

クレマチス属の花粉粒外部形態

矢野義治*

YANO, Yoshiharu*: Pollen Grain Morphology in *Clematis* (Ranunculaceae)

日本に自生するクレマチス属 (*Clematis* L.) は 21 種 5 亜種 (北村・村田 1961) あり、世界中では約 300 種 (Lloyd 1989) が分布している。一方、クレマチスの園芸品種は 19 世紀後半から改良が進められ、新品種が続々と発表され現在では 250~300 品種と推測される。これらの新品種作出に用いられた交配種は東洋のカザグルマ (*C. patens*)、テッセン (*C. florida*)、ラヌギノーサ (*C. lanuginosa*) およびヨーロッパのビチセラ (*C. viticella*) など数種から出発している。そのために園芸品種は交配種の特性を引き継ぎ系統的なグループ分けが可能である。ところが園芸品種の数が多くなり交配種の系統の記録が不明確であったり、錯綜するようになるにしたがって、従来からの交配親による系統的なグループ分けが困難になった。そして新品種を生み出すための交配を組織的に試みるうえでも、支障をきたすようになった。筆者は多数の園芸品種を、その品種特性や交配種の系統によりグループ分けを行ってきた従来の方法他に、基準となる形質はないものだろうかと模索中である。今回は花粉粒の外部形態に着目して、クレマチス属の原種と園芸品種の花粉粒との関連を検討した。

花粉粒の外部形態研究分野の一つにパリノタクソノミーがある。この分野は植物種を花粉の特徴を基準にして、植物の分類・類縁を体系化しようとするものである。

我が国における花粉粒の形態研究は、Kumazawa (1936) によりキンボウゲ科、アケビ科およびメギ科の報告がある。クレマチス属は 31 種を観察して、花粉粒の溝 (colpi) や口 (aperture) の数と位置および表面突起物の分布の特徴などを基にして 3 タイプに大別した。更に各タイプを表面の微細な特徴からそれぞれを 2 つに細分することが可能であるとした。幾瀬 (1956) は日本の植物約 190 科 2,300 種におよぶ膨大な種類の花粉粒研究成果を発表した。ここでクレマチス属 9 種を記載し、カザグルマなどの少数散孔型 (4C^a) とセンニンソウなどの赤道上 3 溝型 (6B^b) の 2 タイプを報告した。

これらの花粉粒の観察は、主として光学顕微鏡によるもので細部の観察には己ずと限界がある。その後、走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope 以下 SEM と略す) の普及により、高倍率で高分解の表面形態の観察が可能となり花粉粒の研究も大きな発展を見た。SEM は無機物質の観察用に開発された機器であるが、これを生物試料に応用するためには前処理方法が重要であり、これらの技術開発によって生物組織の観察も容易になった。

今回は、クレマチス属 13 種および園芸品種 21 種の花粉粒観察を行った。

材料および方法

花粉粒の実験・観察に供したクレマチス属の植物は、すべて当園で育成管理しているものである。国外の自生種や園芸品種は、各国のナーサリーから取りよせたものであり、国内のものについても採取地の明確なものを選んで観察試料とした。花粉粒の採取は、開葯前の状態で室内に取り込み、自然乾燥と臨界点乾燥法の 2 方法で試料を作成した。臨界点乾燥法は脱水、固定のため

* 国立科学博物館 筑波実験植物園, Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Tsukuba, 305.

に 80%, 90%, 100% のエタノール液に各々 20 分間浸した。脱水の完了した試料は酢酸イソアミルで置換した後、耐圧容器内で二酸化炭素と置換し、さらに二酸化炭素の臨界圧力・臨界温度を越える条件でガスを排出し乾燥した。これら一連の手順は日立臨界点乾燥装置 (HCP-2 形) で行った。

花粉粒の試料台への展着は両面テープを使用した。乾燥処理中に開葯した試料は、振かけ法で試料台に均一に散ばるように注意深く行った。まだ葯が裂開していないものは、実体顕微鏡下でピンセットと針で葯を破り試料台に展着した。金属コーティングはターゲット Pt-Pb を装着した 1B-3 型イオンコーダー (エイコー・エンジニアリング) を使用した。

SEM は JSM-5300 (日本電子) を使用した。この時の観察条件は加速電圧 25KV, 傾斜角 $T=30^\circ$ である。

生物試料は作成過程で変形や破損を生じやすく、また観察中に電子線により破壊されることもあり細心の注意を要する。電子線による破壊には金属コーティングを厚くする方法などで対応した。

結果および考察

生物体やその組織を SEM で観察するためには、試料の乾燥や金属コーティングなどの処理が必要である。試料の乾燥処理過程で生じる変形は、臨界点乾燥法の開発によりかなりの程度まで原形状態を保つことが可能となった。金属コーティングは生物試料に導電性を与え、試料内に蓄積する電子を外に逃がす方法であり、よい SEM 像を得るためには必要である。しかしこの処理により表面の微細な構造の観察に障害となることもある。今回観察した花粉粒では支障なく観察できた。それよりも電子線の照射を受けて試料が破壊されることが多く見られ、試料保護の方法の検討が必要と思われた。

花粉粒の熟度

蕾が開いた状態になると他の植物の花粉粒が昆虫などにより運ばれたり、風媒花粉が飛来してコンタミネーションを生ずる。花粉粒観察に供する試料を、蕾が開く前に取り出したものでも成熟した花粉と同様の形態であれば、蕾状態の花粉粒観察がコンタミネーションを防ぐためにも良い方法であると言える。

クレマチス・キルホーサ (*C. cirrhosa*) の小さい蕾から開花したものまで 7 段階を取り、花粉粒の変化を観察した (Fig. 1)。Fig. 1 の A, B, C は蕾が開いた状態のもので、A は開葯直前で乾燥処理中に開葯した。C は蕾が開いた直後のものである。D~G は蕾の状態であるが、G は一番小さくて堅い蕾である。A~E までの外部形態に大きな差異は見られないが、F, G の蕾の小さいものは溝の形態が不規則で不明瞭である。このことは蕾の初期段階では花粉粒が未熟で花粉粒の形態観察には不適であることを示唆している。また開葯後の花粉粒でなくて蕾状態でも成熟花粉粒と同様の形態が観察できる。クレマチス属は多数の雄しべが雌しべを中心円状に取りかこんでおり、雄しべの外側が早く開葯され内側は遅れて開葯する。これらの違いによる花粉粒の外部形態への関連について観察したが、差異はなかった。

試料作成法と外部形態

センニンソウ (*C. terniflora*) の花粉粒を自然乾燥法と臨界点乾燥法で処理した試料の SEM 写真を Fig. 2 に示す。自然乾燥法では楕円形を示し溝が閉じられている。臨界点乾燥法は球状の全体像となり溝が開かれ溝の表面突起も明瞭で数も他の部分より多い。前者を乾燥形、後者を膨潤

