

原 著

ツバキ花粉の生長とカロース栓形成

中村紀雄*・鈴木 恕**

Callose plug formation during the *in vitro* growth of *Camellia japonica* pollen

Norio NAKAMURA* and Hiroshi SUZUKI**

(受付：1981年5月25日)

緒 言

筆者らは花粉管伸長機構を調べる一環として、管伸長にかかわる産物である花粉管壁の構成成分について調べているが¹⁾²⁾カロース栓も管伸長と密接な関係にある産物である。カロース栓の成分としては細胞化学的にカロース(β -1、3-グルカン)や蛋白質の存在が知られている³⁾が、さらに詳しい化学的な検討が必要と思われる。

ツバキ花粉管壁の主成分は直鎖 β -1、3-グルカンであり、アニリンブルーで染色されることからこのグルカンはカロースと考えられる²⁾このグルカンは管壁由来であってカロース栓由来のものではなく、現在このグルカンとカロース栓のカロースとの化学的異同を調べることを計画しているが、このことは前述の課題を検討することでもある。

すでにチャ花粉などでカロース栓の数や形についての報告がなされているが⁴⁾本報では、分析可能な

量のカロース栓を単離するための予備的調査の1つとして、ツバキ花粉の培養条件とカロース栓形成の関係について検討したので、その結果について報告する。

材 料 と 方 法

糖-寒天(1.2%)培地、またはその上にFM 300メンブランフィルター(富士フィルム)を重ねた培地上に花粉を直線状に置床して培養した。伸長した花粉管に0.5%アニリンブルー液を滴下してカロース栓(以下CPと略)を染色し、光学顕微鏡で観察した。花粉をフィルター上で培養した場合は、染色後フィルターを濾紙上に移し脱水風乾した。観察直前に流動パラフィンをかけてフィルターを透明化し、染色されたCP数を顕微鏡下で調べた。

CP数は10~15ケの花粉管について数え、花粉管1本当たりの平均値として表わした。CPには図1に示すように様々な形がみられたが、完成したCP、つ

* 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学生物学教室。

** 〒305 茨城県新治郡桜村 筑波大学生物科学系

* Department of Biology, Yokohama City University, Yokohama 236, Japan.

** Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki 305, Japan.

まり花粉管を閉塞して管内を仕切っているとみられるもの(図1、a~f)をCPとして計数した。

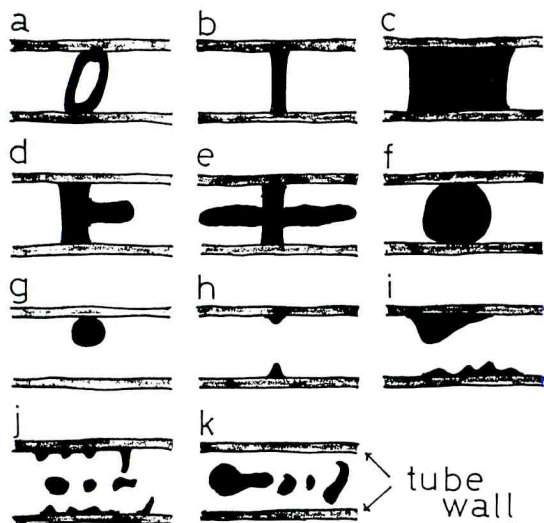


Fig. 1. Various forms of callose plug in growing pollen tubes of *Camellia japonica* L.

All forms were detected by aniline blue stain; in this work, forms (a-f) were counted as the mature callose plug.

