

論 説

Instant Pollen Tubeの形成について (2)

中村 紀雄*

Formation of instant pollen tube (2)

Norio NAKAMURA **

緒 言

前報¹⁾においては、培養初期のツバキなどの花粉が希釈強酸液で処理されると、花粉管状の Instant Pollen Tube (IPoT) を形成すること、その IPoT は発芽率の高い花粉ほどよく作られること、および IPoT 内の原形質は発芽した花粉管内の原形質とは異なり、Golgi vesicle などの構造が崩れていることなどについて報告した。これらの事実は IPoT がふつうの花粉管と同じではないが、IPoT の形成状態をみるのが、吸水から発芽にいたるまでの花粉の生理的变化を探る手がかりの一つになることを示唆している。今回筆者は培養液中の糖濃度および種々の化学物質の IPoT 形成への影響について調査したので、その結果を報告する。

材 料 と 方 法

実験には、前回¹⁾の実験でもっともよく IPoT を形成したヤマツバキ (*Camellia japonica*) の花粉を使用した。開花直後の花から採取した花粉は葉包紙に包み、シリカゲルとともにプラスチック容器に入れて、冷凍庫 (約-15°C) の中に貯えておいた。こうして貯蔵したツバキ花粉は少なくとも2年以内は正常に発芽するが、今回の実験では、採取後6ヶ月以内のものが用いられた。

IPoT の観察の方法は前報の通りであるが、要約すると、スライドガラス上に培養液を滴下し、その表面に塊状にならぬように花粉を均一に散布し、一定時間温室で培養したのちに、4%希硫酸を添加して IPoT を形成させて観察をおこなった。IPoT はふつう発芽前の花粉では発芽孔から出てくるが、発芽した花粉においては花粉管の先端に付加される形に形成される。今回の調査においては、その両者を含めて IPoT 形成率として記録した。

実験結果と考察

(1) 培養液のショ糖の濃度と IPoT 形成

培養液中のショ糖濃度は花粉の発芽や管伸長に影響を与える。したがって IPoT 形成に対しても何らかの影響を及ぼすと考えられる。とくに IPoT 形成には花粉粒の内圧 (浸透圧による) が関与していると考えられるから、酸処理をする前の培養液の濃度は当然 IPoT 形成に変化を与えるであろう。

そこで花粉を10%から30%ショ糖液で一定時間培養し、その後に前記の方法で酸処理をして発芽率と IPoT 形成率を調べた。その結果が Table 1 に示されている。ツバキの花粉は10%液ではよく発芽するが30%液では全く発芽せず、IPoT 形成率は培養液の糖濃度を高くするほど減少する傾向がみられた。

* 横浜市立大学 生物学教室 (横浜市金沢区六浦町 4646)

** Biological Institute, Yokohama City University, Yokohama. 236, Japan.

Table 1 Relation of sucrose concentration of culture medium to IPoT formation of *Camellia japonica* pollen. (Pollens cultured for certain time were treated by 4% sulfuric acid solution.)

Culture time (min)	Rate of germination and IPoT formation (%)					
	10 % *		20 % *		30 % *	
	IPoT **	Germ ***	IPoT	Germ	IPoT	Germ
10	92	0	75	0	41	0
30	—	—	78	0	21	0
45	87	49	—	—	—	—
60	—	—	71	27	23	0
90	90	84	75	48	0	0

* Sucrose concentration of culture medium.

** Rate of IPoT formation. (%)

*** Rate of germination (%)

次に30%液で花粉を各20, 40, 60分間培養したのち、培養液を10%液にかえてIPoT形成への影響をみた。この場合はFig. 1にみられる通り、いずれの

とをしめしている。

そこでさらに、10%ショ糖液で培養した花粉を種々の濃度のショ糖を含む酸液で処理して、IPoT形成への影響を調べてみた。その結果がFig. 2に示

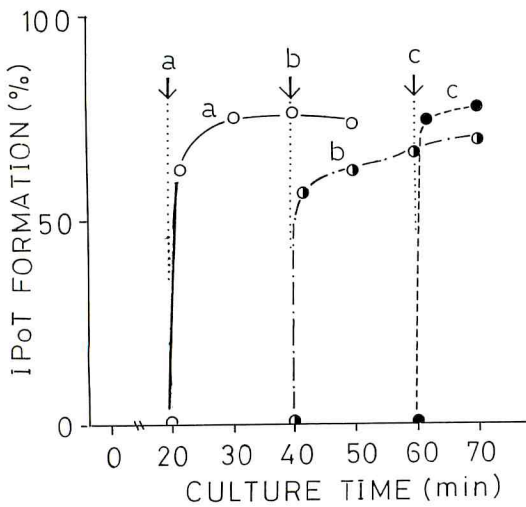


Fig. 1 Effects of translocation of *Camellia japonica* pollen from 30% sucrose medium to 10% sucrose medium on IPoT formation. Three arrows indicate the time of translocation of the pollen.

