

原 著

# テッポウユリ花粉の発芽時における 微細構造の変化

中村澄夫\*・三木壽子\*

Fine structural changes in the germinating lily pollen.

Sumio NAKAMURA\* and Hisako MIKI-HIROSIGE\*

(受付：1980年9月29日)

成熟花粉が柱頭上あるいは培地上に付着すると、これらより吸水して体積を増し、同時に花粉粒内で新しい代謝活性が高まる。今回われわれはテッポウユリを用いて発芽花粉粒内における微細構造の変化を、置床後時間を追って検討し、若干の知見を得たので報告する。

本論文は木原均博士米寿記念号に寄せる。

## 材料および方法

材料としては本学圃場に栽培しているテッポウユリ *Lilium longiflorum* の蕾を、開花前日に採取して室内で開花させたものから成熟花粉を集めて用いた。発芽用培地には 10% 蔗糖・2% 寒天を用い、30°Cで培養後、5分、10分、15分、30分、2時間ごとに 3% Glutaraldehyde 液および 1% OsO<sub>4</sub>液 (pH 7.3 磷酸緩衝液) を用いて二重固定し、その後エタノール・プロピレンオキサイドシリーズで脱水、エポン-アラルダイト混液 (Epon 812-Araldite 6005, 1:1)、あるいは Spurr<sup>13</sup>液に包埋、超薄切片作

成後、酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛で二重染色し、JEM-100B 電子顕微鏡で観察した。

電子顕微鏡用オートラジオグラフ用には、上記培地内に Myo-inositol-2-<sup>3</sup>H (MI-2-<sup>3</sup>H, 25μCi/ml) を加え、1時間培養した花粉を MI-2-<sup>3</sup>H を含まない培地上に細い筆で集めて移し替え、更に3時間培養した後、上記の如く固定包埋し、作製した超薄切片をメッシュ上にはりつけ、染色後サクラ NR-H2-エマルジョンを塗布し、約4週間感光させた後コニードール X で現像し検鏡に用いた。

多糖類検出の為には、3% Glutaraldehyde のみで固定した材料を用い、超薄切片作製後 Periodic Acid Silver Methenamine method<sup>9</sup> により染色して検鏡に供した。

## 結果および考察

テッポウユリの花粉は脂肪性花粉で成熟花粉は多くの脂肪球と、僅かなでんぶん粒をもっている (Fig. 1)。培地上に成熟花粉を置くと約30秒で吸水して花

\* 神奈川歯科大学生物学研究室 〒238 横須賀市稻岡町 82

Biological Laboratory, Kanagawa Dental College, Inaoka, Yokosuka, Japan.

粉は球形になるが、吸水後5分経た花粉粒内にはプロプラスチドが出現し、更に時間が経つとその中にでんぶん粒が蓄積されてアミロプラスチトになる(Fig.3)。この時呼吸活性も高くなる! 花粉粒内の脂肪球は、端の方から分解して多糖類を生じ、polysaccharide particle (p-particle) を作る(Fig. 2)。この傾向は培養時間が長くなり発芽状態になるにつれて盛んになり、花粉粒内に多くのp-particleがみられる(Figs. 1, 3, 7)。Heslop-Harrison<sup>2</sup>は *Secale cereale* の発芽花粉で p-particle が直接花粉壁を形成することを報告しているが、sucrose agar 培地で

培養したテッポウユリではそのような現象は見られなくて、p-particle のまわりに多くのゴルジ体が存在することから(Fig.3)、間接的な細胞壁前駆物質になるのであろうと想像される。発芽花粉粒内には多くのゴルジ体が存在するが、花粉管の成長につれてそのcisternaeの数が増加し(第一表)、Golgi vesicleの產生が盛んになる。そしてこれらの周辺には、ミトコンドリア、リボソーム、ポリソーム、小胞体が多く存在し、発芽花粉細胞質内の盛んな代謝活性を示している(Figs. 3, 6)。

発芽花粉では、花粉管壁の内側に電子透過性の高

Table 1. The increase of the cisternae numbers of Golgi body in the pollen grain of *Lilium longiflorum* during the different cultivated time.

