樹木花粉の超低温貯蔵に関する基礎的研究（II）

市河三次・四手井綱英

Fundamental Studies of Deep-Freezing on Tree Pollen (II)

Sanji ICHIKAWA and Tsunahide SHIDEI

目　　次

要　　旨

花粉の低温処理によって起る凍結障害について論じた。すなわち凍結障害には2つあり，1つは機械的損傷が花粉の細胞質や壁構造におこり，他の1つは正常な機能を低下させる生理的障害である。

1.　機械的な傷害は凍結の結果，細胞質が花粉壁から剝離する偽原形質分離が多く，凍結の時間が長かったり，花粉含水量が多い場合は，さらに進行して細胞質内部に空白な氷晶痕を残す。これらは経時的に進行する。さらに急激に液体窒素に直接ふれると花粉粒は嘴状に裂開する。これらの傷害パターンを分類整理した。この他に細胞液に溶け込んでいたガス体が遊離してできる気泡が花粉の中にみられる場合もあるが，これは花粉の生存にとってあまり有害ではない。

2.　生理的障害は凍結限界温度に近い冷却処理，凍結限界含水率に近い含水量の花粉の冷却処理の場合に発生し，培養基上において，澱粉合成能力が低下，又は，全く消失する。また花粉管の伸張もよくない。

3.　花粉の凍結の様式に2種類ある。1つは細胞内凍結であり，1つは細胞外凍結である。細胞内凍結にはさらに2様式がみられる。

すなわち Flashing 現象で細胞質が微小な氷結晶で瞬間的に凍結される。この現象は顕微鏡下で花粉粒が暗黒に観察されることから容易に判別できるが，このとき花粉粒の形状は新鮮花粉と大差ない。

Flashing した花粉を一旦解凍し，さらに再凍結させると全く異なった凍結様式により細胞内凍結がおこる。巨大な氷結晶の生長をみることから顕微鏡下では透明な花粉として観察され，細胞質の萎縮，花粉外形の変化を伴なう。

細胞内凍結 (Flashing) を解除すると，カラマツ，サザンカ花粉等では顕著な外形の変化をもたらせる。特にカラマツではB型の傷害像として観察される。Exine, Intine と細胞質の剝離が見られ，マツ型花粉でも発芽孔部分に空白帯ができる。この現象は凍結偽原形質分離の一つと考えられる。

この傷害型と第2次の細胞内凍結によっておこった現象を綜合すると，壁構造の変性，つまり細胞壁が氷を透過しない性質が失なわれたものと考えられる。また細胞質の凍結により内部圧力のバランスがくずれ，Flashing 解凍後カラマツ花粉は球形を呈する。これらの傷害が進行すると細胞質内に氷晶痕ができる。

これらの現象はすべての花粉に共通するものではなく，ヒマラヤスギの花粉ではこの条件下では観察できない。またライムギ死花粉で実験すると，Flashing するばかりでなく，再凍結しても再び Flashing し，Pseudoplasmolysis はみられない。

4.　細胞外凍結はカラマツ花粉でよく観察できる。−5°C で植氷し −10°C で凍結した結果，Medium である水が氷晶をつくり，凍結時間が長くなると，前葉体細胞側が特異的に萎縮する(写真8)。この細胞外凍結は花粉の生存に重大な影響は与えず，解凍しても外型に変るところはない。

5.　以上の他長期間超低温に貯蔵した花粉のうち，*Quercus grauca, Magnolia grandiflora, Larix* などの花粉に気泡の発生をみることがある。比較的高い含水率の花粉に発生するが生存力に変りはない。また *Camellia sasanqua* 花粉では凍結により Lipid 様物質の滲出をみる。

第5章　花 粉 の 凍 結 障 害

前章[16]で述べてきたように，花粉粒内の自由水が氷晶を生成すると，他の植物組織と同様に凍結死する。植物細胞の凍結については既に多くの研究[1~15]があるが，花粉の場合は壁構造が他の細胞膜より複雑であるため，凍結の様式に異なる点もあり，凍結によって花粉のうける障害も多様である。カラマツ花粉について凍結障害を類型化し，すでに報告[17]したが，他樹種の花粉でも，その類型をほぼ適用することができる。

凍結障害には，氷晶生成による細胞壁の裂損や，原形質破壊などを主とする機械的傷害のほか，低温処理によって花粉粒内に澱粉形成がみられなくなったり，発芽しても花粉管の伸張が極めてわるい場合など，主として生理的な障害もみられる。ここではこの二者を総合して凍結障害とした。

1.　低温下における花粉の凍結像

カラマツ，クロマツ，ヒマラヤスギ，サザンカ等の花粉を材料として低温下における花粉の凍結像を調べ，凍結死に関する 2・3 の知見をえた。

花粉の凍結にも植物細胞の凍結と同様，細胞内凍結，細胞外凍結の2様式がみられる。また，

カラマツ花粉でえられた細胞内凍結にはさらに2様式がみられた。

新鮮な飽水状態（72%）花粉の凍結にまずみられる細胞内凍結は Flashing 現象[13] であり，さらに Flash した花粉を解凍し再び凍結した時にみられる細胞内凍結である。これらの細胞内凍結は花粉を凍結死させ，細胞外凍結は多くの場合，花粉を生存させることができた。

1・1 細胞内凍結像 (Intracellularfreezing)

飽水カラマツ花粉を水でマウントし，カバーグラスをかけた上，−27°C で急速冷却した場合の細胞内凍結を写真1に示した。冷却処理は，あらかじめ−30°C の低温室* にセットした顕微鏡のステージ (−24〜−26°C) を利用し，急速に冷却した。冷却速度は別に銅コンスタンタン熱電対で測定し，写真2の冷却曲線をえた。Medium の水が完全に氷晶を作り終え冷却が再開するときの冷却速度（写真2の矢印，冷却開始後約 60〜80 秒）は，およそ 0.8°C/sec. であった。

このようにして冷却したカラマツ花粉は，冷却開始後 90〜120 秒までの間に Flashing を終了する。なお，Flashing 開始の時間は Medium の水が氷結し，冷却が再開される時間とほぼ一致する。

また，−18°C 低温室内で，全く同様の実験を行ない，Flashing 開始時間を測定した結果，花粉周囲の水が全面にわたって凍結した時に始まり (冷却開始 60 秒後)，15〜25 秒後が最も激しく，35 秒後には，ほとんどの花粉は Flashing を終った。この場合，個々の花粉における Flashing は瞬間的に全面に起こることが観察される。

Flashing した花粉の形態は，新鮮な状態と変らず楕円球である。これは花粉粒内外が凍結し，内圧と外部圧力がつり合う状態にあると考えられる。

Pinoid 花粉，すなわちヒマラヤスギ，クロマツ等の花粉の Flashing はおこりにくく，特にこの条件下でヒマラヤスギ花粉の Flashing は全く観察できなかった。

さらに Medium を凍結させずに花粉粒だけを Flash させるため，シリコンオイルで飽水花粉をマウントし，細胞内凍結をおこさせた結果，水でマウントした場合と同様，Flashing することが観察された（写真3）。Flashing 開始までの時間は水 Mount の場合と同様である。この点は，飽水乃至は凍結限界含水量以上の水を含む花粉のアンプル内における凍結の現象と同様と考えられる。

サザンカ，ライムギ花粉の Flashing もほぼ同様の方法で観察しうる。即ち飽水状態にした上記花粉を，−30°C 冷却板上で直接冷却した結果，カラマツと同様，細胞内凍結をおこし，Flashing した（写真4）。ライムギでは採取後1カ年を経過した約6%含水率の死花粉を用いたが，飽水させた後の凍結で Flashing することは他の生花粉と同様であった (写真4, 5)。

1・2 細胞内凍結 (Flashing) 花粉の再凍結像

Flashing したカラマツ花粉を約 30°C の温度で直ちに解凍したのち，再び前項と同様の冷却速度で凍結させた。その結果，前項でのべたような Flashing の現象は全く起らず，花粉粒外部にある Medium の氷晶と同様の巨大な氷晶が細胞内に生成し，細胞質など花粉内容物は萎縮し不定型となった。この型の細胞内凍結は顕微鏡下で透明な像として観察される（写真6）。

以上示した細胞内凍結様式の差から，第一次の細胞内凍結つまり Flashing によって花粉壁の構造に変性が生じたことを示す。これはすでに前章でものべたが，根井[15] らは細胞内凍結によっ

---

* この実験は北海道大学低温科学研究所，酒井昭教授，大塚宏二氏の御指導を得て，低温棟において行なったものである。

て細胞壁の選択透過性が損われるとのべ，膜変性のあることを示しているが，カラマツ花粉の再凍結に見られる現象は，外からの氷晶の侵入を容易にさせる物理的な構造変化がおこったことを意味する。ヒマラヤスギ，クロマツ花粉での再凍結の現象は，この条件下では観察することができなかったが，サザンカ花粉の場合はカラマツと同様，透明な巨大氷晶が細胞質内部に侵入するのが観察された。なおライムギ花粉でこの再凍結現象はみられず，再び Flashing する（写真5参照)。

以上のことから，再凍結で巨大氷晶が花粉内部にできることは，すべての花粉にみられる現象ではなく，Taxoid のように Intine が厚く，かつ花粉壁が Varrucate 構造の場合におこりやすく，元来原形質分離をおこしにくい Gramineae 花粉ではおこりにくいことから，壁微細構造の差[16]に由来する現象と考えられる。

1・3 細胞内凍結花粉の解凍像

Flash 中も楕円球を保っていたカラマツ花粉を，+30°C で急速に解凍すると球状に変形し，もはや楕円球とはならない（写真7)。解凍後は Intine 部分の肥厚がみられ，外壁 (Exine) と花粉粒本体との間に空白部分が観察される。この部分には第一前葉体細胞がみられることから Ect-intine 部分が膨潤肥厚したものであり，したがって，この現象は偽原形質分離と考えられる。この空白部分は細胞内凍結したスギ，タイザンボクなどの花粉の解凍後にも観察される。また前節でのべたように，この花粉を再凍結させると，花粉粒内は巨大な氷晶ができることから，膜（壁）構造の凍結変性の結果と考えられる。後節でのべるカラマツ花粉の凍結死を知る指標として重要であり，また空白部分の大小で凍結の程度を知ることができる。この球形化への形態変化は低温処理では細胞内凍結の結果に限定して見られ，一般的には+温度で長期間放置したカラマツ花粉にみられるが，カラマツ花粉は死とともに極軸方向への内圧がなくなるものと考えられる。

