

モウソウチク稈の成熟過程と 木化ペルオキシダーゼの分布

間島 重道・藤田 稔・佐伯 浩

The cell wall maturation in moso-bamboo (*Phyllostachys pubescens* Mazel)
and the occurrence of peroxidase related to the lignification.

Shigemichi MAJIMA, Minoru FUJITA and Hiroshi SAIKI

要 旨

タケ類の稈は、組織が複雑であるが、細胞壁へのセルロースとリグニンの堆積が長期間にわたる点で、細胞壁形成に関わる酵素の抽出と分析に好都合であると期待される。

一方、ペルオキシダーゼ (PO) 基質のうち、リグニン堆積 (木化) に関与する PO を組織化学的にも検出できるとされているシリングアルダジン (SYR) について、その特異性を確認できれば、木化現象を追跡するのに有用であろう。

そこで、本研究では、モウソウチク稈の各種細胞の壁肥厚と木化の進行の様子を光学顕微鏡で観察し、さらにその過程でみられる PO 活性の変化を組織化学・生化学的に分析して、木化に関与する PO の SYR 特異性について検討した。

その結果、細胞壁の肥厚は、網紋道管では4月に進行し、維管束鞘の繊維細胞では4月から7月にかけて維管束側から外縁部へと進行した。基本組織柔細胞の壁肥厚は7月以降にはじまり10月には完了するとみてよいが、肥厚しないものもあった。師部については、壁肥厚・木化ともに認められなかった。その師部を除いて、他の組織での木化は、それぞれ肥厚に約1ヶ月遅れて進行し完了した。

SYRによる呈色は、繊維や柔細胞の細胞壁が肥厚する時期、あるいはそれ以前から、それらの細胞間層に認められ、二次壁が木化する時期になると反応が消失していた。抽出液のアイソザイム分析および分光分析から、木化時期に1ヶ月程度先行して細胞壁結合性 PO の活性が高かった。これらの結果は、SYRを酸化する PO が木化に関与している可能性を示すが、その PO はリグニン堆積全体、特に二次壁のリグニン堆積よりも、細胞間層などリグニン堆積の初期に関与するアイソザイムであると考えられる。

1. 緒 言

ペルオキシダーゼ (以下 PO) は、動物、植物、微生物界に広く存在し、それが触媒する生物学的過程も多岐にわたっており¹⁾、リグニン生合成もその最終段階で PO アイソザイムの作用を

受けるとされている²⁾³⁾。このリグニン生合成の最終段階に関与する PO は、細胞質ではなく細胞壁中に存在する酸性の PO であると考えられているが、確証は得られていない。

一般に、PO を検出するには、 H_2O_2 の存在下で基質を酸化発色させる手法がとられ、3,3'-ジアミノベンチジン（以下 DAB）、グアヤコール（以下 GUC）など多くの基質が試されてきたが、とりわけシリングアルダジン（以下 SYR）は、Harkin と Obst³⁾ によって導入された基質で、木化中の細胞壁 PO に特に親和性を持つ⁴⁾とされている。しかし、木化に関与する PO の SYR への特異性に否定的な報告⁵⁾⁶⁾や、PO 自体に厳密な基質特異性がないとする報告⁷⁾も出されている。

もし、数多くある PO アイソザイムから木化に関与する PO を同定することが可能になれば、免疫電顕法などを用いて、木化現象をより詳しくとらえることが期待される。また、遺伝子工学によって、例えば低リグニン木の開発などにもつながるであろう。従って、木化に関与する PO の基質特異性を明らかにすることには大きな意義がある。

一方、被子植物の単子葉類に属し、不斉中心柱を形成しているタケ類は、樹木木部と著しく形態・性格を異にしており、組織化学・生化学的にみてどのような成熟過程をたどるのかは非常に興味深いところである。例えば、樹木細胞は、形成層で生産され木部に付加された（肥大成長）のち、細胞壁の形成を短期間のうちに完了する。これに対して、タケ稈の成熟過程では、細胞の個数は発筈時に決定されており、細胞壁へのセルロース・リグニンなどの堆積やそれに関わる代謝が長期にわたる。そのため、タケは細胞壁の形成過程を調べたり、生体内反応に関与する酵素の抽出と分析を行うのに好都合な材料であると考えられる。

