

レンゲ 4 倍体の不稔機構に関する研究

Ⅲ. 外的諸条件の花粉に及ぼす影響

林 喜 三 郎

(農学部 育種学研究室)

Studies on the mechanism of partial sterility in induced autotetraploids of renga (*Astragalus sinicus* L.)

Ⅲ. Effect of outer conditions on pollen germination.

by Kisaburo HAYASHI

(Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture)

I. 緒 言

第1, 2報(1961, 64)において、レンゲの人為4倍体は花粉稔性が通常90%以上であり、受精時の胚のうちの約60%にも、特別異常がみられないにも拘らず、受精率でわずか15%程度にすぎないことを観察して、外観的に一応正常にみえる雌雄配偶子について、さらに発芽能力または受精能力などの、生殖生理学的研究を行なう必要のあることを指摘しておいた。本報はその一端として、2x花粉の最適発芽条件ならびに、受粉受精過程で支障となるような特異な発芽現象などについて、調査研究した結果の概要を述べたものである。

なお、本研究は1954~55年、京都大学農学部育種学研究室で実施したものである。その間終始懇篤なる指導を賜った前京都大学教授、現愛媛大学学長香川冬夫博士、現京都大学教授赤藤克巳博士に対し、厚く御礼申し上げるとともに、多大の援助を受けた研究室の各位ならびに、実験材料を分譲された農林省北陸農業試験場に深謝する。

Ⅱ. 実験材料及び方法

1. 実験材料

2倍体としては富農選7号種を、4倍体として富農選7号種より育成した自殖第3および第4世代の、染色体数を確認した生育良好な個体をそれぞれ供試した。

2. 発芽床

花粉の発芽床として細菌培養用寒天2%の培地を用い、蔗糖濃度、pH、花粉置床中の温度および時間等は、実験の目的に応じその都度説明するように規定した。なお、pHの調節は苛性ソーダ、第2磷酸ソーダおよびさく酸などによって行ない、その測定は比色法によった。

3. 花粉の採集および散布

各供試個体について、ほぼ同数宛の開花直前の花より花粉を硫酸紙の上に採集し、毛筆で充分攪拌した後、発芽床全面に出来るだけ均等になるよう散布した。

4. 花粉の発芽率および花粉管長の測定

発芽率はコットンブルーで固定染色後、発芽床全面より無作為に選んだ約500粒について、また花粉管長は100~150の花粉管をアツベ氏の描画装置を用いて転写した後、コンパスで測定した。なお調査にあたっては、内容が充実していない花粉は、無能花粉として調査の対象外とした。第1お

よび第2表は参考までに、花粉の大きさおよび個体別の花粉稔性を示したものである。

Table 1. Diameter of pollen in diploid and tetraploid range

Ploidy	Degrees of ocular micrometer*								Total	Means*
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5		
2 x	1	1	261	36	1				300	5.06 ± 0.02
4 x			6	20	91	197	70	2	386	6.40 ± 0.33

* : 1 unit = ca. 3.25 micron

Table 2. Percentage of stainable pollen in diploid and tetraploid range.

Individual No.	2 x	4 x
1	99.3%	82.4%
2	99.3	92.8
3	99.3	95.0
4	100.0	94.7
5	100.0	93.0
6	99.2	81.7
7	92.6	97.5
8	99.4	91.3
Means	98.6	91.0

5. 雌ずいの pH の測定

約30本の雌ずいを1ccの蒸留水に24時間浸漬し、その浸出液のpHを比色法で測定した。なお、検査は3回にわたって反覆実施し、その平均値を用いた。

6. 花粉の発芽能力保持期間の調査法

花粉の貯蔵は硫酸紙に包んだ花粉を、径15mmの試験管に入れ、対照区以外はその底部に第3表の如き吸湿剤あるいは水を入れて湿度を種々に調節して実施した。

これらの貯蔵花粉は、適宜少量宛とり出し発芽率を調査したが、岩波(1964)によると、花粉の寿命を調査する場合、このような方法

では急激な湿度変化をくり返すため、短命になるとしているので、本実験の対照区以外の区では正確な寿命を示すものとは考えられないが、x花粉と2x花粉との比較には差支えないものと思われされる。

Table 3. Chemicals used for alteration of humidity in storecases.

