

(花粉学実験講座)

6 花粉生理学実験法

(1) 花粉形成

(a) 花粉の形成過程

花が咲く。葯の中に形成された花粉が露出し、風や虫に運ばれ、その一部はめしべについて花粉管を伸ばし、種子形成にあずかる。多くの植物では、開花した花から花粉を採取し、顕微鏡下で外部形態を観察することは容易である。さまざまな模様の花粉壁の構造は、植物の多様性を示す最高の見本であろう。

花粉の形成は小さい蕾(つぼみ)の中で始まる。小さい蕾の中では、花びらなどとともに、葯が分化・形成される。図1は一般の被子植物の花粉発生の概略を示す。まず葯の中には、将来花粉になる始原の細胞から始まった胞原細胞が盛んに増殖して数を増す。周囲にある葯壁組織も細胞分裂を続けるが、やがて、中央部にある胞原細胞は分裂を止め、成長して大きくなって花粉母細胞になる。この時期は、次に起こる減数分裂のための準備期であって、前減数分裂期と呼ぶ。この期間に染色体複製のためのDNA合成をして、同調して減数分裂期に入る。葯壁組織は花粉母細胞を包む形になるので、いわゆる花粉袋となっているが、一つの葯当りの袋の数は通常4である(図2)。

減数分裂の前期は、細糸期・合糸期・太糸期・複糸期・移動期の5期に区別される。前期に続いて第一分裂の中期、後期、終期を経た細胞は、さらに第二分裂の前期・中期・後期・終期を経て、四つの花粉細胞、いわゆる四分子となる(図1)。高等植物では、ここまでが孢子世代であり、胞原細胞増殖から減数分裂終了までは、花粉細胞という小孢子形成過程にあたる。

四分子形成以後は配偶世代である。四分子は、通常すぐ解離してばらばらの単細胞として、一核性花粉細胞期に入る。一部の植物では、四分子のまま(四集粒; ツツジ類・マメ科オジギソウなど)、または花粉塊として(ラン科・ガガイモ科など)葯内に存在する。初期の花粉細胞は、その種に特有な外壁模様を形成する。やがて半数性の核分裂をして、花粉管核(栄養核)と生殖核(精原核)となり、大きな栄養細胞が小さな生殖細胞(精原細胞)を中に閉じこめた形の二核性花粉となる。細胞は再び長い中間期に入り、開花期

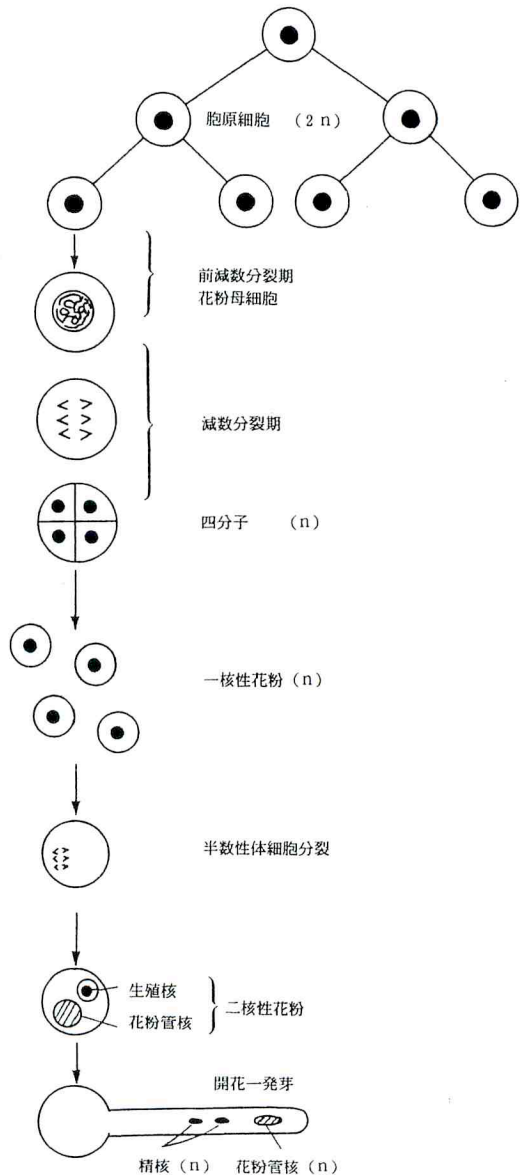


図1 被子植物における花粉発生過程

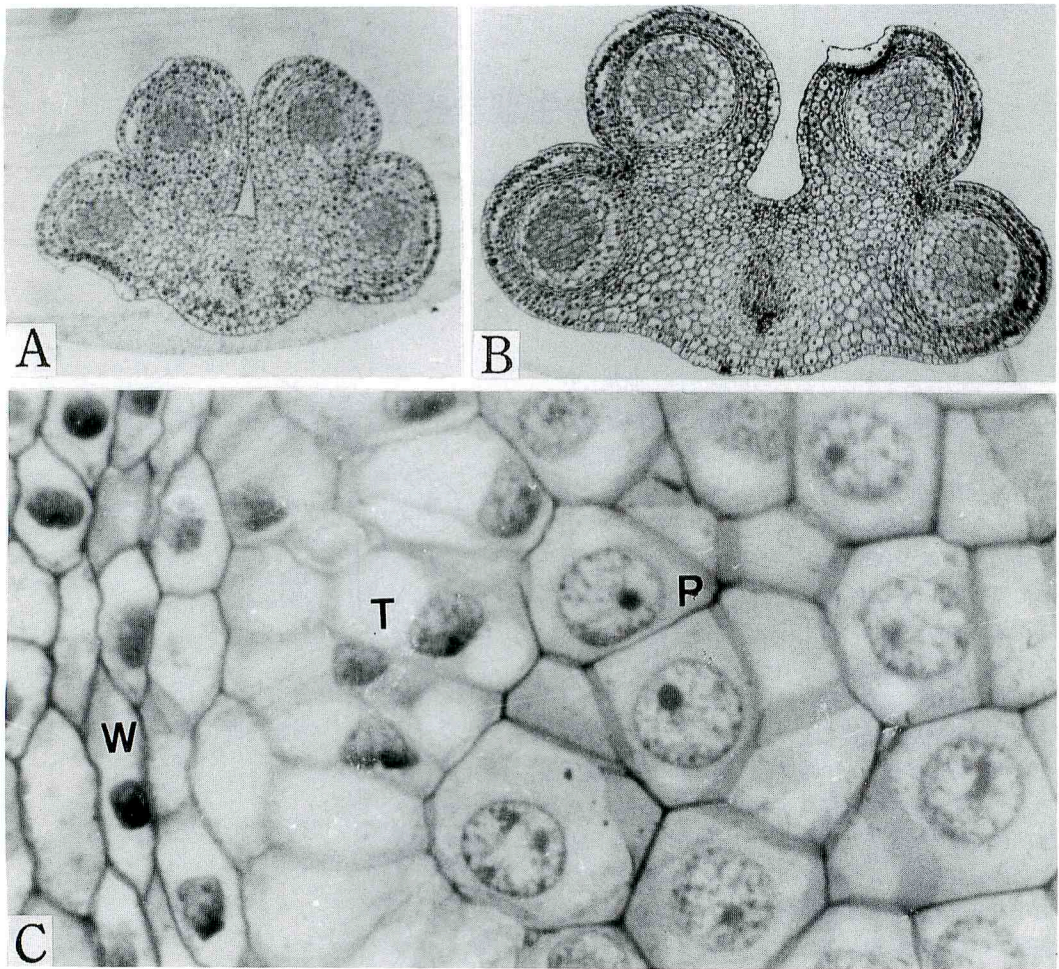


図2 テップウユリの葯の横断切片 A, 9 mmの蕾の葯. 四つの花粉室の中に胞原細胞増殖停止直後の花粉母細胞が識別できる. B, 12 mmの蕾の葯. 減数分裂の開始直前. C, Bの一部の拡大図. P, 花粉母細胞; T, タペート細胞; W, 壁組織. (A, B $\times 30$; C $\times 600$)

近くになると成熟する。開花に伴い葯が裂開して花粉が裸出し、めしべの柱頭につくと花粉管を伸ばし、その管の中で生殖細胞が分裂して2個の精細胞になる（生殖細胞の分裂が開花前に起きている種では三核性花粉として受粉する）。以上は被子植物の花粉形成過程であるが、裸子植物では種類により、さらに複雑な構造をとる。被子植物では2個の精核がそれぞれ卵核と極核に融合し（重複受精）、配偶世代が終わる。このように花粉は、胞原細胞の体細胞分裂期に始まり、前減数分裂期、減数分裂期、中間期、体細胞分裂期、中間期、体細胞分裂期（生殖細胞分裂）を経るとい

複雑な運命をたどる。

(b) 花粉形成の各時期

花粉の発生は、一つの蕾の中で、前減数分裂期以後ほぼ同調して進行する。発生の各時期が蕾の生長度（大きさ・季節）によって推定できると観察には便利である。ユリのように大型の蕾をつける植物では、その長さとお葯の中の花粉の発生とが相関関係を示すので、蕾の長さを測ることによって発生時期を知ることができる。例えば、テップウユリの減数分裂は12 mmの蕾の中で始まり、24 mmで終わり、その期間は7～8日である。花粉細胞内の分裂は58 mm前後の蕾の中で起

こっている。

チューリップやスイセンのように、ある季節一斉に開花する植物は、季節に対応してほぼ同調的に花粉形成が進行する。チューリップは、生育温度の影響を受けやすいが、中部地方の野外での生育を標準にすると、11月上旬に球根の中で減数分裂、3月下旬葉が地上に出て花蕾が伸び出した頃に花粉細胞の分裂が起こる。このような植物は、若い花蕾を定期的に採取し、固定あるいは観察しておかないと、来年まで材料が入手できないことになるので要注意である。

ムラサキツユクサのように次々に蕾をつける植物は、いろいろな発生段階にある細胞が得られる上、長期間使用できる利点がある。

(c) 花粉形成過程の観察法

(I) 花粉細胞の葯からの取り出し

花粉形成過程を観察しようとする時、材料を選択できるなら、なるべく大型の葯をもち、次々に開花する植物を選んだ方がよい。まず開花した花から花粉を採取して、葯の数と花粉の形状を知ることである。次に開花直前の蕾から花弁を裂いて、葯がどこにあるかを

よく観察してから葯を取り出し、切開または押しつぶしによって花粉を観察する。どのような方法がよいかは種によるが、小さな葯ならスライドガラスに載せ、ピンセットの先などで軽く押しつぶし、手早く染色液を滴下してカバーガラスをかけるか、先に染色液をかけてカバーガラスを上に乗せ、その後にピンセットなどで押すかして観察する。

その後順次小さな蕾に挑戦する。葯の長さが2mm前後から数mmあるものでは、スライド上で安全カミソリの刃で葯の先端を切りとり、染色液を滴下、カバーガラスをかけ、その上からピンセットの先で葯の先端に向かう方向に力を加えて押すと内容が外に出ることがある。やがて花粉の外壁にその種特有の模様がなくなり、四分子期の細胞に当たる。それより小さい蕾を選ぶと、減数分裂中の花粉母細胞が見いだせるはずである。蕾の長さ16-17cmで開花するテッポウユリでも、四分子期は2.4cmであるから、意外と小さい蕾を選ばないと減数分裂は観察できない(図3)。減数分裂期の細胞も、葯壁の組織の細胞と区別することができるから、経験を積んでこれが将来の花粉になる細胞と認

