



Title	辺心材放射柔細胞の走査型電子顕微鏡による予備的観察
Author(s)	深沢, 和三; 今川, 一志
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 27(1), 79-90
Issue Date	1970-07
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/20872">http://hdl.handle.net/2115/20872</a>
Type	bulletin (article)
File Information	27(1)_P79-90.pdf



[Instructions for use](#)

# 辺心材放射柔細胞の走査型 電子顕微鏡による予備的観察<sup>†</sup>

深沢和三\* 今川一志\*\*

Some Preliminary Observations of Ray Parenchyma  
Cell by the Scanning Electron Microscopy

By

Kazumi FUKAZAWA and Hitoshi IMAGAWA

## 目 次

まえがき	79
材料および方法	80
結果および考察	81
1. 辺材	81
2. 移行材	84
3. 心材	85
ま と め	86
文 献	87
Summary	87
Explanation of photographs 1~39	88

## まえがき

走査型電子顕微鏡による木材組織の観察は、まだ端緒についたばかりである。透過型電子顕微鏡にくらべて、走査型電子顕微鏡は、試料作成の容易さ、焦点深度の深さなど大きな利点があると考えられ、その木材研究の適用性についての試みは、当教室の石田、大谷らによりなされてきている<sup>1,2)</sup>。

われわれはその一つの応用として単に木材構成要素の形態的な特徴の観察だけでなく、材形成、心材形成の細胞学的な研究の観点から、細胞内容物を直接観察し得ないであろうかと考え、研究に着手した。生きている細胞内の諸器官の形態や構成の変化、また死んだ細胞内の老

<sup>†</sup> 心材形成機構に関する研究 (第7報) Studies on the mechanism of heartwood formation. VII.

第6報: 樋口隆昌他, 木材誌 13 (7), 274, 1968.

\* 北海道大学農学部林産学科 木材理学教室 助教授 農学博士

\*\* 北海道大学農学部林産学科 木材理学教室 助手 農学修士

廢物の形態などから、細胞の機能についての知見を得ることであり、透過型電子顕微鏡による研究では最近めざましく多くの新しい知見を提供している。しかし走査型電子顕微鏡ではこれらの面の研究の可能性すら論ぜられていない。

本報告は、この面における研究の端緒として、辺・心材の放射柔細胞について観察した予備的な成果である。本研究の第1報<sup>3)</sup>、第2報<sup>4)</sup>、第4報<sup>5)</sup>で得た放射柔細胞の光学顕微鏡下での細胞化学的な結果、および野淵、原田らの透過型電子顕微鏡下での結果<sup>6)</sup>をもとにして考察し、今後の研究への手がかりとしたい。

本報告は石田茂雄教授の懇切な御指導をいただいたものであり、深く感謝するとともに、実験にあたり助言を得た大谷諄助手に対し、心から謝意を表す。また多くの助言をいただいた京都大学木材研究所樋口隆昌教授に対し厚く感謝の意を表す。

### 材料および方法

試料として用いた樹種および採取した場所および期日は次のとおりである。

トドマツ	<i>Abies sachalinensis</i> FR. SCHM.	野幌国有林	4. 24, 1969
カラマツ	<i>Larix leptolepis</i> GORDON	苫小牧地方演習林	5. 20, 1969
ミズナラ	<i>Quercus crispula</i> BLUME	雨竜地方演習林	11. 19, 1968
シナノキ	<i>Tilia japonica</i> SIMK.	苫小牧地方演習林	4. 11, 1969

トドマツおよびミズナラについては、伐採後直ちに胸高部円板から新鮮組織を採取したものであり、カラマツおよびシナノキは、胸高部位について10 mm 生長錐にてコアを採取した。いずれも採取後直ちにFAA液、ニューカマー液などにて固定した。固定後十分に水洗し、観察面(多くは半径断面、10×10 mm の大きさ)をマイクロームにて仕上げ、厚さ約3 mm の試片を、辺材外側部または辺材中央部、心材中央部の2カ所(トドマツのみ移行材部を含む3カ所)から作成した。試片をシリカゲル・デシケーター中で十分乾燥後、導電性銀ペーストで銅製試料台(走査型電子顕微鏡用)に接着し、真空蒸着装置により観察面に金の薄層を蒸着した。この検鏡用試料の作成方法は、当研究室で常用しているものであり<sup>1,2)</sup>、とくに本研究の課題にあたり、検討または工夫を加えたものではない。

なおトドマツの一部試片は、採取後直ちにドライアイスで凍結させ、その後液体窒素を用いて真空乾燥する簡便な凍結乾燥法で処理した。

走査型電子顕微鏡は日本電子 K.K. JSM-2 型であり、試料観察面は電子線に対して45°の角度で設置されており、したがって写真における倍率は垂直方向1に対し、水平方向では0.7の割合を示す。

供試木は、針葉樹の着色心材-カラマツ、未着色心材-トドマツ、ならびに広葉樹の規則的心材-ミズナラ、不規則心材-シナノキの4種で、その心材形成における差異を追求することを

目的としたものである。しかし本報では、辺材から心材への連続試片採取、また季節べつ採取をしたものでなく、その予報として、辺心材間の細胞内構造の典型的な差異について考察したい。

## 結果および考察

### 1. 辺材

辺材の放射柔細胞は、核をはじめミトコンドリア、ゴルジ体、ER、プラスチド、リボゾームなどいわゆる細胞器官が豊富に存在することは透過型電子顕微鏡で示されている<sup>6)</sup>。

本報告の走査型電子顕微鏡における観察でも、放射柔細胞においてこれらの諸器官の存在が認められた。ただ透過型電子顕微鏡の超薄切片とは異なり、いわゆる裂開面の表面の観察となるので、細胞が分断され、その中の諸器官が観察面に残存するという条件がなければならない。すなわち残存する諸器官の多くは細胞膜内壁にへばりついたような形となる。これらから細胞内において本来あるべき姿を想像し、また諸器官を同定することが必要になってくる。同定は現在までの光学顕微鏡下における結果<sup>3-5)</sup>、および電子顕微鏡下における観察結果<sup>6,7)</sup>などの諸器官の形態ならびにディメンションからなされた。しかしミトコンドリア、ゴルジ体などについては、本報告の観察結果からは確認することがむずかしく、現在のところ単なる推量にとどまった。

Photo. 1 から Photo. 10 までは、トドマツ辺材最外側の放射柔細胞の観察結果である。また Photo. 11 から Photo. 15 まではカラマツ辺材部の中央、Photo. 16 から Photo. 19 まではミズナラ辺材部の最外側、Photo. 20, 21 はシナノキの辺材外側の放射柔細胞である。以下観察された細胞内諸器官について樹種べつに検討してみる。

**核** Photo. 1 から Photo. 5 まで、トドマツの棒状放射柔細胞核が認められる。トドマツおよびエゾマツの最外側において、放射柔細胞核が長い棒状を示すことは、すでに第2報<sup>4)</sup>の光学顕微鏡における観察で報告した。すなわち核の細長比は春材部においては最外側年輪で10~12であり、2年輪目以降急激に減少し移行材まで3~4を示す<sup>4)</sup>。第2報における測定ディメンションは、最外側において短径4~5 $\mu$ 、長径30~40 $\mu$ であったが、Photo. 1 から Photo. 5 までの核の短径が4~6 $\mu$ であること、また Photo. 3 における核の長径が約35 $\mu$ であることとよく一致している。本来細胞の中央にあり、核液(核基質、核原形質)が充満していた核が、写真上では板状で細胞内壁にへばりついた形で認められるのは、試片処理過程での核液の消失または凝固によるものと思われる。また核膜上の多くのしわはそのための落ち込みによるものと解釈されよう(Photo. 1~3)。Photo. 4 は核の内部が露出されたものである。空隙としてみえるものが、核液の消失したあとで、その中に写真で認められるような細長い果粒状の小体がつまっていたとみることができよう。この果粒状構造体が、染色質または染色体に相当すると考えられよう。あるいはRisのいうところによる染色体間にみえる果粒状または小繊維状のもの

との混在とも考えられる<sup>7)</sup>。Photo. 5は簡易凍結乾燥法の処理によった試料であるが、核の様相は大分異なってみえる。この試料の位置はPhoto. 1から4までの辺材最外側と異なり、辺材の内部に入っている放射柔細胞であるので直接最外側のものと比較することはできない。核液の消失による落ち込み的なものはみられず、表面にクレター状の孔がみられる。核膜の膜孔の径は文献<sup>7)</sup>によると300~400 Å、大きなもので1000 Åの径と報告されている。Photo. 4の孔の径は約5000 Åであり非常に大きい。膜孔の大きさや数は生物の種類によっても、また同じ種類でも活性の違いによって異なる<sup>7)</sup>と報告されているが、本報のPhoto. 5における孔状のものはディメンションも大きく、膜孔もしくは処理による人工的なものであるかどうか判定することはできない。このように簡易凍結乾燥法による核は、他の薬品固定による核と異なった様相を示したが、今後検討しなければならない課題である。

Photo. 12, 13, 14にはカラマツの放射柔細胞核が認められる。カラマツの核は、トドマツよりも細長比は小さく、辺材中央で2~3を示す<sup>4)</sup>。写真上では、その大きさおよび核表面の形態により、周辺のアミロプラストと区別することができる。カラマツにおいて辺材最外側のものについては、いまだ観察していないので、核形態の推移をみることはできないが、写真の辺材中央部では、落ち込みが少ない原形に近い楕円体を保っていると推察される。核膜のしわも比較的少ない。

Photo. 16にはミズナラ辺材最外側の放射柔細胞核が認められる。第2報<sup>4)</sup>において広葉樹の核は、最外側で紡錘状(両端が長く突き出している)、辺材内部では漸次球状に変化することを指摘した。Photo. 16は、この紡錘状の核の形態を示すものである。

Photo. 20, 21はシナノキ辺材の放射柔細胞核が示されている。第2報<sup>4)</sup>の光学顕微鏡下でのシナノキ放射柔細胞核の観察において、紡錘状核の左右両側先端部の突出が、他の広葉樹より長く、そのため核の細長比も比較的大きいことをみいだした(写真未発表)。Photo. 20, 21において、核はその内壁への付着のしかた、また小器官の付着によって多少の変形もあろうが、両端部の長い突出が認められよう。この突出部がERに接続しているものと思われるが、これについては後述する。

**原形質膜** 原形質膜が走査型電子顕微鏡写真で明瞭な膜として認められるのは、原形質が細胞膜と離れており裂開面の残存側に残ることが必要となってくる。Photo. 17と18にミズナラ放射柔細胞の原形質膜の表面と、その向う側の細胞質諸器官の存在が示されている。その他の場合としては、原形質膜の内面が細胞内諸器官と共に、細胞膜内壁に付着した形で見えるもの(Photo. 1~4, 6~9)と、本来細胞内壁に付着するものが原形質膜の乾燥の際、破壊され残渣物として諸粒子にくっつき、細胞膜内壁が露出されてくる場合(Photo. 5, Photo. 20の一部)が認められる。いずれにしても写真上からは、非常に薄く(40~60 Å<sup>7)</sup>、脱水状態では裂け易いことが観察される。膜表面の観察は、この電子顕微鏡の分解能(250 Å)では可能でない。

