

ヤチダモのタネの発芽遅延についての研究 (第3報)

トネリコ属植物のミにふくまれる 成長阻害物質^{*1}

浅川 澄彦⁽¹⁾

ヤチダモのタネの発芽遅延については、第1報¹⁾にのべたようになりにおおくの研究がくりかえされてきたが、残念ながらいづれもほとんどおなじような研究方法と結論をしめしたにすぎなかつた。筆者はこの研究にとりかかったのはじめのころ、シオジのタネの発芽遅延に関連して発芽阻害物質説をかんがえた。これにたカンガエカタを Cox²⁾ はアメリカヤチダモ・アメリカシオジなどのタネの発芽遅延の説明にとりあげ、かなりくわしい実験をこころみている。わがくにでは高穂・豊岡³⁾ がこのようなカンガエカタの可能性をのべてはいるが、これについての実験はまだ報告されていない。ここには阻害物質説に関連して筆者がこれまでにこころみた実験の結果を報告する。

1. 材料と方法

ここにのべる実験のほとんどは、第1報の材料とおなじものについておこなつた。ただ、Table 3 にしめす実験は、北海道神道管林署管内で 1954 年にとれたタネについておこなつた。阻害作用をしらべるための抽出液はつぎのようにしてつくつた。水抽出液は材料をおよそ一定量の蒸溜水につけ、はじめに湯センのういで 30 分から 2 時間熱をくわえ (およそ 90°C)、ひきつづいて 24 時間 40°C の定温器にたもつてからこして定容にした。一方エーテル抽出液は、材料をおよそ一定量のエーテルにつけて 5°C の冷蔵庫にたもち、24 時間してからとりだしてこし、そのエーテルを湯センのういでとばしてから一定量の蒸溜水にとかした。こうしてつくつた抽出液の濃度は、できた液の 100ml. あたりの抽出材料のグラム数 (n) でしめし、抽出液_n であらわすことにする。3, 4, および 5 章の実験では、抽出液の阻害作用はその液を培地にしたときの、ヨリイカブのタネの 2 日間の発芽率でしめされる。

2. 果皮の水抽出液の阻害作用

まえがきののべた仮説をたしかめるために、果皮の水抽出液が自身のタネの発芽を阻害するかどうかしらべた。シオジについての実験の結果を Table 1 にしめす。(II) にしめされているように、うすい抽出液では発芽阻害はほとんどみられなかつたが、この場合にも蒸溜水を培地にしたものにくらべて根の成長がわるかつた。

ヤチダモのタネは果皮をとつても、なお、いちじるしい発芽遅延をしめすから、この原因はタネ自身にあることがあきらかである¹⁾。しかし、この原因の一つであるとかんがえられる前発芽は、果皮がついてい

^{*1} 一部は日林誌 36 (6). (1954) p. 153~159. に報告した。

阻害作用についてのくわしい実験はこの報告を参照されたい。

(1) 造林部造林科種子研究室員

Table 1. 果皮の水抽出液を培地としたシオジのタネの発芽
Germination of *F. Spaethiana* seeds in aqueous extract of pericarp.

(I)

培地 Medium	洗って蒸溜水培地に うつすまでの日数 Washed and transferred to distilled water after	発芽率 Germination percent		
		1 週間目 1 week	17日目 17 days	33日目 33 days
抽出液 Extract ₁₅₀	3 days	10	88	98
抽出液 Extract ₅₀	7 days	0	33	88
蒸溜水 Distilled water	---	97	98	98

(II)

培地 Medium	シヤーレにならべてからの日数 Days after bedding			
	3	5	7	10
抽出液 Extract ₃₀	0	54	91	95
抽出液 Extract ₂₀	1	59	89	98
抽出液 Extract ₁₀	2	62	91	100
蒸溜水 Distilled water	5	72	100	—

Table 2. 果皮の水抽出液などを培地としたヤチダモの胚の成長
Behavior of excised embryos in various media.