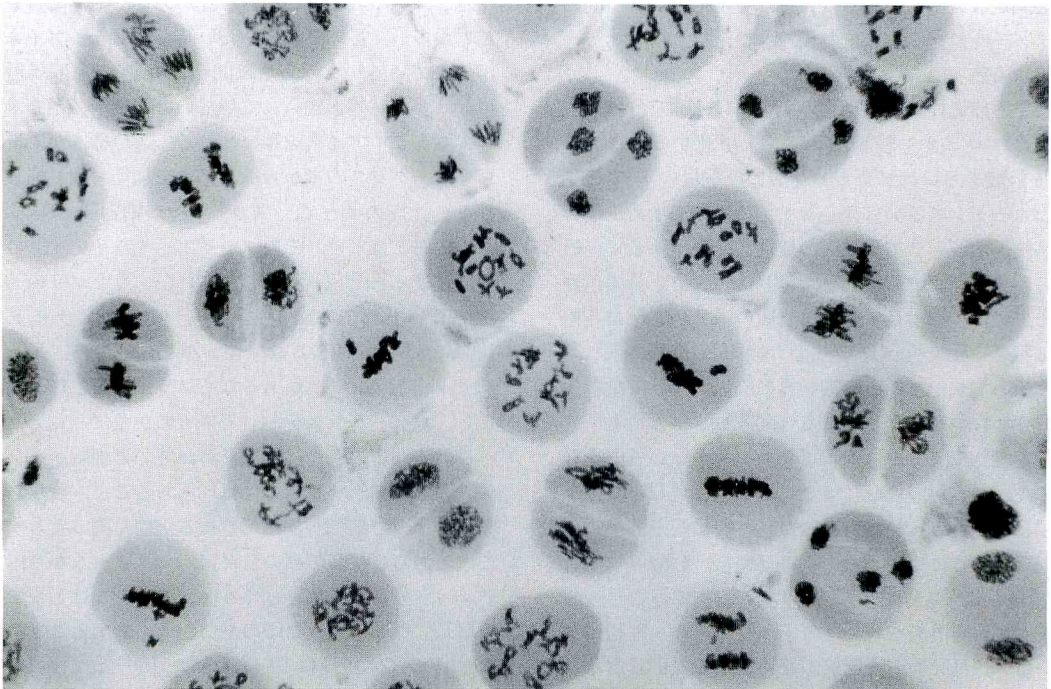


図3 テッポウユリ 22-23 mmの蕾4個から得られた花粉母細胞のオルセイン染色 前期の移動期から第二分裂終期まで混在している。減数分裂後半になると、1個の蕾の中での同調性がやや乱れるので、いくつかの蕾から得た細胞を混ぜて固定すると、減数分裂のいろいろな時期を観察できる。(×260)

識できることが望まれる。前減数分裂期の花粉母細胞も多くの種では区別できるが(図2)、押しつぶし標本では外壁の組織との判別が難しいかもしれない。しかし、図2Aに示されるように、テッポウユリでは胞原細胞増殖停止直後でも、明らかに将来の花粉母細胞が区別される。増殖中の胞原細胞は、周囲の組織の細胞と区別し難い。

しかし、一般の植物では花蕾も小さく、1個の花のつくる花粉も少ないので、葯の中で花粉形成の経過を追うのはそう容易ではない。ある特定の植物で花粉形成を調べたい時、やはり開花した花から順に小さい蕾へと葯を取り、スライド上に花粉細胞を載せられるように馴れることが必要である。

(II) 材料の固定・保存

次々に開花する植物ならば、一度にいろいろの大きさの蕾を集めて葯を取り出し、スライド上に細胞を載せ、染色液をかけて観察すればよいので、とくに固定する必要はない。しかし、蕾または葯を保存し、後で観察するには固定しなければならない。固定液はエタノール3：酢酸1の混合液で十分である。ただし、材料を固定液の中に放置しないで、翌日には70-100%エタノールに移し換えておく。

(III) 染色

花粉形成過程にある細胞の染色には、通常酢酸カーミンかプロピオン酸オルセインを用意する。ともに45%酢酸あるいはプロピオン酸に液重量の1%の割合のカーミンあるいはオルセインの粉末を加え、十分に沸騰、溶解させて冷却後、濾過して使用する。一般に、四分子期までの細胞は、オルセインで十分染色される。染色のこつは、小さな管瓶の中で葯または花粉母細胞を一晩染色(過染)した後45%酢酸に入れ、少々温めて脱色すると、細胞質の染色が抜けて染色体が鮮やかに見えるようになる(図3)。

花粉細胞になるとスポロポレニン性の厚い外壁をもつので、色素が浸透しにくく、核染色は難しくなる。容易に染色される材料もあるが、一般に双子葉植物の花粉は染まりにくい。そのような場合、酢酸カーミン液の中に花粉を入れ、ある程度熱した後室温で長時間放置してから酢酸で脱色すると、一つの花粉細胞核あるいは二核性花粉の生殖核と花粉管核を識別できるようになる。

小さな葯をもつ種で、葯ごと染色する場合には、上記の固定液で固定(30分~24時間)した後、フォルゲン反応で染色することを勧める。この反応は、まず材料を1Nの塩酸に入れ、60°Cで10分間前処理し

て加水分解する。次に塩酸を捨て、Shiff-A液(0.5g塩基性フクシン、1g次亜硫酸カリウム、5ml1N塩酸に水を加えて100mlとし、2時間攪拌後、0.2gの活性炭を加えて濾過、使用する。保存は冷蔵庫で)を入れ、常温で10分間染色し、次にShiff-B液(5ml1N塩酸と1g次亜硫酸カリウムに水を加え、100mlにした液)に移して3分間おく。その後、45%酢酸液に移し、5-10分後、酢酸の1滴と葯とをスライド上に載せ、カバーガラスをかけて軽く押しつぶす。この方法では、1Nの塩酸処理によって組織が解離しやすくなるので、押しつぶし標本を作りやすく、花粉形成過程にある細胞を識別しやすい。核や染色体の染色性は植物によって大幅に異なるので、マメ科・ユリ科などよく染色される根端組織で染色性を確認しておくことを勧める。

(d) 標本の保存

花粉形成過程は、多くの場合押しつぶしスライド標本を作製して観察するだろう。よく染色されていて保存したいスライド標本ができた時、カバーガラスの周囲をパラフィンで封じておくと一時的に保存できる。しかし、いつのまにか小さな孔があいて乾いてしまうことが多い。長時間保存したい時にはドライアイス法が優れている。この方法は開発されてもう30年近くになるが、意外と知られていないので以下に紹介する。

まずドライアイスを手に入れる。よい標本ができたからカバーガラスの上から徐々に力を加え、強く押し付ける。上記のように、スライド上の細胞は45%酢酸の中にあるはずで、そのスライドをドライアイスの平面に載せると、2-3分で凍結する。カミソリの刃などでカバーガラスをはぎとり、直ちにスライドを100%エタノールに入れ、10-20分脱水する。ユーパラル(euparal)があるならスライドの上に1滴落とし、カバーガラスをかけてできあがる。

この方法の注意点は、押し方が強いと細胞がパンクし、弱いと細胞が脱水中にはげ落ちること、脱水が不完全では後で細胞が縮んだり標本が白く濁ったりすることである。湿度の高い日には、エタノールから出してユーパラルを落としカバーガラスをかけるまでを手早くしないと、空気中の湿気が入って濁ることになる。ドライアイスは1kgあれば、100-150枚の標本作製が可能である。

ユーパラルは市販されているが、扱っていない薬品会社も多く、入手できないことがある(ドイツ製、100ml、4,000円位)ので、バルサムで封じることになる。その場合は、スライドをエタノールからキシ

ロールに移し、10分ほどで引き上げ、バルサムを1滴落とし、カバーガラスをかける。

(e) 葯の切片製作

図2に見られるごとく、花粉形成の初期過程や小さい蕾をつける植物では、上記のように固定した後、通常の方法でパラフィンまたは水溶性樹脂（三菱レーヨン製、acrytron E）に包埋して切片とし、ヘマトキシリンで染色するのもよい。多少手間がかかるが、葯全体の組織像がよく観察できる利点がある。欠点は、核が大きい植物では、核が数枚の切片となって、減数分裂期にある細胞の染色体の全体像が捉えにくいことである。（伊藤道夫・岡田洋子）

(2) 花粉の発芽と花粉管の伸長

(a) 人工発芽法一般

どのような実験であろうと、まず実験目的を明確にし、その目的を達成するのに最も適当と思われる計画を立て、計画に沿った準備をしなければならない。ふつつ花粉の生理学実験に使用するガラス器具は硬質ガラス製、薬品は試薬特級、水は再蒸留水を用いるが、これも目的による。

たとえば、ある物質の花粉発芽に及ぼす影響を調べる場合は、できるだけ他の要因を除くために、上述のような配慮がなされるべきであろう。また、花粉を生産する植物は、遺伝的に同じ形質のもの、あるいは同一個体であることが望ましい。さし木などでふやした同一クローン（遺伝的に形質の同じ個体群）でも、環境が違えば表現形質が違ってくる可能性があるため、同じ環境のもとで育てることが必要であろう。

けれども、もし、ただある植物の花粉の発芽を見るだけが目的であるなら、このような考慮はとくにしなくてもよい。水は水道水を沸騰させてさましたものでよいし、ショ糖も家庭で使う市販品でよい。目的が何かにより、材料や方法について、それぞれ判断して実験を進めるべきである。

供試花粉を生産する植物について留意すべき点は、(4)の受精のところでもくしく述べてある。花粉生理の実験についてもかなり書かれている初心者向きの実験書に、上原勉著「花粉の観察と実験」がある。⁽¹⁾ また、「花粉の発芽と花粉管の成長」についての実験法が実験生物学講座16⁽²⁾に載っているので、参考にさせていただきたい。

(I) 培地（培養基）の作製

発芽や花粉管伸長のための培地として、時にめしべを用いることもあるが、ふつつは人工培地が用いられ

る。人工培地には固形のもの液体のものがある。

(i) 固形培地

固形培地にゼラチンやデンプン糊を使用した報告もあるが、ほとんどは現在に至るまで寒天培地が用いられている。

寒天培地は基本的には寒天、ショ糖、水の3者でできている。ショ糖のほかにホウ素を入れると、発芽が促進されたり、花粉管の伸長が良くなることがある。ホウ素はホウ酸またはホウ砂を溶かして培地に加えるが、その含量は10-100 ppm（1/10万-1/1万）程度である。0.1%ホウ酸水溶液を500 mlなり1 lなり作って冷蔵し、培地を作る際に必要量を取り出して、10-100倍に水でうすめて使用する。カルシウム（硝酸カルシウムとして）の添加も有効である場合がある。

ビーカーに所要量のホウ素あるいはカルシウムを溶かした水溶液を入れて寒天と砂糖を加え、加熱して完全に溶解させるが、この時液量が100 mlであれば200 mlのビーカーを、200 mlであれば300 mlのビーカーをというように、沸騰を考慮して大き目の器を使用する。急な沸騰が起こらないよう、ガラス棒でよく攪拌しながら火加減に注意し十分に溶かす。浮遊していた寒天末が全く見えなくなり、液がすき通った状態になったら火から下ろし、あらかじめ乾熱滅菌（120℃、1時間程度）をしておいた底の平たいシャーレ（フラット・シャーレ）に流しこむ。シャーレ（ペトリ皿）は目的にもよるが、ふつつ直径9 cmのものを、場合により6 cmのものをを用いる。寒天液は静かにシャーレの中心に注ぎ、放射状に広がって全面に満たされたところでとめる。直ちにふたをし、温度が下がって固まるのを待つが、シャーレのふたについて水滴が消えるまでは花粉をまかないようにしたい。でき上がった寒天板は3 mm程度の厚味になる。

簡易寒天培地の作製：花粉が比較的早く発芽するものについて使用できる。寒天を溶かきった液にスライドガラスを、その一端を手で持って浸し、直ちにとり出してろ紙で片面を拭き取り、シャーレに入れて固化させる。またピンセットでカバーガラスの角を挟み、全面を寒天液に漬け、とり出して片面の液をろ紙で除き、同様に固めたものを発芽床とする。これらの方法では培地の厚みが薄く、早く花粉をまくことができるが、あらかじめ身にもふたにも湿ったろ紙を底に敷いたシャーレの中に、花粉を置床したスライドあるいはカバーガラスを入れるようにしないと、培地が早く乾くという欠点がある。

少し上下にずらした2枚のスライドガラスに2 mm

厚のガラス板を両端に挟み、間に寒天液を流しこんで2 mm厚の寒天板を作るという田中の考案もある。⁽²⁾できた寒天板は1 cm角ぐらいに切り、それぞれに花粉をまき、温室におく。

