

稲種子の休眠現象に関する生理学的研究

とくに発芽抑制物質との関連において

林 満

(熱帯作物学研究室)

昭和60年8月10日 受理

Physiological Studies on the Relationship between Levels of the Endogenous Germination Inhibitors and the Dormancy of Rice Seed

Mitsuru HAYASHI

(Laboratory of Tropical Crop Science)

目 次

第1章 緒 論

第2章 稲種子内生の伸長および発芽抑制物質とオーキシンの生物検定並びに化学検定

第1節 アベナ伸長テストによる生物検定

第2節 稲剥離胚を用いた発芽テストによる検定

第3節 クロマトグラフィーによる検定

実験1 ペーパーおよび薄層クロマトグラフィーによる検定

実験2 ガスクロマトグラフィーによるアブジジン酸の同定

第4節 考 察

第3章 稲休眠種子内生の発芽抑制物質とオーキシンの存在部位

第4章 自然条件下での休眠覚せいに伴う発芽抑制物質とオーキシンの消長

第1節 休眠覚せい過程における伸長抑制物質の消長

第2節 稲剥離胚の発芽による ABA の発芽抑制力の検定

第3節 休眠覚せい過程における発芽抑制物質の消長

第4節 休眠覚せい過程におけるオーキシンの消長

第5節 考 察

第5章 人為的休眠打破に関する研究

第1節 高温、吸水が休眠打破に及ぼす効果

実験1 種子の浸水時間とその後の貯蔵温度が発芽率に及ぼす影響

実験2 吸水、高温処理効果の品種間差異

実験3 温湯処理が発芽率に及ぼす影響

第2節 高温、高酸素濃度が休眠打破に及ぼす効果

実験1 置床中の酸素濃度が休眠解除に及ぼす影響

実験2 高温、高酸素濃度が発芽率に及ぼす影響

第3節 人為的休眠打破に伴う発芽抑制物質の活性変化—外的要因との関連において—

実験1 高温処理に伴う発芽抑制物質とオーキシンの活性変化

実験2 高温、吸水処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

実験3 高温、高酸素濃度処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

実験4 脱穎および剝傷処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

第4節 高温処理による穎構造の変化—走査型電子顕微鏡による微細構造の観察—

第5節 考 察

第6章 総 括

要 約

謝 辞

文 献

Summary

第1章 緒 論

熱帯地方の稲作は、その成熟期が高温で、しばしば降雨を伴う気象条件下で行われる。このような条件下で発生する穂発芽を回避するには、水稻品種の種子休眠性が必要条件であり、概して熱帯の水稻品種はかなり強い休眠性を有するのが普通である。これに反して我国の稲作では比較的低温条件下で成熟するために、種子の休眠性は必要条件ではなく、低温発芽性を高め

る必要から、むしろ休眠性遺伝形質は排除される方向にあった。ところが、近年西南暖地で夏期に収穫する早期水稻の普及につれて、ほ場での穂発芽による被害が各所で発生したため、再び休眠に対する関心が高まった。著者が休眠現象に着目した時代的背景もまたここにあったといえる。後章で詳述するように作物種子の休眠に関する研究は、極めて多岐に亘り数多くなされてきた^{38,45,61)}。しかし、稲種子の休眠に着目した場合、その要因物質である発芽抑制物質の同定およびその存在部位について、さらには休眠覚せい過程における発芽抑制物質の動向などについては未だ未解決の点が多いことも事実である。このような観点から本研究は、1970年から約10年間鹿児島大学農学部ほ場で得られた水稻種子を用いて、まず、休眠種子内生の発芽抑制物質の生物的並びに化学的検定を行うとともに、種子内におけるそれらの存在部位を明確にした上で、自然的、人為的休眠解除過程での発芽抑制物質の消長をみたものである。本論文は、これら一連の実験を通じて、稲種子の休眠機構に対する知見をとりまとめたものである。

第2章 稲種子内生の伸長および発芽抑制物質とオーキシンの生物検定並びに化学検定

Hemberg²¹⁾ (1949) が植物の休眠現象と密接な関係を有すると推定される生長抑制物質の存在を発見して以来、多くの植物で inhibitor- β と呼ばれる生長抑制物質の存在が認められ、植物の休眠現象はこの物質によって支配されると考えられるに至った^{38,45)}。近年 Milborrow⁴²⁾ が過去に inhibitor- β と報告されたもののうちの多くが、その主成分は Wareing^{7,62)} や Ohkuma⁴⁷⁾ によって発見された abscisic acid (ABA) であることを明らかにしたことから、ABA が多くの植物で、その休眠の要因物質であると推定されている^{2,7,8,27,34,36,63,66,67,74)}。また最近の報告では、休眠解除がこの ABA を主体とする生長抑制物質の量的な減少とオーキシンやジベレリン (GA) などの生長促進物質の量的増加という植物ホルモンの量的な均衡に支配されると説明したものも多い³⁸⁾。

稲種子では、笠原³¹⁾ (1944) が生長物質の存在を示唆して以来、休眠性に関しても植物ホルモンの面からの研究が始められた。竹島⁷¹⁾、池田²³⁾、Mikkelsen^{40,41)}、太田⁴⁹⁾ は休眠種子の穎に inhibitor- β の存在を推定した。これに対して高橋⁶⁹⁾ は穎中に2種の発芽抑制物質の存在を認め、そのうちの1種につい

ては、加藤³²⁾ がモミラクトン A ($C_{20}H_{26}O_3$) であることを報告している。一方、生長促進物質の存在は、池田²³⁾、Mikkelsen⁴¹⁾、太田⁵¹⁾、安江⁷⁷⁾ によって報告され、池田²³⁾、Mikkelsen⁴¹⁾ がオーキシン活性を認めている。また、GA の存在は折田⁵⁴⁾ によって未熟種子で確認されている。しかし、この GA 様物質は、成熟過程で不活性化されるために成熟種子には存在しないと考えられていた。このように休眠種子には生長抑制物質と生長促進物質が存在することが立証されてきたにもかかわらず、物質の本体については必ずしも一致していないのが現状である。

本実験は、休眠性を異にする数品種の水稻種子について、アベナ伸長テストによって種子内生の伸長抑制物質とオーキシンの検定を行い、つぎに、その伸長抑制物質が稲の胚の発芽に及ぼす影響を胚培養法により検定し、さらに、化学的検定によって発芽抑制物質とオーキシンの同定を試みたものである。

第1節 アベナ伸長テストによる生物検定

材料と方法

供試種子は、休眠中の一群と完全に休眠覚せいした一群とに類別した。すなわち、前群については、著者が1970年に予備的試験として43の水稻品種について、それらの休眠性程度を測定したもののうちから、休眠性の強い Ketaktara と Hadsaduri の2品種並びに休眠性の弱い農林48号、Kumari および Gendjah の3品種を選定した。そして一穂毎に開花月日を記録し、それぞれの開花日より40日目の種子を用いた。後群については、完熟種子を室温条件下に約3カ月貯蔵して、完全な発芽力を備えた品種のうちから、センダイ、アケボノ、Peta 23 および Russian 120 の4品種の種子を用いた。これらの種子に内生する伸長抑制物質とオーキシンを下記の方法で検定した。

抽出法; それぞれの籾種子 5g (生重) を粉碎して、50ml の80%エタノールで1昼夜 5°C で抽出した。抽出液をろ紙でろ過し、残渣を 20ml の80%エタノールで再度抽出して、ろ過し、先のろ液と一緒にした。このろ液のエタノールを 35°C の減圧下で完全に除去して、20ml の水溶液としたのち、これに5%量の炭酸水素ナトリウムを加え、このアルカリ水溶液を同量のエチルエーテルで3回抽出し、中性物質をエチルエーテル相に分離する分画を行った。つぎに、水相を 1-n, HCl で pH 3 に調整して、これを同量のエチルエーテルで3回抽出し、酸性物質をエチルエーテル相

に分画した (Fig. 1). さらに、先の中性分画のエチルエーテルを減圧下で濃縮乾固して、これを新たに 20 ml のメタノールに溶かして、同量の石油エーテルで 3 回抽出して、油脂類などを除去するための精製を行った。この中性分画のメタノールおよび先の酸性分画のエチルエーテルを減圧下で濃縮乾固して、それぞれを新たに 2 ml のエチルエーテルに溶かして、これをペーパークロマトグラフィーの試料とした。

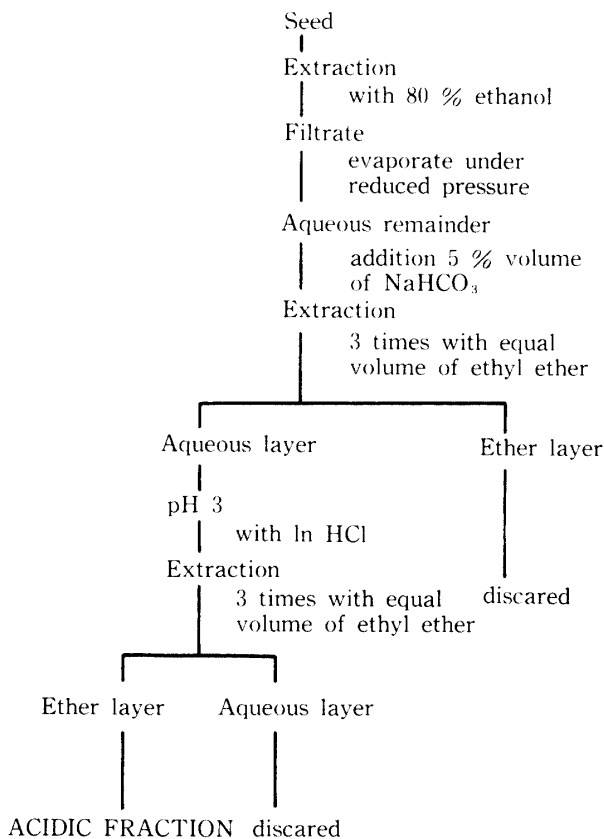


Fig. 1. Extraction technique of the germination inhibitors and the auxin in rice seed.

ペーパークロマトグラフィー法；上述の試料をさらに約 0.5 ml に濃縮してのち、ツベルクリン注射器を用いて、それぞれの全量を 2.5×40 cm の東洋ろ紙 No. 50 の原線に塗布した。そして Stow and Thimman⁴⁶⁾ のイソプロパノール：アンモニア水：水 (8:1:1 v/v) を展開溶媒として用いて、一次元上昇法により 25 cm 展開した。なお、対照区には溶質を含まないろ紙を用いた。風乾クロマトグラムを 10 等分して、各切片をそれぞれ径 3 cm のシャーレに入れ、2 ml の 2% 蔗糖液で一昼夜 5°C で溶出した。それぞれの溶出液のうち 1 ml をアベナテストの検液として、それぞれを 50 ml のフラスコに入れた。

アベナ伸長テスト法；基本的には Nitsch の方法によった⁴⁶⁾。アベナ (Victory 1 号) 種子を水に 3 時間浸漬して、十分に水を含ませたる紙上に胚を上面にして並べて 25°C±1°C の暗室で 20 時間催芽した。そして、同室内で発芽の揃った種子を選び、石英砂を用いた床に胚を上面に向けて約 60° の角度で植付けて育成した。このアベナ幼葉鞘が 2.5~3 cm に伸長した時点で幼葉鞘を切り取り、暫時水に浸してから、2 枚のカミソリ刃を 4 mm 間隔にセットした切断器を用いて幼葉鞘の先端 3 mm を切除し、その下部 4 mm の幼葉鞘切片を作成した。そして、前述のそれぞれの検液に切片を 10 本ずつ入れて、フラスコの口を密閉した。このフラスコを 1 r.p.m. の回転機にセットして、20 時間後の幼葉鞘切片の伸長を拡大鏡 (×10) 下で測定した。なお、暗室内での操作は全て 2CP の赤色光下で行った。回転機は 1/8 HP 電動機に 2 台の 1/3 減速機とチェーンギヤをセットして 1 r.p.m. とし、フラスコをセットする円板を水平方向に回転させるものである。この回転機の使用は切片の湾曲を防止し、さらに少量の検液の検定を可能とする利点を有した。

結 果

休眠種子および休眠覚せい種子の抽出液から得られた酸性エチルエーテル可溶分画の検液についてアベナ伸長テストを行い、その結果をそれぞれ Fig. 2 および Fig. 3 に示した。なお、これらは溶質を含まない対照区の伸長量を 100 とした相対指数でヒストグラムに示した。

休眠種子 (Fig. 2) で 5 品種共通に検出された伸長抑制活性は Rf 0.6-0.8 と Rf 0.9-1.0 であった。Rf 0.6-0.8 の伸長抑制活性は休眠性の強い品種 (Ketaktara, Hadsaduri) の種子でやや大である傾向が認められたが、Rf 0.9-1.0 の伸長抑制活性にはそのような傾向は認められなかった。また、2, 3 の品種に Rf 0.3 以下に伸長抑制活性が検出されたが、この活性と休眠性の強弱とは関連性は全く認められなかった。

休眠覚せい種子 (Fig. 3) における伸長抑制活性は、アケボノ (a) で Rf 0.6-0.7 また Russian 120 (c) で Rf 0.9-1.0 にわずかに検出されたが、他の 2 品種では全く認められず、全体的には休眠覚せい種子では殆ど伸長抑制活性を失っているものとみられる。

一方伸長促進活性つまりオーキシン活性は、休眠中の品種または休眠覚せい後の品種を問わず、Rf 0.5-0.6 を中心とした部分に検出された (Figs. 2, 3)。そして、その活性は休眠覚せいした品種においてやや

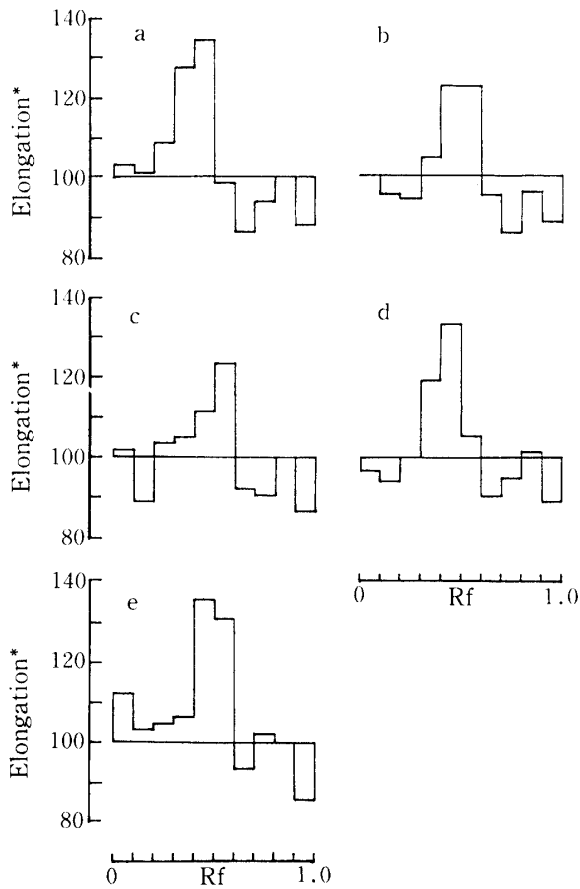


Fig. 2 a,b,c,d, and e. Histograms representing the Avena straight growth test of acidic fraction of extract obtained from dormant seeds in varieties, a; Ketaktara, b; Hadsaduri, c; Norin No.48, d; Kumari, and e; Gendjah. *Relative length of Avena coleoptile for control (=100).

強い傾向がみられた。なお、中性分画については、休眠性と関連するような伸長抑制物質およびオーキシンの活性は検出されなかったため記載を省略した。

第2節 稲剥離胚を用いた発芽テストによる生物検定

材料と方法

1973年に前掲の強休眠性の Ketaktara を水田で栽培し、その開花後50日目の休眠種子（発芽率0%）から得られた酸性エチルエーテル分画に含まれる Rf 0.6-0.8 と Rf 0.9-1.0 の伸長抑制物質（以下それぞれを物質Aおよび物質Bと呼ぶ）およびオーキシン (Rf 0.4-0.6) が、前年に収穫して休眠覚せいした品種 Hadsaduri の剥離胚の発芽に及ぼす影響を胚培養法³³⁾によって検定した。

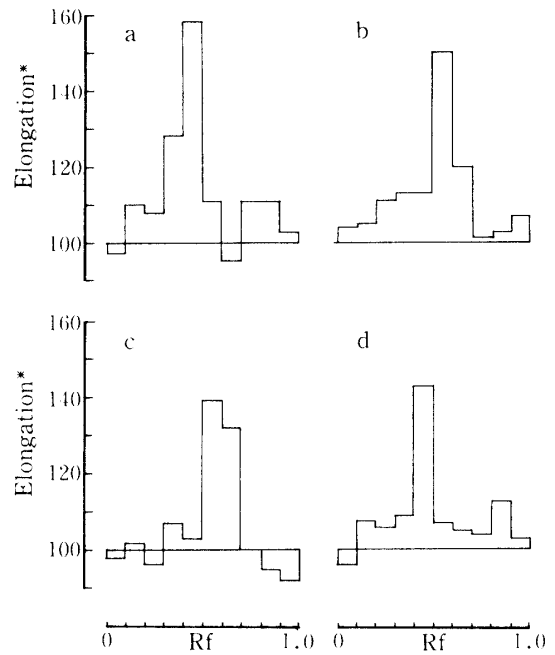


Fig. 3 a,b,c, and d. Histograms representing the Avena straight growth test of acidic fraction of extracts obtained from the husked seed in non-dormant varieties, a; Akebono, b; Sendai, c; Russian 120, and d; Peta 23.

*Relative length of Avena coleoptile for control (=100).

抽出操作およびペーパークロマトグラフ法は基本的には第1節の方法に従ったが、以下の点が相違した。Ketaktara 種子 100g を用い、1lの80%エタノールで抽出し、80mlの水溶液とし、溶媒分画を行った。そして、得られた酸性分画の試料を2mlのエチルエーテルに溶かし、4等分して、それぞれをクロマトグラフした。その4本の風乾クロマトグラムを Rf 0.4-0.6, Rf 0.6-0.8 および Rf 0.9-1.0 の3層に分割して、同一 Rf 層を一緒にして、それぞれを50mlの水で24時間(5°C)溶出した。そして、それぞれの水溶液を40°Cの減圧下で濃縮して、20mlの水溶液とした。この溶液を相対濃度100の検液とし、つぎに、相対濃度100の10mlに等量の水を加えて、相対濃度50の検液を作成した。さらに、相対濃度100の4mlに12mlの水を加えて、相対濃度25の検液を作成した。

検定はオーキシン、物質Aおよび物質Bのそれぞれの相対濃度100、50および25の9検液並びにオーキシンと物質Aの相対濃度50および25をそれぞれ等量ずつ混合した2検液、それに対照区（水）を加えた合計12の検液について行った。

まず、後述するホワイトの改良培地を3×9cmの管瓶に1mlずつ分注(±0.01ml)し、高压滅菌したの

ち、これにミリポアフィルターで滅菌した検液の 1 ml をホールピペットで加えた固形培地に下記の方法で消毒並びに剥離された胚を置床した。

検定用種子（休眠覚せいした Hadsaduri）を脱穎して、80%アルコールで30秒間、つづいて0.2%昇水水で2分間消毒したのち、直ちに滅菌水で水洗した。新たに滅菌水を加えて、無菌室内に約1時間置き、種子を膨軟化させたのち、上皮細胞層の部位にメスを入れて胚を剥離した。この剥離胚をさらに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）が管瓶内の培地に接するようにして置床した。1検液あたり3本の培地を用い、1培地に胚20粒を置床した。これを25°C±1°Cの恒温室内に置き、置床後3日目と7日目の発芽率を測定した。なお、発芽の判定は、幼芽が胚の上部を押し開いて突起し、その幼芽長が1mm以上に達したものを発芽とした。

培地組成(mg/l): Ca(NO₃)₂ 200, Na₂SO₄ 200, KNO₃ 80, KCl 75, NaH₂PO₄ 165, MgSO₄·7H₂O 360, ZnSO₄ 15, H₃BO₃ 15, KI 0.7, Fe₂(SO₄)₂ 2.5, 蔗糖 2×10⁴, 寒天 1×10⁴。

結 果

置床後3日目および7日目の発芽率を Table 1 に示した。

置床後3日目および7日目の対照区の発芽率はそれぞれ58%および100%であったのに対して、物質A区と物質B区では、置床後3日目の発芽はいずれも抑制された。しかし、7日目の発芽率はいずれも対照区と差異がなく、発芽抑制力はそれほど強いものではなかった。3日目の発芽抑制の程度を濃度別にみると物質Aでは、発芽抑制活性は全濃度で認められ、対照区の発芽率に対して相対濃度25の検液でも50%の抑制度であり、濃度が高まるほど発芽抑制の程度は強まる傾向が認められた。つぎに物質Bでは、相対濃度25の検

液では発芽抑制は認められなかったが、相対濃度50以上になると抑制が認められ、その発芽抑制の程度は高濃度ほど強まる傾向にあった。以上述べたように、物質Aと物質Bの発芽抑制の程度には大きな差異があり、発芽に対する物質Aの抑制活性は物質Bのそれよりもきわめて大きかった。

一方、オーキシンでは相対濃度25の検液で発芽が促進されたものの、より高濃度では逆に抑制された。

物質Aとオーキシンを混合した検液では、物質Aの発芽抑制作用がオーキシンによってかなり弱められる傾向がみられた。

以上の結果により、前節でアベナ幼葉鞘切片の伸長を抑制した物質Aおよび物質B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可能性が示唆された。

第3節 クロマトグラフィーによる化学検定

前節の生物検定において、休眠種子に2種類の生長抑制物質（物質Aおよび物質B）とオーキシンの存在が推定された。本節は、それらの物質の種類の推定と同定をクロマトグラフィーによって行ったものである。

材 料 と 方 法

実験1 ペーパーおよび薄層クロマトグラフィーによる検定

1973年に強休眠性の品種の Ketaktara をポット栽培し、その完熟種子を収穫し、3日間風乾してのち、実験時まで約6カ月間-15°C~-20°Cのフリーザーに貯蔵した休眠種子（発芽率0%）について、種子内生の発芽抑制物質およびオーキシンの推定をクロマトグラフィー法によって行った。

抽出操作は第1節の方法に従ったが、以下の点が相違した。Ketaktara 種子 400g を 2l の80%アルコールで抽出し、抽出液を4等分して、それぞれを50mlの水溶液として溶媒分画を行い、その酸性分画を試料

Table 1. The effects of the endogenous inhibitors and auxin extracted from dormant seed in var. Ketaktara on the germination of the excised embryo* of non-dormant seed in var. Hadsaduri, as shown in germination percentage for 3 days and 7 days after sowing

| Extract** | Non (cont.) | Inhibitor-A | | | Inhibitor-B | | | Auxin | | | (Inhibitor-A)+(Auxin) | | | |
|------------------------|-------------|-------------|-----|-----|-------------|----|-----|-------|----|-----|-----------------------|-------|-----|-----|
| | | 25 | 50 | 100 | 25 | 50 | 100 | 25 | 50 | 100 | 25+25 | 50+50 | | |
| Relative conc.*** | | | | | | | | | | | | | | |
| Germination percentage | for 3 days | 58 | 29 | 17 | 15 | 60 | 36 | 33 | 75 | 47 | 33 | 53 | 40 | |
| | for 7 days | 100 | 100 | 100 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 93 | 96 | 100 | 100 |

Note: * The excised embryo was sown on the culture media containing each extract. ** Inhibitor-A, inhibitor-B and auxin were eluted from Rf 0.6-0.8, Rf 0.9-1.0, and Rf 0.4-0.6, respectively, on paper chromatograms of acidic fraction of extract. *** 100, 50, and 25, relative concentrations, were diluted the elution with water 1, 2, and 4 times, respectively.

