

キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava*) 種子発芽の光誘導および高温阻害へのジベレリンおよびアブシシン酸の関与

後藤 遥, 加藤 史記, ハツ橋 寛子

Involvement of Gibberellin and Abscisic Acid in Photoinduction and Thermoinhibition of Seed Germination in *Tricyrtis flava*

Haruka GOTO, Fuminori KATO and Hiroko YATSUHASHI

要 旨

キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava* Maxim.) 種子は, 15°C ~ 25°C では赤色光下で 90% 以上発芽し暗黒では発芽しないが, 35°C では赤色光下でもまったく発芽しない. このような光発芽性や高温阻害へのジベレリン (GA) とアブシシン酸 (ABA) の関与について検討した. 15°C における発芽は, 赤色光下では ABA によって遅延, GA 生合成阻害剤ウニコナゾールによって阻害された. 暗黒中では外生 GA によって発芽が誘導されたことから, 赤色光下では GA が生合成されると考えられた. 赤色光下の発芽率は, 30°C ではおよそ 30%, 31°C 以上ではほぼ 0% と高温で低下した. 30°C では, GA あるいは ABA 生合成阻害剤フルリドン (FD) の単独, または同時投与によって発芽率が回復したが, 31°C では GA と FD の同時投与のみ効果があった. 33 ~ 35°C ではいずれの処理によってもほとんど回復しなかった. これらの結果から, 30 ~ 31°C 付近では, GA 量の減少と ABA 生合成量の増加により発芽が抑制されている可能性が考えられた. 33°C 以上での発芽抑制の要因は不明であるが, わずかな温度の違いによって植物ホルモンの作用が大きく変化することがわかった.

略号 ABA, アブシシン酸; FD, フルリドン; GA, ジベレリン; UZ, ウニコナゾール

緒 言

キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava* Maxim., ユリ科) は林縁に多い夏緑生多年草で, 早春に種子が発芽し, 秋に開花, 初冬に結実する. 宮崎県の固有種であり, 現在は宮崎大学周辺にも多くみられるが, 場所によっては著しく減少している (ハツ橋・村岡 2012, ハツ橋 2017). 植物にとって, 種子散布は唯一の移動手段であり, 散布された種子の休眠がどのような条件で解除されるかは, その植物の繁殖における重要な要素である. 我々は, キバナノホトトギス種子発芽の環境による制御に関する基礎的な研究を通して, この植物の生態を知ること

を目指している。

これまでの研究から、キバナノホトトギス種子は15～25℃連続赤色光下で発芽し、フィトクロムが光受容体として関与していることがわかっている（ハツ橋・宮田 2009）。また、35℃の高温では赤色光下でも発芽しない高温阻害が見られた（松田（黒木）・ハツ橋 2013）。

一般に種子の発芽に植物ホルモンのジベレリン（GA）が促進的に、アブシシン酸（ABA）が抑制的に働くことはよく知られており（川上 2005 など）、この2つの植物ホルモンのバランス（GA-ABA balance）とクロストーク（cross talk）が発芽や光信号の伝達を制御すると考えられている（Bewley et al. 2013 など）。また、発芽の高温阻害にABAが関与することはレタス（Yoshioka et al. 1998, Gonai et al. 2004）やシロイヌナズナ（Toh et al. 2008）など多くの植物で報告されている。今回我々は、キバナノホトトギス種子の光発芽と高温阻害にこれらの植物ホルモンがどのように関わるか、また、温度の違いによってそれはどのように変化するかを、外生植物ホルモンと生合成阻害剤を用いて検証した。

方 法

1 植物材料

キバナノホトトギス（*Tricyrtis flava*）種子は、2011年12月11日から2011年12月24日の間に大谷林道（宮崎県宮崎市折生道）で採取したものを使用した。採取後は超低温フリーザー（-80℃）で保存し、実験の3～6か月前に家庭用冷蔵庫（4.5 ± 1.5℃）に移した。実験に用いる種子は、その都度、吸湿を避けるために、播種の少なくとも1時間前に室温のガラスデシケーターに移した。実験は、2016年3月～2017年11月の間に行った。

