

Title	クりにおけるチロースの形成と壁構造
Author(s)	柴田, 直明; 原田, 浩; 佐伯, 浩
Citation	京都大学農学部演習林報告 = BULLETIN OF THE KYOTO UNIVERSITY FORESTS (1980), 52: 206-215
Issue Date	1980-12-25
URL	http://hdl.handle.net/2433/191702
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

クリにおけるチロースの形成と壁構造

柴田直明・原田 浩・佐伯 浩

Formation and Wall Structure of Tyloses in *Castanea crenata*
SIEB. et ZUCC.

Naoaki SHIBATA, Hiroshi HARADA, and Hiroshi SAIKI

要 旨

クリの培養チロースは7—35℃の全ての培養温度で形成されたが、チロース壁はほとんど肥厚しなかった。傷害チロースは壁の伸張後肥厚し、盲壁孔様構造を形成した。壁の肥厚時には、チロースを形成中の柔細胞内にも新たな壁の肥厚が同時に認められた。壁の木化は肥厚にやや遅れて外側から内側へ進行した。また、クリでは冬期にも傷害チロースが形成された。天然チロースは辺材—心材移行域で年間を通じて形成されるものと思われる。壁の伸張・肥厚・木化過程は傷害チロースと同様であると考えられるが、天然チロースでは壁の木化後、チロースとそれを形成した柔細胞の内壁全面に再び protective layer 類似の壁層が形成された。時には、さらに盲壁孔様構造より小チロースを形成し、壁肥厚を行なうことも観察された。

1. はじめに

幹内で自然に発達したチロース（以下「天然チロース」と呼ぶ）の mature な壁の構造については、既にいくつか報告されている¹⁾²⁾。しかし、その全発達過程を観察した研究はない。一方、辺材ブロックの培養や樹幹に穿孔するなどの処理によって発生させたチロース（それぞれ「培養チロース」、「傷害チロース」と呼ぶ）では、人為が加わるがチロースの発達を追うことができ、形成過程のチロース壁構造を観察した報告もある³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

筆者ら⁷⁾⁸⁾もコナラにおいて培養チロースと傷害チロースを観察してきた。培養チロースでは5—35℃のすべての温度でチロースの発達が認められたが、チロース壁の肥厚はほとんど観察されなかった。傷害チロースの形成は気象条件の影響を受けるが発達過程の追跡が可能で、チロース壁の肥厚・木化段階も観察できた。天然チロースの形成・発達は一般に辺材内部から心材に向かって進み、心材化と関連があると考えられ、また、形成・発達には季節性のあることが報告されている⁹⁾。しかし、コナラの調査では辺材幅が広く辺材—心材境界が不規則な形状を示し、年輪によっては辺材のかなり外側の部分でもチロースが形成されているなどばらつきが著しく、成果が得られなかった。

それに対して、今回試料としたクリでは予備観察より辺材—心材境界が比較的同心円状であり、天然チロースがほぼ辺材—心材移行域ではじめて形成されることがわかったので、天然チロースの発達を追う上で有利であった。そこで、コナラと同様の方法で培養ならびに傷害チロースを観察するとともに、天然チロースを観察しその形成と壁構造を調べた。

2. 材料と方法

チロースの培養にはコナラの場合と同様の培養器⁷⁾を用いた。1978年12月1日にクリを1本切り倒し、樹幹枝下の辺材部からほぼ3 cm角の培養ブロックを作製し、約7, 14, 20, 27, 35°Cで培養した。

傷害チロースの観察には、京都大学農学部附属演習林上賀茂試験地に自生するクリ2本を用いた。1本には1978年8月29日、9月4, 8, 11, 14, 17日にそれぞれ1つずつドリル（直径9 mm）で穴をあけ、9月19日に伐木して各ドリル穴周辺に形成された傷害チロースを観察した。もう1本には1978年12月30日、1979年1月9, 19, 31日、2月11, 21日に穴をあけ、3月16日に伐木した。傷害チロースはおもに傷の上下方向に形成されるので、ドリル穴は胸高部において順次横方向に3—4 cmずつ離してあけた。

なお、培養および傷害チロースの観察は、天然チロースの混在を避けるため、辺材最外部の当年輪孔圍道管部を中心に行なった。

天然チロースの発達は円板を採取して調査した。上賀茂試験地では1979年6月8日、8月23日、10月12日、1980年1月7日、3月14日に、京都大学農学部附属芦生演習林では1979年6月14日、10月6日、1980年2月21日に、それぞれ1本ずつ切り倒し、円板に切って木口面全面（11—28年輪）を双眼実体顕微鏡で観察し、発達中の天然チロースの存在を調べた。

