

(原著論文)

裸子植物花粉粒における前葉体細胞のプログラム細胞死

寺坂 治¹⁾・平塚 理恵¹⁾・山田 陽子²⁾¹⁾ 東京慈恵会医科大学解剖学講座第1生物学研究室

〒182-8570 東京都調布市国領町8-3-1

²⁾ 日本女子大学理学部物質生物科学科

〒112-8681 東京都文京区目白台2-8-1

(2001年9月19日 受付, 2001年10月25日 受理)

The Programmed Cell Death of Prothallial Cells in Gymnosperm Pollen Grains

Osamu TERASAKA¹⁾, Rie HIRATSUKA¹⁾ and Yohko YAMADA²⁾¹⁾ *Division of Biology, Department of Anatomy 1,
Jikei University School of Medicine,
Kokuryo, Chofu, Tokyo, 182-8570 Japan*²⁾ *Department of Chemical and Biological Sciences,
Faculty of Science, Japan Women's University,
Mejirodai, Bunkyo, Tokyo, 112-8681 Japan*

Prothallial cells (PCs), which are rudimentary cells homologous to prothallium body cells in pteridophytes, are present in pollen grains of some gymnosperms. They are relatively small daughter cells produced by asymmetric pollen mitosis. In some species, they die during pollen development.

In this study, *Cycas*, *Ginkgo*, *Pinus* and *Ephedra* pollen grains, containing 1, 2, 2 and 2 PCs, respectively, were used to investigate survival/death of PCs, and their mechanism of cell death. The first PC produced (PC1) in *Ginkgo* and both PCs (PC1 and the second PC produced, PC2) in *Pinus* and *Ephedra* died during pollen grain development. In the PCs that died, chromatin was extremely condensed and fragmented, and adhered to the nuclear envelope. The cytoplasm shrank, ultimately becoming a thin crescent-shaped electron-dense body. The nuclei of these PCs were strongly stained by TUNEL (TdT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling), demonstrating the accumulation of nuclear DNA 3'-OH fragments. In *Ephedra*, TUNEL-positive nuclear constituents were released from PC1 to the exterior of the pollen grain, and were released from PC2 into the interior of the pollen grain. Agarose gel electrophoretic analysis of DNA isolated from *Pinus* pollen grains showed a ladder structure, suggesting that nuclear DNA had been cleaved into nucleosomal fragments about 180-bp long. PC2 of *Ginkgo* and the single PC of *Cycas* survived throughout pollen development, and were TUNEL-negative.

These results suggest that the patterns of survival/death of PCs are species-specific, and that the death of PCs is a form of programmed cell death that has some features in common with apoptosis.

Key Words : cell death, DNA ladder, gymnosperm, pollen, prothallial cell

緒 言

顕花植物の花粉は複数個の細胞からなる雄性配偶体である。裸子植物の花粉は種に固有な回数不均等な有糸分裂によって産出された1～10数個の細胞からなり、それらの中には種によって1～数個の前葉体細胞(PC)が含まれている⁽¹⁾。PCは系統発生上、シダ植物における前葉体の体細胞に相当する痕跡的細胞と考えられ、それらの多くは小型で染色質が著しく凝縮し、ほとんど機能することなく花粉発生過程で細胞死する。被子植物の花粉には存在しない細胞である。

動物の発生では、ニワトリ胚の翼芽指間間充細胞、オタマジャクシの尾部細胞、脊椎動物の神経細胞、ヒトの口蓋上皮組織などにおいて、不要または一時的に機能を果たした細胞が、アポトーシスに基づくプログラム細胞死(PCD)により選択的に除去される。アポトーシス細胞では、細胞の縮小、核DNAのヌクレオソーム単位での断片化、染色質の凝縮、細胞質の縮小、アポトーシス小体の形成および食細胞らによる小体の貪食除去等が特徴的に見られる。PCDは動物の正常な発生、形態形成、ホメオスタシス等に重要な役割を果たすことが明らかになっている^(2, 3)。

植物においては葉の老化⁽⁴⁾、単子葉植物の種子におけるアリュエロン細胞の除去⁽⁵⁾、葉の裂片や穴の形成⁽⁶⁾、木部管状要素^(7, 8)や糸状体⁽⁶⁾などにおける細胞の特殊化、低温に対するタバコ細胞⁽⁹⁾や塩分に対するオオムギ根端細胞^(10, 11)のストレス応答、タバコモザイクウイルス感染によるタバコ細胞の超過敏性細胞死⁽⁷⁾などがPCDの例として報告されている(PennellとLamb⁽¹²⁾を参照)。顕花植物の生殖器官形成においても、雌花における雄蕊原基細胞⁽¹³⁾、タペータム⁽¹⁴⁾、葯の口片細胞⁽¹⁵⁾、不和合性花粉管⁽¹⁶⁾、花柱の伝達組織⁽¹⁷⁻¹⁹⁾、四分大胞子のうちの3個⁽²⁰⁾、花粉管が侵入した助細胞⁽²¹⁾、反足細胞⁽²²⁾などがPCDにより除去される(WuとCheung⁽²³⁾を参照)。筆者らも、アカマツの珠心において、受粉または花粉管伸長によって珠心細胞にPCDが誘起されることを観察している(未発表)。細胞死した珠心細胞は伝達または分泌組織として花粉管伸長に関与すると考えられている。これらの報告より、植物におけるPCDも動物と同様、形態形成やホメオスタシス等において重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、植物におけるPCDの事象は動物におけるそれとはいくつかの点において異なり、植物と動物に共通のPCD反応経路が存在するかどうかは不明である。植物におけるPCDでは、動物におけるPCDの重要な特徴であるアポトーシス小体の形成は起きず、また核DNAの断片化を表すラダー構造も見出されない場合が多い。Fukuda⁽⁸⁾によると、木部管状要素の

