水稻下位節間の挫折抵抗力に関する組織形態学的研究

第2報 下位節間の2次壁肥厚過程に関する光学および電子顕微鏡観察*

松田 智明・川原 治之助・長 南 信雄

(茨城大学農学部)

昭和57年7月31日受理

本研究は主として組織学的手法を用い、水稻下位節間の構成各組織が挫折抵抗力に対して果たす役割を解明しようとするものである。

第1報¹⁰⁾では下位節間の伸長過程について観察したので、次に、2次壁肥厚過程を観察する。水稻の節間構成組織の2次壁肥厚過程については川原ら^{5,7)}の光顕による報告がある。一方、2次壁に関する報告は数多いが、その大部分は針葉樹および双子葉植物の本部についてのものである。イネ科植物の節間については、KAUFMAN ら⁴⁾がエンバクの表皮を、LAWTON ら⁹⁾がドクムギの皮層繊維細胞をそれぞれ電顕観察しているが、水稻についてはまだ電顕による報告がない。

また、リグニンは細胞壁に強度を与える重要な成分であり、イネ科植物のリグニンにはガイアシル、シリニルおよびハイドロキシフェニルの3成分が含まれ、前2者が大部分を占めるといふ¹⁴⁾。一方、BARSKAYA¹⁾は8種の樹木のリグニンについて、シリニル成分の検出にモイレ反応(M反応)を、ガイアシル成分の検出にフロログルシン反応(P反応)を用いて比較研究し、M反応陽性リグニンは枝に“しなやかさ”を付与するが、P反応陽性リグニンは細胞壁を硬くする傾向があるとしている。水稻節間におけるリグニンの組織化学的検出には一般にP反応のみが試みられてきたので、M反応とP反応について再検討の要がある。

この報告は以上の諸報告を参考にして、水稻下位節間の構成組織について、2次壁肥厚とリグニン沈積の過程を光顕と電顕で観察した結果の概要である。

材料および方法

慣行水田栽培された水稻品種コシヒカリの第IV節間(穂首節間を第I節間とする)について、パラフィン切片法、氷結切片法および徒手切片法でプレパラートを作製し、2次壁肥厚段階の判定は偏光顕微鏡によった。準超薄および超薄切片の作製法は第1報¹⁰⁾と同

様である。

リグニンの組織化学的観察のためには、多くの検出方法⁸⁾について検討した結果、P反応とM反応が最適であったので、この2法を採用した。P反応にはフロログルシンの50%塩酸飽和溶液を用いた。M反応は西尾の方法¹²⁾に従って、1%過マンガン酸カリ水溶液、12%塩酸、25%アンモニアで切片を順に、2分、3分、30秒間処理した。1回の観察には厚さ60~80 μ mの徒手切片を3~5枚用いた。

観察結果および考察

1. 皮層繊維組織

光顕による2次壁肥厚過程の観察結果は川原ら^{5,7)}の報告とはほぼ一致するので、考察に関連する第IV節間についての二、三の事項についてとくに述べる。

第1報¹⁰⁾と同様に、供試したコシヒカリの出穂期は8月4日で、第IV節間長は10.4cm、第IV節間の伸長期は7月12日~7月27日であった。

皮層繊維細胞と小維管束鞘細胞の2次壁は外層(S₁層)、中層(S₂層)、内層(S₃層)の3層構造であって、細胞伸長が停止すると直ちにS₁層の肥厚が始まり、S₂層、S₃層へと進む。2次壁肥厚は節間を向基的に進み、節間横断面では、表皮に接する皮層繊維第1列から求心的に第5、6列へと進む。しかし、出穂期直後には2次壁肥厚の節間の上下差はほとんどなくなり、節間を通じて第1~3列にS₃層が完成し、第4~6列はS₂層形成中である。その後は個体差があつて明瞭ではないが、2次壁肥厚が全く停止するのは出穂後7~14日頃と思われる。なお、皮層繊維組織の第4~6列および小維管束鞘が基本柔組織に接する列では、細胞径に比して壁厚がうすく、しばしばS₃層が形成されずに終ることがある。以上の過程を電顕で観察すると次の様相を呈する。