シヨ糖濃度は多くの場合5-10%でよいが、3核性花粉(イネ科、アブラナ科など)では一般に20-30%あたりで発芽が良い。

寒天はDIFCOの精製粉末寒天がよく用いられる。濃度は0.8-1%でよいが、場合によっては2%といった硬いものを作ることがある。

(ii) 液体培地

寒天を用いず、シヨ糖液(ホウ酸添加がよい)を培地とするが、よく用いられているのはファン・ティエgem (Van Tieghem)の温室である。硬質ガラス管(外径12~14 mm程度)をたとえば10 mm幅に切り、両面を平行によく磨ったもの(別注)をパラフィンまたは接着剤でスライドガラスに貼りつける。温室を臨時に作る時は硬パラフィンでよく、その小片をスライドにおいたガラスリングの下に接着させ、加熱すると溶けたパラフィンがリングとスライドの隙間を埋め、火から下ろせば冷えて固まる。カバーガラスの中央に培養液を1滴おき、その上に適量の花粉をまいて裏返し、上縁にワセリンを塗ったガラスリングに載せ、少し力を加えて密着させる。リング内にはあらかじめ同じ培養液を数滴入れるが、これは懸滴の蒸発を防ぐためである。

懸滴培養(hanging drop culture)には、ほかにホーライドを用いる方法もあるが、スライド表面に貼りついたカバーガラスを剥がす困難性を解消する必要がある。

培地のpH: 固形、液体を問わず、培地はpH 5-6の微酸性が一般に適当であるとされる。しかし通常はとくに調整する必要はなく、作った培地はほぼこのあたりのpH値になる。

(II) 人工発芽の容易な花粉

キク科、ヒルガオ科(アサガオなど)、ワタ科(ムクゲなど)のような花粉は人工発芽が困難であり、イネ科の花粉も、チカラシバのように発芽しやすいものもあるが、一般には人工発芽が困難である。発芽や花粉管の伸長を見るのが容易あるいは比較的容易な花粉として、たとえば次のようなものを挙げることができよう: ホウセンカ、ペチュニア、ミョウガ、スイートピー、ムラサキツユクサ、テッポウユリ、スカシユリ、オオマツヨイグサ、ガマ、ヒメガマ、トレニア(ナツスマレ)、ツバキ、チャ、トチノキ、エゴノキ、サル

スベリ。

(III) 花粉発芽試験で留意すべきこと

(i) 培養温度

培養温度は20-30°C、通常24-27°C前後でよいが、花粉の種類により高低を検討せねばならないこともある。野外で開花中の気温を適温とみる考えもあろう。しかし、チャは10月から12月初め頃に開花するが、花粉は25°C前後におくと室温(10-15°C)よりはるかに早く発芽する。トマトは露地では夏に開花するが、花粉は30-33°Cでよく発芽するという。

(ii) 花粉の密度効果(density effect)

培地にまかれた花粉の密度が高いところでは、一般に花粉の発芽率が高く、花粉管の伸長も良い。バラバラとまかれている場合には発芽しにくい。花粉の発芽や花粉管の伸長に必要な物質の培地への拡散が問題なのであろうが、発芽率を調べるには厄介なことになる。面双筆のような小筆に花粉をつけて、軽く一はきするようにして置床するか、花粉が粉状に飛散するものでは、花粉をつけた筆に軽く振動を与えて培地上に飛散落下させる。あるいは薬を先細のピンセットで挟み、指先でピンセットを軽く叩いて、花粉を培地に落下させる。培地と薬との距離は10 cm以上離す。

虫媒花の花粉は脂質などの分泌物で互にくっついているのがふつうで、この場合は培地に花粉を均等に分散させてまくことはさらに難しい。あえて粉状にするには、漏斗にはりつけたろ紙の中に花粉の露出した薬を何個か入れ、上からエーテルを流し、濾過後ろ紙を広げてエーテルを揮散させる。ただしエーテル処理で花粉の発芽力に影響の出る可能性はないとはいえない。エーテル処理をしない花粉をまいて、あらかじめ発芽状態を比較検討する必要があろう。

(iii) 発芽率の算定

しかし、いずれにしても、花粉を均等に培地にまくことは困難である。また培地の部分によるわずかな条件の違いが、発芽力をもつ花粉を発芽させないということも起こり得る。このように本当の発芽率を知ることが難しいが、大よその発芽率を、次のようなことを考慮しながら出すことはできる。

1) カバーガラスの大きさが18 mm角なら、その全域の花粉粒数と発芽粒数を数える。ただし、不稔花粉、不完全花粉は除外し、また高密度にまかれた部分も発芽を観察しにくいのでこれを除く。

2) 発芽とは花粉管形成を指す。花粉管が花粉直径の2倍以上になっている場合を発芽とみなす慎重な見方もあるが、発芽前に起こる、内容の膨出による乳首

状突起の形成はとにかく、短くても明らかに管と認められる状態になったものは、これを発芽花粉と見てよいのではない。

3) 発芽率算定のための観察花粉粒数は多いにこしたことはないが、同一条件のプレパラートを2-3枚、あるいはそれ以上調べ、計最低で200、できれば500粒以上の花粉を見るようにしたい。少数統計法が進歩してはいるが、数を多く扱う方がしっかりしたデータになると思う。

4) 四集粒の場合、機能的には1粒でも発芽すれば事足りるから、四集粒を単位とした発芽率の算定もできる。しかし、ふつうは四集粒数×4として花粉粒数を出し、調査した発芽粒数との百分率で表すのがよい。図4に四集粒であるガンマ花粉の発芽状況を示す。

(iv) 花粉の線状置床

花粉の正確な発芽率を出すことが困難であるなら、あえて発芽率を出さず、花粉管の伸長程度によって花粉の発芽や管生長力を見るのがよいだろう。花粉を線状に置床する方法は岩波⁽³⁾によって開発された。花粉のある量をスライドグラスにとり、カバーグラスの縁(ふち)を使って花粉をていねいに、できるだけ薄く均一に広げる。十分広がったところで、カバーグラスの一辺の縁をやや斜めにして花粉の上におき、その縁を培地の所定の位置に押せば、線状に花粉を置床できる。花粉管はその線にほぼ直角に、両側に伸びるので、一定時間後の管の長さを測ることにより、発芽力や管

生長力を知ることができる。この方法は高密度分布となるため、これで花粉が発芽しないなら、花粉のおかれた条件下での発芽は不能であると断定してよいだろう。

(v) 乾燥花粉の発芽試験

花粉を葯から直ちに培地にまく場合もあるが、貯蔵花粉を使って実験する場合もある。一般に花粉の貯蔵には乾燥・低温がよいが、イネ科の花粉の多くは乾燥が過ぎると発芽しなくなる。乾燥器に貯蔵された花粉をとり出して、すぐに培地にまく時は注意を要する。花粉が吸水して膨らむまでに、発芽に必要な物質が培地にとけ出して発芽しなくなるとか、急激な吸水が構造に害的影響を及ぼすとかの障害が起こりうるからである。空気中にしばらくおいて湿気を吸わせるか、あるいは湿室(湿度95%-飽和)に一定時間入れ、ある程度吸湿膨潤させたのち、培地にまくことにより、いきなりまいた場合よりも高い発芽率を得ることが多いという。⁽⁴⁾

発芽率が最高となる置床前湿室放置時間は、たとえばセイヨウハシバミ(*Corylus avellana*)で5-15分、ハナビシソウで15-30分、フユボダイジュ(*Tilia cordata*)で1-1.5時間、クジャクサボテン類の*Epi-phyllum truncatum*では2-3時間と報告されている。⁽⁴⁾ とくに乾燥花粉・貯蔵花粉の発芽を試験する場合、試みてよいことであろう。(渡辺光太郎)

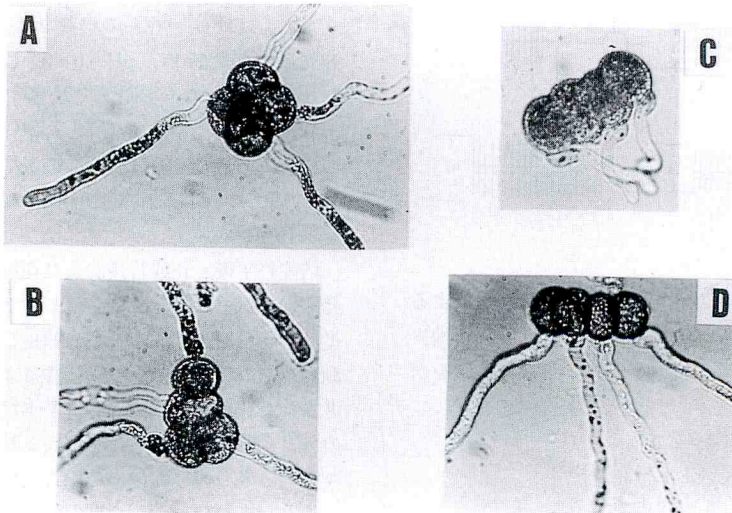


図4 ガマ花粉の発芽 A, 双同側型四集粒の発芽. この型の四集粒が最も多い; B, T字型四集粒; C, D, 線型配列の四集粒. Cでは4粒中3粒が発芽. (×250)

(b) 花粉の発芽・花粉管の伸長と促進または抑制物質

花粉の発芽や花粉管の伸長を指標にして、生長または抑制物質を生物検定する場合、培地は寒天にショ糖、ホウ素などを入れて作成するのが一般的である。またハンギングドロップ法（懸滴培養法、前出）や、シャーレ、ビーカーで液体培養を行う方法もある。寒天培地を用いる場合にも、図5 A, B, C, Dやその変法もある。

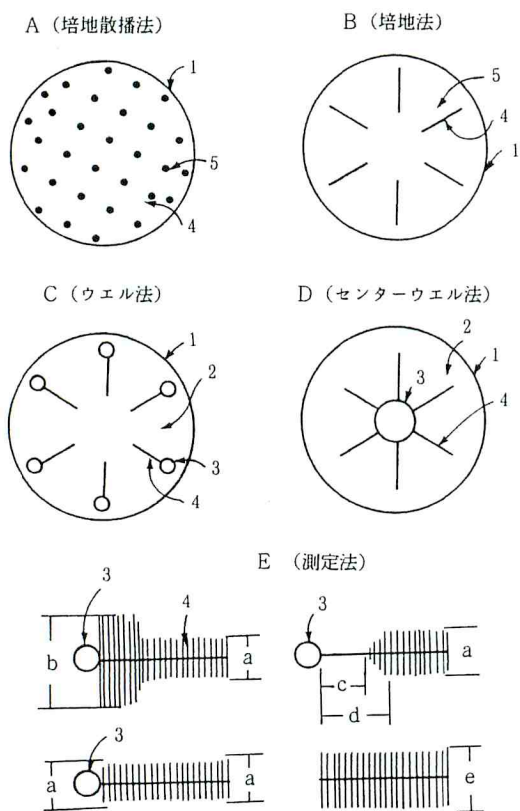


図5 寒天培地による花粉の培養法とウェル法による促進、阻害の測定 1, シャーレ; 2, 寒天培地; 3, さくせつ孔(ウェル); 4, 花粉; 5, 被検体を含む培地

- a, 対照花粉管長 (1/2);
- b-a, 促進花粉管長 (1/2);
- c, 完全阻害長;
- d, 完・不完全阻害長;
- e, 培地法の促進花粉管長 (1/2)

ここでは①生長促進または阻害度を一度に広い濃度範囲で定量的に測定できる。②熱に不安定な物質についても適用可能である。③迅速かつ多数測定できる等の長所があるウェル法を中心に述べる。⁽⁵⁾

