作物の細胞質雄性不稔性に関する組織化学的研究

第3報 トウモロコシにおける ^{14}C 同化産物の部位別の配分*

中 嶋 博・細 川 定 治

(北海道大学農学部)

植物の雄性不稔性に関連する現象の一つとして、植物組織内、とくに葯における炭水化物の行動が、大きな意義をもつことは、さきに報告した⁵⁾⁷⁾⁸⁾ところであるが、本研究はこれら炭水化物の行動をさらに詳細に解析するために、稔性個体とし不稔性個体を供試して、トレーサー法により、光合成産物の花器を中心とする植物体の組織へのとりこみ量、およびその配分成分形態の観点から、両稔性間の異同を明らかにし、不稔の機作解明の一助とするために行なった。

材料および方法

供試材料はトウモロコシの細胞質雄性不稔系統 W23^T, W375B^T, およびそれぞれの維持系統 W23, W375B である。これらの材料を 1968, 1969 年の両年に圃場に植え、花粉発育段階の小孢子期のものを、植物体の頂部より5葉を残して切り取り、これを水にさし、両稔性の個体に約 1.5 mCi の $^{14}\text{CO}_2$ を 24 時間同化させた。すなわち、小孢子期は両稔性間に、葯組織の変化に差異が認められる時期である⁷⁾。W23 系統

については葯のみ、W375B 系統については葯、小穂より葯を除いたもの(以後小穂とする)、穂軸、さらに上より第1葉身、第1葉鞘、第1節間、第2葉身、第2葉鞘、および第2節間について試料を取り、実験を行なった。

各器官の配分形態を fig. 1 に示した方法⁴⁾で分画し、分画した液体試料はエタノール系シンチレーター(葯、小穂、および穂軸については、PPO, 80mg, POPOP, 2 mg; トルエン, 5 ml; ジオキサン, 5 ml; エタノール, 3 ml; ナフタリン, 50 mg; その他の器官については、ブレイ氏溶液)に溶解し、固体試料は燃焼法により、発生した $^{14}\text{CO}_2$ をハイアミンを含むシンチレーター(葯、小穂、および穂軸については、PPO, 80mg; POPOP, 2 mg; トルエン, 10 ml; その他の器官については、DPO, 4 mg; POPOP, 1 mg; トルエン, 10 ml)に吸収させ、液体シンチレーション・カウンターを用いて、それぞれのとりこみ量を計測した。さらに W23 系統の葯では、エタノール可溶部で陽性画分(主としてアミノ酸と考えられるの

Fig. 1 Scheme for the isolation of ^{14}C -labeled constituents

昭和 48 年 4 月 2 日受理

第 147 回講演会 (昭和 44 年 4 月) および第 149 回講演会 (昭和 45 年 5 月) において発表

で、以後アミノ酸画分とする)、およびエタノール不溶部で6規定塩酸(6N HCl)可溶部の陽性画分(主としてたんぱく質と考えられるので、以後たんぱく質画分とする)をペーパー・クロマトグラフィで細分画し、 ^{14}C 標識物質の同定を試みた。展開剤は、正ブタノール:水(3:1)で、発色剤は、水飽和ブタノールのニンヒドリン溶液を用いた。また W375B 系統の葯、小穂、および穂軸の中性画分(主として糖類と考えられるので、以後糖類画分とする)も同様に細分画した。展開剤は、正ブタノール:酢酸:水(4:1:1)で、発色剤は、アニン・フタル酸を用いた。それぞれ展開後、風乾し、X線フィルムに10日間露光した。X線フィルムは現像、定着し、ペーパー・クロマトグラムはそれぞれの発色剤で発色させた。X線フィルム上のスポットと発色させたスポットを標準試薬で同定を試みた。

実験結果

葯、小穂、および穂軸における、 ^{14}C のとりこみ量、および配分成分形態別の分配率を table 1. に示した。葯においては、W23, W375B の両系統とも、実験に供した小孢子期では、稔、不稔によつて、とりこみ量に大きな差異が認められ、稔性のものでは不稔性のものに較べて著しく多かつた。稔性葯では、2次代謝産物と考えられる、エタノール可溶部中のエーテル可溶部(主として、脂肪と考えられるので脂肪画分とする)、その他画分、およびエタノール不溶部への配分が、W23, および W375B でそれぞれ 61.2%, 62.6% と多いのに対して、1次代謝産物と考えられる糖類画分、アミノ酸画分、および有機酸画分(エタ

