

リンゴ果実の早期落果に関連する種子内インドール 化合物の組織内分布と組織化学的定量¹

福井博一・今河 茂・田村 勉

北海道大学農学部 060 札幌市

Histochemical Observation and Quantitative Analysis of Indole Derivatives in Apple Seeds in Relation to Early Drop of Fruit

Hirokazu FUKUI, Shigeru IMAKAWA and Tsutomu TAMURA

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

Summary

A correlation between early drop of fruit and indole derivatives was investigated using histochemical techniques. *In vitro* and *in vivo*, the indole derivatives formed a blue pigment with a peak of absorbancy at 618 nm by *p*-dimethylaminobenzaldehyde-nitrite reaction and a correlation between the concentration of the pigment and absorbancy at 620 nm was observed. At all stages of seed development the embryo was found to give a strong reaction while the endosperm gave a weak or no reaction, and the nucellus gave a moderate reaction. The relative content of indole derivatives in the embryo, endosperm and nucellus tissue was calculated. The relative content of these derivatives in embryos was very low until the 50 th day after full bloom, but showed a marked increase between the 50 th and the 90 th day, and remained at a very high level until harvest. The relative content in the endosperm and nucellus tissue was very low in all stages.

Early drop of fruit was enhanced by a high night temperature (25°C) for 30 days beginning on the 10 th day after full bloom. A reduced rate of fruit enlargement for two days was utilized to distinguish potential drop fruits. Potential drop fruits abscised within 6 to 10 days after that distinction. Fruit drop process was divided into four stages (potential drop fruit stage A, stage B, stage C and abscission). Since no difference in the concentration of indole derivatives was recognized between fruits of stage A and the persistent one, the indole derivatives are considered to have no correlation with early drop of fruit.

緒 言

種子は果実の初期発育において重要な役割を果たし(15), 良好な着果を得るためには種子数の多いことが不可欠である。種子では, オーキシン(11), ジベレリン(2), サイトカイニン(8)などの生長促進物質が生産され, 果実の発育を制御している。なかでもオーキシンはNitsch(14)によってその作用が明らかにされ, 果実の発育には極めて重要な物質であることが知られている。Luckwill(9)は, 早期落果とこの種子内オーキシンとの関係について研究し, 落果した果実のオーキシン活性は正常果のそれより低いことを見出し, 早期落果はこのオーキシン活性の低下によって生ずるのであろうと述べ

ている。しかし, この報告では落果した果実内のオーキシン活性を測定しているため, この結果から落果の原因としてオーキシンの活性低下を挙げることは困難であると考えられる。筆者らは, 定期的な果径の測定によって落果の6~10日前にそれが予測できることを明らかにしたが(5), この方法によって落果を予測した果実を材料とすることにより, この早期落果とオーキシンの関係をより明らかにすることができると考え, 正常果と落果するものとのオーキシンの消長について比較検討した。

Adams(1)は, 組織化学的手法を用い, ネズミの内臓組織内のインドール化合物の分布について報告している。そこで本研究では, この手法を用いてインドール化合物の種子組織内分布を観察し, さらに, それらの組織

¹ 1984年3月9日 受理

内濃度を定量することによって、オーキシンが合成される部位を推定するとともに、早期落果との関係についても調査した。

材料及び方法

北海道大学農学部附属農場に栽植されている 11 年生‘旭’を実験樹として用いた。

実験 I. 種子組織内のインドール化合物の分布とその定量

満開後 30 日目から 10 日ごとに種子を採取し、 -30°C のフリーザーに保存した。

種子からクリオスタットで $40\ \mu\text{m}$ の 2 枚の無固定凍結切片を作製し、室温で空気乾燥した。そのうちの 1 枚については、*p*-dimethylaminobenzaldehyde (*p*-DMAB)-nitrite 反応を行った。

p-DMAB-nitrite 反応

1. 濃塩酸 (比重 1.18) に 5% の割合で溶解した *p*-DMAB 溶液に 1 分間入れる。
2. 濃塩酸に溶かした 1% の亜硝酸ナトリウム溶液に 1 分間入れる。
3. 流水中で 5 分間水洗後、アルコールで脱水し、キシロールを通してカナダバルサムで封入する。

