ハクサイの葉の初期生育と組織発生

大 竹 良 知

(愛知県農業総合試験場)

On the Juvenile Morphology and Histogenesis of Leaves
in Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L.)

Yoshisato OOTAKE

Aichi-ken Agricultural Research Centre, Nagakute, Aichi 480-11

Summary

The process of leaf development of chinese cabbage was observed morphologically and histogenetically to clarify the mechanism of head formation.

1) Seedlings of chinese cabbage (cultivar ; Nozaki-Kohai No.3) were used in this study and were grown in a phytotron at temperatures of 23°C during the day and 18°C during the night.

For histological observations slides were prepared from different parts of the leaves collected at different growth stages of the seedlings by paraffin microtechnique.

2) The leaf shape changed with node positions. The ratio of length to width of the leaf decreased and the number of vascular strands in the midrib increased as node position number increased, counting from the basal point.

3) The leaf consists of two distinct parts ; lamina and midrib. Midrib includes several parallel veins (with one or several vascular bundles) in the parenchyma massive on the adaxial side. Each vascular bundle is composed of cambium, xylem, phloem and some supporting tissues. Epidermis of midrib consists of one layer of cells.

4) Trichome, an outgrowth of an epidermal cell, is an unicellular hair situated over the veins. The initial cell of the trichome has dense cytoplasm, a larger nucleus and a larger nucleolus as compared with those of other epidermal cells.

5) The epidermis of lamina consists of one layer of cells. Palisade and spongy parenchymatous cells contain abundant chloroplasts.

Stomata are differentiated from an epidermal cell of lamina, and distributed at random. The type of stoma complex is anisocytic, having three subsidiary cells surrounding the stoma.

The lamina has fine-netted venation. Parenchymatous cells surrounding the thick vein run parallel with the axis. These parenchymatous cells appeared white in the absence of chlorophyll, similar to those in the midrib.

6) During the early stage of development the successive plastochrones in the shoot apex shortened from 1.3 to 0.5 days. In the leaf primordium, the procambium differentiates at the tip of the leaf buttress. With the development of the primordium, the procambium extends into the apical and marginal parts of the leaf before the initiation of vascular bundle differentiation.

The interfascicular cambium was observed up to the 11 th or the 13 th leaf primordium.

After the initiation of midrib-like tissue in the leaf primordium, the marginal meristem starts to differentiate leaf lamina, which continues to develop prominently until the attainment of full size.

7) The direction of leaf outgrowth changed with ages. At the lower nodes leaf primordia grew upright, whereas at the higher nodes they folded the shoot apex

inward, forming "small head."

8) A tiny projection composed of larger cells is present between two leaf primordia. It is about 0.5 mm long and 1 mm wide. Each cell has a large nucleus and nucleolus, having denser cytoplasm as compared with other meristematic cells.

緒言

ハクサイは冷涼な気候を好む野菜である。したがって夏季には高冷地で栽培されており、昼夜の温度較差が比較的大きい。平地における秋まきの普通栽培では生育初期に 30°C 前後、収穫期に 10°C 以下の温度に遭遇する。これに対し春まき栽培では、生育期間中逆の変化をたどる温度条件下で経過する。このように发育過程と対応する温度条件が異なるとき、野菜の生育反応も作型によって変るはずである。

従来、高冷地野菜の生態についての調査的報告(4, 5)がなされてきたが、環境制御条件下で行った研究は少ない。そこで、ハクサイについて制御温度条件下における葉の形態形成の過程を明らかにし、結球現象の基礎資料を得ようとした。アブラナ属の A ゲノム植物の葉の形態形成に関する知見は筆者の知る限り少ない。伊東(3)らがハクサイの幼葉から成葉への葉形変化、戸辺ら(12)がナタネ (*Brassica napus* L.) の葉の形態について観察しており、また王(13)及び岩崎ら(6, 7, 8)は茎頂の体制について花成との関連で研究している。しかし、茎頂からの葉の発生過程を追ったものは筆者の調べた範囲では見当らなかった。

本報告は制御環境下におけるハクサイの葉の形態形成、特に生長初期における形態変化並びに組織形成の過程を明らかにしたものである。

なお、この研究は名古屋大学農学部で行われた。

材料及び方法

実験材料として、結球ハクサイ(野崎交配 3 号、野崎採種場)を用いた。

栽培は主として 30 cm × 30 cm × 25 cm の木箱で行った。底に鹿沼土を 3~4 cm 敷き、その上に用土として畑土とピートモスとの配合土(容積比 3 : 1)を深さが約 20 cm になるように詰めた。1972 年 7 月 19 日にファイトロン内で、これに種子を直はし、発芽後は間引をかねて大きさをそろえていった。