Relative humidity in cases	0 %	30 %	70 %	100 %
Chemicals	CaCl ₂	66 % H ₂ SO ₄	54 % H ₂ SO ₄	Water

III. 実験結果及び考察

1. 発芽に及ぼす諸条件

(1) 発芽所要時間

蔗糖濃度15%、pH5.6の発芽床を用い、約20°Cの室温で、花粉を散布後20、30、40、50、70分で固定染色して、花粉の発芽率および花粉管長を測定した結果は、それぞれ第1および第2図に示すとおりである。

第1図にみられるように、xおよび2x花粉はともに置床後20分頃より発芽し始め、40分頃それぞれ最高に達するが、x花粉は90%以上発芽しているのに対し、2x花粉は約70%であり、残りの約30%は形態的には正常と観察されるにも拘らず発芽しない。この現象はFUNKE(1965)がアルサイクローバーおよびセラデラ、ESKILLSON(1963)がレッドクローバーの4倍体で観察し

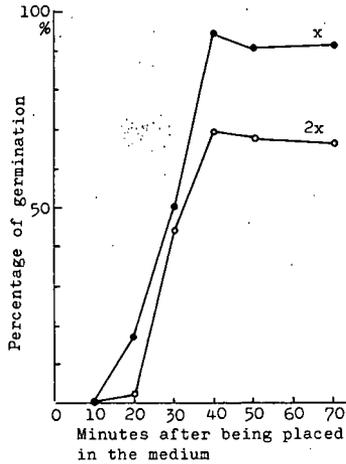


Fig. 1. Percentage of pollen germination in relation to the time after sowing pollen of the artificial culture media.

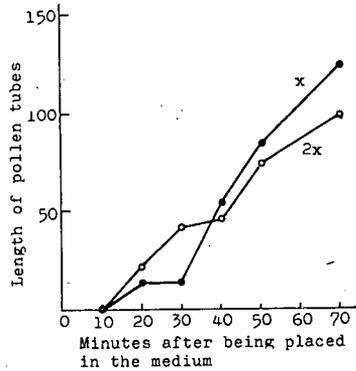


Fig. 2. Length of pollen tubes relation to the time after sowing on the artificial culture media.

た所と一致しており、両氏が指摘するように人為4倍体においては、コットンブルー、カーミンなどの染色法だけで、花粉の発芽力あるいは受精力を推定することは、不確かであることを示すものと考えられる。

一方、花粉管長は、初期には2x花粉の方が優っているが、x花粉が30分頃より急激に伸長速度を増し、40分以降には逆にx花粉の方が優ってくる。このような現象はGREEN (1946) がトウモロコシ、飯塚 (1955) がトウガラシの人為4倍体で報告しているのとはほぼ一致している。

(2) 発芽床の蔗糖濃度

pH 5.6, 蔗糖濃度を0%より40%まで、5%間隔で9段階とした発芽床に花粉を散布し、約20°Cの室温で、1.5時間置床した後の花粉の発芽率と破裂率は第3図に、花粉管長は第4図に示すとおりである。

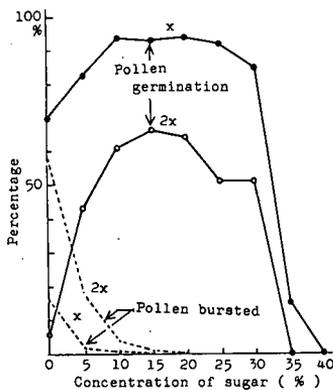


Fig. 3. Percentage of Pollen germination and pollen bursted on culture media with various concentration of sugar.

straight line : Germination of pollen.
Broken line : Pollen bursted.

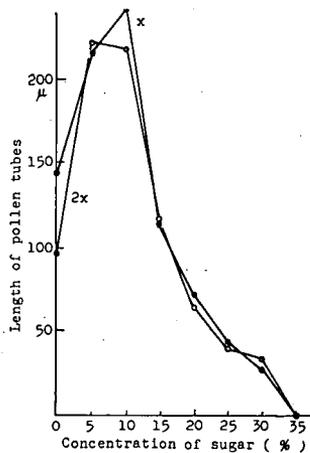


Fig. 4. Length of pollen tubes on culture media with various concentration of sugar.

