

原 著

花粉発芽に関する研究

IV 花粉粒内の遊離アミノ酸と核酸含量について

河 村 重 行*

Studies on Pollen Germination

IV Free amino acid and nucleic acid contents in
pollen grain of some plant

Shigeyuki KAWAMURA*

(受付：1980年10月7日)

緒 言

人工発芽床上で花粉発芽を行わせると発芽の容易なものと難しいものがあり、著者ら（1976）もこれを報告した。この発芽の難易を支配している要因を検討するために本研究を開始したのであるが、著者ら（1974）は先ず花粉発芽に要する糖類が花粉粒内に含まれるかどうかを検討したが、花粉中には人工発芽床上の発芽の良否に関係なく多量の糖類が含まれていることが判明した。

このようなことから、次に人工発芽床が花粉粒におよぼす影響には物理的要因と化学的要因があるものと考え、物理的要因である培地の硬さについて検討を加え、培地の硬さによる影響もあることを確認した（河村ら、1976）。さらに、化学的要因の一つとし

て、培地に添加する糖類に検討を加えた結果、单糖類より多糖類が発芽にはよい影響をおよぼしていることを見出した（河村ら、1979）。

このように花粉発芽に影響をおよぼしている2、3の要因について明らかにすることはできたが、人工発芽床上で認められる著しい発芽率の相異を誘起している要因については充分納得できる結果は得られなかった。

人工発芽床上における花粉の不発芽の原因がどのような要因によるものであるかが解明されれば花粉発芽の機作もある程度明らかになる筈である。このことを解明するための一つの手がかりとして花粉粒内の遊離アミノ酸と、アミノ酸の消長に關係深い核酸について調査を行った。以下その結果を報告する。

* 田園調布雙葉高等学校 東京都世田谷区玉川田園調布1-20-9 〒158

* Denenchofu Futaba Senior High School

Tamagawa Denenchofu Setagaya-ku, Tokyo Japan

材料および方法

実験には発芽しやすい花粉としてホーセンカ (*Impatiens balsamina* L.) とペチュニア (*Petunia hybrida* Hort.)、発芽しにくい花粉としてナタネ (*Brassica napus* L.) とコスモス (*Cosmos bipinnatus*) を用いた。

本実験では、各発育時期の花粉粒内の遊離アミノ酸と核酸 (DNA, RNA) の含量とその消長の確認に重点をおいた。

遊離アミノ酸の検出はニンヒドリン・シップ反応で、核酸の検出はピロニン・メチルグリーン法でそれぞれ行った。各実験の操作方法は次のとおりである。

ニンヒドリン・シップ反応 (アミノ酸反応)

各発育時期の材料をとり、カルノア液で24時間固定した後、パラフィン法で切片を作り、スライドグラスに貼りつけた後、脱パラフィンを行い、ニンヒドリンの0.5%アルコール溶液にいれ37°Cで約15時間処理(脱アミノ)し、蒸溜水でよく洗滌した。次にシップ液で30分間処理してから亜硫酸水に2分間ずつ3回移し変えてシップ液を完全に除去した後、流水で充分に洗い、脱水後バルサムで封入した。なお対照として、酸化的脱アミノ作用をほどこさなかった切片をシップ液で処理して比較を行った。

ピロニン・メチルグリーン法 (核酸反応)

各発育時期の材料をとり、カルノア液で24時間固

定した後、パラフィン法で切片を作り、スライドグラスに貼りつけた後、脱パラフィンを行い、流水で充分に洗い、さらに蒸溜水で5分ずつ3回変えて洗滌してから、ピロニン・メチルグリーン染色液で15分間処理した。次に3級ブタノールで5分間処理し、つづいてブタノール・キシロール等量混合液で5分間処理を行ってから、キシロールに移し、バルサムで封入した。

実験結果

ホーセンカ、ペチュニア、ナタネ、コスモスの花粉はどれも発育が進むにしたがって遊離アミノ酸および核酸とくにRNAの含量が変化する。そのようすは第1表に示したとおりである。

1. 遊離アミノ酸の消長

ホーセンカ、ペチュニア、ナタネ、コスモスの何れの花粉においても桃色または赤色を呈し遊離アミノ酸が認められた。

ホーセンカは、四分子花粉から分離後間もない花粉では桃色を示し遊離アミノ酸が確認できた(図A")。開花7~6日前の花粉は橙赤色で、開花5~4日前からはうすい桃色となる。開花1日前もこの色調に変化はなくアミノ酸が確認できた(図A、A'、A")が、ペチュニア、ナタネ、コスモスに比べて反応は弱かった。

ペチュニアは、開花7~6日前ではきわめてうす

Table 1. Ninyhydrin Schiff and Pyronin Methylgreen reaction in pollen grains.

