

樹木花粉の超低温貯蔵に関する 基礎的研究 (1)

市 河 三 次・四 手 井 綱 英

Fundamental studies on Deep-freezing storage of Tree pollen

Sanji ICHIKAWA and Tsunahide SHIDEI

目 次

要 旨.....	51	5. 冷却・加温のくり返しに対する抵抗性	
第Ⅰ章 序論.....	52	6. 針葉樹花粉低温処理の小括	
1. はじめに		7. 広葉樹花粉における低温処理	
2. 花粉貯蔵の概史		8. 本章小括	
3. 花粉貯蔵に関する基本的問題		第Ⅲ章 花粉の含水量と凍結耐性.....	70
3・1 花粉の stage		1. 花粉内部の水	
3・2 送粉過程における花粉の変性		2. 針葉樹花粉の凍結致死範囲	
3・3 クロマツ・ヒマラヤスギ花粉の+		3. 広葉樹花粉の凍結致死範囲	
温度における生存期間と物質消費		4. 本章小括	
3・4 窒素ガス充填による貯蔵		第Ⅳ章 花粉の予備凍結効果.....	73
4. 本章小括		1. Taxoid 高含水率花粉の予備凍結効果	
第Ⅱ章 超低温における花粉の生存.....	59	2. スギ花粉の予備凍結における凍結傷害	
1. 超低温貯蔵の実験及び生存力の判定		3. ヒマラヤスギ花粉の予備凍結効果	
1・1 冷却装置及び超低温保存装置		4. 広葉樹(風媒)花粉の予備凍結効果	
1・2 花粉生存力の判定		5. 本章小括	
2. マツ花粉の低温処理		あとがき.....	77
3. スギ型(Taxoid)花粉の低温処理		参考文献.....	77
4. マツ型(Pinoid)花粉の加温処理		Résumé.....	78

要 旨

花粉の長期貯蔵は超低温下で生物活性をすべて停止し、解凍後に賦活させて正常な授精をすることが最もよい方法と考えられる。そのためには花粉内の自由水を、花粉に害を与えない程度にとり除くことが重要である。筆者らは、1961年から花粉の超低温長期貯蔵に関する一連の研究を行ってきた。本論文は、その中で特に基礎的な部分をまとめたものである。+温度では花粉内部の物質代謝に関与する自由水は、超低温下で氷晶を生成し物理的傷害を与える。凍結傷害をおこさない限界を凍結限界含水率、凍結限界温度と称する。この両者は樹種によって特有な値をもち、この両者によって凍結致死をひきおこす範囲が決定される。

冷却の速度は凍結限界含水率に近い水分量の花粉の冷却時は急速を必要とするが、凍結に対して安全な範囲にある含水量の場合は、そう問題ではない。また加温過程でも急速度を要求され、緩速で加

温すると、ここでも氷晶を生成し傷害をうける。この凍結傷害をおこす温度帯は樹種により多少の差はあるが $-35\sim-45^{\circ}\text{C}$ 程度と考えられる。この温度帯を最大氷晶生成帯と称し、他の植物柔組織・生鮮植物性食品の場合とほぼ同じと考えてよい。また凍結するべき飽水状態(約70%含水量)の花粉を予備的に、 $-10, -20, -30^{\circ}\text{C}$ 程度で冷却すると、 -196°C で凍結してもなお生存させることができた。この方法を予備凍結と称し、その効果のある温度、時間は -30°C 程度、数時間以上が最もよく、 -196°C 、100日間の凍結で、スギ花粉は非常に高い生存率を維持した。

第 I 章 序 論

1. はじめに

林木育種の第一義の意味は森林の生産力を質的に高めるための、林業用主要樹種の育種であろう。すなわち、その与えられた環境条件や、生物的要因の中において、なお高い生産性を維持しうる樹種への改良であり、耐寒・耐病等、諸耐性の高い樹種の固定であろう。生殖生理学の立場は、そのために林木育種における基礎的な分野として重要な意義をもつ。

筆者らは、特に交雑育種の実践的な基礎部門として広く応用されるべき花粉の長期貯蔵について研究を行ってきた。花粉は光合成機能をもたない独立した多細胞体であり、その生命を長期間維持するためにとるべき方法は、花粉の物質代謝を抑制することにある。その方法として液体窒素によってえられる -196°C の超低温下で、長期間生命力を維持することが可能であることを見出し、その実用的貯蔵の研究を行ってきた。さらにその超低温下に貯蔵するための方法は、低温条件下における生理学を基礎として研究されねばならない。本論文は、主として超低温条件下で樹木花粉を長期間貯蔵するための基礎的問題についてのべる。

2. 花粉貯蔵の概史

B. C. 4世紀にエジプト、アラビア地方でナツメヤシの結実促進のための人工交配が行なわれ、さらに古く B. C. 2000年、ハムラビ時代に *Date palm* の花粉を貯蔵した記録がある。組織的な研究は MARGIN (1886)²⁾ に始まり、MOLISH (1893)³⁾ は80種の花粉を乾燥条件下で貯蔵することに成功した。PFUNDT (1909)⁴⁾ は140種の花粉を0~90% r. h. に規制した容器に入れ、 $17\sim 22^{\circ}\text{C}$ において試験したところ、0~30%の関係湿度が貯蔵に最適だと報じ、HALMAN と BRUBAKER (1926)⁵⁾ にもその値は一般に27.2% r. h. と結論づけた。さらに GOFF (1901)⁶⁾ は低い温度(+温度域)を貯蔵の条件に加え、GRIGGE (1950)⁷⁾ はマイナス温度を貯蔵条件に加えた初めての報告をしている。GRIGGE (1953)⁸⁾ は -20°C に多くの花粉を貯蔵し、AUTLES (1950, 1951)⁹⁾ は、リンゴの花粉を $-55, -60^{\circ}\text{C}$ 下で貯蔵することに成功した。KNOWLTON (1922)¹⁰⁾ は液体酸素の中に *Antirrhinum* の花粉を1時間半さらしても生存する事を見出し、VISSER (1955)¹¹⁾ はリンゴ、トマト、ナン花粉を -196°C に2年間貯蔵し、人工交配をほどこしてよい果実をえている。武藤らは *Picea*, *Abies*, *Betula* 花粉を乾燥・真空(4mm Hg)¹²⁾ 条件下で数年間(室温、 -8°C)生存させ、STANLEY は7種のマツ花粉を、10% r. h., 0°C , $+4^{\circ}\text{C}$ で15年間生存させたと報告している。¹³⁾ また DUFFIELD は -23°C でマツ花粉を2年間、EHRENBERG は同じく -18°C で7年間、KING. J. R. は林業用樹種を用いて -60°C 下での長期貯蔵に成功した。また花粉容器内を真空又は窒素ガス、二酸化炭素等と置換して貯蔵する方法は、武藤、SCHOENIKE, KING. J. R. らが行ってよい結果をえたと報じているし、JENSEN, KING. J. R., T. M. CHING, K. K. CHING¹⁴⁾ らは花粉を凍結乾燥してよい結果をえている。¹⁵⁾ 以上既往の花粉貯蔵に関する研究を要約すると次のようになる。¹⁶⁾ ¹⁷⁾ ¹⁸⁾ ¹⁹⁾

(1)花粉を乾燥状態に保つため容器内の関係湿度を調節している。(2)容器内に不活性ガスを入れるか、真空に保って酸素を遮断する方法を用いる。(3) 0°C 以下、特に -20°C, -196°C を用いている。すなわち花粉容器内の関係湿度及び温度を貯蔵の条件としている。

3. 花粉貯蔵に関する基本的問題

3・1 花粉の stage.

花粉貯蔵における最終的な目的は Pollination にある。したがって花粉の最も適当な Stage を長期間、新鮮な状態で維持することが花粉貯蔵の意義であり、通常は葯裂開後、柱頭上に達するまでの独立した花粉粒の Stage が最も有効である。しかし単粒になると非常に短命な *Gramineae* 花粉にこの前提はあてはまらない。このような場合は開葯をコントロールし、葯内においた状態で生命を長びかせる方法を考えねばならない。この考え方はさらに開花調節にみちびかれる。しかし本論は《独立した多細胞体としての花粉粒の生理的条件を維持したまま、環境条件を規制することによって、生存を長びかせる方法》としての花粉貯蔵に限定した。

3・2 送粉過程における花粉の変性.

花粉は Tapetal cell を通じて養分を吸収し完熟するが、その後、外囲との間にある物質の移動は水だけである。葯の裂開ですべての花粉は脱水現象をおこす。脱水には花粉壁構造、花粉壁上被層 (Perine) にみられる Lipid や表面・断面構造によって脱水速度に差があり、特に Channel が重要な²⁰⁾なはたらきをもつと考えられる。Channel の疎通深度及び分布密度は樹種によってかなり差があり、花粉の脱・吸水に重要な意義をもつものと考えられる。上野は Taxoid (スギ型の花²¹⁾粉) は Pinoid (マツ型即ち有²²⁾囊花粉) より脱水度が高いとのべ、その理由として、Taxoid は Sexine が Verrucate であり、Intine が肥厚しているのに対し、Pinoid は Sexine が網状であり、Intine が薄いとのべているが、筆者はさらに、Channel も、花粉粒、特に細胞質における吸・脱水性を支配するものと考ええる。このように花粉の脱水現象は花粉壁の構造に依存するところが大きいと考えられる。

花粉の水分条件は、生存期間に影響を与え乾燥によって生存期間の長くなる種類、短命化する種類など PFUNDT (1909)²³⁾によって調べられた。水分条件に支配されないものに、ヘラオモダカ・ケン・イチゴツナギ・ライムギをあげているが、これらは最も水分条件に支配される種類であり、特に *Gramineae* 花粉における脱水は致命的である。また乾燥によって長命化する花粉に、トチ・ユリ・オオバコなどをあげ、また r. h. 37% を最適とするものに、ハンノキ・ヤナギなどをあげている。このように花粉粒内部の水は、結果的に花粉の生存期間を左右する。これは花粉の生活代謝に關与する水としての意義が重要である。

花粉の水分を含水量(率)として表現するべきであることは、上述のように吸・脱水が容易な構造をもつことや、外囲の湿度条件によって平衡含水率が容易に変る点、³¹⁾さらに後章でのべる超低温下での凍結障害の誘起などの点から、とくに生存力を問題とする研究では含水量として考察を加える必要がある。

温度条件は水と共に最も重要な点である。物質代謝の反応速度を抑制するために、水分のほか、低温条件が一つの要因となる。自然条件下では風媒・虫媒とも花粉の到達距離・時間は媒介者に支配されるため、²³⁾花粉の構造・機能も外界に適応し、低温期開花のものは糖を含むもの(糖花粉)が多いようである。以上述べたように、自然状態で花粉はその生活代謝のために、貯えた物質を消費する。その動きを知るために次のいくつかの実験を試みた。

3・3 クロマツ・ヒマラヤスギ花粉の+温度における生存期間と物質消費

一般に自然条件下においては雌花までの花粉到達距離及び時間は送粉の媒介者によって支配されるから、虫媒、重力媒花粉に比較して、送粉距離、時間も長い³²⁾ため、物質の消費量も異なるであろう。つまり送粉過程の中における物質消費を抑制する能力を風媒花粉は自からもたねばならないはずであ

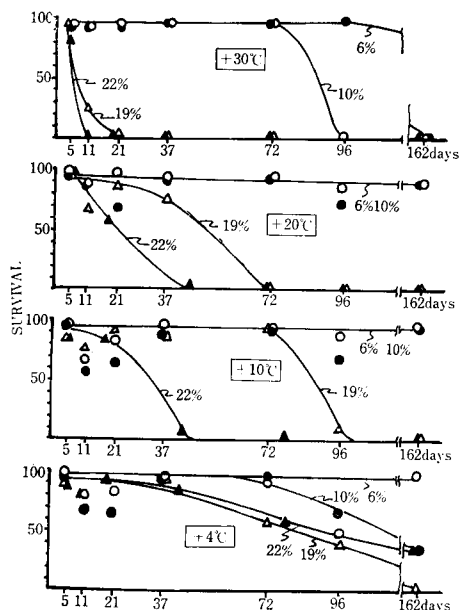


Fig. 1. Effect of some above freezing storage on germination of *Cedrus deodara* pollen at various water contents.

る。このことは前述の PFUNDT が示した花粉の生存期間と関係湿度について、風媒花粉の多くは乾燥によって生存期間を長びかせうというデータが適切にこれを示唆している。

筆者はこの実証をうるため、数種のマツ・ヒマラヤスギ花粉を用いて、花粉含水量と外囲温度の差が与える生存期間への影響について調査した。供試花粉は 6%~29% までの数段階に含水率を調節したのち市販 1cc ガラスアンプルに溶封し、+4°C、+10°C、+20°C、+30°C、室温（5~8 月、京都）の温度条件を加えて、発芽率・澱粉形成率の推移及び、ペーパークロマトグラフィーによる糖組成の変化について調査した。

実験の結果、図 1 に示したように、+ 温度領域では特異的に生存率の高いヒマラヤスギ花粉を用いても、花粉内自由水の量（Fresh-base による含水率）と貯蔵温度の及ぼす生存率の変化に明らかな規則性が見られる。即ち +30°C 下においた 20% 前後の含水率花粉（以下 20% 花粉等と略記）は、数日で発芽率 0 になり、10% 花粉では 72 日間までは発芽率の減少はみられないが 96 日で発芽率は 0 にいたる。また +20°C では 20% 花粉の生存期間は +30°C 区よりやや長くなり、+10°C でさらに長期化する。また、いづれの温度でも花粉含水量が高いほど生存期間は短い。マツ花粉で同様の実験をした結果さらに顕著であった。すなわち、花粉含水量と貯蔵温度はその生存期間に密接な関係がある。花粉内部にある物質は、²⁷⁾ 分解消費の方向にのみ向うのであるから、すべての基質を費消すると死に至る。その経過は即ち、(1) 発芽率の減衰 (2) 澱粉形成の消費 (3) 糖の消費として測定・検知しうる。

発芽率をもって便宜的に代表した生存率は図 1, 2 に示したが、澱粉形成花粉の数も、ほぼ発芽率と同様の推移をたどる（図 3, 4）。この発芽率の減衰と澱粉形成粒の消費は、図 5 に示すような関係

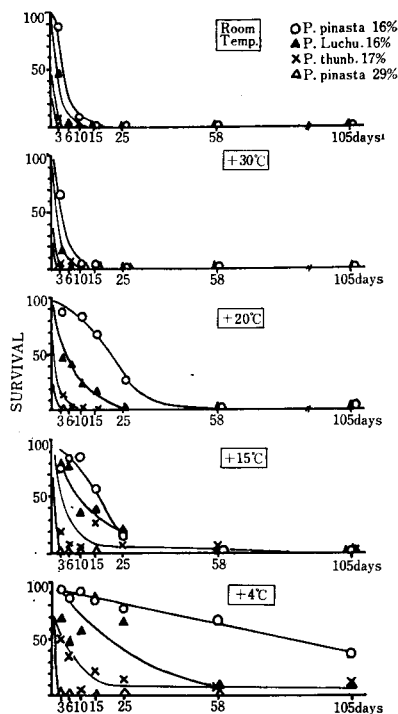


Fig. 2. Effect of some above freezing storage on germination of some kind of *Pinus* pollen.

