMSOの影響	8
4. キク茎頂の形態形成に及ぼすDMSO処理の影響	9
第2節 キク茎頂の凍結後の生存に及ぼす前培養の効果	9
第3節 冷却過程の検討	10
1. 冷却速度の検討	11
2. 緩速冷却終了温度の影響	12
3. 植水の効果	14
第4節 解凍過程の検討	16
1. 解凍方法の検討	16
2. 危険温度域の検討	17
3. 解凍後のキク茎頂の取扱方法の検討	18
第5節 考 察	19
第6節 摘 要	23
第2章 Vitrification (ガラス化) 法による凍結保存	25
第1節 Vitrification 法による茎頂の凍結	25
1. Vitrification 培液への処理時間の影響	25
2. 茎頂の前培養の効果	26
3. 洗浄液のシュ糖濃度の影響	27
4. キクに対するVitrification 法の適用性	27

第2節 考 察	28
第3節 摘 要	29
第3章 茎頂の採取時期・材料と凍結保存性	30
第1節 凍結保存性の季節変化	30
1. ダイアンサス、キク茎頂における解凍後の生存率の季節変化	30
2. キク茎頂の耐低温性の季節変化	31
3. キク挿し穂の冷蔵効果	33
第2節 無菌植物を材料とした凍結保存	34
1. 外植体のサイズと採取部位の影響	34
2. 腋芽に対する障害温度域	35
3. 前培養および凍害防御剤中の糖の効果	36
4. 低温によるハードニングの効果	37
5. キク無菌植物の節組織の凍結保存	38
第3節 考 察	39
第4節 摘 要	41
第4章 凍結・解凍した茎頂のシュート再生	42
第1節 解凍後の茎頂のシュート再生過程の形態観察	42
第2節 キク茎頂のシュート再生に及ぼす培地条件の影響	45
1. 培地中のサイトカイニンの影響	45
2. 培地中のアンモニア態窒素の影響	46
第3節 考 察	47
第4節 摘 要	49
第5章 凍結・解凍した植物の生長と生産性	50
第1節 凍結・解凍した茎頂からのシュートの再生と順化	50
第2節 凍結・解凍したダイアンサスおよびキクの生長と開花	51
1. 凍結・解凍したダイアンサスの生長と開花	51
2. 凍結・解凍したキクの生長と開花	52
第3節 キクのキメラ品種における花色の変異	53
第4節 考 察	55
第5節 摘 要	57
第6章 ナデシコ科およびキク属の近縁種に対する適用性	58
第1節 ナデシコ科の近縁種における茎頂の凍結保存	58
第2節 キク属の近縁種における茎頂の凍結保存	58
第3節 長 期 保 存	61
第4節 考 察	62
第5節 摘 要	63
第7章 総 合 考 察	64
引 用 文 献	66
Summary	73
Plates	78

緒 言

わが国の花き生産は、農業総生産が伸び悩む中で高い伸びを示し1989年度の花き生産年額は、1970年対比で8.1倍、1980年対比で1.7倍になっている。本研究で取り上げたキクとカーネーションはわが国の生産の第1、2位を占める花きであり、1989年にはそれぞれ750億円（18億本）、262億円（7億本）生産され、この両者を合わせると全切り花生産額の48%を占める。これらの花きでは、毎年数多くの新品種が発表されて市場に流通し、品種の流動化がめまぐるしく進む一方で、キクの‘秀芳の力’で見られるように画一化も進んでいる。種苗業者、苗生産業者、研究者にとってこれら膨大な種、品種を圃場で維持管理することは、必要とされる面積的にも労力的にも負担が大きいきばかりでなく、病害虫または不慮の事故による植物の遺失の危険も大きい。

また育種の進展においては、豊富な遺伝資源の保有が前提となる。キク、カーネーションといった成熟した作目では新形質を有した品種の作出が特に望まれており、近縁種を用いた異種間交配が再び注目されている（60, 70）。さらに最近の遺伝子工学的手法による育種技術の進展により、今まで利用不可能であった種をも含めた幅広い植物種が育種素材としての価値を獲得した。ダイアンサス属では異種間細胞融合雑種が作出され（56）、またキクでは形質転換植物が報告される（50）など、育種素材の幅は急速に広がりつつある。さらに国際間で植物特許の法的整備が進む中（1）で、育種素材保有の重要性はますます増加すると考えられる。こうしたことから遺伝資源として、現在流行の品種のみならず、すでに古くなった品種や近縁野生種の簡便でかつ安定的長期保存の技術開発が重要な課題になってきている。

一方これらの植物は栄養繁殖性であるためウイルス罹病が問題となり、茎頂培養によりウイルスフリー化した健全種苗の供給が広く実用化している。また茎頂培養によって無菌化した植物を、*in vitro*で増殖するマイクロプロパゲーションの研究が過去20年間に精力的に行われ、多くの栄養繁殖性作物でその基本的な技術確立がなされてきた。

こうした背景から国際植物遺伝資源委員会（IBPGR）は、1982年に*in vitro*保存に関する専門家による諮問委員会を開催、その報告書の中で*in vitro*技術による植物生殖質の保存技術開発の緊急性と重要性を指摘した（38）。この報告は、植物の*in vitro*保存をその目的から大きく2つの方法に分けて考えることを提唱している。すなわち、生産や育種の現場の要求に応じていつでも植物種の供給を行なう短期的保存を目的としたアクティブコレクション（Active collection）と、より長期に遺伝資源の保存を主目的とするベースコレクション（Base collection）である。前者の目的は、*in vitro*での植物の生長を抑制することで達成され、種々の生長抑制法が開発されている。後者では長期間、植物活性をできるだけ抑えた状態に置くことが望まれることから、現在は超低温下での凍結保存がもっとも有力な方法とされている。

同時にこの報告は、凍結保存の材料として茎頂の有用性を指摘した。農業上有用な植物生殖質の凍結保存を考える際、保存した組織又は器官より植物体がより簡単に再生することが重要であり、またその遺伝的安定性が望まれる。これまでに凍結保存の対象と考えられた種子以外の器官は、茎頂（3, 11, 16, 17, 22, 30, 31, 33, 34, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 52, 70, 71, 72, 75, 81, 83, 84, 90, 93, 99, 100, 108, 118, 119）、胚（不定胚）（6, 9, 21, 51, 88, 98, 113）、葯・花粉（4, 103）、培養細胞（13, 55, 111）、苗条原基（96）、プロトプラスト（8）等である。茎頂は、種子中の胚を除けば、植物の器官の内でもっとも高い植物体再生能力を有している。またその遺伝的安定性も他の体細胞から不定芽（胚）を形成させた場合に比べて高いとされている（64）。さらに茎頂は比較的小さな器官であり、それを構成する細胞も比較的小さく液胞化しておらず凍結保存に適しているとされる（115）。先にも述べたように、すでに多くの栄養繁殖性植物について茎頂培養が広く実用的な技術と

して確立していることから、植物生殖質の保存において茎頂は有力な器官である。

1976年Seibert(83)はカーネーションを用い、植物体から茎頂を取り出して凍結し、解凍後もそれが生存ししかも植物体が再生することを初めて報告した。彼の方法は、切り出したカーネーションの茎頂を5%DMSOを含む液体培地の上に浮遊させ、その上に液体窒素を注ぐというものであり、その生存率は15~33%と低かった。その際茎頂は1000℃/min以上で急速に冷却されたことから、超急速冷却法と呼ばれた。Groutら(30)は同様な超急速冷却法によるジャガイモ茎頂の生存を報告したが、それらの生存率は低く、しかも安定したものではなかった。その後Karthaらがエンドウ(41)、イチゴ(42)、キャサバ(43)で、Uemuraら(108)がカーネーションで、Towillら(99, 100, 101)がジャガイモで、凍害防御剤の存在下で-40℃付近まで緩速冷却の後液体窒素に浸漬する2段階凍結法によれば高い生存率が得られることを相次いで報告した。さらに近年になり、あらかじめ高濃度の凍害防御剤で外植体を処理した後液体窒素に直接浸漬するvitrification法(47, 48, 49, 58, 79, 104, 109, 120)や、ある程度外植体を乾燥させた後液体窒素に浸漬する乾燥法(80, 110)など、新しい凍結法が報告されてきた(78, 80)。

これらの成果を基にして本研究は、遺伝資源の保存のためダイアンサス属、キク属の観賞植物の茎頂の凍結保存法を確立するために行われた。凍結法としては、これまで報告の多い2段階凍結法と新しい方法としてvitrification法を取り上げた。すでに2段階凍結法で成功例のあるカーネーションと同属のダイアンサス交配種を基本種として諸条件を検討し、これをキクに適用する形で研究を進めた。基本的凍結条件が明らかとなった後に、植物材料側の条件として季節性の問題とin vitro植物を用いての凍結の可能性を検討した。またSEMを用いてダイアンサスとキクの凍結・解凍後の茎頂からのシュート再生過程を観察し、両種の形態形成の違いについても検討した。さらに凍結・解凍した茎頂由来の植物の生産性を検定すると共に、先に得られた凍結法の近縁種に対する適用範囲を明らかにした。

本研究を取りまとめるにあたり、大阪府立大学農学部花き学教室今西英雄教授より懇切丁寧なご指導とご助言を賜った。また同大学藤下典之教授ならびに中村明夫教授には有益かつ適切なご助言をいただいた。ここに衷心より感謝の意を表するものである。

本研究は、大阪府農林技術センターにおいて開始し、香川大学において継続し取りまとめを行なった。この間大阪府農林技術センター栽培部大江正温花き研究室長、畜産部西村和彦研究員にはひとかたならぬご指導を賜った。また香川大学五井正憲教授および田中道男助教授には絶えまない励ましと多くのご助言を賜った。さらに元北海道大学低温科学研究所教授酒井昭博士からはたびたび貴重なご助言を賜った。ここに記して感謝の意を表する。

共通する材料および方法

植物材料

ダイアンサス属の代表種としてサクラナデシコ (*Dianthus hybridus* cv. Sakuranadesiko) を、キク属の代表種としてキク品種秀芳の力 (*Chrysanthemum morifolium* cv. Shuhounochikara syn. *Dendranthema grandiflorum*) を基本材料とした(以下ダイアンサス、キクと表す)。これらの母植物は無加温ガラス室内で栽培し、定期的にピンチを行ない若いシュートを培養に供した。なおキクに関しては、周年深夜4時間の光中断を行ない栄養生長を維持した。第6章で用いたナデシコ科、キク属の原種、品種の栽培法も上記に準じた。

凍結に用いたプログラムフリーザーと凍結容器

本研究では以下の2機種のプログラムフリーザーを用いた。

1. プログラムフリーザー FFP-190 (大阪酸素工業株式会社)

冷却槽の温度は、槽内および凍害防御剤を充填したダミーのストロー内にセットした銅-コンスタンタン熱電対により計測、モニターし、槽内温度調節は液体窒素蒸気注入とヒーター加熱により行なう。冷却槽中には自動植水装置を備え、設定温度でストローの一部に強制植水を行なうことが可能である。

2. プログラムフリーザー ET-1 (富士平工業株式会社)

冷却槽中のメタノールを冷媒として、メタノールの温度を電気冷凍コイルとヒーターで制御する。植水は、モニターで設定温度に達した時点で、液体窒素で冷やしたピンセットでストローの一部をはさむことによって行なった。

2段階凍結法での凍結容器には、ウシ精液凍結用の精液凍結ストロー0.5ml および1.0ml (富士平工業株式会社)を用いた。ストローにシリンジを接続して、凍害防御剤溶液と茎頂をストロー中に吸い入れ、先端をヒートシールしてプログラムフリーザーにセットした。Vitrification法での凍結容器には、1.8mlのクライオチューブ (アシストチューブ, SARTSTED社製)を用いた (Fig 1)。

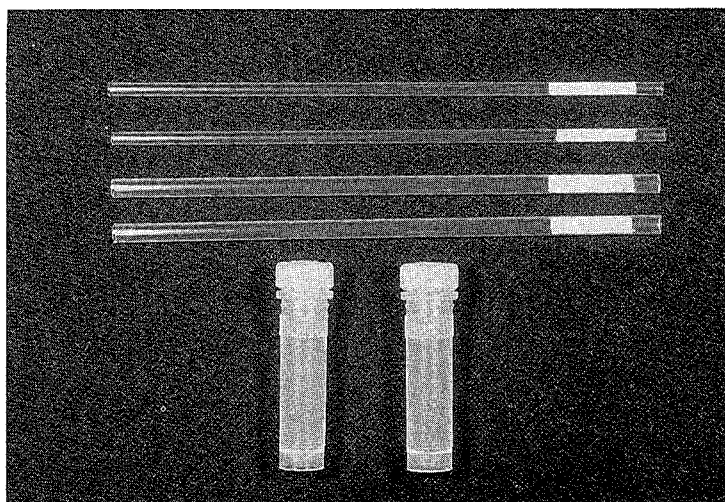


Fig 1. The straws and the cryo-tubes.

培養条件

培地はTable 1に示したようにMurashige & Skoog(54)の培地を基本とし、キクではBA0.1mg/l, NAA1.0mg/l, ショ糖20g/l, 寒天8g/l加えたものを基本培地とし、ダイアンサスでは、1/2濃度の無機、有機成分にBA 0.1mg/l, NAA0.5mg/l, ショ糖20g/l, 寒天8g/l 加えたものを基本培地とした(以下それぞれキク用, ダイアンサス用培地)。すべての培地は、pHを5.7に調整後、オートクレーブで120℃, 15分間滅菌した。培養にはほとんどプラスチックシャーレを用い、前培養には5mlの培地を分注した6cmシャーレを、解凍後の培養には20mlの培

地を分注した9 cmシャーレを用いた。また無菌植物の増殖および解凍後シュートを再生した茎頂の移植用培地としては、粉末ハイポネックス (6.5-6-19, ハイポネックスジャパン社) 3 g/l, ショ糖20g/l, 寒天 8 g/lを含む簡易培地を用いた (以下ハイポネックス培地)。

培養はとくに示さないかぎり, 25℃, 1500lux, 24時間又は16時間照明下で行なった。

Table 1. Components of culture media

Elements	for Chrysanthemum	for Dianthus
MS salts	full	half
MS vitamins	full	half
sucrose	20g/l	20g/l
BA	0.1mg/l	0.1mg/l
NAA	1.0mg/l	0.5mg/l
agar	8g/l	8g/l
pH	5.7	5.7

生存, シュート再生の判定

培養60または90日後に, わずかでもカルスを再生した茎頂を生存とし, また肉眼で茎葉の分化が確認できるものをシュートの再生とした。

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{生存した茎頂数}}{\text{凍結した茎頂数}} \times 100$$

$$\text{シュート再生率 (\%)} = \frac{\text{シュートを再生した茎頂数}}{\text{凍結した茎頂数}} \times 100$$

本論文で用いた略語

BA ; 6-benzylaminopurine,

DMSO ; dimethyl sulphoxide,

EG ; ethyleneglycol

LN₂ ; liquid nitrogen,

MS ; Murashige & Skoog,

NAA ; 1-naphthaleneacetic acid,

4-PU ; 4-piridil urea.

第1章 2段階凍結法による茎頂の凍結保存

植物の茎頂の凍結保存は、1976年のSeibert(83)による最初の報告以来、現在までに13科20種の植物について報告されている。緒言で述べたように、凍結方法は超急速凍結法から2段階凍結法（予備凍結法とも呼ぶ）へ発展し、さらに近年ガラス化法や乾燥法などが開発されつつある(78)。しかし現在までの凍結保存の成功例は、ほとんどが2段階凍結法によるものである。そこで本研究では、まずこの2段階凍結法によるダイアンサスとキク茎頂の凍結保存法を検討し、ついでガラス化法についても検討することとした。

本章では、すでに2段階凍結法を用いた凍結保存の成功例があるカーネーションと同じダイアンサス属の交配種であるサクラナデシコを基本材料とし、2段階凍結法の条件について詳細な検討を行ない、さらに未だ成功例の報告されていないキクについてその適用を検討した。この2段階凍結法による植物組織の凍結では、凍害防御剤の選択、冷却速度ならびに解凍速度等の凍結・解凍条件、さらには植物の生理的条件が相互に関係しあってその成否を決定している。本章では、凍結・解凍の諸条件について順次検討を行なった。

第1節 凍害防御剤の処理方法の検討

植物の90%以上は水であり、活発に生長している組織は通常マイナス数度の凍結に耐えない。植物の茎頂を2段階凍結法で凍結保存するには、凍害防御剤により $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ の凍結に耐えさせることが必要である(77)。本節では、凍害防御剤の種類と処理法がダイアンサス茎頂の凍結後の生存に及ぼす影響を比較検討すると共に、キク茎頂に対する凍害防御剤の処理方法についても検討した。

1. ダイアンサス茎頂に対する凍害防御剤の種類と処理方法

凍害防御剤として現在まで用いられてきた物質は、細胞膜を透過するDMSO、グリセリンなどと容易に透過できない糖類などに大別でき、これらの混合液が一般に凍害防御剤溶液として用いられてきた。ここでは種々の凍害防御剤の効果を再検討すると共にダイアンサス茎頂の凍結に際しての実用的処理方法を検討した。

材料および方法

ガラス室で育成したダイアンサスの母株より若いシュートを採取し、葉原基2対を含む約0.5mmの茎頂を切り出した。この茎頂をただちにTable 2に示した凍害防御剤と共に0.5mlストローに封入し、 20°C で1時間おいた後、プログラムフリーザーにより冷却速度 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で室温から -40°C まで緩速冷却し、その後液体窒素に浸漬、15分後に温水により急速解凍した。解凍した茎頂は滅菌水で3回すすいだ後、ダイアンサス用の培地に置床し40日間培養した。この際凍害防御剤の濃度により液の氷点が異なるが、ここではすべて -3.5°C で植水（第3節、3項参照）を行ない -5°C 又は -5.5°C で10分間冷却槽温度を一定に保ち、その後再び $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -40°C まで冷却した。さらに凍害防御剤をDMSO10%、グルコース3%とし、処理温度を0, 20, 30°C で120分間又は 20°C で10, 60, 120分間前処理の後、同様に凍結、解凍、培養した。なおこれらの実験は、すべて1区当たり15～20個の茎頂を供試し、2回反復した。

結 果

水だけで -40°C まで冷却後液体窒素に浸漬したものは、解凍後まもなく白化し全く生存しなかった。予備試験において水だけで $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却していくと、 -12°C 付近でダイアンサスの茎頂はほとんど枯死した。一方凍害防御剤DMSOを用いた場合、その濃度10%, 5%, 1%に対する茎頂の生存率は、100%, 58%, 0%であっ

た. 10%EGはDMSO同様に, 生存率100%と高い凍害防御効果を示したが, 1%では全く効果がなく生存が得られなかった. 10%グリセリンでは生存率46%と凍害防御効果が見られたもののDMSO, EGと比べると劣り, 1%では全く効果はなかった. グルコース, プロリン単独ではほとんど凍害防御効果が認められず, 生存は得られなかった. 一方, 単独で効果のない3%グルコースを5%DMSOと組み合わせた場合, 5%DMSO単独より高い凍害防御効果を示したが, 1%DMSOとの組み合わせでは生存が得られなかった (Table 2).

Table 2 Effects of cryoprotectants on the survival of dianthus shoot tips.

Cryoprotectants		Survival (%)	Shoot regeneration (%)
DMSO	1%	0	0
DMSO	1% + Glucose 3%	0	0
DMSO	5%	57.8	40.2
DMSO	5% + Glucose 3%	89.3	85.7
DMSO	10%	100	100
DMSO	10% + Glucose 3%	100	100
Glycerol	1%	0	0
Glycerol	10%	46.3	41.3
EG	1%	0	0
EG	10%	100	93.8
Glucose	3%	4.2	0
Glucose	10%	0	0
Prolin	10%	0	0
Control(water)		0	0

Excised shoot tips were treated with each cryoprotectants at room temperature for 1h and then cooled at a rate of 0.5°C/min. down to -40°C followed by immersion into LN₂.

凍害防御剤処理された茎頂は, 解凍後いったん脱色し黄白色となるが, 数日のうちに黄色みが増し1週間以内に再び緑色を回復した. 生存した茎頂の多くはその後やや肥大の後, シュートを形成した. なお詳しい形態形成の過程はSEM等で観察し, 第4章で議論する.

凍害防御剤をDMSO10%, グルコース3%とし, 処理温度を20℃としたところ, 処理時間が10~120分の間では差が見られず, いずれの茎頂も100%近い高い生存率を示した. また処理時間を120分として処理温度を変えた場合は, 0, 20℃では生存率が高く, 30℃では生存率, シュート再生率共に50%前後にまで低下した (Table 3).

以上の結果ダイアンサス茎頂の凍結に関しては, 凍害防御剤をDMSO10%, グルコース3%とし常温で1時間処理し, 0.5°C/min. で-40℃まで緩速冷却した後液体窒素に浸漬すると, 十分高い生存率が得られることが明らかとなった.

Table 3. Effects of treatment duration and temperature of cryoprotectants on the survival of dianthus shoot tips after freezing in LN₂.

Duration (min)	Temperature (°C)	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
10	20	100	100
60	20	100	96.7
120	20	100	100
120	30	52.6	48.8
120	0	100	100

Excised shoot tips were treated by 10% DMSO and 3% glucose at various temperatures for 10 to 120 min. and then cooled at a rate of 0.5°C/min. to -40°C followed by immersion into LN₂.

2. キクに対するDMSOの薬害検定

前項でDMSOは、供試した剤の中で最も高い凍害防御効果を示した。一方ダイアンサス茎頂を高温下で凍害防御処理すると生存率の低下が観察され、これはDMSOの薬害と考えられた。前節で得られたダイアンサス茎頂にとっての最適凍結条件下で、キクの葉片由来のカルスおよび茎頂を凍結した予備試験の結果、全く生存が得られなかった。DMSOは植物組織に対して毒性を有し、その程度は植物種によって異なると考えられるが、キクについての知見はまったくない。そこでまず初めにキクに対するDMSOの薬害の有無を知るため、キク葉片由来のカルスを用いDMSO浸漬処理を行なった。

材料および方法

キク品種秀芳の力の葉片をMSの基本培地にBA 1 mg/l, NAA 2 mg/l, シュ糖40g/lを添加した培地に置床し、形成された緑色のタイトなカルスを同培地で最低2回の継代培養の後、薬害検定に供した。約2×2mmのカルスを切り出し、20℃下で5～20%DMSO溶液に10～60分間浸漬処理の後、上記の培地に再び置床して60日間培養して生存率と生体重を調査した。1処理当たりカルス9個を供試し、2回反復した。

結 果

キクのカルスはDMSOに対して高い感受性を示した。すなわち浸漬したDMSOの濃度が高いほどカルスの生存率は低下し、培養60日後の生体重も低下した。ただし10～60分間の浸漬時間には有意な差は見られなかった。特に15%以上のDMSO溶液に浸漬したカルスでは再培養直後に褐変枯死するものが多く、生存率は大幅に低下し、培養60日後のカルス生体重も著しく低下した (Table 4)。

以上の結果、キクはダイアンサスに比べてDMSOに対する感受性が高く、茎頂の凍害防御剤としてのDMSOは10%以下で用いることが必要と考えられた。

Table 4. Toxicity of DMSO on chrysanthemum callus tissue.

Dippig treatment of DMSO		Survival (%)	Fresh weight (mg)
Conc (%)	Time (min)		
5	10	100	100.9
	30	100	87.9
	60	100	81.4
10	10	88.9	35.5
	30	83.4	24.9
	60	100	36.0
15	10	61.1	22.2
	30	77.8	18.0
	60	55.6	15.4
20	10	44.5	15.6
	30	11.1	4.5
	60	11.1	10.8
control		100	113.8
F-test significance			
Conc.	**	**	
Time	n.s.	n.s.	
Conc. × Time	n.s.	n.s.	

Note: 2×2mm calli were dipped in various concentration of DMSO for 10 to 60 min. and then transferred onto MS medium supplemented with 1mg/l BA, 2mg/l NAA and 40g/l sucrose. Survival rate and fresh weight after 60 days of culture.

3. キク茎頂の生長に及ぼす前培養培地中のDMSOの影響

前項で、DMSOがキクのカルスに対して薬害を起こすことを明らかにした。しかし先にダイアンサス茎頂の凍結で明らかにしたように、DMSOは凍害防御剤として不可欠であり、10%程度の濃度が必要である。茎頂に対する処理方法として、直接浸漬するのではなく、低濃度のDMSOを加えた培地にあらかじめ数日間前培養する方法が考えられる。ここでは、まず低濃度のDMSOを含んだ培地でキク茎頂が生存できるかどうかを検討した。

材料および方法

無加温ガラス室で栽培しているキク母株より若いシュートを取り、葉原基約2枚を含む約0.7mmの茎頂を切り出した。この茎頂をDMSO 5%を含むまたは含まないキク用培地に置床し、培養2, 7, 14, 21日後に、茎頂の基部に形成されたカルスの直径、シュートの形成の有無を調査した。

結 果

DMSO 5%を含まない通常のキク培地では、置床したすべての茎頂がまもなく緑色を増しながらやや肥大し、置床14日後にはシュートの形成が、肉眼で確認できるようになった。21日後にはほとんどの茎頂は、1本のシュートを発達させ、その基部に3mm程度のカルスを形成した。一方DMSOを含む培地に置床した茎頂では、100%生存したものの、置床21日後までにほとんど肥大生長せず、茎葉の形成も肉眼では観察されなかった (Fig. 2)。

以上より、5%DMSOを含む培地上でキク茎頂を培養すると、枯死しないものの生育は著しく抑制されることが明らかとなった。

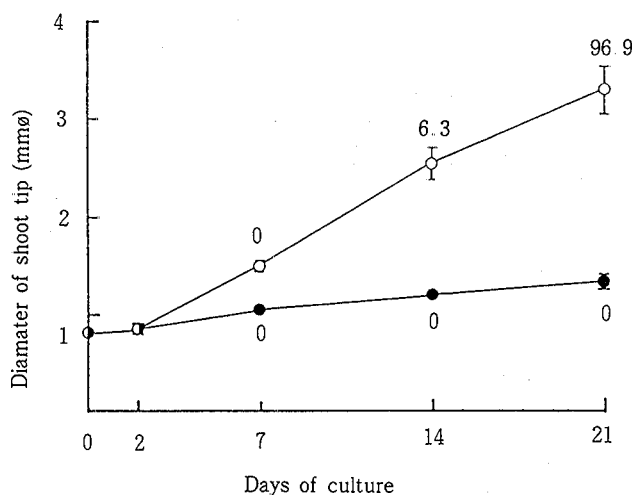


Fig. 2. Effect of DMSO in the medium on growth of chrysanthemum shoot tips. The shoot tips were cultured on MS medium supplemented with 0.1mg/l BA, 1.0mg/l NAA and 20g/l sucrose with (●) or without (○) 5% DMSO. In the figure each bar represents SE of diameter of shoot tips and the numbers show the shoot regeneration rate (%).

4. キク茎頂の形態形成に及ぼすDMSO処理の影響

前項において5%DMSOを含む培地上でキク茎頂は生存はするものの、正常にシュートを発達させないことが明らかとなった。そこでここでは、凍結を想定した場合に考えられるDMSOの処理方法がキク茎頂の処理後の形態形成に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

実際の茎頂の凍結を想定し、A；キク茎頂を通常のキク用培地で培養する（対照区）、B；キク茎頂を5%DMSOを含むキク用培地で2日間前培養の後通常のキク用培地に移植する、C；キク茎頂を5%DMSOを含むキク用培地で2日間前培養の後、10%DMSOと3%グルコースを含む凍害防御剤溶液に0℃で1時間浸漬し、その後通常のキク用培地に移植するの3区を設け、その後の茎頂の生長とシュート形成を観察した。

結 果

5%DMSOを含む培地に2日間前培養した後通常のキク用培地に移した茎頂は、対照区と同様に100%生存し、正常に1ないし2本のシュートを形成した。しかし、前培養の後10%DMSOと3%グルコースを含む凍害防御剤溶液に浸漬した茎頂は、ほぼすべてが生存し、対照区と同様に1ないし2本のシュートを形成したものの、置床した茎頂の46.2%は、異常に肥厚した水浸状の葉を持つシュートを形成した（Table 5, Plate 1）。

以上の結果より、10%DMSOと3%グルコースを含む凍害防御剤へのキク茎頂の浸漬処理は、茎頂の生存には影響しないが、茎頂から再生する葉の形態形成に異常をもたらすことが明らかとなった。

Table 5 Effect of DMSO on the morphogenesis chrysanthemum shoot tips

Treatment	Survival (%)	Shoot regeneration (%)	Shoots with abnormal leaf (%)
A	100	100	0
B	100	100	3.4
C	96.4	92.9	46.2

Treatment A : The shoot tips were cultured directly on the medium for 40 days.
 B : The shoot tips were precultured on the medium with 5% DMSO for 2 days, then were transferred onto DMSO-free medium.
 C : After 2 days of the preculture, the shoot tips were soaked in the cryo-protectant solution for 1h at 0℃, and then the shoot tips were transferred onto DMSO-free medium.

第2節 キク茎頂の凍結後の生存に及ぼす前培養の効果

前節までの結果より、キク茎頂に対する高濃度のDMSO処理は不適當であるが、低濃度のDMSOを含んだ培地で前培養することは可能であることが示され、また茎頂の凍結に関するこれまでの報告の中には前培養によって著しく生存率が高まった例も認められる（35, 41, 42, 99, 119）。ここでは凍結後の生存に及ぼすキク茎頂の前培養効果を検討した。

材料および方法

前節と同様にキク茎頂を切り出し、5%DMSOを含むかまたは含まないキク用培地で0～14日間前培養した。前培養した茎頂を、10%DMSOと3%グルコースの凍害防御剤と共に0.5mLストローに封入し0℃下に1時間おいた。これらのストローをプログラムフリーザーにより冷却速度0.2℃/minで0℃から-40℃まで緩速冷却

し、その後ただちにまたはLN₂に浸漬した後急速解凍した。この間-3.5℃で植氷し、-5℃で10分間冷却槽温度をホールドした。解凍は温水による急速解凍とし、ストローから取り出した茎頂は滅菌水で3回すすいだ後、キク用培地に置床し生存率を比較した。

結 果

前培養せず凍結を行なった茎頂は、解凍後まもなく褐変萎縮し、全く生存しなかった。一方、前培養した後に-40℃まで緩速冷却した後解凍した茎頂は、52~97%と高い生存率を示した。前培養は2日間でも有効で、特にDMSO 5%を含む培地で前培養した茎頂は高い生存率を示した。7~14日間の前培養期間では、凍結解凍後の茎頂の生存に影響せず、その場合培地内のDMSOの有無による差も見られなかった。また液体窒素に浸漬した茎頂の生存率は、-40℃で解凍した場合に比べて全般に2~15%低下した (Table 6)。

Table 6. Effect of pre-culture duration and DMSO in the pre-cultural medium on the survival rate of chrysanthemum shoot tips after colling to -40℃ with and without LN₂ treatment.

Duration of pre-culture (days)	DMSO conc. in pre-culture medium(%)	Survival rate of shoot (%)	
		-40℃	--196℃
0	—	0	0
2	5	94.4	79.4
2	0	52.4	50.0
7	5	83.9	72.6
7	0	97.4	72.5
14	5	85.5	83.1
14	0	86.5	69.4

After pre-culture the shoot tips were treated by 10% DMSO and 3% glucose at 0℃ for 1h then cooled at rate of 0.2℃/min. to -40℃.

