

イネ科 C₄ 植物における葉構造と光合成的特徴との関係

—— Panicum 属 Dichotomiflora グループを中心として ——

大杉 立

(農林水産省草地試験場)

目次

緒言	1	
略号一覧	8	
I. イネ科C ₄ 植物における脱炭酸酵素型と葉構造及び暗期移行直後の		
CO ₂ 放出現象(P I B)との関係の再検討	9	
I-1. 脱炭酸酵素型と葉構造との関係	9	
(1) 材料及び方法	10	
(2) 結果及び考察	10	
I-2. 脱炭酸酵素型とP I Bとの関係	20	
(1) 材料及び方法	21	
(2) 結果及び考察	22	
I-3. 考察	25	
II. <u>Panicum</u> 属 <u>Dichotomiflora</u> グループ内草種の光合成的炭素代謝		29
II-1. <u>P. dichotomiflorum</u> の葉身の脱炭酸酵素型の同定	29	
(1) 材料及び方法	30	
(2) 結果及び考察	30	
II-2. <u>P. dichotomiflorum</u> 以外の <u>Dichotomiflora</u> グループ内草種の		
脱炭酸酵素型の同定	32	
(1) 材料及び方法	32	
(2) 結果及び考察	32	
II-3. <u>P. dichotomiflorum</u> の光合成的炭素代謝機構	34	
(1) 材料及び方法	35	
(2) 結果及び考察	37	
II-4. 考察	42	

Ⅲ. 暗期移行直後のCO ₂ 放出現象 (PIB) の発生機構の解明	49
Ⅲ-1. 脱炭酸酵素型とPIB初期勾配との関係	49
(1) 材料及び方法	50
(2) 結果及び考察	53
Ⅲ-2. PIBパターンに及ぼす環境要因の影響	56
(1) 材料及び方法	57
(2) 結果及び考察	57
Ⅲ-3. PIB初期勾配に及ぼす環境要因の影響	59
(1) 材料及び方法	59
(2) 結果及び考察	59
Ⅲ-4. 考察	64
Ⅳ. <u>Panicum</u> 属 <u>Dichotomiflora</u> グループ内草種のCO ₂ 交換特性と 葉身の形態的特徴	66
Ⅳ-1. 炭素同位体分別能の差異	66
(1) 材料及び方法	67
(2) 結果及び考察	67
Ⅳ-2. CO ₂ 交換特性の差異	72
(1) 材料及び方法	72
(2) 結果及び考察	72
Ⅳ-3. <u>P. dichotomiflorum</u> 葉身の微細構造	79
(1) 材料及び方法	79
(2) 結果及び考察	80
Ⅳ-4. 葉身内部の形態的特徴	82
(1) 材料及び方法	82
(2) 結果及び考察	87
Ⅳ-5. 考察	100

V. <u>Panicum</u> 属 <i>Dichotomiflora</i> グループ内草種の乾物生産特性と要水量	103
V-1. NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の生長速度の比較	104
(1) 材料及び方法	104
(2) 結果及び考察	105
V-2. 異なる土壤水分条件下でのNAD-ME (F) 種と NAD-ME (P) 種の要水量の比較	110
(1) 材料及び方法	110
(2) 結果及び考察	111
V-3. 考察	111
VI. 総合考察	115
謝辞	119
摘要	120
引用文献	124

緒言

イネ科牧草はその起源・生育適温の違いから大きく分けて寒地型と暖地型とに分けられる。我が国の寒地型牧草栽培の歴史は比較的長く、イタリアンライグラス (Lolium multiflorum) やオーチャードグラス (Dactylis glomerata) 等は、明治時代に入って導入され、すでに約 100年の栽培の歴史をもっている。これに対して、暖地型牧草が日本の西南暖地を中心に、寒地型牧草を基幹とする草地の夏枯れ対策用に、また、耕地における有望な青刈り飼料作物として本格的に導入されるようになったのは第二次世界大戦後のことである(野田, 1976)。昭和20年代後半から30年代後半にかけていくつかの導入暖地型牧草の比較試験が全国的に行われ、スーダングラス (Sorghum sudanense)、ネピアグラス (Pennisetum purpureum)、バヒアグラス (Paspalum notatum)、ダリスグラス (Paspalum dilatatum) 等が良好な収量を上げることが明らかにされ、特に、バヒアグラスでは昭和34年から本格的な品種育成が開始された。その後、昭和40年代前半から後半にかけてローズグラス (Chloris gayana) の多数の系統やパニカム類 (Panicum species) が導入され、各地で評価試験が行われた結果、ローズグラスが有望種と認められるとともに、パニカム類ではカラードギニアグラスのソライ系統 (Panicum coloratum cv. Solai)、ギニアグラス (Panicum maximum)、グリーンパニック (Panicum maximum var. trichoglume) 等が一定の評価を受けるに至った(越智・中島, 1978; 越智ら, 1985)。昭和50年代に入ってから新たな外来草種の導入は行われず、既存草種の作付体系の改善や水田転換畑への導入等が積極的に推し進められるようになった。こうしたことを背景に、近年、暖地型諸草種の生理・生態的特性の解明に関する研究が活発に行われるようになった(暖地型牧草に関する試験研究成果要約集, 1979)。

しかしながら、我が国における暖地型牧草の生産量は昭和53年でみると、全自給飼料生産量の 1.1%にすぎない。我が国において暖地型牧草の栽培がこのように限定されている大きな原因の一つには、我が国の気候が暖地型牧草の生育に必ずしも適していない点が上げられる(川鍋・平川, 1971; 茨木, 1979)。暖地型牧草は一般に、高温・多照が持続する条件では高い生産力を上げることができる。延長2000km、緯度差20°の我が国は亜熱帯から亜寒帯までを含み、暖地では夏の酷暑が4カ月持続し、寒地でも高温期が2カ月程度続く。従って、夏の条件ではかなり広範囲で暖地型牧草の栽培が可能であるが、冬の温度条件は、九州・四国あたりでも暖地型牧草にとっては苛酷である。このため、暖地型牧草

は本来、永年生であるものが多いが草種によっては越冬不能となり、1年生としての利用を強いられることになる。さらに、6～7月にかけて、1カ月半にもわたる多雨と日照不足の梅雨期がある。このような気候条件下では、暖地型牧草が生産力を十分発揮することはできないと考えられる。

ところで、イネ科暖地型牧草は光合成機能の面からすべてC₄植物に分類されている。最近の研究によって、C₄植物には生化学的、形態的に多様な変異のあることが明らかにされ、従って、生態的にも特に環境適応性という面から我々の想像以上に多様な変異を示す可能性がある。今後こうした面について研究が進められれば、我が国の気候条件に、より適応した草種を選抜、育種することが可能になることと思われる。本研究の大きな目的は、このようなC₄植物の光合成における多様性をまず明らかにすること、そして、その多様性と環境適応との関係を追究することである。ここで、現在までに明らかにされているC₄植物の光合成に関連する諸形質の多様性を概観し、どの点まで明らかにされ、どのような問題が残されているのかをまとめておく。

C₄植物の炭酸固定反応（以下C₄光合成）は葉肉細胞とKranz細胞（葉緑体を含んだ維管束鞘細胞）という二種類の細胞の共同作業によって行われている（Hatch, 1972）（図1参照）。すなわち、気孔から流入した大気中のCO₂はまず、葉肉細胞においてPEPカルボキシラーゼにより固定され、オキサロ酢酸を經由してリンゴ酸あるいはアスパラギン酸といったC₄ジカルボン酸に転換されKranz細胞に送り込まれる。そこで、C₄ジカルボン酸は脱炭酸酵素によりCO₂とアラニンあるいはピルビン酸といったC₃酸に分解される。C₃酸は葉肉細胞へと逆送され、ピルビン酸・リン酸ジキナーゼによりリン酸化されてCO₂の受容体であるPEPに戻る。一方、再放出されたCO₂はRuBPカルボキシラーゼによってPGAに合成され、カルビン回路を経て、糖へと合成される。このように、C₄光合成はすべての植物が有する基本的なCO₂固定回路であるカルビン回路の前にもう一つのCO₂固定系（以下C₄ジカルボン酸回路）を有し、それが、RuBPカルボキシラーゼの反応の場でのCO₂濃度を数倍から十数倍に濃縮する働きをもっていると考えられている。そしてこの機構があるが故に気孔の開度を小さく保つことができ、高温・乾燥といった苛酷な環境にも適応しうると考えられている（石井・村田, 1978; Edwards and Walker, 1983）。

ところで、Kranz細胞内でC₄ジカルボン酸からCO₂を遊離する反応に関与する脱炭酸酵素としては、NADP-リンゴ酸酵素（NADP-ME）（Hatch and Slack, 1966）、

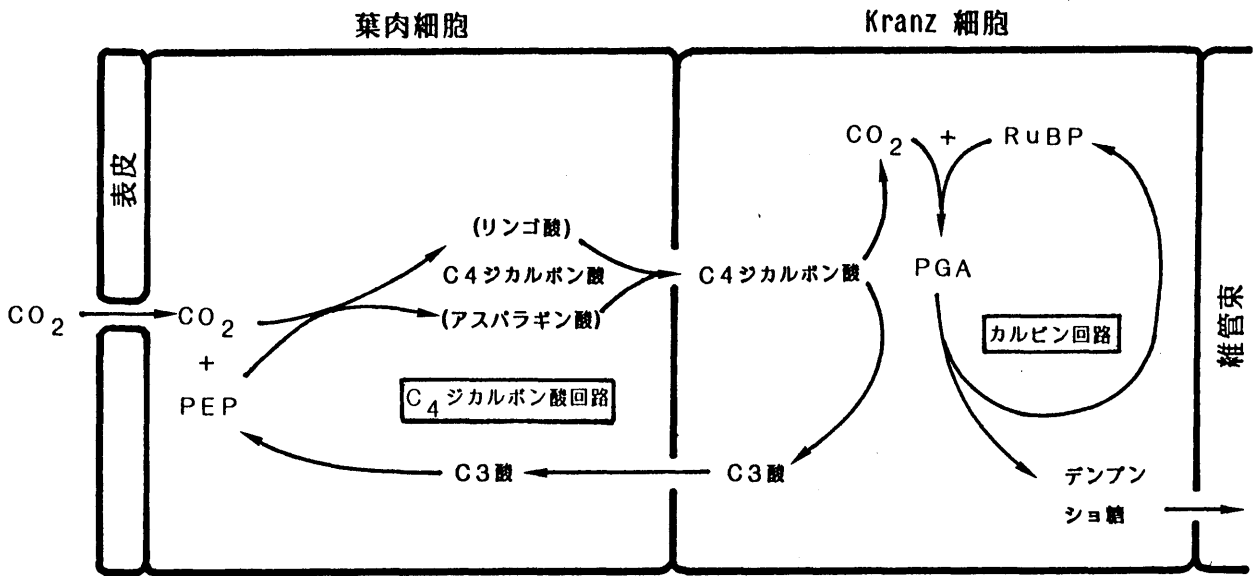


図1. C₄ 光合成における炭素代謝経路の概略 (Hatch, 1976 を一部改変)。

NAD-リンゴ酸酵素 (NAD-ME) (Hatch and Kagawa, 1974a), 及びホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEP-CK) (Edwards ら, 1971) の3種類が知られている。これら3種の脱炭酸酵素のいずれが主に働いているかによってC₄ 光合成はさらにNADP-ME型, NAD-ME型及びPEP-CK型の三つの型(以下脱炭酸酵素型)に分類されている(Gutierrez ら, 1974; Hatch ら, 1975)。これらの脱炭酸酵素は Kranz細胞内での存在場所に違いがみられ, NADP-MEは葉緑体(Kagawa and Hatch, 1975), NAD-MEはミトコンドリア(Rathnam and Edwards, 1975)そして, PEP-CKは細胞質に存在している(Watanabeら, 1984)。また, これらの脱炭酸酵素の違いによって葉肉細胞から Kranz細胞へ移動するC₄ ジカルボン酸あるいは逆向きに移動するC₃ 酸の種類も異なっており, NADP-ME型とNAD-ME型のC₄ 光合成代謝機構は既に明らかにされている。しかし, PEP-CK型においては, Kranz細胞から葉肉細胞へ逆送されるC₃ 酸を一種類に特定できず, 現在までのところ代謝機構の全容は確定していない(金井, 1979)。また, 三つの脱炭酸酵素型のうち, NADP-ME型とNAD-ME型はイネ科以外の単子葉植物や双子葉植物にも見出されているが, PEP-CK型はイネ科植物にしか見出されていない(Gutierrez ら, 1974)。

さて, イネ科の脱炭酸酵素型の異なる草種は, 表1に整理したような種々の形態的・生理的側面において異なる特性を示す。これらの諸特性のうち, メストム鞘の有無や Kranz細胞内の葉緑体の分布は脱炭酸酵素型の違いとよく対応しており, それらの形質は光学顕微鏡下で容易に観察できることから, 脱炭酸酵素型の推定方法として用いられてきた(Hattersley and Watson, 1976; Ellis, 1977)。しかし, このような構造的差異がどのような機能的差異と結びついているかは全くわかっていない。また, CO₂ 交換特性の一つである暗期移行直後の葉からのCO₂ の放出(Post-illumination CO₂ burst, 以下PIB)にも三つのパターンがみられ, 脱炭酸酵素型の違いとよく対応しているが, その発生機構については未だ未知の部分が多い。

ところで, このようなイネ科の脱炭酸酵素型の異なる草種は地理的な分布の面で比較的是っきりとした差異がみられる。例えば, Hartley (1958a, 1958b) 及び Hartley and Slater (1960) は, スズメガヤ垂科とキビ垂科に属するイネ科C₄ 植物の世界的な分布を文献的に調査し, 温度や降雨量との関係を検討した。その結果, スズメガヤ垂科は夏の降雨量が少なく年間を通じて降雨量の安定しない主に熱帯サバンナ地域に分布の中心があるのに対し, キビ垂科は降雨量の多い熱帯雨林あるいは熱帯モンスーン地域に主に分布して

表1. 脱炭酸酵素型の異なるイネ科C₄植物の光合成的諸特性。

	NADP-ME種	NAD-ME種	PEP-CK種
C ₄ ジカルボン酸の形態	リンゴ酸	アスパラギン酸	アスパラギン酸
脱炭酸酵素	NADP-リンゴ酸酵素	NAD-リンゴ酸酵素	フォスフォエノールピルビン カルボキシキナーゼ
Kranz 細胞における脱炭酸酵素の存在場所	葉緑体	ミトコンドリア	細胞質
脱炭酸酵素の酵素学的特徴	Mn ²⁺ あるいはMg ²⁺ が必要. NADPH あるいはピルビン酸で活性阻害.	Mn ²⁺ が必要. CoA あるいはFBPで活性促進.	Mn ²⁺ が必要. FBP, PGA あるいはDHAPで活性阻害.
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性	低-中	高	高
NADP-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性	高	中	中
メストム鞘	無	有	有
Kranz 細胞壁のスベリン層	有	無	有
Kranz 細胞内の葉緑体の分布様式	遠心的	求心的	遠心的
葉緑体のグラナ構造	未発達あるいは痕跡的	発達	発達
Kranz 細胞内のミトコンドリア数	中	多	多
葉緑体の内膜構造	未発達	発達	発達
暗期移行直後のCO ₂ 放出現象	無	有(鋭)	有(鈍)
CO ₂ 1分子を固定するための必要エネルギー量	5ATP 2NADPH	5ATP 2NADPH	4-6ATP 2NADPH
クロロフィル a/b比			
葉肉細胞	3.6	4.3	3.3
Kranz 細胞	6.0	3.6	3.1
葉身全体	4.4	3.9	3.2
代表種	キビ亜科 トウモロコシ サトウキビ ソルガム ブルーパニック メヒシバ	スズメガヤ亜科 シコクビエ カゼクサ オヒシバ キビ亜科 キビ カラードギニアグラス	スズメガヤ亜科 ローズグラス シバ キビ亜科 ギニアグラス パラグラス

utierrez ら (1974), Hatchら (1975), Hattersley and Browning (1981), Watanabe ら (1984) による。

いることを見出した。ところで、NADP-ME種は全てキビ亜科種であり、NAD-ME種とPEP-CK種は大半がスズメガヤ亜科種である。このことから、異なる脱炭酸酵素型が生態的適応の違いと結びついて分化した可能性が高く、また、表1に示したような脱炭酸酵素型の相違と対応した光合成の生化学的機作、葉緑体の分布や微細構造あるいはCO₂交換特性等の違いも環境条件に対する適応の差異の反映であることをうかがわせる。

著者の属する農林水産省草地試験場では、日本の環境と類似した世界各地域からC₄植物を多数収集することによって、我が国により適応した暖地型牧草を見出すことができるのではないかとして、昭和46年から昭和48年にかけて二度にわたってアフリカ大陸のケニア、タンザニア、ナイジェリア等に研究者を派遣し、多数の野草を収集した(宝示戸・堀端, 1982)。その中には100種以上のイネ科C₄植物が含まれていたが、著者が研究を開始した昭和51年当時はそれらの草種について、上に述べたような光合成と関連する諸特性について全く未知の状態であった。そこで、著者はまずこれらイネ科C₄植物について葉構造とPIBを調べ脱炭酸酵素型と対応させて分類することから始めた。その過程で、Panicum属の一部に表1に示した対応関係からはずれる草種のあることを見出した。この事実は脱炭酸酵素型と葉構造あるいはPIBパターン等表1に示した特性が必ずしも因果関係を持って対応しているものではないことを示唆している。そして、これらの草種の中には当試験場における試験において耐湿性が優れていると評価されたものも含まれていた。そこで、これらの例外的対応関係を示す草種をさまざまな角度から検討することによって従来漠然と言われていたC₄光合成の生化学的側面と生理的あるいは形態的側面さらには生態的な適応とがどのような因果関係によって対応しているのかを明確にできるものと考え、本研究を行った。

本論文はV章より構成され、まず、I.において多数のイネ科C₄植物の葉構造とPIBパターンを調べて、脱炭酸酵素型と葉構造及びPIBパターンとの対応関係を再検討した。II.では従来とは異なる対応関係を示したPanicum属Dichotomifloraグループに属する草種について光合成の炭素代謝機構を調べ、C₄植物における光合成機能と葉構造及びPIBパターンとの因果関係を検討した。その結果、Kranz細胞内の葉緑体の分布が、光合成の炭素代謝機構あるいはPIBパターンと無関係であることが明らかになった。そこで、次に、III.において葉緑体の分布と関わりのなくなった三種のPIBパターンについてその発生機構を検討した。また、IV.ではDichotomifloraグループ内の草種の中

心にCO₂交換特性及び葉身の形態的特徴を調査し，葉緑体の分布との関連を検討した。最後に，V. では *Dichotomiflora* グループの草種の乾物生産特性と要水量について調査し，葉緑体の分布を含めた光合成的諸特徴と生産性あるは生態的適応との関連を明らかにしようとした。

略号一覧

本論文では下記の略号を用いる。

CoA	補酵素A
FBP	フルクトース -1,6-ニリン酸
NADP-ME	NADP依存リンゴ酸酵素
NAD-ME	NAD依存リンゴ酸酵素
PEP	フォスフォエノールピルビン酸
PEP-CK	PEP カルボキシキナーゼ
PIB	暗期移行直後のCO ₂ 放出現象
RuBP	リアロース -1.5-ニリン酸

I. イネ科 C_4 植物における脱炭酸酵素型と葉構造及び暗期移行直後の CO_2 放出現象(PIB)との関係の再検討

イネ科の脱炭酸酵素型の異なる草種では葉身横断面における形態的特徴にいくつかの違いがみられる。これらの特徴のうち、光学顕微鏡下で比較的容易に観察できるものはメストム鞘の有無と Kranz細胞内の葉緑体の分布である。メストム鞘は後生木部の発達した大維管束において後生木部と Kranz細胞との間にある葉緑体を含まない細胞層である。NAD-ME種とPEP-CK種ではこのメストム鞘が存在するが、NADP-ME種では存在しないとされている(Hattersley and Watson, 1976)。一方、Kranz細胞内の葉緑体は葉肉細胞内の葉緑体と異なり、細胞内で偏って存在する傾向があり、その偏り方に二種類あるとされている。すなわち、一つは葉肉細胞側の内壁に密着した遠心的な分布であり、もう一つは維管束側の内壁に密着した求心的な分布である。そして、葉緑体はNADP-ME種とPEP-CK種では遠心的な分布をとるのに対し、NAD-ME種では求心的な分布をとるという対応関係がみられている(Gutierrez ら, 1974; Ellis ら, 1977)。

また、脱炭酸酵素型の異なる草種は CO_2 交換特性の一つである、暗期移行直後の CO_2 放出現象(Post-illumination CO_2 burst, PIB)でも異なったパターンを示すと言われている(Downton, 1970; Kanai and Black, 1972)。PIBは植物に光をあてて光合成を行わせた後、暗期に移行させた直後にみられる葉からの一時的かつ急激な CO_2 の放出現象である。NADP-ME種では全くPIBがみられないが、NAD-ME種では暗期移行後15秒付近にPIBの鋭いピークがみられ、また、PEP-CK種でもPIBはみられるがピークは暗期移行後1～2分と遅く、形もなだらかな山形でNAD-ME種の示すパターンとは異なっている。

このような脱炭酸酵素型と葉構造及びPIBパターンの対応関係をもとに、ここでは多数のイネ科 C_4 植物について葉構造とPIBパターンを調査し、既に脱炭酸酵素型の同定されている種については葉構造及びPIBが今まで通りの対応関係が適用されうるものかどうかを確認するとともに、未同定の種については葉構造とPIBパターンをもとに脱炭酸酵素型の推定を行った。

I-1. 脱炭酸酵素型と葉構造との関係

既に, Hattersley and Watson (1976) と Ellis (1977) は脱炭酸酵素型と葉構造との対応関係を検討し, 葉構造によって多くの C_4 植物を脱炭酸酵素型に分類した。Hattersley and Watsonはメストム鞘の有無によってNADP-ME種と他の二つの脱炭酸酵素型とを, また, Ellis はメストム鞘の有無と Kranz細胞内の葉緑体の分布の違いとを組み合わせることによって三つの脱炭酸酵素型を推定できると結論づけている。その後も葉構造による分類をもとにして, 脱炭酸酵素型の異なる種の中のRuBPカルボキシラーゼの活性の違いや量子収率が比較されるなど, 葉構造は簡単でしかも信頼度の高い脱炭酸酵素型推定の方法として認められている (Yeoh ら, 1981; Ehleringer and Pearcy, 1983; Seemann ら, 1984)。ここでは Ellis (1977) と同様な方法によって多数のイネ科 C_4 植物の脱炭酸酵素型の推定と分類を行った。

(1) 材料及び方法

供試材料: 調査した植物種は日本の野生種, アフリカ大陸での収集種及び米国, オーストラリア等から分譲された種から成り, 種数としてはスズメガヤ亜科10属28種, キビ亜科29属95種の合計39属 123種にのぼった。植物は栃木県西那須野町にある草地試験場圃場において常法により栽培された。

葉構造の観察: 葉構造の観察には出穂期前の植物の最上位展開葉を供試した。採取した葉を生葉のまま振動型マイクロトーム (オックスフォード社製 Vibratome) により厚さ30~50 μm の横断切片とし, 主として以下の2形質を光学顕微鏡 (オリンパスBHB-334SW) によって観察した。なお, 必要によっては切片を I_2 -KI液で染色した。

- 1) 後生木部の発達した大維管束におけるメストム鞘の有無。
- 2) Kranz細胞内の葉緑体の分布様式。

(2) 結果及び考察

上記の二つの形質に注目して葉構造を観察した結果, 調査草種は表I-1に示したような三つの型に分けられ, また, 図I-1にはそれぞれの型の代表的草種を示した。すなわち, 大維管束の後生木部と Kranz細胞の間にあるメストム鞘の有無で2群に分かれ, それぞれ, MS型, KS型とした。KS型の植物では, Kranz細胞内の葉緑体は遠心的に分布

表 I - 1. メストム鞘の有無と Kranz細胞内の葉緑体分布様式に基づく
三つの葉構造型。

葉構造型	メストム鞘	葉緑体分布様式
KS	無	遠心的
MS-P	有	求心的
MS-F	有	遠心的

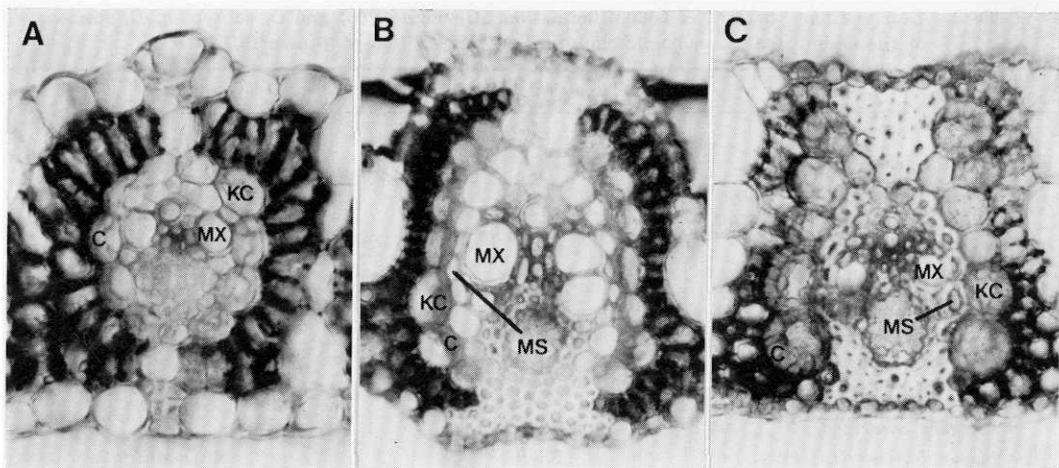


図 I - 1. 各葉構造型の葉身横断面。

A : KS型. Pennisetum purpureum. メストム鞘が後生木部 (MX) と Kranz細胞 (KC) の間に認められない。Kranz細胞内の葉緑体 (C) は遠心的に分布している。×405 .

B : MS-P型. Eragrostis curvula. メストム鞘 (MS) がみられ、Kranz細胞内の葉緑体は求心的に分布している。×330.

C : MS-F型. Zoysia japonica. メストム鞘がみられ、Kranz細胞内の葉緑体は遠心的に分布している。×425.

しており、一部 Kranz細胞全体を埋めるものもあったが、求心的に分布するものはなかった。一方、MS型はさらに Kranz細胞内の葉緑体が求心的に分布するものと遠心的に分布するものとに分かれ、それぞれMS-P型、MS-F型とした。

調査したすべての植物種を上記の葉構造型で表I-2のように分類した。葉構造を調査した種の中で既に脱炭酸酵素型が同定されているものは44種あるが、脱炭酸酵素型と葉構造との対応関係をみると、NADP-ME型と同定されている14種はすべてKS型であり、PEP-CK型である14種はすべてMS-F型であった。しかし、NAD-ME型である16種のうち14種はMS-P型であったが、Panicum coloratumとPanicum bergiiは典型的なMS-P型とは言えなかった。この点については後に詳述する。このように、葉構造の型と脱炭酸酵素型とは表I-3に示されるように一部の例外を除いてほぼ1対1の対応関係が認められることが確認された。

さて、表I-2における三種の葉構造型と植物学的分類との関連を検討してみると、まず、スズメガヤ亜科種ではKS型はなく全てMS型であった。この中で Bouteloua属と Chloris 属はMS-P型とMS-F型の両方の種を含んでいたが他の属はMS-P型あるいはMS-F型の一方の種のみであった。キビ亜科種は大半がKS型であったが、Gutierrezら(1976)によってPaniceae族の Brachiaria グループと総称される諸属 (Brachiaria, Eriochloa, Pseudobrachiaria 及び Urochloa) と Melinideae 族の Melinis 属と Rhynchelytrum属に含まれる種はMS-F型であった。Paniceae 族の Panicum 属は三つの型を全て含み、キビ亜科で唯一のMS-P型の種を含んでいた。さらに、Panicum coloratum は種内が系統によってMS-P型とMS-F型とに分かれた。P. coloratum の Kranz細胞内の葉緑体の分布に関しては、細胞内全体に均等に分布しているとする報告はあるが (Gutierrezら, 1974; Ellisら, 1977), 遠心的あるいは求心的な分布をとるという例はみられていない。ここで用いた品種・系統のうち、cv. Kabulabulaと cv. Solai は明瞭な遠心的分布をしており、また、他のいくつかの系統 (73-294等) は求心的な分布をしていた。細胞内全体に分布している例はMS-P型の系統において葉緑体が細胞内に大量にある場合によくみられたため、このような分布様式はMS-P型の一変形と考えられる。このように P. coloratum種内にMS-P型とMS-F型がみられるということは、葉構造と脱炭酸酵素型との密接な対応関係からみると、異なる脱炭酸酵素型が同一種内に存在する可能性があり、この点については本研究の中でさらに検討する。

以上のように、調査した大半の草種は葉構造の違いに基づく三つの型のいずれかに分類

表I-2. イネ科C₄植物の葉構造型, 暗期移行直後のCO₂放出現象(PIB)のパターン及び脱炭酸酵素型との関係。植物学的分類はBrown(1977)によった。

種	葉構造型 ^{a)}	PIB ^{b)}	脱炭酸酵素型 ^{c)}
Subfamily: Eragrostoideae			
Tribe: Chlorideae			
<u>Bouteloua curtipendula</u> (Michx.) Torr.	MS-F		PEP-CK
<u>B. gracilis</u> (H. B. K.) Lag.	MS-P		NAD-ME
<u>Chloris barbata</u> Swartz	MS-F	I	
<u>C. distichophylla</u> Lag.	MS-P	II	NAD-ME
<u>C. gayana</u> Kunth	MS-F	III	PEP-CK
<u>C. pilosa</u> Schum. & Thonn.	MS-F	III	
<u>C. pycnothrix</u> Trin.	MS-F		
<u>C. roxburghiana</u> Scholt.	MS-P		
<u>C. virgata</u> Swartz	MS-F	I	
<u>Cynodon dactylon</u> (L.) Pers.	MS-P		NAD-ME
<u>Dactiloctenium aegyptium</u> (L.) Beauv.	MS-F	III	
<u>Eleusine africana</u> Kennedy-O'Byrne	MS-P	II	
<u>E. coracana</u> (L.) Gaertn.	MS-P	II	
<u>E. floccifolia</u> Spreng.	MS-P	II	
<u>E. indica</u> (L.) Gaerth	MS-P	II	NAD-ME
<u>E. jaegeri</u> Pilger	MS-P	II	
<u>Enteropogon macrostachyus</u> (Hochst. ex A. Rich.) Munro ex Benth.	MS-P	II	
<u>Leptochloa dubia</u> (H. B. K.) Nees	MS-P	II	NAD-ME
Tribe: Eragrosteae			
<u>Eragrostis curvula</u> (Schred.) Nees	MS-P	II	NAD-ME
<u>E. curvula</u> var. <u>Valide</u>	MS-P	II	
<u>E. ferruginea</u> Beauv.	MS-P	II	
<u>E. lehmanniana</u> Nees	MS-P	II	
<u>E. robusta</u> Stent	MS-P	II	
<u>E. superba</u> Peyr.	MS-P	II	NAD-ME
<u>E. tef</u> (Zucc.) Trotter	MS-P	II	
<u>E. tenuifolia</u> Hochst. ex A. Rich.	MS-P	II	
Tribe: Sporoboleae			
<u>Sporobolus</u> sp.	MS-F	I	
Tribe: Zoysieae			
<u>Zoysia japonica</u> Steud.	MS-F		PEP-CK

Subfamily: Panicoideae

Tribe: Andropogoneae

表I-2. (つづき)

種	葉構造	PIB	脱炭酸酵素型
<u>Andropogon abyssinicus</u> R. Br.	KS		
<u>A. fastaiata</u>	KS		
<u>A. gyanus</u> Kunth	KS		
<u>A. gerardii</u> Vitman	KS		NADP-ME
<u>A. scoparius</u> Michx.	KS		NADP-ME
<u>Arthraxon hispidus</u> (Thunb.) Makino	KS		
<u>Bothriochloa barbinodis</u> Herter	KS		
<u>B. glabra</u> (Roxb.) A. Camus	KS		
<u>B. hasleri</u>	KS		
<u>B. insculpta</u> (Hochst.) A. Camus	KS		
<u>B. pertusa</u> (Willd.) A. Camus	KS		
<u>Dichanthium aristatum</u> (Poir.) C.E. Hubb.	KS		
<u>Eremochloa ophiuroides</u> (Munro) Hack.	KS		
<u>Heteropogon concertus</u> (L.) Beauv. ex R. & S.	KS		
<u>Hyparrhenia collina</u> (Pilger) Stapf	KS		
<u>H. hirta</u> (L.) Stapf	KS		
<u>H. rufa</u> (Nees) Stapf	KS		
<u>Miscanthus sinensis</u> Anderss.	KS		
<u>Sorghum alnum</u> Parodi	KS	I	
<u>S. bicolor</u> (L.) Moench	KS	I	
<u>S. halepense</u> (L.) Pers.	KS	I	
<u>S. sudanense</u> (Pilger) Stapf	KS	I	NADP-ME
<u>S. vulgare</u> Pers.	KS		NADP-ME
<u>Themeda triandra</u> Forsk.	KS		
Tribe: Anthephoreae			
<u>Anthephora hochstetteri</u>	KS	I	
Tribe: Aristideae			
<u>Aristida adscensionis</u> L.	KS ^{d)}	I	
Tribe: Arundinelleae			
<u>Arundinella hirta</u> L.	KS ^{e)}		NADP-ME
Tribe: Maydeae			
<u>Coix lacryma-jobi</u> L.	KS	I	
<u>Zea mays</u> L.	KS	I	NADP-ME
Tribe: Melinideae			
<u>Melinis minutiflora</u> Beauv.	MS-F	III	
<u>M. tenuinervis</u> Stapf	MS-F		
<u>Rhynchelytrum repens</u> (Willds) C.E. Hubb.	MS-F	III	
Tribe: Paniceae			

表I-2. (つづき)

種	葉構造	PIB	脱炭酸酵素型
<u>Axonopus compressus</u> (Swartz) Beauv.	KS		NADP-ME
<u>Brachiaria brizantha</u> (Hochst. ex A. Rich.) Stapf	MS-F	III	PEP-CK
<u>B. decumbens</u> Stapf	MS-F		
<u>B. dictyoneura</u> (Fig. & De Not.) Stapf	MS-F		PEP-CK
<u>B. erucaeformis</u> (J.E. Smith) Griseb.	MS-F		PEP-CK
<u>B. jubata</u> (Fig. & De Not.) Stapf	MS-F		
<u>B. mutica</u> (Forsk.) Stapf	MS-F	III	PEP-CK
<u>B. naudane</u>	MS-F		
<u>B. plantaginea</u> (Link.) Hitchc.	MS-F		PEP-CK
<u>B. ramosa</u> Stapf	MS-F		PEP-CK
<u>B. ruziziensis</u> Germain & Evrard	MS-F		
<u>Cenchrus ciliaris</u> L.	KS	I	
<u>C. setigerus</u> Vahl	KS	I	
<u>Digitaria abyssinica</u> (Hochst. ex A. Rich.) Stapf	KS	I	
<u>D. adscendens</u> Henrard	KS	I	
<u>D. decumbens</u> Stent	KS	I	
<u>D. milaniana</u> (Rendle) Stapf	KS	I	
<u>D. smutsii</u> Stent	KS		
<u>Echinochloa colonum</u> (L.) Link.	KS		NADP-ME
<u>E. crusgalli</u> (L.) Beauv. var. <u>crusgalli</u>	KS	I	NADP-ME
<u>E. crusgalli</u> (L.) Link. var. <u>formosensis</u> Ohwi	KS		
<u>E. crusgalli</u> (L.) Link. var. <u>praticola</u> Ohwi	KS		
<u>E. flumentacea</u> Link.	KS		NADP-ME
<u>E. oryzicola</u> Vasing	KS		
<u>E. utilis</u> Ohwi et Yabuno	KS	I	
<u>Eriochloa australiensis</u>	MS-F		
<u>E. borumensis</u>	MS-F		PEP-CK
<u>E. meyeriana</u> (Nees) Pilger	MS-F		
<u>E. punctata</u> (L.) Desv.	MS-F		PEP-CK
<u>Panicum antidotale</u> Retz.	KS	I	NADP-ME
<u>P. bergii</u> Arech.	MS ^{f)}	II	NAD-ME
<u>P. capillare</u> L.	MS-P	II	NAD-ME
<u>P. coloratum</u> L. (cv. Klein)	MS-P	II	
<u>P. coloratum</u> L. (cv. Kabulabula)	MS-F	II	
<u>P. coloratum</u> L. (cv. Solai)	MS-F	II	
<u>P. coloratum</u> L. var. <u>makarikariense</u> Goosens	MS-P	II	NAD-ME

表I-2. (つづき)