Stage	<i>Impatiens balsamina</i> L.			<i>Petunia hybrida</i> Hort.			<i>Brassica napus</i> L.			<i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.		
	Ninhydrin schiff reaction	Pyronin methyl green reaction		Ninhydrin schiff reaction	Pyronin methyl green reaction		Ninhydrin schiff reaction	Pyronin methyl green reaction		Ninhydrin schiff reaction	Pyronin methyl green reaction	
		DNA	RNA		DNA	RNA		DNA	RNA		DNA	RNA
-7~-6	+	±	#	±	+	+	-	+	±	-	+	±
-5~-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-3~-2	+	+	+	#	+	#	+	+	+	#	+	+
-1	+	+	+	#	+	#	+	+	#	#	+	#
0	+	+	+	#	+	#	+	+	#	+	+	#
+2~+3	+	+	+	#	+	#	+	+	#	+	+	#

Remarks : -7 7 days before flowering

0 Flowering day

+2 2 days after flowering

い桃色を示し遊離アミノ酸がごくわずか認められた。花粉の発育にともない桃色は濃くなり、開花1日前には多量の遊離アミノ酸が認められた。開花当日では前日よりもさらに呈色は濃くなった。

ナタネは、開花7日前には遊離アミノ酸は認められず、開花5～4日前になると桃色を示す。開花3～2日前では桃赤色となり、開花当日になんでも濃さに変化はなく、多量の遊離アミノ酸が認められた(図B、B')。

コスモスは、開花7～6日前のものでは、呈色せず遊離アミノ酸は認められなかった。開花5～4日前になるとうすい桃色を示し、花粉の発育にともなって桃色は濃くなり、開花1日前では赤色を示し多量の遊離アミノ酸が認められた(図C、C')。開花当日のものは前日に比較してうすくなっている。

2. 核酸(DNA、RNA)の消長

ホーセンカ、ペチュニア、ナタネ、コスモスの何れの場合も発育が進むにしたがって、花粉粒は青紫色から紫色または赤紫色になり、RNAの増加が認められた。

すなわち、ホーセンカでは開花7日前の花粉は淡い青紫色であるが、開花7～6日前の花粉は、その楕円状の両端部に青紫色を呈するDNAの反応が認められ、それ以外の部分はやや紫色をおびた桃色を呈し、多量のRNAが認められた。開花5～4日前のものからは赤みをおびた紫色に変わりDNAの増加が認められるようになる。開花2～3日後の中では青紫色となりRNAがかなり減少していることが認められた。

ペチュニアでは、開花7日前から2日前までは紫色であるが、開花1日前より開花当日にかけては花粉粒の周辺部に青紫色を残し、赤みのある紫色を示しRNAの増加が認められた。

ナタネの場合は、開花7～6日前には淡い青緑色の花粉と青紫色の花粉とが薬中に混合しているのが認められるが、開花5～4日前になるとほとんどの花粉が紫色に変わり、開花3～2日前では赤みのある紫色となり、RNAの増加が認められた(図D、

D')。

コスモスは、開花7～6日前のものは青緑色または青紫色を呈し、RNAはほとんど認められないが、開花5～4日前のものでは紫色を示し、さらに開花1日前から当日にはやや赤みをおびた紫色に変わり、RNAの増加が認められた。

