

低温下でのシクラメン属植物の花粉貯蔵

高村武二郎・石塚栄治

Pollen storage under low temperature in the genus *Cyclamen*

Takejiro Takamura and Eiji Ishizuka

Summary

Pollen storage at 20, 5, -20 and -80°C was examined in 16 species of the genus *Cyclamen*. More than 50% pollen grains stored at -80°C after desiccation were germinated after the storage for 3 months in all the species. After the pollen storage for 6 and 9 months, germination percentage of pollen grains stored at -80°C after desiccation was larger than those stored at 20, 5 and -20°C in all the species except *C. africanum*. Thus, pollen storage at -80°C after desiccation was preferable to that at 20, 5 and -20°C in the genus *Cyclamen*.

Key Words : *Cyclamen*, pollen, storage, low temperature

緒 言

*Cyclamen*属の種間交雑で種子が得られる交雑組み合わせは、わずかに数えるほどである⁽¹⁾。シクラメン園芸品種は*C. persicum*の改良により育成されてきたが、*C. persicum*と他の種との交雑では種子が得られていないこともあり、長い間*C. persicum*以外の21種のシクラメン属植物は園芸品種の改良に関与していなかった。しかしながら、Ishizaka and Uematsu⁽²⁾が、胚珠培養を援用してシクラメン園芸品種 (*C. persicum*) と*C. hederifolium*との種間雑種を作出して以来、園芸品種といくつかの*Cyclamen*属野生種との雑種が作出されるようになり⁽³⁻⁸⁾、現在では園芸品種と野生種との種間雑種の複二倍体より育成された品種も存在する。

*C. persicum*以外の*Cyclamen*属植物には、芳香性、耐寒・耐暑性、赤葉や多様な形の葉など園芸品種には欠けている有用形質を有するものもあり、これらの植物は、未利用の有用遺伝資源であると考えられる。したがって、種間交雑後に胚珠培養等の胚救出技術を適用してシクラメン園芸品種と野生種または野生種と別の野生種との種間雑種を育成することにより、シクラメンの遺伝変異を拡大し、新たな品種開発の可能性が広がるものと期待される。しかしながら、*Cyclamen*属植物を日本で栽培した場合、秋咲き、冬～春咲きおよび四季咲きに大別されるように、それぞれ開花期が異なる⁽⁸⁾。そのため、種

間交雑を確実にを行うためには、花粉を貯蔵し、交雑に用いる必要がある。そこで本研究では、開花期の異なる種間交雑を可能とすることを目的として、*Cyclamen*属野生種16種を用いて、5、-20および-80°Cの低温での花粉貯蔵の可能性を調査した。

材料および方法

香川大学農学部の温室で栽培されている秋咲きの*C. africanum*, *C. cilicium*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. intaminatum*, *C. mirabile*, *C. rohlfsianum*, 冬～春咲きの*C. alpinum*, *C. balearicum*, *C. creticum*, *C. libanoticum*, *C. parviflorum*, *C. persicum*, *C. pseudibericum*, *C. repandum*, ならびに開花期に季節性が認められない*C. purpurascens*の開花株の葯を採取し、1個ずつ葉包紙に包んで円筒形のプラスチック容器(直径3.0 cm, 高さ5.2 cm)に入れて密封し、20, 5, -20または-80°Cで3, 6または9か月間の花粉貯蔵を試みた。なお、貯蔵時には乾燥剤としてシリカゲルを同封し、-20および-80°C貯蔵では5°Cで1日間乾燥処理を行った。-80°C貯蔵では、乾燥処理なしで貯蔵する処理区(-80°C無乾燥貯蔵区)も設けた。

貯蔵前と貯蔵後に既報⁽⁹⁾の方法に準じて、花粉を、シヨ糖を添加した1%寒天培地に置床し、暗黒下12時間培養して花粉を発芽させた。シヨ糖濃度は原則とし

て10%としたが, *C. libanoticum*では5%ショ糖を添加した。また, 培養温度は*C. alpinum*および*C. purpurascens*では20℃としたが, 他の種では25℃とした。また, 貯蔵前および貯蔵後の人工培地への播種前のいずれにおいても, 一部の花粉を採取し, 酢酸カーミンで染色して花粉の染色率を調査した。いずれの種においても, 花粉の染色率および人工培地上での花粉発芽率の調査については, それぞれ300および100個の花粉を用いて3反復の実験を行った。