結果と考察

1. カロース栓 (CP) 形成の経時的変化

ツバキ花粉は0.3 Mショ糖培地上で最も良好な生長をしめす。そこでこの培地に生長する花粉のCP形成の様子を調べ、他の実験の対照とした(図2)。

CPは培養2時間で観察されるが、この時のCPの多くは未完成(図1、gとh)であり、管を閉塞したCPをもつ花粉管は少なかった。3時間ではリング状CP(図1、a)が多くみられた。このCPは未完成であるが完成CP(図1、b)と区別できない場合があるのでCPとして計数した。この時期の管内はCPにより完全には仕切られていないと思われる。4時間ではCPの厚さが厚くなり、花粉粒に近い花粉管下半部にCPが多くみられ、CPとCPの間隔が短い花粉管が多かった。また培養2時間ではこの部分に

CPは観察されなかった。このことはある程度花粉管が伸長してからCPが形成されることを示している。5時間ではリング状CPは僅かになり、CPは管上部よりも下部に多くみられた。管伸長が活発になるとCPの完成が速くなるものと思われる。6時間になると管下部で二次生長をして突起を形成したCP⁴⁾(図1、dとe)が観察された。この時期では短い花粉管でも厚いCPが形成されており、管下部に原形質がみられなくなっていた。

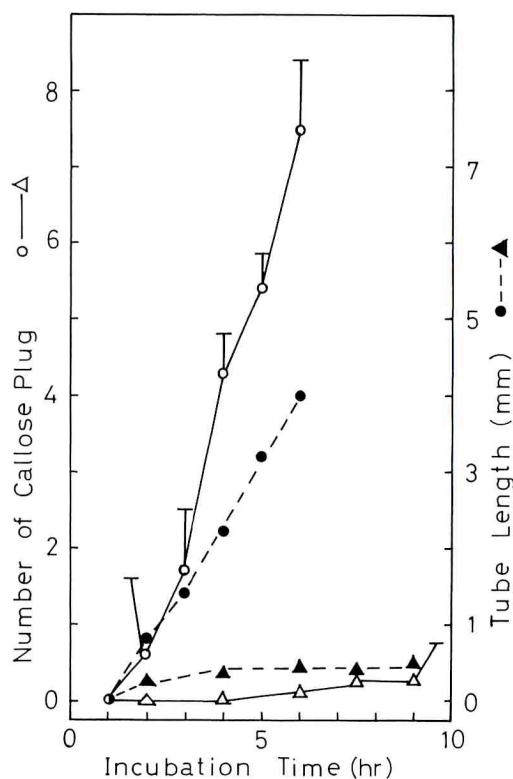


Fig. 2. Time course of callose plug formation and pollen tube growth.

Callose plug number (open symbols) and pollen tube length (closed symbols) were measured during incubation on 0.3 M sucrose medium (○, ●) and 0.01 M maltose medium (△, ▲) at 25°C. Vertical bars indicate the standard errors of the means of 10-15 measurements.

このような CP 形成に対して、無糖および 0.5 M ショ糖培地での生長花粉では、様子が幾分異なっていた。

無糖培地では、4 時間まで CP は観察されず、6 時間後に 1~3 ケの CP をもつ管が多くみられた。7 時間では 2~3 ケの CP をもつ管が多く、またカロース顆粒塊と思われるもの (図 1、j と k) がみられた。24 時間後の CP 数は 6.2 ± 1.6 ケ (管伸長 3.4 ± 0.4 mm) であった。ツバキ花粉粒の貯蔵糖はほとんどがショ糖であるので、CP はショ糖より形成されたことになる。

0.5 M ショ糖培地では 2 時間までは CP は観察されず、4 時間で平均 1 ケ、6~7 時間で 2~3 ケの CP がみられた。9 時間ではさらに CP 数が増加したが未完成な CP やカロース塊 (図 1、g~k) が多くみられた。また原形質分離がみられた。管下部では厚さが異なるいろいろな形の CP がみられ、その様子は無糖の場合とも異なっていた。24 時間後、CP として計測した数は 10.8 ± 3.6 ケ (管伸長 5.6 ± 0.4 mm) であったが、他の培養条件に比べて未完成 CP やカロース塊が多かった。高濃度のショ糖添加は管伸長だけでなく、CP 形成にも影響を与えると思われる。