とした。この試料は少量の色素等を含んでいたため、まずペーパークロマトグラフィーによる精製を行った。その方法⁴⁶⁾は、試料を東洋ろ紙 No. 50 (5×40 cm) の原線に全量塗布して、水を展開溶媒としたクロマトグラムの原線部分を切除したのち、エチルエーテルで再度抽出して、ペーパーおよび薄層クロマトグラフィー (TLC) の試料とするものであった。

物質 A については、その Rf 値より inhibitor- β である可能性が示唆され、また inhibitor- β の主成分はアブシジン酸 (ABA) であることが明らかにされている⁴²⁾ ので、試料と標品 ABA を同時に展開した TLC クロマトグラムにおける蛍光の比較検定を行った。シリカゲル G の 0.25 mm の薄層板 (20×20 cm) に 2 cm 間隔で試料と標品 ABA を塗布して、これを 3 種類の展開溶媒; (A)ーイソプロパノール:アンモニア水:水 (8:1:1), (B)ーベンゼン:酢酸エチル (4:1), (C)ーベンゼン:酢酸エチル:酢酸 (50:5:1) で 10 cm 展開した。風乾クロマトグラムに 5% 硫酸溶液を噴霧し、加熱したのち、短波長の UV ランプによる蛍光の Rf 値を測定した。

一方、オーキシシンについては、植物体に存在が認められている 3 種類の酸性インドール化合物の IAA, IPA および IBA の標品と試料を東洋ろ紙 No. 50 (5×40 cm) の原線に 1 cm 間隔で塗布して、(A)ー展開溶媒で 25 cm 展開した。そして、一般的な UV ランプによる蛍光検査とエーリッヒ試薬 (2 g ジメチルアミノベンズアルデヒド+50 ml 80% アルコール+20 ml

塩酸) に対する呈色反応を検査した。なお、標品はシグマ社製の試薬を用いた。

実験 2 ガスクロマトグラフィーによるアブシジン酸の同定

1976年に強休眠性品種 Ketaktara を水田で栽培し、その完熟種子を収穫して、7日間風乾してのち、8カ月間 -15°C ~ -20°C のフリーザーに貯蔵した種子について、種子内生の発芽抑制物質 (物質 A) のガスクロマトグラフィーによる同定を試みた。

抽出操作は第 1 節の方法に従ったが以下の点で相違した。籾種子 9 kg を 14 l の 80% メタノールで抽出し、900 ml の水溶液とし、溶媒として酢酸エチルを用いて溶媒分画を行い、その酸性酢酸エチル可溶分画をカラムクロマトグラフィーの試料とした。

カラムクロマトグラフィーと生物検定; ABA の一般的抽出操作³⁸⁾に従い活性炭吸着およびシリカゲル分配カラムクロマトグラフィーによる分画を行った。

まず、試料 (1.8 g) を 20 g の活性炭吸着カラムによって精製した。活性炭を水中にて減圧脱気してカラムを充てんし、これに、試料を少量のアセトンに溶かし、希釈して 10% アセトン水溶液とし、吸着させた。溶出液はアセトン 10% 水溶液より 100% 溶液まで、10% 刻みで 10 種類の濃度のアセトン溶液を用い、減圧脱気された 200 ml の溶液で溶出した。そして、それ

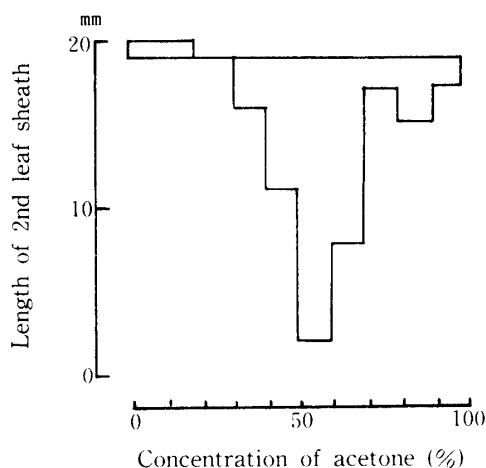


Fig. 4. Histogram representing the rice seedling growth test, c.v. Tanginbozu, of a charcoal adsorption chromatography of the acidic ethyl acetate soluble fraction of the extract obtained from dormant seed in variety Katakara.

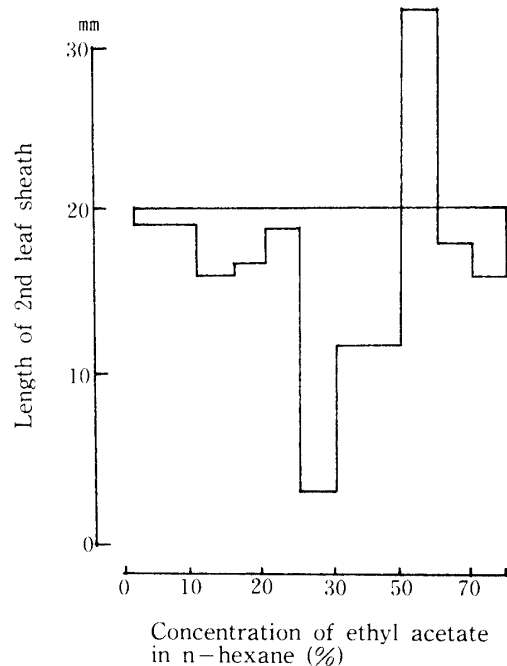


Fig. 5. Histogram representing the rice seedling growth test of the silicic acid partition chromatography of the sample eluted by 50–70% acetone solution in Fig. 4.

それぞれの溶出液を減圧下で濃縮乾固して、その一部を生物検定に供した。

生物検定においては、各濃度区の試料を新たに 1 ml のアセトンに溶かし、そのうちから 20 μ l を 3 \times 9 cm の管瓶にとって、それぞれに 2 ml の水を加えて検液とした。これにわい性稲品種の短銀坊主の催芽種子を 1 検液あたり 10 粒ずつ置き、一般的な浸漬法³⁸⁾によって、30°C、4000 Lux で育生し、7 日後の第 2 葉鞘の伸長を測定した。

その生物検定の結果 (Fig. 4)、アセトン 50~70% 濃度区の試料に顕著な伸長抑制活性が検出された。そこで、これら 3 濃度区の試料のみをそれぞれ少量のアセトンに溶かして一緒にし、濃縮乾固して、シリカゲル分配カラムクロマトグラフィーの試料とした。15 g のシリカゲル (100~200 メッシュ、関東化学 KK) に 0.5 M ギ酸水溶液 9 ml を加え、十分に攪拌して、同ギ酸水溶液を飽和させた n-ヘキサン溶液でカラムに充てんした。試料 (0.2 g) はセライト (セライト 545) に吸着させ、カラムにマウントした。カラムは 0.5 M ギ酸水溶液を飽和させた酢酸エチルと n-ヘキサンの混合溶液 150 ml で溶出した。この混合溶媒中の酢酸エチル濃度は 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 および 100% であった。この 11 種の濃度の溶出液を減圧下で濃縮乾固したのち、各濃度区の試料について、前述の方法で生物検定を行った。その結果 (Fig. 5)、酢酸エチル 30% (n-ヘキサン中) 濃度区の試料にもっとも強い伸長抑制活性が検出された。そこで、この 30% 濃度区の試料を乾固して、メチル化し、ガスクロマトグラフィーの試料とした。

ガスクロマトグラフィー; 標品 ABA の 5 mg 並びに上記の試料の全量をそれぞれメタノール中でジアゾメタンによってメチル化した⁷⁴⁾。そして、それぞれのメチル化物を 0.5 ml のアセトンに溶かして、ガスクロマトグラフィーで分析した。分析機種はヤナコ、ガスクロマトグラフ、モデル G 80 で、検出には水素炎イオン検出器を使用した。3 mm \times 1500 mm のガラスカラム管にシリコン SE-30 (5%) およびシリコン XE-60 (3%) の 2 種類の充てん剤を別々に充てんし、キャリアーガスとして窒素ガスを 25 ml/sec. の流速で流した。注入口および恒温槽の温度はそれぞれ 275°C および 210°C に設定した。そして、まず SE-30 の固定相で標品 ABA のメチル化物を分析して、シス ABA とトランス ABA を検出し、同時にシス ABA 濃度に対する検量線を描いた。つぎに、同じ固定相で試料のメチル化物を分析した。そして、そのシ

ス ABA ピークの面積を求め、先の検量線より試料中の ABA 含量を求めて、種子に内生する ABA 含量を換算した。さらに、分析結果を確認する意味で、シリコン XE-60 の固定相で先述と同じ分析を行った。なお、標品 ABA は、Mixed isomer synthetic crystalline, Approx 90%, Sigma Chemical Company. を使用した。

結 果

実験 1 ペーパーおよび薄層クロマトグラフィーによる検定

休眠種子から得られた酸性エチルエーテル可溶の試料と標品 ABA の蛍光による検査並びにオーキシンの蛍光および呈色反応による検査の結果を Fig. 6 に示した。

図中において、クロマトグラム (a) は A 溶媒で展開したもので、標品 ABA および試料の蛍光の Rf 値はいずれも 0.75 であり、両者は完全に一致した。B 溶媒で展開したクロマトグラム (b) においては、標品 ABA の蛍光は 2 ケ所に検出され、それらの Rf 値は 0.03 と 0.07 であり、ABA はシス ABA とトランス ABA に分離された。一方、試料での分離は認められず、その Rf 値は 0.06 であった。さらに、C 溶媒でのクロマトグラム (c) においても、標品 ABA は Rf

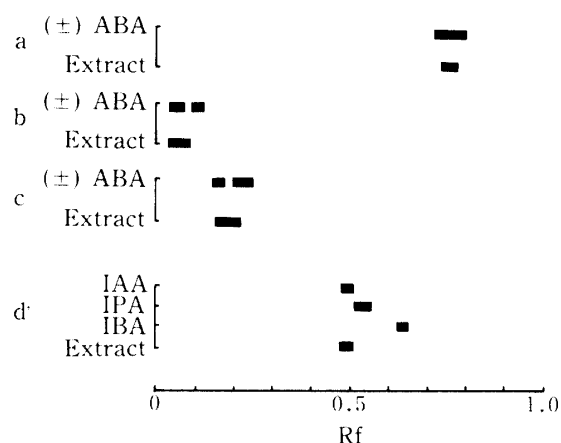


Fig. 6 a,b,c, and d. Thin layer (a, b, and c) and paper (d) chromatograms of the acidic fraction of extracts from dormant seeds in variety Katakara. Thin layer chromatograms of extract and (\pm) ABA developed in a; isopropanol:ammonia:water (8:1:1), b; benzen:ethyl acetate (4:1), and c; benzen:ethyl acetate:acetic acid (50:5:1), respectively. Paper chromatogram (d) of extract, IAA, IPA, and IBA developed in isopropanol:ammonia:water (8:1:1).

0.15 および 0.22 に検出されたが、試料の Rf 値は 0.19 であった。

以上の検定結果において、標品 ABA と試料の蛍光の色調は黄緑色で共通し、その Rf 値も (b) と (c) でややずれたものの、(a) で一致したことから、物質 A は ABA にほぼ間違いないと推定した。

一方、オーキシシンについては、A 溶媒を用いたクロマトグラム (d) において、試料の蛍光とエーリッヒ試薬に対する青色の呈色の Rf 値は一致し、0.49 であった。標品オーキシシンのうち、IAA の蛍光と呈色の Rf 値は 0.49 であり、試料と標品 IAA の Rf 値が一致したことから、オーキシシンは IAA であろうと推定した。

また、物質 B はペーパークロマトグラムの Rf 0.95 に蛍光と赤色の呈色を示したことから、インドール化合物であろうと推定した。

実験 2 ガスクロマトグラフィーによるアブジジン酸の同定

Fig. 7 にシリコン SE-30 の固定相における標品 ABA (a) と試料 (b) のメチル化物のガスクロマトグラムを示した。

標品 ABA はシス ABA とトランス ABA からなり、それらの保持時間は 7.7 分および 10.1 分であった。一方、試料においても、標品のシス ABA と全く同じ保持時間の 7.7 分に明確なピークが検出され、トランス ABA の保持時間 10.1 分にきわめて小さなピークが検

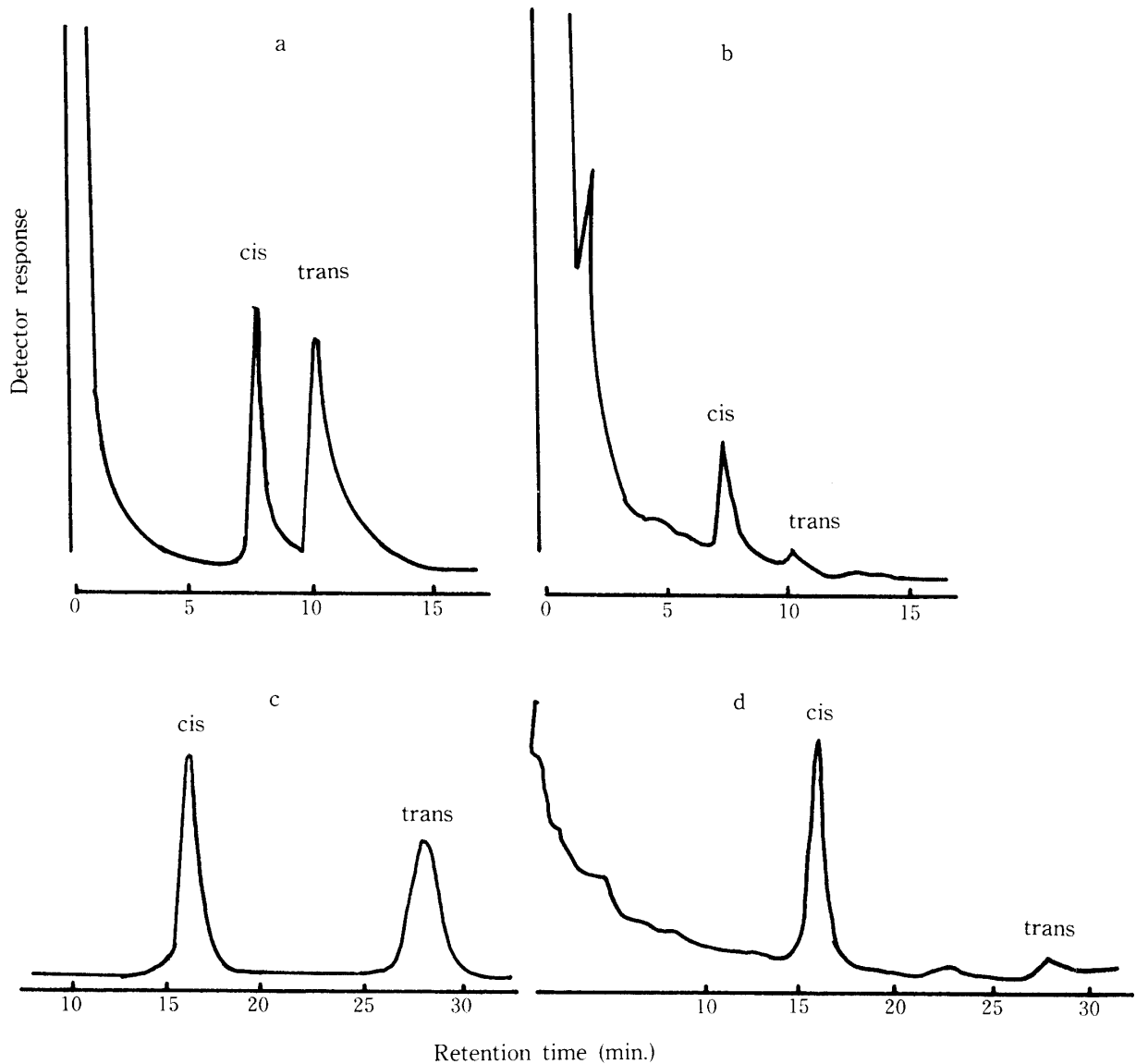


Fig. 7 a,b,c, and d. Gas chromatograms of the methylated sample eluted by 30% ethyl acetate in n-hexane solution in Fig. 5 (b and d) and of the methylated authentic ABA (a and c) on the column of silicon SE-30 (a and b) and silicon XE-60 (c and d).

出された。

つぎに、同図においてシリコン XE-60 の固定相における標品 ABA (c) と試料 (d) のメチル化物のガスクロマトグラムをみると、標品のシス ABA とトランス ABA の保持時間はそれぞれ16.5分および28.3分であり、試料においても、標品 ABA と全く同じ保持時間にそれらのピークが検出された。なお、各ピークの面積に注目すると標品においては、シス ABA とトランス ABA は両クロマトグラムともほぼ同一であり、試料のそれでは明らかにシス ABA が大で、トランス ABA が小であった。

以上のように、2種類の固定相を用いたガスクロマトグラフィー分析において、標品 ABA と試料の保持時間が完全に一致したことから、実験1の薄層クロマトグラフィーで ABA と推定した物質 A は、シスおよびトランス ABA と同定された。さらに、試料つまり休眠種子に内生する ABA はシス ABA が主体で、トランス ABA はきわめて微量であることが明らかとなった。

分析結果のピーク的面積から、種子 1kg に含まれるシス ABA 量を換算したところ、その値は 280 μ g であった。しかし、この値には、種子のトランス ABA 並びに吸着および分配カラムの過程で失われた ABA 量、さらに、生物検定に供した試料中の ABA 量が含まれないので、この休眠種子中には 280 μ g/kg 以上の ABA が内生すると推定される。

最後に、シリカゲル分配カラムのヒストグラム (Fig. 5) において、酢酸エチル 60% (n-ヘキサン中) 溶液で溶出された検液にジベレリン (GA) 活性が検出されたことから、休眠種子には GA 様物質が内生すると推定された。

第4節 考 察

Hemberg^{21, 22)} がジャガイモ塊茎の芽の休眠と密接な関係を有すると推定される生長抑制物質の存在を発見し、その後のペーパークロマトグラフィーの開発によって inhibitor- β と呼ばれる物質の生理的重要性が指摘されて以来、ペーパークロマトグラムでの inhibitor- β の検出の報告は多くの作物で莫大な数に達している。稲の休眠種子においても、仮谷³⁰⁾ が発芽抑制物質の存在を指摘して以来、休眠種子内生の発芽抑制物質の探索がなされ、竹島⁷¹⁾、池田²³⁾、Mikkelsen ら⁴¹⁾、太田^{50, 51)} はいずれも inhibitor- β の存在を推定した。また、高橋⁶⁹⁾ は inhibitor- β とは異なる2種類の発芽抑制物質の存在を報告している。こ

のように、休眠種子に発芽抑制物質が存在することは間違いのない事実と考えられたが、稲種子の発芽に対する生理作用などはそれほど明確ではなかった。そこで第1節では、まず休眠に関与する発芽抑制物質の存在を再確認する意味で、休眠中の種子群と完全に休眠覚せいした種子群を用いて、両群の種子内生の伸長抑制物質の比較をアベナ伸長テストによって行った。その結果、休眠種子群からは、共通して Rf 0.6-0.8 (物質 A) と Rf 0.9-1.0 (物質 B) が検出され、休眠覚せい種子群からは検出されなかったことから、物質 A および物質 B が休眠に関与する物質であろうと推定され、また、物質 A はクロマトグラムの Rf 値から、すでに報告されていた inhibitor- β であろうと推定した¹³⁾。

アベナ幼葉鞘の切片の伸長抑制によって検出された両物質が稲種子の発芽に及ぼす影響をみたのが第2節である。ここで本実験で剥離胚を用いた意義を強調しておきたい。従来の報告の大部分は、検定材料としてアベナおよびコムギの幼葉鞘切片の伸長やレタスの発芽などを用い、これをもって稲種子の発芽に対する影響を類推したものであった。その理由は検定材料である稲種子の発芽力がきわめて旺盛なために、種子から抽出した微量物質の影響を検出することが不可能であったためと考えられる。そこで、著者¹⁵⁾ は一歩進んで、検定に剥離胚培養法³³⁾ を用いた。つまり、後述のように生長促進物質であるオーキシンを多量に含む胚乳を除去することによって、検液に対する感度を高めうると考えたからである。Table 1 にみるように、物質 A および物質 B はいずれも胚の発芽を抑制する発芽抑制物質であることが証明された。そして、物質 A の発芽抑制力が物質 B のそれよりもかなり強力であったことから、物質 A が発芽抑制の主体であろうと推定され、また、相対濃度が高まるほど発芽抑制の程度が大であったことから、休眠程度 (休眠の深淺) に対して内生の発芽抑制物質量が深く関係するものと考えられた。

Milborrow⁴²⁾ は、過去に inhibitor- β と報告されたもののうち、その大部分は、Wareing ら^{7, 55)} や Conforth ら⁴⁾ によって発見された ABA を主成分とすることを明らかにしていた。そこで、第1節および第2節で inhibitor- β と推定された物質 A について、薄層クロマトグラフィーを用いて、標品 ABA との比較検定を試みたところ、両者の蛍光の色調および Rf 値がほぼ一致したことから、物質 A は ABA 様物質に間違いのないものと推定された。つぎに、物質をより明

確なものにするために、ガスクロマトグラフィー分析を行ったところ、休眠種子から得られた試料と標品 ABA とは、それらの保持時間が完全に一致したことから、第2節で発芽抑制物質の主体であると推定した物質 A は、シスおよびトランス ABA であると同定された。稲種子にシスおよびトランス ABA が内生することは、すでに折谷ら⁵⁴⁾によって未熟種子で報告されており、ABA が稲種子に普遍的に内生すると考えられるが、その休眠現象との関係は未知であった。休眠種子から得られた ABA の組成は、他植物の休眠種子と同様で、多量のシス ABA と微量のトランス ABA からなるものであった³⁸⁾。そして、休眠の主因と考えられるシス ABA 量は他植物の休眠種子⁶⁶⁾とほぼ同程度の 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上と推定された。

一般に種子のみならず芽の休眠現象においては、多くの実験例から ABA が休眠の要因物質^{2, 7, 27, 34, 36, 63, 66, 67, 74)}と考えられてきているが、それらの研究は、おもに、オオムギ、モモ、トネリコなどの種子のように休眠解除に低温を必要とする植物でなされたものであり、稲種子のように、休眠解除に低温を必要としない種子での研究はほとんどない。それ故に、稲種子での研究は、ABA の作用機構と外的要因との関係について興味ある結果を導くものと期待され、これについては後述の第5章で考察を行った。

