

植物の培養細胞・組織の超低温保存

酒井 昭*

(1996年1月16日受理)

1. はじめに

将来の食糧確保のための育種事業に必要な遺伝資源や各種の細胞株を中-長期的に保持するために、また絶滅の危機に曝されている植物の *in vitro* culture による増殖や保存と関連して、さらには地球上のバイオマスの改良と増産のためのクローン林業などで、超低温(約 -150°C 以下)保存は重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。超低温保存技術は、凍結に耐えない培養細胞や茎頂、体細胞不定胚などを約 -150°C 以下の温度に貯蔵後植物体に再生させる一連の技術で、組織培養技術と低温生物学的知識とのドッキングの上に発達をつづけてきた。

1980年中頃以降、組織培養技術の進展と遺伝資源の超低温保存の必要性が国内外で認められ、各種の研究機関で超低温保存のプロジェクトが発足した。そこで従来のような特殊な設備と煩雑な操作を必要としない、簡便で効率的な技術の開発が国内外で強く求められていた。そこで筆者らは1990年、プログラムフリーザーを必要としない、クライオチューブを使用したガラス化法(Sakaiら1990)⁴⁾を、同年にフランスのDereuddreらはビーズ乾燥法⁵⁾を発表した。これらの新しい簡便法によって過去5年間に超低温保存できる植物の数が飛躍的に増加した。

1956年に、冬のヤナギの枝とクワの韌皮組織を用い、予備凍結法とガラス化法で植物を液体窒素温度(-196°C)で初めて生かすことに成功してから、現在まで40年間にわたり中断しながらも、培養組織や茎頂の予備緩速凍結法、ガラス化法、簡易凍結法、ビーズガラス化法、改良ビーズ乾燥法を発表し、超低温保存技術の発展に寄与できたことは幸運であったと思う。

2. 耐凍性の高い植物組織の液体窒素温度での生存実験

(1) 初期のガラス化法

1937年、アメリカの生物物理学者のLuyet⁶⁾は氷核の形成およびその成長可能温度範囲を超急速に冷却させれば、氷核の形成と成長が抑えられるので生物細胞は凍結せずにガラス化(vitrification)⁶⁾し、液体窒素温度(-196°C)でも生存させられると指摘した。なお、ガラス化現象では、溶液の組成とその濃度に固有なガラス相転移温度まで過冷却したのち、溶液全体が固体のガラス(非結晶質)に相変化するため、溶液に含まれている水の凍結を回避できる。そしてガラスを緩速に温める時には溶液中の水が凍結するが、この凍結は温水中で急速に温めれば防げる⁷⁾。この当時、乾燥していない生物細胞を液体窒素温度で生かし保存することは人類の夢であった。そこで、この報告にもとづいて血液細胞、神経細胞、タマネギのりん片細胞など微小な細胞や組織で超急速冷却の実験が国際的に相次いで試みられた。しかし凍結に耐えないか、凍結耐性の低い細胞を液体窒素温度に超急速冷却すると冷却中に致死的な細胞内凍結がおり、これらの試みは成功しなかった。1956年に、筆者⁸⁾は -30°C 以下の凍結に耐える耐凍性の高いクワの枝の韌皮組織の微小切片(1細胞層、 $3\times 4\text{mm}^2$)をピンセットでつまみ、室温から直接、液体窒素中に冷却($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)し、10分後 30°C の温水中で急速に温めたところ、約80%の細胞は生存していた。ついで同じクワ組織切片を3-4Mの高張なエチレングリコール(EG)水溶液で10分間処理してから、その液に浸して、液体窒素中に冷却した時には、温水中で温めれば比較的容易に生かすことができた¹⁰⁾。これらの実験は、耐凍性の高い組織切片を超急速または凍害防御剤の濃厚溶液で浸透脱水してから室温から液体窒素中に直接冷却してガラス化させ生かした最初の成功例である。

(2) 予備凍結法によるヤナギの超低温保存

植物細胞や組織を細胞外凍結で十分に凍結脱水してから

Akira SAKAI*

Cryopreservation of Cultured Plant Cells and Meristems.
〒001 札幌市北区麻生町1-5-23* Asabucho 1-5-23, Sapporo 001, Japan
(Hokkaido University, retired)

