レンゲの硬実に関する研究

X. 不透水性の機構ならびに硬実化防止*

安 江 多 輔

(岐阜大学農学部)

硬実の種皮がいかにして不透水性を示すかについての形態的および顕微化学的研究は古くから数多く行なわれているが^{2,4,8,9)} いまだ定説はない。すなわち不透水性の原因を種皮表面のクチクラ層の特殊性におく立場^{5,10)}と柵状細胞に求める立場^{3,7)}とがあり、柵状細胞とするものも、柵状細胞のどの部分が主因をなすかについては研究者により、また植物の種類によつて異なっている。一方、水分が種皮のどの部分から入るかについても植物の種類によつて異なるようであり、不透水性物質についても、ケイ酸、石灰、ワニス、ロー、油性物質、クチン、スベリン、セルロース、ペクチンなど種々の説があり^{8,9)}、いまだ定説はない。

市島⁵⁾はレンゲ種子が硬実性か否かは、種皮表面にある不透水性のクチクラが種瘤の部分で間隙があるか否かによると述べ、また末次¹¹⁾は種瘤中央部の柵状細胞内部にヒビを生じ、このヒビが種皮の外側に達すると透水性に転化するとしている。このように不透水性の原因が種瘤部の間隙あるいはヒビ割れの有無にあるという点で両者は一致しているが、前者⁵⁾は種皮表面のクチクラに原因があるとするのに対して、後者^{11,12)}は柵状細胞内部に起因するとしている。しかしこのような形態以外に不透水性に関与すると考えられる物質についてはなんら明らかにしていない。

本報は以上の現状に鑑み従来の形態的あるいは顕微化学的立場とは異なり、生化学的な立場から、ペクチン溶解物質やペクチナーゼ、セルラーゼなどの酵素類およびエーテルやクロロフォルムなどを用いた溶解反応から、種皮の不透水性に関与する物質を明らかにしようとしたものである。

実験材料および方法

供試材料として本学附属農場で栽培したレンゲ岐阜大晩生種のさやがなかば黒変した時、すなわち種子が成熟をほぼ完成し、水分を失なつて収縮する直前のいまだ膨潤状態の種子を採種し、直ちにピンセットを用いて種皮に傷をつけないように注意して脱粒し、固定

瓶に入れて下記のごとき酵素および酸・アンモニウム塩処理を行なつた。

I. 酵素処理

- (1) ペクチナーゼ, 1%溶液 (pH 3.2)
- (2) セルラーゼ, 1%溶液 (pH 4.8), 4000 Takamine Unit/g
- (3) α -アミラーゼ, 1%溶液 (pH 5.8)
- (4) β -アミラーゼ, 1%溶液 (pH 4.8) Activity 2000°

II. 酸およびアンモニウム塩処理

- (1) 醋酸・醋酸アンモニウム, 各 0.5% 溶液
- (2) 蔞酸・蔞酸アンモニウム, 各 0.5% 溶液
- (3) クエン酸・クエン酸アンモニウム, 各 0.5% 溶液
- (4) 塩酸・塩化アンモニウム, 各 0.5% 溶液

酵素処理の場合は処理濃度をいずれも 1% 溶液としそれぞれの酵素の最適 pH を与えるために、マツキルヴェインの緩衝溶液を用い、処理時間を 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 および 32 時間とし、処理後は水洗し、室内で風乾、硫酸紙袋に入れ、発芽試験まで室内に貯蔵した。酸およびアンモニウム塩処理の場合は、はじめ 0.5% の酸溶液に 1, 2, 4, 6, 12 および 24 時間浸漬し、水洗後それぞれのアンモニウム塩の 0.5% 溶液に同時間浸漬し、処理後は酵素処理の場合と同様水洗、室内で風乾後、硫酸紙袋に入れて貯蔵した。なお処理温度はいずれも 25°C で、1964 年 5 月 21 日から 6 月 2 日の間に行なつた。発芽試験は同年 9 月 10 日に開始し、25°C の恒温下で 30 日間、1 区 100 粒ずつの 4 回反復で行なつた。

