

糖の種類と濃度がニチニチソウ花粉管の発芽と伸長に及ぼす影響

西原高等学校自然科学部 2 年
安里 正喜・武内 聖・比嘉 海斗

要約

ニチニチソウの花粉発芽および花粉管伸長特性を調べるために実験を行った。ニチニチソウは花粉表面にブドウ糖を持っており、柱頭にはショ糖と麦芽糖が含まれていた。また、花粉の発芽が高濃度のブドウ糖で促進され、花粉管伸長はショ糖で促進された。

1. はじめに

ニチニチソウ (*Catharanthus roseus* L.) はマダガスカル原産のキョウチクトウ科ニチニチソウ属の一年生草本である(野呂ら, 2005)。ニチニチソウは初夏から晩秋まで次々に花が咲くためにその名があり、園芸植物として鉢植えや地植えで親しまれている(金田ら, 2013)。私たちが通う西原高校においては、花壇で栽培されているだけでなく、一部が逸脱して野生化しており、市街地において初夏を彩る草花としても知られている。しかし、ニチニチソウはバラなどの多くの園芸植物と異なり品種が少ない(八代, 2008)。一方で近年ではニチニチソウの成分であるビンカアルカロイドに抗ガン剤としての作用が見いだされ、医療現場でも注目されている(中野ら, 2003, 野呂ら, 2005)。このように園芸的価値および医薬品としての価値が見いだされているニチニチソウであるが研究は進んでおらず、また品種も少ないために利用しにくいという側面がある(八代, 2008)。これはニチニチソウが主に自家受粉を行うために品種改良をしにくいというのが原因であり、ニチニチソウの受粉および受精メカニズムを探ることはニチニチソウの利用価値を拡大させるためにも重要なことである。

私たちは生物の授業で植物の生殖について学び、自然科学部で植物の研究をしようと考えた。そこで校内でよく見かけるニチニチソウの花に着目して、花の内部構造を調べたところ、開花している花では常に花粉が見られることに驚いた。また、寒天培地に花粉をまき花粉管の伸長を観察すると、容易に花粉管の発芽および伸長がみられることがわかった。このようにニチニチソウ花粉の観察を進める中で、私たちはニチニチソウ花粉の発芽および伸長には条件があるのか疑問に思った。一般的に花粉管の伸長に用いられる糖はショ糖であるが、二糖類であるショ糖がどんな役割をしているかについてははっきりとした理由がまだわかっていない(前田ら, 2008)。そこで私たちは寒天培地に用いる糖の種類と濃度を変えて、ニチニチソウの花粉管伸長にどのような差異が現れるか観察し、培地の糖の濃度および種類がニチニチソウの花粉管発芽および伸長に及ぼす影響を考察した。

2. 材料および方法

・サンプリング

ニチニチソウは校内に植栽されているものを利用した。サンプリング後はただちに葯および柱頭を取り出して実験に供した。

・花粉および柱頭に含まれる糖の推定

開花したニチニチソウの花 5 本から花粉を取り出して 1.5mL マイクロチューブに入れ、蒸留水を 1.0mL 加え、10 分間タッピングして糖を抽出した。また、開花した花では受粉が確認されたため、受粉していない花蕾の柱頭を取り出して、花粉と同様に糖を抽出した(田辺ら, 1970)。花粉および柱頭抽出液を尿糖試験紙(ウリエース Ga, TERMO)にしみこませて、ブドウ糖の存在を確認した(小林ら, 2006)。なお、尿糖試験紙は、ブドウ糖存在下では、試験紙の色が黄色から緑色に変色した。さらに、抽出液を同様にショ糖試験紙(ショ糖試験紙, 東北文教大学)および麦芽糖試験紙(麦芽糖試験紙, 東北文教大学)にしみこませてショ糖および麦芽糖の存在を確認した(正元ら, 2012, 戸谷, 2015)。なお、ショ糖試験紙ではショ糖の存在下で、麦芽糖試験紙は麦芽糖の存在下で白色から紫色に変色した。ただし、ショ糖試験紙、麦芽糖試験紙はともにブドウ糖存在下でも変色するため、尿糖試験紙で事前に反応が起きないことを確認してから実験を行った。

・糖含量の測定

糖含量はフェノール硫酸法を用いて波長 480nm における吸光度を測定し、全糖として葯および柱頭あたりのグルコース当量を算出した(石原, 1966)。

・花粉および花粉管におけるデンプンの挙動

成熟花粉を取り出し、ヨウ素ヨウ化カリウムで染色することで、デンプンの有無を確認した(岩波, 1985)。さらに、花粉管伸長を確認した後、同様にヨウ素ヨウ化カリウムで染色することで、デンプンの挙動を観察した。

・花粉管の発芽および伸長

糖によるニチニチソウ花粉の発芽および花粉管伸長を観察するために単糖類であるブドウ糖および果糖、二糖類であるショ糖、麦芽糖、乳糖をそれぞれ 0.30mol/L に調整した 10%寒天培地に花粉を播種した(小泉ら, 1992)。さらに対照実験として糖と同様に浸透圧を $0.76 \times 10^6 \text{Pa}$ にそろえた塩化カリウム培地にも同様に花粉を播種した。花粉は播種密度によって発芽率が変わるため、できるだけ密にならないように播種した(山口ら, 2000)。反復実験はそれぞれ 3 回ずつ行った。播種後、総合倍率 600 倍で花粉の様子を検鏡し、播種 30 分後の発芽花粉の割合、播種 60 分後の崩壊花粉の割合、花粉管の平均伸長速度を測定し、糖濃度による花粉管の発芽・伸長特性を観察した。なお、実験時の気温は 30℃であり、湿度は 65%から 70%に保たれていた。

