

# 松類花粉의 아미노酸 組成 및

## 花粉發芽에 따른 그 組成의 變化

서울大學校 農科大學 洪 性 玉

On the Amino Acid Composition in the Pollen of Pines and Changes of the Composition during Germination of Pollen.

Sung Ok Hong

College of Agriculture

Seoul National University

### SUMMARY

In the present experiment the amino acid composition in the pollen of *Pinus taeda* and *Pinus rigida* and metabolic changes of the composition occurring in germinating pollen were examined by the method of paper chromatography. The results obtained in this study are as follows.

1. The mature pollen of *Pinus taeda* and *Pinus rigida* contained 12.00%, 13.19% crude protein respectively and sixteen protein-constituting amino acids and three unknowns were detected on the chromatogram.

2. Main components of the protein-constituting amino acids were leucines, valine, alanine, glutamic acid and aspartic acid.

3. The free amino acids such as leucines, valine, tyrosine, alanine and glutamic acid increased evidently during germination of the pine pollen.

### 緒論

交配에 依한 林木의 改良은 林木育種學上 매우 重要한 位置를 찾이하고 있음에도 不拘하고 交配에 參與하는 花粉이나 胚珠內 物質의 生化學的研究는 林木에 있어서 아직 까지 별로 많이 되어 있는 것 같지 않다. 元來交配의 根本이 되는 受精現象은 花粉內 蛋

白質과 胚珠內 蛋白質이 서로 融合되어 일어나는 것 이므로 이들 花粉이나 또는 胚珠內의 蛋白成分에 關한 生化學的研究는 林木育種學上 必須的인 것이라 고 할 수 있을 것이다. 從來에 花粉의 蛋白質이나 그를 構成하고 있는 아미노酸에 關한 研究는 主로 養蜂上 幼虫의 榮養과 關聯한 것이 있으며 林木育種學의 見地에서 이루 어겼던 것은 數片에 不過하다.

Vivino & Palmer (21)는 별에 依하여 採集된 dandelion, plum, apple, clover, golden rod, aster等의 花粉에서 粗蛋白質을 定量하여 平均 20.15% (生體重) 라고 報告하였으며, Elser & Ganzsmüller (7)는 *Pinus* spp.의 花粉에 12.50%, *Alnus* spp.의 花粉에 23.44%, *Corylus* spp.의 花粉에 16.19%의 粗蛋白質이 各各 含有되어 있다고 發表하였다.

花粉內의 아미노酸에 關한 研究로서, Heyl & Hopkins (14)는 *Ambrosia*의 花粉에서 arginine, histidine, lysine, tyrosine 等의 아미노酸을 確認하였으며 Anderson & Kulp (1)는 corn pollen에 proline이 있음을 報告하였다. Fulchignoni (8)는 소나무類의 花粉에서 protamine의 存在를 報告하였고 Auclair & Jamieson (2)은 별집에서 採取한 willow와 dandelion의 花粉에서  $\alpha$ -amino-n-butyric acid 및 hydroxyproline을 分離하였다.

Hatano (11)는 林木改良을 為한 交配生理의 面에서 黑松花粉의 아미노酸을 分析하였는데 12種의 遊

離아미노酸과 13種의 蛋白構成 아미노酸을 檢出하였다. Durzan (6)은 jack pine의 花粉에서 20餘種의 아미노酸을 報告하였다.

花粉이 雌花에 受粉되면 곧 發芽하여 花粉管이 伸長하게 되며 그에 따라 花粉내에 物質의 變化가 일어날 것이다. 그리하여 筆者는 本實驗에서 受精現象의 生化學的 基礎研究로서 現在 우리나라에서 交雜育種上 主要한 樹種인 *Pinus rigida* 및 *Pinus taeda*의 花粉에 對하여 粗蛋白을 定量하고 蛋白構成아미노酸을 paper chromatography에 依하여 分析하였을 뿐 아니라 特히 成熟花粉과 發芽된 花粉과의 사이에 나타나는 遊離아미노酸組成의 變化를 調査하였다.

本研究는 林木育種學教室에서 行하여졌으며, 本研究를 遂行함에 있어서 始終 指導를 하여주신 玄信圭 博士님께 深甚한 感謝를 드립니다.

## 材料 및 方法

實驗材料는 *Pinus taeda* 및 *Pinus rigida*의 花粉을 使用하였다. *P. taeda*의 花粉은 1966年 4月 26日 서울大學校 光陽演習林에서, *P. rigida*의 花粉은 同年 5月 7日 水原演習林에서 各各 採取하였다. 採取した 花粉은 細篩과 끌린 花粉抽出器를 通하여 精選한 後 dessicator에 넣어 保管하였다.