特に Flashing の結果，細胞質，壁構造に機械的な損壊がもたらされた事は明きらかである。

サザンカ花粉の場合は，解凍後 Plasma 内部は氷晶生成の跡と考えられる顆粒状の不斉な像として観察されるが（写真4)，壁構造の形態的変化は電顕レベルでの追跡をまたねばならない。ライムギ死花粉では，すでに前項でのべた如く花粉内部は無処理花粉と同様の状態を呈し，凍結による損傷はみられなかった。

1・4 細胞外凍結像 (Extracellularfreezing)

飽水状態のカラマツ花粉をカバーグラスにはさみ，水でマウントしたのち −5°C で植氷，直ちに −10°C に急冷して細胞外凍結させたところ写真8に示す凍結像をえた。

細胞外（厳密には花粉粒外）にある水は −10°C に試料をおいた後，2分間以内に結氷し，花粉は次第に不規則な外形を呈するにいたる。カラマツ花粉における細胞外凍結の典型は写真に示したが，特に柄細胞，前葉体細胞のある求心極側（写真8←印）が凸状に萎縮する。一般に常温における乾燥花粉は球形を示すのに対し細胞外凍結におけるこの萎縮は，水分含量が多く，楕円球状から進行するため中心細胞などの萎縮は少なく，花粉粒自身の細胞質部分が萎縮するために不規則な形となると考える。

この細胞外凍結を −10°C で16時間継続させた像は写真8のHである。すなわち細胞外凍結時間が長くなるに伴ない萎縮が進行する。これは細胞外凍結により花粉内部の自由水が昇華によって脱水された結果と考えられる。

細胞外凍結の場合は細胞膜（花粉壁）に傷害を与えず，また細胞質に損傷は起らない。したが

って解凍後は楕円球に戻り，対照花粉と形態的に全く変わりがない。細胞外凍結による花粉内容物の萎縮は偽原形質分離と考えられるがシリコンでマウントした場合は Exine の萎縮はなく，(写真9) Intine 部分が変形を与えているようである。凍結原形質分離であろう。

2. 各種花粉の凍結障害

超低温処理実験による凍結の傷害像を固定し直接検鏡することは相当の設備を必要とする。そこで凍結によって発生した傷害の加温後における形状を無処理花粉と比較する間接的方法によって花粉の凍結傷害の程度を類型化した。即ち，加温（解凍）後の花粉を発芽床又はスライドグラスにとり，直接検鏡して処理別の凍結傷害像を検討し低温処理の諸実験結果に応用した。この間接的方法による傷害パターンは前節でのべた細胞凍結の解凍像とほぼ一致した。なお本節における凍結傷害の類型は既報[17]の分類を用いた。

2・1 スギ花粉における凍結障害

スギ花粉の形態・発芽過程はカラマツ花粉のそれとほぼ同様であるが両者の間にある顕著な差は吸水・脱皮の結果みられる内膜 (Intine) の厚さ（特に膨潤時の直径）がスギでは花粉粒径の2倍にも達することであり，この差が傷害のパターンにもあらわれて来る。表1に示すように，スギ飽水（約72%含水率）花粉では −196°C 10秒処理で約40%がすでに D_2 型の傷害をうける。また20秒処理区では，すべての花粉が D_2 型になるが，カラマツ花粉の場合は C_2 型を示したにすぎない。この両者間にある傷害程度の差は Intine 層の厚さの差に由来するものと考えられることはすでにのべた。したがってカラマツより厚いスギの Intine は低温処理によって急激に氷結晶を作り，細胞質への氷結晶の侵入を容易にするものと思われる。

第1表 72%スギ飽水花粉の −196°C 直接冷却処理における凍結傷害

Table 1 Frost injured of *Cryptomeria japonica* pollen.

Immers. −196°C	10 sec.		20 sec.	40 sec.
Pattern Injury.	N type D_2	59.6% 40.4%	99%	100%
Germ. %	5.9%		0	0
Pattern Injury On Agar medium setting after 72 hrs.	C_4 D_2 N type B_2	11.8% 3.5% 42.3% 36.5%	C_4 type 100%	C_4 type 100%

Water contents; 72%

B型傷害をもつ花粉は多くの場合，B_2 型のまま発芽床上で静止し以後の形態的変化を伴なわない。また −196°C 直接冷却10秒処理の結果，解凍直後には正常な形を示す花粉は約60%にも及ぶが，72時間発芽床で培養後発芽するものはわずか6%にすぎなかった（表1参照）このことは正常型花粉（機械的傷害のみられない）でも，その多くが発芽床上で発芽することのできない，いわば生理的障害をうけているものとみられる。

以上のべて来た機械的傷害や生理的障害の他に，F型すなわち花粉粒内に気泡の発生をみることがあるが後節で詳述する。

2・2 ヒマラヤスギ花粉の凍結障害

一般に Pinoid 花粉の凍結傷害像は Taxoid 花粉に比較して明瞭でなく，傷害パターンもカラマ

ツほど多くない。これらの花粉での凍結傷害の程度は低温処理後，人工発芽床上で現われる原形質の萎縮など主として形態変化によって判別する方法しかないようである。したがっていくつかの冷却実験を行ない解凍直後及び発芽床上での花粉の動きを比較する方法によった。

2・2・1 飽水花粉にみられる凍結傷害

滅菌水を吸収させた68% 飽水花粉を 1cc ガラスアンプルで封じた後，−80°C へ直接冷却した結果，花粉は写真10に示すような傷害像を示した。−80°C に2〜4分間浸漬した処理花粉は細胞質部分にごく微水な気泡様の像が散見でき，また発芽溝位置に空隙がみられる。さらに16〜100分間処理をすると，この気泡様の部分は多少発達して大きくなり，22〜24時間の処理で細胞質は外膜 (Exine) から剝離もしくは Intine 部分にわずかな剝離が生じた。以上の結果から−80°C 処理による凍結傷害は，冷却処理の時間の長短に支配されることがわかる。なおこの気泡様の像が氷晶の痕跡であることを裏づける結果はまだえられていない。なお，いずれの花粉もすべて発芽せず96時間培養で C_4 型を示すことから細胞質の破壊をうけていることは明らかである。

2・2・2 飽水花粉の急激な凍結による傷害

冷却速度をさらに高めるため68% 飽水花粉を 24×32 mm 厚さ 0.13〜0.17 mm のカバーグラスにはさみ，パラフィンで封じた後 −80°C に一定時間冷却処理した。また同時に 6.5% 含水率花粉を処理し対照とした。

この冷却処理の結果は両含水率花粉とも殆んど凍結傷害と考えられる形態変化はみられない。高含水率花粉ではわずかに遠心極側に空白部分が帯状にみられるが，前項の実験結果にみられた細胞質の気泡様損傷は認められない。この結果を前項の結果と併せて考察すると，急激な冷却処理をした場合は，細胞質にあまり大きな氷晶はできず，花粉内の水が過冷却状態であると考えられる。しかし，この処理花粉は人工発芽床上で発芽しない。このことからヒマラヤスギ花粉でも，細胞質は機械的損傷のほか生理的な変化を伴なう障害がある。

2・2・3 ヒマラヤスギ花粉の細胞外凍結

前項の実験に用いた花粉を滅菌水とともにカバーグラスにはさみ −80°C に直接冷却したところ第2表に示すような結果をえた。即ち 6.5% 花粉を −80°C, 120時間冷却処理した結果，全く正常であり，発芽率も対照区と変らず，凍結による傷害はない。つまり花粉粒内に凍りうる水がない限り細胞外の Medium である水が凍って氷晶を作っても花粉に損傷は，与えていないことがわかる。もちろんこのような低含水率の花粉で Flashing 現象はおこらない。

第2表 乾燥，飽水ヒマラヤスギ花粉の水マウント直接冷却処理における花粉の生存と凍結傷害.

Table 2. Frost injured of *Cedrus* pollen. (water mounted)

6.5% pollen			68% pollen	
−80°C	−196°C	Germ. %	−80°C	Injured
10 min.	—	87.0	3 sec.	
30 min.	—	89.3	6 sec.	
60 min.	—	84.8	15 sec.	Germ.
2 hr.	—	90.5	30 sec.	0%
3 hr.	—	84.6	60 sec.	Injur.
21 hr.	—	90.4	90 sec.	C_4
30 hr.	—	81.1	120 sec.	
48 hr.	—	66.5	3 min.	
120 hr.	—	82.0	6 min.	
48 hr.	3 min.	91.2	12 min.	
50 hr.	1 hr.	86.6	30 min.	
22 hr.	3 min.	80.2	60 min.	

Control germination; 88.3%

一方，飽水状態花粉の場合では，カラマツ花粉の例にみられた外部氷晶の侵入が，ヒマラヤスギでは見られない。この点から，Pinoid のもつ壁構造の場合では透過性の増大をもたらすような変化はおこらないものと思われる。

しかし細胞質には前掲の損傷痕跡と思われる気泡様の部分が，花粉の解凍後に散見できること，発芽部位の空白にみえる剝離などが観察され，また発芽床上で 48 時間後 C_4 型の傷害パターンを示し，発芽しない点などから総合して機械的損傷があったことは推定しうる。

2・3 その他の花粉にみられる凍結障害

サザンカなど花粉壁に Lipid 様物質を多く含む花粉，及び *Magnoliaceae* など特に長い発芽溝をもつ種類の飽水花粉の凍結，加温後に現われる形態的，機能的変化を調べた。

傷害のパターンは発芽床上で B_2 型を示すものが多く，いずれも限界含水量以上の水分を含む花粉にこの傷害がみられた。しかしサザンカ・イイギリ等 Lipid 様物質を含む種類の花粉では，花粉壁外側に油滴の滲出が見られる（写真 11 参照）。また高含水率花粉を液体窒素に直接ふれるなど，急激な温度変化を与えると E_2 型の裂口，又は Exine の裂開がみられる（写真 12-B の E）。この凍結傷害をクロマツ花粉で起こさせると，Air bag と Exine 共に花粉実質から離脱する現象が見られた。この点は Taxoid 花粉の脱皮現象に似て，花粉形態学上興味深い。

ライムギ死花粉では，ほとんど細胞質の形態的変化が見られない。Flashing した花粉を再凍結させても，巨大な氷晶の侵入する細胞内凍結がみられないことはすでにのべた。これはライムギはじめ，イネ科花粉が一般に原形質分離を起こしにくい花粉であるという，花粉のもつ特性によるものと考えられる。したがって低温における物理的現象は花粉の場合一様ではなく，特に壁構造など個々の種類によって解剖学的な差と，それに由来する凍結様式の特性について今後更に研究するべきことが多い。

3. 低温処理によって起こる 2・3 の障害

前項まで主として機械的損傷についてのべて来た。しかし冷却処理後，形態的には生花粉と変るところがないが，発芽，澱粉形成能などに影響を及ぼす機能的な障害* がみられる。また既にふれた F 型の障害は発芽の機能に影響は与えず，花粉の生命は維持しうるという点で特異である(次節詳述)。これらはいずれも低温処理の結果与えられたものであるため低温障害として取扱った。

3・1 低温処理による花粉の澱粉合成能の変化

68% 飽水ヒマラヤスギ花粉をアンプルに封入し，急速冷却後，通常の寒天培地で発芽試験を試みたところ，低温処理の温度によって花粉粒内の澱粉合成に差のある事がわかった。置床後 48, 72 時間後の澱粉合成花粉の割合は，第 3 表，第 1 図に示すように変化した。この処理における凍結限界温度は 30～35°C の範囲であり，この温度以下ですべて凍死する。この凍結限界温度以高の処理花粉は，発芽床上での培養時間とともに澱粉合成粒は増加し，72 時間後の発芽率 93% に対し澱粉合成した花粉は 70～90% に及ぶ。この現象は澱粉合成系酵素活性が正常であることを示し，無処理花粉の発芽経過と何等変らない。

* すでに凍結「傷害」として来たものは主として機械的損壊を被むった場合を指して来た。写真 12 にみられる傷害パターンである。しかし，花粉の生理的・機能的な障害を誘起する場合がある。このような場合を凍結「障害」ということにする。まだ低温科学の領域で明確な規定はない。

第3表　急速冷却をしたヒマラヤスギ花粉の発芽率と澱粉形成率
Table 3 Effects of rapidcooling treatments on germnation rate and starch formation rate of *Cedrus deodara* pollen.

