水稻葉身の老化に伴う葉緑体の微細構造変化

長 南 信 雄・川原治之助・松 田 智 明

(茨城大学農学部)

昭和 52 年 1 月 17 日受理

水稻葉緑体の微細構造は、葉身が下位葉の葉鞘から抽出して完全に展開する過程で急速に発達する⁴⁾。そして完全展開直後の葉身は最高の光合成能力を持っているが、その後、老化するに従ってその能力は低下する。このような葉の光合成能力の経時的变化には、葉緑体の微細構造変化が密接に関係しているものと考えられる。

葉の老化過程は、葉緑体の微細構造変化によって明瞭にとらえられるので、インゲンマメ²⁾、キュウリ³⁾、芽キャベツ⁵⁾、カバ属 (*Betula verrucosa* Ehrb)⁶⁾、オオカナダモ⁸⁾、コムギ¹¹⁾、イチョウ¹⁶⁾など多くの植物で観察されている。しかし、水稻葉の老化過程に関しては、葉身展開後の無機成分と炭水化物の含量^{7,12,13,14)}および葉緑素含量¹⁷⁾などが調べられているが、葉緑体の微細構造変化については観察されていない。そこで本研究は育苗末期と登熟期の水稻について、葉身展開後における葉緑体の微細構造変化を電子顕微鏡によって観察したものである。

材 料 と 方 法

電顕観察に供した材料は、1975 年に畑苗代で育苗し水田に移植後、普通に栽培された水稻品種コシヒカリの葉身である。葉身展開後における葉緑体の微細構造変化を経時的にとらえるため、水田で栽培された水稻の止葉を完全展開時 (7 月 25 日) および展開後 10 日おきに採取した。また、水田で栽培された水稻の出穂後 10 日目 (8 月 15 日) および移植期苗では展開葉を葉位別に採取した。なお、水田では穂揃期にあたる 8 月 8 日には 10 a 当たり窒素 2 kg の追肥が行なわれた。

各葉身の中央部附近を約 1 mm の長さに切り、グルタルアルデヒド (pH 7.0, 0.05 M 燐酸緩衝液で 4 % に希釈) で 1 時間低温固定したのち水洗し、さらにオスミック酸 (1.5%) で 1 時間固定した。脱水後スパー樹脂に包埋し、葉の表面と平行な超薄切片としたのち、ウラニウムと鉛によって染色して電顕観察を

行なった。なお、葉緑体とでんぷん粒の大きさ、グラナ数およびシラコイド数などは、葉緑体中心部附近の断面を 2 万倍に拡大した電顕写真によって測定したが、この測定に用いられた葉緑体数は各葉身について約 20 個である。

観 察 結 果

1. 止葉展開後における葉緑体の微細構造変化

(1) 葉緑体の大きさとグラナ数の変化

水田で栽培された水稻の止葉が展開した後のでんぷん粒と葉緑体の断面積の変化は第 1 図に示されている。でんぷん粒を含めた葉緑体断面積は、葉身展開後 30 日目頃まで増加する。でんぷん粒の断面積は葉身の完全展開時に最も大きく、葉緑体断面積の約 3 分の 1 を占めているが (第 5 図)、展開後の時間の経過とともに次第に小さくなり、葉緑体の大きさが最高に達する頃までには殆んど消失している (第 7 図)。

葉身展開後の葉緑体の肥大はグラナとストロマの増加によるものとみられる。そこで、グラナ数を測定しその結果を第 2 図に示した。この図には葉緑体 1 断面当たりのグラナ数 (これを単にグラナ数と呼ぶことにする) と、でんぷん粒を除いた葉緑体の単位断面積当たりのグラナ数 (これをグラナ密度と呼ぶことにする) を示してある。グラナ数の変化は葉緑体断面積と類似の傾向を示し、葉身展開後 30 日目頃までは増加するが、その後、急速に減少する。葉身が抽出展開する過程でグラナ数は急速に増加するが、完全展開後においても暫くの間はグラナ形成の続くことが明らかとなった。しかし、グラナ密度は展開後の日数の経過とともに次第に低下する。

(2) グラナ構造の変化

グラナを構成するシラコイド数は 4~30 の範囲にあり、グラナによって大きな差があるが、多数のグラナについて平均すると 10 前後の値となる。グラナ当たりのシラコイド数は第 3 図に示されている。シラコイド数は葉身の抽出展開する過程で増加するが、この増加は完全展開後 10 日目頃まで続き、その後次第に減少して追肥によって再び増加することはない。完全展

日本作物学会第 160 回および第 163 回講演会において発表した。

Fig. 1. Changes in sectional areas of chloroplasts (●) and starch grains (○). The arrow indicates the heading time.