이러한 花粉 100mg을  $H_2SO_4$ 에 分解하고 micro-kjeldahl法에 따라 全窒素를 求한後 粗蛋白質量을 算出하였다.

成熟花粉에서 遊離아미노酸을 抽出하기 爲하여 1g의 花粉을 秤量하고 小量의 80% Ethanol과 함께 mortar에서 粉粹한 後 다시 80% Ethanol을 加하여 100ml이 되게 하고 24時間 室溫에서 抽出하였다. 그 抽出濾液을 約 40ml이 되게濃縮하고 Dowex 50×8(H<sup>+</sup> type)의 이온交換樹脂 column에서 Plaisted (19)方法에 따라 不純物을 除去하고 精製된 溶出液을 減壓乾固하고 1ml의 10% isopropanol에 溶解시켜 小管瓶에 넣어 paper chromatography에 使用될 때까지 0~3°C의 低溫恒溫器에 賯藏하였다.

花粉의 蛋白構成 아미노酸을 檢出하기 爲하여, 前記의 遊離아미노酸을 抽出하고 남은 殘渣를 鹽酸으로 加水分解하였다. 即 殘渣 500mg을 秤量하여 6N-HCl로 130°C에서 24時間 加水分解시키고 濾過한 後濾液을 40°C에서 減壓濃縮하여 HCl을 除去하고 80% Ethanol에 녹여 다시 減壓乾固하고 1ml의 10% isopropanol에 溶解하여 低溫恒溫器에 賯藏하였다.

한편 發芽된 花粉에서 遊離아미노酸을 抽出하기 爲하여 先 花粉을 發芽시켰는데 그 方法은 다음과

같다. 花粉 1g을 秤量하여 無菌의 petri-dish에 넣고 少量의 蒸溜水(約 3ml)를 加하여 25°C의 incubator에서 48時間 發芽시켰다.

이때에 花粉管의 길이를 顯微鏡下에서 測定하였던 바 50~82μ程度였다(發芽前花粉의 크기는 가로 75~83μ 세로 49~51μ). 이와같이 發芽시킨 花粉을 petri-dish에서 mortar에 옮긴 後 80% Ethanol과 함께 粉碎하여 前記한 遊離시미노酸抽出法과 같은 方法으로 試料를 調製하여 賯藏하였다.

이상과 같이 抽出한 試料에서 각個 아미노酸을 paper chromatography 方法(3, 4, 5, 18, 20)에 依하여 다음과 같이 分離하였다. 即 試料液 5~10μl를 micropipette로 Whatman No. 1 濾紙(23×25cm)上에 spot하여 二元法으로 展開하였다. 展開溶媒는 n-Butanol:acetic acid:water=4:1:5(V/V) 및 Phenol:water=8:2(V/V)를 使用하였다. 展開가 完全히 끝난 後 chromatogram을 잘 乾燥시키고 0.25% ninhydrin의 acetone 溶液(W/V)을 均一하게 噴霧하고 80~90°C에서 10分間 加熱하여 呈色시켰다. 나타난 各 아미노酸을 正確히 表示하고 2% 硫酸銅溶液을 噴霧하여 (이 때에 아미노酸이 赤色으로 變化) 保管하였다. 아미노酸中에 몇 가지를 特殊 確認하기 爲하여, arginine은 Sakaguchi reagent에 依하여, cystine은 sodium nitroprusside에 依하여, histidine과 tyrosine은 Pauly reagent에 依하여, phenylalanine은 NaHCO<sub>3</sub>에 依하여 各各 特色試藥反應을 하였다.

## 實驗結果

### 1. 花粉內 粗蛋白量 및 蛋白構成 아미노酸

micro-kjeldahl 方法에 依하여 테다소나무와 티기다소나무의 花粉內 粗蛋白量을 定量하였던 바 前者에 있어서는 12.00%, 後者에 있어서는 13.19%였으며 paper chromatography에 依하여 얻어진 花粉蛋白構成 아미노酸은 그림 1에 있는 바와같이 展開分離되었다 chromatogram上에서 檢出된 蛋白構成아미노酸은 leucine, isoleucine, phenylalanine, valine, tyrosine, proline, alanine, threonine, glycine, serine, glutamic acid, arginine, histidine, lysine, cystine, aspartic acid 等의 16種과 未知物質 3種이었으며 未知物質은 先 unknown A,B,C라 하였고 unknown A는 cystine의 영이, unknown B는 arginine의 밀에 unknown C는 aspartic acid에 接하여 各各 나타났다. 上記한 16種의 아미노酸과 unknown C는 두 樹種에 다 나타났으나 unknown A는 테다소나무에서, unknown B는 티기다소나무에서 檢出되었다. 또 unknown C는 ninhydrin에 對