Cultivated time	Number of cisternae						Total number of Calculated Golgi bodies
	3	4	5	6	7	8	
0 min		63	37				8
10 min.	18	18	46	18			34
30 min.	4	15	23	48	10		48
1 hr.		8	8	40	40	4	25
2 hrs.	3	6	28	44	19		32
3 hrs.	3	12	19	20	42	4	81
4 hrs.	5	9	14	16	54	2	44

い層(Nakamura et al<sup>7</sup>; Callose wall, Heslop-Harrison<sup>2</sup>: Inner callosic layer, Sedgley<sup>11</sup>: Callose layer)がみられる。この層は花粉粒内までつづき、intine<sup>3,6,7</sup>と細胞膜の間にあって、発芽時にはすっかり花粉粒内壁をとりまいている(Fig. 7)。筆者らはこれよりこの層を callose layer と呼ぶことにする。中村紀雄<sup>5</sup>はツバキ花粉で、成熟花粉壁にはカロース成分は含まれないが、発芽花粉には含まれることを化学分析により証明している。発芽後時間が経つとこの層は厚くなる(Fig. 5a)。なお同様の層はサザンカの発芽花粉粒内にも見られる(Fig. 5b)。成熟花粉の栄養細胞中の細胞壁に沿った部分には小胞体が多く集まっており(Fig. 1)、花粉の吸水後は intine 3

と細胞膜の間に新しい層が(Figs. 3, 4)形成され、これが発達して発芽準備の callose layer が形成されるのであるが、第1、3、4図にも観察されるように、小胞体と細胞膜との間に連絡がみられるところから、この callose layer 形成に小胞体が何らかの関係を持っているのではないかと推量される。岡田<sup>8</sup>らはシクラメンで、Jensen<sup>4</sup>らは subtribe Castilleiinae の成熟花粉内で盛んに vesicle を膨出している ER-stacks を観察し、花粉管形成の準備ではないかと推量している。

第8図は、1時間 MI-2-<sup>3</sup>H を含んだ sucrose agar 培地で花粉を培養した後、これを含まない普通の培地上に花粉を移して更に培養して発芽した花粉

の発芽部を示したものであるが、とりこまれた MI-2-<sup>3</sup>H 由来の物質は、花粉粒内の callose layer 上に多く存在し、コントロール培地上に移されてから形成された花粉管壁の callose layer には少ないことが観察される。

花粉管は Golgi vesicle がその先端部に集まって、その内容物である polysaccharide が放出されて新しい管壁を形成するのであるが<sup>10,11</sup>(Fig. 10 b)、硼素を含む培地上で培養された花粉は、発芽率および発芽の速度、花粉管の伸長率がこれを含まない培地で育てたものよりも格別に優れている。第 10 a 図は、硼素を含む培地 ( $H_3BO_3$ , 10 ppm, sucrose, 10%, agar, 1.5%) で発芽した花粉管の先端を示したものであるが、第 10b 図のものに比べて融合した大きい vesicle が管壁に付着していることが観察される。この vesicle は脂肪球より作られた polysaccharide particle<sup>7</sup> に由来する callose grain の融合したもの

である。Helsop-Harrison<sup>2</sup> は p-particle が callose layer に融合すると説明しているが、筆者らは脂肪球より作られた不定形のものを p-particle、これより変化した直径約  $0.3\mu$  の球形のものを callose grain と区別する方がよいと考える。硼素を含む培地で伸長した花粉管の側面でも callose grain が callose layer に融合するのが見られる (Fig. 9)。これらのことから硼素を含む培地上で花粉管の伸長率がよいのは、このような大きな vesicle が管壁と管先端部の両方に付着するからではないかと想像される。しかし脂肪球からの p-particle の形成および callose layer への融合と硼素との関係については未だ不明である。結局、花粉管壁は常にその先端部で Golgi vesicle により、ペクチン物質を主体として形成され、その後に callose grain の含むカロースが付着して callose layer を形成し厚くなると考えられる。

