

イネ穎果の登熟優先度の決定機構 に関する研究

(研究課題番号：08660012)

平成8年度～平成10年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 中村貞二
(東北大学農学部)

目次

はしがき	1
研究成果	
I サイトカイニン処理がイネ穎果の初期生長および登熟に及ぼす影響	4
II アブシジン酸によるイネ穎果の初期生長および登熟促進効果	11
III 登熟初期段階におけるイネ穎果および葉の植物ホルモンレベル	
1. イネ穎果の内生サイトカイニンおよびアブシジン酸レベル	21
2. イネ葉身のアブシジン酸レベル	28
IV イネにおける登熟優先度決定機構の意義	32
引用文献	37

東北大学図書



00010174279

附属図書館

はしがき

世界的な食糧不足が予想されるに当たって、今後、作物の増収がいつそう期待される。主要穀物であるイネではなおさらのことである。かといって、水田の面積を地球規模で増やすことは容易なことではない。また、栽培の機械化や新型の肥料、農薬の利用など栽培の省力化がいつそう進むにしたいが、水田は、二酸化炭素収支の面から見ると、むしろマイナス要因に移行しつつあると考えられる。したがって、地球環境の保全という面から見ても単位面積当たりの収量を上げるような栽培、つまり多収栽培技術の開発や多収性品種の育成は人類にとって達成しなければならない急務であると考えられる。

従来、作物の物質生産能を高めるために光合成 (source) に関する研究は非常に多く行われてきたが、光合成の高い作物あるいは品種が必ずしも高収量を示さないことがわかってきた。このことは、光合成産物を収穫する部分(sink)に効率よく転流・分配させることが重要であることを示唆している。しかし、この分野の研究はイネ以外の穀物を含めても、今のところは非常に少ない。

イネでは、穎果数すなわち sink 容量を多量に確保しても、1 穂の中でも下部に着生し開花も遅い弱勢な穎果の登熟が悪い場合が多い(木戸ら 1968, 長戸 1950, 田中ら 1963, 和田ら 1969)。1 粒重は年次間の変動係数も低く、品種固有の特性であるから(曾我ら 1957)、結局は、イネの収量の安定・増大化のためには弱勢な穎果をいかに登熟させるかが重要となる。弱勢な穎果は、そのデンプン蓄積期よりも、むしろ胚乳発達の初期段階で生長の遅延を起こし易い(中村ら 1990)が、この遅延は、単に光合成産物の不足により起こるのではないこと(中村ら 1991)、さらにこの遅延は最終粒重および胚乳細胞数の減少を伴うこと(中村ら 1992)が明らかにされている。このことは、弱勢な穎果の初期生長の遅延には、胚乳細胞分裂に関係するようなホルモナルな要因が関与していること、そしてイネにとってはむしろ積極的な意味合いを持つ生長制御であることを示唆していると考えられる。低日射などの光合成産物が不足するような条件下で 1 穂の中の穎果が一斉にデンプンを蓄積した場合には、光合成産物が不足し、ほとんどの穎果の登熟が悪化することも予想されるので、おそらく、これらのことを避けるためにイネ自身が穎果に登熟の優先度をつけ、悪環境下でもある程度の子孫を残すという、イネの植物としての一種の自己防衛のための戦略機構である可能性がある。しかしながら、前述した通り、弱勢な穎果の初期生長が遅れた場合には、最終粒重が減少し登熟が悪化すること、さらに登熟期間が長くとれな

いような地域では、収量が減少することも予想される。したがって、人類がイネの収量の安定・増大化を図るためには、このイネ自身の持つ制御機構を明らかにすることが重要と考えられた。しかし、他の植物も含め、花序内における果実の生長や物質蓄積速度の差を植物ホルモンで明解に説明した報告は今のところ見当たらない。

本研究は、イネ穎果の初期生長や sink の大きさと考えられる胚乳細胞数をコントロールしている植物ホルモンすなわち登熟優先度を決定している植物ホルモンを探求することを第 1 の目的とした。その結果、サイトカイニンという仮説が崩れるなどの回り道もしてしまっただが、最終的にはアブシジン酸 (ABA) であることが明らかとなった。しかも、穎果の生長の抑制では無く促進要因として働いていることがわかった。そして、その起源が葉である可能性も示すことができた。また、登熟優先度決定の生態的意義を実験的に明らかにすることもできた。

こらまでは、どちらかと言えば栄養面、つまり source 側からのアプローチが主だった登熟や収量性に関する研究、sink 側、しかも植物ホルモンの面からアプローチし、それなりの成果が得られた点は、自分なりに満足している。しかしながら、ABA が直接に穎果の生長をコントロールしているのか、または、他のホルモンを介した間接的制御なのかなど、本研究では明らかにできなかった点も多いので、今後続けて研究を行いたいと思っている。

本研究で得られた結果が、今後、いろいろな作物の果実の生長やその収量性に関する研究の参考になれば幸いである。

研究組織

研究代表者	中村 貞二 東北大学農学部助手
研究分担者	なし

研究経費

平成 8 年度	1,500 千円
平成 9 年度	600 千円
平成 10 年度	300 千円
計	2,400 千円

研究発表

Nakamura, T., T.Nakajima and H.Matsunaka 1998. Regulation by ABA on the filling of grains at different spikelet positions within the panicle of rice (*Oryza sativa* L.) Abstract of the 16th International Conference on Plant Growth Substances. 127.

松中仁・中村貞二・西山岩男 1998. 遮光処理がイネの登熟に及ぼす影響. 日本作物学会紀事 67(別 1):190-191.

中村貞二・松中仁 1997. ABA 処理が穂上位置を異にするイネ穎果の初期生長, 乾物蓄積および胚乳細胞数に及ぼす影響. 日本作物学会紀事 66(別 2):249-250.

中村貞二・中嶋孝幸 1997. イネにおける ABA の登熟促進作用について. 日本作物学会紀事 66(別 1):286-287.

Nakamura T. 1997. Factors regulating the early growth of grains at different spikelet positions within the panicle of rice (*Oryza sativa* L.) Abstract of the 2nd International Crop Science Congress. 37.

中村貞二 1996. サイトカイニン処理が穂上位置を異にするイネ穎果の初期生長, 乾物蓄積および胚乳細胞数に及ぼす影響. 日本作物学会紀事 65(別 2):273-274.

研究成果

1 サイトカイニン処理がイネ穎果の初期生長および登熟に及ぼす影響

イネの弱勢な穎果は胚乳発達の初期段階で生長の遅延を起こし易い(中村 1990)が、この遅延は、単に光合成産物の不足により起こるのではないこと(中村ら 1991)、さらにこの遅延は最終粒重及び胚乳細胞数の減少を伴う(中村ら 1992)ことが明らかにされている。さらに、Yoshida (1987)はサイトカイニンの穂首節間注入処理によりイネの弱勢な穎果の登熟が良くなることを示している。一般的には、サイトカイニンは種子の発達初期に高い濃度で存在することから、種子の細胞分裂を促進するのに重要な役割を持つと考えられている(Van Staden 1983)。これらのことは、イネ穎果の初期生長や胚乳細胞分裂にサイトカイニンが関わっている可能性を示すものである。そこで、まずイネにサイトカイニンを処理し、穎果の初期生長、胚乳細胞数などに及ぼす影響を検討した。

材料および方法

市水を塩酸を用いて pH5.5 に調整した多量の溶液で、品種ササニシキを 3.2 葉期まで生育させた。3.2 葉期からは、容積 4l の磁器製ポットに移して水耕栽培した。1 ポット当たり植物体を円形に 15 個体配置し、水耕液の標準成分の濃度は mae ら(1981)と同じとした。最初は標準成分の 1/4 倍とし、その後 1/2 倍、3/4 倍、1 倍と 2 週間ごとに上げていった。出穂期以降は 2 倍とした。なお、水耕液は 1 週間ごとに更新し、その pH は塩酸で 5.5 になるように更新時に調整した。また、分けつは出現後なるべく早い時期に除去した。なお、播種から収穫期まで植物体は昼/夜温が 24/19°C の自然光型ファイトトロン内においた。また、弱勢な穎果の初期生長をある程度低く押さえるために、出穂期から寒冷紗を用いて 75% の遮光、つまり source/sink 比を低下させる処理を行った。

出穂期から水耕液の更新時に、サイトカイニン(trans-zeatin 以下 zeatin とする)を、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M の濃度となるように水耕液に混入した。さらに、zeatin を混入しない対照区を設けた。この zeatin 処理は収穫するまで(出穂後 12 週間)継続した。出穂後 12 週間後に穂を刈り取り、個体ごとに稔実歩合、登熟歩合、登熟穎果の乾物重を測定した。

さらに、強勢な穎果の代表として穂の上から 2 番目の 1 次枝梗最基部着生穎果(2B)と、弱勢な穎果の代表として B2 を選択し、その開花日(発達段階 A)を予め調査し、その後、連日小穂を透かして観察することにより、穎果の幅が籾殻の半分に達した段階(発達段階 H)と、穎果の幅が籾殻の幅に達し穎果が籾殻全体を埋め尽くした段階(発達段階 M)となった日付を調査した。穎果の初期生長を簡単に評価するため、さらに以前の実験(中村ら 1992)と比較するために発達段階 A から発達段階 H までの日数と、発達段階 H から発達段階 M までの日数を算出した。

また、穎果の長さが籾殻の長さのおよそ 3/4 になった段階(新鮮重で 2~5mg)でサンプルし、遊離糖の分析試料とした。サンプルの時刻は 14:00 とし、小穂ごと切り取った後、すぐに籾殻を除去し、新鮮重を測定し、凍結保存した。糖分析は 1 粒ずつ行った。凍結保存した穎果に Phenyl- β -D-glucoside を内部標準として加え、80%エタノールで 80℃、3 時間抽出した。抽出液は陽イオン交換樹脂(Dowex 50-x8)カラムと陰イオン交換樹脂(Dowex 1-x8)カラムを順次通過させ、中性画分を減圧乾固した。その後、TMS 化剤(ガスクロ工業株式会社)で、糖をトリメチルシリル化し、ガスクロマトグラフィーで分析した。分析条件は、以下の通りである。カラムは内径 3mm、長さ 1.5m のガラス製で、充填剤は 3%の SE-30 である。初期のカラム温度は 160℃とし、昇温は 7.5℃/分で 280℃まで行った。試料注入部の温度は 280℃とした。

これらの穂上位置それぞれについて稔実した穎果の最終粒重を測定した後、FAA で固定し、ヴァイブレーションタイプのマイクロトームで横断および縦断切片を作製し、トルイジンブルー O で染色し、横断切片については背面、腹面および側面方向の胚乳細胞層数を、縦断切片については縦方向の胚乳細胞総数を測定した。また、第 3 図に示した方法で相対胚乳細胞数を算出した。

結果および考察

弱勢な穎果の初期生長を制御する指令は穎果に対して連続的に、しかも一定の強さで送られており、source/sink 比の変化などによりその指令が変化した場合、すぐに穎果の初期生長が変化することから(Nakamura ら 1996)、植物成長調節剤をイネに与え、穎果の生長への影響を明らかにするためには、成長調節剤を時間的に連続して植物体に与えるような処

Table 1. Effects of cytokinin application on grain set, grain filling, grain dry weight and yield.

	Cytokinin application			
	0M (Control)	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
<u>Grain set</u>				
%	93.0 (100)	93.4 (100)	93.9* (101)	93.3 (100)
<u>Grain filling</u>				
%	52.0 (100)	62.3*** (120)	61.5*** (118)	62.4*** (120)
<u>Grain dry weight</u>				
mg	19.4 (100)	19.8 (102)	19.8* (102)	19.5 (101)
<u>Yield</u>				
g panicle ⁻¹	1.11 (100)	1.36*** (123)	1.33*** (120)	1.30*** (117)

*,*** Significantly different from the control at 0.05 and 0.001 probability levels, respectively.

Values in parentheses are percent of the control.