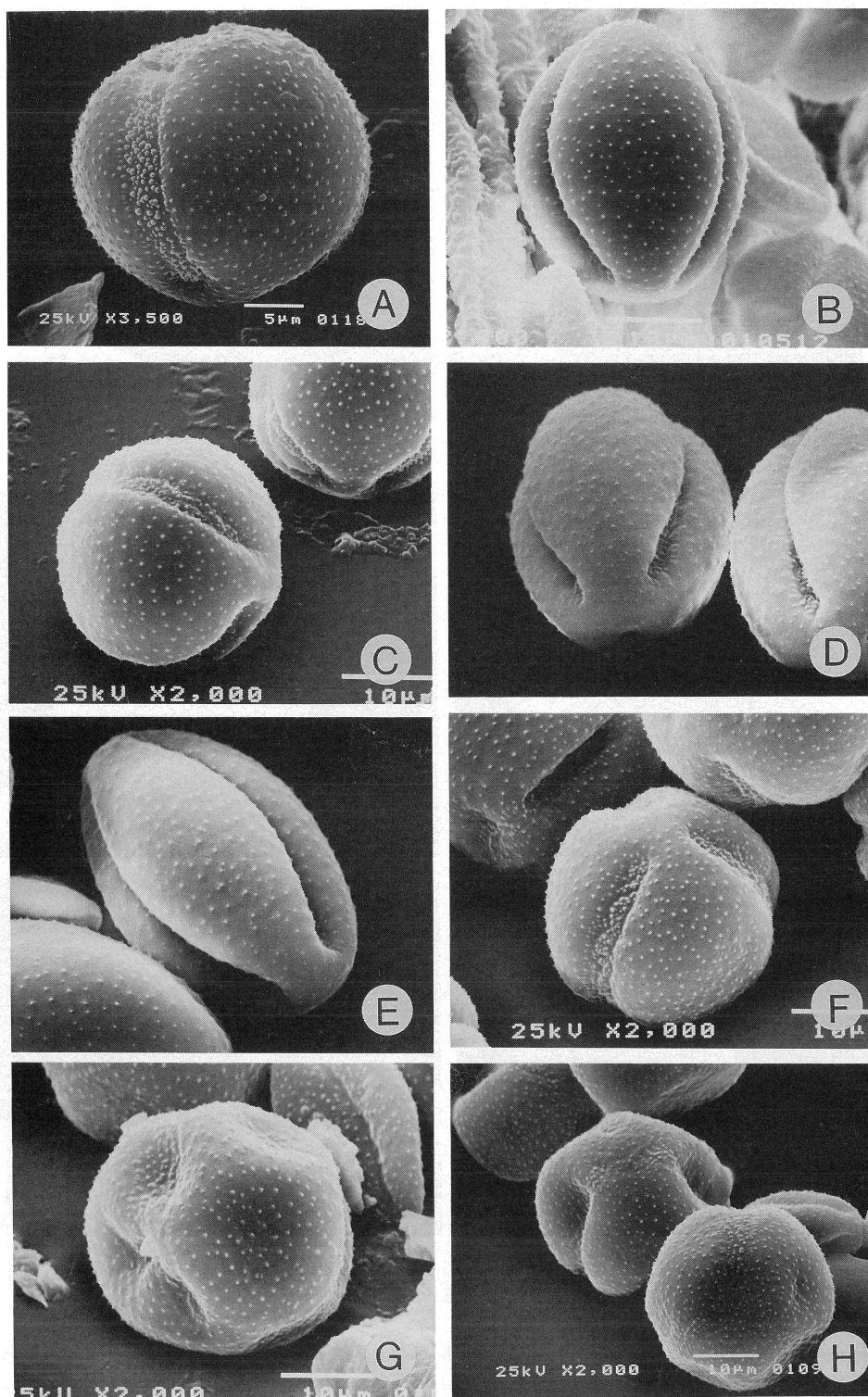


Fig. 1. The variation of pollen grain by the degree of maturity in *C. cirrhosa*.
A-D: post-anther-dehiscence, E-H: pre-anther-dehiscence.

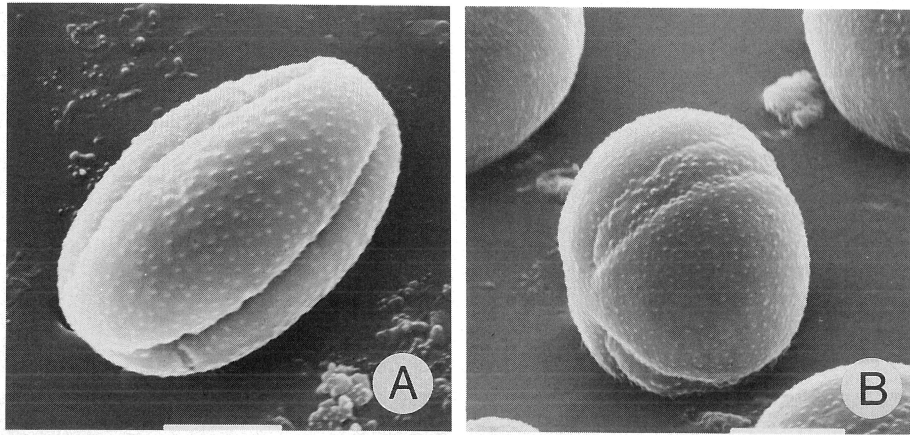


Fig. 2. *C. terniflora*, SEM photographs. A: air drying, B: critical point drying.

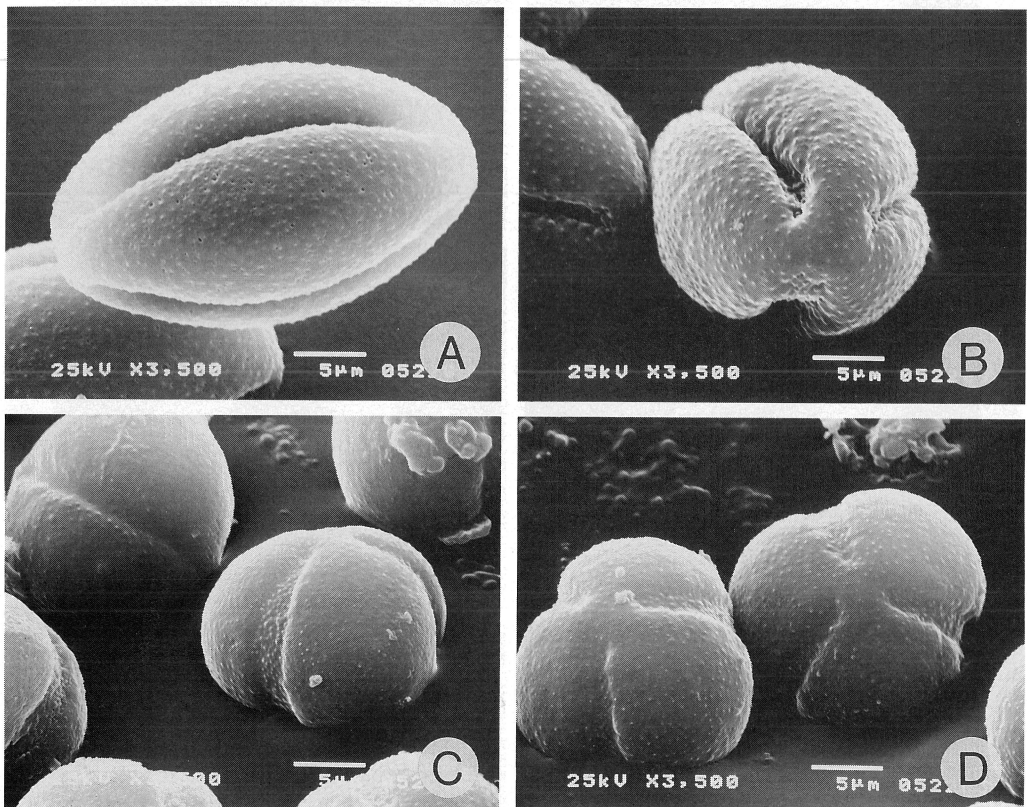


Fig. 3. *C. integrifolia* 'Hendersonii', SEM photographs. A: equatorial view, air drying, B: polar view, air drying, C: equatorial view, critical point drying, D: polar view, critical point drying.