ファイトロンの温度は昼 23°C、夜 18°C、相対湿度は約 70% で、光条件は通常のガラス室とほぼ同様の自然光であった。

木箱のほかに、対照観察のためは場にも小面積の栽培を行い、また外観を継続して観察するため鉢植の材料も用意した。

は種後 1 週間ごとに試料を採取し、外部形態を継続観察するとともに、葉数、葉形を計測し、その後葉及び茎頂付近をそれぞれ FAA 液(70% エタノール・氷酢酸・ホルマリン, 90 : 5 : 5, v/v)で固定した。

FAA で固定した葉はかなり透明であったので、70% エタノールに移した後、そのまま透過光で葉身部の表皮細胞及び内部の柔組織を検鏡するとともに、中肋の葉脈(Midrib vein)を数えた。

組織は FAA で固定した後、常法のパラフィン法により縦断・横断切片を作成した。切片の厚さは部位によって変え、茎頂では 8~10 μ, 中肋・葉身では 15~20 μ とした。染色剤はデラフィールドのヘマトキシリンを使用した。

また、なまの材料の表面観察には落射顕微鏡を用いた。

結果及び考察

1. 外部形態

ハクサイは発芽後 40 日ごろまでは、葉を周囲に広げたロゼット型の生活形を示した。発芽後 4 週間目ごろになると上位の葉が立ち上がってきて、十数葉目の葉がコップ形に次の葉を包んで、上部が互に重なり合う形になった。茎頂部の縦断切片を見ても、葉原基が何層にも重なり、いわば小さな結球を形作っている状態が観察された(第 1 図)。この現象はレタス・キャベツでも知られている(1, 10)。

これらの重なり合った葉が、そのまま結球葉を構成するのではなく、なお数枚の葉は外側に展開した。

Fig. 1. Median longitudinal section of apical part in shoot. Leaf primordia overlap each other tightly, making a "small head". 4 weeks after sowing, ×53.

生育初期における葉数の増加の割合は、生育するにつれて大きくなっていった。1週間の平均出葉間隔は、は種後第2週では約1.3日であったが、第4週には0.5日に縮まった(第2図)。

葉形は葉位によって変化した。第1葉は小型で中肋(葉柄)が細長く伸び、葉身はまだ中肋(葉柄)の基部まで発達していなかった。第2葉以後葉位が上がるにしたがって葉身が大きくなり、葉幅も広がっていき、葉長と葉幅の比は減少していった(第3図)。また葉身は中肋の基部まで発達し、中肋の幅も広がった(第4図)。

Fig. 2. Increases in total leaf number and plastochronic changes in successive weeks.

Fig. 3. The sequential changes in leaf growth and shape from the first 8 leaves. Leaf shape : length/ width.

Fig. 4. Changes in leaf shape with successive leaves. Lamina enlarges and midrib widens with successive leaves.

Fig. 5. Relationship between midrib growth and number of its vascular strands with successive leaves.

位の葉は全体に切れ込みが生じて表裏への凸凹も著しくなり、特に基部ではその程度が大きかった(第4図)。中肋の幅が広くなるにつれて、その中の葉脈の数も増加した(第5図)。

2. 組織の解剖的観察

a. 中肋：中肋は外観上葉身と異なって白くなっており、葉脈だけが緑色に見える。表皮・柔組織ともに細胞は一定の方向(葉の縦方向)に整列している。

表皮は一層であり、柔組織細胞に比べて小さくて細胞壁が厚く(第6図)、両端が細くなった長紡錘形であった(第7図)。

第5葉を観察すると、表皮は向軸側(上表皮)と背軸側(下表皮)で細胞の大きさに差が生じてきて、最終的には向軸側の細胞の方が大きかった(第6図)。

柔組織細胞は発達すると大きなもので長さ1mm近く、径は約0.5mmになった。表皮細胞は紡錘形であったが、柔組織では円筒形の細胞が長く連なる配列とな

Fig. 7. Surface view of epidermis in midrib. Cells are long spindle shape.