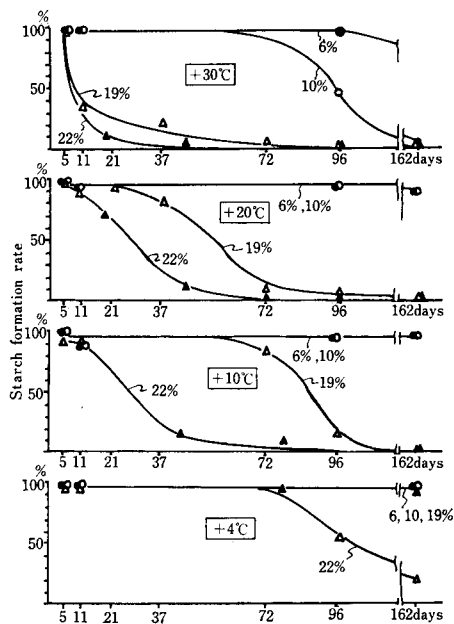


Fig. 3. Effect of above freezing storage on starch formation of *Cedrus deodara* pollen at various water contents.

をもつ。数種のマツ花粉を例にとると、新鮮な花粉は、発芽するすべての個体に澱粉の形成（発芽床土約24時間後）をみるが、発芽率が0になっても、澱粉形成がみられる。すなわち発芽と澱粉形成は全く別の現象であり、発芽は花粉粒の総合的な機能の正常性を示し、澱粉形成は、酵素の Activity を示すものといえることができる。岩波らはこの澱粉形成の現象を、花粉自身の滲透圧調節のためだとのべているが、澱粉 $\rightleftharpoons$ 糖の可逆的反応に関与する澱粉合成系酵素活性は、花粉の生理的飢餓状態の程度を知る上にも有効である。

澱粉合成能力を失なった、即ち澱粉合成系酵素の失活をみた花粉は、ひきつづいて糖、特に Sucrose の消失をもたらす。上述の実験に用いた花粉の糖組成の変化についてペーパークロマトグラフィーで調べた。（写真3）

試料は70% Et-OH で24時間、+20°C で抽出したのち、Bu-OH・酢酸・水系で6重展開し、アニリン・フタル酸で呈色したものである。検出した糖

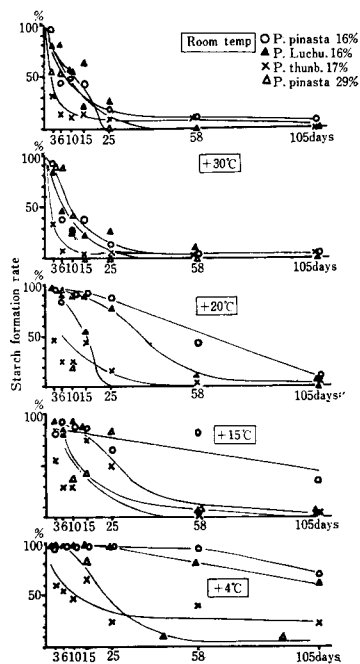


Fig. 4. Effect of above freezing storage on starch formation of some kind of *Pinus* pollen at various water contents.

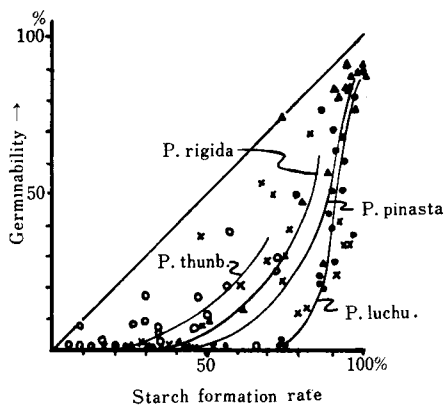


Fig. 5. Relation between starch formation rate and germination of some kind of *Pinus* pollen.

Table. 1 Sugar composition of Cedrus pollen as affected by various water content and stor temperature

Days Stored	5 days							11					21					37					72					96 days									
Stor. - Temp.	Water Content %	Germina- bility %	Starch Forma- tion rate %	Unknown	Fructose	Glucose	Bucrose	Germ %	Starch %	Unknown	Fructose	Glucose	Sucrose	Germ %	Starch %	Unknown	Fructose	Glucose	Sucrose	Germ %	Starch %	Unknown	Fructose	Glucose	Sucrose	Germ %	Starch %	Unknown	Fructose	Glucose	Sucrose	Germ %	Starch %	Unknown	Fructose	Glucose	Sucrose
+ 30 °C	6	93	99	+	+	+	+	91	94	+	+	+	+	97	99	+	+	+	+	96	99	+	+	+	+	96	98	+	+	+	+	90	95	+	+	+	+
	10	95	99	+	+	+	+	89	96	+	+	+	+	91	98	+	+	+	+	96	95	+	+	+	+	96	92	+	+	+	+	+	41	+	+	+	-
	19	94	99	+	+	+	+	26	34	+	+	+	+	+	00	-	+	+	+	00	23	+	+	+	-	0	7	+	+	+	-	0	+	-	-	-	-
	22	83	89	±	+	+	+							00	11	+	+	+	+	00	6	+	+	+	+	0	0	-	+	+	-	0	0	-	±	±	-
+ 20 °C	6	92	99	+	+	+	+	86	91	+	+	+	+	67	89	+	+	+	+	87	90	+	+	+	+	87	92	+	+	+	+	71	91	+	+	+	+
	10	96	99	+	+	+	+	84	87	+	+	+	+	95	99	+	+	+	+	93	95	+	+	+	+	92	95	+	+	+	+	84	95	+	+	+	+
	19	93	99	+	+	+	+	67	26	+	+	+	+	88	93	+	+	+	+	72	80	+	+	+	+	00	5	+	+	+	+	00	3	-	+	+	-
	22	92	94	±	+	+	+							57	70	+	+	+	+	3	7	+	+	+	+	00	00	+	+	+	+	00	00	-	+	+	-
+ 10 °C	6	95	99	+	+	+	+	55	84	+	+	+	+	66	85	+	+	+	+	86	92	+	+	+	+	94	98	+	+	+	+	69	93	+	+	+	+
	10	95	99	+	+	+	+	67	87	+	+	+	+	82	91	+	+	+	+	95	97	+	+	+	+	95	99	+	+	+	+	81	96	+	+	+	+
	19	86	94	+	+	+	+	78	97	+	+	+	+	92	95	+	+	+	+	87	92	+	+	+	+	96	87	+	+	+	+	8	8	+	+	+	+
	22	86	92	+	+	+	+							88	92	+	+	+	+	5	23	+	+	+	+	1	6	+	+	+	+	00	00	-	+	+	-
+ 4 °C	6	95	99	+	+	+	+	66	91	+	+	+	+	61	92	+	+	+	+	90	92	+	+	+	+	94	99	+	+	+	+	62	86	+	+	+	+
	10	95	99	+	+	+	+	78	93	+	+	+	+	79	93	+	+	+	+	91	93	+	+	+	+	84	92	+	+	+	+	47	48	+	+	+	+
	19	88	97	+	+	+	+	74	88	+	+	+	+	82	92	+	+	+	+	94	95	+	+	+	+	55	94	+	+	+	+	39	60	+	+	+	+
	22	83	95	+	+	+	+							96	96	+	+	+	+	86	91	+	+	+	+	58	90	+	+	+	+	37	90	+	+	+	+

は、Rf の高い1つの Spot (低分子の糖と思われる) のほか、Fructose Glucose Sucrose の4種類であり、貯蔵条件のちがいによる組成の変化は第1, 2表に示すようであった。ヒマラヤスギ花粉では、生理的飢餓状態の進行によって澱粉粒の形成をみなくなる時期は、Sucrose の消失期とはほぼ同時であることがわかる。このことは澱粉合成系酵素の失活する時期であると考えて差支えない。このように呼吸基質としての糖の消費により、花粉は死に至るのである。(写真3参照)

以上のことから、風媒花粉では高含水量・高温度の場合、物質代謝は急激に行なわれ、低含水量・低温度条件にある場合に較べて生存期間は非常に短い。(表1, 2参照) この結果から、花粉の生命維持には、物質代謝に関与する水と、外囲温度を可能な限り低位に保つことが重要であろう。

3・4 窒素ガス充填による貯蔵

花粉の生活代謝を抑制する方法の1つに酸素の遮断がある。すなわち花粉の呼吸を停止乃至は抑制して呼吸基質の消費を抑え、あるいは呼吸酵素の不活性化、O₂ の供給制限などの方法である。すでに DUFFIELD, SNOW らは CO₂ ガスの封入を試みているが、筆者はここで、生物的に不活性の窒素ガスを封入し、常温における花粉の生活代謝の抑制を試みた。

供試花粉は京都大学、上賀茂試験地で採取し、実験開始まで約50日間 +4°C に貯えられたものを用いた。窒素ガスは第6図に示したような特殊な栓をつけた分岐管の一方にアンプルを接続し、真空ポンプで約6mmHgまで減圧した後、他方から窒素ガスを導入して溶封した。これらの試料は +4°C ~ +20°C の4段階の温度条件のもとで、一定期間貯蔵し、その後、常法の寒天発芽床において発芽率を調べた。

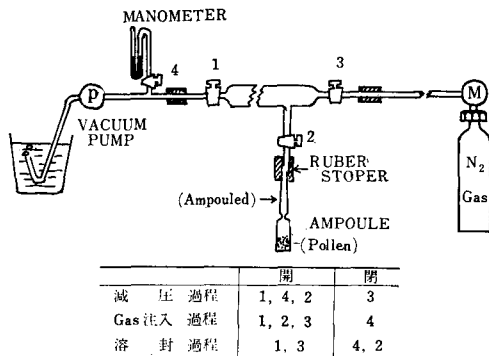


Fig. 6. Apparatus of air exchange.

Table 2. Sugar composition of 245day stored some kind of Pinus pollen as affected by various states.

Pollen	Pinus. thunb. (10%)	P. pinasta (16%)	P. Luchu (17%)	P. rigida (18%)	P. pinasta (29%)
Stor. - Temp. +30°C	Germia bility % 0	Germ % 0	Germ % 0	Germ % 0	Germ % 0
+20°C	Starch forma- tion rate % 0	Starch % 0	Starch % 0	Starch % 0	Starch % 0
+10°C	Unknown +	Unknown +	Unknown +	Unknown +	Unknown +
	Fructose +	Fructose +	Fructose +	Fructose +	Fructose +
	Glucose +	Glucose +	Glucose +	Glucose +	Glucose +
	Sucrose +	Sucrose +	Sucrose +	Sucrose +	Sucrose +

() : Water Contents

数種のマツ花粉を10日間貯蔵した結果、+4°C 条件下では窒素ガス封入の効果はみとめがたい。のみならず +10°C 貯蔵花粉の発芽率は、窒素ガス封入区の方が低い発芽率を示した。また +20°C 区、室温区では窒素封入区がやや高い発芽率を維持したようであるが、20日間貯蔵の結果、両区の違いに窒素ガス封入による効果と考えられる差はみとめがたい。(図7参照)

図8に *P. banksiana* 13%, *P. rigida* 15% 含水率花粉を用いて行なった発芽の経過を示したが、窒素ガス封入効果はないと考えられた。したがって O_2 の遮断によって物質代謝を抑制するという方

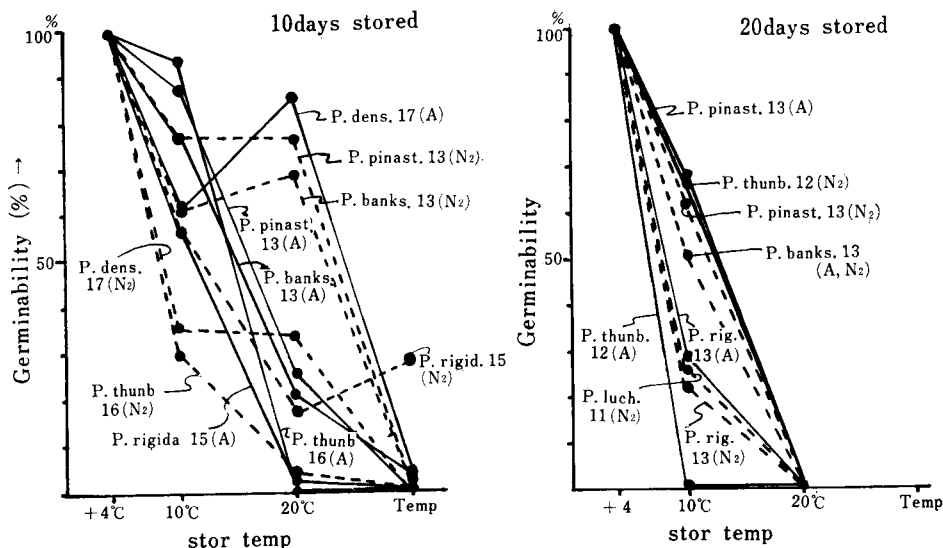


Fig. 7. Germination rate in the air and in Nitrogen gas. (1)

法は余り効果的ではなく、²⁵⁾ DUFFIELD や SNOW らの報告と一致するようである。

4. 本章小括

花粉貯蔵は花粉の生活代謝機能を抑制し、交配時に再び賦活させることに他ならない。生活代謝に関与する花粉の内部条件は、1) 花粉内部の自由水量 2) 呼吸基質であり、外部の環境条件は 1) 温度 2) 湿度 3) 酸素である。この条件の組み合わせが、花粉の生存期間を支配する。

花粉粒内の自由水を適度に脱水することは *Gramineae* 花粉を除いて、ほとんどの種類では死を招かない。ヒマラヤスギで4%まで脱水しても生命は維持される。この脱水の結果、物質代謝の抑制がおこり、加水分解が極度に抑制される。即ち生活代謝の基質の消費が減少し、不活化・呼吸の減少が考えられる。また酵素活性の減衰が見られる。このことは LINSKENS の報告とも一致する。²⁸⁾ LINSKENS は脱水によって室温に放置した花粉の生命が長く維持されることを、Bound Enzyme の遊離と説明しているが、結局生存力の減少は、貯蔵物質の消耗、呼吸による基質の消費にほかならない。筆者の実験の結果、ヒマラヤスギ、数種のマツ花粉では、澱粉 $\rightleftharpoons$ 糖の合成系酵素の不活性化は Sucrose

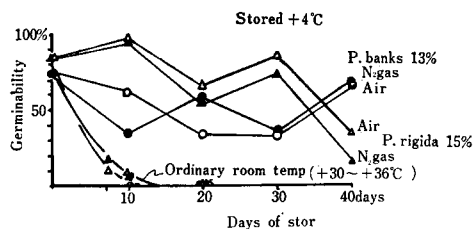


Fig. 8. Germination rate in the air and Nitrogen gas. (2)

の消失と、ほぼ同時におこり、この結果として説明しうる炭水化物の消費は、花粉の含水率と、外囲温度に支配された。STANLEY R. G.²⁷⁾ らはこの点に関し、ほぼ同様な報告をしている。即ち *P. ponderosa* など4種の花粉を15年間 +5°C で貯蔵した場合、貯蔵容器内の r. h. を10%と25%にしたときに花粉内の有機酸量に差のあることがわかり、高温度ほど早く消耗し、また Free-Glucose 量も低分子の糖も、低湿度(10% r. h.) ほどその量が多かったとのべている。表1, 2, 写真3. で示した Sucrose の消失は、Fructose, Glucose に分解したものと考えられる。

以上のべた水分条件について、多くの研究者はすべて花粉貯蔵容器内部の関係湿度として考察を進めているが、外囲の関係湿度によって花粉含水率は容易に平衡するので、生活代謝・反応速度等を論ずる場合、花粉粒内の絶対含水量を基準とする方が、より正確を期せられると考えられる。したがって筆者はすべて花粉固有の含水量をもって考察を進めた。これは後章でのべる超低温下における花粉内の水分量が氷晶の生成に関与するので重要な意義をもつ。

