

スギの二次師部構成要素の細胞壁構造

宮川 誠・藤田 稔・佐伯 浩・原田 浩

The Cell Wall Structure of the Secondary Phloem Elements in
Cryptomeria japonica D. DON

Makoto MIYAKAWA, Minoru FUJITA, Hiroshi SAIKI
and Hiroshi HARADA

目	次
要 旨.....	181
1. まえがき.....	182
2. 材料と方法.....	182
3. 観察結果と考察.....	183
引用文献.....	186
Résumé	187

要 旨

スギの二次師部の構成要素である 師部繊維, 師細胞, 柔細胞および石細胞の 各二次壁について, 透過型, 走査型電子顕微鏡, 偏光顕微鏡を使って観察し, 次の結果を得た。

(1) 師部繊維, 師細胞および軸方向柔細胞はそれぞれ接線方向に列状に並び, その配列には, 師細胞—師部繊維—師細胞—軸方向柔細胞の順の小週期と, 幾つかの小周期からなる大周期とが認められた。

(2) 師部繊維には厚壁で木化が均一に進んでいるもの (Type-1), 厚壁であるが内腔側が未木化のもの (Type-2) および薄壁のもの (Type-3) とが認められた。それらの二次壁はいずれも内層・外層の二層からなっていた。Type-1 および 2 の繊維のフィブリル傾角を偏光顕微鏡で測定したところ, 内層は約45度, 外層は約60度であり, 両者のフィブリルの傾斜方向は互いに反対であった。

壁の薄い Type-3 の繊維では, 透過型電子顕微鏡で観察したところ, 内層・外層のフィブリル配向は, それぞれ厚壁の繊維のものと同じ配向を示した。Type-3 の繊維では木化は外層の外側のみで認められた。

(3) 師細胞の二次壁は木化せず, 多くのラメラからなっていた。師細胞の側壁に存在する師域は10個前後の *subunit* から構成され, 1 個の *subunit* はさらに数個の師孔からなっていた。

(4) 軸方向柔細胞の二次壁は, 師細胞と同じく, 多くのラメラからなっていた。柔細胞の側壁の pit は二・三の領域からなり, その領域間にはマイクロフィブリルの束が仕切として存在していた。

(5) 石細胞は厚壁の師部繊維の列にあらわれ, その二次壁は多くの厚い層からなっていた。

1 ま え が き

師部の微細構造に関する研究は、師要素内の原形質の変動や *slime body* と呼ばれている内容物の挙動、物質転流に関する論文等が主流を占めている。^{1~5)} その反面、二次師部構成要素である、師要素、師部繊維、柔細胞などの細胞壁の微細構造の研究例は、木部のそれに比べて少ないのが現状である。

二次師部の構造に関する最近の研究では、とくに樹木のそれについては、重松による針葉樹の樹皮の構造に関する論文や、伊東等によるスギの二次師部の構成要素の配列と分化に関する報告、また SRIVASTAVA⁹⁾ による *Pinus strobus* の二次師部内の師細胞二次壁の微細構造についての研究等があるだけで、今後さらに研究を進めていく必要があると思われる。

そこで筆者等は、スギの二次師部構成要素である師部繊維、師細胞、柔細胞、石細胞の各二次壁について壁層構造、木化度を検討した。

なお、この研究の実施にあたって、御協力、御助言して下さった当農学部木材構造学研究室各位に心からお礼申し上げる。また、この報告の一部は第23回日本木材学会大会（昭和48年4月於京都）で口頭発表した。

2 材 料 と 方 法

材料には、生長期のものと休止期のものを使用した。

生長期のものとしては1972年5月28日と同年12月25日の2回にわたって農学部演習林本部苗畑に植栽されているスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 若木から試片を採取し、一部はグルタールアルデヒド・四酸化オスmium二重固定、あるいは、過マンガン酸カリウム固定した後、常法により洗浄、脱水、置換の処理を経て、エポキシ樹脂で包埋した。

包埋した小ブロックからウルトラミクロトームで1 μ 厚、2 μ 厚の薄切片を作製し、位相差顕微鏡、偏光顕微鏡で師部要素の配列や師部繊維のフィブリル傾角を調べた。

さらに、各要素の細胞壁構造を調べるためにウルトラミクロトームで0.1 μ 厚の超薄切片を作製し、この切片は脱エポキシ・シャドウイングや、脱リグニン・シャドウイングして、透過型電子顕微鏡 (JEM-7) 用に供試した。

