



Kobe University Repository : Kernel

タイトル Title	落花生におけるCa45のマイクロオートグラフ作製法並びにその分布に就いて(Microautoradiographic Technique and Distribution of Radioactive Calcium by the Peanut Fruit)
著者 Author(s)	水野, 進
掲載誌・巻号・ページ Citation	兵庫農科大学研究報告. 農学編,3(2):105-109
刊行日 Issue date	1958
資源タイプ Resource Type	Departmental Bulletin Paper / 紀要論文
版区分 Resource Version	publisher
権利 Rights	
DOI	
URL	http://www.lib.kobe-u.ac.jp/handle_kernel/81006560

Create Date: 2017-12-18



落花生における Ca^{45} のマイクロオートグラフ作製法

並びにその分布に就いて

水 野 進

Microautoradiographic Technique and Distribution of Radioactive Calcium by the Peanut Fruit

Susumu Mizuno

緒 言

作物体内への物質の吸収及び体内での移動、集積を調べるために、放射性同位元素を利用して、その放射能により組織或は細胞内に於ける物質の分布状態を検討する事を目的としたものをマイクロオートラジオグラフィと呼び、近年その研究並びに応用が著しく進歩して来た。

然しなほ、その研究段階は初期的なものであつて、使用する放射性同位元素の種類及び量、又植物の種類等により一定の作製法は確定していない現況である。特に、 Ca^{45} について見ると、現在その利用が最も進んで居るのは医学、動物学に於ける骨格の研究であつて、しかもなほ使用量については各研究者により種々変化している^{5,16}。植物における Ca^{45} のオートラジオグラフ作製について見ると、RIRIE 他¹⁴ がトマト、小麦、アルファルファ、レッドクローバーの葉において、X-Ray のフィルムで30日間露出を行つている。この時の使用 $Ca^{45} Cl_2$ 量は $50 \mu C/18 Pounds$ of soil であつた。又 BLEDSOE 他¹² は落花生において、結実圏 (Fruiting Medium) 根圏 (Rooting Medium) に一植物体につき $10.5 mc$ の $Ca^{45} Cl_2$ をあたえている。この様に投与量は研究者により著しく違ふものであつて、マイクロオートラジオグラフ作製における投与量、露出期間は未確立の現状である。

一方、落花生においては地上花の子房は受精後子房柄の伸長により地下に移動し、そこで成熟を行うものである。子房柄については PETTIT,¹² WALDRON,¹⁹ REED,¹³ JACOBS⁸) により、茎と同様の組織を持ち、又根と同様な役目をはたす事が認められた。即ち、PETTIT¹²) は子房柄の地下部は根毛状の表皮を形成し、これは吸収組織の一部であると述べている。又 WALDRON:¹⁹) は子房柄は水分及び養分を吸収するものと考えた。

次に結実に関する研究において、VAN DER VOLK¹⁸ は結実に最も必要なものは水と暗黒であると述べている。渋谷氏¹⁶) も同様な事を報告している。BURKHART & COLLINS⁹) は結実圏における Ca の存在により結実がより

有効な事を述べた。BRADY 他²) は結実圏に Ca 液を加へた時に有効であつたと述べ、HARRIS⁶) は結実圏に Ca を加へなかつた時、結実は無視出来る事を示した。

BLEDSOE 他¹²) の Ca^{45} 使用の研究によれば、根圏に加へられた Ca はその大部分が葉、茎及び若い子房に分布し、子房柄より吸収された Ca は殆んどが種実 distributes し、その量は莢、子房柄、種子の順であると述べている。又渋谷、鈴木両氏¹⁷) によると空莢の発生は石灰不足の場合、特に結実圏における Ca 不足が影響するものであり、Ca は直接種子に蓄積されず間接的に種子形成物質の生成に貢献する物質であろうと述べている。以上の様に結実に関する研究が数多くなされているが、Ca が子房柄中で種子形成物質生成に如何なる作用を行うものであるかについては現在手のつけられていない状態である。而して、この問題解決のためには、まづ種実中における Ca の分布状態が如何になつているかを明らかにしなければならぬが、その組織学的研究は皆無である。

よつて著者は、 Ca^{45} のマイクロオートラジオグラフ作製について二三の方法を行い、更に結実圏に与えられた Ca^{45} の子房柄、並びに種実中における分布をオートグラフにより明らかにしたのでその一部を報告する。

材料並びに方法

材料は匍匐性落花生千葉74号であり、栽培状態は第一

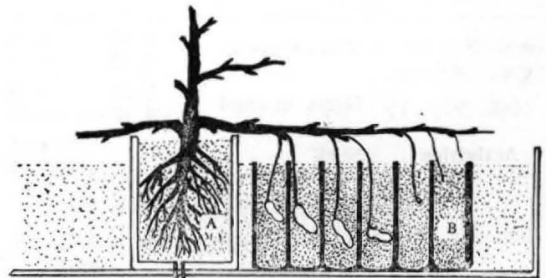


Fig. 1 Diagrammatic view of the peanut plant showing: A, rooting zone B, fruiting zone.