	Starch formation at 24 hr.	Starch formation at 48 hr.	Germination rate (%) at 72 hr.
Cont.	62.3%	85.9%	95.1%
− 5°C	49.0	89.8	91.7
−10°C	52.6	83.2	93.7
−15°C	48.5	72.5	91.4
−20°C	47.1	79.7	92.6
−25°C	59.8	70.7	57.6
−30°C	37.2	44.3	62.2
−35°C	27.4	12.4	0
−40°C	19.9	16.0	0
−45°C	22.0	8.2	0
−50°C	13.9	12.9	0
−55°C	—	6.8	0
−60°C	—	2.4	0
−65°C	12.7	2.0	0
−80°C	6.6	3.0	0

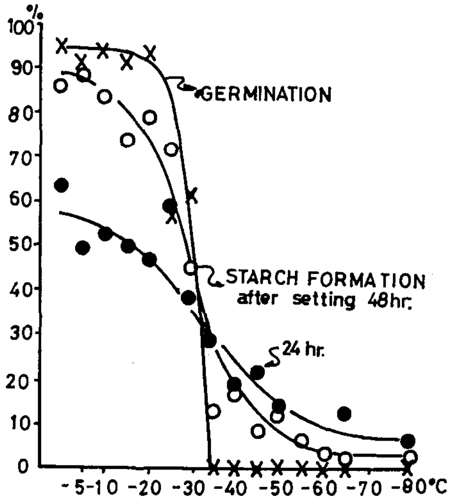


図1　急速冷却処理をしたヒマヤラスギ花粉の凍結限界温度と，発芽率，澱粉形成率の推移
Fig. 1 Germination rate and starch formation rate of rapidly cooled *Cedrus deodara* pollen.

これに対し，凍結限界温度以低まで冷却した花粉は全く逆の傾向を示す。即ち処理花粉の10～25%程度しか澱粉合成粒はみられず，澱粉の充実度も前者に比較して極めて低い。さらに培養中も澱粉合成花粉粒は減少の傾向を示し，72時間で10%以下に低下する。この花粉はまた，すべて発芽床上でC_4型の傷害パターンを示した。

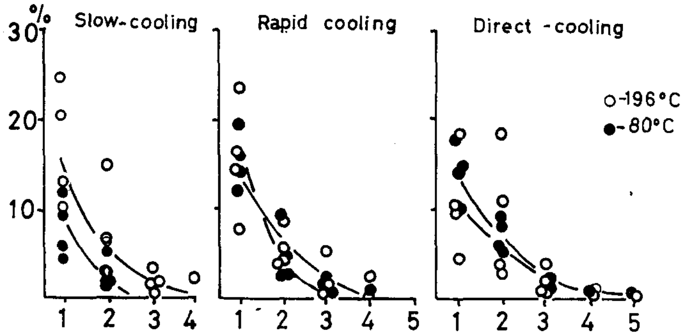
以上の凍結障害は現象上，澱粉⇄糖の合成系酵素の活性が低温処理によって減少又は失活した事を示すものであり，生理的な障害として区別せねばならない。また酵素系の失活する温度は，第1図のように花粉の致死温度と必らずしも一致してはいない。したがって，細胞内凍結によって起る花粉の細胞構造に機械的損傷を与える自由水の氷晶生成のほか，結合水レベルにおける不安定な蛋白質変性があるものと思われる[15]。

3・2　低温処理花粉内に発生する気泡様体

すでに凍結障害のF型[17]として規定したものである，スギ，カラマツ花粉でこの現象は顕著であり，また長期間超低温貯蔵した場合にみられる。

スギ22%含水率の花粉を緩速・急速・直接冷却し，花粉内部に発生する気泡について調査したところ，次の様な結果を得た。図2に示すように冷却速度の差は，気泡発生数に直接関係をもたない。発生する気泡数は1～4個であり処理した花粉のほぼ半数に及ぶ。この気泡は，低含水率花粉の場合には発生をみないが，高含水率ほど多く，処理開始後かなり早い時間で発生する。貯蔵の場合は気泡発生数と貯蔵日数は比例関係にないが，−196°Cで貯蔵した場合，貯蔵日数が多くなると共に気泡発生数も増加する傾向にあった。(図3)

また写真13の1～7に示すように発芽床上で花粉粒が吸水するとともに表面張力をもちはじめ，約5分後，球形になるが，互いに独立し，集合による気泡容積の増加はみられない。したがって



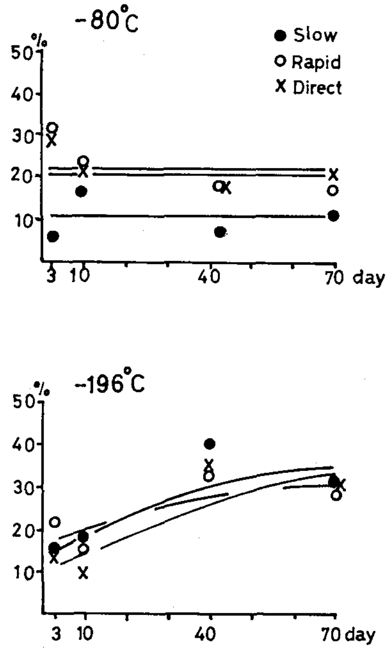
2 図　冷却速度及び貯蔵温度を異にしたスギ花粉粒内の気泡数と頻度
Fig. 2　Number of air-bubble produced by some kinds of treatments in pollen of *Cryptomeria japonica*.

小泡のまま，細胞質内部にあり，発芽とともに花粉管内に進出する。しかし，生殖細胞，花粉管核などの花粉管内への移動に支障はない。(写真 13-9, 10)

カラマツ花粉における気泡の発生は，スギとやや異なり気泡発生の初期は Intine 内面に微小な気泡として存在し，低温に長期間おいた場合に細胞質内部に大きな気泡として出現する。また十温度に放置した花粉にも見られることはスギと同様である。すなわち 22% 花粉の 1 年間貯蔵実験において気泡の発生は，－10, －20, －196°C 各区とも約 60 日で全花粉の 60% 以上に発生がみられた。またこの花粉は新鮮な花粉と全く同様に発芽床上で Pregermination の状態を示すので，花粉の機能に重大な影響はもたないと考えてよい。

Pinus, Quercus, Magnolia などの花粉でも低温処理や，長期貯蔵の場合，培地上に移した花粉に発生をみることがある。発生部位も細胞質内部が多く，2～3 個程度である。いずれも発芽に影響はない（写真13）。

以上のべた気泡は，ニュートラルレッド，アセトカーミン，スダンⅢなどによっても染色されず，物理的な力に対しても球形を保ちながら細胞質内部を移動することから，油滴でなく，気泡であることは明確である。また凍結傷害をうけ花粉粒にみられる気泡様の部分や，プラス温度に長期間においた場合のほか，急激な脱水などによって生ずる花粉の空白部分などは必らず不定形を示すこと（凍結傷害B，C型など）が多いので区別しうる。Duffield[18] は 22°C, 50% の相対湿度の高温高湿条件下で貯蔵したマツ花粉に，2•3 の大きな空胞（Vacuoles）が並んでいたとのべ，石渡・加藤[19] らは凍結食肉に気泡の発生をみるとのべている。すなわち体液中に溶存している微量のガスが体液の氷結と同時に遊離し体積を膨張させ，その Expansion よって細胞，組織に機械的損傷を与えるとのべているが，長期間超低温下に貯蔵した花粉粒中に発生する気泡も，花粉細胞液内に溶存するガス体の遊離によるものと考えるのが適当であろう。



3 図　スギ花粉の超低温貯蔵期間及び貯蔵条件の差による気泡発生率の推移
Fig. 3　Numbers of air-bubbles in deep-frozen pollen of *Cryptomeria japonica*.

