

# レンゲ 4 倍体の不稔機構に関する研究

## IV. ホウ素化合物およびジベレリンなどの 花粉発芽に及ぼす影響

林 喜 三 郎

(農学部 育種学研究室)

## Studies on the mechanism of partial sterility in induced autotetraploid of Renge (*Astragalus sinicus* L.)

### IV. Effect of boric compounds and gibberellin on pollen germination.

by Kisaburo HAYASHI

(Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture)

#### I. 緒 言

前報 (1966) において、レンゲ 4 倍体の花粉は最適条件下で培養しても、発芽率は約 70% であり、花粉管は伸長速度が遅く、破裂し易く、かつ蛇行するなど特異な現象のみられることを指摘しておいた。

本報はこのようなレンゲ 4 倍体花粉の発芽異常を軽減して、受精率をよくすることを終局の目的として、従来 LOO & HAWANG (1944), KATO (1955), 高見 (1956), 沢田 (1958), VASIL (1960) などが種々の自然植物について報告しているような花粉の発芽促進物質を、レンゲ 4 倍体の花粉に適用した結果の概要を述べたものである。

報告に先だち、終始懇篤なる指導と論文の校閲を賜った京都大学教授赤藤克己博士に対し、厚く御礼申し上げる。

#### II. 実験材料および方法

##### 1. 供試材料

使用した 2 および 4 倍体系統は、それぞれ前報 (1966) に用いた富農選 7 号およびその 4 倍体の自殖後代である。1962 および 1963 年の秋それぞれポットに播種し、翌春開花盛期に生育のよい約 50 個体宛より花粉を採取し、発芽試験に供した。

##### 2. 発芽条件

1 級寒天 2%, 蔗糖 10% の発芽床を基準発芽床と呼び、これにその都度説明するような化学薬品を添加して花粉を置床し、27~8°C の恒温器内で 1 時間放置した。これらは前報での最適発芽条件にもとづき決定したものであるが、その他の花粉の採取および散布方法ならびに発芽に関する諸調査方法などは前報と全く同じである。

##### 3. 供試薬品

供試薬品類はすべて特級または 1 級 (JIS 規格) 相当の試薬であり、また硝子器具類も硬質のもので、汚染のないよう充分洗滌して用いた。ただしジベレリンは植物生長剤として協和醗酵社より市販のものを、寒天は 1 級品以外に従来使用して来た石津製薬製の細菌培養用のものも比較のため

に使用した。

#### 4. 薬品の効果の判定法

多数の薬品の効果をおおよそではあるが、簡単に判定するために、筆者は岩波(1957)の方法に示唆を得て第1図に示すような簡易判定法を考案して用いた。

すなわち、前記基準発芽床の一端に1%の被検試薬液をしませた濾紙片を置き、これより浸透によって、濃度勾配を生じさせた後、花粉を散布して発芽状況を調査する方法である。この方法によると被検試薬の種々の濃度に対する花粉の影響を容易に判断することが出来る。しかし、この方法では正確な濃度は不明であるので、有効と思考された薬品については、さらにあらためて試験を実施し、有効濃度の決定を行なった。

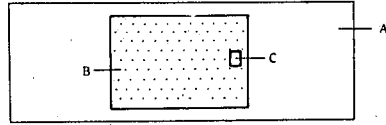


Fig. 1. Method for finding out effect of chemical compounds on germination of pollen. A: Slide glass. B: Agar medium (ca. 40×20×1 mm) with 10% sugar for pollen culture. C: Blotting paper (ca. 3×3 mm) dipped in 1% solution of chemical compounds.

し、この方法では正確な濃度は不明であるので、有効と思考された薬品については、さらにあらためて試験を実施し、有効濃度の決定を行なった。

### III. 実験結果および考察

#### 1. 1級寒天と細菌培養用寒天による基準発芽床条件下における発芽状況の差異

本研究では結果の精密を期するため、基準発芽床の作成に用いる寒天は1級品でなければならぬので、前報での細菌培養用と変更したことによる影響を予め知っておくために、兩種寒天を用いて基準発芽床条件でそれぞれ発芽床を作成し、発芽試験を反覆実施した。第1表はそれらの結果を示したものである。

Table 1. Pollen germination on culture media with two kinds of agar.