さらに糖濃度による花粉の発芽および花粉管伸長を観察するためにショ糖濃度 0mol/L, 0.15mol/L, 0.30mol/L, 0.60mol/L に調整した 10%寒天培地に花粉を播種した(岩波ら, 1998, 松原ら, 1999)。総合倍率 600 倍で花粉の様子を検鏡し, 播種 30 分後の発芽花粉の割合, 播種 60 分後の崩壊花粉の割合, 花粉管の平均伸長速度を測定し, 糖濃度による花粉管の発芽・伸長特性を観察した。測定は 10 分おきに 6 回測定し, 反復は 3 回行った。さらにブドウ糖, 果糖でも同様の実験を行い, 異なる糖濃度下における花粉管の発芽率・崩壊率, 平均伸長速度を測定した。なお, 本実験は 7 月および 12 月の 2 回行い, 7 月期の実験時の気温は 30℃であり, 湿度は 65%から 70%に保たれていた。また, 12 月期の実験時の気温は 20℃であり, 湿度は 50%から 60%に保たれていた。

3. 結果

①校内のニチニチソウ植栽および自生状況

実験は 2016 年 6 月から 8 月にかけて行った。この期間中は台風接近時を除いてほぼ毎日ニチニチソウの開花が確認できた(図 1.)。また, ニチニチソウは花壇で植栽されているものだけでなく, 逸脱しているものも確認された(図 2.)。ニチニチソウは長花柱花であり(図 3.), 花器上部で葯と柱頭が接していた(図 4.)



図 1. 植栽されたニチニチソウ



図 2. 逸脱したニチニチソウ



図 3. ニチニチソウの花器



図 4. ニチニチソウの葯

②花粉および柱頭の糖の検出

花粉抽出液を尿糖試験紙につけたところ変色したため、ブドウ糖の存在が確認できた。しかし、柱頭抽出液からはブドウ糖は検出されなかった。ショ糖試験紙および麦芽糖試験紙は、ブドウ糖存在下でも反応するため、花粉におけるショ糖および麦芽糖の存在ははっきりしなかった。しかし、柱頭抽出液は尿糖試験紙には反応せず、ショ糖試験紙および麦芽糖試験紙には反応が見られたため、柱頭におけるショ糖および麦芽糖の存在が確認できた(図 5.)。

