



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	作物の細胞質雄性不稔性に関する組織化学的研究 : Ⅰ. とうもろこし、およびソルガムの葯における炭水化物の消長とアミノ酸
Author(s)	中嶋, 博; NAKASHIMA, Hiroshi; 細川, 定治 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(2), 201-207
Issue Date	1970
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11794
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(2)_p201-207.pdf



作物の細胞質雄性不稔性に関する組織化学的研究

I. とうもろこし、およびソルガムの葯における
炭水化物の消長とアミノ酸

中 嶋 博・細川定治
(北海道大学農学部工芸作物学教室)

Histochemical studies on the cytoplasmic male-sterility of some crops

I. Changes of carbohydrates and amino acids in anthers

Hiroshi NAKASHIMA and Sadaji HOSOKAWA
(Laboratory of Industrial Crops, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received July 23, 1969

雄性不稔形質とくに細胞質雄性不稔を利用するヘテロシス育種が実用化されているが、その基礎となるこの現象についての遺伝的機作の解明と細胞組織学的な観察結果がタマネギ^{(3),(7),(15)}、とうもろこし^{(1),(13),(14)}、てん菜⁽⁸⁾、ソルガム⁽¹²⁾ そのほかいろいろな作物⁽⁹⁾ で報告されている。これらの報告を要約すると、一般に細胞質雄性不稔現象は、これに関与する細胞質因子と、その変異因子としての核遺伝子の相互作用によりその形質を表現し、細胞組織学的には葯におけるタペート細胞の異常肥大が稔性花粉の退化に関連しているといわれている。しかし植物生理面からの究明あるいは組織化学的な現象、とくに退化の経過におけるそれらについて報告されているものは少ない。わずかに深沢^{(4),(5)} による、小麦、ととうもろこしのアミノ酸代謝の異常、細川⁽⁹⁾ によるてん菜の雌性不稔における炭水化物と pH の変化および渋谷⁽¹¹⁾ によるイネにおける重金属塩類の不稔におよぼす影響に関する報告などがあるのみである。著者らはいろいろな作物の細胞質雄性不稔生起の植物生理学的な機作や経過を知り、その共通点の有無を明らかにするために、てん菜、とうもろこし、およびソルガムなどを実験材料として研究を行なっているが、葯中における炭水化物の消長およびアミノ酸に関する予備実験から若干の知見を得たので、ここに報告する。

材料および方法

供試材料は、とうもろこしでは細胞質雄性不稔系統 W 23^T とその維持系統の W 23、ソルガムでは同じ不稔

系統 Combine Kafir 60-A とその維持系統の Combine Kafir 60-B である。これらの材料を1966年、1967年に北海道大学農学部の実験圃場および温室に植え、開花期の葯の観察によってそれぞれ花粉母細胞 (PMC)、4分子期 (T)、小胞子期 (MS)、および花粉期 (P) の4つの発育時期に材料を採取して、以下の方法で実験を行なった。

実験方法 I. 葯の組織における還元糖と澱粉の調査方法は、とうもろこしとソルガムの各発育段階の葯を数個ずつスライドガラス上に採り、組織を押し潰して、これをフェーリング試薬で処理し亜酸化銅の沈澱の多少について観察した。同様な材料につきヨードヨードカリ液 (IKI) を滴下して澱粉反応の観察も行なった。以上の検鏡による観察結果は、反応ゼロの一方反応のもっとも著しい # にいたる5つの段階に区別して表がされた。また葯の発育に伴う葯組織内の澱粉の所在消長を観察するため、発育時期別の花蕾をホルマリン・アルコールで固定し、通常の方法でパラフィン切片をつくり、キシロール処理でパラフィンを除き、無水アルコール処理後ただちに IKI で染色した。

実験方法 II. 上記の材料について遊離アミノ酸の調査を行なった。両作物の花粉期の葯約120~360個を採り、葯のみ、葯を除いた子房と萼片を含むもの、および葉を採取し、80% エチルアルコールで一昼夜摩擦処理してアミノ酸を抽出し、それを濃縮して東洋濾紙 No. 51 を用いて一次元のペーパークロマトグラフィで展開した。展開剤は4:1:1のブタノール・酢酸・水の混合液である。展開時間は約20時間である。それを乾燥後ニンヒドリ

