

カラマツ花粉の超低温貯蔵に関する研究 (II)

含水率別, 温度別による貯蔵結果と
貯蔵方法に対する考察

梶 勝次* 市川 三次** 久保田 泰則*

Studies on the storage of Japanese larch (*Larix leptolepis*
GORD.) pollen at a super-low temperature (II)

Results of one-year storage of pollen grains, and some
problems concerning the most favourable collecting
and storing conditions of the pollen

By Katsuji KAJI*, Sanji ICHIKAWA**
and Yasunori KUBOTA*

はじめに

雑種カラマツの実用化研究をはじめとして, 人工交配を行なう機会が多くなりつつある。筆者らは第1報でカラマツ花粉の長期貯蔵の必要性を述べ, 低温貯蔵に対する基礎的な問題と考えられる凍結耐性および凍結による傷害を調べてその類型の分類を試みた。

一般に花粉の生存力は樹種によって差があるが, カラマツをはじめ多くの林木花粉は超低温, 低含水率下で長期間発芽力を維持できるようである。また液体窒素(-196°C)に6年間貯蔵したカラマツ花粉を当試験場において人工交配に用いた結果, 完全な種子が得られたことはすでに報告した(市河ら, 1969, 1970)。

本報告では花粉貯蔵の実用化研究として, 温度別, 含水率別の試験を行ない, 最適貯蔵方法および花粉の採集, 調整方法に対する知見をまとめた。

これらの研究を行なうにあたり, ご指導を賜った京都大学四手井綱英教授, 新潟大学船引洪三教授, 京都家政短期大学渡辺光太郎教授, 農林省林業試験場, 育種第3研究室長福原楯勝氏, 生理研究室佐々木恵彦氏および実験を行なうにあたり惜しみないご指導と貯蔵温度の便宜を図っていただいた王子林木育種研究所所長千葉茂博士, また液体窒素による超低温実験に便宜をいただいた北海道家畜改良事業団札幌家畜人工授精所の各位および当場育種科の川辺, 藤田各嬢に深く感謝の意を表わす次第である。

材料および方法

材 料

1970年4月下旬, 北海道立林業試験場構内に植栽されているニホンカラマツクローン(留册2号, 樹齡13

* 北海道立林業試験場 Hokkaido Forest Experiment Station, Bibai, Hokkaido.

** 京都市立四条中学校 Shijyo Junior High School, Kyoto.

[北海道林業試験場報告 第10号 昭和47年11月 Bulletin of the Hokkaido Forest Experiment Station, No. 10, November, 1972]

年)から次に示す方法により花粉を採集して温度別, 含水率別の貯蔵試験を行ないその生存力を調べた。

花粉の採集と含水率の調整

開葯直前に採取した雄花序を室温下で更紙の上におき自然開葯を待って花粉を採集した。この方法により採集された花粉*の平均含水率は, 雄花序の採取時および自然開葯時の温度, 関係湿度に支配されることが多いが, 平均含水率は 25%前後である。

また低含水率花粉を得るために, 図-1Bに示すような大型シャーレ内に乾燥剤を入れて濾紙を敷きその上に花序をまき, 温度を+25°Cに保ちつつ半強制的に開葯させた。この方法によると平均含水率はほぼ 10%であった。

さらに, 実験に供する花粉の含水率はデシケータ一内の関係湿度を調節することにより 6%, 12%, 18%, 25%, 35%, 40%, 48%の 7段階に調整することができた。すなわち, 所定の含水率より高い場合は濃硫酸

をとおした空気をデシケータ一内に送りこみ, 内部の関係湿度を低くした(図-1A)。また所定の含水率より低い場合は, デシケータ一の底に水を入れて吸湿させた。

含水率の測定は Kett 赤外線水分計を用い, 1 g ずつ 3回測定して決定した。

貯蔵温度および貯蔵容器

所定の平均含水率に調整した花粉は, 貯蔵に際して外湿度の影響を少なくするため直ちに 1 cc 入りのガラスアンプル(写真-1)に約 1/3 容量ずつ入れて熔封した。

貯蔵温度は, 電気恒温器による+27°C, +5°C, +2°C, 0°Cと液体窒素による-196°Cの 5段階とした。したがって含水率別処理との組合せは 35 とおりとなった。

