

# カラマツ花粉の超低温貯蔵に関する研究 (I)

—— とくに超低温処理の基礎的問題 ——

市河三次\* 梶勝次\*\* 久保田泰則\*\*

## Studies on the storage of larch (*Larix leptolepis*) pollen at super-low temperatures (I) Some problems concerning with water contents and pre-freezing

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

### まえがき

北海道の林木育種をすすめていくうえで、急がれているものの一つにグイマツとカラマツの交雑育種がある。この場合開花期のずれから1年間花粉を貯蔵しなければならないことはすでに述べた。市河ら(1963, 64)は花粉の発芽力を長期間保つ方法で、多くの樹木花粉が液体窒素(-196°C)の中で長期間の貯蔵に耐え、すでに8~9年間発芽力をおとさずに貯蔵していると報告している。当场においても、1968年、カラマツ花粉について予備的に6年間液体窒素に貯蔵されていた花粉を京都から空輸し人工授粉した結果、正常な種子がえられている(市河ら, 1969)。とくに液体窒素を用いると実用的に他の冷媒や冷凍室を使用する場合に比較して経費が低廉であるばかりでなく、液体窒素は化学的に不活性であり、確実に-196°Cを保つという利点があり、さらに適当な処理を行えば、氷晶生成に対して、他の方法による低温長期貯蔵よりも安全である。

カラマツ花粉も他の樹木花粉と同じく超低温貯蔵が可能と考えられ、さらに超低温下における凍結傷害の発生もスギ、クロマツのほかタイサンボクなどの虫媒花粉とも類似の点が認められ、現在すでに超低温下での花粉貯蔵を行なっているが、今後実用的な貯蔵方法、とくに貯蔵容器などの研究も進めねばならない。

本論は液体窒素を利用した超低温長期貯蔵の諸実験のうち、花粉含水率と温度との関係、凍結による傷害、予備凍結などについての基礎的な実験の結果をまとめて報告する。

これらの研究を行なうにあたり御教示を賜った弘前大学田中清氏、京都大学四手井綱英氏、渡辺光太郎氏、横山正和氏、北海道大学酒井昭氏に厚く感謝の意を表する次第である。

### 実験の材料および方法

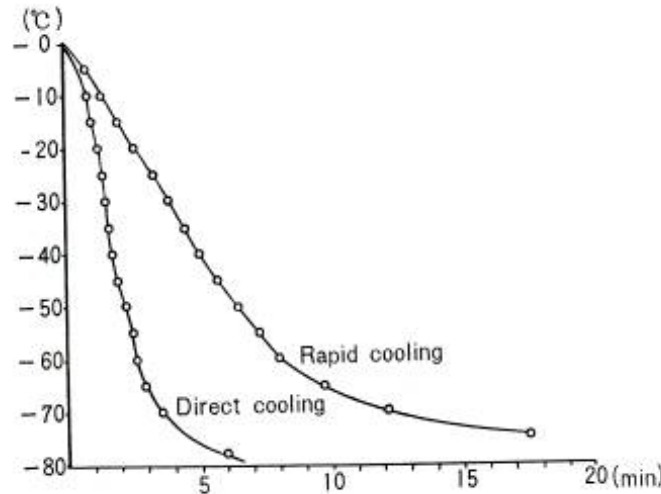
実験に供した花粉は1969年4月下旬、当試験場構内に植栽されているクローン-留萌2号-からつぎに示す方法によって採取し、8月の実験開始時期まで0°Cに貯蔵したものである。

---

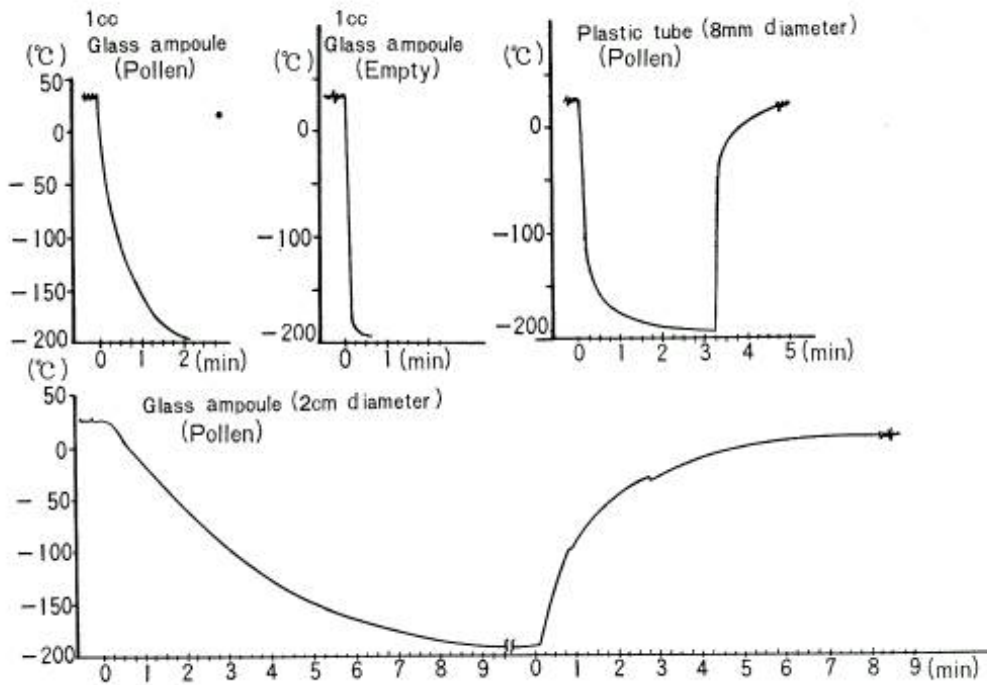
\* 京都市立旭ヶ丘中学校 Asahigaoka Junior High School, Kyoto.

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

[北海道林業試験場報告 第8号 昭和45年6月 Bulletin of the Hokkaido Forest Experiment Station, No. 8, June, 1970]



1 cc ガラスアンプル (花粉 1/3 容量) の  $-80^{\circ}\text{C}$  冷却曲線  
 Cooling rate curve obtained when 1 cc glass ampoule was immersed in dry-ice, ethanol mixture ( $-80^{\circ}\text{C}$ ).



