

稲種子の休眠性および発芽性に関する研究

VII. 剥離胚の発芽による発芽抑制物質の検定並びに種子の休眠程度との関係

林 満・田中丈雄

(熱帯作物学研究室)

昭和53年8月31日 受理

Studies on Dormancy and Germination of Rice Seed

VII. Assay of the Endogenous Germination Inhibitor by the Germination of the Excised Embryo, and Ascertainment of the Relationship between the Germination Inhibitor and the Seed Dormancy-Degree

Mitsuru HAYASHI and Takeo TANAKA

(Laboratory of Tropical Crops)

緒 言

稲種子における休眠性の要因物質の存在はエンバクおよびコムギの幼葉鞘切片の伸長抑制活性やレタスの発芽抑制活性で証明されてきている^{1-3,6,10,14,18)}。

稲種子の休眠性に関する一連の研究において^{1-3,5)}, 休眠種子にはアベナ幼葉鞘切片の伸長を抑制する2つの伸長抑制物質が存在し, それらはアンモニアカル・イソプロパノール溶媒で展開されたペーパークロマトグラムのRf 0.7-0.8とRf 0.9-1.0に検出された¹⁻³⁾。そして, 前者はアブサイシン酸 (ABA) と同定され⁵⁾, 稲種子の休眠性の要因物質のうちで主体であると推定され²⁾, 後者はインドール化合物であろうと推定された³⁾。しかし, これらの物質が稲種子の発芽に及ぼす抑制作用を直接的に証明することは, 非休眠状態の種子の発芽力が相対的に旺盛なために, 不可能であると考えられてきた。それ故に, アベナテストで決定された休眠性要因の生長抑制物質が稲種子の発芽に及ぼす作用を直接的に証明する方法の確立が重要であると考えられた。

前報で³⁾, 稲種子には大きな生長促進活性を有するオーキシンが存在し, その大部分は胚乳に存在することを明らかにした。稲種子の旺盛な発芽力はオーキシンなどの促進作用によるものと推察され, 胚を剥離すると種子に共存する生長物質の大きな影響力を除去し得て, 種子の発芽力は大きく弱められるものと考えられた。そこで, 胚培養法を応用して⁹⁾, 培地に休眠種子より得られる要因物質を加え, 剥離胚を培養すると,

種子の発芽に対する微量の発芽抑制物質の作用を解析しうるであろうと考えられた。

以上の観点から, 本実験は第1に稲種子における休眠性の要因物質の ABA が剥離胚の発芽に及ぼす作用並びに剥離胚の発芽による発芽抑制物質の定量的な生物検定の可否を知るために, 種々の濃度の ABA について剥離胚の培養を行ない, 発芽率を測定した。その結果, ABA は稲種子に対して発芽抑制作用を有し, 剥離胚の発芽によって ABA の定量的な検定が可能であることがわかった。そこで, 第2に稲種子の休眠性の要因物質を休眠種子から抽出して, それらが剥離胚の発芽に及ぼす作用を検定し, つぎに休眠程度と休眠性要因の発芽抑制物質の活性との関係を調査した。さらに, 第3に休眠を人為的に打破して, それらの種子内生の発芽抑制物質の活性変化を検定し, 休眠打破と発芽抑制物質の活性との関係を調査したものである。なお, 本研究は1975年および1976年の2カ年にわたって行なった。

材料および方法

本研究には品種特性として強い休眠性を有するインド型水稻 Hadsaduri の種子を供試した。栽培は本学農学部の水田で行なった。1975年および1976年の播種期はそれぞれ5月15日, 5月21日で, 移植期は6月25日, 7月1日であり, 移植は1株3本植とした。収穫期はそれぞれ10月25日, 11月5日であった。両年とも出穂期を同じくする穂にラベルを付し, ラベルした種子をその完熟期に収穫して, 水選し, 3日間風乾した。風

乾種子は実験時まで -15°C ～ -20°C のフリーザー中に貯蔵したが、種子の貯蔵時期はそれぞれの実験によって異なった。なお、貯蔵種子の休眠は実験時まで貯蔵時の状態に完全に維持されていることが発芽試験によって確認された。一方、剝離胚として検定に供した種子は前年(1974年)に収穫され、翌春まで室内に保存されて、完全に非休眠状態となった種子(品種 Hadsaduri)をその発芽力を一定に保持するために1975年の春にフリーザー中に貯蔵した。そして実験時にその一部を取り出し検定に供した。なお、種子は検定の前日に出库し、室内に置いた。

実験1. 稲の剝離胚の発芽による ABA の発芽抑制作用の検定

標品 ABA の検液を含む培地に剝離胚を置床して、 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温室内に置き、置床後24時間毎に発芽率を測定した。培地の ABA 濃度は 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 および 5ppm で、これらの6試験区について剝離胚の培養を行なった。実験は6反復とした。

播種床; 培地にはホワイト氏の改良培地を用い、 $3 \times 9 \text{ cm}$ の管瓶に 1ml の培地を分注器 ($\pm 0.01\text{ml}$) で分注し、これに綿栓を付して、 1.1 kg/cm^2 で20分間滅菌した。標品 ABA の 0, 0.002, 0.02, 0.2, 2 および 10 ppm 溶液はそれぞれミリポアフィルターで滅菌して、上述の培地にそれぞれ 1ml をホールピペットで加えて、固形培地を播種床とした。