マルトースはツバキ花粉の発芽には影響せず、管伸長を特異的に阻害する⁵⁾。マルトースで管伸長が阻害された時の CP 形成の様子は以下のものである (図 2)。培養 4 時間まではすべての花粉管で CP は観察されず、6~7 時間では CP を形成した管もみられたが、CP のない花粉管がほとんどであった。9 時間でも同様で、CP のみられた管でも、その数は最高 2 ケであった。しかしそれ以上の CP 形成はみられず、観察した CP はすべて厚さが薄く、二次的に生長して突起を形成した CP はみられなかった。無糖培地においてツバキ花粉は内生ショ糖を利用して CP を形成するしかないので、マルトースは CP 形成を阻害したことになる。

2. カロース栓形成におよぼす化学物質の影響

シクロヘキシミド (CHI) もツバキ花粉の発芽には影響せず、管伸長を阻害する⁵⁾。ショ糖、グルコース

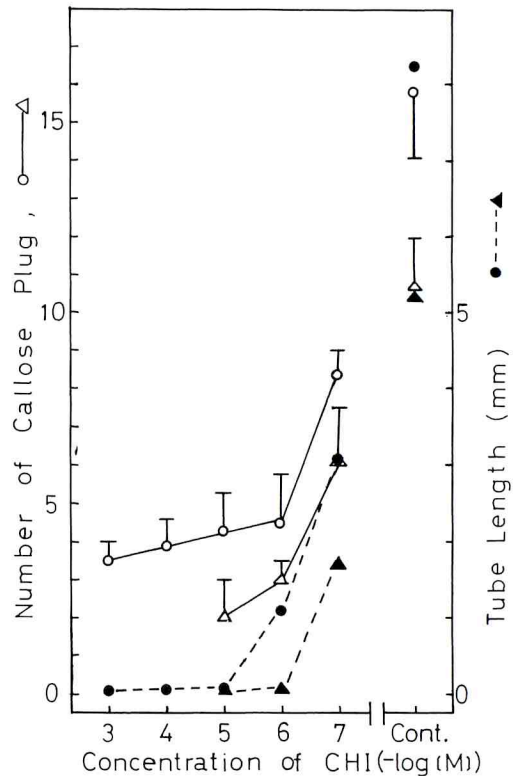


Fig. 3. Influence of cycloheximide on callose plug formation and pollen tube growth.

Pollens were incubated on a FM 300 membrane filter layered over 0.3 M sucrose medium (○, ●) or glucose medium (△, ▲) for 24 hr at 25°C.

Open symbols; callose plug number, closed symbols; pollen tube length.

または無糖培地に種々の濃度の CHI を添加し、CP 形成への影響を調べた (図 3)。糖培地の場合、培養 24 時間後の CP 数を見ると CHI 濃度 mM から μ M の範囲で管伸長は 0.1 mm 以下と阻害されたにもかかわらず、厚さの薄い CP が形成された。マルトースの場合と比べると管長当たりの CP 数は多い。この違いは培地の糖が CP 形成に利用されたことによると考えられる。これに対して、無糖培地に CHI を添加すると、花粉生長の同調性は乱れ、いろいろな長さの管伸長をしめしたが、長いものの管長平均は CHI 濃度 500 nM、50 nM、5 nM の時、それぞれ 0.5、1.9、2.0

mmであった。しかし、いずれの場合もほとんどの花粉管がCPを形成しなかった。ただ50 nMではCPをもつ管も僅かにみられ、その数の最も多いものは3ケであった。5 nMではその数は5ケであった。この場合CPの数と管長はかならずしも相関していなかった。