試料はいずれも3%ゲルタルアルデヒドで直ちに固定し、TEM 観察用にはさらに1%四酸化オスミウムまたは3%過マンガン酸カリウムで後固定し、エポン包埋後超薄切片を作製して4%酢酸ウラニルで後染色した。SEM 観察用試料は臨界点乾燥後金コーティングをした。

3. 結果と考察

3.1 培養チロースの形成

クリにおいてもコナラの場合⁷⁾と同様、7—35°Cのすべての温度でチロースの発達が認められた (Fig.1)。そして、低温条件下ほど発達は遅くなったが、7°Cでも十分にチロースが形成さ

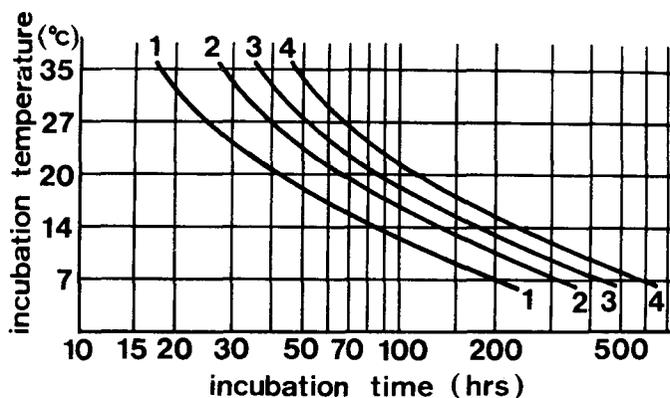


Fig.1 Development of incubated tyloses in earlywood vessels of the current-year growth ring.

1: small tylosis buds were formed in every vessel.

2: most of tyloses elongated to the length of a quarter of vessel diameter (about 200 μ m).

3: most of tyloses elongated to the length of a half of vessel diameter.

4: incubated tyloses had blocked the vessel lumina and their color changed to light brown (lignification of walls).

れた。また、落射照明下で実体顕微鏡を用いて観察すると、伸張中のチロース bud は白っぽく輝いて見えたが、伸張終了後しばらくすると褐色味をおびはじめた。このことは過マンガン酸カリウム染色試料の超薄切片の観察より、木化の開始を示しているものと思われる (Fig. 6 傷害チロース参照)。なお、培養チロースでは壁厚は $0.2-0.3 \mu\text{m}$ (四酸化オスミウム固定試料) のままで、コナラの場合⁷⁾と同様、チロース壁の肥厚はほとんど認められなかった。また、培養チロースの場合は多数のチロースがいっせいに発達してきたが、この際には軸方向柔細胞からも形成された。

3.2 傷害チロースの形成と壁構造

8-9月の実験では、2日前にあげたドリル穴の上下の当年道管中に伸張中のチロース bud が認められた。傷害後5日の部分ではすでに道管が傷害チロースによって閉鎖されており、かなりのチロース壁は肥厚を開始していた。伸張中のチロース壁を Fig. 2 に示したが、この染色性から考えると伸張段階の壁は1層から成っているように思われる。また、マイクロフィブリルの配列はコナラの場合⁸⁾と同様ランダムと思われる。次に内方に四酸化オスミウムの染色性の異なる新たな層が堆積され (Fig. 3)、このとき写真に見られるように多くの microtubule が観察された。この新たな層が肥厚するにつれ壁孔様構造が形成された (Fig. 4)。道管壁に接するもの、チロースに接していても壁孔対となっていないものなど盲壁孔様のものが多い。まれには Fig. 4b のように一見壁孔対のようなものも観察されたが、原形質連絡は見出されなかった。また、チロース壁の肥厚時にはチロースを形成中の柔細胞内にも新たな壁の堆積が認められた (Fig. 5)。

過マンガン酸カリウムによる壁の染色を木化とみなすと、チロース壁の木化は壁の肥厚開始直後 (このとき外観が褐色味をおびる) 壁の外側から始まり (Fig. 6)、壁の肥厚にやや遅れて次第に内側へ進行していった (Fig. 4, 5, 7)。Fig. 7 には肥厚したチロース壁にマイクロフィブリルの配列に基づく染色のパターン (破線) が観察されるが、このパターンはマイクロフィブリルが配列方向を変えながら堆積したことを示している。そして、傷害後15日の部分ではチロース壁全体が十分に木化しており、最終的な壁厚は $1 \mu\text{m}$ 前後であった。このような傷害チロース壁の形成過程はコナラの傷害チロースの場合⁸⁾とよく一致していた。

