

レンゲ同質4倍体における花粉の呼吸特性

林 喜 三 郎

(農学部作物・育種学研究室)

Respiratory Properties of Germinating Pollen in the Autotetraploid Renge (*Astragalus sinicus* L.)

Kisaburo HAYASHI

Laboratory of Crop Science and Plant Breeding, Faculty of Agriculture

Abstract : In order to make clear physiological abnormality of pollen from the autotetraploid Renge, respiration pattern of germination pollen from the tetraploid plants was compared with that from the corresponding diploid plants. For studies of respiration the culture medium contained 200 mg glucose and 50 μ g boric acid in 1 ml deionized water. Oxygen uptake was determined manometrically at 30°C in Warburg flasks which contained about 5 mg of pollen fresh weight and 2 ml of culture medium.

Oxygen uptake and pollen tube growth increased constantly till two hours after pollen were placed in culture medium. Average respiration rate of pollen from the tetraploid, 94.3 μ l/hr/10⁶ pollen grains, was much higher than that from the diploid, 40.6. This result indicated that oxygen requirement of pollen from the tetraploid may be greater than that of the diploid during germination and pollen tube growth in the style.

Respiration rate was stimulated by 2,4-dinitrophenol, an uncoupler of oxidative phosphorylation, while it was inhibited by oligomycine, an inhibitor of oxidative phosphorylation, during culturing pollen from both the tetraploid and diploid. Both effects of the stimulation and the inhibition in pollen respiration, however, appeared more weakly in pollen from the tetraploid than from the diploid. It seems likely that ability of oxidative phosphorylation in pollen from the tetraploid are lower than that from the diploid.

緒 言

レンゲの同質4倍体では成熟分裂の異常にもとづき、約40%の配偶子は異数性となるが、残りの約60%は正倍数性である^{1,2)}。この正倍数性の花粉は発芽可能であるが、花粉管には形態的異常や伸長速度の低下などの異常がみられ、生理的にはかならずしも正常でないことがうかがえる²⁻⁴⁾。事実2倍体の花粉によれば、同質4倍体の胚珠の80%以上を受精させうるが、4倍体の花粉ではせいぜいその20%の胚珠を受精させうるに過ぎない²⁾。このように同質4倍体の花粉の管伸長及び受精能力の低下が、低稔性の主要な原因となっており、この花粉の生理的機構の解明が低稔性原因を解明する上で重要と考えられる。

Dickinson はユリ花粉について一連の研究を行ない、花粉の呼吸が酸化的リン酸化反応に強く依存しており、観察された呼吸特性が高エネルギーリン化合物の利用と再合成の能力に密に関連することを示唆している⁵⁻⁸⁾。

本報告は以上の現状と観察から、レンゲ同質4倍体の花粉の生理的異常を解明する端緒とするため、その呼吸特性を2倍体のそれと比較検討した結果の概要を述べたものである。

実験材料及び方法

供試系統は当研究室で保存中の2及び4倍体の各1系統であり、これらはともに岐阜大晩生種より系統分離またはコルヒチン処理後、自殖をくり返した固定系統である。これらの系統を1975年秋播種し、慣例の方法で栽培した個体のうち生育の良いものを選んで供試した。花粉は開花直後の花より採取して直ちに実験に用いた。

花粉呼吸量の測定は、約5mgの花粉と2mlの培養液をワールブルグ検圧計のフラスコに入れ、30°Cで気層は空気とし、10分間の予備振盪後、経時的に酸素吸収量($\mu\text{l}/\text{mg}$ 花粉)を測定した。花粉の培養液には脱イオン水1ml中に、グルコース200mg、ホウ酸50 μg を溶かしたものを基準とし、これに実験の目的により、2,4-ジニトロフェノール(酸化的リン酸化反応の脱共役剤, DNP, 0.1~10ppm)あるいはオリゴマイシン(酸化的リン酸化反応の阻害剤 0.036~3.6ppm)を添加した。

花粉の発芽及び管伸長の観察は、培養液を少量ずつとり出し、顕微鏡下で撮影した写真について、400粒以上の花粉について発芽率を、50本以上の花粉管について管長を測定した。

