

第5節 植物の生殖器官・植物の花粉管伸長の観察

【目的】 C. Darwinの著書「Different form of flowers」にも掲載されているように、植物の中には花の形態に多型を示すものがある。また、それらの植物では花の形態の多型と自家不和合性が密接に関係しているものも多い。例えば、フツウソバのような二花柱型自家不和合性植物では雌蕊が長く雄蕊の短い長柱花を持つ個体と雌蕊が短く雄蕊の長い短柱花を持つ個体が存在し、異なる型の花を持つ個体間でのみ交配が可能である。これは同型花間の受粉を行った場合、花柱内での花粉管伸長が阻害され受精が成立しないためである。本節の第1の目的は二花柱型自家不和合性植物の小花を実際に観察し、二型花間の形態の違いを認識してもらうことにある。第2の目的は植物の受精における重要な過程の1つである花粉管伸長の観察、さらに自家不和合性による花柱内での自己花粉の伸長阻害の観察を行うことである。本節を通じて植物の自己、被自己の認識機構に興味を持ってもらい、さらにその生物学的、進化学的意義について考えてもらえればと願っている。

5.1 フツウソバの交配

【安全上の注意】 先の鋭利なピンセットを用いるのでケガのないよう注意すること。

【器具】 ピンセット、三角フラスコ

【材料】 フツウソバ (*F. esculentum* Moench)

【交配】 今回の実習では長柱花 (♀) - 長柱花間 (♂), 短柱花 (♀) - 短柱花間 (♂), 長柱花 (♀) - 短柱花間 (♂), 短柱花 (♀) - 長柱花間 (♂) での交配を行い、それぞれの交配組での花柱内での花粉管の伸長を経時的に比較する。時間の都合上、各自これらの4組み合わせから2つを選んで交配を行う。

- 1) 各自、短柱花個体、長柱花個体から花のついた枝を切り取り、水の入った三角フラスコへ入れる。
- 2) 短柱花個体、長柱花個体からそれぞれ花を4個ずつ選び、肉眼 (もしくはルーペ) でピンセットを用いて雌蕊を傷つけないように葯を除去する。葯がはじけないよう注意する。
- 3) 花粉親の葯の基部をピンセットでつまんで葯を摘出し、母親の雌蕊の3本の柱頭に葯をすりつけて受粉を行う。受粉は1) 長柱花 (♀) - 長柱花間 (♂), 長柱花 (♀) - 短柱花間 (♂) の組み合わせ、もしくは2) 短柱花 (♀) - 短柱花間 (♂), 短柱花 (♀) - 長柱花間 (♂) の組み合わせで行う。各交配組み合わせで2つの小花 (雌蕊) を用いる。

5.2 雌蕊の固定、アニリンブルー染色、検鏡

【安全上の注意】 先の鋭利なピンセットを用いるのでケガのないよう注意すること。水酸化ナトリウム液、アニリンブルー溶液が皮膚などについた場合は速やかに水洗すること。

【試薬】 固定液, 70%エタノール, 蒸留水, 1.5N水酸化ナトリウム, 染色液 (1%アニリンブルー,

0.1Mリン酸カルシウム)

【器具】 1.5mlチューブ (24本), ピンセット, スライドグラス (4枚), カバーグラス, ピペットマン (20–200 μ l), 黄色チップ, 恒温器, 実体顕微鏡, 蛍光顕微鏡

【固定】

- 1) 4本の1.5mlチューブに固定液 (酢酸: エタノール=1:3) を1mlずつ分注する。
- 2) 受粉20分後, 50分後の小花を固定液の入ったチューブに移す。1つのチューブに1つの小花を入れ, チューブのふたには受粉後の時間と交配の組み合わせを記しておく。
- 3) 4本の1.5mlチューブに70%エタノールを1mlずつ分注する。固定45分後に小花を70%エタノールの入ったチューブに移し, リンスする (1分)。1つのチューブに1つの小花を入れ, チューブのふたには受粉後の時間と交配組み合わせを記しておく。以降の作業では, 1つのチューブには1サンプルを入れる。サンプルを新しいチューブに移すごとにチューブのふたにマジックで受粉から固定までの時間と交配組み合わせを記しておく。
- 4) 4本の1.5mlチューブに蒸留水を1mlずつ分注しておく。70%エタノールでリンスした小花をピンセットでスライドグラス上に移し, 実体顕微鏡下でピンセットを用いて雌蕊を小花から摘出する。雌蕊の基部をピンセットの先で軽く押してやると雌蕊が小花から簡単にとれる。このとき花柱を傷つけないように注意する。摘出した雌蕊を速やかに蒸留水の入ったチューブに移し, 雌蕊をリンスする (1分)。

