

■テクニカルノート■

## 走査型電子顕微鏡による花粉観察のための最適処理法の検討

重田英子<sup>1</sup> 岩元明敏<sup>1,2</sup> 風間 真<sup>1,3</sup> 鈴木季直<sup>1,3,4</sup>

### Examination of the Most Suitable Preparation Method for Pollen Observation by Scanning Electron Microscope

Eiko Shigeta<sup>1</sup>, Akitoshi Iwamoto<sup>1,2</sup>, Makoto Kazama<sup>1,3</sup> and Suechika Suzuki<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Present address: Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Gakugei University, Koganei-City, Tokyo 184-8501, Japan

<sup>3</sup> Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** To examine the most suitable method to prepare pollen for scanning electron microscope observation, several fixation methods and dehydration (or drying) methods were applied to *Arabidopsis* and lily pollen obtained from flowers before and after flowering. Light and confocal laser microscope observations revealed that, in both plants, pollen obtained before flowering was swollen and wet, while that obtained after flowering was shrunken and dry. For scanning electron microscopy, pollen was unfixed or fixed with 50% (eventually 100%) acetone, FAA (5% formalin with 50% ethanol and 5% acetic acid) or 6% glutaraldehyde solutions. It was then dried naturally in air or artificially by either critical point-dry or freeze-dry machines, respectively. The results indicated that, for scanning electron microscope observation of dry pollen, the most suitable treatment is natural drying without fixation. On the other hand, to observe wet pollen, the combination of FAA or glutaraldehyde fixation with artificial drying using either machines is preferable, and fixation with acetone is unsuitable.

**Keywords:** pollen, *Arabidopsis*, lily, preparation methods, scanning electron microscopy

## 序論

種子植物の生殖器官である花の雄蕊で形成される雄性配偶体の花粉の表面には、種や属によって異なるそれぞれに固有の微細構造的特徴が認められ、それらの植物を分類するための重要な形質の一つとなっている。特に、化石化した植物を対象とする古生物学分野では花粉の形態観察は種の同定に極めて有効であることが知られている。この分野を含め、花粉の外部形態観察は古くから光学顕微鏡で行われており、様々な観察のための試料処理法が開発されている<sup>1)</sup>。一方、最近では、より高分解能で観察できる電子顕微鏡が花粉の微細構造研究に活用され、花粉の表面構造観察では走査型電子顕微鏡(以下、走査電顕)が用いられるが、観察のための試料処理法は十分に検討されていない。従来、いくつか

の方法が開発されてきたが、その多くは外壁しか残っていない化石化した花粉を対象としたものであり、現生植物の“生きた”花粉を観察する試料処理法を検討することが必要である。本学生物科学科では、2003年度から夏季休暇中に3年生対象の電子顕微鏡実習を行っており、自由な観察試料選択では高い頻度で花粉が取りあげられており、その都度、一般的な電顕観察用試料処理法で対応して来た。しかし、ここでも、“生きている”花粉をより自然の状態を観察できる方法を確立する必要があると感じ、今回、シロイヌナズナとテッポウユリの花粉を対象として最適となる試料処理法の検討を行った。

## 材料と方法

神奈川県理学部植物育成棟で栽培した野生型シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* Heynh. および市販のテッポウユリ *Lilium longiflorum* Thunb. から、開花前と開花後に花粉を採取した。

光学顕微鏡観察のため、花粉を小試験管内の100%グリセリン液に包埋し、水流アスピレーターによる脱気を施してからスライドガラスに載物し、カバーガラスで封じてプレパラートを作製した。グリセリン液への包埋直後と24時間後に光学顕微鏡(Olympus BH2)で観察した。

共焦点レーザー顕微鏡による観察のため、採取した花粉を0.1%のオーラミンOを含むリン酸緩衝液(pH 7.2)で蛍光染色<sup>2)</sup>し、スライドガラスに載物後にカバーガラスで封じ、プレパラートを作製した。プレパラート作製から24時間後に共焦点レーザー顕微鏡(Bio-Rad Radiance2100)で観察した。

