

ツボミオオバコ(*Plantago virginica*)およびオオバコ(*P. asiatica*)種子の光発芽性と教材としての可能性

著者	ハツ橋 寛子, 森田 智信, 東郷 博一
雑誌名	宮崎大学教育学部紀要. 自然科学
巻	86
ページ	1-11
発行年	2016-08-31
URL	http://hdl.handle.net/10458/5908

ツボミオオバコ (*Plantago virginica*) およびオオバコ (*P. asiatica*) 種子の 光発芽性と教材としての可能性

八ッ橋 寛子, 森田 智信, 東郷 博一

Photoblastism of *Plantago virginica* and *P. asiatica* Seeds and Their Utility in Student Practice

Hiroko YATSUHASHI, Tomonobu MORITA and Hirokazu TOGO

要 旨

植物の環境応答の1つとして、高等学校「生物」や入門的な生物のテキストで取り上げられているフィトクロム低光量反応について、赤色光/遠赤色光可逆性を明確に示し、かつその生態学的な意義を考察しやすい実験材料と方法を検討した。路傍等によく見られるツボミオオバコ (*Plantago virginica*) とオオバコ (*P. asiatica*) の種子発芽は、光促進が知られているが、短時間の赤色光/遠赤色光照射によって可逆的に制御されることがわかった。オオバコは25℃で、ツボミオオバコは15~25℃の広い温度範囲で光可逆性が見られた。照射箱を試作して自然光で照射実験を行ったところ、日光は発芽を促進し、緑葉の透過光はこれを打ち消す効果があることが確認された。野生植物種子と自然光を用いることにより、植物におけるフィトクロムの役割を示す実験を教育現場で行うことが容易になると考えられた。

緒 言

フィトクロムは、植物の光受容体のひとつで、特に赤色光と遠赤色光の比率を感知することで植物の置かれた状況、例えば直射日光の当たる場所か、他の植物の葉の下か、を識別する役割を持つ。フィトクロム分子は、可逆的に光異性化を起こして赤色光吸収型 (Pr) と遠赤色吸収型 (Pfr) をとる性質があり、低光量反応 (Low fluence response) では、Pfrの割合に依存して反応が起こることが知られている (長谷あきら, 1999など)。

高等学校「生物」教科書 (浅島ら, 2014; 嶋田ら, 2014; 本川ら, 2013など) や入門的な生物のテキスト (池内昌彦ら, 2013など) では、フィトクロムの発見のきっかけとなったレタス (*Lactuca sativa*) 品種グランドラビッツ (Grand Rapids) 種子の反応が紹介され、暗黒中では発芽しないが、赤色光照射によって発芽が誘導され、赤色光に引き続いて遠赤色光が照射されることで赤色光の効果が打ち消されるという赤色光/遠赤色光可逆反応が説明されている。この反

応は、数分間の光照射で種子の発芽率が劇的に変化することから、生徒や学生に植物の反応に対する興味を持たせるには大変有効と考えられる。ただし、この実験を行う場合、フィトクロム関与という生理学的側面と同時に、植物の種子がなぜこのような反応をするかという生態学的側面の考察ができることが望ましい。これらの点について実際の教育現場で実験を行うことを考えると、材料としてレタスという外国産の栽培植物が適切であるか、光源は入手可能か、適切な照射方法や培養方法が実現可能か、などについて検討する必要があると感じられた。

そこでわれわれは、身近な野生植物の中からフィトクロムの低光量反応を明瞭に示す材料を選ぶ試みをし、すでにマツバウンラン (*Linaria canadensis* Dum., ゴマノハグサ科, APGⅢ体系では *Nuttallanthus canadensis*, オオバコ科) が教材として利用可能であることを見出している (八ッ橋・栗丸, 2011)。ここでは、オオバコ科オオバコ属のツボミオオバコとオオバコについて報告し、さらに、人工光のほかに自然光を用いた実験を述べる。

