Phosalone 散布ハクサイ葉の葉緑体の微細構造の変化*

行 本 峰 子, 山 下 修 一**

農林水産省農薬検査所

**東京大学農学部

(昭和54年5月24日受理)

Ultrastructural Changes of Chinese Cabbage Chloroplasts Induced by Phosalone*

Mineko YUKIMOTO and Shuichi YAMASHITA**

Agricultural Chemicals Inspection Station, Kodaira, Tokyo 187, Japan

***Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*

Ultrastructure of the chloroplasts of Chinese cabbages which showed chlorosis with foliar treatment of 1,000 ppm phosalone, was observed by an electron microscope. The chloroplasts in young leaves developed after the treatment and inhibited to greening, were globular rather than normal discoidal shape. Grana formation was inhibited, and the fret system disarranged. In matured leaves, fine structure of the chloroplasts was changed at 24 hr after the treatment, when no visible symptom was appeared. The thylakoids became swollen, and vesicles were formed in stroma. When the chlorosis appeared at 48 hr after the treatment, degradation of chloroplasts such as disorganization of the fret system, vesiculation of the fret membranes and rugged envelope of chloroplasts were observed. Osmiophilic globules increased, and starch grains almost disappeared. The changes induced by phosalone on chloroplast ultrastructure were similar to those caused by some herbicides. It was suggested that the appearance of visual symptoms of phytotoxicity by phosalone result from inhibition of chloroplast development or disruptive changes in chloroplast ultrastructure.

有機リン系殺虫剤を散布したハクサイが、葉枯れ、黄白化など種々の薬害症状を示すことについては、前報¹⁾で述べたが、このうち、phosalone (S-[(6-chloro-2-oxo-3-benzoxazoliny)lmethyl]diethyl phosphorothiolothionate) 処理によって黄白化症状を示した葉の場合、細胞レベルでどのような変化が起こっているのかを知るため電顕観察を行なった。その結果、細胞の外形、ミトコンドリア、小胞体などの微小器官には明らかな変化は認められなかったが、葉緑体の微細構造に著しい変化を認めた。農薬による黄白化症状は、いくつかの除草剤が原因で生ずることはすでに知られており、葉緑体などの微細構造の変化については、Ashton ら²⁾の atrazine 処理したインゲン葉など、いくつかの報告があるほか、Anderson ら³⁾

の総説がある。そこで、phosalone 処理のハクサイ葉について、葉緑体の微細構造の変化を経時的に調べ、これら除草剤による黄白化の例と、比較し考察した。

実験材料および方法

1. ハクサイ苗および薬剤処理

ハクサイ苗 (*Brassica pekinensis* Rupr. 品種、改良千歳) を 9 cm 鉢に 3 本ずつ育て、本葉 2.0~2.5 葉期に、市販のホサロン乳剤を 1,000 ppm になるように水で希釈して散布し、所定時間後に検鏡用の試料とした。

2. 固定および包埋

葉の長さが約 2.5 cm の幼葉と、約 4 cm に展開した葉 (成葉) とから、それぞれ約 2 mm 幅の葉片を切り取り、5% グルタルアルデヒドで前固定 (4 hr) のち、オスミック酸 (1%, 3 hr) で固定し、常法に従ってエポキシ樹脂に包埋した。

* 有機リン系殺虫剤による作物の薬害 (第3報)
Phytotoxicities of Organophosphorus Insecticides to Crops (Part 3)

3. 超薄切片の作成および検鏡

超薄切片は、LKB製のUltratomeを用いて作成した。切片は、酢酸ウラン液で30分、さらにクエン酸鉛液で7分、電子染色を行なった。電子顕微鏡は、日本電子製100Sまたは7A型を用いた。