解凍後生存していたキク茎頂は、キク培地に置床後まもなく一度褐変したが、その茎頂の一部が数日のうちに黄褐色から緑色になった。これら生存した茎頂はその後肥大して緑色のカルス状の組織となり、その一部は培養90日までにシュートを再生した。シュート再生のスピードは個々の茎頂で異なり、シュート再生の形態的様相は、通常の茎頂培養の場合とはかなり異なった (Plate 2)。シュート再生率は、前培養期間による一定の傾向を示さず30~60%程度であった。なおこれらの形態形成に関してはSEM等で観察し、第4章で再度議論することにする。

以上の結果、キク茎頂を液体窒素下に凍結保存した後生存をさせるためには前培養が不可欠であり、実用的にはDMSO 5%を含む培地で2日間前培養した茎頂を、10%DMSOと3%グルコースの凍害防御剤と共に緩速冷却した後液体窒素に浸漬すれば、最も短い期間の処理で高い生存率が得られることが明らかとなった。

第3節 冷却過程の検討

2段階凍結法では緩速冷却中に、茎頂から凍結脱水により徐々に脱水が起きるとされる。この間に細胞内凍結を起こさせないで、しかも適切な脱水が得られるような冷却速度と緩速冷却の終了温度の設定が必要である。本章では茎頂の生存率とシュート再生率に及ぼす冷却条件の影響を検討し、あわせて植氷の効果についても検討した。

1. 冷却速度の検討

2段階凍結法では、緩速冷却中の冷却速度を調節することによって、効率的に凍結脱水を進行させながらしかも細胞内凍結を起こさせないような条件を得ている。ここではダイアンサス、キク茎頂における最適冷却速度について検討した。

材料及び方法

ダイアンサスおよびキクの茎頂を（キクでは5%DMSOを含むキク用培地で2日間の前培養の後）、10%DMSOと3%グルコースの凍害防御剤溶液と共に、0.1~1.0℃/minの速度で0~-40℃まで冷却、液体窒素に浸漬し、15分後に温水で急速解凍した。解凍後はそれぞれダイアンサス用およびキク用培地で60日間および90日間培養した。これらの実験はいずれも1区当たり15個の茎頂を供試し、2回反復した。

Table 7. Effects of cooling rate on the survival and shoot regeneration of dianthus shoot tips.

Cooling rate (℃/min.)	Survival rate (%)	Shoot regeneration rate (%)
0.1	100	100
0.2	100	100
0.5	100	100
1.0	100	100

Excised shoot tips were treated by 10% DMSO and 3% glucose at 0℃ for 1h and then cooled at various speed to -40℃ followed by immersion into LN₂.

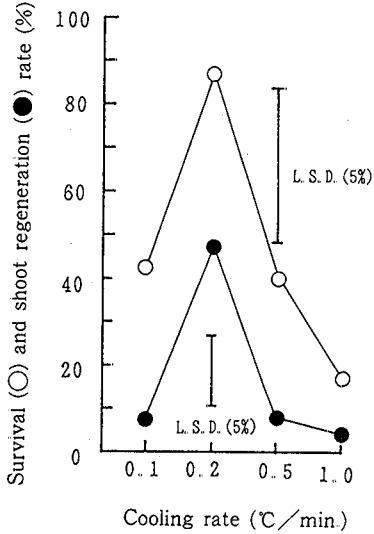


Fig. 3. Effects of cooling rate on the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips. The shoot tips were cooled at various rates to -40℃ after 2days of preculture on the shoot-tip culture medium with 5% DMSO and were then immersed into LN₂.

結 果

ダイアンサス茎頂は $0.1 \sim 1.0^\circ\text{C}/\text{min}$ で -40°C まで冷却の後液体窒素に浸漬すれば、いずれの冷却速度でも100%生存し、シュートを再生した (Table 7)。一方キクの場合は、 $1.0^\circ\text{C}/\text{min}$ から $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ の範囲内では冷却速度が遅いほど生存率が高くなったが、 $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ では低下した (Fig 3)。シュートの再生率も生存率と同様の傾向を示した。

以上よりダイアンサス茎頂は広い範囲の冷却速度で -40°C まで緩速冷却が可能であるが、キク茎頂では $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ が最適冷却速度であることが明らかとなった。

2. 緩速冷却終了温度の影響

ここではダイアンサス、キク茎頂について前項で得られた最適冷却速度で冷却しながら、 $-10 \sim -40^\circ\text{C}$ の間で順次液体窒素に浸漬しどの温度域で凍結脱水が進行するかを明らかにしようとした。

材料および方法

ダイアンサスの茎頂を10%DMSOと3%グルコースの凍害防御剤溶液と共に $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ の速度で冷却し、 $-10, -15, -20, -25, -30, -40^\circ\text{C}$ に達したときただちに液体窒素に浸漬した。さらに、同様のダイアンサス茎頂を植氷とそれに続く -5°C 、10分間のホールドの後 $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ で冷却し $-5, -10, -20, -25, -30^\circ\text{C}$ に達したときそれぞれその温度で70, 60, 40, 30, 20分間 ($0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ で -40°C まで冷却した場合の所要時間と同等) 保った後液体窒素に浸漬する区も設けた。キク茎頂では $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ で冷却し、 $-10, -20, -25, -30, -40^\circ\text{C}$ に達したときただちに液体窒素に浸漬した。解凍および解凍後の培養条件は前項と同様であった。これらの実験は1区当たり15個の茎頂を供試し、2回反復した。

結 果

ダイアンサス茎頂を $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ で冷却し、 -10 または -15°C に達したとき液体窒素に浸漬した場合、解凍後茎頂は白化し全く生存が得られなかった。さらに -20°C まで冷却した茎頂は、わずかながら生存したが、それらはわずかにカルス化しただけで、シュートを再生しなかった。緩速冷却終了温度をさらに下げるにしたがい、茎頂の生存率、シュート再生率は向上した。しかし共に100%に達したのは -40°C まで緩速冷却した場合のみであった (Fig 4)。

またダイアンサスの茎頂を植氷後 -5°C で10分間ホールドし、そのまま -5°C で70分間おいた後液体窒素に浸漬した場合、解凍後の茎頂は全く生存しなかった。また -10°C で60分間おいた後液体窒素に浸漬した場合は、生存する茎頂がわずかに10%ほど見られたものの、シュートの再生は認められなかった。しかし -20°C で40分間おいたものは、先の実験で -20°C に達した時点で液体窒素に浸漬した茎頂がわずか8.6%しか生存しなかったにもかかわらず、93.3%と高い生存率を示した。ただし解凍した茎頂の生長は遅く、またシュートの再生率は33%と低かった。 -25°C で25分間または -30°C で20分間おいたものは、 -40°C まで冷却したものと茎頂の生存率、シュートの再生率共にほとんど差は認められなかった (Fig 4)。

キクに関する結果は、基本的にダイアンサスと同様の傾向を示し、 $-10, -20^\circ\text{C}$ まで冷却後に液体窒素に浸漬した場合、茎頂の生存は全く認められなかった。しかし、 -25°C から -40°C まで緩速冷却終了温度が低くなるほど生存率、シュート再生率共に高くなった (Fig 5)。

以上の結果、ダイアンサス茎頂では $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ で緩速冷却した場合、終了温度は -40°C が最適であるが、 -25°C 以下の温度で一定時間保っても同等の凍結脱水が行われることが明らかとなった。キク茎頂の場合は、 -40°C で緩速冷却を終了することが最適であった。

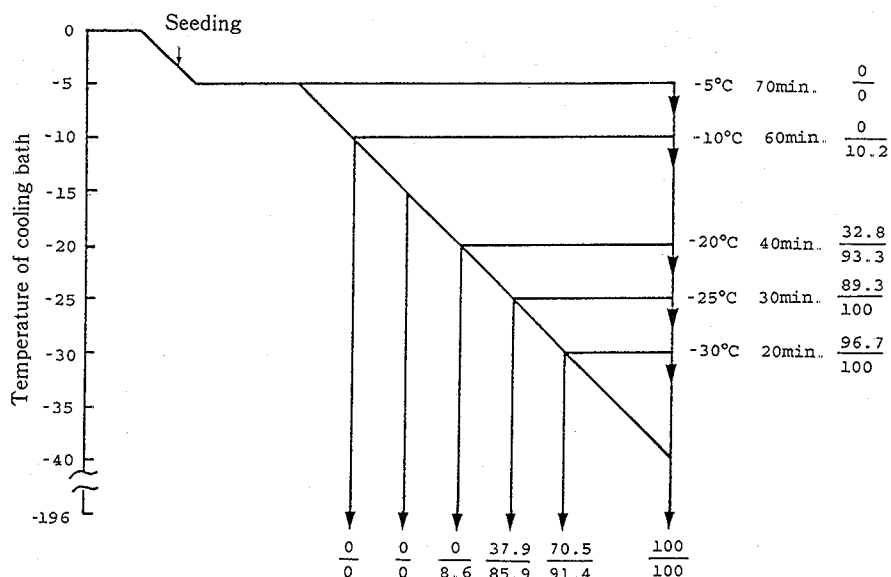


Fig. 4 Effects of various terminal temperatures of slow cooling and holding temperatures during slow cooling on the survival and shoot regeneration of dianthus shoot tips

The figures in the graph refer to : $\frac{\text{Shoot regeneration rate (\%)}}{\text{Survival rate (\%)}}$

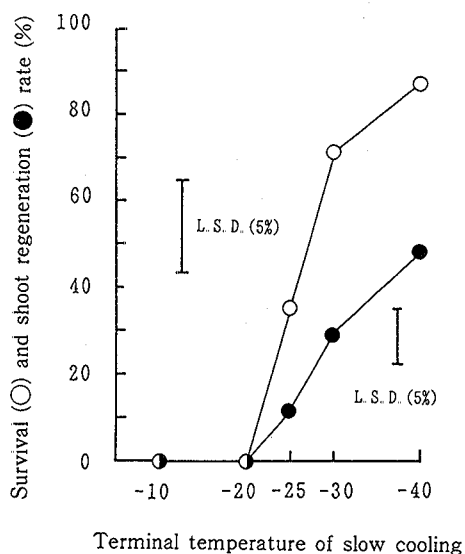


Fig. 5 Effects of various terminal temperatures of slow cooling on the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips

The shoot tips were cooled at a rate of $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ down to indicated terminal temperatures after 2 days of preculture on the shoot-tip culture medium with 5% DMSO and were then immersed into LN_2 .

3. 植氷の効果

2段階凍結法では緩速冷却中に茎頂の周りの凍害防御剤溶液（凍結培液）が先に氷結し、その後茎頂からの脱水が進む。一般に液相から固相への転換は液中のゴミや高分子などの氷核の存在によっており、振動など物理的刺激によっても誘発される。氷点より低い温度で相の転換が起こらない現象を過冷却と呼び、溶液を緩速に冷却した場合にこの過冷却現象は容易に起こる。凍結培液の氷点は溶質の濃度で異なるが、氷点より少し高い温度で強制的に培液の一部に氷晶を形成させることにより、培液の過度の過冷却を回避しスムーズに相転換を起こさせることができ、この作業を植氷と呼ぶ。ここでは植氷時の温度変化を測定すると共に、凍結した茎頂への影響を検討した。

材料および方法

0.5ml ストローに10%DMSOと3%グルコースの凍害防御剤溶液を充填し、この中に0.1mm銅-コンスタンタン熱電対を挿入し、冷却過程のストロー中の温度を測定した。これにはプログラムフリーザー-FFP-190を用い、ストロー温度とチャンバー温度の差が1℃になるよう設定し、植氷過程のプログラムを実行した場合とスキップさせた場合の温度変化を計測した。なおこのプログラムでは植氷をストロー温度が-3.5℃に達したときに行ない、その後チャンバー温度が-5.5℃に達してから10分間その温度に保つよう設定した。

次に実際の凍結における茎頂の生存に及ぼす植氷の影響を見るため、凍結条件の中で植氷のみを省いたプログラムにより凍結した場合のダイアンサス茎頂の生存状態と、植氷を組み入れた完全なプログラムの場合とを比較した。さらにキクについては植氷を省略したプログラムを実行し、凍結培液の過冷却が破れた直後に急速解凍する区も設けて、完全プログラム、植氷をスキップしたプログラムと茎頂の生存を比較検討した。

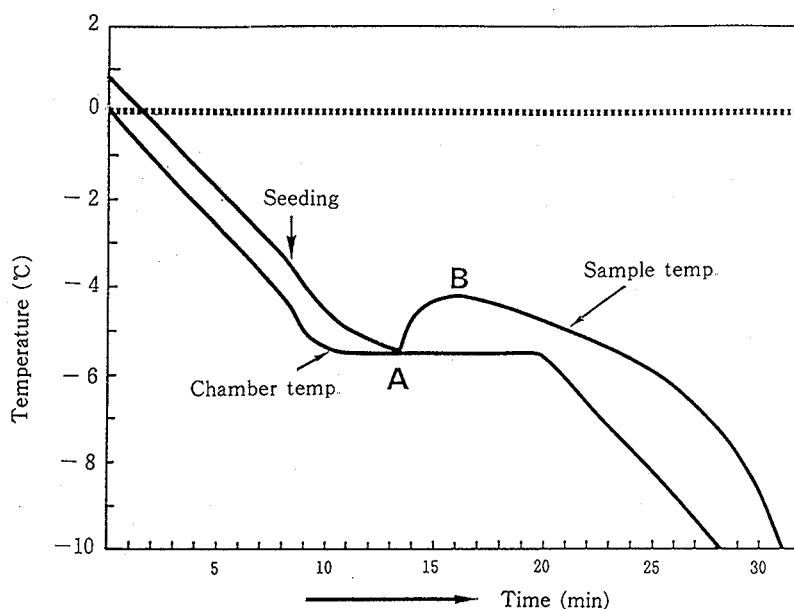


Fig. 6 Cooling curve of the chamber and the sample during the cooling processe by the program-freezer FFP-190.

When the sample temperature reached -3.5°C , the sample was seeded ice crystals automatically. After 5 min. the temperature of the medium rebounded from -5.5°C to -4.2°C .

結 果

植氷を行なった場合のチャンバーと凍害防御剤のみを入れたダミーのストロー内の凍害防御剤の温度をFig. 6示した。チャンバーとストローは $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却されており、ストロー温度が -3.5°C になった時点で自動的に植氷された。その後チャンバーは -5.5°C になった時点で10分間ホールドされた。この間ストロー中の氷は生長し -5.5°C でセンサー付近の凍結培養が凍結(A)、その際の潜熱で -4.2°C まで昇温(B)した。この間 Δt (チャンバー温度-ストロー温度)は、 $0.8\sim 2.6^{\circ}\text{C}$ であった。植氷温度を -3.5°C に設定して繰り返し温度測定を行なった結果、A点は $-5.5\sim -5.2^{\circ}\text{C}$ 、B点は $-4.8\sim -4.2^{\circ}\text{C}$ となり、植氷からA点まで平均5分、A点からB点まで平均3.5分要した。

一方植氷のプログラムをスキップした場合、ストローの温度はチャンバー温度と共に低下し、 -9.9°C で過冷却が破れ急速に -4.1°C まで昇温した (Fig. 7)。この間 Δt は最高 7.1°C まで広がった。繰り返し測定したが、 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した場合、DMSO10%とグルコース3%溶液ではほぼ -10°C 付近で過冷却が破れた。ただし冷却速度を $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ とした場合は、過冷却が破れる温度はさらに低くなり -15°C 付近となった。

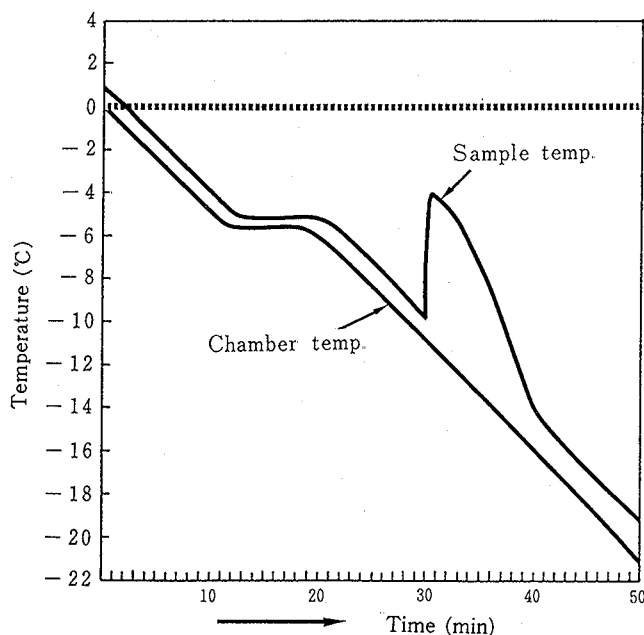


Fig. 7 Cooling curve of the chamber and sample in the case of skip seeding The temperature of the medium rebounded from -9.9°C to -4.1°C

植氷の有無は凍結した茎頂の生存に影響したが、その程度はダイアンサスでは小さくキクでは著しかった。すなわちダイアンサスでは、植氷を行なわなかった区で生存率、シュート再生率共にわずかに低下した (Table 8)。一方、キクでは過冷却が破れた直後 -15°C で急速解凍した茎頂と、植氷を行なって -40°C まで緩速冷却の後液体窒素に浸漬した茎頂は共に高い生存率、シュート再生率を示したのに対し、植氷を行なわなかった茎頂では、生存率が50%以下に低下したばかりでなく、生存した茎頂の生長も遅くシュートの再生は6%と著しく低くなった。

Table 8. Effects of seeding on the survival and shoot regeneration of dianthus and chrysanthemum shoot tips

Species	Seeding	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
Dianthus	with	100	96.7
	without	88.9	61.1
Chrysanthemum	with	95.5	45.5
	without	42.9	6.2
	without	100	67.5
	(thawed at -15°C)		

The shoot tips were frozen by the freezing program with or without seeding. See Fig. 6 and 7.

以上の結果、植氷により凍結培液の過度の過冷却は回避され、茎頂の安定した高い生存とシュート再生が得られることが明らかとなった。

第4節 解凍過程の検討

2段階凍結法においては、緩速冷却に続く急速冷却中に茎頂に残った水はガラス化するか又は細胞に害を与えない程度に十分小さくなると考えられ、このため解凍過程で氷晶の再生長を防止するため急速解凍が必要とされる(77)。ここでは急速解凍の必要性を再確認すると共に、その危険温度域を明らかにした。

1. 解凍方法の検討

これまでの茎頂の凍結保存の報告の多くは、温水による急速解凍を採用している。ここではダイアンサス、キク兩種において、解凍方法の違いが生存に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

ダイアンサスの茎頂を10% DMSOと3% グルコースの凍害防御剤溶液と共に0.5ml ストローに入れ、0.5/min. の速度で -40°C まで冷却し液体窒素に浸漬した。このストローを温水(37°C) 浸漬、氷水(0°C) 浸漬、室温(15°C) 大気中に放置の3つの方法で解凍した。同時に前節と同様のセンサーを入れたストローをあらかじめ液体窒素に浸漬し、上記の3つの方法で解凍して、その昇温状態を記録した。またキクに関しては、温水浸漬による急速解凍と、室温放置を比較検討した。

結 果

ストローの内部温度は、温水に投入した場合 -196°C から 37°C まで約 $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ でほぼ直線的に昇温した。氷水に投入した場合も、 -5°C 付近までは直線的に昇温してその後 0°C の漸近線を描いた。 15°C の室温放置の場合は、 -40°C 付近までは直線的に昇温したものの、それ以降徐々に昇温速度が緩やかとなり、 -4°C 付近で潜熱の取り込みと考えられる昇温曲線の乱れが認められた (Fig. 8)。

温水または氷水で解凍したダイアンサスの茎頂は100%生存し、シュートをほぼ100%再生したのに対し、室温放置して解凍した茎頂は生存率が35.2%にまで低下し、シュートの再生率も11.1%と著しく低くなり、多くはカルス化した (Table 9)。キクも同様の傾向を示し、室温放置で緩速解凍した場合は生存率が劣り、とくにシュートの再生は全く認められなかった。

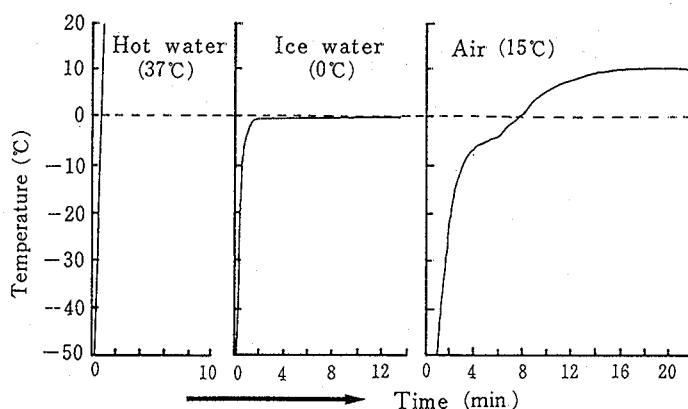


Fig. 8. Warming curve of sample medium.

Table 9 Effects of thawing methods on the survival and shoot regeneration of dianthus and chrysanthemum shoot tips.

Species	Thawing methods	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
Dianthus	Hot water (30°C)	100	96.7
	Ice water (0°C)	100	100
	Air (15°C)	35.2	11.4
Chrysanthemum	Hot water (30°C)	87.5	30.4
	Air (15°C)	66.6	0

以上の結果、ダイアンサス、キク茎頂において解凍後の高い生存率とシュート再生率を得るには急速解凍が不可欠であることが明らかとなった。

2. 危険温度域の検討

前項で室温に放置して解凍した場合、ダイアンサス茎頂の生存が著しく劣った。ここでは前項同様の温度測定を行ないながら室温で解凍し、種々の温度まで昇温したときに温水に浸漬する方法により、緩速解凍過程中的のどの温度で茎頂に障害が起きるかを明らかにしようとした。

材料および方法

前項と同様のセンサーを入れたストローと茎頂の入ったストローをいっしょに液体窒素から取り出して空気中に放置し、ダミーのストローが -100 、 -40 、 -10 、 0 ℃にまで昇温した段階で茎頂の入ったストローを温水に浸漬し急速解凍した。その後先と同様に培養して生存を比較した。

結 果

-100 ℃で急速解凍したダイアンサスの茎頂は100%生存したが、温水に投入する時点の温度が高くなるに従い生存率は100%から62.9%へ、シュート再生率は83.3%から38.6%に低下した (Fig 9)。とくに -40 ℃以上で解凍した茎頂のシュート再生率が劣り、 -40 ℃より高い温度域をゆっくり通過することにより、茎頂がダメージを受けることが明らかとなった。

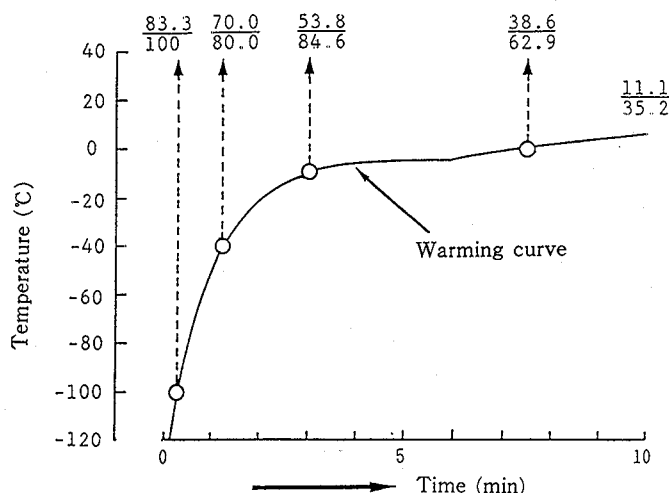


Fig. 9. Damage causing temperature in the process of warming in air at 15°C following removal from liquid nitrogen. The straws were rapidly warmed at various temperatures by immersion into water at 37°C.

The figures in the graph refer to : $\frac{\text{Shoot regeneration rate (\%)}}{\text{Survival rate (\%)}}$

3. 解凍後のキク茎頂の取扱方法の検討

解凍直後の茎頂は凍害防御剤中にあり、再培養時にはこれを洗い流す必要がある。培養細胞の凍結ではこの時の条件が後の細胞の生存率を左右することが報告されている(24)。解凍後のキク茎頂は1度褐変し、そのうち生存するものは緑色を回復したが、そのまま褐変が進んだものは枯死した。褐変は解凍後の茎頂の細胞膜に何らかの障害生じたためと考えられ、膜を保護する何らかの手段を講じれば、生存率が向上する可能性がある。またキクの茎頂培養の初期段階において、低い照度で培養すると褐変が押さえられ生存率が高まることが経験的に知られている。そこでここでは、膜の保護作用があるとされる Ca^{2+} に注目し、解凍後のキク茎頂の洗い方と再培養直後の光条件が茎頂の生存とシュート形成に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

キク茎頂を5% DMSOを加えたキク用培地で2日間前培養の後、0.2°C/minで-40°Cまで緩速冷却の後液体窒素に浸漬した。温水による急速解凍の後、滅菌水又はCPW($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1480mg/l, KH_2PO_4 2720mg/l, KNO_3 101mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246mg/l, KI 0.16mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/l) 塩溶液で3回洗浄した後キク用培地に置床した。さらに再培養開始直後の1週間だけの光条件を、弱光(約50lux)と通常の培養条件(約1500lux)に分け、生存率とシュート再生率を比較した。

結果

キク茎頂は解凍後の洗浄液と光条件の違いにかかわらず、解凍後1度褐色を呈し、その後黄色から緑色に回復した。キク茎頂の生存率は64~81%と処理区間に差がなく、シュート再生率に関しても42~52%と差が認められなかった(Table 10)。また再生したシュートは洗浄液と光条件に関係なくほとんどビトリフィ状の異常葉を形成した。

以上より、キク茎頂の解凍後の洗浄液中の Ca^{2+} およびその後の光条件は、生存、シュート再生に影響しないことが明らかとなった。

Table 10 Effects of washing medium and light conditions after thawing on the survival and shoot regeneration of *chrysanthemum* shoot tips.

Washing medium	Light condition	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
CPW	dim light	81.3	47.9
	1500 lux	71.4	44.8
Water	dim light	72.9	52.1
	1500 lux	64.6	42.1

The thawed shoot tips were rinsed three times with CPW salts solution or distilled water and then placed on the medium. Half of the cultures were incubated under dim light for 1 week and then transferred to normal condition (1500 lux).

第5節 考 察

乾燥した種子が液体窒素に浸漬後も生存することは古くから知られていたが、高等植物の組織が液体窒素に浸漬した後も生存可能であることは、1958年Sun(92)により初めて報告された。茎頂の凍結保存は、Seibert(76)により超急速冷却法を用いて1976年に初めて報告され、その後Karthaら(41, 42, 43), Sakaiら(75), Uemuraら(108), Towillら(99, 100, 101, 102)によって、凍害防御剤の存在下で -40°C 付近まで急速冷却の後液体窒素に浸漬する2段階凍結法により凍結後の茎頂が高い生存率を示すことが相次いで報告された。この2段階凍結法においては、凍害防御剤の選択と処理法、冷却速度、急速冷却終了温度などの凍結条件、さらに解凍方法などが重要な条件とされる。しかしこれらの諸条件を1つの種を用いて総合的に検討した知見は少なく、ある種で成功した凍結条件が経験的に他の種に対して踏襲されてきている。本章では既往の成果を基にして、すでに成功例のあるカーネーションと同属のダイアンサス属交配種を基本種として用い、2段階凍結法の諸条件について再検討し、それらのキクへの適用を検討した。

2段階凍結法では、 -40°C 付近までの急速冷却中に凍結脱水によって茎頂の水分含量が徐々に減少し、その後の急速冷却中に残った水はガラス化もしくは害のない程度の微細な氷晶になると考えられている(77)。しかし植物の組織は約90%が水であり、そのままでは氷点下数度の凍結に耐えないものが多い。実際に本研究で高い凍結保存性を示したダイアンサス茎頂も、水だけで急速冷却すると -12°C 程度までの凍結にしか耐えない。このため -40°C 付近まで急速冷却するには、凍害防御剤の添加は不可欠な条件となる。凍害防御剤として用いられる物質は、細胞内への浸透性から細胞膜透過型と非透過型に大別できる。本章の結果では、細胞膜透過型凍害防御剤であるDMSO, EG, グリセリンは10%単独溶液でも効果が認められたが、非透過型凍害防御剤であるグルコース、プロリンには単独ではほとんど凍害防御効果はなかった。

ダイアンサス茎頂における細胞膜透過型凍害防御剤の凍害防御効果の程度は、DMSO, EGで高く、グリセリンはやや劣った。カーネーションの茎頂では、グリセリンよりもDMSOが有効であることが報告されており(108)、エンドウの茎頂では、グリセリンばかりでなくEGも全く無効であることがKarthaら(41)によって報告されている。しかし動物の精子や受精卵の凍結ではグリセリンはDMSOと同様に有効であり、植物に関しても培養細胞の凍結ではその凍害防御効果が認められている(14, 55)。DMSOの濃度に関しては、本実験では10%では高い凍害防御効果が認められたが、5%では劣り、1%では全く効果がなかった。Kumura(44)はアスパラガスの茎頂に対するDMSOの効果は8~20%で高く4%では劣ることを、Uemuraら(108)はカーネーションの茎頂に対し

5～15%では効果が高く20～25%で劣ることを報告している。さらに既往の報告では、キャサバ (43) では15%, ジャガイモ (100), ブドウ (23) では10%, エンドウ (41), イチゴ (42) では5%のDMSO濃度が採用されている。これら細胞膜透過型凍害防御剤の効果の違いは、基本的に物質により細胞内への透過性が異なり、さらに同一物質でも細胞の種類により透過性が異なるためと考えられる。本実験でダイアンサス茎頂をDMSOを含む凍害防御剤にわずか10分間処理した後にプログラムフリーザーにセットして凍結しても高い生存が得られたことは、DMSOのダイアンサス茎頂組織に対する高い透過性を示している。

非透過型凍害防御剤には、既往の成功例では例外なく細胞膜透過型凍害防御剤と組み合わせて用いられている (10, 19, 114)。本実験では10%DMSOでは単独でも100%生存したためグルコースを添加した効果は明らかではなかったが、単独では効果の劣る5%DMSOに、単独では全く効果のないグルコースを3%加えると5%DMSOの凍害防御効果が増した。しかしこのグルコースの添加効果も1%DMSOでは認められなかった。

現在までのところ、これら凍害防御剤の作用機作は十分明らかにされていない。透過型凍害防御剤は細胞内に容易に拡散し、物理的作用として細胞内の水の氷晶核形成温度を低下させ、結果として細胞の過冷却を進捗することで凍りにくくすると共に、緩速冷却中の凍結脱水による細胞内の濃度の高まりを通じてガラス転移温度を上昇させ、その後に続く急速冷却中のガラス化を安定したものにすると考えられている (95)。また同時に凍害防御剤は、細胞の内外で凍結脱水による細胞膜タンパク分子の変性を防止すると共に、細胞膜脂質の極性基からの脱水による膜脂質2重構造の分子配列の乱れを防止すると考えられている (121)。Chenら (14) はニチニチソウの培養細胞を2段階凍結法で凍結し、緩速冷却中の液相水分の減少と凍害防御剤の関係をNMRを用いて調べ、DMSO濃度が高いほど緩速冷却終了時の液相水分含量が高いがソルビトールはこれに関与しないこと、凍結後の生存と緩速冷却終了時の含水率には直線的関係があることを明らかにした。彼らはこの結果より、細胞膜透過型凍害防御剤であるDMSOの最大の作用は、冷却中の過度の脱水を防ぐことにより細胞構造の破壊を防ぐ点にあるとしている。また同時に非透過型凍害防御剤は細胞の含水率を減らすと同時に細胞内外で氷晶の形成率を減少させる働きがあることを指摘している。Tylerら (105, 106, 107) も同様にNMRを用いた実験から、リンゴ冬芽中の液相水分含量が、緩速冷却終了時にある一定量以下になることが液体窒素浸漬後の生存にとって必要ではあるが、同時に液相水分含量と生存率とは必ずしも一致しないことを指摘している。