一方、無処理の試片から柾目面を含んだ小さなブロックを作製し、カーボンと金をコーティングして走査型電子顕微鏡 (JSM-U3) で師細胞の師域を観察した。

また別に光学顕微鏡用の休止期の試料として同年12月5日、同演習林本部苗畑に植栽されている17年生のスギから試片を採取し、スライディングミクロトームで20 μ ~30 μ 厚の木口、柾目切片を作製した。これらの切片を塩酸フロログルシン溶液、塩化亜鉛ヨウ素溶液、コラリン溶液¹⁰⁾で染色し、光学顕微鏡で観察した。これは師部要素の木化度を調べたり、師細胞を同定確認するため行なった。

この柾目切片のうち、一部は一段レプリカ（白金—パラジウム・シャドウイング、カーボン補強）をつくって透過型電子顕微鏡で観察するとともに、他の一部はJEFFREY氏液で解繊して位相差顕微鏡で観察した。

3 観察結果と考察

3-1 二次師部構成要素の配列と師部繊維の種類

スギの木口と柾目の薄切片 (2μ 厚) を位相差顕微鏡で観察したところ、形態の異なる数種の細胞が規則性をもって配列しているのが認められた (Photo 1, 2)。すなわち Photo. 1 に示されるように、接線方向には、形態のよく似た細胞が配列し、半径方向にはこれら形態の異なる細胞が周期性をもって配列していた。さらに、これらの細胞の種類をコラリン染色、塩酸フロログルシン反応などで同定した結果を考慮して、模式的に示したものが Fig. 1 である。つまり、細胞壁の厚さには後述するように変異があるが、比較的厚壁で木化した師部繊維の列、薄壁の師細胞の列、木口面でも柾目面でも長楕円状に観察される柔細胞の列によって周期が構成されていた。

師部繊維については、伊東^{7,8)}が指摘したように、薄切片の位相差顕微鏡写真 (Photo. 1) で、壁の厚いものと壁の薄いものとに区別できた。しかし厚い壁のものは、塩酸フロログルシン反応 (Photo. 3) と塩化亜鉛ヨウ素染色による木化度の違いから、さらに2種に区別できた。これらの師部繊維の種類を次に説明する。

非常に厚い壁で半径方向径が接線方向径よりも長い傾向をもち、細胞壁の内腔付近まで木化が進んでいるものを Type-1、厚い壁ではあるが、ほぼ方形の断面を示し、細胞壁の外側の部分だけが強く木化しているのを Type-2、薄壁で半径方向径が非常に小さく、木化度の小さいものを Type-3 と便宜上名づけると、それらも、また周期をもっていた。

この周期と前述した構成要素の種類による周期を同時に示すと Fig. 2 のようになる。すなわちスギの二次師部は、師部繊維を一種類とみなしたときには、Cycle-I で示される— (柔細胞—師細胞—師部繊維—師細胞)—の基本的周期と Cycle-II で示されるように三種の師部繊維による樹皮側から形成層へ— (1列の Type-1、—1列の Type-2、—2, 3列の Type-3)—の大周期からなっていた。小周期は、Type-1 の師部繊維の列の外側で例外的に乱れることがあり、垂直細胞間道の周囲でも不規則な配列が観察された (Photo. 4)。

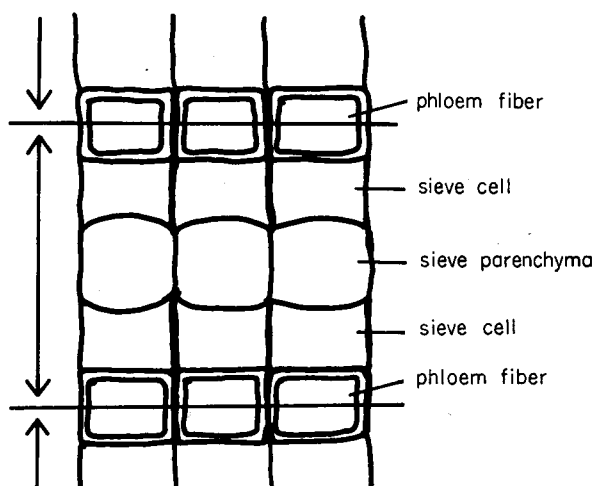


Fig. 1. A schematic diagram showing the standard cellular sequence in the secondary phloem of *Cryptomeria japonica* D. Don.