温度は物質の反応速度に重要な関係をもつ。花粉の生存力は +30°C よりも +10°C で飛躍的に高くなり(図1~4参照)、炭水化物の消費も貯蔵温度が低いほど少ない。この炭水化物代謝の速度は、外囲の温度に依存し、代謝は花粉内の炭水化物分解酵素の活性に支配されると考えられる。加藤、石渡³⁰⁾らによれば、果実の中に含まれる酸化酵素の活性は -12°C で減ずるとのべ、また STANLEY はマツ花粉の貯蔵条件として、花粉内部の炭水化物分解系酵素活性を低下させることだとのべている。したがって温度条件が花粉の貯蔵の中で水と同様、重要な条件だといえる。

さらに O₂ の遮断について KING. J. R.²⁹⁾ はマツ花粉の貯蔵で窒素ガス封入が効果的であったとのべ、CO₂ ガス封入でもよい結果をえたと報告しているが筆者の実験で窒素ガス置換は、通常のアンプル封入区に比較して、ほとんど効果はみとめられなかった。

第Ⅱ章 超低温における花粉の生存

1. 超低温貯蔵の実験及び生存力の判定

1.1 冷却装置及び超低温保存装置

0°C から -79°C までの任意の温度を得るには、市販の大型デューワー瓶を主体とし、寒剤に Dry-Ice 及び未変性エタノールを用いるのが最も適当である。冷却速度も破さいした Dry-Ice の投入量によって任意の速度がえられる。また任意の温度もこの方法によって維持することができる。

凍結保存には液体窒素が安定であって取扱い上便であり広汎に利用されている。液体窒素は -195.8°C で沸騰し、液体の場合常にこの温度を保ち、物理・化学的に安定である。保存容器は「LINDE」の Liquefied Nitrogen refrigerator を利用した。本装置は京大農学部畜産第二講座にあり、LNR 640 型、LNR 25 型の2種がある。いずれも常圧の元で使用しうるばかりでなく、恒温であって、他の冷凍装置にみられる調節機構上の温度差が全くなく、また液体窒素補給の経費も25ℓ容器1ヶ年平均約1万円と低廉であり利点が多い。

以上の装置に対して使用する花粉容器は、超低温下で物理的耐性の高いガラスアンプル(1cc 容量)を用いた。実用的な大量貯蔵の場合は直径約8mm 肉薄ガラスチューブが適当である。

このアンプルに溶封した花粉の冷却速度は次の方法で測定した。即ち、アンプル内部にサーミスタ感温部を装着し、各種の冷却速度について冷却曲線を求め、-196°C への直接冷却については、オン・オフグラフで追跡した。Dry-Ice, Et-OH でえられる最高冷却速度の直線部分は 8.06°C/min. を示す。またこの温度への直接冷却時の初期冷却速度(直線部分)は、約1/sec.~7/sec. であり、-196°C の場合は7/sec. を示した。この場合、花粉の種類、アンプルの材質による冷却速度の差は、実用的に

はほとんど無視しうると考えてよい。

また、アンブル中央部と、アンブル内壁に接した部分の冷却速度の差を、直接冷却法について、銅・コンスタンタン熱電対で厳密に測定すると写真の如くなる。写真(79頁)中のAはアンブル内壁に接した部分、Bはアンブル中央部空気層の冷却曲線である。花粉の形・大きさを異にするスギ・クロマツ・カラマツ3種類の初期冷却速度(直線部分)は次のごとくであった。

花粉 \ 測 温 部 位	冷 却 速 度		最 終 温 度 到 達 時 間	
	アンブル内壁	内 部 空 気 層	アンブル内壁	内 部 空 気 層
<i>Pinus thunbergii</i>	13.5°C/秒	3.2°C/秒	45 秒	90 秒
<i>Cryptomeria japonica</i>	13.0°C/秒	8.7°C/秒	26 秒	46 秒
<i>Larix leptorepis</i>	15~21°C/秒	8.4~12.5°C/秒	45 秒	95 秒

[註] *Cryptomeria* は -80°C 直接冷却の場合の数値である。

アンブル内壁に接する部分の冷却速度は極めて高い値を示すが、この差は花粉の生存にとって、実用的貯蔵の場合あまり重要な意義をもたない。

加温はすべて +20~+30°C の微温湯内に直接浸漬して加温した。この温度を用いた時の加温速度は平均 6°C/sec.* である。また、この温度は一般に花粉の開葯飛散時の外気温より、やや高い温度であり、短時間であればこの温度下においても大きな影響はうけない。

1・2 花粉生存力の判定

処理花粉は各々に最適な組成をもつ Agar・Sucrose Medium の上にまき、24乃至96時間での発芽率をもって、その処理に対する生存率とした。この方法は花粉貯蔵の実用レベルでの検定法であり、凍結によってうける各種の凍結障害の程度を直接示すものではない。またカラマツなど人工発芽床^{**}上で発芽困難な種類は、一定の基準をもうけ、その条件を満足するものをもって生存と認定した。発芽床は通常3発芽床を用い、最も平均的な部分3視野をとり、約200~300粒について発芽率を調べた。なお処理別の生存率の差を検討する実験については、無処理区の発芽率に対する処理花粉の発芽率比をもって生存率とした場合が多い。(本論文各図では Survival と表示した)

2. マツ花粉の低温処理

1962年上賀茂試験地内で採集したクロマツ花粉を、53%, 35%, 32%の高含水率のまま、1°C/min. の速度をもって冷却したところ、第3表に示す結果をえた。すなわち、含水率53%花粉は -35°C まで生存するが -40°C 以下の冷却で凍結死する。32, 35%花粉でも -50°C で生存率は10%台に減じ -75°C ではすべて死にいたる。特に -50°C 処理花粉は発芽床上において発芽した花粉管も短かい、(表3)。この結果を、さらに無処理花粉に対する発芽率比で図示すると図9のごとくなる。すなわち花粉含水率と凍結致死温度の関係が明瞭である。

8°C/min. の速度(Rapid Cooling)で冷却処理をした場合でも、凍結致死温度と凍結死をもたらす含水率の間にみられる致死範囲は、1°C/min. の緩速冷却(Slow-Cooling)における致死範囲とはほぼ等しい。すなわち、クロマツ花粉の場合、この程度の冷却速度は花粉の凍結死にあまり重要な関係のない事を示している。(図9, 10)

また高含水率ほど高い温度で致命的傷害をうけるが、20%含水率花粉では -80°C まで冷却しても生存率は Control と大差ない。さらにこれらの花粉を 30°C/min. の最高冷却速度(直接冷却; 所定

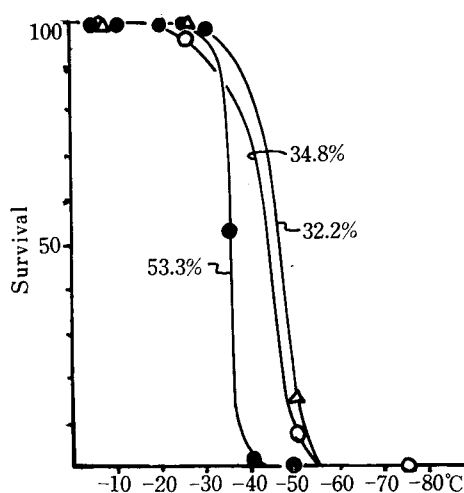
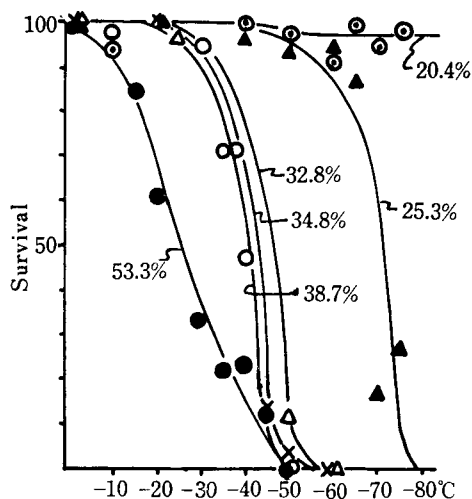
* 直線部分は 18°C/sec. であった。

** 凍結によってうける各種の障害については別稿で詳述する。

Table 3. Effect of slow speed cooling, and direct rewarming on germinability and pollen tube length of *Pinus thunbergii* pollen

on Agar, Sucrose Medium

Pollen	Temp.	after setting 24hr.		48hr.		72hr.		96hr.	
53.3% water content	Cont.	67.2%	47.0 μ	86.0%	125.6 μ	79.4%	161.4 μ	89.6%	171.8 μ
	-5°C	56.0	47.4	72.5	126.8	84.1	153.3	87.9	235.3
	-10°C	59.0	36.7	81.3	97.9	66.1	142.5	88.7	160.6
	-20°C	68.0	37.6	86.0	109.2	82.0	158.6	90.3	204.5
	-25°C	39.1	38.4	90.1	123.2	92.0	150.5	91.9	171.6
	-30°C	44.4	34.7	84.1	132.9	84.1	190.0	91.0	270.9
	-35°C	33.5	32.1	50.8	118.5	59.3	157.4	49.0	237.4
	-40°C	0.0	0.0	+	+	+	+	+	+
	-45°C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	-50°C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	-70°C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
32.2%	Cont.	22.7	24.1	72.4	78.1	82.0	91.7	**	**
	-25°C	55.7	37.1	87.8	121.7	89.0	131.1	86.4	200.8
	-50°C	0.0	0.0	13.1	30.8	13.7	33.4	15.9	33.4
	-75°C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
34.8%	Cont.	58.5	46.9	85.9	135.0	84.8	141.8	88.2	154.7
	-25°C	46.0	32.8	84.3	114.6	91.7	186.5	84.4	154.6
	-50°C	0.0	0.0	32.7	38.0	6.3	48.3	6.3	48.3
	-75°C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Fig. 9. Effect of slow cooling and direct rewarming on survival of *Pinus thunbergii* pollen.Fig. 10. Effect of rapid cooling and direct rewarming on survival of *Pinus thunbergii* pollen.

の温度に直接投入した場合の冷却速度, Direct Cooling)で冷却した場合, 前項の急速冷却で凍結死した各花粉は, 25%花粉をのぞき, すべて10分以内に凍結死している。したがって, 低含水率のクロマツ花粉の場合, 冷却速度はあまり重要な意味をもたず, 生存率は温度と含水率にのみ支配されると

いってよい。

しかし、25%の高い含水率花粉には冷却速度が大きく影響を与え、 -196°C 直接冷却では生存していることから、この程度の高含水率の場合には冷却速度が急速である事を必要とする。

さらに、数種のマツ花粉で冷却試験を試みた。*Pinus densiflora* (6, 26%), *P. pinasta* (7, 36%), *P. banksiana* (4, 31%), *P. thunbergii* (5, 30%), *P. taeda* (9, 27%), *P. rigida* (5, 27%), *P. massoniana* (7, 27%), *P. Luchuensis* (7, 27%), *P. koraiensis* (7, 28%) の各含水率花粉及び *Cedrus deodara* (6, 16, 27, 35, 50, 60%) 花粉を用いて急速冷却処理をほどこしたところ、図11のような結果をえた。即ち高含水率花粉では $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ で生存率は半減し、 -65°C 以下ですべての花粉は凍結死する。

また4～9%の低含水率花粉では $-55\sim-60^{\circ}\text{C}$ で一部生存率の減少をみる種類もあるが、多くは -70°C でも高い生存率を維持しうる。このように急速冷却による致死温度・含水率は、前項のクロマツ花粉の場合とほぼ同じ値を示した。またこの花粉を -196°C に直接冷却した場合、注目すべき結果は、表4に示したように、急速冷却では -70°C ですでに凍結死した花粉でも、一部に -196°C 下で生存する花粉がある。すなわち、*P. thunb.*, *P. masson.*, *P. Luchu.*, *P. korai.*, 等の高含水率花粉は、 -196°C に72時間おいてもなお、高い発芽率を維持している。この結果は、直接冷却による高い冷却速度 ($30^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) に由来する効果と考えられる。

ヒマラヤスギは日本で11月に開花(京都地方)する唯一の針葉樹である。即ち Dry-season に開花する習性を日本内地でも持ち続けている点は、花芽分化と温度の関係等興味深い種類である。この花粉を用いて急速冷却した結果、図12に示したようにマツ花粉と同様な結果をえた。およそ30%以上の含水率であれば、 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ で凍結死をまねき、27%程度以下の含水率であれば生存率に多少の減衰は見られるが凍結による死は招かない。

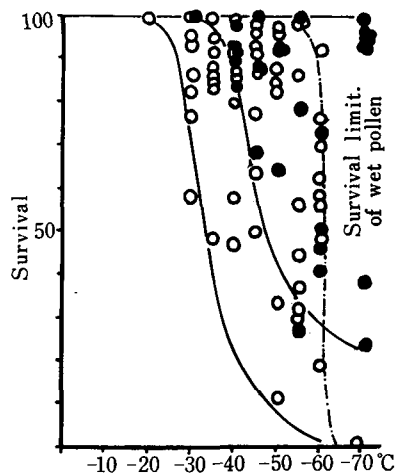


Fig. 11. Effect of rapid cooling and direct rewarming on survival of some kind of *Pinus* spp. Pollen.

○ wet pollen ● dry pollen

Table 4. Effect of direct cooling at -196°C on germinability of various water content of some kind of *pinus* spp. Pollen.

