

樹木花粉の超低温貯蔵に関する基礎的研究 (Ⅲ)

市 河 三 次・四手井 綱 英

Fundamental Studies on Deep-Freezing storage of Tree Pollen (III)

Sanji ICHIKAWA and Tsunahide SHIDEI

目 次

要 旨	47	低温処理の効果	
第 6 章 花粉の超低温長期貯蔵	48	b) イネ花粉の低温処理効果	
1. 超低温貯蔵の装置・方法及び生存の検定		6. 超低温貯蔵花粉の糖変化	
2. 長期貯蔵花粉の生存期間と生存力		7. 本章の小括と論議	
2・1 マツ型花粉の貯蔵結果		第 7 章 貯蔵花粉の人工交配による種子, 結実稔性	57
2・2 スギ型花粉の貯蔵結果		1. 材料と方法	
2・3 広葉樹及びその他の花粉の貯蔵結果		2. 交配結果及び種子稔性	
3. 超低温長期貯蔵に適当な含水率と凍結限界含水率		2・1 数種のマツ貯蔵花粉の場合	
4. 超低温と他の温度における貯蔵効果の比較		2・2 スギ貯蔵花粉の場合	
5. イネ科花粉の生存に及ぼす低温の効果		2・3 カラマツ貯蔵花粉の交配種子と幼苗について	
a) トウモロコシ花粉の		3. 本章の小括と論議	
		あとがき	64
		引用文献	64
		Résumé	65

要 旨

樹木花粉を -196°C の超低温で長期間貯蔵する場合の基礎的な諸問題はすでに第 I, II 報で発表した。本篇は実際に超低温で長期貯蔵を行なった結果及び貯蔵花粉の人工交配による種子や結実稔性 (seed fertility) について述べることにする。

1) 液体窒素中に最高 8 年間貯蔵した花粉は, 生存率の全く変化のないもの, 及び生存率の減少傾向をもつものなどがみとめられた。

2) 長期貯蔵の可能な花粉含水量は急速冷却による凍結限界含水率よりも低くなければならず, その値はほぼ 10% 程度と考えられる。

3) 比較研究のため常温下で最も短命なイネ, トウモロコシ花粉を用いて実験を行なった結果, 樹木花粉とは全く異なり 0°C で 100 分間 (イネ花粉) しか生存しなかった。花粉の水分量が生存の主たる条件とする考察は全くあてはまらない。

4) 液体窒素に 1~5 年間貯蔵したスギ, マツ, カラマツ花粉を人工交配した結果, 種子には超低温貯蔵によると考えられる影響はみられなかつた。たまたカラマツ種子を圃場に播種した結

果、発芽経過、幼苗の生育も無処理区と大差はなく、形質にも変化はみられなかった。

第6章 花粉の超低温長期貯蔵

超低温で牛精子を凍結し長期間保存する方法はすでに実用化され広く普及している。貯蔵精子による人工交配乳牛は孫の代（第3世）までいて、形質に異常はなく精子貯蔵は商業規模で拡大されている。¹⁾ また血液の冷凍保存法も確立され、赤血球・リンパ球・血小板などの凍結貯蔵の²⁾ ほか、骨、角膜などの組織でもすでに臨床的に応用されているものもある。³⁾

花粉の超低温長期貯蔵はまだ実験の段階に止まっているが林木育種、特に交雑育種の普及に伴ってその需要が拡大し、⁴⁾ 実用規模で貯蔵されるものと考えられる。また一方鳥取県では20世紀ナシの増収に花粉を必要とするため花粉貯蔵を大規模で行なっている⁵⁾ ようである。筆者は林業用主要樹種のほか広く採取可能な樹種から花粉を集め -196°C 下における長期貯蔵実験を試みて来た。

1. 超低温貯蔵の装置・方法及び生存の検定

長期貯蔵に用いた各樹種の花粉はあらかじめ適当と思われる含水率（各表参照）に調節し、2 cc ガラスアンプル数本に溶封したのち、直接冷却法によって第2章に述べた器具に装着して液体窒素中に貯蔵した。いずれの花粉も採取後1～2日間で前処理を終り超低温貯蔵を開始した。所定の期間貯蔵した花粉は、直接加温法によって $+30^{\circ}\text{C}$ 程度の微温湯で加温し常法の培養基で発芽テストを試みた。なお貯蔵試料が僅少なものは1アンプルをとり出し2シャーレーにわけて発芽テストを行なった。生存の検定法はすでに第2章で述べた通りである。またスギ・マツ属数種類及びカラマツでは超低温貯蔵花粉を用い実用的な人工交配を行ない、結実種子稔性および育苗の実際を検討した。貯蔵の実験は現在も継続中であり可能な限り長期間貯蔵する目的から試料

第1表 液体窒素保管器の一般性能（文献7より引用）

Table 1. Specification of the liquid nitrogen jar.

	OD-10S	LR-10A-6
High	56.8 cm	53.8 cm
Diameter	28.0 cm	26.0 cm
Inside diameter at the neck	5.5 cm	5.1 cm
No. of Ampoules	252 Amp.	180 Amp.
Weight (Empty)	6.7 kg	5.7 kg
Weight (Full)	17.7 kg	14.6 kg
Liquid Nitrogen	12.0 1**	10.0 1**
	11.0 1*	9.3 1*
consumption of N_2 /day	0.33 1**	0.26 1**
	0.45 1*	0.36 1*
operative days per fill.	36 days**	38 days**
	25 days*	26 days*

** ; Stationary * ; In practical use, 10uses per day.

* 貯蔵温度は $+4\sim-2^{\circ}\text{C}$ 程度であり、貯蔵期間は数日乃至数週間程度である。

の少ない花粉については、さらに貯蔵期間を延長している。したがって生存率の測定の時期は花粉の種類によって統一を欠かさざるを得なかった。

液体窒素保管器は Linde 25 l 用の場合、室温条件下において2週間に 5 l 程度ずつ補給することにより -196°C を維持しうる。この結果、平均1ヵ月当り 10 l、年間約 120 l の補給で充分貯蔵目的を達しうる。したがって液体窒素 1 l 当り80円^{*}とすると年間経費は約1万円となり他の冷凍機（室）に較べて極めて低廉である。実用的な保存容器の一般性能を第1表に引用して参考供する。

2. 長期貯蔵花粉の生存期間と生存力

液体窒素に長期貯蔵した花粉の生存期間と生存力（人工発芽床における発芽率）は次のようであった。貯蔵花粉の種類は針葉樹、広葉樹などあわせて47種であるが花粉の絶対量が僅少なため、第2表に示した30種の貯蔵経過を示すことにする。

2・1 マツ型花粉の貯蔵結果

表2～5に示したマツ型花粉は1962～1965年に貯蔵を開始したものである。表2のユサン *Keteleeria davidiana* を除き低い含水率の花粉は長期間の貯蔵でなお高い発芽率を示した。ヒマラヤスギ 28%, クロマツ 27, 45% 花粉は貯蔵開始時の冷却中にすでに細胞内凍結をおこし凍結死したものであり、これらの花粉は加温後 C_4 型の傷害像を呈しているばかりでなく、発芽床上でも全く澱粉形成はみられなかった。ユサンの場合は低含水率であるにもかかわらず、花粉粒内に非常に大きい気泡をもち全く発芽はみられないが発芽床上で澱粉粒をごくわずかに形成した（写真1参照）。さらに注目すべきことは21% 花粉（ヒマラヤスギ、クロマツ）で長期貯蔵19～27ヵ月に耐えない場合がある。この含水率は凍結限界温度をはるかに下廻っていて、いわば安全な含水率であるにもかかわらず凍結死を起したものである。これはさらにヒマラヤスギ 12.7% 花粉が8年間の貯蔵には耐えられなかったことと一致する。この結果は花粉のもつ凍結耐性ではなく、むしろ加温速度に不適当な操作があったものと考えられる。即ち液体窒素中でもごく微少な氷結晶ができ、通常この氷晶は急速加温によって有害な氷晶に生長することを回避しているが、加温過程でアンブルのような空間部分の多い場合は所定の加温速度が得られず微氷晶が生長して被害をうけるものと考えられる。以上の考察からマツ花粉の超低温貯蔵では液体窒素への貯蔵開始時と加温時における凍結致死を回避すれば貯蔵期間の長短は花粉の生存に直接関係しないものと考えてよい。本実験における最適含水率は10～18% であり、限界含水率よりかなり低位である。つまり長期貯蔵における最適含水率は冷却処理による凍結限界含水率より10% 程度低くなければならないという結果を得た。

2・2 スギ型花粉の貯蔵の結果

表2に示したように、スギ・コノテガシワ・ネズミサシ・ランダイスギ・カヤなどの花粉で行なった長期貯蔵実験では、スギ（10～11% 含水率）花粉の貯蔵成績がかなりよい。5年間の貯蔵で発芽率は50% 程度である。しかし含水量の高い花粉は生存できず、前節と同様、貯蔵開始時すでに発生した細胞内凍結によるものであることは加温後、発芽床上ですべて D_2 型（細胞質の不規則な萎縮）傷害にいた形を示すことから明らかである。またコノテガシワ、ランダイスギでは含水率10～16% の花粉で貯蔵効果がみられた。これはすべて直接冷却・直接加温の方法による。

4カ年貯蔵した結果をみると、ほぼ50% 程度の発芽率を維持していたといえるが、発芽しない花粉の形状もほぼ正常な形のものが多い。10～16% の含水率では花粉に有害な氷晶を作る自由水はまずないものと考えられるから、この不発芽という現象は低温貯蔵中におこった生理的な

第2表 超低温貯蔵花粉の生存力

Table 2. Survival (Germination rate) of deep-freezing storing pollen.

