HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	馬鈴薯茎断片培養系の塊茎形成過程における細胞壁構成分の変化
Author(s)	入宇田, 尚樹; 喜久田, 喜郎; 岡沢, 養三
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 15(3), 235-241
Issue Date	1987-03-26
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12065
Type	bulletin (article)
File Information	15(3)_p235-241.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

馬鈴薯茎断片培養系の塊茎形成過程における細胞壁構成分の変化

入宇田尚樹・喜久田喜郎・岡沢養三
(北海道大学農学部作物理学教室)

(昭和61年9月24日受理)

Changes in Cell Wall Components During Potato Tuber Formation on Stem-Segments Cultured, *in vitro*

Naoki IRIUDA, Yoshio KIKUTA
and Yozo OKAZAWA
Crop Physiology Laboratory, Department of Botany Faculty of Agricultnre,
Hokkaido University Sapporo, 060, Japan

緒　言

植物の生長にあたり，植物体を構成する個個の細胞は伸長，分化，成熟に応じて細胞壁の質的変化をきたすと考えられている[9]。この細胞壁の骨格を構成する cellulose 繊維は，Rhamnogalacturonane, Arabinogalactane, および Xyloglucane などの多糖類と結合し，これらは組織の種類により若干の差異はあるが，いづれも基本的には類似した構造を示している[3,7]。

このような細胞壁組成に関する研究成果に立脚し，細胞生長に伴う細胞壁成分，とくに多糖類の質的量的変動に関する研究もある。軸状器官の組織細胞の長さは分裂時の数倍以上に達する事実を考慮すると，細胞伸長は細胞壁成分の変動に伴う壁面の硬度変化に負うところが少くない。例えば，エンドウの上胚軸切片はオーキシン処理により，その構成細胞の細胞壁に含まれる Xyloglucane 含量の顕著な増加が認められた[2]。またアズキの上胚軸細胞は伸長生長に伴い，紀胞壁硬度を増すがこの細胞壁構成の Hemicellulose 分画中の Xylose 含量の増大が指摘された[10]。

これらの事実より植物の生育相，齢，および生長部位によって構成細胞の細胞壁組成の変動に差用を生ずることが充分示唆される。

バレイショの塊茎形成はその生育過程における生育相の転換であり，伸長中の匍枝次頂部細胞の伸長生長より肥大生長への転換によって開始される[11]。塊茎細胞に関する細胞壁組成については，HOFF and CASTRO (1969)[6] の報告があるが，上記のような生育相の転換時における塊茎形成部位の細胞の細胞壁の質的，量的変動に関しては未だ充分解明されていない。本研究においてはバレイショ塊茎形成をより精密に検討するため，高い再現性を有する茎断片の無菌培養法により実験を行なって，塊茎形成過程における次頂部細胞の細胞壁成分の変動について追求した。

実験材料および実験方法

1) 材料および茎断片の培養

バレイショ塊茎 (*Solanum tuberosum* L. 品種，男爵いも) は北海道中央馬鈴薯原々種農場より供与され種いもを冷暗所に貯蔵し，適宜，25°C で催芽して徒長茎を作成した。この徒長茎の一節を含む茎断片の無菌培養は，OKAZAWA and IRIUDA (1980)[12] の方法に従った。MURASHIGE and SKOOG (1967)[8] の培地 (pH 5.7) に 8.0% 蔗糖，0.8% 寒天を添加し加熱溶解し培養フラスコに 30 mℓ づつ分注，加熱滅菌したのち，節を含む茎断片 (長さ 1.0 cm) を無菌的に培養した。また，対照実験として側枝伸長区を設け，0.1 mg/ℓ の gibberellic acid (GA) を上記培地に加え，塊茎形成過程と比較検討した。培養は暗所 20°C で 4 週間保温した。

2) 細胞壁分画の抽出と分離

培養茎断片より得た側枝先端部 (5 mm 10 本) を培養フラスコより適宜採集，生重測定ののち，80% ethanol 中で磨砕し可溶成分を抽出残渣を再び乳鉢で磨砕した。この操作を反復して得られた沈澱物を ethanol-ether で