Pollen	Dry-pollen			Wet-pollen		
	5 min.	60min.	72hr.	5 min.	60min.	72hr.
<i>P. densiflora</i>	89.3	92.1	31.1	00.0	12.9	00.0
<i>P. pinasta</i>	96.1	91.0	80.6	00.0	00.0	00.0
<i>P. banksiana</i>	93.4	94.2	91.5	00.0	00.0	00.0
<i>P. thunbergii</i>	92.0	83.3	93.8	56.0	44.4	79.3
<i>P. taeda</i>	91.7	90.5	82.8	38.1	21.4	00.0
<i>P. rigida</i>	83.8	94.3	54.9	64.8	33.6	00.0
<i>P. massoniana</i>	91.0	51.8	±	85.2	16.7	37.9
<i>P. Luchuensis</i>	76.2	38.8	46.2	35.7	42.8	48.7
<i>P. Koraiensis</i>	86.2	57.3	61.0	00.0	22.5	42.5

以上を要約するとマツ型花粉 (Pinoid)^{* 21)} を緩速, 急速, 直接冷却の3速度により冷却処理をほどこした結果, クロマツでは -30°C 以下 -40°C で32%以上の含水率花粉は凍結死する。この場合, 冷却速度によって生存率に差は生じないが, 比較的高い27%含水率花粉などでは, 直接冷却で -196°C 下でも生存しうる。すなわち冷却速度は高い含水量の場合の冷却時に影響を与えられと考える。また30%クロマツ花粉の凍結死をまねく温度は $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ であり, またこの30%が, 凍結死をひきおこす含水率といえる。ヒマラヤスギ花粉も, ほぼ同様と考えてよい。クロマツでは凍結死をまねく含水率付近の花粉を冷却処理したのち発芽床に置いたとき, 極めて短小な花粉管の形成をみるに止まったが (表3) この様な状態は後述する他の樹種にも見られ, 凍結による生理的機能障害をうけたものと考えられる。この障害は稿を改めて詳述する。なお低含水率処理花粉のすべては, Control に比し形態的にも異常のない発芽を示している。(写真1参照)

なお, 凍結死と含水量との間に見られる関係に用いる語を, 以下の本論文では下記のように統一して用いることにする。ある含水率のとき, 凍結をひきおこさない最低の温度を凍結限界温度とよび, また凍結死を招かない最高の含水率を凍結限界含水率 (量) と称した。

3. スギ型 (Taxoid)²¹⁾ 花粉の低温処理

スギ花粉は Pinoid と異なった壁構造をもち, 発芽形態も全く異なる。^{21, 22)} この種類の花粉は Intine が吸水膨化し, その膨圧によって壁最外層の Exine から花粉粒が脱出し, のち発芽する。Intine の膨潤時の厚さは Taxoid に属する花粉, *Cunninghamia*, *Thuja*, *Juniperus* など種類によって異なり, スギでは花粉粒径の約2倍, *Larix* は約1.5倍程度である。また Exine の脱皮は物理的・機械的な現象であって, 花粉の生死に直接的関係をもたず, 水分吸収のみによってひきおこされ, また吸水時の温度に影響をうける。 $+10^{\circ}\text{C}$ 以上であれば, スギ花粉で5~10分間で脱皮するが, 0°C に近い場合はほとんど脱皮しない。

表面は Verrucate 構造を示し, マツの Tegulate 構造^{20, 21)} に比較して吸脱水が容易であり, したがって脱水による死は, マツに比較して早く, 3%の含水量の場合, 2週間で死にいたる。

実験に用いた試料は演習林本部試験地, 芦生演習林, 上賀茂試験地, 京都ゴルフ場及び北山中川町にある北山林業地内から雄花を採取し, 実験室内で1日後, 自然開約したものから採取した。供試花粉は水, デシケータで加湿し, 18, 22, 27, 43, 72%の5段階の含水量に調整した。72%花粉は $+4^{\circ}\text{C}$ 下で約24時間, 滅菌水を吸収させ, 外部に付

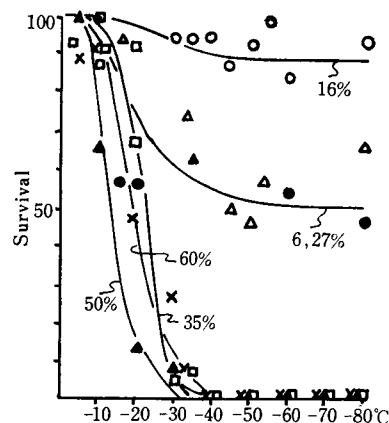


Fig. 12. Effect of rapid colling and direct rewarming on survival of *Cedrus* pollen.

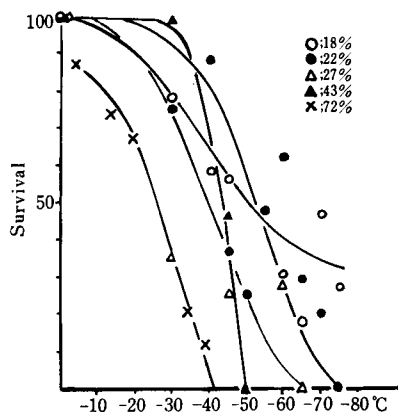


Fig. 13. Effect of rapid cooling and direct rewarming on survival of *Cryptomeria japonica* pollen.

* Pinoid type はマツ, ヒマラヤスギに見られる有囊花粉の発芽型を示す語である。凍結傷害の識別には発芽前期の形状が参考となる点が多いのでこの分類名称を使用した。²¹⁾

着した水を濾紙でとり去ったものであり、72%の含水率で平衡した。これらの花粉を急速冷却した結果は図13に示した。

スギ花粉では20%以下の含水率であれば、超低温下の生存が可能である。また22, 27%花粉では -50°C 前後から生存率が半減し、各々 -65 , -75°C ですべて凍結死する。また27%以上の高含水率花粉の凍結限界温度は $-40 \sim -50^{\circ}\text{C}$ であり、 -30°C まではあまり生存率の低下をもたらさないことから、この含水率に対する凍結限界温度は、 $-35 \sim -45^{\circ}\text{C}$ 程度と考えられる。

さらに、急速冷却では -75°C で凍結死した22%含水率の花粉を、 -80°C に直接冷却した結果、表5に示すように生存率に多少のバラツキはみられるが、直接冷却によれば -80°C でも凍結死せず、24時間経過しても致命的害はうけなかった。このことは、前項のクロマツ花粉の場合と同様、 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$.の冷却速度が大ききとはたらいっているものと考えられる。

またこの処理によって、スギ花粉の中に気泡 (Air bubble) が発生する場合がある。比較的高含水量の花粉にみられる現象であるが、発芽に影響は及ぼさない。この気泡については、別稿の凍結障害の項で詳述したい。

Table 5. Effect of direct cooling on germinability of *Cryptomeria japonica* pollen (Water cont. 22.0%)

Immersed in -80°C	30sec.	1 min.	3	5	10	15	20 min.	30 min.	1 hr.	2 hr	5 hr	24hr
Germinability (%)	79.0	46.4	63.3	80.2	75.7	71.0	52.1	43.5	78.5	80.4	55.4	62.1

Taxoid に属するコノテガシワ (*Thuja orientalis*) 及び、ネズミサシ (*Juniperus rigida*) について、急速冷却した結果もまた、スギ花粉と同様の成績をえた。

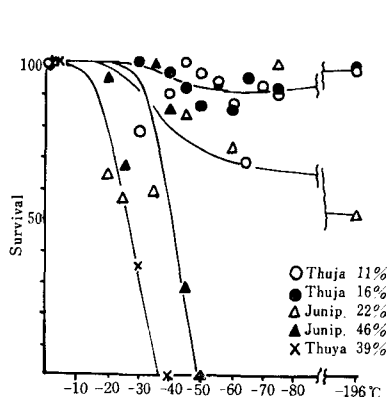


Fig. 14. Effect of rapid cooling and direct rewarming on survival of *Thuja orientalis* and *Juniperus rigida* pollen.

22%の *Juniperus* 花粉では、 -20°C で生存率が半減したが、 -196°C 10分間の直接冷却でも、生存率は同じ程度を維持している。(図14) また39, 46%の高含水率花粉では $-40 \sim -50^{\circ}\text{C}$ で凍結死することがわかる。これらの結果から、凍結限界温度、凍結限界含水率とも、スギ花粉に極めて近い値をとるといえる。

カラマツ花粉の凍結限界含水率が、スギにくらべて高い(図15)のは、カラマツ花粉の生存の規定が、発芽でなく Pregermination (前発芽) 状態である³²⁾ということに関係する。即ちカラマツの花粉管は人工発芽床で形成しにくく、便宜的に長楕円球化し、かつ澱粉が内部に形成されることをもつて Pregermination とし、この状態を示す花粉を生存と規定したことによ

* 形態的に正常かつ楕円球化した Pregermination 状態と、実際に管を出すものとの間にある関係はまだ不明である。また、この規定にもとづく「生存率」と実際の花粉稔性の関連についてもいまのところわからない。

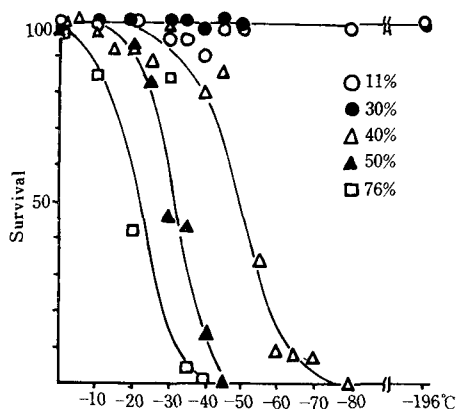


Fig. 15. Effect of rapid cooling and direct rewarming on survival of *Lalix leptolepis* pollen.

る。

以上のべたことから生存率の激減する温度は、花粉の含水率、すなわち花粉粒内にある自由水の量と密接な関係をもち、この温度帯で花粉粒内の水が凍結し、花粉に致命的な損傷を与えることがわかる。温度と含水率の関係については後章で詳述する。

4. Pinoid 花粉の加温処理について

花粉の冷却過程の中で花粉内部の水を、凍結限界含水率以下に調節すれば冷却速度はあまり重要な要因とは考えられないことは前章でのべた。しかし超低温下においた花粉の加温過程でも冷却時と同様に氷晶生成の危険性が存在する。したがって加温過程でもある速度を必要とする。実験的に加温速度を自由に得ることはむずかしいため、直接加温 (Direct-rewarming. 平均速度 $5.6^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. 最高速度 $18^{\circ}\text{C}/\text{sec}$.), 及びデュ

ワー瓶を自然に放置した状態で加温する緩速加温 ($1^{\circ}\text{C}/27 \sim 33$ 分) の方法によった。

数種のマツ型花粉を用いて実験を行なったところ、次に示す図のように、生存率の変化にいくつかのパターンのあることがわかった。

実験は図16中に示す含水率をもった花粉を用い、次の方法で冷却・加温処理をほどこした。

a; 急速冷却により各温度まで冷却した後、直接加温したもの。(図16. の○印)

b; 直接冷却によって所定の温度まで冷却し、のち緩速で加温したもの。(加温速度 $1^{\circ}\text{C}/30\text{min.}$, 図16. ●印)

c; -80°C まで直接冷却し、3時間低温処理したのち、所定の温度 (図16. 横軸の Plot の位置) まで直接加温、その温度から緩速加温したもの (図16. ×印) である。実験の結果は、図16の各図に、処理の差を比較検討するため、まとめて記入した。

P. luchu. (27%), *P. korai.* (28%), *P. masson.* (27%), *Cedrus* (22%) の花粉では、急速冷却・直接加温 (実験a) による生存率の減衰曲線と、緩速加温 (実験B) による生存率の減衰とはほぼ同様の値とパターンを示している。すなわち、この4種は冷却、加温の速度が生存にほとんど影響を与えないと考えてよい。しかし、*P. banks.* (31%), *P. thunb.* (30%), *P. taeda.* (27%), *P. rigida* (27%), *P. dens.* (26%) 花粉では急速冷却・直接加温した場合と、直接冷却・緩速加温の場合とでは生存の限界温度に大きな差があり、緩速加温をすると急速冷却による限界温度より高い温度で致命的害をうけている。つまり急速冷却では -45°C 以下 -60°C で生存可能な花粉でも -45°C , -50°C , -70°C から緩速加温した場合、致命的害をうける事を意味している。

緩速 ($1^{\circ}\text{C}/30$ 分) で加温した場合に凍結死するのは -40°C 前後の温度帯を緩速で通過したことによる加温中の凍結傷害であり、この温度帯が細胞内凍結をひきおこす温度帯と考えられる。なおこの温度帯は急速冷却の凍結限界温度とほぼ一致する。

また *P. korai* (28%), *P. masson.* (27%), *P. Luchu.* (27%) 及び *Cedrus* (22%) 花粉を直接冷却し所定の温度から緩速加温する処理(c)をほどこしてもなお生存率が高いのは、それらの花粉のもつ含水量が凍結限界以下であることに他ならず、*P. thunb.* 花粉の限界含水率より、や高い値であった。

また加温過程を緩速にしたために影響をうけた顕著な例は図17に示した各含水量のヒマラヤスギの例である。処理は直接冷却で $-80^{\circ}\text{C}/3$ 時間処理ののち、図の各温度まで直接加温、その後、緩速加

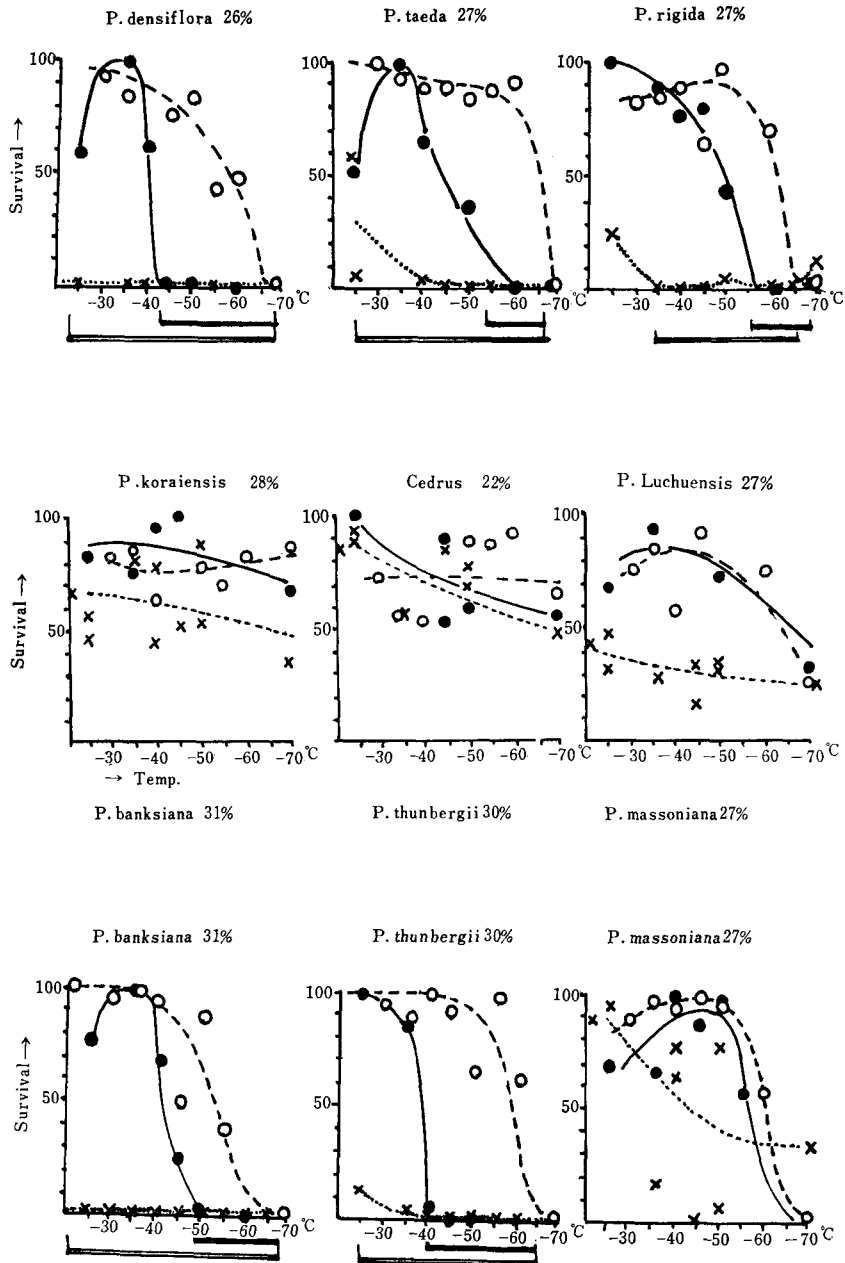


Fig. 16. Effect of various rewarming rate and rewarming temperature on survival of some kind of pinoid pollen.

温したものである。16, 22%花粉はすべての処理で高い生存率を示し、35%以上の花粉はすべての処理で凍結死している。27%含水率は、ヒマラヤスギの限界含水率に近い水分量であり、この花粉の生存の動向は示唆にとんでいる。即ち-30, -35°Cからの緩加温では凍結死し、-20, -25°Cからの緩加温は、わずかだが生存花粉のある事を示している。このことから27%程度の水分量に対して-25~-30°Cの温度帯が最大氷晶生成帯であるということがわかる。

5. 冷却・加温のくり返しに対する抵抗性

花粉の超低温貯蔵の実用的レベルでは、冷却・加温の繰返

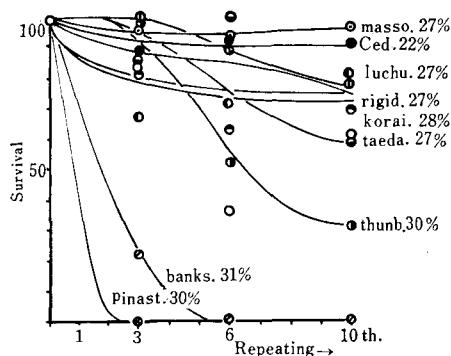


Fig. 18. Effect of repeated directcooling and directrewarming on germinability of various water contents of some kind of *Pinus* spp. pollen.

