アカマツ花粉ミトコンドリアの酵素*

勝又悌三, 栗谷川義夫**, 遠藤文子, 菅原日出男***, 早坂謙造****

(岩手大学農学部農芸化学科)

昭和 51 年 8 月 9 日 受理

Mitochondrial Enzymes of the Pollen of *Pinus densiflora* (Biochemical Studies on Pollen Part XVII)

By Teizo KATSUMATA, Yoshio KURIYAGAWA, ** Fumiko ENDO, Hideo SUGAWARA***
and Sanzo HAYASAKA****

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Iwate University, Morioka, Iwate, Japan

Subcellular fractions were prepared from the pollen of *Pinus densiflora*, and the mitochondrial fraction was assayed for isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities. The isocitrate dehydrogenase required NADP for its reaction, while the activity with NAD was about 8% of that with NADP. DNA-P was mainly localized in the nuclear fraction, and succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase in the fraction sedimented at $15,000 \times g$ for 20 min. The particulate fraction sedimented at $15,000 \times g$ was presumed to be the mitochondrial fraction from the staining with Janus Green B, their Brown's movement, electron microscopic appearance and enzyme activities. Both dehydrogenases and cytochrome oxidase activities in the mitochondrial fraction increased during germination of the pollen on sucrose-agar medium.

(Received August 9, 1976)

** Present address: T. Hasegawa Co., Ltd., Fukaya, Saitama

*** Present address: Kaken Chemical Co., Ltd., Kita-ku, Tokyo

**** Present address: Residential Facility for the Mentally Retarded
Children "Miyagiken Kiteien," Sendai, Miyagi

緒 言

花粉の生化学的研究の一部として, 花粉発芽生理の酵素化学的研究を行なっているが, 糖質代謝関連酵素としてはアミラーゼ, インベルターゼ, マルターゼ (アカマツ花粉のみ), ヘキソキナーゼ, ホスホリラーゼ, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ, 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼなどが, 発芽時に活性を増大することを認めた⁽¹⁻⁴⁾. また, アカマツ花粉に 4 種類のリボヌク

レアーゼ (RNase 1, 2, 3, 4) を確認し, 表在酵素と考えられる RNase 4 が発芽時に活性を増大することを認めた⁽⁵⁾. ついで, アカマツ花粉に酸性プロテイナーゼ, 中性プロテイナーゼを認め, 両酵素とも発芽時に活性を増大し, とくに酸性プロテイナーゼは完熟花粉に 3 種類, 発芽花粉に 4 種類存在することを確認した⁽⁶⁾.

以上のように, 花粉の発芽時には多くの酵素活性が増大し, 花粉粒内および花粉管での活発な代謝が考えられるので, このたびはアカマツ花粉の細胞分画法を検討後, とくにミトコンドリア画分について, イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH と略記), コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH と略記) およびチトクロームオキシダーゼ (CytOx と略記) の発芽時の活性を検討した.

* 花粉の生化学的研究 (第 17 報). 著者らは, この論文を謹んで斗ヶ沢宣久博士の御霊前に捧げます.

** 現在, 長谷川香料株式会社.

*** 現在, 科研化学株式会社.

**** 現在, 精神薄弱児収容施設 "宮城県亀亭園".

実験方法

1. 試料 前報^(1,7)に準じて調製したアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 完熟花粉および発芽花粉 (3% ショ糖-3% 寒天, 30°C で発芽) を試料とした。

2. 花粉の細胞分画法 Hogeboom ら⁽⁸⁾, Schneider⁽⁹⁾の方法, Akazawa ら⁽¹⁰⁾の方法を組合わせた変法により, Fig. 1 に従って分画した。

3. 窒素, RNA リン, DNA リンの定量 分画法を検討するため, 各画分について窒素はマイクロキエルダール法により, RNA リンと DNA リンは前報⁽⁷⁾に準じてそれぞれ定量した。

4. デンプンおよびミトコンドリアの染色 デンプンはヨウ素染色法⁽¹¹⁾, ミトコンドリアは Janus Green

Fig. 1. Separation Procedure of Subcellular Fractions from the Pollen of *Pinus densiflora*.

All procedures were carried out below 5°C. Particles in each fraction were resuspended in a small volume of the homogenizing medium, and the supernatant obtained by re-centrifugation of the suspension was combined with the corresponding supernatant.