考 察

花粉の遊離アミノ酸に関しては、勝又ら(1963)のアカマツ花粉、藤下(1965)のナスやメロンの薬組織の分析、PFAHERら(1970)のトウモロコシ花粉を始め多くの研究があり、何れも13～17種類の遊離アミノ酸が花粉内に含まれていることが報告されている。しかしそれらは何れも多量の花粉を用いてペーパークロマトグラフ法で分析したものであり、この方法では花粉に含まれる遊離アミノ酸の種類を知ることはできるが、各発育時期による花粉一粒内の遊離アミノ酸の含量と消長を知ることができない。本実験では、花粉の発育にともなって花粉一粒内の遊離アミノ酸と核酸がどのように変化するかを検討した。

遊離アミノ酸および核酸(RNA)は、本実験では開花が近づくにつれて増加する傾向が認められたが、ホーセンカのみはやや異なる傾向が見られた。すなわち、ホーセンカでは花粉四分子の時期にすでにニンヒドリン・シップ反応が顕著で、遊離アミノ酸が確認できる。開花7～6日前では赤色の反応が認められた。そして発育の進行にともなってアミノ酸反応は弱まっていく。一方、この時期(開花7～6日前)の核酸反応も強く、特にRNA反応が強かった。そして花粉の発育の進行にともなって紫色に変わりDNA反応が強くなる。

これに対して、ペチュニア、ナタネ、コスモスの花粉においては、開花7～6日前では遊離アミノ酸の反応は微弱か認められず、開花5～4日前になつて現われ、3日ぐらい前になるとニンヒドリン・シップ反応は一層著しくなる。また核酸反応については、ホーセンカの花粉で認められた開花7～6日