種	葉構造	PIB	脱炭酸酵素型
<u>P. decompositum</u> R. Br.	MS-P	II	NAD-ME
<u>P. deustum</u> Thunb.	MS-F	III	
<u>P. dichotomiflorum</u> Michx.	MS-F	II	
<u>P. dregeanum</u> Nees	MS-P	II	
<u>P. hallii</u> Vasey	MS-P	II	NAD-ME
<u>P. infestum</u> Anderss. ex Peters	MS-F	III	
<u>P. laevifolium</u> Hack.	MS-F	II	
<u>P. lanipes</u> Mez.	MS-P	II	
<u>P. longijubatum</u> Stapf	MS-F	II	
<u>P. maximum</u> Jacq.	MS-F	III	PEP-CK
<u>P. maximum</u> Jacq. var. <u>trichoglume</u> Eyles	MS-F		
<u>P. miliaceum</u> L.	MS-P	II	
<u>P. molle</u> Michx.	MS-F	III	PEP-CK
<u>P. obtusum</u> H. B. K.	KS	I	NADP-ME
<u>P. queenslandicum</u> Domin	MS-P	II	
<u>P. ramosum</u> L.	MS-F	III	
<u>P. seminudum</u>	MS-P	II	
<u>P. stapfianum</u> Fourc.	MS-P	II	NAD-ME
<u>P. virgatum</u> L.	MS ^{g)}	II	NAD-ME
<u>Paspalum dilatatum</u> Poir.	KS	I	
<u>P. distichum</u> L.	KS		
<u>P. notatum</u> Flugge	KS	I	NADP-ME
<u>P. plicatulum</u> Michx.	KS		
<u>P. urvillei</u> Steud.	KS	I	
<u>P. vaginatum</u> Swartz	KS		
<u>Pennisetum clandestinum</u> Hochst. ex Chiov.	KS		
<u>P. glaucum</u> (L.) R. Br.	KS	I	
<u>P. purpureum</u> Schum.	KS		NADP-ME
<u>Pseudobrachiaria deflaxa</u> (Schum.) Launert	MS-F		PEP-CK
<u>Setaria glauca</u> (L.) Beauv.	KS	I	
<u>S. italica</u> (L.) Beauv.	KS	I	NADP-ME
<u>S. sphacelata</u> (Schum.) Stapf & C. E. Hubb.	KS	I	
<u>S. splendida</u> Stapf	KS		
<u>Stenotaphrum secundatum</u> (Walt.) Kuntze	KS		
<u>Urochloa brachyura</u> (Hack.) Stapf	MS-F		
<u>U. mosambicensis</u> (Hack.) Dandy	MS-F	III	PEP-CK
<u>U. panicoides</u> Beauv.	MS-F		PEP-CK
<u>U. pullulans</u> Stapf	MS-F		PEP-CK

- a) 表I-1. 参照。
- b) 図I-2. 参照。
- c) 脱炭酸酵素型の分類は以下の文献によった。Brown (1977), Downton (1970), Edwardsら (1971), Huber ら (1973), Gutierrezら (1974a), Gutierrez ら (1974b), Gutierrez ら (1976), Hatch and Kagawa (1974a), Hatch and Kagawa (1974b), Hatch ら (1975), Reger and Yates (1979).
- d) Aristida adscendens では2重の Kranz細胞がみられ, 内側の Kranz細胞内の葉緑体は遠心的に, 外側の Kranz細胞内の葉緑体は求心的に分布していた。
- e) Arundinella hirta では数個の“distinctive cell” (Tateoka, 1958; Crookston and Moss, 1973) がKSタイプの大維管束の間にみられた。
- f) Panicum bergiiでは Kranz細胞内の葉緑体は周辺偏在的な分布をしていた。
- g) Panicum virgatumでは Kranz細胞内の葉緑体は周辺偏在的な分布あるいは細胞内全体に散在していた。

表 I - 3 . 脱炭酸酵素型と葉構造型との対応関係。

脱炭酸酵素型	葉構造型
N A D P - M E	K S
N A D - M E	M S - P
P E P - C K	M S - F

できたが、表 I-3 に示した対応関係に合致しないものがキビ亜科の中に数種認められた。すなわち、Aristida adscensionis はメストム鞘が存在しないため K S 型と分類したが、さらに詳細な構造をみると二重の Kranz 細胞をもっていた。内側の Kranz 細胞内の葉緑体は他の K S 型と同様に遠心的に分布していたが、外側の Kranz 細胞内の葉緑体は求心的に分布していた。このような葉構造は Aristida 属全体に共通のものと思われ、既に A. purpurea 等の他種においても報告されている (Lommasson, 1957; Gutierrezら, 1974)。Arundinella hirta は大維管束が典型的な K S 型であるが、後生木部の未発達の小維管束が存在せず、そのかわりに維管束を含まない丸型の細胞が大維管束と大維管束の間に点在しており、その中の葉緑体は遠心的に分布していた。この丸型の細胞は Tateoka (1958) によって “Distinctive cell” と命名されており、Arundinella 属と Garnotia 属にのみみられる特徴である。また、Panicum bergii と Panicum virgatum はメストム鞘が存在するため MS 型と分類したが、Kranz 細胞内の葉緑体は細胞の内壁全体に密着する、周辺偏在的 (Peripheral) な分布をしており、MS-P 型、MS-F 型のどちらともみなせなかった。また、P. virgatum の場合には周辺偏在的な分布だけでなく葉緑体が大量の場合には細胞内全体に散らばって存在する傾向もみられた。P. bergii の葉緑体の分布については求心的 (Brown and Gracen, 1972)、あるいは遠心的 (Hattersley and Browning, 1981) と報告が一定していないが、本実験で用いた三系統は全て周辺偏在的な分布をとっており今までの報告とは異なった結果が得られた。

I-2. 脱炭酸酵素型と P I B との関係

P I B はまず C_3 植物において発見され (Decker, 1955)、光呼吸のグリコール酸回路におけるグリシン-セリン変換反応において放出される CO_2 に由来することが明らかにされている (Ogren and Chollet, 1982)。従って、みかけ上光呼吸が存在しない C_4 植物には P I B がないと考えられ、 C_4 光合成の主な研究素材であったトウモロコシでは確かに P I B はみられなかった (Forrester ら, 1966b)。しかし、双子葉 C_4 植物の Amaranthus edulis で明瞭な P I B がみられたことから (Bjorkman, 1968)、 C_4 植物にも P I B が存在することが明らかにされ、また、その種間差の存在も示唆された。その後、Downton (1970) は 24 種の C_4 植物の P I B を調査し、その結果 3 種類のパターンのあることを見出した。さらに、Brown and Gracen (1972) は P I B の有無と Kranz 細胞内の葉緑

体の分布とを関連付け、大まかにみるとPIBのみられる種の葉緑体は求心的に分布しているがPIBのみられない種では遠心的に分布していると報告している。しかし、彼らはDowntonのように三つのPIBパターンは見出していない。その後脱炭酸酵素型の発見によって脱炭酸酵素型とPIBパターンとの間に緒言で述べたような密接な対応関係のあることがわかり、PIBパターンの違いが脱炭酸反応を含めたC₄光合成の炭素代謝の違いを反映していると考えられるようになった。しかし、Downtonの調査した植物種の中には、PIBパターンとその後同定された脱炭酸酵素型との対応が異なっているものがあり、また、Brown and Gracenは鋭いピークのPIBとなだらかなピークのPIBを区別していない。その後、系統的に両者の関係をみた研究はなく、脱炭酸酵素型とPIBパターンとの対応関係には例外の存在する可能性が多く残されている。そこで、本節では、脱炭酸酵素型の発見以来初めて、多数のイネ科C₄種についてPIBパターンを調査し、脱炭酸酵素型との対応関係を再検討し、未同定の種についてはPIBパターンのみによる脱炭酸酵素型の分類を行い、1.での葉構造による分類結果と比較した。

(1) 材料及び方法

供試材料：葉構造を調査した植物種の中から各亜科各属ごとに代表的なもの74種（スズメガヤ亜科 7属24種とキビ亜科16属50種）を選び、それらについてPIBの測定を行った（表I-2参照）。

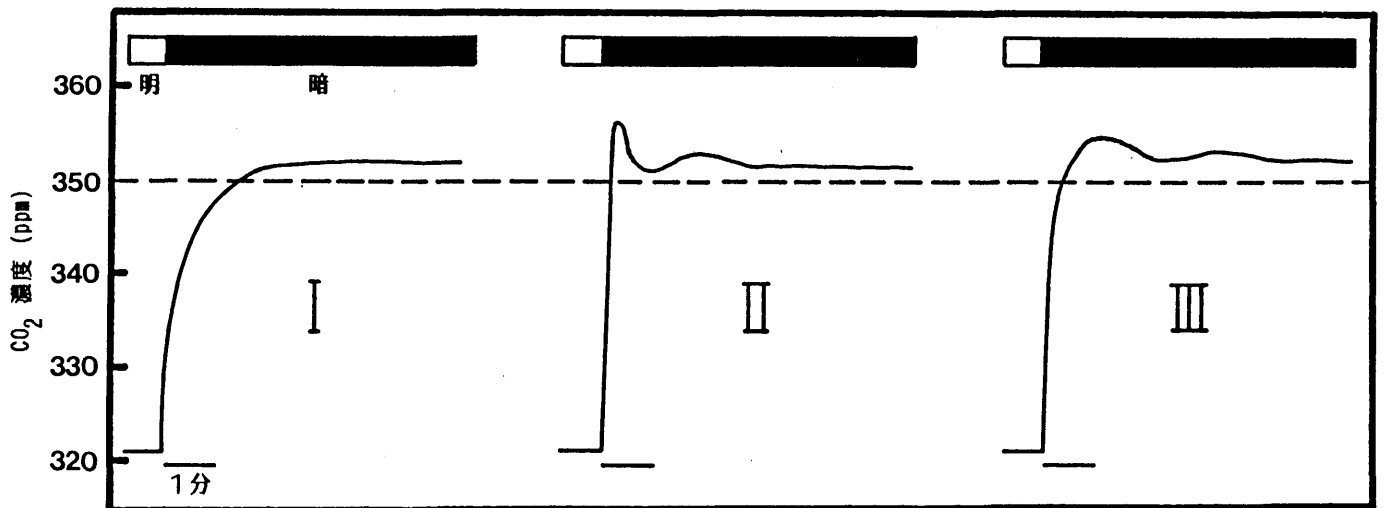
PIBの測定：PIBの測定は1/5000aポットで常法により栽培した植物の最上位展開葉につき行った。測定には厚さ0.6cm、長さ20cmのアクリル製のエアースील型チャンバー(Wolfら, 1969)を使用した。不用空間をできるだけ小さくするために葉幅に応じて幅1.0cm、1.5cm及び2.0cmの三種類のチャンバーを用いた。着生葉を光強度1150 $\mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{sec}$ 、CO₂濃度340±10ppm、葉温33±1°C、空気湿度55±5%、通気量1 l/minの条件に20-30分間置き、光合成速度が定常状態になったことを確認した後、すばやく黒ビニールでチャンバーを覆って、PIBを測定した。暗黒にすることにより葉温は3-4°C急激に低下したが、その後緩やかに上昇してほぼ5分後には照明下での葉温に回復した。測定は個葉の光合成速度が比較的高い時間帯の午前9時から午後2時の間に行った。

(2) 結果及び考察

測定の結果、従来から言われていた通り図 I-2 に示したような三種の P I B パターンが認められた。すなわち、P I B が全くみられずに 3-4 分後に暗呼吸の定常状態に移行するパターン (I 型)、暗期移行約 15 秒後に鋭い P I B を示し、一旦大きく落ち込んでから暗呼吸の定常状態に移るパターン (II 型)、及び暗期移行 1-2 分後になだらかな P I B を示しそのまま暗呼吸の定常状態に移るパターン (III 型) である。三種の P I B パターンのうち II 型は特徴がはっきりしており、他の二種のパターンとは明瞭に区別できた。I 型と III 型とは多くの場合区別できたが、光合成速度が低い場合には III 型の P I B が小さくなり、I 型と区別できない場合もあった。このため、P I B パターンの識別は光合成速度が $40 \text{ mgCO}_2 / \text{dm}^2 / \text{hr}$ 以上の材料についてのみ行った。

表 I-2 には測定した各植物種の P I B パターンを示した。脱炭酸酵素型が同定されている種について P I B パターンをみると、NADP-ME 型 (9 種) は I 型、NAD-ME 型 (16 種) は II 型、PEP-CK 型 (7 種) は III 型のパターンを示した。このように、P I B のパターンは脱炭酸酵素型とよく対応しており、P I B パターンのみによっても脱炭酸酵素型を推定できるものと考えられた。また、葉構造型の違いともよく対応しており、本章で調査した脱炭酸酵素型、葉構造型及び P I B パターンの三者の対応関係を整理すると表 I-4 のようにまとめることができる。

しかし、脱炭酸酵素型の未同定の種の中に、葉構造型と P I B パターンとの対応関係に若干の不一致がみられた。すなわち、スズメガヤ亜科では葉構造が MS-F 型の種は大半が通常の対応関係通り III 型のパターンを示したが、*Chloris barbata*、*Chloris virgata* と *Sporobolus* sp. は I 型のパターンを示した。また、キビ亜科では MS-F 型の種は大半が III 型のパターンを示したが、*Panicum* 属のいくつかの種、すなわち、*P. coloratum* (cv. *Kabulabula* 及び cv. *Solai*)、*P. dichotomiflorum*、*P. laevifolium* 及び *P. longijubatum* は II 型の P I B パターンを示した。*P. coloratum* は前述のように葉構造が MS-P 型の系統と MS-F 型の系統を含んでいるが、MS-P 型の系統だけでなく MS-F 型の系統も明瞭な II 型の P I B パターンを示した。*P. coloratum* については既に Gutierrezら (1974) が脱炭酸酵素型を NAD-ME 型と同定し、さらに、葉緑体の分布についても Kranz 細胞内に均等に分布していると報告している。本研究で用いた MS-P 型の系統にもそのような葉緑体の分布が多くの場合みられたことから、彼らの用いた材料は MS-P



図I-2. C₄ 植物にみられる暗期移行直後のCO₂ 放出現象 (PIB) の3つのパターン。チャンバー入口のCO₂ 濃度は 350ppm。

I, PIBがみられないパターン；II, 暗期移行約15秒後に鋭いピークのPIB (一次PIB) がみられるパターン。多くの場合, 1-2分後にもなだらかなピーク (二次PIB) がみられる；III, 暗期移行 1-2分後になだらかな山形のPIBがみられるパターン。

表 I - 4 . 脱炭酸酵素型 , 葉構造型及び P I B パターンの対応関係
(その 1)。

脱炭酸酵素型	葉構造型	P I B パターン
NADP-ME	KS	I
NAD-ME	MS-P	II
PEP-CK	MS-F	III

型の系統であったと推察される。しかし、P. coloratum は染色体数や外部形態の違いから、P. coloratum var. makarikarienseを含めて、いくつかの生態型に分けられており cv. Kabulabulaや cv. Solai もその一つである (Bryant, 1968; Pritchard and De Lacy, 1974; Bogdan, 1977)。従って、MS-F型の P. coloratumに関しては未だ脱炭酸酵素型は同定されていないものと考えられる。また、P. bergii と P. virgatumは Kranz細胞内の葉緑体が周辺偏在的な分布をしていてMS-P型あるいはMS-F型のどちらとも同定できなかったが、PIBパターンは明瞭なⅡ型であった。このように、Ⅱ型のPIBパターンを示す草種の葉緑体は求心的のみでなく、遠心的あるいは周辺偏在的な分布もとり得ることがわかり、Ⅱ型のPIBパターンは Kranz細胞内の葉緑体の分布の違いとは直接関連していない現象であることが明らかとなった。

I-3. 考察

本実験の目的は従来から言われていた対応関係を再検討することとともに、脱炭酸酵素型の未同定の種を葉構造あるいはPIBパターンによって推定することであった。多数のイネ科C₄植物種につき葉構造とPIBを測定した結果、従来から指摘されているような葉構造、PIB及び脱炭酸酵素型との密接な対応関係が多くの場合あてはまることが明らかとなった。従って、ある植物種の脱炭酸酵素型の推定は、葉構造あるいはPIBパターンのどちらに基づいても、ほぼ誤りなく行えることが確認された。そして、この方式により未同定であった67種の脱炭酸酵素型を推定したところ44種がNADP-ME型、17種がNAD-ME型、16種がPEP-CK型となった。

しかし、葉構造型とPIBパターンの対応関係の合致しない例外的な種がいくつか見出された。Panicum 属の一部の草種、すなわち、P. coloratum (cv. Kabulabulaとcv. Solai), P. dichotomiflorum, P. laevifolium, P. longijubatumは葉構造型がMS-F型であったため葉構造からは脱炭酸酵素型はPEP-CK型と推定された。しかし、これらの種は明瞭なⅡ型のPIBパターンを示したことから、PIBパターンではNAD-ME型と推定された。従来、NAD-ME型の草種が求心的な Kranz細胞内の葉緑体分布をもち、Ⅱ型のPIBパターンを示すという対応関係は例外のないものと考えられてきた。しかし、ここで得られた事実は葉構造とPIBパターンとの対応関係が完璧なものではないということを示しており、次章ではこれらの草種の脱炭酸酵素型を同定することによって脱炭酸酵

素型と葉構造及びPIBパターンの三者の対応関係をもう一度検討したい。

また、*P. bergii*と*P. virgatum*はKranz細胞内の葉緑体が内壁全体に密着する周辺偏在的な分布をしていたため葉構造からは脱炭酸酵素型を推定することはできなかった。しかし、両種とも明瞭なⅡ型のPIBパターンを示したため、PIBパターンによってNAD-ME型と推定した。*P. bergii*は既にNAD-ME型と同定されており(Gutierrezら, 1974), その後の著者らの測定でもNAD-ME型であった。しかし、従来の研究によれば*P. bergii*の葉緑体の分布は求心的(Brown and Gracen, 1972)あるいは遠心的(Hattersley and Browning, 1981)と報告が異なっている。本実験では、観察した三系統(CPI 68858, PI285216, PI372223)とも周辺偏在的な分布をとっていた。このような葉緑体の分布が遠心的、あるいは求心的分布とは異なる独自の分布様式であるのか、あるいは、いずれかの分布の変形したものであるのかは本実験の範囲では明らかではなく、今後の研究に委ねざるを得ない。

スズメガヤ亜科の一部の種では葉構造はMS-F型であったがPIBパターンはⅠ型であったため、脱炭酸酵素型を推定できなかった。しかし、現在までのところ、スズメガヤ亜科には全くNADP-ME種は見出されておらず(Gutierrezら, 1974; Ellis, 1977), また、本測定において、個体によってはⅠ型とⅢ型の間接的なPIBパターンを示すものもみられたことから、これらの種は葉構造型に基づいてPEP-CK種と推定した。

また、*A. adscensionis*は二重のKranz細胞をもっているが、メストム鞘が存在しないため葉構造はKS型とし、また、Ⅰ型のPIBパターンを示したため脱炭酸酵素型をNADP-ME型と推定した。既に、同じ葉構造をもつ同属の*A. purpurea*の脱炭酸酵素型はNADP-ME型と同定されており(Gutierrezら, 1974), *Aristida*属全体としてNADP-ME型と考えられる。しかし、二重のKranz細胞をもつという特徴はイネ科の他のC₄種に例を見ないため、今後その植物分類学上の位置付けが問題になるとともに、C₄光合成の構造と機能との関連を追究するための実験材料としても注目される。

さて、本章で調査したイネ科C₄植物種につき、葉構造とPIBパターンから推定した脱炭酸酵素型を表I-5に整理した。各亜科、族、属レベルの脱炭酸酵素型の分布は従来調査された結果とほぼ一致している(Gutierrezら, 1974; Ellisら, 1977)。すなわち、スズメガヤ亜科に含まれる属はNAD-ME種かPEP-CK種でNADP-ME種はみられない。これに対してキビ亜科の属は大半がNADP-ME種であり、亜科レベルで脱炭酸酵素型の分布が大きく異なっている。このような亜科レベルでの脱炭酸酵素型の分布

表I-5. 葉構造とPIBパターンによって推定した調査草種の脱炭酸酵素型。数字は調査種数を示す。

	NADP-ME	NAD-ME	PEP-CK
Subfamily: Eragrostoideae			
Chlorideae		<u>Bouteloua</u> 1 <u>Chloris</u> 2 <u>Cynodon</u> 1	<u>Bouteloua</u> 1 <u>Chloris</u> 5 <u>Dactyloctenium</u> 1
Eragrosteae		<u>Eleusine</u> 5 <u>Enteropogon</u> 1 <u>Leptochloa</u> 1 <u>Eragrostis</u> 7	
Sporoboleae			<u>Sporobolus</u> 1
Zoysieae			<u>Zoysia</u> 1
Subfamily: Panicoideae			
Andropogoneae	<u>Andropogon</u> 5 <u>Arthraxon</u> 1 <u>Dichanthium</u> 1 <u>Eremochloa</u> 1 <u>Heteropogon</u> 1 <u>Hyparrhenia</u> 3 <u>Miscanthus</u> 1 <u>Sorghum</u> 5 <u>Themeda</u> 1		
Anthephoreae	<u>Anthephora</u> 1		
Aristideae	<u>Aristida</u> 1		
Arundinelleae	<u>Arundinella</u> 1		
Maydeae	<u>Coix</u> 1 <u>Zea</u> 1		
Melinideae			<u>Melinis</u> 2 <u>Rhynchelytrum</u> 1
Paniceae	<u>Axonopus</u> 1 <u>Cenchrus</u> 2 <u>Digitaria</u> 5 <u>Echinochloa</u> 5 <u>Panicum</u> 2 <u>Paspalum</u> 6 <u>Pennisetum</u> 3 <u>Setaria</u> 4 <u>Stenotaphrum</u> 1	<u>Panicum</u> 15	<u>Brachiaria</u> 10 <u>Eriochloa</u> 4 <u>Panicum</u> 6 <u>Pseudobrachiaria</u> 1 <u>Urochloa</u> 4

の違いは脱炭酸酵素型の分化が極めて古い時期に起こったことを示していると考えられる。また、NADP-ME種とNAD-ME種あるいはPEP-CK種は既にみたように、メストム鞘の有無と密接に対応しているが、Brown (1977)はC₄植物がC₃植物から分化する過程で、メストム鞘のみられないNADP-ME種ではC₃植物の葉緑体を含まないメストム鞘が発達して Kranz細胞となり、一方、メストム鞘のみられるNAD-ME種あるいはPEP-CK種ではC₃植物のメストム鞘はそのまま残り、その周りの柔組織細胞がKranz細胞に分化したという仮説を提出している。もし、Brownの言うようにKranz細胞の起源が異なっているとするとNADP-ME種とNAD-ME種あるいはPEP-CK種は異なる環境条件に適応して独立に進化したことも考えられ興味深い。これに対して、スズメガヤ亜科の中には同属内にNAD-ME種とPEP-CK種を含むものがあることからNAD-ME種とPEP-CK種の分化は比較的新しく起こったものと推察される。

II. Panicum属 Dichotomiflora グループ内草種の光合成的炭素代謝

I章において、多数のイネ科 C_4 植物種の葉構造、PIBパターンと脱炭酸酵素型との関係を検討した結果、ほぼすべての草種につき、三者には密接な対応関係がみられ、葉構造あるいはPIBパターンによって脱炭酸酵素型を推定することがおおむね可能であることが確認できた。しかし、Panicum属の一部の種の中に葉構造はMS-F型であるが、PIBはII型のパターンを示すものが見出され、上記の対応関係は必ずしも絶対的なものでないことも明らかとなった。

ところで、Panicum 属は約 600の種を含む大きな属でその中がいくつかの群 (group) あるいは節 (section) に細分されている (Stapf, 1920; Pilger, 1940; Hsu, 1964; Hitchcock, 1971; Brown, 1977)。新たに見出されたMS-F型でII型のPIBパターンを示す種は全て代表的な群である Dichotomiflora グループに属している (Brown, 1977)。このグループは通常に対応関係、すなわち、MS-P型でII型のPIBパターンを示す種も含んでいる (Chippindall, 1955; Brown, 1977)。従って、Dichotomifloraグループはその中が葉構造の点からMS-F型とMS-P型とに分かれており、さらに、グループ内の1種であるP. coloratum では品種・系統によって両方の葉構造型に分かれているという極めて特徴のあるグループであることが明らかとなった。

本章ではこれら Panicum属 Dichotomiflora グループに含まれるMS-F型草種の脱炭酸酵素活性を測定し、脱炭酸酵素型を同定するとともに、 C_4 光合成における炭素代謝機構についても検討し、このグループに属する種の脱炭酸酵素型と葉構造及びPIBパターンとの対応関係を明らかにしようとした。

II-1. P. dichotomiflorum の脱炭酸酵素型の同定

Gutierrez ら (1974) 及び Hatch ら (1975) は多くの C_4 植物の脱炭酸酵素活性を測定し、単子葉及び双子葉 C_4 植物を三つの脱炭酸酵素型に分類したが、Gutierrez らの測定材料の中には P. dichotomiflorum も含まれていた。しかし、この植物種ではいずれの脱炭酸酵素活性も低く、脱炭酸酵素型を同定することはできなかった。そこで、著者は、酵素タンパクを可溶化する等活性測定法を改良することにより、P. dichotomiflorum の脱炭酸酵素型の同定を再度試みた。

(1) 材料及び方法

供試材料：*P. dichotomiflorum*（オオクサキビ）の三豊系と香川系を1/5000a ポットで生育させ、最上位展開葉及びその下の葉を測定に供試した。

粗酵素液の調製：中肋を除去し細断した葉身 1g を冷却した乳鉢にとり、4mlの磨砕液 [50mM HEPES-KOH (pH7.5), 5mM ジチオスレイトール, 2.5mM $MgCl_2$ 及び $MnCl_2$], 100mM Polyclar AT（五協産業）及び 1g 海砂とともに磨砕した。イソアスコルビン酸塩を加えて磨砕する場合には磨砕の直前に 50mg を固体のまま加えた。磨砕液を二重のガーゼで濾過し、その濾液の 1mlはジギトニン処理（0.5%, 10℃, 5 分間）し、残りは未処理のままで10℃, 10,000rpm で 5分間遠心し、その上清を酵素液とした。

活性測定：NADP-ME及びNAD-ME活性は、それぞれ 5mM $MgCl_2$ 及び $MnCl_2$ の存在下で反応の結果生成するNADPH及びNADHの生成速度を 340nmの吸光度上昇で測定した。NAD-MEの活性化剤として FBP(100 μ M)あるいは CoA (50 μ M)を反応液に添加した。PEP-CK活性は 2.5mM $MgCl_2$ 及び $MnCl_2$ の存在下で測定し、消失する1mM オキサロ酢酸の吸光度減少で測定した (Hatch, 1973)。

(2) 結果及び考察

P. dichotomiflorum 葉身の C_4 ジカルボン酸脱炭酸酵素活性を調べたところ、表 II-1 のように、両系統ともNADP-MEは Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} 存在下でも活性が低く、CoA 等によって活性化処理を施しても、活性は高くならなかった。また、PEP-CK活性は全く検出できなかった。これに対して、NAD-ME活性は酵素抽出液の調製法によって大きく異なったが、磨砕液中にイソアスコルビン酸塩を添加して空気酸化を防止し、ジギトニン処理で可溶化を促進すると高い活性を示した。また、 SO_4^{2-} , FBP, CoA 等のNAD-MEに対する特異的な活性化剤を添加することによっても約2倍程度活性化された。こうして得られた値は他の典型的なNAD-ME種の示す活性とほぼ同じレベルにあった (Gutierrez ら, 1974; Hatch ら, 1975)。

Gutierrez らの測定でNAD-ME活性が低かったのは、恐らく空気酸化防止や酵素の可溶化等の測定前処理を施さなかったためと考えられる。*P. dichotomiflorum* ではNAD-MEがミトコンドリアの膜系と強く結合しているために、特に上記のような処理を施し

表II-1. Panicum dichotomiflorum の脱炭酸酵素活性^{a)}。

系統	イソアスコルビン 酸の抽出液への 添加	ジギトニン 処理	NADP-ME		NAD-ME (+Mn ²⁺)				PEP-CK ^{b)}
			Mg ²⁺	Mn ²⁺	—	SO ²⁻	FBP	CoA	
三豊系	-	-	0.77	0.58	0.59	0.77	—	—	0
	+	-	0.77	0.61	2.04	3.44	—	—	—
	+	+	0.80	0.61	3.27	5.29	6.55	6.55	—
香川系	-	-	0.86	0.44	0.45	0.66	—	—	0
	+	-	0.88	0.47	1.56	2.40	—	—	—
	+	+	0.87	0.48	3.00	3.34	6.31	6.66	—

a) 酵素活性は $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ chlorophyllで示した。

b) 対照として測定した Panicum maximum (PEP-CK種) のPEP-CK活性は
5.63 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ chlorophyllであった。

て初めて活性がでてくるものと考えられた。

以上の結果から、葉構造がMS-F型でⅡ型のPIBパターンを示す P. dichotomiflorum の脱炭酸酵素型はNAD-ME型であると結論された。このことは、従来言われてきたNAD-ME型とMS-P型の葉構造との密接な対応関係が必ずしも絶対的なものではないことを意味し、C₄ 光合成の炭素代謝と葉緑体の分布との関係を両者の因果関係として考える場合に重要な情報を与えるものであった。

Ⅱ-2. P. dichotomiflorum 以外の Dichotomiflora グループ内草種の脱炭酸酵素型の同定

P. dichotomiflorum は葉構造がMS-F型であるにもかかわらず、脱炭酸酵素型がNAD-ME型であることが明らかになった。Ⅰ章において P. dichotomiflorum 以外にもこの Dichotomiflora グループ内には葉構造がMS-F型でⅡ型のPIBパターンを示す草種がいくつか認められた。そこで次に、P. dichotomiflorum にみられた葉構造と脱炭酸酵素型の新たな対応関係が他の Dichotomiflora グループ内草種についても共通のものであるかどうかを確認するためにこれらの種の脱炭酸酵素活性を測定した。

(1) 材料及び方法

供試材料：表Ⅱ-2に示したように、葉構造がMS-F型の種であるP. coloratum (cv. Kabulabula及びcv. Solai), P. laevifolium 及び P. longijubatum を供試し、また、同グループ内に属するMS-P型の種であるP. coloratum, P. coloratum var. makarikariense, P. lanipes 及び P. stapfianum も併わせて測定に供試した。

測定方法：Ⅱ-1. と同様である。

(2) 結果及び考察

表Ⅱ-2に示したように、調査した Dichotomiflora グループ内草種はその葉構造型の違いにかかわらず、脱炭酸酵素活性についてはすべて同じ傾向を示した。すなわち、NADP-ME活性はMg²⁺存在下でも極めて低く、PEP-CK活性は全く認められなか

表Ⅱ-2. Panicum 属 Dichotomiflora グループ内草種の脱炭酸酵素活性。

葉構造型 ^{a)}	種	品 種 または 系 統	脱炭酸酵素活性 ^{b)}		
			NADP-ME	NAD-ME ^{c)}	PEP-CK ^{d)}
PS-P	<u>Panicum coloratum</u>	PI364948	0.47	3.96	0
		73-294	0.46	3.95	0
	<u>P. coloratum</u> var. <u>makarikariense</u>	CPI14375	0.81	5.57	0
		N780	0.71	4.81	0
	<u>P. lanipes</u>	PI185560	1.08	3.59	0
	<u>P. stapfianum</u>	PI208017	0.58	3.95	0
PI208246		0.79	4.58	0	
PS-F	<u>P. coloratum</u>	Kabulabula CPI17446	0.46	5.15	0
		Kabulabula PI253240	0.43	5.07	0
		Solai GR-23	0.41	4.66	0
		Solai Yukijirushi	0.52	5.27	0
	<u>P. laevifolium</u>	S. Africa-Kei	0.69	4.13	0
	<u>P. longijubatum</u>	PI189614	0.24	3.91	0

a) 表Ⅰ-1 参照。

b) 酵素活性は $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ chlorophyllで示した。

c) CoA により活性化された値。

d) Chloris gayana (PEP-CK種) のPEP-CK活性は $9.36\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ chlorophyllであった。

った。これに対して、NAD-ME活性は高く、表Ⅱ-1の P. dichotomiflorum の結果と同様にFBPあるいはCoAによって活性化された。

この結果、Dichotomifloraグループに属する種はすべてNAD-ME種であるが、葉構造型ではMS-F型の種（以後NAD-ME（F）種）とMS-P型の種（以後NAD-ME（P）種）とに分化していることが明らかとなった。特に、P. coloratum では種内が品種・系統によってMS-F型とMS-P型に分化していることが注目された。

ところで、これらのDichotomifloraグループに属する草種の中でもすでにPIBや脱炭酸酵素活性が調べられているものがいくつかある。P. laevifolium は従来の報告ではPIBを示さず（Downton, 1970）、また、いずれの脱炭酸酵素活性も極めて低かった（Gutierrezら, 1974）。これに対し、本実験では鋭いⅡ型のPIBを示し、また、NAD-ME活性もジキトニンによる可溶化処理により高い活性を示した。また、Gutierrezら（1974）はP. coloratum をNAD-ME型と同定しているが、既に述べたように、P. coloratum はいくつかの生態型を持っている。Pritchard and De Lacy（1974）は外部形態と染色体数により、P. coloratum をA（var. makarikariense, 主に $2n=36$ ）、B（cv. Kabulabula, $2n=36$ ）、C（cv. Solai, $2n=54$ ）、D（cv. Klein等, 主に $2n=36$ ）、E（小型の系統, $2n=18$ ）の5つの生態型に分類している。本実験で供試した系統はそのうちの4つの生態型に属しており、4つの生態型のうち、A型とD型はMS-P型であり、B型とC型はMS-F型であった。葉緑体の分布の違いは植物分類上の指標としてまだ用いられていないが、遺伝的に固定された形質と考えられるため、P. coloratum は種内を二分して、葉緑体の分布の異なる生態型を別種として扱うのが妥当であろうと考えられた。

Ⅱ-3. P. dichotomiflorum の光合成的炭素代謝機構

前節までの結果から、Panicum 属Dichotomifloraグループの一部の草種は葉構造型がMS-F型でありながら脱炭酸酵素型はNAD-ME型であるという通常に対応関係とは異なった対応関係を示すことが明らかになった。しかし、このNAD-ME（F）種が典型的なNAD-ME型の光合成的炭素代謝を示すのかどうかはまだ未検討である。そこで、本節ではP. dichotomiflorum葉身における $^{14}\text{CO}_2$ の各光合成産物への取り込み様式、葉肉細胞内の C_4 光合成に関連した諸酵素の活性と細胞内の存在場所を調べ、NAD-ME（F）種の光合成的炭素代謝機構を明らかにしようとした。本実験は、東京大学応用微生物

物研究所 宮地重遠教授の指導のもとで武藤尚志助手の協力を得て行った。

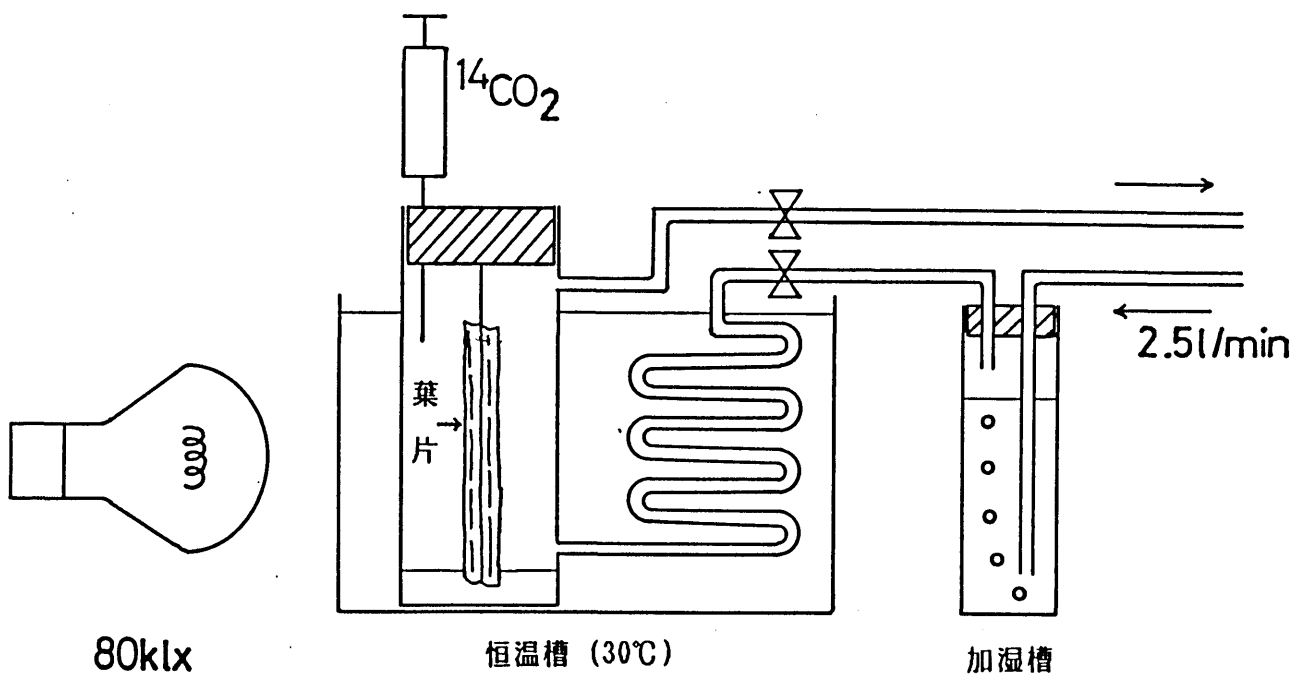
(1) 材料及び方法

供試材料：材料は光強度，40,000lux；室温，25℃；日長，16hrの条件に設定されたグロースキャビネット内で生育させた。 $^{14}\text{CO}_2$ を用いた光合成の固定反応の実験には7-8葉期の，また， C_4 光合成関連酵素活性の測定には4-6葉期の最上位展開葉を供試した。

