

カラマツ花粉の人工発芽に関する研究 (I)

市河三次 * 久保田泰貝り ** 安達芳克 **

Artificial germination of *Larix* pollen (I)

By Sanji ICHKAWA*, Yasunori KUBOTA**
and Yoshikatsu ADACHI**

ま え が き

カラマツの育種は北海道の林業にとって極めて重要な課題である。特に本州中部高山地帯に分布するニホンカラマツ (*Larix leptolepis*) と、樺太、千島に分布する北方型の沿海性カラマツであるグイマツ (*Larix Gmelin*) との種間交雑による F₁ は、生長、耐鼠性、耐寒性にすぐれ、この F₁ 雑種の生産技術を開発することが急務といえよう。筆者らはこれらの研究を遂行する上で、交雑の技術的問題として欠くことのできない、花粉の長期超低温貯蔵について研究を重ねてきた。さらにその生死判定は極めて重要な課題とされる。

従来カラマツ花粉の人工発芽は極めて困難とされてきた^{1), 2)}。発芽床はいずれも強度の酸性培地を用い、わずかな発芽率のあることが報告されているが、筆者らは、通常の寒天発芽床上でのカラマツ花粉の動きを調べた結果、カラマツ花粉も一般の Taxodiaceae 花粉の発芽過程と類似の経過をへて発芽することがわかった。ただし花粉管は一般的な花粉管とその形態をいちじるしく異にするので、電子顕微鏡を用い、花粉膜、花粉管膜の構造を比較し、花粉管膜の形成が認められたので、ここに人工発芽床上でのカラマツ花粉の発芽に関する知見を報告する。なおこれらの研究に多大の御教示をたまわった京都大学四手井綱英教授、北海道大学武藤憲由助教授、電子顕微鏡についてその利用と技術的指導をたまわった京都工芸繊維大学黒沢喜一郎先生及び研究におしみなく協力して下さった北海道立林業試験場の方々に厚く感謝の意を表す次第である。

材料および方法

使用した花粉は 1968 年 4 月北海道立林業試験場に植栽されているニホンカラマツ、クローン試験番号 No. 47, NO. 17, グイマツ、クローン NO. 15 のほか、数個体から 4 月末にそれぞれ集めた花粉を、綿栓をした管ビンに入れ、さらにデシケーターに入れたうえ、0°C で 8 月まで貯蔵したものである。

これらの花粉は 1968 年 7 月 27 日から約 2 週間、一連の実験に供された。

人工発芽床は、百瀬¹⁾の方法によるもののほか、1%の寒天に、本文中の諸表にみられる物質を添加したものを、直径約 4 cm のシャーレーに約 1 mm の厚さに分注したのち、供試花粉を置床したものである。その他は特に操作を加えていない。

*京都市立銅駝中学校 Doda Junior High School, Kyoto.

**北海道立林業試験場 Hokkaido Forest Experiment Station, Bibai, Hokkaido

発芽は+27°Cに調節された恒温器中にシャーレーをおき、24, 48, 72時間後それぞれ検鏡した。しかし96時間以後は雑菌の繁殖がひどく発芽追跡は困難になったのですべて棄却した。発芽の状態はすべてミニコピーのフィルムに撮影し、発芽状態の比較検討、発芽認定、発芽率の算定に用いた。電子顕微鏡による検討は1968年11月まで同一条件で保存した花粉を京都まで送付し、最もよい条件で発芽させたものを、 O_5O_4 , $KMnO_4$ の二種の方法で固定・包埋の系列にうつし、JEM 7型の電子顕微鏡により花粉内部の状態、膜構造をしらべ比較検討したものである。

人工発芽試験の結果

発芽試験は次に示すごとき方法を用いた。発芽の認定については後で述べるが一応次の条件を満たすものをもって発芽個体とした。

- a) 外皮を脱し、長径が短径の1.8~2倍に達したもの
- b) 澱粉粒の形成を見、ヨードヨード加里液で花粉粒全体がほとんど黒く染まる程度に充満したもの
- c) 生殖細胞から精核の分裂を見るもの