Pollen	Water cont. %	7-9 mon.	12-18 mon.	19-23 mon.	24-27 mon.	3yr.	4yr.	5yr.	6yr.	7yr.	8yr.	Cont.
<i>Cedrus deodara</i>	20.0 12.7 12.7 14.0			48.8 55.9 83.5	± + +				87.4		0 0 0	20.4 28.6 28.6 —
<i>Pinus rigida</i>	15.0		92.5									49.4
<i>P. taeda</i>			80.7									63.1
<i>P. Luchu.</i>	11.0		96.9									82.8
<i>P. banks.</i>	13.0		77.5									92.1
<i>P. pinast.</i>	13.0		99.5									100
<i>P. dens.</i>	17.0		95.0									95.0
<i>P. masson.</i>	?		87.7									28.4
<i>P. thunb.</i>	20.4 (S) 20.4 (R) 20.4 (D) 18.0 10.0			23.5 32.6	76.6 86.4 11.9	28.1 19.4 0				± ± 0 76.3 79.1		
<i>Keteleeria david.</i>	13.0							0				60.6
<i>Cryptomeria japon.</i>	26.5 18.0 10.0 11.0		0 50.9 76.9				0 0 52.7			0 0 15.0		75.9
<i>Thuja orient.</i>	38.6 15.6 10.8		0 80.2 92.0	0 43.4 72.6			0 48.2 63.4					
<i>Juniperus</i>	41.6		36.8							0		
<i>Cunninghamia l.</i>	14.0		78.7					30.0				78.0
<i>Torreya n.</i>	19.0	90.0							98.2			
<i>Magnolia grandif.</i>	26.0 17.0 8.0		85.0 62.6 46.3	25.0 36.7 79.4						32.4 67.8 26.3		
<i>Michelia f.</i>	16.0 12.7	84.4	94.4						85.0			
<i>Liriodendron t.</i>	22.0 24.0	19.0	34.0	37.8		51.7			0 40.2			
<i>Idesia polycarpa</i>	23.0 18.0 17.0 12.0		95.0 65.9 95.0 85.1	76.5 82.6 76.0			67.8 41.0 24.2			97.8 98.0 98.0 37.7		
<i>Gleditsia j.</i>	dry	22.7	65.0			98.7			56.2			
<i>Philadelphus s.</i>	dry	90.0				98.0			98.5			
<i>Stewartia m.</i>	19.0	53.4				99.0			59.1			
<i>Quercus dent.</i>	34.3 12.0 9.7		0 51.9 91.6	0 48.3 74.4			0 69.4 21.4					
<i>Cudrania t.</i>	25.0	18.6							10.0			
<i>Punica g.</i>	18.9 16.0	68.0 69.7							49.3 39.1			
<i>Betula p.</i>	15.0	38.5							±			
<i>Sapium s.</i>	16.0	11.2							0			
<i>Quercus g.</i>	28.5	3.4										
<i>Salix g.</i>	19.0		26.5			78.0			±			
<i>Platycarya s.</i>	16.0	19.9										
<i>Aesculus t.</i>	?	39.6										
<i>Phoenix sp.</i>		82.0										
<i>Datura sp.</i>	?	82.0										

(S): Slow cooling (R): Rapid cooling (D): Direct cooling

障害と考えられる。なおスギ 18, 26.5, 39.3% 各含水率をもつ花粉, コノデカシワ 38.6%, ネズミサシ 45.8% の各花粉は C_4 , D_2 型の傷害をうけている。また長期貯蔵の結果, 発芽する花粉の多くは F_1 型即ち, 小気泡を内部に数個もっているが, いずれも花粉管の伸長に特に影響はない。なおカヤは別項のカラムツと同様花粉管を形成しにくいので前発芽 (Pregermination)¹⁰⁾¹¹⁾をもって生存と認定した。

2・3 広葉樹及びその他の花粉の貯蔵結果

10 数種の広葉樹及びフェニックスヤシ, キダチチョウセンアサガオ等の花粉の長期超低温貯蔵の結果も第 2 表に示した。これらを概観すると, a) 貯蔵開始時の発芽率をずっと維持したものの, b) 貯蔵期間によって発芽率が減少の傾向をたどるものに大別することができるのである。この様な生存率に差を生じた理由として, 含水量, 凍結限界温度などが考えられるが, これらの点で共通性や明確な規則性はみられない。

a) 貯蔵開始期の発芽率を維持した花粉

タイザンボク *Magnolia grandiflora*, トウオガタマ *Michelia fuscata*, ハンテンボク *Liriodendron tulipifera* の 3 種はいずれも含水量が凍結限界含水率以下の場合, 6~7 年間超低温貯蔵しても高い発芽率を維持し貯蔵の効果は顕著である。しかし凍結限界含水率以上の花粉では貯蔵当初から凍結死して生存率は全く 0 であった。

イイギリ *Idesia polycarpa*, サイカチ *Gleditsia japonica*, ヒメシヤラ *Stewartia monadelphica*, バイカウツギ *Philadelphus Satsumi* などの花粉の貯蔵効果も顕著であり, 生存率 (この場合は発芽率) は貯蔵期間に関係なく 90% 以上の発芽率をもちつづけていた。以上の花粉は発芽床上でも新鮮花粉と変らない発芽の経過及び形態を示している。また同一処理の不発芽花粉はとくに凍結傷害を示す形態的变化は認められない。なお第 2 表中貯蔵期間によって発芽率に差があるが, 発芽率は寒天発芽床の微妙な条件に支配されることが多く, このような原因によるものと考えられる。

b) 貯蔵期間によって発芽率に減少傾向をもつ種類

カシワ *Quercus dentata*, アラカシ *Quercus glauca*, ハリゲワ *Cudrania tricuspidata*, ザクロ *Punica granatum*, シラカバ *Betula platyphylla* var. *japonica*, ナンキンハゼ *Sapium sebiferum*, ネコヤナギ *Salix gracilistyla* などの花粉は表 2 にも示したように液体窒素下に長期間貯蔵したことによって発芽率が減少する case である。いずれも凍結限界含水率より低い含水量であるが, 4~6 年間で貯蔵開始期の発芽率のほぼ 1/2 に減少する傾向を示した。また発芽床上における花粉のうごきで, 発芽の経過, 花粉管の伸長に特に異常はない。カシワの花粉は F 型すなわち気泡の発生をみるが花粉管の伸長とともに管内を移動することもみられる。多くは F 型の凍結傷害がシラカバ等の傷害としてあげられるが, いずれの処理でも未発芽花粉は特定の傷害型を示していない。このような点から前項と同様, 生理的な障害による不発芽と考えられる。なお高含水率花粉の凍結傷害パターンは D 型 E 型を示すことが多い。⁹⁾¹²⁾

c) その他

トチノキ *Aesculus turbinata*, ノグルミ *Platycarya storobilacea*, キダチチョウセンアサガオ *Datura* sp., フェニックスヤシ *Phoenix* sp., の 4 種類は 7~9 カ月間貯蔵後もかなり高い発芽率を維持しえた花粉であるが, ヒメヤシヤブシ, ヤシヤブシ *Alnus*, はいずれも短命であった。これらは更に長期間貯蔵する意図から, 現在貯蔵を継続しているが試料が少ないためあらためて発芽テストをし結論を出したい。

3. 超低温長期貯蔵に適当な含水率と凍結限界含水率

超低温貯蔵の結果、凍結限界含水率以下であれば貯蔵が可能であることがわかる。しかし6～

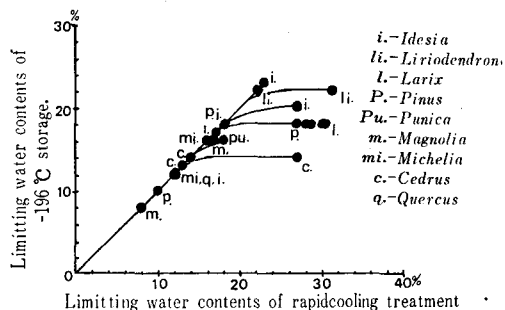


図1 各種花粉の急速冷却における限界含水率と -196°C 長期貯蔵における生存可能含水率

Fig. 1. Relation between limiting water content for rapid cooling and limiting water content for deep freezing storage.