【染色】

- 1) 1.5N水酸化ナトリウム溶液500 μ lを4本の1.5mlチューブに分注する。蒸留水でリンスした雌蕊を水酸化ナトリウムの入ったチューブに移し, 60°Cで30分処理し, 組織を解離させる。
- 2) 4本の1.5mlチューブに蒸留水を1mlずつ分注し, 水酸化ナトリウム溶液で解離処理を行った雌蕊を蒸留水の入ったチューブに移しリンスする (3分)。
- 3) 4本のチューブに1%アニリンブルー染色液を500 μ lずつ分注しておく。蒸留水でリンスした雌蕊をアニリンブルー染色液の入ったチューブに移し45分間染色する。

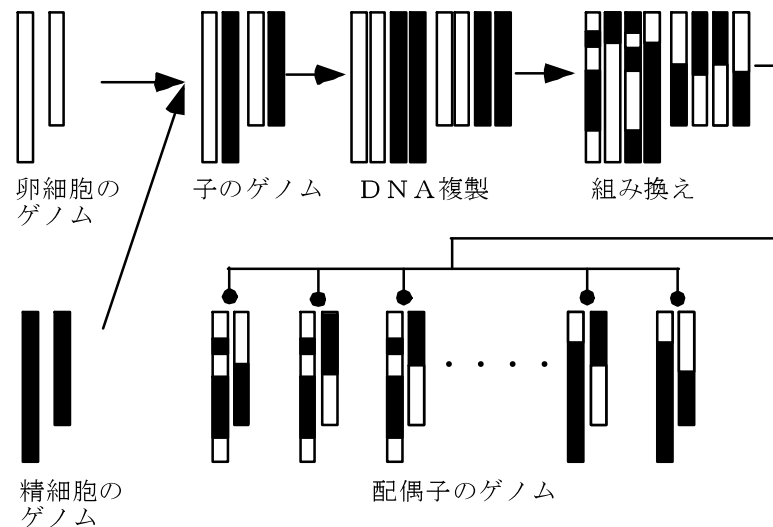
【検鏡】 花粉管伸長は植物の受精における重要な過程の1つである。花粉管伸長は, 細胞分裂ではなく, 花粉細胞に極性ができその一部が先端となって伸びる方式 (tip growth) をとっており, 神経細胞の軸索, 植物の根毛, カビ類の菌糸等が同様の伸長方式をとっている。今回の実習では蛍光顕微鏡を用いてアニリンブルーにより染色された花粉管を観察する。花粉管の細胞壁の主成分はセルロース, カロース, ペクチンである。このうちアニリンブルーはカロースと特異的に結合するため, 花粉管の伸長を観察するために頻繁に用いられる。検鏡時のポイントは同型花間と異型花間での1) 花粉管伸長速度の差, 2) 花柱基部 (珠孔付近) への花粉管の到達率の差である。また, うまく染色できたものでは原形質を花粉管の先端部にとどめるための栓 (カロース栓) が観察できる。

- 1) 雌蕊を先端を切った黄色チップを用いて染色液ごと取り出し, スライドグラス上にのせ, カバーグラスをかける
- 2) 上記の検鏡時のポイントを参考に蛍光顕微鏡で検鏡を行う。

5.3 付録

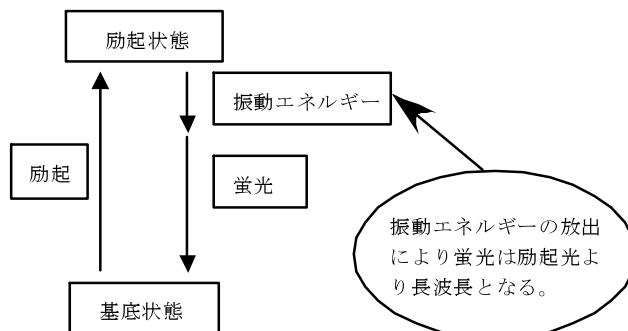
【植物の繁殖様式（自殖性と他殖性）】

植物には自殖性と他殖性の2通りの繁殖様式が存在する。自殖性植物は安定した次代個体の獲得が可能であり、時には爆発的に個体数を増大させ分布域を拡大できる利点を持つ。逆に他殖性植物では次代個体数の確保が自殖性種ほど容易でなく、また一個体では受精が成り立たないため分布域の拡大も容易でない。このような欠点を持つにもかかわらず植物界に多くの他殖性種が存在するのは、他殖性種は自殖性種に比べ、受精時、および減数分裂時に効果的にゲノムの多様度を増大させることができるためと考えられる（下図参考）。他殖性種は自殖性種より環境の変動に対して態勢的であるのだろう。