$^{14}\text{CO}_2$ 固定反応：図Ⅱ-1に示したように，容積140mlの石英ガラス製チャンバー内に長さ約14cm，新鮮重0.2-0.3gの葉片を固定し，80kluxのタングステンランプで照射しながら，30℃の加湿空気を2.5l/minの流速で流し，40-60分間光合成を行わせた。その後，閉鎖系にして $^{14}\text{CO}_2$ (16 μCi)を5mlチャンバー上部より打ち込み $^{14}\text{CO}_2$ の固定反応を開始させた。打ち込みによりチャンバー内の CO_2 濃度は350ppmから550ppmに上昇した。

実験は連続して $^{14}\text{CO}_2$ を葉に取込ませ $^{14}\text{CO}_2$ の全固定量と各産物への取込み量を調べるタイムコース実験と30秒間 $^{14}\text{CO}_2$ を固定させた後 $^{12}\text{CO}_2$ 下に葉片を移し ^{14}C の各産物間での移動をみるパルス/チェイス実験を行った。両実験とも，一定時間毎に葉をチャンバーから取り出し，液体窒素中で反応を停止させた。次にエタノールで稀釈した10%酢酸中でキリングし，60℃のエタノール中で抽出した。残渣は60℃で乾燥させ不溶性画分の ^{14}C 固定量を測定した。可溶性画分は減圧濃縮して二次元のペーパークロマトグラフィにかけ各産物を分離した後，ラジオオートグラムを作成し，各スポットの放射能をGM管で測定することによって各産物への ^{14}C の取込み量を測定した (Miyachi and Hogetsu, 1970)。

葉肉細胞内の C_4 光合成関連酵素活性：葉肉細胞のプロトプラスト化はEdwardsら (1979)及びKanai and Edwards (1973)の方法により行った。1mm以下に細断した葉片を酵素液 (1%セルラーゼ オノズカRS, pH5.5)で0.5-1時間処理した後，茶こし，40 μm ナイロンメッシュで未消化部分及びKranz細胞ストランドを除いた。濾液を300 \times gで2分間遠心し，沈澱物を，0.5Mショ糖液に懸濁させ，同量の0.5Mソルビトール液を上置して，さらに，遠心し，境界面に葉肉細胞プロトプラストを集めた。このようにして集めた葉肉細胞プロトプラストを10 μm ナイロンメッシュを通すことにより破碎し，遠心して，葉緑体 (300 \times g沈澱)，ミトコンドリア (15,000 \times g沈澱)及び細胞質 (15,000



図Ⅱ-1. 葉片を用いた $^{14}\text{CO}_2$ 固定反応装置。

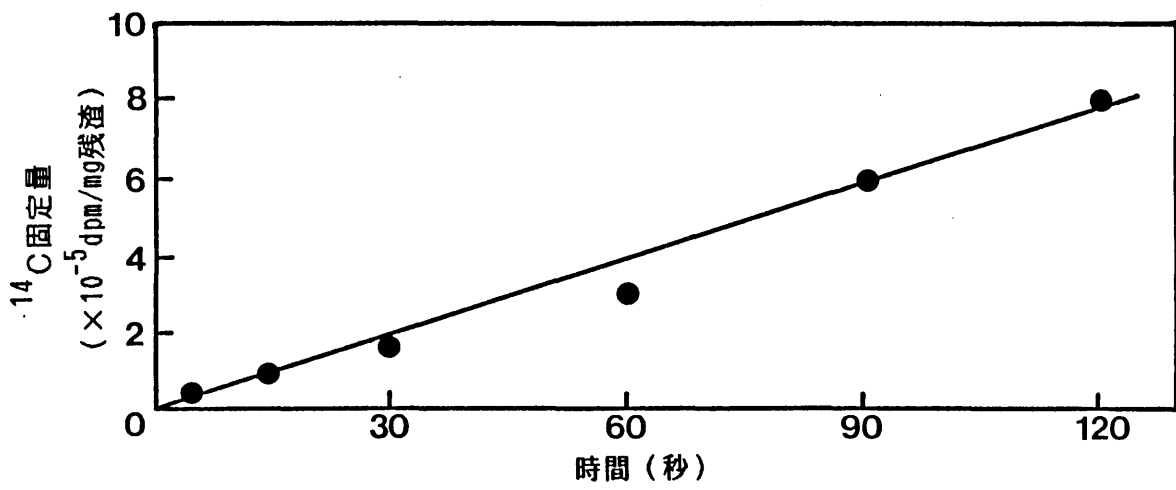
×g 上清)の各画分を得た。それぞれの画分について、表Ⅱ-3に示したC₄ 光合成関連酵素活性を常法に従って測定し、各酵素の細胞内の存在場所を検討した。必要な場合には測定前に活性化処理を施した。

(2) 結果及び考察

まず、*P. dichotomiflorum* の葉身を¹⁴CO₂ を含む空気中に置き、¹⁴CO₂の固定量と各産物中の¹⁴C量を調べた。図Ⅱ-2に示したように、¹⁴CO₂の固定量は120秒間にわたり直線的に上昇し、また、その値も光合成速度に見合った大きさであったことから本実験において光合成反応は正常に行われたものと考えられた。各産物への¹⁴Cの取り込み様式は今まで他のNAD-ME(P)種について報告された結果とほぼ一致していた(図Ⅱ-3)。すなわち、¹⁴Cは最初の15秒間に、アスパラギン酸へ急激に取り込まれ、その後もこのアスパラギン酸への取り込みは緩かに増加していた。しかし、リンゴ酸への取り込みはごくわずかであった。PGA、糖リン酸への取り込みはアスパラギン酸への取り込みに少し遅れて行われた。ショ糖、グルタミン酸/グリシン/セリンへの¹⁴Cの取り込みはさらに遅れ、60秒以後急激に増加した。グルタミン酸/グリシン/セリンへの¹⁴Cの取り込み量のうち約90%はセリンへ取り込まれていた。

次に、¹⁴CO₂を含んだ空気を30秒間流し、¹⁴CO₂を取り込ませたあとは通常の空気を流すパルス/チェイス実験を行った。その結果、まず、図Ⅱ-4に示したように、30秒間の¹⁴CO₂パルス後の葉中の全放射能の変動はほとんどなく、取り込まれた¹⁴Cは葉内でCO₂固定産物の間を移行していたことが確認された。図Ⅱ-5には¹⁴Cの各産物内の分布を示したが、パルス中にアスパラギン酸に最も多く取り込まれた¹⁴Cはその後の通常空気下のチェイス時に急激に減少した。これに対してリンゴ酸の¹⁴Cは取り込まれた量も少なく、チェイス時の移動もわずかであった。チェイス開始時には強くラベルされていたPGAはアスパラギン酸とほぼ平行して減少し、糖リン酸もチェイス開始後10秒で一旦増加するが、その後はPGAと同様に減少した。これらの代謝物の¹⁴Cの減少分は大半がショ糖へ蓄積され、アラニン、グルタミン酸/グリシン/セリンへの移動はごくわずかであった。

以上二つの結果は、¹⁴Cはアスパラギン酸に主に取り込まれ、PGAを経由してショ糖へと移行していくことを示しており、*P. dichotomiflorum*は典型的な“aspartate former”



図Ⅱ-2. 葉片に固定された全 ^{14}C 量の経時変化。

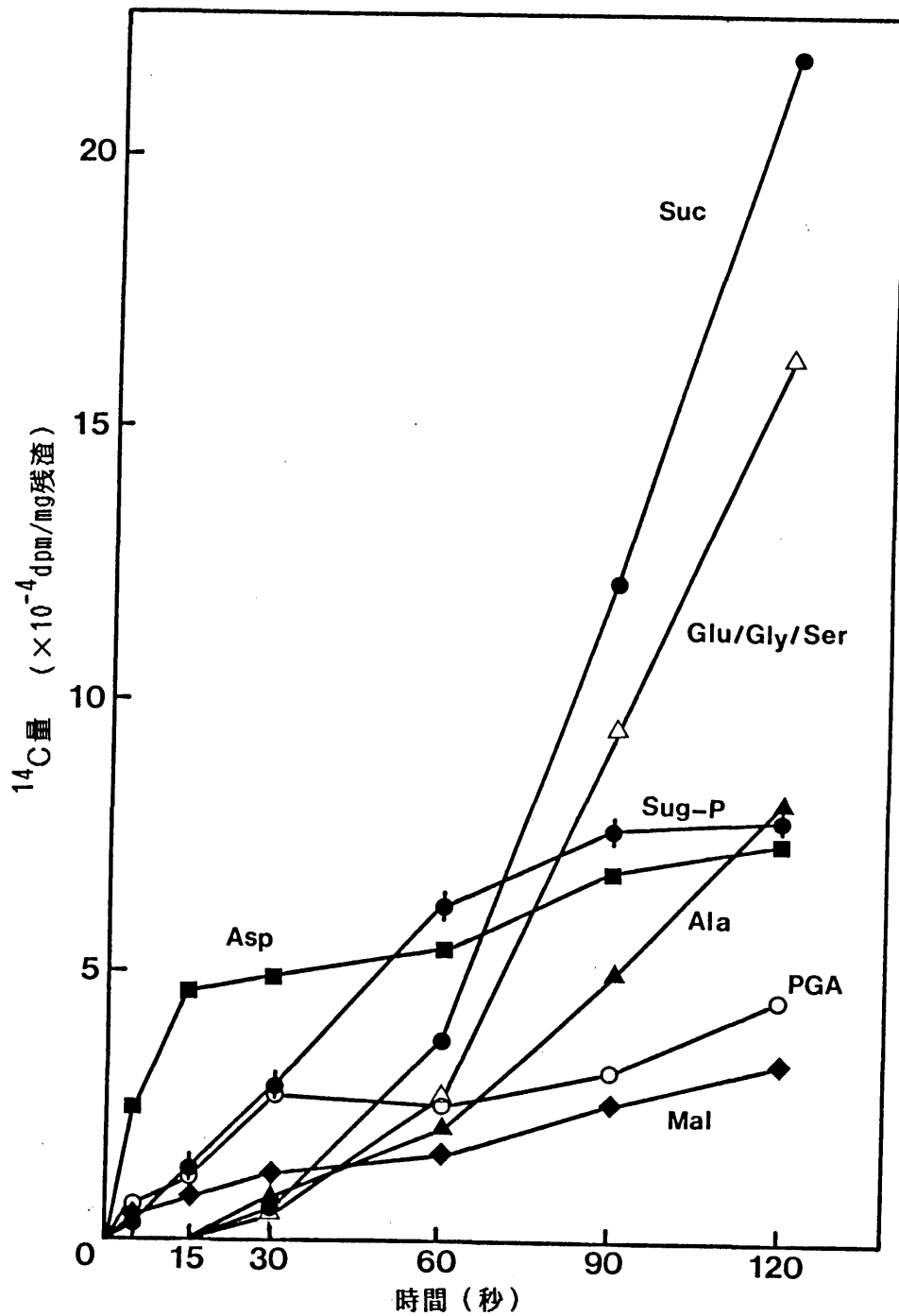
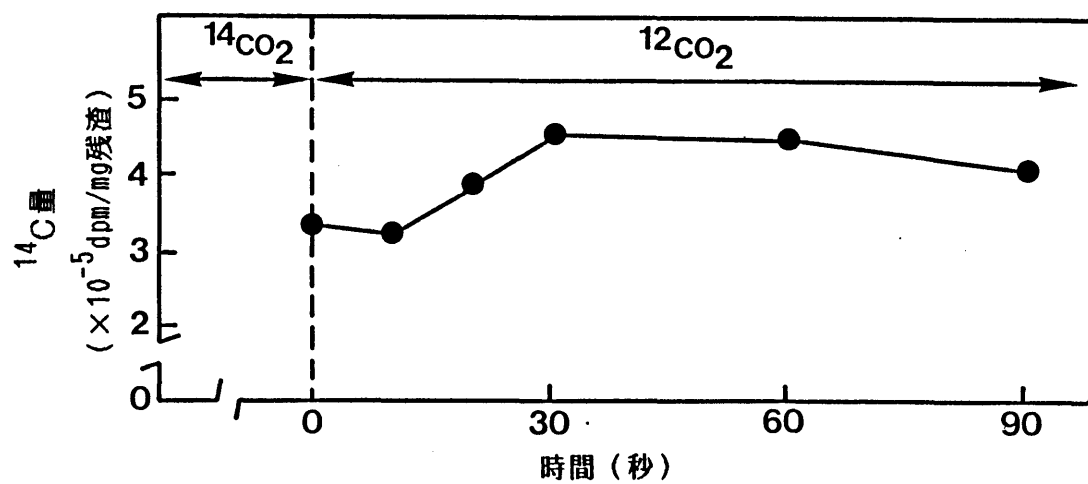


図 II-3. タイムコース実験における各産物内の¹⁴C量の経時変化。
 Ala, アラニン; Asp, アスパラギン酸; Glu, グルタミン酸; Gly, グリシン;
 Mal, リンゴ酸; PGA, フォスフォグリセリン酸; Ser, セリン; Suc, ショ糖;
 Sug-P, 糖リン酸。



図Ⅱ-4. パルス/チェイス実験におけるチェイス時の全 ^{14}C 量の経時変化。

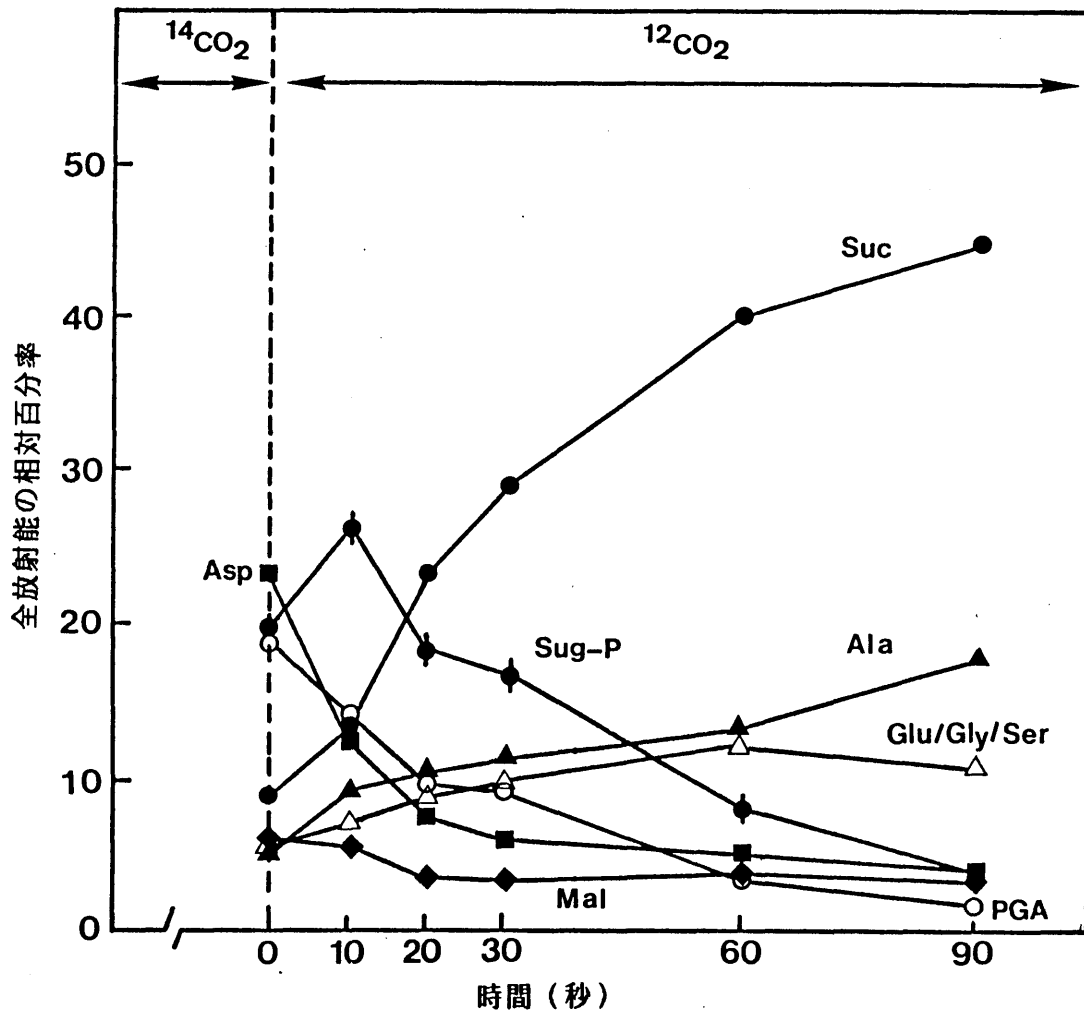


図 II-5. パルス/チェイス実験におけるチェイス時の各産物内の¹⁴C量の経時変化。各産物の略号は図 II-3 参照。

(Downton, 1970) であることがわかった。従って、このことからNAD-ME (F) 種は従来のNAD-ME (P) 種とCO₂ の固定・代謝反応の面では全く同じであることが明らかとなった。

次に、葉肉細胞内のC₄ 光合成に関連したいくつかの酵素の活性と細胞内の存在場所を調べた。まず、本実験における葉肉細胞標品に Kranz細胞の混入がないかどうかを見てみると、表II-3に示したように Kranz細胞に局在するRuBPカルボキシラーゼ活性が葉肉細胞に局在するPEPカルボキシラーゼの活性に比べて極めて低く、Kranz細胞の混入がほとんどない純度の高い葉肉細胞標品が得られていることが確認された。葉肉細胞の各画分に含まれる酵素の活性をみると、葉緑体ではピルビン酸リン酸ジキナーゼ、NADPリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、細胞質では、PEPカルボキシラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、ミトコンドリアではチトクロムCオキシダーゼが各々細胞内全活性の80%以上の高い活性を示し、これらの酵素は局在性の高いことが示された。一方、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは主に細胞質に存在するものの、他の画分にも認められ、また、NADリンゴ酸デヒドロゲナーゼは細胞質とミトコンドリアの両画分に主に認められた。このような各酵素の細胞内存在場所は従来のNAD-ME (P) 種の示す傾向と同様であった。また、NADPリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性に比べてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの活性が著しく高く、酵素活性の面からも、この種が典型的な“Aspartate former”種であることが明らかにされた。

以上のようなP. dichotomiflorum における¹⁴CO₂ の各光合成産物への取込み様式と葉肉細胞内のC₄ 光合成関連酵素の活性と存在場所から判断すると、NAD-ME (F) 種の基本的なC₄ 光合成の炭素代謝機構はNAD-ME (P) 種のそれと全く同じものと考えられる。この点を、さらに確めるために別のNAD-ME (F) 種である P. laevifoliumについてもC₄ 光合成関連酵素の活性と存在場所を調べたが、P. dichotomiflorum と同様な結果を得、上記の結論は正しいものと考えられた(表II-4)。

II-4. 考察

本実験により、Panicum 属 Dichotomiflora グループには、Kranz細胞内の葉緑体が求心的に分布するNAD-ME (P) 種と遠心的に分布するNAD-ME (F) 種が存在すること、及び、両者の基本的な光合成の炭素代謝機構は同じであることが明らかとなった。

表II-3. Panicum dichotomiflorum の葉肉細胞プロトプラスト (MP) 内におけるC₄ 光合成関連酵素活性の分布。

	MP 破碎液 ($\mu\text{mol}/\text{mg chl. hr}$)	MP 破碎液	300 \times g 沈澱 ($\mu\text{mol}/\text{ml sample. hr}$)	15,000 \times g 沈澱	15,000 \times g 上清
PEP カルボキシラーゼ	732	41.1	1.9(4)	0.0(0)	46.9(96)
RuBPカルボキシラーゼ	1.2	0.98	0.80(68)	0.37(32)	0.00(0)
ピルビン酸リン酸ジキナーゼ	122	6.9	6.9(90)	0.2(3)	0.4(7)
アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ	628	35.2	4.2(14)	6.1(21)	18.9(65)
アラニンアミノトランスフェラーゼ	1426	80.0	4.8(7)	1.9(3)	65.5(91)
NADPリンゴ酸デヒドロゲナーゼ	19	1.1	0.9(100)	0.0(0)	0.0(0)
NAD リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	1331	74.7	13.3(17)	38.5(48)	27.8(35)
チトクロムCオキシダーゼ		114.6	0.0(0)	100.8(100)	0.0(0)

表II-4. *Panicum laevifolium* の葉肉細胞プロトプラスト (MP) 内におけるC₄ 光合成関連酵素活性の分布。

	MP 破碎液 ($\mu\text{mol}/\text{mg chl. hr}$)	MP 破碎液	300 \times g 沈澱 ($\mu\text{mol}/\text{ml sample. hr}$)	15,000 \times g 沈澱	15,000 \times g 上清
PEP カルボキシラーゼ	917	110.0	3.4(3)	103.1(95)	1.7(7)
RuBPカルボキシラーゼ	N. D. ^{a)}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
ピルビン酸リン酸ジキナーゼ	201	24.3	21.8(82)	3.0(11)	1.9(7)
アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ	1061	81.5	16.0(26)	40.8(66)	5.0(8)
アラニンアミノトランスフェラーゼ	2976	360.4	19.0(5)	336.8(94)	1.5(0)
NADPリンゴ酸デヒドロゲナーゼ	10	1.2	1.7(100)	0.0(0)	0.0(0)
NAD リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	1163	137.1	29.0(19)	59.0(39)	63.2(42)
チトクロムCオキシダーゼ		131.3	0.0(0)	0.0(0)	176.3(100)

a) N. D., 活性なし。

この事実は Kranz細胞内の葉緑体の分布がNAD-ME型の光合成機構と因果関係をもって対応しているものではないということを示している。また、I章において *Dichotomiflora* グループの草種は葉緑体の分布とは無関係にII型のPIBを示したが、本実験の結果から、このII型のPIBパターンはNAD-ME型の光合成機構と密接に関連した特性であることが明らかとなった。従って、この実験結果は、葉緑体の分布とC₄光合成の炭素代謝機構及び葉緑体の分布とPIBパターンを切り離して考えることを可能にしたという点でC₄光合成の機能と構造の問題をさらに深く研究するために貴重な情報を提供したと考えられる。特に、PIBと葉緑体分布が無関係であることから、三種のPIBの発生機構の違いを直接脱炭酸酵素型の違いと結びつけて検討することができるものと考えられる。しかし、現在までのところ、PIBの発生機構について十分に検討されているとは言い難く、三種のパターンの違いについても納得の得られる説明はなされていない。そこで、III章では三種のPIBをCO₂交換の面から相互に比較して、その発生機構を検討したい。また、NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種が *Dichotomiflora* グループという植物学的な分類では同一のグループに属しているということは、両者が極めて近縁性の高い関係にあることを意味し、従って、葉緑体の分布は少数の遺伝子により決定されていることをうかがわせる。また、もし、両者で生態的な適応の面で差異がみられるならば、葉緑体の分布の違いを環境適応の違いと直接結びつけて考えることも可能になると思われる。IV章以下ではこれら *Dichotomiflora* グループ内のNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種をさまざまな角度から比較検討して、葉緑体の分布の決定要因を探っていきたい。

ところで、I章において葉構造あるいはPIBパターンによって脱炭酸酵素型をほぼ間違いなく推定することができることが確認された。しかし、本章で、NAD-ME型でありながらも葉緑体が遠心的に分布している種が存在することが明らかとなったので、脱炭酸酵素型、葉構造型、PIBの対応関係は表II-5のように再整理することができる。従って、脱炭酸酵素型の推定を行う場合、葉構造がMS-F型の種についてはPIBパターンをあわせて測定する必要があり、もしその種がII型のPIBパターンを示せば脱炭酸酵素型はNAD-ME型、もしIII型のPIBを示せばPEP-CK型と推定して間違いないと考えられる。

こうした基準に従い、供試した *Panicum*属に含まれる種の脱炭酸酵素型を整理すると表II-6のようになる。*P. bergii* と *P. virgatum* は Kranz細胞内の葉緑体が周辺偏在的な分布をしていたが遠心的な分布とは明瞭に区別でき、Kranz細胞の形等がNAD-ME

表Ⅱ-5. 脱炭酸酵素型, 葉構造型及びPIB
パターンの対応関係(その2)。

脱炭酸酵素型	葉構造型	PIB
NADP-ME	KS	I
NAD-ME	MS-P あるいは MS-F	II
PEP-CK	MS-F	III

表Ⅱ-6. 脱炭酸酵素活性と葉構造に基づいた Panicum種の分類。

NADP-ME	NAD-ME(F)	NAD-ME(P)	PEP-CK
Group: Obtusa <u>P. obtusum</u> H. B. K.	Group: Dichotomiflora <u>P. coloratum</u> L. (cv. Kabulabula)	Group: Dichotomiflora <u>P. coloratum</u> L. (cv. Klein) <u>P. coloratum</u> L. var. <u>makarikariense</u> Goosens	Group: Fasciculata <u>P. molle</u> Michx. <u>P. ramosum</u> L. <u>P. texanum</u> Buckl.
Group: Plena <u>P. antidotale</u> Retz.	<u>P. coloratum</u> L. (cv. Solai) <u>P. dichotomiflorum</u> Michx. <u>P. laevifolium</u> Hack. <u>P. longijubatum</u> Stapf	<u>P. lanipes</u> Mez. <u>P. stapfianum</u> Fourc. Group: Diffusa <u>P. bergii</u> Arech. a) <u>P. dregeanum</u> Nees <u>P. hallii</u> Vasey	その他の <u>Panicum</u> <u>P. deustum</u> Thunb. <u>P. infestum</u> Anderss. ex Peters <u>P. maximum</u> Jacq. <u>P. maximum</u> Jacq. var. <u>trichoglume</u> Eyles
		Section: Panicum <u>P. capillare</u> L. <u>P. miliaceum</u> L. <u>P. virgatum</u> L. a)	
		Section: Repentia <u>P. decompositum</u> R. Br.	
		その他の <u>Panicum</u> <u>P. queenslandicum</u> Domin <u>P. seminudum</u>	

a) 表Ⅰ-2 の脚注参照。

(P) 種に類似していたのでここではNAD-ME (P) 種に含めて分類した。

Panicum 属はここに示したようなC₄ 種の三つの脱炭酸酵素型のほかにC₃ 種や P. milioides のようなC₃ 種とC₄ 種の間種も含み、光合成の研究にとって極めて重要な植物群である。現在 Panicum属は属内が四つの亜属に分かれており、さらに、表II-6に示したように、その中が種相互の近縁性程度によりいくつかの群に細分されている (Hsu, 1965; Brown, 1977)。近年、この Panicum属に属する種の光合成に関する研究情報をふまえて Panicum属内を再分類しなおす試みがなされつつある。例えば、Brown (1977) は葉構造型のKS型とMS型は発生学的に極めて遠縁であることやPEP-CK種は穎花の構造が Brachiaria 属に近いことなどをその理由として、NAD-ME種だけを Panicum属の構成種とすべきだと主張している。Dichotomifloraグループ内の種も含め、Panicum 属のNAD-ME種はすべて典型的な Panicumといわれている Panicum亜属に属しているが、Brownのこのような主張はPanicum 属をキビ亜科で唯一のNAD-ME種だけからなる属とみなすことになり、Panicum 属の植物分類上の位置が今後の問題となろう。また、本実験で明らかになったように、Panicum 属のNAD-ME種は Kranz細胞内の葉緑体分布が多岐にわたっており、光合成に関する機能と構造との関係を考える上で興味深い研究素材であると考えられる。

Ⅲ. 暗期移行直後のCO₂ 放出現象 (PIB) の発生機構の解明

イネ科C₄植物のPIBにはI章でみたように、三つのパターンが認められ、それぞれ三種の脱炭酸酵素型とよく対応していた。特に、脱炭酸酵素型が同じNAD-ME型でもKranz細胞内の葉緑体の分布を異にするNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の両方で、PIBは同様なII型のパターンを示したことから、II型のパターンは、葉緑体の分布とはかかわりなくNAD-ME型のC₄光合成の炭素代謝を直接反映した現象と考えられた。

C₃植物のPIBは光呼吸によって放出されるCO₂がその由来であることが確認されている。そのことを証明している一例として低O₂濃度(2%)条件下で光呼吸を抑えるとPIBもみられなくなるということがある(Forresterら, 1966a)。C₄植物でみられるII型の鋭いPIBがC₃植物のPIBとは異なって光呼吸由来ではないということは、低O₂条件下でもPIBがなくなり、形も21%O₂下と変わらないという点から明らかである(Bjorkman, 1968)。また、Wynnら(1973)は暗期に移行する直前(5秒前)に取り込ませた¹⁴Cのうち、NAD-ME型のイネ科C₄植物では約35%が暗期移行後1分以内に放出されるが、C₃植物では約3%と低く、C₄植物のPIBの1/3が暗期移行直前に取り込まれたCO₂に由来していると報告している。これらの点から、C₄植物のPIBはCO₂の代謝に時間のかかる光呼吸ではなく、C₄ジカルボン酸の脱炭酸反応によって生じたCO₂がカルビン回路で固定されずに葉外に放出されるためであろうと考えられている。

しかしながら、他の二つのパターンも含めてその発生機構をCO₂交換の面から検討した例は少ない。その一つの原因はPIBをパターンとしては識別できても、三者を相互に比較できる量的な指標が見出されていないことである。そこで、本実験では、まず、PIBの数量化を試み、次いでPIBに及ぼす光強度、CO₂濃度等の環境要因の影響をパターンと数量化されたパラメーターの両者について検討し、三種のPIBの発生機構をCO₂交換の面から明らかにしようとした。

Ⅲ-1. 脱炭酸酵素型とPIB初期勾配との関係

PIBの大きさを数量化する方法としては、まず、PIBの先端の高さをそのまま

PIBの大きさとする方法が挙げられる。しかし、この方法ではCO₂の放出速度やPIBによる全CO₂放出量はわからない。そのため、観察されたCO₂濃度変化を微分してCO₂放出速度としてとらえる方法が考えられ、今までにもいくつかの測定例がみられる(Forresterら, 1966a; Tregunnaら, 1966; Bulley and Tregunna, 1971; Doehlertら, 1979)。また、一定CO₂濃度(例えば暗呼吸レベルの濃度)以上のCO₂濃度変化曲線を積分して全CO₂放出量を知る方法もとられている。さらに、Peterson(1983a, 1983b)はCO₂濃度変化を非定常状態の濃度変化としてモデル化してPIBを推定している。しかし、多数草種のPIB比較を行う場合には、パターン全体の微分法や積分法では計算に時間がかかる等の問題点がある。

そこで、本実験では暗期移行直後に起こるCO₂濃度上昇時の勾配をPIB初期勾配として数量化し、PIBの大きさの比較を行うことにした。また、NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種については、一定CO₂濃度以上のCO₂放出量を積分法によって求め相互の比較を行った。

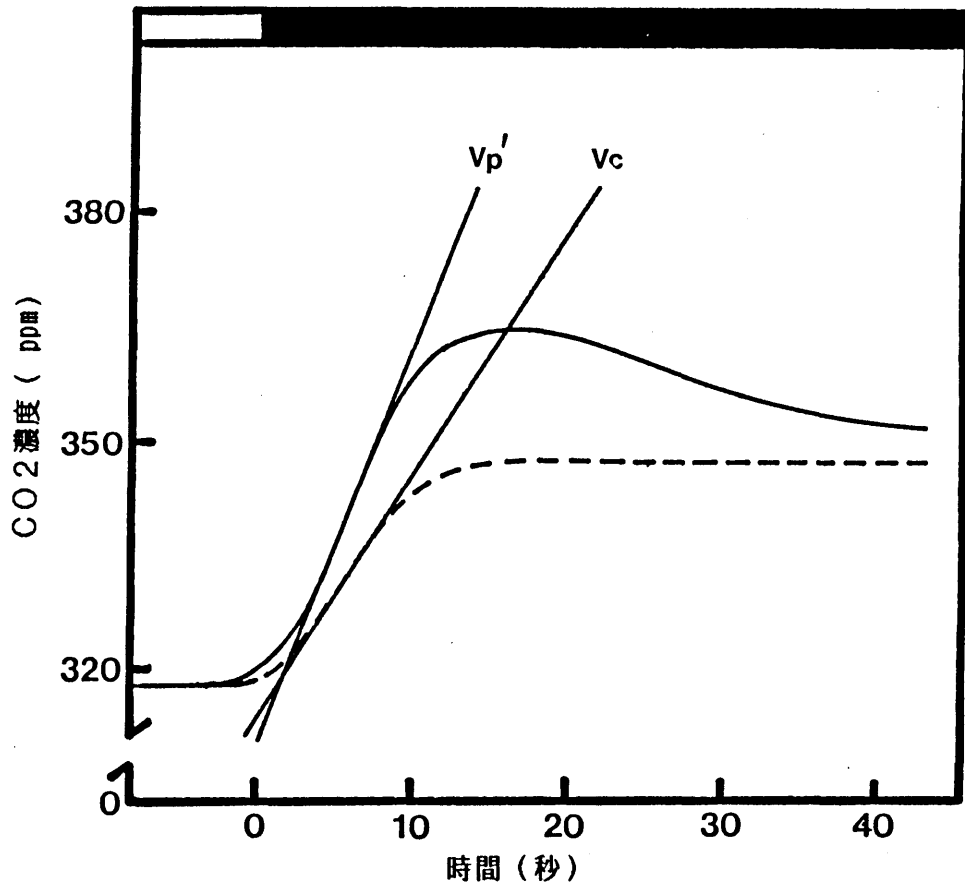
(1) 材料及び方法

供試材料: I-2. においてPIBパターンを測定したものと同一材料を供試した(表I-2参照)。

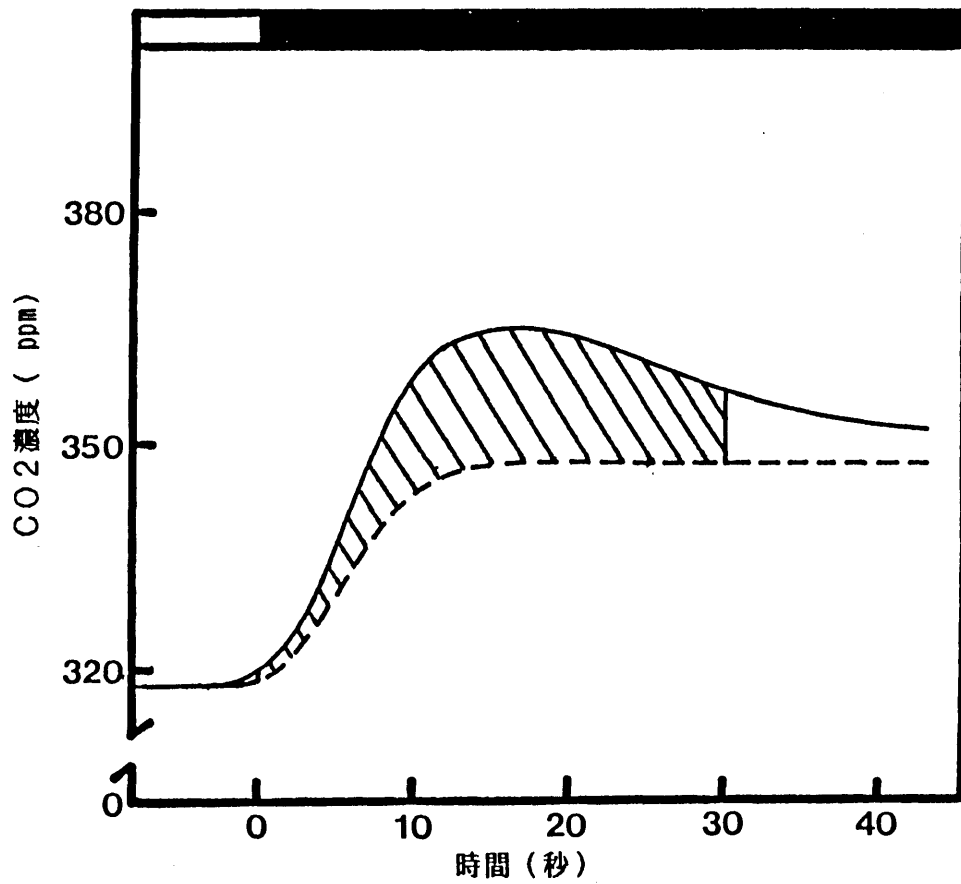
測定方法: I-2. と同じ方法によった。なお、PIB初期勾配(V_p)は次式により求めた(図III-1参照)。

$$V_p = V_p' - V_c$$

ここで V_p' はPIB(実線)の立ち上がり曲線の接線。 V_c は標準曲線(破線)の接線である。標準曲線は定常状態で光合成を行っている状態で、葉身を測定チャンバーより抜きとった時に示すチャンバー出口のCO₂濃度変化パターンであり、赤外線CO₂ガス分析計のCO₂濃度変化に対する応答速度をあらわしている。従って、 $V_p > 0$ の場合は、PIB曲線の接線勾配が標準曲線のそれよりも大きいことを示し、暗期移行直後にCO₂を放出したこと、すなわち、PIBのあったことを表わす。逆に、 $V_p < 0$ の場合は、暗期移行直後はまだ葉によるCO₂の吸収が続いていることを示す。



