花粉退化の細胞、組織ならびに生理学的研究 (第2報)

低温による果菜類の花粉退化と葯組織に含まれる遊離アミノ酸との関係

藤 下 典 之

(大阪府立大学農学部)

N. FUJISHITA : Cytological, histological and physiological studies
on the pollen degeneration. II.

On the free amino acids with reference to pollen degeneration
caused by low temperature in fruit vegetable crops

Summary

The present investigation was undertaken in an attempt to elucidate the physiological basis of pollen degeneration caused by low temperature in some vegetable crops, such as green pepper, tomato, eggplant, melon and strawberry. The vegetables were grown in an unheated glasshouse during winter season, and green pepper and eggplant were grown also in a growth cabinet maintained at 20°C (Table 1). Temperature in the unheated glasshouse during the period of study was shown in Table 2. Just prior to anther dehiscence, one anther was taken from each flower for the determination of pollen fertility, and the remaining ones were used for chromatographic analyses of free amino acids. The analyses were repeated several times during the period of growing.

1. Pollen fertility, estimated by percentage of apparently viable pollen grains stainable with acetocarmine, decreased with the fall of temperature in vegetables grown in the unheated glasshouse, as shown in Table 4. The anthers of flowers blooming in the period from December or January to March was reduced in weight and contained only empty pollen grains or degenerating sporogenous tissue as well as in the case of hereditary male sterile plants reported in the previous paper (Fig. 2 and 3; Table 3 and 4). In April, however, the apparently viable pollen grains increased in number according to the rise of temperature, and the pollen fertility reached more than eighty per cent. On the other hand, the anthers of vegetables grown in the growth cabinet of 20°C contained sufficient pollen grains of viable

appearance, even in the severe cold season (Table 4).

2. Thirteen to fifteen ninhydrin-positive spots were detected in the chromatograms from fertile anthers of the vegetables grown in the growth cabinet of 20°C or in optimum temperature season (Fig. 1). Chromatographic differences were detected visually in the composition of some free amino acids between the fertile anthers and sterile ones caused by low temperature in the unheated glasshouse.

3. In every vegetable tested, correlation was found between pollen fertility and content of proline (Table 4). The chromatograms of fertile anthers had a amazingly large spot of proline, which was either lacking or very faint in the chromatograms of sterile anthers (Fig. 1). The result was in general agreement with that of the previous paper referring to the quantitative difference of proline recognized between fertile and hereditary male sterile anthers.

4. In addition, sterile anthers had smaller spot of alanine than fertile ones in tomato, and a larger spot of asparagine in green pepper (Fig. 1; Table 4-1 and 4-2). Such relations between the pollen fertility and content of alanine or asparagine were not recognized in the other vegetable crops tested.

5. In conclusion, it may be assumed that the low content of proline in mature anthers is related with the pollen degeneration, and amino acids play an important role for development of pollen grains in the vegetable crops tested in the present study.

I. 緒 言

ハウスやトンネルを利用した果菜類の不時栽培では、低温、高温、光線不足などによる落蕾、落花、奇形果の本研究の一部は園芸学会 1963 年度秋季大会において発表。1965 年 2 月 10 日受理。

出現がしばしばみられる。筆者は花粉退化の資料を求めて、これらの異常環境による不稔の機構を、遺伝的な雄性不稔性、雑種や倍数性に由来する不稔性などに対比しながら、追求を進めている。

低温による花粉退化の機構を、成熟分裂時の染色体の

行動や、タベート細胞の消長から調べたものは多く、本報で扱った果菜類でも、タベート細胞の異常肥大が花粉退化のおもな原因になっていた(続報)。一方、花粉退化とアミノ酸との関係がますます明らかにされつつあるけれども^(2,6-12)、低温による花粉退化を生理学的に追求したものはほとんどみあたらない。そこで本報ではトウガラシ、トマト、ナス、メロンおよびイチゴを、無暖房のガラス室で10月から4月まで越年栽培し、その間自然の低温にあつて花粉退化を起した不稔薬のアミノ酸組成を、露地作の適温期や冬季加温された生育箱内で、発育開花した稔性正常薬のそれと比較したところ、prolineをはじめとする2,3のアミノ酸含量と花粉退化との間に興味ある関係がみいだされたので報告する。