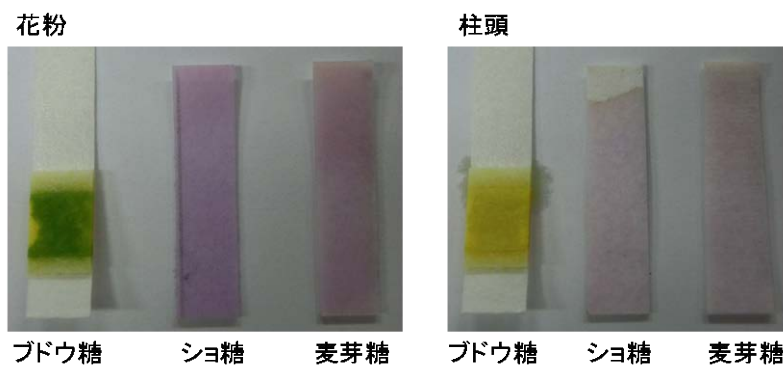


図 5. 花粉および柱頭抽出液におけるブドウ糖，ショ糖，麦芽糖の検出結果

③葯および柱頭の全糖含量

葯あたりの全糖含量は約 $3 \mu\text{g}$ ，柱頭あたりの全糖含量は約 $92 \mu\text{g}$ であった(図 6.)。

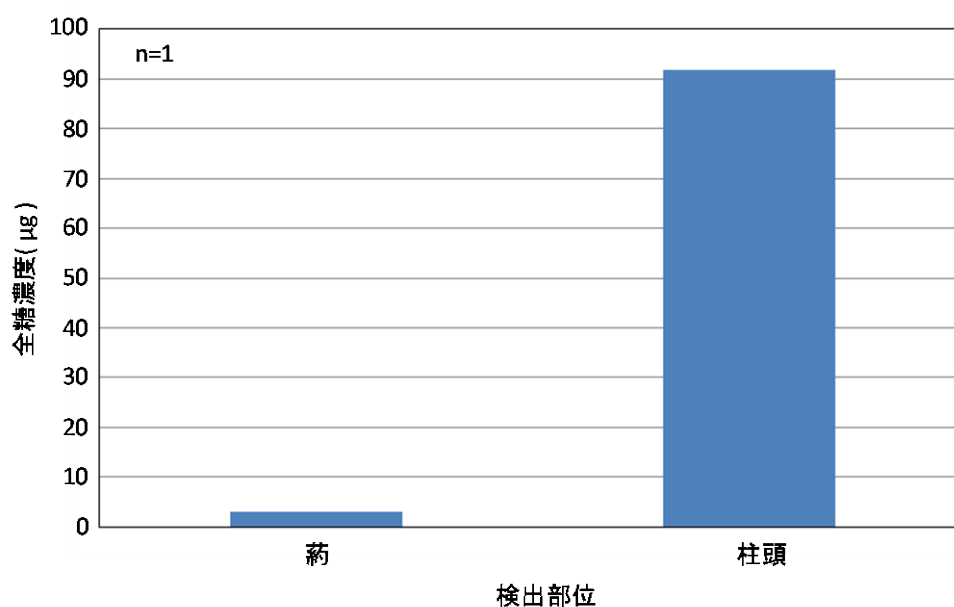


図 6. 葯および柱頭当たりの全糖含量

④花粉および花粉管内のデンプンの挙動

ニチニチソウの成熟花粉にヨウ素ヨウ化カリウム溶液を滴下したところ，花粉が黒く染まったため，花粉内のデンプン粒の存在が確認できた(図 7.)。

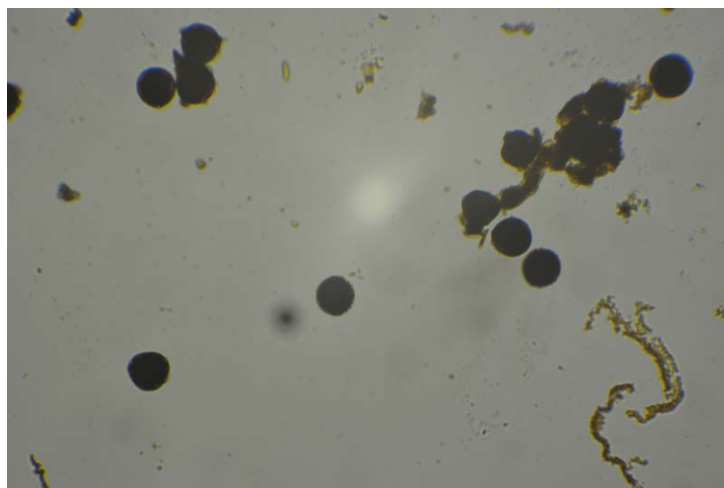


図 7. 花粉内のデンプン粒の様子

また，花粉管を伸長させてヨウ素ヨウ化カリウム溶液を滴下してデンプンを染色したところ，デンプン粒内は黒く染色されたが，花粉管は染色されなかった(図 8.)。

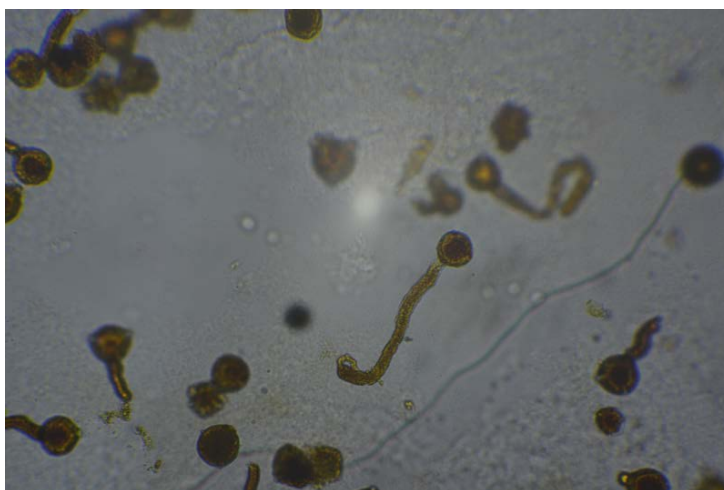


図 8. 花粉および花粉管内のデンプンの様子

⑤異なる糖における花粉発芽および花粉管伸長特性

単糖類として果糖およびブドウ糖を，二糖類としてショ糖，麦芽糖，乳糖を用いて，花粉管の発芽特性を調べた。また，浸透圧だけの影響を見るために，塩化カリウムを用いた。供試した糖および塩化カリウムはすべて浸透圧を $0.76 \times 10^6 \text{Pa}$ にそろえた。発芽率は果糖とブドウ糖では低く，麦芽糖や乳糖で高くなる傾向が見られた(図 9.)。

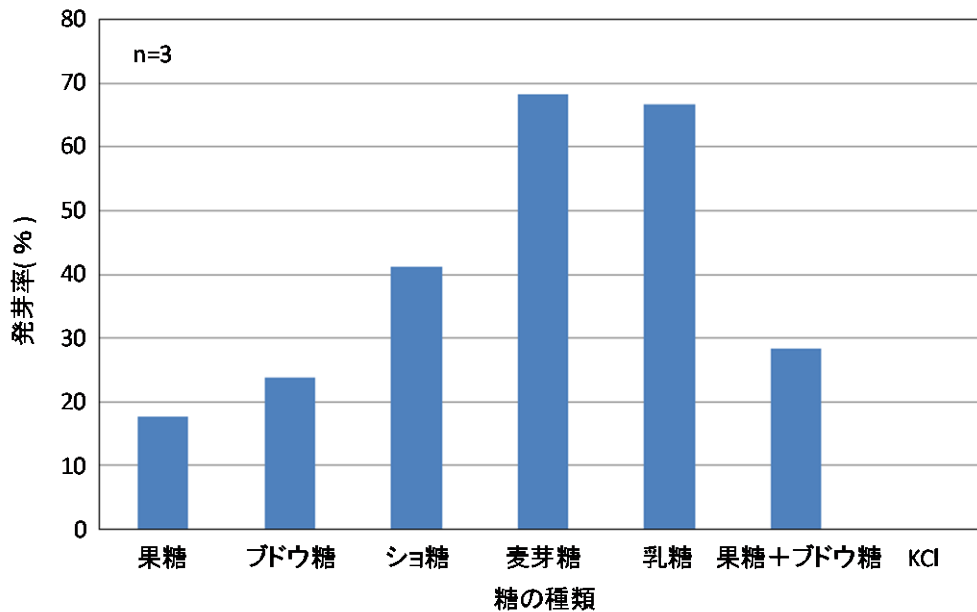


図 9. 異なる糖条件下におけるニチニチソウ花粉の発芽率

※クラスカル・ウォリスの有意差検定 5%レベルで群間に有意差あり

また、最大伸長速度はショ糖でもっとも大きく、単糖類は低い傾向が見られた。ショ糖を除く二糖類と果糖+ブドウ糖は同様の傾向を示したが、伸長速度はショ糖の半分程度であった(図 10.)。