図Ⅲ-1. *P. coloratum* (cv. Kabulabula) のPIBパターン(Ⅱ型)。
 実線は葉を入れた状態でのチャンバ出口のCO₂濃度変化。破線は
 暗期移行とともに葉をチャンバより抜いたときのCO₂濃度変化。



図Ⅲ-2. 積分法によるPIB量(E)計算のための模式図。

また、積分法によるPIB量(E)の測定は、図Ⅲ-2に示したように、暗期移行後30秒間の標準曲線と実測したPIB曲線との間の面積(図中の斜線部分)を計算して求めた。

(2) 結果及び考察

各草種につきPIBの初期勾配(V_p)を測定したところ、V_pは供試草種全体で-176.8~ +261.9の間で広範囲に変動した。そして、異なる脱炭酸酵素型の間でもV_pに大きな違いがみられた(表Ⅲ-1)。すなわち、NADP-ME種のV_pは全て負の値であり平均-108.0と最も小さい値を示した。NAD-ME(P)種のV_pは平均+168.2で全て正の値であり、スズメガヤ亜科種とキビ亜科種の間には大きな差はなかった。NAD-ME(F)種のV_pは平均で+145.8であり、NAD-ME(P)種とほぼ同様の値であった。PEP-CK種のV_pは大半が負の値であり、平均では-46.8とNADP-ME種とNAD-ME種の間値を示した。しかし、キビ亜科のPEP-CK種のV_pは-64.7とスズメガヤ亜科の-23.8より低く(両者の差は5%水準で有意)、NADP-ME種のV_pと同程度の低い値を示す草種もあった。

積分法によって求めたPIB量(E)をNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種との間で比較したが、葉面積あたりあるいは新鮮重あたりのPIB量とも、両者の間で有意な差はなかった(表Ⅲ-2)。

以上のように、脱炭酸酵素型の違いはV_pの違いと密接に対応していることが明らかとなり、V_pは各々の脱炭酸酵素型のC₄光合成炭素代謝を何らかの形で反映しているものと考えられた。V_pが正あるいは負の値をとるということは(1)材料及び方法でも述べたように暗期移行直後のCO₂の放出あるいは吸収を示している。従って、本実験の結果、正の値を示したNAD-ME(P)種とNAD-ME(F)種では暗期移行直後にCO₂を放出しているのに対し、負の値を示したNADP-ME種とPEP-CK種では暗期移行直後はまだ明期と同様にCO₂の吸収が続いており、しかも、NADP-ME種はPEP-CK種よりも低い値を示したため吸収程度が大きかった。

ところで、C₄植物のCO₂固定はまず、葉肉細胞内のC₄ジカルボン酸回路においてPEPカルボキシラーゼによって行われることから、V_pが負の値をとるということは、このCO₂固定反応系が暗期移行後数秒は停止していないことを間接的に示していると考え

表Ⅲ-1. PIB初期勾配 (V_p) の平均と標準偏差。

	V _p (mg CO ₂ / dm ² / hr)		
	スズメガヤ亜科	キビ亜科	全体
NAD-ME	—————	-108.0 ± 30.8(25)	-108.0 ± 30.8(25)
NAD-ME(F)	—————	145.8 ± 49.9(5)	145.8 ± 49.9(5)
NAD-ME(P)	168.5 ± 50.4(16)	167.8 ± 50.7(13)	168.2 ± 49.6(29)
PEP-CK	-23.8 ± 23.2(7)	-64.7 ± 40.1(9)	-46.8 ± 38.9(16)

カッコ内は供試種数。

全体でのNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の間では平均に有意差なし。

それ以外の脱炭酸酵素型間では P<0.001で有意。

NAD-ME(P)種のスズメガヤ亜科とキビ亜科は有意差なし。

PEP-CK種のスズメガヤ亜科とキビ亜科はP<0.05で有意。

表Ⅲ-2. NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の積分法による
PIB量 (E) の比較。

	スズメガヤ亜科	キビ亜科	全体
1. E ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)			
NAD-ME (F)	—————	72.6 \pm 11.32	72.6 \pm 11.32
NAD-ME (P)	68.0 \pm 26.17	81.2 \pm 29.16	73.9 \pm 27.85
2. E ($\mu\text{mol}/\text{g FW}$)			
NAD-ME (F)	—————	1.19 \pm 0.353	1.19 \pm 0.353
NAD-ME (P)	1.05 \pm 0.416	1.21 \pm 0.436	1.13 \pm 0.424

えられる。そして、もしそうであるならば、PIBで観察されるCO₂が脱炭酸反応由来とすると、NADP-ME種がI型のPIBパターンを示す、すなわち、PIBがみられないことの原因は脱炭酸されたCO₂が停止していないC₄ジカルボン酸回路において再固定されるためと解釈することもできる。また、PEP-CK種の示すⅢ型のなだらかなパターンではV_pが負ではあるがNADP-ME種より大きい値を示したことから、C₄ジカルボン酸回路による再固定の程度が小さいためにこのようなパターンになっている可能性も考えられる。

PEP-CK種ではスズメガヤ亜科種とキビ亜科種の間でV_pに差がみられ、キビ亜科種がより小さい値を示した。このことは両亜科種の間で光合成炭素代謝に、C₄ジカルボン酸回路の基質の量が異なる等何らかの違いがある可能性があり、未だにPEP-CK種の炭素代謝機構が確定していない理由もあるいは亜科種間で代謝に違いがあるためかも知れない。また、NAD-ME種は正のV_pを示したが、その原因がC₄ジカルボン酸回路が暗期移行後ただちに停止するためか、あるいは、同回路によるCO₂の再固定能力以上に脱炭酸反応によるCO₂の放出量が多いためかは本実験の範囲では明らかではない。

NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種はPIBパターンとしては区別できなかったが、量的な面で異なっている可能性が考えられた。しかし、PIBの初期勾配あるいはPIB量でも両者で有意差は認められず量的にも同じであることが明らかにされた。

Ⅲ-2. PIBパターンに及ぼす環境要因の影響

C₄植物はみかけ上光呼吸がみられないが、Ⅱ型の鋭いPIBはC₃植物のPIBと外見上区別できないことから、その発生機構が注目され、今までに環境要因、特にO₂濃度の影響が調べられた(Forresterら, 1966a)。その結果、Ⅱ型のPIBは光呼吸由来ではないことが確認され、他のCO₂放出機構としては脱炭酸反応のみであるため、そこで放出されるCO₂がPIBの由来であろうと考えられている。

Ⅱ型のPIBは多くの場合、暗期約15秒付近の鋭いピーク(以下一次PIB)の他に1.5~2分後にⅢ型のPIBとよく似たなだらかな山形のPIB(二次PIB)がみられる(図I-2参照)。一次PIBは脱炭酸反応によって放出されたCO₂の漏れと考えられているが二次PIBについてはその由来はわかっていない。また、Ⅲ型のPIBに関しても全く発生機構は検討されていない。

そこで、本実験では、三種のPIBの発生機構を検討するために、PIBパターンに及ぼすCO₂濃度及びO₂濃度の影響を調査した。

(1) 材料及び方法

供試材料：各々典型的なPIBパターンを示す Panicum antidotale (NADP-ME型, I型), Eleusine coracana (MAD-ME (P)型, II型), Panicum dichotomiflorum (NAD-ME (F)型, II型), Panicum maximum (PEP-CK型, III型)を実験材料として用い, 1/5000a ポットで生育させた植物体の最上位展開葉を測定に供した。

PIBの測定：I-2.と同様であるがCO₂濃度3段階, 各CO₂濃度についてO₂濃度2段階 (P. dichotomiflorumはCO₂濃度2段階)の計6条件下でPIBパターンを観察し, それぞれのガス濃度の影響を調べた。

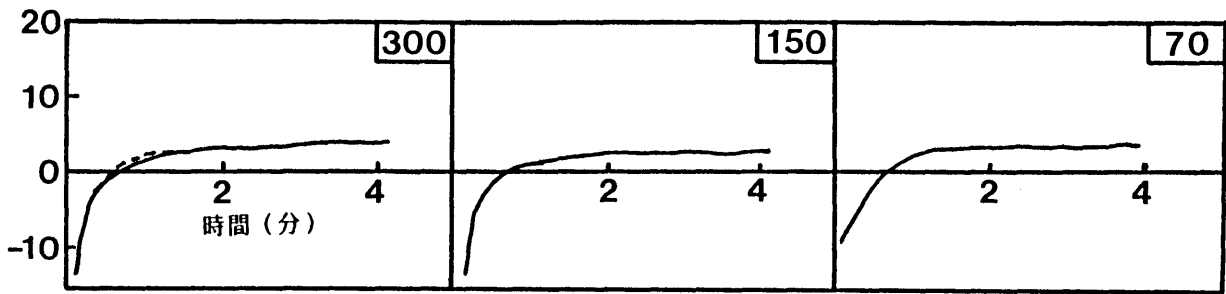
(2) 結果及び考察

20%O₂条件下でPIBパターンに及ぼすCO₂濃度の影響をみると(図III-3), CO₂濃度はNADP-ME種の示すI型とPEP-CK種の示すIII型のパターンにはほとんど影響を及ぼさなかった。これに対して, NAD-ME (P)種及びNAD-ME (F)種の示すII型のパターンの場合, 一次PIBはCO₂濃度の低下によって小さくなり, 60ppm CO₂下では認められなくなった。しかし, 二次PIBはCO₂濃度の低下とともに明瞭になった。

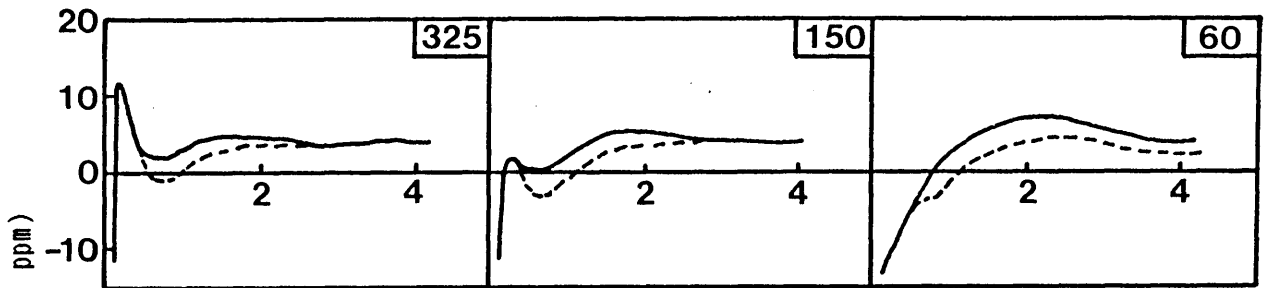
一方, 2%O₂条件下でのCO₂濃度の影響をみると, I型とIII型のPIBパターンは20%O₂下の場合と同じくCO₂濃度の影響を受けなかった。しかし, II型のE. coracanaでは, 一次PIBは20%O₂下の場合と同様にCO₂濃度の低下によって小さくなったが, 二次PIBは20%O₂下の場合とは異なっていていずれのCO₂濃度下でも不明瞭で, ほとんどピークとして認められなくなった。この傾向はNAD-ME (F)種である P. dichotomiflorumでも同様であった。

以上のように, NADP-ME種の示すI型のPIBとPEP-CK種の示すIII型のPIBのパターンに対しては, CO₂及びO₂濃度は影響しなかった。特に, III型のPIBに対して, 低O₂濃度の影響がみられなかったことは, III型のPIBのCO₂も脱

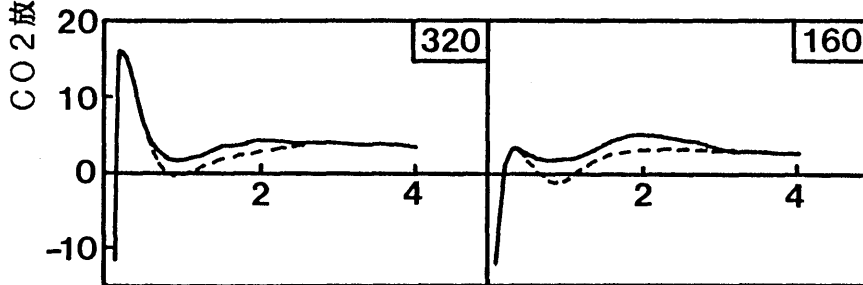
Panicum antidotale (NAD-ME 種, I)



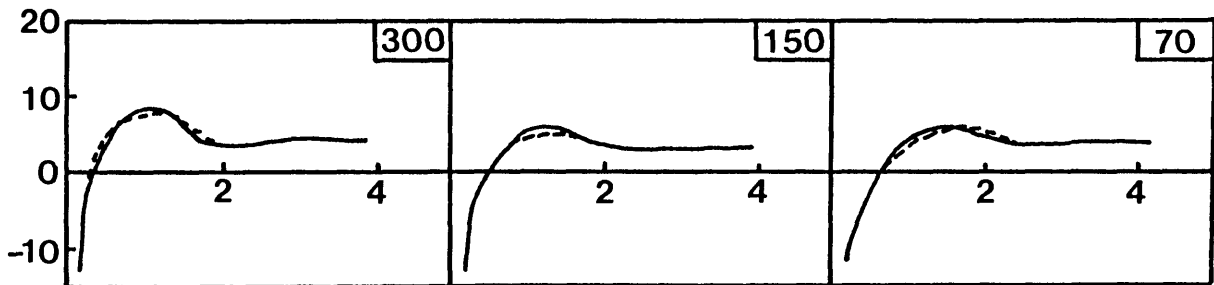
Eleusine coracana (NAD-ME(P) 種, II)



Panicum dichotomiflorum (NAD-ME(F) 種, II)



Panicum maximum (PEP-CK種, III)



図Ⅲ-3. P I Bパターンに及ぼすCO₂ 及びO₂ 濃度の影響。

実線, 20%O₂ 下; 破線, 2%O₂ 下。

右上の数字はP I B測定時のチャンパー入口のCO₂ 濃度。

炭酸反応で放出されるCO₂に由来するものと考えられた。一方、Ⅱ型のPIBに関しては、一次PIBと二次PIBの発生機構は異なっていることが示唆された。一次PIBは低O₂濃度の影響を受けないことから考えて、脱炭酸反応によるCO₂由来と考えられる。一方、二次PIBは逆にO₂濃度の影響を受けることから考えて、O₂濃度に依存した反応、例えば暗呼吸によっている可能性も考えられる。また、NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の間ではPIBパターンに及ぼすCO₂及びO₂濃度の影響に違いがみられず、両者のPIBの発生機構は一次PIBも二次PIBも同様であると考えられた。

Ⅲ-3. PIB初期勾配に及ぼす環境要因の影響

Ⅲ-1.の実験において、PIBの初期勾配(V_p)は脱炭酸酵素型の間で明らかな差異がみられたことから、V_pはC₄光合成の炭素代謝の違いを反映した形質と考えられる。そこで、本実験ではV_pの光強度、CO₂濃度及びO₂濃度に対する反応を調べ、V_pの面からPIBの発生機構を検討した。

(1) 材料及び方法

供試材料：Ⅱ型のPIBパターンを示すNAD-ME(P)種として P. milliaceum と P. coloratum (cv. Klein), NAD-ME(F)種として P. coloratum (cv. Kabulabula)を用いた。それ以外は2.と同様である。

PIBの測定：1.と同様に行い、光強度を6段階、CO₂濃度を7-8段階、O₂濃度を5段階に変えて各々の光合成速度とPIB初期勾配に及ぼす影響をみた。

(2) 結果及び考察

PIB初期勾配(V_p)及び光合成速度(P_n)に及ぼす光強度の影響の結果を図Ⅲ-4に、CO₂濃度の影響の結果を図Ⅲ-5にそれぞれ示した。NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種は全く同様な結果であったため、ここではNAD-ME(P)種の P. milliaceum の結果を示した。まず光強度の影響をみると、いずれの草種においても、光

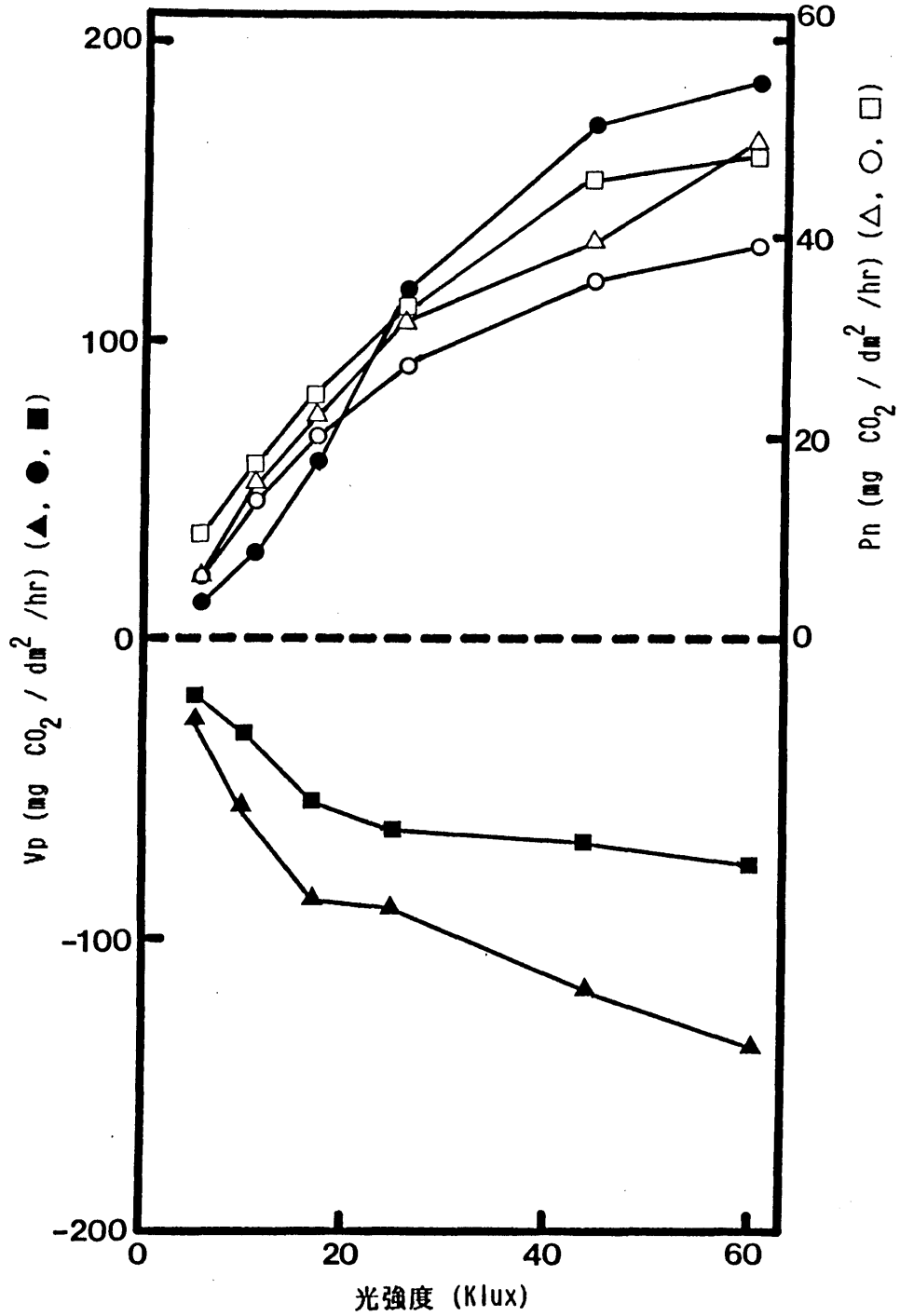
強度が弱いときはそのV_pがほぼゼロであり光強度が増加するにつれ、II型のV_pは増加し、I型とII型のV_pは減少した。すなわち光強度の増大に伴う光合成速度の増加によってII型ではCO₂の放出が、I型とIII型ではCO₂の吸収が一層顕著になり、V_pとP_nの間には密接な関係があることが示唆された。

次にCO₂濃度の影響をみると、I型とIII型ではCO₂濃度が上昇してP_nが増加するにつれV_pは急減し、その後は横ばいとなった。これに対して、II型ではV_pはCO₂濃度の上昇につれて一旦はI型やIII型と同様に減少したが、すぐに増大に転じ、CO₂濃度が低い時は負の値で、一定のCO₂濃度(約150ppm)以上になると正の値となった。

以上のように、I型とIII型では光強度またはCO₂濃度が増加して、P_nが増加するとV_pが減少し、暗期移行直後におけるCO₂の吸収速度が増大した。これに対して、II型では光強度の増大につれてV_pは上昇し、CO₂の放出速度が増大したが、CO₂濃度が低く、極めてP_nが低いときはV_pは減少し、それ以降はP_nの増加に伴ってV_pが増大した。そのためCO₂濃度が上昇するにつれ、V_pは負の値から正の値に変わり、みかけ上CO₂の交換がなくなるCO₂濃度、すなわちV_pのCO₂補償点が認められた。

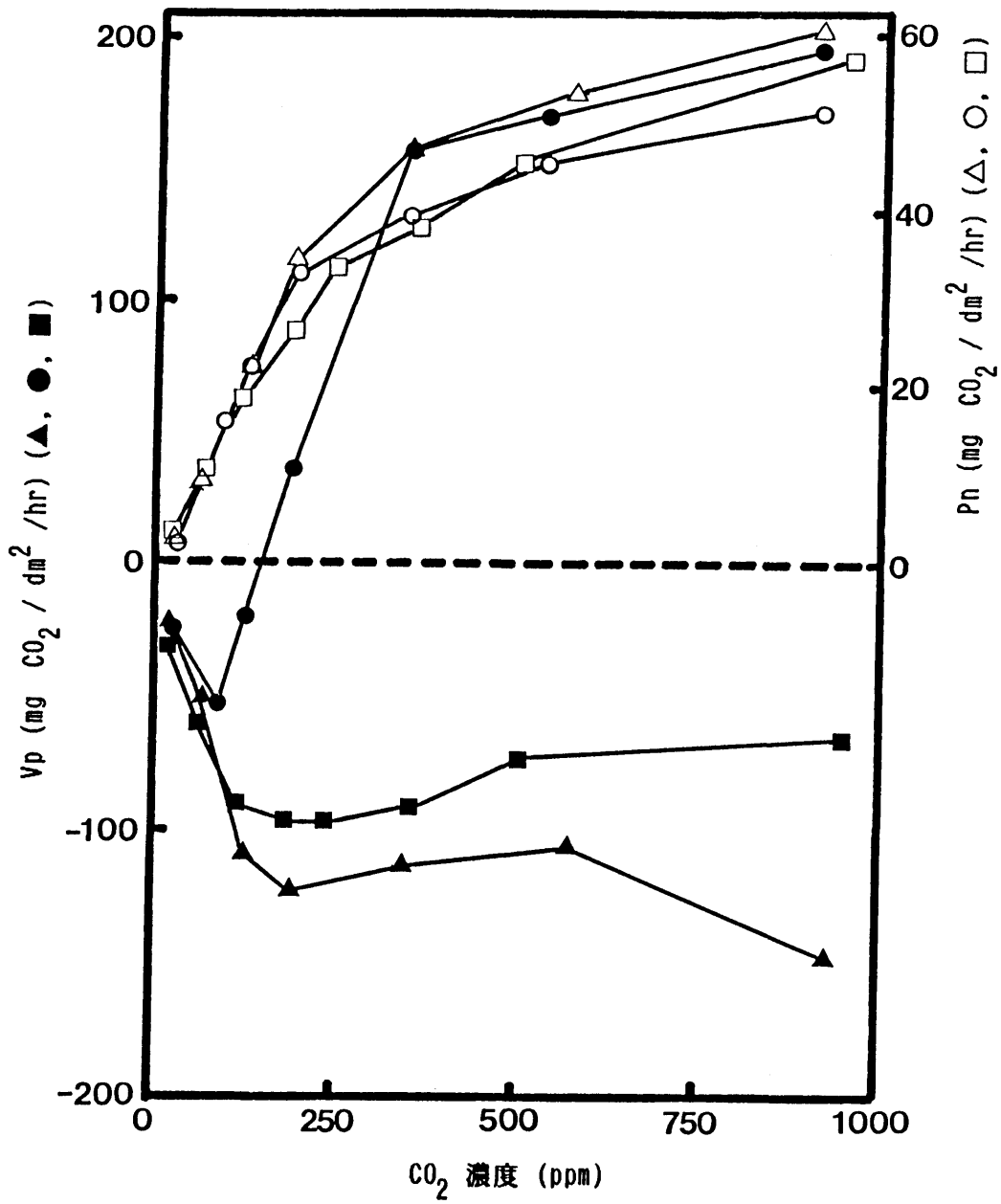
図III-6にはNAD-ME(P)種とNAD-ME(F)種のV_pに対するO₂濃度の影響の結果を示した。また、対照としてC₃種の P. clandestinum に関する結果を併せて示した。P. clandestinum ではP_nはO₂濃度の上昇とともに低下した。一方、V_pは低O₂下では小さく負の値であったがO₂濃度の上昇とともに増大し、O₂が20%以上では正の値であった。この傾向はCO₂濃度が350ppmあるいは920ppmでも同様であったが、高CO₂濃度下のほうがV_pは小さな値を示した。このようなO₂濃度及びCO₂濃度に対するV_pの反応はC₃種の光呼吸の反応と同様であり、PIBが光呼吸由来であることの一つの証明になっているとともに、V_pがPIBの表現型として有効であることを示しているものと考えられた。これに対して、C₄種であるNAD-ME(P)種とNAD-ME(F)種はO₂濃度及びCO₂濃度に対してC₃種とは異なる反応を示した。ここで両種に共通のこととして注目されたのは、II型のPIBはCO₂濃度が低く、V_pが負の値のときはO₂濃度の影響を受け、O₂濃度の上昇に伴い増加した点である。

前節でみたようにII型のPIBの鋭いピーク(一次PIB)は、CO₂濃度の低下に伴い小さくなることから、脱炭酸反応におけるCO₂とC₄ジカルボン酸のプールの大ささと関連のあることが示唆された。それでは、CO₂濃度の低下に伴って、V_pが正から負に変わるという本実験の結果はどのような理由に基づくのだろうか。一つの可能性として

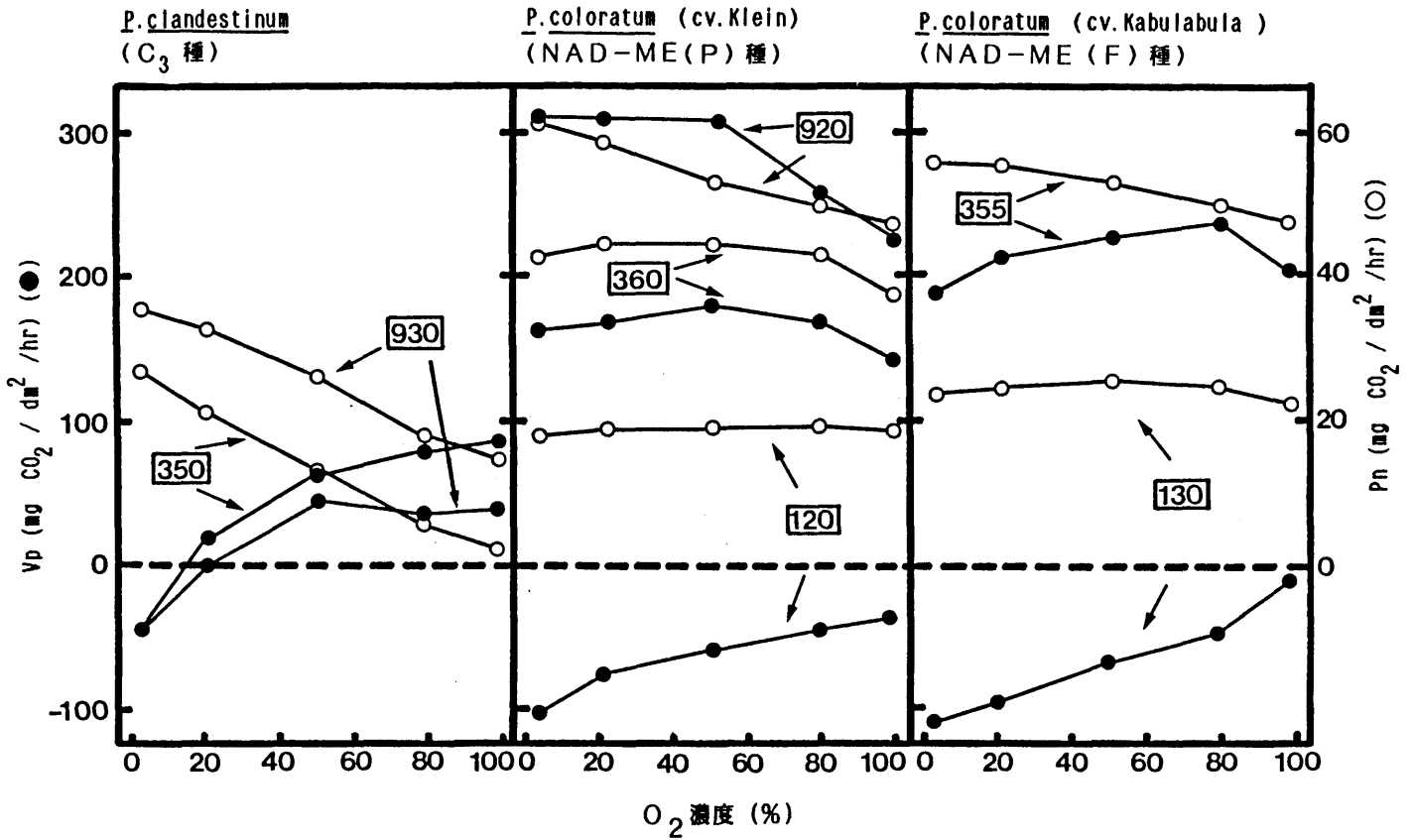


図Ⅲ-4. PIB初期勾配 (Vp) と光合成速度 (Pn) に及ぼす光強度の影響。

- ▲, △, *P. antiodotale* (NADP-ME種) ;
- , ○, *P. miliaceum* (NAD-ME種) ;
- , □, *P. maximum* (PEP-CK種)。



図Ⅲ-5. PIB初期勾配 (Vp) と光合成速度 (Pn) に及ぼすCO₂ 濃度の影響。図中の記号は図Ⅲ-4と同じ。



図Ⅲ-6. *P. clandestinum* (C₃ 種), *P. coloratum* (cv. Klein) (NAD-ME (P) 種), *P. coloratum* (cv. Kabulabula) (NAD-ME (F) 種) のPIB 初期勾配 (Vp) と光合成速度 (Pn) に及ぼすO₂ 濃度及びCO₂ 濃度の影響。 図中の数字は測定時のCO₂ 濃度 (ppm)。

は次のように考えられる。まず、NAD-ME種においても C_4 ジカルボン酸回路は、暗期移行後数秒間は続き、脱炭酸 CO_2 の再固定を行っている。 CO_2 濃度が高い場合は C_4 ジカルボン酸の生成速度が大きく、その結果、脱炭酸 CO_2 の発生速度も大きくなる。そして、 C_4 ジカルボン酸と脱炭酸 CO_2 のプールの大きさを越えれば CO_2 はKranz細胞から葉肉細胞へと出てくる。明条件下ではこの CO_2 は葉肉細胞内のPEPカルボキシラーゼにより再固定されている。暗期移行後、PEPカルボキシラーゼの CO_2 再固定速度が充分でなければ脱炭酸 CO_2 はPIBとして葉外へ放出され V_p は正の値となる。しかし、 CO_2 濃度が低くなるにつれ、 CO_2 の放出と再固定のバランスが見かけ上ゼロになり、さらに CO_2 濃度が低下すると今度は CO_2 の再固定速度が優るため逆に外気の CO_2 を取り込み、 V_p は負の値をとるようになる。しかしながら、このような仮説を裏付けるためには、各 CO_2 濃度下における CO_2 と C_4 ジカルボン酸のプールの大きさやPEPカルボキシラーゼによる CO_2 の再固定能力等が明らかにされねばならないが、これらの点については今後の研究に委ねざるを得ない。

Ⅲ-4. 考察

本実験でPIBを数量化するために新たに導入されたPIBの初期勾配(V_p)は、脱炭酸酵素型で異なる値を示し、また、 C_3 種の V_p は O_2 濃度等に対してPIBの由来である光呼吸と同様な反応を示すことからPIBの発生機構を考える上で一定の示唆を与えることができるパラメーターと考えられる。そこで、本実験で得られた V_p に関する結果に基づいて三種のPIBの発生機構について以下に考察してみたい。

PIBのみかけ上の有無、あるいはその大きさは脱炭酸反応による CO_2 放出速度と再固定速度とのバランスで決定されるはずである。 CO_2 の放出速度は発生源である C_4 ジカルボン酸の生成速度に主に依存しており、一方、再固定速度は CO_2 の固定回路である C_4 ジカルボン酸回路とカルビン回路が暗期移行後どの程度機能するかにかかっている。

従来Ⅱ型のPIBの発生機構については、暗期移行によって明反応からのATPとNADPHの供給がなくなるため、それらを必要とするカルビン回路と C_4 ジカルボン酸回路は停止するが、それらを必要としない脱炭酸反応は C_4 ジカルボン酸の量がなくなるまで続くため CO_2 が再固定されずに葉外に放出されると説明されている(Downton, 1970)。しかし、3. でみたように低 CO_2 条件下ではⅡ型の V_p は負の値になることが

ら、大気条件下でも C_4 ジカルボン酸回路は数秒間は機能しているものと考えられ、その再固定速度以上に放出される CO_2 量が多いことがPIBの主な原因ではないかと考えられた。

また、Downton (1970) はNADP-ME種においてPIBがみられない理由として、脱炭酸反応の基質であるリンゴ酸がカルビン回路にNADPHを供給するため、暗期移行後リンゴ酸のプールがなくなるまでカルビン回路による脱炭酸 CO_2 の固定が続くためとしている。しかし、NADP-ME種の場合、通常の大気条件下でもVpが負の値であることから、カルビン回路だけでなく C_4 ジカルボン酸回路による脱炭酸 CO_2 の再固定もPIBがみられない原因の一つとなっているものと考えられた。

PEP-CK種の示すⅢ型のPIBの発生機構については今まで全く検討されていない。本実験において、Ⅲ型のパターンは低 O_2 濃度の影響を受けなかったことから、その発生源はⅡ型と同様に脱炭酸反応における CO_2 と考えられた。また、Vpが負の値を示すことから、 C_4 ジカルボン酸回路による CO_2 の再固定能力が脱炭酸 CO_2 の基質である C_4 ジカルボン酸の量をしのいでいるものと考えられた。一方、Ⅲ型のピークは暗期移行1~2分後と、Ⅱ型に比べると遅れて現われることから、本実験では検討しなかったが、葉構造の関与も考えられ、葉内の機密性が高く CO_2 ガスの拡散に時間がかかるという可能性もある。

IV. *Panicum* 属 *Dichotomiflora* グループ内草種の CO_2 交換特性と葉身の形態的特徴

II 章までの結果から、*Panicum* 属 *Dichotomiflora* グループ内には Kranz細胞内の葉緑体が遠心的に分布する NAD-ME (F) 種と求心的に分布する NAD-ME (P) 種が存在し、両者は光合成の炭素代謝機構の面では違いがみられず、葉緑体の分布と光合成的炭素代謝は各々独立しており、相互に関係していないことが明らかとなった。

