花粉の生理, 形態学的研究

第7報. 花粉の発芽におよぼす各種アミノ酸の影響について*

沢田 義 康**

YOSHIYASU SAWADA**: Physiological and Morphological Studies on the Pollen Grain.

Part 7. On the Effects of Some Amino Acids on the Germination
of the Pollen Grain and on the Growth of the Pollen Tube.

1958 年 2 月 3 日受付

花粉は, sucrose agar 培地上で発芽が容易な種類ときわめて発芽が困難な種類とに大別される。しかし sucrose agar 培地上で発芽が困難な花粉でも, 適量のアミノ酸をくわえた sucrose agar 培地上では, 容易に発芽することがみいだされた^{3,4)}。本報は sucrose agar 培地上ではほとんど発芽しない *Paris hexaphylla* Chamisso. の花粉とその柱頭, 子房, ならびに sucrose agar 培地上で発芽が容易な *Oryza sativa* L.⁵⁾ の花粉とその雌ずい中に含まれる主要なアミノ酸の種類をクロマトグラフ法によって調べるとともに, これら組織中に含まれるアミノ酸を, sucrose agar 培地に添加して花粉を培養する場合, 両種花粉の発芽, および花粉管の伸長と, 添加したアミノ酸の種類との間に二・三の興味ある関係のあることをしたので, ここに報告する。

供試材料ならびに実験方法

(1) 供試材料

sucrose agar 培地上での花粉の発芽習性上興味ある対立をなす種類である *Paris hexaphylla* Chamisso. (クルマバツクバネソウ) と *Oryza sativa* L. (水稻) の一品種「富錦」を材料植物としてえらび, いずれも蒴裂開直後の花粉と, 雌ずいを材料とした。

(2) 測定方法

まず予備実験により, 花粉の発芽培地としての最適 sucrose 濃度は, *Paris hexaphylla* Chamisso. では 2%, *Oryza sativa* L. 富錦では 12% であり, 最適 agar 濃度は, いずれも 1%, pH は 6.5 であることをたしかめたので, 本実験を通じてこの条件でそれぞれ 0.0005%, 0.001%, 0.003%, アミノ酸添加培地をつくり, これに花粉を散布した。*Paris hexaphylla* Chamisso. は 25° で 4 時間, *Oryza sativa* L. 富錦では 25°~28° で 15 分間培養し, 花粉 100 個体の発芽率をもとめ, 30 個体以上の花粉管長をマイクロメーターで測定した。control は基本培地をもちい, アミノ酸をくわえた培地の場合と同様な条件下での発芽率と花粉管の長さを測定した。なお使用したアミノ酸は, 味の素製薬株式会社製のもので, 次の 19 種類である。

Alanine, arginine, aspartic acid, cysteine, cystine, glutamic acid, glycine, histidine, hydroxyproline, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, tryptophan および valine. 他方花粉, および雌ずい中に含まれるアミノ酸の種類については, *Paris hexaphylla* Chamisso. では花粉 0.2g, 柱頭 0.2g, 子房 0.5g, を材料とし, また *Oryza sativa* L. (富錦) では花粉 0.1g, 雌ずい 0.2g を材料としてペーパー・クロマトグラフ法¹⁾によりアミノ酸の種類をしらべた。

* 本研究の要旨は昭和 32 年 10 月 第 22 回日本植物学会大会に発表

** 北海道学芸大学旭川分校生物学教室 Division of Biology, Asahikawa Branch, Hokkaido Gaku-gei University, Hokkaido, Japan.

spot の大きさ, 発色の程度によって, 卅, 卅, +, 土, 一, の5段階の符号をもってその含量の比較値を表示した。ただし, 一はアミノ酸がぜんぜんみとめられないことをしめす。展開剤としては, 一次元紙クロマトグラフでは butanol-acetic acid-water (4:1:1), 二次元法では含水 phenol (85%), および butanol-acetic acid-water (4:1:1) の両溶媒を併用した。展開は常法により, それぞれ 40×2 cm, および 40×40 cm の No. 50 のろ紙を 25° で静置, 乾燥後ニンヒドリンの

で最高の価をしめし, ついで aspartic acid, histidine, cystein の順であった。つぎにアミノ酸濃度を 0.001% に高めると, 前述の 0.0005% 添加で良好な発芽がみられた種類のアミノ酸は, さらに高い発芽率をしめした。またこの濃度ではじめて発芽促進がみとめられた種類のアミノ酸としては, alanine, glycine, leucine, threonine, tyrosine, tryptophan および valine などがあげられる。さらに 0.003% までアミノ酸の濃度をあげると, aspartic acid をのぞき, 0.001%

Table 1. The effects of amino acids on the germination rate of the pollen grain in *Paris hexaphylla* Chamisso.