理法が必要と考えられた。また、サイトカイニンは一般的には根で合成され木部を通過して地上部に輸送されると考えられていることから、水耕液への投入処理を試み、実際に穎果の初期生長や登熟に及ぼす影響を調べた。

75%の遮光条件下で実験を行ったため、出穂後 12 週間というかなり長い登熟期間を設定して、各登熟形質を測定した。その結果は第 1 表に示した。稔実歩合は 10^{-7} M の zeatin 処理でごくわずかではあるが、有意に高くなったが、 10^{-8} M と 10^{-6} M の zeatin 処理では変化がなかった。一方、登熟歩合は実験を行ったすべての濃度の zeatin 処理で有意に増加した。したがって、サイトカイニン処理により粒重の増加した穎果の数が増加したことになる。次に、登熟した穎果の 1 穂当たりの平均粒重を見ると(第 1 表)、 10^{-7} M の zeatin 処理でわずかではあるが有意に高くなったが、その他の濃度の処理では変化がなかった。1 穂当たりの収量はすべての zeatin 処理で有意に増加した。zeatin 処理による増加率は 17~22%とかなり大きい値であった。前述した、登熟歩合や 1 穂の平均粒重のデータから、サイトカイニン処理による収量の増加は登熟歩合の増加によることがわかった。

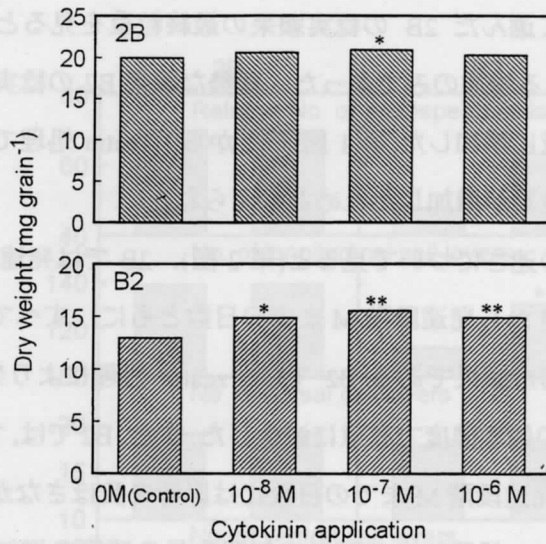


Fig. 1. Effects of cytokinin application on final dry weight of grain 2B and grain B2. *,** Significantly different from the control at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

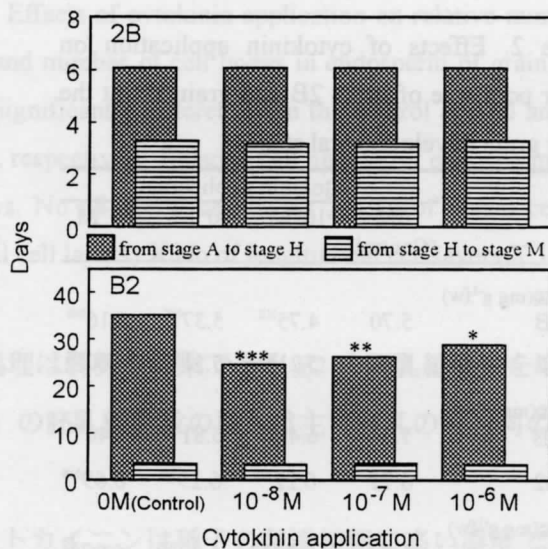


Fig. 2. Effects of cytokinin application on early growth of grain 2B and grain B2. *,**,*** Significantly different from the control at 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels, respectively.

強勢な穎果の代表として選んだ 2B の稔実穎果の最終粒重を見ると、有意に変化したのは 10^{-7} M の zeatin 処理による増加のみであった。弱勢な穎果 B2 の稔実穎果の粒重はすべての濃度の zeatin 処理で有意に増加した(第 1 図)ことから、zeatin 処理で登熟歩合が高まったのは、主に弱勢な穎果の粒重が増加したためと考えられた。

次に、穎果の初期生長の速さについて見ると(第 2 図)、2B では発達段階 A から発達段階 H までの日数と発達段階 H から発達段階 M までの日数ともに、すべての zeatin 処理で変化しなかった。しかし、弱勢な穎果である B2 では、zeatin 処理により発達段階 A から発達段階 H までの日数が全ての処理濃度で有意に減少した。また、B2 では、すべての濃度の zeatin 処理は、発達段階 H から発達段階 M までの日数には影響を及ぼさなかった。

このようなサイトカイニン処理による穎果の初期生長の速度の増加が、穎果への光合成産物供給の大小で説明することができるかどうかを検討するために、発達初期段階の穎果についてその遊離糖の分析を行った。検出された主な糖は、sucrose, glucose, fructose の 3 種類で、それらの合計を全糖として第 2 表に示した。すべての zeatin 処理は、2B および B2 のすべての糖濃度(プール)に影響を及ぼさなかった。したがって、サイトカイニン処理が、弱勢な穎果の初期生長を促進したのは光合成産物以外の要因であることがわかった。

Table 2. Effects of cytokinin application on sugar pool size of grain 2B and grain B2 at the early grain developmental stage.

Sugar	Cytokinin application			
	0M (Control)	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
<u>Fructose</u> (mg g ⁻¹ fw)				
2B	5.70	4.75 ^{NS}	5.37 ^{NS}	6.16 ^{NS}
B2	6.80	5.21 ^{NS}	5.51 ^{NS}	6.00 ^{NS}
<u>Glucose</u> (mg g ⁻¹ fw)				
2B	7.33	6.49 ^{NS}	6.81 ^{NS}	7.40 ^{NS}
B2	6.77	6.22 ^{NS}	6.29 ^{NS}	6.69 ^{NS}
<u>Sucrose</u> (mg g ⁻¹ fw)				
2B	6.74	6.72 ^{NS}	6.12 ^{NS}	5.97 ^{NS}
B2	8.35	11.37 ^{NS}	9.04 ^{NS}	9.94 ^{NS}
<u>Total</u> (mg g ⁻¹ fw)				
2B	19.77	17.96 ^{NS}	18.29 ^{NS}	19.53 ^{NS}
B2	21.92	22.80 ^{NS}	20.84 ^{NS}	22.63 ^{NS}

NS Not significantly different from the control at 0.05 probability level.

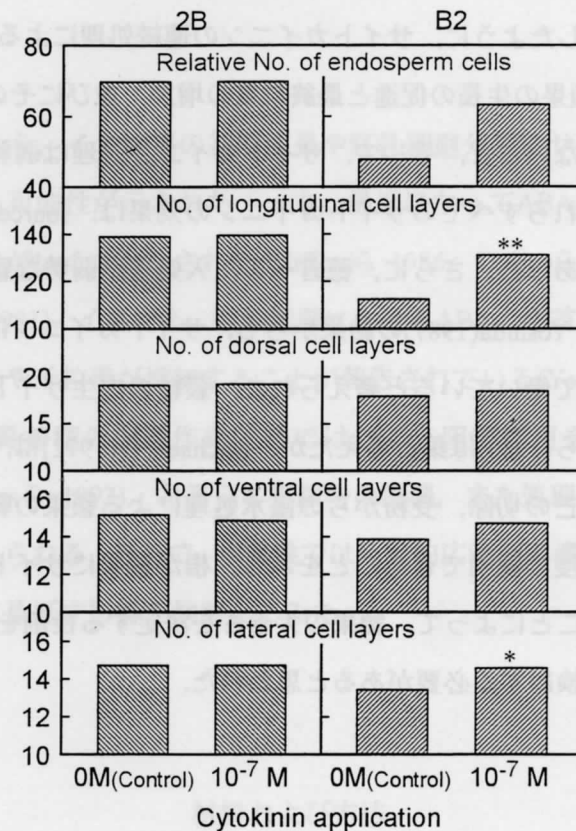


Fig.3. Effects of cytokinin application on relative number of endosperm cells and number of cell layers in endosperm of grain 2B and grain B2. *,** Significantly different from the control at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. Relative cell number of endosperm was calculated as follows. No of lateral cell layers X (No of dorsal cell layers + No of ventral cell layers) X No of longitudinal cell layers X 10⁻³.

さらに、zeatin 処理は弱勢な穎果である B2 の胚乳細胞数を増加させたが 2B には影響しなかった。この B2 の胚乳細胞数の増加は主に胚乳の縦方向の細胞層数の増加によるものであった(第3図)。

一般的には、サイトカイニン(cytokinin)は種子の発達初期に高い濃度で存在することから、種子の細胞分裂を促進するのに重要な役割を持つと考えられている(Van Stadenら 1983)。また、イネでは、折谷ら(1980)が、出穂期における葉身の切除により、穀粒のサイトカイニンレベルは著しく低下することから、穀粒のサイトカイニンのかなりの部分は葉身からの転流によるものと推察した。このことに加え、剪葉や遮光処理によりとくに弱勢な穎果の初期生長は遅れ、胚乳細胞数や最終粒重も減少するという結果(中村ら 1992)から考えると、イネ

穎果の初期生長や胚乳細胞数はサイトカイニンによって制御されていると考えられた。

さらに本研究で示したように、サイトカイニンの連続処理による発達段階 A から発達段階 H までの弱勢な穎果の生長の促進と最終粒重の増加、並びにその促進が穎果の糖プールが増大したからではないこと、そして、サイトカイニン処理は弱勢な穎果の胚乳細胞数を増加させたこと、これらすべてのサイトカイニンの効果は、source/sink 比を増加させた場合と全く同じ効果であった。さらに、穂首への注入処理が弱勢な穎果の登熟歩合や千粒重を増加させたという Yoshida(1987)の結果からも、サイトカイニンはイネ穎果の生長および登熟の促進要因として働いていると考えられた。穀粒の内生サイトカイニンの起源を、前述したように、折谷ら(1980)は葉と考えたが、Michael ら(1972)は、オオムギ穎果の乾物蓄積の遺伝的差異や、芒の切除、受粉からの湛水処理による穎果の乾物蓄積の低下は、穎果のサイトカイニン濃度で説明できることを示し、根が穎果にサイトカイニンのような植物ホルモンを供給することによって、穎果の大きさを決定する役割を持っている推察しおり、起源についてはまだ検討する必要があると思われた。

II アブシジン酸によるイネ穎果の初期生長および登熟促進効果

本研究の I の結果から、イネ穎果の初期生長や胚乳細胞分裂にサイトカイニンが促進要因として関与している可能性が示された。一方、最近になってABAは物質蓄積に関してプラスに働くという報告がいくつかなされた(Cliffordら 1986, Düringら 1980, Saftnerら 1984, Tanner 1980, Tietzら 1981)。イネでも、登熟初期におけるABAの穂首節間への注入により、弱勢な穎果の登熟歩合や千粒重が増加することが報告されている(Yoshida 1987)。一方、ABAに関しては登熟や物質蓄積の促進作用だけではなく、阻害作用を裏付ける報告も多い(Biswasら 1986, Myersら 1992)。おそらく実験時の環境、また処理の量や濃度により効果に変化することが考えられる。そこで、本実験では比較的広範囲の濃度で処理を行い、ABAの穎果の生長や登熟に及ぼす影響を検討してみた。

材料および方法

品種ササニシキの催芽粉を 1/5000a ワグナーポットに円形 20 粒播きし(Satakeら 1969)、戸外で土耕栽培した。肥料は N:200mg, P₂O₅:50mg, K₂O:75mg を含む液肥を播種時に、それから 3 葉期から出穂期までは 10~14 日間隔で施用した。出穂後はその半量を 7 日間隔で施用した。なお、土壌の還元化を防ぐため、さらにポット内の肥料を洗い流すために、液肥施用の直前に大量の水をポット内の土に通過させた。主茎の生育および穂の大きさの同調性を得るために、分けつは出現時に取り除いた。出穂直前から昼/夜温が 24/19℃の自然光ファイトロン内にポットごと移し、寒冷紗により 50%の遮光を開始した。

第 1 実験

茎葉への散布処理 : 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M の±ABA の水溶液(界面活性剤は含まぬ)および control としての蒸留水、それぞれ 50ml を 1 ポット分(20 本)の茎葉になるべく穂にはかけないようにして均一に霧吹きで散布した。散布時期は出穂期、その 1 週間後および 2 週間後の計 3 回である。本研究の I の実験と同様にして強勢および弱勢な穎果(それぞれ 2B, B2)の初期生長の調査を行い、出穂 10 週後に収穫し、穂全体の登熟形質の測定を行った。まず、手の感触により稔実歩合を求め、比重選により登熟歩合を求めた。また、籾殻を除

