



花粉粒の胚形成機構に関する研究：第4報 in vivo 及び in vitro のタバコ葯における組織化学的比較(園芸農学)

三十尾, 修司
松林, 元一

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 14(2):273-278

(Issue Date)

1981-01-30

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLDOI)

<https://doi.org/10.24546/00227223>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00227223>



花粉粒の胚形成機構に関する研究

第4報 *in vivo* 及び *in vitro* のタバコ葯における組織化学的比較

三十尾 修 司・松 林 元 一*

(昭和55年8月11日受理)

STUDIES ON THE MECHANISMS OF POLLEN EMBRYOGENESIS

IV. A Comparison between *in vivo* and *in vitro* Tobacco Anthers for Their Histochemical Features

Shūji MISOO and Motokazu MATSUBAYASHI

Abstract

Histochemical features were compared between the cultured tobacco anthers and *in vivo* ones at their various developmental stages by periodic acid schiff (PAS) reaction in the paraffin sections made from them.

In the anthers at meiotic stage, the pollen mother cells were surrounded densely with the tapetal cells, and a large number of the masses of polysaccharide grains were found in every area of both the connective tissues and the anther wall tissues. At pollen mitotic stage, there was scarcely found the tapetal cell in the loculus, and furthermore only a small quantity of the polysaccharide grains were observed in the connective tissues and the anther wall tissues. After pollen mitotic stage, part of the anther wall tissues attaching to the connective tissues fell into degeneration.

On the contrary, in the anthers cultured at pollen mitotic stage, the anther wall tissues were gradually degenerated in the same manner as *in vivo*. Moreover, the polysaccharide grains were not found at all either in the connective tissues or in the anther wall tissues during 8 days of culture.

On the basis of the present results, the tapetal cells were considered to have no direct effect on the pollen embryogenesis. It is inferred, thus, that some interactions between the status of anthers detached from the donor plant and any derivatives from the tapetal cells which degenerated might play an important role as a trigger for inducing pollen division.

緒 言

葯培養による花粉粒起源胚状体の誘起には、物理的、化学的並びに生物的な要因が複雑に絡み合って関与しているものと考えられる。現在葯培養の可能な植物で半数性植物の形成率を高め、また、これが困難な植物にも適用できる方法を開発するには、これら諸要因の詳細な解析が不可欠であると考えられる。このような観点に立った基礎的な研究は、培地組成、培養条件、培養葯の発育段階などの面から行われつつある。しかしながら、本来正常な花粉粒に発育すべきものがなぜ脱分化して核分裂を引き起こすのか、さらに、その多核化粒及び多細胞化

粒がカルス化せずになぜ受精胚と酷似した胚状体の形成へと向かうのかについては、現在でもなお不明な点が多い。

タバコにおいて得られた結果では、採取した葯から直ちに花粉を取り出して花粉培養を行っても胚状体形成が不可能なのに対し、4日ないし7日間程度葯培養を行った後であればこれが可能である^{1,12)}。また、培養初期に葯が緑色を維持していることが胚状体形成にとって重要であるとされ⁶⁾、蕾の低温前処理¹¹⁾、培養初期の明条件⁵⁾及び培地中の糖⁴⁾などがこの効果を示すと報告されている。このように、タバコの葯培養においては培養初期の葯壁の存在が大きな意味を持っているものと考えられ、タペート細胞の重要性を指摘する報告が多い^{8~11)}。