**アミロプラスト** プラスチドのうち、デンプンの貯蔵をおもな役目とするものをアミロ

プラストとよんでいる<sup>7)</sup>。中に含まれるデンプン果粒の数はいろいろ報告されている。本観察においても多くのアミロプラストが認められる (Photo. 1~3, 5, 6, 10~17, 19)。デンプンの存在は第1報<sup>3)</sup>のヨードヨードカリ反応で確かめられたことであり、本報でも予備的に光学顕微鏡で確認した。アミロプラストの膜面は非常に平滑である。また中に含まれるデンプン粒の数、および大きさにより、球形から楕円体または不定形の種々の形態をとっていることが認められる。アミロプラストの細胞内の量については、季節的または樹皮側から内側へ連続的にみることが必要となってくるが、実験では裂開面からこぼれてしまうことも多く認められ注意が必要であろう。なおプラスト中には、油を含むもの (エライオプラスト)、タンパクを含むもの (タンパクプラスト) などがあるとされているが<sup>7)</sup>、本実験ではアミロプラストと区別してみることができなかった。またアミロプラスト中のデンプン粒の分解によると思われる変形のプラストがみられるが、系統的に調べたものではなく確認することはできない (Photo. 15, 19)。

**ER** ER (endoplasmic reticulum, 小胞体) は袋状、小さな丸いあわ状、細管状の形をとり、複雑に枝分かれをしたり、互いにどこかでくっつき合っていると報告されている<sup>7)</sup>。Photo. 1~3, 6~9においてはトドマツ辺材外側におけるERが示されている。とくにPhoto. 2 (Photo. 1の上部細胞の拡大観察)の核上方には、網状のERが認められるが、これは1945年にPORTERらが<sup>8)</sup>、電子顕微鏡で初めてレース状の網状物質を認めて、lace-like reticulum, cytoplasmic reticulumと呼び、以後ERなる名称が一般に使われるようになってきたものとよく一致しており、その立体型を示しているように思われる。Photo. 2, 3および9において、針葉樹における棒状核との関連におけるERがよく認められる。すなわち核膜のしわが延長してERとなっているように見える。このように核膜の外膜が細胞質中にのびてERとなること、また核分裂の終期にERが娘染色体のそばに寄ってきて核膜を作ることから、核のまわりを包むERがすなわち核膜であるという考えが一般に受け入れられている<sup>7)</sup>。

Photo. 6~9においては、細胞質中に長くのびている細管状のERがみられる。その途中におけるこぶ状の隆起は、前述の袋状、あわ状、細管状のERの相互移行と考えられ<sup>7)</sup>、とくに細管の結合点が小胞状になっているのが多く認められる。ERに付着するリボゾーム (150 Å 径<sup>7)</sup>) については分解能以下であり、観察は可能でない。Photo. 13のカラマツの核からのびているものは、平らな袋状のERと考えられる。

広葉樹においてはPhoto. 16のミズナラ、Photo. 20, 21のシナノキの写真においてERが認められるが、とくに核との関連において核の両側突出部とERとの連結が密接であり、その限りでいえば核の長い突出部分は、袋状のERであるといえるかもしれない。

**ミトコンドリア、ゴルジ体など** ミトコンドリア、ゴルジ体は、超薄切片における断面形態観察により与えられてきたものであり、本実験での走査型電子顕微鏡による表面観察およびとくに残査的形態から判定することは困難であった。写真上において、前述のERと共に存在する粒子状または不定形のもので、それらしいとも思えるし、前記ERのとくに袋状、小胞

状のものとの区別も定かでない。ミトコンドリアの大きさは、短径  $0.3\sim 0.8\ \mu$ 、長径  $0.4\sim 3.0\ \mu$ 、長いもので  $10\sim 20\ \mu$  と報告されている<sup>7)</sup>。またゴルジ体は、長さ  $0.5\sim 1.5\ \mu$  のシステルネが  $6\sim 10$  枚ほど層板状に配列し、全体としては紡錘状、上からみると円盤状でその周囲には突起や小胞がみられるとされている<sup>7)</sup>。このディメンションを参考にしてみれば、Photo. 4 の核の上方の粒子はミトコンドリア、Photo. 6, 7 の不定形物体がゴルジ体、また Photo. 13 および Photo. 20, 21 にミトコンドリア、ゴルジ体のそれぞれ残査的に変形して残ったものがみられるようであるが、確認することはできない。

**細胞質基質** 細胞質基質は、水を分散媒として基質の主要部分であるタンパク質をはじめ、リボゾーム (RNP 果粒)、各種酵素やアミノ酸、脂質、炭水化物や種々のイオンなどが分散しているものと記述されている<sup>7)</sup>。本実験の場合、固定および乾燥処理においていわゆるタンパクの発泡現象ともいえるものが、ときおり観察された。Photo. 10 にその一例を示す。タンパク質鎖状分子の凝固という形で与えられたものと考えられるのか明らかでないが、その細胞の状況によって偶然的に生じたものと考えられる。Photo. 10 は簡易凍結乾燥によるものであるが、他の固定にもみられ、とくにグルタルアルデヒド前固定において顕著にみられた。

## 2. 移行材

トドマツについてのみ、移行材部の放射柔細胞について観察した。しかしトドマツは熟材樹であるので辺心材移行材部の判定はむづかしく、写真でみる限りにおいてはむしろ辺材最内側部と考えられる。Photo. 22 から Photo. 26 までに示す。いずれの写真でも核が認められる。前述したように核の細長比は、辺材最外側に比べて小さい。また Photo. 22, 23, 26 から認められるように、乾燥処理後においても原形に近い楕円体を保っているように思われる。このことは核液の流動性がとぼしくなり、乾燥による核液の消失と落ち込みが少なくなると考えられる。このような核が多く認められるなかで、Photo. 24, 25 のような辺材外側に近い板状の落ち込みを示す核もみられる。前述の核の硬化の前段階であるか、このまま崩壊の過程をたどるかは確認できない。いずれにしても核からの ER の突出は極めて少ない。とくに硬化状の核では顕著に認められる。光学顕微鏡下での過去の観察結果<sup>3~5)</sup>、また前述の辺材における核および核との関連における記述から核の活性について考察すると、活性の高い核は、針葉樹ではディメンションが大きく、核液の流動性高く、核膜の多くのしわから ER が接続していると考えられる。辺材内部および移行材における核の形態は、老化による活性の低下によるものと考えられよう。前述のしわの多い移行材の核は、それ自身ある程度の活性を保ち、心材物質形成の機能ももちうる細胞(後述)とも考えられるが、今後の研究にまちたい。また広葉樹については移行材の核を観察していないが、核の活性の低下(老化)により、両端突出部の ER が退化し球形になるものと想像できよう。

移行材における細胞質中の ER その他諸器官の確認も極めて困難になる。また Photo. 26 にみられるように、原形質膜の乾燥による破壊と共に細胞膜内壁が露出され、残査的に付着す

る確率が非常に多くなるようにみうけられた。デンプン粒の移行材における分解については、写真上から示唆はあたえられなかった。本報は辺材から心材へかけての連続試片の観察を行なわなかったため、細胞内諸器官の老化過程については多くを確かめることができなかった。

### 3. 心 材

心材の放射柔細胞の観察結果を示すと、トドマツでは Photo. 27, 28, カラマツは Photo. 29~32, ミズナラは Photo. 33~36, シナノキは Photo. 37, 38 のとおりである。またミズナラについて光学顕微鏡でサフラン染色をしたものを観察した結果を示すと Photo. 39 のとおりである。第4報<sup>5)</sup>において、光顕下で心材放射柔細胞は均質に染色されることを示した。この着色物質は第4報<sup>5)</sup>の写真および Photo. 39 で示されるように、放射柔細胞により非常に強く染色されるもの、弱く染色されるもの、またほとんど染色されないものの段階を含んでいる。このことは心材物質の放射柔細胞中の量の大小を示しているものと考えられる。またこれらの心材物質は、豊富に存在する放射柔細胞から心材物質のほとんどない他の細胞へ移動し、次第にその細胞を充てんしていくものと考えられる。Photo. 39 の光学顕微鏡下の写真において、下方の細胞の心材物質が膜孔をとおして中央の細胞に移動している状況、および中央の細胞において膜孔から入った心材物質が細胞内に拡散している状態が示されている。この部位は心材中央部であるが、このことは放射柔細胞が辺材から心材へ移行していく段階において、心材物質をそれ自身で形成する細胞と、自身の細胞で心材物質を形成し得ない細胞があることを示していると考えられる。Photo. 29 から 38 までの各樹種についての走査型電子顕微鏡による観察でも、これらの段階的な状態がうかがえる。Photo. 29, 33, 34 は他細胞から心材物質の移動の初期段階が示されたものであり、光学顕微鏡の Photo. 39 とよく対応している。Photo. 33 では、膜孔の位置から判断して、これらの心材物質が膜孔から移動してきたものと観察できよう。Photo. 30 は Photo. 29 の一歩進んだ段階であり、心材物質が細胞内に一様に拡がった状態とみなされよう。

心材物質の多くは細胞内に均質にコロイド状に分散したものと推定することができる。試片の脱水処理過程で、心材物質の量の非常に多い細胞では、厚いヘドロ状の堆積物となり大きな亀裂が入った状態で認められることが多い (Photo. 27, 36, 38)。また亀裂の入らない発泡状態でもみられた (Photo. 37)。心材物質量の比較的少ない細胞では、薄い層状の細胞膜内壁沈着物として認められた (Photo. 29, 31, 35)。これらの物質は、亀裂および細胞膜からの剝離などによって容易に細胞膜と区別することができる。Photo. 35 は、細胞膜壁と心材物質堆積物との対比されたものとして認められる。

心材物質がヘドロ状でなく、膜状に認められることがときにみられた。Photo. 32 に示すとおりである。カラマツに比較的多くみられ、Photo. 30 に認められるように膜孔を通じて移動発展した心材物質が、細胞内にコロイド的分散をせずそれぞれ膜状に発展していったものと考えられる。これを形づくる心材物質は非常に細かい粘着性のものと推察される。トドマツの場



合も非常に細かい物質とみられるが、Photo. 27 でみられるように、膜状形をとらず塊状の群団を作ることが多い。

以上述べたように、樹種的な特徴も若干認められるが、広く確認されたものでもなく今後の追求が必要であろう。また心材未着色樹種(トドマツ)と着色樹種(カラマツ)の違いは、色素物質の有無によるのか、心材物質量の大小によるのか、また木部への滲透の有無によるのか、ここでは述べることができず広く総合的な考察が必要となろう<sup>9)</sup>。

## ま と め

走査型電子顕微鏡(日本電子 K.K. JSM-2 型)により、辺心材の放射柔細胞の諸器官および内容を観察し、心材形成に関する放射柔細胞の役割について知ることを目的とした。本報は、細胞内容物の観察に対する走査型電子顕微鏡の応用の可能性についての予備的観察である。用いた樹種はトドマツ、カラマツ、ミズナラ、シナノキの4種である。新鮮組織の固定-水洗-マイクローム表面仕上げ-脱水-金蒸着の処理方法により、45°傾斜台で観察した。得られた結果を Photo. 1 から 38 までに示したが、要約すると次のとおりである。

1) 細胞内容物は裂開面の細胞内に乾燥残存体として観察される。

2) 活性が高いと思われる核(辺材最外側)は、乾燥による核液の消失が著しく板状に残存する。多くのしわ(落ち込みによるのかもしいない)が存在し、針葉樹ではこのしわが延長して袋状、小胞状または細管状の ER となっているのが認められる。広葉樹では紡錘状核の両側先端部が ER と連結しているように思える。