った。細胞間げきはよく発達し、細胞壁は薄い。

柔組織は、葉脈の分布する線を境とした時、向軸側の方が厚くなった(第6図)。

中肋の葉脈は通常1維管束ないし数本の複合維管束からなっていた。個々の維管束は形成層をはさんで向軸側に木部、背軸側に師部、その両側の繊維細胞—木部・師部繊維—から成る。時には大きな維管束に向い合った形で、ごく細い維管束が観察された。この時には木部は背軸側に師部は向軸側にあった(第6, 8図)。

数本の維管束から成る中肋の葉脈も、前形成層から分化し始めた時点では分離しておらず、発育の過程で分離して、扇形に分布していった。ときには扇のかなめが外れたような形も見られた(第6図)。

毛茸：展開中の若い葉には毛茸が密生していたが、葉が生長するにつれて、それらの間隔は広がっていった。

毛茸はほとんど中肋や葉脈の上に分布していた。

ハクサイの葉の毛茸は単細胞の毛であり、その表面には小さな突起が多数観察された。

毛茸の原基は顕微鏡下で容易にそのドーム状の形から

Fig. 6. Cross section of midrib. Epidermal cells are larger on the adaxial side than on the abaxial side, $\times 11.5$.

Fig. 8. (a) Cross section of midrib vein. Midrib vein was seen as a group of vascular bundles, $\times 53$. (b) Magnified vascular bundle, $\times 133$. c : cambium, x : xylem, f, x : xylem fibres, p : phloem, f, p : phloem fibres.

Fig. 9. Unicellular trichome with tiny projection (a) and its initial cell (b). Trichome initial cell with denser cytoplasmic stain, a large nucleus and nucleolus distinct from the other epidermal cells.

区別できた。原基細胞は細胞壁が厚く、核・仁が大きくしかも細胞質が他の表皮細胞より濃く染まった(第9図)。

b. 葉身：葉身を構成する組織は一樣ではなく、大小の葉脈が網目状に走り、葉脈の太い部分では細胞は葉脈に沿って軸性を持ち、葉緑体も欠除して白くなり、中肋の柔細胞と同様であった。

葉身の表皮は向軸側(上表皮)、背軸側(下表皮)とも

一層であったが、細胞の形・大きさは上表皮と下表皮で若干異っていた。全般的に下表皮の方が小さく、輪郭も入り組んだ形であった(第10図)。

表皮には気孔が分化し、下表皮の方が上表皮よりもその数は多い。気孔の周囲の細胞は3個であり、その1つは小さくて、ペチュニアやタバコに似ている(第11図)。

その発生は第11図に示すように、表皮の小さい細胞よ

Fig. 10. Paradermal sections of the lamina showing epidermal cells and stomata. Section stripped from abaxial side shows smaller epidermal cells and more frequent stomata than that from adaxial side. Stomata complex is anisocytic type having three subsidiary cells.

Fig. 11. Differentiation of stomata. Successive stages of development were seen. a: formation of a small cell, b: formation of stoma mother cell, c: established stoma.

り形成され、気孔の配列、周辺細胞の数などの型の分類によれば、Anisocytic 型に属する(2)。断面を見ると、気孔の内側には葉肉中に大きな空げき(呼吸室)がある。表皮の内層には葉肉組織があり、向軸側はさく状組

織、背軸側は海綿状組織に分化している。さく状組織の細胞は円柱状で、上表面から見ると断面の丸い、周囲に密に葉緑体の分布した細胞が観察された(第12図)。

海綿状組織には大きな間げきができており、各細胞には葉緑体が多数存在していた。

3. 葉の組織発生

茎頂において葉の発生する部分は、被染度が濃くなっていた。隆起のできる所には表層から数層目の層列に並層分裂が観察され、それが内から外へ押し上げているように見えた(第13図)。第1層の細胞には液胞ができて、細胞は伸展し始めていた。伸展は主に背軸側で起こり、向軸側では伸展は見られなかった。葉原基はその発生初期において既に背腹相称ではないようである。

発生した葉原基の内部には、間もなく長軸に伸びた前形成層の分化が観察された。これらの細胞は、他の伸長し始めた細胞より細く、細胞質の染まり方が濃いので区

Fig. 12. Paradermal section of palisade cells. Chloroplasts distribute thickly near the cell surface.

Fig. 13. Initiation of leaf primordium in shoot apex. Periclinal divisions are seen in the inner layers of peripheral zone. Vacuolated cells are seen in the surface layers on the abaxial side. Cells made from periclinal divisions may constitute an initial of procambium and push up the leaf buttress.