第1, 2図はS₁層形成期の皮層繊維細胞のそれぞれ横、縦断面であつて、リボソームの分布密度高く、とくにゴルジ体(g)と粗面小胞体(er)が著しく多い。ゴルジ体は活発にゴルジ小胞(gv)を形成し、細胞

* 一部は、第155回(昭和48年4月)および第162回講演会(昭和51年10月)において発表。

壁にエキソサイトーシスが行われているとみられる（⇒）。また、リボソームの一部は粗面小胞体上にポリゾーム（po）として認められ、粗面小胞体は原形質膜に連絡している（⇒印）。また、第2図では多数の微小管が認められる（mt）。

第3、4図は S_2 層形成期の皮層繊維細胞横断面である。第4図では、中葉・1次壁（ml）、 S_1 層、 S_2 層が明瞭に認められる。 S_2 層形成期を S_1 層形成期と比較すると、細胞小器官の様相は類似しているが、ゴルジ体とゴルジ小胞はより大型となって活発化しているとみられ、また、陥入胞（in）の形成も認められる。第5図は S_2 層形成中期の横断面であって、皮層繊維第1～3列と比較すると内側の第4～6列では、細胞径は大きいが2次壁の肥厚は遅れている。また、一般に、細胞先端の割り込み生長部（＊印）の細胞壁はうすい傾向がある。

皮層繊維組織における2次壁肥厚中の細胞小器官の様相は、ドクムギ⁹⁾をはじめ、他の多くの植物についての報告と一致する点が多い。すなわち、壁材料はゴルジ体（g）→ゴルジ小胞（gv）→エキソサイトーシス（⇒印）の径路で細胞壁に運ばれるとみられる。また、粗面小胞体から直接原形質膜外へ物質輸送されるという報告^{2,11,18)}もある。また、ロマゾームや陥入胞もエキソサイトーシスの一様相とされている^{2,9)}が、ロマゾームは本観察では認められなかった。そして、これらの機構によって運ばれる壁材料としては、炭水化物、酵素たんぱく、リグニンなど、あるいはそれらの前駆物質が含まれていると考えられるが、それらの諸物質と細胞小器官との詳細な関係については今後の研究課題としたい。

2. 表皮

第6図はジェフェレー液で剥離した第IV節間表皮の光顕写真である。乳頭突起には大型（lpa）と小型（pa）とがあって、大型乳頭突起は短細胞（si および cc）の両側に位置することが多い。また、小維管束上の表皮（svep）には乳頭突起は少ない。第7図は短細胞の縦断面であって、珪酸細胞（si）とコルク細胞（cc）は長細胞（lc）の表面より突出し、放射壁も肥厚して特異な形態を呈する。しかし、両細胞壁には皮層繊維細胞のような3層構造は認められない。

表皮細胞の2次壁肥厚過程を電顕で観察すると次の様相を呈する。表皮細胞も細胞伸長の停止直後から2次壁肥厚が始まるが、第8図はその頃の表皮細胞横断面である。ここでも、リボソームと粗面小胞体の分布密度が高く、ゴルジ体、ゴルジ小胞、エキソサイトー

シスの活発な像が認められる。第9、10図はいずれも皮層繊維細胞が S_2 層形成期にある頃の表皮長細胞横断面である。細胞小器官の様相は第8図と類似しているが、ゴルジ体とゴルジ小胞は大型となりエキソサイトーシス（⇒）も活発に行われ、粗面小胞体と原形質膜との連絡（⇒）も顕著に認められる。また、第11図は同じ頃の表皮長細胞横断面であって、小型乳頭突起が形成中である（pa）。すでに表面にはクチクラ層（cu）が形成され、顆粒状にみえる珪酸の沈積（▶）がクチクラ層直下に認められる。さらに、第12図は珪酸細胞（si）の横断面であって、コルク細胞（cc）の端の部分と長細胞（lc）外壁の大型乳頭突起（lpa）も認められる。ここにも珪酸沈積（▶）がみられるが、とくに珪酸細胞の外壁に顕著である。そして、珪酸、コルク両細胞では長細胞に比べて液胞化が遅れる。なお、第10図にみられるように、珪酸細胞と同様に、長細胞外壁の珪酸沈積も放射壁に深く入り込んでいる。

