イネ実生の葉の発達に伴うシュウ酸カルシウム結晶の動態

新 発 田 修 治*・佐 藤 庚

(東北大学農学部)

昭和 56 年 12 月 24 日受理

シュウ酸あるいはシュウ酸カルシウムは植物体に広く見いだされるが、その生理的意義は研究者により意見が異なる。GROOM¹⁰⁾ はシュウ酸は植物に有害であり、カルシウム塩となって代謝系から除かれると考え、BEEVERS, et al.²⁾, CROMBIE⁶⁾ も植物はシュウ酸あるいはシュウ酸塩を再代謝できないとの考えから、これらは代謝の最終産物であるという消極的な見解を示している。しかし、植物体内で安定であるとされている⁸⁾ シュウ酸カルシウムの結晶が、生育が進むにつれて消失するという観察も多く、このことから結晶をシュウ酸あるいはカルシウムの一時的な貯蔵形態と考える研究者も多い^{1,3,7,15,19)}。CALMÉS, et al.⁴⁾ はアメリカザタで、太田¹⁷⁾ は *Lemna* で、実際にシュウ酸が代謝されることを報告している。一方 OLSEN¹⁶⁾, RASMUSSEN, et al.¹⁸⁾ は、培地のカルシウム・カリウム濃度を高めると植物体内のシュウ酸生成量も多くなることから、シュウ酸は過剰な陽イオンを除いて、植物体のイオンバランスを保つ積極的な役割をもつと考えている。

前報²⁰⁾で著者らは、イネの葉には多量のシュウ酸カルシウムの結晶が含まれることを報告したが、植物の生育に伴う結晶の動態を明らかにすることは、その生理的意義を知るうえで重要であるので、本報では幼植物の葉の発達と結晶の動態との関係を示し、あわせて結晶の生理的意義について若干の論考を試みた。

材料および方法

粘土に富む川砂を入れた長さ 15 cm×幅 5 cm×高さ 10 cm の小型ポットに水稻品種ササニシキを播種し、昼/夜温 30°C/27°C の自然光ファイトロン内で生育させた。肥料は 10 l の水に (NH₄)₂ SO₄ 1,900 g, Na₂HPO₄ 200 g, KCl 240 g を溶解した液肥を、播種前にポット当たり 2 cc ずつ 50 cc の水でうすめて与えた。出芽期から 5 葉期まで 3 日ないし 5 日の間隔で、3 ポットから 2 個体ずつ計 6 個体を採取し、FAA 液で固定した。第 1 葉を除く各葉の葉身と葉鞘をそれぞれ先端部(先端から約 1 cm のところ、ただし第 2

葉は 0.5 cm)、中央部、基部(カラーあるいは葉枕から約 1 cm 上のところ、ただし第 2 葉は 0.5 cm)にわけ、星川¹²⁾の方法により 10 μm の横断あるいは縦切片とした後、光学顕微鏡と偏光顕微鏡で観察した。葉肉細胞と結晶の大きさの測定は、中央脈から数えて 2~3 番目の維管束の周辺とその間で行なった。大小を問わず視野中の細胞のほとんどを測定した。結晶は円柱状に集積することが多いので、横断切片で測定した長さから円柱として体積を算出した。細胞は横断切片の切り口が楕円となる楕円柱とみなして、細胞の長さ(a)、幅(b)、平均の厚さ(c)から体積($\pi abc/4$)を求めた。細胞当たりの結晶数は、全結晶数を細胞数で割って算出した。結晶の測定はすべて 1,000 倍で行った。

またキシレンでパラフィンを除いた切片を前報²⁰⁾の方法で調製して、走査型電子顕微鏡による観察も行った。

観 察 結 果

1. 鞘葉の結晶

第 2 葉が抽出するころの、鞘葉中央部の柔細胞に数本の角柱状結晶がみられた(図 1)。これらは前報²⁰⁾にならって組織化学的にシュウ酸カルシウムと同定された。結晶は葉肉細胞におけるように束状になることはなく、種々の方向に重なり合う状態で沈積していた(図 3)。結晶が互いに融合して、晶洞(druse)とみなされる場合も多かった(図 2)。このような形態は、栽培稻の他の部分には認められなかった。生育が進むにつれて結晶を沈積する細胞も多くなり、細胞内の結晶の数も増して、葉身の葉肉細胞の結晶より大きくなる場合もあった。しかし細胞体積に占める結晶の体積比率は低く、中央部で 0.4% であった。

2. 葉身の発達と結晶の沈積

各葉位とも同様の傾向を示したので、第 3 葉の結果を中心に述べる。

葉身内の組織分化は、KAUFMAN¹³⁾ その他が示しているように中肋部分の通気腔、維管束、ついで葉緑細胞の順に進み、抽出前に各組織の構造は完成した。

* 現在は帯広畜産大学

Fig. 9. Changes with time of characteristics of the bundle of crystals at upper, middle and basal part of the leaf in the developing 3rd leaf blade.

a: Percentage of leaf blade length emerged from the previous leaf sheath to its full length (LEP%). b: Length (—) and width (---) of the bundle of crystals (μm). c: Volume of the bundle of crystals (μm^3). d: Volume % of the bundle of crystals to the cell which contained it. e: Number of the bundle of crystals per cell. —○—: Upper part, 1 cm from tip. —□—: Middle part. —△—: Basal part, 1 cm above auricle.