形と表現することもある。このように花粉粒の形態は処理法により異なることがあるので判読には注意すべきである。自然乾燥法の試料では、大きさや形状や発芽口（孔）が不規則な変化をするので、典型的な状態のものを示すことが困難である。臨界点乾燥法で処理した試料は、大きさ、形状および発芽口（孔）の形態をほぼ正確に原形状態で示していると思われる。しかし、この方

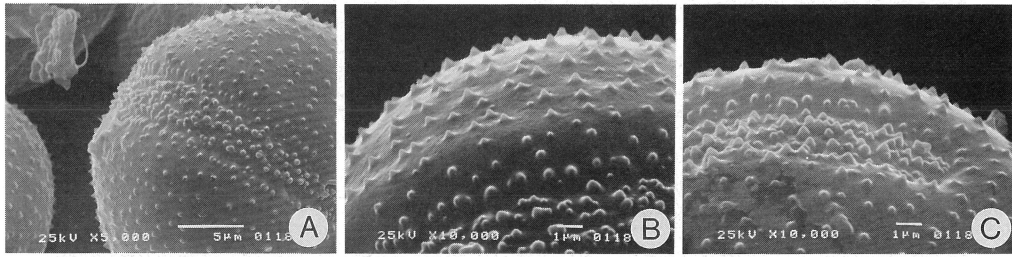


Fig. 4. Surface sculpture of *C. cirrhosa*. A: colpi, $\times 5000$, B: crest, $\times 10000$, C: colpi, $\times 10000$.

法も固定や脱水処理による変形もあり、特に水を多く吸収して膨発寸前まで膨れることもあり、判読には注意を要する。花粉粒の大きさは花粉分類の重要な基準の一つとされてきたが、処理法によって大きく変化することから、厳密な測定結果を示すことは困難である。また楕円形の花粉粒は、極方向と赤道方向からの観察で形状が異なって見えるので、全体像の把握には多方向からの写真を総合して検討されなければならない。Fig. 3 にクレマチス・インテグリフォリア ‘ヘンダーソニー’ (*C. integrifolia* ‘Hendersonii’) の4枚のSEM写真を示す。花粉粒の外被層に特徴的に見られる突起や模様は、花粉粒類別上で重要な指標となる。クレマチス・キルホーサの外被層拡大写真を Fig. 4 に示す。この種の外被層紋様は、溝の部分もその他の部分も同様に鋭三角形の刺状模様である。また刺状分布密度は溝と他の部分で異なり、前者で密であり後者で粗である。

クレマチス属の花粉粒

園芸品種を含むクレマチス属の花粉粒は、全て単粒で複粒のものは見られなかった。単粒の細分は全体の形状、発芽口(孔)の有無、形、数および位置で行った。その結果多数散口粒型、長楕円散口粒型、3-溝型および無口型の4種に分類できた。

多数散口粒型はカザグルマおよびこれらを交配種として改良された園芸品種に見られた (Fig. 5-8)。船橋、兵庫のカザグルマおよび ‘ドーン’ (*C.* ‘Dawn’), ‘ゲッキユウデン’ (*C.* ‘Gekkyuden’), ‘イエロー・クイン’ (*C.* ‘Yellow Queen’), ‘ラモーナ’ (*C.* ‘Ramona’), ‘ニオベ’ (*C.* ‘Niobe’), ‘カクウン’ (*C.* ‘Kakuun’), ‘ネリー・モーズ’ (*C.* ‘Nelly Moser’), ‘カキオ’ (*C.* ‘Kakio’), ‘ドクター・ラッペル’ (*C.* ‘Dr. Ruppel’), ‘ザ・プレジデント’ (*C.* ‘The President’), ‘サノノムラサキ’ (*C.* ‘Sanonomurasaki’), ジャックマニー ‘ルブラ’ (*C.* ‘Jackmanii Rubra’), ‘ベニオコシ’ (*C.* ‘Beniokoshi’), ‘ユキオコシ’ (*C.* ‘Yukiokoshi’), ‘テシオ’ (*C.* ‘Teshio’), ‘ピピアン・ペンネル’ (*C.* ‘Vyvyan Pennell’) など大型の花形のものと同重咲種である。これらは発芽口の数で細分されることもあるが、今回はほとんどが20個以下であったので同一型に区分した。Kumazawa (1936) の分類で Type III, 幾瀬 (1956) の分類で 4C^a 型に類別されるものである。

長楕円散口粒型は発芽口が長楕円で円形口と溝型の間形状である。テクセンシス (*C. texensis*), テクセンシス ‘グラベティ・ビューティ’ (*C. texensis* ‘Gravetye Beauty’), ウィオルナ (*C. viorna*) がこれに当たる (Fig. 9)。乾燥形は不規則に変化するが、臨界点乾燥法で長楕円の発芽口が明瞭である。全体の形状は球形である。Kumazawa (1936) はこれを Type II に分類した。幾瀬 (1956) は多数散孔粒型でまれに口が互いに合流したものが見られるが、これが Type II に相当するとしている。この2種は特徴ある壺状の花形をしている。

無口型はビル・ド・リヨン (*C.* ‘Ville de Lyon’) で見られた。乾燥形の花粉粒は発芽口の存在を暗示する不規則な凹凸が観察できるが、臨界点乾燥法では発芽口らしきものは確認できない形状である。ビル・ド・リヨンはモーレル (Morel) が1899年に発表した古い園芸品種である。

