

折れやすいオオムギの生理*

小久保 亮**

広島大学大学院生物圏科学研究科

Physiology of brittleness of barley

Akira KOKUBO

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

Hiroshima 730, Japan

要 旨

I. 序 論

イネ科の穀物は収穫前に茎が倒れ、収量が減少することがある。この問題を解決するために、従来穀物の短稈化の研究が主として育種学的な面から行なわれてきた。また一方倒れにくい植物を作るためには茎の強さを増すことが重要である。しかし茎の強度を支配する生理化学的要因を調べた研究はほとんど行われていない。イネ科植物で茎が脆く、折れやすい突然変異系統が古くから知られている。

本研究では茎の強度の要因を調べるために、茎の折れやすいオオムギ突然変異系統とその正常系統を用い、折れやすい茎の性質を検討した。予備実験の結果、茎を構成する細胞壁成分の量が茎の強度に關与する可能性が示唆された。従来の細胞壁の研究は主に成長、分化を中心とし、細胞壁の強さの原因に関する研究はほとんど行なわれていなかった。そこで本研究は1) 茎の折れやすさを正確に物理量として表わし、2) 折れやすい茎を形態学的に調べ、3) 折れやすい茎の細胞壁成分の化学的性質を明らかにし、4) 茎の折れやすさと遺伝子発現の関係を解明する研究を行った。

II. 植物材料

岡山県倉敷市の岡山大学資源生物科学研究所に保存されているオオムギ種子を使用し、植物体を同研究所の圃場で生育させ、成熟した茎を実験に供試した。茎の折れやすさの原因を探究するために、自然突然変異により生じた折れやすい茎の系統のカマイラズおよび正常の渦赤神力に突然変異誘発剤 (エチレンメタンスルフォネート) 処理を行い作出した人為突然変異変異系統の折れやすいオオムギ OUM40, OUM41, OUM42 の四系統を用い、対照の折れにくい正常な系統は渦赤神力 (渦) と並赤神力 (並) を用いた。さらに遺伝子発現と茎の成分間の関係を解明するために、茎を折れやすくする遺伝子 *fs2* をもつ一遺伝子突然変異系統の於七変と白瀬戸変および茎を折れやすくする遺伝子 *fs3*

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第18巻、pp119-122 (1992)

* 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1992年11月15日、学位取得日 1992年12月20日

**現在の所属：広島大学理学部 植物 植物形態学講座

を持つコピンカタギ4号変およびその対照として、それぞれの正常系統を用いた。また一遺伝子系統の折れやすいオオムギおよびその正常系統を25℃の暗室で発芽させ、吸水72時間以後の芽生えを実験に供試した。

III. 実験結果および考察

茎の曲げ試験) 茎の折れやすさを定量化するために、材料工学で使用されている"曲げ試験"をオオムギ茎に応用した。圃場から採取した材料から葉や葉鞘を除いた後、茎をメタノール中に保存した。その後水に戻した茎を7cmの長さに切り、2.5cm間隔の支持台の上に乗せ、上から一定速度(50mm/min)で押し、そのとき生じた応力の最大値をロードセンサーにより検出した。また茎の内径、外径を測定した。最大応力および茎の内径と外径から、最大曲げ応力を算出した。折れにくい正常系統では、並は497g/mm²、渦は484g/mm²と両系統とも1mm²あたり約500gの応力が生じていた。それに対して折れやすい系統では、OUM40は98g/mm²、OUM41は297g/mm²、OUM42は69g/mm²カマイラズは302g/mm²であった。すなわち折れやすい系統の茎の最大曲げ応力を正常系統と比較すると、最大曲げ応力の平均値が正常系統の約2/5しかなかった。以上のことから、最大曲げ応力で茎の折れやすさを定量的に表した。

茎の組織の観察) 茎の折れやすさが茎の組織の構造に関係する可能性があるため、茎の横断面の組織を光学顕微鏡で観察した。圃場より採取した第4節間をアルコールを含まないナバシン-クラフIIIで固定した。サンプルを水に戻し茎の組織(表皮組織、厚膜組織、柔組織)を検鏡し、茎の横断面の接線方向および放射方向の細胞壁の厚さおよび細胞の長さを測定した。折れやすい4系統の中、OUM40、OUM42は細胞壁が折れにくい正常系統の並、渦と比較して、すべての組織でもいずれの方向でも薄かった。しかし別の茎の折れやすい系統のカマイラズは表皮と厚膜組織の放射方向の細胞壁だけが折れにくい正常系統の並、渦より厚く、それ以外の組織では薄かった。さらに他の折れやすい茎の系統のOUM41は正常系統の並、渦に比べて表皮組織のみで放射方向以外の細胞壁が厚かったが、それ以外の組織では薄かった。これらのことよりOUM40、OUM42の茎の折れやすさは細胞壁の薄さによることが示唆された。もし細胞壁の厚さが同じ厚さでも細胞自体が大きければ、一個の細胞全体の面積あたりの細胞壁の占める面積の割合は減少するはずである。そこで茎の横断面の細胞の長さを測定した後、茎の横断面の細胞壁の占める断面の割合を算出した。折れやすい茎の系統のOUM40、OUM41、OUM42、カマイラズはどの組織でも、正常系統の並や渦より細胞壁の断面の占める割合が著しく小さかった。これらのことから茎の折れやすさは茎の細胞壁の量の少なさと関係していることがわかった。

