登熟から発芽までの大豆子葉の内部構造の変化

佐藤 庚・池田 武*・皆川 知**

(東北大学農学部・*新潟大学農学部・**宮城食糧事務所)

昭和 57 年 7 月 31 日受理

大豆の登熟に伴う種子重の変化や養分吸収については、昆野¹⁾が、また発芽過程における子葉の重さや大きさの変化については、志田²⁾、McALISTER³⁾、佐藤⁴⁾がそれぞれ報告している。しかし、種子の登熟初期から発芽後黄変するまでの子葉の微細構造については、インゲンの発芽についての報告⁵⁾があるが、大豆については報告がみあたらないようである。

そこで、著者らは、大豆種子を高温と常温下で登熟させ、その登熟過程における子葉の微細構造の変化と、発芽過程における子葉構造の変化を、光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察した。

実験材料および方法

実験 I 大豆ミヤギシロメの種子を、5 月 19 日に 5 cm 四方のペーパーポットに播種し、6 月 15 日、ヨナ土（粘土に富んだ川砂）をつめた 1/5,000 a ポットに 1 株ずつ移植した。各ポットを開花盛期までは戸外の自然条件下で育て、開花盛期以後にファイトロン内に入れて温度処理を開始した。温度処理は、高温区と常温区の 2 区で、昼/夜温はそれぞれ 35°/30°C と 24°/19°C である。開花盛期の 8 月 5、6 両日に開花した花にラベルし、以後の実験には、このラベルした花から発達した莢中の種子を用いた。常温区の採取時期は、8 月 31 日、9 月 12 日、9 月 27 日、10 月 16 日の 4 回であるが、高温区は成熟が遅れたので 5 回目の最終サンプリングは 11 月 10 日になった。ポット当たりの肥料は、10 a 当たり N : 2.8 kg, P : 7.2 kg, K : 12.0 kg で、全量基肥として与えた。チッソは、セミ・マイクロケルダール法、脂肪はソックスレーで抽出後、重量法で、また全糖と粗でんぷんは村山⁶⁾の方法でそれぞれ測定した。

実験 II 大豆種子を 1/5,000 a ポットの深さ 1 cm のところに置床した。発芽過程における採取時期は、子葉が地中にある時（播種後 3 日目）、子葉が抽出したが未展開の時（5 日目）、子葉が完全展開した時（7 日目）、子葉が黄変した時（16 日目）の計 4 回で

ある。

登熟過程の子葉と発芽過程の子葉の 1 枚を向軸側、中央部、背軸側に区分し、グルタルアルデヒドとオスミウム酸の 2 重固定を行って、アルコール脱水後にスーパー樹脂に包埋した。光学顕微鏡（以後光顕と記す）用の試料は、ウルトラミクロトームで 0.5 μm の厚さに、また電子顕微鏡（以後電顕と記す）用には約 0.08 μm の厚さに切り、光顕用試料は 1% トルイジンプルーで、電顕用試料は酢酸ウラニウムと鉛の 2 重染色を行って検鏡した。

実験結果と考察

1) **登熟経過** 高温区の茎葉は常温区にくらべて遅くまで緑色が濃く、種子の成熟は常温区より約 3 週間遅れ、すべての葉が黄化、落葉せず、一部は緑色のまま残った。高温区の成熟種子は、常温区に比べて大きさの変異が大きく、種皮に皺が寄り、概して、幅・厚さが小さく、細長い形をしていた。

2) **一莢種子数と成熟種子の大きさ** 高温区の株当たり莢数は、常温区の約 2.7 倍と多かった（第 1 表）。しかし、高温区では、莢だけ生長して中に種子を含まない不稔莢が全莢数の 52.4% と多く、株当たり種子数は両区間にほとんど差がみられなかった。常温区の成熟種子の百粒重は、高温区より 20% 近く重く、またその大きさは幅と厚さにおいて高温区より僅かに大きい、長さは短かい（第 2 表）。

3) **成分含有率** 高温区の粗蛋白質含有率は、常温区より 5.4% 高く、でんぷん+全糖の含有率は、7% 低い（第 3 表）。脂肪含有率には、明瞭な差がみられない。これらの結果は、昆野¹⁾、佐藤⁴⁾の結果とは

Table 1. Distribution of pods with 0, 1, 2 and 3 seeds.