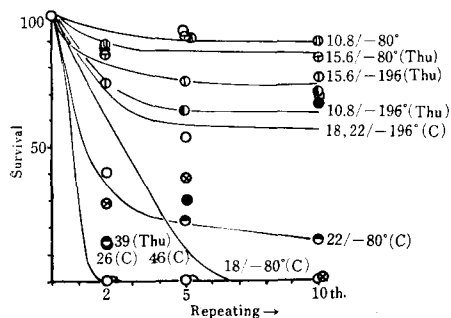


Fig. 19. Effect of repeated directcooling and directrewarming on germinability of various water contents of Taxoid pollens. (Thu); *Thuja orientalis* (C); *Cryptomeria japonica*

しがその操作

の中で必要と

なる事がある。

そこで冷却加温の繰返しが花粉へ与える影響を調査した。

供試花粉は前節の加温実験に用いた花粉である。実験はすべて直接冷却で-80°C 10分間処理し、直接加温で+20°C 10分間の繰返し処理をしたものである。この冷却・加温繰返し試験の結果をまとめると図 18, 19のごとくなる。*P. pinasta* 30%, *P. banks.* 31%花粉は急速冷却で-70°C 処理の結果、すでに凍結死する花粉であるが、3回の繰返しで *P. banks* は生存率が激減し、*P. pinasta* と共にそれ以上の繰返しには耐えられない。しかし他の花粉は6回の繰返しで生存率は減ずるが、繰返し10回処理でもなお高い生存率を保っていた。このうち *Cedrus* 22%, *P. Luchu.* 27%, *P. korai.* 28%以外は急速冷却-80°C 処理で凍結死した花粉であるにもかかわらず直接冷却・直接加温の繰返しに耐えうることを示している。即ち凍結限界含水率付近の花粉の冷却では、その速度が、かなり強く生存を支配することを意味し、また凍結限界温度も冷却や加温の速度によって多少の差のあることを示唆している。

スギ・コノテガシワの花粉を使って同様の試験を行なったところ図 19に示す結果をえた。コノテガシワ 10.8%, 15.6% 花粉は10回-80°C~+30°C 及び-196°C~+30°C の繰返し処理したところ。高い生存率を維持した。この花粉は凍結限界含水率を大巾に下廻っている花粉である。スギ 22%花粉は-80°C 急速冷却で凍結死した花粉であるが、この試験では10回の繰返しに耐えている。これは前項でのべた各種マツ花粉と同様、直接冷却、直接加温という速い速度が与

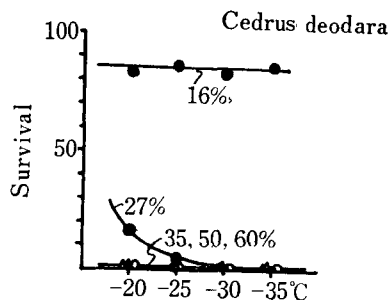


Fig. 17. Effect of various water content on survival rate When rewarm slowly from various below zero temperature of *cedrus* pollen.

えられれば生存可能であることを示している。しかし、さらに高含水率のスギ花粉では1回の冷却ですでに凍死した。

6. 針葉樹花粉低温処理の小括

Pinoid, Taxoid 花粉の緩速冷却 ($1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) 急速冷却 ($8^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) では花粉の生存にあまり影響を与えない。しかし凍結限界含水率に近い水分量の花粉では直接冷却 ($7^{\circ}\text{C}/\text{sec.}$) の速度を与えれば凍結致死をまぬがれることがある。したがって花粉の冷却で速度が重要な影響を及ぼすのは急速冷却による凍結限界含水率付近の花粉である。

花粉の生死に最も大きく関与するものは花粉固有の含水量による。花粉内部の自由水が氷晶を形成し、細胞破壊をもたらすものであり、この結果、花粉は直ちに凍結死する。ある含水量の花粉が凍結死する直前の温度を凍結限界温度と称し、どの温度でも生存しうる最大含水量を凍結限界含水率と称する。この温度と含水量は樹種によって多少の差がある。またこの凍結限度温度は、冷却の速度によって多少の差がある (図 16, 18, 19)。

加温過程における温度変化の速度は重要な意義がある。すなわち直接加温 ($5.6^{\circ}\text{C}/\text{sec.}$) と緩速加温 ($1^{\circ}\text{C}/30\text{min.}$) では生存率に大きな差をもつ。30% 程度のマツ花粉では -60°C から急速加温すれば死を招かないが、 $-40^{\circ}\text{C} \sim -55^{\circ}\text{C}$ 以下から緩速加温すると致命的害を被む。これは $-40^{\circ}\text{C} \sim -55^{\circ}\text{C}$ から緩速で通過することによる加温中の害であって、この温度帯を急速 (直接加温) に通過する場合 (図 16) は凍結死をひきおこさないことが多い。したがって $-40^{\circ}\text{C} \sim -45^{\circ}\text{C}$ 以下及び -70°C までの温度帯にこの含水率花粉を長く停留させておくことは細胞内凍結を誘起することになる。

7. 広葉樹花粉における低温処理

広葉樹花粉を低温処理する場合、大別して風媒と虫媒とに分けられる。虫媒花粉と風媒花粉では機構上も差があり、通常の含水率も風媒の方がやや低い。

風媒花粉は *Quercus dentata* カシワ (12, 34%), *Q. serata* コナラ (10%), *Alnus Sieboldiana* オオバヤシバシ (69%), *Platycarya strobilacea* ノグルミ (16%), *Betula platyphylla* シラカバ (15%) 花粉の急速冷却処理について、図20の結果をえた。この花粉の場合も針葉樹と同様、含水量が花粉の生死を支配する。しかし *Quercus*, *Betula* の 10~15% 低含水率花粉が -60°C 前後から生存率の急減をみるのは、花粉の構造 (発芽孔 3~5) に関係があると思われる。しかし高含水率花

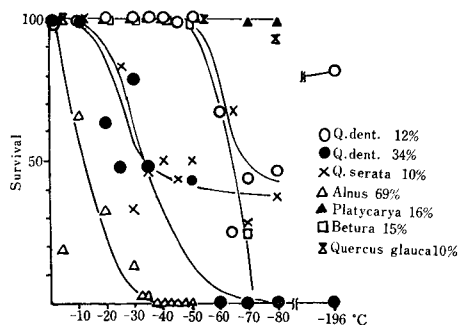


Fig. 20. Effect of rapidcooling on survival of ANEMOPHILY pollen.

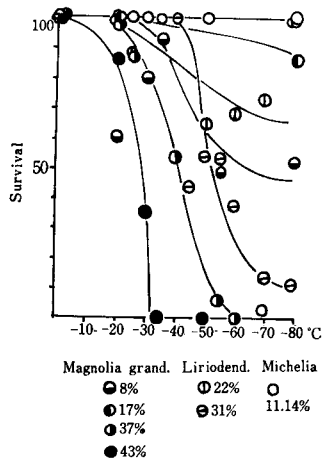


Fig. 21. Effect of rapidcooling on survival of Magnoliaceae pollen.

粉の限界温度は針葉樹とほぼ同様であった。

虫媒花粉は表面構造も疣状を呈するものも多く、風媒花粉と構造上異なる点も多い。これらの点は虫媒花粉の送粉時間が短かく、したがって失水を防ぐための機構が発達していないと考えられる。*Magnolia grandiflora* タイザンボク (8, 17, 34, 43%) 及び *Liriodendron Tulipifera* ユリノキ (22, 31%), *Michelia fuscata* トウオガタマ (11, 14%) の急速冷却の結果は図 21 のようである。凍結限界温度は針葉樹花粉にみられる温度よりひくく、 -80°C でも生存しうる含水率は、風媒広葉樹にくらべて高い。この結果に対して *Magnolia* 花粉が長口粒であり、Intine 肥厚部が大という構造上の特徴からの説明はむづかしい。*Liriodendron* 31% -80°C 処理花粉の生存についても同様である。しかし *Magnoliaceae* 花粉は澱粉をもたない。したがって細胞液中は、糖、^{40~45)} アミノ酸等がある。この糖が耐凍性を保持する原因であるとする、酒井らの耐凍性の増大機構と一致することになる。今後花粉のもつ凍結に対する特性の研究を進めねばならない。

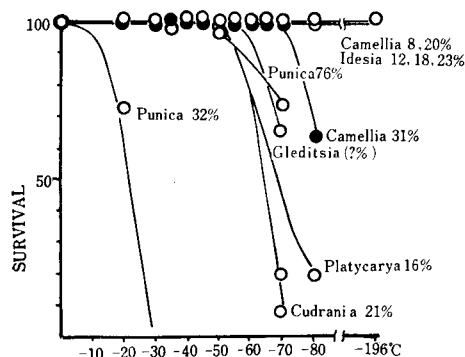


Fig. 22. Effect of rapid cooling on survival of ENTOMOPHILY pollen.

同様の実験を虫媒花粉で行なったところ、図22に示す結果をうる。最も特異的なものは *Idesia*, *Camellia* の花粉である。この2種はかなりの高含水量（サザンカ 31%）であるにもかかわらず超低温で高い生存率をもっている。この種類の花粉は澱粉形成をみず、壁層や細胞質に脂質をもつ。このような状態が凍結耐性を高めていると考えられるデーターはまだえられていないが、同様の形態的構造をもつ *Quercus* 等の風媒花粉に見られない凍結耐性を示していることは注目すべき点である。他の虫媒花粉の凍結限界含水率、温度は、他の樹種とほぼ同様と考えてよい。なお虫媒花粉は実験に充分な花粉量がえられないため、今後さらに研究を重ねたい。

8. 本章小括

1. 花粉を Dry-Ice, Et-OH でえられる最高速度、すなわち $8^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ で冷却したとき、花粉の含水量と凍結の温度によって、生存・凍結死の範囲が決定され、その閾値は針葉樹・広葉樹及び、花粉の含有する物質（糖、油質、澱粉）などの別によって差がみとめられる（図 30）。

2. 一般に $8^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ 程度の冷却速度の差はあまり花粉の生存に重要ではないが、高含水量の場合は直接冷却法（ $1\sim 7^{\circ}\text{C}/\text{sec.}$, 1cc アンプル花粉 1/2 容のとき）の方が生存率は高い。（図 11, 12, 18, 19）

3. 加温は急速加温がよく、 $+20^{\circ}\text{C}$ 微温湯に直接投入することにより、最高 $18^{\circ}\text{C}/\text{sec.}$ 平均 $6^{\circ}\text{C}/\text{sec.}$ の速度がえられる。実用的に 1cc ガラスアンプルを用いた場合はこの方法がよい。また、非常に緩慢な速度（ $1^{\circ}\text{C}/30\text{min.}$ ）では加温過程で致命的害を被む。高含水率花粉が $-35^{\circ}\text{C}\sim -45^{\circ}\text{C}$ の温度帯を緩速で通過すると、多くの場合、凍結死する（図 16）。したがって、この温度帯の通過速度が、凍結傷害をひきおこすか否かを支配するといえる。

4. 広葉樹花粉の低温処理では、風媒花粉と虫媒花粉によって凍結限界温度や凍結限界含水率に差がみられる。すなわち風媒花粉は、針葉樹花粉ににるが、虫媒花粉の場合は、かなり高含水率でも、生存可能なものがある。これは花粉細胞質中の糖濃度や油質などに由来するものと考えられるが、まだこれを支持しうる明らかなデーターはえられていない。

第Ⅲ章 花粉の含水量と凍結耐性

1. 花粉内部の水

花粉の中に存在する水は細胞質中にある自由水と、主に蛋白質分子と結合した結合水に大別できる。

0°C 以下又は超低温における水は、すでにのべた+温度領域にみられる生活代謝としての意味はほとんどなく、生理的な意味として水の関与する部分は酵素活性にのみ限られると考えてよい。一般に植物組織中に存在する酵素は -20°C でも活性があるが、酵母のある種³⁰⁾のものは -37°C で失活し、多くの種類の菌はこの温度域で生活代謝が消費する。したがって生物的零度 (Biological-Zero) は -20°C ~ -30°C と考えるのが適当である。

また物理的な問題は氷晶生成として提起される。加藤³⁰⁾らは生物体の組織では結合水の氷晶析出によって蛋白質分子の結合が物理的に離れ、アミノ酸が大きな分子と結合するという、即ち蛋白変性の機序についてのべているが、花粉における蛋白変性に関するデータは未だない。花粉粒内における氷晶の生成は物理的に花粉粒の破壊をもたらし凍結死を与える。超低温下における花粉の生存は、この氷晶生成に関与する自由水量に支配される。本論文中の各実験に用いた花粉の水分量の範囲は6表の通りである。一般に針葉樹花粉の含

Table 6. Water content of some kind of pollen

Pollen	Dried	Ordinary	Wet	Maxim.
<i>Pinus thunbergii.</i>	5-12%	17-20%	26-53%	72 %
<i>Pinus spp.</i>	5-13	15-18	22-30	72
<i>Cedru deodara</i>	4-10	15-19	22-54	68
<i>Tsuga diversifolia.</i>		15		
<i>Keteleria davidiana</i>		13		
<i>Cryptomeria japonica</i>	4-10	11-18	26-39	72
<i>Lalix reptolepis.</i>	5	16-22	24-30	76
<i>Thuja orientalis.</i>	11	16	22-39	
<i>Taxus cuspidata.</i>		19		
<i>Torreya nucifera.</i>		19		
<i>Juniperus rigida</i>		22		
<i>Cunninghamia</i>		14		
<i>Lanceolata.</i>				
<i>Ginkgo biloba.</i>	18	23	32-33	
<i>Alnus japonica</i>	10	15-17	24-55	71
<i>A. sieboldiana</i>		20-22	28	
<i>Betula platyphylla.</i>	7	15	33	
<i>Quercus serata</i>	9	22	34-49	
<i>Q. variabilis.</i>		22	34	
<i>Q. glauca</i>		29		
<i>Corylus sp.</i>		14		
<i>Fraxinus sp.</i>		14		
<i>Platycarya strobilacea.</i>		16		
<i>Idesia polycarpa.</i>	12	17-22	23	
<i>Camellia sazanka</i>	9-13	21	32	72
<i>Cudrania tricuspidata</i>		21-25		
<i>Stewartia monadelph.</i>		19		
<i>Sapium sebiferum</i>	16	23		
<i>Magnolia grandiflora.</i>	8	17-26	37-46	
<i>Liriodendron Tulipifera.</i>		22-24	31	
<i>Michelia fuscata.</i>	13	16	31	
<i>Punica granatum</i>	16	18	52	
<i>Juglans sp.</i>		22		
<i>Datura sp.</i>		21		
<i>Zea mays, Oriza sativa</i>		≒60-70		

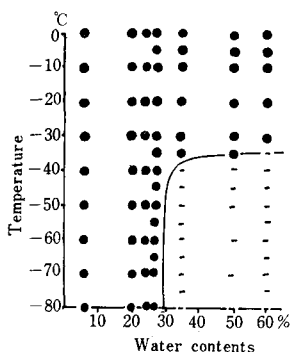


Fig. 23. Diagram shows survival zone (●) and injured zone (—) after rapidcooled and directrewarmed in various temperature at various water content of *Pinus* pollen.