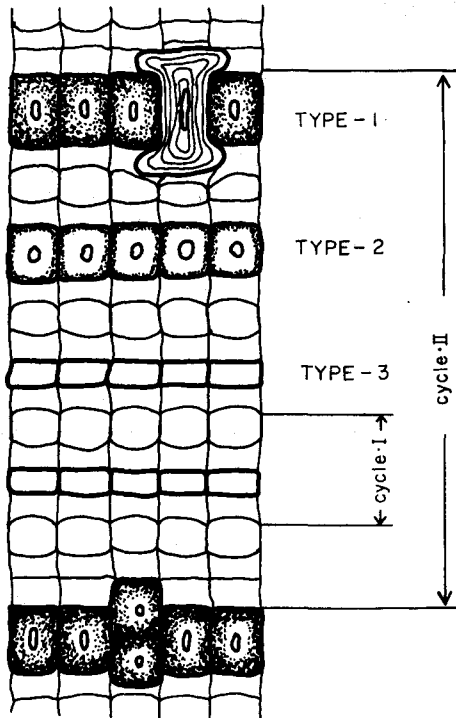


Fig. 2. A schematic diagram showing cell cycles of two kinds and types of phloem fiber. Type-1 fiber, thick-walled, strongly lignified; Type-2 fiber, thick-walled, but less lignified; Type-3 fiber, thin-walled. The long cycle (Cycle-II) is considered to correspond to an annual growth layer of the phloem.

化度を一応調べることができるので、Photo. 5, 6 を比較すると、Type-1 のものは、細胞壁全体が一樣に濃く染まっており、Type-2 のものは、外層は濃く染まっているのに、内層は、あまり染まらなかった。

薄壁の Type-3 のものについては、過マンガン酸カリウム染色では、わかりにくいので、超薄切片を JEFFREY 氏液で脱リグニンし、エッチングしたところ、Photo. 8 に示す様に外層の外側のみ、エッチングされた薄い空隙の層がみられた。したがって Type-3 の場合、外層の外側のみが木化するものと思われる。

これら電子顕微鏡で観察した木化の度合いは、前述した塩酸フロログルシン反応と塩化亜鉛ヨウ素染色による光学顕微鏡の結果 (Photo. 3) とよく対応していた。

次に、これらの師部繊維の内、外二層のフィブリル配向について述べる。Type-1 と Type-2 は、 2μ 厚の柾目薄切片を偏光顕微鏡で、Type-3 は、超薄切片法とレプリカ法を使って透過型電子顕微鏡で観察した。

Photo. 9 は Type-1 の師部繊維を少し斜めにそいだ薄切片で、隣接する 3 個の繊維の内、外二層のそがれた断面が観察される。そこで $530\text{ m}\mu$ の検板を入れて、これらの壁層の相加相減現象を観察したところ、Fig. 3 に示すように、内層、外層のフィブリル配向は互いに反対で

また Type-1 の列の中には細胞壁の著しく大きい不定形の厚壁の細胞が時々観察された。この細胞は石細胞と考えられる (Photo. 1)。

ところで、Fig. 2 で示した Cycle-I は、スギの二次師部構成要素の基本的周期と考えられる。一方は、Cycle-II 生長期と休止期の試料の観察から、スギの二次師部の年輪構造とみなすことができる。

3-2 二次師部構成要素の細胞壁構造

前項で述べた三種の師部繊維、師細胞、柔細胞、石細胞の細胞壁構造について得られた結果は次の通りである。

(A) 師部繊維

過マンガン酸カリウム固定した試料の超薄切片やグルタルアルデヒド・四酸化オスミウム二重固定した試料の超薄切片の脱包埋・シャドウイングしたものを透過型電子顕微鏡で観察したところ、Type-1, Type-2, Type-3 の師部繊維は全て二層構造を示した (Photo. 5, 6, 7)。

Type-1 は、とくに内層が厚く、内腔が殆んど見られないほど肥厚していた (Photo. 5)。

Type-2 も同様であったが、内層の肥厚は、やや少なかった (Photo. 6)。Type-3 は、内層、外層ともに、Type-1, Type-2 に比べて非常に薄かった。

過マンガン酸カリウム固定の試料からは、木

あった。また主消光位から、そのフィブリル傾角を測定したところ、細胞長軸に対して内層は約45度、外層は約60度を示した。Type-2の師部繊維もType-1のものと同様であった。