冬期の実験では、傷害後約3週間で当年輪に多くの傷害チロースの bud が観察された (Fig. 8a)。傷害後1.5か月で道管は傷害チロースによりほぼ閉鎖された (Fig. 8b)。傷害後2.5か月では一部の傷害チロースに明らかに壁の肥厚が認められ、壁孔様構造もできはじめていた。従って、クリにおいては、Ermich¹⁰⁾の観察結果 (傷害チロースのできる期間は、形成層の活動期間よりも少し長かった) と異なり、冬期にも傷害チロースの形成されることが確認された。

なお、3.1および3.2で述べた結果は当年輪におけるものであり、以下に述べる天然チロースの形成部位 (辺材-心材移行域) では、培養および傷害チロースの発達に上記の結果より多くの日数を要した。

3.3 天然チロースの形成と壁構造

3.3.1 天然チロースの形成部位と形成時期

mature な天然チロースは着色心材部の少し外側まで分布しており、培養チロースや傷害チロース (Fig. 8) と比較するとチロースの数が少なく、一つ一つのチロースが大きく伸張して道管を閉鎖していた (Fig. 9)。これらの天然チロースは壁が肥厚し、壁孔様構造を持っていた。

bud 状あるいは薄壁で発達中と思われる天然チロースは、mature なチロースの存在する領域の少し外側の道管中に観察された (Fig. 10)。これらの bud はほとんどが放射柔細胞から出ている。また、培養ならびに傷害チロースと比較して、発達してくる bud の数がかなり少なかった。

た。

このような bud 状の天然チロースはサンプリング時期を変えた 8本のクリ全てに認められた。従って、クリでは年間を通じて天然チロースが形成されるのではないかと推測される。しかし、天然チロースの場合は道管を閉鎖するまで伸張せずに壁の肥厚・木化段階に進む場合もあるので、上賀茂試験地から得た試料について超薄切片の観察も同時に行ない検討した。

Fig.11は1月7日に採取した試料中に観察されたチロース bud である。この時期のチロース壁でも四酸化オスミウムによく染色される1層の薄壁のみを持つものが観察された。このような壁構造は、培養チロースや傷害チロースの観察において、伸張中のチロースに認められたものである。また、冬期の試料においてもマイクロフィブリルの形成と関連があると言われている micro-tubule が観察された。

従って、クリの天然チロースの形成には、ハリエンジュの天然チロースの形成⁹⁾や一般の形成層活動の場合と異なり、特別な季節性がなく、年間を通じて常にチロースが形成されているものと思われる。前述の培養チロースや傷害チロースの観察結果もこの推測を支持するものである。

3.3.2 天然チロース壁の構造

前項で述べたようにクリの天然チロースは年間を通じて形成されるので、培養チロースや傷害チロースの場合と異なり、同一試料内に種々の発達段階の天然チロースが同時に存在していた。

Fig.11は前述のように伸張中の天然チロースの bud と考えられる。クリの場合は辺材一心材移行域の柔細胞に、Fig.11のように四酸化オスミウム染色で濃・淡・濃の3層のいわゆる protective layer (Fujiiら¹¹⁾は淡色の層を“Inner Cellulosic Layer”として区別している)を持つ場合もあれば、濃色の protective layer 1層のみの場合もあった。また、まれには濃・淡・濃・淡・濃の5層から成る場合もあった。しかし、チロース bud の壁はいずれの場合も最内層の濃色の protective layer と連続していた。

天然チロースの壁の肥厚も傷害チロースの場合と同様、壁の伸張が終了した後に行なわれるものと思われる。最終的な壁厚は傷害チロースと同様1 μ m前後であった。天然チロースの場合も壁の肥厚時に放射柔細胞内に新たな壁の堆積が認められた (Fig.5傷害チロース参照)。従って、柔細胞内の protective layer と伸張時に形成されたチロース壁とによって囲まれた細胞の全体がその全表面に新たな壁の肥厚を行なったことになる。このことは、MacDonaldら⁶⁾も *Ulmus* 属3種の立木に菌を接種して形成させた傷害チロースにおいて報告している。ただし、クリの場合は傷害、天然チロース双方において、柔細胞間の壁孔壁には新たな壁の堆積が認められなかった。また、壁孔様構造はやはり壁の肥厚時に形成された。Kóránら¹⁾はハリエンジュの天然チロースにおいて壁孔対の写真を報告しているが、クリの場合は一般に盲壁孔様の構造とすることができる。

天然チロース壁の木化も傷害チロースと同様、壁の肥厚開始後に始まるものと思われる。この際、チロースを形成した柔細胞内の protective layer 最内層とその上に新たに堆積した壁層も同様に木化された。また、天然チロースにおいても、過マンガン酸カリウム染色により Fig.7と同様に肥厚したチロース壁にマイクロフィブリルの配列に基づく染色のパターンが観察された。Kóránら¹⁾や Foster²⁾も mature な天然チロースの壁を観察して、ランダムに配列したマイクロフィブリルからなる外層と配向性のよいマイクロフィブリルからなる内層とを持つと報告している。