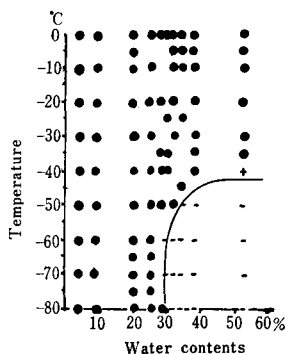


Fig. 24. Diagram shows survival zone (●) and injured zone (—) after rapidcooled and directrewarmed in various temperature at various water content of *Cedrus* pollen.

ることになる。*Cedrus* 花粉の場合の限界含水率は28%であり、限界温度も -40°C である(図24)。

Pinoid は2個の気嚢にはさまれた部分に Intine 肥厚があり、水をよく含むうる。そのため花粉の水分条件によって気嚢間の距離に変化をもたらし、また種類によってこの部分の距りも異なる。Pinoid における凍結限界に多少の差のあることは、この部分の大小に関係があるものと考えられる。

Taxoid の凍結致死範囲は前章でのべたように、4種のあいだでかなりの差がみとめられる。この理由は Taxoid もまた Intine の厚さが種類によって大きく異なるので、この形態的な差が凍結限界に差を生ぜしめる原因と考えられる。スギの限界含水率は23%で *Juniperus* とほぼ同じであるが、カラマツは30%と特異的に高い。(図25, 26) 凍結限界温度はカラマツの -35°C 、その他で -40°C ~ -45°C である。

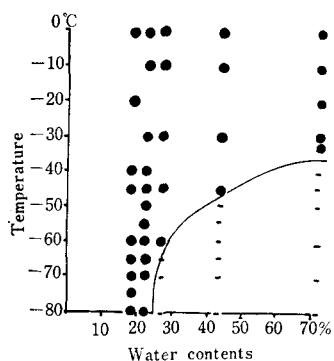


Fig. 25. Diagram shows survival zone (●) and injured zone (—) after rapidcooled and directrewarmed in various temperature at various water content of *Cryptomeria* pollen.

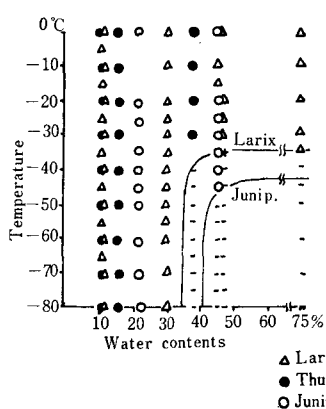


Fig. 26. Diagram shows survival zone (●) and injured zone (—) after rapidcooled and directrewarmed in various temperature at various water content of *Larix Thuja Juniperus* pollens.

水率は低く、広葉樹でも風媒・虫媒花粉で差がみられる。また多くの花粉の飽水状態含水率は68~76%ではほぼ平衡に達する。

2. 針葉樹花粉の

凍結致死範囲

Pinaceae 6種の平均的な凍結限界含水率は30%であり、これより高い含水量の花粉の凍結限界は -40°C と考えてよい。図23で与えられたデータは急速冷却の場合である。したがって超低温貯蔵の実用的術式では、ほぼ25%以下に乾燥し、急速冷却をほどこせば凍結死は回避しう

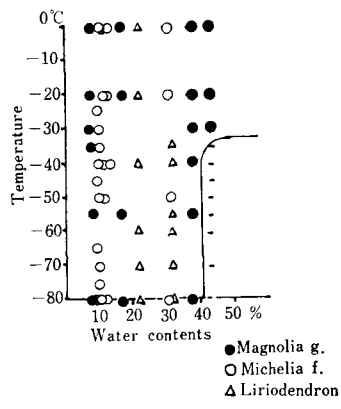


Fig. 27. Diagram shows survival zone (●) and injured zone (—) after rapidcooled and directrewarmed in various temperature at various water content of *Magnoliaceae* pollens.

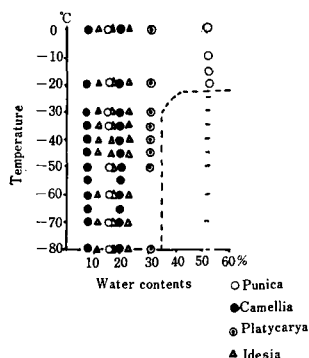


Fig. 28. Diagram shows survival zone (●) and injured zone (○) after rapid cooled and direct warmed in various temperature at various water content of ENTOMOPHILY pollen.

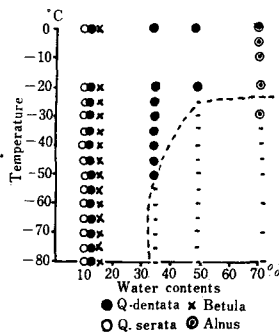


Fig. 29. Diagram shows survival zone (●) and injured zone (○) after rapid cooled and direct warmed in various temperature at various water content of ANEMOPHILY pollen.

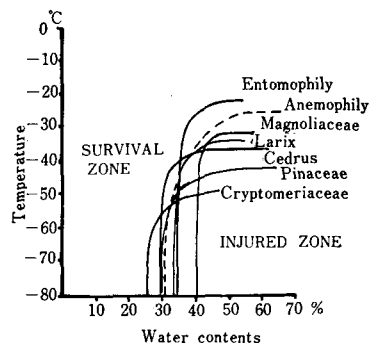


Fig. 30. Diagram shows survival and injured zone after rapid cooling treatment on various pollens.

3. 広葉樹花粉の凍結致死範囲

Magnoliaceae の凍結致死範囲は図27に示すごとく、限界含水率が

38%以上であって、*Thuja*と同様特異的に高い。しかし限界温度は40%花粉の場合 -31°C 以下であって針葉樹花粉に比較してやや高い程度であった。*Camellia*, *Punica*等4種の虫媒花粉の場合の凍結限界温度はさらに高く、 -22°C 以下(50%花粉の場合)であり、限界含水率は35%で *Magnolia*よりやや低い値である。図28に4種の虫媒花粉の致死範囲を示した。一般的な凍結致死範囲として、*Punica*の限界温度は52%花粉の場合で -20°C 以下であり、限界含水率は35%程度と考えられる。また風媒花粉4種の凍結致死範囲を図29に示した。32% *Quercus*花粉の凍結限界温度は -50°C 以下であり、さらに含水率が高くなると -25°C 程度となる。この *Fagaceae*, *Betulaceae*などの花粉の凍結致死範囲は、図28の虫媒花粉の範囲と大きな差はないようであった。

4. 本章小括

各樹種の花粉の超低温処理における凍結致死範囲を比較すると図30に示すようになる。実験に用いた25種の花粉の凍結限界含水率は25%から40%まであり15%のはばがある。凍結致死温度は虫媒の -20°C から、スギの -48°C 程度までかなりの巾があることが認められた。

一般に致死温度は針葉樹花粉が低く、限界含水率も広葉樹花粉に比して低い。この差は、膜・壁構造の差や Channel の到達深度及び密度等のちがい花粉の水分条件を支配し、その結果、細胞液浸透価、濃度の増加等による氷点降下や Vitrifaction を誘起し氷晶の生成を回避しようものと考えられる。また一般的には花粉含水率20%以下であれば多くの花粉粒内に氷晶の生成はみない、つまり氷晶を作るべき自由水が存在しないことを意味し、超低温下でも生存しうることを意味する。したがってこの含水率調節が、花粉の超低温貯蔵における重要な条件となる。

純水の Freezing-point は加藤らによれば直径が小さくなるほど低温になり、直径 10μ 程度で過冷却しうる温度限界は -41.5°C という。しかし花粉の細胞液は Heterogeneous nucleation と考えられるので Freezing-point は純水より高いはずであるし、また花粉外径が 10μ 以下のものは極めて少ないので Freezing-point はさらに高いものと考えてよい。この氷結晶を生成する温度帯、すなわち凍結限界温度に接する低位の温度帯を最大氷晶生成帯 (Zone of Maximum ice crystal formation) と加藤らは名づけている。加藤らによれば、生鮮な植物性食品の最大氷晶生成帯は、ほぼ -25°C と

のべているが、この温度以下であれば細胞内の自由水は過冷却の状態にあると考えられる。花粉細胞質中の溶質は糖、澱粉、油質、アミノ酸など多様であり蛋白質量も多い。したがって溶液の分子濃度も高い。さらに樹種によっても差異が大きく、Freezing point も一様とは考えられない。図30に示した凍結致死範囲が樹種によって差のあるのもこの点に関与していると考えられる。したがって図30の凍結致死範囲を示す曲線は、その花粉における最大氷晶生成温度の上限を示したものであるといえる。なお図30に示した曲線は、さらに厳密な実験によって直線で区劃された凍結致死範囲のパターンを示すものと予測できる。

第Ⅳ章 花粉の予備凍結効果

植物皮層柔組織の凍結過程の中において、ある低温に一定時間以上さらした場合、その後、 -196°C の中においても細胞内凍結を誘起させず、凍結傷害をもたらさないことは酒井らの多くの業績に示されている。この様に通常凍結死すべき細胞が、凍結による障害を回避しうるような前処理を予備凍結(Prefreezing)といい、その最も効果的な温度を効果的予備凍結温度と称している。酒井はこの温度を「細胞内の凍りうる水が脱水されるときの温度」と規定している。この予備凍結は牛精子、ヒトの赤血球の超低温長期貯蔵の場合、特にグリセロール平衡とよばれる。植物組織における予備凍結の作用機作は、耐凍性物質、多糖類の増加であり、花房らは「生体高分子の活性低下、又は失活による変性に対する保護剤として糖、多価アルコールがある」とのべ、永瀬らも牛精子の凍害防止効果物質として糖、エチレングリコール、グリセリン等をあげている。これらの耐凍性物質の作用効果が、花粉の予備凍結効果の作用機作にどのような関連があるかはまだ不明である。

花粉で実用上、予備凍結しなければならない状態はほとんどない。しかし飽水状態の花粉を用いて予備凍結を行なった結果、 -196°C 処理をしても高い生存率を維持し障害の発生も起きないという結果をえた。供試花粉は前述した方法で吸水させ水分平衡した約70%含水率花粉を用いた。アンプルに封入した花粉はデューワー瓶を用い、Et-OH, Dry-Ice によって所定の温度を維持させた低温槽の中に直接投入し、所定の時間予備凍結を行なった。さらに予備凍結後、直接冷却によって -80°C 又は -196°C に浸漬し、一定時間凍結処理後、直接加温し、直ちに発芽床に移して障害の程度、発芽率等を調査した。なお発芽率は、第Ⅱ章の冷却処理に較べてかなり低いため、Control の発芽率を100としたときの指数をもって生存率とし、図示することにした。

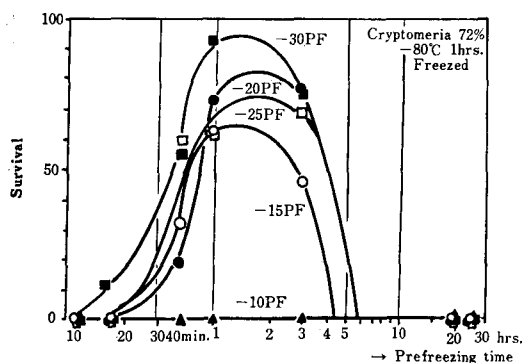


Fig. 31. Effect of prefreezing temperature to various prefreezing time of *Cryptomeria japonica* pollen.

1. Taxoid 高含水率花粉の予備凍結効果

スギ 72%花粉の予備凍結の効果は図31, 32, に示した。スギでは -30°C での予備凍結の結果、生存率は最も高く、Control とほぼ同じ発芽率を示す。また予備凍結効果はその温度が高いほど減少し、 $-10^{\circ}\text{C} \cdot \text{PF}$ (-10°C で予備凍結したことを示す、以下同じ) では全く予備凍結の効果は示さない。図31における実験での効果的予備凍結の時間は1~4時間であり、20, 30時間に及ぶと効果が認められなくなる。しかし、 -196°C 凍結処理をした場合(図32)の予備凍結時間は、30時間が最も効果的である実験結果

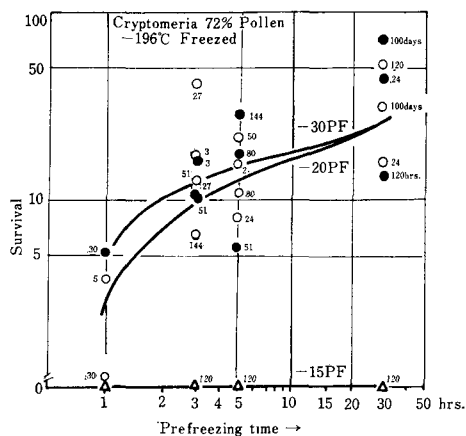


Fig. 32. Effect of prefreezing temperature to various prefreezing time of *Cryptomeria japonica* pollen.

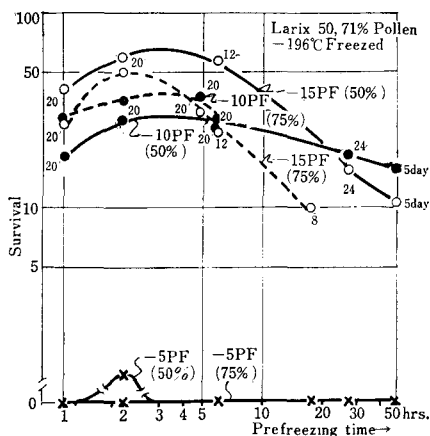


Fig. 33. Effect of prefreezing temperature to various prefreezing time of *Larix leptorepis* pollen.