Fig. 2. Changes in numbers of grana per chloroplast section (●) and per unit area (μm^2) of chloroplast section (○). The arrow indicates the heading time.

開後 20 日目になると、一部の葉緑体ではシラコイド膜の分離が起り、グラナシラコイドの配列が乱れてくる (第 6 図)。完全展開後 30 日目には、このグラナ構造の変化は葉緑体全体に拡がり、シラコイド膜の分離がさらに顕著となって、すでに膜の消失しつつあるものもみられる (第 7 図)。しかしこのような構造破壊は展開後 30 日まではごく一部の葉緑体でしか認められず、他の大部分の葉緑体では引き続きグラナ形成が行なわれている。

展開後 30 日を過ぎるとグラナ構造の破壊が全部の葉緑体に拡がり、グラナ数が減少して葉身の色も緑色から黄緑色になる。展開後 50 日目になっても葉身は黄緑色を保っているが、この時期になると葉緑体の一部にはグラナ構造が完全に破壊され、シラコイドが著しくふくれて小胞 (Ve) を形成するものもみられる (第 8 図、右)。しかし隣接する細胞には内膜系の余り破壊されていない葉緑体が存在する (第 8 図、左)。

Fig. 3. Change in number of thylakoids per granum. The arrow indicates the heading time.

Fig. 4. Changes of plastoglobuli in diameter (A) and in number per chloroplast section (B). The arrow indicates the heading time.

(3) 好オスミウム性顆粒 (plastoglobule) の増加

葉身展開後における葉緑体構造のもうひとつの変化は、キノン化合物やカロチノイド色素などを含有するといわれている⁹⁾ 好オスミウム性顆粒の増加である。この顆粒は展開前にはみられないが、展開後間もなくストロマ内につくられ、その数と大きさを増す (第 5 ~ 8 図)。顆粒の中心部からはずれて切られた電顕像は輪郭が不明瞭であるが、顆粒の中心部附近で切られた場合には輪郭が明瞭である。そこで輪郭の明瞭な顆粒のみについて直径を測定した結果が第 4-A 図に示されている。これによれば、直径の増加速度は止葉展開直後が最も大きく、時間の経過に伴って次第にその速度が衰え、展開後 40 日頃にはほぼ一定の値 (0.4

Figs. 5-7. Chloroplasts from the flag leaves. $\times 30000$. Fig. 5. A chloroplast immediately after leaf expansion. Large starch grains are observed in the chloroplast. Fig. 6. A chloroplast at 20 days after leaf expansion. The thylakoid membranes begin to separate. Fig. 7. A chloroplast at 30 days after leaf expansion. The thylakoid membranes partially disappear and the plastoglobuli increase in number. LG; lipid globule, M; mitochondria, Mb; microbody, PG; plastoglobule, S; starch grain.

Fig. 8. Chloroplasts from the flag leaf, 50 days after leaf expansion. $\times 30000$. The vesicles are formed by swelling of thylakoids. Figs. 9 and 10. Chloroplasts from yellow area of the fifth leaf counted downwards from the flag leaf. $\times 34000$. Fig. 9. A chloroplast showing the decrease in number of grana and in density of stroma. Tonoplast partially disappeared (arrow). Fig. 10. Chloroplast envelope disappeared but the mitochondria are still present. T; tonoplast, Ve; vesicle, M; mitochondria.

Table 1. Size and composition of chloroplasts in the upper five leaves counted downwards from the flag leaf.

Chloroplast size and composition	Leaf position on the stem				
	1	2	3	4	5
Sectional area (μm^2) of chloroplasts (A)	4.0	3.4	3.4	2.8	1.8
Sectional area (μm^2) of starch grains (B)	0.2	0.2	0.3	0	0
A-B (μm^2)	3.8	3.2	3.1	2.8	1.8
Number of grana (C)*	11.5	12.1	10.8	8.2	0
Density of grana (C/A-B)	3.0	3.8	3.5	2.9	0
Number of thylakoids per granum	10.6	10.0	10.8	9.9	0
Diameter (μm) of plastoglobuli	0.35	0.34	0.36	0.42	0.38
Number of plastoglobuli*	2.5	3.2	3.2	6.0	6.0

Note *Number per chloroplast section.