一方、物質 B は第2節においてエーリッヒ試薬に反応し、赤色を呈したことからインドール化合物であろうと推定され、これはすでに八尋⁷⁵⁾が、桑樹冬芽の休眠の要因物質と推定したものと同一物質であると考えられる。

種子に内生するオーキシンは、一般に種子の成熟過程で不活性化^{37, 44)}されるといわれているが、稲種子の場合には強い活性を示した。そして、それは IAA にほぼ間違いのないものと推定され、この物質と休眠現象との関係については第4章で再び述べる。

ジベレリン (GA) と休眠現象との関係に関する従来の研究は、おもに ABA と同様に休眠解除に低温を必要とする種子でなされ、休眠解除が GA の合成によって誘起されると推定した報告がある^{9, 56, 64, 73)}。これまで、稲の未熟種子に内生する GA は成熟過程で不活性化されると考えられていたようであり、休眠現象との関係はほとんど研究されていない。第3節において、完熟した休眠種子に GA 様物質の存在が検出されたことから、稲種子の休眠現象と植物ホルモンとの関係を知る上で GA の研究は重要な課題であるとともに、ABA と同様に GA の作用機構と外的要因

との解析は非常に有意義であるといえよう。

また、本章の結果に基づいて本論文では、クロマトグラムの Rf 0.6–0.8 の物質 A と Rf 0.9–1.0 の物質 B の抑制作用は、発芽抑制作用とみなし、以後の章においては、両者を発芽抑制物質と呼ぶこととした。

第3章 稲休眠種子内生の発芽抑制物質とオーキシンの存在部位

稲種子の休眠は、脱穎によって効果的に打破されるために、穎に内生する発芽抑制物質が休眠性の主要因であると考えられ、そのために、脱穎による休眠打破は穎の発芽抑制物質の機械的除去に起因すると解釈される傾向が強かった。一方、高橋⁶⁸⁾、雨宮¹⁾、池橋²⁴⁾は包被組織と胚の遺伝的要因が休眠性に関与することを認め、また、Roberts⁵⁷⁾、太田⁵³⁾は包被組織の加傷の際に加傷部位が胚に接近するほど休眠打破に有効であることを認めるなど、休眠現象が穎内の発芽抑制物質のみに支配されるものではないことも指摘されていた。しかし、以上の諸報告^{1, 24, 53, 57, 68)}は、遺伝学的あるいは機械的手法を用いての間接的証明であって、直接的に胚および包被組織に存在する発芽抑制物質を定量したものではなかった。

そこで、本実験は種子を穎、胚乳および胚の3部位に分けて、それぞれに内生する発芽抑制物質とオーキシンを検定したものである。

材料と方法

1971年に、ポット栽培した強休眠性の Hadsaduri の完熟種子 10g を穎と玄米の2部位に分けて、それぞれに内生する発芽抑制物質とオーキシンをアベナ伸長テストによって検定した。さらに、1973年には、ポット栽培した強休眠性の Ketaktara の完熟種子を収穫し、風乾してのち、実験時まで -15°C ~ -20°C に貯蔵した凍結種子 10g をまず指ですみやかに脱穎し、つぎに玄米を胚と胚乳にメスで分離して、この3部位に内生する発芽抑制物質とオーキシンをアベナ伸長テストによって検定した。なお、穎、胚乳および胚の重量比はそれぞれ 22:76:2 であった。抽出操作、ペーパークロマトグラフィーおよび生物検定は第2章第1節に従った。

結 果

Hadsaduri の休眠種子の穎と玄米の2部位のアベナ伸長テストによる検定の結果を Fig. 8 のヒストグラムに示した。

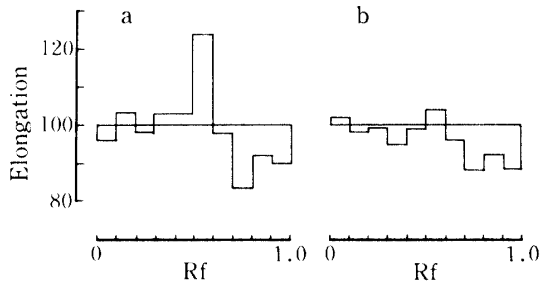


Fig. 8 a and b. Histograms representing the *Avena* straight growth test of acidic fraction of extract obtained from the husked-seed and hull. Histograms: a; husked-seed, b; hull, respectively.

*Relative length of *Avena* coleoptile for control (=100).

穎と玄米の両部位内生の伸長抑制物質は共通し、Rf 0.7-0.8 の物質 A と Rf 0.9-1.0 の物質 B であった。部位別活性については、物質 A では玄米部位が穎部位よりも強い傾向がみられたが、物質 B には差異はほとんど認められなかった。一方、オーキシン活性は、玄米部位の Rf 0.5-0.6 にのみ認められ、穎部位には検出されなかった。

つぎに、Ketaktara の休眠種子の穎、胚乳および胚部位のアベナ伸長テストによる検定の結果を Fig. 9 のヒストグラムに示した。伸長抑制物質の物質 A と物質 B はいずれの部位にも存在し、それらの活性に大きな差異は認められなかった。一方、オーキシン活性は、胚乳および胚にのみ認められ、前述の Hadsaduri と同様に穎には存在しなかった。そして、オーキシン活性は胚乳できわめて大きく、胚では小さかった。

以上の結果は、休眠種子内生の発芽抑制物質が穎のみに存在するものでなく、胚乳および胚にも存在する

ことを明瞭にするとともに、種子 1 粒を基準としてみた場合、各部位に内生する発芽抑制物質量はほぼ等量であることを示したものと見えよう。従って、前述の穎、胚乳、および胚の重量比を考慮すれば、発芽抑制物質の濃度は胚でもっとも高く、穎が中間で胚乳で低い傾向にあることが推定された。

考 察

稲種子の休眠が脱穎によって効果的に打破されることから、休眠機構に関するこれまでの報告^{40,41,49,50,69} は、穎の発芽抑制物質によって解析しようとする傾向が強かった。高橋⁶⁹ は、レタスの発芽試験により稲種子の発芽抑制物質が穎とぬかの両部位に存在することを認め、量的には穎内に強く局在するとし、穎の発芽抑制物質の量とその種子外への浸出の難易によって、種子の休眠程度、つまり発芽率の高低が決定されるものと推定した。

一方、Soundheimer⁶⁶ はトネリコの 1 種 *Fraxinus americana* の種子で、その休眠の要因物質である ABA は種子の全組織に存在し、休眠解除において果皮内の ABA よりもむしろ種子内の ABA の減少が重要な役割をはたしていると報告している。また、高橋⁶⁸、雨宮¹、池橋²⁴ は稲種子の休眠性の遺伝学的研究において、胚内要因が休眠性に関与すること、Roberts⁵⁷、太田⁵³ は包被組織の加傷による休眠打破において、加傷部位が胚に接近するほど有効であることを認め、さらに池田²³ は、除穎した玄米の水中発芽において、休眠種子と休眠覚せい種子とでは発芽率に差異のあることを認めている。以上の諸報告はいずれも、休眠性の要因が穎以外にも存在することを示唆したものと見えるが、実際に物質的な定量を行ったものではなかった。

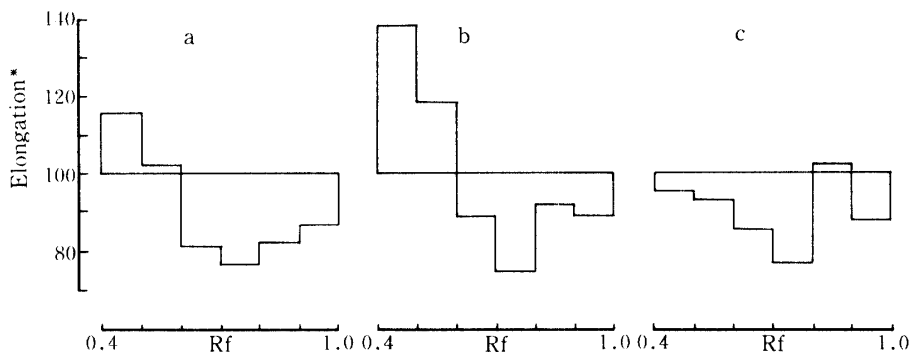


Fig. 9 a, b, and c. Histograms representing the *Avena* straight growth test of acidic fraction of extract obtained from embryo, endosperm, and hull in the variety Ketaktara. Histograms: a; embryo, b; endosperm, and c; hull, respectively.

*Relative length of *Avena* coleoptile for control (=100).

本実験においては、休眠種子を穎、胚乳および胚の3部位に分けて、物質Aと物質Bをアベナ伸長テストにより検定したところ、いずれの部位にも両物質が内生し、それらの活性が全器官でほぼ同程度であったことから、休眠性の要因物質は穎のみでなく胚乳と胚にも存在することを明確にした¹⁵⁾。また、濃度的にみて、生長器官である胚でもっとも高濃度であると推定されたことは、非常に興味あることといえよう。いずれにしろ、脱穎による休眠打破現象に対する理解は、単に穎に存在する発芽抑制物質の除去によるものではなく、玄米中に含まれる発芽抑制物質の不活性化に言及しなければならないのであって、この点については後章の実験で検討することとした。

一方、オーキシンが生長促進作用を有することは良く知られた事実であり、過去には、オーキシンレベルによって休眠現象が説明されていた⁶⁵⁾。しかし、ABAやGAなどの生理作用が明らかにされるにつれて、休眠現象はABAやGAレベルによって説明される場合が多く³⁸⁾、現段階では、オーキシンの作用性はそれほど重要視されていない。しかし、桑の冬芽を用いて八尋⁷⁵⁾が指摘したように、休眠解除機構に発芽抑制物質の不活性化とオーキシンの活性化が関与する可能性があるため、オーキシンの消長については、更に次章で検討することとした。

第4章 自然条件下での休眠覚せいに伴う発芽抑制物質およびオーキシンの消長

Wareingら^{7, 55, 62)}は *Acer pseudoplatanus* の頂芽や葉に含まれる生長抑制物質の季節的変化を生物検定し、その頂芽の休眠の誘起並びに解除と密接に関係する生長抑制物質の存在を推定し、その生理機能を明瞭にした。このことから、その頂芽の休眠の主要因であるABAが発見された。一方、稲種子に関する過去の報告^{23, 40, 49, 53, 69, 71)}は、品種のもつ休眠性程度の差異と発芽抑制物質の活性との関係については論じているものの、実際の休眠覚せい過程において、それらの物質の消長を追跡した報告はほとんどみられない。

そこで、本実験は、まず前章で述べた休眠の要因物質と考えられる物質Aと物質B並びに生長促進物質であるオーキシンが休眠覚せい現象に伴ってどのように変化するかについて、アベナ伸長テストによって調査した。つぎに、標品ABAを用いて、その0.001 mg/l~5 mg/l濃度範囲内の5段階濃度液が、剝離胚の発芽に及ぼす抑制作用力を検定したところ、剝離胚の発芽によって、ABAの 10^{-1} mg/lの濃度間の発芽

抑制力の差異を検出しようとする定量的な検定法を確立しえた。そこで、この検定法を用いて、同一品種で休眠程度を異にする種子に内生する物質Aと物質Bを定量的に測定して、休眠覚せい過程と発芽抑制物質並びにオーキシンの消長との関係を解析したものである。

第1節 休眠覚せい過程における伸長抑制物質の消長

材料と方法

1971年には、水田で栽培された強休眠性の Hadsaduri を用い、1972年には、休眠性の強い Ketaktara, Hadsaduri と弱い農林48号, Gendjah の4品種を用い、それぞれの種子の休眠覚せいの推移と伸長抑制物質の活性の消長との関係をアベナ伸長テストによって検定した。

1971年の Hadsaduri では、開花後20, 30, 45, 52, 68および87日目の種子10gを穎と玄米の2部分に分け、1972年の4品種では、開花後20日目より休眠覚せい終了までの間に各品種とも数回ずつ粃種子10gを用いて、第2章第1節の方法に従って、酸性分画の物質Aについて生物検定を行った。一方、検定に供した種子の休眠覚せいの推移を知るために、開花後20日目より、10日毎にそれぞれの種子の発芽試験(1区50粒, 2区制)を行った。その発芽試験法は、滅菌した200mlのフラスコにろ紙を敷き、10mlの滅菌水を入れた床に、80%アルコールで30秒間、つづいて0.2%昇汞水で2分間消毒した種子を置床し、綿栓付ゴム栓を付して、30°C恒温器内に置き、毎日の発芽率を測定した。

結 果

1971年の Hadsaduri 種子の発芽率の推移を Table 2 に示した。種子は開花後40日目まで全く発芽せず、深い休眠状態にあった。50日目より休眠が覚せいし始めたが、その発芽率は13%にすぎず、60日目30%、70日目81%と徐々に休眠が覚せいした。これらの種子の玄

Table 2. Relations between the transition of the seed dormancy and the aging of seeds after flowering in variety Hadsaduri, as shown by germination percentage for 10 days after sowing

| Days after flowering | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Germination percentage | 0 | 0 | 0 | 13 | 32 | 81 | 96 |

米および穎の抽出物のアベナ伸長テストの結果をそれぞれ Fig. 10 および Fig. 11 に示した。

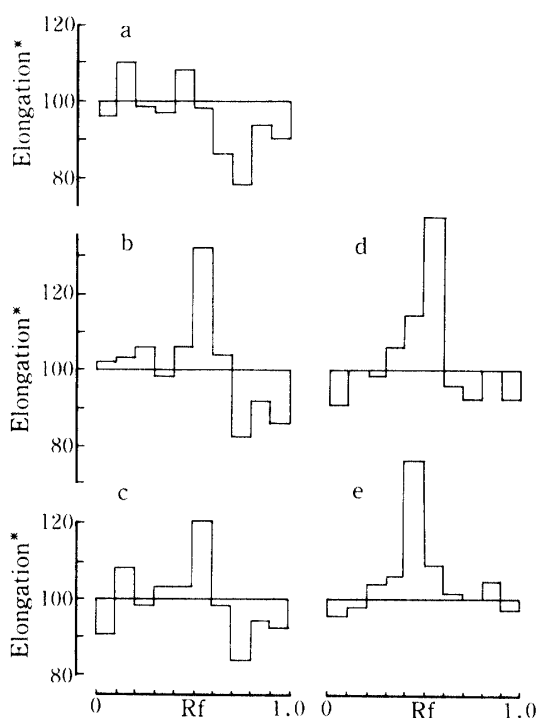


Fig. 10 a,b,c,d, and e. Histograms representing the Avena straight growth test of the acidic fraction of extract obtained from the husked seeds in the variety Hadsaduri. Histograms: a; 20 days, b; 30 days, c; 45 days, d; 52 days, and e; 68 days after flowering, respectively. *Relative length of Avena coleoptile for control (=100).

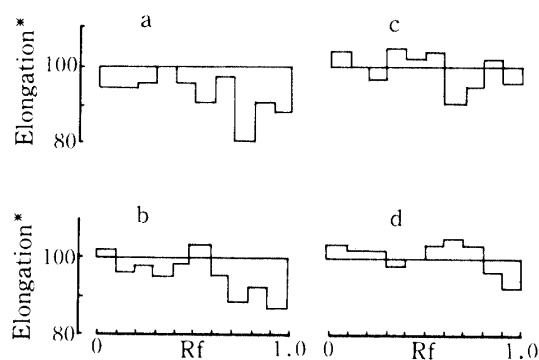


Fig. 11 a,b,c, and d. Histograms representing the Avena straight growth test of the acidic fraction of extracts obtained from hull of seeds in the variety Hadsaduri. Histograms: a; 30 days, b; 45 days, c; 52 days, and d; 87 days after flowering, respectively. *Relative length of Avena coleoptile for control (=100).

休眠種子の玄米と穎に検出された伸長抑制物質はいずれも物質 A および物質 B であり、しかもこれらの物質の変化の様相は両部位で全く同一の傾向が認められた。まず、物質 A 活性は、20日目の種子でもっとも強く、開花後日数の増加に伴ってやや低下し、休眠が覚せいし始める52日目には活性が急激に低下し、休眠覚せい終了期の68日目では、ほとんど検出されなかった。つぎに、物質 B 活性も休眠覚せいに伴って徐々に低下し、休眠覚せい終了期にはきわめて微弱な活性が検出されたにすぎなかった。このように、物質 A および物質 B の活性はいずれも休眠覚せいに伴って低下するという関係があり、Table. 2 に示した種子の発芽率と関連した場合に、これらの物質の変化が休眠覚せいの推移と密接に符合しているといえる。

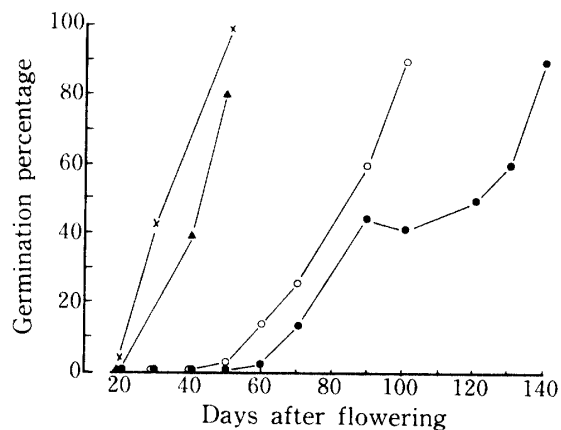


Fig. 12. Relations between the transition of the seed dormancy and the aging of seeds after flowering in 4 varieties, —×—; Norin No. 48, —▲—; Gendjah, —○—; Hadsaduri, and —●—; Ketaktara.

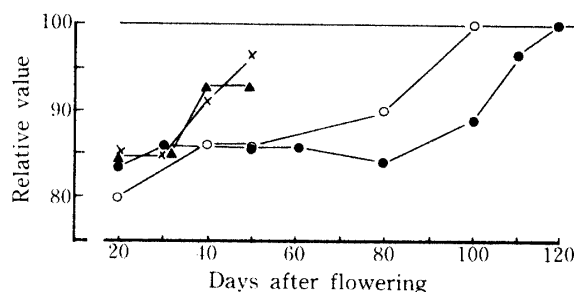


Fig. 13. Relative amount of inhibitor-A eluted from Rf 0.6-0.8 on chromatogram of the acidic fraction of extracts of seed in 4 varieties. Varieties: —×—; Norin No. 48, —▲—; Gendjah, —○—; Hadsaduri, and —●—; Ketaktara. Relative values of elongation of Avena coleoptile for the control (=100).

1972年の4品種における発芽率の推移を Fig. 12 に、また物質 A 活性の変化をコントロール（試料を含まない検液）に対する相対指数で Fig. 13 に示した。

Fig. 12 と Fig. 13 を対比すると、休眠性の弱い農林48号と Gendjah では、両品種とも発芽率は開花後30日目以降に急激な増大を示す。これに対して物質 A 活性はほぼ同時期に急激な低下を示し、発芽の推移と物質 A 活性の低下はよく符合した。つぎに、休眠性の強い Ketaktara と Hadsaduri では、両品種とも開花後50日目までは深い休眠状態にあり、それ以降休眠は徐々に覚せいし、休眠覚せい終了期は Hadsaduri で開花後100日目、Ketaktera で140日目であった。一方、物質 A 活性は深い休眠状態にある期間は共に強く、休眠が覚せいし始めると物質 A 活性も低下し始め、休眠覚せい終了期には物質 A 活性は検出されなかった。

以上のように、全品種において、種子の休眠覚せいの推移と物質 A 活性の消長との間に相当に密接な関係が認められたことから、稲種子の休眠覚せい現象は種子内生の伸長抑制物質の活性の低下によって支配されるものと推定した。

第2節 稲の剝離胚の発芽による ABA の発芽抑制力の検定

材料と方法

標品 ABA の0, 0.002, 0.02, 0.2, 2 および 10 ppm 溶液をそれぞれミリポアフィルターで滅菌して、それぞれの1ml を試料として、第2章第2節の方法にしたがって試料を培地に加え、検液の ABA 濃度を0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 および 5 ppm とした。これに前年度収穫し、室温条件下に翌春まで貯蔵して、完全に休眠の覚せいした Hadsaduri 種子の剝離胚を置床し、25°C±0.5°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。実験は6反復とした。

結 果

5段階の濃度の ABA 水溶液を加えた培地に置床した剝離胚の発芽率を置床後の日数別に Fig. 14 に示し、それらの発芽率の平均値を Table 3 に示した。

まず、置床後2日間における発芽の状況を見ると対照区 (ABA 0 ppm) の発芽率が26%であったのに対して、ABA の低濃度の 0.001 および 0.01 ppm 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、それぞれの差には

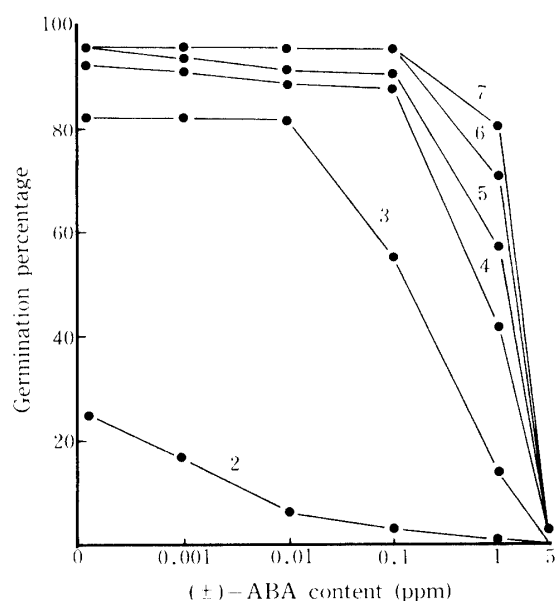


Fig. 14. The quantitative assay of (+)-ABA by means of germination of the excised embryos of rice seeds. The figures against the graph indicate the days after sowing. The method consisted of the every day counting of germination percent, during the 2nd day to the 7th day after sowing of the excised embryos on the culture media containing ABA.

10%水準で有意性が認められた。そして、対照区の発芽率と0.01 ppm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、濃度間においては、0.001 ppmでの発芽率と0.1 ppm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5 ppmでのそれとの間に明確な差異が認められた。0.1 ppmと5 ppmにおける発芽率の差は極めてわずかであったが、10%水準で有意性が認められた。しかし、0.01 ppmと0.1 ppm, 0.1 ppmと1 ppm, 1 ppmと5 ppmとの間の発芽抑制度の差異は置床後2日間の発芽率で判定できなかった。

置床後3日間の発芽状況を見ると、0.001 および 0.01 ppm の発芽率と対照区のそれとの間にはほとんど差異はなかったが、0.1 ppm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日間では差異を判定できなかった0.01 ppmと0.1 ppm, 0.1 ppmと1 および 5 ppm並びに1 ppmと5 ppmと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日間になると、0.1 ppm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、

Table 3. Significant difference of mean germination percentage between ABA contents in Fig. 14, as shown by germination percentage of the excised embryos

| | | ABA content (ppm) | | | | | |
|-------------------|---|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | | 0 | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | 5 |
| | | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| Days after sowing | 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 the same day after sowing followed by the same letter are not significantly different at the 5% level. The comparisons of 0ppm v.s. 0.001ppm and 0.001ppm v.s. 0.01ppm on 2 days after sowing are significantly different at the 10% level.