2 播種および発芽実験

種子は、濾紙（No.6, アドバンテック, 東京）を二重に敷いた直径9cmのガラスシャーレに水（超純水, 比抵抗 > 18 MΩ・cm, Simplicity UV による, 日本ミリポア株式会社, 東京）または試験液を1.5 mL 加えたものに25粒ずつ播いた。

発芽実験は、インキュベータ（MIR151 または MIR153, 三洋電機, 東京）内で行った。赤色光光源は、インキュベータに設置した研究用LED光源システム（赤色基盤 MIL-R18(A), 光源フレーム MIL-U200, 三洋電機, 東京）で、ピーク波長は660 nm, 光強度は、3.1 W m⁻²であった。シャーレは、赤色光条件の場合は、無色透明の蓋をしたスチロールケースに入れ、暗黒条件の場合は、アルミ箔で二重に包んでステンレス製蓋付ケースに入れ、さらにこれを紙製の暗箱に入れた。乾燥を防ぐため、これらのケースには湿らせたペーパータオルを敷いた。光照射以外の操作は、弱い緑色安全光の下で行った。発芽実験中、赤色光照射は連続して行った。

発芽温度は、15.0 ± 1.0℃, 25.0 ± 0.7℃, 30.0 ± 1.4℃, 31.0 ± 0.8℃, 33.0 ± 0.9℃, または 35.0 ± 0.8℃（以降それぞれ15℃, 25℃, 30℃, 31℃, 33℃, または35℃と表記する）であった。

3 試験液の調整

GA, ABA, ウニコナゾール (UZ), フルリドン (FD) の原液および試験液は以下のように調整した。

GA (Gibberellin A₃, 071-02813, 和光純薬, 東京), ABA (± cis-trans-Abcisic Acid, A1012, Sigma Chemical, St. Louis, USA), UZ (U5232, LKT Laboratories, Inc., Minnesota, USA), および FD (064-06241, 和光純薬) をそれぞれ少量のエタノールに溶解し, 水で所定の濃度に希釈して原液とした。試験液は, これらの原液のうち1つまたは複数と水を所定の量混合することで調整した。実験に用いたこれらの試薬の濃度は, 予備実験によって発芽に最も効果のあることがわかっている範囲にある。

結 果

1 温度と発芽率

キバナノホトトギス種子は, 以前の報告 (松田 (黒木)・ハツ橋 2013) と同様, 15°C, 25°C では, 暗黒中で発芽せず, 連続赤色光下で 90 ~ 100% 発芽したが, 35°C ではいずれの条件でも発芽しなかった (図 1)。30°C では, 赤色光下で平均およそ 30% 発芽した。

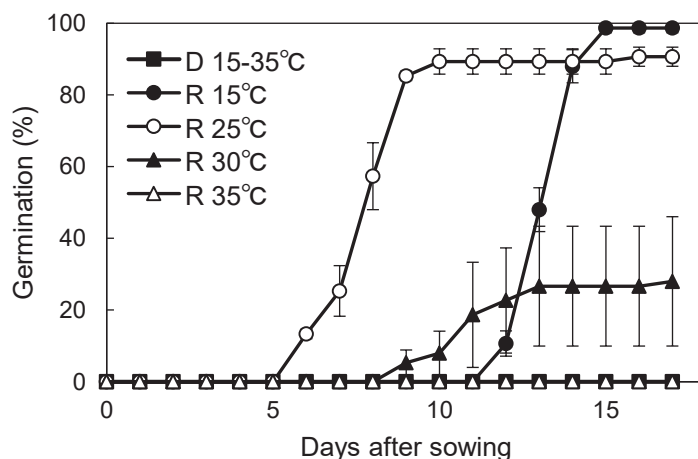


図 1 様々な温度におけるキバナノホトトギス種子発芽の時間的経過. 水に播いた種子を赤色光連続照射下(R)または暗黒(D)で図に示した温度に置き, 同じシャーレの発芽を継続して観察した. 暗黒に置いた種子は, いずれの温度でも発芽しなかった. 各データは3シャーレ(各25粒)の平均値±標準誤差。