ら液体窒素中に冷却すれば、これらを液体窒素温度で生かせる可能性が考えられる。しかし1950年代の始めごろまでは、耐凍性の高い植物組織でも耐えうる最低温度は自然界で起こる最低温度である $-70\text{--}80^{\circ}\text{C}$ 程度と考えられていた⁹⁾。筆者は、1955年の冬に、耐凍性の高いヤナギの枝を異なる温度まで凍結脱水してから液体窒素中に冷却し 0°C の空中で温めた。 -15°C 以下 -70°C までの温度で凍結脱水したのち液体窒素に冷却した枝はすべて生きており、正常に発根しシュートを伸長した^{10,11)}。さらに -30°C まで凍結脱水後、1年間液体窒素に貯蔵したヤナギの枝は 0°C の空中で融解後、正常に伸長した。これらの実験は、乾燥していない植物を液体窒素温度で生かし植物体に再生させた最初の成功例である。こうして細胞外凍結で十分に脱水後、液体窒素温度に冷却して生かす方法を予備凍結法と呼んだ^{11,12)}。また凍結に耐えられない培養細胞や茎頂は、グリセリンやDMSOなどの凍害防御剤で処理して予め $-30\text{--}40^{\circ}\text{C}$ の凍結耐性を付与したのち、この温度範囲まで凍結脱水すれば液体窒素温度で生かせる可能性が生じた。しかしこの可能性が培養細胞で確かめられるまでには10年以上の長い年月を必要とした。

植物の培養細胞で最初に液体窒素保存に成功し、さらに保存したニンジンの培養細胞から植物体の再生に成功したのはNag & Street(1973)¹³⁾である。この当時の冷却方法は -70°C まで緩速に冷却後液体窒素に冷却する方法が植物で採られていたので、筆者ら¹⁴⁾は $-30\text{--}50^{\circ}\text{C}$ まで凍結脱水後液体窒素に冷却する予備凍結法を発表した。また茎頂の凍結保存の最初の成功はカーネーションで1976年に報告¹⁵⁾され、その後、イチゴ、パレイショ、エンドウなど多くの材料で報告された¹⁶⁾。しかし液体窒素に冷却された茎頂のドーム部位の分裂細胞が殆ど凍死し、生き残った細胞がカルス化し、二次的にシュートを形成する可能性が指摘され¹⁷⁾、茎頂の凍結保存に問題が投げかけられ研究は中断していた。

3. 1988年以降の新しい取り組み

定年3年後の1986年、約1年間かけて日本国内の動物、植物、微生物の凍結保存の現状を「凍結保存」¹⁸⁾に取りまとめ、また植物の耐凍性に関する英文専門書を外国で出版して身軽になった。そこで1987年春から1年間アメリカの大学において超低温保存の研究の現状を探った。訪問先はアメリカタイプカルチャーコレクション(ATCC)、医学材料の凍結保存で著名なDr. Merymannの研究室、植物関係ではコーネル大学のDr. Steponkusの研究室、コロラドのUSDAの種子貯蔵研究所などである。この頃の新しい研究の動向は走査示差

熱熱量計(DSC)を用いた各種凍害防御剤のフェーズダイアグラムの研究¹⁹⁾、濃厚な凍害防御剤で浸透脱水された血球のモノサイトのガラス化による超低温保存の研究が行われていた²⁰⁾。この当時にはDSCを用いた研究によってvitrificationの基礎概念が明らかにされ、動物細胞・組織をガラス化によって超低温で生かそうとする機運がたかまっていた。

(1) 培養細胞のガラス化法

組織培養技術の発達により、色々な植物で大量増殖が容易になり、それにつれて継代培養による大量の培養植物を維持する労力、スペース、経費、変異の発生、コンタミネーションなどが問題になってきた。したがって必要な培養細胞、茎頂、不定胚などを中-長期的に安定保存するには超低温保存が理想的である。しかし従来の緩速予備凍結法では、高価なプログラムフリーザを必要とし、操作が面倒である上、1回の実験に数時間を要し多量の液体窒素を必要とした。そのため特殊な設備を必要としない、簡便で効率的な超低温保存法の開発を試みた。

