ダイコンのすいり現象に関する研究 (第4報)

すいりの発生経過について

高 野 泰 吉

(名古屋大学農学部)

T. TAKANO: Studies on the pithiness of radish. IV.

On the process of pithy tissue formation in the radish root

Summary

Anatomical observation was made to elucidate the process of the occurrence of pithy tissue of the radish root.

It is well known that the 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) reaction, according to the difference in color intensity, reflects the physiological activity of fresh tissue in plants. In general, the tissue between the central part and the cambium ring in a cross section shows lower physiological activity than the others. Making this more in detail, the parenchyma which is apart from the conductive tissue is shown to become weak in the TTC reaction as the plant grows. Furthermore, if the esterified pectin is present in the cell wall of the parenchyma, a deep carmine color will appear by the hydroxamic acid reaction. Large parenchymatous cells which are far apart from the conductive tissue, however, show only a weak color reaction. On the other hand, staining with ruthenium red, though not specific for pectins, shows a reddish pink color in the presence of calcium pectate. Aged parenchymatous cells are stained with this dye. From these facts, it seems that the de-esterification and/or the splitting of pectin chain molecule is promoted and, consequently, the solubility of pectins in the middle lamella and the primary cell wall of parenchymatous cells changes as the radish root ripens. In this stage of root growth, it was found that the content of soluble matter in the tissues surrounding the vessels increased. These tissue are visible as transparent ones. These aged parenchym-

atous cells become large in size and thin in thickness of the cell wall, and are separated from the neighboring cells. According to the observations using the phase contrast microscope, the fusion of the cell plate melts away, but the union of the fibrillar bundle in the cell wall remains. As a result, the schizogenetic intercellular spaces are formed. In the observation, it was demonstrated that the occurrence of pithy tissue is accompanied with the dissolution of the middle lamella pectin and of the cementing material (probably protein) between the bundles of the fibrillar structure in the cell wall.

Young cells surrounding the vessels and the sclerenchymatous cells developed from the meristem show a positive TTC reaction. It is also noted that the esterified pectin recognized in the middle lamella and in the primary cell wall shows deep carmine color by the hydroxamic reaction. Recently, WATANABE drew attention to the fact that some young parenchymatous cells and sclerenchymatous cells in fleshy roots possess an ability of cell division in the xylem parenchyma. It seems that these cells have an appropriate amount of desoxyribonucleic acid, kinins and auxins as the materials and/or the agent that induce cell division in the xylem parenchyma. The schizogenetic intercellular spaces do not appear in such young tissues. It may be concluded that from these observations that pithiness in the radish root is a phenomenon accompanied with the senescence of parenchymatous cells.

ダイコンの肥大様式は木部肥大型に属する^(19,20)。したがって根部の肥大生長は形成層輪の活動力、木質部柔組織にあらわれる異常分裂組織の発達度と密接な関係がある⁽²⁰⁾。ダイコンのすいりは肥大根の成熟ともない柔細胞が大きくなり、その老化によつてもたらされるものと考えられている^(8,9,13,14)。しかしながらこの老化の生理解剖学的指標については明らかでないため、現象の解釈は

1965年7月7日受理

あいまいになっている。解剖的变化としては、通常組織から離れている柔細胞が巨大となり、細胞膜が互いに遊離し、細胞内含物の低下をひきおこし⁽¹³⁾、気ほうが細胞の内外に含まれるようになる。これが肉眼的に白く認められるようになったとき「す」がいつたといわれる⁽⁹⁾。すいり過程の解剖的観察については萩屋 (1952a)⁽¹³⁾ および藤村 (1957)⁽⁹⁾ の報告があるが、なお疑問の点が多い。本研究はすいりの発生経過における木部柔組織の生

理解剖的变化を検討し、老化現象にともなう変化の特異的指標を見だし、すいり防止機構を明らかにすることに役立てようとする。

実験材料および方法

実験材料の採取要項は第1表のとおりである。

Table 1. Outline of experiments designed to probe the process of pithy tissue formation.

