

## 花粉多量培養器の小型化

林 喜三郎\*

Mass Culture of Pollen in Miniature Vessel

Kisaburo HAYASHI\*

\* Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku 783, Japan

Schrauwen and Linskens have designed a special vessel for mass culture of pollen tubes in 1967. However their vessel uses hardly in the cases of a plant which produces a small amount of pollen, because the vessel is a little too large for amount of culture medium. We have prepared a miniature vessel which we made Schrauwen and Linskens's vessel in small size and pollen culture experiments have been conducted by using the new miniature vessel in the diploid and the tetraploid plants of Renque, *Astragalus simicus* and *Petunia, Petunia hybrida*, respectively. Our experiments have yielded good results at the optimal germination condition shown in Table 2, although mass cultivable periods of pollen became shorter as compared with the results in the Schrauwen and Linskens's report.

## 緒 言

人為同質4倍体の低稔性は花粉の発芽能力や受精能力の低下によるところが大きく、これを裏付ける報告は少なくない<sup>(1)</sup>。しかしながら、このような花粉の発芽能力や受精能力の低下の機構や原因については、ほとんど明らかにされていない。

従来、花粉の発芽や花粉管の伸長を研究する場合には、懸滴法、スポットテスト法、懸濁法、寒天やゼラチンなどの固体培地法など数多くの方法が試みられている<sup>(2,3)</sup>。しかし、何れの方法も花粉と花粉管の生化学的分析には不適當である。これに対し、Schrauwen, J. & H. F. Linskens<sup>(4)</sup>は、花粉管の多量培養器を開発し(以下、SL培養器と呼ぶ)、これを用いてペチュニア花粉の発芽過程のアミノ酸及び蛋白代謝を研究している。4倍体花粉の生化学的解析のためにもこの方法の採用を考えたが、レンゲでは多量の花粉を採取することが容易でないので、SL培養器をそのまま利用できない。林はオランダ、Katholieke大学の

理学部植物学研究室に留学中に、Linskens博士の厚意によって、小型化した多量培養器を作って頂き、実験する機会を得た。結果は必ずしも充分ではないが、ここにその大要を報告して大方のご参考に供したい。報告に先だち同博士のご厚意に厚く御礼申し上げる。

## 材料及び方法

Schrauwen, J. & H. F. Linskens<sup>(4)</sup>は、750mgのペチュニア花粉を100 mlの培養液に懸濁させて(7.5 mg/ml)、実験しているが供試花粉が少なくなると、培養液を少なくするか、花粉密度を下げなければならない。そこで、SL培養液を約十分の一に小型化して、Table. 1の条件について検討した。

供試の花粉は当研究室で育成、保存中のレンゲ及びペチュニアの2Xおよび4X系統の花粉を用いた。レンゲの花粉の採取は、開花前日の裂開している葯をつぼみから露出させ、花粉をピンセットで硫酸紙の上に振り落としとして採取した。50mgの花粉を採取するのに

**Table 1.** Observed conditions in mass culture experiments of pollen

Plants	Exp.	Medium volume	Pollen density	Temperature
<i>Astragalus sinicus</i>	I	4, 6, 8, 10 ml	5 mg/ml	25°C
	II	8	2.5, 5, 7.5, 10	25
	III	8	5	20, 25, 30
<i>Petunia hybrida</i>		10	5, 10, 15, 20	25

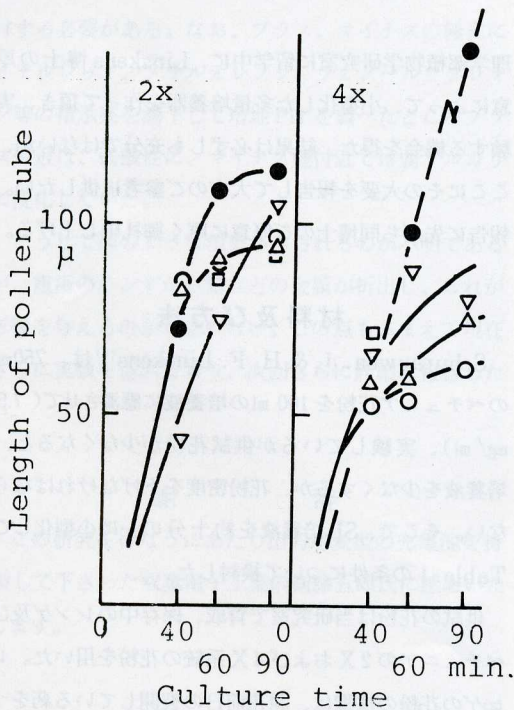
約1時間を要した。一方ペチュニアの花粉は開花前日の未裂開の葯をシャーレにとり、一晩置くと葯が裂開するので、花粉を葯壁からふるい分けた。1花1-2mgの花粉が採取できるので、レンゲに比べると採取がはるかに容易である。花粉は採取直後か翌日中に実験に供試し、翌日まで花粉を保存する場合は、-12°Cの冷凍庫に置いた。花粉は培養に際しては、予め湿室内に約30分間は置いた後供試した。培養液はショ糖10%、ほう酸0.01%の水溶液を用い、対照の寒天培養には上記の培養液に寒天2%を添加して、スライドガラス上

