数種の沈水植物細胞における 硝酸銀還元反応の検討*

吉 田 吉 男**

Yoshio YOSHIDA**: Some Informations on the Silver Nitrate
Reduction in the Cells of Several Submerged Plants*

昭和32年12月6日受付

種々の生体組織に著しい硝酸銀還元能のある事は古くから注目せられ、Szent-Györgyi (1928¹⁾)以来種々の研究結果からその還元要因が Ascorbic acid であることが決定せられ、更に Giroud et Leblond (1937)²⁾等はこの反応から逆にアスコルビン酸の組織化学的検出法を確立した。

植物細胞では特に生きている葉緑体において硝酸銀を還元して黒くなる反応の強い事が知られ所謂“Molisch”反応として多くの研究者により追求されて来た。しかしなおより慎重な検討の望まれている点も少くはない。

ここでは *Elodea* その他の沈水植物の葉の細胞におけるこの反応を検討し、又ペーパークロマトグラフィーによりその還元性物質の検出を試みた結果、若干の知見を得たので報告する。

材 料 と 方 法

Elodea densa Casp., *E. canadensis* Michx., *Hydrilla verticillata* Casp., *Ceratophyllum demersum* L., *Potamogeton crispus* L. の5種の沈水植物の新生葉を被検材料として次の試薬及び処理について夫々の反応程度を観察した。酢酸々性、アンモニア性、中性の10%硝酸銀液を試薬とし次の諸種の処理を行った。① Giroud-Leblond 法：酢酸々性10%硝酸銀液 (pH≒3) に30分浸漬、D.W. で洗滌、チオ硫酸ソーダ 3.5% 溶液に1時間浸漬、D.W. で洗滌、Glycerin で検鏡、i. これらの手順を暗黒中に行う。ii. 普通室内散光中に行う。② 酢酸々性、アンモニア性、中性各硝酸銀液 (pH≒3~9 数段階) 単独処理 (30分~1時間浸漬)、i. 暗黒中に行う。ii. 普通散光中に行う。

て行う。③ 試薬をスライド上の被検材料に滴下しカバーをかけ直ちに火焰を通して加熱す。

ペーパークロマトグラフィー：一次元上昇法、東洋ろ紙 No. 50, 2×40 cm を用い、展開剤は n-ブタノール 4, 氷酢酸 1, 水 5, を分液ろと中にてよく混和し2~3日間放置後上澄液を使用する。被検液の調製は新鮮草体 1.5g に5%メタ磷酸1ccを加え乳鉢中で磨碎、遠心分離し上澄液を用いる。ろ紙の下端から7cmを出発線とし、その中央点に0.02 ccの検液を滴下し、乾燥後スタンドに装置し下端1cm迄浸るように展開液を注入、酵素作用を抑制するため器底に少量の KCN の結晶を投入し出発線より30cmの高さ迄展開上昇せしめ、乾燥後試薬を吹きつけ発色せしめる。顕色剤としては上記各硝酸銀液の他 2,6-dichlorophenolindophenol 400 mg/l 50% ethanol 溶液 (アスコルビン酸の検出), Benzidin 0.5 g, 酢酸 5 cc, 純アルコール 20 cc の混液 (100~105° に5~15分間加熱処理、還元糖の検出), その他を使用した。

実 験 結 果

Giroud-Leblond 法：暗処理では液胞、細胞質が一様に淡く暗灰色を呈し、葉緑体は僅かに暗褐色を帯びる。明処理でも殆んど同じ反応を示し、暗と明とで特に差は認められない。

酢酸酸性試薬 (pH≒3)：液胞、細胞質は一様に暗灰色を呈し、葉緑体は弱く黒ずんでくる。

アンモニア性試薬 (pH≒9)：綿毛状暗灰色沈殿が液胞を充たす。しかし葉緑体の着色は殆んど負に近い。

* 文部省助成金による。No. 407041, 昭和30年度、要旨は第22回植物学会大会 (東京) に報告。

** 新潟大学理学部生物学教室 Department of Biology, Faculty of Science, Niigata University, Niigata, Japan.

中性試薬 (pH=6): 液胞は幾分暗灰色を帯び又綿毛状沈殿も若干生ずる。葉緑体は多少黒化す。

これらの反応は暗処理と明処理とで殆んど大差は認められない。

加熱処理: 何れの試薬でも加熱によって著しく反応が強められるが、酸性及び中性試薬で加熱処理を行った場合において特に葉緑体が殆んど特異的に強く黒化し、液胞の一樣暗化も弱く、綿毛状沈殿も微弱である (Table 1)。酸性と中性とではその効果が後者に於て優れ、又調製に簡便であるから以後の実験はすべて中性試薬加熱処理法によった。

