

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学分野実習の教材開発を目指して —

ハツ橋 寛子, 栗丸 猛

**Regulation of Germination by Light, Temperature and Gibberellin
in *Linaria canadensis* Seeds :
A New Material for Student Practice in Seed Germination Physiology**

Hiroko YATSUHASHI and Takeshi KURIMARU

要 旨

身近な野生植物の種子発芽特性を調べ, 発芽生理, 特にフィトクロムに関する実習の材料としての適否を検討した。関東以西に広く分布する外来植物マツバウンラン (*Linaria canadensis* Dum.) の種子発芽は, 冷湿処理, 光, ジベレリンによって発芽が促進された。冷湿処理なしでは発芽しなかったが, 2週間の冷湿処理を行うと, 15°Cおよび25°C連続赤色光 (5.8 W m⁻²) 下で, 60%以上発芽した。暗黒中では, いずれの温度でも発芽しなかった。赤色光は10秒の短時間照射でも発芽誘導効果があり, フィトクロム低光量反応の特徴を示した。ジベレリンA₃は, 3 mg L⁻¹以上で効果があり, 冷湿処理や赤色光照射を行わなくても, 発芽を誘導した。このように, マツバウンラン種子は, 広い温度範囲でフィトクロム依存の光発芽性を示し, 低濃度のジベレリンに対して感受性があるなど, 刺激と植物の反応の教材としても優れていることがわかった。

緒 言

植物の光に対する反応の典型的な例として, 高等学校生物や大学の入門的な教科書には, フィトクロムによるレタス種子の発芽制御がしばしば取り上げられる。しかし, 実習を行うための材料としては, この種子には, いくつかの問題がある。第一に, 典型的な反応を示すGrand Rapidsという品種は, 日本では一般に市販されておらず, 入手がやや困難であること, 第二に, フィトクロム低光量反応 (low fluence response : LFR) の特徴である赤色光 - 遠赤色光可逆反応を明瞭に示すためには, 発芽温度を25°C前後に保たなければならないことである。これより温度が低いと暗黒対照の発芽率が高くなり, 逆に30°Cを越すと光発芽率も下がることが知られている (Bewley & Black 1994など)。このような温度管理は, 特に高等学校など

では難しいことが多い。さらに、光発芽性の生態的な意義を考察する際、人為的に選択された栽培種より、野生種の方が考えやすい。そこで、我々は、身近な野生植物の中で、実習の材料として扱いやすい種を見出すことを試みた。

マツバウンランは、北アメリカ原産の外来植物で、現在では、関東以西に広く野生化し、しばしば群生しているのがみられる(清水ら 2001)。春から初夏に紫色の花を穂状につけ(図1)、微細な種子を多量に生産する。宮崎大学構内においても、容易に採集できるため、この種子発芽特性について調べたところ、前処理は必要であるが、温度依存性が低く、典型的なフィトクロムLFRを示し、ジベレリン感受性があることがわかったので報告する。

材料と方法

1. 植物材料

マツバウンラン(*Linaria canadensis* Dum.)は、2003年5月5日から26日にかけて、宮崎大学木花キャンパス内で結実した個体を採取し、室内で水に差しておいた。数日後、蒴果が開いて、種子が自然に落下するのを待って採種し、褐色の小瓶にいれてデシケーター(22±2℃)で実験に使用するまで保存した。実験は、2003年6月～2004年3月の間に行った。種子は、多面体で、長径約0.45 mmである(図1)。