また硬実性消去に関する実験は次のごとくである。ただし、以下の実験には I および II の場合と異なり、市販 (関谷産業 KK) のレンゲ岐阜大晩生厚種子を用い、25°C で一定期間水浸し、その間に吸水膨潤した種子を除去し、未膨潤の硬実種子のみを供試した。

III. 蔞酸および蔞酸アンモニウム処理

1964 年 9 月 1 日から 12 月 10 日まで 100 日間水浸した後の未膨潤の硬実種子を、12 月 10 日に蔞酸および蔞酸アンモニウムの 0.5% 溶液に 20, 40, 60, 80 および

* 昭和 42 年 6 月 19 日受理

大要は第 139 回講演会 (1965 年 4 月) において発表

100°C の温度下でそれぞれ2時間浸漬し、水洗後直ちに置床して 25°C で30日間発芽試験を行なった。

IV. ペクチナーゼ処理

1964年10月20日から12月10日まで51日間水浸した後の未膨潤の硬実種子を12月10日に、ペクチナーゼ1%溶液 (pH 3.2) に table 2 のごとく25および 35°C で15日間、45, 55および 65°C で1日8時間ずつ3日間計24時間、75および 85°C で8時間浸漬し、水洗後直ちに置床して、25°C で30日間発芽試験を行なった。

V. クロロフォルムおよびエーテル処理

1965年2月10日から5日間水浸した後の未膨潤種子を2月18日に、100粒ずつ固定瓶に入れ、クロロフォルムまたはエチルエーテルを2ml ずつ入れ、25°C 2回反復で table 3 のごとく、1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24および32時間浸漬した後、流水で30分間水洗し、直ちに置床して、25°C で30日間発芽試験を行なった。

実験結果およびその考察

I 硬実化防止に対する多糖類分解酵素処理の効果

不透水性に与する物質をまず種皮に含まれる多糖類にもとづくものと仮定して、多糖類分解酵素ペクチナーゼ、セルラーゼ、 α -および β -アミラーゼの1%溶液で実験方法記載のごとき処理を行なった種子の25°C 恒温下での、置床30日後の膨潤率、発芽率および硬実率は fig. 1 に示すごとくである。すなわちいずれの酵素処理区においても処理時間が長くなるにつれて、破線で示した膨潤率は増加し、実線で示した硬実率は低下する。この傾向は (1) のペクチナーゼ処理区において特にいちじるしく、無処理区すなわち処理時間0区の硬実率64.8%に対して処理時間が1, 2, 4, 6, 8時間と長くなるにつれて、硬実率はそれぞれ37.0%, 8.3%, 4.3%, 2.0%および0%となり、ペクチナーゼは硬実化防止に対していちじるしい効果を示す。しかし、(2) のセルラーゼ、(3) の α -および (4) の β -アミラーゼ処理区においては処理時間が12時間以上になると硬実率はかなり低下するが、いずれも0%にはならず、かつ酵素を含まない緩衝溶液 (pH 3.2, 4.8 および 5.8) で処理した対照区との間にほとんど差異が認められない。したがってセルラーゼ、 α -および β -アミラーゼには硬実化防止の効果はないものと考えられる。いいかえればレンゲ種子の不不透水性は種皮あるいは種瘤部に沈積するペクチン質がカルシウムなどと結合し、不溶性のペクタイト化することに基因するものと考えられ、セルロース、アミロペクチン、アミロースなどは直接関係していないものと推察

される。

一方点線で示した発芽率はいずれの酵素処理区および緩衝溶液処理区においても、膨潤率との間に大差は見られない。したがってこれらの酵素液処理による発芽障害はないものと考えられる。ただし (1) のペクチナーゼの24時間および32時間処理区においては腐敗率がともに約18%, (3) の α -アミラーゼの16時間

Fig 1. Effect of presoaking treatment with four kinds of carbohydrase on the percentage of germination, permeable seeds and hard seed content in milk vetch seeds.

