

林木の受精機構に関する研究 (Ⅱ)

クロマツの生殖器官に存在する花粉管生長抑制物質

橋 詰 隼 人・近 藤 芳 五 郎 (鳥取大学農学部造林学研究室)

Studies on the Mechanism of Fertilization in Forest Trees (Ⅱ).

Inhibitors to the Growth of Pollen Tubes in the Reproductive
Organs of *Pinus Thunbergii*.

Hayato HASHIZUME and Yoshigorō KONDO

(Laboratory of Silviculture, Faculty of Agriculture, Tottori University)

1961年12月20日受理

I 緒 言

筆者等は別報²⁾において、アカマツの生殖器官に存在する花粉管生長抑制物質について研究し、それが受精後胚珠における花粉管の緩慢な生長に一つの役割をはたしているように思われることを報告した。今回、クロマツについて同様な実験をおこなったのでその結果を報告する。本研究は昭和36年度文部省科学研究費をもちいておこなわれた。記して謝意を表する。

II 材料および方法

1. 供試材料

推定15年生クロマツから生長物質抽出のための試料を採取した。すなわち、花粉は4月下旬にとり、冷蔵庫に貯蔵したものをもちいた。雌花は開花期(4月23日)、当年生球果は開花後(5月25日)、胚珠は1年生球果から受精期(6月26日)にとり、ただちに生長物質抽出のためにもちいた。死滅花粉は75°Cで24時間殺したものを試料とした。発芽試験にもちいた花粉は4月下旬に採取したクロマツ花粉で、湿度25%で冷蔵庫に貯蔵したものである。

2. 生長物質の抽出

前記各試料 10g (生重) をアカマツの場合と同様の方法²⁾により抽出し、酸性区分と中性区分にわけた。

3. ペーパー・クロマトグラフィー

別報²⁾アカマツの場合と同様である。展開溶媒としてイソプロパノール-アンモニア-水 (8:1:1, v/v) 混液およびブタノール-酢酸-水 (4:1:2, v/v) 混液をもちいた。

4. アベナ伸長試験

既報¹⁾と同様である。

5. 花粉発芽試験

別報²⁾アカマツの場合と同様である。発芽試験は基本培地として寒天濃度1%, 蔗糖濃度3%, pH5.6の固形発芽床でおこない、26~27°C (暗所) で4日後に調査した。その他の事項はアカマツの場合と同様であるから別報²⁾を参照されたい。

III 実験結果および考察

1. 花粉に存在する生長物質

a. 花粉発芽および花粉管の生長におよぼす酸性区分および中性区分の影響

花粉抽出物の酸性および中性の各フラクションに 1.5 ml の蒸溜水をくわえ、2°C で20時間抽出した。これを原液として、寒天濃度1%, 蔗糖濃度3%で、原液のF₀ ~ 0.5%の各濃度の培地を 1.5ml ずつつくり、クロマツ花粉をまきつけた。

その結果 (Table 1), 酸性区分では著しく花粉発芽および花粉管の生長が抑制された。原液の50%区では全然発芽しなかつた。中性区分では酸性区分ほど抑制作用は顕著でないが、50%区では抑制の傾向がみられた。酸性区分中性区分ともに、生存花粉抽出物と死滅花粉抽出物との間には花粉発芽および花粉管の生長に関して著しい差異が認められなかつた。以上の結果から、花粉発芽および花粉管の生長を抑制する物質は中性区分よりも酸性区分に多く存在することがわかつた。

b. 生長物質のペーパー・クロマトグラフィーによる分離

Table 1. The effect of acid and neutral fractions of ether extracts from pollen grains on the germination and tube growth of *Pinus* pollen.*

Concentration to original solution	Acid fraction				Neutral fraction			
	Live pollen		Dead pollen		Live pollen		Dead pollen	
	Germination	Tube length	Germination	Tube length	Germination	Tube length	Germination	Tube length
Control%	87 %	186 μ	87 %	186 μ	85 %	191 μ	85 %	191 μ
50	0	0	0	0	8	12	60	84
5	13	54	23	55	71	134	86	198
2.5	37	72	39	74	82	174	86	209
0.5	70	185	87	199	87	189	88	202

* Control medium, 1% agar-3% Sucrose. Culture temp., 26~27°C. Results after four days. Mean of two expts.