本章では、葉緑体の分布が炭素代謝以外のどのような光合成的特徴と関連しているのかを CO_2 交換特性と葉身の形態的特徴の諸側面から検討した。

IV-1. 炭素同位体分別能の差異

大気中には $^{12}\text{CO}_2$ の他に安定同位体である $^{13}\text{CO}_2$ が全 CO_2 の約 1% 含まれている。 C_3 植物はその CO_2 固定反応において質量数の小さい $^{12}\text{CO}_2$ を C_4 植物に比べより選択的に取り込むことが知られている。そのため、選択性の程度を後述の式により計算される $\delta^{13}\text{C}$ 値で表すと C_3 植物では $-23\sim-35$ 、 C_4 植物では $-11\sim-16$ と、大きく異なることになり、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は C_3 植物と C_4 植物を区別する最も信頼できる指標の 1 つとなっている (Bender, 1971; Troughton, 1971; Smith and Epstein, 1971)。 $\delta^{13}\text{C}$ 値の信頼性は例えば次のようなことから明らかである。*P. milioides* は CO_2 補償点が C_3 植物と C_4 植物の中間の値 (約 20ppm) を示し (Krenzer ら, 1975; Keck and Ogren, 1976; Morgan and Brown, 1980)、また、低 O_2 濃度下での光合成速度の増大程度も中間的傾向を示す (Brown and Brown, 1975)。一方、維管束鞘細胞内に C_4 植物と同様に葉緑体が存在する (Brown and Brown, 1975; Kanai and Kashiwagi, 1975)。これらの点から、 C_3 植物と C_4 植物の中間種と考えられていたが、この種の $\delta^{13}\text{C}$ 値は C_3 植物と同じ低い値を示し (Brown and Brown, 1975)、また、光合成の炭素代謝は C_3 植物と全く同じであることがわかった (Kanai and Kashiwagi, 1975; Edwards ら, 1982)。

ところで、 C_4 植物の脱炭酸酵素型の異なる種の間においても $\delta^{13}\text{C}$ 値に違いがみられることが最近報告されている。Hattersley (1982) によると $\delta^{13}\text{C}$ 値は、NADP-ME 種 > PEP-CK 種 > NAD-ME 種の順で小さくなり、NAD-ME 種が最も強く $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ を分別し、 $^{12}\text{CO}_2$ を多く取り込むとしている。また、鮫島ら (1983) は、NADP-ME 種が最も小さい分別能を示すが、PEP-CK 種と NAD-ME 種の

間では差はみられないという結果を得ている。本実験では、Panicum 属の多くの種を用い、同一条件で生育させた材料について $\delta^{13}\text{C}$ 値を調べ、NAD-ME (F) 種と NAD-ME (P) 種の差異を中心に他の脱炭酸酵素型も含めて検討した。

(1) 材料及び方法

供試材料：表IV-1に示したように C_3 種、 C_3/C_4 中間種を含めた Panicum 属24種を供試した。

測定方法：草地試験場の同一圃場で生育させた栄養生長期の最上位展開葉を 70°C で48時間乾燥させ、粉碎した後 5-10mg を測定に供した。材料を過剰量の酸化銅とともに 800°C で6分間加熱し CO_2 を液体窒素中に捕捉した。得られた CO_2 の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比は同位体比測定用トリプルコネクタ-質量分析器 (Finnigan MAT 250) により測定し、次式により $\delta^{13}\text{C}$ 値を計算した。

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\frac{\text{測定試料中の}^{13}\text{C}\text{含量}(\%)}{\text{標準試料中の}^{13}\text{C}\text{含量}(\%)} - 1 \right] \times 1000$$

標準試料としては国際原子力エネルギー機関 (IAEA) より譲渡された NBS-19 を用い、研究室レベルでのランニングスタンダードとして、低圧充填の高純度炭酸ガスを用いた。 $\delta^{13}\text{C}$ 値の測定は農水省生物資源研究所において鮫島宗明氏 (機能開発部) の協力を得て行った。

(2) 結果及び考察

調査した $\delta^{13}\text{C}$ 値を表IV-1に示した。 C_3 種では $-25.67 \sim -27.48$ 、 C_4 種では $-10.86 \sim -13.04$ と大きく異なっており、また、それぞれの値は従来調査された例とほぼ同じ範囲にあった。また、 C_3/C_4 中間種である P. milioides の $\delta^{13}\text{C}$ 値は -27.21 でありこれも従来例とほぼ同様な値を示していた。脱炭酸酵素型ごとの $\delta^{13}\text{C}$ 値をみると、Panicum 属全体の C_4 種では、NAD-ME (P) 種が平均 -12.43 と最も小さい値を示し、NAD

表IV-1. Panicum種の $\delta^{13}\text{C}$ 値。

	種名	$\delta^{13}\text{C}$ 値
C_3	<u>P. bisulcatum</u>	-25.67
	<u>P. clandestinum</u>	-27.48
C_3 / C_4	<u>P. milioides</u>	-27.21
NADP-ME	<u>P. antidotale</u>	-10.86
	<u>P. obtusum</u>	-12.15
NAD-ME(F)	<u>P. coloratum</u> (cv. Kabulabula) *	-12.10(5)
	<u>P. coloratum</u> (cv. Solai) *	-11.40(5)
	<u>P. dichotomiflorum</u> *	-12.10(5)
	<u>P. laevifolium</u> *	-11.90(5)
	<u>P. longijubatum</u> *	-12.21
NAD-ME(P)	<u>P. bergii</u>	-12.05
	<u>P. capillare</u>	-12.96
	<u>P. coloratum</u> *	-12.20(5)
	<u>P. coloratum</u> var. <u>makarikariense</u> *	-12.70(5)
	<u>P. decompositum</u>	-12.47
	<u>P. dregeanum</u>	-12.60
	<u>P. hallii</u>	-12.63
	<u>P. lanipes</u> *	-12.38
	<u>P. queenslandicum</u>	-11.97
	<u>P. stapfianum</u> *	-12.30(5)
	<u>P. virgatum</u>	-12.30
	PEP-CK	<u>P. deustum</u>
<u>P. infestum</u>		-12.21
<u>P. maximum</u>		-11.87
<u>P. maximum</u> var. <u>trichoglume</u>		-11.74
<u>P. molle</u>		-12.14
<u>P. ramosum</u>		-13.04
<u>P. texanum</u>		-11.99

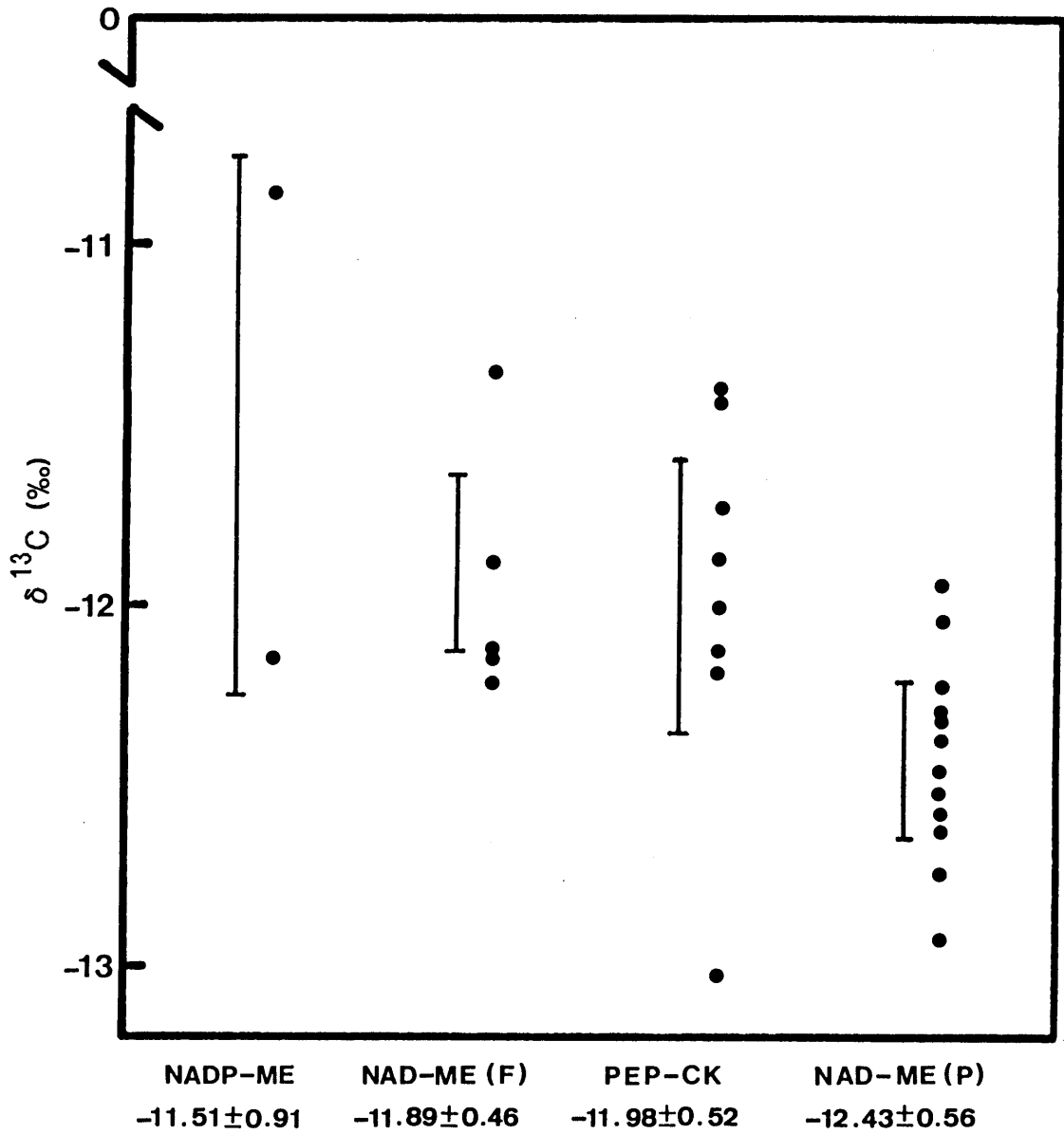
カッコ内の数字は反復数。

*, Dichotomiflora グループに属する種。

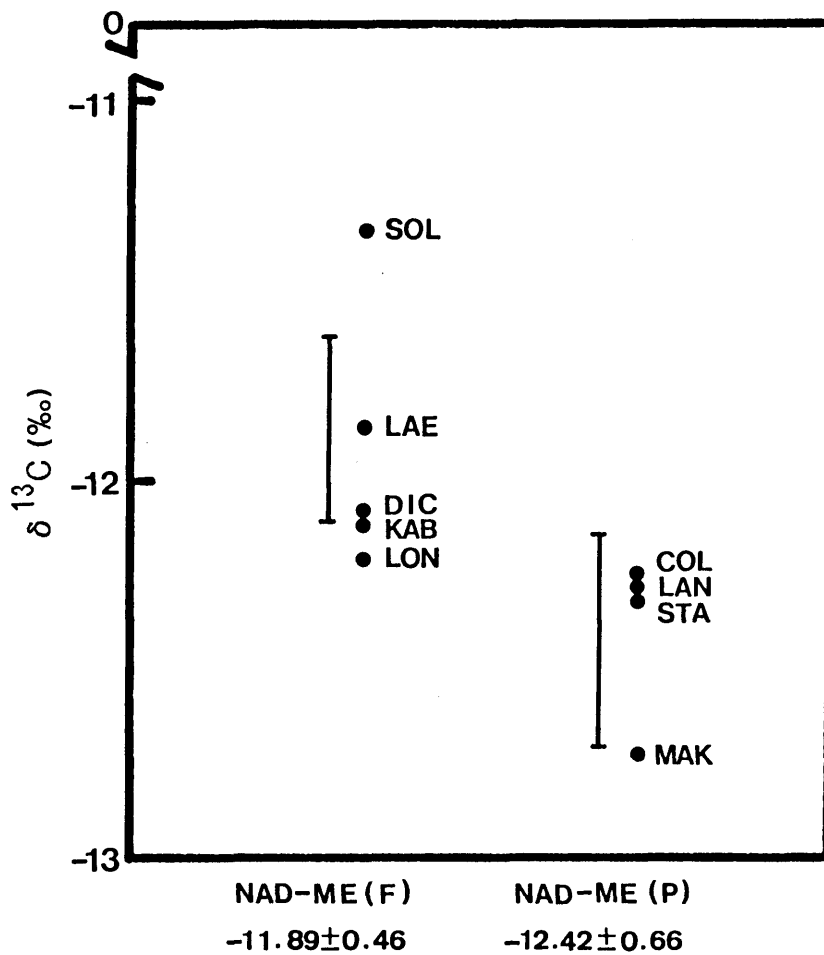
-ME (F) 種の平均とは1%水準で有意な差が認められた。しかし、その他の脱炭酸酵素型との間の差は有意ではなかった(図IV-1)。Dichotomifloraグループ内のNAD-ME (P) 種とNAD-ME (F) 種だけについて比較した場合も、両者の差は1%水準で有意であった(図IV-2)。

このように、Panicum種について $\delta^{13}\text{C}$ 値を調べた結果では、NADP-ME種、PEP-CK種及びNAD-ME (P) 種の間で従来から言われているような有意な差は認められなかった。この点に関しては、供試したNADP-ME種が2種と少なく、また、PEP-CK種の中に1種(P. ramosum)他に比べて極端に低い値を示すものがあったことを考えると、今後さらに検討する必要がある。しかしながら、同じNAD-ME種の葉構造の変異型であるNAD-ME (P) 種とNAD-ME (F) 種の間では有意な差がみられ、前者がより強く $^{12}\text{CO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ を分別して $^{12}\text{CO}_2$ を選択的に取り込んでいた。

ところで、 C_4 植物における炭素同位体分別の機作は未だよく解明されていない。 C_3 植物における低い $\delta^{13}\text{C}$ 値はカルビン回路の CO_2 固定酵素であるRuBPカルボキシラーゼによる強い $^{12}\text{CO}_2$ の分別吸収にその主要原因が求められている(O'Leary, 1980)。 C_4 植物にもKranz細胞内にRuBPカルボキシラーゼがあるが、Kranz細胞の気密性が高く、 CO_2 が外に漏れにくいため、RuBPカルボキシラーゼは $^{12}\text{CO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ をほとんど分別せずに取り込むと考えられている。従って、 C_4 植物における分別はむしろ CO_2 の気孔からの流入、その後の $\text{CO}_2 - \text{HCO}_3^-$ の転換及びPEPカルボキシラーゼによる固定反応さらには脱炭酸反応で生じた CO_2 のKranz細胞からの漏れの大小によって主に起こるものと考えられている(O'Leary, 1980)。そして、脱炭酸酵素型の異なる種の間でみられる $\delta^{13}\text{C}$ 値の違いは、脱炭酸反応では分別が起こらず、 $\text{CO}_2 - \text{HCO}_3^-$ の転換とPEPカルボキシラーゼによる固定反応は三者共通であるため、主に気孔での CO_2 の拡散程度の違いに基づく細胞間隙 CO_2 濃度(C_i)と外気 CO_2 濃度(C_a)の違い(C_i/C_a 比)とKranz細胞からの CO_2 の漏れ程度の違いに由来するのではないかと考えられている(O'Leary, 1980; Hattersley, 1982; Farquhar, 1983)。さて、本実験でみられたNAD-ME (P) 種の $\delta^{13}\text{C}$ 値がNAD-ME (F) 種に比べて低いという事実は、NAD-ME (P) 種がより強く $^{12}\text{CO}_2$ を分別吸収していることを表わしている。このことと、両者とも C_4 光合成炭素代謝の面では同じであったことを考えあわせると、この両者は CO_2 の拡散過程あるいはKranz細胞からの CO_2 の漏れの程度に違いがあることが考えられた。



図IV-1. *Panicum*属内のNADP-ME種, NAD-ME (F)種, NAD-ME (P)種及びPEP-CK種の $\delta^{13}\text{C}$ 値。



図IV-2. Panicum属 Dichotomiflora グループ内のNAD-ME (P) 種とNAD-ME (F) 種の $\delta^{13}\text{C}$ 値。

SOL, P. coloratum(cv. Solai); LAE, P. laevifolium; DIC, P. dichotomiflorum; KAB, P. coloratum(cv. Kabulabula); LON, P. longijubatum; COL, P. coloratum; LAN, P. lanipes; STA, P. stapfianum; MAK, P. coloratum var. makarikariense.

IV-2. CO₂ 交換特性の差異

一般的にC₄植物はC₃植物に比べて気孔の開度が小さくそのために光合成速度に対する蒸散速度の比率が小さくなり、光合成の水分利用効率が低い。しかしながら、C₄植物の異なる脱炭酸酵素型種の間でこのようなCO₂交換特性に差がみられるという報告はまだない。ところが、前節で $\delta^{13}\text{C}$ 値のNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種間における違いがKranz細胞からの漏れも含めたCO₂の拡散過程の差に由来するのではないかと推察された。本節では両種間のCO₂交換特性、主に気孔におけるCO₂拡散抵抗の違いを検討した。

(1) 材料及び方法

供試材料：気孔拡散伝導度等に及ぼすCO₂濃度の影響を検討した実験にはNAD-ME(F)種として、*P. dichotomiflorum* (以下DIC)、NAD-ME(P)種として、*P. coloratum* var. *makarikariense* (MAK)を用い、また、対照としてC₃種の*P. bisulcatum* (BIS)を用いた。また、一定CO₂濃度下で気孔拡散伝導度等を比較した実験で用いた材料は表IV-2に示した通りである。

測定方法：1/5000aポットにより屋外で生育させた植物体の最上位展開葉を測定に供試した。測定は開放系でオーバーフロー型チャンバーを用いて行った。葉温 30 ± 0.5 ℃、光強度 $1400 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、飽差 $8 \pm 1\text{mmHg}$ 、ガス流量 $2 \text{ l}/\text{min}$ の条件で測定し、CO₂濃度はN₂ガス、O₂ガス及び5%CO₂ガス(95%N₂)を混合装置(Stec AGRU-712S)で混合することにより調節した。チャンバー内のガスの一部(1.5 l/min)を赤外線ガス分析計(島津、URAS-106)、次いで露点計(EG&G、モデル911)に導入し光合成速度(Pn)、蒸散速度(Tr)を測定した。測定は各種3反復で行った。葉面積はNAD-ME(F)種が平均 $7.1(\text{cm}^2)$ 、NAD-ME(P)種が $4.4(\text{cm}^2)$ であった。細胞間隙CO₂濃度(Ci)は、 $Ci = Ca - Pn/Gs$ により求めた(Fauquharら, 1978)。ここでCaは外気CO₂濃度、Gsは気孔拡散伝導度である。

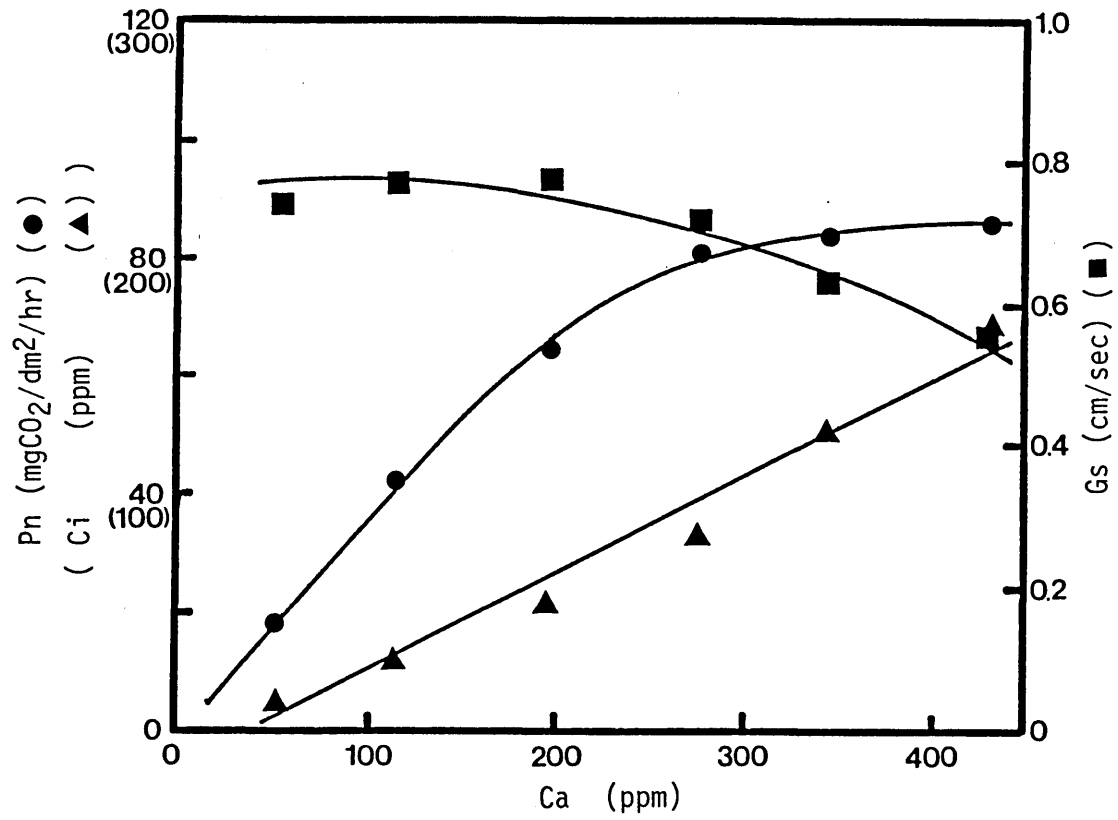
(2) 結果及び考察

まず、NAD-ME (F) 種のDICとNAD-ME (P) 種のMAKとで外気CO₂濃度 (Ca) に対するみかけの光合成速度 (Pn), 気孔拡散伝導度 (Gs) 及び細胞間隙CO₂濃度 (Ci) の反応を比較した (図IV-3, 図IV-4)。また, 図IV-5にはC₃植物であるBISの同様な応答曲線を比較のために示した。C₃植物であるBISでは, Caの上昇に従ってPnは上昇し, 400ppmを越えてもまだ飽和していない。また, Gsは200ppmまでは変化ないが, それ以上の濃度になると少しずつ減少している。Ciは直線的に上昇し, Caが350ppmのときCiは約230ppmであった。一方, C₄植物であるDICとMAKではPnはCaの上昇につれて上昇するが350ppm付近で飽和した。GsはBISと同様に高CO₂濃度で低下した。CiはCaの上昇につれて上昇するが, BISに比べて上昇程度は小さかった。このように, 外気CO₂濃度の変化に対してDICとMAKのPn, Gs, Ciは典型的なC₄種の反応を示したが, DICとMAKの間にみられた違いとしてはDICのほうが飽和光合成速度が高いことがあげられる。また, Gsも測定したCaの範囲内では常に高く, Ciも若干高い傾向がみられた。

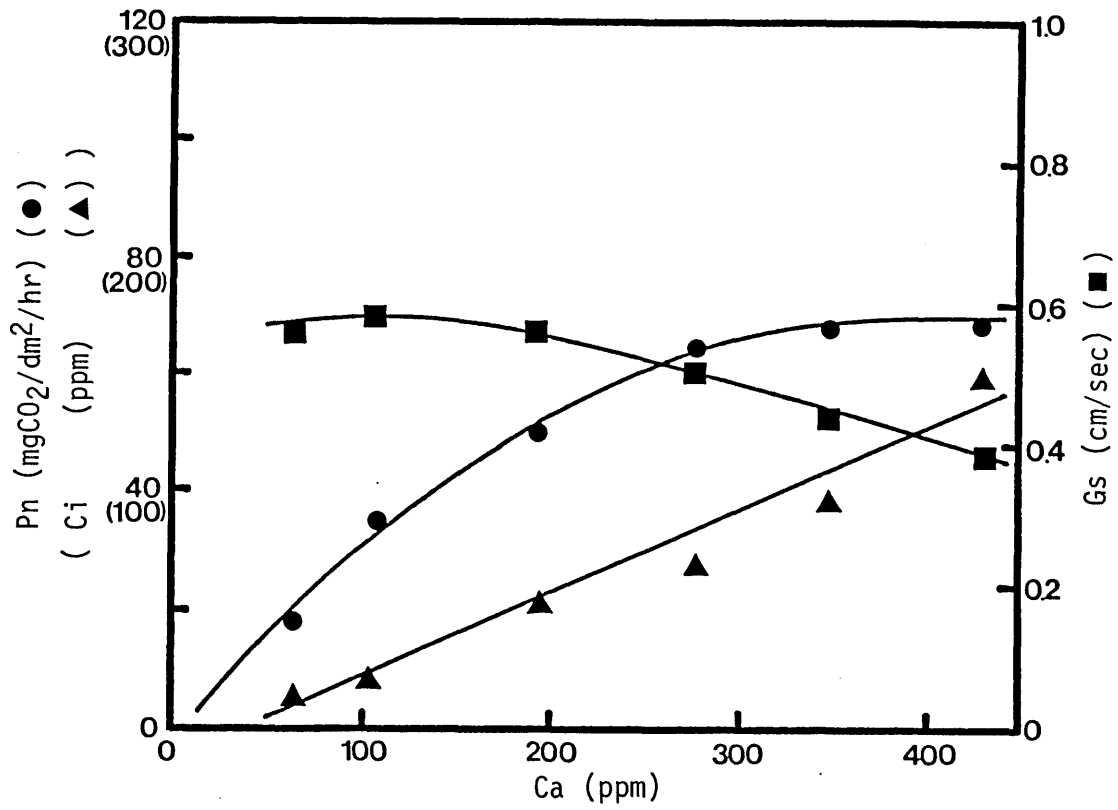
図IV-6には細胞間隙CO₂濃度 (Ci) に対するPnの反応をBIS, DIC, MAKの3草種について示した。反応曲線の初期勾配より求めたcarboxylation efficiency (葉肉細胞における炭酸固定効率, CE) はC₃植物のBISが0.40と低いのに対し, DICは1.40, MAKは1.21と高い値を示したが, DICがMAKより若干高かった。このように, DICはMAKに比べてGsが大きいだけでなく, CEの点でも優っていると考えられた。

さて, DIK, MAKにみられたCO₂交換特性上の違いが他のNAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の間においても同様にみられるかどうかを検討した (表IV-2)。その結果, Pn, 蒸散速度 (Tr), GsともにNAD-ME (F) 種がNAD-ME (P) 種より高い値 (0.1%水準で有意) を示した。しかし, CiとCi/Ca比は前者が若干高かったものの両方で有意な差はみられなかった。以上のように, NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種はC₄光合成の炭素代謝機構は同じであってもCO₂交換特性には違いがみられ, 前者の高いPnはGsの大きいこと (気孔開度が大きいこと) に主に起因していると考えられた。

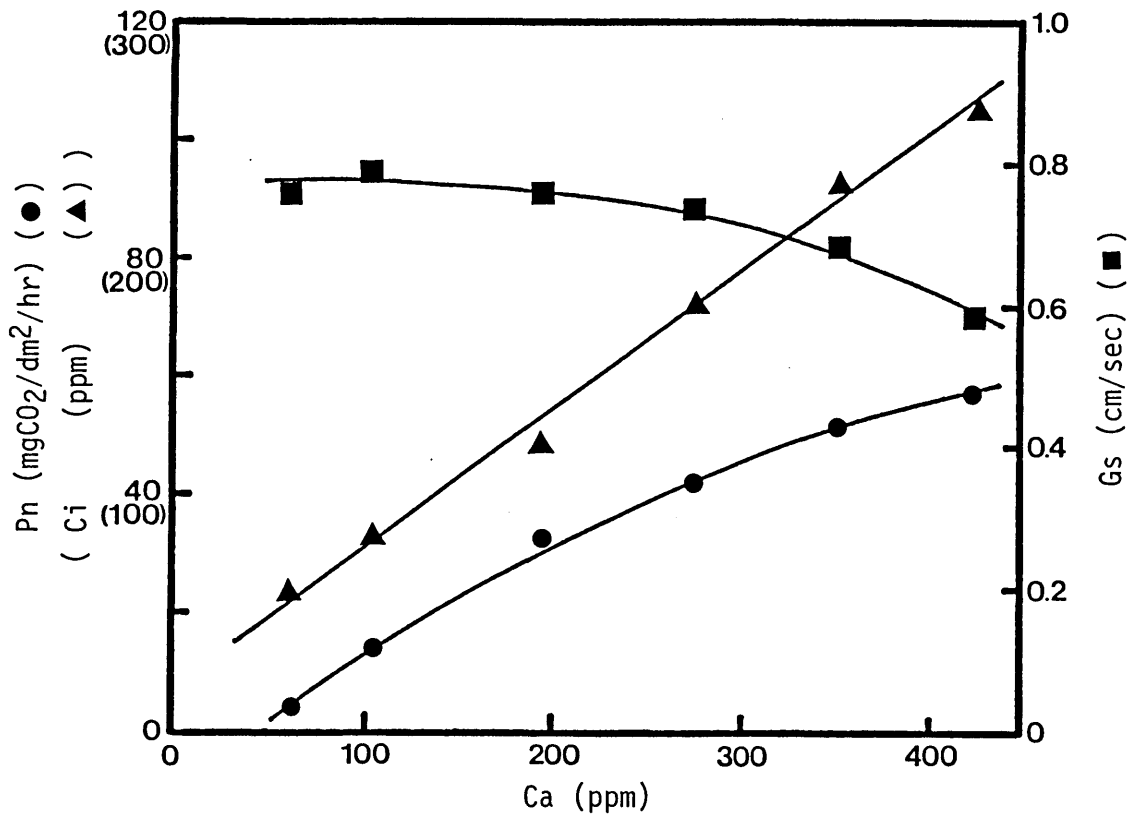
ところで, 前節で明らかになったNAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の間での $\delta^{13}\text{C}$ 値の違いはCO₂の拡散過程に両方で差異があるためではないかと推察された。本実験の結果, Gsには両方で大きな差異がみられたものの, Ci及びCi/Ca比に差は



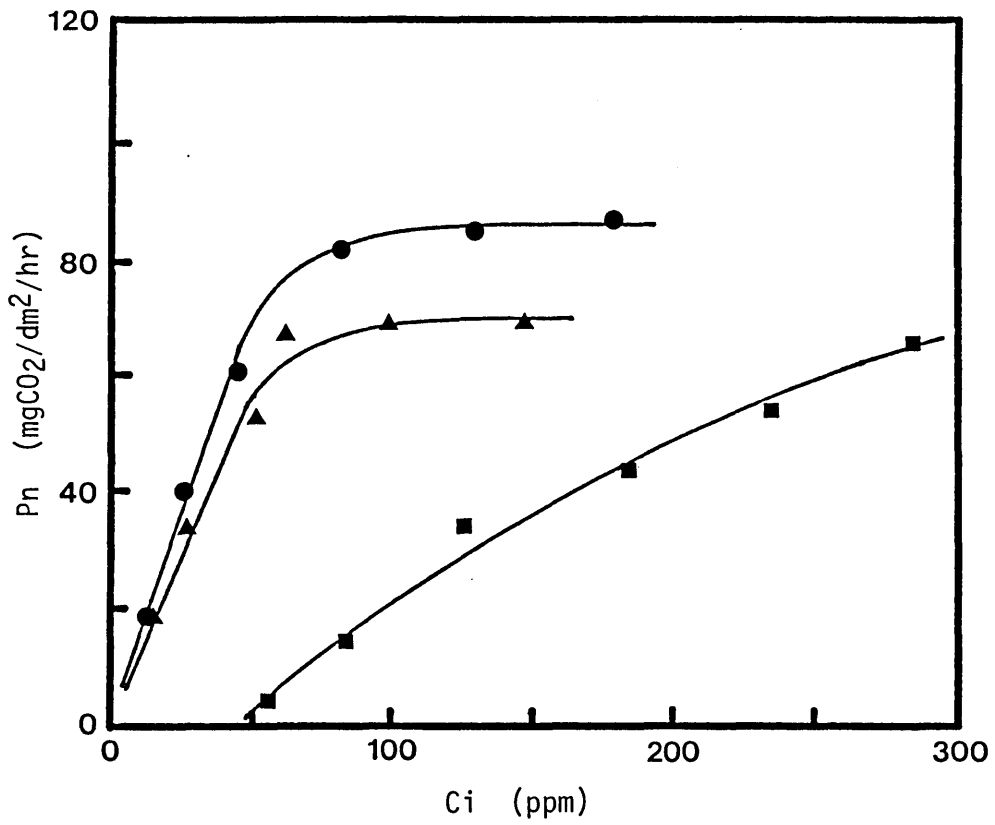
図IV-3. *P. dichotomiflorum* (NAD-ME (F) 種) 葉身の
 光合成速度 (Pn), 気孔拡散伝導度 (Gs) 及び細胞間隙
 CO₂ 濃度 (Ci) に及ぼす外気CO₂ 濃度 (Ca) の影響。



図IV-4. *P. coloratum* var. *makarikariense* (NAD-ME (P) 種)
 葉身の光合成速度 (Pn), 気孔拡散伝導度 (Gs) 及び細胞間隙
 CO₂ 濃度 (Ci) に及ぼす外気CO₂ 濃度 (Ca) の影響。



図IV-5. *P. bisulcatum* (C₃種) 葉身の光合成速度 (Pn), 気孔拡散伝導度 (Gs) 及び細胞間隙CO₂濃度 (Ci) に及ぼす外気CO₂濃度 (Ca) の影響。



図IV-6. 細胞間隙CO₂濃度(Ci)と光合成速度(Pn)との関係。
P. dichotomiflorum(●), *P. coloratum* var. *makarikiariense* (▲),
P. bisulcatum (■)。

表IV-2. NAD-ME (P) 種とNAD-ME (F) 種の光合成速度 (Pn), 蒸散速度 (Tr), 気孔拡散伝導度 (Gs), 細胞間隙CO₂ 濃度 (Ci) 及び Ci と外気CO₂ 濃度 (Ca) の比 (Ci/Ca)。

	Pn (mgCO ₂ / dm ² / hr)	Tr (gH ₂ O/dm ² /hr)	Gs (cm /sec)	Ci (ppm)	Ci/Ca
1. NAD-ME(P)					
COL	69.4	2.40	0.411	71.5	0.21
MAK	68.3	2.31	0.418	84.7	0.25
STA	62.8	2.36	0.393	85.0	0.25
平均	66.8±5.4	2.36±0.15	0.407±0.023	80.4±18.3	0.24±0.02
2. NAD-ME(F)					
LAE	80.6	2.72	0.497	78.2	0.23
DIC	81.4	2.81	0.540	93.3	0.28
KAB	77.8	2.64	0.495	91.5	0.27
SOL	80.6	2.73	0.506	81.4	0.24
平均	80.1±5.8	2.73±0.23	0.509±0.045	86.1±16.8	0.26±0.02
- - 2. -1.	13.3 ^{***}	0.37 ^{***}	0.102 ^{***}	5.7	0.02

COL, P. coloratum; MAK, P. coloratum var. makarikariense; STA, P. stapfianum;

LAE, P. laevifolium; DIC, P. dichotomiflorum; KAB, P. coloratum(cv. Kabulabula);

SOL, P. coloratum(cv. Solai).

測定条件: 外気CO₂ 濃度, 340±5ppm ; 光強度, 1400μE/ m² /sec ; 葉温, 30±0.5 °C ;
飽差, 8±1mm Hg.

