



Title	走査電子顕微鏡による道管二次壁の層構造の観察
Author(s)	平川, 泰彦; HIRAKAWA, Yasuhiko; 石田, 茂雄 他
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 41(1), 191-204
Issue Date	1984-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21113
Type	departmental bulletin paper
File Information	41(1)_P191-204.pdf



走査電子顕微鏡による道管 二次壁の層構造の観察*

平川泰彦* 石田茂雄*

A SEM Observation of the Layered Structure of the Secondary Wall in Vessels

By

Yasuhiko HIRAKAWA* and Shigeo ISHIDA*

目 次

1. 緒 言	191
2. 試料の調製と観察方法	192
3. 結 果	192
4. 考 察	195
5. 引用文献	200
6. Summary	201
7. 写真説明 (Explanation of Photographs)	203
8. 写 真 (Photographs 1-26)	

1. 緒 言

広葉樹には、木部の道管にらせん肥厚を有するものが多く、そのような場合にとくに道管二次壁の構造は仮道管に比べかなり複雑であることが知られている。道管壁におけるらせん肥厚の形態は、一般に樹種によって異なり^{1),2),3)}、また二次壁の層構成も三層のもの、偏光顕微鏡による観察で均一な複屈折を示すものおよび多層から成る例が報告されており^{4)~11)}、やはり樹種的に異なっている。

近年の岸らの研究により^{10),11)}、道管二次壁の層構成およびその構造の概要は多くの樹種について知られるに到ったが、反面、各樹種についての詳細な検討は不十分であり、かつらせん肥厚を有する樹種においてはそれと壁構造との関係、換言すれば、らせん肥厚の壁層への帰属の問題が研究課題として残されている。

OHTANI ら³⁾によれば、道管要素においてらせん肥厚を有する樹種は、本邦産材に限って

* 1983年8月31日受理 Received August 31, 1983.

* 北海道大学農学部林産学科木材理学教室

* Laboratory of Wood Physics, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

も18科30属62種に達し、その形態は多様であり、針葉樹の仮道管のそれが比較的単純な形態を示すのとは大きく異なっている。しかし、それが二次壁最内層の一部であるのか^{12),13)}、あるいは別個のものであるのか¹⁴⁾についての観察事例は少なく、らせん肥厚と二次壁最内層とのマイクロフィブリル配向の関係については、詳細な検討が必要である。

従来、この種の研究では、マイクロフィブリル配向の解明が基盤となることから、レプリカ法および切片法による電子顕微鏡的観察が常法とされてきたが、らせん肥厚の走行方向が極めて変化に富み、かつ道管径が仮道管と比較してかなり大きい点を考慮するならば、それに代わる方法として、走査電子顕微鏡 (SEM) による観察が有効であると考えられる。

以上の観点から、本研究では、今後の道管壁構造の解明への基礎的知見を得ることを目的とし、OHTANI⁹⁾らによって特徴的ならせん肥厚を有することが明らかにされている三樹種 (アズキナン、ホオノキおよびアサダ、いずれも散孔材) を対象とし、SEMを主として用い、らせん肥厚の帰属に留意しながら、二次壁層構造の解明を行おうとしたものである。

なお、本論文は北海道大学学位審査論文の一部であり、さらにその一部は、第31回木材学会大会において口頭で発表されたものである。

2. 試料の調製と観察方法

本研究では、アズキナン (*Sorbus alnifolia* C. KOCH)、ホオノキ (*Magnolia obovata* THUNBERG) およびアサダ (*Ostrya japonica* SARG.) を観察対象とした。すべて散孔材であるが、選択の理由は、らせん肥厚の形態が三者三様に異なること、道管要素率が比較的高く、道管径が各樹種ごとにはほぼ一定であること、供試木の入手が容易であったことによる。

供試木は、いずれも北海道大学農学部附属、苫小牧地方演習林第139林班に生育する、通直で生長が良好なものであり、それらの胸高直径は15~20 cm、樹高は5~15 mである。試料採取は、'80年および'81年の6月と7月に数回行われた。

試料の採取方法は前報¹⁵⁾に準じ、樹幹の胸高付近から、樹皮・形成層・辺材部を連続して含むブロックを切り出し、ただちに0.8モル蔗糖水溶液または緩衝剤により高張とした四酸化オスミウム水溶液に浸漬した。

その後、SEM観察用の試料には、アセトンによる脱水、臨界点乾燥、片刃カミソリによる道管内腔の露出 (柱目面)、白金のシャドウイング、金のion sputter coating法によるコーティング処理を行った。超薄切片および薄切片の調製は、既往の方法^{6),11)}に準じて行われた。

電子顕微鏡観察には、JSM-2、JSM-F15 (電界放射型SEM) およびJEM-6ASを用いた。

3. 結 果

細胞壁の観察にあたっては、既成の壁の観察のみでは充填物質の存在により、マイクロフィブリル配向の詳細を知ることが困難な場合があり¹⁶⁾、堆積直後のマイクロフィブリル配向を観察

