

レタス種子の発芽過程における 子葉細胞の微細構造の変化

土 倉 亮 一・大江 眞 貴 子・和 田 アイ 子*

Ultrastructures of Cotyledonary Tissues during Germination of Lettuce Seeds

Ryoichi TOKURA, Makiko OE and Aiko SAKAI-WADA*

Received April 2, 1990

抄 録： レタス種子の発芽過程における子葉の微細構造の変化を、透過型電子顕微鏡により観察をした。子葉中の貯蔵物質であるタンパク質や脂質が発芽とともに急速に消失し、吸水開始後5日目には、葉緑体、ミトコンドリア、小胞体等の細胞小器官が完全に発達した。吸水後の時間経過と共に、葉緑体は光合成を行いデンプンを合成した。しかし吸水開始後26日目以後、葉緑体ではストロマチラコイドが膨潤し、次いで崩壊した。グラナチラコイドも膨潤し、葉緑体全体は小型になり変形した。ミトコンドリアは、形の大小、クリステの発達の程度に差はあるものの、吸水開始から50日目に至るまで、観察されたものはすべて正常な微細構造を示していた。

索引語：レタス、子葉、葉緑体、ミトコンドリア

Abstract: Ultrastructural changes in the cotyledonary cells during germination of lettuce seeds were observed. The reserve materials in the cotyledonary cells, lipid granules and protein bodies, disappeared rapidly after imbibition. After 5 days of imbibition, chloroplasts, mitochondria and other organelles, such endoplasmic reticulum and Golgi bodies well developed. The chloroplasts produced photosynthetic starch. But, after 26 days of imbibition, stroma thylakoids in the chloroplasts were swollen and then decayed. Grana thylakoids were also swollen. Finally, the chloroplasts become smaller and changed in their forms. Mitochondria showed normal form throughout life of the cotyledon, although the differences were recognized in their size and the development of cristae.

* 奈良女子大学理学部生物学教室
(Department of Biology, Faculty of Science, Nara Women's University)

Key Words: lettuce, cotyledons, chloroplasts, mitochondria

1. はじめに

発芽過程における子葉細胞の微細構造の変化は、柑橘類の種子でなされている (Casadoro and Rascio, 1987; Garcia-Agustin and Primo-Millo, 1989)。しかし、吸水から発芽、成長期を経て退化に至るまでの子葉細胞の微細構造の変化については情報が殆ど無い。本研究では、レタスの子葉を用い吸水開始後、発芽、成長、退化までの過程における細胞内微細構造の変化を葉緑体及びミトコンドリアの形態変化を中心に観察し、植物成長過程における子葉の役割について考察した。

2. 材料及び方法

レタス種子 (*Lactuca sativa* L., cv. Grand Rapids) はタキイ種苗株式会社 (京都) より購入した。種子はパーミキュライトに播き、約2,000luxの蛍光灯の連続光下、26°Cで蒸留水を与えて発芽、成長させた。種子の蒔播後0.5日、1日、1.5日、2日、3日、5日、10日、15日、21日、26日、30日、35日、40日、50日目の子葉と吸水前の子葉を電子顕微鏡の観察用試料とした。

透過型電子顕微鏡用試料は、1/15M リン酸緩衝液または0.2M カコジル酸緩衝液によってpH7.0に調整した5%グルタルアルデヒドに3時間から24時間4°Cで固定した後、同じ緩衝液で洗浄し、さらに同じ緩衝液でpHを整えた1%四酸化オスミウムに24時間4°Cで固定した。段階的にアセトンで脱水した後、エポキシ系の樹脂に包埋した。超薄切片は、クエン酸鉛で染色し透過型電子顕微鏡 JEM-2000EX で観察した。