Fig. 14. Longitudinal sections of primordial leaf at three stages of development. (a) Protuberance from leaf buttress showing periclinal divisions and densely stained cells adjacent to them, and vacuolated cells in surface layer. (b) Leaf primordium growing upward from the buttress, showing procambium and its initial. Vacuolated cells are frequent on the abaxial side. (c) Further outgrowth of leaf primordium. Procambium cells shorten acropetally.

別される。この部分はアスコルビン酸、リボ核酸、インドール化合物の呈色の著しい所であると言われる。

葉原基は周縁に残された分裂組織と前形成層での細胞分裂と、それによってできた細胞自身の伸長・肥大によって容積生長をする。観察した限りでは、並層分裂を開始した細胞群がそのまま葉原基を持ち上げ、また次々と

細胞を増生する事で前形成層を形成しているように見えた。

葉原基の縦断切片の観察では、先端の分裂部のすぐ下まで前形成層が伸びていっており、その個々の細胞を見ると基部の細胞ほど長くなっていて、前形成層の始原が葉原基の先端にあることを示すと考えられる(第14図)。

縦断切片の観察からは、分裂組織は先端だけでなく、周縁全体にあることが分かる。中肋的な細胞を分化してきた分裂組織はやがて葉身を分化するようになり、以後中肋は前形成層の分裂によって縦断面の細胞数を増していく。縦方向での中肋の分裂組織がどの位の期間活性を保っているかは、今回の観察では明らかにできなかった。

葉原基において将来中肋になる部分に形成された前形成層は、葉原基が発育するにしたがって分散し、維管束に分化していく。この過程は、葉原基の中央で早く進行し、両側へいく程遅れて進行する。葉原基の基部の観察では、中央部で維管束の分化が進行しているころでも、周縁分裂組織から前形成層が分化するのが見られた。前形成層が分離した後も、それらの間には脈間形成層が残って細胞分裂を続け、柔組織細胞を形成していくが、これは葉原基 11~13 番になるころには消えていった(第15図)。脈間形成層が活動しなくなった後も、残された前形成層はなお柔組織細胞を同心円状に形成し続ける。

以上に述べた葉の発生過程をまとめてみると、(1) leaf buttress の形成、(2) 中肋的な軸部分の形成、(3) 葉身の形成の段階に分けられる。まず中肋の肥大伸長が先行し、周縁に葉身が分化してからは、葉身の生長の方が大きくなり、最後に中肋が葉全体を引き伸す形で伸長する。この過程を模式的に示すと第16図のようになる。

4. 巨大細胞群からなる突起について

今までの写真にもしばしば見られるように、ヘマトキシリンに極めて濃く染まり、大きな核と仁を持って、液胞のほとんど無い巨大な細胞からなる組織(?)が観察された。茎頂部の横断面を見ると、各葉原基の間にはさまって、大体3層程度の細胞層から成る薄い膜のような形に細胞が集っている。この小突起は発芽直後でも存在し、葉原基の縁の基部から分化してくる(第17, 18図)。結球した状態でも、その高さはせいぜい0.5 mm にしかならず、先端の細胞では仁が小さくなっており、基部から先端へいくほど細胞の齢は進んでいた。さらに進行すると、固定の際原形質分離を起こすようになり、染色も薄くなって、最終的には核もい縮していく(第18図)。

肉眼や解剖顕微鏡下での観察では、この組織は葉位の低い所では見落されることもあるが、必ず存在し、茎頂

Fig. 15. Interfacicular cambium. It may be an interim product of procambium during differentiation to parenchyma. p : procambium, ic : interfacicular cambium.

Fig. 16. Diagrams showing the development from primordium to mature leaf. a-b : expansion of primordium, c-d : lamina begins to develop, e-f : developing and mature leaf with petiole.

Fig. 17. Cross section of leaf primordia 1 week after sowing, showing tiny projections. c : cotyledon, 1 : 1st leaf, 2 : 2nd leaf, p : tiny projection.