このように、表皮外壁の珪酸沈積が2次壁肥厚中から始まり外壁全面に及ぶことは、水稻^{3,15)}、エンバク⁴⁾ですでに報告されている。また、エンバクの珪酸細胞では壁肥厚後期になると細胞内腔に amorphous silica body が発達してくる⁴⁾。今回の観察では、超薄切片作製に難があって、水稻の珪酸、コルク細胞の壁肥厚後期の様相は観察できなかった。しかし、水稻節間の珪酸沈積は2次壁肥厚中から始まること、下位節間は成熟後も葉鞘内部にあることが多いこと、および珪酸細胞の様相を考えると、節間表皮の珪酸沈積は単なる蒸散作用によるよりも、むしろ積極的な細胞活性を伴う輸送に負うところが大きいと考えられる。そして、表皮における大型、小型乳頭突起、短細胞の分布様相およびクチン、珪酸、リグニン沈積の状態を考えると、保護組織としてだけでなく、機械組織としての機能の観点からも節間表皮を再考する必要があると考えられる。

3. 基本柔組織

基本柔組織の2次壁肥厚については川原ら⁷⁾の光顕観察があるので、ここでは、第13図に2次壁肥厚期の電顕像を示した。基本柔細胞でも、ゴルジ体、ゴルジ小胞、粗面小胞体などが少なくないが、表皮、皮層繊維細胞と比較して異なるのは、早期に大きな液胞が発達し、リボソーム（rs）を付着した陥入胞（in）が数多く認められることである。

また、大維管束鞘は1～3の細胞列から成るが、2次壁が3層構造を呈するものはほとんどなく、大部分

はうすい S_1 層のみの肥厚で終る。

4. リグニンの沈積過程

第14図は第IV節間横断面の表皮(ep), 皮層繊維組織の第1~5細胞列(cf, 1~5)および大維管束(lv)における, 2次壁肥厚の初期(A, S_1 層形成期), 中期(B, S_2 層形成期)および終了後(C)のM反応(図の左側, M)とP反応(図の右側, P)の呈色状態を示す模式図である。なお, 小維管束は皮層繊維組織と, 小維管束木部は大維管束木部とそれぞれ同様の呈色状態となる。2次壁肥厚前には, 大, 小維管束の道管壁にP反応が弱く現われるのみでM反応はない。

2次壁肥厚が開始すると, まず, 大, 小維管束の木部にM反応が現われ, 次第に維管束鞘へと遠心的に広がる。また, 表皮および皮層繊維第1, 2列にもM反応が現われ, 第5, 6列へと求心的に広がる。M反応は S_1 層形成が進むにつれて次第に強まるが, P反応は大, 小維管束の木部から維管束鞘にかけて弱く現われるのみである(第14図A)。

皮層繊維細胞に S_2 層形成が始まると, P反応はM反応の出現した軌跡を追うように, 大, 小維管束の木部から維管束鞘にやや強く, 表皮と皮層繊維第1, 2列に弱く現われる。M反応は初期(A)よりも全般的に強まるが, 皮層繊維組織と大, 小維管束の木部では, P反応の現われた部分のM反応は弱まる(第14図B)。個々の細胞では, M反応は S_1 層から現われ S_2 , S_3 層へと求心的に反応が進み, 中葉・1次壁には認められない。P反応は中葉・1次壁から現われ, S_1 , S_2 層へとM反応の跡を追うように進み, P反応の出現した部分ではM反応は弱まる。このようにして, 第IV節間のリグニン沈積は, 2次壁肥厚

の場合と同様に, 出穂期直後にその増加最盛期を経過し終る。その後は個体差が大で明瞭ではないが, リグニン沈積は出穂後7~14日頃に終了するように思われる。

リグニン沈積の終了した第IV節間横断面(第14図C)では, P反応は表皮, 皮層繊維組織, 小維管束に強く, 大維管束鞘には弱く, 基本柔組織には認められない。また, P反応は皮層繊維第1, 2列の方が第5, 6列より強く, 大, 小維管束では木部が最も強い。一方, M反応は大維管束鞘に強く, 表皮, 皮層繊維組織, 小維管束には弱く, P反応と相補的な関係が認められる。また, M反応は皮層繊維第5, 6列に強く, 第1, 2列には弱い。また, 皮層繊維細胞に注目するとき, すでに川原ら⁷⁾が指摘したように, P反応は中葉・1次壁, S_1 層に頭著に強く, S_2 , S_3 層へ向って弱くなるが, 逆に, M反応は S_3 層に強く, S_2 , S_1 層へ向って弱くなる。