図に示す如く根圏は 1/5ワグナーポットに砂耕栽培を行い結実圏は子房柄が 3cm. に伸長した時に一壇あたり 10 μ Cの $Ca^{45}Cl_2$ を水耕液⁷に加へ壇中に出来るだけ均一に与えた。壇中には250gr. の砂を入れ雨水の浸入を防ぎ、一週間に一度水耕液を加へて適度の湿度を保つた。而して一定期間の後子房柄を取り出し、一方でマイクロオートラジオグラフを作製し、他方灰化法によりCaを抽出し、endo-window型のGeiger-Muller Counter Tube (G.M.-B-5) 下5cm. にて相対的の放射能の強度を求めた。

結果並びに考察

先づオートラジオグラフ作製の方法であるが、当実験の場合植物体の一部(子房柄)を長月日放射能のもとにさらすので使用放射性同位元素の量の多少は植物体に影響するところが大である。即ち使用量の多い時は突然変異或いは発育不良等種々の変化が起き正常の落花生生育は得られない。又少い場合は植物体に影響はないが、オートラジオグラフ作製の場合、放射エネルギーの微小により期待するオートラジオグラフを得ることは困難となる。よつて著名は、RIRIE,¹⁰ BLEDSOE¹¹等の研究をもとにし植物体に影響なく、しかもオートラジオグラフ作製に十分である量を考え乾燥砂 250 gr. に対して 10 μ Cの $Ca^{45}Cl_2$ を使用した。作製の方法に関しては多くの方法が考えられ C.L. COMAR,⁴或いは古関氏⁹等によりくわしく説明されているので省略するが、著者の研究においては Stripping Method を用いた。この方法によると組織の構造と放射性同位元素の存在位置を同一プレパラートにて観察出来、更に解像力の比較的よいオートグラムが得られる利点を持つものである。子房柄の各部分の固

定は、Caの流出を防ぐため、組織化学的研究に利用されている Kóssa氏¹²法によつた。次いでパラフィン包埋を行い15 μ , 25 μ の切片とし、デラフィールド氏のヘマトキシリンで染色後、1%チエロイジン液で切片をおおい(2回)、感光乳剤膜を切片の上にかぶせた。この場合使用感光膜は富士オートラジオグラフィ用乾板(Stripping Method用)であつた。切片は光をさえぎり、乾燥してからデシクターの中に入れ冷蔵庫中で8, 16, 32, 64, 128の各日数間保存した。即ちこの保存期間が露出期間である。露出終了後、富士 FD-111 現像液で 20°C. 3分間現像を行い、定着水洗後アルコールで脱水(95%アルコール, 純アルコール各3分)、キシロールで透徹し(プレパラートが3分以上キシロール中に浸らぬよう注意)、バルサムで封入した。同時に前記チエロイジン膜でおおつたプレパラートをendo-window型の Geiger Muller Counter Tube (G.M.-B-5)下 0.5cm. の位置に置き、3分間の相対的の放射能の強度を求めた。これによると子房柄1切片中(25 μ)の Ca^{45} の強度は大體 2.4 Counts/Min. であつた。また莢の 15 μ と 25 μ の切片においては各々 1.7, 3.7 Counts/Min. であつた。なほ各切片の面積は大體 8 mm² であつた。その結果を見ると、先づ露出日数と適正オートラジオグラフの関係は第2図a, bに示す如く32日露出のものにおいて感光はわずかではあるが行はれている。しかしそれ以前のは全然感光していない。次いで64日のものにおいては十分なるオートラジオグラフが得られ、128日のものにおいては露出過度の状態を呈している。又切片の厚さと感光度の関係をみると同一露出日数64日において、第2図c, dに示す如く25 μ の切片のものにおいて適正露出オートラジオグ

