

## カロチノイド生合成阻害型除草剤による高温下での種子発芽誘導

遠藤 貴司<sup>\*,\*\*</sup>・吉岡 俊人<sup>\*</sup>・郷内 武<sup>\*</sup>・佐藤 茂<sup>\*</sup>・羽柴 輝良<sup>\*</sup>

Induction on seed germination at high temperatures by herbicides which inhibit carotenoids biosynthesis

Takashi Endo<sup>\*,\*\*</sup>, Toshihito Yoshioka<sup>\*</sup>, Takeru Gonai<sup>\*</sup>, Shigeru Satoh<sup>\*</sup> and Teruyoshi Hashiba<sup>\*</sup>

要約：カロチノイド生合成阻害型除草剤が高温下での種子の発芽に及ぼす効果について調べた。ミドリハコベ (*Stellaria neglecta* WEIHE) 種子は 23°C 以上、レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) 種子は 33°C 以上の高温下では発芽率が著しく低下したが、カロチノイド生合成阻害型除草剤であるフルリドン処理すると、高温下でも高い発芽率を示した。また、ジベレリンの生合成阻害剤であるユニコナゾールは高温下でのフルリドンの発芽誘導効果を低下させた。フルリドンとカロチノイド生合成系の阻害部位が同じであるノルフラゼンは、フルリドンと同様に高温下での発芽を誘導した。一方、アブシジン酸生合成系の初期過程を阻害するクロマゾン処理ではこのような効果はみられなかった。以上の結果から、同じカロチノイド生合成阻害型除草剤の中でも、高温下での発芽を誘導する効果があるものとないものが存在することがわかった。この要因としては、前者がカロチノイドの生合成を阻害する過程でアブシジン酸の合成のみを阻害しているのに対して、後者がアブシジン酸とジベレリンの両方の合成を阻害しているためと推察された。

キーワード：カロチノイド生合成阻害型除草剤, 発芽誘導, フルリドン, アブシジン酸, ジベレリン

ミドリハコベ (*Stellaria neglecta* WEIHE) は、秋に発芽し春に開花する冬植物としての生活環をもつ。春に散布されたミドリハコベの種子は地温が高い夏季にはほとんど発芽しない。同様にレタス (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) 種子は、20°C前後に発芽適温域をもち、それ以上の高温にさらされると発芽しなくなる。こうした高温下での種子の発芽抑制は、種子に周囲の気温を感じとり発芽時期を調節する機構が存在しているためと考えられる。

これまで著者らは、カロチノイド生合成阻害型除草剤でありアブシジン酸 (以下 ABA と略す) 生合成阻害剤としても用いられているフルリドン処理することで、レタス種子が高温下でも発芽が可能になること、さらに、フルリドンによって発芽が誘導された種子中で ABA 含量が急激に低下することを明らかにした (Yoshioka ら 1998)。このことは、フルリドンの高温下での発芽誘導効果が、種子中の ABA の生合成阻害効果によるものであることを示している。

本研究では、まず、このフルリドンによる高温下での発芽誘導に ABA 以外の要因が関与しているかどうかを調べる目的で、種子の発芽促進に働くと考えられているジベレリン (以下 GA と略す) の役割を GA 生合成阻害剤を用いて検討した。また、フルリドンと阻害部位が異なるカロチノイド生合成阻害型除草剤が、高温下での種子の発芽誘導効果を有するかどうかについて検討をおこなった。