하여 赤褐色을 呈하였다. 이와같이 나파난 各 아미노酸을 크로마토그램上의 濃度 및 面積에 따라 +, ±, - 等으로 表示하여 그들의 相對的 量을 比較하였다(表 1).

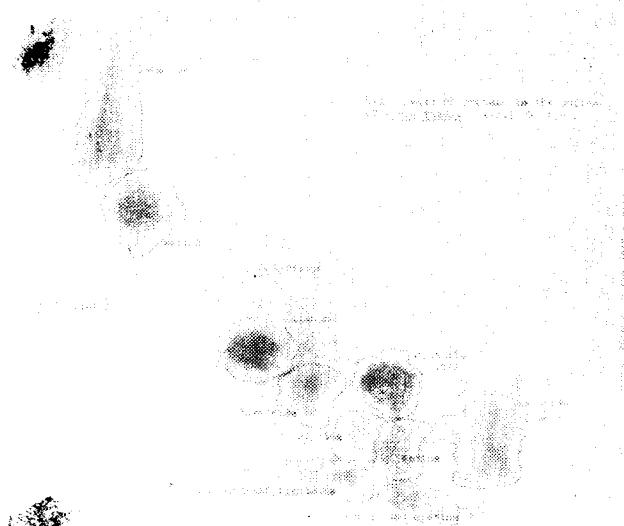


그림 1. 花粉蛋白構成아미노酸의 크로마토그램  
Fig. 1. Chromatogram of the hydrolysate of protein in the pine pollen (*Pinus taeda*)

表 1. 테다소나무와 리기다소나무 花粉中의 蛋白構成아미노酸

Table 1. Amino acids in the hydrolysate of protein in the pollen of *Pinus taeda* and *Pinus rigida*.

Amino acids	<i>P. taeda</i>	<i>P. rigida</i>
1. Leucines	+	+
2. Phenylalanine*	±	±
3. Valine	+	+
4. Proline	+	+
5. Tyrosine	+	±
6. Alanine	+	++
7. Arginine	+	+
8. Histidine	+	+
9. Threonine	+	+
10. Glycine	+	+
11. Serine	+	+
12. Lysine	+	+
13. Cystine	+	+
14. Glutamic acid	+	+
15. Aspartic acid	+	+
16. Unknown A	±	±
17. " B	-	±
18. " C	±	±

Note: (+)(+)(±) indicate relative quantities of the compounds appearing on the same chromatogram.

omatogram. (±); in a trace amount.

\* : NaHCO<sub>3</sub>-test positive near valine on the chromatogram.

表 1에서 볼수있는 바와같이 花粉蛋白構成아미노酸은 glutamic acid, aspartic acid, alanine, valine, leucines 等이 가장 많았으며 tyrosine 및 phenylalanine이 少量으로 存在하였으며 그밖의 아미노酸은 大概 비슷한 程度로 舍有되어 있었다. 未知物質은 다 微量으로 存在하였다.

## 2. 花粉이 發芽함에 따라 나타나는 遊離아미노酸의 變化

花粉이 發芽함에 따라 나타나는 花粉內 遊離아미노酸의 變化는 發芽前의 成熟花粉內 遊離아미노酸과 發芽後의 花粉內 遊離아미노酸을 比較하여 觀察하였다. 發芽前 成熟花粉의 遊離아미노酸은 그림 2에 있는바와 같이 展開分離되었고 發芽後 花粉의 遊離아미노酸은 그림 3과 같이 展開分離되었다. 나타난 各 아미노酸의 相對的 量을 比較하여 表 2에 그 結果를 綜合하였다. 相對的 量은 chromatogram 上에서 發色된 面積과 濃度에 依하여 決定하였다.

花粉이 發芽되면 外形의으로 花粉管이 伸長되어 나오는데 그에 따라 遊離아미노酸의 變化는 發芽前後에 다음과 같은 差異가 있었다. 即 두 樹種의 花粉에서 共通된 傾向으로서 alanine 및 glutamic acid가 發芽前에 比하여 顯著히 增加하였고 發芽前 成熟花粉에 있어서는 微量 或은 痕跡이 發芽後에 있어서는 明顯하게 增加하였다.