に流し固めて使用した。実験は同一条件で2回以上反復してそれらの平均値で表示した。なお、以下本文中では多量培養をMC、寒天板培養をACと呼ぶこととする。

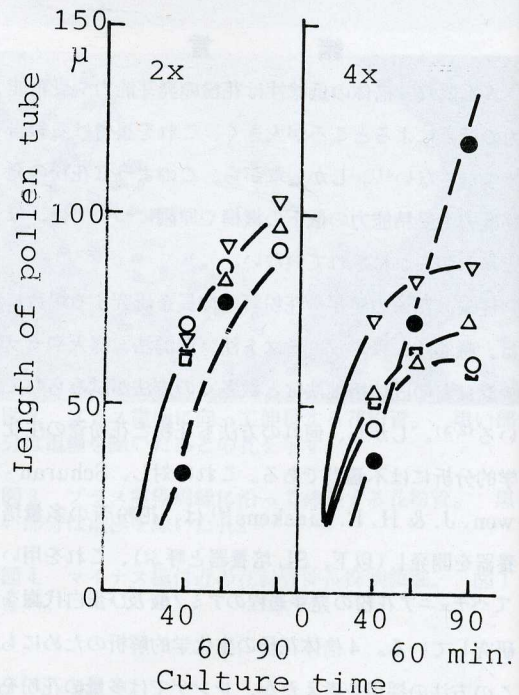
## 実験結果

### 1. レンゲ

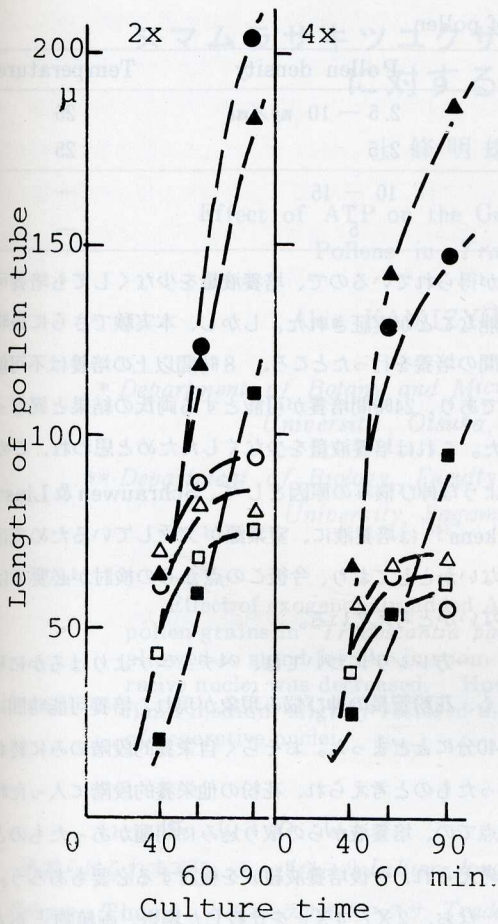
培養液量、花粉密度及び培養温度を変えて、実験を行った場合の花粉管長の経時的変化を図示すると、Fig. 1-3図のとおりである。なお、花粉発芽率の



**Fig. 1.** Effects of medium volume on tube length in mass-culture of *Astragalus* pollen. Agar culture: ●...●. Mass culture: ∇(4ml), △(6ml), □(8ml), and ○(10ml)



**Fig. 2.** Effects of pollen quantity in medium on tube length in mass culture of *Astragalus* pollen. Agar culture: ●...●. Mass culture: ∇(2.5mg/ml), △(5), ○(7.5) and □(10)



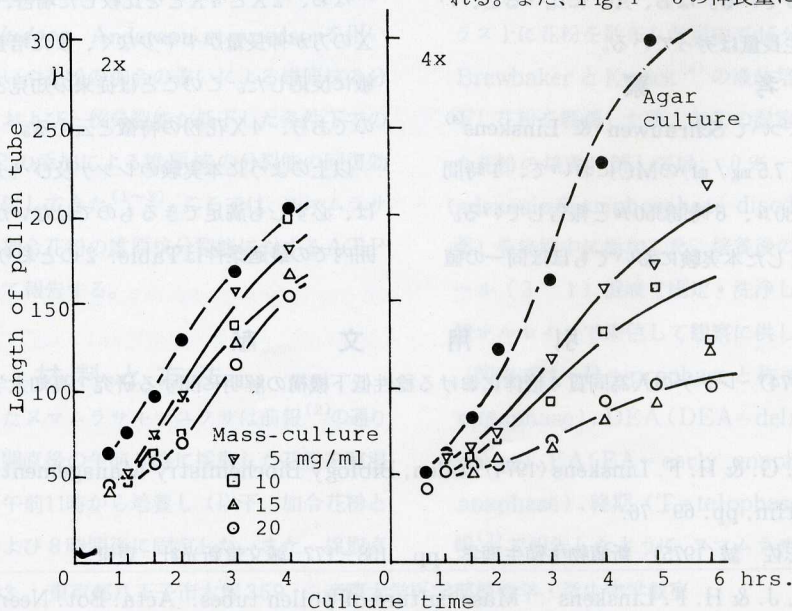
**Fig. 3.** Effects of temperature on tube length in mass culture of *Astragalus* pollen. Close and open marks are shown agar and mass culture respectively.