* 作物育種学研究室

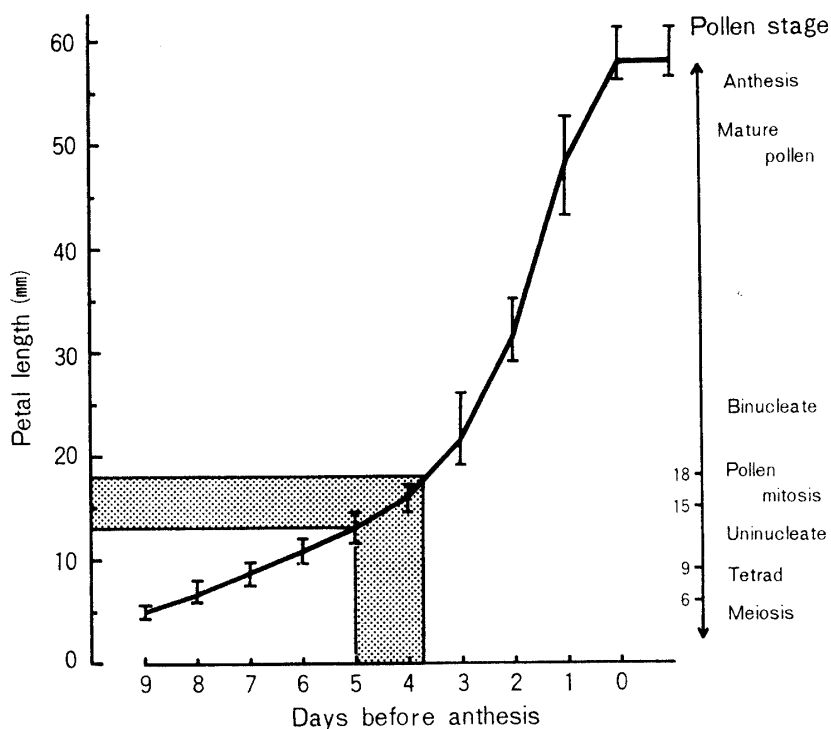


Fig. 1. Relationships between petal lengths and pollen stages in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow. Error bars represent the ranges of petal lengths measured on 10 samples. The spotted area indicates the range of anthers used for culture.

しかし、このタペート細胞の効果についても、その実体は何ら説明されておらず、葯の組織学的な研究もほとんどみあたらないのが現状である⁷⁾。

本研究は、以上のような点をふまえて、花粉粒を取り巻く葯壁の変化を *in vivo* と *in vitro* の葯で組織学的に比較検討したものである。さらに、培養中の糖の動向を知る目的で葯壁中の多糖類顆粒の消長を調査したので、これを合わせて報告する。

材料及び方法

実験材料として、日本専売公社関西支社より種子の譲渡を受けた *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow ($2n=48$) を供試した。

葯培養用の培地としては、前報⁴⁾と同様、田中の処方¹³⁾よりインドール酢酸 (IAA) を除外した寒天培地を用いた。ショ糖濃度は2.5%, 寒天濃度は0.8%, pHは6.0とした。この培地を20ml入れた50mlの三角フラスコに花粉粒有糸核分裂期前後に相当する发育ステージの葯を15個ずつ置床した。培養は昼間13時間蛍光灯照明(約2,000 Lux)を行い、夜間11時間を暗黒条件とした $30 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温器内で行った。

培養2, 4, 6及び8日後にそれぞれ1フラスコの全

葯をアルコール・酢酸固定液(アルコール:酢酸=3:1)で固定した。一方、*in vivo* で花卉の長さ、花粉の发育ステージ及び開花前日数の三者の関係を調査したところ、Fig. 1に示すような結果が得られた。この調査結果に基づき、Table 1に示したような各发育ステージの花粉を含む葯を各々15個ずつ固定した。これら *in vivo* 及び *in vitro* の固定葯は、常法によるパラフィン切片を作製し、Periodic Acid Schiff (PAS) 反応によって染色後、組織学的調査及び多糖類顆粒の調査に供試した。

実験結果

in vivo 及び *in vitro* の葯におけるパラフィン切片の写真はそれぞれ Fig. 2 及び Fig. 3 に、また、多糖類含量については Table 1 に示した。

まず、*in vivo* の葯でその生長を追って調査した結果を述べる。減数分裂期には花粉母細胞 (PMC) の周囲にタペート細胞 (TC) がぎっしりと詰まっており、葯室 (L) を取り巻いている葯壁組織 (AT) 及び結合組織 (CT) には多糖類の顆粒 (PG) が塊状になって集積しているのが認められた (Fig. 2-a)。四分体期になると、多糖類顆粒は依然多数認められたが、花粉母細胞を覆って