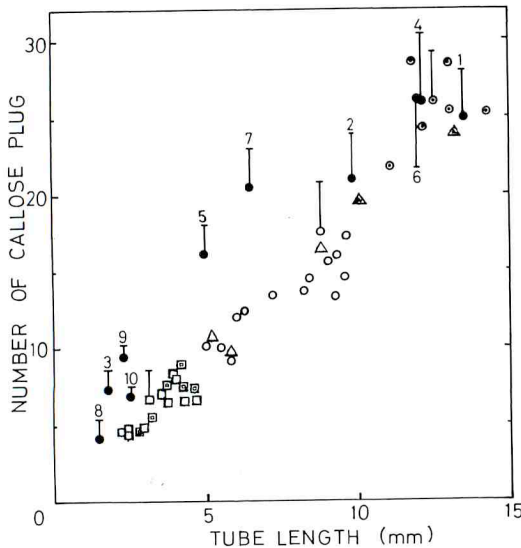


Fig. 4. Relationship between callose plug number and pollen tube length.

Open symbols : pollens were incubated on 0.3 M sucrose (○), 0.3 M glucose (△) or sugar-free medium (□) and on each medium supplemented with 0.4 mg/ml bovine serum albumin (double symbols) for 24 hr at room temperature. Pollen tube growth was always normal. Closed circles : pollen were incubated on 0.3 M sucrose medium containing (1) 20 μ M, (2) 200 μ M and (3) 2mM indoleacetic acid, (4) 2 μ M and (5) 20 μ M benzyladenine, (6) 20 μ M, (7) 200 μ M and (8) 2mM adenine, (9) 0.2 M melibiose or (10) 0.1 M palatinose. Pollen tube growth was inhibited in media 3, 5, 7, 8, 9, and 10.

Pollen tube growth was inhibited in media 3, 5, 7, 8, 9 and 10.

図4は0.3 Mショ糖、グルコースまたは無糖培地上で24時間生長した花粉管の長さやCP数の関係を示している。ツバキ花粉管伸長を促進する牛血清アルブミン(BSA)⁹⁾を培地に添加した時の結果も示してある。花粉管が長いほどCPが多くつくられており、花粉管長(x, mm)とCP数(y)の間のおおよその相関関係は、 $y = 2x$ として表わすことができる。チャ花粉⁴⁾で得られたCP数と管長の関係もほぼこの式で表わされる。

BSAは管伸長を促進したけれども、管長当たりのCPを変化させることはなく、CP形成には影響しないと考えられる。またインドール酢酸、その他の物質についてもショ糖培地に添加して、管伸長とCP数に対する影響を調べた。いずれも管伸長の促進はみられず、影響しないか、または阻害した。30%以上の管伸長阻害がみられた時の管長当たりのCP数は対照より多くなる傾向がみられた。CHIの場合(図3)もCP数が多くなっており、管伸長条件の悪さはCP形成の原因となるかも知れない。

CPの単離を試みるに際しては、CP数の推定できる、しかも、その数の多い花粉管を試料にするのが望ましい。管伸長条件が悪い場合にCPが多く形成される傾向があるけれども、上記関係式を目安とすれば、できるだけ花粉管を長く伸ばさせ、それを試料とするのが良いと思われる。

この実験ではCPの検出にアニリンブルーを使用した。この色素がカロースを特異的に染めることについては細胞化学的知見より疑問が出されている。またカロースは糖蛋白質であるとの考えも出されている³⁾しかし、この色素はCPの検出に実際に有効であり、また抽出した β -1,3-グルカン標品にも親和性を示した。さらに確かな知見を得るためには、単離したCPやカロース標品を用いた化学的な検討が必要であろう。

Summary

Callose plug formation during the *in vitro* growth of *Camellia japonica* pollen was studied with light microscopy. Various forms and sizes of callose plug were formed from the endogenous sucrose and exogenously supplied sugars, but the formation of well-developed plugs was influenced by a supply of high concentration of sucrose and was markedly inhibited by maltose added. In normally growing tubes, plug number per tube increased with pollen tube growth and approximate plug number was found to be estimated from a formula, $y = 2x$, where x is pollen tube length (mm) and y is plug number per tube. However, in growing tubes whose growth was repressed by some chemicals, the y/x ratio showed a tendency to increase in comparison with that of normally growing tubes. Despite the great promotion of the pollen tube growth, bovine serum albumin did not influence the y/x ratio.

