

稲種子の休眠性および発芽性に関する研究

XI. 休眠解除と内生ジベレリン様物質との関係

林 満・松尾友明*

(熱帯作物学研究室・*青果保蔵学研究室)

昭和57年8月10日 受理

Studies on Dormancy and Germination of Rice Seed

XI. Ascertainment of the Relationship between the Endogenous Gibberellin-Like Substances and the Seed Dormancy

Mitsuru HAYASHI and Tomoaki MATSUO*

(Laboratory of Tropical Crops, *Laboratory of Postharvest Physiology and Preservation of Fruits and Vegetables)

緒 言

休眠解除に低温を要求する種子では、内生のアブジン酸 (ABA) によって休眠が誘起し、内生のジベレリン (GA) によって休眠が解除されると推定した報告が多い^{1, 14, 18, 20}。休眠解除に低温を必要としない稲種子で、これまで内生の ABA の活性程度によって休眠の誘起と解除が支配されることを明らかにしてきた^{2, 3, 4, 6-9}。また、稲種子の休眠に関する他の報告においても、数種のフェノール化合物を含む発芽抑制物質によって休眠が論じられてきた^{10, 11, 15, 17, 19}。しかし、著者ら⁶は、休眠種子中の ABA を同定する過程の生物検定において、これまで存在しないと考えられていた GA 様物質の存在を初めて確認したのである。そこで本研究は、この GA 様物質と稲種子の休眠解除との関係を解析し、同時に GA₃ の同定を目的として行った。

材料および方法

実験 1. 休眠種子、休眠覚せい種子および非休眠性種子に内生の GA 様活性の比較

本実験には品種特性として、室温条件下で約4カ月にも及ぶ休眠期を有するインド型水稻 Ketaktara と休眠期を有しない (非休眠性) 日本型水稻ミズホの種子を供した。1979年に鹿児島大学農学部の水田で栽培さ

れた両品種の完熟種子を収穫、水選して、7日間風乾した。

Ketaktara の休眠種子は2分し、1部を室温条件下に、他の1部を -15°C ~ -20°C のフリーザー中に実験時までともに約5カ月間貯蔵した。一方、ミズホの収穫種子はすべて室温条件下に貯蔵した。なお、実験時の種子は、室温貯蔵した Ketaktara とミズホ種子では完全な発芽を示し、低温貯蔵した種子では全く発芽せず深い休眠状態にあった。

抽出および溶媒分画; それぞれの籾種子 500g を粉碎して、2l の80%メタノールで2日間室温で抽出した。抽出液を濾過し、残渣を新たに80%メタノールで再度抽出した。そして、抽出液を 35°C の減圧下で50ml の水溶液としたのち、有機溶媒による分画を行い、その酸性酢酸エチル可溶の抽出物を濃縮乾固して、カラムクロマトグラフィーの試料とした⁶⁾。

カラムクロマトグラフィーおよび生物検定; 試料 (0.3g) を活性炭吸着カラムクロマトグラフィーによって精製した⁶⁾。その溶出液の濃度は、20%アセトン水溶液から20%刻みで100%溶液までの5種類であった。それぞれの溶出物を減圧下で濃縮乾固して、それらをシリカゲル分配カラムクロマトグラフィー (SPC)⁶⁾ の試料とした。5g のシリカゲル (100~200メッシュ) に 0.5 M ギ酸水溶液 3ml を加え、カラムに充てんし、試料をそれぞれセライト (545) に吸着させてマウントした。そして、カラムは 0.5 M ギ酸水溶液で飽和させた酢酸エチルと n-ヘキサンとの混合溶媒 50ml で溶出した。その混合溶媒中の酢酸エチル濃度は、10

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 No. 456013 による。

%から10%刻みで100%までの10種類であった。それぞれの溶出物を減圧下で濃縮乾固して生物検定の試料とした。各試料を新たに1mlのアセトンに溶かし、その全量につき、矮性稲の短銀坊主による生物検定⁶⁾を行った。この実験は2反復とした。