しかし、タケの細胞壁肥厚や木化といった成熟過程についての研究例は樹木木部に比べて少ない。樋口ら⁸⁾⁹⁾は、伸長中のモウソウチク稈について、フロログルシン-塩酸染色によりリグニンの堆積を調べ、組織化学・生化学的に検出したペルオキシダーゼ活性と比較した。しかし、稈の頂端から一定間隔で試料を採取しており、節間内での成熟の度合が上から下へと著しく異なっているタケ類特有の成熟過程を考慮にいれていない。また、彼らは木化の開始期に注目し、最終的にリグニンがどれだけ堆積するかについては述べていないが、細胞壁の木化過程を追跡するためには、リグニンが最も活発に堆積する時期を明らかにする必要がある。Itoh¹⁰⁾は、マダケについて、伸長終了後の稈についても追跡し、クラソンリグニン量などから、リグニン堆積の時期を推定している。

そこで、本研究では以上のことを考慮しながら、1990年5月2日より約1ヶ月毎に採取したモウソウチクについて、観察部位を第15節間の中央部付近に限定し、細胞種ごとに細胞壁肥厚と木化の進行の様子を顕微鏡で観察した。さらにその成熟過程での PO 活性の変化を SYR, DAB, GUC を用いて組織化学・生化学（電気泳動、分光分析）的に分析し、木化に関与する PO の SYR に対する特異性について検討した。

2. 試料と方法

2. 1 試料

京都大学理学部植物園で採取したモウソウチク (*Phyllostachys pubescens* Mazel) の第15節間（地面より数えて第14節と第15節との間）を試料とした。1990年4月に発筈し伸長したものを4月竹として5月2日に採取し、さらに5月中生長を続けたものを5月竹として6月2日に採取した。以下、同様に6月竹を7月2日、7月竹を8月2日、8月竹を9月11日、10月竹を11月1日に採取した。また10月13日には2年生竹の採取を行った。なお、試料相互の比較を確実にするため、

Table 1. Sample data of *Phyllostachys pubescens* Mazel.

Sample name	Apr.C.	May.C.	Jun.C.	Jul.C.	Aug.C.	Oct.C.	2yr.C.
Date of sampling ('90)	5/2	6/2	7/2	8/2	9/11	11/1	10/13
Culm height (cm)	389	1470	1507	1255	1420	1510	1328
15th internode	15th node height (cm)	194	247	297	335	262	199
	14th node height (cm)	174	220	269	301	236	176
	15th internode length (cm)	20	27	28	31	26	23
	Culm diameter (cm)	16.6	11.8	13.2	9.4	8.8	9.2
	Culm wall thickness (mm)	10.6	9.0	11.3	9.1	9.7	10.2

*15th internode is internode between 14th and 15th node from the base.

稈径が大きくて揃ったものを選んだ (Table 1)。試料は採取後、酵素の失活を防ぐために直ちに液体窒素で凍結して、ディープフリーザー (−90℃) 中で保存した。

さらに、91年1月10日に、当年生および4年生のモウソウチク (日当り良, 不良各2本ずつ) の第15節間を採取し、稈の成熟の個体差を光学顕微鏡で観察した。

2. 2 光学顕微鏡観察

凍結保存した各試料の軸方向中央部を、1%グルタルアルデヒドで固定後、凍結ミクロトームで厚さ30μmの横断面切片を作製した。

細胞壁の肥厚とリグニン堆積の様子を見るために、薄切した切片にスライドガラス上でフロログルシン (2%) - 塩酸 (6N) 反応を行い、5分間放置して検鏡した。

また、PO活性の分布を見るために、切片を0.01% H₂O₂に10分間浸したのち、SYR (15分), GUC (30分), DAB (25分) とそれぞれインキュベート (各1ml, 室温) し検鏡した。

