

論 説

花粉の生理学的研究 XXV

Instant pollen tube の形成について (1)

中 村 紀 雄*・岩 波 洋 造*

Physiological Researches of Pollen XXV

Studies on the formation of instant pollen tube (1)

By

Norio Nakamura** and Yozo Iwanami**

ま え が き

花粉を適当な人工培地に散布すると、吸水し、発芽して花粉管を伸ばすが、吸水から発芽までの時間は普通数分から数時間で、この間に花粉粒の中では様々な代謝変化が進行している。したがって発芽という現象の中にはいろいろな生理的变化が含まれているが、発芽口から花粉管または花粉管状の細胞内容が出現するという現象は、たとえば超高線量の放射線を照射して核の機能を失わせたときにもみられ、走査型電子顕微鏡で観察する時の真空蒸着の操作の過程でもみられることがある。⁽²⁾ このような自然の発芽とは異なると思われる花粉管状の管の出現は、花粉の生理学的研究、特に自然の発芽現象との比較の上で、大へん興味のあることである。

これらの現象と無関係ではないと思われるが、最近 Linskens ら(3)は、培養したペチュニア花粉を希釈した強酸で処理すると花粉管状の管が形成されることをみた。彼らはこの管の形成がきわめて短時間に行なわれるために、Instant Pollen Tube (IPoT)とよび、この IPoT の形成が吸水前の花粉にはみられず、発芽力を失った花粉にもみられないことから、IPoT 形成は花粉の発芽や花粉管の伸長と関連のある現象であると考えた。

筆者らの研究室ではこの Linskens らの仕事に注目し、たとえば須山は培養初期のチャの花粉が酸液で処理されると IPoT を形成すること、培養時間を長くするほど IPoT の形成率が高まること、および発芽を始めた花粉は IPoT をつくりにくくなることなどの事実を観察した。筆者らは、この IPoT を調べることが、花粉の発芽や花粉管伸長の機構を解明するための手段の1つになりうると考えて IPoT の調査を続けてきたが、今回はこれらのうちの基礎的な調査の結果について報告する。

材 料 と 方 法

今回の調査に用いた花粉は以下の7種類で、開花直後の花から採取して直ちに実験に使用した。ツバキ、サザンカ、クロマツの花粉は長く貯蔵に耐えるため、採取後、花粉をシリカゲルと共にプラスチック容器に入れ、-15℃のもとに貯え、必要に応じて容器より取り出して使用した。

ヤマツバキ	<i>Camellia japonica</i>
サザンカ	<i>Camellia sasanqua</i>
テッポウユリ	<i>Lilium longiflorum</i>
トウモロコシ	<i>Zea mays</i>
マツパボタン	<i>Portulaca grandiflora</i>

* 横浜市金沢区六浦町 横浜国立大学生物学教室 (☎236)

** Biologikai Institute, Yokohama City University, Kanazawa-ku, Yokohama, Japan

ロシアヒマワリ *Helianthus annuus*クロマツ *Pinus thunbergii*

実験方法は、まずスライドガラス上に 10% 蔗糖培養液を滴下し、その表面上に花粉を散布し、一定時間 23℃～25℃ のもとで培養した。培養後、濾紙で蔗糖液を吸い取り、スライドガラス上に残った花粉に直ちに希釈した酸液を滴下した。普通 IPoT は数秒から 1、2 分の間に形成されたので、この調査においては酸を滴下してから 3～10 分以内に IPoT 形成率、および IPoT の長さを測定した。IPoT を形成させる酸として、硫酸、塩酸、硝酸を用いたが、酢酸では IPoT は形成されなかった。ここでは 3～4% 希硫酸を用いた時の結果をしめした。対照実験としては、花粉を同様に培養した後に、酢酸カーミン液を滴下、固定して観察、測定をおこなった。IPoT の長さ、花粉管の長さの測定は、最も長いものから順に 10 個の平均値をとった。また、IPoT の形成率の測定においては、すでに発芽していた花粉と酸処理により IPoT を形成したものとは、形態的に区別が困難な場合が多かったので、共に IPoT として測定した。

実験結果と考察

(1) IPoT の形成の観察

IPoT はいずれも発芽口の部分から出てきたが、その形は花粉の種類や酸の濃度により違いがみられた。また、ユリ花粉は酸処理により、発芽溝の部分が太くふくれ上り、クロマツは細胞全体が変形してふくらみトウモロコシ、マツバボタンの花粉は IPoT を形成しなかった。