3) 活性が低いと思われる核(辺材内部、移行材)は、乾燥による核液の消失が少なく、原形を保ったまま観察されるように思える。核膜のしわも少なく、それからの ER の突出も極めて少ない。

4) デンプン粒を含むアミロプラストは多く観察される。膜面は平滑であり、デンプン粒の数により球形から不定形の種々の形態をとる。エライオプラスト、タンパクプラストは本報では同定できない。

5) レース状の ER、および細管状の ER が認められ、細管状 ER の分岐点は多く小胞状となっているのがみられた。

6) 袋状の ER、ミトコンドリア、ゴルジ体の同定は本報告の実験では困難である。

7) 細胞質基質は、ときに発泡状または凝固状に認められた。

8) 心材物質は、細胞によりその量の多少、他細胞からの移動またはその性質などにより、ヘドロ状、膜状ないしは塊状残査として観察された。

9) 心材物質の柔細胞間移動、および心材物質のない細胞も認められることから、心材物質を形成しうる細胞と、形成し得ない細胞があると考えられる。

以上の走査型電子顕微鏡による観察は、今後辺材から心材への連続的観察または季節べつ

採取により、心材形成に関する細胞学的機能の推定をある程度行なえるものと考えられる。また細胞内諸器官の同定には、実験方法の開発が必要となろう。

## 文 献

- 1) 石田茂雄, 大谷 諄, 藤川清三: 走査型電子顕微鏡の木材組織研究への二, 三の適用例. 日本木材学会北海道支部講演集 1, 5, 1968.
- 2) ISHIDA, S., and OHTANI, J.: Study of tyloses by the scanning electron microscopy. 1. Some preliminary observations of tyloses, mainly in Haru-nire, *Ulmus* sp.. Res. Bull. of the College Exp. For. Hokkaido Univ. 26 (1), 1, 1968.
- 3) 樋口隆昌, 深沢和三, 中島庄兵: 心材形成機構に関する研究 (第1報), 組織の細胞化学. 木材誌 10 (6), 235, 1964.
- 4) 深沢和三, 樋口隆昌: 心材形成機構に関する研究 (第2報), 放射柔胞核の消長と DNA 量について. 木材誌 11 (5), 196, 1965.
- 5) FUKAZAWA, K., and HIGUCHI, T.: Studies on the mechanism of heartwood formation IV. RNA content in the ray parenchyma cell. J. Japan Wood Res. Soc., 12 (5), 221, 1966.
- 6) NOBUCHI, T., and HARADA, H.: Electron microscopy of the cytological structure of the ray parenchyma cells associated with heartwood formation of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. DON). J. Japan Wood Res. Soc., 14 (4), 197, 1968.
- 7) 新家浪雄, 重永道夫編: 細胞の構造. 共立出版 1967.
- 8) PORTER, R. et al.: A study of tissue culture cells by electron microscopy. J. of Exp. Medicine 81 (2), 233, 1945.
- 9) BOSSHARD, H. H.: Aspect of the aging process in cambium, and xylem. *Holzforschung* 19 (3), 65, 1965.

## Summary

This is a preliminary report on the possibility of using the scanning electron microscope (JSM-2) for cytological examination of heartwood formation. The tree species used in this experiment were *Abies sachalinensis* FR. SCHMIDT, *Larix leptolepis* GORDON, *Quercus crispula* BLUME and *Tilia japonica* SIMK. The method of specimen preparation is as follows: (1) fixation of fresh tissues, (2) washing in running water, (3) section preparation with a microtome, (4) dehydration in a desiccator, (5) coating the surface of the section with a thin gold layer by vacuum evaporation, and (6) examination of the section by scanning electron microscopy with the surface of the section at a 45° angle. Photographs which were obtained in this way are shown in photographs 1-38.

There are still many unsolved problems in this method of specimen preparation but these preliminary experiments have already produced some interesting results. A summary of these results is as follows:

- 1) Cell substances and organelles are observed as dehydrated residue on the inner surface of ray parenchyma cells.
- 2) Nuclei which are high in activity have a plate-like form because of the loss of nuclear sap. As a result of the collapse of the nucleus, the nuclear membrane occurs in folds. In coniferous trees, tubular, cisterna-like endoplasmic reticulum (ER) extends from these folds of the nuclear membrane. In broad-leaved trees, ER extends from the spindle axis of the fusiform nucleus.

- 3) Nuclei which are low in activity (inner sapwood or intermediate wood) are assumed to retain their original form, that is, there is no collapse and no loss of nuclear sap. There is little folding of the nuclear membrane and little elongation as ER.
- 4) Numerous amyloplasts containing starch granules can be seen in sapwood. They have a smooth membrane and take different forms depending on the number and size of the starch granules. Elaioplasts and aleuroplasts are not identified in this report.
- 5) Tubular ER can be observed in lace-like and thread-like forms, junction of ER tubules were mostly the vesicular type.
- 6) Cisterna-like ER, mitochondria and Golgi bodies are not identified in this report.
- 7) The ground substances of the cytoplasm appeared occasionally as a bubble-like gel substances.
- 8) Heartwood substances appear as mud-like, layered, membranous, lumpy residues. These differences may be caused by differences in the quantity of substance and by transfer from adjacent cells.
- 9) As a result of the experimental facts mentioned above, two types can be postulated. One type can form the heartwood substance by itself and the other type can not form the heartwood substance.

### Explanation of Photographs

Photographs from 1 to 37 show the radial planes and 38 shows the tranverse (cross) plane through the scanning electron microscopy. Photograph 39 shows the radial plane through the light microscopy.

- Photo 1.** Nuclei in ray parenchyma cells of the outermost sapwood of *Abies sachalinensis*. Since ray cells have been cut obliquely, a part of nucleus is presented under the cell wall. In the above cell, an amyloplast (starch granule) and other organelles can be seen on the inner surface of the wall.  $\times 3,000$ .
- Photo 2.** Enlargement of photo 1. Surface of the nucleus (nuclear membrane) has numerous folds which might be caused collapse. Lace-like and tubular organelles linked to the surface of the nucleus may be considered as ER.  $\times 6,000$ .
- Photo 3.** Entire nucleus in a ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Abies sachalinensis*. This elongated nucleus measures about 35 micron in length. Horizontally, tubular ER adheres to cell wall. A number of the amyloplasts can be seen in the cell.  $\times 3,000$ .
- Photo 4.** Inside of nucleus in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Abies sachalinensis*. Grain-like contents may be considered as chromatin or chromosome. Nuclear sap had lost completely during the drying treatment, so that, the spaces are seen between these contents.  $\times 10,000$ .
- Photo 5.** Nucleus treated by the easy Freeze-Drying method in ray parenchyma cell of inner part of sapwood of *Abies sachalinensis*. Large pores (about 0.5 micron in diameter) are seen in the smooth surface. It is obscure whether these pores are true pores in nuclear membrane or artifacts. Non-protoplasm adheres to wall.  $\times 6,000$ .
- Photo 6.** Organelles in ray parenchyma cells of the outermost sapwood of *Abies sachalinensis*. Tubular organelles adhered to the wall may be considered as ER. Other vesicles are unconfirmed and obscure.  $\times 3,000$ .

- Photo 7.** Organelles such as ER, mitochondria, golgi body and others in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Abies sachalinensis*.  $\times 10,000$ . Enlargement of photo 6.
- Photo 8.** Residues of the organelles in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Abies sachalinensis*.  $\times 10,000$ .
- Photo 9.** Nucleus in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Abies sachalinensis*. ER linked to nucleus can be seen.  $\times 10,000$ .
- Photo 10.** Cell contents and ground substance of cytoplasm treated by the easy Freeze-Drying method in ray parenchyma cell of inner part of sapwood of *Abies sachalinensis*. Consequently, ground substance of cytoplasm appeared in bubble-like gel substance.  $\times 6,000$ .
- Photo 11.** Contents in ray parenchyma cells of the inner part of sapwood of *Larix leptolepis*. Numerous amyloplasts, nucleus (above cell) and other organelles can be seen.  $\times 2,000$ .
- Photo 12.** Enlargement of photo 11, above cell. Surface of nucleus is smooth relatively.  $\times 6,000$ .
- Photo 13.** Nucleus, amyloplasts and other organelles in ray parenchyma cell of inner part of sapwood of *Larix leptolepis*.  $\times 3,000$ .
- Photo 14.** Nucleus (above right) and organelles in ray parenchyma cell of inner part of sapwood of *Larix leptolepis*. Organelle from nucleus may be considered as cisterna-like ER (?) adhered to cell wall.  $\times 6,000$ .
- Photo 15.** Amyloplasts in ray parenchyma cell of inner part of sapwood of *Larix leptolepis*. Some may be considered as a dissolution of starch granules.  $\times 6,000$ .
- Photo 16.** Fusiform nucleus in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Quercus crispula*.  $\times 6,000$ .
- Photo 17.** Plasmalemma in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Quercus crispula*. Amyloplasts and other organelles are enveloped with plasmalemma.  $\times 3,000$ .
- Photo 18.** Plasmalemma in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Quercus crispula*. A large grain (left) is not identified in this paper.  $\times 6,000$ .
- Photo 19.** Amyloplasts in ray parenchyma cell of the outermost sapwood of *Quercus crispula*. Starch granules (above cell) are supposed to be dissolved partly. Some organelles on starch granules (under cell) can be seen.  $\times 2,000$ .
- Photo 20.** Fusiform nucleus in ray parenchyma cell of the outer part of sapwood of *Tilia japonica*. Nuclear membrane (supposed ER) projected from both ends of it.  $\times 3,000$ .
- Photo 21.** Nucleus, ER from nucleus and other organelles in ray parenchyma cells of the outer part of sapwood of *Tilia japonica*.  $\times 3,000$ .
- Photo 22.** Oval nucleus in ray parenchyma cell of the innermost sapwood of *Abies sachalinensis*. Because collapse of nuclear membrane can be seen little, nucleus would retain their original form.  $\times 3,000$ .
- Photo 23.** Oval nucleus in ray parenchyma cell of the innermost sapwood of *Abies sachalinensis*.  $\times 6,000$ .
- Photo 24.** Nucleus in ray parenchyma cell of the innermost sapwood of *Abies sachalinensis*. This nucleus with remarkable collapses may be considered that it retains activity.  $\times 5,000$ .
- Photo 25.** A part of nucleus in ray parenchyma cell of the innermost sapwood of *Abies sachalinensis*. Collapses can be seen.  $\times 10,000$ .
- Photo 26.** Nucleus in ray parenchyma cell of the innermost sapwood of *Abies sachalinensis*. Oval nucleus and smooth cell wall (lumen side) can be seen.  $\times 6,000$ .