0.1ppm と 1 および 5ppm, また 1ppm と 5ppm のそれぞれの濃度間差は置床後 3 日間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 日間以降も認められ、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 の発芽抑制作用の定量的検定にきわめて有効であることが認められた。そして、検出する ABA 濃度の範囲はきわめて広く、低濃度においては置床後 2 日間で、0.01ppm 以上の ABA 濃度では置床後 3 日間および 4 日間の発芽率で各濃度間の発芽抑制力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 1ppm 以下であれば 10^{-1} ppm 濃度間の発芽抑制力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。そこで、この方法を発芽抑制度の検定に適用することとした。

第 3 節 休眠覚せい過程における発芽抑制物質の消長

材料と方法

1975年に、強休眠性の Hadsaduri をポット栽培し、出穂期を同じくする穂にラベルを付し、ラベルした種子の平均水分含量が20%に達した時を完熟期として収穫し、室温条件下に置いた。そして、収穫時の休眠種子(発芽率0%)、収穫後30日を経過した休眠覚せい中の種子(発芽率33%)および90日を経過した休眠終了種子(発芽率98%)に内生する発芽抑制物質(物質 A と物質 B)の量を前節の剝離胚による発芽テストによって検定した。実験は6反復とした。抽出材料として種子 40g を用い、第 2 章第 1 節の方法にしたがって、得られた酸性分画のクロマトグラムの Rf

0.6-0.8 と Rf 0.9-1.0 の 2 部位について、2ml の水で溶出(1 昼夜, 5°C)し、ミリポアフィルターで滅菌して、そのうちの 1ml を試料とした。

結 果

Hadsaduri の休眠程度に差のある種子に内生する物質 A と物質 B の発芽抑制力の差異を剝離胚の発芽率でみたのが Table 4 である。

まず、置床後 2 日間の胚の発芽率をみると、収穫時の種子(休眠種子)、収穫後30日目の種子(休眠覚せい中の種子)および90日目の種子(休眠終了種子)から得られた物質 A 添加による剝離胚の発芽率は、それぞれ0%、1%および8%であり、無添加の対照の26%に対して何れも抑制効果が明瞭であった。一方、物質 A 添加区内にも差異がみられ、休眠種子と休眠覚せい中の種子との間には差がなく、休眠終了種子では、前 2 者に対して高率でそれらの差は5%水準で有意であった。

つぎに、置床後 3 日間の胚の発芽率をみると、休眠種子 25%、休眠覚せい中の種子 51%、休眠終了種子 85%であり、3 者間のいずれにも明瞭な差が認められたことから、休眠種子よりも休眠覚せい中の種子で物質 A 量が減少していることがわかる。また、休眠終了種子では、対照の発芽率89%とほとんど差がなかったことから、休眠終了種子の物質 A 量はかなり微量であることが示された。

一方、物質 B については、置床後 2 日間の胚の発芽率は、休眠種子 10%、休眠覚せい中の種子 18%、休眠終了種子 26%であり、3 者間のいずれにも明瞭な差が認められたことから、物質 B 量についても休眠種子にもっとも多く、休眠覚せい中の種子ではやや減少していること、また、休眠終了種子では、対照の26%と同率で、物質 B はほとんど存在しないことが

Table 4. Comparison of levels of the endogenous germination inhibitors in seed differing in the degree of dormancy, as shown by germination percentage of the excised embryos

| The degree of seed dormancy | | Germination inhibitor | | | | | | |
|-----------------------------|---|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| | | A | | | B | | | Non |
| | | strong | weak | non-dormant | strong | weak | non-dormant | cont. |
| | | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| 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: The excised embryo culture method consisted of the every-day-counting germination percent, during the 2nd day to the 4th day after sowing of the excised embryos on the culture media containing inhibitors. Germination inhibitor A and B were eluted from Rf 0.6–0.8 and 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.

わかった。

物質 A と物質 B の発芽抑制力を休眠種子で比較すると、置床後 2 日間の両者の発芽率に明瞭な差が認められ、物質 A が低率であり、さらに、置床後 3 日間でも物質 A の発芽抑制力が検出されたのに反して、物質 B では検出されなかったことから、物質 A は物質 B よりも発芽抑制力がかなり強いことが明瞭であった。

以上の結果から、剝離胚の発芽率で検定した場合に、休眠覚せい進行に伴って、種子内生の発芽抑制物質量が減少するという関係が存在することがわかった。換言すれば、種子内生の発芽抑制物質量の減少程度によって種子の休眠程度が決定されるといえよう。

また、物質 A と物質 B を比べた場合に、物質 A の減少が休眠覚せいの主体となることが明らかとなった。

第 4 節 休眠覚せい過程におけるオーキシンの消長

材料と方法

休眠性程度の異なる農林 48 号、Kumari、Hadsaduri および Ketaktara の 4 品種をポット栽培し、それらの種子を開花後 20 日目より休眠覚せい期までの期間に数回ずつ、種子に内生するオーキシン活性をアベナ伸長テストによって検定した。なお、種子は開花後 40 日目に収穫し、室温条件下に貯蔵した。

粃種子 10g を用いて、第 2 章第 1 節の方法にしたがって得られた酸性分画のクロマトグラムの Rf 0.4–0.6 を 2ml の 2% 蔗糖水溶液で溶出（一昼夜、5℃）し、そのうちの 1ml を検液として、アベナ伸長

テストによる検定を行った。なお、本実験においては、オーキシン活性の変化をより効果的に検出するために、幼葉鞘切片の伸長の測定を常法の 20 時間後から 12 時間後に変更した。

結 果

種子の発芽率の推移を Fig. 15 に、またオーキシンの活性の変化を Fig. 16 に示した。

休眠性の弱い農林 48 号と Kumari においては、休眠覚せい開始は農林 48 号が早く Kumari でやや遅れたが、両者とも発芽率はほぼ直線的に増大した。これに対して、休眠性の強い Ketaktara と Hadsaduri では、前 2 者よりも休眠覚せい開始は遅れ、その覚せい速度も緩慢であり、4 品種の休眠期間には明瞭な差異があったにもかかわらず、Fig. 16 のオーキシンの活

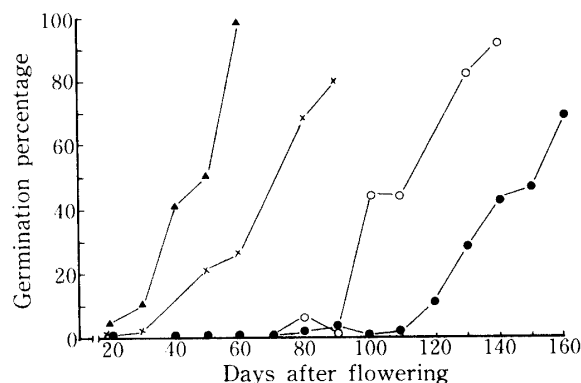


Fig. 15. Relations between the transition of the seed dormancy and the aging of seeds after flowering in varieties, —x—; Kumari, —▲—; Norin No. 48, —○—; Hadsaduri, and —●—; Ketaktara.

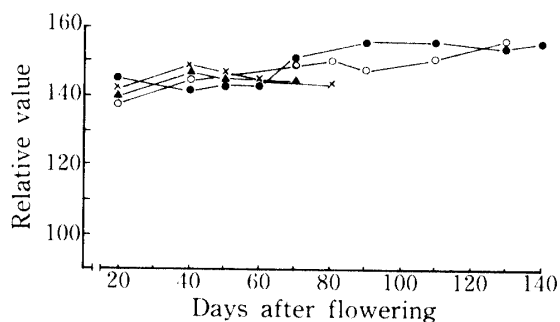


Fig. 16. Relative amount of auxin eluted from Rf 0.4-0.6 on chromatogram of the acidic fraction of extracts of seeds of 4 varieties. Varieties: —×—; Kumari, —▲—; Norin No. 48, —○—; Hadsaduri, and —●—; Ketaktara. Relative values of elongation of *Avena* coleoptile for the control (=100).

性は、いずれの種子のどの段階でも、伸長指数140~160とほぼ一定であった。

このように、オーキシン活性には第1節で認められた休眠の推移に伴って、伸長抑制物質の活性が変化するというような関係 (Fig. 12, Fig. 13) はほとんど認められなかったため、オーキシンは休眠覚せい現象に対して直接的な要因でないと推定した。

第5節 考 察

稲種子の休眠性と発芽抑制物質との関係に関する過去の研究報告^{23, 40, 41, 49-53, 69-71}は、おもにある一時期の種子の休眠程度の差を穎に内生する発芽抑制物質の差異によって説明しようとする傾向が強く、休眠覚せい現象と内生の発芽抑制物質の消長との関係についての報告はほとんどみられず、休眠覚せい過程における種子体内での物質の生理作用については不明確な点が多かった。

前章において、稲種子の休眠現象に関与すると考えられる発芽抑制物質として、物質A (ABA) と物質Bを推定し、それらが穎のみならず胚乳および胚にも存在することを明確にした¹⁵。そこで、カエデの頂芽の休眠について行った Wareing ら⁵⁵の例にならって、著者^{13, 14}は稲種子の休眠覚せい過程と発芽抑制物質の消長との関係を経時的に調べることにより、前述の物質が稲種子の休眠現象に対する真の要因であることを一歩進めて証明しようと試みた。まず、穎と玄米に内生する物質Aと物質Bの活性が休眠の覚せいに伴ってともに低下するという関係を認め、また、主要因であると考えられる物質Aは、休眠性程度の異なる

4品種のすべてにおいて、休眠覚せいに伴って活性が平行的に低下するという関係のあることを明確にした¹⁴。しかし、これらの結果はアベナ幼葉鞘切片の伸長による検定から得られるものであり、稲種子の発芽に対する直接的証明とはいえない。一般に過去の多くの報告^{23, 49, 50, 57, 69}をみてもこの点には全くふれられていない。その理由は稲種子の発芽力がありにも旺盛なために微量の発芽抑制物質に対する感度が小で、発芽に対する物質の作用を検出しえなかったものと考えられる。

著者¹⁵は、第3章において生長促進物質のオーキシンの大部分が胚乳に内生していることを明らかにしたことから、胚乳を除去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うるために、微量物質に対する感度が太なるであろうと考えた。そこで、胚培養法³³を用いて、培地に休眠の要因物質と推定されるABAを添加し、発芽率を測定したのである。その結果はTable 3に示したように、剝離胚の発芽は微量物質の作用の検出にきわめて有効であり、置床後日数と発芽率との関係から、発芽抑制物質 (ABA) の量的変化を推定する方法で、その検定可能な(±)-ABAの濃度範囲は0.001mg/l~1mg/lと広く、その感度は 10^{-1} mg/lの濃度間の発芽抑制度の差異を検出しうるものであった。この検出法は、胚乳に存在する生長促進物質の影響を受けない点で、コムギ剝離胚をABA溶液で湿したる紙上に並べて、25°Cで48時間後の幼葉鞘の伸長を測定するMilborrow⁴²の方法に類似するものであり、上述のように、稲種子の剝離胚の発芽によってABAの量的変化を検定しえたことは、稲の休眠種子から得られる微量の発芽抑制物質の抑制作用の検定にきわめて有効であることを示すものであった。

そこで、同一品種で休眠覚せい過程の種子に内生する物質Aと物質Bを剝離胚の発芽によって検定した結果 (Table 4) は、種子の休眠覚せいが進行するほど内生の物質量が減少するという関係を明瞭にした。

かつて高橋の報告^{69, 70}は、休眠性の程度が穎に含まれる発芽抑制物質の量とその穎外への浸出の難易の2要因によって決定されると推定したが、これは、本実験が穎のみならず胚乳、胚を含めた種子内生の発芽抑制物質によって解釈しうることを示している点で全く異なるものであり、後述する種子体内での発芽抑制物質の不活性化機構の研究の必要性を示唆するものであった。

また、第3節の供試材料の量は40gであり、これ

より得られた物質 A の発芽抑制作用は置床後 4 日目以降なくなったが、第 2 節で (±)-ABA 5mg/l で 97% の種子に休眠状態が誘起されたことはきわめて興味深く、休眠の解除のみでなく誘起も発芽抑制物質質量によって支配されると推定される。

剝離胚の発芽に対して、第 2 章第 2 節の結果と同様に、物質 A は物質 B よりも強い抑制力を有したことから、休眠現象の要因物質の主体であると推定される。また、アベナ伸長テストの結果では、物質 A と物質 B の活性はほぼ同等に検出され、休眠覚せいに伴って同様に低下したのに対し、剝離胚の発芽テストでは、物質 B の活性は休眠覚せいの初期段階で著しく低下し、物質 A との間には大きな差異が認められた。このように、両物質の作用がアベナの伸長と稲の発芽とで異なったことから、従来のアベナ伸長などに対する抑制作用の検定結果をそのまま発芽に適用することには問題があろう。

一方、オーキシンの活性は、発芽抑制物質の活性の消長の様相とは異なり、休眠覚せい過程を通じてほぼ一定であったことから、第 2 章第 2 節の結果に示されたような発芽に対する物質 A の抑制力を弱めるといったような相互作用はあるとしても、休眠覚せい現象に直接的に関与するものではないと推定される。

第 5 章 人為的休眠解除に関する研究

種子の休眠が脱穎や果皮、種皮を含む包被組織の刺傷処理によって打破される場合に、硬実種子でないものでは、水分の透過性の促進よりもむしろガスの透過性の促進に起因すると考えるのが一般的である^{45, 46)}。稲種子においても Roberts⁵⁷⁾ は外穎の全部または部分的な除去によって休眠が打破されることを認め、また池田²³⁾ は果皮、種皮の除去によって発芽が促進されることを認めて、両者はその休眠性が包被組織の酸素透過に対する障害に起因すると報告している。そして、その休眠解除現象について、Roberts^{59, 61)} は種子内で起こるある種の酸化反応に依存するという仮説をたて、現象を生化学的に解釈している。

一方、種子の休眠の要因として包被組織に存在する発芽抑制物質が発見されて以来、脱穎による休眠解除は、穎の発芽抑制物質の機械的な除去に起因すると考えられる場合が多い^{45, 65)}。稲種子においても穎に発芽抑制物質の存在が確認され^{13-15, 17, 23, 40, 49, 69, 71, 77)}、高橋^{69, 70)} が穎内生の発芽抑制物質の種子外への透過を主眼にしたように、休眠解除現象を物理的なものと解釈する傾向がみられた。

著者^{13-15, 17)} は休眠の要因物質の物質 A と物質 B は穎、胚乳および胚に内生すること (第 3 章)、さらに、休眠覚せい現象が内生の発芽抑制物質質量の減少によって誘起されること (第 4 章) を明らかにしたことから、休眠解除現象は内生の発芽抑制物質の酸化的不活性化によって誘起されるという視点から研究を進めた。

本章ではまず最初に、従来認められてきた休眠打破に対する高温の効果は、前処理としての種子の吸水によって著しく促進されることを明らかにした。第 2 に休眠解除に及ぼす酸素分圧の効果について検討し、高酸素分圧条件下に種子を置床すると休眠解除が促進されることを明らかにした。

以上の結果に基づいて、第 3 に高温、水分、酸素の外的要因が内的要因である種子内生の発芽抑制物質の不活性化とどのような関係をもっているかを検討した。その中で、高温は種子の包被組織の変性を伴う物理的效果を主体とするものであらうと示唆された。そこで、第 4 に種子の穎組織の微細構造について走査電顕下での観察を行ったものである。

第 1 節 高温、吸水が休眠打破に及ぼす効果

材料と方法

実験 1 種子の浸水時間とその後の貯蔵温度が発芽に及ぼす影響

強休眠性の Ketaktara の種子をあらかじめ 25°C の水に 12, 24 および 48 時間浸漬し、附着水をろ紙で除いたのち、それぞれの種子を 1×10 cm の密封管瓶に詰め、35, 40 および 45°C に 0, 1, 2, 3, 5 および 7 日間貯蔵する計 54 処理を行い、常法の発芽試験によって、休眠打破の程度を測定した。

供試種子は 1 処理区あたり 50 粒を用い、各処理区とも 2 反復とした。なお、処理に伴う種子の水分含量の測定は 105°C で 24 時間乾燥後に行った。

つぎに、上記の実験で得られた結果は、飽和含水率の種子を 40°C に貯蔵するのがもっとも有効であることを示した。そこで、水温を 30, 35 および 40°C とし、これに 24 および 48 時間浸漬した吸水種子を 40°C に 1, 3, 5 および 7 日間貯蔵する計 24 処理について、休眠打破の程度を発芽試験によって測定した。

実験 2 吸水、高温処理効果の品種間差異

休眠性程度の強い Hadsaduri, Russian-120, 中程度の Gendjah, Peta 23, 弱い Assam IV, Russian 26 の 6 品種の種子のそれぞれについて、30°C の水に 24 時間

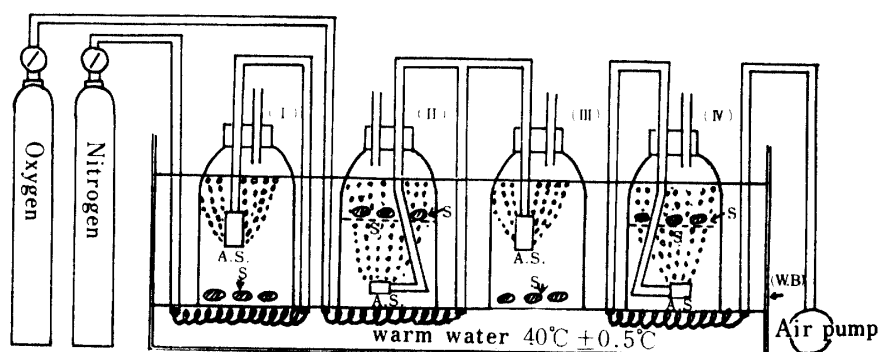


Fig. 17. Apparatus for supplying oxygen to seeds during 40°C hot-water treatment. (I); nitrogen was continuously blown into water to block up the dissolving of new oxygen (control plot), (II); oxygen was continuously blown into water and then contacted immediately to seeds (contact oxygen plot), (III); oxygen was continuously blown into water but was not contacted to seeds (saturate dissolved-oxygen plot), and (IV); air was continuously blown into water and then contacted to seeds (aeration plot). S; seed, A.S.; air stone, W.B.; warm bath. The gases were continuously blown from aerosol bomb and were warmed by being made to pass through warm water thermostatically controlled at 40°C ± 0.5°C.

浸漬した吸水種子を 40°C に 0, 1, 2 および 3 日間貯蔵する処理を行い、休眠打破の程度を発芽試験によって測定した。

実験 3 温湯処理が発芽率に及ぼす影響

強休眠性の Ketaktara の種子を 40°C の温湯中に 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 120 および 168 時間浸漬処理し、処理種子の休眠打破の程度を発芽試験によって測定した。

供試種子は 1 処理区あたり 50 粒を用い、1.3 × 40 cm の試験管に入れて、これに 80 ml の水を加え、40°C の恒温水槽中に置く処理を 2 反復した。

つぎに、上記の実験で得られた結果を実験 1 の結果と対比したとき、休眠打破に何らかの形で酸素供給の多少が関与しているのではないかと考えられたので、温湯処理中の種子に酸素を供給し、酸素濃度が休眠打破に及ぼす影響を処理種子の発芽試験によって測定した。

酸素供給装置の概要を Fig. 17 に示した。4 個の 3.5 l の広口瓶にそれぞれ 3 l の水を入れて、40°C の恒温水槽中に置き、恒温水槽と瓶中の両水面を同位置に保ち、瓶中の温度を 40°C に保った。つぎに、瓶中に送入するガスによる温度の低下を防ぐために、ガス送入の各トラップのゴム管を 7 m ほど恒温水槽中に置き、ガスを加温して送入し、全ての瓶中の温度を 40°C に保った。

Fig. 17 において、(I) は用器の底部に種子を置き、中間部にエアーストンをつるし、ポンベより窒素ガスを送入して、水に新たに酸素が溶解するのを阻止する

対照区、(II) は用器の中間部に種子を置き、底部にエアーストンを置き、ポンベより酸素ガスを送入して、水中の溶存酸素量を飽和に保つと同時に種子に直接酸素を接触させる酸素接触区、(III) は (I) と同じセットで、これに酸素ガスを送入して、水中の溶存酸素量を飽和に保つ溶存酸素飽和区とした。さらに、(IV) は (II) と同じセットで、これにエアープンプで空気を送入して、種子に空気を接触させる通气区とした。

種子を対照区 (I) の用器に入れて 40°C 温湯浸漬を行い、浸漬開始から 24, 48 および 72 時間後にそれぞれ酸素接触区 (II)、溶存酸素飽和区 (III) の用器に移して、24 時間ごとに発芽試験を行った。なお、供試種子は 1 処理区あたり 50 粒とした。一方、通气区 (IV) の用器には種子 700 粒を置き、24 時間ごとに 100 粒をとり出し、7 日間にわたり発芽試験によって休眠打破の程度を測定した。

結 果

実験 1 種子の浸水時間とその後の貯蔵温度が発芽率に及ぼす影響

25°C で吸水した種子の水分含量とその後の貯蔵条件の差異による水分含量の変化をみたのが Table 5 である。あらかじめ 25°C で 12, 24 および 48 時間浸水した種子の水分含量は、それぞれ 25, 27 および 28% であり、処理時間差による含水率の差異はそれほど大ではなかった。貯蔵期間中は密封用器に入れたにもかかわらず、種子の含水率はやや低下し、その低下は 5% 以内であったが、貯蔵期間が長いほど、また、浸

Table 5. Moisture contents of seeds after storage at 35, 40, and 45°C for 1 to 7 days following soaking in water at 25°C for 12, 24, and 48 hours in variety Ketaktara

| Soaked for Moisture content after soaking Storage temp. °C | 12 hours | | | 24 hours | | | 48 hours | | |
|---|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|-----|-----|
| | 25% | | | 27% | | | 28% | | |
| | 35 | 40 | 45 | 35 | 40 | 45 | 35 | 40 | 45 |
| | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| Days of storage | 1 | 24 | 24 | 25 | 25 | 25 | 29 | 27 | 28 |
| | 2 | 24 | 23 | 23 | 25 | 25 | 24 | 28 | 27 |
| | 3 | 23 | 24 | 23 | 26 | 24 | 24 | 28 | 27 |
| | 5 | 23 | 23 | 22 | 24 | 24 | 24 | 27 | 27 |
| | 7 | 24 | 21 | 21 | 25 | 22 | 24 | 27 | 27 |

Note: The imbibed seeds were placed into the sealed glass tubes following the removal of the surface-water of seeds.

