

# 琉球大学学術リポジトリ

## 細胞キメラ利用による栄養繁殖性ネギ類の育種に関する研究

メタデータ	言語: 出版者: 安谷屋信一 公開日: 2010-03-15 キーワード (Ja): 細胞キメラ, ワケギ, 乾物生産, 育種, 生育特性, 光合成, 増殖 キーワード (En): Allium, Breeding, Cytochimeras 作成者: 安谷屋, 信一, 野瀬, 昭博, Adaniya, Shinichi, Nose, Akihiro メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/16287">http://hdl.handle.net/20.500.12000/16287</a>

## 第1章 緒 論

細胞キメラは、起源層と成熟組織間の由来関係を明らかにする上で重要な貢献を果たした (Tilney-Bassett)。しかし、細胞キメラは、2-4-4 が4倍体の抽出源として用いられる以外に、植物生理、生態および育種的研究には用いられてない。

気孔サイズおよび密度には、個体内はもとより種内に一定の変異が存在することが知られている。このような気孔サイズおよび密度に関する変異性に注目し、植物改良を行う試みがある (Jones, 1987)。気孔形質の改良して育種を行うためには、内層の遺伝子型が同一で、第1層 (表皮) のみの遺伝子型の異なる isogenic line を用い、気孔の生理的、生態的役割を明確にすることが必要である (Jones, 1987)。しかし、このような isogenic line を作出することは極めて困難である。

植物体の全同化量に対して表皮の同化量が無視できるほど少なければ、表皮の倍数性が異なる細胞キメラ体 (4-2-2, 2-4-4 など) は、2倍体および4倍体の isogenic lines とみなすことができる。したがって、細胞キメラ体は、気孔の生理・生態的役割を明らかにする上で重要な研究手段となるものと推察される。

本研究は、ワケギにおける細胞キメラの育種的利用の可能性を明らかにする目的で、以下の事項を検討した。まず、第2章では、細胞キメラ体を迅速・効率的に検出するため、第1および第2起源層の倍数性を細胞当たりの仁の数で同定することを検討した。第3章では、細胞キメラ体の *in vivo* および *in vitro* 増殖時のキメラ性の変化を調査し、実験植物としての細胞キメラ体の利用の可能性を検

討した。第4章で細胞キメラ体の表皮形態を調査し、倍数体と比較した。第5章では、高温期および低温期における細胞キメラ体の生育特性を調査した。第6章では、細胞キメラ体の光合成特性を調査した。第7章で、細胞キメラ体の育種的利用の可能性を総合的に考察した。

## 第2章 細胞キメラ性の検定法

### 第1節 緒言

Adaniya and tamaki (1991) は、ワケギの細胞キメラ (4-2-2 および 2-4-4) の形態および生態を 2 倍体および 4 倍体と比較し、4-2-2 における収量の増加と結球の早まりを報告している。このような 4-2-2, 2-4-4 細胞キメラは、それぞれ 2 倍体および 4 倍体とは、第 1 層 ( $L_1$ ) のみの倍数性が異なるので、気孔形質に関連した光合成研究、特にガス交換系の研究における重要な実験植物となることが期待される。これらの研究では、実験材料として多数の倍数体および細胞キメラ体が必要となる。したがって、従来の間接的な気孔サイズや気孔密度による  $L_1$  および花粉サイズによる第 2 層 ( $L_2$ ) の倍数性検定法に代わって、直接的で、迅速なキメラ性検定法を開発し、検定効率を向上させることが必要となる。

本章では、コルヒチン処理によって作出したネギ (Allium fistulosum L.) およびワケギ (A. wakegi Araki) の細胞キメラ植物を用い、 $L_1$  および  $L_2$  の倍数性を孔辺細胞および葉肉細胞当たりの仁の数による直接的なキメラ性検定法を報告する。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 孔辺細胞長および染色体数による $L_1$ および $L_3$ の倍数性検定

1987年および1989年に、それぞれワケギ“珠葱”およびネギ“九条細”の茎頂部を以下のような方法でコルヒチン処理した。1) 茎

頂部（葉原基 2～3 枚を含む）を摘出し、0.2% コルヒチン、30g/1 ショ糖、8g/1 寒天を含む MS 培地上で 3 日間処理した。2) 処理後の培養体を 1 か月おきにコルヒチンフリー培地で 2～3 回継代培養した後、幼植物体をガラスハウスに移植した。

1989年および1990年に、それぞれワケギおよびネギのコルヒチン処理植物のキメラ性を調査した。L1の倍数性は孔辺細胞長に基づいて検定し、ワケギでは約40 $\mu$ mを示す個体を2倍性、約50 $\mu$ mを示すものを4倍性表皮とした。またネギでは、約44 $\mu$ mの孔辺細胞を有するものを2倍性、約54 $\mu$ mのものを4倍性とした。L3の倍数性は、いずれの種でも根端細胞の染色体数で検定し、 $2n=16$ を2倍性、 $2n=32$ を4倍性根とした。これらL1およびL3の倍数性検定によって、4-?-2、2-?-4および4-?-4を選抜し、未処理の2倍体（2-2-2）とともに実験に供試した。

孔辺細胞長の計測は、3株の展開第3葉身の中位部における合計90細胞で行った。根端の染色体は、常法のフォイルゲン染色によって観察した。

## 2. 細胞当たりの仁の数によるL1およびL3の倍数性検定

ワケギでは、2-2-2、4-?-2、2-?-4および4-?-4における葉鞘内の未展開葉身（未熟葉身）および完全展開第3葉身（成熟葉身）の表皮を実験に用いた。ネギでは、2-2-2、4-?-2、2-?-4および4-?-4における成熟葉身を用いた。仁の数によるL3の倍数性検定には、ワケギの2-2-2および4-?-4の根を用い、根端部から0、1および6cm部の約5mmの根片を検定に用いた。

L1およびL3の倍数性は、いずれも種々の仁を有する細胞の頻度（

細胞当たりの仁の頻度)を求めて推定した。

### 3. 葉肉細胞当たりの仁の数によるL2の倍数性検定

L2の倍数性は、通常花粉サイズによって検定されている(Tilney-bassett)。しかし、ワケギは難開花性の完全不稔種なので、花粉サイズによるL2の倍数性検定は困難である。そのため、まずネギの倍数体および細胞キメラ体を用い、花粉サイズおよび葉肉細胞当たりの仁の数で判定した倍数性が一致するかどうかを確かめた。次いでワケギの未熟葉身および成熟葉身における葉肉細胞当たりの仁の頻度を求め、L2の倍数性を推定した。

これらの倍数性判定では、株当たり1葉身、3株で3葉身を供試した。観察細胞数は、株当たり約600葉肉細胞、3株の合計約2,000葉肉細胞を観察した。細胞当たりの仁の頻度は、種々の数の仁を有する細胞の%で表した。系統間の仁の頻度の違いは、2試料 $\times$ 2検定で検定した。花粉サイズの違いは、多試料中央値検定で検定した。

### 4. 仁染色法

表皮および葉肉細胞内の仁の染色は以下の方法で行った。(1) 酢酸1:アルコール3溶液で固定した葉身片を60℃、15分間1N-HClで解離した。(2) 解離した葉片からHClを除くため、30分間99.9%アルコールで脱水した。(3) 蒸留水で洗浄した葉片をスライドガラス上に置き、表皮と葉肉組織に分離した。(4) 両組織は、それぞれカバーガラスを掛け、葉肉組織は押しつぶした後、99.9%アルコールで1時間以上脱水した。(5) カバーガラスを除いた後、カバーガラスまたはスライドガラス上に付着した表皮または葉肉細

胞を風乾した。(6) スライドグラス上に50% AgNO<sub>3</sub>を滴下し、カバーグラスを掛けた後、40℃、暗黒条件下で12時間以上処理した。

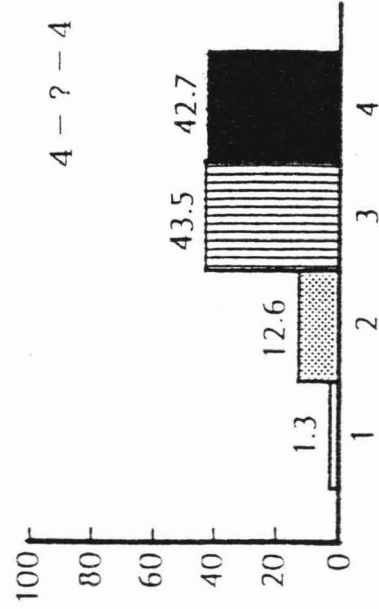
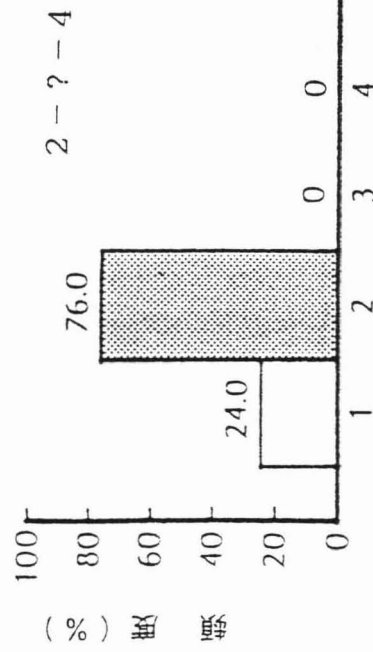
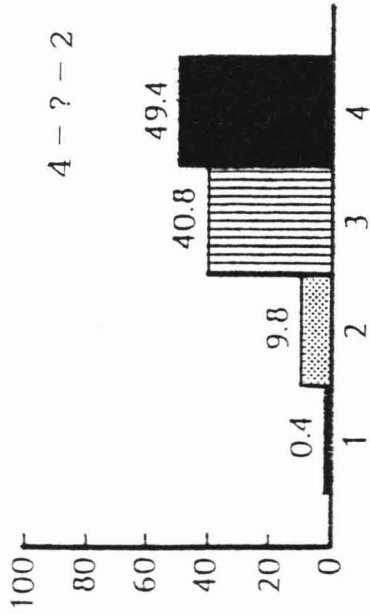
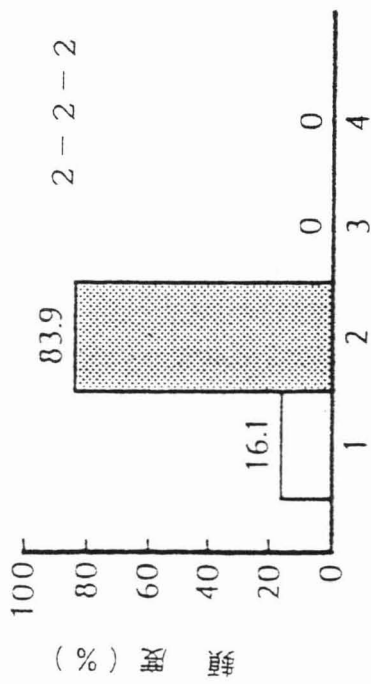
根細胞の仁も、表皮および葉肉細胞の仁と同様にして染色した。

### 第3節 結果

#### 1. ネギの孔辺細胞および葉肉細胞当たりの仁の数によるL1およびL2の倍数性検定

2-2-2および2-?-4では、孔辺細胞当たりの仁の最大数は2個で、観察細胞の約80%は2個の仁を有していた。4-?-2および4-?-4では、孔辺細胞当たりの仁の最大数は4個で、観察細胞の約1, 10, 40および45%は、それぞれ1, 2, 3および4個の仁を有していた(第1図)。これら2-2-2および2-?-4または4-?-2および4-?-4の間の仁の頻度には有意差はなかった。したがって、ネギの孔辺細胞長による倍数性の分類と孔辺細胞当たりの仁の最大数で分類した倍数性は完全に一致するので、L1の倍数性は孔辺細胞当たりの仁の最大数で判定できることがわかった。

2-2-2および4-?-2では、葉肉細胞当たりの仁の最大数は2個で、観察細胞の約60%は仁2個を有していた。2-?-4および4-?-4では、葉肉細胞当たりの仁の最大数は4個で、観察細胞の4, 30, 45および20%は、それぞれ1, 2, 3および4個の仁を有していた(第2図)。2-2-2および4-?-2または2-?-4および4-?-4の間の仁の頻度には有意差があったが、細胞当たりの仁の最大数から、2-2-2と4-?-2および2-?-4と4-?-4のL2の倍数性は、それぞれ2倍性および4倍性として推定された。

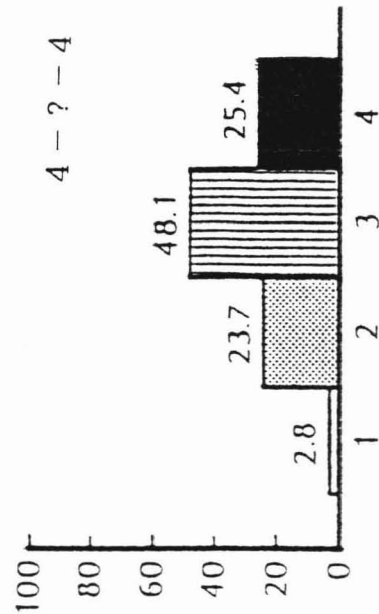
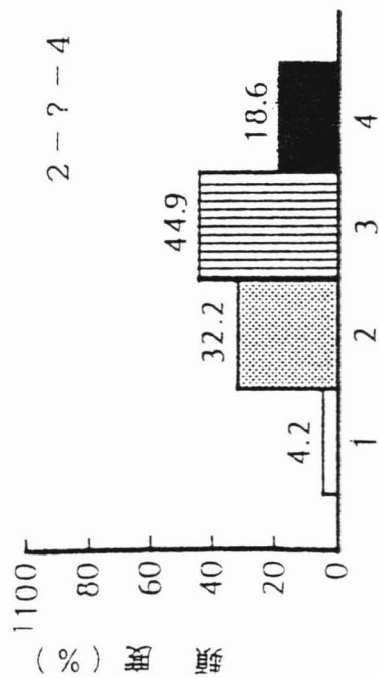
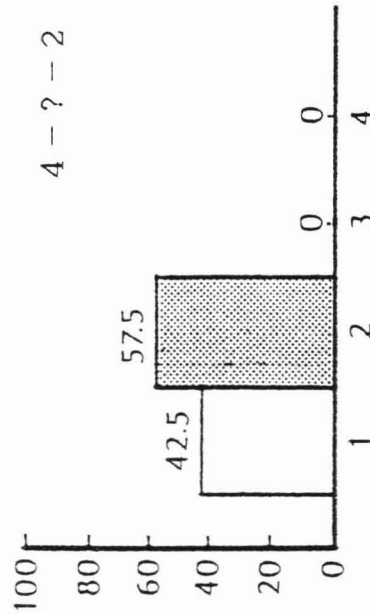
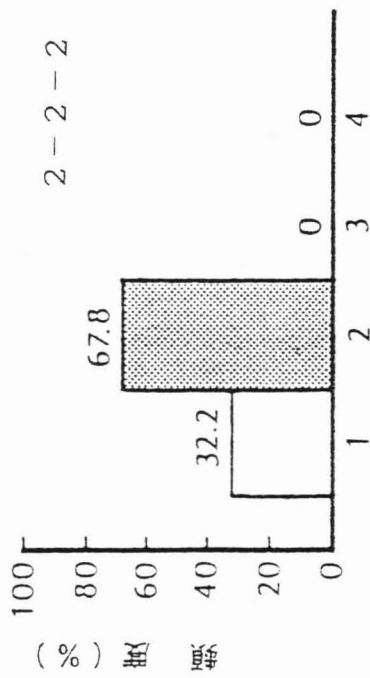


