

カラマツの胚珠の発育と種子不稔性

梶 勝 次

On the pollination and development of ovules , and
on the sterility of seeds in Japanese larch
(*Larix leptolepis* GORD.)

Katsuji KAJI

緒 論

カラマツの育種をすすめて行くうえで最も急がれているもののうちに、採種園での結実促進と交雑技術的進歩とがある。採種園からの種子の生産量は次第に増えつつあるが(表-2 参照), 当初計画された生産量までにはほど遠いのが現状である。そのため採種園での結実促進方法の開発と、種子稔性の向上とが期待されている。また交雑育種については主に耐兎耐鼠性を得られる点で、カラマツ類の生長増大を目的とした基礎および実用化の研究が以前から続けられてきた。

本報告は上記の目的でカラマツの育種をすすめて行くうえでの基礎資料を得て、さらに受粉から結実までの諸機構を明らかにして不稔種子ができる原因を探るため、すでに報告された多くの発生学的解明と比較し、後述の問題点の解明を試みたものである。

本研究を遂行するにあたり多大なるご指導を賜った京都大学四手井綱英教授、新潟大学船引洪三教授、京家政短期大学渡辺光太郎教授、京都市立四条中学校教諭市河三次博士ならびに農林省林業試験場造林部遺伝育種第三研究室および種子研究室の各位に深く感謝の意を表す。

研究小史と問題点

カラマツ属は種子の稔性が一般に 20 ~ 40% と低く、また無受粉胚珠でもシイナ種子まで発育するなどその発育機構には多くの不明な点が残されている。そのひとつとして花粉粒は人工培地上で発芽し難く(市河ら 1969, 梶ら 1970), 花粉管はきわめてまれにしか観察されない(写真-31, 32 参照), 人工交配を効率的にすすめようとする場合や解剖学的に生殖機構を明らかにすることが難しいものと考えられる。しかし BARNER *et al.*(1960, 7962), CHRISTIANSEN(1960, 1972) はカラマツおよびダグラスファー(*Pseudotsuga taxifolia* BRIT.) の受粉受精機構を観察して、花粉粒の活力検定方法とともに受粉機構の共通している点をあげている。また DOYLE *et al.* (1962 a, b; 1935) からも多くの樹種を調べて、両者の受粉機構はきわめて類似していると報告している。

さらに先述の種間交雑において、耐鼠性の高いグイマツ(*Larix gmelini*(RUPR.)LITVIN.)とカラマツ(*L. leptolepis* GORD.) の組合せでは、後者を父系とした方が交雑し易く、両種の正逆交配において明らかな差があり(TAKAHASHI *et al.* 1968, 1972), グイマツの花粉に何らかの支障があるかもしれないとしている。筆者

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

[北海道林業試験場報告第 12 号昭和 49 年 10 月 Bulletin of the Hokkaido Forest Experiment Station, N0. 12, October, 1974]

ら(梶・久保田 1971)もこの事実を確認しており、さらに 1969 年採集のグイマツおよび F₁ 雑種の花粉粒に異常形態を散見した(梶 1970, 写真-1~3 参照)。しかし 1970 年採集した花粉には異常が認められなかった。花粉粒の発育および稔性について、CHRISTIANSEN (1960), EKBERG *et al.* (1967, 1968) はそれぞれスウェーデンにおけるヨーロッパカラマツの低温による異常、ならびにニホンカラマツ (*L. leptolepis* GORD.) を含めたカラマツ属 3 種の緯度による稔性の差異を報告している。

裸子植物、とくにマツ科を中心とした発生学的解明の業績も数多く、19 世紀半ばに HOFMEISTER (1851) により始められたとされている (SMOLSKA, 1927)。SMOLSKA (1927) はカラマツの蔵卵器の発達を中心に受精機構を報告し、HUTCHINSON (1920) および BUCHHOLZ (1926) はそれぞれモミ属、マツ属の胚発生について興味ある資料を提供している。

なお、これらの交雑育種を効果的にすすめる目的で、1972 年と 1974 年にそれぞれ [林木の種間交雑における受精の組織学的研究], [針葉樹の受粉機構] と題して育種研究談話会が開かれた。そのなかであらためて問題点を明らかにするとともに、この分野での研究の発展が待たれることになった (林木育種研究談話会, 1970)。

実験方法

材料および方法

北海道立林業試験場構内に植栽されているニホンカラマツクローン(留萌 2 号, 樹齢 13 年)を用い、1969 年 5 月初旬より 8 月下旬まで 4~5 日おきに球果(球花)を採取し、球果中央部の胚珠を Carnoy's 液で固定した。さらに同年 6 月末から 1970 年 3 月末まで花芽を採取固定して下記の方法により発育過程を観察した。なお 1970 年に同一母樹から材料を採取して、両年の結果を比較検討した。

固定した材料は 70% アルコールに浸し、12 月まで +4℃ に保たれた冷蔵庫に貯蔵しておき、そり後ずい時とりだしてパラフィン埋蔵によるプレパラートを作成して観察した。なお染色は雄性配偶体(花粉粒)のうごきを明らかにする目的から主に Newton's Gentic violet method を用い、一部 Heidenhein's Ironalum he-matoxylin method を用いた。

材料の観察にあたり、固定およびマイクロトーム刀による標本の得失を考慮して、できるかぎりの徒手切片を作成した。

受粉胚珠と種子の稔性調査

1969, 1970 両年の 9 月に同一母樹からそれぞれ 10 球果を採取して、種子の発芽試験を行なって稔性を調べた。稔性は発芽した種子と発芽しないものに大別し、後者を不稔種子としてとり扱った。なお種子の発芽促進のための前処理は行わず、+25℃ の温度条件下で行なった。

さらに両年ともに、6 月中旬に球果中央部の 30 胚珠を調べて受粉胚珠の割合を求め、それらの胚珠から 1 胚珠あたりの平均受粉粒数を求めた。

結果および考察

花芽の分化と発育

花芽の分化期は分化前後の気象条件のちがいに、連年多少のずれがみられる。雌花芽と雄花芽の識別は、

松柏類 (Coniferae) では花をとくに球花 (Strobilus) と称し、成熟してできたものを球果 (Cone) と呼んでいるが、本稿では両者を含めて球果と表した。

短枝に冬芽が形成される頃(8月下旬~10月上旬)には明らかとなる(写真-6~9)。花芽の分化は、種鱗原基または胞原組織原基の分化を鏡検し、直接雌雄花への分化を観察するとともに、間接的にホルモン剤、環状剥皮、断根処理による効果からおおよそ6月中旬~7月中旬に始まると推測された。

橋詰ら(1966)は、花芽の発育は地域や個体によって多少異なり、北海道では初秋の発育が長野県より約20日早いことを明らかにしている。しかし北海道での初春の発育は遅く、浅川(1965)の結果とくらべると開花すなわち受粉時期から蔵卵器の形成および受精後の胚発生時期まで約2週間遅いことが明らかにされた。

カラマツの着花年齢は一般に5~10年とされている。また長日条件で生長させて3~4年で樹高3mになったものを水平におくと花芽を分化するといわれている。しかし1969年に北海道野幌模範林内に造成した精英樹特定組合せの次代検定林を1973年に調査した結果、相当数の着花が認められ、この結果から分化時期の気象条件および環境条件によっては、実生苗を用いた自然状態でも3~4年で着花するといえる。

雌性配偶体の発育過程

美唄(当時)における開花は一般に4月下旬から5月初旬にかけてはじまり、開花した雌性配偶体は、さらに5月上旬から下旬にかけて胚のう細胞の核が分裂をくりかえして多数の遊離核からなる液腔を形成し、胚乳体と胚乳上部に蔵卵器原基、蔵卵器の形成と次第に発育していく(写真-10~15)。この発育過程はすでに報告されているマツ属一般のそれと同一である(JOHANSEN 1950, 猪野 1964 など)。

蔵卵器の形成を最初に観察したのは5月30日であったが、6月14日には大部分の胚珠が蔵卵器を形成していた。このことから蔵卵器の形成は5月下旬から6月中旬に行なわれることがわかった。蔵卵器の数は胚珠によって異なり、1つの胚珠に0~6個数えられるが、3個あるいは4個持った胚珠が多かった(写真-16~21)。また蔵卵器のなかには写真-22~23に示すように異常形態を呈したものが散見され、蔵卵器を形成しない胚珠も認められた。

頸細胞は1層4細胞からなり、中央の2細胞は周囲の2細胞にくらべてやや大きい。珠孔は受粉を終えると写真-12, 14~15に示すように珠皮が珠孔部に向かってまきこみながら崩壊し、珠孔部を封ずる。一方、(胚)珠心は蔵卵器が形成される6月中旬になると先端部が海綿状を呈し、受粉粒が付着しやすくなると同時に花粉管の伸長が容易になっているように思われる。

珠孔に入った受粉粒は珠心の方に徐々に移動し、6月中旬までには珠心先端部に付着する。この受粉機構としてDOYLE *et al.* (1935), BARNER *et al.* (1960)は、受粉時期の珠孔部は下を向いており、一方花粉粒は水に浮かないため花粉粒自身が珠心に移動すると考えられないことから、受粉粒を珠孔先端から珠心に運ぶ水と異なった比重を持った珠孔液が浸出することを明らかにしている。筆者らも水面に投下した花粉粒は瞬間的に沈下することを確認し(梶ら 1972)、また早朝に受粉時期の胚珠をピンセットでとり出してみると、飛散粒をとらえる珠皮先端部の先までわずかに浸出した粘液が観察された。DOYLE *et al.*, BARNER *et al.*: (前出)の報告と合せてこの粘液が花粉粒をとらえ、珠心にはこぶ受粉液であろうと考えられた。