Table 6. Effects of storage temperatures on breaking the dormancy of seeds after presoaking at 25°C for 12, 24, and 48 hours in variety Ketaktara, as shown by the germination percentage of seeds for 7 days after sowing

| Presoaked for Storage temp. °C | 12 hours | | | 24 hours | | | 48 hours | | |
|-----------------------------------|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|-----|-----|
| | 35 | 40 | 45 | 35 | 40 | 45 | 35 | 40 | 45 |
| | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| Days of storage | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 7 | 24 | 69 | 12 | 53 | 86 | 12 | 52 |
| | 2 | 7 | 24 | 70 | 14 | 59 | 72 | 24 | 82 |
| | 3 | 11 | 24 | 88 | 10 | 66 | 68 | 28 | 84 |
| | 5 | 12 | 22 | 88 | 14 | 73 | 68 | 28 | 83 |
| | 7 | 11 | 38 | 86 | 12 | 76 | 57 | 34 | 87 |

水時間が短いほど大となる傾向が認められた。

Table 6 は、25°C で吸水した種子の休眠打破に及ぼす貯蔵の温度および期間の影響をみたものである。貯蔵前の吸水種子の発芽率はいずれも0%で、種子は深い休眠状態にあった。

まず、12時間浸水種子についてみると、45°C 貯蔵した種子の発芽率は、1日間で69%であり、3日間では、すでに88%であった。これに対して、35°C および40°C 貯蔵種子の発芽率は、1日間でそれぞれ7%および24%であり、7日間でも、11%および38%とかなり低率であった。

つぎに、24時間浸水種子では、貯蔵1日間の発芽率は、45°C で86%、40°C で53%、35°C で12%であり、順位は12時間浸水種子と同様であったが、45°C 貯蔵では貯蔵日数の増加に伴って、発芽率が漸減したのに対して、40°C では貯蔵日数の増加に伴って漸増し、7日間貯蔵種子の発芽率は76%であった。一方、35°C 貯蔵では、貯蔵日数の増加は種子の発芽率にほとんど影響を及ぼさなかった。

さらに、48時間浸水種子では、各貯蔵温度区とも最初の1日間の発芽率は、24時間浸水種子のそれらとほ

ぼ同率であり、ここでも貯蔵日数の増加につれて45°C 貯蔵種子の発芽率の漸減傾向と40°C 貯蔵種子の漸増傾向がみられ、とくに2日間の発芽率がすでに82%に達した。また、これまで発芽率の漸増が認められなかった35°C貯蔵種子でも発芽率は漸増し、7日間で34%となったが、これは40°C 貯蔵種子に比べてかなり低率といえる。

以上のように、吸水種子の休眠打破に対する貯蔵効果は高温ほど大であり、前段階の浸水時間が長くなるほどその効果を助長した。そして、45°C 貯蔵では、貯蔵日数の増加が種子の発芽活力の減退を招いたことから、休眠打破にとって40°C 貯蔵がもっとも効果的であることが明らかとなった。

なお、種子の浸水温度を変えて、40°C 貯蔵の休眠打破効果をみたのが Table 7 である。

30, 35 および40°C で24時間浸水した種子の含水率はそれぞれ27, 28および28%であり、浸水の温度および時間の違いによる差異はほとんど認められなかった。これらの種子を40°C 貯蔵すると、30°C 浸水種子の1日間貯蔵で発芽率70%とやや低率であったものの、3日間貯蔵ではほぼ80%であり、他の貯蔵種子の

Table 7. Effects of temperature and duration of the presoaking and duration of storage at 40°C on breaking the dormancy of seeds in variety Ketaktara, as shown by the germination percentage for 7 days after sowing

| Soaked at (°C) | | 30 | | 35 | | 40 | |
|--------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Soaked for (h) | | 24 | 48 | 24 | 48 | 24 | 48 |
| Moisture content after soaking | | 27 | 28 | 28 | 28 | 28 | 28 |
| Days of storage at 40°C | 1 | (%) 70 | (%) 70 | (%) 84 | (%) 81 | (%) 85 | (%) 79 |
| | 3 | 85 | 79 | 86 | 87 | 84 | 85 |
| | 5 | 92 | 82 | 87 | 86 | 84 | 85 |
| | 7 | 92 | 85 | 85 | 90 | 86 | 87 |

Note: Seeds were stored at 40°C for 1 to 7 days following soaking in water at 30, 35, and 40°C for 24 and 48 hours, and the imbibed seeds were placed into the sealed tubes.

発芽率とそれほど大きな差異は認められなかった。

このように、30°C~40°C 浸水では、浸水の温度および時間の差異は発芽率にそれほど大きな影響を及ぼさず、また、40°C 貯蔵日数の長短もそれほど大きな影響を及ぼさなかった。

以上の結果と先述 (Table 6) の 25°C 浸水種子における結果を対比してみると、25°C で24および48時間浸水した種子の含水率と 30°C~40°C で浸水した種子のそれとはほぼ同率であったにもかかわらず、25°C 浸水種子と 30~40°C 浸水種子とでは 40°C 貯蔵による休眠打破効果に差異が認められたことから、種子の浸水中の温度の累積がその後の40°C 貯蔵の休眠打破

Table 8. Effects of duration of storage at 40°C on breaking the dormancy of seeds in 6 varieties differing in the intensity of dormancy, as shown by the germination percentage for 7 days after sowing

| Varieties | Days of storage | | | | Intensity of dormancy |
|-------------|-----------------|----|----|----|-----------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| Hadsaduri | 2 | 99 | 99 | 96 | strong |
| Russian-120 | 2 | 92 | 86 | 71 | strong |
| Gendjah | 10 | 98 | 98 | 96 | moderate |
| Peta-23 | 34 | 84 | 82 | 89 | weak |
| Asam IV | 48 | 96 | 92 | 98 | weak |
| Russian-26 | 95 | 99 | 99 | 92 | non-dormant |

Note: The seeds were soaked in water at 30°C for 24 hours before storage.

Table 9. Effects of soaking in hot-water at 40°C on breaking the dormancy of seeds in variety Ketaktara, as shown by the germination percentage for 7 days after sowing, and percentage of moisture contents of seeds after soaking

| Hours soaked at 40°C | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 24 | 48 | 72 | 120 | 168 |
|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Germination percentage | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 | 10 | 44 | 65 | 65 | 48 | 35 |
| Moisture content (%) | 20 | 23 | 24 | 25 | 26 | 26 | 27 | 29 | 30 | 30 | 30 |

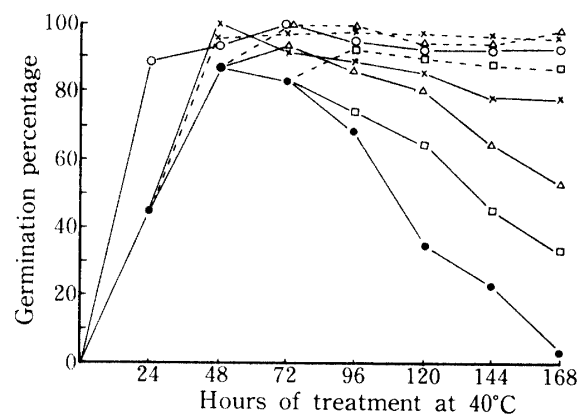


Fig. 18. Effects of oxygen supply on breaking the dormancy of seeds in the case of soaking treatment at 40°C hot-water in the variety Ketaktara (see the apparatus shown in Fig. 17). —●—; control (soaking water blocked up the dissolving new oxygen by continuous supply of nitrogen), —; oxygen was continuously blown in water, and then dissolved oxygen was saturated,; oxygen was continuously blown in water and contacted to seeds. —○—; air was continuously blown in water and contacted to seeds. ×, △, and □; seeds were transferred from control plot to contact oxygen plot and saturate dissolved-oxygen plot after 24, 48, and 72 hours, respectively.

効果に相加されるものと考えられる。

実験2 吸水、高温処理効果の品種間差異

6品種の種子について、40°C貯蔵の休眠打破効果を見たのがTable 8である。同表において、供試種子の休眠程度はHadsaduri, Russian 120は強、Gendjahは中、Peta 23, Assam IVは弱、Russian 26は休眠終了種子であることは0日の発芽率で明らかである。しかし、40°C貯蔵1日間以降には品種間差異はみられず、全品種ともに休眠は打破されていた。

このように、飽和吸水種子(1日吸水種子)を40°Cに貯蔵するときわめて短時間に休眠は打破されたことから、高温処理において、前段階における種子の吸水は高温の休眠打破効果にきわめて促進的な作用を及ぼすことが明らかとなった。

実験3 温湯処理が発芽率に及ぼす影響

40°C温湯処理時間の増加に伴う発芽率の変化を見たのがTable 9である。発芽率は、温湯浸漬時間に比例して増加するが、48時間および72時間で65%と最高値に達し、それ以降は処理時間の増加に伴って低下し、168時間では35%であった。このような40°C温湯処理の発芽障害は、実験1および2の気中での処理では認められなかったことから、気中と水中の酸素濃度の差異によって発生したものと考えられた。そこで、温湯中に酸素を供給して、発芽率の変化を見たのがFig. 18である。

対照区の種子の発芽率は、48時間で86%、72時間で80%と最高値に達し、それ以後は処理時間の増加に伴って低下し、168時間ではわずか3%であった。

つぎに、対照区で24時間処理後に酸素接触区へ移し、処理を継続した種子の移行後24時間および48時間の発芽率は、それぞれ96%および98%と移行時より大きく増加し、また、処理時間の増加に伴う発芽率の低下は認められなかった。一方、溶存酸素飽和区へ移行した種子でも移行後24時間で99%の発芽率であったが、酸素接触区とは少々異なり、処理時間の増加に伴って、発芽率は漸次低下し、168時間処理では75%であった。この低下度は対照区に比して著しく小さく、溶存酸素を飽和に保つことによって、発芽率の低下は大きく阻止された。

さらに、対照区から48時間後に酸素接触区へ移行した種子について、移行後24時間の発芽率は、100%であり以後不変で、24時間後に移行した場合と全く同じであった。これに対して、溶存酸素飽和区へ移行した種子では、24時間後の発芽率は、95%と高率であったが、処理時間の増加に伴って漸減し、168時間処理

Table 10. Germination percentage of seeds germinated during the 40°C hot-water treatment

| Plots* | Hours treated at 40°C hot-water | | | | | | |
|---------|---------------------------------|----|----|----|-----|-----|-----|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 | 168 |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A** | | 0 | 84 | 95 | 98 | 98 | 98 |
| B** | | 0 | 52 | 55 | 67 | 66 | 64 |

Note: * Control was blocked up the melting of new oxygen by continuous insertion of nitrogen in water.

A and B: oxygen was continuously blown in water, A: seeds were contacted with oxygen, B: seeds were not contacted with oxygen (see apparatus of Fig. 17).

** Seeds were transferred from control plot to the respective plots after 24 hours treatment.

で53%で24時間後移行種子よりも低率であった。

対照区から72時間後に酸素接触区へ移行した種子の場合、発芽率は、移行後24時間で95%と高率ではあったが、処理時間の増加に伴ってやや低下する傾向が認められ、168時間処理では85%であった。これに対して溶存酸素飽和区へ移行した種子の場合に、移行後の発芽率の増加は全く認められず、処理時間の増加に伴って低下し、168時間処理では32%であった。

通気区の種子の発芽率をみると、処理開始後24時間ですでに87%と高率であり、72時間で100%に達し、処理時間の増加に伴う発芽率の低下はきわめて微少であった。

なお、Table 10に示すように、酸素接触区では、処理中にはほとんどの種子が発芽したのに対して、酸素量の少ない対照区においては全く発芽が認められなかった。

以上の結果から、温湯処理は種子の休眠をきわめて効果的に打破するが、処理中の酸素不足は著しく休眠打破効果を阻害することが明らかとなった。すなわち、人為的な高温による休眠打破に際して、酸素の供給が平行的に行われなければ、温度の効果は発揮されることがわかった。

第2節 高温、高酸素濃度が休眠打破に及ぼす効果

材料と方法

実験1 置床中の酸素濃度が休眠解除に及ぼす影響
休眠性程度の異なる Gendjah, Hadsaduri および Ketaktara の3品種の収穫種子を風乾して、ポリエチ

レン袋に入れて、室温条件下に貯蔵した。そして、収穫期から休眠終了期まで10日毎に種子を酸素100% (高酸素分圧区) および0% (低酸素分圧区) 並びに空気 (対照区) 条件下に置床して、30°C の恒温器内に置き、10日間にわたって毎日の発芽率を測定した。

置床およびガス充填法; 殺菌した 500ml の三角フラスコにろ紙を敷き、10ml の滅菌水を加え、これに消毒した種子100粒 (2区制) を置床した。このフラスコに活栓付ゴム栓を付し、パラフィンで気密にし、吸引ポンプで排気して活栓を閉じた。そして、高酸素分圧区は酸素ガスボンベ、低酸素分圧区は窒素ガスボンベに連結して、ガスを充填した。なお、置床後2日毎にガスの更新を行った。

実験2 高温、高酸素濃度が発芽率に及ぼす影響

室温条件下に7日間貯蔵した未だ深い休眠状態にあった Hadsaduri 種子 (発芽率0%) と30日間貯蔵した休眠覚せい中の Ketaktara 種子 (発芽率15%) を用いて、これらの乾燥種子を紙袋に入れて、50°C の恒温器内に4日間置く高温処理を行った。この処理種子を3段階の酸素濃度 (酸素100%, 20%, 0%) 条件下に実験1の方法にしたがって置床し、発芽率を測定した。

なお、上記の実験は置床中の酸素の影響をみたものであるが、高温処理中の酸素分圧も関係するかも知れないという観点から、以下のような補足的実験を行った。

Ketaktara の休眠種子 (発芽率0%) を用い、種子を30°C で24時間浸水して、その吸水種子を2個の活栓付フラスコに300粒ずつ入れて、それぞれに酸素20% および0% のガスを充填した。そして、40°C 恒温器内に2日間置く吸水、高温処理を行った。これらの処理種子100粒ずつを先述の方法で3段階の酸素濃度条件下に置床し、発芽率を測定した。なお、酸素濃度はガス混合装置を用いて窒素ガス中の酸素ガス濃度とした。両実験とも3反復した。

結 果

実験1 置床中の酸素濃度が休眠解除に及ぼす影響

休眠種子を3段階の酸素濃度条件下に置床して、休眠解除に及ぼす酸素の影響を収穫後日数との関連においてみたのが Fig. 19 である。

休眠性弱の Gendjah 種子においては、高酸素分圧区の発芽率は、いずれの段階においても対照区の発芽率よりもやや優れたものの、その差は小であった。一方、低酸素分圧区では、前2者に比して発芽率は低率で、約10日間の遅れがみられた。

休眠性が中の Hadsaduri 種子においては、対照区では収穫後10日目より休眠が解除し始め、その後発芽率は徐々に増大し、80日目に60%、100日目に78%と休眠が解除したのに対して、高酸素分圧区では収穫直後に20%で、以後収穫後日数に応じて発芽率を増加し、30日目には80%と休眠が解除し、休眠解除までの期間

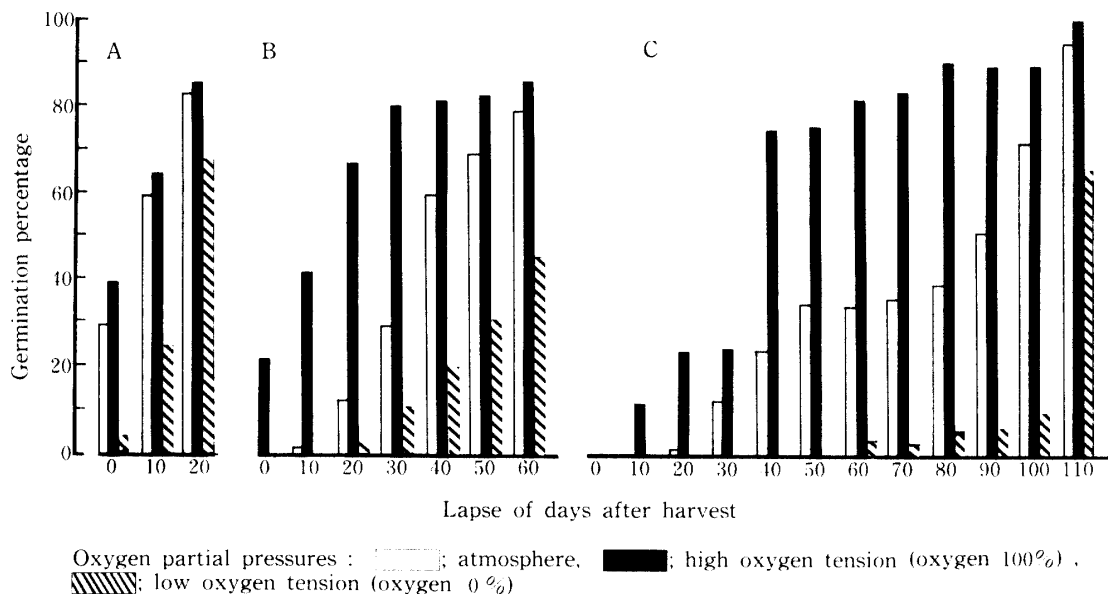


Fig. 19. The effects of oxygen partial pressure under the condition of sowing on the release of the seed dormancy in varieties, A; Gendjah, B; Hadsaduri, and C; Ketaktara. Germination test was made at 30°C for 10 days.

は対照区よりも著しく短縮された。一方、低酸素分圧区では、収穫後20日目より休眠は解除し始めたものの、60日間を経過しても45%とかなり低率であった。このように、休眠解除に対して、高酸素分圧は促進、低酸素分圧は抑制の作用を示したが、その程度はいずれも休眠性弱の Gendjah よりも大であった。

休眠性強の Ketaktara 種子においては、対照区の種子の休眠解除は収穫後20日目より開始されたが、その後の速度はきわめて遅く、50%の休眠解除に達するのに90日間を要し、100日目に72%、110日目に94%と推移した。これに対して、高酸素分圧区では、対照区よりも10日間早く休眠解除し始め、20日目に24%、40日目にはすでに74%の種子が休眠解除し、60日目には81%と推移し、対照区に比して著しく休眠期間を短縮した。

他方、低酸素分圧区では、長期間にわたって休眠解除は認められず、収穫後の60日間を経過して初めて休眠が解除し始めたものの、100日目でも発芽率は9%にすぎなかった。しかし、対照区の種子の休眠がほぼ完全に解除された110日目には、低酸素分圧区の種子の休眠も65%解除された。このように、高酸素分圧の促進作用および低酸素分圧の抑制作用の程度は Hadsaduri 種子におけるそれらの作用よりも大であった。

以上の結果から酸素は休眠解除にきわめて顕著な影響を及ぼし、休眠解除に対する促進および抑制の程度は品種のもつ休眠性の強弱並びに種子の休眠程度の深浅に対応して変化することが明らかとなった。

実験2 高温、高酸素濃度が発芽に及ぼす影響

高温処理した乾燥種子を3段階の酸素分圧条件下に置床した種子の発芽率を Table 11 に示した。

深い休眠状態にあった Hadsaduri 種子（発芽率0%）では、高温処理後、空気の酸素分圧とほぼ等しい酸素20%のガス中に置床した場合、発芽率は31%であった。これに対して酸素100%中での発芽率は88%で、高酸素分圧区で休眠打破が促進された。一方、酸

Table 11. The effects of oxygen partial pressure, under the condition of sowing, on breaking the dormancy of seeds treated with high temperature at 50°C for 4 days in varieties Hadsaduri and Ketaktara

| Varieties | Hadsaduri | | | Ketaktara | | |
|----------------------------------|-----------|----|---|-----------|----|----|
| | 100 | 20 | 0 | 100 | 20 | 0 |
| Oxygen tension during sowing (%) | 100 | 20 | 0 | 100 | 20 | 0 |
| Germination percentage* | 88 | 31 | 2 | 95 | 83 | 36 |

Note: Germination percentage of the untreated seeds was 0% in Hadsaduri and 15% in Ketaktara. *Germination percentage for 10 days after sowing.

素0%中での発芽率は2%にすぎず、低酸素分圧区で休眠打破効果は著しく抑制された。他方、休眠覚せい中の Ketaktara 種子（発芽率15%）では、酸素100%および20%での発芽率はそれぞれ95%および83%と高率であったのに比して、酸素0%では36%と低率であった。

以上の2例が示すように、高温処理後の種子の休眠打破の程度は置床中の酸素分圧条件によって著しい影響を受け、高酸素分圧では促進的にまた低酸素分圧では抑制的に作用することがわかった。

なお、高温処理中の酸素濃度が休眠打破効果に及ぼす影響をみたのが Table 12 である。この表に示されるように、高温処理中の酸素分圧の差異は休眠打破効果にほとんど影響を及ぼさず、Table 11 の結果と同様に置床中の酸素分圧条件が著しく影響を及ぼすことがわかった。

第3節 人為的休眠打破に伴う発芽抑制物質の活性変化—外的要因との関連において—

材料と方法

実験1 高温処理に伴う発芽抑制物質とオーキシシ

Table 12. The effects of oxygen partial pressure, under the conditions of both high temperature treatment and sowing, on breaking the dormancy of the imbibed seeds in variety Ketaktara

| Oxygen tension during high temperature treatment | 20 | | | 0 | | |
|--|-----|----|---|-----|----|---|
| | 100 | 20 | 0 | 100 | 20 | 0 |
| Oxygen tension during sowing (%) | 100 | 20 | 0 | 100 | 20 | 0 |
| Germination percentage* | 96 | 77 | 6 | 89 | 68 | 0 |

Note: The seeds soaked in water for 24 hours at 30°C were treated with high temperature of 40°C for 2 days. * Germination percentage for 10 days after sowing.