細胞当たりの仁の数

細胞当たりの仁の数

第1図 ネギの2-2-2, 4-?-2, 2-?-4および4-?-4 植物における孔  
辺細胞当たりの仁の頻度





細胞当たりの仁の数

細胞当たりの仁の数

第2図 ネギの2-2-2, 4-?-2, 2-?-4および4-?-4 植物における葉肉細胞当たりの仁の頻度

これらの植物のL2の倍数性を花粉サイズで検定し、葉肉細胞当たりの仁の最大数で推定した倍数性と比較した。2-2-2と4-?-2および2-?-4と4-?-4の間には、花粉サイズに関する有意差はなく、2-?-4および4-?-4の花粉は、2-2-2および4-?-2より有意に大きかった（第1表）。したがって、2-2-2と4-?-2および2-?-4と4-?-4のL2の倍数性は、それぞれ2倍性および4倍性として同定された。

花粉サイズで判定したL2の倍数性は、葉肉細胞当たりの仁の最大数で推定した倍数性と完全に一致した。したがって、ネギのL2の倍数性は、葉肉細胞当たりの仁の最大数によって検定できることがわかった。

## 2. ワケギの孔辺細胞および根細胞当たりの仁の頻度によるL1およびL3の倍数性検定

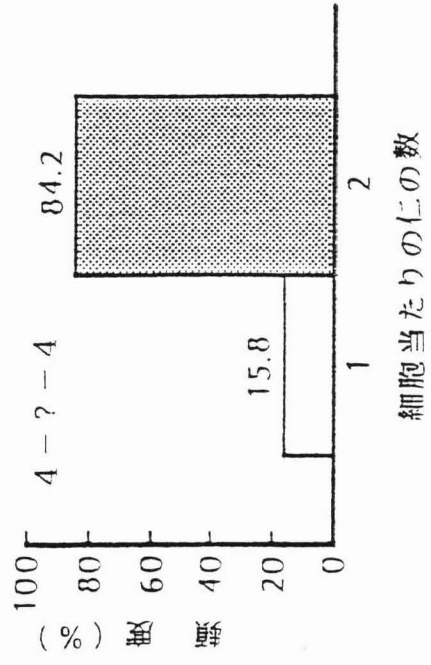
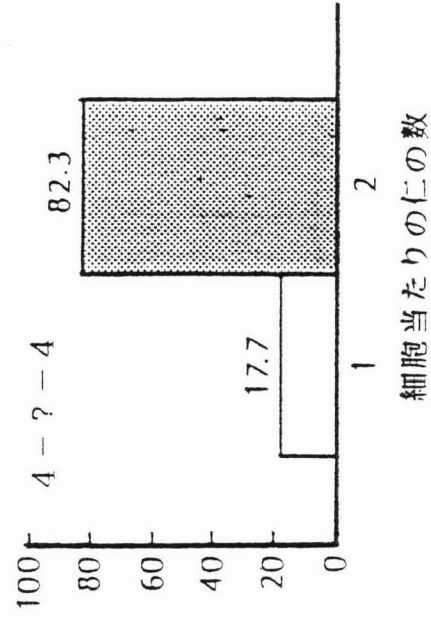
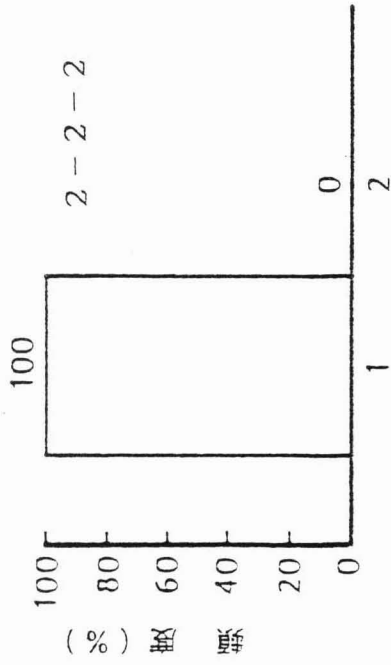
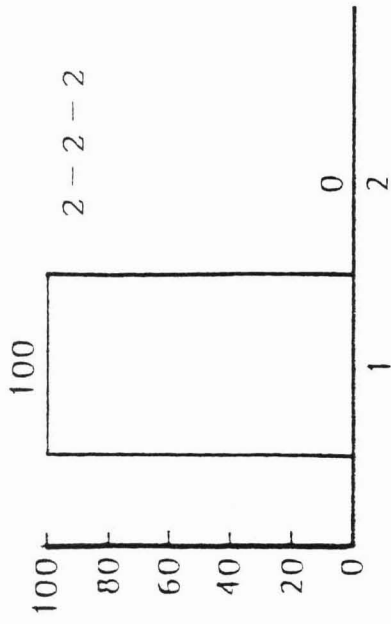
2-2-2の未熟および成熟葉身で、観察した全ての孔辺細胞は、いずれも1個の仁を有していた。4-?-4の未熟および成熟葉身では、孔辺細胞当たりの仁の最大数は2個で、観察細胞の約80%は2個の仁を有していた（第3図）。2-2-2および4-?-4における未熟および成熟葉身の間には、いずれも仁の頻度に有意差はなかった。これらの結果は、ワケギのL1の倍数性は、葉齢によらず孔辺細胞当たりの仁の最大数で判定できることを示している。

2-2-2の根端部では、根細胞当たりの仁の最大数は2個で、観察細胞の約50%は仁2個を有していた。しかし、根端から1および6cm部の根片では、ほとんど全ての細胞は仁1個を有していた。一方、4-?-4の根端部では、細胞当たりの仁の最大数は4個で、観察細胞の約30、50、10および5%は、それぞれ1、2、3および4個の仁

第1表 ネギの2-2-2, 4-?-2, 2-?-4および  
4-?-4植物における花粉サイズ

各起源 層の倍 数性	観察 花粉数	花粉サイズ ( $\mu\text{m}$ )	
		長径	短径
2-2-2	45	34.1 b <sup>2</sup>	25.4 b
4-?-2	45	34.0 b	26.0 b
2-?-4	45	42.5 a	32.7 a
4-?-4	45	43.6 a	31.3 a

<sup>2</sup> 多試料中央値検定 (P>0.01) による検定.



第3図 ワケギの2-2-2および4-?-4植物における孔辺細胞当たりの仁の頻度

を有していた。1, 6 cm部の根片における仁の最大数は2個で、細胞の約40%は2個の仁を有していた(第4図)。2-2-2および4-?-4の各根部位の根片における仁の頻度には有意差があった。

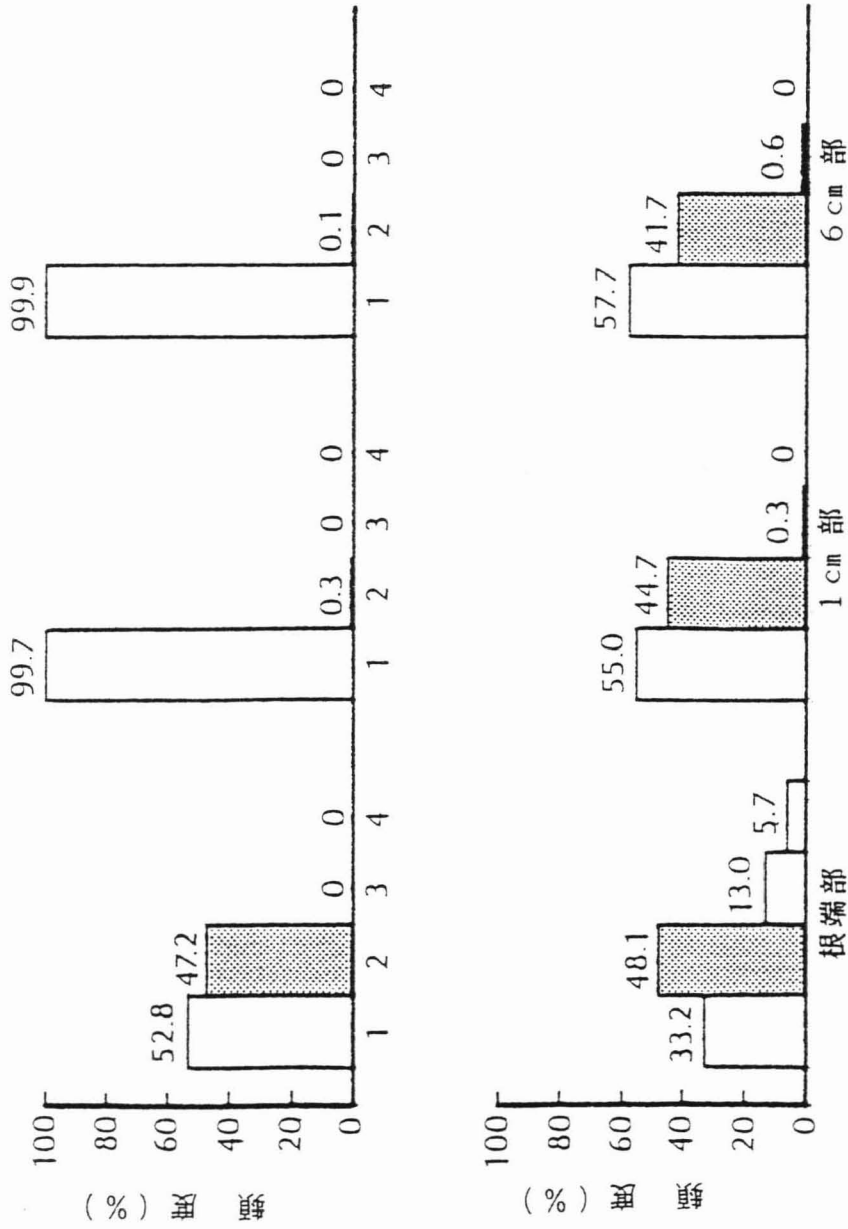
### 3. ワケギの葉肉細胞当たりの仁の数によるL2の倍数性の検定

2-2-2の未熟および成熟葉身のいずれの場合も、葉肉細胞当たりの仁の最大数は2であったが、観察細胞のほとんどは仁1個(99%)を有していた。4-?-4の未熟および成熟葉身でも、葉肉細胞当たりの仁の最大数は2個であったが、仁2個を有する細胞の割合は約70%であった(第5図)。2-2-2の未熟および成熟葉身の間には、仁の頻度には有意差はなかった。しかし、4-?-4の未熟および成熟葉身の間には、仁の頻度は有意に異なった。しかしながら、2-2-2および4-?-4における未熟葉身の間および成熟葉身の間には、高い有意差があった。したがって、ワケギのL2の倍数性は、細胞当たりの仁の頻度(最頻値)で決定できることがわかる。

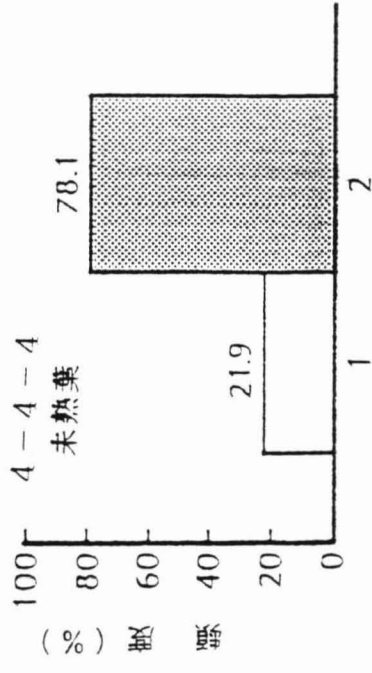
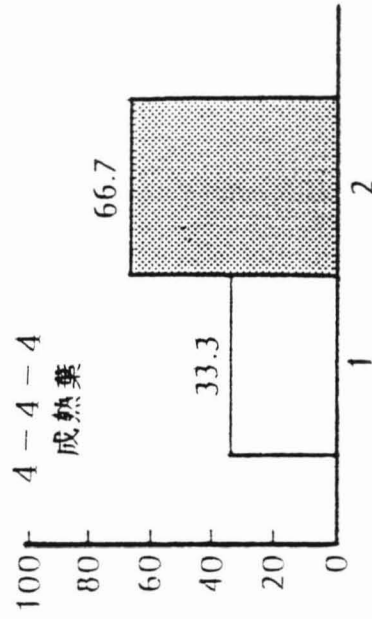
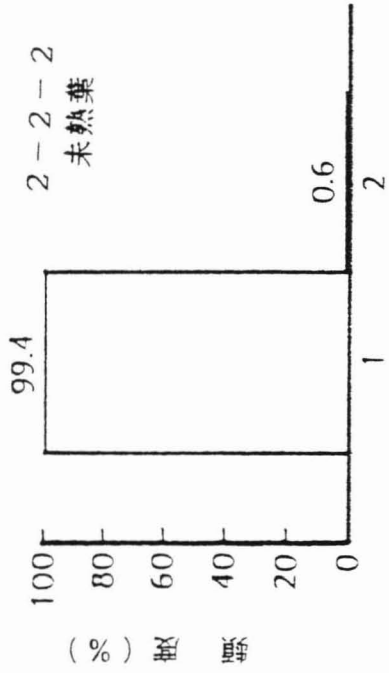
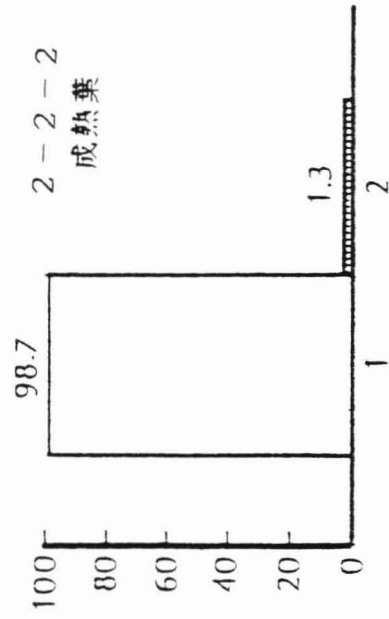
第6図は、2-2-2, 4-?-2, 2-?-4および4-?-4のL2の倍数性を葉肉細胞当たりの仁の最頻値で検定した例を示した。観察細胞のほとんど全てが仁1個を有する場合、L2の倍数性は2倍体として同定される。また、約70%の細胞が仁2個を有する場合、L2の倍数性は4倍体として同定される。したがって、4-?-2, 2-?-4および4-?-4は、それぞれ4-2-2, 2-4-4および4-4-4として同定される。