の様に考えられる。すなわち凍結限界含水率とは急速冷却・直接加温の処理下において、その含水率以下では -80°C でも生存しうることを意味する値である。ところがこの含水率の花粉をさらに超低温(-196°C)に長くおくと冷却過程でできた微氷晶(花粉の生存に直接害がない程度の)が超低温下で生長するか、もしくは加温の途中で急激に有害な氷晶にまで生長するためと考えられる。したがって充分脱水された花粉、いかえれば細胞に有害となる氷晶をつくる水を取り除いた花粉が液体窒素の中で長期間の貯蔵に耐えうるということになる。以上凍結限界含水率より10～20%低い値が一般に液体窒素における長期貯蔵に適当な含水率といえることができる。

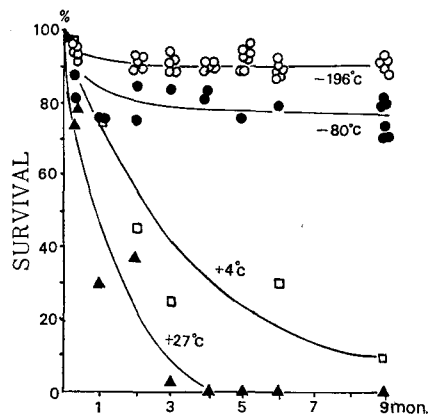


図2 クロマツ花粉の貯蔵温度と含水率のちがひによる貯蔵効果

Fig. 2. Effect of various water contents and temperatures on deep freezing of pine pollen.

7年間貯蔵した結果、発芽率の減少する花粉もあり、急速冷却で -196°C に耐えた花粉が必ずしも長期間の貯蔵に耐えうるものではない。花粉の凍結限界含水率と長期貯蔵効果のあった花粉の含水率との関係を示すと図1のようである。

すなわちイイギリ *Idesia* 花粉以外貯蔵に適当な含水率は急速冷却による凍結限界含水率よりも低い。その差はユリノキ *Liriodendron* で9%, マツ科(数種)で平均約10%, カラマツ12%, ヒマヤナスギで13%であった。つまり急速冷却でえられた凍結限界含水率よりそれだけ低い含水率が超低温下における長期貯蔵に適当な含水率である。この理由は次

4. 超低温と他の温度における貯蔵効果の比較

クロマツおよびカラマツの花粉を用い $+27^{\circ}\text{C}$ 、 $+4^{\circ}\text{C}$ 及び $-2\sim-20^{\circ}\text{C}$ 冷凍室、 -80°C 、 -196°C などの各温度に1年間貯蔵し生存率の比較試験をしたところ、図2に示す結果をえた。クロマツ20.4%花粉を -80°C 、 -196°C に貯蔵した結果は9カ月でも生存率はほとんど変らない。また4, 11%の低含水率花粉を $+4^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫内に貯蔵すると生存率は平均して80%程度を維持できたが、室温(5～2月)においた花粉は2カ月で生存率が半減し、ほぼ9カ月後にすべて発芽なくなる。また $+4^{\circ}\text{C}$ でも高含水率(25%)花粉では3カ月で生存しなくなっている。この結果は第I報⁶⁾でのべた+温度域での生存の推移と対応させて考察することができる。図3はカラマツ16%花粉をアンプルに封入し、 $+27^{\circ}\text{C}$ から

* 王子製紙K. K. 育種研究所冷凍室、北海道栗山町。

** フレオン22による2段冷凍エタノールバス、京大・畜産第二研。

-196°Cまで6段階の温度に1年間貯蔵した結果である。+27°C 恒温器においた花粉は15日で生存率が50%に減少し、30日で生存花粉はなくなる。この結果も第1章の図1, 2, 図7で示した数種のマツ、ヒマラヤスギ花粉の+温度における生存力と対応できる。+4°Cでは1年間で生存率は当初の50%に減少するが-2°C、-10°C、-20°Cでは生存率にかなりのバラツキがみられるもののほぼ80%を維持した。液体窒素に貯蔵した場合は、ほぼ恒常的に80%を維持している。なおカラマツの生存率は前発芽(Pregermination)の状態を示すものを生存花粉とみなして算定した。カラマツの場合は-2°C以下であれば生存率はほぼ80%を維持したが、データーにバラツキが多い。これは低温維持のための冷凍機構による温度上下が関与したものと推測される。

5. イネ科花粉の生存に及ぼす低温の効果

イネの花粉は最も寿命が短いものの一つで

あって通常その生存は、開葯後約7分間とされている。イネにくらべるとタケ、トウモロコシは比較的長命といえるが通常は1乃至数時間ともいわれる。イネ科花粉は一般に急激な脱水が致命的であり、乾燥や脱水を重要な前処理とする低温貯蔵は不可能と考えられる。著者は低温がこのような短命花粉にどのような効果をあたえるかについて実験を試みた。イネ科花粉の開葯時における含水量は約60~70%であり、樹木花粉の飽水状態の水分量とほぼ等しい。トウモロコシ花粉は室内で水挿しし開葯させて採取し直ちにアンプルに封入したものと、アンプル内を窒素ガスに置換して封入したものにわけ急速冷却処理及び+4°C, 0°C, -5°C, -13°Cチェンバーに所定の時間おく処理をほどこした。生存花粉の調査は寒天発芽床(15% Sucrose, 1% Agar, pH 6. 発芽開始時間置床後約10分)で発芽率を測定した。一方、イネ花粉の場合は開葯直後の花粉を直接カタクリ発芽床(カタクリ, 5% Sucrose 15%)に採粉し、+5°C, 0°C, -1°C, -2°C, -5°C, -10°C, -30°C, -75°Cに調節したチェンバーに直ちに入れ、所定の時間低温処理した後室温(+30°C)で発芽させたものである。以上の結果を図4, 5, にまとめた。

a) トウモロコシ花粉の低温処理の効果

トウモロコシ花粉は0°Cにおいたとき96時間で34%の発芽率を示し120時間処理では発芽しない。しかし+4°Cでの生存はさらに低く、96時間ではわずかに4%しか発芽しなかった。また窒素ガス置換の場合は96時間でわずかに数粒の発芽が処理区にみられたにとどまった。この結果からトウモロコシ花粉を0°Cにおいて100時間までごくわずかであるが生存させようという結果をえた。予備的に常温におけるトウモロコシ花粉の生存力を調べた結果、50~60分間放置した花粉は発芽床上ですべて吐出してしまい、最高1時間程度で発芽力を失うが0°Cでは96時間でも発芽力を維持しているので花粉生存に対する低温の効果は著明といえる。

また緩速冷却(1°C/1 min.)及び急速冷却(8°C/1 min.) -1°C低温処理をほどこしたところ次のような結果をえた。

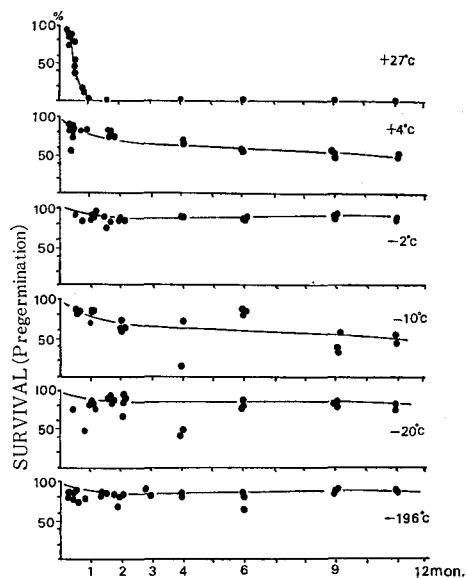


図3 カラマツ花粉の温度別貯蔵効果(文献21より引用)

Fig. 3. Survival of larch pollen stored at various temperatures. (Cited from 21)

緩・急速冷却とも -5°C で発芽率は全くなくなる。この場合、加温後アンプル内部で花粉は湿った団粒状を必ず呈するが（この現象は加温後5～10秒で現われる）顕微鏡下では新鮮花粉と全く変らない形状をしている。この現象は -5°C 以下のすべての処理花粉で観察されイネ科花粉¹⁶⁾¹⁴⁾に見られる汗かき現象、即ち吸湿後起こる花粉からの液滲出現象と関係があると思われる。また -1°C に直接冷却した花粉は3時間半放置してもなお高い発芽率を維持しえた。また $+4^{\circ}\text{C}$ に12～24時間おいた花粉を直接冷却し -17°C 、 -30°C 及び -70°C に1時間放置したところすべて発芽力を失っていた。さらに 0°C 、 -5°C 、 -13°C に1時間おいたのち発芽試験を試みたが 0°C を除き全く発芽をみなかった。この結果から新鮮なトウモロコシ花粉の Freezing point は、ほぼ -5°C 程度と考察されそれ以上であれば低温度ほど花粉の生存に有効であるといえる。（表3、4参照）なおトウモロコシ花粉で凍結障害像はえられない。一般にこの種の花粉は原形質分離をおこしにくい¹²⁾ためと考えられる。このことは前述のライムギ凍結像（第Ⅱ報第5章）についても同様である。なお凍結死花粉は加温後発芽床上で必ず原形質吐出することが観察された。

第3表 トウモロコシ花粉の冷却処理と低温処理
Table 3. Germination of cone pollen following cold treatment.