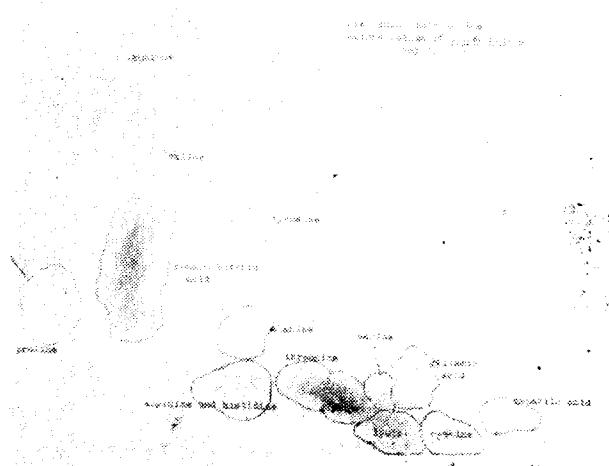
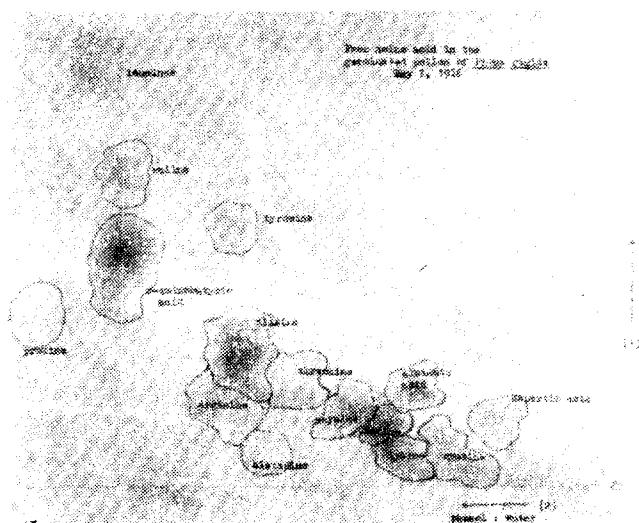


그림 2. 成熟花粉內 遊離아미노酸의 크로마토그램

Fig. 2. Chromatogram of free amino acids in the mature pollen (*Pinus rigida*)

그림 3. 發芽된 花粉內 遊離아미노酸의 크로마토그램.  
 Fig. 3. Chromatogram of free amino acids in the germinated pollen (*Pinus rigida*).



跡的으로 存在하던 leucines, valine, tyrosine 等이 發芽後에는 뚜렷한 量的 增加를 보여 相當히 많은 量으로 나타났으며 phenylalanine은 發芽前에는 나타나지 않았으나 發芽後에 비로소 出現하였다. 王樹種別로 몇 가지 差異를 보였는데 테다소나무에서 發芽後에  $\gamma$ -aminobutyric acid와 threonine이 增加하였고 glycine, serine, lysine 等은 發芽後에 出現하였다. 그러나 리기다소나무에서는 이러한 變化가 없었다.

表 2. 成熟花粉과 發芽된 花粉中の 遊離아미노酸  
 Table 2. Free amino acids in the mature and germinated pollen.

Amino acids	<i>P. taeda</i>		<i>P. rigida</i>	
	mature	germinated	mature	germinated
1. Leucines	+	+	+	+
2. Phenylalanine*	+	+	+	+
3. Valine	+	+	+	+
4. $\gamma$ -aminobutyric acid	+	#	#	#
5. Proline	#	#	#	#
6. Tyrosine	+	+	+	+
7. Alanine	+	#	+	#
8. Arginine	+	+	+	+
9. Histidine	+	+	+	+
10. Threonine	+	+	+	+
11. Glycine	+	+	+	+
12. Serine	+	+	+	+
13. Lysine	+	+	+	+
14. Cystine	+	+	+	+
15. Glutamic acid	#	#	#	#
16. Aspartic acid	+	+	+	+

\* : NaHCO<sub>3</sub> test positive near valine on the chromatogram

## 考察 및 結論

### 1. 花粉內 粗蛋白量 및 蛋白構成아미노酸

本 實驗에서 花粉內 粗蛋白量은 테다소나무에 12.00% 리기다소나무에 13.19%였다. Elser & Ganzsmüller(7)는 소나무류의 花粉粗蛋白이 12.50%, 오리나무류에 있어서는 23.44%, 개암나무류에 있어서는 16.19%였다고 報告하였다. 그려므로 소나무類의 花粉에는 大體로 12~13% 程度의 粗蛋白이 含有되어 있는 것으로 생각되며 다른 林木에 比較하여 그의 含量이 적은 것 같다.