- Permeable seeds
 -● Germination
 - Hard seeds
 - ×---× Permeable seeds
 - ×.....× Germination
 - ×——× Hard seeds
- } Treated plot.
- } Check.

Check: soaked in buffer solutions (pH 3.2, 4.8, 5.8 and 4.8) without added enzyme.

Fig. 2. Effect of presoaking treatment with four kinds of acid and its corresponding ammonium salt on the percentage of germination, permeable seeds and hard seed content in milk vetch seeds.

- Permeable seeds.
-● Germination.
- Hard seeds.

～32時間処理区においては18～40%と高く、これらの区においては処理時間が長い場合にはやや発芽障害があるものと考えられる。

II 硬実化防止に対する酸およびアンモニウム塩処理の効果

上述のごとくレンゲ種子の不透水性に不溶性のペクチン質が関与しているとすれば、ペクチナーゼ以外のペクチン溶解物質で処理することによっても硬実化を防止することが可能と考えられる。そこでペクチン溶解物質として知られている蓚酸および蓚酸アンモニウ

ム^{1,6)}のほか、醋酸・醋酸アンモニウム、クエン酸・クエン酸アンモニウムおよび塩酸・塩化アンモニウム溶液で実験方法記載のごとき処理を行なった。処理種子の置床30日後の膨潤率、発芽率および硬実率は fig. 2に示すごとく、いずれの区においても処理時間が長くなるにつれて膨潤率が高くなり、したがって硬実率は低下する。この傾向は(2)の蓚酸および蓚酸アンモニウム処理区において特にいちじるしく、無処理区すなわち処理時間0区の硬実率56.8%に対して、1時間処理区は0.8%、2時間処理区は0.5%、4時間以上の処理区はいずれも0%となり、硬実化防止にいちじるしい効果が認められる。このような結果は1963年の予備実験においても認められた。しかし(1)の醋酸・醋酸アンモニウム区、(3)のクエン酸・クエン酸アンモニウム区および(4)の塩酸・塩化アンモニウム区では12時間あるいは24時間処理によつて硬実率はかなり低下するが、いずれも0%にはならない。

Anderson ら¹⁾はワタの繊維のセルロースの骨格構造を観察するための研究において、0.5%の蓚酸アンモニウムで煮沸するとペクチン質を完全に除去することができるとしている。本実験においてもレンゲ種子を蓚酸および蓚酸アンモニウムの0.5%溶液に、25°Cでそれぞれ1～24時間浸漬したのであるが、4時間以上の処理によつて硬実率は0%となる。したがって、レンゲの種皮あるいは種瘤部に含まれる不溶性のペクチン質が溶解除去され、そのために硬実化が防止されたものと考えられる。この事実はレンゲ種子の不透水性に不溶性のペクチン質が関与しているという前記ペクチナーゼ処理の結果を裏付けるものと考えされる。

なお、発芽率については硬実化防止に最も効果のあった(2)の蓚酸・蓚酸アンモニウム処理区および(1)の醋酸・醋酸アンモニウム処理区において処理時間が2時間以上になると、長くなるにつれてかなり発芽障害が認められる。しかし(3)のクエン酸・クエン酸アンモニウム区においては24時間処理でも、膨潤率99.5%に対して発芽率は92.8%と高く、ほとんど発芽障害は認められない。

III 硬実性消去に対する蓚酸および蓚酸アンモニウム処理の効果

前述のごとく完熟直前の膨潤状態の種子を、蓚酸および蓚酸アンモニウムで処理すると硬実化を防止することができるが、ここではさらに一旦硬実化した種子に対する効果を明らかにするために、100日間水浸した後の未膨潤種子を0.5%の蓚酸および蓚酸アンモニウム溶液に table 1のごとく20～100°Cでそれぞれ

Table 1. Effect of soaking treatment with oxalic acid and ammonium oxalate on the breaking of hard-coatedness in milk vetch seeds.