結 果

秋咲き*Cyclamen*属野生種と花期に季節性が認められない*C. purpurascens*における貯蔵後の花粉のアセトカーミン染色率および人工培地上での発芽率をそれぞれ第1図および第2図に示した。いずれの種の花粉においても貯蔵3および6か月後では高いアセトカーミン染色率を示し, 貯蔵9か月後においても*C. mirabile*の20℃貯蔵区を除くすべての処理区で75%以上の高い値が示された(第1図)。

一方, アセトカーミン染色率と異なり, 人工培地上での花粉発芽率はいずれの処理区においても貯蔵後, 特に6か月以上の貯蔵後に大きく低下した(第2図)。*C. africanum*, *C. cilicium*, *C. graecum*, *C. mirabile*および*C. purpurascens*では20℃貯蔵区以外の処理区で, *C. hederifolium*および*C. rohlfsianum*では20℃および5℃貯蔵区以外の処理区で, *C. intaminatum*では-80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区で貯蔵3か月後に貯蔵前の50%以上の発芽率が認められた。しかしながら, 貯蔵6か月後では*C. cilicium*の-80℃貯蔵区, ならびに*C. graecum*の-20℃, -80℃無乾燥および-80℃貯蔵区でのみ貯蔵前の50%以上の発芽率が維持され, 貯蔵9か月後ではいずれの種のいずれの処理区においても, 貯蔵前の50%以下の発芽率であった。*C. africanum*では, 貯蔵6か月後の花粉発芽率は-80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区で他の処理区より有意に高い値を示した。*C. cilicium*, *C. graecum*および*C. rohlfsianum*では, 貯蔵6か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区で最も高い値を示し, 貯蔵9か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区で他の処理区より高い値を示した。*C. hederifolium*および*C. purpurascens*の貯蔵6か月後および9か月後での花粉発芽率は, -80℃貯蔵区で他の処理区より高い値を示した。*C. mirabile*における貯蔵6か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区で他の処理区よりも高い値を示し, 貯蔵9か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区で最も高い値を示した。*C. intami-*

*natum*の貯蔵9か月後では, -80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区のみで花粉発芽が認められた。

冬~春咲き*Cyclamen*属野生種の貯蔵後の花粉のアセトカーミン染色率および人工培地上での発芽率をそれぞれ第3図および第4図に示した。秋咲き野生種や*C. purpurascens*と同様に多くの種において貯蔵3および6か月後では高いアセトカーミン染色率を示したが, *C. creticum*においては, 20℃貯蔵区および5℃貯蔵区では貯蔵6か月後には75%以下のアセトカーミン染色率となり, 貯蔵9か月後ではいずれの処理区においても60%以下の花粉しか染色されなかった(第3図)。

一方, 秋咲き野生種や*C. purpurascens*と異なり, 春咲き野生種の人工培地上での花粉発芽率は, アセトカーミン染色率よりは明らかに低い値ではあるものの, いずれの種においても-80℃貯蔵区での貯蔵3か月後では75%以上の高い値であった(第4図)。また, 貯蔵6か月後においても, *C. creticum*以外のすべての春咲き野生種で, -80℃貯蔵区または-80℃貯蔵区と-80℃無乾燥貯蔵区の両方の花粉発芽率が貯蔵前の50%以上の値を示した。しかしながら, 貯蔵9か月後ではいずれの種においても, 貯蔵前の50%以上の発芽率が維持された処理区は認められなかった。*C. alpinum*, *C. creticum*および*C. libanoticum*では, 貯蔵6か月後および9か月後での花粉発芽率がいずれにおいても, -80℃貯蔵区で最も高い値を示した。*C. parviflorum*においては, 貯蔵6か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区で最も高い値を示し, 貯蔵9か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区で他の処理区より高い値を示した。*C. balaricum*では, 貯蔵6か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区で最も高い値を示し, 貯蔵9か月後での花粉発芽率は-80℃無乾燥貯蔵区で他の処理区より高い値を示した。*C. persicum*, *C. pseudibericum*および*C. repandum*においては, いずれにおいても貯蔵6か月後での花粉発芽率は-80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区で他の処理区よりも高い値を示したが, 貯蔵9か月後での花粉発芽率は*C. persicum*では-80℃無乾燥貯蔵区, *C. pseudibericum*では-80℃貯蔵区, *C. repandum*では-80℃貯蔵区および-80℃無乾燥貯蔵区で最も高い値を示した。