B により染色し^(12,18), 顕微鏡観察 (ミトコンドリアの場合は位相差顕微鏡を併用) を行なった。

5. 電子顕微鏡観察^(14,15) 花粉細胞のミトコンドリア, ミクロソーム画分を Millonig 固定液 (グルタルアルデヒド: 0.5 M リン酸緩衝液, pH 7.4: 蒸留水…以下水と略記…=2:5:1) で固定した後, Palade 固定液 (2% 四酸化オスミウム: 0.133 M ペロナル緩衝液, pH 7.4: 0.1 N 塩酸: 水=10:4:4:2) で再固定し, アルコールで脱水後, Epon 812 で包埋した。それをポーター 2 型のミクロトームで超薄切片とし, 酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色を行ない, 日立 HS 7 型電子顕微鏡で観察 (10,000 倍) した。

6. 酵素液の調製 Fig. 1 で得た各画分を, 以下のように 0.50 M (0.25 M も使用) ショ糖を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁して用いた。すなわち, 核画分は 5 ml, デンプン画分は 3 ml, ミトコンドリア, ミクロソーム画分は 2 ml に懸濁し, 酵素量と反応量が直線関係を示すように, 前記 ショ糖溶液で希釈して (図中に特記しないときは希釈しない) 用いた。

7. 酵素活性の測定

(1) IDH: Plaut ら⁽¹⁶⁾の方法に準じて測定した。すなわち, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 0.003 M NADP (NAD も併用, いずれも Sigma) 0.1 ml, 0.02 M 硫酸マンガン 0.1 ml, 0.04 M DL-イソクエン酸 (Sigma) 0.1 ml, 水 0.6 ml, 酵素液 0.1 ml の反応液の 340 nm における吸光度の増加を光電分光光度計で測定して活性を求め, 1 分間に吸光度を 0.001 だけ増加させる酵素活性を 1 単位とした。なお対照として, 反応液中基質溶液の代わりに水を加えたものを同時に測定して吸光度を補正した。また活性と pH の関係を検討した予備実験では, ツンベルグ法^(17,18)も併用し, $(1/t - 1/t') \times 100$ (t は本実験の脱色時間, t' は盲検の脱色時間) により活性を表わした。

(2) SDH: Slater ら⁽¹⁹⁾の方法に準じて行なった。すなわち, 0.195 M コハク酸 0.4 ml, 0.043 M シアン化カリウム 0.7 ml, 0.0075 M 赤血塩 0.4 ml, 0.38 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1.1 ml, 酵素液 0.4 ml の反応液について, 赤血塩の 400 nm における吸光度の減少を光電分光光度計で測定して活性を求め, 1 分間に吸光度を 0.001 だけ減少させる酵素活性を 1 単位とした。なお対照試験は, IDH の場合に準じて行なった。また予備実験では, ツンベルグ法^(17,18)も併用した。

Fig. 2. Effect of pH on Isocitrate Dehydrogenase, Succinate Dehydrogenase and Cytochrome Oxidase Activities.

The dehydrogenase activities were assayed using Thunberg tubes at 37°C, and were calculated from the following formula $(1/t - 1/t') \times 100$ as described under "Materials and Methods." The cytochrome oxidase activity was measured at the indicated pH by the method described under "Materials and Methods" using the whole homogenate diluted with 2 volumes of the homogenizing medium, and is expressed as decrease in O.D. at 550 nm per 5 min.

△—△ isocitrate dehydrogenase activity,
□—□ succinate dehydrogenase activity,
○—○ cytochrome oxidase activity.

(3) **CytOx**: Smith⁽²⁰⁾の方法に準じて行なった。すなわち、還元型チトクローム *c* [Sigma 製チトクローム *c* を 90 μM になるように 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、パラジウムアスベストを触媒として、水素ガスで還元した溶液] 1.0 ml, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1.9 ml, 酵素液 0.1 ml の反応液について、還元型チトクローム *c* の 550 nm における吸光度の減少を光電分光光度計で測定して活性を求め (Fig. 2 には減少した正味の吸光度変化をプロットした), SDH の場合に準じて酵素単位を算出した。なお対照試験は、基質溶液の代わりに 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えたものについて行なった。

結果および考察

著者らは、花粉細胞内顆粒と酵素活性について検索中であるが、そのためには花粉細胞内顆粒の分画法を検討する必要がある。分画法の検討は、窒素, RNA リン, DNA リンの測定, デンプンおよびミトコンドリアの染色, 電子顕微鏡観察, 前記の酵素活性測定などにより行なった。

Fig. 3. Effects of NAD and NADP on the Activity of Isocitrate Dehydrogenase.