の活性変化

1973年に水田で栽培した強休眠性の Ketaktara の完熟種子を収穫し、3日間風乾してのち、実験時まで -15°C \sim -20°C に貯蔵した種子を供試した。この種子 10g を 30°C の水に24時間浸漬したのち、附着を除き、200ml のフラスコに入れて、口を密封し、 40°C に2日間置き、吸水、高温処理を行った。処理種子および無処理種子の穎、胚乳および胚に内生する伸長抑制物質とオーキシンの活性をアベナ伸長テストによって検定した。抽出操作および生物検定は第2章第1節の方法にしたがい、4反復した。

実験2 高温、吸水処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

1976年に水田で栽培した Hadsaduri の完熟種子(発芽率0%)を供試した。

種子 40g を 50°C に10日間置く高温処理、この処理種子を水に2日間浸漬する高温浸水処理および 40°C の温湯中に通気して、これに種子を2日間浸漬する温湯処理を行った。これらの3処理種子および無処理種子に内生する物質 A と物質 B を第4章第2節の方法にしたがって6反復で実験し、処理間の量的比較を行った。

実験3 高温、高酸素濃度処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

1978年に水田で栽培した Ketaktara の完熟種子を収穫後3日間風乾してのち、実験時まで4ヵ月間 -15°C \sim -20°C に貯蔵して、その休眠種子(発芽率0%)を供試した。

吸水種子を酸素100%および0%条件下に置き、吸水、高温処理を行った。そして、処理種子および無処理種子に内生する物質 A と物質 B を実験2と同じ方法で検定した。

1区に風乾種子 40g を供し、 30°C の水に24時間浸漬した吸水種子を 500ml のフラスコに入れて、活栓付ゴム栓を付し、酸素100%ガスおよび窒素100%ガスを別々に充填して、 40°C に2日間置く吸水、高温処理を行った。

実験4 脱穎および刺傷処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

1975年に水田で栽培した Ketaktara の完熟種子(発芽率0%)を供試した。

乾燥種子並びに 25°C の水に24時間浸漬した吸水種子について、脱穎並びに刺傷(胚の近傍を針で刺傷)の2処理を行い、処理種子と無処理種子の伸長抑制物質の活性をアベナ伸長テストで検定した。

1区に籾種子 10g を供し、各処理種子を密封容器に入れて、 15°C の恒温器内に10日間置いたのち、それぞれの玄米部位について、実験1の方法にしたがって検定した。なお、実験は5反復とした。

結 果

実験1 高温処理に伴う発芽抑制物質とオーキシンの活性変化

種子の穎、胚乳および胚に内生する発芽抑制物質とオーキシンの吸水、高温処理に伴う活性の変化をみたのが Fig. 20 である。

無処理種子の穎、胚乳および胚のいずれにも Rf 0.6 \sim 0.8 (物質 A) と Rf 0.9 \sim 1.0 (物質 B) の2種類の発芽抑制物質の活性が検出され、胚乳および胚の Rf 0.4 \sim 0.6 にオーキシン活性が検出された。一方、処理種子においては、発芽抑制物質の活性は休眠打破処理に伴って、いずれの器官においても低下し、その低下の程度は物質 A では、胚および穎で胚乳よりもやや

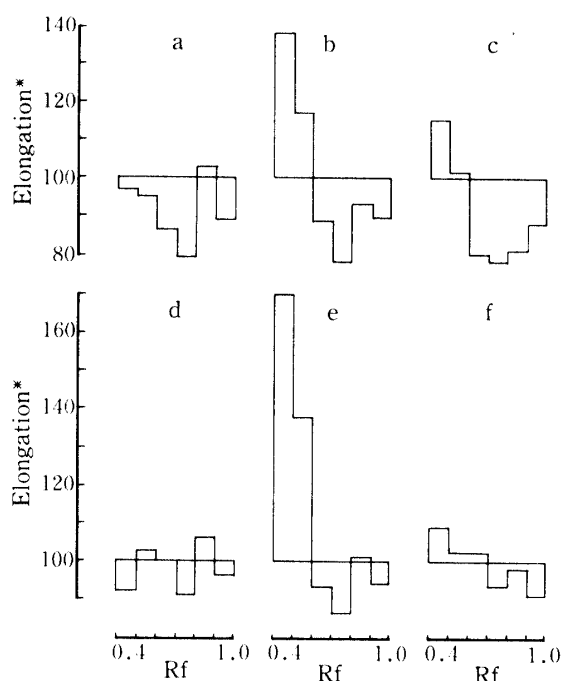


Fig. 20 a,b,c,d,e, and f. Histograms representing the Avena straight growth test of the acidic fraction of extract obtained from hull (a and d), endosperm (b and e), and embryo (c and f) of the non-treated seeds (a, b, and c) the seed treated with high temperature at 40°C for 2 days (d, e, and f). The seeds were soaked in water for 24 hours at 30°C before high temperature treatment. *Relative length of Avena coleoptile for the control (=100).

大であり、物質 B では、穎でやや大である傾向があったものの、発芽抑制物質の変化の器官別の差異には大差のないことがわかった。一方、オーキシシン活性は胚乳部位のみで著しい増大を示した。

実験2 高温、吸水処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

50°C に10日間貯蔵した高温処理種子(表中 I)、この処理種子をさらに2日間浸水した高温浸水処理種子(II)、温湯(40°C)に2日間浸漬した温湯処理種子(III)および無処理種子の40gに内生する物質 A と物質 B の活性を第4章に述べた剥離胚の発芽率でみたのが Table 13 である。

まず、高温処理種子(I)と無処理種子の物質 A の活性を比較すると、置床後2日間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 活性の低下が認められた。さらに置床後3日間の高温処理種子の発芽率は試料を含まない対照の発芽率とほぼ同率であり、高温処理種子の物質 A 活性の低下の程度が大であることが示された。

つぎに、高温浸水処理種子(II)の物質 A においては、置床後2日間の発芽率は対照の発芽率と差異がなく、この処理種子からは物質 A 活性は検出されなかった。

さらに、温湯処理種子(III)の物質 A においては、置床後2日間の発芽率と対照の発芽率との差はきわめて小であり、物質 A 活性は高温処理種子よりもさらに低下していることが明らかであった。

一方、物質 B 活性は、いずれの処理種子からも検

Table 13. Comparison of levels of the endogenous germination inhibitors in the seeds treated with high temperatures in variety Hadsaduri, as shown by the germination percentage of the excised embryos

| Treatment* | | Germination inhibitor | | | | | | | | |
|-------------------|---|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| | | A | | | | B | | | Non | |
| | | non-treatment | I | II | III | non-treatment | I | II | III | cont. |
| | | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| 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: * Treatment I; seeds were placed at 50°C for 10 days, II; seeds were soaked in water for 2 days after treatment I, and III; seeds were directly soaked in the 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. The excised embryo culture method and elution of inhibitor A and B were the same as shown in Table 4.

Table 14. Comparison of levels of the endogenous germination inhibitors in the imbibed seeds, treated with high temperature for 2 days under the conditions of two kinds of oxygen tension in variety Ketaktara, as shown by the germination percentage of the excised embryos

| Germination inhibitor | | A | | | B | | Non | |
|-------------------------------------|---|-----|---------|-----|-----|---------|-----|-------|
| High temperature treatment | | non | at 40°C | | non | at 40°C | | |
| Oxygen tension during treatment (%) | | | 100 | 0 | | 100 | 0 | cont. |
| | | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| Days after sowing | 2 | 0 | 10 | 3 | 10 | 39 | 6 | 26 |
| | 3 | 25 | 76 | 27 | 85 | 84 | 87 | 86 |
| | 4 | 94 | 96 | 98 | 95 | 99 | 97 | 95 |

Note: The seeds were soaking in water at 30°C for 24 hours before treatment. Numbers are the mean germination percentage of five replications. The excised embryo culture method and elution of inhibitor A and B were the same as shown in Table 4.

出されず、物質 B は処理によって不活性化していた。

以上のように、いずれの処理においても発芽抑制物質の活性は低下するが、高温処理種子に残存する物質 A は処理後の浸水によって完全に不活性化することが明らかとなった。さらに、温湯処理した場合の物質 A 活性は処理日数の長い高温処理の場合よりも低下の程度が大であったことから、処理条件下の水分の存在は発芽抑制物質の不活性化の速度を大きく速めることが明らかとなった。

実験3 高温、高酸素濃度処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

高酸素分圧および無酸素条件下で吸水種子を高温処理して、種子内生の物質 A と物質 B の活性変化に及ぼす酸素の影響を剥離胚の発芽率でみたのが Table 14 である。

まず、両者の物質 A 活性を比較すると、高酸素分圧区の置床後 2 日間および 3 日間の発芽率は 10% および 76% であったのに対して、無酸素区のそれらは 3% および 27% であり、両者の発芽率には、すでに置床後 2 日間で明瞭な差異が認められ、高酸素分圧区で種子の物質 A 活性が低下していることがはっきりと示された。そして、高酸素分圧区の置床後 3 日間の発芽率は試料を添加しない対照の発芽率と大差がなかったことから、高酸素分圧区の種子の物質 A 活性の低下の程度が著しく大であることが示された。

つぎに、物質 B 活性を比較すると、置床後 2 日間の発芽率は、高酸素分圧区で 39%、無酸素区で 6% であり、この両者の発芽率には明瞭な差異が認められると同時に、高酸素分圧区では物質 B の発芽抑制作用は検出されなかった。このように、吸水種子の高温処理において、発芽抑制物質の活性変化は処理中の酸素分圧条件によって著しく影響され、活性低下の程度は高酸素分圧条件下で大であることが明らかとなった。

一方、無酸素区と無処理区とで、物質 A 活性を比

較すると、置床後 2 日間と 3 日間の発芽率は、無酸素区で 3% と 27%、無処理区 0% と 25% であり、両者間にはほとんど差異が認められず、物質 B 活性も同様に差異が認められなかった。そして、両者の発芽率はいずれも対照のそれよりもかなり低率であり、両者の発芽抑制物質の活性はきわめて強いものであった。このように、無酸素条件下で高温処理した場合に、種子の発芽抑制物質の活性はほとんど変化しないことが明らかとなった。

以上の結果は、前節実験 1 および 2 の置床中の高酸素濃度が休眠打破を促進し、低酸素濃度が抑制するという現象を発芽抑制物質の不活性化の面から説明するものであった。

実験4 脱穎および刺傷処理に伴う発芽抑制物質の活性変化

脱穎および刺傷処理した玄米種子内生の伸長抑制物質の活性変化に及ぼす水分の影響をみたのが Table 15 である。

まず、乾燥種子において、処理種子と無処理種子で物質 A と物質 B 活性を比較すると、いずれの処理でも両物質の伸長抑制活性は低下し、その低下の程度に処理間差はほとんどなく、また両物質間にも差異は認められなかった。

つぎに、吸水種子においても、両物質の活性は低下し、その低下の程度の処理間差または物質間差も認められなかった。

吸水種子と乾燥種子とを比較すると、伸長抑制活性の低下の程度は吸水種子で著しく大であり、これは実験 2 の結果と同様に、人為的な休眠打破処理において、発芽抑制物質の不活性化の速度が種子の吸水に強く影響されることを示すものであった。つまり、人為的休眠打破は発芽抑制物質の不活性化によって誘起されること、また、発芽抑制物質の不活性化が吸水によって著しく助長されるという意味において、人為的休眠打

Table 15. Comparison of levels of the endogenous growth inhibitors in the unimbibed and imbibed dormant seeds undergone the husking treatment and the injuring treatment, respectively, assayed by Avena straight growth test

| Treatment | Unimbibed seed | | | Imbibed seed | |
|--------------------|----------------|---------|----------|--------------|----------|
| | non | husking | injuring | husking | injuring |
| Growth inhibitor A | 78.4 | 86.3 | 86.5 | 96.3 | 95.2 |
| Growth inhibitor B | 76.8 | 84.9 | 85.5 | 96.4 | 93.1 |

Note: The treated seeds were stored for 10 days at 15°C before extraction. Growth inhibitor A and B were eluted from Rf 0.6–0.8 and 0.9–1.0, respectively, on paper chromatograms of acidic fraction of extract obtained from the husked seeds in variety Ketaktara. Numbers are indicated as percentage of control (not containing inhibitor) on Avena coleoptile elongation.

破処理は全て共通していることが明らかとなった。さらに、以上の結果は第1節の実験における休眠打破効果に対する水分の促進作用と符合し、水分の促進作用について発芽抑制物質の面から説明を可能とするものであった。

第4節 高温処理による穎構造の変化—走査型顕微鏡による組織学的観察—

材料と方法

1977年に、強休眠性の Ketaktara をポット栽培し、その登熟期を 25°C および 30°C 条件下に置いて、成熟した種子の休眠程度は、30°C 条件下で弱まり、25°C 条件下では変異しないことを認めた¹⁹⁾。そこで、30°C、25°C および自然条件下で完熟した種子並びに 50°C で10日間の高温処理を行った種子を用い、それらの種子の穎の表面および裏面構造を走査電子顕微鏡 (JSM-15 型) によって観察した。なお、顕微鏡の加圧電圧は、15KV を常用し、撮影には Fuji Neopan SS を使用した。FAA 固定液 (ホルマリン 5: 酢酸 5: 50% エタノール 90) からそれぞれの種子をとり出し、附着した固定液をろ紙で除去し、表面構造の検鏡においては、籾のままドータイトで試料台に接着した。裏面構造の検鏡においては、籾の両端 1mm をカミソリ刃で切除して、外穎と内穎に分け、両方とも中央脈付近から縦断して試料台に接着した。観察は外穎並びに内穎とも基部 (護穎側) より頂部への縦方向に試料を移動させながら行い、つづいて試料を左から右へ移動させ、穎の全面を観察した。すなわち、1粒の種子については、試料台の接着面とは反対側の面全体を観察した。なお、観察した種子数は1区あたり約20粒であった。

結 果

穎の外側表皮の表面構造は外穎、内穎ともに Fig. 21 に示されるように、縦列に配置された円形突起 (T)、円形突起の縦列間にある溝 (幅 5 μ m~9 μ m)、その溝に生じる針状突起の硬毛 (B、基部径約 35 μ m) が観察された。円形突起は Fig. 24 に示される如く、2個の乳頭状のふくらみをもち、その2個のふくらみの間の距離は一定ではなく (55 μ m~68 μ m)、そして突起間の上下幅は約 90 μ m であった。硬毛は Fig. 21 に示される如く、基部または中途で破損したものもあり、その内部は中空であった (A)。

種子の休眠程度を大きく低下させた 30°C、休眠程

度に変異しなかった 25°C および自然条件下で登熟した種子の穎の外側表皮の表面構造を比較検鏡した結果、Figs. 23, 24, 27, 28 に示されるように、30°C 条件下で登熟した種子の穎に亀裂 (C) が検出された。この亀裂は 25°C および自然条件下で登熟した種子には検出されなかった。そして、この亀裂以外には両者の構造に相違点はなかった。さらに、この亀裂は 30°C 処理種子の約 7 割程度の種子で認められた。また、その亀裂の発生位置は一定したものではなく、主に穎の基部から中心部にかけての範囲に認められ、その部位は円形突起と円形突起の中間部であり、水平に位置するよりもむしろ傾斜していた (Figs. 23, 24)。亀裂は、円形突起縦列の 1 列程度のもの (Figs. 23, 27) から数列に及ぶものまであり (Figs. 24, 28)、観察された亀裂の内では 2~3 列に及ぶものが最も多かった。しかしその亀裂の幅はほぼ一定であり (約 0.8 μ m)、組織の奥深くまで達しているように観察された。そこで、穎の内側表皮の表面構造を検鏡し、その結果を Figs. 25, 26 に示した。内側表皮の表面は外側表皮のそれに比して凸凹の少ない滑らかな構造で、穎の縦軸方向に平行して、気孔 (S) と毛茸 (T) が観察された。30°C 処理種子では Fig. 26 に示されるように、亀裂 (C) が観察された。この亀裂は外側表皮で観察されたのと同様に傾斜しており、その幅は約 0.7 μ m で外側表皮のそれとほぼ等しいものであった。この亀裂は外側表皮と同様に 25°C および自然条件下で登熟した種子には認められなかった。しかし、内側表皮の亀裂は Fig. 26 に示されるように、外側表皮の亀裂より長く、切片の外周部位より中心部へと伸びているものが多く観察され、切片作成中に延長されたものと考えられた。

上述のように、種子の休眠程度を大きく短縮させる 30°C 処理を施した種子の穎に亀裂が発生していることがわかったので、種子の休眠を効果的に打破する 50°C 高温処理を10日間施した種子について、穎の外側表皮の表面構造を検鏡し、その結果が Figs. 29, 30 に示された。50°C 高温処理された種子においては、30°C 処理種子よりも亀裂の数は多く、不規則に四方に伸び、幅も大きかった。その最大幅は 90 μ m にも達し、30°C 処理種子のそれの約 100 倍であった (Fig. 30)。

以上の結果から、登熟中並びに収穫後の高温処理種子の穎に亀裂が生じていることが発見され、高温が穎組織に変性を誘起させる作用を有することが明らかとなった。そして、休眠短縮に及ぼす 30°C 処理と 50°C 処理の影響には両者間に大きな差異が認められ

るが、その差異は穎組織の変性の程度の差異として認められると推定された。

第5節 考 察

稲種子の休眠打破の実用的な手法として、休眠種子を50°C付近の温度に一週間程度置く処理法が確立されている^{28,60)}。しかし、この方法では、休眠打破の効果が種子の休眠程度によって著しく変動し、有効な処理期間の予測が困難であるという欠点が指摘されている²⁸⁾。これに対して、第1節で確立された吸水種子の高温処理法は、種子の休眠程度に関係なく短期間に休眠を打破しうるものであり、また、通気した温湯中に種子を浸漬する方法では、室温条件下で4カ月にも及ぶ休眠期間を有する種子の休眠をわずか1日間で打破しうるもので敏速で確実という点で従来の方法よりも優れているといえよう。

従来の高温処理は一般に乾燥を伴うことから、休眠打破に対して高温^{16,29,48,62,70)}と乾燥^{35,70)}のいずれを主因と考えるかが争点であった。この点について、第1節に述べたように、乾燥を伴わない条件下で休眠が効果的に打破されたことから、高温が主因であることが明確にされたといえよう。

つぎに、種子の含水率と休眠打破の効果との関係について、太田ら⁵²⁾、安江⁷⁸⁾は高含水率の種子では、休眠打破の効果が低下すると報告しているが、第1節の結果はこれと全く逆で休眠打破効果を促進するものであった。安江⁷⁸⁾は、休眠種子を40°Cの水中に20日間置いたのち、発芽試験を行ったものであるが、第1節実験4,5の結果と対比した場合に、処理中の酸素不足によって種子の発芽力は、減退していたと類推される。それ故に、種子の高含水率そのものは休眠打破を抑制するものではなく、休眠打破に対して促進的に作用することが明確にされた¹⁶⁾。

さらに、休眠覚せいと酸素との関係について、池田²³⁾、Roberts⁵⁸⁾、高橋⁶⁸⁾、岩下²⁶⁾は休眠の覚せいたした種子は発芽にほとんど酸素を必要としないのに反して、休眠種子は酸素を必要とすることを認め、池田²³⁾は休眠種子の酸素要求度が休眠覚せい種子よりも高いと報告している。これに対して、第2節の結果は休眠種子が発芽に際して酸素を必要とする点で一致すると同時に、酸素要求度は種子の休眠程度の差異によって異なることを明確にした。そして無酸素条件下で休眠が全く打破されなかったことから、種子の休眠打破にとって酸素の存在が必要であり、また、その機構に酸化反応が関与している可能性は大であると考え

られた。

休眠打破機構と酸化反応との関係についてRoberts⁵⁹⁾は、休眠解除において、高酸素濃度に貯蔵した場合の促進効果、また高温処理や加傷処理の促進効果、さらに末端酸化酵素系の阻害剤のKCNなどの促進効果を認めて、発芽以前に体内での酸化反応の必要性を強調し、最近その酸化反応⁶¹⁾は酸化的ペントース燐酸径路が主要であると要約するに至っている。これに対して著者¹⁶⁾は、休眠現象に発芽抑制物質の介在を疑問視しているRoberts^{59,61)}のこの説とは別に、酸化反応は発芽抑制物質の不活性化に関与するという仮説をたてたのである。そして、まず、休眠打破現象と種子内生の発芽抑制物質の不活性との関係を温度、水分および酸素の外的要因との関連において解析を試みたのである。

前処理として種子を水に浸漬し、その吸水種子を用いて高温処理を行い、高温処理前の種子と処理後の種子で種子内生の発芽抑制物質の活性を比較したところ、処理後の種子に含まれる発芽抑制物質の活性は明瞭な低下を示し、その低下は穎、胚乳および胚のいずれの器官でも生じ、その程度に器官別に大差のないことが示され、高橋^{69,70)}の報告に見られる種子外への浸出とは別に、発芽抑制物質は体内で不活性化することを明確にしたのである^{18,20)}。

水分については、従来の休眠打破法である高温、脱穎および刺傷処理において、乾燥種子と吸水種子で発芽抑制物質の不活性化の程度を比較したところ、その不活性化の程度は吸水種子で乾燥種子よりも大であったことから、休眠に及ぼす種子の吸水の効果は、水分の存在によって発芽抑制物質の不活性化が大きく助長されることにあり、種子体内の酵素の活性化⁴⁴⁾にその意義を認めうるのである²⁰⁾。

酸素については、酸素濃度100%および0%の気体中で高温処理を行い、無処理種子内生の発芽抑制物質の活性との比較を行ったところ、発芽抑制物質の活性の低下は酸素の存在下で起こったのに反し、無酸素下では誘起されなかった。この結果は、第2節の人為的休眠打破が酸素の存在下で誘起され、無酸素下で誘起されなかったことと完全に符合するものであり、これは種子の休眠解除において、発芽に先行する発芽抑制物質の不活性化の機構に酸素の存在が必須であることを明らかにするものであった²⁰⁾。それ故に、これまで休眠解除の機構に関与すると考えられてきた酸化反応は発芽抑制物質の不活性化にその意義を認めうるものである^{18,20)}。

このように第3節の発芽抑制物質の不活性化に関する結果は、第1節および第2節の休眠打破現象に対する温度、水分および酸素の促進的効果と完全な符合を示すものであり、人為的休眠打破現象が自然的休眠覚せい現象と同様に種子内生の発芽抑制物質の不活性化に支配されることを明確にすると同時に、酵素的な酸化反応によって内生の発芽抑制物質が不活性化されるものと推定される。

第2節において、高温処理による休眠打破効果は、発芽試験中の酸素濃度に著しい影響を受けたのに対して、処理中の酸素濃度の影響をほとんど受けなかった。さらに、乾燥種子を50°Cで10日間高温処理した場合に、処理種子には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うちに発芽抑制物質が不活性化された。以上の結果から、著者¹⁹⁾は、高温処理によって包被組織に物理的な変化が起こり、酸素の透過が促進されて、発芽抑制物質が不活性化されるもので、置床中の酸素濃度条件が大きく影響を及ぼすのであろうと考えた。そこで、走査電子顕微鏡による穎の表面構造の観察を行ったのである。まず、30°Cの高温条件下で登熟して休眠程度が大きく低下した種子の穎に亀裂が発見された。この亀裂は休眠程度の変異しなかった25°C条件下で登熟した種子並びに無処理種子の穎には検出されず、亀裂が高温によって生じたことは明白であった。つぎに、休眠種子を50°Cに10日間置いて、休眠が打破された種子についても同様な観察を行ったところ、より多数のしかもより大きな亀裂が観察されたことから、穎に生じた亀裂が高温の作用によることがさらに明確になったのである。高温処理種子における穎組織の亀裂の発見は、種子の包被組織の変化に伴って種子内への酸素の侵入を容易にするものと考えられ、そのために発芽抑制物質の不活性化が促進されて、種子の休眠打破あるいは休眠程度の変異が誘起されると推定される¹⁹⁾。そして、稲種子の休眠性は種子内生の発芽抑制物質に起因し、種子の休眠解除現象は発芽抑制物質の不活性化によって支配されるというこれまでの関係に種子の包被組織の酸素透過性が関与するという全く新しい解釈が稲種子の休眠現象に対して与えられたのである。

第6章 総 括

稲種子の休眠性に関する従来の解釈は、脱穎によって休眠が効果的に打破されるという事実から、穎中の発芽抑制物質に視点を置き、穎内生の発芽抑制物質を主因と主張する研究者と脱穎、刺傷や高温処理が休眠