以上のように、天然チロースの壁は傷害チロースと同様にして伸張・肥厚・木化するものと思われるが、天然チロースでは肥厚した壁の木化終了後、チロースとそれを形成した柔細胞内にさらに新たな壁層の形成が認められた。すなわち、Fig.12のように、十分に肥厚したチロース壁

の内側に再び四酸化オスミウムでよく染色される壁層が観察された。この壁層は天然チロースの盲壁孔様構造の壁孔壁上にも存在し、チロースを形成した柔細胞の壁の内側にも形成されていた。従って、この壁層は四酸化オスミウムによく染まることと細胞壁の内側全面に存在することより、濃色の protective layer に類似の壁層と思われる。

また、Fig.13では一度伸張した天然チロースから再びチロースの bud 様のものが膨出している。Fig.14はこのような構造を TEM で観察した例であるが、ここではチロースTを作った後に、再びチロースT'を作ったものと考えられる。そして、このチロースT'の四酸化オスミウムによく染色されている壁層(チロースT'の伸張時の壁)は、チロースT内に形成された protective layer 類似の濃色の層と連続し、その後肥厚した層はチロースT、放射柔細胞R内に連続している。このことは、チロース壁が肥厚したとき、もとの柔細胞にも壁の堆積する(Fig.5)のと同様の現象が生じたことを示している。チロースの盲壁孔様構造においては、通常チロース壁の木化時に壁孔壁も木化する(Fig.4)ので、一般の道管—柔細胞間壁孔壁とは多少性質を異にするものと考えられるが、protective layer 類似の層が堆積され、さらにそこから再びチロースが形成されることより、チロースとそれを形成した柔細胞は全体として一つの柔細胞として機能し、もとの柔細胞と同様の挙動をすると見ることができる。

Fig.15では、肥厚後再び protective layer 類似の壁層を持つようになった天然チロース内に、かなり多数のでんぶん粒が観察される。これらのでんぶん粒は柔細胞内に初めから存在していたものが単にチロース内へ移動してきたと考えるには量が多すぎるので、チロース形成後に再び貯蔵されたものと思われる。従って、このことからチロース形成後にチロースと柔細胞が全体として再び一つの柔細胞として機能している可能性が考えられる。このような現象は、天然チロースにかぎらずチロースと柔細胞が長く生存する条件下でみられるものと思われる。

最後に、今回の実験では着色心材部の形成時期等が調べられていないので、天然チロースの形成と心材形成との関係は明らかにできなかった。天然チロースの形成には道管の水分通導機能の消失も関連していると思われるし、柔細胞自身の aging 等との関係も問題となるが、これらは今後の課題である。

引用文献

- 1) KÓRÁN, Z. and W. A. CÔTÉ, JR.: The ultrastructure of tyloses. In "Cellular ultrastructure of woody plants" (W. A. CÔTÉ, JR. ed.) Syracuse Univ. Press, Syracuse, New York 319-333 (1965)
- 2) FOSTER, R. C. : Fine structure of tyloses in three species of the *Myrtaceae*, Aust. J. Bot., **15**, 25-34 (1967)
- 3) KÓRÁN, Z. and W. A. CÔTÉ, JR. : Ultrastructure of tyloses and a theory of their growth mechanism. I. A. W. A. News Bull., No.2, 3-15 (1964)
- 4) MEYER, R. W. : Tyloses development in white oak, Forest Prod. J., **17**, 50-56 (1967)
- 5) MURMANIS, L. : Formation of tyloses in felled *Quercus rubra* L., Wood Sci. Technol., **9**, 3-14 (1975)
- 6) MACDONALD, W. L. and H. S. McNABB : Electron microscope observations of Ceratocystis ulmi-induced tylosis development in Ulmus, Eur. J. For. Path., **4**, 2-10 (1974)
- 7) SHIBATA, N., M. FUJITA, H. SAIKI, and H. HARADA : Development of the incubated tyloses in *Quercus serrata* THUNB., Bull. Kyoto Univ. Forests, **50**, 174-182 (1978)
- 8) 柴田直明, 原田 浩, 佐伯 浩 : コナラの傷害チロース壁の発達, 日本電子顕微鏡学会第35回学術講演会 講演予稿集, p.164 (1979)
- 9) FUJITA, M., K. NAKAGAWA, N. MORI, and H. HARADA : The season of tylosis development and changes in parenchyma cell structure in *Robinia pseudoacacia* L., Bull. Kyoto Univ. Forests, **50**, 183-190 (1978)
- 10) ERMICH, K. : The origin of tyloses in trunks of growing oak trees (*Quercus robur* L.), Ekol. Pol. Ser. A, **12**, 505-528 (1964)

- 11) FUJII, T., H. HARADA, and H. SAIKI : The layered structure of ray parenchyma secondary wall in the wood of 49 Japanese angiosperm species, *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 251-257 (1979)

Résumé

The formation and wall structure of incubated, traumatic, and natural tyloses in *Castanea crenata* SIEB. et ZUCC. were observed.