考 察

低温下で花粉の生理活動を抑えて貯蔵する方法は一般的に用いられているが⁽¹⁰⁾, *Cyclamen*属植物の低温下での花粉貯蔵に関する情報はほとんどない。本研究の結果, *C. intaminatum*以外の種における3か月の花粉貯蔵では, -20℃貯蔵区, -80℃無乾燥貯蔵区および-80℃

貯蔵区でいずれも貯蔵前の50%以上の花粉発芽率が維持された。*C. intaminatum*においても、 -80°C 無乾燥貯蔵区および -80°C 貯蔵区では貯蔵前の50%以上の花粉発芽率を示した。一方、6か月以上の長期間花粉を貯蔵した場合には、貯蔵9か月後の*C. africanum*を除いて、貯蔵後の花粉発芽率は -80°C 貯蔵区で -20°C 貯蔵区より高い値を示した。これらのことから、*Cyclamen*属植物の花粉貯蔵、特に6か月以上の長期貯蔵では、 -80°C で貯蔵することが望ましいと考えられる。

本研究で用いた*C. africanum*、*C. persicum*および*C. repandum*を除くすべての種において、貯蔵6か月後と貯蔵9か月後のいずれかまたは両方で -80°C 貯蔵区の貯蔵後の花粉発芽率が -80°C 無乾燥区より有意に高い値を示した。また、*C. balearicum*と*C. persicum*の貯蔵9か月後を除いて、貯蔵6か月後および貯蔵9か月後に -80°C 貯蔵区の花粉発芽率が -80°C 無乾燥貯蔵区より有意に低い値を示すことはなかった。貯蔵中の花粉の水分が多いと、呼吸などの生理活動により発芽に必要な物質が消耗される可能性がある⁽¹⁰⁾。また、水分が凍結する温度で貯蔵する場合には、花粉内部の水分凍結による物理的破壊作用が生じることが容易に予想され、花粉の冷凍貯蔵ではその作用を防ぐために貯蔵前の花粉の乾燥が効果的であることが報告されている⁽¹¹⁾。実際、花粉の水分含量は花粉貯蔵に影響を及ぼす大きな要因であり^(12,13)、液体窒素を用いたトマト花粉の超低温貯蔵では、6.8および9.3%に含水率を下げた花粉が貯蔵に相当であったと報告されているように⁽¹³⁾、いくつかの植物では何らかの乾燥処理が超低温下での花粉貯蔵に有効であると報告されている⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。本研究の -80°C 無乾燥貯蔵区ではシリカゲルを同封したため、花粉内部の水分が凍結される前にいくらかの乾燥効果が生じたと考えられるが、それを考慮しても多くの*Cyclamen*属植物で 80°C での花粉貯蔵前の1日間の乾燥処理が有効であったことが示唆される。