材料と方法

種子は、すべて宮崎大学木花キャンパス (宮崎市学園木花台西 1-1) 内で採集した。ツボミオオバコ (*Plantago virginica* L.) 種子は2012年5月17日に採集し、室温に置いた後、同年10月30日に家庭用冷蔵庫 (NR-C372M-SH, パナソニック, 東京, 5 ± 1.5 °C) に入れて実験まで保存した。オオバコ (*Plantago asiatica* L.) 種子は2012年12月4日に採集し室温で風乾後、12月11日に冷蔵庫に移した。

発芽実験においては、図1のツボミオオバコの実験では直径30mm, その他の全ての実験では60mmのシャーレに濾紙 (No.6, アドバンテック東洋, 東京) を2重に敷いて播種し、純水を加えた。純水の量は、図1のツボミオオバコでは0.6mL, その他の実験ではツボミオオバコで2.5mL, オオバコで2.0mLであった。これらのシャーレを15°Cまたは25°Cの人工気象器 (BioTRON, LPH-350SP, 日本医化器械製作所, 大阪) に入れ、発芽を観察した。種子の観察は必要に応じてルーペを用いて行い、幼根の突出が確認できた場合を発芽とした。暗黒中におかれた種子の観察には弱い緑色光を用いた。

人工光の光源は白色蛍光灯 (FLR40SW/M/36-B, 日立) またはLED光源 (研究用LED光源システム, 赤色基盤MIL-R18(A), 遠赤色基盤MIL-IF18(A), 光源フレームMIL-U200, 三洋電機, 現パナソニック, 東京) を用いた。赤色光のピーク波長は660nm, 遠赤色光は730nmであった。白色蛍光灯は人工気象器に、LED光源はインキュベータ (MIR-153, 三洋電機) に装着して行った。光パワーメータ (Optical Power Meter 3664, 日置電機, 長野) にSiダイオード光センサー (9742) を装着してエネルギー密度を測定し、光子密度に換算したところ、照射面の光強度は、白色光 3.6 W m^{-2} (換算波長550nmでおよそ $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 赤色光 9.3 W m^{-2} ($51 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 遠赤色光 19 W m^{-2} ($110 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) であった。照射時のインキュベータ内の温度は、培養温度とほぼ同じ 25.5 ± 0.5 °C または 15.0 ± 0.5 °C にした。

自然光照射は、屋外において太陽の散乱光 (およそ1700 Lx) を用い、試作した照射箱 (詳細は結果に記述) に入れたシャーレに直接あるいはツワブキ (*Farfugium japonicum*) の葉または濾紙 (No.2, アドバンテック東洋, 東京) を透過した光を照射した。

原則として同じ実験を2回以上繰り返して代表的な結果を示している。

植物の葉と濾紙の透過スペクトルは多目的分光光度計 (MPS-2450, 島津製作所, 京都) を用

いて測定した。

結 果

1. 光発芽性

ツボミオオバコとオオバコの種子発芽が白色光の影響を受けることを、15℃および25℃で確認した。ツボミオオバコは、いずれの温度でも暗黒では発芽せず、白色光下25℃で3日、15℃では6日でほぼ95%発芽した(図1左)。オオバコも暗黒では全く発芽しなかった。白色光下では、25℃においては4日後までにはほぼ100%発芽したが、15℃では10%以下しか発芽しなかった(図1右)。以上のように、15℃におけるオオバコ以外は、いずれも光で発芽が誘導される明らかな正の光発芽性が見られた。

