

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501071

研究課題名(和文) 種子発芽の光調節に関する教材として利用可能な野生植物の探索と実験法の確立

研究課題名(英文) Search for seeds of wild plants as teaching materials and development of experiment methods to demonstrate phytochrome-mediated photoregulation in seed germination and its biological role.

研究代表者

八ツ橋 寛子 (Yatsubashi, Hiroko)

宮崎大学・教育文化学部・准教授

研究者番号：60182359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：高校「生物」で扱われる種子の光発芽性とその生態的意義について、適切な植物教材を見出すとともに、実験方法の確立を目指した。身近な野生植物の種子を採集したところ、ほとんどが光発芽性を示した。特にオオバコとツボミオオバコの種子は、短時間の赤色光/遠赤色光照射によって可逆的に発芽が制御され、フィトクロムの関与が明らかであった。また、厚紙の箱を加工した照射箱を用いることで、葉を透過した自然光が可逆的にオオバコ種子の発芽を抑制することを示すことができた。このように、野生植物の種子と自然光を用いることで、生徒は自然条件下でのフィトクロムによる制御の意義をより容易に考察できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plant materials and experimental methods to demonstrate seed germination response to light and the importance of this response in natural condition were searched for high school education. We collected seeds of several ruderal plants familiar to us, most of which showed positive photogermination, and seed germination of *Plantago virginica* and *Plantago asiatica* was reversibly regulated with short red and far-red light pulses repeatedly applied, indicating involvement of phytochrome. We also made an irradiation box to show that natural light transmitted through a green leaf could reversibly inhibit *Plantago* seed germination. Experiments using seeds of wild plants and natural light may help students to consider about the biological role of phytochrome regulation.

研究分野：植物生理学

キーワード：高等学校生物 種子 光発芽 フィトクロム 野生植物 自然光 オオバコ ツボミオオバコ

1. 研究開始当初の背景

種子の光発芽性は、高等学校における植物の環境応答の単元でしばしば取り上げられ、特に光受容体フィトクロム B の関与する低光量反応(赤色光/遠赤色光可逆反応:赤色光による発芽誘導効果を遠赤色光が可逆的に打ち消す反応)が紹介されることが多い。植物の成長には光合成のための光が必要であるので、種子の光発芽性は、発芽直後から光合成ができる環境でのみ発芽し、不適切な環境で発芽して枯死する危険を回避するという生態的意義があると考えられる(J.D. Bewley, 2013 他)。フィトクロムは、赤色光によって活性型の Pfr に、遠赤色光によって Pfr が不活性な Pr に可逆変換するのであるが、この性質は、自然条件では、Pr と Pfr の存在比によって植物が曝される光に含まれる赤色光と遠赤色光の比率を感知するものであり、特に他の植物の緑葉によって光が遮られる状態にあるか否かを識別していると考えられる。これは、緑葉は赤色光を選択的に吸収するため、透過光は遠赤色光の比率が高くなり、したがってフィトクロムは Pr の比率が高くなるからである。しかし、教科書で一般的に扱われるレタス(品種 Grand Rapids) 種子の赤色光と遠赤色光の短時間くり返し照射に対する反応では、自然界においてフィトクロムがどのような意味を持っているのか、説明しにくい。第1にレタスが外国産の栽培植物であって本来の生育条件が想像しにくいいため、第2に単波長光(赤色光や遠赤色光)が繰り返し短時間照射されるなど自然にはあり得ない条件であるためである。さらに授業で実験を行う場合、Grand Rapids 種のレタス種子は一般に市販されておらず入手が困難であること、また温度依存性が高く 25 付近でなければ明確な光発芽性が見られないこと、単色光を得ることが難しいことなどの問題がある。特に遠赤色光は、通常の蛍光灯の光には含まれておらず、遠赤色光用の特殊な蛍光灯に短波長光をカットするフィルターをかけるか、白熱灯に赤色と青色のセロファンをかけるなどして得ることになるが、前者は入手が難しく、後者は熱が出ることと透過率が低いため十分強い光が得られないという問題がある。そこで、身近な野生植物を材料とし、自然光を用いて実験ができれば、種子の光発芽性の生態的意義がより理解されやすくなると期待できる。我々は、すでにマツバウンラン(*Linaria canadensis*) が、15-25 で光発芽性を示し、フィトクロム低光量反応が観察されることを報告している(ハツ橋および栗丸, 2011)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物の環境応答の1つである種子の光発芽特性を学校教育課程で分かりやすく示すことのできる植物教材を野生種から見出すとともに教育現場で可能な実験方法を検討することである。