3. 結 果

吸水前の種子の子葉では小型の細胞がお互いに密に接しており、細胞の内部はスフェロゾームやプロテインボディーで占められていた (図1)。これらに混じって細胞の所々に未発達なクリステをもつミトコンドリアが数個から十数個集まっているのが見受けられた (図2, M)。ミトコンドリアの短径はおよそ0.4 μ mで基質部は電子密度が低く、一方クリステは高電子密度の線として見える。またプラスチドは前色素体の段階で内部に極少量のチラコイドが認められる (図2, pp)。

吸水後0.5日経過した子葉細胞では、スフェロゾームの間隙に小胞体やゴルジ体が見受けられた。また、ミトコンドリアのクリスタ間腔が膨らんでいた (図3)。

吸水後1日目の種子では、種皮から幼根が少し出始めていた。この様な種子の子葉細胞では、スフェロゾームが吸水前の細胞に比べてやや減少していた。また前色素体では色素体の内膜が陥入し、その小胞が認められた (図4, 白矢印)。

吸水後1.5日目の子葉細胞では、細胞の周辺部にリボゾームをつけた小胞体が多数見られた (図5, ER)。また、前色素体の内部には小胞が多数認められた。

吸水後2日目の子葉細胞の葉緑体は急速に発達し、チラコイドが長軸方向に平行に伸びている。またそれらが重なって将来グラナに発達すると思われる部分も認められる (図6, 矢頭)。

細胞内の所々に小型の液胞がスフェロゾームや色素体に挟まって出現した(図6, V)。この時期の子葉組織には細胞間隙があらこちらで見られた。

吸水後3日目の子葉細胞では、細胞内のスフェロゾームやプロテインボディーが減少し、代わって液胞が細胞の半分以上を占める像も見られた(図7)。ミトコンドリアのクリステの数もかなり増加した(図8)。葉緑体は大型となりチラコイドの数も増え、プラスト顆粒も認められる(図8, pg)。この時期の子葉は緑色を呈し、展開を始めた。

吸水後5日目の子葉細胞では、液胞が細胞の大半を占め、スフェロゾームやプロテインボディーは全く認められず、細胞質が細胞周辺にくっついて見られる。この部分に、大型でチラコイドのよく発達した葉緑体が見られる(図9, C)。葉緑体は、チラコイドが3層から8層ぐらい重なって成るグラナと、これらのグラナとグラナの間を結ぶストロマチラコイドを持つという典型的な葉緑体構造を示している(図10, C)。基質部には径約 $0.03\sim 0.1\mu\text{m}$ のプラスト顆粒も見られる。プラスト顆粒は、超薄切片像上の一個の葉緑体につき10個前後見られた。ミクロボディーも又、認められた(図10, m)。

吸水後10日目の子葉細胞では、葉緑体のチラコイドは5日目のものに比べて、さらによく発達し、チラコイドが10層以上積み重なったグラナが沢山見られた(図11)。基質部には同化デンプン粒を持つものもあった(図11, st)。ミトコンドリアはクリステの数が増加し、よく発達していた(図11, M)。また、シスターネが5層ぐらい積み重なったゴルジ体がいくつか見られた(図12, G)。この時期の子葉は緑色で完全に展開し、小型ではあるが第1葉が認められた。

吸水後15日目の子葉細胞では、沢山の同化デンプン粒を持った葉緑体が多数見られた。チラコイドが10層以上から成るグラナがむしろ同化デンプン粒の間に挟まっているように見える(図13)。また、プラスト顆粒が散在しているのが見られた。第1葉は、10日目のものよりやや成長し、大きくなっていた。

吸水後21日目の子葉細胞では、葉緑体は沢山の同化デンプン粒を含んでいたが、15日目のものに比して少なかった(図14)。この時期のミトコンドリアは、子葉の成長及び老化の一連の過程において、一番大きい形を示した時期でありその短径は $1.5\mu\text{m}$ に達するものもあった(図15, M)。第1葉は更に発達し、第2～3葉が認められた。