ンの試薬により発色させ、標準のアミノ酸と対比して照合した。

実験結果

I. とうもろこしおよびソルガムのフェーリング反応についての実験結果を Table 1, 2 および Fig. 1, 2 に示した。これらの作物は実験が行なわれた生育環境により少なからず差があったので、実験結果にはややふれがあったが、概括して相似した結果であった。すなわち両作物の稔性型と不稔性のいずれの葯中においても、還元糖の反応はその發育段階にしたがって、小孢子期まではより顕著となる。すなわち小孢子期までは増加の傾向を示すがそれ以後はほとんど増加しないか、やや減少の傾向を示した。葯全体についての IKI に対する澱粉反応に

ついでの実験結果は Table 3, 4 および Fig. 3, 4 に示した。とうもろこしでは稔性型、不稔性のいずれも4分子期までは増加し、それ以後やや低下し、小孢子期以後は稔性型では急激に増加の傾向を示し、不稔型では激減する。ソルガムでは發育前期ではその傾向がとうもろこしと異なるが、小孢子期以後はとうもろこしと同じ傾向を示した。すなわち澱粉反応について、稔性型、不稔型間に大きな差異が認められた。これは稔性葯における成熟花粉が澱粉を多量に含有することによるものである。

つぎに葯の切片の観察により、葯組織内の澱粉の所在と消長を追究した。実験結果は Plate I, II. に示した。両作物の稔性型、不稔型とも花蕾の發育初期すなわち、花粉母細胞期には葯隔と内皮に多量の澱粉の集積が見られ、その後の葯の發育にしたがって小孢子期までは、こ

Table 1. Reaction of reducing sugar by Fehling's reagent in respective growth stage of maize anther in 1966 and 1967

Type*	Reducing sugar reaction***	Developmental stage of anthers**							
		PMC		T		MS		P	
		I	II****	I	II	I	II	I	II
F	-0		1						
	±1	3	5						
	+2	6	2		4			1	
	#+3	6	2	3	3	6		2	7
	##4			8	3	32	20	12	11
	average	2.20	1.50	3.72	2.90	3.84	4.00	3.73	3.61
S	-0	5		2					
	±1	2	6	4	1	1		4	1
	+2	2	4	3	3	9	4	4	1
	#+3			8	3	13	9	6	7
	##4			4	3		7	1	11
	average	0.75	1.40	2.38	2.80	2.52	3.15	2.26	3.40

- Note: * F: fertile
S: sterile
** PMC: pollen mother cell
T: pollen tetrad
MS: pollen microspore
P: mature pollen
*** - : no precipitation
± : trace amount of precipitation
+ : small amount of precipitation
+ : middle amount of precipitation
: large amount of precipitation
**** I : observation in 1966
II : observation in 1967

Table 2. Reaction of reducing sugar by Fehling's reagent in respective growth stage of sorghum anther in 1966 and 1967

Type*	Reducing sugar reaction***	Development stage of anthers**							
		PMC		T		MS		P	
		I	II****	I	II	I	II	I	II
F	-0	10	6	2	4				
	±1	5	14	8	12	1	2	1	2
	+2		17	3	20	4	10	5	15
	+3		2	1	3	10	20	16	2
	##4						7	9	
	average	0.33	1.38	1.21	1.56	2.60	2.87	3.06	2.00
S	-0	9	6	5					
	±1	5	7	10	8		1		5
	+2	1	13	1	11	7	10	8	9
	+3		5		18	8	16	11	6
	##4				1		11	12	
	average	0.46	1.54	0.75	2.31	2.53	2.97	3.12	2.05

Note: Symbols are the same as in Table 1.

