ダイコンにおける自家不和合性の 生理機構について (第5報)

自家不和合性に及ぼす認識花粉の効果

建 部 民 雄

(大阪府茨木市上泉町)

Studies on the Physiological Mechanism of Self-Incompatibility in Japanese Radish

V. Effect of Recognition Pollen on Self-Incompatibility

Tamio TATEBE

Kamiizumi-cho, Ibaraki-shi, Osaka

Summary

Pollen materials used for the preparation of the so-called recognition pollen were collected from mutually cross-compatible, different individuals belonging to the same cultivar. Then, 'crushed' compatible pollen as a kind of recognition pollen was prepared by grinding the pollen with an agate mortar, and 'killed' compatible pollen as another recognition pollen by exposing the pollen to 75% ethanol solution. Immediately after applying these recognition pollens each to the stigmas, it was pollinated further with self pollen. Besides, conventional self pollination was carried out as controls.

Pollen behavior on the stigma was examined to determine the degree their fertility. That is, pistils of treated flowers were collected in the next morning of the pollination day, and fixed and stained in lactic blue. After being differentiated in lactic acid, pollen counts were made in a drop of glycerol. The results obtained are summarized as follows:

In the self pollination alone (controls), a few pollen grains germinated on the stigma. The developed pollen tubes were very short and did not penetrate the barrier of stigma papillae. However, pollen germination was fairly increased by the preceding application of 'crushed' compatible pollen. In this case, many pollen tubes penetrated the barrier of stigma papillae. A few emptied pollen grains which had transferred their contents into the developing pollen tubes were recognized. By the preceding application of 'killed' compatible pollen, the percentage of pollen germination was increased considerably as compared to that of controls. In general, the length of developed pollen tubes which were affected by applying the 'killed' pollen was somewhat shorter than that produced by the 'crushed' pollen application.

As commonly accepted, the effect of recognition pollen on the overcoming of self-incompatibility may be caused by some supposed recognition substances (proteins) contained in the coating (exine) of pollen grains.

It seems that the preceding application of recognition pollen in combination with the following self pollination partially overcome self-incompatibility of Japanese radish.

緒 言

周知のように、ソ連の有名な育種家 Michurin は、不和合の遠縁植物間雑種を獲得しようとして、自家及び遠縁植物両花粉の混合受粉を試み、ある程度の成果を収めた。彼はその場合、用いる和合花粉をメントール (mentor, 養育者) と称した (この術語はその後死滅花粉をも含めて使用されるようになった)。彼の後継者達は、その後上記のメントールを用いての種属間雑種の育成のほか、異なる種の花粉をメントールとして、自家の花粉と混合、又は追加受粉を行い、自家不和合性の消去及び他家受粉を主とする植物の自殖後代の勢力減退の防止などに、かなりの成績をあげた(1)。

一方欧米諸国の研究者達は、これらソ連学者の業績を一時無視する態度をとっていたが、その後諸所で追試が行われ、その正しいことが認められるようになった。Stettler(19)は、*Populus trichocarpa* の花粉に、 γ 線を照射して殺し、それをメントールとして、*Populus* の他の種の花粉と混合して、従来不和合とされていた他の5種との間に、種間雑種を作ることができた。次いで Knox ら(10)も、同じく *Populus* で追試に成功した。そして彼等は最近の生化学、免疫化学的研究の進歩を踏まえて、メントール花粉には不和合性に関する認識物質 (recognition substances) を含むと考えて、これを認識花粉 (recognition pollen) と称した。

このほかにも認識花粉の効果は、*Lotus*(5)、リンゴ(2)、*Cosmos*(8)、*Nicotiana*(15)、*Petunia*(18)、及びハクサイ(13)などでも認められている。しかし一方リンゴ(27)や *Petunia*(6)では否定的な成績も出ている。

Zalivskaya(1)は、ハツカダイコンの品種内異個体間受粉 (交雑和合) に対する、キャベツとカブの花粉による追加受粉 (complementary pollination) の効果を研究した。その成績によると、異種の花粉を追加受粉した場合は、対照区に比し結実歩合及び後代の勢力が増大したという。更に異個体間受粉の花粉量を制限してキャベツとカブの花粉を追加受粉すると、結実歩合は倍加したという。生井ら(12)は、ダイコンとキャベツとの属間雑種において、両種の混合花粉の受粉は、対照区に比し、雑種子数が有意に高くなったと報告している。