去した後凍結乾燥し、1穂分ごとに粒重を測定した。2B および B2 については1粒ずつ測定した。

穎果への滴下処理： 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} M の±ABA の水溶液(界面活性剤は含まぬ)および対照としての蒸留水、それぞれ3 μ l を弱勢な穎果(B2)にマイクロシリンジの先端を内穎と外穎の間から差し込んで滴下した。その際に子房(若い穎果)を傷つけないように注意した。滴下時期は開花1日後と3日後の計2回である。前述したように処理を行った弱勢な穎果の初期生長を観察し、出穂10週後にサンプリングし、籾殻を除去した後凍結乾燥して粒重を測定した。

第2実験

10^{-7} M の±ABA および+ABA(天然型、東レ社)水溶液それぞれ3 μ l を、穎果(2B・B2)に第1実験と同様な方法で滴下処理した。滴下時期も第1実験同様、開花後1日後と3日後で計2回実施した。穎果の初期生長の調査、発達初期段階の穎果の遊離糖の分析、最終の胚乳細胞数の測定を本研究のIと同じ方法で行った。

結果および考察

第1実験の茎葉散布処理した個体における登熟形質を測定した結果、稔実歩合はすべての処理で変わらなかった(第1表)。一方、登熟歩合はすべての±ABAの茎葉処理で有意に増加し、 10^{-7} M処理の増加が最大であった。したがって、処理により粒重の増加した穎果の数が増加したことになる。1穂当たりの登熟した穎果の平均粒重(乾物重)は、処理によりほとんど変化しなかった。1穂当たりの収量はすべての処理で有意に増加し、 10^{-7} M処理で最大の増加率(19%)となった。以上より、処理による収量の増加は登熟歩合の増加、すなわち粒重の増加した穎果数が増加したことによることがわかった。穂上位置別に見てみると、2Bの稔実穎果の粒重はすべての処理で変化しなかったが、B2の稔実穎果の粒重は処理により増加する傾向が見られた(第1図)。このことから、処理により登熟歩合が高まったのは、主に弱勢な穎果の粒重が増加したことによることがわかった。次に、穎果の初期生長を見ると(第2図)、2Bでは発達段階Aから発達段階Hまでの日数と、発達段階Hから発達段階Mまでの日数ともに、全ての処理で変化しなかった。一方、B2では、処理により発達段階Aから発達段階Hまでの日数が全ての処理濃度で有意に減少した。発達段階Hから発達段階Mまで

の日数はすべての処理で影響を受けなかった。以上より、±ABAの茎葉散布処理はとくに弱勢な穎果の初期生長を速め、最終粒重を増加させること、つまり登熟促進効果があることが明らかとなった。

Table 1. Effects of foliar application of ABA on grain set, grain filling, grain dry weight and yield.

	ABA application				
	0M (Control)	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M
<u>Grain set (%)</u>	79.3 (100)	80.1 (101)	82.2 (104)	79.0 (97)	80.9 (102)
<u>Grain filling (%)</u>	38.1 (100)	40.6* (107)	45.3*** (119)	42.1** (110)	43.0** (113)
<u>Grain dry weight (mg)</u>	18.86 (100)	18.94 (100)	19.01 (101)	18.83 (100)	18.94 (100)
<u>Yield (g panicle⁻¹)</u>	0.847 (100)	0.912 (108)	1.010** (119)	0.937* (111)	0.955** (113)

*, **, *** Significantly different from the control at 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels, respectively. Values in parentheses are percent of the control.

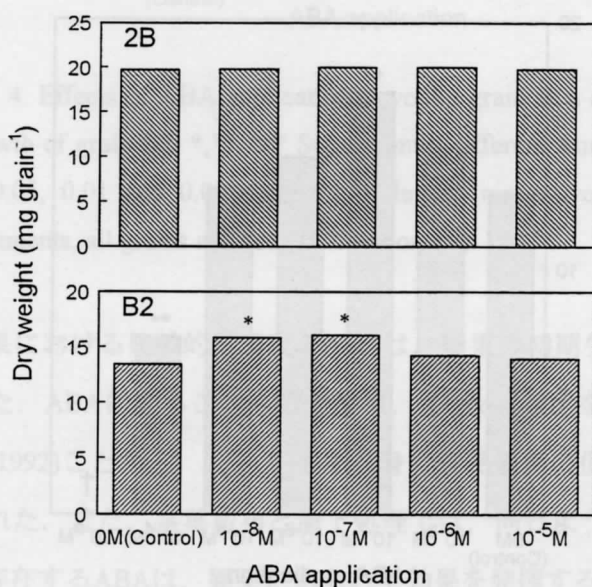


Fig. 1. Effects of foliar application of ABA on final dry weight of grain 2B and grain B2. * Significantly different from the control at 0.05 probability level.

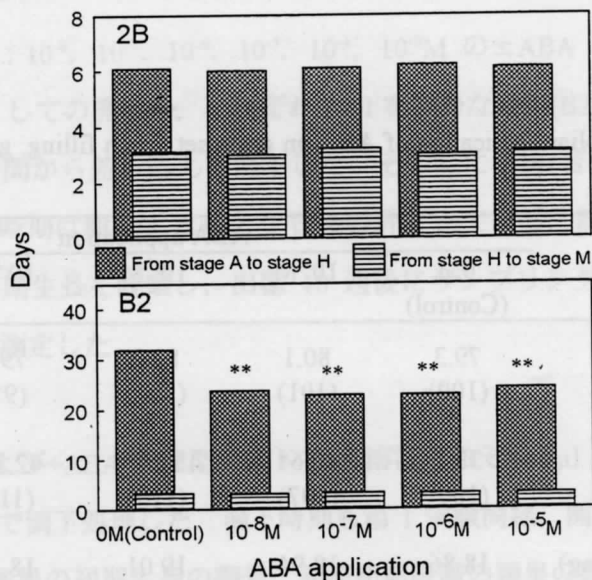


Fig. 2. Effects of foliar application of ABA on early growth of grain 2B and grain B2. ** Significantly different from the control at 0.01 probability level.

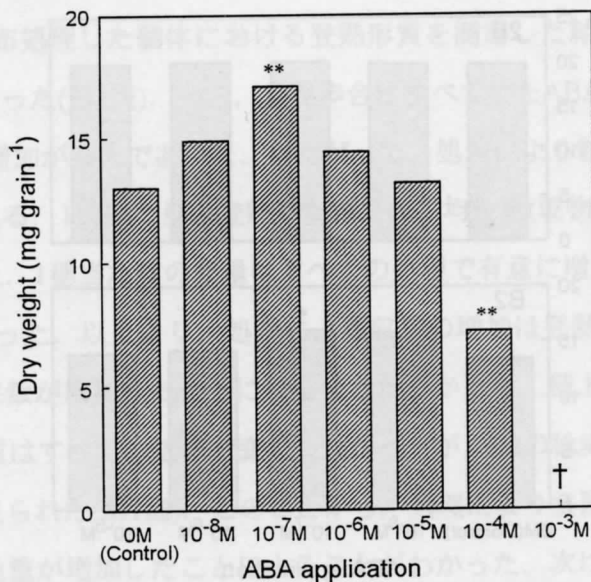


Fig. 3. Effects of ABA application to young grain as a drop on final dry weight of grain B2. ** Significantly different from the control at 0.01 probability level. † All grains aborted (100% abortion).

第1実験の滴下処理における弱勢な穎果の最終粒重は 10^{-7}M で最大となり、対照区よりも有意に高い値を示した。 10^{-4}M の高濃度処理では反対に有意に減少した。今回行った最も高濃度である 10^{-3}M 処理では、全ての穎果が不稔となった(第3図)。また、処理により発達段階Aから発達段階Hまでの日数が 10^{-7}M 処理で最小となったが、高濃度では増加した(第4図)。なお、発達段階Hから発達段階Mまでの日数は、全く稔実しなかった 10^{-3}M 処理を除いて茎葉散布同様影響を受けなかった。

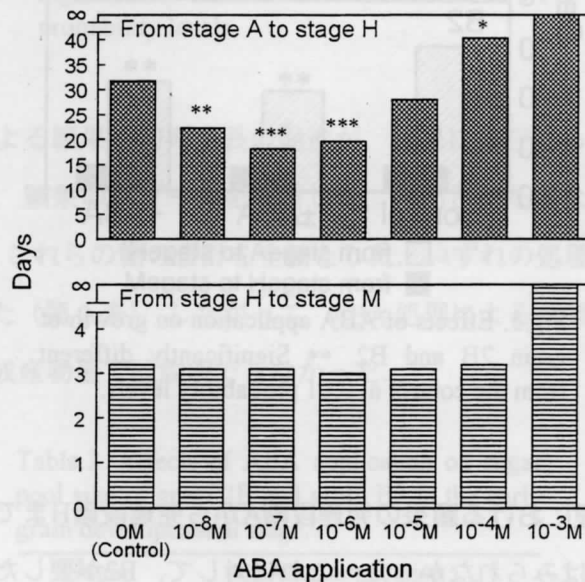


Fig. 4. Effects of ABA application to young grain as a drop on early growth of grain B2. *, **, *** Significantly different from the control at 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels, respectively. In 10^{-3}M treatments, all grains aborted (100% abortion).

以上より、穎果における比較的低濃度のABAは、穎果の初期生長や最終粒重を増加させることがわかった。ABAによるこれらの効果は、source/sink比を高めた場合の結果と同様である(中村ら 1992)ことから、ABAがイネ自身の登熟制御の促進要因として働いている可能性が示唆された。また、茎葉散布と滴下処理では、同じような登熟促進効果が認められたので、葉に存在するABAは、穎果に送られて効果を発揮する可能性が示唆された。

以上のように、ABAは比較的低濃度側では登熟を促進すること、また高濃度側では反対に抑制することが明らかとなった。しかも、穎果の初期生長も促進するという、物質蓄積ではなく細胞の分裂や伸長の促進といった純粋な意味での生長促進効果が認められた。

種子の生長発達をABAが促進するという報告は今のところない。そこで、この促進効果を再確認すること、さらに天然型のABA(±ABA)でも同じ効果が認められるのかを知るために第2実験を行った。なお、処理濃度は第1実験で最も促進効果が大きかった $10^{-7}M$ とした。

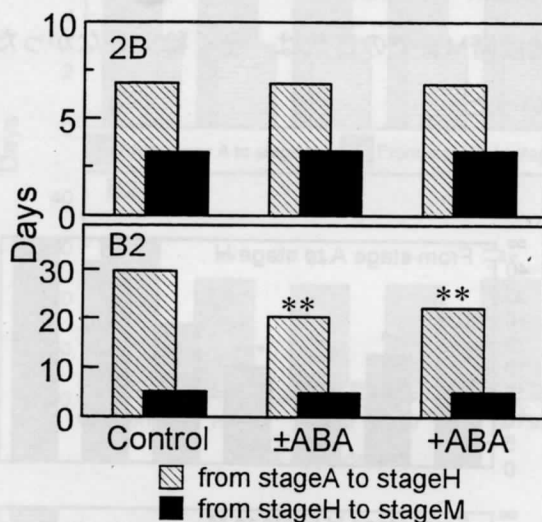


Fig.5. Effects of ABA application on growth of grain 2B and B2. ** Significantly different from the control at 0.01 probability levels.

第2実験の滴下処理における穎果の発達段階Aから発達段階Hまでに要した日数は、2Bでは処理による有意差はみられなかった。これに対して、B2が要した日数は2Bと比較して著しく遅延し20.3から29.7日を要し、遅延の程度は2Bと比較して最大で+334%の日数を要した。しかしながら、これらのB2の生長はABA処理によって有意に促進されており、対照区と比較して±ABA区で-31.5%・+ABA区で-25.7%の日数となった。一方、発達段階Hから発達段階Mまでに要した日数は、2Bでは処理による有意差はみられなかった。B2の生長は2Bと比較して有意に遅延したが、その程度は小さなものであった。両 ABA処理による影響は見られなかった(第5図)。

2Bの最終粒重を見ると、両 ABA 処理による有意な増加は認められなかった。しかしながら、B2では両 ABA 処理によって有意に増加し、その程度は±ABA 区で+15.3%・+ABA 区で+12.7%と大きく増加した。B2と2Bを比較すると、いずれの処理区においてもB2の方が有意に小さかった(第6図)。

これらの事実より、とくに弱勢な穎果の初期生長の促進や最終粒重の増加は天然型ABA(+ABA)でも生じることが明らかとなった。

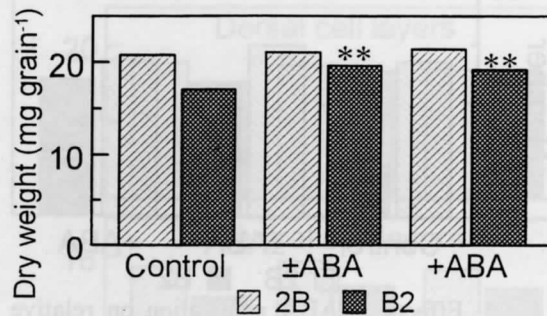


Fig.6. Effects of ABA application on final dry weight of grain 2B and grain B2. ** Significantly different from the control at 0.01 probability levels.