The activities were measured by the method described under "Materials and Methods" using mitochondrial fraction.

●—● isocitrate dehydrogenase (IDH) activity with NADP, ○—○ IDH activity with NAD.

はじめに、予備実験として Fig. 1 に従って調製した全ホモジネート (0.50 M ショ糖溶液を使用) を用いて、IDH, SDH および CytOx 活性と pH の関係を調べた結果 (Fig. 2), IDH および SDH は 7.5, CytOx は 7.0 でそれぞれ最大の活性を示したので、以後の実験はこれらの pH で行なった。

IDH は補酵素として、NAD または NADP を必要とするが、アカマツ花粉 IDH の場合、いずれを要求するかを Fig. 1 で得られたミトコンドリア相当画分を用いて検討した結果 (Fig. 3), NADP に特異的であったので、以後の実験はすべて NADP を添加して行なった。なお NAD 添加では、NADP のときの約 8% の活性を示した。

一般に細胞分画の場合、生化学的活性の研究には 0.25 M ショ糖液を、形態学的研究には 0.88 M ショ糖液を用いているが、近年両者の研究を同時に行なうため、0.50 M ショ糖液も使用されている。そこで、0.25 M と 0.50 M

Table I. Effect of Sucrose Concentration of Homogenizing Medium on Enzyme Activities of Whole Homogenate

Sucrose concentration (M)	Activity		
	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	Succinate dehydrogenase	Cytochrome oxidase
0.25	8800	246	1940
0.50	13,200	250	2040

The activities were measured by the method described under "Materials and Methods," and are expressed as units per g of fresh pollen.

Table II. Distribution of Nitrogen, Ribonucleic Acid-P and Deoxyribonucleic Acid-P among Subcellular Fractions Isolated from the Pollen

Sucrose concentration ^{a)} (M)	Fraction	Nitrogen		RNA-P		DNA-P	
		(mg) ^{b)}	(%)	(μg) ^{b)}	(%)	(μg) ^{b)}	(%)
0.25	Whole homogenate	11.2	100	206.2	100	46.2	100
	Nuclei	2.3	20.5	22.7	11	42.3	91.6
	Starch	0.7	6.3	8.4	4.1	0.7	1.5
	Mitochondria	0.2	1.8	4.1	2	0	0
	Microsomes	2.7	24.1	40.2	19.5	0	0
	Supernatant	4.7	42	120.8	58.6	0	0
0.50	Whole homogenate	11.2	100	196.8	100	45.0	100
	Nuclei	2.1	19	24.5	12.4	41.4	92
	Starch	0.6	5.4	8.8	4.5	0.7	1.6
	Mitochondria	0.2	1.8	4.5	2.3	0	0
	Microsomes	2.8	25	39.3	20	0	0
	Supernatant	4.8	42.9	111.2	56.5	0	0

^{a)} sucrose concentration of homogenizing medium, ^{b)} contents per g of fresh pollen.

Table III. Distribution of Enzyme Activities among Subcellular Fractions Isolated from the Pollen

Fraction	Activity					
	NADP-specific isocitrate dehydrogenase (units)	(%)	Succinate dehydrogenase (units)	(%)	Cytochrome oxidase (units)	(%)
Whole homogenate	13,200	100	250	100	2040	100
Nuclei	0	0	11.2	4.5	80.3	3.9
Starch	54	0.4	3.7	1.5	78.2	3.8
Mitochondria	75	0.6	225	90	1680	82.4
Microsomes	0	0	0	0	0	0
Supernatant	12,300	93.2	0	0	0	0

The activities were measured by the method described under "Materials and Methods," and are expressed as units per g of fresh pollen.