教材として適切な植物の条件として、1. 身近に自生する野生植物であって、種子の採取が容易であること。2. 種子の発芽が光の影響を受けること、特にフィトクロム低光量反応に特異的な赤色光/遠赤色光可逆反応を示すこと。3. 発芽温度範囲が広く、精密な温度制御が不可能な状況であっても2の反応を見ることができること、が挙げられる。

また、実験のための光源として、人工光源のみでなく、自然光(太陽光とその緑葉透過光)を用いてもフィトクロム反応が起きることを示すことができれば、フィトクロムの持つ生態的意義の考察がしやすくなる。しかし、低エネルギー反応は弱光で起こるため、緑葉透過光を照射しても、少しでも直射光が漏れれば発芽誘導に十分な Pfr が生成されるおそれがある。このため、通常の光の当たる環境下で実験することのでき、かつ簡易な装置を作製することとした。

さらに、これらの結果を踏まえ、学校現場で実施可能な授業展開を検討した。

3. 研究の方法

種子は、すべて宮崎大学周辺で採集した。採集した種子は、約1週間室温で風乾した後、自動デシケータに保存した。必要に応じて、冷蔵庫または冷凍庫に移した。発芽実験においては、直径6cmまたは3cmのシャーレに濾紙を2重に敷いて純水を加え、播種した。これらのシャーレを15 または 25 の恒温装置に入れ、発芽を観察した。暗黒中におかれた種子の観察には、弱い緑色光を用いた。

人工光源として白色蛍光灯(FLR40SW/M/36-B, 日立)またはLED光源(研究用LED光源システム 赤色基盤 MIL-R18(A), 遠赤色基盤 MIL-IF18(A), 光源フレーム MIL-U200, 三洋電機)を用いた。自然光は、屋外において太陽の直射光または散乱光を用い、必要に応じてツワブキまたはクズの葉を透過させた。

4. 研究成果

(1) 植物材料の検討

ナガミヒナゲシ(*Papaver dubium*)、スズメノヤリ(*Luzula capitata*)、スミレ(*Viola mandshurica*)、ニワゼキショウ(*Sisyrinchium rosulatum*)、ツボミオオバコ(*Plantago virginica*)、オオバコ(*Plantago asiatica*)の採集種子について、発芽に対する光の影響、温度の影響を調べた。

15 または 25 の暗黒または白色光下で播種したところ、ナガミヒナゲシはいずれの条件下でも30日間でほとんど発芽しなかった。スズメノヤリは暗黒中では発芽せず、15 白色光下でおよそ100日後までに40%発芽した。スミレは、25 白色光のみ50日までに12%発芽した。ニワゼキショウは暗黒では発芽せず、白色光15 で14日後までに60%発芽した(図1)。ツボミオオバコも暗黒では発芽せず、白色光下で7日以内に95%発芽し

た(図2)。オオバコは暗黒では発芽せず、白色光下25℃では5日後までにほぼ100%発芽したが、15℃では10%以下であった(図3)。すなわち、発芽しなかったナガミヒナゲシ以外は、すべて白色光によって発芽が促進される正の光発芽性を示したが、スズメノヤリとスミレは発芽に時間がかかり、最終発芽率も低かった。ナガミヒナゲシやこれらの2種は、やや深い休眠状態にあると考えられ、休眠解除方法について、さらに検討する予定である。

短期間で発芽したツボミオオバコとオオバコについて、赤色光/遠赤色光可逆反応が起こるか調べた。短時間の赤色光と遠赤色光を繰り返し照射すると、いずれの種も25℃で赤色光を最後に照射したときに高い発芽率を示し、遠赤色光によって打ち消されるという典型的な赤色光/遠赤色光可逆反応を示した(図4,5)。ツボミオオバコは15℃でも可逆性を示したが、やや不明瞭な結果であった。これはフィトクロムAの関与する超低光量反応による可能性がある。

ツボミオオバコについて、光感受性の変化を調べたところ、播種(吸水開始)後12時間頃から上がり始め3日~5日の間比較的高い光感受性を維持することがわかった(図6)。レタス(Grand Rapids)では、光感受性は播種直後から上がり始め1時間以上で最高になるが、暗黒中に2日以上置くと下がりはじめ、赤色光を当てても発芽しない暗休眠(skotodormancy)に入る(地神とハツ橋、未発表)。学校現場での授業準備を考えたとき、ツボミオオバコは、複数クラス分を前もって教師が吸水させ暗黒に保存することがより容易である。播種を明所で行っても、吸水直後は光感受性が低いため、光の影響を受けにくく、さらに実験まで長期間保存することができるからである。