ダイコンの自家不和合性の消去に対する認識花粉の効果については、まだ報告が見当たらない。そこで筆者はダイコンの同一品種内の和合の他家の花粉を、75% のエタノールで殺すか、又は粉碎して、それぞれ受粉後、さらに自家の花粉を受粉した結果、いずれも単に自家受粉した対照区よりも良い成績が得られ、特に粉碎花粉区において優れているように思われた。以下その成績を記

述し、多少の考察を試みたい。

材料及び方法

供試品種として‘聖護院’と‘みの早生’を用いた。従来和合花粉を殺す簡単な方法として、メタノール処理が行われている。筆者はその効果を確認しようとして、市販のメタノールで処理した花粉を他家受粉した後、柱頭を検鏡した。その結果、柱頭上の花粉粒数は概して少なかったが、少数の花粉粒は発芽していた。もっとも花粉管は極めて短小で、柱頭内には侵入しなかった。一方同じ個体から採った無処理の花粉による他家受粉区は、正常な交雑和合の花粉行動を示した。次に交配時に常用している 75% エタノールで処理した花粉による他家受粉を行い、柱頭を検鏡したところ、それらの花粉は全部死滅していた。思うに古くから消毒に純エタノールを用いず、70~80% のエタノールが用いられているのは、上記の事情によるものであろう(9)。以上の成績によって、今回は和合花粉を殺すには 75% エタノール処理によることとした。すなわち、あらかじめ袋装しておいた花から採った新鮮花粉を、時計皿に取り、それに 75% エタノールを注ぎ、よくかき混ぜて、10 分後、吸取紙で余分のエタノールや水分を吸収した。次にそれを乾燥器に 1~2 時間入れてよく乾燥させた。受粉の方法は、対照区として自家受粉を行い、実験区として異個体から採った花粉を上記の方法で殺して、それを受粉し、その直後更に自家受粉を行った。別に γ 線を用いず、機械的に花粉を殺す手段として、花粉を粉碎する方法を案出した。すなわち、開花前日に異個体の花枝を切ってびんにさし、それを定温器 (22°C) に入れておき、翌朝よく開いた花 (20 花) の裂開したやくから、花粉をめもの製の乳鉢内へ針でかき落とし、乳棒でよくすりつぶして粉碎花粉を作る。さてこの粉碎花粉を針で柱頭上におき、次に自家の花粉を、その上に針でかき落すようにして受粉した。一方対照として自家受粉区を設けた。よく粉碎した花粉を検鏡すると、花粉は完全に碎かれて不定形の塊となり、花粉本来の形のものは 1 粒も見られなかった。従って花粉の発芽力は全然ないものと考えられた。

実験成績を検討するには柱頭法を用いた。すなわち受粉後材料を定温器 (22°C) 内に入れた。翌朝雌ずいを取り、ラクティックブリューで固定染色し (3 時間)、乳酸で分染して (24 時間)、グリセリンに封入検鏡した。供試花数は各区 10 花とし、柱頭上における花粉粒数、発芽花粉粒数、花粉管の伸長度、及び空虚花粉粒数 (花粉管が伸長して内容の空虚となった花粉粒数) を数えて、認識花粉の自家不和合性に及ぼす影響を検討した。

Table1. Effect of 'crushed' compatible pollen on self-incompatibility.

Plant number	Pollination method	No. of pollen grains on stigmas	No. of pollen grains germinated	Percentage of pollen germination	No. of emptied pollen grains
1	S	205	40	19.5	0
	C	340	191	56.1	6
2	S	244	41	16.8	0
	C	270	121	44.8	5
3	S	246	28	15.4	0
	C	338	221	65.4	8
4	S	163	15	9.2	0
	C	155	108	69.6	6
5	S	361	153	42.3	0
	C	308	233	75.6	13
11	S	149	27	18.1	0
	C	357	257	72.0	4
12	S	307	113	36.8	3
	C	322	231	71.7	25
13	S	198	29	14.6	0
	C	369	289	78.3	21
14	S	82	6	7.3	0
	C	394	316	80.2	27
15	S	253	20	7.9	0
	C	216	141	65.3	9

S : Self pollen (control).

C : 'Crushed' compatible pollen + self pollen.

Table2. Effect of 'killed' compatible pollen on self-incompatibility.

Plant number	Pollination method	No. of pollen grains on stigmas	No. of pollen grains germinated	Percentage of pollen germination	No. of emptied pollen grains
1	S	179	21	11.7	0
	K	241	171	71.0	6
2	S	429	244	56.9	1
	K	324	246	75.9	4
3	S	95	5	5.3	0
	K	105	58	55.2	0
4	S	275	23	8.4	0
	K	300	86	28.7	0
5	S	219	76	34.7	0
	K	219	167	76.3	4
6	S	153	26	17.0	0
	K	302	185	61.3	3
8	S	216	62	28.7	0
	K	234	158	67.5	1
10	S	212	54	25.5	0
	K	225	181	80.3	0
11	S	185	23	12.4	0
	K	168	99	58.9	3
12	S	156	27	17.3	0
	K	131	95	72.5	1

S : Self pollen (control).

