テッポウユリの雌ずい物質が花柱内での花粉管伸長に 及ぼす影響と受粉による花柱内物質の変動

雨木若慶*・手塚修文・山本幸男

名古屋大学農学部 464 名古屋市千種区

Effect of Pistillary Sap on the *in vivo* Pollen Tube Growth
and Changes in Components of Stylar Sap by Pollination in
Lilium longiflorum Thunb.

Wakanori AMAKI, Takefumi TEZUKA and Yukio YAMAMOTO

School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464

Summary

When stigmatic sap or stylar sap collected by centrifugation was placed on the stylar canals of bisected pistils of *Lilium longiflorum*, or when pollen grains were pre-soaked in the stigmatic sap, growth of pollen tubes in the style was accelerated even in self-combination.

When stylar sap collected from cross-pollinated styles was placed on the stylar canals of the bisected pistils, the growth of incompatible pollen tubes was significantly promoted more than by the placement of the sap from non- or self-pollinated styles.

Changes in constituents of the stylar sap after pollination were also examined. Protein content in the sap decreased in the upper 4/5 of the style in 24 hrs after pollination. Stylar sap eluted through Sephadex G-150 column showed two peaks of carbohydrates, i.e., a broad band of high molecular weight and a narrow band of low molecular weight. After cross-pollination, both peaks were lowered, while after self-pollination only the peak of low molecular weight was lowered.

These results suggest that the movement of stylar sap from the stylar tissue to the stylar canal is different between self- and cross-combinations, and that the inhibitory substance for the pollen tubes is absent even in self-combination, and that certain proteoglycans are related to self-incompatibility.

緒 言

テッポウユリ (*Lilium longiflorum* Thunb.) は、配偶体型自家不和合性を示し、その雌ずい、葯が大きく、観察の容易さなどから自家不和合性の研究によく用いられる。Ascher(1) は、配偶体型自家不和合性の反応をレギュレーター-オペロンモデルを用いて説明した。しかし、花粉管伸長のさいの代謝反応が、どのように調節されるのか、また受粉にともなう花柱内の代謝変化がどのような形で花粉管伸長の制御に関わっているのかは未だに不明である。

配偶体型自家不和合性を示す植物では、花粉管が花柱内を伸長するときに不和合花粉 (自家花粉) では花粉管

伸長速度が減じて受精に至らない。これは花粉管伸長を直接阻害する物質が雌ずいまたは花粉管内に生成されることによるのか、それとも雌ずい側で花粉管伸長に必要な物質の生成や代謝反応が抑制されることによるのかは未だ明らかでない。

テッポウユリ雌ずいの柱頭と花柱溝の上皮細胞は分化して分泌細胞の機能を持ち(4, 16, 18)、粘液を分泌する。これらの粘液は花粉管壁合成に利用されることが知られている(9)。もしこれらの粘液が自家不和合性に関連した情報伝達の媒体になっているとすると、粘液中に情報物質が存在すると考えられる。そこで筆者らは、遠心力を利用して雌ずい組織から粘液含有の汁液(sap)を採取し、縦断雌ずいに塗布して自家不和合反応に及ぼす影響を調べた。また、花柱から採取した汁液(stylar sap)に

1986年12月2日 受理

* 現在 東京農業大学農学部 156 世田谷区桜丘 1-1-1

ついて成分分析を行ない、花粉管伸長との関連を検討した。

材料及び方法

1. 植物体の育成

実験には、温室で促成栽培したテッポウユリ (*Lilium longiflorum*) の 'Georgia' (G) と 'ひのもと' (H) を用いた。開花3日前に小花柄をつけて小花を切り取り、水にさして 23℃ 下で開花させた。受粉に用いた花粉は、開花1日前の小花から採取した葯をシリカゲル上で1昼夜乾燥後、4℃ に貯蔵したものから採取した。