種々の助言と指導を賜つた今津正教授に感謝の意を表します。

II. 材料および方法

供試材料および栽培方法は第1表に示すとおりである。材料はいずれも本学研究室で維持中の自殖系を用いた。ナスは2月中旬ごろから菌核が、メロンは12月下旬から蔓枯れ病がひどくなつたので、以後の調査は中止した。

ガラス室の天窓と側窓は11月上旬より全部閉じたが、室温をあげるための加温は行なわなかつた。実験期間中のガラス室内の最高および最低気温は月平均して第2表に示した。地下部は地温の低下によつておこる萎凋(吸水不能)を防ぐため、温度調節器をつけた温床線をベッドの地表下10cmに張り、11月上旬より通電しほぼ15°Cに保つようにした。なお、この程度の地下部の加温では、着蕾部位の気温に影響のないことを、あらかじめ電子管式自動温度記録計で確かめておいた。冬季加温栽培用の生育箱は、容積ほぼ1.5m³のビニール2重張りのもので、天井に換気扇をつけ底部に温床線をはり、温度調節器で箱内の温度を20°Cに保つようにしたもの

Table 2. Average maximum and minimum temperatures in the unheated glasshouse during the period of study (1962~1963)

	Oct. 1962	Nov.	Dec.	Jan. 1963	Feb.	Mar.	Apr.
Maximum temp. (°C)	28.8	22.2	19.5	15.6	18.5	24.5	29.1
Minimum temp. (°C)	16.2	11.2	7.6	3.6	3.4	7.3	13.6

で、これをガラス室内に設置した。

花粉稔性およびアミノ酸組成の調査にあつては、開薬直前の花から(メロンのみ開花前日の夕方)の花1本ずつ薬をとつて稔性調査の材料とし、残りの薬をアミノ酸分析の材料にした。花粉稔性(正常花粉率)は、アセトカーミン滴下による常法で1花ごとに300~500粒の花粉について形、大きさとも正常で、内容のよく充実したものを正常花粉とし、調査花粉の総数に対するこれら正常花粉数の百分率を求め、調査日ごとにそれらの平均値で示した。気温の下降および稔性低下による開薬不能花では、薬をスライドグラスの上におき、ピンセットで花粉がつぶれないように注意しながら、薬の内容を押だしてその稔性を調べた。

薬組織に含まれる遊離アミノ酸は、ペーパークロマト

Table 3. Fresh weight of 100 anthers in mg

Vegetable crop	Pollen fertility	
	80~95% (fertile anther)	0% (sterile anther)*
Green pepper	133.3	150.8
Tomato	302.0	242.8
Eggplant	1008.2	561.0
Melon	434.2	355.1
Strawberry	275.6	76.5

* No apparently viable pollen grain was found in any crop.

Table 1. Materials and cultural procedures

Vegetable crop	Cultivar	Seeding date	Planting date	Examined period	Cultural condition	
					Unheated glasshouse*	Growth cabinet** (20°C)
Green pepper	Ise Piment	Aug. 1, 1961	Sept. 18	Oct. 1961~Apr. 1962	○	○
Tomato	Wase-Sekaiichi	Aug. 20, 1962	" 26	Nov. 1962~ " 1963	○	—
Eggplant	Shizuoka No. 11	"	" 26	" 1962~Feb. 1963	○	○
Melon	Earl's Favourite	Sept. 10, 1962	" 26	" 1962~Dec. 1962	○	—
Strawberry	Kōgyoku	—	Oct. 17	Mar. 1964~Apr. 1964	○	—

* The root zone temperature was controlled at 15°C by the heating cable, and the room was unheated. Room temperature was shown in Table 2. Seedlings were planted in the bed.