葉身発達初期の、核と細胞質に富んだ若い細胞には結晶は全くみられず、液胞化が進む過程でも結晶は認められなかった。葉身抽出直前になって、維管束鞘細胞にはじめて小さな角柱状の結晶が形成されたが、葉緑細胞には全く認められなかった。葉身が抽出しはじめると葉緑細胞にも結晶が沈積しはじめるが、数は少なく、結晶も極めて小さい(図5)。しかし展開終了ころ(抽出開始から3日目)には、ほとんどの葉緑細胞に結晶がみられるようになった(図9e)。

葉緑細胞では一水塩の針状結晶が集合して、結晶束(bundle of crystals)を形成した(図5, 7)。結晶の

Fig. 10. Changes with time of size of crystals at the middle part of the developing 3rd leaf sheath.

a: Length (—□—), width (—■—) and volume (---□---) of the bundle of crystals. b: Volume % of the bundle of crystals and prismatic crystals to the cell which contained it. —□—: Chlorenchyma cell. —■—: Parenchyma cells.

ほとんどは、結晶束として成長した。結晶束は、葉身の先端部、中央部、基部いずれの部位でも葉身展開終了ころにかけて、その長さ、幅、体積を増加して急激に生長した。先端部ではそれ以後ほとんど長さは変化しなかったが、幅はゆるやかには増加し、その結果、体積もゆるやかに増加した。中央部、基部では長さ、幅、体積がゆるやかに増加した。抽出開始から15日目の結晶束の長さは中央部、基部、先端部の順に、また幅と体積は先端部、中央部、基部の順に大きかった。したがって先端部には短く太い結晶束(図4)が、中

Fig. 1. Cross sections under normal light (A) and crossed nicoles (B) of the middle part of coleoptile when the 2nd leaf emerged, $\times 45$. **Figs. 2-3.** Scanning electron micrographs (SEM-graph) of Ca oxalate crystals in the coleoptile. **Fig. 2.** The druse-like crystals, $\times 3300$. **Fig. 3.** Prismatic crystals, $\times 5000$. **Figs. 4-8.** Ca oxalate crystals in the 3rd leaf. **Fig. 4.** Cross section under half polarization of the upper part of the leaf blade at 7th day after emergence, $\times 230$. **Fig. 5.** SEM-graph of crystals in the mesophyll cell when the leaf began to emerge, $\times 4,500$. **Fig. 6.** Cross section under crossed nicoles of the middle part of the leaf blade at 7th day after emergence, $\times 230$. **Fig. 7.** SEM-graph of the upper part of the leaf blade at 12th day after emergence, $\times 4100$. **Fig. 8.** Cross section under normal light (A) and crossed nicoles (B) of the middle part of the leaf sheath at 3rd day after emergence, $\times 358$.

Key to abbreviation

• **C**; Ca oxalate crystals. **CH**; chloroplast. **CW**; cell wall. **VB**; vascular bundle.

Table 1. Correlation coefficients between length and volume of mesophyll cell and crystal in the third leaf blade of rice seedlings.

Days after leaf emergence	Parts of ¹⁾ leaf blade	Length	Volume
3	upper	0.156	0.316
	middle	0.451**	0.356**
	basal	0.351	0.167
7	upper	0.462*	0.374**
	middle	0.626**	0.482**
	basal	0.211	0.050
12	upper	0.466**	0.353**
	middle	0.516**	0.382**
	basal	0.418**	0.314**
15	upper	0.463*	0.354*
	middle	0.655**	0.432**
	basal	0.516**	0.237

1) Parts are the same as in fig. 9. Asterisks, * and **, show the significance at 5 % and 1 % level, respectively.

