

## ナシ培養茎頂の一つの簡易凍結保存法

新野孝男・八鍬春美・佐藤喜美雄・酒井 昭\*

農業生物資源研究所遺伝資源第二部

植物栄養体保存研究チーム

(〒996 山形県新庄市十日町 6000-1)

\*元北海道大学低温研究所

(〒001 札幌市北区麻布町 1-5-23)

(1991年8月2日受付)

(1991年9月18日受理)

培養したナシのシュートの茎端をプログラムフリーザー、凍害防御剤のジメチルスルフォキシド (DMSO) を使用せずに凍結保存する方法を検討した。5°C で3週間ハードニングしたシュートから切出した茎端を0.4 M ソルビトールと1.25 M グリセリンの凍害防御剤液で約18時間、5°C で浸透脱水した。その後、凍害防御剤液0.6 mlが入った2.0 mlのクライオチューブに茎端を入れ、-30°Cのフリーザーに1時間置き、凍結脱水後、液体窒素に浸漬した。急速融解した茎端のシュート形成率は約70%であった。この簡易凍結法で、他の8品種のナシでも高いシュート形成率が得られ、ナシ等の果樹類の培養シュートからの茎端の凍結保存法としてこの方法が実用的に使えるものと考えられた。

## 1. 緒言

近年、遺伝資源の長期保存に培養した茎頂を用いた凍結保存が注目されている。この保存は、コンパクトな保存ができる、無菌条件である、大量増殖が可能である、成育をコントロールできる、カルス等に比べ遺伝的変異の可能性が少ない等の利点がある。しかし、ナシの培養茎頂を用いた凍結保存の試みは、少ししか報告されていない<sup>1,2,3,4)</sup>。凍結保存に成功した報告は、いずれも低温(-1°C~5°C)下で、シュートをハードニングし、切出した茎頂を最適に組合わせた凍害防御剤中で、約-40°Cまで0.1~0.5°C/min.でゆっくり予備凍結した後、液体窒素(LN<sub>2</sub>)中に冷却する方法を採用している。凍害防御剤は、10~15%ジメチルスルフォキシド(DMSO)(W/V)と9.1~25.7%の糖あるいは糖アルコールを用いている。この、いわゆる緩速予備凍結法は、高価なプログラムフリーザーを使う必要があるとともに、植水、凍害防御剤の添加等複雑な操作があり、また、DMSOによる葉害の恐れもある。そこで、これらの問題点を解決し、より簡易な凍結保存法として、2~3 Mの凍害防御剤液で浸透脱水後、-30~-40°Cで予備凍結して補足

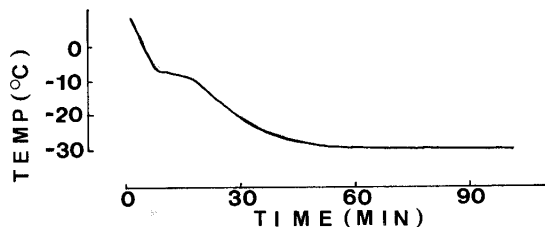
脱水することで、液体窒素中への急速冷却中における致命的な細胞内凍結を避ける方法が考えられている。ネーブルオレンジの珠心胚細胞を用いた実験では、2あるいは3 Mグリセリンと0.4 M シュークロースの凍害防御剤液に25°Cで10分間浸透脱水後、-30°Cで20~30分間凍結脱水し、LN<sub>2</sub>に冷却すれば、融解後の細胞の生存率は約90%であると報告されている<sup>5)</sup>。

本研究では、ナシの培養した茎頂を用い、この簡易な凍結保存法が茎頂の凍結保存に応用できるかを検討した。

## 2. 材料及び方法

## 材料

材料は主として約40日間隔で、継代培養しているナシ‘ブーレグマンリ’を用いた。その他、品種試験では、ニホンナシ3品種、セイヨウナシ5品種の培養茎頂を用いた。茎頂培養は、Murashige-Skoog (MS) 培地<sup>6)</sup>にベンジルアデニン2.5 mg/l、シュークロース2.5%を添加し、pH 5.6に調整した、0.8%寒天培地で行った。培養は、25°C、16時間照明(3,000 lux)で行った。実験に用いた茎頂は継代培養して30日間経過したシュートを5°C、8時間照明(1,000 lux)で3週間ハードニ



**Fig. 1** Freezing curve of 0.6 ml cryoprotective solution and 10 meristems placed in a 2.0 ml cryotube.

The 0.6 ml cryoprotective solution and 10 meristems placed in a cryotube were directly transferred to a freezer at  $-30^{\circ}\text{C}$ . The cryoprotective solution containing 0.4 M sorbitol and 1.25 M glycerol initiated freezing at about  $-9^{\circ}\text{C}$ .