2 発芽適温における GA と ABA の影響

発芽適温の 15°C において, 暗黒中および赤色光連続照射下で GA および GA 生合成阻害剤 UZ, ABA を与え発芽の時間経過への影響を見た (図 2, 表 1)。

暗黒中で GA (0.5 mmol/L) を与えると発芽が起こったが, 赤色光下に比べて発芽開始はおよそ 5 日, 50% に達するまでの日数はおよそ 8 日遅れた (図 2)。最終発芽率はほぼ 100% で,

赤色光下と差がなかった。暗黒中でGAと同時に与えたUZは、ほとんど効果を持たなかった(表1)。赤色光下では、UZ (0.1 mmol/L) は発芽を完全に阻害し、GAを同時に与えることによってほぼ回復した。

外生ABA (0.1 mmol/L) によって赤色光下での発芽はおよそ10日間遅延し、最終発芽率も70%に低下した(図2)。暗黒中でGAまたはGAおよびUZ (GA+UZ) と同時に与えたABAは、発芽を著しく阻害した(表1)。

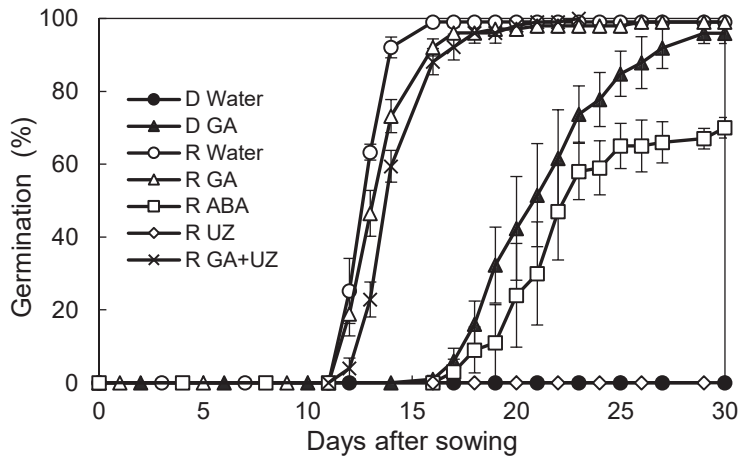


図2 15℃暗黒中(D)または赤色光下(R)におけるGA (0.5 mmol/L), ABA (0.1 mmol/L), UZ (0.1 mmol/L)の発芽の時間的経過への影響. 各データは4シャーレ(各25粒)の平均値±標準誤差. その他は図1と同じ.

表1 15℃暗黒(Dark)または赤色光連続照射下(Red)において、GA (0.5 mmol/L), UZ (0.1 mmol/L), ABA (0.1 mmol/L)を与えたときの、播種から20日後または30日後の発芽率. 各データは4シャーレ(各25粒)の平均値±標準誤差. 図2に示したデータまたは同時に行った処理の結果による.

	Dark		Red	
	20 days	30 days	20 days	30 days
Water	0 ± 0.0	0 ± 0.0	99 ± 0.9	99 ± 0.9
GA	42 ± 14.2	96 ± 2.8	97 ± 7.1	99 ± 3.5
GA+UZ	40 ± 7.1	95 ± 2.5	98 ± 13.8	100 ± 1.7
GA+ABA	0 ± 0.0	21 ± 5.4	42 ± 1.9	96 ± 1.0
GA+UZ+ABA	0 ± 0.0	9 ± 2.5	3 ± 1.1	85 ± 0.0
UZ	-	-	0 ± 0.0	0 ± 0.0
ABA	-	-	24 ± 3.0	70 ± 10.2

3 高温における GA と ABA の役割

30 ~ 35°Cの高温による発芽の抑制に対して、GA および ABA がどのように関わるかを検討した。赤色光連続照射下で GA, UZ, および ABA 生合成阻害剤 FD を与えたところ、温度