### 材料及び方法

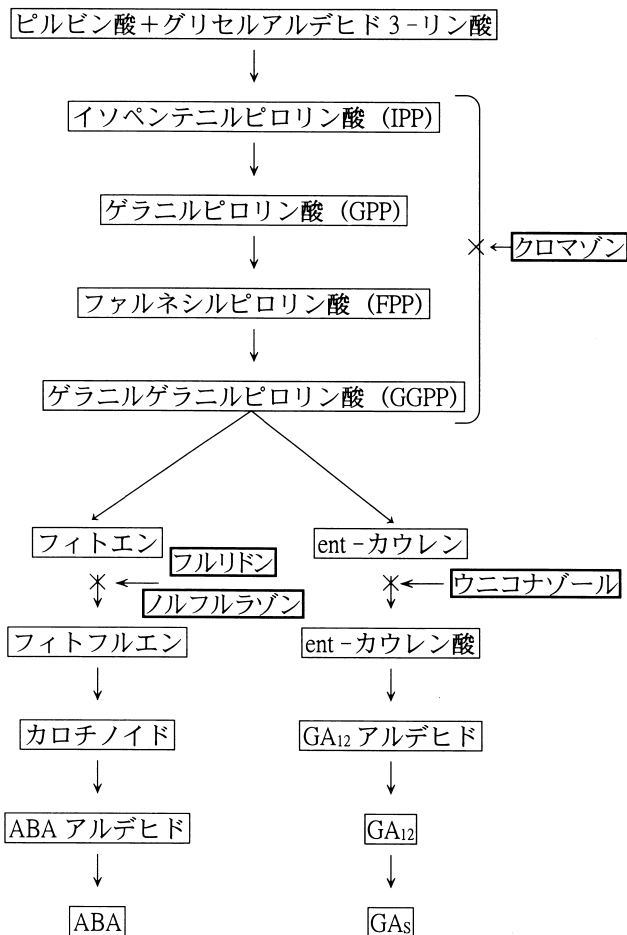
#### 試験 1 フルリドンによる高温下での発芽誘導

直径 55mm の丸型シャーレに直径 50mm のろ紙 (ADVANTEC No.2) を敷き、ミドリハコベ種子 50 粒、またはレタス種子 50 粒を置床した。これらに 1.5ml の蒸留水、または 30  $\mu$ M フルリドン溶液を添加し、暗黒下、3, 8, 13, 18, 23, 28, 33°C の温度条件でインキュベーションした。発芽率の調査は 1 日おきに 14 日後まで行い、最終的な発芽率をその温度条件における発芽率とした。発芽試験の繰

\* 東北大学大学院農学研究科

\*\* 現在：宮城県古川農業試験場 〒989-6227 宮城県古川市大崎字富国 88 番地

Miyagi Prefectural Furukawa Agricultural Experiment Station, 88 Fukoku, Ousaki, Furukawa, Miyagi 989-6227, Japan



第1図 カロチノイド合成阻害型除草剤（フルリドン、ノルフルラゾン、クロマゾン）とジベレリン合成阻害剤（ウニコナゾール）の作用部位

り返し数は3とした。ミドリハコベ種子は1997年5月に仙台市近郊で採取した。レタス種子はタキイ種苗から購入した。

#### 試験2 GA合成阻害剤を用いた発芽試験

レタス種子100粒を置床したシャーレに、30 $\mu$ Mフルリドン溶液、60 $\mu$ Mウニコナゾール溶液、またはフルリドンとウニコナゾールとの混合溶液（それぞれの溶液の濃度は30, 60 $\mu$ M）を1.5ml添加し、33 $^{\circ}$ Cの暗黒条件下でインキュベーションした。発芽率は、2日おきに14日目まで調査した。発芽試験の繰り返し数は3とした。

#### 試験3 各種カロチノイド合成阻害型除草剤を用いた発芽試験

レタス種子100粒を置床したシャーレに蒸留水、あるいは所定濃度のフルリドン、ノルフルラゾン、またはクロマゾン溶液を1.5ml添加し、33 $^{\circ}$ Cの暗黒条件下でインキュベーションした。発芽率は14日後に調査し、発芽試験の繰り返し数は3とした。