μm)に達する。しかし葉緑体1断面当たりの顆粒数は、展開後40日を過ぎても増加する(第4-B図)。

2. 葉位別にみた葉緑体の微細構造

(1) 登熟期

水田栽培の水稻について出穂後10日目に上位5葉^{注)}の葉緑体の大きさと構造を調査した結果は第1表に示されている。この時期の葉色は第1～3葉では葉身全体が緑色であるが、第4葉では先端部の約10%が枯死しているほかは黄緑色である。さらに第5葉では先端から約3分の2が枯死し、これより基部は黄化しているが、ここでは黄化部について観察した。葉緑体断面積は、下位葉になるに従って小さくなるが、とくに第4葉から第5葉にかけて著しく小さくなる。でんぷん粒は第1～3葉にわずかに存在するが、第4、5葉には全く存在しない。グラナ数とグラナ密度は第2葉で最も高い値を示すが、これらの値が明らかに減少する第4葉ではシラコイド膜の分離が顕著となる。しかし、グラナ当たりのシラコイド数については上位4葉間では差が小さい。さらに第5葉の黄化部ではグラナ構造が殆んど破壊され、マトロマもきわめて少くなっている(第9図)。好オスミウム性顆粒の直径と数は下位葉ほど増加する傾向がみられ、とくに第4、5葉ではその増加が著しい。

このように登熟最盛期にあたる出穂後10日目頃の葉緑体の構造は、第1～3葉間では大きな差異はみられない。しかし、第4葉以下ではグラナ数の減少とともに葉緑体も収縮することから、マトロマも減少しているものとみられる。上位3葉の出葉間隔を8～9日として計算すると、第3葉は完全展開後すでに36～38日を経過したことになるが、この時期においてもなお葉緑体構造の顕著な破壊はみられない。この結果

注) 止葉を第1葉とし、これより下へ第2、3、4、5葉とする。

と止葉における葉緑体構造の経時的变化から判断すると、止葉を含む上位3葉の葉緑体は展開してから30～40日後に著しい構造破壊が始まるものとみられる。

第5葉の黄化部ではグラナが殆んど消失しているがこの段階になるとトノブラスト(T)の電子密度が著しく高まり、部分的に破壊しているのが観察される(第9図、矢印)。黄化がさらに進んでグラナが完全に消失すると、葉緑体の限界膜も消失し、わずかなストロマと多量の好オスミウム性顆粒を残して葉緑体は崩壊する(第10図)。なお、この段階でもミトコンドリア(M)は完全には破壊されずに残っている(第10図)。

(2) 移植期

移植期の畑苗について葉位別に観察した結果では、最上位完全展開葉の葉緑体には多量のでんぷん粒が蓄積されているが、その1枚下の葉身ではでんぷん粒が激減し、グラナとストロマが増加して葉緑体が肥大する。最上位完全展開葉の2枚下の葉身になると、グラナの一部にはすでにシラコイド膜の分離がみられるがグラナ構造の完全な破壊にまでは至らない。しかし、3枚下の黄緑化した葉身になると、葉緑体全体にわたってグラナ構造の破壊しているものがみられ、好オスミウム性顆粒も増加する。このように葉身展開後における葉緑体構造の変化の様相は、生育初期の下位葉と生育後期の上位葉では同じであるが、その変化速度は下位葉の方が速く、完全展開後20日目頃から葉緑体構造の著しい破壊が始まるものとみられる。

考 察

葉身が抽出展開する過程で葉緑体の構造は急速に発達して光合成も盛んになるが、葉身が完全に展開するまでは葉鞘基部の維管束が成熟せず、炭水化物の葉から稈への転流が行なわれないため、展開直後の葉緑体

には多量のでんぷん粒が蓄積するものと考えられる。しかし、葉身の完全展開後は維管束の通導機能も盛んになるため、でんぷん粒は次第に減少するものとみられる。

葉緑体の構造的充実は葉身展開後においても暫くの間は継続するが、一方では一部の葉緑体から構造破壊が始まって次第にその範囲を広げ、遂にはすべての葉緑体において構造破壊が進行するようになる。葉身の同一部位内において葉緑体の形成と破壊が同時に進行する過程を老化の第1過程とするならば、老化の第2過程はすべての葉緑体において構造破壊が進行する過程ということができよう。老化の第1過程における葉緑体の構造破壊は主としてシラコイド膜の分離にとどまり、内膜系の消失にまでは至らない。しかし、老化の第2過程では内膜系の消失が著しくなるためグラナ数が急速に減少する。