このような処理による穎果の初期生長の促進が、穎果に存在する光合成産物に関係するかを検討するために、穎果の糖プールを分析した。検出された主な糖は、sucrose, glucose, fructose の3種類で、これらの糖の合計を全糖とした。いずれの処理も、糖プールへ有意な影響を及ぼさなかった(第2表)。したがって、ABA処理による弱勢な穎果の生長促進は、穎果に存在する光合成産物量では説明できなかった。

Table.2. Effects of ABA application on sugar pool size of grain 2B and grain B2 at the early grain developmental stage.

Sugar	ABA application		
	Control	±ABA	+ABA
Fructose (mg g ⁻¹ fw)			
2B	6.49	6.33 ^{NS}	7.01 ^{NS}
B2	6.31	8.24 ^{NS}	6.88 ^{NS}
Glucose (mg g ⁻¹ fw)			
2B	7.11	7.55 ^{NS}	6.92 ^{NS}
B2	6.00	8.37 ^{NS}	7.01 ^{NS}
Sucrose (mg g ⁻¹ fw)			
2B	6.29	6.10 ^{NS}	5.88 ^{NS}
B2	13.46	11.04 ^{NS}	10.85 ^{NS}
Total sugar (mg g ⁻¹ fw)			
2B	19.89	18.39 ^{NS}	19.80 ^{NS}
B2	25.77	27.65 ^{NS}	24.74 ^{NS}

NS Not significantly different from the control at 0.05 probability level.

穎果の sink サイズと考えられる胚乳細胞数(相対値)を見ると、2Bでは処理による影響は見られなかったのに対して、B2では両ABA処理によって大幅に増加した(第7図)。

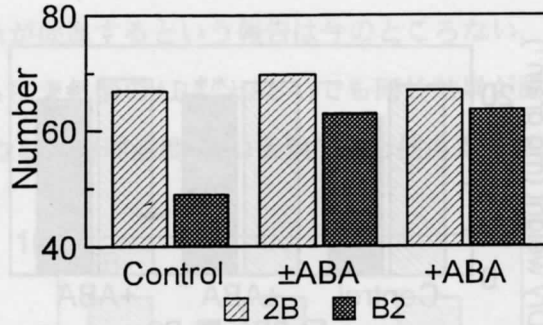


Fig.7. Effects of ABA application on relative number of endosperm cells of grain 2B and grain B2. Relative cell number of endosperm was calculated as follows. Number of lateral cell layers \times (number of dorsal cell layers + number of ventral cell layers) \times number of longitudinal cell layers $\times 10^{-3}$.

各方向の細胞層数を見ると、2B ではいずれの方向とも処理による有意な影響は見られなかった。これに対して、B2 ではいずれの方向でも処理によって増加の傾向が見られ、なかでも縦方向の細胞層数の増加が顕著であった（第 8 図）。したがって、処理による胚乳細胞数の増加は、主に胚乳の縦方向の細胞層数の増加によるものであることがわかった。なお、この胚乳細胞数についても、 \pm ABA と +ABA（天然型）の効果にほとんど違いは見られなかった。

以上より、ABA はイネの弱勢な穎果の初期生長を促進すること、そしてこの生長の促進は胚乳細胞数や最終粒重の増大を伴うことが明らかになった。これら ABA の効果は、source/sink 比を高めた場合の以前の結果(中村ら 1992)と同様であることから、イネ自身における ABA による登熟制御機構の存在が強く示唆された結果となった。

ABAと穀粒の物質蓄積との関係に関してはかなり報告がある。まず、ダイズの種子における ABA 含量のピークは、種子の乾物蓄積が最も盛んな時期にあらわれることから、ABA はダイズ種子の物質蓄積において重要な役割を果たしていると考えられている(Quebedeaux ら 1976)。さらに、ダイズでは、葉柄のガードリングや、莢除去処理により、葉の ABA レベルが著しく上昇し、1 時間以内に気孔の閉鎖と光合成速度の低下がもたらされること(Setter ら 1980)、source である葉に与えた ABA は発達中の莢に移行することから、莢は source 機能(光合成)を阻害する ABA を葉から取り除く役割を持つと考えられている(Setter ら 1981)。また、登熟期のオオムギの穂への ABA 塗布処理により、止葉に与えた ^{14}C -sucrose の穂への転流が促進されること(Tietz ら 1981)、ABA が貯蔵器官における sucrose の吸収(Saftner 1984)、光合成産物の unloading(Clifford ら 1986、Düring ら 1980、Tanner 1980)を促進することが報告

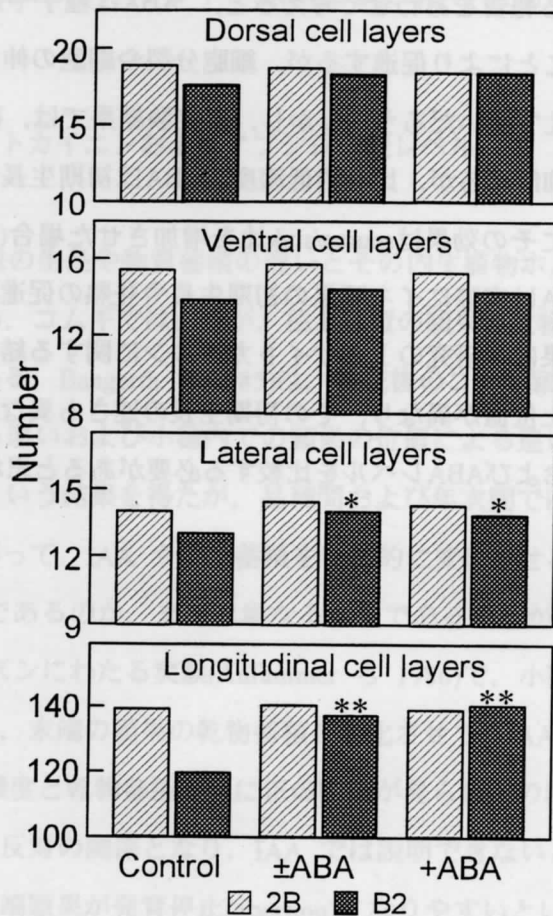


Fig. 8. Effects of ABA application on number of cell layers in endosperm of grain 2B and B2. *,** Significantly different from the control at 0.05 and 0.01 probability levels.

されている。イネでも、登熟初期におけるABAの穂首節間への注入により、弱勢な穎果の登熟歩合や千粒重が増加されることが報告されている(Yoshida 1987)。

一方、ABA に関しては登熟や物質蓄積の促進作用だけではなく、阻害作用を示した報告も多い。イネの穂への ABA 塗布処理が不稔歩合を高めるという報告(Biswas ら 1986)、さらに、ABA を含む培地で培養したトウモロコシ穎果の胚乳細胞数と穎果の最終粒重は減少するという報告(Myers ら 1992)などである。さらに、Jones ら(1986)はトウモロコシ穎果を *in vitro* で生長させ、受粉後 6, 12, 24 日目から培地に ABA を加え、最終粒重を調べた。その結果、24 日目(物質蓄積期)からの処理で最終粒重は増加したが、6, 12 日目からの処理ではむしろ減少した。さらに開花後 23 日目の穎果の *in vitro* での glucose 吸収は $10^{-5}M$ の濃度だけではあるが、ABA の添加により促進されることを示した。

以上のABAに関する報告をあわせて考えると、ABAは種子や穎果の物質蓄積を膜の能動輸送を増大させることにより促進するが、細胞分裂や細胞の伸長が主である初期生長は反対に抑制すると考えて良いだろう。しかし、本実験結果では、確かに高濃度のABAはイネ穎果の初期生長を抑制するが、比較的低濃度のABAは初期生長や胚乳細胞分裂をむしろ促進しており、さらにその効果はsource/sink比を増加させた場合(中村ら 1992)と全く同じ反応だったので、ABAは実際にイネ穎果の初期生長や登熟の促進要因として働いていると考えられた。この結果は本研究のIのサイトカニンに関する結果と全く同じものであった。したがって、穂上位置が異なり、その初期生長の速さも異なる発達初期段階の穎果の内生サイトカニンおよびABAレベルを比較する必要があると思われた。



以上より、ABAはイネ穎果の初期生長を促進するが、そしてこの生長の促進は胚乳細胞数や細胞伸長の増加によるものであることがわかった。これはABAの効果はsource/sink比を高めた場合の以前の報告(中村ら 1992)と一致することから、イネ穂におけるABAによる登熟制御機構の存在が強く示唆された結果となった。

III 登熟初期段階におけるイネ穎果および葉の植物ホルモンレベル

1. イネ穎果の内生サイトカイニンおよびアブシジン酸レベル

穂上位置による穀粒の生長や物質蓄積の違いとその内生植物ホルモンとの関係を調べた研究はわずかしかない。コムギではあるが、穂上位置の穎果の乾物蓄積の違いを IAA の面から検討した報告がある。Bangerth ら(1985)は、開花後のコムギ穎果の IAA レベルの穂上での小穂の位置による違いおよび小穂内での穎果の位置による違いは、穎果の乾物蓄積速度と正の関係にあるという結果を得たが、品種間および年次間ではそのような関係は見いだせなかった。したがって、IAA や乾物蓄積を特異的に変化させるような実験を行うことにより、IAA が原因であるのか、または単なる結果であるのかが明らかになると考え、2 品種を用いた 2 シーズンにわたる実験(Aufammer ら 1986)で、小穂の基部穎果を人為的に不稔にする処理を行い、末端の穎果の乾物蓄積を変化させて、IAA レベルを比較した。その結果、穎果の IAA 濃度と乾物蓄積の間に正の関係が見られたのは、1 シーズンの 1 品種のみで、ほかはすべて反対の関係となり、IAA では説明できないとした。Reed ら(1989)は、トウモロコシの先端穎果が発育停止(abortion)になりやすいという現象を炭水化物供給と植物ホルモンの面から解析した。穎果の発育停止は開花後 8 日から 12 日(この日で乾物蓄積は停止する)にかけて起こるが、開花後 12 日までの種々の炭水化物濃度には差がないこと、開花後 8 日から 26 日までは、発育停止粒が着生する穂軸の全炭水化物濃度は発育停止しない穎果が着生する穂軸のそれよりもむしろ高いことから、穎果の発育停止は炭水化物供給の減少によって生じるのではないことを示した。さらに IAA, ABA, サイトカイニンの濃度については、発育停止が完了する開花後 12 日よりも後になってから発育停止した穎果とそうでない穎果の間に差がみられるようになったことから、発育停止はこれらの植物ホルモンのシグナルによって開始されるのではないと推察した。発育停止が完了した後は、発育停止した穎果は発育停止しない穎果に比べて、高い ABA 濃度、そして低い IAA 濃度を示し、さらにサイトカイニン濃度も低い傾向を示したことから、ABA は発育停止へのプロセスが開始してから、穎果の発育停止を促進すること、IAA やサイトカイニンは本来なら穎果の生長を促進するはずであるが、発育停止粒では ABA などの発達阻害要因に打ち勝つほどのものではないのだろうと推察した。

以上のように、1 穂内の穀粒の生長の差を内生植物ホルモンにより説明ができた報告は

今のところ見あたらない。しかし、本研究のⅠおよびⅡの結果は、内生のサイトカイニンまたは ABA により説明ができる可能性を強く示唆している。そこで本実験ではイネの穂の代表的なサイトカイニンである trans-zeatin(Z)と trans-zeatin riboside(ZR) (高木 1990)、そして ABA の内生レベルを測定してみた。