種子消毒, 胚剝離および置床法; 検定用種子を脱穎して、径 9cm のシャーレーに入れ、80% アルコールで30秒間、つづいて 0.2% 昇汞水で2分間消毒して、直ちに滅菌水で水洗し、新たに約 60ml の滅菌水を加えて、無菌室内に約1時間置き、種子を膨軟化させて胚の剝離を容易にした。胚の剝離は上皮細胞層の部位にメスを入れて行なった。剝離された胚はさらに 3% 過酸化水素水で20分間消毒し、滅菌水で水洗して、メスを入れた面(腹面)が培地に接する様にして、1試験区(1管瓶)につき20粒を置床した。

培地組成; (mg/l) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 200, Na_2SO_4 200, KNO_3 80, KCl 75, NaH_2PO_4 16.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 360, ZnSO_4 1.5, H_3BO_3 1.5, KI 0.7, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2.5, 蔗糖 2×10^4 , 寒天 1×10^4

検定は全て無菌操作で行ない、水、フィルターおよびピペットは 1.1 kg/cm^2 で20分間滅菌し、他の器具は 150°C で5時間殺菌した。なお、発芽の判定は胚の幼芽が上部を押し開いて突起し、その幼芽長が約 1mm となった時を発芽とした。本実験に供した標品 ABA は Absciscic acid, Mixed isomers, Synthetic crystalline,

Approx. 90% (Sigma Chemical Company) であった。

実験2. 稲種子の休眠程度と種子内生の発芽抑制物質の活性との関係

本実験には1975年に収穫された種子を供した。(1) 収穫時にフリーザーに貯蔵された休眠種子(発芽率0%)の 20, 30, 40 および 50g から得られる発芽抑制物質の活性を剝離胚の発芽によってそれぞれ検定した。(2) 収穫時の休眠種子, 収穫後30日目の休眠覚せい中の種子(発芽率33%)および収穫後90日目の休眠覚せい種子(発芽率98%)をフリーザーに貯蔵した。これらの種子 40g から得られる発芽抑制物質の活性を剝離胚の発芽によってそれぞれ検定した。なお、収穫後10日毎に発芽試験(1区50粒, 2区制)を行なって、休眠の程度を測定した。

上述の(1), (2)の発芽抑制物質を含む培地を播種床として、実験1と同じ方法でそれぞれの発芽抑制物質の活性を剝離胚の発芽によって検定した。なお検定は置床後5日間とし、実験は6反復とした。

抽出および溶媒分画; 種子を粉碎して、500ml のフラスコに入れて、これを 250ml の80% エタノールで一昼夜 5°C で抽出した。抽出液を濾紙で濾過し、濾液はナス型フラスコに移し、さらに残渣を 100ml の80% エタノールで再度抽出して、濾過し、濾液を先の濾液と一緒にした。この濾液のエタノールを 40°C の減圧下で除去して、20ml の水溶液となし、前報³⁾にしたがって溶媒分画を行なった。そしてその酸性エチルエーテル可溶分画をペーパークロマトグラフィーの試料とした。

ペーパークロマトグラフィー; 溶媒分画で得られた溶液を減圧下で完全に除去して、新たに 2ml のエチルエーテルに溶かし、約 1ml に濃縮して溶質とした。2.5×40cm の東洋濾紙 No.50 の下部 5cm の原線に先の溶質の全量をツベルクリン注射器で塗布した。そして、 25°C の恒温室内で溶媒; イソプロパノール: アンモニア水: 水 (8:1:1) で一次元上昇法により 25cm 展開し、展開後クロマトグラムを風乾した。このクロマトグラムの R_f 0.6—0.8 と R_f 0.9—1.0 の2層に発芽抑制物質が分配されることが判明している¹⁻³⁾、この2層のみを別々に切り取り、小さく刻んで径 3cm のシャーレーに入れ、2ml の蒸留水で一昼夜 5°C で溶出した。そして、この溶出液をミリポアフィルターで滅菌して、その 1ml を培地に加えて、剝離胚の発芽による検定を行なった。なお、対照区には溶質を含まないクロマトグラムを用いた。

実験3. 休眠打破と種子内生の発芽抑制物質の活性

との関係

本実験には1976年に収穫され、収穫後直ちにフリーザーに貯蔵された種子を供した。(1) 種子を 50°C で10日間処理する高温処理区、(2) 種子を 50°C で10日間処理してのち、処理種子を2日間水に浸漬する高温浸水処理区、(3) 40°C の温湯中に通気して、これに2日間種子を浸漬する温湯処理区、(4) 無処理区の4試験区を設け、これらの処理種子40gから得られる発芽抑制物質の活性を実験2と同じ方法で検定した。以上と並行して処理種子の休眠打破の確認のために発芽試験(1区50粒, 2区制)を行なった。