- Photo 27.** Heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Abies sachalinensis*. Thick layered and lumpy residues of heartwood substance can be seen on the cell wall.  $\times 3,000$ .
- Photo 28.** Mud-like substance of heartwood in ray parenchyma cell of heartwood of *Abies sachalinensis*. This layered residue cracks in various directions. Pits are covered with it.  $\times 6,000$ .
- Photo 29.** Earlier stage of transfer development of heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Larix leptolepis*. Heartwood substance appears to move through the pits from the adjacent ray cell.  $\times 3,000$ .
- Photo 30.** Later stage of transfer development of heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Larix leptolepis*. As more heartwood substance transfers, it will become the layer (mud-like layer).  $\times 3,000$ .
- Photo 31.** A little mud-like residue of heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Larix leptolepis*.  $\times 3,000$ .
- Photo 32.** Membranous residue of heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Larix leptolepis*.  $\times 3,000$ .
- Photo 33.** Transfer development of heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Quercus crispula*. Appearance of movement through the pits can be seen.  $\times 3,000$ . This photograph corresponds with photo 39 through the light microscopy.
- Photo 34.** Transfer development of heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Quercus crispula*.  $\times 6,000$ .
- Photo 35.** Heartwood substance layer and cell wall in ray parenchyma cell of heartwood of *Quercus crispula*.  $\times 3,000$ .
- Photo 36.** Large cracks of mud-like heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Quercus crispula*.  $\times 5,000$ .
- Photo 37.** Bubble-like appearance of heartwood substance in ray parenchyma cell of heartwood of *Tilia japonica*.  $\times 3,000$ .
- Photo 38.** Mud-like heartwood substance with cracks in ray parenchyma cell of heartwood of *Tilia japonica*.  $\times 3,000$ .
- Photo 39.** Transfer development of heartwood substance through the pits, from one cell with it to another cell without it of heartwood of *Quercus crispula*. Heartwood substance is stained with safranin.  $\times 3,000$ . (Light microscopy)

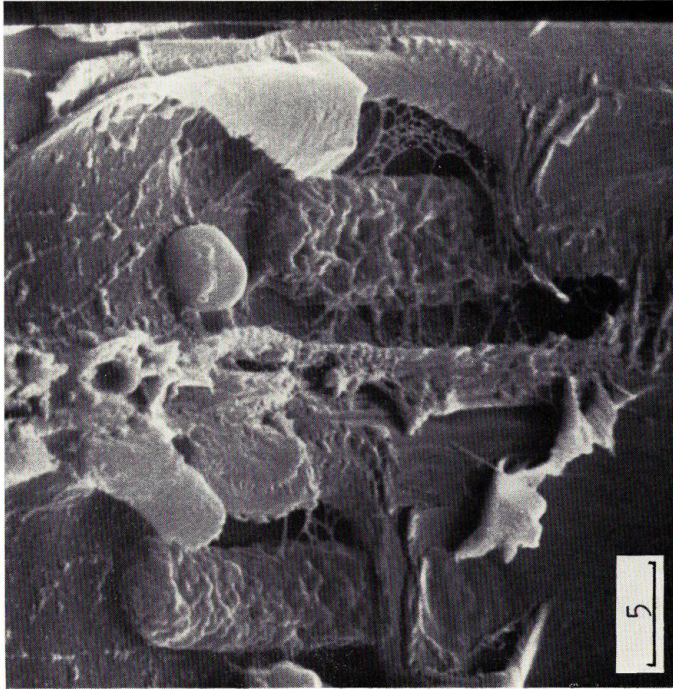


Photo 1.

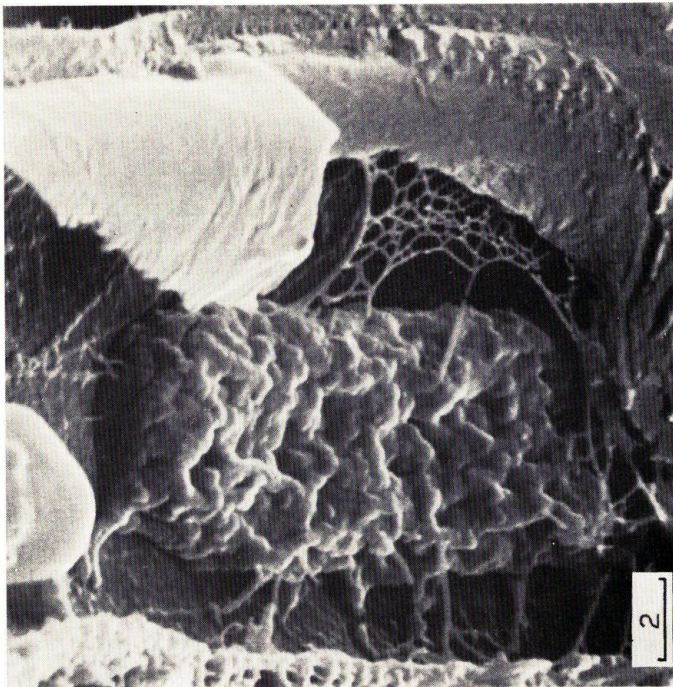


Photo 2.



Photo 3.

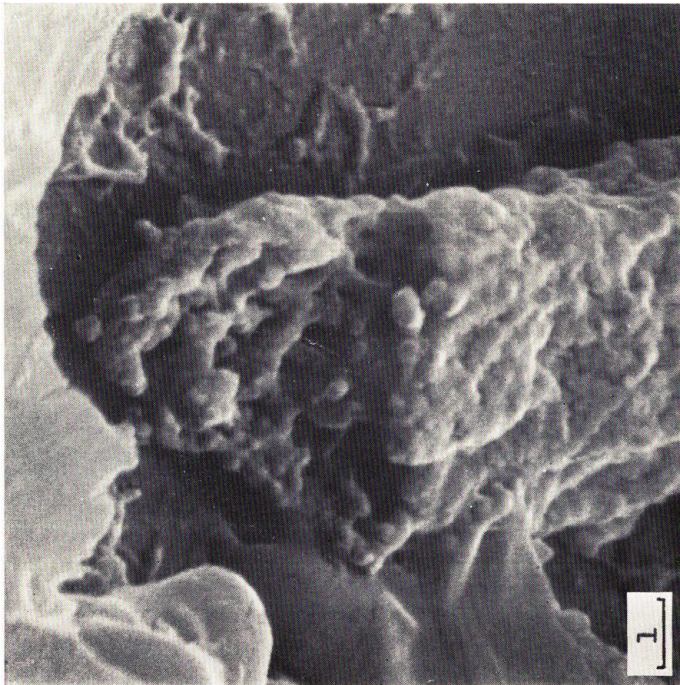


Photo 4.

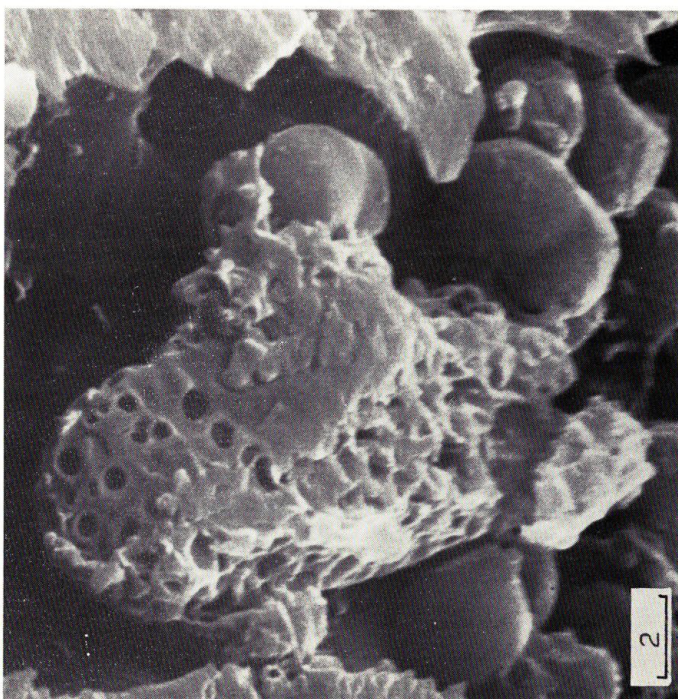


Photo 5.

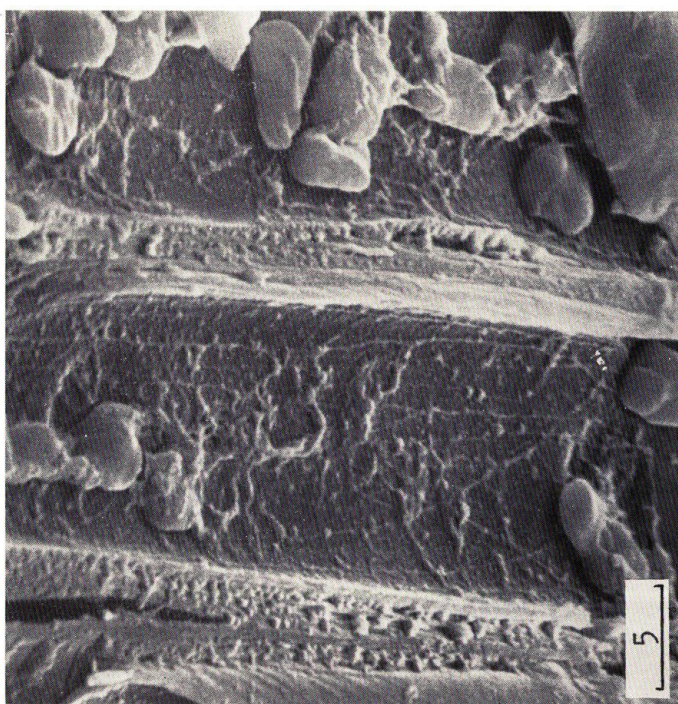


Photo 6.



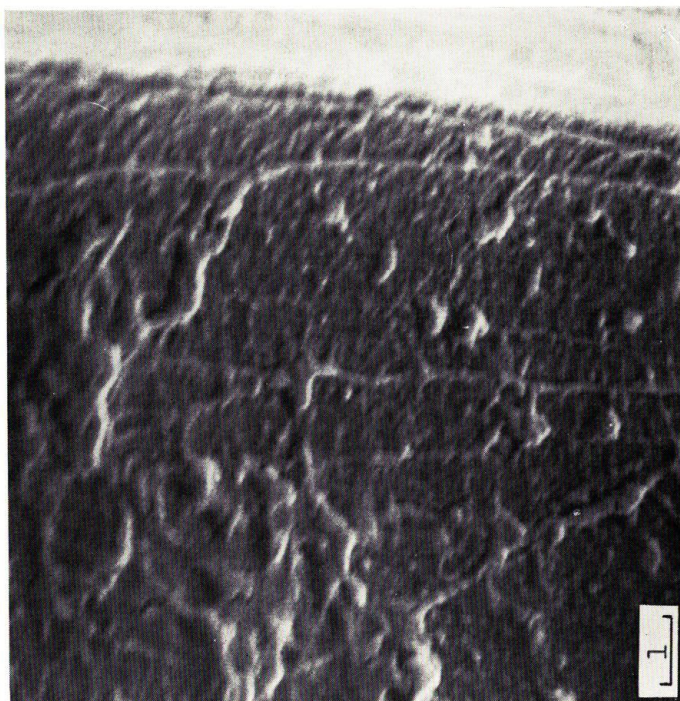


Photo 7.