Temperature treated (°C)	Treatment*	Permeable seeds (%)	Seed coat ruptured seeds (%)	Permeable seeds (%)**	Germination (%)
		immediately after treatment		after 30 days	
20	Treated	1.0	0.0	7.0	7.0
	Check	0.0	0.0	8.0	8.0
40	Treated	2.5	0.5	15.0	15.0
	Check	4.0	0.0	15.0	15.0
60	Treated	6.5	5.0	18.0	12.0
	Check	5.5	0.5	16.5	10.5
80	Treated	39.5	35.5	98.0	0.0
	Check	44.0	0.0	98.0	0.0
100	Treated	100.0	100.0	100.0	0.0
	Check	100.0	100.0	100.0	0.0

*Treated: soaked in 0.5 % solution of oxalic acid and ammonium oxalate for 2 hours respectively.

Check: soaked in hot water of corresponding temperature with treated plots for 4 hours.

**Include the permeable seeds immediately after treatment.

Table 2. Effect of soaking treatment with pectinase on the breaking of hard-coatedness in milk vetch seeds.

Temperature treated (°C)	Treatment*	Duration treated	Permeable seeds (%)	Permeable seeds (%)**	Germination (%)
			during soaking	after 30 days	
25	Treated	15days	5.7	10.3	6.0
	Check	〃	4.7	12.7	6.7
35	Treated	〃	11.3	19.7	5.0
	Check	〃	11.3	19.3	9.0
45	Treated	24h	10.3	15.3	9.7
	Check	〃	8.7	14.0	6.7
55	Treated	〃	19.3	34.6	1.7
	Check	〃	19.0	34.0	2.3
65	Treated	〃	64.0	74.0	1.3
	Check	〃	58.3	67.0	1.3
75	Treated	8 h	78.3	86.0	0.0
	Check	〃	62.0	74.7	0.0
85	Treated	〃	95.7	98.3	0.0
	Check	〃	95.7	98.3	0.0

*Treated: soaked in 1 % pectinase solution (pH 3.2).

Check: soaked in McIlvaine's buffer solution of pH 3.2.

**Include the permeable seeds during soaking treatment.

2時間浸漬処理を行なった。処理種子の置床30日後の膨潤率、発芽率および腐敗率を温湯に4時間浸漬した対照区とともに示したのが table 1 である。膨潤率は処理温度が 20, 40, 60, 80 および 100°C と高くなるにつれて次第に増加し、80 および 100°C では 98~100% 膨潤しているが、対照の温湯処理区との間に有意差が認められないので、高温による硬実性消去の効果は認められるが、とくに蓚酸および蓚酸アンモニウ

ム溶液による硬実性消去の効果は認められない。

IV 硬実性消去に対するペクチナーゼ処理の効果

I において膨潤種子の硬実化防止に対して、いちじるしい効果を示したペクチナーゼの硬実種子に対する硬実性消去の効果を明らかにするために、実験方法記載のごとき処理種子の置床30日後の膨潤率および発芽率を pH 3.2 の緩衝溶液の対照区とともに示したのが table 2 である。処理温度が高くなるにつれて膨潤率が高くなり、したがって硬実率は低下するが、対照の緩衝溶液処理区との間にほとんど差が認められないので、高温による硬実性消去の効果は認められるが、とくにペクチナーゼによる硬実性消去の効果はないものと考えられる。

V 硬実性消去に対するクロロフォルムおよびエーテル処理の効果

I および II の結果から、種皮あるいは種瘤部に含まれるペクチン質が不透水性に関与しているとしても、III および IV の結果から、一旦硬実化した強度の硬実に対しては、これらの物質は作用し得ないか、あるいはこれらの物質の影響を受けない他の物質、すなわちクチクラの主成分をなすクチン、ローまたは脂肪性物質が不透水性の原因をなしている可能性がある。もしこ

れらの物質に不透水性の原因があるとすれば、クロロフォルムまたはエーテルで種子を処理すれば、クチクラの主成分をなすクチンあるいはローなどが溶解して不透水性の原因を除くことができると考えられる。そこで実験方法記載のごとく 25°C で5日間水浸して、膨潤種子を除いた後の未膨潤種子に対して、クロロフォルムおよびエーテルで浸漬処理を行なった。

table 3 は処理種子の置床30日後の膨潤率、発芽率

Table 3. Effect of soaking treatment with chloroform and ethyl ether on the breaking of hard-coatedness and germination in milk vetch seeds.