	Temp.	Germ.%	Number of pollen		Temp.	Germ.%	Number of pollen
	Control	49.5 %	184		Control	49.5	184
Slow cooling	0°C	6.4	344	Rapid cooling	0°C	6.4	344
	-3°C	1.4	270		-5°C	0	
	-5°C	+	245		-10°C	0	
	-7°C	0			-20°C	0	
	-10°C	0			-70°C	0	
	-20°C	0					
	-70°C	0					

第4表 -1°C 直接冷却トウモロコシ花粉の発芽率
Table 4. Germination of cone pollen following direct cooling at -1°C .

Time	Germination rate	Number of pollen
10 min.	21.4%	215
25 min.	34.8	302
40 min.	36.3	124
80 min.	41.0	217
120 min.	30.9	236
210 min.	41.8	153

b) イネ花粉の低温処理効果

イネ花粉を 0°C においたとき図4に示すようにごくわずかの花粉は最高100分間生存した。20分間では9%の発芽率を示し、以後は2～3%の発芽率を100分間まで維持した。また -1°C 以下のすべての温度はイネ花粉に致命的であった。比較のため硫酸紙に採取した花粉を5分間放置した後、発芽床に移した場合は3%に減じていた。それ以後はすべて発芽せず培地上で原形質吐出をする。特に -80°C の凍結処理では15分間以内の処理だと解凍後発芽床上で原形質吐出がみられるが凍結が4時間に及ぶと原形質吐出がみられず花粉の外観は新鮮時と全く変らない。以上の結果から水分量を調節することの全く不可能なイネ科花粉では生存の可能性は温度要

因の調節のみにかかっているといえよう。今後、予備凍結の方法などを応用することに研究の余地が残されていると考える。

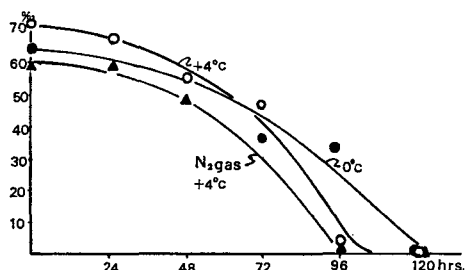


図4 トウモロコシ花粉の 0°C 貯蔵効果
Fig. 4. Survival of corn pollen stored at 0°C, +4°C.

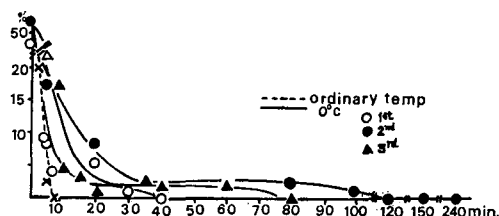


図5 イネ花粉の 0°C 貯蔵効果
Fig. 5. Survival of rice pollen stored at 0°C.

6. 超低温貯蔵花粉の糖変化

すでに第1章で花粉の代謝の結果糖組成の変化がみられ、その最も顕著なものは蔗糖の消失であり、それは花粉の含水量と貯蔵の温度に支配されるとのべた。超低温下では花粉の代謝は全くないと考えてよく、したがって物質消費とくに蔗糖の消失は全く考えられない。表5に示した花粉

第5表 +40°C, -196°C 貯蔵花粉の糖組成の比較
Table 5. Sugar composition of pollen stored at +4°C and -196°C.

Pollen	Water content	Stor. temp.	Stor. period	Germ. rate	Spots				Number of spots
<i>Pinus thunb.</i>	27%	+4° C	32 Mon.	0%	W.	Fr.	Gl.	—	3
	27%	-196°C	27	0	—	Fr.	Gl.	Su.	3
<i>P. pinasta</i>	29%	+4° C	29	0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
	?	-196°C	12	0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
<i>Cunninghamia</i>	34.5%	+4° C	10	0	—	Fr.	Gl.	—	2
	34.5%	-196°C	10	0	—	Fr.	Gl.	Su.	3
<i>Torreya nucif.</i>	?	+4° C	7	0	—	—	Gl.	—	1
	19%	-196°C	7	+	—	Fr.	Gl.	Su.	3
<i>Philadelphus</i>	?	+4° C	7	0	—	—	Gl.	Su.	2
	?	-196°C	7	90.0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
<i>Betula</i>	7%	+4° C	7	0	—	Fr.	Gl.	Su.	3
	7%	-196°C	7	0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
	33%	+4° C	7	0	—	Fr.	Gl.	—	2
	33%	-196°C	7	0	—	Fr.	Gl.	Su.	3
<i>Quercus dent.</i>	9.7%	+4° C	18	0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
	9.7%	-196°C	18	74.4	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
	34.3%	+4° C	18	0	W.	Fr.	Gl.	—	3
<i>Quercus serot.</i>	28.5%	+4° C	6	0	?	Fr.	Gl.	—	3
	28.5%	-196°C	6	3.4	—	Fr.	Gl.	Su.	3
<i>Alnus sieb.</i>	?	Fresh	1	*	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
	22%	-196°C	10	*	?	Fr.	Gl.	Su.	4
<i>Magnolia</i>	8%	+4° C	6	0	—	Fr.	Gl.	Su.	3
	8%	-196°C	6	0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
	39%	+4° C	6	0	—	Fr.	Gl.	Su.	3
	39%	-196°C	6	0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4
	26%	-196°C	6	85.0	W.	Fr.	Gl.	Su.	4

Fr.; Fructose, Gl.; Glucose, Su.; Surcose, W.; White spot, (Unknown)

?: Unknown spot,

の糖組成表は表示の期間それぞれの温度に貯蔵した花粉を70%エタノールで抽出し、ブタノール・酢酸・水系で6重展開した後、アニリンヒドロゲンフタレートで呈色させ比較検討したものである。なおこの表には糖組成を明確に知りえた花粉についてのみ記載した。貯蔵条件による12種の花⁶⁾粉の糖組成の変化はすでにのべたマツ、ヒマラヤスギ花粉の場合とほぼ同様の結果がえられた。即ち +4°C に貯蔵したもののうち、高含水率花粉の場合は Sucrose の消失がみられるのに対し -196°C に貯蔵した花粉ではタイザンボク (39% 含水率)、シラカバ (33%)、ランダイスギ (34.5%)、クロマツ (27%) 花粉などですでに凍結死し発芽が全くみられないにもかかわらず Sucrose の存在がみ¹²⁾られた。これは他の超低温下での生存花粉と全く同じ糖組成であった。さきに第5章で凍結限界含水率以上のヒマラヤスギ花粉を凍結させた場合、発芽床上で澱粉合成を行わず機能的な障害があるとのべたがこのような花粉でも糖、とくに Sucrose をもっていることが今回の実験からも明白となる。即ち超低温下における凍結障害は、酵素系を失活せしめるが、少なくとも炭水化物、糖は全く変化せず存在することを示していた。即ち基質消費のないことをも意味する。

7. 本章の小括と論議

-196°C 超低温下で花粉を7年間貯蔵した結果、多くは高い生存率を維持することができた。超低温長期貯蔵に最も適当な含水率は急速冷却処理によってえられた凍結限界含水率より平均して約 10% 程度低い。したがって凍結限界含水率の測定は超低温貯蔵開始時に重要な要件となって来る。この貯蔵に有効な含水率と限界含水率の差異は超低温下に長期間貯蔵したことによって花粉の生存に有害な氷晶が生成する場合、即ち超低温下におかれた時間が問題となる場合と、加温が緩速である場合におこる凍結によって死滅する場合の両者いずれかが関係するものと思われる。現在のところ、いずれかのケースを直接支持するデータはえられていないが、長期貯蔵後発芽床上で見られるスギ花粉には C₄ および D₂ 型傷害が多いこと、また発芽花粉にも F 型の障害が観察されていることはこれらの花粉が低温障害をこうむらない程に充分脱水されていない事を示すものと思われる、この場合は凍りうる水が加温過程で有害な氷晶に生長した case と推定できる。しかし一方 -196°C に長期間¹⁾おいた間に凍結傷害をうけたと推定される、つぎのような場合もある。第3章でものべた22%スギ、27%~30% の数種のマツ花粉を冷却・加温 10 回の繰返し試験を行なったときも、かなりの発芽率を維持したことから含水率が高くても直接冷却、直接加温すれば生存するわけであり、したがって直接冷却・直接加温という温度変化に伴う要因よりも超低温下においた時間が超低温貯蔵での花粉の生存を支配する要因として強くはたらくものと考えられる。