2. 雌ずい液の採取

雌ずいを、柱頭直下及び花柱下端で切断して柱頭、花柱に分け、花柱はさらに縦断した後、ほぼ等しい長さに横断して4切片とした。第1図に示したステンレス製の遠沈管の内管に濾紙 (TOYO No.2) 2枚を敷いた上に組織切片を入れ、遠心 (5,000×g, 20分) した。柱頭または花柱切片から振り出された液を、それぞれ柱頭液 (stigmatic sap)、花柱液 (stylar sap) とした。

3. 雌ずい内の花粉管長の測定

開花後1日目の小花から花被、花糸を除き、小花柄は5mmを残して切除した。この雌ずいを Hiratsukaら(8)の方法で縦断し、自家(不和合)または他家(和合)受粉し、25℃ 暗黒下で培養した。48時間の培養後、コットンブルー液を滴下し、実体顕微鏡下で花粉管長を測定した。1処理区には、10本の雌ずいを供試した。

4. 雌ずい液が花粉管伸長に及ぼす影響

柱頭液が花粉管伸長に及ぼす影響: 各品種の柱頭から採取した柱頭液に花粉を15分間浸漬して十分に膨潤した後に、縦断雌ずいに自家及び他家受粉することにより調べた。

花柱液が花粉管伸長に及ぼす影響: 未受粉花柱からは

開花後2日目に、受粉した花柱からは受粉後24時間目にそれぞれ花柱液を採取し、それぞれの花柱液を縦断雌ずいの花柱溝全体に塗布した後、自家受粉した。

5. 花柱液中のタンパク質の定量

受粉した花柱の、部位による花柱液中のタンパク質含量の変動の測定のために、未受粉、自家または他家受粉後24時間目に、それぞれ10本の 'ひのもと' の花柱 (約10cm長) を5等分して、その各部位 (約2cmの切片) 50個から採取した花柱液に、10% トリクロル酢酸を等量加えてタンパク質を沈殿させた。その沈殿を1N 水酸化ナトリウムで溶解後、Lowryら(13)の方法によりタンパク質を定量した。

受粉後の花柱液中のタンパク質含量の経時変動については、受粉後12 (開花後36時間となる。第7図)、24、48、96時間目に各10本の花柱から花柱液を採取し、上記と同様の操作により定量した。

6. 花柱液の Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィーによる分析

花柱液0.6mlを、溶出に用いる0.1M リン酸緩衝液 (pH5.6) であらかじめ平衡にした Sephadex G-150 カラム (1.5×42cm) にのせ、溶出液はフラクションコレクターを用いて1.0mlまたは1.6ml毎に分画した。各分画について、全炭水化物はフェノール硫酸法(6)、ウロン酸は Blumenkrantz と Asboe-Hansen(3) の方法により、タンパク質またはアミノ酸は Lowryら(13)の方法により定量した。

結 果

1. 縦断雌ずいにおける花粉管伸長

'Georgia' (G) と 'ひのもと' (Hinomoto) (H) の雌ずいのそれぞれに和合及び不和合受粉し、花粉管長の変化を経時的に示したのが第2図である。'Georgia' 花柱では 'ひのもと' 花柱の場合に比べ、和合、不和合花粉とも花粉管伸長が速かった。また、受粉後48時間目の和合花粉管長に対する不和合花粉の花粉管長の割合は、'Georgia' 花柱では41.3%、'ひのもと' 花柱では34.5%であり、'ひのもと' 花柱における自家不和合反応が顕著であった。従って、以後の受粉の実験には雌側 (花柱) に 'ひのもと' を用いた。

2. 雌ずい液が花粉管伸長に及ぼす影響

開花2日後の未受粉雌ずいから採取した柱頭液及び花柱液を縦断花柱の花柱溝に塗布し、不和合受粉後48時間培養したときの花粉管伸長を示したのが第3図である。柱頭液あるいは花柱液の何れを塗布しても不和合花粉の花粉管伸長は促進された。

次に、'Georgia' あるいは 'ひのもと' 花粉をあらかじめ

Fig. 1. Illustration of a centrifuge tube for collecting pistillary sap. F: filter paper, I: inner tube, O: outer tube, P: pore.

