

(原著論文)

アカマツ花粉細胞壁多糖成分の性質

最上 則史¹・中村 澄夫²・中村 紀雄¹¹ 横浜市立大学大学院総合理学研究科 〒236 横浜市金沢区瀬戸 22-2² 神奈川歯科大学生物学教室 〒238 横須賀市稲岡町 82

(1997年3月26日 受付, 1997年5月15日 受理)

Properties of Polysaccharides from the Pollen Cell Wall of *Pinus densiflora*Norifumi MOGAMI¹, Sumio NAKAMURA² and Norio NAKAMURA¹¹ *Graduated School of Integrated Sciences, Yokohama City University,
Yokohama, 236 Japan*² *Biological Laboratory, Kanagawa Dental College, Yokosuka, 238 Japan*

To understand the growth mechanism of the pollen tube of *Pinus densiflora*, the sugar composition of cell wall constituents from mature quiescent pollen grains and germinated pollen was analyzed by gas-liquid chromatography. The wall polysaccharides were fractionated into pectic substance, hemicellulose A, and hemicellulose B (HB) fractions, and the properties of the pectic substance and HB polysaccharides were examined. The yield of the pectic substance fraction from the quiescent pollen grain wall was very small, whereas that from the wall of germinated pollen was larger; the yield of the HB fraction from the cell wall of germinated pollen was also larger. These results indicate that these polysaccharide fractions are involved in formation of the pollen tube wall.

The main monosaccharide in the pectic substance fraction from the quiescent grain wall was arabinose (ca. 40%), and uronic acid accounted for ca. 10% of the total weight. In contrast, the proportion of uronic acid in the pectic substance fraction from the germinated pollen increased to 25%. In both cell walls, the main component was the HB fraction and the main monosaccharide in this HB fraction was arabinose.

The cell wall components of germinated pollen of *P. densiflora* are very different from those of *Camellia japonica* pollen tubes. The cell wall components, tube growth and tube wall formation in pine and camellia pollen are discussed, based on these results.

Key words : *Camellia japonica*, hemicellulose, pectin, *Pinus densiflora*, pollen wall polysaccharides

緒 言

植物細胞の中でも非常に早い成長速度を示す被子植物の花粉管は、細胞内でオルガネラの局在性がみられ、先端成長をするという特徴を持つ⁽¹⁾。花粉管の伸長には、先端部分で行われる細胞壁の形成が重要な役割をはたしており、これまでに様々な種類の被子植物の花粉で花粉壁多糖成分の分析が行われてきた^(2, 3)。それによると、被子植物の花粉管壁はヘミセルロース、ペクチン質、そしてセルロースで構成されており、とくにペクチン質は花粉管先端での一次壁の形成および管壁の外層の形成に関与していることが知られている⁽⁴⁾。ペクチン質の性質やその合成は花粉管伸長に大きな影響を与えると考えられる。

伸長組織におけるペクチン質は、その主鎖であるポリガラクトン酸が構造的多様性を持つことにより細胞成長に重要な役割をはたしているが⁽⁵⁾、花粉管壁では先端部分にはメチルエステル化したペクチンが、また花粉管外層には脱メチルエステル化されたペクチンが存在しているなど、分布に局在性がみられることが免疫化学的な実験より明らかにされている^(6, 7)。

一方、裸子植物の花粉管の成長速度はきわめて遅く、またオルガネラの局在性がみられないなど被子植物に比べてかなり異なっている⁽⁸⁾。また、裸子植物花粉粒壁の多糖成分については僅かに報告^(9, 10)がみられるものの、花粉管壁の多糖成分と花粉管伸長の関係についてはほとんど研究されておらず、ペクチン質が花粉管伸長にどのような関与をしているかについてもはっきりとしていない。

現在我々は、花粉管伸長と細胞壁形成の関係を知らるために、アカマツ花粉壁より多糖成分を抽出し、その性質を調べ、ツバキなど被子植物花粉細胞壁との相違を調べている。本論文ではとくにペクチン質とヘミセルロース性多糖の化学的性質について調べた結果を報告する。