(1) "Incubated tyloses" were induced in the growth chambers⁷⁾ maintained at 7, 14, 20, 27, and 35°C. Abundant tyloses developed at each temperature, although they developed slowly in lower temperature (Fig. 1). The incubated tylosis wall was stained with OsO₄ in the same density as the innermost protective layer in the parenchyma cell which was forming the tylosis, and it had a thickness of 0.2-0.3 μm. The incubated tylosis wall hardly thickened.

(2) "Traumatic tyloses" were induced in two living trees which were bored with a drill. The development of traumatic tyloses in earlywood vessels of the current-year growth ring from August to September was as follows: many tylosis buds were enlarging after 2 days from the boring. After 5 days from the boring tyloses blocked the vessel lumina and their walls were thickening. The wall of parenchyma cells which were forming the tyloses also thickened simultaneously with thickening of the tylosis wall (Fig.5). Parallel-oriented microtubules were observed near the plasmalemma of tylosis in the thickening stage (Fig.3), and the wall formed in this stage exhibited highly oriented microfibrillar structure (Fig.7). Blind pit-like structures of tylosis wall were also formed in the thickening stage (Fig.4). Judging from the stainability with KMnO₄, outer part of the tylosis wall began to be lignified immediately after the wall began to thicken (Fig.6). The lignification proceeded to inner part of the wall, following after the proceeding of wall thickening (Figs.4,5,7). After 15 days from the boring the tylosis wall had a thickness of about 1 μm, and was wholly well lignified.

Traumatic tyloses developed even in winter, although they developed very slowly (Fig.8).

(3) "Natural tyloses", which were formed normally in a living tree (Fig.9), developed in the transition zone (Fig.10). A small number of developing tyloses formed mainly from a ray parenchyma cell were found in the vessels adjacent to heartwood zone. Enlarging buds (Fig.11) and the tyloses in the wall thickening stage were observed all the year round. Natural tyloses, therefore, seem to be formed throughout the year.

Wall formation in natural tylosis appears to proceed through the same steps as traumatic tyloses. Well-lignified wall of the natural tylosis had also a thickness of about 1 μm, and its structure was similar to that of a traumatic tylosis.

The wall of parenchyma cells which were forming natural tyloses also thickened in the thickening stage of the tylosis wall. This wall was, however, not deposited on the pit membranes of interparenchymatous pit-pairs.

After the lignification stage natural tyloses and the parenchyma cell from which the tyloses were formed deposited one more osmiophilic layer again (Fig.12). This layer was observed on the whole inner surface of their walls, and it was similar to the innermost protective layer found in a parenchyma cell. The tylosis-parenchyma cell complex with the osmiophilic

