

桑樹内生ジベレリン様物質の存在に関する研究

八尋正樹・児玉宗久

(熱帯作物学研究室)

昭和53年8月31日 受理

Studies on the Presence of Endogenous Gibberellin-like Substances in the Mulberry Tree, *Morus latifolia* Polet

Masaki YAHIRO and Munehisa KODAMA

(Laboratory of Tropical Crop)

緒 言

Mitchell ら¹²⁾ は、ある種の豆の種子のエーテル抽出物が、葉の伸長や幼植物の生長促進などの生理活性を示すことを見いだして高等植物中にもジベレリン様物質が存在するであろうことを示唆した。以後、数人の研究者が豆類の未熟種子からジベレリン様物質の単離に成功した。しかし、高等植物において、種子以外の部分からジベレリンを単離、同定したのは、Kawarada ら¹²⁾が最初で、彼らは温州みかんの徒長枝の抽出物からジベレリン A₁ を単離、同定した。その後、多くの研究者により、多くの植物の種々な部分から、多くの種類のジベレリンが単離された¹²⁾。

桑樹の種々な生理作用^{1-5,7-11,13)} に関与しているであろうと推察される内生のジベレリンについて、まだ、その存在を報告した実験例をみない。そこで、著者らは地上部の生長点部分を用い、ジベレリン様物質が存在するか否かについて実験方法を検討してきたが、1978年にその存在を確認したので報告する。

材料および方法

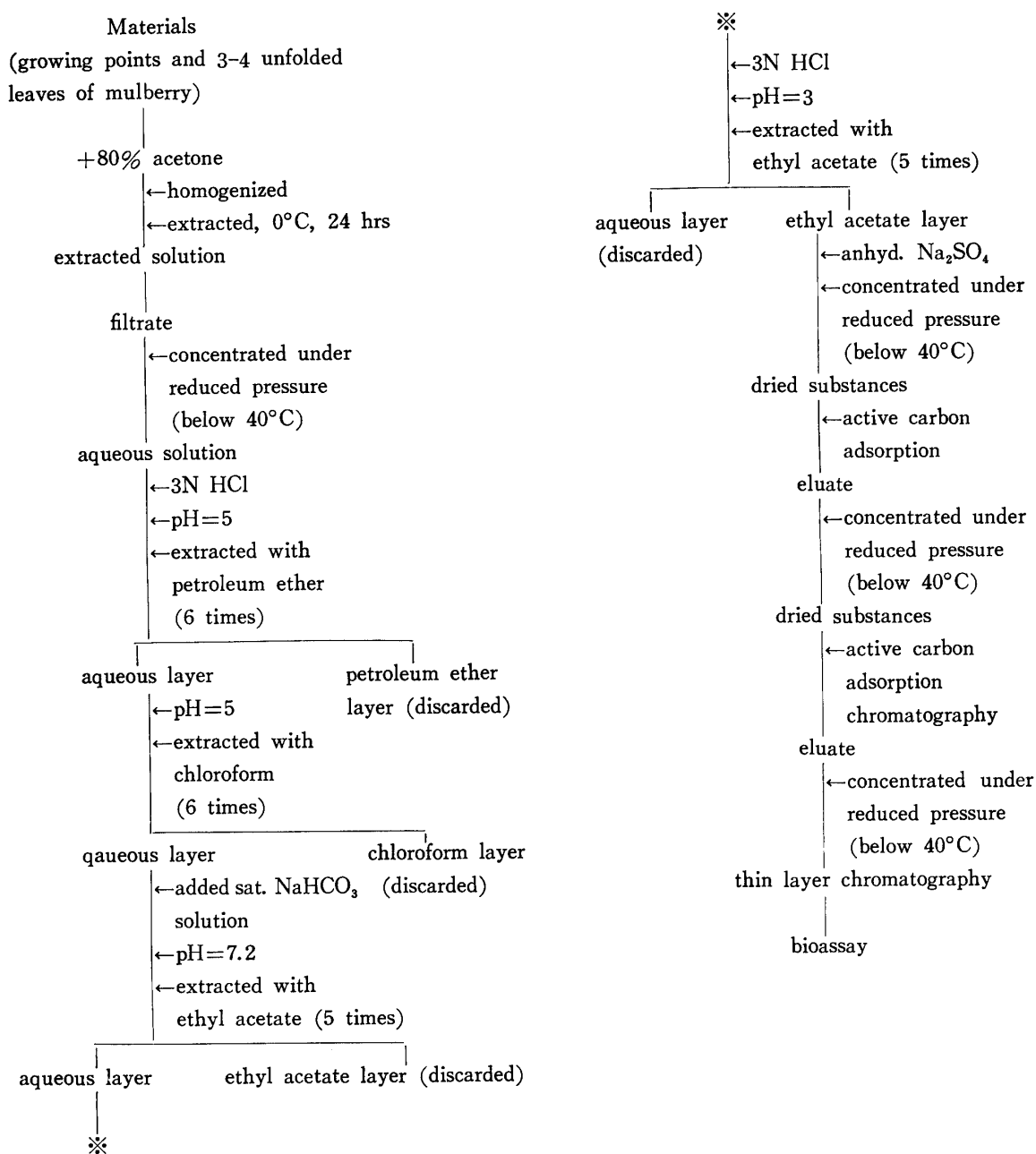
本実験は、材料の採取時期および実験方法の幾らかの相違により実験 1, 2, 3 に分けられるが、実験 3 を主体として報告する。