生存力の測定

貯蔵に先だち生存率を調べ, 貯蔵後 0.5 ヶ月, 1 ヶ月, 2 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月, 9 ヶ月および 12 ヶ月にそれぞれの生存率を調べた。発芽床は寒天培地(寒天 1%, 蔗糖 30%; pH 5.5)を用い, 花粉の置床後 48~72 時間に生存率を調べた。花粉の生死判定は筆者らが第 1 報で紹介した方法による。すなわち, 梶ら(1970)および市河ら(1970)のいうように, 前発芽(pregermination)の状態を呈したものは置床後 72 時間前後で花粉粒内に澱粉粒を形成し, 中心細胞の移動が認められた。これを生存花粉とし, 一方原形質分離が認められる花粉は容易に死花

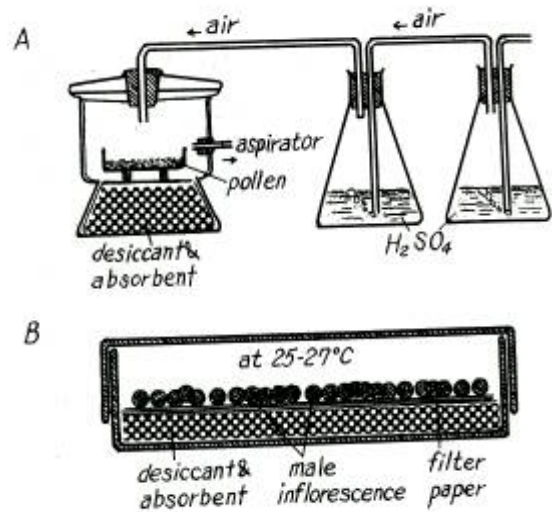


図-1 花粉の採集と花粉含水率調整(乾燥)の装置

Fig. 1. Method of collecting larch pollen and of controlling its moisture content.

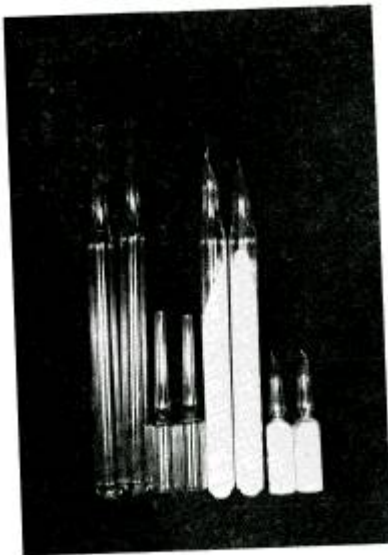


写真-1 花粉貯蔵のためのガラスアンプル
ガラスアンプルは直径 1cm, ガラスの厚さ 0.3mm である。

Photo. 1. Glass ampoules for storing pollen grains.

The ampoule with the thickness less than 0.3mm. is recommended.

* 花粉とあるのは正確には花粉粒のことである。

粉であると判定することができた (写真-3 参照)。

測定はすべて顕微鏡写真で判定し、1 処理につき約 600 粒を調べて平均生存率を求めた。なお生存率の表示は 5%括約とした。

実験結果および考察

温度別含水率別貯蔵試験

貯蔵試験の結果は表-1, 図-2 に示した*。図から明らかなように、低含水率花粉は、+27°C区を除き 1 ヶ年間の貯蔵後でも生存率は低下することがなく、花粉採集時の生存率を維持している。これに反し生存率が低下し

表-1 カラマツ花粉の貯蔵期間と生存率

Table 1. Effect of temperature and moisture content of larch pollen on the survival ratio in storage period.

貯蔵温度 (°C) Temp.	花粉含水率 moisture content (%)	貯蔵期間別生存率 (5%括約) Storing period and survival (% Pregermination) *							
		0	0.5	1	2	3	6	9	12mon.
+27	6	100	95	85	80	60	10	0	0
	12	100	95	20	0	0	0	0	0
	18	100	0	0	0	0	0	0	0
	25	100	0	0	0	0	0	0	0
	35	100	0	0	0	0	0	0	0
	40	100	0	0	0	0	0	0	0
	43	100	0	0	0	0	0	0	0
+5	6	100	100	100	95	95	95	95	95
	12	100	100	100	95	95	95	80	80
	18	100	100	100	95	95	90	55	55
	25	100	100	100	95	95	0	0	0
	35	100	100	100	95	15	0	0	0
	40	100	100	100	95	20	0	0	0
	48	100	100	100	95	5	0	0	0
+2	6	100	100	100	100	100	95	95	95
	12	100	100	100	100	95	95	85	80
	18	100	100	100	100	100	95	80	80
	25	100	100	100	100	95	50	0	0
	35	100	100	100	100	50	5	0	0
	40	100	100	100	90	10	5	0	0
	48	100	100	100	60	10	0	0	0
0	6	100	100	100	100	100	100	95	95
	12	100	100	100	100	100	90	80	80
	18	100	100	100	100	95	95	80	80
	25	100	100	100	100	100	95	0	0
	35	100	100	100	100	95	35	0	0
	40	100	100	100	95	50	10	0	0
	48	100	95	95	80	35	5	0	0
-196	6	100	100	100	100	100	100	100	100
	12	100	100	100	100	100	100	100	100
	18	100	100	100	100	100	100	100	100
	25	100	95	95	95	95	95	0	0
	35	100	85	40	20	5	5	0	0
	40	100	85	15	0	0	0	0	0
	48	100	80	0	0	0	0	0	0

