ハツカダイコンの肥大初期における体内成分の変化 及び内生サイトカイニンの肥大促進効果¹

早田 保義・鈴木 芳夫

筑波大学農林学系 305 茨城県新治郡桜村

The Relationships of Plant Hormones, Sugars and Nitrogen to the Early Development of Radish Root

Yasuyoshi HAYATA and Yoshio SUZUKI

*Institute of Agriculture and Forestry, The University of
Tsukuba, Sakura, Niihari-gun, Ibaraki 305*

Summary

In the present study, changes in the contents of plant hormones, sugars, and nitrogen in radish (*Raphanus sativus* L. radicola group) were investigated during the early development of the root.

Auxin and cytokinin activities in the leaves decreased gradually with root development. The sugar contents also decreased up to the 16th day after sowing, but varied little thereafter.

In the hypocotyl, however, an increase of cytokinin activity was observed 21 days after sowing, when the primary cortex began to slough off. Thereafter, the dry weight of hypocotyl increased rapidly. The auxin activity increased remarkably with thickening of root on the 29th day after sowing. The reducing and total sugar contents decreased up to the 21th day after sowing, but afterwards, increased with thickening of root.

The definite relationship between the thickening of root and the nitrogen contents of leaves or hypocotyl was not recognized.

Furthermore, cytokinin-like substances were extracted from thickening hypocotyls. When the extracts were applied to intact hypocotyls using cotton thin threads, the hypocotyls were hastened in thickening as compared to the control.

Thus, it is suggested that cytokinins play some role in the thickening of hypocotyl and in addition, auxin and sugars are also involved in root thickening process.

緒 言

ダイコンの根部肥大には、植物ホルモンが関与しており(16)、特に Radin and Loomis (10) は肥大期に達した根部ではサイトカイニン活性が高まることを述べている。また、Suzuki(13) は肥大部の一部である胚軸部に直接カイネチンを処理すると、胚軸部の肥大が早まることを報告している。以上のように根部肥大にサイトカイニンが密接に関係している可能性は極めて高いものと思われる。しかし、ダイコンの内生サイトカイニン様物質が intact な実生の根部肥大に影響を与えるかどうかを検討した報告は見当たらない。加えて、根部の培養系を用い

た実験で、根部肥大における糖及びオーキシンの必要性が指摘されているが(6, 17, 18)、intact な実生でのこれらの体内物質と根部肥大との関連についても十分な検討は行われていない。そこで本報では、これらの関連を明らかにするためハツカダイコンの肥大初期におけるこれら体内物質の消長を調べるとともに、胚軸部から抽出した内生サイトカイニン様物質を含む溶液を直接胚軸部に処理することにより、内生サイトカイニンの胚軸部に対する肥大効果を検討した。

材料及び方法

実験 1 肥大初期における体内物質の消長

ハツカダイコン(品種‘サクサ’、サカタ種苗)を1978

¹ 1981 年 9 月 18 日受理

年9月4日に、ガラス室内の砂箱に播種した。発芽後3日おきに園試処方均衡培養液組成の2倍液を灌水施肥し、初生皮層の剥脱が完了するまで実生を育成した。この間、分析試料の採取を播種後それぞれ7日、11日、16日、21日及び29日目に行った。採取した植物体を葉部、胚軸部、根部に分け、直ちに真空凍結乾燥後、粉末にして分析試料とした。

還元糖及び非還元糖の定量分析をソモギーネルソン法で、定性分析をガスクロマトグラフィーによって行い、窒素の定量分析はケルダール法で行った。オーキシン様物質の抽出純化は Atsumi ら(1)の方法に従い、分析試料 1.5g を用いた。得られた抽出液を用いて、更にパークロマトグラフィー(展開溶媒イソプロパノール:アンモニア:水=10:1:1)を行った。展開終了後、IAA (Indol-3-acetic Acid) の Rf 値に相当する Rf 3 から 4.5 の部位についてアベナ伸長テストを行い、オーキシン活性を検定した。オーキシン活性は IAA 当量として算出した。サイトカイニン様物質の抽出は Miller(7)の方法に従い、分析試料 1.5g を用いた。抽出液のサイトカイニン活性は、ダイズカルス検定法を用い、カイネチン当量として表した。