実験2. 休眠打破にともなうGA様活性の変化

1980年に収穫されたKetaktaraの休眠種子を供した。粃種子500gを用い、これを40°Cの温湯中に2日間および4日間置く温湯処理⁵⁾を行い、休眠を完全に打破した。この種子を80%メタノール中で摩砕して、実験1にしたがって抽出および溶媒分画を行い、その酸性酢酸エチル可溶の抽出物を直ちにSPCの試料とした。そのSPCにおける混合溶媒中の酢酸エチルの濃度は0%から5%刻みで100%までの20種類とした。そして、それぞれの溶出物について短銀坊主による生物検定⁶⁾を行った。この実験は4反復とした。

実験3. 非休眠種子の吸水にともなうGA様活性の変化

休眠が自然覚せいした種子 (Fig. 1 (2)) と人為的に打破された種子 (Fig. 2) のGA活性には大きな差異が認められた。そこで、1980年に収穫された非休眠性のミズホ種子を用いて、種子が吸水した場合のGA様活性の変化を検定した。

粃種子500gを用い、(1) 種子を15°Cの水に20時間浸漬した。(2) この吸水種子の附着水を沬紙で除き、密封容器に入れて、さらに15°Cで5日間貯蔵した。これらの(1)、(2) 処理種子について、実験2と同じ

方法でGA様活性を検定した。この実験は4反復とした。

実験4. 休眠種子内生のGA₃の同定

1981年に収穫されたKetaktaraの休眠種子を供した。粃種子40kgを粉砕して、80%メタノールで抽出し、その抽出物を溶媒分画⁶⁾して、得られた酸性酢酸エチル可溶の濃縮乾固物(3.8g)を活性炭吸着カラムクロマトグラフィーにかけ、1.1gの濃縮乾固物を得た。つぎに、この抽出物(1.1g)をSPC⁶⁾によって精製した。その混合溶媒中の酢酸エチルの濃度は、0%から60%までは5%刻みに、60%から100%までは10%刻みとした。そして、それぞれの溶出物の1/50量について生物検定⁶⁾を行い、Fig. 4にみられるように40%および45%溶出物に明瞭なGA様活性が検出された。そこで、薄層クロマトグラフィー¹⁾ (TLC)によって、これらのGA様物質を既知のGA₃、GA_{4,7}とクロマトグラフィーを行い、各Rf値(1/10)について、矮性稲の短銀坊主および矮稲Cの2品種による生物検定⁶⁾を行った。

結果および考察

休眠性のKetaktaraの休眠種子および休眠覚せい後の種子と非休眠性のミズホの種子から得られた抽出物を活性炭吸着カラムクロマトグラフィー⁶⁾にかけ、アセトン20, 40, 60, 80および100%で分画されたそれぞれの溶出物をさらにSPCで分画し、生物検定した結果、GA様活性が検出されたのは、いずれの種子

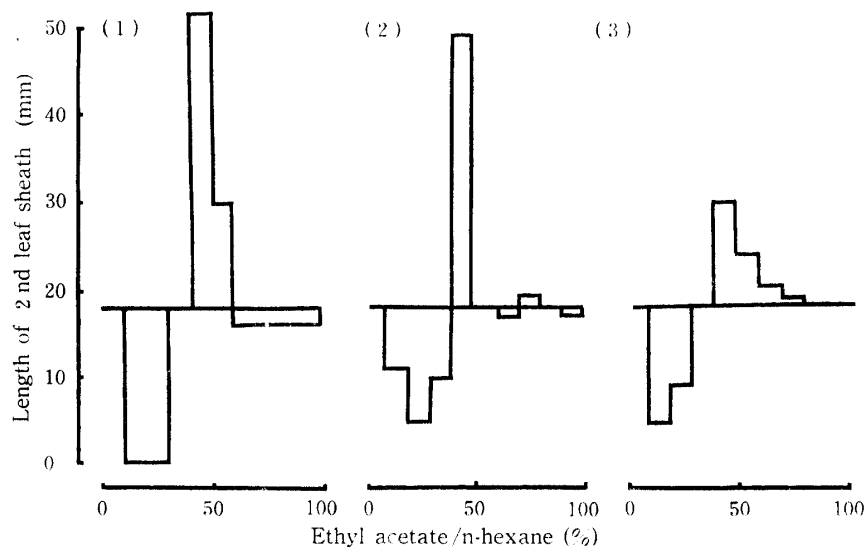


Fig. 1 (1), (2) and (3). Histograms representing the rice seedling growth test, cv. Tan-ginbozu, of a silica gel partition chromatography of the acidic ethyl acetate soluble fraction of extract obtained from (1) dormant seeds and (2) seeds of released dormancy, cv. Ketaktara, and (3) non-dormant seeds cv. Mizuho.