細胞膜透過型凍害防御剤は、容易に細胞内に浸透するため細胞に対して毒性を有する。特にDMSOは植物細胞に対して毒性が指摘されているが (115)、植物ごとの毒性に関する知見は極めて少ない。本実験でダイアンサス茎頂を30℃で凍害防御剤処理すると生存率が低下し、これは薬害と考えられた。一方、キクはダイアンサスに比べてDMSOに対して高い感受性を有し、キクカルスではDMSO処理濃度が10%を越えると著しく生存率が低下した。またエンドウの芽生えの茎頂は10%以上のDMSOに48時間さらすとすべて枯死する (41)。このようにDMSOの植物に対する毒性は、処理濃度、処理温度、植物種によって異なるが、本章の結果が示すように凍害防御作用を期待するためには10%程度の濃度が必要である。また本実験の結果は、DMSOが組織の生存ばかりでなく、茎頂の形態形成に影響することを明らかにした。解凍後のキク茎頂から再生した植物は、水浸状の異常形態を示すものが多かったが、この異常形態が主に凍害防御剤として使用されたDMSOによるものであった。以上のように、DMSOは薬害の問題はあるものの、高い凍害防御効果を示すことから、第2章以降の実験では10%DMSOと3%グルコースを添加した凍害防御剤溶液を基本として用いた。ただし、本実験で高い凍害防御効果を示したEGについては、まだ応用例が少なく薬害等についても不明でありDMSOに代わるものとして検討する価値があろう。

ダイアンサス茎頂では、茎頂を切り出した直後に凍害防御剤処理して凍結しても高い生存率が得られたが、キ

ク茎頂では生存を得るためには前培養は不可欠な要因であった。凍害防御剤処理する際、あらかじめ低濃度のDMSOの入った培地に数日間前培養することにより高い生存率が得られた例は、エンドウ (41)、ヒヨコマメ (5)、ラッカセイ (5)、シュガービート (11)、ホワイトクロバー (119) などで報告されている。しかし本実験の結果は、キク茎頂の凍結解凍後の生存のためには前培養自体が不可欠な要因であり、培地中のDMSOは不可欠な条件ではないことを示した。ジャガイモでも、凍害防御剤を含まない培地に前培養することによって高い生存率が得られている (99)。先に示したようにDMSOは植物組織に対して高い浸透性を持っており、茎頂への浸透だけが目的であれば前培養は必要とは考えられない。切り出した直後の茎頂は大きな切断面を有しており、凍害防御剤を含まない培地での前培養の有効性は、前培養が茎頂の傷に対する治癒期間として有効であることを示していると考えられる。とくにキクの茎頂は、通常の茎頂培養でも切断面から褐変が進みやすく、さらに夏期に切り出した茎頂は温度変化に敏感でより障害を受けやすく、これは前培養により克服される (第4章、第1節の2) ことが認められる。一方、5%DMSOを含むキク用培地で培養したキク茎頂の発育が劣りシュート形成も妨げられたことは、培地中のDMSOがキク茎頂に浸透しその生理的狀態に影響を与えたことを示している。Withersは (115) 前培養が茎頂の傷に対する回復期間として効果があることを指摘する一方、前培養培地中のDMSOによる生長の抑制が凍結保存性を増すことがありうることを指摘している。以上より、その生理的意味は明らかではないが、キク茎頂の凍結・解凍後の生存を得るためには、前培養が有効であることは確かである。

2段階凍結法では、緩速冷却中に徐々に凍結脱水により茎頂内の水分が減少する。脱水の程度は、冷却速度と緩速冷却終了温度の組み合わせによってコントロールされる。脱水程度が不十分だとその後の急速冷却の過程で細胞内凍結を起こし、その細胞は死ぬと考えられている (77)。ダイアンサスの茎頂は $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で緩速冷却し、 -20°C 以上で緩速冷却を終了し液体窒素に浸漬するとほとんど生存しないが、 -25°C 以下では高い生存率を示した。このことは $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した場合、 -20°C に達したときは未だ十分な脱水が起こっていないが、その後 $-20^{\circ}\text{C}\sim-25^{\circ}\text{C}$ に達するまでのわずか10分間に、脱水がその後の急速冷却中に細胞内に障害が発生しないレベルにまで進行したことを示している。一方、 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -40°C まで緩速冷却するのに要したのと同じ時間だけ、種々の温度で保った後液体窒素に浸漬すると、 $-5^{\circ}\text{C}\cdot 70\text{分}$ では生存しないものの $-10^{\circ}\text{C}\cdot 60\text{分}$ では10%ながら生存する茎頂が見られ、 $-20^{\circ}\text{C}\cdot 40\text{分}$ では高い生存率を示した。これは凍結脱水は -10°C でも進み、 -20°C に保たれている間に凍結脱水がかなり進行することを示している (Fig 4)。ダイアンサス茎頂を冷却速度 $0.1\sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -40°C まで冷却した後液体窒素に浸漬した場合、生存率に差が見られないのは、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した場合でも -20°C から -40°C まで冷却するのに15分を要し、この間に凍結脱水が十分に進むためと考えられる。キク茎頂を $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却し種々の温度で液体窒素に浸漬した結果は、キクもダイアンサス同様 -20°C では十分な脱水が進行しておらず、 $-25^{\circ}\text{C}\sim-30^{\circ}\text{C}$ 付近で十分な脱水が完了することを示した。しかしダイアンサスに比べてキク茎頂の最適冷却速度が $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ と遅く、緩速冷却終了温度も -40°C まで必要となったのは、キクはダイアンサスと比べて茎頂を構成する細胞から水が抜けにくいことを示している。凍結脱水の進行は植物種によって異なり、これは細胞膜の特性を反映していると考えられる。そのため緩速冷却速度と緩速冷却終了温度の組み合わせは植物種によって最適条件が異なり、ホワイトクロバーで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 -40°C (119)、ジャガイモで $0.3\sim 0.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ (99, 100, 101)、エンドウで $0.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 -40°C (41)、シュガービートで $0.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 -40°C (11)、イチゴで $0.84^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 -40°C (42) といった条件が採用されている。

水溶液を徐々に冷却すると一般に凝固点では氷晶の形成は始まらず、液相のまま溶液温度は下がり続ける過冷却現象を起こす。氷晶の形成には氷核が必要であり、氷核が小さい程氷晶が形成され始める温度も低い。氷晶形成が始まるまで温度が低下すると、過冷却は自然に破れ急速に昇温してその溶液の水点まで温度は上昇する。一

方氷点よりやや高い温度で強制的に氷核を植え付けると、ほとんど過冷却しないで氷晶の形成が起こる。本実験において植氷を組み込んだ完全なプログラム、または植氷をスキップしたプログラム実行時のストロー中における凍害防御剤の温度を計測した結果は、ほぼ上記の通りの現象が確認できた。これまでの凍結方法の解説中では、植氷の必要性が指摘されてはいる(115)ものの、過冷却が破れた後の急激な温度変化が問題なのか、それに続く緩速冷却中に新たな問題が生じるのかは明らかではなかった。Panisら(63)は、バナナの培養細胞の凍結において、植氷の有無により生存率に差が生じることを明らかにし、安定した高い生存率を得るためには植氷が不可欠な手順であるとした。また動物胚の凍結において、植氷をしないと過冷却が破れた後いったん昇温した材料が凍結プログラムにしたがって再び急速に冷却されるため脱水が十分に進まず、その後 -20°C 以下の温度にさらされると細胞内凍結を起こし胚が死ぬとされている(61)。本実験の結果ではキクの茎頂は植氷せずに凍結を完了すると大きなダメージを受けるが、過冷却が破れた直後の -15°C で急速解凍した場合は生存の低下は認められなかった。このことはキク茎頂を凍結した場合、過冷却が破れた直後の潜熱発熱による温度変化自体が問題なのではなく、それに続くその後の緩速冷却中に障害が発生したことを示している。本実験に用いた凍害防御剤溶液では植氷をしない場合に過冷却が破れるのは -10°C 付近($0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却した場合)であり、この温度以下では植氷の有無にかかわらず凍結培液は凍る。先の議論よりダイアンサス、キク茎頂の凍結脱水は、 -25°C 付近に達すれば適当なレベルにまで進むことから、 -40°C まで緩速冷却すると、植氷の有無にかかわらず凍結脱水は十分起こったはずである。また同時に行った観察によれば、植氷後のストロー中の氷晶の生長はゆっくりしており、柱状の結晶が生長したが、植氷せずに過冷却が破れた場合は急速にストロー全体が白濁した。渡辺ら(112)は、植氷を行なわなかった場合凍結培液中に形成される氷晶の大きさは、植氷した場合に比べて著しく小さくなることを顕微鏡観察しており、これは先に述べたストローの外観の観察と一致する。これらのことから緩速冷却中の茎頂の周りに形成された氷晶の大きさの違いが、緩速冷却中の凍結脱水の進行を阻害又は細胞内凍結を誘起した可能性がある。Frankら(25)は、細胞内凍結が起こるのは細胞内に氷晶が自発的に形成されるのではなく、細胞外の氷晶により細胞内に植氷されることによって生じることをモデル実験で証明した。Ashworthら(2)は数nmレベルの非常に細い管の中では氷晶形成が強く妨げられることを示し、実際の植物細胞壁にある小孔が氷晶の形成と細胞内への侵入を妨げている可能性を示した。以上のことからこれまでの報告の中で植氷の効果が凍結する材料によって異なるのは、細胞膜の生理的特性による脱水の難易と共に細胞壁の構造上の違いによる細胞内への氷晶の進入の難易が関係している可能性があるといえよう。

解凍速度は、解凍後の組織の生存率を左右した。ダイアンサス、キク茎頂ともに緩速解凍すると、生存率は急速解凍した場合よりかなり劣った。Sakaiら(73)は、耐凍性のかかなり高いクワの皮層細胞でも、予備凍結温度(緩速冷却終了温度)が高いと緩速解凍で生存率が低いが、 -20°C 以下で予備凍結すると緩速解凍しても急速解凍しても生存率に差が見られないことを明らかにした。Uemuraら(108)は -30°C 以上で予備凍結したカーネーション茎頂は緩速解凍ですべて死ぬが、 -35°C 以下で予備凍結したものは緩速解凍しても生存することを確認し、 -50°C では緩速解凍、急速解凍による差がないことを明らかにした。一方Towillら(99)はジャガイモ茎頂を -40 または -50°C まで緩速冷却した場合、急速解凍すると緩速冷却終了温度による差がないが、緩速解凍すると -50°C の方が劣ったとしている。またYakuwaら(118)はクワの冬芽の凍結に関して、予備凍結を -20°C にした時は解凍方法による生存率の差は見られないが、 -30°C にしたときは緩速解凍の方が生存率がまざったことを報告している。先に議論したように、緩速冷却終了時には植物組織の中にある程度水が残っており、これらは急速冷却中にガラス化又は細胞に害のない程度の微小結晶になり、急速解凍すればすべて生存するが、緩速解凍すると脱ガラス化し氷晶が再生長して細胞に害を及ぼすと考えられている(77)。緩速冷却終了温度が低い場合茎頂

の脱水程度が更に進み、この状態では急速解凍の際に急激に復水し害を生じるため、緩速解凍の方が急速解凍より生存率が高くなると考えられている。しかしこの場合脱ガラス化の害が生じないのは茎頂内でガラス化しうる水が極めて少ないためと考えられ、このような過度の脱水に耐えられる細胞は限られているだろう。本実験では -40°C で緩速冷却を終了しているため茎頂内に一部凍結可能な水が残っており、高い生存率を得るには解凍過程で茎頂を急速に解凍することが不可欠であったと考えられる。実用的には緩速解凍より急速解凍の方が簡便であり、ことさら緩速冷却終了温度を下げる必要はないと考えられる。また緩速解凍の過程で害の生じる温度域は、ダイアンサス茎頂の場合 -40°C 以上の温度域であった。Sakaiら (74) は、クワの皮層組織を緩速解凍の過程で種々の温度で急速解凍した際 -40 から -30°C のわずかに6秒間で生存率が急激に低下し、この原因はこの温度域でもっとも氷晶の再生長が起こるためとした。茎頂は数多くの細胞の集まりであるのでそれほど反応はシャープにはならないが、いずれにしても急速解凍が不可欠であることは確かであった。 15°C の空气中にストローをおいた場合、危険温度域である -40°C 以上に達するまで約1分を要しており、実用的には手早く液体窒素から取り出しすぐに温水に浸漬すれば問題はないと考えられる。さらに本実験の結果では、解凍に温水を用いても冷水でも差がなかった。これまで多くの研究者が 37°C を解凍温度としたのは、凍結保存の研究が動物細胞の結果を基にしたためと思われ、水の量が十分であれば常温の水を用いて急速解凍しても実用的には問題はないと考えられる。

融解直後の茎頂は、比較的高い温度の凍害防御剤溶液中にある。先にも議論したように、凍害防御剤として用いたDMSOは植物組織に対して毒性を有しており、解凍後これを取り除く必要がある。これまでの茎頂の凍結保存の報告では、液体培地で洗うことにより茎頂から凍害防御剤を除く方法 (41, 99, 108)、全く洗浄せずに自然に培地中に拡散させる方法または濾紙等に直接置床し自然に吸い取らせる方法 (119) などが取られている。解凍直後の茎頂はそれを構成する細胞の膜に多少なりとも障害があると考えられ、凍害防御剤を取り除くために洗い過ぎることはかえって害があることが指摘されている (115)。本実験で用いたCPWはその主成分は CaCl_2 であり、プロトプラスト培養における洗浄液として有効性が確認されているものである。菅原ら (91) によれば、 Ca^{2+} イオンは凍結解凍後の細胞膜に作用してその障害の修復に作用又は障害の進行を防止すると考えられている。本実験でその有効性が確認できなかったのは、茎頂は培養細胞に比べれば数多くの細胞から構成されている複雑な構造を有するため、培養細胞におけるような明らかな効果が見られなかったと考えられる。今回は洗浄液の温度は室温とし特に注意を払わなかったが、Finkleら (24) は、サトウキビとイネの培養細胞の凍結後、 22°C で洗浄した方が 0°C で洗浄した場合より生存率が上がったことを報告している。この結果は凍害防御剤の毒性を避けるためには、必ずしも低温で処理することがよいとは限らないことを示している。また解凍直後の再培養における光条件は、キク茎頂の生存シュート再生に全く影響しなかった。Henshawら (35) はジャガイモの茎頂を超急速冷却法で凍結後、20または 25°C 、 $0\sim 4000\text{lux}$ 下で培養し、どの条件下でもシュート形成が起こったことを報告している。解凍直後にキク茎頂は褐変し、組織に何らかの障害があることが窺えるが、これは弱光下でも回避できず、特にシュート形成率に差がなかったことからこの障害回復に対して光は関与しないと考えられる。

第6節 摘 要

2段階凍結法によるダイアンサス、キク茎頂の凍結保存法の確立について検討した。

1. 細胞膜浸透型の凍害防御剤であるDMSO、EG、グリセリンは単独で効果があり、細胞内に浸透しないグルコースは単独では効果が認められないが、低濃度のDMSOと組み合わせると効果が認められた。キクは

DMSOに対して高い感受性を有し、15%以上の高濃度で処理するとカルスの発育が劣り、10%で処理した茎頂からの再生シュートの葉に異常な形態形成を引き起こした。

2. 凍結後のキク茎頂を生存させるためには、2日間の前培養が不可欠であったが、前培養培地中へのDMSOの添加は不可欠な条件ではなかった。
3. ダイアンサスでは -40°C まで緩速冷却した後液体窒素に浸漬すれば、冷却速度が $0.1\sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の範囲でいずれもほぼ100%の茎頂が生存した。緩速冷却終了温度と生存率との関係から、ダイアンサス茎頂では、 $-20\sim -25^{\circ}\text{C}$ の間に、その後の急速冷却中に細胞内に障害が発生しない程度にまで凍結脱水が進むことが明らかとなった。一方キクでは $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -40°C まで緩速冷却の後、液体窒素に浸漬すると最も高い生存率が得られた。植氷により緩速冷却中の凍結培液の過冷却が回避でき、安定した生存が得られた。
4. 高い生存率を得るためには、茎頂を液体窒素から急速に解凍することが不可欠であり、緩速解凍した場合は著しく生存率が劣った。

第2章 Vitrifaction (ガラス化) 法による凍結保存

Vitrification (ガラス化) 法は、前章で議論した2段階凍結法とは異なり、高張な凍害防御剤の溶液で処理し材料を浸透的に脱水した後、直接液体窒素に浸漬して急速に冷却し、氷晶の形成を伴わない準安定なガラス状態にして超低温で保存しようとするものである。

Vitrification法による凍結保存はマウス胚での成功(68)以来、植物に対しても適用性が検討され、すでにいくつかの成功例も報告されている(47, 48, 58, 79, 104, 109, 120)。本法では毒性が低い高濃度の凍害防御剤の組成とその処理法、茎頂の前処理法、解凍後の洗浄法などが重要であると考えられている(78)。本章ではSakaiら(79)により報告されたvitrificationの培液を用い、本研究で取り扱ったダイアンサス、キク茎頂に対する適用性を検討した。

第1節 Vitrifaction法による茎頂の凍結

本節では、Sakaiらのvitrificationの培液を用いて、茎頂の前培養、凍結培液への処理法、解凍後の洗浄法などを検討し、vitrification法による凍結法の確立について検討した。

1. Vitrifaction培液への処理時間の影響

Vitrification法においては、急速冷却に先立つ茎頂からの浸透的脱水を高張な凍結培液への処理時間によってコントロールしている。ここでは常温下での処理時間の影響を検討した。

材料および方法

切り出したダイアンサスの茎頂をシロ糖0.5M (17.1%)を含むダイアンサス用培地に1日間前培養した後、1mlのvitrification培液(Sakai et al, 1990 以下PVS2, Table 11)の入った1.8mlクライオチューブに入れ室温下(23~27℃)で数分間置き、液を取り替えて最終的に液量を0.5mlとし、液体窒素に直接浸漬した。茎頂をPVS2に浸漬してから液の取り替えをはさんで最終的に液体窒素に浸漬するまでのPVS2への処理時間を3, 5, 10分間に変えてその効果を見た。解凍は温水中で急速解凍とし、その後1.2Mシロ糖溶液で薄め、1.2Mのシロ糖液で2回洗った後通常のダイアンサス用培地に置床した。1区10~15個の茎頂を供試し、5回反復した。

Table 11. Components of vitrification solution (PVS2 Sakai et al 1990)

DMSO	15%	w/w
EG	15%	w/w
Glycerol	30%	w/w
in MS medium containing 0.5M sucrose		

結 果

PVS2処理中、肉眼的には茎頂になんの変化も認められなかった。クライオチューブ中のPVS2は液体窒素に浸漬後も透明のままであった。ダイアンサス茎頂は、PVS2の処理時間3~10分の間では、生存率は59~69%と差は認められなかったが、シュート再生率は処理時間5, 10分間で約40%となり3分間処理の11%余りに比べ高くなった(Table 12)。

解凍直後の茎頂は2段階凍結法の場合と同様に一度白化し、生存している茎頂は数日内に膨大した。その後のシュート再生の様相は2段階凍結法と同様であったが、生存した茎頂の約半数が、シュートの再生を伴わない白色カルスに発達した。

以上よりダイアンサス茎頂はvitirfication法によっても凍結保存が可能であることが明らかとなった。しかし解凍後の茎頂のシュート再生率は、2段階凍結法によって凍結したものに比べて低い値であった。

Table 12. Effects of exposure times to PVS2 on the survival and shoot regeneration of dianthus shoot tips.

Total exposure time (min)	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
3	59.7	11.4
5	69.2	39.1
10	62.3	40.3

2. 茎頂の前培養の効果

前項でPVS2処理時間は5分で十分であったが、シュートの再生率に関しては2段階凍結法に比べて劣った。これまでのvitrificationの報告の多くは、何らかの前培養をした後凍結することで高い生存率もしくはシュート再生率を得ている。ここでは、前培養とその培地中の糖濃度がシュート再生率を高めるかどうかを検討した。

材料および方法

ダイアンサス茎頂を、通常のダイアンサス用培地およびシヨ糖濃度を0.5Mとした同培地に0, 1, 2, 3日間前培養した後、PVS2の処理時間を5分間として液体窒素に直接浸漬した。解凍後は両種とも1.2Mシヨ糖溶液で2回洗浄して、ダイアンサス用培地に置床した。1区当たり15個の茎頂を供試し、4～6回反復した。

結 果

いずれの処理区でも解凍後の茎頂の生存が確認された。しかし0.5Mシヨ糖を含んだ培地およびダイアンサス用培地で前培養した区は、生存率、シュート再生率ともに明らかに低下し、前培養せずに凍結した区で最も高い生存率とシュート再生率が得られた (Table 13)。このことから前培養自体は不可欠な条件ではないことが明らかとなった。

Table 13. Effects of preculture medium and preculture duration on the survival of dianthus shoot tips frozen by vitrification.

Preculture medium*	Duration (day)	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
0.5M sucrose	1	62.2	34.1
	2	50.2	35.2
	3	27.8	6.6
Normal	1	90.6	39.4
	2	61.1	21.1
	3	56.0	3.4
	0	92.3	50.9

* Normal medium : 1/2MS medium supplemented with 0.1mg/l, BA, 0.5mg/l NAA and 20g/l sucrose. 0.5M sucrose : The concentration of sucrose was changed to 0.5M/l (171g/l) in the normal medium.

3. 洗浄液のショ糖濃度の影響

Vitrification法においては解凍後、高張な凍結培養液で浸透的に脱水されている茎頂に障害を発生させることなく復水させる必要がある。ここでは、解凍後の洗浄液の糖濃度の影響を検討した。

材料および方法

前項でダイアンサスの茎頂をvitrificationで凍結する際、前培養は不可欠な条件ではなかったもので、ここではこの作業を省略した。切り出した茎頂の乾燥を防ぐためダイアンサス用培地に置床しておき、実験に用いるだけの数が揃ったところでPVS2で5分間処理した後、液体窒素に直接浸漬して凍結した。解凍後、0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2Mのショ糖溶液で2回洗浄し、ダイアンサス用培地に置床した。1区当たり15個の茎頂を供試し、5回反復した。

結 果

解凍後滅菌水で洗浄した茎頂の生存率は約20%と低く、多くはわずかな白色カルスを形成するにとどまった。洗浄液のショ糖濃度が0.4M以下の区では、生存率が33~36%, シュート再生率が8~18%と低かったのに対し、0.8M以上では生存率63~91%, シュート再生率43~53%と高くなった (Table 14)。

Table 14 Effects of sucrose concentration in the dilution medium on the survival of dianthus shoot tips frozen by vitrification.

Dilution medium	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
0.1M sucrose	34.2	18.1
0.2M sucrose	32.8	15.8
0.4M sucrose	35.8	8.1
0.8M sucrose	63.3	42.5
1.2M sucrose	91.3	53.4
Control	19.5	3.0

4. キクに対するVitrification法の適用性

前項までにダイアンサス茎頂では、vitrification法によって凍結保存が可能であることが明らかとなった。キク茎頂に関しては前章で、2段階凍結法で生存を得るには前培養が不可欠な要因であることが明らかとなっている。ここでは前項で得られたダイアンサスでの最適条件を、前培養したキク茎頂に適用できるかどうかを検討した。

材料および方法

キクの茎頂をショ糖濃度を0.5Mに変更したキク用培地に2日間前培養した後、先のダイアンサスと同様の方法で凍結した。この時PVS2に処理する時間を5, 10, 15分間とした。解凍後は1.2Mショ糖溶液で2回洗浄してキク用培地に置床した。

結 果

解凍後のキク茎頂は、2段階凍結法の場合と同様、置床後間もなく褐変した。生存した茎頂は、数日のうちに茎頂の一部より緑色を回復し、緑色のカルス状の組織へと発達した。PVS2の処理時間が、5ないし10分では生存率は7~10%と低かったが、15分間処理では64%と2段階凍結法に匹敵する生存率が得られた (Table 15)。シュート再生率も同様の傾向を示し、PVS2の処理時間が長いほど高くなった。

Table 15. Effects of exposure time to PVS2 on the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips

Total exposure time (min)	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
5	6.7	0
10	9.9	6.5
15	63.9	31.8

Excised shoot tips were precultured on MS medium supplemented with 0.1mg/l BA, 1.0mg/l NAA and 0.5M sucrose for 2 days and then were treated with PVS2 for 5 to 15 min. followed by immersion into LN₂.

第2節 考 察

前章でダイアンサスおよびキク茎頂の凍結保存について検討した2段階凍結法では、緩慢冷却の過程で凍結培養液が植水により先に凍結し、その結果凍結脱水により茎頂の含水量は漸減する。その後の急速冷却過程では、茎頂内に残った水はガラス化(vitrification)すなわちamorphous glassとなり氷晶を形成しないか、または非常に細かい氷晶を形成し、細胞に害を起さないと考えられている(77)。すなわち2段階凍結法では、凍結培養液は凍結しており、茎頂内はガラス化していることになる。一方vitrification法では、高張な凍結培養液とこれによって浸透的に脱水された茎頂を急速に冷却することにより、凍結培養液、茎頂共にガラス化していることになる。Vitrification法では氷晶が形成されないため、細胞内における氷晶の形成による害を回避できる。この過程を達成するには、細胞毒性の低い高濃度の凍害防御剤の組成、適度な浸透脱水を得るための処理方法、解凍後の高張液の薄め方、さらには前培養など植物材料側の条件などがその成否を決定すると考えられている(78)。

これまでにvitrification法によって凍結が報告されている例は、アスパラガスの培養細胞と体細胞胚(109)、ライムギのプロトプラスト(48)、キャベツの培養細胞(47)、オレンジの珠心細胞(79)、ミントの茎頂(104)、ホワイトクローバーの茎頂(120)、ナシの茎頂(58)などであり、いずれも2段階凍結法で高い生存率が得られている種である。用いられた凍結培養液は、DMSO、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、エチレングリコールなどで、唯一エチレングリコールを共通項とするほか、組み合わせや濃度割合は研究者によってまちまちで、7~8M程度の溶液を用いている。本章ではSakaiらの培養液を用いたが、この溶液が常温から液体窒素に直接浸漬することによりガラス化することは、この溶液をいったん-196℃まで急速に冷却した後10℃/minで昇温した際、示差熱分析により-115℃でガラス転移点を示し、-75℃で融点を示すことより確認されている(79)。

この高張液の処理法としては、浸透圧ショックを避けるため低温下で数回に分けて徐々に濃度を増す方法が取られることがある(47, 48, 104)が、今回用いたSakaiらの培養液では直接常温で処理しても生存が得られた。本法では、高張液による浸透的脱水の制御は処理時間の長短によっており、ダイアンサスでは3分ではやや不足で5分で十分となったが、キクでは15分間が必要であった。この処理時間は植物によって異なり、同じ培養液で処理してもホワイトクローバーの茎頂では25℃5分間又は0℃15分間処理がよく(120)、オレンジ珠心細胞では25℃3分間で(79)、さらにナシの培養シュートの茎頂では90分がよいとされている(58)。これらの違いは、2段階凍結法における緩速冷却速度と緩速冷却終了温度の最適条件が種によって異なるのと同様、細胞からの水のぬけにくさが種によって異なるためと考えられる。

アスパラガスの培養細胞(109)では凍結する前に0.4Mシュクロースを含む培地で前培養することで、またホ

ワイトクローバーの茎頂(120)では1.2Mソルビトールを含む培地で2日間前培養することにより高い生存が得られている。一方オレンジ珠心細胞(79)では前培養が不可欠ではなかった。本実験で用いたダイアンサスでも前培養は必要なく、長期間の前培養は、前培養培地の組成にかかわらず生存率の低下をもたらした。第1章でも議論したように前培養の意義は第1に切り出した直後の茎頂のキューリングにあると考えられ、ダイアンサスの場合には基本的に必要ではない。またキクでは、2段階凍結法において生存を得るためには前培養が不可欠な要因であったため、本章でも前培養を行い、その組成は既往の報告に従いショ糖濃度を0.5Mとした培地を用いた。糖を含む培地での前培養は、穏やかな浸透的脱水がその主な作用と考えられるが、糖の種類による影響や、DMSOとの比較など詳細な検討はなされていない。Vitrification法により、より高い生存率とシュート再生率を得るため、今後前培養培地の組成ならびに前培養期間等を検討する必要がある。

解凍後の洗浄液のショ糖のモル濃度は極めて重要であり、0.8M以上のショ糖濃度の溶液で洗浄した場合のみ高い生存率が得られた。解凍後に低張な溶液で洗浄すると生存率が低下することは、vitrification法で凍結した培養細胞でも認められている(47)。これらの原因は、解凍後の組織は高張液の中で浸透的に脱水された状態にあり、低張な溶液で洗浄することで急激に復水させると障害が発生するものと考えられている(77)。

以上より、vitrification法によりダイアンサス、キク茎頂の凍結保存が、基本的には可能であることが明らかとなったが、その生存率、シュート再生率は2段階凍結法と同等かやや劣った。しかし、このvitrification法はプログラムフリーザーを必要とせず、短期間で処理が完了する点など2段階凍結法より優れた点もあり、今後更に生存率の向上を計るため、諸条件の詳細な検討を進める必要がある。

第3節 摘 要

1. Vitrification法によるダイアンサス、キク茎頂の凍結保存を検討した。
2. Sakaiらの凍結培液にダイアンサスでは3分、キクでは15分間処理することにより高い生存率が得られた。
3. ダイアンサス茎頂における前培養は、生存を得るための不可欠な条件ではなく、前培養期間が長くなると生存率は低下した。
4. Vitrification法によって凍結されたダイアンサス、キク茎頂の生存率、シュート再生率は、2段階凍結法のそれより低かった。

第3章 茎頂の採取時期・材料と凍結保存性

植物の凍結保存の成否は、凍害防御剤、凍結・解凍方法ばかりでなく、材料の植物自身の生理的狀態によっても影響されと考えられる。本章では茎頂の凍結・解凍に対する反応の季節的变化を明らかにすると共に、比較的高温条件下で培養されている無菌植物から得た茎頂の凍結方法を検討した。

第1節 凍結保存性の季節変化

これまで茎頂の凍結保存の可能性が報告された植物は、13科20種にわたり、必ずしも寒冷地に起源を持つ植物ではない。切り出した組織または器官が凍害防御剤の存在下で、しかも制御された条件の中で凍結・解凍後も生存する性質と、植物が生育適温より低い凍らない程度の低温に対して生存できる耐低温性や、氷点下の気温に対して何らかの防御策を自ら講じて耐える耐凍性などとは、かなり異なった性質と考えるべきである。そこで本論文では、凍害防御剤処理をして凍結・解凍後に生存する性質を凍結保存性と呼び、耐低温性、耐凍性とは区別することにする。前章までにダイアンサスは凍結・解凍後高い生存を示すことを明らかにしたが、この植物が自然界で高い耐凍性を持つわけではない。凍結保存性は基本的に凍結される植物の生理的狀態、中でも細胞膜の特性に依存していると考えられる。リンゴなどの冬芽の耐凍性には明らかな季節変動が認められ、凍結保存性にも季節変化が報告されている(40)。本研究で用いたダイアンサスの茎頂では、凍結・解凍後に明らかな季節変化が見られないことは経験的に知られていた。一方予備試験で、キクにおいては夏半期に結果が安定せず、季節変化がある可能性が認められた。このため本節では主にキク茎頂の凍結保存性ならびに耐低温性に季節変化があるかどうかを検討すると共に、キク挿し穂に対する冷蔵の効果も検討した。

1. ダイアンサス、キク茎頂における解凍後の生存率の季節変化

材料および方法

無加温室内の光中断下で栽培しているキクの母株より若いシュート周年にわたり採取した。第1章で得た方法により茎頂を凍結・解凍して、生存率とシュート再生率を調査した。また同様にダイアンサス茎頂を4月、8月、12月に採取し第1章で得た方法で凍結解凍した。

結 果

凍結・解凍後のキク茎頂の生存とシュート再生率には明らかな変動が認められた。12、1月に得た茎頂では凍結・解凍後の生存率はほぼ100%と高く、逆に7～9月では特に低く、他の月ではほぼ80%であった。シュート再生率は12、1月で安定して高く、他の月ではバラツキが認められ、7、8月で特に低くなった(Fig. 10)。1年間の平均は、生存率79.6%、シュート再生率43.3%であった。一方ダイアンサスの茎頂は、どの月に採取しても100%生存しシュートを再生した(Table 16)。

Table 16 The survival and shoot regeneration of dianthus shoot tips excised and frozen in different seasons.