実験2 内生サイトカイニン様抽出物の胚軸部肥大に及ぼす影響

ハツカダイコン(品種‘サクサ’)を1979年10月24日に実験1と同様にガラス室内の砂箱に播種して実生を育成した。初生皮層の剥脱が始まった播種後20日目に実生を採取し、実験1と同手順で分析試料を調製した。

サイトカイニン様物質の抽出法については、Short and Torrey (12)の方法を若干変更して行った。すなわち、胚軸部の試料 10g を 200 ml の 80% エタノールで、乾燥し 24 時間 4°C 下で抽出した。この抽出液からエバポレーターでエタノールを蒸発させた後、ヘキサン可溶物質を取り除き、更に 30 ml の飽和硝酸銀溶液で処理し、サイトカイニン様物質を銀の沈殿物として得た。その後沈殿物を 2N 塩酸で処理し、サイトカイニン様物質を上澄に溶出させた。上溶液を Dowex 50 WH⁺、陽イオン交換カラムに通し、水で洗浄後、3N 水酸化アンモニウムで溶出させ、濃縮乾固の後、再び 4 ml の水で溶かし抽出液とした。この抽出液を Suzuki の方法(13)に従い、ハツカダイコンの胚軸部に処理して胚軸部に対する肥大効果を調査した。すなわち、播種後7日目の実生の胚軸部にアセトン洗浄後の木綿糸を通し、その一端を処理液に漬け6日間培養した(第1図)。培養打ち切り後、処理部の直径を測定し、処理前との差を算出して、この値を肥大効果の指標とした。なお、 α -NAA (α -Naph-

Fig. 1. Treatment of intact radish hypocotyl with test solution. The end of a thread (indicated with arrow) is dipped in the test solution.

thylacetic Acid) 添加がカイネチンの効果を高めるという報告(13)があるので、すべての処理区に α -NAA 0.01 ppm を添加した。処理区は、カイネチン (0.1 ppm) 区、抽出液 (30 倍及び 300 倍) 区を用い、対照として蒸留水及び α -NAA (0.01 ppm) 区を設けた。実験は小ガラス箱内で行い、1区10個体を用い、無作為に配置した。

結果及び考察

実験1 肥大初期における体内物質の消長

第2図に示されるように、葉部の生体重及び乾物重は順次増加を続けた。特に播種後20日前後に急激な増加

Fig. 2. Fresh and dry weights of leaves and hypocotyl in radish plant.

$\triangle$ --- $\triangle$: fresh weight of leaves, $\triangle$ — $\triangle$: dry weight of leaves, $\square$ --- $\square$: fresh weight of hypocotyl, $\square$ — $\square$: dry weight of hypocotyl.

Table 1. Changes in the auxin contents² of IAA fraction extracted from leaves and hypocotyl of radish plant.

Organ extracted	IAA equivalent ng/g dry weight at various days after sowing				
	7	11	16	21	29
Leaf	37	15	10	6	4
Hypocotyl	3	17	13	18	520

² Auxin contents were determined by avena straight growth test.

を示しており、この時期に、根部の肥大生長の開始とともに生じる初生皮層の剝脱が肉眼的に認められた。また胚軸部では、この肥大生長の開始期までは緩やかな増加にとどまっているが、それ以後急激な増加を示した。

以上の発育経過の中で、胚軸部の肥大生長と体内成分、特に、基礎代謝物である糖の含量及び植物生長調節物質であるオーキシンやサイトカイニンの活性の消長との間には比較的密接な関係がみられた。

オーキシン活性（ペーパークロマトグラム上の IAA 相当の Rf 値部分）は、第 1 表に示したように、葉部では発育が進むにつれ順次低下する傾向がみられた。同様のことを Avery (2) がタバコの葉部で、Wheeler (19) がインゲンマメの葉部で確かめている。一方胚軸部では急速な肥大生長をしている播種後 29 日目に高いオーキシン活性が認められた。これまで萩屋・高木 (3) が肥大初期のハツカダイコンに NAA 散布すると地上部、根部とも発育が促進されることを確かめており、更に高野 (14) は NAA 散布が根部の分裂組織を増加させることを報告している。本試験においても肥大生長している胚軸部で内生オーキシンの活性が高まっていることから、オーキシンがハツカダイコンの肥大生長に大きく関与していることがうかがえる。