以上の実験は2回以上の反復を行なったが、本文中ではとくに断らない限りそれらの平均値のみを示した。

実験結果及び考察

1. 花粉の発芽、管伸長と呼吸

2倍体及び4倍体の花粉(2X及び4X花粉)について、5.5時間にわたり基準培養液で培養した場合の花粉の発芽率、管長及び呼吸量を測定した結果はFig. 1のとおりである。

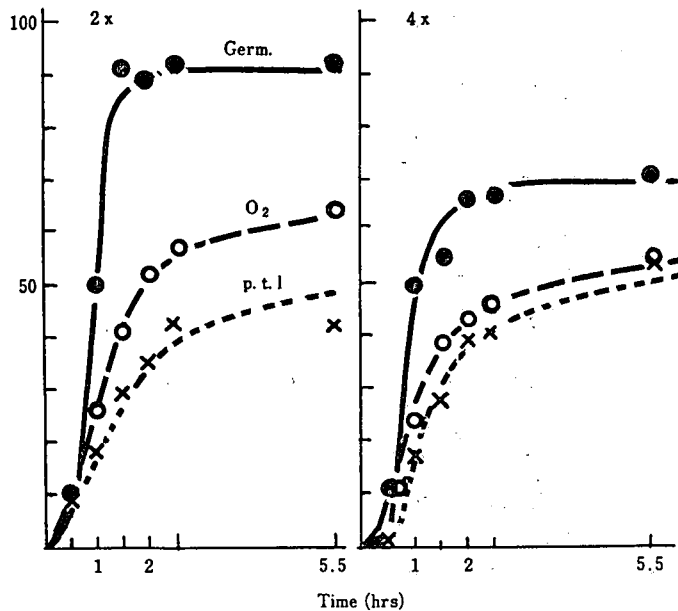


Fig. 1. Pollen tube growth and respiration of germinating pollen. Germ. : Germination of pollen in percent. p. t. l. : Pollen tube length in μm . O₂ : Oxygen uptake in $\mu\text{l}/\text{mg}$ pollen. Each Warburg flask contained about 5 mg pollen and 2 ml of basic culture medium, 200 mg glucose and 50 μg boric acid in 1 ml deionized water.

同図によると、2X 及び 4X 花粉とも 30 分後より次第に発芽を始め、以後急速に発芽率を増加するが、1.5 時間後にほぼ最高値に達した後は横ばいとなる。すなわち、1.5 時間までに発芽可能な花粉は発芽を完了し、その時の発芽率は既報⁹⁾ とほぼ同じように 2X では 90 % 強、4X では 70 % 弱である。一方花粉管長も培養開始 30 分後から増加し始め、時間の経過とともに直線的に増加するが、2 時間以降は増加傾向が次第ににぶってくる。これらの経過は 2X 及び 4X 花粉ともほぼ同じであって既報²⁾ のように 2X 花粉の方が優る傾向は認められない。これは既報の場合寒天の固体培地を用いていることによる培養条件のちがいによるためではないかと考えられる。

花粉の呼吸量は培養開始後から直ちに始まり、以後時間の経過とともに直線的に増加するが、2 時間以後は呼吸量の増加は次第ににぶってくる。これらの経過は前述の花粉管伸長カーブとほぼ一致している。2 時間までの 2X 及び 4X 花粉の平均呼吸速度はそれぞれ 26.0, 21.5 $\mu\text{l/hr/mg}$ 花粉であり、2X 花粉の方が高い。しかし、花粉一粒当りの重量は 4X 花粉 ($2.65 \times 10^{-6} \text{mg}$) の方が 2X (1.55) より重く、また 4X 花粉には約 40 % の異数性花粉を含み、これらは発芽能力を欠くと考えられるので²⁾、それらのことを考慮して同数の花粉粒当りの呼吸速度を算出すると、2X 花粉は $40.6 \mu\text{l/hr}/10^6$ 花粉粒、4X 花粉は 94.3 となり、4X 花粉の方が 2X 花粉よりはるかに高くなる。この値はあくまで推定値であるが、ライ麦、クローバーなどの 4X の根の分裂組織の酸素要求度が 2X のそれより 30~100 % 高いとする Hall⁹⁾ の結果ともよく一致している。このように 4X 花粉の発芽には 2X より多くの酸素を必要とするようであり、実際の花柱及び子房内での花粉管行動に影響していることも考えられる。

