

和ナシ花粉の発芽生理に関する研究

田 辺 賢 二*・林 真 二・平 田 尚 美

(鳥取大学農学部園芸学研究室)

Physiological Studies on Germination of Japanese Pear Pollen (*Pyrus serotina* R.)

Kenji TANABE, Shinji HAYASHI and Naomi HIRATA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tottori University)

The possibility of practical use of stored pollen for the artificial pollination of Japanese pear was investigated from 1966 to 1967.

Investigations were conducted to clear some of the physiological phases of pollen germination.

In Japanese pear pollen, there were five sugars such as sucrose, glucose, fructose, xylose and unknown sugar (may be maltose), the sucrose content was significantly larger as compared with the others.

In 12 kinds of carbohydrates added in agar media, better germination and tube growth were obtained with sucrose or maltose. Whereas fructose completely inhibited germination in spite of being contained in the pollen.

The effects of different boric acid levels upon pollen germination and tube growth were examined in the presence or absence of sucrose.

When boric acid was included in the medium, best germination and tube growth were obtained with 10% sucrose, and also obtained were considerably germination and tube growth even in the absence of sucrose.

Furthermore, the boric acid stimulated the invertase activity of pear pollen remarkably.

From the results presented here, it was suggested that the boric acid stimulated the germination and tube growth of Japanese pear pollen, and its effects might be due to the sugar metabolism in pollen grains.

緒 言

果樹栽培に強力な農薬が頻繁に使用されるようになってから、訪花昆虫が著しく減少し、また一方では栽培の集約化によって、品種の単一化が強く進められてきた。そのため今日では、自然交配による結実安定が望めず、人工授粉が必須の作業となっている。

しかし労働力不足から、種々の肥培管理作業が省力化されつつある。人工授粉においても、花粉採取ならびに調製の労力を省くために、花粉供給施設を設置し、貯蔵花粉を利用しようとする動きがある。

本研究は貯蔵花粉の合理的利用に関係して、行なった

ものである。実験遂行に際し、多大の御教示と援助をいただいた農学科植物病理学研究室、西村正賜助教授に心からお礼申し上げる次第である。

実験材料および方法

1966, '67年、鳥取市面影の旧農学部果樹園、および園芸実験ほ場で採取した日本ナシ、八雲・晩三吉・二十世紀および長十郎の花粉を供試した。

花粉の含有糖分量は、80%エタノールで抽出した後、Somogyi法により定量を行ない、また糖類は、蒸留水で煮沸抽出を行なった後、PPC(展開液、ブタノール:

*附属砂丘利用研究施設

酢酸：水=4：1：2) によって調べた。

糖の種類と発芽の関係は、五炭糖、六炭糖および多糖類から数種ずつ選び、合計12種類の糖を供試した。それぞれの糖について、0.3Mol 加用1%カンテン培地を調製し、これに花粉を置床し、温度25℃、関係湿度100%に4時間保った後、染色固定を行なって発芽率と花粉管の長さを調査した。べつに sucrose, glucose および fructose の濃度と発芽との関係を調査した試験でも、同様な方法を用いて行なった。

花粉の発芽に伴う培地中の sucrose の消長は、10% sucrose 溶液培地と、10% sucrose 加用カンテン培地とについて調べた。すなわち溶液培地においては、液面に花粉を散播した後、25℃に保温し、経時的に培養液と花粉を採取して、Somogyi 法による還元糖、非還元糖の定量と花粉管の長さを測定した。またカンテン培地においては、花粉を置床後経時的に培地を80%エタノールに浸漬して糖の抽出を行ない、PPC によって sucrose の消長を調べた。

Boron と花粉の発芽の関係は、ホウ酸 (H_3BO_3) の濃度を 10, 100, 250 および 500ppm とし、これと濃度が 0, 10, 20, 25, 30% の各 sucrose 濃度とを組合せた1%カンテン培地を調製し、花粉の発芽率ならびに花粉管の伸長の状態を調査した。

Boron が花粉中の invertase 活性におよぼす影響は、10% sucrose を基質とし、これにホウ酸 (H_3BO_3) 濃度が 200ppm になるようホウ酸を加え、さらに花粉1, 水10の割合で破碎抽出を行なった粗 invertase 液を加えて反応させ、生成される還元糖を経時的に定量することによって調べた。