各種花粉容器 (空又は花粉 1/3 容量時) の  $-196^{\circ}\text{C}$  直接冷却  
 及び  $+27^{\circ}\text{C}$  温湯直接加温の温度変化

Oscillograms were obtained when some kinds of vessels were immersed in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), and subsequently rewarmed in water at  $+27^{\circ}\text{C}$ .

図一1 各種の花粉貯蔵容器の冷却曲線

Fig. 1. Oscillograms and cooling rate curves of pollen grains contained in different kinds of vessels.

## 花粉の採取と貯蔵

1) 通常採取： 母樹より開葯直前の雄花序を採取し、温室内で開葯させて採取した。平均の花粉含水率が20%になるまで乾燥し、直ちに市販のガラスアンプル（20cc入り）に溶封し貯蔵した。

2) 無菌的採取： 上記の雄花序を80%エタノールに1~2秒浸漬して表層の樹脂をとり除き、10%クロールカルキで消毒ののち、滅菌水で良く水洗し大型シャーレ内でシリカゲルにより強制開葯させて採粉し、1cc入りのガラスアンプルに約1/3容量ずつ入れて溶封した。これらは総て無菌的に行なった。

## 発芽試験

発芽床は通常の寒天培地（寒天1%、蔗糖10%、pH5）を用い、+27°Cの恒温器中におき所定の時間ごとにとり出して検鏡した。生死判定は前報でも述べたとおり、前発芽（Pre-germination）状態のもの（写真-1-A<sub>1</sub>参照）は置床後72時間前後で澱粉粒の形成、中心細胞の分裂など生理的形態的变化がみられる。このような花粉粒を生存花粉と認定した。

## 超低温処理

冷却（Cooling）ガラスアンプル又は精液貯蔵用ストローに封入した供試花粉を、ドライアイス、99%エタノールによって、最高温度降下速度（8°C/sec）を保ちながら、室温から-80°Cまで急速冷却（Rapid cooling）した。冷却の途中で所定の温度まで降下したアンプルは直ちにとり出し急速加温した。

凍結（Freezing）急速冷却した花粉、または室温においた花粉を、液体窒素に直接投入（Direct cooling）して一定時間凍結処理を行なった。この直接冷却の場合、アンプル、ストローなど花粉貯蔵容器の材質、花粉容量などによって、冷却速度に差が生ずる。サーシスターオシログラムで示す冷却曲線は図-1の通りである。直径約3cmの大型アンプルの冷却速度は極めておそく、また直径1cm以内のガラスアンプル（花粉充満時）の中心部の冷却曲線は-30~-50°Cでほぼ直線であり、花粉の最大氷晶生成温度帯（Critical temperature zone）の通過は6~9秒と考えるとよい。

加温（Rewarming）凍結処理をした花粉は、加温過程での氷晶生成を防ぐため、すべて急速加温した。すなわち+25°Cの微温湯にアンプルを直接浸漬した。常温までの加温に要する時間は10~15秒である。

## 高含水率花粉の調製

凍結傷害の発生機序を調べるため必要とする高含水率花粉は、つぎのようにして調製した。飽水状態の花粉は、まず外皮（Exine）の脱皮をひきおこさない+5°Cの水に約3時間花粉を浸漬して吸水させた後、粉状を呈するまで濾紙で花粉表面の付着水を取り除いたものである。この時の含水率は72~76%を示し、ほぼ一定な値となる。この飽水状態における含水率はヒマラヤシーダ、スギなどの実験値とほぼ一致する。また40%、50%等の花粉は、水を入れたデシケーター内の湿度を100%にし、この中で数日間、花粉に吸湿させて含水率を調整した。

## 花粉の人工発芽床における形態と凍結傷害の類型

超低温処理実験による凍結傷害、とくに凍結像を固定し直接検鏡することは、花粉の場合極めてむずかしい。今回は凍結によって発生した傷害の加温後の状態を、無処理花粉と比較する間接的方法をとった。すなわち、加湿花粉を発芽床又はスライドグラス（20%グリセリン液：カラマツ花粉の等張液）にとり、直接検鏡して処理別の凍結傷害像を検討し、処理花粉の形態をつぎのように類型化した（写真-1参照）。

### A 正常型花粉（Normal）

A<sub>1</sub>： 外皮から脱し、前発芽の形を示し、正常な生長を示している。

A<sub>2</sub>: 前発芽状態から、さらに長楕円球化している(発芽床置床後 72~96 時間)。

A<sub>3</sub>: 管状の突起または花粉管状の管をもつもの。ごく稀にみられ、花粉管と考えられる。これが正しい発芽の仕かたと考えられる。

A<sub>4</sub>: 発芽床上で長時間経過し、球形に異常生長したものなど。

以上の各ステージに属する花粉を生花粉とした。

#### B 偽原形質分離(Pseudoplasmolysis)を呈した花粉

B<sub>1</sub>: 外皮から脱せず花粉壁と原形質の間に間隙ができ、偽原形質分離状態を呈するもの。

B<sub>2</sub>: B<sub>1</sub>がさらに進行し、分離部分の幅が、かなり厚くなっているもの。

このステージは処理温度と時間に関係して B<sub>1</sub>から B<sub>2</sub>へ進行し、発芽床上での時間経過によって C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>に進行する。Bは凍結傷害の初期的な形状である。

#### C 気泡(Air bubble)の形成された花粉

C<sub>1</sub>: 小気泡が内膜の内面に列状に発生しているもの。

C<sub>2</sub>: 気泡がC<sub>1</sub>にくらべ、かなり大きく発達しているもの。

C<sub>3</sub>: 直径 8~10 $\mu$ 以上の気泡が原形質内部にも発生し、原形質破壊をもたらすもの。

C<sub>4</sub>: 人工発芽床上で長時間経過すると、気泡が集まり、また原形質の萎縮をみるもの、これはB型傷害の発芽床上における最終的形態に同じである。

この各ステージは凍結傷害の中程度に進行した形であり、処理温度、時間、含水率に密接な関係を持ち、C<sub>1</sub>から C<sub>4</sub>へ進行する。また気泡は、原形質に発生するが中心細胞など花粉粒内の細胞にはできない。この気泡は原形質内部の氷晶生成に由来すると考えられる。