***, P<0.001。

認められず、従って、 $\delta^{13}\text{C}$ 値の違いは気孔からの CO_2 の拡散過程の違いよりもむしろ Kranz 細胞からの CO_2 の漏れ程度の違いによるものと考えられた。しかし、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は長期間にわたる光合成反応の結果であるのに対し、本実験は短期間の測定であり $\delta^{13}\text{C}$ 値とGsあるいはCi/Ca比との関係をより明らかにするためには各生育期ごとの両者の関係を検討する必要がある。また、Tr及びGsのNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種間の違いから両者が乾物生産における水分利用効率の面でも有意な差を示す可能性も考えられたが、この点についてはV章で検討する。

IV-3. *P. dichotomiflorum* 葉身の微細構造

緒言で述べたように、イネ科の異なる脱炭酸酵素型種の間では Kranz細胞の微細構造に特徴がみられる(Black and Mollenhauer, 1971; Carolin ら, 1973; Gutierrezら, 1974; Hatch ら, 1975; Chapman ら, 1975)。すなわち、NAD-ME種(本研究の中でのNAD-ME(P)種)とPEP-CK種ではKranz細胞内の葉緑体はよく発達したグラナ構造をもち、ミトコンドリアの数も多く、その内膜構造も発達している。これに対して、NADP-ME種では葉緑体のグラナ構造は全くみられないか、ごくわずかに痕跡的にみられるだけであり、ミトコンドリアの数も少ない。また、NAD-ME種ではミトコンドリアは主に葉緑体の内側(維管束側)に位置し、葉緑体の外側(葉肉細胞側)には見出されない。また、Hattersley and Browning(1981)及びHattersley and Perry(1984)によれば、NADP-ME種とPEP-CK種にはKranz細胞壁、特に葉肉細胞と接する側に、水や CO_2 を通さないスベリン層が発達しているが、NAD-ME種には存在しないとされている。このようにNAD-ME(P)種については既に葉身の微細構造が相当明らかにされているが、本研究で新たに見出されたNAD-ME(F)種についてはまだ調べられていない。そこで、本実験ではNAD-ME(F)種の *P. dichotomiflorum* の葉身横断面の電顕観察を行い、葉緑体とミトコンドリアの微細構造及び両者の位置関係等について検討した。

(1) 材料及び方法

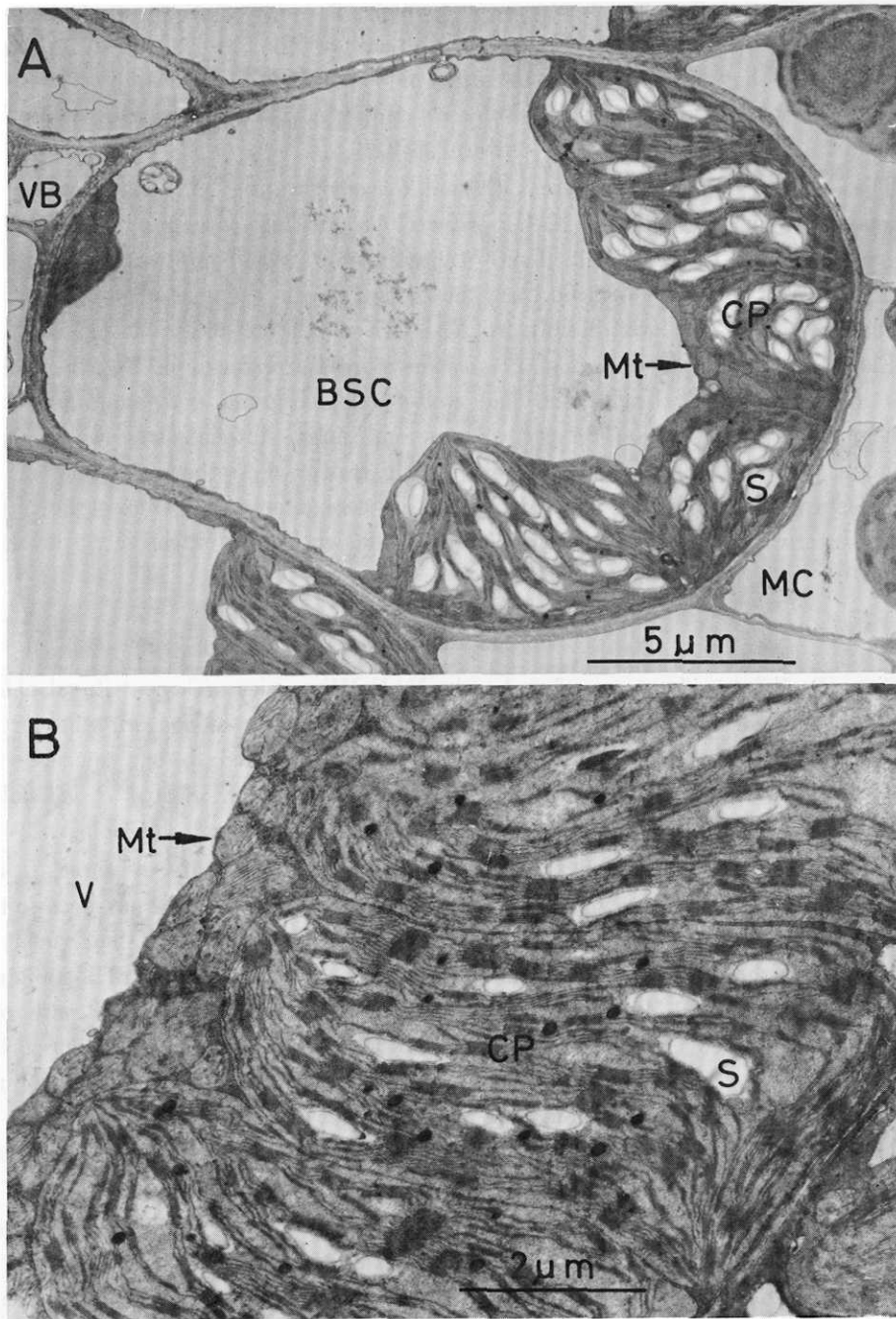
供試材料：1/5000a ポットでガラス室内で生育させた *P. dichotomiflorum* の葉身を用いた。

実験方法：葉片を2%グルタルアルデヒド（0.05 Mカコジル酸緩衝液，pH7.0）で室温において3時間固定した後，冷緩衝液で数回洗浄し，1.5%オスミウム酸で10℃，6時間固定した。葉片をエタノールで脱水して Spurr樹脂に包埋し，超薄切片を作製した後，酢酸ウランとクエン酸鉛で染色してJEM-T7S 電顕で観察した。なお，本実験は茨城大学農学部の長南信雄教授の協力を得て行った。

（2）結果及び考察

図IV-7の葉身横断面の電顕写真にみられるように，*P. dichotomiflorum* のKranz 細胞（図ではBSC）内の葉緑体は液胞によって押しやられるように遠心的な分布をとっていた（図IV-7A）。また，葉緑体はよく発達したグラナ構造をもち，多数のデンプン粒を含んでいた（図IV-7B）。そして，多数の大きなミトコンドリアが葉緑体の内側（維管束側）に密着して存在し，その内膜構造はよく発達していることが認められた（図IV-7B）。このように，*P. dichotomiflorum* では葉緑体もミトコンドリアも遠心的に分布しており，しかも，両者の位置関係はNAD-ME（P）種と同様であった。また，Kranz細胞壁にスベリン層は確認できず，この点もNAD-ME（P）種と同様であった。

ところで，NAD-ME型の脱炭酸反応はKranz細胞内のミトコンドリアで行われる（Hatch and Kagawa, 1974b）。従って，放出されたCO₂が葉緑体内でRuBPカルボキシラーゼにより固定されるまでには2つの細胞内小器官の膜系とその間の細胞質を通過せねばならず，当然CO₂は大きな抵抗を受けるものと考えられる。そのため，こうした抵抗をできるだけ小さくするために，NAD-ME型の植物ではKranz細胞内で両小器官が密着して両者の間の細胞質部分を少なくし，しかも，ミトコンドリアを外側から葉緑体が囲み込むような配列をとることによって放出されたCO₂を外へ漏らさず効率的に固定しているのではないかと考えられる。NAD-ME（F）種がこのようにNAD-ME（P）種と同様な葉緑体とミトコンドリアの位置関係をもつということは，NAD-ME型の光合成的炭素代謝にとって両者の位置関係が最も重要であり，これら細胞内小器官の分布が遠心的であるか求心的であるかは他の要因と関連して決まっているのではないかと推察される。葉緑体とミトコンドリアの相互の位置関係の重要性について，最近，Holbrookら（1985）がC₃/C₄中間種の*P. milioides*がC₃種とC₄種の間的な光呼吸量を示すことの説明として維管束鞘細胞内においてミトコンドリアで生じた光呼吸由来の



図IV-7. *P. dichotomiflorum*の Kranz細胞の微細構造。

A: 発達したグラナ構造をもつ葉緑体 (CP) が Kranz細胞 (BSC) の中で遠心的な分布をしており、大きなデンプン粒 (S) を含んでいる。

MC: 葉肉細胞, VB: 維管束, X6000。

B: 大型のミトコンドリア (Mt) が多数葉緑体 (CP) と液胞 (V) の間に分布している。X14000。

CO₂ を外側の葉緑体で再固定することによるものであるという見解を明らかにしている。

IV-4. 葉身内部の形態的特徴

C₄ 植物の葉構造のうち、脱炭酸酵素型によって異なるものとしては従来から Kranz細胞内の葉緑体の分布、あるいはメストム鞘の有無が注目されてきた。しかし、最近になって、葉身横断面における葉肉細胞と Kranz細胞の面積比 (Hattersley, 1984) あるいは維管束間距離 (Kawamitsu ら, 1985) 等も脱炭酸酵素型間で異なっていることがわかってきた。

ところで、本研究におけるNAD-ME (F) 種の新たな発見によって Kranz細胞内の葉緑体分布の決定要因に関して興味もたれた。それとともに、葉身の他の形態的特徴にNAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の間でどのような違いがあり、また、その違いが葉緑体分布とどのように関連しているのかといった点も検討すべき問題と考える。さらに、前節までに明らかとなった両者の $\delta^{13}\text{C}$ 値や気孔拡散伝導度の違いに形態的特徴がどのように関連しているのかという点も興味ある問題である。そこで、本実験では Panicum 属C₄ 種の葉身の多数の形態的な特徴を調査し、NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の違いを中心に、他の脱炭酸酵素型種間の違いも含めて検討した。

(1) 材料及び方法

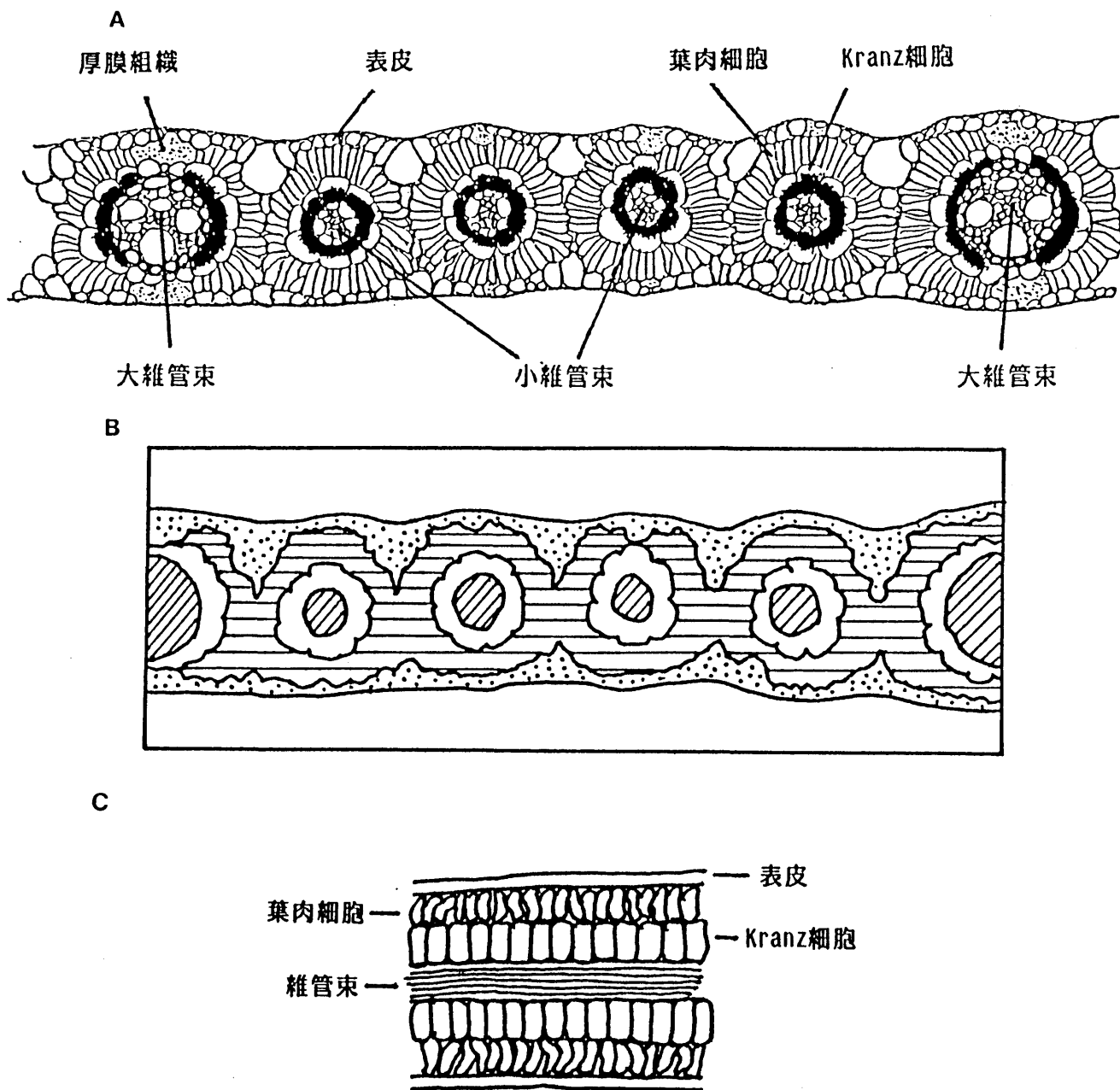
供試材料：表IV-3に示したように2変種を含む Panicum属合計22種を用いた。脱炭酸酵素型の未同定のは葉構造及びPIBパターンから推定した。また、Dichotomiflora グループ内の種 (*印) のうち、P. coloratum のcv. Kabulabula と cv. Solai は染色体数や外部形態の違いから別種として扱った。

測定方法：屋外圃場で生育させた植物体の栄養生長期における最上位展開葉につき図IV-8にみられるような約30 μm 厚の横断面と縦断面切片を振動型ミクロトーム (Vibratome, Oxford社製) によって作成し、I₂-KI液で染色して表V-4に示した種々の形態的特徴を光学顕微鏡下で観察測定した。横断面における調査項目は、大維管束間にある小維管束の数、大維管束を囲む Kranz細胞数、小維管束を囲む Kranz細胞数及び維管束間距離である。大維管束と小維管束の区別は後生木部が発達しているものを前者、そうでない

表IV-3. 葉構造の観察に用いた Panicum種。


	種名	種名 略号	供試 系統数
NADP-ME	<u>P. antidotale</u>	ANT	3
	<u>P. obtusum</u>	OBT	2
NAD-ME(F)	<u>P. coloratum</u> (cv. Kabulabula) *	KAB	5
	<u>P. coloratum</u> (cv. Solai) *	SOL	5
	<u>P. dichotomiflorum</u> *	DIC	5
	<u>P. laevifolium</u> *	LAE	5
	<u>P. longijubatum</u> *	LON	1
NAD-ME(P)	<u>P. bergii</u>	BER	3
	<u>P. capillare</u>	CAP	1
	<u>P. coloratum</u> *	COL	7
	<u>P. coloratum</u> var. <u>makarikariense</u> *	MAK	6
	<u>P. decompositum</u>	DEC	1
	<u>P. dregeanum</u>	DRE	2
	<u>P. hallii</u>	HAL	1
	<u>P. lanipes</u> *	LAN	1
	<u>P. miliaceum</u>	MIL	2
	<u>P. queenslandicum</u>	QUE	1
	<u>P. stapfianum</u> *	STA	5
	<u>P. virgatum</u>	VIR	3
	PEP-CK	<u>P. deustum</u>	DEU
<u>P. infestum</u>		INF	1
<u>P. maximum</u>		MAX	3
<u>P. maximum</u> var. <u>trichoglume</u>		TRI	1
<u>P. molle</u>		MOL	2
<u>P. ramosum</u>		RAM	1
<u>P. texanum</u>		TEX	1


*, Dichotomifloraグループに含まれる種。



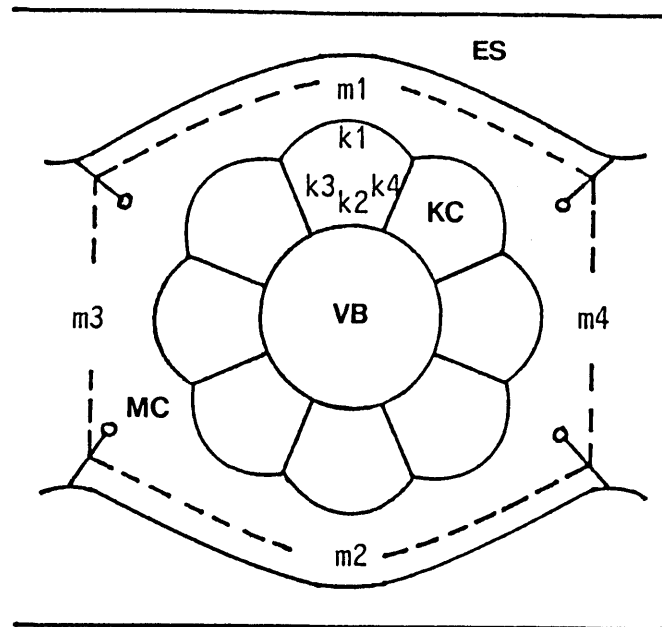
図IV-8. *P. coloratum* var. *makarikariense* (NAD-ME (P) 種) の葉身断面における形態的特徴。

A: 葉身横断面。

B: 大維管束間の各組織の面積測定用模式図。 , 表皮+厚膜組織;

, 葉肉細胞; , Kranz細胞; , 維管束。

C: 葉身縦断面。



図IV-9. C_4 植物の葉身横断面の模式図。

MT, 葉肉細胞の全体の外周 ($m_1+m_2+m_3+m_4$) ;

MUL, MTのうち表皮と接する部分の長さ (m_1+m_2) ;

KT, Kranz細胞1個の外周 ($k_1+k_2+k_3+k_4$) ;

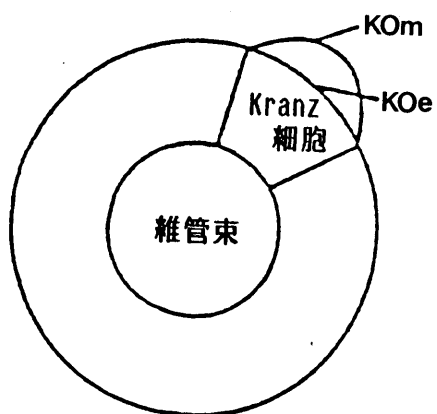
KO, KTのうち葉肉細胞と接する部分の長さ (k_1) ;

KI, KTのうち維管束と接する部分の長さ (k_2) ;

KO/T , KTに占めるKOの割合 ($k_1/(k_1+k_2+k_3+k_4)$) ;

ES, 表皮+厚膜細胞 ; MC, 葉肉細胞 ;

KC, Kranz細胞 ; VB, 維管束。



図IV-10. Kranz 細胞外周のうち葉肉細胞と接する部分の長さの推定値 (KOe) を求めるための模式図。KOMは実測値。

ものを後者とした。また、葉身横断面の顕微鏡写真を拡大し、各組織ごとに分割して面積を自動面積計で測定し全体に占める各組織の割合を求めるとともに、葉肉細胞とKranz細胞の面積比を求めた。葉身縦断面の拡大写真からはKranz細胞の縦の長さ（葉脈方向の長さ）と横の長さ（葉幅方向の長さ）を測定し、両者の比を求めた。

さらに、図IV-9に示したように葉身横断面の顕微鏡写真をもとに、各維管束について葉肉細胞とKranz細胞の周長等をキルビメーターを用いて計測した。その際、葉肉細胞については個々の細胞の境界が不明瞭だったため、1つの維管束を囲む葉肉細胞全体の長さ（MT）及びその表皮と接する部分の長さ（MUL）を測定した。Kranz細胞については個々の細胞の外周長（KT）、KTのうち葉肉細胞と接する部分（KO）、KTのうち維管束と接する部分（KI）の各長さを測定した。また、Kranz細胞の周長のうち、葉肉細胞と接している部分の長さ（KO）、及びその全周長に占める割合（KO/T）については図IV-10に示したように維管束とKranz細胞を同心円とみなしたときの推定値を図IV-9中の K_2 、 K_3 、 K_4 及び維管束を囲むKranz細胞数により計算し、実測値÷推定値によりKranz細胞の葉肉細胞側への膨らみ程度を表示した。大維管束と小維管束について測定したが、小維管束により大きな変異がみられたためここでは小維管束の結果を示した。

（2）結果及び考察

種々の葉構造的特徴のうち、まず、各組織の面積的大きさ等をPanicum属全体で比較した結果を表IV-4及び表IV-5に示した。このうち主なものについて考察を加える。

大維管束間の小維管束の数：大維管束間の小維管束の数はPEP-CK種がNAD-ME（F）及びNAD-ME（P）種に対して有意に多かった。また、大維管束を囲むKranz細胞数についてはNADP-ME種が、小維管束を囲むKranz細胞数についてはNAD-ME（P）種が最大であった。これらの形質は本実験においてはじめて調査されたものである。大維管束間の小維管束数は葉幅の大きい草種ほど多い傾向が著者らの他の実験において認められ、葉身の幅の拡大に小維管束が関与している可能性が示唆された。

維管束間距離：維管束間距離は長いグループ（NAD-ME（P）種及びNAD-ME（F）種）と短いグループ（NADP-ME種及びPEP-CK種）とに分かれた。Kawamitsuら(1985)はメストム鞘を欠くKS種はメストム鞘を有するMS種に比べて維管束間距離が短い、MS種内のNAD-ME種とPEP-CK種の間では差はみられない

という結果を得ている。しかし、本実験では、PEP-CK種の維管束間距離はNAD-ME種に比べて有意に短かった。これは本実験で用いた Panicum 属の PEP-CK種は葉幅の広い種が多く、Kawamitsu らの実験のように PEP-CK種でも葉幅の狭いスズメガヤ亜科の種を含んでいないためと考えられた。

葉身横断面における各組織の割合：Hattersley (1984) と Wilson and Hattersley (1983) は多数のイネ科 C_4 種及び Panicum種について葉肉細胞/Kranz 細胞面積比を調べ、その値はNADP-ME種>NAD-ME種>PEP-CK種の順であるという結果を得ており、本実験でも同様な結果を得た。しかし、本実験ではさらにNAD-ME (P)種とNAD-ME (F)種との間で有意な差がみられた。つまり、光合成の炭素代謝機構の面では差異の見られない両者において、葉肉細胞/Kranz細胞面積比が異なっていることはこの形質が脱炭酸酵素型の違いのみに基づいているものではないことを示している。

縦断面における Kranz細胞の縦/横比：Brown (1974) はキビ亜科とスズメガヤ亜科に属する種について Kranz細胞の縦/横比を調べキビ亜科では縦/横比は1より大きく Kranz 細胞は横長であるが、スズメガヤ亜科では1より小さく縦長で、亜科レベルで大きく分化しており、何らかの生態的適応の違いと関連しているのではないかと報告している。本実験の結果、同じキビ亜科内の Panicum種でもNAD-ME (P)種の Kranz細胞は縦長、一方、NAD-ME (F)種は横長であり、両者が生態的適応の面で異なっている可能性も考えられる。

さて、以上の調査形質のうち葉肉細胞/Kranz細胞比を除く10形質について行った主成分分析の結果を表IV-6と図IV-11に示した。表IV-6にみられるように最初の3主成分で75%以上が説明され、第1主成分には、大維管束間の小維管束数、大維管束間の全横断面積、維管束割合が主に関与し、第2主成分には小維管束を囲む Kranz細胞数と Kranz細胞割合が主に関与していた。図IV-11の各種のスコア散布図をみると、NADP-ME種、NAD-ME (F)種及びNAD-ME (P)種はそれぞれ小グループを形成したが、PEP-CK種は2つのグループに分かれた。PEP-CK種の1つのグループに含まれる種 (P. infestum, P. maximum 及び P. maximum var. trichoglume) は染色体の基本数が8で、他の Panicum 種の9と異なっているが (Brown, 1977), 葉構造の面でも他と異なったグループを形成することが明らかとなった。

以上の結果は Panicum属全体で比較したものであるが、Dichotomifloraグループ内のNAD-ME (F)種とNAD-ME (P)種についても比較した (表IV-7)。維管束

表IV-4. 各脱炭酸酵素型の細胞面積等に関する形質。

形質	NADP-ME (n=2)	NAD-ME (F) (n=5)	NAD-ME (P) (n=12)	PEP-CK (n=7)
大維管束間の 小維管束の数	10.3±4.7	5.1±0.5	4.2±1.3	11.8±3.0
大維管束を囲む Kranz 細胞数	19.8±0.6	13.6±1.1	11.8±1.9	12.8±0.6
小維管束を囲む Kranz 細胞数	7.7±1.6	6.6±0.4	8.1±0.5	5.7±1.6
維管束間距離 (μm)	123.6±9.1	203.5±11.3	189.5±15.0	148.2±25.1
大維管束間の 全横断面積 (cm^2)	0.227±0.026	0.277±0.046	0.167±0.052	0.287±0.090
各組織の面積 割合				
表皮と厚膜組織 (%)	34.5±2.4	23.1±3.7	30.0±3.5	27.9±2.6
葉肉細胞 (%)	45.2±1.6	38.6±5.6	39.8±4.8	38.4±6.2
Kranz 細胞 (%)	14.2±0.6	30.5±4.7	20.6±2.0	26.4±5.1
維管束 (%)	6.1±0.3	7.7±1.3	9.7±2.0	7.3±1.7
葉肉細胞/ Kranz 細胞面積比	3.3±0.1	1.3±0.4	2.0±0.3	1.6±0.5
葉身縦断面における Kranz 細胞の縦横比	1.5±0.5	1.2±0.2	0.8±0.1	1.0±0.2

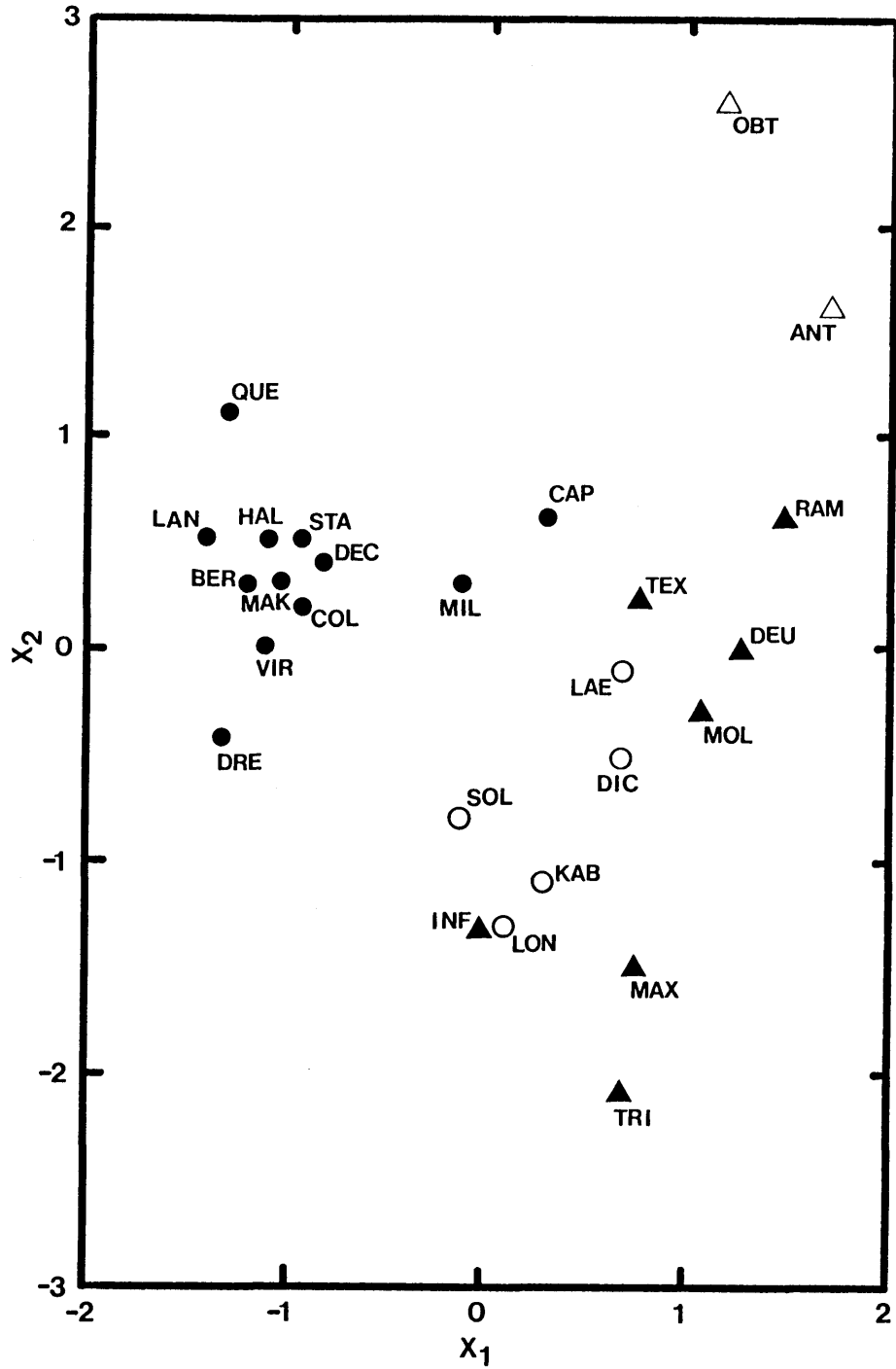
表IV-5. 細胞面積等に関する形質の平均の差の有意検定。

形質	NADP-ME vs. NAD-ME(F)	NADP-ME vs. NAD-ME(P)	NADP-ME vs. PEP-CK	NAD-ME(F) vs. NAD-ME(P)	NAD-ME(F) vs. PEP-CK	NAD-ME(P) vs. PEP-CK
大維管束間の 小維管束の数	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	**	***
大維管束を囲む Kranz 細胞数	**	***	*	*	N. S.	N. S.
小維管束を囲む Kranz 細胞数	N. S.	N. S.	N. S.	***	N. S.	**
維管束間距離	*	*	N. S.	N. S.	***	**
大維管束間の 全横断面積	N. S.	N. S.	N. S.	**	N. S.	*
各組織の面積 割合						
表皮と厚膜組織	*	N. S.	N. S.	**	*	N. S.
葉肉細胞	*	*	*	N. S.	N. S.	N. S.
Kranz 細胞	**	***	***	*	N. S.	*
維管束	N. S.	***	N. S.	*	N. S.	*
葉肉細胞/ Kranz 細胞面積比	***	***	***	*	N. S.	N. S.
葉身縦断面における Kranz 細胞の縦横比	N. S.	N. S.	N. S.	**	N. S.	N. S.

*, P<0.05 ; **, P<0.01 ; ***, P<0.001 ; N. S., 有意差なし。

表IV-6. 細胞面積等10形質による主成分分析の因子負荷量,
固有値及び寄与率。

形質	主成分		
	1	2	3
大維管束間の 小維管束の数	0.80	-0.16	-0.35
大維管束を囲む Kranz 細胞数	0.56	0.35	-0.23
小維管束を囲む Kranz 細胞数	-0.52	0.70	0.26
維管束間距離	-0.50	-0.10	0.81
大維管束間の 全横断面積	0.76	-0.10	0.40
各組織の面積 割合			
表皮と厚膜組織	-0.24	0.63	-0.63
葉肉細胞	0.36	0.60	0.56
Kranz 細胞	0.14	-0.93	0.07
維管束	-0.80	-0.20	-0.29
葉身縦断面における Kranz 細胞の縦横比	0.63	0.35	0.08
固有値	3.29	2.43	1.85
寄与率	32.9	24.3	18.5



図IV-11. 細胞面積等10形質による主成分分析における各種の第1主成分 (X_1) - 第2主成分 (X_2) 平面でのスコア散布図。

△, NAD-ME種; ○, NAD-ME (F)種;

●, NAD-ME (P)種; ▲, PEP-CK種。

種名の略号は表IV-3. を参照。

間距離と横断面における葉肉細胞割合を除いて調査したほとんどの形質で両者に有意な差がみられ、両者は Kranz細胞内の葉緑体の分布以外の形態的特徴の面でも大きく異なっていることが明らかとなった。

次に、葉構造的特徴のうち Kranz細胞の周長に着目した諸形質の比較を表IV-8及び表IV-9に示した。この諸形質は Kranz細胞の表面積の大きさ、特に、Kranz細胞と葉肉細胞の接触面積の大きさに関連しているものと考えられ、 C_4 ジカルボン酸や CO_2 の移動の難易とも関係しているものと思われる。葉肉細胞全体の外周長(MT)、葉肉細胞の外周のうち表皮や機動細胞と接する部分の長さ(MUL)そして、個々のKranz細胞の外周(KT)、外周のうち葉肉細胞と接する部分の長さ(KO)及び維管束と接する部分の長さ(KI)等いずれの形質もNAD-ME(F)種が最大で、NADP-ME種が最小であった。また、Kranz細胞外周長に占める葉肉細胞と接する部分の割合(KO/T)はPEP-CK種とNAD-ME(F)種が高かった。PEP-CK種は、各組織の面積割合等の形質をもとにした主成分分析の結果2つのグループに分かれたが、KO/Tの値も両者で異なっていた。すなわち、染色体の基本数(X)が8であるグループのKO/Tの平均は58.4と極端に高かったが、他種の平均は45.7であり、 $X=8$ のグループはKranz細胞と葉肉細胞の接触面積が極めて大きいことがわかった。また、NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の間では調査した全ての形質に有意差がみられ、特に、前者のKranz細胞が大型であることが明らかとなった。

調査した6形質について行った主成分分析の結果を表IV-10と図IV-12に示した。表IV-10にみられるように最初の2主成分で95%が説明され、第1主成分にはKO、KI、KTが関与し、Kranz細胞の大きさを示す主成分と言える。また、第2主成分には主にKO/Tが関与していた。図IV-12の各種のスコア散布図をみると、面積割合等に基づく主成分分析の結果(図IV-11)と同様に、NADP-ME種、NAD-ME(F)種及びNAD-ME(P)種はそれぞれまとまった小グループを形成した。また、PEP-CK種も同様に2つのグループに分かれた。

ところで、個々のKranz細胞は葉肉細胞側へ膨らんだ構造をもっている。その膨らみ程度を(1)材料及び方法で述べた方式により推定した(図IV-10参照)。KOでみたときの膨らみ程度(KOm/KOe)でも、KO/Tでみたとき((KO/Tm)/(KO/Te))も、NAD-ME(P)種が最も小さかった。これに対して、NADP-ME種、NAD-ME(F)種及びPEP-CK種の間では大差なく、これらの草種ではKranz細

表IV-7. *Panicum*属 *Dichotomiflora* グループ内のNAD-ME(F)種と
NAD-ME(P)種の細胞面積等に関する形質。

形質		NAD-ME(F) (n=5)	NAD-ME(P) (n=12)	有意水準
大維管束間の 小維管束の数		5.1±0.5	3.8±0.4	**
大維管束を囲む Kranz 細胞数		13.6±1.1	10.8±1.7	*
小維管束を囲む Kranz 細胞数		6.6±0.4	8.1±0.3	***
維管束間距離	(μm)	203.5±11.3	197.3±10.3	N.S.
大維管束間の 全横断面積	(cm^2)	0.277±0.046	0.166±0.121	**
各組織の面積 割合				
表皮と厚膜組織	(%)	23.1±3.7	31.3±2.3	**
葉肉細胞	(%)	38.6±5.6	39.1±1.1	N.S.
Kranz 細胞	(%)	30.5±4.7	20.1±1.7	**
維管束	(%)	7.7±1.3	9.7±0.9	*
葉肉細胞/ Kranz 細胞面積比		1.3±0.4	2.0±0.1	*
葉身縦断面における Kranz 細胞の縦横比		1.2±0.2	0.8±0.1	**

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; N.S., 有意差なし。

表IV-8. 細胞周長等に関する形質の平均。

形質	NADP-ME (n=2)	NAD-ME(F) (n=5)	NAD-ME(P) (n=12)	PEP-CK (n=7)
MT (μm)	198.0 \pm 34.0	285.3 \pm 19.1	227.6 \pm 15.9	198.5 \pm 37.9
MUL (μm)	105.5 \pm 18.4	186.9 \pm 16.6	165.9 \pm 12.9	131.6 \pm 23.9
KO (μm)	14.6 \pm 2.6	32.4 \pm 1.1	18.5 \pm 1.1	25.8 \pm 6.8
KI (μm)	5.3 \pm 0.4	11.0 \pm 0.6	7.7 \pm 0.9	8.7 \pm 1.6
KT (μm)	31.2 \pm 4.3	68.1 \pm 1.9	46.0 \pm 2.7	49.8 \pm 7.1
KO/T (%)	43.6 \pm 1.1	47.4 \pm 1.0	40.1 \pm 1.6	51.1 \pm 6.9

1) 図IV-9. 参照。

表IV-9. 細胞周長等に関する形質の平均の差の有意検定。

形質	NADP-ME vs. NAD-ME(F)	NADP-ME vs. NAD-ME(P)	NADP-ME vs. PEP-CK	NAD-ME(F) vs. NAD-ME(P)	NAD-ME(F) vs. PEP-CK	NAD-ME(P) vs. PEP-CK
MT	*	N.S.	N.S.	***	***	N.S.
MUL	N.S.	N.S.	N.S.	*	***	**
KO	N.S.	**	*	***	*	*
KI	**	N.S.	**	***	**	N.S.
KT	N.S.	N.S.	*	***	***	N.S.
KO/T	N.S.	N.S.	**	***	N.S.	**