ガラス化法で使用するガラス化液として要求される3つの条件がある: 1) 通常の冷却速度で -70°C まで容易に過冷却し、 -100°C 以下でガラス化すること; 2) 薬害ができるだけ少なく脱水能力が高い; 3) ある程度細胞内に透過できること。こうした条件を充すガラス化液としてグリセリンを主体にし、それにDMSO, EG, スクロースを交えた約7.5 Mの濃厚な混合液を考えた。グリセリンを主体にしたのは、EGやDMSOと比較して薬害が少ないことと、細胞内への浸透性が小さいと考えたからである。これらのことは、のちにオレンジの珠心胚細胞のプロトプラストで確認できた。このガラス化法の実験では、安定した培養細胞で個体に再生できるオレンジの珠心胚カルスを選んだ。そこで以前から知り合いの果樹試験場安芸津支場の小林省蔵博士に協力を求めた。研究目的は、高い生存率が得られるガラス化液の組成とその操作法の選定である。1988年初夏ごろから実験を試みた。札幌から安芸津に自費で向ういて1週間に5日間ずつ半年間に3回行った実験は失敗の連続であった。しかしその年の10月中頃、4回目の実験でついに高い生存率が得られ細胞の増殖が確認された。このガラス化液をPVS2⁴⁾と呼んだ。この組成は30%(w/v)グリセリン; 15%(w/v)EG; 15%(w/v)DMSOを0.4 Mスクロースを含む基本培地に溶かしたものである。DSCでの測定によって、この液のガラス転移点(Tg)は約 -115°C 、融点(Tm)は約 -37°C であった⁴⁾。このガラス化液は現在も国内や外国で最も多く使われている。またガラス化液としてPVS2のほかPVS3: 50%(w/v)グ

リセリンと 50% (w/v) スクロースとの混合液²¹⁾も発表した。この液は粘性が高すぎるためグリセリンとスクロースの各 40% の混合液を使用している。なお、ガラス化液として EG を主体にし、ソルビトールを交えた液がコーネル大学の Langis ら²²⁾によって使用されている。

オレンジのパックドセルを室温で 2 分間 PVS 2 液で処理したのち、クライオチューブ (1.8 ml) または 0.5 ml のストローにいれ液体窒素中に冷却された細胞は 80-90% が生存しており、増殖し個体に再生した^{4,23)}。2 分間の処理中に、凍害防御剤がある程度透過して脱水耐性を高め、さらに細胞内の水が脱水され、液体窒素温度に冷却中に約 -115°C で細胞および PVS 2 液が共にガラス化し、その状態で液体窒素温度で貯蔵される。ガラス化法では、培養細胞を直接高濃度のガラス化液に浸すために、浸透ストレス傷害や葉害を起こし易い。そこで PVS 2 液で処理する前に凍害防御剤の混合液 (2 M グリセリン + 0.4 M スクロース) で室温で 10 分間処理後 0°C の PVS 2 または PVS 3 液で処理した場合、アスパラガスの細胞では 90% 近い細胞が生存し高い植物再生率を示した²¹⁾。さらに脱水耐性の低い培養細胞では、0.3 M スクロースまたはマンニトール溶液で 1-3 日間前培養したのち、 0°C に冷やされた PVS 2 の 30% と 60% 希釈液で処理後、100% PVS 2 液で処理することによって、オランダではタバコと *Catharanthus* の細胞^{24,25)}で、中国ではイネの細胞²⁶⁾でかなり高い生存率を得ている。なお、従来の緩速予備凍結法 (凍結保存) と違い、ガラス化法 (超低温保存) では細胞内も外液 (ガラス化液) もガラス化し全く凍結が起きないので、これを凍結保存と呼ぶのは適当ではないと思う。