## Summary

1. Fine structural changes in the germinating pollen grain of *Lilium longiflorum* cultured on 10% sucrose and 1.5% agar medium were investigated. There are many lipid bodies and few starch grains in a mature lily pollen grain. In the cytoplasm of the water absorbed pollen grain, it is observed that the lipid body forms polysaccharide particles (p-particles) which are seen as an electron transparent particle, and that proplastids which will produce many starch grains later are made.
2. In the sucrose-agar medium the pollen tube wall made out of Golgi vesicles as showed in Fig. 10b. In the pollen grain which absorbed water, a callose layer was built up between the intine layer and the cell membrane, and continued in the pollen tube wall (Figs. 5, 6, 7). It is assumed that the pollen tube wall is built with pectic substances from the Golgi vesicle at the first (Fig. 10b), and after that many callose grains, derived from the p-particle, fused on the developing pollen tube wall, on the sucrose-agar medium containing boric acid (10 ppm) in Fig. 10a.

## Literature

- 1 Dickinson, D. B., 1968. Plant Physiol., **43** 1.
- 2 Heslop-Harrison, J., 1979. Ann. of Bot. **44** suppl. 1. 1.
- 3 Iwanami, Y., 1959. J. Yokohama Munic Univ., **116** (C-34. Biol. 12) 1
- 4 Jensen, W. A., M. Ashton & L. R. Heckard, 1974. Bot. Gaz., **135** 210
- 5 Nakamura, N., 1980. J. J. of Palynology, No. 25. 11

- 6 Nakamura, S., 1979. J. Electron Micros., **28** 275
- 7 Nakamura, S., H. Miki-Hirosige & Y. Iwanami, 1979. J. J. of Palynology No. 24. 33
- 8 Okada, C. & Z. Nakazawa, 1978. J. J. of Palynology, No. 22. 1
- 9 Rambour, A. & C. P. Leblond, 1967. J. Cell Biology, **32** 27
- 10 Rosen, W. G., S. R. Gawlik, W. V. Dashek & K. A. Siegesmund, 1964. Am. J. Bot., **51** 61
- 11 Rosen, W. G. & S. R. Gawlik, 1966. Protoplasma **61** 181
- 12 Sedgley, M. 1979. J. Cell Sci., **38** 49
- 13 Spurr, A. R., 1969. J. Ultrastruct. Res., **26** 31