発芽可能な蔗糖濃度範囲は x 花粉； 0～35%， 2 x 花粉； 0～30%， 発芽率の良好な範囲も x 花粉； 10～25%， 2x 花粉； 10～20%と両者は大体一致しているが， 2 x 花粉の方が高濃度における適応力が劣り， 適応範囲がやゝ狭い。破裂花粉は x 花粉は10%以下， 2 x 花粉は15%以下の低濃度の区に現われるが， 同一濃度では2 x 花粉の方が， x 花粉よりつねに多く， かつ濃度の低下にとともに急激に増加する。花粉管長は x 花粉は10%， 2 x 花粉は 5%および10%が良好である。

以上の結果を総合すると， 花粉の培養条件としての最適蔗糖濃度は， x および 2 x 花粉とも10%と考えられ， 両者の最適濃度が一致しないマクワウリの場合（田中・向井， 1955）とは， やゝ異なっている。

(3) 発芽床の pH

最適 pH を決定するために， 蔗糖濃度を実用的好適濃度と考えられる10%とし， pH を 3～10 と変えて， 約 20° C の室温で置床 1 時間後に調査測定を行なった。発芽率および破裂率は第 5 図に， 花粉管長は第 6 図に示すとおりである。

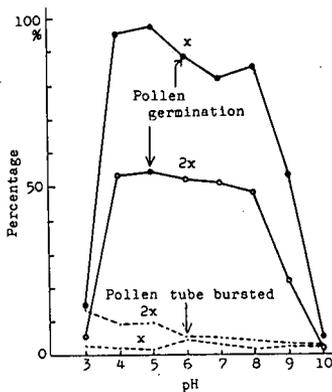


Fig. 5. percentage of pollen germination and pollen tube bursted on culture media with various pH.

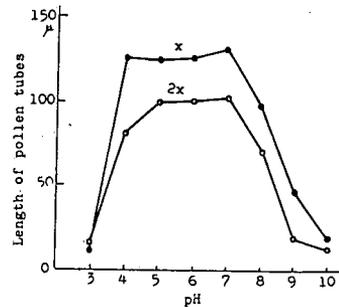


Fig. 6. Length of pollen tubes on culture media with various pH.

x 花粉の発芽率の高い pH は 4 および 5 とかなり酸性側にかたよっているが， pH 6～8 でも発芽はそれほど悪くはない。2 x 花粉は pH 4～8 の間では， 何れも 50% 前後と良好である。破裂花粉は蔗糖濃度が 10% と好適であるためか全般に少ない。花粉管長は x 花粉は pH 4～7 の間では約 130 μ， 2 x 花粉は pH 5～8 の間では約 100 μ とそれぞれ前後の区に比べて良好である。

以上の結果を総合すると， 培養条件としては， x 花粉 pH 4～7， 2 x 花粉 5～7 が好適と考えられ， 両者はほぼ一致し， 両者の最適 pH が一致しないマクワウリの場合（田中・田端， 1953）とは やゝ異なっている。

また雌ずいの pH は 2 倍体 6.7 ± 0.26 ， 4 倍体 6.3 ± 0.32 であり， 両者の差異は僅少でそれぞれ花粉発芽の好適範囲内にあり， 柱頭上での発芽伸長には支障はないものとする。この点については上記のマクワウリの場合ともよく一致している。

(4) 花粉の発芽温度

蔗糖濃度 15%， pH 5.6 の発芽床を用い， 5° C 間隔で 10～40° C の 7 段階の温度のもとで， 発芽させた場合の置床後 1 時間の， 発芽率および花粉管の破裂率は第 7 図に， 花粉管長は第 8 図に示すとおりである。

x および 2 x 花粉はともに本実験範囲内の温度では， すべて発芽可能であるが， 発芽好適範囲は x 花粉は 20～35° C， 2 x 花粉は 25～30° C であり， 2 x 花粉の方がやゝ狭い。花粉管の破裂は両種花粉とも温度の上昇とともに急激に多くなるが， その傾向は 2 x 花粉の方がやゝ著しく， とくに 35° C

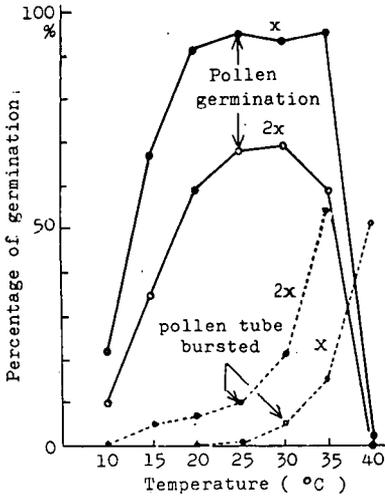


Fig. 7. Effect of temperature on pollen germination and pollen tubes bursted.