Time of excision	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
January	100	100
April	100	100
August	100	100

以上のことから、キクの凍結保存性には季節的変動があるが、ダイアンサスではないことが明らかとなった

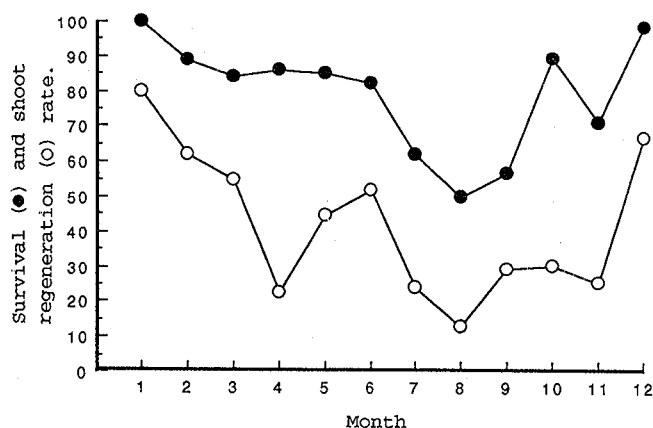


Fig 10 Seasonal changes of the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips frozen by 2 step freezing method.

2. キク茎頂の耐低温性の季節変化

前項でキク茎頂の凍結・解凍後の生存には明らかな季節性が認められた。しかしこれは、茎頂の生理的变化によって凍結・解凍過程で茎頂の受ける障害の程度が異なるためなのか、それとも凍結・解凍とは無関係に茎頂培養自体における再生能力が変化したためか、さらには凍結に到るまでに遭遇する低温による障害の発生が季節的に異なるのかは判然としない。そこで、通常の茎頂培養を周年にわたって行なうと共に、実際に茎頂を低温にあわせて低温に対する反応の季節変化の有無も検討した。さらに凍結した茎頂と同様に、茎頂を切り出した後一定期間前培養し、低温にあわせてその反応を見た。

材料および方法

周年にわたりキク茎頂を切り出しキク用培地に置床し、半数はただちに5℃暗黒下に移して30日間冷蔵した後から、残り半数は置床直後から通常の培養条件下で60日間培養し、生存率とシュート再生率を調査した。

また前培養の効果を確認するため、5月下旬から6月上旬にかけてキクの茎頂培養を行ない、半数をただちに、残りを25℃明条件下で15日間前培養の後5℃暗黒下で冷蔵し、冷蔵後30, 60, 90, 150, 210日後に取り出し、再び25℃明条件下で60日間培養した。

さらに有効な前培養期間を確かめるため、同時期に茎頂培養したキク茎頂を一部はただちに、残りは25℃明条件下で2, 5, 10, 15日間前培養の後5℃暗黒下に30日間冷蔵し、再び25℃明条件下に移して培養した。

結 果

茎頂を切り出したただちに25℃明条件下で培養したものは、若干のバラツキは認められるものの生存率、シュート再生率に明確な季節的変動は認められなかった (Fig 11)。期間中の平均生存率は90.2%で、シュート再生率は76.5%であった。一方置床直後に5℃暗黒下に移し30日冷蔵した後、25℃明条件下に移した茎頂の生存率およびシュート再生率は、年により変動パターンが若干異なるが夏半期に比べて冬半期に明らかに高く、明確な季節変動が認められた。ただし再生したシュートの生育には季節による差は認められなかった。

6月にキクの茎頂を冷蔵前に25℃で15日間前培養すると、生存、シュート再生に対し著しい効果が認められた。すなわち6月に茎頂培養しすぐに冷蔵した茎頂の生存率、シュート再生率は共に低かったが、明条件下で15

日間前培養の後に冷蔵した茎頂は高い生存率とシュート再生率を示し、冷蔵日数が210日までは冷蔵期間に関係なく高い生存率を示した (Fig. 12). 貯蔵中にシュートは若干ずつ生長し、210日間冷蔵終了時には黄化したシュートがすでにかなり伸長していた。

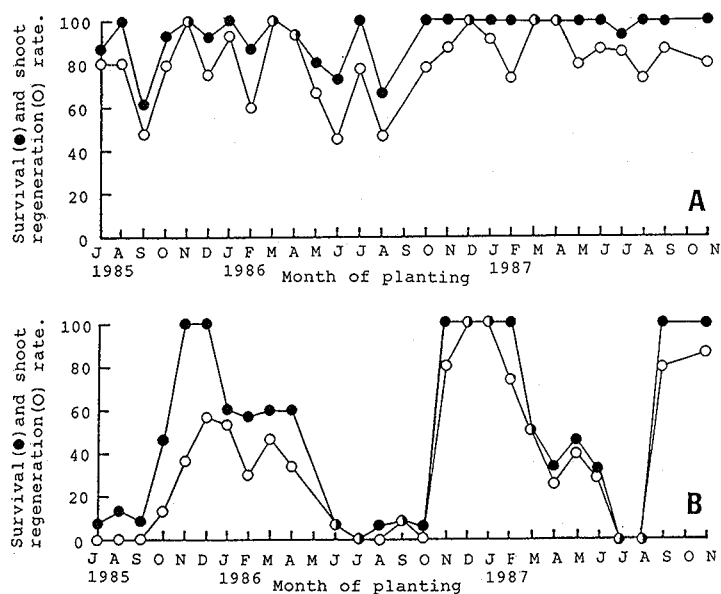


Fig 11. Seasonal changes of the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips with or without cold storage. A : Excised shoot tips were incubated at 25°C under constant light of 1500 lux. B : Excised shoot tips were stored at 5°C for 30 days just after placing on the medium and then transferred to the normal condition same as A.

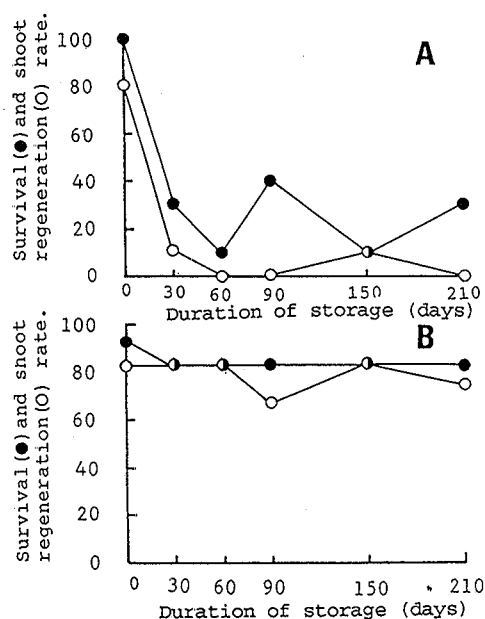


Fig 12. The survival and shoot regeneration of the chrysanthemum shoot tips after various days of cold storage. A : The shoot tips were stored at 5°C without preculture. B : The shoot tips were stored at 5°C after 15 days of preculture at 25°C.

以上のように夏半期に採取した茎頂でも、25℃での前培養期間を設けると冷蔵後も高い生存率を示したが、その前培養期間は2日間でも有効であり、10日間以上行なうと冷蔵後の再培養下でのシュートの生育が、より短い前培養後に冷蔵された茎頂のそれより優れた (Table 17)。

以上の結果、キクの茎頂は通常の茎頂培養においては生存率およびシュート再生率に明確な季節的変動は認められず、茎頂自体のシュート再生能には季節性はないことが明らかとなった。一方置床直後に低温にさらすと夏半期で生存率およびシュート再生率が低下したが、冬半期ではこの低下が認められなかった。このことから25℃培養では認められない茎頂の季節的な生理的変化、すなわち夏半期の茎頂は低温に遭遇すると障害を受けることが明らかとなった。またこの夏半期の置床直後の低温による生存率の低下は、前培養によって回避できた。

Table 17. Effects of preculture on the survival and shoot regeneration rates of chrysanthemum shoot tips after 30 days of cold storage.

Duration of preculture (days)	After 60 days of culture at 25℃		
	Survival (%)	Shoot regeneration (%)	Plant height (mm)
0	23.1	23.1	6.2 ± 1.0
2	100	100	7.5 ± 1.3
5	100	92.3	7.2 ± 1.8
10	100	92.3	19.6 ± 3.2
15	100	100	16.1 ± 3.0

Shoot tips were stored at 5℃ for 30 days after various duration of preculture at 25℃. After storage shoot tips were incubated at 25℃ for 60 days. Planting date : 31th May.

3. キク挿し穂の冷蔵効果

第1項で得たキク茎頂の凍結・解凍後の生存率、シュート再生率の季節変動は、母株の栽培中の気温の季節変化と関係があると考えられた。そこで夏期に採取した挿し穂を冷蔵処理することにより、凍結・解凍後の生存率、シュート再生率が高まるかどうかを検討した。

材料および方法

無加温温室で栽培しているキク母株より7～8月に5回にわたり挿し穂を採取し、ビニール袋に入れ0℃暗黒下に貯蔵した。2週間後に取り出し茎頂を摘出し、5%DMSOを含むキク用培地で2日間前培養の後、第1章で得た方法により凍結・解凍した。また冷蔵終了日に母株より得た茎頂も同様に凍結・解凍した。

結 果

冷蔵した挿し穂の茎頂は、切り出した時点および前培養中は、対照の茎頂と外見上差はなかった。冷蔵した挿し穂由来の茎頂は、解凍後の緑色を回復するのが対照の茎頂に比べて早かった。最終的な生存率、シュート再生率も対照の茎頂に比べて高くなり、明らかに挿し穂冷蔵により凍結保存性の向上が認められた (Table 18)。

Table 18. Effects of cold storage of cutting taken in mid-summer on the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips frozen in LN₂.

Treatment	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
Cold storage	95.0	54.4
Control	59.1	28.6

The cutting were taken in mid-summer and stored at 0℃ for 2 weeks. Shoot tips were excised from the cuttings and precultured on the medium containing 5% DMSO for 2 days. The shoot tips were cooled at a rate of 0.2℃/min. to -40℃ prior to immersion into LN₂.

第2節 無菌植物を材料とした凍結保存

前節までの茎頂はすべて無加温温室で栽培されている母株より得たものであり、茎頂培養の過程で微生物汚染の発生が低率とはいえ避けられない。このため一度無菌植物を確立した後ここから茎頂を採取すれば、この微生物汚染の危険は大幅に低下すると考えられる。しかし培養条件下で育てられた植物は、温室等で育てられている植物と比べてその生理的状态が大きく異なると考えられ、これまでと同様の条件で凍結保存が可能であるかどうかは検討を要する。本節では、キク、ダイアンサスの無菌植物を材料として、これまで得た方法の適用性を検討した。

1. 外植体のサイズと採取部位の影響

無菌植物を確立する際、茎頂から出発していれば、それらの植物のウイルス汚染を問題にする必要はなく、凍結材料として茎頂を用いる必要はない。さらに無菌条件下で育てた植物のシュートは細く、その茎頂は温室で育成したものとは比べて著しく小さく、取扱が困難である。しかも無菌植物を材料としても手作業により茎頂を摘出する際、再び微生物に汚染される危険がある。このため外植体には、クリーンベンチ内で容易に切り出せるシュートの節組織を用いることとした。ここでは腋芽を含む節の組織のサイズとシュート上の節位の影響を検討した。

材料および方法

茎頂培養由来のダイアンサス無菌植物をハイポネックス培地で節培養しながら維持して材料に供した。展開葉1対を含む節を新しい培地に移植し、7～9週間後に伸長した新しいシュートの上位より2節を取り出し、葉身部を切除の後腋芽を含む長さ2あるいは5mmの節部茎組織を切り出し外植体とした。また同時に、対照としてこれら無菌植物の茎頂約0.3mmを切り出し凍結した。これら外植体を10%DMSOと3%グルコースを含んだ凍害防御剤溶液と共に、0.1～0.5℃/minの冷却速度で-40℃まで冷却の後液体窒素に浸漬した。温水で急速解凍の後ダイアンサス用培地に置床し、40日間培養し、生存率とシュート再生率を調査した。

また節の移植後10週目のシュートを用い、最上展開葉の節よりシュート基部に向かって1, 3, 5, 7節目を、また7週間後のシュートを用い、同様に上位から1, 2, 3節目を採取して長さ2mmの外植体を調整し、その節の位置を区別して同様に凍結・解凍した。

結 果

凍結を行わないで、ダイアンサス用培地に置床した節組織は、その大きさに関係なく、すぐに100%の腋芽が伸長してシュートとなり、やや遅れて外植体の茎の切り口から白色のカルスが増殖し、培養60日後にはそのカルスから発根が認められた。

凍結解凍後の5mmの節組織は35～47%が生存した。生存した節組織は、いったん全体が白色化し培養1週間以内に外植体両端の茎の切り口付近の組織の一部が緑色を回復、そこからカルスの形成が起こった。その後カルスは生長し発根が認められたが、培養60日後までにシュートの再生は全く観察されなかった。

2mmの節組織の場合は95%以上が生存し、5mmの節同様解凍後全体が白色化したがまもなく組織の大部分が緑色を回復し、切り口付近からカルスの形成が起こった。培養60日後までにはカルスから根の形成が認められると共に26～33%の節組織でシュートの再生が観察された (Table 19)。また対照とした無菌植物の茎頂は、100%生存しシュートを再生した。

Table 19. Effects of explant size and cooling rate on the survival and shoot regeneration of the nodal segments of in vitro grown dianthus

Explant size (mm)	Cooling rate (°C/min)	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
5	0.1	47.4	0
	0.2	42.7	0
	0.5	34.7	0
2	0.1	94.6	25.9
	0.2	96.5	32.5
	0.5	97.4	27.3

シュート上の節位に関しては、10週齢のシュートを用いた場合、上位節が下位節に比べて、解凍後の回復が早く生存率も高かった。またシュートの再生は、部位による有意差が認められず32～72%であった。一方7週齢のシュートでは上位3節の間に有意差が認められず、生存率は100%。シュート再生率は42～60%であった (Table 20)。

Table 20. Effects of shoot age and the node position on the survival and shoot regeneration of nodal segments of in vitro grown dianthus

shoot age*	Position**	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
10weeks old	1	100	71.7
	3	100	32.1
	5	96.1	50.6
	7	59.7	36.8
7weeks old	1	100	60.1
	2	100	59.5
	3	100	41.8

*Shoots were propagated by nodal cutting. The age of the new shoots was taken as the number of weeks after planting nodal segments.

**The top node which had fully expanded leaves was numbered position 1

以上の結果、ダイアンサス無菌植物の節組織は、外植体のサイズを小さくすれば第1章で得た方法で凍結・解凍後も生存が得られることがわかったが、シュートの再生に関しては茎頂に劣ることが明らかとなった。またシュート上の部位に関しては、上位3節を用いればシュートの齢による差は認められず、以下の実験では5-6節を有したシュートの上位3節を用いることとした。

2. 腋芽に対する障害発生温度域

ダイアンサス培養シュートの腋芽を含む節組織は、第1章で得られた方法で凍結・解凍すると、生存率はほぼ100%となるものの、シュートの再生率が低かった。ここでは外植体のうち特に腋芽が凍結過程のどの温度域で障害を受けるかを明らかにした。

材料および方法

前項と同様の方法で植氷の後0.5°C/minで冷却し-5, -10, -15, -20, -25, -30, -35°Cに達した時点で半数はただちに、残り半数は液体窒素に浸漬した後、急速解凍した。解凍後ダイアンサス用培地に植え付け、

60日後にシュートの再生を比較した。

結 果

緩速冷却の途中で順次液体窒素に浸漬していくと、 -15°C より高い温度で浸漬したものは全く生存しなかったが、 -25°C より浸漬温度が下がる程生存率およびシュート再生率共に高くなった。

液体窒素に浸漬せずに順次解凍した場合は、いずれの冷却温度区も最終的な生存率はほぼ100%で、差は認められなかった。しかし解凍後の組織がいったん白色化した後、緑色を回復するのに要する時間は解凍温度が高いほど短く、シュートの再生の早晩も同様な傾向を示した。最終的なシュート再生率は、冷却温度が下がる程低くなったが、特に -25°C 以下で急速に低下した (Fig 13)。

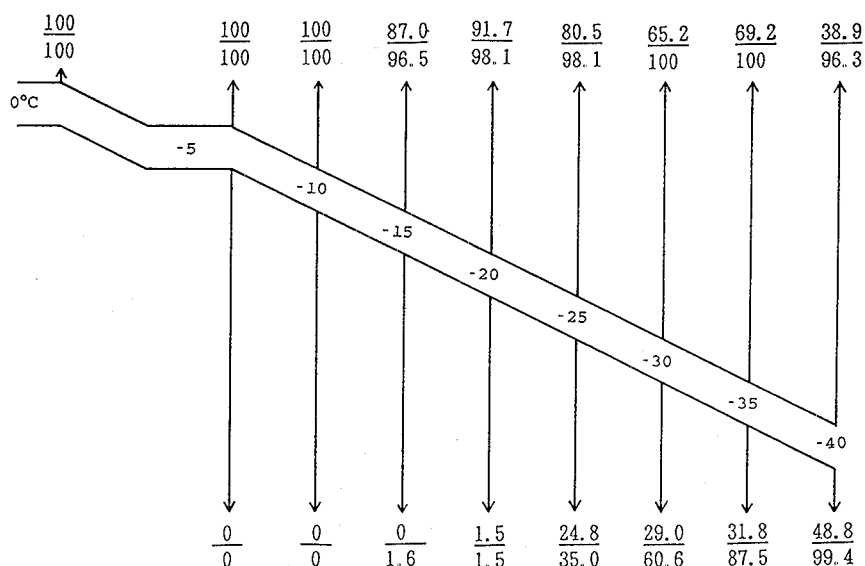


Fig. 13. Damage causing temperature in the process of slow cooling. The nodal segments of dianthus were cooled at a rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from 0 to -40°C and were thawed rapidly or immersion into LN_2 at various temperatures.

The figures in the graph refer to : $\frac{\text{Shoot regeneration rate (\%)}}{\text{Survival rate (\%)}}$

以上のことから、節組織は茎頂と同様、液体窒素に浸漬後100%の生存を得るためには、 -40°C まで緩速冷却を続ける必要があることが明らかとなった。しかし液体窒素に浸漬後に生存が得られる程度まで緩速冷却するとその段階ですでに節組織の腋芽は傷害を受けることが明らかとなった。

3. 前培養および凍害防御剤中の糖の効果

前項までの結果は、戸外で栽培されたダイアンサス茎頂と同様の条件で凍結・解凍すると、in vitroで育成した同植物の節組織では高いシュート再生率が得られないことを示した。カーネーションの無菌植物茎頂の凍結保存において、前培養培地中の糖濃度が解凍後の茎頂のシュート再生に対して重要であるとの報告がある(18)。ここでは、シュート再生率の向上を目的として前培養中のショ糖の効果を検討すると共に、凍害防御剤中の糖濃度の効

果について検討した。

材料および方法

前項と同様の方法により調整した2mmの節組織を、0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2Mのショ糖溶液に1日間前培養した後、前項と同様の方法で凍結・解凍した。また凍害防御剤中の糖濃度をグルコース3%から、0.4M (7.2%) および0.8M (14.4%) に変更した防御剤溶液で同様の凍結を行った。

結 果

前培養中の糖濃度が高くなるほど節組織の生存率は低下した。特に0.8Mまたは1.2Mショ糖液に前培養した組織は解凍後まもなく白化し、ほとんど生存しなかった。またシュート再生は水で前培養した区でのみ安定して観察され、濃度に関係なくショ糖液で前培養すると著しく低下した (Table 21)。

Table 21. Effects of sucrose concentration in the preculture medium on the survival and shoot regeneration rates of nodal segments of dianthus.

Sucrose conc.	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
0	94.4	38.6
0.1 M	92.7	7.0
0.2 M	80.2	7.1
0.4 M	55.7	0
0.8 M	42.1	0
1.2 M	0	0

The stem segments (2mm) were dipped in various concentrations sucrose solution for 16 hours and then were cooled at rate of 0.5°C/min. until -40°C followed by immersion into LN₂.

グルコース濃度を高めた凍害防御剤を用いた場合、生存率はいずれの区もほぼ100%であったが、シュート再生率は20~23%と改善は見られなかった (Table 22)。

Table 22. Effects of glucose concentration in the cryoprotectant solution on the survival and shoot regeneration of nodal segments of dianthus.

Cryoprotectant solution	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
DMSO 10% Glucose 3%	99.4	48.8
DMSO 10% Glucose 0.4M	100	23.0
DMSO 10% Glucose 0.8M	94.7	19.8

以上の結果より、高濃度の糖による前培養はダイアンサス節組織の凍結保存性の向上には効果がなく、さらに凍害防御剤中の糖濃度を高めてもシュート再生率は高まらないことが明らかとなった。

4. 低温によるハードニングの効果

無菌植物は通常25℃前後の恒温状態で培養されることが多く、これらを凍結の材料とした報告では、低温 (0~4℃) に一定期間さらした後凍結を行う方法が取られている例が多い (45, 71, 72)。ここでは、このハードニングの効果について検討した。

材料および方法

ダイアンサス無菌植物を培養器ごと1℃暗黒下に0, 1, 4, 12日置いた後, 前項までと同様の方法で外植体を調整し, 凍結・解凍した。

結 果

いずれの処理区から得た節組織も対照区(0日区)と同様, 凍結・解凍後の生存率は100%, シュート再生率は45~49%で, ハードニングの効果は認められなかった (Table 23)。

Table 23. Effects hardening on the survival and shoot regeneration of nodal segments of dianthus.

Duration of hardenning*	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
0 day	99.4	48.8
1 day	100	44.8
4 days	100	47.6
12 days	100	48.1

* 7 weeks old cultures were stored for various time at 1℃ under dark condition.

5. キク無菌植物の節組織の凍結保存

前項までで, ダイアンサス無菌植物の節組織を用いた凍結保存において, 外植体サイズが生存とシュート再生率に大きく影響したが, 糖による前培養, ハードニングはシュート再生率の改善には有効ではなかった。そこでキクでは外植体サイズを小さくし, 第1章で得られた方法が適用可能かどうかを調べた。

材料および方法

節培養で維持増殖しているキク品種‘秀芳の力’と‘兼六香菊’を供試し, シュートの茎頂と腋芽を含む節組織約0.5mmを切り出した。なおこの時の茎頂とは茎頂の分裂組織を含むと思われる茎の先端部位の組織であり, また節はシュート上の上位数節を供試した。5%DMSOを含んだキク用培地に2日間前培養の後, 0.2℃/minで-40℃まで緩速冷却の後液体窒素に浸漬した。温水による急速解凍の後キク用培地に置床し, 60日後生存率とシュート再生率を調査した。

結 果

両品種ともin vitroの植物由来の茎頂は, 生存率80~95%と母植物由来の茎頂と同程度であったが,, シュートの再生率は10%前後と低く多くはカルスを形成したのみであった。一方節組織は生存率自体が8.8~24%と低く, 生存した組織はすべてカルス化し, シュートの再生は全く認められなかった (Table 24)。

Table 24. Responses of different cultivars of in vitro grown chrysanthemum to cryopreservation.

Cultivar	Portion	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
Shuhounotikara	shoot tip	80.0	10.0
	nodal segment	23.8	0
Kenrokukougiku	shoot tip	95.0	8.8
	nodal segment	8.8	0

以上よりキクもダイアンサスと同様, 第1章で得た方法により無菌植物の組織の生存は得られるものの, シュートの再生率は母植物の茎頂を凍結した場合より劣ることが明らかとなった。

第3節 考 察

植物の耐寒性や耐凍性と、原産地との間には深い関係があることは多くの植物で認められている(76)。しかしこれまでに茎頂の凍結保存の可能性が報告された植物は、必ずしも耐寒性、耐凍性の高い植物ばかりではない。本実験で用いたダイアンサス、キクはともに雑種起源ではあるが、いずれも温帯に生育する植物に由来しており、冬季は地上部の大部分は枯れ込み、地際部で節間伸長をしない、いわゆるロゼット状態のシュートを形成する温帯性の宿根草である。ところが取り出した茎頂の凍結保存性は、両種で著しく異なった。第1章でも見たように、ダイアンサス茎頂は高い凍結保存性を示し、無加温室で栽培した母植物を用いた場合はその凍結保存性に季節的变化は認められなかった。一方キクでは、凍結保存性に明らかな季節性が認められ、夏の高温期に採取した茎頂では、生存率、シュート再生率共に、低温期に採取した茎頂より劣った。キクの茎頂自身の形態形成能を比較するため、周年にわたって茎頂培養を試みたところ、シュート再生率に季節変動は認められず、茎頂の分裂組織の形態形成能自体は、25℃で培養するかぎり季節の変動を示さなかった。また高温期の茎頂は切り出した直後に低温にさらされると著しく生存率が低下したが、これは前培養によって回避された。細胞又は組織が、凍結を伴わない程度の低温に急にさらされることにより発生する障害をコールドショックと呼ぶ。Morrisら(53)は、サイコモアカエデの培養細胞を通常の培養温度から様々な温度にまで急冷すると著しい生存率の低下が見られることを明らかにし、このコールドショックは変温の速度、変温の幅が大きいほど激しいことを示した。本研究のキク茎頂の場合、夏の高温期にはコールドショックを受けやすく、切り出した直後の茎頂は大きな傷害部分を有するため特に感受性が高く、前培養によって一定の治癒がなされるとこれを回避することができるものと考えられる。

一方キク茎頂の凍結保存性に関しては、2日間の前培養を行ってから凍結しているにもかかわらず季節変動が認められた。また高温期に採取した挿し穂を0℃で2週間冷蔵するとその茎頂の凍結保存性がいくらか回復した。先の結果より、キク茎頂の凍結保存性の季節変動は、茎頂自体の再生能力の変化や、コールドショックの感受性の問題ではなく、外気温の変化に伴って変化する凍結保存性にかかわる細胞の生理的要因が存在していること示している。Katanoら(40)によれば、リンゴの冬芽から取り出した茎頂は水だけで-15℃以下にまで緩速冷却すれば液体窒素に浸漬しても生存するが、この性質は萌芽1ヵ月前すなわち外気温が-2.5~0℃以上になると失われはじめ、5月以降では10%DMSOを用いてもリンゴの茎頂は-10℃の凍結に耐えない。これまでに茎頂の凍結保存が報告されている中でも、ナシ、ブドウでは材料が冬芽に限られ、高温期に活発に生育しているシュートの茎頂では生存が得られない。これらのことは、凍結保存性には凍害防御剤処理によって改善しうる要因と共に、季節により変動する植物の生理的特性による要因も存在することを示している。江沢ら(23)によれば、凍結保存性の増した冬季の茎頂では、形態的には液胞の小胞化が観察され、生体内成分に関しては糖の増加が認められそのパターンが凍結保存性の増大パターンと一致したとされている。第1章でも議論したように、凍害は細胞膜の構造または機能破壊によると考えられるが、凍結保存性が増大する過程で細胞膜がどのように変化するのかに関する情報は未だに少ない。吉田(121)によれば、分離した細胞膜ではハードニングした後に細胞膜の磷脂質脂肪酸の含量が増加すること、膜蛋白質組成が変化することを認めているが、これら細胞膜の蛋白質や脂質の量的質的变化が、凍結時の膜の安定性にどうかかわっているかは不明であるとしている。

以上より凍結保存の実施にあたっては、ダイアンサスに関しては季節を考慮する必要はないが、キクに関しては冬季の茎頂を用いることが望ましいと考えられる。

無菌の材料を凍結に用いることは、微生物汚染がないこと、その無菌植物が茎頂培養により確立されたものであればウイルス汚染も回避できていること、さらに先に述べた季節に関係なく作業ができる点など優れた点が多い。しかし無菌植物は概して小さく、そこから茎頂の様な小さな外植体を取り出す作業は容易ではなく、この作業中に再び微生物汚染の生じる危険性がある。そこで本研究では実用的見地から、茎頂の代わりに作業の容易な節組織を外植体を選び凍結条件を検討した。

無菌植物は25℃恒温で培養されており、これらの植物の細胞の生理的状態は温室で栽培している母株のものとは異なるのではないかと考えられた。しかし第1章で得られた方法により凍結・解凍すると、ダイアンサス、キクともに無菌植物の節組織では母株の茎頂同様高い生存率が得られた。

ダイアンサスの無菌植物から茎頂部約0.3mmを切り出し凍結したところ、圃場栽培の母株から得た茎頂と同様100%生存し、シュートを再生した。しかし、無菌植物から得た節組織の凍結においてはシュート再生率は茎頂に比べて低く、その際外植体の大きさが決定的な要因であった。ダイアンサス5mmの節組織はその両端の一部の組織が生存したに過ぎなかったが、2mmでは大部分の組織が生存し、シュートの再生も認められた。外植体がある一定の大きさを越えると、同一の凍結条件で凍結した際生存率が低下してしまうことはジャガイモの茎頂でも認められている(35)。外植体のサイズが大きいとその表面積に対する体積の比が大きくなり、均一な脱水が得られにくくなること、さらにその際に生じる温度勾配が大きくなることなどから、同一の条件でもある一定のサイズ以上の外植体では高い生存率が得られなくなるものと考えられる。2mmの節組織は、0.5℃/minで-25℃まで冷却して液体窒素に浸漬するとわずかながら生存が認められ、-40℃まで緩速冷却しなければ液体窒素に浸漬後高い生存は得られなかった。一方緩速冷却の途中で順次解凍した場合、解凍温度が低くなるに従い解凍後の緑色の回復が遅れそれと共にシュートの再生も遅れて-25℃以下になると80%以上のシュート再生率は得られなくなった。このことは十分な脱水を得るためには、母株の茎頂と同様-40℃付近まで緩速冷却する必要があるが、脱水過程で腋芽部位がすでに何らかの傷害を受けることを示している。外植体を作業上不都合のない程度まで大きくしても、組織全体が生存できるような凍結方法の開発は、今後の課題である。

Dereuddera(18)はin vitroで育成したカーネーション品種ユーローの2ヵ月齢のシュートの茎頂ならびに節組織を凍結し、上位5節以下の節組織でシュートの再生が著しく劣ることを明らかにし、これを頂芽優勢と関連した腋芽の生長抑制の影響であろうとしている。本研究で供試した10週齢のシュート上では下位節の腋芽の凍結・解凍後の生存は上位節のものより劣り、上位1～3節では有意な差がなかった。これらのことは無菌植物と言えども、シュート上に生理的勾配があることを示しており、材料の選択には注意を要する。

In vitroで育成した材料を用いた凍結保存の報告では、凍結に先立つ低温処理(45, 71)や、高濃度の糖を含む培地での前培養(18)、さらに低温に代わるものとしてABA処理(13, 62, 69)をしている例などがある。Seibertら(84)はカーネーション茎頂の凍結保存に先立ち、母植物を4℃で3日間ハードニングすることにより生存率が高まったとしている。しかしダイアンサスの無菌植物では、12日間までの低温処理によってもシュート再生率は向上しなかった。またDereuddera(18)は、in vitroのカーネーションの茎頂および腋芽を0.75Mショ糖で一晩前培養した後、5%DMSOと0.75Mショ糖を含む凍害防御剤と共に凍結することにより100%近いシュート再生率を得ているが、本研究で用いた材料では高い糖濃度の培地による前培養は却って生存率の低下をもたらした。凍害防御剤中の糖濃度を上げて高いシュート再生率は得られなかった。この違いの原因は明らかではないが、本研究では糖の前培養にショ糖溶液を用いたが、彼らは所定の濃度のショ糖を含む寒天培地で行ったことも一因と考えられる。さらに彼らの用いたカーネーション品種ユーローは矮性品種であり、おそらくin vitroで育成した同品種の植物体は極めて小さく、用いた外植体はかなり小さいものと考えられ、単純な比較はできない。