花粉の種類も超低温下の長期貯蔵の可否に関係する。即ち貯蔵効果のある花粉のなかで最初の発芽率をかなり高く維持するグループと発芽率の減少をみるグループが大別できた。各々のグループに属する花粉には、含水率など、とくにグループの差を示す共通性はみられないが、高い発芽率を長期間維持している花粉の多くは虫媒花粉であり、特に油様物質¹⁷⁾¹⁸⁾を含む花粉が多いようであった。

以上のべた結果と考察を総合すると花粉を超低温下で長期間貯蔵し、高い生存率を維持するための基本的条件は花粉の生存にとって有害な氷晶を作りえないよう花粉から水分を充分とり除くことであり、実際には花粉の種類に固有の凍結限界含水率より、ほぼ10%程度低い含水率まで脱水することでこの条件を満足させることができる。脱水は長命花粉では通常の風乾で充分であり特殊なケースとして予備凍結による脱水が考えられる。しかし短命なイネ科花粉の場合は乾燥が致死要因であるため、ある程度以上の脱水を前提条件とする超低温貯蔵は不可能である。イネ、ト

ウモロコシとも $0^{\circ}\text{C} \sim 1^{\circ}\text{C}$ においたところ、イネ花粉は 100 分間、トウモロコシは 96 時間以上にわたって、わずかではあるが発芽力を維持することができた。この例は温度要因のみを制御したケースである。また 1 年以内の貯蔵に有効な温度として $0^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 程度で十分な場合がある（カラマツ図 3、クロマツ図 2）。 -20°C 冷凍室貯蔵区では生存率に多少のバラツキが見られた。

実用的な林木育種事業における所要花粉量の推定は極めてむづかしく、カラマツ等では人工媒助法が種子の増収にさけがたいといわれており、この様な場合カラマツ花粉需要量は極めて大量が予想される。したがって冷凍庫の利用は多量の花粉を供給する短期間の貯蔵法としては、温度調節機構が正確であれば有効であるといえよう。

温度の精度は液体窒素が高く、 -196°C 恒温と考えてよい。また経費も低廉であり供給もかなり容易であるため、長期間貯蔵の方法として特にすぐれている。花粉容器を長いガラスチューブ等にとすると貯蔵効率も高まり、精英樹、クローン等優良な雄性遺伝質の長期間保存にも液体窒素貯蔵法は極めて有効と考えられる。また超低温貯蔵花粉の糖組成をしらべたところ Sucrose はどのような高含水率花粉にも存在が認められ凍結傷害をうけた結果、澱粉合成はおこらないが Sucrose は全く消失しないことが明白となった。

第 7 章 貯蔵花粉の人工交配による種子、結実稔性

超低温処理をほどこした花粉は便宜的に人工発芽床上で発芽させ、花粉管の形成をもつて生存と判定して来た。しかし超低温下における長期貯蔵の主目的は育種学的な応用性を指向する。このような貯蔵条件におかれた花粉が、よし生きているとしても新鮮花粉と同様の機能を保持しているかどうかが問題である。それ故、貯蔵花粉を交配実験に供し種子の結実、稔性、さらに育苗まで追跡することが必要であろう。そこで林業上重要な樹種であるマツ、スギ及びカラマツの超低温貯蔵花粉を用いて人工交配を行ない、その後の種子の結実稔性などについて調査した。

1. 材料と方法

交配花粉は次の第 6 表～第 14 表に示した花粉である。それぞれの花粉は各母樹の開花期直前まで -196°C 中に貯蔵し直接 $+30^{\circ}\text{C}$ まで加温した。支配母樹までは 0°C 前後のデュワー瓶に入れて輸送し、交配直前に常温に戻し、花粉銃等であらかじめ「袋かけ」をしておいた雌花に交配した。種子は充分成熟したのち球果ごと採取し、常法によって稔性試験、発芽試験を行なった。なおカラマツの交配花粉は液体窒素から直接ドライアイス・エタノール (-80°C) を入れたデュワー瓶に移し、大阪から北海道千歳経由美唄まで航空機と自動車で輸送した。その間約 10 時間を要したが、ドライアイスは 2 kg のうち約半量の減少にすぎず、 -80°C を維持した。

2. 交配結果及び種子稔性

2・1 数種のマツ貯蔵花粉の場合

表 6 に示した 6 種のマツ花粉を 1966 年から 1 ケ年液体窒素に貯蔵し、1967 年春、京都大学演習林上賀茂試験地中井技官によってこれらの花粉でのクロマツ、アカマツを母樹とする人工交配試験が行なわれた。（表 8～11）。クロマツを母樹とした種子の充実率や種子稔性は対照区（袋かけをしたのち新鮮な花粉を交配した区）の種子に較べ大差はない。しかもアカマツを母樹とした交配の結果（第 10, 11 表）種子の充実率にかなりのバラツキが見られる。このバラツキは授粉前後の雌花の環境が不適当な点、つまり袋内部の異常な高温などによって、受精機能が阻害され

第 6 表 人工交配実験に供した超低温貯蔵花粉の概要
Table 6. Outline of artificial pollination with the deepfreeze-stored pollen.

pollen	Stor. period	Stor. temp.	Water content %	Germination rate%	
				-80 °C	-196 °C
<i>Pinus thunberg.</i>	1 year	-196°C	5.0%		50.4%
<i>P. densif.</i>	1	"	6.0		63.4
<i>P. taeda</i>	1	"	9.0		70.0
<i>P. Luchu.</i>	1	"	7.0		66.8
<i>P. masson.</i>	1	"	7.0		36.5
<i>P. pinasta</i>	1	"	7.0		95.8
<i>Cryptomeria japonica</i>	2	-80°C	?	56.7%	29.8
	2	"	?	59.0	23.3
	2	"	?	48.0	24.3
<i>Larix lept.</i>	5	-196°C	22.0	See table 13, 14	

第 7 表 人工交配実験に供した数種のマツ超低温貯蔵花粉の発芽率
Table 7. Germination of artificial pollination with the deep-freeze-stored Pinus pollen.

Species	Germination rate %	
	Fresh pollen	Stores pollen
<i>Pinus thunbergii</i>	19.0%	50.4%
<i>P. densiflora</i>	47.2	63.4
<i>P. taeda</i>	49.3	70.0
<i>P. Luchuensis</i>	51.4	66.8
<i>P. massoniana</i>	50.9	36.5
<i>P. pinasta</i>	35.8	95.8

た結果によるものと思われる。表 12 に示した成熟球果や種子の大きさで、重量などの形質にはバラツキが見られないことから受粉、受精時における環境条件が不相当であったことに由来すると思われる。以上の結果からいずれも 1 ケ年、液体窒素に貯蔵した花粉を用いた交配種子の稔性や種子の形状などは、ほぼ正常で他と大差がないと考えられる。

2・2 スギ貯蔵花粉の場合

1962 年 3 月から翌年 3 月まで 3 通りの冷却速度で冷却し 1 年間 -80°C および -196°C に貯蔵したスギ花粉を用い、京都上賀茂ゴルフ場に植栽された推定 40 年生のスギ 4 母樹をえらびこれらにあらかじめ袋かけをして交配実験を行なった。花粉 1 種につき 3 ケ所の雌花について交配を行なった。その結果、表 12 に示したように、種子重量は対照（自然受粉 Open pollination）に対して平均その 66% 程度の重量に止まっている。これは「袋かけ」による球果の生長阻害によるものと考えられる。No. 1 と No. 4 母樹において袋かけをほどこした雌花の新鮮花粉交配による種子の重量も対照の種子重量より低く、スギ種子の標準重量 3.1 mg/粒 にくらべてもかなり低い。以上のように交配技術に由来すると思われる種子成熟の阻害が見られる以外は超低温貯蔵に原因する負の結果は存在しないものと思われる。また母樹間や冷却速度、貯蔵温度などによると思われる差はあまり明らかではなかった。また種子充実率も母樹間のバラツキが大きいため低温処理の差は明らかでない。

第8表 -196°C 1カ年間貯蔵した数種のマツ花粉のクロマツ人工交配結果

Table 8. Result of pollinating *P. thunbergii* with different pine pollen that had been stored at -196°C for one year.