なお、本実験では培養 2 時間以降に管伸長や呼吸速度の低下する現象がみとめられたが、Tupy¹⁰⁾, Hrabetova and Tupy¹¹⁾ のリンゴ花粉、Dickinson⁵⁾ のユリ花粉の培養では 2 時間以降も本実験のような低下は認めていない。この理由は植物のちがいによるものであり、レンゲ花粉では本培養条件が必ずしも適当でなかったとも考えられる。また Dickinson は花粉の発芽前と管伸長の盛んな時の呼吸速度はそれらの中間、すなわち多くの花粉が発芽を始めた時期の呼吸速度より高いとしているが、本実験ではこのような現象もキャッチしていない。以上の本実験結果は上記の培養条件の不備や測定時期及び頻度の不備にもよると考えられるので、今後さらに詳細に検討し度い。

2. 2.4 ージニトロフェノール及びオリゴマイシンの呼吸への影響

Dickinson はオリゴマイシンは呼吸を抑制し、DNP は呼吸を促進するだけでなく、オリゴマイシンの抑制効果を除去する作用のあることを報告し、花粉の呼吸が酸化的リン酸化反応と密接に関連することを示唆している⁷⁾。そこで、本研究でも 4X 花粉におけるこれらの点を検討するために、DNP やオリゴマイシンを培養液に添加して呼吸量の変化を調査した。

まず、DNP 及びオリゴマイシンを培養当初より培養液に加えた場合の 2 時間後の呼吸総量を示したのが Table 1 及び 2 であり、同表の単位時間当たり平均呼吸量を無添加の場合を 100 とした比数で図示すると Fig. 2 及び 3 のとおりである。

これらの図表によると、DNP は 2X 及び 4X 花粉の呼吸量を増加させ、その効果は 1 ppm 区で最も強く現われる。しかしこの促進効果は 4X では 2X ほど著しくない。オリゴマイシンは DNP とは逆に 2X 及び 4X 花粉の呼吸量を減少させ、その効果は 0.36 ppm で最も顕著であるが、この場合も抑制効果は 4X 花粉では 2X 花粉ほど著しくない。

以上の DNP やオリゴマイシンの効果をさらに確認するために、それぞれ効果のもっとも著しい濃度 1 ppm 及び 0.36 ppm を用い、培養開始後 30 分で添加した場合の呼吸量の変化を追跡した結果は Fig. 4 のとおりである。

Table 1. *Effect of 2,4-dinitrophenol on oxygen uptake of germinating pollen*

Ploidy	DNP ppm	O ₂ uptake in $\mu\text{l}/2$ hrs/mg pollen			Average respiration rate
		I	II	III	
2x	0	—	46.0	45.3	22.8
	0.1	43.1	—	54.2	24.5
	1	56.5	67.7	59.3	30.6
	10	33.4	—	36.9	17.6
4x	0	42.4	32.4	39.2	19.0
	0.1	—	—	—	—
	1	49.0	49.0	42.2	23.4
	10	35.2	—	—	17.6

Each flask contained about 5 mg pollen and 2 ml of basic medium with 0–10 ppm DNP. Average respiration rate are presented in $\mu\text{l}/\text{hr}/\text{mg}$ pollen.

Table 2. *Effect of oligomycine on oxygen uptake of germinating pollen*

Ploidy	Oligo- mycine ppm	O ₂ uptake in $\mu\text{l}/2$ hrs/mg pollen					Average respiration rate
		I	II	III	IV	V	
2x	0	42.2	46.0	—	50.1	50.4	23.6
	0.036	47.0	52.5	16.5	58.4	—	19.3
	0.36	16.2	—	25.6	24.6	25.3	11.5
	3.6	32.1	—	33.3	44.9	—	18.4
4x	0	—	32.4	—	43.8	39.2	19.2
	0.036	35.5	33.5	35.3	42.3	—	18.3
	0.36	33.0	—	35.4	33.7	27.8	16.2
	3.6	38.1	—	32.6	45.4	—	19.4

Culture medium is the basic medium with 0–0.036 ppm oligomycine. The other explanation are shown in Table 1.