又従来報告せられた高等陸生植物では典型的反応の場合、grana にまず、還元銀による最も強い黒化が現われることが多かったが、此等沈水植物細胞ではすべて、葉緑体の黒化は殆んど一樣であって、grana に特に著しい知見を得ることはできなかった。

細胞及び葉緑体の vital activity と還元能:

でんぷん量 — 中性試薬加熱処理によって生ずる葉緑体の黒化の強さは一葉でも部分によって強弱あり、それはヨード試験による葉緑体内同化でんぷん量に略々平行であった。即ち中肋、葉脈或は所謂 Blattfält 等のでんぷん量の著しい葉緑体は極めて強く典型的な黒化を示し、液胞中の綿毛状沈殿は少く、同化でんぷん量の少い縁辺、基部等の細胞の葉緑体ではでんぷん量の減少に従って漸次顕著な黒色から次第に灰褐色へと反応がうすくなっている。

傷害 — 機械的であると化学的であるとを問わず傷害をうけ、死滅した細胞では葉緑体は勿論細胞質、液胞にも全く何らの反応をも生じない。生死両細胞を対比する時その contrast は極めて顕著である。

原形質分離 — 0.6M しょ糖液で処理した細胞は強く原形質分離を起すがそれ自体は反応の生起には全く無影響であった。しかし原形質分離処理が長期間に亘る時は細胞が不健全状態に傾くのは当然であって、硝酸銀反応も漸次減衰した。

核の存否による葉緑体の変化と硝酸銀反応 — Elodea では原形質分離処理により一細胞内において原形体が二塊に分割されることがあり、そのような場合核を含む分割塊中の葉緑体は次第に退化して黄化、矮小化し同化でんぷん量も激減するが、核を含まない他方の分割塊中の葉緑体は鮮緑を保って却って肥大化し著しく同化でんぷんを

Table 1. The reaction intensities in various silver-nitrate reagents.

	Ground-Leblond's procedure			Acidic reagent			Neutral reagent			Ammoniacal reagent		
	in dark	in light		in dark	in light	heating	in dark	in light	heating	in dark	in light	heating
Chloroplast	+	+	weak dark brown	+	+	+++ specific blackening	+	+	+++ specific blackening	-	-	
Vacuole and cytoplasm	++	++	diffused dark grey flocculum precipitation	++	++	diffused weaker darkening	++	++	diffused weaker darkening	over all complete darkening with remarkable flocculum precipitation		

Table 2. The coloration and intensity of silver-nitrate reaction in the nucleated and enucleated protoplasmic fragments cultured with the 0.6 M sugar solution. The leaf cell of *Elodea densa*.

Cultur duration (days)		2	3	4	5	6	7
Nucleated part	Chloroplast	++++ black	++++ black with slight brown	+++ blackish	++ brown	+	+ yellowish brown
	Morphological alteration		shrink, etiolate, and starch decrease.				
	Vacuole and cytoplasm	dark grey	flocculum	precipitation		faintly	
Enucleated part	Chloroplast	++++ black	++++ black	++++ black	+++ black	++ black	++ black
	Morphological alteration		enlarge, green, and starch increase.				
	Vacuole and cytoplasm	dark grey	flocculum	precipitation		faintly	