結 果

実験 1. 稲の剝離胚の発芽による ABA の発芽抑制作用の検定

ABA を含む培地に剝離胚を置床して、剝離胚の発芽に対する ABA の作用を調べ、その結果を第1図に示した。

ABA は胚の発芽に抑制作用を示し、その発芽抑制

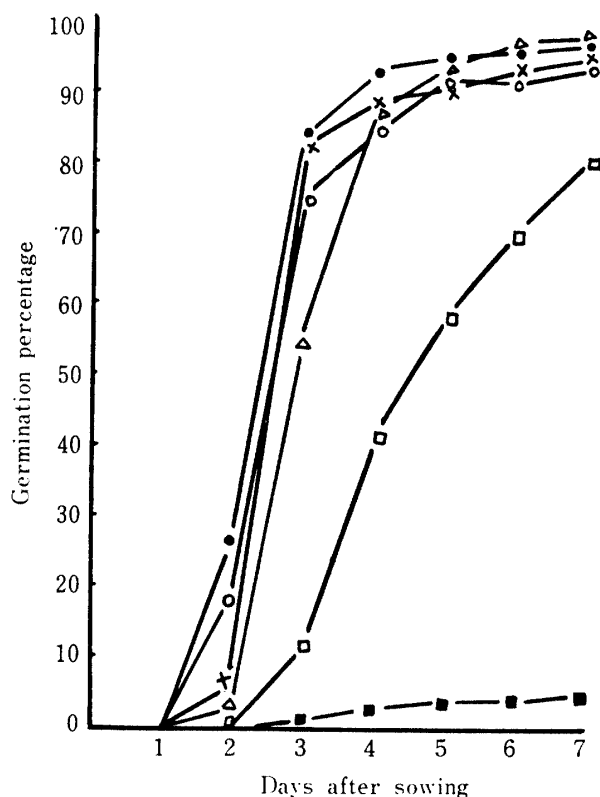


Fig. 1. The actions of (±)-ABA on the germination of the excised embryos of rice seeds.
Note: ABA content; (●) 0ppm, (○) 0.001 ppm, (×) 0.01ppm, (△) 0.1ppm, (□) 1ppm, (■) 5ppm

度は ABA が高濃度ほど大である傾向が認められた。すなわち、ABA を含まない対照区での胚の発芽は置床後2日目より始まり、その発芽率は26%であった。そして3日目にはすでに82%が発芽し、4日目以降も漸増して、7日間で96%の発芽率であった。一方、ABA 濃度の0.001, 0.01 および 0.1ppm 区でも置床後2日目より発芽が開始されたが、ABA 濃度が高いほど発芽抑制度は強い傾向が示された。そして ABA 濃度の1および 5ppm では発芽が完全に抑制された。置床後3日目では、ABA 濃度の低い 0.001 および 0.01ppm の発芽抑制作用はほとんど消失したが、0.1ppm では明瞭な発芽抑制作用が認められた。そして、1ppm でも発芽が開始されたが、その発芽抑制度は大であり、5ppm では依然として発芽が完全に抑制された。置床後4日目に発芽を抑制したのは ABA 濃度1 および 5ppm のみであり、とくに後者の発芽抑制度は依然として顕著であった。置床後5日目以降では、ABA 濃度 1ppm では徐々に発芽抑制度は小となったが、5ppm は強い発芽抑制度を維持し、置床後7日間の発芽率は5%にすぎなかった。

以上の結果から、ABA は稲の剝離胚の発芽に対して抑制作用を有し、それは高濃度ほど強く、特に、ABA 濃度 5ppm では約 95% の胚が発芽を抑制されることがわかった。

ABA を含む培地に置床した剝離胚の発芽率を置床後の日数別に第2図に示し、それらの平均値の差の有意検定の結果を第1表に示した。

対照区(発芽抑制物質を含まない)の発芽率が置床後2日目に26%であったのに対して、ABA 低濃度の0.001 および 0.01ppm での発芽率はそれぞれ18%および 6%であり、それぞれの発芽率の差はわずかであったが、それぞれの発芽率の間には10%水準で有意性が認められた。そして、対照区の発芽率と 0.01ppm 以上の濃度での発芽率には明確な差異が認められた。さらに、他の濃度間においては、0.001ppm での発芽率と 0.1ppm 以上の濃度での発芽率との間、0.01 での発芽率と 1 および 5ppm でのそれとの間に明確な差異が認められた。0.1ppm と 5ppm における発芽率の差は極めて僅かであったが、10%水準で有意性が認められた。しかし、0.01ppm と 0.1ppm, 0.1ppm と 1ppm, 1ppm と 5ppm との間の発芽抑制度の差異は置床後2日目の発芽率で判定出来なかった。さらに、置床後2日目における 0.1ppm 以上の濃度での発芽率はいずれも極端に低かった。

置床後3日目になると、0.001 および 0.01ppm の

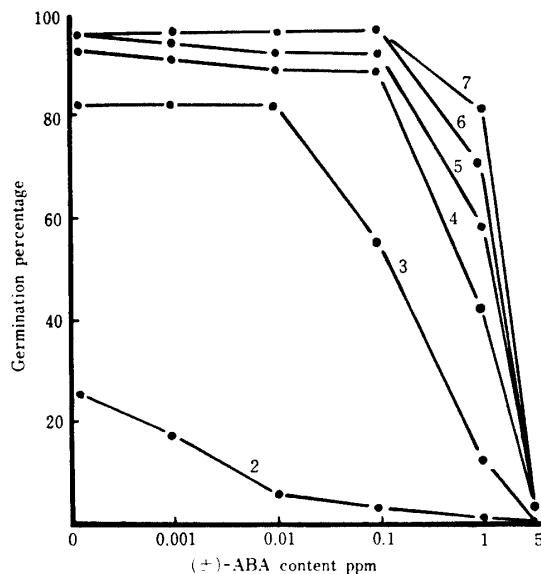


Fig. 2. The quantitative assay of (±)-ABA by means of germination of the excised embryos of rice seeds. The figures against the graph indicate the days passed after sowing.