この気泡の発生は，スギ花粉ではかなり短時間で発生することがみられ（写真 13 参照），特に

22% の高い含水率花粉の冷却処理中にも発生する。しかし他の樹種では含水率 10% 程度の場合でも液体窒素中で約 1 年間貯蔵した花粉に気泡の発生がみられるので低含水率花粉の気泡発生速度はかなり緩慢と思われる。

4. 本章の総括と論議

1. 花粉の凍結による障害には，凍結による機械的な細胞質，壁構造の損傷等を主とする凍結傷害と，花粉の正常な機能を低下もしくは停止させる凍結障害とに大別できる。また傷害の程度によって数種のパターンがあり，カラマツ花粉の凍結傷害をモデルとしてマツ科，広葉樹などの凍結傷害を組みあわせた結果，凍結障害を大別すると次のようになった。

a) 花粉壁，外・内膜 (Exine, Intine) が細胞質から剝離し，顕微鏡下で空白層を観察しうる型である。これは凍結による偽原形質分離の一つと考えられる。スギ，カラマツ花粉で顕著にみられ，マツ型花粉，*Magnoliaceae* にもみられる。（B型）凍結傷害の進行とともに B_1〜B_3 に変わる。

b) 氷晶の生成が内膜 (Intine) 内面から Plasma にまで及ぶ型で，氷晶痕と考えられる空白部分 (解凍後は気泡様に観察しうる) が細胞質中にみられ，経時的にはB型から推移する（C型)。

c) 急激な冷却によって原形質のコロイド変性が起り，原形質に不規則な剝離，萎縮を生ずる。(D型)

d) 上述のD型傷害とほぼ同様の機序によって発生する型で花粉粒が嘴状に裂開するなど，花粉の外型に変化を与える型をE型とする。

e) 花粉粒内部に気泡を含む障害の類型をさしてF型とした。F型は他の凍結傷害と発生機序を異にし，また花粉に致命的な傷害とならない。したがって生理的な障害として取り扱う。

f) 以上のほか花粉の生理的機能が低下し，澱粉合成能力の消滅や花粉管伸張の異常など生理的障害がある。

以上のパターンに大別する花粉の凍結障害は，すべて解凍後の花粉粒の像から類型化したものである。B〜E型は花粉の細胞内凍結の結果生じた像である。これらの傷害の発生機序については凍結原形質分離や氷結晶による細胞質の損壊など，いろいろの説があるが今のところ不明な点が多い。

2. 花粉の細胞内凍結 (Intracellularfreezing) と細胞外凍結 (Extracellularfreezing)

飽水カラマツ花粉を −27°C に急速冷却し，細胞内凍結を直接観察した結果，冷却後 90〜120 秒で，Flashing 現象を呈する。Flash した花粉の外形は新鮮な常温における形と変らず，細胞質は顕微鏡下で暗黒にみえる。即ち微結晶による光線の散乱による。この Flashing 現象は多くの花粉で観察しうる。(第一次細胞内凍結としてこの現象を規定する必要があろう。)

また Flash したカラマツ花粉を急速に解凍した結果，B型の凍結傷害を示していることから，1で述べた凍結傷害パターンのB型は，細胞内凍結の結果ということができる。

さらに Flash した花粉を解凍し再び凍結した場合に Flashing 現象はみられず，細胞質内部に巨大な氷晶が生成し，かつ細胞質の萎縮がみられる。この結果は Flashing により膜壁構造に大きな変性のあったことを示し，花粉外部の氷晶の侵入を妨げられない変性を示したものと考える。

飽水カラマツ花粉を水でマウントし，−5°C で植氷後 −10°C で急速冷却した結果，細胞外凍結像を観察することができた。すなわち，花粉外部の氷が結晶し，花粉粒を外部から圧迫して，著じるしく変形させる。しかし Flashing 現象は全くみられず，時間の経過と共に花粉粒は変形し，細胞外凍結の進行がみられた。この花粉粒の変形はまた，細胞外凍結による自由水の昇華，脱水の結果と考えられる。

細胞外凍結した花粉を急速解凍した結果，花粉の形は完全に復元し，新鮮な時の状態と差がない。以上のことから，この冷却・加温（解凍）条件下にある限りでは細胞外凍結は致命的ではない。

3. ヒマラヤスギ飽水花粉を前項と同様，急速冷却したが，Flashing 現象の観察は困難であり，細胞外凍結の場合でもカラマツのような変形はみられない。また再凍結処理をしても氷晶の Plasma 侵入は観察されなかった。これは壁構造の差に由来するという考えだけでは説明できない。解凍後，細胞質に気泡が現われ損傷がみられる（写真 13 の 10)。特に遠心極側の空白化が観察された。

4. 花粉の凍結障害には，機械的な細胞質の損傷，壁構造の変性のほか，澱粉合成系酵素活性の消失もしくは低下という生理的障害が与えられる。ヒマラヤスギの例では凍結死した花粉を培養した場合全く澱粉形成をみなくなるか，もしくは極端な減少がみられる。このとき澱粉の充実度も顕著に減少する。この傾向はヒマラヤスギの他，マツ科，スギ科花粉などにみられる。この生理的障害は凍結によって蛋白変性が生じ澱粉⇄糖合成系酵素の変性又は不活性化，失活を招いためと考えられる。

5. 長期間花粉を貯蔵した場合，花粉粒内に気泡の発生をみる場合がある（カラマツ，スギ，タイザンボク，ヒマラヤスギなど)。この気泡は細胞液内に溶存していたガス体が，気化したためのものと考えられる。凍結損傷が細胞質におこり解凍後，表面張力をえて気泡様になる場合とまぎらわしい。また，この気泡は含水率の比較的高い場合に多い傾向がある。しかし，どの花粉の場合も気泡は花粉管の伸張に影響を及ぼさず，花粉管内に進出することも多くある。

以上述べたように花粉の超低温処理によって発生する凍結傷害で花粉に重大な影響を与えるものは，氷晶の生成による機械的損傷，すなわち細胞内凍結であり，この場合は致命的である。この傷害はその樹種に固有の凍結含水量以上の水をもつ花粉に極めて急速に発生し，傷害の程度も終末温度が低い方が大きい。細胞外凍結の場合は全く損傷をあたえず花粉は生存する。カラマツ花粉の細胞内凍結（Flashing 現象）の場合，花粉粒の内部圧力と外部の Medium の氷晶による外圧はつりあっているため楕円球のままの状態でいられるが，解凍後は楕円球となるための内部圧力がなくなり球形となることはすでに各所で述べた。この例は即ち，凍結によって，細胞構造の機械的破壊があったことを示している。このような細胞質の機械的変性は第一次凍結（Flashing）によっておこり，同時に壁・膜構造の変性をもたらす場合（サザンカ，カラマツ花粉）もある。この壁構造の変性は再凍結させた場合，ほとんど数分のうちに Exine を通って細胞質の中まで氷結晶が生長，侵入するのが見られることによって現象的に裏づけられる。

膜構造の変化はまた生理的な障害をもたらすことが知られている。根井[15]らによれば細胞膜の凍結による障害の一つとして，細胞表面に存在する自己分解酵素の Inhibitor が離脱し，細胞内で致命的反応（Ribosome の崩壊）がおこって，不可逆的死にいたるか，または凍結によって基質が分解をうけやすくなるとのべているが，C_4 型の凍結傷害は（特にヒマラヤスギ花粉の場合，具体的に細胞内凍結（Flashing）がみられないものでも C_4 型の発生をみる）この 2 次的障害の結果と考えることもできる。まだ低温科学領域でこれらを裏づける証左がないので今後の研究にまたねばならない。また，今後花粉の凍結死の機序の詳細も，原形質分離法などで解明して行かねばならない。

あ と が き

本論文は京大演習林報告第 42 号（51〜82 頁）で発表した論文の続編である。凍結像，細胞内

凍結，細胞外凍結の実験は，北海道大学低温科学研究所植物凍害部門の酒井昭教授，大塚宏二氏の御教示，施設利用の便宜を与えられた。また京大防災研究所低温室を利用させて頂いた。なおカラマツに関する部分は北海道立林業試験場で行なった実験である。育種科長久保田泰則氏，梶勝次氏の御協力をえ，一部は北海道立林業試験場報告で発表した。以上の方々の御協力を得たことをここに記して深尽な謝意を表わしたい。なお本論文は「京都大学審査学位論文」の一部である。

参　考　文　献

1) 酒井　昭・吉田静夫：超低温における植物組織の生存（VI），生存率に及ぼす冷却及び加温速度の影響，低温科学，生物篇 **25**, 9-19, (1967)

2) ————：同上 (V)，耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係，低温科学，生物篇 **25**, 1-7, (1967)

3) ————：同上 (IV)，急速冷却・加温した細胞の生存の機構，低温科学，生物篇 **24**, 1-13, (1966)

4) Sakai. A.: Survival of plant tissue at super-low temperatures III. Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frost hardiness. Plant physiol. **40**, (5). 882-887, (1965)

5) 酒井　昭：液体ヘリウム中での木の生存。低温科学，生物篇 **20**, 121-124, (1962)

6) ————：木本類の耐凍性の増大の過程 (X)，枝の耐凍性を効果的にたかめる温度，低温科学，生物篇 **20**, 29-52, (1964)

7) ————：同上 (IX)，糖類の凍害に対する保護作用，低温科学，生物篇 **18**, 23-24, (1960)

8) ————：同上 (VIII) 耐凍性と多価アルコールとの関係 **18**, 15-22, (1960)

9) ————：同上 (VI)，糖類の季節的変動 (I) 日林誌 (I), **42**, (3), 97-102, (1960)

10) ————：超低温における植物組織の生存，低温科学，生物篇 **14**, 17-23, (1956)

11) ————：同上 (II)，低温科学，生物篇 **16**, 41-53, (1958)

12) ————：同上 (III)，低温科学，生物篇 **21**, 1-17, (1963)

13) 朝比奈英三：超低温で生存する動物細胞の凍りかたについて。低温科学，生物篇 **16**, 65-75, (1958)

14) 大塚宏二，酒井　昭：急速冷却した植物細胞にできる氷の電子顕微鏡的研究。低温科学，生物篇 **25**, (1967)

15) 根井外喜男編：凍結・乾燥と細胞障害，東大出版会，(1970)

16) 市河三次・四手井綱英：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, (1971)

17) ————・久保田泰則・梶　勝次：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，北海道立林業試験場報告 **8**, 11-26, (1970)

18) Duffield J. W. and Callaham R. Z.: Deep-freezing Pine pollen, Silv. Gent. **8**, 22, (1959)

19) 加藤舜郎・石渡憲治：食品冷凍法，恒星社厚生閣(1965)

Résumé

This paper deals with the pattern of freezing and injury when pollen was deep-frozen. Two kind of injury was observed when pollen was deep-frozen, that is mechanical injury and physiological one.

1. The following phenomena are considered mechanical injury. Psuedoplasmolysis (separation of cytoplasm from cell wall), prolongation of time to freeze, formation of ice-crystal in the cytoplasm when high water content pollen is deep-frozen and crack formation when pollen was directly immersed in liquid nitrogen (−196°C). Sometimes air bubbles were formed in cytoplasm but it was not harmful to germination.

2. Physiological injury appears when pollen was deep-frozen at about limiting temperature for crystalization or treated at about limiting water content for crystalization. Physiologically injured pollen decreased the ability of starch formation on agar medium or lost its ability, and elongation of pollentube was not good.

Two kind of patterns was observed when pollen was deep-frozen.

One is intracellularfreezing, the other is extracellularfreezing.

There are two stages in intracellularfreezing.

1. "Flashing".

Formation of minute ice-crystal in cytoplasm in a moment as the temperature falls. In this stage the shape of pollen is the same as the normal one.

2. "Pseudoplasmolysis" and shrink of cytoplasm.

Flashed pollen is frozen twice, large ice-crystal is formed in the cytoplasm and it shrinks. Therefore the shape of pollen is changed completely.