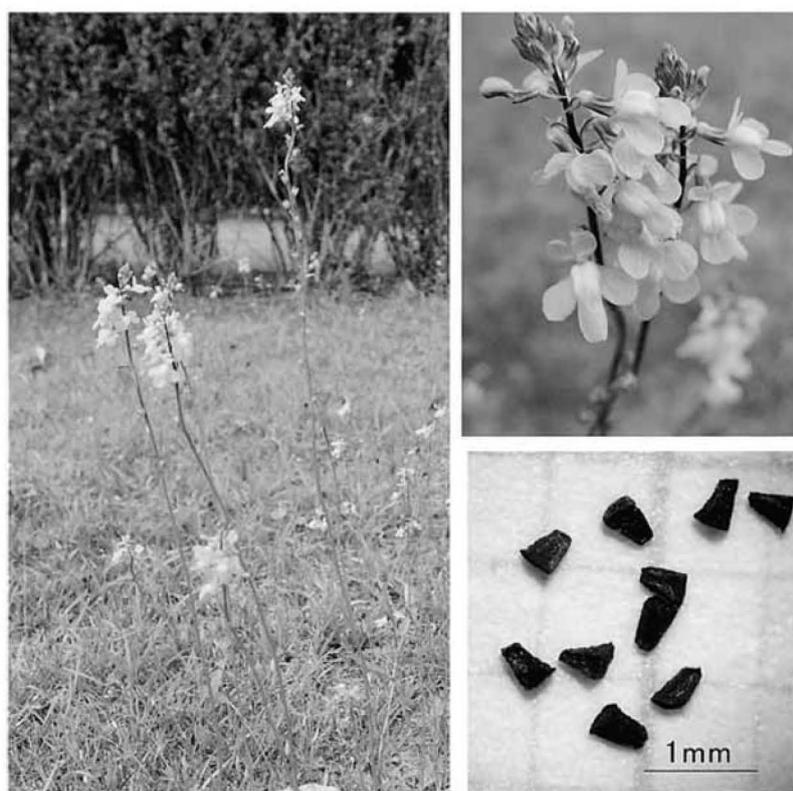


図1 宮崎大学構内のマツバウンラン*Linaria canadensis* Dum. (左) とその花 (右上) および種子 (右下)。植物体と花は2009年4月21日撮影。

2. 播種と発芽実験および照射

濾紙 (No.6, 東洋アドバンテック, 東京) を 2 枚敷いた直径 3 cm のプラスチックシャーレに純水を 0.6 mL 加え, ミクロスパーテルにおよそ $1/3$ (8 ± 2 mg) の種子を均等に播いた。ジベレリンの効果調べる実験では, 純水の代わりに, 所定の濃度のジベレリン A₃ (和光純薬工業, 大阪) 水溶液を用いた。

冷湿処理を行う場合は, 播種後のシャーレを個別にアルミホイルで包み, 暗箱にいれた上, 冷蔵庫 ($5 \pm 1.5^\circ\text{C}$) に発芽実験まで保存した。

発芽実験は, 特に記載がない場合は, $25^\circ\text{C} \pm 0.6^\circ\text{C}$ または $15^\circ\text{C} \pm 0.8^\circ\text{C}$ (以下それぞれ 25°C または 15°C と表す) のインキュベータ (MIR151, 三洋電機, 東京) 内で行った。

照射は, 上記のインキュベータ内で, 以下の蛍光灯を光源として用いて行った。赤色光は, FL20S・R-F (20W, 松下電器産業株式会社, 東京) で光強度 5.8 W m^{-2} (およそ $32 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 遠赤色光は, FL20S FR-74 (20W, 東芝, 東京) に塩ビフィルター (テクナライト R2805, 筒中プラスチック工業株式会社, 東京) を一重に巻いたもの (4.3 W m^{-2} , およそ $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) である。連続照射は, 発芽温度に移してから観察まで引き続いて行い, またパルス (短時間) 照射は, 発芽温度に移した直後に所定時間行った。照射時以外のシャーレは, アルミホイルで包み, 暗箱に入れて所定温度に置いた。照射以外の操作は, 暗室内で, 弱い緑色光のもとで行った。

3. 発芽の観察

種子の発芽の判定は, 原則として, 発芽温度に置いてから 6 日後に行った。種子や幼根が微小なため, 30 倍の実体顕微鏡を用いて観察し, 視野内の種子およそ 100 粒を無作為に選んで, このうち幼根の突出しているものを発芽として発芽率を出した。

結 果

1. 冷湿処理の効果

22°C 白色光下に置かれたマツバウンラン種子は, 2 週間たってもまったく発芽せず, 休眠状態にあると考えられた。そこで, 休眠打破効果のあることが知られている冷湿処理を行うこ

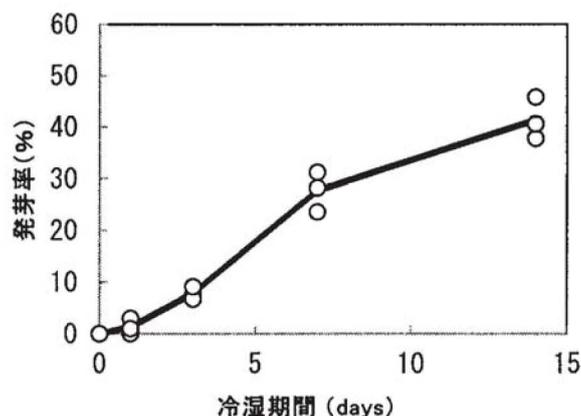


図2 マツバウンラン種子の冷湿処理期間と 25°C 赤色光連続照射下での発芽率。横軸に示した期間, 種子を 5°C の湿潤状態に置き, その後, 25°C 赤色光連続照射下に移し6日間置いた。各点は, 1シャーレの値。