Temp.	Seed number				Pod number/ 3 plants
	0	1	2	3	
C	%	%	%	%	
35°/30°	52.4	34.6	11.9	1.1	185
24°/19°	1.4	30.5	62.3	5.8	69

大要は、第 174 回講演会（57 年 10 月）において発表

ば同様である。

4) 細胞層数と細胞長 子葉の長さ方向と幅方向における柵状細胞層数は、高温区の方が少ないが、厚さ方向では高温区の方が多かった。8月31日の厚さ方向だけは、両区差がなかった(第4表)。子葉の横断面における細胞の長さとは幅を部位別にみると、8月31日の種子の肥大初期には細胞長は部位間に大きな差がみられないが、成熟するにつれて背軸側ほど細胞の長

さが大きくなった(第5表)。一方、細胞の幅は、肥大初期から成熟期まで背軸側の方が大きかった。また、高温区の細胞長は、全期間で常温区より小さく、幅も始めは常温区より小さいが、成熟するにつれてこれより大きくなった。向軸面の表皮に平行な切片で測定した細胞直径は、どの部位でも高温区の方が常温区より僅かに大きく、子葉の中央部では高温区の38.3 μm 、常温区36.4 μm 、周辺部4ヶ所の平均値は、そ

Table 2. Size of matured seeds.

Temp.	Length	Width	Thick- ness	100-seed weight*
$^{\circ}\text{C}$	mm	mm	mm	g
35°/30°	9.4	7.5	6.7	27.8
24°/19°	9.0	8.1	7.0	33.1

Each figure represented seed size shows the average of 10 seeds.

* Measured on seeds of 13% moisture content.

Table 3. Chemical constituents of matured seeds.

Constituent	35°/30° C	24°/19° C
Crude protein ¹⁾	42.8%	37.4%
Lipids	17.3	19.2
Crude starch	5.4	7.9
Total sugar	7.6	12.1
Residue	26.9	23.4

1) Calculated by total N (%) $\times 6.25$.

Table 4. Number of cell layers in three directions of cotyledon.

Direction	Date	Aug. 31	Sep. 12	Sep. 27	Oct. 16	Nov. 10
	Temp.					
Length	35°/30° C	367	754	804	785	794*
	24°/19° C	652	867	958	941*	
Width	35°/30° C	142	523	538	520	523
	24°/19° C	434	601	624	649	
Thickness	35°/30° C	27	33	32	34	31
	24°/19° C	28	26	28	26	

Each figure shows the average of 6 seeds.

* Matured seeds.

Table 5. Cell length and width on several parts of transections of cotyledon (μm).

Temp. $^{\circ}\text{C}$	Portion	Aug. 31		Sep. 12		Sep. 27		Oct. 16		Nov. 10	
		L	W ¹⁾	L	W	L	W	L	W	L	W
35°/30°	Palisade cell	43.5	12.0	59.2	13.0	65.8	15.6	69.9	20.4	77.3	18.6
	Adaxial part	32.3	18.6	53.3	25.4	75.7	33.1	77.5	36.5	79.4	37.4
	Central part	34.3	22.6	51.1	25.3	97.4	37.3	96.9	42.2	109.5	37.9
	Abaxial part	33.1	20.3	47.4	27.8	92.5	39.6	111.9	38.9	148.5	44.9
	Average ²⁾	33.2	20.5	50.6	26.2	88.5	36.7	95.4	39.2	112.5	40.1
24°/19°	Palisade cell	52.6	13.1	68.7	15.5	95.0	16.4	110.5	14.8		
	Adaxial part	39.0	22.9	73.3	26.0	91.2	29.5	117.5	31.3		
	Central part	48.9	25.5	91.3	32.0	118.1	39.0	122.8	34.4		
	Abaxial part	42.6	26.8	95.1	35.5	134.7	37.8	153.9	39.2		
	Average	43.5	25.1	86.6	31.2	114.7	35.4	131.4	35.0		

Each figure shows the average of 20 cells.