ノール可溶部の陰性画分を有機酸画分とする)は、38.8%, 37.4%とその配分は少ない。一方、不稔性葯では、2次代謝産物への配分は、41.8%, 39.6%と少ないのに対して、1次代謝産物は、58.2%, 60.4%と高い値を示した。さらに詳細に検討すると、1次代謝産物については不稔性葯で、糖類、およびアミノ酸画分へのとりこみ割合が、稔性葯にくらべて著しく高い。さらに、2次代謝産物については、不稔性葯はエタノール不溶部中で、6N HCl 不溶部画分(主として、細胞壁物質と考えられるので細胞壁画分とする)で高い分配率を示したが、たんぱく質、および脂質画分では著しく低い分配率を示した。

小穂においては、 ^{14}C のとりこみ量に大きな差異が認められた。しかしその配分は、葯の場合とは異なり、不稔性個体の小穂では、細胞壁画分にやや多くとりこまれていたが、その他の成分では顕著な差異は認められない。

穂軸においては、 ^{14}C のとりこみ量には大きな差異は認められなかつたが、不稔のものに多くとりこまれており、とくに糖類画分が著しく多かつた。

葉部、および節間についてのとりこみ量、および配分成分形態別の分配率を table 2. に示した。 ^{14}C のとりこみ量は、両稔性とも葉身が一番少なく、葉鞘、節間の順序で多くなり、この傾向には稔性による差異は認められない。部位別にみると、下部が高い傾向を示した。葉身、および葉鞘では炭水化物(糖類、多糖類、細胞壁物質)に主として多くとりこまれていた。葉鞘では、とくに細胞壁画分に多くとりこまれていた。第2節間では、糖類画分は少なく、アミノ酸画分に多い傾向を示した。一般に、葉鞘では1次代謝産物が多

Table 1 The distribution of ^{14}C incorporated into fertile and male-sterile maize anther, spikelet and rachis

	Anther W23 W23 ^T		Anther W375B W375B ^T		Spikelet W375B W375B ^T		Rachis W375B W375B ^T	
Total ^{14}C incorporated ($\mu\text{Ci}/\text{mg}$ dry wt.)	51.3	3.6	55.7	4.8	21.4	9.4	11.3	15.5
Ethanol sol. (%)	69.2	69.4	68.4	75.0	62.1	57.0	60.2	71.0
Neutral Fraction	18.7	30.6	10.1	31.3	30.4	33.3	39.0	54.2
Anionic Fraction	11.7	5.6	11.3	8.3	8.9	6.5	6.2	7.1
Cationic Fraction	8.4	22.0	16.0	20.8	8.9	8.6	5.3	5.2
Petroleum Ether Fraction	9.0	0.0	4.1	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
Others	21.4	11.2	26.9	14.6	13.5	8.6	9.7	4.5
Ethanol insol.	30.8	30.6	31.6	25.0	37.9	43.0	39.8	29.0
6N HCL sol.								
Cationic Fraction	9.0	2.8	11.9	4.2	3.7	2.2	1.8	1.3
Others	19.9	22.2	15.4	12.5	17.8	16.1	19.4	12.2
6N HCL insol	1.9	5.6	4.8	8.3	16.4	24.7	18.6	15.5

Table 2 The distribution of ^{14}C incorporated fertile and male-sterile maize plant