PCDは細胞学的にはアポトーシスというよりはネクローシス的であり、細胞死の正確な機構は不明である。一方、植物の多くのPCDでは、液胞の崩壊とそれに基づく細胞小器官の退化が起こるが、動物においては観察されていない。今日までの植物におけるPCD研究では、細胞死の過程で観察される事象は種または組織、細胞により多様であり、生化学的特性はもちろん、植物の細胞死に共通した形態学的特性が存在するかどうかは未だ明らかにされていない。

本研究では、裸子植物花粉粒の構成細胞の一つである前葉体細胞が、花粉粒形成過程においてPCDにより退化し消失すること、そのPCDでは核DNAが約180-bpのヌクレオソーム単位に断片化すること、染色質が凝縮し核膜に密着すること、細胞質が縮小することなど、アポトーシスに共通したいくつかの特徴をもつ細胞死であることが明らかになった。

材料および方法

本研究には、裸子植物4種、ソテツ(*Cycas revoluta* Thunb.)、イチョウ(*Ginkgo biloba* L.)、アカマツ(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)およびフタマタマオウ(*Ephedra distachya* L.)の自然条件下で発達中の花粉粒を用いた。

TUNEL染色法

TUNEL染色法に用いる薄切切片は、一般的にはホルマリン固定・パラフィン包埋法によって得られているが、本研究ではパラホルムアルデヒド固定・テクノビット7100樹脂包埋法によって作製した。後者は前者に比べて蛍光観察において像の鮮明さにやや欠けるが、DAB染色では好結果が得られ、また、花粉細胞が生体内における性状により近い状態に保たれる点において優れた方法である。

採集した葯をPBS(phosphate buffered saline, pH7.4, Sigma社)で調整した3.7%パラホルムアルデヒドによって4℃で約半日間固定した。固定後、エタノール・シリーズで脱水し、テクノビット7100樹脂(Kalzer社)で包埋した。得られたブロックより、ガラスナイフを用いて1μmの厚さの切片試料を作製した。試料をTaKaRa in situ Apoptosis Kit(Takara社)を用い、以下の手順でTUNEL染色した。1) 20μg/ml proteinase Kによって室温で15分間余分なタンパク質を除去、2) 3%過酸化水素水で5分間内因性ペルオキシダーゼをブロック、3) ターミナルトランスフェラーゼとFITC標識dUTPの1:9混液により37℃で90分間、後者をDNAの3'-OH末端に付加、4) ペルオキシダーゼ標識抗FITC抗体により37℃で30分間標識、5) DAB液(1M Tris-HCl pH7.5 50μl, 30%過酸化水素水1μl,