実験 3 は鹿児島大学農学部桑園に栽培中の植付後、約15年生の品種大島桑(ろ桑型)、根刈仕立て、春刈後条長約 90cm に生長した桑樹につき、生長点を含めた先端 3~4 開葉までの部分 1kg が 1978年6月13日に採取され材料として用いられた。

材料は採取直後生量を測定し、80%アセトンと共にミキサーでホモジナイズし、生量の約3倍量の80%ア

セトンで、0°C、24時間抽出した。抽出材料はろ過し、ろ液のアセトンは 40°C 以下で減圧濃縮し、少量の水溶液とした。この水溶液は、生長抑制物質や葉緑素、脂肪を除くため、前処理として 3N 塩酸で正確に pH=5 に調整し石油エーテルで6回抽出した。水層は pH=5 であることを確認後、更にクロロホルム⁶⁾ で6回抽出した。水溶液は飽和重曹液を加えて pH=7.2 とし、酢酸エチルで5回抽出後、得られた中性酢酸エチル可溶分画層は今回の実験では対象からはずした。一方、水層は 3N 塩酸で pH=3 とし、酢酸エチルで5回抽出した。このようにして得られた酸性酢酸エチル可溶分画は無水硫酸ソーダで脱水後 40°C 以下で減圧濃縮し、乾固物質 5.4g を得た。この乾固物質は色素等を除くため 100% アセトンで溶解し、蒸留水を加えてアセトン濃度を10%とし、活性炭に吸着させ、100%アセトンと 100% メタノールで溶出されてくるものを集めた。この両溶出液は一緒にし、40°C 以下で減圧濃縮し、乾固物質 2.3g を得た。この乾固物質につき活性炭吸着クロマトグラフィ法を適用した。溶出液にはアセトン 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%および 100% メタノールを用いた。予備実験の結果よりジベレリン様物質の活性をほとんど認めなかった 10, 20, 30, 40, 90, 100%アセトンおよび 100%メタノール溶出分画は以後の実験では省略された。活性の認められた 50, 60, 70, 80%アセトン溶出液につき 40°C 以下で減圧濃縮し、それぞれシリカゲル薄層クロマトグラフィ法(200 μ m の厚さ)を用い、ジベレリン様物質を分離した。展開液はクロロホルム(20):酢酸エチル(8):酢酸(1)で、15cm 展開し、風乾して10等分し、各分画の物質を含むシリカゲルをかきとり、3ml のアセトンを加えて溶出ろ過し、ろ液

Table 1. Extraction and fractionation of gibberellin-like substances in mulberry tree



を直径 3cm, 高さ 13cm のガラス製の管ビンに入れ, 蒸発させ, 2ml の蒸留水で溶出した. この溶出液 (A) につき常法通り生物検定を行ない, ジベレリン様物質の活性を調べた.

生物検定には矮性水稻の短銀坊主種子を用いた. 種子は 80% エタノールで 30 秒, 次に, 0.2% 昇汞水で 3 分消毒し, 滅菌水で充分洗い, 吸水後シャーレに置床し, 30°C, 照度 1500 ルツクスの定温器内においた. 置床後 2 日目に 2mm に発芽, 5mm に発根した種子を溶出液 (A) の入った管ビンに 10 個体ずつ入れ, ビニール

で封じ, 前述の定温器に入れ, 7 日後に第二葉鞘の長さを物指しで測定し, 対照と比較してジベレリン様物質の存在を調べた (Table 1).