1) L : Length, W : Width.

2) Average figures were calculated except the palisade layers, since they occupied in very small ratio to the total layers.

Figs. 1~27. Transections of soybean cotyledon during ripening periods. Figs. 1~12. Transections of cotyledon ripened at 24°/19°C. Figs. 13~27. Transections of cotyledon ripened at 35°/30°. Figs. 1, 5, 9, 13, 18, and 23: Samples at Aug. 31. Figs. 2, 6, 10, 14, 19 and 24: Samples at Sep. 12. Figs. 3, 7, 11, 15, 20 and 25: Samples at Sep. 27. Fig. 4, 8, 12, 16, 21 and 26: Samples at Oct. 16. Figs. 17, 22 and 27: Samples at Nov. 10. Figs. 1~4 and 13~17: Adaxial parts of cotyledon. Figs. 5~8 and 18~22: Central parts of cotyledon. Figs. 9~12. and 23~27: Abaxial parts of cotyledon. $\times 245$.

Abbreviation

Fig. 28. Accumulation of starch granules in abaxial parts of cotyledon ripened at 24°/19°C. Sampling time was Sep. 12. $\times 8,320$.

Fig. 29. Development of thylakoids in abaxial parts of cotyledon ripened at 35°/30°C. Sampling time was Sep. 12. $\times 16,700$.

Fig. 30. Endoplasmic reticulums in abaxial parts of cotyledon ripened at 24°/19°C. Sampling time was Sep. 27. $\times 16,700$.

Fig. 31. Transection of matured seed ripened at 24°/19°C. $\times 6,230$.

Fig. 32. Transection of matured seed ripened at 35°/30°C. $\times 6,230$.

Fig. 33. Prolamella in the parenchyma cells of the cotyledon germinated but remained in the soil. $\times 21,200$.

Fig. 34. Thylakoid development in the parenchyma cells of folded cotyledon just after emergence. $\times 21,200$.

Fig. 35. Chloroplasts in the parenchyma cells of completely unfolded cotyledon after emergence. $\times 10,250$.

Fig. 36. Dilation of thylakoids and appearance of numerous vesicles in the parenchyma cells of yellowed cotyledon. $\times 8,400$.

ST : Starch grain, PB : Protein body, ER : Endoplasmic reticulum, TH : Thylakoids, CW : Cell wall, SP : Lipid, M : Mitochondria, PG : Plastoglobules, V : Vesicle, PL : Prolamella.

れぞれ $41.2\ \mu\text{m}$, $39.4\ \mu\text{m}$ であった。また、両温度区とも、子葉の中心部の細胞直径は周辺部より僅かに小さかった。

以上のように、高温下で稔ると登熟期間が延長し、子葉の長さ方向、幅方向の細胞数が減少し、厚さ方向の細胞数が増加したが、子葉の横断面における細胞の大きさは高温区の方が長さ（表皮に直角の方向）が小さく、幅が大きくなった。その結果、種子の長さは、高温区の方が僅かに大きく、幅、厚さは小さくなり、百粒重は減少した。