* The pollen grains were considered to have vability when they reached the pregermination stage, and survival ratios were obtained at 5% interval.

* この結果の 1 部は第 83 回日本林学会で発表した (1972)。

ているのは高含水率花粉である。しかし貯蔵温度が+27°C区では、花粉含水率が12%以上になると、含水率に関係なく貯蔵後2ヵ月間で生存率は0になる。各貯蔵温度区に共通していることは、低含水率花粉であれば長期間高い生存力を維持し、高含水率花粉の場合は逆の現象を示す。この傾向はヒマラヤスギ、各種マツ花粉の結果（市河ら、1971）と同じである。また+27°C区を除いて+2°C、0°Cおよび-196°Cの各温度区では、含水率が18%以下の花粉は、貯蔵1年後でもほぼ採集時の生存率を維持している。しかし+5°C区では、花粉含水率18%の場合に生存率は55%まで低下している（表-1）。また25%以上の高含水率花粉はどの温度区でも9ヵ月で生存率は0になっている。

-196°Cに貯蔵した場合の生存率の変化をみると（図-2 e）、平均含水率が6%、12%および18%の場合に貯蔵の効果が現われ、生存率の低下はみられない。また25%の花粉は凍結限界含水率に近い微氷晶が生成し、

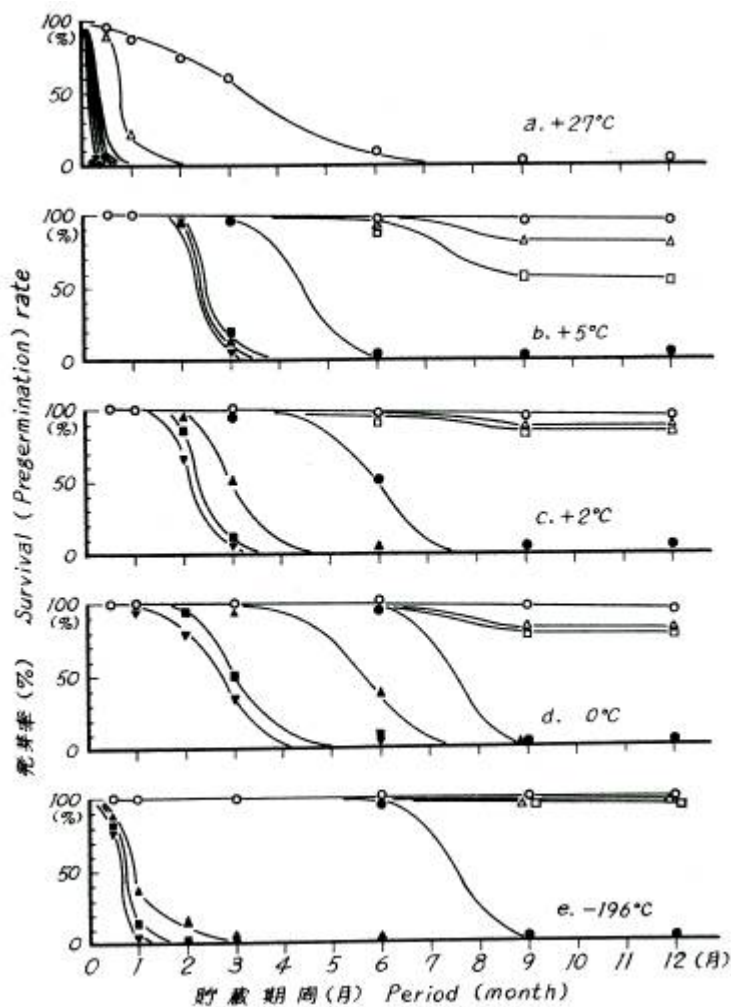


図-2 カラマツ花粉の生存率（発芽率）の変化

Fig.2. Effect of temperature and moisture content on the survival of larch pollen in storage.

