HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	作物の細胞質雄性不稔性に関する組織化学的研究 : 第５報　テンサイの葯組織における無機燦とフォスフォリラーゼ活性
Author(s)	津田, 周彌; 中嶋, 博; 細川, 定治
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 11(2), 182-188
Issue Date	1978-09-29
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11916
Type	bulletin (article)
File Information	11(2)_p182-188.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

作物の細胞質雄性不稔性に関する組織化学的研究

第5報　テンサイの葯組織における無機燐とフォスフォリラーゼ活性

津田周彌・中嶋　博・細川定治
(北海道大学農学部工芸作物学教室)

(昭和53年2月17日受理)

Histochemical Studies on the Cytoplasmic Male-sterility of Some Crops

V. Changes of phosphorylase activities and inorganic phosphorous in sugar beet anther

Chikahiro TSUDA, Hiroshi NAKASHIMA and Sadaji HOSOKAWA
(Laboratory of Industrial Crops, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo. Japan)

葯の発育に伴なう葯壁内の炭水化物なかでも澱粉の消長が稔性葯と不稔性葯との間では著しい相異のあることはすでに報告した[2,5]。光合成の最終生産物である澱粉や蔗糖が，エネルギー源や炭素源として，他の生化学的反応に利用されるためには，再び単糖にまで分解されて色々な代謝径路に入る必要がある。葯壁内の澱粉が，葯の正常な発育に伴なって消失していくのは，当然これが葯や花粉の発育になんらかの型で利用されていくためであると考えられる。したがって花粉不稔は，このような澱粉→糖→色々な代謝径路という一連の化学変化のいずれかの過程に生ずる異常によって起こるか，あるいは少なくともそのような異常を結果するであろうと考えてよいであろう。澱粉の分解には，アミラーゼおよび，フォスフォリラーゼが関与している。したがって葯組織内のこれらの酵素の活性の，両稔性葯間における異同を検討することが，不稔性葯の中で営まれる代謝過程の異常を探る着眼点と考えられる。

著者らは組織化学的手法を用いて，フォスフォリラーゼ活性と，この酵素による反応に関与する無機燐の消長について観察したので，その結果を報告する。

材料および方法

用いた材料は，テンサイの1年生雄性不稔系統 SL 9460 M とその0型である SLC-03 で，いずれも鉢植として温室において育成したものである。

フォスフォリラーゼ活性は，JENSEN (1962)[4] の記述する澱粉法に準拠して観察した。すなわち，基質溶液は0.5 g のグルコース—1—リン酸カリ（東京化成製）をpH6に調製した酢酸緩衝液（0.2 M の酢酸 9.0 mℓ＋0.2 M 酢酸ナトリウム 95.1 mℓ）に溶解して作製した。以下 G-1-P 液と称する。ピンセットで取出した葯をそのままガラス管に入れた G-1-P 液に浸漬し，所定時間室温で培養した。その際必要に応じて緩衝液および蒸留水を対照として，これらにも葯を浸漬した。次にヨードヨードカリ液（以下 IKI と称する）中に葯を入れて染色し，のちに随時スライドガラス上にとり，IKI で封入して検鏡した。このとき既存の澱粉は青紫色の顆粒として観察されるが，新しく形成された澱粉は赤紫色に染った可溶性澱粉状，あるいは不定型の青紫色として観察された。(Fig. 1)

無機燐は，葯をスライドガラス上にとり，モリブデン酸アンモンを1滴を懸け，その後カバーガラスで覆って暫時放置した後検鏡した。その際無機燐は主として葯の外側に燐モリブデン酸アンモンの液滴あるいは結晶として観察される。(Fig. 2)