Variety	Sowing date	Sampling date	Studying items
Shogoin	Sept. 3 '60	Nov. 25 '60	TTC reaction
Rapid red	June 3 '61	July 8 '61	TTC reaction
Rapid red	Sept. 5 '63	Sept. 30~ Oct. 20 '63	Anatomical observation

2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (略称 TTC) 反応は各部位から組織塊を切りとり、各々の塊からコルクボーラで打抜き、氷結マイクロームで厚さ 0.9 mm 位の切片をつくり、相見・藤巻 (1960) の方法⁽¹⁾にしたがつて組織の活力診断を行なった。すなわち、1% TTC, 0.4 M コハク酸ソーダ液 (基質), 0.1 M 磷酸塩 緩衝液を 1:5:4 の割合に混合した反応液を径 9 cm のシャーレに 4 cc 入れ (No. 2 の濾紙を敷いておく), その上に組織切片をおく。暗所の 35°C 下において約 2 時間反応させ、反応の結果生じた赤桃色のホルモザンの呈色程度を肉眼的に 0, 1, 2, 3, 4 の段階にわけて示した。

解剖的観察は生材料または 10% ホルマリン貯蔵材料を用いて、徒手切片または氷結マイクローム切片をつくり、主として細胞膜の変化をしらべた。細胞膜成分のうちマイクロファイブリルを構成するセルロースは変化が少なく、無定形マトリックスを構成するペクチン質は変化しやすいといわれているので⁽⁷⁾、ペクチン質の組織化学的变化を観察した。ペクチン質の検出はルテニウムレッド染色法⁽¹⁵⁾とヒドロキシラミン-鉄反応法^(10,16,20,21)によつた。ルテニウムレッド水溶液はペクチン質を特異的に染色するものではないが^(15,24)、古くから用いられていることと、老化した細胞膜のペクチン酸およびその塩 (石灰) を赤桃色によく染める傾向がある⁽²⁴⁾。ヒドロキシラミンはアルカリ性の条件下でペクチンヒドロキサム酸複合体をつくり、それが酸性のもとで鉄イオンと反応すると赤色に呈色する。ペクチン質以外にも若干のフェノール性物質と化合するが、これらは水溶性なので除去することができる⁽¹⁰⁾。この反応は若い細胞膜の特長とみられるメチルエステル化したペクチン、すなわちペクチン酸およびその塩を特異的に染め^(16,20)、ルテニウムレッド法と対照的に染め分けられる。そのほかリグニン

はフロログルシン-塩酸反応により、スベリンは稀硫酸-ヨードヨード加里法 (SCOTT 1948)⁽²³⁾ によつて検出を試みた。なお生組織の浸出液は Abbé の屈折計によつて屈折率を求め、可溶性物質濃度 (固形物パーセント) としてあらわした⁽²⁾。

観察結果と考察

ショウゴインダイコン晩生種の根径約 9 cm, 根長約 12 cm の個体から採取した切片の TTC 還元反応の強さを示すと第1図のようである。ショウゴインダイコンの組織はややあらいで、すいりはじめの判定が困難であるが、肉眼的にすいりはみとめられなかつた。縦断面で

Fig. 1. Intensity of TTC reaction in Shogoin radish root.

呈色反応の弱い部分がみとめられるのは図の 0.5 および 1 の位置である。横断面でも皮層部と心部との中間において活力が低い。この傾向は高橋 (1956)⁽²⁵⁾ の結果と一致する。いつそう若い肥大根では皮層部に通道組織の分布密度が高く、これをとりまく若い柔組織ないし分裂組織が集まっているので、TTC 反応は著しく強い。これらの事実からすいりは組織の活力すなわち呼吸強度の低下と関連しており、この反応の強さを組織の老化の尺度とすることができよう。

つぎにハツカダイコンのすいり程度と TTC 反応との関係をしらべた結果を第2表に示す。ショウゴインダイコンの場合と同様に正常な組織の活力が高い。この TTC 反応は通道組織付近がとくに濃い赤桃色に染まり、ここから離れている柔組織の反応は一樣に淡い桃色となる。萩屋 (1952 a, b)^(13,14) は肥大にともなう組織分化の程度

Table 2. Relationship between the degree of pithiness and TTC reaction in radish tissues.