第4節 摘 要

本章では、茎頂の凍結・解凍に対する反応の季節的変化を明らかにすると共に、比較的高温条件下で培養されている無菌植物から得た茎頂の凍結・解凍方法を検討した。

1. ダイアンサスではいずれの時期に採取した茎頂でもほぼ100%生存しシュートを再生した。一方キクでは凍結・解凍後の生存率、シュート再生率に明らかな季節変動が見られ、夏期に低く、冬期に高くなる傾向があった。切り出したキク茎頂自体の形態形成能には季節変動はなかった。夏期に切り出された茎頂は摘出直後に低温にさらすとコールドショックを受けたが、これは前培養によって回避された。夏期に採取したキクの挿し穂を0℃で2週間冷蔵後茎頂を摘出し凍結すると同時期の茎頂に比べて凍結保存性が向上した。
2. In vitroで育成したダイアンサスの節組織は、外植体を5mmにして凍結・解凍すると一部の組織しか生存しないが、2mmにするとほぼ100%が生存したものの、シュートの再生率は茎頂より劣った。キクでも同様にin vitroの材料では、生存率は圃場の母株より得た茎頂同様に高いものの、シュート再生率は劣った。

第4章 凍結・解凍した茎頂のシュート再生

凍結・解凍した茎頂が生存していることだけでなく、引き続き安定したシュートの再生がみられることが、植物遺伝資源の凍結保存の確立にとって不可欠の条件である。前章までにダイアンサス、キク茎頂の凍結条件を基本的に明らかにした。母株由来の茎頂を2段階凍結法で凍結・解凍した場合、茎頂からのシュート再生は、ダイアンサスでは安定して高かったが、キクではシュートを再生せずカルス化するものも認められた。本章では、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた観察により、ダイアンサス、キク両種の凍結・解凍後のシュート再生の初期過程を比較検討した上で、さらにシュート再生率の低いキクについて、凍結・解凍後の茎頂からのシュート再生に及ぼす培地の影響を検討した。

第1節 解凍後の茎頂のシュート再生過程の形態観察

第1章で凍結・解凍したダイアンサスの茎頂はほぼ100%シュートを再生したのに対し、キクの茎頂はしばしばカルス化しシュートの再生を伴わないものが見られた。ここでは、解凍後の茎頂におけるシュート再生の初期過程を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

材料および方法

凍結前、解凍直後、培養3日から2週間後まで茎頂を順次採取し、FAA (ホルムアルデヒド：酢酸：50%エタノール = 5 : 5 : 90) で固定した。試料はエタノール・アセトンシリーズで脱水後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥の後、イオンコーターで金蒸着した。検鏡は走査型電子顕微鏡日立 S-501B または S-800 により行った。

結 果

切り出した直後のダイアンサスの茎頂は、その大きさにより1ないし2対の葉原基を有していた。厳密に1対の葉原基だけが確認できるものは横径で0.2mm程度であり、1対の葉原基の内側に次の葉原基が確認できる程度では横径0.5mm程度縦径0.6mm程度となり、外側の葉原基が縦方向に伸長し、内側にもう1対の葉原基が形成されたものでは更に縦径が0.8~1mm程度と大きくなる。本実験ではできるだけ0.5mm程度のものを選んで供試した。

凍結せずにダイアンサス用培地に置床した場合、置床1週間後には切り出したときに存在した外側1対の葉原基が1mm程度に伸長し、次の葉原基がドームと共に確認できた (Fig. 14-3)。しかし最外部の葉原基はそれ以上伸長せず、2週間後には次の葉原基がすでに2mm程度に伸長し、その先端部には多数の気孔が確認できた。また同時にこの時期にすでに腋芽の発達を観察される茎頂が多かった (Fig. 14-4)。

ダイアンサスの茎頂を凍結した場合、解凍直後の茎頂には組織の崩壊や傷は全く認められず (Fig. 14-2)、intact な茎頂 (Fig. 14-1) と全く変わりがなかった。培養1週間後では、切り出した際にあった外側の1対の葉原基は肥厚し次の葉原基が確認できたが (Fig. 14-5)、これらの先端部には萎縮した部位が認められる茎頂が多く、これらの葉は先端が2つに分れる独特の形に発達した。2週間後では最外部の葉原基は葉身に対して横方向には肥厚したが、縦方向にはほとんど伸長せず、さらに1対または2対内側の葉原基が伸長を開始していた (Fig. 14-6)。この時、外側の葉原基の腋芽と思われるシュートもしばしば茎頂の側部より発達しているのが観察された。

キク茎頂の場合、切り出し直後の茎頂 (約0.7mm) は約2枚の葉原基を有しており、その背軸側 (abaxial side) にはすでに多数の毛が確認された (Fig. 15-1)。

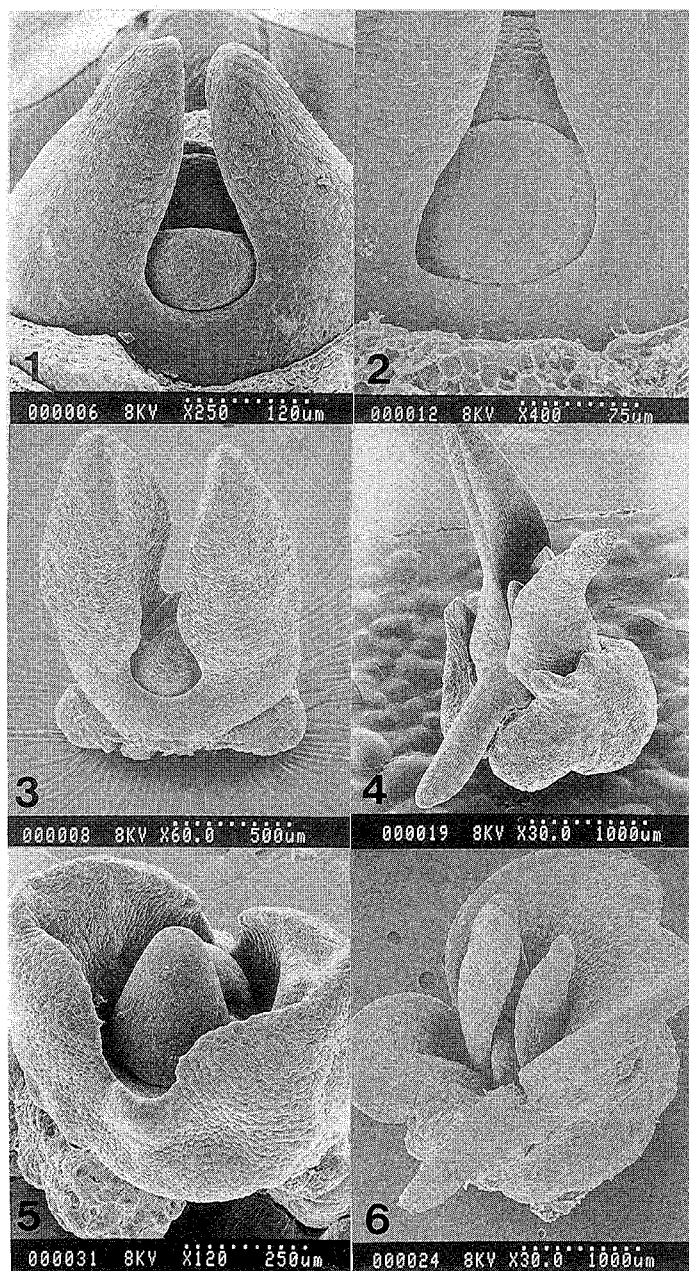


Fig. 14 Micrographs of the dianthus shoot tips.

1. An unfrozen shoot tip immediately after excision.
2. A shoot tip immediately after thawing.
3. An unfrozen shoot tip cultured 1 week.
4. An unfrozen shoot tip cultured 2 weeks.
5. A thawed shoot tip cultured 1 week.
6. A thawed shoot tip cultured 2 weeks.

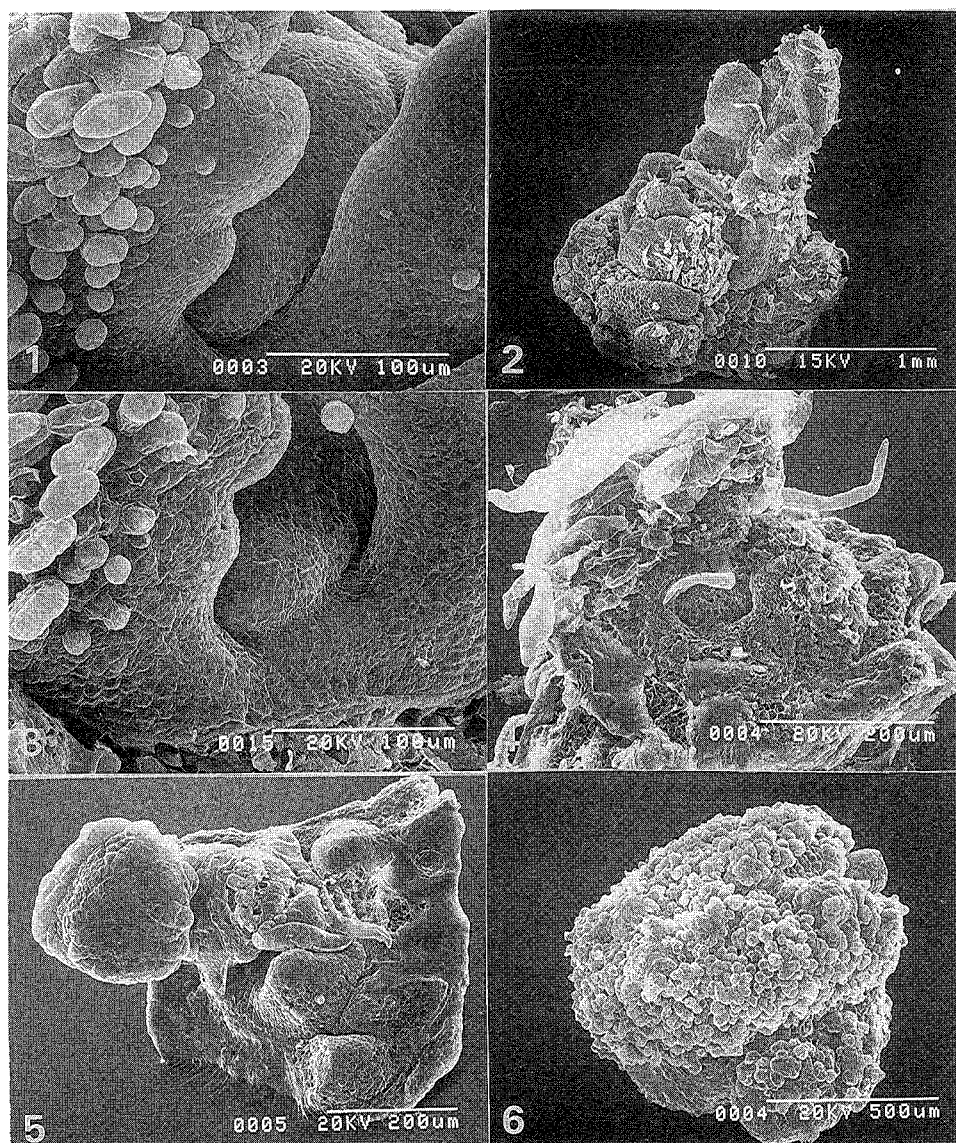


Fig. 15 Micrographs of the chrysanthemum shoot tips.

1. An unfrozen shoot tip immediately after excision.
2. An unfrozen shoot tip cultured 20 days.
3. A shoot tip immediately after thawing.
4. A dead shoot tip recultured 10 days.
5. A viable shoot tip recultured for 20 days.
6. A viable shoot tip recultured for 20 days.

凍結解凍を行なわない場合、切り出した際に有していた外側1枚の葉原基は肥厚するにとどまり、さらに1枚内側の葉原基が正常に発達を開始し、培養3週間後には肉眼でも確認できる欠刻を有した正常な葉に発達した (Fig 15-2)。この時、葉縁にはすでに多数の気孔も確認できた。

凍結解凍のために DMSO 5%を含む培地で前培養したキク茎頂は、2日間の前培養期間中には茎頂の再生長は認められず、切り口にもカルスの再生は全く認められなかった。

解凍直後のキクの茎頂は全体として大きな組織の崩壊は認められなかったが、葉原基、ドーム表面には細かいシワが多数認められた (Fig 15-3)。死んだ茎頂はそのまま萎縮した (Fig 15-4)。一方生存した茎頂は、再生の過程でドームまたは葉原基の一部より表層構造を保った滑らかな表面を持つ組織の一部が膨れ再生長するもの (Fig 15-5)、脱分化し表面が粗のカルス状組織を形成するもの (Fig 15-6)、またその両方を有するものに分れた。第1章でも見たように、生存した茎頂はカルスを発達させながら生長し、その内50~60%でシュートの再生が認められた。この間、カルスはなめらかな表層を保った部分と脱分化した粗面の部分がモザイク状となり、シュートがいずれの部分に起源するかについては特定できなかった。肉眼観察によれば、いったんカルス化したと思われる茎頂からも、培養期間の経過と共にシュートを再生するものが認められた。

以上より解凍後のダイアンサス茎頂では、ほとんど全体が生存しており、本来の茎頂ドームまたは腋芽由来の定芽のシュートが発達することが明らかとなった。一方キクでは、生存部位は限られており、再生したシュートには不定芽的であるものが含まれ、その由来は特定できなかった。

第2節 キク茎頂のシュート再生に及ぼす培地条件の影響

前章で凍結・解凍後のキク茎頂は生存はしているが、しばしばシュート再生に至らないことが認められた。これは、キク茎頂では凍結・解凍によって本来の茎頂分裂組織が正常な形態形成を行えない程度の障害を受けた可能性を示している。こうした障害の程度が大きいと思われる組織から形態形成を導くには、通常の茎頂培養とは異なった培地が要求されるかも知れない。そこで本節では、解凍後のキク茎頂のシュート再生率の向上を目的として、培地中のサイトカイニンの種類と濃度、アンモニア態窒素の影響を検討した。

1. 培地中のサイトカイニンの影響

組織からのシュート再生には、培地中のサイトカイニンの種類、濃度が強く作用することは広く認められている。解凍後のキク茎頂を、3種類のサイトカイニンを添加した再培養培地に置床し、生存率およびシュート再生率に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

キク‘秀芳の力’と‘アプリコットマーブル’の2品種を用い、第1章で得た方法により茎頂を凍結・解凍した。解凍後の茎頂は、キク用培地のサイトカイニンを BA, Zeatin, 4PU それぞれ0.1または1.0mg/lとした培地に置床し、生存とシュートの再生を比較した。

結 果

両品種とも茎頂は解凍後1度褐変したが、間もなく緑色を回復した。茎頂の生存率は、いずれの培地上でも83~100%と高く、凍結・解凍後のキク茎頂の生存に関して再培養培地中のサイトカイニンの種類と濃度による差は認められなかった (Table 25)。

一方シュートの再生は、サイトカイニンの種類と濃度による差が認められ、その傾向は品種によって異なった。すなわち‘秀芳の力’では、すべての処理区でシュートの再生が観察されたが、BA 1.0mg/l または Zeatin 0.1mg/l 添加区で、対照としたキク用培地である BA 0.1mg/l 区よりシュート再生率が高かった。またその後の茎葉の発達程度は Zeatin 0.1mg/l 区で最も優れた。ただし第1章でも述べたように、再生シュートの多くは水浸状の異常形態を示し、培地による差は認められなかった。一方‘アブリコットマーブル’では、BA を添加した区でのみ正常なシュート再生が起こり、他区ではほとんどカルス化するがシュートは再生されてもその発達は極めて貧弱であった。

Table 25. Effects of cytokinin in the reculture medium on the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips.

cv.	Cytokinin (mg/l)		Survival (%)	Shoot regeneration (%)
Shuhounotikara	BA	0.1	86.6	60.0
	BA	1.0	96.7	96.7
	4PU	0.1	90.0	40.0
	4PU	1.0	83.3	26.7
	Zeatin	0.1	90.0	87.5
	Zeatin	1.0	80.0	30.0
Apricot marble	BA	0.1	100	71.4
	BA	1.0	93.8	93.8
	4PU	0.1	100	0
	4PU	1.0	98.3	0
	Zeatin	0.1	100	20.0
	Zeatin	1.0	100	14.7

以上の結果より、培地のサイトカイニンの種類と濃度は解凍後の茎頂の生存には作用しないが、その後のシュート再生には大きく作用すること、またその作用には品種間差があることが明らかとなった。用いた両品種で高いシュート再生が得られた培地は、BA と NAA を組み合わせて添加したものだけであった。

2. 培地中のアンモニア態窒素の影響

培養細胞の凍結保存において、解凍後の再培養培地中のアンモニア態窒素が、解凍直後の細胞の活性回復に対し阻害的に働くことが報告されている(46)。キク茎頂は、再培養初期にはかなり褐変することが観察され、解凍後かなりの障害を受けているものと考えられた。そこでここでは、培地中のアンモニア態窒素成分を除いた培地における解凍後のキク茎頂の生存とシュート再生をキク用培地との間で比較検討した。

材料および方法

本研究で用いた MS 培地は、 NH_4NO_3 を 1650mg/l 含んでいる。第1章で得た方法によりキク茎頂を凍結・解凍し、 NH_4NO_3 を除いたキク用培地と除かないキク用培地とに置床し、生存とシュートの再生を比較した。

結 果

いずれの培地に再培養した茎頂も解凍後いったん褐変し、引き続き培養するうちに緑色を回復した。生存率は 82~90%, シュート再生率は 48% と培地中のアンモニア態窒素の有無による差は見られなかった (Table 26)。しかし NH_4NO_3 を除いた培地上に再生したシュートは淡緑色を呈し、明らかに通常のキク用培地で再生したものより生育が劣った。

Table 26 Effects of NH_4NO_3 in the medium on the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips

NH_4NO_3	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
with	81.7	48.1
without	89.8	47.9

* with : normal MS medium contained 1650mg/l NH_4NO_3
 without : NH_4NO_3 was omitted.

第3節 考 察

植物遺伝資源の凍結保存において、保存した茎頂が必要に応じて解凍後速やかに植物体を再生し、実用に供えられることは不可欠な条件である。このためには、凍結・解凍後の茎頂が高率でシュートを再生することが前提となる。

本研究で用いたダイアンサス、キクともに基本的にシュートの再生能力は凍結・解凍後も保持されていた。これまでに報告された茎頂の凍結保存の例でも、茎頂の形態形成能は程度の差はあれ保存されており、解凍した茎頂が全くシュート再生能力を欠くといった報告はまれである。これは茎頂の持つ高い分裂組織活性によるものであり、茎頂が優れた生殖質保存の材料である理由の一つである。しかしこれまでの報告では凍結・解凍後の茎頂はしばしばカルス化することが指摘されており(115)、さらに再生したシュートが本来の茎頂ドームに由来するものであるかどうかはほとんど確認されていない。植物遺伝資源の保存の目的からして再生した植物は true-to-type でなければならず、カルスを経て再生した植物にはソマクローナル変異の発生の危険性がより増すと考えられる。第1章で見たように、ダイアンサスではシュートの再生率がほぼ100%であったのに対し、キクでは生存した茎頂の約半数がシュートの再生を伴わずカルス化した。これは基本的に凍結・解凍によって受けた傷害の程度が両種で異なるためと考えられ、このため解凍後のシュート再生の過程を詳細に観察しておく必要があると考えられた。

SEM による形態観察は、両種における凍結・解凍によって受ける障害の程度と引き続くシュート再生の様相が大きく異なることを明らかにした。すなわちダイアンサスの場合、凍結・解凍後も茎頂の大部分が生存しており、通常の茎頂培養と同様、本来のドーム由来および腋芽由来の定芽的シュート形成が起こっていた。ただし、再生長の開始における多少のラグタイムの存在と、主として1番外側の1対の葉原基の先端部位に見られた萎縮した組織の存在などから、茎頂が全く凍結・解凍の影響を受けていない訳ではなかった。Seibert ら(84)は、カーネーションの茎頂を低温下でハードニングした後に液体窒素直接浸漬法によって凍結した場合、葉原基は解凍後に死ぬが、茎頂先端部の分裂組織のみは生存すると報告している。凍結・解凍後の傷害の程度は、凍結方法により大きく異なると考えられるので、彼らの用いた超急速冷却法における茎頂の生存率の低さは、その方法における傷害の程度が2段階凍結法より大きいことを示している。さらに彼らの実験は比較的大きな茎頂を用いているので、葉原基の大部分が枯死したとも考えられる。実際の茎頂培養で摘出される茎頂の大きさにはかなりバラツキが見られ、種によっても茎頂の大きさや、葉原基の大小は異なる。このため今後の課題として、凍結したときの茎頂の大きさと受ける障害の程度、さらにはそれらの茎頂のシュート再生の様相との関係を検討しておく

必要であろう。

一方キクの場合は、生存している組織は茎頂全体から見れば小さな部分であり、そこから再生する過程で表層を維持しながら再生する場合と脱分化した組織を形成する場合が認められた。しかし SEM による経時的連続観察には限界があり、最終的に再生してきたシュートが本来のドーム又は腋芽由来であるのか不定芽由来であるかは判断できなかった。解凍後の茎頂からのシュート再生の可否は茎頂が受けた障害の程度により決まり、生存組織がある程度より小さくなると生存部分が再生しても正常な形態形成が起こらずカルス化するにとどまると考えられた。Haskins ら(33)はエンドウの茎頂の凍結・解凍後の組織観察を行い、本研究でのキク同様、生存組織がかなり限られた部分であり、しかも葉原基の組織にあることを報告している。また Grout ら(32)はジャガイモの茎頂について同様の観察を行い、解凍後の茎頂表層の細胞に多くのダメージを認めたものの生存した茎頂から 8 割程度のシュート再生を認め、植物体再生に対しては本来の茎頂構造が維持されていることが不可欠な条件ではないと結論している。

植物の器官、組織などからシュートの再生を誘導する場合、培地中のオーキシシンとサイトカイニンの種類および濃度が強く作用することは広く認められている。茎頂は頂端分裂組織と葉原基を含み、ある程度体制を有している複合器官である。それでもなお茎頂培養において正常なシュート再生を得るには、培地中への植物ホルモンすなわちオーキシシンとサイトカイニンの単独又は組み合わせでの添加が不可欠な条件であり、ダイアンサス、キクも例外ではない。解凍後のダイアンサス茎頂が通常の茎頂培養で用いられる培地上でほぼ 100% 生存しシュートを再生したのは、その茎頂が前述のように凍結・解凍による障害をあまり受けなかったため、シュート再生に関するホルモンの要求性が通常の茎頂培養の場合と変わらなかったことによる考えられた。また凍結の有無にかかわらず、培養の初期段階で腋芽由来のシュートの発達が観察されたが、これは培地の特性にもよるものと考えられた。一方キクでは凍結・解凍後の茎頂は大きな障害を受けており、再培養培地中のサイトカイニンの種類と濃度は茎頂の生存率には全く影響しなかったものの、シュート再生率には大きく作用した。‘秀芳の力’において BA 1.0mg/l 区と Zeatin 0.1mg/l 区で、これまでキク用培地として用いてきた BA 0.1mg/l 区よりシュート再生率が向上した。ただし多量の植物ホルモンの添加によってシュート再生率が向上しても、起源が明らかではない不定芽が多数形成されるならば、その遺伝的安定性には疑問が残る。ソマクローナルバリエーションの発生と培地中のホルモンとの直接的関係は明らかではないが、カランコエの葉片培養系では培地中のサイトカイニン量と増殖された植物の帯化や葉序の乱れの発生率との間には関係があると報告されている(37)。キクの場合、凍結・解凍された茎頂由来の植物からのソマクローナルバリエーションの問題はダイアンサス等に比べるとより留意する必要がある。なお本章で用いた‘アプリコットマートル’については凍結・解凍した茎頂由来の植物を順化、育成して得た花について、その花色の変異よりシュートの起源を第 5 章で再度議論する。

さらに本章の結果は、凍結・解凍したキク茎頂からのシュート再生に関して、サイトカイニンの種類と濃度の作用の様相が品種によって異なることを示した。同じ種内でも品種により、細胞の分裂、不定芽形成、発根などに対する植物ホルモンの要求性が異なることは広く認められている(64)。本章で供試した 2 品種では NAA と BA の組み合わせで安定したシュート再生が得られたが、第 6 章で再び議論するように広く近縁種や多くの品種を 1 度に扱うためには培地の汎用性が求められる。

Withers ら(116)は DMSO を含む培地での前培養もしくは凍害防御剤処理により Brassica の茎頂のカルス化と callused leaf の形成を引き起こすが、その反応は再培養培地中のホルモン成分の組成によって異なるとしている。キク茎頂において DMSO が、再生シュートに異常形態を導くことは第 1 章でも述べたが、凍結・解凍したキク茎頂に見られた水浸状の異常は、再培養培地のサイトカイニン組成の変更では克服できなかった。

解凍後のキク茎頂がいったん褐変することは第1章で述べた。これは本章の形態観察より、解凍後のキク茎頂の大部分の細胞が障害を受けているためと考えられた。Kuriyama ら(46)は凍結・解凍したイネの培養細胞の再培養培地について、アンモニア態窒素が回復期には阻害的に、再生長には促進的に働くことを認め、凍害を受けた細胞はアンモニウムイオンに対し感受性が高いと指摘している。本章の結果は、解凍後のキク茎頂の生存率およびシュート再生率に関して培地中のアンモニア態窒素の有無は影響しなかった。これは培養細胞に比べて茎頂が多細胞により構成されているため、培養細胞で見られた様な明確な反応が現われなかったものと考えられた。

第4節 摘 要

1. 本章では、SEMを用いた観察によりダイアンサス、キク両種の凍結・解凍後のシュート再生の初期過程を比較検討した。さらにシュート再生率の低いキクについて、凍結・解凍後の茎頂からのシュート再生に及ぼす培地の影響について検討した。
2. 凍結していないダイアンサス茎頂は、切り出した際の1番外側の1対の葉原基がある程度伸長し、その次の1対の葉原基が大きく発達してシュートを形成した。解凍後の茎頂は、一番外側の1対の葉原基は肥厚しただけで発達せず、次の1対の葉原基が正常に発達してシュートを形成した。
3. 凍結していないキク茎頂は、切り出した際の1番外側の葉原基は肥厚するにとどまり、次の葉原基が正常な葉に発達しシュートを形成した。解凍後のキク茎頂では、生存している組織は茎頂全体の一部であり、シュートは生存した組織より表層を維持しながら再生するものと、脱分化したカルスを経て再生するものに分れた。
4. 以上より凍結・解凍後に再生したシュートは、ダイアンサスでは定芽的であるが、キクでは不定芽的なものを含むことが明らかとなった。
5. 解凍後のキク茎頂の生存に対して再培養培地中のサイトカイニンの種類と濃度は影響せず、シュートの再生に対しては強く作用したが、その反応は品種によって異なった。

第5章 凍結・解凍した植物の生育と生産性

凍結保存において凍結・解凍した茎頂由来の植物が、解凍後も正常に生育開花、結実すると共に、その植物が遺伝的特性を維持していることが重要である。この遺伝的特性を維持しているか否かを検定するためには、1つには解凍した植物体を生育させその表現型により評価する方法と、他方染色体又はDNAレベルで変異を検討するものがある。DNAレベルでの変異の検討は近年急速に発展している(65)が、現時点において変異の有無を遺伝情報全般にわたり検定することは不可能である。本章では実用的見地から、凍結・解凍後の茎頂由来の植物を凍結していない母株由来の植物と共に栽培し、その生育開花状況を比較検討すると共に、キクのキメラ品種を用いて、茎頂の受けた凍害の程度を再生植物の花色の変化により評価することを試みた。

第1節 凍結・解凍した茎頂からのシュートの再生と順化

解凍後の茎頂のシュート再生に関しては第3章で明らかにしたが、再生されたシュートが *in vitro* で小植物体に生長し、それを順化して圃場に持ち出すことができれば実際に遺伝資源としての利用価値が著しく制限される。これまで凍結・解凍後に *in vitro* で組織より再生したシュートがしばしば生育を停止し、植物体に至らないことがリンゴ、ナシで報告されており(52, 94)、これらの植物での凍結保存の実用化を阻害している。ここではダイアンサス、キクの凍結・解凍後の茎頂から再生したシュートが、ホルモンフリーの培地に移植後も生育し、順化可能な小植物体に引き続き發育していくかどうかを検討した。さらにこれらのシュートを用い、*in vitro* から温室への順化を検討した。

材料および方法

ダイアンサスとキクの凍結・解凍した茎頂としていない茎頂をそれぞれダイアンサス用、キク用培地で60または90日間培養後、肉眼で明らかにシュートの再生を認めた茎頂をホルモンフリーのハイポネックス培地に移植した。移植40日後に生存数、シュートの発達数を調査した。

In vitro で形成された健全なシュートの先端部位をダイアンサスでは展開葉2対、キクでは展開葉3枚で切り取り、半数はオキシベロン粉剤(インドール酪酸0.5%含有、塩野義製薬株式会社)処理の後、メトロミックス350(グレース社、カナダ)を充填したプラグトレイ(200穴)に挿し、トレイ全体をビニルシートで覆い50%遮光した温室内で発根順化を同時に行った。約4週間後順化率、発根状態を調査した。

結 果

ダイアンサスの場合、凍結していない茎頂でも凍結・解凍した茎頂でも、ダイアンサス用培地上で60日間培養している間に、複数のシュートを再生した。これらのシュートは、ホルモンフリーのハイポネックス培地に移植後も100%生存し、正常なシュートとして発達した。1茎頂当たりの発達したシュート数は、凍結・解凍した茎頂で8.5本、凍結していない茎頂で3.5本となり、凍結・解凍した茎頂で多くなった(Table 27)。

キクの場合、凍結していない茎頂はキク用培地上で90日間培養するとほとんど1本のシュートを再生し、その基部にわずかなカルスを形成した。このシュートをホルモンフリーの培地に移植すると、シュート基部より発根し、すべてのシュートはそのまま発達を続けた。一方凍結・解凍した茎頂では、シュートの再生が前項で見たように不定芽的なものを含み、発達したカルスの複数の部位からシュートが再生される場合も認められた。これらのシュートのほとんどはビトリフィ状の異常葉を有していた。この茎頂をホルモンフリーのハイポネックス培地に移植すると、約15%の茎頂において再生シュートが発達せず枯死したが、残りの85%の茎頂ではシュートが発

達し、1茎頂当たり約4本の正常なシュートを形成した (Table 27)。

In vitro で育成したダイアンサスおよびキクのシュート先端部は、温室内で培養土に直接挿し芽することではほぼ100%順化し、その後引き続き小植物体に生育した。4週間後の発根状態はオキシベロン処理の有無にかかわらず良好であった (Table 28)。

Table 27. Shoot development of the frozen and unfrozen shoot tips

Species	% of shoot tips with developed shoots	No. shoots per shoot tip
Dianthus		
unfrozen (n=36)	100	3.5
frozen (n=57)	100	8.5
Chrysanthemum		
unfrozen (n=49)	100	1.2
frozen (n=54)	85.2	4.1

The unfrozen and thawed shoot tips of dianthus and chrysanthemum were cultured in the shoot tip culture medium for 60 or 90 days respectively. Then the regenerated shoots were transferred into Hyponex medium without phytohormone and cultured for 40 days.

Table 28. Acclimatization of in vitro grown shoots derived from the thawed shoot tips.