TABLE 1. Development of pod and activities* of various portions of peanut fruit

Days after soil penetration		5	10	20	30	40	55	80
Length of pod (cm.)		0.3	1.0	2.5	3.5	"	"	"
Length of seed (cm.)	Lower seed	-	0.3	1.1	1.3	1.5	1.7	"
	Upper seed	-	0.1	0.3	1.2	1.3	1.6	"
Activities	Top of gyno.	0.67 ±0.12	2.26 ±0.14		3.56 ±0.15		3.77 ±0.08	
	Gyno. in sand	2.26 ±0.17	4.78 ±0.12		5.25 ±0.10		5.35 ±0.06	
	Shell		4.11 ±0.07	(Pod)	7.07 ±0.04		21.12 ±0.05	
	Seed				0.81 ±0.02		0.85 ±0.07	
	Seed-coat ⁵				1.40 ±0.90		6.96 ±0.11	

* Number of disintegrations a minute a milli-gram of oven-dried tissue.

ラフが得られ、 15μ のものは露出不足を思はせるものであった。ここで考えられることは、露出時間と云うものが切片の Count 数によつてきまるものでなく、切片における Count 数が少なくともそれが或る一部に集中している場合、その露出時間は Count 数が多くても放射同位元素が全面にわたる場合より短時間でよいということである。事実植物体内における Ca^{45} の分布というものは、或る一定の組織、細胞の中に集中するものであり、従つて切片中の Count 数によつて適正露出時間は決定出来ないものと思はれる。ただ切片中の Count 数が多ければ、当然集中組織の Count 数も大となるので露出時間決定の目安として考えられるものである。又 Ca^{45} のエネルギーの弱い事を考えた場合、切片を薄く切るとは当然細胞中の Ca^{45} の含量低下をきたし、オートラジオグラフ作製不可能な場合が考えられる。以上の事より著者は植物体に影響を与えない普通のトレーサー用として C^{45} を使用する場合、即ち砂 250gr. に $10\mu\text{C}$ を与えた場合 Ca^{45} のオートラジオグラフ作製は切片の厚さ 25μ 前後が適当であり、露出日数は2ヶ月前後を必要とするものと思う。

さて、次に上記の方法によつて落花生子実発達時における Ca^{45} の分布を調査した結果は次の様である。まづ、子房柄が地中に侵入した後の肥大状態を見ると、西川、三上両氏¹⁰⁾の研究によると莢の大きさは開花後35日目において、子実の大きさは42日目において殆んど最大に達する。莢の生体重は開花後35日目に最高値を示し、その後水分の減少に伴い減ずる傾向がある。と述べている。著者の調査によつても第一表に示す如く子房柄が地下侵入後30日前後で莢の大きさは最大に達している。又子実の大きさは40日～55日頃に殆んど最大に達している。よつて莢の肥大開始時、種子の肥大開始時、莢の最大達成時ならびに種子最大達成時につき各々 Ca^{45} の子実中の分布状態を eudo-window 型の Geiger-Miiller Counter Tube (G. M.-B-5) 下 5 cm にて、相対的の放射能の強度を求めて見ると、第一表の如くである。即ち、生育時における子房柄より吸収される Ca^{45} は、種子の肥大開始後(地中侵入後10日)子房柄の地上部、地下部において著しい増加は認められないものである。莢中の Ca^{45} は種子の肥大と共に次第に増加して行くものであり、特に莢の生長が停止し種子の成熟が進む時期(30日～55日まで)の Count 数は、莢の生長期に比し著しい増加が認められた。又種皮中の Ca^{45} は種子の完熟に近い時期において増加している。種子中には殆んど Ca^{45} の存在は認められなかつた。次に、子房柄、子実中の如何なる組織に Ca^{45} が分布するかにつきマイクロオートラジオグラフにより観察すると、第2図e～iに示す通りである。即ち、子房柄中にお

ける Ca^{45} の分布は節部の外周にある厚膜組織をかこむ内皮の一層に集中して、地上部に比し地下部は分布が著しい(第2図e, f)。子実においては10日目(第2図g)のものは莢の基部の仮導管の外側と外皮中皮の一部のみに分布している。そして莢の先端に進むにつれ Ca^{45} の分布は見られなくなつていく。30日目(第2図h, i)になると、莢の仮導管の外側にそつて Ca^{45} の分布は基部から先端まで続いており同時に基部の外皮、中皮の一部組織にも Ca^{45} の分布をみ、基部と先端部とは、基部組織の方が多くの Ca^{45} の存在を示している。又仮導管の内側の組織には全然 Ca^{45} の存在は発見出来なかつた。

