

ホウレンソウの葉身微細構造に およぼすオゾンの影響

矢吹駿一・松崎敏英

Influence of Ozone on Fine Structure of Spinach Leaves

Shun-ichi YABUKI and Toshihide MATSUZAKI

緒 言

光化学オキシダントによる植物被害は、葉身に発現する白色の小斑点を主とする各種の斑点症状が一般的である。この他、クロロシス、ネクロシスあるいは葉の黄化や色素発現を伴うことがあり、急性の落葉現象も見られる。これらを総称して一般に可視障害と呼んでいる。

これに対し、植物生育におよぼす慢性的な影響や老化の促進、酵素活性、光合成能等の生化学的あるいは微細構造の形態変化に及ぶ被害がある。これら通常肉眼的に確認し得ない被害を指す概念として、不可視障害⁽⁷⁾という言葉が提言されている。しかし、今日の科学的手法によるならば、これらの障害をも不可視障害とするのは適当ではないかも知れないが、本報告では、従来の慣例に従い急性の可視障害以外の障害を不可視障害と定義する。

オキシダントとは、大気中の酸素によって酸化されない中性ヨウ化カリウムを酸化してヨウ素を遊離させるような過酸化物質を含む物質の総称である。これらの中にはオゾン、窒素酸化物、有機過酸化物質、パーオキシアセチルナイトレート (PAN) などが含まれている。このうち、オゾンの占める割合は90%程度といわれている⁽⁸⁾。

筆者らは光化学オキシダントが農作物の生育、収量におよぼす影響を解析するために、不可視障外の判定方法の確立および被害発現の機作に関する研究を実施中である。さきに、ホウレンソウに対するオゾンの接触処理が、光合成速度に影響をおよぼすことを報告⁽⁸⁾した。

本報では、ホウレンソウの葉身の器官および組織微細構造の変化を細胞レベルでとらえた観察知見を報告する。

本研究の実施にあたり、超薄切片の作製法等、電子顕微鏡による観察手法については、東京農業大学教授中村重正博士ならびに同講師齋藤紀子氏の御指導に負うところが多かった。ここに記して厚くお礼を申し上げる。

1. 実験方法

(1) 試料の育成方法

1979年8月16日に、a/5000ワグネルポットにホウレンソウ(品種:深緑)をは種し、ポット当り3株仕立で栽培した。施肥および耕種管理については、空気浄化の条件以外は通常の方法によった。また、空気浄化方法は、光化学オキシダント発生時の影響を避けるため、オゾン接触当日まで空気浄化室(Filtered Air Chamber:FAC)⁽¹²⁾内に配置した。

(2) オゾンの接触処理方法

9月23日に、平均12葉期のホウレンソウに対してオゾン接触処理した。処理は1組2室で構成されているグロスキャビネット(コイトロン, 2S-A型)を用い、自然光(晴天)で、室温25°C、湿度70%の条件で実施した。

グロスキャビネットの一方の室は、オゾン発生機で生成したオゾンを0.2ppmの濃度になるよう調整導入する接触室とした。また、他の一室は通常空気のみを導入する無処理室とし、オゾン無処理および接触処理終了後のポットを配置する対照室とした。なお、接触処理当日の外気空気中のオゾン濃度は、日最高値が0.04ppmを越えることがなく、オキシダントによる植物影響は無視で

きるものであった。

オゾンの接触は午前9時より開始し、影響を接触累計時間数で把握するため、2時間間隔で8時間までの4処理区分とし、それぞれ3ポットを供試した。

オゾン処理による可視障害の調査は、翌日の午後、葉身に発現した被害症状と、その程度を光化学オキシダント被害調査法⁽³⁾に準じて行い、被害症状と被害面積率を調査した。

(3) 電子顕微鏡観察用試料の作製と観察方法

被害調査終了後直ちに、最大被害面積率を示した第7～8葉の葉身中央部から、5mm平方の葉肉組織を切り出した。切片は氷冷下の4%グルタルアルデヒド溶液中で前固定を行い、その後2%オスミウム酸溶液中で後固定を行なった。固定後の脱水操作はエタノールシリーズにより実施した。