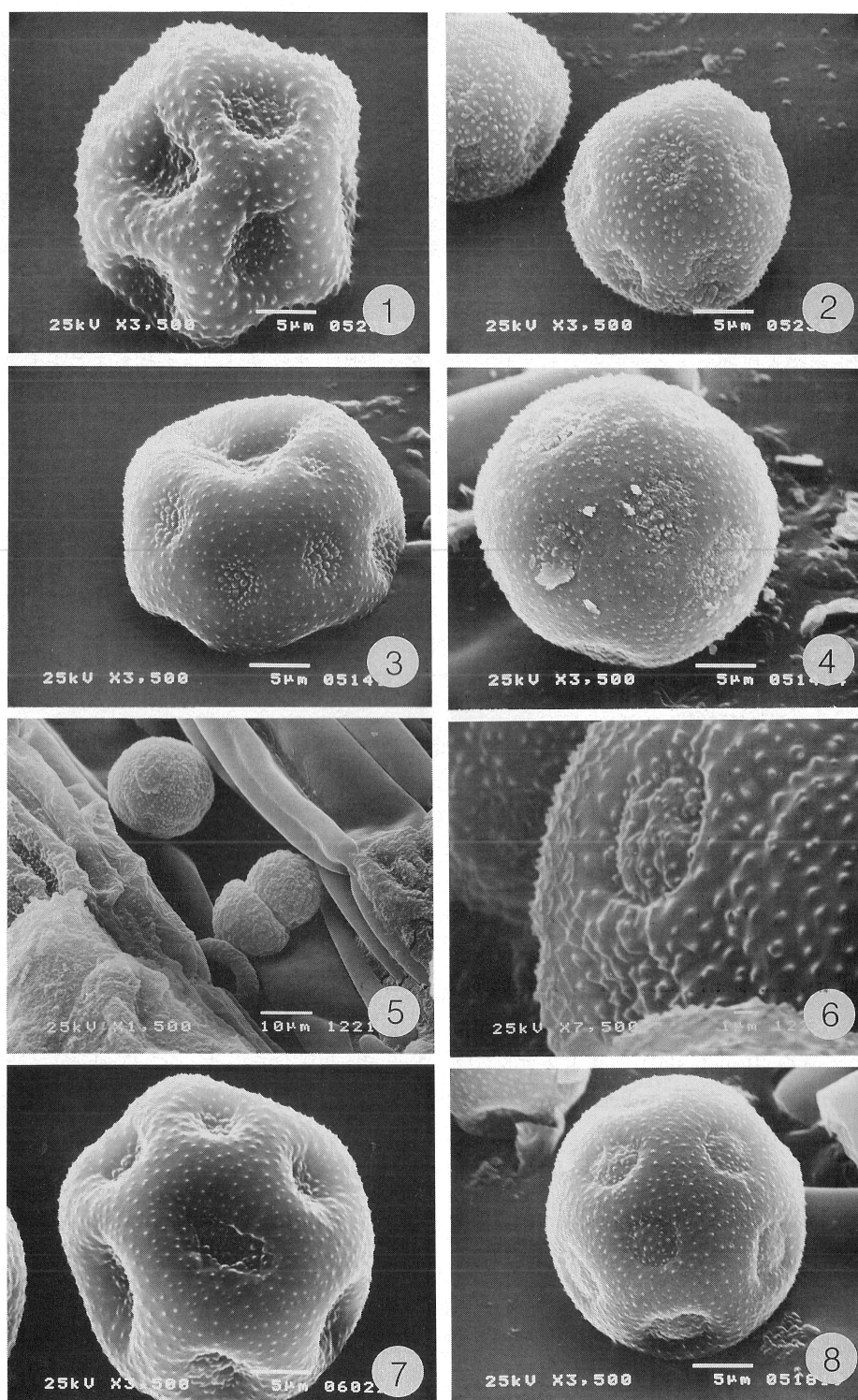


Fig. 5. *Clematis* spp. and cultivars, SEM photographs.

- 1: *C. patens* (Chiba prefecture). air drying, $\times 3500$.
 2: *C. patens* (Chiba prefecture). critical point drying, $\times 3500$.
 3: *C. patens* (Hyogo prefecture). air drying, $\times 3500$.
 4: *C. patens* (Hyogo prefecture). critical point drying, $\times 3500$.
 5: *C. patens* (Chiba prefecture). air drying, grains partially
 6: *C. patens* (Chiba prefecture). air drying, apertural
 area, $\times 7500$.
 7: *C.* 'Gekkyuden'. air drying, $\times 3500$.
 8: *C.* 'Gekkyuden'. critical point drying, $\times 3500$.

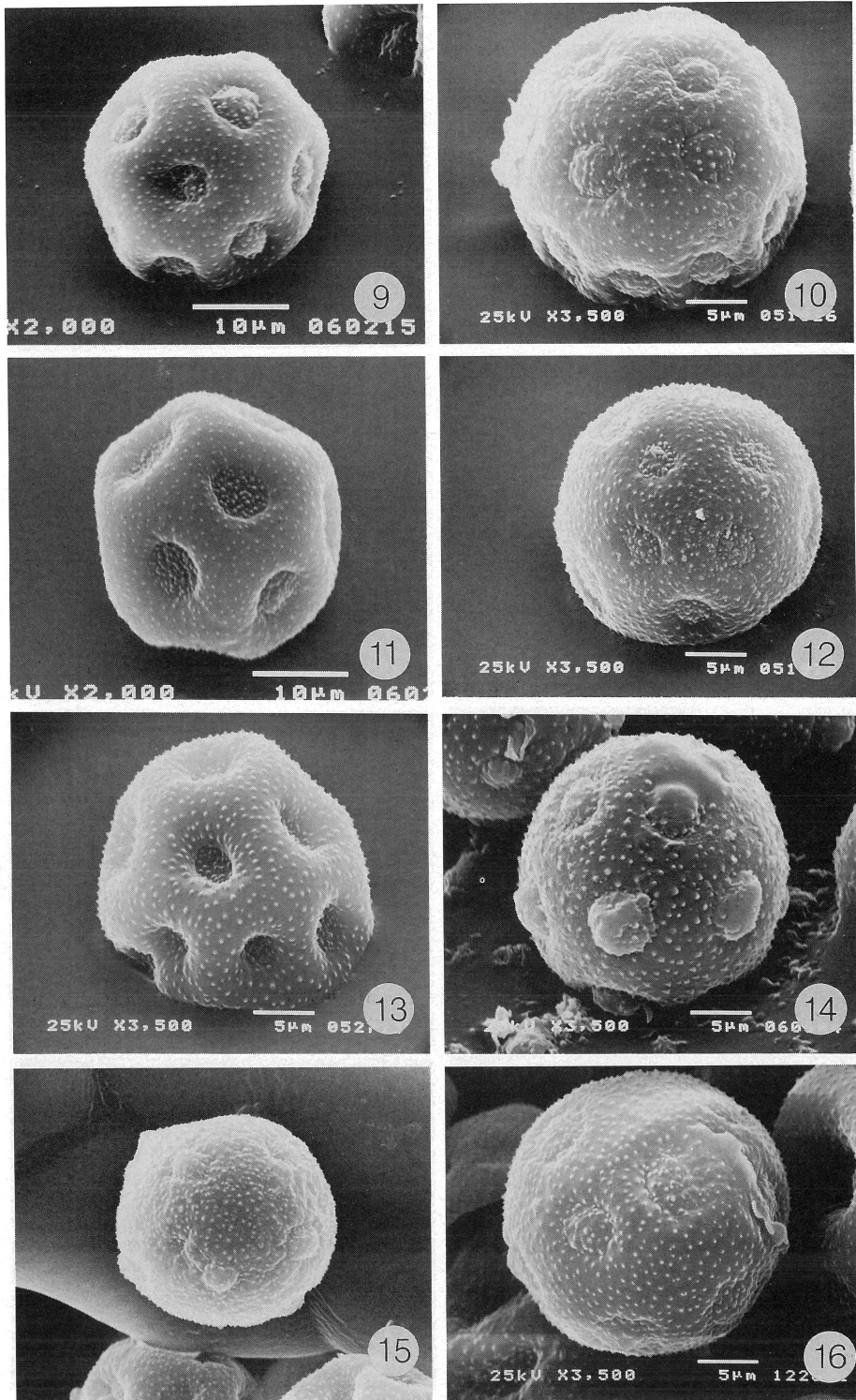


Fig. 6. *Clematis* cultivars, SEM photographs.

- 9: C. 'Dawn'. air drying, $\times 2000$.
 10: C. 'Dawn'. critical point drying, $\times 3500$.
 11: C. 'Yellow Queen'. air drying, $\times 2000$.
 12: C. 'Yellow Queen'. critical point drying, $\times 3500$.
 13: C. 'Ramona'. air drying, $\times 3500$.
 14: C. 'Ramona'. critical point drying, $\times 3500$.
 15: C. 'Niobe'. critical point drying, $\times 3500$.
 16: C. 'Kakuun'. critical point drying, $\times 3500$.