交配組合せ	花 粉	雌花数 No. of female flowers (A)	採取球 果 数 No. of collected cones (B)	結果率 Cone set percent (%) (B/A)	鱗 片 数 No. of cone scales (C)	胚珠数 No. of cone ovules (D)	総種子数 Obtai- ned total seeds (E)	充実種 子 数 No. of full seeds (F)	枇種子数 No. of empty seeds	1球果当りの 充実種子数 Full seeds per collected cones (G) (F/B) (%)	充 実 率 Full seeds per obtained seeds (F/E) (%)	種 子 稔 性 Seed fertility (G/D) (%)
<i>P. thunb.</i> × <i>P. thunb.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	29	27	93.1	83.8±11.5	164.4	1,976	1,723	253	63.8±14.6	87.2±5.5	38.1±6.7
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	21	17	81.0	77.2±9.3	154.4	1,019	883	136	51.9±16.2	86.7±5.8	33.7±14.5
<i>P. thunb.</i> × <i>P. dens.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	50	34	68.0	88.4±8.0	176.8	1,916	488	1,428	14.4±4.6	25.5±14.1	8.1±2.9
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	28	25	89.3	77.1±9.4	154.2	1,192	177	1,015	7.1±5.5	14.8±24.5	4.6±3.3
<i>P. thunb.</i> × <i>P. taeda</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	82	41	53.7	75.0±19.4	150.0	925	0	925	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	19	16	84.2	63.6±6.7	127.2	424	0	424	—	—	—
<i>P. thunb.</i> × <i>P. Luchu.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	28	16	57.1	78.6±10.6	157.2	886	101	785	6.3±5.1	11.4±5.1	4.0±3.0
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	14	13	92.9	65.5±6.1	131.0	512	79	433	6.1±4.3	15.4±10.1	4.6±3.2
<i>P. thunb.</i> × <i>P. masso.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	27	25	92.6	83.2±8.5	168.4	1,176	349	827	20.5±12.8	29.7±11.2	12.2±6.3
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	11	9	81.8	77.4±6.1	154.8	478	223	225	24.8±7.8	46.7±7.4	16.0±4.5
<i>P. thunb.</i> × <i>P. pinast.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	8	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	17	17	100.0	64.4±6.7	128.8	869	0	669	—	—	—

第9表 -196°C 1 年間で貯蔵した数種のマツ花粉のアカマツ人工交配結果

Table 9. Result of pollinating *P. densiflora* with different pine pollen that had been stored -196°C for one year.

8

交配組合せ	項 花粉	雌花数	採取球 果 数	結果率	鱗 片 数	胚珠数	総種子数	充実種 子 数	枇種子数	1 球果当りの 充実種子数	充 実 率	種 子 稔 性
		No. of female flowers (A)	No. of collected cones (B)	Cone set percent (%) (B/A)	No. of cone scales (C)	No. of cone ovules (D)	Obtain- ed total seeds (E)	No. of full seeds (F)	No. of empty seeds (G)	Full seeds per collected cones (G) (F/B) (%)	Full seeds per obtained cones (F/E) (%)	Seeds fertility (G/D) (%)
<i>P. dens.</i> × <i>P. thunb.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	21	18	85.7	55.1 ± 8.7	110.2	2	2	0	0.1 ± 0	100 ± 0	0.1 ± 0
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	9	6	66.7	53.3 ± 7.5	106.6	2	0	2	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. dens.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	15	8	53.3	45.1 ± 12.5	90.2	175	68	107	8.5 ± 14.9	38.9 ± 18.7	9.4 ± 14.7
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	12	3	25.0	52.0 ± 3.6	104.0	29	25	4	8.3 ± 7.4	86.2 ± 17.4	8.0 ± 6.0
<i>P. dens.</i> × <i>P. taeda.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	18	16	88.9	55.4 ± 4.8	110.8	175	9	166	0.6 ± 1.1	5.1 ± 39.3	0.5 ± 0.9
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	14	8	57.1	58.9 ± 4.2	117.8	0	—	—	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. Luchu.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	20	8	40.0	55.6 ± 7.8	111.2	5	1	4	0.1 ± 0	20.0 ± 0	0.1 ± 0
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	19	16	84.2	52.4 ± 8.0	104.8	16	0	16	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. masso.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	17	13	76.5	52.8 ± 6.6	105.6	2	0	2	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	9	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. pinast.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	24	19	79.2	56.0 ± 5.4	112.0	0	—	—	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	11	7	63.6	54.0 ± 2.8	108.0	2	0	2	—	—	—

Table 10. Cones and seeds obtained by pollinating *P. thunbergii* with different pine pollen that had been stored at -196°C .

第10表 -196°C 貯蔵花粉のクロマツ交配種子と球果

交配組合せ	項 花 粉	球 果 Cone			種 子 Seed		
		長 径 Length (cm)	短 径 Width (cm)	生 重 量 Fresh Weight (g)	長 径 Length (mm)	短 径 Width (mm)	生 重 量 Fresh Weight (mg)
<i>P. thunb.</i> × <i>P. thunb.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	5.4±1.0	2.8±0.1	10.7±5.9	5.5±0.1	3.6±0.8	16.6±3.0
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	4.7±0.2	2.6±0.6	9.4±2.3	5.2±1.0	3.1±0.7	12.6±1.7
<i>P. thunb.</i> × <i>P. dens.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	4.4±0.9	2.5±0.4	8.3±3.4	5.0±0.7	3.1±0.5	12.1±2.9
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	4.6±0.5	2.5±0.2	8.2±2.3	5.0±0.8	3.1±0.3	11.5±1.8
<i>P. thunb.</i> × <i>P. taeda</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	4.5±0.5	2.4±0.3	10.1±2.4	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	5.3±0.4	2.8±0.5	15.2±3.4	—	—	—
<i>P. thunb.</i> × <i>P. Luchu.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	5.5±0.8	3.0±0.2	16.5±3.5	5.1±0.3	3.4±0.1	14.2±2.2
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	4.7±0.6	2.6±0.3	12.2±2.7	4.8±0.5	3.2±0.4	11.3±3.2
<i>P. thunb.</i> × <i>P. masso.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	4.5±0.7	2.4±0.4	14.2±4.9	5.1±0.8	3.3±0.4	13.1±1.3
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	4.8±0.6	2.6±0.1	11.6±2.2	4.8±0.4	3.2±0.6	11.8±2.0
<i>P. thunb.</i> × <i>P. pinast.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	4.4±0.9	2.4±0.4	11.5±2.3	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	5.2±0.7	3.0±0.3	16.3±2.5	—	—	—

Table 11. Cones and seeds obtained by pollinating *P. densiflora* with different pine pollen that had been stored at -196°C .

第11表 -196°C 貯蔵花粉のアカマツ交配種子と球果

交配組合せ	項 花 粉	球 果 Cone			種 子 Seed		
		長 径 Length (cm)	短 径 Width (cm)	生 重 量 Fresh Weight (g)	長 径 Length (mm)	短 径 Width (mm)	生 重 量 Fresh Weight (mg)
<i>P. dens.</i> × <i>P. thunb.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	1.9±0.2	1.2±0.2	1.1±0.02	3.5±0.5	2.5±0.5	7.1±0.6
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	2.3±0.6	1.4±0.2	1.6±0.8	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. dens.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	2.7±0.7	1.5±0.3	2.2±1.4	4.4±1.2	3.0±0	7.8±0.7
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	2.8±0.4	1.5±0.2	2.6±0.5	4.5±0.7	3.0±0.2	8.5±1.8
<i>P. dens.</i> × <i>P. taeda.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	2.3±0.4	1.5±0.3	1.9±0.8	4.0±0.7	2.8±0.4	7.4±1.5
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	2.2±0.5	1.3±0.2	1.7±0.5	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. Luchu.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	1.9±0.3	1.1±0.2	1.0±0.4	4.0	3.0	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	2.3±0.2	1.3±0.2	1.5±0.6	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. masso.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	2.1±0.5	1.3±0.4	1.4±0.3	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen			—	—	—	—
<i>P. dens.</i> × <i>P. pinast.</i>	新 鮮 花 粉 Fresh pollen	2.3±0.6	1.3±0.3	1.4±0.8	—	—	—
	貯 蔵 花 粉 Stored pollen	2.5±0.3	1.4±0.2	1.7±0.5	—	—	—

第12表 スギ -196°C 及び -80°C 1年間貯蔵花粉の人工交配結果Table 12. Result of artificial pollination with *Cryptomeria* pollen that had been stored at -196° or -80°C for 1 year.