Degree of pithiness	0	1	2	3
Index of TTC reaction	2.5	1.5	0.9	0.8

A vertical section A cross section
Fig. 2. Relationship between the portion of pithy tissue formation and the direction of vascular strands.

Fig. 3. Relationship between the portion of pithy tissue formation and the formation of transparent area surrounding the conducting tissues.

C : Conductive tissue ; P : Pithy tissue

という用語で、通道組織間の隔たりが大きくなった場合分化が進んでいると表現し、通道組織から離れている柔細胞の養分障害がすいりの一原因であるとしている。事実、これらの巨大な柔細胞の活力低下を示す TTC 反応の弱い部分とすの発現位置と対応している（第2図、第3図）。しかし柔細胞の老化が構成素材の不足によるのか分裂活動をさかんにする細胞分裂ホルモンの量や活性の低下によるのかについてはまだ明らかにされていない。

いずれにせよ、すいり発生部位における生理的活性の低下は明らかにみとめられ、有機成分の変化も減少傾向となっている（第1報および第3報）。この場合、萩

屋^(13,14)、宮崎⁽¹⁸⁾は可溶性物質濃度の低下をもつて生理的活性の低下とみなし、さらにすいりの発生経過と対応させているが、この解釈には難点がある。筆者は高橋^{(1956)⁽²⁵⁾}との共同研究において、可溶性物質とくに糖分の量がすいり組織と正常組織との間で生理的活性を示す指標にはならないことを明らかにしている。また、すのはいっていない若い肥大根組織は白濁色を呈しているが、すのはいる前後のある期間内に第3図にみられるように通道組織周辺の柔組織が透明になつてくる。その範囲は図の場合より拡大し、すいり部をのぞいて全面におよんでいく。透明化のおこりははじめにおける可溶性物質濃度は白濁状を呈する正常組織のそれより高くなっている。この透明化現象はでん粉の糖化によるものと思われる。

要するに可溶性物質濃度を生理的活性の尺度とし、肥大生長の経過やすいりの進行などに対応させることはできないが、概括的に生長期の経過と対応させる場合には可溶性物質の濃度を生理的活性の尺度とすることができる。この点は前報においても明らかにしたとおりである。本研究において、透明化現象のおこるとき可溶性物質濃度の上昇がおこること、根身の各部分における可溶性物質濃度は萩屋⁽¹⁹⁵²⁾の結果⁽¹⁸⁾と同様に皮層部で濃く、皮層部と心部の中間部で低いことが再確認された。この事実は第1図の TTC 反応と同様、若い組織の分布密度との相関において理解することができる。

Fig. 4. Relationship between the vessels and the large parenchymatous cells.
l.p. Large parenchymatous cell
m Meristematic cell
S Sclerenchymatous cell
v Vessels

Fig. 5. Abnormal thickening wall of sclerenchymatous cell.