K : 'Killed' compatible pollen + self pollen.

実験成績及び考察

実験は1976, 1977年の春に行ったが, 1976年の予備実験の成績は省略して, 1977年の成績のみを以下に記述する. '聖護院'を供試し, 他家の粉碎花粉が自家不和合性に及ぼす効果を検した成績は, 第1表のとおりであった.

自家受粉を行った対照区においては, 柱頭上の花粉の発芽歩合は低く, たとえ発芽しても, 花粉管は極めて短小で, ほとんど柱頭乳頭細胞に侵入していなかった. ところが, 他家の粉碎花粉及び自家の花粉を受粉した実験区においては, 対照区に比し, 柱頭上の花粉の発芽歩合は著しく高かった. 花粉管長も概して長くなり, かなり

多数の花粉管は乳頭細胞内へ侵入した。一部には空虚花粉粒も認められた。ただ個体番号 12 のみは、低度の自家和合性を示した。この成績によると、他家の粉碎花粉を添加して自家受粉すれば、自家和合性を高めるものと考えられる。

次に‘みの早生’を供試し、他家の殺した花粉が自家不和合性に及ぼす効果を検した成績は、第 2 表のとおりであった。

他家の 75% エタノールで殺した花粉及び自家の花粉の受粉区は、対照の自家花粉のみの受粉区に比し、概して柱頭上の花粉の発芽歩合高く、花粉管もある程度乳頭細胞内へ侵入した。また極少数ながら、空虚花粉粒の認められた個体もあった。ただ個体番号 2 は、多少自家和合性を有する個体であったが、これに反して、個体番号 3 及び 4 は、強い自家不和合個体であった。いずれにしても、エタノールで殺した他家の花粉を添加して、自家受粉を行うと、ある程度自家和合性を高める効果があると思われる。なお供試品種が異なるので、厳密な意味で比較することはできないが、その効果は粉碎花粉区のそれよりはやや劣るもののようである。

今回の実験の成果は次の 2 点であると考えられる。従来の研究では、その多くが認識花粉として異なる種、又は異なる品種の花粉を用いているが、今回の実験では、同じ品種の異なる個体の花粉を用いてある程度の効果を収め、ダイコンの自家不和合性の機構解明に一步接近したこと。又従来の γ 線照射や、メタノール処理によらず、粉碎による死滅花粉を用いて、良好な成績を得たことである。

Visokoostrovskaya(1)は、キャベツを供試し、自家受粉してから、アブラナの花粉で追加受粉した場合の、花粉及び花粉管の行動を検鏡した。それによると、自家受粉では柱頭上花粉粒の発芽は悪く、少数柱頭内に入った花粉管も、その生長は遅く、極めて少数の花粉管が、胚のうに達するに過ぎなかった。調査した 1,600 個の胚珠のうち、正常な受精を行ったものは 1 個もなかった。ところが自家受粉後アブラナの花粉で追加受粉した場合には、自家の花粉はよく発芽した。花粉管の多くは胚のうまで達し、受精が行われた。もっともその過程は、他家受粉の場合より 2 倍も遅く、したがって胚珠の一部は死んでしまった。しかし柱頭に近いところにある胚珠は、原則として受精したという。

ソ連学派の人々の研究(1)によると、花粉の中には酵素、ビタミン、オーキシンのような生理的活性物質が大量に含まれているとし、メントール花粉の効果は、花粉の中に含まれているそれら生理的活性物質の刺激による