もう一枚はマイヤーの酸性ヘマラウンで染色後脱水、封入し、形態を観察した。各採取日における胚、胚乳及び珠心の形態的特徴は、第 1 表に示すとおりである。

In vitro での吸収スペクトルの測定

インドール酢酸 (IAA) を 70% エタノールで溶解し、その 1 ml に濃塩酸中に 5% の *p*-DMAB を含む溶液 9

ml を加え、さらに 0.05 g の亜硝酸ナトリウムを加えた。吸収スペクトルは日立 200-20 型分光光度計で測定した。

組織中での吸光度測定

胚、胚乳及び珠心組織内の 620 nm での吸光度を、オリンパス MMSP 型顕微分光光度計で測定した。測定はスキャンニング法を用い、測定値は 50 反復 (5 反復 \times 10 種子) の平均値を用いて表わした。

実験 II. 早期落果と種子内インドール化合物との関係

前報(5)に従い、‘サマーレッド’の花粉を人工授粉した後、樹体全体をビニルハウスで覆い、満開後 10 日目から 30 日間午後 6 時から午前 6 時の間ハウス内を 25°C 一定とする夜間加温処理を行い、早期落果を促した。2 日ごとの果径測定によって 2 日間の果径増加量を算出し、その値を用いて落果の 6~10 日前に落果する果実を判定し、それを落果判定果 A (potential drop fruit stage A) とした(5)。正常果 (persistent fruit) と落果判定果 A を随時採取し、採取直後に果実から種子を取り出し -30°C で保存した。実験 I と同様に無固定凍結切片を作製後、*p*-DMAB-nitrite 反応を行い、顕微分光光度計を用いて組織内吸光度を測定した。

結果

実験 I. 種子組織内インドール化合物の分布とその定量

p-DMAB-nitrite 反応で形成された色素の性質
インドール化合物は、第 1 図に示すような縮合反応を

Table 1. Morphological characteristics of the different parts of a seed.

Sampling date (days after full bloom)	morphological characteristic		
	embryo	endosperm	nucellus
30	spherical embryo	free nuclear endosperm	many mitosis
40	heart-shaped embryo	cellular endosperm	enlargement of cells degeneration of nucellus
50	spindle-shaped embryo	enlargement of cells (Inner part is absorbed by embryo. Outer part has meristematic activity.)	Broken down and absorbed by endosperm
60-130	full size	Endosperm and nucellus were broken down and disappeared.	

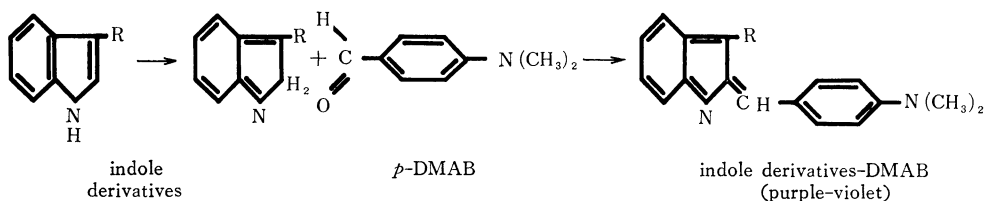


Fig. 1. Suggested reaction between indole derivatives and *p*-DMAB (modified from Glenner and Lillie (6)).

行い青紫色の物質を形成した。IAA の標準試薬を *in vitro* で *p*-DMAB と反応させ、形成された色素の吸収スペクトルは、第2図に示すように 580nm から 630nm にかけての緩やかなピークを持っていた。また、620nm

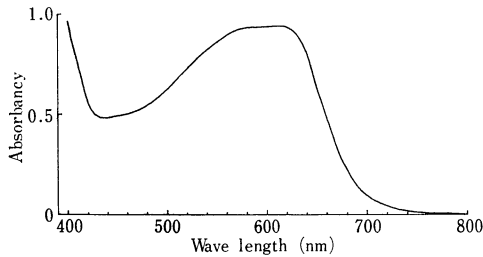


Fig. 2. Absorption spectrum of IAA ($10^{-3}M$).