これら雌性配偶体の発育過程は、年度および材料の生育環境により諸器官の分化、発育時期に多少のずれが認められるが、すでに報告された多くの結果と一致した。

冬芽(Winter bud)の形成とは、頂芽(Terminal bud)でなく花芽の着生する短枝(Dwarf shoot)の冬芽の先端が淡い褐色を示した時点をもって冬芽の形成とみなす。

ここでいう受粉液はマツやスギ、ヒノキにみられるものと異なり、瞬間的に花粉粒を珠心に運ばないで徐々に珠孔から珠心に運ぶようである。またこの液が飛散粒を珠孔にとらえる機構に果たす役割は明らかでない。

受粉胚珠および受粉粒

採取した球果中央部の胚珠を調べた結果、受粉している胚珠は1969年が67%、1970年が77%であった(図-1)。いずれも30胚珠を調べた結果であり、材料が少ないため明確でないが、平均すると70%前後の胚珠が受粉している。両年の受粉胚珠率の差異は、採取した胚珠の近くの雄花の着花量ならびに受粉時期の気象条件のちがいなどが大きく影響していると考えられる。

1胚珠あたりの平均受粉粒数は1969年が2.4粒、1970年が3.3粒であった。これを受粉した胚珠だけについてみると3~5粒保有したものが多く、最多9粒まで数えられた。

横山(1969)によると受精直前には正常な胚珠は86.7%、82.3%であったのが、受精後にはそれぞれ28.9%、31.3%と約3分の1近くまで激減していることを明らかにしている。上記2例が示すように胚珠の70~80%が受粉している結果から、平年においては花粉飛散量の不足も、また受粉機能の支障もないものと考えられる。

雄性配偶体(受粉粒)のうごき

4月下旬から5月初旬にかけて開花すると、飛散粒は胚珠の先にある柱頭様の珠皮先端部にとらえられて珠孔に入る。受粉時およびそれ以後の花粉粒は、写真-24~30に示すように退化した第1、第2栄養細胞(前葉体細胞)、柄細胞、中心細胞、花粉管管細胞およびそれらを取りまく細胞質、細胞膜(外膜、内膜外層・内層など;市河ら1969)とそれぞれの細胞核を有する。すなわち、カラマツの成熟花粉は5細胞5核の時期である。

受粉粒は、受粉後1~2週間のうちに水分を吸収し、内膜外層(Ect-intine)が膨潤して外皮(外膜, Exine)を脱皮する。受粉後約1ヵ月を経過した5月末日には胚珠の珠皮先端部および種鱗に外皮が付着しているのが認められた。このことから受粉にあずからなかった花粉粒も水分を吸収して外皮を脱皮するものと思われる。受粉粒は外皮を脱皮したのち、再度受粉液(珠孔液)の働きによって珠孔から珠心先端部に付着する。しかしその付着する時期は、蔵卵器形成よりやや遅れるようで(写真-15参照)、受粉粒は長期間珠孔にとどまっているといえる。受粉粒数と珠心に付着した粒数をくらべると後者がやや少なく、さらに受精時期の胚珠では大部分が受粉粒が管形成を行なっているにもかかわらず珠孔にとり残された花粉粒が散見された。BARNER *et al.* (1960)は受粉粒がわずかに膨潤して外皮を脱皮したのも5~6週間の長い休止期(resting period)に入ると報告している。この研究の観察でも、写真-24~28に示すように6月上旬まで受粉粒の大きな形態的变化は認められなかった。

受粉後約1ヵ月を経過した6月中旬の胚珠(写真-29~30)から明らかなように、受粉粒は淡緑色の厚い層におおわれている。この細胞膜はCarnoy's液で固定した場合観察できず、その働きなどは不明である。しかし内膜外層が膨潤して外皮を脱皮したのちに形成されるものと考えられ、その厚さは花粉粒径の約5分の1(約15μ)

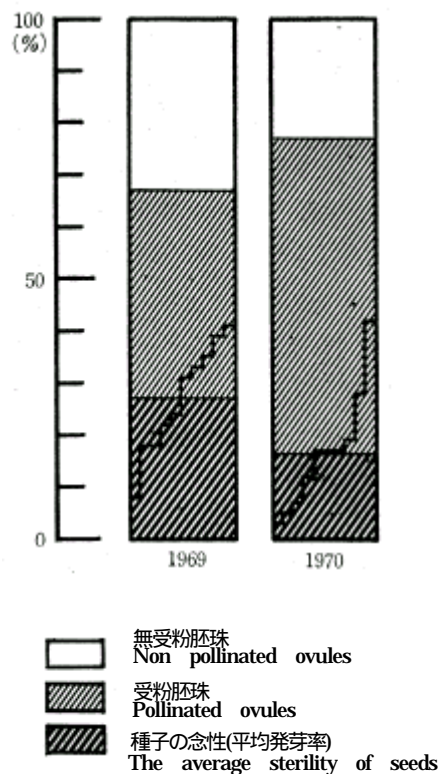


図-1 受粉胚珠の割合と種子の念性
受粉胚珠の割合は、球果中央部の30胚珠の平均であり、種子念性は10個の球果別発芽試験による平均値である。いずれも留萌2号クローンを用いた。

Fig.1. The ratio of pollinated ovules, and of sterility of harvested seeds in 1969 and in 1970.

The ratio was indicated as an average of 30 ovules, and of 10 cones. Used clone for this study: Rumoi No.2.

で、膨潤した内膜外層の厚さとほぼ等しい。また写真-29は、受粉粒が珠孔から珠心へと移動する過程を示すが、受粉粒数が多い場合には上記淡緑色の厚い層に包まれて、珠孔から珠心まで密につまっている場合が多い。すなわち胚珠は、珠孔が受粉粒によって十分にみたされるまで継続的に受粉する（換言すれば受粉能力がある）ものと考えられる。

6月26～28日には、胚珠に受精卵の分裂像がみられ（写真-51 - 55）、受精は6月中旬～下旬に行なわれていることが明らかである。梶ら（1970、写真-31～32）および市河ら（1972）は人工発芽床上でまれにはあるが明らかな管形成を観察しており、カラマツ花粉の発芽の方向は、マツ属花粉のそれと異なり花粉極軸（前葉体細胞から中心細胞方向）に対して直角方向に管形成を行なうことを確認した。花粉極軸に対して直角方向に管形成を行なうのはスギ科花粉の多くにみられるもので、マツ属花粉は花粉極軸方向に管形成され、この点が両者間で異なっている。

一般に花粉管は珠心内を通直に伸長しないためマイクローム刀による切片では、同一視野または同一切片で観察し難く、連続切片を観察する必要がある。さらに胚珠を横に切断した場合、別の角度から調べることが可能である（写真-16、21、38～50参照）。

写真-38～49は珠心を水平に切断した連続切片を示したもので、数個の受粉粒（写真-38～41）と数本の花粉管および花粉内容物がみられる（写真-50、矢印）。その数は1胚珠あたりの受粉粒数とほぼ一致し、珠心に付着した花粉粒は写真に示すようにその大部分が管形成を行なうものと思われる。さらに蔵卵器近くの切片でも5本の花粉管を数えることができる（写真-47）ことから、大部分の受粉粒は発芽能力を有すると考えられた。しかし蔵卵器近くまで花粉管を伸長したとしても、すべての受粉粒（精核）が受精にあずかることは不可能で、卵細胞の数以上の受粉粒は、管形成を行なうが漸時消失するものと思われる。なお管形成にあたっては、-花粉内容物柄細胞、2つの精核、花粉管核およびそれらを取りまく細胞質 - を管の中におしこみ受精を行なう（写真-35～37）。

マツ科マツ属の中心細胞は分裂する前に花粉管内に移動し、その先端部で2精核になるといわれている。しかしカラマツでは管形成まで発達した像が少なく、明確にすることができなかった。

受精および胚の形成

受精は蔵卵器の中央部で行ない、精核が卵核に近づくかたちで両性核が合致する（SMOLSKA 1927）。材料のなかには卵細胞の認められない蔵卵器や異常に大きく発達した卵細胞が散見されたが、受精卵を多く観察した。これらの受精卵は分裂をくりかえしながら蔵卵器基部に沈下し、さらに発達して胚原細胞層、サスペンサー層、ロゼット細胞層および開放細胞層からなる4層16細胞の成熟前胚を形成する（写真-56）。この前胚の形成過程は卵核と精核とが合致した受精卵が、その位置がまたは少し沈降しながら2回分裂して4核の遊離核となり（写真-51～54）、これが蔵卵器基部に沈降して1層にならび、さらに分裂をくりかえして成熟前胚を形成する（写真-55～56）。

用いた材料で前胚の形成が認められたのは、6月18日以降のものであった。一方6月11日に採取固定した材料では管形成まで発達した胚珠が認められないことから、管形成から成熟前胚の形成まできわめて短期間のうちに急速に発達するものと考えられた。

蔵卵器は1つの胚珠に3～4個存在し、それぞれの卵細胞が受精すると結局受精卵の数だけ前胚を形成することになる。前胚に由来する第1次サスペンサーは急速に伸長して、先端にある胚原細胞（写真-57、矢印）を胚乳の中におしこむ。さらに各胚原細胞は急速に分裂をくりかえし（写真-58）、幼胚を形成する。写真-59～60

示す多くの幼胚はたがいに競争して最も充実し、胚乳深部に侵入したものが胚として生長して成熟種子へと発達して行く。

写真-57 から明らかなように、カラマツ属は単純多胚 (Simple polyembryony) 現象を示すことが確認された。さらに徒手切片でも大部分の胚珠は幼胚を形成しているのがみられる (写真-60 ~ 61) ことから、受精機構およびその前後の発育は順調に行なわれていると考えられた。

種子の稔性と不稔種子形成の原因

受粉率および種子発芽率は、図-1 に示すとおりである。図から明らかなように、1969 年の受粉率 (67%) は 1970 年の受粉率 (77%) より 10%低いのにたいして、種子発芽率はそれぞれ 26.9%, 16.7%であり前年が約 10%高い結果を得た。また球果別の種子発芽試験では、3%から 42% (1970 年) まで大きな幅を示した。受粉率が高いのに対して種子の発芽率が低い主な原因は、自家受粉が行なわれる機会がおおいたためと考えられる。

一般に自家受粉させた種子の発芽率は、人工交配または自然交配によって得られたものより低い場合が多い

表 - 1 カラマツの自家受粉と人工(自然)交配による発芽率の差異

Table 1. Difference of germination ratio between open-pollination and selfing of larch.