	1st Leaf Blade		1st Leaf Sheath		1st Internode		2nd Leaf Blade		2nd Leaf Sheath		2nd Internode	
	W375B	W375B ^r	W375B	W375B ^r	W375B	W375B ^r	W375B	W375B ^r	W375B	W375B ^r	W375B	W375B ^r
Total ^{14}C incorporated (m $\mu\text{Ci/mg}$ dry wt.)	5.1	8.4	34.1	57.0	43.4	83.5	11.8	12.4	23.8	36.9	83.3	121.7
Ethanol sol.												
Neutral Fraction	58.8	65.5	32.0	47.5	40.1	41.7	53.4	49.2	41.6	37.7	36.9	53.2
Anionic Fraction	13.7	37.0	17.3	16.8	17.1	15.3	29.7	16.1	21.4	17.9	4.8	13.1
Cationic Fraction	3.0	8.3	3.0	5.6	3.9	4.9	9.3	9.7	5.0	3.5	3.1	6.2
Petroleum Ether Fraction	4.7	11.9	4.7	9.3	10.1	11.4	12.7	12.9	7.2	6.3	24.5	20.3
Others	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ethanol insol.	25.5	8.3	7.0	15.8	9.0	10.1	1.7	10.5	8.0	10.0	4.5	13.6
6N HCL sol.	41.2	34.5	68.0	52.5	59.9	58.3	46.6	50.8	58.4	62.3	63.1	46.8
Cationic Fraction	6.0	6.0	8.5	3.2	2.5	3.8	11.9	11.3	5.5	5.4	7.2	6.3
Others	17.6	16.6	21.1	21.6	13.8	22.3	16.9	20.2	15.1	20.3	31.0	27.4
6N HCL insol.	17.6	11.9	43.4	27.7	43.6	32.2	17.8	19.3	37.8	36.6	24.9	13.1

く、葉鞘、および節間では2次代謝産物が多い傾向を示した。

以上のように、葉部、および節間では、器官によって明らかにとりこみ量、および成分への分配率に差異が認められたが、稔性による分配率の差異は、第1葉身の糖類画分、第1葉鞘の細胞壁画分、第1節間の多糖類画分、第2葉身の糖類画分、および第2節間の糖類画分ならびに細胞壁画分で見いだされた。このように稔性により、とりこみ量と分配率に差異のみられる物質がおもに炭水化物であることは、葯における炭水化物の消長の差異が雄性不稔性と関係することを考えあわせ興味あることである。

ペーパー・クロマトグラフィによる葯の遊離アミノ酸、およびアミノ酸残基についての結果を table 3. に示した。遊離アミノ酸については、前報と同様に不稔性葯では、プロリンが検出されなかつた。アミノ酸残基では、両稔性とも全く同様で、プロリン残基も検出された。 ^{14}C で標識された遊離アミノ酸については、稔性葯では6種類、不稔性では2種類が見いだされた。またアミノ酸残基については、稔性葯で8種類見いだされたが、不稔性葯では全く見いだされなかつた。

さらに、葯、小穂、および穂軸の糖類画分の細分画の結果を Fig. 2 に示した。両稔性とも糖類の主要な配分形態はショ糖であり、ブドウ糖、および果糖も認められたが、稔性葯にのみ、Rf から考えてマルトースと推定される物質が検出された。またこれらの糖類

Fig. 2 Autoradiography of sugars in maize

I : anther
II : spikelet
III : rachis

Table 3 The detection of amino acids and amino acids residues

	Non-radioactive				Radioactive			
	Free Amino acid		Fraction of Protein		Free Amino acid		Fraction of protein	
	W23	W23 ^T	W23	W23 ^T	W23	W23 ^T	23W	W23 ^T
Leu	+	+	+++	+++	±	—	++	—
Phen	±	+	++	++	—	—	++	—
Val, Meth	+	++	+++	+++	+	—	+	—
Try	±	+	+	+	—	—	+	—
Pro	++	—	+	+	+	—	—	—
Ala	+++	++	+++	+++	++	++	++	—
Gly, Ser	+	++	+	+	++	—	+	—
Glu	+	+	+	+	+	+	—	—
His	±	+	+	+	—	—	+	—
Asp	±	+	+	+	—	—	+	—

* —(absent) ± + ++ +++ (more definitely presented)