発芽率と対照区のそれとの間にはほとんど差異はなくなったが、0.1ppm以上の濃度と対照区の間には発芽率に明確な差異が認められた。そして、置床後2日目では差異を判定出来なかった0.01ppmと0.1ppm、0.1ppmと1および5ppm並びに1ppmと5ppmの間でそれぞれの発芽率に明瞭な差異が認められた。

置床後4日目になると、0.1ppm以下の濃度では対照区の発芽率とほとんど差異はなくなった。しかし、0.1ppmと1および5ppm並びに1ppmと5ppmのそれぞれの濃度間の差は置床後3日目よりも一層明確となった。そして、これらの濃度間の発芽率の差異は置床後5日目以降も認められ、1ppmと5ppmにおける発芽率の差異は置床後日数の増加に従って大となった。

以上の結果から、稲種子の剝離胚の使用がABAの発芽抑制作用およびABAの発芽抑制制度の定量的検定に極めて有効であることが認められた。そして、検出するABA濃度の範囲は極めて広く、低濃度は培養2日間で、0.01ppm以上のABA濃度では培養3日間および4日間で各濃度間の発芽抑制制度の差異を検定するもので、置床後日数の差異はあるとしても、ABAの 10^{-1} ppm濃度間の発芽抑制制度の差異を検定する全く新しい生物検定法が確立されたといえる。しかし、5ppmではほとんどの胚が休眠状態にはいるために、5ppm以上の濃度のABAを検定することは不可能で

Table 1. Significant difference of mean germination percentage between ABA content in Fig. 2 (germination percentage of the excised embryos)

Days after sowing	ABA content (ppm)					
	0	0.001	0.01	0.1	1	5
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2	26 ^a	18 ^{ab}	6 ^{bc}	3 ^{cd}	1 ^d	0 ^d
3	82 ^a	83 ^a	83 ^a	55 ^b	12 ^c	0 ^d
4	93 ^a	92 ^a	90 ^a	90 ^a	42 ^b	3 ^c

Note: Numbers are average of six replications. Numbers within a row for the same day after sowing followed by the same letter are not significantly different at the 5% level. The comparisons of 0 ppm v.s. 0.001ppm and 0.001ppm v.s. 0.01ppm on 2 days after sowing are significantly different at the 10% level.

あった。

実験2. 稲種子の休眠程度と種子内生の発芽抑制物質の活性との関係

第2表に示される如く、収穫時のHadsaduri種子は全く発芽せず、深い休眠状態にあった。この休眠種子から得られる発芽抑制物質の活性を検定するのに必要な種子量を決めるために、種子20, 30, 40および50gの4段階を用い、その検定結果は第3図に示された。

第3図において種子20gに含まれるRf 0.6~0.8とRf 0.9~1.0の2つの休眠要因の発芽抑制物質(以下それぞれを物質Aおよび物質Bと呼ぶ)を含む培地での発芽率は物質を含まない対照区のそれとほとんど差異がなく、置床後2日目で物質Aおよび物質Bともに対照区に対して差は5%であり、3日目で物質Aが25%、物質Bが9%といずれも僅かであって、この程度では種子に内生する発芽抑制物質の活性を検出することは不可能であった。つぎに、種子量30gでは物質Aの活性は20gよりも大きく現われるが、物質Bの活性が依然として小で、検定しえないことがわかった。さらに種子量40gでは物質Bの活性も明瞭となり、短

Table 2. Transition of dormancy, as shown by germination percentage of seeds, in variety Hadsaduri

Days after harvest	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Germination percentage*	0	2	11	33	60	64	72	84	92	98

*: at 30°C for 10 days after sowing

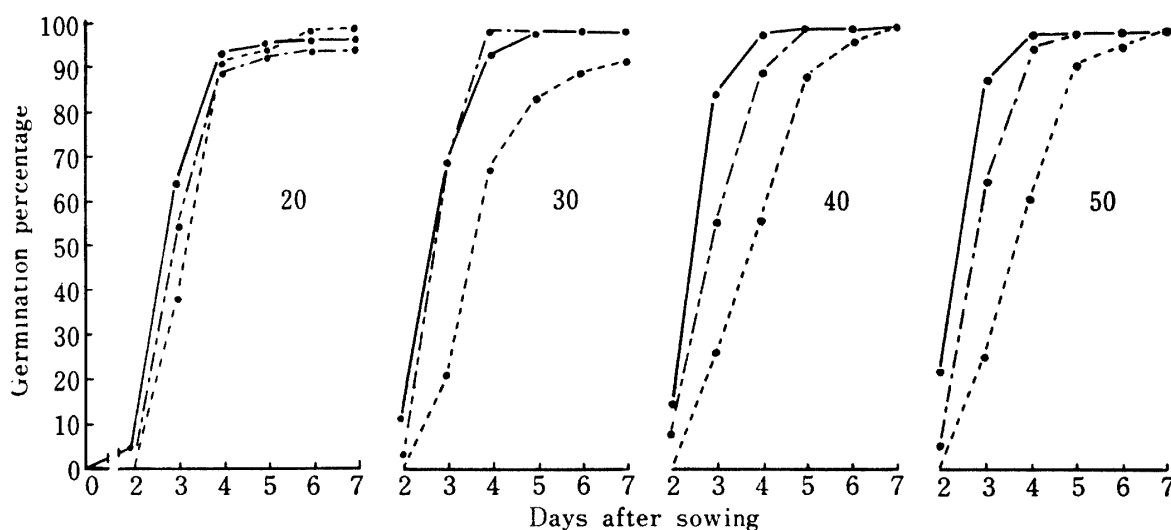


Fig. 3. The assay, using the excised embryo method, of the inhibiting levels of Rf 0.6—0.8 and Rf 0.9—1.0 on paper chromatograms of acidic fractions of the extracts obtained from dormant seeds in variety Hadsaduri.

Note: The figures against the graphs indicate the weight of the seeds, extracted.