母樹 Mother tree	組合せ Combination		発芽率 Germination rate (%)	
グイマツ <i>Larix gmelini</i>	宗谷 1 号 Souya No.1	× L L Self	31.8 6.0	
	幾寅 1 号 Ikutora No.1	× L L Self	37.4 4.5	
	中標津 5 号 Nakashibetsu No.5	× L L Self	38.6 3.0	
	ニホンカラマツ <i>Larix leptolepis</i>	上川 2 号 Kamikawa No.2	× L L Self Open	31.3 0 20.0
		網走 1 号 Abashiri No.1	× L L Self Open	52.7 6.0 35.0
		十勝 35 号 Tokachi No.35	× L L Self Open	48.0 12.0 53.0
日高 8 号 Hidaka No.8		× L L Self	36.3 31.0	
		Open	31.0	

注： グイマツの各クローンは同一の 4 花粉親をそれぞれ交配し (各クローン 4 組合せ)、ニホンカラマツ各クローンは同一 3 花粉親を交配した。人工交配種 (× L L) の発芽率はそれら各組合せの平均値である (畠山・榎未発表)。

Notes: Each clone of *Larix gmelini* and *L. leptolepis* was pollinated by the same four and three pollen sources, respectively. The values of germination rate for mother trees were computed using average values of four combinations for *L. gmelini* and three combinations for *L. leptolepis*, respectively. (HATAKEYAMA and KAJI, unpublished)

表 - 2 光珠内見本採種園における着果数の推移
Table.2 Results of fruiting in the model seed orchard at
 Koshunai, Bibai, Hokkaido.

年度 seed yera	採種球果数 Number of cones	備考 Reference
1964	1000	採種園面積約 1ha, 現存本数 414 本 Seed orchard area: ca. 1ha. consisting of 414 trees.
1965	0	
1966	3000	精選種子約 1kg Selected seed lot: ca. 14kg
1967	6500	
1968	8500	精選種子約 6kg Selected seed lot: ca. 6kg
1969	101000	
1970	0	
1971	26000	
1972	0	
1973	37200	

傾向が認められる(表-1, 畠山・梶 未発表)。また, 着果量の多い豊作年に生産された種子は, 凶作年に採取した種子より発芽率が高く, 種子の長期貯蔵にも耐えるといわれている。すなわち, 着花は豊作年では多くのクローンに認められるが, 凶作年には少数のクローンに限られてくるため他家受精の機会が少なく, したがってシイナ種子が多く生産されるものと考えられる。両年の着果量を当該構内にある見本採種園 排水, 断根, 草生, 中耕など土壌の理化学性改善および結実促進試験が行なわれている について調べると, 1969 年は最高着果数を示したのに対し, 1970 年は皆無に近かった(表 - 2, 藤谷ら 1973)。

以上述べてきたことから, 不稔種子が作られる原因は, 自家受粉による稔性低下を含めて雄性配偶体と雌性配偶体のいずれかに障害がある場合が考えられる。しかし, 平年においては, 1) . 図-1 から明らかなように受粉率は 70%前後に達している。2) . 1 胚珠あたりの受粉粒数は 3~5 粒認められ, 花粉飛散量の不足および受粉機構に障害があると考えられない。3) . 受粉粒の大部分は珠心で管形成を行なっている。4) . 前胚を形成している胚珠が多く, 受精機構に支障があるとは考えられない。以上のことからカラマツの不稔種子(シイナ)が作られる主な原因は, 初期の胚発生過程あるいはその後の発育段階で胚または胚乳が何らかの原因で崩壊しているものと考えられた。しかし, 雄花の着花がほとんどみられない凶作年においては, 当然のことながら受粉粒数の不足がシイナ種子の形成される第 1 因子となるものと推測される。

討 議

前述のように, カラマツの受粉および受精機構について, つぎに示すような多くの不明な点がある。1) . 無受粉胚珠でもシイナ種子まで発育する。2) . 受粉粒は珠孔において不安定な時期ともいえる長い休止期をもつ。3) . 花粉粒は, 現在のところ人工培地上で管形成が行なわれにくい。そのために 4) . 花粉粒内の細胞核, とくに精核の分裂, 発達を明らかにされにくい。5) . 受粉胚珠および受粉粒数が多いのに対し, 充実種子が少ない。さらに細部にわたると, 6) . 受粉機構とくに, BARNER *et al* (1960) の報告した珠孔液が受粉に果す役割が明らかでない。7) . 蔵卵器の異常発育が散見され, また 8) . 飛散時期の花粉粒には, 異常形態を示す場合がある。9) . 受粉粒は淡緑色の厚い層におおわれている。しかしその機構など不明で, 今後の究明が待たれる。さらにつぎのような 2 現象についての研究が続けられなければならないであろう。

(1) . 6月中旬の蔵卵器の上部と下部に細胞が認められる(写真-22)。これは時期的にみて、異常発達した卵細胞あるいは受精卵の分裂過程と考えられる。受精卵の分裂過程であると仮定すると、発育の早い胚珠が受精を行ない、写真-51~54の説明と合せると、4遊離核への分裂の1つの断面と推測される。しかし写真-51~52にみられるような発達は多くの胚珠に認められるが、受精卵の2回の分裂による4遊離核が蔵卵器基部に沈降する過程としては、核が離れていて安定した発育過程とは考えられない。また材料はすべて固定したのに対し、4遊離核が蔵卵器中央部で紡錘体に連なり、核が移動中とも考えられるものが散見された。これらのことから4遊離核の時期は、前胚の形成過程できわめて不安定な時期と考えられた。

(2) . 写真-63~64に示す現象で、蔵卵器基部では前胚が形成されつつあるが、上部には2つの細胞が認められる。2細胞はそれぞれ大きな細胞と小さな細胞が合致しており、卵核と精核が合致(受精)した直後の像とも推定される。この現象に関して、HUTCHINSON(1920)は、バルサムモミ(*Abies balsamea*)では受精して4遊離核まで発達し、被子植物一般にみられる重複受精に似た現象を示すと報告している。一方、ALLEN *et al.*(1972)はダグラスファーの受粉受精機構を観察して、前胚の発育段階において蔵卵器上部に数個からなる細胞群(super-numerary nuclei)の発生事例を多く認め、その発生機構および働きについては明らかでない述べている。写真に示された現象は、カラマツでも前胚の形成前後に細胞群が発生する場合がありますを示すものである。

以上述べてきた観察結果と現在までの多くの報告、すなわち前述のように、カラマツの受粉機構は、ダグラスファーのそれときわめて類似している(DOYLE *et al.*, BARNER *et al.*; 前出)。この報告に対して、ALLEN(1963)はカラマツの受粉機構に関する限りではマツとダグラスファーの中間を示すとしている。さらにダグラスファーと同じように前胚形成過程で蔵卵器上部に細胞群の発生が認められ、また両者は単純多胚現象を示す(JOHANSEN 1950)。以上のことからカラマツ属の受粉・受精ならびに胚発生機構全般についてみると、マツ属とトガサワラ属の中間を示す点が多いと考えられた。

あ と が き

本報告の1部は第81回(1970)、第82回(1971)日本林学会で発表した。針葉樹類の発生学的研究は現在にいたるまで多数報告されており、多くのことが明らかになっている。本研究の結果でも、発生学的知見においては既往の諸報告の業績が確認された。

この研究は発生学的解明とその間の知見から、種子稔性の向上を図る目的で行なわれたが、なお不明な点が残されており、今後は、交雑育種を含めて生殖生理を中心とした林木育種の基礎資料を得ると同時に、その結果を採種園の管理、施業から種子の生産および球果害虫の防除、さらに育苗技術との関連において発展させていきたいと考えている。

なお、農林省林業試験場造林部、斎藤幹夫、横山敏孝両氏には、とりまとめにあたり格別の助言をいただいた。ここに幸甚なる謝辞を述べる。

摘 要

ニホンカラマツの受粉・受精機構を究明して、不稔種子がつけられる原因を探り、あわせて林木育種の基礎資料を得るために、1969年と1970年の材料を用いて花芽の発育過程、雌性配偶体および雄性配偶体(受粉粒)の発達について調べた。同時に受粉胚珠の割合、受粉粒数、管形成の方向などについてつぎのことが明らかにされた。なお、両性配偶体の発育過程ならびに花粉管形成の主な発育段階はプレート写真に示した。

1. 美唄地方においての開花は4月下旬から5月初旬に行なわれる。飛散時の花粉粒は、第1・第2栄養細胞(前葉体細胞)、柄細胞、中心細胞、花粉管細胞とそれぞれの細胞核を有する。すなわち飛散時は5核5細胞の時期である。(写真-24~30)。