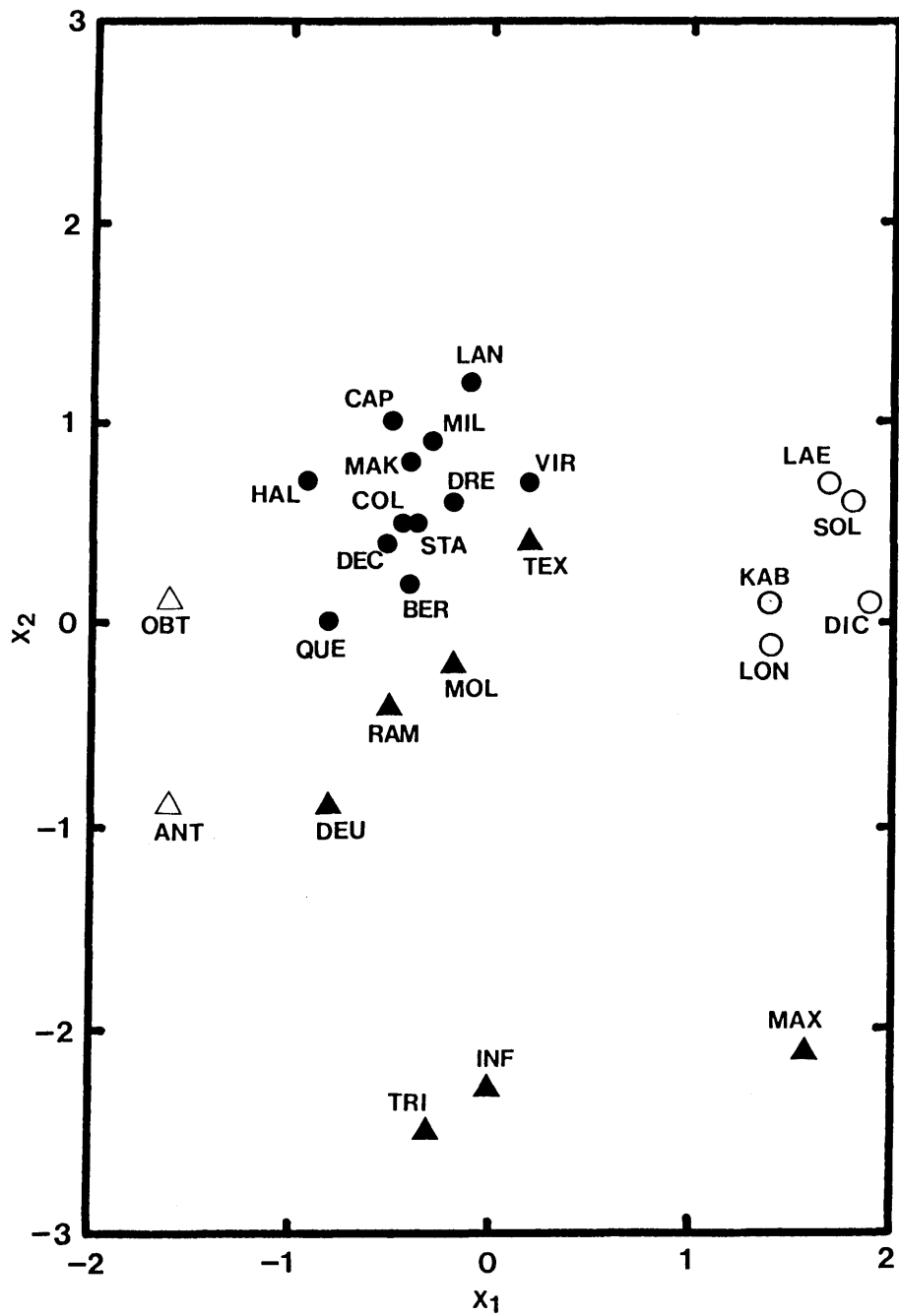
形質略号は図IV-9参照。

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; N.S., 有意差なし。

表 IV - 10 . 細胞周長等 6 形質による主成分分析の
因子負荷量，固有値及び寄与率。

形質	主成分	
	1	2
MT	0.67	0.68
MLU	0.62	0.74
KO	0.91	-0.40
KI	0.96	-0.18
KT	0.98	-0.01
KO/T	0.42	-0.88
固有値	3.72	1.97
寄与率 (%)	62.0	32.9

形質略号は図 IV - 9 参照。



図IV-12. 細胞周長等6形質による主成分分析における各種の第1主成分 (X_1) - 第2主成分 (X_2) 平面でのスコア散布図。
 図の記号は図IV-11と同。種名の略号は表IV-3を参照。

表IV-11. Kranz細胞の全周長のうち葉肉細胞と接する部分の長さ(KO)及び全周長に占める割合(KO/T)の実測値と推定値及び両者の比。

		NADP-ME	NAD-ME(F)	NAD-ME(P)	PEP-CK
KOm	(μ m)	14.6	32.4	18.5	25.8
KOe	(μ m)	9.9	22.8	15.4	17.1
KOm/KOe		1.47	1.42	1.20	1.50
KO/Tm	(%)	43.6	47.4	40.1	51.1
KO/Te	(%)	37.4	38.9	35.9	41.6
(KO/Tm)/(KO/Te)		1.17	1.22	1.12	1.23

KOm, KO/Tm; 実測値。

KOe, KO/Te; 推定値。

胞を葉肉細胞側に膨らませて接触面積を大きくする構造になっていることが明らかになった(表IV-11)。

このように、種々の葉身の形態的特徴に関して脱炭酸酵素型の異なる種間で大きな差異がみられた。特に、NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の違いが大きく、両者は光合成の炭素代謝機構の面では同じであるが、生態的には異なった環境に適応して分化した可能性が考えられた。

IV-5. 考察

本実験の結果、NAD-ME(F)種はNAD-ME(P)種に比べて $\delta^{13}\text{C}$ 値が大きく、大気条件下の光合成速度も高く、気孔拡散伝導度も大きいことが明らかとなった。また、前者のKranz細胞は大型で、このため、葉肉細胞/Kranz細胞面積比は小さく、Kranz細胞は葉肉細胞側に大きく膨らんで両細胞の接触面積を大きくする構造となっていた。

さて、本章の考察としては主に2点にしぼって行ってみたい。

i) 本実験において、NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の間で $\delta^{13}\text{C}$ 値に有意な差がみられたことは C_4 種間でみられる $\delta^{13}\text{C}$ 値の違いの解釈を一步進めることができると考えられる。すなわち、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が脱炭酸酵素型によって異なる理由として、IV-1.の結果及び考察で述べたように2つの可能性が考えられている。その1つは、脱炭酸反応において放出された CO_2 がKranz細胞から葉肉細胞側へ漏れる程度に差があるのではないかということである。Hattersley(1982)によれば、漏れの程度が大きいほど、Kranz細胞内の機密性が低下し、RuBPカルボキシラーゼによって分別された $^{13}\text{CO}_2$ が細胞外へ出やすくなって、その分 $^{12}\text{CO}_2$ の分別吸収が多くなる。その結果として $\delta^{13}\text{C}$ 値はより小さな値となる。そして、脱炭酸される CO_2 は主に原形質膜や細胞壁を通して細胞間を移動するため、細胞壁に漏れの程度を左右する何らかの特徴的違いがあるはずであるとし、一つの例として、NADP-ME種とPEP-CK種のKranz細胞壁には水や CO_2 に対して不透性のスベリン層が存在するが、最も低い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示すNAD-ME種では存在しないという点を上げている。もう一つの考え方は、 CO_2 の葉内への拡散過程に差がみられるのではないかという考え方である。O'Leary(1981)によれば、気孔拡散抵抗が大きいほど葉肉への CO_2 の供給が減少し、外気 CO_2 濃度(C_a)に対

する細胞間隙CO₂濃度(C_i)の比が小さくなり、そこでの¹³CO₂と¹²CO₂の分別が強くなり、C₄植物の場合には、δ¹³C値は小さくなる。しかし、この2つの分別過程はそれぞれ独立して作用するのではなく、相互に関連し合っているものと考えられ、どちらにより力点が置かれるかは研究者によって異なっている。

本実験における電顕観察の結果、NAD-ME(F)種のP.dichotomiflorumのKranz細胞の細胞壁にスベリン層は確認できず、また、今までの報告でも存在しないとされている(Hattersley and Browning, 1981)。従って、NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種はスベリン層の有無という点では相違がなく、両者のδ¹³Cの値の違いをHattersley(1982)のようにスベリン層の有無による漏れ程度の違いということから説明することはできない。一方、NAD-ME(F)種の気孔拡散伝導度はNAD-ME(P)種のそれよりも大きかったものの、C_i/C_a比は両者でほとんど差が認められず、CO₂の葉内への拡散過程の違いのみから説明することも難しい。恐らく両者がδ¹³C値の違いの原因となっているものと推察されるが、Kranz細胞からの漏れには葉緑体の分布の違いも関与している可能性も考えられる。また、従来はこのようなCO₂の拡散程度の違いも脱炭酸酵素型が異なることの何らかの反映であると考えられていたが、同じ脱炭酸酵素型であるNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種間でδ¹³C値に違いがみられたという本実験の結果から、脱炭酸酵素型が同じでもδ¹³C値に差が生じることが明らかとなった。

ii) NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の間では葉身の形態的特徴の上で多くの違いがみられたが、特に、Kranz細胞の大きさ、形に際立った特徴が認められた。同時に、両者の間には光合成速度や拡散伝導度にも違いがみられたことから、基本的な光合成炭素代謝は同じでも、光合成効率の面では異なっており、葉構造の違いはそのような効率の違いと結びついていることが考えられる。例えば、NAD-ME(F)種のKranz細胞が大型で、葉肉細胞側に大きく膨らみ両細胞の接触面積を大きくしているということは、両細胞間の光合成中間代謝物の移動を速やかにかつ大量に行うために有利な特徴と考えられる。この点に加えてNAD-ME(F)種でみられたKranz細胞内の葉緑体が遠心的に葉肉細胞側の内壁に密着し、その内側にミトコンドリアを囲んでいるという構造はC₄ジカルボン酸の移動距離を最小にし、効率よくCO₂の固定を行うことを可能にしているものと推察される。IV-2. でみられたNAD-ME(F)種がNAD-ME(P)種よりも carboxylation efficiency が若干高いということもこのような葉構造の違いと結びつ

いているのかも知れない。しかしながら、NAD-ME (F) 種におけるこのような Kranz 細胞の特徴は同時に葉外への水分の放出量も大きくしている可能性がある。すなわち、Kranz 細胞が葉肉細胞側へ膨らんで接触面積の大きい NAD-ME (F) 種のほうがより水分の移動量が多いのではないかと考えられる。また、本実験では NAD-ME (F) は蒸散速度や気孔拡散伝導度も高いことも見出された。このような CO₂ 交換特性及び葉構造の特徴から、NAD-ME (F) 種と NAD-ME (P) 種は生態的適応の場面で異なっており、前者は特に、水分条件の良好な環境に適応して分化したのではないかと推察された。

V. Panicum 属 Dichotomiflora グループ内草種の乾物生産特性と要水量

各脱炭酸酵素型がどのような環境条件に適応して進化したかは重要な問題であるが、現在の各脱炭酸酵素型の地理的分布を気象要因との関係で比較することによって生態的適応の一端を知ることができる。緒言において述べたように、Hartley (1958a, 1958b)及び Hartley and Slater (1960) はスズメガヤ亜科は熱帯サバンナ、キビ亜科は熱帯雨林あるいは熱帯モンスーン地帯に分布の中心があり、両者は降雨量との関係で住みわけていと報告している。また、Brown (1977) は最も耐乾性に優れたイネ科 C_4 種はスズメガヤ亜科の各種、キビ亜科の Aristideae 及び Panicum 属の section Dura に属する種で、一部を除いてほとんどが NAD-ME 種であることから、三つの脱炭酸酵素型の中では NAD-ME 種が最も耐乾性に富むものであると考えている。さらに、Ellis ら (1980) は南西アフリカのナミビアの植生を調査し、脱炭酸酵素型の分布は降雨量と関係が深く、降雨量の多い地域で NADP-ME 型、降雨量の少ない地域で NAD-ME 型の比率が増加し PEP-CK 型は両者の中間的な分布をしていると報告している。我が国でも武田・箱山 (1985) 及び武田ら (1985) によって主に降雨量との関連で検討されている。これらの点から、三つの脱炭酸酵素型の分布は降雨量等の水分条件と密接に関連しており、各脱炭酸酵素型への分化が異なる水分環境への適応の結果として起こったのではないかと推察される。中でも、NAD-ME 種が脱炭酸酵素型の中では最も乾燥に適応して分化したと考えられているが、今まで調査されているものは全て NAD-ME (P) 種であり NAD-ME (F) 種に関する情報はほとんど得られていない。

IV章において、Panicum 属 Dichotomiflora グループ内の NAD-ME (F) 種と NAD-ME (P) 種は CO_2 交換特性や葉構造の点で差異のあることが示された。特に、気孔拡散伝導度や Kranz細胞の形態的差異から両者は異なる水分環境に適応して分化した可能性が考えられた。従って、もし、NAD-ME (F) 種と NAD-ME (P) 種とで水分適応の面で差異がみられるならば、葉緑体分布の違いが水分環境に対する適応の差異と結びついていることも考えられ、興味ある問題を提起する。

ところで、牧草生産においては、いうまでもなく収量性がまず第一に重要な問題であり、特に温暖な地域で栽培される暖地型牧草の場合には初期生長速度が雑草との競争に打ち勝つために重要な問題となる。しかし、Dichotomiflora グループ内の草種についてはこれらの特性が未だ十分に検討されていない。そこで、本実験ではまず生育全般にわたる生長速

度を調査し、NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の差異を検討し、次いで、要水量の面から両者の水分適応の差異を検討した。

V-1. NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の生長速度の比較

暖地型牧草は、一般に初期生長は不良であり、そのことが暖地型牧草の栽培面積が拡大しない一つの原因ともなっている。しかし、清水ら(1981)は、多数のイネ科暖地型牧草の初期生長速度を比較した結果、かなりの種間差があり、特に、*Dichotomiflora*グループの *P. laevifolium*は旺盛な生長を示すことを報告している。既に見てきたように、*P. laevifolium* はNAD-ME (F) 種であるが、NAD-ME (F) 種全体として旺盛な初期生長を示すかどうかは明らかでない。また、年間収量としてみたとき、NAD-ME (F) 種の *P. dichotomiflorum* や *P. coloratum* (cv. *Kabulabula* あるいはcv. *Solai*) が他の高位生産を上げている暖地型牧草(ローズグラス等)に匹敵する収量を上げることが報告されている(越智, 1981; 越智, 1984)。しかし、NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種を同一条件下で比較した例はまだない。そこで、本実験では *Panicum*属 *Dichotomiflora*グループ内草種の生長速度を調査し、NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の間で比較した。

(1) 材料及び方法

供試材料: 実験には、NAD-ME (F) 種として *P. coloratum* (cv. *Kabulabula*) (以下KABと略)、*P. coloratum* (cv. *Solai*) (SOL)、*P. dichotomiflorum* (DIC) 及び *P. laevifolium* (LAE) を、また、NAD-ME (P) 種として *P. coloratum* (COL)、*P. coloratum* var. *makarikariense* (MAK) 及び *P. stapfianum* (STA) を供試した。DICとLAEは1年生、他は多年生である。1年生と多年生の区別は、秋に株を温室に掘り上げ翌年まで生存しなかったものを1年生、生存し、再度圃場に移植して生育したものを多年生として行った。

栄養生長期の生長量の比較: 供試系統数はSOLが2、COLとMAKが4、その他は5である。1982年6月22日に育苗箱(45cm×36cm×10cm)に埋め込んだペーパーポット(径2cm×高さ10cm)に播種し、7月8日(2-3葉期)に同じ形の育苗箱に埋め込んだ大

径のペーパーポット（径10cm×高さ10cm）に各穴1本移植した。乾物量の調査は6-7葉期（NAD-ME（F）種は7月31日，NAD-ME（P）種は8月5日）及びその12日後の2回各系統5個体の地上部を採集して行った。実験は自然光ガラス室内で行ったが，気象条件としては7月が梅雨の影響で平均気温が低く（平年の-2.1℃），調査した7月下旬から8月中旬にかけても低温，日照不足が続き，生育期間中のガラス室内の平均気温は21℃で植物は徒長気味であった。

出穂期の生長量の比較：実験にはSOLは3系統，それ以外の草種は各5系統を用いた。1983年4月22日ペーパーポットに播種し，自然光ガラス室内で生育させた後，3-4葉期（5月25日）に圃場に移植した。各系統とも株間30cmの1本植で4畦（1畦3m，畦間0.8m）移植した。施肥は17-17-17化成肥料で基肥として窒素成分14kg/10aを与えた。出穂始期頃より3回（7月14日，7月28日，8月11日）地上部を1系統あたり5株刈り取り，生長量を調査した。ただし，LAEは早生で出穂が早かったため7月14日と7月28日の2回の刈り取りを行った。生育期間の気象条件をみると，5月の気温は平年並み（平均気温15.7℃）であったが，6月の梅雨入り（12日）以降低温と多雨が続き，梅雨明け（7月26日）とともに温度は平年並みにもどったが，全般に，この年の気象条件はC₄植物にとっては好適とはいえないものであった。

（2）結果及び考察

栄養生長期の生長速度の比較：表V-1に1回目の調査時点（NAD-ME（F）種は7月31日，NAD-ME（P）種は8月5日）での生長に関わる各種形質の測定結果を示した。葉面積，葉重及び地上部乾物重はNAD-ME（F）種がNAD-ME（P）種より優っており，特に，葉面積は2.7倍にも達した。乾物率は10.8%とNAD-ME（P）種の16.0%に対して明らかに低かった。また，表には示していないが，葉身の厚さはNAD-ME（F）種が216.4μm，NAD-ME（P）種が174.4μmであった。これらの点から，NAD-ME（F）種はNAD-ME（P）種に比べて多汁質で，厚みのある葉を急速に展開していると言える。

ところで，両者は播種時期は同じ（6月22日）であり，一回目の調査日の早いNAD-ME（F）種が遅いNAD-ME（P）種より生長量が大きいため，両者の初期の生長に大きな差があることを示している。従来から，1年生の植物は多年生の植物に比べて初期

表V-1. NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の生長解析開始時の各種生長パラメーターの比較。

	葉令	草丈 (cm)	葉面積 (cm ²)	葉重 (mg)	地上部重 (mg)	比葉面積 (cm ² /mg)	乾物率 (%)
1. NAD-ME (F)							
LAE (5)	7.1	52.9	90.7	230.4	382.4	0.394	9.8
DIC (5)	6.8	38.9	65.8	160.4	240.3	0.410	12.4
KAB (5)	6.1	48.1	70.6	183.5	288.9	0.385	10.6
SOL (2)	6.3	50.3	66.8	169.7	295.2	0.394	10.4
平均	6.6±0.5	47.6±6.1	73.5±11.7	186.0±31.1	301.7±59.1	0.396±0.010	10.8±1.1
2. NAD-ME (P)							
COL (4)	6.3	31.0	21.4	67.2	103.2	0.318	16.2
MAK (4)	6.3	42.6	31.2	113.6	175.4	0.275	14.7
STA (5)	7.0	42.2	29.8	113.6	174.1	0.265	17.2
平均	6.5±0.4	38.6±6.6	27.5±5.3	98.1±26.8	150.9±41.3	0.285±0.029	16.0±1.3
1.-2.	0.1	9.0	46.0 **	87.9 *	150.8 *	0.111 *	5.2 ***

播種日は6月22日、調査日はNAD-ME (F) 種が7月31日、NAD-ME (P) 種が8月5日。

LAE, *P. laevifolium*; DIC, *P. dichotomiflorum*; KAB, *P. coloratum*(cv. Kabulabula); SOL, *P. coloratum*(cv. Solai); COL, *P. coloratum*, MAK, *P. coloratum* var. *makarikariense*; STA, *P. stapfianum*.

カッコ内の数字は供試系統数。

*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001。

生長が早いと言われている（大山，1975）。NAD-ME（F）種のうち，2種は1年生であり，NAD-ME（P）種は全て多年生であったため，平均としてみたときの両型種の生長の差は1年生と多年生の差が反映しているのではないかと考えられた。確かに，1年生のLAEはNAD-ME（F）種の中で最も生長量が大きかった。しかし，多年生のKABやSOLもNAD-ME（P）型の各種より有意に高い生長量を示し，両型種の生長量の違いは，1年生と多年生との違いとは考えられなかった。また，種子重にも両型種間で差はなく，両者の違いをこの点から説明することもできなかった。

表V-2に6-7葉期から12日間の期間内についての生長解析の結果を示した。両型種の平均で比較すると，相対生長率（RGR）はNAD-ME（F）種が0.190，NAD-ME（P）種が0.145とその差は有意ではなかったものの前者が高い傾向がみられた。そして，その高いRGRは純同化率（NAR）と葉面積比（LAR）の両者が高いことによって支えられており，中でも，LARの高いことがこの種のRGRを高くしていることが明らかとなった。

出穂期の生長量の比較：暖地型牧草の場合，イネ等のように育種が十分進んだ作物と異なり，1株内の各茎が一斉に出穂することはなく，通常主茎がまず出穂し，次いで分けつが徐々に出穂する。しかも株ごとにもバラつきが多い。このため出穂期を特定することは難しいが，本試験では調査した各種の50株の主茎の出穂時期の平均をその種の出穂始期とした。また，分けつ全体の出穂がそろそろ時期を出穂盛期としたが，その時期は出穂始期の約3週間後であった。出穂始期は，LAEが最も早く7月6日であった。次いでSOLが7月9日，COL，MAK，STA及びKABは7月16～20日であった。DICは調査期間内には出穂しなかった（DICの出穂始期は9月20日であった）。従って，早晚性の点ではNAD-ME（P）種はあまり種間に変異はみられなかったが，NAD-ME（F）種では極早生のLAEから晩生のDICまで大きな変異がみられた。

表V-3に出穂盛期における各種生長パラメーターを示した。NAD-ME（F）種は草丈，乾物重，葉面積ともNAD-ME（P）種より明らかに大きかった。生育日数に両型種で差がみられないことから，平均CGRもNAD-ME（F）種が有意に高かった。しかし，SLA，乾物率には両型種で差はみられなかった。

NAD-ME（F）種の中でも，LAEは極早生であり，初期生長は極めて良好であったが出穂盛期における乾物重では他のNAD-ME（F）種より劣っていた。しかし，それでもNAD-ME（P）種の2倍の乾物重を示していた。また，調査時点で未出穂であ

表V-2. NAD-ME (F)種とNAD-ME (P)種の生長解析。

	RGR (mg/mg/日)	RLGR (cm ² /cm ² /日)	NAR (mg/cm ² /日)	LAR (cm ² /mg)
1. NAD-ME (F)				
LAE	0.172	0.147	0.857	0.214
DIC	0.205	0.197	0.815	0.256
KAB	0.189	0.152	0.928	0.224
SOL	0.197	0.171	0.993	0.226
平均	0.190±0.014	0.167±0.023	0.898±0.079	0.230±0.019
2. NAD-ME (P)				
COL	0.175	0.184	0.881	0.198
MAK	0.138	0.161	0.741	0.183
STA	0.123	0.129	0.766	0.169
平均	0.145±0.027	0.158±0.028	0.796±0.075	0.183±0.015
1.-2.	0.055	0.009	0.102	0.047**

一回目の調査日は 7月31日 (NAD-ME (F)種) と 8月 5日 (NAD-ME (P)種)。

二回目はその後12日目。

種名略号は表V-1. 参照。

**、P<0.01。

表V-3. NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の出穂盛期における生長量の比較。

	生育日数 (日)	乾物重 (g/植物体)	葉面積 (cm ² / 植物体)	平均CGR (g /m ² / 日)	比葉面積 (cm ² /mg)	乾物率 (%)
1. NAD-ME (F)						
LAE	93	107.4	10096.2	4.81	0.189	16.3
DIC	107	174.0	18017.9	6.78	0.221	13.8
KAB	103	170.3	15302.0	6.89	0.252	19.4
SOL	94	145.7	20599.5	6.46	0.206	21.1
平均	99.3±6.9	149.4±30.7	16004.0±4493.0	6.24±0.97	0.217±0.027	17.7±3.3
2. NAD-ME (P)						
COL	106	48.6	5686.8	1.91	0.177	21.9
MAK	106	54.0	7081.7	2.12	0.186	18.0
STA	106	49.5	9751.7	1.95	0.198	22.5
平均	106	50.7±2.9	7506.7±2066.0	1.99±0.11	0.187±0.011	20.8±2.4
1.-2.	-6.7	98.7 ^{**}	8497.3 [*]	4.25 ^{**}	0.030	-3.1

種名略号はV-1. 参照。

*, P<0.05; **, P<0.01。

ったDICは、その後の追跡調査は行っていないが、出穂まではさらに生長量が増大し、出穂期の乾物生産としてはNAD-ME (F) 種の中で最大になると推察される。

以上のように、栄養生長期でみられたNAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の生長量の差は出穂期まで持続され、全体としての乾物生産にも大きな差となって表われた。

V-2. 異なる土壤水分条件下でのNAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の要水量の比較

C₃ 植物とC₄ 植物では乾物生産における水の利用効率に違いがみられ、C₄ 植物ではC₃ 植物に比べて要水量（単位乾物を生産するのに必要な水分量）が小さいということはよく知られている（松中・坂，1977；Brown and Simmons, 1979）。しかしながら、C₄ 植物中の脱炭酸酵素型の異なる種間で要水量に差がみられるかどうかについてはまだ報告はされていない。前節において明らかになったように、Panicum 属 Dichotomiflora グループのNAD-ME (F) 種はNAD-ME (P) 種に比べて、栄養生長期の水分含有率が高い。また、IV章でみたように蒸散速度が高く、気孔拡散伝導度も大きい。これらの点から、両型種は乾物生産における水利用効率の面でも違いがみられる可能性があり、本実験では土壤水分条件を変えて両者の栄養生長期の要水量の比較を行った。

(1) 材料及び方法

供試材料：供試草種はV-1. と同様であり、供試系統数はMAKとSTAが1、他は2である。また、Dichotomifloraグループ以外の Panicum属の草種のうち P. antidotale (NADP-ME種、以下ANT) と P. capillare (NAD-ME (P) 種、CAP) を各1系統ずつ供試し、Dichotomifloraグループの草種と比較検討した。

実験方法：1985年 6月 7日にペーパーポット（径2cm ×高さ10cm）に播種し、2-3葉期に1/5000aポットに1本植で移植し、7月11日から、NAD-ME (F) 種は11日間、NAD-ME (P) 種は生育が遅かったため14日間の地下部を含めた乾物生産に要した水分消費量を求めた。水分消費量（蒸散量）は重量法で測定したが、土壤表面からの蒸発量の補正は裸地ポットの蒸発量を差し引くことで行った。測定は一定時刻（午前 9時半～10時半）に実施し、各系統3反復で行った。実験は低水分区（圃場容水量の65～70%）と高

水分区（同85～90%）の2段階で行った。実験は自然光ガラス室内で行ったが、処理期間中の平均最高気温は38.2℃、平均最低気温は21.0℃とやや高温であった。

（2）結果及び考察

処理開始時点のNAD-ME（F）種とNAD-ME（P）種の各種生長パラメーターを表V-4に示した。前節で明らかになったようにNAD-ME（F）種はNAD-ME（P）種より初期生長が良好であるため、処理開始時点で既に、葉令で1.5、草丈で26.4cmの差があり、葉面積、乾物重も大きかった。

低水分区と高水分区における要水量を表V-5に示した。Dichotomifloraグループ内の種を比較すると、NAD-ME（P）種の要水量は低水分区においては平均で101.7、NAD-ME（F）種のそれは121.9と、有意ではないが後者が多い傾向がみられた。一方、高水分区では、NAD-ME（P）種は95.0と低水分区と大差ないが、NAD-ME（F）種は131.3と低水分区より多く、その結果、両者の差は5%水準で有意であった。これは、高水分区ではNAD-ME（P）種もNAD-ME（F）種もともに乾物増加量が低水分区より多く、それと同時に水消費量も増大しているが、NAD-ME（F）種の水消費量がより多くなっているためである。このように、NAD-ME（P）種は土壤水分状態が異なっても要水量は変わらないが、NAD-ME（F）種は土壤水分が増すと要水量が増大し、乾物生産における水の利用効率が低下することが明らかとなった。

ところで比較のために供試したANT（一般名ブルーパニック）は耐湿性が弱いといわれる草種であり、低水分区に比べて高水分区では乾物増加量が少なく、水消費量も少なかった。高水分区の根は褐変しており、根からの水の吸収が抑えられたものと思われる。CAP（ハイキビ）はDichotomifloraグループ以外のNAD-ME（P）種であるが、ANTと同様に低水分区に比べて高水分区で大きく要水量が減少しているが、高水分区の根は外見は低水分区と同様に正常であった。

V-3. 考察

本実験の結果、DichotomifloraグループのNAD-ME（F）種とNAD-ME（P）種は乾物生産及び要水量の面で違いがみられた。すなわち、NAD-ME（F）種は

表V-4. NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の土壤水分処理開始時の生長量の比較。

	葉令	草丈 (cm)	葉面積 (cm ²)	葉重 (g)	莖重 (g)	根重 (g)	比葉面積 (cm ² /mg)	乾物率 (地上部)(%)
1. NAD-ME(F)								
LAE (2)	8.6	83.4	250.9	0.734	0.578	0.239	0.342	8.2
DIC (2)	7.6	49.7	116.8	0.343	0.202	0.147	0.341	10.7
KAB (2)	7.8	73.2	143.3	0.449	0.396	0.150	0.319	9.2
SOL (2)	7.3	68.1	157.4	0.412	0.304	0.143	0.382	9.3
平均	7.8±0.5	68.6±13.6	167.1±59.2	0.484±0.165	0.370±0.156	0.169±0.049	0.344±0.040	9.3±1.0
2. NAD-ME(P)								
COL (2)	6.4	39.8	26.9	0.087	0.052	0.033	0.309	12.0
MAK (1)	5.9	38.7	26.6	0.093	0.061	0.034	0.286	10.0
STA (1)	6.6	50.3	22.6	0.090	0.065	0.042	0.251	13.6
平均	6.3±0.3	42.2±5.9	28.2±5.9	0.089±0.007	0.058±0.009	0.035±0.005	0.282±0.024	11.9±1.5
- -	***	***	***	***	***	***	***	*
1. -2.	1.5	26.4	138.9	0.395	0.312	0.134	0.062	-2.6

種名略号は表V-1. 参照。

*, P<0.05; ***, P<0.001。

表V-5. NAD-ME (P) 種とNAD-ME (F) 種の要水量の比較。

	低水分区			高水分区		
	乾物増加量 (g/ 植物体)	水消費量 (ml/植物体)	要水量 (ml/g)	乾物増加量 (g/ 植物体)	水消費量 (ml/植物体)	要水量 (ml/g)
1. NAD-ME(F)						
LAE (2)	3.96	554.5	139.9	4.86	724.8	149.1
DIC (2)	4.34	518.7	119.6	4.50	576.7	129.0
KAB (2)	4.56	490.0	107.4	5.39	631.3	117.1
SOL (2)	2.52	303.9	120.5	4.16	540.6	130.0
平均	3.85±0.92	466.8±112.0	121.9±13.4	4.73±0.53	618.4±80.2	131.3 ±13.2
2. NAD-ME(P)						
COL (2)	1.98	212.5	107.1	2.28	249.0	109.3
MAK (1)	1.66	162.8	98.2	1.85	171.4	92.8
STA (1)	1.19	118.4	99.7	1.50	124.0	82.8
平均	1.61±0.40	164.6±47.1	101.7±4.8	1.87±0.39	181.5±63.1	95.0±13.4
1.-2.			20.2			36.3 *
ANT (1)	2.43	239.1	98.4	2.26	189.3	83.8
CAP (1)	1.29	184.2	143.3	1.17	120.3	103.3

カッコ内の数字は供試系統数。種名略号は表V-1. 参照。

*, P<0.05。

NAD-ME (P) 種に比べて初期生長が良好で、その後の栄養生長期においても十分な RGR を示し、出穂期までの全体の乾物生産速度も大きかった。また、NAD-ME (F) 種は低土壌水分では要水量は NAD-ME (P) 種と大差ないが、土壌水分が高い状態では明らかに多くなり、乾物生産に対する水の利用効率が低下していた。

2. の要水量の比較試験は低水分区 (圃場容水量の 65~70%) と高水分区 (同 85~90%) を設けたため、異なる土壌水分に対する生長反応の比較が可能である。この点からみると、両型種とも高水分区で処理期間中の乾物増加速度は大きくなっていった。しかし、NADP-ME 種の ANT や、同じ NAD-ME (P) 種でも *Dichotomiflora* グループに属さない CAP は高水分区での生育が劣っていた。このことは NAD-ME (P) 種、NAD-ME (F) 種を問わず *Dichotomiflora* グループに属する草種は高土壌水分条件下で十分な生育を示す草種と言える。この点に関して、Hsu (1965) は *Panicum* 属の分類の仕事の中で *Dichotomiflora* グループに属する種は一般に池の回りや小川のほとりといった水分が過剰な条件の場所に主に生育していると報告し、また、Anderson (1972) は KAB と MAK はともに湛水状態で十分な生長ができるという結果を得ており、本実験の結果と符合するものである。

しかしながら、乾物の高水分区の低水分区に対する増加程度を比較すると、NAD-ME (P) 種は平均で 16% であるが、NAD-ME (F) 種は 23% と大きく、水分条件に対する生長の反応性は後者がより高いと言える。そして、そのような高い生長反応性は要水量の増大を伴っており、いわば多量の水分消費と結びついて実現されているとみなすことができる。従って、NAD-ME (F) 種は高土壌水分条件に適応してより高い乾物生産を上げることができる草種と言える。この点に関して、太田・越智 (1983) は DIC と KAB は根の通気組織が発達して過湿な状態でも根に十分な酸素を送り込める構造になっていると報告している。

ところで、NAD-ME (P) 種と NAD-ME (F) 種の間に見られた要水量の違いは既に IV 章でみた CO₂ 交換特性、特に蒸散速度や気孔拡散伝導度の違いとも関連しているものと考えられる。丸山ら (1985) はイネのインド稲と日本稲の要水量を比較し、要水量の小さい日本イネは気孔抵抗 (気孔拡散伝導度の逆数) が大きいと報告しており、本実験の結果と一致している。また、村田ら (1983) は *P. dichotomiflorum* について土壌低温処理により根からの吸水を抑えて蒸散速度を低下させると要水量も低下するという結果を得ており、気孔の反応と要水量は密接な関係があるものと考えられる。

VI. 総合考察

1970年代から開始された脱炭酸酵素型による C_4 植物の分類が進むにつれて、脱炭酸酵素型と Kranz細胞内の葉緑体分布とは表1に示したように、ほぼ完全な対応関係にあることが明らかにされ、 C_4 光合成の炭素代謝機構と葉緑体分布とは何らかの因果関係によって結ばれていることが予測された。しかし、本研究で脱炭酸酵素型が同じNAD-ME型であっても葉緑体の分布が求心的な種のみではなく遠心的な種も存在することが明らかにされ、葉緑体分布と炭素代謝機構との対応関係は完全ではないことが明らかとなった。

さて、本研究の結果、NAD-ME(F)種はNAD-ME(P)種に比べて大気条件下での光合成速度が高いことが明らかにされた。従来、脱炭酸酵素型と葉緑体分布は対にして考えられていたため、脱炭酸酵素型の異なる種間での光合成速度の違いが炭素代謝機構の違いによるものかあるいは葉緑体分布の違いによるものかを知ることはできなかった。しかし、本研究のように炭素代謝機構が同じでありながら葉緑体分布が異なる種間で光合成速度に違いが認められるということは、葉緑体の分布の違いが光合成の炭素代謝機構の違いよりむしろ、光合成の効率と結びついていることが考えられた。

ところで、遠心的な葉緑体分布はIV章でも考察したように、光合成中間代謝産物の移動の面では求心的な分布より効率的と考えられる。何故ならば、葉肉細胞から Kranz細胞への C_4 ジカルボン酸の移動は両細胞間の C_4 ジカルボン酸の濃度差に基づく拡散によって行われる(Osmond and Smith, 1976)。また、NAD-ME型の場合、脱炭酸反応は Kranz細胞内のミトコンドリアで行われ脱炭酸された CO_2 は葉緑体で固定される。ところで、NAD-ME(F)種では、Kranz細胞内でミトコンドリアと葉緑体がともに遠心的分布をとることが確認された(IV章)。従って、両器官が遠心的な分布をとることは葉肉細胞からの C_4 ジカルボン酸の移動距離を小さくするという点で求心的な分布より有利と言える。また、 C_4 ジカルボン酸の拡散は原形質連絡を通じて行われるため、両細胞間の原形質連絡の数も問題になると思われる。IV章でもみたようにNAD-ME(F)種では Kranz細胞が葉肉細胞側へ大きく膨らんで両細胞間の接触面積を大きくしていた。接触面積が大きければ原形質連絡数が多くなっていると考えられ、この点でもNAD-ME(F)種はNAD-ME(P)種より有利と考えられる。