○, △, □, ●, ▲, ■ and ▼ stand for 6, 12, 18, 25, 35, 40 and 48% moisture contents of pollen, respectively.

時間の経過とともに氷晶が発達し次第に細胞内凍結をおこして凍結死したものと考えられる。含水率が 35%、40%および 48%の場合は、 -196°C に入れたとき瞬間的に細胞内凍結が起ったものと考えられる。また含水率 18%以下では凍りうる自由水が存在しないか、もしくは細胞外凍結によって生存が可能となり、発芽率が維持されたものと考えられる。すなわち 18%以下の含水率花粉を -196°C 下においたとき、花粉は細胞外凍結によって生命が維持されているものと考えられる。

一方、含水率 25%の花粉は貯蔵後 6 ヶ月、および 35%のものでは 3 ヶ月まで発芽率の低下はみられない。それにもかかわらず、そののち急に凍結死するが、これは微氷晶が細胞の破壊をひきおこすまで生長したためと考えられ、氷晶の生長速度などを今後究明しなければならない。

低温貯蔵による障害

第 1 報で述べたように、カラマツ花粉の凍結傷害は、花粉の膜壁構造の破壊がみられる点でスギ花粉に類似している。初期的な傷害は花粉壁外層と内膜の剥離として現われ、次にその間隙の氷晶の生成と生長がみられる。さらにそれが進行すると細胞内凍結をひきおこすが、これは -20° ~ -30°C 以下の低温下で 25~35%以上の高含水率花粉の場合におこり、この場合花粉がすべて凍結死することは第 1 報で報告した。含水率が 18%以下の場合には細胞外凍結をひきおこすだけの水が存在せず、内粉の生存に何ら影響がない。

さらに花粉粒内に気泡が多く発生していることがあるが、このような気泡は初期的な細胞内凍結をおこした花粉の解凍後にもみられ、また過度に脱水した低含水率花粉に水を吸収させた場合にも同様な気泡の発生がみられる。この気泡は、前者の場合は時間の経過とともに(写真-2bに示すように)、花粉粒内部の細胞質まで破壊がすすみ、後者は(写真-3Aに示すように)前発芽状態まで発育するので識別は容易である。

第 1 報で花粉の凍結傷害を 6 つの類型に分類したが、長期貯蔵の結果みられる障害はさらに次の 2 つに分類できる。第 1 は写真-2a に示す type で、特にプラス温度で貯蔵したときにおこる生理的飢餓花粉にみられ、第 2 は細胞内凍結により凍結死した花粉の場合(写真-2b)である。

花粉の採集方法と実用的貯蔵方法

カラマツの雄花序は側枝、不定芽にまばらに着生し、花粉を大量に採集することはかなりの労力を必要とする。金子(1971)は 1000 cc の雄花序から得られる精選花粉量は 55 cc と報告している。しかし、LANNER (1962), DUFFIELD *et al.* (1941, 1959) SCHOENIKE *et al.* (1963) および市河ら(1971)ほか多くの研究者によって、数年間の貯蔵は可能であることが明らかにされているので、花序の採取しやすい雄花の豊作年に花序を採取して花粉を貯蔵することが