反応の強さは両者ともに—（反応の全く認められない

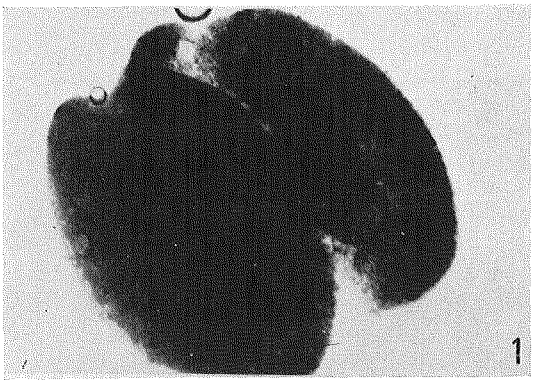

Fig. 1. Phosphorylase reaction by G-1-P substrate. Newly formed starch is stained purplish by IKI and looks like the soluble starch.

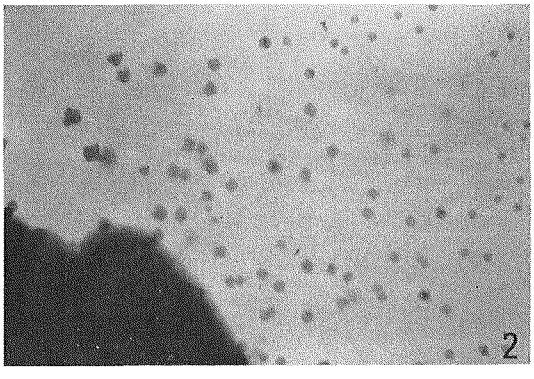

Fig. 2. Inorganic phosphorus forms the yellow crystals or drops of phospho-ammonium-molybdate by ammonium molybdate treatment.

もの) ± (辛うじて反応の認められるもの), 以下+, ++, +++, ++++ をもって表わし, それらにそれぞれ 0, 1, 2, 3, 4, 5 の数値を与えて平均値を求めた。

実 験 結 果

実験 1. 新鮮葯内の澱粉と無機燐

稔性葯 119 個および不稔性葯 83 個について, 無機燐と澱粉反応を調査し, 各葯の大さや花粉の発育状態によって, 葯の発育段階別に集計した。その結果は Table 1 と Fig. 3 に示してある。澱粉についてはすでに報告したのと全く同じく, 稔性葯の葯壁中の澱粉は葯の発育に伴なって漸次減少するが, 不稔性の葯では減少の程度が少なく, 開花時においてもなお相当量の澱粉粒が残存している。また無機燐の反応はメンデル性雄性不稔の場

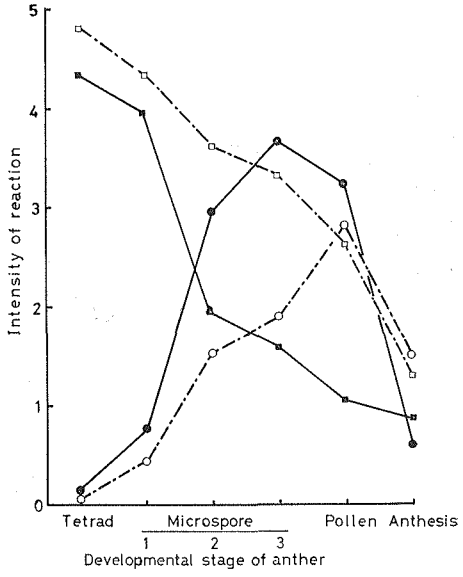

Fig. 3. Starch and inorganic phosphorus reaction during anther development.

—●—: inorganic phosphorus reaction ; fertile anther
---○---: 〃 ; sterile
—■—: starch reaction ; fertile anther
---□---: 〃 ; sterile

合[3] とほぼ等しく, 葯の発育初期においては両稔性葯間に差異が認められないが, 葯の発育に伴なって稔性葯に多く認められるようになる。そして稔性葯では花粉外壁の完成頃に最も多く, その後次第に減少していく。不稔性葯では花粉の退化完了時まで増加し, 開花時に減少する。