ものと考えられるという。最近 Pandey(14)も、この現象は花粉から生長物質が提供されるためであろうとしている。

ダイコンの自家不和合性は、既知のように、芽胞体型 (sporophytic system) のものである。すなわち花粉の遺伝的性質は、その花粉のもっている遺伝子によって決定されるのではなく、その花粉を生じた父植物の遺伝子型によって決まるものである(21)。この機構について、近年 Dickinson ら(3)は、ハツカダイコンを供試し、電子顕微鏡及び細胞化学的研究方法を駆使して、次の事実を明らかにした。この植物では、花粉の形成に当たり、やくのタペート細胞 (tapetal cell) で作られた特殊の物質が、その成熟期に、花粉の外膜に移り、それを被うに至る。同氏らはこれを“tryphine”と称した。この“tryphine”は、自家受粉を行った場合、柱頭細胞の分泌物と作用して、カロース体 (callosic body) を形成し、自家の花粉管の生長を停止することを確かめた。一方他家受粉を行った場合には、カロース体は形成されなかったという。更に同氏ら(4)は実験を進めて、遠心分離法によって、花粉から抽出され、柱頭上におかれた“tryphine”は、柱頭の外層内に侵入できた。もしもその場合、抽出された花粉が、柱頭に対して不和合のものであれば、あたかも不和合花粉管と同じように、カロース体を作ることができたという。したがって認識物質(ある種の蛋白)が、“tryphine”中に含まれているものと考えられた。別に Heslop-Harrison 及びその共同研究者達(7, 11)も、*Iberis*, *Silene*, *Brassica* 及び *Raphanus* を供試して、同様の成績を発表している。しかし彼等は“tryphine”の代りに、“pellicle”という術語を用いている。これらの研究によると、自家不和合植物における認識花粉の効果は、花粉の中に含まれる生理的活性物質によるというよりもむしろ、花粉の“tryphine”の中に含まれた認識物質の作用によるものと考えられる。

Pandey(15)によると、*Nicotiana* においては、和合花粉に γ 線を照射して殺し、不和合花粉と混合して受粉すると、自家不和合性の弱い組合せにおいては、ある程度自殖種子が得られた。ところがそれらの材料を検鏡したところ、 γ 線を照射して殺したはずの花粉粒も、十分長い花粉管を生ずることが観察された。しかしそれらは正常な受精を行わなかったという。Sree Ramula ら(20)も、*Nicotiana* ではほぼ同様の事実を観察した。そして高度の γ 線照射によって、花粉の核機能(分裂又は受精能力のごとき)は高度に害されても、細胞質的機能(花粉管の発芽のごとき)はあまり影響されなかったと述べて

いる。しかしながら前述のように、今回の実験においては、ダイコンの花粉を75% エタノールで殺したものと及び粉碎花粉は、完全に死滅して、柱頭上で花粉の発芽を示すようなことは全然なかったことを、再び強調しておきたいと思う。

Roggen(16)によると、キャベツを供試して、花粉を水、10% アセトン、及び50% アセトンで洗い、それぞれ自家受粉を行うと、自家不和合性の弱い系統では、自家受精力を高めたが、自家不和合性の強い系統では、明らかな成績は得られなかったという。更に同氏(17)は、アブラナの花粉のエーテル抽出物を、コモチカンランの柱頭に塗り、自家受粉を行ったところ、つぼみ受粉に匹敵する程度の高い自家受精力を示したという。1976年の春、筆者もRoggen(16)に従って、ダイコンの花粉を、それぞれエーテル、50% アセトン、及び水で洗って自家受粉を試みたが、自家不和合性を弱めることはできなかった。Dickinsonら(4)も、“tryphine”を抽出する唯一の方法は、遠心分離法であり、他の溶媒ではうまくいかないと述べている。“tryphine”の抽出物及び、“tryphine”を除去した花粉を用いての自家不和合性消失の実験は、なお今後の研究課題であると考えられる。

摘 要

‘聖護院’と‘みの早生’のダイコン2品種を供試し、同じ品種内の異なる個体から採った和合花粉と、75% エタノールで処理して殺すか、又は粉碎し(認識花粉)、それらの花粉をまず受粉した後、直ちに自家の花粉を受粉した。一方同一個体につき、普通の自家受粉を行って対照区とした。得られた成績は、柱頭法によって検討した。

他家の粉碎花粉及び自家の花粉を受粉した区は、対照の自家受粉のみの区に比し、柱頭上の花粉の発芽歩合は著しく高まった。花粉管長も概して長くなり、かなり多数の花粉管は乳頭細胞内へ侵入した。一部には花粉管が長く伸び、花粉粒の内容の空虚となった空虚花粉粒も認められた(第1表)。

他家の75% エタノールで殺した花粉及び自家の花粉を受粉した場合においても、自家受粉のみの区に比し、柱頭上の花粉の発芽歩合高く、花粉管もある程度乳頭細胞内へ侵入した。また極少数ながら、空虚花粉粒も認められた(第2表)。