#### D 異常な傷害花粉(花粉内容物の萎縮)

D<sub>1</sub>: 当初から活力のない(Abortive)花粉、又は急激な乾燥(常温)などによってうける傷害である。

D<sub>2</sub>: 液体窒素に花粉が直接ふれて萎縮したものである。原形質コロイドの急激な変性によって剥離が全面におよばないため花粉内容物が星状に萎縮したと考えられる。

D<sub>3</sub>: B, C型傷害をうけ発芽床上で長時間経過した場合にみられる萎縮である。

この類型に属する傷害像の空白部分(気泡等)はC型傷害のそれにくらべて、必ず不定型を示す。発生機序はB, C型と異なる。

#### E 花粉粒の破壊

E<sub>1</sub>: 原形質吐出を招いたもの。

E<sub>2</sub>: 急激な凍結によって外皮を含む花粉外殻、原形質が嘴状に裂開したもの。

#### F 気泡をもちつつ前発芽状態となる場合

F<sub>1</sub>: 気泡が花粉粒内にあるもの(発芽初期)。

F<sub>2</sub>: F<sub>1</sub>の発芽床で時間経過したもの。

F型は低含水率花粉でも長期超低温貯蔵中に発生する場合があります、スギ、ヒマラヤシーダ花粉にもみられることがあるが、発芽に支障はない(市河, 1963)。

以上のように花粉の凍結傷害類型を大別することができる。これらの傷害の発生機序については明らかでない部分が多いが、原形質コロイドの変性、自由水(Free-water)の氷晶生成等による傷害は花粉の含水率、冷却(又は加温)速度、凍結の時間の3条件に支配される。

花粉の超低温処理実験の結果と考察

花粉含水率と温度の関係

多くの樹木花粉を超低温処理した結果生ずる凍結傷害は、花粉固有の含水率に支配されることはすでに報告した(市河, 1968)。カラマツ花粉の場合も急速冷却したときに超低温下で生存しうる範囲は、マツ科, スギ科, ブナ科の数種類の風媒花粉の場合と、ほぼ同様の結果がえられる。数段階の含水率をもつ花粉を急速冷却したところ表-1のような結果をえた。なお-196°C区は液体窒素に10分間直接投入したものである。

表-1 カラマツ花粉における花粉含水率のちがいによる急速冷却の温度と生存率 (置床後 72 時間)

Table 1. Freezing temperature and survival rate of larch pollen at different water contents.

温度 Temp. (°C)	含 水 率 Water content (%)					
	11%	30%	40%	50%	50%	76%
0	94.1 (%)	99.0 (%)	98.0 (%)	— (%)	— (%)	66.7 (%)
- 5	—	—	—	—	—	—
- 10	98.3	99.0	—	92.4	52.5	56.0
- 15	—	—	—	30.4	—	—
- 20	98.0	99.0	98.0	85.1	85.3	27.3
- 25	—	—	—	75.8	88.9	—
- 30	98.1	93.6	68.2	—	40.6	55.4
- 35	97.0	92.7	72.2	2.5	38.2	2.0
- 40	94.0	88.5	34.0	8.3	9.9	+
- 45	96.9	96.2	36.2	0.0	0.0	16.0
- 50	94.4	97.2	29.2	0.0	0.0	0.0
- 55	—	—	—	0.0	—	—
- 60	—	—	+	0.0	0.0	0.0
- 65	—	—	—	0.0	—	—
- 70	—	—	—	0.0	0.0	0.0
- 75	—	—	—	0.0	—	—
- 80	72.5	97.4	0.0	0.0	0.0	0.0
-196	98.0	97.0	0.0	0.0	0.0	0.0

0~80°C : 急速冷却 Rapid cooling

-196°C : 直接投入 10 分間 Direct cooling, 10min

生存率 (置床後 72 時間) Survival rate : 72 hrs after setting

表-1, 2 に示すごとく, カラマツ花粉の急速凍結の結果, 凍結の致死範囲は含水率 40%の花粉で-55°C 以下, 50%の花粉で-35°C以下, 76%の飽水花粉の場合は-30°C以下という結果をえた。

含水率 30%以下であれば, 凍結傷害による死はこの場合\*招かない。すなわち凍結に対する限界含水率は-196°Cに対しては 30%以下であり, 40%以上の高含水率の花粉に対してはおよそ-30~-50°Cが, その含水

\* 冷却速度, 含水率がこの条件下にある場合に限定される。

率に対する致死温度とすることができる。これらの結果をクロマツおよびスギ花粉のそれと比較してみると図-2のようになる。

カラマツ花粉の場合、凍結に対する致死含水率はクロマツ、スギ花粉に比較してやや高い。しかし高含水率花粉での凍結致死温度は-30~-40°Cでほぼ同じ結果をえた。すなわち、花粉粒内部の自由水が多ければ、-30~-40°Cで氷晶を生成し、その結果、原形質に機械的損傷を与え、致死するものであることは、他の樹種、とくに風媒花粉と同じである(市河ら, 1963, 64; 市河, 1968)。また凍結に対する限界含水率の示す曲線は、スギ科、マツ科のそれと、ほぼ同じであった。このようにして生成された花粉内部の氷晶が与える花粉の損傷、すなわち各範囲の含水率をもつ花粉の凍結傷害についてまとめたものが表-2である。

含水率75%の飽水状態にある花粉は0°CからすでにB型傷害、すなわち偽原形質分離状を呈するものがみられる。この花粉は-20°C以下でC型傷害、つまり花粉内部に氷晶が生成し、-50°C以下になると、

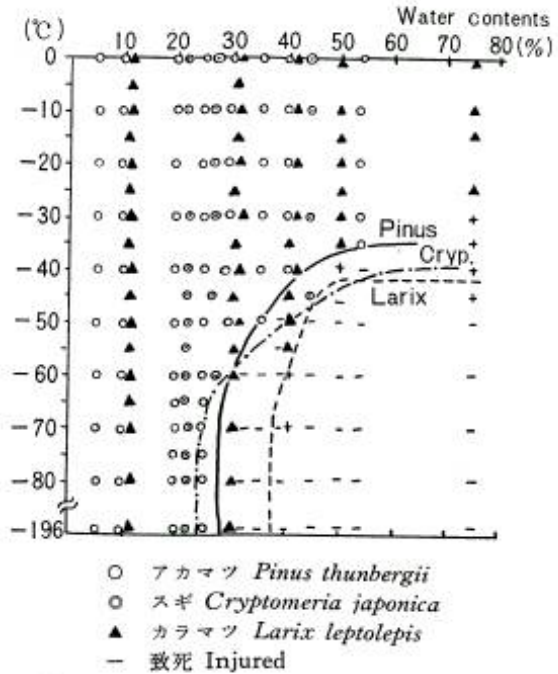


図-2 2, 3の針葉樹花粉における凍結に対する生存温度と対凍結限界含水率の範囲  
Fig. 2. Survival curve of pollen obtained from some species of coniferous trees.