本観察に用いられた水田栽培の水稲は穂揃期の追肥によって止葉展開後の葉緑体形成が促進されたものと考えられる。この追肥がない場合には老化の第1過程から第2過程への移行が早まるものとみられるが、その場合においても葉緑体の大きさとグラナ数が最高に達する時期は出穂後に来るものと推定される。止葉展開後の窒素含量^{7,12)}と葉緑素含量¹⁷⁾を測定した結果によると、いずれも出穂後に最高に達し、その後、次第に減少する。したがって葉身展開後における葉緑体構造の変化は、これら葉内成分の変化とよく類似しているものとみられる。生育後期の上位葉では老化の第1過程が1カ月以上も継続して老化の進行が緩慢であるが、生育初期の下位葉では第1過程の期間が短く、第2過程の進行も速い。このため下位葉は上位葉よりも生存期間が短い¹⁴⁾。

光合成能力を葉位別に測定した結果¹⁰⁾によると、完全展開直後の葉身では光合成能力が最も高いが、その次の下位葉もほぼ同じ程度の能力を持っている。また止葉展開後においては、止葉が最高の能力を示し、下位葉ほど能力が低下する。そして止葉から数えて4枚目の下位葉では止葉の約半分の能力しか持っていない。このような葉位別の光合成能力の差異には、暗反応因子としてのたんぱく態窒素含量が関係していると考えられている。

光合成反応と葉緑体の微細構造に関する研究によれば、明反応はシラコイドで行なわれ、暗反応は主としてストロマの酵素によって行なわれる⁹⁾。したがって、シラコイド膜の分離からその消失に至る一連の内膜系の構造破壊が進むに従って明反応は低下するも

のと考えられる。また、葉身の老化にともなってストロマのリボソームなどにも変化が起っているものと推定されるが、本研究ではその変化をとらえることができなかった。しかし、老化の第2過程におけるストロマの減少とこれにともなう葉緑体の収縮は、暗反応低下のひとつの表われであろう。

なお、葉身の老化にともなって細胞質内のリビッド顆粒(第5図)と液胞内顆粒の増加が認められた。また、細胞間隙に接している細胞壁の表面には未同定の物質が付着し、これが葉身展開後の日数の経過とともに増加するのを観察した(第5～8図)。これらの点については今後さらに詳細に観察する予定である。

摘 要

水田で栽培された水稲の止葉を完全展開後 10 日おきに採取して葉緑体の微細構造を電顕によって観察した。完全展開時の葉身には多量のでんぷん粒が蓄積されているが、これは次第に減少して展開後 30 日目には殆んど消失する。グラナ当たりのシラコイド数は葉身展開後も増加して 10 日目には最高に達する。展開後 20 日目には一部の葉緑体で構造破壊の最初の徴候とみられるシラコイド膜の分離が認められた。葉緑体の大きさとグラナ数の増加は展開後 30 日頃まで続くが、それ以後は内膜系の消失とストロマの減少が顕著となり、葉身が黄緑色に変化する。展開後の日数が経過するに従って好オスミウムの性顆粒の直径と数が増加する。

出穂後 10 日目に上位 5 葉を採取して葉緑体の微細構造を葉位別に比較した。上位 3 葉の葉緑体では構造破壊が殆んどみられず、葉位間の構造的差異も小さい。しかし、止葉から数えて4枚目の黄緑化した葉身ではでんぷん粒が完全に消失し、グラナ数も減少して、好オスミウム性顆粒が著しく増加する。さらに止葉から数えて5枚目の黄化部では、グラナとストロマが消失して葉緑体が収縮する。そして最後に葉緑体は限界膜を失って崩壊する。

葉緑体の破壊過程は移植期苗の葉身においても同じであるが、その破壊速度は登熟期の上位葉よりも速い。

引 用 文 献

1. 嵐 嘉一・江口 広 1954. 水稲の葉の發育経過に関する研究, 1. 葉身並びに葉鞘の發育経過. 日作紀 23: 21—25.
2. BARTON, R. 1966. Fine structure of mesophyll