IPoT を形成する花粉においても吸水前に酢酸蒸気処理、熱処理 (100℃、30 分) したときには IPoT 形成はみられず、また、花粉を培養せずに直接酸処理した場合も IPoT 形成は観察されなかった。したがって、花粉が吸水・膨潤して、生理的活性状態にはいることが IPoT 形成のために不可欠の条件であると思われる。

IPoT の形成の様子は、ツバキ花粉の場合、発芽前の培養花粉を酸で処理すると、発芽口の部分から、ややゲル化したように見える細胞内容が湧きでるように

伸びてきて管を形成した。この管形成に要する時間は培養時間の長さが長いほど長くなった。しかし、IPoT 形成後長時間酸中に放置しておくと、他の発芽口からも乳首状突起が出現した。同様のことは、花粉を直接酸で処理して、長時間放置した場合にも観察された。また、花粉管伸長過程にはいった花粉に酸処理をおこなうと IPoT は瞬間的に形成され、時に管先端より原形質の吐出がみられた。

(2) 前培養時間の長さと IPoT の形成率

ベニユニアの花粉は培養時間を長くするほど IPoT をよく形成し、15 分間培養して酸処理をすると約 50% の花粉が IPoT をつくること知られている。筆者らがツバキ、サザンカ、ヒマワリの花粉について調べた培養時間と IPoT 形成率の関係が Fig. 1 に示されている。

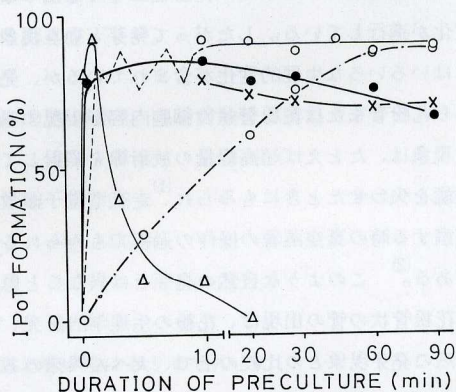


Fig. 1 Relation of IPoT formation to the duration of preculture of pollen grains.

○.....*Camellia japonica* pollen (— · — pollen precultured on sucrose-agar plate)
●.....*Camellia japonica* pollen washed in acetone
×.....*Camellia sasanqua* pollen
△.....*Helianthus annuus* pollen

グラフにみられるとおりツバキ花粉を蔗糖寒天培地上で培養した場合、IPoT 形成率はベニユニアの場合のように、培養時間に比例して増加したが、培養液上の場合、培養 10 分間で 80% 以上の IPoT 形成率をしめしたが、それ以内の時には一定の値が得られなかつ

た。この違いは、培養液上で培養した場合、花粉の表面に脂質が付着しているため、散布花粉が小塊を作ってしまう、個々の花粉粒の吸水が同時に行なわれなかったためと考えられる。そこでアセトンで洗った花粉（花粉をアセトン中に浸し、乾燥した後、散布すれば正常に発芽し、生長する⁽⁵⁾）を用いて調べたところ、1分間培養しただけで常に80%以上のIPoT形成がみられた。したがって、ツバキの花粉は吸水しさえすれば、短時間でIPoTを形成しようと考えられる。

サザンカの場合も、ツバキの花粉と同様に、培養10分で80%のIPoT形成がみられた。

ヒマワリにおいては、花粉を直接酸で処理した場合にも20%のIPoT形成がみられ、培養後1分まではIPoT形成率が増加したが、5分後には12%に減少するという急激な変化がみられた。これらの原因については、ヒマワリの花粉の寿命がごく短いことと関係があると思われるが、細かい点については不明である。

(3) 前培養時間とIPoTの長さ

花粉の培養時間と酸処理により生じたIPoTの長さとの関係がFig.2に示されている。ツバキの花粉は散布後20~30分で発芽したが、発芽後に酸処理をおこなうと、おそらくIPoTは発芽した花粉の先に付け加えられるような形態になると思われる（Fig.8参照）。Fig.2のPt + IPoTは観察したIPoTの長さをしめし、Ptは対照の実際の花粉管の長さを、そしてIPoTは、その長さの差、つまり酸処理により伸長したと思われるIPoTの長さを示している。したがってIPoT自身の伸びは培養時間に比例して長くなり、発芽時に最高となるが、発芽してからはかえって短くなる傾向がみられた。サザンカの場合も60~90分にかけて発芽がみられたが、ツバキと同じ傾向であった。このことは花粉管をつくるために花粉中に準備されている膜成分の量や、細胞の内圧の大小と関係していると思われる。