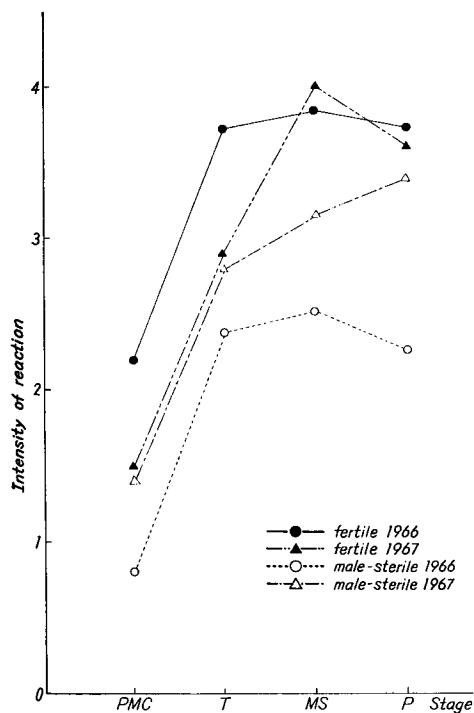


Fig. 1. Average intensity of reducing sugar reaction in maize anther during the developmental stage in 1966 and 1967.

Note: Symbols are the same as in Table 1.

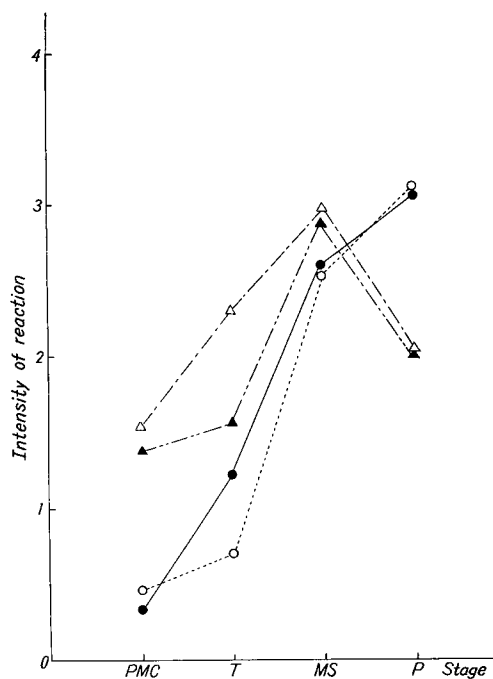


Fig. 2. Average intensity of reducing sugar reaction in sorghum anther during the developmental stage in 1966 and 1967.

Note: Symbols are the same as in Table 1 and Fig. 1.

Table 3. Starch reaction by IKI in respective growth stage of maize anther in 1966 and 1967

Type*	Starch reaction***	Developmental stage of anthers**							
		PMC		T		MS		P	
		I	II****	I	II	I	II	I	II
F	-0						6		
	±1		6				20		
	+2	11	14	3	5	5	25		
	#+3	5	1	3	15	14	8		2
	##4			9	20	19	1	16	28
	average	2.31	1.76	3.40	3.37	3.36	1.63	4.00	3.93
S	-0		1				2	10	16
	±1	1	6			1	11	6	32
	+2	11	3	2	18	16	23		2
	#+3	1		6	28	36	4		
	##4			12	8	7			
	average	2.00	1.20	3.50	2.84	2.81	1.72	0.37	0.72

Note: Symbols are the same as in Table 1.

Table 4. Starch reaction by IKI in respective growth stage of sorghum anther in 1966 and 1967

Type*	Starch reaction***	Developmental stage of anthers**							
		PMC		T		MS		P	
		I	II****	I	II	I	II	I	II
F	-0								
	±1					2	14		
	+2			2	13	7	24		
	#+3	2	13	13	18	6	2	2	
	##4	13	27		9			27	20
	average	3.86	3.67	2.86	2.90	2.26	1.70	3.93	4.00
S	-0						4	1	9
	±1	1		2	6		18	13	11
	+2			4	27	8	18	18	
	#+3	8	16	9	7	6			
	##4	7	24			1			
	average	3.31	3.60	2.46	2.02	2.53	1.35	1.53	0.55

Note: Symbols are the same as in Table 1.

