



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	花粉細胞の超低温における生存 I
Author(s)	大塚, 宏二; OTSUKA, Kouji
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 107-111
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17789
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p107-111.pdf



花粉細胞の超低温における生存 I*

大塚 宏 二

(低温科学研究所)

(昭和46年10月受理)

I. 緒 言

植物細胞の超低温における生存のしくみを明らかにするため、我々は一連の基礎的研究¹⁻⁵⁾、とくに生在に及ぼす冷却および加温速度の影響、異なった条件下で冷却および加温した細胞内に生ずる氷晶の電子顕微鏡的研究³⁻⁴⁾を行なってきた。

生重量当りの含水率が約20%以下のアネモネ球根は室温から液体窒素中に入れても、加温速度のいかんにかかわらず生存していることが酒井⁶⁾によって明かにされた。同様なことが樹木花粉について市河等⁷⁾によって確められた。一般に球根、種子、花粉、コケ等⁸⁾の極度の乾燥に耐えるものでは生重量当りの含水率が20~25%以上になると室温から液体窒素中に入れて急速冷却すると致死的な細胞内凍結をおこすため生存できなくなる。含水量がそれより飽和含水量である50~60%まで高まるにつれて耐凍度が次第に低下する。このように、これらの材料では含水量と耐凍度の関係、および耐凍度と超低温における生存の関係を調べるのに都合のよい材料である。とくに花粉は凍結融解後の生存テストが容易で確実であるし、同一個体から採集した花粉を乾燥状態で0~-5°Cに長く貯蔵し、てきぎ含水量をかえて実験できる利点がある。乾燥した花粉を室温液体ガスの温度にまで急速冷却し、空中でゆっくりあたたためても花粉が生存していることは前世紀末すでにMolishによって確められた。最近、市河、四手井⁷⁾によって樹木花粉の超低温貯蔵に関する広汎な研究が行なわれた。しかし基礎的な問題については未解決の問題が少なくない。以上の理由から、超低温における植物細胞の生存の機構を明らかにする一連の実験として、花粉を用いて行なった実験結果を報告する。

II. 材料と方法

ヒマラヤスギ *Cedrus Deodara* の花粉(生重量当りの含水率19%)を-5°Cに貯蔵し、実験時に+5°Cの水中で4時間吸水させ55~60%の含水率にして用いた。カバーガラス(18×18mm)の間に少量の花粉(約5000~6000個)を0.03mlの水または溶液に浸して冷却した。溶液につけないで凍結する時には花粉をカバーガラスの間に一層にひろげてはさみ、周囲をワセリンで封じた。緩慢凍結は-5°Cのイソペンタン槽中に投入後5°Cずつ低い槽に移し、所定の温度まで冷却した。急速冷却は所定の温度に冷やされたイソペンタン槽または液体窒素中に直接投入した。加温は0°Cの空中(緩慢加温、約1°C/秒)か30°Cの水(急速加温、約150°C/秒)

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1172号

で行なった。処理後スライドガラス上の寒天培地 (1% 寒天, 10% 蔗糖, pH 7.0-7.2) に播き、シャーレの中に湿った濾紙とともに入れて 26°C 恒温器中で培養した。72~96 時間後に顕微鏡下で花粉管の伸長を調べ、花粉管の伸長しているものを正常なものとみなし、総計 250~300 個の花粉を数えてその生存率を算出した。

III. 結果および考察

各温度で予備凍結後液体窒素素中に入れ、ついで急速及び緩慢に加温した花粉細胞の生存率を第 1 表に示す。緩慢加温した場合には予備凍結温度のいかにかわらず、ほとんどすべて

第 1 表 予備凍結後液体窒素素温度に急速冷却し、急速加温した花粉細胞の生存率

予備凍結温度 (°C)		-5	-10	-15	-20	-30	-50	-70
生存率	急速加温	0	66	80	90	25	10	0
	緩慢加温	0	0	0	0	0	0	0

予備凍結: カバーガラスの間に水でマウントした花粉を各温度まで緩慢凍結し、その温度に 20 分間おく

花粉含水率: 56%

の細胞が死んでいた。-10~-20°C の温度範囲で予備凍結後急速加温した場合には、66~99% の生存率がえられた。しかし -30°C 以下まで予備凍結した場合の生存率はきわめて低かった。このことは -30°C 以下への凍結中に被害が生じたことを示している。-15~-20°C の温度範囲まで予備凍結し部分的の脱水された細胞では冷却中に細胞に害を与えないような微氷晶が細胞内に生ずるが、急速に加温すれば細胞に害を与えるほどの大きさに生長できないため細胞に害を与えないものと考えられる。また -5°C まで予備凍結したものでは急速冷却中に致死的な細胞内凍結を生ずるものと考えられる。同じ含水率の花粉を凍害防禦効果を有する溶質の 2M 水溶液に浸して緩慢に凍結しても -40°C 以下の凍結に大部分の細胞が耐えられるようにはならない (第 2 表)。第 2 表は緩慢凍結後急速加温した場合の結果であるが、緩慢加温した場合の