本法は岩波⁽³⁾や Martin⁽⁶⁾の方法を改良し、簡易に定量化したものである。まず使用する植物種花粉の培地として適当な基準培地を作る。すなわち、寒天末、ショ糖、ホウ素を加え、水に懸濁し、所定の pH とする。これを加熱溶解させ、直径 90 mm の底の平らなシャーレに流しこみ、放冷する。シャーレのふたの内側に紙を張り、蒸留水を含ませ、シャーレ内の湿度を高く保つようにして 4°C の冷蔵庫で一昼夜放置する。この処理は寒天中の物質の均一化と発芽を一斉にさせることに有効である。花粉の置床直前に図5に示すようにシャーレの周囲から等距離の位置にコルクボーラーで直径 5 mm の搾せつ孔(ウェル)を6カ所空ける。この場合、モデル型紙の上でウェルを空けると正確となる。またウェル内の寒天片を取り去るにはサッカーで吸いとして除去するとよい。

花粉は 100 メッシュのふるいを通して、ガラス板上にできるだけ均一に散布する。次いでカバーガラスを用いて、その一辺(切断面)で撒布花粉の一定量をかきとり、これを図5のようにウェルに接して、また中心に向かって花粉を一定線上に置床する。この6個のウェルのうち、一つは対照として蒸留水 50 μ l を注入し、他のウェルには被検液を各々 50 μ l 注入する。その後シャーレのふたのろ紙に再び蒸留水を含ませ、ふたをして培養する。

たとえば、チャ花粉の培養では寒天 1.2%, ショ糖 8%, ホウ素 17 ppm, pH 5.0-5.5 の培地に花粉を置床し、25-26°C の下で暗所で培養するのが良い結果を得る。これを標準培養法⁽⁵⁾としている。またチャ花粉の場合、花粉管は約 14 時間で最大生長を示し、後変わらない。しかし時間的便利さから 20 時間培養を基準としている。

培養終了後、花粉管長および花粉発芽阻害、不完全発芽帯(図5 E)の長さをノギスで測定する。花粉管長は、花粉置床線から両側に伸長した花粉管の全長を測り、その 1/2 とする。被検物質によって生長が最も促進された花粉管長(例外的に1本だけが特別伸びたものなどは除外)を最大花粉管長とし、花粉線のうちウェルから最も遠い部分の花粉管長を内部対照花粉管長とする。またシャーレごとの対照(水)を水対照とし、最大花粉管長とこれら二つの対照とを比較して生長促進の程度を調べる(図6)

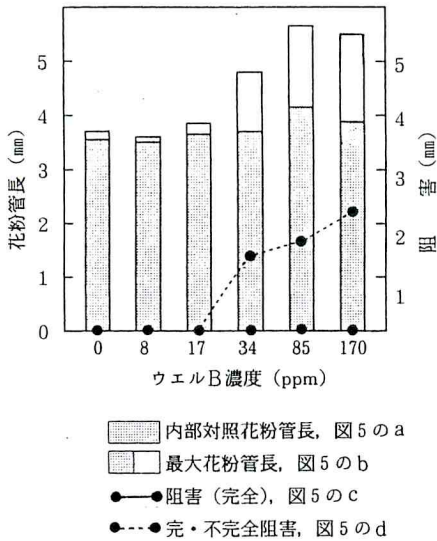


図6 チャ花粉管生長に及ぼすホウ素の影響 (ウエル法)

生長阻害は、全く発芽していない花粉帯 (図5E) の長さを阻害 (完全:c) とし、これに花粉管生長が抑制されている花粉帯 (図5E, [d-c]) を加え、完・不完全阻害として表わす。培養はすべて3連制で行うのを基準とする (図7は実例)。

このウエル法の変法としてセンターウエル法がある。被検液を中央のウエル (図5D) に入れ、4-6条の花粉線を置床し、培養する。これはとくに阻害の測定の信頼度を高めることができる。

このように本法は簡易、迅速に被検物質の促進や阻害を検索、定量的に測定できる。しかし、やや定量性に欠ける短所もあるので、後述の培地法と組み合わせることによって、まずウエル法で大まかに検索し、のち培地法で確認するのが有効である。

なお、寒天中に拡散しにくい物質、たとえば沈殿性のものはとり扱えない。

培地法は寒天培地作成時に被検物質を同時に加え、前述と同様にして培地を作り、図5Bのように花粉を置床し、発芽させる。そして図5E右下のように花粉管長e (1/2) を測定する。対照は被検物質を入れない培地での花粉管長である。

このようにしてウエル法は生理活性物質や新しい植物栄養素の検索,⁽⁷⁾ 堆肥の腐熟度、産業廃棄物の堆肥化の検定,⁽⁸⁾ また土壤中の残留農薬、工場廃水のチェックにも利用できる。さらに培地またはウエルに

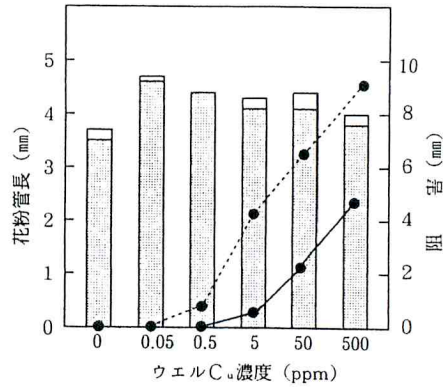


図7 チャ花粉管生長に及ぼす銅の影響 (ウエル法) グラフの示すところは図6に同じ。

阻害物質を閾値レベルに入れておき、ウエルまたは培地にそれを非阻害化させる物質を入れることによって、生物に害をもたらす物質のマスキングをする物質も検索でき、⁽⁶⁾ 応用面の広がりのある生物検定法である。

なお、使用できる花粉の種類などは成書を参考にされたい。 (小西茂毅)

(c) 柱頭反応、受粉反応

被子植物では、花粉はめしべの柱頭について発芽する。花粉管は柱頭組織に侵入し、花柱内を子房に向かって伸長する。花粉のついた柱頭部分が生理的变化を起こすことは、古くからラン科植物で、あるいはクルミやパパイヤで知られているが、いずれも花粉の付着部や花粉管の侵入部の褐変である。この事実は花粉のついた柱頭部分が死滅することを示している。受粉によって起こる柱頭の変化を柱頭反応とよぶが、褐変壊死以外の顕著な柱頭反応がイネ科植物やアブラナ科植物に見られる。アブラナ科では、とくに自家不和合現象が関係し、自家受粉 (同一個体内の花粉をめしべが受ける) の場合と他家受粉 (他の個体の花粉を受ける) の場合とで柱頭および花粉の反応が違う。

(I) イネ科の柱頭反応

イネ科の場合、受粉による柱頭の変化で注目すべきことが二つある。一つは受粉後数分 (早いものでは1分以内) で起こる染色性の変化である: 柱頭の花粉付着部の細胞は、色素液によって花粉のついていない部分の細胞より、早くこく染まってくる。ライムギ、コ

ムギ、オオムギなどでは、酢酸カーミンにより、花粉付着部の細胞核が他より早く染まる（図8）。イネやトウモロコシも酢酸カーミン処理で受粉部の細胞核が早く染まるが、核が小さいので、むしろメチレンブルーやメチルグリーンなどの塩基性色素の水溶液（0.01%）を用い、液胞がこく染まるのを見るのがよい。受粉部の細胞は、この場合、最初液胞が染まるが、これを湿室に入れ、数時間後に観察すると、花粉付着部以外の細胞は液胞のみが染まるだけであるのに、付着部の細胞では核が染まっているのを見ることができらう。色素水溶液で核が染まるのは、その細胞の死を意味している。イネ科における柱頭反応は花粉のついた部分の、またその周辺の細胞のゆっくりと起こる壊死（necrobiosis）を伴っているのである。

今一つの受粉による柱頭の変化は、花粉付着部の凋萎・枯死の現象であるが、これについてはあとで述べる。

染色性の変化を見るには次のようにすればよい。まず開花が始まったばかりの穂を、茎の部分20 cmほどをつけて切りとり、葉も除いて水に挿す。穂の一つずつの花は小花とよばれるが、小花はまもなく、茎を切った刺激で開く。

小花の中には1個のめしべと、1-6（多くは3、イネなどは6）本のおしべがある。めしべの柱頭は二

つに分かれ、多数の毛が生えている、いわゆる羽毛様柱頭である。毛は白くて細長い、ふつう4列、時に5列の縦に並ぶ多数の細胞から成る。

開き出した小花、または開花前的小花からおしべをピンセットで手早く取りはずし、受粉の心配のないめしべの柱頭を基部から摘出し、スライドガラス上におく。顕微鏡で花粉のついていないことを確かめたのち、開葯した葯を柱頭の上10-15 cmに持ち来たり、軽く揺らして、または葯を挟んだピンセットを人差し指で軽く叩いて柱頭に花粉をかける。同時に計時に移る（ストップ・ウォッチを押す）が、花粉は多くかけないように注意する。受粉させた柱頭は、別の花粉のついていないスライドに移しかえ、検鏡して、柱頭のどの毛のどの部分に花粉がついているかを、おおよそ知っておく。

一定時間後、柱頭に色素液を滴下し、カバーガラスをかけて検鏡する。当初しばらくはいずれの部分も染まらないことがあるが、やがて受粉部の細胞で、色素液の性質により、核あるいは液胞が染まってくるのが見られる。この反応は、受粉後色素液滴下までの時間、つまり作用時間の長い時は著しく、たとえば受粉柱頭を湿室に1-2時間おいて色素液をかけた場合は、受粉部の核は直ちに染まり出す。

酢酸カーミンは十分にカーミンの溶けこんだもので

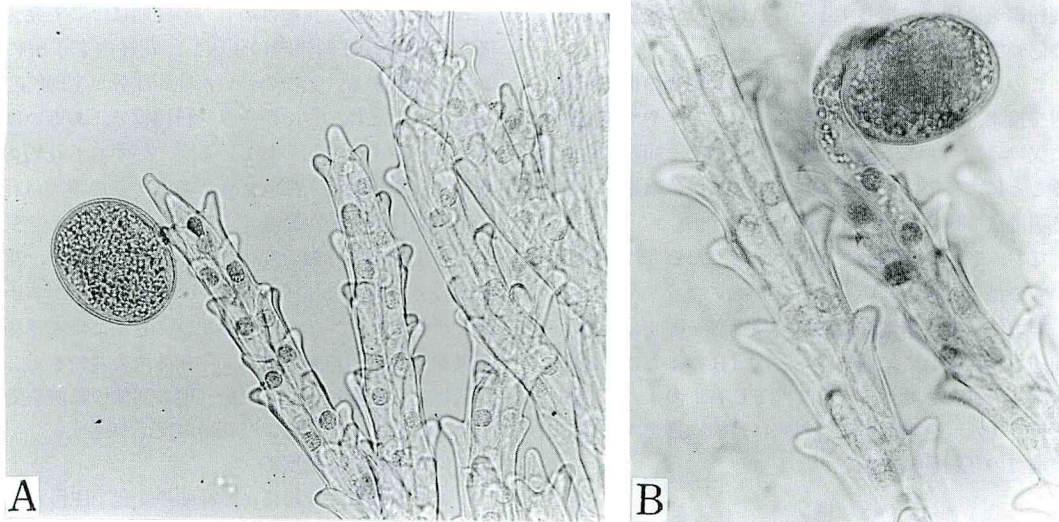


図8 ライムギの柱頭反応 A, 花粉のついた柱頭の毛では、細胞核が他よりも早くこく染まる; B, 受粉後2分での染色反応。花粉はすでに発芽し、花粉管は柱頭の毛に侵入、伸長している。酢酸カーミン染色。(A × 280, B × 350)

ないと、柱頭反応を見ることができない。こい酢酸カーミンを作るには、45% 酢酸に約1% 重のカーミン粉末を加え、加熱沸騰させて溶かすが（前出）、たとえば逆流冷却器をとりつけたり、コルク栓に孔をあけて30-40 cm くらいの細長いガラス管をさしこみ、蒸発した酢酸が冷えて液化し滴下還元されるようにしたりして、紫赤色に近いこい色に1滴1滴がなるまで長時間加熱し、その後冷却、カーミンを沈でんさせてろ過する。カーミンはメルク製などがよく、日本製はよくないと従来いわれてきた。

受粉後1-2分で色素液を滴下することにより、ライムギ、コムギ、オオムギなどでは柱頭反応が明らかになるが、発芽直前の花粉は、色素液が酢酸カーミンであっても、まもなく破裂する。図8のような発芽も破裂もない花粉の付着部の反応を見るには、葯から出た花粉を硫酸紙などに広げて1-2時間気乾し、発芽力を失ったものを柱頭に授ける。ただし、花粉管を形成した花粉は酢酸カーミンで破裂することはない。