実験はすべて2シャーレーの平均とした。

実験1. クエン酸添加培地による発芽試験

表-1にみられる通り、従来のクエン酸培地における発芽は全くみとめられない。クエン酸濃度1%以下の発芽床では原形質の萎縮はみられず、徐々に外膜(Exine)を脱し、かつ次節で述べる発芽の初期形態を保つようになるが、48時間以降は態上の変化がみられなくなる。なおお瀬¹⁾、原田ら²⁾の報告にみられる花粉管は、前葉体細胞部分の膨化したものと考えられ、表-1の楕円球化した各プロットに少数認めることができた。

実験2. 通常の寒天発芽床における発芽試験

N0.47 花粉を用いた通常の蔗糖、寒天培地を用いて発芽実験を行なった結果表-2のような結果をえた。

表-2の結果からは蔗糖濃度が高いほど発芽率が高くなっているようである。これは一般の針葉樹花粉と逆の傾向を示している意味は理解しがたい。発芽の形態については次節で詳述するが、すでに死んだ花粉(1967年冷水産)とは、形態的に全く異なり長楕円球化している。死花粉は写真1にみられるごとく、すべて原形質が萎縮するので生花粉との判別は容易である。また、超低温処理によって凍結死させた高含水率花粉(含水率78%—196°C処理)は、細胞質部分に氷晶生成が多く見られ、やや楕円球化するが、以後の形態的变化は認められない。長楕円球化した花粉は、48時間から72時間で、柄細胞の分裂が認められる。これら形態的变化については次章で詳述したい。

実験3. 球果抽出液添加発芽床による発芽試験

8月上旬、結実木から採集した球果より次の方法をもって抽出液を作った。氷50cc及び70%エタノール50cc中に各球果5gを入れて磨砕し、約24時間常温で抽出したのち各抽出液を100ccの氷にうすめた。これら巧抽

表-1 クエン酸添加培地上における花粉粒の形態変化

クエン酸濃度 (%)	蔗糖濃度 (%)			
	5	10	20	30
0	○	○	○	○
1	○	○	○	—
3	—	○	—	—
6	—	—	—	—
10	—	—	—	—
20	—	—	—	—

[註] ○：楕円状に膨化したもの
—：原形質萎縮をみたもの

表-2 寒天発芽床による発芽試験

蔗糖濃度 (%)	pH	発芽率 (%)
10	7	52.0
20	7	70.2
30	7	95.4]

出液を、所定の濃度こうすめて発芽床に添加しN0.47 カ
ラマツ花粉を散布した後、72 時間後検鏡した結果を調べた。

エタノール抽出液添加区は水抽出液添加区に比較して発
芽率がやや低い。これはエタノールによる害と考えられる。
蔗糖濃度は一般的には高い方が発芽率が高い傾向を示してい
るが、抽出液添加濃度が高いと発芽率は減少する傾向がみら
れた。これらの実験では、発芽抑制または促進物質が球果中
に存在するかどうかはわからない。なおこれらの結果は、対
照区とほぼ同様の発芽率を示していた。

人工発芽床におけるカラマツ

花粉のうごき

脱 皮

カラマツ花粉は Taxodiaceae の花粉と同様に、発芽床
からの水分を吸収し、Exine の内側にある内膜 (Intine) が
膨潤し、その膨圧によって Exine から脱出する。しかし、
この Intine は他の Taxodiaceae に比較してかなり薄い (写
真 2)。Exine の裂口は、したがって、花粉粒の赤道面に沿
って二分する場合は 1/3 におよぶ。この場合、下半分
(前葉体細胞側) をそのまま着けている場合が多い。

吸水して生長する花粉粒の形態

死花粉の場合は、すべて原形質の萎縮をみる (写真 1
)。正常な花粉粒では原形質の剥離、萎縮はみられない。正
常に吸水膨潤化した花粉が Exine から脱皮すると、向心極側に 2 個の退化した前葉体細胞がみられる (写真 3, 4)。
電顕で観察すると、各前葉体細胞の外側には、Exine と同様の電子密度をもつ層の存在がみとめられる (写真 4)。
Intine は、2 層乃至 3 層にわかれ、外側は Exine の内側にあるラメラ構造に接し、内側は原形質膜に接続する (写
真 5・B)。Intine は、内外 2 層にわかれ、内層 (End-Intine) の方が電子密度が高く、外層 (Ect-Intine) は低い (写
真 4)。この Ect-Intine には第一前葉体細胞があり (写真 2, 4)、吸水膨化してゼラチン状膜となる部分である。写
真 5 A は発芽個体の横断面であるが、すでに低電子密度の Intine 外層はみられないことから第 1 前葉体細胞は
Ect-Intine にある事が証明しうるであろう。