材料および方法

品種ササニシキを本研究のⅡと同じ方法で生育させ、出穂直前から昼/夜温が 24/19℃の自然光ファイトロン内にポットごと移した。

実験に用いた穎果は穂の上から 2 番目の 1 次枝梗の最基部の穎果(2B)と、穂の最基部の 1 次枝梗の先端から 2 番目の穎果(B2)ある。各々の穎果の開花日に 1 穂内の他のすべての穎果を除去する穎果間引き処理を設けた。2B および B2 の各々の穎果の初期生長を本研究のⅠおよびⅡと同じ透視法により調査した。4つの発達段階 E は穎果の先端が籾殻の頂点までの約 3/4 に達した段階、発達段階 T は穎果の先端が籾殻の頂点に達した段階、発達段階 H は穎果が籾殻の幅の半分に達した段階、発達段階 M は穎果が籾殻全体を全て埋め尽くした段階の 4つの発達段階で、ホルモン分析のための穎果のサンプリングを行った。

イネ穎果からの zeatin(Z), zeatin riboside(ZR), アブシジン酸(ABA)の精製・定量法をチャート式に第 1 図に示した。小穂ごとサンプルした後、籾殻を取り外し、穎果の生重量を測定後、直ちに液体窒素で凍結した。その後分析に供するまで、-80℃の超低温層内で保存した。次に、イネ穎果を 80%メタノールで抽出した(-4℃,20 時間)。そして、その抽出液を遠心濃縮し、乾固させ、0.1N 酢酸/5%メタノールを加えて乾固物を溶かした。その後、一端-20℃で凍結させ、そして溶解した。その後遠心分離にかけ、タンパクや葉緑素などを沈澱させた。その上澄み液を回収し、次に述べる液体クロマトグラフィーにより精製分離するための試料とした。

ホルモンを精製・定量するに当たって本実験のサンプルが微量であることから、(サンプルした穎果が発達初期段階なので非常に小さいこと、また穎果の穂上位置が固定されている、などの理由で)酢酸エチルや n-ブタノールなどによる溶媒分画、そしてイネではフェノール性物質が少ないことなどから、PVP カラムによる精製は行わなかった。そこで1つの C18-ODS ミニカラム(JT Baker, 直径 5mm, 長さ 10cm)で分画することを試みた。標準試料

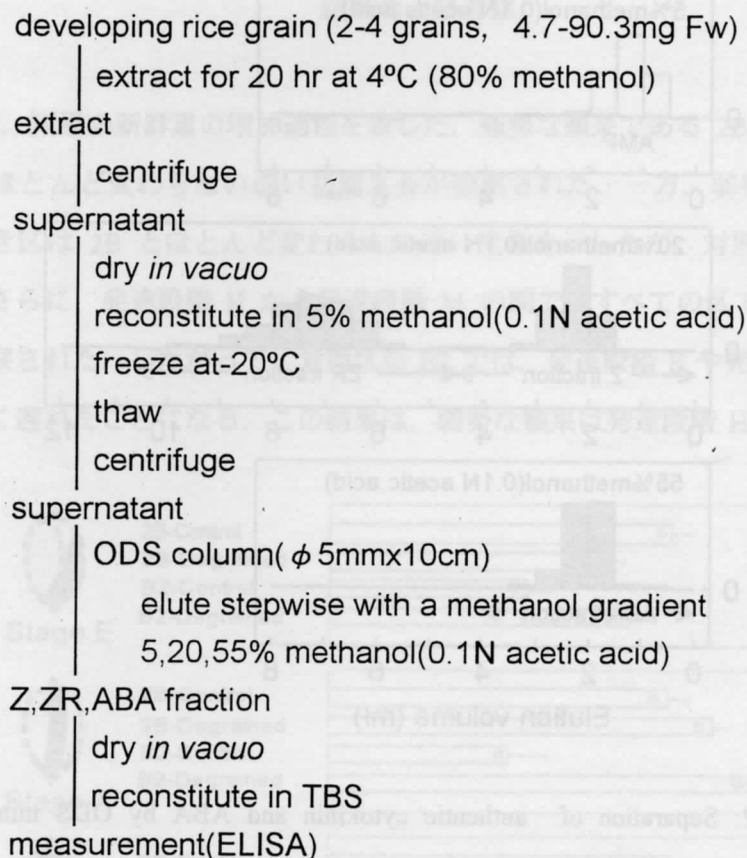


Fig.1. Purification and quantitative analysis procedures for ABA, Z and ZR.

を load し、種々の濃度のメタノール-酢酸溶液を流して分画した結果を第 2 図に示した。実際には試料を load し、図中に示した Z, ZR, ABA の部分を回収した。標準試料を load した後、5%メタノール(0.1N 酢酸)を流した場合に AMP が溶出することを確認できた。AMP は zeatin ribotide と分画操作において同様の挙動を示すことが知られる。最終的に用いる Z, ZR 用では zeatin ribotide にも交差反応性を示すが、本方法では、Z または ZR と zeatin ribotide が完全に分離することができた。回収した Z, ZR, ABA の画分を遠心濃縮し乾固し、TBS に溶解した後、Sigma 社のイムノアッセイキットにより定量した。なお、今回は時間の都合により、分析は 3 反復しかできなかった。したがって、誤差も大きい結果となった。現在も分析を行っており、反復数を増加させているところである。

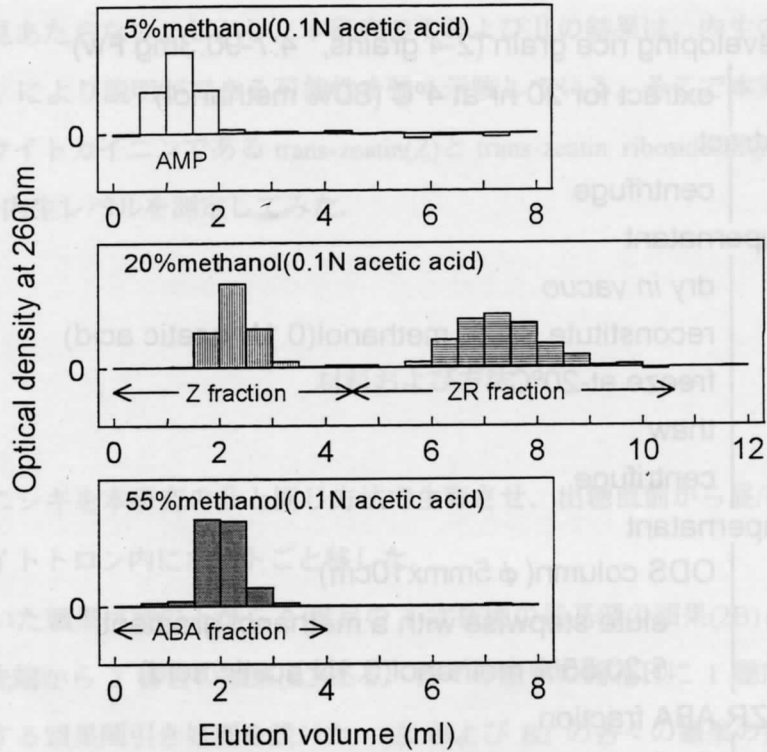


Fig.2. Separation of authentic cytokinin and ABA by ODS mini-column.

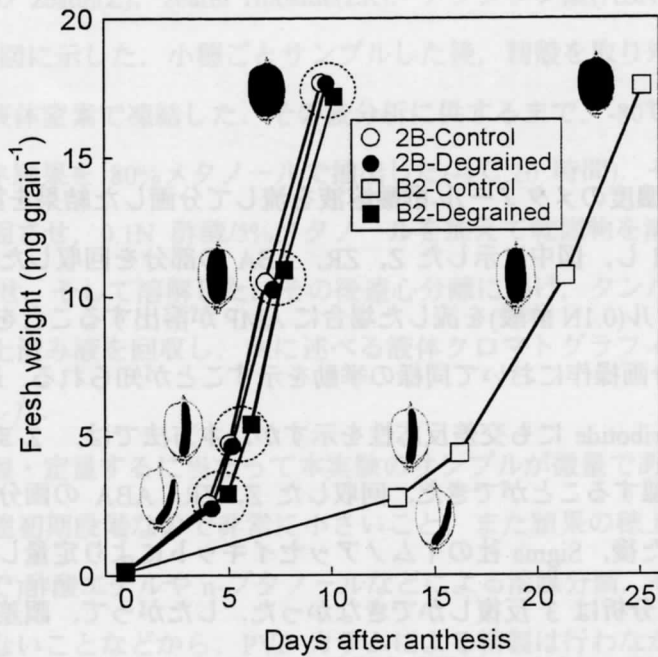


Fig.3. Changes in fresh weight of grain after anthesis.

結果および考察

第3図に、穎果の新鮮重の増加過程を表した。強勢な穎果である2Bでは、対照区、間引き区ともほとんど変わらない速い初期生長が観察された。一方、弱勢な穎果であるB2では、間引き区は2Bとほとんど変わらない速い生長を示したが、対照区は明らかに生長が遅れた。さらに、発達段階Hから発達段階Mの間ではすべての区でほとんど変わらない生長が観察された。したがって、対照区のB2では、発達段階Eや発達段階Tの段階で生長が著しく遅れたことになる。この結果は、弱勢な穎果は発達段階Hまでの生長が遅延

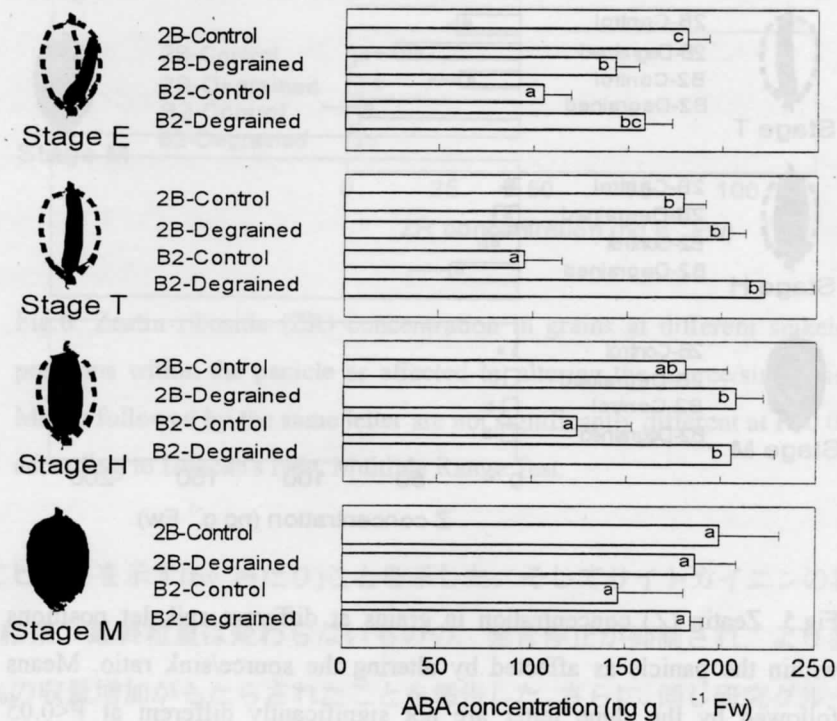


Fig.4. ABA concentration in grains at different spikelet positions within the panicle as affected by altering the source/sink ratio. Means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's New Multiple Range Test.