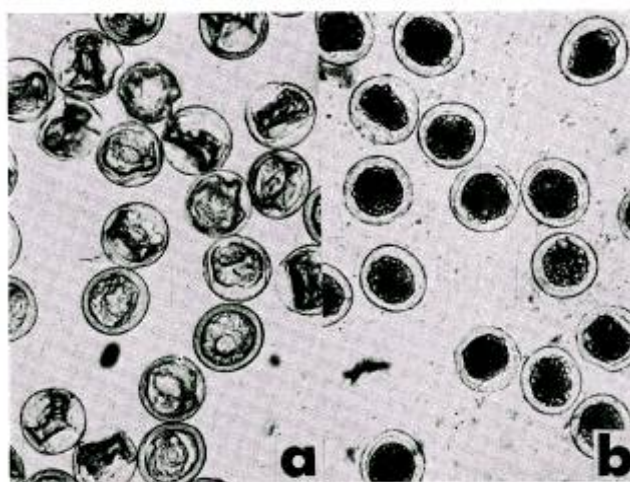
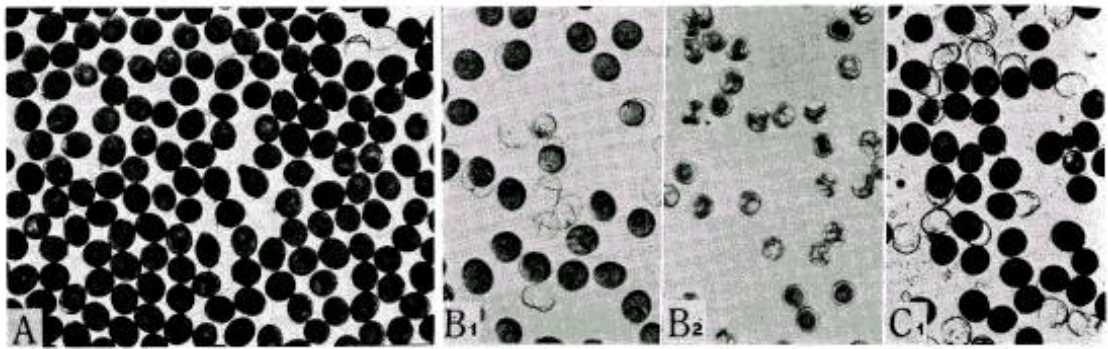


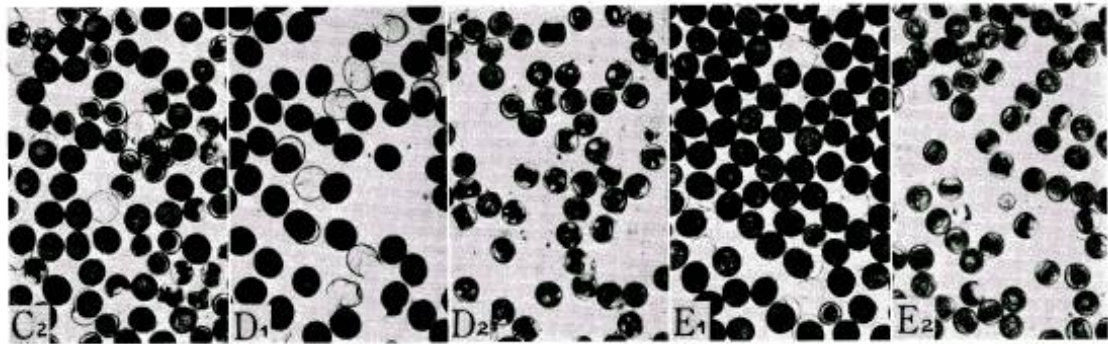
写真-2 カラマツ花粉の長期貯蔵による障害の類型
a. +温度にみられる生理的飢餓花粉
b. 超低温にみられる細胞内凍結花粉

Photo.2. Patterns of morphological changes of larch pollen in long term storage.

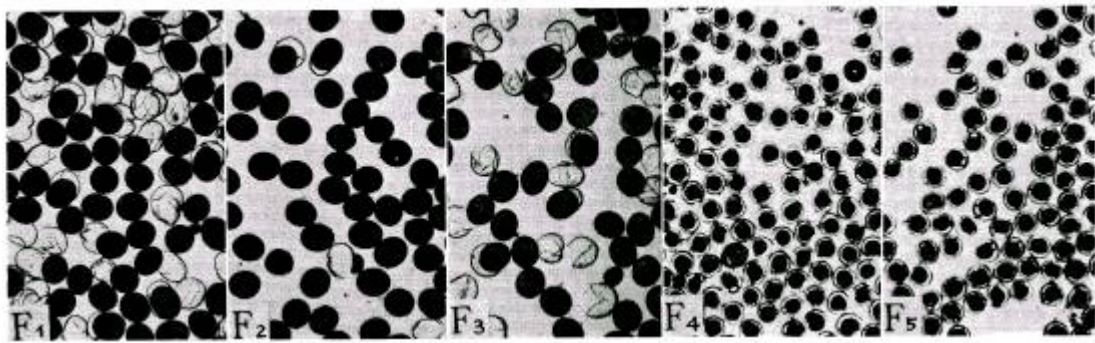
- Physiologically staved pollen at high temperature storage condition.
- Intercellular frost pollen at a superlow temperature storage condition.