走査電顕観察用の最適試料作製方法を検討するために、採集した花粉を数種の化学固定法と脱水(または乾燥)法との組み合わせた以下の6つの方法で処理した。

- (1) 無固定で自然乾燥
- (2) アセトン固定後に自然乾燥
- (3) FAA固定後に臨界点乾燥
- (4) FAA固定後に凍結乾燥
- (5) グルタルアルデヒド固定後に臨界点乾燥
- (6) グルタルアルデヒド固定後に凍結乾燥

花粉の化学固定には3つの方法を試みた。第1のアセトン固定法では、花粉を室温下で50%アセトンに浸潤して1分間超音波洗浄装置で処理し、800gによる遠心(5分間)分離後に100%アセトンに置換した。100%アセトンによる800gの遠心を各5分間で2回繰り返した後、沈澱中の花粉を濾紙上に回収した。第2の固定法では、FAA(ホルマリン5%、エタノール50%、酢酸5%)混合液を固定液とし、花粉を、室温下、12時間この液で処理した。第3の固定法では、透過型電子顕微鏡観察用試料の化学固定で一般的に良く使われるグルタルアルデヒド(以下GA)を用いた。リン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した6%GA液中に花粉を浸漬し、4℃下で12時間固定した。

脱水(または乾燥)にも次の3つの方法を試みた。第1の方法は自然乾燥法である。花粉を濾紙上に置き、室温下で1週間大気中に静置して乾燥させた。第2の方法として、走査電顕観察のために一般的に行なわれている臨界点乾燥法を用いた。無固定または化学固定された花粉のそれぞれをエタノール系列(50、60、70、80、90、95、99.5、100%; 各1時間)

で脱水し、更に12時間、100%エタノール中に置いた後、800gの遠心(5分間)で花粉を沈澱分離させ、エタノールと酢酸イソアミル(1:1)混合液で30分間処理した。その後、同条件の遠心を行ない、混合液を100%の酢酸イソアミルに置換し、再度遠心を繰り返して、酢酸イソアミルへの置換を完全にした。花粉を含む沈澱を少量(1ml)の100%酢酸イソアミルで懸濁し、30分後に臨界点乾燥装置(JEOL JCPD-5)で処理して乾燥させた。第3の方法として凍結乾燥法を用いた。前法と同じエタノール系列による脱水を行った後、同条件の遠心を行ない、エタノールとt-ブチルアルコール(1:1)混合液で30分間処理した。その後の処理も前法の酢酸イソアミルをt-ブチルアルコールに変えて同じように操作し、凍結乾燥装置(JEOL JFD-310)で処理して乾燥させた。

乾燥された試料は、走査電顕用試料台に両面テープを介して接着させ、イオンコーター(JEOL JFC-1100E)で白金をコーティングし、走査電顕(JOEL JSM840A)で観察した。

## 結果と討論

### 水を含む自然状態に近い花粉の形態

図1は、開花前(A、B)と開花後(C、D)に採集したシロイヌナズナの花粉をグリセリン液に包埋した直後と24時間後に観察した光学顕微鏡写真である。開花前の花粉は、グリセリン液包埋直後で殆ど自然の状態に近いもの(図1A)とグリセリン液包埋24時間後のもの(図1B)とで形状に違いはなく、直径およそ20 $\mu$ mの膨らんだ球形であった。一方、開花後では、グリセリン液包埋直後の花粉(図1C)は長楕円体であったが、グリセリン液包埋24時間後の花粉(図1D)は、開花前の花粉と同様に膨らんだ球形であった。花粉は葯の開裂によって空気中に放出されてから雌蕊の柱頭に達するまでは植物本体から水分供給を受けられないため、開花後の放出直前の葯内花粉は予め乾燥に耐えられるような形状を確保している。このことから、一般に、花粉自体には乾燥型と膨潤型があることが知られている。従って、開花後のグリセリン液包埋直後の花粉(図1C)は乾燥型の形状を示しており、一方、グリセリン液包埋24時間後の花粉(図1D)は液中で水分を吸収した膨潤型の特徴を示していると考えられる。開花前では、まだ十分な水分が供給されているため採集直後でも花粉は膨潤型を示したと考えられる。

図2は、開花前(A、B)と開花後(C、D)に採集したテッポウユリの花粉をグリセリン液に包埋した直後と24時間後に観察した光学顕微鏡写真である。シロイヌナズナの花粉とくらべると、膨潤型での花粉