飛散粒は胚珠の先にある柱頭様の珠皮先端部の働きによって珠孔に入り、その位置で内膜外層が膨潤して外皮を脱皮する。このとき、外皮とともに第1栄養細胞が離脱する場合が多い。その後の受粉粒は、蔵卵器が形成される6月上旬頃まで形態的变化は認められない。さらにその後徐々に珠孔から(胚)珠心へと移動して珠心先端部に付着する。

2. 幼胚珠は、マツ属一般にみられるように胚のう細胞の核の分裂によって多数の遊離核が形成される(写真-13)。すなわち液腔を形成し、それが発達して胚乳原基(胚乳体)から胚乳および珠心、蔵卵器原基から蔵卵器、さらに1層4細胞からなる頸細胞を形成する。

蔵卵器は、5月下旬から6月中旬にかけて形成される。1つの胚珠に3~4個の蔵卵器をもったものが多く、最多6個もった胚珠が認められた(写真-16~21)。また、蔵卵器が異常発達した胚珠が散見された(写真-22~23)。

3. 珠心に付着した受粉粒の大部分は、花粉管を伸長する(写真-38~49)。花粉管形成、すなわち花粉粒の発芽の方向は、花粉極軸に対して直角方向であることが確認された(写真-31~32, 35~37)。管形成は6月中~下旬に行なわれ、その際花粉内容物を全部管の中におしこんで受精する。

4. 受精は6月中~下旬に行なわれ、受精卵は2回分裂して4核の遊離核となる(写真-51~54)。4遊離核は造卵器基部に沈降し、さらに分裂をくりかえして4層(開放細胞層、ロゼット細胞層、第1次サスペンサー層および胚原細胞層)16細胞からなる成熟前胚を形成する(写真-56)。その後サスペンサーの伸長およびその先端にある胚原細胞の急速な分裂により、幼胚の形成へと発達する(写真-57~61)。

なお、カラマツは初期の胚形成様式が、単純多胚現象を示す属であることが確認された(写真-57)。

5. 花芽の分化期および上述の諸器官の分化、発達時期は、供試材料の生育環境によって異なる。すなわち本報の観察結果と、東京および長野の材料による結果とをくらべると、北海道では花芽の分化期が1~2週間早い。しかし、開花時期は常に2週間前後のおくれが認められ、さらに蔵卵器の形成時期、受精の時期から胚発生まで継続的に1~2週間おけているが、種子の採取時期は9月10日以降でおおよそ同じ頃である。

6. 受粉胚珠の割合は、1969年が67%、1970年が77%であった。1胚珠あたりの受粉粒数は3~5粒であり、0~9粒の範囲で数えられた。成熟種子の発芽率は、1969年が26.9%、1970年が16.7%であった(図-1)。このとより受粉胚珠の割合または受粉粒数と種子発芽率(種子稔性)の間には、平衡関係がなく、凶作年に採取した種子は発芽率が悪い傾向が認められた(表-2参照)。

7. 以上のことから不稔種子(シイナ)がおおくつくられる原因について、受粉粒数の不足、受粉機構の障害および花粉粒の発芽能の欠除など雄性配偶体に起因する支障はないと推測され、さらに受精機構にも障害がないと考えられることから、自家受粉による稔性の低下現象(表-1)を含めて初期の胚発生過程あるいはその前後の発育段階で、胚または胚乳が何らかの原因によって崩壊するために、結局シイナ種子になるものと考えられた。

8. カラマツは、無受粉胚珠でもシイナ種子まで発達する。また受粉粒は、受粉後形成される淡緑色の厚い膜におおわれている。さらに前胚形成過程において、蔵卵器上部に細胞群の発生が認められる(写真-63)ことなど、受粉・受精機構究明の立場から多くの不明な点について討論した。

現在までの多くの報告と観察結果から、カラマツの受粉・受精機構および胚発生機構全般についてみると、マツとトガサワラ両属の中間を示す点が多いと考えられた。

文 献

- ALLEN, G. S. 1963. Origin and development of ovule in Douglas-fir. *For. Sci.* 9 : 386-393 .
- ALLEN, G. S. and J. N. OWENS 1972. The life history of Douglas-fir. 97-101. *Canadian For. Ser.*, Ottawa .
- 浅川澄彦 1965 カラマツの結実促進. 最近の林業技術 6 : 14-17 日林協
- BARNER, H. and H. CHRISTIANSEN 1960. The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favourable time for controlled pollination in *Larix*. *Silvae Genet.* 9 : 1-11 .
- BARNER, H. and H. CHRISTIANSEN 1962. The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favourable time for controlled pollination in *Pseudotsuga menziesii*. *Silvae Genet.* 11 : 89-102 .
- BUCHHOLZ, J. T. 1926. Origin of cleavage polyembryony in conifers. *Bot. Gazet.* 81 : 55-71 .
- CHRISTIANSEN, H. 1960. On the effect of low temperature on meiosis and pollen fertility in *Larix decidua* MILL. *Silvae Genet.* 9 : 72-78 .
- CHRISTIANSEN, H. 1969. On the germination of pollen of *Larix* and *Pseudotsuga* on artificial substrate, and on viability tests of pollen of coniferous forest trees. *Silvae Genet.* 18 : 104-107 .
- CHRISTIANSEN, H. 1972. On the development of pollen and fertilization mechanisms of *Larix* and *Pseudotsuga menziesii*. *Silvae Genet.* 21 : 166-174 .
- DOYLE, J. 1926 a. Notes of the staminate cone of *Larix leptolepis*. *Proc. Roy. Ir. Aca.* 37 : 154-168 .
- DOYLE, J. 1926 b. The ovule of *Larix* and *Pseudotsuga*. *Proc. Roy. Ir. Aca.* 37 : 170-180 .
- DOYLE, J. and O'LEALY 1935. Pollination in *Tsuga*, *Cedrus*, *Pseudotsuga*, and *Larix*. *Sci. Proc. Roy. Dub. Soc.* 21 : 191-204 .
- EKBERG, I. and G. ERIKSSON 1967. Development and fertility of pollen in three species of *Larix*. *Hered.* 57 : 303-311 .
- EKBERG, I., G. ERIKSSON and Z. ŠULÍKOVÁ 1968. Meiosis and pollen formation in *Larix*. *Hered.* 59 : 427-438 .
- 藤谷光紀・畠山末吉・梶 勝次・大島紹郎 1973 カラマツ採種園の施業試験 () 光珠内採種園の結実促進試験. 昭 48 林木育種研講 27-31
- 橋詰隼人・今井元政 1966 カラマツ花芽の発育経過について. 日林誌 48 : 425-435
- HUTCHINSON, A. H. 1920. Fertilization in *Abies balsamea*. *Bot. Gazet.* 69 : 153-163 ,
- 市河三次・久保田泰則・安達芳克 1969 カラマツ花粉の人工発芽に関する研究() 北林試報 7:32-36
- 市河三次・四手井綱英 1972 樹木花粉の超低温貯蔵に関する基礎的研究() 京大演報 43 : 30
- 猪野俊平 1964 植物組織学 493-494 内田老鶴園新社
- JOHANSEN, D. A. 1950. Plant embryology. 22-23 Walth. Mass, U. S. A .
- 梶 勝次 1970 カラマツ類の結実過程と結実予測. 昭 45 北海道林業研究論文集 147-151
- 梶 勝次・市河三次・久保田泰則 1970 カラマツ花粉の人工発芽に関する研究(II), 北林試報 8:1-11
- 梶 勝次・久保田泰則 1971 グイマツ, ニホンカラマツ混植採種園における雑種生産例. 昭 46 北海道林業研究論文集 344-347
- 梶 勝次・市河三次・久保田泰則 1972 カラマツ花粉の超低温貯蔵に関する研究(II). 含水率別, 温度別による貯蔵結果と貯蔵方法に対する考察. 北林試報 10 : 50-58
- 林木育種研究談話会 1970 林木の種間交雑における受精の組織学的研究. 林木の育種 64 : 12-17
- SMOLSKA, A. 1927. Die Entwicklung des Archegoniums und der Befruchtungsprozesse bei *Larix europaea* D. C. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. B.* 994-1038 .
- 高橋延清・柳沢聰雄・久保田泰則 1968 雑種カラマツの生産と利用. 北海道林木育種叢書 8 : 58-107
- TAKAHASHI, N. and T. HAMAYA 1972, Improvement of larch through hybridization in Japan. *Proc. IUFRO Genet, SABRAO Joint Symp.* C-2 : 1-12 .

Summary

This investigation on the pollination and fertilization mechanisms of Japanese larch (*Larix leptopis* GORD.) was carried out for two years in early summer of 1969 and 1970. Many additional materials were collected in order to compare with the series of development in each year from the date of flower bud formation until fruiting.

The most important stages of development of flower buds or ovules are showed in plates .

1. In Hokkaido , the inflorescence begins during the period from late April to early May , when pollination is done. The microgametophyte of *Larix* at the stage of pollen dispersal involves five cells and five nuclei, *i.e.* 1st & 2nd vegetative (prothallium) cells , stalk cell , central cell , pollen tube cell and each five nuclei (see photos 24 ~ 28) .

It is said that pollination mechanism of *Larix* is similar only to that of *Pseudotsuga* (DOYLE *et al.* 1935 , BARNER *et al.* 1960 and others) , whereas the integument grows to envelop the pollen and is closed by collapse , and then the pollen is transferred within a micropyle . At the same time , the pollen is caught and picked up by a pollination droplet (the fluid in the canal) , and floats or is drawn into the micropyle canal . Finally , the pollen is transferred by the fluid after the resting period , which is contained temporarily in the integument tips and then move to the nucellus top where the pollen germinates (see photos 35 ~ 37) .