なお新鮮花粉と貯蔵花粉の invertase 活性の比較も、上記の方法に準じて行なった。

ホウ酸溶液に浸漬処理を行なった花粉増量剤のナシ石細胞粉末の、花粉発芽におよぼす効果は、花粉1に対し増量剤5の割合で混合し、10% sucrose 加用1%カンテン培地に置床して調査した。

実 験 結 果

1. 花粉の発芽と糖の関係

八雲の花粉について、その糖組成を調べた結果は、Table 1 および Fig. 1 に示すとおりであった。花粉に含まれる糖の大部分が非還元糖で占められ、還元糖は比較的少なかった。一方新鮮花粉と貯蔵花粉とを比較してみると、貯蔵花粉ではやや還元糖が増加する傾向がみられた。これらの糖の種類を PPC によってみると、

sucrose, glucose, fructose, xylose の4種が確認され、また Rf 値の最も低い部分の糖は未確認であるが、おそらく maltose と思われ、計5種類の糖が含まれていることが認められた。

Table 1. Soluble sugar contents in fresh pollen and stored pollen (Yakumo pear)

Pollen	Total sugar(%)	Reducing sugar(%)	Non-reducing sugar(%)
Fresh	17.3	3.8	13.5
One year stored	17.0	4.5	12.5

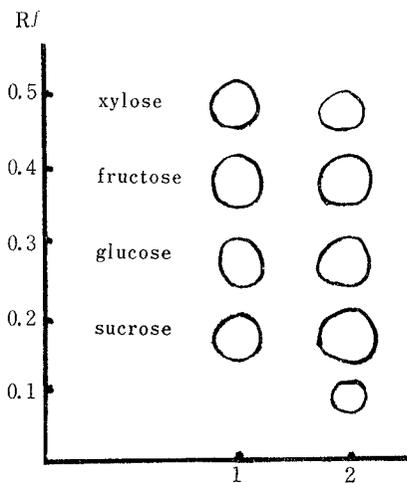


Fig. 1. Paper chromatogram of sugars from the pollen of Yakumo pear.

1 : standard 2 : mature pollen

つぎに培地の糖の種類と、二十世紀花粉の発芽との関係を table 2 に示す。発芽率ならびに花粉管の伸長は、sucrose において最も良好であり、ついで maltose であった。また六炭糖類の glucose, galactose において、やや良好な発芽が見受けられた。一方花粉の中には fructose が含まれているにもかかわらず、fructose の培地では、発芽が全く認められなかった。五炭糖類では xylose と arabinose において、また多糖類では starch において、それぞれ発芽がみられたが sucrose には、はるかにおよばなかった。

他方 sucrose, glucose および fructose の三種類の糖について、それらの濃度と発芽の関係をみた結果、Fig. 2~Fig. 4 のとおりであった。

Table 2. Effects of different carbohydrates upon pollen germination and tube growth (Nijisseiki pear)

Carbohydrate	Germination(%)	Tube length(μ)
xylose	19.0	103.5
ribose	0	0
arabinose	28.5	232.0
glucose	41.6	328.0
galactose	42.4	181.0
mannose	7.0	59.2
fructose	0	0
sucrose	75.5	675.2
maltose	66.0	403.2
ramnose	17.1	25.2
starch	32.5	262.0
pectin	0	0

All cultures were grown 1% agar with 0.3 Mol carbohydrate for 4 hours at 28°C.

まず sucrose についてみると、5~25%で良好な発芽がみられ、特に10~15%で最高の発芽率を示した。また30%の濃度になると著しい発芽率の低下をみた。花粉管の伸長は5%において最もよく、それ以上では sucrose の濃度が高くなるにしたがい、伸長がおさえられ、特に20%以上では著しい伸長抑制がみられた。

glucose 培地においては、1~16%において良好な発芽率を示し、また花粉管の伸長は1~10%で良好であり、16%以上になると著しくおさえられた。

一方 fructose の培地における発芽状態をみると、1%の濃度において、やや良好な発芽が認められたが、それ以上の濃度では、全く糖を含まない培地におけるよりも、発芽率、花粉管の伸長のいずれも著しく抑制された。

つぎに花粉の発芽に伴う培地の sucrose の消長を示すと Fig. 5 および Fig. 6 のとおりである。発芽の開始とともに培地に還元糖の生成がみられ、特に置床3時間後からの生成が急速であった。一方これとは逆に sucrose は時間の経過に伴って減少していった。

また花粉管の伸長をみると、還元糖の比較的少ない、置床後3時間ごろまでは著しい伸長を示したが、その後は緩慢な伸長となり、花粉管の先端から内容物を吐出すものも多数みうけられた。これは fructose の培地においてみられた状態ときわめて類似していた。