でも吸着カラムにおいてアセトン60%および80%で溶出された抽出物だけであった。そして、80%溶出物のGA様活性は60%溶出物のそれに比べて著しく微弱であり、しかもSPCにおけるフラクション値が60%溶出物のフラクション値と一致したことから、同一GA様物質の残留物による活性と判断されたので、60%溶出物をSPCしたヒストグラムをFig. 1に示した。

GA様活性は休眠種子(1)、休眠覚せい後の種子(2)、非休眠種子(3)のいずれにおいても検出されたが、休眠性のKetaktara(1)、(2)と非休眠性のミズホ(3)のGA様活性を比較すると、両品種の間には明瞭な差異が認められ、KetaktaraのGA様活性が著しく大であった。一方、同じKetaktaraの休眠種子(1)と休眠覚せい後の種子(2)にはGA様活性にほとんど差異は認められなかった。

つぎに、Ketaktaraの種子において、休眠を40°C温湯処理によって打破した種子のGA様活性を検定した結果のヒストグラムをFig. 2に示した。

このヒストグラムにみられるように、休眠種子(Fig. 1)で検出されたGA様活性は、2日間(1)および4日間(2)のいずれの処理種子でも著しく低下した。そして、2日間と4日間の処理間にはほとんど差異は認められなかった。

さらに、非休眠性のミズホ種子を吸水させて、内生のGA様活性を検定した結果のヒストグラムをFig. 3に示した。

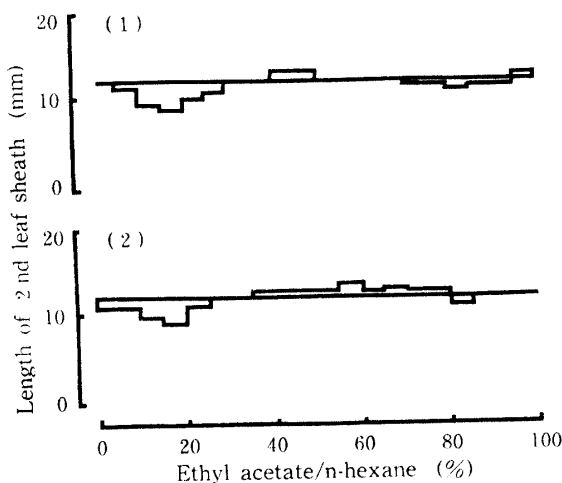


Fig. 2 (1) and (2). Histograms representing the rice seedling growth test, cv. Tan-ginbozu, of a silica gel partition chromatography of the acidic ethyl acetate soluble fraction of extract obtained from seeds of broken dormancy with 40°C hot-water treatment for 2 days (1) and 4 days (2), cv. Ketaktara.

このヒストグラムにみられるように、ミズホの乾燥種子(Fig. 1(3))で検出されたGA様活性は、水浸漬種子(1)の場合、Ketaktara種子における人為的な休眠解除種子と同様に、著しく低下した。また、吸水種子を5日間貯蔵した種子(2)の場合も新たなGA様活性の増加は認められず、すべてFig. 2のヒストグラムと共通するものであった。

既報^{2,4,6-9)}において、稲種子の休眠と内生のABA活性との間には、その休眠がABA活性の程度によって支配されていると推定してきた。その理由の1つとして、休眠解除とABA活性の低下が平衡的であること、休眠種子と休眠性を有しない種子とではABA活性に大きな差異が認められることであった。しかし、Fig. 1にみられるように、休眠種子(1)と休眠覚せい後の種子(2)のGA様活性はほぼ等しく、ABA活性で認められた関係は全くなく、むしろIAA活性の変化(未発表)に類似するものであった。また、非休眠種子(3)のGA活性は休眠種子(1)のそれよりも逆に小であった。