実験材料と方法

1. 材料

開花前のアカマツ (*Pinus densiflora*) の雄花を採集し、25°C 恒温下で開齎させた後、花粉のみを採取した。花粉はさらに恒温器中 (30°C) で乾燥させ、使用時まで -20°C で保存した。

花粉細胞壁を調製する際には、無水アセトンで洗っ

た花粉を、糖を含まない 1.3% 寒天培地または蒸留水 (DW) 上で 30°C で 40-48 時間培養した。

ツバキ花粉は、細胞化学の観察に際しては 6 時間、ペクチンの抽出に際しては 20-24 時間、0.3M ショ糖-1.3% 寒天培地上で培養した。

2. 花粉管壁多糖類の細胞化学

前報⁽¹¹⁾に準じ、花粉壁のカロースの検出には 0.01% アニリンブルー (AB, pH 11)、0.5% ラクモイド-50% エタノール液、 β -グルカンの検出には 0.01% カルコフロアホワイト液を使用し、ペクチンの検出には 0.01% ルテニウムレッド液を使用した。AB とカルコフロアホワイト染色に際しては蛍光顕微鏡で観察した。

3. 花粉壁多糖類の抽出分画

成熟花粉粒または発芽花粉を DW に懸濁し、フレンチプレス (130-150 MPa) で破碎した。花粉破碎液を遠心分離 (10000×g, 20 分) して得られた沈殿を再び DW に懸濁し、遠心分離 (2000×g, 10 分) して沈殿を得た。この沈殿を DW に懸濁し、沸騰水中に 10 分間保ち、冷却後、ヒト唾液アミラーゼ (0.1%, pH 6.5, Sigma) を加えて 30°C で一晩攪拌放置した。デンプンを消化した細胞壁懸濁液を遠心分離 (2000×g, 10 分) し、得られた沈殿をアルコールとアセトンで洗い、減圧下で乾燥させたものを粗花粉壁標品とした。そして細胞壁多糖を前報⁽¹²⁾に準じてペクチン質、ヘミセルロース A (HA)、ヘミセルロース B (HB)、 α -セルロース (残渣) 画分に分画した。ペクチン質の抽出には 20mM 蔞酸アンモニウム (pH 4.2)、ヘミセルロースの抽出には 24% KOH を使用した。各画分の多糖をエタノール沈殿物として回収した。

4. 細胞壁多糖の精製

発芽花粉細胞壁より抽出したペクチン質と HB 画分を DEAE-セルロース (DE-32, Whatman) を用いたカラムクロマトグラフィーで部分精製した。

ペクチンの精製においては、発芽花粉をフレンチプレスで破碎し、遠心分離して得た沈殿を 1M NaCl 溶液中で攪拌してタンパク質を除き、得られた沈殿を粗花粉細胞壁標品とした。熱シュウ酸アンモニウム抽出を 5 回行い、得られた上清を減圧下で濃縮し、DW に対して一晩透析した。透析後の溶液にプロティナーゼ K (0.02%, Boehringer-Mannheim) を加え、25°C で一晩攪拌放置した。この溶液を DW に対して

透析した後に、終濃度が10%になるようにCaCl₂を加えてペクチンを沈殿させた。このようにして得たペクチンを0.5% EDTAを含む10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で緩衝化したカラム (OH⁻タイプ, 2.2×35cm) につけ、NaCl 濃度勾配 (0-0.5 M) により溶出した。7ml ずつ画分を集め、多糖のピークは1つのみ検出されたのでこの部分を集めて減圧濃縮し、透析した後、凍結乾燥してペクチン部分精製標品とした。

HBについては、HB 画分標品をDWに溶解し、カラム (CH₃COO⁻タイプ, 2.2×37cm) につけ、0.01M, 0.3M, 1M 濃度の NaCl 液で段階的に溶出した。最も糖量の多い画分を集め、透析後、凍結乾燥し、HB 部分精製標品とした。

