

開花時期の異なる2タイプのチガヤ (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) における種子発芽の光制御

八ッ橋寛子, 倉内 潤*

Light-control of Seed Germination in Two Types of *Imperata cylindrica* (L.) Beauv. Characterized by Flowering Phenology

Hiroko YATSUHASHI and Jun KURAUCHI

要 旨

宮崎大学構内に生育する開花期および形態の異なる2タイプのチガヤ (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) において, 種子発芽の光による制御に相違があるかを検討した。早咲き型 (E型) の種子は, 赤色光によって発芽が促進されたが, わずかな緑色観察光による促進効果もみられ, 冷湿処理後は暗黒中や連続遠赤色光下でも発芽したことから, フィトクロムによる超低光量反応や高照射反応を起こしている可能性が考えられた。また, 1回の赤色光短時間照射 (パルス) によって発芽が促進され, 赤色光-遠赤色光可逆性から, フィトクロム低光量反応も関与することがわかった。一方, 普通型 (C型) は連続赤色光下では発芽したが, 暗黒中では発芽せず, 観察光の影響もみられなかった。1回の赤色光パルスは, いずれのタイミングで与えても, 有意な発芽促進効果を持たなかったが, 赤色光パルス照射を播種直後と4日後, または3日後と4日後の2回行ったところ, 発芽が促進された。これらのパルス照射の各々において, 赤色光-遠赤色光可逆性がみられたので, C型種子の発芽にはフィトクロムの低光量反応が複数の段階で関与していることが示唆された。

緒言

チガヤ (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) は陽地の草原に群生するイネ科の多年草で, アジア・アフリカ・オーストラリアなど広く分布しており, 日本でも全国で見られる。松村ら (1980) は, 濃尾平野のチガヤについて, 2タイプの亜種があり開花時期の早いものをE型 (Early type), 開花時期の遅い一般型をC型 (Common type) とした。また, 形態的にも違いがあり, E型は, 稈の節が無毛であるのに対し, C型は, 稈の節が有毛であることで区別が可能としている。水口ら (2003) は, 宮崎大学構内にも5月上旬から6月上旬にかけて出穂, 開花するC

* 学校法人宮崎学園宮崎学園高等学校
略語: Pfr, 遠赤色光吸収型フィトクロム

型の他, 局所的に3月下旬から出穂するE型が生育することを見出した。さらに, これらのチガヤの種子休眠性にはタイプ間差があり, E型種子には明確な休眠性がみられず, 暗黒中でも白色光下でも高い発芽率を示すのに対して, C型は25°C恒温条件では暗黒中でほとんど発芽せず, 白色光によって明らかな発芽促進があることを報告している(水口ら, 2002)。

このようにC型では光要求性が報告されているが, 光受容体など光制御の実態は明らかでない。また, E型種子の発芽が全く光制御を受けないのかについても, さらに詳細な検討が必要と考えられた。

一般に種子発芽を制御する光受容体としてフィトクロムが知られており(Bewley and Black, 1994; Baskin and Baskin, 2001など), 典型的な低光量反応の他, 高照射反応および超低光量反応が報告されている(Shinomura et al., 1996; 篠村, 2001)。そこで, 本研究では, E型種子とC型種子の発芽に関して, 光反応性を詳細に検討するとともに, 光受容体フィトクロムが関与するかどうかについて実験を行った。

材料と方法

1. 植物材料

チガヤ(*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) 種子は宮崎大学構内で, E型種子は2004年4月20日~4月25日, C型種子は2004年5月20日~5月25日に採取した。採取場所は水口ら(2003)によった。種子を採取したE型の個体は稈の節が無毛, C型個体は稈の節は有毛であり松村ら(1980)および水口ら(2003)の記載と一致した。

採集した種子はグロスチャンバー(ダイトロン, 宮崎ダイキン空調株式会社, 宮崎, 23°C ±2°C, 湿度30~70%)で1日乾燥させた後, チャック付ポリエチレン袋に密封して家庭用冷蔵庫(R-336TD HITACHI, 東京)の冷凍庫(-18±2°C)または超冷凍(MDF-192, SANYO, 東京, -80°C)で実験に用いるまで保存した。冷凍保存した種子は, 吸湿を避けるため, 実験に用いる2時間前に室温のデシケーター内に移した。