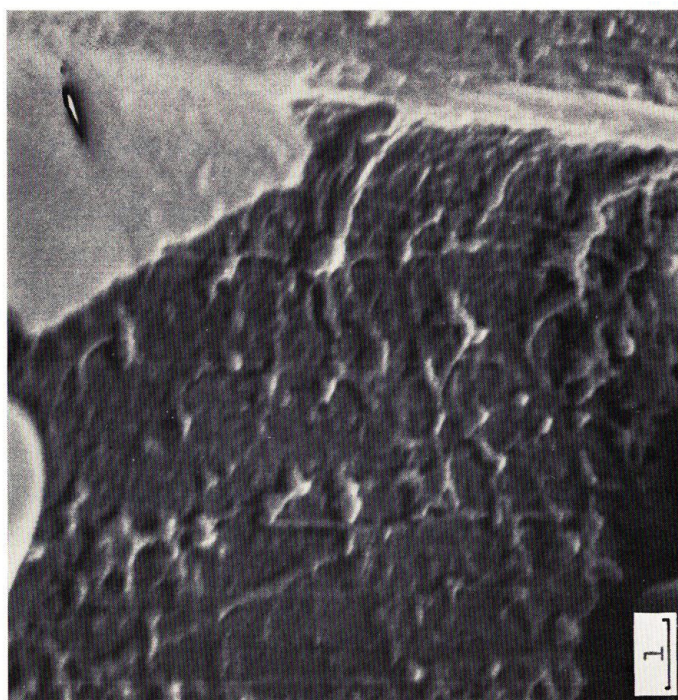


Photo 8.

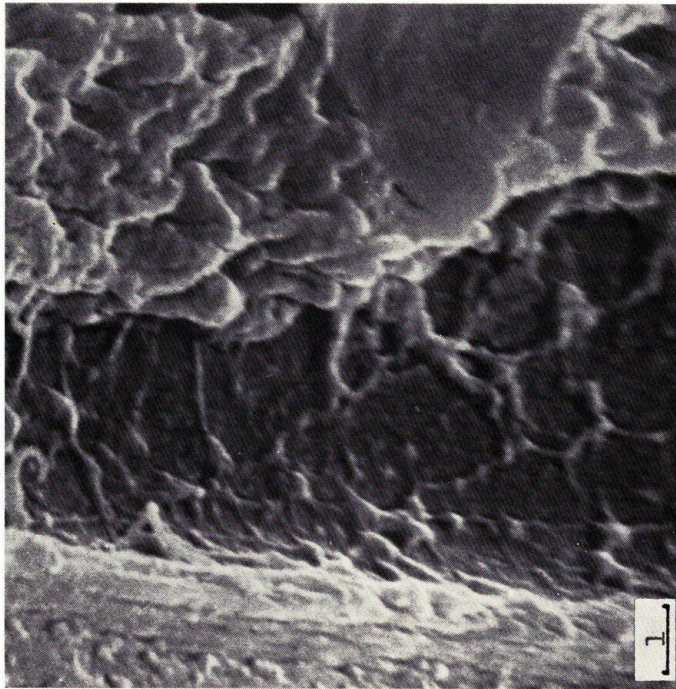


Photo 9.

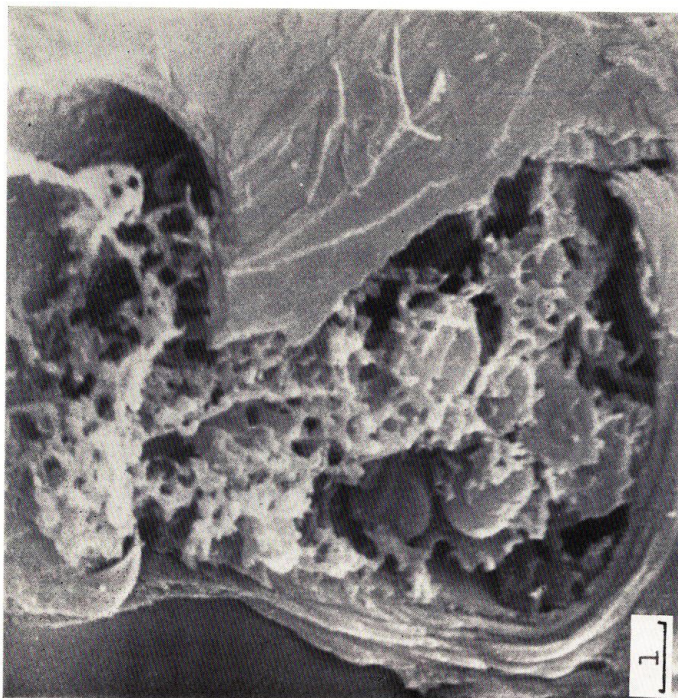


Photo 10.

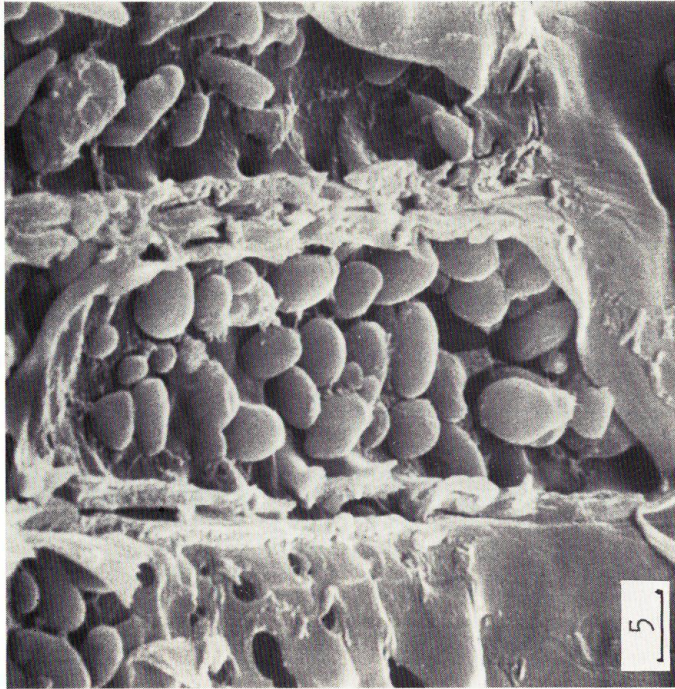


Photo 11.

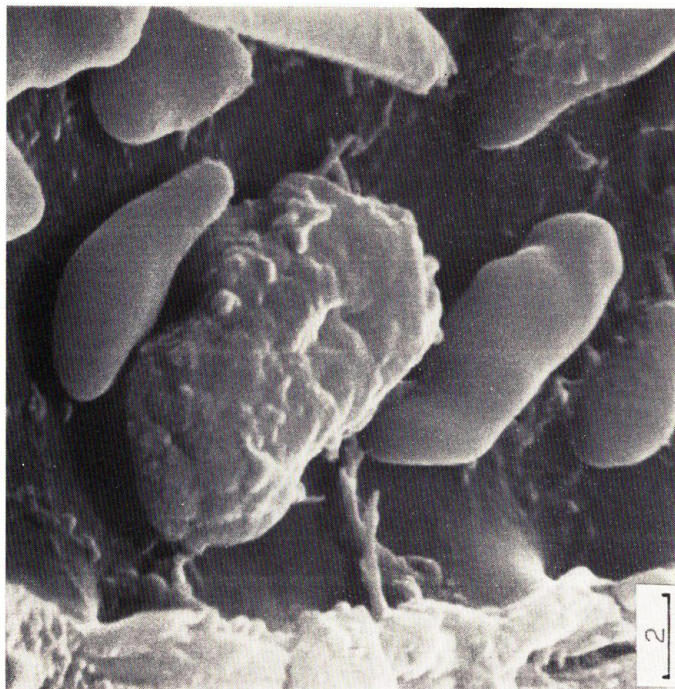


Photo 12.

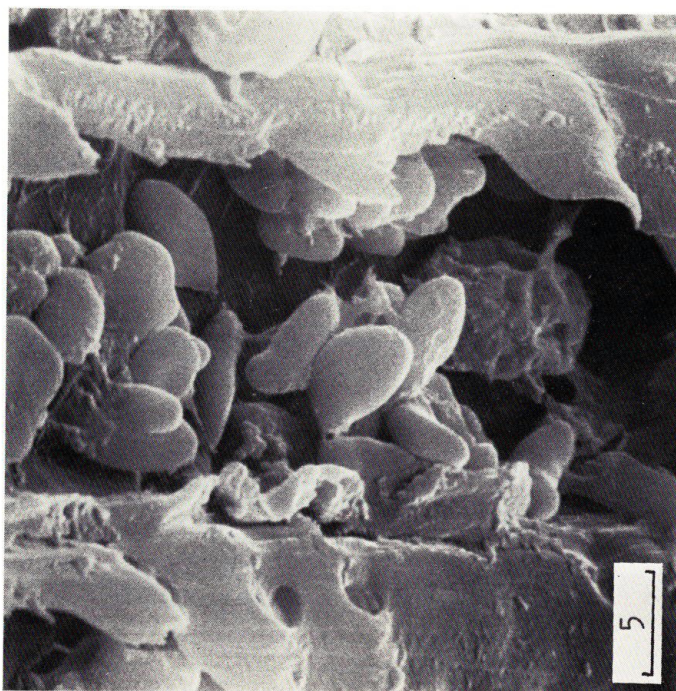


Photo 13.

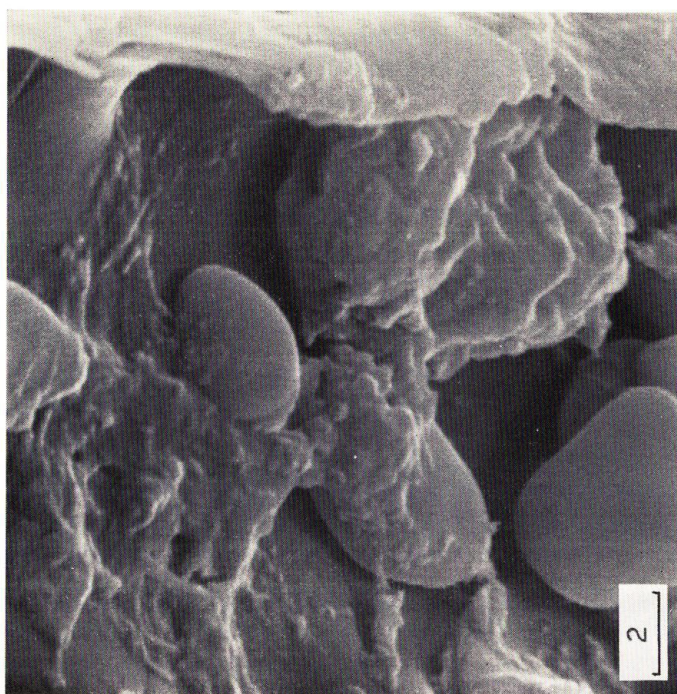


Photo 14.

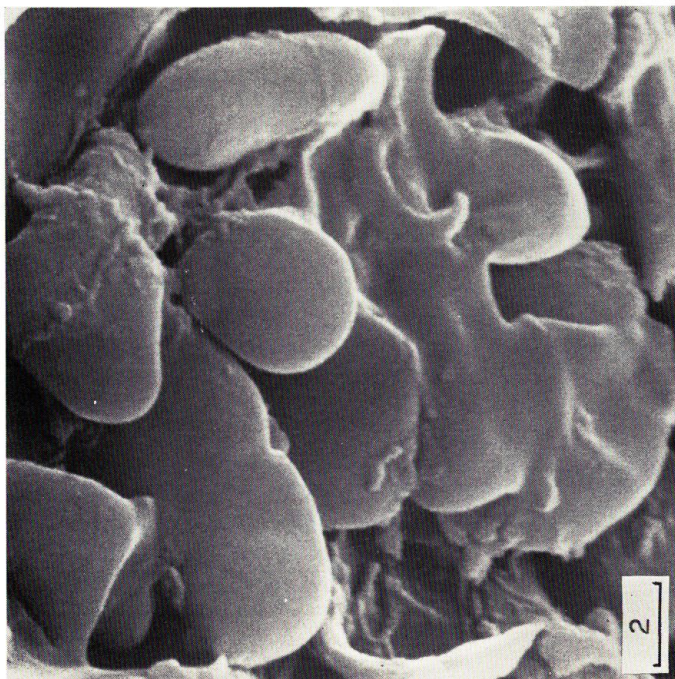


Photo 15.