脱脂した。この残渣に5 mℓの冷水を加え20°Cで5分超音波処理し，澱粉粒を微細化した。この操作を5反復し，全部の上清液を集めた。また，澱粉を完全に除去するため，α-amylase 処理 (30°C，2時間) を行ない，先の上清液を合わせて澱粉分画とした。残渣は I_2-KI 試薬により澱粉の混在が認められなかったためこれを紀胞壁分画とした。

この細胞壁分画は，5 mℓの1%蓚酸アンモニウムで80°C 3 g時間抽出し遠心分離 (3,000 g×5分) し，上清液を Pectins 分画とした。残渣は2 *M* CF_3COOH (TFA) で121°C 2時間加水分解したのち，遠心分離 (3,000×g，5分) し，上清液を Hemicellulose 分画，沈澱を cellulose 分画とした。

3) 単糖の Acetylation と Gas chromatography

単糖類のアセチル誘導体は乾涸した試料を $NaBH_4$ で2時間還元し無水酢酸を滴下し濃縮して得たシロップに methanol を加え濃縮して得た無水沈澱に水を加え，CH_2Cl_2 でアセチル化した単糖を抽出乾涸した。

単糖類のアセチル誘導体のアセトンに溶解液 (5 μℓ) を Chromosorb W (80～100 mesh) に2% Silicone OV-225 液相を充填したガラスカラム (1.5 m×4 mm) で分離した。Carrier gas は窒素を10 mℓ/min の流速で，分離槽の温度は210°C，試料注入温度215°Cに保った。相対検量値は各単糖のピークの面積を三角形法（ピーク高×半値幅）により算出した。

4) 細胞壁 Cellulose の酸加水分解，酵素分解

培養茎断片より発生した側枝先端部 (5 mm) から得た各生育時期の cellulose と3 *M* H_2SO_4 とを100°C 20時間酸加水分解した。これに水を加えて希釈したのち遠心分離 (3,000×g，5分) した未分解 cellulose は，anthrone-硫酸法 (VILES and SILVERMAN 1949)[15] により定量し処理前の cellulcse 量の百分率で示した。

また，酸処理の場合と同様に抽出分離した cellulose を0.5 mℓの5 m*M* MES (pH 5.5) に浸漬し，0.1 mℓ cellulase (明治製菓，1000単位) を添加し37°C 4時間保温したのち，0.4 mℓの80% ethanol を加え酵素反応を停止，反応液を遠心分離 (10,000×g，5分) して未分解 cellulose を集めた。

結　　果

1) 茎断片培養系の塊茎形成過程

塊茎形成区と側枝伸長区 (0.1 mg/ℓのGAを添加し培養) における側枝の生育状況を Fig. 1 に示した。塊茎形成区は培養7日目より側枝次頂部に膨大 (Swelling) が起き，11日目に膨大部の肥大が進み4週間目休眠芽を有する完熟塊茎となった。即ち，塊茎形成の過程はそれぞれ側枝伸長期，膨大期，肥大期，完熟期に分けて生育相の転換を示すことができる。また側枝伸長区（対照区）では発生した側枝は伸長生育を続け塊茎形成は認められなかった (Fig. 1)。

2) 塊茎形成部組織細胞の細胞壁成分の変化

細胞壁成分を3成分 (Cellulose, Hemicellulose, Pectins) に分画し定量した。塊茎形成区では側枝先端部細胞の細胞壁 cellulose 含量は側枝伸長期 (5日目) から

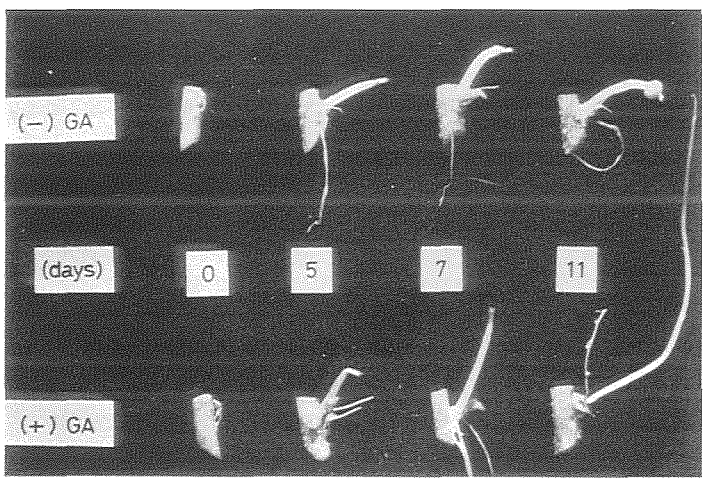

Fig. 1. Tuber formation and shoot elongation of shoot-tips on potato stem segments cultured *in vitro* with or without gibberellic acid.