2. 播種

濾紙(No.6, 東洋アドバンテック, 東京)を2重に敷いた直径6cmのガラスシャーレに水2mlを加えたものに, 暗室内で後述の緑色安全光を用いて種子30粒を小穂ごと播き, さらに水を1ml加えた。なお, チガヤの小穂は2小花からなるが, 1小花は不稔であり, 種子は1小穂に1粒できる(長田, 1989)。播種後, シャーレを緑色安全光にかざし小穂内に種子の影の見えないものは除去し不足分を追加して種子数が30粒になるようにした。9cmのシャーレを用いた際は, 1シャーレ当たり水を計6ml, 種子数を50粒にした以外は, 同様の方法で播種した。水は, 逆浸透純水装置(MILLI-RO, 日本ミリポア・リミテッド, 東京)で一次処理した逆浸透水を超純水装置(MILLI-Q Labo, 日本ミリポア・リミテッド, 東京)でさらに処理した比抵抗17.9 MΩ/cmの超純水を用いた。

暗室内での作業は, 原則として弱い緑色安全光下で行った。緑色安全光は, 昼白色蛍光灯(サンラインFL10D-G, 10W, 日立株式会社, 東京)にプラスチックフィルム(リュテートNo.63およびNo.31 龍電社, 現東芝ライテック株式会社, 東京)を巻いたものから得た。

3. 発芽および冷湿処理

種子はインキュベータ (MIR151 または MIR153, 三洋電機, 東京, $25 \pm 0.6^\circ\text{C}$) 内で発芽させた。発芽の経過の観察は, 暗室内の緑色安全光のもとで行った。幼根が種皮から突出した場合を発芽と判断した。

予め冷湿処理を行う場合は, 播種直後のシャーレを暗箱に入れ, 低温 (家庭用冷蔵庫内, 4°C) に保存した。冷湿処理の期間は, 予備実験で効果のあった7日間とした。冷湿処理の後 25°C に移し, 必要に応じて一定期間暗黒において照射実験を行った。

4. 照射

照射は以下の光源をインキュベータに装着して行った。赤色光光源は赤色蛍光灯 (ハイライト S FL20S・R-F 純赤色, 20 W, 松下電器産業株式会社, 東京) で, 光強度は 5.8 W m^{-2} であった。遠赤色光光源は遠赤色蛍光灯 (遠赤色 ノイズレス FL20S FR-74, 株式会社東芝, 東京) に遠赤色フィルター (テクナライト R2805, 筒中プラスチック工業株式会社) を一重に巻いたもので, 光強度は 4.2 W m^{-2} であった。短時間照射 (パルス照射) はいずれの光も5分間行った。

結果

1. E型種子とC型種子の発芽に対する赤色光および遠赤色光連続照射の効果

E型種子とC型種子の発芽の時間経過を暗黒中, 赤色光下, 遠赤色光下で調べた (図1)。E型種子の発芽率は, 最も高い赤色光下で40%程度であり, 暗黒中でもおよそ30%, 遠赤色光下でおよそ20%と大きな差はなかった。一方, C型種子は遠赤色光下と暗黒中では10%以下であったが, 赤色光下では70%近い高い発芽率を示し, 赤色光による顕著な発芽促進効果がみられた。