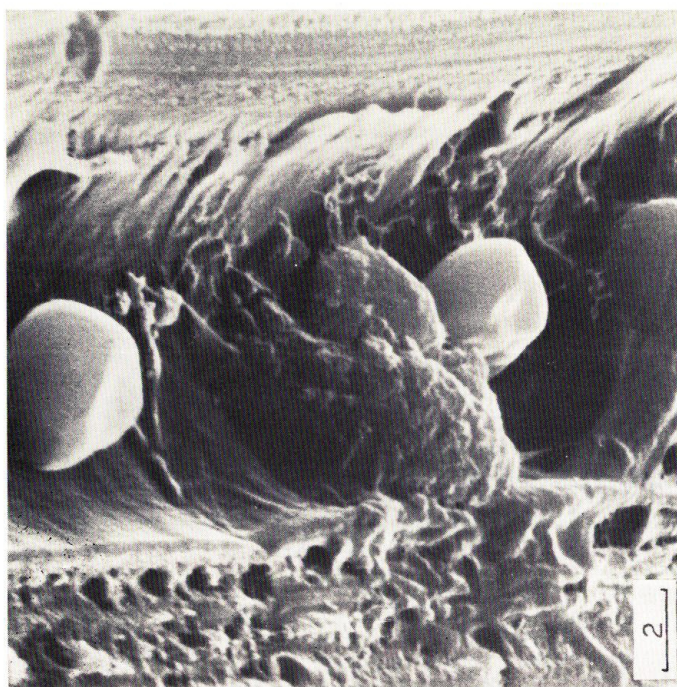


Photo 16.

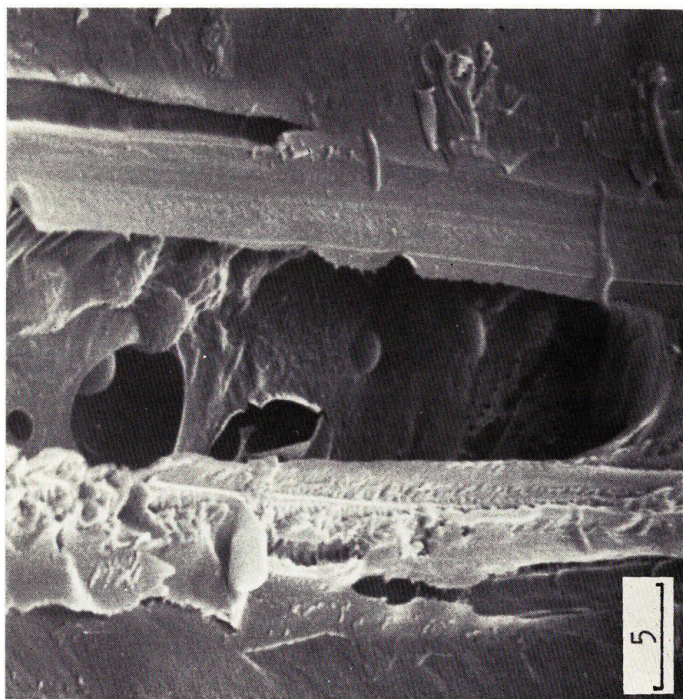


Photo 17.

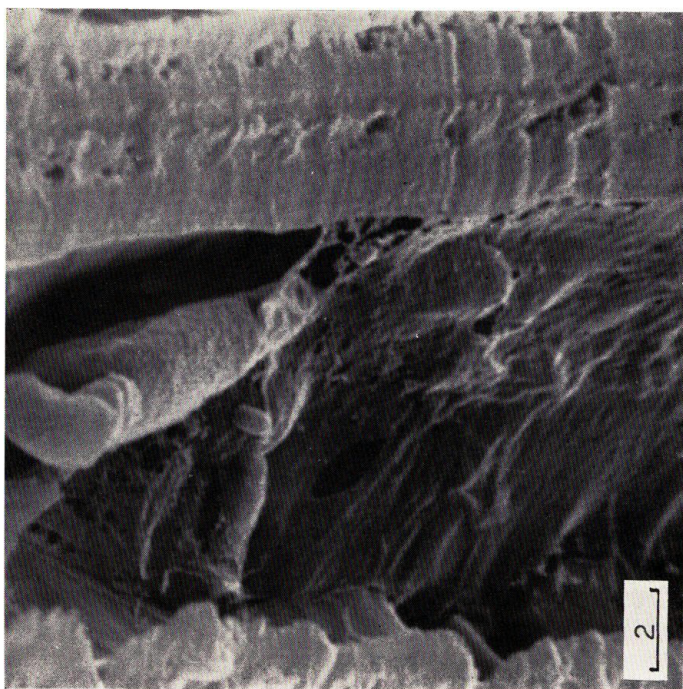


Photo 18.

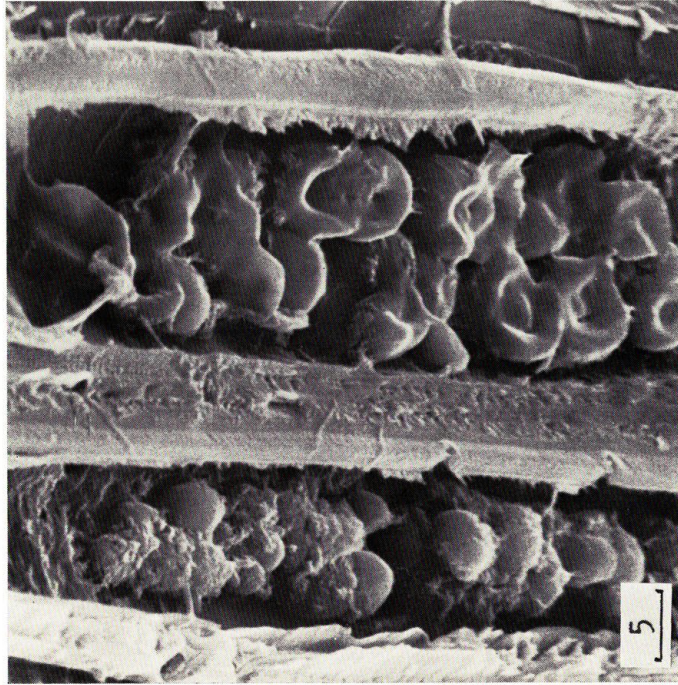


Photo 19.

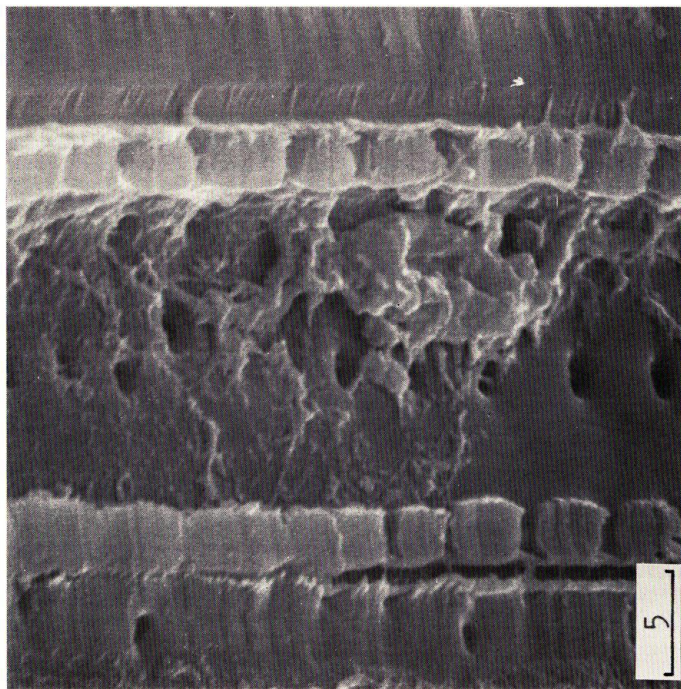


Photo 20.

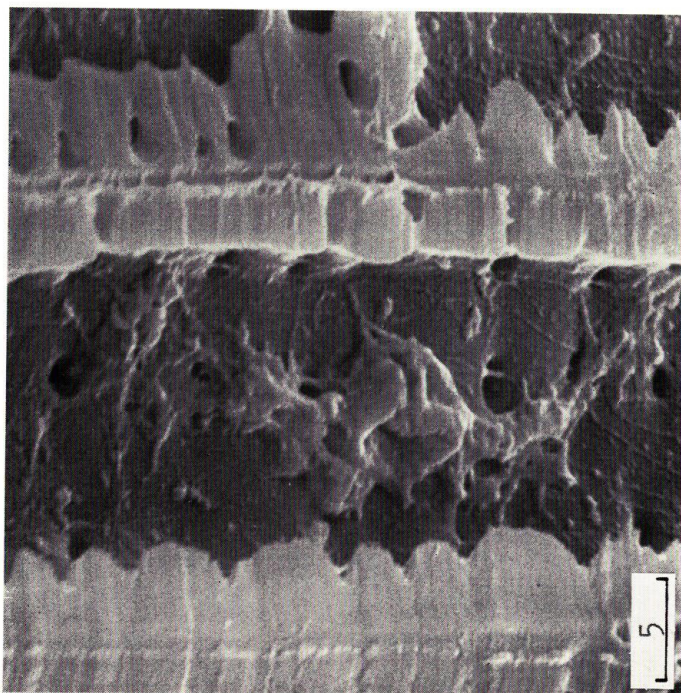


Photo 21.

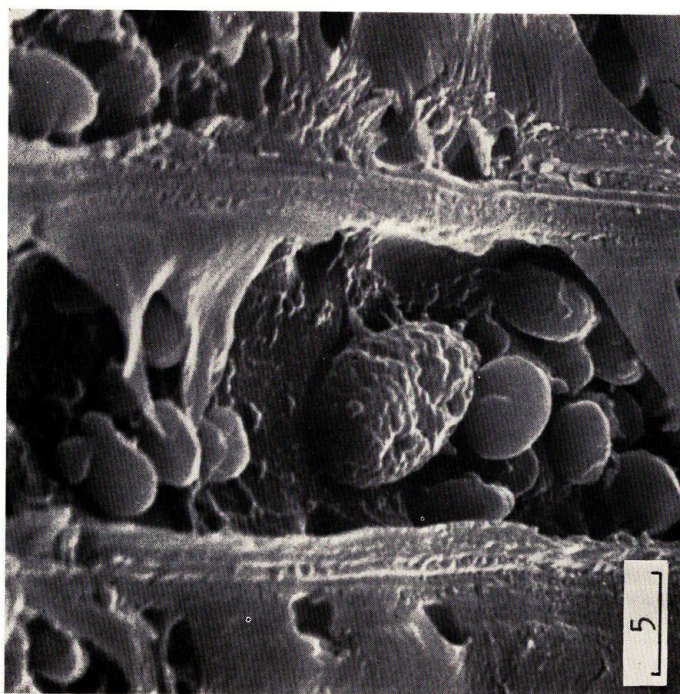


Photo 22.





Photo 23.