結 論

以上行つた実験より、まづ Ca^{45} のマイクロオートラジオグラフ作製については、250gr. の砂に $10\mu\text{C}$ の Ca^{45} を与えた場合、切片の厚さは 25μ 前後が最も適して、その露出時間は富士オートラジオグラフ用乾板 (Stripping Method 用) を用いて大体2ヶ月前後のものと思はれる。

次に地中より子房柄が吸収する Ca の分布状態は子房柄においては大体地中侵入後10日間以後の増加は殆んどなく、厚膜組織の外側内皮の一層に集中するものである。子実における分布は、莢に最も多く、しかも莢の生長停止後種子の成熟の進む時期に著しい増加が認められ、若い子実においては莢の基部の外皮、中皮の一部、及び仮導管の外側の組織のみに分布し、先端部の組織には存在しない。而して種子の成熟に従つて、次第に先端部の同じ組織に分布して行くものである。

(工芸作物学講座, 昭33.9; 1 受理)

参 考 文 献

- 1) BLEDSOE, R. W., COMAR, C. L. & HARRIS, H. C. : *Science*, **109**: 329~330, 1949.
- 2) BRADY, N. C., REED, J. F. & COLWELL, W. E. : *J. Amer. soc. Agron.*, **40**: 155~167, 1945.
- 3) BURKHART, L. & COLLINS, E. R. : *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **6**: 272~280, 1941.
- 4) COMAR, C. L. : *Radioisotopes in biology and agriculture*. MCGRAWHILL, 1955.
- 5) COMAR, C. L., VISEK, W. J., LOTZ, W. E. & RUST, J. H. : *Amer. Jour. Anat.*, **92**: 361~389, 1953.
- 6) HARRIS, H. C. : *Plant Phys.*, **24**: 150~161, 1949.
- 7) HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. : *California Agr. Exp. Sta. Cir.*, **347**: 1939.
- 8) JACOBS, W. P. : *Amer. Jour. Bot.*, **34**: 361~370, 1947.

- 9) 古関靖夫：オートラジオグラフィー。納谷書店，1954.
- 10) 西川五郎，三上藤三郎：日作紀，18，71~73，1949.
- 11) 岡本耕造，上田政雄，前田隆夫：顕微鏡的組織化学。医学書院，1955.
- 12) PETTIT, A. S. : *Mem. Torrey Bot. Club.*, 4, 275~296, 1895.
- 13) REED, E. L. : *Bot. Gaz.*, 78, 289~310, 1942.
- 14) RIRIE, D. & TOTH, S. J. : *Soil Sci.*, 73 1~10, 1952.
- 15) ROBERT, D. A. & DOBYNS, B. M. : *Science*, 109 327~328, 1949.
- 16) 渋谷常紀：農及園，11，188~1894，2125~2132，1936.
- 17) 渋谷常紀，鈴木正行：日作紀，23，87~91，1954.
- 18) VAN DER VOLK, P. C.: *Pub. Sur la Physiologic Vegetable*, Nimeque, 1914.
- 19) WALLRON, R. A. : *Contr. Bot. Lab. Univ. Pennsylvania*, 4, 302~338, 1919.

Summary

Peanut plants of the Virginia Runner Variety (Chiba 74) were grown in sand culture with the root and fruit zones isolated from each other as shown in Fig. 1. The top of each pot, which held the root of the plant, was placed 1 inch above the surface of the sand in the fruiting glass jug. When the gynophore reached the surface of the jug, $\text{Ca}^{45}\text{-Cl}_2$ was added, at the rate of $10\mu\text{c}$, to each jug

containing 250 gr. of sand.

As regards the technique for microautoradiograph, the stripping emulsion method was tried by using fuji autoradiographic plate ET-2E in a dark room. And the slides were exposed to β -ray of Ca^{45} from 8 to 128 days in the light tight box. The best exposure time was about 2 months in the case of histological section of 25μ . And it was important to avoid overexposure, since this caused a loss of resolution as shown in Fig.2 (a-d).

The relationship between the deposition of Ca^{45} in peanut and the anatomical structure was presented in Fig. 2 (e-i). In the autoradiogram of the longitudinal sections of 10,30-day-old fruit, it was noted that the extent and nature of the Ca^{45} deposition was characteristic and was a reflection of the particular fruit structure, as follows;

A, the Ca^{45} -containing compounds were relatively concentrated in the cortex of the gynophore, especially in the single layer of endodermis.