休眠解除に低温を要求する種子において、人為的な

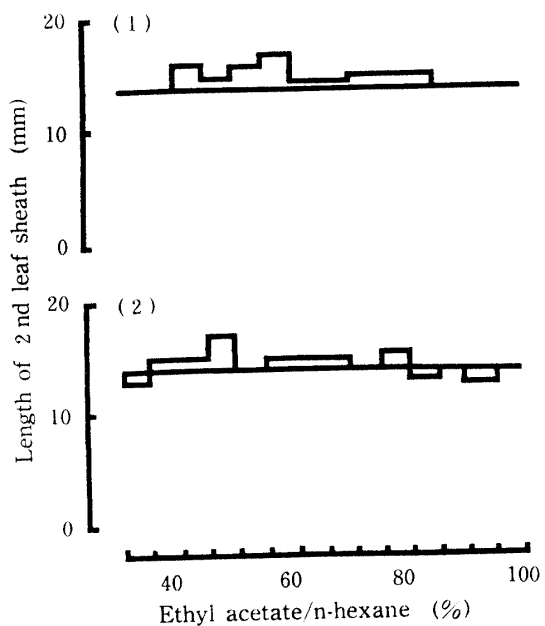


Fig. 3(1) and (2). Histograms representing the rice seedling growth test, cv. Tan-ginbozu, of a silica gel partition chromatography of the acidic ethyl acetate soluble fraction of extract obtained from the imbibed seeds, cv. Mizuho.

- (1); Seeds were soaked in water at 15°C for 20 hours,
- (2); Imbibed seeds were stored at 15°C for 5 days.

休眠打破処理（低温処理）の前後における内生の GA 様物質の活性程度を比較すると、処理後の種子で GA 様物質の種類および量的な増加が認められることから、GA 様物質がそれらの種子の休眠解除に支配的な役割をはたすと推定されている^{1,14,18,20}。これに対して稲種子は、休眠解除に低温を必要としないし、また、これまで GA 様物質が存在しないと考えられていた^{12,13} ために GA 様物質と休眠との関係は全く未知であった。稲種子の休眠を人為的に打破した場合の GA 様活性 (Fig. 2) は、低温要求種子とは全く逆に著しい低下を示し、稲の休眠種子における GA 様物質の生理的な作用が低温要求種子と異なることを示唆していると解釈された。そして Fig. 1 と Fig. 2 の結果を総合して、GA 様物質は稲種子の休眠解除に対して支配的な関係を有しないものと推定された。

Fig. 2 および Fig. 3 でみられた GA 様活性の低下は、いずれも吸水種子におけるものであり、GA 様物質の種子外への浸出を考慮する必要がある。しかし、吸水種子において処理後にオーキシンが体内で活性化された⁹ こと、ABA が体内で不活性化された⁷⁻⁹ ことを考え合せた場合に、GA 活性のこのような著しい低下は、種子の発芽初期段階における体内代謝での GA 様物質の消費であると解釈するのが妥当であろう。代謝と GA との関係に関しては、GA が α -アミラーゼなどの活性を高め、それによって貯蔵澱粉の易動化がもたらされ、発芽へと連係すると考えられている¹⁴。稲種子における GA 様物質の活性低下は、上記の機構と類似した GA の消費の可能性を強く示唆したものと見えよう。

Fig. 4 の SPC で検出された酢酸エチル40%および

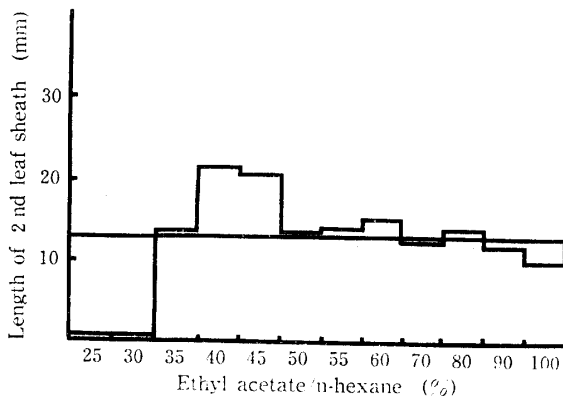


Fig. 4. Histogram representing the rice seedling growth test, cv. Tan-ginbozu, of a silica gel partition chromatography of extract obtained from the dormant seeds, cv. Ketaktara.

