

2 *Gorteria diffusa* の種子発芽の特異性に関する研究 part II

静岡県立磐田南高等学校 生物部
1年 平野 靖也, 村松 壮, 鈴木 雅大

1 序論

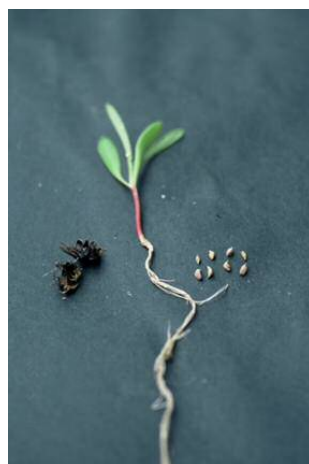
Gorteria diffusa (図1) は、南アフリカ北西部に自生する一年生のキク科植物である(図2)。キク科の種^{たね}は厳密に言えば、「瘦果」と呼ばれる果実であり、内部に1個の種子を含んでいる。したがってキク科植物の胚は、種皮とその外側の果皮を破って発芽してくるのである。しかし本研究では、便宜的に瘦果を「種子」と呼ぶことにする。*G. diffusa* の種子散布の方法は、キク科の中でも特異的である。*G. diffusa* の総苞片は果実が実る頃融合して木質化し、内部に複数の種子を包み込んでしまう。そして総苞と花茎の接点付近で外れて、原野を転がっていき、硬くつながった総苞片の先端がどこかに引っかかり、いずれ土をかぶるのである。この種子を包み込む殻のことを、文献では‘closed receptacle’^{たね}と称しているが(Duncan & Ellis 2011)、本文では「殻」と呼ぶことにする。そんな硬い殻に包まれた種子がどのように発芽するかというと、図3のように壺型の殻の上部には直径1 mm程度の孔があいていて、子葉はここから外へ現れる。下部には先述の総苞と花茎の接点だった部分に直径0.5 mm程の小さな孔が開いていて、この孔から根が出てくる。また内部の種子は複数だが、吸水させてから発芽してくるのは、普通1個体だけである(図4)。この硬い殻をはさみで取り除き、種子をすべて取り出して、同じ容器に同時に播いてみた。1個の殻の中には普通4個~7個の種子が収まっているにもかかわらず、発芽するのは1個か稀に2個であった。これは発芽した種子から他の種子へ発芽阻害物質が分泌されているためかもしれないと考え、1個の殻から取り出した種子を別々の容器に入れて水を与え発芽させようとしたが、やはり結果は同じで、発芽するのは1または2個であった(山村 未発表)。そこでこの特異的な種子発芽には、種子の休眠を維持するホルモンとして知られているアブシシン酸が関係しているのではないかと考え、「1個の殻の中の複数の種子の内、1個または2個だけが他の種子よりもアブシシン酸の含有量が少ないのではないか」という仮説を立てて検証を行った。以下アブシシン酸のことをABAと呼ぶ。平成20年度には、仮説に沿う結果は得られたものの、データ数が少なかつたために仮説を支持しているとは言い切れなかつた。part IIの研究ではデータ数を増やし、仮説の検証を行った。



図1 *Gorteria diffusa*



図2 カーペット上に広がって咲く
Gorteria diffusa
南アフリカ南西部にて撮影



2 材料と方法

種子の ABA 含量は生物検定法により調べることにした。Tucker & Mansfield (1971) に従い、ABA 濃度と気孔開度の相関関係を利用した。

(1) ABA 溶液濃度と気孔開度の関係

検定材料として前研究ではシマフムラサキツユクサを用いたが、今回は気孔が大きく、より観察に適していると判断したツユクサ (*Commelina communis*) を用いることにした。

ABA はどの濃度で、どのくらいの気孔を閉じさせる効果があるのか調べた。ABA は、2-cis,4-trans-Abscisic acid (SIGMA 社製) で濃度は、 10^{-4} mol/L から 10^{-9} mol/L まで調製した。1/10 ずつリン酸バッファーで希釈したものを調製した。ツユクサの葉は前述の文献に基づき、展開葉の中で茎の一番上に着いているもののみを用いた。シャーレの中にリン酸バッファー入れツユクサの葉の切片を浮かべて一晩暗室に置き、すべての気孔が閉じたことを顕微鏡で見て確認する。上述のように調製した各濃度の ABA 溶液に葉の切片を浮かべ、28°C の恒温条件下で 3 時間、9000 lux の光を当てた。ABA 処理されていない葉では、この光照射により気孔が大きく開く (平均気孔開度 $8.4 \mu\text{m}$)。それぞれについて、裏の表皮の切片をつくり、100 個の気孔の開度を顕微鏡で調べた。