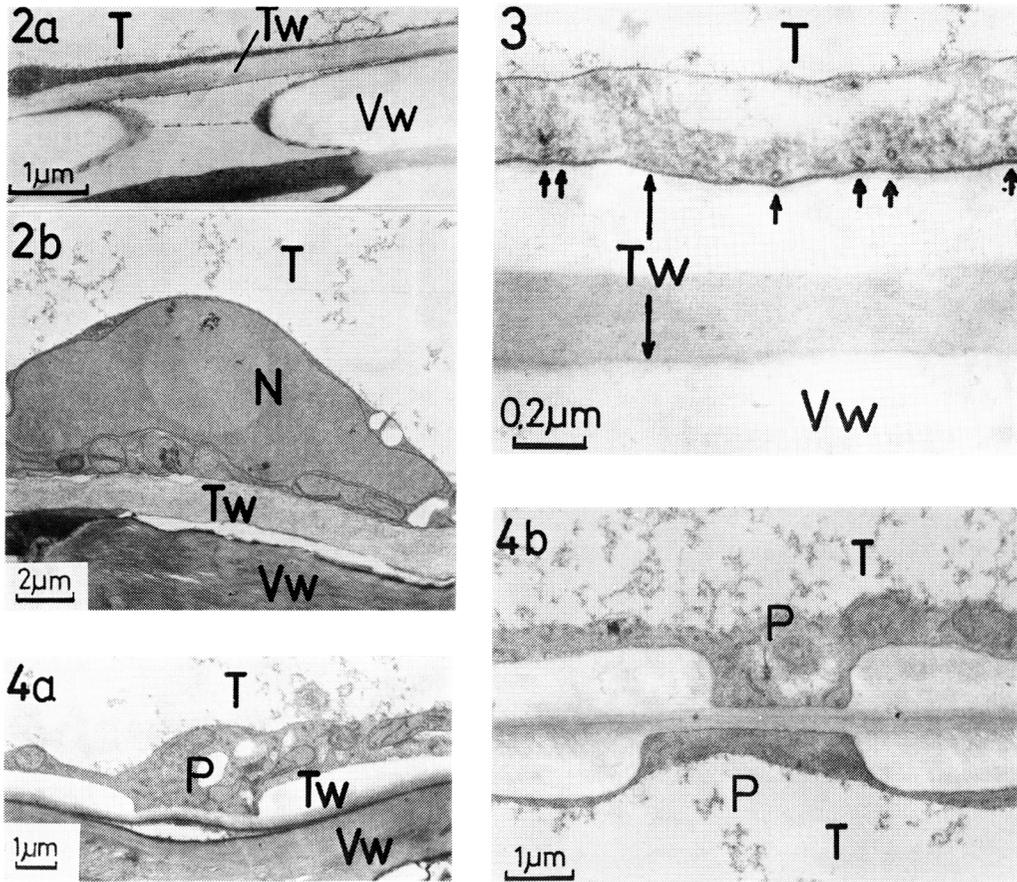


Fig.2 Traumatic tylosis wall in the enlarging stage. The tylosis has a single osmiophilic wall in this stage. **a**: fixed with glutaraldehyde (GA) and OsO_4 . **b**: fixed with GA and KMnO_4 . Tylosis wall appears to be swollen with KMnO_4 .

Fig.3 Traumatic tylosis wall in the thickening stage, fixed with GA and OsO_4 . The inner light wall (electron-transparent) is thickening in this stage. Many microtubules can be observed (arrows).

Fig.4 Blind pit-like structures of traumatic tyloses in the thickening stage, fixed with GA and KMnO_4 . **a**: a pit-like structure is formed in this stage. The outer tylosis wall formed in the enlarging stage is densely stained with KMnO_4 . **b**: no plasmodesmata are found on the tylosis walls corresponding to the pit membrane, although pit-like structures are forming a pair.

Fig.5 Traumatic tylosis-parenchyma cell complex in the thickening stage, fixed with GA and KMnO_4 . **a**: the thickening wall of the complex is less stained and light-colored in this stage. **b**: enlarged view of the ray-ray pit-pair shown in **a**. The pit membrane is covered only by a protective layer, and the thickening light wall is not observed on it.