Auclair & Jamieson (2)은 버들과 딘들류의 花粉蛋白構成 아미노酸으로서 hydroxy-proline 과 methionine을 비롯하여 16種을 報告하였다. 而 Hatano(11)는 黑松의 花粉에서 glycine, alanine等 12種의 蛋白構成아미노酸을 確認하였다.

本 實驗에서는 테다소나무와 리기다소나무의 花粉蛋白構成아미노酸 16種을 檢出하였는데 그中에 glutamic acid, aspartic acid, alanine, valine, leucines等이 가장 많이 存在하였으며 hydroxyproline과 methionine은 檢出되지 않았다. 而 amide로서 glutamine과 asparagine이 나타나지 않았는데 이들이 花粉蛋白中에 存在한다고 해도 酸加水分解에 依하여 各已該當아미노酸으로 轉換되므로 그들이 amide 形態로 나타나지 않은 것으로 생각된다. 花粉蛋白構成 아미노酸中에 glutamic acid와 aspartic acid가 特히 많은 것은 amide에서 轉換된 量때문인 것으로 推定된다.

### 2. 花粉이 發芽함에 따라 나타나는 遊離아미노酸의 變化

松類에 있어서 春期에 受粉(pollination)되면 花粉은 곧 發芽하여 花粉管이 珠心組織을 서서히 長고 伸長하며 越冬期에 中止되었다가 翌春에 다시 伸長이 계속되어 6月上旬~6月中旬에 受精(fertilization)을 하게 된다. 이와 같이 松類에 있어서는 受粉에서 受精까지 長時日을 要하게 되는데 이期間中에 雌雄各配偶體에는 形態的變化뿐 아니라 그 内部含有物質에 있어서 많을 變化가 있을 것은 明確한 일이다. 그러나 이 方面의 研究는 特히 松類에 있어서 많지 않은 것 같다. Helmers & Machlis (13)는 *Pinus ponderosa*의 花粉에서 몇 가지 糖類를 確認하고 그中에는 發芽에 依하여 뚜렷한 減少를 나타내는 것이 있었으며 糖類는 花粉發芽時呼吸과 關聯됨을 報告하였다.

本實驗에서 筆者は 花粉內 遊離아미노酸의 組成이 發芽前後에 어떻게 달라지는가를 調査하였다. 即 花粉이 發芽되기 前에 遊離아미노酸은 Hatano (11)가 報告하였던 바와같이 phenylalanine이 나타나지 않았고 leucines, valine, tyrosine等이 흔적의으로 存在하였으며 及面에 aspartic acid, glutamic acid, proline等이 多量으로 含有되어 있었다.

한편 花粉이 發芽함에 따라 遊離아미노酸의 組成에 있어서 많은 變化를 가져왔다. 發芽前에 없었던 phenylalanine이 出現하였으며 흔적의으로 存在하였던 leucines, valine, tyrosine과 alanine, glutamic acid等이 發芽前에 比하여 뚜렷히 增加되었다. *P. taeda*에서 glycine, serine, lysine이 發芽後에 出現하였는데 이는 두樹種間에 一致하지 않으므로 樹種間의 差異에 因함인지 더욱 調査가 必要할 것으로 생각된다.

種子가 發芽될 때에도 遊離아미노酸의 組成의 變化가 일어나게 되는데 Hatano (9, 10, 12)와 Kano & Hatano (15)는 針葉樹類의 種子가 發芽할 때에 遊離아미노酸이 增加되는데 특히 asparagine은 發芽時에만 出現한다고 報告하였다. Katsuta (16)는 松類의 種子가 發芽됨에 따라 leucines, valine, proline, alanine, asparagine, glutamic acid, glycine等이 增加한다는 것을 調査하였으며 또 그는 (17) 胚乳中의 脍藏蛋白質이 發芽中에 急히 分解되어 아미노酸으로 幼植物에 集積된다는 것을 提示하였다. 그러므로 花粉과 種子의 發芽中에 遊離아미노酸의 變化를 比較해 보면 人體로 發芽와 더불어 몇 가지 아미노酸이 增加된다는事實을 確認할 수 있다.