タバキ花粉管壁からのペクチンの抽出、部分精製は前報⁽¹³⁾に準じて行った。

5. 糖の分析

多糖類の加水分解および中性糖のガスクロマトグラフィーによる分析は前報⁽¹²⁾に準じて行った。ウロン酸量はガラクトロン酸を標準としてカルバゾール-硫酸法⁽¹⁴⁾で、また総糖量はグルコースを標準としてフェノール-硫酸法⁽¹⁵⁾により測定した。

6. 電気泳動

Kikuchiらの方法⁽¹⁶⁾に準じて、10mM EDTAを含む2.5% 酢酸-2.5% ピリジン緩衝液 (pH 4.7) にペクチンを溶解し、同緩衝液で緩衝化したセルロースアセテート膜 (SEPARAX-D, 富士フィルム) を用いて電気泳動を行った (100V, 30分)。アセテート膜は0.5% トルイジンブルーで染色した。標準物質としてオレンジ製ポリガラクトロン酸 (PGA, Sigma) とエステル化度の異なるレモン製ペクチン (Sigma, エステル化度 30, 60, 90%) を用いた。また、それぞれの標品を脱エステル化するために0.1N 水酸化ナトリウムで処理した (4°C, 30分間)。

結 果

1. 発芽と管伸長

アカマツ花粉は発芽、管伸長に長時間を要する。このため培養中にしばしば微生物が繁殖しがちであり、また糖培地で成長している花粉細胞内には多量のデンプンが蓄積される。これらは細胞壁調製の支障となるため、アセトンで洗った花粉を無糖培地で培養するこ

とを試みた (Fig. 1)。アセトン処理は除菌に対してはあまり効果的ではなかったが、発芽促進効果を示した。とくに無糖培地において、アセトン処理した花粉はショ糖培地の場合と同じような成長を示した。この理由については現在検討中である。また無糖培地で成長した花粉はデンプンが少なかった。したがって以後の実験では、アセトン処理した花粉を無糖培地で成長させた。

2. 花粉管壁多糖類の細胞化学

花粉管壁の多糖の分布を知るために、46時間培養した花粉をAB, ラクモイド, カルコフロアホワイト, ルテニウムレッド色素で染色し、光学顕微鏡または蛍光顕微鏡で観察した。花粉管壁はカロースの存在を示すAB, ラクモイド, カルコフロアホワイト染色によって壁全体がごく薄く染色される程度であった。被子植物花粉では、ABによって管先端部分は染色されずにその下部の管壁全体が濃く染色されるが、アカマツ花

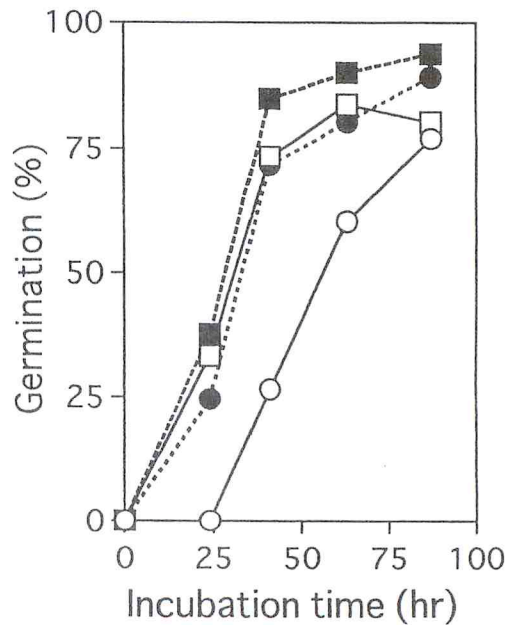


Fig. 1. The germination percentage of *Pinus densiflora* pollen. Untreated pollen grains (clear symbols) and grains treated with acetone (solid symbols) were incubated on 0.1 M sucrose (□, ■) or sugar-free (○, ●) solution at 30°C.