表-2 花粉含水率のちがいによる急速冷却効果と凍結傷害の類型  
Table 2. Rapid cooling and its injury pattern.

含水率 Water Content	11%					30%					76%								
	生存率 Survival rate	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	生存率 Survival rate	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	F <sub>1</sub>	生存率 Survival rate	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>
コントロール Control 0°C	99.0						98.0						99.0						
- 10	94.1						99.0						66.7	+	+				
- 20	98.3						99.0						56.0	+	+	?	+		
- 30	98.0						99.0						27.3	+	+	+	?		
- 35	97.0						93.6						55.4	+	+	+	?		+
- 40	94.0						92.7						2.0		?	?			?
- 45	96.9						88.5				±		+		?	?			?
- 50	94.4						96.2				±		16.0		?	?		+	?
- 55	94.4						97.2				±		0.0		?	?		+	?
- 80	40.5	+	+	+	?	+	97.4				±		0.0		?	?			?
-196	89.6	+	+	+	+	+	97.0			+	+	?	0.0		?	?			?

± : 1視野中にごく稀にみられるもの, rare  
+ : 1視野中少数みられるもの, a few  
? : 1視野中にかなりの数がみられるもの, common  
? : 全視野中にほとんどみられるもの, abundant

傷害はすべて C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 型（原形質にも氷晶が生成する）に進行することを示す。この傷害発生とともに花粉の生存率は 0%になる。

11%, 30%花粉でも -80°C, -1°C で多少傷害の発生をみることがあるが、いずれも B 型が多い。この B 型傷害を呈する花粉は、すでにのべた通り、人工発芽床上で原形質が萎縮し、長楕円球化しない。

30%花粉 -196°C 処理では F<sub>1</sub> 型、すなわち気泡を花粉内部にもちながら、楕円球化し、前発芽の状態を呈するものが、かなり多くみられる。この F<sub>1</sub> 型はクロマツ、ヒマラヤシダ、スギ等の花粉でもみられるが、発芽に影響をおよぼさないようである（市河ら、1963；市河、1968）。また生存率の高い 11%, 30%花粉にも多少の傷害花粉がみられるが、花粉含水率は、元来多量の花粉末の平均値であり、個々の花粉粒の含水率に差のある事は当然予想しうる。したがって、この中に混入した少数の高含水率花粉が傷害をうけたものと考えられる。

#### 高含水率花粉における予備凍結効果

予備凍結について酒井（1960, 66, 67）、酒井ら（1967）は植物の組織で研究を重ね、多くの業績を発表し、西川（1955）は牛の精液の超低温貯蔵で予備凍結は回避しえない重要な前処理としている。花粉の貯蔵で實際上、予備凍結をしなければならない場合は、ごく限られており、とくに風媒花粉の場合はほとんどその必要はない。しかしカラマツ花粉の採取は温室内で強制開葯させるため、室内の関係湿度が高く花粉含水率は 30% 以上におよぶ場合が多い。このような花粉を直ちに低温貯蔵の系列に組み入れることは危険であり、当然、乾燥という前処理をほどこさねばならない。また高温による急激な乾燥は D 型傷害を誘発する危険も多い。そこで高含水率のまま貯蔵する場合には、予備凍結をすることによって、凍結致死をかなり回避できるものと考え

表-3 予備凍結効果と凍結傷害の類型

Table 3. Pre-freezing time and its injury pattern.

含水率 50% の花粉 Pollen, water contents 50% 置床後 96 時間 96 hrs after setting

予備凍結 処理時間 Pre- freezing time	-196°C 投入時間 (液体チッソ) Immersed time in liq. nitrogen	予備凍結温度 Pre-freezing temperature.														
		-5°C					-10°C					-15°C				
		生存率 Survival rate(%)	B <sub>2</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	生存率 Survival rate(%)	B <sub>2</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>	生存率 Survival rate(%)	B <sub>2</sub>	C <sub>4</sub>	D <sub>3</sub>	F <sub>2</sub>
1 hr	20 min	0.0		?	+		19.7		+	+		40.7		+		
2 "	20 "	+		?	+		29.9		+	+		60.1		+		
6 "	12 hr	0.0		?	+		28.3	+	+	+		56.3		+		+
18 "	8 "	0.0	+	?	+		+	?	?	+		10.0	+	+		
27 "	24 "	0.0	+	?	+		18.8	+	+	+		15.8	+	+		
50 "	5 days	0.0	+	?	+		15.4	+	+	+		10.7	+	+		

含水率 76% の花粉 Pollen, water contents 76% 置床後 72 時間 72 hrs after setting

予備凍結 処理時間 Pre- freezing time	-196°C 投入時間 (液体チッソ) Immersed time in liq. nitrogen	予備凍結温度 Pre-freezing temperature.																	
		-5°C					-10°C					-15°C							
		生存率 Survival rate(%)	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	生存率 Survival rate(%)	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	生存率 Survival rate(%)	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
1 hr	20 min	0.0		?		?		28.3	+		+			27.1	+		+	+	
2 "	20 "	0.0		?		?		35.8		+	+			50.0	+		+		
5 "	20 "	0.0		?		?		37.2	+		+			30.7	+		+		
6 "	12 hr	0.0		?		+	+	25.3		+		+		24.4		+		+	

えられる。

供試花粉は、含水率 50%および 75%のもので、1cc ガラスアンプルに封入し、それぞれ $-5^{\circ}$ 、 $-10^{\circ}$ 、 $-15^{\circ}$ に調節したデュワー瓶に、所定の時間直接浸漬し予備凍結したのち、液体窒素に直接移し所定の時間凍結させた。急速加熱した供試花粉は人工発芽床で発芽試験をこころみた。表-3 は置床後 72~96 時間後の生存率である。Control は表-1 に示した 50%、76%花粉の発芽率である。いずれも $-196^{\circ}\text{C}$ に 10 分間直接凍結した結果は、生存率 0%である。