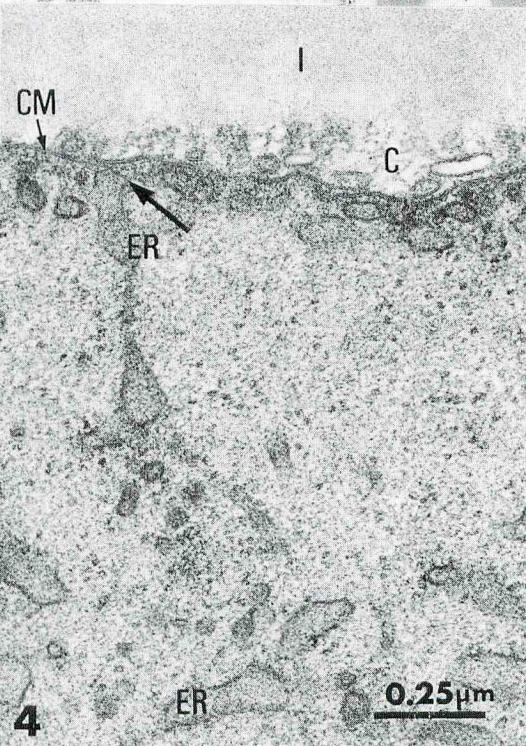
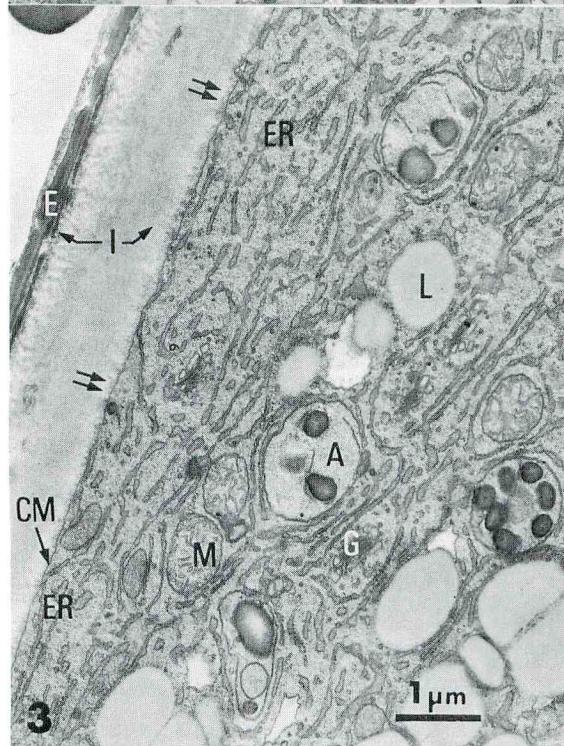
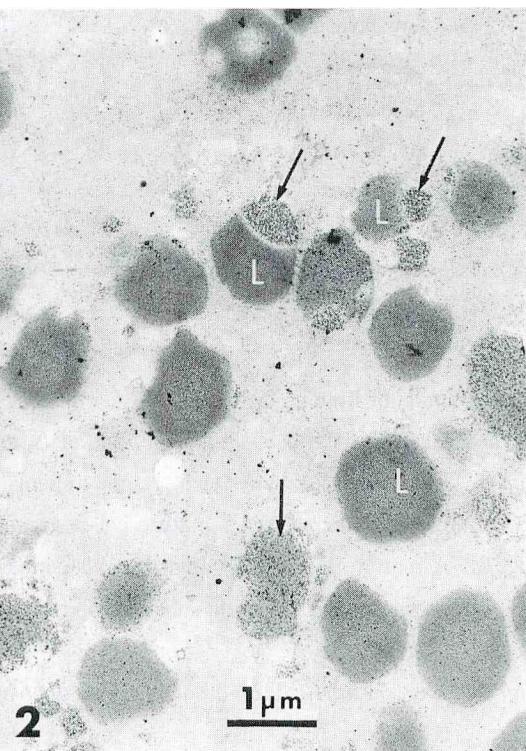
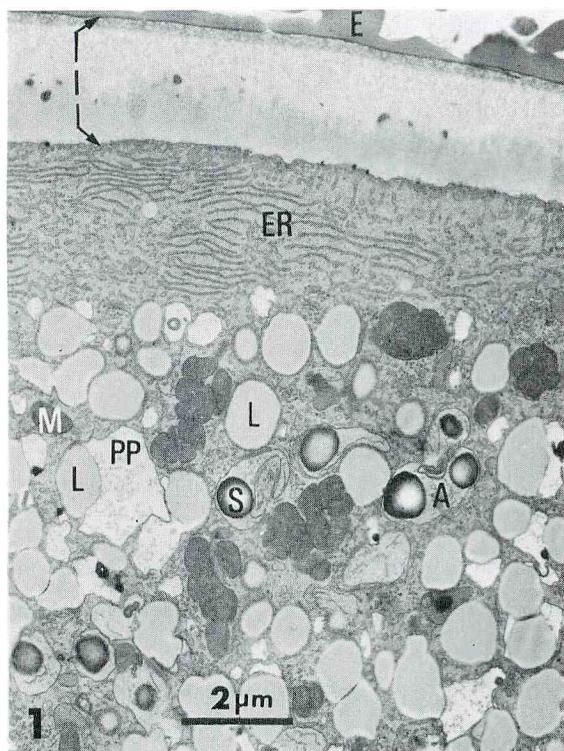
## Key to abbreviations