なお、SYR反応液は、Harkin と Obst³⁾の方法を参考に、25mgのSYRを加温した少量のアルコール液 (エタノール: メタノール: イソプロパノール = 9:0.5:0.5 (v/v)) に溶解し、さらに同液を加え全量を25mlとしたものを用いた。GUC反応液は、Goldberg ら⁶⁾の方法を参考に、16.2mgのGUCに1/15M Na-K リン酸緩衝液 (pH 7.17) を加え、全量を25mlとした。DAB反応液は、パーオキシダーゼ発色基質 (協和メデックス, No. SS01) を用いた。

2. 3 パーオキシダーゼの分析

(1) 酵素の抽出

凍結した各試料の節間中央部付近から小片 (約10g) を切り出し、体積・重量を測定した。この小片をステンレス製乳鉢で凍結破碎した。Goldberg ら⁶⁾, Imberty ら¹¹⁾に従い、この試料粉を、1) 0.1M Na-K リン酸緩衝液 (pH 6.0), 2) 1 M NaCl 水溶液と0.5M NaHCO₃水溶液で交互に数回、3) 2.5% (w/v) ペクチナーゼ (MASEROZYME R-10 YAKULT) と0.5% (w/v) セルラーゼ (CELLULASE ONOZUKA R-10 YAKULT) を含む0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で順次抽出し、1) 2) 3) に含まれているPOを、それぞれ“細胞質性”, “細胞壁弱結合性”, “細胞壁強結合性” POと呼ぶことにした。各フラクションは脱塩して凍結乾燥し、重量を測定後、以下の実験に供した。

(2) アイソザイム分析

抽出した酵素の酸性アイソザイムを電気泳動¹²⁾により分離し、DABで染色してアイソザイム

バンドの位置を記録した。

(3) ペルオキシダーゼ活性のSYRによる検出

凍結乾燥試料約3.0mgを1 mlのH₂Oに溶解した。これに、SYR基質溶液（上述したSYR溶液と0.1M Na-Kリン酸緩衝液（pH 7.0）を1:1（V/V）で混合したもの）3 mlを加え、0℃で10分間静置した後、0.01% H₂O₂ 0.1 mlを滴下してよく攪拌し、反応を開始した。POの活性は、反応開始後530nmの吸光度の経時変化を測定することにより測定した。一方、ホースラディシュペルオキシダーゼ（Peroxidase (III) PEO-301 TOYOBO 105U/mg）の水溶液（0.1, 0.05, 1.0×10^{-2} , 1.0×10^{-3} , 1.0×10^{-4} %（w/v））各1 mlにSYR基質溶液を加えて、同様に530nmの吸光度変化を測定し、PO活性（U）-反応初期速度の検量線を作図した。