蓄積することは既に報告した⁴⁾が、このような葉緑体の変化と硝酸銀反応との関係を検した。その結果は第2表の如くであって有核部では葉緑体の変化、葉緑素量、同化でんぷん量に全く平行的で葉緑体の反応は黒から次第に褐色、黄褐色と著しく減衰し、液胞内の暗灰色綿毛状沈殿も4~5日以後は殆んど見られなくなった。これに対比して無核部では反応能は極めて強く保たれたが葉緑体の肥大変化とは平行して増大する事はなく、やはり健全時に比べれば若干減衰の傾向を示した。しかしその程度は前者における程ではなく、両者のcontrastは顕著であった。

暗培養と反応 — *Elodea*, *Hydrilla* を植えた水鉢を暗黒中に保った。既に成育していた葉は暗黒中におかれても葉緑体は30日後でも健全時に比しそれ程顕著な黄化は起さない。しかし同化でんぷんは消費し尽され硝酸銀反応の強さも著しく低下し僅かに茶褐色を呈するに止まる。しかし全く負となることはなく生死両細胞を対比する時生きている限り反応能が保たれる事は明かである。又暗保中に新に発した葉は無論著しく黄化しているが細胞が死滅しない限りは硝酸銀反応が全く負となる事はなく、正負の判定が困難な程微弱になっても尙生死両細胞を対比する時は両者の間に明か

な差を認めることができる。

クロマトグラフィーによる還元性物質の追求：従来生体組織における硝酸銀反応を惹起する還元要因はアスコルビン酸の局在であると多くの研究は一致した結果を示している。しかし尙植物細胞においてはこの反応をアスコルビン酸の組織化学的検出法として用いる場合にはより慎重な検討を望む者もあり、二三沈水植物についての上記の検討結果はこれ迄報告された陸上植物の場合と若干の相異点も見られる。それでこれらの植物についてクロマトグラフィーにより硝酸銀還元物質の検知を試みた結果は第1図の如くであって、アンモニア性、中性、酸性の各硝酸銀試薬により徐々にではあるが何れも顕著なクロマトグラムが現われ、夫々 Rf 約 0.08 附近に黒色~暗灰色のスポットを現わす。*Ceratophyllum* の場合だけ少しく上って Rf 約 0.1 位である。更に *E. densa*, *Hydrilla*, *Potamogeton* では前者に一部重複して Rf 約 0.13~0.14 附近に長楕円形のもう一つのスポットをも現はし、*Potamogeton* では他の二種類に比して小さい。又このスポットは同一種においても場合により大小、強弱を現わすことがあるが、Rf 0.08 の主たるスポットは殆んど一定共通であった。生育条件不良のため還元能の低下している

Fig. 1. Paper chromatograms (somewhat schematified) of the metaphosphoric acid extract from *Elodea densa* (1), *E. canadensis* (2), *Hydrilla verticillata* (3), *Potamogeton crispus* (4), and *Ceratophyllum demersum* (5), and of the metaphosphoric acid solution only (6), pure ascorbic acid solution with metaphosphoric acid (7), and pure glucose solution (8), developed with butanol-acetic acid mixture, and sprayed with neutral silver reagent (1~7) and benzidin reagent (8). The spots represent unknown new reducers (x, y), metaphosphoric acid (m), ascorbic acid (As), glucose (Gl), and originated from the solvent (s), respectively.

草体及び 30 日間暗培養されて殆んど還元能を失いかけている材料についてのクロマトグラムは Rf 0.13 のスポットが極めて微弱に見られるだけで、Rf 0.08 の主たるスポットは殆んど判定に困難か或は検出せられず、顕鏡的試験とクロマトグ

ラフィーの結果とはよく一致し、このスポットを生ずる物質が細胞内における還元要因に間違いのないことを証明している。すべての場合に停止線に達する細長い或は少しく縊れた極めて微弱なスポットも現われるがこれは盲検により溶剤に由来する微量混在物によるものであることが分った。これら被検液の調製には 5% メタリン酸水溶液を用いたが、D.W. のみを抽出液として調製した場合にはこれらのスポットは全く現われないか現われても極めて微弱であって、安定剤としてメタリン酸の存在を必要とするものであることを示した。メタリン酸自体も硝酸銀試薬に反応する性質があるがメタリン酸だけをクロマトグラフィーにかけた場合は Rf 0.24 の楕円形暗灰色のスポットと Rf 0.11 附近に不明瞭な暗部を現わすのみであってメタリン酸は只還元性物質の安定剤として働くだけ