ングしたものを用いた（予備実験でハードニングしない茎頂を  $-196^{\circ}\text{C}$  に冷却した場合シュート形成はほとんど見られないことを確認している）。茎頂の大きさは長さ 2~3 mm, 幅約 1 mm とした。

#### 凍害防御剤

凍害防御剤としてグリセリンのみを用いて茎頂を  $-196^{\circ}\text{C}$  に冷却した予備実験で、茎頂の生存、シュート形成が最も高くなったグリセリンの濃度は 1.25 M (18 時間処理) であった。そこで、本実験では、グリセリンの濃度は 1.25 M とし、それに 0.4 M の糖（主にソルビトール）を併用して凍害防御剤混合液とした。切り出した茎頂は 2 ml クライオチューブ (Wheaton 社製) に 10 茎頂と混合液 0.6 ml を入れ、 $5^{\circ}\text{C}$  で 1 晩 (約 18 時間) 浸漬した。

#### 予備凍結と融解

クライオチューブに入れた茎頂は  $5^{\circ}\text{C}$  からそのまま直接  $-30^{\circ}\text{C}$  のフリーザーにいれ、予備凍結させた。凍害防御剤混合液は、 $-8.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  まで過冷却した後、凍結を開始した。凍結後  $-30^{\circ}\text{C}$  に達するまでの時間は約 1 時間であった (Fig. 1)。 $-30^{\circ}\text{C}$  に達してから 0~4 時間後に、クライオチューブをキャニスターのなかに入れ、 $\text{LN}_2$  に浸漬した (冷却速度約  $280^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )。融解は  $37^{\circ}\text{C}$  の水のなかにかキャニスターとともに 2 分間浸漬して行った (加温速度約  $280^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )。融解した茎頂は 1.25 M グリセロール液で 2 回洗浄した後、上記の MS 培地から  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を除いた培地に植えつけた。

#### 回復調査

回復調査は融解植付け 40 日後に行い、茎頂の一部でも緑色を呈したものを生存、明瞭なシュートを形成したものをシュート形成とし、それらの百分率で生存率及び

**Table 1.** Effect of sugar or sugar alcohol in combination with 1.25M glycerol on the shoot formation of in-vitro-grown pear shoot tips immersed in  $\text{LN}_2$  after prefreezing at  $-30^{\circ}\text{C}$

Sugar or Sugar alcohol	Survival (% $\pm$ S.E.)	Shoot formation (% $\pm$ S.E.)
0.4M Sorbitol	85 $\pm$ 7	70 $\pm$ 6
0.4M Sucrose	80 $\pm$ 4	43 $\pm$ 5
0.4M Glucose	68 $\pm$ 3	43 $\pm$ 5

Cryoprotection of shoot tips was compared for three cryoprotectants in combination with 1.25M glycerol at  $5^{\circ}\text{C}$  for 18hrs. The shoot tips were placed in a cryotube with 0.6 ml cryoprotective solution and then placed in a freezer at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 2 hrs prior to a plunge into  $\text{LN}_2$ . After rapid thawing in  $37^{\circ}\text{C}$  water, the shoot tips were washed with 1.25M glycerol twice. The shoot tips were placed onto 0.8% agar MS medium excluding  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Ten shoot tips were tested for each of four replicates.

Pear: *Pyrus communis* L. cv. Beurré d'Amanlis.