3. 結果と考察

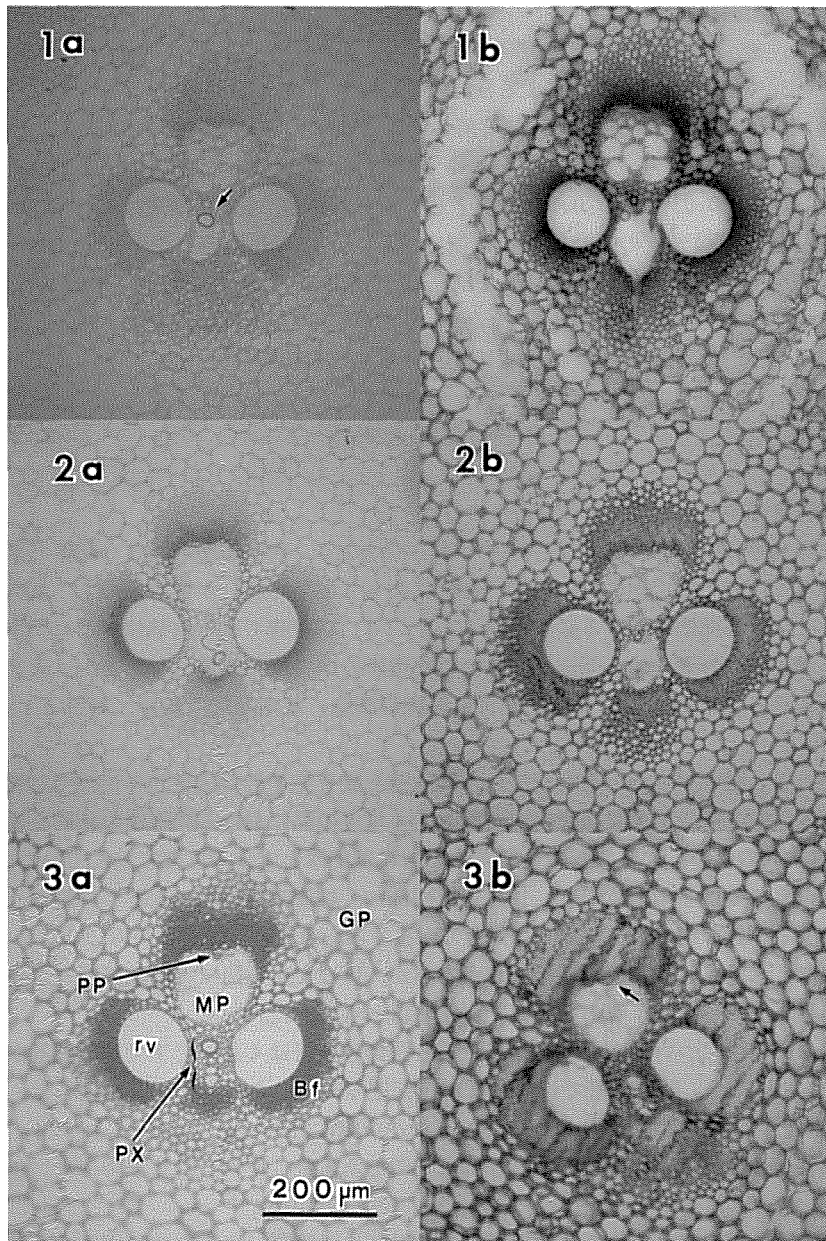
3. 1 細胞壁の肥厚と木化、およびPOの分布

モウソウチク稈の成熟は稈壁の厚さ方向で均一ではなく、表皮側から髓こう側へと漸進的に進行する。従って、同一切片内においても、部位によって成熟の度合いが異なるので、試料相互を比較するためには観察部位を揃える必要がある。そこで、本研究では生化学分析と対照出来るように、観察場所を節間の平均的な部位、すなわち稈壁厚の中央部に限定した。また、観察対象は原生木部環紋道管、後生木部網紋道管、維管束鞘繊維細胞、基本組織柔細胞、師部とした（Figs. 1-3）。

ところで、壁の肥厚や木化の進行状況は、細胞壁形成を完了した試料との比較で見極めることが必要である。そこで、1生育期を終えた稈と、4年生の稈における細胞壁の状態を検討した。その結果、日当りの良いものは当年生・4年生ともに壁肥厚と木化が高度に進んでいたのに対し、日当りの悪いものでは4年生竹でも、10月竹と同様に、維管束鞘外縁部、とくに髓こう側の繊維部や、柔細胞に壁肥厚と木化が完全でないものが多くみられた。このことから、モウソウチクは、周囲の環境によって成熟の程度には個体差があるが、ほぼ1生育期で細胞壁肥厚と木化を完了することが判明し、同時に完了時の状態を把握することもできた。

それぞれの細胞種についての観察結果を見ると、環紋道管は4月竹ですでに環紋部が肥厚・木化していた（Fig. 1a）。網紋道管では4月竹で壁が肥厚していた。リグニンの堆積は、4月竹で維管束鞘繊維と接する壁に始まり、5月竹でこれが全域に広がった（Fig. 2a）。一方、SYRは4月竹・5月竹で道管壁を染めてはいたが詳細は不明であった。なお6月竹以降には呈色しなかった。