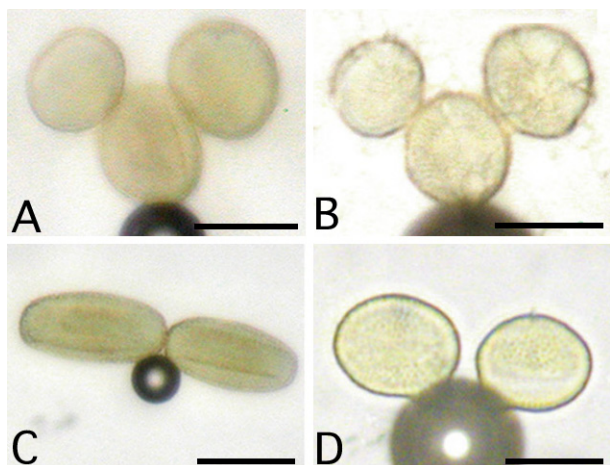


図 1. シロイヌナズナの花粉の光学顕微鏡像。開花前に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(A)と24時間後の花粉(B), および、開花後に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(C)と24時間後の花粉(D)。スケール: 20  $\mu\text{m}$ 。

直径が70~100  $\mu\text{m}$  ではるかに大きいことと形状がやや膨らんだレンズ状を呈していることを除けば、それぞれの処理法による花粉の形態的特徴は同じであり、開花後に採集した花粉のうち、グリセリン液包埋直後の花粉のみが乾燥型を示した。

共焦点レーザー顕微鏡は、通常の光学顕微鏡より高分解能で走査電顕像に近いイメージを与える。図3は、開花後に採集したシロイヌナズナとテッポウユリの蛍光染色花粉の共焦点レーザー顕微鏡像である。いずれの花粉も、その表面には網目状の模様が明瞭に観察されており、これらの花粉外壁が網目型であることを示している。蛍光染色液中で十分に吸水しているため花粉は膨潤型であり、開花前に採集した花粉も同様の形態的特徴を示した。

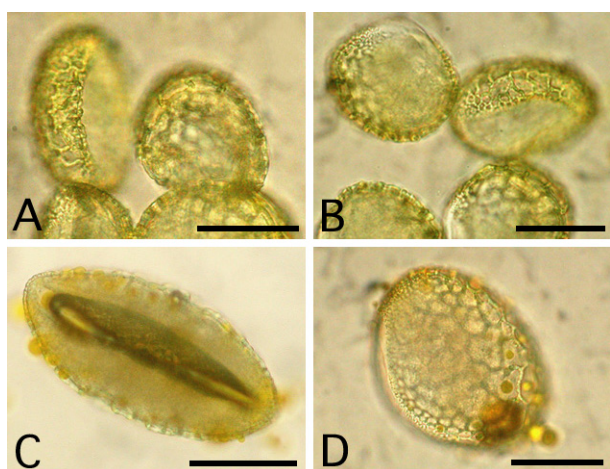


図 2. テッポウユリの花粉の光学顕微鏡像。開花前に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(A)と24時間後の花粉(B), および、開花後に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(C)と24時間後の花粉(D)。スケール: 50  $\mu\text{m}$ 。

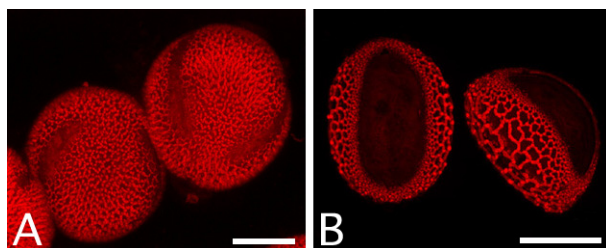


図 3. 開花後に採集したシロイヌナズナ(A)とテッポウユリ(B)の花粉の共焦点レーザー顕微鏡による蛍光染色像。スケール: 10  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B)。