## 第4節 考 察

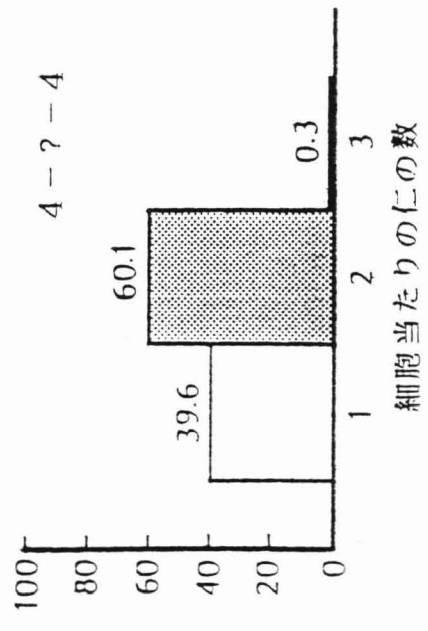
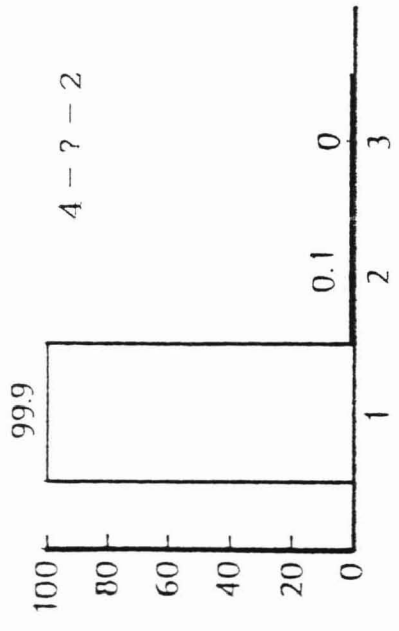
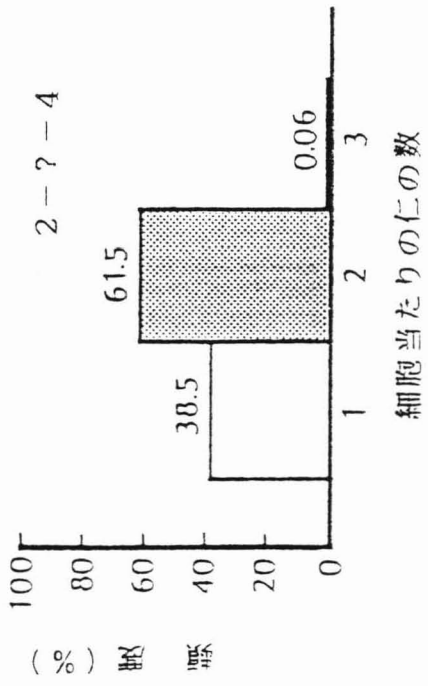
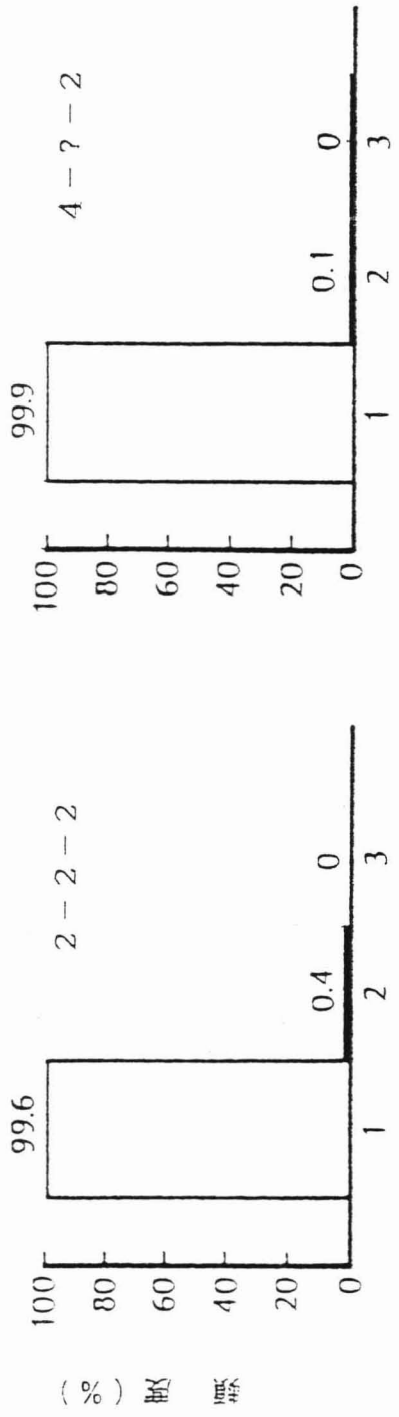
ワケギ(染色体数,  $2n=16$ )は、ネギとシャロット間の自然交雑



第4図 ワケギの2-2-2および4-?-4 植物における孔辺細胞当り  
の仁の頻度



第5図 ワケギの2-2-2および4-4-4植物における葉肉細胞当たりの仁の頻度



第6図 リケギの2-2-2, 4-?-2, 2-?-4および4-?-4 植物における葉肉細胞当たりの仁の頻度



種であることが細胞遺伝学的に証明されている (Tashiro, 1984) .  
ワケギの染色体構成のうち、通常、仁染色体は2本ある。一本はシャロットから由来した長いJ字型染色体で、他はネギから由来した短いJ字型染色体から成っている。これらのAllium種では、仁染色体上の付随体の有無に関する多型が報告されている (Adaniya, et al., 1978; Kato, 1956; Tashiro et al., 1982; Tashiro, 1984) .  
このような付随体の有無に関しては、他のいくつかのAllium種でも報告されているので (Langer and Koul, 1983; Schubert et al., 1983), Allium属では、このような多型は特殊な現象ではないことがわかる。

Kato (1954) は、ネギの実生の根端細胞で、仁染色体上の付随体付着糸の切断によって染色体断片が生じることを報告している。さらにKato (1956) は、付随体の欠失に関するホモ個体 ( $s^-s^-$ ) とヘテロ個体を ( $ss^-$ ) を検出し、これらの個体は体細胞分裂の過程で出現することを推定している。Tashiro (1984) は、 $2n=14V+2J^+$ の核型を有するネギと $2n=14V+2J^+$ のシャロット間の交雑からF1雑種を育成し、 $2n=14V+Jt+JT$ および $2n=14V+J+JT$ の核型を有する個体を検出している。F1雑種におけるこれらの核型の出現は、付随体の有無に関する染色体多型が少なくとも Amphiplasty (Navashin, 1934) によるものでなく、単純な付随体欠失によって生じていることを示唆している。

本実験で用いたワケギ品種“珠葱”は、j型仁染色体に大型の付随体を有しているが、J型仁染色体には付随体が観察されなかった。しかしながら、根端細胞では、仁染色体数と仁の最大数は一致し、細胞当たりの仁の最大数は、2倍性根で2個および4倍性根で4個

観察されるので、J型仁染色体は明らかに仁形成能力を有していることがわかる。しかし、表皮細胞、葉肉細胞および根上部細胞では、必ずしも仁染色体数と仁の最大数は一致しなかった：2倍性の組織では、ほとんど全ての細胞は仁1個を有し、4倍性の組織では、約30%および約70%の細胞は、それぞれ1個および2個の仁を有していた。これらの結果から、J型仁染色体は付随体を消失しているが、仁形成部（付着糸）は保持していること、またJ型仁染色体の仁形成能力はj型仁染色体より弱いことが示唆される。一方、ネギでは、2倍体および4倍体のいずれにおいても、表皮および葉肉細胞当たりの仁の最大数（2倍体で仁2個、4倍体で仁4個）と仁染色体数（2倍体で2本、4倍体で4本）とは一致した。このことはネギの仁染色体の間の仁形成能力は等しいことを示している。

仁形成能力の等しい仁染色体を有するネギでは、L1およびL2の倍数性は、それぞれ表皮および葉肉細胞当たりの仁の最大数によって容易に決定できる。すなわち、孔辺細胞長で分析したネギのL1の倍数性は、表皮細胞当たりの仁の最大数で判定したL1の倍数性と一致した。また、花粉サイズで分析したL2の倍数性は、葉肉細胞当たりの仁の最大数で判定した倍数性と一致した。

2本の仁形成能力を異にする仁染色体を有するワケギでは、必ずしも細胞当たりの仁の最大数で決定することはできなかった。すなわち、表皮組織では、細胞当たりの仁の最大数は、2倍性表皮で1個および4倍性表皮で2個なので、L1の倍数性判定は容易であった。しかし、2倍性の葉肉組織では、1.3~0.1%の葉肉細胞が仁2個を有し、4倍性葉肉組織では、0~0.3%の葉肉細胞が仁3個を有していた。また2倍性の根の上位部組織では、0.3~0.1%の細胞

が仁2個を有し、4倍性の根でも0.3~0.6%の細胞が仁3個を有していた有していた。

ワケギのこれらの細胞内には、1個の大きな仁または2個のほぼサイズの等しい2個の仁以外に、小さい仁が存在した。これらの小さい仁は、恐らくJ型仁染色体の仁形成部から由来したものと思われる。このような仁を含む細胞を無視すると、細胞当たりの仁の最大数は、2倍性組織で1個および4倍性組織で2個となるので、L1の倍数性と同様に、L2の倍数性も仁の最大数で正確に決定できる。

L1における倍数性は、通常気孔サイズや気孔密度で決定されている。しかし、気孔サイズや気孔密度でL1の倍数性を直接決定することは困難である。例えば、Ticha (1982) の総説にあるように、気孔サイズや、特に気孔密度は、光強度や水分状態のような環境要因および葉位の違いで変化する。また、気孔サイズの頻度分布は、異なる倍数体の間、特にコルヒチン処理初代の異なる倍数体の中で重なることがある (Eenink and Alvarez, 1975)。さらに、もしいくつかの連続した倍数体が存在しなければ、気孔サイズによってL1の倍数性を決定することは困難となる。

L1の倍数性は、孔辺細胞当たりのクロロプラストの数によっても決定される。しかし、細胞内のクロロプラストの数は、細胞サイズの変異性に密接に関連するので、1葉内でも一定の幅で変異する (Batterfass, 1983; Ellis and Leech, 1985; Hermsen and De Boer, 1971; Najcevska and Speckmann, 1968; Phke and Leech, 1987; Standring et al., 1990)。したがって、気孔サイズおよび気孔密度によるL1の倍数性の決定と同様に、孔辺細胞当たりのクロロプラストの数によって直接的にL1の倍数性を決定することは困難

である。

一般に、L2の倍数性は花粉サイズで決定されている ( Tilney-Bassett, 1986) 。しかし、花粉サイズも一定の幅で変異するので、異なる倍数体間、特にコルヒチン処理初代の異なる倍数体間の花粉サイズの頻度分布は重なることがある ( Eenink and Alvarez, 1975) 。また、人為同質倍数体では、通常不規則な減数分裂による染色体の不均衡配分によって、不稔花粉や過剰な染色体を有する花粉が増加する。そのため花粉サイズの変異性は拡大し、花粉サイズによるL2の倍数性検定は困難となる。さらに開花するまで長期間を必要とする作物や、ワケギのように難開花性の作物もある。これらの作物では、花粉サイズをL2の倍数性検定の基準として用いると実験効率は低下する。

細胞当たりの仁の最大数または仁の最頻値は、葉位や葉齢に関係なくほぼ一定している。したがって、これらの指標をL1およびL2の倍数性判定基準として用いると、幼描段階での倍数体および細胞キメラ体の早期選抜が可能となり、実験効率は著しく向上するであろう。

Jones (1987) は、気孔の生理的役割を明らかにするためには、気孔形質のみの異なる突然変異や isogenic lineが重要な研究手段となることを述べている。もし表皮における炭酸同化量が全植物体のそれに比較して無視できるほど少なければ、L1の倍数性のみの異なる4-2-2および2-4-4は、2倍体および4倍体に対する isogenic lineと見なすことができる。したがって、気孔の生理的役割の解明を目的とした研究では、4-2-2や2-4-4などの細胞キメラ体は重要な植物材料となるであろう。これらの研究では、多数の倍数体および

細胞キメラ体が必要となるので、迅速で、正確な細胞キメラ性検定法が有効であろう。

### 第3章 増殖とキメラ性の安定性

#### 第1節 緒言

細胞キメラは、植物組織学における実験植物として重要な価値を有している。しかし、育種的には細胞キメラ体が倍数体の分離源として利用されているだけで (Tilney-Bassett, 1986 a), その育種的価値は明確にされてない。そのためか、細胞キメラの増殖については報告が少ない。

突然変異育種では、変異組織からキメラ性を回避し、いかに変異体を選抜するかが重要な課題となっている (渡辺・山口, 1983)。しかし、観賞用植物では斑入りや花色、果色キメラのように経済的価値の高いものが多いので (Tilney-Bassett, 1986 b), キメラ性を維持し安定的に増殖する技術が必要となる。

Adaniya and Tamaki (1991) は、ワケギの細胞キメラ体において収量が増加することを報告し、細胞キメラ体における光合成能力の向上を示唆している。細胞キメラ体を材料とした光合成研究からは、興味ある問題が提起されるものと思われる。しかし、今日まで光合成研究や育種への細胞キメラの利用については、ほとんど研究例がない。細胞キメラ体がこれらの研究材料として成立するためには、細胞キメラ体の増殖過程において、キメラ性が変化しないことが前提となる。

本章では、圃場条件下および試験管内における細胞キメラ体の増殖とキメラ性の安定化条件を検討し、生理・生態的研究における実験植物としての細胞キメラ利用の可能性を考察した。

## 第2節 材料および方法

### 1. 圃場条件下における増殖とキメラ性の安定性

#### 1) コルヒチン処理当代におけるキメラ性の安定性

1991年3月15日に、第1章の実験方法に準じ、茎頂部をコルヒチン処理した。1991年7月26日～8月7日に育成した処理植物の細胞キメラ性を第1章の方法に準じて分析し、2倍体および4倍体の外に、4-2-2, 2-4-4, 2-4-2, 4-4-2, 4-8-4の細胞キメラ体を検出した(第I回)。これら2倍体、4倍体および細胞キメラ体の2株または3株から分けつした栄養系のキメラ性を、1991年9月12日～10月2日に調査した(第II回)。さらに、それぞれの倍数体および細胞キメラ体から分けつした栄養系のキメラ性を10月28日～11月25日に分析した(第III回)。

#### 2) 3年生株におけるキメラ性の安定性

1987年にコルヒチン処理し、育成した4倍体、4-2-2, 2-4-4植物に2倍体を加えた系統を供試した。1990年7月30日(第I回)に、倍数体および細胞キメラ体当たり4株のキメラ性を検定後、ビニルハウス内で栽培した。その後、実験1)で行ったように、分けつした栄養系を1990年11月10日(第II回)に、さらに分けつした栄養系のキメラ性を1991年4月7日(第III回)に検定して起源層の倍数性の変化について調査した。

### 2. 試験管内における増殖とキメラ性の安定性

1987年にコルヒチン処理し、育成した3年生の2倍体、4倍体、

4-2-2, 2-4-4植物を用いた。これらの植物体から、第1章の実験で示した方法に従って、2～3枚の葉原基を有する茎頂部を摘出し、0, 0.0625, 0.125, 0.25および0.5ppm BAを含むMS培地で1か月間培養した。また、BA (6-Benzyl aminopurine) の0.5ppmとNAA (naphthalene acetic acid) の0.1, 0.5, 1.0ppmを組み合わせた培地上で茎頂部を培養し、増殖体のキメラ性の変化を調査した。