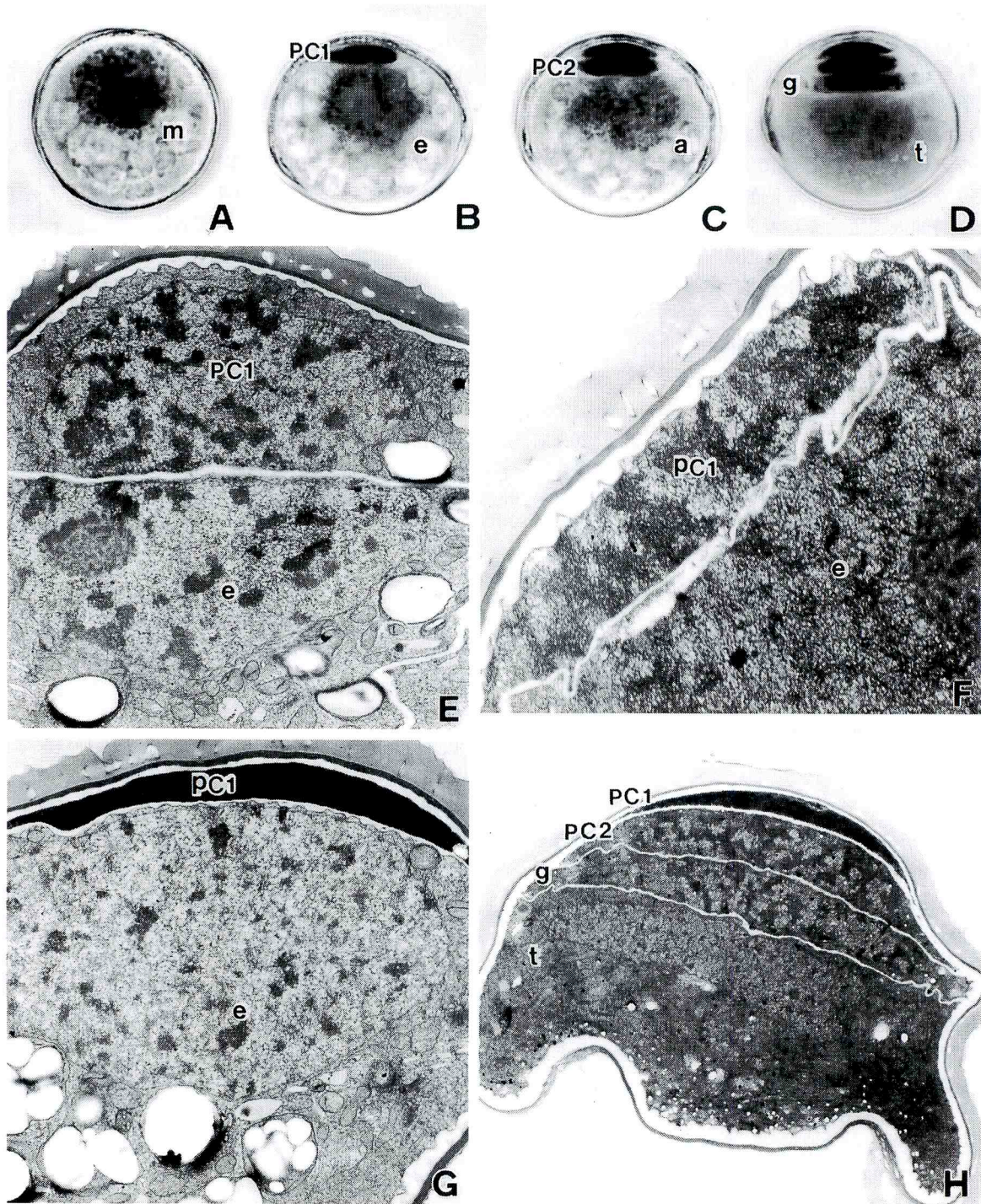


Fig. 1. The pollen grain development of *G. biloba*.

A-D : The developmental steps from the microspore (A) to the mature pollen grain (D), shown by aceto-carmin staining. E-G : Electron microscopic photographs of the pollen grains with PC1, just after microspore division (E), and with shrinking PC1s (F, G). H : Mature pollen grain composed of 4 cells. PC1 has shrunk into a thin crescent-shaped electron-dense body, indicating cell death, but PC2 is still alive. m, microspore ; PC1, 1st prothallial cell ; e, embryonic cell ; PC2, 2nd prothallial cell ; a, antheridial initial ; g, generative cell ; t, tube cell. A-D, $\times 1080$; E, $\times 7880$; F, $\times 16200$; G, $\times 8100$; H, $\times 4860$.

4mg/ml 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 50 μ l, 蒸留水 0.9ml) により室温で 12 分間染色. 各処理ごとに試料を PBS により 5~15 分間洗浄した.

電子顕微鏡観察

1) 0.1M PIPES (pH6.8) で調整した 2% グルタルアルデヒドにより 4 $^{\circ}$ C で 1 晩前固定, 2) 0.1M PIPES で洗浄, 3) 2% 四酸化オスミウムにより 4 $^{\circ}$ C で 1 時間後固定, 4) エタノール・アセトン・シリーズにより脱水, 5) Quetol653 により 60 $^{\circ}$ C で 48 時間包埋および重合, 6) 酢酸ウランと鉛による二重染色.

核 DNA の単離と電気泳動解析⁽²⁴⁾

1) 液体窒素存在下で花粉粒を破碎, 2) 破碎した花粉粒を 60 $^{\circ}$ C の CTAB (2%CTAB, 1.4M 塩化ナトリウム, 0.2% メルカプトエタノール, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH8.0) に加え, 30 分間穏やかに攪拌, 3) 等量のクロロホルムを加え室温で 15 分間攪拌, 4) 8000xg で 10 分間遠心分離, 5) 得られた水層に 2/3 の量の 2-プロパノールを加え, 6) 9500xg で 10 分間遠心分離, 7) 沈殿を TE 溶液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) に溶解, 8) 終濃度 100 μ g/ml RNase で 37 $^{\circ}$ C, 30 分間処理, 9) 2% アガロースゲルにより電気泳動, 10) 臭化エチジウムで染色し写真撮影.

結 果

図 1 はイチョウ花粉粒の発達過程を示している. 本種の成熟花粉粒は小孢子, 胚的細胞, 造精器細胞が行う 3 回の花粉内糸分裂によって形成される (図 1 A-D). 小孢子が分裂して最初の前葉体細胞 (PC1) と胚的細胞を (図 1 A, B), 胚的細胞が分裂し 2 番目の前葉体細胞 (PC2) と造精器細胞を (図 1 C), 造精器細胞が分裂し生殖細胞と管細胞を形成する (図 1 D). これらの分裂はすべて共通した分裂軸のもとに起きる典型的な不均等分裂であり, 分裂ごとに小型で凝縮した染色質をもつ細胞を花粉四分子の内膜側に, 大型で分散の強い染色質をもつ細胞を外膜側に形成する. 小孢子分裂直後の PC1 は扁平であり, やや強く凝縮した染色質をもつ楕円形の核と少量の細胞質を持っている (図 1 E). 細胞質内には少数の染色体, ミトコンドリア, その他の細胞小器官が含まれているが, 液胞はほとんど発達していない. しかし, まもなく PC1 の核は長楕円形になり (図 1 B, F), さらに核を含む細胞全体が細い三日月状に変形する. この間, 染色質の凝縮および細胞質の縮小が急激に起き, 両者の識別はほとんど不可能となり, ついには細胞全体が電子密度の高い塊状を呈する (図 1 G). PC1 は細胞死する. 細胞死過程における核膜, 細胞膜および細胞小

器官の構造変化については細胞の縮小が急激であるため, 詳細な観察はほとんど不可能であった. 一方, PC2 は花粉粒成熟過程を通じて, 少量ではあるが通常の構造をした細胞質をもち続け, 核は長楕円形を維持している (図 1 C, H). PC2 の染色質も強く凝縮するが, PC1 より弱い (図 1 D, H).