近くでは葉数として数えるかどうか困ることがある。

巨大細胞群については、その実体分らず、従来の形態に関する文献、*Brassica* 属を扱った文献には参考になる記述はない。岩崎 (9)、高野 (11) はその存在を確認しているが、これに関する発表はなされていない。

摘 要

ハクサイの葉の形態とその初期発育について外部形態的、組織的に観察した。

1) 葉の形は葉位とともに変化し、生育初期には葉位

があがるにしたがって、細長い形から幅の広い形へと変化していく。葉面積は増加し、中肋の幅は広がって、中肋内部の葉脈の数も増加していった。

2) ハクサイの葉では葉身と中肋(葉柄)が外観上ははっきりと区別できる。中肋には5本～十数本の葉脈がほぼ平行に走り、各葉脈の周囲には柔組織が著しく発達しているが、普通向軸側の方がよく発達していた。葉脈は太いものでは数本の維管束から構成され、各維管束は形成層と、その両側にある木部、師部、繊維細胞からなっていた。

3) 毛茸は主に葉脈部に沿って発生し、単細胞である。その発生は他の表皮細胞と著しく異なる被染度と、大きな核・仁が認められることによって区別された。

4) 葉身の表皮は一層で、さく状組織、海綿状組織には多数の葉緑体がある。表皮からは気孔が分化するが、その配列は一定していない。

5) 葉身には網目状に葉脈が走り、葉脈の周囲の細胞は葉脈に沿って軸性を持ち、太い葉脈の周囲の柔細胞は中肋と同様葉緑素が欠落して白く見える。

6) 生育初期には、出葉間隔は生長するにしたがって短くなった。

葉原基の中には、発生と同時に前形成層が観察され、以後葉原基はその先端・周縁で前形成層を分化しながら発育していく。前形成層は発達して維管束に分化していくが、その過程で脈間形成層が観察される時期があった。

7) 葉は発生後、最初中肋的な組織が形成され、その後周辺に形成された葉身の広がり優占し、最後に中肋が全体を引き伸ばすように伸長する。

8) 葉原基の発生する方向は生育段階によって変わり、初期にはほぼ垂直に発育するが、その後葉原基は茎頂の上にかぶさって発育するようになり、互に重なって小さな結球を形成した。

Fig. 18. (a) Tiny projection showing large cells in longitudinal section. (b) Apical part of projection. Nucleoli are not evident. (c) Basal part. Nuclei and nucleoli enlarge prominently. Cells in the middle part of projection have enlarged nuclei and nucleoli. lp: leaf primordium.

9) 今までに記載のない、大きな核と仁を持ち、濃く染まる巨大な細胞の集まりが観察された。

Fig. 19. Diagrams showing successive stages of leaf primordium growth and extension of a tiny projection composed of large cells stained densely. Arrows show the direction of extension of the tiny projection.

謝 辞 本研究を遂行する上で終始指導して頂いた名古屋大学農学部清水正治教授に深く感謝の意を表します。

また原稿の御校閲を賜った名城大学農学部高野泰吉教授に心から御礼を申し上げます。

引用文献

1. BENSINK, J. 1971. On morphogenesis of lettuce leaves in relation to light and temperature. Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen. 71—15.
2. ESAU, K. 1965. Plant anatomy. pp. 158—167. John Wiley & Sons, Inc.
3. 伊東秀夫・加藤徹. 1957. 白菜の結球現象に関する研究. 結球の組織学的並びに生理学的研究. 園学雑. 26: 154—162.
4. 岩間誠造・浜島直己・芹沢暢明. 1953. 標高と蔬菜類の生態 (第1報). 春播甘藍の高温期における生態. 同誌. 21: 241—250.
5. 岩間誠造・浜島直己. 1953. ———— (第2報). 暖地育成甘藍苗の高冷地における生態. 同誌. 22: 9—14.
6. 岩崎文雄・細田友雄. 1966. 菜類の抽苔に関する研究 (第I報) 単一ゲノム品種の生長点の構造の変化と抽苔との関連について. 育雑. 16: 39—44.
7. ————. 1967. ———— (第II報) 複合ゲノム品種の生長点の形態的变化

- と抽苔との関連について. 同誌. 17: 297—301.
8. ————. 1969. ————. (第Ⅲ報) 生育に伴う生長点部位の組織化学的变化について. 同誌. 19: 39—46.
9. 岩崎文雄. 1973. 岩崎よりの私信, 東京教育大学, 東京.
10. NORTH, C. 1957. Studies in morphogenesis of *Brassica oleracea* L. I. Growth and development of cabbage during the vegetative phase. J. Exp. Bot. 8: 304—312.
11. 高野泰吉. 1973. 高野よりの私信. 名城大学. 名古屋.
12. 戸刈義次・菅野考己. 1952. 菜種組織の発達過程. 農技研報D 2号: 1—39.
13. WAN, Po-Jen. 1969. Changes in the anatomical structure of the shoot apex of To-pe-tsai (*Brassica chinensis* L.) during transition from the vegetative to the reproductive state and the determination of the bolting. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 38: 52—59.