Fig. 2. Pollen tube growth in the styles of *Lilium longiflorum*. The styles were incubated at 25°C after self- or cross-pollination.

Fig. 3. Pollen tube growth in the canals of the longitudinally bisected styles of *Lilium longiflorum* 'Hinomoto' smeared with pistillary (stigmatic or stylar) sap from 'Hinomoto' or 'Georgia'. The bisected styles were incubated at 25°C for 48 hrs after pollination with pollen grains of 'Hinomoto'(self) or 'Georgia'(cross). H: Hinomoto, G: Georgia.

Vertical lines indicate standard errors.

め 'Georgia' あるいは 'ひのもと' 柱頭液に 15 分間浸漬してから 'ひのもと' に受粉したときの花粉管伸長を示

Fig. 4. The influence of pre-soaking of pollen in stigmatic sap on pollen tube growth in the canals of bisected styles of *Lilium longiflorum* 'Hinomoto'.

Pollen ('Hinomoto' or 'Georgia') was soaked in stigmatic sap for 15 min just before pollination. The styles were incubated at 25°C for 48 hrs after pollination.

H: Hinomoto, G: Georgia.

Vertical lines indicate standard errors.

したのが第 4 図である。花粉を柱頭液へ浸漬すると、対照区と比較して和合および不和合花粉双方の花粉管伸長を促進したが、どちらの品種から取り出した柱頭液でも効力に差は認められなかった。

第 5 図は、受粉後 24 時間経過した花柱から花柱液を採取し、縦断花柱に塗布して花粉管伸長に及ぼす影響を調べた結果を示したものである。不和合受粉した花柱から採取した液と未受粉花柱から採取した液の間には差がなかったが、和合受粉した花柱から採取した液は、未受粉及び不和合受粉後採取した花柱液よりもさらに花粉管伸長を促進した。

3. 受粉による花柱内物質の変動

受粉後 24 時間目に花柱各部から花柱液を採取し、タンパク質含量を比較したのが第 6 図である。受粉後 24 時間目には花粉管は第 6 図の A の部分にのみ存在するのであるが (第 2 図参照), 受粉により, A のみならず, B, C, D の各部分においてもタンパク質含量の低下がみられた。また, 花柱全体から採取した花柱液のタンパク質含量の変化をみると, 未受粉花柱では開花後次第にタン

Fig. 5. Pollen tube growth in the canals of bisected styles of *Lilium longiflorum* 'Hinomoto' smeared with pollinated or non-pollinated stylar sap. The bisected styles were incubated at 25 °C for 48 hrs after pollination with pollen grains of 'Hinomoto'(self) or 'Georgia'(cross). Vertical lines indicate standard errors.

Fig. 6. Protein content in the stylar sap from the respective sections of pollinated or non-pollinated styles of *Lilium longiflorum* 'Hinomoto'. Stylar sap was collected from the styles incubated at 25°C for 24 hrs after pollination with pollen grains of 'Hinomoto'(self) or 'Georgia'(cross).

パク質含量が増加した(第7図)。これに対し、受粉により花柱液内のタンパク質含量は著しく低下し、受粉後 48 (開花後 72) 時間目以降では和合受粉よりも不和合受粉した花柱でより低下した。

Fig. 7. Changes in protein content in stylar sap from pollinated or non-pollinated styles of *Lilium longiflorum* 'Hinomoto'. The styles were incubated at 25°C.