Sorts of amino acids	Concentration of amino acid					
	0.0005%		0.001%		0.003%	
	Germination rate		Germination rate		Germination rate	
Control	0	%	0	%	0	%
D. L-Alanine	0		20.0		0	
L-Arginine	0		0		0	
L-Aspartic acid	42.7		56.1		68.8	
L-Cysteine	34.4		88.1		0	
L-Cystine	trace		0		0	
L-Glutamic acid	81.0		85.5		64.3	
Glycine	0		10.5		0	
L-Histidine	34.8		71.6		12.9	
L-Hydroxyproline	0		trace		trace	
L-Leucine	0		6.2		trace	
L-Lysine	0		trace		0	
L-Methionine	trace		trace		0	
L-Phenylalanine	0		0		0	
L-Proline	10.6		30.5		trace	
D. L-Serine	0		0		0	
D. L-Threonine	0		7.8		0	
L-Tyrosine	0		20.5		0	
D. L-Tryptophan	0		24.8		0	
D. L-Valine	0		23.0		0	

0.02% ブタノール溶液を発色剤としてもちい, アミノ酸の種類をしらべた。

実験結果および考察

(1) 花粉の発芽におよぼすアミノ酸の影響

0.0005% アミノ酸添加 sucrose agar 培地上における *Paris hexaphylla* Chamisso. の花粉の発芽率は (第1表参照), glutamic acid 添加

濃度で顕著な発芽促進がみとめられた histidine, glutamic acid では, かえって発芽率の減退がみとめられた。

つぎに *Oryza sativa* L. の花粉についていうと, (第2表参照), 0.0005% の arginine, alanine, valine 添加した培地上で対照区に比しそれぞれいちじるしい発芽の促進がみられた。

さらに 0.001% アミノ酸添加培地では valine

Table 2 The effects of amino acids on the germination rate of the pollen grain in *Oryza sativa* L.

Sorts of amino acids	Concentration of amino acid		
	0.0005%	0.001%	0.003%
	Germination rate	Germination rate	Germination rate
Control	58.6 %	58.6 %	58.6 %
D. L-Alanine	73.2	75.0	81.8
L-Arginine	78.5	76.0	42.8
L-Aspartic acid	17.5	17.9	0
L-Cysteine	23.4	trace	0
L-Cystine	58.5	60.9	34.6
L-Glutamic acid	40.0	0	0
Glycine	63.5	54.1	52.5
L-Histidine	55.5	41.0	trace
L-Hydroxyproline	58.0	57.7	76.4
L-Leucine	50.0	68.7	52.7
L-Lysine	52.0	53.1	55.5
L-Methionine	45.6	45.3	45.7
L-Phenylalanine	60.0	78.4	55.5
L-Proline	52.2	57.5	72.1
D. L-Serine	50.5	72.8	81.8
D. L-Threonine	53.0	40.7	26.0
L-Tyrosine	50.0	29.6	0
D. L-Tryptophan	62.4	61.0	37.5
D. L-Valine	71.4	82.5	20.0

による促進がもっともいちじるしく、ついで phenylalanine, arginine, alanine の順をしめし、0.0005% アミノ酸添加培地に比しいずれも発芽率の増加がみられた。また 0.003% アミノ酸添加培地では、alanine, serine の添加による発芽率がいちばん高く、他方 hydroxyproline, proline の場合にも発芽率の増加がみられた。しかし 0.001% アミノ酸添加により高い発芽率がみられた phenylalanine, valine は、0.0003% 濃度では急激に発芽の低下をきたした。またこの他のアミノ酸添加培地上の花粉の発芽は、control に比しいちじるしくわるい。

(2) 花粉管の伸長におよぼすアミノ酸の影響

Paris hexaphylla Chamisso. の花粉管伸長とアミノ酸との関係についていうと、第1表と第3表とを比較すればあきらかなように、0.0005%, 0.001%ならびに 0.003% の各アミノ酸添加培地