### 脱水(乾燥)後の花粉の形態

図4は、開花前に採集したシロイヌナズナの花粉に種々の固定法と脱水(乾燥)法を試みた結果を示す走査電顕像である。いずれの条件下でも花粉は光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で確認された膨潤型を示した。花粉は亜三角錐形の間口型で、3つの発芽口を持ち、花粉型としては三溝型であった。また、前述したように外壁は網目型で、表面には明瞭な網目状の畝が観察された。開花後に採集したシロイヌナズナの花粉を同様に処理した結果(図5)では、無固定で自然乾燥させた花粉(図5A)のみが長楕円体の乾燥型形状を示し、他の処理法の組み合わせでは、観察された花粉はいずれも膨潤型であった。また、アセトン固定後に自然乾燥した花粉(図5B)では変形が生じており、この処理法の組み合わせは、目的が膨潤型の花粉を観察する場合であっても適していないと考えられる。しかし、膨潤型の花粉を観察する場合であれば、他の4つの処理法の組み合わせはいずれも適用しうるものと考えられる。

図6は、開花前に採集したテッポウユリの花粉に種々の固定法と脱水(乾燥)法を試みた結果を示す走査電顕像である。花粉は、良く知られているように、レンズ状長楕円体形の間口型で、1つの発芽口を持ち、花粉型としては単溝型であり、外壁は網目型であった<sup>4)</sup>が、無固定で自然乾燥した花粉(図6A)では、外壁表面の網目が不明瞭で、表面を何らかの物質が覆っているように思われた。この物質は時に花粉表面を被覆しているとされるカロース<sup>3)</sup>である可能性が高い。花粉処理法の違いによってシロイヌナズナの場合よりも形状に多くの違いが生じていた。固定液が有機溶媒を含む場合には外壁表面の網目を構成する畝が不明瞭でやや変形しており、一部では崩壊しているような状態を呈し、網目を欠く開口部には表面に何らかの物質が粘着しているようであった(図6B-D)。一方、固定にGAを用いたものでは形状は整っており、表面の網目および開口部の構造も明瞭であった(図6E, F)。開花後に採集したテッポウユ