次に、花柱液内成分の変動をさらに詳しくみるため、未受粉および受粉後 40 時間目に花柱液を採取し、Sephadex G-150 を用いて得られたカラムクロマトグラムを第 8 図に示す。未受粉花柱から採取した花柱液の炭水化物の溶出パターンは、高分子側のピーク (溶出量で 20 から 50ml) と低分子側のピーク (溶出量で 60 から 75 ml) の 2 つを示した。ウロン酸の溶出パターンも、炭水化物の溶出パターンとはほぼ同調する 2 つのピークがみられた。タンパク質およびアミノ酸の溶出パターンは余り明瞭ではないが 4 つのピークを示した。これら各成分の溶出パターンは受粉によって変動した。特に炭水化物でその変動が顕著であった。すなわち、不和合受粉後採取した花柱液は炭水化物の低分子側ピークが著しく低下し、和合受粉後の花柱液は高分子側のピークが著しく低下した。ウロン酸含量については、未受粉と比較すると不和合受粉後の花柱液では変化はみられないが、和合受粉後の花柱液では高分子側のピークが低下した。アミノ酸にあたる Lowry 法陽性のもっとも低分子側のピークは、受粉によって高まった。

遠心で集めた花柱液中の炭水化物含量の、受粉後の経時変化を示したのが第 9 図である。不和合受粉の場合、高分子側ピークにはほとんど変化がみられないが、低分子側ピークは徐々に低下した。一方、和合受粉の場合、初めに低分子側ピークが著しく減少し、その後高分子側ピークが低下し、また低分子側ピークの回復がみられた。

考 察

柱頭液を縦断雌ずいの花柱溝に塗布すると、不和合花粉の花粉管伸長が著顕に促進された(第 3 図)。もし、花

Fig. 8. Elutions pattern of pollinated or non-pollinated styler sap of *Lilium longiflorum* 'Hinomoto' through Sephadex G-150 column. Volume of each fraction collected was 1.0 ml. The styles were incubated at 25°C. Styler sap was collected 40 hrs after pollination with pollen grains of 'Hinomoto' (self) or 'Georgia' (cross).

○: carbohydrates, ●: protein and amino acids, ▲: uronic acids.

Fig. 9. Elution pattern in carbohydrates of pollinated or non-pollinated styler sap of *Lilium longiflorum* 'Hinomoto' through Sephadex G-150 column. Volume of each fraction collected was 1.6 ml. The styles were incubated at 25°C for indicated periods after pollination with pollen grains of 'Hinomoto' (self) or 'Georgia' (cross).

粉と雌ずいの間の認識に受粉後花粉が接触する柱頭液が関与しているとするれば、あらかじめ柱頭液に浸漬した花粉を受粉することにより、柱頭液を採取した品種の自家不和合遺伝子の違いが花粉管伸長の差としてあらわれると予想されたが、異品種の柱頭液に浸漬後受粉しても花粉管伸長に差はみられなかった (第4図)。Ascher と Drewlow(2) は、テッポウユリの柱頭粘液を花柱溝に注入して自家不和合反応への影響を調べ、和合および不和

合花粉の花粉管伸長は若干促進されたが、自家不和合反応には影響がなかったと報告しており、本実験結果と一致している。また、三木(14)は、テッポウユリ柱頭粘液中に花粉の発芽と花粉管の伸長を促進する物質が存在するが、この物質は自家不和合反応には関与していないと報告している。さらに、Labarca と Loewus(10)は、 ^{14}C でラベルした柱頭粘液を花柱溝に注入して花粉管壁への取込みを調べ、柱頭粘液成分のほとんどを占める多

糖類が花粉管壁合成の材料として利用されていることを示した。これらのことから、柱頭粘液は自家不和合反応とは無関係で、受粉時に花粉に花粉管壁合成の材料を与えるという栄養的役割をになうものと思われる。本実験で柱頭液を花柱溝に塗布したときにみられた著しい花粉管伸長の促進は、柱頭粘液の栄養的役割に加え、遠心によって柱頭組織に存在した何らかの物質が取り出され、花粉管伸長を助けたことによるのであろう。

次に、未受粉の花柱から採取した花柱液を縦断花柱に塗布しても不和合花粉の花粉管伸長が促進された(第3図)。これは、花柱溝に分泌される粘液または花柱組織に花粉管伸長を促進する物質が存在することを示している。受粉後に花柱液を採取すると、和合受粉後採取した花柱液は未受粉、不和合受粉後採取した花柱液に比較して、有意に花粉管伸長を促進した(第5図)。これは、和合受粉後には花柱内で花粉管伸長を促進する物質がさらに増加しているためと思われる。