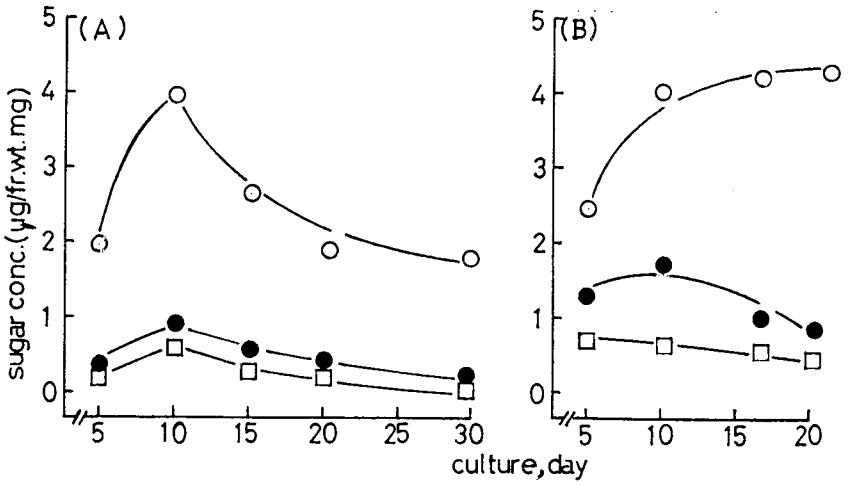

Fig. 2. Changes of cellwall constituents in shoot-tips on potato stem segments cultured *in vitro*.

(A) Process of tuberformation, −GA.
(B) Process of shoot elongation, +GA.
The cellwall constituents were separated into cellulose (—○—), hemicellulose (—●—), and pectins (—□—).

膨大期 (10 日目) に 2 倍の増加が認められ，肥大期から完熟期にかけて減少した。Hemicellulose, Pectins 含量は Cellulose 含量の 1/6～1/5 程で膨大期にわずかに増加した (Fig. 2-A))。側枝伸長区では (Fig. 2-B), 側枝先端部細胞の Cellulose 含量は伸長生長に伴って増加したが，培養経過とともに一定値を示した。Hemicellulose 含量は，側枝発生初期に高い値 (1.2～1.8 μg/mg 生重) を示したが，そののち減少した。Pectins 含量は培養期間中 0.45 μg/mg 生重で変化しなかった。Fig. 2 に示すように両実験区とも培養開始後 5～10 日目の cellulose 含量の増加が著しく生育相の転換に伴う側枝先端部の細胞構築の変動を示唆している。

3) Hemicellulose 分画の中性糖成分の変動

Hemicellulose を構成する糖としては，Rhamnose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galactose および Glucose を検出した (Fig. 3)。Table 1 は塊茎形成区および側枝伸長区の Hemicellulose 構成糖成分の変動を百分率で示した。塊茎形成区では膨大期，肥大期にかけて Glucose と Xylose が主成分で，完熟期には Arabinose の顕著な増加があった。これに対し側枝伸長区では，全培養期間を通じ Glucose (40～54%), Xylose (12～22%), Galactose (11～16%) の 3 種類の糖が主成分を占めた。この区では側枝の伸長生長という単一な変動であり，Hemicellulose を構成する糖の種類にも目立った増減はなかった。しかし塊茎形成区では側枝次頂部の伸長生長から塊茎形成への生育相の転換に伴い，Hemicellulose を構成する単糖の顕著な変動が観察された。