(2) 簡易凍結法

この方法は筆者がガラス化法の失敗の繰り返しの中で思い付いたもので、細い試験管中にパックドセルをいれ、それに 2 M グリセリンと 0.4 M スクロースの混合液を加え室温で 10 分間処理したのち、 -30°C のフリーザ (気相) に試験管を移し自発凍結させる。そこに約 1-2 時間おいて細胞を凍結脱水後液体窒素に入れる²⁷⁾。この方法は振とう培養細胞^{27,28)}を凍結保存する一つの簡便法で、最近、川原・秋田ら^{29,30)}はタバコ、ニンジン、ポプラ、シロイヌナズナなどでも成功している。なお、2 M グリセリンと 0.4 M スクロースを -30°C で凍結すると 40-50% のグリセリンとスクロースの濃厚な混合液 (PVS 3) となる。そこで -30°C で凍結する代わりに 0°C の PVS 3 で脱水処理してもほぼ同じ生存率が得られている²¹⁾。

(3) 茎頂のガラス化法

茎頂のガラス化法では 1 日間前培養されたクローバーの茎頂を 1.8 ml のクライオチューブに入れ、PVS 2 液で室温で 5 分または 0°C で 10-30 分間処理して脱水後直接液体窒素に冷却 (冷却速度: 約 $160^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) してガラス化させ、80-90% の高いシュート形成率を得た。このように草本類の茎頂のガラス化法による超低温保存は、従来の凍結保存法と比べ操作が簡単で、処理時間が短く、しかも高いシュート形成率が得られる³¹⁾。こうした利点の他、液体窒素処理された茎頂は再培養後も退色することなく 2-3 日以内に生長を始め、シュート形成が早く、カルス化は殆ど見られなかった。実際に液体窒素処理された茎頂を再培養後縦断切片を調べたところ、茎頂のドーム部位の分裂組織が殆ど傷害をうけていなかった。ニンニクの茎頂を従来の緩速予備凍結法とガラス化法と比較した Niwata³²⁾の結果によれば、従来の緩速凍結法では約半数の茎頂がカルス化するか異常であったが、ガラス化法では殆ど異常は認められなかった。このガラス化法による茎頂の超低温保存は簡便で理想的であるが、残る問題は適用範囲の調査である。まずリンゴ (5 品種)³³⁾、ナシ (8 品種)³³⁾の培養茎頂では、予め 3 週間コールド・ハードニングしたのち、茎頂を取り出し、スクロースを含む寒天培地上で 16 時間前培養された茎頂はガラス化法で 60-70% のシュート形成率を示した。さらにクワの 13 品種³⁴⁾について上記の方法でかなり高いシュート形成率が得られた。その他の木本植物での成功例はラズベリー³⁵⁾、チャノキ³⁶⁾、チェリー³⁷⁾などである。さらに最近ではオーストラリアの絶滅に類している木本植物の *Greville* を始め約 15 種でガラス化法による成功例が報告されている³⁸⁾。

アスパラガスの多芽体³⁹⁾やダイアンサス⁴⁰⁾以外のクローバー³¹⁾、キク⁴⁰⁾、リンドウ⁴¹⁾などの草本植物の培養茎頂では、スクロースまたはソルビトールを含む寒天培地上で 1 日間前培養後 PVS 2 液で処理すれば高いシュート形成率が得られた。しかしワサビ⁴²⁾を始めかなり多くの草木植物では、シュート形成率が低かった。これら耐性の低い茎頂では、前培養後 2 M グリセリンと 0.4 M スクロースの混合液で室温で 20 分間処理 (ローディング処理) して脱水耐性を高めてから PVS 2 液で処理すると高いシュート形成率が得られた⁴²⁾。これを契機として他の多くの材料でもローディング処理することにより高いシュート形成率が得られるようになった。たとえばササユリ⁴³⁾、スターチス⁴⁴⁾、毛根根の根端分裂組織ではオタネニンジン⁴⁵⁾、ペラドーナ⁴⁶⁾、西洋ワサビ⁴⁷⁾で成功例が相次いだ。さらに同じ方法で石垣島の国際農水圏でタロの茎頂⁴⁸⁾、パパイヤの不定胚 (Lu ら未発表) が成功し、