M シュ糖溶液を用い, Fig. 1 に従って全ホモジネートを調製し, 前記の酵素活性を測定した結果 (Table I), 0.50 M シュ糖溶液の場合, 0.25 M に比べて NADP 特異性 IDH はかなり, CytOx は若干強い活性を示すので, 以下酵素活性測定のためには, 0.50 M シュ糖溶液を用いて細胞分画を行なった。

最初 Hogeboom ら⁽⁸⁾, Schneider⁽⁹⁾ の方法に準じて細胞分画を行なったが, ミトコンドリア相当画分に多量のデンプンを認めたので, 次に Akazawa ら⁽¹⁰⁾ がサツマイモの場合に用いた分画法も参考にして, Fig. 1 に従って分画を行なった。

各画分について, 窒素, RNA リン, DNA リン含量を測定した結果 (Table II), シュ糖の濃度差による相違は

ほとんど認められなかった。窒素および RNA リンは, 核, ミクロソーム, 上澄画分に多く, ミクロソーム画分の RNA リンがミトコンドリア相当画分のそれより約 9~10 倍も多いことは, 動物肝臓^(21,22) に類似している。DNA リンはほとんど核画分のみ検出されたが, デンプン画分の 1.5~1.6% は核の混入と思われる。近年, ミトコンドリア⁽²³⁾, クロロプラスト⁽²⁴⁾ などにも DNA が存在することが知られてきたが, 今回の花粉の分画法では核外 DNA は検出されなかった。

次に各画分をヨウ素染色した結果, 核, デンプン画分では明らかに陽性であったが, ミトコンドリア, ミクロソーム相当画分はほとんど反応を示さず, これらの画分にはデンプンの混入はほとんどないと考えられる。ミトコンドリア相当画分を Janus Green B で染色すると, 薄い青黒色に染まり, 活発なブラウン運動を行なう多数の顆粒がみられ, また電子顕微鏡観察ではミトコンドリア特有の構造が認められ, またミクロソーム画分にはミトコンドリアの混入は認められなかった。なお細胞顆粒を分画しないで, 細胞化学的

にミトコンドリアを観察した例は, フクロナデシコ⁽²⁵⁾, アカバナクンシラン⁽²⁶⁾, チョウセンヤマナラン⁽²⁷⁾, テッポウユリ⁽²⁸⁾, ツバキ⁽²⁹⁾, ヤマユリ⁽³⁰⁾ などの花粉について多数報告されている。

一方, 酵素活性を測定した結果 (Table III), NADP 特異性 IDH 活性は大部分上澄画分に検出されたが, ミトコンドリア相当画分にも 0.6% 認められ, 従来いわれているように花粉の場合も, この酵素は可溶性と不溶性の 2 つの異なった存在形式をとっているようである。SDH 活性や CytOx 活性は, ミクロソーム, 上澄画分には見られず, ミトコンドリア相当画分に SDH 活性の 90%, CytOx 活性の 82.4% が検出された。核画分に SDH 活性 4.5%, CytOx 活性 3.9% を検出したが, これはミト

Fig. 4. Changes in NADP-Specific Isocitrate Dehydrogenase and Succinate Dehydrogenase Activities during Germination of the Pollen.

The activities were measured by the method described under "Materials and Methods" using mitochondrial fraction, and are expressed as units per g of fresh pollen.

●—● isocitrate dehydrogenase activity,
○—○ succinate dehydrogenase activity.

ミトコンドリアの混在によるものかどうか今後の検討課題である。デンプン画分にも若干これらの活性を認めたが、これはミトコンドリアの混在のためと考えられる。

以上の諸結果から、Fig. 1 の分画法によりアカマツ花粉のミトコンドリア (15,000×g 遠心画分) は核画分、デンプン画分などが除かれて比較的よく分画されていると考えられる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法⁽³¹⁾によりミトコンドリア画分を精製することが望ましいが、一般に精製とともに呼吸活性は急激に低下することが知られているので⁽³¹⁾、以下の発芽花粉の実験にも、すべて Fig. 1 のミトコンドリア調製法を適用した。

発芽時の酵素活性を検討した結果 (Fig. 4, 5), NADP 特異性 IDH の場合、完熟花粉に比べて発芽花粉 (18 時間) で 2.1 倍の活性増大が認められた。SDH および CytOx の場合、完熟花粉に比べて発芽花粉 (18 時間) でそれぞれ 1.6, 1.9 倍の活性増大が認められた。