しやすいという本研究のIおよびIIの結果と同様であった。

第4図に、実際に穎果中に含まれるABAの含量を、各発達段階ごとに表した。まず発達段階EではB2対照区のABA含量だけが明らかに他の処理区よりも低かった。発達段階Tについても同様の結果が見られた。発達段階Hにおいても若干ではあるが、他の処理区

より低い含量を示した。しかし、発達段階 M になると、他の処理区との間に有意な差は見られなかった。以上のことから、生長の速い穎果の方が ABA レベルが高いことが明らかになった。しかも、それは穎果の生長に差が生じる発達段階 H より前の段階で観察され、生長がほとんど同じとなる発達段階 H 以降は観察されなかった。これらのことは、ABA はイネ穎果の初期生長を促進していることを強く示唆するものである。

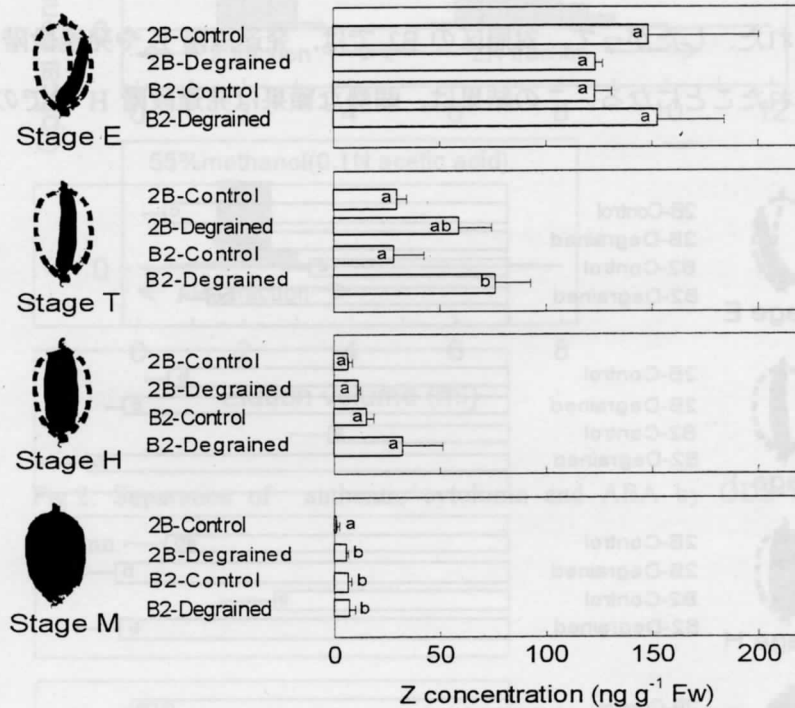


Fig.5. Zeatin (Z) concentration in grains at different spikelet positions within the panicle as affected by altering the source/sink ratio. Means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's New Multiple Range Test.

第 5 図は各発達段階における zeatin レベルを示した。どの発達段階においても有意な差は見られなかった。本実験からは生長発達段階の早い時期、特に発達段階 E に zeatin レベルが高く、生長が進むにつれ急激に Z の濃度が低くなることがわかった。第 6 図には zeatin riboside レベルを示した。これも Z と同様、区間の差は認められず、生長発達段階の早い時期に濃度が高く、発達段階が進むにつれて低くなることがわかった。

Dietrich ら(1993)は、開花後 1-10 日目のトウモロコシ穎果のサイトカイニンをラジオイムノアッセイで調べたところ、穎果の主なサイトカイニンは zeatin と zeatin riboside で開花

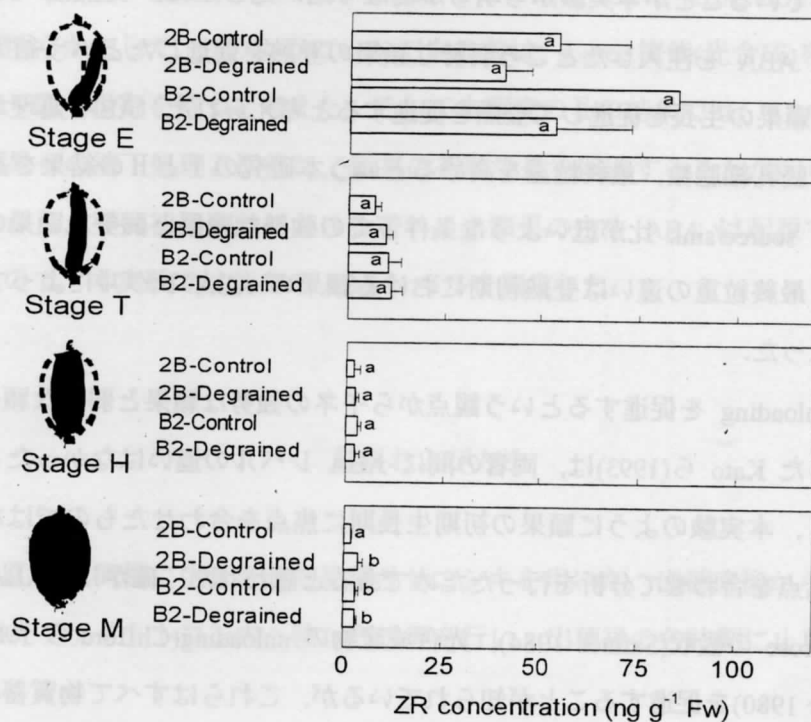


Fig.6. Zeatin riboside (ZR) concentration in grains at different spikelet positions within the panicle as affected by altering the source/sink ratio. Means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's New Multiple Range Test.

後 9 日目にピークを示す(fw 当たり)ことを示した。そしてサイトカイニンの茎への注入処理を行った結果、最終粒重は変わらないものの、発育停止が抑制され、より多くの穎果が成熟し、30%の収量増加がもたらされたことを報告した。さらに、同じ研究グループの Meilan ら(1993)は、イネ穎果のサイトカイニンレベルは開花後 4-5 日目に一時的に上昇することから、サイトカイニンは胚乳の細胞分裂に関与し内生のレベルの上昇は収量増加につながると考えた。以上の報告や Van Staden(1983)の報告のサイトカイニンは種子の発育初期に高い濃度で存在するという事実から、サイトカイニンは細胞分裂を促進するのに重要な役割を持ち、しいては登熟に有利に働いていると考えられる。しかし、本実験では zeatin, zeatin riboside の両サイトカイニンとも強勢な穎果と弱勢な穎果で、また生長の早い穎果と遅い穎果でほとんど同じようなレベルを示した。つまり、穂上位置の違いによる穎果の初期生長の違いはサイトカイニンで説明することはできなかった。

一方、ABA はそのレベルにおいても時期的なレベルの変化においてもイネ穎果の初期

生長を促進していることが本実験から明らかとなった。たしかに、Yoshida ら(1987)の実験で穂首節間に ABA を注入したところ弱勢な穎果の登熟を促進したという結果が得られたので ABA は穎果の生長を促進して登熟を促進すると考えられた。ABA 処理が弱勢な穎果の初期生長、胚乳細胞数、最終粒重を高めるという本研究の I と II の結果をあわせて考えると、とくに source/sink 比が低いような条件下での強勢な穎果と弱勢な穎果の初期生長、胚乳細胞数、最終粒重の違いは登熟初期における穎果の ABA レベルによって生じることが明らかとなった。

ABA は Unloading を促進するという観点からイネの強勢な穎果と弱勢な穎果の ABA レベルを比較した Kato ら(1993)は、両者の間に ABA レベルの違いはなかったと報告している。おそらく、本実験のように穎果の初期生長期に焦点を合わせたものではなく、デンプン蓄積期に焦点を合わせて分析を行ったためであると思われた。確かに、ABA は貯蔵器官における sucrose の吸収(Saftner 1984)、光合成産物の unloading(Clifford ら 1986, Düring ら 1980, Tanner 1980)を促進することが知られているが、これらはすべて物質蓄積を促進するというものである。しかしながら、本研究の I, II の結果と本実験の分析結果からはイネ穎果においては ABA は生長そのものを促進していることが明らかとなった。このような種子の発達に関する報告は始めてである。

サイトカイニンを処理すると ABA と同様に弱勢な穎果の初期生長、胚乳細胞数、最終粒重を高めることが本研究の I の結果で得られ、Dietrich ら(1993)と同じ登熟促進効果が認められたことになる。確かにサイトカイニンは穎果の発達や登熟に重要な役割を持っていることは確かである。しかし、穂上位置によるイネ穎果の生長や登熟の差はサイトカイニンによって制御されているのではないことが本実験結果から明らかになった。

2. イネ葉身のアブシジン酸レベル

イネ穎果のアブシジン酸(ABA)の起源については、今のところわからない。しかし、Setter ら(1980)は葉柄のガードリング(蒸気で蒸す処理---篩管の通導機能を減退させる)処理や、莢除去処理により、葉の ABA レベルが著しく上昇すること、そして 1 時間以内に気孔の閉鎖と光合成速度の低下をもたらすことを明らかにし、莢に葉から ABA が送られる可能性

を示唆した。さらに、Setter ら(1981)は source である葉に与えた ABA は発達中の莢に移行することを明らかにした。このように sink である莢は、source 機能(光合成)を阻害する ABA を葉から取り除く役割を持つと考えた。そして本研究のⅡの結果では、ABA の莖葉への散布処理は穎果への滴下処理と同様に、穎果の初期生長を促進することが明らかとなった。以上のことから、登熟初期段階における若いイネ穎果の内生 ABA は起源である可能性が示唆されたので、本実験では葉身の ABA レベルを測定した。

材料および方法

本研究のⅢ-1 と同様に生育させた品種ササニシキを用いた。出穂直後から 24/19℃(昼温/夜温)の自然光ファイトロン内へ移し各処理を行い、出穂後の各時期に止葉をサンプリングした。

処理区は、自然光条件下の対照区と、寒冷紗により 50%の遮光を行った遮光区、出穂日に穂首節から穂を除去した穂除去区を設けた。出穂日、および出穂 1 日後、4 日後、7 日後、10 日後に止葉のサンプリングを行った。サンプリング時刻は、出穂日については 13:00 に、それ以後のサンプリングについては、一日に 2 回、5:00 と 13:00 に行った。サンプリングは、止葉をカラーの部分で切り取り、新鮮重を測定した後、直ちに止葉を液体窒素で凍結し、分析を行うまで -80℃の超低温槽内で保存した。-80℃で保存した止葉のサンプルを、ホモジナイザー(IKA ウルトラタラックス)を用いて、80%メタノール中でホモジナイズした。その後、3℃で 20 時間抽出した。抽出後、遠心分離(2℃)し上澄みを回収した。さらにもう一度残渣から抽出した。その後は本研究のⅢ-1 と同じ方法で ABA を定量した。

結果および考察

出穂後の、止葉葉身の ABA レベルについてみると(第 7 図)。いずれの処理区においても、日変化がみられ、早朝から午後にかけて低下する傾向がみられた。対照区は、出穂後増加して、出穂 3 日後に最大値を示し、その後減少した。遮光区は、出穂後ほとんど変化することなく全期間に渡って処理区の中で最も低い値で推移した。穂除去区は、出穂 1 日後の

早朝に最大値を示し、出穂 1 日後の午後に最小値になるものの、その後大きな日較差を示しながらも徐々に増加する傾向がみられた。

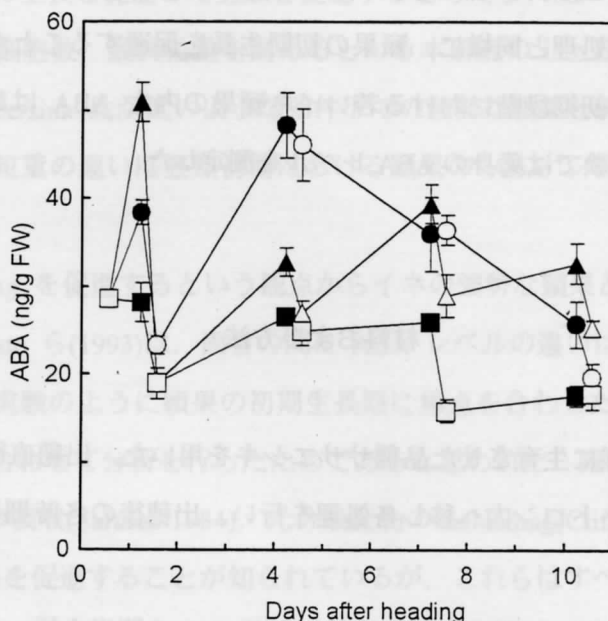


Fig. 7. Effect of treatments altering the source/sink ratio on ABA concentration in flag leaves.