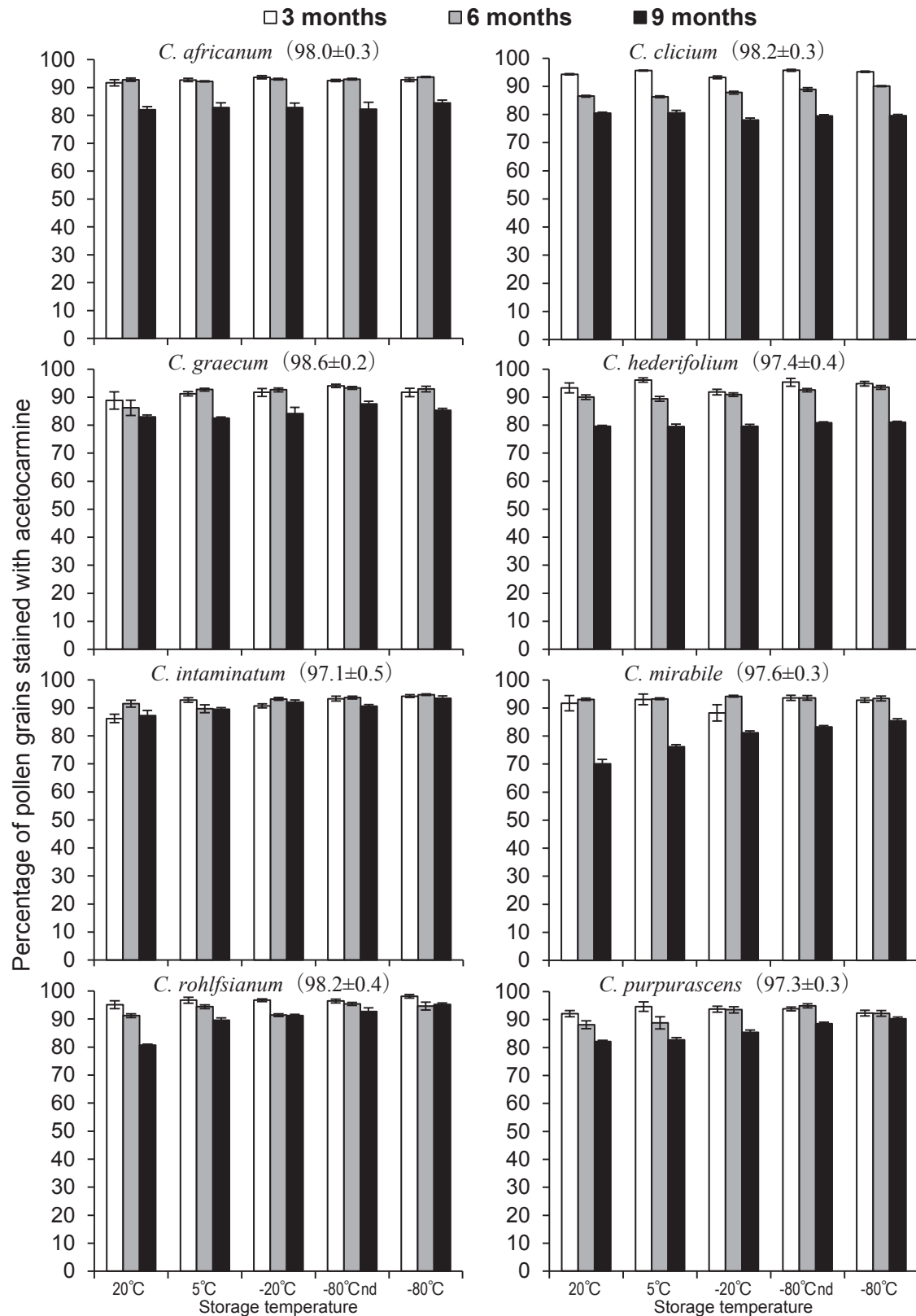
本学で栽培した秋咲きの*Cyclamen*属植物は、主に9月下旬から10月に、冬～春咲きの*Cyclamen*属植物では種によって異なるが、主に1月中旬から4月にかけて開花しており（データ未掲載）、埼玉県での開花時期として報告されているものとほぼ同様であった⁽⁸⁾。これは、日本の多くの地域で秋咲きの*Cyclamen*属植物を花粉親とし

て春咲きの*Cyclamen*属植物に交雑する場合には3～6か月の、春咲きの*Cyclamen*属植物を花粉親として秋咲きの*Cyclamen*属植物に交雑する場合には6～9か月の花粉貯蔵が必要となることを意味する。本研究の結果、 -80°C 貯蔵区で比較的高い花粉発芽率が長期間維持されることが示されたが、貯蔵9か月後に貯蔵前の50%以上の発芽率を維持できた種は認められなかった。いくつかの植物では、液体窒素中で1年またはそれ以上比較的高い花粉発芽率を維持しながら貯蔵できることが報告されている^(14,16,18,19)。したがって、*Cyclamen*属植物においても6か月を超える花粉貯蔵を想定して、液体窒素中での花粉貯蔵を検討することが望ましいと思われる。