とにした。冷湿処理とは、湿潤状態にある種子を、発芽温度に移す前に、一定期間低温にさらすことである（材料と方法参照）。播種したシャーレをさまざまな期間 5℃に保ち、その後 25℃赤色光連続照射下に移し 6 日後に観察したところ、冷湿期間が 3 日以上で発芽がみられ、14 日では発芽率およそ 40% になった（図 2）。

2. 発芽温度と光条件の影響

発芽時の温度と光照射によって、発芽率がどのような影響を受けるか、冷湿処理後の種子を用いて検討した。冷湿処理は 14 日間行い、25℃あるいは 15℃に移して、暗黒、赤色光連続照射、あるいは赤色光 5 分パルス照射後暗黒に、それぞれ 6 日間おいて発芽率を観察した。いずれの温度でも、暗黒中においたものはまったく発芽しなかったが、赤色光を照射したものは、連続照射でもパルス照射でも、50% 以上発芽した（表 1）。このように、マツバウンラン種子は、15~25℃の温度範囲で、正の光発芽性を示すことがわかった。さらに、赤色光パルスが十分な発芽率を誘導することから、フィトクロム関与の LFR であることが考えられた。また、15℃の方が発芽率がやや高いことがわかったので、発芽温度は以降 15℃とすることとした。

表 1 マツバウンラン種子の発芽温度と発芽率 (%)。14 日間の冷湿処理の後、表に示した温度と光条件に移し、6 日後に観察した。光条件は、D: 暗黒対照, R_{cont}: 赤色光連続照射, R_{pulse}: 赤色光パルス照射 (5 分) である。各データは、3 シャーレの平均値 (M) と標準誤差 (SE) を表す。

	15℃		25℃	
	M	SE (%)	M	SE (%)
D	0.0	± 0.0	0.0	± 0.0
R _{cont}	67.2	± 4.8	61.6	± 3.6
R _{pulse}	65.9	± 3.0	50.6	± 2.4

3. 発芽を誘導する赤色光の光量と赤色光 - 遠赤色光可逆性

発芽がフィトクロムの LFR であることを確かめるため、有効な赤色光の光量と、遠赤色光による赤色光の効果の打ち消しおよび可逆性を調べた。

赤色光 (5.8 W m⁻²) は、10 秒の照射ですでに飽和しており、必要光量は 58 J m⁻² (およそ 3.2 × 10⁻⁴ mol m⁻²) 以下であることがわかった（図 3）。これは、通常 LFR といわれる 10⁻⁷~10⁻⁴ mol m⁻² の範囲（豊増ら, 2009）に入る。

さらに、遠赤色光パルスによる打ち消し効果をみたところ、表 2 に示すように、冷湿処理が 7 日のときは、きわめて明瞭な可逆性が示され、LFR であることを裏付けた。冷湿処理 14 日では、打ち消しは部分的になったが、この理由は、現在のところ不明である。シロイヌナズナでは、吸水した種子中でフィトクロム A が合成され、超低光量反応 (VLFR) が起きることが報告されており (Shinomura *et al.* 1994)、冷湿期間が長くなると VLFR が起きやすくなる可能性が考えられるが、マツバウンランでは、遠赤色光のみでは発芽は誘導されなかったため、さらに検討を要する。