(2) 光源の検討

実験光源として研究用LED光源装置(三洋電機)が適切であるか否か検討した。この装置は、260×170mmのフレームに10×160mmのLED基盤を最高20本まで装着し、恒温機内に設置して使用するものである。内寸600×320mmの恒温器にフレームを3個取り付け、各フレームに10本の赤色LED基盤を装着した状態で、シャーレを置く面の光強度を測定したところ、両端やフレームの境に当たる箇所では最大強度の50~70%の強度になった。フレームには拡散板が付いていたが、局所的な光斑もあった。このようにLEDは指向性が強いので、個々の種子に当たる光の強さによらつきが出る可能性があった。通常の赤色光または遠赤色光の照射実験においては、反応の飽和光量を十分(今回の条件では2倍以上)上回る光量を用いる必要があるといえる。

自然光を用いてフィトクロムの可逆作用を示すために、太陽の直射光(または散乱光)と緑葉を透過したそれらの光を、それぞれ赤

色光と遠赤色光の代わりに用い、交互に種子に照射できるようにした。不要な光が側面から漏れないように、ふたにシャーレの大きさの孔をくりぬいた箱にシャーレを入れ、さらに一回り大きな暗箱に収めることで、室外でも実験が可能になった。また、孔の上に葉を載せたり外したりすることで容易に交互照射を行うことができる。シャーレの出し入れをする場合は暗所で行った。ツブキの葉を用い、この方法でオオバコの種子発芽への自然光の影響を調べたところ、明らかな可逆性がみられた(図7)。対照として、葉の代わりにろ紙を用いることで、葉が単に光を弱くするだけでなく、選択透過性のあることがわかる。

(3) 授業展開について

以上の結果から、高等学校などの授業として可能な実験プロトコルをツボミオオバコで考察した。

ツボミオオバコ種子は、採取後、乾燥材とともに冷蔵保存または冷凍保存する。実験日の3~5日前にシャーレに播き(数時間以内であれば通常の室内で行ってよい)、暗所(暗箱内等)に保存する。保存中は光が当たらないように注意する。播種後2重の照射箱に入れて保存してもよい。実験当日、直射光の場合は、そのまま外箱のふたをとり、数分間光を当てた後しめて保存する。あるいは、この作業の後用意した葉を孔をふさぐように載せて数分透過光を照射し、外ふたをかぶせ、同様に保存する。結果の観察は、25℃では3日後、15℃では6日後以降に行える。

この実験から、緑葉の透過光が当たると種子は発芽をしない休眠状態になることがわかり、光を巡る競争を回避することを考察できる。このような照射箱を多数用意できれば、様々な自然環境下で光を当て、どのような環境で種子発芽が抑制されるかを知ることができるであろう。