そこで、受粉が花柱液の成分組成に及ぼす影響をみると、花柱液内のタンパク質含量は受粉後、花柱の上部4/5の部分において速やかに減少すること(第6, 7図)、また、炭水化物は和合受粉後には低分子側、高分子側双方のピークが減少するが、不和合受粉後には低分子側ピークのみが減少することが明らかとなった(第8, 9図)。

Spanjers (17) は、テッポウユリの柱頭に受粉すると生電的な電位変化(bioelectric potential)が生じ、和合受粉と不和合受粉では電位変化のパターンが異なることをみている。また、Dickinson ら(5) は、テッポウユリの花柱溝から注射器を用いて粘液を採取して等電点電気泳動にかけた結果、その泳動パターンが受粉により変化することを示した。これらのことは、受粉によって柱頭に与えられた花粉の情報は速やかに花柱内を伝達され、花柱の代謝変化を引き起こすことを示唆している。

Herrero と Dickinson (7) は、テッポウユリと同じ配偶体型自家不和合性を示すベチュニアにおいて受粉による花柱内のデンプン含量の変動を調べ、不和合受粉後のデンプン含量の低下が和合受粉後に比較して少ないことを報告している。一方、Labarca と Loewus (11) は、テッポウユリの花柱溝に分泌される粘液をペンタエリスリトール溶液で洗い流して集め、その主成分が arabinogalactan であり、粘液の分泌量には受粉による差異がみられたものの、粘液の Sephadex G-100 ゲル濾過パターンには受粉による違いがみられなかったとしている。本実験の結果では、和合受粉後に花柱内物質をより低分子化して花粉管が利用しやすい形に変換するような代謝変化が起こるのに対し、不和合受粉後にはこのような代謝変

化が起こらなかった。花柱内の炭水化物代謝において、このような差がみられたのは、Labarca と Loewus (11) とは花柱内物質の採取方法に違いがあったためと考えられよう。花柱内物質の含量低下の原因としては、花柱での生産または分泌量の低下(18)、花粉管による物質の取込み(15)、炭水化物代謝による低分子化による減少(7)の3つが考えられるが、これらの原因の何れがどの程度関与しているか不明である。研究者の用いる実験方法により、異なる結果を生むのであろう。

未受粉花柱の花柱液(花柱溝分泌液と花柱組織液の双方を含むと思われる)の中に花粉管伸長を顕著に促進する栄養物質が存在すると思われる。自家受粉後の花柱液と未受粉の花柱液の間には花粉管伸長の促進程度に差がみられなかったことから、花粉管伸長を直接阻害する物質の局在は考えられなかった。intact 雌ずいに自家受粉したときの花粉管伸長速度が遅いのは、花粉管伸長を促進する栄養物質の花柱溝への移動が抑えられたことに因るのかもしれない。遠心力で汁液を花柱からしぼり出して花柱溝に与えれば、不和合組合せでも花粉管は伸びてしまう。花柱液の主成分は、成分変動のパターンから見てもプロテオグリカン(proteoglycan)であろう。

今後は受粉後花柱内で速やかに起こる花柱液の移動を和合、不和合組合せについて比較する必要がある。さらに、Linskens (12) が提唱している花粉と雌ずい間の“認識反応”と花柱における“拒絶反応”(花粉管伸長速度の低下)と呼ばれる現象についても、その内容を粘液の挙動の面から明らかにする必要がある。

摘 要

テッポウユリの雌ずいの柱頭または花柱から遠心分離法により採取した組織液を、雌ずい内に塗布し、それが花粉管伸長に及ぼす影響と、受粉により花柱液含有成分が如何なる変動を受けるかを調べた。