- cells in senescing leaves of *Phaseolus*. *Planta* **71**: 314—325.
3. BUTLER, R. D. 1967. The fine structure of senescing cotyledons of cucumber. *J. Exp. Bot.* **18**: 535—543.
4. 長南信雄・川原治之助・松田智明 1977. 水稻の葉肉細胞における形成過程の電子顕微鏡観察. *日作紀* **46**: 147—156
5. DENNIS, D. T., M. STUBBS and T. P. CAULTATE 1966. The inhibition of Brussels sprout leaf senescence by kinins. *Can. J. Bot.* **45**: 1019—1024.
6. DODGE, J. D. 1970. Changes in chloroplast fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. *Ann. Bot.* **34**: 817—824.
7. 長谷川儀一・大庭高明・西川欣一 1959. 葉分析の研究. IX. 水稻の主稈葉, 節間部及び穂部の生育に伴う無機要素の含量並びにその集積及び移行(その1). *日作紀* **28**: 169—174.
8. IKEDA, T. and R. UEDA 1964. Light- and electron-microscope studies on the senescence of chloroplasts in *Elodea* leaf cells. *Bot. Mag. Tokyo* **77**: 336—341.
9. 村上 悟 1973. 葉緑体. 小川和朗他編, 細胞学大系. 朝倉書店 東京 **3**: 194—293.
10. 村田吉男 1961. 水稻の光合成とその栽培的意義に関する研究. 農技研報告 **D9**: 1—169.
11. SHAW, M. and M. S. MANOCHA 1965. Fine structure in detached, senescing wheat leaves. *Can. J. Bot.* **43**: 747—762.
12. 田中 明 1956. 葉位別に見た水稻葉の生理機能の特性及びその意義に関する研究. 第3報 各葉位の葉の窒素代謝と生理機能との関係. *土肥誌* **26**: 413—418.
13. ——— 1956. ——— 第4報 各葉位の葉の磷酸及び加里代謝と生理機能との関係. *土肥誌* **27**: 223—228.
14. ——— 1958. ——— 第10報 各葉位の葉における炭水化物の蓄積, 消失状態. *土肥誌* **29**: 291—294.
15. ——— 1958. ——— 第11報 各葉位の同化作用力及び同化産物の移動. *土肥誌* **29**: 327—333.
16. TōYAMA, S. and R. UEDA 1965. Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids. II. Changes in fine structure and pigment composition of the plastids in autumn leaves of *Ginkgo biloba* L. *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku* **12**: 31—37.
17. 延 圭復・太田保夫 1973. 水稻葉の葉位別葉緑素含量と切断葉片の葉緑素保持力の生育に伴う消長. *日作紀* **42**: 6—12.

Changes in Chloroplast Ultrastructure during the Senescence of Leaves in Rice Plants

Nobuo CHONAN, Harunosuke KAWAHARA and Toshiaki MATSUDA

(Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki, 300-03)

Summary

The flag leaves were sampled from rice plants of the paddy field at intervals of 10 days after the full expansion, and ultrastructure of the chloroplasts was observed by electron microscope.

When the leaves had just fully expanded, the large starch grains accumulated in the chloroplasts, but afterwards the starch grains gradually decreased and after 30 days they almost disappeared (Figs. 1, 5, 6 and 7). The number of thylakoids per granum continued to increase for 10 days after leaf expansion (Fig. 3). The separation of thylakoid membranes, which is the first sign of destruction, was observed in some chloroplasts at 20 days after leaf expansion (Fig. 6). The size of chloroplasts and the number of grana continued to increase for 30 days after leaf expansion (Figs. 1 and 2), but they were followed by the breakdown of inner membrane system and by the decrease in amount of stroma (Figs. 7 and 8). As the inner membranes breakdown, the leaf colour changed to yellow-green and the plastoglobuli increased in size and number (Fig. 4).

At the ripening stage of rice plants, ultrastructure was compared among chloroplasts in the upper five leaves (Table 1). Structural differences were not so marked among chloroplasts in the upper three leaves. However, the chloroplasts in the fourth leaf counted downwards from the flag leaf, showed a disappearance of the starch grains, a decrease in number of the grana, and a spectacular accumulation of the plastoglobuli. In the yellow area of the fifth leaf, the chloroplasts shrank because of the disappearance of grana and stroma (Fig. 9), and finally the chloroplasts envelope disappeared (Fig. 10).

The similar pattern of destruction as mentioned above was observed in the chloroplasts from seedling leaves, but the destruction was more rapid than those at the ripening stage.