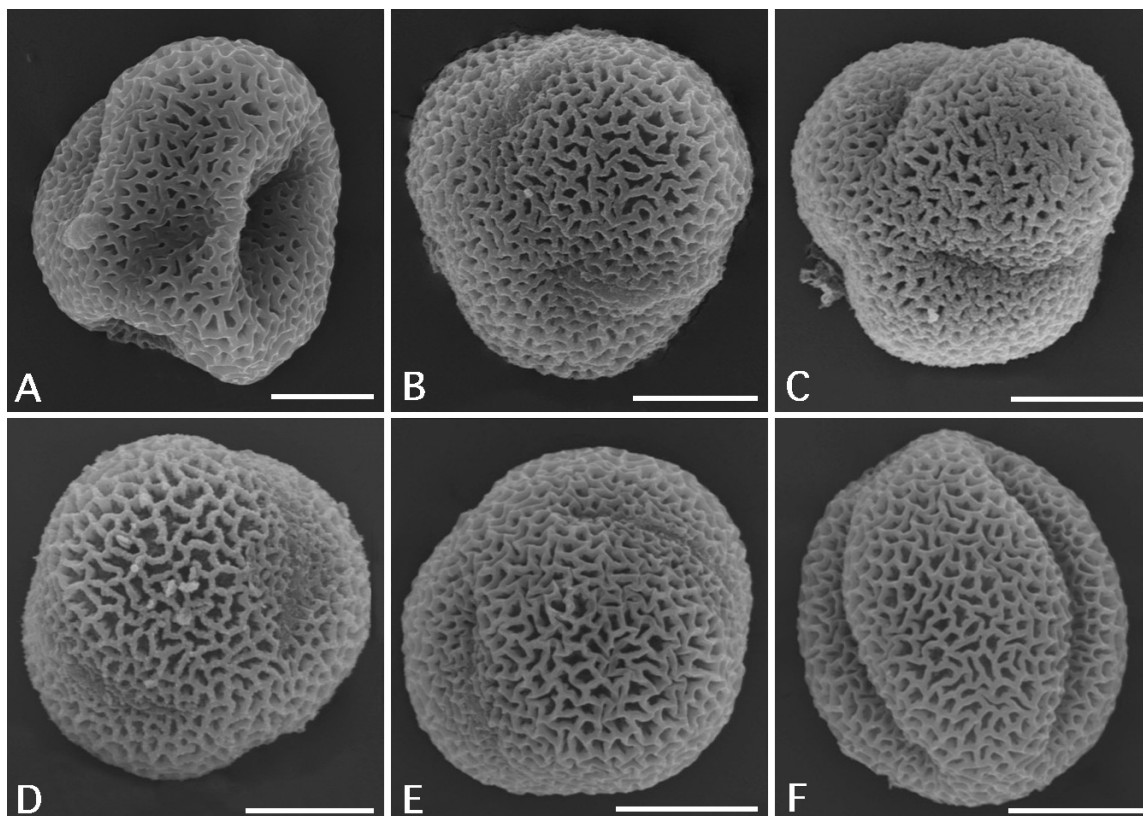


図 4. 開花前に採集したシロイヌナズナ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 5  $\mu$ m.

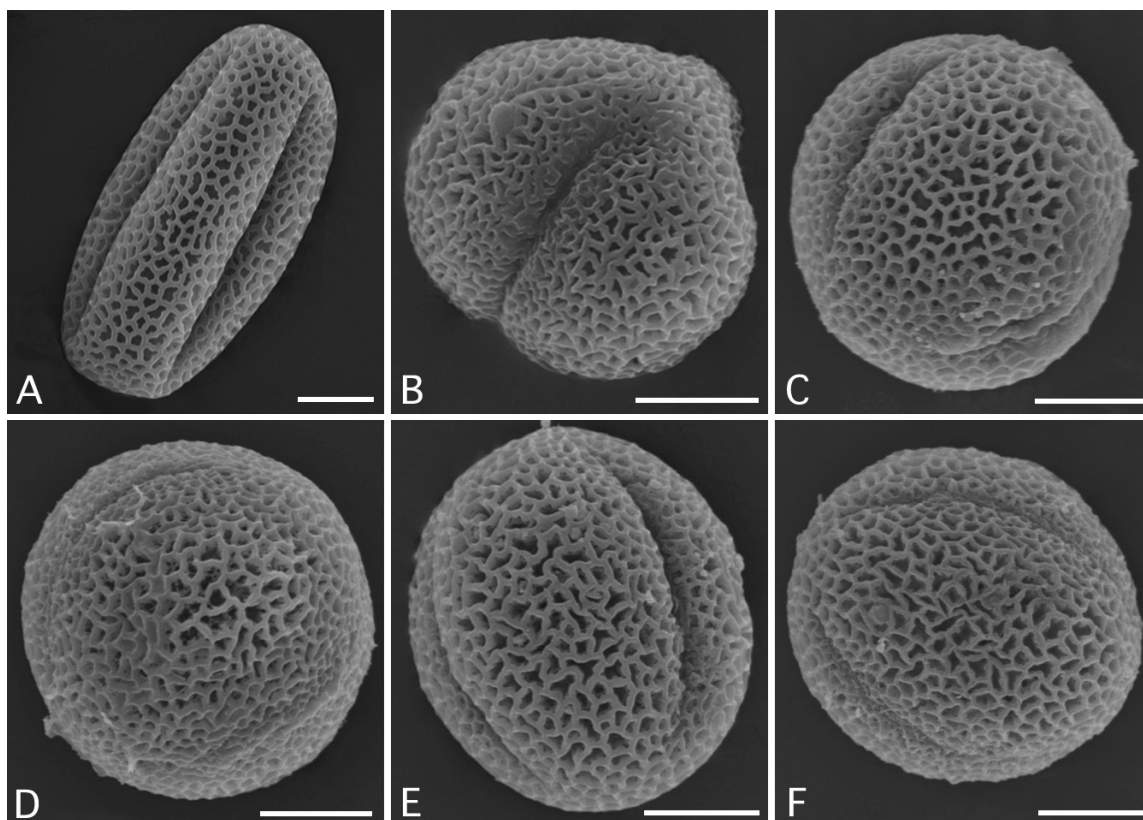


図 5. 開花後に採集したシロイヌナズナ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 5  $\mu$ m.