透過型電子顕微鏡(以下、TEMと記す)による観察用の試料は、脱水後エポキシ系樹脂に包埋、硬化させ、葉身の表裏に沿った面の超薄切片を作製した。切片の電子染色は、酢酸ウラニルおよび酢酸鉛の二重染色とした。観察に用いたTEMは、JEM, T-7S(日本電子製)で、加速電圧は60KVである。

走査型電子顕微鏡(以下、SEMと記す)による観察試料は、脱水後エポキシ系樹脂中に浸漬し、液体窒素中で凍結割断⁽⁵⁾し、葉肉組織断面の切片を作製した。切片はプロピレンオキサイド中で脱樹脂を行い、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥法⁽¹⁾により乾燥した。観察に際しては金(Au)をイオン化させコーティングした。使用したSEMは、MSM, 4C-101S(日立-明石製)で、加速電圧は15KVである。

なお、葉緑体、プラスト顆粒およびでんぷん粒の計測

は、 5×10^3 ないし 1×10^4 倍で撮影した写真により行った。測定に供した切片数は、各処理につき10個以内とした。

2. 実験結果

(1) 可視障害の発現状況

0.2 ppmのオゾンを2時間から8時間まで接触した場合の可視障害の発現程度を第1図に示した。2時間の接触で、第7～8葉に白色小斑点状の症状が発現したが、被害面積率は10%以下であった。

被害面積率は接触時間を増すに従って増加した。最も激しい症状を示した第8葉の4, 6, 8時間接触処理における被害面積率は、それぞれ30, 70, 80%を示した。また、障害の発現葉位も接触時間の増加とともに下位葉に及び、6時間の接触で5～6葉位にも発現し、8時間では第3葉位にまで達した。しかし、第1, 2葉位および第11葉以上の葉には可視障害は認められなかった。

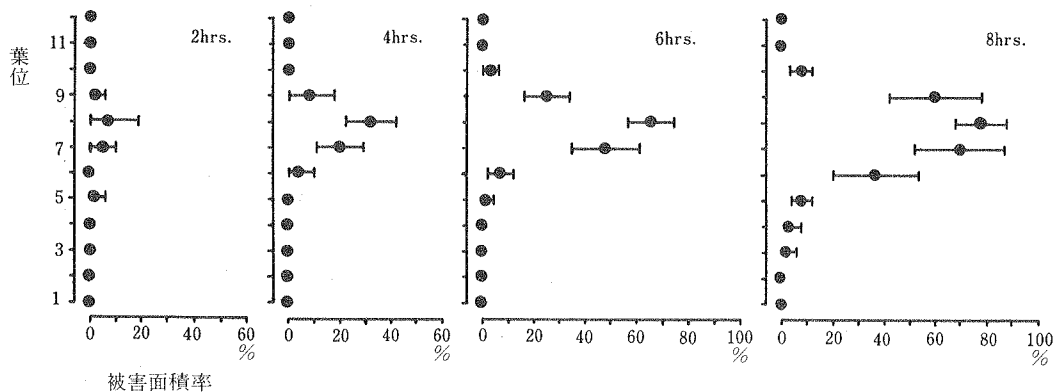
被害症状は、白色小斑点状のものが大部分を占めたが、6時間接触では斑点が拡大し、それぞれが融合して白色不定形の大型斑点を形成した。さらに8時間接触ではクロロシス症状を示し、甚だしいものは脱水してネクロシス症状を呈することもあった。

これらの可視障害の発現状況は、野外ほ場でホウレンソウが受ける光化学オキシダントの障害のうちの、オゾンタイプの被害と類似していた。

(2) 葉身組織構造の変化

一般に光化学オキシダントによる障害は、気孔を中心に発現するとされている⁽⁶⁾そこで、オゾン接触葉と健全葉(無接触葉)をSEMにより比較観察し、葉身組織構造に及ぼすオゾンの影響を調査した。

写真1に示すように健全葉では、葉身裏面の気孔の大部分は閉鎖していた。これに対して、6時間接触葉の同



第1図 オゾン接触処理時間数の増加による葉位別被害面積率の変化(mean ± S.D.)