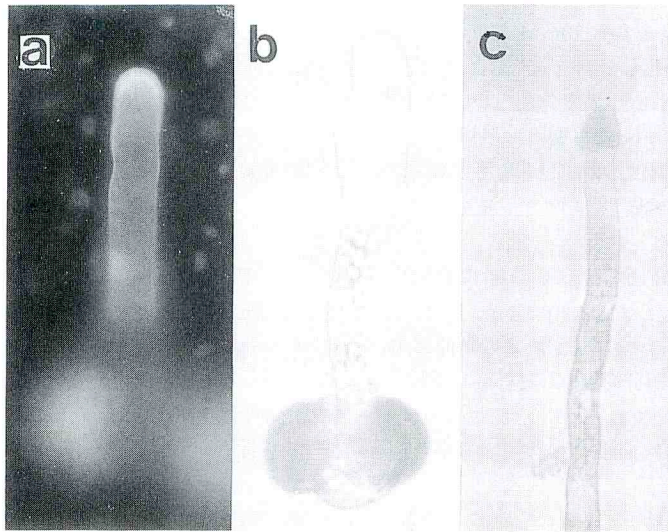


Fig. 2. Germinated pollen of *Pinus densiflora* stained with aniline blue or ruthenium red. Pollen tube of *Pinus densiflora* stained with aniline blue for callose (a), and with ruthenium red for pectin (b) : pollen tube of *Camellia japonica* stained with ruthenium red (c).

粉管ではこのようなことはみられなかった。そして時に Fig. 2a に示すように、管先端部分がとりわけ強く染色されることがあった。ペクチンの存在を示すルテニウムレッド染色によっては、管壁全体が弱く染色され、とりわけ強く染色されるような部分は観察されなかった (Fig. 2b)。ツバキ花粉管先端部分はルテニウムレッドで強く染色され (Fig. 2c)、アカマツの場合とは異なっていた。また無糖およびショ糖培地で成長した花粉のあいだでこれら色素に対する反応性の違いはみられなかった。

3. 花粉細胞壁多糖の性質

発芽成長したアカマツ花粉の花粉粒部分と花粉管部分を分離することが困難であったので、培養していない成熟花粉粒の細胞壁と培地で成長した花粉全体から抽出した細胞壁のそれぞれの構成多糖をガスクロマトグラフィー分析した。発芽花粉には花粉粒部分と花粉管部分の両方の細胞壁が含まれているので、花粉粒部分と成熟花粉粒の細胞壁成分には大きな違いはないものとみなし、発芽花粉と成熟花粉粒の細胞壁成分の違いは形成された花粉管の壁成分によるものと考え、両

細胞壁成分を比較した。

それぞれの細胞壁多糖を、ペクチン質、HA、HB、 α -セルロース画分に分離し、その収量とその構成多糖の単糖組成を比較した (Table 1)。ただしそれぞれの細胞壁の α -セルロース (残渣) 画分はほぼ同じ収量 (約 60%) であったが、加水分解率が低く、この画分の顕微鏡観察から、その多くは花粉粒外壁成分と考えられ、詳しい分析は行わなかった。

花粉粒細胞壁の多糖成分のうちペクチン質、HA、HB 画分は全体の 30% を占めたが、その中でペクチン質画分の収量は非常に僅かであった。これに対して、発芽花粉ではペクチン質画分の収量が約 20 倍に増加し、HB 量も増加した。HA 画分量は減少した。花粉粒のペクチン質画分の主要な糖はアラビノースで、約 45% を占めており、発芽後もその割合に大きな変化はみられなかった。しかし、ウロン酸は発芽前は約 10% であったのが、発芽後では 25% に増加した。花粉粒の HA 画分はグルコースが主成分であり、発芽花粉でもほとんど同じであった。HB 画分における主要な糖はアラビノースであり、アラビノースとグルコース量に僅かな違いがみられた他は花粉粒と発芽花粉で

Table 1. Sugar composition of polysaccharides from the walls of mature quiescent pollen grains and germinated pollen of *Pinus densiflora*