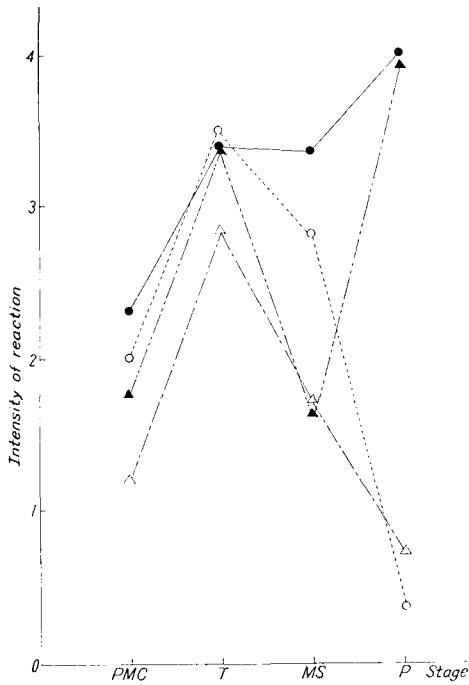


Fig. 3. Average intensity of starch reaction in maize anther during the developmental stage in 1966 and 1967.

Note: Symbols are the same as in Table 1 and Fig. 1.

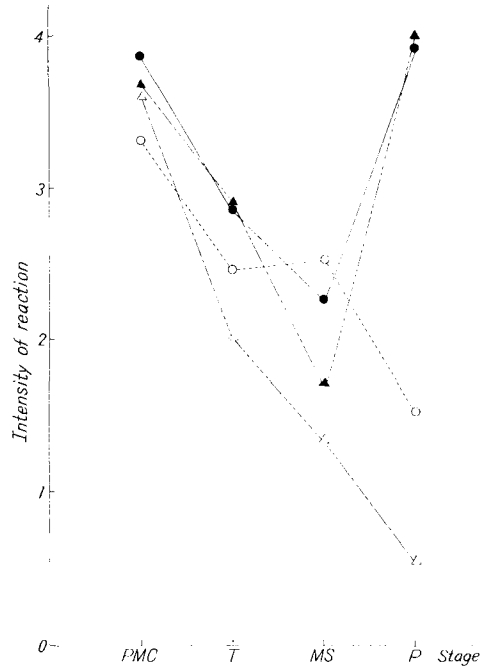


Fig. 4. Average intensity of starch reaction in sorghum anther during the developmental stage in 1966 and 1967.

Note: Symbols are the same as in Table 1 and Fig. 1.

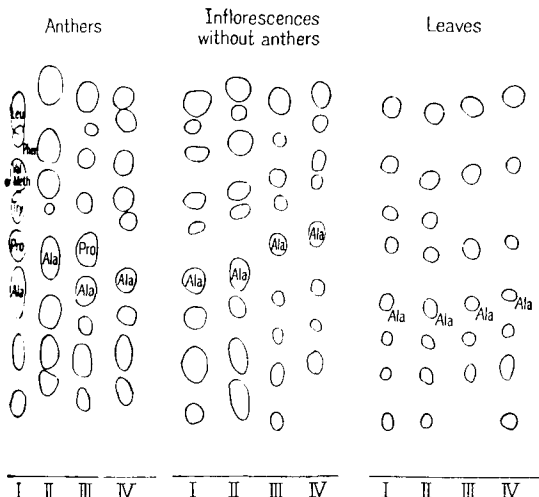


Fig. 5. Tracings of paperchromatograms of amino acids in anthers, inflorescences without anthers and leaves of fertile and male-sterile plants.

I. maize fertile II. maize male-sterile
III. sorghum fertile IV. sorghum male-sterile

れが減少する傾向を示す。小孢子期以後花粉期にかけて、いずれの作物も葯壁組織の澱粉は両型とも全く消失し、稔性型には花粉粒に著しい反応が認められる。またタペート細胞はIKIで濃染するが、稔性葯では小孢子期にいたって退化をはじめ、花粉期には完全に消失する。不稔型ではタペート細胞は部分的に異常肥大を起こし、小孢子期にいたっても退化は認められない。