発達諸段階のイチョウの花粉粒を TUNEL 法により染色した. その結果, 形成直後の楕円形~長楕円形を呈した PC1 の核はほとんど染色されないが, 細い三日月状にまで変形した PC1 の核は褐色に濃染され, PC1 の核内に DNA の切断により遊離した 3'-OH 末端が蓄積したことが示唆された (図 2 A). しかし, PC2 およびその他花粉粒形成過程に出現する小孢子, 胚的細胞, 造精器細胞, 生殖細胞, 管細胞のすべての細胞核は染色されない (図 2 B-D). 図 2 E は TUNEL 染色された PC1 の核の極面像である. 断片化した染色質の凝縮塊が核膜に接して分布している. 対照実験としてのターミナルトランスフェラーゼ処理なしの TUNEL 染色では, PC1 を含むすべての細胞核は染色されなかった (データは省略).

アカマツの花粉粒はイチョウとほぼ同じ様式により発達し, 成熟期には PC1, PC2, 生殖細胞および管細胞の 4 細胞より構成されている (図 3 A). アカマツの形成直後の PC1 および PC2 の核は長楕円形であり, TUNEL 法によってほとんど染色されない (図 3 D). しかし, まもなく 2 細胞の染色質は著しく凝縮し, 細胞質は縮小し, 細胞全体が細い三日月状に変形する. この時期における PC1 および PC2 の核は TUNEL 法により明瞭に染色される (図 3 B-F). 図 3 C は PC1 の極面像であり, 核膜に隣接する凝縮した染色質断片が観察される. しかし, 小孢子, 胚的細胞, 造精器細胞, 生殖細胞, 管細胞のすべての核は染色されない.

PC1 および PC2 を含む 3~4 細胞期のアカマツ花粉粒より DNA を単離し, アガロースゲル電気泳動法により解析した. 泳動パターンより約 180-bp およびその倍数の長さからなる DNA 断片のラダー構造が明らかとなり, PC1 および PC2 の核 DNA が, ヌクレオソームを単位とした長さに断片化されたことが示唆された (図 4).

フタタマオウの成熟花粉粒は小孢子, 胚的細胞, 造精器細胞, 生殖細胞の 4 回の分裂により形成される (図 5 A). PC1 および PC2 の核と細胞質はともに著しく縮小し退化するため, 成熟花粉粒中ではほとんど観察されない場合が多い. PC1 および PC2 の核は TUNEL 法により明瞭に染色される (図 5 B-F). 花粉粒によっては, TUNEL 法によって染色された核成分が PC1 より花粉粒外部に (図 5 B, C), また PC2 より花粉粒内の他の細胞すなわち, 造精器細胞,

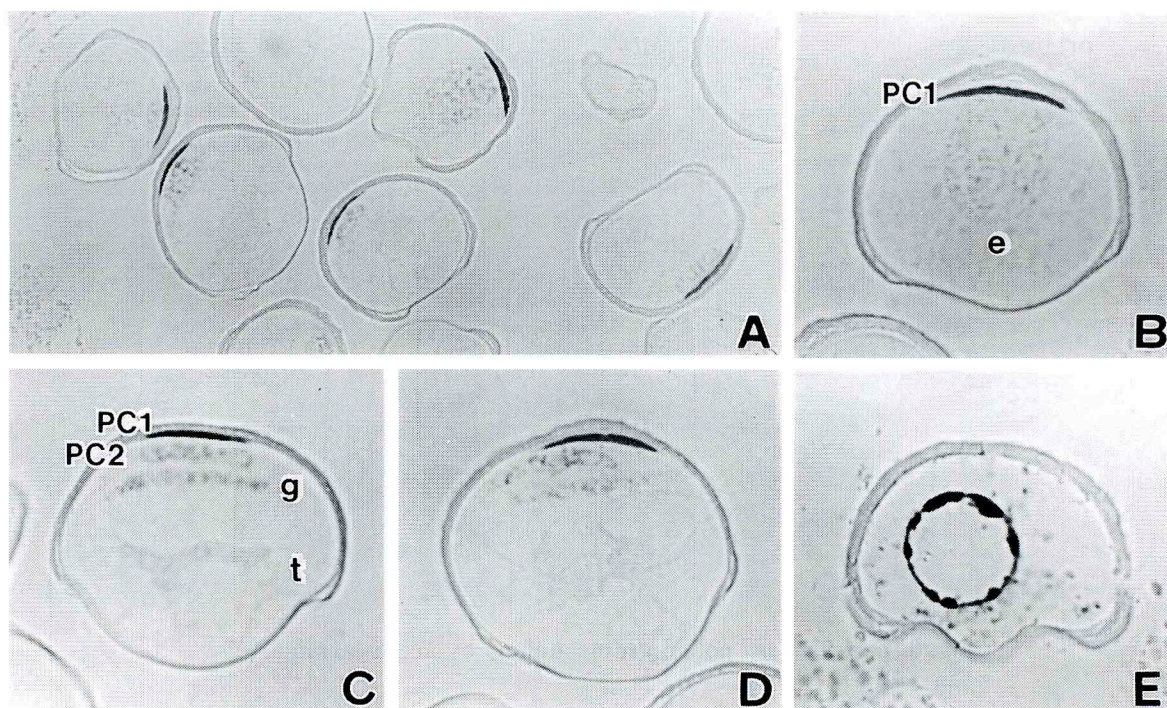


Fig. 2. TUNEL staining of *G. biloba* pollen grains at bi-cellular (A, B) and mature stages (C-E). The nucleus of PC1 was strongly stained, whereas PC2 and other cell nuclei were not stained. E: The polar view of PC1 nucleus, showing that the bodies of condensed chromatin adhered to the nuclear envelope. $\times 1500$.