番号 No.	培地 Medium	シヤーレにならべてからの日数 Days after bedding		
		3	5	7
1	蒸溜水 Distilled water	19	20	—
2	胚をとりだした胚乳をつけた蒸溜水 Distilled water with their own endosperms	18	20	—
3	かわいたタネの胚乳をつけた蒸溜水 Distilled water with dried endosperms	19	20	—
7	抽出液 Extract ₂	19	20	—
6	抽出液 Extract ₅	15	18	20
5	抽出液 Extract ₁₀	15	18	20
4	抽出液 Extract ₂₀	6	15	15

Note: 1. Behavior of excised embryos is shown by an increase of "A" (see p. 22 of the second report).

2. These embryos were excised from the seeds treated under moist condition at 25°C for 3 months followed by 2°C for 2 months.

3. Dried seeds of the same origin were kept at room temperature.

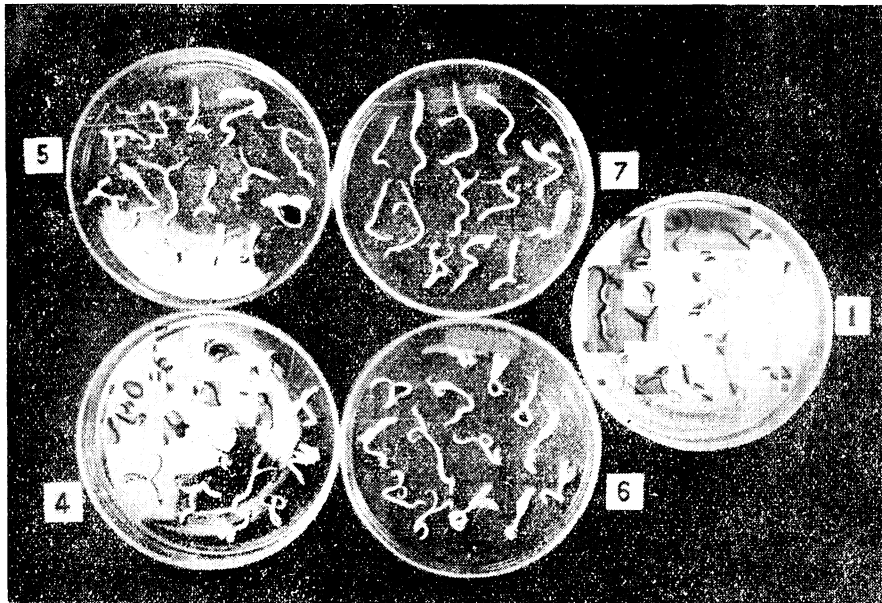


Fig. 1 いろいろな濃度の抽出液によるヤチダモの胚の成長
ペトリー皿につけてある番号は第2表にしるしてある。

Behavior of excised embryos in extracts of various concentrations, photographed on the 7th day after bedding in the experiment shown in Table 2, where the number of each petri dish is described.

るといちじるしくおくれることがわかった²⁾。そこでこのタネについては、とりだした胚の成長にたいする阻害作用をしらべた。この場合第2報にのべたように、みのつてからかわいたまま保存されたタネの胚は成長しにくいから、あらかじめ25°Cで3カ月、2°Cで2カ月処理したタネ——これは第5報に報告するはずの発芽促進実験のための材料の一部である——の胚をつかった。この実験の結果をしめすがTable 2である。胚乳の影響は処理された——自身の——胚乳でも、処理されない胚乳でもみとめられなかった。ところが果皮の抽出液は、かなりうすい液でも成長阻害をしめすことがわかる。ことに根の伸長成長がおさえられているらしく、Fig. 1にしめすように胚軸から幼根にかけての肥大成長は対照区(1)にまさっているようにおもわれるのに、ほとんどのびていないでいくから畸形的である。抽出液²⁰を培地にした胚(4)はしばらくしてくさってしまった。