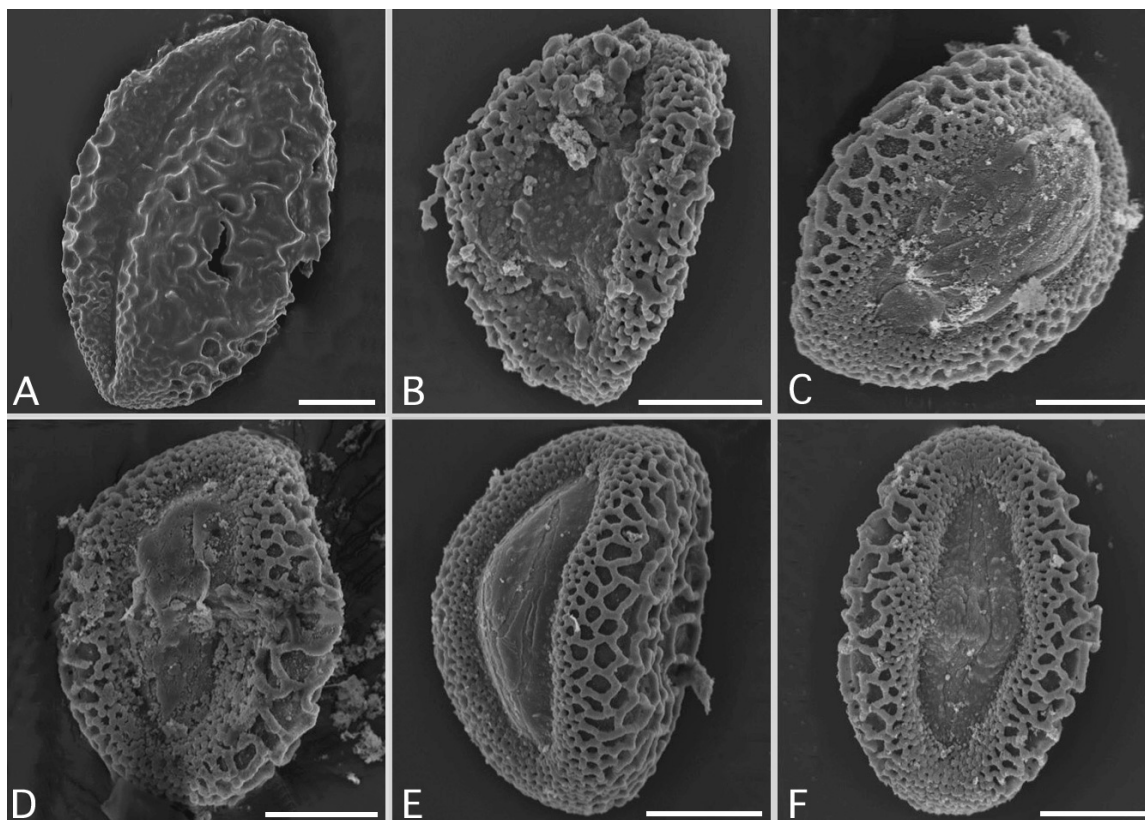


図 6. 開花前に採集したテッポウユリ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 20  $\mu\text{m}$ .