(2) 種子からの抽出液と気孔開度の関係

種子に含まれると考えられる ABA により気孔の開度に変化があるかを調べた。1 個の殻の中にある種子を全て取り出し、各シャーレに 1 個の種子とリン酸バッファー 5 ml を入れて、その中で種子をすりつぶす。そのシャーレを冷蔵庫に半日以上置き、ABA を溶出させた。ツユクサの葉の処理は上で述べた ABA 溶液の実験のとおり行い、気孔の開度を観察した。今回調べた殻の総数は 24 個である。

3 結果

図 5 に ABA 溶液濃度と気孔開度の関係を示した。ABA の濃度が低いほど、気孔は大きく開いた。表 1 に今回調べた 24 個の殻の種子の結果を示した。1 つの殻から取り出した各種子の抽出液の、光照射下でも気孔を開かせない作用には差があった。気孔開度の最大のものとの差は平均 $7.1 \mu\text{m}$ であった。表 1 の結果をもとに、種子 1 の開度を 1 とした場合の他の種子の開度の相対値 (平均) を求めた (図 6)。これを見ると大きく気孔が開いていたものは、1 つの殻の全種子の中で 1 個または 2 個であり、その他は多くの気孔が閉じたままか、少し開いているだけであった。3 個目の種子では開度は半分になっていた。

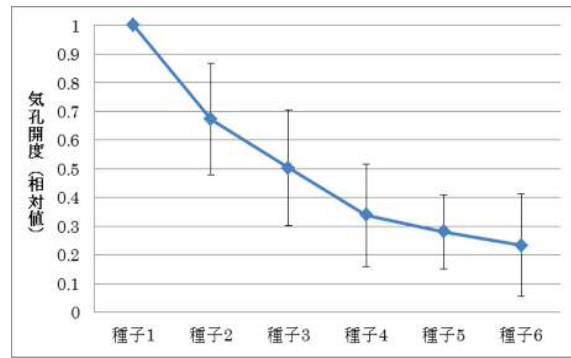
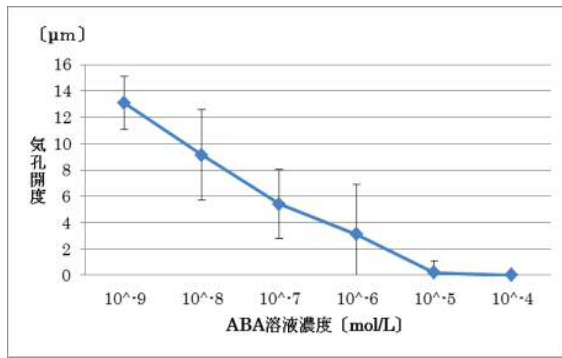


図5 気孔の開閉に対するABAの作用

| | 種子1 | 種子2 | 種子3 | 種子4 | 種子5 | 種子6 |
|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|
| 殻1 | 7.9 | 7.2 | 7.0 | 1.9 | | |
| 殻2 | 10.4 | 7.9 | 6.0 | 4.3 | 3.5 | 2.8 |
| 殻3 | 12.0 | 10.8 | 4.6 | 3.4 | 1.9 | |
| 殻4 | 10.7 | 9.6 | 7.6 | 3.8 | 3.1 | |
| 殻5 | 6.4 | 4.9 | 2.6 | 1.9 | 1.4 | |
| 殻6 | 9.8 | 8.1 | 6.9 | 4.4 | | |
| 殻7 | 9.6 | 8.6 | 3.8 | 1.5 | | |
| 殻8 | 8.1 | 7.0 | 5.9 | 5.4 | | |
| 殻9 | 8.0 | 7.2 | 6.4 | 3.7 | | |
| 殻10 | 16.1 | 10.7 | 9.3 | 9.2 | 8.5 | 6.2 |
| 殻11 | 13.4 | 8.1 | 6.1 | 6.0 | 4.9 | 0.5 |
| 殻12 | 11.7 | 6.8 | 5.3 | 5.3 | 1.7 | |
| 殻13 | 9.0 | 5.0 | 4.0 | 2.0 | 1.8 | |
| 殻14 | 12.9 | 4.5 | 3.5 | 3.0 | | |
| 殻15 | 9.8 | 4.2 | 1.4 | 1.1 | | |
| 殻16 | 9.6 | 6.3 | 5.0 | 1.9 | | |
| 殻17 | 9.5 | 5.4 | 4.1 | 3.1 | | |
| 殻18 | 9.3 | 6.5 | 4.1 | 1.3 | | |
| 殻19 | 8.7 | 3.7 | 1.3 | 0.7 | | |
| 殻20 | 7.2 | 5.9 | 5.7 | 5.0 | | |
| 殻21 | 12.8 | 7.8 | 5.9 | | | |
| 殻22 | 11.3 | 2.3 | 2.1 | | | |
| 殻23 | 7.3 | 4.0 | 3.8 | | | |
| 殻24 | 5.7 | 3.9 | 3.7 | | | |
| 平均 | 9.9 | 6.5 | 4.8 | 3.4 | 3.4 | 3.2 |