コムギなどで自然状態で開花後1-2日の小花のめしべを見ると、花粉のついた柱頭の毛はいずれも全長にわたってしおれ、ついていない毛は全く健全である。ところが受粉後3-4日すると、柱頭の毛はすべてしおれてしまう。これは受精後子房が肥大してきて、母体からの給水が子房に向けられ、柱頭への給水が行われなくなったためであろう。

花粉付着部のしおれは、スライド上においた柱頭に花粉をかけ、そのまま空气中に放置すれば20分前後から見られるようになる。この際、やはりコムギでの観察であるが、破裂花粉の付着部が最も早くしおれ出し、ついで不発芽花粉の付着部がしおれ、花粉管をどんどん子房に向けて伸ばしている花粉粒の付着部が最もおそくしおれ出す。

イネ科におけるこのような柱頭の反応、とくに受粉による柱頭細胞の染色性変化は花粉の発芽と密接な関係がある。発芽における花粉と柱頭細胞との相互作用のあり方は、次のアブラナ科について述べられているところと非常によく似ている。（渡辺光太郎）

(II) アブラナ科の受粉反応

アブラナ科植物は、胞子体型の自家不和合性機構によって受粉反応が制御されている。花粉とめしべの間で行われる認識反応の機構はいまだに明らかでない。その認識反応には、めしべの柱頭中に存在するS糖タンパク質が関与していると思われるが、花粉側にこれに相応するものがまだ検出されていない。遺伝的に言えば、花粉とめしべにおけるS遺伝子の表現

型が異なる場合に、花粉は発芽し、花粉管が柱頭に侵入し、花柱を通して受精に至る。しかし、表現型が同じ場合、つまり自家受粉したような場合には、花粉は発芽しないか、発芽しても花粉管を柱頭組織に侵入させることができない。

花粉発芽時の物質の動きは十分にはわかっていないが、これまでの論文を基に、想像を交えた一つのシナリオを描けば次のようになるだろう。アブラナ科植物の柱頭はドライタイプに分類されて、⁽¹⁰⁾ 多数の単一細胞の乳頭細胞で形成されている。乳頭細胞の壁部分の構成は、外側からペリクル層、クチクラ層 (cuticle)、細胞壁、原形質膜、細胞質物質の順になっている。柱頭についた花粉は、柱頭表面の分泌物との特異的な相互作用によって粘着する。その後すぐ、花粉と柱頭間の水分ポテンシャル差により、花粉は吸水する。吸水と同時に、花粉壁のタンパク質が柱頭表面上に放出され、柱頭上の分泌物と結合しながら自他認識の情報伝達が行われ、それと同時に、花粉に柱頭側から発芽に必要な物質が提供され、発芽する。

花粉の人工発芽実験では、ショ糖、カルシウム、ホウ素が必需要因であることが多いが、ナズナではショ糖よりポリエチレングリコールが花粉の発芽によいという報告もある。⁽¹¹⁾ 発芽した花粉管はクチクラ層と接する。花粉由来のクチナーゼの活性により、クチクラは分解される。このとき、S遺伝子の表現型が一致した場合は、花粉管の伸長は阻害され、伸びても乳頭細胞に侵入できない。そして、花粉管と乳頭細胞の両方にカロース (β -1, 3-グルカン) を主成分とする多糖類の沈着が観察される (図9A)。S遺伝子が異なる場合は、花粉管が乳頭細胞の細胞壁のセルロース・ペクチン層に侵入し (図9B)、花柱の誘導組織の細胞間隙を通して、子房に至る。

配偶体型自家不和合性を示すタバコでは、柱頭側のS糖タンパク質がRNase活性をもち、その酵素活性による毒性によって、花粉管伸長の阻害が起こると説明した最近の報告もあるが、⁽¹²⁾ アブラナ科植物のS糖タンパク質にも、そのような活性があるかどうかは疑問である。

これらの報告の多くは、顕微鏡と電子顕微鏡を用いた、いろいろな観察結果を基にしたものである。長焦点の高倍率実体顕微鏡や画像解析装置などがあれば、更に便利だろう。

ここでは我々が自家不和合性の検定に用いている塩基性アニリンブルー染色による花粉管観察法について簡単に述べる。

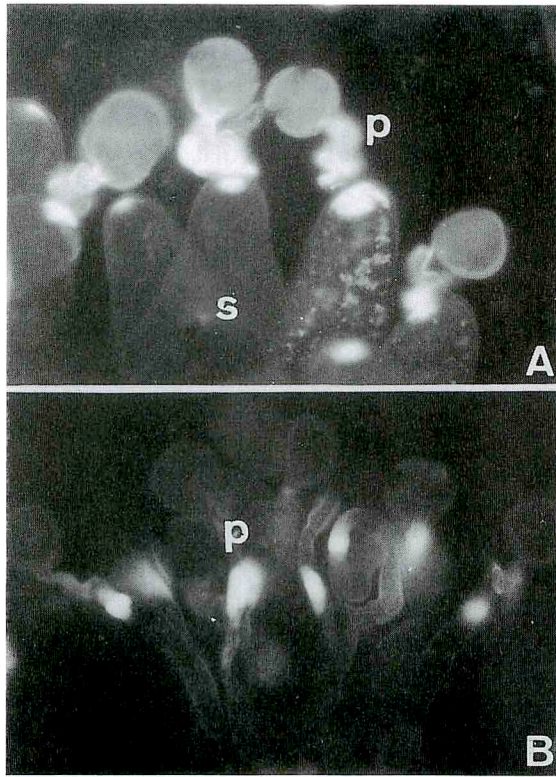


図9 カブの花の自家受粉(A)と他家受粉(B)の時の花粉管の行動 p, 花粉管; s, 柱頭乳頭細胞. 他家受粉の時の乳頭細胞はコントラストが強すぎて, 写真には見えていない. (×430, 盧原図)

塩基性アニリンブルー染色液の作り方: 2% K_3PO_4 水溶液を作り, 0.01%の濃度にアニリンブルーを溶かす. 1昼夜以上放置して色が薄くなったものを用いる.

染色方法

(i) 材料: 受粉した花を用意する. 環境条件によって大幅に変異するが, ハクサイやカブなどでは1時間前後, キャベツ類では, 数時間後に花粉管が柱頭に侵入する. 一般には, 受粉後1晩経過した花が観察しやすい. たくさんの交配組合せを観察するときには, 花柄から切りとった花を1%寒天に挿して, 受粉すると便利である.

(ii) 花からめしべを切り出し, 固定する(エタノール: 酢酸=3:1).

(iii) めしべを1N NaOH水溶液に移し, 60°C恒温器内で1.5時間処理する. 組織を柔らかくすると, 塩基性にすることが目的である.

(iv) めしべを塩基性アニリンブルー溶液に移し, 1.5-2時間室温で染色する.

(v) 柱頭または花柱部分をナイフで切ってスライドガラス上におき, 50%グリセロールを少量たらして, カバーガラスをのせる. 場合によっては軽くたたく.

(vi) 蛍光顕微鏡(励起フィルターEX 420-490, 吸収フィルターBA 520)下で緑色がかった白色のカロースが観察できる.

上記の(ii)-(iv)の作業は96穴マイクロプレート(Falcon 3072)を用いると便利である.

(盧一燮, 日向康吉)

(d) 花粉管の花柱内および子房内伸長

花柱や子房内における花粉管伸長の観察は次のような目的で行われる: 1) 花粉稔性の評価, 2) めしべの成熟期の決定, 3) 自家不和合現象(配偶体型)の観察, 4) 交雑不親和現象の観察.

1) 花粉稔性は, 花粉粒の染色性や人工培地上での

発芽を観察することによっても評価できる。しかしその場合に得られる稔性花粉率は結実率に直接結びつく値ではなく、たとえば稔性花粉率50%でも、十分量の花粉を受粉すれば結実率は100%にもなり得る理屈である。従って結実率の要因としての花粉稔性を評価するには、花柱内、さらには子房内の花粉管伸長を観察することが望ましい。

2) Currah & Ockendon⁽¹³⁾ はタマネギのめしべの成熟期を調べるため、開花後いろいろな時期に授粉し、その約1日後に花柱下部に達していた花粉管の数を数えた。葯の裂開する頃およびそれ以前に授粉した場合には花柱下部に達する花粉管はほとんどないが、その後の授粉では20本以上認められるようになった。すなわち、タマネギの花が雄ずい先熟であることが確かめられた。

3) ナス科、マメ科、バラ科、ユリ科などで配偶体型自家不和合性をもつ植物においては、自家花粉は花柱内で管伸長を停止する。Kho & Baer⁽¹⁴⁾ はトマトの近縁種 *Lycopersicum pervianum* の自家和合性個体と自家不和合性個体について花柱内の自家花粉管伸長の様子を比較した。自家不和合性個体では自家花粉管の伸長が遅く、かつ花柱内で停止した。一般にそのような花粉管の先端は膨んでいて、また、しばしば破裂している。

4) 遠縁交配の際にも花粉管伸長が停止することが多い。Sedgley & Blesing⁽¹⁵⁾ はスイカに異属(カボチャ、キュウリなど)および異科(トマト、エンドウ、ダイコン、トウモロコシなど)の花粉を授け、花粉発芽と花粉管伸長を観察した。ほとんどの組合せで柱頭上の花粉の発芽は認められたが、いずれの場合も花柱内で花粉管の伸長が停止した。

花粉管観察の方法は、前述の、柱頭上の花粉発芽観察の方法に準ずる。すなわち、アニリンブルーで処理した試料を落射型蛍光顕微鏡下で観察する。花粉管壁の主成分であるカロースは、それ自体は蛍光性を持たないが、アルカリ性の液に溶かしたアニリンブルー(ウォーターブルーともいう)で処理すると蛍光性を持つようになり、波長320-400nmの近紫外線の照射により黄緑色の二次蛍光を発する。⁽¹⁶⁾ この現象を花粉管観察に最初に利用したのはLinskens & Esser (1957)⁽¹⁷⁾ であり、その後Martin⁽¹⁸⁾ やKho & Baer⁽¹⁴⁾ によってプレパラート作成手順の細部に改良が加えられた。柱頭部分とは異なり、花柱部分は相当の厚さがあって、その中の構造が重要なため、組織切片にして観察した方がよい。

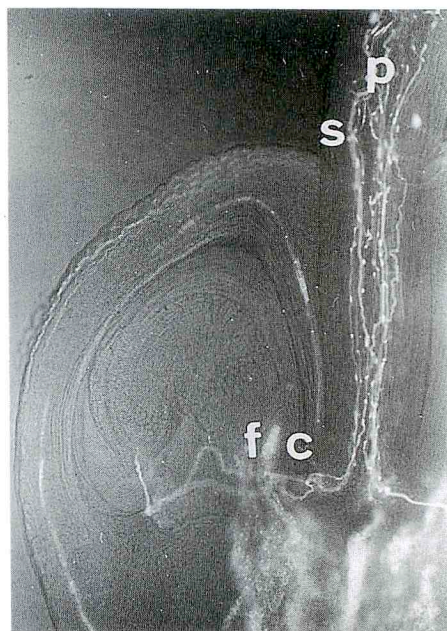


図10 ニラの花粉管の伸長 花粉管(p)が花柱(s)を通して子房の腔所(c)に出、珠柄(f)を巻くようにして腺状の誘導組織に至り、そこから珠孔へまっすぐに進んでいる。(×30, 小島原図)

図10は受粉20時間後のニラの花から、めしべの縦断切片(厚さ約1mm)をカミソリの刃を用いて徒手で作り、前述の方法により固定、軟化、染色し、落射型蛍光顕微鏡で観察したものである(この時は0.1%のアニリンブルー液を用いた)。花粉管(p)が花柱(s)内を伸長し、花柱の最下部に達したところで子房内の腔所(c)に出、珠柄(f)を巻くようにして腺状の誘導組織に至り、そこから珠孔へまっすぐに進入しているのがわかる。