Culture media	Pollen	Replication			Mean
		1	2	3	
I <sup>1)</sup>	x	0.0%	0.3%	3.4%	1.2%
	2x	0.9	3.2	2.5	2.2
II <sup>2)</sup>	x	96.8	91.5	83.6	90.6
	2x	83.1	51.8	39.4	58.1

1) I: Basic medium with 10% sugar and 2% agar used for chemical analyses

2) II: Medium with 10% sugar and 2% agar ordinarily used for bacterium culture.

第1表によると、細菌培養用寒天を用いた区は、xおよび2x花粉とも前報と同様良好な発芽率を示しているが、1級寒天を用いた区はほとんど発芽していない。これは極めて興味ある事実であって、レンゲの花粉は化学的に純粋な蔗糖と寒天のみでは、発芽し難いことを示すものと考えられる。なお細菌培養用寒天で発芽が良好なのは、精製が不十分で残存する共雑物質が、花粉の発芽を促したためと考えられる。したがって、1級寒天を使用した以下の実験結果においては、各種化学薬品の発芽促進効果は極めて明確に判定出来るものと思される。

#### 2. 諸化学薬品の発芽促進効果

レンゲの花粉発芽に効果のある薬品を探索するために、従来報告されている促進物質中、第2表に示すような化学薬品を選んで、簡易判定法によって発芽促進効果の有無を調査した。

Table 2. Chemical compounds examined

Inorganic salts	FeCl <sub>3</sub> , SnCl <sub>2</sub> , KCl, NH <sub>4</sub> Cl, MnSO <sub>4</sub> , CoSO <sub>4</sub> , ZnSO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> , CdSO <sub>4</sub> , NiSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .
Amino acid	Alanin, Arginin, Aspartic acid, Cystine, Glutamic acid, Glycine, Histidin, Hydroxy proline, Leucine, Lysine, Methionine, Phenyl alanine, Proline, Serine, Threonine, Tryptophane, Tyrosine, Valine.
Vitamin	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> .
Others	Gibberelline, Colchicine.

その結果、大部分の薬品については、発芽促進効果は認められなかったが、ホウ酸とホウ砂では、濾紙片から約5 mm 以上離れた所で多数の発芽がみられた。これは両薬品が1%の濃度では発芽抑制効果を示すが、それよりやや薄い濃度では顕著な促進効果を示すことを意味するものと考えられる。なお念のために蔗糖液にごく微量のホウ酸を加えて花粉の発芽状況を無添加のものと比較したところ、ホウ酸添加区は花粉を懸滴培用しても非常によく発芽するが、無添加区は全く発芽しなかった。したがってホウ素化合物は多くの研究者が他の植物で指摘しているように (JOHRI & VASIL, 1961), レンゲの x および 2x 花粉に対しても発芽促進効果は顕著であると考えられる。

3. ホウ酸およびホウ砂の促進効果

上記実験で発芽促進効果のみられたホウ酸およびホウ砂について、促進効果の詳細を知るために、1963年には  $1 \times 10^m$  ( $m: -1, 0, 1, 2, 3$ ) ppm および  $5 \times 10^n$  ( $n: 0, 1, 2$ ) ppm の8段階、1964年には  $4^k$  ( $k: 0, 1, 2, 3, 4, 5$ ) ppm の6段階で、それぞれ基準発芽床に添加し、発芽試験を実施した。第2および第3図はホウ酸を使用した場合の発芽率および花粉管の伸長結果を、第4および第5図はその際の発芽状況を示したものである。

第2図によると、x および 2x 花粉はともに1 ppm で促進効果が現われはじめ、10~64 ppm で最高となるが、100 ppm 以上になるとやや抑制的となる。ただし、最適濃度における発芽率は x 花粉はほぼ100%であるのに対し 2x 花粉は約70%にとどまっている。また花粉管長についても第3図にみられる如く、ほぼ同じ傾向を示すが、

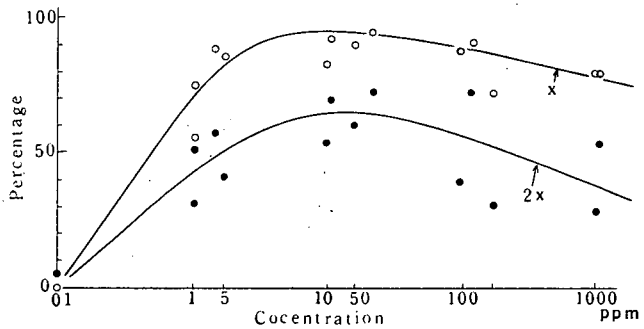


Fig. 2. Percentage of pollen germination on culture media with different concentration of boric acid.