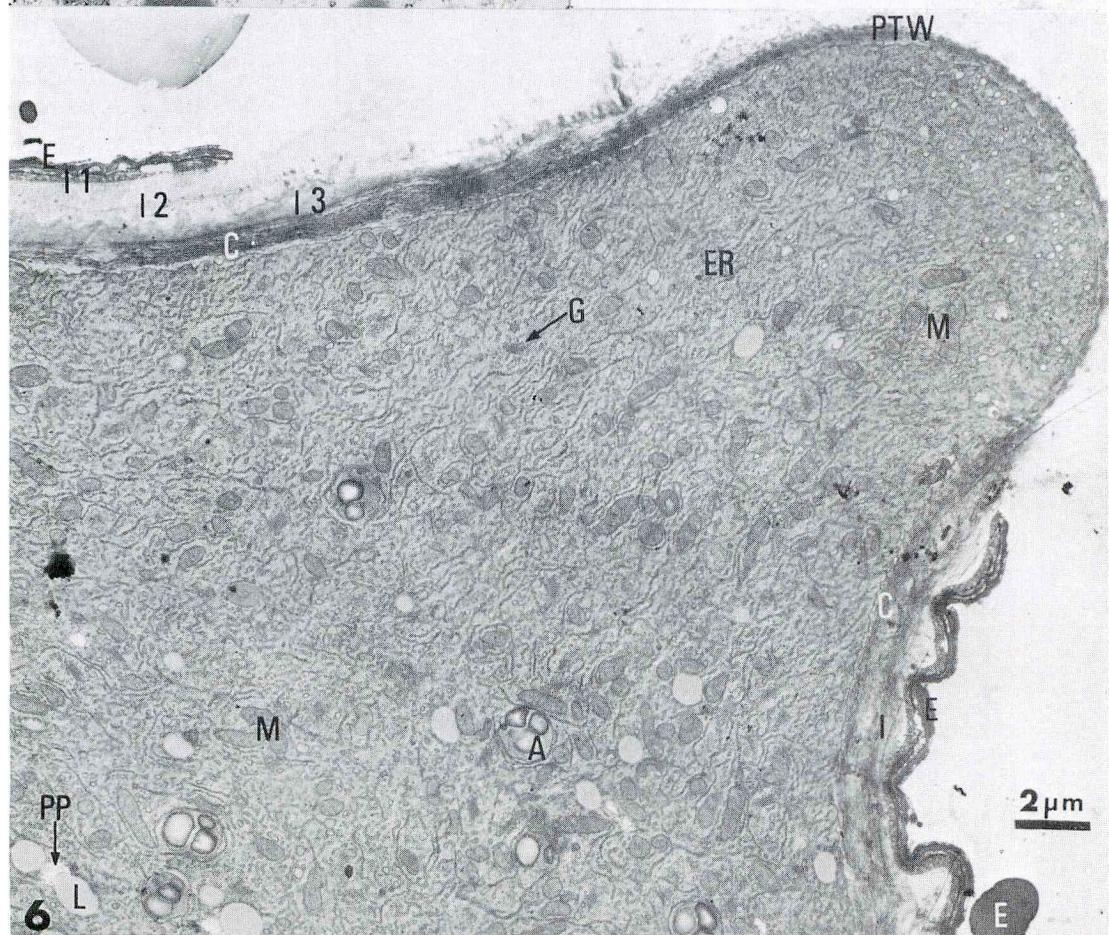
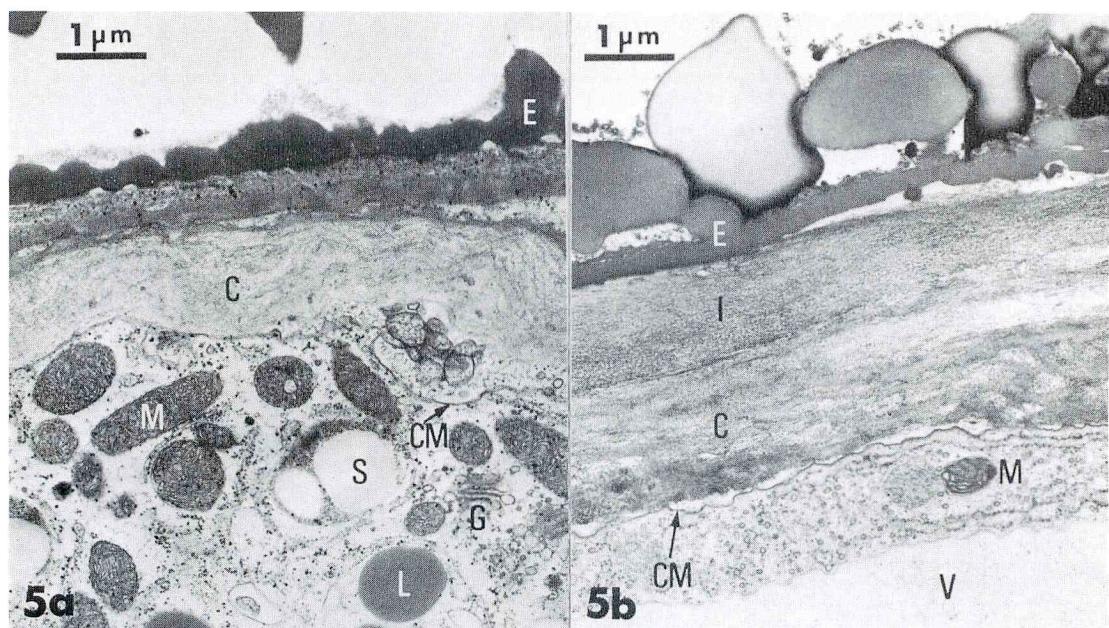
A	: amyloplast	I1	: intine 1
C	: callose layer	I2	: intine 2
CG	: callose grain	I3	: intine 3
CM	: cell membrane	L	: lipid body
E	: exine	M	: mitochondrion
ER	: endoplasmic reticulum	PP	: polysaccharide particle
G	: Golgi body	PTW	: pollen tube wall
GV	: Golgi vesicle	S	: starch grain
I	: intine	V	: vacuole