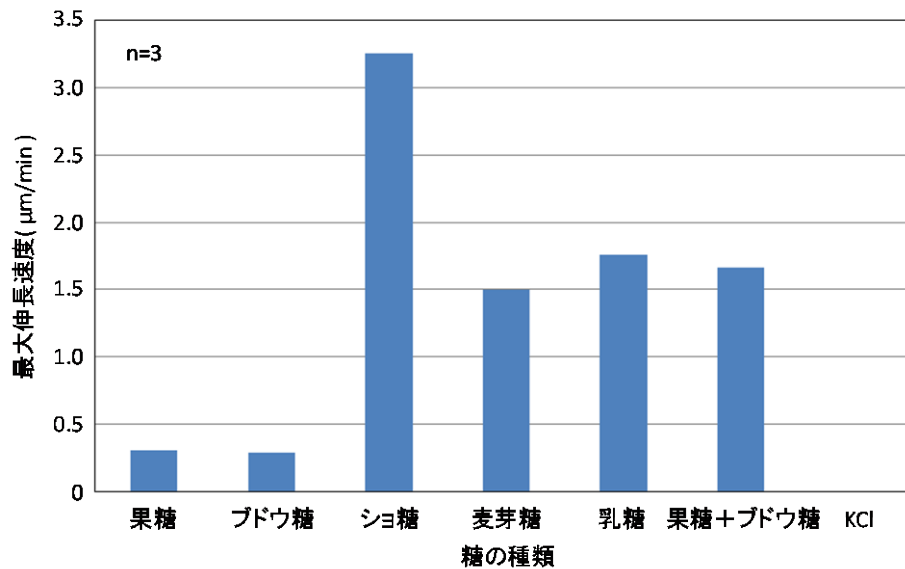


図 10. 異なる糖条件下におけるニチニチソウ花粉の最大伸長速度

※クラスカル・ウォリスの有意差検定 5%レベルで群間に有意差あり

花粉の崩壊率については、二糖類では花粉の崩壊率が小さかったのに対して、単糖類では崩壊率が大きい傾向が見られ、これは、単糖類の混合液でも同様の結果になった(図 11.)。

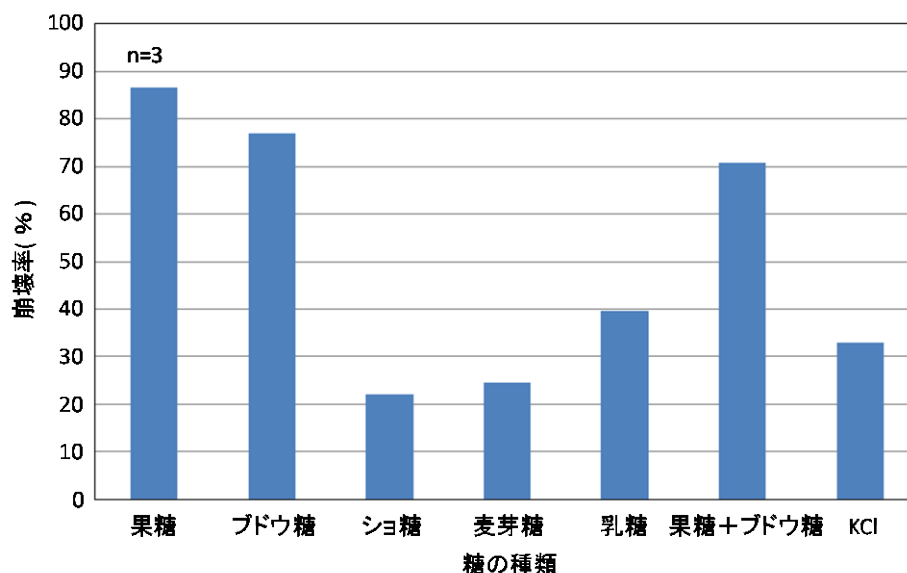


図 11. 異なる糖条件下におけるニチニチソウ花粉の崩壊率

※クラスカル・ウォリスの有意差検定 5%レベルで群間に有意差あり

⑥ 異なる糖濃度における花粉発芽および花粉管伸長特性

上記の結果をもとに、ショ糖およびショ糖の分解産物であるブドウ糖，果糖を用いて異なる糖濃度における花粉管発芽および伸長特性を観察した。濃度は浸透圧をそろえるために，0mol/L，0.15mol/L，0.30mol/L，0.60mol/L の 4 処理とした。30℃におけるニチニチソウ花粉は糖濃度が高くなるにつれて発芽率も高くなったが，ショ糖の場合は低濃度でも比較的発芽率が高い傾向が見られた(図 12-1.)。さらに 20℃でも濃度に対しては同様の反応が見られたが，全体的に発芽率が高くなった(図 12-2.)。