花粉抽出物の酸性区分をペーパー・クロマトグラフィーによつて分離し、さらにアベナ伸長試験および発芽試験によつて内在する生長物質をしらべた。

イソプロパノール-アンモニア-水で展開した場合 (Fig.1), 生存花粉では、アベナ伸長試験でIAA位置と

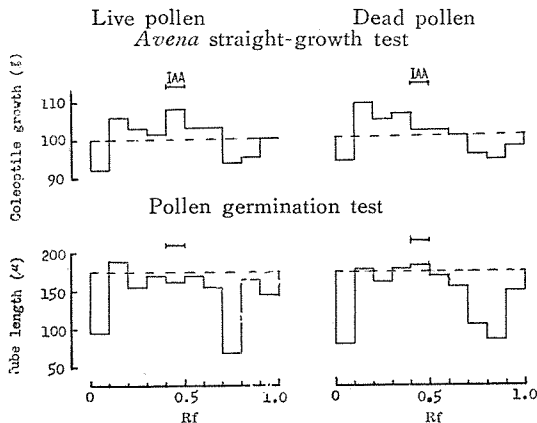


Fig. 1 Histograms showing the effect of chromatograms of acid fraction of ether extracts from pollen grains on the growth of *Avena* coleoptiles and *Pinus* pollen tubes. Developing solvent, isopropanol-ammonia-water (8:1:1). Control medium, 1% agar-3% sucrose. Culture temp., 26~27°C. Tube length, after four days. The horizontal broken lines represent the growth of controls. One of two similar results.

Rf0.1~0.3 に促進物質, Rf0~0.1と0.7~0.9に抑制物質が認められた。発芽試験では Rf0~0.1と0.7~0.8に抑制物質が認められたが, 促進物質は認められなかった。死滅花粉では生存花粉に比して著しい差異が認められなかった。しかし, IAA 位置の物質はやや減少の傾向がみられた。

ブタノール-酢酸-水で展開した場合 (Fig.2) は生存花粉ではアベナ伸長試験で Rf0.4~0.6と0.9~1.0に抑

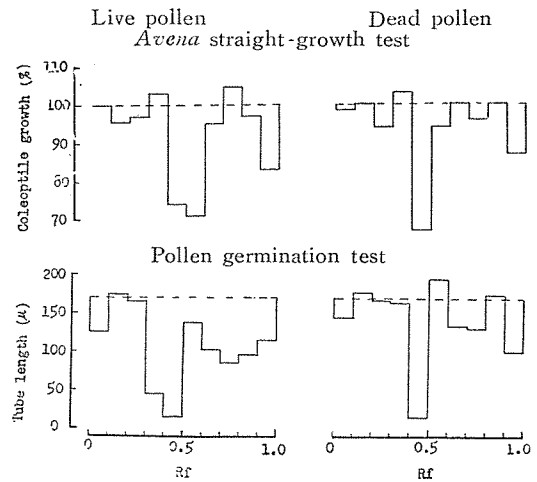


Fig. 2. Histograms showing the effect of chromatograms of acid fraction of ether extracts from pollen grains on the growth of *Avena* coleoptiles and *Pinus* pollen tubes. Developing solvent, butanol-acetic acid-water (4:1:2).

制物質が, また発芽試験では Rf 0.3~0.5 と 0.6~1.0 に抑制物質が認められた。死滅花粉では Rf 0.6~0.8 の花粉管生長抑制物質がやや減少の傾向がみられた。

2. 雌花, 当年生球果および胚珠に存在する生長物質

a. 花粉管の生長におよぼす胚珠および珠心の影響

寒天濃度1%, 蔗糖濃度5%, pH5.6の培地に5月下旬クロマツ当年生球果から採取した胚珠および6月下旬1年生球果から採取した珠心をいれ, これにクロマツ花粉をまきつけた。