予備凍結の結果、50%、76%両花粉とも、 $-5^{\circ}\text{C}$ での予備凍結では、すべて凍結致死をひきおこし、C<sub>4</sub>、D<sub>3</sub>型の傷害をうけている。すなわち $-5^{\circ}\text{C}$ では予備凍結効果のない事を示している。

$-10^{\circ}\text{C}$ で予備凍結した花粉はかなり $-196^{\circ}\text{C}$ の超低温に耐えて生存している。この場合、予備凍結時間の長短は、1 時間以上であれば生存率にあまり関係しないと考えてよい。

$-15^{\circ}\text{C}$ での予備凍結効果は $-10^{\circ}\text{C}$ より高いと考えられる。すなわち、予備凍結 2 時間 $-196^{\circ}\text{C}$ 、20 分処理では両花粉とも 50%以上の生存率がえられている。このことは、スギ、ヒマラヤシーダ花粉の予備凍結効果(未発表)とほぼ同じ結果を示している。

表-3 で示した予備凍結処理花粉の凍結傷害は、50%と 76%両区の発芽置床後の時間が異なるため、そのまま比較することはできないが、いずれも致死花粉は B<sub>2</sub> 乃至 C 型の傷害を受けている。効果的予備凍結温度は、凍結致死をひきおこす温度以上でなければならず、かつその中でも低い温度の方が効果的であると考えられる。すなわちカラマツの場合は $-10^{\circ}$  ~  $-15^{\circ}\text{C}$ が効果的な予備凍結の閾値であると考えてよい。

予備凍結効果について西川(1955)は、牛の精液ではグリセロールに平衡させて凍結耐性の増大をはかり、酒井(1960)は植物組織の耐凍性の増大は組織・細胞液内の糖に由来するとのべているが、花粉の場合は、いくつかの細胞を内部にもった、1つの独立した多細胞体であり、花粉外部からの物質移入はないため、予備凍結中に、原形質内部の自由水が傷害をおよぼさない程度に細胞外凍結し、結果的に乾燥状態になるか、もしくは原形質の粘度が高くなるなど、主として原形質など花粉内部の物理化学的条件の変化が予備凍結の作用機作であると考えられる。さらに今後研究を進めて行く予定である。

#### 凍結傷害の発生に関与する温度と時間

高含水率花粉が超低温下において凍結傷害をひきおこす時間と温度および、傷害の種類について調べるためつぎの実験を行なった。

アンプルに封入した 40%、75%含水率の花粉を $-10^{\circ}$ 、 $-30^{\circ}$ 、 $-50^{\circ}\text{C}$ に調節されたデュワー瓶及び $-196^{\circ}\text{C}$ で直接、所定の時間凍結させたのち、急速解凍して直ちに検鏡したものである(写真-2 参照)。

表-4 に示したごとく、この処理時間の限りにおいては、40%、75%両花粉とも $-10^{\circ}\text{C}$ 処理では、凍結傷害をほとんどうけない。すなわち、花粉内の自由水は $-10^{\circ}\text{C}$ で少なくとも 7 時間以内では氷晶を生成しないものと考えてよい。

しかし $-30^{\circ}\text{C}$ で 40%花粉を処理した場合、処理時間が長くなるほど偽原形質分離が進行して B<sub>2</sub> 型となり、7 時間で C<sub>1</sub> 型、すなわち微氷晶の生成をみるにいたる。この $-30^{\circ}\text{C}$ で含水率 76%の花粉を処理した場合、傷害発生はきわめて早い。B<sub>1</sub> 型→B<sub>2</sub> 型への移行、B 型→C<sub>1</sub> 型への移行は 10~20 分間で、ごく短時間内におこることを示している。 $-50^{\circ}\text{C}$ 処理では花粉の含水率の差に関係なく、5 分間以上の処理で B<sub>2</sub>、C<sub>1</sub> 型の傷害が発生し、処理時間が 2 時間以上になると氷晶は発達して C<sub>2</sub> 型傷害が多発する。さらに液体窒素で処理した場合は 1 分間以内ですでに 40%、75%両含水率花粉とも微氷晶の生成をみ、2 時間以上経過すると氷晶はさらに発達して



表-4 カラマツ花粉における凍結傷害発生の時間とその類型

Table 4. Duration of exposure to different temperature and patterns of injury.

処理温度 Temp.		-10°C							-30°C							-50°C							-196°C						
処理時間 Time	傷害型 Injury	N	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	E <sub>2</sub>	N	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	E <sub>2</sub>	N	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	E <sub>2</sub>	N	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	E <sub>2</sub>
	花粉含水率 40% Pollen, water contents 40% (Fresh-base)	1 min	?							?							?										+	?	
5 "		?							?							+		+	+							+	?		
10 "		?							?	±								?	+							+	?		
20 "		?							?									?	+	+						+	?		
30 "		?							?	+								+	?	+						+	?	+	
1 hr		?							+	?								+	?	+						+	?	+	
2 "		?							?	+	±								+	?	+					+	?	?	
7 "		?	±								?	?							+	?		+				+	?	?	
100 "		?																	+	?		+				+	?	?	
花粉含水率 76% Pollen, water contents 76%	1 min	?							?							?	?							+	?	±			
	5 "	?							?	+							+								+	?			
	10 "	?							+	+	?	+						?	±						+	?	+		
	20 "	?									+	+	+					?	±						+	?	+		±
	30 "	?		±							?	+	+					?	±						+	?	?		±
	1 hr	?									?	+						?	+							?	+		
	2 "	?									?	+						?	+	+						?			
	7 "	?									?	+						?	?	+						?			
	100 "	?										+						?	?	+						?	?		+

N : 正常型 Normal form or non injury

± : ごくまれにみられる, rare

+ : 少数みられる, a few

? : かなりの数みられる, common

?? : 全視野ほとんどみられる, abundant

C<sub>2</sub>型の傷害に進行する。

また 40%, 50%両花粉とも-50°Cまで1分間以内であれば、花粉内に水晶生成をみない。これは図-1に示したアンプル内部の温度降下速度と関係しており、Dry ice・Et-OH-80°C液で1分間直接冷却しても内部温度は約-20°Cにしか低下しないことから、この時間ではアンプル内部の花粉は表示の温度まで冷却されていないものと考えられる。