また、楕円球化の進んだ花粉は、この前葉体部分が突出する場合がある (写真 6)。この部分について原田ら
2)、百瀬 2) は花粉管としており、BARNER ら 3) は tube 状の Connection といっているが、明らかに前葉体細胞が
2 層になって存在しており、花粉管の伸長はこの部分からはおこらない。

膨化した花粉粒では、この前葉体細胞につづいて、2 個の大きな細胞が見られる。求心極側に柄細胞があり

表 - 3 水及びエタノール球果抽出
液を添加した蔗糖(30%)培
地による花粉発芽率

抽 出 液 添 加 濃 度 (%)	Et-OH 抽出液添加区 (%)	水 抽 出 液 添 加 区 (%)
1	95.6	94.2
5	96.0	93.6
10	84.1	98.4
20	85.1	93.7
40	33.9	22.6

表 - 4 無蔗糖培地による発芽率

抽 出 液 添 加 濃 度 (%)	Et-OH 抽出液添加区 (%)	水 抽 出 液 添 加 区 (%)
1	89.0	92.0
5	48.7	91.3
10	62.0	90.4
20	16.6	71.5
30	8.5	1.5

表 - 5 水抽出液(30%)添加と蔗糖
濃度関係 (発芽率)

糖 濃 度 (%)	30%水抽出液添加区 (%)
10	44.3
20	77.8
30	85.3

* 前発芽 (Pre-Germination) は京都大学農学部渡辺光太郎博士によってとなえられようとしている、花粉管
の形成はまだみとめられないが、形態の変化や澱粉の形成などによって、花粉管形成の前段階にあるとみ
とめられる状態をいう。

続いて中心細胞が見られる(写真 2, 4)

前発芽(Pre-Germination)*

吸水した花粉は数時間で楕円球化しはじめる。Taxodiaceae 花粉では、この頃になると、遠心極または極軸に直角の方向に、花粉粒直径の約 1/2~1/3 程度の太さをもった突起を生じ、徐々に花粉管を形成するのが普通であるが、カラマツ花粉においては、この様な突起は通常みられない。すなわち、置床後数時間で花粉粒径の約 1.5 倍程度の楕円球化が始まる。この状態が前発芽状態(Pre-germination)であると言えよう。この状態のとき、直径約 40 μ 程度の柄細胞、中心細胞がよく観察される。これは Aceto-Carmine でよく染まる。このステージ以降、Ect-Intine は徐々に消失する。また、グイマツでは花粉粒赤道面に突起を生ずるような形態をとるものが 1/10 程度みられた。この部分は無菌的培養によって長時間追跡すると、花粉管状に約 300 μ 伸張する場合が極めて稀に見られる事があるが、この点に関しては逐次研究を進めている。

花粉管の伸長と発芽の条件

発芽床置床後、24 時間以降で花粉粒内に澱粉粒が形成されはじめる。48 乃至 72 時間以降になると中心細胞は 2 個の精細胞に分裂し、中央部に進出する。花粉粒は楕円球化が進み、長楕円球になり、96 時間乃至 120 時間で長径約 200 μ に達する(写真 6)。このような花粉粒の伸長に伴って花粉管膜の形成を見るが、光学顕微鏡下では判別しにくい。電子顕微鏡による観察では原形質膜の外側にある 1 層と Ect-Intine が肥厚したまま原形質を包含していることがわかる(写真 5A, 7)。