** Seedling was planted in 30 cm clay pot.

グラフ法により検出した。各果菜とも、供試薬の生体重(50~150mg)およびろ紙の原点につける試料の量(0.03~0.06 ml)は比較の対象ごとに一定にしたが、不稔薬と正常薬とでは生体重がかなり違つたので(第3表)、供試薬数を加減して両者の生体重をそろえた。抽出、展開、同定の方法はいずれも第1報のとおりである。

III. 実験結果

供試した果菜類の稔性正常薬(花粉稔性 80% 以上のものを正常薬とした)からは 13~15 種の遊離アミノ酸およびアミドが検出された。これらのうちの proline は、気温の季節的变化による花粉稔性の高低にともなつて、いずれの果菜でもその含量が著しく増減したほか、alanine や asparagine も果菜の種類によつては、稔性により増減する傾向を示した。

Fig. 1. Chromatograms of amino acids in fertile (left) and sterile anthers (right).

(1) Proline

トウガラシ、トマト、ナス、メロンおよびイチゴとも低温による花粉稔性の低下にともなつて、葯組織に含まれる proline の量は顕著に減つた。すなわち、11 月初旬までや 4 月以降に、あるいは冬季 20°C に加温された生育箱内で、发育開花した稔性正常葯からは、クロマトグラムの中で最大もしくはそれに近い大きな proline のスポットが検出された(第4表、第1図)。しかし、気温の下降にともなつて内容の充実した正常花粉が減り、逆に空虚花粉がふえていくと、それらの葯の proline のスポットは小さくなつていつた(第4表)。その後さらに気温が下がつて、遺伝的な雄性不稔同様に葯胞内に空虚花粉または退化した組織しか認められない完全不稔葯になつてしまうと、ナス、メロンおよびイチゴの葯からは proline のスポットは認めることができず、トマトからのそれもこん跡程度となつた。トウガラシだけはなお proline のスポットが検出できたが、スポットの大きさは正常葯にくらべると著しく小さくなつていた(第1図-a, 第4表)。病虫害におかされずに越冬できたトウガラシ、トマトおよびイチゴでは、花粉稔性 0% の状態が続いた 1 月中旬から 4 月はじめまでの間、proline の蓄積される兆候は全く認められなかつた。しかし、4 月上旬になつて、気温が上がり、正常花粉が認められだすと、

Table 4. Relations among the pollen fertilities and proline, alanine or asparagine contained in mature anthers.

(1) Green pepper

Item	Flowering (sampling) date												
	Oct. 11		Dec. 26		Jan. 8		Jan. 22		Feb. 6		Feb. 23		Apr. 30
Cultural condition*	U. G.		U. G. 20°C		U. G. 20°C		U. G. 20°C		U. G. 20°C		U. G. 20°C		U. G.
No. of flowers analyzed	18		20 20		16 16		22 16		20 20		28 17		20
Pollen fertility	95.8		7.8 82.1		3.3 84.3		0 81.7		0 83.6		0 80.0		83.0
Proline	≡		≡ ≡		+ ≡		+ ≡		+ ≡		+ ≡		≡
Alanine	≡		≡ ≡		++ ++		++ ++		+ ++		+ ++		++
Asparagine	++		≡ ++		≡ +		≡ +		≡ ++		≡ ++		++

(2) Tomato

Item	Flowering (sampling) date													
	Nov. 9	27	Dec. 18	24	27	Jan. 7	16	25	Feb. 5	Mer. 7	15	26	Apr. 8	15
Cultural condition*	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.
No. of flowers analyzed	5	5	6	6	6	7	7	9	11	9	8	8	6	8
Pollen fertility	96.0	68.0	2.7	7.0	1.1	1.3	0	0	0	0	0	0	37.9	77.2
Proline	≡	≡	≡	≡	++	++	—	±	—	—	—	—	≡	≡
Alanine	++	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	+	+	+
Asparagine	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	++	≡	≡	++

(3) Eggplant

Item	Flowering (sampling) date											
	Nov. 9	19	Dec. 10		Dec. 17		Jan. 8		Jan. 16		Feb. 5	
Cultural condition*	U. G.	U. G.	U. G. 20°C		U. G. 20°C		U. G. 20°C		U. G. 20°C		U. G. 20°C	
No. of flowers analyzed	5	5	7	5	5	5	7	5	8	5	7	5
Pollen fertility	75.7	11.9	2.5	84.6	0	90.3	0	92.5	0	94.6	0	91.5
Proline	≡	+	—	≡	—	≡	—	≡	—	≡	—	≡
Alanine	++	++	++	++	+	+	+	+	±	+	±	++
Asparagine	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	++	≡