76%飽水花粉は-30°C以下で5分間処理をすると傷害はB<sub>1</sub>型からB<sub>2</sub>型に進み、20分ではB<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>型へ進行することから、内膜の内面に微氷晶が生成する時間は大体この時間と考えられる。以上を模式的に図化すると図-3のごとくなる。

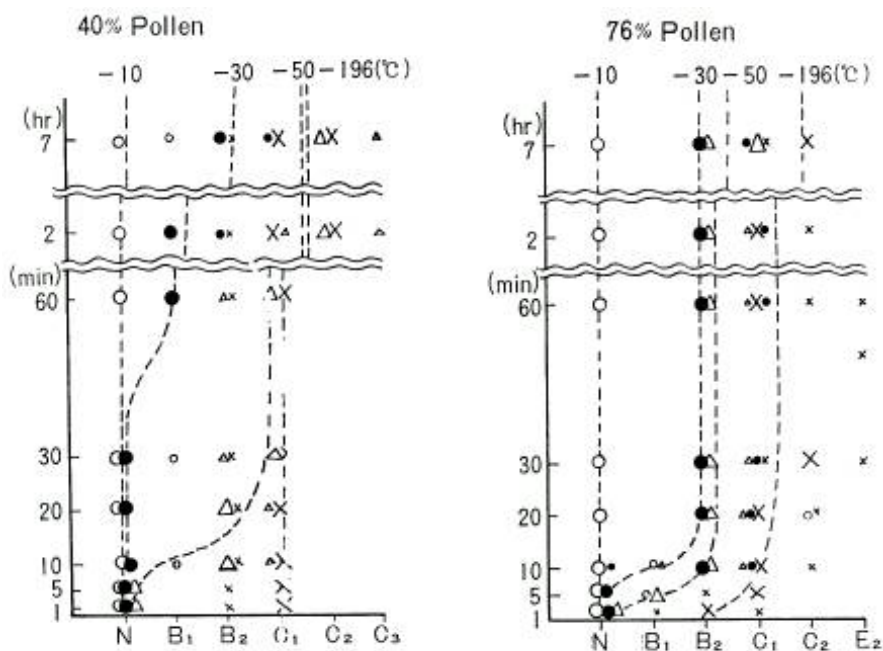


図-3 高含水率花粉における予備凍結の時間と凍結傷害の推移

Fig. 3. Pre-freezing time and morphological changes of pollen with high water contents (Schematic).

すなわち

- (1) -10°C処理ならば7時間以内に限っては凍結傷害はおこらない。
- (2) -30°C処理では花粉含水率の大小によって氷晶生成時間にいちじるしい差を生じ、自由水の多いほど氷晶生成の時間は短い。
- (3) -50°C処理では5分以上の処理で氷晶生成をみるが、含水率の差はあまり関係しない。
- (4) -196°C処理では、ほとんど瞬間的に氷晶生成を招き、時間と共に氷晶は生長する。

また 76%花粉では E<sub>1</sub>型すなわち外皮を含む花粉全体が裂断する損傷をうけるものがみられた。以上のことから凍結に対する限界含水率以上の花粉のうける凍結傷害は、最大氷晶生成帯付近の温度、すなわち-30°Cでは処理時間に比例する。

以上は短時間に発生する凍結傷害であるが、極めて緩慢に発生する凍結傷害がみられる。22%含水率の花粉を、平均-20°C冷凍室内に数カ月貯蔵した結果、すべての花粉に C<sub>3</sub>型の傷害が発生した。この場合は冷凍

室の冷凍機構上、室内温度の上下があり、温度の不定、とくに $-20^{\circ}\text{C}$ を中心とする上下の温度範囲は氷晶生成にとって最も危険な温度帯であり、この温度の上下の繰返しが凍結傷害の原因であることも考えられる。この点は長期貯蔵にとって重要な課題であるので今後研究を重ねなければならない。

### 摘 要

カラマツ花粉の超低温長期貯蔵の研究の一部として、カラマツ花粉の凍結に対する耐性、傷害について研究をした。

1. 急速冷却による凍結致死範囲は、花粉の含水率 30%以下ならば $-196^{\circ}\text{C}$ まで冷却しても生存することが可能である。したがって、カラマツ花粉の凍結に対する限界含水率は 30%以下であることがわかった。

2. この限界含水率は他の針葉樹花粉に比較してやや高いが、含水率 40%以上であれば $-30^{\circ}\text{C}$ ～ $-40^{\circ}\text{C}$ で凍結傷害をうけ、すべて凍結死する。この温度は最大氷晶生成温度帯で他の花粉と同じ値を示していた。

3. 50%および 76%の高含水率花粉を $-196^{\circ}\text{C}$ の凍結に先だって、 $-5^{\circ}$ 、 $-10^{\circ}$ 、 $-15^{\circ}\text{C}$ で予備凍結をした後、液体窒素に 20 分間浸漬した結果、 $-5^{\circ}\text{C}$ での予備凍結効果は全くなかったが、 $-10^{\circ}$ 、 $-15^{\circ}\text{C}$ で予備凍結を 1～6 時間行なえば、液体窒素の中でも生き残ることができる。予備凍結をしないで液体窒素へ入れるとすべて凍結死する花粉でも、最高 60%まで生存させることができた。

4. 含水率 40%の花粉を使い、 $-30^{\circ}\text{C}$ に直接投入して冷却すると、1 分では全く凍結傷害をうけないが、1 時間で偽原形質分離状の傷害がおこり、7 時間処理では内膜の内面に微氷晶を生成する。76%花粉を使うと 1 分間では正常な状態にとどまるが、10 分処理で偽原形質分離がおこり、一部に氷晶生成をみる。この偽原形質分離、微氷晶をもった花粉を人工発芽床上で培養すると、その各々から大きな気泡を生ずる。