花粉の IDH に関しては、Dickinson ら⁽³²⁾ がユリ花粉について活性を認め、花粉の SDH に関しては、ヤマユリ^(33,34)、ヤナギ⁽³⁵⁾、ムラサキツユクサ⁽³⁵⁾、テッポウユリ⁽³⁵⁾、キク⁽³⁶⁾ などの花粉について、それぞれ活性が認められている。また花粉の CytOx に関しては、Okunuki^(33,37) がヤマユリ花粉で CytOx 活性を認め、Pyl'nev ら⁽³⁸⁾ がトウモロコシ花粉、Schloesser⁽³⁹⁾ がペチュニア花

Fig. 5. Change in Cytochrome Oxidase Activity during Germination of the Pollen.

The activity was measured by the method described under "Materials and Methods" using mitochondrial fraction, and is expressed as units per g of fresh pollen.

粉を用い、それぞれ発芽花粉の花管先端部でその活性が強いことを細胞化学的に検討、また Chuvashina ら⁽⁴⁰⁾ がミヤマズミ、クロスグリなどの花粉を用い、fertile pollen では CytOx 活性が強く、sterile pollen ではパーオキシダーゼ活性が強いことを細胞化学的に検討している。また Dickinson⁽⁴¹⁾ は、ユリ花粉が花粉管を伸長させるときに呼吸活性が増大することを報告している。以上のように、完熟花粉についての報告はあるが、発芽時の活性とくにミトコンドリアの酵素活性についての知見はほとんどみられない。

花粉発芽の最初の過程が何であるかは、むずかしい問題であるが、少なくともその 1 つはミトコンドリアの酵素系が活性化されることと思える。前報⁽¹⁻⁶⁾ で明らかにしたように、アカマツ花粉は発芽時に糖質代謝関連酵素および RNase 4, 酸性プロテイナーゼ、中性プロテイナーゼなどの活性を増大するが、この時期は多量のエネルギー供給を必要としているので、これら糖質代謝関連酵素の活性増大と平行して、ミトコンドリア内のトリカルボン酸サイクル、呼吸系に関与する酵素がその活性を増大して、エネルギー供給に応じているものと推論する。

当研究室では、以上の分画法で分画したリボソームや、別にアカマツ花粉から調製したペプチド鎖延長因子 (EF-1, EF-2) などを用い、アカマツ花粉の無細胞タンパク質合成系を確立したので⁽⁴²⁾、今後この系を活用して緒言で述べた諸酵素や、これらミトコンドリア内の酵素の発芽時の活性増大機構を追究したいと考えている。

要 約

アカマツ花粉の細胞分画法を検討後, とくにミトコンドリア画分について, イソクエン酸, コハク酸デヒドロゲナーゼおよびチトクロームオキシダーゼの発芽時の活性を検討し次の結果を得た.

(1) イソクエン酸デヒドロゲナーゼは NADP に特異的であるが, NAD 添加では NADP の場合の約 8% の活性を示した.

(2) Fig. 1 に従って細胞分画を行なったが, DNA リンは主として核画分に存在し, コハク酸デヒドロゲナーゼおよびチトクロームオキシダーゼ活性は, ほとんど $15,000 \times g$ 遠心画分に検出された. この $15,000 \times g$ 遠心画分は, Janus Green B 染色, ブラウン運動観察, 電子顕微鏡観察, 酵素活性などから, ミトコンドリア画分と推定した.

(3) ミトコンドリア画分の NADP 特異性イソクエン酸デヒドロゲナーゼ, コハク酸デヒドロゲナーゼ, チトクロームオキシダーゼは, 発芽時にいずれもその活性を増大した.

本研究の一部は, 文部省科学研究費によって行なったものであり, 厚く感謝の意を表す.