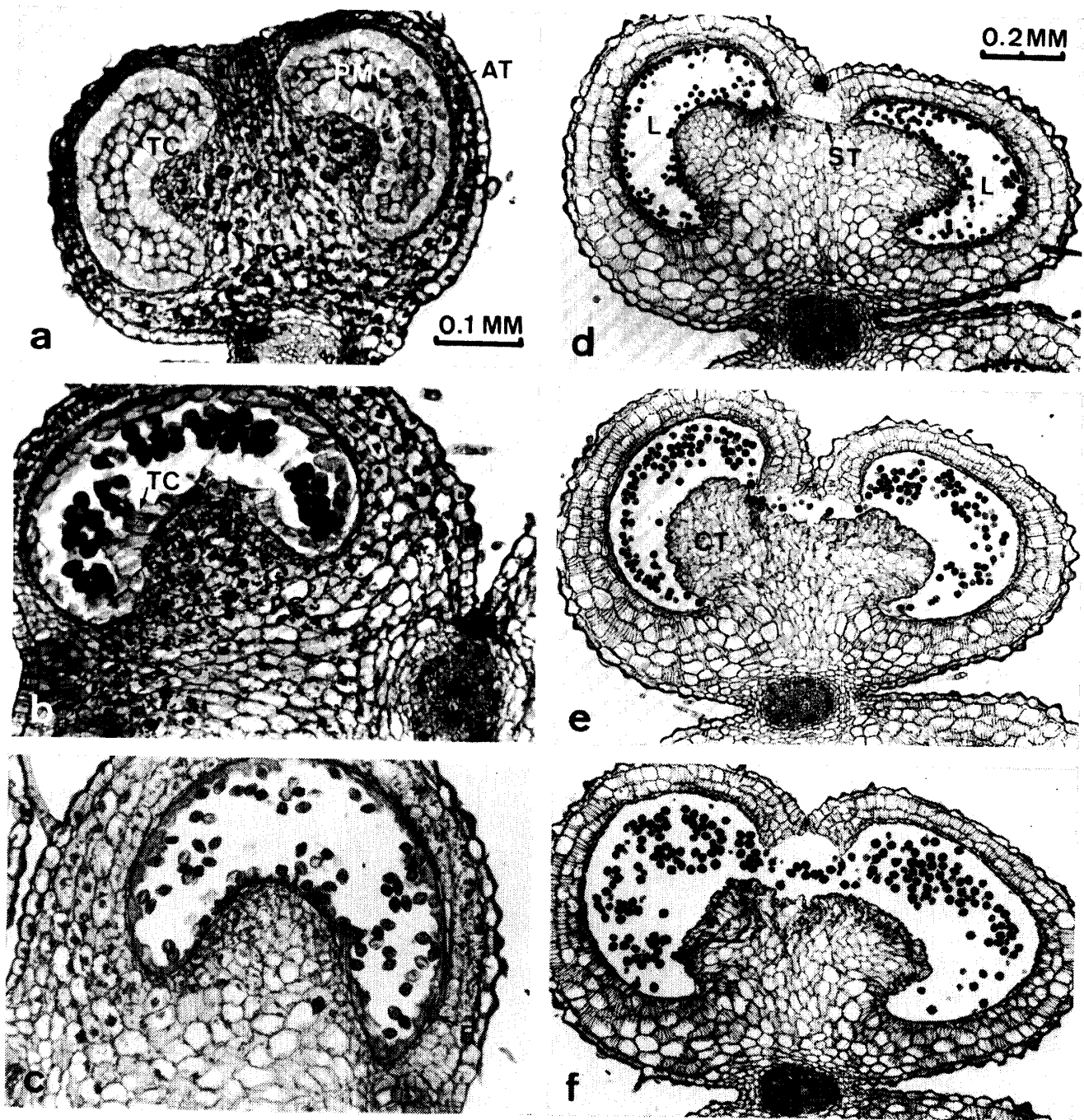


Fig. 2. Transverse sections of tobacco anthers *in vivo* (a, b and c: *ca.* $\times 120$; d, e and f: *ca.* $\times 50$).