央部、基部には長く細い結晶束（図6）が沈積していた。細胞体積に占める結晶束の体積比率は先端部から順に、3.8%、1.4%、0.6%であったが、先端部では11.0%、中央部では4.0%に達する場合もあった（図9）。

結晶束の長さや細胞の長さおよび結晶束の体積と細胞の体積との間には有意な正の相関が得られることが多かった。すなわち細胞体積の増大にともなう結晶束も大きく生長していることが認められた（表1）。

前報と同様に維管束に近接する葉緑細胞には、八面体の二水塩の結晶が認められたが、一水塩の針状結晶も共存する場合が多かった。

3. 葉鞘の発達と結晶の沈積

葉鞘内の組織分化の順序は、葉身と同様であった。結晶も、維管束鞘細胞および柔細胞に角柱状結晶が沈積し（図8）、ついで葉緑細胞に結晶束が沈積した。

葉身と同様に葉鞘の葉緑細胞の結晶束も、葉鞘のageが進むにつれて大きくなり、細胞体積に占める結晶束の体積比率も高まった。しかし葉身に比べ、結晶束の大きさも小さく、体積比率も低かった（図10）。柔細胞内の結晶はさらに小さく、体積比率は0.1%にすぎなかった。

考 察

高等植物のシュウ酸の合成経路としては、(1) 解糖

系 TCA 回路で生産されるオキサロ酢酸などの中間物質から直接合成、(2) イソクエン酸からグリオキシル酸を経て合成、(3) 光合成の暗反応で生産されるグリコール酸から合成の3通りが考えられている¹¹⁾。

HODGKINSON¹¹⁾は高等植物の場合には、ほとんど第3の経路で合成され则认为している。水稻でも光合成の場である葉緑細胞に、多量のシュウ酸カルシウムの結晶が沈積する（前報²⁰⁾および本報）事実、この考えと矛盾しない。

長南ら⁵⁾によると葉身の抽出展開にかけて葉緑体は著しく肥大し、その構造が充実し、細胞内にミクロボディが形成される。このミクロボディはパーオキシゾームとグリオキシゾームの二種からなるとされる²¹⁾。パーオキシゾームは葉緑体で生産されるグリコール酸をグリオキシル酸に酸化して、いわゆる光呼吸に関与する²¹⁾が、同時にここではグリオキシル酸からシュウ酸が合成される²¹⁾。一方、シュウ酸カルシウムは、抽出以前の葉身の葉緑細胞には全く認められないが、抽出展開とともに葉緑体の発達に呼応して沈積すること、細胞の大きさの増大にともなう結晶束が大きくなることがわかった。一方、葉身の光合成能は展開直後最大に達し、以後減少する¹⁴⁾。結晶束は、抽出開始から展開終了（抽出開始から3日目）にかけて、長さ、幅、体積を増して急激に生長するが、展開終了後あるいは抽出開始から7日目以降では、増加率が低下した。これらの事実は、光合成とシュウ酸カルシウムの沈積との間に相互関係があることを示唆する。

しかし、本報で明らかなように、葉緑体を含まない鞘葉にも結晶が沈積し、また数が少ないうえにでんぷん貯蔵能の高い葉緑体を含む維管束鞘や、その他の柔細胞も葉身の展開前から葉緑細胞に先立って結晶を沈積した。これらの結晶は光合成と直接関係のないシュウ酸合成系によって沈積したと思われるが、細胞体積に占める結晶の体積比率は鞘葉で、0.4%、葉鞘柔細胞で0.1%以下にすぎず、葉緑細胞の0.6~3.8%に比べて低いので、シュウ酸合成能も低いと思われる。

一般にシュウ酸カルシウム植物体内で安定であるとされる⁸⁾が、一度形成された結晶が消失するという報告も多い^{1, 3, 7, 15, 19)}。しかし本実験では葉緑細胞が老化しても結晶が変形あるいは消失することはなかった。したがって結晶が、シュウ酸あるいはカルシウムの一時的な貯蔵形態であると断定することは難しい。

イネの葉には、含水量の異なる二種のシュウ酸カルシウムが存在する²⁰⁾。GARDNER⁹⁾は *in vitro* の実験から、二水塩の生成する条件として、シュウ酸に対し

て過剰のカルシウムの供給が必要であることを示唆し、HODGKINSON¹¹⁾によれば PEDERSON は、さらにマグネシウムイオンの共存が必要であると述べている。カルシウムやマグネシウムが比較的濃く存在すると推測される維管束鞘細胞や維管束に近接する葉緑細胞あるいは葉枕の維管束周辺細胞に二水塩の存在する事実、このことを裏付けるようにも考えられる。いずれにしてもシュウ酸カルシウムの生理的意義については不明な点が多く、今後の研究が望まれる。