打破に効果的であることを根拠に、主として胚への酸素供給に視点を置き、種子の包被組織の酸素不透過性を主因と主張する研究者に二分されていた。それ故に、休眠現象に対する外的あるいは内的条件と種子に内生する発芽抑制物質の消長との関係は、それぞれ個別的に論議されるのみで具体的に両者を連結した統一的な論理の展開はほとんどなされなかったのである。上述のような稲種子の休眠性に関する解釈は、おもに1960年代に得られたものであり、その当時の植物ホルモンとくに発芽抑制物質の生理的機能に関する知識は未だ初歩的であったともいえる。しかし、1963年に、発芽抑制物質のABAが発見され⁷⁾、1967年に、休眠現象を支配すると考えられていたinhibitor- β の主成分がABAである⁴²⁾ことが明らかにされて以来、休眠現象とABAの生理作用との関係に関する報告は多くみられ、とくに休眠解除に低温を必要とする種子において、低温とABAの生理作用との関係についての報告がみられるようになり、現在、種子の休眠の誘起または解除に関する生理学的解釈は、きわめて多様化してきているのである³⁸⁾。

このような時代的背景のもとで著者¹³⁻²⁰⁾は、稲種子の休眠現象に関して従来個々に論じられてきた各要因に関連性をもたせ、休眠現象を外的あるいは内的要因の関連のもとに発芽抑制物質の消長に主点を置いて解析を試みたのである。

まず、本研究における特徴的な結果は、第1に、従来不明確であった休眠性の要因物質について、その主体がABAであることを明確にし¹⁷⁾、第2に、この要因物質の種子内での存在部位が従来の知見とは大きく異なり、種子の全器官に存在し、とくに生長器官である胚で濃度が大きいことを認め¹⁵⁾、包被組織の酸素透過性を考慮することが必要となった。そして、第3に、休眠打破効果が高温、水分、酸素の外的要因によって著しく促進されること¹⁶⁾、さらに第4に、高温による休眠打破効果はおもに高温処理に伴って生じる包被組織の微細な亀裂の発生によることを認め¹⁹⁾、この第4の発見は、種子に内生する発芽抑制物質とくにABAの体内での酸化的不活性化が休眠解除現象を支配するという仮説に大きな論拠を与えるものであった。そして、従来個々に論議されていた外的あるいは内的要因は、そのかわりの比重に大小はあると考えられるが、全てABAの不活性化の促進に関与することを明瞭にし、前述の両要因説の間に密接な関連の存在するを見出したのである。

また、従来多くの研究者が取り扱ってきた供試植物

は、休眠解除に低温を必要とするものであった。従って稲種子のように休眠解除に低温を必要としない種子で論じたものはほとんどなく、ここにも本研究の特色をみることが出来るのである。さらに、包被組織の酸素透過により種子の内的要因の破壊が生じるのではないかという指摘がなされているものの、それが ABA の酸化的不活性化に関与するという報告は未だみられず、ABA の不活性化機構の今後の研究に一つの方向を示したものとえよう。

一方、作物種子の休眠解除機構にジベレリンが関与しているという報告がみられる³⁷⁾。稲種子の場合、従来未熟種子に存在するジベレリンは登熟過程で不活性化し、成熟種子には存在しないと考えられていたようであるが、本研究において成熟種子にジベレリン様物質の存在が認められた¹⁷⁾。稲種子の休眠解除とジベレリンの作用との関係の解明が今後の重要な研究課題であろう。

最後に、熱帯地方の稲作では、同一品種を用いて作季を変えた場合に、種子の休眠程度が変異することは良く知られた現象である^{3, 6, 10-12, 19, 24, 25, 39, 43, 70)}。その具体的な一例として、Murty⁴³⁾ は、インド南部において乾季作（平均気温 31°C）の種子の休眠程度が雨季作（平均気温 19°C~24°C）のその程度よりも低下することを報告し、著者ら¹⁹⁾ も登熟温度を変えて同様の現象を確認している。本研究結果から、作季の気温の高低は、種子の穎組織の変性の程度に差異をもたらす、種子内への酸素透過量の多少とそれに伴う発芽抑制物質の不活性化の程度に影響を及ぼすと考えられるのである。また、我国西南暖地において、早期水稲作の穂発芽を発生させる高温期、降雨、倒伏といった条件が、第 5 章の休眠打破効果を著しく促進する外的要因と類似するものであり、穂発芽現象もまた十分に説明しうるのである。

要 約

本研究は、稲種子の休眠現象を、外的あるいは内的要因の関連のもとに発芽抑制物質の消長に重点をおいて解析したものである。

1. 稲種子内生の伸長および発芽抑制物質とオーキシンの生物検定並びに化学的検定

(1) 休眠種子と休眠覚せい種子に内生する伸長抑制物質とオーキシンの検定

休眠種子群と休眠覚せい種子群から得られた伸長抑制活性とオーキシン活性は酸性エチルエーテル分画に認められた。イソプロパノール:アンモニア水:

(8:1:1) で展開したペーパークロマトグラムの Rf 0.4-0.6 にオーキシン活性、Rf 0.6-0.8 と Rf 0.9-1.0 に伸長抑制活性が検出された。オーキシンは全ての種子に共通して存在したが、2つの伸長抑制物質つまり Rf 0.6-0.8 (物質 A と呼ぶ) と Rf 0.9-1.0 (物質 B と呼ぶ) は、休眠種子群のみに存在が認められ、また、それらの活性が強休眠性品種で大きく、弱休眠性品種で小さい傾向が認められたことから、休眠性の要因物質であろうと推定された。

(2) 稲剥離胚を用いた発芽テストによる発芽抑制物質とオーキシンの検定

休眠種子から得られた物質 A と物質 B の剥離胚の発芽に対する発芽抑制作用を検定した。両物質はともに稲種子の発芽を抑制する発芽抑制物質であることが証明された。また、両物質の発芽抑制作用については、物質 A が物質 B よりもかなり強力であることが明らかとなった。一方、オーキシンは低濃度で発芽を促進し、また、物質 A の発芽抑制力を弱める作用を有した。

(3) 休眠種子内生の発芽抑制物質とオーキシンの化学検定

休眠種子内生の物質 A、物質 B およびオーキシンのクロマトグラフィーによる同定を試みた。オーキシンと物質 B は、エーリッヒ試薬に対して、それぞれ青色と赤色の呈色反応を示し、いずれもインドール化合物であろうと推定された。さらに、オーキシンは薄層クロマトグラフィーによる比較検定の Rf 値と呈色から IAA と推定された。物質 A はガスクロマトグラフィー分析でシス ABA とトランス ABA と同定された。とくに強休眠性の品種 Ketaktara の最深休眠期に着目した場合、種子内生の ABA の組成は、多量のシス ABA と微量のトランス ABA よりなり、種子内生のシス ABA 量は 280 μg/kg 以上であると概算された。

2 稲休眠種子の発芽抑制物質およびオーキシンの存在部位

まず、休眠種子を穎と玄米の 2 部位に分けて、それぞれの発芽抑制物質とオーキシンをアベナ伸長テストで検定した。物質 A と物質 B はともに両部位に存在するのに反し、オーキシンは玄米部位のみに存在することが明らかとなった。つぎに、休眠種子を穎、胚乳および胚に分けて検定したところ、物質 A と物質 B はいずれの器官にも存在することが明らかとなった。そして、各器官の発芽抑制物質の活性はほぼ同程度であったので、重量比からみて、その濃度は胚でもっと

も高く、次に穎で高く、胚乳で低いと推定された。一方、オーキシンは胚乳に大部分が存在すると推定された。

3 自然条件下での休眠覚せい過程の推移と発芽抑制物質とオーキシンの消長との関係

(1) 休眠覚せい過程における発芽抑制物質の消長

強休眠性の品種 Hadsaduri の種子を供試して、種子を穎と玄米に分けて、それぞれに内生する発芽抑制物質の活性変化と休眠との関係を解明するために、開花後20日目より休眠覚せい終了期までに数回にわたってアベナ伸長テストによる検定を行った。開花後20日目の種子の両部位には物質 A と物質 B の活性がともに強く、そして、両物質の活性は休眠覚せいの進行に伴って低下した。この関係は、両物質が種子の休眠覚せい過程に関与していることを明確にするものであった。つぎに、休眠性程度の異なる4品種の籾種子を用いて、物質 A について品種間差異をみた。全品種とも物質 A の活性変化と休眠覚せい過程の推移とはほぼ完全な符合を示し、上記の Hadsaduri におけると同様の関係が認められた。

(2) 稲の剥離胚の発芽による(±)-ABAの発芽抑制力の検定

5段階の濃度の(±)-ABAを添加した培地に休眠終了種子の剥離胚を置床して、24時間毎に発芽率を測定した。置床後日数別の発芽率の差から、ABA濃度間の発芽抑制作用の差異を検出することが明らかとなった。検出する濃度範囲は0.001mg/l~1mg/lでありその 10^{-1} mg/lの濃度間におけるABAの発芽抑制力の差異を検定するものであった。この検定法は休眠種子から得られる微量物質の稲種子の発芽に対する作用を定量的に検定するのに有効であろうと推定された。

(3) 休眠覚せい過程における発芽抑制物質の消長

強休眠性 Hadsaduri の休眠種子(発芽率0%)、休眠覚せい中の種子(発芽率33%)および休眠終了種子(発芽率98%)から得られた物質 A と物質 B の発芽抑制作用を剥離胚の発芽テストによって検定した。発芽抑制作用は両物質とも休眠種子でもっとも強く、休眠覚せい中の種子では、休眠種子よりも弱く、休眠終了種子では、物質 A の微弱な作用のみが認められた。また、物質 A の発芽抑制作用が物質 B のそれよりも強く、物質 A が休眠覚せいに深い関係のあることが確認された。

(4) 休眠覚せい過程におけるオーキシンの消長

4品種の休眠種子について、開花20日目より休眠終

了期に至るまでの時期別のオーキシン活性の変化をアベナ伸長テストで検定した結果、オーキシンは休眠覚せい過程の推移に直接的には関与しないと推定された。

以上、(1)~(4)の結果から、稲種子の自然条件下での休眠覚せい現象は種子内生の発芽抑制物質の活性の消長によって誘起されること、物質 A と物質 B が稲種子の休眠性の要因物質であり、なかでも物質 A が主導的役割を担うものであることが明確となった。すなわち、休眠性程度の品種間差異および各品種における種子の休眠程度は物質 A の活性の差異によって説明しうるものと考えられた。

4 人為的休眠打破に関する研究

(1) 種子の休眠打破に及ぼす吸水、高温の影響

25°C~40°Cで12時間~48時間浸水した吸水種子を35°C~45°Cの飽和湿度の気中に貯蔵した場合に、吸水種子の休眠打破に対する貯蔵効果は高温ほど大であり、前段階の浸水の温度が高く、時間が長いほどその効果を助長した。そして、45°C貯蔵は、貯蔵日数の増加が種子の発芽活力の減退を招き、効果的高温限界は40°C附近であろうと推定された。また、25°C浸水種子と30°C~40°C浸水種子とでは、40°C貯蔵の休眠打破効果に差異が認められたことから、種子の浸水中の温度の累積が休眠打破効果に相加されるものと考えられた。また、吸水種子を40°Cに貯蔵すると休眠性程度の差異にかかわらず、短時間に完全な休眠打破効果が得られ、高温処理において、前段階の種子の吸水は、高温の休眠打破効果にきわめて促進的な作用を及ぼすことが明らかとなった。つぎに、40°C湯湯中に種子を直接浸漬した場合、短時間で休眠打破効果が認められたが、浸漬時間の増加に伴って発芽障害が生じた。この場合に水中への酸素の人為的な供給によって、発芽障害が軽減されたことから、処理中の酸素不足は休眠打破効果を著しく阻害することが明らかとなった。すなわち、休眠打破処理に際して、酸素の供給が平行的に行われなければ温度効果は有効とならないことが実証された。

以上の結果から、飽和含水種子を40°Cの気中に1~2日貯蔵して休眠を打破する方法と通気した40°C湯湯中に種子を1日間浸漬して休眠を打破する2種類の休眠打破法が確立された。

(2) 高酸素濃度が休眠解除に及ぼす影響

休眠性程度の異なる Ketaktara, Hadsaduri, Gendjah の3品種を用いて、室温条件下に貯蔵した種子をそれらの収穫直後から10日毎に休眠終了期まで、高酸素分圧、空気および低酸素分圧条件下に置床して発芽

率を調べ、休眠解除に及ぼす酸素の影響をみた。休眠解除に対して、高酸素濃度は促進的に、低酸素濃度は抑制的に作用することが明らかとなった。また、それらの効果は休眠性の強い品種ほど大であった。つぎに、休眠打破処理を施した種子について、前述と同様に置床中の酸素分圧を変えて発芽試験を行った結果、休眠打破効果は高酸素分圧条件下で大きく促進され、低酸素分圧条件下では抑制されることが明らかとなった。

(3) 人為的休眠打破に伴う発芽抑制物質の活性変化—外的要因との関連において—

まず、吸水種子を高温処理して、処理種子の穎、胚乳および胚に内生する物質 A と物質 B およびオーキシンの活性変化をアベナ伸長テストによって検定した。物質 A と物質 B の活性は休眠打破処理に伴っていずれの器官においても低下し、その低下の程度には器官別に大差のないことが明らかとなった。一方、オーキシン活性は胚乳部位のみで著しい増大を示した。つぎに、3種類の高温処理を行い、物質 A と物質 B の不活性化に及ぼす水分の影響を剥離胚の発芽テストによって検定した。高温処理種子内生の物質 A 活性は低下し、物質 B は不活性化していた。物質 A 活性の低下は 50°C 高温処理では 40°C 温湯処理よりも小であり、50°C 高温処理種子に残存する物質 A は処理後に種子を浸水することによって完全に不活性化することが明らかとなった。また、温湯処理による物質 A 活性の低下の程度は処理日数の長い高温処理のそれよりも大であったことから、処理条件下の水分の存在が発芽抑制物質の不活性化の速度を著しく速めることがわかった。さらに、脱穎および刺傷処理を行い、物質 A と物質 B の不活性化に及ぼす水分の影響をみた。両物質の活性の低下の程度は、吸水種子では乾燥種子よりも著しく大きく、前述と同様に水分の存在が両物質の不活性化の速度を促進することが明らかとなった。つまり、人為的休眠打破は発芽抑制物質の不活性化によって誘起されること、また、発芽抑制物質の不活性化が吸水によって著しく助長される点で全ての休眠打破処理は共通していることが明らかとなった。

高酸素分圧および無酸素条件下で、吸水種子を高温処理して、物質 A と物質 B の活性変化に及ぼす酸素の影響を剥離胚の発芽テストで検定した。物質 A と物質 B の活性は、高酸素分圧条件下で著しい低下を示し、無酸素条件下でほとんど変化しないことがわかった。

(4) 30°C の高温条件下で登熟して、休眠程度の低下した種子と 50°C で10日間高温処理を施し休眠打破

された種子を用いて、穎組織の微細構造を走査電子顕微鏡で観察した。まず、30°C 条件下で登熟した種子の穎に亀裂が発見された。この亀裂は 25°C 条件下で登熟した種子および無処理種子には認められなかった。つぎに、50°C 高温処理を施した種子の亀裂は極めて大きく、無数にしかも不規則であった。この結果から、高温処理による休眠打破効果は、種子の包被組織の変化を誘起するという高温の物理的作用に基づくものと推定された。

(1)~(4)を総合して、休眠打破に対する水分と高酸素分圧の促進作用並びに低酸素分圧の抑制作用は、種子内生の発芽抑制物質の活性に対するそれらの作用として、さらに、高温の作用は穎組織の変性に伴う酸素透過性の促進に、その意義を認めうるのである。そして、これらの結果は、人為的休眠打破現象も自然的休眠覚せい現象と同様に種子内生の発芽抑制物質の不活性化に支配されることを明確にすると同時に、人為的休眠打破効果の出現時間の著しい短縮は酵素的な酸化反応によって発芽抑制物質が不活性化されるためであると推定される。

1~4の結果を総括すると、稲種子の休眠性の要因物質の主体は ABA であり、自然のおよび人為的休眠解除現象は発芽抑制物質の不活性化によって誘起される。そして、その不活性化は外的要因の連関のもとで体内の酵素的な酸化反応によるものであろうと推定される。

謝辞 本論文に対する御校閲を賜った九州大学武田友四郎教授、松本重男教授並びに上本俊平教授に衷心より感謝の意を表す。また、この研究の遂行にあたり、多くの御助言と御指導を賜った鹿児島大学池田三雄名誉教授、植木健至教授並びに八尋正樹教授に深謝するとともに、実験遂行上数々のご協力をいただいた熱帯作物学研究室の飯山睦子氏並びに専攻生の各位に感謝の意を表す次第である。

文 献

- 1) 雨宮 昭：イネの交雑種子における休眠性の発現。日作紀, 36, 295 (1967)
- 2) Arias, I., Williams, P. M. and Bradbeer, J. W.: Studies in seed dormancy IX. The role of gibberellin biosynthesis and the release of bound gibberellin in the post-chilling accumulation of gibberellin in seeds of *Corylus cavellana* L. *Planta*, 131, 135-139 (1976)
- 3) Chang, T. T. and Yen, S. T.: Inheritance of grain dormancy in four rice crosses. *Botanical Bull. of Academic Sinica*, 10, 1-9 (1969)
- 4) Conforth, J. W., Milborrow, B. V., Ryback, G. and Wareing, P. F.: Identity of sycamore 'dormine' with

- abscisin II. *Nature*, **205**, 1269-1270 (1965)
- 5) 檀上 勉・泰広 善・鹿本泰徳：早期水稻の穂発芽について. 宮大農研時報 **6**, 137-143 (1960)
 - 6) Dore, J.: Dormancy and viability of padi seed. *Malayan Agr. J.*, **38**, 163-173 (1955)
 - 7) Eagles, C. F. and Wareing, P. F.: Dormancy regulators in woody plants. *Nature*, **199**, 874-875 (1963)
 - 8) EL-Antably, H. M. M., Wareing, P. F. and Hillman, J.: Some physiological response to dl. abscisin (dormine). *Planta*, **73**, 74-90 (1967)
 - 9) Frankland, B. and Wareing, P. F.: Hormonal regulation of seed dormancy in hazel (*Corylus avellana* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *J. Exp. Bot.*, **17**, 596-611 (1966)
 - 10) Ghose, B. N.: Studies on germination of spring (boro) and summer (aus) paddy to determine dormancy and viability. *Indian J. Agr. Sci.*, **30**, 129-134 (1960)
 - 11) Ghose, B. N.: Agro-meteorological studies on rice I. *Indian J. Agr. Sci.*, **32**, 235-241 (1962)
 - 12) Gopinathan Nair, V., Ponnaiva, B. W. X. and Raman, V. S.: Studies on seed dormancy in certain short-duration rice variety. *Indian J. Agr. Sci.*, **35**, 234-246 (1965)
 - 13) 林 満・姫野正己：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅱ. 休眠性と生長物質の関係. 熱帯農業, **16**, 270-275 (1973)
 - 14) 林 満・姫野正己：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅲ. 未熟種子の発芽性および種子の休眠性と生長物質との関係. 熱帯農業, **17**, 245-249 (1974)
 - 15) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅳ. 抑制物質およびオーキシンの種子内の存在部位及びそれらの種類. 熱帯農業, **19**, 156-161 (1976)
 - 16) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅴ. 稲の吸水種子の高温処理による休眠打破. 熱帯農業, **20**, 164-171 (1977)
 - 17) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅵ. 休眠種子の発芽抑制物質のガスクロマトグラフィーによる同定. 熱帯農業, **23**, 1-5 (1979)
 - 18) 林 満・田中丈雄：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅶ. 剝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. 鹿大農学術報告, **29**, 11-20 (1979)
 - 19) 林 満・日高洋一郎：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅷ. 登熟中並びに収穫後の温度条件が種子の休眠および穎の変性に及ぼす影響. 鹿大農学術報告, **29**, 21-32 (1979)
 - 20) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究Ⅸ. 酸素および水分が種子の休眠解除並びに発芽抑制物質の不活性化に及ぼす影響. 鹿大農学術報告, **30**, 1-9 (1980)
 - 21) Hemberg, T.: Growth-inhibiting substances in terminal buds of fraxinus. *Physiol. Plant.*, **2**, 37 (1949)
 - 22) Hemberg, T.: The significance of the inhibitor- β complex in the rest period of the potato tuber. *Physiol. Plant.*, **11**, 615-626 (1958)
 - 23) 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)
 - 24) 池橋 宏：稲の発芽諸特性の品種間差異および環境変動に関する育種学的研究. 農事試験場研究報告, **19**, 1-60 (1973)
 - 25) International Rice Research Institute: Ann Report, 218-219 (1970)
 - 26) 岩下友紀：水稻穂発芽難品種の育成に関する研究. 鹿児島県農試報告, 70周年記念誌 72-99 (1971)
 - 27) Jangaard, N. D., Sckerl, M. M. and Schiefer, S. R. H.: The role of phenolics and abscisic acid in nutsedge tuber dormancy. *Weed Sci.*, **19**, 17-20 (1971)
 - 28) Jennings, P. R.: Breaking dormancy in rice seeds. IRRRI Rep. 19-20 (1963)
 - 29) Jennings, P. R. and Jesue, de J.: Effect of heat on breaking dormancy in rice seed. *Crop Sci.*, **4**, 530-553 (1964)
 - 30) 仮谷 桂：水稻の休眠機構. 農及園 **26**, 1107 (1951)
 - 31) 笠原安夫：種実の発芽促進及び抑制に関する物質に就いての実験的研究. 農学研究, **36**, 1 (1944)
 - 32) 加藤忠弘・高橋成人・北原喜男：モミの化学調節物質—モミラクトンの構造と生理作用. 植物の化学調節, **10**, (2), 75-79 (1975)
 - 33) 加藤幸雄：植物組織培養法. p. 227-237 誠文堂新光社, 東京, (1966)
 - 34) Khan, A. A.: Seed dormancy; changing concepts and theories. in Khan, A. A.(ed), *The physiol. and biochem. of seed dormancy and germination.* p. 29-50, North-Holland Pub. Comp. Oxford (1977)
 - 35) Kondo, M. and Okamoto, T.: Storage of rice X. *Ber. Ohara Inst.*, **6**, 175-185 (1934)
 - 36) Lipe, W. N. and Orane, J. C.: Dormancy regulation in peach seeds. *Science*, **153**, 541 (1966)
 - 37) 増田芳雄・勝見允行・今関英雄：植物ホルモン. p. 47-76 朝倉書店, 東京, (1970)
 - 38) 増田芳雄・勝見允行・今関英雄：植物ホルモン. p. 251-288 朝倉書店, 東京, (1970)
 - 39) Mercedes, R. B.: Dormancy period of promising rice varieties. *The Philippine Agriculturist*, **39**, 558-570 (1956)
 - 40) Mikkelsen, D. S. and Sinah, M. N.: Germination inhibitor in *oryza sativa* and control by preplanting soaking treatment. *Crop Sci.*, **1**, 332-335 (1961)
 - 41) Mikkelsen, D. S., Sinah, M. N. and Glezewski, A. T.: The occurrence and some physiological properties of endogenous growth substances in the hull of *oryza sativa*. *The 11th Pacific Sci. Cong.* (Tokyo) (1966)
 - 42) Milborrow, B. V.: The identification of (+)-abscisin II, (+)-dormine, in plants and measurement of its concentrations. *Planta*, **76**, 93-113 (1967)
 - 43) Murty, K. S. and Janardhan, K. V.: Seasonal influence on the dormancy period in rice. *Oryza*, **1**, 93-98 (1965)
 - 44) 中山 包：発芽生理学. p. 3-14 内田鶴圃, 東京, (1960)
 - 45) Nikolaeva, M. G.: Physiol. of deep dormancy in seed. *Acad. of Sci. of the USSR*, 163-183 (1969)
 - 46) Nitsch, J. P.: Method for the investigation of natural auxin and growth inhibitors. in Wain, R. L. and Wightman, E.(eds), *The chem. and mode of action of plant growth substances.* p. 3-31, Butterworths Sci. Pub.,