- a: Meiotic stage (petal length: 5mm). The pollen mother cells (PMC) are being covered with the tapetal cells (TC). Many the polysaccharide grains (PG) are observed both in the connective tissues (CT) and in the anther wall tissues (AT).
- b: Early tetrad stage (petal length: 6mm). The TCs are found to be degenerating. Many the PGs are still observed.
- c: Mid uninucleate stage (petal length: 10mm). Decreased numbers of the PGs are prominent.
- d: Pollen mitotic stage (petal length: 15mm). There is scarcely found the TC in the loculus (L). The PG disappear in almost all of the CTs. The stomium tissues (ST) fall into breakdown.
- e: Binucleate stage (petal length: 22mm). The CTs are degenerating gradually.
- f: Mature pollen stage (petal length: 50mm). Degeneration of the CTs at more advanced status is seen.

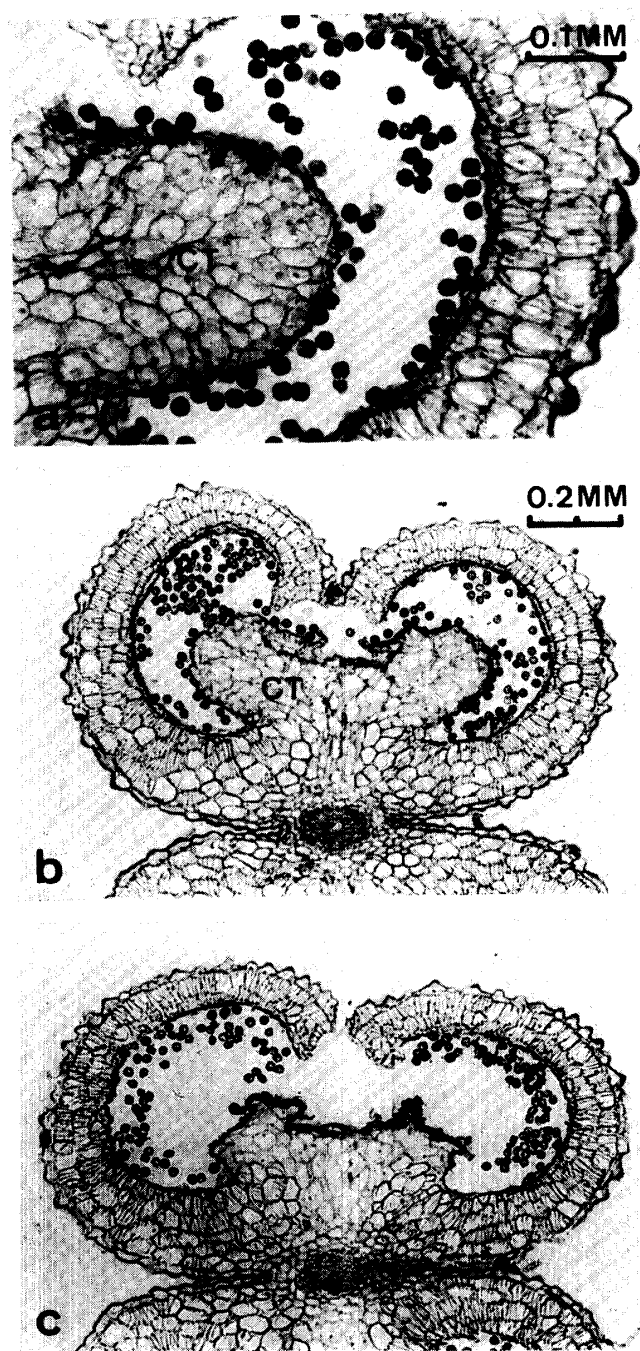


Fig. 3. Transverse sections of tobacco anthers *in vitro* (a: ca. $\times 120$; b and c: ca. $\times 50$).

- a: Two days after inoculation. The PGs are not found at all in the CTs. Two thecae have been already united.
- b: Four days after inoculation. The CTs fall into degeneration.
- c: Eight days after inoculation. More advanced situation of degeneration is observed in the CT. The anther loculus is bursting open.

