

光および温度によるキバナノホトトギス (*Tricyrtis flava*) 種子発芽の制御

八ツ橋 寛子・宮田 真理子*

Regulation of Seed Germination in *Tricyrtis flava* by Light and Temperature

Hiroko YATSUHASHI and Mariko MIYATA*

要 旨

宮崎県固有種キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava* Maxim., ユリ科) 種子の発芽に対する温度および光の影響を調べた。採取から1.5ヵ月後の種子は、15 ~ 25 °C では光休眠状態にあり、暗黒中では発芽しなかったが、白色光または赤色光の照射によって、25 °C では13日後までにおよそ70%、15 °C では19日後までにおよそ90%発芽した。遠赤色光あるいは青色光照射下では、全く発芽しなかった。予め4.5 °C の冷湿処理を1 ~ 8週間行くと、白色光下での発芽が早まり、8週間の冷湿処理後は暗発芽が見られるようになった。5分間の赤色光の短時間照射は、1回でも、数日に渡って繰り返しても、発芽誘導効果はなかった。しかし、赤色光を2日間あるいは4日間連続照射した後、遠赤色光パルスを与えると、部分的な発芽抑制が見られたことから、発芽の誘導にはフィトクロムの関与があると考えられた。

緒言

キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava* Maxim., ユリ科) は、宮崎県の固有種であり、「改定・日本の絶滅のおそれのある野生生物：植物」(環境庁編, 2000)によれば、絶滅危惧類にランク付けされている。宮崎県内では広く各地に分布しているが、個体数は減少している(宮崎県版レッドデータブック, 2000)。

キバナノホトトギスは多年生であるが、遺伝的多様性の点から、種子による繁殖は重要と考えられる。本研究は、キバナノホトトギスの繁殖における種子の役割を知るための基礎として、種子の発芽特性を明らかにすることを目的とした。

キバナノホトトギス種子の発芽特性に関しては、Takahashi (1981) が、明条件下の発芽に対する冷湿処理と発芽温度の影響を報告しているが、光条件についての詳細な研究例はない。われわれは、宮崎大学に近い加江田溪谷に自生するキバナノホトトギスの種子を材料に、その発芽が、光条件によってどのように制御されているか、冷湿処理と発芽温度が光制御に対して

どのような影響を与えるかを調べ、さらに光受容体について検討した。これらの結果から、自然条件におけるキバナノホトトギス種子の発芽特性について考察した。

材料と方法

1 植物材料

キバナノホトトギス種子は、2006年12月13日、加江田溪谷(宮崎市大字鏡洲)の遊歩道沿いに生育するおよそ1000個体から果実ごと採取した。完全に成熟した果実から種子を取り出し、混合して、室温のデシケーター内でおよそ1ヶ月間乾燥後、家庭用冷蔵庫の冷蔵室(4.5±1.5)に、さらに2007年10月17日に同冷凍室(-16.5±1.5)に移して保存した。吸湿を避けるため、実験に用いる少なくとも1時間前に室温のデシケーターに移した。すべての実験は、2007年1月から2008年1月までの間に行った。

2 播種と発芽

種子は、濾紙(No.6, 東洋アドバンテック, 東京)を二重に敷き超純水(抵抗値17.9M /cm以上)を加えたガラスシャーレに播いた。直径6 cmシャーレを用いた場合は、各シャーレ当たり超純水2 ml, 種子25粒, 9 cmシャーレではそれぞれ4 ml, 50粒とした。播種後は、乾燥を防ぐため、シャーレを無色透明のラップフィルムで覆った。暗黒条件の場合は、アルミ箔で二重に覆った。これらのシャーレは、湿らせたペーパータオルを敷いたプラスチックケースに入れた。

発芽実験はインキュベータ(MIR151またはMIR153, 三洋電機, 東京)内で、25.0±0.6 あるいは15.0±0.8 でおこなった。

必要に応じて、種子を発芽温度に置く前に冷湿処理を行った。冷湿処理では、播種した種子のシャーレをアルミ箔で二重に覆い、冷蔵庫(4.5±1.5)中に一定期間置いた。

3 光源および照射

照射はインキュベータに装着された蛍光灯によって行った。白色光(光強度4.5Wm⁻²)は、植物育成用蛍光ランプ(プラントルクス, FL20SS・BRN/18-A, 20W, 東芝ライテック, 東京)を使用した。赤色光(2.4Wm⁻²)は、赤色蛍光灯(FL20S・R-F, 20W, 松下電器産業, 東京)から得た。遠赤色光(2.5Wm⁻²)は、遠赤色蛍光灯(遠赤色ノイズレス, FL20SFR-74, 東芝ライテック, 東京)にフィルター(テクナライトR2805, 筒中プラスチック工業, 東京)を一重に巻いたものから得た。青色光(1.7Wm⁻²)は、青色蛍光灯(FL20S-B, 20W, 松下電器産業)を用いた。