柱頭液は、雌ずいへの塗布、または花粉をそれに浸漬後受粉させることにより、花粉管伸長を促進したが、採取した品種の間にはその促進の程度に差はなかった。

花柱液は、雌ずいへ塗布すると不和合花粉の花粉管伸長を促進した。また和合受粉後に採取した花柱液は未受粉、不和合受粉後に採取したものよりもさらに花粉管伸長を促進した。

花柱液内のタンパク質含量は、受粉後速やかに減少した。炭水化物については、不和合受粉後低分子炭水化物のみが減少し、高分子炭水化物は低下しなかったが、和合受粉後には高分子炭水化物含量も低下した。

以上のことから、花柱溝への花柱液分泌あるいは移動が減少することと、花柱液内炭水化物の低分子化が起こ

らないことが自家花粉の花粉管伸長速度が遅い原因と考えられた。

引用文献

1. ASCHER, P. D. 1966. A gene action model to explain gametophytic self-incompatibility. *Euphytica* 15 : 179—183.
2. ASCHER, P. D. and L. W. DREWLOW. 1970. Stigmatic exudate: A potential carrier of exogenous substances into the style of *Lilium longiflorum* Thunb. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95 : 706—708.
3. BLUMENKRANTZ, N. and G. ASBOE-HANSEN. 1970. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* 54 : 484—489.
4. DASHEK, W. V., H. R. THOMAS and W. G. ROSEN. 1971. Secretory cells of lily pistils. II. Electron microscope cytochemistry of canal cells. *Amer. J. Bot.* 58 : 909—920.
5. DICKINSON, H. G., J. MORIARTY and J. LAWSON. 1983. Pollen-pistil interaction in *Lilium longiflorum*: The role of the pistil in controlling pollen tube growth following cross- and self-pollinations. *Proc. R. Soc. Lond. B* 215 : 45—62.
6. DUBOIS, M., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. ROBERTS and F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 : 350—356.
7. HERRERO, M. and H. G. DICKINSON. 1979. Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: Changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *J. Cell Sci.* 36 : 1—18.
8. HIRATSUKA, S., T. TEZUKA and Y. YAMAMOTO. 1983. Use of longitudinally bisected pistils of *Lilium longiflorum* for studies on self-incompatibility. *Plant Cell Physiol.* 24 : 765—768.
9. KROH, M., H. MIKI-HIROSHIGE, W. ROSEN and F. LOEWUS. 1970. Incorporation of label into pollen tube walls from myoinositol-labeled *Lilium longiflorum* pistils. *Plant Physiol.* 45 : 92—94.
10. LABARCA, C. and F. LOEWUS. 1972. The nutritional role of pistil exudate in pollen tube wall formation in *Lilium longiflorum*. I. Utilization of injected stigmatic exudate. *Plant Physiol.* 50 : 7—14.
11. LABARCA, C. and F. LOEWUS. 1973. The nutritional role of pistil exudate in pollen tube wall formation in *Lilium longiflorum*. II. Production and utilization of exudate from stigma and stylar canal. *Plant Physiol.* 52 : 87—92.
12. LINSKENS, H. F. 1975. Incompatibility of *Petunia*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 188 : 299—311.
13. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275.
14. 三木寿子. 1972. Stigmatic exudate. *花粉* 3 : 14—18.
15. RAFF, J. W., J. M. PETTITT and R. B. KNOX. 1983. Cytochemistry of pollen tube growth in stigma and style of *Prunus avium*. *Phytochemistry* 31 : 214—231.
16. ROSEN, R. G. and H. R. THOMAS. 1970. Secretory cells of lily pistils. I. Fine structure and function. *Amer. J. Bot.* 57 : 1108—1114.
17. SPANJERS, A. W. 1981. Bioelectric potential changes in the style of *Lilium longiflorum* Thunb. after self- and cross-pollination of the stigma. *Planta* 153 : 1—5.
18. YAMADA, Y. 1965. Studies on the histological and cytochemical changes in the tissues of pistil after pollination. *Japan. J. Bot.* 19 : 69—82.