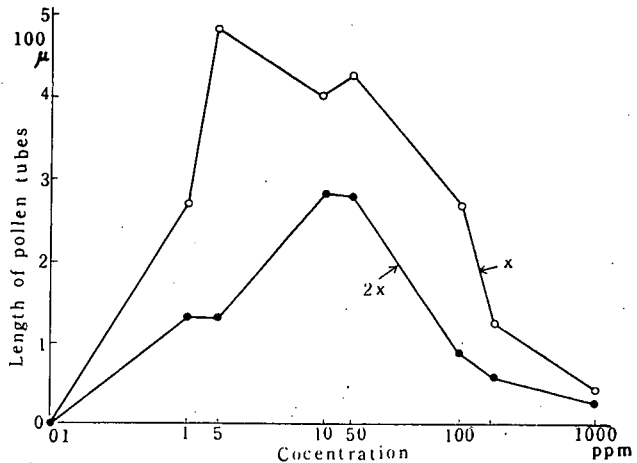


Fig. 3. Length of pollen tubes on culture media with different concentration of boric acid.

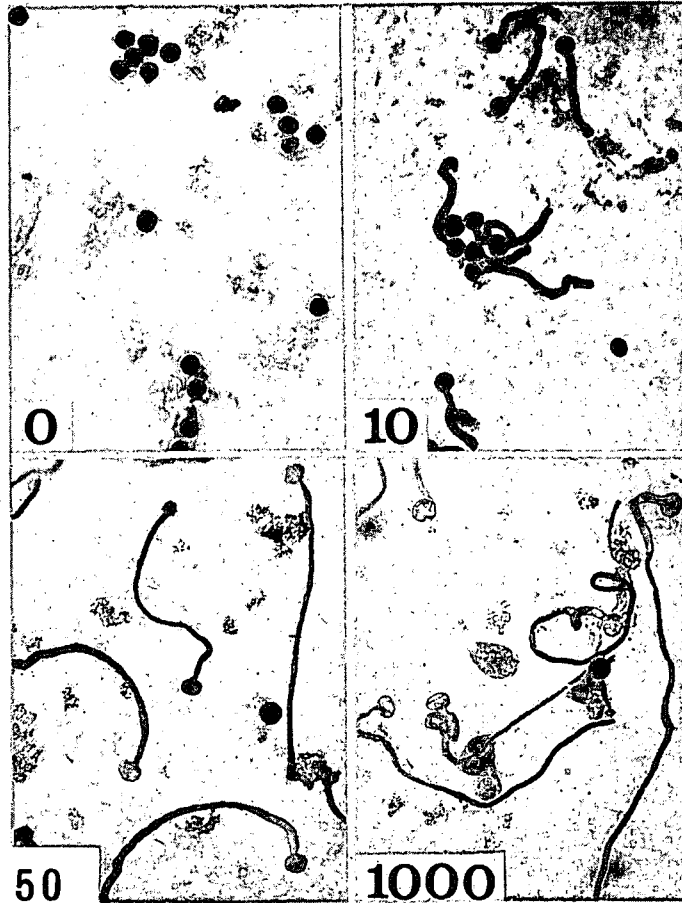


Fig. 4. Germination of haploid pollen on culture media with 0, 10, 50, 1000 ppm of boric acid respectively.