短時間照射の場合、1回のパルスは、赤色光は5分間、遠赤色光は10分間とした。

4 発芽の観察および検定

発芽経過の観察は、暗室内の緑色安全光のもとで行った。ただし、最終発芽数は、通常の室内で数えた。緑色安全光は、昼白色蛍光灯(サンラインFL10D-G, 10W, 日立, 東京)にプラスチックフィルム(リュテートNo.63+No.31, 龍電社, 現東芝ライテック, 東京)を巻いたものを1灯使用した。幼根が種皮を破って、突出した場合を発芽とした。

必要に応じて、Tukeyの全群間比較法で発芽率の有意差を検定した。

結果

1 採取種子の休眠性

採取から47日後の種子を25℃あるいは15℃白色光連続照射下あるいは暗黒中におき、発芽の時間経過を観察した(図1)。白色光下では、25℃で播種8日後、15℃で15日後から発芽が始まり、25℃で13日後に約7割、15℃で19日後に約9割の最終発芽率に達した。このように、発芽の開始は、25℃中の方が早かったが、最終発芽率は15℃中の方がやや高かった。しかし、いずれの温度においても、暗黒中では全く発芽しなかった。したがって、この時期の種子は、光休眠状態にあると考えられる。

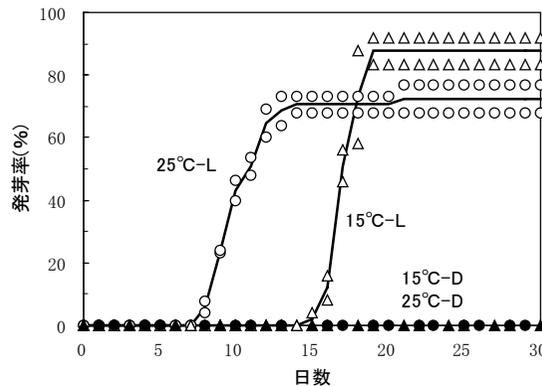


図1 キバナノホトトギス種子の25℃(○, △)および15℃(□, ●)における明(L, 白)および暗(D, 黒)条件下における発芽の時間経過。各点は1シャーレ25粒の発芽率。

2 照射光の波長

赤色、遠赤色、青色の単色光を25℃で連続照射したところ、赤色光以外の光では、種子発芽は全く起こらなかった(図2)。赤色光下における発芽は、播種7日後から始まり、12日後までにほぼ一定値に達し、白色光下とほとんど同様の経過であった。

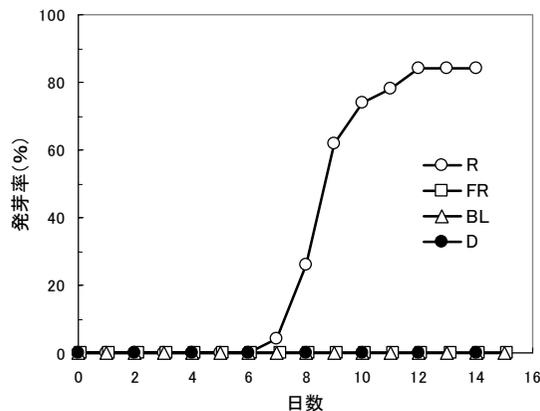


図2 25℃における赤色光(R)、遠赤色光(FR)、青色光(BL)下または暗黒(D)中での発芽の時間経過。種子は播種と同時に図に示した光条件においた。データは2シャーレ(1シャーレ25粒)の平均値。

3 冷湿処理の効果

吸水した種子に予め低温を経験させる冷湿処理は、しばしば休眠を解除することが知られている (Baskin and Baskin, 2001など)。今回、暗黒状態で4.5 付近の低温にさまざまな期間おいた種子の発芽の時間経過を調べた (図3)。1 ~ 8 週間の冷湿処理の後、白色光下で25 あるいは15 の発芽温度においた場合、25 では、冷湿処理期間に伴って、発芽開始が早まり、最終発芽率が上がった。15 においた場合も、発芽の開始が早まった。データは示していないが、赤色光下でも、ほぼ同様の傾向が見られた。さらに8 週間の冷湿処理は、暗黒中での発芽を誘導する効果があった。また、図には示していないが、4 週間の冷湿処理によっても、20% 程度の暗発芽がみられた。