2. 3 ~ 5 archegoniums on the average were formed in one ovule ranging from 0 ~ 6 during the period from late May to mid-June , in 1969 (see photos 16 ~ 21) . On the other hand , those of morphologically abnormal form appeared in various ovules (see photos 22 ~ 23) .

The pollinated pollen grew to be ellipsoidal and had increased up to 1/5 in diameter of pollen , and fell in to the long resting period with morphologically still form characteristic of archegonium .

3. All the pollen on the nucellus top were recognized to germinate , as germ tube were found in the transverse sections of nucellus tops through the continuous preparations (see photos 38 ~ 50). Photos 31 ~ 32 and also 35 ~ 37 suggest that the pollen of *Larix* germinates to right angles for the 1st & 2nd vegetative (prothallium) cells and central cell on the substrate or on the nucellus top , but germinating pollen or germ tube was never found on the integument or in the micropyle canal.

The microgametophyte of *Larix* pours its contents , such as dense cytoplasm gorged with starch , stalk cell , small tube nucleus and two large male nuclei of unequal size into the germ tube and into the archegonium .

4. Fertilization is carried out in mid to late June in Hokkaido . The fertilization mechanism and the later ovule development of *Larix* is similar to the other species of Pinaceae . *Larix inter alia* , possesses several archegonia (photos 16 ~ 23) , and all the archegonia in a given ovule are ordinarily fertilized (see photos 51 ~ 57) , whereas each fertilized archegonium gives rise to only one embryo (Simple polyembryony , see photo 57) .

5. There are some differences in the developmental processes of flower buds and of ovules among the geographical regions or individuals . Generally speaking , the flower bud development in Hokkaido begins in early autumn about two weeks earlier than in Nagano or in Tokyo , however , the inflorescence in Hokkaido begins in spring about two weeks later than in Nagano. It was also recognized that the formation of archegonium and also fertilization continued for about two weeks later , but the dates of harvesting cones for these two regions or among individuals were not very different .

6. The ratio of pollinated ovule was 67% in 1969 , and was 77% in 1970 . The number of pollinated pollen grains were averaged to be 3 ~ 5 in one ovule , ranging from 0 ~ 9 . The results of germination tests of seeds obtained gave average 26.9% in 1969 , and 16.6% in 1970 (see Fig . 1) .

The results of the above two cases suggest that there found no relationship between the ratio of pollination

pollination and seed sterility , therefore the sterility of seeds closely relates to the possibility of cone production(see tables 1 and 2).

7 . The above mentioned results suggest the reason why the sterile seeds are produced . In ordinary year , because the ovule has no lack of pollinated grains and also because the facts,as we observed , the most of the pollen grains produced germ tubes on the nucellus tops of the ovules , it seems probable that the sterile seeds are produced at the early stages of development of proembryos and also at its later stages , including the sterility caused by selfing (Table 1) . These may be the major factors disturbing the development of proembryos or embryos and also endsperms.

8 . After the present author and his collaborators made considerable amount of discussion on pollination and fertilization mechanisms of *Larix letolepis*(see photos 22 , 52 , 54 and 63 ~ 64) , we have concluded that *Larix* represents the intermediate genus between *piuns* and *Pseudotsuga* of Pinaceae so far as pollination mechanisms and the following ovule developnlent are concerned .

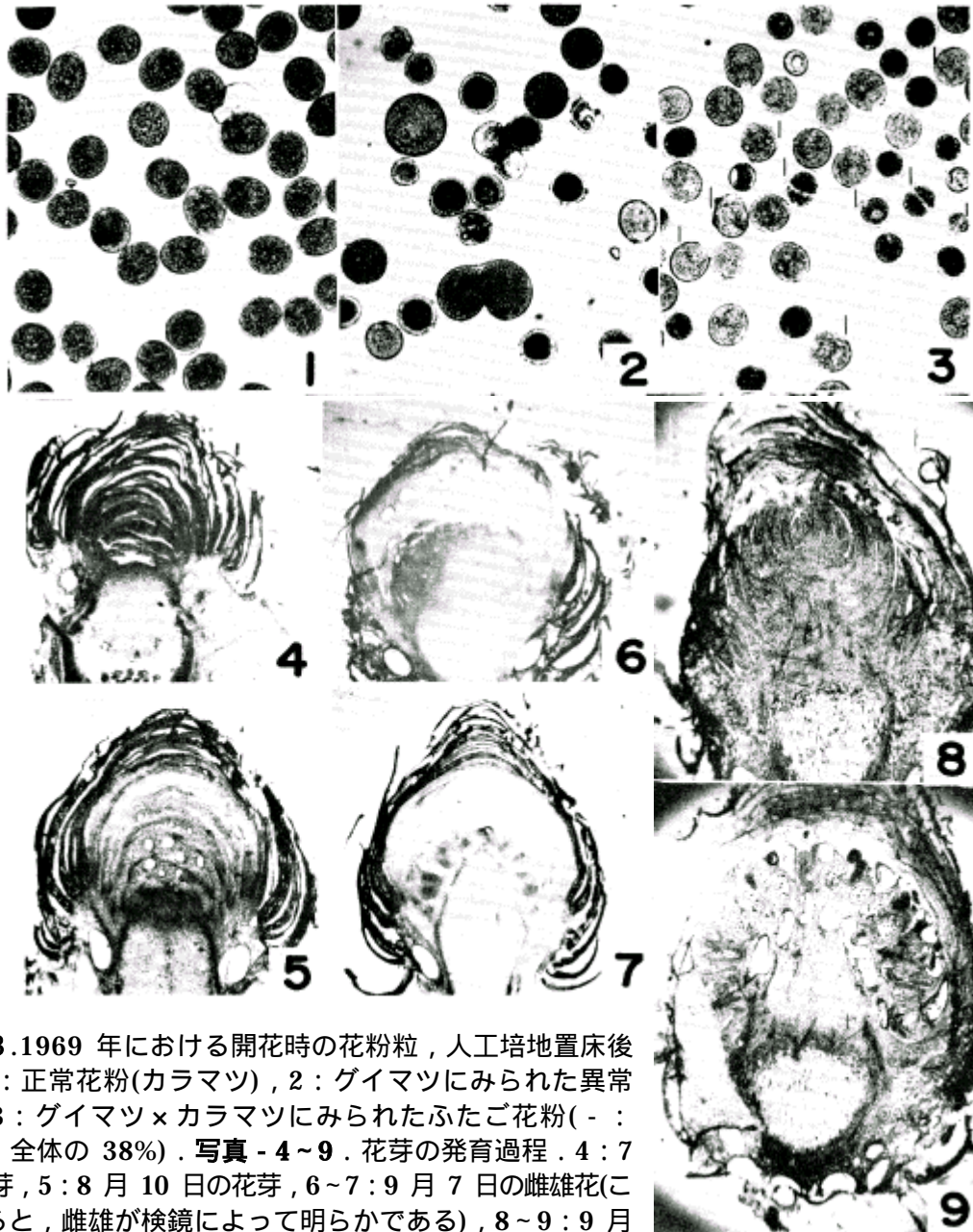


写真 - 1 ~ 3. 1969 年における開花時の花粉粒，人工培地置床後 48 時間 . 1 : 正常花粉(カラマツ) , 2 : グイマツにみられた異常形態花粉 , 3 : グイマツ x カラマツにみられたふたご花粉 (- : ふたご花粉 , 全体の 38%) . 写真 - 4 ~ 9 . 花芽の発育過程 . 4 : 7 月 7 日の花芽 , 5 : 8 月 10 日の花芽 , 6 ~ 7 : 9 月 7 日の雌雄花(この時期になると , 雌雄が検鏡によって明らかである) , 8 ~ 9 : 9 月 29 日の雌雄花 .

Photos (1)-(3): Dispersion of pollen grains in 1969, 48 hours after setting. (1)=normal pollen of *Larix leptolepis*. (2)=morphologically abnormal pollen of *L.gmelini*. (3)=double pollen appears in hybrid of *L.gmelini* x *L.leptolepis*(points the double pollen, observed up to ca.38%). **photos (4)-(9):**Development of flower buds in 1969. (4)=longitudinal section of flower bud, fixed on July 7. (5)=flower bud, fixed on August 10. (6&7)=female and male flower, fixed on September 7. (8&9)=female and male flower, fixed on September 29.