2x 花粉管はつねに多少蛇行し、とくに 100 ppm 以上の高濃度ではその傾向が顕著である（第4, 5図参照）。すなわち、ホウ酸を使用する場合 10~64 ppm が最適と考えられる。

なお、前報で最適発芽条件である細菌培養用寒天 2%, 蔗糖 10%, ホウ酸無添加の発芽床での発芽試験も同時に実施したが、その結果を上記ホウ酸最適濃度区と比較すると、発芽率はほぼ一致しているが、花粉管長は x 花粉 106  $\mu$ , 2x 花粉 64  $\mu$  で、それぞれホウ酸最適濃度の約  $\frac{1}{4}$  にとどまっている。したがって最適濃度のホウ酸添加の基準発芽床は花粉管伸長に対して、前報より改善されたものと云いうる。

ホウ砂については、1964年度のみ実施したが、ホウ酸とほぼ同様で最適濃度も 16~64 ppm であり、JOHRI & VASIL (1961) が多くの植物で 10~150 ppm が最適濃度であるとしているのともよく一致する。

#### 4. 諸化学薬品の花粉管伸長に対する促進効果

ついで発芽に有効でなくても、花粉管の伸長に対し効果のある化学薬品があるかも知れないと考え、ホウ酸 1 ppm を基準発芽床に添加して、前掲の第2表の薬品について簡易判定法によって効果の有無を調査した。その結果、塩化カリ、塩化第2鉄、シスチン、ジベレリンなどの4種は効果ありと判断された。

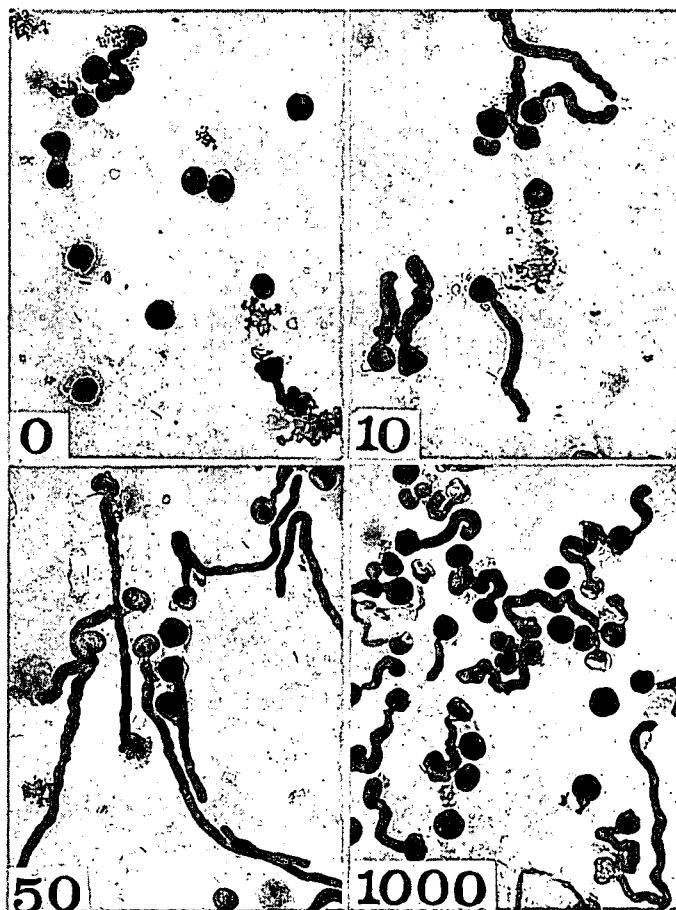


Fig. 5. Germination of diploid pollen on culture media with 0, 10, 50, 1000 ppm of boric acid respectively.

そこで、これらの効果をさらに明確にするために、ホウ酸 1 ppm を添加した基準発芽床にこれらの薬品毎にそれぞれ 0.1~1000 ppm の間、10 倍間隔の濃度で薬品を添加して発芽率と管長との測定を行なった。

第 6 図は塩化カリ、塩化第 2 鉄およびシスチンの結果を図示したものである。同図によるとどの薬品も、x および 2x 花粉の発芽に対して高濃度で抑制効果が認められるが、促進効果は低濃度でも認められない。しかし花粉管伸長に対しては、x 花粉の場合、塩化第 2 鉄の 0.1 ppm、シスチンの 0.1~10 ppm、2x 花粉の場合、塩化カリおよびシスチンの 10 ppm 以下、塩化第 2 鉄の 1 ppm 以下の低濃度で、促進効果が認められる。