3. 抽出液のいろいろな性質

こうして抽出液の発芽阻害——成長阻害——作用がたしかめられたので、液のなかで、この作用をになつている物質をつきとめるてはじめの実験をこころみた。これらの実験にも直接自身のタネをつかうことがのぞましいが、実験に時間がかかるうえに成長の程度のチガイはくらべにくいので、ずつとはやく、そろつて発芽し阻害作用をうけやすいヨリイカブのタネをつかう方法⁶⁾をえらんだ。石川はこのタネがかならずしも阻害作用をかんじやすくはないが、二、三の理由から阻害作用のあるなしをしらべるのにはてきしているとのべている。

1. 阻害作用をになつている部分をしらべる実験

シオジの果皮の水抽出液¹⁵を水道で24時間、ひきついで蒸留水で1時間透析したところ、原液で

は 26% しか発芽しなかつたのに透析した液では 100% 発芽した。すなわち、抽出液の阻害作用は透析によつてまったくうしなわれた。

ついで、3種類のイオン交換樹脂をつかつておなじ抽出液を酸性部分とアルカリ性部分にわけ、阻害作用がどちらの部分にあるかをしらべた。

まず、IRA 410 によつて酸性部分を吸着し、NaOH でこれをあらいとつて IR 120 をとおして酸性部分をわけた。アルカリ性部分は IRC 50 に吸着し、HCl であらいだしてから IRA 410 をとおしてわけた。このようにしてつくつた抽出液のいろいろな部分の阻害作用を Table 3 にしめす。

Table 3. シオジの果皮の水抽出液からわけられたいろいろな部分の発芽阻害作用
Germination inhibiting activity of various fractions separated from an aqueous extract of *F. Spaethiana* pericarps. Activity is shown by germination percent of *Brassica Rapa* seeds in each medium.

(I)

培地 Medium	発芽率 Germination percent
蒸溜水 Distilled water	100
抽出液 Extract _{7.5}	70
抽出液 Extract ₁₅	16
酸性部分をのぞいた抽出液 Extract ₁₅ without acid fraction	100
酸性部分 Acid fraction ₁₅	18
中和された酸性部分 Neutralized acid fraction ₁₅	96

(II)

培地 Medium	試験するまえの pH pH at the beginning	発芽率 Germination percent
蒸溜水 Distilled water	6.2	98
抽出液 Extract ₁₅	8.2	88
酸性部分をのぞいた抽出液 Extract ₁₅ without acid fraction	12.0	94
酸性部分 Acid fraction ₁₅	1.0	84
中和された酸性部分 Neutralized acid fraction ₁₅	7.0	82
アルカリ性部分をのぞいた抽出液 Extract ₁₅ without alkalic fraction	1.6	42
アルカリ性部分 Alkalic fraction ₁₅	12.0	100
クエン酸溶液 M/20 citric acid solution	1.0	30

Note: The extract₁₅ was withdrawn from the experiment shown in Table 1 (I), so its activity had been considerably lost and it was alkalinified a little.

2. pH と阻害作用の関係

抽出液をわけると pH がいちじるしくたかくなつたりひくくなつたりする (Table 3(II))。そこでこれらの阻害作用が pH の影響によるのかもしれないとかんがえ、いろいろな pH の緩衝溶液をつくつて発芽におよぼす影響をしらべた (日林誌36 (6), 155. Table 5)。その結果 pH の影響は溶液の濃度によつてちがひ、うすい溶液ではほとんどみられないことがわかつた。つぎの節にのべる滲透圧の値や酸性部分にふくまれている物質の量(6章参照)などから、まえの節の実験につかつた抽出液₁₅ の濃度は pH の影響をかんがえなければならぬほどこいものではないとおもわれる。

3. 抽出液の濃度と阻害作用の関係

筆者が阻害物質説をかんがえたのは果皮による

発芽遅延の説明としてである。したがって、ほとんどの実験は果皮の抽出液についておこなわれた。しかし、高樋・豊岡⁹⁾はヤチダモの発芽遅延に関連して胚乳のなかに発芽阻害物質があるかもしれないとかがえているし、Cox³⁾もヤチダモとおなじ発芽のシカタをしめすアメリカヤチダモの胚乳に阻害物質があると主張しているので、ここではタネの抽出液もつくつておなじ方法で実験をこころみた。また、阻害作用の原因をつきとめる一つの方法として、抽出される物質を単純にするためにエーテルによる抽出液もつくつた。Fig. 2 はヤチダモのそれぞれの抽出液の濃度と阻害作用の関係をしめしている。

