

テンサイとトウモロコシの花粉表面の X 線微小部分析

中嶋 博¹⁾・マエフスカ-サフカ アンナ^{2)*}・

島本 義也²⁾・伊藤 利章³⁾

¹⁾ 北海道大学農学部附属農場 〒060 札幌市北区北 11 条西 10 丁目

²⁾ 北海道大学農学部植物遺伝資源学講座 〒060 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

³⁾ 北海道大学農学部電子顕微鏡センター 〒060 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

(1993 年 8 月 25 日 受理)

X-ray Microanalysis of Pollen Grain Surface of Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and Maize (*Zea mays* L.)

Hiroshi NAKASHIMA¹⁾, Anna MAJEWSKA-SAWKA^{2)*}

Yoshiya SHIMAMOTO²⁾ and Toshiaki ITOH³⁾

¹⁾ *Experiment Farms, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060 Japan*

²⁾ *Laboratory of Plant Genetics and Evolution, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060 Japan*

³⁾ *Electron Microscopy Center, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060 Japan*

** Present adress : Institute for Plant Breeding
and Acclimatization, Bydgoszcz, Poland*

Mineral composition of the pollen grain surface in sugarbeet and maize was examined by SEM with X-ray microanalysis. In sugarbeet, three different preparative techniques were applied to determine their possible effect on the element of pollen (Table 1). In maize, plants were grown under five different fertilizer conditions, and their effect on the element of pollen was examined.

The results obtained are as follows :

- 1) Seven elements could be detected in air dried pollen of both crops : Mg, Si, P, Cl, S, K and Ca, of which P and S were particularly prominent.
- 2) In sugarbeet, chemical fixation of pollen caused the loss of Mg, Cl and K, when the fixation was followed by FD, and caused the loss of Cl and K when followed by CPD. These elements could be removed from the pollen during preparative procedure. However, such procedures induced simultaneously the appearance of Na, which was unable to detect in the air dried pollen : Na may come from Karnovsky's fixative.
- 3) It was possible to detect mineral elements from air dried pollen. In case of chemical fixation followed by drying procedur, special attention to the loss

and appearance of elements would be needed.

4) In maize, there were marked difference on the growth of plants due to various fertilizer conditions, but the effect of fertilizer on the element of pollen was not clear.

Key words : X-ray microanalysis, Pollen, Sugarbeet, Maize, Mineral element.

緒 言

種々の花粉の無機成分についてはすでに多くの報告がある^(1,2,3)。近年著しい発達をとげている X 線微小部分分析法^(4,5,6)を用いて、花粉の無機成分の同定ならびに量的な異同について言及が可能であれば、著者らが行なっている植物の雄性不稔性の生理的な機作を明らかにする研究や花粉を用いた系統分化の研究^(7,8)の一助となるものと思われる。X 線微小部分分析は試料表面に電子線を照射した時に発生する元素固有の特性 X 線を選別することによって、試料に局在する元素を検出する方法である。これには 2 つの形があり、特性 X 線の波長の違いにより選別する波長分散形と、電氣的エネルギーの違いによって選別するエネルギー分散形である。この検出装置を透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡に組み込み、微小領域における元素の分布状態を調査することができる。エネルギー分散形は低い電流値でも測定でき、多元素を同時に分析可能である。本研究では走査型電子顕微鏡にエネルギー分散形を組み込んだものを用いた。原子番号 11 の Na から 92 の U までの元素が検出できる。

この分析方法は非生物試料の金属や合金では用いられているが、植物試料への応用では作物の肥料の吸収と体内挙動についてなどがあ⁽⁹⁾。

本研究では初めに、テンサイの花粉を供試し、この

分析方法の花粉への応用の可能性、問題点について検討した。特に、種々の試料作製方法による試料、すなわち風乾花粉、t-ブタノール乾燥花粉および臨界点乾燥花粉の異同について調査した。

次に施肥を異にして栽培されたトウモロコシの花粉表面の無機元素の異同について調査した。

材料および方法

テンサイ（系統 NK172）の花粉は北海道農業試験場の温室で生育している数個体から葉包紙に採集した。シリカゲルの入ったデシケータに貯蔵し、Table 1 に示す 3 つの試料作製方法を試みた。その 1 つは花粉をシリカゲルで乾燥させたままの風乾花粉（AD）、他の 2 つは花粉をカルノフスキー液⁽¹⁰⁾で固定後、エタノールで脱水し、そのうち 1 つは t-ブタノールを用いて凍結乾燥（FD）⁽¹¹⁾したもの、他の 1 つは液化炭酸ガスで臨界点乾燥（CPD）した花粉を試料とした。それぞれ乾燥後、各 2 個のカーボン試料台にカーボン両面テープで貼りつけ、カーボン蒸着後、走査型電子顕微鏡（SEM）検鏡ならびにそれに付属した X 線分析装置で分析を行った。それぞれの試料作製方法とも、各試料台 5 花粉の計 10 個花粉について分析した。用いた SEM は日立の S-800、エネルギー分散形 X 線マイクロアナライザーは堀場の EMAX-2000 である。