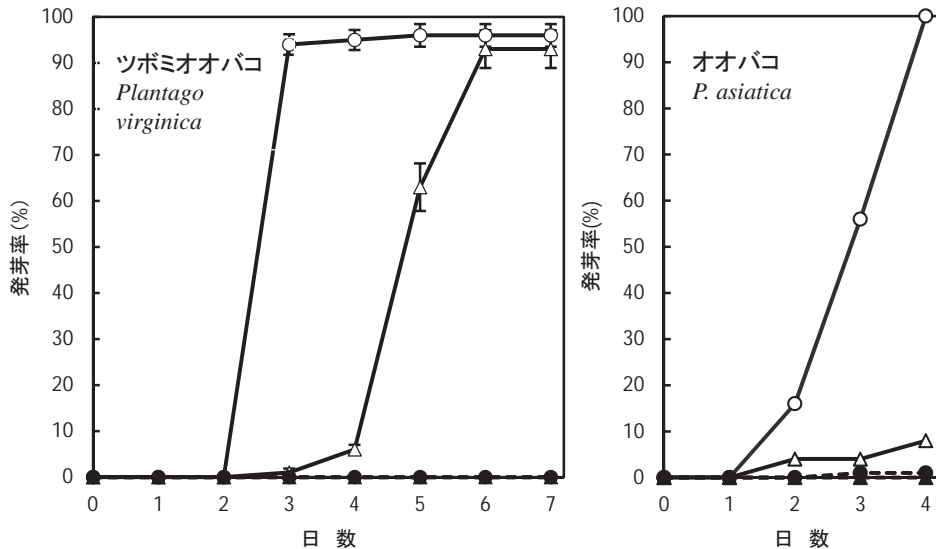


図1 ツボミオオバコ (*Plantago virginica*) およびオオバコ (*P. asiatica*) 種子の25℃および15℃、白色光下および暗黒中における発芽の時間経過。種子は1シャーレあたり25粒播き、ツボミオオバコは4シャーレの平均±標準誤差、オオバコは1シャーレの値である。○: 25℃ 白色光, △: 15℃ 白色光, ●: 25℃ 暗黒, ▲: 15℃ 暗黒。

2. 赤色光短時間照射の効果

フィトクロム低エネルギー反応の特徴は、およそ 1mmol m^{-2} 以下の光量で反応が飽和すること、および赤色光の効果が遠赤色光によって可逆的に打ち消されることである(長谷, 1999)。

今回の材料について飽和光量を確認するため、まず短時間照射の最大の効果が得られる時期を調べた。ツボミオオバコでは、1分間の赤色光を吸水開始から72~132時間後に与えると発芽率が50%を超えることがわかった(図2)。一方、オオバコは吸水開始から数分以内に与えた赤色光が80%近い発芽を誘導し、この効果は少なくとも播種から20時間は維持された(表1)。

次に、赤色光の照射時間と発芽率の関係を調べた。ツボミオオバコの種子を25℃で3日間暗黒で吸水させた後、5～600秒の赤色光を照射したところ、5秒（約250 $\mu\text{mol m}^{-2}$ ）ですでに反応が飽和していることが分かった（表2）。オオバコでは、吸水直後に与えた赤色光の効果は15秒（約770 $\mu\text{mol m}^{-2}$ ）で飽和していた（表3）。これらは、いずれも低光量反応の範囲内であった。

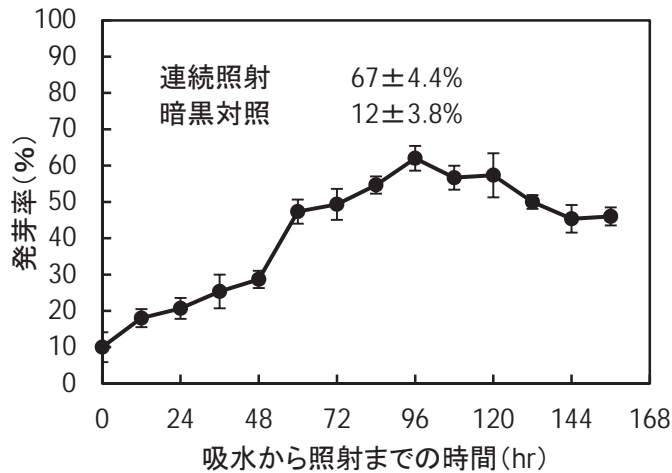


図2 ツボミオオバコ種子の吸水時間と光感受性の変化。吸水開始後、横軸に示した時間に1分間の赤色光を照射し11日間25℃に置いた。1シャーレあたり50粒、3シャーレの発芽率の平均値±標準誤差を示す。

表1 オオバコ種子の吸水時間と光感受性の変化。吸水開始後様々な時間に赤色光を1分間照射し、25℃に置いた。1シャーレ20粒あたり4シャーレの吸水7日後の結果。

吸水時間 (hr)	発芽率(%)		
	平均	±	SE
暗黒対照	11.3	±	3.1
<0.1	78.8	±	2.4
1	73.8	±	9.4
4	81.3	±	9.0
10	83.8	±	4.7
24	87.5	±	4.3