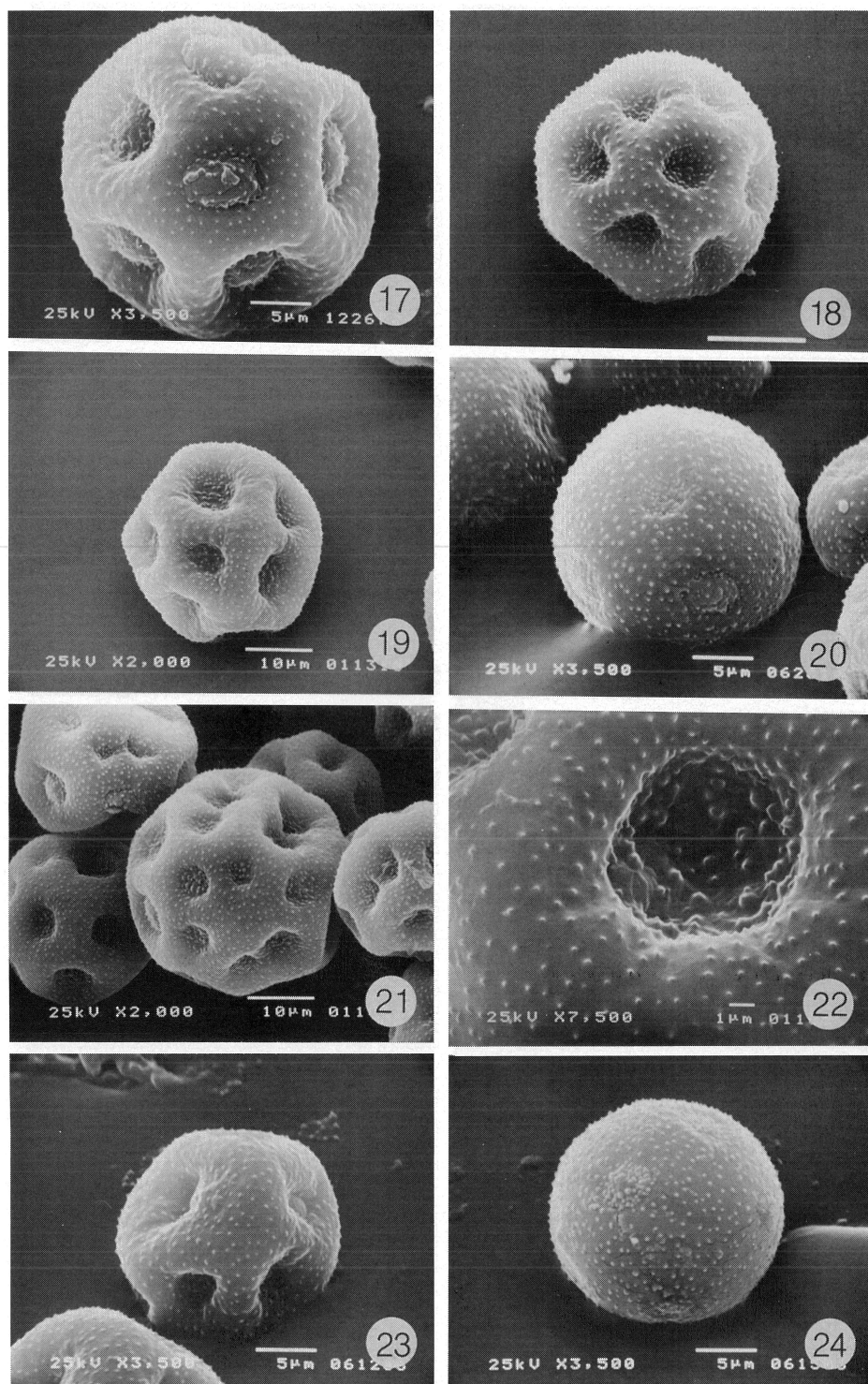


Fig. 7. *Clematis* cultivars, SEM photographs.

- 17: C. 'Nelly Moser'. air drying, $\times 3500$. 21: C. 'Sanonomurasaki'. air drying, $\times 2000$.
 18: C. 'Kakio'. air drying, $\times 2000$. 22: C. 'Sanonomurasaki'. air drying, apertural area, $\times 7500$.
 19: C. 'Dr. Ruppel'. air drying, $\times 2000$. 23: C. 'Jackmanii Rubra'. air drying, $\times 3500$.
 20: C. 'The President'. critical point drying, $\times 3500$. 24: C. 'Jackmanii Rubra'. critical point drying, $\times 3500$.
 21: C. 'Sanonomurasaki'. air drying, $\times 2000$.
 22: C. 'Sanonomurasaki'. air drying, apertural area, $\times 7500$.
 23: C. 'Jackmanii Rubra'. air drying, $\times 3500$.
 24: C. 'Jackmanii Rubra'. critical point drying, $\times 3500$.

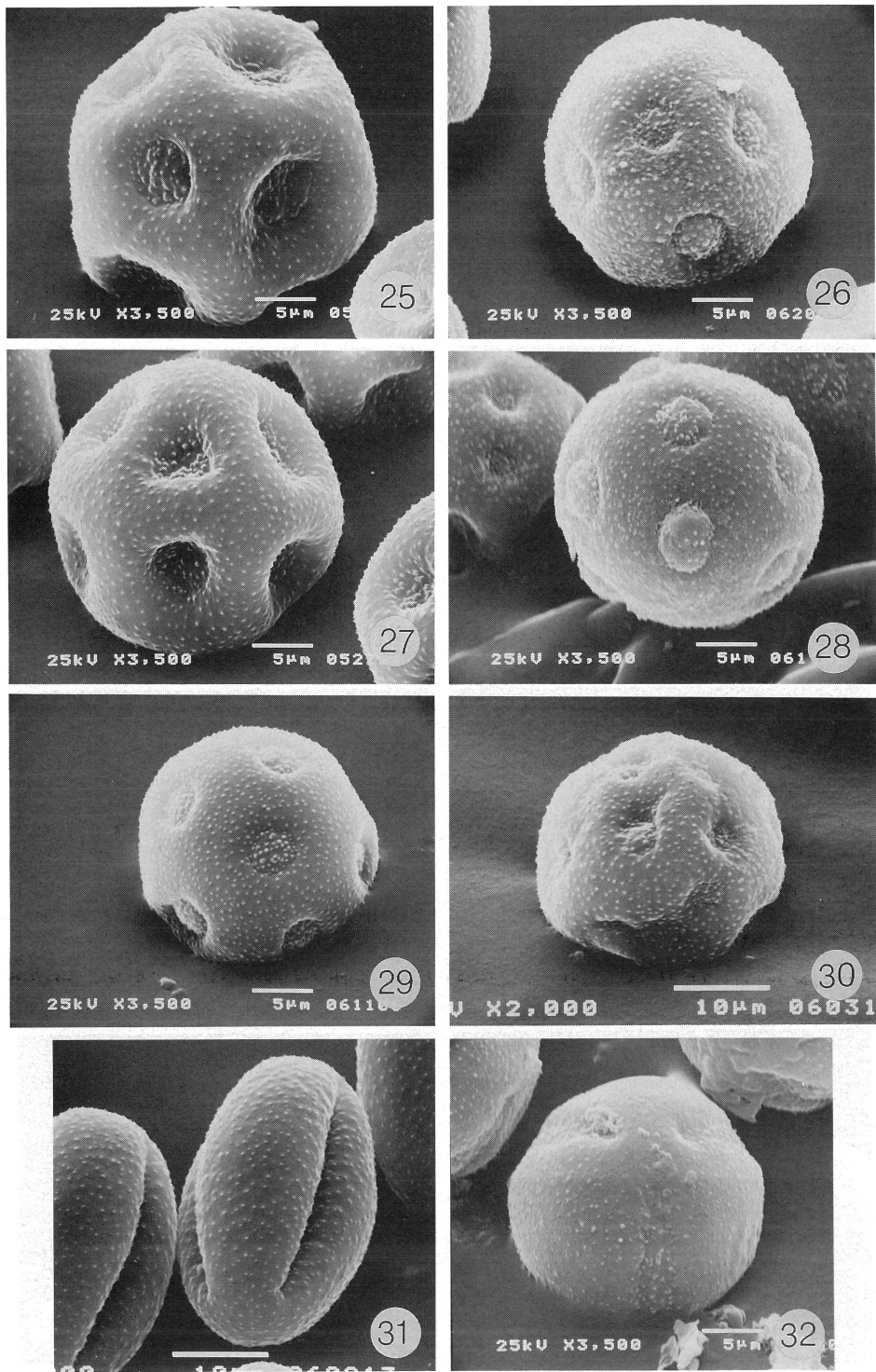


Fig. 8. *Clematis* spp. and cultivars, SEM photographs.