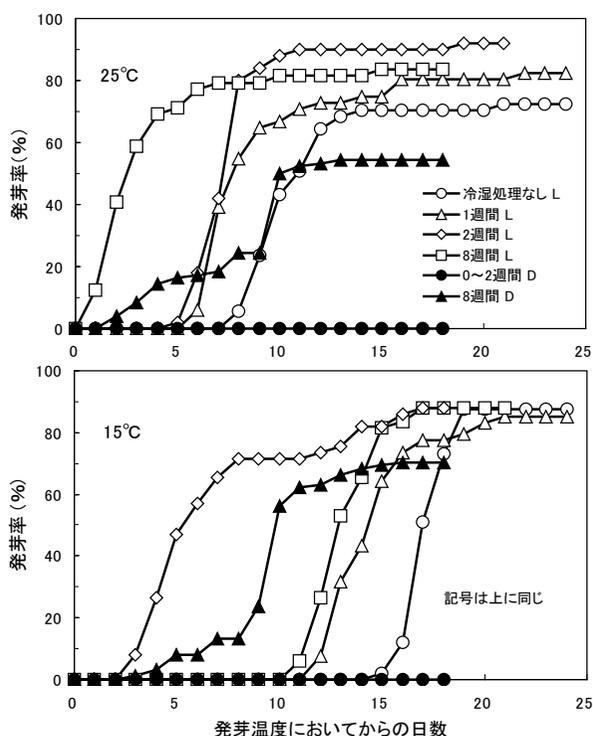


図3 低温処理を行った種子の発芽経過。種子は図に示した期間(週)低温処理を行った後、25 または15 の発芽温度に移した。白い記号は白色光下(L)、黒い記号は暗黒中(D) においた結果を表す。各データは2シャーレ (1シャーレ25粒) の平均値。

4 赤色光および遠赤色光パルス照射の効果とフィトクロム関与の可能性

赤色光のみに発芽誘導効果があったことから、フィトクロムの関与が考えられた。そこで、フィトクロム低光量反応を誘導する赤色光パルス照射が発芽誘導効果をもつか調べた (表1)。5 分のパルス照射を播種後1時間から7日後までのさまざまな時期に1 回行い、30日間観察したが、いずれも発芽は全く起こらなかった。さらに、短時間照射を播種後毎日1 回7日後まで計8 回繰り返し行った場合も、発芽は見られなかった。また、予め冷湿処理を4 ~ 8 週間行っても、赤色光パルスの明確な効果は見られなかった。

表 1 赤色光パルスおよび連続照射の効果。「パルス 1 回」は、播種後右の列に示した時期にそれぞれ 1 回パルスを照射し、「パルス繰返し」は播種後 1 時間を第 1 回とし、以後 24 時間おきに 8 回の照射を繰返し与えた。「連続照射」は、播種から観察時まで連続して照射を行った。観察は播種から 23 日後。各データは 2 シャーレ (1 シャーレ 25 粒) の平均値。

照 射		発芽率(%)
なし		0
パルス 1 回	1 時間後	0
	3 時間後	0
	6 時間後	0
	1 日後	0
	2 日後	0
	3 日後	0
	4 日後	0
	5 日後	0
パルス繰返し (8 回)	6 日後	0
	7 日後	0
		0
		0
		0
		0
		0
		0
連続照射		78

フィトクロム関与の可能性について、遠赤色光の効果調べることさらに検討した。赤色光は、連続して 2 日間以上照射すれば、一定の効果があることがわかった (図 4, -FR) ので、播種から 5 日後までのさまざまな期間、赤色光を照射した後、遠赤色光パルスを 10 分間照射して、その影響を見た (図 4, +FR)。その結果、4 日間までのいずれの照射期間においても、赤色光による発芽誘導効果の低下が見られた。特に、2 日間の赤色光照射の効果は、遠赤色光パルスによってほぼ完全に打ち消された。5 日間の赤色光照射の後では、遠赤色光パルスの効果は見られず、この時点で、発芽誘導過程における Pfr の作用はすでに終了していると考えられた。