45%の GA 様物質を既知の GA_3 , $GA_{4,7}$ と同時に TLC でコクロマトグラフィーし、40%の GA 様物質を短銀坊主と矮稲 C で生物検定した結果をそれぞれ Fig. 5A および Fig. 5B に、45%の GA 様物質をそれぞれ Fig. 5C および Fig. 5D に示し、さらに既知の GA_3 の Rf 値を図中に表示した。

SPC において酢酸エチル40%および45%で溶出された GA 様物質の TLC における Rf 値は、いずれも GA_3 の Rf 値と近似した。しかし、40%溶出区の GA 様物質は短銀坊主に対しては活性を示したが (Fig. 5A), 矮稲 C には全く活性を示さなかった (Fig. 5B)。一方、45%溶出区の GA 様物質は短銀坊主と矮稲 C の両者に対して活性を示した (Fig. 5C, D)。これらの結果は、40%と45%溶出区の GA 様物質が異質であることを示したといえよう。

村上の報告¹⁰ によると、矮稲 C は C-3 位の水酸基を持たない GA にはほとんど反応しないので、未知の GA の同定に短銀坊主との併用が有用であると述べられている。Fig. 5A, B の結果は40%酢酸エチルで溶出された GA が C-3 位に水酸基を持たず、かつ水酸基を2個か、あるいは水酸基1個と C-10 位に極性基を持っている可能性を示唆するものであった。さらに、この GA が酸性酢酸エチル可溶であること、SPC で40%酢酸エチルで溶出されることを総合的に考慮すると、この物質は GA_1 であると推定される。

一方、45%溶出区の GA は、SPC で45%酢酸エチルで溶出されたこと、両矮性稲がこれに反応したこと、TLC の Rf 値が GA_3 に近似したことから、 GA_1 か GA_3 であろうと推定された。

以上の結果から、Ketaktara の休眠種子に存在する GA は複数であり、生物検定におけるそれらの活性の程度からみて、この種子に内生する GA_3 の総量は著しく少ないことが示され、 GA_3 当量で約 5 ng/kg の極微量であると概算された。また、現在、マスフラグメントグラフィーと GC-SICM による完全な同定と定量を検討中である。

黒河内^{12,13} らは、水稻の日本晴、T-136 の茎葉、根、穂から GA_1 と GA_3 を検出しており、これは本実験の種子の GA_3 と良く符合していると考えられる。しかし、完熟種子中の GA は検出していない。これはおそらく種子中の GA が極微量であったためであろう。また、芽生の着いた籾殻中に GA_4 の存在を認めているが、本実験で検出された GA の挙動とは、SPC の溶出位置、TLC の Rf 値ならびに両矮性稲に対する反応において全く異なり、この GA_4 は発芽初