吸水後26日目の子葉細胞では、葉緑体内の同化デンプン粒含量は21日目のものよりもさらに少なく、ストロマチラコイドの膨潤が見られた(図16, CA)。中にはストロマチラコイドが殆ど見られず、グラナチラコイドが膨潤したような様相を呈し、さらにグラナの配列が乱れてしまっているものもあった(図16, CB)。ゴルジ体もその構造が崩れ始めているのが見られた(図16, G)。

吸水後30日目の子葉細胞では、葉緑体はストロマチラコイドが殆ど認められなくなり、グラナチラコイドは膨潤し、ほぼ円形の断面を示すものが目だった。また、葉緑体外膜は一部崩壊しているようで、外形も不規則な形を示すものが多い。この様な葉緑体中に見られるプラスト顆粒は大きく、径約 $0.4\mu\text{m}$ もある。しかし、数においては典型的な形を示した5日目の葉緑体中で認められた数と同程度の、およそ10個前後であった。ミトコンドリアはクリステが不明瞭になってきているものや、中心部分が抜けて空胞化した部分の見られるものもあった(図17, M)。

吸水後35日目の子葉細胞では、葉緑体ではストロマチラコイドが殆ど見られなくなり、グラナが膨潤してしまって層状構造が崩れ始めて認められるに過ぎないものが見られた(図18)。

吸水後40日目の子葉は淡緑色を呈し、子葉細胞はかなり崩れている(図19)。この時期の崩れていない細胞内のミトコンドリアはクリステが少なく、形も小型であった(図20, M)。また、

ゴルジ体もシスターネが不明瞭になっているものが見られた (図20, G)。

吸水後50日では、本葉は7～8枚以上出ており、苗の9割以上の子葉がすでに枯れてしまっていた。辛うじて植物体にくっついていない子葉について観察したところ、細胞の殆どが不規則な型を呈し、その内部に見られる葉緑体は膜系が殆ど崩壊し、ストロマチラコイドは認められない。またグラナは円形を示すが、内部は均質な電子密度を示している (図21)。葉緑体中のプラスト顆粒は大きく、径が $0.5\mu\text{m}$ ぐらいの大きさのものもあった。

4. 考 察

本研究で用いたレタスの種子は、貯蔵物質として子葉にタンパク質と脂質を各々、プロテインボディーとスフェロゾームとして多量に含んでいた (図1)。これらと同様の事が *Citrus limon* の種子 (Garcia-Agustin and Primo-Millo, 1989), clementine (*Citrus nobilis* × *Citrus aurantium amara pumila*) の種子 (Casadoro and Rascio, 1987) 及び *Gossypium hirsutum* の種子 (Yatsu, 1965) で報告されている。また、本研究では吸水開始後、時間を追ってプロテインボディーやスフェロゾームは急速に減少し、一方液胞が形成されたがこれも前記の研究者達と同じ結果であった。しかし、Garcia-Agustin and Primo-Millo (1989) によると液胞の起源はプロテインボディーを含む包膜であると考えているが、本研究ではそのような事実を得ることは出来なかった。これは使用材料の違いであると考えたよりもむしろ、一般的に子葉の固定は難しいので、恐らく固定による結果の違いによると考えた方が適切であると考えられる。液胞の起源は更に検討の余地があると言えよう。

レタスにおいては、吸水前の種子の子葉は白色を呈し、また細胞は密に並んでおり、細胞内にはプロテインボディーやスフェロゾームの間に前色素体やミトコンドリアが見られたが、小胞体やゴルジ体は殆ど見いだせなかった。また、ここで見られた色素体は、内部に僅かにチラコイドが認められるに過ぎなかった (図2, pp)。しかし、Casadoro and Rascio (1987) は clementine の種子の子葉細胞で見られる色素体は、吸水前にすでに発達したチラコイドを持っていると報告している。この違いは恐らく、材料の違いによるものと考えられる。というのは、柑橘類では種子の形成段階で子葉が緑色を呈しているものが多く知られている。このことは、子葉細胞内の色素体には種子の段階でチラコイドが発達していることを示唆するもので、clementine の種子も恐らく緑色を呈しているのであろう。