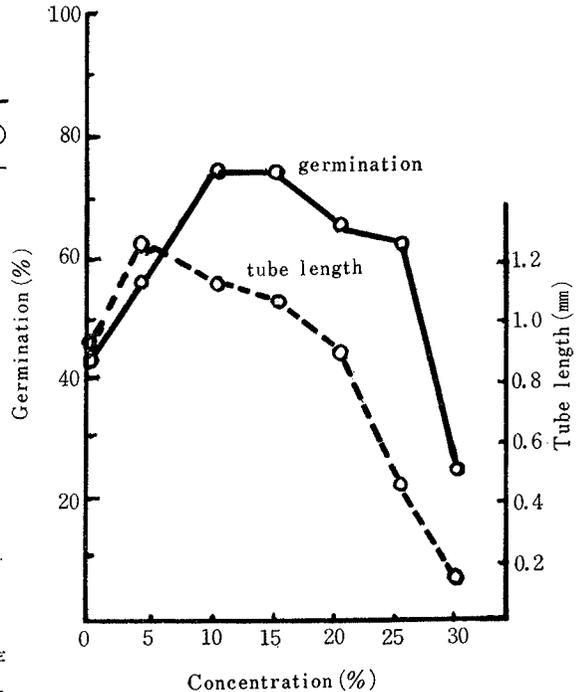


Fig. 2. Effects of sucrose concentration on pollen germination and tube growth (chojuro pear).

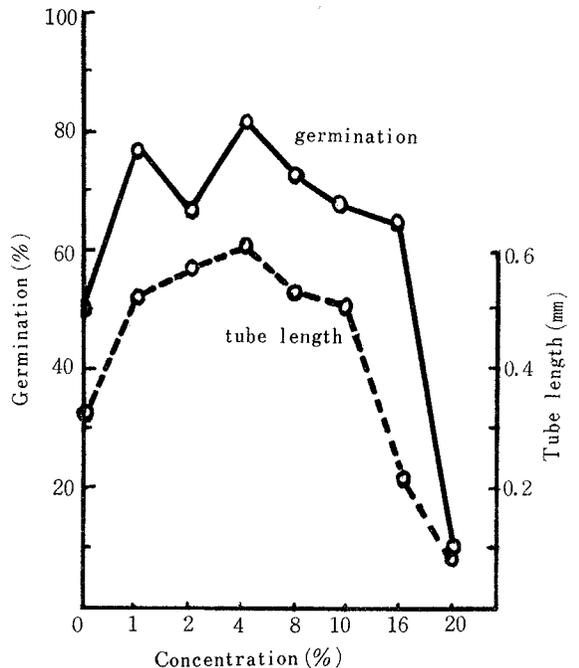


Fig. 3. Effects of glucose concentration on pollen germination and tube growth (chojuro pear).

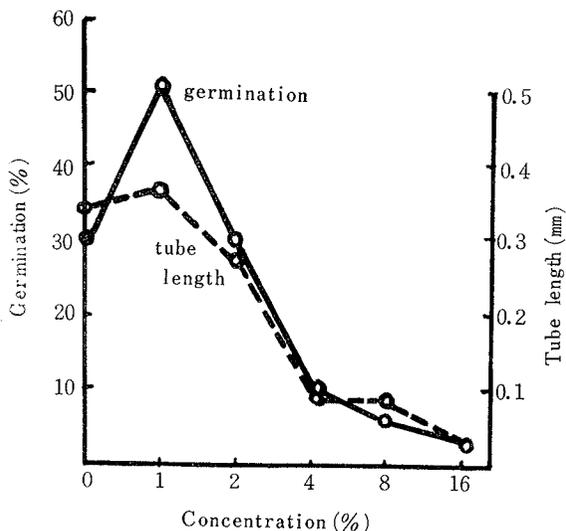


Fig. 4. Effects of fructose concentration on pollen germination and tube growth (chojuro pear).

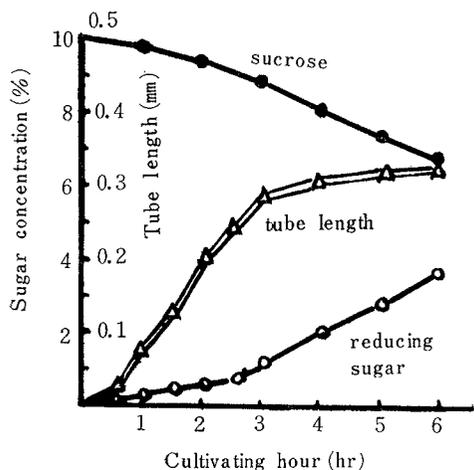


Fig. 5. Changes of sugar in the sucrose medium following the germination of Yakumo pear pollen.