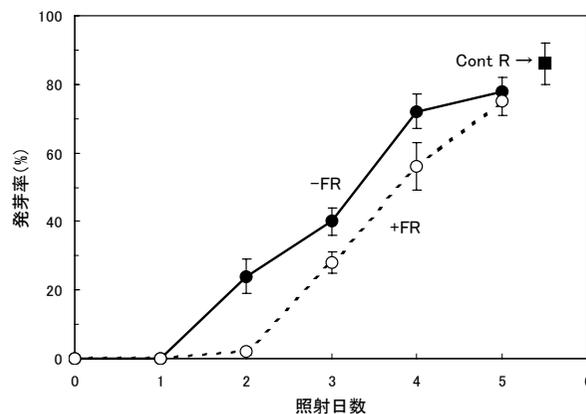


図 4 赤色光照射後に与えた遠赤色光短時間照射の効果。播種直後から赤色光を横軸に示した日数照射した。その後、直ちに (-FR) あるいは遠赤色光を 10 分照射した後 (+FR) 暗黒に移した。Cont R は、播種から観察終了まで連続照射したときの結果。縦軸は播種から 2 週間後の発芽率 (平均値 ± 標準誤差) を表す。

次に、この遠赤色光の効果が、可逆的なものであるか確かめた（表2）。赤色光を播種から2日間あるいは4日間連続照射した後、遠赤色光パルス照射して暗黒に移したところ、発芽率は、遠赤色光パルスなしの場合に比べ低下した。遠赤色光パルスによる発芽抑制は、赤色光2日間照射では $P < 0.01$ 、4日間照射では $P < 0.05$ で有意であった。遠赤色光に引き続き赤色光パルスを与えると、発芽率は回復した。遠赤色光パルスの効果が、赤色光4日間照射の後では、2日間照射に比べ低下するのは、上述のように、発芽の過程が進み、Pfrの関わる段階が終了した種子が多くなるため、と考えられる。

以上の結果から、キバナノホトトギス種子の発芽において、赤色光パルスの効果は明らかではなかったが、赤色光連続照射後は遠赤色光による可逆的な打消しが見られることから、フィトクロム低光量反応が何らかの形で関与していると考えられた。

表2 赤色光連続照射直後に与えた遠赤色光パルスの効果とその可逆性。播種直後から2日間あるいは4日間赤色光を照射した後、表に示すパルス照射を行い、暗黒に移した。播種から13日後に発芽を観察した。各データは、6シャーレ（1シャーレ50粒）の発芽率（%）の平均値±標準誤差。各データの右の列において、異なる文字は、それぞれの水準で有意差があることを示す。

照射	赤色光連続照射期間				
	2日間		4日間		
	発芽率 (%)	1 %	発芽率 (%)	1 %	5 %
None	16.0 ± 4.6	b	64.3 ± 3.9	ab	bc
FR*	4.3 ± 1.3	a	51.0 ± 2.9	a	a
FR-R*	20.6 ± 3.4	b	72.3 ± 4.1	b	c
FR-R-FR	3.7 ± 1.5	a	56.1 ± 4.7	a	ab

* FR: 遠赤色光パルス, R: 赤色光パルス

考察

採取直後のキバナノホトトギスの種子は、15でも25でも、正の光発芽性であり、赤色光によって発芽誘導されることが明らかになった。光受容体として、フィトクロムが関与する可能性が考えられたが、発芽を誘導するには、赤色光を2日以上連続照射する必要があり、5分のパルスは繰り返し与えても効果は得られなかった。しかし、遠赤色光や青色光の連続照射は発芽を全く誘導せず、高照射反応の可能性は低いと考えられた。2日間の赤色光照射の直後に与えた遠赤色光パルスは、有意に発芽を抑制し、この抑制効果は、引き続いて与えた赤色光パルスによって可逆的に打ち消されたので、フィトクロム低光量反応の関与が示唆された。赤色光パルスの効果が得られない理由については、発芽過程の複数の段階でPfrが必要である、などの可能性があるが、今後の検討が必要である。

キバナノホトトギスは、林縁や明るい林床にはえる多年草である。加江田溪谷では、遊歩道に沿って、正午前後の直射日光の当たりにくい東向き斜面上に、多数の個体が生育している。例年9月下旬から10月初旬に開花した後、11月下旬から12月上旬にかけて、蒴果が成熟し、先端が開裂して薄い円板状の種子が風によって散布される。その後、地上部は完全に枯死するが、