サザンカ花粉では、発芽前の培養20~60分にかけてIPoTの伸長増がみられなかったが、そのかわりに原形質全体が花粉の外膜の外に飛び出す現象がみられ

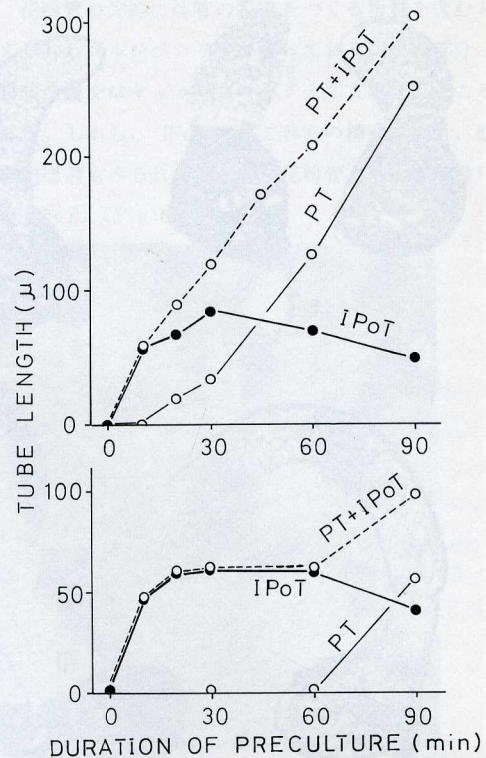


Fig. 2 Relation of the length of IPoT and pollen tube of *Camellia japonica* pollens to the duration of preculture.

PT.....pollen tube, IPoT.....instant pollen

PT+IPoT....length of tube added IPoT to pollen tube

(4) 花粉の活力とIPoTの形成

花粉がIPoTを形成するためには、吸水、膨潤することが必要であると思われるが、さらに細胞内の生理的状态にも影響されると考えられる。そこで花粉を培地に散布する前に、100℃、80℃で一定時間熱処理を行い、細胞の生理的機能、つまり活力を失わさせてIPoT形成率を調べた結果がFig.4である。100℃中に10分間おいた花粉はほぼ発芽力を失ない、吸水、膨潤はみられたがIPoTの形成はほとんどみられなかった。80℃で10分間の熱処理では80%の花粉が活力をもっていたが、処理時間の長さに比例してIPoT形成率、発芽率が急減した。

また、ヒマワリの花粉では開花時に花粉を採取し、直ちにIPoT形成をみると高い形成率をしめしたが（

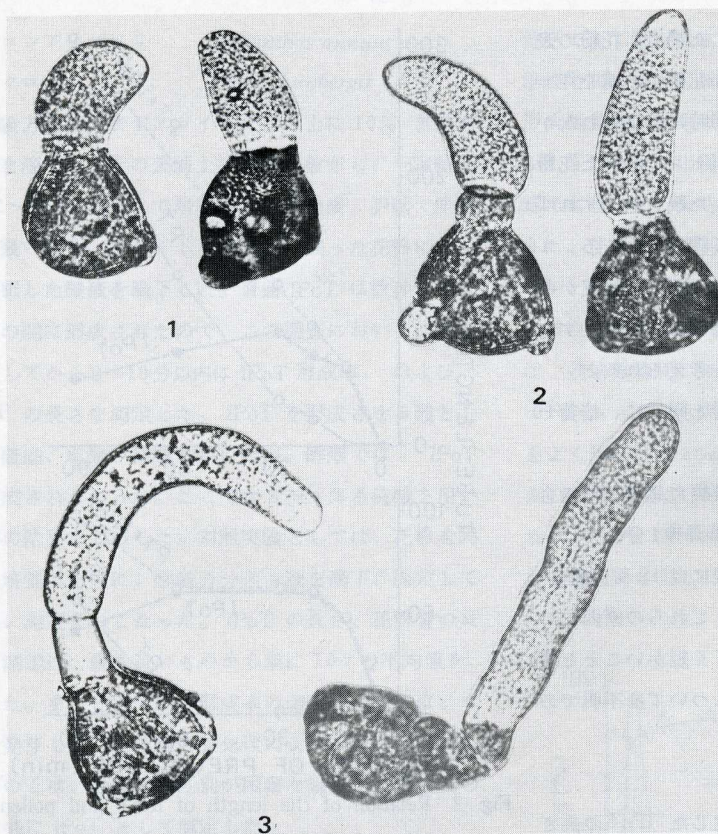


Fig. 3 Photographs show that IPoTs produced from precultured pollens of *Camellia japonica* look like intact pollen tubes.