Mother tree	No-1	No-1	No-1	No-2	No-2	No-2	No-3	No-3
pollen (2yrs. stor.)	Open	S-196	S-80	S-196	R-80	D-196	D-80	R-80
seed weight (mg/grain)	2.24	1.40	1.77	2.28	3.95	2.50	3.82	1.95
Full seed per obtained seed (%)	76.9	19.7	42.5	53.0	68.4	59.5	82.2	26.2
	No-3	No-4	No-4	No-4	No-4	No-4	No-4	Cont.
	R-196	Open	Cont.	D-80	R-196	D-196	D-196	Cont.
	3.31	3.04	3.41	2.41	2.65	2.26	2.18	3.98mg
	76.3	71.9	68.2	66.5	61.7	86.9	86.6	59.8 %

S: Slow cooling R: Rapid cooling D: Direct cooling

2・3 カラマツ貯蔵花粉の交配種子と幼苗について*

1968年8月から液体窒素に貯蔵した22%含水率の花粉を1969年5月上旬北海道立林業試験場構内植栽のクローン留萌2号に交配した。えられた種子の稔性は表13に示す通りである。

Table 13. Result of artificial pollination with *Larix* pollen that had been stored at -196°C for one year.第13表 カラマツ -196°C 1年間貯蔵花粉の人工交配結果

母樹番号 Mother tree	花粉母樹番 号 Pollen	貯蔵温度 Stor. temp.	花粉の 生存率 Survival of pollen	種子数 No. of total seed	発芽数 No. of Germ. seed	シイナ数 No. of Empty seed	種子充実率 No. of Full seed	種子発芽率 Germination rate
98	49A	+ 2°C	75.0%	69	9	41	39.2%	13.0%
99	47A	+ 2°	35.0	58	6	52	10.3	10.3
60	52A	+ 2°	30.8	81	14	67	17.3	17.3
98	52A	- 10°	+	86	3	82	4.7	3.5
60	47A	- 10°	83.3	84	37	40	52.5	44.0
98	47A	- 20°	87.8	48	9	39	18.8	18.8
99	47A	- 20°	87.8	73	38	35	52.1	52.1
60	47A	- 20°	87.8	91	45	34	63.8	49.5
41	21A	- 196°	87.8	76	49	27	64.5	64.5
41	16A	- 196°	19.3	77	41	35	54.5	53.2
40	16A	- 196°	19.3	85	8	77	9.4	9.4
40	21A	- 196°	87.8	102	3	99	2.9	2.9
40	40A	- 196°	100	92	32	57	33.1	34.8
99	Open		100	84	27	57	32.1	32.1
60	Open		100	87	21	64	26.4	24.1
98	98A	- 196° (ST)	100	67	26	36	46.2	38.8

ST: ストロー封入による花粉 Strow sealed

* この一連の実験は北海道立林業試験場の研究指導委託として行なわれ、主として同試験場育種科で実験が行なわれた。

交配種子の充実率はバラツキが多く、対照、自然結実 (Open) と比較しにくい、交配直前の花粉を発芽試験したところ前発芽状態をさえすものがなかった。B₃~C 型の凍結傷害を受けた花粉では充実種子がほとんど得られなかった。

またこの実験に先立ち 1968 年まで 5 年間液体窒素に貯蔵したニホンカラマツ (信州大学構内植栽) 花粉をルモイ 2 号及び網走 34 号の 2 クローンに交配し、えられた種子の圃場発芽試験をこころみたところ、表 14 のような経過を示した。すなわち、いずれの母樹ともに花粉間の種子発芽

Table 14. Germination of seeds obtained by artificial pollination with *Larix* pollen that had been stored at -196°C for four years.

第 14 表 カラマツ -196°C 4 年間貯蔵花粉交配種子の発芽

(1964 信州大演習林採取花粉)

クローン 名	個体 No.	Pollen	まきつけ 粒 数	発芽開始		発芽中期		発芽終了		発芽数		現在数 (1969)
				生	枯	生	枯	生	枯	数	発芽率 %	
ルモイ 2号	95	'68 混合	98	6		20	4	16	4	24	24	15
	"	Non pollinat.	11	0		8	0	8	0	8	72	8
	"	Self pollinat.	79	12		57	4	48	4	61	77	36
	"	Open	49	0		12	1	11	1	13	26	2
	"	-196°C 4年貯蔵	76	1		9	2	8	1	11	14	7
アバシリ 34号	5	'68 混合	18	0		13	1	13	0	14	77	1
	"	Non pollinat.	12	1		7	1	7	0	8	16	0
	"	Self pollinat.	9	0		3	2	2	1	5	55	2
	"	Open	85	2	1	40	4	38	2	44	51	32
	"	-196°C 4年貯蔵	160	1		125	10	127	2	139	86	5
アバシリ 20号	2	Self	123	0		86	2	85	1	88	71	53
調査月日				June 18 1969		July 8 1969		July 18 1969				Aug. 11. 1969

この花粉は京都より北海道まで -80°C Et-OH, Dry-Ice によって空輸したものである。

経過にバラツキが多く比較することは困難であるが、貯蔵花粉の交配でえられた種子の発芽率がよく悪いという点はみとめられない。これらの種子を Softex (Soft-X-ray) で透視した写真を 2 に示す。充実種子の大きさは貯蔵花粉よりも新鮮花粉の交配種子の方が大きい傾向がみられた。

またこの種子を圃場に播種し、1970 年 8 月 1 年生苗を調査した結果、立枯病 (Damping off) などによる二次的な影響と考えられる枯死苗がみられたが、幼苗の生育状態に異常は全く認められなかった (写真 3 参照)。なお今後、交配種子の播種苗を用いて染色体の異常の有無や育苗成績の比較など形質調査を続ける予定である。

3. 本章の小括と論議

超低温貯蔵 1 カ年のマツ 6 種、スギ及びカラマツの各花粉を用いて人工交配試験を行なった結果、一般に「袋かけ」などに由来すると考えられる球果、種子の形状に矮小な点が見られたが、種子稔性、種子重量など、特に超低温貯蔵の結果と考えられるマイナスな点は認められなかった。またカラマツ種子の圃場発芽試験の結果得られた一年生苗が Damping off などのために枯死

* 北林試久保田泰則氏による。

する程度も対照区（無処理交配区）、グイマツ×カラマツ F_1 雑種などにみられる程度とほぼ同様であり、苗の形態にも超低温貯蔵に由来すると考えられる異常は認められなかった。以上、超低温貯蔵花粉の実用的なレベルに於ける検討の結果、 F_1 までは異常を伴う障害も出現せず、ほぼ満足しうる結果をえた。なお長期間貯蔵の花粉を用いて交配試験、育苗試験を重ねている。

あ と が き

本報は樹木花粉の超低温貯蔵に関する基礎的研究の第6・7章を第Ⅲ報としてまとめたものである。本報中の第8～10表に示されたマツ交配に関する部分は上賀茂試験地中井技官が実施された交配試験であり、カラマツに関する部分は北海道立林業試験場久保田部長におう所が多い。特に記して謝意を表わす。なお本論文は京都大学審査学位論文の一部である。

引 用 文 献

- 1) 北海道酪農開発事業団：細胞の低温保存。北海道酪農開発事業団家畜人工授精所，No. 8, (1966)
- 2) 根井外喜男編：凍結・乾燥と細胞障害。東大出版会，(1970)
- 3) 岩佐 裕：冷凍保存の組織移植における意義と冷凍保存骨（同種）の移植骨としての利用価値限界に関する研究。京府医大誌。67 (1), 23-48, (1960)
- 4) 久保田泰則・高橋延清・柳沢聡雄：雑種カラマツの生産と利用。北海道林木育種叢書。第8集，北海道林木育種協会，(1968)
- 5) 山田満男：ナシの人工授粉用取機の構造と作業能率。農業及園芸，41 (8): 1223-1226, (1966)
- 6) 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 (1)，京大，演報42, 51-82, (1971)
- 7) 北海道酪農開発事業団：Liquid-Nitrogen「OD-OS」及び「OD-IS」保存器の性能について。北海道酪農開発事業団家畜人工授精所，資料 No. 14, (1967)
- 8) Ueno Jitsuro: Studies on pollen grains of gymnosperms concluding remarks to the relationships between Coniferae, Jour. Inst. Polytechn. Osaka city Univ. 11, (1960)
- 9) 市河三次・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 (1)，北海道立林業試験場報告，8, 11-26 (1970)
- 10) 渡辺光太郎・市河三次：花粉の発芽に関する一・二の知見，日本花粉学会誌，No. 6, 3-8, (1970)
- 11) 市河三次・久保田泰則・安達芳克：カラマツ花粉の人工発芽に関する研究 I，北海道立林業試験場報告，7, 32-38, (1969)
- 12) 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 (II)，京大，演報，43, 9-32, (1972)
- 13) 岩崎正子：稲に与えた不良条件が花粉に及ぼす影響：京大。農学部卒業論文。(昭39)
- 14) 山田一郎・長谷川浩：イネ花粉の人工発芽 (9)，日作紀，28, 157-159, (1960)
- 15) 岩崎正子：遮光条件が水稻の花器並びに受粉・受精に及ぼす影響：京大。農学部修士論文，(昭41)
- 16) 渡辺光太郎：イネ科受粉生理の研究 (学位論文) 京大・農学部応用植物学研究室，(1961)
- 17) Linskens H. F.: Pollen physiology. Ann. Rev. of Plant Physiol. Vol. 15, Ann. Rev. Inc., California, (1964)
- 18) 志佐誠・加藤幸雄：植物生殖生理学。誠文堂新光社，(1962)
- 19) 加藤舜郎・石渡憲治：食品冷凍法。恒星社厚生閣，(1965)
- 20) Tumanov. I. I. and Krasarcov. O. A.: The effect of thawing rate on the survival of vitrified cells and hardened plants. Fisiol. Rast. 9 (5), 595-606, (1962)
- 21) 梶勝次・久保田泰則・市河三次：カラマツ花粉の超低温貯蔵 II. 1972. 北林試報 (印刷中)

Résumé

Results of fundamental studies related to the long-term storage of tree pollen at -196°C were reported in two previous papers. In the present paper, result of the long-term storage of pollen at deep-freezing temperatures and the fertility of seeds obtained by artificial pollination with the stored pollen are dealt with, and also a general discussion of the studies is presented.