●:control, ▲:panicle removed, ■:shaded (early morning)
○:control, △:panicle removed, □:shaded (day time)

ABA は、茎葉散布処理でも若い穎果への滴下処理と同様に穎果の生長を促進すること(本研究Ⅱ)から、若い穎果の ABA の起源は、葉である可能性が示唆された。出穂後に遮光した区、つまり、弱勢な穎果の初期生長が遅延するような条件下において、測定期間中の止葉の ABA レベルが、対照区と比較して大幅に低いことが明らかとなった(第 7 図)。このことは、植物が光の強さを感じて葉身での ABA の生合成を制御している可能性を強く示唆するものである。また、穂を除去した場合には、翌朝急激に増加し対照区よりも明らかに高いレベルとなったが、日中にかけて他区同様急激に減少、その後対照区より低いものの徐々に増加し、出穂 8~10 日後には対照区と同程度かわずかに上回るまで回復した(第 7 図)。ABA が葉から穂に送られていると考えたので、穂除去処理により対照区以上の ABA レベルが観察されることを期待したが、それは一時期のみであった。穂切除というドラスティックな処理が植物の種々の代謝活性に影響を及ぼし、葉における ABA の生産にマイナスの影響を与えたか、穂切除により若い分げつ芽などの他の器官へ ABA が大量に移動したなど考えられるが、今のところ想像の域を脱し得ない。ただ光の強さを変化させるという、マイルドな処理では、明らかに葉の ABA レベルが低下することから、光の強さにより葉

の ABA 生産量が制御されていると考えて良さそうである。

また、葉の ABA レベルは早朝に高く、日中に低下する傾向が認められた。遮光により ABA レベルが低下することから、むしろ日中の方が高くなるはずである。おそらく日中に葉から他の器官(穂など)に多く輸送されているのだろうが、sink と考えられる穎果の生長の日変化などとともに検討が必要である。

本研究の莖葉や穎果への ABA 処理実験と穎果および止葉の ABA レベルの測定実験の結果を総合してイネにおける ABA の登熟制御について考えてみる。ABA の主な生合成場所であると考えられている葉は、太陽光線の強さを感じ取り、ABA の生産量を変化させる。生産された ABA は、葉から穂へ移行され、特に光が弱く生産量の少ない場合には何らかのメカニズムを通じて強勢な穎果と弱勢な穎果との間に内生 ABA レベルの勾配を生じる。この結果、弱勢な穎果では、胚乳細胞数の減少、穎果の初期生長の遅延、最終粒重の減少が引き起こされると考えた。

この考えをサポートする報告がある。折谷(1985)は、葉の老化と ABA レベルの関係を明らかにするために検討したところ、登熟速度の速い品種の方が葉の ABA レベルも高く、老化も早いことを明らかにした。登熟速度とは、穂重増加が出穂後早い時期に最大に達することをさしており、このことは、言い換えると弱勢な穎果の初期生長が速く、穂全体としてデンプン蓄積期に入るのが早いということになる。このことから、葉の ABA が、穎果の初期生長を制御している可能性が非常に高いことになる。

ただし、ABA 処理により弱勢な穎果の初期生長は確かに促進はされたが、強勢な穎果の初期生長速度、程度までには至らなかった。しかしながら、ABA を若い穎果に連続的に供給すれば可能であるかもしれない。なぜなら、弱勢な穎果の初期生長は、source/sink 比を変えるような処理により、すぐに変化することから、生長の初期段階で決定づけられてしまうものではなく、生長制御に関する指令が常に穎果に送り続けられていると考えられるからである(Nakamura ら 1996)。また、ABA が生長や細胞分裂を促進する事実が非常に少なく、むしろ阻害する事実の方が多いことから、ABA がイネ穎果の生長を直接促進しているのではなく、他の要因例えば穎果における別のホルモンの生合成などを通じて働いている可能性もあり、今後検討が必要であると思われた。

IV イネにおける登熟優先度決定機構の意義

イネは、一穂の中でも開花の早い強勢な穎果と比較的開花の遅い弱勢な穎果とが共存している。このことは、開花の段階ですでに登熟優先度が存在していることを意味する。さらに、本研究の I, II で述べたように開花後の光条件が弱い場合には、さらに、弱勢な穎果の初期生長が遅れ、その後起こるデンプン蓄積開始も遅れることが明らかとなった。さらに本研究の II および III の結果から、植物ホルモンである ABA がイネ穎果の初期生長の促進要因であることが明らかとなり、このような植物ホルモンを介した生長制御はイネにとっては積極的な制御である可能性が示唆された。おそらく、その一つは不良環境下で一穂内の全ての穎果が同時に登熟するのを回避し、競合しないようにするための機構であると考えられた。

そこで本実験では、出穂後のさまざまな時期に遮光処理を行い、つまり光環境を急変させ、イネ穎果の初期生長や登熟に及ぼす影響について穂上位置の違いを含めて検討した。そして、イネによる積極的な穎果の初期生長の制御が持つその意義について考察した。

材料および方法

供試品種としてササニシキを用いた。1/5000a ワグネルポットに円形 20 粒播きし、本研究の II, III と同様に自然光条件下で土耕栽培した。また、出穂直前から 24/19℃(昼・夜温)の自然光ファイトトロンに移し、出穂後の各時期に寒冷紗による 50%遮光処理を行った。処理期間は、出穂後 0 から 2 週目まで(0-2 区)、2 から 4 週目まで(2-4 区)、4 から 6 週目まで(4-6 区)、0 から 6 週目まで(0-6 区)の 4 処理区をもうけた。出穂後の各時期における地上部の乾物重を測定した。サンプリングは、出穂期、出穂 2 週後、4 週後、6 週後、10 週後の各時期に行った。地上部は、サンプリング後直ちに 80℃で 2 日間通風乾燥したのち、穂、葉、葉鞘・茎の各部位に分け乾物重を測定した。出穂 6 週後および出穂 10 週後については、一穂粒数・稔実歩合・登熟歩合・登熟粒重・一穂粒重(稔実粒)の測定を行った。さらに、穂上の全ての位置の穎果の粒重(自然乾燥)も測定した。

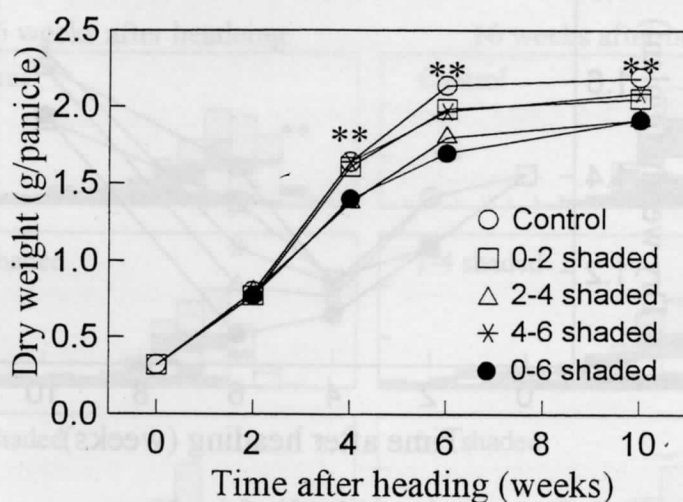


Fig. 1. Changes in panicle dry weight.

** Significantly different from each other at 0.01 provability level.

結果および考察

出穂 10 週間後の最終的な穂重は、穂重増加の最盛期に遮光した 2-4 区と 0-6 区で最も低い値となった。出穂直後から出穂 6 週間後までと最も長い間遮光された 0-6 区では、出穂 6 週後の穂重は、最も低い値であったが、自然光条件下に戻された出穂 6 週間後以降の穂重増加量は、処理区の中でも最大で、最終的な穂重も 2-4 区と同程度になった。また、0-2 区と 4-6 区の穂重は、ほぼ同様に推移し、2-4 区、0-6 区よりは高いものの、対照区には及ばなかった(第 1 図)。

出穂 2 週間後の葉鞘と茎の乾物重は、出穂後遮光された 0-2 区(0-6 区)と自然光条件下におかれた対照区(2-4 区、4-6 区)で有意な差がみられた。しかしながら、出穂 4 週間後には、若干の違いはみられるものの、有意な差はみられなかった。また、出穂 6 週間後以降は、全ての処理区で葉鞘・茎の乾物重は増加し、出穂 10 週間後には、出穂期よりも高くなった(第 2 図)。したがって、6 週目以降の穂重増加の減少は、穂自身の光合成産物の受け入れ能力が減退するためと考えられた。0-6 区ではその減退が特に小さかったと考えられた。

出穂 6 週および 10 週間後の各登熟形質について比較した(第 1 表)。稔実歩合は、出穂 6 週および 10 週間後、いずれにおいても 95%程度と高い値を示した。出穂 6 週間後の登熟歩合は、全ての処理区において対照区と比較して大幅に低い値を示した。その後、出穂 10

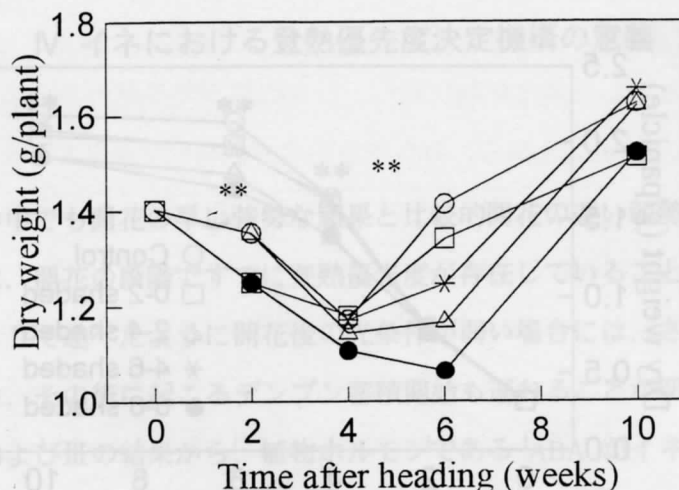


Fig.2. Changes in dry weight of leaf sheath + stem.
 ** Significantly different from each other at 0.01 provability level. Symbols are the same as those shown in fig.1.

Table 1. Grain Filling characteristics at 6 or 10 weeks after heading.

	Weeks after heading	Control	Shaded period (weeks after heading)			
			0-2	2-4	4-6	0-6
Grain set (%)	6	95.6	95.8	95.7	95.5	95.3
	10	95.8	95.1	95.3	97.3	95.9
Grain filling (%)	6	90.2	72.0 **	59.7 **	78.1 **	54.5 **
	10	94.0	90.2	78.4 **	94.3	79.1 **
Mean dry weight of filling grains (mg/grain)	6	19.5	19.7	19.6	19.2	19.7
	10	19.7	19.5	19.2	19.5	19.4
Dry weight of all grains (g/panicle)	6	1.73	1.63	1.45 **	1.62	1.38 **
	10	1.80	1.72	1.60 **	1.73	1.62 **
Yield (g/panicle)	6	1.66	1.32 **	1.10 **	1.39 **	1.00 **
	10	1.77	1.65	1.40 **	1.69	1.43 **

** Significantly different from control at 0.01 provability level.

週間後までに、全ての処理区で大幅に増加したが、2-4区および0-6区で78.4%、79.1%と対照区と比較して有意に小さかった。登熟粒の一粒重を測定した結果、各処理区に有意な差はみられず、19.2mgから19.7mgと同様な値であった。また、出穂6週間後と出穂10週間後を比較しても、同様な値を示した。登熟期間を充分にとった出穂10週間後の一穂粒重は、2-4区と0-6区で最も低かった。出穂6週間後の一穂粒重を比較すると、0-6区が2-4区よりも低いことから、0-6区の方が、登熟後期に乾物を蓄積する粒が多いと考えられた。

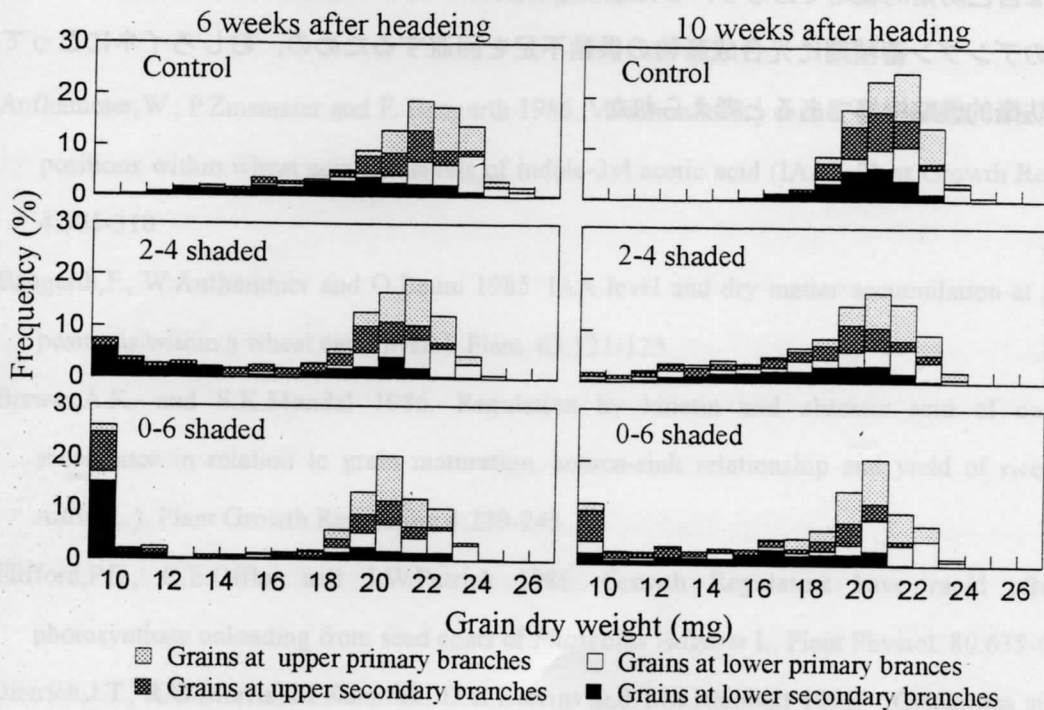


Fig.3. Distribution frequency in grain dry weight at 6 or 10 weeks after heading.