引用文献

1. ARNOTT, H.J. and F.G.E. PAUTARD 1970. Calcification in plants. In Biological Calcification; Cellular and Molecular Aspect (Ed.) H. Schraer, North-Holland, Amsterdam. 375—446.
2. BEEVERS, H., M.C. STILLER and V.S. BUTT 1966. Metabolism of the organic acids. In Plant Physiology, vol. IVB (Ed.) F.C. Steward, Academic Press, New York and London. 119—262.
3. CALMÉS, J. and J. CARLES 1970. La répartition et l'évolution des cristaux de calcium dans les tissus de vigne vierge au cours d'un cycle de végétation. Bull. Soc. Bot. France **117**: 189—198.
4. ——— and M. PIQEMAL 1977. Variation saisonnière des cristaux d'oxalate de calcium des tissus de vigne. Can. J. Bot. **55**: 2075—2078.
5. 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.
6. CROMBIE, W.M.L. 1960. Metabolism of "ex-tacyclic" organic acids. In Encyclopaedia of Plant Physiology, vol. 12, part 2 (Ed.) W. Ruhland, Springer, Berlin. 897—902.
7. CZAPEK, K. 1921. Biochemie der Pflanzen. Band III. Gustav Fischer, Jena. 16—79.
8. GALLAHER, R.N. 1975. The occurrence of calcium in plant tissue as crystals of calcium oxalate. Commun. Soil. Sci. Plant Anal. **6**: 315—330.
9. GARDNER, G.L. 1976. Kinetics of the dehydration of calcium oxalate trihydrate crystals in aqueous solution. J. Coll. Interface Sci. **54**: 298—310.
10. GROOM, P. 1896. Preliminary note on the relation between calcium and the conduction of carbohydrates in plants. Ann. Bot. **10**: 91—96.
11. HODGKINSON, A. 1977. Oxalic Acid in Biology and Medicine. Academic Press London, New York, San Francisco. 143—153.
12. 星川清親 1960 受精調査法, クリスタル莖による簡便プレパラート作製法. 戸荻義次他編, 続作物試験法. 農業技術協会, 東京. 139—140.
13. KAUFMAN, P.B. 1959. Development of the shoot of *Oryza sativa* L. II. Leaf histogenesis. Phytomorphology **9**: 277—311.
14. 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 **D9**: 1—169.
15. NIETHAMMER, A. 1931. Mikroskopie und mikrochemie einiger kalkoxalatausscheidungen in der pflanzenzelle. Planta **12**: 53—59.
16. OLSEN, C. 1939. Absorption of calcium and formation of oxalic acid in higher green plants. C.R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim. **23**: 101—124.
17. 太田安定・橘 泰憲 1978. 培地への蓚酸添加による Lemna の増殖と蓚酸の代謝的利用. 土肥誌 **49**: 16—20.
18. RASMUSSEN, G.K. and P.F. SMITH 1961. Effects of calcium, potassium and magnesium on oxalic, malic and citric acid content of Valencia orange leaf tissue. Plant Physiol. **36**: 99—101.
19. SCOTT, F.M. 1941. Distribution of calcium oxalate crystals in *Ricinus communis* in relation to tissue differentiation and presence of other ergastic substances. Bot. Gaz. **103**: 225—246.
20. SHIBATA, S., K. SATO and K. HOSHIKAWA 1981. On the calcium oxalate crystals in rice leaves. Japan. Jour. Crop Sci. **50**: 201—216.
21. TOLBERT, N.E. 1971. Microbodies-peroxysomes and glyoxysomes. Ann. Rev. Plant Physiol. **168**: 325—341.

Behavior of Calcium Oxalate Crystals with Leaf Development in Rice Seedling

Shuji SHIBATA* and Kanoe SATO

(Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980)

Summary

Deposition and development of calcium oxalate crystals were observed with the development of coleoptile and several leaves in a japonica rice seedling (cv. Sasanishiki). The results are summarized as follows:

1) Prismatic crystals first deposited in the parenchyma cells of coleoptile when the 2nd leaf emerged (Figs. 1, 2, 3) and then slightly increased their size as aging of seedling proceeded.

2) In leaf blade before emerging from the previous leaf sheath, small crystals deposited in bundle sheath cells, but not in chlorenchyma cells. When the leaf blade began to emerge and unfold, the bundles of crystals abundantly deposited in chlorenchyma cells (Figs. 4, 6, 7) and thereafter they increased size and number per cell with aging of the leaf. The size and number of crystals and thus the volume percentage of them to the cell which contained them tended to be greatest at the upper part and smallest in the basal part of leaf blade (Fig. 9). There was positive correlation between the cell size and the crystal size (Table 1).

3) In leaf sheath the crystals deposited initially in the parenchymatous cells including bundle sheath and then in the chlorenchyma cells (Fig. 8). Their length, width, volume and volume percentage to the cell also increased with aging of the sheath, although their amount was less than in the leaf blade.

* Present address: Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080.