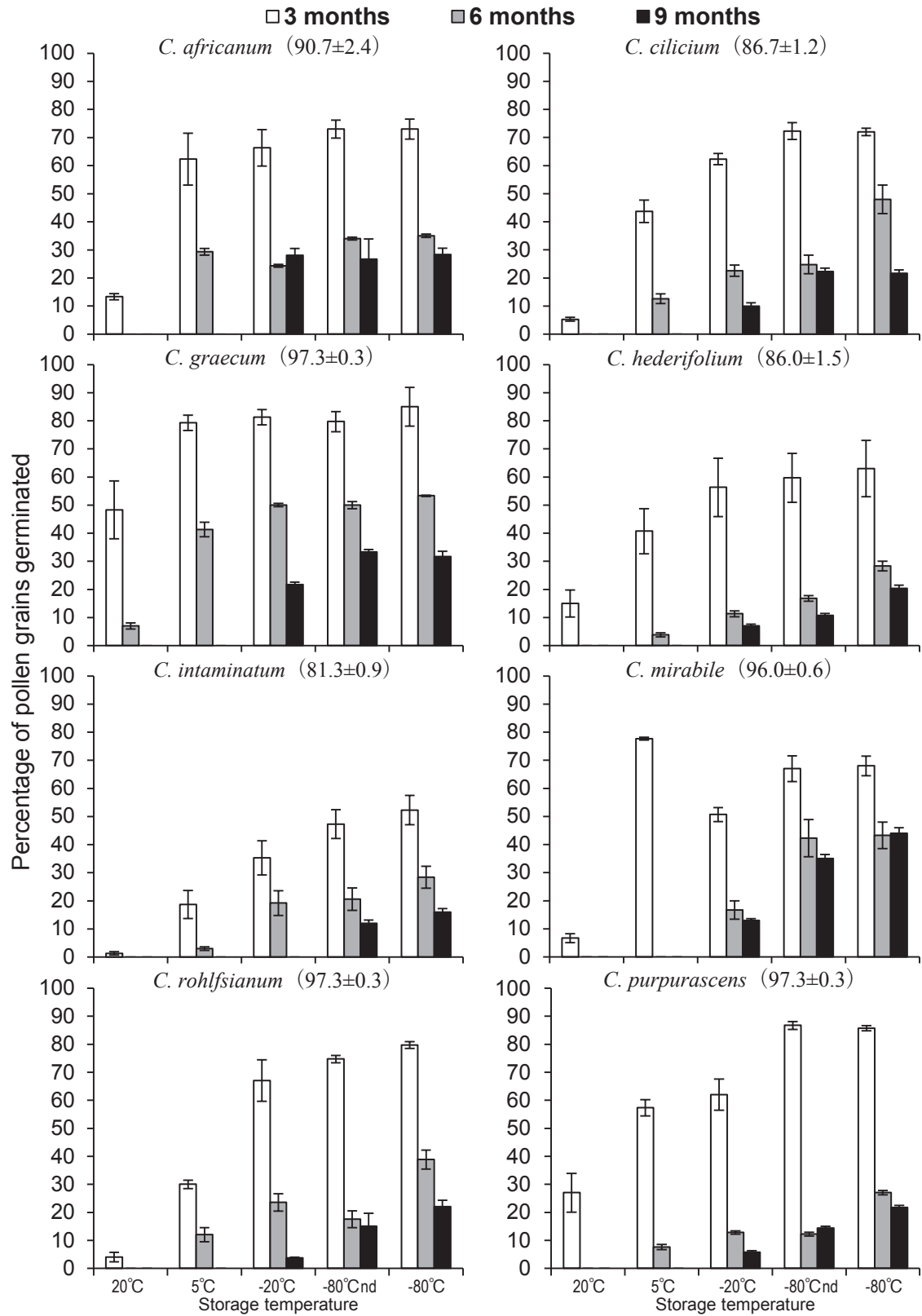
なお、本研究では、いずれの処理区においても、貯蔵3、6および9か月後のアセトカーミン染色率と人工培地上での花粉発芽率に明確な差異が認められた。貯蔵前より貯蔵後でその差異が顕著になっていること、本研究では密閉したシャーレ内の寒天培地上で花粉を培養しており、貯蔵後の花粉の吸水は十分に行われたと考えられること等を鑑みると、貯蔵後には、アセトカーミンには染色されるものの発芽能力は著しく低下している花粉が多く存在しているものと推測される。したがって、一般にアセトカーミン染色が花粉稔性の簡易推定法として用いられることもあるものの、*Cyclamen*属野生種の花粉貯蔵において花粉稔性を調査する場合は、少なくとも人工培地上での花粉発芽を調査する必要があることが示唆される。