茎の細胞壁の成分) 折れやすい系統の茎で細胞壁の占める割合が小さいことが明らかになったため、折れやすい系統の茎の細胞壁成分が少ない可能性が考えられる。そこで茎の細胞壁成分を調べた。圃場より採取した茎をメタノール中に保存した。茎成分の分析前に水に戻して磨砕し、有機溶媒で洗い、 α -アミラーゼ、プロナーゼ処理の後、残渣を乾燥させて細胞壁粗標品を得た。粗標品をEDTA処理してペクチン画分を得、クロラミンTで脱リグニン処理を行ない、残渣を17.5%NaOHで処理してヘミセルロース画分を得、残渣をセルロース画分とした。さらに各画分を加水分解後、水素化ホウ素ナトリウムで還元し、アセチル化後、ガスクロマトグラフィーにより細胞壁構成単糖を定性定量した。こうして得られたセルロース画分の糖の99.95%はグルコースであり、純粋なセルロース画分が得られたと考えた。セルロース画分では折れやすい系統のOUM40の細胞壁糖量は正常系統の渦の約6%であり、折れやすい系統のOUM41の糖量は渦の約50%、折れやすい系統のOUM42の糖量は正常系統の渦の約28%、そして折れやすい茎のカマイラズは正常系統の渦の約

64%と、折れやすい系統の茎の糖量が正常系統より著しく少なかった。それに対して、クロラミンT画分やヘミセルロース画分の糖では折れやすい系統の細胞壁糖量は正常系統よりわずかに少なかった。さらに茎の折れやすさを示す最大曲げ応力と各系統のセルロース量との間の相関をとった。その結果、最大曲げ応力とセルロース量との間には $r=0.93$ の高い相関を得、他の細胞壁成分とは有意な相関が見られなかった。以上のことから、茎の折れやすさは細胞壁中のセルロース含量の少なさに関連していることがわかった。

茎のリグニン含量) 茎の折れやすさにリグニンが関係している可能性があるため一遺伝子突然変異系統の於七変 (*fs2*)、白瀬戸変 (*fs2*)、コビンカタギ4号変 (*fs3*) およびそれぞれの正常系統茎のリグニン含量を測定した。茎より調製した細胞壁粗標品にアセチルプロマイドを加え、70℃で30分処理し、茎を溶解した後、塩酸ヒドロキシルアミンおよび 2N NaOH を加え、氷酢酸で中和した。一晚静置した後上清を280nmの吸光度で測定することによりリグニン量を定量した。茎の折れやすい系統の於七変 (*fs2*) および白瀬戸変 (*fs2*) は正常系統よりリグニン量は少なかった。しかし折れやすい系統のコビンカタギ4号変 (*fs3*) は正常系統よりリグニン量が多かった。このことからリグニン量は茎の折れやすさと直接の関係がないことがわかった。

セルロースの精製) 従来の細胞壁の分画方法を用い、標準セルロースを処理した結果、セルロースの重合度が約 100 に減少した。そのためセルロースを低分子化せずに精製する分画法を開発した。圃場に生育した材料の茎より調製した細胞壁粗標品に EDTA-Na₂ で処理しペクチン画分を除き、2N TFA で 120℃ で 1 時間処理し、遠心でヘミセルロース画分を除き残渣を得た。次にジオキサン: 水 (8:2) で沈殿を常温で3日間洗浄しセルロースを精製した。標準セルロースにもこの精製方法を行ったところ、精製の前後で重合度は約 300 とほとんど変わらず、本方法でセルロースの分子量を定量することにした。茎より精製したセルロース画分では、構成糖の 97% がグルコースであり、リグニンは約 3% しかなかった。