実験 1 は 1978 年 4 月 10 日に実験 3 と同じ桑樹の春の発芽時期 (燕口期から第 4 開葉期まで) の材料 1kg を用い, 実験 3 と同じ抽出精製法で行なった. ただし, 実験 3 は薄層クロマトグラフィ法を用いたが, 実験 1 ではペーパークロマトグラフィ法を用いた点が異なった. この際, 活性炭吸着クロマトグラフィ法のアセトン 60% の溶出物質が多量のため, 物質を 3cm 幅のペ

一パーの原線にスポットする場合、ペーパー1枚が3枚に増加したため、ペーパーから物質を溶出する場合、蒸溜水 2ml 加えるところを 3ml 加えたためジベレリン様物質の濃度を低下させることになった。アセトン 70% 溶出分画も同様の理由で蒸溜水 4ml が加えられた。展開液はイソプロパノール (10):アンモニア (1):水 (1) であった。

実験 2 は 1978 年 5 月 15 日に材料 1kg を採取した。実験 3 と同一の桑樹を用い、春刈後条長約 50cm に生長した生長点および第 2~3 開葉までを含む部分を材料とした。抽出および薄層クロマトグラフィ、生物検定は実験 3 と同じ方法で行なったが、精製途中の石油エーテル、クロロホルム抽出の操作は行なわなかった。

結果および考察

実験 3 の結果は Fig. 3 に示すように、活性炭吸着

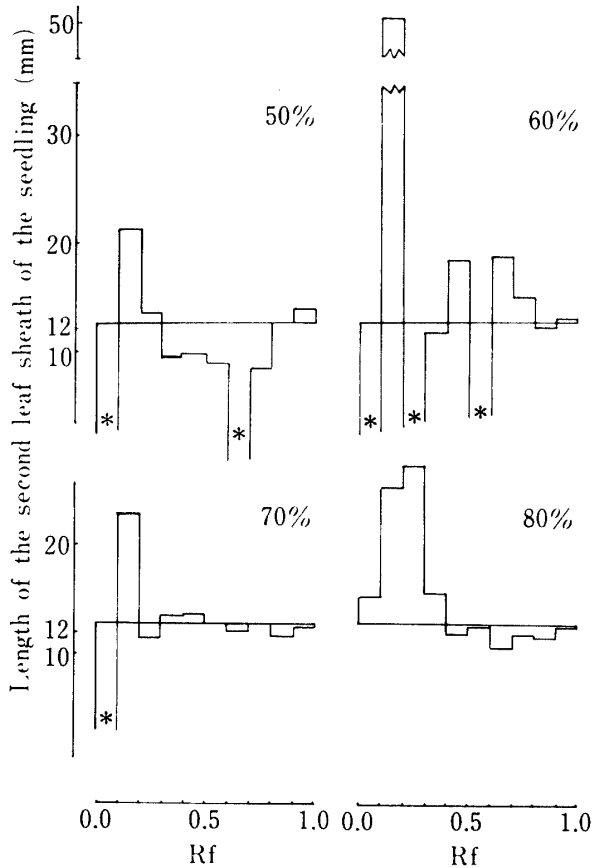


Fig. 3. Histograms showing activities of the gibberellin-like substances of extract from growing point containing 3-4 unfolded mulberry leaves. Thin layer chromatography was conducted about eluate by 50, 60, 70, 80% acetone in active carbon adsorption chromatography. The developing solvent was chloroform-ethyl acetate-acetic acid (20:8:1). *: Coleoptiles did not elongate at all.

クロマトグラムのアセトン60%溶出分画の薄層クロマトグラムによる Rf 0.1-0.2 の部分に、生物検定用の短銀坊主種子の第二葉鞘長の著しい(対照の約4倍)伸長が認められ、ジベレリン様物質の存在を確認した。

実験 1 では活性炭吸着クロマトグラムのアセトン 60% 溶出分画のペーパークロマトグラムによる Rf 0.3-0.6 の部分に著しい伸長がみられ、対照の約 2.5 倍 (Rf 0.4-0.5) の伸長促進活性が認められた (Fig. 1)。