生殖細胞または管細胞方向に放出されている像が観察される (図 5 E)。これらの核成分の放出によって PC1 と PC2 の核はさらに細くなりやがて観察不可能となる。成熟した花粉粒によっては、TUNEL 法により柄細胞の核の一部が弱く染色される場合がある (図 5 F)。柄細胞はシダ植物配偶体における造精器の柄をつくる細胞に相当する痕跡的細胞と考えられている。その他のすべての細胞は TUNEL 法により染色されることはない。

ソテツの成熟花粉粒は小孢子と造精器細胞の 2 回の分裂によって形成され、1 個の PC、生殖細胞、管細胞の 3 細胞性である。PC は成熟期の花粉粒においても生存し、細胞質には少数のミトコンドリア、デンプン粒、リピッド、その他の細胞小器官が観察される。核内には多くの異質染色質が形成されているが、TUNEL 法によって染色されない (データは省略)。

考 察

維管束植物の雄性配偶体は構造を著しく単純化させる方向へと進化を遂げた。裸子植物の花粉はその単純

化への過程の中間的段階に位置している。*Dacrydium* 属やマキ属などの一部の裸子植物では、形成された PC が分裂を数回繰り返して、花粉粒内に数細胞からなる前葉体組織を形成する。ソテツの間では形成された PC は分裂はしないが、そのまま生き続ける。しかし、多くの裸子植物では、PC はその雄性配偶体すなわち花粉において、形成後ほとんど機能しないまま退化するか、まったく形成されない。裸子植物の花粉粒発生過程で起こる PC の退化は典型的なプログラム細胞死 (PCD) であり、PC の PCD は結果的に雄性配偶体の構造を単純化させる機構としての役割を果たしている。

PC の細胞死の過程では、染色質の凝縮と断片化、染色質断片の核膜への隣接、細胞質の縮小、また、DNA の遊離 3'-OH グループの蓄積、すなわち核 DNA の 180-bp からなるヌクレオソーム単位への断片化が明らかになった。これらの形態学的、生化学的特徴は動物におけるアポトーシスに共通した特徴である。一方、植物の PCD における重要な事象として報告されている液胞の崩壊は PC においては観察されず、また、核膜、細胞膜、ミトコンドリアや染色体等の細

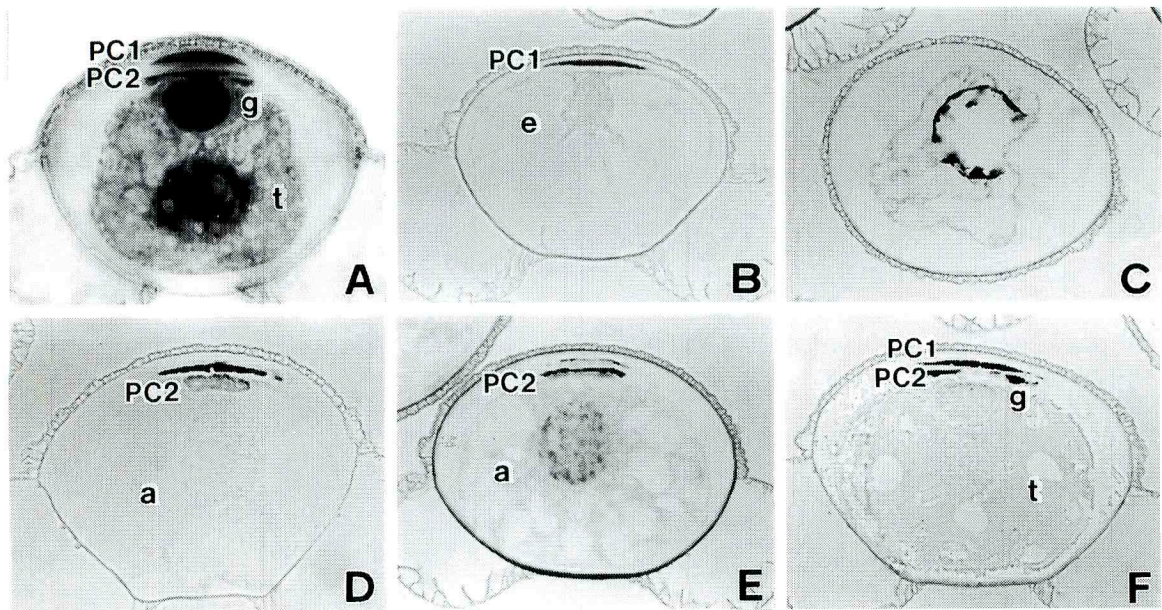


Fig. 3. *P. densiflora* pollen grains stained by aceto-carmin (A) and TUNEL (B-F).

A : Mature pollen grain with PC1, PC2, generative cell and tube cell. PC1 and PC2 have degenerated into vestiges. B, C : Bi-cellular pollen grain with thin crescent-shaped nucleus of PC1, which was strongly stained by TUNEL (B), and polar view of the pollen grain (C). D, E : Tri-cellular pollen grain. The PC2 nucleus just after embryonal cell division that showed a long ellipsoidal shape was not strongly stained (D). Soon after, PC2 was extended into a crescent shape and was strongly stained (E). F : The mature pollen grain. The generative cell and tube cell were not stained by TUNEL. $\times 860$.