Chemical name	Duration treated (h)	Permeable seeds (%)	Germination (%)	Hard seeds (%)	Average length of time for	
					softening of seeds (days)*	Germination (days)*
Chloroform	0	82.0	82.0	18.0	4.89	5.58
	1	83.0	83.0	17.0	1.10	1.54
	2	90.0	90.0	10.0	1.14	1.61
	4	86.0	86.0	14.0	1.04	1.59
	6	86.0	85.5	14.0	1.10	1.59
	8	88.5	87.5	11.5	1.22	1.78
	16	91.0	90.5	9.0	1.18	1.82
	24	86.5	84.0	13.5	1.09	2.14
	32	86.5	85.0	13.5	1.05	1.89
Ethyl ether	0	82.0	82.0	18.0	4.89	5.58
	1	82.5	81.0	17.5	1.06	1.75
	2	89.0	87.5	11.0	1.12	1.77
	4	89.0	87.0	11.0	1.02	1.72
	6	87.5	87.0	12.5	1.07	1.80
	8	89.0	81.0	11.0	1.23	1.75
	16	85.5	82.5	14.5	1.17	3.01
	24	87.5	85.0	12.5	1.24	2.36
	32	90.0	90.0	10.0	1.00	1.76

*Calculated by 15th day after seeding.

Fig. 3. Effect of soaking treatment with chloroform and ethyl ether on the breaking of hard-coatedness and germination in milk vetch seeds.

および硬実率を平均膨潤日数ならびに平均発芽日数とともに示したものである。無処理区の硬実率18.0%に

対してクロロフォルムおよびエチルエーテル1時間処理区はそれぞれ17.0%および17.5%で、無処理区との間にほとんど差が認められない。また処理時間2時間以上の場合、クロロフォルム処理区は9.0~14.0%,エチルエーテル処理区は10.0~14.5%であつて、無処理区よりやや低いが大差はなく、処理時間が長くなつても硬実率の低下が認められないので、クロロフォルムおよびエチルエーテルの硬実性

消去効果はないものと考えられる。しかしながら膨潤速度および発芽速度にはかなり大きな差異が認められる。すなわち fig. 3 に示すごとく、無処理区の膨潤率がゆるやかなS字状カーブをえがいて増加し、置床後9日目に80%に達するのに対して、クロロフォルムおよびエーテル処理区においては、いずれも置床翌日すでに80~90%の膨潤率を示し、吸水膨潤現象がいちじるしく早い。このことは table 3 の無処理区の平均膨潤日数4.89日に対して、クロロフォルムおよびエーテル処理区のそれがいずれも1.00~1.24日であることから推察される。また table 3 からわかるごとく膨潤した種子はほとんどすべて発芽し、本実験の範囲ではクロロフォルムおよびエーテルによる発芽障害は認められず、発芽曲線も fig 3 とほぼ同様であり、かつ平均発芽日数も無処理区の5.58日に対して、処理区はいずれも1.54~3.01日と発芽がいちじるしく早い。したがつてクロロフォルムおよびエチルエーテル処理は硬実性消去の効果はないが、発芽促進に対しては効果がいちじるしいと考えられる。そしてクチクラの主成分をなすクチンおよびローなどは強度の硬実の原因とはならないが、種子の吸水膨潤現象をいちじるしく抑制していると考えられる。

以上の結果、レンゲ種皮の不透水性には種瘤部あるいは柵状組織に沈積する不溶性のペクチン酸カルシウムなどのペクテイトが関係しているものといえよう。したがつて蓂酸によつてカルシウムを沈澱させるか、またはペクチナーゼのような酵素によつて加水分解することによつて硬実化が防止できたものと考えられ