そこで引きつづき、細胞膜の老幼と細胞離生の関係について観察を加えた。道管付近の厚膜細胞ならびに若い柔細胞では細胞膜の中葉がヒドロキシラミン-鉄反応によく染まるペクチンメチルエステル化程度の高い小形の細胞からなっており（第4図）、ルテニウムレッドには淡くしかそまらない（第4図）。これらの組織では大形の柔細胞にくらべて中葉が厚く、とくに厚膜細胞では中葉以外の部分にもペクチンメチルエステルの形態で存在し、さらに細胞内面にペクチン突起（pectic warts）がみとめられる（第5図）。CARLQUIST (1956)⁽⁴⁾はペクチン突起をキク科植物の細胞間隙面でみとめている。しかしダイコンの場合は細胞内面にみとめられた。彼によればこの突起は機械的支持の役割をもつていないとのべており、検出法も FOSTER (1934)⁽⁶⁾ が分裂組織における細胞膜染色法として考案したタンニン酸-鉄反応によっていることから、細胞分裂後必要とする隔膜ペクチン質の貯蔵形態であると考えられる。渡辺は日本のダイコンにおいて厚膜細胞が道管形成にあずかるほか、いつたん厚膜となつた細胞でも、道管形成に参加しないものは再び薄膜となり、これによつて道管間に柔細胞が介在するよう

になると観察⁽²⁹⁾しているが、本実験の観察から細胞膜ペクチン質がエステル化しているという結果は細胞の若さなしい分裂能力を保持しているものと理解できる。前述のように通道組織を離れ、他の通道組織からも最も遠い巨大な柔細胞の中葉はルテニウムレッドによく染まり、他方ヒドロキシラミン-鉄反応には染まりにくい、淡く染まる中葉となっており、TTC 反応の場合と同様これ形柔細胞は老化したと判断される。すなわちこの判断はROBBINS⁽²²⁾が述べているように senescence を細胞分裂の能力を失うことと考えることによつて理解されよう。

本実験の標本において播種後 25 日のダイコンでは肉眼的に「す」はみとめられなかつたが、通道組織より離れている柔組織ではすでに細胞離生がはじまつている（第6図 b, c）。通常、細胞の接合部は中葉のペクチンが厚めで、染色度も高いが（第6図 a）、すいり直前においては、この部分も他の部分と等しい厚みと染まり具合になつてくる。やがて中葉ペクチンは溶解してくるが、完全になくなることはなく、細胞離間側の膜面に残留するか、離間した第一次膜間に遊離状態となつている。また、ある面には中葉部分が附着していないこともある（第6図 b）。他方、中葉は板状の接着様物質として存在するものではないようで、第6図 c のように離生間隙の膜面に中葉ペクチンがひも状に残存し、したがつて接合膜内でも2方向から走っている中葉は2本のひもとして観察される。この点理解に苦しんだが、細胞膜の位相差像を観察することによつて推測ができるようになった。

第7図のように、位相差顕微鏡によると、ひも状のせんいが細胞の接合部（かど）において直角ないし斜交し、走向はかなり曲折していることがわかる。このようなせんい状配列をみると、一種のからみ合い状態を呈し、容易に離れないように思われる。このような状態は通常電子顕微鏡でないと観察できないと考えていたが、位相差顕微鏡でもおおまかに観察することができる。ここで

Fig. 6. The process of schizogenous intercellular space formation.

Fig. 7 The process of intercellular space formation (Observations using the phase contrast microscope)

おまかにという表現を用いたのは、位相差像によるひも状構造は FREY-WYSSLING の著書⁽⁷⁾に掲載されている細胞膜の微細構造を示すいくつかの写真例から判断して、さらに細い十数本の糸の束に相当していることが推定されたからである。

このようにせんい束であるひもはさらに織物のようにあやをなしているが、第7図からわかるように1本1本または同一走向の数本ずつがざん次ばらばらとなり、図の b, c のように細胞の離生がおこってくる。この観察からすれば、細胞膜は断面的に中葉、第1次膜、第2次膜と大別されるが、その実態は立体的なもので、その境界も明瞭な区別はないようである。さきにすいりは中葉ペクチンの溶解によるという藤村の見解⁽⁹⁾をのべたが、著者の観察結果から考えると、中葉ペクチンがひも状でかなり後まで残り、第1次、第2次膜もひも状で交叉している状態をゆめ、引き離すためには、ペクチン質以外にこれらの膜層を接着している物質の溶解も考えなければならない新しい事実と直面した。なお、普通の光学顕微鏡下の観察において、中葉ペクチンは厚みが正常なものと大差ないにもかかわらず、膜の離生がはじまっていることをみとめている。この現象が artifact によるものでなければ、細胞の離生は中葉ペクチンの脱エステル化や低分子化のほかには何か生理化学的变化がおこっているものと推察される。