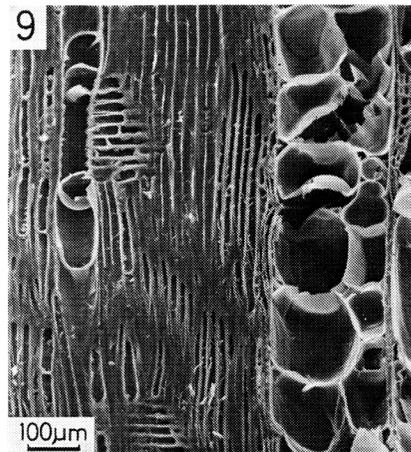
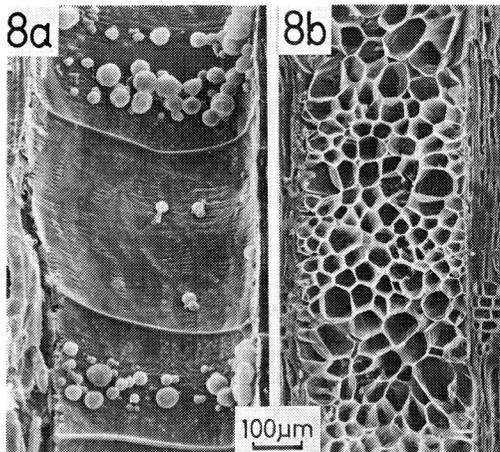
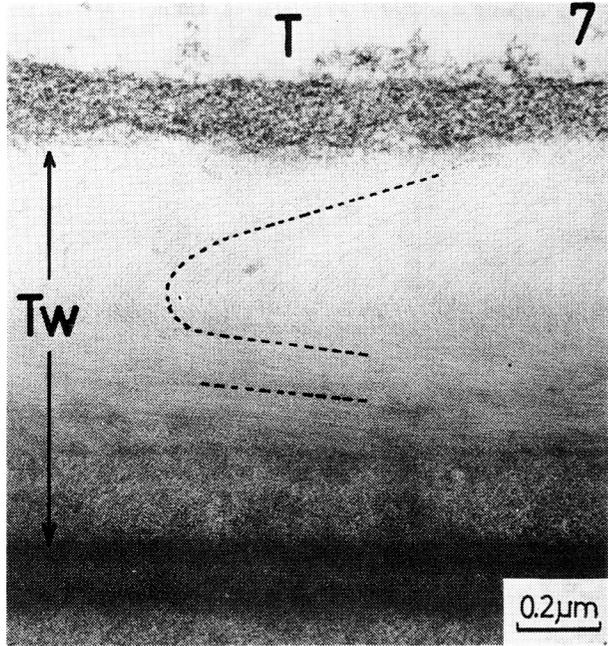
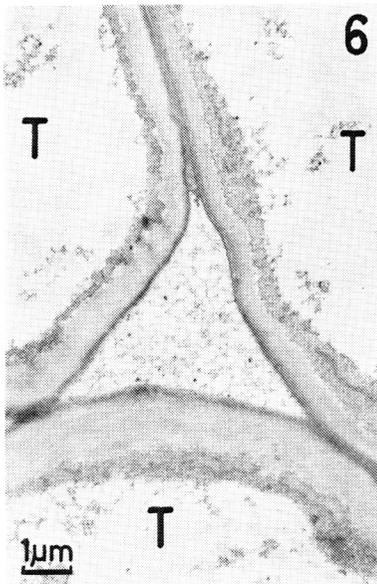
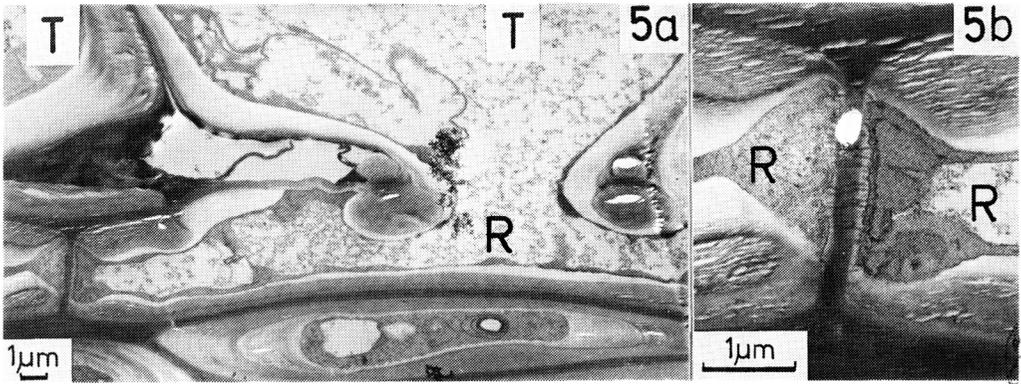
Fig.6 Traumatic tyloses in the early period of thickening stage, fixed with GA and KMnO_4 .