実験結果

1. 薬剤処理24時間後の肉眼症状および微細構造

幼葉、成葉とも、処理時にすでに抽出し緑色を呈していた葉で、いずれも肉眼症状には変化が認められなかった。無処理の葉緑体 (Fig. 1) に比較し、幼葉の葉緑体は、Fig. 2 に示すように多少変形し、ストロマ中に小胞が散在し、チラコイド膜の分離、好オスミウム顆粒の増加が認められた。一方、成葉の葉緑体については、これらの変化は認められなかった。

2. 48時間後の症状および微細構造

肉眼的には幼葉、成葉ともまだらに黄白化した。幼葉については、処理後に抽出し白化した部分、成葉につい

ては、緑色を呈していた葉が処理により黄白化した部分の、微細構造を観察した。幼葉の場合、Fig. 3 に示すように、葉緑体は著しく変形するのが認められた。正常な葉緑体は紡錘形であるが、処理葉では、短軸方向へふくらんだ形となり、突起が出たものや、ミトコンドリア、細胞質などをとりこんだ形のものも観察された。ストロマの電子密度は低く、デンプン粒は減少し、小胞が一部に認められた。ラメラは、長軸方向への平行性が失われ、不規則になる像も観察された。

成葉の葉緑体は、Fig. 4 に示すように、紡錘形の両端の尖りがなくなり、周辺は凸凹するのが見られた。小胞が、葉緑体の周辺部、とくに細胞壁に面した部分に多く見られるようになり、好オスミウム顆粒が増加し、デ

Fig. 1 Chloroplasts from control plants. $\times 6,000$

Fig. 2 Chloroplasts from young leaves 24 hr after the treatment with phosalone. Vesicles are formed in stroma. $\times 11,500$

Fig. 3 Mesophyll cells from young leaves 48 hr after the treatment. Chloroplasts have globular shape. $\times 2,400$

Fig. 4 Amoeboid chloroplasts from matured leaves 48 hr after the treatment. Numerous vesicles are formed. $\times 6,300$

ブン粒はほとんど見られなくなった。チラコイド膜が分離し、ラメラが蛇行するのが認められた。

3. 72 時間後の症状および微細構造

肉眼的には、幼葉は先端部を除きほとんどの部分が白化し、成葉は 48 時間後と同様まだらに黄白化した。電顕観察による葉緑体は、幼葉では、次に示すような種々のタイプが見られた。1) 外形はほぼ球形に変形し、チラコイド膜は完全に分離し、小胞が充満しているもの (Fig. 5)。2) 突起、陥入などが生じて外形が著しく変形し、ラメラ数が減少するが、小胞の形成はあまり見られないもの、3) 周囲が凸凹で、はなはだしい場合は、細胞質、ミトコンドリア等を取りこんだような形をなし、チラコイド膜は分離し、さらに蛇行し、小胞の形成が多いもの。4) 外形は大きく膨潤し、ストロマの電子密度が低いもの。1)~4) のいずれの場合も、好オスミウム

Fig. 5 Chloroplasts from young leaves 72 hr after the treatment showing breakdown of thylakoids. $\times 5,200$

Fig. 6 Chloroplasts from young leaves 120 hr after the treatment. $\times 8,000$

顆粒が多く見られ、1 カ所に 5~6 個凝集して存在する例も見られた。デンプン粒は、比較的正常な葉緑体には見られたが、変形したものにはほとんど観察されなかった。

成葉では、48 時間後の場合と同様であったが、チラコイド膜はさらに分離し、内部に基質のない小胞状に変性するのが観察された。

4. 120 時間後の症状と微細構造

肉眼的には、幼葉の基部は緑色になりはじめ、成葉は主として葉脈に沿った部分が黄白化するのが観察された。微細構造については、幼葉の葉緑体は、外形、内部構造ともに、72 時間後の場合と同様であったが、ラメラがまったく見られない葉緑体も観察された。小胞の形成は、ストロマの電子密度が低く、ふくらんだ葉緑体では認められなかったが、その他のものではいずれも多く見られ (Fig. 6)、小胞が大きくなったために葉緑体が異常な形になったと思われる例も観察された。