(4) Melon

Item	Flowering (sampling) date				
	Nov. 5	9	28	Dec. 10	18
Cultural condition*	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.
No. of flowers analyzed	5	6	8	6	6
Pollen fertility	88.8	94.7	67.9	3.3	0
Proline	≡	≡	≡	—	—
Alanine	≡	++	++	++	++
Asparagine	+	++	++	±	+

(5) Strawberry

Item	Flowering (sampling) date			
	Mar. 16	19	Apr. 2	19
Cultural condition*	U. G.	U. G.	U. G.	U. G.
No. of flowers analyzed	32	26	7	11
Pollen fertility	0	0	53.0	83.9
Proline	—	—	≡	≡
Alanine	≡	++	≡	≡
Asparagine	≡	≡	≡	≡

* U. G. : unheated glasshouse, 20°C : growth cabinet

— (absent) < ± < + < ++ < < ≡ (more definitely presented)

proline のスポットもまた検出できるようになり，4 月末には再びクロマトグラムのうちで最も大きいスポットになつていた（第4表）。

このような花粉稔性と葯組織の proline 含量との関係は，一次元展開後にイサチンを噴霧する方法をとるといつそう明りょうに確認できた。

（2）Alanine および asparagine

低温による花粉稔性の低下にともなつて，トマトの葯に含まれる alanine の量が減り，トウガラシの asparagine は逆にふえる傾向を示した。しかし，花粉稔性の変化にともなう alanine や asparagine 含量の増減は，proline ほど著しくなく，また普遍性も乏しく，大部分の果菜では稔性が上下しても，それらの含量には変化が認められなかつた。

トマトの alanine のスポットは，低温によつて正常花粉が減つてくると小さくなり，花粉稔性が 0% におちた 1 月中旬から 3 月の下旬にかけて開いた花の葯からはこん跡程度しか検出できなかつた（第1図-b，第4表-2）。しかし，その後は気温の上昇にともなう稔性の回復につれてスポットはしだいに大きくなり（第4表2），花粉稔性と alanine 含量との関係は proline のそれとよく似ていた。同様な傾向はトウガラシとナスのクロマトグラムにもうかがえたが，トマトほど明りょうではなかつた。

トウガラシの asparagine のスポットは，低温によつて正常花粉が減つてくるとしだいに大きくなり，稔性が 0% におちた 1 月下旬から 2 月いっぱいにかけて開いた花の葯からは，クロマトグラムのうちで最大もしくはそれに近い大きなものとなり，同時期に加温された生育箱内で開いた花の，稔性正常葯の asparagine のスポットとは著しく大きさが違つていた（第1図-a，第4表-1）。このような葯組織に含まれる asparagine の花粉稔性低下にともなう増量は，proline やトマトの alanine が稔性低下にともなつて減量するのと全く逆の現象であつた。

IV. 考 察

堺市（大阪府下）近郊で，ナス，トマト，トウガラシなどを冬季無暖房のガラス室で栽培すると，とくに寒い冬でないかぎりつぎつぎと開花しながら越冬するので，このような立地条件と果菜の性質を利用して，低温による花粉退化の機構を調査している。一般に，果菜類の花粉稔性は 11 月後半からおちはじめ，1 月から 3 月末にかけては正常花粉が全く認められず，ほとんどが空虚花粉で葯自体の重量も減り，外観，内容とも遺伝的な雄性不稔葯をつくりの不稔葯となるが，4 月に入ると不思議なほど急激に稔性は回復した。このような花粉稔性の季節的なうつりかわりは，今回の実験も含めて供試品種や