胞小器官の構造変化は、PCの細胞質の縮小が急激であるため観察することはできず、植物のPCDにおける事象が多様であることの一端を示している。

植物におけるPCDが動物のそれと明瞭に区別される点の一つは、植物には動物におけるアポトーシス小体の形成およびファゴサイトーシスによる小体の貪食機構がないことである。植物における死細胞のその後の消長は、これまでほとんど明らかにされていなかった。しかし、フタマタマオウでは、TUNEL法によって染色されたPC1およびPC2の核成分が、それぞれ花粉粒外または花粉粒内の他の構成細胞に向かって放出されることが明らかとなった。これらの事実は、放出された物質はその後未知の方法によって廃棄されるか、または他の周辺細胞に対する分泌物としての役割を果たす可能性を示しており、死細胞の処理法の一つを示唆している。また、筆者らはアカマツの珠心において、伸長した花粉管近傍に分布する珠心細胞がPCDを起こすこと、細胞死中の珠心細胞からデンプ

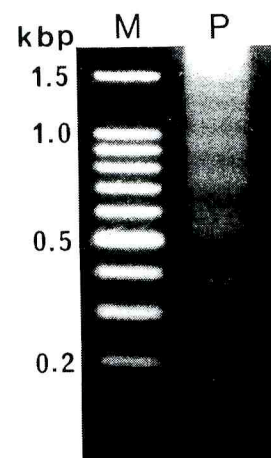


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA isolated from the pollen grains of *P. densiflora* (P), and marker DNA (M). Lane P shows nucleosomal fragments about 180-bp long, forming an oligonucleosomal ladder.

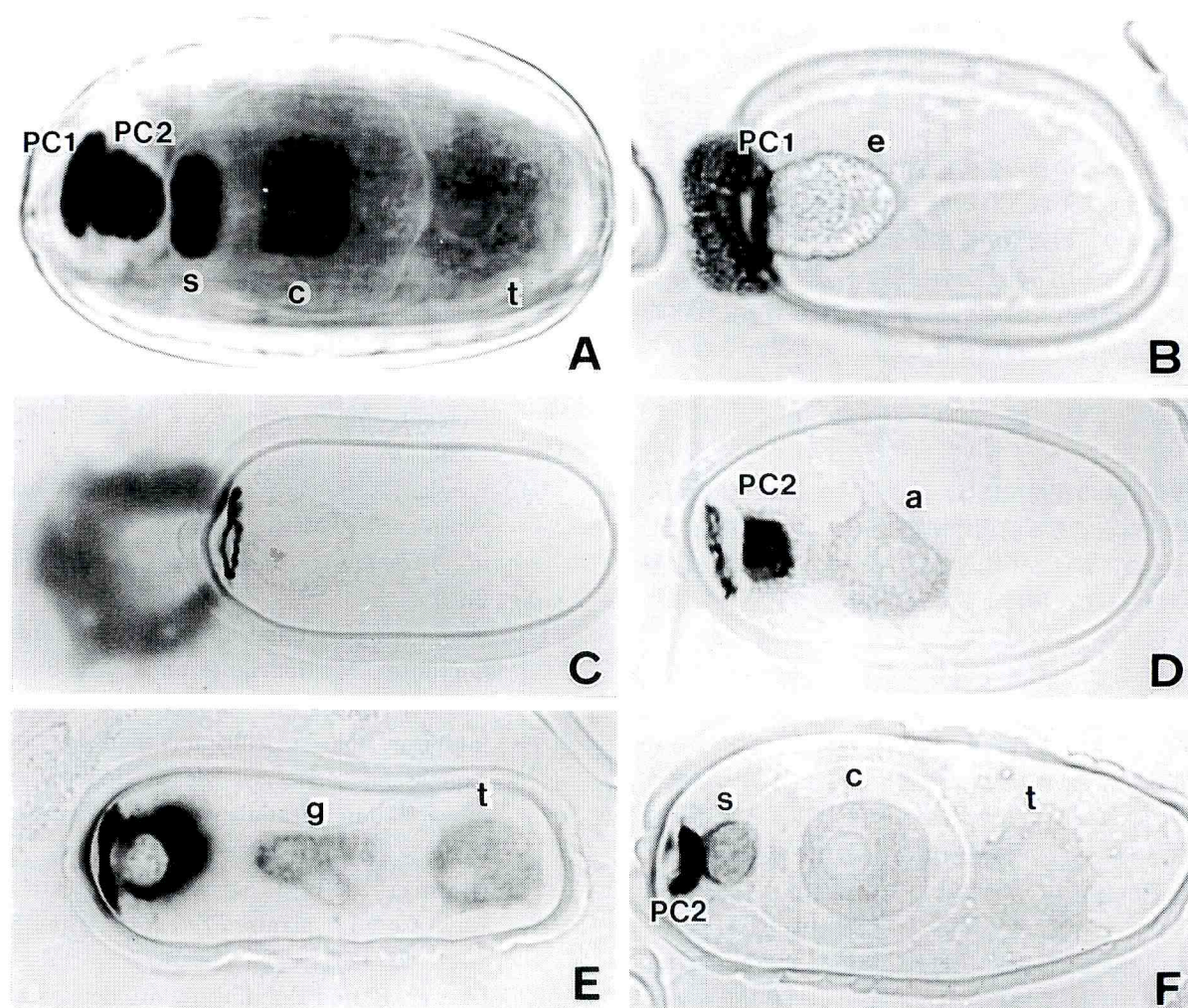


Fig. 5. *E. distachya* pollen grains stained by aceto-carmin (A) and TUNEL (B-F). A : Mature pollen grain. s, stalk cell ; c, central cell. B, C : Bi-cellular pollen grain with TUNEL-positive PC1. D-F : Tri-cellular (D), four-celled (E) and mature pollen grains (F) with TUNEL-positive PC1 and/or PC2. The TUNEL-positive nuclear constituents were released from PC1 to the exterior of the pollen grain (B, C) and from PC2 into the interior of the pollen grain (E). The stalk cell nucleus was slightly stained (F). $\times 1700$.