II. 一次元のペーパークロマトグラフィによる遊離アミノ酸の検索の結果を Fig. 5 に示した。一次元展開のため6~8種類程度のアミノ酸が検出されたに過ぎなかったが、この実験ではとくにプロリンの存否についての調査を行なった。その結果ではいずれの作物でも花粉期の葯ではプロリンの存在が認められたが、不稔葯では認められず、また葯を除いた花蕾や葉身にもその存在は認められなかった。そのほかのアミノ酸についてもこの実験の範囲ではとくに著しい異常は見出されなかった。

考 察

細川ら⁹⁾はさきにてん菜の葯における炭水化物の消長について調査し、正常葯では葯の発育に伴って葯壁に

顕著に認められる澱粉反応が次第に消失し、フェーリング反応による還元糖の反応が増加するが、不稔型の葯の葯壁の澱粉反応は後期まで消失せず、還元糖の反応もあまり著しくないことを観察している。このことはてん菜の場合には葯の組織内の炭水化物が花粉の正常な発達に何らかの形で関連していることを示すものと推定されるが、本実験において、とうもろこしとソルガムを供試した結果では、てん菜の場合とは異なり、不稔葯の葯壁における澱粉の残存性は認められず、還元糖は4分子期における反応よりやや多い程度にとどまる。村上ら¹⁰⁾は稲を低温処理したとき、移行組織での多糖類の合成は抑制されるが、分解は比較的よく行なわれ、分解された糖類が花粉母細胞または花粉に移行せず、移行組織とタペート細胞に蓄積し、花粉に対する養分供給の阻害を起すものと推定している。また FUKASAWA ら⁶⁾は細胞質雄性不稔小麦を用いて、花粉退化における糖の阻止的作用を認めているが、これらの報告からもタペート組織の異常が炭水化物の代謝転流と関連していることが、自然推定される。なおまた葯中における遊離アミノ酸とくにプロリンについては、小麦、とうもろこし、てん菜、タマネギおよびその他のそ菜類において、その存在が調べられている^{3),4),5),9)}が、いずれも正常葯には存在するが、不稔葯には存在しないと報告されている。ソルガムについても同様のことが確認された。本実験でも上記の諸報告と一致する結果が得られている。しかし、植物によっては不稔葯中にもプロリンの存在が認められるという報告²⁾もある。本実験の花蕾から葯を除いたものおよび葉身では、稔性の如向にかかわらず、プロリンの存在は認められなかったが、深沢ら⁵⁾はコムギの花粉形成期の止葉を両稔性のものについて調査し、正常型の葉にはプロリン蓄積が多く、不稔型のものは極めて少なかったと報告している。著者らの実験結果の差異についてはさらに追求する必要がある。また炭水化物代謝とアミノ酸すなわち窒素代謝との因果関係についてもさらに研究を重ねる必要があろう。

摘 要

とうもろこしおよびソルガムの細胞質雄性不稔系統とその維持系統を用いて、作物の細胞質雄性不稔性に関する共通な生理学的な支配現象を明らかにするための葯の細胞組織学的な試究を行なった。

1) とうもろこしの葯組織内に含まれる還元糖はその発育にしたがってフェーリング反応は顕著になる傾向を示し、またソルガムでは、小胞子期まではその反応は明

らかに増加を示し、小胞子期以後減少することが観察された。

2) とうもろこしおよびソルガムともに稔性のいかんにかかわらず、小胞子期まで IKI による葯壁の澱粉反応は減少し、両作物とも花粉期には稔性葯では澱粉反応が葯壁では消失し、花粉粒で顕著に認められるようになる。反応の認められる位置は、両作用とも葯隔と内皮であった。すなわち、花粉期には稔性のものでは花粉粒に著しい澱粉反応が認められた。一方不稔性のものは花粉形成がなく、小胞子以後退化するので澱粉反応はほとんど認められなかった。

3) とうもろこしおよびソルガムとも花粉期では、稔性葯でのみプロリンが検出されたが、花器の葯以外の組織および葉などでは稔性のいかんにかかわらず、プロリンは検出されなかった。