—●— cont., ---●--- Rf 0.6—0.8, -●- Rf 0.9—1.0

期間の培養によって、その活性の検定が可能であることがわかった。すなわち、対照区、物質Aおよび物質Bにおける置床後2日目のそれぞれの発芽率は14%、0%および8%であり、3日目のそれらは84%、26%および56%であった。置床後3日目の3者間の発芽率の差が最も大であり、置床後2日目および3日目における対照区の発芽率と両物質区の発芽率との間には明確な差が認められた(5%水準で有意)。この種子量で内生の発芽抑制物質の活性を検定しうるということがわかった。そして、種子50gでは、それらの発芽抑制活性が種子40gと大差がなかった。

以上の結果をもとに、第2表に示された品種 Hadsaduri の収穫時の休眠種子(発芽率0%)、収穫後30日の休眠覚せい中の種子(発芽率33%)および収穫後90

日の休眠覚せい種子(発芽率98%)の40gに含まれる物質Aおよび物質Bの発芽抑制活性を胚の発芽によって検定し、その結果は第3表の通りである。

まず物質Aの発芽抑制活性は休眠種子では非常に強く、休眠覚せい中の種子ではやや低下し、休眠覚せい種子では大きく低下していた。すなわち、休眠種子における置床後2日目、3日目および4日目の発芽率はそれぞれ、0、25および87%であった。そして、休眠覚せい中の種子のそれらは1、51および93%であり、休眠覚せい種子のそれらは8、85および91%であった。この発芽率の差異から、休眠種子と休眠覚せい中の種子にはともに物質Aが多量に存在するものの、置床後3日目の両者の発芽率の間には明瞭な差異が認められ、休眠種子よりも休眠覚せい中の種子の物質A活性が低

Table 3. Comparison of the levels of endogenous germination inhibitors in seed differing in the degree of dormancy assayed by the germination of the rice excised embryos

The degree of seed dormancy		Germination inhibitor					cont.	
		A			B			
		strong	weak	nondormant	strong	weak		nondormant
Days after sowing		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2		0 ^b	1 ^b	8 ^a	10 ^c	18 ^b	26 ^a	26
3		25 ^c	51 ^b	85 ^a	90 ^a	85 ^a	88 ^a	89
4		87 ^a	93 ^a	91 ^a	97 ^a	94 ^a	93 ^a	95

Note: Inhibitors A and B were eluted from Rf 0.6—0.8 and Rf 0.9—1.0, respectively, on paper chromatograms of acidic fraction of extracts obtained from seeds in variety, Hadsaduri. Numbers are the mean germination percentage of six replications. Numbers within a row for the same day after sowing and the same germination inhibitor followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

Table 4. Comparison of the levels of endogenous germination inhibitors in seeds treated with the high temperatures assayed by the germination of the rice excised embryos

Treatment		Germination inhibitor								cont.
		A				B				
		non-treatment	I	II	III	non-treatment	I	II	III	
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Days after sowing	2	0 ^c	9 ^b	29 ^a	18 ^a	12 ^b	45 ^a	58 ^a	30 ^a	24
	3	27 ^b	85 ^a	89 ^a	75 ^a	80 ^a	94 ^a	94 ^a	87 ^a	73
	4	88 ^a	93 ^a	96 ^a	89 ^a	95 ^a	97 ^a	97 ^a	97 ^a	93

Note: Bioassay and Rf of A and B were the same as shown in Table 3. treatment I; seeds were placed at 50°C for 10 days, II; seeds were soaked in water for 2 days after treatment I, III; seeds were directly soaked in 40°C hot-water being supplied continuously with air, for 2 days. Numbers are the mean germination percentage of six replications. Numbers within a row for the same day after sowing and the same germination inhibitor followed by the same letter are not significantly different at the 5% level.

下していることがわかる。また、休眠覚せい種子での発芽率と休眠種子および休眠覚せい中の種子での発芽率には置床後2日目にすでに明瞭な差異が認められ、休眠覚せい種子の物質A活性は休眠覚せい中の種子のそれよりもかなり低下していることがわかる。

一方、物質Bの発芽抑制活性は物質Aのそれよりもかなり弱いことが、休眠種子における両者の発芽率の差異から明瞭であった。休眠程度の差異と物質B活性との関係は物質Aにおけるそれらの関係とほぼ同様の傾向がみられるとはいえ、物質Aに比べてその程度ははるかに小であった。

以上の結果から、稲種子の休眠覚せいと発芽抑制物質の活性との間には、種子の休眠程度が異なると発芽抑制物質の活性が異なるという関係が存在することがわかった。換言すれば発芽抑制物質の活性によって種子の休眠程度が決定されるといえる。そして、休眠性の主要因物質は物質Aであることが明らかとなった。

実験3. 休眠打破と種子内生の発芽抑制物質の活性との関係

高温処理、高温浸水処理および温湯処理を施した種子並びに無処理種子のそれぞれ40gから得られる物質Aおよび物質Bの活性を前述の剝離胚の発芽によって検定した。その結果が第4表に示された。なお、上述のいずれの処理においても、種子の休眠は完全に打破されていたことが発芽試験によって確認された。

まず、高温処理種子と無処理種子の物質Aの活性を比較すると、検定2日目の両者の発芽率にはすでに明瞭な差異が認められ、高温処理種子の物質Aの活性が無処理種子のそれよりも低下していた。さらに、置床後3日目の高温処理種子の物質Aにおける胚の発芽率は対照区の発芽率とほぼ同じであり、高温処理種子で

は物質A活性の低下の度合は極めて大であった。つぎに、温湯処理種子から得られた物質Aにおいては、検定の置床後2日目の発芽率と対照区の発芽率との差異は極めて僅かであり、物質Aの活性は高温処理種子の物質Aの活性よりもさらに低下していた。さらに、高温処理種子を浸水した高温浸水処理種子の物質Aにおいては、検定の置床後2日目の発芽率は対照区のそれと差異がなく、この種子からは物質Aの活性は検出されなかった。また物質Bについては、その活性は無処理種子のみにおいて検出され、いずれの処理においても不活性化されていた。