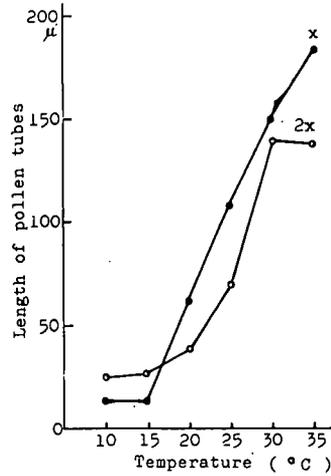


Fig. 8. Effect of temperature on growth of pollen tubes.

では発芽率がかなり高いにも拘らず、花粉管の過半数が破裂する点は注目すべき点である。花粉管長はxおよび2x花粉管とも温度の上昇に伴ない、急速に増大するが、35°Cの2x花粉管が30°Cのそれとほとんど変わらないのは、上記の如き破裂によるためである。

以上の結果を総合すると、花粉の培養条件としては、x花粉は30~35°C、2x花粉は25~30°Cが適温と考えられる。

(5) 発芽能力保持期間

xおよび2x花粉の標記の差異を知るため、貯蔵器内の湿度0, 30, 70, 100%および対照区について、日数の経過に伴う発芽率の低下度および発芽力を失なうまでの日数を調査し、第9図はx花粉、第10図は2x花粉の結果を图示したものである。たゞしこれは寒天2%, 蔗糖10%, pH5.6の発芽床に置床し、20~25°Cの室温下で置床1時間後の結果である。

第9および第10図によると、xおよび2x花粉はともに湿度100%区では貯蔵17日目に、0%区では58日目に発芽しなくなる。また中間の30および70%区では発芽力の保持期間は0%区とほぼ同じであるが、発芽率は湿度の高いほど概して低い。すなわち、xおよび2x花粉はともに湿度の低い

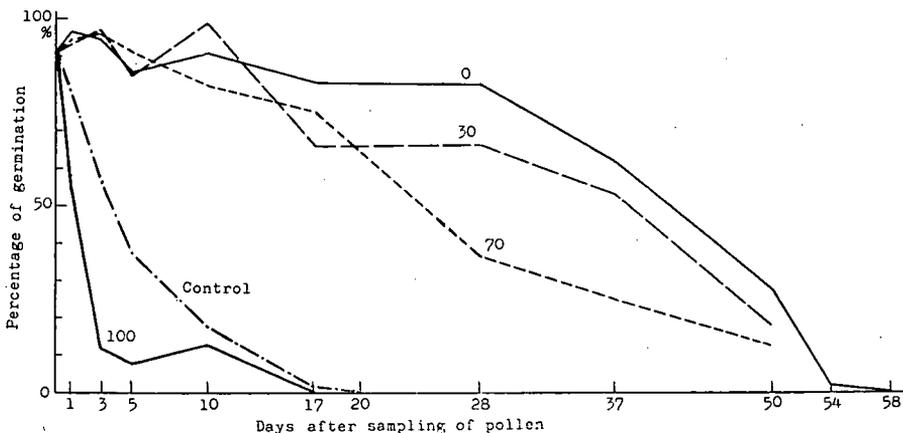


Fig. 9. Germination of haploid pollen stored in various humidity. Numerals stand for relative humidity in storecases.

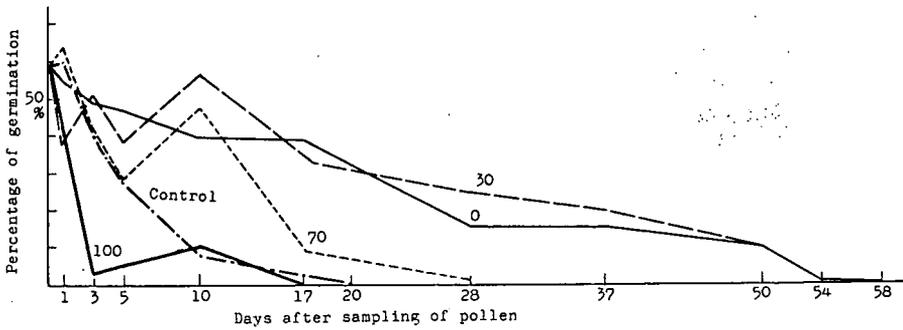


Fig. 10. Germination of diploid pollen stored in various humidity. Numerals stand for relative humidity in storecases.