Type-3の師部繊維のフィブリル傾角は、偏光顕微鏡では測定できなかったで、一段レプリカ法により内腔側から観察すると、内層のフィブリルは、細胞長軸に対して約45度に走っていた(Photo. 10)。さらに過マンガン酸染色して斜めにそいだ超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察したところ、Photo. 11に示すように、内層の約45度に対して外層は、その反対方向に約60度をもって配向していることが判明した。

また師部繊維のpitについては、Photo. 2に示されるように、Type-1、Type-2のものでは、内層のフィブリルに平行に約45度に傾斜したスリット状の孔口をもち、夏材仮道管のそれによく似ていた。Type-3のものについては、pitは観察していない。

ところで、光学顕微鏡観察から、師部繊維を木化度と形態上の差から、三つの型に区分したが、細胞壁の微細構造に関する限り、全て同じ壁層構造とフィブリル配向を示すことは、興味深いことである。木化度や形態の差が、このように何故、師部繊維に生じたかは、季節変化とも関連していると思われるが、これに関しては、師部繊維の分化経過も含めて、さらに検討する必要がある。

なお、師部繊維の壁層のフィブリル配向がS-helixかZ-helixかについては、検討していない。

(B) 師細胞

脱包埋・シャドウィングした超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察すると、師細胞の二次壁は、師部繊維と大きく異なり、多くのラメラからなっていた(Photo. 12)。木化については、塩酸フロロ

グルシン反応からも、超薄切片のエッチング処理(Photo. 8)によっても、未木化であることが観察された。師域については走査型電子顕微鏡で、その微細構造を観察した結果、Photo. 13に示されるように、1個の師域は、ほぼ10個前後のsubunitからなり、その1個のsubunitは、さらに数個の師孔から構成されていることがわかった。

ところでSRIVASTAVA⁹⁾は*Pinus strobus*の二次師部における師細胞の二次壁がラメラ構造を示すということを報告しているが、スギ属やマツ属での師細胞壁のラメラ構造が師細胞全般に共通して観察されるかどうかは、きわめて興味深い問題と思われる。

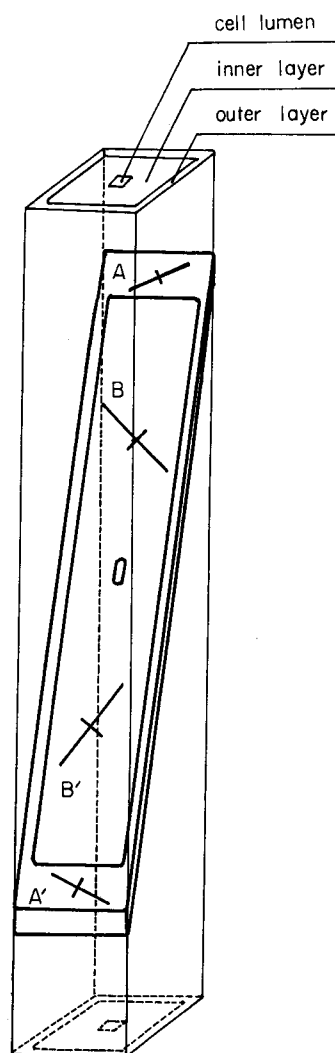


Fig. 3. A schematic diagram showing the thin section cut oblique to the axis of Type-1 fiber and major extinction position of the layers in it. Fibril angle of the outer layer can be determined in A or A', and that of the inner layer in B or B'.

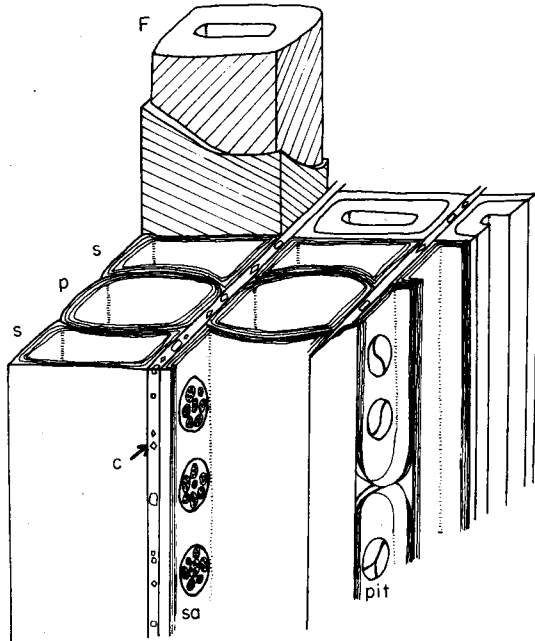


Fig. 4. A schematic diagram showing the secondary wall structure of phloem elements of *Cryptomeria japonica* D. Don. F, fibers, thin- or thick-walled; s, sieve cells; p, axial parenchyma cells; sa, sieve area; c, crystals.