実験 II. G-1-P 液処理

稔性型の花蕾 27 個, 不稔性型の花蕾 32 個から, それぞれ 4～5 個の葯を取出して, そのうちの 1 個をヨード反応と葯の長さの測定に供し, 残余の葯を G-1-P 液に入れて培養, 6 時間, 18 時間, 30 時間および 42 時間後に IKI で染色, 同時に葯の長さを測定した。培養時間の短い間は, 葯の花糸付着部周辺, またピンセットで生じた傷口周辺に, 新たに形成された澱粉が認められるが, その後これらの部位より放射状に反応が拡大していく (Fig. 1)。時には新たな澱粉反応が全く観察されない場合もあったので, 反応の平均値によって, フォスフォリラーゼ活性の強さを測定すべく, 葯の発育時期を 2 つに分けて集計した。すなわち, 葯長 0.9 mm 以上になると稔性葯では既存の澱粉の反応が殆んど失なわれるので, この長さ以上の葯と, これより小さな葯とに分けた。その結果は

Table 1. Reactions of starch and inorganic phosphorous

A. Starch

Type	Intensity of reaction	Developmental stage of anthers					
		Pollen tetrad	Microspore I	Microspore II	Microspore III	Pollen	Anthesis
Fertile (SLC-03)	−	·	·	1	·	3	2
	±	·	·	9	9	25	15
	+	·	·	5	7	3	·
	++	·	7	9	2	1	·
	+++	1	9	·	·	·	·
	++++	5	6	·	·	·	·
	Total of observed anthers	6	22	24	18	32	17
	Average of reaction	4.33	3.96	1.92	1.61	1.06	0.88
Sterile (SL 9490-M)	−	·	·	·	·	·	3
	±	·	·	·	1	1	6
	+	·	·	2	4	7	3
	++	·	1	4	2	5	2
	+++	2	4	7	10	3	·
	++++	9	4	2	1	·	·
	Total of obsreved anthers	11	9	15	18	16	14
	Average of reaction	4.82	4.33	3.60	3.33	2.63	1.29
Chi-square		n.s.	n.s.	21.16***	18.22***	22.53***	8.62*

B. Inorganic Phosphorous

Type	Intensity of reaction	Developmental stage of anthers					
		Pollen tetrad	Microspore I	Microspore II	Microspore III	Pollen	Anthesis
Fertile (SLC-03)	−	5	12	·	·	·	12
	±	1	3	2	·	1	1
	+	·	7	4	1	8	3
	++	·	·	12	6	6	1
	+++	·	·	5	9	17	·
	++++	·	·	1	2	·	·
	Total of obsreved anthers	6	22	24	18	32	17
	Average of reaction	0.17	0.77	2.96	3.67	3.22	0.59
Sterile (SL 9460-M)	−	10	7	4	2	·	6
	±	1	1	4	5	1	1
	+	·	·	3	6	5	2
	++	·	1	3	3	6	4
	+++	·	·	1	2	4	1
	++++	·	·	·	·	·	·
	Total of observed anthers	11	9	15	18	16	14
	Average of reaction	0.09	0.44	1.53	1.89	2.81	1.50
Chi-square		n.s.	n.s.	12.82*	18.03***	3.80	7.02

Table 2. Phosphorylase reaction of fresh anthers treated by G-1-P

Type	Anther length	below 0.9 mm					above 0.9 mm				
	Incubation period (hrs.)	0	6	18	30	42	0	6	18	30	42
Fertile (SLC-03)	−	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	±	2	2	·	·	·	8	3	2	5	1
	+	16	3	1	1	1	6	4	9	9	4
	++	5	2	2	1	·	·	1	7	8	2
	+++	4	·	·	3	2	·	·	2	6	4
	++++	·	·	·	·	·	·	·	·	·	2
	Total of observed anthers	27	7	3	5	3	14	8	20	28	13
	Average of reaction	2.4	2.0	2.7	3.4	3.7	1.4	1.8	2.5	2.5	3.2
Sterile (SL 9460-M)	−	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
	±	·	·	·	·	·	4	·	·	·	·
	+	·	·	·	·	·	·	2	·	2	2
	++	2	·	1	·	·	6	5	5	4	·
	+++	3	1	·	1	·	3	6	8	5	1
	++++	3	2	2	6	1	11	1	3	8	4
	Total of observed anthers	8	3	3	7	1	24	14	16	19	7
	Average of reaction	4.1	4.7	4.3	4.9	5.0	3.7	3.4	3.9	4.0	4.0