をえた。この2つの実験結果の差についてその理由はわからない点が多いが、いずれも1時間以下で予備凍結の効果はえられない。予備凍結効果は、現在までのところ、 -196°C で100日間の凍結処理をした花粉で高く維持されている。また、 $-30^{\circ}\text{C} \cdot \text{PF}$ 区は正常な花粉管の伸長と高い発芽率を示している(写真2, 3参照)。この条件下では予備凍結によって得た凍結耐性は予備凍結時間にはあまり関係しないものと考えられる。カラマツ花粉の予備凍結温度はスギに比較して高く、 -10°C 、 -15°C が適当と考えられる。(図33)この理由は図15に示した急速冷却の限界温度に対応する。さらに50% 70%という含水量の差も予備凍結効果にわずかに関係があるものと思われる。即ち50%区はいずれも70%区に較べて生存率も高く、最高5日間の凍結処理でも10%以上の生存率を維持した。 $-5^{\circ}\text{C} \cdot \text{PF}$ ではわずかにNormalな形を示すものもみられたが予備凍結効果は全くないと考えてよい。

2. スギ花粉の予備凍結における凍結傷害

一般に飽水状態花粉の発芽率は新鮮花粉に比較するとかなり低く平均41.3%である。また置床後もExineと花粉実質の間に間隙を生ずる傷害型を示すものは全体の約16%に及ぶ。これは過度の吸水によってIntine膨潤がおこり、かつExineからの脱皮を伴わないまま長時間おかれたときに発芽能力を失なったものと考えられる。したがってこのようなIntine膨潤は一温度に花粉をおいた時、機械的傷害を誘発し、原形質の不規則な萎縮となって現れる。予備凍結効果のなかった花粉の解冻後の傷害は主としてこの形のものであり、スギ花粉の凍結死花粉に普遍的に見られる。また予備凍結の結果、正常な花粉管の伸張をみるものもControlに較べて少なく、解冻直後は正常な形を示すが、正常な発芽を伴わない花粉が多い。写真1, 3に示すように解冻後、凍結傷害が見られないにもかかわらず、72時間培養後発芽する個体はわずかに10~20%にとどまっている。特に図32に示した $-20^{\circ}\text{C} \cdot \text{PF}$ 区にこの形が多い(写真1, 3参照)。以上のことから予備凍結によって生ずる障害は、凍結死花粉に普遍的に見られる花粉実質萎縮型、及び正常な形を保ちながら花粉管伸長を伴わない、いわば発芽能力の喪失という生理的障害を被むるものの2つに大別できるようである。この生理的障害の発生機序については今後の研究で解明しなければならない。

3. ヒマラヤスギ花粉の予備凍結効果

ヒマラヤスギ68%花粉を用いて予備凍結効果を調べた結果、図34に示すような結果をえた。すなわち効果的予備凍結の時間は20~40時間である。この $-20^{\circ}\text{C} \cdot \text{PF}$ 区では -196°C 凍結処理の時間が長いほど生存率は低くなる傾向を示した。しかし $-30^{\circ}\text{C} \cdot \text{PF}$ 区は全く予備凍結の効果を示していない。この結果は酒井らの報告や、スギ・カラマツにみられる結果とは全く逆の結果を示しているが、 -30°C で、すでに凍結傷害をひきおこしたものである。なお Pinoid の凍結傷害の程度は解冻直後の花粉粒から知ることは困難であり、発芽床 $72 \sim 96$ 時間培養後調べたところ、発芽しない花粉は澱粉形成がごく少ないか全くみられない。また自己分解 (Autolysis) することは、急速冷却の場合の凍結死と同様であった。しかし予備凍結効果のあった花粉は、花粉管の形態・伸長も正常であり、澱粉粒の充満もみられる。また澱粉合成系酵素の活性も予備凍結によって維持され、解冻後、賦活することが明らかとなった。

4. 広葉樹(風媒)花粉の予備凍結効果

Quercus dentata (カシワ, 70%), *Alnus sieboldiana* (オオバヤシバシ, 71%) の花粉の予備凍結効果を図35に示した。*Quercus*では急速な冷却速度をうため、カバーガラスに水と共にマウントしたもの(図35のG)及び通常のアンプル封入(図35のA)の2法とした。 -10 , -20 , -30°C で30分間予備凍結したガラスマウント区は非常に高い生存率を示したのに対し、ガラスアンプル封入区の生存率は低い。

また効果的予備凍結温度はガラスマウント区とアンプル区では全く逆の結果を示している。この結果の考察は、予備凍結処理後の -80°C 直接凍結速度がカバーガラス区は約 $150^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. という超急速であった事に由来するのか、予備凍結効果そのものであるか今のところわからない。この試験に供した70%花粉の急速冷却による生存率は -10°C ; 43.3%, -20°C ; 21.2%, -30°C ; 8.8%, -32.5°C ; +, -35°C ; +, -37.5°C ; 0%という結果をえていることから、凍結限界含水率はほぼ -30°C 以下と考えてよく、 $-30^{\circ}\text{C} \cdot \text{PF}$ は限界温度に、ごく近いため予備凍結の段階で、すでに凍結傷害をう

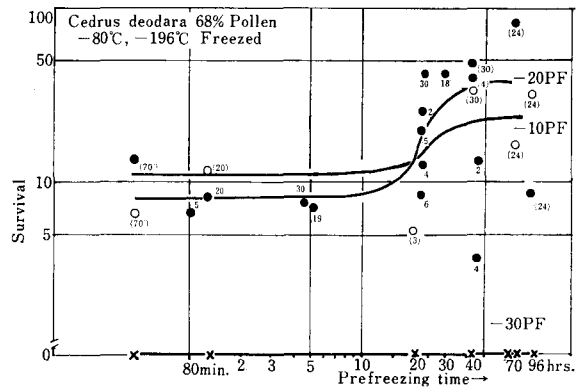


Fig. 34. Effect of prefreezing temperature to various prefreezing time of *Cedrus deodara* pollen.

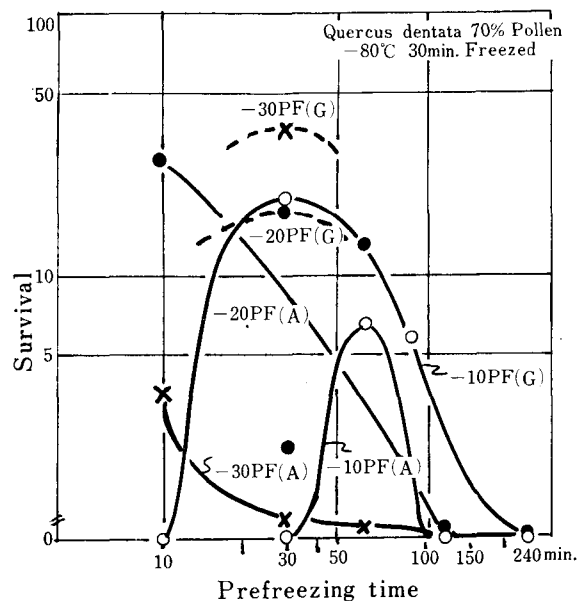


Fig. 35. Effect of prefreezing temperature to various prefreezing time of *Quercus dentata* pollen. (G): glass mounted. (A): Ampouled.

けていたと考えられる。さらにカバーガラスのマウントは凍結処理中、ガラスの隙間にエタノールが侵入するものが多く、その場合はすべて棄却したため、わずかに30分予備凍結処理の結果のみになった。

Alnus の効果的な予備凍結温度は -20°C と考えられる (図36)。また $-30^{\circ}\text{C}\cdot\text{PF}$ も予備凍結時間が長いほど効果が減少する傾向がみられ、針葉樹花粉と逆の結果を示している。また予備凍結温度が高いほど効果は減少する。*Alnus*, *Quercus* 両花粉とも発芽率は Control にくらべて低いが花粉管の形態、伸長は全く正常であった。

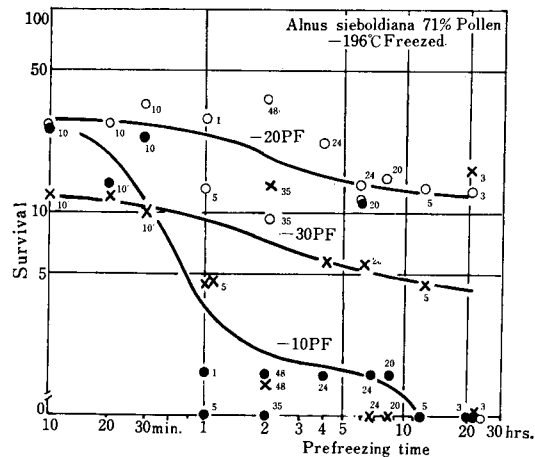


Fig. 36. Effect of prefreezing temperature to various prefreezing time of *Alnus sieboldiana* pollen.

5. 本章小括

i) 通常の冷却処理では必らず凍結死する含水量の花粉を、一温度にある時間さらすと、 -80°C 、 -196°C の超低温処理でもなお生存しうる。この処理を予備凍結⁴⁵⁾といい、効果をもたす温度及び時間を効果的予備凍結温度、及び効果的予備凍結時間と称する。 ii) 実験に用いた各種高含水率花粉の予備凍結効果は次表に示す通りである。*Cedrus* を除き効果的な温度は、その花粉の凍結限界温度よりやや高い温度帯と考えられる。*Cedrus* は -10°C が効果的であって他樹種と逆の結果を示した。 iii) 効果的予備凍結時間は樹種によって差があり、スギで1~30時間 *Cedrus* 3~70時間、カンワ10分~1時間である。予備凍結の結果えられた凍結耐性は、その後の超低温処理の時間によって、わずかに差の生じたものがあつた (図 32, 34, 36)。しかしスギでは予備凍結後、100日間、液体窒素中においてもなお高い生存率を維持した。 iv) 花粉の予備凍結の作用機作はまだ不明な点が多い。また予備凍結効果をえた花粉の発芽率は Control に比較して低いことが多いが、発芽状態は正常である。なおスギ・カラマツ等では生理的障害と考えられるものがあつた。 v) 花粉の超低温貯蔵の場における予備凍結の実用的意義はあまりない。花粉は完熟後、外部からの物質移入は水だけに止まり、植物柔組織のように耐凍性物質の絶対量の増加は期待できない。したがって予備凍結効果は花粉の水分量の減少に伴う細胞液濃度の変化に由来する凍結保護作用と考えられる。 vi) 酒井は植物の細胞における効果的予備凍結温度は -30°C と報告しているが花粉の場合は樹種により $-10\sim-30^{\circ}\text{C}$ と効果的予備凍結温度の範囲に多少の幅のあることが認められた。これは植物の柔組織における細胞と花粉は、その壁構造も全く異なり、花粉は水分の移動が容易に行なわれる機構をもつことに関係がある。スギ・カラマツは Intine が発達して水分吸収能力が高く、発芽機構の中にこの機能をもっているから、高含水量のときは当然 Intine 部分に多くの水が保持されていると考えられる。他樹種もその壁構造上、花粉壁の水分量は高いものと推測される。したがって、この構造によって予備凍結は一種の細胞外凍結現象をおこし、Intine や花粉壁が界面となって花粉の細胞質内外に水蒸気圧の差を生ぜしめ、結果的に花粉粒の脱水現象がおこり、内部の膠質溶液の濃度、特に糖濃度を高め、凍結保護作用も高まるものと考えられる。

あ と が き

本論文は1961年度機関研究として開始されたものである。すでに約50種の花粉を液体窒素に貯蔵し、最高8ヶ年貯蔵した花粉の一部は、ほとんど新鮮な花粉と同様の発芽率を保ち、また一部は人工交配の結果、正常な種子・幼苗を得ている。また、凍結の傷害は一般に物理的な傷害と生理的な障害のあることがわかった。これらの点は凍結様式などとともに稿を改めて詳述したい。

この研究を遂行するに当って京都大学農学部森林生態学研究室構成員の各氏、京大演習林、京都府立植物園 麓園長、及び北海道立林業試験場久保田泰則・梶勝次・中西曜子の諸氏の御協力をえた。また北海道大学酒井昭教授、武藤憲由助教授、大塚宏二助手、弘前大学田中教授、静岡大学上野教授のほか、京大農学部応用植物学研究室渡辺光太郎博士、横山和正氏など多くの方々の絶大な御教示御指導を賜った。特に記して深甚な謝意を表わす次第である。

なお本論文の各章の梗概は日本林学会大会^{34~38)}、関西支部、北海道支部大会³⁹⁾、日本花粉学会³³⁾において講演した。

参 考 文 献

- 1) 岩波洋造; 花粉学大要 p.7 風間書房, 1964.
- 2) Margin, L.; cf. Johri. B. M., and Vasii I. K.; Physiology of pollen.; The Botanical Review. 27, (1961)
- 3) Molisch, H.; Cited from (2).
- 4) Pfundt. M.; Cited from (2).
- 5) Halman & Brubaker.; Cited from (2).
- 6) Goff.; Cited from (2).
- 7) Grigge. A.; Cited from (2).
- 8) Grigge. A.; Cited from (2).
- 9) Antles.; Cited from (2).
- 10) Knowlton. H. E.; Studies on pollen with special reference to longevity. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Mem. 52. (1922)
- 11) Visser.; Cited from (2).
- 12) 武藤憲由ほか; トウヒ属・モミ属花粉の生存期間, 北大演報, 21(2), 354, (1962)
- 13) Stanley R. G. and Petersen. J.; Viability of Pine pollen stored 15 years. Res. Note Pacif. Sthwest. For. Rang. Exp. Sta. 173, 5, (1960)
- 14) Duffield J. W. and Callaham R. Z.; Deep-freezing Pine pollen. Silv. Gent. 8, 22—24, (1959)
- 15) Ehrenberg. C. E.; Studies on the longevity of stored Pine pollen. Needelanden fran. Statens skogsforsknings-Institut. 49(7), 1—31, (1960)
- 16) King. J. R.; The freeze-drying of pollens. Econ. Bot. 15(1), 91—8, (1961)
- 17) Schoenike. R. E. and Stewart. D. M.; Fifth year results of vacuum-drying storage and additives on the viability of some conifer pollens. For. Sci. 9, 96, (1963)
- 18) Jensen. C. J.; Pollen storage under vacuum. Arsskr. Vet-Landbohjsk, (1964)
- 19) Ching T. M. and Ching K. K.; Freeze drying Pine pollen. Plant Physiol. 39(5), 705—709, (1964)
- 20) 竹岡政治; 樹木花粉膜の表面構造に関する電子顕微鏡的研究, 京都府立大学学術報告・農学, 17, 43—69, (1965)
- 21) Ueno Jitsuro; Studies on pollen grains of gymnospermae concluding remarks to the relationships between Coniferae, Jour. Inst. Polytechn. Osaka city Univ. 11, (1960)
- 22) Pfundt. M.; Cited from (2).
- 23) 森 隆也ほか; 花粉に関する研究 第3報 花粉内の澱粉粒について, 愛知学大研究報告, 9, 159, (1960)
- 24) 岩波洋造; 花粉学大要 p.159 風間書房 (1964)
- 25) Duffield J. W. and Snow A. G.; Pollen longevity of *Pinus strobus* and *Pinus resinosa* as controlled by humidity and temperature. Amer. Jour. of Bot. 28, (1941)
- 26) Shoenike. R. E. and Stewart D. M.; Cited from (17).

- 27) Stanley R. G.; Endogenous carbohydrates, organic acids, and Pine pollen viability. *Silvae gent.* **11**, (1961)
- 28) Linskens H. F.; Pollen physiology. *Ann. Rev. of Plant physiology*, **15**, (1964)
- 29) King J. R.; Prolonged viability of pollen in an uncontrolled atmospheric environment. *Amer. Jour. Bot.* **48**, 534—535, (1961)
- 30) 加藤舜郎・石渡憲治; 食品冷凍法 厚生閣, (1965)
- 31) Lanner R. M.; Controlling the moisture content of Conifer pollen. *Silv. gent.* **11**(4), 114—7, (1962)
- 32) 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 (1), 北海道立林業試験場報告, **7**, 35, (1969)
- 33) 市河三次; 花粉の超低温貯蔵に関する一・二の考察, 日本花粉学会誌, **2**, 13—16, (1968)
- 34) 市河三次・四手井綱英; 樹木花粉の超低温貯蔵について, (1) 日林講, **74**, 238—240, (1963)
- 35) ————・—————; 樹木花粉の超低温貯蔵について, (2) 日林講, **74**, 240—241, (1963)
- 36) ————・—————; 樹木花粉の超低温貯蔵について, (Ⅱ) 日林講, **75**, 215—216, (1964)
- 37) ————・—————; 樹木花粉の超低温貯蔵について, 日林講, **76**, 224—226, (1965)
- 38) ————・—————; 樹木花粉の超低温貯蔵について, (Ⅴ) 日林講, **77**, 239—242, (1966)
- 39) 市河三次・久保田泰則・梶 勝次; カラマツ花粉の人工発芽に関する研究; 日林北海道支講, **18**, (1969)
- 40) 吉田静夫・酒井 昭; 植物の凍害に及ぼす融解速度の影響 I; 低温科学 生物篇, 25集 (1967)
- 41) 酒井 昭; 超低温における植物組織の生存 I, 低温科学 生物篇, 14集 (1956)
- 42) ————; 超低温における植物組織の生存 II, 低温科学 生物篇, 16集 (1957)
- 43) ————; 超低温における植物組織の生存 III, 低温科学 生物篇, 21集 (1963)
- 44) ————; 超低温における植物組織の生存 IV, 低温科学 生物篇, 24集 (1966)
- 45) ————; 超低温における植物組織の生存 V, 低温科学 生物篇, 25集 (1967)
- 46) 西川義正; 氷点下における精子の長期保存とその実用性 (1), 畜産の研究, **9**(12), 1—15, (1955)
- 47) 花房尙史; 生体高分子の構造・機能と凍結融解および凍結乾燥, 凍結・乾燥と細胞障害, 東大出版会 (1970)
- 48) 永瀬 弘; 牛精子に対する炭水化物の凍結防止効果, —————, —————, (——)
- 49) 加藤舜郎; 食品冷凍の理論と応用 (上巻); 光琳書院, (1961)

Résumé

The preservation of pollen in deep-frozen state has been studied since 1961.