B, within the pod, they were found to be in the quantities in the tracheid and epidermis parts of the shell, while in the seed or seed coat scarcely any Ca^{45} was found. It seemed that from the basal region of shell a considerable amount of Ca^{45} entered the terminal one during the development of the fruit.

(Laboratory of Industrial Crop Science,
Received Sept. 1, 1958)

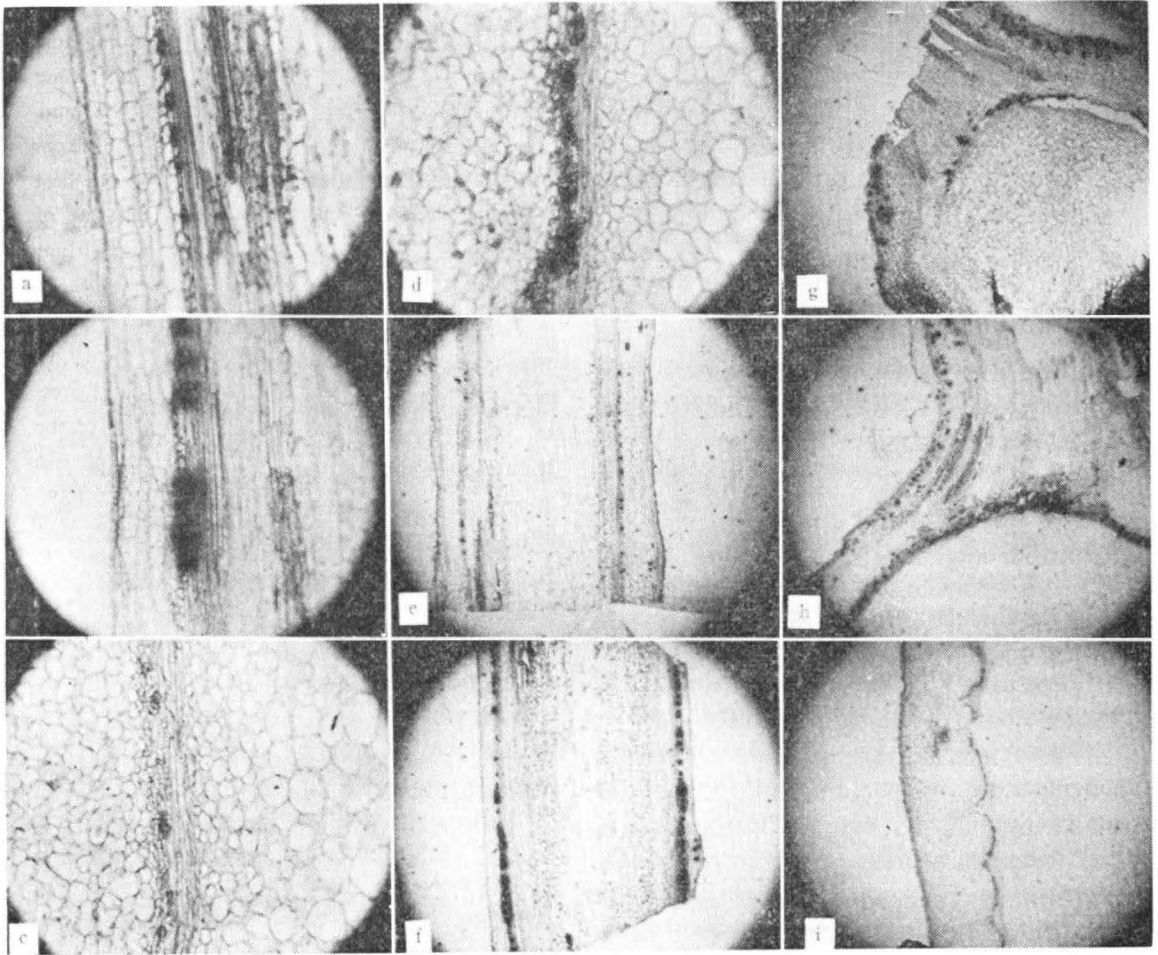


FIG. 2. Radioautograph of peanuts. Black spots show concentration of Ca^{45} .

- | | |
|---|---------------------------------------|
| a, exposure time 64 days, section 25μ . | f, gynophore in sand (30-day-old). |
| b, " 128 days, " | g, shell of 10-day-old. |
| c, section 15μ , exposure time 64 days. | h, i, shell of 30-day-old. |
| d, " 25μ , " | |
| e, top of 30-day-old gynophore. | (a-d $\times 100$, e-i $\times 20$) |