Table 1. Preparation procedures of pollen for this experiment

	Air dry (AD)	t-Butanol freeze dry (FD)	Critical point dry (CPD)
Fixation	—	*	*
Dehydration	—	*	*
t-Butanol	—	*	—
CO ₂	—	—	*

— non-treatment * treatment

Fixation : Karnovsky's fluid

Dehydration : ethanol, water

Table 2. Elements, atomic numbers and ranges of measurement examined in this experiment

Element	Atomic number	Characteristic x-ray line (K α) (keV)	ranges of measurement (keV)
Na	11	1.041	1.01~1.09
Mg	12	1.252	1.21~1.34
Si	14	1.739	1.67~1.83
P	15	2.013	1.90~2.15
S	16	2.307	2.23~2.37
Cl	17	2.621	2.54~2.70
K	19	3.312	3.18~3.43
Ca	20	3.690	3.58~3.78

加速電圧は15KV, 試料吸収電流は 3×10^{-10} A, X線取り出し角度は0度, 試料とBe入射室との距離は20 mmである. 測定時間は400秒である. 倍率は5000倍で, 分析面積は $11.25 \mu\text{m}^2$ である. 測定した元素の原子番号, 特性X線のK α 線のエネルギー, および設定した測定範囲をTable 2に示した.

トウモロコシでは60年以上にわたり同じ水準の肥料を施されている北海道大学農学部附属農場の圃場で生育させたトウモロコシを供試した. この圃場は前年の作物根部の残渣を含み, 肥料水準は10a当り窒素, リン酸, カリ(N, P, K)各10kgの施された対照区(C), Pの施されていない区(-P), Kの施されていない区(-K), Sの施されていない区(-S), およびNPKの施されていない区(-F)の5種である. 各区で生育させたトウモロコシ(系統P-3540)の花粉を供試した. 採集した花粉をコットンブルーで染色し顕微鏡観察により, その染色程度で花粉の稔性, 不稔性を調べた.

花粉をシリカゲルを入れたデシケータで乾燥後, 倍

率は1000倍, 分析面積は $264 \mu\text{m}^2$ の他はテンサイ花粉と同じ条件で, 各区10花粉の無機成分を測定した.

結 果

テンサイの風乾花粉表面で検出された元素は, マグネシウム(Mg), シリカ(Si), リン(P), イオウ(S), 塩素(Cl), カリウム(K), およびカルシウム(Ca)の7元素である. Fig. 1に分析例を示した. Table 3には各試料作製方法ごとの10花粉の元素の毎分当たりのカウント数(CPM)の平均値を示し, 試料作製方法間の有意性を検定した. FDとCPDではナトリウム(Na)が検出されたので, Naを含む8元素について示した. AD, FD, CPDの試料作製方法の花粉とも共通に見いだされた元素は, Si, P, S, CaでP, Sは多量であった. その他の元素は試料作製方法により検出されないものもあった. すなわち, ADではNaが, FDではMg, Cl, Kが, またCPDではCl, Kが検出されなかった. ADではP

Table 3. Mineral element content (counts/min) of sugarbeet pollen grains in three different preparation procedures.

	Na	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca
AD*	---	44a**	72a	743a	215a	125	887	67a
FD	41b	---	152b	495b	312b	---	---	282b
CPD	57c	71b	228b	644a	384c	---	---	146c

* see Table 1.