一方発育に伴う内生サイトカイニン活性の消長を第 2 表に示したが、葉部では播種後 29 日目にわずかに高まっているものの全体的には発育が進むにつれ低下する傾向を示した。同様な傾向がイネやダイズ (8) の葉部でも報告されている。また胚軸部では第 1 回採取時（播種後 7 日目）に高いサイトカイニン活性が認められたが、発育が進むにつれ順次低下し、播種後 21 日目の初生皮層の剝脱期に再び高いサイトカイニン活性がみられた。

Koyama ら (5) は「桜島」ダイコンの肥大部に Zeatin が存在することを明らかにしている。さらに Radin and Loomis (10) はハツカダイコン「White Icicle」で、初生皮層の剝脱の始まった播種後 17 日目から急激にサイトカイニン活性が高まることを報告しており、本実験

Table 2. Changes in the cytokinin contents² extracted from leaves and hypocotyl of radish plant.

Organ extracted	Kinetin equivalent $\mu\text{g/g}$ dry weight at various days after sowing				
	7	11	16	21	29
Leaf	2.2	0.46	0.08	0.06	0.13
Hypocotyl	8.4	1.5	0.21	4.0	1.1

² Cytokinin contents were determined by soybean callus test.

の結果はこれとほぼ一致した。サイトカイニンが細胞分裂に関与していることと (7)、肥大部において形成層輪ができ、細胞分裂が活発に行われる初生皮層の剝脱期にサイトカイニン活性が高まることを考え合わせると、胚軸部の肥大生長にサイトカイニン類が密接に関係していることが推定される。

次に発育に伴う還元糖及び非還元糖含量の変化を第 3 図に示したが、非還元糖含量は葉部ではほぼ一定していたが、胚軸部では急速な肥大生長をしている播種後 29 日目にその増加がみられた。一方、還元糖含量は、葉部では播種後 16 日前後まで減少傾向を示し、その後一定の値を保ったが、胚軸部では、発芽後発育とともにいったんは減少傾向をたどり、その後、肥大生長の開始とともに急激な増加が認められた。また胚軸部の糖組成は、主に、ブドウ糖、果糖及びショ糖からなり全調査期間を通じて変わることはなかった。渋谷ら (11) は根部が肥大生長

Fig. 3. Reducing and non-reducing sugar contents in leaves and hypocotyl of radish plant.

△—△: reducing sugar of leaves, △---△: non-reducing sugar of leaves, □—□: reducing sugar of hypocotyl, □---□: non-reducing sugar of hypocotyl.

Fig. 4. Nitrogen content in leaves and hypocotyl of radish plant.

△—△: leaves, □—□: hypocotyl.

をしている時期の葉部及び根部の糖含量の消長を調べ、両部位の糖含量が増加していくことを認めている。しかし、本実験で、葉部では、胚軸部の肥大所間中はほとんど増加することなく一定の値を保ち、さらに胚軸部では発芽後いったんは減少傾向をたどるが、肥大生長が始まるとともに著しく増加していくことが確認された。このことから胚軸部の糖含量の増加は肥大生長の開始と密接な関係があるものと考えられる。また、肥大型に胚軸部の sink の能力が急速に高まることがうかがえる。苦名(15)はダイコンの根部肥大における窒素の重要性を指摘している。窒素含量の消長を第4図に示したが、葉部では、播種後16日目以降生育とともに減少したが、胚軸部では急速な肥大生長をしている時期において減少傾向は認められなかった。このことから、肥大している胚軸部は葉部に比べ強い sink となっている可能性が示唆される。本実験で、糖及び内生のオーキシンやサイトカイニンが肥大生長に深く関与していることはうかがえたが、肥大生長に対するオーキシンや糖などの役割は明らかにされたとは言えない。しかし、オーキシンについては糖含量の消長とオーキシンのそれとはよく一致しており、オーキシンは糖などの代謝産物の転流を促進させるというこれまでの報告(9)もあり、肥大型における胚軸部の sink の能力を高める働きをしている可能性が推察される。

実験2 内生サイトカイニン様抽出物の胚軸部肥大に及ぼす影響

実験1において、肥大初期に内生サイトカイニンの活性が高まったが、この胚軸部から抽出したサイトカイニ

Fig. 5. Effect of extracted cytokinin-like substances on the thickening of intact radish hypocotyl.