以上の結果から、高温による休眠打破効果は主として種子内生の発芽抑制物質の活性の低下に起因することが推定された。

考 察

ABAの定量的な検定に最も普通に用いられているのは、エンバクおよびコムギ幼葉鞘切片、セイヨウカラシナの根、イネの幼苗などの生長抑制活性による検定で、これらは生長抑制作用を指標とするものである¹²⁾。発芽抑制作用を指標としたものに、レタス種子の発芽抑制活性による検定があるが、これは主に定性的な検定に用いられている¹²⁾。そして、発芽抑制作用を指標とした定量的な検定法はいまだほとんど例を見いだせない。本研究においては、稲種子の剝離胚の発芽によってABAの発芽抑制活性を定量的に検出した(第2図)。検定されたABA濃度は0.001 mg/l ~ 5mg/lであって、ABAに対する感度は10⁻¹ mg/lの濃度間の発芽抑制度の差異を検出するものであり、検定日数(置床後の日数)の長短によって、検定濃度の範囲を広げうる長所を有する全く新しいABAの定

量的な検定法であった。この検定法は種子に共存するオーキシンやジベレリンなどの促進物質の大きな影響力を受けない点で、コムギ剥離胚を ABA 溶液で湿した濾紙上に並べて、25°C で48時間後の幼葉鞘の長さを測定する Milborrow¹¹⁾の方法に類似している。上述の如く、稲種子の剥離胚の発芽によって ABA を定量的に検定し得たことは稲の休眠種子から得られる微量の発芽抑制物質の定量的検定に本検定法が極めて有効であることを示すものであった。

Hemberg⁹⁾ がジャガイモ塊茎の皮層部に多量の生長抑制物質が含まれることをアベナテストで発見し、その塊茎の休眠解除と生長抑制物質含量の減少との間に密接な関係を認めて以来、多くの種子で、休眠現象に関与する生長抑制物質の存在が、Hemberg の手法によって明らかにされてきた。稲種子においても、数種の生長抑制物質が報告されてきている^{3,5,7,10,14,18)}。前報で¹⁻³⁾、稲の休眠種子には2つの生長抑制物質が存在することをアベナ伸長テストで認め、休眠覚せいとこれらの生長抑制物質の活性の低下との間に密接な関係を認めて、これらの生長抑制物質が休眠性の要因物質であることを推定してきた。そして、それらの生長抑制物質の化学検定で ABA (物質 A) が同定され⁹⁾、インドール化合物 (物質 B) が推定された⁹⁾。しかし、これらの生長抑制物質が稲種子の発芽に如何なる作用を有するかを直接的に証明し得なかった。稲種子の発芽力は極めて旺盛で、発芽は均一であるので、休眠種子から得られる微量の発芽抑制物質に対する感度は極めて低く、その作用を検出することは困難である。Roberts¹⁵⁾ は稲の休眠種子から得られた抽出物を稲種子の発芽で検定し、発芽抑制および発芽促進作用のいずれをも検出し得ず、現在その存在が間違いないとされている発芽抑制物質の休眠への介在を疑問視した。太田¹⁴⁾は休眠種子から得られた抽出物をペーパークロマトグラフィーで分離して、その発芽抑制作用を稲種子の発芽で検定している。しかし、その濃度は100ppm以上であり、あまりにも感度が低く、微量の発芽抑制物質の活性の検定には広く応用しがたいものであった。このように、稲種子の休眠性の要因物質の活性を稲種子の発芽によって定量的に検定することはほとんど不可能であると考えられてきた。それ故に、種子の発芽に対する作用は不明のまま、コムギ幼葉鞘などの生長抑制作用のみによって休眠性の要因物質の決定がなされてきた。しかし、本研究において、先述のアベナ伸長テストによって稲種子の休眠性要因の生長抑制物質であると決定された2つの物質は、いずれも稲種子の

発芽を抑制する発芽抑制物質であることを初めて証明し (第3図)、休眠覚せいとそれらの発芽抑制物質の活性の低下との間に密接な反比例的な関係のあることを再確認して、この両発芽抑制物質が稲種子の休眠性の要因物質であることを直接的に証明しえた。さらに、休眠覚せいは主に物質 A (ABA) によって支配されることが認められていたが、本研究においても物質 A の発芽抑制作用が物質 B よりも強く、休眠覚せいとこの物質 A の不活性化との間に前報⁹⁾と同様の関係が認められ、この物質 A が稲種子の休眠性の要因物質のうちで主体であることがさらに明確にされた (第3表)。

前報¹⁾のアベナ伸長テストによる検定においては、物質 A および物質 B はともに休眠覚せいに伴って不活性化し、休眠覚せい時の種子にはそれらの活性はほとんど検出されなかった。しかし、本研究の剥離胚の発芽による検定においては、物質 A の活性が休眠覚せい時の種子において検出され、逆に物質 B の活性は休眠覚せいの初期段階で著しく低下した。このように、両物質は生長抑制作用と発芽抑制作用とは異なる活性を示すものであり、物質 A は生長抑制作用よりも発芽抑制作用が強く、逆に物質 B は発芽抑制作用よりも生長抑制作用が強い特性を有するものと推定される。それ故に、生長抑制作用を指標とする生物検定における生長抑制活性をそのまま種子の発芽性に対する作用として適応した場合には少々の相違のあることに留意すべきであろう。従って、剥離胚の発芽による本検定法は発芽抑制物質の活性を直接的に検定し得るものであり、稲種子の休眠性の要因である発芽抑制物質の作用を検定するのにアベナ伸長テストよりもまさっていると考えられる。