セルロースの重合度と分子数) 自然突然変異の折れやすいオオムギおよび人為突然変異の OUM40、OUM41、OUM42 を用い、茎の折れやすさの原因はセルロース含量の少ないことによることがわかった。この結果をさらに明らかにするために折れやすい茎を持つ一遺伝子突然変異系統を使用した。一遺伝子突然変異系統の於七変 (*fs2*)、白瀬戸変 (*fs2*) とコビンカタギ4号変 (*fs3*) およびそれぞれの正常系統の茎の細胞壁成分を調べた。折れやすい一遺伝子突然変異系統の於七変 (*fs2*)、白瀬戸変 (*fs2*)、コビンカタギ4号変 (*fs3*) のペクチン画分やヘミセルロース画分では折れやすい茎の系統の糖量を比較して正常系統との間に一定の傾向はなかった。一方折れやすい一遺伝子突然変異系統では茎のセルロース含量は正常の系統に比べて 22~28% と少ないことが明らかになった。次にセルロースが少ない原因が茎中のセルロースの分子量が少ないためか、それとも分子数が少ないためかを調べるため、粘度法によりセルロースの重合度を測定した。各系統から精製したセルロースを五酸化リン中で乾燥させた。乾燥したセルロースをセルロース可溶化剤カドキセンに溶かし、セルロース溶液の粘性を粘度計で測定した。折れやすい系統の於七変 (*fs2*) のセルロースの重合度は 1292 ± 16 であり、その正常系統の重合度 1104 ± 4 と両者ともほぼ同じ程度であった。折れやすい系統の白瀬戸変 (*fs2*) の重合度は 665 ± 2 であり、その正常系統は 614 ± 5 とやはり同じ程度であった。コビンカタギ4号変 (*fs3*) の重合度は 942 ± 2 であり、その正常系統は 865 ± 7 であった。これらのことから折れやすい系統の茎のセルロースは折れにくい正常系統と重合度がほとんど変わらなかった。セルロースの分子数では、於七変、白瀬戸変、コビンカタギ4号変のいずれの一遺伝子突然変異系統とも正常系統より著しく少なかった。以上のことから、*fs2* や *fs3* の茎中のセルロースの分子数が正常系統より少なくなることがわかった。

折れやすさの遺伝子の発現時期) 折れやすさの遺伝子の発現時期を見いだすために、野外で育成させた於七変 (*fs2*)、白瀬戸変 (*fs2*) とコピンカタギ4号変 (*fs3*) およびそれらの正常系統の茎のセルロース含量をその全成長期間にわたって定量した。折れやすい系統の於七変 (*fs2*) と白瀬戸変 (*fs2*) は茎のセルロース含量が成長の最盛期以降に正常系統より少なくなった。折れやすい系統のコピンカタギ4号変 (*fs3*) のセルロース含量は茎の成長の初期から正常系統より少なくなった。これらのことから茎では *fs3* 遺伝子の発現が *fs2* 遺伝子より早いことがわかった。茎だけではなく、茎以外の組織でも *fs3* 遺伝子の発現が *fs2* 遺伝子よりも早い可能性があるので、次に暗所で育成させた黄化芽生えの幼葉鞘のセルロース量を幼葉鞘の全成長期間にわたって調べた。折れやすい系統の於七変 (*fs2*) および白瀬戸変 (*fs2*) の芽生えのセルロース含量は成長期間中正常系統と同程度であった。折れやすい系統のコピンカタギ4号変 (*fs3*) では茎の場合と同じく芽生えのセルロース量が成長初期から正常系統より少なかった。これらのことより芽生えで *fs3* 遺伝子が *fs2* 遺伝子より早く発現することがわかった。さらにこのことは野外と暗所という異なった環境条件下でも、また異なった組織でも、*fs3* 遺伝子が *fs2* 遺伝子より早く発現することが示された。

IV. 結 論

オオムギ突然変異系統の茎の折れやすさは細胞壁中のセルロース分子数の少なさにより起こり、折れやすさの遺伝子 *fs3* は *fs2* より早い成育時期に発現する。

参 考 文 献

- (1) Takahashi R., Yamamoto J., Yasuda S. and Itano Y. (1953) Inheritance and linkage studies in barley. Ber Ohara Inst landw Forsch 10: 29-52
- (2) Takahashi R., Hayashi J. and Hiura U. (1966) Inheritance and linkage studies in barley III. Linkage studies of the gene for fragile stem-2 and orientation of linkage map on barley chromosome 5. Ber Ohara Inst landw Biol Okayama Univ 13: 199-212
- (3) Hayashi J. and Moriya I. (1985) Trisomic analysis of a fragile stem mutant found in Kobinkatagi4. Barley Genetic Newsletter 15: 47-48