** significant difference between different letters within each element

--- not detected

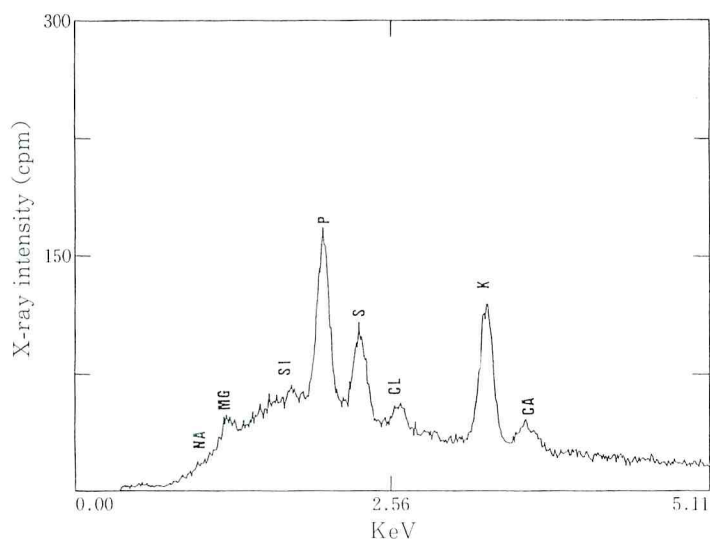


Fig.1. X-ray spectrum of air dried pollen of sugarbeet

Table 4. Mineral element content (counts/min) of maize pollen grains grown under five different fertilizer conditions.

	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca
C*	37	48	689	156	110	600	131
-P	31	50	603	156	85	514	109
-K	31	36	595	134	105	602	107
-S	33	40	636	163	92	543	117
-F	30	43	720	152	95	537	94
L.S.D.(0.05)	ns	ns	92	21	ns	ns	31

C*: apply NPK fertilizer

-P : no P fertilizer

-K : no K fertilizer

-S : no S fertilizer

-F : no NPK fertilizer

がFD, CPDより高い値であったが, Mg, Si, S, Caは少なかった。

トウモロコシ花粉については, コットンブルーによる染色は肥料処理の如何にかかわらずほとんど100%染色され, 差異は認められなかった。Table 4に各区10個の風乾花粉で検出された元素の平均値と最小有意差を示した。検出された元素はテンサイの風乾花粉と同じMg, Si, P, Cl, K, Caの7元素である。見出された元素はPがもっとも顕著で以下K, S, Ca, Cl, Si, Mgの順であった。施肥間で有意差の見出されたのはP, S, Caである。Pについては-F

区と-P区および-K区間で, またC区と-K区間で, Sについては-S区と-K区間で, CaについてはC区と-F区間で有意差が認められた。

考 察

テンサイ花粉の無機要素の構成については, Knightら^(1,2)により, それぞれ mequiv./gr.dry weightでNa (73), Mg (23), P (16), S (26), K (45), Ca (21)が報告されている。他の植物の花粉に比べ, Naが特に多いとされている。また, 他の植

物の花粉では上述の他に Al, Mn, Fe, Cu, Zn などとも認めている^(1,2,3)。これらの報告は花粉全体を分析したものであり、本報告の花粉表面の元素とは異なるかあるいは含まれる元素が微量のため検出されなかったと思われる。本実験で得られる各元素のカウント数は加速電圧や検出器の効率、原子番号、濃度比、表面状態などにより変化する。Na が AD で検出されず、CPD, FD で検出されたのは、固定液のカルノフスキー液に含まれるカゴジル酸ナトリウムの Na が検出されたものと思われる。テンサイ花粉で Na が多いとされているのに、AD で検出されなかったのは、Na が花粉表面には少ないか、Na の検出効率が低いかもしれないと思われる。Cl, K は植物に必要な元素であるが、生体内では常に水溶性イオンの形で存在し、特定の有機化合物の構成成分にはならない。そのため、FD, CPD では固定や脱水などの過程で流出し、検出されなかったと思われる。Mg, Si, S, Ca は AD で得られた値より、FD, CPD で高い値が得られているのは、処理に用いた薬品などの汚染や処理による花粉内部よりの浸出が考えられる。

テンサイ花粉の無機成分は試料作成方法の違いにより、異なる結果が得られた。花粉のような乾燥した試料では、シリカゲルを入れたデシケータで乾燥させたものがトブタノール凍結乾燥や臨界点乾燥よりも流出や添加が少なくよい結果が得られた。この分析法を水分の多い新鮮試料に適用する場合、試料の形態保存のため、AD あるいは CPD により乾燥させねばならない。この場合、CPD では Mg が検出されることから、FD より有効である。しかし、他の特定の元素に注目する場合は、FD の方が操作が簡単である。

トウモロコシについては前述の Knight ら^(1,2) は Na (1), Mg (13), P (21), S (18), K (32), Ca (3) が検出されたことを報告している。肥料処理により植物体の生育には明らかな影響が認められた。しかし、コットンブルーの染色性による花粉の稔性には影響は認められなかった。花粉表面で検出された元素の差異は施肥した成分と一定の関係は見い出せなかった。これらのことから肥料処理にかかわらず花粉は稔性を示し、また花粉の無機元素も大きく変異せず、栄養分の不足は植物体の小型化やそれに伴い雄穂も小さくなり花粉数の減少などによって対処していると考えられる。