25: *C.* 'Beniokoshi'. air drying, $\times 3500$.

26: *C.* 'Beniokoshi'. critical drying, $\times 3500$.

27: *C. patens* 'Yukiokoshi'. air drying, $\times 3500$.

28: *C. patens* 'Yukiokoshi'. critical point drying, $\times 3500$.

29: *C.* 'Teshio'. air drying, $\times 3500$.

30: *C.* 'Vyvyan Pennell'. air drying, $\times 2000$.

31: *C. viticella*. air drying, $\times 2000$.

32: *C. viticella*. critical point drying, $\times 3500$.

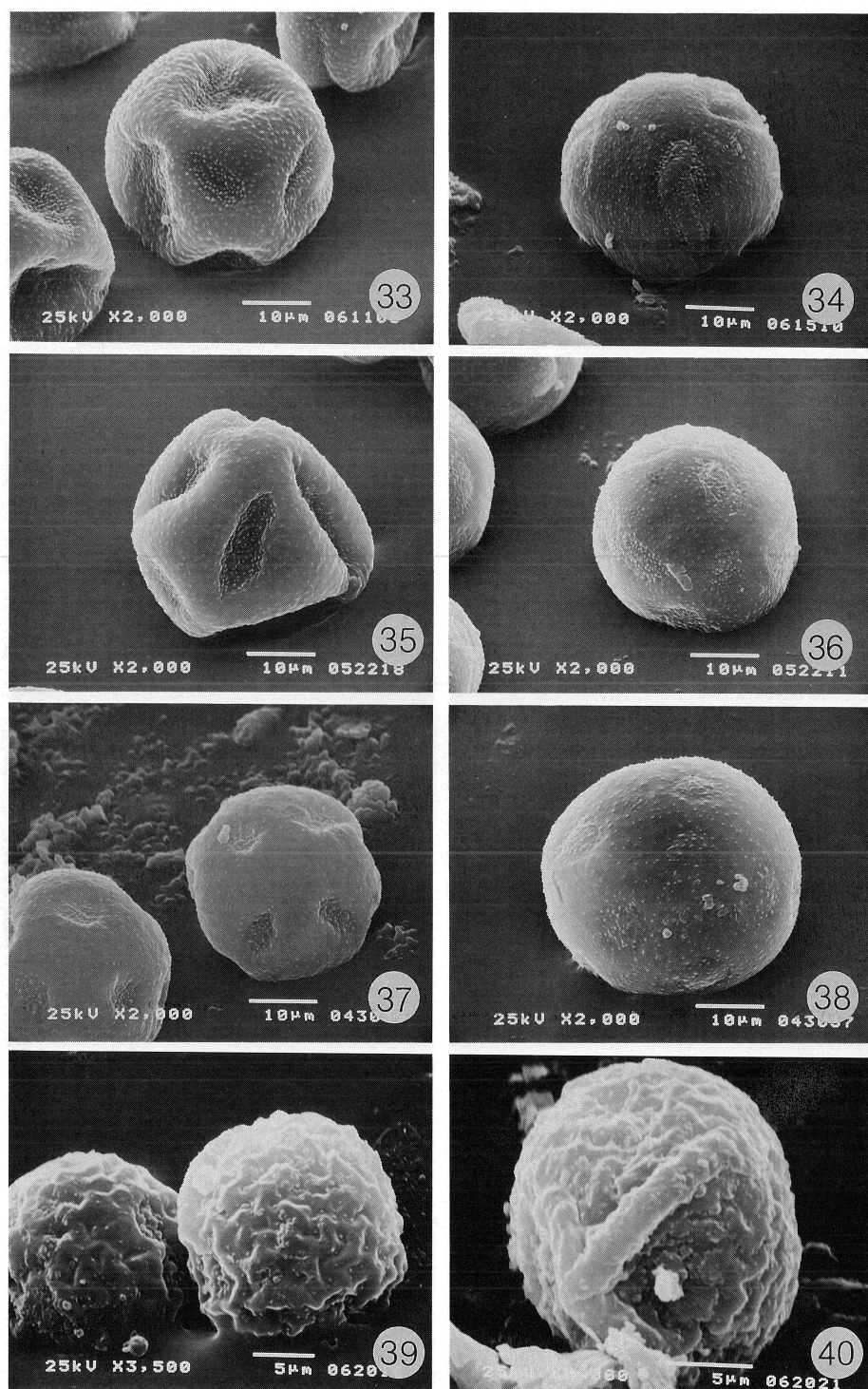


Fig. 9. *Clematis* spp. and cultivars, SEM photographs.

33: *C. viorna*. air drying, $\times 2000$.

37: *C. texensis*. 'Gravetye Beauty'. air drying, $\times 2000$.

34: *C. viorna*. critical point drying, $\times 2000$.

38: *C. texensis*. 'Gravetye Beauty'. critical point drying, $\times 2000$.

35: *C. texensis*. air drying, $\times 2000$.

39: *C.* 'Ville de Lyon'. critical point drying, $\times 3500$.

36: *C. texensis*. critical point drying, $\times 2000$.

40: *C.* 'Ville de Lyon'. critical point drying, $\times 5000$.