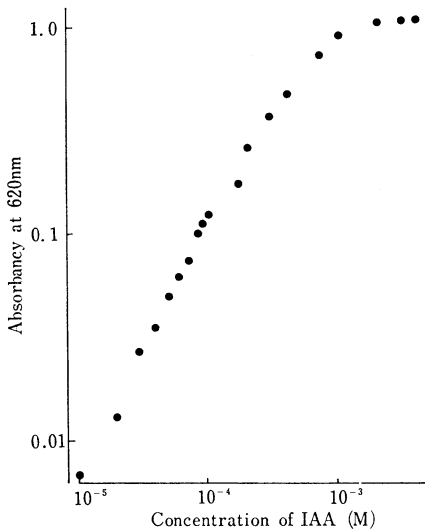


Fig. 3. Relation between the concentration of IAA and absorbancy at 620 nm.

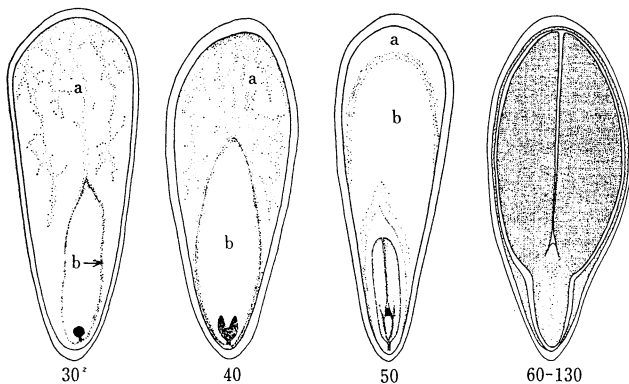


Fig. 4. Distribution of blue pigmentation by *p*-DMAB-nitrite reaction. (The dotted part indicates the existence of blue pigment.) a : nucellus b : endosperm
* Days after full bloom.

の吸光度は第3図に示すように $10^{-3}M$ 以下の濃度で IAA と相関が認められ、吸光度を用いた定量が可能であることが明らかとなった。

組織化学的観察及びインドール化合物の組織化学的定量

いずれの发育段階の種子も、種皮は赤い色素を形成した。

各採取時期の種子切片の呈色状態を第4図に、そして、各組織の 620nm の組織内吸光度を第5図に示した。すべての发育段階の胚は、インドール化合物の存在を示す濃い青紫色色素を形成し、その吸光度は他の種子内組織と比べてかなり高かった。満開後30日目の球状胚の状態の胚では極めて強い反応がみられ、その吸光度は0.80と高かった。しかし、心臓型胚(満開後40日目)、紡錘型胚(同50日目)と胚が发育するに従いその高い呈色性は弱まり、吸光度は0.06となった。その後、胚の发育と共に吸光度は再び上昇し、満開後90日目には0.65となり、110日目以後は0.74を示して一定した。第4図に示すように、満開後50日目の胚の呈色状態は60~130日目にそれと幾分異なっており、50日目のものでは生長点組織と維管束組織が他の部分より強く呈色したのに対し、60日目以後のものでは逆にそれらの部分の呈色性は弱かった。また、成熟胚の子葉では極めて濃い呈色反応が見られた。

遊離核の状態の胚乳(満開後30日目)はかなり強い反応を示し、その吸光度は0.12であったが、細胞質の状態に形態が変化するとほとんど反応がなくなった。しかし、珠心組織との境界面では、細胞質胚乳となった後も中程度の呈色が観察された。胚乳組織は胚の发育に伴い胚によって消化、吸収され、満開後60日目には組織のほとんどが崩壊していた(第1表)。

珠心組織は、種子の发育初期において中程度の呈色が認められたが、満開後50日目以後では胚乳組織によって消化され、組織は崩壊し、ほとんど呈色しなくなった。

胚、胚乳及び珠心の体積を回転した円体の体積の求め方を用いて近似的に算出し、それに 620nm の吸光度の値を掛け合わせた値をインドール化合物含量相対値として表わし第6図に示した。胚のインドール化合物含量相対値は満開後60日目までは極めて小さかったが、それ以後急激に増大し、満開後90日目には95となった。しかし、その後含量相対値の増加は衰え、110日前後でその値は一定した。胚乳及び珠心組織のインドール化合物含量相対値は、いずれの時期