- London (1956)
- 47) Ohkuma, K., Lyon, J. L., Addicott, F. T. and Smith, O. E.: Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton seed. *Science*, **142**, 1592-1593 (1963)
- 48) 岡 彦一・蔡国海：稲種子の休眠と寿命に関する品種間差異. 育種, **5**, 90-94 (1955)
- 49) 太田保夫：発芽抑制物質と稲種子の休眠性に関する研究. 第1報, 日作紀, **35**, 283 (1966)
- 50) 太田保夫：発芽抑制物質と稲種子の休眠性に関する研究. 第2, 3報, 日作紀, **36**, 294-295 (1967)
- 51) 太田保夫：イネを中心とする生長抑制物質. 植物の化学調節, **3**, (2), 119-126 (1968)
- 52) 太田保夫・中山正義：発芽抑制物質と稲種子の休眠性に関する研究. 第4報, 日作紀, **38** (別号1) 145-146 (1969)
- 53) 太田保夫：作物における種子の休眠. 農業技術, **28**, 68-74 (1973)
- 54) Oritani, T., Oritani, T. and Yoshida, R.: Growth inhibitors in immature seeds of rice plant. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan*, **44**, 329-334 (1975)
- 55) Phillips, I. D. J., and Wareing, P. F.: Studies in dormancy of sycamore. *J. Exp. Bot.*, **9**, 350-364 (1958)
- 56) Pinfield, N. J., Martin, M. H. and Stobart, A. K.: Hormonal change during after-ripening in seeds of stachys alpina. *The New Phytologist*, **75**, 81-85 (1975)
- 57) Roberts, E. H.: Dormancy in rice seed II. The influence of covering structures. *J. Exp. Bot.*, **12**, 430-445 (1961)
- 58) Roberts, E. H.: Dormancy in rice seed III. The influence of temp. moisture and gaseous environment. *J. Exp. Bot.*, **13**, 75-94 (1962)
- 59) Roberts, E. H.: The distribution of oxidation-reduction enzymes and the effects of respiratory inhibitors and oxidising agents on dormancy in rice seed. *Physiol. Plant.*, **17**, 14-29 (1964)
- 60) Roberts, E. H.: Dormancy in rice seed IV. Varietal response to storage and germination temp.. *J. Exp. Bot.*, **16**, 341-349 (1965)
- 61) Roberts, E. H. and Smith, R. D.: Dormancy and pentose phosphate pathway. in Khan, A. A.(ed), *The physiology and biochem. of seed dormancy and germination*. p. 385-406, North-Holland Pub. Comp., Oxford (1977)
- 62) Robinson, P. M. and Wareing, P. F.: Chemical nature and biological properties of the inhibitor varying with photoperiod in sycamore (*Acar pseudoplatanus*). *Physiol. Plant.*, **17**, 314-323 (1964)
- 63) Rudnicki, R. M.: Studies on abscisic acid in apple seeds. *Planta*, **86**, 63-68 (1969)
- 64) Ruonichi, R., Sinska, I. and Lewak, S. T.: The influence of abscisic acid on the gibberellin content in apple seeds during stratification. *Biol. Plant*, **14**, 325-329 (1972)
- 65) Samish, R. M.: Dormancy in woody plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **5**, 183-204 (1954)
- 66) Soundheimer, E., Tzon, D. S. and Galson, E. C.: Abscisic acid levels and seed dormancy. *Plant Physiol.*, **43**, 1443-1447 (1968)
- 67) Summer, D. C. and Lyon, J. L.: Effects of (±) abscisic acid on seed germination in four species of grasses, *Planta*, **75**, 28-32 (1967)
- 68) 高橋成人：稲種子の発芽に関する生理遺伝学的研究. 東北大農研彙報, **14**, 1-87 (1962)
- 69) 高橋成人：稲種子の休眠と発芽. 東北大農研報, **18**, 195-213 (1967)
- 70) 高橋成人：稲種子の休眠と発芽. 植物の化学調節, **2**, 84-92 (1967)
- 71) 竹島淳三：水稲種子の生長調整物質について, 農及園, **36**, 869 (1961)
- 72) 海野元太郎：水稲品種の発芽特性に関する研究. 日作紀, **5**, 211-216 (1944)
- 73) Villers, T. A. and Wareing, P. F.: Interaction of growth inhibitor and a natural germination stimulator in the dormancy of *Fraxinus excelsior* L.. *Nature*, **185**, 112-114 (1960)
- 74) Williams, P. M., Ross, J. D. and Bradbeer, J. W.: Studies in seed dormancy VII. The abscisic acid content of the seeds and fruit of *Corylus avellana* L.. *Planta*, **110**, 303-310 (1973)
- 75) 八尋正樹：桑樹冬芽休眠の生理学研究. 鹿大農学術報告, **21**, 43-76 (1971)
- 76) 安江多輔・浅井 靖：稲種子の休眠と穂発芽に関する研究. 岐阜大農研報, **26**, 1-12 (1968)
- 77) 安江多輔・古田 稔：登熟中の環境条件がイネ種子の休眠性および発芽性におよぼす影響. 岐阜大農研報, **31**, 31-39 (1971)
- 78) 安江多輔：イネ種子の含水率および水中浸漬と休眠覚せい効果. 岐阜大農研報, **34**, 1-10 (1973)

Summary

This investigation was carried out with the intention of making obvious the relationship between the fluctuation in the endogenous germination inhibitors and the dormancy in rice seeds, which is to be controlled by various internal and/or external factors.

1. Biological and chemical determinations of the endogenous germination inhibitors and of the auxin in rice seeds

(1). Determinations of growth inhibitors and of the auxin

The endogenous growth inhibitors and the auxin of dormant seeds and that of non-dormant seeds

were assayed, using the paper chromatography and *Avena* straight growth test.

Activities of the growth inhibitors and of the auxin were found only in the acidic ethyl ether soluble fraction of the extract, and their Rf zones detected on chromatograms which were developed in ammoniacal isopropanol (8:1:1 v/v) were Rf 0.4–0.6, Rf 0.6–0.8, and Rf 0.9–1.0, respectively, these are hereafter to be referred as to auxin, inhibitor-A, and inhibitor-B, respectively. The auxin was detected in all the varieties used, but inhibitor-A and inhibitor-B were detected only in the dormant seeds (Figs. 2, 3), and the levels of both of the inhibitors were higher in the dormant seeds having the strong intensities than in any others, therefore they were assumed to be the factors inducing rice seed dormancy.

(2). Determinations of germination inhibitors and of the auxin

An active influence of the germination inhibitors in the dormant seed upon the germination of the excised embryo of rice seeds was examined by making use of the excised embryo culture method, *i.e.*, the excised embryo of non-dormant seed was sown on the culture media containing the growth substances obtained from the extract of the dormant seed.

Both of the described above growth inhibitors obtained from the dormant seeds were obviously proved to be genuine germination inhibitors. Furthermore, inhibitor-A was ascertained to have stronger inhibitory action on the seed germination than that in inhibitor-B. On the other hand, the endogenous auxin accelerated the seed germination at lower levels having an action which weakens the inhibitory action of inhibitor-A (Table 1).

(3). Identifications of the germination inhibitors and of the auxin

The germination inhibitors and the auxin of the dormant seeds were identified by means of chromatographies.

Inhibitor-A; Using the strongly dormant seed in rice variety Ketaktara, the acidic ethyl acetate soluble fraction of the extract was fractionated by a charcoal adsorption chromatography with aqueous acetone solution, using stepwise-elution method, and each fraction was bioassayed with rice seedling elongation. From 50 to 70% acetone fraction showing the most prominent growth inhibiting activity was purified further by the silicic acid partition chromatography with ethyl acetate in the n-hexane solution, and the resulted 11 fractions were bioassayed. The result obtained indicated that the 30% ethyl acetate fraction contained the inhibitor most abundantly (Figs. 4, 5). Then the sample of this fraction was methylated by diazomethane and thereafter was analyzed by gas chromatography with 2 kinds of glass column packed with different silicons at 210°C, and this substance showed the same retention time as authentic abscisic acid (ABA). The detected ABA (inhibitor-A) of the extract was composed almost entirely of cis-ABA with small quantity of trans-ABA (Fig. 7). The quantity of cis-ABA was estimated to be over 280 µg in the seed of 1 kg in fresh weight.

Auxin and inhibitor-B; According to the fact that the auxin and the inhibitor-B were registered to be bluish color and reddish color on chromatograms to Ehrlich's reagent, respectively, they were estimated to be indolic compound, and the former was estimated as 3-indoleacetic acid (IAA) according to the Rf value on the paper and the thin layer chromatograms (Fig. 6).

2. Locations of the inhibitors and of the auxin within the dormant seed organs

Both of the inhibitors and the auxin contained in each one of the three organs; embryo, endosperm, and hull, were examined by means of the paper chromatography and *Avena* straight growth test.

Two inhibitors in the dormant seed existed in all the organs, *i.e.*, embryo, endosperm, and hull, endowed with nearly equal biological activities (Fig. 9). Consequently, if the activities of the inhibitors of each organ are to be calculated in terms of one-seed, almost equal quantities of the inhibitors are to be distributed in each organ, and it is noticeable that in spite of its relatively very small body, embryo contains as much quantity of the inhibitors as any other organs. The auxin in the dormant seeds was detected only in both the embryo and the endosperm, and not in hull. Activity of the auxin in the endosperm was stronger than that of embryo, then it was fixed that most of the auxin in

seed was contained in endosperm unlike in case of the inhibitors.

3. Relationship between the fluctuation of the endogenous inhibitors and the auxin, and the release of rice seed dormancy under natural condition

(1). The fluctuating effects of the growth inhibitors upon the release of the dormancy

Using *Avena* straight growth test, the levels of inhibitors in the husked seed and the hull of Hadsaduri seed having the stronger dormancy were assayed at several period during the term from the 20th day after flowering to the termination of dormancy, in order to make clear the relationship between the dormancy and the endogenous inhibitors.

Levels of both of the inhibitors; inhibitor-A and inhibitor-B, were detected most strongly in the husked seed and the hull at the 20th day after flowering, and their existence decreased in proportion to the advancement of the release of dormancy (Figs. 10, 11).

Then, varietal difference in the levels of inhibitor-A was assayed, using the seeds of 4 varieties having different dormant periods. In non-dormant seeds, the decreasing in the levels of the inhibitor-A took place suddenly in the early stage of ripening, and germinability of the seeds was promoted in right proportion to decreasing of levels of the inhibitor-A, on the other hand, the decreasing of the levels of inhibitor-A in dormant seeds was hardly recognized during the ripening period, and the levels of inhibitor-A in the seeds were gradually decreased during the period after complete maturity. There was a parallel relationship between the release of the dormancy and the decreasing of levels of the inhibitor-A (Figs. 12, 13).

Basing on this result, it was confirmed that the levels of inhibitors in the dormant seeds differed clearly from those in the non-dormant seeds, and it may be reasonably considered that varietal difference of dormancy and the degree of the intensity of the dormancy was primarily determined by the levels of the endogenous inhibitors.

(2). Establishment of a new bioassay method of inhibitor by means of the excised embryo culture method

A new method enabling us to assay quantitatively the abscisic acid (ABA) by means of the germination of the excised embryo of the non-dormant rice seed was fixed up. The method consisted of the every-day-counting of the germination percentage, during the period from 2nd day to the 6th day after the sowing of the excised embryo on the culture media containing ABA. The assay limits to ABA content were noted to be ranged between 0.001 mg/l and 5 mg/l, and the sensitivity on the germination inhibiting level was noted to be within 10^{-1} mg/l of ABA content (Fig. 14, Table 3). It was reasonably considered that this assay method might be used on the assay of the endogenous germination inhibitors contained in the dormant rice seed.

(3). Comparison of the levels of the germination inhibitors of the seed differing in the degree of the dormancy

Using the seeds in variety Hadsaduri having the strong intensity of the dormancy, the levels of germination inhibitor in the seed differing in the degree of dormancy, that is, with the germination percentage being 0%, 33%, and 98%, were assayed quantitatively by means of the rice excised embryo culture method.

Similarly to the case of the growth inhibitors described above both of the germination inhibitors were noted to have a close relationship with the degree of dormancy in seed. Inhibitor-A (ABA) was ascertained to have stronger inhibitory action on the seed germination than inhibitor-B, with the confirmation of the fact that ABA was the main factor in the rice seed dormancy (Table 4).

(4). Relationship between the dormancy and the auxin

Using the dormant seeds of 4 varieties, the change of levels of the auxin was assayed at several periods during the term from 20th day after flowering to the termination of dormancy, in order to make clear the relationship between the dormancy and the auxin.

Levels of the auxin were detected at all periods with nearly equal biological activity unlike in case

of the inhibitors. As the result of the assay, it is considered that the auxin does not have any direct correlation with the release of the rice seed dormancy (Figs. 15, 16).

4. Studies on the artificial breaking of the dormancy in the rice seed

(1). The effects of the high temperature and moisture on breaking the dormancy

The relations between the temperature and the period of presoaking the seeds, between the temperature and the period of storage of the imbibed seeds, and between the oxygen in water and the breaking of the dormancy of seeds, were investigated.

When the seeds with moisture content over the range from 25 to 28 percent soaked in water at 25°C for 12 to 48 hours, were stored at 35°C, 40°C, and 45°C in air with saturated humidity, the dormancy was broken in shorter period at the higher temperature, and moreover it was noted that the dormancy was to be affected more with the rising of the temperature and with increasing of the period of presoaking treatment. When the seeds with high moisture contents were stored at 45°C, the germination damage of seeds occurred simultaneously with the increasing of the days of storage, but did not occur below 40°C. Accordingly, it was fixed that the storage at 40°C was the most effective and safe treatment for breaking the dormancy of the seeds having the high moisture content (Tables 6, 7).

When the imbibed seeds were stored at 40°C, the dormancy was effectively broken during the shorter period through all of the seeds in spite of the varietal difference in the intensities of the dormancy (Table 8). Then it was proved that moisture of seeds after presoaking treatment performed quite a big promoting action in breaking the dormancy by high temperature.

The dormancy was broken by the treatment of soaking directly the seeds in 40°C hot-water, and the germination damage became more remarkable in right proportion to the increasing of duration of the treatment (Table 9). It was proved that both the dormancy breaking and the germination damage had a close relationship with the amount of oxygen in water during the treatment, namely, breaking of the dormancy was promoted, and germination damage was decreased, by the supply of much amount of oxygen in hot-water (Fig. 18, Table 10).

The dormancy of the imbibed seeds which were soaked in water from 25°C to 40°C for 24 to 48 hours, was effectively broken by the treatment of storage at 40°C for 1 to 7 days in air with saturated humidity. When the dry dormant seeds were soaked immediately in 40°C hot-water supplied continuously with oxygen, the dormancy was also broken by only 1 day's soaking. Basing on the above mentioned results, two new methods for breaking the dormancy of rice seeds were fixed up, namely, one is the treatment in which the seeds of the saturated moisture content are to be stored at 40°C for 1 to 2 days in the air with the saturated humidity, another is the treatment in which the seeds are to be soaked in 40°C hot-water supplied continuously with air for only 1 day.

(2). The effects of the high oxygen tension on the release of the dormancy

The seeds of 3 varieties having the different dormancy periods were stored in the laboratory, and they were tested for germination under the high, the medium, and the low oxygen partial pressures with the interval of 10 days during the dormancy periods.

The release of the dormancy was promoted under the high oxygen tension but it was inhibited under the low oxygen tension, in comparison with the atmospheric condition. Both the degrees of the promotion and of the inhibition were positively proportional to the intensities of the dormancy through all the varieties (Fig. 19).

The imbibed seeds treated with high temperature of 40°C, for 2 days under the conditions of two kinds of the oxygen tension, *i.e.*, 20% and 0% oxygen, were sown in the flasks containing 100%, 20%, and 0% oxygens, respectively.

The dormancy of the seeds treated under the condition of 20% oxygen was broken most effectively at the high oxygen tension, but under the condition of 0% oxygen, breaking of the dormancy was inhibited exceedingly. On the other hand, the dormancy of seeds treated under the condition of 0% oxygen was broken effectively at the high oxygen tension, but under the condition of 0% oxygen, no

breaking of the dormancy occurred at all (Table 12).

(3). The changes of levels of the germination inhibitors and of the auxin with the artificial breaking of the dormancy

The endogenous inhibitors and the auxin in hull, endosperm, and embryo of the imbibed seeds treated with high temperature of 40°C, for 2 days were assayed, respectively, by means of *Avena* straight growth test.

Levels of both of the endogenous inhibitors were obviously decreased with the similar proportion in all organs, and the increasing in the levels of the auxin was recognized only in endosperm (Fig. 20).

The effects of moisture upon the decreasing in the levels of the endogenous inhibitors of the seeds, which were artificially broken by 3 kinds of high temperature treatments, were assayed by means of germination test of the excised embryo of rice seeds, respectively.

The levels of the inhibitors in dormant seeds decreased at the period when the seed dormancy was broken by artificial treatment, but the decreasing of level of inhibitor-A of the imbibed seeds soaked in 40°C hot-water supplied with air continuously for only 2 days was greater than that of the unimbibed seeds placed at 50°C for 10 days, and the inhibitor-A left in the unimbibed seed disappeared soon at the period when the seeds treated were soaked in water (Table 13).

Two kinds of artificial treatment, *i.e.*, husking and injury, were given to the unimbibed and imbibed dormant seeds, which were stored in incubator at 15°C for 10 days. And the endogenous inhibitors in the husked seeds were assayed with *Avena* straight growth test.

The levels of inhibitors were decreased also in all the kinds of seeds (Table 15).

Basing on all these results, it was noted that the decreasing of germination inhibitors in the imbibed seeds was exceedingly greater than that of the unimbibed seeds. And it was obviously proved that the artificial breaking of the dormancy was induced also with the decreasing of the endogenous germination inhibitors like in case of the natural release of dormancy, and it was a common feature that the decreasing of the endogenous germination inhibitors was remarkably promoted by imbibing of the seeds.

The imbibed seeds were treated with high temperature of 40°C, for 2 days under the condition of two kinds of the oxygen partial pressure, *i.e.*, 100% and 0% oxygen, and the endogenous germination inhibitors in the seeds were assayed quantitatively, by means of the excised embryo culture method of the rice seeds.

The results showed that levels of the inhibitors were decreased remarkably under the condition of 100% oxygen, but they were kept unchangeable under the condition of 0% oxygen (Table 14).

(4). Degeneration of surface structure of the hull treated at high temperature

In the rice plants were grown at 30°C and under natural condition from the flowering time to the harvesting time, the dormancy of the seed ripened at 30°C was noted to be lower than that of the one ripened under the natural condition, thereafter a comparison of the surface structure of hull of both of the seeds was carried out by the observation making under scanning electronic microscope.

Linear cracks about 0.8 μ m wide were noted on the outer epidermis of the hull of the seeds ripened at 30°C. These cracks were noted to be scattered chiefly on the lower portion at the center of the hull, situated at the center between tubercles, and running across 1-3 longitudinal rows of tubercles (Figs. 23, 24, 27, 28). Since similar cracks were found also on the inner epidermis of the hull (Fig. 26), it was reasonably assumed that the two sorts of crack on the outer and inner epidermis were connected mutually through hull-tissues. No such cracks were observed on the hull of the seeds ripened under natural condition.

By the same method, the hull of the seeds whose dormancy was effectively broken by the 50°C treatment for 10 days was observed, too.

It was noted that the cracks were large sized, innumerable, very dense and irregular in shape, the maximum width reaching 90 μ m (Figs. 29, 30).

Basing on the above obtained results, and owing to the fact that restriction of an oxygen-entrance into ordinary hull was to be removed by the occurrence of the cracks in the hull treated, it was assumed that the inactivation, or the decreasing, of the endogenous germination inhibitors contained in the dormant rice seeds, was brought into a finish during a quite short period, as a result of enzymatic oxidation reaction which was to be brought forth at the time when water and warmth were given to the seed, followed by the result that the dormancy of the seed treated was reduced exceedingly. While it was reasonably assumed that the entrance of oxygen into the seed was to be influenced in right proportion to the degeneration degree of the hull, which was accompanied with another reasonable assumption that the levels of the endogenous germination inhibitors in the seed were also to be controlled by the hull degeneration-degree.

Consequently, concerning the rice seed dormancy, a new interpretation was brought forth as in the follows: the main factor inducing the dormancy is the abscisic acid (ABA) of the germination inhibitor, and either phenomenon of natural release or that of the artificial breaking of the dormancy is to be induced in right proportion to the inactivation of the endogenous germination inhibitors, as well as to the working of the enzymatic oxidation reaction of the germination inhibitors.

Explanation of figures

- Fig. 21. Observation of outer surface-structure of hull by SEM. ($\times 75$)
 T: An arrow shows the longitudinal rows of tubercles.
 B: An arrow shows the bristle occurred among the rows of tubercles.
 A: An arrow shows a hole occurred with excision of bristle.
- Fig. 22. Outer surface of hull. ($\times 250$)
 T: An arrow shows tubercles having two bulges.
- Fig. 23. Linear cracks are observed on outer surface of the hull of seeds ripened at 30°C . The cracks are existed at the center between tubercles, running across 1 longitudinal row of tubercles. ($\times 250$)
- Fig. 24. A crack is running across 3 longitudinal rows of tubercles. ($\times 250$)
 This crack is found generally on the observation.
- Fig. 25. Observation of inner surface-structure of hull. ($\times 250$)
 S: Stoma, T: Trichome
- Fig. 26. The similar cracks are also found on the inner surface of hull ($\times 750$)
- Fig. 27. An arrow shows the enlarged cracks of Fig. 23. Width of the crack is about $0.8\ \mu\text{m}$. ($\times 750$)
- Fig. 28. An arrow shows the enlarged crack of Fig. 24. ($\times 750$)
- Fig. 29. The outer surface-structure of hull of seed treated at 50°C for 10 days. The cracks are very dense and irregular in shape. ($\times 250$)
- Fig. 30. The cracks are very large and have the maximum width, reaching about $90\ \mu\text{m}$. ($\times 750$)