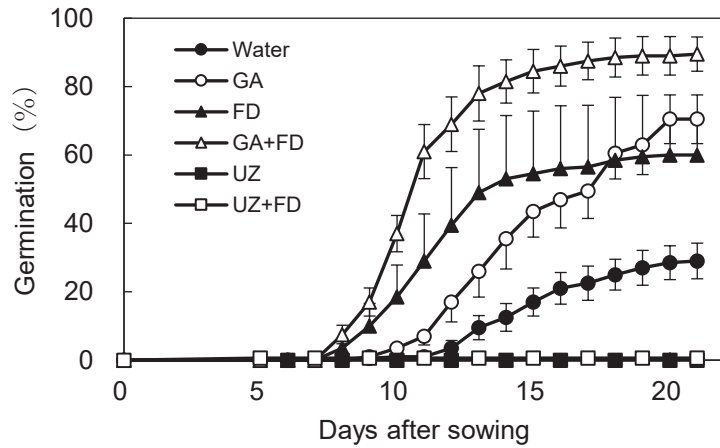


図3 30°C赤色光下におけるGA (1.0 mmol/L), FD (0.1 mmol/L), UZ (0.1 mmol/L) の発芽の時間的経過への影響. 各データは4シャーレ(各25粒)の実験を2回行い、すべてのシャーレの発芽率から計算した平均値±標準誤差. その他は図1と同じ.

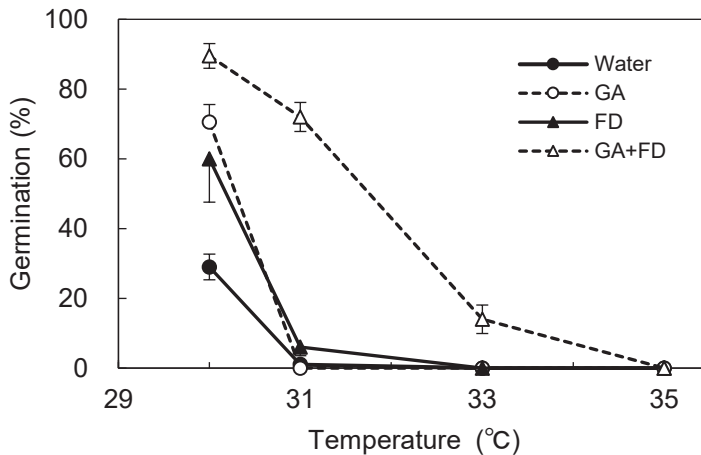


図4 温度によるGA (1.0 mmol/L) およびFD (0.1 mmol/L) の効果の違い. 横軸に示した温度で赤色光下に播種から21日置いた種子の発芽率. 30°Cおよび35°Cは8シャーレ, 31°Cおよび33°Cは4シャーレ(いずれも各25粒)の平均値±標準誤差.

によって異なる反応が見られた (図3, 4).

30°Cでは、GA または FD は単独でも発芽を促進したが、GA と FD を同時に与えると対照

に比べて発芽開始が早まり、最終発芽率もほぼ90%まで高くなった(図3)。また、UZは発芽を完全に阻害し、FDを同時に与えても回復しなかった。

31°Cから35°Cでこれらの植物ホルモンおよび生合成阻害剤の効果をみると(図4)、31°CにおいてはGAまたはFD単独の効果は有意でなく、顕著な促進が見られたのはGAとFDの同時投与(GA+FD)のみであった。33°Cでは、GA+FDのみわずかに発芽誘導効果があったが、35°Cではどの処理も効果がなかった。

考 察

今回の実験から、キバナノホトトギス種子においても、GAおよびABAが発芽制御に関与することが示された。ただし、33°C以上の高温では、それら以外の要素の関与も考えられた。

発芽適温(15°C)において、外生GAは暗黒中での発芽を誘導し、ジベレリン生合成阻害剤UZは赤色光下の発芽を完全に阻害した(図2)。また、UZによる阻害は、外生GAによって回復した。これらの結果は、赤色光下では、GAが生合成されることによって発芽が誘導されることを示唆する。赤色光下で与えたGAが有意な効果を持たなかったことも、赤色光でGAがすでに十分量合成されたとすれば、この仮説に矛盾しない。ただし、暗黒中でGAを与えた場合は赤色光下より発芽の遅れが見られ、FDを同時に与えても完全には同じにならなかった(データは示していない)。したがって、外生GAは赤色光の効果を完全に代替するものではない。赤色光がGAに対する感受性を変化させる可能性もあり、さらに検討が必要である。暗黒中でも、UZの効果が見られる場合もあり(表1)、わずかな内生GAは存在するかもしれないが、発芽を誘導するレベルではないと考えられる。