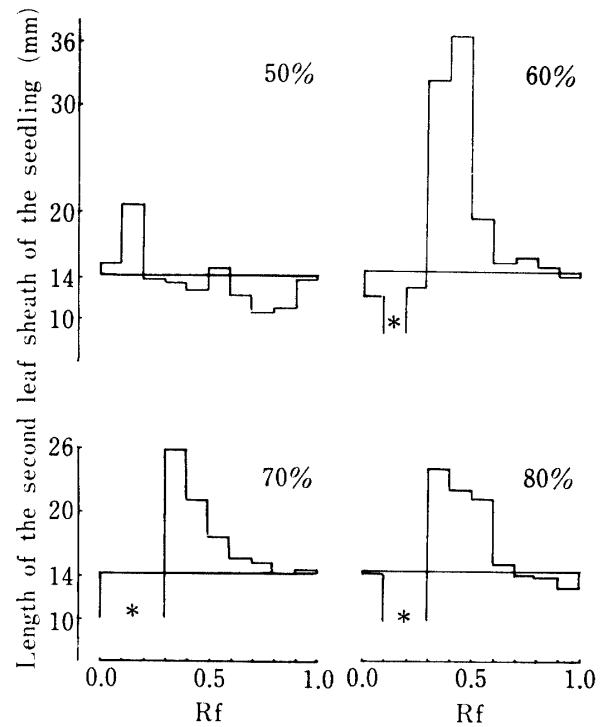


Fig. 1. Histograms showing activities of the gibberellin-like substances of extract from sprouting mulberry buds in the spring. Paper chromatography was conducted as to solution eluted by 50, 60, 70, 80% acetone in active carbon adsorption chromatography. The developing solvent was isopropanol-ammonia-water (10:1:1). *: Coleoptiles did not elongate at all.

実験 2 では実験 3 と同じく、活性炭吸着クロマトグラムのアセトン60%溶出分画の薄層クロマトグラムによる Rf 0.0-0.2 の部分に対照の約 1.8 倍 (Rf 0.1-0.2) の伸長促進活性がみられた (Fig. 2)。実験 2 の方法では石油エーテル、クロロホルム抽出の操作を行なわなかったため、生長抑制物質の残存量が多かった。

桑樹の冬芽の春の発芽期並びに生長中の開葉を含んだ生長点には、生長抑制物質が多量に含まれており、この物質を除去すること、あるいは分離することがジ

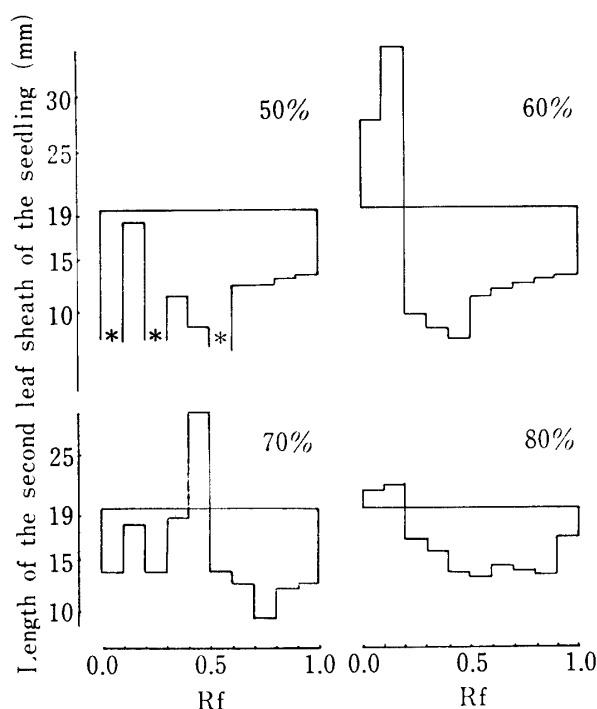


Fig. 2. Histograms showing activities of the gibberellin-like substances of extract from growing point containing 2-3 unfolded mulberry leaves. Thin layer chromatography was conducted as to eluate by 50, 60, 70, 80% acetone in active carbon adsorption chromatography. The developing solvent was chloroform-ethyl acetate-acetic acid (20:8:1). *: Coleoptiles did not elongate at all.

ベレリン様物質の確認には不可欠であった。この生長抑制物質はクロロホルムで一部除去され、活性炭吸着クロマトグラフィを行ない、更にペーパーあるいは薄層クロマトグラフィ法を適用してジベレリン様物質から分離させた。その結果、各実験ともジベレリン様物質の存在が確認された。

なお、実験3の場合活性炭吸着クロマトグラムのアセトン濃度 50, 70, 80% 溶出分画の薄層クロマトグラムによる、それぞれ Rf 0.1-0.2, Rf 0.1-0.2, Rf 0.1-0.3 に伸長促進活性がみられた。これらはアセトン60%溶出分画の Rf 0.1-0.2 の著しい伸長促進活性を示したジベレリン様物質と同一のものと推定した。

実験1においても、アセトン60%溶出分画の第二葉鞘長の伸長促進の他に、アセトン濃度 50, 70, 80% 溶出分画のペーパークロマトグラムのそれぞれ Rf 0.1-0.2, Rf 0.3-0.6, Rf 0.3-0.6 に伸長促進がみられた。Rf 0.3-0.6 の物質はアセトン60%溶出分画の