文 献

- (1) 中村紀雄・吉田孝治：ツバキ花粉壁のペクチン物質。花粉誌 25, 11—16 (1980).
- (2) Nakamura, N., K. Yoshida and H. Suzuki: Hemicellulose of the pollen tube wall of *Camellia japonica*. Plant and Cell Physiol. 21, 1384—1390 (1980).
- (3) Reynolds, J. D. and W. V. Dashek: Cytochemical analysis of callose localization in *Lilium longiflorum* pollen tubes. Ann. Bot. 40, 409—416 (1976).
- (4) 岩波洋造・矢本恒夫：花粉管内のカロース栓の研究〔I〕。花粉管にできるカロース栓の数と形について。横浜市大論叢 29, 1—23 (1978).
- (5) Nakamura, N.: Physiological studies on the pollen growth of *Camellia japonica* L. *in vitro*. J. Yokohama City Univ. Biol. ser. 5, 1—100 (1978).

新著紹介 西グルジアのチャオジアン花粉分析

サチロバとメドリシュベリの報告で花粉の光学顕微鏡写真と同定した属・種名のリストと、花粉分析の図表 9 を含む。Pinus, Picea, Abies, Tsuga, Taxodiaceae, Fagus, Carpinus, Quercus, Zelkova, Ulmus, Alnus, Lycopodium, Osmunda などが出ている。上野の専門の裸子植物では Sequoia, Metasequoia, Sequoiadendron, Cunninghamia, Taxodium, Cryptomeria japonica, Ephedra などを図 X X III で示している。しかしスギ科の中の属の同定は極めて困難で、現生種でも区別しにくい。どのようにして同定したのか知りたい。グルジア共和国は、黒海とカスピ海の間位置し、コーカサス山脈の南に当たる。(上野)

I. Shatilova & N. SH. Mchedlishvili: Palynological complexes of the Tschaudian deposits of Western Georgia and their geochronological significance. 14.3×21 cm pp. 96 Plate X X X (LUG) 1980.

新著紹介

中村 純：日本産花粉の標識 I・II

I (解説) : 91 ページ、1 図。 II (図版) : 写真 157 図版 (3211 図)。花粉分析学者の光学顕微鏡写真集である。

□定 価：1 セット 4,500 円 (郵送の場合は荷作・郵送料込みで 5,000 円)

〈送金方法〉

- 1) 郵便振替 大阪 317961 (大阪市立自然史博物館友の会)
- 2) 現金書留 〒 546 大阪市東住吉区長居公園 1-23 大阪市立自然史博物館

☆近刊予報

鳴倉巳三郎監修 花粉研究会著：花粉症のための「花粉
検索ハンドブック」

p. 45, 12.7×18 cm. 図・写真多く便利である。

希望者は 750 円 (送料とも) を振替 京都 43168 花粉研究会へ申込みこと。

新著紹介

Elise Van. Campo : Spores d' Hépatiques du Neogène Tunisiem et sédimentation sporale. Mém. Trav. E. P. H. E., Inst. Montpellier, 32., 2 fig., 19 pl. 20.8×26.8 cm.1978

著者は日本花粉学会名誉会員 Madeleine Van Campo の娘である。現在、母堂と同じ研究所に勤務しており、上野が 27 年前にパリの Van Campo 研究室にいた頃は 6 歳位であった。今やフランス花粉学界の中堅学者である。エリーズとはエリザベスのフランス語の女性名である。

Ecole Platique des Hautes Etudes (E. P. H. E.) は高等学院とでも訳し、そのモンペリエ研究所花粉研究室の報告である。北アフリカのチュニジアにおけるシダ類胞子を主とした堆積物の研究で、19 枚の図版には光学顕微鏡写真 L. M. G と走査電子顕微鏡写真 S. E. M. を多くのせてある (上野)。