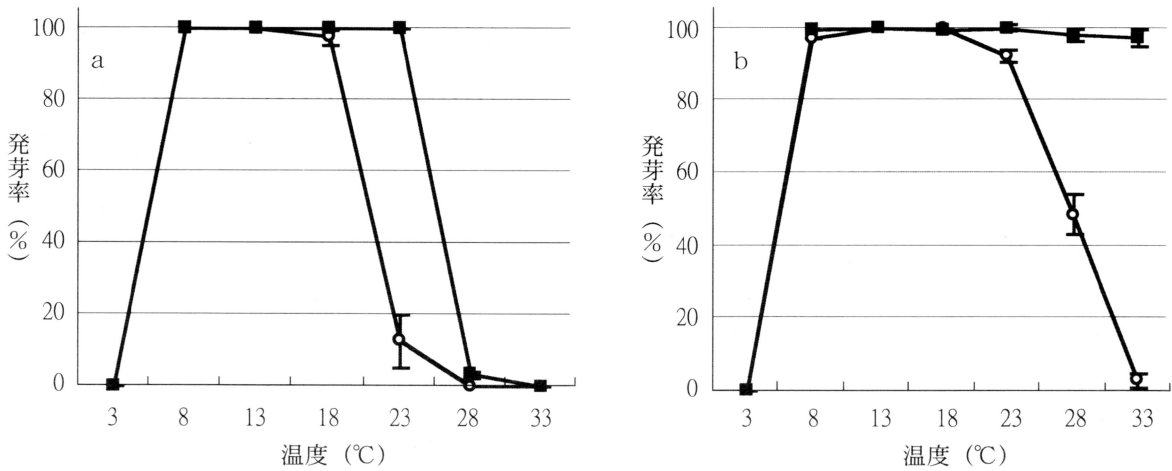
#### 供試薬剤

本研究で用いた植物ホルモン生合成阻害剤の作用部位を第1図に示した。フルリドン（1-methyl-3-phenyl-5-[3-trifluoromethyl(phenyl)]-4-(1H)-pyridinone）とノルフルラゾン（4-chloro-5-methylamino-2-(3-trifluoromethylphenyl)pyridazin-3(2H)-one）はフィトエンデサチウラーゼを特異的に阻害し（Albrechtら1991）、クロマゾン（2-(2-chlorophenyl)methyl-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone）はイソペンテニルピロリン酸からゲラニルゲラニルピロリン酸に至るステップを阻害する（Kobayashiら1995；Sandmannら1986；Scottら1994）。また、ウニコナゾールは、p-450が関与するent-カウレンからent-カウレン酸の酸化過程を阻害する。フルリドンはダウ・ケミカル日本㈱の山内一馬氏から、ノルフルラゾンは㈱エス・ディー・エスバイオテックの保古尚宏氏から、クロマゾンは㈱FMCのDavid Keifer氏から提供していただいた。

#### 結果及び考察

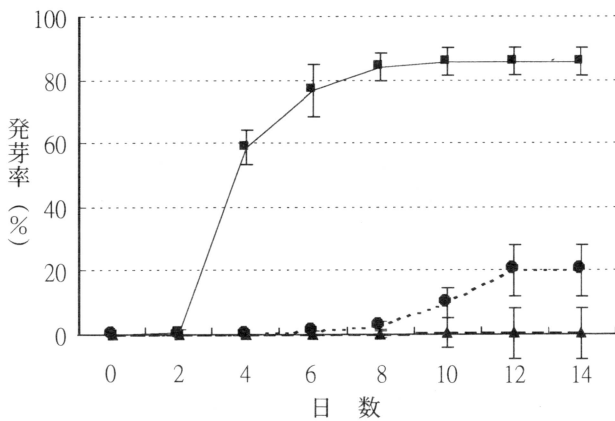
ミドリハコベ種子の発芽率は、フルリドン無処理の場合、8 $^{\circ}$ Cから18 $^{\circ}$ Cではほぼ100%であったが、23 $^{\circ}$ Cでは12.7%、28 $^{\circ}$ C以上では0%となった（第2図-a）。フルリドン無処理のレタス種子においても、23 $^{\circ}$ Cで100%、28 $^{\circ}$ Cで48.5%、33 $^{\circ}$ Cで3.2%となり、高温下で発芽率が低下した（第2図-b）。発芽が抑制される高温下でフルリドンを処理すると、ミドリハコベでは、23 $^{\circ}$ Cで100%、レタスでは28 $^{\circ}$ Cで98.2%、33 $^{\circ}$ Cで97.6%の発芽率を示した（第2図-a, b）。これは、レタス種子を用いたこれまでの研究（Yoshiokaら1998）と一致する結果であった。また、著者らはすでにこのような高温下での発芽抑制やフルリドンによる発芽誘導効果が冬雑草や園芸作物で広く認められる現象であることを報告している（Endoら1998）。したがって、ミドリハコベにおいても、フルリドンによる高温下での種子の発芽誘導効果は、フルリドンが種子中のABAの合成を阻害しているために生じていると考えられる。