維管束鞘の繊維細胞群における壁の肥厚は、4月竹の内縁側（維管束側）繊維から開始していた（Fig. 1a）。5月竹では内縁部では肥厚がほぼ終了し、繊維群の中央部でもかなり進行していた（Fig. 2a）。6月竹になると、これら繊維は内腔がほとんど埋まっており、最外縁部でのみ肥厚が進行中であった。フロログルシン-塩酸反応によるリグニン染色では、5月竹で内縁側繊維にのみ呈色がみられる（Fig. 2a）。内縁側では、6月竹で著しく呈色が強まり、リグニン堆積が6月中に進んだことがわかった。呈色部位は繊維群の徐々に外側へと拡大し、10月竹では維管束鞘全体が濃い赤色を呈した。稈壁中央部の維管束では、繊維鞘は表皮側（師部側）、2個の網紋道管側、そして髓こう側（原生木部側）の4ヶ所に区別されるが、髓こう側の繊維群では、他の繊維群より発達が遅れる傾向があった（Fig. 3）。SYRは4月竹の内縁部繊維壁を濃い紫色に染



Figs. 1-3 Cross-sectional views of a developing vascular bundle at the middle of the culm thickness on April Culm (1), May Culm (2) and July Culm (3), respectively. Series a are stained with Phloroglucin-HCl to detect the cell wall thickening and lignification, while the peroxidase distribution are traced in series b stained with SYR. Arrow in Fig. 1a shows the thickened and lignified annular vessel, and in Fig. 3b shows the reaction in proto phloem by SYR. Abbreviations: Bf (bundle sheath fiber), GP (ground-tissue parenchyma), MP (meta phloem), PP (proto phloem), PX (proto xylem), rv (reticulate vessel).

色したことが注目される (Fig. 1b)。そして中央部や外縁部でもすでに呈色が認められる。これらの呈色部位を高倍率で観察すると細胞間層が染まっていた。5月竹になると呈色はより外側の繊維壁に移り、壁肥厚の進んだ内縁部では呈色反応は消失していた (Fig. 2b)。6月竹では肥厚の進んでいない最外縁部だけで呈色し、7月竹では、髄こう側繊維部の最外縁部を除いて呈色はない (Fig. 3b)。8月竹以後、SYRの呈色は繊維では認められない。SYRの呈色部位を詳細にみると、二次壁の肥厚開始期に、細胞間層が濃く染まるが、二次壁での呈色は弱い。

基本組織柔細胞の細胞壁肥厚がはじまるのは7月竹で、それまでは薄壁のままである。その後、8月竹・10月竹で肥厚が進むが、薄壁のままの細胞が2年生竹でも残っていた。フロログルシン-塩酸反応の呈色は7月竹から認められるが、8月竹～10月竹で濃度が増加した。呈色しない薄壁細胞も存在した。SYRの呈色は4月竹ですでに認められ7月竹まで持続した。8月竹では呈色しない部分が多く、10月竹・2年生竹では呈色しなかった。

師部については、4月竹以降細胞壁厚に変化はみられず、フロログルシン-塩酸反応も起こらなかった。しかし、SYRは、6月竹・7月竹で原生師部の細胞内腔全体が呈色した (Fig. 3b)。

GUCによるPO活性の検出の結果は、以下のような点でSYRの場合と異なった。すなわち、5月竹で原生師部細胞内腔に発色がみられ、6月竹でも内縁・中央部の繊維に呈色が残っている。さらに、7月竹の基本組織柔細胞に呈色しないものがある。また、8月竹、10月竹、2年生竹でも師部に呈色が残っている、などである。

一方、DABは4月竹ですでに師部、網紋道管、原生木部、繊維、基本組織柔細胞などほとんど全ての細胞に顕著な呈色がみられた。6月、7月、8月、10月竹ではSYRと似た呈色を示すが、師部の細胞壁に強い活性がみられ、SYRの場合と異なっていた。このように、DABではSYRやGUCに比べて、4月竹など若い程での呈色が組織全体で著しく、その他の時期では組織による染色強度の差異や季節変化が少なく、呈色の反応を個々の組織の壁肥厚や木化と関係付けられなかった。

3. 2 アイソザイム分析

DAB染色による各フラクションのアイソザイムパターンをFig. 4に示す。DABはPOの一般的な基質とされているので、ここで検出されたPO中に木化に関与するPOも含まれていると考えられる。