### 第3節 結 果

#### 1. 圃場条件下における増殖とキメラ性の安定性

##### 1) コルヒチン処理当代におけるキメラ性の安定性

2倍体および4倍体では、いずれの検定時にも起源層の倍数性に変化は認められなかった。しかし、4-2-2は第III回の検定時に、検定株数の約65%は2倍体に変化していた。2-4-4のキメラ性は、4-2-2と比較すると安定的で、4-2-2 および4倍体がそれぞれ1個体(3.7%)分離した。2-4-2からは2倍体(62.9%), 2-4-4(33.3%) および4倍体(3.7%)が分離し、親株のキメラ性は完全に消失した。4-4-2も第III回の検定では検出されず、多くは4-2-2(55.6%) および2-4-4(38.9%)へ、また1個体(5.6%)は2倍体へ変化した。4-8-4からは、多くの株が4倍体(83.3%)になり、残りは2-4-4(16.7%)へ変化して、親株のキメラ性は消失した(第2表)。

##### 2) 3年生株におけるキメラ性の安定性

1978年に誘発し、育成した2倍体、4倍体、4-2-2および2-4-4キメラ植物を圃場条件下で増殖し、起源層の倍数性の変化を調査し



た。増殖した倍数体および細胞キメラ体の 160~284 の栄養系には、まったくキメラ性の変化は認められず、キメラ性は安定していた（第3表）。

## 2. 試験管内における増殖とキメラ性の安定性

2倍体，4倍体および細胞キメラ体における外植体当たりの増殖株数は，BA無添加区で1株，0.125ppm BA区では約3株となり増殖率は低かった。一方，0.25ppm BA添加区では約6株，0.5ppm BA区では約9株に増加し，増殖率は高まった。

2倍体および4倍体では，いずれのBA濃度区でもキメラ性の変化は認められなかった。また，4-2-2および2-4-4でも0~0.125ppm BA濃度域ではキメラ性の変化は認められなかった。しかし，0.25ppm BAおよび0.5ppm BA区では，4-2-2から2倍体（25.0%）と4倍体（5.4%）が分離し，2-4-4から2倍体（2.2%）または4倍体（2.6%）が分離した（第4表）。

0.5ppm BAと0.1，0.5および1.0ppm NAAを組み合わせた処理区における増殖株数およびキメラ性の変化を第11表に示した。増殖株数は，いずれもNAA濃度の増加に伴って増加し，0.5ppm BA+1.0ppm NAA区で外植体当たり約16株に増殖した。このように，BA単独添加培地に比較すると，BAおよびNAA添加培地では増殖率は著しく高まった。

2倍体では，いずれのホルモン区でもキメラ性の変化は認められなかった。しかし，BA+NAA添加培地の4倍体からは，4-8-4または8-8-4が分離した。4-2-2植物からは，増殖体の約半数が2倍体となり，そのほか4倍体，4-4-2，不完全周縁キメラ，混数体が出現し

第2表 圃場条件下で増殖したコルヒチン処理当代植物  
におけるキメラ性の安定性

倍数体 とキメ ラ植物	検定 <sup>1</sup> 月日	検定 株数	検定株のキメラ型と出現数						
			2-2-2 <sup>2</sup> 4-2-2	2-4-2	4-4-2	2-4-4	4-4-4	4-8-4	
2-2-2	1	3	3	0	0	0	0	0	0
	11	9	9	0	0	0	0	0	0
	111	27	27	0	0	0	0	0	0
4-2-2	1	3	0	3	0	0	0	0	0
	11	9	2	7	0	0	0	0	0
	111	27	18	9	0	0	0	0	0
2-4-2	1	3	0	0	3	0	0	0	0
	11	9	5	0	1	0	3	0	0
	111	27	17	0	0	0	9	1	0
4-4-2	1	2	0	0	0	2	0	0	0
	11	6	0	2	1	1	2	0	0
	111	18	1	10	0	0	7	0	0
2-4-4	1	3	0	0	0	0	3	0	0
	11	9	0	0	0	0	8	1	0
	111	27	0	1	0	0	25	1	0
4-4-4	1	3	0	0	0	0	0	3	0
	11	9	0	0	0	0	0	9	0
	111	27	0	0	0	0	0	27	0
4-8-4	1	2	0	0	0	0	0	0	2
	11	6	0	0	0	0	0	5	1
	111	18	0	0	0	0	3	15	0

<sup>1</sup> コルヒチン処理した3株を 1991年7月26日～8月7日(1)に検定し、  
それぞれから分けつした苗を9月12日～10月2日(11)および10月28日  
～11月25日(111)に検定した。

<sup>2</sup> 起原層の第1層、第2層および第3層における倍数性。

第3表 圃場条件下で増殖した3年生の2倍体、4倍体  
および細胞キメラ植物におけるキメラ性の安定性

倍数体 とキメ ラ植物	検定 月日	増殖 株数	検定 株数	検定株のキメラ型と出現数			
				2-2-2 <sup>v</sup>	4-2-2	2-4-4	4-4-4
2-2-2	I	4	4	4	0	0	0
	II	69	12	12	0	0	0
	III	284	36	36	0	0	0
4-2-2	I	4	4	0	4	0	0
	II	62	12	0	12	0	0
	III	182	36	0	36	0	0
2-4-4	I	4	4	0	0	4	0
	II	53	12	0	0	12	0
	III	214	36	0	0	36	0
4-4-4	I	4	4	0	0	0	4
	II	34	12	0	0	0	12
	III	160	36	0	0	0	36

<sup>z</sup> コルヒチン処理した4株を1990年7月30日(I)に検定し、それぞれから分けつした苗を11月10日(II)および4月7日(III)に検定した。

<sup>v</sup> 起原層の第1層、第2層および第3層における倍数性。

第4表 試験管内における2倍体，4倍体および細胞キメラ植物の増殖  
とキメラ性の安定性に及ぼすBAの影響

倍数体 とキメ ラ植物 <sup>2</sup>	BA濃度 (ppm)	外植 体 <sup>3</sup> 数	増殖 株数	外植体 当たり 株数	検定 株数	検定株のキメラ型と出現数			
						2-2-2 <sup>4</sup>	4-2-2	2-4-4	4-4-4
2-2-2	0	6	6	1.0	6	6	0	0	0
	0.0625	6	18	3.0	16	16	0	0	0
	0.125	6	18	3.0	11	11	0	0	0
	0.25	6	36	6.0	36	36	0	0	0
	0.5	6	53	8.8	50	50	0	0	0
4-2-2	0	6	6	1.0	6	0	6	0	0
	0.0625	6	10	1.7	8	0	8	0	0
	0.125	6	17	2.8	12	0	12	0	0
	0.25	6	34	5.7	31	1	29	0	1
	0.5	6	58	9.7	56	14	39	0	3
2-4-4	0	6	6	1.0	6	0	0	6	0
	0.0625	6	10	1.7	8	0	0	8	0
	0.125	6	22	3.7	22	0	0	22	0
	0.25	6	55	9.2	39	0	0	38	1
	0.5	6	57	9.5	45	1	0	44	0
4-4-4	0	6	6	1.0	6	0	0	0	6
	0.0625	6	11	1.8	10	0	0	0	10
	0.125	6	18	3.0	17	0	0	0	17
	0.25	6	36	5.0	34	0	0	0	34
	0.5	6	65	10.8	40	0	0	0	40

<sup>2</sup> 3年生株を供試した。

<sup>3</sup> 葉原基2～3を含む茎頂部。

<sup>4</sup> 起原層の第1層，第2層および第3層における倍数性。

た。また、2-4-4植物からは、多くの4倍体が出現し、そのほか2倍体、2-2-4、2-4-2、4-8-4が分離した。さらに4-2-2または2-4-4から分離した2倍体または4倍体の株数は、NAA濃度が高くなるにつれて多くなる傾向にあった。総じてキメラ性の変化は、BA単独添加培地におけるよりも、BA+NAA添加培地において激しかった（第5表）。

#### 第4節 考 察

圃場条件下で増殖した3年生の2倍体、4倍体および細胞キメラ体の株には、いずれもキメラ性の変化は認められなかった。したがって、主茎の茎頂部における層状構造は、分けつ株（増殖株）の茎頂部の層状構造と同一であり、圃場条件下で増殖した株が、腋芽に起源することは明かである。ちなみに、タマネギ（Hussey and Falavigna, 1980）では腋芽茎頂の層状構造は、主茎茎頂の層状構造と類似していることが知られている。

圃場条件下で増殖したコルヒチン処理当代の2倍体および4倍体の増殖株には、いずれも倍数性に変化は認められなかった。しかし、細胞キメラ体、特に2-4-2、4-4-2、4-8-4におけるキメラ性の変化は激しかった。このことは、処理当代の細胞キメラ株には、依然として不完全周縁キメラまたは区分キメラが存在していることを示唆しているものと思われる。

以上のように、コルヒチン処理後数代を経た4-2-2および2-4-4の細胞キメラ体は、圃場条件下で安定的に増殖することが可能である。しかし、コルヒチン処理当代の細胞キメラ体のキメラ性は変化し易

第5表 試験管内における2倍体，4倍体および細胞キメラ植物の増殖とキメラ性の安定性に及ぼすBAおよびNAAの影響

倍数性とキメラ植物 <sup>z</sup>	ホルモン濃度 (ppm)		外植体数	増殖株数	外植体当たり株数	検定株数	検定株のキメラ性出現数											
	BA	NAA					2-2-2	4-2-2	2-4-2	4-4-2	2-2-4	2-4-4	4-4-4	4-8-4	8-8-4	Heri <sup>v</sup>	Hi <sup>x</sup>	
2-2-2	0	0	6	6	1.0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0.1	6	69	11.5	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0.5	6	72	12.0	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	1	6	96	16.0	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-2-2	0	0	6	6	1.0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0.1	6	53	8.8	32	3	19	0	3	0	0	6	0	0	1	0	0
	0.5	0.5	6	94	15.7	58	16	37	0	2	0	0	1	0	0	2	0	0
	0.5	1	6	98	16.3	59	28	22	0	3	0	0	2	0	0	0	4	0
2-4-4	0	0	6	6	1.0	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	0.5	0.1	6	59	9.8	41	1	0	0	0	1	35	3	1	0	0	0	0
	0.5	0.5	6	104	17.3	82	8	0	4	0	2	42	26	0	0	0	0	0
	0.5	1	6	110	18.3	98	1	0	2	0	8	54	33	0	0	0	0	0
4-4-4	0	0	6	6	1.0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0.1	6	50	8.3	26	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	1	0
	0.5	0.5	6	95	15.8	40	0	0	0	0	0	0	0	0	37	1	2	0
	0.5	1	6	89	14.8	44	0	0	0	0	0	0	0	0	43	0	1	0

<sup>z</sup> 3年生株を供試した。

<sup>v</sup> 葉原基2-3を含む基頂部。

<sup>x</sup> 起源層の第1層，第2層および第3層における倍数性。

く、キメラ性が安定化するまでには数代の経過が必要であることがわかる。したがって、細胞キメラ体育成を目的とすると、キメラ性の安定化までの期間短縮を検討することは重要な課題となるものと思われる。

試験管内における細胞キメラ増殖の実験では、BAの0～0.125 ppmにおいて増殖率は低かった。しかし、細胞キメラ体におけるキメラ性の変化はなく、安定的に増殖することが可能であった。このような低濃度のBA添加培地で増殖された株も、圃場条件下での増殖株と同様に、腋芽に由来していることがわかる。

一方、高濃度（0.25ppmおよび0.5ppm）のBA処理で増殖率は高まった。また、BA+NAA処理では、さらに増殖率は向上した。しかし、増殖率が高まるにつれ、細胞キメラ体のキメラ性は激しく変化した。また、NAA添加によって4倍体の層状構造も変化した。このようなキメラ性の変化については、高濃度のBA添加またはBA+NAA添加によって、層状構造における次のような変化が生じていることが考えられる。1) 単層起源の不定芽からの苗条形成（4-2-2および2-4-4から、それぞれ4倍体および2倍体の分離）、2) 重複、置換または穿孔によって変化した層状構造からの腋芽または不定芽の分化（4-2-2 および2-4-4 から、それぞれ多数の2倍体および4倍体の分離）、3) カルス形成による層状構造の崩壊とカルスからの不定芽形成（4-2-2 からの不完全周縁キメラ株および混数体、4倍体からの4-8-4および8-8-4の分離）。高濃度のBA処理またはBA+NAA処理による増殖率の向上は、主にこのような不定芽分化の促進によってもたらされたものであると推察される。

組織培養技術は、栄養繁殖性作物の突然変異育種における変異体

選抜や自然発生の周縁キメラ品種からの変異体選抜に有効な方法であることが知られている（渡辺・山口，1983）．例えば，‘刺無しblackberry’の周縁キメラ品種から真性‘刺無しblackberry’の分離（Mc Pheeters and Skirvin, 1983）， $\gamma$ 線照射したカーネーションの茎頂からの花色変異体の選抜（Johnson, 1980），ナシのG-G-W（緑-緑-白）およびG-R-G（緑-赤-緑）型の周縁キメラ品種から緑系統，アルビノ系統，赤系統などの分離（Abu-Qaoud, H et al., 1990），キクのbronze ‘Indianapolis’からピンクと白色品種の分離（Bush et al., 1976），など，多くの植物で報告されている（Kasperbauer et al., 1981）．

一方，周縁キメラ植物には商品的価値の高いものがあり，特に観賞用植物には，斑入り植物など多くの周縁キメラ品種がある（Tilney-Bassett, 1986）．これらの品種では，周縁キメラ性を崩さずに安定的に増殖することが必要となる．例えば，*Yucca elephantipes* Regelの黄縁（yellow leaf margin）品種などでは，試験管内での大量増殖が可能である（Pierik et al., 1983）．しかし，*Yucca*の場合でも，ワケギの細胞キメラ体と同様に，BA濃度を高くするとカルスを形成し，キメラ性は崩壊して不定芽由来の真性緑色植物が出現することが報告されている．

ワケギの細胞キメラ体は，試験管内増殖によっても安定的にキメラ性を維持することが可能である．しかし，増殖率は低いので，外植体のサイズ（Pratt et al., 1967）や *Yucca*で行われているような茎頂部への物理的障害（茎頂部の垂直切断など）（Fujieda et al., 1979; Hussey and Falavigna, 1980）などによって，増殖率の向上を図ることが必要である．



染色体の倍数化に伴う光合成特性の変化については、多くの報告がある (Bazzaz et al., 1982; Setter et al., 1978; Warner et al., 1987). しかし、これらは倍数体そのもの光合成特性を扱っているため、倍数化によって生じた光合成特性の差異が、ガス交換系 (表皮) の倍数化による影響か、または炭酸ガス固定系 (葉肉組織) の倍数化による影響かを判断することは困難である。一方、I型の細胞キメラ体 (4-2-2および2-4-4など) を実験材料とすると、これらの細胞キメラ体の光合成特性を、それぞれ2倍体および4倍体と比較することによって、ガス交換系と炭酸ガス固定系の相互作用を別個に検討することが可能となる。さらに、細胞キメラ体を用いることによって、種内における気孔サイズおよび気孔密度の変異幅を拡大することが可能なため、植物種の地理的分布・適応および倍数性種の地理的分布域の相違に関する気孔系の役割を理解する上で有利になるものと思われる。