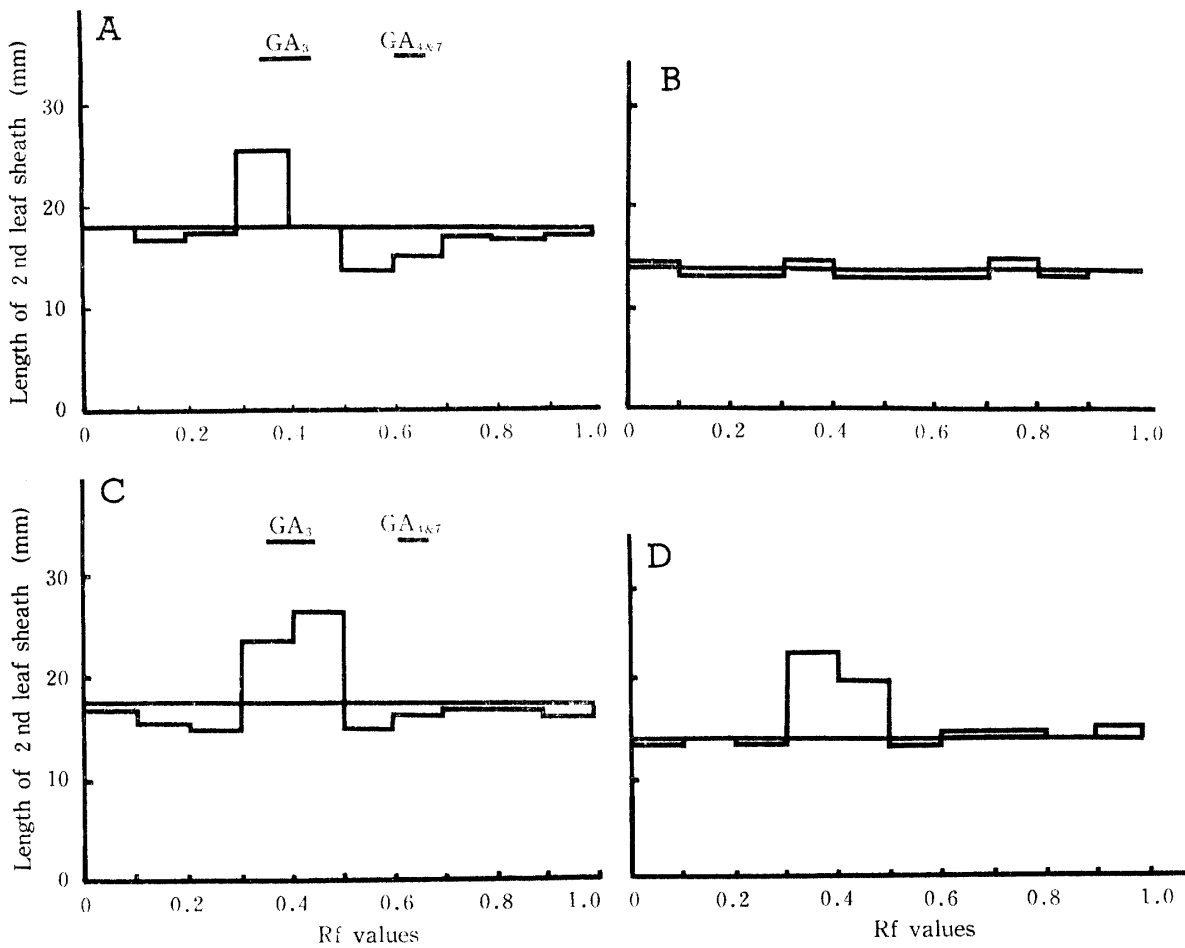


Fig. 5 A, B, C and D. GA-like activity of extract eluted by 40% ethyl acetate in n-hexane (A and B) and 45% ethyl acetate in n-hexane (C and D) in Fig. 4.

The silica gel partition chromatography purified extract was fractionated by thin layer chromatography and the resulting chromatogram was divided into 10 equal strips, and the eluate was assayed with rice seedling growth test with the use of two dwarf cultivars, Tanjinbozu (A and C) and Waito-C (B and D).

期に新たに合成された可能性が大である。稲種子に内生するこのように微量の GA がどのような生理的役割を果しているかを解明することが今後の検討課題である。

要 約

GA 様物質は休眠種子のみならず休眠覚せい種子および休眠性を有しない種子にも存在した。休眠性 Ketaktara 種子の GA 様活性は、非休眠性 ミズホ種子のそれよりも著しく大であった。一方、同じ Ketaktara の休眠種子と休眠覚せい種子では、GA 様活性にほとんど差異は認められなかった。また、休眠を人為的に打破した場合に、GA 様活性は著しく低下し、さらに非休眠性種子が吸水した場合も同様であった。これらを総合して、GA 様物質と休眠との間には、

発芽抑制物質の ABA と休眠との間に認められたような関係が認められなかったことから、GA 様物質は稲種子の休眠解除に支配的な関係を有しないと推定された。

稲の休眠種子から得られた酸性酢酸エチル可溶の抽出物をシリカゲル分配カラムクロマトグラフィーで分画すると、GA 物質は酢酸エチル (n-ヘキサン中) 40%および45%で溶出される。溶出されたこれらの GA 様物質を薄層クロマトグラフィーと2品種の矮性稲 (短銀坊主, 矮稲 C) とを組合せて同定した結果、40%酢酸エチルで溶出された GA は GA₁₉、45%酢酸エチルで溶出された GA は GA₁ か GA₃ であろうと推定された。そして、この種子に内生する GA の総量は、GA₃ 当量で 5 ng/kg と極微量であると概算された。