表2 ツボミオオバコ種子の発芽に対する赤色光照射の効果。25℃で3日間吸水させた種子に様々な時間、赤色光を照射して8日後の発芽率。1シャーレあたり50粒4シャーレの結果。

照射時間 (s)	発芽率(%)		
	平均	±	SE
0	7.0	±	1.5
5	51.5	±	2.8
20	51.5	±	2.8
60	46.0	±	2.5
180	45.5	±	3.0
600	48.5	±	2.9
連続	64.5	±	1.9

表3 オオバコ種子の発芽に対する赤色光照射の効果。25℃で5～30分吸水させた種子に様々な時間、赤色光を照射して8日後の発芽率。1シャーレあたり25粒, 5シャーレの結果。

照射時間 (s)	発芽率(%)		
	平均	±	SE
0	8.8	±	3.9
5	46.4	±	6.4
15	60.8	±	2.7
60	59.2	±	5.4
180	57.6	±	5.2
600	64.0	±	7.2
1800	60.8	±	2.7

3. 赤色光／遠赤色光可逆反応

以上の結果から、赤色光／遠赤色光可逆反応性の有無を調べるための照射を、ツボミオオバコでは、種子を3日間暗黒で吸水させた後に、オオバコでは吸水開始からおよそ5分後に行うこととした。また、時間計測の正確さ等を考慮して、赤色光照射時間は1分、遠赤色光照射時間はツボミオオバコでは3分、オオバコでは1分とした。

ツボミオオバコは、25℃では、遠赤色光が赤色光の効果を一時的に打ち消し、最後に遠赤色光を照射したシャーレは暗黒対象よりもやや低い発芽率となった(図3)。15℃では、暗黒対象と遠赤色光照射後の発芽率が25℃のときより高くなったが、赤色光照射後より有意に低かった(図3)。オオバコでも、25℃で明瞭な光可逆性が見られた(図4)。

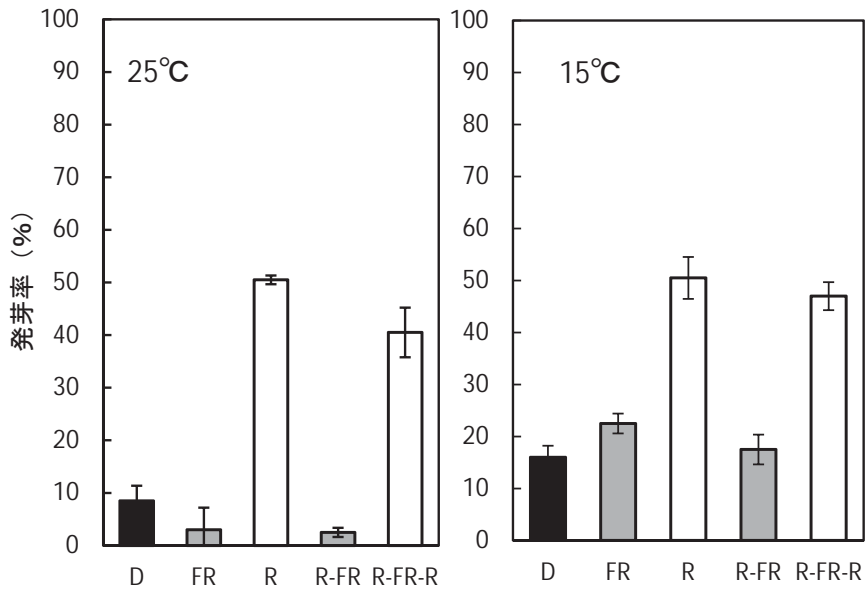


図3 ツボミオオバコにおける赤色光／遠赤色光可逆反応。それぞれの温度で、播種から3日後に赤色光 (R) 1分, 遠赤色光3分 (FR), またはそれらの照射を引き続いて行い (R-FR, R-FR-R), 25°Cではさらに3日, 15°Cでは8日おいて発芽数を観察した。1シャーレあたり50粒, 4シャーレの発芽率の平均値±標準誤差を示す。