ほど花粉の寿命は長くなり、従来の研究結果ともよく一致している（岩波，1964）。また対照区の寿命は100%区とほぼ同じであるが、貯蔵1日後の発芽率は採取直後とほとんど変わらない。以上のように湿度の如何を問わず、 x および $2x$ 花粉の寿命はほぼ一致するので、この点から4倍体の不受精原因を見出すことは困難である。

2. $2x$ 花粉にみられる特異な発芽現象

(1) 生理的特異性

以上本実験で調査した諸要素は、何れも花粉の発芽に重要な影響を与えるが、 $2x$ 花粉は最適条件下で培養しても、

- (a) 発芽率は70%どまりであり、残りの30%は形態的に正常であるにも拘らず発芽しない。
- (b) 花粉管の伸長量が小さい。
- (c) 花粉あるいは花粉管の破裂が多い。

(d) 蔗糖濃度および温度変化に対する花粉の発芽、あるいは花粉管の伸長の好適範囲が狭い。等である。

このうち(a)~(c)は従来、*Brassica*, *Sinapis*, *Raphanus*, *Rumex* 属の植物 (SCHWANITZ, 1942), トウモロコシ (GREEN, 1946), レッドクローバー (JULÉN, 1950), テンサイ (望月, 1950), トウガラシ (飯塚, 1955) 等の人為4倍体において指摘された所とよく一致し、人為4倍体に共通の生理的特異性と考えられる。また(d)については従来とくに指摘されていないが、 $2x$ 花粉は環境条件の変化によって影響を受け易いことを意味するものと考えられる。もしも、(a)~(d)にあげた $2x$ 花粉の生理的特異性が、実際の柱頭上でも現われるものとするれば、受精過程でも障害が生じ易く、4倍体の不受精の原因となり得るものと考えられる。

(2) 形態的特異性

第11図は最適条件であるI—(4)項の 25°C の場合の x および $2x$ 花粉管の伸長状況を示したものである。

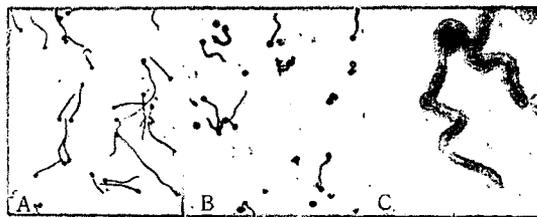


Fig. 11. Tubes of haploid (A) and diploid (B, C) pollen. A and B: ca. $\times 60$. C: ca. $\times 300$.

第11図(B)の2x花粉管のなかには、(A)のx花粉と同じように細く滑らかに伸びるものも一、二認められるが、大部分は太くジグザグに蛇行またはラセン化している(第11図, B, C)。この蛇行あるいはラセン化した花粉管は、発芽条件の良否に関係なくつねに観察される。JOHRI & VASIL (1961) は、(a). 季節外れの花粉, (b). 長期間貯蔵した花粉, (c). 高濃度の発芽床に置床した花粉等において、まれに現われることがあると述べている。しかし、本実験で用いた花粉は上記(a)~(c)の何れにも該当しないので、前項で述べた生理的特異性の形態的な1つと考えられる。なお、田中・向井(1954)がマクワウリの4倍体で報告したような花粉管の多発芽、または分岐などの異常はレンゲの場合はほとんど見られない。

IV. 要 約

レンゲ4倍体における不受精機構の解明に関する生殖生理学的研究の一端として、x および2x花粉の最適発芽条件ならびに発芽状況を比較検討した結果はつぎのとおりである。

1. x および2x花粉の発芽および花粉管伸長に対する最適条件および実用的培養条件はつぎのとおりである。

	花 粉	最 適 条 件		実用的培養条件
		発 芽	花粉管伸長	
蔗 糖 濃 度	x	10 ~ 25%	10%	10%
	2x	10 ~ 20%	5 ~ 10%	10%
pH	x	4 ~ 7	4 ~ 7	4 ~ 7
	2x	4 ~ 8	5 ~ 7	5 ~ 7
温 度	x	25 ~ 35°C	35°C	30 ~ 35°C
	2x	25 ~ 30°C	30°C	25 ~ 30°C