する必要があることから、本研究では、二次壁形成中の細胞を分化の初期から終了まで、マイクロフィブリルの配向を基盤として順次追跡調査することとし、このため、観察対象を分化中の細胞の観察が容易な早材部の半径壁とした。

観察は、分化中の細胞を対象とした二次壁の形成経過の把握、また成熟細胞における既成の壁の裂開および切片による観察を同時平行的に行うことにより進められ、最終的に壁層構造を明らかにした。

細胞壁の主たる構成単位であるマイクロフィブリルについては、その幅および長さ等について議論があり、それらはいまだに特定されていないため、壁層構成についての観察結果を述べる前に SEM による観察事例を Photo 1 に呈示する。写真は、S2 形成中のアズキナシの道管要素における堆積直後のマイクロフィブリルを電界放射型 SEM で撮影した約 8 万倍の高拡大写真である。マイクロフィブリルの幅は $120 \text{ \AA} \sim 470 \text{ \AA}$ まで種々認められるが、約 150 \AA 幅のものが大部分を占めている。マイクロフィブリル相互の間隔は $60 \text{ \AA} \sim 700 \text{ \AA}$ である。また、マイクロフィブリルは少なくとも $5,000 \text{ \AA}$ 以上の長さであるように観察され、その幅はその範囲においてほぼ一定である。Photo 1 においては、マイクロフィブリルの配向は極めて明瞭であり、今後の SEM 観察の可能性を示唆させる。

次に、アズキナシの道管二次壁についての観察結果を述べる。成熟道管要素の内腔表面を示す Photo 2 で明らかのように、らせん肥厚は、Z-helix の $1 \sim 4 \mu\text{m}$ 径のものおよびそれから分枝状を呈する S または flat-helix (flat-helix との語については、細胞長軸に対して約 90° であることの広義の意味で用いる) の小径のものが存在する。しかし、早材部のごく初期に形成された年輪境界付近の道管では、らせん肥厚の形態がやや異なるため、それらの細胞については観察対象から除外した。

二次壁の大部分は三層構成であるが、各壁層の構造はアズキナシ独自の特徴を有する。S1 は S-helix 約 40° のマイクロフィブリルからなるラメラが先ず堆積し、細胞分化にともない時計方向へと順次旋回するラメラがその上に堆積することにより形成される。それは、S1 が裂開した部分を示した Photo 3 および S1 形成中の細胞での S-helix (Photo 4 下) と flat-helix (Photo 4 上) の交差構造の存在でも明らかである。

S2 における特徴は、その形成中期以降にらせん肥厚の形成が開始される点である。S2 形成の初期には、マイクロフィブリルの配向が Z-helix、約 40° と一定で (Photo 5)、ラメラ構造をなす (Photo 6) のに対して、中期には壁孔周辺を主としてらせん肥厚の形成が開始され (Photo 7)、後期にはほぼそれが完了する。しかし、その走行方向は常に Z-helix であり、S2 のマイクロフィブリル配向と一致している。

S3 は、S または flat-helix のマイクロフィブリルから成るが、Photo 8 に示すように、壁孔のない全領域に均一に堆積するわけではない。そこでは、写真左下の二本の Z-helix のらせん肥厚間にそれが堆積せず、右側のみに堆積していることが明らかである。

S3の堆積以後には、Photo 9に示すように、S3上のみならず、S3とマイクロフィブリル配向が同一かまたは多少配向を異にするSまたはflat-helixのらせん肥厚が形成される。したがって、Z-helixのらせん肥厚と、Sまたはflat-helixのそれとは、その形成時期が異なっている。

以上の二次壁形成経過の観察からは、二層と三層部両者の存在が示唆されるが、それらは薄切片による観察で確認された。Photo 10においては三層構成が明らかであり、壁厚の比率はS1, S2, S3の順に、約1:2:0.1であるが、Photo 11においてはS1およびらせん肥厚(Z-helix)を含むS2のみの二層構成でありS3は存在しない。

らせん肥厚内におけるマイクロフィブリル配向は、Z・S-helixにかかわらず一般的にらせん肥厚の走行方向と一致するが(Photo 12と13)、Photo 14に示すようにZ-helixのらせん肥厚とS3のマイクロフィブリル配向がほぼ直交する部位においては、らせん肥厚内におけるマイクロフィブリルの一部がその走行方向と直交する場合がある。