の量については、不稔性葯では一般に少ないものようであつた。

脂質画分へのとりこみは稔性葯でかなり認められたが、不稔性葯では認められず、また他の組織においては稔性如何にかかわらず、ほとんど検出されなかつた。

考 察

細胞質雄性不稔系統のテンサイ、トウモロコシ、およびソルガムなどの葯の細胞組織化学的研究⁵⁾⁷⁾⁹⁾から、雄性不稔現象のおこる要因は、現在のところタペート細胞の異常肥大と、これに関連しておこる炭水化物、あるいはたんぱく質の異常代謝による小胞子への養分の移行の障害をあげるのが通説である。葯のタペート細胞の主たる機能は、発育している小胞子、および花粉のための、酵素、ホルモン、および栄養物質の生産と運搬であるといわれている。これら葯の生理学的研究は²⁾¹²⁾、細胞分裂と関連づけて多くの研究者によつてなされているが、今日では、タペート細胞の役割として、花粉外膜の形成やデオキシリボ核酸合成のための、ヌクレオチド、あるいはヌクレオシドのプールが強調されている。¹²⁾ 光合成産物の葯中における代謝については、今日まで研究されているものはとくにない。

本研究では、トウモロコシの細胞質雄性不稔性と光合成産物の部位別の配分、および配分成分形態との関係に関連させて考察する。table 1, 2. から明らかなように、¹⁴C 同化産物のとりこみ量は、稔性個体で葯に多く、小穂、穂軸の順序で少なくなるが、不稔性個体では逆の関係、すなわち葯で少なく、小穂、穂軸の順序で多くなつた。その他の器官では、不稔性個体に多くとりこまれていた。このことから、従来の一般的

な考え方である葯組織中への栄養分の移行、あるいは四分子期以後の葯壁を通過する栄養分の小胞子あるいは花粉への移行が妨げられ、このために不稔になるという推定と、このとりこみ量の異同についての観察結果は、少し異なる結果を示しているようである。すなわち不稔性葯では、穂軸から小穂への光合成産物の転流が著しく阻害されていると推定される。また現在のところ、花粉の異常とタペート細胞の異常、および光合成産物の花器への転流の阻害の間での因果関係は明らかではないが、Rohrbach⁹⁾ は雄性不稔のテンサイの花糸の形態的な異常によつて、栄養分の転流が阻害されているとしている。Kinoshita⁶⁾ は同じテンサイで不稔性個体のタペート細胞と小胞子の異常の結果として、花糸の形態的な異常を観察している。また、一般的に光合成産物は、生長、および分化をしている新しい組織や器官への転流が著しいことが知られており、シンクとソースとの観点から考察して、ソースである葉での光合成能力には、植物体の大きさから稔性によつて著しい差異は考えられないが、シンクとしての葯、および小穂には稔性によつて著しい差異がみられる。トウモロコシでは雌雄同株であるために、小穂には雌性器官がなく、葯のシンクとしての機能の差異がそのまま小穂にあらわれたことによるものと考えられる。

table 1. から明らかなように、葯における配分成分形態からみて、稔性葯では、1次代謝産物から2次代謝産物に容易に合成が行なわれるが、不稔性葯では、その合成が阻害されているものと推定される。つまり、不稔性葯では糖類、およびアミノ酸は高い分配率を示しているが、多糖類では大体同じであり、たんぱく質は著しく少ない。また有機酸では、不稔性葯

で、分配率は小さく、このことは不稔性葯の呼吸活性の低下と関連していると推定される。

小穂においては、とりこみ量、および細胞壁画分に差が認められ、これは前述の葯への光合成産物の配分が不稔性個体で著しく低下していることと関連しているものと推定される。外見からも不稔性個体の小穂は稔性のそれとあまり変化がないことは、細胞壁画分への分配率が高いことと軌を一にしている。

葯、小穂以外の他の器官においては、配分成分形態別の分配率は稔性によつて、一定の傾向が認められなかったが、炭水化物の画分において差異がみられた。このことは炭水化物の消長と不稔現象とは、なんらかの関係をもつことを示唆している。