シュート形成率で示した。試験は、1 試験区 10 茎頂、4 反復を基本として行った。

#### 3. 結果

1.25 M グリセリンの存在下で  $-196^{\circ}\text{C}$  に冷却された茎頂の回復に及ぼす糖及びソルビトールの影響を調べた。 $-196^{\circ}\text{C}$  に冷却された茎頂は植付け後一旦褪色し、約 10 日位で緑のスポットがみられ、約 20~30 日で明瞭なシュートを形成するようになった。最も高いシュート形成率が得られたのはソルビトールで、ついでシュークロース、グルコースの順であった (Table 1)。そこで、以下の試験ではソルビトールをグリセリンに添加して用いた。 $-196^{\circ}\text{C}$  に冷却された茎頂の回復に及ぼすソルビトールの濃度の影響について検討した。ソルビトール無添加区ではシュート形成はほとんどなく、0.4 M あるいは 0.6 M の濃度で最も高いシュート形成率が得られた。しかし、濃度がこれ以上高くなるとシュート形成率が低くなった (Table 2)。

1.25 M グリセリンと 0.4 M ソルビトールの存在下で、 $-196^{\circ}\text{C}$  に冷却された茎頂の回復に及ぼす  $-30^{\circ}\text{C}$  での処理時間の影響を検討した。 $-30^{\circ}\text{C}$  での保持時間 (凍結脱水時間) が 0 時間では 18% のシュート形成しか得られなかった。しかし  $-30^{\circ}\text{C}$  で 1 時間凍結脱水することにより 68% と急激なシュート形成率の高まりが見られた。凍結脱水が 2 時間ではシュート形成率が 50% となり、

**Table 2.** Effect of sorbitol concentration on the shoot formation of in-vitro-grown pear shoot tips immersed in LN<sub>2</sub> after prefreezing at -30°C

Concentration of sorbitol (M)	Survival (% ± S. E.)	Shoot formation (% ± S. E.)
0	25±9	8±5
0.2	78±8	28±8
0.4	83±5	55±7
0.6	83±5	53±6
0.8	70±4	38±5
1.0	63±6	33±9

Cryoprotection was compared for six sorbitol concentrations supplemented with 1.25M glycerol at 5°C for 18 hrs. The shoot tips were placed in a 2.0 ml cryotube with 0.6 ml cryoprotective solution and then placed in a freezer at -30°C for 2 hrs prior to a plunge into LN<sub>2</sub>. The other conditions were the same as those shown Table 1.

**Table 3.** Effect of holding time at -30°C on the shoot formation of in-vitro-grown pear shoot tips frozen in LN<sub>2</sub>

Holding time at -30°C (hrs.)	Survival (% ± S. E.)	Shoot formation (% ± S. E.)
0	50±9	18±5
1	90±4	68±5
2	88±3	50±7
3	68±8	35±5
4	70±8	33±5

The shoot tips were cryoprotected with a mixture of 1.25M glycerol and 0.4M sorbitol solution at 5°C for 18 hrs. The shoot tips were placed in a 2.0 ml cryotube with 0.6 ml cryoprotective solution. They were directly transferred to a freezer at -30°C and held there for 0-4hrs prior to a plunge into LN<sub>2</sub>. The other conditions were the same as those shown Table 1.

**Table 4.** Shoot formation of in-vitro-grown shoot tips of eight pear cultivars frozen in LN<sub>2</sub>.

Cultivar	Survival (% ± S. E.)	Shoot formation (% ± S. E.)
<i>Pyrus communis</i>		
cv. Joséphine de Malines	55±7	33±5
cv. Idaho	63±5	48±3
cv. Beurré Jean Van Geert	80±6	60±4
cv. Duchesse d'Angouleme	73±6	65±7
cv. Beurré Superfin	60±4	38±3
<i>Pyrus pyrifolia</i>		
cv. Senryo	85±5	70±4
cv. Yoshino	83±5	50±4
cv. Hokkaiwase	80±5	60±5

Shoot tips were cryoprotected with a mixture of 1.25M glycerol and 0.4M sorbitol at 5°C for 18 hrs. The shoot tips were placed in a 2.0 ml cryotube with 0.6 ml cryoprotective solution. They were then placed in a freezer at -30°C for 1 hrs prior to a plunge into LN<sub>2</sub>. The other conditions were the same as those shown Table 1.

それ以上の処理時間ではシュート形成率は逆に低下する傾向にあった (Table 3).

以下の結果, ハードニングしたシュートから切り出した茎頂を 1.25 M グリセリンと 0.4 M ソルビトール混合液に 1 晩浸漬後, -30°C のフリーザーに直接入れ, -30°C になってから 1 時間凍結脱水する方法が -196°C

に冷却された茎頂から最も高いシュート形成率が得られることが分かった。そこで, この方法を用いて, セイヨウナシ 5 品種, ニホンナシ 3 品種の培養茎頂を用いて, 品種試験を行った。その結果, セイヨウナシでは 33~65%, ニホンナシでは 50~70% と良好なシュート形成率をうることができた (Table 4).