稲種子の発芽抑制物質の不活性化に関する研究は未だほとんどない。第3実験で得られた知見を踏まえて、従来著者らが行ってきた研究結果を中心に包括的な考察を次に試みたい。Roberts¹⁵⁾や Jennings ら⁸⁾によって確立された休眠打破法は 50°C 付近の温度中に種子を1週間程度置いて、休眠を打破するものであった。著者ら⁴⁾が新しく確立し得た休眠打破法は飽和含水種子を 40°C に2日間置いて休眠を打破する方法と、40°C の温湯中に通気して、その中に種子を1~2日間浸漬して休眠を打破する2つの方法であった。前者の 50°C 高温処理は乾燥種子の休眠打破法であり、後者は吸水種子の休眠打破法である。本実験でも明らかな如く、同じ休眠種子の休眠を打破するのに、前者は10日間を要し、後者では2日間で充分であった (第4表)。この様に休眠打破法の違いによって、打破効果の出現

に大きな時間的な差異がある。Roberts¹⁶⁾ は乾燥種子の高温による休眠短縮が、ある化学反応に対する高温の作用であり、酵素的な反応ではないと述べている。しかし、化学反応が何であるについては触れていない。一方、種子が吸水すると体内の酵素が活性化することが知られ、さらに、吸水種子を高酸素分圧中に置くと休眠が打破されることを認めて、著者ら⁴⁾ は前報で吸水種子の高温による休眠打破は酵素的な酸化反応に対する高温の作用である可能性が大きく、酸化反応によって発芽抑制物質が不活性化されるために、より短期間にしかもより低温で休眠が打破されるものと推論した。本実験における、高温浸水処理区および温湯処理区の結果は、吸水種子では種子内生の発芽抑制物質が短時間の内に不活性化されることを明らかにし、さらに50°C 高温処理によって発芽抑制物質の活性が低下していたことから、Roberts の化学反応もまた発芽抑制物質の不活性化に関連していることが示された。そしてまた、乾燥種子では高温処理された種子に発芽抑制物質の活性が認められ、この処理種子を浸水すると、短時間の内にその活性が消失したことから、高温処理は一般に指摘される如く、種子の包被組織の物理的な変性をもたらすものであろうと推察された。包被組織の変性によって、種子内への酸素の侵入が容易となり、発芽試験において与えられる水分と温度(30°C)によって、発芽抑制物質が短時間の内に不活性化されて、処理種子は発芽するものと考えられ、乾燥種子ではRoberts の化学反応で、吸水種子では前報で推定された化学反応で発芽抑制物質が不活性化されて休眠が打破されるものと推定される。それがために、50°C 高温処理種子では播種後発芽までに3日間を要するが、温湯処理種子では播種後1日で発芽するものと考えられ、物質Aの不活性化に要する時間の差が発芽速度の差異として現われたものであろうと考えられる。

稲種子の休眠は脱穎によって有効に打破されるので、休眠性の要因物質が穎に存在するものと考えられてきた^{10,13,17)}。しかし、前報で³⁾、休眠性の要因物質は穎のみならず、胚および胚乳にも存在することを認めている。休眠性の要因の遺伝的行動は種子の発芽試験によって解析されてきており、包被組織内要因の論議に限定されてきた感がある。胚内要因の発現は包被組織内の要因によって抑制されるために、胚内要因の遺伝的解析法はいまだ確立されていない。休眠性の変異は遺伝的要因によるものであり、休眠性と内生の発芽抑制物質の活性との間に密接な関係が存在するので、胚と穎の個々に存在する発芽抑制物質の活性を別々に本

検定法で検定することによって、個々の要因の遺伝的な行動の解析が可能であると考えられる。さらに、休眠性および非休眠性種子を用いて、本検定法における検液と剥離胚を様々に組み合わせて解析することが、休眠性の生理的な研究の有効な一手段となりうると考えられる。

一方、稲種子にオーキシンとジベレリン様物質の存在を認め、人為的に休眠を打破すると種子内生のこれらの生長促進物質が活性化されることを認めている(未発表)。休眠打破処理種子において、物質BのRfに発芽促進作用の活性が検出された。これは休眠打破処理によって活性化されたジベレリン様物質によるものと推定され、稲種子の休眠性とジベレリンの活性化との関連の解析が今後の重要な研究課題であると考えられる。

要 約

稲種子の休眠性とその要因物質との関連を明確にするために、稲種子の剥離胚の培養法を応用して、休眠性の要因物質が胚の発芽に及ぼす作用を解析した。

1. 稲種子の剥離胚の培養によって発芽抑制物質の活性を定量的に検定する新しい方法が確立された。この方法はアブサイシン酸(ABA)を含む培地に稲の剥離胚を置床して、置床後2日目より7日目までの毎日の発芽率を測定し、置床後の日数別の発芽率の差から、ABA濃度間の作用の差異を検定するもので、検定しうるABAの濃度範囲は0.001mg/lから5mg/lで、その 10^{-1} mg/lの濃度間におけるABAの抑制度の差異を検定しうるものであった。この方法は種子に共存する促進物質の大きな影響を受けないので、発芽抑制物質の定量的検定に適していると考えられる。

2. アベナ伸長テストで稲種子の休眠性の要因物質であると推定されていた2つの生長抑制物質はいずれも稲種子の発芽を抑制する発芽抑制物質であることが明らかとなった。そして、休眠覚せいと内生の発芽抑制物質との間には、発芽抑制物質の活性の低下に伴って休眠が覚せいするという関係の存在が再確認された。さらに、稲種子の発芽に対する抑制作用は、かつて著者らがABAと同定した物質が他の発芽抑制物質よりも著しく強い発芽抑制作用力を有し、稲種子の休眠性の要因物質はABAが主体であることが確認された。