Table 1. Successful cryopreservation of meristems cooled to -196°C by vitrification using PVS 2

Plant	Pretreatment	References
Woody plants		
Apple (5 sp, cv)	CH, PC	33
Cherry (8 cv)	CH, PC	37
<i>Grevillea scapigera</i> *	PC, LD	38
<i>G. cirsiifolia</i> *	PC, LD	38
Mulberry (13 sp, cv)	CH, PC	34
Pear (5 cv)	CH, PC	33
Raspberry (3 cv)	CH, PC	35
Tea plant	CH, PC	36
Herbaceous plants		
Asparagus (bud cluster)	None	39
<i>Bletilla striata</i> (protocome)	PC, LD	49
Chrysanthemum	PC	40
Dianthus	PC	40
Gallic** (12 cv)	None	32
Gentiana	PC	41
<i>Lilium japonicum</i>	CH, PC, LD	43
Statice (4 cv)	CH, PC, LD	44
Taro	PC, LD	48
Wasabi (4 cv)	PC, LD	42
White clover (3 sp)	PC	31
Hairy roots		
<i>Armoracia rusticana</i>	PC, LD	47
<i>Atropa belladonna</i>	PC, LD	46
<i>Panax ginseng</i>	PC, LD	45

CH: cold-hardening, PC: preculture, LD: loading treatment with 2 M glycerol plus 0.4 M sucrose, *Australian endangered woody plants and 6 other species; **Post dormant bulbs.

cv: cultivar, sp: species.

千葉大学でランのプロトコム⁴⁹⁾でもガラス化法の有効性が実証された。これら異なる材料における PVS 2 液での処理時間は、温度によって、また取り出した茎頂の大きさ、茎頂の性質、ことにドームの分裂組織上部の被覆状態によってかなり異なる。また耐性の低い茎頂では、 0°C に冷やされた PVS 2 溶液で時間をかけて処理した方が生存率が高い。PVS 2 液を用いたガラス化法による茎頂での成功例を **Table 1** に取りまとめ示す。

(4) ビーズガラス化法の開発 (**Fig. 1**)

ガラス化法は簡単で比較的短時間の操作で高いシュート形成率が得られるので、茎頂の一つの有力な超低温保存法である。しかしこの方法では多量の茎頂を同時に処理できない。また毛状根の分裂組織や小さい材料ではピンセットでそれらを処理することが面倒である。そこでこうした小さい材料をローディング液 (2 M グリセリンと 0.4 M スクロース) を含むアルギン酸ソーダのビーズ

(直径 3-4 mm) に包み込んだのち、 0°C に冷却した約 50 ml の PVS 2 を入れたビーカー (200 ml) 中で 100 分間振とうしながら脱水したのち、10 個ずつビーズをクライオチューブにいれ、液体窒素に冷却する方法 (ビーズガラス化法) を発表した⁵⁰⁾。この方法では材料が取扱い易く、しかもガラス化法と同程度のシュート形成率が得られた⁵⁰⁾ (**Fig. 1**)。また、あとで説明するビーズ乾燥法と比べ、ビーズガラス化法ではシュート形成率が約 30% 高く、その上、脱水時間が著しく縮小できる。こうした利点のほか、ビーズガラス化法は取扱いが容易であるため培養細胞、藻類、毛状根、茎頂、不定胚などの実用的な保存法になる可能性がある。