In the case of *Larix,* flashed normal (ellipsoidal) pollen turned to globose after thawing, and the membrane such as exine and intine separated from cytoplasm owing to pseudoplasmolysis. "Flashing" was also observed in *Camellia sasanqua* Thunb. It is difficult to observe "flashing" in pollen of *Cedrus deodara* Loud.. "Flashing" was observed in dead pollen of rye (*Secale cereale* L.) and it was flashed twice but did not occur pseudoplasmolysis.

Typical extracellularfreezing was observed in pollen of *Larix leptolepis* Gordon. Mounted water formed ice-crystal when ice nucleus was inoculated at $-5°C$ and prothalial cell in larch pollen shrinked as time prolong (photo. 8). Pollen viability was not seriously affected by extracellularfreezing and the shape of pollen was changed when it was rewarmed.

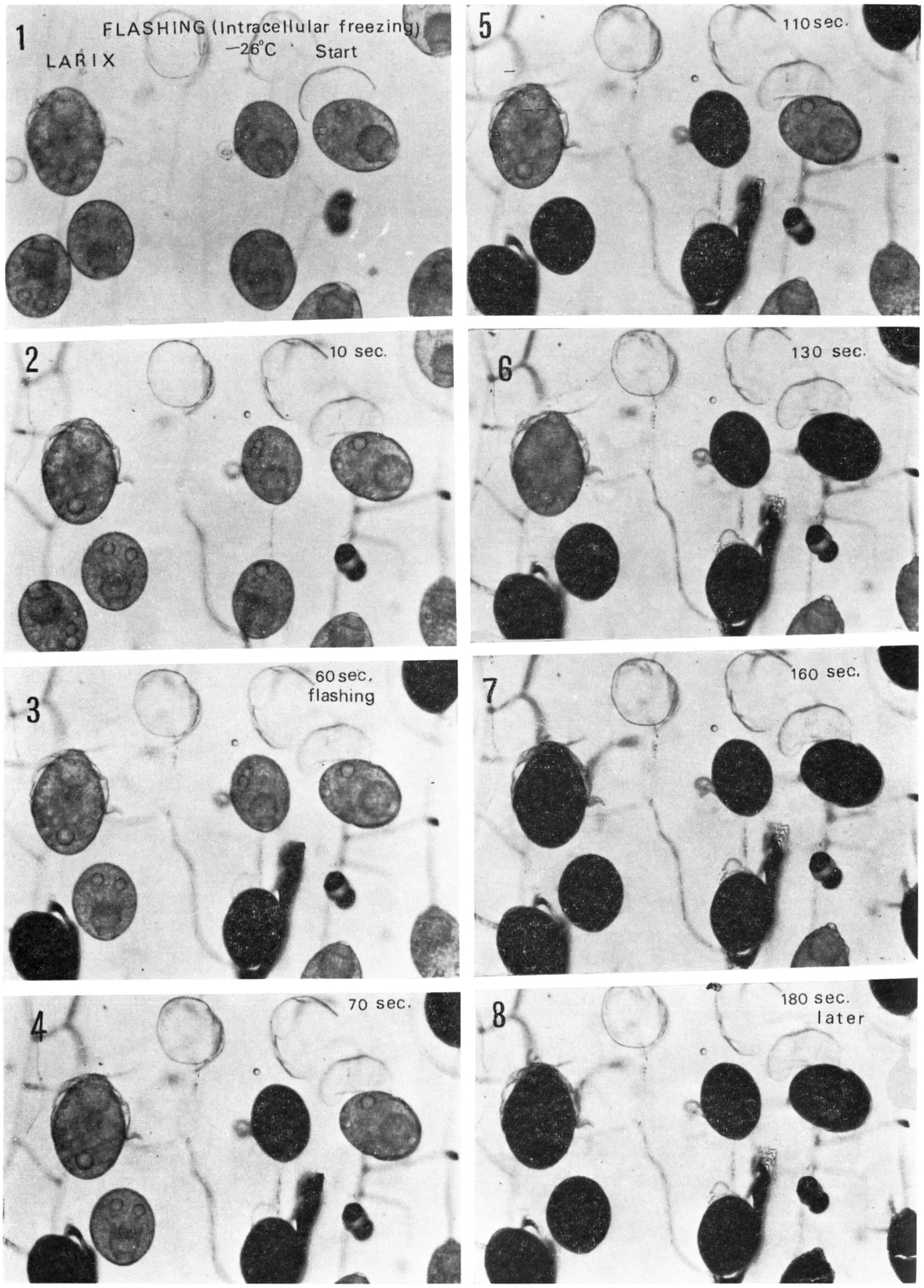


PHOTO 1. View of intracellular freezing (Flashed) pollen. of *Larix reptolepis*.

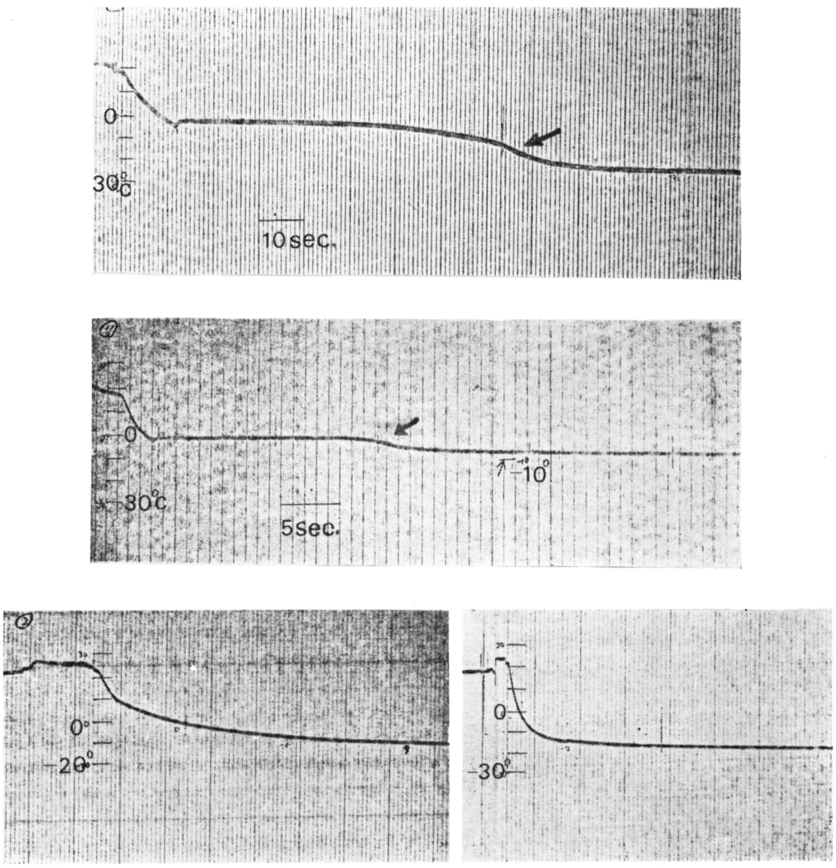


PHOTO. 2. Oscilogram of super rapid cooling. (Water mounted)

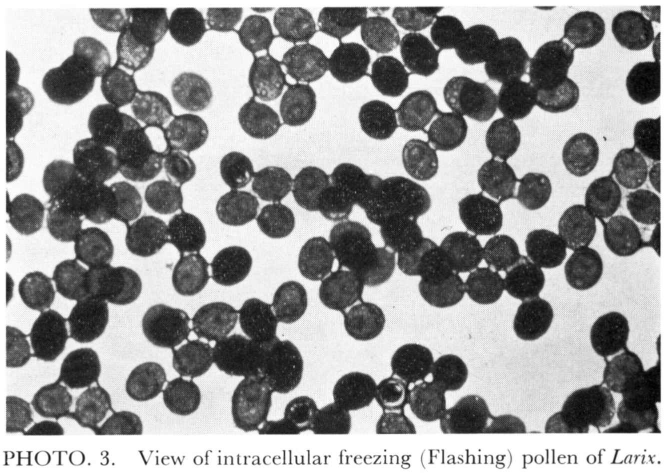


PHOTO. 3. View of intracellular freezing (Flashing) pollen of *Larix*. (70% water contents, silicon oil mounted)

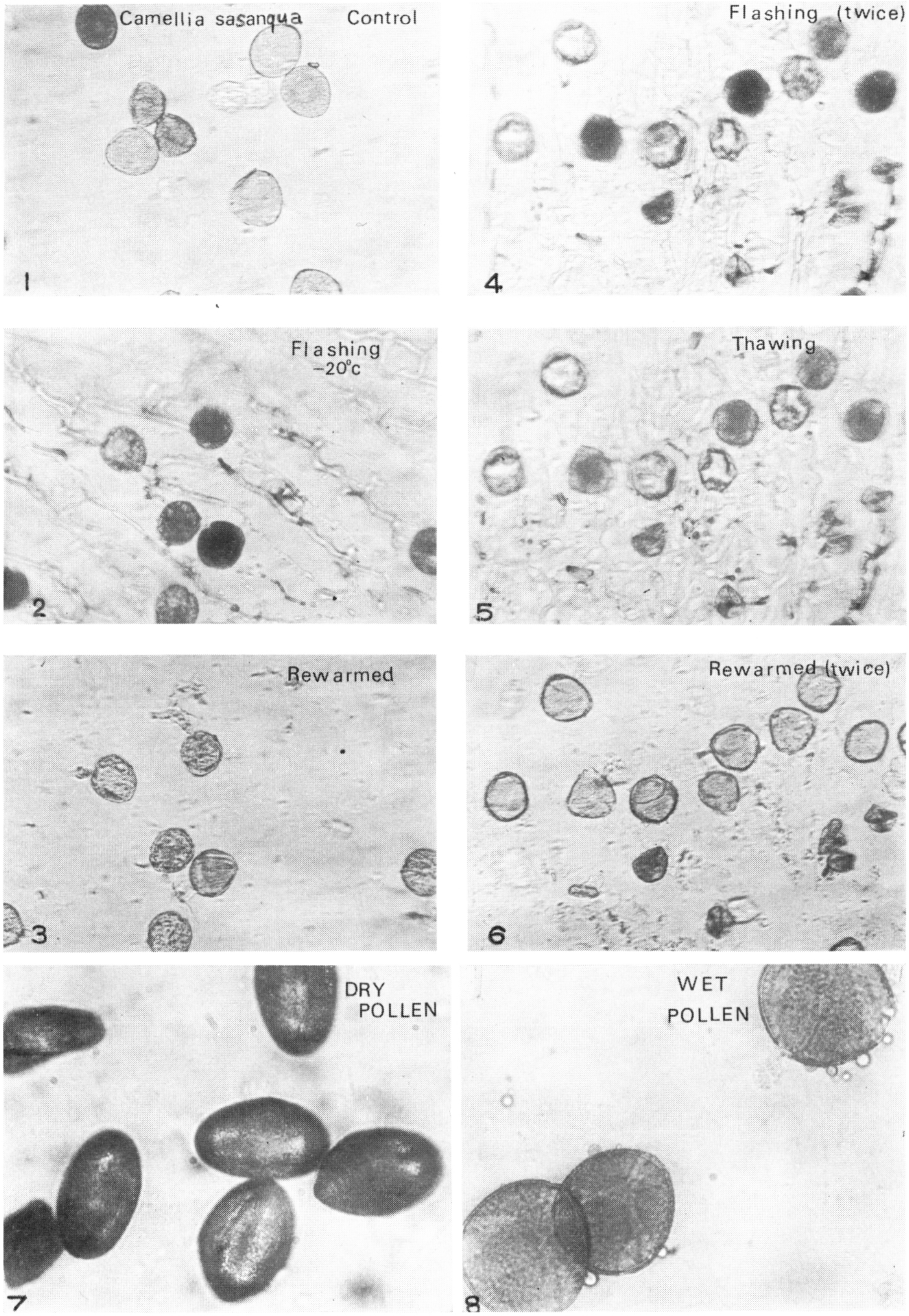


PHOTO. 4. View of intracellular freezing. (*Camellia sasanqua* pollen)