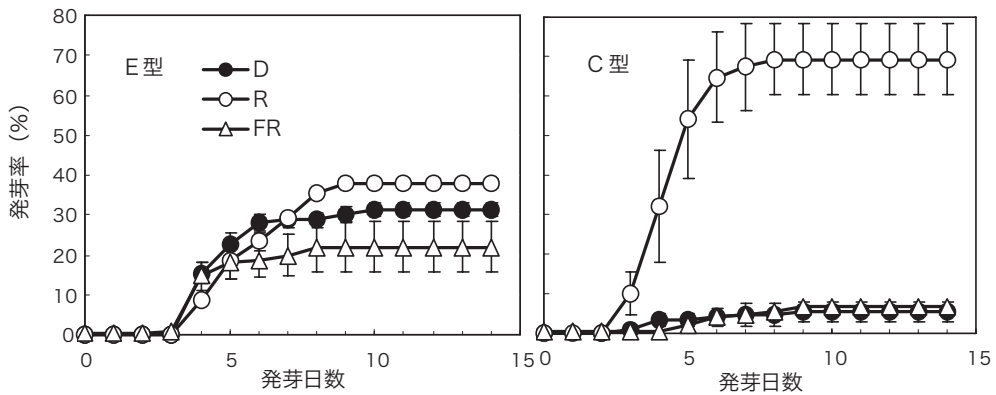


図1 E型およびC型種子発芽の時間経過。種子は吸水開始から図に示した光処理を連続して行った。発芽は暗室内の緑色安全光の下で毎日観察した。データは3シャーレ (各50粒) の平均値と標準誤差。D: 暗黒対照, R: 赤色光照射, FR: 遠赤色光照射。

2. 冷湿処理の影響

両種子に冷湿処理を7日間行い、その後25°Cで赤色光または遠赤色光の連続照射を行ったところ、E型種子では、冷湿処理を行わなかった種子に比べ暗黒対照と遠赤色光処理の発芽率が上昇したが、赤色光処理の発芽率は有意な変化はなかった(図2上)。対照的に、C型種子では、冷湿処理によって赤色光処理の発芽率は上昇したが、暗黒対照と遠赤色光処理による発芽率の上昇はほとんどみられなかった(図2下)。これらの結果は、E型種子は、冷湿処理によって、さらに光に対する感受性が上がり、わずかな遠赤色光吸収型フィトクロム(Pfr)によって発芽が誘導されるようになったが、C型種子では、発芽を誘導するPfrの閾値は変わらず、一定量以上のPfrに対する反応性が上昇したと解釈できる。

ここで、E型種子で冷湿処理を行わなかった場合、遠赤色照射区あるいは暗黒対照において赤色光照射区より有意に低い発芽率が観察され、図1と異なる結果となった。これは、図1においては、毎日の発芽率を緑色安全光で観察したが、図2では12日後に結果を見るまで、完全な暗黒状態であったため、この違いによる可能性がある。

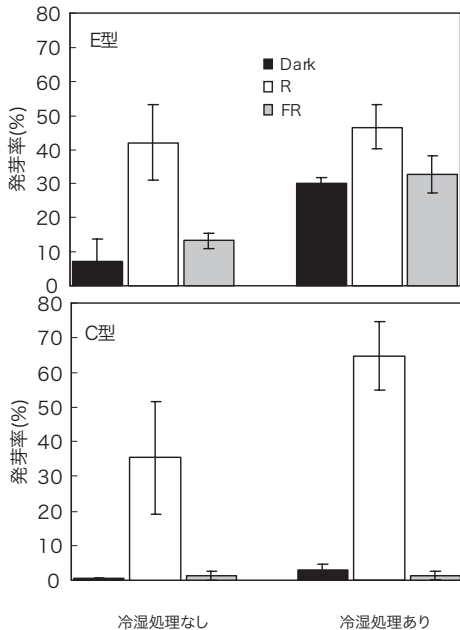


図2 E型およびC型種子の発芽に対する冷湿処理の効果。播種後7日間の冷湿処理を行い、25°C連続照射下に移して12日後に発芽率を観測した。光処理は図1と同じ。データは3シャーレ(各50粒)の平均値と標準誤差。

3. 赤色光短時間照射の効果

図2においてみられた赤色光による発芽促進がフィトクロム低光量反応であるかどうかを確かめるため、赤色光の短時間照射(パルス)をE型およびC型種子に行った。E型種子においてはパルスの効果は播種からの時間によって異なり、30時間後が最大であった。しかし、C型種子では、0~144時間のいずれの時期に与えても、大きな発芽誘導効果はみられなかった(図3, 4)。