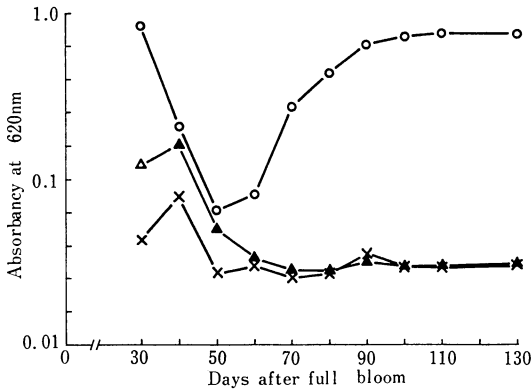


Fig. 5. Relative concentration of indole derivatives
○: embryo, △: free nuclear endosperm,
×: nucellus, ▲: borders of nucellus and
endosperm.

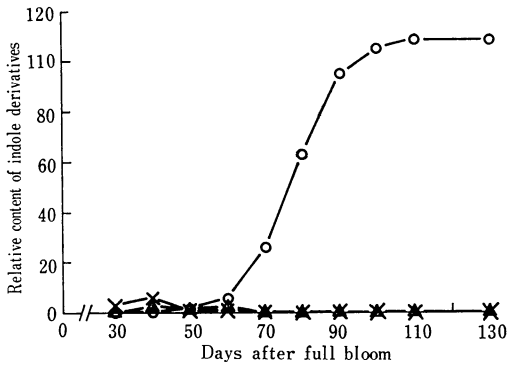


Fig. 6. Relative content of indole derivatives.
○: embryo, △: endosperm, ×: nucellus.

でも非常に低い値で推移した。

実験 II. 早期落果と種子内インドール化合物との関係

実験 I の結果からインドール化合物の多くは胚に含まれ、早期落果が発生するときの果径が 10~20mm の時期(対照区では満開後30日目前後)の胚では極めて高い *p*-DMAB-nitrite 反応が認められたことから、正常果(persistent fruit)と果径増加量の減少によって、落果が予測された落果判定果 A (potential drop fruit stage A) の胚のインドール化合物の量的な差を 620nm の吸光度を用いて調べた結果が第 7 図である。正常果と落果判定果 A との間にはほとんど差が認められず、インドール化合物は早期落果と関係がないと考えられる結果が得られた。

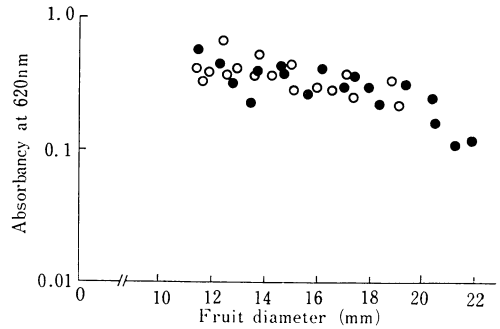


Fig. 7. Correlation between fruit drop and indole derivatives in embryos.

●: persistent fruit,
○: potential drop fruit-stage A (5).

考 察

Ehlich 試薬を用いたインドール化合物の組織化学的検出法は、Adams(1), Glenner(7), Glenner and Lillie(6) によって種々開発され、動物組織に対しては多くの応用例が報告されている。しかし、植物組織についてのものは今までのところ見当たらなかった。これらの方法はいずれも一長一短があり、それぞれの検出法の適用を試み、比較検討を行う必要があるが、本報では、強酸処理による組織の傷みが激しい欠点はあるものの、高い感応性と特異性を持っている Adams(1) の *p*-DMAB-nitrite 反応による検出法を用いた。この方法は *in vitro* では第 1 図に示すように、検出されるインドール化合物が青紫色色素の分子の骨格を形成しているために、その呈色の特異性は極めて高く、*p*-DMAB は他のフェノール類や芳香族アミンとも反応して縮合物を生成するが、それらは黄色又は桃色を呈し、青紫色となることはない(1)と報告されている(1)。