で Rf 0.8 及び 1.3 のスポットがメタリン酸によるものでないことは明かである。この場合メタリン酸自体のスポットの現れない理由は明らかではないが何らかの形で還元性物質と結合してそれを安定化しているのかも知れない。

これらのスポットが何であるか果してアスコルビン酸であるかどうかをその特異反応及び純標品試験と対照した。アスコルビン酸により特異的に還元されて青色から無色になる 2,6-dichlorophenolindophenol 液を顯色剤とした場合停止線に近い溶剤由来のスポットが微紅色を現わした以外青地に他の変化は現われない。純アスコルビン酸 5 mg/cc D.W. 溶液のクロマトグラムは夫々硝酸銀液で黒褐色、Indophenol 液で青地に白色の Rf 0.4 の明かなスポットを現わした。同じ純標品の 5% メタ磷酸溶液での試験は Rf 0.375 の所に同様のより著しいスポットと Rf 0.25 の所にメタ磷酸のスポットを現わした。メタ磷酸の存在はアスコルビン酸の Rf 値を低下せしめ自体の Rf 値は若干上っている。これらの結果と対照すれば草体抽出液における硝酸銀還元をのスポットがアスコルビン酸でないということは確実である。

永井 (1951)⁵⁾ によれば種によっては 3,4-dioxyphenylalanine (DOPA) が還元にあづかっている事もあり、それは potassium ferricyanide 等によっても顯色されるという。しかし報告せられた DOPA のクロマトグラム上の位置は此等草体抽出液に於ける硝酸銀還元をのスポットとは全くかけ離れた位置にあり、実際 potassium ferricyanide で の 顯色試験もここでは全く反応しなかった。タンニン検出試薬として用いられる ferric chloride でも全く反応を示さずタンニン系物質でもないと思われる。還元糖検出のための Partridge-Westall のアンモニア性硝酸銀試薬⁶⁾ により Rf 0.08, 0.13 のスポットが暗灰褐色に現われる。しかし Horrock, Manning (1949) の Benzidin 試薬⁶⁾ 顯色に於て黄褐色の背景に暗褐色のスポットの特異的呈色像は認められず、却って Rf 0.08 の部分が黄褐色の背景に少しく空白のまま残される。Glucose 純標品のクロマトグラフィの Benzidin 顯色は Rf 0.15 の著しい特異的呈

色像が現われ、これは草体抽出液による Rf 0.13 の硝酸銀還元をのスポットと位置的に近似してはいるがそれ自身は Benzidin 顯色に全く現われないのであるから此等のスポットが糖でないことも又明かである。

考 察

永井 (1950)⁷⁾ は陸生高等植物について詳細な研究をなし典型的な Molisch 反応は酸性試薬において最も著しく、アンモニア性では液胞、細胞質に一樣黒色綿毛状沈殿を顯著に生ずるが葉緑体の着色は極めて微弱にすぎない。又完全なる暗黒処理では葉緑体の着色は全く起らず、僅かな沈殿が不規則に生ずるにすぎない事を報告し、同様の結果は Metzner (1952)⁸⁾ によっても報告されている。それに比べてここで取上げられた沈水植物細胞では若干反応の様相に相異点があり、単に細胞内に生ずる還元銀量だけを見るならばやはりアンモニア性試薬に於て最も著しいが、葉緑体の特異的黒化即ち所謂 Molisch 反応の生起に注目するならば、単なる試薬浸漬処理でも葉緑体の着色は幾分か認められるがその程度は弱く、アンモニア性では殆んど負であって、酸性及び中性試薬による加熱処理に於て最も典型的であり概して

Fig. 2. Experimental diagram showing the relation between reaction intensity in chloroplast or in vacuole and cytoplasm and acidity of silver reagent.

—: Heat treatment.

- - -: Soaking treatment only.