Table 1. Comparison between *in vivo* and *in vitro* tobacco anthers for their polysaccharide grain content

<i>in vivo</i>				<i>in vitro</i>	
Petal length (mm)	Days ¹⁾	Pollen stage	Content of polysaccharide grains ²⁾	Days ¹⁾	Content of polysaccharide grains ²⁾
4~	-5	Meiosis	+++		
6~	-4	Tetrad	+++		
9~	-3	Early uninucleate	++		
10~	-2	Uninucleate	++		
12~	-1	Late uninucleate	+		
15~	0	Pollen mitosis~Binucleate	+		
18~25	+1	Binucleate	±		
41~50	+3	Mature pollen	—	+2	—
				+4	—
				+6	—
				+8	—

1) -5, 0 and +8 correspond to 5days before, the day of and 8days after inoculation, respectively.

2) This indicates a relative content of polysaccharide grains in the connective cells, measurements being made on 12 anthers at each stage.

いたタペート細胞は崩壊し始めていた (Fig. 2-b)。一核期の葯では、一核初期から中期、後期へと发育ステージが進むに従ってタペート細胞がさらに崩壊し、後期から花粉粒有糸核分裂期になると内被内側壁(E)に薄くへばりついて残存する程度となった (Fig. 2-c, d)。また、この時期には葯壁組織の細胞内に繊維状構造が発達し、裂開部組織 (ST) も崩壊し始めるのが認められた (Fig. 2-d)。一方、多糖類顆粒の含量もまたこの一核期に急激な減少を示した (Table 1)。二核初期まで発達すると、タペート細胞の崩壊物は全くみられなくなった (Fig. 2-e)。二核期以後、裂開部組織は完全に崩壊して結合組織から離れ、2個の葯室が連結される状態となった (Fig. 2-e, f)。この時期になると、发育ステージが進むにしたがって、結合組織側の葯壁組織細胞は変形して縮むように崩壊した。また、多糖類顆粒もほとんどみられず、成熟花粉粒期には全く消失する状態となった (Fig. 2-f, Table 1)。これとは反対に、花粉粒の方は发育ステージが進むにしたがってその粒径を増し、花粉粒内が徐々に濃染される傾向が認められた (Fig. 2-e, f)。

次に、*in vitro* の葯での調査結果を述べる。花粉粒有糸核分裂期に置床した培養葯では、Table 1 に示すように、培養2日目からすでに多糖類顆粒が消失しており、

培養日数が8日になっても多糖類顆粒の集積は全くみられなかった (Fig. 3)。培養日数が増すにつれて、結合組織側の葯壁組織が *in vivo* の葯と同様に縮むように崩壊し、その崩壊細胞はそのまま平たく積み重なって残存している状態が観察された (Fig. 3-c)。また、内部の花粉粒は、*in vivo* の葯中の成熟花粉粒のように濃染されるものは培養8日目においても認められなかった。

考 察

タバコの葯培養を行った場合、培養初期に褐変の起こった葯からはほとんど幼植物の発生がみられず、褐変が培養2週目以後に生じた場合に発生率の良いことが知られている⁶⁾。また、この葯の緑色維持に対して培養初期の光、培地中の糖が有効であることも認められている⁴⁾、⁵⁾。一方、最近可能となった花粉培養を行う場合に、タバコでは、植物体から採取した葯から直ちに花粉を取り出して培養に成功した例は報告されておらず、一たん数日間葯培養を行った上か、蕾あるいは葯に対して冷蔵処理、無気処理あるいは water stress などを与えた上で花粉培養に供試した場合に成功している^{2, 3, 7, 8, 10~12)}。これらのことから、タバコの葯培養においては、培養初期に葯組織が極めて重要な役割を果たしていることが推察される。そこで本研究では、この葯組織の *in vivo* 及

び *in vitro* における組織学的変化、及び多糖類の集積の有無について検討を加えることにする。

in vivo 及び *in vitro* の葯の組織学的変化を比較すると、いずれの場合も形態的にはほとんど同様の組織の退化を示していることがわかる。すなわち、両者とも二核期以後は結合組織側の葯壁組織細胞が徐々に崩壊縮小し、葯室が大きくなる。やや異なる点としては、培養葯におけるこの崩壊が *in vivo* の葯よりも少々遅れるということ位である。*in vivo* の葯と同様に大きな葯室の発育が進んだ培養葯でのみ花粉の多細胞化が進むという報告がなされており⁷⁾、著者らの観察でもこの傾向が認められている。