4) 細胞壁 cellulose の特性

側枝の伸長生長区では側枝先端部 5 mm の組織より分離した cellulose の 37～49% は酸処理によって加水分然されなかった。しかしながら塊茎形成区では，伸長生長区にくらべて酸耐性 cellulose の含量が低い (29～37%) が，膨大期にその割合が高い値を示した (Table 2)。

更に上記の Cellulose を Cellulose 処理した場合も，側枝の伸長生長区では未分解 cellulose 含量がほぼ一定値 (56～68%) を示したが，塊茎形成区では一般に低い値 (22～35%) を示した (Table 3)。特に膨大期には酸耐性 Cellulose 含量，Cellulase 耐性 Cellulose 含量とも高く，生育相の転換に細胞壁 cellulose の結晶化と融解が相互に進むと示唆される。またこの膨大期の側枝先端部組織細胞壁より分離した Cellulose 標品を 25 μm の篩で分別したところ 25 μm 以下の粒子は酸耐性の cellulose が 38% で，25 μm 以上の粒子では 23% が酸耐性であった。これらの結果は膨大期に細胞壁の Cellulose が大量に合成され，短かい結晶化した Cellulose による細胞壁の再構築が進むと示唆される。

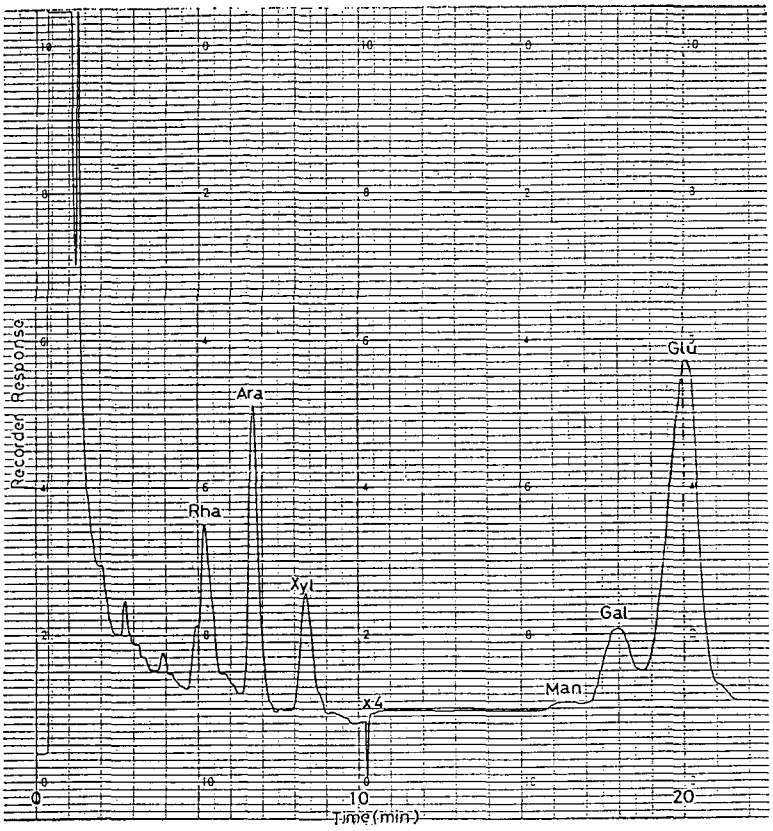

Fig. 3. Gas chromatogram of neutrla sugars from hemicellulose.
Rha : rhamnose, Ara : arabinose, xyl : xylose, Man : mannose, Gal : galactose, Glu : glucose.

Table 1. Sugars constituting hemicellulose fractions isolated from the apical 5-mm part of shoot-tips developed on potato stem-segments cultured *in vitro* with or without gibberellic acid The data are expressed as per cent of total sugar constituents in hemicellulose fraction isolated

Culture day	Glucose	Galactose	Mannose	Xylose	Arabinose	Rhamnose
A. (−GA Tuberization)						
4. (Stolon)	38.4	3.4	11.0	26.0	11.4	9.8
7. (Swelling)	28.8	3.2	4.4	37.8	9.8	16.0
14. (Developing)	45.4	4.5	4.3	26.4	12.5	6.9
28. (Maturing tuber)	28.9	5.3	3.8	24.9	27.7	9.4
B. (+GA Shoot-elongation)						
5. (Shoot-tip appeared)	54.3	15.6	10.8	11.5	3.8	4.0
10. (Developing)	43.5	10.9	9.2	21.8	5.9	8.7
16. (Elongating)	38.4	13.2	10.8	21.0	7.9	8.7
20. (Lateral shoot)	39.6	13.7	8.8	21.5	9.7	6.7