1) Among pollen that had been stored in liquid nitrogen for eight years, some pollen showed no change in longevity, while others showed a considerable decrease.

2) In order to store pollen safely for a long period, the water content must be lower than the limiting water content for freezing which seems to be about 10%.

3) For comparison, rice and corn pollen were used in an experiment, which are among the shortest-lived at prevailing temperatures. Rice pollen, unlike tree pollen, survived for only 100 minutes at 10°C . That water content plays the most important role in pollen survival, does not be applied here.

4) *Cryptomeria*, *Pinus* and *Larix* pollen were used in an artificial pollination, which no influence of deep-freeze storage was observed. *Larix* seeds sown in nursery showed no difference in development and growth of the seedling compared with the control.

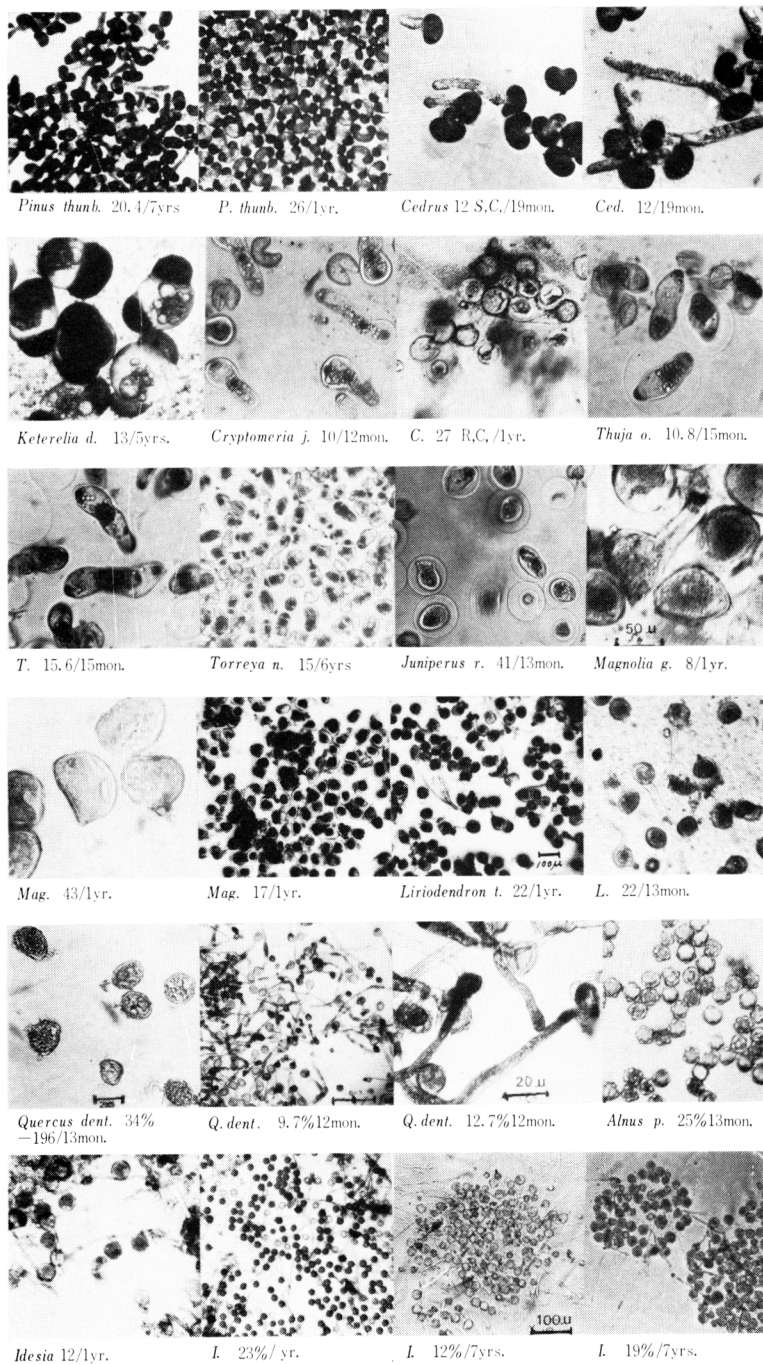
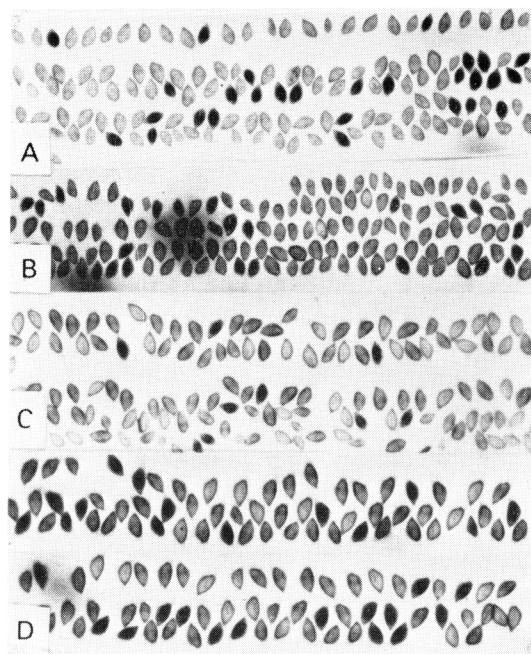


Photo. 1. Germination of pollen stored at deep-freezing temperatures.

超低温貯蔵花粉の発芽



- A: Abashiri No. 34 × $-196^{\circ}\text{C}/5\text{year stor.}$
pollen
B: Abashiri No. 34 × Open pollination
C: Rumoi No. 2 × $-196^{\circ}\text{C}/5\text{ years stor.}$
pollen
D: Rumoi No. 2 × Mixed pollen (Fresh)
Black: Full seed
White: Empty

Photo. 2. Larch seeds obtained by artificial pollination with the Five year stored pollen.
(Photographed with soft-X-ray, courtesy Forest Exp. Sta. of Hokkaido)
貯蔵花粉の人工交配によってえられたカラマツ種子 (soft-X-ray)
(北林試による)

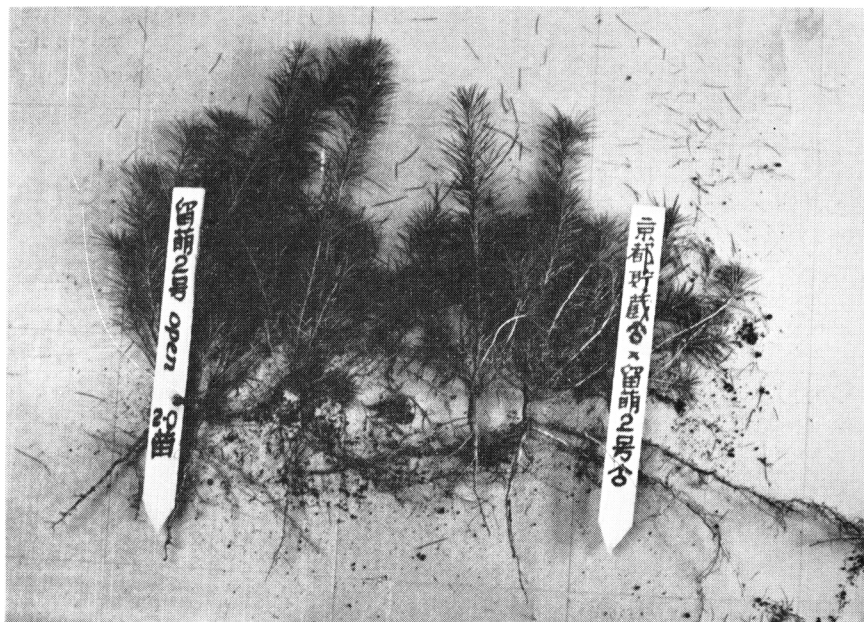


Photo. 3. Two year-old seedlings from seeds obtained by pollinating with *Larix* pollen that had been stored at -196°C for five years. (courtesy masses. Kubota and Kaji, Forest Exp. Sta. of Hokkaido)
 -196°C 5年間貯蔵ニホンカラマツ花粉の交配種子からえられたカラマツ2年生苗 (北林試 久保田, 梶による)