摘 要

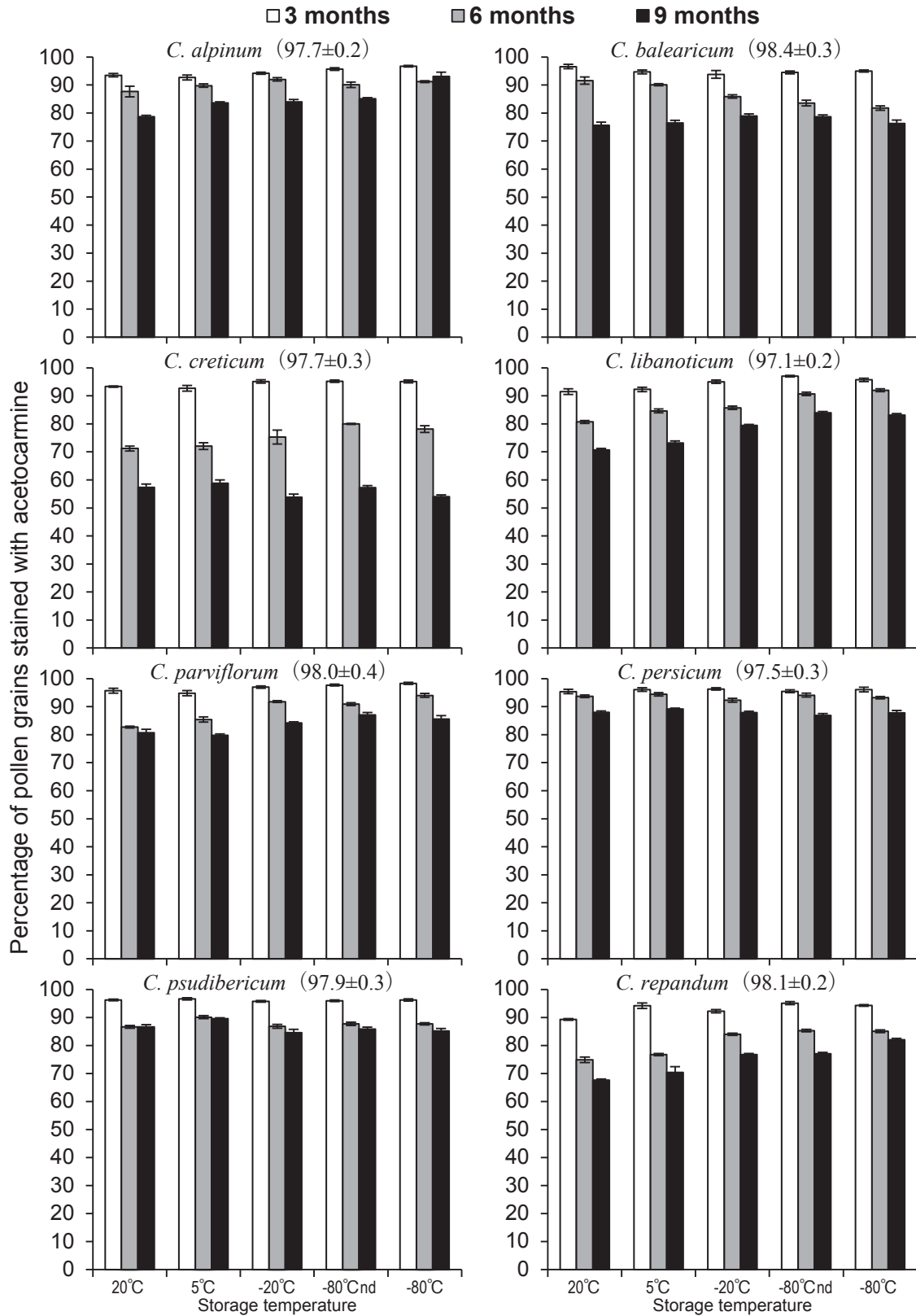
*Cyclamen*属野生種16種を用いて、20、5、 -20 および -80°C での花粉貯蔵の可能性を調査した。貯蔵3か月後ではすべての種において、乾燥処理した後に -80°C で貯蔵した -80°C 貯蔵区で貯蔵前の50%以上の花粉発芽率が維持された。また、6か月以上の長期間花粉を貯蔵した場合には、*C. africanum*を除いたすべての種で、貯蔵後の花粉発芽率は、 -80°C 貯蔵区で他の温度で貯蔵した区より高い値を示した。これらのことから、*Cyclamen*属植物の花粉貯蔵においては、乾燥処理した後に -80°C で貯蔵することが望ましいと考えられた。