本章では、4-2-2および2-4-4キメラが圃場条件下および試験管内 (BA 0.125ppm以下の濃度条件下) において安定的に増殖できることを明かにした。したがって、これらの細胞キメラ体は、植物解剖学や組織学的研究だけでなく、生理・生態的研究においても利用が可能であり、今後、これらの細胞キメラ体が生理・生態的研究において重要な役割を果たすものと期待される。

## 第4章 表皮形態

### 第1節 緒言

気孔サイズや気孔密度などの気孔形質は、植物種内はもとより、個体内でも一定の幅で変異することが知られている。例えば、アルファルファ (Cole・Dobrenz, 1970), ブルーパニックグラス (Dobrenzら, 1969), ブルームグラス (Tan・Dunn, 1975), オオムギ (Miskin・Rasmusson, 1970), ソルガム (Liangら, 1975) における葉の気孔サイズや気孔密度は、葉位の異なる葉間はもとより、1葉内の異なる部位においても変異することが報告されている。このような気孔形質の変異性に注目して作物育種を行う試みは、いくつかの植物で行われている。Walton (1974) は、ブルームグラスの気孔サイズと収量の関係を調査し、気孔の大きさと収量に負の相関関係を認めている。Dernoeden and Butler (1978, 1979) および Dobrenz ら (1969) は、ブルーパニックグラスにおける気孔密度と耐乾性または水分利用効率の関係を調査し、気孔密度の低さと耐乾性に正の相関を認めている。その他、気孔密度と耐寒性 (Knecht・Orton, 1970) および耐暑性 (Rutland, 1987) について検討した報告がある。

Jones (1986) は、気孔形質を改良して作物育種を行うためには、気孔の生理・生態的役割を明らかにすることが必要である、と述べている。気孔の生理・生態的役割を明らかにするためには、まず目的とする植物種における気孔形質の変異幅を明確にし、変異幅を拡大することが必要であろう。

通常 染色体の倍数化に伴って、気孔サイズは大きくなり、気孔密度は低下する。もし4-2-2および2-4-4を、それぞれ2倍体および4倍体に含めると、2倍体および4倍体における気孔サイズ、気孔密度に関する変異幅を拡大することが可能となる。種内における気孔形質の変異幅の拡大は、植物生理および植物の環境適応に関する気孔の役割を検討する上で重要であると考えられる。

本章では、細胞キメラ体を乾物生産および光合成研究の実験材料として用いるにあたり、2倍体、4倍体、4-2-2および2-4-4の細胞キメラ体における気孔サイズ、気孔密度、気孔面積などの気孔形質を調査した。

## 第2節 材料および方法

材料は、1989年にコルヒチン処理し、育成したワケギ (*Allium wakegi* Araki cv. Shunegi) の2倍体、4倍体および4-2-2、2-4-4細胞キメラ体を供試した。

1992年5月22日に、2倍体、4-2-2、2-4-4および4倍体の鱗茎を、それぞれ約1.2、1.1、1.1および1.6 gに調整し、プランター (73×45×25 cm) に1系統あたり60球を植え付けた。1992年7月1日に植物体を掘上げ、表皮形態の調査を行った。

表皮形態の測定には、完全展開第1葉身を供試し、孔辺細胞長、気孔サイズ (気孔最外部孔の長・短径)、気孔密度 (気孔数/mm<sup>2</sup>)、気孔最外部の気孔面積および孔辺細胞以外の表皮細胞サイズ (細胞長・幅) および表皮細胞密度 (細胞数/mm<sup>2</sup>) を測定した。葉身の面積は、それぞれをメスで植物体の軸に沿って切り開き、複写機で

複写後，自動葉面積計（林電工AAM-8）で測定した。その後，切り開いた葉身は，酢酸・アルコールの1：3液で固定し，表皮形質の測定まで保存した。

葉身の表皮形質の測定は，次のようにして行った。まず，葉身を先端部から葉身基部まで11等分し，第1，3，5，7，9および第11分割部位の葉身片を計測に供試した。

孔辺細胞長，気孔サイズ，表皮細胞サイズは，葉身片の表皮を顕微鏡の10 X 40 X 1.25倍下で観察し，描画装置を用いて測定した後，実測値に換算した。孔辺細胞長および気孔サイズの測定には，それぞれ1葉1部位あたり20細胞を用いた。表皮細胞サイズの測定には，30細胞を供した。気孔密度および表皮細胞密度は，それぞれ10視野（10×10倍）の平均値で表した。

1葉身当りの気孔数は，葉身の6部位の平均気孔密度×6葉の平均葉面積で算出した。気孔当りの気孔面積は，気孔最外部の楕円面積（気孔長径×気孔短径× $\pi$ ）を求め，20細胞の平均値で表した。葉身当たりの全気孔面積は，葉身の6部位の平均気孔密度×気孔当りの気孔面積×6葉の平均葉面積を用いて算出した。

実験期間中の日平均最低気温（SD），日平均気温（SD）および日平均最高気温（SD）は，それぞれ20.5（±3.0），27.8（±2.7）および35.4（±3.6）℃であった。

### 第3節 結果

第1葉身における気孔長径は，いずれの系統でも葉身先端部で最も大きく，基部にかけて小さかった。4倍体および4-2-2の気孔長

径は、2倍体および2-4-4の気孔長径に比較すると、いずれの葉身部位でも高い値を示した(第7図)。また、4倍体の気孔長径は4-2-2より大きく、2-4-4の気孔長径は2倍体より大きかった。葉身の全部位の平均気孔長径は、2倍体、2-4-4と4倍体、4-2-2との間には有意差があり、4倍体と4-2-2が高い値を示した(第11図)。

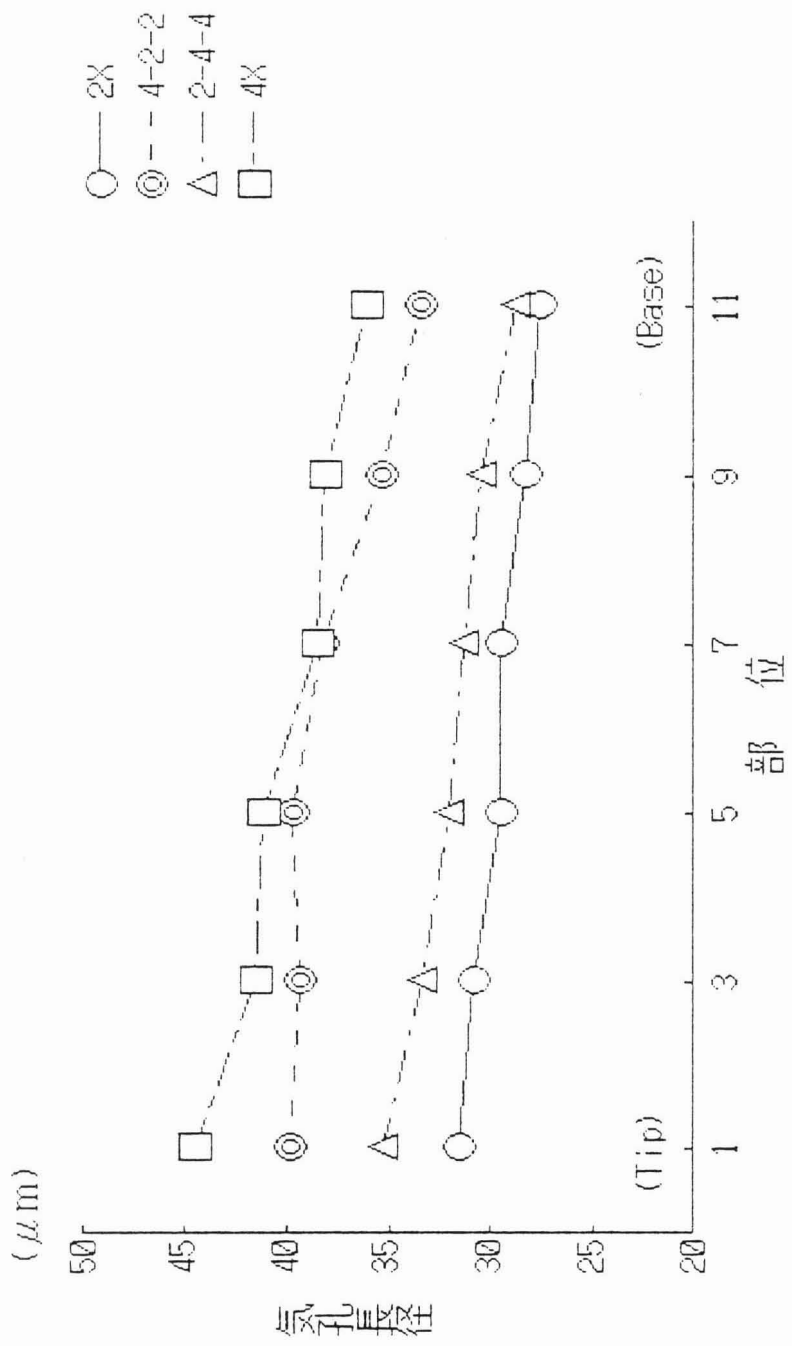
気孔短径は、気孔長径と同様に、葉身先端部で大きく、基部で小さかった(第8図)。4倍体および4-2-2の平均気孔短径は、2倍体および2-4-4の平均気孔短径に比較すると有意に大きかった(第11図)。

第1葉身の孔辺細胞長は、いずれの系統も先端部において短く、基部にかけて僅かに長くなる傾向にあった(第9図)。4倍体および4-2-2の平均孔辺細胞長は、2倍体および2-4-4に比較すると有意に大きかった。また、4倍体と4-2-2間では、4倍体の孔辺細胞長が大きく、2倍体と2-4-4間では、2-4-4の孔辺細胞長が大きかった(第11図)。

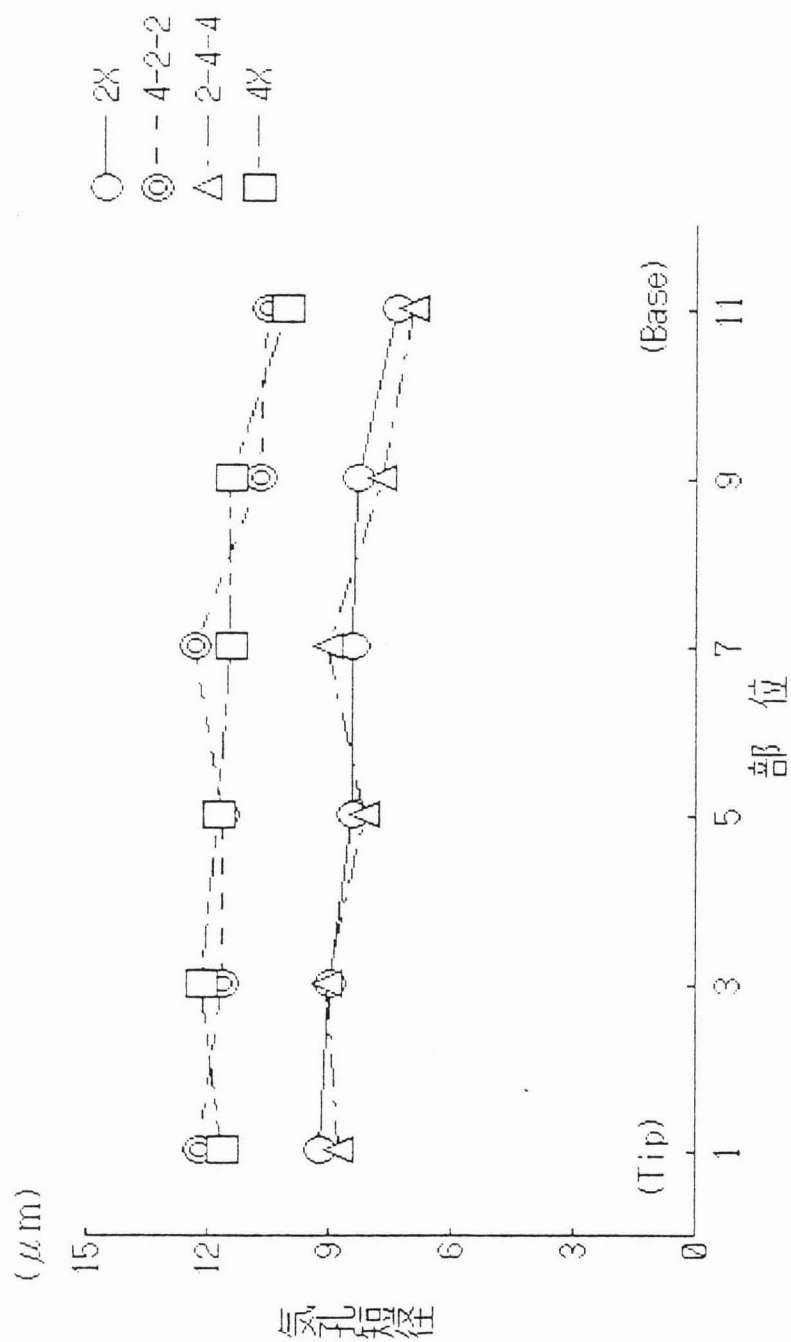
気孔密度は、いずれの系統も葉身先端部～5位部で高く、11部で低かった(第10図)。系統間では、4倍体および4-2-2より2倍体および2-4-4で高かった(第11図)。2倍体と2-4-4間では、2倍体の気孔密度が高く、4倍体と4-2-2間では、4-2-2の気孔密度が高くなる傾向にあった。

第1葉身における単位葉面積当たりの全気孔面積は、いずれの系統も先端部で大きく、基部で小さかった。また、2倍体および2-4-4より4倍体および4-2-2の単位葉面積当たりの全気孔面積は、いずれの部位でも大きかった(第12図)。