細胞壁中のシュウ酸石灰の結晶については、伊東が指摘したように半径壁の中間層に存在していた。この結晶の方向性に関して、 2μ 厚の木口、および柾目薄切片を、 $530\text{ m}\mu$ の検板を入れた偏光顕微鏡で観察したところ、半径壁の中間層に点々と存在している多くの結晶の Z' の方向が木口面でも柾目面でも全て同一方向であることを示した。このことは、細胞壁中に結晶が何らかの配向をもって存在していることを意味する。

以上、光学顕微鏡、電子顕微鏡による細胞壁構造についての観察結果をまとめて、模式図を描くと Fig. 4 のとおりである。ただし各要素の一次壁については、全く検討していないし、また放射柔細胞の細胞壁は全く観察対象に入れていない。これらは、今後の研究課題である。

(C) 軸方向柔細胞

同じく脱包埋・シャドウイングした超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察したところ、柔細胞の二次壁も、師部細胞と同じく、多くのラメラからなっていることがわかった (Photo. 14)。木化についても、師細胞と同様である。

柔細胞の pit を一段レプリカ法を使って、内腔側から観察すると、Photo. 15 に示すように、pit は二、三の領域からなり、その領域の間には、ミクロフィブリルの束が走向しているのが認められる。pit の中にある小粒状のものは、原形質連絡の跡と思われる。

(D) その他

Photo. 16 は脱包埋・シャドウイングした超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した石細胞の一部の強拡大写真である。細胞の形は不定形であるが、その細胞壁の一部は、このように厚い壁層が何枚も積み重なっていた。これらの壁層の木化やフィブリルの配向については観察していない。

引用文献

- 1) ESAU, K.: Aspects of ultrastructure of phloem, In The formation of wood in forest trees, ed. by ZIMMERMANN, M. Academic press 51-63, (1964)
- 2) FALK, H.: zur Herkunft des Siebröhrenschleimes bei *Tetragonia Expansa* Murr, Planta (Berl.), **60**, 558-567, (1964)
- 3) ZEE, S. Y.: Fine structure of the differentiating sieve element of *Vicia faba*, Aust. J. Bot., **17**, 441-456, (1969)
- 4) WOODING, F. B. P.: The development of the sieve elements of *Pinus Pineae*, Planta (Berl.), **69**, 230-243, (1966)
- 5) WOODING, F. B. P.: Fine structure of callus phloem in *Pinus Pineae*, Planta (Berl.), **83**, 99-110, (1968)
- 6) 重松頼生: 針葉樹の樹皮の構造, 京都大学学位論文, (1965)

- 7) ITOH, T., S. HAYASHI and J. KISHIMA: Cambial activity and radial growth in Sugi trees (Japanese *Cryptomeria*), *Wood Res.*, **45**, 23–45, (1968)
- 8) 伊東隆夫: スギ樹皮の構造と発達, 第21回木材学会大会研究発表要旨, (1971)
- 9) SRIVASTAVA, L. M.: On the ultrastructure of Cambium and its vascular derivatives. III. The secondary walls of the sieve elements of *Pinus strobus*, *Amer. J. Bot.*, **56**(3), 351–361, (1969)
- 10) 木島正夫: 植物形態学実験法, 広川書店, (1965)

Résumé

The authors examined the secondary wall structure of fibers, sieve cells, axial parenchyma cells and stone cells (sclereids) in the secondary phloem of *Cryptomeria japonica* D. DON.

1) Elements in the phloem were arranged respectively in uniseriate tangential bands (Photo. 1) and radial cell cycles of two kinds were found in them, i.e. the short cycle composed of four bands, sieve cell—fiber—sieve cell—parenchyma cell and the long cycle composed of several short cycles (Fig. 2).

2) Some of the fiber bands had thick-walled fibers and the others had thin-walled ones. The secondary wall in both fibers was composed of two layers, i.e. the outer layer and the inner layer (Photo. 5, 6, 7).