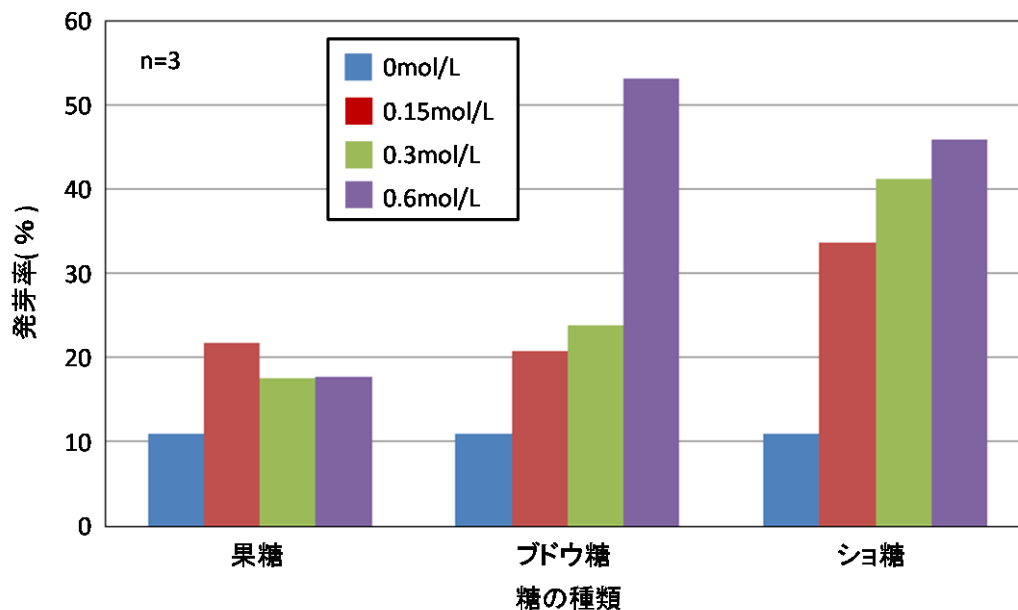


図 12-1. 異なる糖濃度下におけるニチニチソウ花粉の発芽率(30℃)
※クラスカル・ウォリスの有意差検定で群間に有意差なし

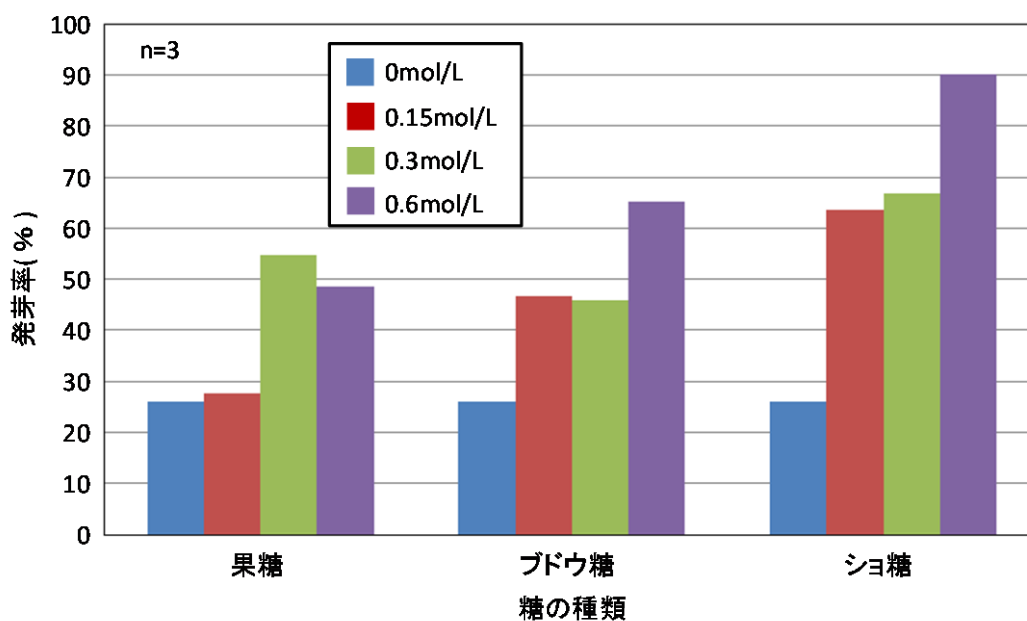


図 12-2. 異なる糖濃度下におけるニチニチソウ花粉の発芽率(20℃)
※クラスカル・ウォリスの有意差検定で群間に有意差なし

30℃における最大伸長速度は高濃度では3つの糖すべてで高くなる傾向が見られたが、ショ糖では低濃度でも比較的伸長速度が速かった(図 13-1.)。20℃においても同様の結果が見られたが、30℃の時と比較するとほとんど伸長は見られなかった(図 13-2.)