a. (貯蔵温度) +27°C~-196°C	a. +27°C	a. +27°C	a. +5°C
b. (花粉含水率) 6~48%	b. 12%	b. 18%	b. 6%
c. (貯蔵期間) 貯蔵前	c. 0.5 ヲ月	c. 0.5 ヲ月	c. 12 ヲ月
d. (生存率) 100%	d. 90%	d. 0	d. 95%



a. +5°C	a. +2°C	a. +2°C	a. 0°C	a. 0°C
b. 18%	b. 18%	b. 25%	b. 6%	b. 25%
c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月
d. 55%	d. 80%	d. 0	d. 95%	d. 0



a. -196°C	a. -196°C	a. -196°C	a. -196°C	a. -196°C
b. 6%	b. 12%	b. 18%	b. 35%	b. 48%
c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月	c. 12 ヲ月
d. 100%	d. 100%	d. 100%	d. 0	d. 0

写真-3 貯蔵花粉の発芽試験

Photo.3. Germination test of stored larch

a, b, c, and d stand for storage temperatures, moisture contents of pollen, storing periods and survival ratios, respectively (see Table 1).

すすめられる。

花粉粒は通常、飛散前に完熟しているため、雄花の開葯直前に花序を採取して花粉を採集するのがもっとも容易である。また雄花序の採取時間は、芽鱗が90%以上剥がれて、葯の部分がふくらみ黄緑色を呈する頃が花粉の採集にもっとも適切な時期と考えられ、およそ2~3日の期間中に行なえば良い。花粉がすでに飛散しはじめた花序は側枝からとりにくく、また花粉の採集効率も落ちる。採取した雄花序は低湿度の室内で風乾すると自然に開葯して花粉を採集することができる。また含水率を調整したい場合、もしくは長期貯蔵の目的の場合には図-1に示す方法によると必要な低含水率の花粉が容易に得られ、また花粉を無菌的に採集する場合にもこの方法は好都合である。この半強制的な開葯による花粉の採集は、トドマツ、スギなどにおいては乾燥による脱水のため開葯しない場合があるが、カラマツは急激な乾燥に耐え容易に花粉を採集することができる。また古越(1966b)の紹介したHANGER-INGERSTEDT花粉抽出器や古越(1966a)の考案した花粉抽出装置など機械的な採集装置において問題とされている雄花序の洗浄も、上記方法では10%クロールカルキ液に短時間浸すことにより

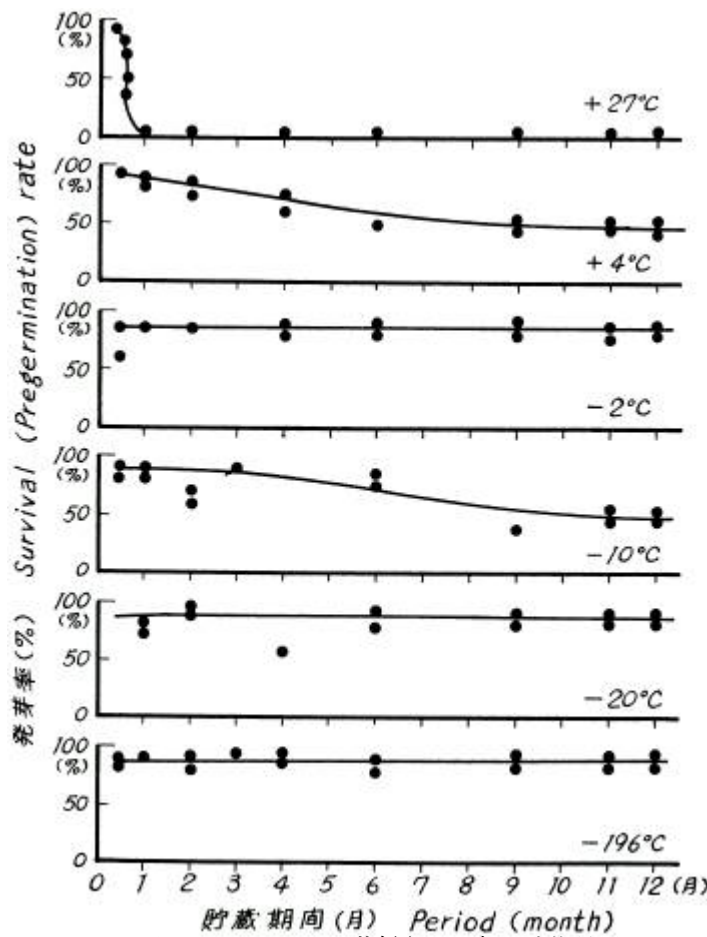


図-3 カラマツ花粉*の温度別貯蔵効果

* 花粉含水率は16%である

Fig. 3. Effect of temperature on the survival of larch pollen*in storage.