ま と め

従来カラマツ花粉は強酸性培地を用いて、わずかの発芽をみるという説があつたが、人工発芽床は 10~30% での蔗糖、1%寒天の培地で充分発芽することがわかった。また花粉管は一般の多くの花粉にみられるような形態での花粉管形成はせず、長楕円球状に花粉管を形成するものと考えられる。澱粉は置床後約 24 時間から形成されはじめ、中心細胞は 48~72 時間で分裂し、花粉粒中央に進むようである。以上のような点から、カラマツ花粉は、人工発芽床置床 48 時間以上経過後、澱粉の形成、生殖細胞の分裂、長楕円球化等の形態上の変化の見られる状態をもって一応発芽とみなしうると考えられる。特に外形上は、長径が短径の約 2 倍、即ち平均して 140 μ 以上となったものは、上記の 3 条件を満足しているので、これをもって発芽とみなしてよいと考えられる。今後超低温貯蔵の研究途上でさらに研究を進める予定である。

摘 要

1. カラマツ花粉の人工発芽を寒天蔗糖培地で行なってみたところ発芽と考えうる状態を得た。
2. 培地は寒天 1%、蔗糖 10~30%が最適と考えられ、pH は 5~7 であった。
3. 発芽は、置床後約 72 時間で認定することができる。吸水後、楕円球化した花粉粒は、やがて Exine を脱皮し、澱粉粒の形成を見る。約 72 時間で長楕円球化し中心細胞が分裂しはじめる。一応この条件を満足したものををもって発芽個体と認定した。
4. 花粉管は、円筒状に長楕円球化する形状を示す。

参 考 文 献

- 1) 百瀬行男 1965 カラマツ花粉の発芽力をしらべる方法. 日林誌 47 (7) : 171
- 2) 原 田 泰・柳沢聡維 1946 森林植物花粉の発芽試験. 帝林北林試報 2 : 45 - 70
- 3) BARNER, H. and CHRISTIANSEN, H. 1962, The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favourable time for controlled pollination in *Larix Silvae Gent.* 11 (1) : 1 - 11
- 4) ———・—————1962. The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favourable time for controlled pollination in *Pseudotsuga Menziesii*. *Silvae Gent.* 11 (4) : 89 - 102

Summary

- 1) The authors experimented the artificial germination of larch pollen (*Larix leptolepis*)
- 2) As to the growth of the pollen tube, the best result was obtained when the culture medium contained over 10% to 30% sucrose and 1% agar.
- 3) The optimum culture temperature for germination was found to be at 27°C.
- 4) We may regard larch pollen as germination when the pollen forms starch and grows to ellipsoid form, about 200 μ in length.

図 版 説 明

- 写真 1 人工発芽床上的における死花粉 (1967 年産, 冷水産)
Exine から脱皮せず原形質の萎縮がみられる。
- 写真 2 人工発芽床上において脱皮した花粉 (置床後 24 時間)
ゼラチン状の透明層は Ect-Intine である。
- 写真 3 カラマツ花粉の発芽 (置床後 48 時間)
すでに中心細胞は分裂し花粉粒中央部に移動している。
Tm : 花粉管膜 St.C : 柄細胞 P.C : 前葉体細胞 C.C : 中心細胞
- 写真 4 人工発芽床上における Exine 脱皮直前のカラマツ花粉の電顕像 (OsO₄ 固定) (置床後 72 時間)
1st P.C : 第一前葉体細胞 2nd P.C : 第二前葉体細胞 St.C 柄細胞 Exi : 外膜
St : 澱粉粒 End=Int : 内膜内層 Ect-Int : 内膜外層
- 写真 5 A 人工発芽床上におけるカラマツ発芽花粉の横断面電顕像 (OsO₄ 固定)
B カラマツ花粉の膜構造電顕像 (OsO₄ 固定)
St : 澱粉粒 Pl.mb : 細胞膜 m : ミトコンドリア End - Int : 内膜内層 Exi : 外膜
pl : 細胞質 St.C : 柄細胞 N : 核 N.mb : 核膜 Ect-Int : 内膜外層
- 写真 6 発芽状態のカラマツ花粉 (置床後 96 時間)
- 写真 7 Exine より花粉管膜への移行 (電顕) (置床後 72 時間)