中性において優っているようである。(Fig. 2) 永井・尾形 (1952)¹⁷⁾ は又海藻では酸性より中性においてより好適な特異的結果をうる事を見ているが此等の場合もむしろそれに近い傾向が認められる。何れの場合にも処理時における明暗条件は反応に殆んど差異を生じておらず、Gautheret (1938)⁹⁾, Mirimanoff (1938)¹⁰⁾ 等も指適しているような光の不可欠性はこの場合必ずしも認められない。

所謂 Molisch 反応は葉緑体における還元性物質の局在によるとの従来の定説に対し、永井 (1950)⁷⁾ はその反応生起の機構について種々の実験結果から還元性物質はむしろ液胞及び細胞質内に分散しているのであって、葉緑体の黒化は還元銀膠質粒子が二次的条件によって吸着されて起るものであると説明し、pH が大きく反応生起に影響するところから荷電関係による吸着を考えている。Caruso (1938)¹¹⁾, Savelli and Caruso (1938, 1939)¹²⁾, Danielli (1953)¹³⁾ 等も還元性物質の葉緑体への局在を疑問視し反応生起には他にも要因がある事を示唆している。Höfler (1939)¹⁴⁾ も孔辺細胞に於て条件により速かに一様分散型、葉緑体特異型が現われる事を見ている。此等沈水植物細胞に於ても試薬の酸性度により夫々前記の様に反応の様相を異にし、アンモニア性では一様に反応が強くなるのに酸性に傾くにつれ葉緑体に顕著となるのは此等も同様に酸性度に支配される二次的吸着により葉緑体反応が生起するものであるが、単なる試薬浸漬ではむしろ液胞、細胞質中の一様暗化、綿毛状沈殿の方が著しく、加熱処理によって始めて強い葉緑体の特異的黒化が見られるのは、陸生植物に比べて此等の吸着関係が弱く加熱処理がそれを飛躍的に拡大するために葉緑体の特異的黒化をもたらすもので、必ずしも葉緑体における還元性物質の局在を意味するものではなく、還元性物質それ自体はむしろ液胞及び細胞質中に一様に分散して存在しているものと考えられる (Fig. 2)。

Molisch 反応の強さとでんぷん量との関係について Höfler (1939)¹³⁾ は密接に関連する事を示し、永井 (1950¹⁵⁾, 1953¹⁶⁾) は直接的関係は認められないと言い又黄化した芽生え即ち葉緑素のないものでは反応は生じない事を報告している—永井・尾形 (1952)¹⁷⁾。ここではでんぷん量

及び葉緑素量と大凡の平行関係が認められたが必ずしも絶対的なものでなく、常に平行とは限らない。これは反応の強さがむしろ細胞及び葉緑体の vital activity に、より密接な連関性をもっている事を示唆するもので、でんぷん、葉緑素量即ち光合成能との平行は間接的なものであろう。Molisch (1918)³⁾, Geitler (1922)¹⁸⁾ 等は既にこの反応が細胞の生死判別に利用できる事を注目し、尾形・永井 (1953¹⁹⁾, 1954²⁰⁾) は藻体細胞の生死、被害判定等に此が有効な実用的手段である事を示した。ここでもその事実は明かに認められ、vital activity の低下に平行して反応の強さは減弱したが細胞が生きている限りはどんなに微弱であっても生死両細胞を比較する時は明かに差異を認めることができる。原形質分離細胞が正常細胞と全く同じ反応を示す事は既に永井 (1950)⁹⁾ も報告しているがここでも単なる原形質分離そのものによる細胞の vital activity の低下は少ないものである事を示している。

Szent-Györgyi (1928)¹⁾ 以来 Giroud-Leblond (1934)²¹⁾, Bourne (1936)²²⁾, Weier (1938)²³⁾ 等その他多くの研究により硝酸銀還元物質はアスコルビン酸であることが決定せられ、永井・尾形 (1950⁷⁾, '51⁵⁾, '52¹⁷⁾, '53¹⁶⁾) は更にクロマトグラフィーにより詳細広範な研究をなし、陸生高等植物のみならず海藻類においてもアスコルビン酸が共通の還元要因である事を明かにした。しかし同一の手法に従ってなされた此等沈水植物での結果は全く異った結果を示し、現われた硝酸銀還元スポットは被験種に略共通であったが予想に反してアスコルビン酸のスポットとは全く異り、更に DOPA でもなくタンニン系物質でもなく又還元糖でもなかった。*in vitro* でのモデル実験の結果はアスコルビン酸はアンモニア性試薬を最も強く且つ敏感に還元することを示し、永井 (1951)⁵⁾ もクロマトグラフィーでアンモニア性試薬がインドフェノール試薬について強くアスコルビン酸を検出し得る事を報告し、又アスコルビン酸以外にもフラボノイド、タンニン、還元糖等種々のスポットが現われる事もあったが、これらはすべてアンモニア性試薬でのみ検出され、酸性試薬では反応しなかったという。それに対しこの場合はアンモニア性、中性、酸性のすべての試薬に反応し陸生高等植物及び海藻類等におけるものとは異った