Rf 0.3-0.6 の著しく伸長促進したジベレリン様物質と同一と見なしたが、アセトン50%溶出分画の Rf 0.1-0.2 の物質は異なったジベレリン様物質ではないかと推定した。

また、実験2において、アセトン70%溶出分画の Rf 0.4-0.5 に伸長促進活性がみられた。これは60%溶出分画に示された Rf 0.0-0.2 のジベレリン様物質と異なるジベレリン様物質ではないかと推定した。

ジベレリン様物質の時期的な量の多少の推移は実験方法が多少異なったため比較できなかった。

要 約

桑樹内生のジベレリン様物質の存在を確認するために、生長中の桑樹の3つの異なった時期に、幾らか異なった方法で、3つの実験が行なわれた。

各時期に、材料は生量 1kg が採取され、アセトン抽出、精製、活性炭吸着クロマトグラフィ、ペーパークロマトグラフィあるいは薄層クロマトグラフィを行ない、最後に矮性水稻の短銀坊主種子を用いて生物検定を行ない、ジベレリン様物質の活性が対照と比較されて決定された。

3つの実験いずれも、ジベレリン様物質の活性が認められ、Rf 値の異なった2つ以上のジベレリン様物質が桑樹の地上部の主として生長点部分には存在することが確認された。

謝 辞

本実験を報告するに当たり、実験方法につき種々の御助言を賜った鹿児島大学農学部松尾友明助手に感謝の意を表す。また、本実験の遂行に協力された末吉和代専攻学生にお礼を申し上げる。

文 献

- 1) Abdllaev, I. K. and Aliev, M. O.: Effect of gibberellin on the growth, development, and food value of mulberry tree leaves. *Izv. Akad. Nauk Azerb. SSSR, Ser. Biol. Nauk*, 3-8 (1965)
- 2) Czarnolewski, H. and Lewandowska, T.: Effect of gibberellic acid on growth and feed value of mulberry leaves. *Rocz. Nauk Poln., Ser. A. Rosl.*, 90, 441-447 (1965)
- 3) Czarnolewski, H.: The influence of gibberellic acid on the growth of mulberry seedling. *Zesz. Nauk Univ. Mikol. Kopernika Toruniu Biol.* 285-294 (1966)
- 4) 本多恒雄・坪井滯: 桑樹の休眠現象とジベレリン, 植物調節化学研究会第1回大会, 講演要旨集, 10-11 (1966)
- 5) 森田富夫: 桑苗に対するジベレリンとヨージンの施用試験. 愛知蚕試概要, 36年度, (1962)
- 6) Most, B. H. and Vlitos, A. J.: Studies on endogenous gibberellin-like substances in sugar cane. *Proc. Intern. Soc.*

- Sugar-cane Technologists*, 12, 610-611 (1965)
- 7) 大西敏夫：桑樹におけるジベレリン処理に関する研究。第1報。ジベレリン処理と生育および収葉量について。京工織大織報 4, 182-187 (1964)
 - 8) 大西敏夫：桑樹におけるジベレリン処理に関する研究。第2報。高冷地におけるジベレリン処理と生育について。京工織大織報, 4, 401-406 (1965)
 - 9) 大西敏夫・青木茂一：桑樹におけるジベレリン処理に関する研究。第3報。肥培の相異とジベレリン処理の影響。京工織大織報, 5, 43-48 (1966)
 - 10) Ply'nov, I. V.: Effect of gibberellin on the growth of the mulberry tree. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.*, 1, 46-50 (1961)
 - 11) Rao, L. S. et al: Response of mulberry seeds to gibberellic acid treatment. *Curr. Sci.*, 32, 348-349 (1963)
 - 12) 田村三郎編：ジベレリン。p. 29-31, 東京大学出版会, 東京(1969)
 - 13) 八尋正樹・林 満：ジベレリン処理が桑樹冬芽の休眠に及ぼす影響。日蚕雑, 35, 371-373 (1966)

Summary

In order to ascertain the persence of endogenous gibberellin-like substances in the growing mulberry trees, three experiments were carried out at three different sampling dates and by a few different methods.

Materials of 1kg fresh weight were collected at each sampling date, and acetone extraction, partial purification, active carbon adsorption chromatography, paper chromatography or thin layer chromatography, and the bio-assay using "Tan-ginbozu" seeds of dwarf rice plants, were conducted, and the activities of gibberellin-like substances were decided in the comparison with the control.

The activities of gibberellin-like substances were recognized in each experiment, namely, the presence of two or more gibberellin-like substances varying in Rf value, was confirmed mainly at the growing points of the tops of mulberry trees.