細胞質性POでは、7月竹以外は、よく似たパターン (Fig. 4 ①～⑧) である。細胞壁の肥厚やリグニン堆積との関連が注目される細胞壁 (弱・強) 結合性POについてみると、7月竹は特異的なパターン (⑨⑩⑭⑮) を示している。特に細胞壁弱結合性POについては、維管束鞘繊維の壁肥厚が著しい4月竹と基本組織柔細胞で著しい8月竹においても、⑨⑩と同一であると思われるアイソザイム (⑪⑫⑬) が現れており、時期による不連続性がみられた。これらのアイソザイムはDABで検出されたものであるが、⑨～⑬のアイソザイムの出現の時期は、前記の組織化学的手法においてSYRによる呈色の時期と対応しており、このアイソザイムがSYR酸化POに相当する可能性が高い。

3. 3 SYR酸化PO活性の季節変化

分光測光による測定値を相互に比較するために、各試料の粉碎前の体積値により、単位体積当りに含まれるSYR酸化PO量を算出し、3種のPOの絶対量で表示した (Fig. 5)。

細胞質性POでは、4月竹で最大であり、壁肥厚と木化が進行する時期には減少し7月竹で最

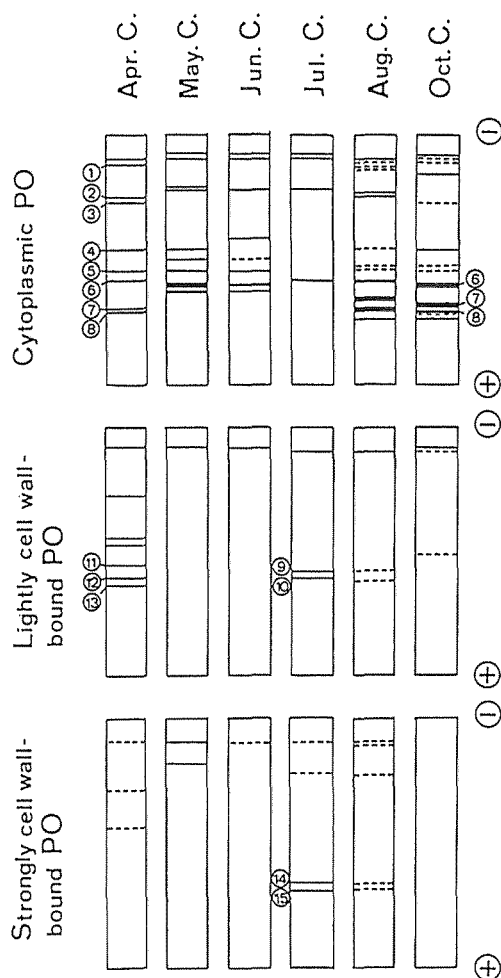


Fig. 4 Isoenzyme patterns of peroxidase in 15th internode separated into Cytoplasmic, Highly cell wall-bound and Strongly cell wall-bound fractions, stained with DAB.

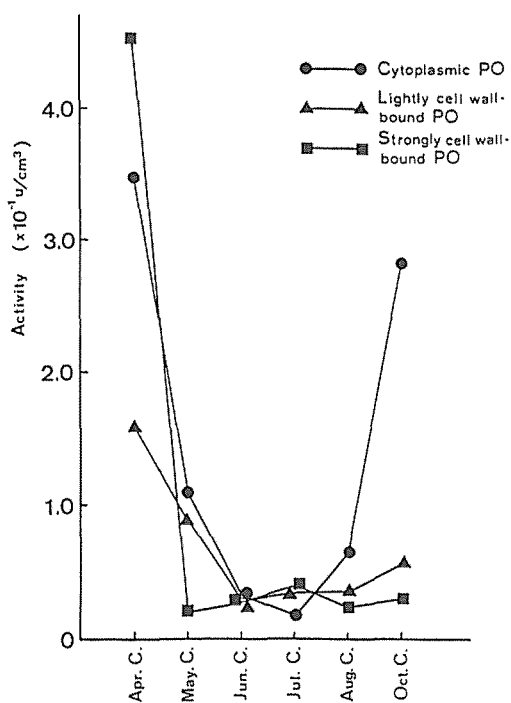


Fig. 5 Activities of SYR oxidative peroxidase separated into Cytoplasmic, Lightly cell wall-bound and Strongly cell wall-bound fractions. Activities were estimated using horseradish peroxidase as a standard.