場合も初めから10%液で培養した場合と同じように高いIPoT形成率を示した。このことはIPoT形成が酸処理をする時の花粉粒の内圧と関係があるこ

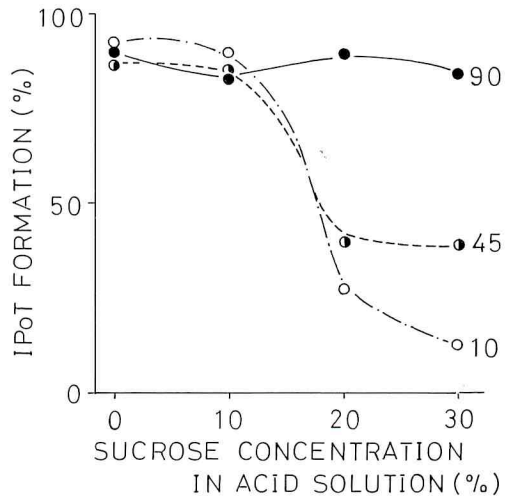


Fig. 2 Relation of sucrose concentration in acid solution to IPoT formation of *Camellia japonica* pollen. Figures along the curves show culture time of the pollen in minutes.

されている。この場合、グラフに示されているように

酸液中の糖濃度が高いほど IPoT の形成率は減少した。とくに 10 分間培養した場合はまだ花粉が発芽していないのですべて IPoT のみであるが、酸液中の糖濃度が高いときほど IPoT は形成されにくいことをしめしている。しかもこの時の形成された IPoT は管状というよりは球状に近い形になった。これらのことから花粉が高濃度のショ糖を含む酸液中では浸透圧的に内から管を押し出す力が弱まることと共に、外液の粘度が高まることによって管が出にくくなるため、IPoT の形成率が下ると推測できる。

以上の結果から培養液中および酸液中のショ糖濃度が IPoT 形成に影響することが判明したので、以

後の調査の対照実験には、10%ショ糖液で培養した花粉を、糖を含まぬ酸液で処理する方法をとることにした。

(2) 糖の種類と IPoT 形成

花粉の培養液にショ糖を加えるのは外液の浸透圧を高めることのほかに、エネルギー源として使われることが知られている²⁾ので、エネルギー源としての利用価値の異なる糖を含んだ培養液で花粉を培養してから酸処理をして IPoT 形成への影響を調べた。

Table 2 Effects of various kinds of sugars (0.3M) in culture medium on pollen germination and IPoT formation.

Culture time (min)	Rate of germination and IPoT fomation (%)							
	Glucose		Mannitol		Fructose		D.W	
	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ
10	94	0	92	0	91	0	82	0
20	94	3	92	0	88	0	82	0
30	93	15	85	6	73	14	72	0
40	—	—	—	—	—	—	67	8
45	89	54	82	10	68	20	—	—
50	—	—	—	—	—	—	39	13
60	89	55	69	22	46	18	35	20

Table 2 はグルコース、フラクトース、マニトールの 0.3 M 液および蒸留水 (D, W) でツバキ花粉を培養したのち、酸液で処理して IPoT 形成を調べた結果をしめしている。

グルコースで培養した花粉は発芽率、IPoT 形成率ともにショ糖の場合 (Table 1) とほぼ同じであったが、他の糖で培養した花粉はショ糖の場合にくらべて発芽率がかなり低くなり、IPoT 形成率も培養時間が長くなると減少する傾向がみられた。この傾向はフラクトース、D.W で顕著にみられ、とくにフラクトースは D.W の場合とほとんど同じ値を示した。このことから、ツバキの花粉の生長にはフラク

トースはほとんど利用されないと推測される。

(3) イオンと EDTA の影響

培養液中に各種のイオンや EDTA (ethylene diamine tetra acetate) を添加すると花粉の発芽や花粉管伸長に影響があらわれることについてはすでに多くの報告がある。^{3,4)}これらの中で花粉の生長に促進的に働くことが知られている Ca^{++} と B^{+++} 、阻害的に作用する Cu^{++} 、 Zn^{+++} 、およびキレート試薬である EDTA を培養液に添加して、IPoT 形成率への影響を調査した。その結果が Table 3 に示されている。

Table 3 Effects of some ions and EDTA in culture medium on pollen germination and IPoT formation.