部位の気孔は、写真2に示すように開放しているものが多かった。この現象は気孔密度の少ない葉の表面においても同じ傾向を示した。しかし、6時間または8時間の接触においても気孔が閉鎖している部分が認められるなど、接触時間数と気孔開閉の程度との間には必ずしも明確な関係は認められなかった。

次に、葉身断面の組織を観察した結果を写真3に示した。健全葉では、表皮組織、柵状組織、海綿状組織および通導組織等の基本的な組織系は整然と配置されており、柵状組織の細胞内には多数の葉緑体が含まれていた。これに対して、写真4に示す4時間接触葉では、表皮系を除く各組織の結合が緩かになり、細胞間げきが大きくなる傾向が観察された。さらに接触時間を増し、8時間接触すると、写真5に示すように細胞は萎縮し、組織はかなり破壊された。また、これら組織系の変化に伴って、柵状組織中の葉緑体の減少が認められた。この変化は、4時間接触（写真7）までは健全葉（写真6）との間に差は見られなかったが、8時間接触（写真8）では明らかに減少した。

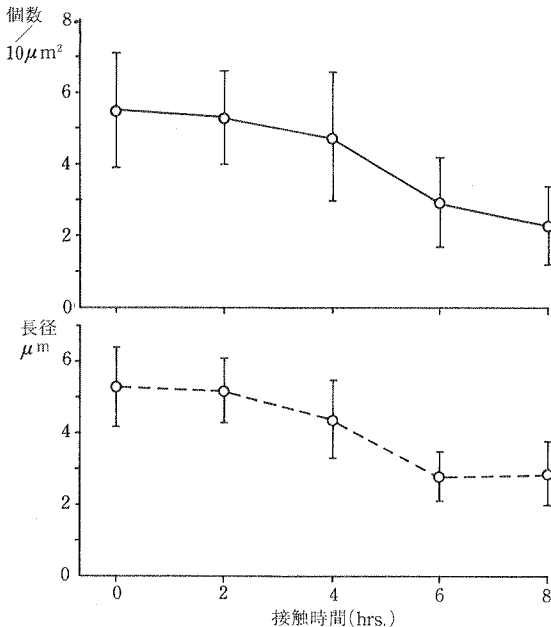
(3) 細胞質微細構造の変化

柵状組織の細胞の構造の変化をSEMにより観察した。写真9に見られるように、健全葉における正常な構造は、細胞壁に囲まれた細胞質の中央には液胞が形成され、

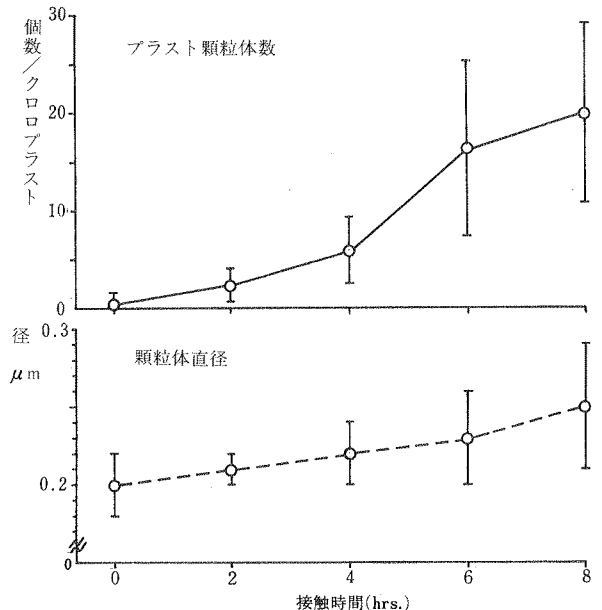
葉緑体、ミトコンドリア、マイクロボディ等が細胞膜に接して存在する。さらに写真12に示す葉緑体の断面では、紡錘型の中央部に大型のでんぶん粒が形成され、その周囲にストロマ部がある。また、ストロマ部には写真15に示すように規則的に積層された膜構造を持つグラナメラと、それらを連結するインターグラナメラが発達していた。基質はリボソームによって満たされており、また少数ではあるが、直径200~250nmの好オスミウム染色性を持つプラスト顆粒が認められた。