蛍光染色によらず、通常の染色によって花粉管を観察する方法もいろいろ考案されている。^(19,20) 高価な蛍光顕微鏡を必要としない利点はあるが、たとえばコットンブルー染色では花柱の師管のカロースも染まるといったように、花柱組織もかなり染まってしまうことが多く、適用できる植物種が限られるようである。

(小島昭夫, 日向康吉)

(注) リン酸三カリウムの0.1Nの水溶液に0.5%濃度にアニリンブルーを溶かしこんだものを蛍光染色に用いて、好結果が得られる場合もある。なお花粉管の蛍光顕微鏡による観察法については、本誌36巻1号、88ページに寺坂治氏も述べておられる。参照し

ていただきたい。

(e) 裸子植物花粉の発芽と花粉管の伸長

裸子植物の花粉は、被子植物の花粉では見られない前葉体細胞を形成するものが多く、また発芽後、雄原

細胞から体細胞（中心細胞）と柄細胞を生じ（図11）、前者が分裂して精細胞を生ずる。^(2,21-24) このように発生的に違いがあるばかりでなく、発芽生理的にも一般に次のような異なる性質がある。

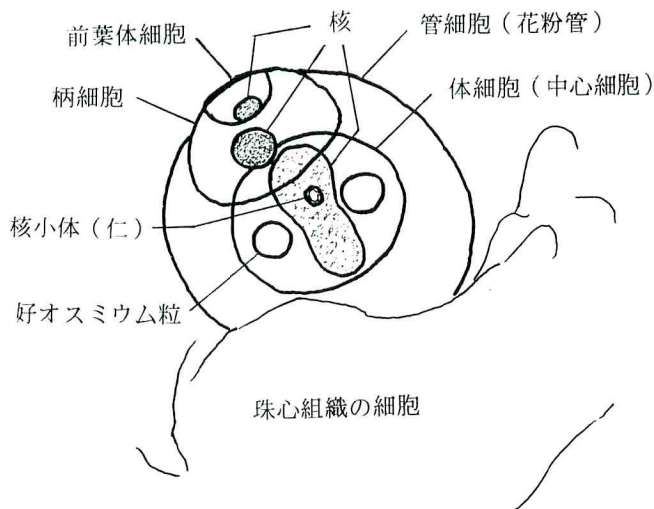
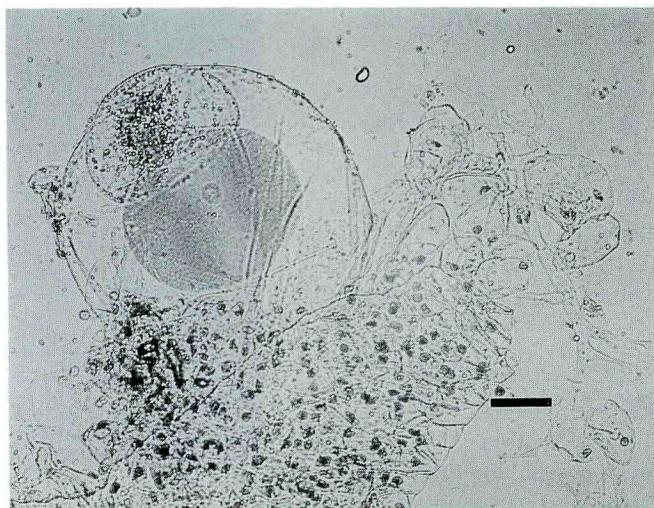


図11 イチョウの胚珠（いわゆる「ぎんなん」）の珠心組織に寄生する雄性配偶体（1983年10月3日） 5月10日頃受粉して胚珠内で発達したもの。最も上部にある小さい細胞が前葉体細胞で、その下に柄細胞があり、丸く脹らんだ管細胞（花粉管）の中に柄細胞に接して見られる大きな細胞が体細胞（中心細胞）である。酢酸カーミンで染色したものであるが、体細胞の中央の薄く染まっている部分が核で、その中央の小さい球状に見えるのが核小体（仁）である。核の両側に見られるやや薄く染まった球状の構造は、好オスミウム粒と呼ばれるものである。この体細胞は、二つの精細胞への分裂に入る直前の状態である。なお、この写真の下半分に見られる多数の細胞は、珠心組織の細胞である。この組織の中に、大きく脹らんだ管細胞の先端部からさらに細く伸びだした花粉管が多くの枝分かれをしていくこんでいる。⁽²³⁾ この場合の花粉管は、養分の吸収器として働いている。バー＝50 μ m

1) 浸透圧の低い培地上でも、花粉や花粉管の破裂が起こりにくい。

2) 発芽時間（置床後発芽までの時間）が長く、花粉管の伸長速度が小さい。

3) 発芽から精細胞（ソテツ類とイチョウでは精子）が形成されるまでの雄性配偶体としての成熟期間がきわめて長い。すなわち、自然での受粉と受精との間隔が長く、月一年単位である。

これらの性質は、発芽実験を行う上で、都合の良いことも、また悪いこともある。

(I) 花粉の採取と貯蔵

培養期間がせいぜい2-3日で済む発芽初期の実験に用いるのであれば、被子植物の花粉の場合と同様に、とくに花粉を無菌的に採取しなくてもよいが、上述の精細胞あるいは精子形成までの成熟過程の研究など、培養期間が数日から数か月に及ぶ場合は、花粉を無菌的に採取しなければならない。

イチョウでの実験例⁽²⁴⁾を示すと、(1) 開葯直前の雄花を採取。(2) 水洗。(3) 無菌箱内に移し、70% エタノールで15秒。(4) 10% ピューラックス+0.05% Tween 20で10分。(5) 無菌水で3回水洗。

(6) 無菌ろ紙で雄花表面の水分を除去。(7) 雄花を無菌のペトリ皿に移す。この場合、開葯までの時間を短くするためにも、また後日、無菌花粉を何回も分けて使用することなども考慮して、一つのペトリ皿当りの雄花の数は少ない方がよい。(8) これらのペトリ皿を、内部をエタノールで拭きとったガラス張りの定温器(20-25°C)へ移し、そのふたをわずかにずらして開葯を待つ。(9) 開葯したら、花粉以外の部分を除き、ペトリ皿のふたをする。以上のようにして無菌花粉が得られるが、直ちに使用しない場合はそのペトリ皿のまま冷凍庫(-20°C)に貯蔵する。

花粉を貯蔵する場合、一般には乾燥(シリカゲルなどを入れた乾燥容器)、低温(冷蔵庫)、暗黒の条件で行うが、長い期間の場合、過度の乾燥が発芽やその後の花粉管伸長に悪影響をもたらすことがある。そのような場合は、上述のイチョウ花粉の貯蔵法のように、乾燥剤を使用しないで-20°C くらいの冷凍庫に貯蔵した方が良好な結果が得られる。なお、裸子植物を含む樹木花粉の超低温貯蔵については、花粉の含水量との関係を含めて、市河⁽²⁵⁾によって詳細に研究されている。

(II) 裸子植物花粉の培養法

(i) 培地(培養基, 発芽基, 発芽床)

一般には、被子植物花粉の場合と同様に、1-2%

の寒天(時にはゼラチン)を含む固形培地が用いられるが、とくにマツ科などの花粉のように気のもつものでは、液体の表面に浮かぶので、液体培地もしばしば用いられる。これらの気のもつ花粉を懸滴で培養すると、被子植物の花粉の場合と異なり、液体の中に浮遊して空気に直接触れない状態になるが、アカマツ花粉では、通常の液体表面に浮いている場合と変わらないか、時にはより良好な結果が得られることがある。

培地の組成についてみると、初めに述べたように、裸子植物の花粉は低浸透圧に耐えられるので、純水あるいは純水のみで溶かした1-2% 寒天の板が培地として使用できる。この場合は、花粉自身のもつ物質を使用しての発芽や管伸長の過程を追跡することが可能となる。しかし、アカマツ花粉の場合、4-5日間で貯蔵でんぶんを消費し尽くして生長を停止してしまうので、精細胞形成などの成熟過程の観察には適さない。一般には、被子植物でもよく用いられる無機成分を組合わせたBrewbakerとKwack⁽²⁶⁾の培地が、必要に応じてショ糖(0.1-5%)を加え、液体のまま、あるいは寒天を加えて用いられる。⁽²⁷⁾ このほか、多くの無機成分とビタミンやホルモンなどの有機成分を含む培地(表1)が、イチョウ花粉で精子形成まで見ることのできる培地として用いられている。⁽²⁸⁾ いずれの培地でも、そのpHは微酸性(5-6)で用いられる。

(ii) 培養条件

まず培養温度についてみると、15~35°Cの範囲であるが、ふつう25~30°Cで試みてみるとよい。光については、マツ属花粉でフィトクロムの関与が推定されているので、⁽²⁹⁾ 注意を要する。さらに、やはりマツ属花粉でX線や紫外線の低線量(265 nm, 0.4 mW/cm², 1.5分以内照射)が発芽や花粉管の伸長を促進することが報告されている。⁽³⁰⁾

(iii) 乾燥貯蔵花粉のとり扱い

乾燥花粉を培地にまく際の注意は、人工発芽法一般のところでも述べられているが、裸子植物の花粉について改めて述べておく。

乾燥剤を用いて貯蔵していた花粉を乾燥容器からとり出して直ちに培地に置くと、死に至るか、発芽伸長が悪くなり、とくにその悪影響は、置床する時の培地の温度(置床温度)が低い場合に著しい。⁽³¹⁾ 従って、乾燥容器からとり出した花粉はパラフィン紙上に広げて時計皿の上に置き、それを内側に湿ったろ紙を張りつけた大型のペトリ皿に入れ、ふたをして30-60分

表1 イチョウ花粉の精子形成までの培養に用いられた培地組成と培養条件

培地組成							
KNO ₃	950mg	H ₃ BO ₃	10mg	グリシン	2mg	カイネチン	0.2mg
NH ₄ NO ₃	720	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	10	ピリドキシン塩酸塩	0.5	インドール酢酸	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	チアミン塩酸塩	0.5	ココナットミルク	100-150 g
CaCl ₂	166	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	葉酸	0.5	水	1000ml
KH ₂ PO ₄	68	ミオ-イノシトール	100	ビオチン	0.05		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	25	ニコチン酸	5	ショ糖	20 g		
培養条件							
25°C, 明期 16 時間 (園芸用蛍光灯, Sylvania Grolux)							

—上記溶液に, Na-EDTA 7.45gとFeSO₄·7H₂O 5.57gを水1 lに溶解した溶液を5ml加え, 寒天7gを加える—

配偶体の発達経過: 約6週間で体細胞(中心細胞)が形成され(自然では2-3か月かかる), 約3か月で精子が形成された(自然では, 約4か月かかる).