Species	IBA treatment*	Survival (%)	Root formation (%)		
			very good	good	poor
Dianthus	with	100	100	—	—
	without	100	100	—	—
Chrysanthemum	with	100	100	—	—
	without	100	100	—	—

In vitro derived dianthus shoots with two pair of expanded leaves and chrysanthemum shoots with 3 expanded leaves were planted in artificial soil in a greenhouse

* Half of the shoots were treated with 0.5% indole butyric acid powder before cutting

以上より、ダイアンサス、キクのどちらについても、解凍後に再生したシュートはホルモンフリーの培地に移植することにより、容易に幼植物に発達することが明らかとなった。さらに in vitro で健全に育成したダイアンサス、キクのシュートは直接培養土に挿し芽することにより、発根と順化を同時に行うことが可能であることが明らかとなった。

第2節 凍結・解凍したダイアンサスおよびキクの生長と開花

本節では凍結・解凍したダイアンサスおよびキク茎頂由来の植物を圃場または温室内で実際に栽培し、その生長と開花を母株由来の植物と比較検討した。

1. 凍結・解凍したダイアンサスの生長と開花

材料および方法

2年間液体窒素下で保存した茎頂由来の無菌植物、および通常の茎頂培養由来の無菌植物をハイポネックス培

地で節培養により増殖した。これらの植物のシュートを前項で述べた方法により順化しその後無加温室内で育成した株、および温室内で栽培維持している母株よりそれぞれ挿し芽を得た。1990年9月22日に無加温室内の33×59×15cmのプランターに6株ずつ定植、各区とも2プランターを供試、施肥ならびに灌水は慣行栽培に準じて、生育開花をみた。

結 果

凍結・解凍した茎頂由来の植物および通常の茎頂培養由来の植物は、圃場で維持してきた母株由来の植物に比べて初期生育が優れた。植え付け3か月後の草丈は凍結区、茎頂培養区、圃場母株区でそれぞれ18.2, 19.0, 15.9 cmであり、分枝は6.3, 6.7, 5.0本であった。無加温室での開花期はいずれの区にも差が見られず、4月下旬より始まり5月第2週にピークを迎えた。株当たりの切り花本数は、茎頂培養区で最も多く、凍結区、圃場母株区の順に多くなった。得られた切り花の品質は、茎頂培養区、凍結区で優れ、圃場母株区に比べて60cm以上の長い切り花の割合が多くなった (Table 29)。これら3区において全切り花の平均節数は、茎頂培養区6.8、凍結区6.3、圃場母株区6.6と差が見られないことから、茎頂培養区、凍結区では共に節間伸長が促進されたことを示した。また圃場母株区の花弁には、典型的なウイルス感染の病徴である白い縞が多数認められ (Plate 4)、切り花品質は著しく低かった。

以上の結果、凍結保存した茎頂由来のダイアンサスは正常に生育開花し、その植物には茎頂培養によるウイルスフリー化と同様の効果が期待できることが明らかとなった。

Table 29. Production of cut flowers from the plants derived from cryopreserved shoot tips of dianthus.

Source of plants	Number of cut flowers per plant with stem length of			Total
	>60cm	50cm~60cm	50cm>	
Cryopreserved plants	2.0	4.7	1.1	7.8
Shoot tips culture	2.3	5.0	1.3	8.6
Control	0	3.0	4.4	7.4

2. 凍結・解凍したキクの生長と開花

材料および方法

前項で述べた方法により凍結・解凍した茎頂由来の苗および圃場で維持している母株から挿し芽苗を得、1990年6月16日に50×35×10cmの箱に10株ずつ定植、1区2箱供試し、無加温室内、自然日長下で栽培した。

また同様にして得た凍結・解凍した茎頂由来のシュートを順化した苗約130本を秋に無加温室で栽培し、自然の低温に遭遇させた後翌年春に伸長したシュートから6月4日に挿し芽を得、6月18日に圃場に定植、10日後にピンチし2本仕立とし、以下慣行に従って栽培した。

結 果

1990年の箱植え栽培では、開花日は10月27日前後で、凍結・解凍した茎頂由来の植物と母株由来の植物とで全く差は認められなかった。箱植えのため切り花長、切り花重は小さかったが、開花時の切り花長、葉数、切り花重、舌状花数に関して、両者の間に全く差は認められなかった (Table 30)。

1991年の圃場での栽培結果では、凍結・解凍した茎頂由来の124株の開花日は10月29日前後で、花色の変異は認められなかった。無作為に抽出した20本の平均切り花長は88.5±1.1cm、節数は55.5±0.9で母株由来の植物と

有意差は認められなかった。

Table 30 The cut flower quality of the plants derived from frozen and unfrozen shoot tips of chrysanthemum.

	Date of flowering	Length of flower stem	No. leaves	Weight of flower(g)	No. floret	
					R*	T*
Unfrozen (n=20)	27.2±0.2 Oct.	56.5±0.9	42.9±0.2	31.6±1.1	192.9±3.2	6.1±0.9
Frozen (n=18)	27.1±0.4 Oct.	55.0±1.4	41.1±0.4	32.4±1.2	192.4±3.7	5.6±0.8

* R : ray floret, T : tubrous floret.

第3節 キクのキメラ品種における花色の変異

第3章で、キク茎頂では凍結後生存している部分は組織の一部に過ぎず、茎頂の表層構造を維持してシュートを再生するものと脱分化したカルスを経て再生するものがあることを明らかにしたが、再生過程の形態観察だけでは、再生したシュートの起源を特定できなかった。キクには茎頂の周縁キメラ構造により花色が変化したキメラ品種群があり、これらの植物では茎頂のドーム構造が破壊されるとそれが花色の変化として現われる。また変化した花色の方向性から、再生したシュートの起源が特定できる可能性がある。そこでキクのキメラ品種を用い、凍結・解凍した茎頂由来の植物を温室で栽培し、その花色の変異程度を調査した。

材料および方法

キク‘アプリコットマーブル’の母株より茎頂を切り出し、第1章で得た方法により凍結・解凍した。第3章第2節で得られた結果に基づき、解凍後キク用培地またはBAを1.0 mg/lに変更した2種類の培地で60日間培養し、シュートを再生した茎頂をハイポネックス培地に移植した。その後健全なシュートのみを発達したものから順次前述の方法により順化し、以後無加温室内で栽培した。また凍結を行わない通常の茎頂培養を先の2種類の培地を用いて行ない、それらの再生シュート由来の株も同時に栽培した。これらの植物は、7月にビニルハウス内に移動し、以後自然日長下での季咲きとした。十分花弁が展開し約7割の管状花が開花した花を採取し、1花につき花弁3枚をケント紙に張り付け、花弁表側中央部位の直径6 mmの円内の平均反射光を色測色差計（日本電色工業、ND101-DP型）で測定した。

結 果

ハイポネックス培地上で、凍結・解凍した‘アプリコットマーブル’の1茎頂当たり得られたシュートの数は、再培養培地のBA 0.1 mg/l区で1.5本、BA 1.0 mg/l区で1.4本であった。一方凍結していない茎頂では、培地にかかわりなく1茎頂当たり平均1.7本のシュートが得られた。これらは第1節の方法で順化育成できた。

栽培期間中の植物の生育はいずれの処理区でも均一で、開花日は11月7日頃となり早生化または遅延は認められなかった。なお凍結区の1個体が、斑入り葉を開花時まで展開した。‘アプリコットマーブル’の持つ本来の花色は杏色（アプリコット）であり、花色が変化した個体はすべてピンク色の花を付けた。

凍結していない通常の茎頂培養区では、キク用培地で育成した植物の86個体中1個体のみで分枝の一部にピン

ク花を着けたほかはすべてアプリコット色の花を着けた。また培地の BA 濃度を0.1mg/l から1.0mg/lに変更した培地で育成した植物では、74個体中2個体でピンク花に変わった。以上より通常の茎頂培養では、160個体中2個体で茎頂のキメラ構造が完全に破壊されたことになり、その発生率は1.3%であった。

一方凍結・解凍区では、キク用培地で再分化した植物では35個体中24個体でピンク花に、BA 1.0 mg/l 区では57個体中42個体でピンク花となり、全体の71.7%の個体で茎頂のキメラ構造が破壊された (Table 31)。

Table 31. Variations of flower colour in the plants derived from frozen and unfrozen shoot tips of the periclinal chimera cultivar of chrysanthemum.

Source plants	Cytokinin in the regeneration medium	No plant		
		Apricot (%)	Pink (%)	Total
Unfrozen	BA 0.1	86 (100)	0 (0)	86
	BA 0.1	72 (97.3)	2 (2.7)	74
Frozen	BA 0.1	11 (31.4)	24 (68.6)	35
	BA 0.1	15 (26.3)	42 (73.7)	57

色差計による花卉の色調の平均測定値は、アプリコット色の花ではa値14.0、b値15.9、L値67.0であり、ピンク花ではa値22.1、b値-7.2、L値65.3となり、Fig 16 に示したように同一花色内ではほとんどばらつきがなかった。また実体顕微鏡下で花卉を剥皮観察したところ、‘アプリコットマーブル’では花卉表層にアントシアンと思われる赤色素発現が認められ、花卉内層は明らかに黄色味がかったのに対し、ピンクに変色した個体の花卉の表層では同様に赤色素の発現が観察されたが、内層は完全に白かった。

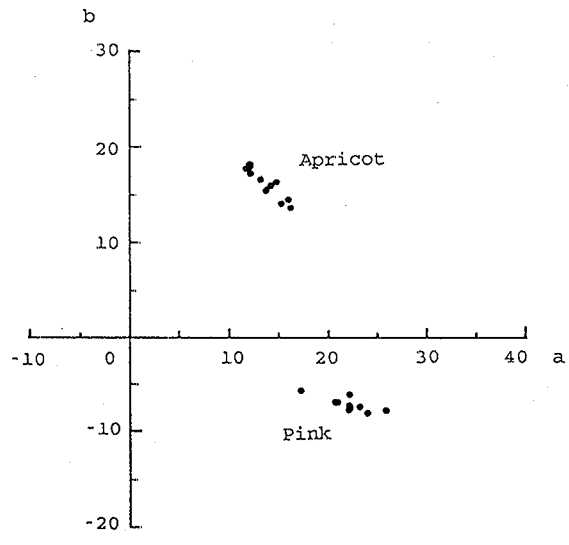


Fig 16. Flower colour of *Chrysanthemum morifolium* cv 'Apricot marble' derived from frozen shoot tips by a colour analyzer.

第4節 考 察

植物遺伝資源の保存の目的は、その植物のもつ遺伝情報を後世に利用可能な形で残すことにある。このためには安定的な生存と個体再生、それに続く植物の正常な生育と開花が保証されなければならない。さらに保存した植物が、その遺伝的情報を正確に維持しているかどうか、根本的な問題として存在している。

茎頂を凍結・解凍した後培養すると、シュートの再生が確認されるが、そのシュートは幾枚かの葉を展開した後それ以上の発達が認められない場合がある。リンゴでは緩速冷却中の $-20\sim-40^{\circ}\text{C}$ の間で茎頂ドームが傷害を受け、解凍後は元々あった葉原基のみ伸長するがそれ以上の葉の展開が認められず、培地中のサイトカイニンを変えることにより葉原基からの不定芽形成を導いている(94)。またナシでも解凍後の茎頂からシュートが生長を続ける割合は極めて低く(59)、これら果樹の茎頂の凍結保存の実用化を阻んでいる。ダイアンサス、キクともに、1度シュートの再生した茎頂では、ホルモンフリーのハイポネックス培地へ移植するとその後もシュートが発達を続け、簡単に無菌植物が確立された。ダイアンサスの場合シュートの再生が定芽的であるにもかかわらず、凍結・解凍した茎頂をホルモンフリーの培地に移した場合の再生シュート数が、凍結していない茎頂の場合に比べて多かった。第4章のSEMによる観察でも明らかにしたように、凍結・解凍により茎頂最外部の葉原基が多少とも障害を受けることによりシュートの発達が阻害され、このことが結果的に頂芽優勢を弱め、腋芽の発達をより促したと考えられた。またキクの場合は、ホルモンフリーの培地に移植後一部で茎頂が枯死したものの、大部分は正常にシュートが発達した。茎頂1個当たりのシュート再生数は、通常の茎頂培養がほとんどモノシュートであったのに対し平均4本とかなり多く、先の形態観察で指摘した起源の明らかでないシュートがかなり含まれると考えられた。また再生初期に認められた水浸状の異常葉は、第1章で述べたように主にDMSOの薬害と考えられ、ホルモンフリーの培地上で発達したシュートには全く認められなかった。

これら再生したシュートは、*in vitro*で健全な幼植物体に発達し、節培養によって容易に増殖できた。*In vitro*で形成された健全なシュートは、ダイアンサス、キク共に順化が容易であり、湿度の保持にさえ注意すれば、シュート先端部を直接温室内で挿し芽して植物体とすることができた。その際発根促進剤の使用は不可欠ではなかった。*In vitro*で得たシュートはしばしば表層のクチクラ層の発達や気孔の機能が悪く、順化中の乾燥に耐えられず枯死する場合や、本来挿し芽増殖が困難な植物で十分な発根が得られない場合があり、低い順化率が問題となっている(64)。この発根順化の過程は、*in vitro*苗生産コストの35~75%を占めることが示され、この過程を可能なかぎり *in vivo*で行うことの重要性が早くから指摘されている(15)。本研究で用いたダイアンサス、キクは本来挿し芽が容易な植物であり、*in vitro*で健全なシュートさえ得られれば、発根順化には問題がなかった。以上のことから、ダイアンサス、キクでは必要に応じて茎頂を解凍してから2か月以内に *in vitro*増殖系が再開でき、さらに順化苗も容易に供給できると考えられた。

凍結・解凍した茎頂由来の植物は、ダイアンサス、キクともに母植物と同様に正常に生育開花した。ダイアンサスの切り花の生産性に関しては、本実験が箱植であったことから切り花の絶対数はやや少なかったが、凍結茎頂由来の植物は圃場母株由来の植物より生産性に優れ、以前報告した温室内地床での結果(27)と基本的に同じであった。また凍結・解凍した茎頂由来のダイアンサスの花卉にはウイルス病斑が認められず、通常の茎頂培養と同様にウイルスフリー効果が期待できた。栄養繁殖性の作物のほとんどがウイルス罹病の問題を抱えており、ダイアンサス、キクの母株をほ場で維持する場合ウイルス汚染はほとんど避け難い。また茎頂培養を行って無菌植物を確立した後 *in vitro*で節増殖している間にも、再汚染の危険は完全には否定できない。植物をクリーンな

状態で保存できる点からも、茎頂は遺伝資源の凍結保存の材料として優れているといえよう。

凍結保存された植物が遺伝的に安定であるか否かについて、これまでに十分な情報は得られていない。この遺伝的安定性が問題となる背景には、近年のマイクロプロパゲーションの進展による大規模な *in vitro* 増殖における多くの培養変異—ソマクローナルバリエーション—の発生がある。培養過程に生じる変異は、植物体の体制を高く保持している節培養等で一般に低く、カルスなど脱分化の過程を含む培養系で高いことが指摘されている(64)。通常の茎頂培養による植物体の再生は、第3章で見たように脱分化の過程を全く含まないことが多く、それだけ再生個体の遺伝的安定性は高いと考えられる。茎頂の凍結保存において、茎頂が凍結・解凍の過程で頂端分裂組織に何らの障害も受けなければ通常の茎頂培養と同様に高い遺伝的安定性が期待できる。すなわち凍結・解凍により大きな障害を受けず、本来のドームまたは腋芽よりシュートが再生するダイアンサスでは遺伝的安定性は高いと予想されるが、キクのように、茎頂からの植物体再生が茎頂の一部から生じるような場合や脱分化したカルスの状態を経てシュートが再生された可能性がある場合などでは、その遺伝的安定性に疑問がもたれる。本研究で用いたダイアンサス‘サクラナデシコ’およびキク‘秀芳の力’の栽培結果において、凍結保存自体の遺伝的安定性を議論するには規模が小さすぎるとはいえ、表現型には大きな変異は認めなかった。

本研究では、キク茎頂が凍結・解凍の過程でどの程度本来の茎頂の体制を維持できるかを明らかにする手段の一つとして、キクキメラ品種の茎頂を凍結・解凍し、そのキメラ構造がどの程度維持されるかを検討した。本研究で用いた‘アプリコットマーブル’は多くの枝変わり品種群で構成されるマーブル系の1品種であり、その花色の発現は花卉表皮にはアントシアニンを含みカロチノイドは含まず、花卉内層にはカロチノイドを含んでいるといった周縁キメラ構造によっている(85)。花卉表層と内層はそれぞれ茎頂のドームの外衣第1層(L1)、第2層(L2)に対応する。このため凍結した茎頂からの再生シュートがドームにおける本来のキメラ構造を維持できなければ、花色の変化となって現われる。すなわち再生した植物が、茎頂のL1に起源すればピンクマーブルに、L2に起源すればそのアントシアニン生成能によりフロリダマーブル(黄色)などに変化すると予想される。

通常の茎頂培養では、花色の変化はわずかに160個体中2個体(1.3%)にすぎず、茎頂のキメラ構造はほとんど破壊されなかった。一方、凍結・解凍した茎頂では、約72%の変異が認められ、変化した花色はすべて本来の杏色からピンクに変化していた。また花卉の剥皮観察では、ピンクに変化したものでは表皮のみにアントシアンの発現が確認でき、花卉内層の色素発現は認められなかった。柴田ら(87)は、アプリコットマーブルの小花培養により不定芽を得、これらL1起源であると考えられる植物はすべてピンクマーブルと同じ色素発現をすることを認めた。Bushら(12)はキクのキメラ品種群であるインディアナポリスを用い、茎頂を Earle らの方法(20)でマルチプルシュートおよびカルスを経てシュートを再生させた場合、すべての再分化植物において茎頂のL2の形質はL1のものに置き変わったこと、すなわちすべてL1起源の植物であることを花色の変異から示した。本研究で、凍結・解凍した茎頂からの再分化植物の多くが本来のアプリコットマーブルの花色からピンクの花色に変化したことは、障害を受けた茎頂から再生した新しい分裂組織は、茎頂のL1起源であることを示している。この結果は、キク茎頂は凍結・解凍後の再生の過程において、茎頂の一部からシュートを再生している場合のあることを先の第4章での形態観察と共に確認したことになる。また再培養培地のBA濃度を0.1mg/lまたは1.0mg/lとしても、ハイポネックス培地上で形成されるシュート数に大きな変化がないことと、花色の変化の程度に変わりはないことから、この程度のサイトカイニンの濃度差は凍結・解凍後のキクの不定芽形成に影響しないことを示している。

以上の結果より、キクにおいては再生植物には不定芽由来の植物が相当数含まれ、実際の遺伝資源の保存と運

用に当たってはこれら不定芽由来植物におけるソマクローナルバリエーションの問題を留意すべきと考えられる。一方本研究の結果は、キメラ品種の花色の変異を用いて、形態観察だけでは難しい茎頂のシュート再生の起源を推定することが可能であることを示した。今後の凍結手法の発展において茎頂のキメラ構造を破壊しない、すなわち茎頂の大部分が生存している凍結法を開発するために、このキメラ品種を用いた検定法は良い指標となるであろう。

第5節 摘 要

凍結・解凍した茎頂由来のダイアンサスおよびキク植物を栽培し、その生育開花と生産性をみた。

1. 凍結・解凍後の茎頂から再生したシュートは、ホルモンフリーのハイポネックス培地に移植することにより容易に幼植物へと発達した。これらは節培養により容易に *in vitro* で増殖でき、さらにシュートの先端部を湿度を保った状態で培養土に直接挿し芽することにより容易に順化できた。
2. 凍結・解凍した茎頂由来のキクは、母株由来の植物と同様に正常に生育開花し、特に変異は認められなかった。
3. 凍結・解凍した茎頂由来のダイアンサスは通常の茎頂培養由来の株と同様、ほ場で維持されていた母株由来の植物に比べて旺盛に生育し、より長い切り花が多く収穫でき、ウイルスフリー化が期待できた。
4. 凍結・解凍したキクのキメラ品種の茎頂由来の植物は、約7割が花色の変化を示し、その方向性から茎頂の外衣第1層由来の植物であることがわかった。

第6章 ナデシコ科およびキク属の近縁種に対する適用性

遺伝資源の保存はその多様性を維持することを目的とするため、保存技術には広い適用性が求められる。本章では前章までに得た最適条件を用い、ナデシコ科とキク属の野生種および園芸品種について茎頂の凍結保存を検討し、さらに液体窒素下での長期貯蔵の可能性についても検討した。

第1節 ナデシコ科の近縁種における茎頂の凍結保存

ナデシコ科は、約75属2000種からなり、とくにダイアンサス属 (*Dianthus*)、マンテマ属 (*Silene*)、カスミソウ属 (*Gypsophila*) が園芸的に重要である。本節ではダイアンサス属を中心として、原種ならびに園芸品種の茎頂の凍結保存を検討した。

材料および方法

ナデシコ科の5属38種・品種 (Table 32) について、茎頂 (0.3~0.7mm) を切りだし凍害防御剤 (10% DMSO と 3% グルコース) と共に0.5mlのストローに封入、0℃で1時間おいた後0.5℃/min で-40℃まで冷却、その後液体窒素に浸漬した。液体窒素下に最低15分間おいた後、温水により急速解凍し、取り出した茎頂を CPW 溶液で3回すすいで、ダイアンサス用の培地に置床した。

結 果

供試したダイアンサス属29種・品種、カスミソウ属3種、リクニス属3種、マンテマ属2種、バッカリア属1種のいずれの種も80~100%と高い生存率を示し、大きな種間あるいは品種間差は認められなかった (Table 32)。凍結・解凍後の茎頂は、いったん退色し、数日中に再び緑化して肥大した。茎頂の基部の切り口付近のみにカルスの形成が認められ、種によっては引き続き根の形成も見られたが、基部カルスの形成程度、発根程度は種・品種によって異なった (Plate 7, 8, 9)。シュートの再生率は、7割以上の種・品種で80%以上と高く、50%以下となったのはアイゼンナデシコ (*D. deltoides*)、カスミソウ (*G. elegans*)、スイセンノウ (*L. coronaria*) の3種のみであった。

いずれの種でも、ダイアンサス用培地でシュートを再生させた後ホルモンを含まないハイポネックス培地に移植すると、容易に幼植物へと発達した。In vitro で十分発達した健全なシュートは、温室内の湿度を保った挿し床に直接挿すことにより、順化することが可能であった。

以上の結果、本研究で得られた方法によりナデシコ科観賞植物5属38種・品種の茎頂については凍結保存が可能であることが明らかとなった。

第2節 キク属の近縁種における茎頂の凍結保存

現在栽培されているキクは雑種起源であり、チョウセンノギク (*C. zawadskii* var. *latilobum*) とハインマカンギク (*C. indicum* var. *procumbens*) の雑種に由来し、その後いくつかの近縁種も交配された可能性がある。キク属には約200種が含まれ、わが国には約20種が自生している。本節ではわが国に自生するキク属植物の茎頂の凍結保存を検討した。なおここで言うキク属は広義のキク属で、このため表中の学名も *Chrysanthemum* とし *Dendranthema* とは記していない。

Table 32. Variations in response to cryopreservation by genotypes of *Caryophyllaceae* ornamentals

Genotype	Survival (%) [*]	Shoot regeneration (%) ^{***}
<i>Dianthus hybridus</i> ^{***}		
cv. Cadiz	32/32 (100)	30/32 (93.8)
cv. Francesco	27/28 (96.4)	18/28 (64.3)
cv. Gigi	31/31 (100)	31/31 (100)
cv. Gypsy	29/29 (100)	29/29 (100)
cv. Icebark	30/30 (100)	30/30 (100)
cv. Lena	30/30 (100)	30/30 (100)
cv. Nora	26/26 (100)	26/26 (100)
cv. Paradin	24/24 (100)	24/24 (100)
cv. Pink francesco	25/25 (100)	25/25 (100)
cv. Sakuranadesiko	30/30 (100)	30/30 (100)
cv. Scania	32/32 (100)	31/32 (96.9)
cv. Setonohatushimo	23/23 (100)	22/23 (95.7)
<i>D. acicularis</i>	29/29 (100)	29/29 (100)
<i>D. alpinus</i>	26/26 (100)	26/26 (100)
<i>D. barbatus</i>	29/29 (100)	24/29 (82.8)
<i>D. biflorus</i>	30/30 (100)	18/30 (60.0)
<i>D. carthusianorum</i>	29/29 (100)	25/29 (86.2)
<i>D. chinensis</i>	25/27 (92.6)	24/27 (88.9)
<i>D. deltoides</i>	28/28 (100)	13/28 (46.4)
<i>D. fragrans</i>	26/26 (100)	26/26 (100)
<i>D. gratianopolitanus</i>	29/29 (100)	27/29 (93.1)
<i>D. henteri</i>	26/28 (92.9)	26/28 (92.9)
<i>D. japonicus</i>	31/31 (100)	27/31 (87.1)
<i>D. lustriana</i>	32/32 (100)	32/32 (100)
<i>D. myrtineruius</i>	27/27 (100)	27/27 (100)
<i>D. nappy</i>	26/27 (96.3)	21/27 (77.8)
<i>D. orientalis</i>	28/28 (100)	21/28 (75.0)
<i>D. plumarius</i> var. <i>lumnitzeri</i>	28/29 (96.6)	28/29 (96.6)
<i>D. superbus</i>	21/21 (100)	16/21 (76.2)
<i>Gypsophilla paniculata</i>	30/30 (100)	29/30 (96.6)
<i>G. elegans</i>	29/29 (100)	12/29 (41.4)
<i>G. repense</i>	26/29 (89.7)	15/29 (51.7)
<i>Lychnis coronaria</i>	26/32 (81.3)	5/24 (20.8)
<i>L. chalconica</i>	32/32 (100)	27/32 (84.4)
<i>L. coeli-rosa</i>	30/30 (100)	18/30 (60.0)
<i>Silene armeria</i>	32/32 (100)	28/32 (87.5)
<i>S. pendula</i>	23/28 (82.1)	23/28 (82.1)
<i>Vaccaria pyramidata</i>	27/27 (100)	21/27 (77.8)

* No. surviving shoot tips / No. frozen shoot tips.

** No. shoot regenerating shoot tips / No. frozen shoot tip.

*** Including *D. caryophyllus*.

材料および方法

わが国に自生するキク属植物のうち15種、2交配種および3栽培キク品種合計20種・品種 (Table 33) について、茎頂を切り出し、5 %DMSOを含んだキク用培地に2日間前培養した後、凍害防御剤 (10% DMSO と 3 % グルコース) と共に0.5mlのストローに封入、0℃で1時間おいた後0.2℃/min. で-40℃まで冷却、その後液体窒素に浸漬した。液体窒素下に15分間おいた後、温水により急速解凍し、取り出した茎頂を CPW 溶液で3回すす

いで、キク用の培地に置床した。また、対照として凍結を行わないで通常の茎頂培養だけを行なう区も設けた。

結 果

いずれの種・品種でも凍結をしていない茎頂は100%生存し、栽培ギク3品種ならびに12種では67~100%と高いシュート再生率を示したが、シマカンギク (*C. indicum*)、アシズリノジギク (*C. japonense* var. *ashizuriense*)、チョウセンノギク (*C. zawadskii* var. *latilobum*) および栽培ギクとイソギクの交配種ではシュートの再生率が50%以下と低かった。またシュートは再生したもの、イソギク (*C. pacificum*) とエゾノヨモギギク (*C. vulgare* var. *boreale*) では再生シュートの生育が著しく不良であった。これら以外の種では再生したシュートはおおむねモノシュートで、わずかな基部カルスを形成した (Table 33)。

凍結・解凍後のキクおよびキク近縁野生種の茎頂は全体として80%以上の高い生存率を示したが、イソギク、ハマギク (*C. nipponicum*) およびチョウセンノギクではやや生存率が劣った。シュート再生の様相は種によって異なり、栽培ギクと同等もしくはそれ以下のシュート再生率しか示さなかったのは、シマカンギク、アシズリノジギク、リュウノウギク (*C. makinoi*)、ハマギク、イソギク、エゾノヨモギギク、イワギク (*C. zawadskii*)、チョウセンノギクで、それ以外は80%以上の高いシュート再生率を示した (Table 33, Plate 10, 11, 12)。

以上の結果、本実験で得られた方法によりキク属観賞植物の茎頂の凍結保存が可能であるが、シュートの再生率に関しては種間差がみられることが明らかとなった。

Table 33. Responses of various Japanese chrysanthemum species to cryopreservation

Species	frozen shoot tips		control (unfrozen)	
	S (%) [*]	R (%) ^{**}	S (%) [*]	R (%) ^{**}
<i>Chrysanthemum morifolium</i>				
cv. Shuhounotikara	83.3	58.3	100	100
cv. Kenrokukougiku	91.3	52.7	100	100
cv. Parliament	100	62.6	100	100
<i>C. arcticum</i> ssp. <i>maekawanum</i>	100	96.5	100	100
<i>C. boreale</i>	93.4	85.0	100	100
<i>C. cuneifolium</i>	95.9	80.0	100	100
<i>C. indicum</i>	96.7	9.4	100	21.0
<i>C. japonense</i> var. <i>ashizuriense</i>	96.7	29.3	100	45.0
<i>C. makinoi</i>	96.9	37.5	100	100
<i>C. nipponicum</i>	46.5	28.3	100	100
<i>C. ornatum</i>	87.5	78.2	100	96.9
<i>C. pacificum</i>	63.1	12.3	100	96.9
<i>C. morifolium</i> × <i>C. pacificum</i> '22-B'	87.5	41.7	100	43.8
22-B × <i>C. morifolium</i> 'Moon light'	89.9	13.0	100	18.8
<i>C. shiwogiku</i>	100	86.7	100	93.8
<i>C. vulgare</i> var. <i>boreale</i>	85.9	20.8	100	91.7
<i>C. weyrichii</i>	100	100	100	100
<i>C. yoshinaganthum</i>	90.0	90.0	100	100
<i>C. zawadskii</i>	100	61.5	100	100
<i>C. zawadskii</i> var. <i>latilobum</i>	90.0	40.0	100	67.4

^{*}S : Survival rate (%) = No. surviving shoot tips / No. frozen shoot tips × 100

^{**}R : Shoot regeneration rate (%) = No. shoot regenerating shoot tips / No. frozen shoot tips × 100

第3節 長期保存

凍結保存は植物の生殖質を長期間にわたって保存することが第1の目的である。これまでの実験結果は15分間液体窒素に浸漬してすぐさま解凍したものであり、比較的長期間液体窒素下に保存後解凍し、その活性が維持されていることを証明する必要がある。本節では前節までに得られた凍結法によって凍結保存したダイアンサス、キク茎頂の長期保存を検討した。

材料および方法

ダイアンサス'サクラナデシコ'とキク'秀芳の力'の茎頂を液体窒素下で、それぞれ1～4年間および2～8か月間貯蔵後解凍した。凍結方法および解凍後の培養方法は前章までと同様とした。

結 果

液体窒素下に1, 2, 3, 4年浸漬保存されたダイアンサス茎頂は、高い活性を維持しており、解凍後はほぼ100%生存し、かつシュートを再生した (Table 34, Plate 3)。ダイアンサス用培地でシュートを再生した茎頂は、ホルモンを含まないハイポネックス培地に移植することにより容易に幼植物となった。以後これらの幼植物は普通の培養植物同様、節培養によって増殖することができた。

Table 34. Viability of *Dianthus hybridus* cv. Sakuranadesiko shoot tips cryopreserved in liquid nitrogen for various time periods.

Duration of storage in LN ₂	No. thawed shoot tips	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
1 year	16	16 (100)	16 (100)
2 years	10	10 (100)	10 (100)
3 years	13	12 (92.3)	12 (92.3)
4 years	13	13 (100)	13 (100)
control (unfrozen)	20	20 (100)	20 (100)

キクでも同様に8か月まで液体窒素下に保存した茎頂は高い活性を維持していた (Table 35)。再生したシュートは第1章で述べたようにビトリフィ様の異常葉をもつものが多かったが、ダイアンサスと同様のハイポネックス培地に移植すると正常なシュートを多数再生させ、以後節培養で維持増殖できた。

Table 35. Viability *Chrysanthemum morifolium* cv. Shuhounotikara shoot tips cryopreserved in liquid nitrogen for various time periods.