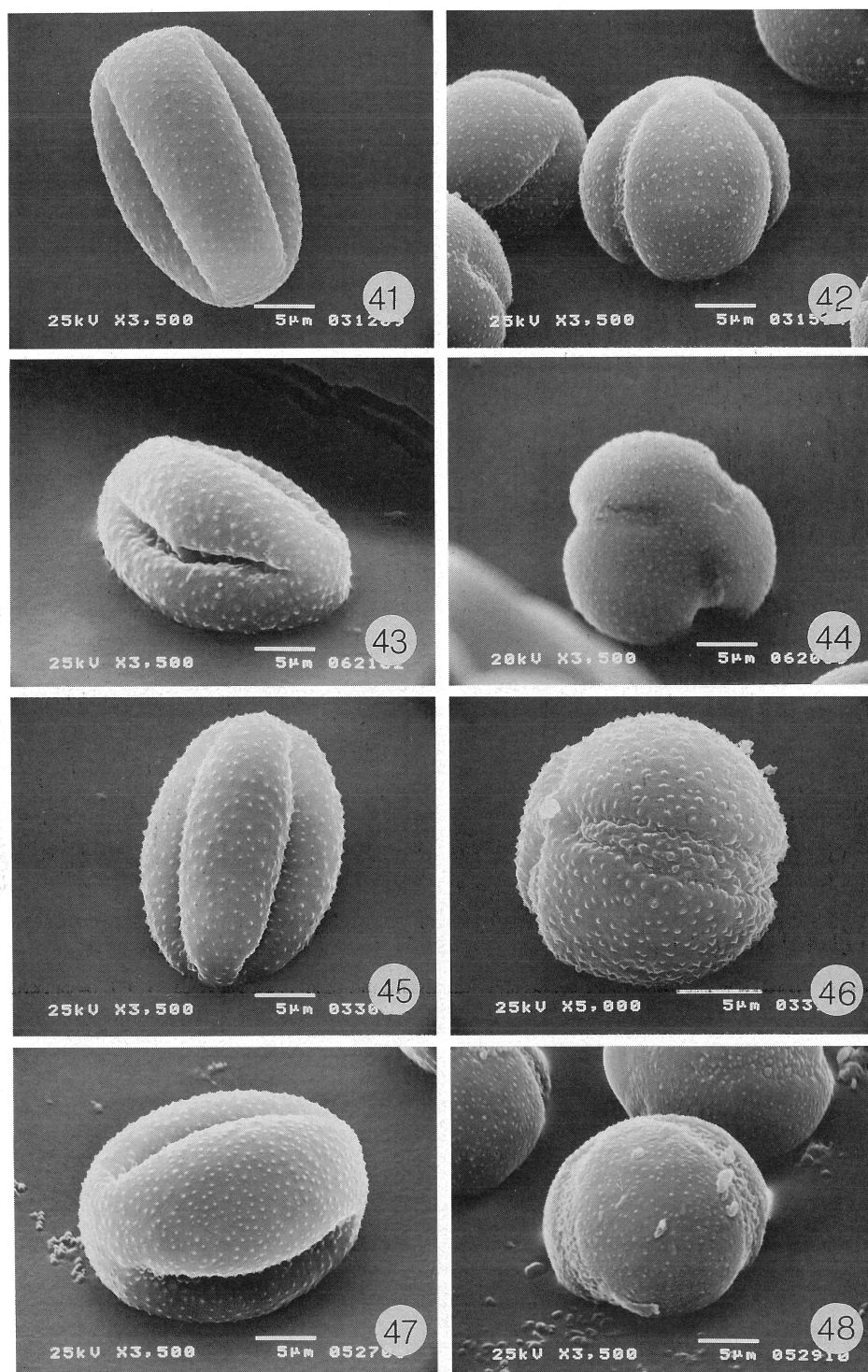


Fig. 10. *Clematis* spp., SEM photographs.

- 41: *C. macropetala*. air drying, equatorial view, $\times 3500$.
 42: *C. macropetala*. critical point drying, equatorial view, $\times 3500$.
 43: *C. macropetala*. air drying, $\times 3500$.
 44: *C. macropetala*. critical point drying, polar view, $\times 3500$.
 45: *C. armandii*. air drying, equatorial view, $\times 3500$.
 46: *C. armandii*. critical point drying, equatorial view, $\times 5000$.
 47: *C. recta*. air drying, $\times 3500$.
 48: *C. recta*. critical point drying, $\times 3500$.

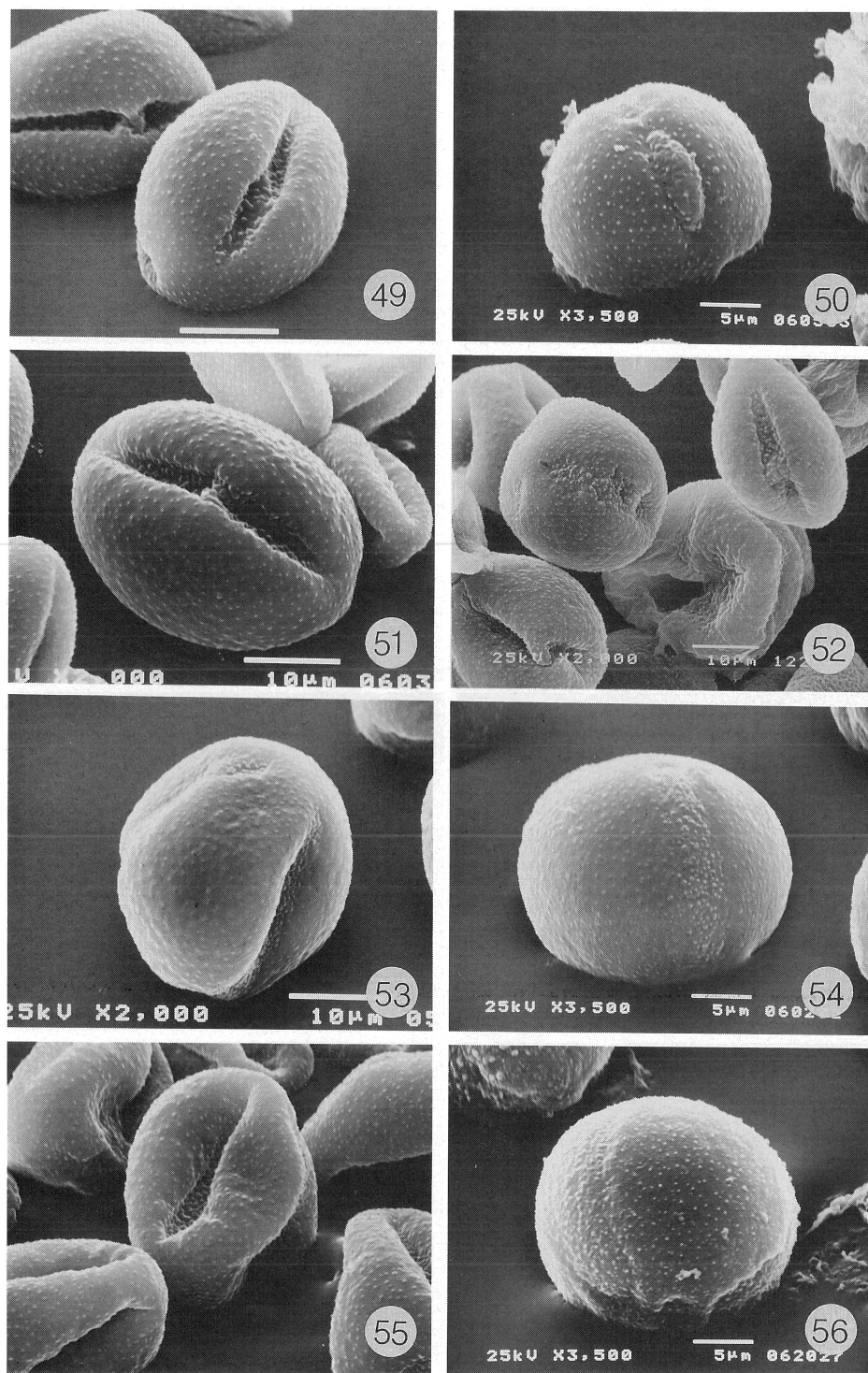


Fig. 11. *Clematis* spp. and cultivars, SEM photographs.

- 49: *C. montana* 'Tetrase'. air drying, $\times 2000$.
 50: *C. montana* 'Tetrase'. critical point drying, $\times 3500$.
 51: *C. integrifolia* 'Eriostemon'. air drying, $\times 2000$.
 52: *C. integrifolia*. air drying, $\times 2000$.
 53: *C. integrifolia* 'Yubune'. air drying, $\times 2000$.
 54: *C. integrifolia* 'Yubune'. critical point drying, $\times 3500$.
 55: *C. 'Rouguchi'*. air drying, $\times 2000$.
 56: *C. 'Rouguchi'*. critical point drying, $\times 3500$.