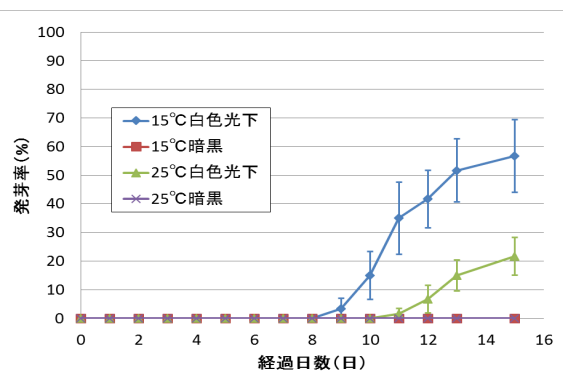


図1 ニワゼキショウ種子の発芽の時間経過

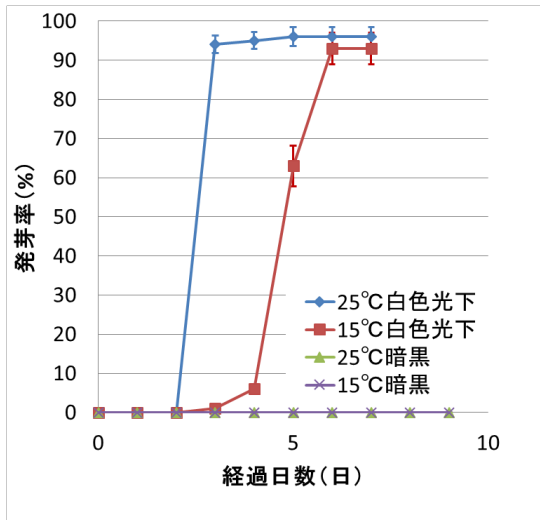


図2 ツボミオオバコ種子発芽の時間経過

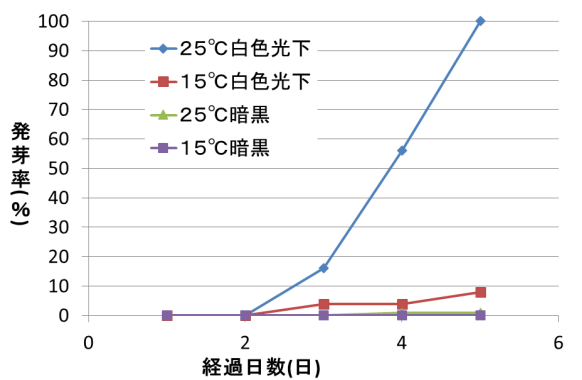


図3 オオバコ種子発芽の時間経過

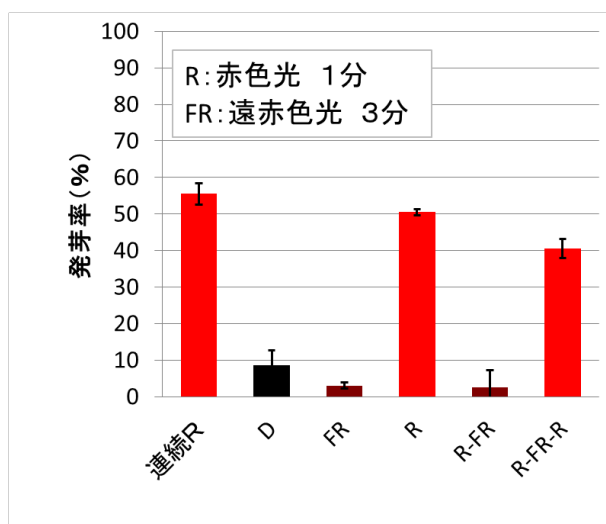


図4 ツボミオオバコ種子発芽の光可逆反応

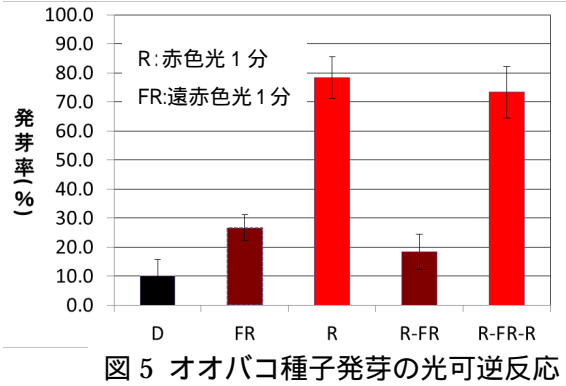


図5 オオバコ種子発芽の光可逆反応

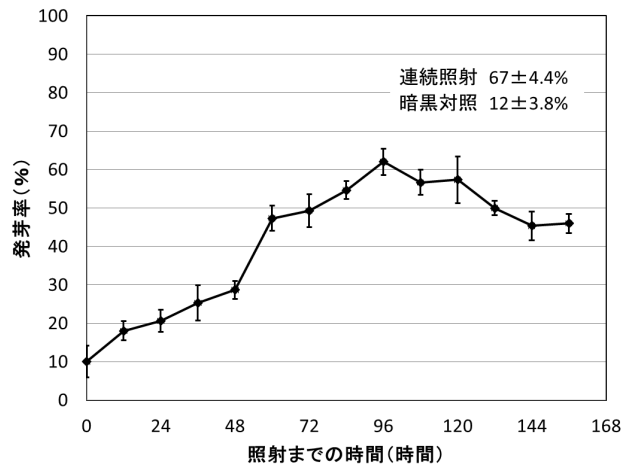


図6 ツボミオオバコ種子の吸水後の光感受性の変化

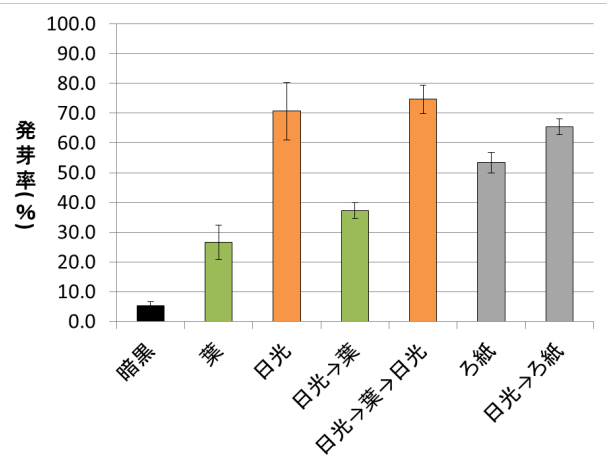


図7 オオバコ種子発芽の自然光による光可逆反応 (日光の照度 1,700Lx)

<引用文献>

D.J. Bewley et al. (2013) Seeds, 3rd ed., Springer

ハツ橋寛子, 栗丸猛 (2011) マツバウンラン (*Linaria canadensis* Dum.) 種子発芽の光, 温度およびジベレリンによる制御: 高等学校および大学における発芽生理分野実習の

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 件）

〔学会発表〕（計 件）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

八ツ橋 寛子 (YATUHASHI, Hi roko)

研究者番号：60182359

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：