Exp. no.	Periods of storage in LN ₂ (month)	Survival (%)	Shoot regeneration (%)
1	Nov. 1989 ~ Jan. 1990 (2)	16/16 (100)	16/16 (100)
2	Jan. 1990 ~ Mar. 1990 (2)	15/15 (100)	15/15 (100)
3	Nov. 1989 ~ Mar. 1990 (4)	15/15 (100)	13/15 (86.7)
4	Feb. 1990 ~ Jun. 1990 (4)	16/16 (100)	14/16 (87.5)
5	Nov. 1989 ~ Jul. 1990 (8)	15/15 (100)	13/15 (86.7)
6	Jan. 1990 ~ Sep. 1990 (8)	16/16 (100)	13/16 (81.3)

以上の結果からダイアンサス、キク共に茎頂を第1章で得られた方法で凍結しその後液体窒素下で保存すれば、長期間高い活性を維持しながら無菌状態で貯蔵することが可能であった。

第4節 考 察

有用植物の遺伝資源の保存は基幹種のみならず、その近縁野生種もその対象となる。更に近年の遺伝子工学的手法の発達により、かなり遠縁でも有用形質をもった野生種が利用可能となってきた。これら膨大な種の保存を実施するに当たり、茎頂の凍結保存においても、単一の手法でできるだけ広範囲の植物種が保存できることが望ましい。ところがこれまでの凍結保存の報告では、基幹種のみを取り扱ったものが多く、わずかにジャガイモで近縁野生種(102)の、リンゴで園芸品種および台木品種群 (106, 107) の茎頂の凍結保存例があるだけである。本研究は実用的なベースコレクションの確立を目的としており、このため本章ではナデシコ科およびキク属の観賞植物とその近縁種の茎頂の凍結保存を単一の方法で検討した。

ナデシコ科5属38種・品種の植物については、茎頂の凍結解凍後の生存に関してわずかな種間差しか見られず、いずれも非常に高い生存率を示した。またキク属20種・品種の茎頂に関しても、わずかな例外を除いて解凍後の高い生存率が得られた。一方解凍後の茎頂からのシュート再生に関しては、ナデシコ科観賞植物の間には若干の種間差が認められたものの全体として高かったが、キク属では解凍後生存した茎頂からのシュート再生に関して大きな種間差が認められた。単一の培地上での形態形成に関し、種間差のみならず品種間差があることは、キク、カーネーションの茎頂培養のみならず、キクの葉片からの不定芽形成(26)、プロトプラスト培養(29)でも認められている。この違いは、組織からの形態形成にもっとも大きく関与すると考えられる培地のホルモンの種類と濃度に関して、その最適条件が種・品種によって異なるためと考えられ、キク茎頂のシュート再生に関して、培地中のサイトカイニンの最適条件が異なることはすでに第4章でも確認した。Towill (102)はジャガイモの品種ならびに近縁種の茎頂の凍結保存において、シュートの再生に関して種間差を認め、凍結・解凍後の培養に単一の培地を用いることの限界を指摘している。

キク属において解凍後のシュートの再生率の低かったもののうち、凍結を行わない通常の茎頂培養でもシュートの再生率の低かった種および再生したシュートの発育が著しく悪かった種、すなわちシマカンギク、アシズリノジギク、イソギク、エゾノヨモギギクおよびイソギクと栽培ギクとの交配種等では、培地の改良により凍結解凍した茎頂からのシュート再生率の向上が期待できる。ただし実際の適用に当たっては、個々の種に関して最適培地の検索は大変な労力がかかるため、標準的培地であらかじめ通常の茎頂培養を行ない、不適当な種のみについて再検討するのが適当であろう。さらにキク属の中には、通常の茎頂培養では高いシュート再生率を示すにもかかわらず、凍結・解凍後のシュート再生率の著しく低い種もみられた。第3章で見たように凍結・解凍後のキクの茎頂の生存部分は比較的小さく、これらキク属植物のシュート再生率の種間差は、受けた凍害の程度と生存した組織におけるシュート再生能の種間差、さらにはDMSOに対する感受性の差などによるものと考えられる。

前章までに示したようにダイアンサスの茎頂の凍結条件には、キクに比べると広い許容範囲があり、更に解凍後の形態観察でも見たようにダイアンサスの茎頂は凍結・解凍により受ける傷害はごくわずかであった。これらのことはダイアンサスの細胞がキクに比べて凍害を受けにくいことを示唆している。本章の結果は、ダイアンサスにおける高い凍結保存性といった細胞膜の特性と考えられる性質が、広く科のレベルで共通する性質であることを示している。今後の植物遺伝資源の保存を考える際、科のレベルで同一の方法が適用できるならば、その技術開発は急速に進むと考えられる。本研究で得られた方法により、キク属以外のキク科の植物においても凍結保存が可能であるかどうか早急に検討する必要がある。

植物の生殖質の凍結保存の実用化に際しては、どれだけの期間安全に保存できるかを明らかにしておく必要が

ある。植物の茎頂の凍結保存が初めて報告されたのが1976年であり、まだ歴史が浅く、これまでの報告でもジャガイモ(7)、キャサバ(7)で4年間、カモミール(16)で3年間活性を失わずに保存できたとしておりこれより長期間の例はない。本実験でダイアンサス茎頂が4年間活性を失わずに保存できたことは、これらの実証の1つとして、数年間はまず問題なく保存可能であることを示している。さらに20年間液体窒素下で保存したウン精子が新鮮精子と同等の受胎成績を示した報告(89)もあり、植物の茎頂もより長期の保存が可能であろう。なお本章で行った長期保存の実証作業は継続中であり、今後より長期的な活性維持の定期的検査を継続していく予定である。液体窒素、すなわち -196°C という超低温下では、通常の生物活性はほとんど停止していると考えられ、一度液体窒素下に保存されればその保存期間中の活性の低下は、放射線のバックグラウンド等の影響を除けば理論的にはありえない。

第5節 摘 要

1. 前章までに得た最適凍結条件を用い、ナデシコ科5属38種・品種およびキク属20種・品種の茎頂の凍結保存を各々単一の方法で検討した。
2. ナデシコ科植物については、供試したダイアンサス属、カスミソウ属、リクニス属、マンテマ属、バッカリア属のいずれの種(品種)も高い生存率を示し、種間差は認められなかった。シュートの再生はアイゼンナデシコ、カスミソウ、スイセンノウ等でシュートの再生率が低かったが、それ以外の種では高かった。
3. キク属植物については、全体として高い生存率を示したが、イソギク、ハマギクおよびチョウセンノギクではやや生存率が劣った。シュート再生率は種によって異なり、栽培ギクと同等かそれ以下のシュート再生率を示したのは、シマカンギク、アシズリノジギク、リュウノウギク、ハマギク、イソギク、エゾノヨモギギク、イワギク、チョウセンノギクで、それ以外のコハマギク、キクタニギク、ワジギク、サツマノギク、シオギク、ナガワノギク、ピレオギクでは高いシュート再生率を示した。
4. 液体窒素下に4年間貯蔵したダイアンサス'サクラナデシコ'および8か月貯蔵したキク'秀芳の力'の茎頂は高い再生活性を維持していた。

第7章 総 合 考 察

植物の遺伝資源の *in vitro* での保存は、緒言でも述べたようにアクティブコレクションとベースコレクションに大別できる。アクティブコレクションで用いられる生長抑制法は、すでに基本的な方法が確立され49種の植物で短中期的 *in vitro* 保存の可能性が報告されている(57)。すなわち培養温度を温帯起源の植物は0℃付近までのできるだけ低い温度に、また熱帯起源の植物では10~20℃程度にすることにより著しく生長を抑制できる。培地成分に関しては糖濃度を低めること、浸透圧調節剤を添加し高張な培養基とすること、更にはいくつかの生長抑制剤を添加することなどにより、効果的に生長抑制が達成できる。基本的に無菌植物の増殖系が確立されている植物種に関しては、これら生長抑制法は容易に適用できるものと考えらる。本研究で用いたカーネーション、キクに関してもすでにいくつかの方法が提唱され(28, 36, 67, 82)、育種業者の中には *in vitro* で品種の保存を行っている所もある。

一方ベースコレクションに関しては現在までのところ、凍結保存を用いた gene bank はどの作物でも確立していない。この原因は、第1に現在凍結保存の可能性が報告されている植物種の数が本来の目的である gene bank の実用化には程遠いものであること、さらにこれまでの報告が単一の種を用いて凍結・解凍後の生存のみを問題としたものが大部分であることがあげられる。農業分野における植物遺伝資源の凍結保存が実用化されるためには、いくつかの条件が求められる。第1に凍結・解凍後の安定した生存とその後の植物体の再生を得るための最適凍結・解凍・培養条件を決定すること、第2にこの技術が近縁種をも含めた幅広い種に対して適用性があること、第3に保存された植物組織の時間的、質的安定性が保証されること、すなわち長期保存の実証および再生した植物の正常な生長発育とその遺伝的安定性などである。このように植物遺伝資源の保存法として凍結保存を実用化するには、包括的な技術確立の必要性が指摘できる。このため国際植物遺伝資源委員会は、凍結保存技術の情報交換を目的とした国際的データベースの運営を始めている(117)。

本研究は、遺伝資源保存に対する重要性が社会的に認識されつつある中、花き園芸分野での主要花きであるダイアンサス属、キク属を取り上げ、その茎頂の凍結保存法の開発とその評価を行ったものである。

本研究では茎頂の凍結保存方法として、2段階凍結法と新しい凍結法として vitrification 法を検討したが、現時点では従来の2段階凍結法の方が vitrification 法より結果が安定していた。しかし vitrification 法は、プログラムフリーザーを必要とせずしかも短時間で凍結できる利点があり、今後検討すべき研究課題である。以下に両種についての最適凍結条件を要約する。

ダイアンサスでは、通常の茎頂培養と同様に葉原基2対を含む大ききで茎頂を切り出し、DMSO 10%とグルコース3%を含む凍害防御剤と共にストローに封入し0℃下で1時間処理し、その後プログラムフリーザーを用いて0.5℃/minの冷却速度で-40℃まで冷却し、液体窒素に浸漬して保存、必要に応じて温水での急速解凍をすれば高い生存率が得られる。またキクでは、切り出した茎頂をDMSO 5%を含むキク茎頂培養用の培地で2日間前培養の後、先のダイアンサスと同様の凍害防御剤で処理し、0.2℃/minで-40℃まで冷却して液体窒素に浸漬すれば、温水で急速解凍の後ダイアンサス同様高い生存率が得られた。

こうして凍結された茎頂は、ダイアンサスで見たように液体窒素下で最低4年間は高い活性を維持でき、更に長期の安定した保存が期待できる。また凍結・解凍した茎頂由来の植物は、通常の茎頂培養と同様ウイルスフリー効果が期待でき、凍結保存の材料としての茎頂の有利性が示された。

解凍したダイアンサス茎頂は定芽的にシュートを再生し、キクでは一部は不定的であった。遺伝情報の正確な保存といった観点から培養変異はできうるかぎり避ける必要があり、本来の茎頂分裂組織を完全に維持できるよ

うな凍結方法の改善が求められる。特に観賞植物における品種保存の場合、品種の特性がキメラによって現われるものも多数あり、キクに関してはキメラ品種の維持には問題があるという、本研究で示された凍結保存の限界には留意すべきである。再生したシュートは容易に幼植物に生長し、解凍2ヵ月以内に *in vitro* 増殖系が確立でき、得られたシュートの順化も容易であった。

それぞれの凍結方法は、ナデシコ科およびキク属の広い範囲の植物で適用可能な方法であった。

以上のように、ダイアンサス、キクに関して茎頂の凍結保存確立のための基本的諸条件は明らかにされ、貴重な遺伝資源を小さなスペースで安全にしかもクリーンな状態で長期間保存することが可能となった。このことにより種・品種の保存にかかる労力が大幅に軽減でき、更にダイアンサス属、キク属におけるベースコレクションの実用化が期待できよう。

引用文献

1. 阿部誠二. 1991. 植物の法的保護環境：種苗法と工業所有権法. SHITA REPORT No 1 : 7-12
2. Ashworth, E. N. and Abeles, F. B. 1984. Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freeing of plant tissues. *Plant Physiol.* 76 : 201-204.
3. Bajaj, Y. P. S. 1981. Regeneration of plants from potato meristems freeze-preservation for 24 months. *Euphytica* 30 : 141-145.
4. Bajaj, Y. P. S. 1981. Regeneration of plants from ultra-low frozen anthers of *Primula obconica*. *Scientia Hort.* 14 : 93-95.
5. Bajaj, Y. P. S. 1983. Production of normal seeds from plants regenerated from the meristems of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum* cryopreserved for 20 months. *Euphytica* 32 : 425-430.
6. Bajaj, Y. P. S. 1984. The regeneation of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. *Theor. Appl. Genet.* 67 : 525-528
7. Bajaj, Y. P. S. 1985. Cryopreservation of germplasm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and cassava (*Manihot esculenta* Crenzt) : Viability of excised meristems cryopreserved up to four years. *Indian J. Exp. Biol.* 23 : 285-287.
8. Bajaj, Y. P. S. 1988. Regeneration of plants from frozen (-196°C) protoplasts of *Atropa belladonna* L., *Datura innoxia* Mill and *Nicotiana tabacum* L. *Indial J. Exp. Biol.* 26 : 289-292.
9. Bertrand-Desbrunais, A., Fabre, J., Engelmann, F. and Dereuddre, J. 1988. Adventive embryogenesis recovery from coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos after freezing in liquid nitrogen. *C. R. Acad. Sci.* 307, III : 795-801.
10. Bhandal, I. S., Hauptman, M. and Widholm, J. M. 1985. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant Physiol.* 78 : 430-432
11. Braun, A. 1988. Cryopreservation of sugarbeet germplasm. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 14 : 161-168.
12. Bush, S. R., Earle, E. D. and Langhans, R. W. 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum motiforium* 'Indianapolis'. *Amer. J. Bot.* 63 : 729-737.
13. Chen, T. H. H. and Gusta, L. V. 1983. Absciscic acid-induced freezing resistance in cultured plant cells. *Plant Physiol.* 73 : 71-75.
14. Chen, T. H. H., Kartha, K. K., Constabel, F. and Gusta, L. V. 1984. Freezing characterisitics of cultured *Caththaranthus roseus* (L.) G. Don with dimethyl sulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant Physiol.* 75 : 720-725.
15. Deberch, P. C. and Maene, L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.* 14 : 335-345.
16. Diettrich, B., Donath, P., Popov, A. S., Butenko, R. G. and Luckner, M. 1990. Cryopreservation of *Chamomilla recutita* shoot tips. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 186 : 63-67.

17. Dougall, D. and Wetherell, D. F. 1974. Storage of wild carrot cultures in the frozen state. *Cryobiol.* 11 : 410-415.
18. Dereuddre, J., Fabre, J. and Bassaglia, C. 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. *Plant Cell Reports* 7 : 170-173.
19. Duncal, D. R. and Widholm, J. M. 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant Physiol.* 83 : 703-708.
20. Earle, E. D. and Langhans, R. W. 1974. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and establishment of tissue cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99 : 128-132.
21. Engelmann, F., Duval, Y. and Pannetier, C. 1988. Use of cryopreservation for setting up a bank of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. *Oleagineux* 43 : 327-328.
22. Ezawa, T., Harada, T. and Yakuwa, T. 1989. Studies on freeze-preservation of fruit tree germplasm. III. Freeze-preservation of grape shoot tips. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 64 : 51-55.
23. 江沢辰広, 原田隆, 八鍬利郎, 藤川清三, 勾坂勝之助. 1989. ブドウ茎頂の耐寒性増大にともなう生理的および形態的变化. *園学雑* 58別2 : 46-47.
24. Finkel, B. J. and Ulrich, J. M. 1982. Cryoprotectant removal temperature as a factor in the survival of frozen rice and sugarcane cells. *Cryobiol.* 19 : 329-335.
25. Frank, F., Mathias, S. F., Galfre, P., Webster, S. D. and Brown, D. 1983. Ice nucleation and freezing in undercooled cells. *Cryobiol.* 20 : 298-309.
26. 深井誠一, 陳忠英, 大江正温. 1987. キクの葉片培養におけるシュート形成に関する品種間差異. *大阪農技セ研報*. 24 : 55-58.
27. 深井誠一. 1988. 組織培養による遺伝子資源の長期保存. *農耕と園芸*. 43 : 182-185.
28. 深井誠一, 森井正弘, 大江正温. 1988. キクの in vitro 保存. *植物組織培養*. 5 : 22-25.
29. 深井誠一, 柴田道夫, 天野正之, 山崎教道, 大江正温. 1988/89. キクプロトプラストからの植物体再生. *大阪農技セ研報*. 25 : 25-30.
30. Grout, B. W. W. and Henshaw, G. G. 1978. Freez preservation of potato shoot-tips cultures. *Ann. Bot.* 42 : 1227-1229.
31. Grout, B. W. W., Wescott, R. J. and Henshaw, G. G. 1979. Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiol.* 15 : 478-483.
32. Grout, B. W. W. and Hensaw, G. G. 1980. Structural observation on the growth of potato shoot-tip cultures after thawing from liquid nitrogen. *Ann. Bot.* 46 : 243-238.
33. Hanks, R. H. and Kartha, K. K. 1980. Freeze preservation of pea meristems : cell survival. *Can. J. Bot.* 58(8) : 833-840.
34. Harada, T., Inaba, A., Yakuwa, T. and Tamura, T. 1985. Freeze-preservation of apices isolated from small heads of brussels sprouts. *HortSci.* 20(4) : 678-604.
35. Henshow, G. G., O'Hara, J. F. and J. A. Stamp. 1985. Cryopresersvation of potato meristems. p.160-170. In 'Cryopreservation of plant cells and organs.' CRC Press. Florida.
36. Hosoki, T. 1989. In vitro storage of *Chrysanthemum morifolium* at room temperature. *Plant Tissue*

Culture Letter 6 : 85-87,

37. Huitema, J. B. M. and Hof, L. 1990 Effects of endogenous cytokinin levels on the epigenetic instability of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln propagated in vitro. p 74-79 In 'Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding' (Ed. by deJong, J.) CPO. Wageningen.
38. International Board for Plant Genetic Resources 1983. IBPGR advisory committee on in vitro storage Report of the first meeting. p 1-11 IBPGR Rome
39. Katano, M. and Ishihara, A. 1983. Survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen HortSci. 18(5) : 707-708.
40. Katano, M. 1986. Seasonal change of freezing tolerance of apple shoot tips. Proc. Fac. Agric. Kyusyu Tokai Univ. 5 : 1-5
41. Kartha, K. K., Leung, N. L. and Gamborg, O. L. 1979. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent regeneration. Plant Sci. Lett. 15 : 7-15.
42. Kartha, K. K., Leung, N. L. and Pahl, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristem and masspropagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105(4) : 481-484
43. Kartha, K. K., Leung, N. L. and Morginski, L. A. 1982. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crants). Z. Pflanzenphysiol. 107. : 133-140.
44. Kumu, Y., Harada, T. and Yakuwa, T. 1983. Development of a whole plant from a shoot tip of *Asparagus officinalis* L. frozen down to -196°C. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 61 : 285-294.
45. Kuo, C. C. and Lineberger, R. D. 1985. Survival of in vitro cultured tissue of 'Jonathan' apples exposed to -196°C. HortSci. 20(4) : 764-767.
46. Kuriyama, A., Watanabe, K., Ueno, S. and Mitsuda, H. 1989. Inhibitory effect of an ammonium ion on recovery of cryopreserved rice cells. Plant Science 64 : 231-235.
47. Langis, R., Schnabel, R., Earle, E. D. and Stepankus, P. L. 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. Cryo-Lett. 10 : 421-428.
48. Langis, R. and Steponkus, L. 1990. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. Plant Physiol. 92 : 666-671.
49. Langis, R. and Steponkus, L. 1991. Vitrification of isolated rye protoplasts : Protection against dehydration injury by ethylene glycol. Cryo-Lett. 12 : 107-112.
50. Lemieux, C. S., Firoozabady, E. and Robinson, K. E. P. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum. p.150-155 In 'Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding' (Ed. by de Jong, J.) CPO. Wageningen.
51. Marin, M. L. and Duran-vila N. 1988. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis*(L.)Osb.) after immersion in liquid nitrogen. Plant Cell Tissue Organ Culture 14 : 51-57.
52. Moriguchi, T., Akihami, T. and Kozaki, I. 1985. Freeze-preservation of dormant pear shoot apices. Japan J. Breed. 35 : 196-199.
53. Morris, G. J., Coulson, G., Meyer, M. A., McLellan, M. R., Fuller, B. J., Grout, B. W. W., Pritchard, H.

- W. and Knight, S. C. 1983. Cold shock-A widespread cellular reaction. *Cryo-Lett* 4 : 179-192.
54. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473-497.
55. Nag, K. K. and Street, H. E. 1975. Freeze preservation of cultured plant cells. I. the pretreatment phase. *Physiol. Plant* 34 : 254-260.
56. 中野 優, 三位正洋. 1990. セキチクとビジョナデシコの体細胞雑種の作出. 育種(別1) : 26-27.
57. Ng, S. Y. C. and Ng, N. Q. 1991. Reduced-growth storage of germplasm p.11-39. In "In vitro methods for conservation of plant genetic resources"(ed. by Dodds, J. H.) Chapman and Hall London
58. 新野孝男, 酒井昭, 八鍬春美, 野尻邦雄. 1991. ナシの培養茎頂のビトリフィケーション法による液体窒素保存. 園学雑 60別2 : 164-165.
59. 岡成美, 八鍬春美, 新野孝男. 1988. 液体窒素中で凍結したナシ冬芽からのシュート再生. 園学要旨 昭63秋 : 96-97.
60. 大川清. 1990. 世界におけるカーネーションの生産動向3. フローリスト. 7 (69) : 66-67.
61. 小栗紀彦. 動物胚の生存率に及ぼす植氷温度の影響. p.110-113. 凍結保存(酒井明編). 朝倉書店.
62. Orr, W., Keller, W. A. and Singh, J. 1986. Induction of freezing tolerance in an embryogenic cell suspension culture of *Brassica napus* by abscisic acid at room temperature. *J. Plant Physiol* 126 : 23-32.
63. Panis, B. J., Withers, L. A. and De Langhe, E. A. L. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *Cryo-Lett* 11 : 337-350.
64. Pierik, R. L. M. 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus nijhoff publishers. Dordrecht.
65. Potter, R. H. and Jones, M. G. K. 1991. Molecular analysis of genetic stability P.71-91. In 'In vitro methods for conservation of plant genetic resources'(Ed. by Dodds, J. H.) Chapman and Hall. London
66. Preece, J. E. and Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field p.71-93. In 'Micropropagation'(Ed. by Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H.) Kluwer academic publishers. Dordrecht
67. Preil, W. 1985. In vitro storage in chrysanthemum breeding and propagation p.161-165. In "In vitro techniques"(ed. by Shafer-Mennhr, A.) Martinus Nijhoff, Dordrecht.
68. Rall, W. F. and Fahy, G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313 : 573-575.
69. Reaney, M. J. T. and Gusta, L. V. 1987. Factors influencing the induction of freezing tolerance by abscisic acid in cell suspension cultures of *Bromus inermis* Less and *Medicago sativa* L. *Plant Physiol.* 83 : 423-427.
70. Reed, B. M. and Lagerstedt, H. B. 1987. Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. *HortSci* 22(2) : 302-303.
71. Reed, B. M. 1988. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. *Cryo-Lett* 9 : 766-771.
72. Reed, B. M. 1990. Survival of in vitro-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortSci* 25 : 111-113

73. Sakai, A. 1966. Survival of plant tissue at super-low temperature. IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol.* 41 : 1050-1054
74. Sakai, A. and Yoshida, S. 1967. Survival of plant tissue at super-low temperature. VI. Effects of cooling and rewarming rates on survival. *Plant Physiol.* 42 : 1695-1701.
75. Sakai, A., Yamada, M., Sakata, D., Harada, T. and Yakuwa, T. 1978. Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196°C . *Low Temp. Sci. Ser. B* 36 : 31-38.
76. 酒井 昭. 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応. 学会出版センター.
77. 酒井 昭. 1987. 生物細胞・組織の液体窒素温度における生存の機序. p.46-55. 凍結保存 (酒井昭編) 朝倉書店.
78. 酒井 昭. 1990. 植物培養細胞・組織の液体窒素中での保存. *組織培養*. 16 : 91-494.
79. Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Report* 9 : 30-33.
80. Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing methods. *Plant Science* 74 : 243-248.
81. 佐藤昌孝, 原田隆, 八鍬利郎. 1987. 食用ユリにおける生殖質の凍結保存. 園学要旨 昭62春 : 330-331.
82. Schnapp, R. S. and Preece, J. E. 1986. In vitro growth reaction of tomato and carnation microplants. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 6 : 3-8
83. Seibert, M. 1976. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C . *Science* 191 : 1178-1179.
84. Seibert, M. and Wetherbee, P. J. 1977. Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. *Plant Physiol.* 59 : 1043-1046
85. 柴田道夫, 川田稷一, 豊田努. 1981. キクの枝変わり品種キメラ構造の解明に関する研究 (第1報) 花色と花弁内の色素分布および染色体数との関係. 園学要旨 昭56春 : 346-347.
86. 柴田道夫, 川田稷一, 天野正之. 1984. キクの枝変わり品種キメラ構造の解明に関する研究 (第2報) 小花培養による花色と染色体数の変化. 園学要旨 昭59秋 : 308-309.
87. 柴田道夫, 川田稷一, 天野正之, 亀野貞, 山岸博, 豊田努, 山口隆, 沖村誠, 宇田昌義. 1988. イソギク (*Chrysanthemum pacificum* NAKAI) とスプレーギク (*C. morifolium* RAMAT.) との種間交雑による小輪系スプレーギク品種ムーンライトの育成経過とその特性. 野菜・茶業試験場研究報告. A 2 : 257-277.
88. Shimonishi, K., Ishikawa, M., Suzuki, S. and Oosawa, K. 1991. Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation methods. *Japan. J. Breed.* 41 : 347-351.
89. 白山勝彦, 入谷明, 西川義正, 大西宏. 1986. 液体窒素で長期 (20年間) 保存した牛凍結精液による受胎試験成績. 家畜人工受精研究会誌 8 : 18-20.
90. Stushnoff, C. 1987. Cryopreservation of apple genetic resources. *Can. J. Plant Sci.* 67 : 1151-1154
91. 菅原康剛, 酒井昭. 植物培養細胞の凍結融解後の生存におよぼす Ca^{++} の効果. 低温科学生物編 33 : 21-28.
92. Sun, C. N. 1958. The survival of excised pea seedlings after drying and freezing in liquid nitrogen. *Bot. Gaz.* 119 : 234-236.

93. 鈴木卓, 原田隆, 八鍬利郎. 1988. オウトウ及びクロミノウグイスカズラ茎頂の液体窒素中における凍結と融解後の植物体再生. 園学要旨 昭63秋: 100-101.
94. 鈴木卓, 原田隆, 八鍬利郎. 1989. 液体窒素で凍結したリンゴ茎頂からの植物体再生率の向上. 園学雑 58別2: 42-43.
95. 高橋恒男. 1987. 動物細胞の凍結障害と凍害防御剤の作用機序. p 15-23. 凍結保存 (酒井昭編) 朝倉書店.
96. Taniguchi, K., Tanaka, R., Ashitani, N. and Miyagawa, N. 1988. Freeze preservation of tissue-cultured shoot primordia of the annual *Hapropapus gracilis* (n=4) Jap. J. Genet. 63: 267-272
97. Tilny-Bassett, R. A. E. 1987. The chimera problem. p 271-284. In 'Improving vegetative propagated crops' (Ed. by Abbott, A. J. and Atkin, P.K.) Accademic Press London
98. Tisserat, B. 1981. Cryogenetic preservation and regeneration of date palm tissue HortSci 16(1): 47-48.
99. Towill, L. E. 1981. *Solanum tuberosum*: A model for studying the cryobiology of shoot tips in the tuberbearing *Solanum* species. Plant Sci Lett 20: 315-324.
100. Towill, L. E. 1981. Survival at low temperature of shoot tips from cultivars of *Solanum tuberosum*. Cryo-Lett 2: 373-382.
101. Towill, L. E. 1983. Improved survival after cryogenetic exposure of shoot tips derived from in vitro plantlet cultures of potato Cryobiol 20: 567-573.
102. Towill, L. E. 1984. Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups andigena, phureja, stenotomum, tuberosum and other tuber-bearing *Solanum* species. Cryo-Lett 5: 319-326.
103. Towill, L. E. 1985. Low temperature and freezing/vacuum-drying preservation of pollen. p.172-198. In 'Cryopreservation of plant cells and organs.' CRC Press Florida.
104. Towill, L. E. 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. Plant Cell Reports 9: 178-180.
105. Tyler, N., Stushnoff, C. and Gusta, V. 1988. Freezing of water in dormant vegetative apple buds in relation to cryopreservation. Plant Physiol. 87: 201-205.
106. Tyler, N. and Stushnoff, C. 1988. The effects of prefreezing and controlled dehydration cryopreservation of dormant vegetative apple buds. Can. J. Bot. 68: 1163-1167.
107. Tyler, N. and Stushnoff, C. 1988. Dehydration of dormant apple buds at different stages of cold acclimation to induce cryopreservability in different cultivars. Can. J. Bot. 68: 1169-1176.
108. Uemura, M. and Saksi, A. 1980. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. P. C. P: 21(1): 85-94.
109. Uragami, A., Sakai, A., Nagai, M. and Takahashi, T. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. Plant Cell Reports 8: 418-421.
110. Uragami, A., Sakai, A. and Nagai, M. 1991. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. Plant cell Reports 9: 328-331.
111. Watanabe, K. Yamada, Y., Ueno, S. and Mituda, H. 1985. Change of freezing resistance and retention of

- metabolic and differentiation potenciales in cultured green *Lavendula vera* cells which survived repeated freez-thaw procedures. Agric. Biol. Chem 49(6) : 1727-1731.
112. 渡辺克美, 吉川弘正, 上野三郎, 満田久輝. 1985. 細胞凍結保存における植氷と凍害防御剤の役割. 環境科学総合研究所年報第5巻 : 71-77.
113. Withers, L. A. 1979. Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.) Plant Physiol. 63 : 460-467.
114. Withers, L. A. and King, P. J. 1979. Proline : A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. Plant Physiol 64 : 675-678.
115. Withers, L. A. 1986. Cryopresevation and genebanks p.96-140. In 'Plant cell culture technology' (Ed. by Yeomann, M. M.) Blackwell. Oxford.
116. Withers, L. A., Benson, E. E. and Martin, M. 1988. Cooling rate/culture medium interactions in the survival and structural stability of cryopreserved shoot-tips of *Brassica napus*. Cryo-Lett 9 : 114-119.
117. Withers, L. A., Wheelans, S. K. and Williams, J. T. 1990. In vitro conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. Euphytica 45 : 9-22.
118. Yakuwa, H. and Oka, S. 1988. Plant regeneration through meristem cultures from vegetative buds mulberry (*Morus bombycis* Koiz.) stored in liquid nitrogen. Ann. Bot. 62 : 79-82.
119. Yamada, T., Sakai, A., Mastumura, T. and Higuchi, S. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) Plant Science 73:111-116.
120. Yamada, T., Sakai, A., Mastumura, T. and Higuchi, S. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitirification. Plant Science 78 : 81-87.
121. 吉田静夫. 1987. 植物細胞の凍結傷害. p.30-39. 凍結保存 (酒井昭編). 朝倉書店.