2. 花粉の発芽と Boron の関係

各種の濃度の sucrose 培地における発芽に対して、Boron の効果をみたところ、Fig. 7 および Fig. 8 の結果を得た。発芽率についてみると、sucrose 0%では発芽率が10%と、きわめて低率であるが、ホウ酸が10ppm 加わることにより、約60%に上昇し、sucrose の含まれない培地においても Boron の花粉発芽におよぼす効果の著しいことが認められた。また sucrose の濃度が20

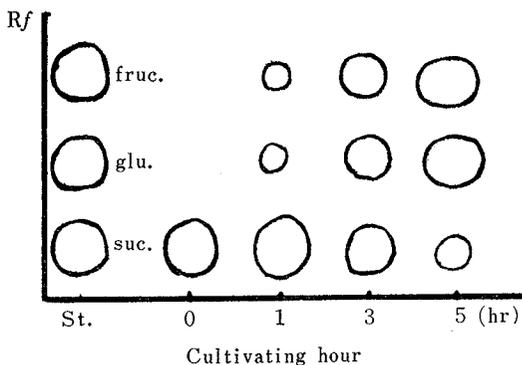


Fig. 6. Changes of sugar in the sucrose agar media following the germination of Yakumo pear pollen.

※以下の状態では、20~35%発芽率が上昇し、濃度が25%以上になると低濃度のホウ酸では発芽促進はみられず、高いホウ酸濃度ほど発芽率が高まった。他方花粉管の伸長に対する Boron の効果をみると、sucrose の濃度が0~20%の範囲では、Boron によって著しく伸長が促進された。

しかし 25~30%の高い sucrose 濃度のもとでは、何ら促進的な効果は認められなかった。

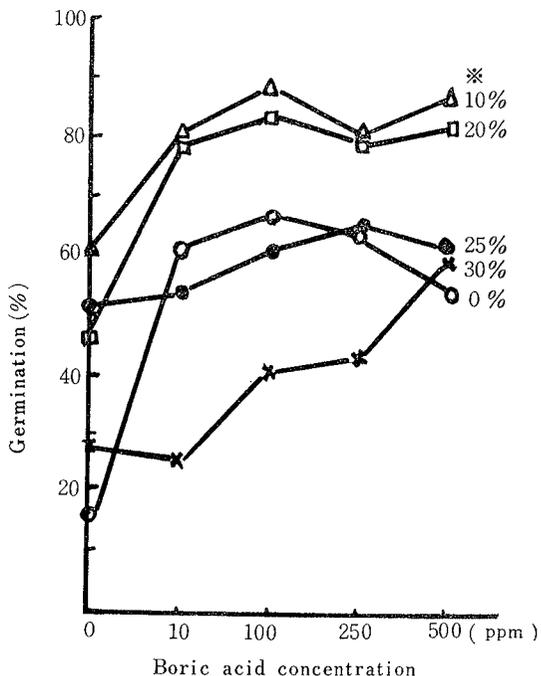


Fig. 7. Okusankichi pollen germination in the agar media with various combination of sucrose and boric acid concentration.

*sucrose concentration

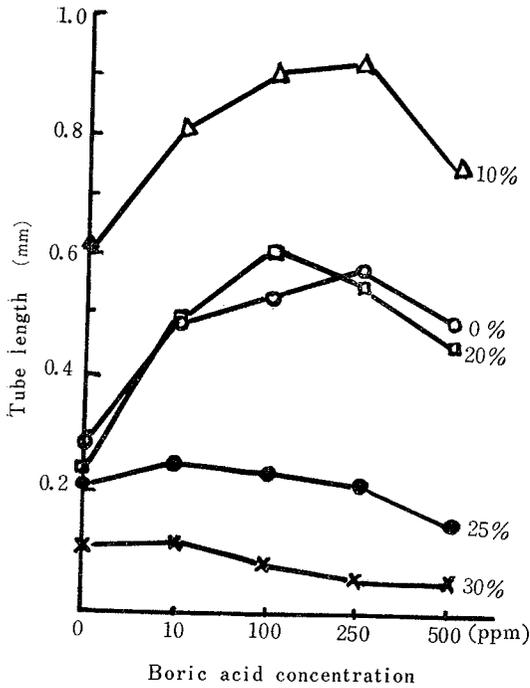


Fig. 8. Okusankichi pollen tube growth in the agar media with various combination of sucrose and boric acid concentration