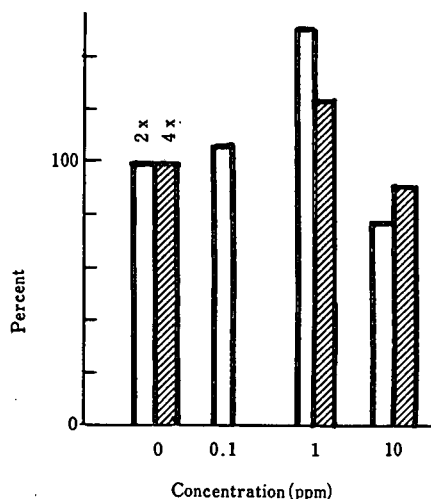


Fig. 2. Stimulation effect of 2,4-dinitrophenol on respiration rate of germinating pollen. Vertical axis shows respiration rate as percent of control plot whose rate are presented in Table 1.

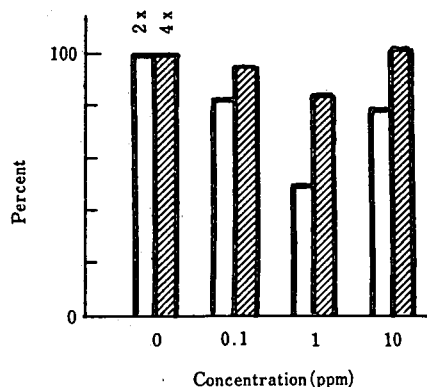


Fig. 3. Inhibition effect of oligomycine on respiration rate of germinating pollen. Vertical axis shows respiration rate as percent of control plot whose rate are presented in Table 2.

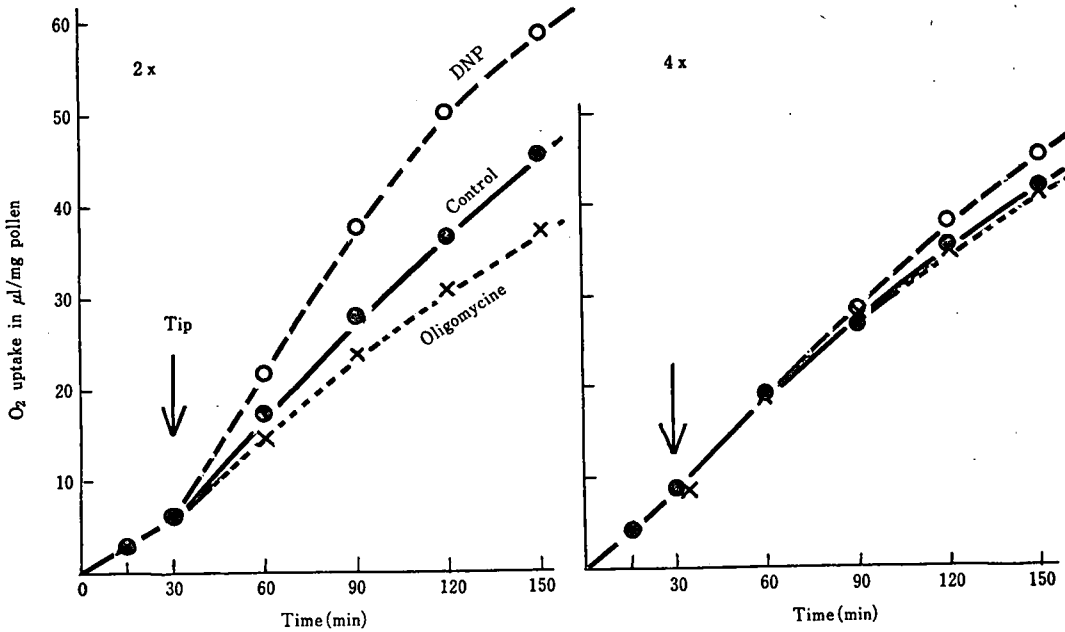


Fig. 4. Stimulation effect of pollen respiration by 2,4-dinitrophenol and inhibition effect by oligomycin. The main compartment of each control flask contained about 5 mg pollen and 2 ml of basic culture medium of which 0.5 ml was placed in the side arm. Other flasks had the same contents plus the following additives. DNP treatment: 25 µg DNP in the side arm to give 1 ppm after tipping. Oligomycin treatment: 0.9 µg oligomycin in the side arm to give 0.36 ppm.