A: water, B: α-NAA 0.01 ppm, C: α-NAA 0.01 ppm + kinetin 0.1 ppm, D: 1/30 concentration of extracted cytokinin-like substances + α-NAA 0.01 ppm, E: 1/300 concentration of extracted cytokinin-like substances + α-NAA 0.01 ppm. Vertical bars indicate confidence limits at 95%.

ン様物質が intact な実生の肥大生長に影響している可能性を確認するために実験2を行った。

第5図に示されるとおり胚軸部抽出液区における胚軸部の肥大量はカイネチン区に比べ劣る傾向にあるが、蒸留水区及び α-NAA 区に比べると肥大量の有意な増加が認められた。これまで Radin and Loomis(10)もハツカダイコンの根部の培養系を用いてサイトカイニン様抽出物が根部肥大に影響をもつことを報告している。また Suzuki(13)もハツカダイコンの胚軸部に直接カイネチンを処理すると肥大が早まることを報告しており、これらの報告及び本実験の結果から、内生サイトカイニン様抽出物が根部肥大に影響することは明らかである。また有意差はないものの抽出液区の肥大量がカイネチン区に比べ劣る傾向にあった原因としては、抽出液の純化が十分でなく、胚軸部肥大に悪影響を及ぼす物質の除去が不

Fig. 6. Effect of kinetin and extracted cytokinin-like substances on hypocotyl tissue.
 A: water, B: α -NAA 0.01 ppm, C: extracted cytokinin-like substances +
 α -NAA 0.01 ppm, D: kinetin 0.1 ppm + α -NAA 0.01 ppm.

完全であった可能性, 更に抽出過程で使用した薬品が混入し, 胚軸部の肥大に悪影響を及ぼした可能性などが考えられる。それらの根拠として, 抽出手順を経た蒸留水を胚軸部に処理した場合, 無処理の蒸留水に比べ有意ではないが, 若干肥大が劣る傾向にあったことがあげられる。

抽出液処理によって見られた肥大量の増加が, 胚軸部組織の発達によるものかどうかを確かめるために, 処理部の横断切片プレパラートを作成して検鏡した。その結果, 第6図にみられるように, いずれの区でも8層の皮層細胞層がみられ, その細胞数はほぼ同数であった。また α -NAA 区では蒸留水区に比べて皮層細胞の肥大傾向が大きかった。これにカイネチンまたはサイトカイニン様抽出液を添加すると, 皮層細胞の肥大傾向はさらに著しくなった。中心柱の大きさは, 蒸留水区と α -NAA 区では差異は認められず, α -NAA 単独処理は中心柱の発育にほとんど影響しないものと考えられた。しかし蒸留水区及び α -NAA 区とカイネチン区及びサイトカイ

ニン様抽出液区と比較した場合, 後者は横断切片全体の径に対して1.5倍前後, 更に中心柱の径においては2倍前後前者よりも肥大しているのが認められた。このことは, Suzuki(13) 及び Radin and Loomis(10) の実験結果を裏づけるものであり, さらに内生サイトカイニン様物質が intact な実生においても中心柱の肥大生長に著しい効果を持つことを示している。

以上二つの実験結果から, サイトカイニンは根部肥大の開始に深く関与しているものと思われる。なお, オーキシンは, サイトカイニン活性が高まった後にその活性が高まることから, サイトカイニンとは別の形で根部肥大生長に関与しているものと考えられる。高野(14)は, ダイコンの肥大時におけるオーキシンの効果として, NAA 散布が根部の分裂組織を増加させることを認めた。さらに本実験で, オーキシンの活性と糖含量の消長が類似していることから, オーキシンは代謝物質の根部への転流を促進させることによっても根部肥大に関与しており, このことは, 根部肥大に糖及びオーキシンの必