成葉の葉緑体は、72 時間後と同様であった。幼葉、成葉とも、120 時間後までの観察では、葉緑体限界膜の破壊は認められなかった。

考 察

Phosalone 処理によって、ハクサイ葉は黄白化症状を示すが、薬剤処理後に抽出してくる部分は、ほぼ完全に白化し、処理前に緑色を呈していた部分は、葉脈に沿って、またはまだらに黄白化した。薬剤処理後に抽出してくる部分の場合、24 時間後の試料がなく、48 時間以降について、白化した葉の葉緑体を観察したところ、48 時間目には、前駆体であるプロプラスチドに近い形のが多数見られ、72 時間後、葉緑体はさらに変形が著しくなり、ラメラ系の攪乱、好オスミウム顆粒の増加、小胞の形成がさらに増加するのが見られた。これは、葉緑体への分化の過程が阻害されたためプロプラスチドに似た形のが見られたと考えられ、さらに phosalone の影響により、未分化または分化した葉緑体の内部構造が破壊されたと考えられる。デンプン粒がほとんど見られなくなることからも、光合成の機能は阻害されていると考えられる。葉緑体の異常の種類および程度はさまざまであったが、これは、ハクサイ体内の薬剤の濃度差、薬剤の影響が葉緑体の分化の段階によって異なるなどの原因によると考えられる。

一方、処理前に緑色を呈していた部分の場合、肉眼的にまったく症状が認められない処理 24 時間後に、すでに微細構造に変化が認められ、葉緑体は多少変形し、小胞の形成が観察された。48 時間後には、黄白化症状が

現われ、電顕的には、葉緑体の変形、小胞の形成、好オスミウム顆粒の増加、ラメラの異常などが観察されたが、上述の処理後抽出した白化葉に比較すると、正常に近い形であった。処理前に抽出した葉では、白化葉の場合と異なり、正常な葉緑体が phosalone の影響で破壊され、その結果としてクロロシスが生じたと考えられる。デンプン粒が少ないことから、この場合も、光合成機能は阻害されていると考えられる。

Atrazine などの除草剤処理によってクロロシスが生じた場合に、葉緑体の微細構造が変化することは知られており、atrazine 処理のインゲン²⁾、pyriclor 処理のタバコ⁴⁾、pyrazon 処理のインゲン⁵⁾、glyphosate 処理の quackgrass⁶⁾、などの葉緑体では、グラナの崩壊、好オスミウム顆粒の増加、小胞または空胞の形成、外形が球形にふくらむなどの変化が観察されており、植物の種類は異なるが、phosalone 処理によるハクサイの葉緑体の場合も、これらの除草剤による変化と類似している。また、同様の現象は、薬剤以外の原因、たとえばイネごま葉枯病菌に感染したイネ⁷⁾、イネの老化葉⁸⁾ などでも観

察されていることから、phosalone の場合、葉緑体の構造破壊に伴う一般的な変化が生じたものと考えられる。

本研究を行なうにあたり、種々ご教示をいただいた、東京大学農学部、与良清教授に深謝する。

引用文献

- 1) 行本峰子・石谷秋人: 農薬誌 **4**, 1 (1979)
- 2) F. M. Ashton, E. M. Gifford Jr. & T. Bisalputra: *Bot. Gazette* **124**, 336 (1963)
- 3) J. L. Anderson & W. W. Thomson: *Residue Rev.* **47**, 167 (1973)
- 4) J. Geronimo & J. W. Herr: *Weed Sci.* **18**, 48 (1970)
- 5) J. L. Anderson & J. P. Schaelling: *Weed Sci.* **18**, 455 (1970)
- 6) W. F. Campbell, J. O. Evans & S. C. Reed: *Weed Sci.* **24**, 22 (1976)
- 7) O. Horino & S. Akai: *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **36**, 43 (1970)
- 8) 長南信雄・川原治之助・松田智明: 日作紀 **46**, 379 (1977)