Fig. 2 に示した糖類の細分画より、シヨ糖、ブドウ糖、および果糖が主たる糖類であり、稔性葯においてのみ、マルトースと推定される糖類が検出された。table 1. の糖類画分とあわせ考えると、稔性個体では葯、小穂、穂軸の順で少なくなるが、不稔性個体では逆の関係であり、スポットの大きさとよく一致している。斗ヶ沢ら¹¹⁾はトウモロコシの花粉、また、Shannon¹⁰⁾はトウモロコシの未熟種子において、シヨ糖、ブドウ糖、および果糖を見い出しているが、マルトース様糖類の存在を記載していない。これらのことから、この物質は、花粉では見い出されないの、稔性葯の葯壁に存在するものと思われる。この物質が花粉の正常な発育とどのように関連しているかは明らかでない。Fukasawa³⁾もトウモロコシの正常葯で、類似の糖類を見い出してマルトースと推定しているが、コムギの正常葯からはこの物質を見い出していない。このことより、この糖類はトウモロコシに特異的なものと思われる。

table 3. に示されたアミノ酸については、すでに述べたように多くの報告がある。¹⁴C で標識された遊離アミノ酸は、不稔性葯では非常に少なかった。これは数種のアミノ酸の合成能力が低下しているか、あるいは阻害されていると推定される。また不稔性葯で、標識されたアミノ酸基が検出されなかつたのは、たんぱく質がほとんど合成されなかつたものと推定される。これはこの時期でのアミノ酸合成が阻害されていることによることも推定される。アミノ酸画分とたんぱく質画分のとりこみ量をあわせて考えると、不稔性葯における、標識されたアミノ酸は非常に少ない。遊離アミノ酸およびアミノ酸残基においては、不稔性葯で遊離アミノ酸のプロリンが検出されないのを除き、大きな差異は見られない。このことより、¹⁴C を

施与される以前の発育段階では、アミノ酸合成、およびたんぱく質合成はほぼ正常に行なわれていたことを示している。稔性葯において、標識された遊離アミノ酸、およびアミノ酸残基がそれぞれ6種類と8種類見い出されているが、このことより、遊離アミノ酸で標識されたものが、ただちにたんぱく質にとりこまれることが考えられる。

稔性葯の脂質画分にかんがりの量の¹⁴Cのとりこみがみられるが、不稔性葯では認められない。このことは、花粉外膜の発達に重要な役割をするカロチノイド¹²⁾、さらに葯の色素などもこの分画に入ると考えられることから、稔性葯では脂質代謝は正常に行なわれているが、不稔性葯ではこの代謝過程に異常をきたしていることを示している。葯中の脂肪については、*Lilium henryi* について調べられており¹²⁾、中期までは葯中に脂肪がなく、その後急にあらわれ、花粉の成熟に必要な水準まで増加するとされている。

これらの実験結果より、トウモロコシの小孢子期では、不稔性個体の花器への光合成産物の配分は著しく阻害されている。また種々の代謝系に異常をきたしているか、あるいは代謝活性が著しく低下しており、とくに、1次代謝産物から2次代謝産物への合成が阻害されていると推定された。

摘 要

細胞質雄性不稔現象についての、植物生理学的な機作を明らかにする一助として、トウモロコシの細胞質性不稔系統 W23^T、W375B^T とその維持系統 W23、W375B を用いて、両稔性個体間の、光合成産物の配分について、¹⁴C トレーサー法で研究した。

1. 光合成産物の葯へのとりこみ量、および配分成分形態については、稔性個体間では大きな差が認められた。しかしながら、系統間では明らかな差異は認められなかつた。

2. 供試された小孢子期では、不稔性個体の花器への光合成産物の転流が著しく阻害されていた。

3. 不稔性葯では稔性葯に比較して、有機酸画分(陰性画分)で、やや低い分配率を示したが、糖類画分(中性画分)、およびアミノ酸画分(陽性画分)では、高い分配率を示した。

4. ¹⁴C アミノ酸、および ¹⁴C アミノ酸残基については、両稔性間に著しい差異がみられ、不稔性葯では、それらは著しく少なかった。稔性葯でのみ、マルトースと思われる糖類が検出された。

5. 花器以外の器官では、両稔性間で一定の傾向は

認められなかつた。しかし炭水化物については両稔性間で著しい差異が認められた。

6. 稔性葯では、脂質画分に ^{14}C がかなりとりこまれていたが、不稔性葯では、まったくとりこまれていなかった。

これらのことより、トウモロコシの四分子期より、小孢子期にかけて、不稔性葯への光合成産物の転流は著しく少なく、また葯の呼吸活性の低下と関連し、1次代謝産物から2次代謝産物への合成が著しく阻害されているものと推定された。