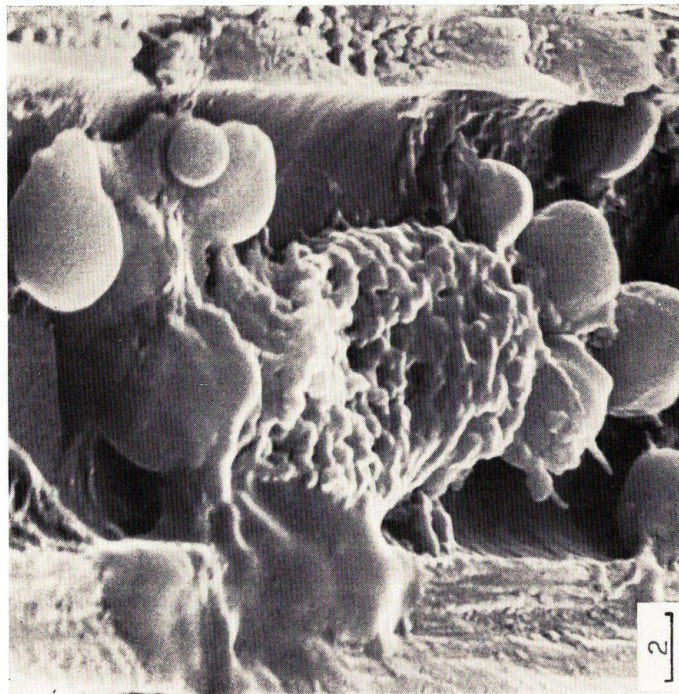


Photo 24.

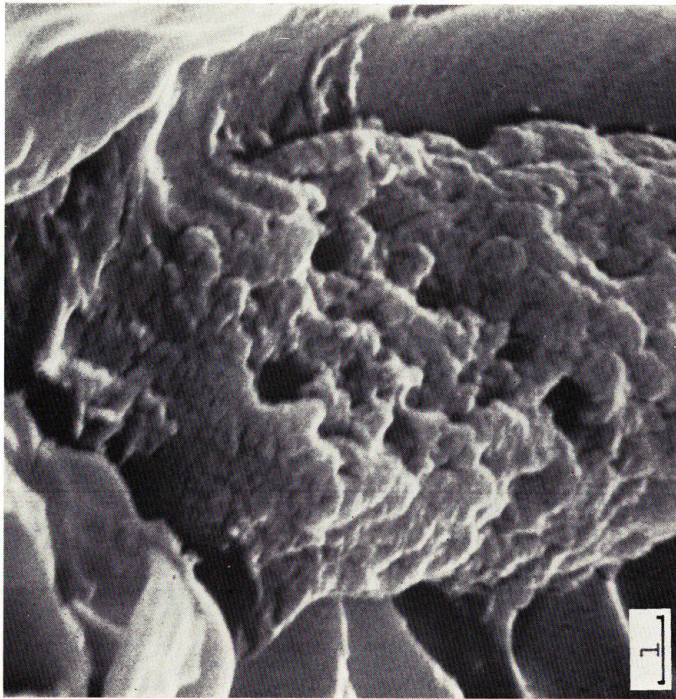


Photo 25.

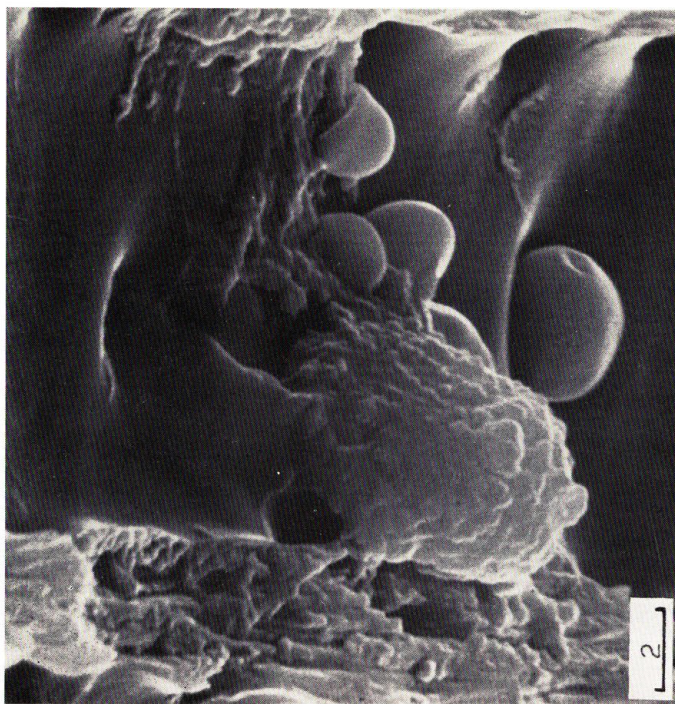


Photo 26.

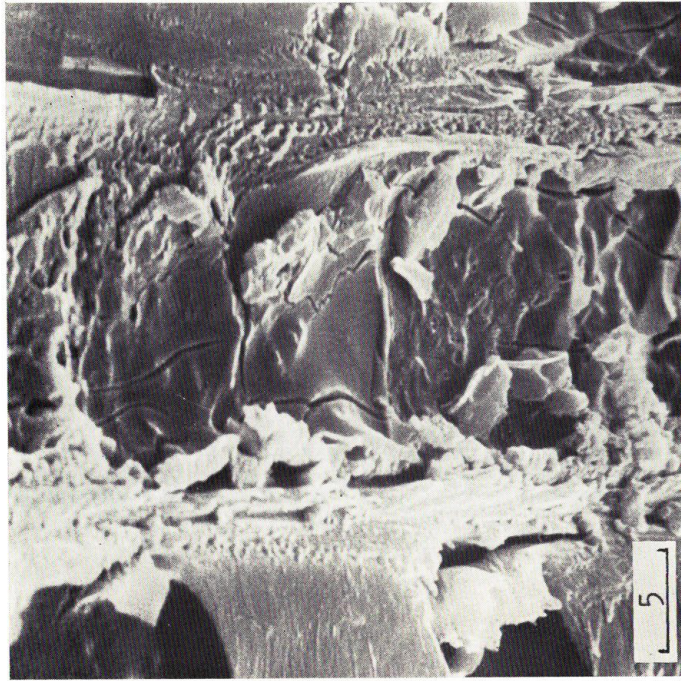


Photo 27.

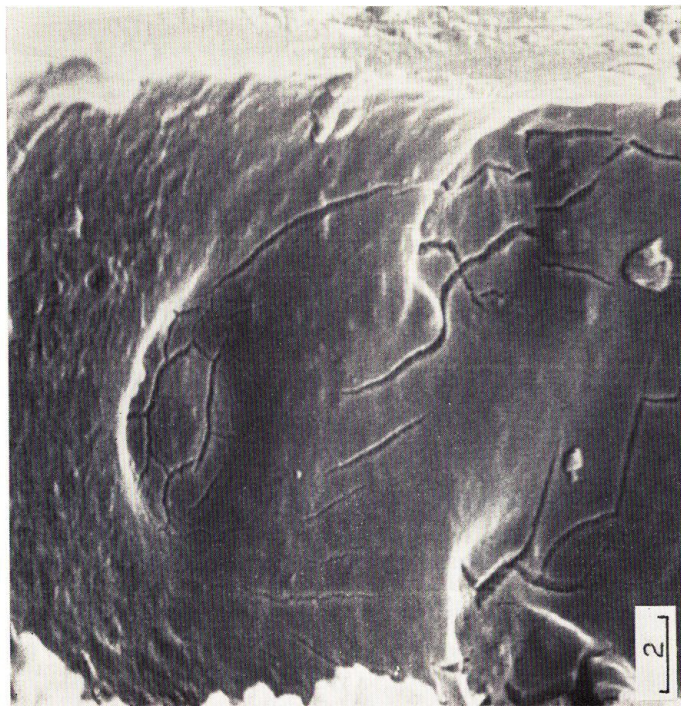


Photo 28.

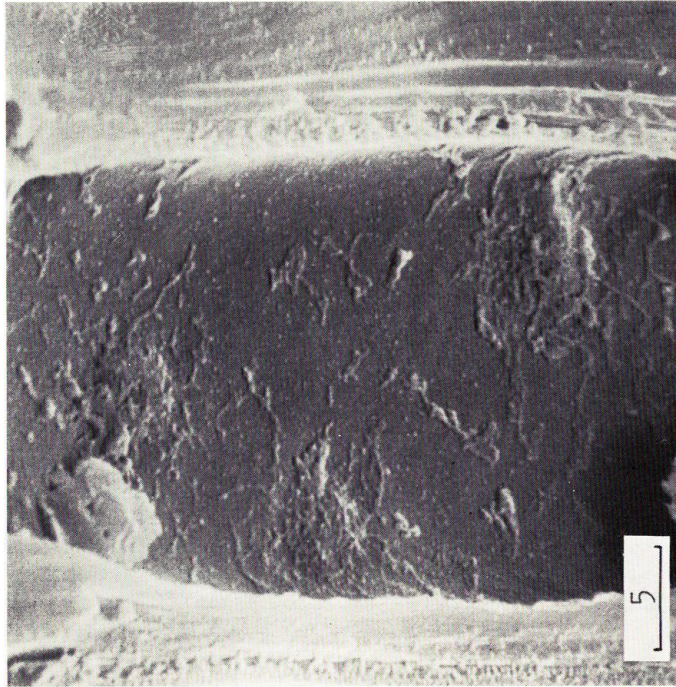


Photo 29.

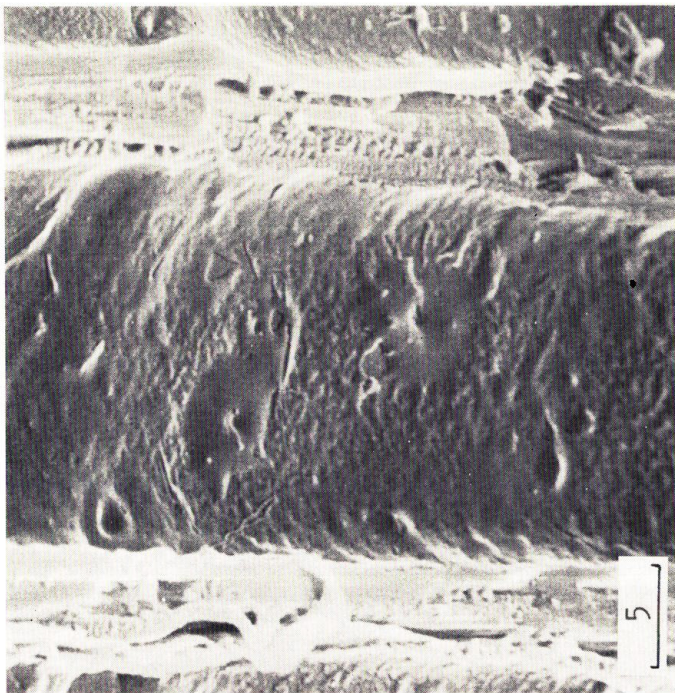


Photo 30.