つぎに花粉の invertase 活性におよぼす Boron の影響をみたところ Fig.9 の結果を得た。すなわち基質に200ppm のホウ酸を加えることにより、還元糖の生成量が、無てん加のものに比べて約2倍となり、Boronが花粉の invertase 活性を高めていることが認められた。

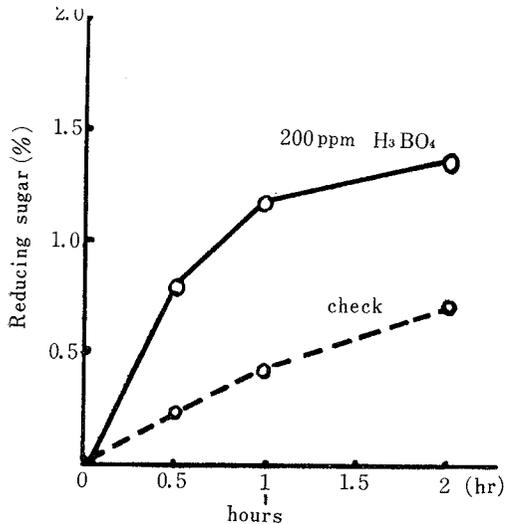


Fig. 9. Effect of boric acid on invertase activity of Yakumo pear pollen.

3. 貯蔵花粉の活性化に対する Boron の利用

貯蔵花粉と新鮮花粉の活力を、花粉管の伸長速度ならびに invertase 活性について比較した結果, Fig.10 および Fig.11 を得た。花粉管の伸長は新鮮花粉に比べ、貯蔵花粉のそれがきわめて緩慢であり、また invertase 活性も貯蔵花粉は新鮮花粉の50%以下に低下していた。

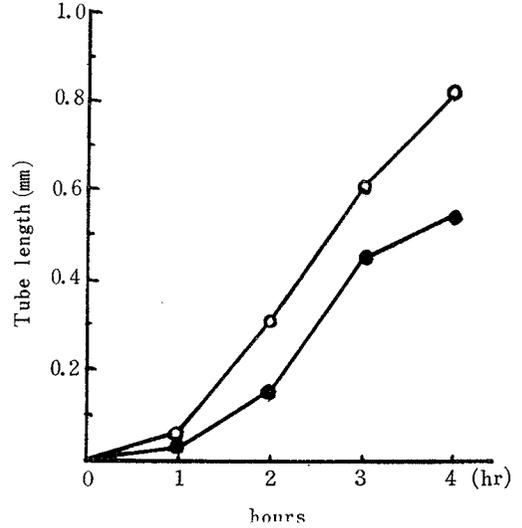


Fig. 10. Tube growth of fresh pollen and stored pollen. (Yakumo pear).
○ fresh pollen
● one year stored pollen

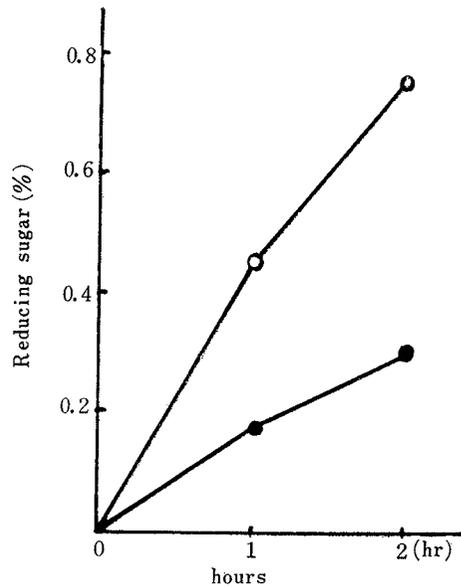


Fig. 11. Invertase activity in fresh pollen and stored pollen. (Yakumo pear)
○ fresh pollen
● one year stored pollen

したがって、1年間の貯蔵によって発芽率そのものには、大きな変化がみられなくても、活力いわゆる発芽勢がかなりおとろえていることが認められる。

つきに、貯蔵花粉の発芽促進に対する Boron の効果を示すと Table 3 および Fig. 12のとおりである。採取調製後1月の間、室内に放置し、その後冷蔵庫に1年間貯蔵したところの、ほとんど発芽能力を失なった花粉でも、Boron によってかなり発芽をみる事ができた。新鮮花粉と発芽率のほとんど変わらない貯蔵花粉については、Boron によって、新鮮花粉に近い発芽勢を回復することが知られた。他方人工授粉の際の花粉増量剤としてのナシ果実石細胞の粉末に Boron を含ませた場合にも、Table 4 のように貯蔵花粉の花粉管伸長が著しく促進されることが認められた。