3. 人為的な処理によって休眠が打破される場合に、種子内生の発芽抑制物質は不活性化される。休眠打破の効果の出現が発芽抑制物質の不活性化を伴ない、さらに、処理の違いによる打破効果の出現の時間的な差

異は発芽抑制物質の不活性の程度の差異として認められることがわかった。

4. 稲種子の休眠性の遺伝的な解析は発芽試験によってなされてきている。しかし、それらの結果には少々矛盾する点があり、それほど明確ではない。著者らは、遺伝的な研究において、休眠種子の穎、胚乳および胚に内生する発芽抑制物質の定量的検定が剥離胚の培養法によってなされるならば、休眠性の遺伝を明確に説明しうると考える。

文 献

- 1) 林 満・姫野正巳：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅱ。熱帯農業, **16**, 270-275 (1973)
- 2) 林 満・姫野正巳：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅲ。熱帯農業, **17**, 245-249 (1974)
- 3) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅳ。熱帯農業, **19**, 156-161 (1976)
- 4) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅴ。熱帯農業, **20**, 164-171 (1977)
- 5) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅵ。熱帯農業, 投稿中
- 6) Hemberg, T.: The significance of the inhibitor- β complex in the rest period of the potato tuber. *Physiol. Plant.*, **11**, 615-626 (1958)
- 7) 池田三雄：稲種子の穂発芽に関する研究。鹿大農学術報告, **13**, 89-115 (1963)
- 8) Jennings, P. R. and Jesue, J. DE.: Effect of heat on breaking dormancy in rice seed. *Crop Sci.*, **4**, 530-533 (1964)
- 9) 加藤幸雄：植物組織培養法。p.227-237, 誠文堂新光社, 東京 (1966)
- 10) Mikkelsen, D. S. and Sinah, M. N.: Germination inhibitor in *Oryza sativa* and control by preplanting soaking treatment. *Crop Sci.*, **1**, 350-353 (1961)
- 11) Milborrow, B. W.: The identification of (+)-Abscisin II [(+)-Dormin] in plants and measurement of its concentrations. *Planta*, **76**, 93-113 (1967)
- 12) 増田芳雄・勝見允行・今関英雄：植物ホルモン。p.262-263, 朝倉書店, 東京 (1971)
- 13) 太田保夫・竹村儀子：米穀の貯蔵と種子の休眠性。農業技術, **25**, 218-222 (1970)
- 14) 太田保夫：作物における種子の休眠。農業技術, **28**, 68-74 (1973)
- 15) Roberts, E. H.: Dormancy in rice seed II. *J. Exp. Bot.*, **12** 430-445 (1961)
- 16) Roberts, E. H.: Dormancy in rice seed IV. *J. Exp. Bot.*, **16**, 341-349 (1964)
- 17) 高橋成人：水稻種子の発芽遅速の品種間差異について。東北大農研彙報, **7**, 1-12 (1955)
- 18) 高橋成人：稲種子の休眠と発芽-発芽阻害物質と品種-。東北大農研報, **18**, 195-213 (1966)
- 19) Tsinger, N. V.: Development and physiology of properties of a seed. p.1-284; Moskva, Idz. SSSR. (1958)

Summary

By making use of the excised embryo culture method an investigation was made on the active influence of the endogenous germination inhibitors in dormant rice seed upon the germination of the excised embryo, with the intention of making obvious the relationship between the endogenous inhibitors and the dormancy in rice seed.

1. A new method enabling us to assay quantitatively the abscisic acid (ABA) by means of germination of the excised embryo of non-dormant rice seed was fixed up. The method consisted of the every day counting of the germination percentage, during the 2nd day to the 6th day after the sowing of the excised embryos on the culture media containing ABA. The assay limits to ABA content were note to be ranged between 0.001mg/l and 5mg/l, and the sensitivity on the germination inhibiting level was recognized within 10^{-1} mg/l of ABA content. It was satisfactorily considered that this assay method could be used on the assay of endogenous germination inhibitors contained in dormant rice seed.

2. In the previous reports, with the use of Avena straight growth test, two growth inhibitors were recognized in dormant rice seeds, and were identified to be abscisic acid and indole compound, together with the estimation of the factors inducing rice seed dormancy. By the assay mentioned both growth inhibitors were obviously proved to be genuine germination inhibitors. Similar to the case of the growth inhibitors reported previously germination inhibitors were noted to have a close relationship with the degree of dormancy in rice seed. Furthermore endogenous ABA was ascertained to have stronger inhibitory action on the seed germination than indole compound, with the confirmation that ABA was the main factor in rice seed dormancy.

3. The levels of the germination inhibitors in dormant seed was decreased at the time when the seed dormancy was broken by artificial treatments. Although the period required for the breaking of the dormancy was shorter than that under natural condition, namely, about 10 days in a high temperature of 50°C and only 2 days in 40°C hot-water treatment, it was detected that, regardless of the difference in the periods, the level of the germination inhibitor was made to be decreasing to the minimum at the time when provided that the dormancy was lasting.

4. Several genetical analyses of dormancy in rice seed were conducted by means of germination test, but

the results reported were not so satisfactory, leaving a few somewhat conflicting points. The authors considered that if the genetical works had been accompanied with the quantitative analyses of the germination inhibitors contained in the different portions of the dormant seed; hull, endosperm and fertilized embryo, with the use of the excised embryo culture method, the genetics of dormancy would have been explained with more clarity.