また第 7 図はジベレリンの促進効果を調査した結果を図示したものであり、第 8 図はその時の発芽状況を示したものである。

この場合も発芽に対する効果はほとんど認められないが、花粉管の伸長に対しては極めて顕著な効果があり、x および 2x 花粉はともに 10 ppm で対照区の 3~4 倍の伸長量を示す。このような好影響は花粉管の形態にも現われ、ジベレリンを 10 ppm 添加した場合には、2x 花粉においても蛇行した花粉管はほとんど出現せず、x 花粉と見わけがたいほどなめらかである(第 8 図参照)。したがって、ジベレリンの効果は前報の塩化カリ、塩化第 2 鉄、シスチン等の効果よりもはるかに大

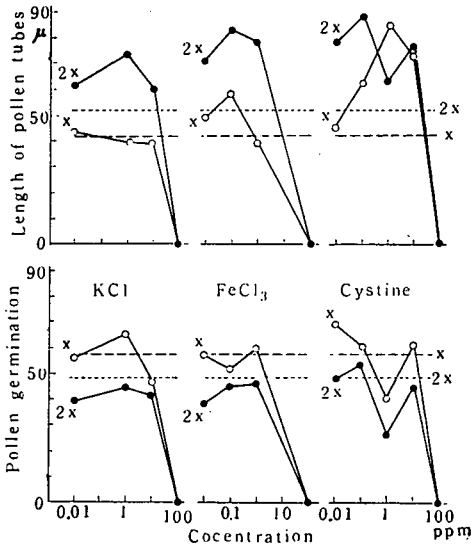


Fig. 6. Percentage of pollen germination and length of pollen tubes on potassium chlorids, ferric chlorids and cystine media of different concentration with 10% sugar, 2% agar and 1% boric acid as the basis of the media. Broken lines stand for germination percentage and tube length on the media as the basis.

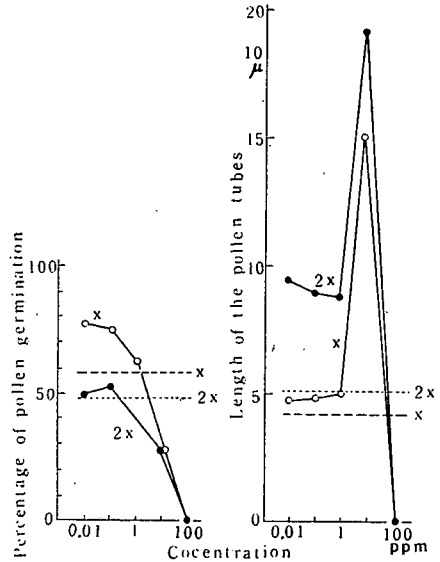


Fig. 7. Percentage of pollen germination and length of pollen tubes on gibberellin media of different concentration with 10% sugar, 2% agar and 1 ppm boric acid as the basis of the media. Broken lines stand for germination percentage and tube length on the media as the basis.

きく、とくに 2x 花粉の培養には欠くことの出来ないものと考えられる。しかし、発芽に対する抑制作用も著しく、管伸長に最も有効な 10 ppm では発芽率は逆に著しく低下していることは、特異な作用として留意すべき事項である。

なお、この点に関し本実験ではホウ酸量が花粉の発芽に対し十分な量でないためとも考えられるので、ホウ酸量を 50 ppm に増量し、ジベレリンを 10 ppm 添加した場合としない場合について発芽試験を行なった。それらの結果は第 9 図に示すようである。

第 9 図によると、x および 2x 花粉ともホウ酸 1 ppm の場合とよく似た傾向を示しているが、ジベレリン無添加区では 2x 花粉管長が x 花粉より劣るにも拘らず、添加区では凌駕している点で異っている。このような現象は従来人が 4 倍体花粉の報告では見当たらない(林, 1966)。

さらにホウ酸濃度の差異によるジベレリン効果の大小を明確にするために、第 7 および第 9 図の測定値について、ジベレリン無添加区を 100 とした比数で添加区を示したものが第 10 図である。