5) 登熟過程の子葉の光顕観察 8月31日の子葉柔細胞は、小さくて分裂中であり、顆粒の蓄積は少ない。背軸側と中央部の細胞には、濃く染色された蛋白粒らしい顆粒とでんぷん粒がみられる（第1, 5, 9, 13, 18, 23図）。9月12日には、細胞は伸長し、蛋白粒は高温区的全細胞でみられ、常温区では蛋白粒同志が融合してアメーバ状を呈した（第2, 6, 10, 14, 19, 24図）。大きな複粒ででんぷんが常温区的全細胞でみられるが、高温区ではみられない。9月27日は常温区の登熟盛期で、蛋白粒は向軸側でも融合してアメーバ状を呈し、中央部、背軸側では融合後に細分化したと思われる不規則な形を呈し、複粒ででんぷんが全細胞でみられる（第3, 7, 11図）。高温区の蛋白粒とでんぷんは、9月12日の常温区と同様な状態であるが、複粒ででんぷんの大きさは、常温区より小さい（第15, 20, 25図）。10月16日には、常温区の種子は成熟し、各部とも球形の蛋白顆粒がみられる。でんぷん粒は、背軸側と中央部からほとんど消失し、向軸

側に大きな複粒として存在した（第4, 8, 12図）。高温区の各部には、蛋白粒とでんぷん粒が混在している（第16, 21, 26図）。11月10日、高温区の成熟期には蛋白粒が大部分を占めており、でんぷん粒はほとんどみられない（第17, 22, 27図）。

6) 登熟過程の子葉の電顕観察 8月31日：小胞体が背軸側の蛋白粒間にみられるようになるが、向軸側では比較的少ない。プラスチック内には、小さなでんぷん粒とその間に僅かなラメラ構造の発達がみられ、周辺にはミトコンドリアがみられる。9月12日：常温区では、でんぷん粒が急激に発達し、蛋白粒や小胞体が増加する（第28図）。これらの傾向は、向軸側よりも背軸側で顕著である。プラスチック内のラメラ構造は、高温区の背軸側で良く発達している（第29図）。9月27日：両区とも小胞体が著しく多くなるが、この傾向は向軸側より背軸側でより大きい（第30図）。常温区（10月16日）と高温区（11月10日）の成熟種子では、小胞体がほとんどみられなくなって細胞全体が蛋白粒と脂肪球でうめつくされている。でんぷん粒は、常温区の向軸側にみられるほかはほとんど消失し、またチラコイドの構造もみられなくなる（第31, 32図）。

7) 発芽過程の子葉の電顕観察 播種後3日目の発芽はしたが未抽出の子葉に、小さな蛋白粒とでんぷん粒がみられるが、脂肪球は認められない。脂肪は分解して炭水化物となったか^{2,10)}、細胞膜系の構成成分として使われたものと思われる。蛋白顆粒も細分化して小粒となっている¹⁾。でんぷん粒は単粒のものがほとん

どで、その周辺にはプロラメラが僅かに観察される(第 33 図)。抽出直後の未展開子葉では、でんぷん粒の蓄積とラメラ構造が背軸側でみられるが、向軸側ではラメラは発達途中であり(第 34 図)、でんぷん粒も背軸側に比べて少ない。子葉完全展開時には、向軸側のクロロプラストは完成して、ラメラ構造の発達とでんぷん粒の蓄積がみられ、また周辺にはミトコンドリアがみられる(第 35 図)。背軸側ではでんぷんの消失と僅かにラメラ構造の分解がみられる。子葉黄変期には、クロロプラスト内のでんぷん粒が消失し、ラメラ構造が崩壊して vesicle が出現した(第 36 図)。この様に、ラメラ構造の発達、崩壊やでんぷん粒の蓄積、消失が、背軸側の方が向軸側に先行したのは、地上に抽出した時点では背軸側が先に光をうけることが関係していると思われる。