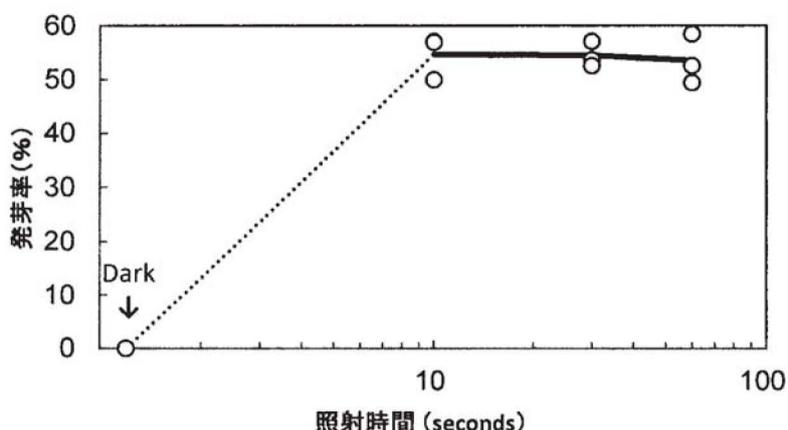


図3 マツバウンラン種子の赤色光照射時間と発芽率。14日間の冷湿処理の後、15℃に移し、横軸に示した時間の赤色光照射を行った後、暗黒に6日置いた。各点は、それぞれ1シャーレの結果、最も左の点(Dark)は、暗黒対照の結果を示す。

表2 マツバウンラン種子発芽の赤色光—遠赤色光可逆性。表に示した期間の冷湿処理の後、それぞれの照射を行い、暗黒に6日置いて発芽を観察した。D:暗黒対照, R:赤色光パルス照射(1分), FR:遠赤色光パルス照射(5分)。例えば、R-FRは赤色光パルスに引き続いて遠赤色光パルスを照射したことを示す。各データは、6シャーレの平均値±標準誤差。

照射	冷湿理期間			
	7days		14days	
	M	± SE(%)	M	± SE(%)
D	0.0	± 0.0	0.2	± 0.2
R	35.6	± 0.8	48.5	± 3.3
FR	0.0	± 0.0	0.0	± 0.0
R-FR	0.0	± 0.0	23.0	± 4.3
R-FR-R	33.0	± 0.6	44.6	± 3.4
R-FR-R-FR	0.0	± 0.0	23.5	± 7.2
FR-R	32.4	± 0.8	44.1	± 5.8

4. ジベレリンの効果

レタス種子では、赤色光照射によってジベレリン合成が誘導されることが知られており (Toyomasu *et al.* 1993), 外生のジベレリンは赤色光の効果を代替する (De Greef and Fredericq 1983)。また、ジベレリンが冷湿処理の代わりになる例も *Polygonum convolvulus* や *Stachys alpine* などでも報告されている (Baskin and Baskin 2001)。そこで、マツバウンランの種子発芽においても、ジベレリンがこのような効果を示すかどうかを調べた。

冷湿処理を7日間行った種子において、ジベレリンA₃(GA₃)は、3 mg L⁻¹以上での暗発芽を誘導した(図4上)。赤色光照射時にも、GA₃は発芽を促進し、暗黒の場合より低濃度で飽和したが、飽和発芽率はおよそ50%で、暗発芽の場合を超えることはなかった。すなわち、GA₃と赤色光の効果は、それぞれの飽和濃度および飽和光量においては、相加的ではなく、マ

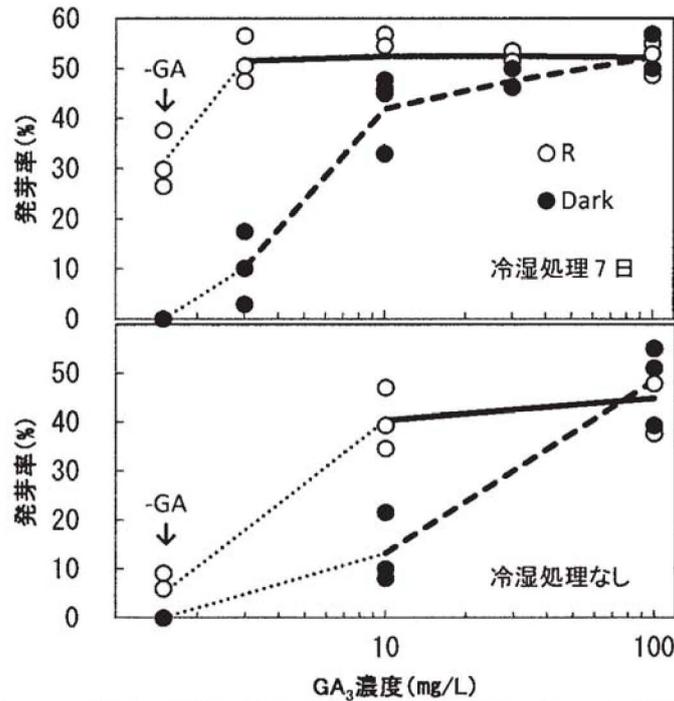


図4 マツバウンラン種子の発芽に対するジベレリンの効果。種子は、横軸に示す濃度のGA₃溶液に播き、発芽温度15℃で、各光処理をした後、暗黒中に6日おいて観察した。Rは、1分間の赤色光パルス照射、Darkは暗黒対照。上図は7日間冷湿処理を行った場合、下図は冷湿処理を行わなかった場合の結果。各点はそれぞれ1シャーレの結果、最も左の点(-GA)は、ジベレリンを与えない対照の結果を示す。