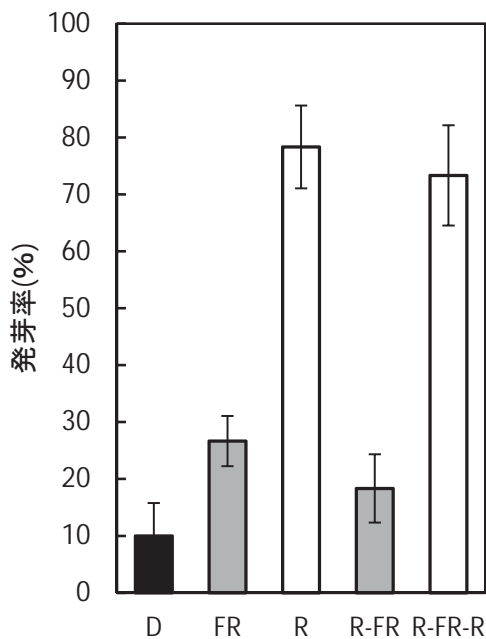


図4 オオバコにおける赤色光／遠赤色光可逆反応。25°Cで播種し約5分後に赤色光 (R) 1分, 遠赤色光3分 (FR), またはそれらの照射を引き続いて行い (R-FR, R-FR-R), さらに7日おいて発芽数を観察した。1シャーレあたり20粒, 3シャーレの発芽率の平均値±標準誤差を示す。

4. 自然光に対する反応

ツボミオオバコとオオバコは、いずれもフィトクロム低エネルギー反応の特徴である典型的な赤色光／遠赤色光可逆性を示すことがわかった。しかし、この結果から直接、自然界におけるこのような反応の意義を生徒や学生が考察することは難しい。そこで自然光である直射日光（またその散乱光）と植物の緑葉を透過した日光の効果の違いがわかる実験方法を検討した。

自然光照射は、屋外や屋内の窓際などで行うことになるが、必要な光のみが必要な期間種子に当たるような工夫が必要である。そこで、菓子箱を利用して図5のような照射箱を手作りした。内箱の穴を葉で覆うと緑葉の透過光を照射でき、外箱の蓋をすると暗黒にできる。穴の上の葉を載せたり外したりすることで交互照射が可能である。また、葉の代わりに別のフィルターを用いることもできる。この照射箱を用い、オオバコ種子の光可逆反応をみたところ、ツワブキの葉の透過光は日光の発芽誘導作用を可逆的に打ち消すことが示された。しかし、濾紙の透過光は日光の効果に有意な影響を及ぼさなかった（図6）。使用したツワブキの葉と濾紙の透過スペクトルは図7のようであった。