同図から明らかなように、DNPの促進効果とオリゴマイシンの抑制効果は添加後直ちに現われ、しかもそれらの両効果は2Xでは強く、4Xでは微弱であることが再確認された。

Dickinson は花粉の発芽前後の呼吸速度の差異は花粉管の発芽、伸長に必要なRNA、タンパク、セルローズ、カロースなどを合成するためのATPの利用程度の多少と、花粉内外からの基質供給量の多少との関係によるものであろうとしている³⁾。本実験では発芽前後の呼吸速度の差異は認められなかったが、レンゲの4X花粉の発芽、管伸長には当然同様の現象が生じていると考えられる。したがって、4X花粉ではDNPやオリゴマイシンの呼吸速度に対する効果が微弱にとどまった本実験結果は、酸化的リン酸化の反応経路に何らかの機能低下のあることを示すものであろう。このことは前項で指摘した酸素要求度の高いことと共に、4X花粉の呼吸代謝過程の異常をうかがわせ、管伸長あるいは受精能力低下につながるのではないかと考えられる。

要 約

同質4倍体の花粉の生理的な異常機構を解明する端緒として、花粉の呼吸特性を検討した。

ワールブルグ検圧計のフラスコに約5mgの花粉と2mlの培養液(1mlの脱イオン水中、200mgグルコース、50µgホウ酸)を入れ、30°Cで5.5時間まで経時的に酸素吸収量を測定した。2時間までは花粉管長、呼吸量とも一定の割合で増加するが、この間の4X花粉の平均呼吸量は10⁶個花粉当り94.3µl/hr₅であって、2X花粉のそれ、40.6、より著しく高く、4X花粉の発芽及管伸長により多くの酸素を要求することが明らかにされた。つぎに上記の培養液に2,4-ジトロフェノール及びオリゴマイシンを添加した場合には、前者では呼吸の促進、後者では呼吸の抑制効果

がみられるが、それらの効果は 4X では 2X に比らべ微弱であった。このことより 4X では呼吸における酸化的リン酸化反応の機能の低下が予想される。

以上のように 4X 花粉では、生理的な異常機構として、花粉の呼吸代謝での異常があげられ、これが花粉の受精能力の低下をもたらす要因の一つと考えられる。

引用文献

- 1) 林喜三郎・森沢徹男, レンゲ同質 4 倍体子孫における異数体頻度の推定. 高知大学研報, 26, 農 No. 13 (1977).
- 2) ———, レンゲの人為同質 4 倍体における稔性低下機構の解明に関する研究. 高知大農紀要, No. 28 (1974).
- 3) ———, レンゲ 4 倍体の不稔機構に関する研究—III, 高知大学研報, 15, 自然科学 No. 2 (1966).
- 4) ———, ———— —IV, 高知大学研報, 15, 自然科学 No. 3 (1966).
- 5) Dickinson, D. B., Germination of lily pollen: Respiration and tube growth. *Science*, 150, 1818-19 (1965).
- 6) ———, The relation between external sugars and respiration of germinating lily pollen. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, 88, 651-56 (1966).
- 7) ———, Inhibition of pollen respiration by oligomycine. *Nature*, 210, 1362-63 (1966).
- 8) ———, Permeability and respiratory properties of germinating pollen. *Physiol. Planta.*, 26, 118-27 (1967).
- 9) Hall, O., The effect of polyploidization on the structure and function of the root meristem. *Hereditas*, 71, 145-50 (1972).
- 10) Tupy, J., Radiorespirometric study of the utilization of exogenous sucrose, glucose and fructose by germinating apple pollen. *Biol. Plant.* 4, 69-84 (1962).
- 11) Hrabetova, E. and J. Tupy., Respiration of apple pollen on different sugar substrates and the problem of the rule of sucrose in pollen tube growth. *Biol. Plant.*, 3, 270-76 (1961).

(昭和54年9月28日受理)

(昭和55年2月12日発行)