Table 3. Phosphorylase reaction of anthers after darking treatment

	Type	Fertile (SLC-03)			Sterile (SL 9460-M)		
	Incubation period (hrs)	0	20	48	0	20	48
Starch Reaction	−	65		·	·		·
	±	·		38	12		1
	+	·		31	16		29
	++	·		8	15		19
	+++	·		2	5		13
	++++	·		·	·		2
	Total of observed anthers	65		79	48		64
	Average of reaction	1.00		1.67	2.27		2.78
Inorganic phosphorus Reaction	−	2	·	·	6	·	·
	±	·	·	·	·	1	·
	+	3	2	·	6	6	·
	++	4	6	4	3	21	10
	+++	7	27	21	·	23	33
	++++	·	12	20	·	1	7
	Total of observed anthers	16	47	45	15	52	50
	Average of reaction	2.87	4.04	4.36	1.40	3.33	3.94

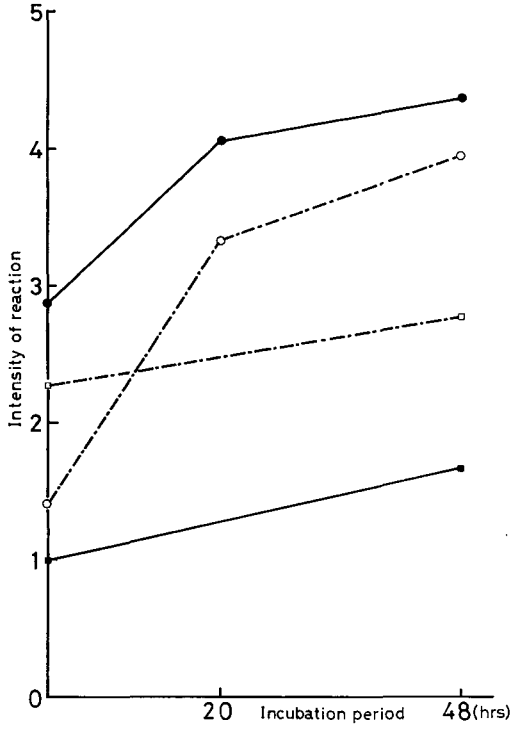

Fig. 4. Changes in starch and inorganic phosphorus after the G-1-P treatment in dark.

Symbols are the same as Fig. 3.

Table 2 に示されている。調査花数が少ないためと，既存の澱粉が若い葯や不稔性葯に多いために，確実な結果とはいえないが，いずれの型においても培養時間が長くなるにしたがって澱粉反応が強くなっている傾向が観取される。

実験 III.　暗黒処理を行なった後の G-1-P 液処理

両稔性型の個体より花枝を切り取り，暗箱中に入れて，葯壁内の既存の澱粉を消失させる試みを行なった。処理期間は3日間である。両稔性のそれぞれについて小胞子期以降にある葯を取出して，その一部について無機燐と澱粉反応とを観察し，他のものを G-1-P 液中で培養した。ヨード反応による澱粉の観察は48時間後，モリブデン酸アンモンによる無機燐の反応は20時間と48時間後に観察した。結果は Table 3 の通りであり，その平均値をグラフに示したものが Fig. 4 である。Table 3 の G-1-P 無処理区と Table 1 の新鮮葯とを比較すると，稔性葯および不稔性葯ともに暗黒処理を行なうことによって，澱粉の反応はもとより無機燐の反応も減少していることが明らかである。これらの反応は，G-1-P 液処理によって次第に増加していくが，澱粉反応は暗黒処理を行なう前の水準までは回復しない。一方無機燐の方は暗黒処理を行なう前よりも増加している。この場合，稔性と不稔性とを比較すると澱粉反応の増加の度合については差異はみられなかったが，無機燐の反応の増加の度合は不稔性の方が著しかった。すなわち分散分析の結果では，稔性の型の差に対する $F^{n_1=1}_{n_2=220}=42.21^{**}$ 処理に対する $F^{n_1=2}_{n_2=220}=73.38^{**}$ 交互作用に対する $F^{n_1=2}_{n_2=220}=5.141^{**}$ であった。