一方、多糖類顆粒は *in vivo* では四分子期頃まで結合組織及び葯壁組織中に多数蓄積しているが、一核期になると急速に減少し、花粉粒有糸核分裂期を過ぎると全く認められなくなる。培養葯でも、少なくとも培養8日目までは、培養によって葯壁に多糖類が集積するような変化は起こらないようである。ペチュニア及びタバコの胚珠の培養では、珠皮の澱粉蓄積の良好な場合に接合子及び前胚の発育が良いと報告されている¹⁴⁾。受精胚形成における珠皮様の役割を葯壁が演じていると仮定すると、この多糖類の蓄積という面で矛盾することになる。したがって、葯壁にはこれとは別の機能が存在するものと考えざるを得ない。

葯培養における葯壁の効果に関して、タペート細胞の重要性を強調した報告が多い⁹⁻¹¹⁾。しかしながら、本研究の結果では、タペート細胞は四分子期から一核期初期にその崩壊が激しく、葯培養に最適とされる花粉粒有糸核分裂期以後にはすでにほとんど退化、消失していることが判明した。このことから、タペート細胞自身が花粉粒の胚状体形成に直接関与しているとは考えがたい。むしろ、タペート細胞は崩壊時にその内容物を葯室内に放出すると考えられるので、この放出された物質と、生体から切り離された時の葯を取り巻く環境の変化との間に何らかの相互作用が起こり、それが花粉粒の分裂に重要な役割を演じているのではないかと推察される。

摘 要

葯培養における葯壁及びタペート細胞の重要性に注目し、各種発育ステージにある *in vivo* の葯と培養8日目までの *in vitro* の葯のパラフィン切片を作製して組織学的並びに組織化学的变化の比較を行った。

in vivo の葯では、減数分裂期には花粉母細胞の周囲

にタペート細胞が密に充満した状態で存在し、多糖類の顆粒塊が結合組織、及び葯壁組織内に多数認められた。培養供試時期に相当する花粉粒有糸核分裂期前後になると、すでに一核期からその徴候のみられたタペート細胞の退化が進み、葯室内でほとんど認められない状態を示した。また、多糖類顆粒もこの時期にはごく少量しか認められなかった。二核期以後、発育ステージが進むにしたがって結合組織側の葯壁組織は縮むように崩壊した。

これに対し、花粉粒有糸核分裂期前後に置床した *in vitro* の葯では、*in vivo* の葯とほぼ同様の葯壁組織の崩壊がおこったが、その速度はやや遅い傾向にあった。また、調査した培養8日目までの葯組織内には多糖類顆粒の蓄積は全く認められなかった。

以上のことから、タペート細胞自身が花粉粒の分裂に直接関与しているとは考えられず、むしろ、このタペート細胞の崩壊による溶出物と、生体から切断された葯における変化との間に何らかの相互作用が起こり、これが花粉粒の分裂に対して重要な役割を演じているのではないかと推察される。

引 用 文 献

- 1) 有賀小海・中島哲夫：育雑，27，別2，82-83，1977.
- 2) 今村順・原田宏：日本植物生理学会1980年度年会講演要旨集，218，1980.
- 3) ———：第7回植物組織培養シンポジウム講演要旨集，4，1980.
- 4) 松林元一・三十尾修司：神大農研報，12(2)，173-181，1977.
- 5) 三位正洋：育雑，24，別2，164-165，1974.
- 6) Mii, M.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 80, 206-214, 1976.
- 7) 中島哲夫・松倉小海：育雑，24，別2，166-167，1974.
- 8) NITSCH, C.: In *Haploids in Higher Plants, Advances and Potential* (ed. by K. J. KASHA), Univ. Guelph, Guelph, 123-135, 1974.
- 9) NITSCH, J. P.: *Phytomorph.*, 19, 387-404, 1969.
- 10) SUNDERLAND, N. and M. ROBERTS: *Nature*, 270, 236-238, 1977.
- 11) ——— and ———: *Ann. Bot.*, 43, 405-414, 1978.
- 12) 田口拓郎・三位正洋：育雑，30，別1，50-51，1980.
- 13) 田中正雄：育雑，23，171-174，1973.
- 14) 脇塚巧・中島哲夫：育雑，25，別1，150-151，1975.