これに対して、4時間接触では白色小斑症状を呈した部分の細胞は写真10、13に示す変化が認められた。すなわち、基本的な構造や配置は健全葉と大差なかったが、葉緑体数の減少とともに、形状がやや丸味を帯びてきた。さらにグラナメラの構造は、積層が乱れるとともに薄くなり、密度が減少した。また、プラスト顆粒はやや増加する傾向が認められた。

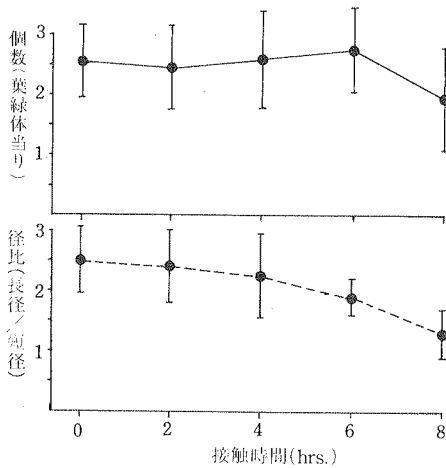
さらに8時間接触処理した葉身部の細胞は、著しい変化が認められた。すなわち、写真11に示すように細胞膜は原形質分離を起したり、膜が破壊された。また、細胞質内の配置もかなり乱れていた。葉緑体は写真14に示すような球形になり、縮小するとともに密度も著しく減少した。さらに、写真16に示すように葉緑体のグラナメラの多くは消失し、残ったものも細断されたように散在



第2図 柵状組織細胞における葉緑体の数と大きさの変化 (mean \pm S.D.)



第3図 葉緑体内のプラスト顆粒体の数と大きさの変化 (mean \pm S.D.)



第4図 葉緑体内、でんぶん粒の数と形状の変化
(mean ± S.D.)

するにすぎなかった。これに対して、プラスト顆粒は明らかに増加した。

以上に述べた細胞質内のいくつかの物質について、計測を行った結果を第2, 3, 4図に示した。第2図は葉緑体の数と形状を示したものである。すなわち、一定視野(10 μ m²)中の個数は4時間接触で減少し、6時間接触では健全葉に比較して有意な差となった。また、形状は長径と短径の比が小さくなり、著しく小さな球形になり、6時間接触で有意差が認められた。一方、グラナラメラ構造の消失にともなって増加するプラスト顆粒は、第3図に示すように4時間接触処理から増加し、6時間では急激に増加した。また、葉緑体内のでんぶん粒は、接触時間の増加に伴って細分され、数はやや増加する傾向が見られたが、8時間接触では数も減少した。また、形状も球形化することを認めた。

3. 考 察

SEM観察に供する植物の組織断面の試料を作製する場合、試料固定の前あるいは後に鋭利な刃物で切断する方法がある。この場合、切断時の刃の滑りで断面の細部が埋り、観察に適する部分が極く限られることが多い。また、固定後に凍結させて、刃物等で打ち割り破断面を作る方法もあるが、この場合も凍結時に内部に氷晶が生じて構造の変性や亀裂が生じやすい。これに対して、今回実施した樹脂に浸漬した後に液体窒素中で凍結切断する方法⁽⁵⁾は、これらの欠点を補い比較的容易に観察に適する試料が得られた。本法は、今後SEM観察用の植物試料の作製に広く利用できるものと考えられる。

光化学オキシダントにより障害を受けた葉の気孔は、開放した状態で観察されることはイネ⁽⁶⁾アサガオ⁽¹³⁾等で報告されている。その原因は孔辺細胞が障害を受けて機能を失い、本来閉鎖すべき環境におかれても閉じなくなることによるものと考えられている。今回のハウレンソウの場合も同じ傾向が認められたが、一方では、長時間の接触処理の後でも、閉鎖した状態の気孔も観察された。このことから、同一の葉身においてもオゾンの影響は異なることが示唆された。