翌年2月頃から芽生えが観察される。多年生であるため、前年の個体から生じるシュートもあるが、種子からの実生個体も含まれるとみられる。

自然環境における温度や光等の変化は、実験条件よりはるかに複雑であり、種子の発芽動向を推定するのは難しいが、今回の実験から得られた結果をもとに、以下に自然環境下でのキバナノホトトギスの種子発芽について考察を試みる。実験結果から、結実直後の種子は、休眠状態にあるが、適当な条件下では、比較的短期間に高い割合で発芽し、休眠打破に長期間の後熟や冷湿処理は必要ないことがわかった。加江田溪谷のキバナノホトトギス生育地の気温は、データロガーによる我々の計測によれば、2007年12月は平均10.0、最高12.5、最低7.5、2008年1月は平均8.2、最高12.0、最低5.5であり(未発表)、今回の実験条件よりも低いですが、光条件が適当であれば、発芽する可能性はあると考えられる。予備的に行った野外実験では、12月上旬に生育地においた種子は、1月中旬に発芽した。しかし、光が全く当たらない場合、または、遠赤色光の比率の高い緑葉透過光のみが当たる場合は、種子は未発芽のまま越冬すると推定される(図2参照)。この場合も、低温期間が長く続けば、一部は暗発芽が可能となり(図3)、気温の上がる春に発芽すると考えられる。ただし、上述のように、2007年1月の記録された最低気温は5.5であり、宮崎県における平均気温は通常1月に最低になることから(気象庁気象統計情報による)、種子が十分な低温経験が得られない可能性も考えられる。この時点で未発芽の種子は、埋土種子集団を形成するであろうが、その後の動向については、さらにデータが必要である。

従って、野外の条件で、晩秋～初冬に結実後、一部の種子は1～2ヶ月ほどの間に発芽し、このとき未発芽だった種子の一部は、越冬後、翌春に発芽するが、残りは埋土種子集団を形成する可能性が示唆された。さらに、少なくとも、結実から1～2ヶ月後の種子はフィトクロムの関与する光発芽性であり、光が当たる環境を選んで発芽することによって、幼い芽ばえが、周囲の背の高い植物との競争によって淘汰されることを防いでいると考えられる。キバナノホトトギスは、夏緑性多年草であるが、走出枝などは出さず、基本的に種子が芽生えた場所で成長する。従って、種子の散布と発芽条件の選択は、生育環境を決める要因となり、キバナノホトトギスの繁殖において、種子は重要な役割をもつと考えられる。

今回の実験は、種子の生理的な特性を知ることが主な目的であったため、ほとんどを25で行ったが、今後、野外におけるキバナノホトトギスの生育期間に近い温度でも行い、自然環境下における種子発芽について推定する知見をさらに得たいと考えている。

Takahashi (1981)によれば、採取から10日後のキバナノホトトギス種子(宮崎県尾鈴山産)は、白色光下10～20でほぼ100%、25で約50%発芽した。4の冷湿処理を行うと、発芽が早く起こるようになり、25下での発芽が促進された。本研究の結果はこの報告と大きな矛盾はなく、冷湿処理の効果が裏付けられ、さらに、2ヶ月の冷湿処理が暗発芽を誘導することが見出された。また、鈴木(2000)は、ホトトギスとタイワンホトトギスの種子が、一部の条件で例外があるものの、全体として、強い光発芽性を示すと述べている。今回、キバナノホトトギスについても、光発芽性が確認された。ホトトギス属のような林縁、林床の植物においても明瞭な光発芽性が見られることは、生態的にどのような意味があるか興味深い。

引用文献

- Baskin, C.C. and Baskin J.M. (2001) *Seeds, Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*, Academic Press, San Diego
- 環境庁編 (2000) 改定・日本の絶滅のおそれのある野生生物：植物 (維管束植物)
- 鈴木貢二郎 (2000) コリ科ホトトギス属 2 種とツルボの種子発芽における光反応性の差異, 東農大農学集報, 45 : 210-216
- Takahashi, H. (1981) Seed dormancy in *Tricyrtis* Sects. *Flavae* and *Brachycyrtis* (Liliaceae). *Sci. Rep. Fac. Educ., Gifu Univ. (Nat. Sci.)* 6 : 684-691
- 宮崎県版レッドデータブック作成検討委員会 (2000) 宮崎県における保護上重要な野生生物 (宮崎県版レッドデータブック), 宮崎県環境科学協会

MEMOIRS
OF
THE FACULTY OF EDUCATION AND CULTURE
UNIVERSITY OF MIYAZAKI

NATURAL SCIENCES

21

CONTENTS

Yoshimasa NONAKA : Sensitivity analysis of air pollutant concentration for meteorological factors.....	1
Osamu EGE : Special Ways of Measuring Nuclear Quadrupole Resonance Several detecting methods and their features, and the subjects from now	... 13
Hiroko YATSUHASHI and Mariko MIYATA : Regulation of Seed Germination in <i>Tricyrtis flava</i> by Light and Temperature 21
Delphine Abla Azumah and Kenichi NAKABAYASHI : The Use of Digital Content to improve upon the Teaching and Learning of Science in Basic Schools in Ghana 29

SEPTEMBER 2009