Sugar	Amount, weight %					
	Pectic substance		HA		HB	
	Grain	Germinated pollen	Grain	Germinated pollen	Grain	Germinated pollen
	(0.6)	(12.8)	(11.4)	(5.1)	(18.1)	(25.9)
Rhamnose	6.7	6.4	1.3	1.1	3.4	2.3
Fucose	0	0	0.1	0.4	0.9	1.2
Arabinose	43.5	48.6	14.4	12.6	52.3	41.3
Xylose	5.9	5.4	3.5	3.1	6.3	5.9
Mannose	0.8	0.1	3.1	0.1	0.6	0.2
Galactose	10.7	9.9	2.9	3.3	8.9	10.3
Glucose	21.0	4.9	65.2	72.2	16.8	27.8
Uronic acid	11.5	24.8	9.5	7.2	10.8	11.0

The germinated pollen contains the cell walls of both the pollen grain and the pollen tube.

Figures in parentheses indicate the yields as percentage weight of polysaccharide fractions from the cell walls of pollen grains or germinated pollen.

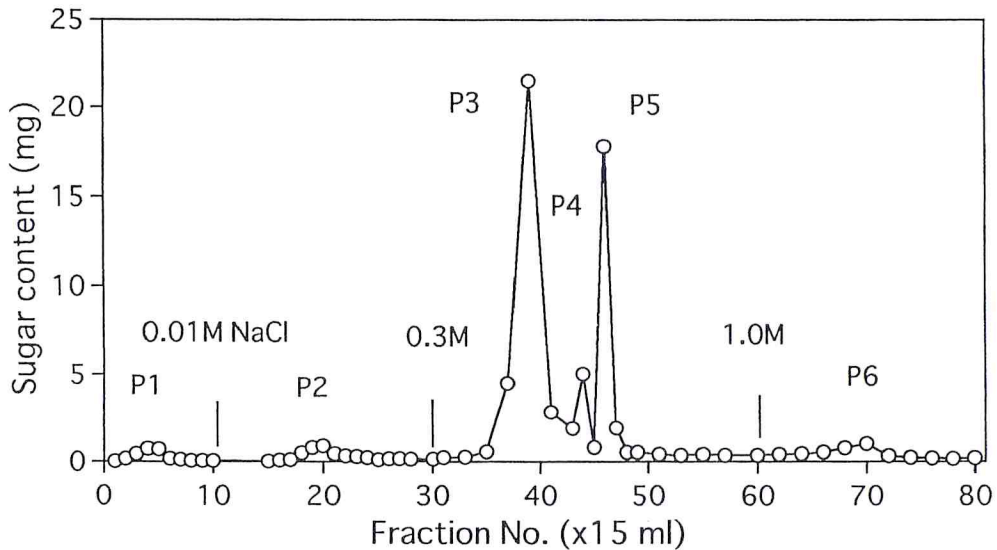


Fig. 3. DEAE-cellulose column chromatography of HB-polysaccharides from the pollen wall of *Pinus densiflora*. The water-soluble HB fraction (107mg) from germinated pollen was loaded on a DEAE-cellulose column (2.3×37cm, CH₃COO⁻ type) and eluted with 0.01, 0.3, and 1 M NaCl. The peak fractions collected were dialyzed and lyophilized, and 70 mg of sugar was recovered. P3 fraction was used as a partially purified HB.

Table 2. Sugar composition of the partially purified pectin and HB from the germinated pollen of *Pinus densiflora*.