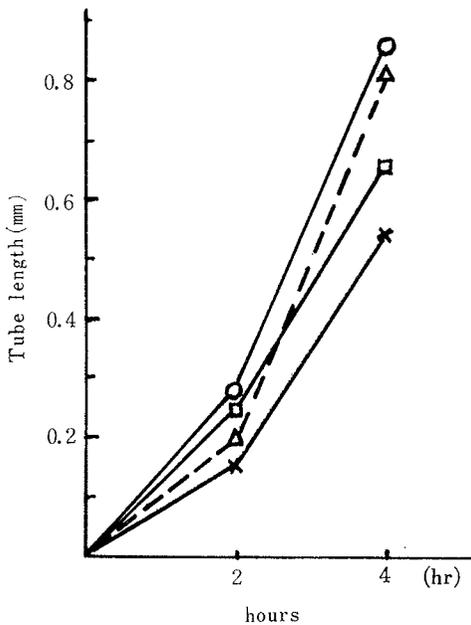


Fig. 12. Effect of boric acid on tube growth of stored pollen. (Yakumo pear)

- : Fresh pollen
- △ : Stored pollen added 500ppm boric acid
- : Stored pollen; 200ppm
- × : Stored pollen; 0ppm

Table 3. Effects of boric acid concentration on the germination of stored pollen*

Concentration of boric acid (ppm)	Germination (%)
0	4.4
100	8.0
200	10.6
500	12.0

*The Nijisseiki pollen which was stored in refrigerator for one year and left for one month in room temperature.

Table 4. Effects of stone cell powder treated with various boric acid concentration tube growth of stored pollen (Yakumo pear).

Concentration of boric acid (ppm)	Tube length (μ)
0	105
100	254
250	295
500	330

考 察

1. 発芽と糖について

和ナシ八雲花粉の含有糖分の組成は、非還元糖、特に sucrose が多く、還元糖は glucose, fructose が認められるがその量はかなり少なかった。志佐によれば各種の花粉において開花直前まで starch を多く含み、開花時にはこれが sucrose に変化するものが多いといわれ、⁽⁶⁾ このような含有糖分の starch \rightarrow sucrose の変化を示す花粉はデンプン花粉とよばれている。二十世紀の花粉において、開花前には starch が含まれ、それが非還元糖に変化することはすでに知られており、⁽¹¹⁾ この八雲花粉も多くの sucrose を含むことから、和ナシの花粉はデンプン花粉に属するものと考えられる。

発芽と培地の糖の関係をみると、二糖類の sucrose, maltose の培地における発芽率ならびに花粉管の伸長がきわめて良好であり、ついで六炭糖の glucose, galactose であった。培地の濃度が供試したいずれの糖も 0.3Mol であったために、発芽のみられなかったものについては、fucose のように、濃度を低くすることによって、発芽がみられるものも存在すると考えられる。しかし、花粉中に含まれる糖、ならびに Fig. 2の結果より sucrose, maltose, glucose, galactose が花粉の糖代謝に大きく関与しているものと思われる。

ナシ花粉の場合、発芽前の含有糖分は、大部分が sucrose と考えられ、発芽の進行に伴い sucrose→reducing sugar の転換が行なわれることはまずまちがいないであろう。しかしながら、sucrose と glucose は著しい発芽促進を示すのに反し、fructose はほとんど促進作用を示さず、かなりの低濃度でも発芽を阻害している。HRABETOVA によれば、リンゴの花粉において、fructose が花粉内に取りこまれ、呼吸に利用されるにもかかわらず、まったく花粉管の伸長がみられなかったと述べている。⁽¹⁾ このほかにも fructose が花粉の発芽を著しく阻害するという報告が多い。⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾⁽¹³⁾