Table 2. The resistance to acid hydrolysis of cellulose fractions isolated from the apical 5-mm part of shoot-tips developed on stem-segments cultured *in vitro* with or without gibberellic acid
The data are expressed as per cent of cellulose contents before and after acid hydrolysis of cellulose fractions isolated

A. (Tuber formation)		B. (Elongation growth)	
Culture day	Percent of cellulose left	Culture day	Percent of cellulose left
4	31.0±1.3%	5	48.4±2.4%
7	37.5±1.0	10	49.1±2.1
14	29.6±2.5	16	37.5±0.4
28	32.5±1.8	20	41.2±1.3

Table 3. The residual amounts of cellulose after cellulase digestion of cellulose fractions isolated from the apical 5-mm part of shoot-tips developed on potato stem-segments cultured *in vitro* with or without gibberellic acid
The data are expressed as per cent of cellulose contents before and after cellulase digestion of cellulose fractions isolated

A. (Tuber formation, −GA)		B. (Elongation growth, +GA)	
Culture day	Per cent of cellulose left	Culture day	Per cent of cellulose left
4	30.8±2.5%	5	56.3±5.0%
7	35.0±1.6	10	68.6±1.1
14	23.1±2.0	16	64.4±0.5
28	21.8±0.4	20	67.9±0.8

考　　察

バレイショの塊茎形成は，伸長生長中の匍枝次頂部組織細胞が膨大し肥大生長へと転換することで，形成した塊茎は形態的あるいは機能的に茎の特性を維持しつつ，機能的には主として貯蔵器官としての役割を果している。

しかしながら，塊茎形成は生長点細胞の分化が伴わないが，生長率の変化による生育相の転換である。よって，バレイショの茎断片を無菌的に培養し，その塊茎形成過程における側枝先端部組織細胞の細胞壁多糖類を抽出して Pectins, Hemicellulose, Cellulose に分画し分析を試みた。本実験では，培養期間を通してこの紀胞壁は Cellulose が主成分で Pectins, Hemicellulose は極めて少なかった。

HOFF and CASTRO (1969) はバレイショ塊茎の細胞壁は Pectins' 55%, Hemicellulose 7%, Cellulose 28%，蛋白質10% を含むと報告している。

OKAZAWA and IRIUDA (1980) による培養小塊茎の場合，メークィンでは Pectins, Hemicellulose Cellulose はそれぞれ 6%, 6%, 88% で，男爵ではそれぞれ 8%, 5%, 87% であった。これらの報告と比較すると本実験では細胞壁に多量の Cellulose 含量を示したが，これらは品種および実験条件の相異に由来するものである。本実験の結果より塊茎形成過程における細胞壁の変化を考察すると，Cellulose 含量とその特性の変動を重視する必要がある。

培養茎断片より発生した側枝先端部組織細胞の Cellulos 含量は塊茎形成過程の側枝伸長期から膨大期にかけて増加し，そののち肥大期に至って減少した。また量的に少ない Pectins, Hemicellulose 含量についても伸長期から膨大期にわずかながら増加を示した。

BURSTRÖM (1974) は生長中のエンドウの茎節間細胞の細胞壁 Pectins, Hemicelullose, Cellulose の含量を検討し，Pectins の増加は細胞分裂期と一致するが，Cellulose の増加は節間伸長の活発な時期と一致すると報告し細胞壁成分と生長との関係を述べている。

側枝先端部組織細胞由来の Cellulose の酸加水分解処理の結果は膨大期の側枝先端部の Cellulose が他の生育時期の Cellulose よりその Polymerization の低下