しかし、組織化学への応用の場合は、組織から易溶性のインドール化合物が反応の過程で流失する可能性が高く、この呈色法で検出される物質はトリプトファンや組織と結合した難溶性のインドール化合物のみであるので、組織内の全インドール化合物を検出することはできないと考えられる。内生オーキシン的一种であるインドール酢酸は組織からの易溶性が高いが、トリプトファンから合成されることが知られ(3)、組織内のトリプトファンや組織結合性のインドール化合物の量は、インドール酢酸(内生オーキシン)の量と関連性が高いと考えられるので、以下この考え方に基づいて考察を進めることにする。

第 4 図及び第 5 図に示した結果から、胚組織内のインドール化合物の濃度は極めて高く、オーキシンであるイ

インドール酢酸の生合成は主に胚で行われていることが推測された。また、その濃度は満開後30日目の発育段階の初期と、満開後70日目以後の胚が full size に達した時期に高かった。Luckwill(9, 10) は、オーキシンを抽出、定量し、その消長が胚乳の形態的变化と一致することから、オーキシンは細胞質状態の胚乳に由来していると述べている。しかし、この方法では、種子全体からオーキシンを抽出しているため、その由来組織を限定することは難しい。さらに、Luckwill(9) はオーキシンの胚乳由来の証明として、8月12日(満開後80日目前後と考えられる)の種子の胚乳組織のオーキシン活性が高いことを挙げているが、第1表に示すようにこの時期の胚乳は、胚の発育に伴いほとんどが消化吸収されて、組織が崩壊しているため、この考え方には疑問が残る。また、第4図に示すように、細胞質の状態の胚乳組織にはインドール化合物の存在がほとんど認められなかった。しかし、リンゴ種子には Ehrlich 反応では検出できない非インドール型オーキシンの存在が認められており(11)、このオーキシンが特異的に胚乳で合成されている可能性もあり、今後この物質について詳細に検討する必要があると考えられる。リンゴ種子のオーキシン活性は、胚が full size に達した後急激に低下すると言われている(9)。しかし、第6図に示したように、インドール化合物含量相対値は最大値に達した後一定し、減少は見られなかった。したがって、種子発育後期のオーキシン活性の低下は、合成されたインドール酢酸が組織結合型インドール化合物などの不活性型となり、ジベレリンの例のように胚に蓄えられたことによると考えられる。

Luckwill(10) は落果した果実 (abscised fruit) と正常な果実 (picked fruit) のオーキシン活性を測定し、落果した果実のオーキシン活性は正常果の 1/3 以下であると報告している。しかし、この結果は既に樹体を離れて落果した果実内のオーキシン活性を測定したものであるために、この結果からオーキシンの活性低下が落果の原因であるとする考えは支持し難い。果径増加量の変化を用いる落果判定によれば、落果の6~10日目の落果過程の初期段階で調査を行うことが可能である(5, 17)。この方法で落果を予測し、落果判定果と正常果のインドール化合物含量の差をみたものが第7図である。落果判定果の胚のインドール化合物の組織内濃度は、正常果のそれとほとんど差がなく、胚のインドール酢酸合成能は両者の間で差がないと考えられた。Weinbaum and Simons(16) は胚の RNA, DNA たん白質及びでん粉量を組織化学的に調査し、落果判定果の胚は正常果のものとは生理的に何ら差が認められないと述べている。また同

様に、筆者ら(4) は胚の退化は早期落果の原因ではないことを観察している。したがって、早期落果は胚に由来するオーキシンの活性低下によって起こるものではなく、胚乳及び珠心組織に由来する他の物質によって引き起こされると考えられる。Murneek(12) もまた、早期落果は胚乳組織の発育不全に起因する現象であると述べている。今後、胚乳組織とそこで合成されると言われるサイトカイニンやジベレリンについて、落果との関係を検討する必要がある。