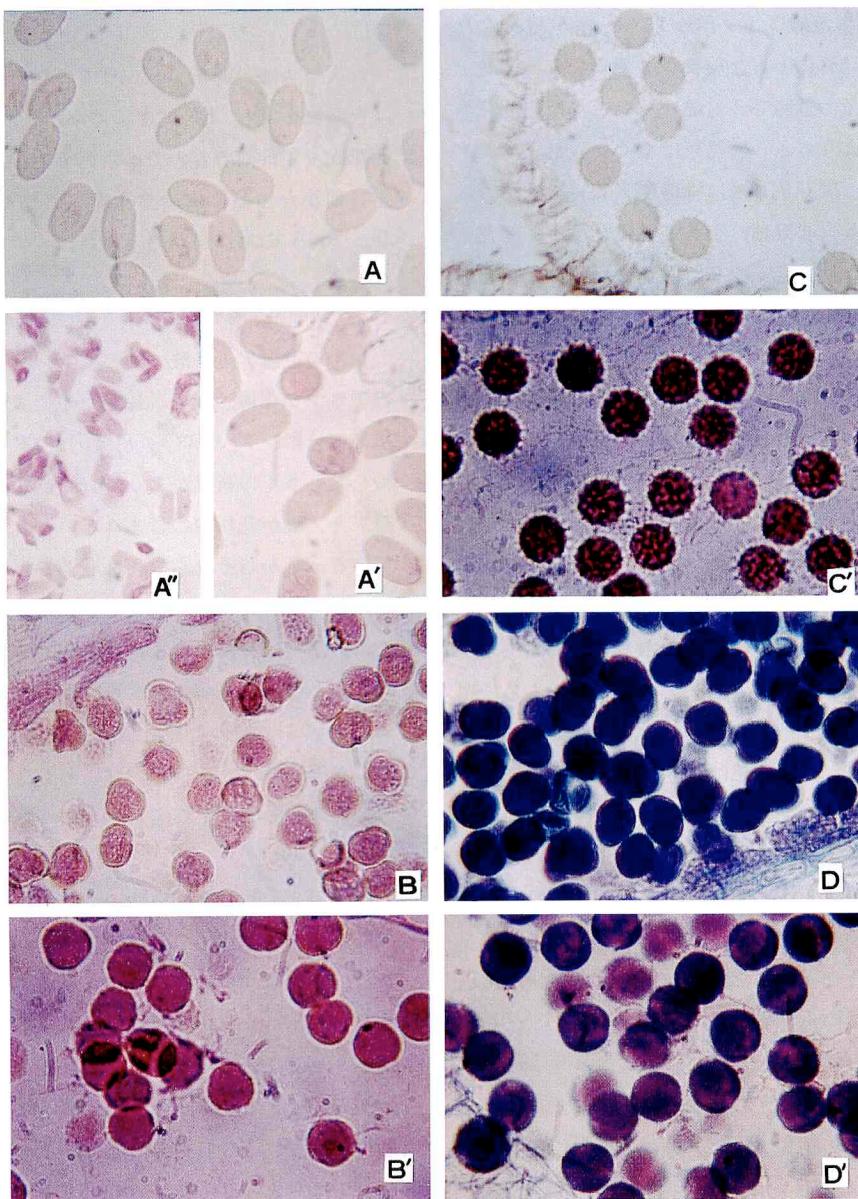


Fig. 1. Free amino acid stained with ninhydrin Schiff reaction and nucleic acid stained with pyronin methylgreen reaction (D and D') in developmental stages of pollen grains (X 400).

A : *Impatiens balsamina* L.
 A' : *I. balsamina* L.
 A'' : *I. balsamina* L.
 B : *Brassica napus* L.
 B' : *B. napus* L.
 C : *Cosmos bipinnatus*
 C' : *C. bipinnatus*
 D : *Brassica napus* L.
 D' : *B. napus* L.

1 day before flowering (Cont.)
 1 day before flowering.
 9—8 days before flowering.
 5—4 days before flowering.
 3—2 days before flowering.
 Flowering day (Cont.).
 1 day before flowering.
 5—4 days before flowering.
 Flowering day.

前の RNA 反応は、ペチュニア、ナタネ、コスモスでは弱く、花粉の発育とともに強くなる。

このように、ホーセンカとペチュニア、ナタネ、コスモスの遊離アミノ酸含量と消長の相異が、人工発芽床上での発芽の良否に關係あるかどうかは本実験からは言及できない。しかし、ホーセンカの花粉に比べて発芽の悪いペチュニアやさらに発芽の困難なナタネとコスモスの花粉には多量の遊離アミノ酸が含まれている一方、発芽の良好なホーセンカの花粉には少ないということは注目すべきことである。すなわち、花粉が柱頭上に付着してからの、花粉と柱頭との間に物質の移動があるのではないか。もし物質の移動があるならば、柱頭の代役を果す人工発芽床の化学的組成が花粉発芽・不発芽の重要な要因となることが考えられる。柱頭から花粉へ移動する物質は、花粉粒内に貯えられた高濃度の遊離アミノ酸を代謝系をとおして適切な濃度に変えるのではないか。加藤ら（1970）は、「外部からプロリンを培地に加えると花粉の発芽と管伸長が促進されることもある。このプロリンは花粉内の天然に貯蔵されたプロリンに加わるので、促進はかなり低い濃度（0.05%以下）でみられる。遊離プロリンの濃度が高まると花粉発芽も管伸長も阻害される。そこで成熟花粉のプロリンの濃度が高くなると代謝のレベルを低める要因となる」と述べている。このことはホーセンカの花粉に比べて多量の遊離アミノ酸を貯えていながら人工発芽床上で発芽の困難なナタネやコスモスの花粉発芽は、発芽床として使用する培地の問題に示唆をあたえているように思われる。渡辺（1969）によれば、「タバコ・キク科・リンゴの柱頭滲出物は花粉の発芽や管生長に有効である。テッポウユリではコバルト (Co^{++}) も花粉の発芽・生長を促す。柱頭や花柱中の Co 含量は成熟時最高に達し、受粉後に半減する。これはタンパク合成に必要な花粉中のアミノアシラーゼの活性が Co^{++} により顕著に高められる事実と關係があると思われる」と述べている。これらのことから、発芽困難な花粉に使用する培地の検討が今後の課題の一つであろう。

成熟した正常な花粉には発芽に必要な单糖類が含まれており（河村ら、1974）、本実験からは発芽に必要な遊離アミノ酸と核酸が何れの植物の花粉でも確認された。また、核酸とアミノ酸の消長とはほとんど同じ傾向であることが確認された。岩崎ら（1969）は、ナタネの柱頭で「タンパク反応は核酸反応と殆ど同じ傾向がみられた」と報告している。核酸合成とタンパク質合成はほぼ平行しておこることが知られているが、本実験でもこれが立証されたものといえる。