出穂6週後の0-6区では、発達初期段階で生長が停滞していると思われる10mg以下の粒がかなりあったが、他のほとんどは18mg以上であった。つまり登熟が進んでいない粒とかなり進んだ粒の両極端が存在した。そして前者は主に二次枝梗着生穎果いわゆる弱勢な穎果であった。10週後になると10mg以下の粒はかなり減少した。したがって、0-6区の6週目以降の穂重増加が多かったのは、主に弱勢な穎果の生長によると考えられた。一方、6週目の2-4区では、10mg以下の粒は0-6区よりかなり少ないが、10~18mgの粒は多かった。つまり、デンプン蓄積途中の穎果が多かったことになるが、これらの穎果は10週目まであまり重量が増加しなかった(第3図)。

以上より、登熟初期の日射量が多く1穂内のほとんどの穎果がデンプン蓄積に入った時に日射量が制限されると登熟はかなり悪化することが明らかとなった。一方、登熟初期から日射量が制限された場合は、強勢な穎果の登熟が優先的に進み、大部分の弱勢な穎果は生長初期段階で生長能力を失うことなく生長を停滞していることが明らかとなった。これらのことと、本研究のⅡおよびⅢで述べたように、植物ホルモンであるABAが穎果の初期生長を制御していることから考えると、弱勢な穎果の発達初期段階での生長の停滞は、穎果のデンプン蓄積期に光合成産物の供給不足を回避するための、むしろイネにとっては積

極的な自己防衛的戦略であろう。したがって、弱勢な穎果の発達初期段階での生長停滞は、穎果のデンプン蓄積期に光合成産物の供給不足を回避するための、むしろイネにとっては自己防衛的戦略機構であると考えられた。

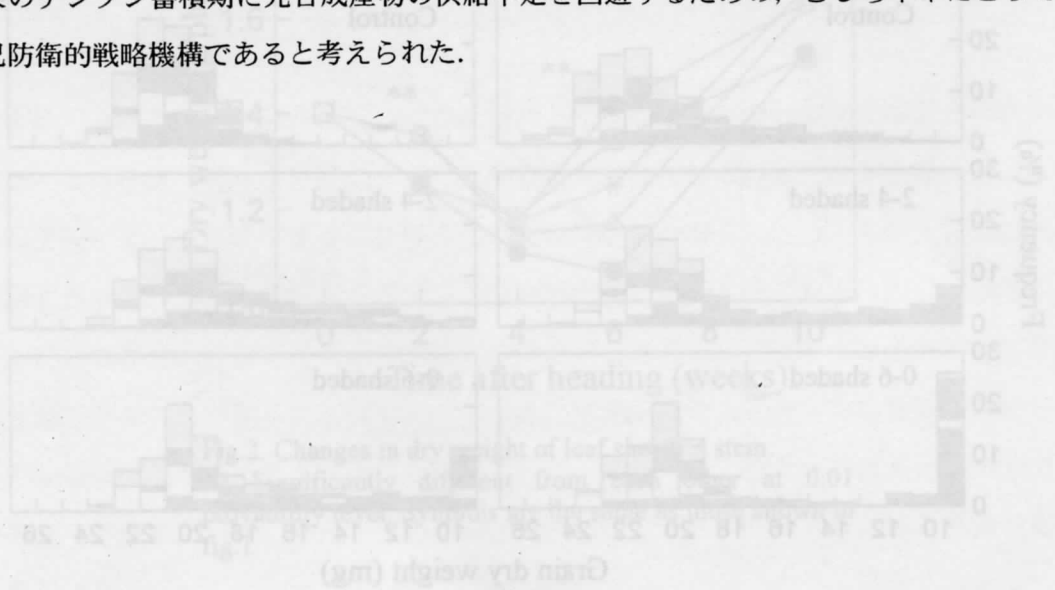


Fig. 2. Changes in budmura and grain dry weight in relation to grain development stages under different shading treatments. The distribution frequency of grain dry weight in 10 weeks after heading is shown in the figure. The grain dry weight of the lower primary panicles is shown in the figure. The grain dry weight of the upper secondary panicles is shown in the figure. The grain dry weight of the lower secondary panicles is shown in the figure. The grain dry weight of the upper primary panicles is shown in the figure.

穎果の0-6区では、葉面被覆率が低下するにつれて、葉面積あたりの光合成産物の供給量が減少し、穎果の生長が抑制され、穎果の重量が減少した。また、穎果の重量が減少したことは、穎果の生長が抑制されたことからも明らかである。したがって、穎果の生長が抑制されたことは、穎果の生長が抑制されたことからも明らかである。したがって、穎果の生長が抑制されたことは、穎果の生長が抑制されたことからも明らかである。

図2 穎果の生長と葉面被覆率の関係

以上より、葉面被覆率の低下は、穎果の生長を抑制し、穎果の重量を減少させる効果があることが明らかになった。この結果は、穎果の生長が抑制されたことからも明らかである。したがって、穎果の生長が抑制されたことは、穎果の生長が抑制されたことからも明らかである。したがって、穎果の生長が抑制されたことは、穎果の生長が抑制されたことからも明らかである。

引用文献

- Aufhammer, W., P. Zinsmaier and F. Bangerth 1986. Variation of dry matter accumulation at different positions within wheat ears and levels of indole-3yl acetic acid (IAA). *Plant Growth Regulation* 4:305-310.
- Bangerth, F., W. Aufhammer and O. Baum 1985. IAA level and dry matter accumulation at different positions within a wheat ear. *Physiol. Plant.* 63:121-125.
- Biswas, A.K. and S.K. Mondal 1986. Regulation by kinetin and abscisic acid of correlative senescence in relation to grain maturation, source-sink relationship and yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* 4:239-245.
- Clifford, P.E., C.E. Offler and J.W. Patrick 1986. Growth Regulators have rapid effects on photosynthate unloading from seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 80:635-637.
- Dietrich, J.T., R.O. Morris, M. Kaminek, D.G. Blevins and T.M. Reinbott 1993. Cytokinins and grain development in Maize. *Plant Physiol.* 102(abstract No. 115):S-23
- Düring, H. and G. Alleweldt 1980. Effects of plant hormones on phloem transport in grapevines. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 93:339-347.
- Jones, R.J., S.M. Griffith and M.L. Brenner 1986. Sink regulation of source activity by hormonal control. In *Regulation of Carbon and Nitrogen Reduction and Utilization in Maize.* (Ed) J.C. Shannon, D.P. Knievel and C.D. Boyer, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. :233-246.
- Kato, T. and K. Takeda 1992. 1993. Endogenous abscisic acid in developing rice grains on primary and secondary branches of rice (*Oryza sativa* L.).
- 木戸三夫・梁取昭三 1968. 死米の組織および発育過程に関する研究. *日作紀* 37:143-149.
- Mae, T. and Ohira, K. 1981. The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 22:1067-1074.
- Meilan, R., M. Kaminek, K.G. Cassman and R.O. Morris 1993. Elucidating the role cytokines play in the control of rice grain development. *Plant Physiol.* 102(abstract No.330):S-61.
- Michael, G. and H. Seiler-Kelbitsch 1972. Cytokinin content and kernel size of barley grain as affected by environmental and genetic factors. *Crop Sci.* 12:162-165.

- Myers, P.N., T.L. Setter, J.T. Madison and J.F. Thompson 1992. Endosperm cell division in maize kernels cultured at three levels of water potential. *Plant Physiol.* 99:1051-1056.
- 長戸一雄 1950. 糝に関する研究 (I). *日作紀* 19:1-8.
- 中村貞二・星川清親 1990. イネ穎果の生長および稔実特性について. 59(別 2):101-102.
- 中村貞二・中嶋孝幸・星川清親 1991. イネ穎果の生長と糖プール. -発達初期-. *日作紀* 60(別 2):297-298.
- 中村貞二・永松大・星川清親 1992. イネ穎果の初期生長と稔実及び胚乳細胞数との関係. *日作紀* 61(別 2):129-130.
- Nakamura, T., N. Murakami and K. Hoshikawa 1996. Factors regulating the early grain growth in rice (*Oryza sativa* L.) *Proceedings of the 2nd Asian Crop Science Conference* :508-509.
- 折谷隆・葭田隆治 1980. 作物の栄養体及び穀粒における物質蓄積能力とサイトカイニン含量との関係. *日作紀* 49(別 1):153-154.
- 折谷隆志 1985. 登熟期における水稻の光合成速度と内生植物ホルモンとの関係. *日作紀* 54(別 2):184-185.
- Quebedeaux, B., P.B. Sweetser and J.C. Powell 1976. Abscisic acid levels in soybean reproductive structures during development. *Plant Physiol.* 58:363-366.
- Reed, A.J., G.W. Singletary, J.R. Schussler, D.R. Williamson and A.L. Christy 1988. Shading effects on dry matter and nitrogen partitioning, kernel number, and yield of maize. *Crop Sci.* 28:819-825.
- Saftner, R.A. and R.E. Wyse 1984. Effect of plant hormones on sucrose uptake by sugarbeet root tissue discs. *Plant Physiol.* 74:951-955.
- Satake, T., I. Nishiyama, N. Ito and H. Hayase 1969. Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. I. Methods of growing rice plants and inducing sterility in the phytotron. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 38:603-609.
- Setter, T.L., W.A. Brun and M.L. Brenner 1980. Effect of obstructed translocation on leaf abscisic acid, and associated stomatal closure and photosynthesis decline. *Plant Physiol.* 65:1111-1115.
- Setter, T.L., W.A. Brun and M.L. Brenner 1981. Abscisic acid translocation and metabolism in soybeans following depodding and petiole girdling treatments. *Plant Physiol.* 67:774-779.
- 曾我義雄・野崎倫夫 1957. 水稻における蓄積炭水化物の消長と登熟との関係. *日作紀* 26:105-108.
- 高木真基子 1990. イネに含まれるサイトカイニン. *植物の化学調節* 25:57-67.

- 田中孝幸・松島省三 1963. 水稻収量の成立原理とその応用に関する作物学的研究. 第64報 登熟機構に関する研究. 11. 早期発育停止物の発生経過とその予察法. 日作紀 32:35-38.
- Tanner, W. 1980. On the possible role of ABA on phloem unloading. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 93:349-351.
- Tietz, A., M. Ludewig, M. Dingkuhn and K. Dörffling 1981. Effect of abscisic acid on the transport of assimilates in barley. *Planta* 152:557-561.
- Yoshida, R. 1987. Effects of zeatin and abscisic acid on grain ripening in rice. *Proc. 14th Annual Plant Growth Regul. Soc. America Meeting*, 91-96.
- Van Staden, J. 1983. Seeds and cytokinins. *Physiol. Plant.* 58:340-346.
- 和田源七・松島省三 1969. 水稻収量の成立原理とその応用に関する作物学的研究. 第96報 穎果数と登熟歩合と収量との関係, とくに最適モミ数と最適登熟歩合について. 日作紀 38:294-297.