5. カラマツ花粉を処理したときにおこる傷害をつぎの様に類型化した。

A 正常： A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>

B 偽原形質分離： B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>

C 氷晶（気泡）生成： C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>

D 異常な傷害： D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>

F 気泡をもつが前発芽するもの： F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>

A, B, C 型は時間の経過とともにステージが進行する。凍結処理をして生存しうるのは A, F 型のみである。

6. カラマツ花粉における凍結傷害は $-30^{\circ}\text{C}$ 処理のとき、傷害発生の時間は含水率の差によってきまる。含水率の高いほど時間は短い。

液体窒素では含水率 40%以上の花粉では瞬間的に氷晶生成をもたらせる。氷晶の生長は処理時間に比例する。氷晶は原形質に発生するが、花粉内の他の細胞には発生しない。したがって他にいくつかの傷害が考えられる。今後さらに支障を伴わない低含水率花粉の調整、実用的な長期貯蔵法について研究を進めねばならない。

### 文 献

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

———・四手井綱英 1963 樹木花粉の超低温貯蔵について (1). 日林講, 238-240

———・——— 1963 ————— (2). ———, 240-241

———・——— 1964 ————— (3). ———, 215-216

———・——— 1965 ————— (III). ———, 224-226

- 市河三次 1968 花粉の超低温貯蔵に関する一、二の考察, 日花誌 2 : 13-16
- KING, J. R. 1961. Prolonged viability of pollens in an uncontrolled atmospheric environment. Amer. J. Bot. 48 : 534-535.
- 酒井 昭 1966 超低温における植物組織の生存 (IV). 低温科学 生物編 24 : 1-13.
- 1967 ————— (V). —————, —————, 25 : 1-7.
- 吉田静夫 1967 超低温における植物組織の生存 (VI). 低温科学 生物編 25 : 9-19
- 1960 木本類の耐凍性増大の過程 (IX). 低温科学 生物編 18 : 23-24
- SAKAI, A. 1965. Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between enrective prefreezing temperatures and the degree of forest hardiness. Plant physiol. 40 : 882-887.
- 西川義正 1955 畜産の研究. 9 : 1-15

### Summary

This study was carried out to store larch (*Larix leptolepis*) pollen for a long period at super-low temperatures.

Relations were studied between water contents of the pollen and its survival, and some morphological changes were observed.

1. Larch pollen can survive after they were immersed directly in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) if its water contents were below 30% (see Table 1 and Fig. 2).

2. The maximum water contents for survival of the pollen were rather higher than those of other coniferous pollens (*Cryptomeria*, *Cedrus* etc). When the water contents of larch pollen were higher than 40%, all of the pollen died at  $-30^{\circ}\text{C}\sim-40^{\circ}\text{C}$ . Ice-crystal fully developed at this range of temperature and other kind of pollen also died at the same range (see Tables 1 and 2, and Fig. 2).

3. To investigate effective pre-freezing temperature, larch pollen was prefrozen for an hour to six hours at temperatures  $-5$ ,  $-10$  and  $-15^{\circ}\text{C}$  and was then immersed directly in liquid nitrogen. When the water contents of pollen were comparatively high (50-76%), prefreezing treatment at  $-5^{\circ}\text{C}$  had no effect, while the treatments at  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-15^{\circ}\text{C}$  were effective for survival of pollen (see Table 3). 60% of the pollen which were suffered prefreezing treatment would be able to survive, while all of the pollen with no prefreezing treatment were not viable.

4. The pollen with 40% water content was cooled directly at  $-30^{\circ}\text{C}$ , there found no damaged pollen grains in a minute after cooling, but pseudoplasmosis was observed after an hour and the ice-crystal developed at inner part of the intine in several hours later under the successive cooling. On the other hand, for the pollen with 76% water content, no change was observed within a minute after cooling, but pseudoplasmosis was observed in ten minutes and some of them formed ice-crystal under the successive cooling (see Fig. 3).

When the pseudoplasmosized pollen and pollen with ice-crystal were cultured on agar medium, large air bubbles were produced in protoplasm (see Fig. 3).

5. The following stages of damage were seen morphologically when larch pollen was immersed in liquid nitrogen (see Photo. I).

- A. Normal form. Stages 1, 2 and 3.
- B. Pseudoplasmosized form. Stages 1 and 2.
- C. Crystallized form. Stages 1, 2, 3 and 4.
- D. Abnormal form. Forms 1, 2 and 3.
- E. Broken form. Forms 1 and 2.
- F. Special form. Stages 1 and 2.

As time passes the stages advance from 1 to 4 successively, in A, B and C.

The pollen only in the stages A and F can survive from freezing.

6. Extend of damage on larch pollen by being frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  depends upon the water content.

The higher the water content, the shorter the time for injury. When the pollen with 40% water content was immersed in liquid nitrogen, ice-crystal was immediately formed. Growth of ice-crystal depends upon the time immersed in liquid nitrogen (see Photos I and II).

## 写真説明

### 写真-1 Photo. 1

- A<sub>1</sub> 正常型花粉 (置床後 24~48 時間)  
Normal form.
- A<sub>2</sub> 前発芽花粉 (置床後 72~120 時間)  
Pre-germination stage.
- A<sub>3</sub> 発芽花粉 (無菌培養 144 時間以上)  
Germination of pollen.
- A<sub>4</sub> 異常生長花粉  
Abnormal (spherical) growth.
- B<sub>1</sub> 偽原形質分離 (初期)  
Pseudoplasmolized stage—stage 1.
- B<sub>2</sub> 偽原形質分離 (中期)  
Pseudoplasmolized stage—stage 2.
- C<sub>1</sub> 微氷晶を内膜内面に生成した花粉  
Air bubbles are observed in the inner part of intine. Bubbles seemed to be formed after melting of minute ice-crystal.
- C<sub>2</sub> 氷晶の発達した花粉  
Pollen grains at more advanced stage of C<sub>1</sub>.
- C<sub>3</sub> Plasm まで氷晶の生成した花粉  
Pollen grains at more advanced stage of C<sub>2</sub>. Ice-crystal is formed in the plasm.
- C<sub>4</sub> C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub> の花粉の人工発芽床上での状態  
Pollen grains on agar plate (C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub> stages).
- D<sub>1</sub> 異常な損傷をうけた花粉 (乾燥によるもの, もしくは Abortive であったもの)  
Abnormal pollen caused by dryness.
- D<sub>2</sub> 液体窒素に直接触れて損傷した花粉  
Abnormal pollen caused after direct immersion in liquid nitrogen (−196°C).
- D<sub>3</sub> D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 等の花粉の発芽床上での状態  
Pollen grains on agar medium (D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> stages).
- E<sub>1</sub> 原形質吐出花粉  
Punctured pollen on agar medium.
- E<sub>2</sub> 高含水率花粉で急激な凍結傷害をおこした花粉  
Punctured pollen caused after rapid freezing owing to high water content (−196°C).
- F<sub>1</sub> 気泡を内部にもちながら楕円球化した花粉  
Ellipsoidal pollen grains with air bubbles.
- F<sub>2</sub> F<sub>1</sub> の花粉の発芽床上における状態  
Ellipsoidal pollen at more advanced stage of F<sub>1</sub> on agar medium.