小となった。そして細胞壁形成が低調になる10月で再びPO量が多くなっている。従って、このフラクションのPOについては、木化に関わるPOではなく、春期における細胞活動全体に関わるPOや、秋期における成分貯蔵に関与したりそれ自体が蓄積されているPOである可能性が高い。

これに対し、細胞壁弱結合性 PO では、6 月竹から 8 月竹にかけてほぼ一定かやや増加傾向にある点が細胞質性 PO とは異なっている。

細胞壁強結合性 PO は、4 月および 7 月に極大になっており、繊維と柔細胞の壁肥厚開始期と一致している。

3. 4 考 察

モウソウチク科における各種細胞の成熟過程、すなわち壁の肥厚と木化の過程、そして PO 活性の発現・分布を顕微鏡的に追跡した結果と、3 段階の抽出液に含まれる PO の特徴（活性量・アイソザイムパターン）を分析した結果とを比較検討すると、つぎのような諸点が注目される。

1) 樋口ら⁸⁾⁹⁾や Itoh¹⁰⁾は、リグニンの堆積開始は細胞壁肥厚中であるとしているが、これは細胞間層のリグニンである。しかし、木化現象全体をとらえるならば、リグニンの大部分が堆積する二次壁の木化が重要な意味を持つであろう。本研究の観察の結果から、網紋道管、維管束鞘繊維細胞、基本組織柔細胞の各々の細胞壁では、それぞれ発達の時期は異なるが、細胞壁の肥厚と二次壁に多量のリグニンが供給される時期とは、およそ 1 ヶ月のずれがあることになる。この長期間のずれは、壁の肥厚と木化の現象を今後さらに詳しく追跡するのに活用できるかもしれない。

2) 木化に特異的であると期待される SYR の呈色は、細胞壁の肥厚開始期に細胞間層領域に明瞭に検出されたが、リグニンが盛んに集積する時期には逆に呈色が消失していた。また、細胞壁性の PO についても、繊維と柔細胞の壁肥厚開始期に活性が高かった。リグニンの代謝に関与する酵素は、リグニンの実際の堆積に先だって壁に供給されて当然ではあるが、そのずれが 1 ヶ月以上にも達することは問題となろう。またリグニンの大部分が堆積する二次壁ではなく、細胞間層に活性が検出されたことも注目される。細胞間層におけるリグニン堆積は非常に早い時期に進行するので、SYR で検出されている PO が、二次壁リグニンではなく、細胞間層リグニンの代謝だけに関与している可能性があろう。さらに柔細胞壁では、細胞の伸長が完了した直後（節間基部では伸長中であるが、供試した節間中央部ではすでに停止している）の 4 月竹で、すでに呈色が認められているが、この細胞間層の木化が始まるのは数カ月も遅れる。非常に未熟な細胞壁にはフェルラ酸などによる糖鎖の架橋構造があるとされているが、ここで検出されている PO はフェルラ酸などのフェノール成分の縮重合に関与している可能性もあろう。一方、原生師部の細胞内腔における SYR の呈色は、リグニン堆積とは関係づけることができない。この呈色部位ではカロースが充填していると考えられるが、それがフェノール成分を含む場合には、前述の仮定が適用できるかもしれない。いずれにしても SYR の反応は DAB や GUC に比べて興味深いものであり今後さらに検討する必要がある。

3) 抽出された多種類の PO は、モウソウチク科の大部分を占めている維管束鞘繊維と基本組織柔細胞に含まれていたと考えることができる。これらの PO の中には、その活性発現や活性量の変化が、繊維や柔細胞の成熟過程と対応するものがあった。組織化学と生化学的分析によって、木化に関与する PO がかなり絞り込まれてきたといえる。