GINZBURG (1958)⁽¹¹⁾ は細胞膜中葉部にペクチン質のほかに蛋白成分が含まれることを推測し、さらに 1961 年⁽¹²⁾には蛋白の変成や分解をひきおこす 2, 3 の物質を用いて根の細胞の分離に成功している。このような一連の変化は細胞の老化と関連しているものと思われる。

老化した細胞膜は、ルテニウムレッドによく染まるペクチン酸カルシウムが含まれているといわれている^(15,24)。この事実は第3報において化学分析によっても明らかにしている。また一般にそ葉の細胞膜中に、生きた状態においてはペクチン酸カルシウムは存在しないと

いう CONRAD の見解⁽⁵⁾が正しいとすれば、老化した細胞ではすでに細胞膜が死んだ状態にあると考えられる。このことに関連して、サツマイモの冠水による硬化は冠水をうけて窒息死をおこす結果細胞膜のペクチン酸カルシウムが形成されるという三輪ら (1947) の見解⁽¹⁷⁾と同一のことかも知れない。

上述のような細胞膜の変成がどうしておこるかじゅうぶんな説明はできなかったが、少なくともダイコンの柔細胞においてはリグニン化やスベリン化というような膜の不透性変化はみとめられなかつたので、膜の性状が物質の転流に支障をきたす主因とは考えにくい。しかし、肥大生長が急激におこる場合に内容物蓄積が充足できなくなり、通道組織から離れている柔細胞がとくに養分不足に陥るという考え方(萩屋 1952a)⁽¹³⁾が妥当に思われる。

以上の観察ならびに考察から根の肥大生長ならびにすいり防止の基本的要因として、分裂組織の増生ないし活力維持のための核酸や細胞分裂ホルモンの量ならびに活性⁽³⁰⁾と転流蓄積が円滑に行なわれるために転流条件の研究⁽³⁾が、今後の重要な課題として残されているように思われる。

要 約

本実験はすいり発生経過について生理解剖的变化を観察した。

TTC 反応による肥大根組織の活力診断によれば、道管列から離れた部分に生理的活性の低い細胞分裂能力を失なつた巨大柔細胞が存在する。すいりが進行するにつれて、換言すれば組織の老化にともなつて TTC 反応も弱まる。「す」の発現が肉眼的にみとめにくいとき、TTC 反応ですいり始めを見いだすことができる。

すいりの発生経過は生理的活性が弱まり、中葉ペクチンの脱エステル化や低分子化がおこり、蛋白様物質の変成や分解も関与して、離生的に間隙を形成し、それが拡大されて「す」となる。