引用文献

1. DUVICK, D. N. 1965. Cytoplasmic pollen sterility in corn. *Adv. Gent.* 13: 1-55.
2. EDWARDSON, J. R. and M. K. CORBETT 1961. Asexual transmission of cytoplasmic male sterility. *Nat. Acad. Sci.* 47: 390-396.
3. 藤下典之 1964. 花粉退化の細胞・組織および生化学的研究. 第一報 雄性不稔蔬菜退化と遊離アミノ酸との関係. *園学雑*, 33: 133-139.
4. FUKASAWA, H. 1954. On the free amino acids in anthers of male sterile wheat and maize. *Jap. Jour. Gent.* 29: 135-137.
5. 深沢広祐・三藤勝弘 1956. 異質細胞質による雄性不稔コムギのアスパラギンとプロリン. *科学*, 26: 313-314.
6. FUKASAWA, H., K. MITO and M. FUJIWARA 1957. Preventive effect of sugars on the pollen degeneration of wheat plant. *Bot. mag. Tokyo* 70: 251-257.
7. 花岡 保 1963. 北海道に適する玉ねぎ品種ならびに一代雄種の利用に関する研究. *北海道農試報告*, 60.
8. 細川定治・竹田武雄・大谷義雄・池端瑞子 1954. 甜菜雄性不稔の細胞組織学的研究. 第1報. 花粉退化とタペート細胞の異常肥大について. *育雑*, 4: 196-202.
9. ———・津田周弥・竹田武雄 1963. てん菜の雄性不稔現象に関する組織化学的研究. *育雑*, 13: 117-124.
10. 村上寛一・川口数美・水島宇三郎 1958. 低温下での稲の葯の組織化学的異常とその品種間差異につい

て。育種, 8: 119-127.

11. 渋谷紀起 1966. イネの部分雄性不稔性の研究. 育種, 16: 174-178.
12. SINGH, S. P. and H. H. HARDEY 1961. Pollen abortion in cytoplasmic male sterile sorgham. Crop Sci. 1: 430-432.
13. SUTO, C. 1955. Cytogenetical studies of male sterility in maize. Bull. nat. Inst. Agr. Sci. 5: 137-178.
14. 齋 涉 1966. とうもろこし細胞質雄性不稔の遺伝機構ならびに稔性回復遺伝子の農業形質におよぼす影響. 道立農試報, 13.
15. 建部民雄 1952. タマネギの雄性不稔個体に於ける花粉退化の細胞学的研究. 園学雑, 21: 73-75.

Summary

In order to clarify the common physiological causation responsible for the cytoplasmic male-sterility among various crops, the authors are conducting the histochemical studies on the male-sterile lines in comparison with their maintainers. The present paper describes the results of the observation on maize, *Zea mays* L., and sorghum, *Sorghum sativum* L., which inherit the male-sterility through the cytoplasm in cooperation with chromogene.

Reducing sugar in fresh anthers smeared on slide glasses was detected by means of Fehling's reagent under the microscope. In the both crops, the amount of reducing sugar increased gradually as the age of anther advanced, and no difference in its content was found between fertile and male-sterile lines during microsporogenesis.

Starch grains in fresh anthers smeared on slide glasses were detected by means of IKI solution under the microscope. A large amount of starch grains was observed in the both lines of respective crop, and they were found to be located in the endothecium and parenchyma. At the age of anther advanced, they gradually decreased, but they kept remained still at anthesis in fertile lines of respective crop. On the other hand, male-sterile lines left no traces of them in anther tissue at anthesis. Detailed observations revealed that in fertile line the starch grains were located in pollen grains.

Examination of paper chromatogram of free amino acid showed that the nearly matured anthers of respective crop had the proline, which could not be found in other flower parts and leaves. The male-sterile line of respective crop never possessed this amino acid even in anthers at anthesis.

Plate I

Starch reaction in anther tissue of fertile and male-sterile maize.

- A. fertile; pollen mother cell stage ($\times 400$)
- B. male-sterile; ibid.
- C. fertile; pollen tetrad stage
- D. male-sterile; ibid.
- E. fertile; pollen microspore stage
- F. male-sterile; ibid
- G. fertile; mature pollen stage
- H. male-sterile; ibid.