3) In the thick-walled fibers, the fibril angle of the inner layer measured by polarizing microscope was about 45° to the cell axis, and that of the outer layer was about 60° . In the outer layer fibrils inclined in the opposite direction to those in the inner layer (Photo. 9).

Examination with phloroglucinol-hydrochloric acid staining (Photo. 3) in light microscopy, and potassium permanganate staining (Photo. 5, 6) in electron microscopy showed that the outer layer was strongly lignified but the inner layer had considerable variation in lignification among the tangential fiber bands. In the less lignified fiber bands, the lumen side zone of the inner layer was not lignified.

4) Electron microscopy also revealed that the fibrillar orientation of the two layers in thin-walled fibers was similar to that in thick-walled ones (Photo. 10, 11), and lignification of the wall, investigated by the delignification method of ultrathin sections, was restricted to the outer region of the outer layer (Photo. 8).

5) The secondary wall of the sieve cell was composed of many lamellae (Photo. 12) and was not lignified. The sieve area consisted of subunits and each subunit possessed several sieve pores.

6) The secondary wall of the axial parenchyma cell was also composed of many lamellae and was not lignified. The pit on the lateral wall was composed of two or three areas, and between these areas a bundle of microfibrils existed as a boundary.

7) Stone cells sometimes occurred in the thick-wall fiber bands. Their secondary wall was composed of many thick lamellae (Photo. 16).

The cell wall structures of the phloem elements mentioned above were diagrammatically represented in Fig. 4.



Photo. 1. A cross section of the secondary phloem photographed in phase contrast. Note the regular arrangement of elements. F, thick-walled fibers; f, thin-walled fibers; s, sieve cells; p, parenchyma cells; st, stone cell (sclereid).

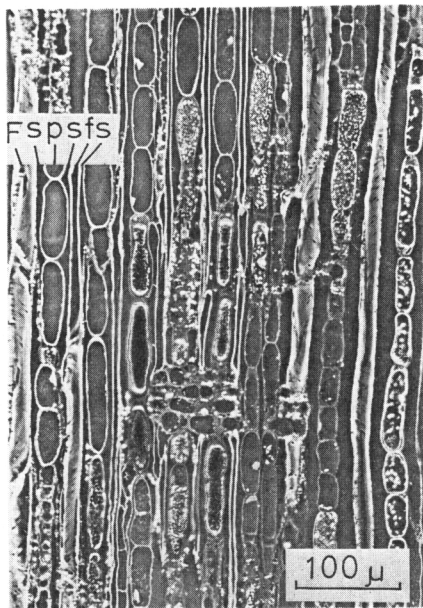


Photo. 2. A radial section of the secondary phloem. Note the orientation of pit aperture in the thick-walled fibers. F, f, s, p, see Photo. 1.

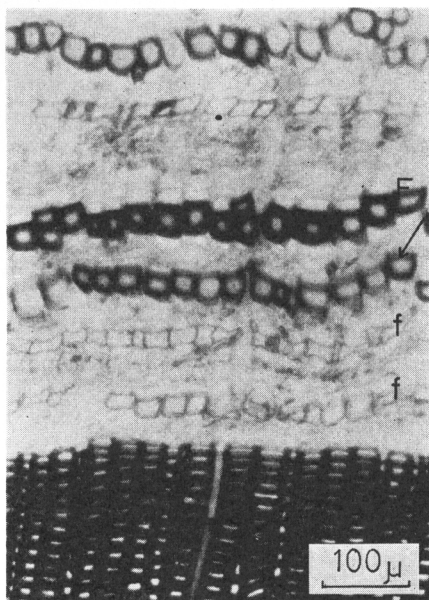


Photo. 3. A cross section stained with phloroglucinol-hydrochloric acid. Note the difference in lignification among tangential fiber bands. Arrow indicates a band of the thick-walled fibers, but less lignified.

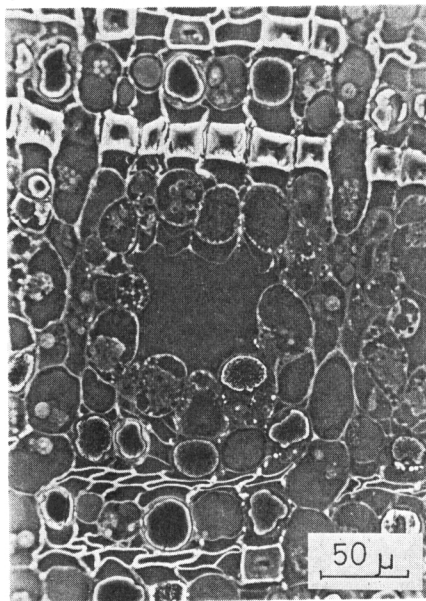


Photo. 4. A cross section of the axial intercellular canal surrounded by epithelial cells.