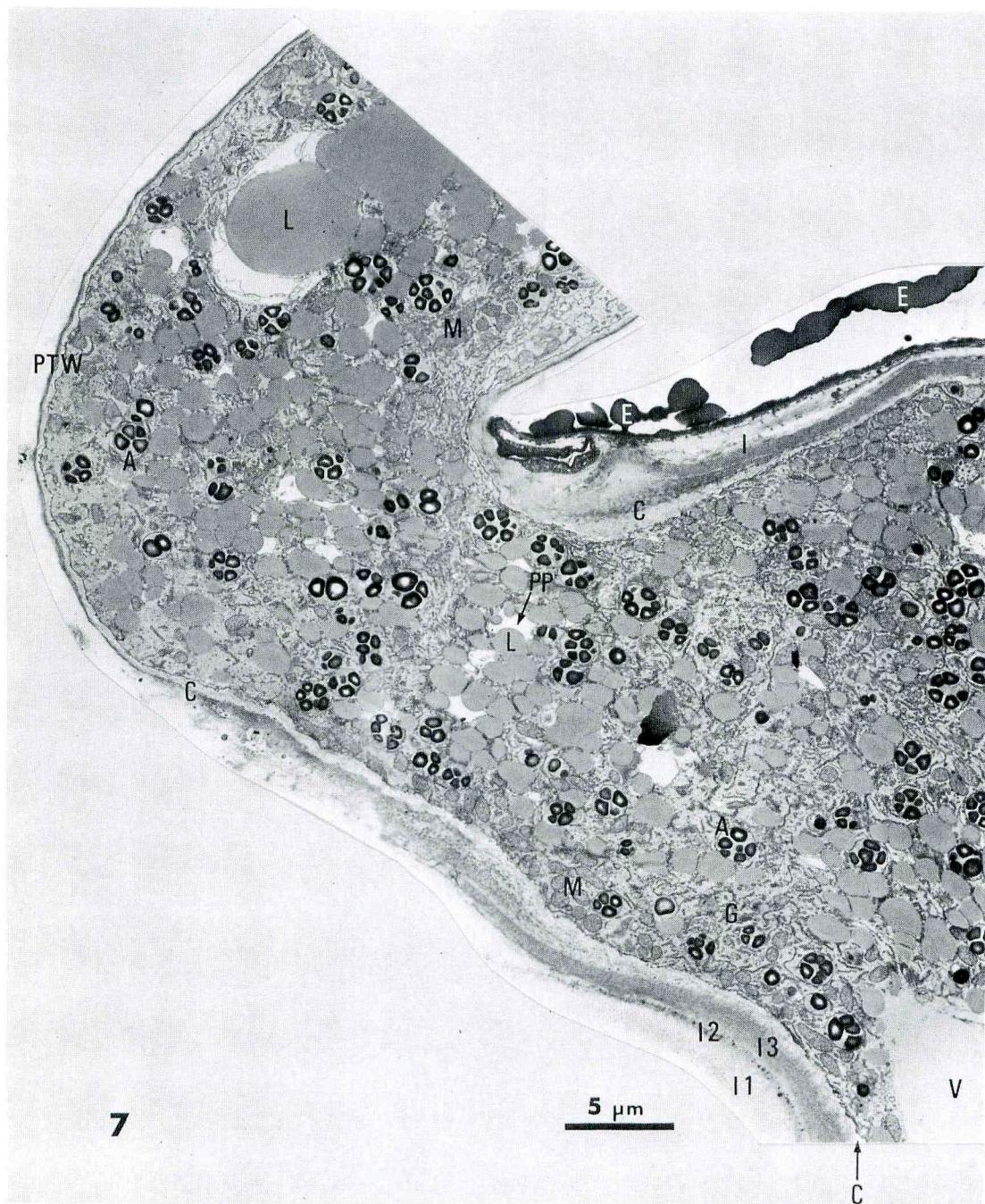
## Explanation of Figures.