摘 要

組織化学的手法を用いて、種子中のインドール化合物の組織内分布及び早期落果との関係について調査した。*in vitro* においても組織内においても、インドール化合物は *p*-dimethylaminobenzaldehyde-nitrite 反応によって 618nm に吸収極大を持つ青紫色色素を生成した。胚はすべての発育段階において、インドール化合物の存在に基づく強い呈色反応を示した。しかし、細胞質状態の胚乳ではほとんど反応が見られず、インドール化合物の存在が認められなかった。珠心組織は中程度の反応を示したが、満開後50日目までに組織が崩壊した。胚、胚乳及び珠心組織のインドール化合物含量相対値を算出し、各組織ごとにその消長を調査した。胚の含量相対値は満開後50日目までは極めて低い水準であったが、それ以後90日目にかけて急激に増加して高い値となり、その後収穫日まで変わらなかった。胚乳及び珠心のインドール化合物含量相対値は、全期間低い値で推移した。果径増加量の変化によって、落果が予測された果実の胚のインドール化合物含量と正常果のそれとの間には差がみられず、胚由来のインドール化合物は早期落果と無関係であると考えられた。

引用文献

1. ADAMS, C. W. M. 1957. A *p*-dimethylamino-benzaldehyde-nitrite method for the histochemical demonstration of tryptophane and related compounds. *J. cli. Path.* 10 : 56—62.
2. DENNIS, F. G. Jr. 1976. Gibberellin-like substances in apple seeds and fruit flesh. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101 : 629—633.
3. ERDMANN, E. and U. SCHIEWER. 1971. Tryptophan-dependent indoleacetic-acid biosynthesis from indole, demonstrated by double-labeling experiments. *Planta* 97 : 135—141.
4. FUKUI, H., S. IMAKAWA and T. TAMURA. 1984. Relation between early drop of apple fruit and embryo development. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 61 : 399—407.
5. 福井博一・今河茂・田村勉. リンゴの早期落果とエチレン生成及び離層形成との関係. 園学雑. 投

- 稿中。
6. GLENNER, G. G. and R. D. LILLIE. 1957. The histochemical demonstration of indole derivatives by the post-coupled *p*-dimethylaminobenzylidene reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 5 : 279—296.
 7. GLENNER, G. G. 1957. The histochemical demonstration of indole derivatives by the rosindole reaction of E. Fischer. *J. Histochem. Cytochem.* 5 : 297—306.
 8. LETHAM, D. S. and M. W. WILLIAMS. 1969. Regulators of cell division in plant tissues. VIII. The cytokinins of the apple fruit. *Physiol. Plant.* 22 : 925—936.
 9. PUCKWILL, L. C. 1948. The hormone content of the seed in relation to endosperm development and fruit drop in the apple. *J. hort. Sci.* 24 : 32—44.
 10. LUCKWILL, L. C. 1953. Studies of fruit development in relation to plant hormones. I. Hormone production by the developing apple seed in relation to fruit drop. *J. hort. Sci.* 28 : 14—24.
 11. LUCKWILL, L. C. 1957. Studies of fruit development in relation to plant hormones. IV. Acidic auxins and growth inhibitors in leaves and fruits of the apple. *J. hort. Sci.* 32 : 18—33.
 12. MURNEEK, A. E. 1954. The embryo and endosperm in relation to fruit development, with special reference to the apple, *Malus Sylvestris*. *Pro. Amer. Soc. Hort. Sci.* 64 : 573—582.
 13. 中川昌一. 1978. 果樹園芸原論——開花・結実の生理を中心として——. p.316—325. 養賢堂. 東京.
 14. NITSCH, J. P. 1950. Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *Amer. J. Bot.* 37 : 211—215.
 15. 大川勝徳. 1974. 果樹における結実と植物ホルモン. 植物の化学調節. 9 : 87—94.
 16. WEINBAUM, S. A. and R. K. SIMONS. 1974. Histochemical appraisal of the relationship of seed abortion to chemical induction of apple fruit abscission following bloom. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99 : 266—269.
 17. WEINBAUM, S. A. and R. K. SIMONS. 1974. An ultrastructural evaluation of the relationship of embryo/endosperm abortion to apple fruit abscission during the post-bloom period. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99 : 311—314.