初期の可視障害は、葉の表面に白色小斑点が発現することは先に述べたとおりである。光学顕微鏡によるアサガオの葉の観察では、表面に近い柵状組織から障害が起るとされている⁽²⁾。今回のSEM観察においても、柵状組織内部の葉緑体の減少が認められた。これらのことから、主に葉裏の気孔から侵入したオゾンは、裏面に近い海綿状組織の間げきを通過して、柵状組織を侵すことから始まり、次第に周辺の組織に障害をおよぼすものと推察された。

一般に双子葉植物の葉緑体は、長径5~6 μ mの紡錘型をしているが、老化に伴って球形化するとともに小さくなりやがて消失する。このような形態の変化は自然条件下では葉の老化あるいは、人為的に茎から切り離れた葉を水に浸漬させるような障害を与えた場合などにも見られることが報告されている⁽¹⁴⁾。ハウレンソウの葉身においても、オゾンの接触により、葉緑体の形状が球形化し縮小することおよび、数が減少することが認められた。

また、オゾンに接触した葉緑体内の変化の一つに、グラナラメラ構造の壊変がある。すなわち、グラナラメラは規則的に積層された袋状の膜構造から成り、内部にクロロフィルがリン脂質と結合した状態で、タンパク質とともに安定した状態で存在する⁽¹⁵⁾。この構造はオゾンの接触により、次第に積層が不規則となり消失して行くことが認められた。また、もう一つの変化として接触時間の増加と共にプラスト顆粒が増加することも確認した。この顆粒体は、かなりの脂質を含むことからラメラ構造の破壊にともなって遊離した脂質が蓄積されたものと考えられている⁽¹⁶⁾。

グラナラメラは植物の光合成活動に大きく関与する明反応の場である。ラメラ構造がオゾンにより破壊されると、葉緑体中のクロロフィルは消失する。そして、これが結果的に光合成能力の低下につながる。野外で光化学オキシダントの影響を受けたポプラ⁽⁴⁾やオゾン接触処理をしたハウレンソウ⁽⁸⁾の光合成速度の低下はすでに確認

されている。今回の実験においては、微細構造上の変化として改めて確認された。

先に述べたように、これら葉緑体微細構造の変化は、何らかの原因によって葉緑体が退化する際の共通した現象である。自然条件下では初秋から晩秋にかけての樹木の葉の黄化や紅葉する時の変化として徐々に進行する。しかし、オゾンとの接触においては、これらの変化が数時間のうちに急激に進行した。この結果、光合成能力は急激に低下し、物質生産が著しく阻害されることになり、生育途上の作物に対して、無視できない影響を及ぼすものと考察された。

摘 要

12葉期のホウレンソウに対し、0.2ppmのオゾンを2時間間隔で8時間まで接触し、葉身部の器官および細胞の微細構造におよぼすオゾンの影響を電子顕微鏡により観察したところ、おおむね次のような知見が得られた。

1. 可視障害は2時間処理から発現し、処理時間の増加に伴って発現葉位と被害面積率は、ともに増加した。

2. 葉身裏面の気孔は6時間処理で開放しているものが著しく増加した。葉肉組織は2～4時間処理により細胞間の結合が乱れる傾向が観察された。

3. 柵状組織細胞の葉緑体数は4時間処理により減少し、形状は紡錘形から球形に変化し、6時間処理で健全葉に対して有意な差が認められた。

4. 接触処理の時間数を増すほど葉緑体ストロマ部のラメラ構造は崩壊し、プラスト顆粒は増加した。また、この現象が光合成速度の減少と密接に関係するものと推

察された。

5. 以上の微細構造の変化は、双子葉植物の正常な生育過程においては葉の老化に伴って緩かに進行する現象とされているが、オゾンとの接触においては、これらの現象が数時間のうちに急激に進行することが示唆された。