Studies on the cryopreservation of shoot tips of *Dianthus* and *Chrysanthemum*.

Seiichi Fukai

SUMMARY

Of late, the flower production in Japan showed rapid growth in spite of the depression of the total agricultural production in Japan. Chrysanthemum and carnation are two major cut flowers in Japan. In 1989, 1.8 billion of chrysanthemum (75 billion yen) and 711 million of carnation (36 billion yen) were produced in Japan.

Many new cultivars are introduced to the commercial market annually. On the other hand many old cultivars have disappeared, because the modernization in flower production has led to need for mass-production of uniform cultivars. It is difficult for breeders and nurseries with a restricted supply of labor and land to maintain so many cultivars.

Conservation of plant germplasm have become more important because sufficiently wide range of variation is required for any effective crop improvement programme and the recent advances of bio-technology have showed many possibilities of using wide range of related species for further crop improvement.

In vitro storage has been explored as a means of conserving the germplasm. There are two ways to store plants in vitro : one employs the slow growth techniques for short or medium term storage (active collection) ; the other, uses cryopreservation for long term storage (base collection). A reliable preservation techniques would allow the breeder, reseacher and nursery men to maintain a large number of species and cultivars. This studies were carried out to establish a reliable potocol for the cryopreservation of shoot tips of *Dianthus* and *Chrysanthemum* ornamentals. *Dianthus hybridus* cv. Sakuranadesiko and *Chrysanthemum morifolium* cv. Shuhounotikara were used throughout the studies except when stated otherwise.

Chapter 1 Cryopreservation of shoot tips by two-step freezing methods.

In the two-step freezing method, the shoot tips were cooled slowly until sobzero temperture in the presence of cryoprotectants prior to immersion into liquid nitrogen (LN₂). This chapter revealed the basic freezing prtocol for dianthus and chrysanthemum shoot tips

Section 1 Cryoprotectants

10 % dimethyl-sulflyoxide (DMSO), ethyleneglycol (EG) and glycerol (GLY) were effective as cryoprotectants for the cryopreservation of dianthus shoot tips. Glucose of 3 % was only effective in combination with 5 % DMSO. The dianthus shoot tips treated with 10 % DMSO and 3% glucose at 0~20℃

for 10~120 min showed high survival rates after cooling at a rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until -40°C prior to immersion into LN_2 . Chrysanthemum was more sensitive to DMSO. More than 15 % DMSO caused serious damage to chrysanthemum callus growth and the shoot tips treated with 10 % DMSO regenerated abnormal vitrified leaves

In the following chapter 10 % DMSO and 3% glucose was used as the cryoprotectant solution.

Section 2 Effects of preculture on survival of chrysanthemum shoot tips

None of the shoot tips survived when excised and immediately cooled to -40°C with cryoprotectants prior immersion into LN_2 . However the shoot tips precultured on the medium with or without 5% DMSO for 2~14 days showed high survival after cooling at a rate of $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -40°C prior to immersion into LN_2 .

Section 3 Cooling process

All of dianthus shoot tips cooled at the rate of $0.1\sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -40°C prior to immersion into LN_2 survived. When dianthus shoot tips were immersed into LN_2 at various temperatures during the slow cooling, only the shoot tips cooled to -40°C showed 100% of survival and shoot regeneration. But the shoot tips cooled to -25°C or -30°C and held at the same temperatures for 30 and 20 min respectively prior to immersion into LN_2 showed comparable survival rates as those cooled to -40°C .

The optimal cooling rate and terminal slow cooling temperature for chrysanthemum shoot tips was $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and -40°C respectively.

Seeding of ice crystal into cryoprotectant solution at -3.5°C prevented supercooling of the medium. This seeding procedure was necessary for a reliable cryopreservation.

Section 4 Thawing process

Rapid thawing of the cryopreserved shoot tips was essential to ensure high survival.

Chapter 2 Cryopreservation of shoot tips by vitrification

In the vitrification method, the shoot tips were treated osmotically with a concentrated cryoprotectant solution for short time to dehydrate the tissue and then immersed into LN_2 directly.

Section 1 Adaptability of vitrification method

The dianthus shoot tips dipped into PVS2 (15% DMSO, 15%EG, 30%GLY in MS medium containing 0.5M sucrose) for 5min. at room temperature prior to immersion into LN_2 showed more than 90% survival rate. But the shoot regeneration rate of the shoot tips was about 50%. The shoot tips of chrysanthemum were also successfully cryopreserved by vitrification.

Chapter 3 Seasonal variation in freeze-resistance and cryopreservation of in vitro grown plants

The key to the success of cryopreservation is not only the freezing methods but also the type of the

materials. This chapter revealed that dianthus shoot tips could be cryopreserved successfully all year round but the survival and shoot regeneration of chrysanthemum shoot tips varied seasonally. Survival rates of the stem segments excised from in vitro grown plantlets were high but shoot regeneration rates were low compared to the shoot tips taken from the mother plants.

Section 1 Seasonal variation

The survival and shoot regeneration of the cryopreserved shoot tips of dianthus was not affected by seasonal variation

Similarly the survival and shoot regeneration of chrysanthemum in normal shoot tip culture was not affected by seasonal variation. The chrysanthemum shoot tips were sensitive to cold shock stress in summer but it was avoided by preculture. The survival and shoot regeneration rates of chrysanthemum shoot tips frozen in mid-summer was still low even though the shoot tips were precultured for 2 days prior to freezing.

Section 2 Cryopreservation of in vitro grown materials

It is laborious to excise shoot tips from in vitro grown plantlets because the plants were tender and small. In this section nodal segments of in vitro grown plantlets were used as materials.

The nodal segments of dianthus and chrysanthemum survived after cryopreservation by the protocol described above. But shoot regeneration rate was lower compared to that of shoot tips taken from the mother plants. Survival and shoot regeneration of small segments (2mm) was higher than that of large segments (5mm). Axillary buds in the dianthus nodal segments were damaged by the slow cooling process below -25°C .

Chapter 4 Shoot regeneration from thawed shoot tips

Sufficient shoot regeneration from the thawed shoot tips is essential for germplasm storage. Previous chapter showed that 100% of thawed dianthus shoot tips regenerated shoots but half of the survived shoot tips of chrysanthemum failed to regenerate shoot after thawing. This chapter revealed the extent of damages observed on the cryopreserved dianthus and chrysanthemum shoot tips.

Section 1 Effects of culture medium on shoot regeneration from thawed chrysanthemum shoot tips.

Cytokinin in the medium does not affect the survival rate of thawed chrysanthemum shoot tips. High shoot regeneration was observed in the combination of BA and NAA.

Section 2 Morphological observation of thawed shoot tips

Microscope examination of dianthus and chrysanthemum shoot tips with or without freezing revealed that the pattern of shoot regeneration was completely different. In the dianthus shoot tips, the outer pair of the leaf primordia swelled but did not develop normally and then the next inner pair of leaf primordia developed into a shoot within 2 weeks of culture after thawing. In the chrysanthemum different types of recovery

were observed. Survived chrysanthemum shoot tips showed two ways of shoot regeneration : a small bump with smooth surface on leaf primodium developed into a shoot, or green spot appeared on the rough surface of the callus and this developed into a shoot.

Those regenerated shoots developed into plantlets easily on the medium free of phytohormone. The plantlets could be maintained and multiplied by nodal cutting in vitro

Chapter 5 Growth and productivity of cryopreserved plants

This chapter revealed that the plants derived from thawed shoot tips grew and flowered normally

Section 1 Acclimatization of shoots derived from cryopreserved shoot tips.

The plantlets derived from the thawed shoot tips of dianthus and chrysanthemum were easily propagated by nodal cuttings in vitro. The top parts of the in vitro grown shoots were easily acclimatized in a greenhouse.

Section 2 Growth and flowering of the thawed plants

Plants derived from cryopreserved shoot tips of dianthus grew vigorously and flowered normally in the greenhouse. The plants showed higher productivity and better flower quality compared to the plants derived from the mother plants grown in the green house.

There was no difference in growth, flowering and flower quality between chrysanthemum derived from the thawed shoot tips and those from the mother plants.

Section 3 Variation of flower color in chimera chrysanthemum

In about 70% of regenerated plants from thawed shoot tips of chrysanthemum cv. Apricot Marble, periclinal chimera cultivar, the flower color changed from the original apricot color to pink. This means that many of regenerated shoots originated from the tunica layers of the apical dome and not from the whole shoot tip.

Chapter 6 Application to the *Caryophyllaceae* and *Chrysanthemum* ornamentals

The standardized cryopreservation protocol for all or most genotypes is required to establish in vitro gene bank. The results of this chapter revealed that a single two-step freezing methods is applicable for the cryopreservation of a wide range of genotypes in dianthus and chrysanthemum related species.

Section 1 *Caryophyllaceae* ornamentals

Shoot tips of 5 genera 38 species and cultivars of the *Caryophyllaceae* ornamentals were cryopreserved. Excised shoot tips were cooled at a rate of 0.5°C/min to -40°C in the presence of 10% DMSO and 3% glucose prior to immersion into LN₂. High survival and shoot regeneration were observed in all species and cultivars.

Section 2 *Chrysanthemum* ornamentals

The shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native to Japan were cryopreserved : first precultured for 2 days, then slow cooling ($0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) until -40°C with 10% DMSO and 3% glucose prior to immersion into LN_2 and rapid thawing. High survival rates were observed in 3 cultivars of chrysanthemum, 12 species and 2 interspecific hybrids. A slightly low survival rate was observed in 3 species. The shoot regeneration of the frozen shoot tips varied from 9.4% to 100% depending on species.

Section 3 Long term storage

High viability of the cryopreserved shoot tips of dianthus was maintained for up to 4 years. Shoot tips of chrysanthemum also showed high viability after a storage of 8 months in LN_2 .

Chapter 7 General discussion

This study came out with basic protocols for the cryopreservation of dianthus and chrysanthemum shoot tips. These protocols were applicable for a wide range of related species. The thawed shoot tips regenerated shoots and grew into plantlets and if necessary, in vitro multiplication line would be established within 2 months after thawing. In dianthus, viability of the cryopreserved shoot tips were maintained for at least 4 years.

In chrysanthemum, initiation of cryopreservation during winter season is recommended. Morphological observation and variation of flower color in chimera cultivar showed that regenerated shoots from the thawed shoot tips of chrysanthemum derived from a part of the shoot tips not from whole shoot tips. This results suggested that the somaclonal variation of the regenerated plants should be taken into consideration when using cryopreserved plants.

—78—

Plate 1

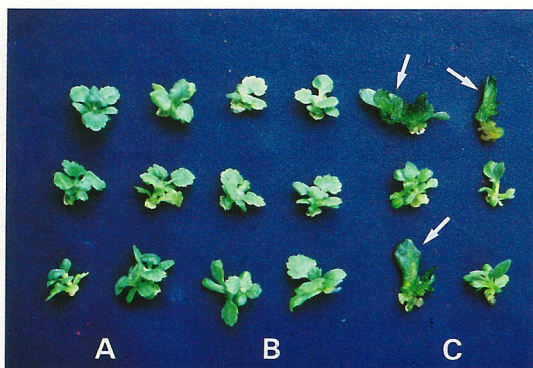


Plate 4



Plate 2



Plate 5



Plate 3



Plate 6



Plate 1. Effect of DMSO on the morphogenesis of shoot tips. Arrows indicate abnormal vitrified leaves. Treatment condition (A ~ C) are given in Table 5.

Plate 2. Shoot regeneration from a cryopreserved shoot tip (right) and an unfrozen shoot tip (left). Unfrozen shoot tips usually grow up into monoshoot plantlets with a small basal callus, but some of the cryopreserved shoot tips regenerate small plantlets with a large callus.

Plate 3. Shoot regeneration of *D. hybridus* cv. 'Sakuranadesiko' cryopreserved for 4 years.

Plate 4. 5. Flowers of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Apricot marble' derived from frozen and unfrozen shoot tips.

Plate 6. Flowers of cryopreserved plants (right), the mother plant (middle) and the plants from shoot tip culture (left).

Plate 7

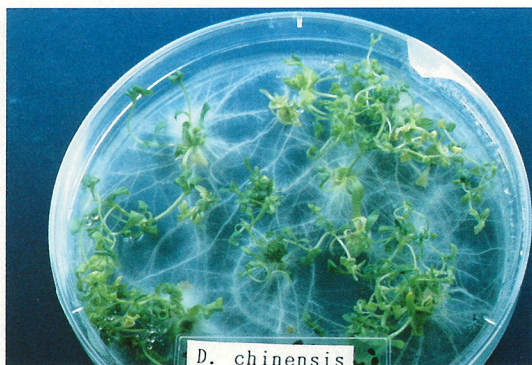


Plate 10

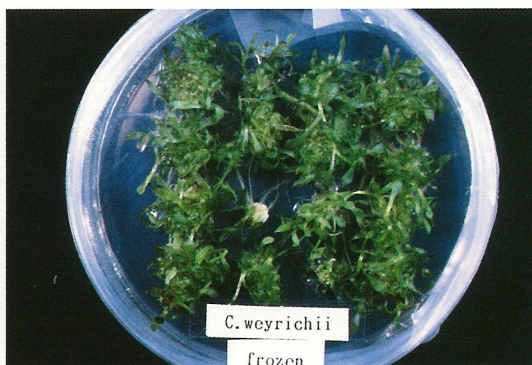


Plate 8

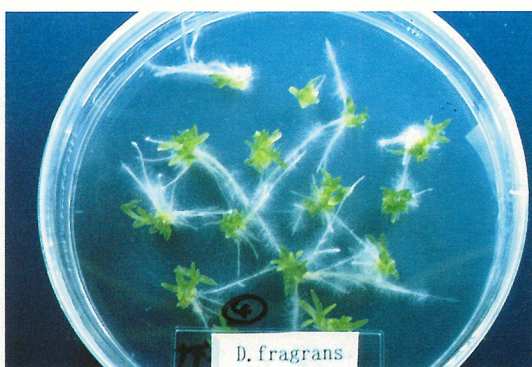


Plate 11

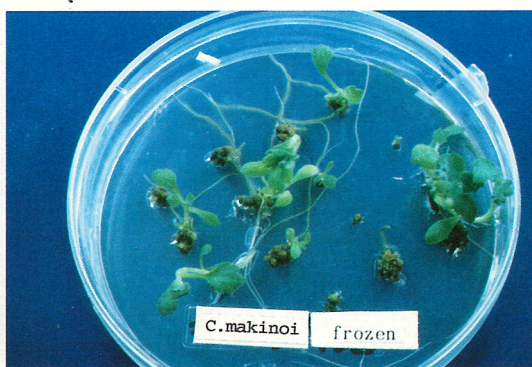


Plate 9

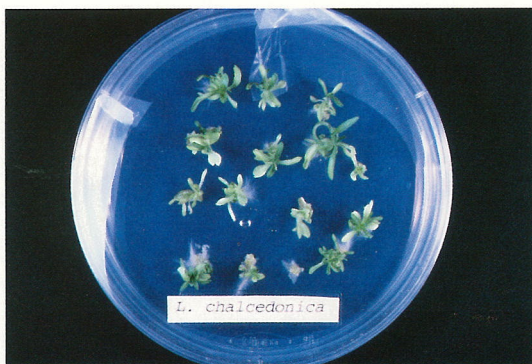


Plate 12

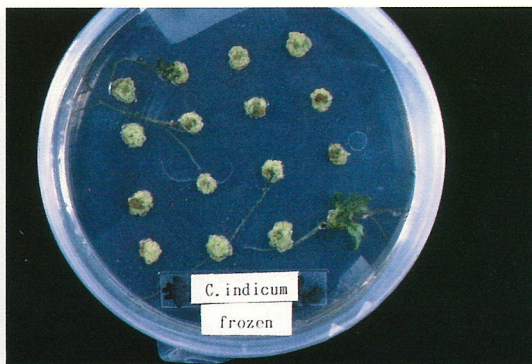


Plate 7, 8, 9. Shoot regeneration from frozen shoot tips of *D. chinensis*, *D. fragrans* and *L. chalcidonica*.

Plate 10, 11, 12. Shoot regeneration from frozen shoot tips of *C. weyrichii*, *C. makinoi* and *C. indicum*.

香川大学農学部紀要

- 第1号 幡 克 美：アカマツ材の成分並びにパルプ化に関する研究（1955年3月）
- 第2号 内 藤 中 人：植物成長ホルモンに関する植物病理学的研究 特に植物病原菌に及ぼす影響について（1957年10月）
- 第3号 松 沢 寛：アオムシコマユバチの生態に関する研究（1958年3月）
- 第4号 梶 明：和紙原料の醗酵精練に関する研究（1959年3月）
- 第5号 森 和 男：傾斜地蜜柑園経営の構造分析（1960年3月）
- 第6号 玉 置 鷹 彦：ガラク並びに池泥の研究（1960年3月）
- 第7号 上 原 勝 樹：傾斜地開発利用に関する物理気象的研究（1961年3月）
- 第8号 桑 田 晃：オクラとトロロアオイとの種間交雑およびそれらより育成された種々の雑種ならびに倍数体に関する研究（1961年9月）
- 第9号 中 潤三郎：甘藷の生育過程に関する作物生理学的研究（1962年3月）
- 第10号 斉 藤 実：香川県及び北愛媛県の地質について（1962年3月）（英文）
- 第11号 小 杉 清：グラジオラスの生産と開花に関する研究（1962年9月）（英文）
- 第12号 吉 良 八 郎：貯水池の滞砂に関する水理学的研究（1963年2月）
- 第13号 野 田 愛 三：禾穀類の根鞘に関する研究（1963年3月）
- 第14号 川 村 信一郎：豆類のデンプンの研究（1963年3月）（エスペラント文）
- 第15号 浅 野 二 郎：種子の耐塩性を中心とした海岸地帯におけるアカマツおよびクロマツ林の成立に関する研究（1963年3月）
- 第16号 山 中 啓：乳酸菌のペントース・イソメラーゼに関する研究（1963年8月）（英文）
- 第17号 葦 沢 正 義：香川県における葡萄の旱害に関する研究（1964年3月）
- 第18号 谷 利 一：カキ炭疽病の病態生理学的研究，とくに罹病果実の病徴発現にあずかるペクチン質分解酵素の役割（1965年3月）
- 第19号 樽 谷 隆 之：カキ果実の貯蔵に関する研究（1965年3月）
- 第20号 狩 野 邦 雄：ラン種子の発芽培地に関する研究（1965年3月）（英文）
- 第21号 山 本 喜 良：コモンベッチおよびその近縁種の雑種に関する研究（1965年3月）
- 第22号 中 広 義 雄：鶏における飼料の消化率測定法に関する研究（1966年10月）
- 第23号 井 上 宏：ナツダイダイの果実発育に関する研究，とくに水腐病の発生機構を中心として（1967年3月）
- 第24号 宮 辺 豊 紀：異常乳の生成と塩類均衡とくにカゼイン磷酸カルシウムに関する研究（1967年8月）（英文）
- 第25号 十 河 村 男：樹皮リグニン及び樹皮フェノール類に関する研究（1971年9月）
- 第26号 大 島 光 昭：赤クローバーサイレージ中の窒素栄養源に関する研究（1971年11月）（英文）
- 第27号 辰 巳 修 三：林木葉部中におけるカルシウムの化合形態とその生理に関する基礎的研究（1974年11月）
- 第28号 樽 谷 勝：ブドウの葉脈黄変による早期落葉の研究（1974年12月）
- 第29号 倉 田 久 男：カボチャ・スイカの性の分化におよぼす日長および温度の影響に関する研究（1976年3月）

- 第30号 鎌田 萬：中小河川治水計画に適用する計画降雨の合理的算定法に関する研究（1976年6月）
- 第31号 山本 弘幸：エンバク冠さび病の抵抗性発現機構に関する研究（1978年3月）
- 第32号 岡本 秀俊：テントウムシの摂食の生態に関する実験的研究（1978年3月）
- 第33号 山崎 徹：*α*-ヒドロキシフェニル並びにシリニルリグニンに関する研究（1978年9月）（英文）
- 第34号 市川 俊英：イネを加害する4種の同翅亜目顎吻群昆虫の配偶行動に関する研究（1979年2月）
（英文）
- 第35号 吉田 博：農業生産共同組織の展開・構造・運営に関する研究（1980年3月）
- 第36号 一色 泰：鶏盲腸の栄養生理学的研究（1980年3月）
- 第37号 中條 利明：富有カキ果実の発育ならびに品質に及ぼす温度条件に関する研究（1982年2月）
- 第38号 五井 正憲：温帯花木の花芽形成ならびに開花調節に関する研究（1982年2月）
- 第39号 松井 年行：和三盆糖の食品学的研究（1982年2月）
- 第40号 藤目 幸敏：ハナヤサイ類の花らい形成並びに発育の温度条件に関する研究
—特に異常花らいについて—（1983年2月）
- 第41号 西山 壮一：カンガイ用管路における空気混入流の水撃作用に関する研究（1983年2月）
- 第42号 真山 滋志：エンバク冠さび病の抵抗性発現におけるアベナルミンの役割（1983年10月）（英文）
- 第43号 門谷 茂：海洋堆積物中のアミノ酸の初期統成過程に関する研究（1983年10月）
- 第44号 一井 真比古：水稻育種における再生茎形質の選抜指標としての効用に関する研究（1984年11月）
（英文）
- 第45号 片岡 郁雄：ブドウ果実の着色に関する研究
—とくにアブジジン酸による着色の制御について—（1986年10月）
- 第46号 鈴木 晴雄：畑地栽培におけるフィルムマルチと植被が地温に及ぼす影響に関する農業気象学的研究（1986年10月）
- 第47号 蓑輪 雅好：解放型畜舎内の放射熱環境に関する研究（1986年10月）
- 第48号 藤田 政之：サツマイモ塊根組織のチトクロムP-450系酵素に関する研究（1986年10月）
- 第49号 田中 道男：組織培養によるファレノプシスの栄養繁殖に関する研究（1987年2月）
- 第50号 長谷川 暁：東洋系シンビジウムの繁殖に関する研究（1987年12月）
- 第51号 笠井 忠：大豆の少糖類の加水分解に関する研究（1987年12月）
- 第52号 青柳 省吾：四国北部の瀬戸内沿岸における花崗岩風化残積土（マサ土）および安山岩風化残積土の土壌特性に関する研究（1987年12月）
- 第53号 片山 健至：*Fusarium solani* M-13-1によるリグニンサブストラクチャーモデル化合物の分解
（1989年11月）（英文）
- 第54号 増田 拓朗：植栽基盤としてのマサ土の問題点とその改良法に関する研究（1990年10月）
- 第55号 多田 邦尚：海水中の溶存タンパク様物質およびアミノ酸の動態に関する研究（1990年10月）
- 第56号 深井 誠一：ダイアンサスおよびキク属植物における茎頂の凍結保存に関する研究（1992年10月）
- 第57号 吉田 裕一：イチゴの花器および果実の発育に関する研究
—‘愛ベリー’の奇形果発生を中心として—（1992年10月）
- 第58号 越智 正：燧灘の化学環境特性と物質循環に関する研究（1992年10月）

Memoirs of Faculty of Agriculture, Kagawa University

- No. 1 Katsumi HATA : Studies on the Constituents and Pulping of "Akamatsu" (*Pinus densiflora* SEB et Zucc) Wood (March, 1955)
- No. 2 Nakato NAITO : Phytopathological Studies Concerning Phytohormones with Special Reference to Their Effect on Phytopathogenic Fungi (October, 1957)
- No. 3 Hiroshi MATSUZAWA : Ecological Studies on the Branconid Wasp, *Apanteles glomeratus* (March, 1958)
- No. 4 Akira KAJI : Studies on the Retting of Plant Fiber Materials for Japanese Paper Manufacture (March, 1959)
- No. 5 Kazuo MORI : An Analytical Study on the Structure of the Mandarin Orange Growing Orchard Farm in a Sloping Land Region (March, 1960)
- No. 6 Takahiko TAMAKI : Studies of Garaku Paddy Soil and Reservoir Deposits (March, 1960)
- No. 7 Masaki UEHARA : Physical and Meteorological Studies on the Cultivation and Utilization of Slope Land (March, 1961)
- No. 8 Hikaru KUWADA : Studies on the Interspecific Crossing between *Abelmoschus esculentus* MOENCH and *A. Manihot* MEDIC and the Various Hybrids and Polyploids Derived from the Above Two Species (September, 1961)
- No. 9 Junzaburo NAKA : Physiological Studies on the Growing Process of Sweet Potato Plants (March, 1962)
- No. 10 Minoru SAITO : The Geology of Kagawa and Northern Ehime Prefectures, Shikoku, Japan (March, 1962) (in English)
- No. 11 Kiyoshi KOSUGI : Studies on Production and Flowering in Gladiolus (September, 1962) (in English)
- No. 12 Hachiro KIRA : Hydraulical Studies on the Sedimentation in Reservoirs (February, 1963)
- No. 13 Aizo NODA : Studies on the Coleorhiza of Cereals (March, 1963)
- No. 14 Sin'itiro KAWAMURA : Studoj pri Ameloj de Legumenoj (March, 1963) (in Esperanto)
- No. 15 Jiro ASANO : A Study on the Formation of Pine Forests on Seaside Areas, giving due Consideration to the Salt Resistance of the Seeds (March, 1963)
- No. 16 Kei YAMANAKA : Studies on the Pentose Isomerases of Lactic Acid Bacteria (August, 1963) (in English)
- No. 17 Masayoshi ASIZAWA : Studies on the Drough Damage of Grape Trees in the Region of Kagawa Prefecture (March, 1964)
- No. 18 Toshikazu TANI : Studies on the Phytopathological Physiology of Kaki Anthracnose, with Special Reference to the Role of Pectic Enzymes in the Symptom Development on Kaki Fruit (March, 1965)
- No. 19 Takayuki TARUTANI : Studies on the Storage of Persimmon Fruits (March, 1965)
- No. 20 Kunio KANO : Studies on the Media for Orchid Seed Germination (March, 1965) (in English)
- No. 21 Kiyoshi YAMAMOTO : Studies on the Hybrids among the *Vicia sativa* L. and its Related Species (March, 1966)
- No. 22 Yoshio NAKAHIRO : Studies on the Method of Measuring the Digestibility of Poultry Feed (October,

1966)

- No.23 Hiroshi INOUE : Studies on the Fruit Development of Natsudaïdai (*Citrus Natsudaïdai* HAYATA), with Special Reference to Water Spot Injury (March, 1967)
- No.24 Toyoki MIYABE : Studies on the Production and the Salt Balance in Relation to Calcium Phosphocaseinate of Abnormal Milk (August, 1967) (in English)
- No.25 Murao SOGO : Studies on the Bark Lignin and Bark Phenolic Compounds (September, 1971)
- No.26 Mitsuiaki OHSHIMA : Studies on Nutritional Nitrogen from Red Clover Silage (November, 1971) (in English)
- No.27 Shuzo TATSUMI : Fundamental Studies of the Chemical Forms of Calcium and Their Metabolisms in the Tree Leaves (November, 1974)
- No.28 Masaru KURETANI : Studies on the Early Summer Defoliation of Grape Vines Caused by Veinyellowing (December, 1974)
- No.29 Hisao KURATA : Studies on the Sex Expression of Flowers Induced by Day-length and Temperature in Pumpkin and Watermelon (March, 1976)
- No.30 Takashi KAMADA : Studies on the Rational Estimation of Rainfall for Design Flood (June, 1976)
- No.31 Hiroyuki YAMAMOTO : Study on the Mechanism of Resistance Expression in the Crown Rust Disease of Oat (March, 1978)
- No.32 Hidetoshi OKAMOTO : Laboratory Studies on the Food Ecology of Aphidophagous Lady Beetles (Coleoptera : Coccinellidae) (March, 1978)
- No.33 Toru YAMASAKI : Studies on *p*-Hydroxyphenyl- and Syringyl Lignins (September, 1978) (in English)
- No.34 Toshihide ICHIKAWA : Studies on the Mating Behavior of the Four Species of Auchenorrhynchous Homoptera which Attack the Rice Plant (February, 1979) (in English)
- No.35 Hiroshi YOSHIDA : A Study of the Development, Structure and Management of Co-operative Groups (March, 1980)
- No.36 Yutaka ISSHIKI : Nutritional and Physiological Studies on the Function of Ceca in Chickens (March, 1980)
- No.37 Toshiaki CHUJO : Studies on the Effects of Thermal Conditions on the Growth and Quality of Fruits of Fuyu Kaki (February, 1982)
- No.38 Masanori GOI : Studies on the Flower Formation and Forcing of Some Ornamental Trees and Shrubs in East Asia (February, 1982)
- No.39 Toshiyuki MATSUI : Food Chemical Studies on Wasanbon-to Sugar (Japanese traditionally refined sugar) (February, 1982)
- No.40 Yukihiko FUJIME : Studies on Thermal Conditions of Curd Formation and Development in Cauliflower and Broccoli, with Special Referene to Abnormal Curd Development (February, 1983)
- No.41 Souichi NISHIYAMA : Studies on the Water Hammer of the Air-entrained Flow in Irrigation Pipe Lines (February, 1983)
- No.42 Shigeyuki MAYAMA : The Role of Avenalumin in the Resistance of Oats to Crown Rust (October, 1983) (in English)

- No.43 Shigeru MONTANI : Early Diagenesis of Amino Acids in Marine Sediments (October, 1983)
- No.44 Masahiko ICHI : Studies on the Utility of Ratoon Traits of Rice as the Indicator of Agronomic Characters in Breebing (November, 1984) (in English)
- No.45 Ikuo KATAOKA : Studies on the Coloration of Grape Berries with Special Reference to the Regulation of Color Development by Absciscic Acid (October, 1986)
- No.46 Haruo SUZUKI : Agrometeorological Studies on the Effect on Soil Temperature, of Film Mulching and Canopy in the Upland Mulching Culture (October, 1986)
- No.47 Masayoshi MINOWA : A Study on Thermal Radiation Environment in an Open-type Livestock Barn (October, 1986)
- No.48 Masayuki FUJITA : Studies on Cytochrome P-450-Dependent Mixed Function Oxygenase in Sweet Potato Root Tissue (October, 1986)
- No.49 Michio TANAKA : Studies on the Clonal Propagation of *Phalaenopsis* through *in vitro* Culture (February, 1987)
- No.50 Atushi HASEGAWA : Studies on the Propagation of Oriental Cymbidium (December, 1987)
- No.51 Tadasi KASAI : Studies on the Hydorolysis of Oligosaccharides of Soybeans (December, 1987)
- No.52 Shogo AOYANAGI : Studies on the Physical Properties of Residual Granitic and Andesitic Soils in Setouchi Coastal Region, Northern Shikoku (December, 1987)
- No.53 Takeshi KATAYAMA : Degradation of Lignin Substructure Model Compounds by *Fusarium solani* M-13-1 (November, 1989) (in English)
- No.54 Takuro MASUDA : Studies on the Characteristics of Masa Soil as a Medium for Tree Growth and Methods for its Improvement (October, 1990)
- No.55 Kuninao TADA : Behavior of Dissolved Proteinous Substances and Amino Acids in Seawater (October, 1990)
- No.56 Seiichi FUKAI : Studies on the Cryopreservation of Shoot Tips of *Dianthus* and *Chrysanthemum* (October, 1992)
- No.57 Yuichi YOSHIDA : Studies on Flower and Fruit Development in Strawberry, with Special Reference to Fruit Malformation in 'Ai-Berry' (October, 1992)
- No.58 Tadashi OCHI : Studies on the Characteristics of Chemical Environment and the Recycling of Nutrient in Hiuchi Nada Sea Area (October, 1992)

平成4年10月25日印刷 平成4年10月30日発行

香川県木田郡三木町

香 川 大 学 農 学 部

印 刷 所 ア ー ト 印 刷 株 式 会 社

香川県木田郡三木町池戸1779番地13

電話(0878)91-0170番