Sugar	Amount, weight %	
	Pectin	HB
Rhamnose	5.6	5.4
Arabinose	12.4	43.8
Xylose	4.8	5.3
Galactose	6.9	9.8
Glucose	3.7	4.0
Uronic acid	66.5	31.6

単糖組成に大きな差はみられなかった。発芽花粉のペクチン質とHB画分についてはさらにDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる部分精製を行った。ペクチン質画分はNaCl濃度勾配法でカラムから溶出され、0.15M濃度付近に一つの糖ピークをもつ画分として集められた（データは示されていない）。またHB画分はFig. 3に示すように段階的にNaCl濃度をあげて溶出され、最も糖量が多く検出された画分が集められた。Table 2は精製されたペクチンとHB画分の単糖組成を示している。ペクチンは精製前に比べてウロン酸量が67%に増加し、アラビノースは12%に減少した。またHB画分部分精製標品ではアラビノースが44%を占め、ウロン酸は32%に増加した。

部分精製したペクチンのエステル化を調べるために電気泳動を行った（Fig. 4）。ペクチンの移動度はPGAに比べて小さく、そしてスポットは非常に薄いという特徴がみられた。標品の濃度を上げてスポットの濃さには変化はみられなかった。しかし脱エステル化処理をしたあとではHB画分部分精製標品と同じ移動度を示し、スポットも濃く検出された。このことはペクチンにはエステル化したウロン酸が多く含まれていることを示している。また比較するため調べたツバキの花粉管壁のペクチンはPGAとほぼ同じ移動度を示し、脱エステル化処理をしたあとでも移動度に変化がみられず、ほとんどエステル化していないことが示された。

考 察

マツの花粉管の伸長速度は非常に遅く、伸長した花粉管の長さも非常に短い。そのためマツの花粉管伸長に関する研究は、主に形態的な面から行われてきてい

て、最近ではアカマツ花粉内に存在する細胞骨格系の花粉管伸長への関与を示す報告^(17, 18)、またマツ花粉管内の微細構造に関する報告^(8, 19)がなされている。しかし生化学的研究は少なく、花粉管壁成分の生化学的研究はみられない。

細胞化学的にアカマツ花粉管壁を調べると（Fig. 2）、多くの被子植物の花粉管壁に関する知見（4, 20）から予測された結果とは異なっていた。アカマツの花粉管壁のカロースは非常に僅かと考えられ、ツバキ花粉管などではABに染色されない管先端部分にむしろカロースが検出されることがあった（Fig. 2a）。そしてツバキの花粉管先端にはその存在が明瞭であるペクチンは、アカマツ花粉管先端にはみられず、壁全体でも多くないことが示された（Fig. 2b, c）。これらの結果はアカマツとツバキ花粉では花粉管壁成分やその分布がかなり異なることを示しており、花粉管伸長の違いが壁成分つまり管壁形成と密接に関係していることを示唆しているのかも知れない。

花粉管壁成分をさらに詳しく調べるために花粉管壁標品として発芽花粉を使用し化学的に分析した。花粉管部分のみを集めて調べるべきであるが、発芽した花粉の花粉粒部分と花粉管部分を分離することは困難であった。しかし、花粉粒細胞壁と発芽花粉の細胞壁成分を比較すると明瞭な違いがみられた（Table 1）。花粉粒の細胞壁では非常に僅かであったペクチン質画分の量が発芽花粉では増加し、またHB画分量も増加した。このことからこれらの成分がアカマツの花粉管壁成分として新しく合成されたと推測される。発芽花粉のHA画分量の割合は花粉粒の場合より減少し、アカマツ花粉管ではカロースが少ないことを示している（Table 1, Fig. 2）。HA画分はツバキ花粉管では主成分であり、そのほとんどがカロースである⁽¹²⁾。ツバキ花粉でも発芽にともなってペクチン質画分の量が増加したが、HB画分の増加はみられず、最も量的に増加したのはカロースである⁽²¹⁾。

細胞壁構成多糖のうちペクチンは、花粉管の伸長に重要な役割をはたしていると考えられている⁽²²⁾。被子植物の花粉細胞内では、ペクチンはゴルジ体で高度にメチルエステル化されてから分泌、輸送され、花粉管先端部分の壁内に組み込まれた後に脱エステル化されるとの報告がある⁽⁶⁾。そしてメトキシル置換の割合が低くなったペクチンは、カルシウムイオンによる架橋構造を形成し、花粉管壁を補強していくと推測される。アカマツの花粉管壁のペクチンは、その大部分がエステル化されており、ツバキのペクチンとかなり