4. 阻害作用と滲透圧の関係

水抽出液の阻害作用が滲透圧に影響されているかどうか、また Fig. 2 にしめされるように濃度がたかくなるにともなう阻害作用の増加が滲透圧と関係があるかどうかをしらべるために、水抽出液⁴⁰⁾の滲透圧を氷点降下法ではかつたところ、タネについては 3.6、果皮については 2.6 気圧という値がえられた。そこで、別にいろいろな滲透圧をもつたシヨ糖液をつくり、これらの液を培地として滲透圧と発芽との関係をしらべた。その結果 (日林誌 36 (6).157. Fig. 4), 5 気圧ぐらいまではほとんど影響がないことがわかつた。したがって、阻害作用は滲透圧にはよつていないとかがえてもよさそうである。

5. そのほかの 2, 3 の性質

水抽出液にみとめられる阻害作用は直火で沸騰させるとかなりみじかい時間でもうしなわれる。Fig. 3 はその過程をしめしている。阻害作用は光にたいしては安定であつた。また抽出液の pH は、発芽床のなかで試験のおわりまでになかくなる傾向がみられたが、このことは阻害作用がよつ液でとくにいちじるしかつた。

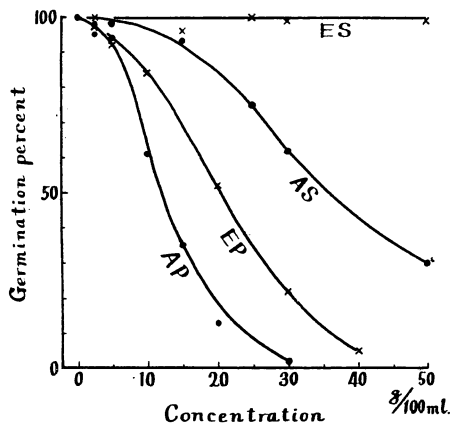


Fig. 2 抽出液の濃度と阻害作用の関係。AP, EP, AS, ES はそれぞれ果皮の水抽出液・エーテル抽出液、タネの水抽出液・エーテル抽出液をしめしている。

Relationship between inhibiting activity and concentration of extracts. AP, EP, AS, and ES indicate aqueous and ether extracts of pericarp, and aqueous and ether extracts of seed, respectively.

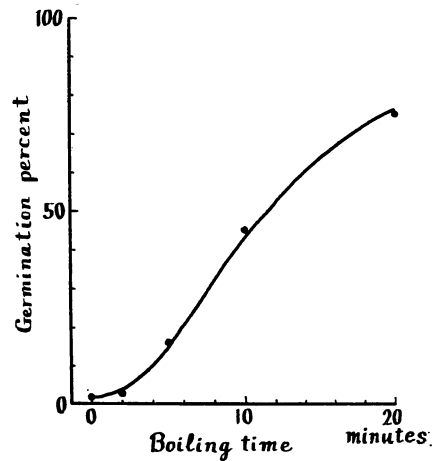


Fig. 3 ヤチダモの果皮の水抽出液の阻害作用が液をにることによつてよくなる過程。Boiling injury of inhibitors in aqueous extract of pericarp of *F. mandshurica* var. *japonica*.

Table 4. トネリコ属の4種のミの抽出液の阻害作用の比較
Comparison of inhibiting activities of extracts among four species in *Fraxinus* by an indicator of the germination percent of *Brassica Rapa* seeds.