粉碎花粉区は、エタノールで殺した花粉区よりも、自家受精力がより向上するように思われた。

ダイコンにおいては、自家の花粉に認識花粉を加えて自家受粉を行うと、自家受精力をある程度まで高めることができるようであり、認識花粉の効果は、花粉に含ま

れる認識物質(ある種の蛋白)の作用によるものと思われる。

引用文献

1. BABADJANYAN, G. A. 1962. (亀井健三訳. 1968. 植物の異種類受粉. たたら書房. pp. 1—153).
2. DAYTON, D. F. 1974. Producing progenies by selfing in apple with the aid of recognition pollen. Proc. XIX Internat. Hort. Congr. IA. Sec. VII. Fruits. 310.
3. DICKINSON, H. G. and D. LEWIS, 1973. a. Cytochemical and ultrastructural differences between intraspecific compatible and incompatible pollination in *Raphanus*. Proc. Roy. Soc. London, B. 183: 21—38.
4. ————. ————. 1973. b. The formation of the tryphine coating the pollen grains of *Raphanus*, and its properties relating to the self-incompatibility system. Ibid. 184: 149—165.
5. GRANT, W. F., M. R. BULLEN, and NETTANCOURT, D. de. 1962. The cytogenetics of *Lotus*. I. Embryo-cultured interspecific diploid hybrids closely related to *L. corniculatus* L. Can. J. Genet. Cytol. 1: 105—128.
6. GILISSEN, L. J. W. J. and H. F. LINSKENS, 1975. Pollen tube growth in styles of self-incompatible *Petunia* pollinated with radiated pollen and with foreign pollen mixtures. Gamete Competition in Plants and Animals. pp. 201—205. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.
7. HESLOP-HARRISON, J. KNOX, R. B. and HESLOP-HARRISON, Y. 1974. Pollen-wall proteins: exine-held fractions associated with the incompatibility response in Cruciferae. Theor. Appl. Gene. 44: 133—137.
8. HOWLETT, B. J. KNOX, R. B. PAXTON, J. H. and HESLOP-HARRISON, J. 1975. Pollen wall proteins: physicochemical characterisation and role in self-incompatibility in *Cosmos bipinnatus*. Proc. Roy. Soc. London B. 188: 167—182.
9. 岩波洋造, 1975. 有機溶媒中の花粉と種子. 花粉誌. 15: 3—15.
10. KNOX, R. B. WILLING, R. R. and ASHFORD, A. E. 1972. Role of pollen-wall proteins as recognition substances in interspecific incompatibility in poplars. Nature 237: 381—383.
11. MATTSSON, O. KNOX, R. B. HESLOP-HARRISON, J. and HESLOP-HARRISON Y. 1974. Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. Nature 247: 298—300.
12. 生井兵治, 細田友雄. 1976. 受粉と受精に関する遺伝育種学的研究 I. ダイコン類とカンラン類との混合受粉による属間交雑率の向上(予報). 育学

- 雜. 26, 別冊 2: 139—140.
13. 生井兵治. 1977. 受粉と受精に関する遺伝育種学的研究Ⅱ. ハクサイの自殖稔性におよぼすダイコン花粉混合受粉の影響(予報). 育学雜. 27, 別冊 1: 146—147.
 14. PANDEY, K. K. 1975. a. Mentor pollen: possible role of wall-held pollen growth substances in overcoming intra- and interspecific incompatibility. Incompatibility Newsletter 6: 74.
 15. ———. 1975. b. Transformation, incompatibility and plant improvement. Ibid. 6: 91—121.
 16. ROGGEN, H. 1974. Pollen washing influences (in)compatibility in *Brassica oleracea* varieties. Fertilization in Higher Plants pp. 273—278. North-Holland Pub. Comp., Amsterdam.
 17. ———. 1975. Stigma application of an extract from rape pollen (*Brassica napus* L.) effects self-incompatibility in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* DC). Incompatibility Newsletter 6: 80—86.
 18. SASTRI, D. C. and SHIVANNA, K. R. 1976. Recognition pollen alters intraspecific incompatibility in *Petunia*. Ibid. 7: 22—24.
 19. STETTLER, R. F. 1968. Irradiated mentor pollen: its use in remote hybridization of black cottonwood. Nature 219: 746—747.
 20. SREE RAMULA, K. BREDEMEIJER, G. M. M. and van GASTEL, A. J. G. 1977. Influence of mentor pollen on gametophytic intraspecific incompatibility in *Nicotiana*. Incompatibility Newsletter 8: 87—90.
 21. 建部民雄. 1944. ダイコンにおける自家ならびに交雑不和合性の遺伝学的研究(1). 園学雜. 15: 61—73.
 22. WILLIAMS, R. R. and CHURCH, R. M. 1975. The effect of killed compatible pollen on self-compatibility in apple. Jour. Hort. Sci. 50: 457—461.