ン粒や不定形の物質が細胞外に向けて放出されることを明らかにしている (未発表)。これらの物質は花粉管内に取り込まれ、受精までに約1年間伸長し続ける花粉管に対し、栄養分の一部として関与するものと想像される。被子植物の一種であるタバコにおいても、花粉管伸長に対応して花柱の伝達組織でPCDが起こり、ある種の物質が伝達組織から細胞外マトリックスへ放出され、さらには花粉管へ移動することがCheung⁽¹⁷⁾によって報告されている。Cheungは、受

粉により誘導された伝達組織の退化は、花粉管伸長に対する生化学的関与であると述べている。死細胞物質の放出とその物質の周辺細胞への取り込みは、植物における死細胞処理の様式であり、動物におけるアポトーシス小体形成とその貪食作用に相当する機構と考えられる。

PCのPCDへの誘導には、形成時における不均等分裂が重要な役割を果たしているものと推測される。アカマツおよびクロマツ花粉において、分裂中の小胞

子または胚的細胞を遠心処理し、本来の分裂の不均等性や分裂軸極性をわずかでも阻害すると、形成された小型細胞がたとえPCに相当する細胞であっても細胞死しない⁽²⁵⁾。また、イチョウのPC2、ソテツのPCおよびすべての種の生殖細胞は不均等分裂によって小型細胞として形成されるが、細胞死はしない。これらの事実より、娘細胞が細胞死を起こすには、分裂における厳密な不均等性と分裂極性が必要であり、それらによって細胞死を誘導する細胞環境すなわち生化学的反応経路が確立、維持されていることが想定される。

要 約

裸子植物の花粉粒には、シダ植物前葉体の体細胞の痕跡的細胞である前葉体細胞(PC)が存在する。PCは花粉粒における不均等分裂によって形成される小型の細胞であり、種によっては花粉粒の発達過程で細胞死を遂げる。

本研究では、PCを1個もつソテツ、2個もつイチョウ、アカマツ、フタマタマオウの花粉粒を用い、各PCの生死および細胞死の機構を解析した。イチョウの花粉粒において最初に形成されるPC1およびアカマツ、フタマタマオウの2個のPC(PC1と2番目に形成されるPC2)は花粉粒の発達中に細胞死する。細胞死が進行中のPCでは、染色質が著しく凝縮し、断片化して核膜に隣接する。細胞質も縮小し、ついには電子密度の高い細い三日月状構造を呈する。これら核は、TUNEL法(TdT-mediated dUTP-fluorescein nick end labeling)によって濃染し、核DNAの断片化による遊離3'-OH末端の蓄積が示唆された。フタマタマオウでは、TUNEL染色されたPC1およびPC2の核内成分がそれぞれ花粉粒外、花粉粒内の他の細胞に向かって放出される。また、アカマツの花粉粒より単離されたDNAを電気泳動法により解析したところ、核DNAの断片化が約180-bpのヌクレオソーム単位で起きたことを示唆するDNAラダー構造が得られた。一方、イチョウのPC2およびソテツのPCは、成熟花粉粒においても生存し、TUNEL法によっては染色されない。

以上の結果より、PCの生死は種に特異的であり、細胞死の機構はアポトーシスに共通したいくつかの特性を持つプログラム細胞死であることが明らかになった。

謝 辞

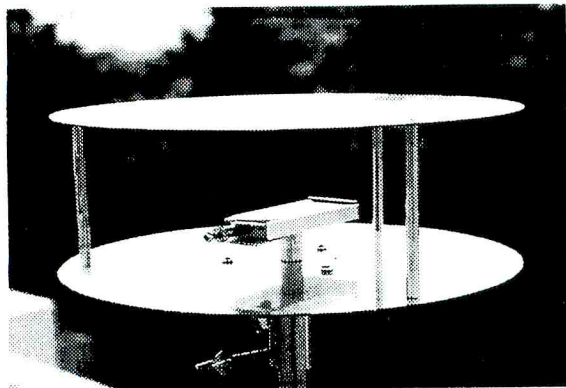
本研究を進めるに当り、研究材料のご提供、ご助言を賜りました武田製薬工業株式会社・春日久男博士および瀬川隆夫氏に厚くお礼申し上げます。

引 用 文 献

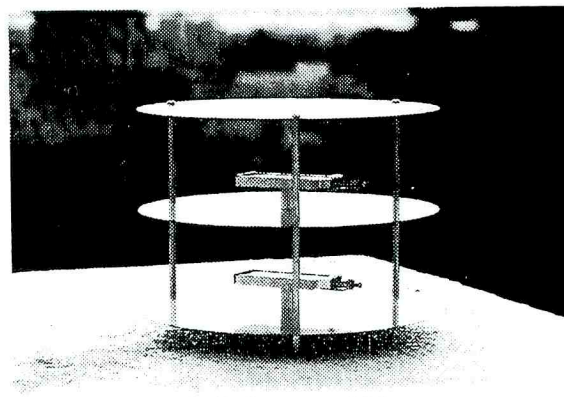
- (1) Terasaka, O.: Nuclear differentiation of male gametophytes in gymnosperms. *Cytologia* **47**, 27-46 (1982).
- (2) Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff: Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354 (1997).
- (3) Ranganath, R. M. and N. R. Nagashree: Role of programmed cell death in development. *Inter. Rev. Cytol.* **202**, 159-242 (2001).
- (4) Bleecker, A. B. and S. E. Patterson: Last exit: Senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1169-1179 (1997).
- (5) Kuo, A., S. Cappelluti, M. Cervantes-Cervantes, M. Rodriguez and D. S. Bush: Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* **8**, 259-269 (1996).
- (6) Greenberg, J. T.: Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12094-12097 (1996).
- (7) Mittler, R. and E. Lam: In situ detection of nDNA fragmentation during the differentiation of tracheary elements in higher plants. *Plant Physiol.* **108**, 489-493 (1995).
- (8) Fukuda, H.: Tracheary element differentiation. *Plant Cell* **9**, 1147-1156 (1997).
- (9) Koukalová, B., A. Kovarik, J. Fajkus and J. Široký: Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Lett.* **414**, 289-292 (1997).
- (10) Katsuhara, M. and T. Kawasaki: Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Plant Cell Physiol.* **37**, 169-173 (1996).
- (11) Katsuhara, M.: Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiol.* **38**, 1091-1093 (1997).
- (12) Pennell, R. I. and C. Lamb: Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**, 1157-1168 (1997).
- (13) Dellaporta, S. L. and A. Calderon-Urrea:

- The sex determination process in maize. *Science* **266**, 1501-1505 (1994).
- (14) Bedinger, P. : The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**, 879-887 (1992).
- (15) Beals, T. P. and R. B. Goldberg : A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. *Plant Cell* **9**, 1527-1545 (1997).
- (16) Geitmann, A. : Cell death of self-incompatible pollen tubes : necrosis or apoptosis ? In : M. Cresti, G. Cai and A. Moscatelli (eds.), *Fertilization in Higher Plants : Molecular and Cytological Aspects*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 113-137 (1999).
- (17) Cheung, A. Y. : The pollen tube growth pathway : its molecular and biochemical contributions and responses to pollination. *Sex. Plant Reprod.* **9**, 330-336 (1996).
- (18) Wang, H., H.-M. Wu, and A. Y. Cheung : Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. *Plant J.* **9**, 715-727 (1996).
- (19) de Graaf, B. H. J., B. Knuiman and C. Mariani : The PELPs in the transmitting tissue of *Nicotiana tabacum* are translocated through the pollen walls in vivo. XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, p. 29 (1998).
- (20) Bell, P. R. : Megaspore abortion : a consequence of selective apoptosis ? *Int. J. Plant Sci.* **157**, 1-7 (1996).
- (21) Fisher, D. B. and W. A. Jensen : Cotton embryogenesis : The identification, as nuclei, of the X-bodies in the degenerated synergid. *Planta* **84**, 122-133 (1969).
- (22) Murgia, M., B.-Q. Huang, S. C. Tucker and M. E. Musgrave : Embryo sac lacking antipodal cells in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Amer. J. Bot.* **80**, 824-838 (1993).
- (23) Wu, H.-M. and A. Y. Cheung : Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol. Biol.* **44**, 267-281 (2000).
- (24) Doyle, J. J. and J. L. Doyle : Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15 (1990).
- (25) Terasaka, O. and T. Niitsu : Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells. I. Centrifugal, cold and caffeine treatments. *Bot. Mag. Tokyo* **100**, 205-216 (1987).
-

空 中 花 粉 採 集 器

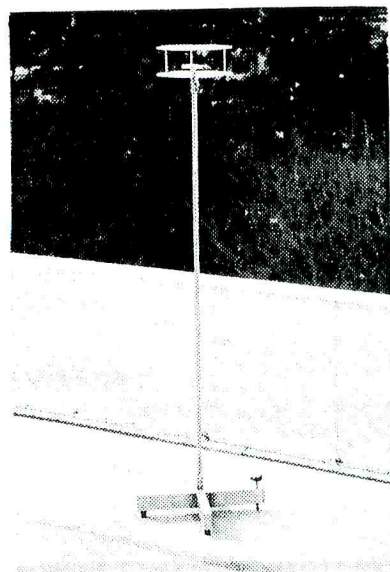


◀ダラム型
DK-1SA
DK-2SA
(脚ナシ)



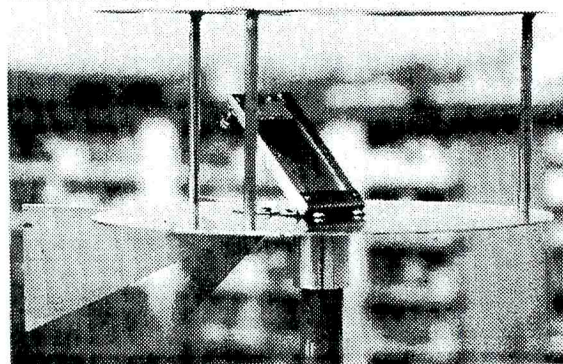
▲ダラム型2段式 DK-3SA

オールステンレス製です



◀ダラム型
DK-1SA
(全景)

▽IS式ロータリー型 RK-1SA
(ダラム型の4~5倍の採集効率)



ダラム型：重力型の標準花粉捕集器

1950年代から使われている日本で最も普及型のモデルです。

ロータリー型（回転式風受け型捕集器）

1980年代から使われている捕集効率の高いモデルです。

※この他、お客様の御要望により、特別型も製作致します。

型 式 名	価 格
DK - 1SA	¥ 28, 800
DK - 2SA	¥ 19, 800
DK - 3SA	¥ 23, 800
RK - 1SA	¥ 42, 800

オ プ シ ョ ン	価 格
伸縮ポール H=1.4m-4.5m自在調整 フェンス支柱、取付専用	¥ 13, 800

取り扱い店

理化学機器 設計・製造

西 精 機 株 式 有 限 公 司

〒274-0071 千葉県船橋市習志野5-8-15

TEL 047-474-0103

FAX 047-477-0033