本研究の遂行にあたり、弘前大学福重裕康助教授に御指導を賜つた。ここに深謝の意を表する。

引用文献

1. BROOKS, J. and G. SHAW 1968. Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotinoids in nature. *Nature* **219**: 532—533.
2. ECHLIN, P. 1971. The role of the tapetum during microsporogenesis of angiosperms. In *Pollen: Development and Physiology* (Ed.) J. Heslop-Harrison, Butterworths London, 41—61.
3. FUKASAWA, H., K. MITO and M. FUJIWARA 1957. Preventive effects of sugars on the pollen degeneration of wheat plant. *Bot. Mag. Tokyo* **70**: 251—257.
4. 福重裕康. 1968. 水稻穎果の蔗糖受容能力と温度との関係. *日作東北支部会報* **10**: 15—16.
5. 細川定治・津田周弥・武田竹雄 1963. てん菜の雄性不稔現象に関する組織化学的研究. *育種* **4**: 196—202.
6. KINOSHITA, T. 1971. Genetical studies on the male sterility of sugar beets (*Beta vulgaris* L.) and its related species. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **56**: 435—541.
7. 中嶋 博・細川定治 1970. 作物の細胞質雄性不稔性に関する組織化学的研究. I. トウモロコシ、およびソルガムの葯における炭水化物の消長とアミノ酸. *北大農学部邦文紀要* **7**: 201—207.
8. ————— 1971. ————— II. てん菜の葯における、DNA、多糖類および蛋白質の消長ならびに光合成産物の移行. *北大農学部邦文紀要* **8**: 1—4.
9. ROHRBACH, U. 1965. Beiträge zum Problem der Pollensterilität bei *Beta vulgaris* L., I. Untersuchungen über die Ontogenese des Phänotyps. *Z. Pflanzenzüchtg.* **53**: 105—124.
10. SHANNON, J. C. 1968. Carbon—14 distribution in carbohydrates of immature *Zea mays* kernels. Following $^{14}\text{CO}_2$ treatment of intact plants. *Plant Physiol.* **43**: 1215—1220.
11. 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・岩動悠子・高橋睦子 1962. 花粉の生化学的研究. 第2報. トウモロコシ、クロマツ、オニユリ、カボチャ花粉の糖質について. *岩手大農学部報告* **6**: 6—8.
12. VASIL, I. K. 1965. Some aspects of the physiology of anthers. In *Plant tissue culture*. (Ed.) P. R. White and A. R. Grove. *Barkley California*, 341—356.

Histochemical Studies on the Cytoplasmic Male-sterility of some Crops

III. Distribution of ^{14}C -assimilates in maize

Hiroshi NAKASHIMA and Sadaji HOSOKAWA

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Summary

In order to clarify the common physiological causation responsible for the cytoplasmic male sterility in various crops, the authors have carried out histochemical studies on male sterile plants as compared with fertile plants.

The present study describes the results of an observation of maize, *Zea mays* L., which inherits male sterility through cytoplasm incorporation of the chromogene. Using the ^{14}C tracer methods, the following results were obtained on the distribution of ^{14}C -assimilates.

1. At the microspore stage, the translocation of the photosynthates into the anther and the spikelet was obstructed in the male sterile plants.
2. In comparison with the fertile anthers, male sterile anthers have a low distribution ratio in the anionic fraction, but it has a high distribution ratio in the neutral and the cationic fractions.
3. In the fertile anther, one undetermined sugar spot was detected. A remarkable difference between fertile and sterile plants was also detected in ^{14}C amino acids and ^{14}C amino acids residues.
4. ^{14}C -assimilate is incorporated into the lipid fraction in the fertile anthers, but not in the sterile anthers.

On the basis of such observations, one of the causes of male sterility was surmised to be insufficient translocation of photosynthates from the rachis to the anther. This may be due to some inactivation or obstruction in the synthetic activities from the primary metabolic products to secondary ones.