引 用 文 献

- 1) GASPAR, T., PENEL, C., THORPE, T. and GREPPIN, H.: Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Univ. of Geneva. Centre de Botanique. Geneve. pp324, 1982
- 2) HIGUCHI, T.: Biochemical Studies of Lignin Formation. II. Physiologia Plantarum. 10. 621-632, 1957
- 3) HARKIN, J. M. and OBST, J. R.: Lignification in Tree: Indication of Exclusive Peroxidase Participation. Science. 180. 296-298, 1973

- 4) CATESSON, A. M., CZANINSKI, Y. and MONTIES, B.: Caractères histochimiques des peroxydases pariétales dans les cellules en cours de lignification. *Comptes rendus Acad. Sci.* **286D**. 1787-1790, 1978
- 5) STICH, K. and EBERMANN, R.: Investigation of the Substrate Specificity of Peroxidase Isoenzyme Occurring in Wood of Different Species. *Holzforschung*. **42**. 221-224, 1988
- 6) GOLDBERG, R., CATESSON, A. M. and CZANINSKI, Y.: Some Properties of Syringaldazine Oxidase, a Peroxidase Specifically Involved in the Lignification Processes. *Z. Pflanzenphysiol.* **110**. 267-279, 1983
- 7) PANG, A., CATESSON, A. M., FRANCESCH, C., ROLANDO, C. and GOLDBERG, R.: On Substrate Specificity of Peroxidases Involved in the Lignification Process. *J. Plant Physiol.* **135**. 325-329, 1989
- 8) 樋口隆昌・川村一次・石川 宏: 筍におけるリグニンの生成について. *日本林学会誌*. **35**. 258-263, 1953
- 9) 樋口隆昌・川村一次・山崎 登・森本市朗: 筍におけるリグニンの生成について (第V報) パーオキシダーゼによるコニフェリール・アルコールの縮合に及ぼすアスコルビン酸-グルタチオン系の阻害作用について. *日本林学会誌*. **37**. 502-507, 1955
- 10) ITOH, T.: Lignification of Bamboo (*Phyllostachys heterocycla* Mitf.) During its Growth. *Holzforschung*. **44**. 191-200, 1990
- 11) IMBERTY, A., GOLDBERG, R. and CATESSON, A. M.: Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of ligninification. *Planta*. **164**. 221-226, 1985
- 12) 津村義彦・大庭喜八郎: スギ針葉のパーオキシダーゼアイソザイムの遺伝子分析. *筑大演報*. **3**. 31-57, 1987

Résumé

The relation between cell wall thickening and lignification were examined on various types of cells of bamboo culms being collected from the 15th internode every months from Spring (Table 1). Peroxidase (PO) activity was observed on the cells by histochemical methods using some substrates such as syringaldazine (SYR) which is expected to be specific to the lignification-PO. On the other hand, three types of POs, namely, cytoplasmic, lightly cell wall-bound and strongly cell wall-bound ones, which were extracted from the culms, were characterized by electrophoretic and spectrophotometric assays.

According to the microscopic observation, the maturation of annular vessels has already completed in the April culm on which elongation of the observed position has stopped, whereas walls of reticulate vessels was thickened in April and lignified in May. The cell wall thickening of the bundle sheath fibers started from the inner (vascular) -side on April and proceeded to the outer (parenchyma) -side by the end of July. Increase of lignin content on each cell wall was shown to be delayed about one month from the thickening (Fig. 2a). PO activity with syringaldazine (SYR-PO) was stained clearly on the intercellular layer of fibers at the just-beginning of cell wall thickening preceding one month to the initiation of lignification (Fig. 1b and 2a). While parenchyma cells of the ground tissue have thickened their wall from July to October, the lignification was delayed one month or more to the thickening, as well the case of fibers. SYR-PO was already detected on the April culm and decreased at the beginning of the lignification.

According to the electrophoretic and spectrophotometric assays, some PO isoenzymes seem to be related to the lignification of fibers and parenchyma cells, and the change of quantity of cell wall-bound POs was also consistent with the histochemical observation. Judging from these results, SYR-PO is strongly suggested to be participated in the lignification not on the secondary

wall but on the intercellular layer.