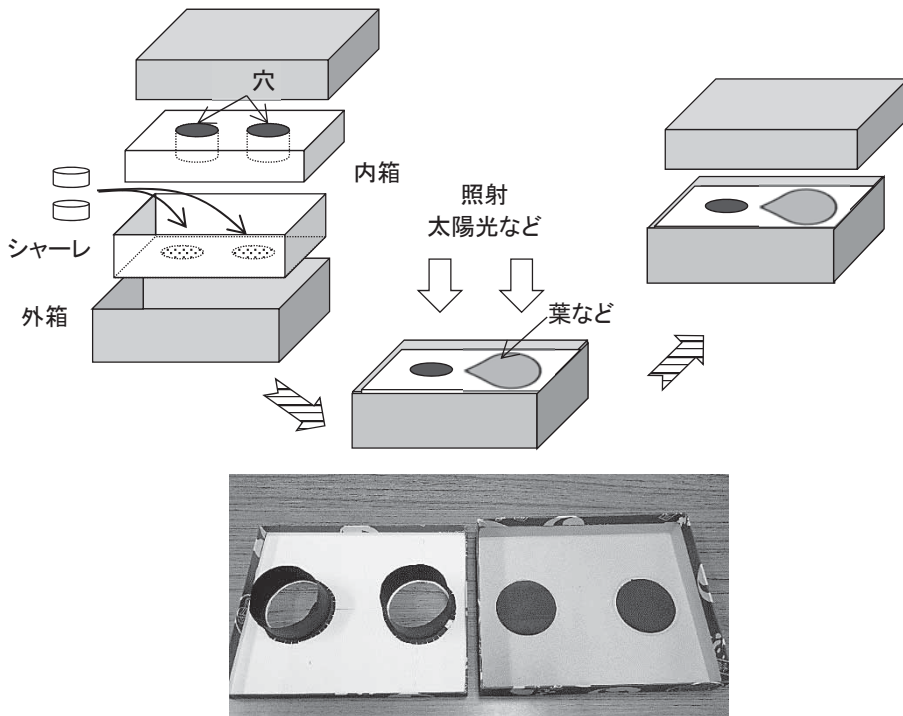


図5 自然光用照射箱の使用手順（上）と内箱の内部（下）。紗ーレおよび葉や濾紙は暗室内で内箱にセットし、外箱に入れて照射場所まで運ぶ。照射は、外箱の蓋を取って行う。内箱の底には紗ーレの位置を示す円、蓋の内側には紗ーレを固定する円筒をつけた。

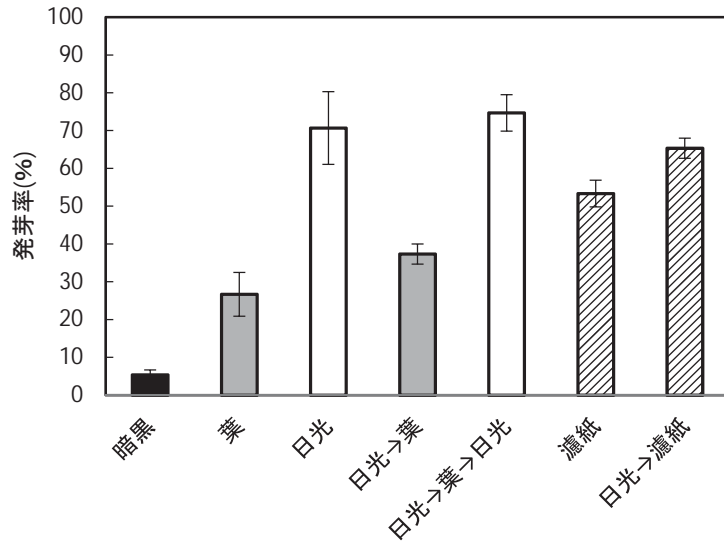


図6 照射箱を用い、オオバコ種子に自然光を照射した後の発芽率。日光の散乱光（日光、1700~1730 Lx）を直接、あるいはツワブキの葉（葉）または濾紙（No.2, アドバンテック東洋）を透過させ、それぞれ3分ずつ、またはそれらを引き続いて照射し、7日後に発芽を観察した。1シャーレあたり25粒、4シャーレの発芽率の平均値±標準誤差を示す。