前色素体の葉緑体への発達過程の形態学的研究については、非常に多くの研究報告がなされている。本研究に用いたレタス子葉における葉緑体の発達も、過去の研究報告と同様の結果を得た。レタスの子葉における前色素体からの葉緑体への発達は、吸水開始後2日目には、子葉はまだ種皮を被っているにも関わらず、前色素体中にチラコイドが発達し葉緑体へと変化していた (図6, C)。吸水開始後5日目で色素体は典型的な葉緑体の形態を示した (図10, C)。吸水開始後15日目のものでは、チラコイドの間に沢山の同化デンプン粒を持っていた (図13)。この頃には、小型の第1葉がすでに認められていたが、光合成の中心的役割はまだ子葉が果たしているものと考えられる。葉緑体は21日目以降退化の兆しが見え始めた。まず、葉緑体中の同化デンプン粒が減少し始め (図14)、やがて葉緑体中に殆ど認められなくなった (図16)。これと平行して葉緑体のストロマチラコイドの膨潤が始まり (図16, CA)、次いでグラナの膨潤が見られるようになった (図16, CB)。次ぎにストロマチラコイドが崩壊し、膨潤したグラナ部だけが葉緑体に残

り、しかも不規則な形となり小型となった。さらに退化が進むと葉緑体の外膜の崩壊が所々で見られた(図17)。一方、葉緑体中のプラスト顆粒はストロマやグラナのチラコイドの膨潤化と平行して、数の上では余り変化は認められなかったが、徐々にその径が増大した。

これまでの報告結果と本研究で用いたレタス子葉での葉緑体の退化過程を比較すると、レタスの子葉の葉緑体のチラコイドの退化過程は *Elodea densa* (Ikeda and Ueda, 1964) の退化過程と似ていた。しかし、プラスト顆粒について言えば、本材料では *Elodea densa* のように数の増加はなく、サイズの増大のみが認められたので、この点は *Betula verrucosa* (Dodge, 1970) の報告に一致する。また、Cran and Possingham (1974) は *Spinacia* sp. の葉緑体の退化過程で大きなグラナを観たと報告しているが、これは本材料で認めたグラナチラコイドが膨潤したものと同じであろう。Mlodzianowski and Kwintkiewicz (1973) は *Brassica oleracea* L. var. *gongyloides* の葉緑体の退化過程で葉緑体中に長い均質なチラコイドが出現すると述べているが、本材料ではそのような像は得られなかった。また、葉緑体の退化過程中に結晶構造(Cran and Possingham, 1974) やフィトフェリチンの出現(Barton, 1970) が報告されているが、これらは本研究では観察されなかった。本材料の葉緑体の退化の過程はこの様にいくつかの点でこれまでの報告と異なる点が見られた。これは種の相違によるものであるとも考えられるが、葉緑体の退化の過程についてのこれまでの報告は本葉におけるものであるのもので、むしろ子葉と本葉の相違によるものであらうと考えられた。