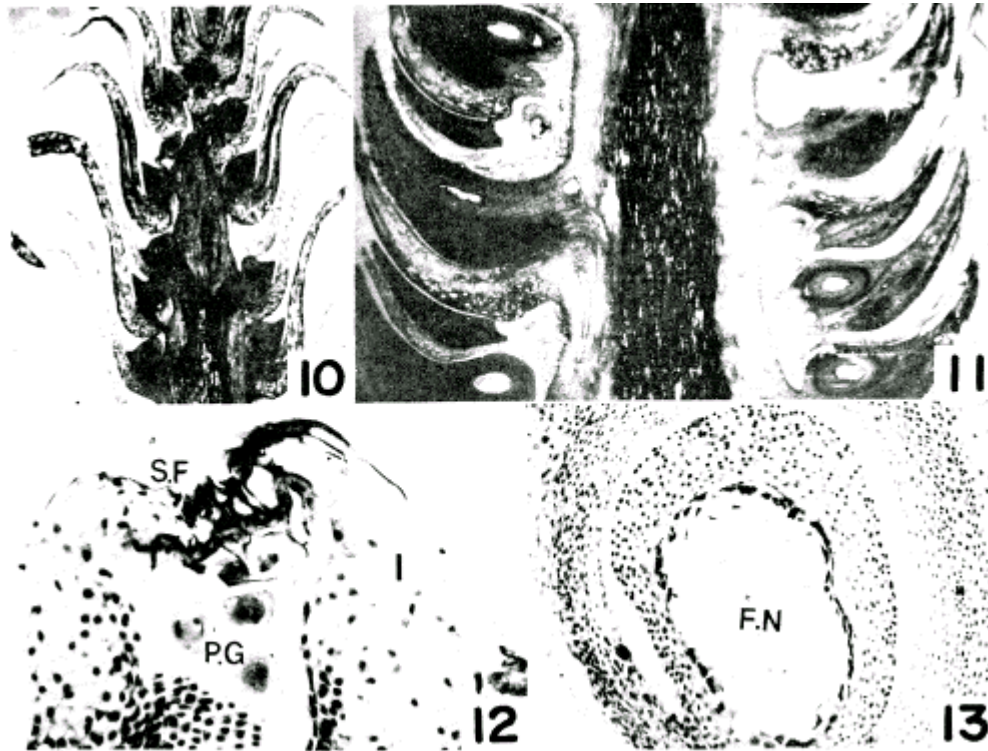
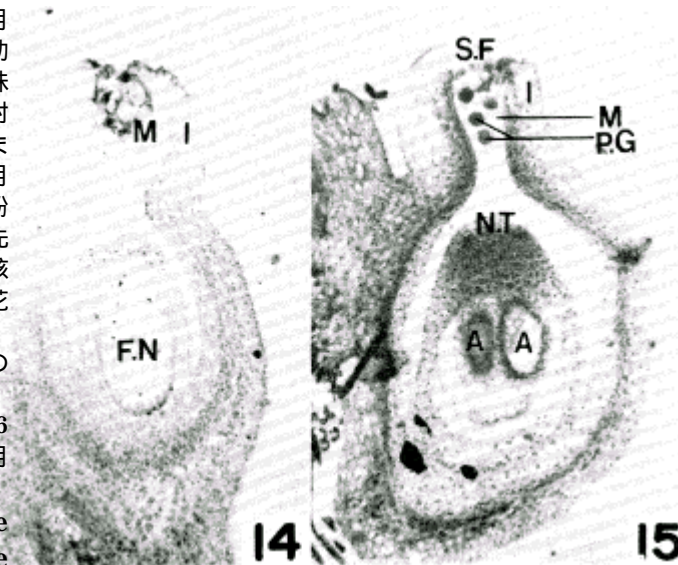


写真 - 10 ~ 11 . 開花時(5月1日)の雌花と6月1日の幼球果 . 写真 - 12 . 受粉後珠皮先端部は崩壊して珠孔を封ずる . 受粉粒は6月中旬頃までこの位置にとどまる(5月14日) . 写真 - 13 ~ 15 . 受粉後の胚珠の発育 , SF : 珠皮先端部 , I : 珠皮 , FN : 遊離核と液腔 , M : 珠孔 , PG : 花粉粒(受粉粒) , NT : 珠心 , A : 蔵卵器 . 13 : 5月20日の胚珠にみられる遊離核(液腔) . 14 : 5月19日の胚珠 . 15 : 6月中旬の一般的な胚珠(6月20日)



Photos (10) & (11): The female inflorescence at the

time of pollination, fixed on May 1, and the young staminate cone, fixed on June 1. **Photos (12):** The stigmatic flap, collapsed after pollination. **Photos (13)-(15):** Ordinary ovules after pollination. SF-stigmatic flap; I-integument; FN-free nuclei; M-micropyle canal; PG-pollen grains; NT-nucellus top; A-archegonium. (14)=fixed on May 19. (15)=ordinary ovule, fixed on June 20.

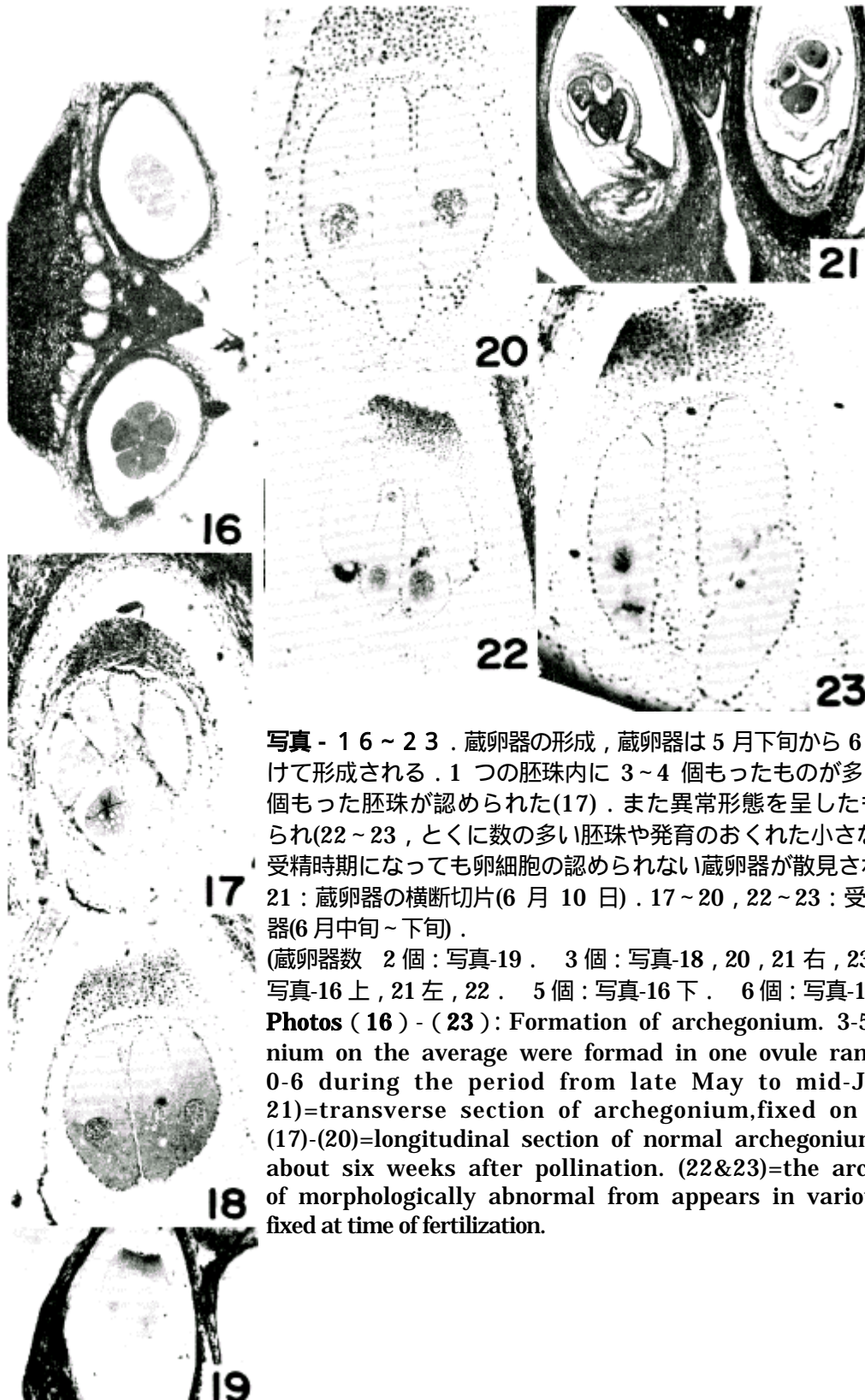


写真 - 16 ~ 23 . 蔵卵器の形成, 蔵卵器は 5 月下旬から 6 月中旬にかけて形成される . 1 つの胚珠内に 3 ~ 4 個もったものが多く, 最多 6 個もった胚珠が認められた(17) . また異常形態を呈したものが認められ(22 ~ 23, とくに数の多い胚珠や発育のおくれた小さな蔵卵器), 受精時期になっても卵細胞の認められない蔵卵器が散見された . 16 , 21 : 蔵卵器の横断切片(6 月 10 日) . 17 ~ 20 , 22 ~ 23 : 受精時の蔵卵器(6 月中旬 ~ 下旬) .

(蔵卵器数 2 個 : 写真-19 . 3 個 : 写真-18 , 20 , 21 右 , 23 . 4 個 : 写真-16 上 , 21 左 , 22 . 5 個 : 写真-16 下 . 6 個 : 写真-17)

Photos (16) - (23) : Formation of archegonium. 3-5 archegonium on the average were formed in one ovule ranging from 0-6 during the period from late May to mid-June.(16& 21)=transverse section of archegonium, fixed on June 16. (17)-(20)=longitudinal section of normal archegonium, fixed on about six weeks after pollination. (22&23)=the archegonium of morphologically abnormal from appears in various ovules, fixed at time of fertilization.