Culture time (min)	Rate of germination and IPoT formation (%)					
	Ca(NO ₃) ₂ (10 ⁻³ M)		H ₃ BO ₃ (10 ⁻³ M)		CuSO ₄ (10 ⁻³ M)	
	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ
10	87	0	86	0	82	0
20	86	2	83	0	71	0
30	77	22	82	19	30	0
45	86	54	84	32	17	0
60	84	72	77	58	12	0
90	86	86	84	71	—	—

Culture time (min)	Rate of germination and IPoT formation (%)							
	ZnSO ₄ (10 ⁻³ M)		ZnSO ₄ (10 ⁻⁵ M)		EDTA ₃ (10 ⁻³ M)		EDTA ₃ (10 ⁻⁵ M)	
	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ
1	—	—	—	—	85	0	—	—
10	88	0	90	0	76	0	88	0
20	90	0	92	0	46	0	86	0
30	90	0	90	27	20	0	86	14
40	92	0	87	46	7	0	—	—
45	—	—	—	—	—	—	—	21
50	90	0	84	56	7	0	—	—
60	89	0	92	69	3	0	81	45
90	—	—	—	85	—	—	69	82

表にみられるように Ca⁺⁺ と B⁺⁺⁺は IPoT 形成率に対して特別な変化を与えなかった。これらのイオンは多くの花粉の生長に促進的に働くが、ツバキ花粉に対しては促進作用をしめさないことが報告されているから、⁵⁾ IPoT 形成に影響があらわれないことはむしろ当然であろう。一方、Cu⁺⁺は発芽を完全に抑え、IPoT の形成に対しても強い阻害作用を示した。EDTA (10⁻³M) も発芽および IPoT 形成に対して阻害的に作用したが、Zn⁺⁺は発芽を強く抑えたが、IPoT の形成に対してはほとんど阻害作用を示さなかった。このことは、Zn⁺⁺の阻害作用が、Cu⁺⁺や EDTA の作用と質的に違っていることをしめして

いる。

(4) 植物ホルモンの影響

インドール酢酸 (IAA)、ジベレリン (GA)、ベンジルアデニン (BA) の IPoT 形成に対する影響について調べた結果が表 3 に示されている。この場合 10⁻⁴M の濃度の BA を与えたときに発芽および IPoT 形成を強く阻害したほかは、ほとんど対照との相違がみられなかった。これらのホルモン類は発芽や IPoT 形成に対してはほとんど関与していないものと思われる。

Table 4 Effects of growth hormone in culture medium on pollen germination and IPoT formation.

Culture time (min)	Rate of germination and IPoT formation (%)											
	IAA (10 ⁻³ M)		IAA (10 ⁻⁵ M)		BA (10 ⁻⁴ M)		BA (10 ⁻⁶ M)		GA (10 ⁻⁴ M)		GA (10 ⁻⁶ M)	
	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ
10	88	0	91	0	61	0	81	0	93	0	91	0
20	91	0	87	2	38	0	87	40	87	0	94	2
30	90	2	92	21	20	0	89	58	84	14	89	42
45	88	7	91	36	14	0	84	61	82	—	80	48
60	91	13	90	61	15	0	86	73	82	41	81	58

(5) 呼吸阻害剤の影響

呼吸毒である DNP (2,4 - dinitrophenol), KCN, NaN₃ (PH7.0) の影響について検討した結果が Table 3 に示されている。

DNP は KCN, NaN₃ と作用機作が異なり、花粉においても呼吸量そのものはむしろ促進させることが

知られている⁹⁾が、IPoT 形成についてはこれらの間に違いがみられず、いずれの場合にも高い濃度においても IPoT 形成がみられた。しかし KCN, DNP では Zn の場合と同様に、実際の発芽はみられなかった。

このような違いは IPoT の形成と発芽の機構の違いを示していると思われる。

Table 5 Effects of respiration inhibitors on pollen germination and IPoT formation.