以上のリグニン沈積の様相は2次壁肥厚が進む過程を通じて認められ, 第V節間においても第IV節間と同じ様相であった。また, 数多くの節間におけるP反応とM反応を観察してみると, 上述の規則性に関する例外は認められないが, 登熟後期の節間の反応濃度には個体差がかなりあったという点を指摘しておきたい。

上述のリグニン沈積過程の中で, P反応が出現するとその部分のM反応が弱くなった理由として, M反応リグニン(シリングル成分)がP反応リグニン(ガイアシル成分)に転化したのか, あるいは, P反応リグニンの沈積がM反応を妨害しているのか, いずれとも判断しがたい。しかし, いずれにしても, 両リグニン成分ともに細胞壁を強化するものであり, とく

Abbreviations: cc, cork cell; cf, cortical fibers; cu, cuticular layer; cw, cell wall; ep, epidermis; er, endoplasmic reticulum; g, Golgi apparatus; gv, Golgi vesicle; in, invagination; lc, long cell; lpa, large papilla; lv, large vascular bundle; lvs, large vascular bundle sheath; m, mitochondria; ml, middle lamella and primary wall; mp, metaphloem; mt, microtubule; mx, metaxylem; pa, small papilla; pl, plastid; pm, plasmalemma; po, polysome; pxl, protoxylem lacuna; rs, ribosome; S_1 , outer layer of the secondary wall; S_2 , central layer of the secondary wall; si, silica cell; ssep, outer epidermis of the small vascular bundle; v, vacuole; xp, xylem parenchyma.

Dark arrows ($\Rightarrow$), white arrows ($\Rightarrow$) and arrow heads ($\blacktriangleright$) indicate exocytosis, connections between endoplasmic reticulum and plasmalemma, and silica deposition, respectively, in Figs. 1~4 and 8~12. All bars indicate 1.0 μ m.

Figs. 1 ($\times 12,100$) and **2** ($\times 21,400$). Transection (Fig. 1) and longitudinal section (Fig. 2) of cortical fiber cells at the thickening stage of S_1 layer.

Figs. 3 ($\times 31,000$) and **4** ($\times 32,400$). Transections of cortical fiber cells at the thickening stage of S_2 layer.

Fig. 5. Transection of epidermis and cortical fibers at the middle thickening stage of S_2 layer. $\times 4,500$. Aristesks (*) indicate the fiber cell tip.

Fig. 6. Face view of epidermis. $\times 500$.

Fig. 7. Longitudinal section of silica and cork cells. $\times 2,000$.

Fig. 8. Longitudinal section of epidermal long cell at the early thickening stage of secondary wall. $\times 24,500$.

Figs. 9 ($\times 18,200$) and **10** ($\times 34,500$). Transections of epidermal long cells at the thickening stage of secondary wall.

Fig. 11. Transection of an epidermal long cell with a small papilla. $\times 15,300$.

Fig. 12. Transection of an epidermal long cell with a large papilla and a silica cell. $\times 6,600$.

Fig. 13. Transection of parenchyma cells at the thickening stage of the secondary wall. $\times 33,400$.

Fig. 14. Diagrams showing the reactions of Mäure (M) and phloroglucinol (P) at the early (A), middle (B) and mature (C) stages of secondary wall thickening in the 4th internode.

