

○岡田佳奈子¹⁾・森永健太¹⁾・井上侑子²⁾・矢田光徳²⁾・田中 収³⁾・桑畑 進⁴⁾・駒井史訓¹⁾

(¹⁾ 佐賀大農アグリセンター・²⁾ 佐賀大院工学系研究科・³⁾ 桜木理化学機械(株)・⁴⁾ 大阪大院工学研究科)

【目的】

花粉の SEM 観察を行うと、試料室内が真空状態になるため試料の水分が蒸発して乾燥花粉となるが、これまでに、常温でも液体状の塩であり、真空下でも蒸発しないイオン液体で花粉を処理することで膨潤花粉の像が獲得できることについて報告した。処理後の花粉は内部に水分を含むため、生存していると考えられ、真空下における花粉管伸長のムービングイメージが得られることが期待される。ここではその前段となる、イオン液体を用いた膨潤花粉と花粉管の観察技術の改良点について検討した。

【材料および方法】

発芽可能なイオン液体の検索：オリエンタルハイブリッドの完熟花粉を酢酸エチルで粘性除去し、10%スクロース溶液を寒天（1%）で固化した円柱状の培地（直径5mm、高さ2mm）に散布した。そこへ、無水エタノールあるいは蒸留水で希釈した14種のイオン液体（1%）を滴下し、光学顕微鏡を用いて発芽頻度を評価した。花粉管の SEM 観察：粘性除去した花粉を培地上に撒き、30℃で数時間培養したものを培地ごとカーボンテープ上に置き、イオン液体で処理して室温で静置後、SEM（日立 S-3000N）で観察した（高真空あるいは低真空モード、加速電圧1~15kV）。架台の温度は、非接触型温度計を用いて測定した。

【結果および考察】

〔イオン液体の条件〕希釈溶媒：無水エタノールで希釈したイオン液体で膨潤花粉を処理すると SEM 観察が可能であることから、同様の方法で14種のイオン液体を培地上の花粉に施し光学顕微鏡で観察したところ、いずれも伸長が認められなかった。希釈溶媒に用いた無水エタノールが花粉を不活化したことが考えられたので、親水性のイオン液体を蒸留水で希釈したところ、アニオンに BF_4 を持つイオン液体で最も良く発芽が確認された。

〔試料室内の条件〕架台の温度：培地に最も近い架台は温風で加温しておくことにより、花粉管が伸長可能な温度帯域を確保することができた。真空モードと加速電圧：SEM で膨潤花粉の像を獲得する際、より鮮明な像にするため高真空モード、加速電圧は15kVで行うため、花粉に与えるダメージを低減することを考慮し、真空度と加速電圧の条件について検討した。真空モードは、高真空では鮮明な像が得られたのに対し、低真空は試料室内に存在する培地水分により電子線が拡散してしまったため、像を捉えることができなかった。また、加速電圧は、1kVまで下げると二次電子の検出が困難になり像が不鮮明になったため、像検出はそれよりも高い電圧が望ましいと考えられた。

〔培地の条件〕支持体：SEMで観察すると試料室内が真空状態になることにより培地が乾燥し、それに伴い花粉管が細切ってしまった（図A）。花粉が培地に直接接することを防ぐために、培地上面にろ紙やパラフィン紙を支持体として使用したが、花粉管と類似した繊維が像に多数現れた（図B；ろ紙，C；パラフィン）。そこで多孔質セラミックの薄板を活用したところ、背景が明瞭になり花粉管の細切もなくなった（図D）。培地のイオン液体処理：培地上面にセラミックを用いた場合、側面を無水エタノールで希釈したイオン液体で処理することにより培地の乾燥を抑制することができた。

現在、以上の改良点を導入し、花粉管伸長の様子を SEM 観察することを試みている。

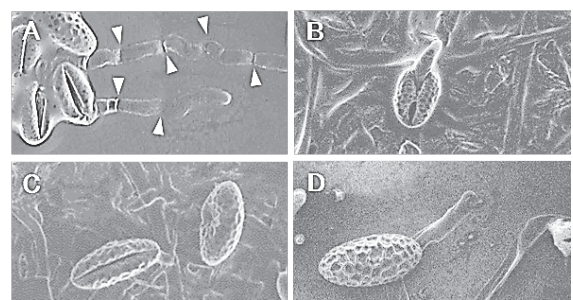


図 支持体を用いた花粉管形態のSEM像の比較