があると推測できる。更に，この膨大期の側枝先端部のCellulose を Cellulase 処理した場合も，他の生育時期の Cellulose より強い耐性を示した。また，エンドウの側枝細胞の膨大の際に Cellulase が関与すると言う報告[4] があるが，本実験においても側枝膨大期にCellulase活性の増加が推察できるが，伸長期から膨大期の Cellulose 含量の著しい増加や，Cellulase の基質になり難い Cellulose の合成を考慮すると明確な結論は，今後の研究に委ねたい。

ジベレリン(GA) の培地への添加は側枝次頂部の塊茎化を阻害する。培養開始後の数日間は，側枝先端部は形態的に両実験区とも差異は認められないが (Fig. 1), Hemicellulose分画の構成単糖の種類，およびCellulose分画の耐酸性など物理，化学的差異が明瞭である。本実験から茎断片の培養開始と同時に側枝生長の質的変動が決定づけられていると推察される。SHIBAOKA (1974)[14] によれば，GA 処理により伸長生長を促進するアズキ下胚軸表皮細胞の Cellulose microfibril は細胞の縦軸に対し直角方向に配列しているので伸長生長の抵抗とはならないが，Cytokinin 処理によれば細胞縦軸と平行して配列し伸長生長に対して大きな障害となり，細胞横軸方向へ膨大すると述べている。バレイショの塊茎形成では，側枝先端部の肥大が次頂部組織細胞の膨大に始まる[1]。しかしこの塊茎形成過程における細胞壁と植物ホルモンとの関連性については未だ検討されていない。本実験の結果は，塊茎形成過程の促進によって側枝先端部細胞の細胞壁 Cellulose は伸長生長をしている細胞の細胞壁 Cellulose に比較して硫酸や Cellulase に対する耐性が顕著に低下すること，Hemicellulose を構成する中性単糖類は塊茎形成区では Glucose, Arabinose と Xylose が主成分であるが，側枝の伸長生長区では Glucose と Xylose および Galyctose が主成分であることを明らかにした。

塊茎形成の開始については，2つの概念が提出されている。その1つは WARNER (1934)[16] による「塊茎形成の過程は光合成産物量と植物体の CN 比によって制御されている。」というものである。すなわち体内に炭水化物の過剰蓄積をきたし，これが塊茎形成の直接的要因であるとするものである。これに対して，GREGORY (1956)[5] は，「短日条件下で葉身中に合成されるホルモンが匐枝へと転流されることにより塊茎形成が開始される。」とし，OKAZAWA (1967)[11] は，匐枝のジベレリン含量の低下を観察した。PALMER and SMITH (1969)[13] は匐枝の無菌培養を行ない培地にサイトカイニンを添加することによって塊茎形成を開始させることに成功した。しかしながら，多くの詳細な研究報告があるにもかかわらず塊茎形成の機構については依然不明な点が多い。

培養茎断片の側枝の塊茎形成は，側枝先端部の組織細胞の細胞壁に構造的あるいは物理化学的性質に変動が起り，その性質は培養開始と同時時に方向づけが決定されていると結論できる。

摘　　要

バレイショの徒長茎の茎断片培養を用いて塊茎形成過程の側枝先端部組織細胞の細胞壁成分とHemicellulose分画を構成する中性糖類の種類および Cellulose の物理的性質を調べた。

塊茎形成区では側枝先端部組織細胞の細胞壁は Cellulose 含量が高く，Hemicellulose, Pectins 含量は Cellulose の20%程であった。Cellulose 含量の最大値は膨大期の細胞で，この時期の Cellulose は耐酸性であり，Cellulose の基質となり難い結晶化した短かい microbibril であると推定した。

ジベレリン(GA) 添加培地で培養した側枝の先端部組織細胞は，伸長生長に伴って Cellulose 含量が増加するが，その後一定の値となった。この Cellulose は塊茎形成区のそれと比較して酸や Cellulose に極めて耐性のある結晶型繊維の性質を示した。Hemicellulose 含量は培養初期に高い値を示したが，その後減少した。Pectins 含量は培養期間中ほぼ一定値 (生重1g当り 0.45 mg Pectins) を示した。

Hemicellulose 分画を構成する単糖類は，塊茎形成区では Glucose, Arabinose, Xylose が，伸長生長区では Glucose, Xylose, Galactose が主成分を占めた。