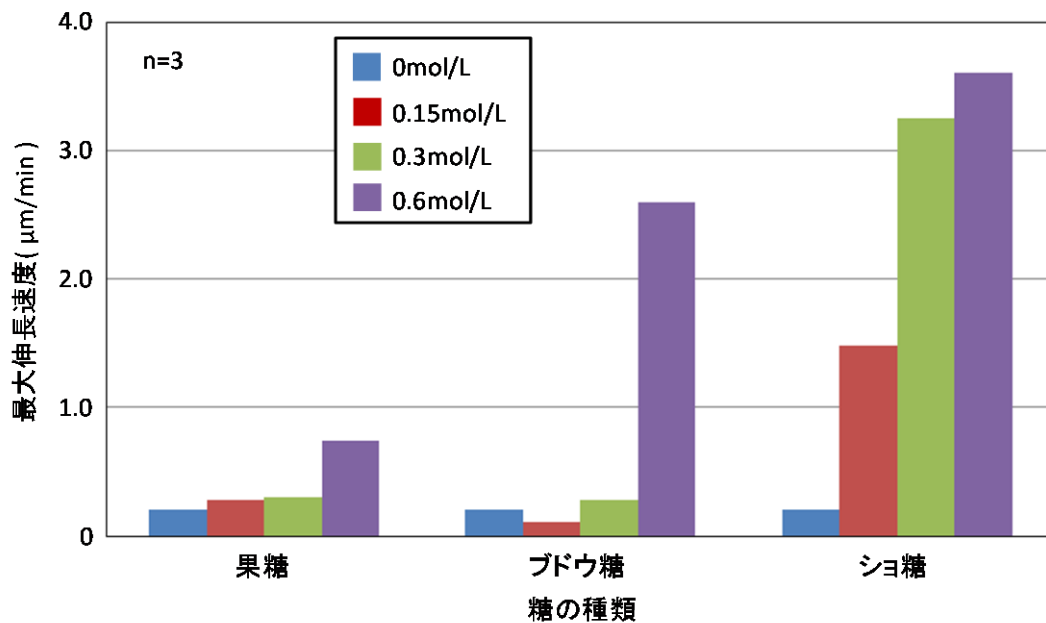


図 13-1. 異なる糖濃度下におけるニチニチソウ花粉の最大伸長速度(30℃)
※クラスカル・ウォリスの有意差検定 5%レベルで群間に有意差あり

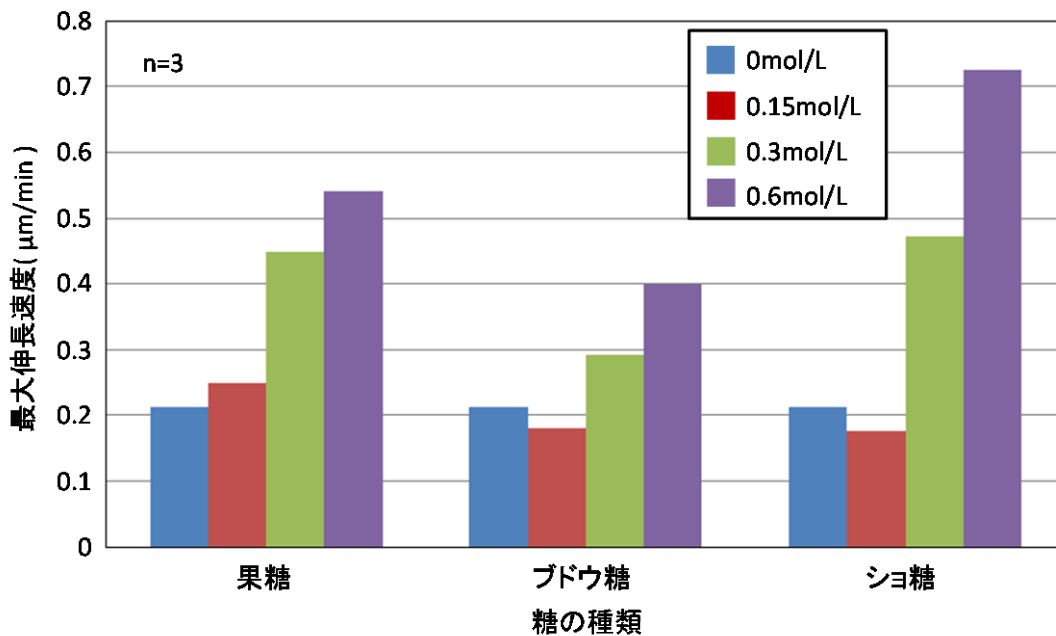


図 13-2. 異なる糖濃度下におけるニチニチソウ花粉の最大伸長速度(20℃)
※クラスカル・ウォリスの有意差検定で群間に有意差なし

30℃における花粉の崩壊率は果糖では濃度によらず高い傾向が見られたが、ブドウ糖では高濃度は花粉の崩壊が抑制された。また、ショ糖は他の糖に比べて崩壊率が低かった(図 14-1.)。これに対して 20℃では全体的に崩壊率が低くなり、0.6mol/L では花粉の崩壊が見られなかった(図 14-2.)。