第 2 表 異なる媒液中で緩慢凍結後急速加温した花粉の生存率

媒液の種類	凍 結 温 度 (°C)				
	-20	-30	-40	-50	-70
水	95	48	5	0	0
2M 蔗糖	96	89	16	10	3
2M DMSO	94	71	16	4	5
2M グリセリン	94	80	12	3	0
2M NaCl	86	83	37	28	0
空 中*	96(95)**	65(45)**	40(0)**	3(0)**	0(0)**

* カバーガラスの周辺部をワセリンで封じて凍結した

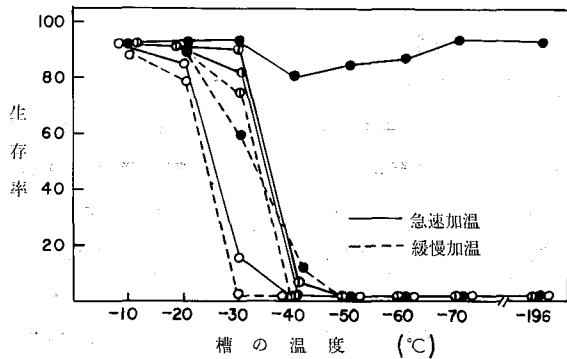
** 0°C の空中で融解後の生存率

花粉含水率: 58%

生存率もほとんど同じであった。しかし、水に浸さないで空中で -40°C まで冷却後急速加温された花粉の生存率は緩慢に加温されたものよりも生存率がかなり高かった。このことは空中でゆっくり冷却された場合には、かなりの数の細胞が -40°C 近くまで過冷却後急速に凍結し、細胞に害を与えないような微氷晶が細胞内に生じ、そのため急速加温した場合にはこれらの生存率がゆっくり加温されたものより高くなっているように考えられる。

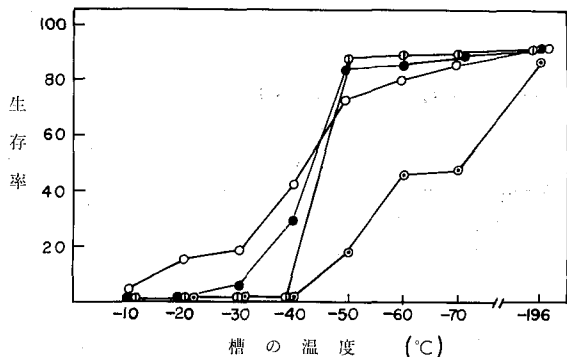
水または溶液に浸した花粉を異なった温度に保っているイソペンタン槽中に入れて急速冷却後、ことなつた条件で加温した場合の生存率を第1図に示す。2M 蔗糖溶液以外の媒液に浸した場合には急速加温した花粉の生存率のたかまりは約10%以下であったが、2M 蔗糖溶液に浸した花粉を -40°C 以下の槽中に入れた後急速加温した時、約80%以上の生存率が得られた。

しかし、ゆっくりと加温した場合には -40°C 以下の温度では全細胞が死んでいた。このことは2M 蔗糖溶液以外の溶液に浸して -40°C 以下の槽中に入れて急速冷却した場合には、冷却中と1分間イソペンタン槽中におかれる間に花粉が殺れることを示している。しかし2M 蔗糖溶液中に入れて急速冷却した場合にはその時間には花粉細胞内に害を与える程度の大きさの氷晶が存在していなかったことを示している。第1図の結果はクワの皮層細胞⁹⁾で得られた結果とよく似ている。ただクワの細胞では3Mや4Mグリセリン溶液に浸してグリセリンが細胞内に多量透過した細胞を -30°C 以下の槽中に入れて急速加温しても生存細胞は全く認められなかった。このことは細胞内におけるグリセリンの存在が細胞内での氷の再結晶温度を下げるために細胞の生存に不利であることを示すものと考えられる。なおクワの皮層細胞ではグリセリンが細胞内に透過しない細胞では液体窒素中に入れて急速冷却、加温しても細胞はすべて生存していた⁹⁾。花粉細胞の場合には3Mや4Mグリセリン溶液に浸して液体窒素中に入れたのち急速加温すれば全細胞が生



第1図 急速冷却された花粉の生存率におよぼす媒液と加温速度の影響

水または各溶液で1時間処理した花粉をカバーガラスにそれぞれの液でマウントして各温度に急速冷却、1分間おいてから急速加温または緩慢加温した。○、水；●、2M 蔗糖；◼、1M 蔗糖；◻、2M グリセリン



第2図 媒液に浸して液体窒素中で急速冷却された花粉細胞の加温過程における生存率

カバーガラスに水でマウントした花粉を -15°C で予備凍結、または各溶液で1時間処理した花粉をマウントして急速冷却後、各温度の槽に移しそこに2分間おいてから急速加温した。○、水；●、2M 蔗糖；◻、3M グリセリン；◼、3M DMSO