引用文献

1. BAGLEY, B.W., J.H. CHERRY, M.L. ROLLINS and A.M. ALTSCHUL 1963. A study of protein bodies during germination of peanut (*Arachis hypogea*) seed. Amer. J. Bot. **50** : 523—532.
2. BEEVERS, H. 1961. Metabolic production of sucrose from fat. Nature **191** : 433—436.
3. 昆野昭晨 1976. ダイズの子実生産機構の生理学的研究. 農技研報 **D 27** : 254—285.
4. McALISTER, D.F. and O.A. KROBER 1951. Translocation of food reserves from soybean cotyledons and their influence on the development of the plant. **26** : 525—538.
5. 村山 登・吉野 実・大島正男・塚原貞雄・川原崎裕司 1955. 水稻の生育に伴う炭水化物の集積過程に関する研究. 農技研報 **B 4** : 123—166.
6. ÖPK, H. 1966. Changes in cell fine structure in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. during germination. J. Exp. Bot. **17** : 427—439.
7. 佐藤 庚・池田 武 1979. 日長・温度に対する大豆の生育反応. 第 4 報 登熟期間の温度が成熟種子の収量および諸形質に及ぼす影響. 日作紀 **48** : 283—290.
8. ———・————・大友健二 1979. ———. 第 5 報 大豆の初期生育における部位別の生長と温度との関係. 日作東北支部報 **22** : 97—99.
9. 志田庄二郎・檀上 勉 1971. マメ科作物種子の発芽にともなう子葉の変化について. 第 4 報 ダイズの初期生育と子葉貯蔵養分の消化ならびに同化組織への変化. 宮崎大農研報 **18** : 325—334.
10. STUMPF, P.R. and C. BRADBURY 1959. Fat metabolism in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. **10** : 197—222.

Changes of Fine Structure of Soybean Cotyledons During Seed Ripening, Germination and Emergence

Kanoe SATO, Takeshi IKEDA* and Satoshi MINAGAWA**

(*Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980, *Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-21, and **Miyagi Local Food Agency Office*)

Summary

Two observations were made. Firstly, growth and fine structures of cotyledons of ripening soybean seeds under high and normal temperatures were compared under light microscopy and electron microscopy. Secondly, changes of fine structure of cotyledons during germination, emergence and yellowing were observed. Soybean used is cv. Miyagishirome. The mean day/night temperatures were 35°/30°C (high temperature) and 24°/19°C (normal temperature). The results obtained are summarized as follows:

1. The seed maturity at 24°/19°C was about three weeks faster and 100-seed weight was greater than those at 35°/30°C. The number of seeds ripened per plant was almost the same between the two on account of very high sterility at 35°/30°C, although the number of pods per plant was greater at 35°/30°C (Tables 1 and 2).

2. The number of cell layers in both length and width directions of cotyledon was greater at 24°/19°C than at 35°/30°C, but that in thickness in opposite. The mean cell length of matured cotyledon was greater at 24°/19°C than at 35°/30°C, but the mean diameter was smaller at 24°/19°C (Tables 4 and 5).

3. Carbohydrate concentration (sugar+starch) was higher at 24°/19°C than at 35°/30°C, but protein concentration in opposite (Table 3).

4. The number of starch granules was most abundant in late ripening periods (Sep. 27 at 24°/19°C and Oct. 16 at 35°/30°C). At maturity they were almost disappeared from all parts at 35°/30°C and from abaxial parts at 24°/19°C. A few thylakoids appeared among starch grains during ripening period. Protein body was small at early ripening period, then became amoeba like at middle and late ripening periods, and grew up to bigger round bodies at maturity. Many endoplasmic reticulums were observed in adaxial parts of the cotyledon at middle and late ripening periods. Lipid spherical bodies were packed reticulately among the protein bodies just before maturity (Figs. 1-32).

5. The partitioned protein granules appeared in parenchyma cells of the cotyledon germinated but remained in the soil, and lipid bodies were almost disappeared at this time. In completely emerged yet folded cotyledon, thylakoid formation and starch deposition preceded at abaxial part, but after unfolding they became more prominent at adaxial part, suggesting a light reception be concerned (Figs. 33-35). When cotyledon turned yellow, thylakoids were separated to form numerous vesicles (Fig. 36). These procedures seemed to proceed faster in abaxial parts.