らせん肥厚とS3、両者のマイクロフィブリル配向はPhoto 13に示すように一致および不一致の双方の例が観察された。

次にホオノキの観察結果を述べる。成熟道管要素の内腔表面では所々に凹部が存在し、それらがらせん肥厚を存在せしめている(Photo 15)。二次壁は三層構成であり、S1, S2およびS3の壁厚比率は、順に約1:2:1である(Photo 16)。S1はflat-helixのマイクロフィブリルから成り交差構造は認められず、S2はZ-helix約40°のマイクロフィブリルから成る。ホオノキではS3の形成様式および構造に特徴がある。S3はflat-helixのマイクロフィブリルから成るが、その堆積が細胞内で均一に行われるわけではなく、極めて特異的である。すなわち、S3のマイクロフィブリルは、まず数ミクロン以上の幅の帯状に堆積し(Photo 17)、それらがある厚みを持った時点でS3のマイクロフィブリルの未堆積の領域にはほぼ同配向のマイクロフィブリルが堆積する(Photo 18)ものと推定される。したがって、S3には帯状に凹部が存在する結果となる。S3形成がかなり進んだ段階においても凹部にS3のマイクロフィブリルが全く堆積しない例も認められたが(Photo 19)、成熟道管要素における既成のS3の裂開部における観察では薄層ではあるもののS3が欠落することはないことが確認され(Photo 20)、壁厚に若干の差異があってもS3は常に存在するものと推定される。

最後に、アサダの観察結果を述べる。アサダにおいては、一般的に傾角のかなり小さいS-helixのらせん肥厚が存在するが(Photo 21)、その走行方向がかなり大きく変化する場合もある。二次壁の層構成は多くの場合三層であるが(Photo 22)、4~5層(もしくはそれ以上)の例(Photo 23)も観察された。しかし、最外層から順に三層、すなわちS1, S2およびS3は常に存在し、それらの壁厚比率は順に約1:3:1である(まれにS3が薄層である場合もある)。各壁層におけるマイクロフィブリルの配向は、S1で70°~90°のS-helix, S2で約45°のZ-helix, またS3では60°~80°のS-helix(Photo 24)である。アサダにおける層構成上の特徴は、S3上

に種々の配向から成るマイクロフィブリルが堆積し、多くの薄層を存在せしめることである。また、薄層の数は、道管要素間のみならず道管要素内においても異なる場合がある。たとえば Photo 25 では、写真左では Z-helix, 右で S-helix, さらに中央部では軸とほぼ平行のマイクロフィブリルが堆積中であり、Photo 26 では、写真中央部から連続するマイクロフィブリルが下部側において曲線状をなしている。この種の極めて複雑なマイクロフィブリル配向から成る層の存在は、既成の壁の裂開面においても確認され、それらとせん肥厚との関係が示唆される。

4. 考 察

従来、マイクロフィブリル配向の解明にはレプリカ法が常法とされてきたが、本研究では主として SEM を用いた点が既往の報告と大きく異なっている。SEM 観察では、広範囲の観察が可能な利点により、壁形成の過程を詳細に把握することができたが、さらに本研究では、堆積直後のマイクロフィブリルの高拡大 SEM 写真を呈示し (Photo 1), この種の研究分野における SEM 手法の可能性をも示し得た。すなわち SEM 手法は、マイクロフィブリルをその配向のみならず単位構造に近い状態で捉え得る段階に到ったものと考えられる。細胞学分野においてはすでに、ミトコンドリア (Mitochondria) のクリステ¹⁷⁾ (Cristae) や、微小管¹⁸⁾ (Microtubules) 等についての明瞭な SEM 写真が呈示されており、近年においては、SEM が解像力において光学顕微鏡と TEM の中間的機器であるとの通念は払拭されつつあるが、本研究で呈示したマイクロフィブリルの写真もその好例となろう。

試料が絶乾状態であることおよび蒸着金属によるマイクロフィブリルの太り等の種々の問題はあつたものの、Photo 1 においては、その形態についても若干の言及が可能である。マイクロフィブリルの幅については種々の値が報告されているが、本研究で観察された幅の最低値は約 120 Å であり、最も本数的に多いものの幅は約 150 Å 付近に集中していた。約 470 Å 幅のものも認められるが、それらは数本のマイクロフィブリルの束から成っており、また SEM 像においては蒸着金属の被覆厚が当然差引かれることから、マイクロフィブリルの幅は 150 Å よりはかなり小さく、また多くのマイクロフィブリルがほぼ同一の幅をもつことが推定される。またマイクロフィブリルの幅は、その長さ方向においても少くとも 5,000 Å 程度の範囲では一定であるように観察されるが、その断面形等の諸問題をも含めて、それらについては今後の検討が必要であらう。この種の微細な構造物の SEM 観察には、導電染色法の使用が必須条件となるが、その技術は年々向上しつつあり、マイクロフィブリルの微細形態についてもさらに詳細な知見を得ることも可能となるものと思われる。

本研究では、三種の広葉樹における道管二次壁の層構成および構造を明らかにしたが、その主たる論点は、らせん肥厚の形成と直接係る壁層の構造およびらせん肥厚の帰属の問題である。そこで、まず本研究の観察結果から構成した二次壁の層構成を図に示し、その後それらの諸点について考察していく。

アズキナシでは、Fig. 1 に示すように、道管要素内においても三層および二層の両者が存在し、各層のマイクロフィブリル配向は、S1: S~Z への旋回するラメラ、S2: Z-helix (約40°), S3: S~flat-helix (70°~90°) であり、壁厚の比率は順に約1:2:0.1であった。またらせん肥厚と各層とのマイクロフィブリル配向の関係は、S2またはS3のそれと同一のもの、それらと別個の配向からなるものの三種が認められた (Photo 1~14)。