光合成効率は Kranz細胞からの CO_2 の漏れの程度とも関連しており、葉緑体の分布は物質の移動距離の問題のみでなくこのような CO_2 の漏れの大小と結びついている可能性

も考えられる。NAD-ME (F) 種はNAD-ME (P) 種より $\delta^{13}\text{C}$ 値が高く、Kranz 細胞からの CO_2 の漏れが少ない可能性が示唆された。すなわち、Kranz細胞の気密性が高く CO_2 の漏れが少ないほどRuBPカルボキシラーゼによる $^{12}\text{CO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ の分別が起りにくくなり、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は高くなり大気中の値に近づく。逆に、 CO_2 の漏れが多いほどRuBPカルボキシラーゼによる分別が強化され、固定されずに、いわば排除された $^{13}\text{CO}_2$ が細胞外へ出る割合が高くなり、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が低くなると考えられる。しかし、両型種ともKranz細胞壁には CO_2 に対して不透性のスベリン層はみられず、細胞壁の組成から両者のKranz細胞の気密性の違いは説明できない。したがって、葉緑体分布の違いがあるいはこのような CO_2 の漏れ程度の違いに関与していることも考えられた。この点に関し、Ehleringer and Pearcy (1983)は多数の C_4 植物の量子収率を測定し、興味ある結果を得ている。彼らによれば、 C_4 植物の量子収率はNAD-ME種(双子葉) $<$ NAD-ME種(イネ科) $<$ NADP-ME種(双子葉) $<$ PEP-CK種(イネ科) $<$ NADP-ME種(イネ科)の順で増大しているという。この順序は上述の $\delta^{13}\text{C}$ 値の傾向と類似している。 C_4 植物の場合、Kranz細胞からの CO_2 の漏れが多くなるほど炭酸固定の効率は低下するが、当然それに従い量子収率も低下するはずである。彼らはNAD-ME種が他の脱炭酸酵素型種よりも量子収率が低かったのはスベリン層を有せず、漏れが多いためと推測している。しかし、双子葉 C_4 植物ではKranz細胞内の葉緑体は全て求心的な分布をとることから、上述の傾向は遠心的分布をとる種の方が求心的分布をとる種より量子収率が高いと考えることができる。このように、量子収率の面からも、葉緑体の分布の違いがKranz細胞からの CO_2 の漏れの大小に関与している可能性が考えられる。以上のように、NAD-ME (F) 種は CO_2 の漏れの点でも、効率的な光合成を行っていると考えられる。

ところで、Ⅲ章において、その発生機構を検討したPIBは CO_2 の漏れとも関連した特性と考えられるが、NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種の間では、PIB初期勾配(Vp)の大きさ、PIBパターンやVpに及ぼす環境要因の影響の点で差異は認められず、葉緑体の分布の違いがPIBに関与していないことが示された。つまり、 $\delta^{13}\text{C}$ 値の違いで示唆された CO_2 の漏れ程度の違いがPIBの差としては現れていなかった。しかし、これはPIBと $\delta^{13}\text{C}$ 値のいわば感度の違いに帰せられるかも知れず、それらの点にも考慮してさらに検討する必要がある。

以上のように、光合成効率の点からみると遠心的な葉緑体分布は求心的な分布よりも

優っていると考えられる。しかしながら、逆に、求心的な葉緑体分布は光合成産物（ショ糖）の篩部への転流という点からすればその移動距離が短いので有利のはずである。光合成産物の転流はC₄植物がC₃植物より速く、その理由として葉身横断面における篩部面積が大きい点が上げられる（Lush and Evans, 1974; Gullaherら, 1975）。しかし、C₄植物の中で脱炭酸酵素型の違いにより転流速度に差異があるかどうかという点に関する報告はまだなく、また、転流速度の一つの指標と考えられる Kranz細胞内の葉緑体中に蓄積するデンプン量も電顕観察では明瞭な違いは認められなかった（Black and Mollenhauer, 1971; Gutierrezら, 1974）。しかし、本研究では、葉身横断面における維管束面積割合はNAD-ME（P）種が最も高かった。このことから、NAD-ME（P）種は転流速度も高い可能性が考えられ、求心的な葉緑体分布をとる種は光合成産物の転流という点では有利であると推察された。

以上のように、葉緑体の遠心的分布と求心的分布は光合成効率あるいは光合成産物の転流の面でそれぞれ有利な特徴であると考えられるが、各C₄植物種がどちらの葉緑体分布をとるようになったかは、その種の生育する環境条件の違いによって決定されたものと思われる。本研究の結果、NAD-ME（F）種とNAD-ME（P）種の間には蒸散速度、気孔拡散伝導度さらに要水量の点で大きな差異がみられたことから、両者の葉緑体分布の違いは水分環境に対する適応の違いの一つのあらわれではないかと推察した。すなわち、十分な水分が確保できる条件下では光合成産物の転流は制限要因とはならず、できるだけ光合成効率を高めるように葉緑体は遠心的な分布をとるが、比較的水分の不足しがちな条件下では光合成産物の転流が大きく障害され、光合成効率をある程度犠牲にして転流障害を最小にするように求心的な葉緑体分布をとるよう分化したのではないかと考えた。

ところで、C₄植物の脱炭酸酵素型と水分生理との関係をC₄植物の地理的分布と降水量との関係からみると、NAD-ME種が最も乾燥した地域に生育しており、この種が乾燥に適応して分化したと考えられる。Panicum属内のNAD-ME種も主に乾燥地域に分布しているが（Brown, 1977）、同じNAD-ME種でも *Dichotomiflora* グループに属する種は土壤水分が豊富でむしろ過湿気味な地域に生育するといわれている。

（Hsu, 1965; Clayton, 1966; Napper, 1966; Stanfield, 1970; Bogdan, 1977; Lloyd, 1981）。本研究の結果でも、*Dichotomiflora*グループに属する種は十分な水分条件下で大きな生長速度を有することが示され、上述の特徴を裏付けたものと言える。さらに同グループの中のNAD-ME（F）種とNAD-ME（P）種を比較すると、前者が高土壌

水分条件下でより高い生長速度を示したということから、葉緑体の分布が水分環境に対する適応性と何らかの因果関係を有していることが考えられた。しかし、本論文では葉緑体の分布と水分適応との関係を直接的に明らかにすることはできなかった。

NAD-ME (F) 種とNAD-ME (P) 種が *Dichotomiflora* グループの中で分化している、すなわち、両型種が互いに近縁であるということは葉緑体の分布を決定している遺伝子数が少ないことを表わしている。また、*P. coloratum* では種内が両者に分化していることから両者の交雑によって後代を得る可能性が高いはずである。従って、もし交雑によって後代が得られるならば、その材料を用いて葉緑体分布と水分適応の関係をさらに明確にすることができるものと期待され、著者も今後そのような方向で検討してみたいと考えている。

謝辞

この論文をとりまとめるにあたっては、東京大学農学部教授玖村敦彦博士と同助教授石井龍一博士の御指導と御校閲を賜った。研究遂行にあたっては終始農林水産省草地試験場牧草部生理第一研究室長 村田孝雄博士（現農業生物資源研究所機能開発部炭素代謝制御研究室長）の御指導と激励を賜わり、同研究室 清水矩宏技官（現九州農業試験場草地部牧草導入研究室）及び、佐藤節郎技官の御協力を得た。また、 $^{14}\text{CO}_2$ を用いた実験では東京大学応用微生物研究所第七研究部 宮地重遠教授、武藤尚志助手に懇切な御指導を賜った。電子顕微鏡を用いた実験では茨城大学 長南信雄教授の御指導を受けた。 $\delta^{13}\text{C}$ 値に関する実験では農業生物資源研究所機能開発部窒素代謝制御研究室 鮫島宗明博士の御協力を得た。また、草地試験場牧草部採種研究室 小松敏憲技官には貴重な助言をいただいた。さらに、論文のワードプロセッサによる作成にあたっては吉田典子さんの手を煩わせた。ここに上記の各位に対して謹んで感謝の意を表する。

摘要

1960年代のC₄ 光合成回路の発見以来C₃ 植物とC₄ 植物について、それらの光合成的諸特性を明らかにする試みが多数なされてきた。近年ではさらに、C₄ 植物種間での生化学的、形態学的な特徴の比較がなされつつある。これらは、光合成研究という面のみではなく、作物栽培という面からみても暖地型牧草の環境適応性という問題にも関連し、興味深い研究分野である。

本研究は我が国の環境に適したイネ科暖地型牧草を導入するための基礎研究として、C₄ 植物の光合成に関連する種々の特徴を明らかにし、それらの相互の関連を検討したものである。研究結果の概要は次の通りである。

I. 多数のイネ科C₄ 植物について、脱炭酸酵素型と葉構造及び暗期移行直後のCO₂ 放出現象(P I B)との対応関係を検討し、次の結果を得た。

1. メストム鞘の有無と Kranz細胞内の葉緑体の分布の違いに基づく三つの葉構造型

(K S型、メストム鞘がみられず、Kranz細胞内の葉緑体は遠心的に分布；MS-P型、メストム鞘が存在し、葉緑体は求心的；MS-F型、メストム鞘が存在し、葉緑体は遠心的)は三種の脱炭酸酵素型(NADP-ME型、NAD-ME型及びPEP-CK型)と対応しており、葉構造型によって脱炭酸酵素型の推定がほぼ誤りなく行えることが確認された。

2. P I Bの三種のパターン(I型、P I Bがみられない；II型、鋭いピークのP I Bがみられる；III型、なだらかな山形のP I Bがみられる)は三種の脱炭酸酵素型と対応しており、P I Bパターンによっても脱炭酸酵素型の推定を行えることが示された。

3. しかし、Panicum 属の Dichotomiflora グループ内の一部の草種では葉構造型がMS-F型であるがP I BパターンはII型を示し、上記とは異なる対応関係を示した。

II. 葉構造とP I Bパターンについて例外的な対応関係を示したPanicum 属の Dichotomiflora グループ内の草種につき、脱炭酸酵素活性及びC₄ 光合成の炭素代謝機構を調べ、次の結果を得た。

1. 葉構造型がMS-F型でII型のP I Bパターンを示した P. dichotomiflorumでは三種類の脱炭酸酵素活性のうち、NAD-MEだけが高い活性を示し、NADP-ME

活性は低く、PEP-CKは全く活性が得られなかった。従って、*P. dichotomiflorum* の脱炭酸酵素型はNAD-ME型であることが示され、NAD-ME型には求心的な葉緑体分布をもつもの（以下NAD-ME(P)種）の他に遠心的な分布をもつもの（NAD-ME(F)種）も存在することが明らかとなった。

2. Dichotomifloraグループ内の他の草種の脱炭酸酵素型もNAD-ME型であることが示され、Dichotomifloraグループ内には、NAD-ME(P)種とNAD-ME(F)種の両者が存在することが明らかとなった。

3. 従って、葉構造型あるいはPIBパターンによる脱炭酸酵素型の推定は、葉構造型がMS-F型の場合には、PIBパターンを併わせて測定する必要があることが明らかとなった。

4. また、II型のPIBパターンは葉緑体の分布とは無関係でNAD-ME型のC₄光合成の炭素代謝を直接反映した現象であることが示された。

Ⅲ. PIBの発生機構をPIBの初期勾配とPIBパターンから検討し、次の結果を得た。

1. PIBを数量化するために、新たにPIBの初期勾配(V_p)を測定した。

V_p>0はCO₂の放出を、V_p<0はCO₂の吸収を表している。V_pはNADP-ME種では-108.0, NAD-ME(P)種で168.2, NAD-ME(F)種で145.8, PEP-CK種で-46.8(いずれもmgCO₂/dm²/hr)であり、その違いは脱炭酸酵素型の違いと密接に関連していることが示された。

I型とⅢ型のV_pは光強度の上昇につれて減少した(常にV_p<0)、逆にII型のV_pは増大した(常にV_p>0)。また、I型とⅢ型のV_pはCO₂濃度の上昇につれても減少した(常にV_p<0)。これに対して、II型のV_pは一旦減少したが(V_p<0)、その後上昇した(V_p>0)。従って、CO₂の交換がなくなる(V_pがゼロになる)CO₂濃度、V_pのCO₂補償点がみられた。以上の結果、II型のV_pも負の値を取り得ることが明らかになり、全ての脱炭酸酵素型において暗期移行直後には、まだPEPカルボキシラーゼによるCO₂固定系が機能しているものと考えられた。

2. PIBパターンに対する環境要因の影響をみると、NADP-ME型の示すI型、及びPEP-CK型の示すⅢ型のPIBパターンに対してCO₂濃度及びO₂濃度は影響を与えなかった。一方、NAD-ME型の一次PIB(暗期移行約15秒後のピー

ク)はCO₂濃度の低下とともに減少し、二次PIB(同約1-2分後の小ピーク)は逆に若干増大した。また、一次PIBはO₂濃度の影響は受けないが、二次PIBはO₂濃度の上昇につれて増大した。

IV. Panicum 属のNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種のCO₂交換特性と葉身の形態的特徴を調査し、次の結果を得た。

1. ¹²CO₂と¹³CO₂の分別能の指標であるδ¹³C値はNAD-ME(F)種(-11.89)とNAD-ME(P)種(-12.43)との間で有意な差がみられ、後者がより強い同位体効果を示した。
2. NAD-ME(F)種はNAD-ME(P)種に比べて通常の大気条件下では光合成速度、蒸散速度が高かった。また、気孔拡散伝導度も大きかったが、細胞間隙CO₂濃度と外気CO₂濃度の比(C_i/C_a比)は両者で差がみられなかった。1.でみられたδ¹³C値の違いの原因としてはC_i/C_a比の違いとKranz細胞からのCO₂の漏れ程度の違いが考えられるが、前者には差がみられなかったことから、主にCO₂の漏れの違いによるものと考えられた。
3. NAD-ME(F)種である P. dichotomiflorumの葉身では、ミトコンドリアは葉緑体と同じ遠心的な分布をしているが、両者の位置関係はミトコンドリアが内側、葉緑体が外側であった。また、Kranz細胞壁にCO₂に対して不透性のスベリン層はみられなかった。従って、2.で示唆されたNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の間でのCO₂の漏れの違いには細胞壁の組成ではなく葉緑体の分布の違いに起因している可能性が考えられた。
4. NAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種は葉緑体の分布以外の葉身の形態的特徴においても大きな差異がみられ、特に、前者のKranz細胞は大型でしかも葉肉細胞側に大きく膨らんでおり、また、横断面における葉肉細胞とKranz細胞の面積比も小さかった。

V. Panicum 属のNAD-ME(F)種とNAD-ME(P)種の乾物生産特性と要水量を比較し、次の結果を得た。

1. NAD-ME(F)種はNAD-ME(P)種に比べて初期生長が旺盛で、特に葉面積の展開速度が早かった。また、その後の栄養生長期においても高い相対生長率

(RGR)が維持され、出穂期における乾物生産量も約3倍であった。

2. NAD-ME (F)種とNAD-ME (P)種は低水分条件下(圃場要水量の65-70%)では要水量は若干前者が多いが、高水分条件下(同85-90%)では明らかに前者が多かった。
3. NAD-ME (F)種はNAD-ME (P)種に比べて高い土壤水分条件下での生長速度が早く、高土壤水分条件に適応していることが示された。

引用文献

- 1) Anderson, E. R. (1972): Flooding tolerance of Panicum coloratum. Queensl. J. Agric. and Anim. Sci. 29:173-179.
- 2) Bender, M. M. (1971): Variations in the $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ ratios of plants in relation to the pathway of carbon dioxide fixation. Phytochemistry 10:1239-1244.
- 3) Björkman, O. (1968): Further studies of the effect of oxygen concentration on photosynthetic CO_2 uptake in higher plants. Carnegie Inst. Wash. Year Book. 6:220-228.
- 4) Björkman, O. (1976): Adaptive and genetic aspects of C_4 photosynthesis. In "CO₂ metabolism and plant productivity" Ed. R. H. Burris and C. C. Black, University Park Press, Baltimore, pp. 287-309.
- 5) Black, C. C. and H. H. Mollenhauer (1971): Structure and distribution of chloroplasts and other organelles in leaves with various rates of photosynthesis. Plant physiol. 47:15-23.
- 6) Bogdan, A. V. (1977): Tropical pasture and fodder plants. Longman, London and New York, pp. 76-194.
- 7) Brown, R. H. and V. E. Gracen (1972): Distribution of the post-illumination CO_2 burst among grasses. Crop Science. 12:30-33.
- 8) Brown, R. H. and W. V. Brown (1975): Photosynthetic characteristics of Panicum milioides, a species with reduced photorespiration. Crop Science. 15:681-685.

- 9) Brown, R.H. and R.E. Simmons (1979): Photosynthesis of grass Species differing in CO₂ fixation pathways. I. Water-use efficiency. Crop Science. 19:375-379.
- 10) Brown, W.V. (1960): A cytological difference between the Eupanicoideae and the Chloridoideae (Gramineae). The Southwestern Naturalist. 5:7-11.
- 11) Brown, W.V. (1974): Another cytological difference among the Kranz subfamilies of the Gramineae. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 101:120-124.
- 12) Brown, W.V. (1977): The Kranz syndrome and its subtypes in grass systematics. Memoirs of the torrey Botanical Club. 23:1-97.
- 13) Brown, W.V. and B.N. Smith (1972): Grass evolution, the Kranz syndrome, ¹³C / ¹²C ratios, and continental drift. Nature. 239:345-346.
- 14) Bryant, W.G. (1968): Interim assessment of introduced plants- No.1 Panicum coloratum L. Soil Conservation Service of New South Wales. pp.18-33.
- 15) Bulley, N.R. and E.B. Tregunna (1971): Photorespiration and the post-illumination CO₂ burst. Can. J. Bot. 49:1277-1284.
- 16) Carolin, R.C., S.W.L. Jacobs and M. Vesk (1973): The structure of the cells of the mesophyll and parenchymatous bundle sheath of the Gramineae. Bot. J. Linn. Soc. 66:259-275.
- 17) Chapman, E.A., J.M. Bain and D.W. Gove (1975): Mitochondria and chloroplast peripheral reticulum in the C₄ plants. Amaranthus Edulis and Atriplex Spongiosa. Aust. J. Plant Physiol. 2:207-223.

- 18) Chippindall, L.K.A. (1955): A guide to the identification of grasses in south africa. In: "The grasses and pastures of South africa", Ed. by D.Sc.D. Meredith, Central News Agency, South Africa, pp.321-338.
- 19) Clayton, W.D. (1966): A key to Nigerian grasses. Samaru Research Bulletin No.1 pp.30-34.
- 20) Crookston, R.K. and D.N. Moss (1973): A variation of C_4 leaf anatomy in Arun-
dinella hirta (Gramineae). Plant physiol. 52:397-402.
- 21) 暖地型牧草に関する試験研究成果要約集 (1979)。暖地型牧草研究会資料 No.5
- 22) Decker, J.P. (1955): A rapid, post-illumination deceleration of respiration in green leaves. Plant Physiol. 30:82-84.
- 23) Doehlert, D.C., M.S.B. Ku and G.E. Edwards (1979): Dependence of the post-illumination burst of CO_2 on temperature, light, CO_2 , and O_2 concentration in wheat (Triticum aestivum). Physiol. Plant. 46:299-306.
- 24) Downton, W.J.S. (1970): Preferential C_4 -dicarboxylic acid synthesis, the postillumination CO_2 burst, carboxyl transfer step, and grana configurations in plants with C_4 -photosynthesis. Can. J. Bot. 48:1795-1800.
- 25) Edwards, G.E., R. Kanai and C.C. Black (1971): Phosphoenolpyruvate carboxykinase in leaves of certain plants which fix CO_2 by the C_4 -dicarboxylic acid cycle of photosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:278-285.
- 26) Edwards, G.E., R.M. Lilley, S. Craig and M.D. Hatch (1979): Isolation of intact and functional chloroplasts from mesophyll and bundle sheath protoplasts of the C_4 plant Panicum miliaceum. Plant Physiol. 63:821-827.

- 27) Edwards, G.E., M.S.B. Ku and M.D. Hatch (1982): Photosynthesis in Panicum milioides, a species with reduced photorespiration. *Plant & Cell Physiol.* 23:1185-1195.
- 28) Edwards, G.E. and D. Walker (1983): C_3 , C_4 : mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. Blackwell Scientific Publications, London.
- 29) Ehleringer, J. and R.W. Pearcy (1983): Variation in quantum yield for CO_2 uptake in C_3 and C_4 plants. *Plant Physiol.* 73:555-559.
- 30) Ellis, R.P. (1977): Distribution of the Kranz syndrome in the Southern African Eragrostoideae and Panicoideae according to bundle sheath anatomy and cytology. *Agroplanta*. 9:73-110.
- 31) Ellis, R.P., J.C. Vogel and A. Fuls (1980): Photosynthetic pathway and the geographical distribution of grasses in South West Africa / Namibia. *S. African. J. Sci.* 76:307-314.
- 32) Farquhar, G.D. (1983): On the nature of carbon isotope discrimination in C_4 species. *Aust. J. Plant. Physiol.* 10:205-226.
- 33) Farquhar, G.D., D.R. Dubbe and K. Raschke (1978): Gain of the feedback loop involving carbon dioxide and stomata. Theory and Measurement. *Plant Physiol.* 62:406-412.
- 34) Forrester, M.L., G. Krotkov and C.D. Nelson (1966a): Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. I. Soybean. *Plant Physiol.* 41:422-427.

- 35) Forrester, M. L., G. Krotkov and C. D. Nelson (1966b): Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. II. Corn and other monocotyledons. *Plant Physiol.* 41:428-531.
- 36) Gallaher, R. N., D. A. Ashley and R. H. Brown (1975): ^{14}C -photosynthate translocation in C_3 and C_4 plants as related to leaf anatomy. *Crop Sci.* 15:55-59.
- 37) Gutierrez, M., R. Kanai, S. C. Huber, S. B. Ku and G. E. Edwards (1974a): Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of various types of C_4 plants. I. Carboxylases and CO_2 fixation studies. *Z. Pflanzenphysiol.* 72:305-319.
- 38) Gutierrez, M., V. E. Gracen and G. E. Edwards (1974b): Biochemical and cytological relationships in C_4 plants. *Planta (Berl.)* 119:279-300.
- 39) Gutierrez, M., G. E. Edwards and W. V. Brown (1976): PEP carboxykinase containing species in the Brachiaria group of the subfamily Panicoideae. *Biochem. Syst. Ecol.* 4:47-49.
- 40) Hatch, M. D. (1976): The C_4 pathway of photosynthesis: mechanism and function. In: "CO₂ metabolism and plant productivity" Ed. by R. H. Burris and C. C. Black, University Park Press, Baltimore, pp. 59-81.
- 41) Hatch, M. D. and T. Kagawa (1974a): NAD malic enzyme in leaves with C_4 -pathway photosynthesis and its role in C_3 acid decarboxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 160:346-349.
- 42) Hatch, M. D. and T. Kagawa (1974b): Activity, location and role of NAD malic enzyme in leaves with C_4 -pathway photosynthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* 1:357-369.

- 43) Hatch, M.D. and C.R. Slack (1966): Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.* 101: 103-111.
- 44) Hatch, M.D., T. Kagawa and S. Craig (1975): Subdivision of C_4 -pathway species based on differing C_4 acid decarboxylating systems and ultrastructural features. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:111-128.
- 45) Hartley, W. (1958a): Studies on the origin, evolution, and distribution of the Gramineae. I. The tribe Andropogoneae. *Aust. J. Bot.* 6:116-128.
- 46) Hartley, W. (1958b): Studies on the origin, evolution, and distribution of the Gramineae. II. The tribe Paniceae. *Aust. J. Bot.* 6:343-357.
- 47) Hartley, W. and C. Slater (1960): Studies on the origin, evolution, and distribution of the Gramineae. III. The tribes of the subfamily Eragrostoideae. *Aust. J. Bot.* 8:256-276.
- 48) Hattersley, P.W. (1982): $\delta^{13}C$ values of C_4 types in grasses. *Aust. J. Plant Physiol.* 9:139-154.
- 49) Hattersley, P.W. (1983): The distribution of C_3 and C_4 grasses in Australia in relation to climate. *Oecologia.* 57:113-128.
- 50) Hattersley, P.W. (1984): Characterization of C_4 type leaf anatomy in grasses (Poaceae). Mesophyll: bundle sheath area ratios. *Annals of Bot.* 53:163-179.
- 51) Hattersley, P.W. and L. Watson (1976): C_4 grasses: An anatomical criterion for distinguishing between NADP-malic enzyme species and PCK or NAD-malic enzyme species. *Aust. J. Bot.* 24:297-308.

- 52) Hattersley, P.W. and A.J. Browning (1981): Occurrence of the suberized lamella in leaves of grasses of different photosynthetic types. I. In parenchymatous bundle sheath and PCR("Kranz ") sheaths. *Protoplasma*. 109:371-401.
- 53) Hattersley, P.W. and S. Perry (1984): Occurrence of the suberized lamella in leaves of grasses of different photosynthetic type. II. In herbarium material. *Aust. J. Bot.* 32:465-473.
- 54) Hitchcock, A.S. (1971): *Manual of the grasses of the United States*. Dover Publication, Inc., New York, pp.685-686.
- 55) Holbrook, G.P., D.B. Jordan and R. Chollet (1985): Reduced apparent photorespiration by the C_3 - C_4 intermediate species, Moricandia arvensis and Panicum milioides. *Plant Physiol.* 77:578-583.
- 56) 宝示戸貞雄・堀端俊造 (1982): アフリカからの新作物探索導入調査報告書。熱研資料 No.58 pp.1-120.
- 57) Hsu, C.C. (1965): The classification of Panicum (Gramineae) and its allies, with special reference to the characters of lodicule, style-base and lemma. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, Sec. 3. Bot.* 9:43-150.
- 58) Huber, S.C., R. Kanai and G.E. Edwards (1973): Decarboxylation of malate by isolated bundle sheath cells of certain plants having the C_4 -dicarboxylic acid cycle of photosynthesis. *Planta*. 113:53-66.
- 59) 茨木和典 (1979): 暖地型牧草に関する育種・栽培利用の実態と研究の現状。
2. 分野別研究成果の概要と問題点。 3) 栽培(単年草種)。 暖地型牧草研究会資料 No.6 pp.41-48.

- 60) 石井龍一・村田吉男 (1978): C_3 , C_4 植物の光合成。日作紀 47(1):165-188.
- 61) Kagawa, T. and M.D.Hatch (1975): Mitochondria as a site of C_4 acid decarboxylation in C_4 -pathway photosynthesis. Arch.Biochem.Biophys. 167:687-696.
- 62) 金井龍二 (1979): C_4 -光合成。蛋白質・核酸・酵素 別冊22. (光合成の機作) pp.173-185.
- 63) Kanai, R. and C.C.Black (1972): Biochemical basis for net CO_2 assimilation in C_4 -plants. In "Net carbon dioxide assimilation in higher plants" Edital by C.C.Black, Raleigh: Proc.South Sec. Amer.Soc.Plant Physiol. pp.75-93.
- 64) Kanai, R. and G.E.Edwards (1973): Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. Plant Physiol. 51:1133-1137.
- 65) Kanai, R. and M.Kashiwagi (1975): Panicum milioides, a Gramineae plant having Kranz leaf anatomy without C_4 -photosynthesis. Plant & Cell Physiol. 16:669-679.
- 66) 川鍋祐夫・平川孝行 (1971): 暖地型牧草の生態と栽培利用上の課題(2)。畜産の研究 25(10):1315-1318.
- 67) Kawamitsu, Y., S.Hakoyama, W.Agata and T.Takeda (1985): Leaf interveinal distances corresponding to anatomical types in grasses. Plant Cell Physiol. 26:589-593.
- 68) Keck, R.W. and W.L.Ogren (1976): Differential oxygen response of photosynthesis in soybean and Panicum milioides. Plant Physiol. 58:552-555.

- 69) Krenzer, E. G., D. N. Moss and R. K. Crookston (1975): Carbon dioxide compensation points of flowering plants. *Plant Physiol.* 56:194-206.
- 70) Lloyd, D. L. (1981): Makarikari grass - (*Panicum coloratum* var. *makarikiense*) - A review with particular reference to Australia. *Tropical Grasslands.* 15:44-53.
- 71) Lloyd, D. L. and J. P. Thompson (1978): Numerical analysis of taxonomic and parent-progeny relationships among Australian selections of *Panicum coloratum*. *Queensland J. Agric. Animal Sci.* 35:35-46.
- 72) Lommasson, R. C. (1957): Vascular bundle sheaths in the genus *Aristida*. *Phytomorphology.* pp.364-370.
- 73) Lush, W. M. and L. T. Evans (1974): Translocation of photosynthetic assimilate from grass leaves, as influenced by environment and species. *Aust. J. Plant Physiol.* 1:417-431.
- 74) 松中昭一・坂 斉 (1977): C_3 , C_4 植物分類的にみた雑草防除 (2)。 *雑草研究* 22:177-183.
- 75) Maruyama, S., N. Kabaki and K. Tajima (1985): Water consumptions in Japonica and Indica rice varieties. *Japan. Jour. Crop Sci.* 54:32-38.
- 76) Miyachi, S. and D. Hogetsu (1970): Light-enhanced carbon dioxide fixation in isolated chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* 11:927-936.
- 77) Morgan, J. A. and R. H. Brown (1980): Photosynthesis in grass species differing in carbon dioxide fixation pathways. III. Oxygen response and enzyme activities of species in the *Laxa* group of *Panicum*. *Plant Physiol.* 65:156-159.

- 78) Morison, J. I. L. and R. M. Gifford (1983): Stomatal sensitivity to carbon dioxide and humidity. A comparison of two C_3 and two C_4 grass species. *Plant Physiol.* 71:789-796.
- 79) 村田孝雄・大杉 立・清水矩宏 (1983): オオクサキビ及びヒエの生育に及ぼす土壌低温の影響。草地試研報 24:31-40.
- 80) Napper, D. M. (1966): Grasses of Tanganyika. Ministry of Agriculture, Forests and Wildlife, Tanzania. pp.63.
- 81) 野田 博 (1976): 暖地型牧草の導入と評価。暖地型牧草研究会資料 No.2 pp.1-14.
- 82) 越智茂登一 (1981): オオクサキビの特性と栽培法。草々の情報 30:29-40.
- 83) 越智茂登一 (1984): カブラブラグラスの特性と栽培。関東草飼研誌 8:71-77.
- 84) 越智茂登一・中島阜介 (1978): パニカム草種の種・品種の特性とその種別。
II. 主成分分析による種・品種の類別と評価。草地試研報 13:41-62.
- 85) 越智茂登一・堀端俊造・宮崎尚時・前岡邦彦・高田寛之 (1985): アフリカからの探索・収集草種の評価と有望草種の選定 - 石垣島における暖地型イネ科草種の一次評価 - 草地試研報 31:31-56.
- 86) Ogren, W. L. and R. Chollet (1982): Photorespiration. In "Photosynthesis volume II. Development, carbon metabolism, and plant productivity". Ed. by A. Govindjee, Academic Press, London, pp.191-230.
- 87) 太田 顕・越智茂登一 (1983): 暖地型牧草の耐湿性の草種間差異。草地試研報 25:37-47.

- 88) 太田 顕・越智茂登一 (1985): オオクサキビの収集系統の特性と分布。草地試研報 31:57-67.
- 89) 大山一夫(1975): 暖地型牧草の特性に関する研究。 1. 発芽・初期生育速度の種・品種間差異について。九州農業研究 37:192-193.
- 90) O'leary, M.H. (1981): Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20:553-567.
- 91) Osmond, C. B. and F.A. Smith (1976): Symplastic transport of metabolites during C_4 -photosynthesis. In: "Intercellular communication in plants. Studies on Plasmodesmata" Ed. by B.E.S. Gunning and A.W. Robards, Springer, Berlin. pp.229-241.
- 92) Peterson, R. B. (1983a): Estimation of photorespiration based on the initial rate of post-illumination CO_2 release. I. A nonsteady state model for measurement of CO_2 exchange transients. *Plant Physiol.* 73:978-982.
- 93) Peterson, R. B. (1983b): Estimation of photorespiration based on the initial rate of post-illumination CO_2 release. II. Effects of O_2 , CO_2 , and temperature. *Plant Physiol.* 73:983-988.
- 94) Pilger, R. (1940): Gramineae III (unterfam, panicoideae), in Engler, A. U. K. Prantl, Die Natürlichen Pflanzenfamilien 14e, W. Engelmann, Leipzig
- 95) Pritchard, A. J. and I. H. De Lacy (1974): The cytology, breeding system and flowering behaviour of Panicum coloratum. *Aust. J. Bot.* 22:57-66.

- 96) Rathnam, C. K. M. and G. E. Edwards (1975): Intracellular localization of certain photosynthetic enzymes in bundle sheath cells of plants possessing the C_4 pathway of photosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 171:214-225.
- 97) Reger, B. J. and I. E. Yates (1979): Distribution of photosynthetic enzymes between mesophyll, specialized parenchyma and bundle sheath cells of Arundinella hirta. Plant Physiol. 63:209-212.
- 98) 鮫島宗明・山下 淳・大谷 武 (1983): 作物の炭素同位体分別能に関する比較作物学的研究。 2. C_4 作物における $\delta^{13}C$ 値の種間・種内変異について。 日作紀 52 (別号1):199-200.
- 99) Seemann, J. R., M. R. Badger AND J. A. Berry (1984): Variations in the specific activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase between species utilizing differing photosynthetic pathways. Plant Physiol. 74:791-794.
- 100) 清水矩宏・大杉 立・村田孝雄 (1981): 暖地型イネ科牧野草の初期生育における 属・種間差異。草地試研報 20:64-75.
- 101) Smith, B. N. and S. Epstein (1971): Two categories of $^{13}C / ^{12}C$ ratios for higher plants. Plant Physiol. 47:380-384.
- 102) Stanfield, D. P. (1970): The flora of Nigeria. grasses. Ibadan University press Nigeria, pp.66-72.
- 103) Stapf, O. (1920): Gramineae in prain's flora of tropical Africa. 9, part 4.
- 104) 武田友四郎・箱山 晋 (1985): イネ科 C_3 , C_4 植物の生態と地理的分布に関する研究。 第2報 極東および東南アジア地域におけるイネ科 C_3 , C_4 植物の地理的分布について。日作紀 54(1):65-71.

- 105) 武田友四郎・谷川孝弘・梶 和一・箱山 晋 (1985): イネ科 C_3 , C_4 植物の生態と地理的分布に関する研究。 第1報 日本におけるイネ科 C_3 , C_4 植物の分類ならびに気象条件による地理的分布。 日作紀 54(1):54-64.
- 106) Tateoka, T. (1958): Notes of some grasses. VIII. On leaf structure of Arundinella and Garnotia. Bot. Gaz. (Grawfordsville). 120:101-109.
- 107) Tregunna, E. B., G. Krotkov and C. D. Nelson (1966): Effect of oxygen on the rate of photorespiration in detached Tobacco leaves. *Physiol. Plant.* 19:723-733.
- 108) Troughton, J. H., K. A. Card and C. H. Hendy (1974): Photosynthetic pathways and carbon isotope discrimination by plants. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook.* 73:768-780.
- 109) Watanabe, M., J. Ohnishi and R. Kanai (1984): Intracellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in bundle sheath cells of C_4 plants. *Plant & Cell Physiol.* 25:69-76.
- 110) Wilson, J. R. and P. W. Hattersley (1983): In vitro digestion of bundle sheath cells in rumen fluid and its relation to the suberized lamella and C_4 photosynthetic type in Panicum species. *Grass and Forage Science.* 38:219-223.
- 111) Winter, K., J. A. M. Holtum, G. E. Edwards and M. H. O'leary (1982): Effect of low relative humidity on $\delta^{13}C$ value in two C_3 grasses and in Panicum milioides C_3 - C_4 Intermediate Species. *J. Exp. Bot.* 33:88-91.
- 112) Wolf, D. D., R. B. Pearce, G. E. Carlson and D. R. Lee (1969): Measuring photosynthesis of attached leaves with air sealed chambers. *Crop Sci.* 9:24-27.

- 113) Wynn, T., H. Brown, W. H. Campbell and C. C. Black (1973): Dark release of $^{14}\text{CO}_2$ from higher plant leaves. *Plant Physiol.* 52:288-291.
- 114) Yeoh, H., M. R. Badger and L. Watson (1981): Variations in kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase among plants. *Plant Physiol.* 67: 1151-1155.