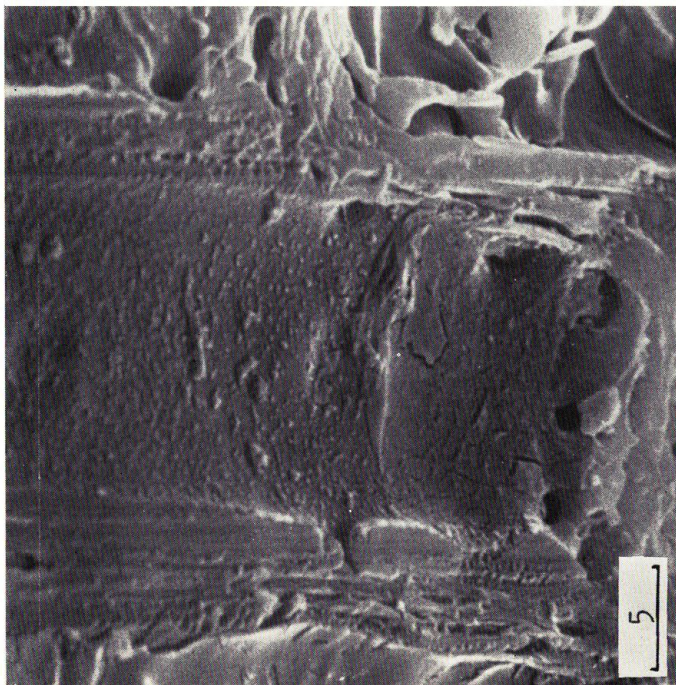


Photo 31.

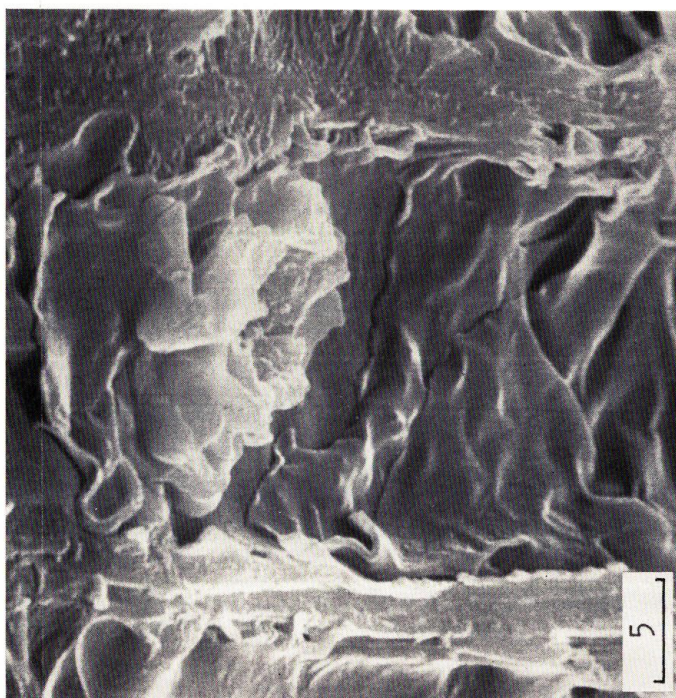


Photo 32.

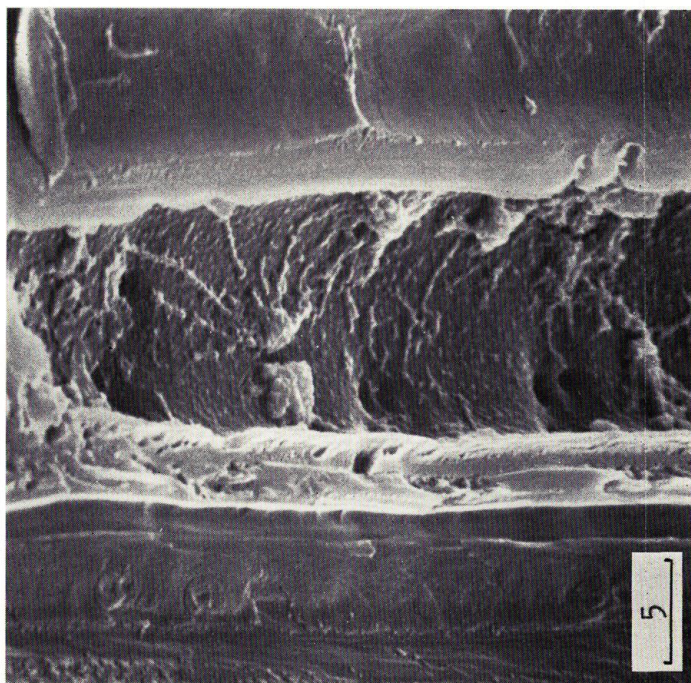


Photo 33.

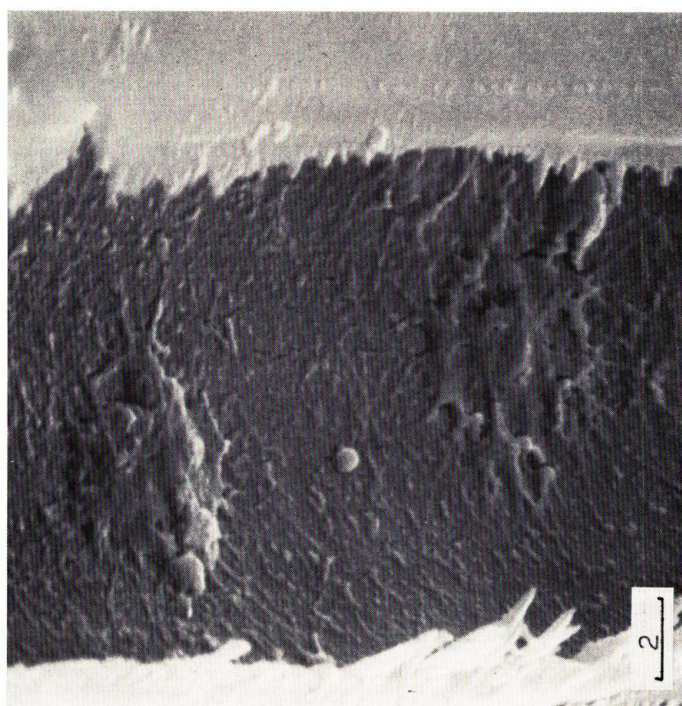


Photo 34.



Photo 35.



Photo 36.

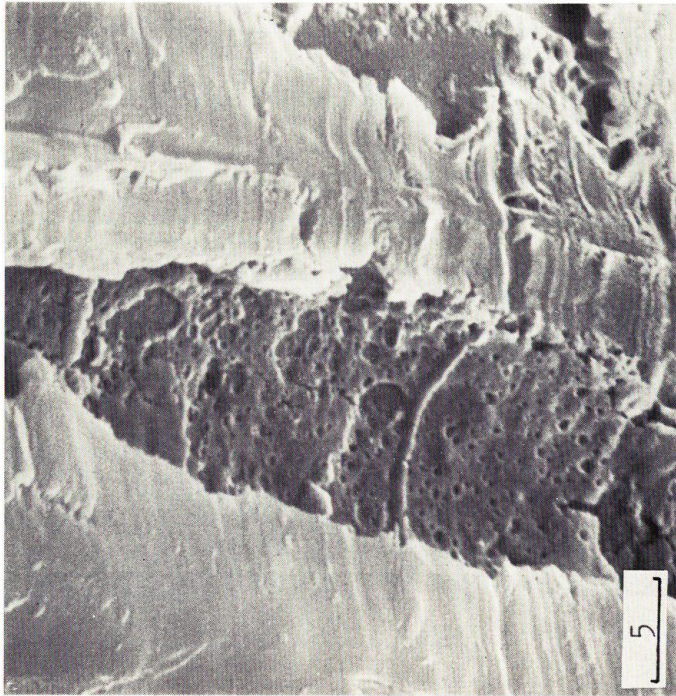


Photo 37.

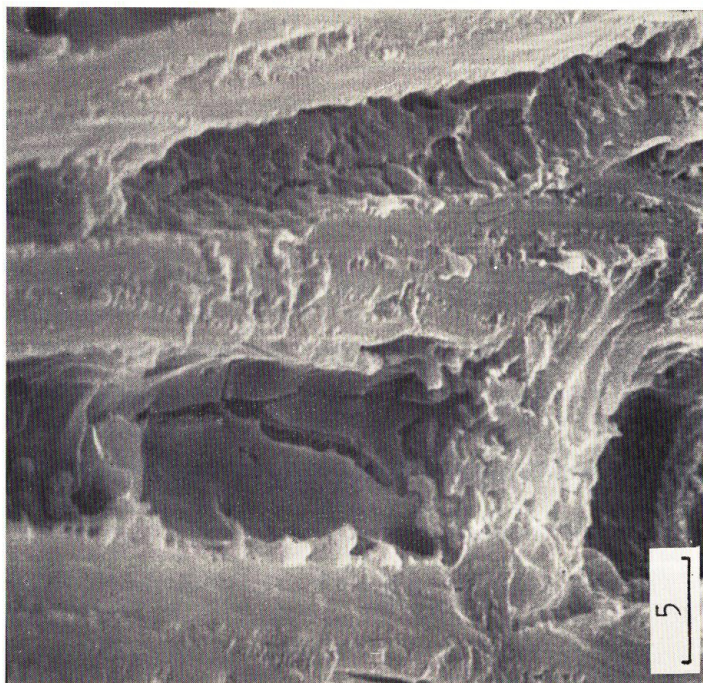


Photo 38.



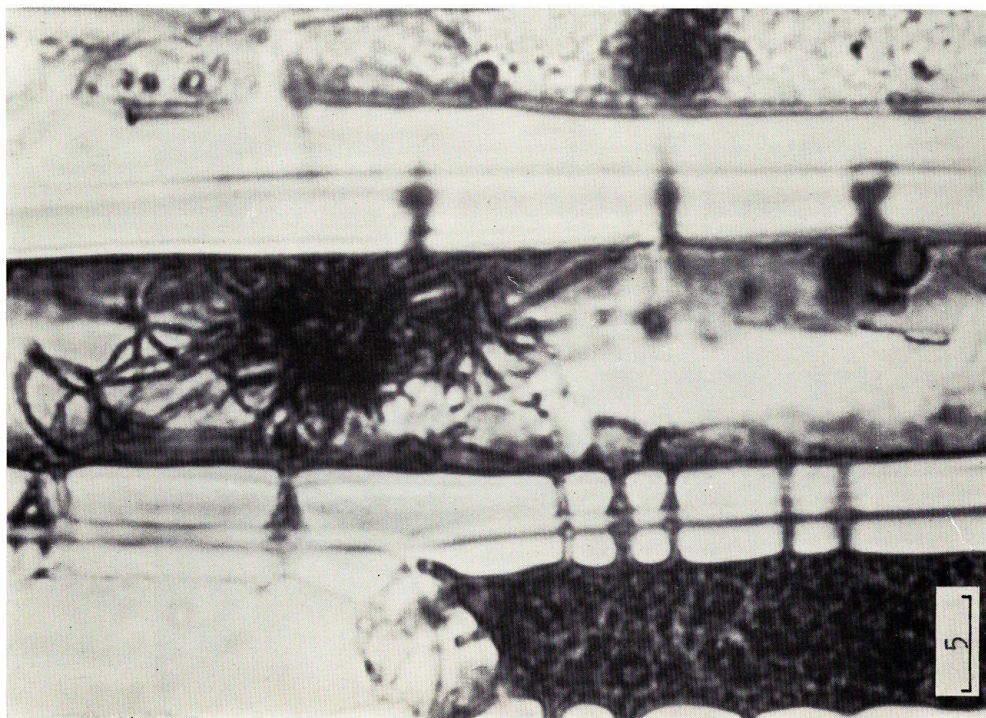


Photo 39.