外生ABAは、15°C赤色光下で発芽を遅延させた。シロイヌナズナでは、赤色光はフィトクロムを介して、ABAの生合成を抑制し、不活性化を促進すると考えられており、またABAはGA生合成を抑制、不活性化を促進する可能性も示唆されているが(Bewley et al 2013)、キバナノホトトギスにおいても赤色光下でABA量が低下する可能性がある。ただし、ここではABAは外生のGAの効果も抑制した(表1、GA+ABAおよびGA+ABA+UZ)ことから、内生外生を問わずGAの作用過程に抑制的に働くと考えられる。

キバナノホトトギス種子の赤色光下での発芽は、30°C以上で明らかな抑制がみられ、35°Cでは完全に阻害された(図4)。30°Cでの発芽促進には外生GAとFDが効果を持つことから(図3、図4)、この温度ではGA生合成が抑制され、同時にABAの生合成が起きている可能性が考えられた。31°CではGAとFDを同時に与えないと大きな回復効果は見られなかった。Gonairら(2004)は、レタス(cv. Grand Rapids)種子で、暗黒中28°Cでは外生GAまたはFDのいずれか一方を与えれば発芽は回復するが、33°Cでは両者を同時に与えないと効果がないという今回と非常によく似た結果を得ているが、高温の影響を受けるのは内生ABA量のみであり、内生GAの量はほとんど変わらないことを報告している。彼らはこの結果を、ABAへの感受性の変化とGAによるABA分解促進等で説明しているが、キバナノホトトギスについてはさらに検証が必要である。

33°CになるとGAとFDの両方を与えても14%しか発芽せず、35°Cではいずれの処理でも発芽しなかったことから、GAとABAの内生量以外の抑制因子が示唆される。30°Cにおける発芽の遅れや、33°C以上での発芽抑制因子については、FDのABA生合成阻害効果が不十分である可能性や、GAやABAへの感受性の変化、ABA不活性化阻害なども考えられる。

FD は上述のように 30°C 赤色光下で発芽促進効果があったが、UZ をともに与えると発芽は起こらなかった。したがって、ABA の生合成が阻害されても、GA が存在しなければ発芽はおこらないと考えられた。シロイヌナズナでは、高温 (34°C) 下で誘導された ABA は GA の生合成酵素の発現を阻害することを Toh ら (2008) が報告しているが、キバナノホトトギスは 15°C においては、前述のように ABA は GA の作用過程を阻害すると考えられ、30°C でもこれら両方の可能性がある。いずれの場合も、発芽は GA によって誘導されるといえる。

これらの結果から、キバナノホトトギス種子の発芽において、図 4 のような制御モデルを考えることができた。このモデルに基づく、発芽適温 (15°C) では、赤色光がフィトクロム Pfr を介して GA 生合成を促進し、またおそらく同時に ABA 生合成を抑制して、発芽を誘導する。暗黒では、十分な GA が合成されないために発芽が起こらない。30~31°C の中高温では、GA 生合成が抑制されるとともに ABA 生合成が促進され、その結果発芽抑制が起こる。しかし、さらに高温 (33~35°C) になると、その他の阻害要因も関与して発芽阻害が起こる。このように、一部の要因は不明であるが、キバナノホトトギス種子においては、30~35°C のわずかな温度差で異なる発芽制御システムが働いていることが示唆された。