る。そしてクチクラは硬実の原因とはならないが、種子の吸水現象を抑制すると考えられる。

引用文献

1. ANDERSON, D.B. and T. KERR 1938. Growth and structure of cotton fiber. *Indust. Eng. Chem.* **30** : 48—54.
2. CHRISTIANSEN, M.N. and R.P. MOORE 1959. Seed coat structural differences that influence water uptake and seed quality in hard seed cotton. *Agron. J.* **51** : 582—584.
3. HAMLY, D.H. 1932. Softening of the seeds of *Melilotous alba*. *Bot. Gaz.* **93** : 345—375.
4. HYDE, E.O.C. 1954. The function of the hilum in some papilionaceae in relation to ripening of the seed and the permeability of the testa. *Ann. Bot.* **18** : 241—256.
5. 市島吉太郎 1917. 紫雲英の硬粒に関する研究. 札幌農会報 **9**(39) : 1—32.
6. KERTESZ, Z.I. 1951. The pectic substances. *Inter Science.* 628.
7. KÜHN, O. 1925. Die Hartschaligkeit bei *Lupinus angustifolius*. *Kühn-Archiv.* **9** : 332—404.
8. 中村俊一郎 1958. 種子の硬実に関する研究. 農及園 **33** : 1782—1786.
9. 中山 包 1960. 発芽生理学. 内田老鶴圃. 226—238.
10. NELSON, A. 1926. "Hard seeds" in leguminosae. *Nature* **118** : 804—805.
11. 末次 勲・植木千尋 1960. レンゲの硬実に関する研究. 北陸農試報告 **1** : 73—88.
12. UEKI, C. and I. SUETSUGU 1954. On the discrimination of hard seed in some leguminous forage crops. 1. Genge (*Astragalus sinicus* L.). *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* **22** : 44—46.

Studies on the Hard Seed of Milk Vetch (*Astragalus sinicus* L.)

X. The cause of the impermeability of hard seed in milk vetch.

Tasuke YASUE

(Faculty of Agriculture, Gifu University, Kakamigahara, Gifu)

Summary

The treatment of seeds with four kinds of carbohydrase, four kinds of acid and its corresponding ammonium salt, ethyl ether and chloroform was carried out in order to clarify the cause of the impermeability, especially the substance concerned in it. The results obtained are as follows.

1) When yet the swelled seeds which were nearly ripe, were pretreated by soaking in a 1 per cent pectinase solution for 2 hours, the hard seed content decreased from 64.8 per cent to 8.3 per cent; and in the same pretreatment for 4 hours, the content decreased to 4.3 per cent; and in the same pretreatment for more than 8 hours, the hard seed content was not found at all. This fact indicates that pectinase prevents the hardening of seeds. However, this preventive effect was not found in cellulase, α - and β -amylase using the same pretreatment.

2) A remarkable preventive effect was found in the presoaking treatment, using the same seeds in 0.5 per cent oxalic acid and 0.5 per cent ammonium oxalate solution for 1 hour respectively: the hard seed content was decreased from 56.8 per cent to 0.8 per cent. When the same pretreatment was continued for 2 hours, the content was decreased to 0.5 per cent; and in the same pretreatment for more than 4 hours, the hard seed content was not found at all. If the treatment was prolonged, some decrease of hard seed content was also found in the presoaking treatment using the following combinations: 0.5 per cent citric acid and ammonium citrate; acetic acid and ammonium acetate; and hydrochloric acid and ammonium chloride.

3) The effectiveness in breaking hard-coatedness of a 1 per cent pectinase solution, and of a 0.5 per cent oxalic acid and ammonium oxalate, was not found in the case of strong hard seeds which remain hard for 51 days and 100 days respectively after placing on the seed-bed.

4) The soaking treatment with ethyl ether and chloroform gave no indications of being effective in the breaking of hard-coatedness, although it did show signs of effectiveness in the promotion of softening of seeds and germination.

5) From the results obtained, it was concluded that the pectic substances, presumably in the form of pectates, in the strophiole and palisade layers were involved in causing the impermeability of seeds, and that the impermeability was not caused by cuticula, though the cuticula controlled the velocity of seed-swelling and germination.