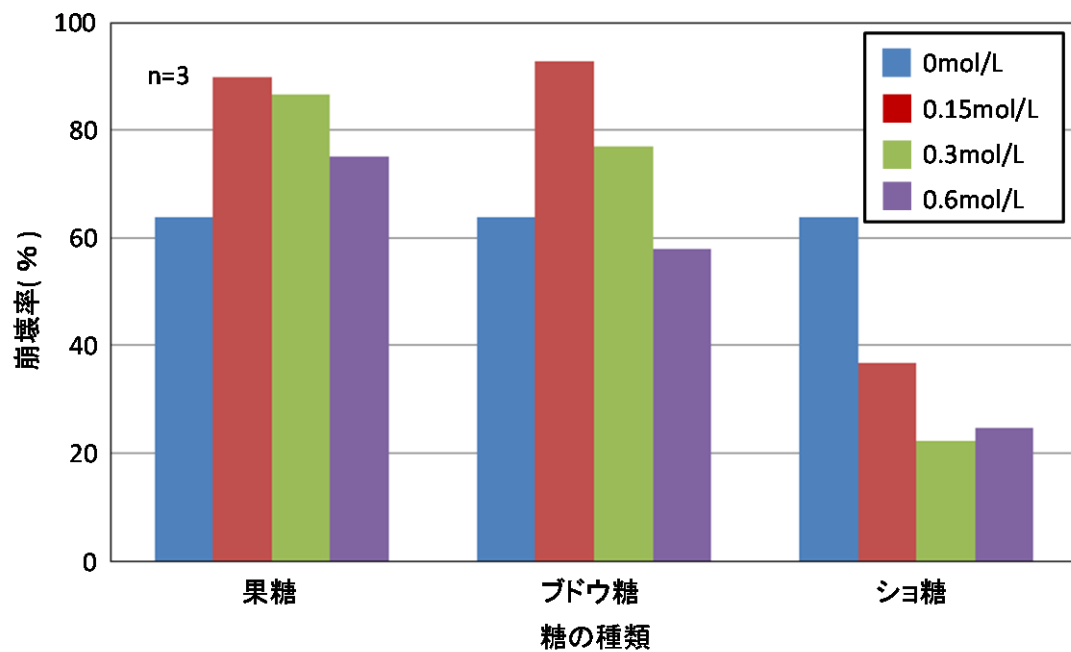


図 14-1. 異なる糖濃度下におけるニチニチソウ花粉の崩壊率(30℃)
※クラスカル・ウォリスの有意差検定 5%レベルで群間に有意差あり

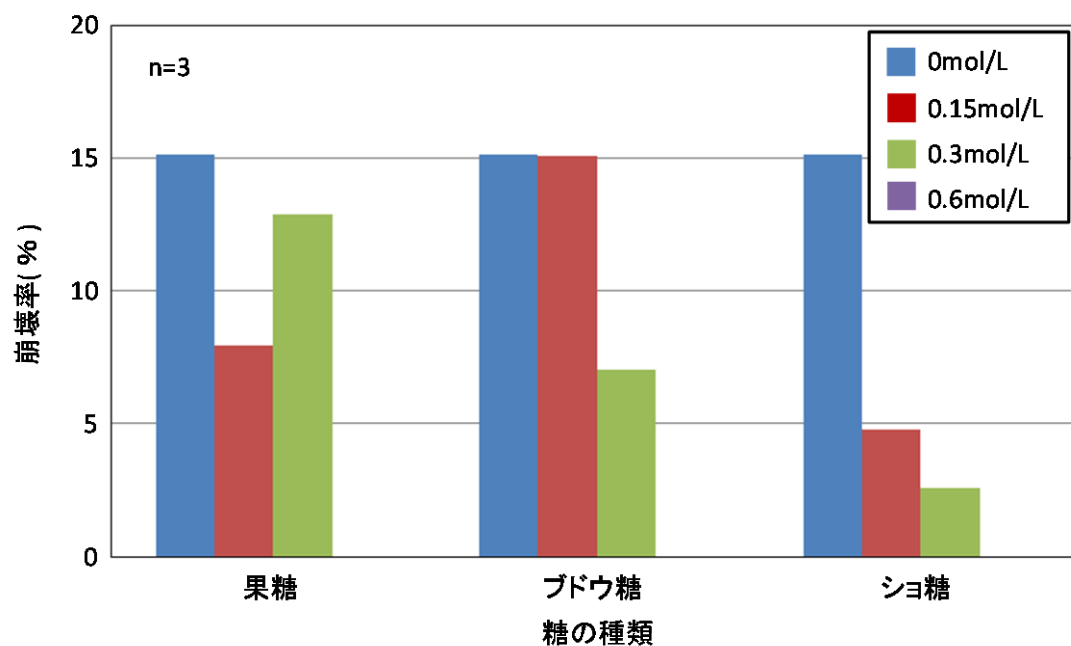


図 14-2. 異なる糖濃度下におけるニチニチソウ花粉の崩壊率(20℃)
※クラスカル・ウォリスの有意差検定で群間に有意差なし

4. 考察

ニチニチソウは一般的には1年草として知られているが(金田ら, 2013), 観察の結果, 沖縄県では逸脱した個体が多年草化していることがわかった。花粉および柱頭の糖の解析を行ったところ, 花粉は糖を含まない培地中では一部だけが崩壊していたことから, 花粉表面にブドウ糖が存在していることが示唆され, さらに柱頭抽出液からショ糖と麦芽糖が抽出されたこと, 葯当たりの全糖濃度と比較すると30倍以上の糖が含まれていたことから, 柱頭に含まれるこれらの糖が花粉の発芽と花粉管伸長に影響していることが示唆された(栗村ら, 1995)。また, 花粉の観察結果より, ニチニチソウは花粉内にデンプンを蓄積していることがわかった。さらに, 花粉管はヨウ素ヨウ化カリウム溶液では染色されなかったため, 花粉管伸長時にはデンプンが分解され, ブドウ糖が花粉管先端に輸送されることで伸長が促進されていると考えられる(勝又ら, 1968a)。

ニチニチソウ花粉の発芽は, 浸透圧一定条件下で糖の種類によって異なっていた。また, 塩化カリウムでは発芽しなかった。これはニチニチソウ花粉が浸透圧のみで発芽するわけではないことを示唆している。さらに, 花粉管伸長についても浸透圧の影響より糖の種類に影響を受けると考えられ, 特にショ糖の存在下では花粉管伸長が促進されたため, スクローストランスポーターの存在が示唆された(廣瀬ら, 2008, 廣瀬, 2011)。

糖をショ糖, ブドウ糖, 果糖に限って濃度を変えて実験を行ったところ, ショ糖では花粉の崩壊率が低く, 花粉管の最大伸長速度が速い傾向が見られた。また, 発芽率も比較的高い傾向が見られた。これは, ニチニチソウ花粉管にはスクローストランスポーターが存在し, ショ糖を積極的に取り込んで利用している結果だと考えられる。一方, ブドウ糖では高濃度条件下で発芽率が上昇したこと, 花粉管の伸長に関して, ブドウ糖や果糖では低濃度では花粉管の最大伸長速度は低かったが, 高濃度になると最大伸長速度が高くなったことから, 培地の濃度が高くなると浸透圧調整のためにブドウ糖や果糖も花粉管内に取り込まれ, 代謝に利用されていると考えられる(勝又ら, 1968a, 勝又ら, 1968b)。

異なる温度条件下でこの実験を行ったところ, 花粉管は温度に依存せずに発芽し, 花粉管の伸長は温度に左右され, 20℃の時にはほとんど伸長しなかったことから, 花粉管の発芽は糖の種類や濃度などのシグナルによってただちに起きる反応であり, 花粉管伸長時には温度依存性の酵素反応が盛んに行われていると考えられる。