レタス子葉中に見られた、ミトコンドリアは吸水開始後、色素体がまだ葉緑体にまで発達していない時期(0.5日目)に既に形が大きくなり、クリステが発達していた。また、葉緑体が活発に機能していると考えられる時期(15日目～21日目)にはミトコンドリアもまた最も発達していた(図11及び15, M)。葉緑体のストロマやグラナの膨潤する時期(26日目)以後、ミトコンドリアはやや小型となり、クリステも減少した。しかも、葉緑体の機能がかなり低下していると考えられる30日目にはミトコンドリア内に空隙が現れ(図17, M)、やがてさらに小型になった(40日目, 図20, M) が、正常な微細構造を呈していた。Dennis, Stubbs and Coultate (1967), Mlodzianowski and Kwintkiewicz (1973), Cran and Possingham (1974) らは、ホウレンソウやアブラナ科の葉で葉緑体が退化、崩壊した後にもミトコンドリアは存在していたと報告しており、本観察においても、同様の結果を得た。本研究で、葉緑体の発達や退化の過程とミトコンドリアの発達や小型化とは平行関係が見られた。さらに、子葉が活発に機能している時期は勿論の事、子葉が活動を開始する以前から、また子葉の機能が低下し停止する過程においても正常な構造を持つミトコンドリアを認めることが出来たということは、各々の時期に各々異なる量のエネルギーが必要であることを示しているものと思われる。

小胞体やゴルジ体は全過程で余り見られなかったのも、一般的な事は判らなかった。

上記の事から、本研究で用いたレタスの子葉は、発芽後約50日間を植物体の一部として存在していたが、そのうち吸水開始から約25日目までの前半は植物体の栄養を賄うために貯蔵物質を分解し、さらに光合成を行い、それ以後の後半は本葉の発達にともなって、子葉の役割は終了し、子葉は退化過程をたどるが、その最初の兆しは葉緑体のチラコイドの構造の変形として現れることが判った。

5. 引用文献

- Barton, R. (1970) *Planta* 94: 73-77.
 Casadoro, G. and Rascio, N. (1987) *Planta* 170: 300-307.
 Cran, D. G. and Possingham, J. V. (1974) *Protoplasma* 79: 197-213.
 Dennis, D. T., Stubbs, M. and Coultate, T. P. (1967) *Can. J. Bot.* 45: 1019-1024.
 Dodge, J. D. (1970) *Ann. Bot.* 34: 817-824.
 Garcia-Agustin, P. and Primo-Millo, E. (1989) *J. Exp. Bot.* 40: 383-390.
 Ikeda, T. and Ueda, R. (1964) *Bot. Mag. Tokyo* 77: 336-341.
 Mlodzianowski, F. and Kwintkiewicz, M. (1973) *Protoplasma* 76: 211-226.
 Yatsu, L. Y. (1965) *J. Cell Biol.* 25: 193-199.

図版説明

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 図1 吸水前の子葉細胞 | 図12 吸水後10日目の子葉細胞部分 |
| 図2 吸水前の子葉細胞部分 | 図13 吸水後15日目の子葉細胞部分 |
| 図3 吸水後0.5日目の子葉細胞部分 | 図14 吸水後21日目の子葉細胞部分 |
| 図4 吸水後1日目の子葉細胞部分 | 図15 吸水後21日目の子葉細胞部分 |
| 図5 吸水後1.5日目の子葉細胞部分 | 図16 吸水後26日目の子葉細胞部分 |
| 図6 吸水後2日目の子葉細胞部分 | 図17 吸水後30日目の子葉細胞部分 |
| 図7 吸水後3日目の子葉細胞 | 図18 吸水後35日目の子葉細胞部分 |
| 図8 吸水後3日目の子葉細胞部分 | 図19 吸水後40日目の子葉細胞 |
| 図9 吸水後5日目の子葉細胞 | 図20 吸水後40日目の子葉細胞部分 |
| 図10 吸水後5日目の子葉細胞部分 | 図21 吸水後50日目の子葉細胞部分 |
| 図11 吸水後10日目の子葉細胞部分 | |
- (スケールは1 μ m)

略語：C＝葉緑体，CW＝細胞壁，ER＝小胞体，G＝ゴルジ体，g＝グラナ，M＝ミトコンドリア，
 m＝ミクロボディー，N＝核，P＝プロテインボディー，pg＝プラスト顆粒，pp＝前色素体，
 S＝スフェロゾーム，st＝デンプン粒，V＝液胞
 矢頭；グラナチラコイド，矢印；ストロマチラコイド