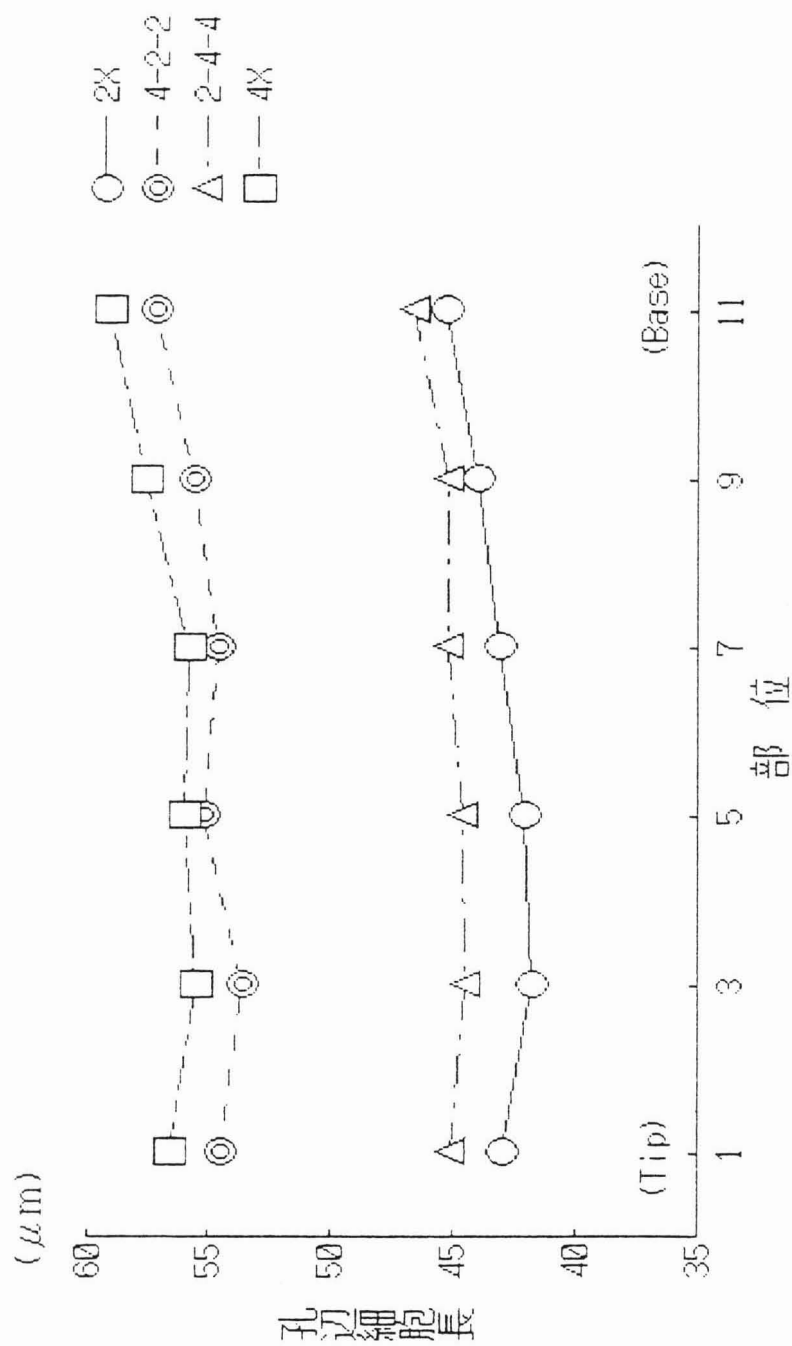
表皮細胞長は、いずれの系統も先端部で小さく、基部で大きかっ



第7図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における気孔長径

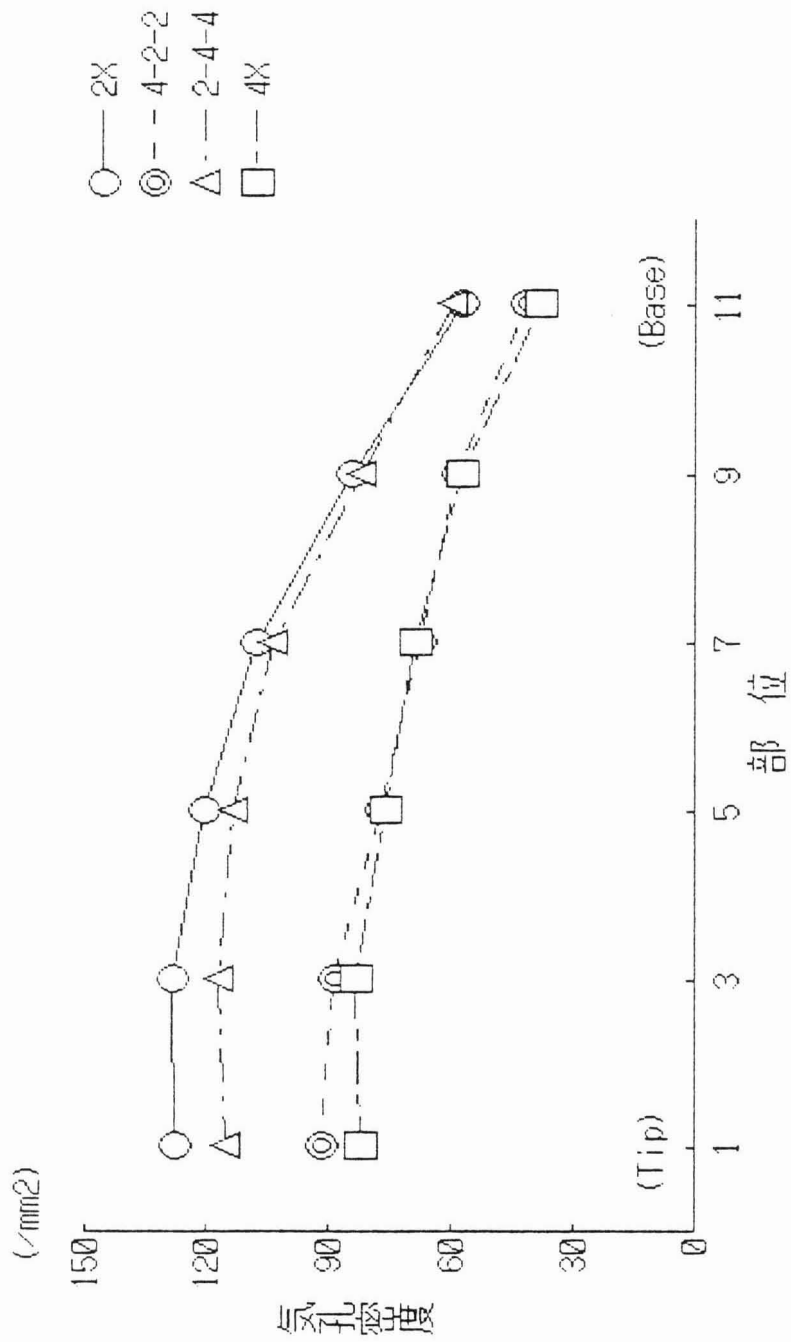


第8図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における気孔短径

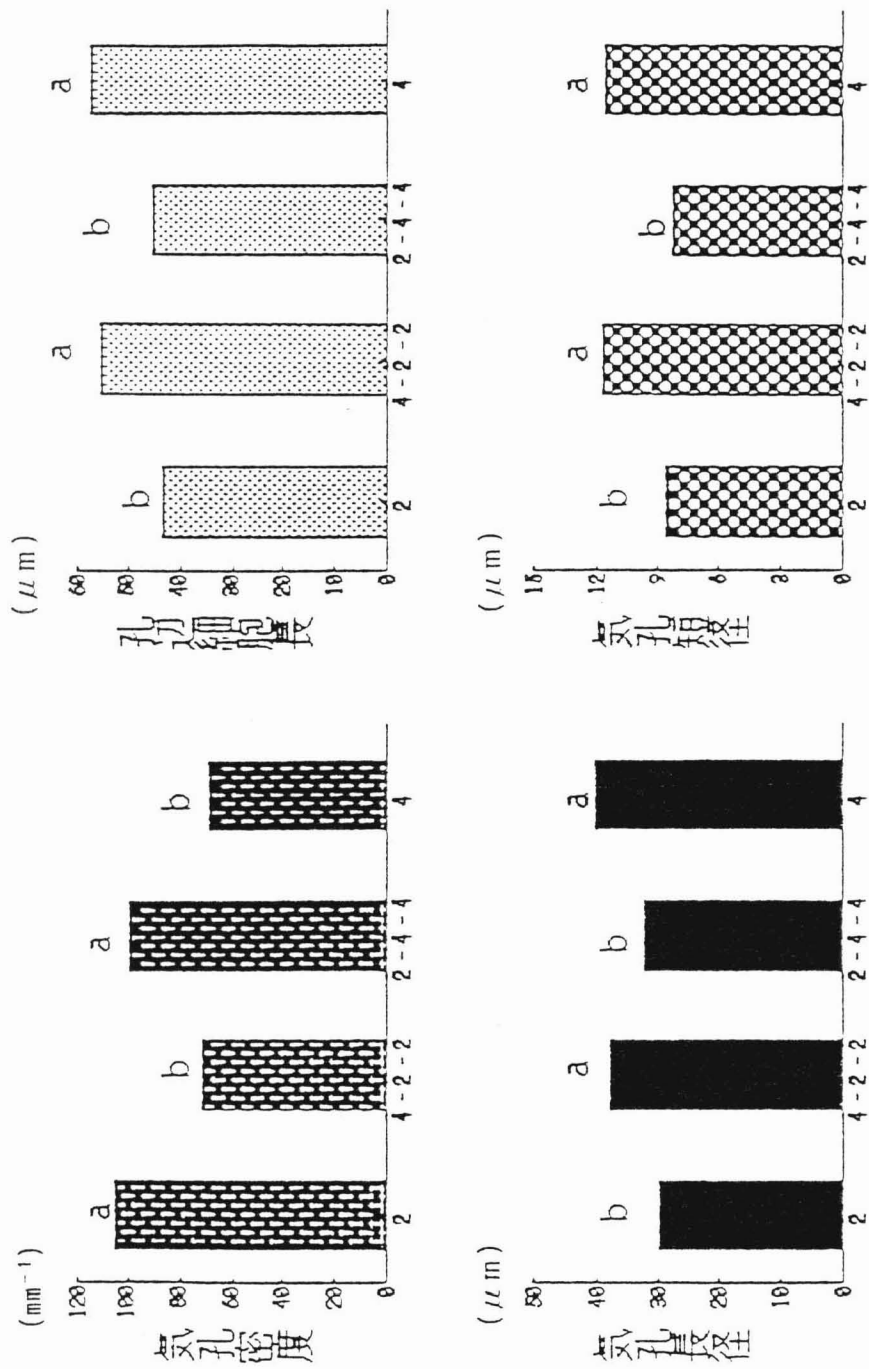


第9図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における孔辺細胞長



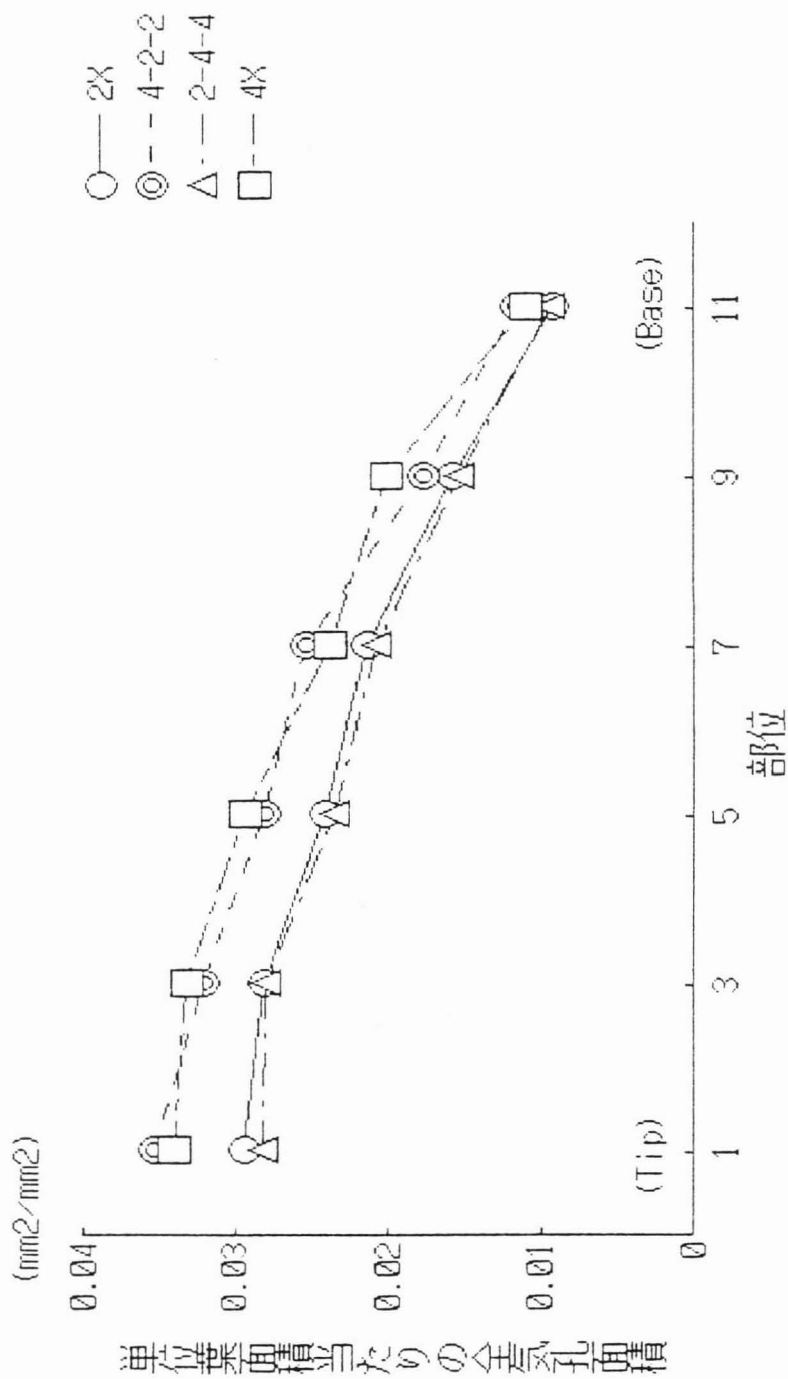


第10図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における気孔密度



第11図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体における気孔形質

(Duncan's multiple range test P<0.05)