存できた。また第2図に示すように、3Mグリセリン溶液に浸して液体窒素中に入れて急速冷却し、次いで -70°C 以上の異なった温度に保たれた槽中に移してから 30°C の水中で急速加温した場合、2M蔗糖溶液に浸した場合と同様 -50 と -40°C の温度範囲で急速に生存率が低下した。これらの事実は花粉細胞内にグリセリンがほとんど透過していないことを示すものと考えられる。第2図の結果は急速冷却中に細胞内に生じた微氷晶が急速に生長し細胞に害を与えるようになる温度が -50°C 以上にあることを示している。この値は各のクワの皮層細胞で得られた結果とほとんど同じである⁵⁾。

IV. 摘 要

十分に吸水したヒマラヤスギの花粉は約 -20°C までの緩慢凍結に耐えるが、各種の凍害防禦物質の保護効果は少なく、これらの溶液を用いても -30°C 以低までの予備凍結耐えさせることはできない。そのため -30°C まで予備凍結した花粉を液体窒素に入れたのち空中でゆっくり加温して生存させることはできない。しかし水に浸した花粉を $-15\sim-20^{\circ}\text{C}$ まで予備凍結し、細胞外凍結によって部分的に脱水後液体窒素中に入れ、急速に加温すれば80%以上の細胞が生存できる。これらの細胞を液体窒素中に入れてからゆっくり加温すると約 -50°C 以上の温度で生存率は急速に低下する。このことは急速冷却中に細胞内に生じた微氷晶の生長が -50°C 以上で著しく高まることを示している。2M蔗糖中に浸した花粉をこの氷晶生長速度の大きい -40°C の槽中に入れて急速冷却後急速に加温する時は全細胞が生存していた。しかし1Mの蔗糖、2Mのグリセリン、DMSOに浸したものではほとんどの細胞が生存できなかった。急速に冷却した細胞に対する糖の保護作用の機構は興味ある問題で今後これについてさらに研究をすすめたい。

終わりに、御指導下さった酒井昭教授並びに実験材料の花粉を提供して下さい下さった市河三次氏に深く謝意を表します。

文 献

- 1) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.
- 2) Sakai, A. 1966 Survival of plant tissue at super-low temperatures IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol.*, **41**, 1050-1054.
- 3) 大塚宏二・酒井 昭 1967 急速冷却した植物細胞内にできる氷の電子顕微鏡的研究. 低温科学, 生物篇, **25**, 21-27.
- 4) Sakai, A. and Otsuka, K. 1967 Survival of plant tissue at super low temperatures V. An electron microscope study of ice in cortical cells cooled rapidly. *Plant. Physiol.*, **42**, 1680-1694.
- 5) Sakai, A. and Yoshida, S. 1967 Survival of plant tissue at super low temperatures VI. Effect of cooling and rewarming rates of survival. *Plant. Physiol.*, **42**, 1695-1701.
- 6) 酒井 昭 1960 球根類の耐凍性. 園芸学会誌, **29**, 233-238.
- 7) 市河三次・四手井綱英 1971 樹木花粉の超低温貯蔵に関する基礎的研究 (1). 京都大学演習林報告, **42**, 51-82.
- 8) Luyet, B. J. and Geheio, P. M. 1938 The survival of moss vitrified in liquid air and its relation to water content. *Biodynamica*, **2**, 1-7.
- 9) 酒井 昭 1970 急速冷却された植物細胞の生存に関与する要因. 低温科学, 生物篇, **28**, 27-36.

Summary

Mechanism of survival of plant cells cooled rapidly to superlow temperatures was studied with pollen cells of Himalayan cedar (*Cedrus Deodara*)

1. Pollen cells dried to a water content below 20% (per unit fresh weight) survived immersion in liquid nitrogen from room temperature regardless of rewarming rates.

2. Pollen cells having water content about 60% could withstand slow freezing only to -20°C regardless of rewarming rates. However, these pollen cells pre-frozen to -15°C or -20°C survived immersion in liquid nitrogen when rewarmed rapidly. 2 M solutions of sucrose, glycerol, DMSO and NaCl were found to give these pollen cells only a slight protection against injury caused by slow freezing.

3. Pollen cells treated with 2 M solutions of sucrose and glycerol were immersed in baths at various temperatures and then rewarmed slowly or rapidly. All glycerolated cells were killed when cooled rapidly by immersion in baths below -40°C , regardless of rewarming methods used. In contrast, the pollen cells treated with 2 M sucrose solution survived rapid cooling to any temperature below -40°C when rewarmed rapidly.

4. In pollen cells immersed in liquid nitrogen after pre-freezing to -15°C or after treatment with 2 M sucrose solution, an abrupt decrease in survival was noted in the temperature range from -50 to -40°C in the process of rewarming from liquid nitrogen.

The results obtained may be explicable in terms of ice crystal size. The ice crystals formed in the pollen cells during rapid cooling may be small enough to be innocuous; hence, when rewarming is carried out rapidly, they may melt before they have time to grow to a dangerous size and cells remain viable.