異なることが示された (Fig. 4). 壁成分の違いだけでなく、このような構造的な違いも壁形成に影響し、そして管伸長の違いに反映することが考えられる。また電気泳動では、アカマツのペクチンは PGA やツバキのペクチンよりも低い移動度を示した。これについては主鎖分子のウロン酸が高度にメチル化されてい

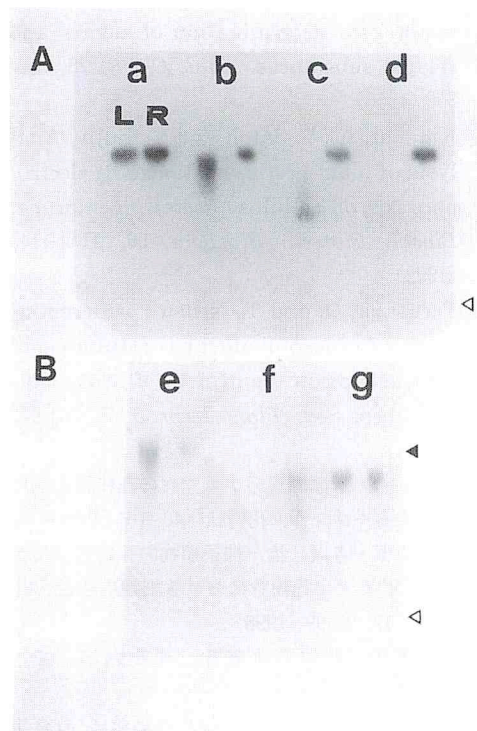


Fig. 4. Analysis of acid polysaccharides by electrophoresis on cellulose acetate membrane. A: authentic samples of polygalacturonic acid (PGA, a) and lemon pectins (b-d). The degrees of esterification in b, c and d were 30, 60 and 90 %, respectively. B: acid polysaccharides from the pollen walls of *Camellia japonica* (pectin, e) and *Pinus densiflora* (pectin, f and HB, g). Electrophoresis of untreated samples (left lane, L) and samples (right lane, R) treated with 0.1 N NaOH was performed at 100 V for 30 min and sugars were detected using 0.5% toluidine blue dye. Clear and solid arrowheads indicate the positions of origin and PGA, respectively.

るか、または側鎖分子である中性糖の影響を示唆する報告⁽²³⁾があり、アカマツの場合は、脱エステル化処理をした後でも低い移動度を示したので、ペクチン分子の側鎖としての中性糖の影響や分子量の影響が考えられる。

ツバキ花粉では管先端部分にゴルジ小胞が高密度に集中し、その内容物であるペクチンにより薄い一次壁(管壁外層)が形成され、それをカロス(HA画分)が裏打ち補強することで二層からなる管壁が形成されると考えられる⁽²¹⁾。これに対してアカマツ花粉管壁は厚く、管先端部分でも厚い壁が存在し、壁におけるペクチンの分布は不明である。またアカマツ花粉壁ではツバキ花粉とは異なりHB画分が主成分である。HBがどのように花粉管壁に分布し、その形成においてどのような役割をはたしているのか詳細に検討する必要がある。

要 約

アカマツ花粉管の伸長メカニズムを調べるために、成熟花粉粒と発芽花粉の細胞壁の多糖成分をガスクロマトグラフィー分析した。細胞壁多糖はペクチン質、ヘミセルロースA、ヘミセルロースB(HB)画分に分離され、おもにペクチン質とHB画分の多糖の性質を調べた。花粉粒のペクチン質画分の収量は非常に僅かであり、発芽花粉ではその量が増加し、また、HB画分の量も増加した。このことはこれらの多糖画分が花粉管壁形成に関与していることを示している。

花粉粒のペクチン質画分の主要な単糖はアラビノース(約40%)で、ウロン酸は約10%であったが、発芽花粉ではウロン酸が25%に増加した。どちらの細胞壁でも、その主成分はHB画分であり、アラビノースがその主要な単糖成分であった。