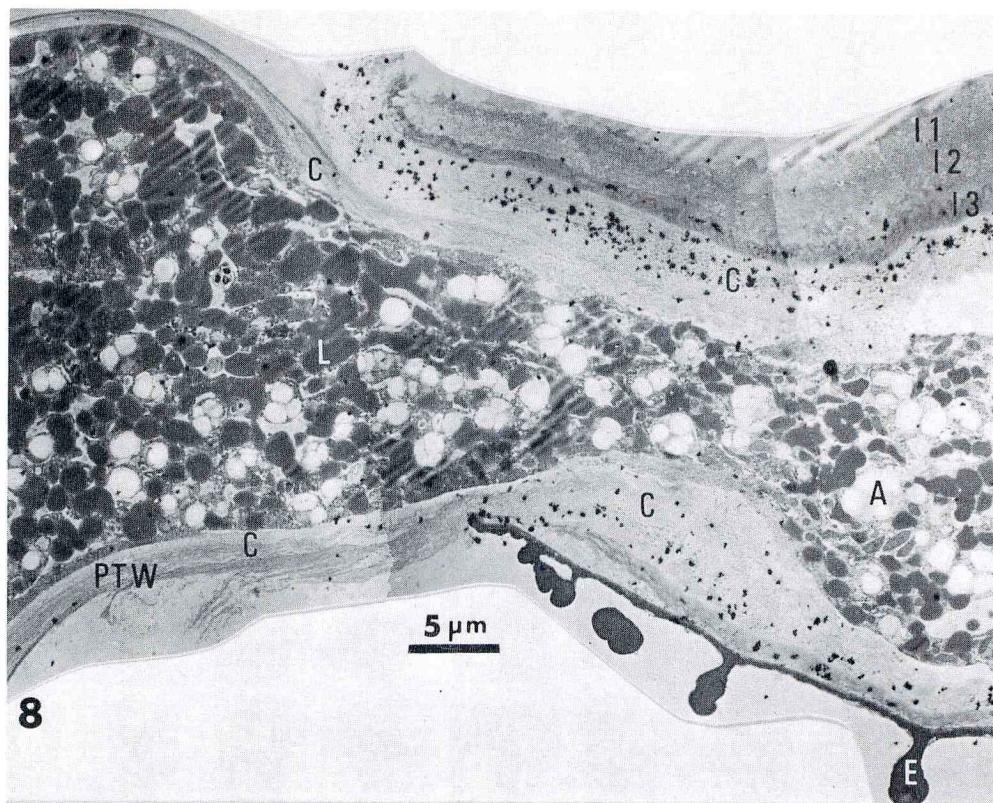
These figures' material is the pollen grain of *Lilium longiflorum* except Fig. 5b.