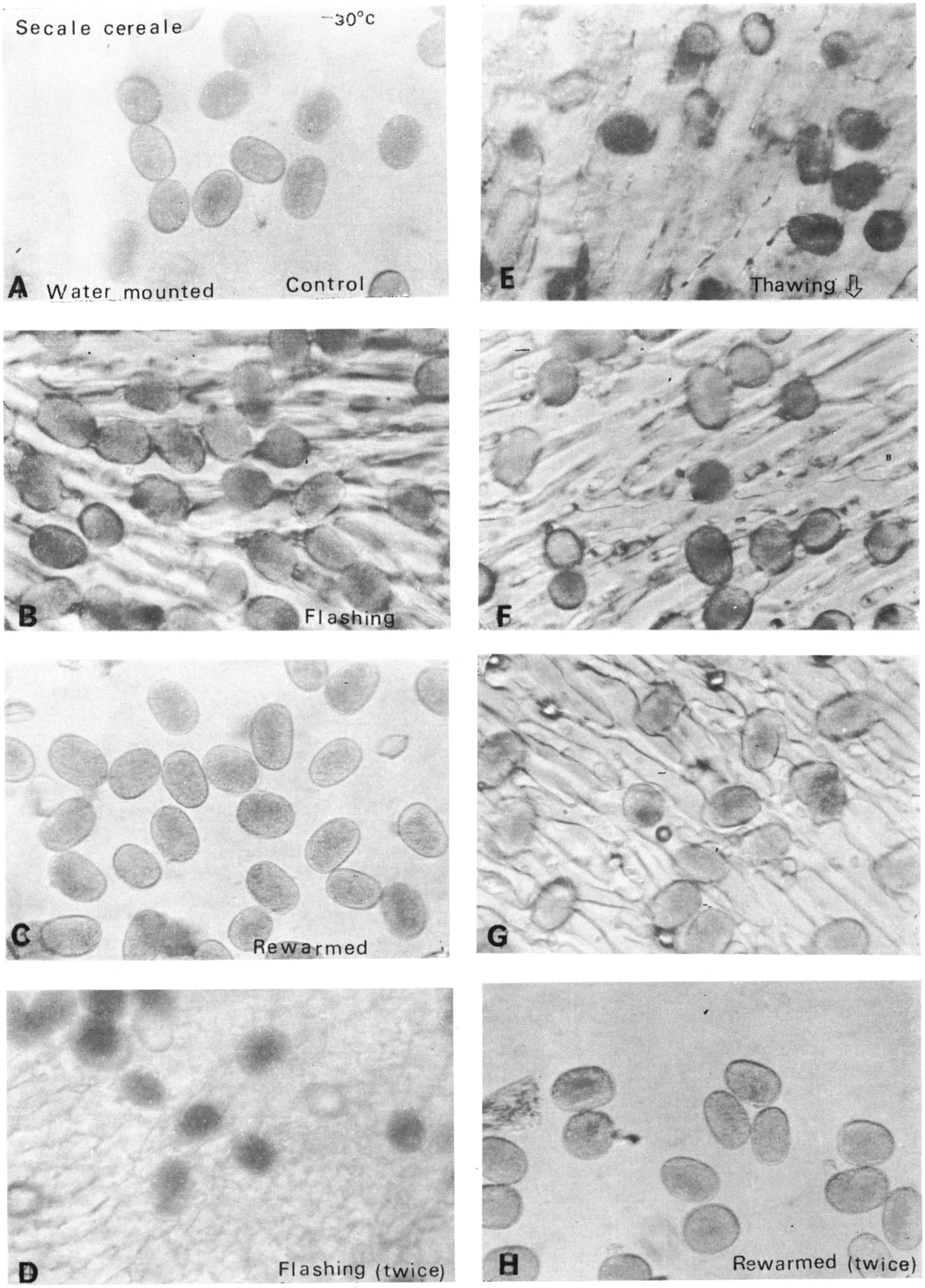


PHOTO. 5. View of intracellular freezing. (*Secale cerəale,* −20°C super direct freezing)

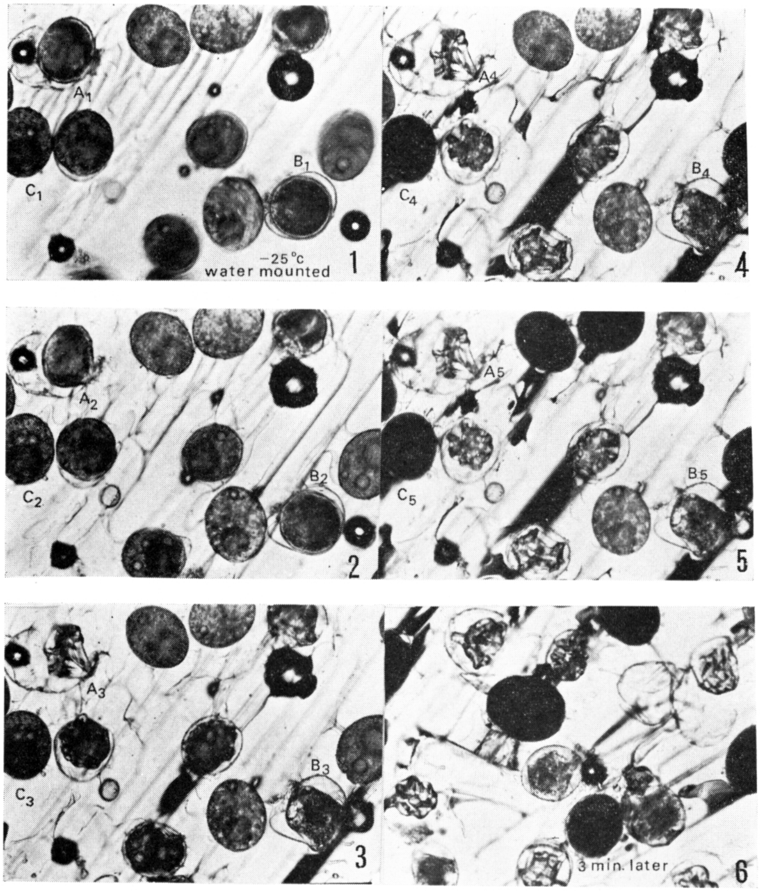


PHOTO. 6. View of intracllular freezing and flashing *Larix* pollen. which was frozen again. (Water mounteded, −25°C super direct cooling)

Note; A_{1-2}: B type Injury A_{3-5} B_{3-5} Intracellular freezing (twice)
B_{1-2}: B type Injury
C_{1-3}: Normal C_{4-5} Flash

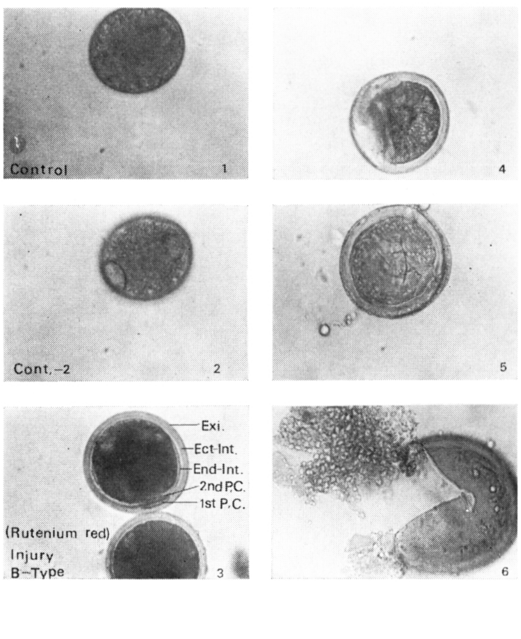


PHOTO. 7. Frost injured *Larix* pollen. (After thawilng; Pseudoplasmolysis)