筆者の結果、ならびにこれらのことより、ナシ花粉の糖代謝は sucrose→glucose が主経路と考えられ、一方の fructose は代謝の主経路をはずれているため、培地の fructose 濃度がかなりの低濃度でも花粉中に蓄積し、酵素阻害、いわゆる Feed back 効果を示し、その結果著しい発芽阻害がみられるものと推察される。

sucrose 培地は花粉の発芽に伴い、glucose と fructose とが生じ、sucrose が減少してゆくことが知られている。⁽³⁾⁽⁶⁾ ナシ花粉について調べた結果も同様であった。この発芽に伴う培地の変化は、花粉中の invertase の溶出によるものか、あるいは積極的な分泌に原因するものかは不明であるが、吸収利用されるのは、glucose の形でなされるものと思われる。

2. 発芽におよぼす Boron の効果について

花粉の発芽におよぼす Boron の効果に関する従来の研究は、その大部分が sucrose の一定濃度の培地における種々の効果について論じられてきた。⁽²⁾⁽¹¹⁾

筆者が sucrose の濃度と Boron の濃度を種々に組合せ、それぞれの sucrose 濃度における Boron のナシ花粉発芽におよぼす効果をみたところ、Fig. 7 および Fig. 8 のごとく、sucrose の濃度の高低によって、効果のあらわれ方もかなり異なることが認められた。すなわち sucrose 0%の培地においても、発芽ならびに花粉管の伸長に対する Boron の効果がきわめて大きいこと、また、sucrose の濃度が高くなるにしたがい、高濃度の Boron で発芽率が高くなる。しかしながら sucrose の濃度が高い培地では、花粉管の伸長に対する Boron の効果はまったく認めることができなかつた。

Boron の花粉発芽を促進する機構として、糖と Boron が complex を形成し、糖の膜透過を容易にし、花粉中への取りこみを促進すること、⁽²⁾ あるいは complex の形成により培地の浸透圧を低下させることにより、高濃度の培地における発芽を可能にしたり、花粉管

の膜物質であるペクチンの生成を刺激することによる⁽¹²⁾ など種々に論じられてきた。Boron—sugar 複合体の根拠として、Boron の葉面散布を行なったトマト植物の糖分転流が促進されたことをあげている。⁽⁹⁾ しかし正常な植物体中の糖と Boron との比率を考えた場合、糖の担体として働くには、あまりにも Boron の量が少なすぎると考えられる。また、古くより柱頭には多くの Boron が存在することが知られているにもかかわらず、sugar—Boron 複合体はまだ見出されていないことなどから、sugar—Boron 複合体の可能性はうすいと思われる。このことは、sucrose 0%の培地においても、Boron の発芽ならびに花粉管伸長に対する促進作用がきわめて大きいことから説明が可能であろう。

Boron が花粉の発芽に特異的に大きな効果を示すことは、花粉中にとり込まれて、主要な代謝に関与していることを予想させる。Boron が各種酵素に対して補酵素ないし、ふ活剤としての作用を有するという例はまだ少ないが、その中で invertase を活性化するという例がみられる。⁽¹⁴⁾ 筆者がナシ花粉の invertase 活性におよぼす Boron の影響をみた結果によれば、Boron が invertase を強く活性化することが認められた。したがってこれらのことより、Boron は発芽中の花粉にとり込まれ、invertase の活性を高めて、貯蔵養分としての sucrose の分解を促進し、呼吸ならびに膜合成の基質としての glucose の生成を強く進めることが考えられる。志佐らは fructose 培地で、まったく発芽しないユリ花粉も、培地に Boron を加えることによって発芽するようになることを認めているが、⁽⁷⁾ これも Feed back 効果により、おさえられていた invertase が Boron によって活性化され、sucrose→glucose の転換が進められるようになる結果、呼吸、膜合成の代謝が進行し、発芽をみるようになったと解釈される。

このように、貯蔵養分として sucrose をもつナシ花粉においては、invertase のもつ役割はきわめて大きく、1年間の貯蔵によって発芽能力が著しく低下した花粉も、Boron を与えることにより、発芽をみるようになるのも、Boron の invertase 活性化作用におうところが大きいと思われる。そのほか、Boron 欠乏の植物は一樣に膜組織の崩壊、生長点や通導組織の壊死などの症状がみられ、⁽¹⁴⁾ また最近、Boron はペクチン合成に重要な myo—inositol の生成を促進することが明らかにされている⁽⁸⁾ ことなどから、Boron の花粉発芽を促進する作用の一つとして膜合成の促進も十分に考