**Table 5.** The shoot formation of in-vitro-grown pear shoot tips frozen in LN<sub>2</sub> by three different cryogenic protocols.

Method	Survival (% ± S. E.)	Shoot formation (% ± S. E.)
Conventional slow freezing <sup>1</sup>	80±5	45±5
Simple freezing <sup>2</sup>	85±5	70±5
Vitrification (PVS2) <sup>3</sup>	83±3	68±3

<sup>1</sup> Shoot tips were precultured at 5°C for 18 hrs in 0.5M sorbitol solution and then cooled to -40°C at 0.5°C/min in the presence of 10% DMSO and 0.5M sorbitol.

<sup>2</sup> Shoot tips were treated with cryoprotective solution containing 0.4M sorbitol and 1.25M glycerol at 5°C for 18 hrs and then frozen in a freezer at -30°C for 1 hr prior to a plunge into LN<sub>2</sub>.

<sup>3</sup> Shoot tips were precultured at 5°C for 1 day on MS medium containing 0.7M sucrose and then treated with PVS2<sup>10</sup> at 25°C for 90 min prior to a plunge into LN<sub>2</sub>.

The shoot tips were placed onto 0.8% agar MS medium excluding NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Twenty shoot tips were tested for each of duplicates.

Pear: *Pyrus pyrifolia* cv. Senryo

次に、この浸透脱水と予備凍結を組み合わせた簡易凍結法、従来の緩速予備凍結法及びビトリフィケーション法<sup>13</sup>の3つの液体窒素保存方法についてシュート形成率を比較した。その結果、3方法とも生存率についてはほぼ同様な成績が得られたが、シュート形成率では明らかに今回の簡易凍結法とビトリフィケーション法が従来の緩速予備凍結法に比べ、優れていることがわかった (Table 5)。

#### 4. 考 察

液体窒素保存を実用的なレベルにするためには、①茎頂の切出しが簡単にできる、②凍害防御剤処理が簡単かつシステム化でき、また薬害の心配がない、③プログラムフリーザーがなくても予備凍結ができる等の操作を解決する必要がある。これらを解決する方法として浸透脱水-予備凍結法<sup>5,7</sup>、ビトリフィケーション法<sup>8,9,10,11,12,13</sup>、乾燥法<sup>14</sup>が現在開発されつつある。今回の簡易凍結法は、1.25 M グリセリンと 0.4 M ソルビトール混合液で約 18 時間浸透脱水した後、-30°C のフリーザーで補足的に凍結脱水した後、LN<sub>2</sub> に冷却する方法である。浸透脱水の時間は、ネーブルオレンジの珠心胚由来カルス組織では 2-3 M グリセリン+0.4 M シュークロース液中で 25°C、10 分処理<sup>5</sup>で、シロクロバのカルス、茎頂では 3 M グリセリンでそれぞれ 25°C で 10 分処理<sup>7</sup>で高い生存率を得ている。本実験では、処理時間は 5°C で 1 晩

浸漬 (約 18 時間) と長くしても問題はなく、これは 2-3 mm の大きい茎頂を用いているためと考えられる。また、この方法では、グリセロールの細胞への浸透はあまりなく、細胞への凍害防御剤の十分な浸透は必ずしも必要でないと思われる<sup>5</sup>。

DMSO による薬害については、浸漬方法あるいは時間を慎重に行うことである程度避けることができるが、再成長が劣る例も見られる<sup>15</sup>。このことから、今回の方法が DMSO を使うことなく凍結保存できることは、大きな利点の一つであると言える。

-30°C での凍結脱水のための処理時間は、ネーブルオレンジの珠心胚由来カルスでは、0.5 ml ストロー中で約 0.2 ml の細胞浮遊液を凍結するために、20-30 分と短かった<sup>5</sup>が、シロクロバの茎頂では 1 時間<sup>7</sup>で、本実験での、最もシュート形成率の良好な処理時間とほぼ同じであった。茎頂の場合は、その茎頂の大きさ、茎頂の形態、浸漬液量等により、この脱水時間が変わる可能性はあるものと思われる。