ツバウンランにおいても、赤色光によってジベレリン合成が誘導されると考えて矛盾しなかった。さらに、GA₃は、冷湿処理も代替するようにみえた(図4下)。この場合も、最大発芽率は、およそ50%であった。このように、GA₃は、マツバウンラン種子において、赤色光と同様に発芽誘導をする作用と、冷湿処理に代わって休眠を打破する作用の2つの作用を示した。

考 察

西日本を中心に広く分布する外来植物マツバウンランの種子は、冷湿処理によって休眠が解除され、典型的なフィトクロムLFRを示した。光感受性は15~25℃で明らかであり、温度依存性は、レタスGrand Rapids種子に比べ低かった。したがって、学校現場などで温度制御が難しい状況でも、真夏を除くほとんどの季節で、フィトクロム反応を示す実験材料に用いることができると考えられる。

光発芽性は、野生植物の種子には広くみられる性質であり(Baskin and Baskin 2001; Bewley and Black 1994など)、特定の種のみのものではない。しかし、特に高等学校生物の教科書で具体的なデータが取り上げられているのは、ほとんどレタスに限られており、誤解を招きかねない。マツバウンランのような身近な野生植物を材料に実習を行うことは、このような誤解を解き、植物が野生の状態で生きていく上で、光発芽性がどのような意義を持つか、考察するのに有効である。一般に、正の光発芽性を持つ種子は、小さく貯蔵物質が少ないと言われているが、マツバウンランも例外でなく、貯蔵栄養の多少と、光発芽性の関連を考えるよい

例になるかも知れない。

さらに、マツバウンランでは、ジベレリンが光照射や冷湿処理を代替して種子発芽を促進するので、発芽の制御におけるジベレリンの役割を考察する実験にも好適である。GA₃は、本研究において、3~10 mg L⁻¹ (およそ 1~3 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) で有意な効果がみられたが、これは、レタス Grand Rapids で効果のある濃度とされている 10⁻⁴ mol L⁻¹ (Bewley and Black 1994) 以下であり、高いジベレリン感受性を持つといえる。

問題点としては、光によって発芽を誘導するには、一定期間の冷湿処理が必要であること、および種子が微細なため、肉眼での発芽の判定が難しいことである。前者は、適切な濃度のジベレリンで代替または期間の短縮ができる。後者については、発芽期間を長くして幼根が十分伸びてから観察することで、ある程度は解消できるであろう。

今回の実験では、発芽率は最高でも60%を超えなかった。未発芽分が、不稔など発芽能力のない可能性もあるが、より深いタイプの休眠状態であることも考えられる。この場合、休眠の多型 (polymorphism) といえるが (Bewley and Black 1994), これについては、さらに検討が必要である。

引用文献

- Baskin, C. C. and J. M. Baskin, 2001, Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego
- Bewley, J. D. and M. Black, 1994, Seeds: Physiology of Development and Germination. 2nd ed. Plenum Press, New York
- De Greef, J. A. and H. Fredericq 1983, Photomorphogenesis and hormones, Encyclopedia of plant physiology, new series, vol. 16A, p. 401-427, Springer-Verlag, Berlin
- 清水矩宏, 森田弘彦, 廣田伸七, 2001, 日本帰化植物写真図鑑, 全国農村教育協会
- Shinomura, T., A. Nagatani, J. Chory, and M. Furuya, 1994, The Induction of Seed Germination in *Arabidopsis thaliana* is Regulated Principally by Phytochrome B and Secondarily by Phytochrome A. Plant Physiol. 104: 363-371
- Toyomasu, T., H. Tsuji, H. Yamane, M. Nakayama, and I. Yamaguchi, 1993, Light Effects on Endogenous Levels of Gibberellins in Photoblastic lettuce seed. J Plant Growth Regul 12: 85-90
- 豊増知伸, 吉岡俊人, 清和研二 2009, 発芽と光—チャンスをつかむメカニズム, 「発芽生物学」(種生物学会編), p. 71-89, 文一総合出版