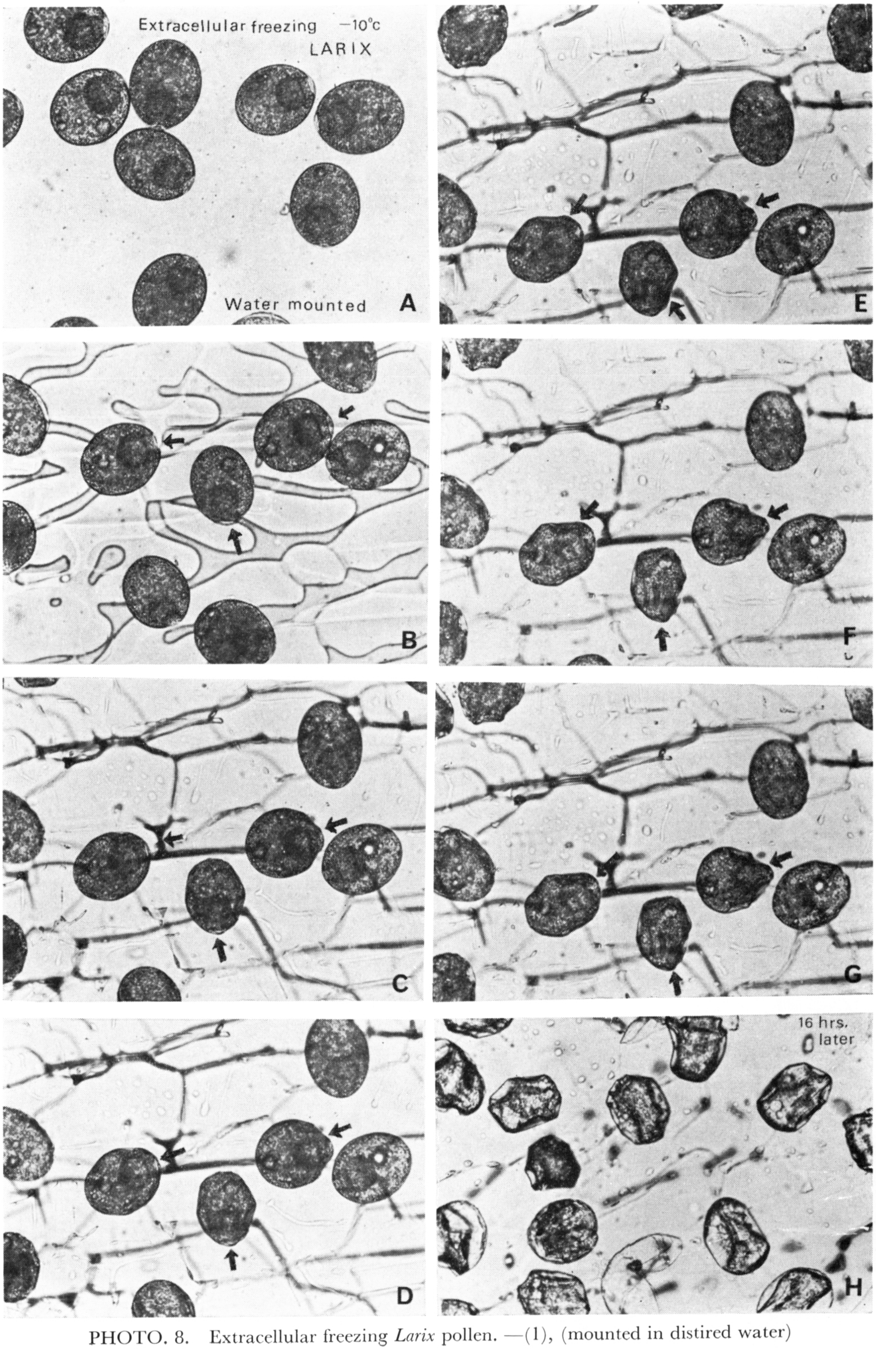


PHOTO. 8. Extracellular freezing *Larix* pollen. —(1), (mounted in distired water)

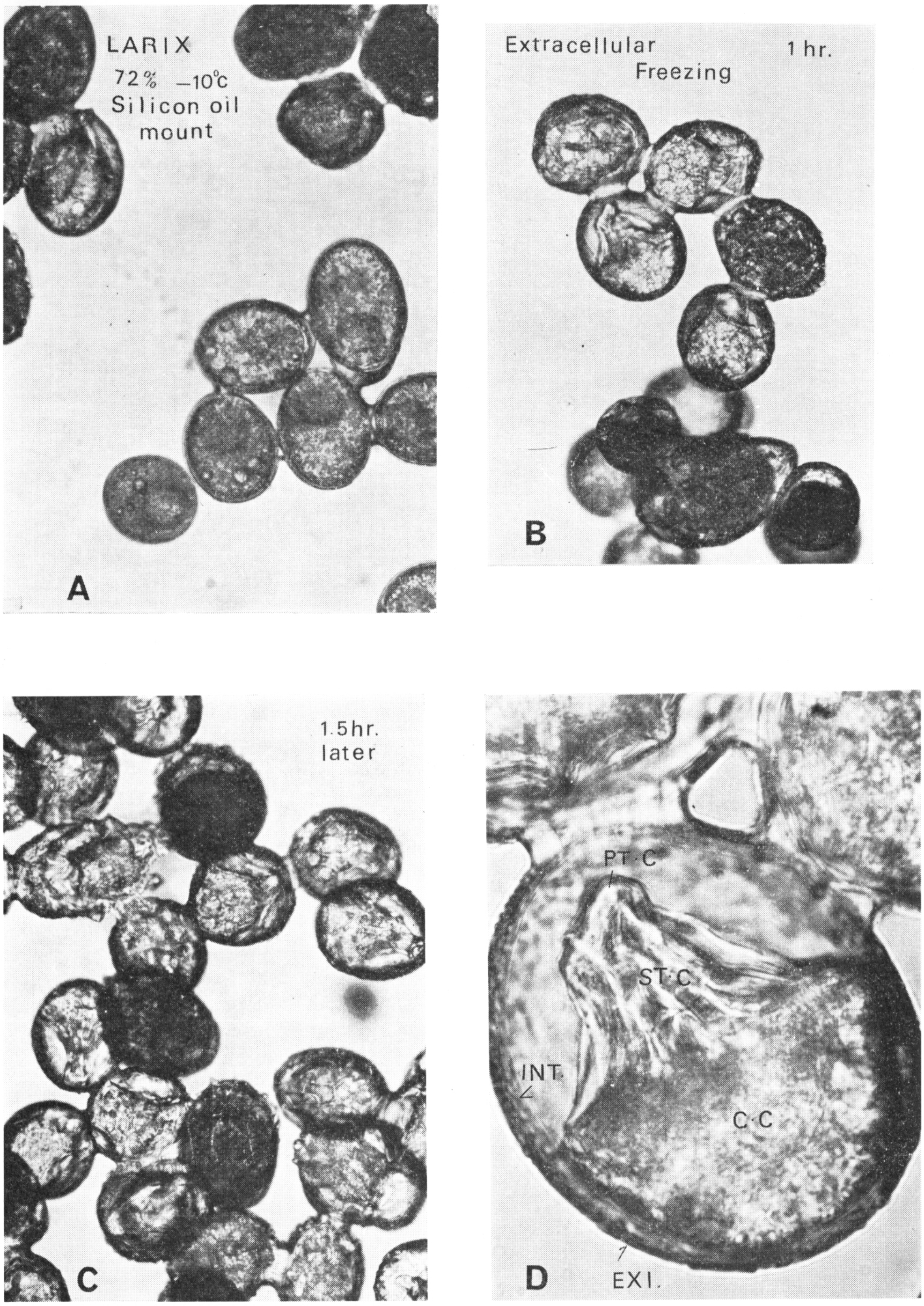


PHOTO. 9. Extracellular freezing *Larix* pollen—(2), (mounted in Silicone oil)

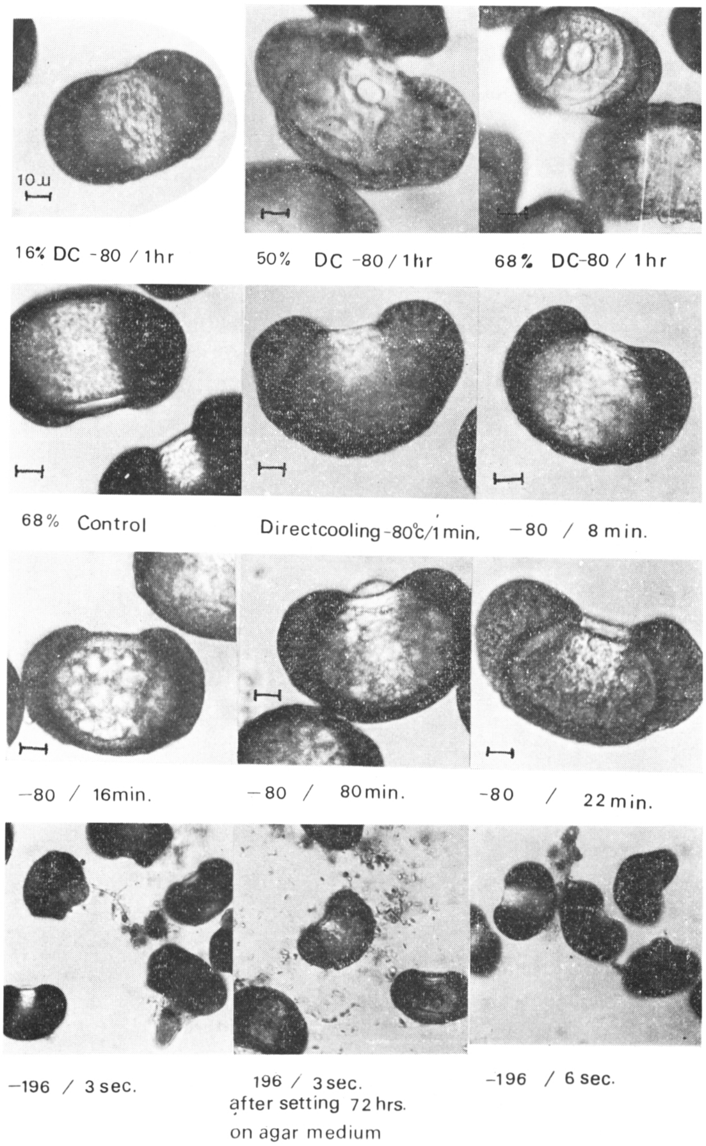


PHOTO. 10. Many kind of frost injured of *Cedrus deodara*.

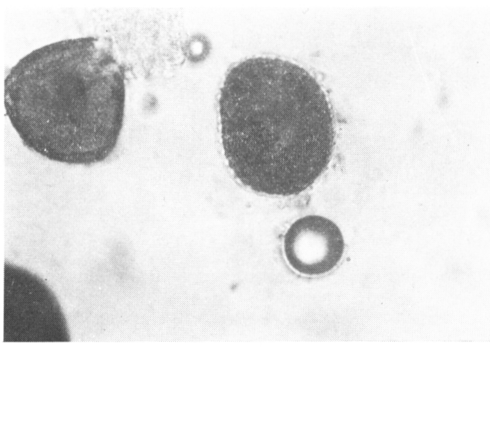


PHOTO. 11. Frost injured pollen. (*Camellia sasanqua*)
Lipid exudation was observed.