アカマツ発芽花粉の細胞壁の成分は以前報告されたツバキ花粉管壁の成分とは大変異なっている。アカマツとツバキの花粉の細胞壁成分の比較に基づいて、花粉管伸長および花粉管壁形成について論議した。

引用文献

- (1) Rosen, W.G., S.R. Gawlik, W.V. Dashek and K. A. Siegesmund: Fine structure and cytochemistry of *Lilium* pollen tubes. *Amer. J. Bot.* 51, 61-71 (1964).
- (2) 中村紀雄: 花粉管細胞壁の多糖類. 横浜市大論

- 叢 23, 181-195 (1987).
- (3) Rae, A. L., P. J. Harris, A. Bacic and A. E. Clarke : Composition of the cell walls of *Nicotiana glauca* Link et Otto pollen tubes. *Planta*. 166, 128-133 (1985).
- (4) Steer, M. W. and J. M. Steer : Pollen tube tip growth. *New Phytol.* 111, 323-358 (1989).
- (5) 桜井直樹・山本良一・加藤陽治 : 植物細胞壁と多糖類. 培風館 pp.129-137 (1991).
- (6) Geitmann, A., Y. Q. Li and M. Cresti : Ultra-structural immunolocalization of periodic pectin depositions in the cell wall of *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Protoplasma* 187, 168-171 (1995).
- (7) Li, Y. Q., C. Faleri, A. Geitmann, H. Q. Zhang and M. Cresti : Immunogold localization of arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma* 189, 26-36 (1995).
- (8) Win, A. H. N. de, B. Knuimann, E. S. Pierson, H. Geurts, H. M. P. Kengen and J. Derksen : Development and cellular organization of *Pinus sylvestris* pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 9, 93-101 (1996).
- (9) Stanley, R. G. and H. F. Linskens : Pollen. Springer-Verlag. pp.133-142 (1974).
- (10) Hara, A., H. Yamashita and A. Kobayashi : Isolation of a polysaccharide from the inner cell wall, intine, of pollen of *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol.* 18, 381-386 (1977).
- (11) 中村紀雄・中村澄夫・鈴木 恕 : テッポウユリ小孢子母細胞および成熟花粉粒の細胞壁多糖類. 花粉誌 34, 133-139 (1988).
- (12) Nakamura, N., K. Yoshida and H. Suzuki : Hemicellulose of the pollen tube wall of *Camellia japonica*. *Plant Cell Physiol.* 21, 1383-1390 (1980).
- (13) 中村紀雄・吉田孝治 : ツバキ花粉管壁のペクチン物質. 花粉誌 25, 11-16 (1980).
- (14) Galambos, J. T. : The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. *Anal. Chem.* 19, 119-132 (1967).
- (15) Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356 (1956).
- (16) Kikuchi, A., S. Satoh and T. Fujii : Analysis of plant pectic substances by electrophoresis on cellulose acetate membrane. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1144-1145 (1992).
- (17) Terasaka, O. and T. Niitsu : Differential roles of microtubule and actin-myosin cytoskeleton in the growth of *Pinus* pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 7, 264-272 (1994).
- (18) 寺坂 治・新津恒良 : アカマツの花粉管先端に遍在するキネシン. 花粉誌 40, 1-6 (1994).
- (19) 平塚理恵・寺坂 治 : 裸子植物の花粉管伸長機構 I. アカマツ花粉管における細胞内小胞. 花粉誌 42, 93-99 (1996).
- (20) 三木寿子 : 花粉の研究 II. 生物科学 32, 213-220 (1980).
- (21) 中村紀雄・鈴木 恕 : 花粉粒壁糖組成の発芽期における変化. 花粉誌 29, 33-38 (1983).
- (22) Li, Y. Q., F. Chen, H. F. Linskens and M. Cresti : Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex. Plant Reprod.* 7, 145-152 (1994).
- (23) Kikuchi, A., S. Satoh, N. Nakamura and T. Fujii : Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. *Plant Cell Reports* 14, 279-284 (1995).