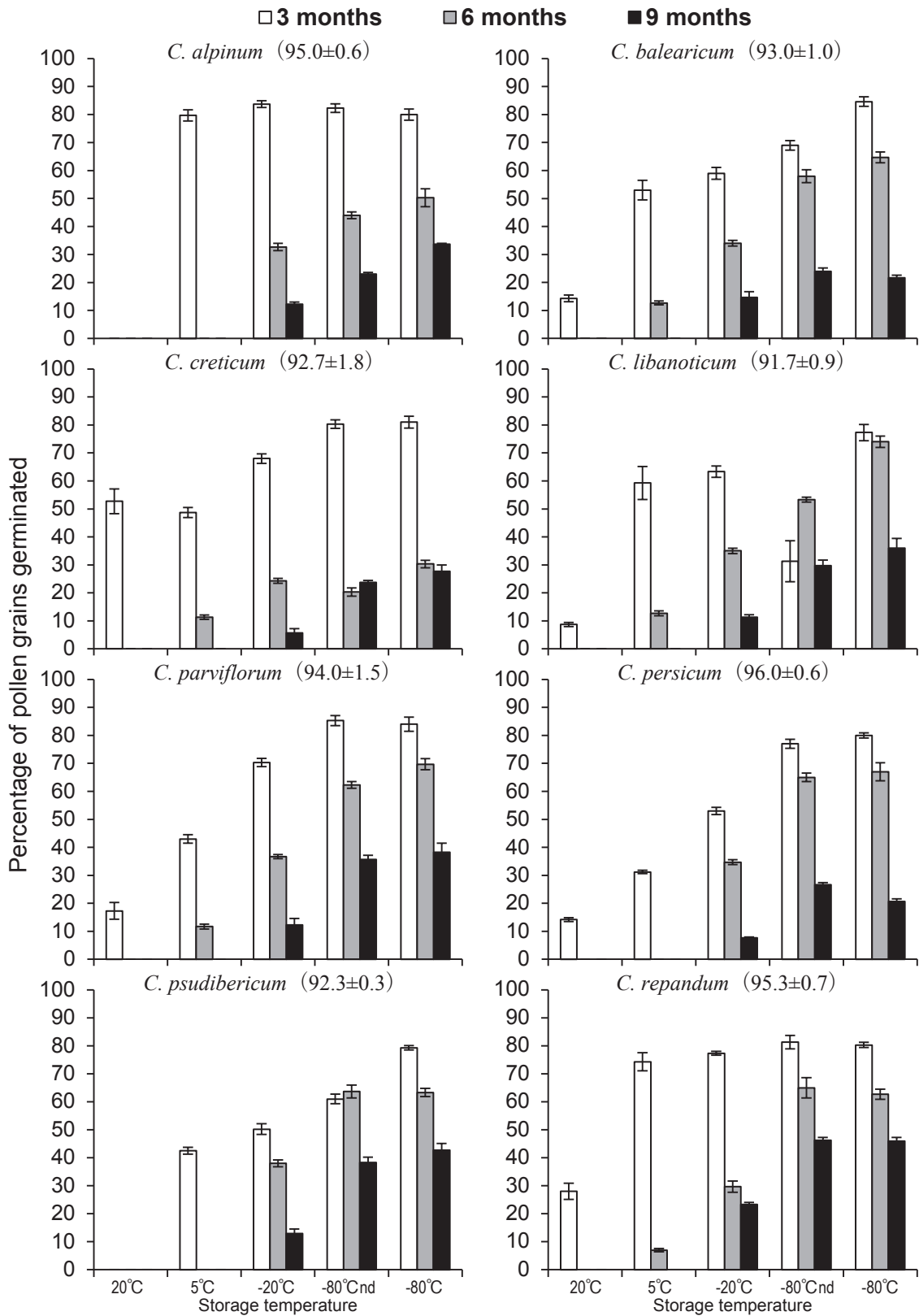
第1図. 秋咲き *Cyclamen* 属野生種および *C. purpurascens* 花粉の3, 6および9か月間貯蔵後のアセトカーミン染色率に及ぼす貯蔵温度の影響. バーは標準誤差を示す. 種名の後の数字は貯蔵前のアセトカーミン染色率 (%). nd: 乾燥処理なしで貯蔵.