ホオノキでは Fig. 2 に示すように、三層構成ではあるがS3一部の薄層化が特徴であった。マイクロフィブリルの配向は、S1: flat-helix, S2: Z-helix (約40°), S3: flat-helix であり、壁厚の比率は順に、約1:2:1であった (Photo 15~20)。ホオノキにおけるS3の一部の欠落はすでに OHTANI⁹⁾ らにより報告されているが、本研究ではS3が完全に欠落することはほとんどなく、ごくわずかではあってもS3は薄層で存在するものと推定された。

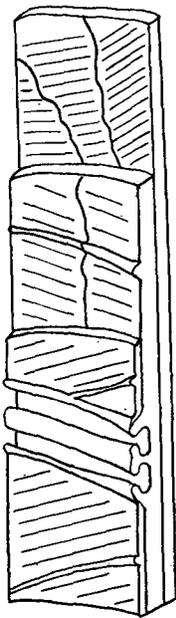


図-1 アズキナシの道管二次壁層構造を示す模式図

Fig. 1. A schematic drawing of vessel secondary wall layered structure of Azukinashi.

1=S1, 2=S2, 3=S3.

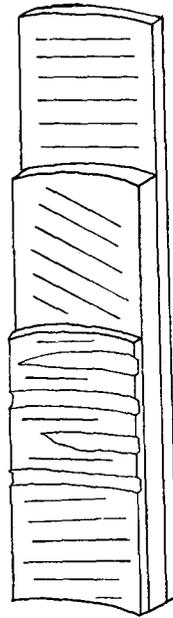
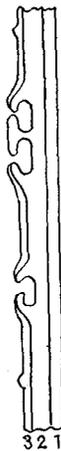


図-2 ホオノキの道管二次壁の層構造を示す模式図

Fig. 2. A schematic drawing of vessel secondary wall layered structure of Hónoki.

1=S1, 2=S2, 3=S3.

アサダでは Fig. 3 に示すように、三層以上の場合があるが、外側からの三層は道管要素間で変動することなく常に存在していた。マイクロフィブリルの配向は、S: flat-helix, S2: Z-helix (約45°), S3: S~flat-helix (70°~90°) であり、壁厚比率は順に約1:3:1であった。S3より内側を構成するマイクロフィブリルの配向は、道管要素間のみならず道管要素内においても変動が大きく、らせん肥厚のマイクロフィブリル配向は、S3のそれと一致および不一致の二者

が認められた (Photo 21~26)。

以上の結果においては、三樹種ともに、S1からS3へと順にマイクロフィブリル配向が、ほぼ flat (S)-Z-flat (S)へと変化する点で共通であり、このパターンは仮道管および MEYLAN ら¹⁹⁾により報告されている他樹種の道管二次壁のそれと一致している。また、壁厚の比率は、アズキナシの S3 が薄層であり、アサダの S3 も薄層となる場合があるものの、すでに報告⁸⁾されているブナのそれとほぼ一致している。すなわち仮道管と異なる点は、道管においては S1 および S3 がかなりの厚みを持つ⁸⁾点である。

ホオノキおよびアサダについては、二次壁が三層であるとの岸らの報告¹⁰⁾があり、本研究でも基本的には三層であることが確認された。しかし、アズキナシをも含めて本研究で対象とした三樹種の道管二次壁は、仮道管のような典型的な三層構造をなすわけではない。すなわち、図 (Fig. 1~3) においてはすでに S3 (アズキナシでは S2 をも含む) と定義した層の一部の隆起 (マイクロフィブリルの付加生長による) や薄層化、およびアサダで認められた S3 上の付加的な層 (図中では AL で表示した) の存在が問題となる。

そこで、まず本研究で観察されたらせん肥厚について考察する。IAWA²⁰⁾の定義では、らせん肥厚とは、細胞壁二次壁内面上の全面あるいは一部に存在するらせん状の隆起であるとされている。それにしたがうならば、たとえば Fig. 2 に示したホオノキの S3 は、S2 上のらせん肥厚とみなすこともでき、壁層区分が異なってくる。しかし、その壁厚の一部は道管要素内で若干変動はするものの、すべての道管要素に存在し、そのマイクロフィブリル配向も道管要素間でほとんど変動しないことから、それらはらせん肥厚と呼ばれるべきものではないものと考えられる。すなわち、らせん肥厚とは単なる壁内面における隆起ではなく、壁孔のない領域 (unpitted region) における壁の変異の産物とみなすべきであろう³⁾。そして、その帰属は、その形成時期およびマイクロフィブリルの配向を基盤として分類されるべきものであると考えられる。たとえば、アズキナシの Z-helix のらせん肥厚は、S2 形成段階に形成されかつそのマイクロフィブリル配向は S2 のそれと一致するから、S2 の一部の隆起とみなされる。このようにして本研究で観察されたらせん肥厚の帰属を分類するならば、それらは Table 1 のように示すことができる。