第3図にフルリドンとGA合成阻害剤であるウニコナゾール共存下でのレタス種子の発芽率の推移を示した。33 $^{\circ}$ Cの高温下でフルリドンを処理すると、発芽率は、処理後4日目に58.7%、10日目では85.7%まで達し、高温下での発芽誘導効果を示した。これに対して、ウニコナゾールを処理すると、10日目で0.3%の発芽率を示したが、ほとんど発芽しなかった。また、フルリドンとウニコナゾールの同時処理では6日目から発芽が認められ、12日目に発芽率が20.0%を示し、その後発芽率は上昇しなかった。フルリドンの単独処理ではほとんど全ての種子が発芽したが、フルリドンとウニコナゾールの同時処理では発芽率が20%までしか上昇しなかったのは、ウ



第2図 高温域におけるフルリドンの種子発芽誘導効果

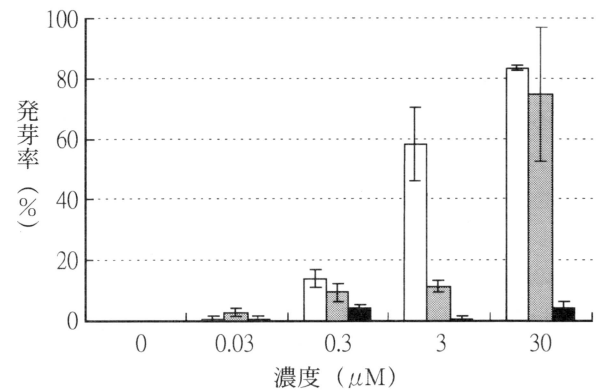
ミドリハコベ(a)種子50粒, またはレタス(b)種子100粒を蒸留水(○), あるいは30 $\mu$ Mのフルリドン(■)培地に置床し, 各温度条件のもとで, 暗黒条件でインキュベーションした。発芽率は, 14日後まで調査を行い, 最終的な発芽率を各温度条件下における発芽率とした。各区の繰り返し数は3とした。



第3図 フルリドンによる高温下での種子発芽誘導に対するウニコナゾールの阻害効果

レタス種子100粒を33 $^{\circ}$ C暗黒下で, それぞれの薬剤培地に置床し, 発芽率を2日おきに14日後まで調査した。30 $\mu$ Mフルリドン: ■, 60 $\mu$ Mウニコナゾール: ▲, 30 $\mu$ Mフルリドンと60 $\mu$ Mウニコナゾールとの混合溶液: ●

ニコナゾールがGAの合成を阻害し, フルリドンの発芽誘導効果を低下させているためと考えられる。オオムギ種子では, ABAの減少とGAの増加が,  $\alpha$ -アミラーゼの誘導を引き起こして発芽を誘導することが知られている(Sandmannら1987)。すなわち, レタス種子において高温下で種子の発芽が誘導されるには, ABAの合成が阻害されることとGAの合成が行なわれることが同時に起こる必要があると考えられる。しかしながら, GA欠損のトマトやシロイヌナズナの変異体を用いた研究によって, 種子の休眠の打破にGA合成系は関与しておらず, GAの役割は発芽後期過程での幼根の伸長等の



第4図 各種カロチノイド合成阻害型除草剤の高温下での種子発芽誘導効果

レタス種子を33 $^{\circ}$ C, 暗黒条件下で0, 0.03, 0.3, 3.0, 30 $\mu$ Mの各種カロチノイド合成阻害剤の培地に置床し, 14日後の発芽率を調査した。

□: フルリドン, ▨: ノルフルラゾン, ■: クロマゾン

作用だけに限定されることが明らかになっている(Hilhorstら1992)。レタス種子の発芽において, オオムギ種子と同様にABAとGAが同一サイトの制御に関わっているかについては, 今後の研究に待つところが大きい。

フルリドンと阻害部位が異なるカロチノイド合成阻害型除草剤によるレタス種子の発芽誘導効果を第4図に示した。33 $^{\circ}$ Cの蒸留水培地の下では, レタス種子は全く発芽しなかったが, フルリドン処理では濃度が高くなるにつれ発芽率が上昇し, 3 $\mu$ Mで58.0%, 30 $\mu$ Mでは83.3%の発芽率を示した。フルリドンとカロチノイド合成系の阻害部位が同じであるノルフルラゾンは, フル