△▲, 30°C ○●, 25°C □■, 20°C

経時的变化は特記しない限り、花粉管長と同じ傾向であった。

これらの図によると、何れの場合も40分までの花粉管の伸長は急速であり、最良の条件下では、2Xの70-80μ、4Xで60-70μに達するが、その後の成長は次第に減少し90分では停止したかに見える。この場合の最終伸長量は2Xでは培養液量および花粉密度が変わっても有意な差異が認められないが、4Xでは培養液量及び花粉密度が低下するほど伸長量が増大する傾向が認められる。ただし、温度については、20°C区は25、30°C区より劣ったが、2Xでは25°C、4Xでは30°C区がそれぞれ僅かながら優った。

一方、ACの場合には40分まではMCより劣るが、その後も生長速度が余り落ちないために、1、2の例外を除いて60分以降ではMC区より優ってくる。ただし、60分以後はやはり次第に成長が鈍る傾向が認められる。また、Fig. 1-3の伸長量にはそれぞれかなり



**Fig. 4.** Effects of pollen quantity in medium on tube length in mass culture of *Petunia* pollen.

**Table 2.** The optimal conditions for mass culture of pollen.

Plants		Medium volume	Pollen density	Temperature
<i>Astragalus</i>	2 X	6—10 ml	2.5—10 mg/ml	25
<i>sinicus</i>	4 X	8	2.5	25
<i>Petunia</i>	2 X	10	10—15	—
<i>hybrida</i>	4 X	—	5	—

の差異が認められる。この理由は明確でないが、採取条件あるいは培養条件の僅かの違いによるものではないかと考えている。

以上を総合すると、レンゲのMCはACに比べると、初期生長は極めて急速であるが、40分以後には早くも生長が鈍ってくる。ただし、ACでは実験の都度測定値にかなりの差異があったのに対し、MCでは比較的安定した数値が得られていることは注目に値する。

## 2. ペチュニア

花粉密度について実験した結果はFig. 4に示すとおりである。同Fig.によると、2X、4Xとも経時的に順調な生長曲線を描き、最終調査時の6時間においてもなお生長を続けている。しかも花粉密度が低くなるほど、伸長量が増大する傾向が認められ、この傾向がとくに4Xにおいて著しい。また、同じ条件では概して4Xの方が劣っている。なお、ACに比べると、いずれのMC区も生長量は劣っている。

## 考 察

ペチュニア2Xについて Schrauwen & Linskens<sup>(4)</sup>は培養液量100ml(7.5 mg/ml)のMCにおいて、1時間で40 $\mu$ 、3時間130 $\mu$ 、6時間350 $\mu$ と報告している。培養液量を10mlとした本実験においてもほぼ同一の値

が得られているので、培養液量を少なくしても培養可能なことが実証された。しかし、本実験でさらに長時間の培養を行ったところ、8時間以上の培養は不可能であり、24時間培養が可能とする両氏の結果と異なっていた。これは培養液量を少なくしたためと思われる。このような伸び悩みの原因として、Schrauwen & Linskens<sup>(4)</sup>は培養液に、窒素源が欠乏しているためではないかとしており、今後この点からの検討が必要ではないかと考えている。

一方レンゲについては、ペチュニアよりはるかに早く、花粉管長の伸び悩み現象が現れ、培養可能時間は40分にとどまった。おそらく自栄養的段階のみに終わったものと考えられ、花粉の他栄養的段階に入った時点での、培養液からの取り込みに問題があったものと考えられ、今後培養液組成を検討する必要もあろう。

なお、2Xと4Xとを比較した場合、両植物とも4Xの方が伸長量がやや少なく、また培養条件変化に鋭敏に反応した。このことは従来の知見とも一致するものであり、4X花粉の特徴と云える。

以上のように本実験のレンゲ及びペチュニアのMCは、必ずしも満足できるものではないが、限られた範囲内での最適条件はTable. 2のとおりである。

## 引 用 文 献

- (1) 林喜三郎(1974) レンゲの人為同質4倍体における稔性低下機構の解明に関する研究 高知大学農学部紀要第28号.
- (2) Stanley, R. G. & H. F. Linskens(1974) Pollen, Biology Biochemistry Management. Springer-Verlag, Berlin, pp. 69-76.
- (3) 加藤幸雄・志佐 誠(1975) 新植物生殖生理学 pp. 108-177. 誠文堂新光社 東京.
- (4) Schrauwen, J. & H. F. Linskens: Mass culture of pollen tubes. Acta. Bot. Neerl. 16. 177-179 (1967).

(受理日 1988年3月31日)