を通じいずれも花粉の発芽を促進する作用をもつアミノ酸の添加により、この植物の花粉管の伸長も同様に促進される。しかもアミノ酸の種類、濃度と花粉管伸長促進との間の関係は、花粉発芽の場合ときわめてよく一致する。

(3) 花粉に含まれるアミノ酸の種類

まず *Paris hexaphylla* Chamisso. の花粉に含まれるアミノ酸については、第4表に示すように、glutamic acid がもっとも多く、histidine, aspartic acid, alanine がこれについて多く、その他、proline, tryptophan, leucine, cysteine なども多少ながらみとめられた。他方 *Oryza sativa* L. の花粉では、(第5表参照), serine がもっとも多く、その他 alanine, tryptophan, arginine, hydroxyproline, phenylalanine, valine などが認められた。このように花粉に含

Table 3. The effects of amino acids on the growth of the pollen tube in *Paris hexaphylla* Chamisso.

(The numbers in each columns show the lengths of pollen tubes expressed by the micrometer scale)

Sorts of amino acids	Concentration of amino acid					
	0.0005%		0.001%		0.003%	
	$M^* \pm \delta$	V^{**}	$M^* \pm \delta$	V^{**}	$M^* \pm \delta$	V^{**}
Control						
D. L-Alanine			7.4±1.4	18.8		
L-Aspartic acid	10.2±2.5	24.5	14.5±3.2	22.0	15.9±2.1	13.2
L-Cysteine	7.7±1.3	16.8	13.4±3.6	26.8		
L-Cystine						
L-Glutamic acid	12.8±2.9	22.6	15.6±2.1	14.1	9.3±2.6	27.9
Glycine			6.2±1.5	24.1		
L-Histidine	8.9±2.1	23.5	17.5±3.7	21.1	10.2±5.1	50.0
L-Hydroxyproline						
L-Leucine			6.5±1.7	26.0		
L-Lysine						
L-Methionine						
L-Phenylalanine						
L-Proline	6.2±1.2	19.3	8.7±1.8	20.6		
D. L-Serine						
D. L-Threonine			7.1±1.9	26.5		
L-Tyrosine			8.5±1.3	15.2		
D. L-Tryptophan			8.6±1.7	19.7		
D. L-Valine			8.0±1.5	18.7		

* Mean

** Coefficient of variability calculated from $V = \delta / M \times 100$

Table 4. The amino acids which were identified to be contained in the pollen grain and in the pistil of *Paris hexaphylla* Chamisso.

Sorts of amino acids	Stamen	Pistil	
	Pollen grain	Stigma	Ovary
D. L-Alanine	+	+	+++
L-Arginine	—	—	—
L-Aspartic acid	++	++++	+++
L-Cysteine	±	±	+
L-Cystine	—	—	—
L-Glutamic acid	++++	+++	++
Glycine	—	—	—
L-Histidine	+++	+++	++
L-Hydroxyproline	—	—	+
L-Leucine	±	+	+
L-Lysine	—	—	—

Table 4. Continued

Sorts of amino acids	Stamen	Pistil	
	Pollen grain	Stigma	Ovary
L-Methionine	—	—	++
L-Phenylalanine	—	—	—
L-Proline	±	±	+
D,L-Serine	—	—	—
D,L-Threonine	—	—	—
L-Tyrosine	—	—	—
D,L-Tryptophan	±	++	++
D,L-Valine	—	—	—

Table 5. The amino acids which were identified to be contained in the pollen grain and in the pistil of *Oryza sativa* L.

Sorts of amino acids	Stamen Pollen grain	Pistil Stigma, Ovary
D,L-Alanine	++	+
L-Arginine	+	+
L-Aspartic acid	—	—
L-Cysteine	—	—
L-Cystine	—	—
L-Glutamic acid'	—	—
Glycine	—	—
L-Histidine	—	—
L-Hydroxyproline	+	+
L-Leucine	—	—
L-Lysine	—	—
L-Methionine	—	—
L-Phenylalanine	±	—
L-Proline	+	±
D,L-Serine	+++	++
D,L-Threonine	—	—
L-Tyrosine	—	—
D,L-Tryptophan	+	+
D,L-Valine	±	—