- Fig. 1. Mitochondria, many endoplasmic reticula and lipid bodies, which are forming polysaccharide particles, are seen in a mature pollen grain.  $\times 7,500$
- Fig. 2. A mature pollen grain treated with periodic acid silver methenamine method. Silver deposits are showing polysaccharide substances in the polysaccharide particles (arrow) formed from lipid body.  $\times 12,000$
- Fig. 3. A pollen grain cultured on a sucrose-agar medium during 30 min. There are mitochondria, amyloplasts, Golgi bodies, lipid bodies forming p-particles and a growing new layer (callose layer) which is shown an electron transparent layer (double arrow) between the intine layer and cell membrane attaching ER.  $\times 12,000$
- Fig. 4. The same material as Fig. 3. It is observed that many endoplasmic reticula are continued to the callose layer under the intine layer (thick arrow).  $\times 60,000$
- Fig. 5. A callose layer is shown around the vegetative cytoplasm of a pollen grain of lily (a) and *Camellia sasanqua* (b).  $\times 12,000$
- Fig. 6 & 7. Germinating pollen grains. In the cytoplasm, amyloplasts, mitochondria, Golgi bodies, ERs and many lipid bodies forming p-particles are shown. A callose layer is seen in the pollen tube wall and under the intine layer of the pollen grain wall.  $\times 5,000$  (Fig. 6),  $\times 3,750$  (Fig. 7)
- Fig. 8. This pollen grain was cultured on the sucrose-agar medium during 3 hrs after the culturing 1 hr on the sucrose-agar medium containing myo-inositol-2- $^3$ H ( $0.5\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ). Tritiated substances derived from MI-2- $^3$ H are observed on the callose layer in the pollen grain wall, but less on the layer in the tube wall which was developed on the no labeled medium.  $\times 2,500$
- Fig. 9. It is observed that callose grains are fusing to the side wall (arrow) of a pollen tube on the culture medium containing boric acid (10 ppm).  $\times 21,500$
- Fig. 10. A pollen tube tip (a) cultured on the sucrose-agar medium containing boric acid and one (b) cultured on the sucrose agar medium. Many small vesicles derived from Golgi body are observed in the tip 10b., but aggregated large vesicles of callose grains are shown in the tip 10a.  $\times 12,000$

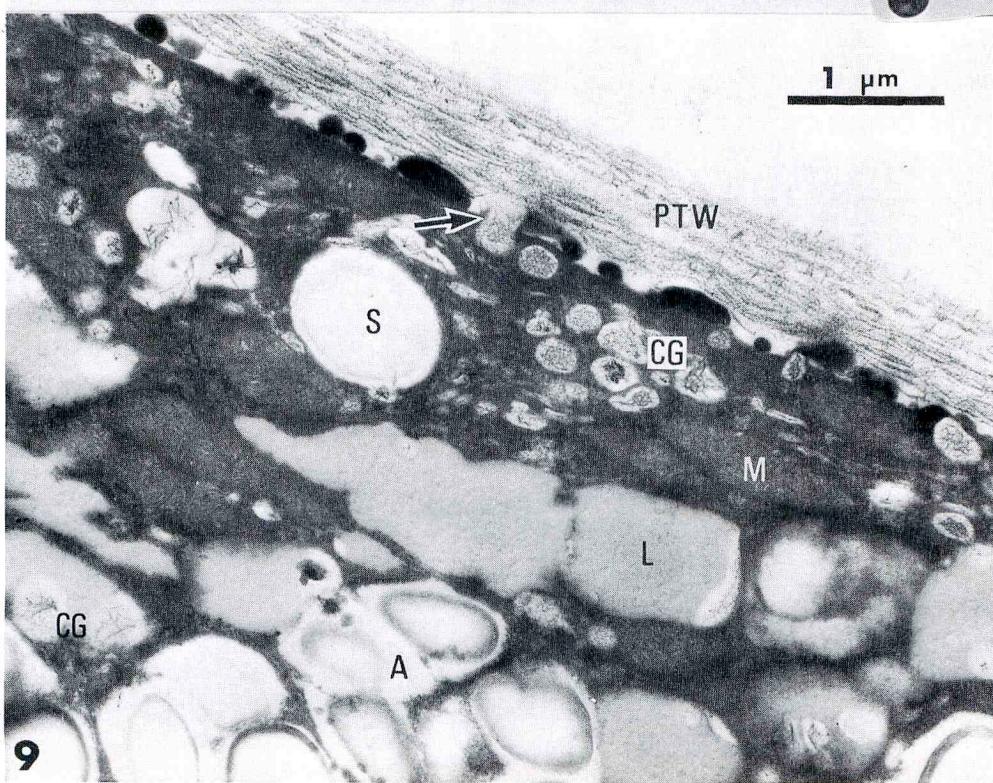








8



9