(5) 改良ビーズ乾燥法

ビーズ乾燥法は、茎頂をアルギン酸ソーダのビーズに取り込み、0.8 M スクロースで 16 時間処理して乾燥耐性を誘導後クリンベンチ上で数時間乾燥させ、乾燥した

Encapsulation-vitrification

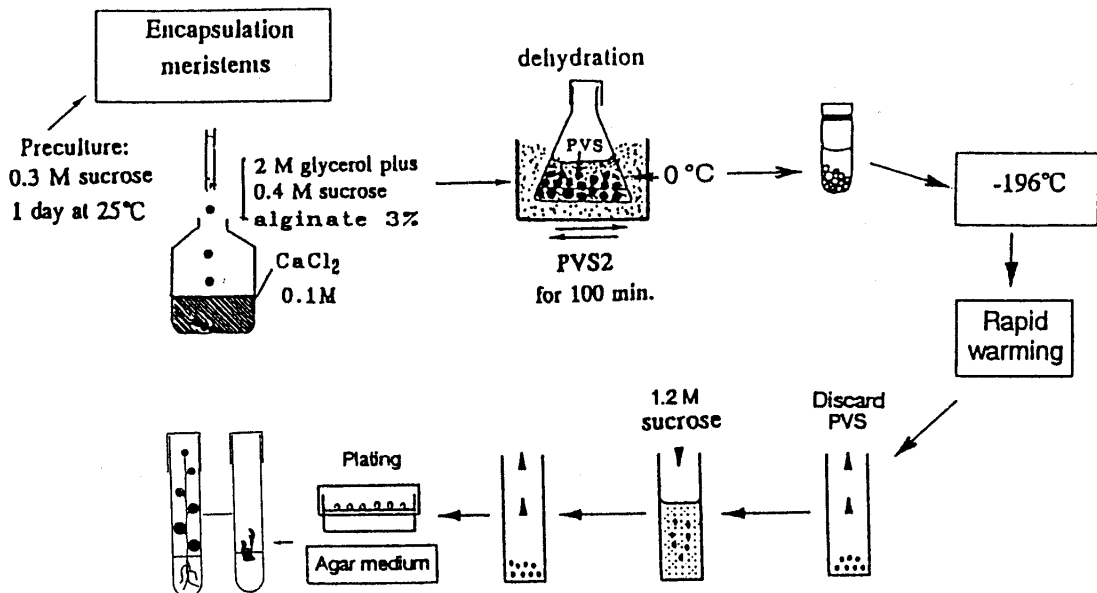


Fig. 1 Encapsulation/vitrification procedure for cryopreservation of meristems (Matsumoto *et al.* 1995).

ビーズを液体窒素中に投入して生かす方法で、フランスの Dereuddre^{5,51)} によって発表された。この方法の特徴はビーズに入れられた茎頂を 0.8 M スクロース溶液に浸し 16 時間処理して脱水耐性を高めることにある。この場合、乾燥中にビーズ内の糖の濃度が高まるにつれて、茎頂は浸透的に脱水され、やがて糖の飽和濃度または過飽和濃度で茎頂からの脱水が進み、茎頂の含水量が約 20% (生重量) に達したとき液体窒素に冷却してガラス化させる。この方法は乾燥に数時間を必要とするが操作が簡単であるため多くの茎頂の保存に試みられた。しかしこの方法では、一般にシュート形成率が低く、シュート形成に時間を要する。そこで筆者ら⁵²⁾ は、シュート形成率をさらに高める改良法によってリンゴ、ナシ、クワの培養茎頂で 50-70%⁵²⁾、コーヒーの不定胚⁵³⁾ で約 50% の個体再生率を得た。さらにワサビ、ササユリなどの培養茎頂を 0.8 M スクロースに 1.0 M グリセリンを加えて 16 時間処理後、乾燥することにより、シュート形成率をさらに約 30-40% 高め、シュート形成を早めることができた⁵⁴⁾。この実験は、他の凍害防御剤と違いグリセリンと糖との混合液は極度に濃縮されても薬害が少ないことを示している。現在までに試みた数種類の材料では、いずれもシュート形成率を 40-50% 高められた。この改良法が熱帯材料を始め多くの材料に適用されることを期待している。