まれるアミノ酸の種類は、植物の種類によってこととなるが、とくに興味のあることは、花粉粒そのものに大量に含まれている種類のアミノ酸の多くが、それを sucrose agar 培地にくわえると花粉の発芽を促進することである。しかし *Paris hexaphylla* Chamisso. の leucine, *Oryza sativa* L. の glutamic acid のように、花粉には含まれているが、培地にくわえても促進的影響をあたえない種類のアミノ酸もみとめられたが、この場合

は花粉そのものに含まれている量だけで、花粉の発芽にはじゅうぶんとみるべきであろう。

(4) 雌ずいに含まれるアミノ酸の種類

まず *Paris hexaphylla* Chamisso. の柱頭についてみると、(第4表参照), aspartic acid, glutamic acid, histidine がいずれも大量に含まれ、その他 tryptophan, leucine, alanine, がこれにつき, cysteine, proline もわずかながら

みとめられた。つぎに子房に含まれるおもなアミノ酸としては, aspartic acid, alanine がもっとも多く, ついで histidine, glutamic acid, tryptophan, methionine で, その他 hydroxyproline, cysteine, leucine, proline などがみとめられた。花粉, ならびに柱頭に大量に含まれている aspartic acid, histidine, glutamic acid などを sucrose agar 培地に添加することによって, 花粉の発芽および花粉管の伸長がいちじるしく促進されるが, このことから柱頭上での花粉の発芽に対して, これらのアミノ酸が密接な関係をもつことが予想される。なお子房には, 柱頭にみられなかった hydroxyproline, methionine, の存在がみられたが, この種のアミノ酸を sucrose agar 培地にくわえても花粉の発芽には影響がみとめられなかった。

つぎに *Oryza sativa* L. の雌ずいでは (第5表参照), 花粉の場合と同様に serine がもっとも多く, その他 alanine, arginine, hydroxyproline, tryptophan がみられた。しかも *Paris hexaphylla* Chamisso. の場合と同様に, 雌ずいに含まれるこれら各種類のアミノ酸を sucrose agar 培地にくわえて *Oryza sativa* L. の花粉を培養すると, 発芽促進の傾向がみられた。

以上の結果を総合すると sucrose agar 培地上ではほとんど発芽のできない *Paris hexaphylla* Chamisso. の花粉でも, 花粉, 柱頭および子房の三部分に共通してみられる aspartic acid, glutamic acid, histidine のようなアミノ酸を sucrose agar 培地に適量添加することにより, 花粉の発芽でいちじるしく促進されることがたしかめられた。また sucrose agar 培地上で容易に発芽する *Oryza sativa* L. の花粉の場合も, 花粉, 雌ずいに多量に含まれる serine, alanine の添加により, 花粉の発芽がいちじるしく促進される。このことから, 花粉の発芽に影響をおよぼすアミノ酸の種類は, 植物の種をことにすることによりことなるものと考えられる。久保²⁾は *Oryza sativa* L. の花粉をゼラチン培地上で, 適当な吸水条件のもとで発芽させると, 高率の発芽をみたと報告しているが, このような発芽条件下では, ゼラチンの加水分解によって生ずるある種のアミノ酸が発芽に好影響をおよぼすことも予想にかたくない。

本研究にさいしいろいろと御指導をいただいた北海道大学農学部田川隆教授に深謝の意を表する。

Summary

1. The pollen grain of *Paris hexaphylla* Chamisso. does not germinate on the sugar agar medium. By adding aspartic and glutamic acids, histidine or cysteine to the control medium, the pollen grain is, however, enabled to germinate readily.

2. Although the pollen grain of *Oryza sativa* L. can germinate to a certain extent on the control medium, the germination was markedly stimulated when arginine, valine or alanine was added to the medium.

3. The kinds of amino acids which accelerate the germination of the pollen grain of *Paris hexaphylla* when they were added to the culture medium, were found to be present in the pollen grain itself and in the pistil of this plant. A similar relation was found to be true in the case of *Oryza sativa* L.

参 考 文 献

- 1) Linskens, H.F., Papierchromatographie in der Botanik, 105-129 (1955).
- 2) 久保 淳, 福岡. 学. 大. 紀. 6: 1 (1956).
- 3) 沢田義康, 北. 学. 大. 紀. 7: 112 (1926).
- 4) ———, 北. 学. 大. 紀. 印刷中.
- 5) 山田一郎, 穂積清之, 日. 作. 紀. 22.103 (1953).