- (1) 勝又悌三, 斗ヶ沢宣久: 農化, **42**, 1 (1968).
- (2) 勝又悌三, 斗ヶ沢宣久: 農化, **42**, 8 (1968).
- (3) 勝又悌三, 斗ヶ沢宣久: 農化, **42**, 13 (1968).
- (4) 勝又悌三, 鈴木寿直, 故斗ヶ沢宣久: 日本花粉学会会誌 (花粉誌), **16**, 29 (1975).
- (5) 勝又悌三, 江尻慎一郎, 田村藤二郎, 佐々木裕子: 日農化大会講演要旨, p.162 (1975).
- (6) 勝又悌三, 江尻慎一郎, 大久保陽一: 花粉誌, **17**, 17 (1976).
- (7) 斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 太田達郎: 農化, **41**, 178 (1967).
- (8) G. H. Hogeboom and W. C. Schneider: "The Nucleic Acids," Vol. II, ed. by E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 105.
- (9) W. C. Schneider: *J. Biol. Chem.*, **176**, 259 (1948).
- (10) T. Akazawa and I. Uritani: *J. Biochem.*, **41**, 631 (1954).
- (11) 葛西千春, 宮 慶一郎, 勝又悌三, 斗ヶ沢宣久: 岩手大農報, **8**, 89 (1966).
- (12) 須田正巳, 原 勝: 標準生化学実験法, 文光堂, 1953, p. 389.
- (13) 緒方規矩雄: 酵素研究法, 第 3 巻, 朝倉, 1957,

- p. 112.
- (14) G. E. Palade: *J. Exptl. Med.*, **95**, 285 (1952).
- (15) J. H. Luft: *Anat. Record*, **133**, 305 (1959).
- (16) G. W. E. Plaut and S. C. Sung: *J. Biol. Chem.*, **207**, 305 (1954).
- (17) 石本 真: 酵素研究法, 第 1 巻, 朝倉, 1955, p. 606.
- (18) Y. Oota, Y. Yamamoto and R. Fujii: *J. Biochem.*, **40**, 187 (1953).
- (19) E. C. Slater and W. D. Bonner, Jr.: *Biochem. J.*, **52**, 185 (1952).
- (20) L. Smith: "Methods in Enzymology," Vol. II, ed. by G. Glick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 732.
- (21) 和田文吾, 佐藤重平, 太田次郎: 基礎細胞学, 裳華房, 1966, p. 50.
- (22) J. N. デビッドソン (右田政弘, 植田勝巳訳): 核酸の生化学, 共立, 1965, p. 124.
- (23) 若林一彦: 蛋白質 核酸 酵素, **19**, 1178 (1974).
- (24) 菊池忠寿, 石田政弘: 同上, **19**, 1195 (1974).
- (25) J. Heslop-Harrison: *Grana Palynologica*, **4**, 7 (1963).
- (26) B. Gullvåg: *ibid.*, **5**, 253 (1964).
- (27) J. R. Rowley and G. Erdtman: *ibid.*, **7**, 517 (1967).
- (28) H. G. Dickinson: *Grana*, **11**, 117 (1971).
- (29) 岩波洋造: 花粉誌, **15**, 3 (1975).
- (30) 中村澄夫: 同上, **16**, 11 (1975).
- (31) 名和義彦, 旭 正: 蛋白質 核酸 酵素, 別冊, 生体膜実験法, 上, 共立, 1974, p. 304.
- (32) D. B. Dickinson and M. D. Davies: "Pollen Development and Physiology," ed. by J. Heslop-Harrison, Butterworths, London, 1971, p. 190.
- (33) K. Okunuki: *Acta Phytochim.*, **11**, 27 (1939).
- (34) *idem*: *ibid.*, **11**, 65 (1939).
- (35) R. Lundén: *Grana Palynologica*, **1**, 3 (1956).
- (36) Y. Tsukamoto and S. Matsubara: *Plant Cell Physiol.*, **9**, 227 (1968).
- (37) K. Okunuki: *Acta Phytochim.*, **11**, 249 (1940).
- (38) P. M. Pyl'nev and P. Diakonov: *Dokl. Mosk. Sel'skokhoz. Akad.*, **1961**, 163 [*C. A.*, **58**, 7133 d (1963)].
- (39) K. Schloesser: *Z. Botan.*, **49**, 266 (1961) [*C. A.*, **57**, 14188 c (1962)].
- (40) N. P. Chuvashina and V. K. Mel'nikov: *Fiziol. Rast.*, **11**, 330 (1964) [*C. A.*, **62**, 3071 c (1965)].
- (41) D. B. Dickinson: *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **88**, 651 (1966).
- (42) S. Ejiri, M. Nunomiya and T. Katsumata: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1227 (1976).