その結果, これらの培地ではいずれも花粉管の生長は抑制された。1年生球果の珠心を含む培地では, 4日後の花粉管長は対照の130 μ に対し74 μ であつた。これらの実験で花粉管の伸長に屈化性は認められなかった。しかし, 1年生球果の珠心を含む培地では花粉管が気ノウに対して直角に相反する2方向に同時に伸長するものが非

常に多く観察された。

b. 生長物質のペーパー・クロマトグラフィーによる分離

雌花および当年生球果抽出物：雌花抽出物の酸性区分をイソプロパノール-アンモニア-水で展開した場合 (Fig.3, left), アベナ伸長試験では花粉の場合と大体同じ位置に促進物質および抑制物質が認められた。発芽試験では Rf 0~0.1, 0.2~0.3 および 0.6~0.9 に抑制物質が認められた。

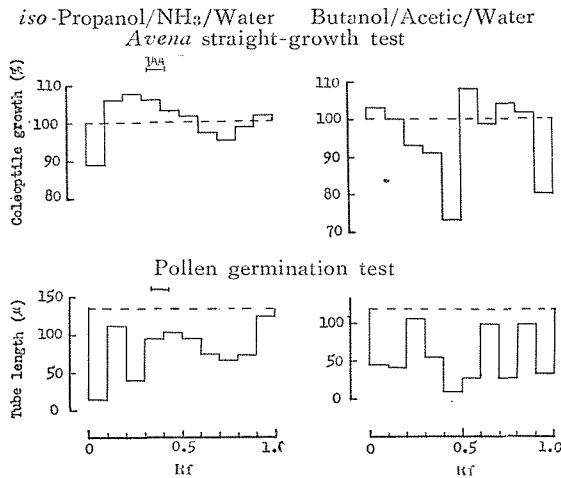


Fig. 3. Histograms showing the effect of chromatograms of acid fraction of ether extracts from ovulate strobili on the growth of *Avena* coleoptiles and *Pinus* pollen tubes. The material was collected on April 23.

ブタノール-酢酸-水展開 (Fig.3, right) でもアベナ伸長試験では花粉の場合と大体同様の結果がえられたが、発芽試験では Rf0~0.2, 0.4~0.5, 0.7~0.8 および 0.9~1.0 に抑制物質が認められた。

閉花後の当年生球果抽出物の場合 (Fig.4), 発芽試験では雌花と同様の結果がえられた。

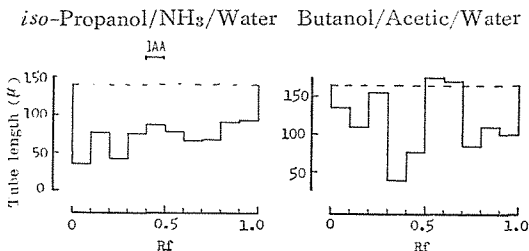


Fig. 4. Histograms showing the effect of chromatograms of acid fraction of ether extracts from conelets after pollination on the growth of *Pinus* pollen tubes. The material was collected on May 25.

胚珠抽出物：受精期の胚珠抽出物の酸性区分をイソ

プロパノール-アンモニア-水で展開した場合 (Fig.5, left), アベナ伸長試験では雌花の場合と大体同じ位置に

iso-Propanol/ NH_3 /Water Butanol/Acetic/Water
Avena straight-growth test

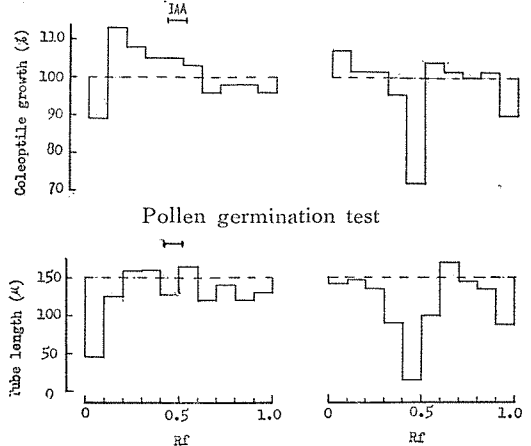


Fig. 5. Histograms showing the effect of chromatograms of acid fraction of ether extracts from the ovules of fertilizing time on the growth of *Avena* coleoptiles and *Pinus* pollen tubes. The material was collected on June 26.