4. あとがき

1956 年に予備凍結法とガラス化法で植物の超低温保存に道を開いてから 40 年が経過した。また植物の超低温保存の新しい技術開発の突破口をつくるために、定年 5 年後の 1988 年に自分の費用で一人で始めたガラス化法も、つぎつぎに、意欲的なすぐれた共同研究者に巡り会い、バトンタッチしながら 7 年間、超低温保存の技術開発を進めることができた。それらの成果は外国雑誌に約 30 編の論文として発表し遺伝資源保存の国際協力事業に寄与できたと思う。昨年からはマレーシア、インドネシアに出かけ熱帯の材料にも取り組んでいる。あと数年かけて熱帯材料を液体窒素温度で自由に生かせる様にし、地球上の遺伝資源や絶滅の危険にある植物の超低温保存を国際的に軌道にのせたいと願っている。また凍結はもちろん、冷温にも乾燥にも敏感な熱帯植物を -196°C で生かし植物体に再生させる技術は、学問的にも好奇心をそそるし、植物と低温を長年研究してきた筆者の挑戦すべき最後のゴールでもある。

こうして超低温保存の技術開発を長年推進してこられたのも、長い研究生活で蓄えた低温生物学の基礎知識と経験、専門分野の国際的な情報網、一緒に研究を進めてきた多くの共同研究者の優れた培養技術と培養系、それと超低温保存の国際的必要性を展望し、40 年間、諦めず研究と普及に努めてこられたからだと思う。最後に研究に協力して多くの成果を出して頂いた、小林省蔵、山