岩波（1973）は、「花粉が正常に生長するためにはアミノ酸、とくにプロリンが必要であり」、「花粉が発芽して花粉管を卵に運ぶまでの過程にプロリンなどのアミノ酸を必要とし、一方雌ずいも受精に際してアミノ酸を必要としているといえる」と述べているが、各種の遊離アミノ酸は、花粉発芽より、花粉の生長および発芽後の花粉管伸長に必要なものであって、人工発芽床上での発芽の良否は花粉自体にあるよりはむしろ培地の化学的組成や物理的条件に支配されているものと考えられる。

要

1. 花粉発芽の基礎的実験の一つとして、花粉粒内の遊離アミノ酸、核酸の含量が植物の種類、花粉の発芽時期によりどのように異なるかを調査した。
2. 実験にはホーセンカ、ペチュニア、ナタネおよびコスモスの花粉を用いた。
3. 遊離アミノ酸の検出はニンヒドリン・シップ反応で、核酸の検出はピロニン・メチルグリーン法で行った。
4. その結果、同一植物の花粉でも発芽時期によってアミノ酸、核酸の含量に差が認められた。
5. 一般に、花粉の発芽初期から成熟するまでの過程で、遊離アミノ酸と RNA 含量は増加し、DNA 含量はあまり変化しなかった。
6. ホーセンカは発芽初期からアミノ酸反応と核酸 (RNA) 反応が強かったが、開花日に近づくにし

たがって反応は弱まる傾向がみられた。

言を与えて下さいました筑波大学農林学系の岩崎文雄氏に深謝致します。

本稿を終えるにあたり、研究の遂行に適切な御助

引 用 文 献

- 藤下典之 1965 花粉退化の細胞、組織ならびに生理学的研究（第2報）。低温による果菜類の花粉退化と薬組織に含まれる遊離アミノ酸との関係 園雑 34 (2) : 37—44.
- 岩波洋造 1973 花粉の生理学における問題点と研究経過V (アミノ酸について) 横浜市大論叢 24 (2) : 37—58.
- 岩崎文雄・塚田元尚・細田友雄 1969 菜類における花器の発育の形態的、組織化学的研究 育雑 19 (6) : 25—30.
- 加藤幸雄・志佐誠 1975 新・植物生殖生理学 P. 164 誠文堂新光社 東京.
- 河村重行・岩崎文雄・細田友雄 1974 花粉発芽に関する研究I 花粉粒内の糖含量について 育雑 24(3) : 146—152.
- 河村重行・岩崎文雄 1976 花粉発芽に関する研究II 花粉発芽と培地の寒天濃度との関係 育雑 26 (4) : 291—297.
- 河村重行・岩崎文雄 1979 花粉発芽に関する研究III 各種糖類の花粉発芽に及ぼす影響 花粉誌 23 : 3—8.
- Pfahler, P. L. and H. F. LINSKENS 1970 Biochemical Composition of Meize (*Zea mays* L.) pollen I. Effects of the endosperm mutants, Waxy (*wx*), Shrunken (*sh₂*) and Sugary (*Su₁*) on the amino acid content and fatty acid distribution. Theoret. Appl. Genetics 40 (1) : 6—10.
- 渡辺光太郎 1969 花粉の生理—とくに雌雄との相互作用について— 植物生理学 8 : 47—54.

Summary

So many papers has reported that there are large variation as to the germinability of pollen among species, but the reports concerning to the mechanism of the difference are few.

Impatiens balsamina L. and *Petunia hybrida* Hort. as represented species of good pollen germinability and poor pollen germinability of *Brassica napus* L. and *Cosmos bipinnatus* were used as materials.

The presence of free amino acid and nucleic acid in pollens were observed with cytochemical techniques, that is, the ninhydrin schiff method for free amino acid and pyronin methyl green method for nucleic acid.

Differences in both free amino acid and nucleic acid reactions were observed among species and pollens at different developmental stages. In general, the free amino acid and R N A reaction were weak at the early stage of the development of pollen and strong at mature stage. On the other hand, in *Impatiens balsamina* L., free amino acid reaction was weak at the late stage of the development of pollen.