Photo. 5. A cross section of a phloem fiber (Type-1). The secondary wall is composed of two layers stained deeply and uniformly with potassium permanganate. Wo, the outer layer; Wi, the inner layer; Type-1 fiber, thick-walled and strongly lignified fiber.

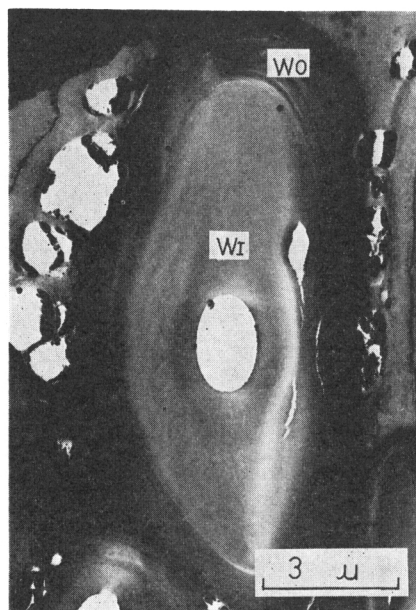


Photo. 6. A cross section of a phloem fiber (Type-2). The secondary wall is composed of two layers, but the inner layer (Wi) is not stained so deeply as the outer layer (Wo). Type-2 fiber, thick-walled but less lignified fiber.

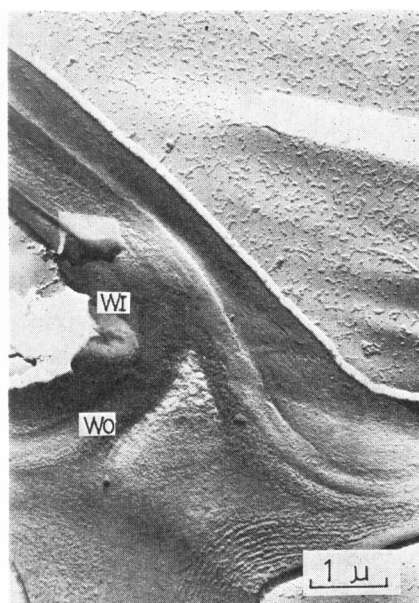


Photo. 7. A cross section of phloem fibers (Type-3). Note the two layers (Wo & Wi) in the secondary wall. (Gutaraldehyde-osmium fixed, Pt-Pd shadowed after removing epoxy resin).



Photo. 8. A cross section of phloem fibers (Type-3). The outer region of the outer layer (arrow) was delignified (shadowed section after treatment by Jeffrey's solution). Type-3 fiber, thin-walled, lignification occurs only in the outer region of the wall.

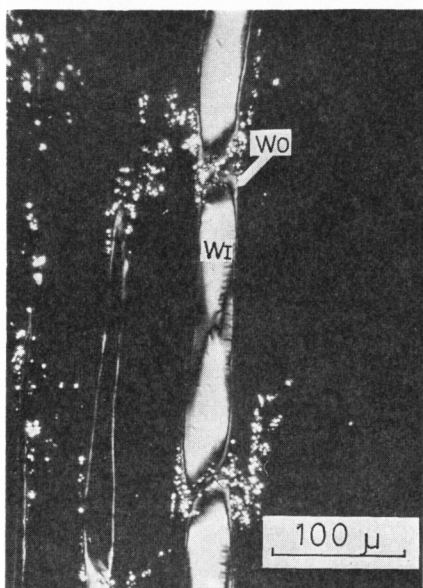


Photo. 9. A polarizing micrograph of an oblique longitudinal section of Type-1 fibers. Interference colour difference between two layers were observed by means of the sensitive colour plate (530 mμ), as shown in Fig. 3. W_o , the outer layer; W_i , the inner layer.