Tm : 花粉管膜 Exi : 外膜 Lip : 色素

市河・久保田・安達

第 I 図版

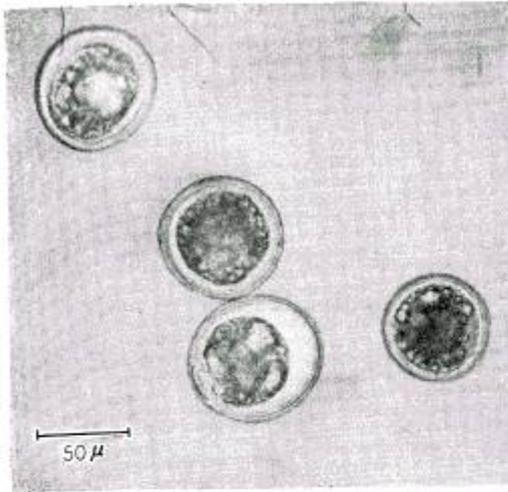


写真 1

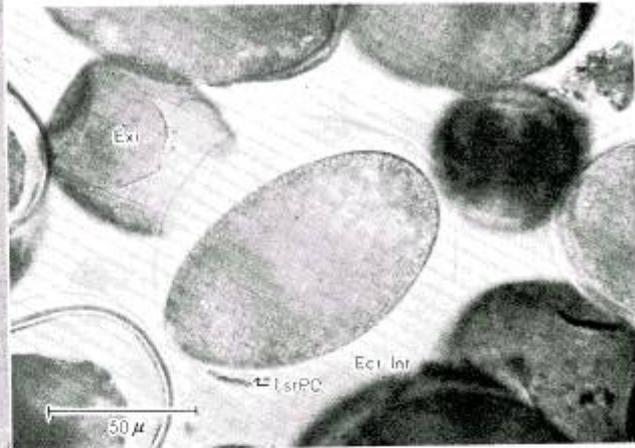


写真 2

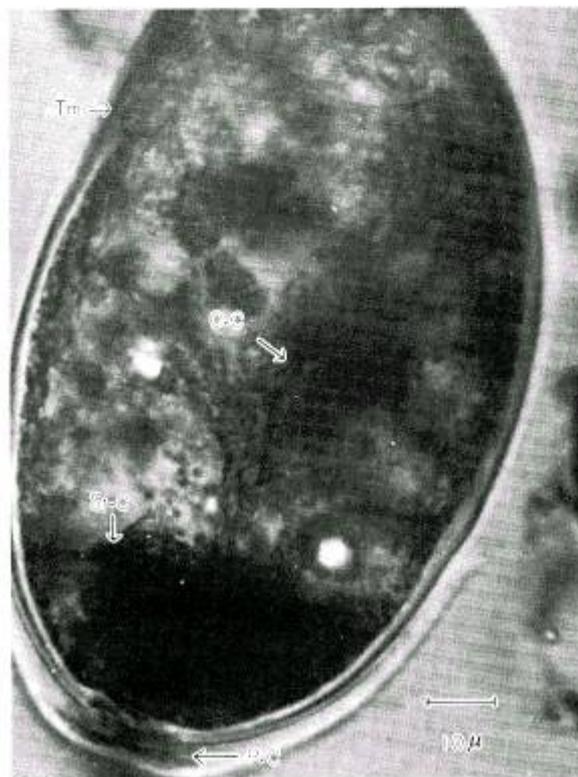


写真 3

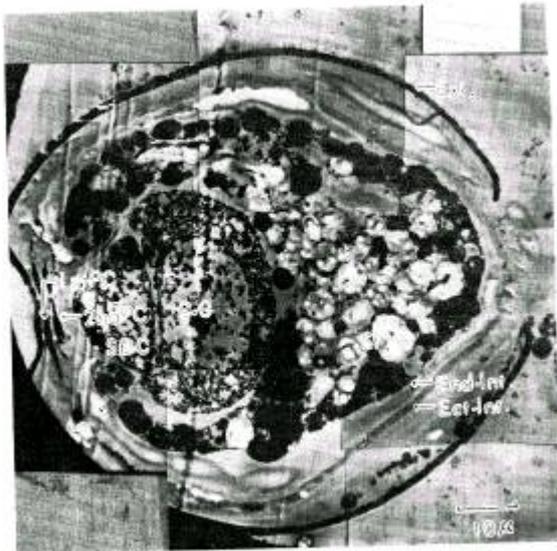