これらの解剖的観察において TTC 反応による組織の

活力診断のほか、ヒドロキシラミン-鉄反応によるペクチン質の存在形態の判別と位相差顕微鏡による微細構造の観察とは従来の知見に見解を付加することに変役立った。

本研究を行なうにあたりご校閲ならびにご鞭撻いただいた本学志佐 誠教授、京都大学塚本洋太郎教授に対し厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. 相見霊三・藤巻和子. 1960. TTC による根の活力診断法. 農及園 35: 1345~1346.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1950. Methods of analysis 807~808.
3. CANNY, M. J. 1962. The mechanism of translocation. Ann. Bot., n.s. 26: 603~617.
4. CARLQUIST, S. 1956. On the occurrence of intercellular pectic warts in *compositae*. Amer. J. Bot. 43: 425~429.
5. CONRAD, C. M. 1926. A biochemical study of the insoluble pectic substances in vegetables. Amer. J. Bot. 13: 531~547.
6. FOSTER, A. S. 1934. The use of tannic and iron chloride for staining cell wall meristematic tissue. Stain Techn. 9: 91~92.
7. FREY-WYSSLING, A. 1957. Macromolecule in cell structure. Harvard Univ. Press (Cambridge, Massachusetts)
8. 藤井健雄・吉江貞剛. 1941. 根菜類の鬆入現象に関する研究(第1報) 菜菔の發育と鬆の発現との関係. 園学雑 12: 63~77.
9. 藤村 良. 1957. 根菜類のすいりに関する研究(第1報). 二十日ダイコンのすいり発生経過に関する解剖学的観察. 園芸学研究集録 8: 81~85.
10. GEE, M., REEV, R. M. and MCCREADY, R. M. 1959. Reaction of hydroxylamine with pectinic acids. Chemical studies and histochemical estimation of the degree of esterification of pectic substances in fruit. J. Agr. and Food Chem. 7: 34~38.
11. GINZBURG, B. Z. 1958. Evidence for a protein component in the middle lamella of plant tissue. A possible site for indolyl acetic acid action. Nature. 181: 398~400.
12. ———. 1961. Evidence for a protein gel structure crosslinked by metal cations in the intercellular cement of plant tissue. J. Exp. Bot. 12: 85~107.
13. 萩屋 薫. 1952 a. 大根類のすいり現象の生理学的研究(第1報). 生育に伴うすの発現経過について. 園学雑. 21: 81~86.
14. ———. 1952 b. 同上(第2報). 大根のすの発現に關係を有する形質の品種間差異に就て. 園学雑 21: 165~173.
15. KERTESZ, Z. I. 1951. The pectic substances. Interscience publishers (N. Y.).
16. MCCREADY, R. M. and REEVE, R. M. 1955. Test for pectin based on reaction of hydroxamic acids with ferric ion. J. Agr. and Food Chem. 3: 260~262.
17. 三輪知雄・藤崎三雄・田中国治・高野克夫・村上浩. 1947. 甘藷の冠水による硬化について. 農業と経済 13: 23~29.
18. 宮崎義光. 1956. 大根のすいりに関する 2, 3 の実験. 農及園 31: 1265~1266.
19. 並河 功・沢村東平. 1929. 聖護院大根の肥大生長に関する解剖学的観察. 園芸の研究 24: 55~67.
20. REEVE, R. M. 1959. A specific hydroxylamine-ferric chloride reaction for histochemical localization of pectin. Stain Techn. 34: 209~211.
21. ———. 1959. Histological and histochemical changes in developing and ripening peaches. II. The cell walls and pectins. Amer. J. Bot. 46: 241~248.
22. ROBBINS, W. J. 1957. Physiological aspects of aging in plants. Ibid. 44: 289~294.
23. SCOTT, F. M. 1948. Internal suberization of plant tissues. Science. 108: 654~655.
24. SPURR, A. R. 1957. The effect of boron on cell wall structure in celery. Amer. J. Bot. 44: 637~650.
25. 高橋 汎. 1956. 大根のすいり現象に関する研究. 京大農学部修士論文.
26. TAKANO, T. 1963. Studies on the pithiness of radish. I. Relationship between the degree of pithiness and organic constituents in radish root. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 32: 114~120.
27. 高野泰吉. 1965. ダイコンのすいり現象に関する研究(第2報). ナフタレン酢酸, しよ糖, ほう素のすいり防止効果. 園学雑. 34: 315~320.
28. ———. 1966. 同上(第3報). すいりに伴うペクチンの変動. 園学雑. 35: 43~48.
29. 渡辺光太郎. 1958. 大根肥大生長の解剖学的考察. 西山市三編著. 日本の大根. 79~97.
30. ZWAR, J. A. and SKOOG, F. 1963. Promotion of cell division by extracts from pea seedlings. Aust. J. Biol. Sci. 16: 129~139.