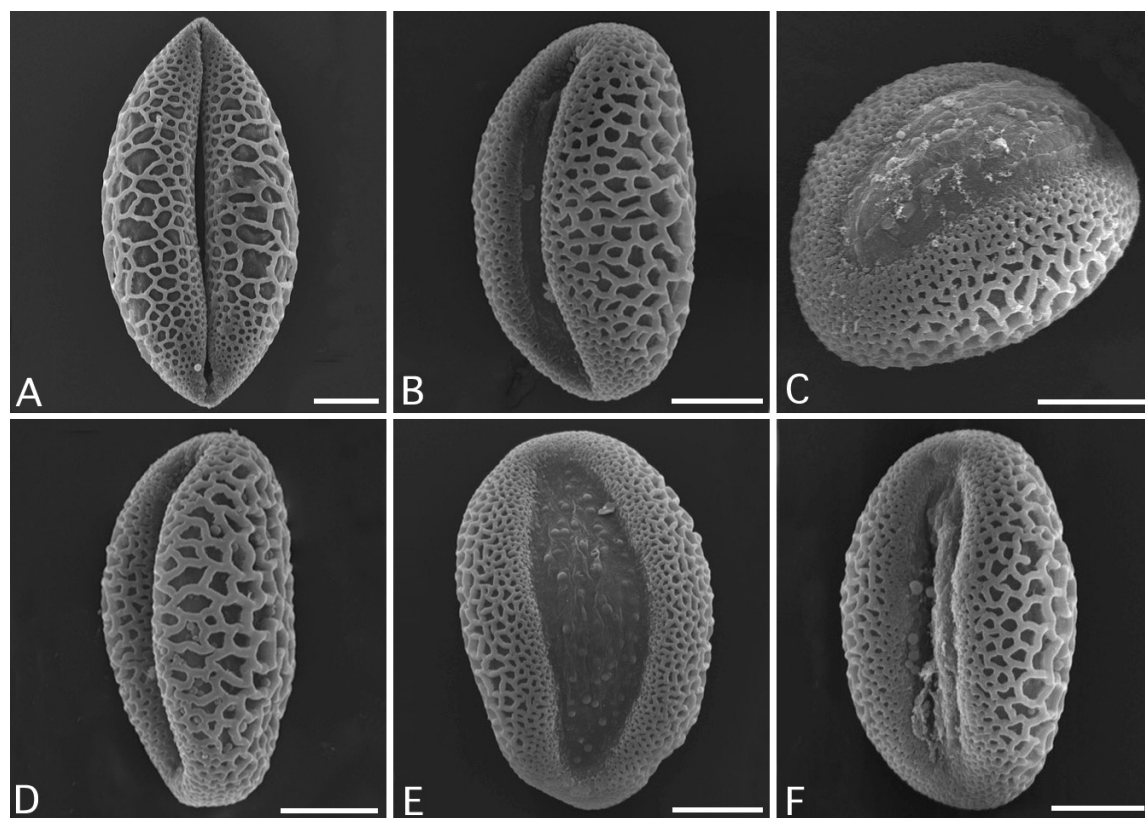


図 7. 開花後に採集したテッポウユリ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 20  $\mu\text{m}$ .

りの花粉を同様に処理した結果(図 7)では、両端の尖鋭化が認められる無固定で自然乾燥させた花粉(図 7A)を除き、形状は概ねレンズ状長楕円体型であり、光学顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察された結果と良く対応しており、特に FAA 固定後に臨界点乾燥を行なった花粉は膨潤型として最も良く一致していた。いずれの処理法の組み合わせでも表面の網目構造や開口部は明瞭に観察された。

最も自然に近い状態の花粉を観察するための固定法および脱水または乾燥法を検討するために、これらの手法の組み合わせで開花前の花粉(基本的に膨潤型)と開花後の花粉(基本的に乾燥型)を処理したが、結論として、乾燥型の花粉を観察する場合には、いかなる水溶液処理も好ましくなく、無固定で自然乾燥することが最も適していると考えられる。一方、膨潤型の花粉を観察する場合には、基本的に何らかの化学固定をすべきであるが、アセトン固定は適していないと考えられる。シロイヌナズナでは GA 固定が、テッポウユリではやや FAA 固定が良好な結果を与えており、最終的には花粉種ごとに最適手法の検討が必要になると思われる。膨潤型花粉の乾燥法については臨界点乾燥法と凍結乾燥法で質的に大

きな差違はなく、いずれの方法でも良い結果をもたらすと考えられる。今回の評価では、かなり低倍で観察された走査電顕像を対象にしたが、高倍率観察でどのような処理法の違いが認められるかについては今後の課題である。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、野生型シロイヌナズナの種子をご提供下さいました神奈川大学理学部安積良隆博士に感謝の意を表します。

## 文献

- 1) 日本花粉学会編 (2002) *花粉学事典* 第4版. 朝倉書店, 東京.
- 2) Nishikawa S-I, Zinkl GM, Swanson R, Maruyama D and Preuss D (2005) Callose (b-1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* 5:22.
- 3) Fikimoto R, Fuji T and Sekimoto H (1998) A newly identified chemotactic sexual pheromone from *Closterium ehrenbergii*. *Sex Plant Reprod.* 11:81-85.
- 4) Iwanami Y, Sasakuma T and Yamada Y (1988) *Pollen: Illustrations and Scanning Electronmicrographs*. Kodansha/Springer-Verlag, Tokyo.