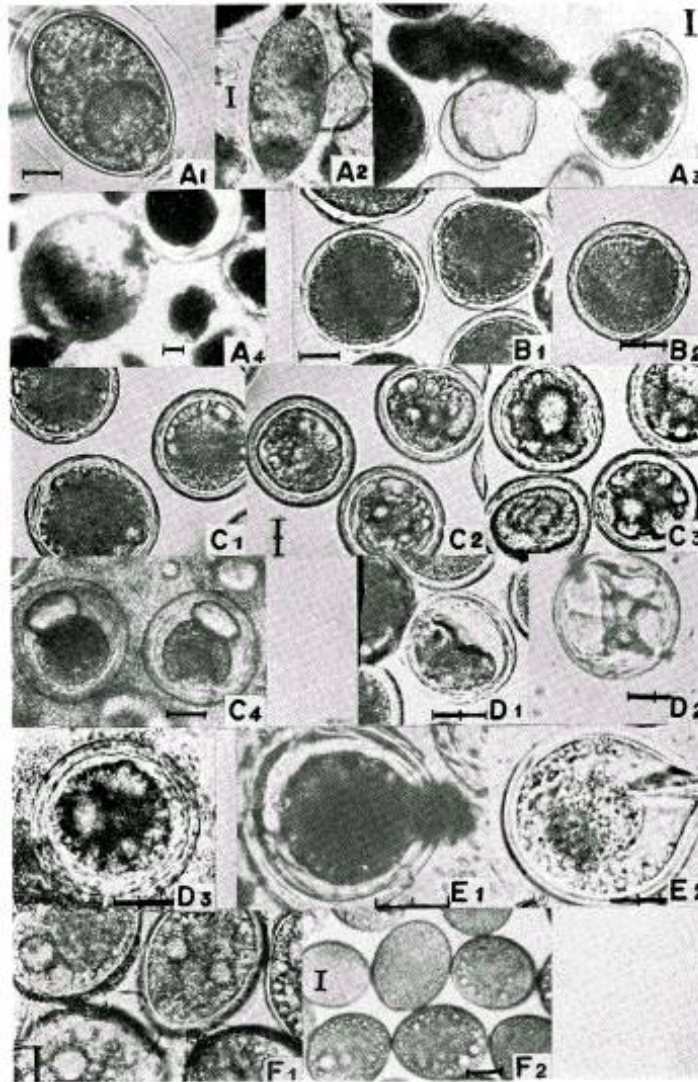
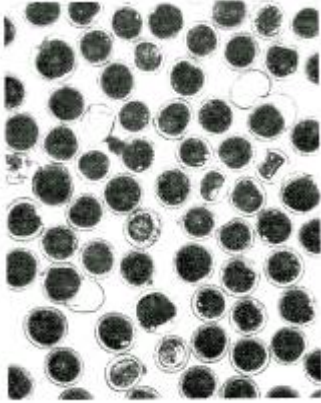


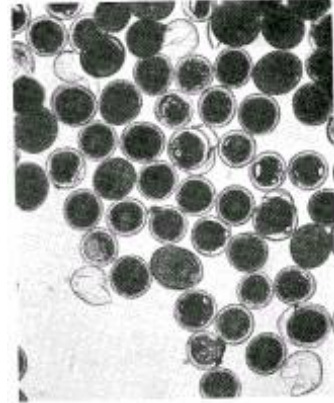
写真-1 カラマツ花粉の超低温処理における凍結傷害の類型  
Photo 1. Patterns of morphological changes of larch pollen immersed in liquid nitrogen. (? \_\_\_? 20 $\mu$ )

Photo 2

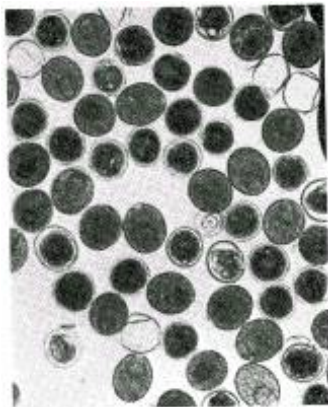
市河・梶・久保田



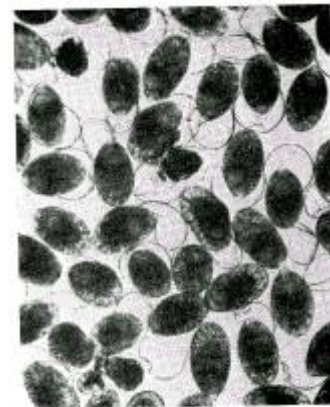
−5°Cで2時間の予備凍結の後−196°Cに20分間おいた花粉（花粉含水率76%置床後1時間）  
Prefreezing treatment at −5°C for 2 hours and exposed to −196°C for 20 minutes.  
Pollen water content : 76%.



−10°Cで2時間の予備凍結の後−196°Cに20分間おいた花粉（花粉含水率76%置床後1時間）  
Prefreezing treatment at −10°C for hours and exposed to −196°C for 20 minutes. Pollen water content : 76%.



−15°Cで2時間の予備凍結の後−196°Cに20分間おいた花粉（花粉含水率76%、置床後1時間）  
Prefreezing treatment at −15°C for 2 hours and exposed to −196°C for 20 minutes.  
Water content of pollen is 76% and after setting about 1 hour on agar medium.



無処理花粉（置床後20時間）  
（前発芽状態）  
Non treatment.  
After setting about 120 hours on agar medium.  
（Pregermination stage.）

写真-2 発芽床における予備凍結処理花粉

Photo 2. Pollen grains on agar medium under the prefreezing.