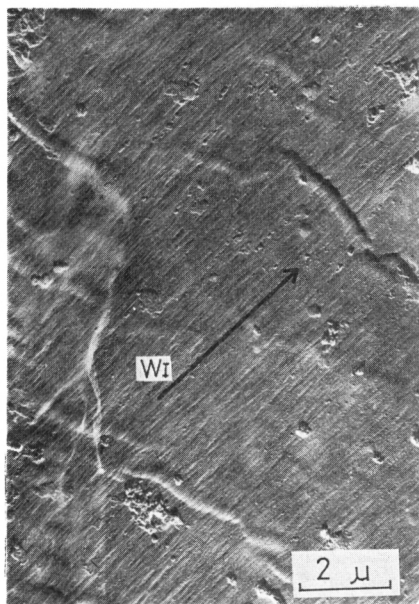


Photo. 10. A replica of the inner layer of Type 3 fiber. W_i arrow, fibrillar orientation of the inner layer; fiber axis is vertical.

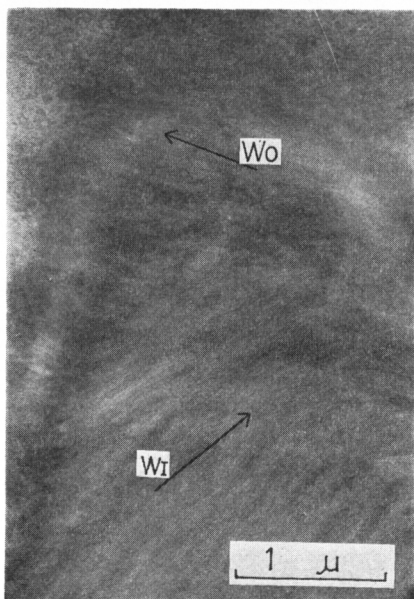


Photo. 11. An oblique longitudinal section of Type 3 fiber. W_i arrow, fibrillar orientation of the inner layer; W_o arrow, that of the outer layer; fiber axis is vertical.



Photo. 12. A cross section of the sieve cells. Note the multi-lamellae structure of the wall and a crystal in the intercellular layer. (Guteraldehyde-osmium fixed, Pt-Pd shadowed after removing epoxy resin)

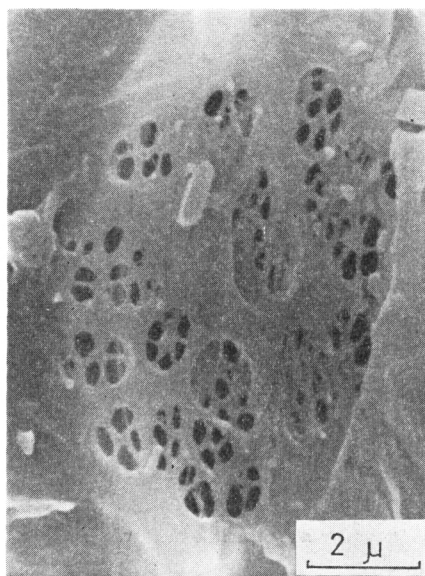


Photo. 13. A scanning electron micrograph of a sieve area. Note that the sieve area is composed of subunits which contain several sieve pores.

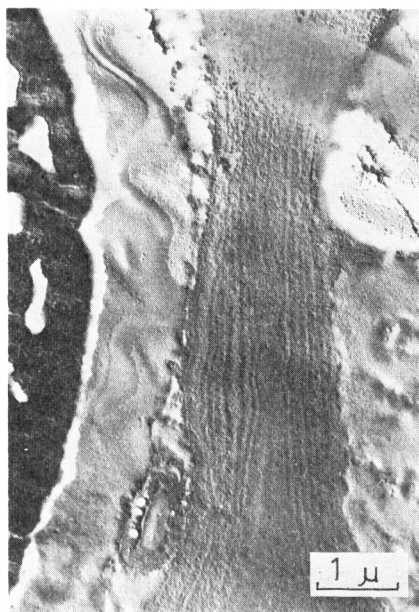


Photo. 14. A cross section of axial parenchyma cells. Note the multi-lamellae structure of the walls.



Photo. 15. A replica of pits on the lateral wall of an axial parenchyma cell. A pit is divided into two areas by a bundle of microfibrils (arrows), and granular materials on the membrane seem to show the remains adhered to plasmodesmata.



Photo. 16. A cross section of a stone cell. Note the thick lamellae of the secondary wall. (Glutaraldehyde-osmium fixed, Pt-Pd shadowed after removing coxy. resin).