別の物質であると思われる。Rf 0.08 及び 0.13 の此等の物質は何れも分解乃至は酸化を受け易い不安定な物質であって、抽出に際しては安定剤としてメタ磷酸の存在を必要とする事はアスコルビン酸に類似しているが還元力は比較的に弱く鈍い。Rf 0.13 のスポットは *E. canadensis*, *Ceratophyllum* では現われず、又場合によりかなり消長があって不安定で還元力も弱く、此の意義は従属的なものであると思われる。此等二つのスポットが物質的に何であるかは尙決定できなかったが、此等沈水植物は陸生植物に比し若干の点で相異が認められるが大凡類似の著しい還元反応を示すにも拘らず還元物質の分析は全く違った物質の存在を示した事は注目に値しよう。

Giroud-Leblond 法はアスコルビン酸の細胞化学的検出法としては必ずしもその特異性及び敏感度が十分でない事は既に Mirimanoff (1938)²⁴⁾, 新家・重永 (1947)²⁵⁾, 飯島・平岡 (1950)²⁶⁾, 及び Danielli (1953)¹³⁾ 等によって注意され、又種によっては蔞酸の存在が著しく反応に干渉する事が永井・尾形 (1952)¹⁷⁾ によって明かにされた。沈水植物においては上記の実験結果がアスコルビン酸以外の物質によった事を明かにし、又試薬の pH, 加熱等の二次的條件による反応生成物の著しい易動性は此の処理法が細胞化学的検出法としてすべての場合に絶対にアスコルビン酸の存在及びその局在性を示すものとは言い切れず、反応結果の判定には尙より以上に慎重な考慮が必要とされるであろう。

傷害を受け、死滅した細胞での還元反応の消失は極めて鋭敏であって生死両細胞の対照は全く顕著であるが、Weier (1938)²³⁾ によればこれは還元性物質が酸化されて還元力を失うからであって、酸化を防止する条件下では死細胞でも反応の

生起を認め得たと言う。この場合安定剤としてメタ磷酸が存在すればこの還元性物質は磨砕抽出によってもクロマトグラフィーにおいて充分強い還元力が保持されていたが、メタ磷酸液中において切断された細胞でも顕微鏡下では完全に反応能を失い、又単にメタ磷酸液中に浸漬せられただけでもそれによって害をうけ原形質は不規則に収縮し、硝酸銀反応は負となった細胞外に磨砕抽出せられる場合にすらメタ磷酸は充分有効な安定剤であるのだから、たとえ傷害死滅細胞内においてもこの場合還元性物質は安定化されている筈で、葉緑体の特異的黒化はともかくとしても少くとも一次的な硝酸銀還元は起ってよいと思われるのに顕微鏡下において全く何らの反応も認められないのは奇妙である。*in vivo* においては“生きている”という何らかの微妙な条件が必要なのであるか、或は又還元性物質自体はメタ磷酸により安定化されてはいても死滅細胞には反応を阻止する条件が出現するのであろうかとも考えられる。*E. canadensis* のメタ磷酸磨砕遠心上澄液に中性硝酸銀液を滴下したところ著しく白濁し、帯淡黄褐色の沈殿を生じ、先にアスコルビン酸での *in vitro* のモデル試験において見られたような還元銀の白色沈殿は認められなかった。この状況は永井・尾形 (1952)¹⁷⁾ が反応干渉物質の研究で報告している状況と類似している。クロマトグラフィーで展開されれば各物質が分離され、安定化された還元性物質は他に妨げられることなく硝酸銀試薬により暗灰色のスポットを生ずるのかも知れない。しかし此等の関係を説明するためには尙将来の検討にまたねばならない。

終りに有益な御助言を下された本学教育学部相馬倂介教授、東京教育大学植田利喜造助教授に謝意を表する。

Summary

Several studies on the silver-nitrate reduction in the cells of five species of the submerged plants were carried out.