促進および抑制物質が認められた。発芽試験では Ri 0~0.1 に顕著な抑制物質が認められたが、雌花でみられる Rf 0.2~0.3 および Rf 高位の抑制物質は減少の傾向がみられた。

ブタノール-酢酸-水展開の場合 (Fig.5, right) は、アベナ伸長試験では雌花の場合と大体同じ位置に生長物質が認められた。しかし、発芽試験では雌花でみられる Rf0~0.2 および 0.7~0.8 の抑制物質が認められなかつた。

アカマツ及びクロマツに存在する生長物質については別報²⁾において考察したが、以上の結果をアカマツの場合と比較すると、クロマツの生殖器官に存在する生長物質はアカマツのそれと著しく相違しないようである。イソプロパノール-アンモニア-水展開で Rf0.4~0.5 に存在するオーキシンは合成 IAA の Rf 値と比較して IAA であると推定される。Rf0~0.1 の抑制物質はニンヒドリン試薬で紫紅色、塩化第二鉄水溶液で黄色に発色し、ブタノール-酢酸-水展開で Rf0.4~0.5 の抑制帯に見出された。また Rf0.2~0.3 の花粉管生長抑制帯にはエールリッヒ試薬で青色に発色する物質が存在するが、この物質はブタノール-酢酸-水展開で Rf0.7~0.8 の抑制帯に見出された。その他の抑制物質についてはこの両展開溶媒によるクロマトグラム上の位置を同定することができなかつた。ブタノール-酢酸-水展開で Rf0.9~

1.0の抑制帯はIAAのRf値と一致するが、アベナ伸長試験では促進されない。酸性溶媒は展開中にオーキシンを不活性化するおそれがある。したがって、このRf 0.9~1.0の抑制帯はオーキシンの不活性化されたものによる影響か、抽出物中に存在する他の抑制物質による影響か、あるいは口紙中に存在する物質による影響かあきらかでない。いずれにしても耐酸性の弱い物質に対しては酸性溶媒は十分注意する必要があるように思う。

生長物質の生物試験において、花粉管はアベナ子葉鞘の生長を抑制する物質に対しては子葉鞘と同様に反応する。しかし、子葉鞘の生長を促進するオーキシンに対しては必ずしも同様に反応しない。とくにRf 0.4~0.5のIAAに対しては、アカマツの場合と同様、それが高濃度で存在する場合は子葉鞘と反対に反応するよう思われた。またRf 0.2~0.3のオーキシンに対しても同じ傾向が認められるようであるが、Rf 0.1~0.3の部分には数種類の物質が混在するので、この部分のオーキシンと花粉管生長抑制物質とが同一のものであるかどうかは判定できない。

マツの生殖器官に存在する物質が花粉発芽および花粉管の生長におよぼす影響に関する既往の研究については別報²⁾において考察した。クロマツは4月下旬~5月上旬に受粉して翌年の6月下旬~7月上旬に受精する。この間受粉した花粉は発芽して、きわめて徐々に花粉管をのぼしている。この珠心における花粉管の緩慢な生長の原因については、花粉管の生長を抑制している物質の存在が推定される。TANAKA⁴⁾はアカマツの花粉に2種類の花粉管生長抑制物質が存在することを認め、それが花粉管の緩慢な生長に一つの役割をはたしているものと考えている⁵⁾。本研究の結果からも、クロマツの花粉、雌花および胚珠には花粉管の生長を抑制する物質が認められた。これらの抑制物質は開花期の雌花および閉花後の球果には多量に存在するが、受精期の胚珠では1種類をのぞき減少の傾向がみられる。したがって、この花粉管生長抑制物質は珠心における花粉管の緩慢な生長の一つの