* Moisture content ca. 16%.

解決されると思われる。

花粉を貯蔵するに先だつ含水率の調整は、雄花序を室温下において自然開葯させると、平均含水率は25%前後となる。しかし長期貯蔵を目的とする場合は予め含水率を18%以下に厳重に調整することが必要で、貯蔵温度は電気冷蔵庫または冷凍室で得られる温度で良いと考えられる。なぜなら、1969年に予備試験を行なった結果、含水率16%の花粉を -10°C あるいは -20°C 下で貯蔵しても、図-3に示すように1ヵ年間の貯蔵に耐えており、今回の実験結果でも、 $+2^{\circ}\text{C}$ 以下の温度であれば高い生存率を維持し、液体窒素による貯蔵がもっとも良い成績を示すことがわかった。すなわち液体窒素に貯蔵した場合、確実に -196°C 恒温を保つという利点と、液体窒素は化学的に不活性で安全確実であり、ほかの冷媒や冷凍室のような装置を必要とせず経済的であるという長所がある(写真-4)。しかし貯蔵容器の改良をはじめとして冷却速度、加温の方法など今後さらに実用的な研究が残されている。

プラス温度下での貯蔵の場合には、関係湿度が生存力に影響を与え(LANNER, 1962)、さらに花粉粒は吸水性が高く、カラマツ花粉粒を水面に投下するときわめて短時間に吸水して1~2秒で沈下するのが観察される。この現象はLANNER, DUFFIELDらのいうように関係湿度の変化により花粉含水率が容易に変化することを示すものと思われる。

筆者らは写真-1に示すガラスアンプルを用いて、含水率を一定に保って貯蔵を行なったが、今後さらに実用的かつ、安価な貯蔵容器の開発が必要とされる。

おわりに

温度別、含水率別貯蔵試験の結果をとおり、貯蔵方法および花粉採集方法について、2, 3の知見を述べた。実用レベルでの貯蔵技術は、今後より安全な貯蔵方法と貯蔵容器の開発によって改良することが可能である。また低温下に貯蔵する場合の冷却速度および加温速度の検討、細胞内凍結の発生機構の解明、および実的な人工交配による育苗など継続的に研究を行なう予定である。

摘 要

カラマツ花粉の実用的な貯蔵方法を明らかにするため、温度別、含水率別の貯蔵試験を行ない生存力を調べた。貯蔵温度は $+27^{\circ}\text{C}$ 、 $+5^{\circ}\text{C}$ 、 $+2^{\circ}\text{C}$ 、 0°C および -196°C の5区とし、花粉含水率は6, 12, 18, 25, 35, 40および48%とし1ヵ年の生存率の変化を調べた。その結果今までにわかったことは：

1. 貯蔵温度が $+27^{\circ}\text{C}$ の場合は、含水率が18%以上であると0.5ヵ月で生存率は0となり、また12%のものは2ヵ月、6%のものは6ヵ月でほぼ生存率が0になった(表-1 図-2a)。 $+5^{\circ}\text{C}$ ~ 0°C の低温での生存力は、花粉含水率と貯蔵温度には密接な関係があり、含水率が高いほど生存率は早く0になることがわかった。

2. 花粉含水率が25%以上になると貯蔵温度に関係なく、貯蔵後9ヵ月までに生存率は0になった。しかし18%以下の低含水率花粉は、 $+2^{\circ}\text{C}$ 以下の貯蔵温度下で1年間貯蔵したのちでも80%以上の生存率を維持し $+5^{\circ}\text{C}$ でも55%以上の生存率が保たれた(表-1)。

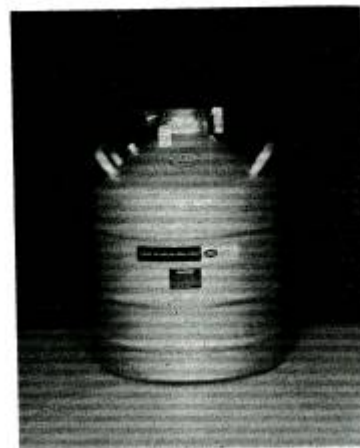


写真-4 液体窒素貯蔵容器
LIND製LD-31型

Photo. 4. Liquid nitrogen container for storing pollen in LD-31.