Culture time (min)	Rate of germination and IPoT formation (%)													
	KCN(10 ⁻² M)		KCN(10 ⁻³ M)		DNP(10 ⁻³ M)		DNP(10 ⁻⁴ M)		DNP(10 ⁻⁵ M)		NaN ₃ (10 ⁻³ M)		NaN ₃ (10 ⁻⁵ M)	
	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ	IPoT	Germ
10	91	0	87	0	84	0	87	0	93	0	90	0	88	0
20	90	0	84	0	79	0	92	0	94	5	86	0	90	-
30	86	0	88	0	78	0	86	0	94	48	90	10	92	27
40	82	0	83	5	82	0	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	84	0	88	60	84	17	87	-
50	84	0	84	10	79	0	-	-	91	76	-	-	-	-
60	82	0	73	19	75	0	89	0	93	69	72	25	94	53
90	-	-	70	41	78	0	-	-	-	-	62	51	83	60

以上、花粉の発芽と IPoT 形成との間の共通点、非共通点を見出し、IPoT 形成を調べることが、花粉の発芽機構を追求するための一つの手がかりになりうるかどうかを知るために、花粉の培地に種々の薬品を加えたときの IPoT 形成の様子について調査した。

花粉が発芽するためには、それに必要なさまざまな化学反応が進行することとともに、管を押し出すための膨圧の高まりが必要である。これらの中でどれ一つ欠いても花粉は発芽しない。今回の調査で発芽率と IPoT 形成率とは、あるときは並行して進行し、またあるときは発芽はみられずに IPoT の形成のみがみられることがわかった。このことは生理的

変化の総合的な結果としてあらわれる発芽という現象のうちの一部の解明に、IPoT 形成の調査が役立つことを示唆している。さらに、発芽率と IPoT 形成率が並行した値をしめす場合には IPoT 形成を調べることによって花粉の発芽能を知ることが可能になる。

筆者は以上の考えに立って、さらに花粉の発芽や管伸長と IPoT 形成とを比較検討していくつもりであるが、これらの考え方や実験結果について御批判いただければ幸いである。

この研究を進めるにあたり種々の助言をいただいた横浜市立大学岩波洋造教授に感謝の意を表します。

引用文献

1) 中村紀雄, 岩波洋造 (1973)

花粉の生理学的研究 XXV : Instant pollen tube の形成について (I) 花粉誌 Vol 12 : 19-24

- 2) J. C. O'kelley (1955)
External carbohydrates in growth and respiration of pollen tubes in vitro. Amer. Jour. Bot. 42 : 322-327
- 3) 渡辺光太郎 (1969) 花粉の生理 植物生理 8, NO1,2 : 47-54
- 4) J. Heslop-Herrison (1971)
Pollen ; development and physiology Butterworths, London.
- 5) 岩波洋造, 中村紀雄 (1968)
花粉の生理学的研究 XVI : 花粉の人工培養における Boron と Calcium の促進的効果
横浜市立大論叢 Vol. 19. (自) : 1-19
- 6) D. B. Dickinson (1967)
Permeability and respiratory properties of germinating pollen. Physiol Plant. 20 : 118-127

Summary

Studies on the formation of instant pollen tube (IPoT) of *Camellia japonica* pollen were made for getting a means of elucidation of the mechanism of pollen germination.

- 1 Pollen showed high germination percentage usually formed IPoT in high rate.
- 2 Pollen cultured in medium of high concentration of sucrose (e. g. 30%) could not germinat at all, however, it retained the ability to form IPoT.
- 3 When Pollens were cultured in various kinds of sugar media, the highest IPoT formation rate was observed in sucrose medium.
- 4 Pollen cultured in medium containing fructose or mannitol formed IPoT in the same way as did pollen cultured in D. W.
- 5 Though inhibiting substances such as Zn, KCN and DNP inhibited pollen germination strongly, they could not inhibit IPoT formation.

バックナンバー (続)

第 12 号目次 (1973, 12, 30)

- 上野実朗 : 被子植物系統樹の花粉学的考察 (多集粒について)
- 三好教夫 : 走査電子顕微鏡による蘚類胞子の観察
- 中村紀雄・岩波洋造 : 花粉の生理学的研究 XXV (IPoT の形成について)
- 岩波洋造 : 花粉とブライン・シュリンプの卵の耐熱性 (英文)
- 第 14 回日本花粉学会集会報告
- 堀江延治 : 走査電子顕微鏡観察の際の花粉処理法

☆ 会誌第 4 号～第 11 号はまだ残部があります。第 3 号以前と第 6 号はありません。

御希望の方は第 4 号から第 10 号までは各冊 500 円、第 11 号からは各冊 1,000 円(振替・現金)(送料別)を本会あて送って下さい。