同図によると、ジベレリン添加による発芽抑制効果および花粉管伸長促進効果は、何れもホウ酸 50 ppm 区では 1 ppm 区に比らべ、著しく減少しているが、その傾向は 2x 花粉に比し、x 花粉において顕著である。すなわち、これは 50 ppm 区ではジベレリン無添加区でもホウ酸の作用で、発芽および花粉管伸長はそれぞれ相当程度促進されているためであるが、このような条件下でもジベレリン効果は 2x 花粉に強く現われることを示している。

以上の諸点から、ジベレリンの効果とホウ酸濃度との関係は、なお十分な検討が必要と思われるが、ホウ酸 50 ppm とジベレリン 10 ppm を添加した発芽床は、レンゲの花粉とくに 2x 花粉の培養に際し、従来の発芽床よりも一段とすぐれたものと考えられる。

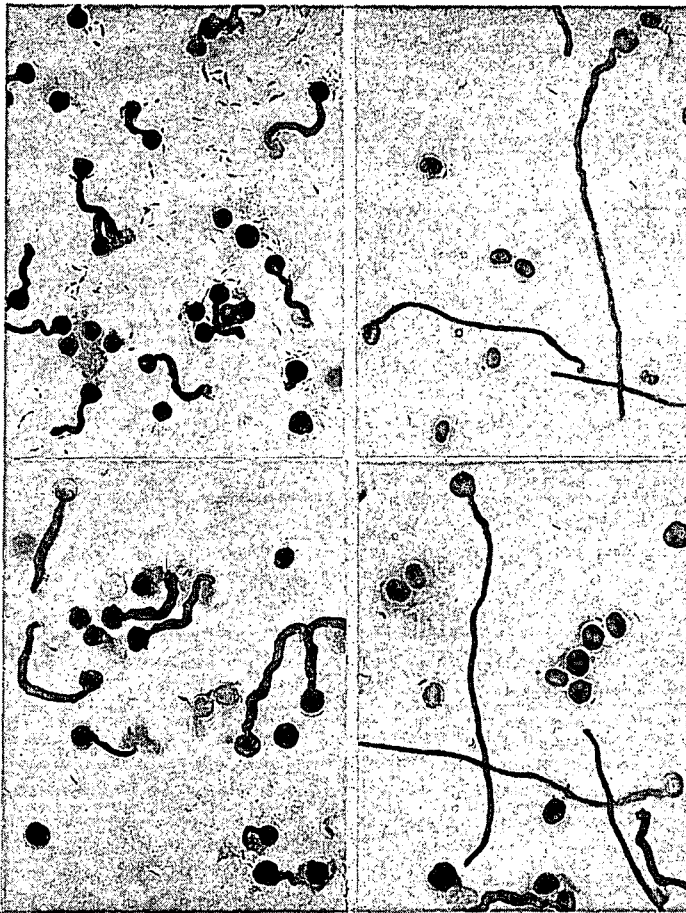


Fig. 8. Germination of pollen on 0, 10 ppm gibberellin media with 10% sugar, 2% agar and 10% boric acid as the basis of the media. Upper row: Haploid pollen. Lower row: Diploid pollen. Left column: 0% gibb. media. Right column: 10% gibb. media.

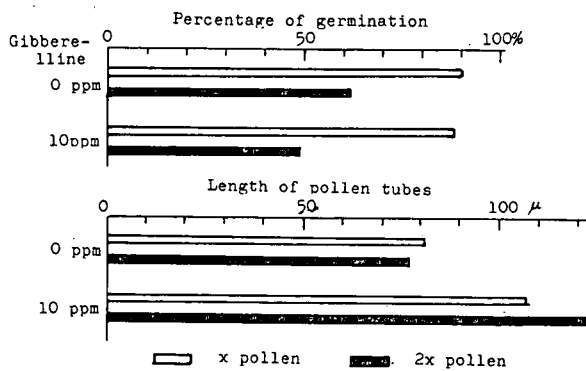


Fig. 9. Percentage of pollen germination and length of pollen tubes on 0 and 10 ppm gibberellin media with 10% sugar, 2% agar and 50 ppm boric acid.