花粉芽時에 遊離아미노酸이 生成 또는 增加되는 機作(mechanism)은 Hatano (10)가 種子發芽에서 推定하였던 바와같이 主로 蛋白質의 酵素作用에 依하여 아미노酸으로 分解되는 catabolic formation에 因한다고 볼수 있으며 部分的으로는 transamination에 依한 anabolic formation도 考慮할 수 있을 것이다. 그러나 이러한 機作에 對하여서는 앞으로 더욱 깊은研究가 必要할 것으로 본다.

以上 考察한 바에 依하여 다음과 같은 結論을 얻을 수 있다.

1) 松類花粉의 粗蛋白量은 *P. taeda*에서 12.00%, *P. rigida*에서 13.19%였다.

2) 花粉蛋白構成아미노酸은 16種과 未知物質3種으로 組成되었으며 leucines, valine, alanine, glutamic acid等이 가장 많이 나타났다.

3) 花粉이 發芽됨에 따라 遊離아미노酸 特히 leucines, valine, tyrosine, alanine, glutamic acid等이 發

芽前보다 顯著히 增加되었으며 phenylalanine은 發芽後에 비로소 出現하였다.

## LITERATURE CITED

- Anderson, R.J. and W.L. Kulp 1923. N.Y. State Agric. Expt. Sta. Tech. Bull. 92: 21. Cited by Auclair and Jamieson (1948).
- Auclair, J.L. and C.A. Jamieson 1948. A qualitative analysis of amino acids in pollen collected by bees. Science 108:357-358.
- Block, R.J., E.L. Durrum and G. Zweig 1959. A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. Academic Press Inc. New York: 110-169.
- Consdens, R., A.H. Gordon and A.J.P. Martin 1944 Qualitative analysis of proteins: A partition chromatographic method using paper. Biochem. Jour. 38:224-232.
- Dent, C.E., W. Stepka and F.C. Steward 1947. Detection of the free amino acids of plant cells by partition chromatography. Nature 160(4072):682-683.
- Durzan, D.J. 1964. The nitrogen metabolism of *Picea glauca* (Moench.) Voss, and *Pinus banksiana* L. with special reference to nutrition and environment. Ph. D. Thesis to Cornell Univ.
- Elser, E. and J. Ganzsmüller 1931. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 194:21-32. Cited by Auclair and Jamieson (1948).
- Fulchignoni, D.E. 1936. Sulla Presenza di Protamine nelle Sporule del Licoposia. Arch. d. Sci. Biol. 12:66-70.
- Hatano, K. 1953. On the amino acids in the seeds and seedlings of *Ginkgo biloba*. Bull. Tokyo Univ. Forests 44:221-227.
- . 1953. On the amino acids of coniferous seeds at germination stage. Bull. Tokyo Univ. Forests 45:145-154.
- . 1955. The amino acids in the pollen and female flower of *Pinus Thunbergii*. Bull. Tokyo Univ. Forests 48:149-152.
- . 1955. Freie Aminosäuren in den reifenden Ginkgo-Samen. Jour. Jap. For. Soc. 37(12):527-529.
- Helmers, H. and L. Machlis 1956. Endogenous

- substrate utilization and fermentation by the pollen of *Pinus ponderosa*. Plant Physiol. 31:284-288.
14. Heyl, F.W. and H.H. Hopkins 1920. Jour. Amer. Chem. Soc. 42:1738-1743. Cited by Auclair and Jamieson (1948).
15. Kano, T. and K. Hatano 1953. On the amino acids in the seeds of *Pinus Thunbergii* at germination stage. Jour. Jap. For. Soc. 35:292-298.
16. Katsuta, M. 1959. Physiological studies of the ripening and germinating processes of pine seeds (1) Changes of seed protein. Bull. Tokyo Univ. Forests 55:125-159.
17. ——. 1961. The breakdown of reserve protein of pine seeds during germinating. Jour. Jap. For. Soc. 43(7):241-244.
18. Linskens, H.F. 1959. Papierchromatographie in der Botanik. Springer-Verlag, Berlin. 148-178.
19. Plaisted, P.H. 1958. Clearing free amino acid solution of plant extracts for paper chromatography. Contributions Boyce Thompson Inst. 19:231-244.
20. Smith, I. 1962. Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol. I, "Chromatography. William Heinemann. Medical Books LTD., London. 82-142.
21. Vivino, A.E. and L.S. Palmer 1944. The chemical composition and nutritional value of pollens collected by bees. Arch. Biochem. 4:129-136.