リドンと同様に、高温下での種子の発芽誘導効果を示し、 $3\mu\text{M}$ で11.3%、 $30\mu\text{M}$ では74.7%の発芽率を示した。これに対して、クロマゾンは、0.03から $30\mu\text{M}$ までの濃度範囲では、発芽を誘導することはなかった。第1図に示したように、ABAとGAは、植物においてカロチノイド生合成系の初期段階であるゲラニルゲラニルピロリン酸を中間産物として共有している。Frayら(1995)は、カロチノイド生合成系のフィトエン合成酵素を過剰発現させた形質転換トマトの果実ではカロチノイド含量が上昇してGA含量が低下したことを報告している。彼らの研究結果は、*ent*-カウレン合成反応が、通常、ゲラニルゲラニルピロリン酸を共通基質とするフィトエン合成反応によって競争的に抑制されていることを示している。したがって、フルリドンやノルフルラゾンのような阻害部位をもつ除草剤は、ABAの生合成を阻害すると同時に、ゲラニルゲラニルピロリン酸をABA生合成系からGA生合成系に変換することにより種子中のGA合成量を増加させた結果、高温下での発芽誘導効果を示している可能性が考えられる。これに対して、クロマゾンは、ABAとGAの生合成系が分岐しているゲラニルゲラニルピロリン酸以前の過程を阻害するため、ABAの合成を阻害すると同時にGAの合成も阻害した結果、発芽誘導効果を示さなかった可能性が考えられる。しかし、この可能性を検証するには、GAの定量的解析が必要である。

以上の結果より、レタス種子は、温度に応答して種子内のABAやGAのバランスをはかることで発芽を調節していると考えられる。この植物ホルモンによる発芽調節機構は、雑草などの野生植物においては、進化の過程で気温年較差に対応していくために獲得してきた環境適応機構の一つだと考えられる。また、同じカロチノイド生合成阻害型除草剤の中でも高温下での発芽に対して反応性が異なることは、この反応系が新規のカロチノイド生合成阻害型除草剤の作用部位を特定するモデル系として利用できることを示している。フルリドンやノルフルラゾンによって発芽が誘導された種子は、葉緑素を作らない白色の幼植物体となって、まもなく枯死する。このような作用をもつ除草剤は、農作物の植え付け前に土壌に混和処理することにより、土中に多数存在している雑草

種子をいったん出芽させた後に枯死させてしまうといった新しい雑草防除法として利用できるかもしれない。

#### 引用文献

- Albrecht, M., G. Sandmann, D. Musker and G. Britton 1991. Identification of epoxyphytoene and hydroxyphytoene from norflurazon-treated scendesmus. *J. Agricultural & Food Chem.* 39 (3) : 546 - 569.
- Endo, T., T. Yoshioka and S. Satoh 1998. Involvement of Abscisic acid in high-temperature inhibition of seed germination. *Progress in seed research Conference proceedings of the 2nd ICSST*, pp.20 - 24.
- Fray, R. G., A. Wallace, P. D. Fraser, D. Valero, P. Hedden, P. M. Bramley and D. Grierson 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* 8 : 693 - 701.
- Hilhorst, H. W. M. and C. M. Karssen 1992. Seed dormancy and germination : The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth. Regul* 11 : 225 - 238.
- Kobayashi, M., M. Gomi, J. Agemathu, T. Asami, S. Yoshida and A. Sakurai 1995. Fluctuation of endogenous gibberellin and abscisic acid levels in germinating seeds of barley. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (10) : 1969 - 1970.
- Sandmann, G. and P. Boger 1986. Interference of dimethazone with formation of terpenoid compounds. *Z. Naturforsch.* 41C : 729 - 732.
- Sandmann, G. and P. Borger 1987. Interconversion of prenyl pyrophosphates and subsequent reactions in the presence of FMC 57010. *Z. Naturforsch.* 42C : 803 - 807.
- Scott, J. E., L. A. Wetson, J. Chappel and K. Hanley 1994. Effects of clomazone on IPP isomerase and prenyl transferase activities in cell suspension cultures and cotyledones of solanaceous species. *Weed Sci.* 42:509-516.
- Yoshioka, T., T. Endo and S. Satoh 1998. Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 39 : 307 - 312.

(2000年12月21日受付, 2001年4月24日受理)