以上より, ニチニチソウにおいては花粉が柱頭に受粉すると, 花粉表面のブドウ糖が柱頭表面の水に溶け出し, 発芽を促進するシグナルになると考えられる(岩波, 1985)。イネなどの植物では柱頭に受粉する花粉の数が多いほど結実する確率が高いと考えられているが(生井, 1992), これは受粉する花粉粒数が増えるほど花粉表面から溶け出すブドウ糖の濃度が高くなるためであると考えられる。発芽した花粉管は柱頭に含まれるショ糖や麦芽糖を取り込むと同時に花粉内のデンプンを分解しながら花粉管を伸長させると考えられ, このとき取り込まれたショ糖や麦芽糖, デンプンを分解することで得られた麦芽糖はさら

に分解されて、花粉管内でブドウ糖と果糖になると考えられる。花粉管内のブドウ糖や果糖は、呼吸における ATP 合成の基質として使われるだけでなく、細胞壁の原料になると考えられる(社団法人日本生化学会, 2000)。花粉管の伸長は、花粉管先端部でおきることから、スクローストランスポーターなどのショ糖の取り込み機構は花粉管の先端部にあると推察され、さらに、花粉内に蓄積していたデンプンが花粉管に移動しないことから、花粉内でデンプンがアミラーゼによって麦芽糖に分解され、花粉管先端に輸送されていると考えられる(上原, 1985)。花粉管の先端部では取り込まれたショ糖や麦芽糖、さらに花粉内から輸送されてきた麦芽糖がマルターゼやインベルターゼによって分解されて代謝に利用されていると考えられる(中村ら, 1975)。

本研究結果は花粉の発芽および花粉管伸長のメカニズムを知る上で、重要なものであると考えられる。ただし、本研究では最終的に代謝に使われるブドウ糖や果糖が直接取り込まれない理由までははっきりしなかった。今後は単糖類の取り込み阻害機構や、単糖類による花粉管の崩壊についてさらに研究を進めていきたい。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたってご指導いただいた沖縄県立西原高等学校の宮城仁志先生、喜久川 幸代先生、與那覇 紘子先生に感謝申し上げます。また、実験を進めるにあたって補助をしていただいた沖縄県立西原高等学校実習助手の上地 美智子先生、実験方法についてご指摘いただいた沖縄県農業研究センターの砂川 春樹氏、ショ糖試験紙および麦芽糖試験紙を提供していただいた東北文教大学人間科学部の鈴木 隆先生、糖濃度の測定に協力していただいた沖縄県立球陽高等学校の新川 百合子先生、宮城 直樹先生に感謝申し上げます。

6. 引用文献

- ・野呂征男ら, 2005, 薬用植物学改訂第 5 版, 株式会社南江堂
- ・金田初代・金田洋一郎, 2013, 色・季節でひける花の事典 820 種, 西東社
- ・八代嘉昭, 2008, ニチニチソウ(ビンカ), 農業技術体系 花卉編 8
- ・中野明正・小牧祐子, 2003, こんな根どうだ根-第 6 回ニチニチソウ-, 根の研究 12(2)
- ・前田隆昭ら, 2008, サンショウ花粉の人工培地上での発芽に及ぼすショ糖濃度, 培養温度およびホウ酸濃度の影響, 園学研. 7 (1)
- ・田辺賢二ら, 1970, 和ナシ花粉の発芽生理に関する研究, 鳥取大学附属砂丘利用研究施設研究報告 XX II
- ・小林辰至・光永伸一郎, 2006, 尿糖試験紙を用いたソバ発芽種子におけるグルコース濃度の簡易測定, 生物教育第 45 巻第 3 号
- ・正元和盛ら, 2012, 葉脈を用いた転流糖検出の中学校理科授業実践, 熊本大

学教育実践研究

- ・戸谷義明，2015，実験教室で実施可能な「水あめづくり」実験法の検討と開発，Bulletin of Aichi Univ. of Education 64
- ・石原 忠ほか，1966，フェノール硫酸法によるカキ中のグリコーゲン，グルコースの定量，長崎大学水産学部研究報告，v. 21
- ・岩波洋造，1985，花粉学，株式会社講談社
- ・小泉貞明・水野丈夫，1992，新訂図解実験観察大事典(生物)，東京書籍
- ・山口裕文ら，2000，応用植物科学実験，株式会社養賢堂
- ・岩波洋造・森脇美武，1998，絵でみてできる生物実験，株式会社講談社
- ・松原幸子ら，1999，ダイコンおよび *Brassica campestris* の花粉の人工培地上での発芽促進，園学雑．68 (2)
- ・栗村光男ら，1995，柱頭分泌液を利用した人工培地におけるイチジク花粉の発芽，園藝學會雑誌 63 巻 4 号
- ・勝又悌三・斗ヶ沢宣久，1968a，花粉の生化学的研究(第 10 報)花粉の糖質代謝に関与する酵素について(その 2)花粉のインベルターゼおよびマルターゼについて，農化第 42 巻 第 1 号
- ・廣瀬竜郎ら，2008，イネの花粉形成および花粉機能発現におけるショ糖トランスporter (OsSUT1) の役割，日本作物學會紀事 77(別号 1)
- ・廣瀬竜郎，2011，ショ糖トランスporterは稲の花粉機能に必須である，中央農業総合研究センター北陸研究センターニュース No. 31
- ・勝又悌三・斗ヶ沢宣久，1968b，花粉の生化学的研究(第 9 報)花粉の糖質代謝に関与する酵素について(その 1)花粉のアミラーゼについて，農化 第 42 巻 第 1 号
- ・生井兵治，1992，植物の性の営みを探る，株式会社養賢堂
- ・社団法人日本生化学会，2000，細胞機能と代謝マップ I．細胞の代謝・物質の動態，株式会社東京化学同人
- ・上原 勉，1985，花粉の観察と実験，ニューサイエンス社
- ・中村紀雄ら，1975，花粉のショ糖合成酵素とインベルターゼの性質，農化第 49 巻 第 9 号