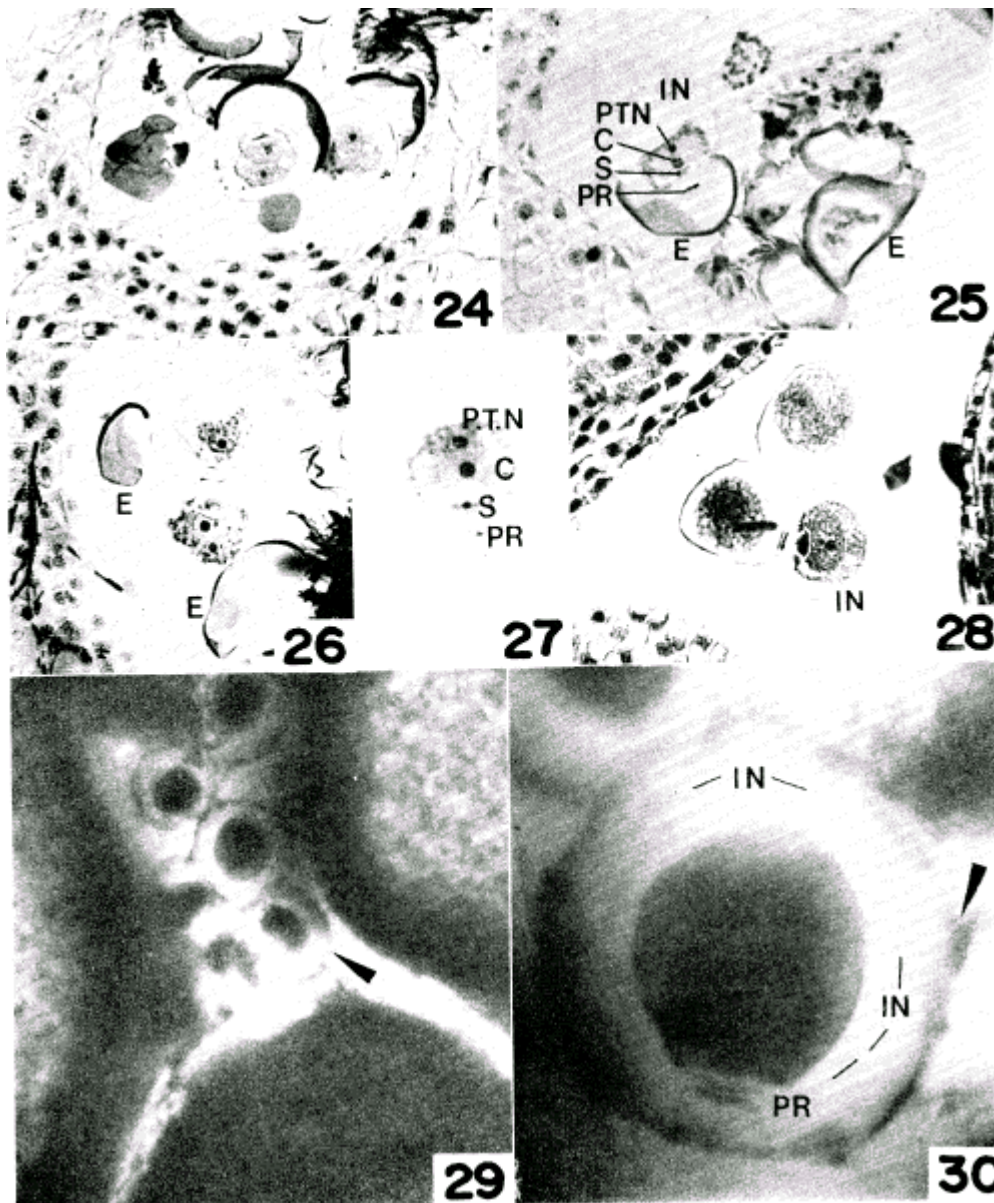


写真 - 24 ~ 30 . 受粉粒のうごき . E : 外膜 , IN : 内膜 , PR : 栄養(前葉体)細胞 , S : 柄細胞 , C : 中心細胞 , PTN : 花粉管細胞 , 細胞中の黒い点はそれぞれの細胞核 . 24 : 5 月 15 日の受粉粒 , 25 : 5 月 19 日の受粉粒 , 26 ~ 27 : 5 月 23 日の受粉粒 , 28 : 6 月 11 日の受粉粒 , 29 ~ 30 : 徒手切片による 6 月 16 日の受粉粒 , 受粉粒は内膜の外側に形成された厚い膜におおわれている(矢印) .

Photos(24)(30): Development of pollinated grains. E-exine;IN-intene;PR-prothallium(vegetative)cell;S-stalk cell;C-central cell;PTN-pollen tube cell and black dots in the cells stand for each nucleus,respectively. (24)=2 weeks after pollination,fixed on May 15. (25)=pollinated grains,fixed on May 19. (26&27)=fixed on May 23. (28)=fixed on June 11. (29&30)=free hand section of pollinated grains,the photos taken on June 16. The pollinated grains are covered by other walls which might formed out of the intene of about 1/5 of the pollen diameter (arrow).

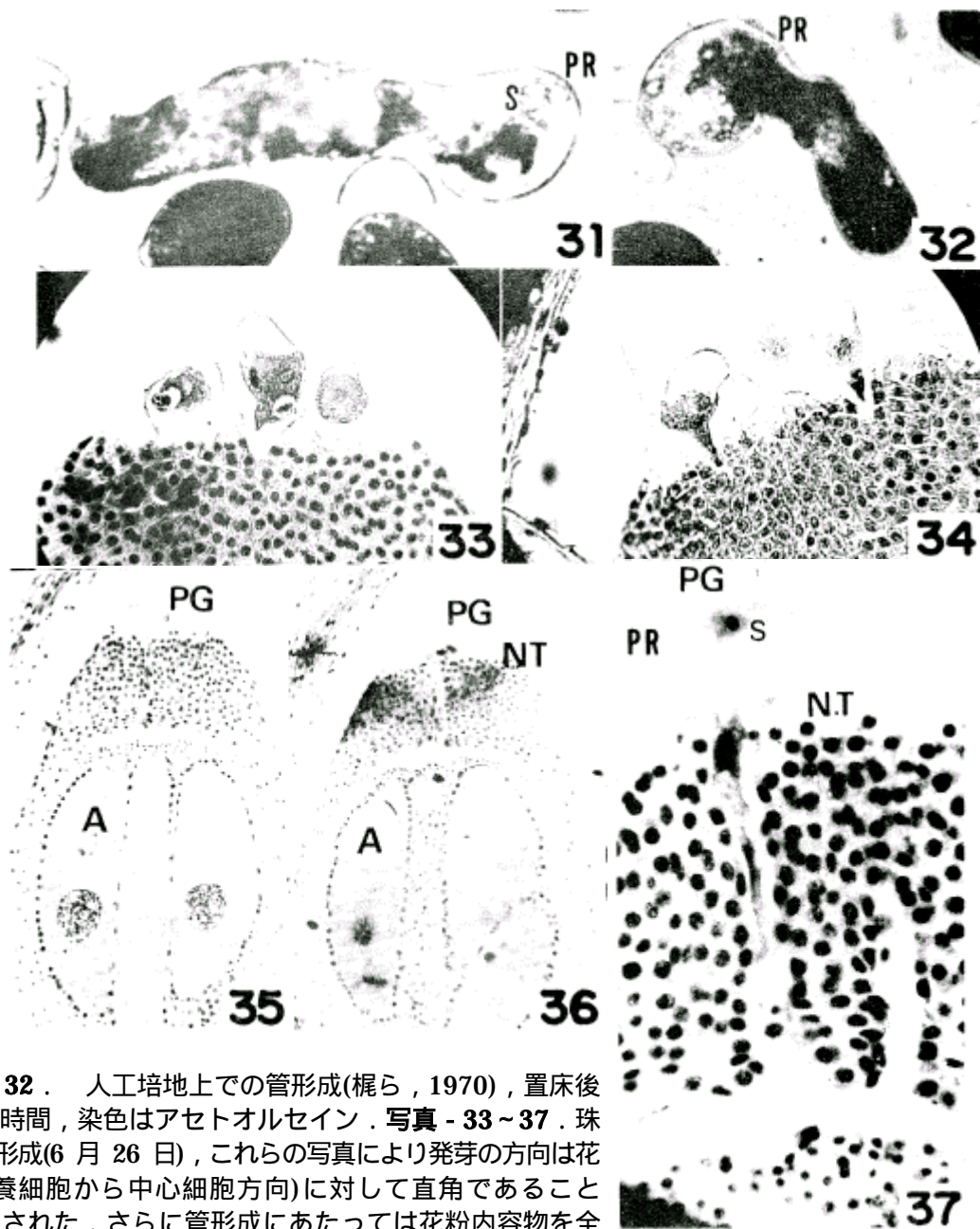


写真 - 31 ~ 32 . 人工培地上での管形成(梶ら, 1970), 置床後 144 ~ 168 時間, 染色はアセトオルセイン . 写真 - 33 ~ 37 . 珠心内での管形成(6 月 26 日), これらの写真により発芽の方向は花粉極軸(栄養細胞から中心細胞方向)に対して直角であることが明らかにされた . さらに管形成にあたっては花粉内容物を全部その中におしこむ(記号は図版 4 と同じである) .

Photos(31)-(32): Germination of pollen in vitro, according to KAJI *et al.*, 1970. About 144-168 hours after setting. Stained by aceto-orcein. **Photos(33)-(37):** Germination of pollen in the nucellus top, fixed on June 16. Marks show similar to those in PLATES II&IV. Photos(31-37) suggest that the pollen of *Larix* germinates at a right angle to prothallium cell or stalk cell, and that the microgametophyte of *Larix* pours its contents into the germ tube.