抽出部分 Part extracted	抽出液 Extract		アラゲアオダモ <i>F. Sieboldiana</i> var. <i>pubescens</i>	シオジ <i>F. Spaethiana</i>	ヤチダモ <i>F. mandshurica</i> var. <i>japonica</i>	オウシウ ヤチダモ <i>F. excelsior</i>
	溶媒 Solvent	濃度 Conc. g/100ml				
果皮 Pericarp	蒸溜水 Distilled water	20	19	48	17	60
	エーテル Ether	30	31	27	82	17
タネ Seed	蒸溜水 Distilled water	20	7	14	26	49
	エーテル Ether	30	100	100	100	95

4. 阻害作用の種によるチガイ

第1報¹⁾であきらかにしたわがくにのトネリコ属植物のタネの発芽のシカタのチガイを、阻害物質によつて説明できるかどうかたしかめるために、4つの種について果皮とタネの水・エーテル抽出液の阻害作用をくらべた。Table 4 にしめた結果からは、発芽のシカタと抽出液の阻害作用のあいだに關係がみとめられない。

5. 阻害作用の消長

これまでのにべたことから、すくなくとも果皮にある阻害作用はこの属のタネの発芽遅延と關係がある

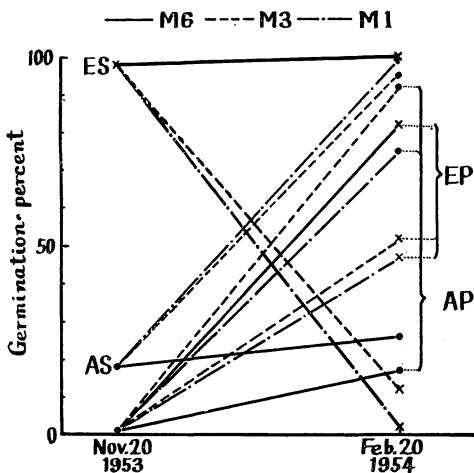


Fig. 4 前処理のあいだの阻害作用の消長
Rise and fall during pretreatments. Signs are common to Fig. 1. Pretreatments, M1, M3, and M6, are described at p. 20 of the second paper.

とかがえてもよさそうである。そこでヤチダモのタネを第2報²⁾ 2(1)(i) にのべた方法で前処理しているあいだに、この阻害作用がどのようにかわつたかを Fig. 4 にしめす。

6. かんがえられること

抽出液としてとりだされた阻害作用が自身のタネの発芽におよぼす影響は、かなりたかい濃度でないとならわれない。しかし、成長阻害はうすい抽出液でもはつきりみとめられ、とくに幼根の成長を阻害するものとおもわれる。この事実はヨリイカブによる実験にあたつてもみとめられた。このことは、第2報²⁾ のヤチダモのタネの前発芽——タネのなかでの胚の成長——についての実験とかがえあわせて、かなりたしかなことだとおもわれる。

抽出液にとりだされた阻害作用についていくつかの性質があきらかにされた。阻害作用は透析によつてかなりたやすくうしなわれるから、あまりおおきい分子量をもつた物質ではなさそうである。イオン交換樹脂によつて抽出液をわけた結果、阻害作用は液の酸性部分によつてになわれているらしい。ペーパー・クロマトグラフィーによれば、この酸性部分には 1 ml あたり、およそ 10 mg のクエン酸と、わずかのシウ酸がふくまれていた*。したがつて、2, 3 の樹木のミの果皮にふくまれている阻害作用について ROHMEDE⁷⁾ が報告しているように、このような有機酸が阻害作用に関係がありそうである。植物のいろいろな部分の抽出液がタネの発芽を阻害するという現象についてはかなりおおくの報告があるが、EVENARI⁵⁾ がのべているように、これらのうちのあるものは抽出液の滲透圧によつている場合がある。筆者は抽出液の滲透圧をはかつて、この点をたしかめたが、この場合には滲透圧は関係がないものとおもわれる。また、この阻害作用は 100°C 以上の熱をかけるとかなりたやすくうしなわれた。

阻害物質の作用と光との関係が報告されている⁸⁾ が、この場合には関係はないものとおもわれる。発芽試験の培地につかつた抽出液の pH は、試験しているあいだにたかくなる傾向をしめしたが、このことは抽出液をそのまま放置した場合にもいくらかみとめられた。石川⁹⁾ はホウレンソウの果皮にふくまれている阻害物質についての研究で、おなじような抽出液のアルカリ化を報告し、これが阻害作用とは関係がないとのべているが、一度培地につかつてアルカリ化したものの放置してアルカリ化したものの阻害作用がよわくなつていたからなにか関係がありそうである。