写真 4

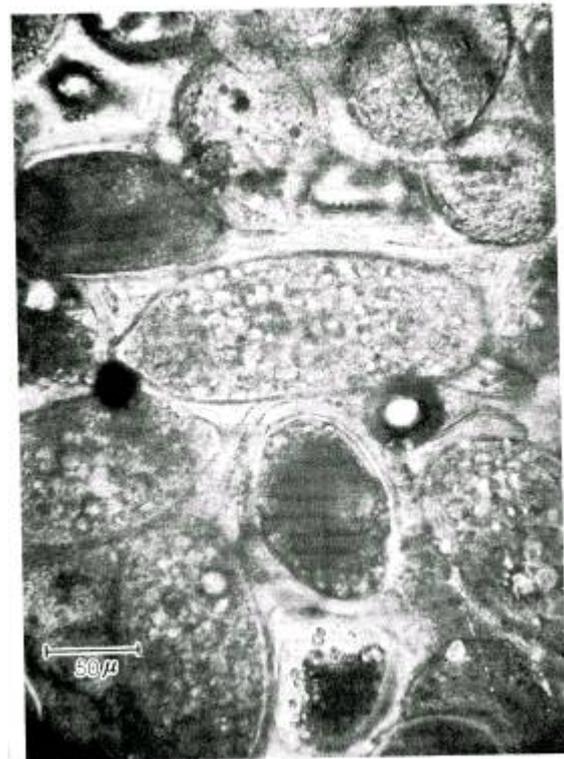


写真 6

写真 6

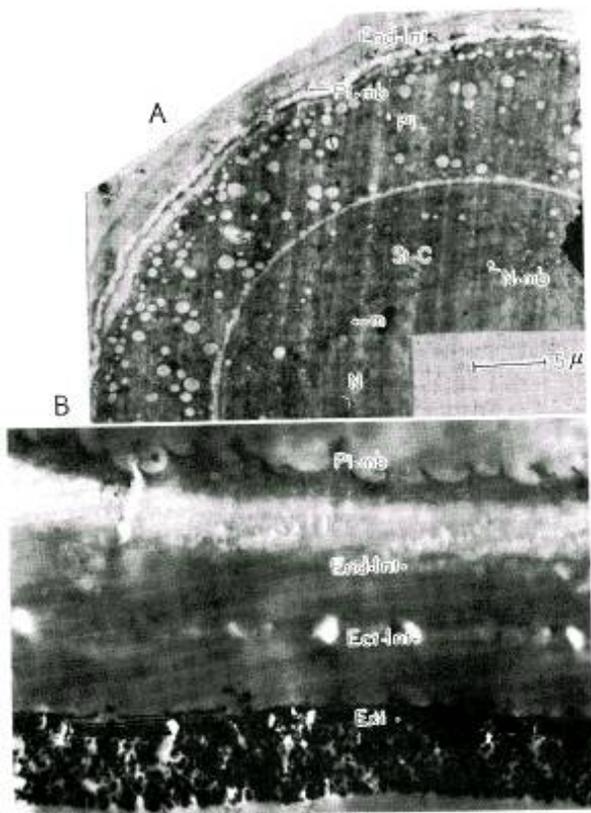


写真 5

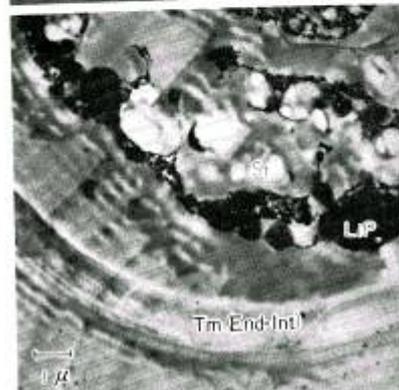
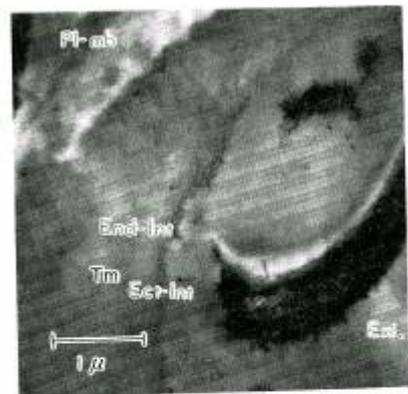


写真 7