原因をなしているのではないかと推考される。

IV 要 約

1. 花粉管の生長は花粉抽出物の中性区分よりも酸性区分で顕著に抑制された。

2. 花粉管の生長は胚珠あるいは珠心を含む培地で抑制された。

3. 酸性区分をペーパー・クロマトグラフィーとアベナ伸長試験によつてしらべた結果、花粉、雌花および胚珠抽出物には、少なくとも2種類の促進物質(Rf 0.1~0.3 および 0.4~0.5, イソプロパノール-アンモニア-水)と2種類の抑制物質(Rf 0~0.1 および 0.7~0.9, 同上溶媒)が認められた。Rf 0.4~0.5の促進物質はインドール酢酸と推定されたが、他の物質については明らかにならなかった。

4. 酸性区分をペーパー・クロマトグラフィーと発芽試験によつてしらべた結果、花粉抽出物では少なくとも2種類の花粉管生長抑制物質(Rf 0~0.1 および 0.7~0.9, イソプロパノール-アンモニア-水)が、雌花および閉花後の球果抽出物では3種類の抑制物質(Rf 0~0.1, 0.2~0.3 および 0.6~0.9, 同上溶媒)が認められた。

5. 花粉管はRf 0~0.1 および 0.6~0.9の抑制物質に対しアベナ子葉鞘と同様に反応した。

6. 酸性区分における2種類の花粉管生長抑制物質(Rf 0.2~0.3 および 0.6~0.9)は受精期の胚珠では減少の傾向がみられた。

以上の結果からクロマツの花粉および胚珠に存在する花粉管生長抑制物質は珠心における花粉管の緩慢な生長に関係があるのではないかと思われる。

参 考 文 献

- 1) 橋詰：日林誌，43：120~162，1961.
- 2) 橋詰・近藤：日林誌，1962. (印刷中)
- 3) TANAKA, K. : Sci. Rep. Tohoku Univ. (Biol), 24 : 45~54, 1958.
- 4) — : Ibid., 26 : 259~268, 1960.

Summary

This study was undertaken for elucidating the cause of slow growth of pollen tubes in the ovule of *Pinus*. Growth substances were extracted with peroxide-free ether from the pollen grains, ovulate strobili, conelets and ovules of *Pinus Thunbergii*. Paper chromatographic separation of growth substances in the extracts was performed in the ascending method in *iso*-propanol-ammonia-water (8:1:1, in vol.) and *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:2, in vol.). The chromatograms were assayed by the *Avena* straight growth test and the pollen germination test. As the material of the germination test, the pollen grains of *Pinus Thunbergii* were used. The results obtained are summarized as follows:

1. The growth of pollen tubes was greatly inhibited by the acid fraction, and slightly by the neutral fraction of ether extracts from pollen grains.

2. The growth of pollen tubes was inhibited by the medium containing ovules or nucelli.

3. From the paper chromatography and the *Avena* straight growth test, at least two kinds of auxins (Rf 0.1~0.3 and 0.4~0.5, *iso*-propanol-ammonia-water) and two kinds of inhibitors (Rf 0~0.1 and 0.7~0.9, the same solvent) were found in the acid fraction of ether extracts from pollen grains, ovulate strobili and ovules. Among these substances, the auxin of Rf 0.4~0.5 was presumed to be indoleacetic acid as compared with the Rf value of synthesized IAA. The other substances could not establish the chemical nature of them.

4. From the paper chromatography and the pollen germination test, at least two kinds of inhibitors to the growth of pollen tubes (Rf 0~0.1 and 0.7~0.9, *iso*-propanol-ammonia-water) were found in the acid fraction of ether extracts from pollen grains, and three kinds of the inhibitors (Rf 0~0.1, 0.2~0.3 and 0.6~0.9, the same solvent), in that of ovulate strobili and conelets.

5. Pollen tubes responded to two inhibitors of Rf 0~0.1 and 0.6~0.9 in the same manner as *Avena* coleoptiles.

6. Two inhibitors to the growth of pollen tubes (Rf 0.2~0.3 and 0.6~0.9) in acid fraction tended to decrease in the ovule at fertilizing time.

From these results, it is supposed that inhibitors to the growth of pollen tubes in the pollen grains and ovules of *Pinus Thunbergii* may play a role in slowing down the growth of the pollen tubes in the nucellus.