1...pollens precultured for 10 minutes
2... " " 20 minutes
3... " " 30 minutes

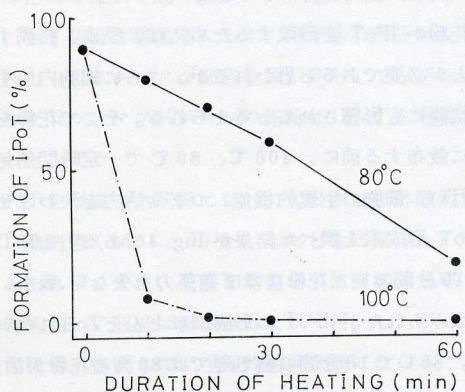


Fig. 4 Effect of heating the pollen of *Camellia japonica* before preculture on the formation of IPoT.

80C.....pollen heated for 10 minutes at 80C
100C..... " " 100C

Fig.1)、採取後それを室温に放置しておくと、Fig.5のようにIPoTの形成率が減少した。しかも、ヒマワリの花粉ではいずれの時間においても発芽は観察されなかった。キクの仲間の花粉は一般に寿命が短かく、たとえばコハマギク⁽⁶⁾の花粉が開粉6時間で発芽力を失なうことと考えあわせると、興味あることである。

花粉が IPoTをつくるということは、その花粉が生きていて、発芽の準備を進めていたことを意味しているから、IPoT の形成の調査は、花粉の発芽力を知るための1つの手段になるように思われる。

(5) 電子顕微鏡による IPoT の観察

ツバキの花粉を用いて自然に発芽した花粉管と IPoT の先端部分の断面を比較したものが Fig.6である。試料の調

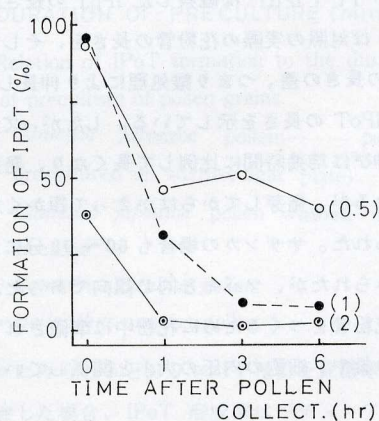


Fig. 5 Relation of the formation of IPoT of *Helianthus annuus* to the time after pollen collection. (Figures along the graph show the length of preculture time in minutes.)

製は、花粉管および IPoT を 2% 過マンガン酸カリウムで固定したのち、リン酸緩衝液で洗い、アセトン、プロピレンで脱水してからエポン812に包埋した。40℃に1日、60℃に2日間保った後室温に放置して樹脂をかためた。切片作成後、硝酸鉛と酢酸ウラニルで染色をおこない、電子顕微鏡で観察した。

花粉管の先端には管の膜壁をつくる物質を含むと考えられるゴルジベシクル⁽⁷⁾が集っており、この部分は光学顕微鏡ではキャップブロック⁽⁸⁾としてみえるところである。しかし、IPoTではこれらの構造は崩れ、他の細胞構造もみられず、正常の花粉管とは大きな違いがみられた (Fig.6)。