2. x および2x花粉はともに

- (1) 発芽能力のある花粉は置床後40分でほとんど発芽を完了する。
- (2) 発芽好適 pH はそれぞれ自家の雌ずいの pH と一致する。
- (3) 花粉の寿命は湿度の低いほど長い。

3. 2x花粉は最適条件下で培養しても、つぎのような生理的、形態的な特異性を示す。

- (1) 形態的に正常な花粉の約30%は発芽しない。
- (2) 花粉および花粉管は破裂し易い。
- (3) 花粉管の伸長量は小さい。
- (4) 蔗糖濃度、温度変化に対する適応範囲はx花粉より狭い。
- (5) 花粉管の大部分は蛇行またはラセン化する。

4. 上記の特異性は受粉受精過程で障害となり、4倍体の不受精の原因となり得るものと考えられる。

V. 引 用 文 献

ESKILSSON, L. 1963. A method for estimating in autotetraploid plants. *Hereditas* 49: 185-189.
 FUNKE, C. 1956. Vergleichende morphologische und physiologische Untersuchungen am pollen diploider und autotetraploider Kulturpflanzen. *Z. Pflanzenzücht.* 36: 165-196.
 GREEN, J. M. 1946. Comparative rates of pollen tube establishment in diploid and tetraploid maize. *Jour.* 37: 117-121.
 林 喜三郎. 1961. レンゲ4倍体の不稔機構に関する研究-I. 高知大学学術研究報告. 10. II-第11号.

- 林 喜三郎. 1964. レンゲ4倍体の不稔機構に関する研究 II. 育雑. 14 : 112—118.
 飯塚 宗夫. 1955. 人為倍数性植物の稔性に関する研究. III. 育雑4 : 229—232.
 岩波 洋造. 1964. 花粉学大要 181—187. 風間書房.
 JOHRI, B. M. & VASIL, I. K. 1961. Physiology of pollen. Bot. Rev. 27 : 325—281.
 JULÉN, U. 1950. Fertility conditions of tetraploid red clover. I. Hereditas 36 : 151—160.
 望月 明. 1950. 倍数性甜菜の花粉管の伸長. 遺雑. 25 : 233.
 SCHWANITZ, F. 1942. Über die Pollenkeimung einiger diploider Pflanzen und ihrer Autotetra-
 ploiden in künstlichen Medium. Züchter 14 : 273—282.
 田中正武・田端 守. 1953. 甜菜の人為倍数体の研究 II. 生研時報 第6号 : 105—111.
 田中正武・向井輝美. 1954. ————— III. 生研時報 第7号 : 86—93.

(昭和41年5月20日受理)

VI. Summary

In the first and second reports of this series of study (HAYASHI, 1961, '64), we have shown that the reduced number of ovules and high frequency of dropping legumes in the induced autotetraploid range are due to failure of fertilization. In the present report, various conditions necessary for pollen culture and abnormalities of pollen germination in tetraploids are described with the aim of clarifying the causes of failure of fertilization in tetraploid plants.

The conditions suitable for germination and growth of pollen tubes in diploids and tetraploids are shown in the following table.

	Pollen	Suitable range for germination of pollen	Suitable range for growth of pollen tube	Optimum range for pollen culture
Concentration of sugar	x	10 — 25%	10 %	10%
	2 x	10 — 20%	5 — 10%	10%
pH	x	4 — 7	4 — 7	4 — 7
	2 x	4 — 8	5 — 7	5 — 7
Temperature	x	25 — 35°C	35°C	30 — 35°C
	2 x	25 — 30°C	30°C	25 — 30°C

Both the pollen of diploids and tetraploids germinate within forty minutes after being placed in the culture medium, and survive for 58 days in a low relative humidity (0—30%) and for 17 days in a high relative humidity (100%).

In tetraploids, however, the pollen germination is somewhat abnormal: (a) the 30 % of normal pollen are not able to germinate. (b) The pollen grains and tubes burst occasionally. (c) The pollen tubes grow slowly and are occasionally coiled or zigzag in shape on the optimum medium. (d) The ranges of suitable concentration of sugar and temperature for germination are narrow. These abnormalities of pollen germination are considered to contribute substantially to the failure of fertilization in tetraploids.