[注] 上記組成のうち, ココナットミルクの代わりにイースト抽出物(0.25%)を, また, カイネチンの代わりにベンチルアデニン(0.1 ppm)を用い, インドール酢酸1 ppm, 寒天0.9%として, 25°で暗黒培養した実験でも, 培養21日で体細胞が形成され, 培養50日未満で, うずまき状の生毛体を有する精細胞が得られている。⁽²⁴⁾

間放置してから, あらかじめ培養温度と同じ温度にしておいた培地に手早く置床すればよい。(田中 清)

(3) 受 精

(a) 材料植物の準備

植物の種類, 時には品種によって, 低・高温耐性, 花芽分化, 開花に対する日長作用や春化作用, 栽培の難易, 花序・花器の形態構造, 開花の季節と時刻, 生殖機構や生理などが違っているので, 事前にそれらを熟知しておく必要がある。次に若干の例を述べよう。

1) 日長作用と春化作用: 短い日長条件のもとで花をつけるイネ, キク, アサガオなどの短日植物, 逆の性質をもつコムギ, ダイコン, スミレなどの長日植物, 日長に関係なく花をつけるナス, トマト, ソバ, トウモロコシなどの中性植物。長日になると雌花形成が抑制されるキュウリをはじめとするウリ科植物。発芽中や若い苗の時に, ある期間低温(0-10°C)に会って初めて花のつく(春化作用)ムギ, 多くのアブラナ科植物, ソラマメなど。それぞれの植物の催花(花成)に適した栽培時期や方法がある一方で, それらの持前の特性を逆利用して, 日長や温度処理により不時に花を咲かせることも可能となる。

2) 形態: おしべの型に, 互いに癒着して筒状になっているキク科の集葯雄ずい, 10本のうち1本だけが離れているマメ科の二体雄ずい, 4本のうち2本が長

いシソ科の二強雄ずいなどがある。除雄(交配のために邪魔なおしべを取り去る)の時, 離れているおしべや短いおしべを取り残さないこと。サクラソウ, ソバ, レンギョウなどでは, 同じ品種でありながら, めしべが長くおしべは短い長花柱花だけをつける株と, 逆にめしべが短くおしべは長い短花柱花だけをつける株とが, ほぼ1:1で存在する。これを異形ずいと呼ぶが, 自家受粉しても種子のとれない自家不和型の植物である。

3) 生殖様式: 有性生殖の様式は二大別される。イネ科, マメ科, ナス科はほとんどが自花受粉によって種子のできる自殖型である。一方, ホウレンソウ・アスパラガス・キウイなどの雌雄異株植物, キュウリ・カボチャ・ペゴニア・トウモロコシなどの雌雄異花同株植物, アブラナ科・バラ科の果樹・前述の異形ずいを示すサクラソウ科などの自家不和植物は, その形態や生理的性質から, 他家受粉によって種子のできる他殖型である。自殖型の中には, 花卉が閉じたままで受粉する閉鎖花もある(スミレの仲間やカタバミなど)。多くの植物では同一花の中でおしべの方がめしべより早く成熟するが, セキチク, キキョウ, ホウセンカではその傾向が強く, 逆にアブラナ科やイヌサフランのように雌ずい先熟の植物もある。花卉が開く前に, すでに花の中で花粉の出ている強い雄ずい先熟型の種類もあるので, 除雄の適期を逃してはならない。受粉の

成否を左右するものに、花粉とめしべ（胚のう、卵）の寿命がある。

4) 形質特性の遺伝的優劣と倍数性：遺伝的特性の違う2種類の植物の間での交配では、細胞質が関与する場合など、どちらを母親（種子親）に、どちらを父親（花粉親）にするかによって、交雑可能度やできた雑種の形質が異なることもあるので、正逆（相反）交配をする。自然の交雑率を求めたり、誘導育成植物が意図した雑種になっているかどうかを確かめる必要のある研究では、母親側に必ず対立形質のうちの劣性側を当てる。無配偶生殖（apomixis, 受精しないで母親と同じ特性をもった植物のできる現象）の実験の場合も同じである。倍数性の違う種類間では、 $2x$ (♀) × $4x$ (♂) のように、低次のものを母親側にする方が一般に受精しやすい。

(b) 除雄

(I) 除雄・交配用具

ピンセット（先のとがった真っすぐなもの）、アルコール瓶（消毒用70%エタノールを入れた50mlの広口瓶）、毛筆（交配用で先細のもの、綿棒でもよい）、パラフィン紙袋（目的以外の花粉の受粉を防ぐ、花序や花の大きさによって袋の大きさを加減する。薬包紙を二つ折りにして、水がかかっても離れないので貼り合わせるとよい。大きいと風当たりが強くて、花柄が折れたり傷つくなどの思わぬ被害を受ける）、虫ピン・ゼムクリップ（袋の入口から昆虫が入らないようにとめる。少しさびたものがはずれにくくて使いやすい）、花卉を合わせて、その先を2cmたらずのプラスチック製接木用クリップでつまむと、袋の代用にもなる。

ラベル（交配記録用に3×6cm大の荷札がよい）、油性黒の極細マジック・インキ（袋・ラベル記入用。水性と赤色は消えたり退色しやすい）、ルーペ（開葯状態、除雄、受粉の確認用、小形のもの）。

(II) 除雄操作

除雄は自花受粉を避けるのが目的で、葯を破らない、残さない、めしべを傷つけないことが鉄則である。蕾が大きいほど除雄しやすいが、花粉が成熟して受精力をもつようになってきているので、誤って葯を傷つけると自花受粉させてしまう。極端な雄ずい先熟でなければ、開花前日の午前中が無難である。除雄と同時に目的とする花粉を授け、袋かけをすると操作がかなり省ける。おしべの本数が一定しているものは取り残しのないように数えながら、花糸の下の方から摘みとる。決して葯の途中をピンセットで挟まないこと。ウリ科では単

性の雌花でも、時として花粉を内蔵した小さなおしべをもっていることがあるので注意する。除雄が終わればただちに袋かけをする。花が変わるたびにピンセットをアルコールに漬けて、付着している花粉を殺す。雌雄異花同株の植物では、雌花に開花前に袋かけをしておけば除雄の必要はないが、受粉対象の雌花と同じ頃に咲く雄花を事前に摘みとっておくと、より安全である。

(c) 受粉（交配）

受粉用の花粉（葯）の採取前に吸蜜に訪花した昆虫によって、他の種類の花粉が混入したり、先取りされたりするので、花粉提供用の花には開花前（なるべく前日の夕方）に袋かけしておく。多量に花粉が必要な時、あるいは開花予定日の気温が低すぎて開葯不能になりそうな時（4、5月によく起こる）には、開花前日に花を摘みとってシャーレに入れて部屋あるいは恒温器内に持ちこんでおくといよい。ウリ科は開花前日に暗期がないと花が開かず、花粉や葯の採取率が悪くなるので、朝まで暗い部屋においておく。イネ科の花粉は他の植物の花粉と違って乾燥に弱く、ごく短命であるから注意する。

植物の種類によって葯の開き方が違うが、葯をピンセットや指先で持って軽く柱頭に接してやるか、柱頭上で軽く振動させて花粉をふりかければよい。風媒花や葯からこぼれ落ちるような花粉は、シャーレ（ペトリ皿）や時計皿に受け、毛筆の先や綿をほぐした綿棒につけて受粉させることもできる。花が変わるたびにピンセットと指先をアルコールで消毒する。受粉が終わればすぐに袋かけをするが、風媒花や訪花昆虫の多い花は厳重に行うこと。トウモロコシのように風媒で受粉する植物は、風の当たらない部屋で花粉をかけないと、予想外の交雑が起きる。

1花ごとに、受粉が終わったらただちにラベルに、交配組み合わせ（両親）、交配年月日、花の熟度（蕾受粉、老花受粉などの別）、花粉量（多少）、交配者などを記入する。受精に失敗して花が落ちてても、ラベルが植物体上に残っているように、ラベルのつけ方を工夫する。ラベル記入事項を別の野帳に記録しておくといよい。

自然交雑の恐れが無くなったら、なるべく早く袋をはずす。

(d) 受精の確認

(I) 交雑可能度

受粉（交配）花数に対する結実数で算出する結実率（%）、受粉花または果実当たりの充実種子数などが

ら受精の成否、難易がわかる。得られた種子の胚あるいは子葉、胚乳に花粉親の優性形質が現れておれば、受精して雑種になっていることが証明できる（エンドウの種子の子葉の緑色に対する黄緑、イネの胚乳のモチ性に対するウルチ性、トウモロコシの胚乳のサトウ性に対するデンプン性など）。茎葉、花、果実、種皮に花粉親の特性が現れるような遺伝形質の場合は、種子をまき、栽培して確かめる。類縁関係の離れている種間や倍数性の違う植物間の交配では、時に果実は収穫できても種子が無かったり、とれた種子をまいても母親そっくりの植物（傾母植物）しか出てこないことがある。前者には単為結果、後者には無配偶生殖の可能性があるので見逃さないことである。

(II) 受精の細胞組織学的観察

何百個もの胚珠を抜って、何千枚もの連続切片を作って顕微鏡で観察しても、胚のう内での受精の様子を確かめるチャンスはほとんどない。しかし、柱頭から胚珠の珠孔までの間の花粉管の行動、胚のう内の卵細胞・極核その他の細胞の所在、受精直後の接合子や胚の初期発育、胚乳核の分裂増殖や細胞膜形成、珠心細胞の消長などは見られる。図12はキュウリの胚や胚乳形成の、初期の様子を示したものである。メロンやキュウリでは、受精すると珠孔入口の珠皮が烏がくちばしを開けたような格好で開くので、その形からも受精の有無が的確に識別できる。

細胞組織学的観察は開花当日（受精前）から、受粉後の日を追い、めしべ、子房、胚珠などを対象として、まず材料を固定することから始まる。その際あらかじめ、できるだけ不用部分を取り除いておく。固定は酢酸1：エタノール3のFarmer固定液（固定時間は1-2時間）や80%エタノール90：ホルマリン5：酢酸5のFAA固定液（12時間前後）で行う。次に70%エタノールで数回洗って保存しておく、適宜取り出して脱水、パラフィン誘導をする。子房や胚珠の縦軸方向に平行または直角に切片が切れるよう、材料入りのパラフィンケーキをマイクロトームにセットする。軸が歪んだままで斜めに切ると、1枚の切片内に胚のう全体が納まらなくなる。切片の厚さ20 μ mくらいが適当で、厚すぎると細胞が重なって観察し難く、一方薄すぎると胚のう内の各細胞が数枚の切片に分散する上、連続切片（スライドグラス）がふえて、標準作製や観察の能率が低下する。実際には植物の種類ごとに、まず試し切りすべきである。染色はデラフィールドのヘマトキシリンなどで行う。永久標本の作製法についての詳細は成書によっていただきたい。

(e) 受精への工夫

バイオテクノロジー技術の急速な進歩は、植物の受精分野にも及んできている。

ふつうには受精のできない自家不和合や交雑不和合は、①花粉の柱頭上での発芽不能、②花粉管の雌ずい内での伸長不良・停止、③受精不能、④受精卵・胚の発育不能・退化、⑤子房（花）や幼果の早期脱落（離層の発達）などが原因となっている。これらを克服して効率のよいF₁採種や遠縁交雑育種に役立てようとして発達してきた一つが *in vitro* fertilization（生体外受精）で、培養技術を応用した試験管受精がそうである。他に子房培養とか、胚培養とかがある。

(I) 試験管受精 test tube fertilization

無菌にした容器内の培地に、めしべまたはその一部を置床し、開花直前に滅菌した葯から採取した花粉を授け、培養によって受精とその後の胚の発育を助長しようとする技法である。めしべと葯の表面殺菌は、70%エタノールに30秒、有効塩素1%のアンチホルミンに10数分漬けたあと、滅菌水で2、3回洗うとよい。

1) 柱頭受粉 stigma fertilization

除雄した花を滅菌したあと、花弁を取り、花柄をわずかにつけて培地に置床する。柱頭に発芽抑制のある時は柱頭を切除する。がく片はつけたままの方が受精後の子房の発育が良いという。花粉をその柱頭や花柱の切口に受粉して培養する。タバコ、ペチュニア、エンドウ、トウモロコシ、キンギョソウ、スイートピーなどで成功している。

2) 胎座つき胚珠への受粉 placental fertilization

受精阻害の要因が、柱頭、花柱、子房にある場合に適用される。

滅菌した子房から未受精の胚珠を胎座（placenta）とともに摘出して培地に置く。その上またはまわりの培地上に花粉をまいて培養する。ワタ、トウモロコシで成功している。

3) 胚珠受粉

2)に近い技法であるが、胎座をつけず、未受精胚珠のみを取り出して置床。胚珠や胚珠のまわりに花粉をまいて培養する。

2)、3)の場合、花粉の発芽、花粉管の伸長、受精、受精胚の発育のすべてに適合した培地処方が要求され、植物の種類によっても違うので難しい。ハナビシソウではNitschの培地で、ウリ科ではMS培地+ショ糖3%で成功している。