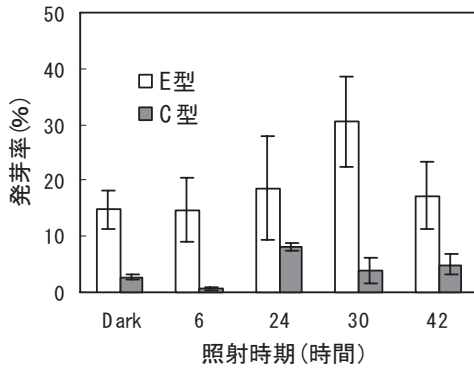


図3 播種後様々な時間に与えた1回の赤色光パルスの効果。データは3シャーレ (各50粒) の平均値と標準誤差。

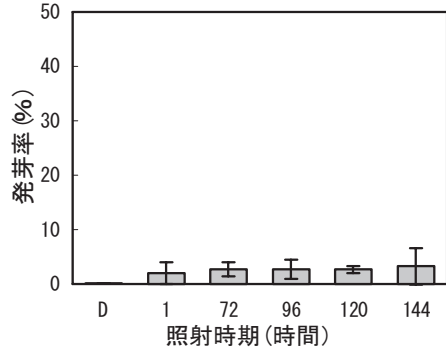


図4 C型種子に播種後様々な時間に与えた1回の赤色光パルスの効果。データは3シャーレ (各50粒) の平均値と標準誤差。

4. E型種子における赤色光 / 遠赤色光可逆性

E型の種子の発芽は赤色光パルスによって有意に促進されたので、遠赤色光パルスがこの作用を打ち消すかどうかを調べた。赤色光パルスの効果を遠赤色光パルスが可逆的に打ち消す反応はフィトクロム低光量反応の特徴とされている (篠村, 2001)。図5が示すように、赤色光の効果は遠赤色光パルスによって、有意に打ち消され、この反応がフィトクロム低光量反応であることが示唆された。

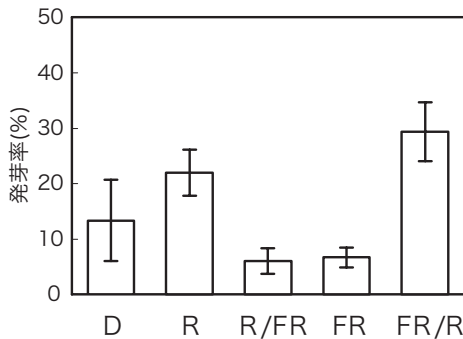


図5 E型種子における赤色光 / 遠赤色光可逆性。播種から30時間後に赤色光パルス (R)、遠赤色光パルス (FR)、または赤色光パルスとを遠赤色光パルスを続けて図に示した順に与えた。Dは暗黒対照。発芽は、12日後に観察した。データは、3シャーレ (各50粒) の平均値と標準誤差。

5. C型種子における赤色光パルスの繰り返し照射の効果

C型種子は、E型種子と異なり、照射時期に関わらず1回の赤色光パルスによって有意な発芽促進は見られなかった (図3, 4)。しかし、予め冷湿処理を行うことによって、赤色光への感受性を高めることができるので (図2)、冷湿処理後、パルスを与えることで発芽を誘導できないか検討した。その結果、1回のパルスの効果は冷湿処理によって有意に増幅されなかったが、複数回のパルスによって発芽が起り、パルスの回数が増えるに従って高い発芽率が観察された (図6)。また、同じ回数のパルスでも、照射の時期によって、効果が異なった。2回のパルスは、冷湿処理2時間後と1日後に与えた場合は有意な効果はないが、2時間後と4日後、

あるいは3日後と4日後に与えると発芽を誘導した (図7)。

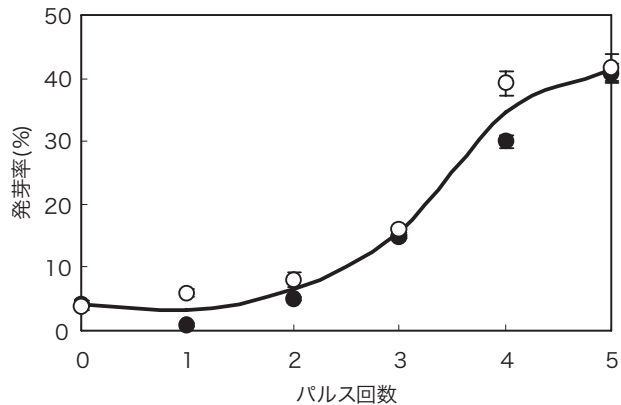


図6 冷湿処理後のC型種子に1日毎に与えた赤色光パルスの回数と発芽率。冷湿処理終了の2時間後に最初のパルスを照射し、その後24時間おきに照射した。発芽は播種から12日後に観察した。異なる記号は独立した別の実験の結果を表す。各データは6シャーレ(各30粒)の平均値と標準誤差。