考　　察

以上の実験において第一に認められる事実は，フォスフォリラーゼ活性が認められた組織は，葯壁，花糸および葯隔であって，タペート細胞や花粉粒には認めることができなかったことである。これは葯を切片とせず，そのまま培養したために，基質溶液がこれら組織に滲透しえなかったためとも考えられるのであるが，G-1-P 液を処理する前に既に葯壁が破壊されていて，これら組織への基質溶液の滲透が容易であるはずの葯についても，これら組織にフォスフォリラーゼ活性が認められなかった。したがってこのことは葯内のフォスフォリラーゼの分布を示しているものと考えて差支えないと考えられる。

G-1-P 液浸漬後の，ヨード反応による澱粉の増加の程度は，稔性葯と不稔性葯の間には全く変化が認められなかった。一方無機燐の反応の増加の程度は不稔性葯において多かった。その原因については現在のところ説明し難いが，この無機燐の増加は G-1-P →澱粉＋無機燐の反応によるものである。以上2つの事実は，不稔性葯の葯壁内におけるフォスフォリラーゼの澱粉合成方向への活性が低下していないことを示唆している。したがって生育に伴なう葯壁内の澱粉消失に認められる両稔性葯間の差異は，この組織内におけるフォスフォリラーゼの有無あるいは，その量的な差によって生ずるものではなく，この酵素の澱粉分解の方向に働く活性が何らかの原因，例えば無機燐の少ないことにより阻害されることが原因の1つとなる可能性を示していると判断される。酵素活性が pH の変化に敏感に反応することを考えると，すでに報告した葯組織汁液の pH[2] が，稔性葯の花粉期で著しく中性側に傾くことが，この酵素の関与する反応の方向に大きな関連性をもつ可能性が窺われる。

新鮮葯においての無機燐の反応が不稔性葯において少ないことはメンデル性雄性不稔についても同じく認められたところである[3]。不稔性葯では澱粉消失も少ないこ

とから，一見これら両反応には直接の関係が存在するかのようである。しかし暗黒処理によって澱粉の消失を促すと，無機燐も同時に減少していくことからも，両者の負の相関関係を直接結びつけることはできない。

無機燐が生体内における代謝に関与するのは，主として炭水化物代謝と ATP が関与する場合である。葯の発育に伴なって生ずる最も重要な現象は花粉の形成であり，これには多量の原形質蛋白の合成を必要とすることは明らかである。したがって稔性葯の発育に伴なって観察される無機燐の増加はアミノ酸代謝に関係したものであると考えるのがより妥当であろう。ことに反応の増加程度が生殖核と栄養核が形成される花粉期より減少していくことを考えると，その可能性が大きいと思われる。したがって蛋白合成の径路における異常がより直接的な原因となってタペート細胞の異常を経て花粉不稔が結果するのではないかという推論も可能である。この点で興味深いのは，すでに報告されているように，不稔性葯において遊離アミノ酸のプロリンが存在しないこと[2]およびトウモロコシで見い出された不稔性葯における蛋白合成の阻害[6]という事実である。