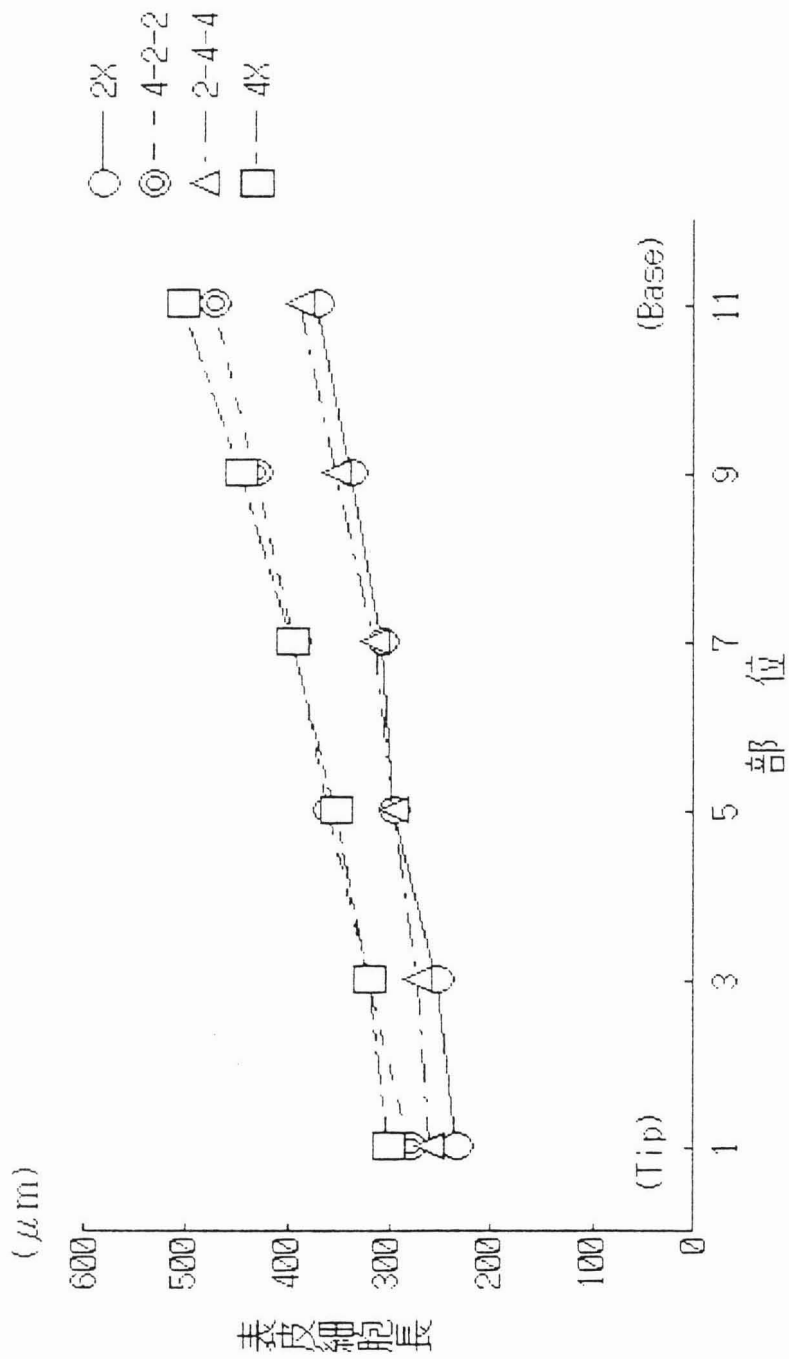


第12図 2倍体、4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における単位葉面積当たりの全気孔面積

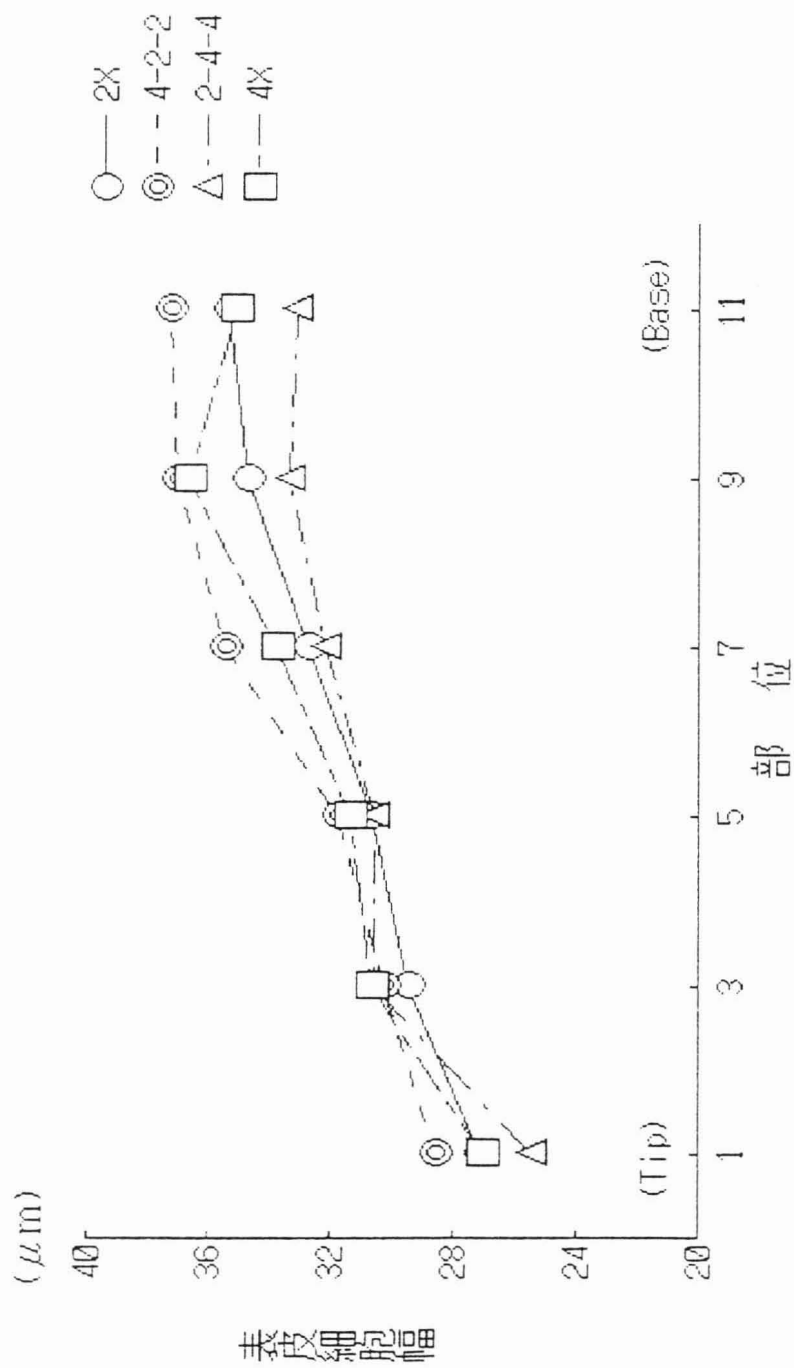
た（第13図）。また、表皮細胞幅は、細胞長と同様に、先端部で小さく、基部で大きかった（第14図）。しかし、系統間の表皮細胞幅には有意差はなかった（第16図）。表皮細胞密度は、いずれの系統においても、気孔密度と同様に、葉身先端部で高く、基部で低かった（第15図）。これらの結果は、葉身先端部では小さい細胞が高密度にあり、基部では大きな細胞が低密度に存在することを示している。表皮細胞長の系統間差異については、4倍体および4-2-2の細胞長が2倍体および2-4-4より大きかった（第16図）。また、細胞密度については、2倍体および2-4-4で細胞密度は高く、4倍体および4-2-2で低かった（第16図）。

葉身長および第1葉の葉面積は第17図に示した。4倍体および2-4-4の葉身は、2倍体および4-2-2より有意に長かった。葉面積も2-4-4および4倍体で大きく、2倍体および4-2-2で小さかった。したがって、1葉身の葉面積は表皮の倍数性にかかわらず、内層の倍数性に関係していることがわかる。

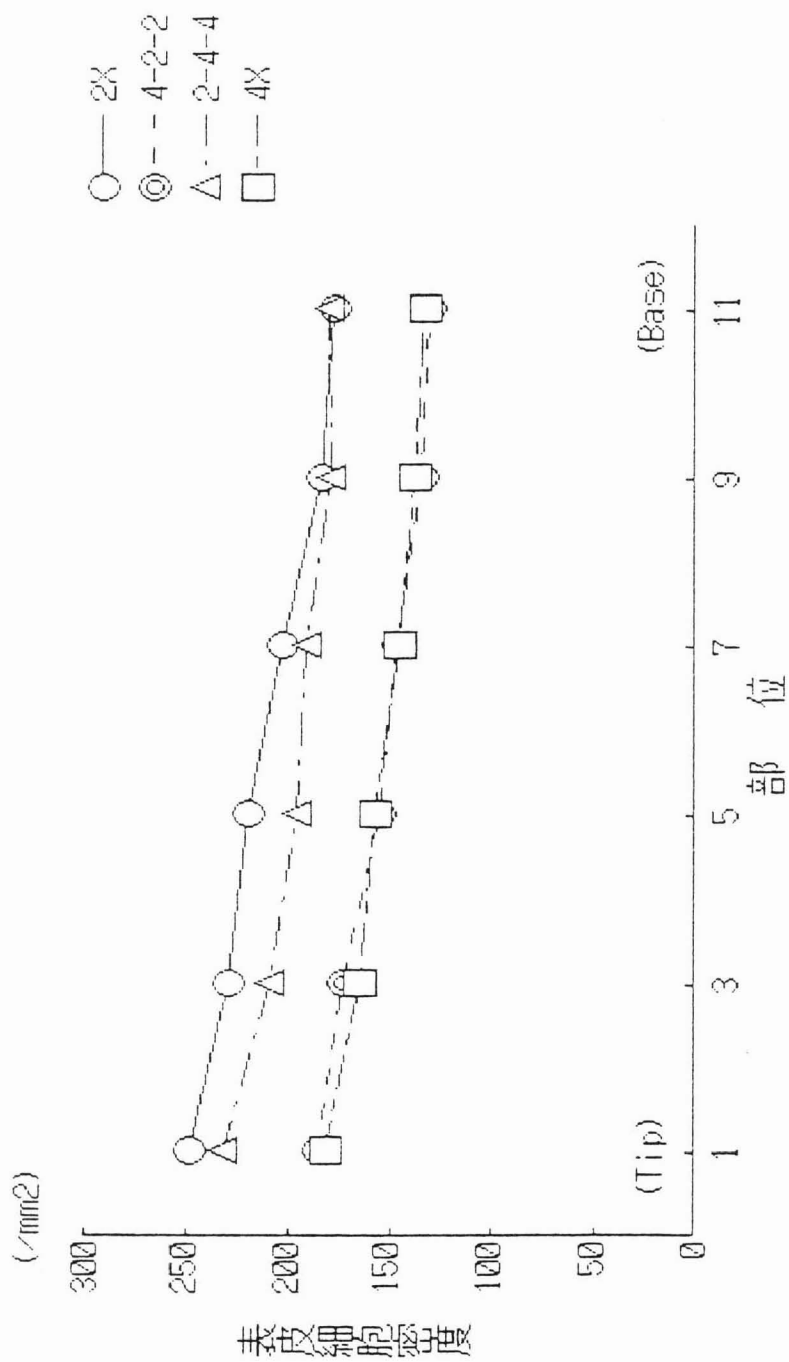
葉身当りの全気孔数（単位葉面積当たりの平均気孔密度×全葉面積）および葉身当りの全細胞数（単位葉面積当たりの平均細胞密度×全葉面積）は第18図に示した。葉身当りの全気孔数は、大きい葉面積と高い気孔密度を有する2-4-4で最も多く、葉面積も小さく気孔密度も低い4-2-2で少なかった。しかし、2倍体は葉面積は小さいが、高い気孔密度を有するため、1葉身当りの全気孔数は4倍体に勝った。さらに、1葉身の全表皮細胞数も、2-4-4で最も多く、4-2-2で最も低かった。また、葉面積は大きいですが、気孔密度が低い4倍体における表皮細胞数は、葉面積が小さくて気孔密度の高い2倍体と差異が認められなかった。



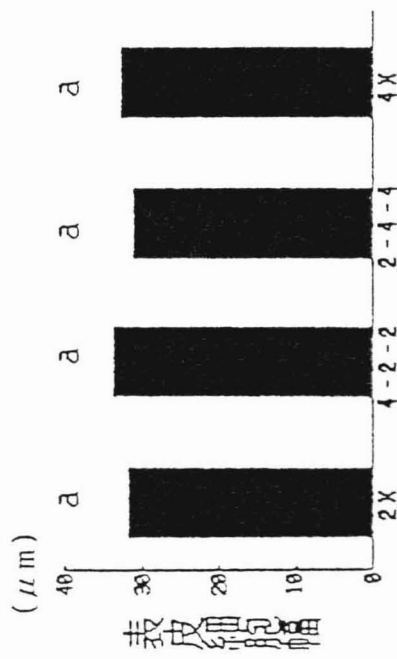
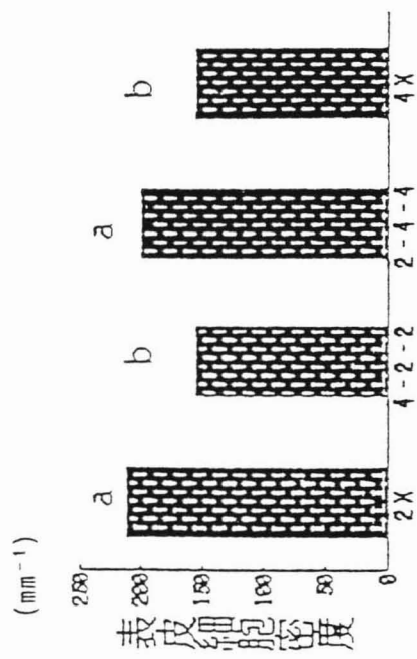
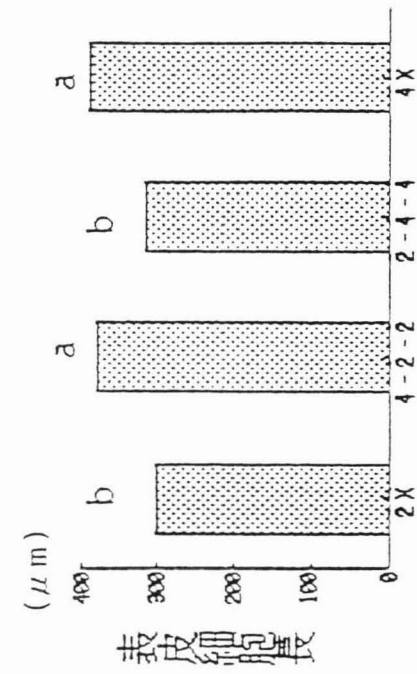
第13図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における表皮細胞長



第14図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における表皮細胞幅



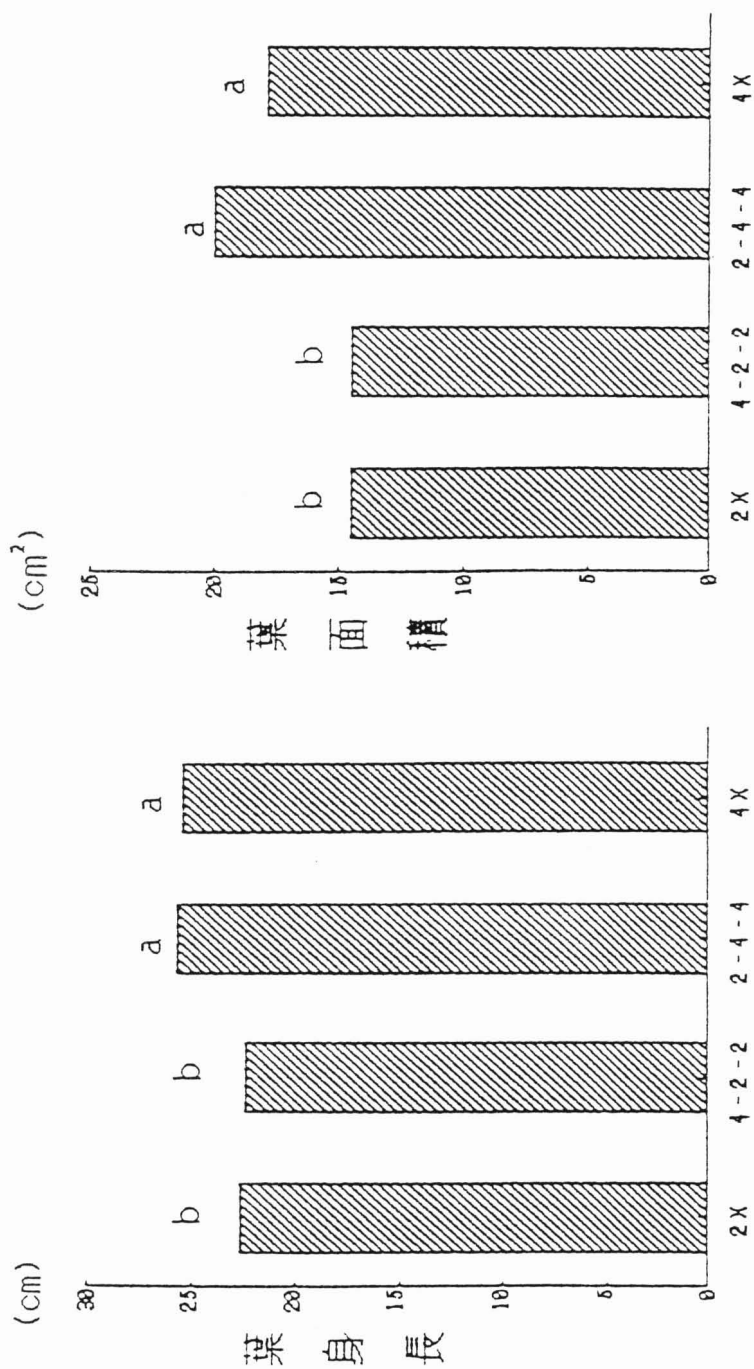
第15図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の第1葉身の各部位における表皮細胞密度