側枝先端部搬織細胞の細胞壁における塊茎形成区とGA 処理による伸長生長区との構造的あるいは化学組成的性質の差異は培養開始時期に決定づけられていることが明らかとなった。

引 用 文 献

1. BOOTH, A.: Role of growth substances in development of stolons. *in* The growth of the potato. IRVINS, J. D. and MILTHORPE, F. L. edited. 99-113. 1963
2. BRUSTRÖM, H. G.: Patterns of syntheses during internodal growth of pisum stems. *Z. Pflanzenphysiol.* **74**: 1-13. 1974
3. DARVILL, A. G., MCNEIL, M. and ALBER-

SHEIM, P.: Structure of plant cell walls. *Plant Physiol.* **62**: 418-422. 1978

4. FAN, D. F. and MACLACHLAN, G. A.: Control of cellulase activity by indoleacetic acid. *Can. J. Bot.* **43**: 1025-1034. 1966
5. GREGORY, L. E.: Some factors for tuberization in the potato plant. *Am. J. Bot.* **43**: 281-288. 1956
6. HOFF, J. E. and CASTRO, M. D.: Chemical composition of potato cellwall. *J. Agr. Food Chem.* **17**: 1328-1331. 1969
7. KEEGSTRA, K., TALMADGE, K. W., BAUER, W. D. and ALBERSHEIM, P.: The structure of plant cell walls. III. A model of the wall of suspension-cultured sycamore cells based on the interconversions of the macromolecular components. *Plant Physiol.* **51**: 188-196. 1973
8. MURASHIGE T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 437-497. 1962
9. NEVINS, D. J., ENGLISH P. D., and ALBERSHEIM, P.: Changes in cellwall polysaccharides associated with growth. *Plant Physiol.* **43**: 914-922. 1968
10. NISHITANI, K. and MASUDA, Y.: Growth and cellwall changes in azuki bean epicotyls. I. Changes in wall polysaccharides during intact growth. *Plant Cell Physiol.* **20**: 63-74. 1979
11. OKAZAWA, Y.: Physiological studies on the tuberization of potato plants. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **55**: 267-336. 1967
12. OKAZAWA, Y. and IRIUDA N.,: On occurrence of defected potato tubers with rough russeted skin. *J. Crop Sci.* **49**: 58-65. 1980
13. PALMER, C. E. and SMITH, O. E.: Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. *Nature.* **221**: 279-280. 1969
14. SHIBAOKA, H.: Involvement of wall microtubules in gibberellin promotion and kinetin inhibition of stem elongation. *Plant Cell Physiol.* **15**: 255-263. 1974
15. VILES F. J. Jr., and SILVERMAN L.,: Determination of starch and cellulose with anthrone. *Anal. Chem.* **21**: 950-953. 1949
16. WERNER, H. O.: The effect of a controlled nitrogen supply with different temperatures and photoperiods upon the development of the potato plant. *Nebraska Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* **75**: 132. 1934

Summary

The changes in cellwall composition differentiated from subapical part of potato stolon were investigated during the tuberformation by means of potato stem segment cultures, *in vitro*, while gibberellic acid was used to promote elongation growth of stolon as an inhibitor of tuber formation.

The isolated cellwall preparation was separated into three fractions: pectins; hemicellulose; and cellulose. Among the cellwall constituents, the cellulose content increased prior to swelling in stolon-tips. Since the cellulose isolated from the stolon-tips at the swelling stage was the most resistant to acid hydrolysis, it could be assumed that the nature of the cellulose in this stage was having crystallized with the minimal size of polymerization degree, suggesting that cellulose was involved in a very active turnover during tuber formation.

The main hemicellulosic sugars of the cellwall from stolon-tips were rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose, and glucose, although their relative proportions were different from those found for GA-treated shoot-tips. The levels of arabinose, galactose and mannose were influenced by growth and differentiation of stolon-tips, whereas those produced no significant effect on the behaviour of xylose, rhamnose and glucose contents.

It is possible to say that the first sign of tuber formation appears to change in the cellwall conformation in the subapical region of potato stolon probably by the action of a certain signal prior to the swelling in the stolon-tips.