第2図. 秋咲き*Cyclamen*属野生種および*C. purpurascens*花粉の3, 6および9か月間貯蔵後の人工培地上での花粉発芽に及ぼす貯蔵温度の影響. バーは標準誤差を示す. 種名の後の数字は貯蔵前の花粉発芽率 (%). nd: 第1図参照.



第3図. 冬～春咲き *Cyclamen* 属野生種花粉の3, 6および9か月間貯蔵後のアセトカーミン染色率に及ぼす貯蔵温度の影響. バーは標準誤差を示す. 種名の後の数字は貯蔵前のアセトカーミン染色率 (%). nd: 第1図参照.



第4図. 冬～春咲き *Cyclamen* 属野生種花粉の3, 6および9か月間貯蔵後の人工培地上での花粉発芽に及ぼす貯蔵温度の影響. バーは標準誤差を示す. 種名の後の数字は貯蔵前の花粉発芽率 (%). nd: 第1図参照.

引用文献

- (1) Grey-Wilson, C. : *Cyclamen*, Timber Press, Portland (2002).
- (2) Ishizaka, H. and Uematsu, J. : Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton. by ovule culture. *Japan. J. Breed.*, 42, 353-356 (1992).
- (3) Ishizaka, H. and Uematsu, J. : Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. *Euphytica*, 82, 31-37 (1995).
- (4) Ishizaka, H. : Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* and *C. graecum*, *Euphytica*, 91, 109-117 (1996).
- (5) Eward, A. : Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. *Plant Breeding*, 115, 162-166 (1996).
- (6) 澁澤直恵, 小川謙司 : 胚珠培養法を用いた *Cyclamen persicum* Mill. と *C. rohlfianum* Aschers. および *C. persicum* と *C. libanoticum* Hildebr. の種間雑種の作出. *東京農試研報.*, 27, 9-15 (1997).
- (7) 高村武二郎, 山田理恵子, 田中道男 : シクラメン園芸品種 (*Cyclamen persicum* Mill.) と *C. purpurascens* Mill. の種間雑種作出に及ぼす種子親の遺伝子型の影響. *香川大学農学部学術報告*, 54, 45-48 (2002).
- (8) Ishizaka, H. : Interspecific hybridization by embryo rescue in the genus *Cyclamen*, *Plant Biotechnol.*, 25, 511-519 (2008).
- (9) 高村武二郎, 石塚栄治 : 人工培地上における *C. coum* の花粉発芽, *香川大学農学部学術報告* 66, 1-4 (2014).
- (10) 岩波洋造 : 花粉学. 講談社, 東京 (1980).
- (11) Ching, T.M. and Ching, K.K. : Freeze-drying pine pollen. *Plant Physiol.*, 39, 705-709 (1964).
- (12) Connor, K.F. and Towill, L.E. : Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage, *Euphytica*, 68, 77-84 (1993).
- (13) Karipidis, C., Olympios, C., Passam, H.C. and Cavvas, D. : Effect of moisture content of tomato pollen stored cryogenically on *in vitro* germination, fecundity and respiration during pollen tube growth, *J. Hort. Sci. and Biotech.*, 82, 29-34 (2007).
- (14) Towill, L.E. : Liquid nitrogen preservation of pollen from tuber-bearing *Solanum* species. *HortSci.*, 16, 177-179 (1981).
- (15) Hecker, R.J., Stanwood, P.C. and Soulis, C. A. : Storage of sugarbeet pollen. *Euphytica*, 35, 777-783 (1986).
- (16) Luza, J.G. and Polite, V.S. : Cryopreservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen. *Euphytica*, 37, 141-148 (1988).
- (17) Parton, E., Vervaeke, I., Delen, R., Vandebussche, B., Deroose, R. and De Proft, M. : Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, 125, 155-161 (2002).
- (18) Polite, V.S. and Luza, J.G. : Low temperature storage of pistachio pollen. *Euphytica*, 39, 265-269 (1988).
- (19) 金澤俊成, 小林佐代, 八鍬利郎 : ギョウジャニンニクの開花過程および花粉発芽と貯蔵, *園学雑.*, 60, 947-954 (1992).