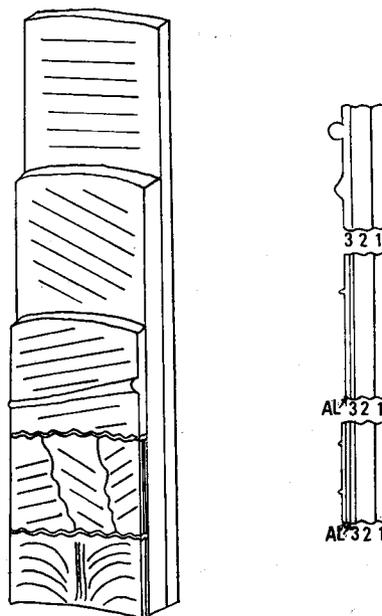


図-3 アサダの道管二次壁の層構造を示す模式図

Fig. 3. A schematic drawing of vessel secondary wall layered structure of Asada.

1=S1, 2=S2, 3=S3, AL=Additional layer.

表-1 らせん肥厚の帰属

Table 1. Relationship between spiral thickenings and wall layers

Modification	Species	Helix of thickenings
Ridges of parts of S2	Azukinashi	Z-helix
Ridges of parts of S3	Azukinashi	S (flat)-helix
	Asada	S (flat)-helix
Sculpturings by thinning of parts of S3	Hónoki	S (flat)-helix
Distinct microfibrillar aggregates on S3	Azukinashi	S (flat)-helix
	Asada	S (flat)-helix
Ridges of parts of layers on S3	Asada	S (flat)-helix

したがって、Fig. 3の壁層構成の規定に際してアサダのS3上の層を付加層として扱ったのも同様の根拠により、そのマイクロフィブリル配向は常に不定でありかつその存在自体も一定ではない(存在したりしなかったりする)ことから、S4やS5と分類されるべきものではない。

以上の観点から、壁層構成の規定に際してたとえその一部が薄層化または隆起していてもその存在およびマイクロフィブリル配向がほぼ一定で道管要素内および間で変動しないもののみをSで示し、それらが不定であるものをALで示し、かつ壁厚が異なる場合(道管要素内)のある壁層を○印で示すならば、三樹種の道管二次壁の層構成はTable 2のように表示される。

表-2 道管二次壁の層構造

Table 2. Layered structure of secondary walls of vessel elements

Species	Layered structure
Azukinashi	S1+S2°, S1+S2°+S3°, S1+S2°+S3°+ST,
Hónoki	S1+S2+S3°,
Asada	S1+S2+S3°, S1+S2+S3+ST, S1+S2+S3+AL°+(ST, AL°),

ST; Spiral thickenings are distinctively present on S3.

AL; Additional layer.

The modified layers are marked °.

アズキナシのS1は旋回するラメラから成りS1内においてマイクロフィブリルの配向が一定ではないが、その構造はすべての道管要素で一定であり、その規定には特に問題がないものと考えられる。

道管二次壁の層構成に関しては、三タイプの存在が報告^{4)~10)}されており、かつらせん肥厚が樹種の特徴を示すことが多い^{1)~3)}点を考慮するならば、道管二次壁の構造が樹種の特徴を示すことは容易に推察される。また、山中²¹⁾らにより示されたマクロラメラ構造もある樹種では固有の特徴であるかもしれない。本研究では、わずか三樹種を対象としたにもかかわらず、道管二次壁が基本的には三層構成ではあるものの三者三様でかつ固有の構造をもつことが明らかとなった。したがって、道管二次壁においては同一の壁層構成ではあっても樹種が異なれば微

細構造的にかなりの相違を示す可能性があり、それは樹種識別の有力な判断基準となり得る可能性があるものと思われる。

らせん肥厚の帰属に関しては、Table 1 に示したように、それが二次壁最内層の一部である^{13),14)} 例およびそれとは別個に独立して存在する例¹²⁾ の両例が認められ、それらが道管要素内および間で変動するとの事実^{3),22)} がより正確に例証された。らせん肥厚の形態についての分類法は研究者により異なっているが¹⁾⁻³⁾、各壁層との関係を基準に分類することも今後可能となる。

さらに本研究では、S2の一部が隆起していると考えられるらせん肥厚がアズキナシにおいて観察された。Z-helix のらせん肥厚は他樹種においても存在することが知られているが³⁾、その走行方向は事実上S2のマイクロフィブリル配向と一致し、その配向を反映していることが推定される。

また、分枝形状のらせん肥厚の存在も数多くの樹種で知られているが、アズキナシのSとZ-helix のそれらが形成時期を若干異にしながらも成熟道管では連続体で分枝状を呈するのと同様に、多樹種においてもその種の形成様式が存在するものと推察される。しかしアズキナシのZ-helix のらせん肥厚は、その大部分がS2形成段階に形成はされるものの、マイクロフィブリルの堆積は、次のS3形成段階にも継続されているように観察された。すなわち、道管要素内においては、壁孔のない領域においても配向を異にするマイクロフィブリルが同時に堆積しているものと考えられ、細胞学的な観点からもそれは極めて興味深い。何故ならば、仮に、微小管がマイクロフィブリルの配向の決定に関与しているとするならば¹⁸⁾、当然配向の異なる微小管が一細胞内で観察されるものと推定されるからである。