文 献

- 1) Arias, I., Williams, P. M. and Bradbeer, J. W.: Studies in seed dormancy IX. *Planta*, **131**, 135-139 (1976)
- 2) 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. *熱帯農業*, **16**, 270-275 (1973)
- 3) 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. *熱帯農業*, **17**, 245-247 (1974)
- 4) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究 IV. *熱帯農業*, **19**, 156-161 (1976)
- 5) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究 V. *熱帯農業*, **20**, 164-171 (1977)
- 6) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究 VI. *熱帯農業*, **23**, 1-5 (1979)
- 7) 林 満・田中文雄：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究 VII. *鹿大農学術報告*, **29**, 11-20 (1970)
- 8) 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. *鹿大農学術報告*, **29**, 21-32 (1979)
- 9) 林 満：稲種子の休眠性および発芽性に関する研究 IX. *鹿大農学術報告*, **30**, 1-9 (1980)
- 10) 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)
- 11) 加藤忠弘・高橋成人・北原喜男：モミの化学調節物質. *植物の化学調節*, **10**, 75-79 (1975)
- 12) Kurogochi, S., Murofushi, N., Ota, Y. and Takahashi, N.: Gibberellin and inhibitors in the Rice plant. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 207-208 (1978)
- 13) Kurogochi, S., Murofushi, N., Ota, Y. and Takahashi, N.: Identification of gibberellins in the rice plant and quantitative changes of gibberellin A₁₉ throughout its life cycle. *Planta*, **146**, 185-191 (1979)
- 14) 増田芳雄・勝見允行・今関英雄：植物ホルモン. p. 113-192, 朝倉書店, 東京 (1971)
- 15) Mikkelsen, D. S. and Glazewskii, A. T.: The Occurrence and some physiological properties of Endogenous growth substances in the hull of *Oryza sativa*. *The 11th Pacific Sci. Cong.* (1966)
- 16) 村上 浩：奇蹟の植物ホルモン. p. 167, 協和醗酵工業 KK, 東京 (1980)
- 17) 太田保夫：作物における種子の休眠. *農業技術*, **28**, 68-74 (1973)
- 18) Ross, J. D. and Bradbeer, J. W.: Studies in seed dormancy V. *Planta*, **100**, 288-302 (1971)
- 19) 高橋成人：稲種子の休眠と発芽. *東北大農研報*, **18**, 195-213 (1967)
- 20) Williams, P. M., Ross, J. D., and Bradbeer, J. W.: Studies in seed dormancy VII. *Planta*, **110**, 303-310 (1973)

Summary

This investigation was carried out for the purpose of ascertaining the relationship between the endogenous gibberellin(GA)-like substances and the releasing of the rice seed dormancy, since the results in the previous paper in this series proved that GA-like substances exist in the dormant rice seeds.

The endogenous GA-like substances were detected in any dry seeds, regardless of dormant seeds, seeds of released dormancy naturally and non-dormant seeds, having no dormancy. Concerning the comparative biological activity of GA-like substances, seeds of cv. Ketaktara, a dormant-type, showed distinctly higher GA-like activity than that of cv. Mizuho, a non-dormant-type, and in case of cv. Ketaktara no difference was detected in GA-like activity between the dormant seeds and the seeds releasing dormancy. A breaking of dormancy of rice seeds using a artificially hot-water method, decreased markedly the GA-like activity. In case of non-dormant seeds imbibing also greatly decreased the GA-like activity. Basing on these results, no such relationship as the one established between abscisic acid, a germination inhibitor, and dormancy was demonstrated between the GA-like activity in the seeds and the seed dormancy. Thus, it was suggested that the endogenous GA-like substances played no major role in relasing the dormancy of rice seeds. These results also suggest that the physiological involvement of GA-like substances of rice seed may be quite different from that of the other seeds requiring low temperature for breaking the dormancy.

Using the strongly dormant seeds of rice cv. Ketaktara, GA-like substances were analyzed by 3 kinds of chromatography and bioassay with rice seedling with the use of two dwarf cultivars, Tanguinbozu and Waito-C.

GA-like substances contained in the acidic ethyl acetate soluble fraction of the extract were fractionated, in 60% aqueous acetone solution, by charcoal adsorption chromatography, using stepwise-elution method. Then the active fraction was mounted again on a silica gel partition chromatography, and the GA-activity was found in fractions of 40% and 45% ethyl acetate in n-hexane. The active extracts purified, was furthermore fractionated by thin layer chromatography (TLC). Judging from *R_f* value on TLC and the relative activity in rice bioassay, GA-like substance eluted by 40% ethyl acetate in n-hexane, was assumed to be GA₁₉ and that eluted by 45% ethyl acetate to be GA₁ or GA₃, respectively. The content of endogenous GA₅ in rice seeds was extremely low; about 5 ng/kg GA₃ being equivalent as the one estimated by rice bioassay.