以上のように細胞、組織の微小部領域で無機成分の分析ができることから、これまでの組織化学的分析方法と並行して実験することにより、かなり有効な手段

になるものと思われる。本実験で得られた相対値と Knight ら^(1,2) の分析値は異なっている。これは生物試料では、量的測定のための、正確な標準となるものがなく、量的な追究はできないためである。しかし類似の試料の同一元素間の相対値の多少については言及可能である。今後、試料作製方法や機器の改良も期待できるので、さらに有効な分析技術となろう。花粉の成分と他の組織の成分は類似しているとの報告もあり、本研究の様な簡単な方法で成分分析が可能であれば、植物成分の研究にとって有効な手段となる。

要 約

X 線微小部分分析法をテンサイとトウモロコシの花粉に適用して、花粉表面の無機成分の検出を試みた。テンサイ花粉を風乾、トブタノール凍結乾燥および臨界点乾燥の3つの異なる方法により試料を作製し、作製方法による花粉の無機成分の異同について調査し、次に肥料を異にした条件で栽培されたトウモロコシの花粉の無機成分の異同について調査し、以下の結果が得られた。

- 1) 両作物とも風乾した花粉では Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca の7元素が検出された。
- 2) テンサイでは試料作製方法により明らかな差異が認められた。風乾花粉との比較で、凍結乾燥した花粉では Mg, Cl, K が、臨界点乾燥した花粉では Cl, K が認められなかったが、Na が新たに認められた。これらは前処理による流出と添加によると思われる。
- 3) 風乾した花粉で比較的簡単に無機成分の検出が可能である。試料作製法によって元素の流出や添加が考えられるので結果の考察には注意が必要である。
- 4) トウモロコシについては肥料処理により植物体の生育には明らかな影響が認められた。しかし、花粉の稔性には影響は認められなかった。花粉で検出された元素の差異は施肥した元素と一定の関係は見い出せなかった。これらのことから肥料処理にかかわらず花粉の無機元素は大きく変異せず、栄養分の不足は植物体の小型化や花粉数の減少などによって対処していると考えられる。

謝 辞

本研究にあたり、テンサイの花粉を戴いた北海道農業試験場畑作物生産部、ならびにトウモロコシの材料を提供して戴いた本学作物栄養学講座但野利秋教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- (1) Knight A. H., W. M. Crooke and H. Shepherd : Chemical composition of pollen with particular reference to cation exchange capacity and uronic acid content. *J. Sci. Food Agri.* **23**, 263-274 (1972).
- (2) Stanley, R. G. and H. F. Linskens : Pollen Biology Biochemistry Management. Springer-Verlag, Berlin•Heidelberg• New York pp. 673 (1974).
- (3) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・太田達郎 : 花粉の生化学的研究(第6報)花粉の無機成分および各種リン化合物について. 日本農芸化学会誌 **41**, 178-183. (1967).
- (4) 水平敏和・J. C. Russ : 分析電子顕微鏡—微小部 X 線分析の理論と生物医学的応用. 日本メディカルセンター pp. 307 (1978).
- (5) 日本電子顕微鏡学会関東支部編 : 医学・生物学電子顕微鏡観察法. 丸善, 東京 pp. 379 (1981).
- (6) Goldstein, J. T., D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, C. Fiori and E. Lifsin : Scanning electron-microscopy and X-ray microanalysis. Plenum Press, New York and London pp. 673 (1981).
- (7) Nakashima, H., J. Abe and C. Tsuda : Pollen diameter and ultrastructure in genus *Beta*. *Jpn. J. Palynol.* **30**, 7-13 (1984).
- (8) 中嶋 博・津田周弥 : トウモロコシ (*Zea mays* L.) 花粉粒大の変異. 北大農場研究報告 **27**, 55-61 (1991).
- (9) 日本土壤肥料学会編 : 植物と金属元素. 博友社 pp. 212 (1982).
- (10) Karnovsky, M.J. : A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**, 137 (1965).
- (11) Akahori, H., H. Ishii, I. Nonaka and H. Yoshida : A simple Freeze-Drying Device Using t-Butyl Alcohol for SEM Specimens. *J. Electron. Microscopy* **37**, 351-352 (1988).