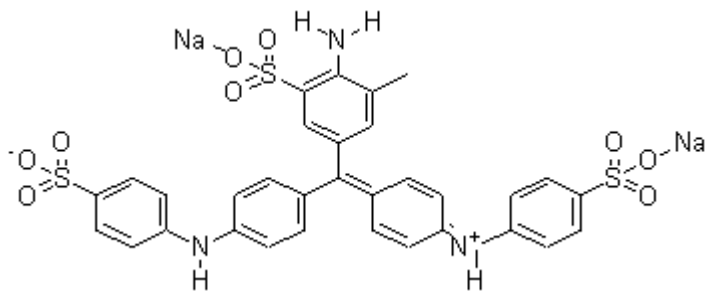
有性生殖におけるゲノムの多様性獲得の模式図。受精では両親のゲノムが合わさって子のゲノムになる。子世代での減数分裂において組み換えと染色体の再配分がおこり配偶子（胚嚢細胞、花粉細胞）のゲノムが構成される。

【蛍光の原理】



光エネルギーを吸収し、そのエネルギーを再び光として発する現象を光発光とよぶ。蛍光は光発光の一種。光発光を行う物質は光エネルギーを吸収し、その電子が励起される。励起された電子は運動エネルギーと光エネルギーを發し、基底状態へと戻る。この過程で放出される光が蛍光である。蛍光は励起光にくらべ波長が長くなるため、蛍光の波長を選択的に透過させるフィルターを用いることにより蛍光のみが検出可能となる。

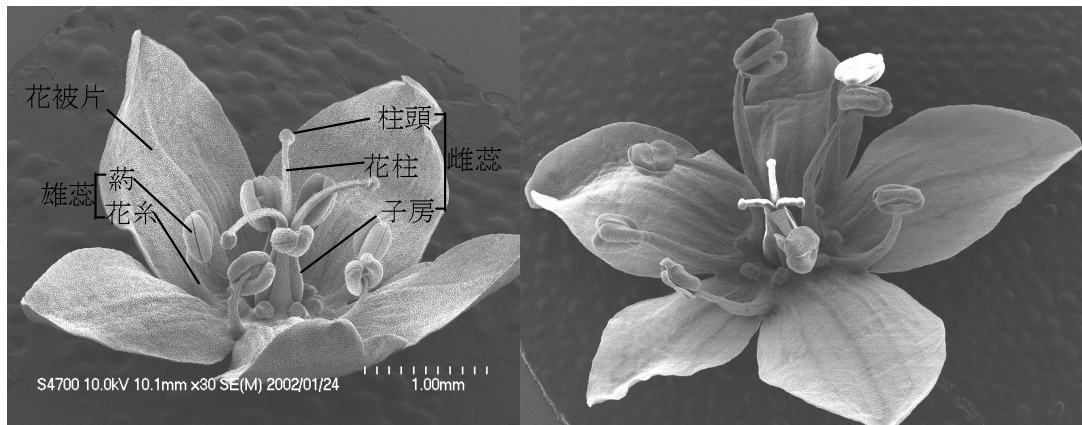
【アニリンブルー (C₂₀H₂₅N₃Na₂O₉S₃) の構造式】



【フツウソバの二花柱型自家不和合性】

フツウソバは二花柱型自家不和合性を示す完全他殖植物である。花型を決定する遺伝子は自家不和合性を決定する遺伝子と緊密に連鎖してS遺伝子群を構築し、長柱花がss、短柱花がSsとする一対の対立遺伝子群に支配されている。異なる型の花では花粉のサイズにも差がみられ、S遺伝子群にはこれらを決定する遺伝子も含んでいると推察されている。

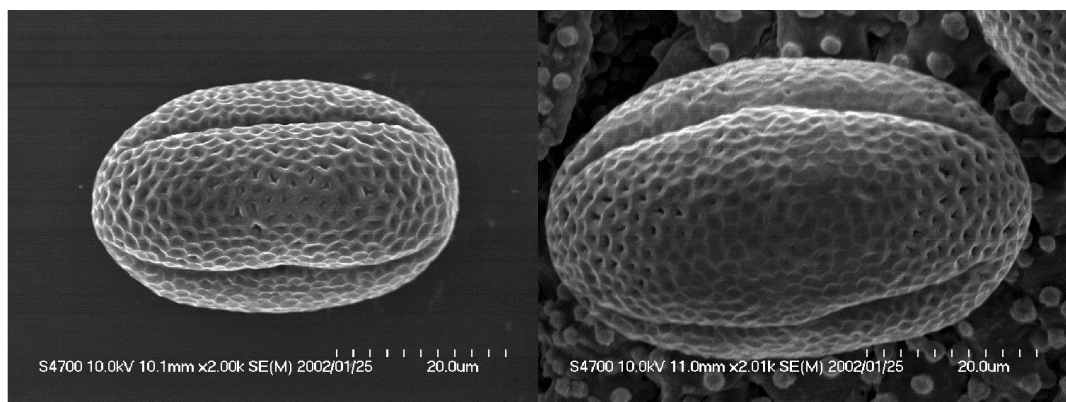
【フツウソバの小花】



フツウソバの長柱花

フツウソバの短柱花

【フツウソバの花粉】



長柱花の花粉

短柱花の花粉