らせん肥厚内(隆起部)におけるマイクロフィブリル配向は、多くの場合その走行方向と一致しているが^{3),12)}、稀には、Photo 14のように、平行および直交するマイクロフィブリルからなるものが存在していた。この種のらせん肥厚は、S2形成段階に形成されたZ-helix のらせん肥厚上をS3のマイクロフィブリルが被い、さらにその上にZ-helix のマイクロフィブリルが再び堆積するような特殊な領域に限定されるが(Fig. 4)、極めて興味深い構造である。

道管二次壁の構造に関しては、移行層やラメラ構造の存在の有無等、種々の解明されるべき問題が残っている。移行層的¹¹⁾ なラメラの存在はアズキナシのS1で、またS2におけるラメラ構造の存在を示唆させる堆積直

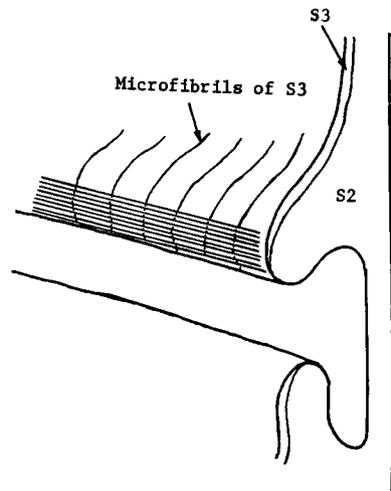


図-4 アズキナシの Z-helix らせん肥厚内における直交するマイクロフィブリル

Fig. 4. The cross microfibrils in the Z-helix spiral thickening of Azukinashi.

後のマイクロフィブリルのシート状のはく離も同樹種で観察されたが、道管壁の構造および形成様式は極めて複雑であり、今後の多樹種にわたる検討が望まれる。

本研究では、従来の常法とは異なる SEM を主として用い、三種の広葉樹の道管二次壁の層構造を明らかにした。二次壁形成過程の SEM による観察は、その構造のみならず、極めて興味深い壁形成の様式をも明らかにすることを可能ならしめた。本研究で対象としたのはわずかに三樹種のみであり、道管二次壁構造の全貌を解明したわけではないが、本研究の結果は、この種の分野における今後の研究に基礎的知見を提供するとともに、手法的にも新たな可能性を呈示し得たものとする。

引用文献

(References)

- 1) PARHAM, R. A. and KAUSTINEN, H.: IAWA Bulletin, 8-14 (1973).
- 2) MEYLAN, B. A. and BUTTERFIELD, B. G.: New Phytol., 81, 139-146 (1978).
- 3) OHTANI, J. and ISHIDA, S.: Res. Bull. College Exp. For. Hokkaido Univ., 35-2, 433-464, (1978).
- 4) BAILEY, I. W. and VESTAL, M. R.: J. Arnold Arboretum, 18, 187-195 (1937).
- 5) PRESTON, R. D.: Ann. Bot., 3, 507-530, (1939).
- 6) 原田 浩: 木材学会誌, 8, 252-258 (1962).
- 7) WARDROP, A. B.: in The formation of wood in forest trees, ZIMMERMANN, M. H., ed., Academic Press, 87-134 (1964).
- 8) HARADA, H.: in Cellular ultrastructure of woody plants, CÔTÉ, W. A. Jr., ed., Syracuse Univ. Press, 235-247, (1965).
- 9) 芦田謙二・原田 浩・佐伯 浩: 第25回日本木材学会大会研究発表要旨集, 43 p. (1975).
- 10) 岸 恭二・原田 浩・佐伯 浩: 京大演報, 49, 122-126 (1977).
- 11) KISHI, K., HARADA, H. and SAIKI, H.: Mokuzai Gakkishi, 25, 521-527 (1979).
- 12) WERGIN, W. and CASPERSON, G.: Holzforsch., 15, 44-49 (1961).
- 13) PATEL, R. N.: Nature, 198, 1225-1226 (1963).
- 14) HODGE, A. J. and WARDROP, A. B.: Aust. J. Sci. Res. B, 3, 265-269 (1950).
- 15) HIRAKAWA, Y. and ISHIDA, S.: Res. Bull., College Exp. For. Hokkaido Univ., 38-2, 249-263 (1981).
- 16) 今村祐嗣・原田 浩・佐伯 浩: 京大演報, 44, 183-193 (1972).
- 17) TANAKA, K.: International Rev. Cytol., 68, 97-125 (1980).
- 18) 平川泰彦・石田茂雄: 第31回日本木材学会大会研究発表要旨集, 77 p. (1981).
- 19) MEYLAN, B. A. and BUTTERFIELD, B. G.: Wood Sci. Technol., 12, 222 (1978).
- 20) 国際木材解剖学者連合用語委員会: 木材学会誌, 21, 1-16 (1975).
- 21) 山中勝次・原田 浩: 京大演報, 40, 293-300 (1968).
- 22) CÔTÉ, W. A. Jr.: An atlas of electron micrographs. University of Washington Press, (1967).
- 23) WARDROP, A. B. and DADSWELL, H. E.: Nature, 168, 610-612 (1951).
- 24) PANSHIN, A. J. and DE ZEEUW, C.: Textbook of wood technology, Vol 1. 3rd Ed., McGraw Hill Book C., New York (1970).