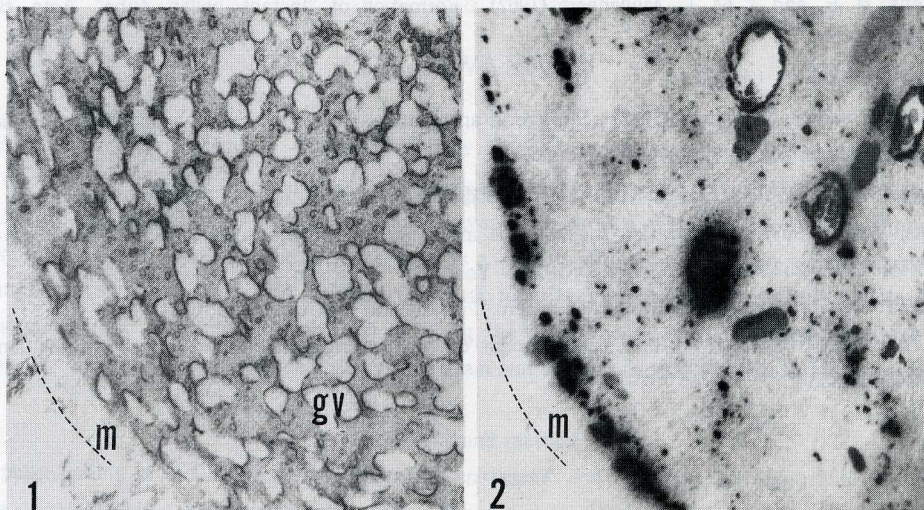


Fig. 6 Comparison of electron micrograms of the tips of pollen tube(1) and instant pollen tube(2) of *Camellia japonica*.

(gv.....golgi vesicle, m.....pollen tube membrane)

以上 IPoT についての基礎的な調査の結果について述べたが、花粉が酸液中で花粉管状の IPoT をつくる機構については、発芽前の培養花粉がもっともよく IPoT をつくること、サザンカの花粉で酸処理をした時に細胞内容の " とび出し現象 " がみられることなどから、酸が発芽口付近の細胞壁に何らかの変化を与え、物理的に IPoT が出やすい状態をつくったと考えられる。つまり、酸を処理することにより正常な原形質の構造は失われてしまうから、花粉が吸水し、膨潤して

から生理的活性状態にはいり、酸処理直前までの間に生じた細胞内圧や花粉細胞壁の収縮する力によって内容物が外に押し出されると考えられる。また、その際の花粉の細胞壁の変化は、柔細胞壁における acid growth⁽⁹⁾ に対応するものと考えられる。しかし、IPoT 形成は花粉の種類、細胞の生理的状態、発芽口の形などの影響を受けると思われるので、その形成機構を説明するのはまだ困難な現状である。

引用文献

- 1 Iwanami, Y. (1963) : Effects of irradiation on pollen II. Gamma Field Symposia 2.53-67
- 2 岩波洋造 (1971) : 花粉学大要 (口絵写真) 風間書房
- 3 Linskens, H. F. and J. M. L. Mulleneers (1967) : Formation of "Instant pollen tube". Acta. Bot. Neel. 16.132-142
- 4 須山芳明 (1970) : (未発表)
- 5 Iwanami, Y. and N. Nakamura (1972) : Storage in an organic solvent as a means for preserving viability of pollen grains. Stain Techn. 47.137-139
- 6 永海秋三・秋沢一位・岩波洋造 (1972) : キク属植物花粉の人工培養の研究・花粉誌・10.13-17
- 7 Linskens, H. F. (1969) : Fertilization mechanisms in higher plants. Fertilization (ed. C. B. Metz and A. Monroy) Vol. 2 189-252. Academic Press INC. New York.
- 8 Iwanami, Y. (1959) : Physiological studies of pollen. J. Yokohama City Univ. 16 (C-34). 1-137
- 9 Rayle, P. L. and R. Cleland (1970) : Enhancement of wall loosening and elongation by acid solution. Plant Physiol. 46. 250-253

Summary

Pollen grains of *Camellia japonica*, *Camellia sasanqua* and *Helianthus annuus* which had been precultured for a short time and treated with dilute acid solution (e. g 4% sulfuric acid) produced instant pollen tube (IPoT) as shown in Fig. 3. IPoT was produced through germination pore of the pollen grain or from the tip of pollen tube, and the length of IPoT was proportioned to the duration of preculture (Fig. 1, 2). Pollen grain heated and lost the ability to germinate could not produce IPoT (Fig. 4). Electron microphotograph of the tip of the IPoT showed that the components of the protoplasm of IPoT got out of shape and golgi vesicles which had a role of carrying membrane substance for making pollen tube were not observed in a tip of IPoT (Fig. 6).

It can be concluded by these facts that though IPoT closely resembles to pollen tube and its formation seems to have some connection with the germination of pollen, IPoT differs from normal pollen tube qualitatively.