試験年度による多少のずれはあつても，各果菜とも実験のたびにほぼ同様な経過をたどつた（続報参照）。一方 20°C の生育箱内はガラス屋根と 2 重ばりのビニールの下にあるため光線量は減つており，そのうえ灌水時以外はほとんどしめきつているため，炭酸ガス量も不足しているものと想像されるが，この中で生育した花の葯は露地作の適温期（5 月～6 月，9 月～10 月）に发育した花の葯同様に，常に 80% 以上の高い花粉稔性を持ち続けている。これらのことから冬季無暖房のガラス室でみられる果菜類の花粉退化は，おもに低温によるものと考えられる。

このような自然の低温遭遇によつて起きた不稔葯と，適温条件下で发育した稔性正常葯のアミノ酸組成を比較すると，既報⁽³⁾の遺伝的雄性不稔葯と正常葯との間に認められた結果同様に，proline は正常葯に多量に含まれていたにもかかわらず，不稔葯からはほとんど検出できないほどその含量の減つていくことがすべての果菜に共通してみられた。proline は成熟花粉の主要なアミノ酸であるともいわれており⁽¹³⁾，花粉稔性の高低と proline のスポットの大小との間には平行関係がみられたが，はたして正常葯と不稔葯の proline 含量の差が，葯胞内に含まれる正常花粉そのものの多少のみに由来しているかどうかはまだ明らかでない。この点，葯組織と花粉とを別々に分けて分析する必要もあろう。他方，proline 含量の差は，花粉形成の過程に生じた異常の程度に由来するものとも考えられるので，花粉と葯組織の发育段階別のアミノ酸組成を，正常葯と不稔葯とで比べたいと思っている。

低温による不稔葯では proline の含量が減るほかに，alanine がトマトで減り，asparagine がトウガラシでふえる傾向を示した。alanine 含量の花粉稔性低下にともなう減少は，トマトとトウガラシの高温⁽⁴⁾や，除雄剤 FW-450 処理⁽⁵⁾による不稔葯，あるいは sorghum の雄性不稔葯⁽²⁾でも認められている。しかし，水稻⁽⁹⁾では稔性と alanine 含量との関係は認められておらず，テンサイ⁽⁸⁾やトウモロコシ⁽¹⁰⁾の雄性不稔葯では，逆に alanine が正常葯より多量に含まれていたという。asparagine 含量の稔性低下にともなう増加は，トウガラシのみにみられ，今回の低温による不稔葯，および高温⁽⁴⁾や FW-450 処理⁽⁵⁾による不稔葯でも明らかなほか，その雄性不稔葯にも増量の傾向がうかがえ，不稔葯の生体重がトウガラシのみ正常葯より重かつた事実とあわせみると，植物の種類による特異性とも思われる。そ菜以外のものでは asparagine の増加のみとめられたものにはコムギ^(6,7)とトウモロコシ^(6,10)の雄性不稔葯がある。逆に不稔葯で aspara

gineが減少したというものにはタマネギの雄性不稔薬⁽⁸⁾がある。

薬組織に含まれる proline の量と花粉稔性との関係は、かなり広範囲の植物に共通して認められたのに対し、alanine や asparagine の含量と花粉稔性との関係の有無や強弱は植物の種類によつてまちまちであり、さらに同一研究者の分析した同種類の植物でも、供試した不稔の系統や品種によつて違つた結果⁽¹⁰⁾のでているものもある。このような不稔薬のアミノ酸組成の品種や系統によるちがいは、染色体の対合異常やタペート細胞の消長異常などの、不稔の機構上の差異によつても生じるのではなうか。

既報の雄性不稔薬と今回の低温による不稔薬とは、前者が遺伝によるものであるのに対し、後者は環境によるものであるという点で大きく違つていたが、そのアミノ酸組成やタペート細胞の消長過程には類似性があった。アミノ酸組成では、両方の不稔薬とも proline 含量がすべてのそ菜で例外なく、著しく減少していたことから、不稔薬ではその生合成に関係する代謝過程、たとえば $\text{proline} \rightleftharpoons \text{glutamic acid}$ のいろいろな段階に block があつたり (雄性不稔)、block が生じて (低温や高温による不稔)、その蓄積が妨げられたのかかもしれない。ただし、proline の減量と花粉退化の二者間の因果関係を裏づける資料はまだ得られていない。proline の減つていた雄性不稔薬も低温による不稔薬も、ともにタペート細胞の消長過程に異常がみられ、それが花粉退化のおもな要因となつていたが (統報参照)、筆者がいままでに扱つた材料のうち、同様な機構で花粉が退化した別の不稔薬からも、やはり proline はほとんど検出できなかった。これらの事実と、稔性正常薬でも若い未熟な時期には proline はほとんど検出されず、四分孢子期以後⁽¹⁾ (タペート細胞が正常に消失しはじめるころから後⁽³⁾) になつて急にその蓄積が認められるという事実とを照合すると、タペート細胞の消長とアミノ酸代謝との間に密接な関係があるように思われる。