ヨリイカブをもちいる方法によれば、果皮、タネの水抽出液、果皮のエーテル抽出液はいずれも阻害作用があるが、第1報にのべた発芽のシカタとかがえあわせると、ヤチダモのタネ以外のタネの抽出液の阻害作用は発芽遅延とは関係がないはずである。

CROCKER⁴⁾ は、シメリケ層積処理が種皮にふくまれている阻害物質の溶出 (leaching) によい条件をあたえるとのべているが、Fig. 4 の結果はこのことをあきらかにしめしている。しかし、第2報 2(1)(ii) の Fig. 4 にしめされているように、阻害物質は溶出するまえに——おそらくタネの吸水にもなつて——影響をあらわすものとおもわれる。果皮の阻害作用をのぞく目的でおこなつた流水につける処理によつて、果皮自身からはかなりすみやかに——シオジではおよそ 20 時間で——溶出によつて阻害作用がうしなわれていたにもかかわらず、発芽促進に——または前発芽促進に——たいしたキキメがなかつたこととかんがえあわせると、このカンガエカタがただしいとしても、阻害作用をどのようにして、とりのぞくかは今後へのこされた問題である。

タネのエーテルにとける部分にははつきりした変化があらわれているが、このような前処理は発芽促進のキキメはなかつたので、すくなくとも現在のところこの変化におおきな意義をもとめることはできない。

この実験のあいだみちびいていただいた研究室長柳沢聰雄技官と、実験のこまかい方法をおしえていただいたりカンガエカタについていろいろみちびいていただいた生理研究室長長谷川正男技官にあつくお礼をもうしのべる。

7. あらまし

トネリコ属植物のタネの発芽遅延の原因の一つとしてかんがえられた発芽阻害物質について、抽出液に

* この分析は長谷川正男技官 (生理研究室長) にしていただいた。

とりだして2, 3の性質をあきらかにした。果皮の水抽出液のなかには, ヤチダモの胚の成長を阻害し, ほかのわがくにトネリコ属植物のタネの発芽を阻害する, 熱にかなりよわいわりあいに分子量のちいさな酸性物質がみつめられた。

文 献

- 1) 浅川澄彦: 林試報, 83. (1956) p. 1~18.
- 2) ———: 林試報, 83. (1956) p. 19~28.
- 3) COX, L. G.: Ph. D. Thesis. Cornell Univ. (1942) p. 186~254.
- 4) CROCKER, W.: Growth of Plants. New York (1948) p. 105.
- 5) EVENARI, M.: Bot. Rev. 15. (1949) p. 159~160.
- 6) 石川茂雄: 植物学雑誌, 64. (1951) p. 120~125.
- 7) ROHMEDER, E.: Beiträge zur Keimungsphysiologie der Forstpflanzen. (1942) p. 7~14.
- 8) SIEGEL, S. M.: Science 112. (1950) p. 754.
- 9) 高樋 勇・豊岡 洪: 日林北支講, 1. (1952) p. 1~5.

Studies on the Delayed Germination of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* Seeds. (3)
On the growth inhibitors in *Fraxinus* fruits.
Sumihiko ASAKAWA

Résumé

In the first report¹⁾ the writer has described the germination manner of seeds of the Japanese species in *Fraxinus*. With particular reference to the delayed germination of *F. Spaethiana* seeds by their pericarps, he has assumed the presence of some germination inhibitors in their pericarps. Such ideas have been already proposed by COX²⁾ with *F. nigra*, *F. americana*, and *F. pennsylvanica* seeds, who has supposed the inhibitors to be involved in their endosperms. About materials used by the writer, nothing as yet has been ascertained as regards the relation between the inhibiting activity of aqueous extract of seeds and their germination. So in this report the inhibitors in pericarp are mostly discussed.