表1 1殻内の全種子の抽出液のツクサの葉の気孔に対する作用 (気孔開度: 単位 μ m)

各殻の全種子を、気孔開度の大きいものから順に1、2、3・・・と番号を付けて並べてある。網掛けした種子は、他の種子と比べて気孔開度が大きく、この種子が、ABA量が少なく発芽するはずだったことを示唆する。網掛けの基準は、種子1と2の開度の差(Δ1)と種子2と3の開度の差(Δ2)とを比較し、Δ1 > Δ2ならば、種子1のみを、Δ1 ≤ Δ2ならば種子2までを網掛けした。

4 考察

Tucker & Mansfield (1971) のツクサを用いた気孔開閉試験でも、ABAの気孔の開閉に対する作用は、図5の結果とほぼ同様の結果が出ている。光照射をしても、ABAは気孔を開かせず閉じたままにする作用を持っている。図5の結果に表1の結果を照らし合わせると、ABAが低濃度であると見なせる種子1の開口度の平均値が9.9 μ mなので、ABA濃度は10⁻⁸ mol/L以下であると推定できる。一方、ABAが相対的に高濃度であると見なせる種子4の平均値は3.4 μ mなので、同様に図5から約10⁻⁶ mol/Lであると推定できる。したがってその差は100倍以上であると考えられる。また、図6からわかるように、種子3は種子1に比べて開度が1/2になっており、これも図3から、ABA量が10倍以上濃いことを示唆する。このことは、殻の中の種子が2個までは同時に発芽してくることはあっても、3個目が同時に発芽してきた例は無いこと

と関係があると思われる。また、平成 20 年度の研究においても、8 個の殻で、種子抽出液の気孔開度への影響は今回の結果と類似していた。以上のことから *G. diffusa* の種子発芽の特徴は、仮説のとおり ABA 量の差によるものであると考えられる。

しかしながら、Millar *et al.*(2006)によれば、シロイヌナズナとオオムギで調べたところ、休眠種子 (D) と休眠を終えた種子 (ND) を比較すると乾燥状態では ABA 含有量に差が無かったという。ところが、種子が吸水した後、6 時間経つと、D より ND の方が ABA は少なくなってきた、12 時間後には ND の ABA は D の半分の量となったという。そしてその違いをもたらしているのは、「ABA 8' -ヒドラーゼ」という、ABA の不活性化に関わる酵素の遺伝子が発現しているか否かだった。モデル植物であるシロイヌナズナでこのような実験結果が出ているため、キク科の *G. diffusa* にもこのことが当てはまるかもしれない。もしそうならば、私たちの実験結果は別の解釈をする必要がある。私たちの ABA 抽出は、前述のように種子をリン酸バッファー中ですり潰し、12 時間以上冷蔵庫で保存するという方法であった。したがって、初めは全種子の ABA 含量に差がなかったとしても、その後水に浸され半日以上置かれている間に、1 個または 2 個の種子だけに ABA 8' -ヒドラーゼが発現し、低温下であっても抽出液内の ABA を不活性化して、そのシャーレのみ気孔を閉じさせなかったという考え方である。

5 今後の課題

本実験の結果が、前述の 2 つの解釈の内どちらにより生じたのかを確かめる必要がある。その上で、何故 1 個または 2 個の種子だけに限って、ABA 含量が低い、あるいは ABA 8' -ヒドラーゼ活性が高くなるのか、その生理的なメカニズムを探求すべきだろう。しかしながら、そのための実験は、高速液体クロマトグラフィーによる ABA の定量や、ABA 8' -ヒドラーゼの遺伝子発現量を測るための mRNA の定量など、高校の生物実験室ではできないものばかりである。