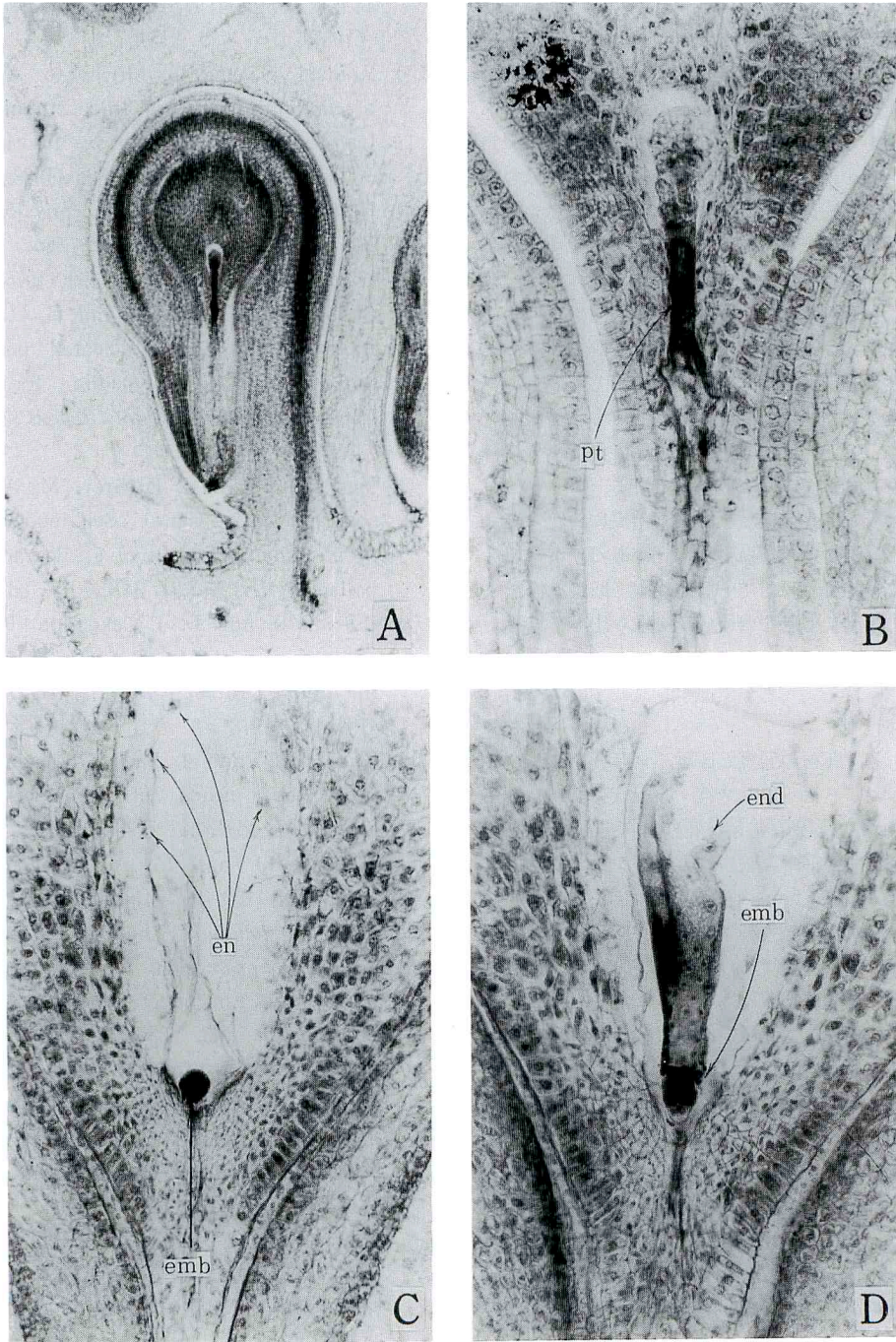


図12 キュウリの胚形成 A, B, 受粉(開花)2日後. Aは胚珠全体(長さ 650μ , 幅 415μ), BはAの拡大で接合子の時期, 花粉管がよく見える; C, 受粉4日後, 胚は2~4細胞期で直径 5μ , 胚乳核がわずかに見える; D, 受粉8日後, 胚は球状で 35μ , 胚乳の遊離核がよく見える. pt, 花粉管; end, 胚乳; en, 胚乳核; emb, 胚.

(II) 子房内受粉 *intra-ovarian pollination*

柱頭や花柱に受精の阻害要因があり、子房が大きくて内部に空隙のあるものに適用される。子房壁の一部に縦の裂目を入れ、子房壁と胚珠の間の空隙に針の先につけた花粉を押しこむ。または、花粉あるいはわずかに発芽した花粉を浮遊液 (100-200 mg/l ホウ酸を含む) ごと注射器で注入する。この際子房上部に孔を二つ開け、一つの孔に注射器を差しこみ注入する。液が腔内に満たされると、今一つの孔から溢れ出るので、その時点で注入を終える。傷口はワセリンで封じる。

この方法は子房が大形で中に空隙があるものでないと適用できない。子房の熟度、浮遊液中の花粉密度、浮遊液量など、成否に関係する要因も多い。ケシ科 (ハナビシソウ、ケシ) で成功している。

その他、受精助長の方法として、蕾受粉、CO₂ 施与、反復受粉、高温処理、混合受粉などがある。また遠縁植物間の交雑で受精はしても胚が途中で成長を停止する場合、その手前で胚または胚珠を取り出して培養し、雑種植物を育成することができる。(藤下典之)

引用文献

- (1) 上原 勉：花粉の観察と実験，グリーンブックス 46 ニューサイエンス社 3版 (1985).
- (2) 田中 清：花粉の発芽と花粉管の成長. 勝見允行・増田芳雄編，実験生物学講座 16 植物生理学 [II]. 丸善 pp. 14-21 (1983).
- (3) 岩波洋造：花粉の生理学的研究 XⅢ. *Camellia japonica* の花粉管の伸長阻害について. 植雑 70, 144-149 (1957).
- (4) Lichte, H.-F.: Über die Physiologie von Angiospermenpollen und ihre Bedeutung für die Pflanzenzüchtung. *Angew. Bot.* 31, 1-28 (1957).
- (5) 横田博実, 小西茂毅：花粉培養法の植物栄養学分野への導入のためのチャ花粉培養法の検討. 土肥誌 52, 239-245 (1981).
- (6) Martin, F. W.: *In vitro* measurement of pollen tube growth inhibition. *Plant Physiol.* 49, 924-925 (1972).
- (7) Konishi, S. and H. Yokota: Promotion of tea pollen tube growth by incubated solution of rape seed cakes. *Plant & Cell Physiol.* 21, 255-263 (1980).
- (8) 若沢秀幸, 小西茂毅：花粉管生長テストの堆肥の腐熟度検定への応用. 花粉誌 33, 139-149 (1987).
- (9) Konishi, S. and S. Miyamoto: Alleviation of aluminium stress and stimulation of tea pollen tube growth by fluorine. *Plant & Cell Physiol.* 24, 857-862 (1983).
- (10) Heslop-Harrison, J.: The physiology of the pollen grain surface. *Proc. R. Soc., London Ser. B.* 190, 275-299 (1975).
- (11) Leduc, N., M. Monnier and G. C. Douglas: Germination of trinucleated pollen: formulation of a new medium for *Capsella bursa-pastoris*. *Sex. Plant Reprod.* 3, 228-235 (1990).
- (12) McClure, B. A., J. E. Grey, M. A. Anderson and A. E. Clarke: Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347, 757-760 (1990).
- (13) Currah, L. and D. J. Ockendon: Protandry and the sequence of flower opening in the onion (*Allium cepa* L.). *New Phytol.* 81, 419-428 (1978).
- (14) Kho, Y. O. and J. Baer: Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17, 298-302 (1968).
- (15) Sedgley, M. and M. A. Blesing: Foreign pollination of the stigma of watermelon (*Citrullus lanatus* [Thumb.] Matsum. and Nakai). *Bot. Gaz.* 143, 210-215 (1982).
- (16) Arnold, A.: Ein neues Reagenz auf Kallose. *Naturwiss.* 43, 233-234 (1956).
- (17) Linskens, H. F. and Kl. Esser: Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwiss.* 44, 16 (1957).
- (18) Martin, F. W.: Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Tech.* 34, 125-128 (1959).
- (19) D'Souza, L.: Staining pollen tubes in the styles of cereals with cotton blue; fixation by ethanol-lactic acid for enhanced differentiation. *Stain Tech.* 47, 107-108 (1972).

- (20) Alexander, M. P.: A method for staining pollen tubes in pistil. *Stain Tech.* **62**, 107-112 (1987).
- (21) 上野実朗: 花粉学研究 (増訂版), 風間書房 pp. 21-63 (1987).
- (22) 三木寿子: 花粉の研究 I. 生物科学 **32**, 57-68 (1980).
- (23) Friedman, W. E.: Growth and development of the male gametophyte of *Ginkgo biloba* within the ovule (*in vivo*). *Amer. J. Bot.* **74**, 1797-1815 (1987).
- (24) 中嶋敏祐: イチョウ雄性配偶体の発達過程に関する研究—*In vitro* での発達について. 弘前大学大学院理学研究科昭和62年度修士学位論文第166号 (1988).
- (25) 市河三次: 樹木花粉の超低温貯蔵に関する基礎的研究. pp. 1-166 (1971).
- (26) Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack: The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.* **50**, 859-865 (1963).
- (27) Ho, R. H. and O. Sziklai: Germination of Douglas-fir pollen. *Silvae Genetica* **21**, 48-51 (1972).
- (28) Role, R.: Developpement *in vitro* du pollen de *Ginkgo biloba* L. *Cytologia* **45**, 481-495 (1980).
- (29) Dhawan, A. K. and C. P. Malik: Effect of growth regulators and light on pollen germination and pollen tube growth in *Pinus roxburghii*. *Ann. Bot.* **47**, 239-248 (1981).
- (30) Seibold, H. W., L. Zelles and D. E. W. Ernst: Tube growth stimulation of pine pollen by low doses of irradiation. Dose rate, reproducibility and comparison between UV-light and ionizing rays. *Rad. Environ. Biophys.* **16**, 107-115 (1979).
- (31) Tanaka, K.: The pollen germination and pollen tube development in *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. VIII. Effects of humidification and sowing temperature. *Sci. Rep. Tohoku Univ., Ath. Ser., Biol.* **31**, 1-6 (1965).

著者紹介

◇伊藤 道夫

昭和6年12月, 新潟県生まれ. 名古屋大学大学院理学研究科博士課程(生物学専攻)修了. 名古屋大学理学部助手, 助教授をへて, 平成元年4月から静岡大学理学部(生物学教室)教授. 理学博士.

◇岡田 洋子

平成3年3月静岡大学大学院修士課程(生物学専攻)修了. 現在広島大学大学院博士課程生物学専攻に在学中.

◇渡辺 光太郎

昭和2年3月, 大阪府生まれ. 京都大学農学部農林生物学科卒. 同大学院5年を修了. 同農学部助手をへて昭和46年より京都文教短期大学(当時京都家政短期大学)教授. 農学博士.

◇小西 茂毅

昭和9年12月, 京都府生まれ. 三重大学農学部農学科卒業. 京都大学農学部助手, 静岡大学農学部助教授をへて昭和57年より同大学農学部教授(応用生物化学科). 農学博士.

◇日向 康吉

昭和9年3月, 山形県生まれ. 東京大学大学院(生物系, 農学)博士課程修了. 東北大学農学部助手, 助教授をへて同大学農学部教授(植物育種学). 農学博士.

◇盧 一燮

昭和32年韓国生まれ. 韓国忠北大学校卒業. 東北大学大学院博士課程(農学部植物育種学専攻)在学中(平成3年3月現在).

◇小島 昭夫

昭和29年9月, 東京都生まれ. 東京都立大学卒. 現在東北大学農学部植物育種学研究室研究生.

◇田中 清

大正13年2月, 山形県生まれ. 東北大学理学部卒業(生物学教室). 弘前大学文理学部助手, 福島大学学芸学部講師, 弘前大学理学部助教授をへて同大学教授. 平成元年3月定年退官後, 尚綱女学院短期大学教授. 平成3年3月退職. 理学博士.

◇藤下 典之

昭和3年12月, 兵庫県生まれ. 大阪府立農業専門学校(現大阪府立大学農学部)卒業. 大阪府立大学農学部助手, 講師をへて昭和48年より同農学部助教授(蔬菜学研究室). 農学博士.