ピッチェリー (*C. pitcheri*) にテクセンシスを交配して作出された。しかし一方ではテクセンシスの F_1 種から選出されたとする説もある (Fretwell 1989)。

3-溝型は乾燥形では楕円形で溝が閉じ、膨潤形では球形で溝に巾のあることがわかる。溝には1個の発芽口が確認できるタイプ、溝が極の部分で3本が接近するタイプおよび離れるタイプも観察できる。日本のボタンヅル (*C. apiifolia*)、クロバナハンショウヅル (*C. fusca*)、クサボタン (*C. stans*)、センニンソウ (*C. terniflora*)、外国種ではキルホーサ (*C. cirrhosa*)、インテグリフォ

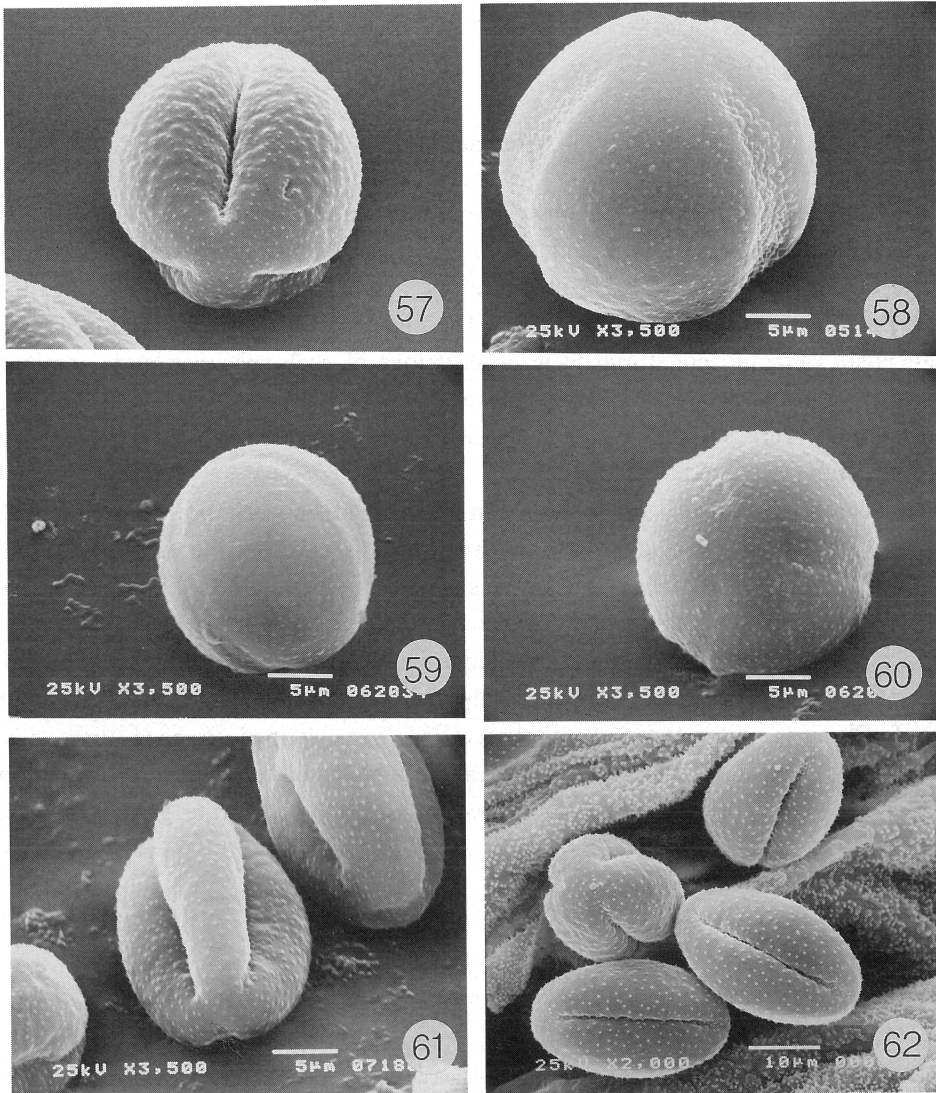


Fig. 12. *Clematis* spp. and cultivars, SEM photographs.

- 57: *C. fusca*. air drying, $\times 2000$.
 58: *C. fusca*. critical point drying, $\times 3500$.
 59: *C. stans*. critical point drying, equatorial view, $\times 3500$.
 60: *C. stans*. critical point drying, polar view, $\times 3500$.
 61: *C. tritemata* 'Rubro-marginata'. air drying, $\times 3500$.
 62: *C. apiifolia*. air drying, equatorial and polar view, $\times 2000$.

リア (*C. integrifolia*), レクタ (*C. recta*) およびマクロペトラ (*C. macropetala*), 園芸品種ではアルマンディー ‘アップル・ブロッサム’ (*C. armandii* ‘Apple Blossom’), モンタナ ‘テトラローズ’ (*C. montana* ‘Tetrarose’), ‘エリオステモン’ (*C. integrifolia* ‘Eriostemon’), ‘ローグチ’ (*C. ‘Rouguchi’*), トリテルナタ ‘ルブロマルギナータ’ (*C. triternata* ‘Rubro-marginata’) などである (Fig. 10-12)。

花粉粒の基本形を考える上で、発芽装置としての溝の型がもっとも古く、次に溝の中に内口が出現する型、最後の段階として口 (孔) の型となる一連のコースがある (上野 1970)。

クレマチス属の花粉粒は 3-溝型と多数散口粒型が大多数を占めているが、中間型と考えられるものも観察され、変化に富んでいる。

Summary

Scanning electron microscopic observation was made of the morphology of pollen grains of 13 species of *Clematis* and its 21 cultivars. The observation was made on those specimens which have been prepared by means of 2 methods, i.e. air drying method and critical point drying method. The classification of pollen grains was done through polar view and equatorial view observations of each specimen and examination of the morphological features of the aperture and the colpi. Air and critical point drying methods were suitable for the observation of aperture and measurement of its size, respectively.

The degree of maturity of pollen grain unchanged between pre- and post-anther-dehiscence and showed no difference between inside and outside in many anthers. Then, the collection of pollen grains was done at the state of bud so that the incorporation of pollen grains of any other plant could be prevented.

The classification of pollen grains was done on the basis of the number of aperture, number of colpi, properties of the exine sculpture and the like. As a result, the pollen grains of *Clematis* under the present observation were verified to be 4 types, i.e. 3-colpate grain type for *C. terniflora*, spherical and multi-scattered foramina grain type for *C. patens*, sycolpate grain type for *C. viorna* and non-aperturate grain type for *C. ‘Ville de Lyon’*.

文 献

- Fretwell, B., 1989. *Clematis*. Capability's Books, Deer Park. p 81.
 幾瀬マサ, 1956. 日本植物の花粉, 広川書店・東京.
 北村四郎・村田源, 1961. 原色日本植物図鑑 草本編 (II)・離弁花類, 保育社・東京.
 Kumazawa, M., 1936. Pollen grain morphology in Ranunculaceae, Lardizabalaceae and Berberidaceae. Jap. Jour. Bot. 8: 19-46.
 Lloyd, C., 1989. *Clematis*. Capability's Books, Deer Park. p 44.
 Moore, P. D., J. A. Webb and M. E. Collison, 1991. Pollen Analysis. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 田中敬一 (編), 1991. 医学・生物学領域の走査電子顕微鏡技術, 講談社・東京.
 上野実朗, 1970. 花粉学とその実験法. その 1, その 2, その 3, 科学の実験. Vol. 21, No. 8, No. 9, No. 10, 共立出版株式会社・東京.