られるところである。

3. 貯蔵花粉の活性化に対する Boron の利用

適期授粉, 省力といった果樹作管理の合理化のために, 貯蔵花粉の利用が考えられるようになったが, 貯蔵花粉は, 発芽勢のおとろえている点で新鮮花粉と同様な扱いを行なうことに, 一まつの不安がある。貯蔵花粉の発芽勢の低下する原因として, Table 1 および Fig. 11 より, 貯蔵養分の消もうよりも, 酵素活性の低下が大きな原因と思われる。前項において, Boron が invertase の活性を高めることを推察したが, これは貯蔵花粉の発芽促進剤として利用の可能性は大きいと考えられる。

人工授粉に際しての, 発芽促進物質の利用については, グルタミン酸ソーダー, エチルアルコールなどが試みられている⁽⁴⁾⁽⁵⁾ が, その他にはほとんど例をみない。

発芽促進物質の使用法としては, 授粉前に花叢に spray する方法か, あるいは花粉けん濁液を作りこれに促進物質を加えて⁽⁵⁾ 筆授粉する方法がとられている。

しかし一般には, 人工授粉は花粉 1 に対して 5 倍量の増量剤が使用されている。したがって, 貯蔵花粉を用いる際に, この増量剤に発芽促進物質を混合して使用することが適当と考えられる。筆者が増量剤としてのナシ果実の石細胞粉末を, Boron 溶液に浸漬処理し, これを増量剤として使用したところ顕著な効果がみとめられた。

そこで貯蔵花粉を人工授粉に使用する場合に, 花粉発芽促進剤として, Boron はきわめて有望と考えられる。

摘 要

和ナシ二十世紀の人工授粉を行なうにあたっての, 適切な方法を見出す目的で花粉の発芽生理に関する 2, 3 の実験を行なった。結果を要約すると次のとおりである。

1. 和ナシ花粉に含まれる糖は, sucrose, glucose, fructose, xylose の 4 種と, さらに maltose と思われる糖の合計 5 種であった。そしてそれらの中で sucrose が最も多く含まれていた。

2. 12 種の糖について, それぞれ 0.3Mol の濃度のカンテン培地を調製し, 花粉の発芽状態を調査したところ, sucrose, maltose, glucose, galactose において良好な発芽を示した。さらに sucrose, glucose, fructose の濃度と発芽の関係をみたところ, sucrose では 5~15%, glucose では 1~12% でそれぞれ良好な発芽を示したが, fructose は 2% 以上の濃度になると発芽を強く阻害した。

3. 花粉の糖分吸収に関連して, sucrose 培地の変化を経時的に観察したところ, 発芽の開始とともに, glucose, fructose の生成が認められた。

4. sucrose の濃度別に花粉発芽に対する Boron の効果をみた。sucrose 0% の培地においても Boron によって著しく発芽率, 花粉管の伸長が促進された。また sucrose 濃度の高い培地では, Boron の濃度が高いほど発芽促進の効果が大きかった。しかし sucrose の濃度が高くなるほど花粉管の伸長に対する Boron の効果は少なくなった。

5. 花粉の invertase 活性におよぼす Boron の影響をみたところ, Boron は著しく invertase の活性を高めた。

6. 人工授粉の際に使用する増量剤に Boron を混用することによって, 貯蔵花粉の発芽勢が著しく回復した。

参 考 文 献

1. EVA HRABETOVA and J. TUPY : Pollen Physiology and Fertilization, North Holland Publishing Co., 95, 1964.
2. GAUCH, H. G. and W. M. DUGGER : Plant Physiol. 28, 457, 1953.
3. 岩波洋造 : 花粉学大要, 風間書房, 136, 1963.
4. 大野正夫 : 園芸学会雑誌, 31, 360, 1962.
5. " : " 33, 1, 1964.
6. 志佐誠, 加藤幸雄 : 植物生殖生理学, 誠文堂新光社 125, 127, 1962.
7. " 桜井博, 桶口春三 : 育種学会講演要旨, 1958.
8. STANLY, R. G. and F. A. LOEWS ; Pollen Physiology any Fertilization, North Holland Publishing Co. 128, 1964.
9. SISLER, C., W. M. DUGGER, Jr. and H. G. GAUCH : Plant Physiol. 31, 11, 1956.
10. VASIL, I. K. : Amer. Jour. Bot. 47, 239, 1960.
11. " : Pollen Physiology and Fertilization, North Holland Publishing Co. 107, 1964.
12. VISSER, T. : Meded Landbouwhoges. Wageningen, 55, 1, 1955.
13. 脇坂幸雄 : 園芸作物における花粉貯蔵の研究, 九州大学学位論文, 1967.
14. 山崎伝 : 微量要素と多量要素 : 博友社, 239, 1967.