田敏彦, 新野孝男, 浦上敦子, 西沢秀次, 甲村浩之, 倉貫幸一, 畠中知子, 松本敏一の皆さんを始め他の多くの国内外の協力者の方々に感謝致します。

文 献

- 1) 酒井 昭, 1991. 農業及び園芸, **66**: 1223-1229
- 2) Sakai, A., 1995. In "Somatic Embryogenesis in Woody Plants, 9" (eds. by Jain, S., P. Gupta, R. Newton), p. 293-315, Kluwer Acad. Publ., Netherlands.
- 3) Sakai, A., 1995. In "Cryopreservation of Plant Germplasm I, Bio-technology in Agriculture and Forestry 32" (ed. by Y. P. S. Bajaji), p. 53-69, Springer-Verlag, Berlin.
- 4) Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama, 1990. Plant Cell Rep., **9**: 30-33.
- 5) Dereuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud, M. Duron, 1990. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 310, SerIII: 317-323.
- 6) Luyet, B. J., 1937. Biodynamica, **29**: 1-15.
- 7) 酒井 昭, 1995. 植物の分布と環境適応-熱帯から極地砂漠へ, p. 109-111. 朝倉書店, 東京.
- 8) 酒井 昭, 1956. 低温科学, 生物編, **14**: 17-25.
- 9) Scholander, P. F., W. Flagg, R. F. Hock, L. Irving, 1953. J. Cell. Comp. Physiol. 42, Suppl. 1: 1-56.
- 10) 酒井 昭, 1958. 低温科学, 生物編, **16**: 41-53.
- 11) Sakai, A., 1960. Nature, **185**: 393.
- 12) Sakai, A., 1965. Nature, **206**: 1064-1065.
- 13) Nag, K. K., H. E. Street, 1973. Nature, **245**: 270-272.
- 14) Sugawara, Y., A. Sakai, 1974. Plant Physiol., **54**: 772-774.
- 15) Seibert, M., 1976. Science, **191**: 1178-1179.
- 16) Sakai, A., 1984. Horticult. Rev., (ed. by Janick, J.), p. 357-362, AVI Pub., Westport, U. S. A.
- 17) Haskins, R. H., K. K. Kartha, 1980. Can. J. Bot., **58**: 833-840.
- 18) 酒井 昭(編), 1987. 凍結保存-動物・植物・微生物, 朝倉書店, 東京.
- 19) Fahy, G. M., D. R. MacFarlane, C. A. Angell, H. T. Meryman, 1984. Cryobiol., **21**: 407-426.
- 20) Takahashi, T., A. Hirsh, E. F. Erbe, J. B. Bross, R. L. Steere, R. J. Williams, 1986. Cryobiol., **23**: 103-115.
- 21) Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, T. Matsuzawa, 1993. Plant Sci., **91**: 67-73.
- 22) Langis, R., B. J. Schnabel-Preikstas, E. D. Earle, P. L. Steponkus, 1990. Cryobiol., **27**: 658-659.
- 23) Sakai, A., S. Kobayashi, I. Oiyama, 1991. J. Plant Physiol., **137**: 465-470.
- 24) Reinhoud, P. J., A. Urugami, A. Sakai, F. Van Iren, 1995. In "Methods in Molecular Biology" (eds. by Day, J. G., M. R. McLellan), p. 113-120, Humana Press, Totowa, NJ.
- 25) Reinhoud, P. J., E. W. M. Schrijnemakers, F. V. Iren, J. W. Kijne, 1995. Plant Cell Tiss. Org. Cul., **42**: 261-267.
- 26) Huang, C. N., J. H. Wang, Q. S. Yan, X. Q. Zhang, Q. F. Yan, 1995. Plant Cell Rep., **14**: 730-734.
- 27) Sakai, A., S. Kobayashi, I. Oiyama, 1991a. Plant Sci., **74**: 243-248.
- 28) Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, T. Matsuzawa, 1992. Cryo-Letters, **13**: 379-388.
- 29) 川原良一, 和田和子, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨集, p. 114.
- 30) 和田和子, 篠崎一雄, 川原良一, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨集, p. 115.
- 31) Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura, S. H. Higuchi, 1991. Plant Sci., **78**: 81-87.
- 32) Niwata, E., 1995. Cryo-Lett., **16**: 102-107.
- 33) Niino, T., A. Sakai, K. Nojiri, 1992a. Plant Cell Tiss. Org. Cul., **28**: 261-266.
- 34) Niino, T., A. Sakai, S. Enomoto, J. Magoshi, S. Kato, 1992b. Cryo-Lett., **13**: 303-312.
- 35) Reed, B., 1992. Cryobiol., **29**(6): 740.
- 36) Kuranuki, Y., A. Sakai, 1992. Cryobiol., **31**(6): 740.
- 37) 田代 浩, 新野孝男, 馬越 淳, 秋濱友也, 1995. 14回組織培養学会, 講演要旨集, p. 120.
- 38) Touchell, D. H., K. W. Dixson, 1995. In "Internat. Workshop on In Vitro Conservation of Plant Genetic Resources", p. 33(Organized by Univ. Kebangsaan Malaysia and IBPGRI), Kuala Lumpur.
- 39) Kohmura, H. A., A. Sakai, S. Chokyu, T. Yakuwa, 1992. Plant Cell Rep., **11**: 433-437.
- 40) 深井誠一, 1992. 香川大学農学部紀要, **56**: 1-79.
- 41) 佐藤光子, 八代 昇, 酒井 昭, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨集, p. 73.
- 42) Matsumoto, T., A. Sakai, K. Yamada, 1994. Plant Cell Rep., **13**: 442-446.
- 43) Matsumoto, T., A. Sakai, K. Yamada, 1995. Plant Cell Tiss. Org. Cul., **41**: 231-241.
- 44) 高橋千昭, 松本敏一, 酒井 昭, 山田員人, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨集, p. 71.
- 45) 吉松嘉代, 佐々木和生, 山口浩子, 下村講一郎, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨集, p. 113.
- 46) 神谷 隆, 佐々木和生, 吉松嘉代, 下村講一郎, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨集, p. 112.
- 47) PUNCHINDAWAN, M., 平田収正, 宮本和久, 酒井 昭, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨, p. 70.
- 48) Think, N. T., 高木良子, 仙北俊弘, 1995. 14回植物組織培養学会, 講演要旨集, p. 117.
- 49) 原田和明, 吉松嘉代, 下村講一郎, 三位正洋, 石川恵子, 1995. 育種学会 88回講演集, p. 120.
- 50) Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi, K. Yamada, 1995. Cryo-Lett., **16**: 189-196.
- 51) Fabre, J. J. Dereuddre, 1990. Cryo-Lett., **11**: 413-426.
- 52) Niino, T., A. Sakai, 1992. Plant Sci., **87**: 199-206.
- 53) Hatanaka, T., T. Yasuda, T. Yamaguchi, A. Sakai, 1994. Cryo-Lett., **15**: 47-52.
- 54) Matsumoto, T., A. Sakai, 1995. Cryo-Lett., **16**: 299-306.