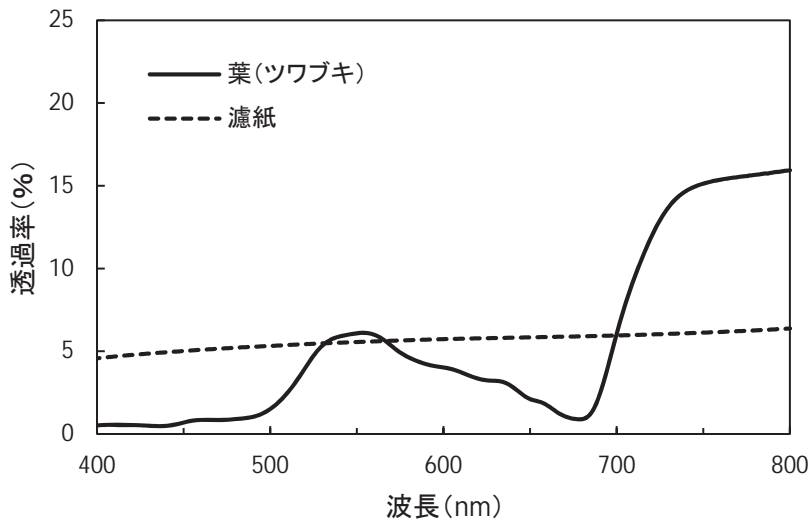


図7 ツワブキ (*Farfugium japonicum*) の葉と濾紙 (No.2, アドバンテック東洋) の透過スペクトル。

考 察

植物の環境応答のひとつとしてフィトクロムの役割を考える実習を高等学校や大学で行うとき、材料としてのレタス種子および照射光についていくつかの問題がある。まず、従来研究に使われてきたグランドラピッズ種は、わが国では一般に市販されておらず、入手が困難である。リーフレタスと呼ばれる非結球レタスは正の光発芽性が報告されているが、グレートレークス系の結球レタスは通常、暗黒でも発芽して光の影響をあまり受けない (White *et al.*, 1971)。第二にレタスは外国産の栽培植物であって本来の生育状況が想像しにくく、生態学的考察が難しい。第三に、発芽と光応答性の温度依存性が高く、25℃付近に保たなければ明瞭な光反応が見られない。温度が低いと暗発芽率が高まり (Gonai *et al.*, 2004)、30℃を超えると明条件でも発芽しなくなる (吉岡ら, 2009)。また、吸水開始から光を感じるようになるまでの時間が短く、10分程度で部分的に光応答性が現れおよそ1時間で十分に感じるようになるので (八ッ橋, 未発表)、播種に時間がかかって光が当たると、暗黒対象としたシャーレでも発芽が見られることになる。赤色光および遠赤色光の光源は、最近の研究にはLEDが用いられることが多いが、照射装置一式の価格は安価とはいえない。また、LEDは指向性が高く、光の強度が不均一になりやすく、種子によって受ける光量に差が生じる可能性がある。赤色光は市販の蛍光灯と赤色フィルターを用いて得ることもできるが、遠赤色光は通常の蛍光灯の光には含まれないため、難しい。さらに、自然界では単色光の赤色光や遠赤色光が存在することはない。

ツボミオオバコやオオバコの種子が光発芽性を持つことはすでに報告されている (Yamamoto, 1977; Baskin & Baskin, 2001)。また、ツボミオオバコの赤色光/青色光可逆性や自然光の影響に関する報告 (松田, 2001, 2004) もあるが、ここでは、上記のような点から、ツボミオオバコとオオバコの種子が学校現場で実験材料として適しているかについて検討した。

ツボミオオバコは北米原産の外来種であるが、関東以南を中心に野生化して分布を広げている (清水ら, 2001)。オオバコは全国でごく普通に見られる在来 (長田, 1976) または史前帰化植物 (清水ら, 2001) であり、両者とも道ばたや校庭などに多い。いずれも、根生葉のみのロゼット型で、踏みつけの多い日当たりのよい場所に生育し、長径1.5mmほどの小さな種子を多数生産する。植物を実際に観察することにより、草丈が低いので、他の植物がすでに繁茂する場所で発芽することは成長に不利であること、種子が小さく、土中に埋まったまま発芽することは芽ばえの枯死につながる可能性が高いことなどが容易に考察できる。

今回の実験では、両者とも、短時間の赤色光と遠赤色光によって可逆的に発芽が制御され、典型的なフィトクロム低エネルギー反応を示した。温度依存性については、ツボミオオバコは15℃でも25℃でも光発芽性が見られた。赤色光/遠赤色光可逆反応は、25℃の方がより明瞭であったが、15℃でも見られた。オオバコは15℃では明条件でも発芽率が低かったが、25℃で可逆反応が見られた。オオバコは30℃でも光発芽性を示すという報告があり (山本, 1983)、したがって、気温に合わせて適切な種を選べば、恒温装置を用いずに実験を行える可能性がある。

播種からの光感受性の変化をみると、ツボミオオバコでは吸水開始から2.5~5.5日で高くなることがわかった。吸水から感受性が高まるまで時間があるので、播種作業を通常の室内で行うことが可能である。また、教員が実験の準備をすることを考えると、感受性の高い状態が3日程度維持されることは、まとめて播種し、長い期間にわたって使用できるという点で有利である。一方、オオバコは、吸水から光を十分に感受するようになるまでの時間が短いので、播