−196°Cに貯蔵した場合、花粉含水率が18%以下であれば1年間貯蔵したのちでも、100%の生存力を維持することがわかった。

3. 液体窒素による貯蔵では、25%以上の高含水率花粉は時間の経過とともに、氷晶が生成および生長し、生存力は失われた。図-2 eにみられる25%含水率花粉の生存率の変化から明らかなように、貯蔵後6ヵ月まで生存率を維持していたものがその後急速に生存力を失なった。これは氷晶が徐々に生長してゆき、細胞内凍結という物理的な破壊をひきおこしたためと考えられる。

4. 以上の結果から実用的な花粉の採集と貯蔵方法については、(1)花粉の含水率を18%以下に調整して貯蔵すること、(2)最も高い生存力を維持するためには、−196°Cを保つこと、(3)生存力を維持するためには、貯蔵容器は密栓とし、貯蔵温度を何度にするかということよりも一定低温度に保つことの方がよい結果が得られること、などが明らかにされた。

5. カラマツ花粉の採集の際には、図-1に示すような雄花序の急激な乾燥による半強制的な方法でも、生存力に影響なく前発芽状態まで発育する(写真-3)。

文 献

DUFFIELD, J. W. and A. G. SNOW 1941. Pollen longevity of *Pinus strobus* and *Pinus resinosa* as controlled by humidity and temperature. Amer. J. Bot. 28 : 175-177.

DUFFIELD, J. W. and R. Z. CALLAHAM 1959. Deep-freezing pine pollen. Silvae Genet. 8 : 22-24.

古越隆信 1966 a HANGER-INGERSTEDT花粉抽出器. 日林誌 48(2) : 69-71.

古越隆信 1966 b 林木の人工交配に関する研究 (I). 第77回日林講 236-239.

市河三次・久保田泰則・安達芳克 1969 カラマツ花粉の人工発芽に関する研究 (I). 北林試報 7 : 32-38.

市河三次・梶 勝次・久保田泰則 1970 カラマツ花粉の超低温貯蔵に関する研究 (I). 北林試報 8 : 11-26.

市河三次・四手井綱英 1971 樹木花粉の超低温貯蔵に関する基礎的研究 (I). 京大演報 42 : 51-82.

梶 勝次・久保田泰則・市河三次 1970 カラマツ花粉の人工発芽に関する研究 (II). 北林試報 8 : 1-11.

金子富吉 1971 カラマツの花粉採取. 林木の育種 65 : 16-18.

LANNER, R. M. 1962. Controlling the moisture content of conifer pollen. Silvae Genet. 11 (4) : 114-117.

SCHOENIKE, R. E. and D. M. STEWART 1963. Fifth year results of vacuum-drying storage and additives on the longevity of some conifer pollens. For. Sci. 9 : 96.

Summary

For the purpose of fundamental studies on breeding larches by hybridization, the effects of temperature and moisture content on the longevity of Japanese larch (*Larix leptolepis* GORD.) pollen during the storage were studied.

Before storage, the moisture content of pollen was preconditioned to 6, 12, 18, 25, 35, 40 and 48 percent, and the pollen was stored at five temperatures, *i. e.* +27°, +5°, +2°, 0° and −196°C. Then viability of the pollen was tested after 0.5, 1, 2, 3, 6, 9 and 12 months of storage, respectively. The pollen from each treatment combination was cultured on agar medium, and its viability was tested by the methods of ICHIKAWA *et al.* (1970) and KAJI *et al.* (1970). The pollen grains were considered to have viability when they reached the pregermination stage. The pregermination stage is defined as the formation of starch grains and development of generative cells on the artificial agar medium. Although most of the stored pollen looked normal and reached to the pregermination stages on the medium, it scarcely formed the germ tube.

The higher the equilibrium moisture content of pollen was, the more loss of viability occurred.

When stored at equilibrium moisture content lower than about 18 percent, the pollen remained viable. However, most of the pollen had lost its viability within 15 days when stored at high temperature above +27°C (see Fig. 3a). When the moisture content was higher than 25 percent, the viability was affected by storage temperature conditions, and the pollen gradually lost the longevity during the long term storage, and all of pollen grains lost their viability within nine months. The feasibility of storing larch pollens in a domestic deepfreezer was also discussed.

It is suggested that the most important condition is to control the moisture content of pollen before starting the pollen storage. Therefore the vessels to store pollen should be sealed perfectly.

The authors conclude that, among the several methods of different temperature conditions described above, the liquid-nitrogen method revealed to keep the high viability.