木本性遺伝資源保存のために培養茎頂の液体窒素保存の研究は、Rubus 属<sup>16</sup>、リンゴ<sup>13</sup>、ナシ<sup>1,2,3,4,13</sup>、クワ<sup>17,18</sup>等で行われているが、ほとんどの研究では、緩速予備凍結法を用いている。今回の浸透脱水-予備凍結法は、従来の緩速予備凍結法に比べ、凍害防御剤の処理が簡単で、DMSO を使用せずまたプログラムフリーザー

と植氷凍結が不必要である。その上、茎頂の切出しが簡単である等多くの利点がある。今後、この方法が、ナシ以外の培養茎頂の液体窒素保存に適用されることを希望する。なお、現在までクワ、リンゴの数品種ではこの方法である程度のシュート形成が得られることは確認しているが、さらに最適な処理条件を設定していく必要がある。

本研究の遂行にあたり御協力頂いた白田和人植物栄養体保存研究チーム長に、また、本研究の培養等の実験的補助を頂いた竹田洋子氏、柿崎くめ子氏に深く感謝します。

#### 文 献

- 1) Reed, M., 1990. HortScience, **25**: 111-113.
- 2) Dereuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud, M. Duron, 1990. C. R. Acad. Sci. Paris, **310**: 265-272.
- 3) 新野孝男, 佐藤喜美雄, 岡 成美, 1989. 園学要旨, 平1東北支部: 51-52.
- 4) 新野孝男, 八畝春美, 石原愛也, 1990. 園学雑, **59** 別1: 46-47.
- 5) Sakai, A., Kobayashi, I. Oiyama, 1991. Plant Sci., **74**: 243-248.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 7) 山田敏彦, 1991. 東北農試研究報告, **83**: 21-145.
- 8) Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai, T. A. Takahashi, 1989. Plant Cell Rep., **8**: 418-421.
- 9) Sakai, A., S. Kobayashi, I. Oiyama, 1990a, J. Plant Physiol., **137**: 465-470.
- 10) Sakai, A., S. Kobayashi, I. Oiyama, 1990b. Plant Cell Rep., **9**: 30-33.
- 11) Towill, L. E., 1990. Plant Cell Rep., **9**: 178-180.
- 12) Yamada, T., A. Sakai, T. Matumura, S. Higuchi, 1991. Plant Sci., **78**: 81-87.
- 13) Niino, T., A. Sakai, H. Yakuwa, K. Nojiri, Plant Cell Tissue Org. Cult., (in press)
- 14) Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai, 1990. Plant Cell Rep. **9**: 328-331.
- 15) Diettrich, B., S. Popov, B. Pfeiffer, D. Newmann, R. Butenko, M. Luckner, 1982. Plant Med., **4b**: 82-87.
- 16) Reed, M., H. B. Lagerstedt, 1987. HortScience, **22**: 302-303.
- 17) 新野孝男, 岡 成美, 1990a. 日蚕雑, **59**: 111-117.
- 18) 新野孝男, 1990 b. 日蚕雑, **59**: 135-142.

#### Summary

### A Simple Freezing Method for Cryopreservation of In-vitro-grown Pear Shoots.

Takao NIINO, Harumi YAKUWA, Kimio SATO and Akira SAKAI\*

*Department of Genetic Resources II, National Institute of Agrobiological Resources.*

6000-1, Tohkamachi, Shinjo, Yamagata, 996, Japan

*\*Pre Institute Low Temperature Science, Hokkaido University.*

Asabucho 1-5-23, Kitaku, Sapporo, 001 Japan

In-vitro grown shoot tips of pear (*Pyrus*) were cryopreserved without using a programable freezer and dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant. The shoot tips were cryoprotected with a solution of 0.4 M sorbitol and 1.25 M glycerol at 5°C for 18 hrs. The shoot tips were placed in a 2.0 ml cryotube with 0.6 ml of cryoprotective solution and then placed in a freezer at -30°C for 1 hr prior to a plunge into LN<sub>2</sub>. The average rate of shoot formation was about 70%. This simple freezing method was successfully applied to eight pear cultivars. This method appears promising as a practical method for cryopreserving shoot tips from in-vitro-grown plantlets of fruit trees.