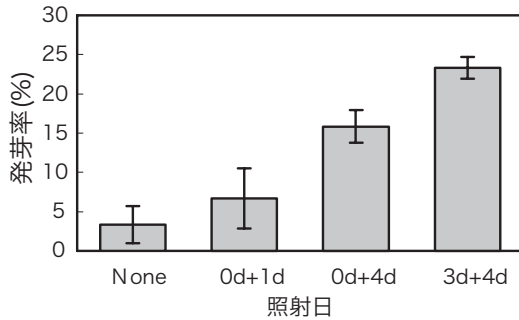


図7 冷湿処理後のC型種子における2回の赤色光パルスの効果。パルスは冷湿処理2時間後と1日後(0d+1d)、直後と4日後(0d+4d)、あるいは3日後と4日後(3d+4d)に与え、発芽は冷湿処理終了から12日後に観察した。各データは6シャーレ(各30粒)中、最高、最低値を除いた4シャーレの平均値と標準誤差。

6. C型種子における赤色光/遠赤色光可逆性

C型種子は2回の赤色光パルスによって有意に発芽誘導されることがわかったので、それぞれの赤色光パルスの効果が遠赤色光パルスによって打ち消されるかどうかを調べた(図8)。パルスは2回、冷湿処理2時間後と4日後(0d:4d)、あるいは3日後と4日後(3d:4d)に与えた。いずれの処理においても、2回の赤色光パルスの直後にそれぞれ遠赤色光パルスを照射すると、発芽はほとんど見られず、暗黒対照と有意差はなかった。2回の赤色光パルスのうち、いずれか一方の赤色光パルスの後に遠赤色光パルスを与えると、3d:4dでは、1回の赤色光パルスの結果と同程度になり、0d:4dでは、1回の赤色光パルスの結果よりさらに低い発芽率となった。この結果から、2回の赤色光パルスのいずれも、フィトクロム低光量反応を誘導することが明らかになった。また、0d:4dの結果から、暗黒中で吸水する種子においても、少量のPfrが存在すること、また、播種直後にパルスによって生じたPfrは、減少しながら、4日以降も存在することが推定できた。

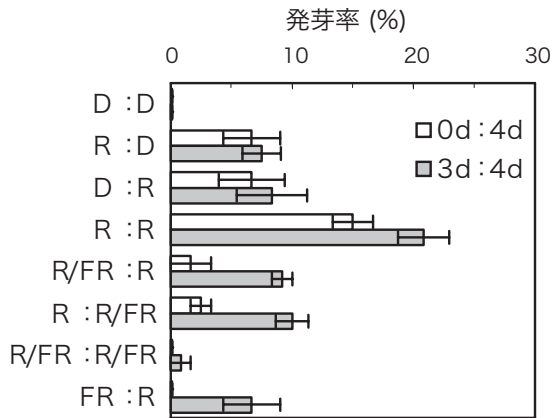


図8 C型種子における2回の赤色光パルス照射による発芽誘導と遠赤色光パルスによる打消し。パルスは冷湿処理2時間後と4日後(0d:4d)または3日後と4日後(3d:4d)に与えた。照射の記号は図5と同じで、コロンの前後が前後の照射日の処理を表す。各データは5シャーレ(各30粒)中、最高、最低値を除いた4シャーレの平均値と標準誤差。

考察

開花時期の異なる2タイプのチガヤは、種子の発芽特性においても相違がみられた。図1では、E型種子は光に対する反応性が低いのにに対しC型は光要求性であるように見え、これは、E型の発芽率が比較的低いことを除けば、水口ら(2002)やMatsumuraら(1983)の結果と矛盾しない。彼らは、E型種子はC型種子よりも発芽における光要求性は低いと述べている。しかし、今回の実験では、完全な暗黒中においたE型種子の発芽率は、赤色光を照射したものより有意に低かった(図2, 低温処理なし)。E型種子の発芽において光要求性が認められたという報告はこれが最初である。