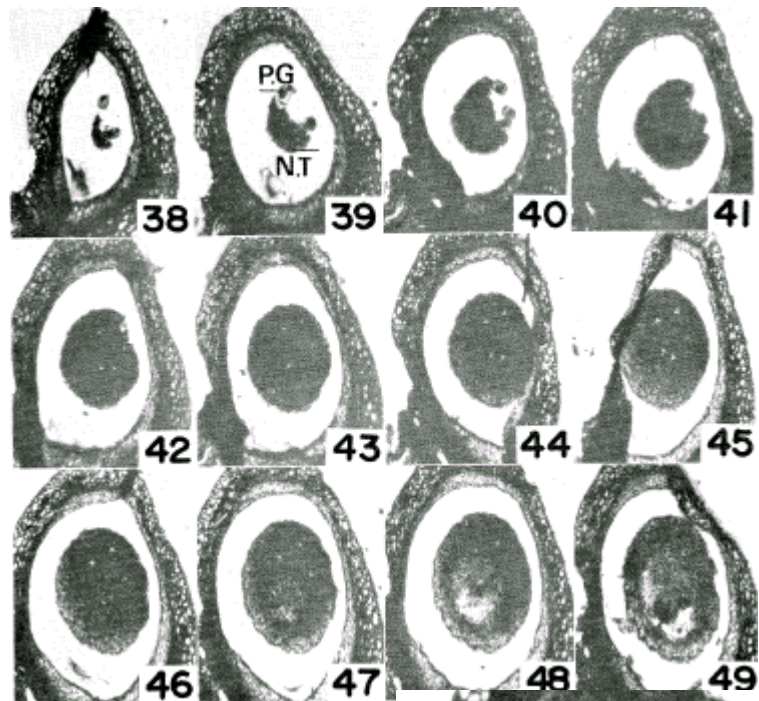
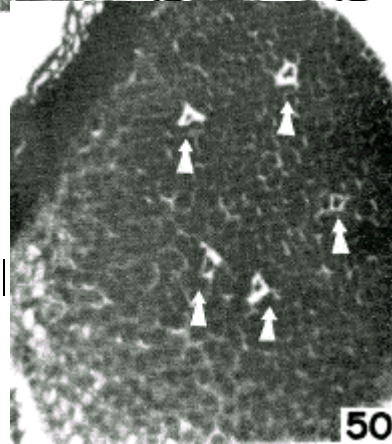


写真 - 38 ~ 50 . 6 月 18 日の珠心の横断連続切片 , 数個の花粉粒 (PG) ならびに伸長した 5 本の花粉管の断面が観察される . すなわち , 受粉粒は発芽能力をもっていると考えられた . 38 : 珠孔方向 , 珠心先端 (NT) ←→49 : 藏卵器方向 , 50 : 45 の拡大写真 , 矢印は花粉管および花粉内容物 .

Photos(28)-(50): Continuous transverse sections of nucellus tops. Several pollen grains and germ tubes are observed in the nucellus tops. Photos (38) shows in the opposite direction to the arshagonium, and photos (49) shoes in the opposite direction to the micropylar canal. (50)= enlarged photos (45),and the arrows show the germ tubes. It seems that the most of the pollen grains produced germ tubes on the nucellus tops.



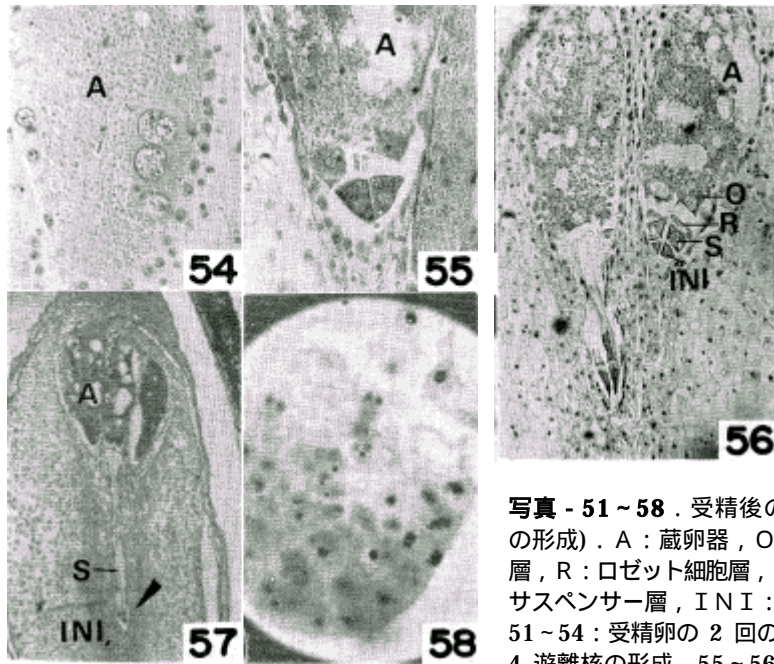
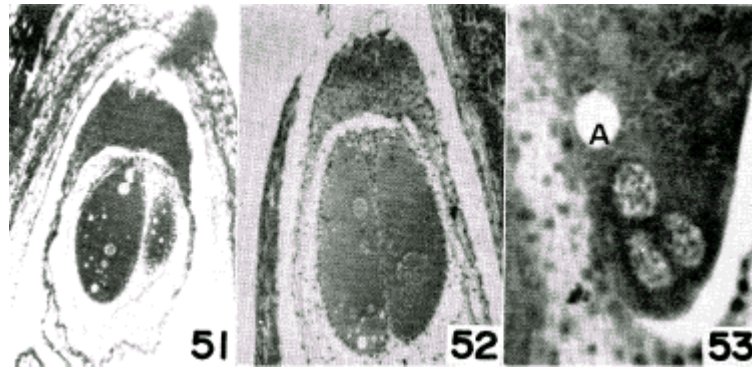


写真 - 51 ~ 58 . 受精後の発育(前胚の形成) . A : 蔵卵器 , O : 開放細胞層 , R : ロゼット細胞層 , S : 第 1 次サスペンサー層 , I N I : 胚原細胞層
 51 ~ 54 : 受精卵の 2 回の分裂による 4 遊離核の形成 , 55 ~ 56 : さらに分

裂をくりかえして成熟前胚を形成する(56 右) . 57 : 伸長したサスペンサーと先端の胚原細胞(矢印 , I N I) . 58 : 胚原細胞の急速な分裂による幼胚の形成 .

Photos(51)-(56): Division of fertilized nuclei and formation of proembryos. A-archegonium; O-open cell layer;R-rossette cell layer;S-primary suspensor layer;INI-embryo's initial cell later (51-54)=1st and 2nd divisions of fertilized nuclei (3 of the 4 free nuclei are shown). (55&56)= formation of proembryos. **Photos(57):** Elongated primary suspensor and a simple polyembryony in *Larix*. **Photos(58):** Rapid division of initial cell and formation of embryos.

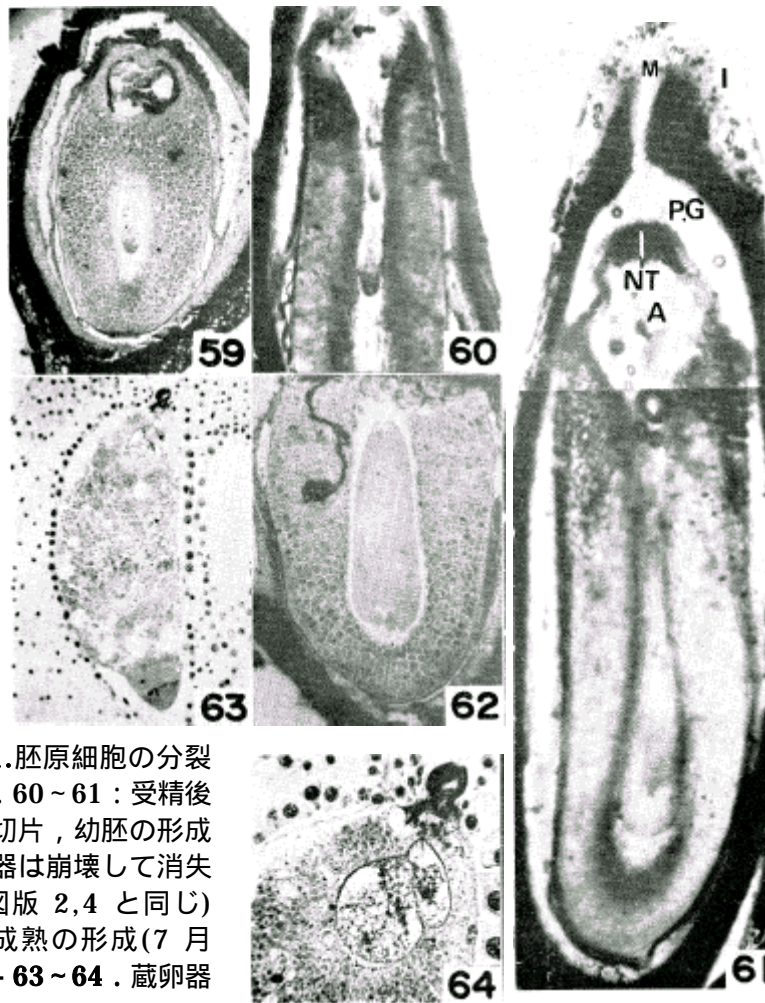


写真 - 59 ~ 61. 胚原細胞の分裂と幼胚の形成 . 60 ~ 61 : 受精後の胚珠の徒手切片 , 幼胚の形成とともに蔵卵器は崩壊して消失する (記号は図版 2,4 と同じ)
 写真 - 62. 成熟の形成 (7 月 30 日) . 写真 - 63 ~ 64 . 蔵卵器

基部には前胚の形成が認められるが上部には2つの細胞がみられる . これは前胚形成過において , 蔵卵器上部に細胞群が発生する場合があると考えられた .

Photos(59)-(62): Longitudinal section of developing young embryos. Marks show similar to those in PLATEsII&IV. (60&61)=free hand section of young embryo. (62)=median longitudinal section of matured embryo in *Larix* fixed on August 30. **Photos(63)&(64):** Formation of proembryo locating under the archebonium, and two large cells of unequal size are seen at the upper part. The photos suggested that supernumerary cells might formed after fusion or developing proembryo in *Larix*.