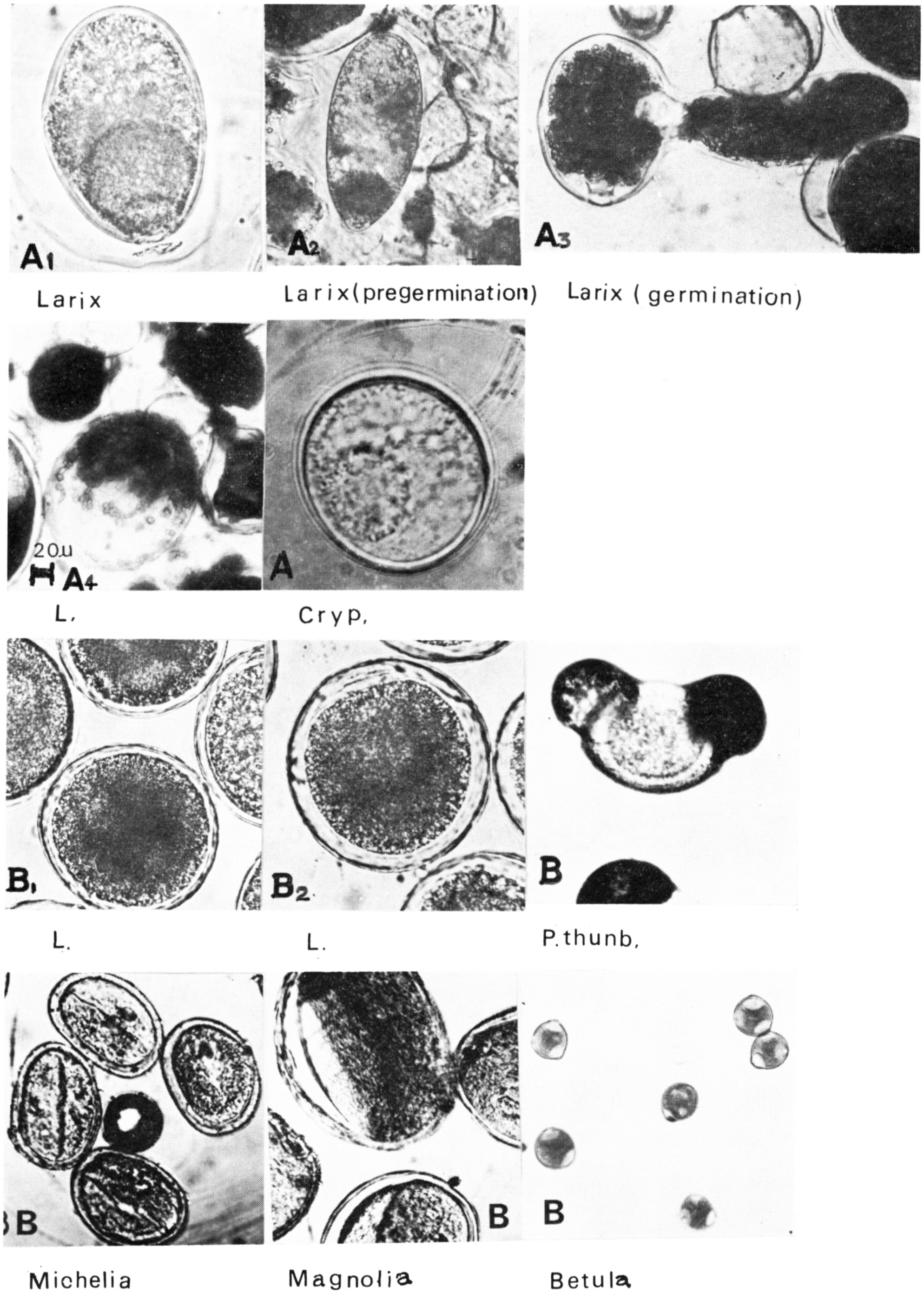
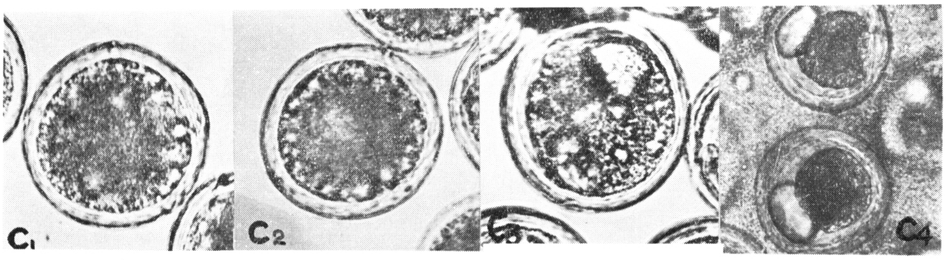
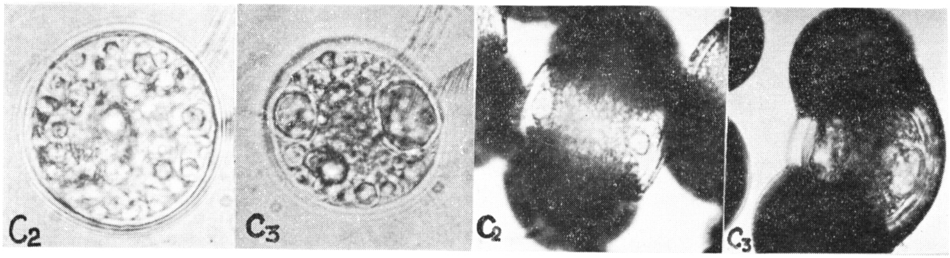


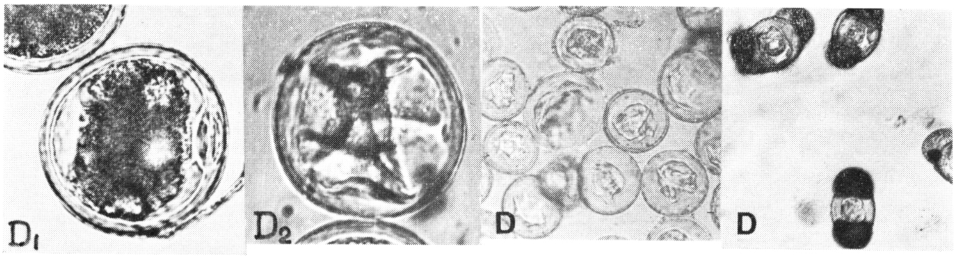
PHOTO. 12. Morphological changes of some kind of pollen immerzed in liquied nitrogen.



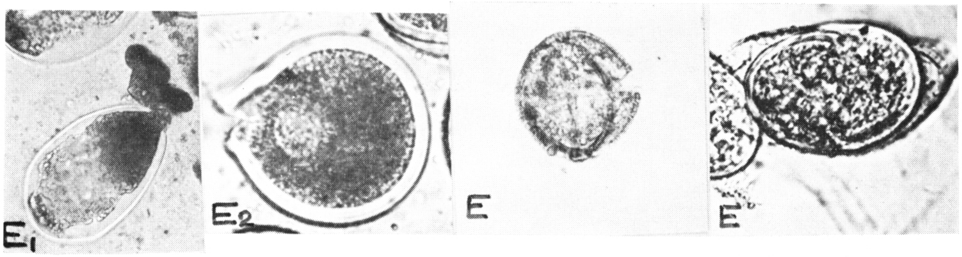
L. L. L. L.



Cryptomeria C. .. P. thunb. P. thunb.



L. L. Cryp. P.thunb,



L. L. Sapium DC —196/30min. Michelia DC-196

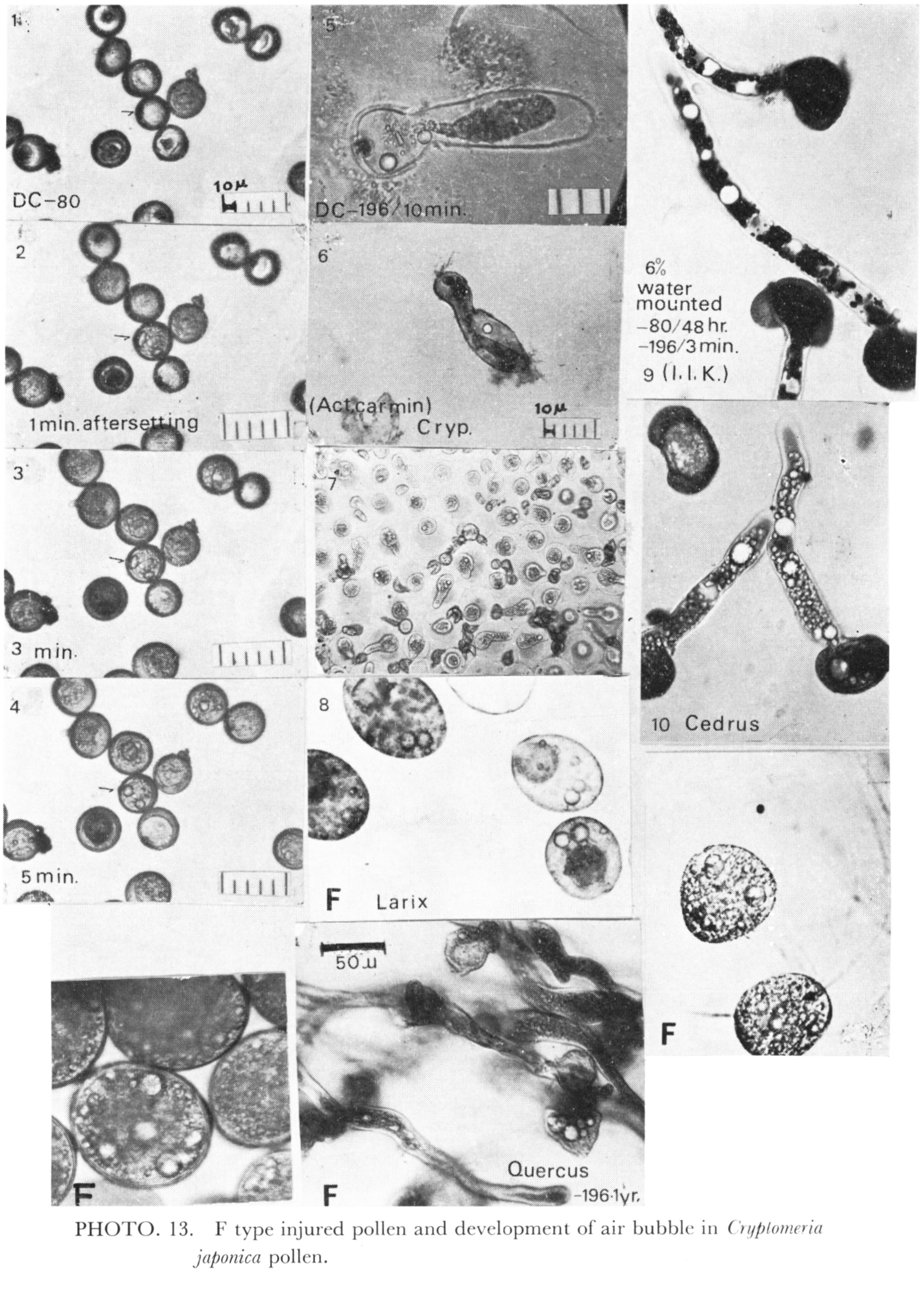


PHOTO. 13. F type injured pollen and development of air bubble in *Cryptomeria japonica* pollen.