図1において、E型種子の暗発芽率が高かったのは、結果で述べたように、毎日の観察時に使用した緑色安全光的作用によると考えられるが、これはフィトクロム超低光量反応である可能性がある。また、遠赤色光下でも同程度の発芽がみられることから、高照射反応の関与も考えられる。あるいは、E型種子の発芽においては、低レベルのPfrが有効で、緑色安全光や遠赤色光によって生じるPfr、または暗黒吸水中に生じるPfrも一定の効果を持つということもできる。特に、冷湿処理を行った場合は、Pfrへの感受性が高まるか、Pfrの効果が増幅されるように見える(図2)。C型種子においては、暗発芽や遠赤色光連続照射下の発芽はほとんど観察されず、超低光量反応や遠赤色光型高照射反応は関与していないことが示唆された。

一方、いずれのタイプの種子発芽にも、フィトクロム低光量反応が関与することがわかったが、ここでも、E型とC型では反応性に違いがみられた。E型種子では、1回の赤色光パルスで発芽が誘導され、赤色光パルスの直後に与えた遠赤色光パルスは、赤色光の効果打ち消した(図5)。C型種子では、1回の赤色光パルスは、いずれの時期に与えても有意な効果はなかった(図3, 4)が、冷湿処理の後に与えた2回のパルスは有意な効果があり、それぞれ直後の遠赤色光パルスによってその効果が打ち消された(図8)。この結果は、C型チガヤの種子発芽過程においては、フィトクロム低光量反応の関与する段階が複数存在する可能性を示唆する。E型、C型ともに、赤色光パルスの効果は、照射の時期によって異なり、播種直後は効果が低い傾向があった。

このように、チガヤにおいては、E型の種子発芽にフィトクロム超低光量反応、高照射反応および低光量反応が、C型種子の発芽に複数のフィトクロム低光量反応が関与することが示唆

された。種子の発芽にフィトクロムの異なる反応が関与する例は、シロイヌナズナでも報告されており、高照射反応と超低光量反応はフィトクロム A, 低光量反応はフィトクロム B によることが明らかにされた (J. W. Reed et al. 1994; Shinomura et al., 1996; 篠村 2001)。チガヤにおいても、タイプによって種子発芽に優先的に関わるフィトクロム分子種が異なる可能性も考えられるが、これについてはさらに検討が必要である。

引用文献

- C. C. Baskin and J. M. Baskin (2001) Seeds, Academic Press, San Diego, CA, USA
J.D. Bewley and M. Black (1994) Seeds (2nd ed.), Plenum Press, New York
松村正幸, 行村徹 (1980) チガヤ 2 型の比較生態 (1), 岐阜大学農学部研究報告 43 : 233-248
M. Matsumura, T. Yukimura and S. Shinoda (1983) Fundamental studies on artificial propagation by seeding useful wild grasses in Japan IX, J. Japan. Grassl. Sci. 28:395-404
水口亜樹, 西脇亜也, 小山田正幸 (2002) チガヤ (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) における開花時期の異なるタイプ間の種子発芽特性の違い. Grassland Science 48:216-220
水口亜樹, 西脇亜也, 小山田正幸, 杉本安寛 (2003) 宮崎大学構内における開花時期の異なるチガヤ (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) 2 タイプの分布, 宮崎大学農学部研究報告 49:89-94
長田武正 (1989) 日本イネ科植物図譜, 平凡社, 東京
J. W. Reed, A. Nagatani, T. D. Elich, M. Fagan, and J. Chory (1994) Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. Plant Physiol. 104: 1139-1149
T. Shinomura, A. Nagatani, H. Hanzawa, M. Kubota, M. Watanabe, And M. Furuya (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8129-8133
篠村知子 (2001) フィトクロムファミリーとその生理機能分担, 「植物の光センシング」 pp39-45, 秀潤社, 東京