Summary

In the optical studies of the secondary wall organization in vessels, the layered structure has been classified into three types⁴⁻¹⁰. Details of this structure have a little been published by electron microscopic studies^{6,8,11} in recent years, however, knowledge of this is far from complete in vessels. For instances, the fine details of spiral thickenings organization and the relationship between spiral thickenings and each secondary wall layers still remain to be resolved.

In the past, the replica technique and ultrathin sectioning method have been employed in these investigations, but large areas of the specimen can not be examined by these methods. The SEM proved to be the major research tool in this study, because the spiral thickening direction has considerable variations. The purpose of this study was, making an observation of the orientation of microfibrils in each stages of secondary wall formation, to clarify the layered structure of vessels in three species of hard woods (diffuse porous woods), Azukinashi (*Sorbus alnifolia* C. KOCH), Hônoki (*Magnolia ovobata* THUNBERG) and Asada (*Ostrya japonica* SARG.), which have characteristic spiral thickenings respectively in vessels, using SEM (JSM-2 and JSM-F 15).

The recently developed SEM (Field emission SEM) possesses a resolution (about 30 Å) comparable with that obtained with the TEM. The SEM micrograph at a high magnification by this instrument could bring into clear view not only of the microfibrillar orientation but also of the morphology of microfibrils which have been deposited in differentiating vessel elements forming S2 layer of Azukinashi (Photo 1). The microfibrils width was found 120 Å~470 Å, but the specimen surface is coated with a thin layer of a metal and the large width microfibrils seem to consist of some of them aggregation. A great majority of them have about 150 Å width, therefore it is concluded that microfibrillar width is under 150 Å.

The SEM observation has little directly demonstrated the fine structure of microfibrils and further its use is limited by its specimen preparations, i. e. specimen drying and coating by a metal, but such observation appears to assist in elucidating the fine structure of microfibrils. As the combination of SEM and TEM seems to allow the most detailed study of cell and cell wall structure in biological fields, such observation seems to be an important record for the future SEM study.

The observations were made on the vessel elements in early woods of three species. In Azukinashi, the spiral thickenings of Z-helix with branching in S or flat-helix were formed in mature vessel elements (Photo 2). The S1 layer consisted of overlapping lamellae of slightly different microfibrillar orientations from S to Z-helix (Photos 3 and 4). The S2 layer showed the uniform microfibrillar orientation in Z-helix and the lamella structure (Photos 5 and 6), but the spiral thickenings in Z-helix have been formed in the late stage of S2 formation (Photo 7). The orientation of microfibrils of S3 was in flat or S-helix, but they were not deposited uniformly in all unpitted regions (Photo 8). After the S3 deposition, the S or flat-helix thickenings were formed, the microfibrillar orientation of which was same^{13,14} or not¹² as that of S3 (Photo 9). The examination by sections also confirmed that the secondary wall consisted of two or three layers (Photos 10 and 11). The microfibrillar orientation in spiral thickenings was generally consistent with their directions^{3,12} (Photo 12 and 13), but rarely inconsistent in the region as shown in Photo 14 and Fig. 4. The layered structure of secondary wall was

shown in Fig. 1.

In Hônoki, the secondary wall consisted of three layers (Photo 16), but the thinning of parts of S3 layers was characteristic (Photo 15). The microfibrils of S3 were firstly deposited in a ribbon-like fashion and further such deposition was continued (Photos 17~20). The layered structure was shown in Fig. 2.

In Asada, spiral thickenings were directed in S-helix, but their directions were often considerably variable (Photo 21). The secondary wall consisted of three layers or more (Photos 22 and 23), but the presence and microfibrillar orientation of additional layers on S3 was not uniform in between vessel elements and even within a element. The microfibrillar orientation of S3 and additional layers was shown in photos 24~26. The layered structure of secondary wall was shown in Fig. 3.

In vessel secondary walls of three species, our observations were consistent with earlier reports of S (flat) - Z - S (flat) arrangement⁹⁾ for the S1, S2 and S3, and layers thickness for 25%, 50% and 25%,⁹⁾ respectively, but the S3 layers of Azukinashi were little thickened for 2.5%.

With regard to the layered structure of vessels, it has been classified into three categories^{7,10,11)}: (1) typical three layered, (2) layered structure showing uniform birefringence and (3) multi-layered. The vessels secondary wall of three species examined in this study consisted of three layers in substance, but they were often modified and showed three distinct types of wall structure respectively.