に、BARSKAYA¹⁾の主張に従えば、P反応リグニンの分布は節間組織の力学的強度にとって重要であって、それは節間周辺部の表皮、皮層繊維組織、小維管束に集中的に検出された点に注目したい。

また、個々の皮層繊維細胞では中葉・1次壁にP反応が顕著であったということは、繊維細胞相互の接着が強く、したがって、皮層繊維組織は表皮とともに筒状の機械組織として節間を包む機能を強化していると考えられる。

5. 下位節間の2次壁肥厚過程に関する一考察

第1報¹⁰⁾でみたように、分裂帯から伸長帯にかけての表皮、皮層繊維組織、小維管束鞘の各構成細胞においては強い代謝活性の様相が認められた。さらに、それらの2次壁肥厚および珪酸、リグニン沈積過程においてもまた、強い代謝活性の様相が観察された。このような構成細胞の強い代謝活性の結果として、下位節間の強固な外骨格的構造が作られると考えられる。そこで、このような外骨格的構造形成に必要な物質の転送について若干考察しておくたい。

まず、部間分裂組織の細胞中に含有されていたでんぷんおよび好オスミウム性顆粒が細胞分裂および細胞伸長に利用される¹⁰⁾。また、基本柔組織に存在した移動でんぷんの一部も表皮、皮層繊維組織に転送されるであろう。一方、早期より原生師管が機能している大維管束からの物質転送も考えられる。そして、川原ら⁶⁾によれば、第IV節間伸長後期に第IV節間の小維管束の原生師管および原生道管が形態的に完成し機能し始めるという。本観察結果には記さなかったが、電顕観察によっても川原らの報告は裏づけることができた。したがって、第IV節間の伸長後期以降、葉身から直

接小維管束を通じて表皮、皮層繊維組織へ物質転送が行われることは十分期待できる。

摘 要

挫折抵抗力を検討するために、水稻第IV節間構成細胞の2次壁肥厚過程を光顕と電顕で観察した。

表皮には大型および小型乳頭突起があり、大型乳頭突起は短細胞の両側に位置する。表皮外壁には2次壁肥厚中にクチクラ層直下から珪酸の沈積が始まり、珪酸細胞ではとくに顕著である。2次壁肥厚中の表皮、皮層繊維細胞では、リボソームの分布密度高く、ゴルジ体、ゴルジ小胞、エキソサイトーシスが顕著に認められ、粗面小胞体と原形質膜との連絡および陥入胞も数多く観察された。

モイレ反応(M反応)とフロログルシン反応(P反応)を用いて、2次壁肥厚に伴う両反応陽性リグニンの沈積を組織化学的に検出した。その結果、M反応が最初に現われ、P反応がその軌跡を追うように検出され、最終的には、P反応は節間周辺部の表皮、皮層繊維組織、小維管束に、M反応は大維管束鞘にそれぞれ顕著に認められる。また、皮層繊維細胞では、中葉・1次壁および2次壁外層にP反応が、2次壁内層にM反応が顕著に認められる。

引 用 文 献

1. BARSKAYA, E.I. 1962. Histochemical study of lignification during maturation of wood. *Soviet Plant Physiol.* **9**: 167—174.
2. ESAU, K., V.I. CHEADLE and R.H. GILL 1966. Cytology of differentiating tracheary elements. I. Organelles and membrane sys-

- tems. Amer. J. Bot. **53**: 756—764.
3. 樋口隆昌 1968. リグニン. 右田伸彦他編, 木材化学, 上. 共立出版, 東京. 317—338.
 4. KAUFMAN, P.B., L.B. PETERING and J.G. SMITH 1970. Ultrastructural development of cork-silica cell pairs in *Avena* internodal epidermis. Bot. Gaz. **131**: 173—185.
 5. 川原治之助・和田 清 1968. 稲の形態形成に関する研究. 第4報 稈の表皮および皮層繊維の形成について. 日作紀 **37**: 384—393.
 6. ———・長南信雄 1968. ———. 第5報 稈における維管束の成熟過程. 日作紀 **37**: 399—410.
 7. ———・和田 清 1968. ———. 第6報 稈構成細胞壁の構造, とくに2次細胞壁における微繊維の走向について. 日作紀 **37**: 597—607.
 8. 木戸三夫・梁取昭三 1963. 乾湿田における水稻の生理生態学的研究. (Ⅷ) 水稻稈における珪酸の分布および節間別珪酸含有量の変化. 日作紀 **31**: 237—240.
 9. LAWTON, J.R., P.J. HARRIS, K.H. LOWRY and M.S. DHANOA 1979. Apical intrusive growth of fibres from the flowering stem of *Lolium temulentum* L. New Phytol. **82**: 739—745.
 10. 松田智明・川原治之助・長南信雄 1982. 水稻下位節間の挫折抵抗力に関する組織形態学的研究. 第1報 下位節間の伸長過程に関する光学および電子顕微鏡観察. 日作紀 **51**: 561—569.
 11. MORRÉ, D.J. and H.H. MOLLENHAUER 1974. The endomembrane concept: a functional integration of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. In Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure (Ed.) A.W. ROBARDS, McGraw-Hill, London. 84—137.
 12. 西尾康三 1959. モイレ反応の個体差異. Ronso **3**: 1—6.
 13. PICKETT-HEAPS, J.D. 1966. Incorporation of radioactivity into wheat xylem walls. Planta **71**: 1—14.
 14. SARKANEN, K.V. and H. LUDWING 1971. Lignins. John Wiley & Sons, New York. 1—94.
 15. 吉田昌一 1964. 水稻体内におけるケイ素の存在様式と生理的意義に関する研究. 農技研報 **B 15**: 1—58.