V. 摘 要

低温による果菜類の花粉退化の機構を生理学的に追求しようとして、トウガラシ、トマト、ナス、メロンおよびイチゴを、無暖房のガラス室内で越年栽培し、適温条件下で发育した稔性正常薬と、低温で花粉の退化した不稔薬に含まれる遊離アミノ酸をペーパークロマトグラフ法により分析し比較した。

1. いずれの果菜とも気温の下降にともなつて退化花

粉がふえ、12月または1月から3月末にかけて開いた花の葯内には、ほとんど空虚花粉しかみられず、葯の生体重も減少した。しかし、4月に入ると気温の上昇にともなつて稔性は急激に回復した。20°C に調節された生育箱内で发育した葯は、厳寒期にも80%以上の花粉稔性をもちつづけていた。

2. 開葯直前の稔性正常葯のクロマトグラムからは、13~15個のスポットが検出されたが、そのうち2,3のアミノ酸は不稔葯のクロマトグラムにくらべると、量的に違つていた。

3. 各そ菜とも稔性正常葯からの proline のスポットは非常に大きかつたが、花粉稔性の低下にともなつて小さくなり、空虚花粉ばかりになつた不稔葯からはほとんど検出できなくなるほどその含量は減つた。

4. トマトの不稔葯では alanine が減り、トウガラシの不稔葯では asparagine がふえる傾向がそれぞれ認められたが、これらアミノ酸含量の増減と花粉稔性との関係は proline ほど顕著でなく、また他の果菜類には認められなかつた。

5. そ菜では雄性不稔葯でも、低温による不稔葯でも proline 含量が著しく減つていたから、proline の生合成に関係のあるアミノ酸代謝と花粉の退化との間には密接なつながりがあるものと推察される。

引用文献

1. BRITIKOV, E. A. et al. 1964. H. F. LINSKENS (editor): Pollen physiology and fertilization, 77~85. North Holland Pub. Comp., Amsterdam
2. BROOKS, M. H. 1960. Genetics 45: 978.
3. 藤下典之. 1964. 園学雑. 33: 133~139.
4. ————. 1964. 園芸学会秋季大会研究発表要旨.
5. ————. 1965. 園芸学会秋季大会研究発表要旨.
6. FUKASAWA, H. 1954. Jap. J. Genet. 29: 135~137.
7. 深沢広祐・三藤勝弘. 1956. 科学 26: 313~314.
8. 細川定治・津田用弥・武田竹雄. 1963. 育学雑. 13: 117~124.
9. 片山 平. 1961. 育学雑. 11: 291~294.
10. KHOO, U. and H. T. STINSON Jr. 1957. Proc. Nat. Acad. Sci. 43: 603~607.
11. 尾崎 清・田井喜三男. 1957. 日土肥学会講演要旨第3集: 40.
12. ————. 五島 皓. 1962. 農及園. 31: 1340.
13. TUPY, J. 1964. H. F. LINSKENS (editor): Pollen physiology and fertilization, 86~94. North Holland. Pub. Comp., Amsterdam

Fig. 2. Photomicrographs of apparently viable pollen grains (left) and empty pollen grains caused by low temperature (right). From upper to lower : green pepper, tomato, eggplant, melon and strawberry.

Fig. 3. Photomicrographs of cross section of fertile (left) and sterile anthers (right). Sterile anthers contained degenerating sporogenous tissue or empty pollen. From upper to lower : green pepper, tomato, eggplant, melon and strawberry.