種時に光が当たらないように注意する必要があるが、播種と照射を引き続いて行える。

われわれは、以前にマツバウンランが2週間の冷湿処理後にフィトクロム低光量反応を示すことを報告している(八ッ橋・栗丸, 2011)が、ツボミオオバコやオオバコは、冷湿処理を必要としなかった。

照射光として、人工光の代わりに自然光を用いる実験も行った。照射用の箱を工夫することで、直射日光と緑葉の透過光の効果を比べることができ、可逆性があることも示された。葉の代わりにNDフィルター(今回は濾紙)を用いることで、フィトクロムが感知するのが光の強さではなく、質、すなわち波長分布の違いであることを考察することも可能である。すなわち、図7に示されるように緑葉はクロロフィルによって赤色光を選択的に吸収し、遠赤色光を相対的に多く透過するのに対し、濾紙による減光はほとんど波長に依存しないことが効果の違いと考えることができる。ただし、この照射箱は、特に直射光を用いる場合は太陽の向きに合わせて傾けないと陰ができるなど、改良の余地がある。

以上のように、野生植物種子と自然光を用いることで、特定の品種のレタス種子や赤色光、遠赤色光の光源がなくても、フィトクロム低エネルギー反応を示すことは可能である。野生植物は、遺伝的、生理的に均一でないことなどから、実験材料としては敬遠されがちであるが、栽培植物より効果的にフィトクロムの生態学的意義を考察することができるという点で利用を検討する価値がある。また、種によって休眠特性や発芽特性が異なるので、それぞれに適した実験手順を考えるべきであり、さらに多くの種について情報が必要である。

謝 辞

本研究はJSPS科研費23501071によって助成を受けた。

引用文献

- Baskin C. C. & Baskin J. M. (2001) Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego
- Gonai T, Kawahara S, Tougou M, Satoh S, Hashiba T, Hirai N, Kawaide H, Kamiya Y & Yoshioka T (2004) Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed., J Exp Botany, 55: 111-118
- White J. C., Hillman J. & Phillips I. D. J. (1971) Studies on the Chemical Induction of a Light Requirement for Germination in Seeds of Lettuce, *Lactuca sativa* L., cv. Great Lakes. J. Exp Botany, 23 (4) : 987-995
- 浅島誠 他20名 (2014) 文部科学省検定教科書高等学校理科用生物, 東京書籍, 東京
- 池内昌彦・伊藤元己・箸本春樹 (監訳) (2013) キャンベル生物学原書9版, 丸善出版, 東京
- 嶋田正和 他21名 (2014) 文部科学省検定教科書高等学校理科用生物, 数研出版, 東京
- 清水矩宏・広田伸七・森田弘彦 (2001) 日本帰化植物写真図鑑—Plant invader 600種, 全国農村教育協会, 東京
- 長田武正 (1981) 原色日本帰化植物図鑑, 保育社, 東京
- 長谷あきら (1999) 植物の光センサー, 津田基之編, 生物の光環境センサー, 共立出版, 東京, p.25-39
- 松田仁志 (2001) 野草ツボミオオバコの発芽に及ぼす光の影響についての実験, 生物教育 42 : 58-64
- 松田仁志 (2004) 野草ツボミオオバコ種子の光発芽に及ぼす土の深さと葉を透過した太陽光の影響に関する実験, 生物教育, 44 : 126-133

- 本川達雄 他17名 (2013) 文部科学省検定教科書高等学校理科用生物, 新興出版社啓林館, 大阪
- ハツ橋寛子・栗丸猛 (2011) マツバウンラン (*Linaria canadensis Dum.*) 種子発芽の光, 温度およびジベレリンによる制御—高等学校および大学における発芽生理分野実習の教材開発を目指して, 宮崎大学教育文化学部紀要 (自然科学), (24) : 1-7
- Yamamoto M. (1977) Effects of Light on Seed Germination in *Plantago asiatica* L. 山形大学紀要, 自然科学 9 : 311-322
- 山本光男 (1983) オオバコ種子の形成期の環境条件と発芽, 生物環境調節21 : 69-72
- 吉岡俊人・藤茂雄・川上直人 (2009) 発芽と温度: 巡りくる季節を感じ取る, 種生物学会編, 発芽生物学, 文一総合出版, 東京, p.49-70