しかし、この特異的な種子発芽についての生態学的な意味の研究は可能だと思われる。私たちは実験を始める前から、*G. diffusa* の発芽の特徴は、その生育地である半砂漠地帯への適応戦略ではないか、と考えていた。地中海性気候のナマクワランドでは秋から冬にかけて雨が降り、それが春の花園を生み出す大きな要因となる。冬の雨で 1 つの殻の中の 1 つの種子が発芽しても、もしその後雨が降らなければ最初に発芽した種子は枯れてしまうだろう。すると、次に ABA で深く休眠していた同じ殻の中の他の種子が、何らかの理由で ABA を失い発芽してくるのではないかと推定した。すなわち、一斉に殻の中の全ての種子を発芽させてしまわず、硬い殻の中で保護しつつ、何回かの発芽の機会を待つ能力を持つのではないかという仮説である。このことは Duncan & Ellis(2011)も「この種の発芽は不定期で、1 個または 2 個しか発芽せず、残りの種子を 1 シーズンまたはそれ以上の期間休眠させておくのだろう」述べている。私たちも栽培していて、この不規則な発芽を確認している。

この仮説を検証するために現在、次のような予備実験を行っている。1 つの殻の中の種子を全て取り出して 1 つのシャーレに入れて水を注ぎ、1 個体または 2 個体が発芽するのを待つ。発芽したものは取り除き、そのシャーレを一旦乾燥させる。1 ヶ月ほどそのまま放置し、再び水を与え次の種子が発芽するか否かを調べる。乾燥させるのは、自然条件下で 1 個体が発芽した直後に再び雨が降らない日々が続くという疑似体験を与えるためである。この条件下では最初に発芽した種子は枯れてしまうはずなので、次の雨で 2 番目の種子が発芽してくるのではないかと想定した実験である。予備実験の段階であるため現在は 4 つの殻で調べているが、その内 3 つの殻で予想通りの結果が出ている。今後は殻の数をさらに増やし、継続して観察を続けていきたいと考えている。

謝辞

本実験に際し、植物ホルモンの定量法に関して貴重な御助言をくださった、首都大学東京教授、小柴共一先生に、また *Gorteria diffusa* の文献をお送りくださったケープタウンのカーステンボッシュ植物園の Graham Duncan 氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 川合慶充、鈴木浩基、寺田昌弘、平野雄一.(2009)
『*Gorteria diffusa* の種子発芽に見られる特異性に関する研究』
平成 21 年度磐田南高校課題研究報告書. P52-57.
- Graham Duncan & Allan G. Ellis (2011)
“GORTERIA DIFFUSA Compositae”
Curtis’s Botanical Magazine vol. 28 (4):pp. 341-348
- Richard Cowling & Shirley Piece (1999)
“Namaqualand - A Succulent Desert-” : Briza Publications
- S.D. Johnson & J.J Midgley (1997)
“Fly pollination of *Gorteria diffusa* (Asteraceae), and a possible mimetic function for dark spots on the capitulum”
American Journal of Botany 84(4):p429-436
- D.J. Tucker & T.A. Mansfield(1971)
“A simple Bioassay for Detecting “Antitranspirant” Activity of Naturally Occurring Compounds such as Abscisic Acid” : Planta(berl.)98, p157-163
- A.A.Millar *et al*(2006)
“Seed dormancy and ABA metabolism in *Alabidopsis* and barley: the role of ABA 8’-hydroxylase”
The plant Journal 45, p942-954.
- 清水建美 (2001)
『図説 植物用語辞典』 p 98- p 99 : 八坂書房
- 高橋信孝・増田芳雄編 (1994)
『植物ホルモンハンドブック上・下』: 培風館
- 小柴共一・神谷勇治編(2002)
『新しい植物ホルモンの科学』: 講談社サイエンティフィック
- 増田芳雄編著 (1992)
『絵とき植物ホルモン入門』 p126-151 : オーム社
- 増田芳雄編(1991)
『植物ホルモン研究法』 p53 : 学会出版センター
- テイツ・ザイガー編, 西谷・島崎監訳(2004)
『植物生理学 第3版』 p547-554 : 培風館