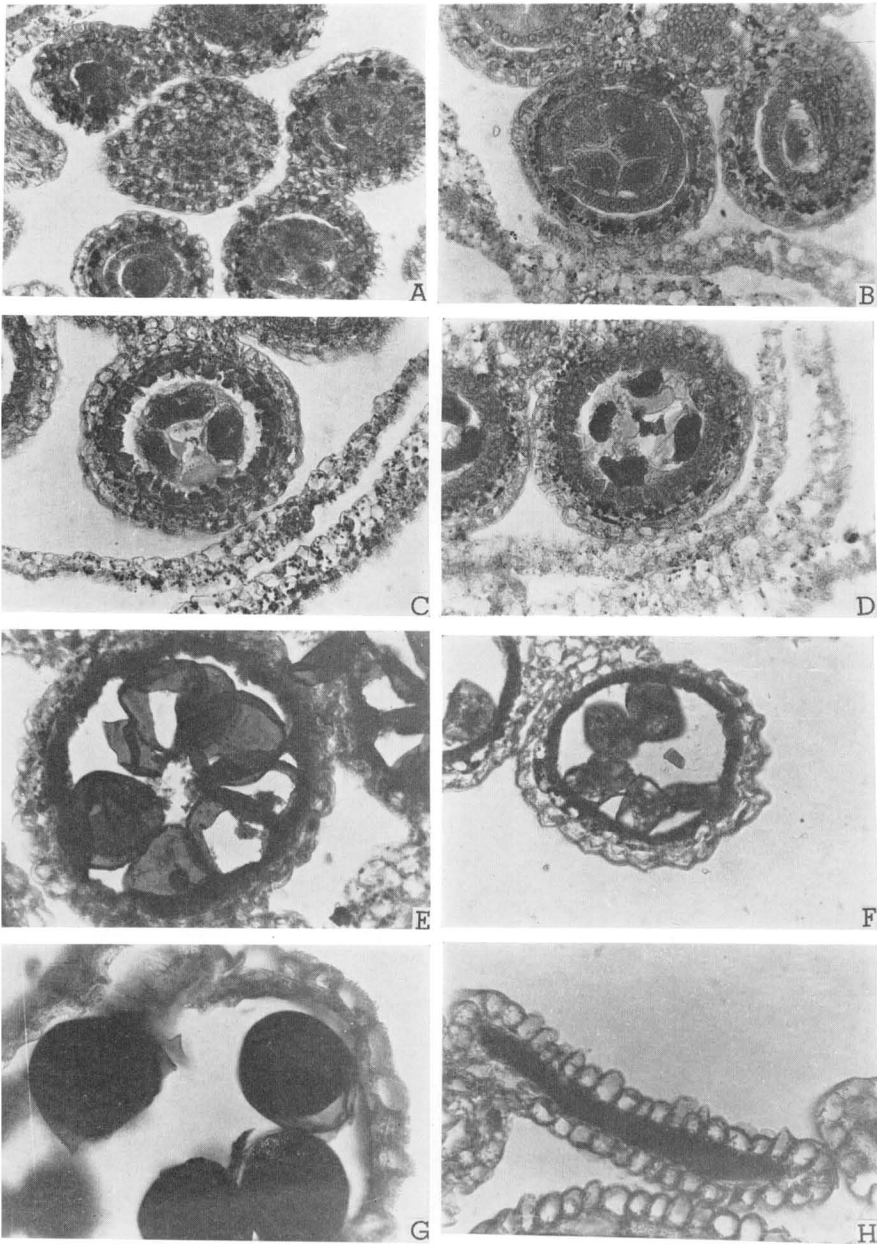


Plate II

Starch reaction in anther tissue of fertile and male-sterile sorghum.

- A. fertile; pollen mother cell stage ($\times 400$)
- B. male-sterile; *ibid.*
- C. *fertile*; pollen tetrad stage
- D. male-sterile; *ibid.*
- E. fertile; pollen microspore stage
- F. male-sterile; *ibid.*
- G. fertile; mature pollen stage
- H. male-sterile; *ibid.*