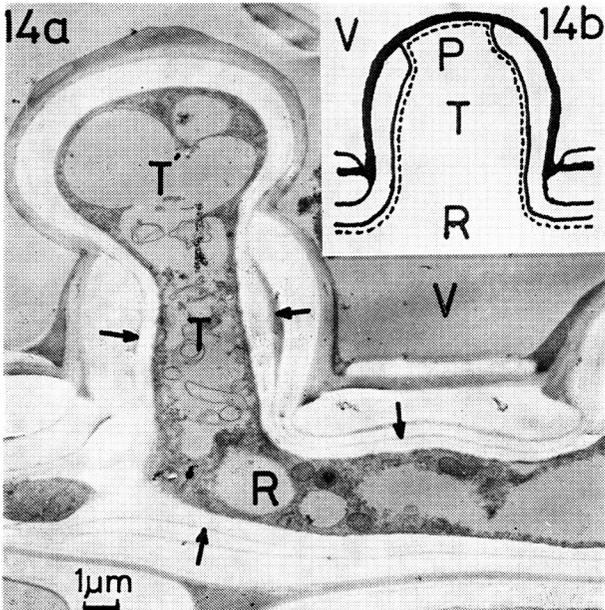
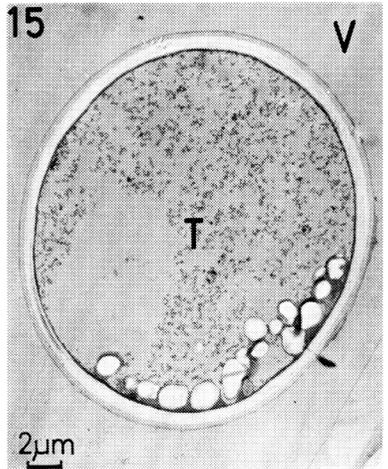
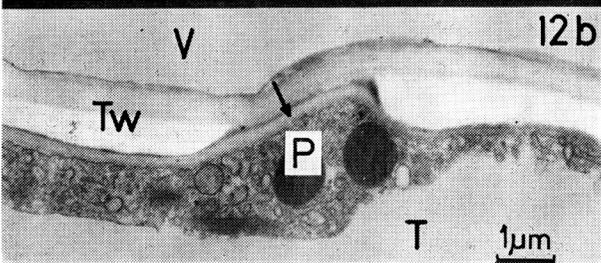
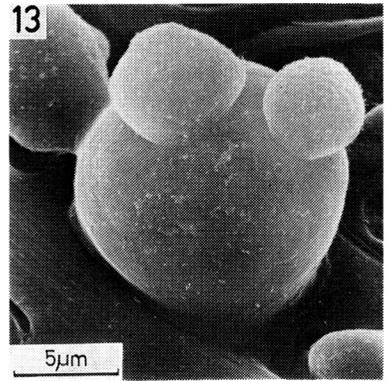
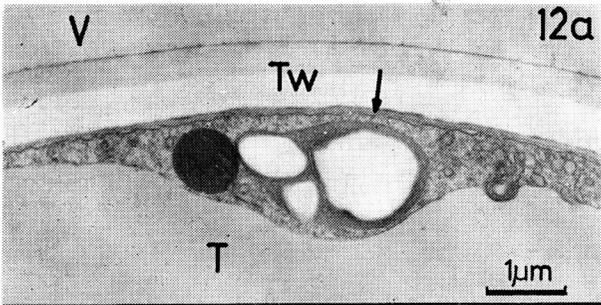
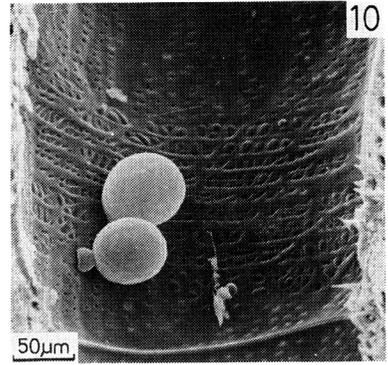
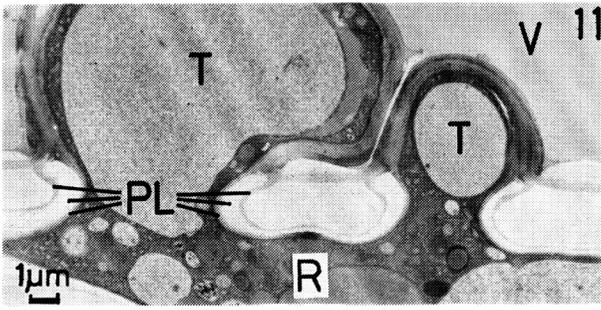
Fig.7 Oblique section of traumatic tylosis wall in the lignification stage, fixed with GA and KMnO_4 . The fibrillar pattern (broken lines) indicates a highly oriented microfibrillar structure in the thickened wall.

Fig.8 Radial view of traumatic tyloses developing in the current-year growth ring in winter. **a**: the tylosis buds after about 3 weeks from the boring. **b**: the tyloses after one and a half months from the boring.

Fig.9 Radial view of natural tyloses in heartwood.

ABBREVIATIONS T: tylosis Tw: tylosis wall P: pit-like structure N: nucleus R: ray parenchyma cell PL: protective layer V: vessel Vw: vessel wall





layer sometimes formed tyloses again (Figs.13,14), and it often stored many starch grains (Fig.15). The whole tylosis-parenchyma cell complex seems to behave as a single parenchyma cell.

Fig. 10 Radial view of natural tylosis buds developing in the transition zone.

Fig. 11 Enlarging natural tylosis buds with a single osmiophilic wall sampled in January, fixed with GA and OsO₄.

Fig. 12 Osmiophilic layer (arrow) in a well-lignified natural tylosis, fixed with GA and OsO₄.

This layer is also observed on the tylosis wall corresponding to the pit membrane as shown in **b**.

Fig. 13 Small natural tylosis with two tylosis buds.

Fig. 14 Small natural tylosis (**T**) with a small tylosis (**T'**), fixed with GA and OsO₄. A pit-like structure (**P**) may be formed first in the tylosis (**T**) as illustrated in **b**. After the osmiophilic layer (arrows in **a**, and the broken line in **b**) is deposited, the tylosis (**T'**) may be formed again. The outer dark wall of the tylosis (**T'**) is also joined with the osmiophilic layer, and the inner light wall of tyloses (**T'** and **T**) and the ray parenchyma cell (**R**) may be formed simultaneously.

Fig. 15 Starch grains stored in the natural tylosis with the osmiophilic layer, fixed with GA and OsO₄.