引用文献

(1) 肥高洋, 永谷隆: HITACHI TECHNICAL DATA (SEM No.3), 1973

(2) 飯島勉, 管田重雄, 大平俊男: 東京都公害研究所光化学スモッグ研報4, p.105~107, 1975

(3) 関東地方公害対策推進本部大気汚染部会: 光化学スモッグによる植物影響調査報告書, 1976

(4) 久野春子: 大気汚染学会誌15(5), p.207~212, 1980

(5) 永谷隆: HITACHI TECHNICAL DATA (SEM No.7), 1975

(6) 中村拓: 農林水産省農業技術研究所研報D30, p.1~68, 1979

(7) 中村拓: 農業技術32, p.539~543, 1979

(8) 大嶋保夫, 矢吹駿一, 前野道雄: 神奈川県農業総合研究所研報121, p.45~50, 1980

(9) 大平俊男: 東京都公害研究所光化学スモッグ研報1, p.1~28, 1971

(10) TOYAMA, S and UEDA, R: Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku, p.31~37. 1965

(11) 遠山益, 大平俊男, 沢田正: 東京都公害研究所光化学スモッグ研報3, p.607~625, 1974

(12) 矢吹駿一, 大嶋保夫, 前野道雄, 篠崎光夫, 水沢芳名: 神奈川県農業総合研究所研報120, p.27~39, 1978

(13) 山田美男, 長沢允子: 細胞7, p.37~49. 1975

SUMMARY

The fine structure of organs, tissues and cells of spinach (*Spinacia oleacea* L.) leaves fumigated with ozone was observed by transmission and scanning electron microscope.

12th-leaf-stage plants were examined for this purpose. Fumigation of ozone at 0.2 ppm were continued for 2 to 8 hours at intervals of 2 hours in a controlled-environmental fumigation chamber.

The visible injury caused by ozone was appeared in 2 hours fumigation, and number and rate of injured leaves area were increased along with the exposure rate.

The rate of stomatal opening on the reverse side of leaves were conspicuously increased with 6 hours exposure of ozone. The interconnection of cells in the mesophyll showed a tendency to become loose with 2 to 4 hours of exposure.

The number of chloroplast in palisade cells were decreased for 4 hours-exposure and its shape was

changed from globular into spindle. Significant difference at 6 hours of exposure were recognized on the leaves as compared with those of control.

It was recognized that break down of stroma-lamella-body and increased number of plastoglobule were increased along with the elongation of exposure treatment. And relationship was found between these changes and depression rate of photosynthesis by plant.

In the normal growth of dicotyledons, the above changes occur slowly along with aging of leaves. Beside, the fumigation of ozone, accelerated the structural changes of plants. It was suggested that these changes might be responsible or drastically prompting the aging of plant within several hours.

写真説明

- | | |
|---|--|
| 1. 葉身裏面の気孔 (O ₃ 無処理葉:健全葉) | 2. 葉身裏面の気孔 (O ₃ 接触2時間) |
| 3. 葉身の断面 (O ₃ 無処理葉) | 4. 葉身の断面 (O ₃ 接触2時間) |
| 5. 葉身の断面 (O ₃ 接触6時間) | 6. 柵状組織細胞内の葉緑体 (O ₃ 無処理葉) |
| 7. 柵状組織細胞内の葉緑体 (O ₃ 接触2時間) | 8. 柵状組織細胞内の葉緑体 (O ₃ 接触8時間) |
| 9. 柵状組織の細胞質 (O ₃ 無処理葉) | 10. 柵状組織の細胞質 (O ₃ 接触4時間) |
| 11. 柵状組織の細胞質 (O ₃ 接触8時間) | 12. 葉緑体の断面 (O ₃ 無処理葉) |
| 13. 葉緑体の断面 (O ₃ 接触4時間) | 14. 葉緑体の断面 (O ₃ 接触8時間) |
| 15. 葉緑体の断面中のラメラ構造 (O ₃ 無処理葉) | 16. 葉緑体の断面中のラメラ構造 (O ₃ 接触8時間) |

記号説明

CW:細胞壁, V:液胞, CP:葉緑体, M:ミトコンドリア, S:でんぷん粒, G:グラナラメラ,
P:プラスト顆粒,