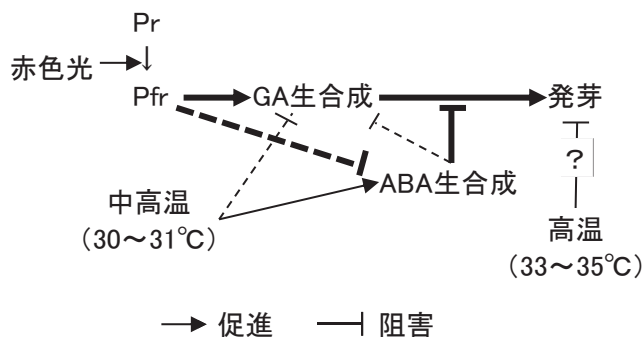


図 5 キバナノホトトギス種子において、現時点で考えられる発芽の制御モデル。赤色光によってフィトクロム Pfr が形成され、GA の生合成が促進される。中高温 (30~31°C) では、GA の生合成が抑制されると同時に ABA 生合成が促進され、発芽抑制が起こる。さらに高温になると、それ以外の経路によっても発芽が抑制されるため、外生 GA と FD では回復しない。太線は発芽適温、細線は高温における反応経路、破線はさらに検討が必要な経路であり、[?] は不明の要因を表す。

これまでに得られた結果から、生育地におけるキバナノホトトギスの生態について以下のように考察できる。宮崎市の 7、8 月の日最高気温と日最低気温の過去 30 年の平均値はそれぞれ約 31°C および 24°C であるが、いずれも上昇傾向にある (気象庁 HP)。キバナノホトトギスは、通常 10 月上旬に開花し、12 月中旬に種子が成熟した後、根を残して地上部は枯れる (八ッ橋・村岡 2012)。自然界における発芽は 1~2 月と推定されるが、連続した光照射が必要なため (八ッ橋・宮田 2009)、他の草本や木の葉の下になるなどして適当な光が当たらないと発芽せず、埋土種子として夏を迎える可能性がある。地表のかく乱などによって光が当たっても、温度が高いと発芽が抑制される。このことは、発芽直後の芽ばえが微小で成長に時間がかかり、夏以降に発芽すると冬までに根が十分発達せず越冬が難しいので、これを回避する意味があるので

はないか。高温で休眠に入った種子は、冷湿処理を経て休眠解除されることが報告されており(松田(黒木)・ハツ橋 2013), 春に発芽しなかった種子の一部は冬を経て翌春発芽すると考えられる。ただし、今回の結果から、このような休眠とその解除機構も夏の温度のわずかな違いに影響を受けると考えられ、高温が続くと発芽率が下がる可能性がある。

謝 辞

この研究は、平成 28 年宮崎大学度戦略重点経費によって助成を受けた。

引用文献

- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., and Nonogaki, H. (2013) *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd ed. ISBN: 978-1461446927, Springer, New York
- Gonai, T., Kawahara, S., Tougou, M., Satoh, S., Hashiba, T., Hirai, N., Kawaide, H., Kamiya, Y. and Yoshioka, T. (2004) Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *J. Exp. Bot.*, 55: 111-118.
- 川上直人 (2005) 種子の休眠・発芽と温度—発芽調節メカニズムの解明をめざして—, *J. Jpn. Soc. Reveget. Tech.*, 30 (3), 514-517
- 気象庁, 過去の気象データ検索, 宮崎県宮崎市 (2018.9. 閲覧) http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php?prec_no=87&block_no=47830&year=&month=&day=&view=
- 松田(黒木) 亜紀, ハツ橋寛子 (2013) 宮崎県固有種キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava*) 種子の暗黒処理による二次休眠誘導とその解除における冷湿処理の効果, 宮崎大学教育文化学部紀要(自然科学), (28): 1-5
- Toh, S. et al. (2008) High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 146: 1368-1385.
- ハツ橋寛子, 宮田真理子 (2009) 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, 宮崎大学教育文化学部紀要(自然科学) (21): 21-28
- ハツ橋寛子, 村岡嗣文 (2012) 加江田溪谷(宮崎市)における宮崎県固有種キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava*) の生活史および個体数の変動, 宮崎大学教育文化学部紀要(自然科学), (25, 26): 47-54
- ハツ橋寛子 (2017) キバナノホトトギス (*Tricyrtis flava* Maxim.) が十年で十分の一に —加江田溪谷における調査から, 宮崎の自然と環境 (2): 4-10
- Yoshioka, T., Endo, T. and Satoh, S. (1998) Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 39: 307-312.