As the wall layers in unpitted regions were modified by spiral thickenings in the case of three species examined in this study, the relationship between spiral thickenings and secondary wall layers was examined. It was classified on the basis of the microfibrillar orientation and its formation stage. For instance, Z-helix thickenings of Azukinashi in which microfibrillar orientation was consistent with that of S2 and further they were formed in the S2 formation stage, therefore, were regarded as the ridges of the part of S2. These relationships were shown in Table 1. Although the spiral thickenings of Hônoki could be regarded as the ridges on S2, it seems reasonable to suppose that they were formed by the thinning of the part of S3 as judged by their structure.

On the basis of the results given in Table 1, the layered structure of secondary wall in vessels of three species was indicated as in Table 2. The wall layers were divided on the basis that their microfibrillar orientation and presence were uniform between vessel elements and within a vessel element. As they were often a little modified, the modified wall layers are marked ° in Table 2. The layers on S3 of Asada were divided as additional layers not as S4 and S5, because their microfibrillar orientation was frequently variable even in a cell and further they were presented or not between vessel elements. In the case of the S1 of Azukinashi, it consisted of overlapping lamellae, but its organization was uniform in all vessel elements. This organization might fortify the presence of transition layers in vessel secondary walls from S1 to S2.

From the observation on spiral thickenings of Azukinashi a matter of great interest was found. In the branched spiral thickenings, the direction of Z-helix ones reflected the microfibrillar orientation of the S2 and further their formation stage was slightly different from that of S-helix. Additionally, the microfibrillar deposition forming Z-helix thickenings was kept in S3 formation stage (Photo 14), this means that the microfibrils differently oriented are

simultaneously deposited in a vessel element.

The microfibrillar orientation in the spiral thickening is generally parallel to its direction^{1,12}, but rarely crossed in the region as shown in Fig. 4 where the S3 microfibrils covered the edge of Z-helix thickenings.

Some workers attempted to classify helical thickenings into various categories¹⁻⁹, but the alternative classification was based essentially on the morphology of thickenings. They might be classified on the basis of the relationship between thickenings and wall layers in future.

写真説明

(Explanation of Photographs)

Note: The vessel axis is vertical in all SEM photographs.

Plates 1-3 (Photos 1-14) show the vessel secondary walls of Azukinashi.

- Photo 1.** A SEM micrograph at a high magnification showing depositing microfibrils of S2.
- Photo 2.** Spiral thickenings in a mature vessel element. They are directed in Z-helix and branched in S-helix.
- Photo 3.** The exposed overlapping lamella structure of S1 in a cell forming S2. The microfibrillar orientation is changed from S-helix to Z-helix, for S1 to S2.
- Photo 4.** Overlapping lamellae in a cell forming S1. The flat-helix microfibrils are depositing on the S-helix ones.
- Photo 5.** The microfibrillar orientation in a cell at the early stage of S2 formation. Microfibril are deposited in Z-helix.
- Photo 6.** Tearing back of a lamella of deposited microfibrils in a cell forming S2.
- Photo 7.** The beginning of the spiral thickening formation in a cell forming S2.
- Photo 8.** The inner surface of a cell forming S3. The microfibrils of S3 are deposited only on the right.
- Photo 9.** The deposition of S-helix spiral thickenings. Their microfibrillar orientation is a little different from that of underlying S3.
- Photo 10.** A section showing the three layers.
- Photo 11.** A section showing the two layers.
- Photo 12.** The microfibrillar orientation in the spiral thickening in Z-helix. It is consistent with the direction of the spiral thickening.
- Photo 13.** The relationship of microfibrillar orientation between the spiral thickenings and the underlying S3. The microfibrillar orientation of the spiral thickening shown by arrow is not consistent with that of S3.
- Photo 14.** Two different orientations of microfibrils in the spiral thickening. The spiral thickening consists of microfibrils in S-helix of S3 (black arrow) and in Z-helix (white arrow).

Plate 4 (Photos 15-20) show the vessel secondary walls of Hōnoki.

Photo 15. The lumen surface of a mature vessel element.

- Photo 16.** A section showing three layered structure.
- Photo 17.** The microfibrillar deposition of S3 in a ribbon-like fashion (arrow).
- Photo 18.** The microfibrillar deposition of S3 in the region of the depression of S3 layer.
- Photo 19.** The depressions of S3 layer.
- Photo 20.** The presence of the thinner layer of S3 in the region of the depression of S3.
- Plate 5** (Photos 21-26) shows the vessel secondary walls of Asada.
- Photo 21.** The lumen surface of a mature vessel element.
- Photo 22.** A section showing three layered structure.
- Photo 23.** A section showing four layered structure. AL; Additional layer.
- Photo 24.** The microfibrillar orientation of S3 in S-helix.
- Photo 25.** The various orientations of microfibrils on S3. They are deposited in Z-helix (left hand), in S-helix (right hand) and parallel to cell axis (in the center).
- Photo 26.** The various orientations of microfibrils of the additional layer.