The purpose of this study was to find out the method of storage in the deep-frozen state and to pollinate the most favourable time.

The best way to store pollen for a long time is to stop the biological activity at -196°C .

Free water participating in pollen metabolism, forms ice-crystals and causes physical injury when deep-frozen, so reducing the water content of pollen is most important. The maximum water content at a definite temperature below zero, and minimum temperature at definite water content to avoid frost injury are called limiting temperature for crystalization, respectively.

Pollen has its own characteristic value for these factors and they determine the survival range of deep-frozen pollen.

Cooling rate is not as usual but pollen of about limiting water content must be cooled rapidly.

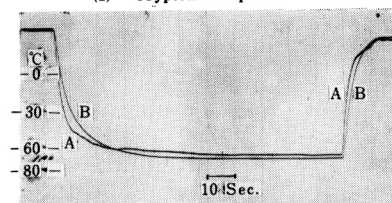
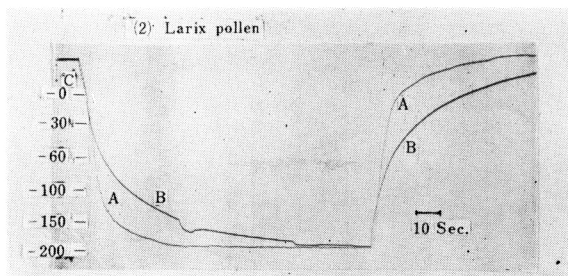
Rapid rewarming is important, for if it is rewarmed slowly, ice-crystal is formed and the pollen is injured.

The temperature range where frost damage most easily occurs is from about -35°C , -45°C depending upon tree species.

High water content pollen (about 70%) died when it was frozen rapidly, but it was still able to live by frozen prefreezing it at -10°C , -20°C and -30°C before it was deep-frozen.

For many species the most effective pre-freezing temperature and time are about -30°C and more than four or five hours respectively.

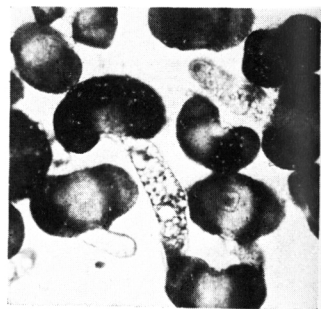
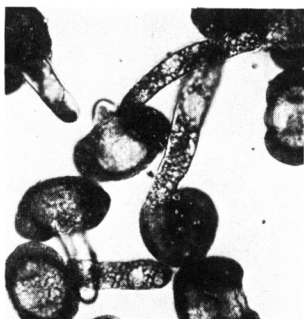
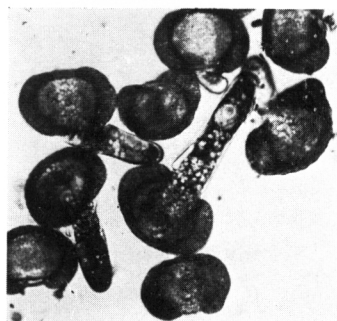
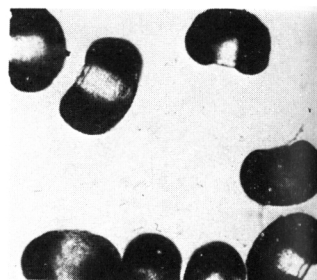
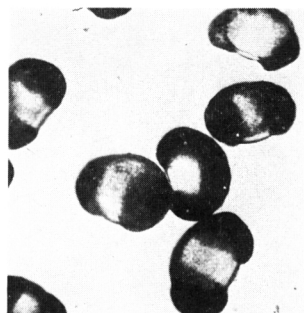
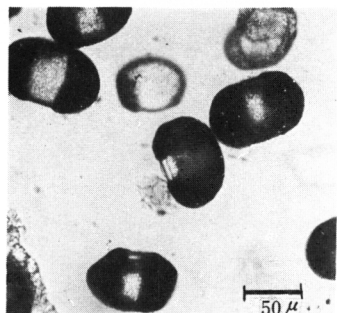
Pre-freezing treatment was very effective in many species such as *Cryptomeria japonica* and many other trees when they were deep-frozen at -196°C for 100 days.

(1) *Cryptomeria* pollen(2) *Larix* pollen

Oscillogram of a ampouled pollen immersed into liquid nitrogen (2), and -80°C Et-OH, CO_2 bath (1) and subsequently rewarmed in room temperature at $+30^{\circ}\text{C}$.

この測定は北海道大学低温科学研究所酒井、大塚両氏の御好意によって行なった。

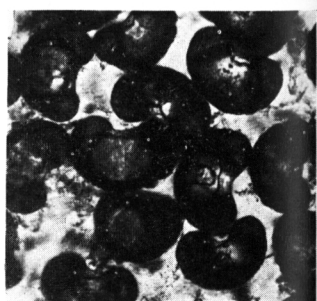
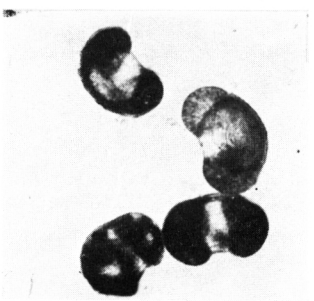
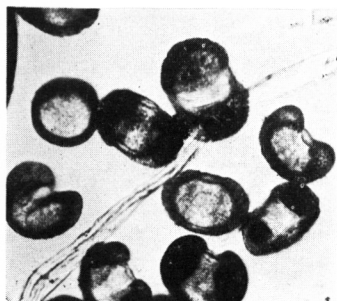
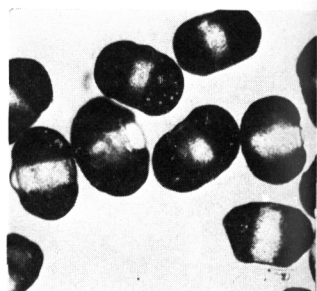
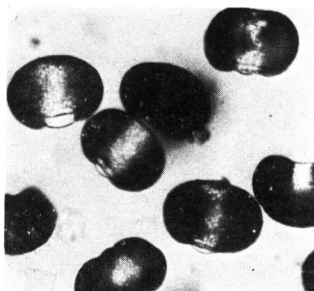
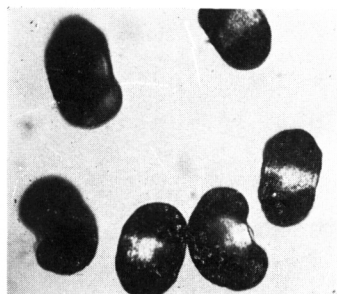
Photo plate 1.
View of germination and frost injured *Cedrus* pollen.



—10°C

—20°C

—30°C



—40°C

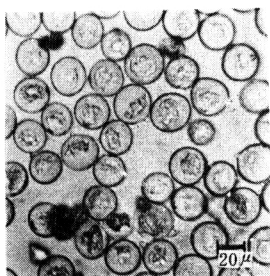
—50°C

—70°C

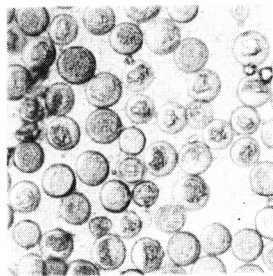
Cooling; Rapidly (8°C/min.), Pollen water contents; 68%.
Upper; After setting 10 min. (in Water drops)
Below; After setting 72 hrs. (on Agar sucrose medium)

Photo plate 2.
Effect of Pre-freezing

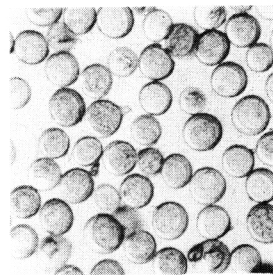
Cryptomeria japonica



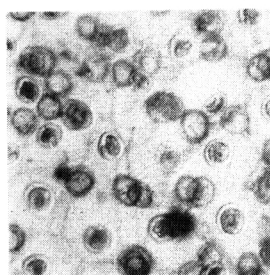
PF-15/5hrs., -196/51 hrs.



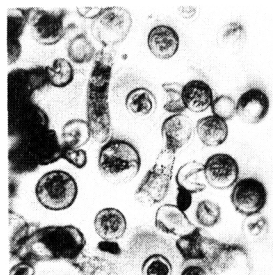
PF-20/3hrs., -196/120 hrs.



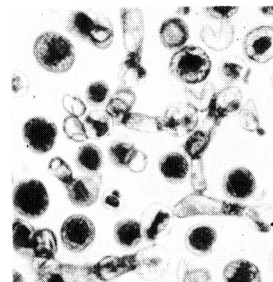
PF-30/3hrs., -196/27hrs.



PF-15/5hrs., -196/51 hrs.

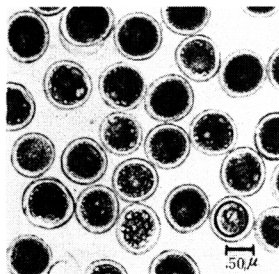


PF-20/3hrs., -196/120 hrs.

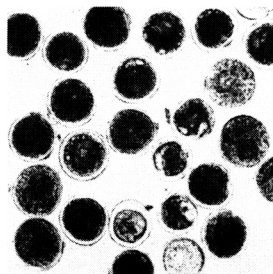


PF-30/3hrs., -196/27hrs.

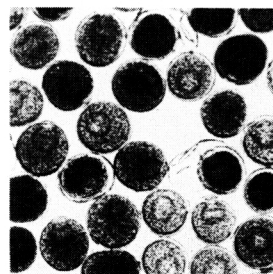
Larix leptolepis



PF-5/6hrs., -196/21hrs.

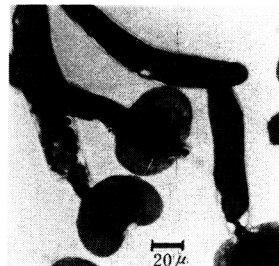


PF-10/6hrs., -196/12hrs.



PF-15/1hr. -196/20min.

Cedrus deodara



PF-10/44hrs., -80/30hrs.



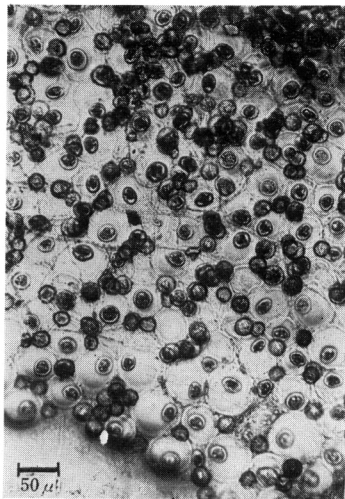
PF-20/44hrs., -80/30hrs.



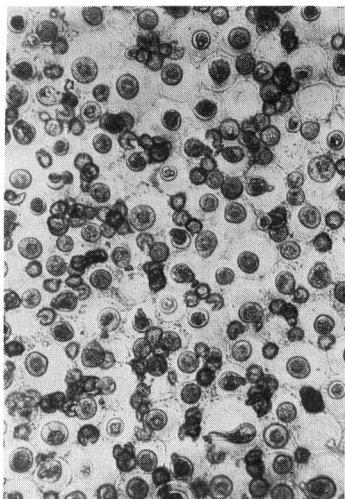
PF-30/44hrs., -80/30hrs.

PF 10/3 hrs., -196/20 hrs.; on the treatment of pre-freezing 3 hrs by -10°C and 20 hrs. immersed in -196°C after pre-freezing.

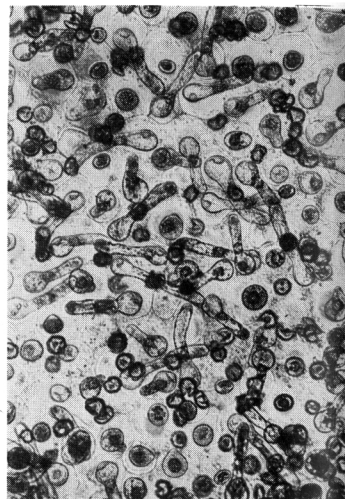
Photo plate 3. Effect of Pre-freezing
Cryptomeria japonica pollen (Water contents aprox. 72%)



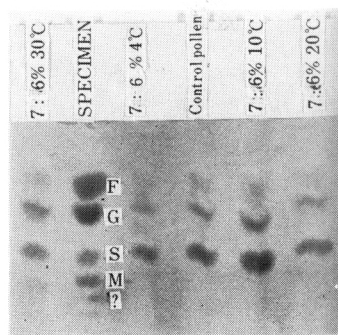
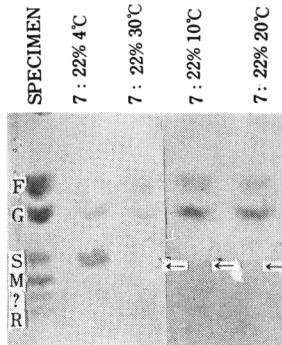
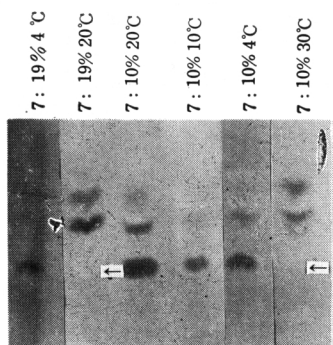
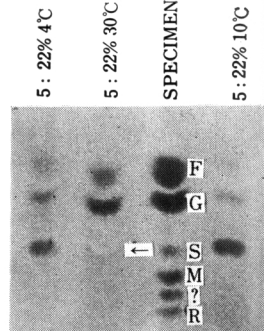
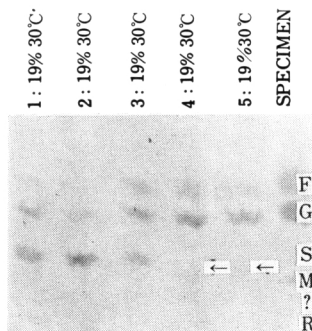
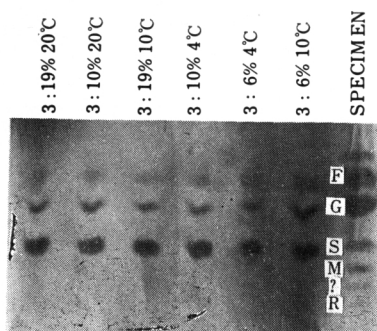
PF 15/5 hrs -196/100 days.



PF 20/30 hrs., -196/100 days.



PF 30/30 hrs., -196/100 days.



Chromatogram of sugars in pollen of various water content stores at +30, +20, +10, and +4°C. (*Cedrus deodara*)

1; Fresh pollen 2; 5day stored 3; 11days stored 4; 21days stored 5; 37days stored 6; 72days stored 7; 96days stored
 ↑ Indicates the extinct of Sucrose.

F=Fructose G=Glucose
 S=Sucrose M=Maltose
 R=Raffinose S'=Unknown