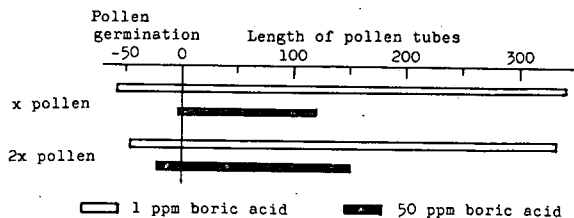


Fig. 10. Effect of 10 ppm gibberelline on 1 and 50 ppm boric acid media.

#### IV. 要 約

前報(1966)において指摘しておいた4倍体花粉の発芽率の低下,花粉管の伸長遅延および蛇行などの異常を軽減するために,花粉の発芽を促進と思われる化学物質36種について,岩波(1957)の方法より示唆をえた簡易判定法によって検討した結果はつぎのとおりである。

1. x および 2x 花粉はともに

- (1) 化学的に純粋な1級寒天2%と蔗糖10%の基準発芽床ではほとんど発芽しない。
- (2) ホウ酸およびホウ砂は1~1024 ppmで,発芽ならびに花粉管伸長に対し促進効果があり,最適濃度は10~64 ppmである。ただし,促進効果の最も著しい場合でも,2x花粉の発芽率は約70%であり,前報以上に高めることは困難である。
- (3) 塩化カリ,塩化第2鉄およびシスチンなどは,下記の濃度で花粉管伸長に対してのみ軽微な促進効果がある。

花 粉	塩 化 カ リ	塩 化 第 2 鉄	シ ス チ ン
x	— ppm	10 ppm	0.1 ~ 10 ppm
2 x	0.01 ~ 10	0.01 ~ 1	0.01 ~ 10

- (4) ジベレリンは10 ppmで花粉管伸長に対して顕著な促進効果があるが,同時に発芽抑制効果を伴う。

2. ホウ酸50 ppmとジベレリン10 ppmを添加した基準発芽床は,2x花粉管がx花粉より長く,蛇行せずに伸長する点で,従来の発芽床より優れた発芽床だと思われされる。

#### V. 引 用 文 献

- 林 喜三郎 1966 レンゲ4倍体の不稔機構に関する研究 III 高知大学学研, 15: 自然科学II第2号  
 岩波 洋造 1957 花粉の生理学的研究 VIII 植雑 70: 144-149.  
 JOHRI, M. & VASIL, I. K. 1961 Physiology of pollen. Bot. Rev. 27. 326-381.  
 KATO, Y. 1955 Response of plant cells to gibberellin. Bot. Gaz. 117: 16-24.  
 LOO, T. L. & HAWANG, T. C. 1944 Growth stimulation by manganese sulphate, Indole-3-acetic acid and colchicine in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot. 31: 356-368.  
 沢田 義康 1958 花粉の生理生態学的研究. VII. 植雑 72: 218-223.  
 高見 順 1956 花粉の生理学的研究. 植雑 69: 128-132.  
 VASIL, K. L. 1960 Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. Amer. J. Bot. 47: 239-247.

(昭和41年5月20日受理)

#### VI. Summary

In the previous report of this series of study (HAYASHI, 1966), it has been shown that



about 30 % of normal pollen of the induced autotetraploid renge are not able to germinate the pollen tubes grow slowly and are occasionally coiled or zigzag in shape on the optimum culture medium. In the present investigation, the effects of chemical compounds (Table 2) on pollen germination have been studied. The results obtained are as follows :

1. The pollen of diploids and tetraploids easily germinate on the medium with 10 % sugar and 2 % agar for ordinarily used for bacterium culture, but germination on the basic medium with 10 % sugar and 2 % agar used for chemical analyse is very poor (Table 1).

2. An addition of 10~64 ppm boric acid or borax to the basic medium promotes the germination and elongation of pollen tubes, but the addition of other chemical compounds do not have any effect (Fig. 2~5).

3. The addition of 10 ppm gibberelline to 1 ppm boric acid medium increases the length of pollen tube drastically, but the rate of pollen germination is reduced by a half (Fig. 7, 8). KCl, FeCl<sub>3</sub>, cystine produce moderate effect on elongation of pollen tube (Fig. 6).

4. On the culture medium with 10 % sugar, 2 % agar, 50 ppm boric acid and 10 ppm gibberelline, the rate of pollen germination in tetraploids is about 50 %, but the pollen tubes elongate well and resemble those of diploids in shape (Fig. 9).