雄性不稔性とフォスフォリラーゼやアミラーゼ活性との関係についての報告はミカンについてなされており[1]，アミラーゼ活性は小胞子後期では活性が低く，不稔性のものではその後極端に低くなっている。またフォスフォリラーゼ活性は不稔性葯において相対的に活性が弱いと報告している。フォスフォリラーゼ活性と雄性不稔性との関係については今後もさらに研究が望まれる。

要　　約

稔性葯と不稔性葯との間で，葯の発育に伴なう葯壁内の澱粉の消長に著しい相異のあることを見い出している。本研究では炭水化物代謝において重要な役割をもつ酵素であるフォスフォリラーゼの活性とそれと関係の深い無機燐について調査し，雄性不稔性生起の機作について追求し，以下の結果を得た。

1. 新鮮葯においては，モリブデン酸アンモンを用いた無機燐の反応では稔性葯では花粉期まで増加するが，それ以後減少する。不稔性葯では稔性葯に比較して相対的に弱い反応を示した。

2. G-1-P 液処理による澱粉合成の程度は両稔性葯とも同様であった。一方無機燐は不稔性葯においては稔性葯よりも増加の程度が多かった。

以上の結果から，澱粉合成に作用するフォスフォリラーゼの活性については両稔性間に差異はみられなかったが，無機燐の反応の強さについては差異がみられ，蛋白代謝の差異が推定された。

引 用 文 献

1. 平田尚美・林　真二： 温州ミカンの花粉退化の機構．第2報，花粉の発育に伴うやく中の糖，でん粉ならびに酵素活性の変化，農及園，**44**：991-992. 1969
2. 細川定治・津田周弥・武田竹雄： てん菜の雄性不稔現象に関する組織化学的研究，(葯組織の水素イオン濃度，炭水化物及びアミノ酸の消長について)，育雑，**13**：117-124. 1963
3. 細川定治・津田周弥： てん菜の遺伝的雄性不稔現象に関する組織化学的研究，(メンデル性雄性不稔現象に伴う葯の組織化学的変化)，甜菜研究会報，**4**：1-12. 1965
4. JENSEN, W. A.: Botanical histochemistory, p. 1-408. W. H. Freeman and Co., San Francisco and London, 1962
5. 中嶋　博・細川定治： 作物の細胞質雄性不稔性に関する組織化学的研究．第2報，てん菜の葯における DNA，多糖類および蛋白質の消長ならびに光合成産物の移行，北大農邦文紀，**8**：1-4. 1971
6. 中嶋　博・細川定治： 作物の細胞質雄性不稔に関する組織化学的研究．第3報，トウモロコシにおける ^{14}C 同化産物の部位別の配分，日作紀，**43**：1-7. 1974

Summary

The authors observed the difference in the starch reaction in the endothecium of anthers between fertile and male-sterile types of sugar beets. With the purpose of obtaining some informations about the physiological causes of this difference, the authors investigated the activity of phosphorylase which will play an indespensable role for the starch metabolism in endothecium, and the reaction of the inorganic phosphorus which is accompanied with the phosphorylase reaction.

The results can be summarised as follows:

1. In fresh anthers, the reaction of inorganic phosphorus observed by the utilization of ammonium molybdate became conspicuous gradually in fertile anther as the age of anther advanced to the pollen stage at which the reproductive and vegetative nuclei are completed, and after this stage, the reaction decreased. The intensity of reaction in male-sterile anther was weaker than that in fertile anther during all the developmental stages

of anther except at anthesis, though the increase of the reaction was continued until the developmental stage immediately before the anthesis.

2. No difference was observed in the starch accumulation by the treatment with G-1-P substrate between these two types. Being treated with this substrate, the inorganic phosphorus reaction was increased in both types, and the degree of increase in this reaction appeared to be higher in male-sterile anther in comparison with that in fertile anther.

On the basis of results mentioned above, it was estimated that no decrease in the phosphorylase activity directing to the starch synthesis exists in the male-sterile anther, and the difference in the intensity of the inorganic phosphorus reaction might be due to the difference in the protein metabolism between two types.