1. Materials and methods

Most materials are similar to those used in the first report, but seeds used in the experiment shown in Table 3 are 1954 crops. The procedure of preparing an extract was as follows: Samples were immersed in a given volume of distilled water, heated (ca. 90°C.) on a water-bath for half an hour to 2 hours, incubated at 40°C. for 24 hours, and then filtered. On the other hand, an ether extract was prepared by immersing samples in a given volume of ether, decanting after keeping in 5°C. refrigerator for 24 hours, evaporating on a water-bath, and dissolving the residue in a given volume of distilled water. A concentration of an extract is shown by gram number "n" of extracted samples per 100 ml. of extract, and represented by the extract_n. In experiments of chapter 3, 4, and 5, an inhibiting activity in an extract is shown by means of the germination percentage of seeds of the Yorii variety of *Brassica Rapa* in 2 days, and an extract is one from the pericarp.

2. Inhibiting activity of aqueous extract of pericarp

When dewinged seeds of *F. Spaethiana* were germinated in pericarp extracts of various concentrations, they yielded results as shown in Table 1. Strong inhibiting activity for germination was found only in concentrated extracts. Diluted extracts, however, were proved to inhibit the growth—especially elongation—of radicles. The latter property was observed in the experiment with excised embryos of *F. mandshurica* var. *japonica* seeds, too (Table 2 and Fig. 1).

3. Some properties of extracts*

(1) Determination of fraction including inhibitors.

The aqueous extract₁₅ of *F. Spaethiana* pericarp was dialysed against tap-water for 24 hours and distilled water for an hour. This dialysis resulted in the loss of inhibiting activity, so some substances of relatively low molecular weight are involved in the inhibition. Moreover, the extract₁₅ was fractionated by using three kinds of amberites, i. e. IRA 410, IR 120, and IRC 50. Activity of each fraction is shown in Table 3. The acidic fraction contained about 10 mg. citric acid and trace of oxalic acid per ml. according to paper

* Details about these experiments are shown in Jour. Jap. For. Soc. 36 (6). 153—159. 1954.

chromatography, which seem to carry the inhibiting activity of extract of the pericarp.

(2) Inhibiting activity and pH of medium.

As fractionating has resulted in a marked shift of pH , an effect of pH on germination was tested. In consequence, germination was proved to be affected more strongly by the concentration than by pH of solution. Accordingly an inhibition by pH cannot be caused in extract₁₅.

(3) Concentration of extract and its inhibiting activity.

Of *F. mandshurica* var. *japonica*, aqueous and ether extracts of pericarps or seeds—seed coats, endosperms, and embryos—showed the inhibiting activities as given in Fig. 2 in various concentrations.

(4) Ascertaining whether an inhibiting activity is due to an osmotic pressure of extract or not.

Aqueous extract₄₀ of pericarp or seed of *F. mandshurica* var. *japonica* was proved to have 2.6 or 3.6 atmospheres, respectively, by means of measuring the depression of freezing point. As no inhibition for germination was found even at 5 atmospheres in the experiments with sucrose solution of various osmotic pressures, an inhibiting activity of extract is thought to have no connection with its osmotic pressure.

(5) Other properties.

An inhibiting activity is easily destroyed by boiling (Fig. 3), but is not affected by light. Moreover, the inhibiting mechanism may have some connection with mechanism controlling pH of an extract.

4. Difference among species of inhibiting activities

Inhibiting activities of extracts were compared among four species in *Fraxinus* (Table 4). This result suggests that the markedly delayed germination of *F. mandshurica* var. *japonica* seeds cannot be explained by only “inhibitors”.

5. Rise and fall of inhibitors

Rise and fall of inhibitors during pretreatments, described in 2. (1). (i) of the second paper²⁾, are shown in Fig. 4. Inhibiting activity in the pericarp falls with the advance of treating, which is thought to be due to leaching.

The writer expresses his cordial thanks to Mr. T. YANAGISAWA and Mr. M. HASEGAWA for their kind coaches and advices, and to Dr. L. G. COX for his kindness that he gave the writer an opportunity of reading his thesis.