1. The reduction occurred as in the land plants, but the specific blackening of chloroplast (so-called “Molisch’s reaction”) was most typical when the material was heated with neutral silver reagent.

2. The light and dark conditions in procedure had no influence on the occurrence of reduction.

3. The specific blackening of chloroplast does not always indicate the localization of the reducing agent in it. It is due to the secondary deposition of reduced silver on chloroplast, and the agent is rather contained diffusely through the vacuole and cytoplasm.

4. The parallelism between the reaction intensity of chloroplast and the starch and chlorophyll contents was not always absolute, but it was connected rather more closely with the vital activity of cell and chloroplast.

5. The trials of detection of reducing substances by means of the chromatography showed the silver reducing spots in the position of R_f 0.08 in all cases and also of 0.13 in a few cases. These spots were not ascorbic acid, DOPA, reducing sugar, tannin nor flavonoid etc. For the extraction of these substances the presence of metaphosphoric acid was necessarily required as a stabilizer. The identification of these substances is as yet remained unsettled.

6. It must be considered, from these facts, that the Giroud-Leblond's procedure or silver-nitrate reagent are not always sufficiently specific in all cases for ascorbic acid in the cytochemical use.

Literatures

- 1) Szent-Györgyi, A., *Biochem. J.* **22**: 1387 (1928). 2) Giroud, A. and Leblond, C.P., *Biol. Ztbl.* **57**: 658 (1937). 3) Molisch, H., *Sitz. berich. d. kais. Akad. wiss. i. Wien. Abt. 1.* 127 (1918).
- 4) Yoshida, Y., *J. Fac. Sci. Niigata Univ. Ser. II.* **2**: 73 (1956). 5) Nagai, S., *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ.* **2**: Ser. D. 1 (1951). 6) Kuwada, S., *Chromatography*, Tokyo (1951). 7) Nagai, S., *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ.* **1**: Ser. D. 33 (1950). 9) Metzner, H., *Protoplasma* **41**: 129 (1952). 9) Gautheret, R., *C. r. Akad. Sci. Paris.* **198**: 1252 (1938). 10) Mirimanoff, A., *Rev. gen. Bot.* **50**: 333 (1938). 11) Caruso, C., *Protoplasma* **30**: 341, 481, **31**: 98, 489 (1938). 12) Savelli, R. and Caruso C., *ibid.* **32**: 397 (1938), **32**: 517 (1939). 13) Danielli, J.F., *Cytochemistry*, New York (1953). 14) Höfler, R., *Protoplasma* **33**: 258 (1939). 15) Nagai, S., *Bot. Mag. Tokyo* **63**: 250 (1950). 16) ———, *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ.* **4**: Ser. D. 27 (1953). 17) Nagai, S. and Ogata, E., *ibid.* **3**: Ser. D. 46 (1952). 18) Geitler, L., *Öster. Bot. Zts.* **71**: 116 (1922). 19) Ogata, E. and Nagai, S., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisher.* **19**: 1750 (1953). 20) ——— and ———, *Physiology and Ecology* **6**: 10 (1954). 21) Giroud, A. and Leblond, C.P., *C. r. Soc. Biol.* **115**: 705, 841 (1934). 22) Bourne, G., *Anat. Rec.* **66**: 369 (1936). 23) Weier, E., *Amer. J. Bot.* **25**: 501 (1938). 24) Mirimanoff, A., *Rev. Cytol. Cytophysiol. Veget.* **3**: 119 (1938). 25) Shinke, N. and Shigenaga, M., *Rep. 74 Div. Sci. Council* (1947). 26) Iijima, M. and Hiraoka, T., *Bot. Mag. Tokyo* **63**: 278 (1950).