第16図 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の表皮細胞密度および表皮細胞サイズ

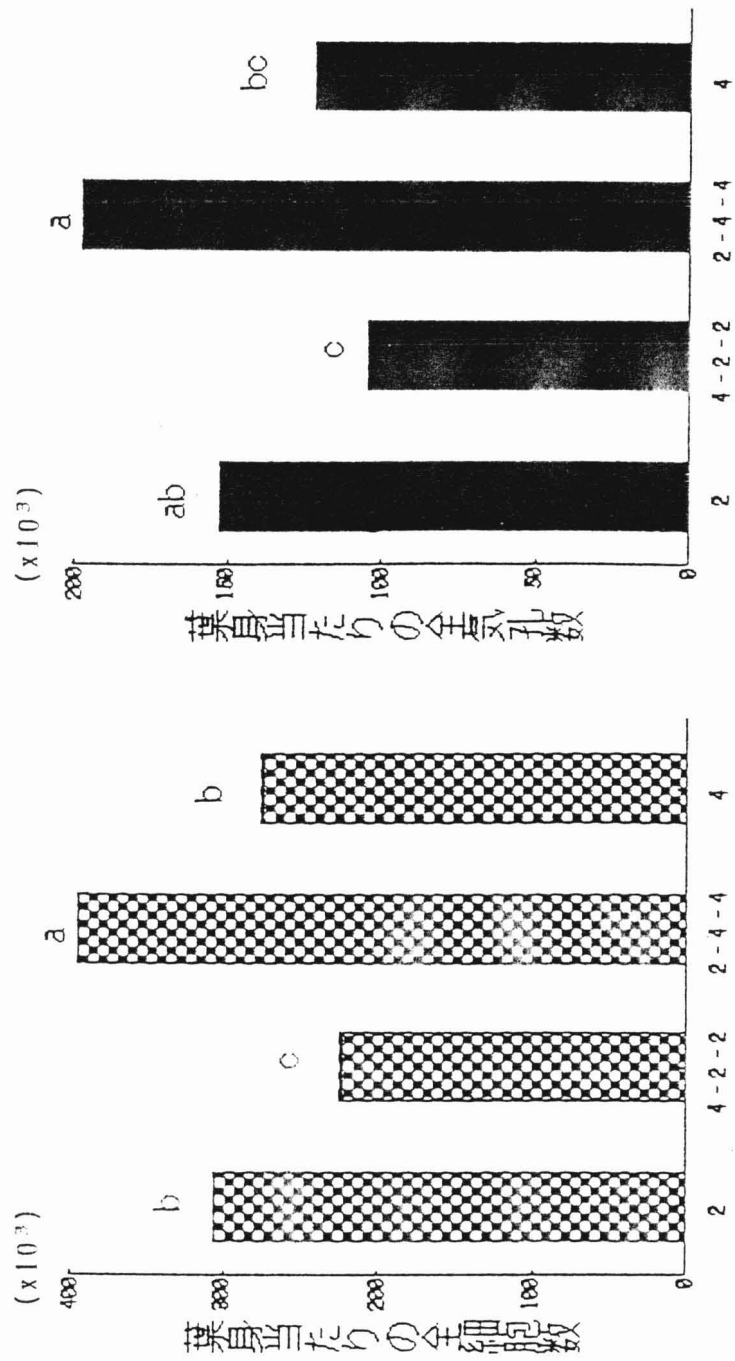
(Duncan's multiple range test  $P < 0.05$ )





第17図 2倍体、4倍体および細胞キメラ体における第1展開葉身の長さおよび葉面積

(Duncan's multiple range test  $P < 0.05$ )



第18図 2倍体、4倍体および細胞キメラ体の第1葉当たりの全細胞数および全気孔数

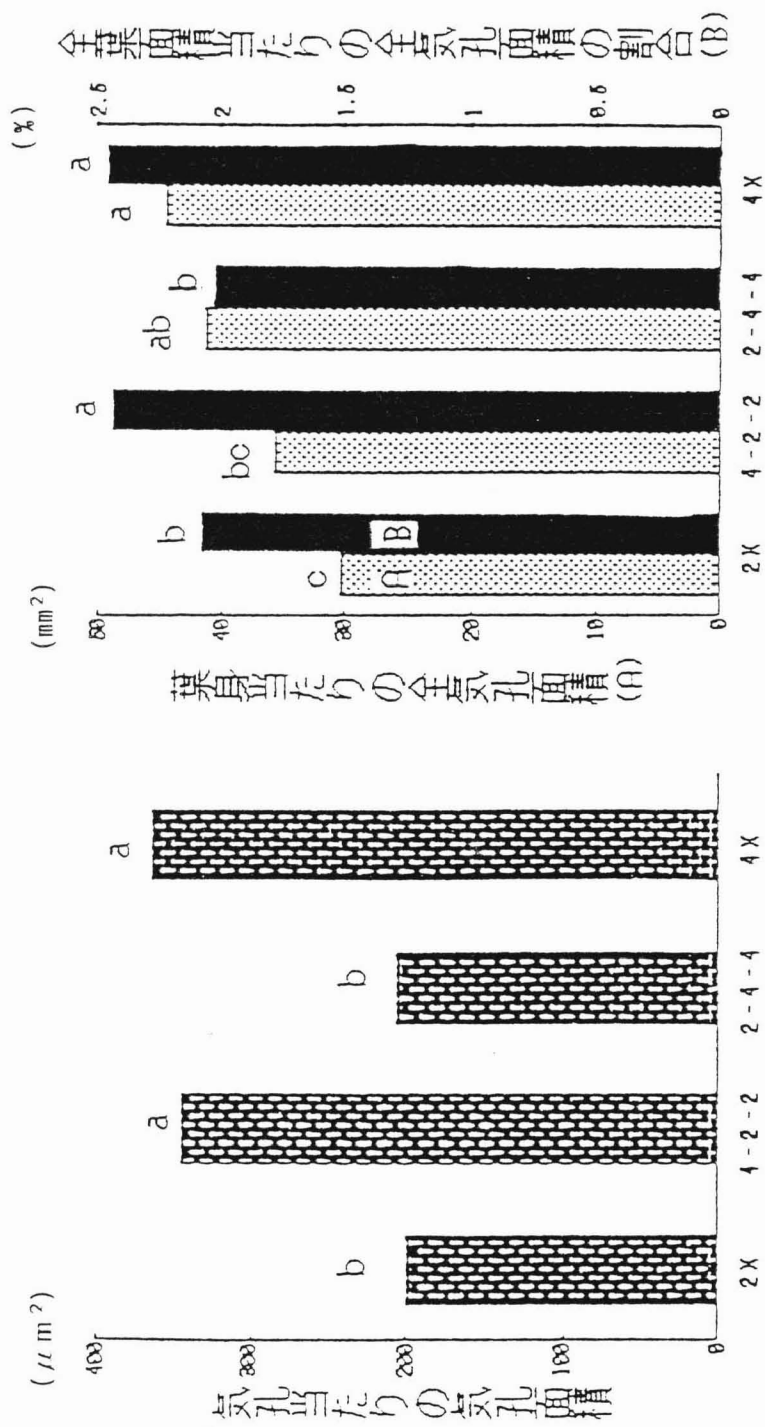
(Duncan's multiple range test  $P < 0.05$ )

気孔当たりの気孔面積、葉身当りの全気孔面積（単位葉面積当たりの平均気孔面積×全葉面積）および葉面積当たりの全気孔面積の割合を第19図に示した。気孔当たりの気孔面積は、2倍体および2-4-4よりも4-2-2および4倍体で有意に大きかった。葉身当りの全気孔面積は、4倍体で最も大きく、2倍体で最も小さかったが、2倍体と4-2-2、4-2-2と2-4-4および2-4-4と4倍体の間では有意差はなかった。しかし、葉面積当たりの全気孔面積の割合は、2倍体と2-4-4および4-2-2と4倍体の間で有意差はなく、4倍性表皮を有する4-2-2および4倍体が大きかった。

各系統の第1葉身における気孔形質の変異係数（CV）を第6表に示した。気孔密度の変異係数は、いずれの系統でも気孔サイズおよび孔辺細胞長の変異係数より著しく高い値を示した。また、4-2-2および2-4-4をそれぞれ2倍体および4倍体の変異体と見なし、2倍体に4-2-2を含め、4倍体に2-4-4を含めると、それぞれの変異係数は、当然のごとく2倍体および4倍体の変異係数より大きくなった。

#### 第4節 考察

葉位レベルおよび1葉内の部位レベルにおける気孔サイズまたは孔辺細胞サイズおよび気孔密度に関する変異性については、Ticha（1982）の総説で詳細に述べられている。通常、気孔密度は葉の先端で大きく、基部に向かって低くなる（Ticha, 1982）。しかし、基部で高い気孔密度を示し、先端部に向かって低くなる植物種もある（Tan・Dunn, 1975; Liangら, 1975）。通常、葉内の気孔サイズ



第19図 2倍体，4倍体および細胞キメラの気孔当たりの気孔面積，葉身  
 当たりの全気孔面積および全葉面積および全葉面積当たりの全気孔面積の割合

(Duncan's multiple range test  $P < 0.05$ )

第6表 2倍体, 4倍体および細胞キメラ体の  
第1葉身における気孔形質の変異係数(%)

倍数性	気孔 密度	気孔サイズ		孔辺細 胞長
		長径	短径	
2X	24.6	4.6	6.8	2.7
4-2-2	24.3	6.4	6.0	2.0
2-4-4	21.0	6.4	8.5	1.6
4X	23.2	6.8	5.6	2.2
-----				
2X+4-2-2	31.4	13.4	16.6	12.3
2-4-4+4X	28.8	13.1	18.2	11.9

または孔辺細胞サイズの勾配は、気孔密度の勾配と逆の関係にある (Jones, 1987)。また、気孔密度は、気孔サイズに比較すると、葉齢はもとより葉内部位においても大きく変異する。さらに、気孔密度や気孔サイズは、環境要因や内的要因によっても変異することが知られている (Ticha, 1982)。

ワケギでは、葉の先端部に小型の表皮細胞が高密度で分布し、基部に向かうにつれて表皮細胞は大きくなり、密度は低下した。また、孔辺細胞の密度も先端部で高く、基部で低かった。しかしながら、孔辺細胞の大きさは、葉の全面でほぼ均一な大きさであるにもかかわらず、先端部付近の孔辺細胞の気孔は、基部より有意に大きかった。したがって、先端部付近の単位葉面積当りの全気孔面積は、先端部付近で著しく高くなり、基部で小さくなった。このようにワケギの2倍体における特異的な気孔分布は、4倍体、4-2-2および2-4-4でも同様に観察された。

ワケギの特異的な気孔分布は、ワケギの葉枯れ現象（葉の先端部の枯れ上り）と関係している可能性がある。すなわち、葉の先端部における単位葉面積当たりの全気孔面積の拡大は、葉先端部における蒸散速度の上昇と局所的な水分ストレスの増大を招き、最終的には葉の先端部で、早期に永久萎凋に達するものと推察される。葉枯れは、夏季のネギやワケギの葉ネギ栽培において、多灌水で軟弱生長となったり、根系の貧弱な植物に多く発生し、著しく品質を低下させるため、その対策は急務となっている。しかし、いまだその原因は解明されていない (増井, 1981)。葉枯れ現象をワケギの気孔の特異的な分布と関連させて検討することは必要であろう。

通常、気孔形質の改良による光合成能力の向上を目的とした育種

的研究では、気孔サイズより気孔密度を育種目標としたほうが有利であるとされている (Jones, 1987)。すなわち、種内の気孔密度の変異幅は気孔サイズの変異幅より大きいので、個葉の光合成能力に関する変異幅を拡大するためには、気孔密度を育種目標とするほうが有利となるのであろう。実際、ワケギの2倍体、4倍体および細胞キメラ体における気孔密度の変異係数は、気孔サイズの変異係数より著しく高かった。また、ワケギの種内における気孔密度の変異係数は気孔サイズの変異係数より高いことも報告されている (安谷屋, 未発表)。

しかしながら、個葉の光合成能力に直接関与する気孔形質は、気孔サイズや気孔密度ではなく、単位葉面積当たりの気孔面積である。種内レベルでは、気孔密度の変異を利用するほうが単位葉面積当たりの気孔面積の拡大には有利となるのであろう。しかし、倍数体レベルでは、単位葉面積当たりの気孔面積は、小さな気孔を高密度で有する系統 (2倍体と2-4-4) より大きな気孔を低密度で有する系統 (4倍体と4-2-2) で大きかった。すなわち、単位当たりの全気孔面積の増加には、倍数化による気孔密度の低下を上回る気孔サイズの拡大が関与しているものと考えられる。単位葉面積当たりの気孔面積が大きい4倍体および4-2-2では、気孔伝導度が大きくなり、ある一定の条件下では光合成速度が2倍体および2-4-4より高くなることと考えられる。しかし、高温条件下では、水分蒸散が盛んになるので、水分ストレスを受け易くなることも推察される。

表皮のみの倍数性が異なる細胞キメラ体は、植物の適応に関する気孔の生理的役割を明らかにするうえで有効な研究材料であろうと考えられる。植物種は、すでに進化の過程でそれぞれの生育環境に

適応できる気孔形態を獲得しているものと思われる。したがって、種内の気孔形質の変異幅は、ほかの形態形質の変異幅よりも小さいことが予想される。一方、4-2-2および2-4-4が、それぞれ2倍体および4倍体に対するisogenic lines（表皮のみの遺伝型が異なる）と見なせるならば、2倍体に4-2-2または4倍体に2-4-4を加えることによって、気孔形質の変異幅を著しく拡大できる。拡大された変異幅を有効に利用することによって、2倍体または倍数体レベルの育種が有利に展開できるものと思われる。