Histological Studies on Breaking Resistance of Lower Internodes in Rice Culm

II. Ultrastructural and histochemical observations on the secondary wall formation.

Toshiaki MATSUDA, Harunosuke KAWAHARA and Nobuo CHONAN
(Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ibaraki 300-03)

Summary

In this paper, we report an observation with light and electron microscope on the process of the secondary wall thickening and lignin accumulation in the cells of the 4th internode from the top of rice culm, var. Koshihikari.

Materials for ultra thin sections were fixed in 2–4% glutaraldehyde, postfixed with 1–2% osmium tetroxide, and embedded in Spurr's resin. Meshes were stained with uranium and lead. For histochemical detections of lignin, free hand sections, 60–80 μm in thickness, were treated with Mäule's reagents (M-reaction) and phloroglucinol-HCl (P-reaction).

The secondary wall of the cortical fibers makes a start of thickening just after the cell has completed its elongation. It usually consists of three layers; S_1 , S_2 and S_3 . In-

crease in secondary wall thickness is associated with increase in number of Golgi apparatus, Golgi vesicles, exocytosis and invagination. The ribosomes are often present as polysomes on the rough endoplasmic reticulum, some of which connect with the plasmalemma (Figs. 1-4). The fiber cells have smaller diameter and thicker walls in the outer rows near the epidermis than those in the inner rows which sometimes lack S_3 layer. The secondary walls of the tips of fiber cells thicken more slowly and are thinner than those of the central part (Fig. 5).

The epidermal long cells have a large number of small papillae, and a number of large ones on both sides of the short cells, but a fewer papillae on the small vascular bundle (Fig. 6). The aspects of cell organelles at their wall thickening stage are similar to those in the cortical fibers (Figs. 8-10). At this stage, silica deposition centripetally progresses from the inside of cuticular layer in all the outer walls of the long cells, especially in those of the silica cells (Figs. 9-12).

As for the parenchyma cells, a large vacuole is formed from an early stage of cell development, and conspicuous invaginations are often seen accompanying with ribosomes (Fig. 13).

No lignin is detected in elongating cell walls except those of the protoxylem vessels. On and after beginning of the secondary wall thickening, M-reaction begins by appearing (Fig. 14A). On and after beginning of the S_2 layer thickening, P-reaction follows up the traces of M-reaction. M-reaction decreases in the part where P-reaction is positive (Fig. 14B).

In the 4th mature internode, P-reaction is generally intensive in the epidermis, cortical fibers and small vascular bundle. M-reaction is the most intensive in the large vascular bundle sheath (Fig. 14C). In a fiber cell, P-reaction is the most intensive in the middle lamella-primary wall complex and decreases centripetally. On the contrary, M-reaction is intensive on the faint parts of P-reaction, but both reactions are not obvious in the parenchyma. In briefly saying, P- and M-reactions relate complementally each other.

The secondary wall thickening and the lignin accumulation in the 4th internode of the cultivar terminate about 5 days after heading and entirely complete after next 10 days.