要性を指摘した培養系の実験結果(6, 17, 18)を支持するものと考えられる。

今後更に、根部の肥大生長に対するこれら体内成分の役割を明確にし、温度、光条件など環境条件の違いが根部の肥大生長に与える影響を体内成分との関係から明らかにしていくべきであろう。

摘 要

ハツカダイコンの肥大初期における体内成分、特に、糖、窒素、オーキシン様物質及びサイトカイニン様物質の消長を調査した。また、内生サイトカイニン様抽出物の根部肥大に及ぼす影響についても調査した。

1. 葉部の糖含量は、播種後 16 日前後まで減少傾向をたどりその後はば一定値を保った。胚軸部では発芽後いったんは減少傾向をたどったが、肥大の開始とともに急激な増加を示した。

2. 葉部のオーキシン活性は、生育が進むにつれ減少したが、胚軸部では、すでに肥大が始まっている播種後 29 日目に高い活性が認められた。

3. 葉部のサイトカイニン活性は、生育が進むにつれ減少傾向を示した。胚軸部は、播種後 7 日目に高い活性を示したが、それ以後減少傾向をたどり、初生皮層の剥脱の開始が認められる播種後 21 日目から再び高い活性を示した。

4. ハツカダイコンから抽出したサイトカイニン様物質を、播種後 7 日目のハツカダイコン実生株の胚軸部に 6 日間処理すると、処理部の肥大が認められた。

5. 以上のことから、サイトカイニンは胚軸部の肥大生長に関与していることが明らかになり、さらにオーキシン及び糖も肥大生長に関係していることが指摘された。

引用文献

1. ATSUMI, S., S. KURAISHI, and T. HAYASHI. 1976. An improvement of auxin extraction procedure and its application to cultured cells. *Planta (Berl)* 129 : 245—247.
2. AVERY, G. S. 1935. Differential distribution of a phytohormone in the developing leaf of *Nicotiana* and its relation to polarized growth. *Bull. Torrey Bot. Club* 62 : 313—330.
3. 萩屋 薫・高木健夫. 1959. 根菜類の「す入り」現象の研究(第6報)葉面施肥剤及び生長調整剤散布の「す入り」防止効果. *園学雑*. 28 : 109—114.
4. 今関英雅・勝見允行・増田芳雄. 1971. 植物ホルモン. p.216—219. 養賢堂. 東京.
5. Koyama, S., S. Kawai, Z. Kumazawa, Y. Ogawa, and H. Iwamura. 1978. Isolation and Identification of trans-zeatin from the roots of *Raphanus sativus* L. cv. Sakurajima. *Agric. Biol. Chem.* 42 : 1997—2001.
6. Loomis, R. S. and J. G. Torrey. 1964. Chemical control of vascular cambium initiation in the isolated radish roots. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 52 : 3—11.
7. Miller, C. O. 1965. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: Compounds from maize which promote cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50 : 1052—1058.
8. Oritani, T. and R. Yosida. 1973. Studies on nitrogen metabolism in crop plant. XII. Cytokinins and abscisic acid-like substance level in rice and soybean leaves during their growth and senescence. *Proc. Crop Sci. Japan* 42 : 280—287.
9. Patrick, J. W. 1979. Auxin-promoted transport of metabolites in stem of *Phaseolus vulgaris* L.. *J. exp. Bot.* 30 : 1—13.
10. Radin, J. W. and R. S. Loomis. 1971. Changes in the cytokinins of radish roots during maturation. *Physiol. Plant.* 25 : 240—244.
11. 渋谷正夫・鈴木芳夫・井上頼数. 1968. 根菜類のす入り現象に関する研究. *東京教育大学農学部紀要* 14 : 131—187.
12. Short, K. C. and J. G. Torrey. 1972. Cytokinins in seedling roots of pea plant. *Plant. Physiol.* 49 : 155—160.
13. Suzuki, S. 1981. Effect of plant growth regulators applied by an injection method on the thickening growth of radishes. *Sci. Rept. Fac. Agr. Meijo Univ.* 17 : 33—39.
14. 高野泰吉. 1965. ダイコンのすいり現象に関する研究(第2報)ナフタレン酢酸、しょ糖ならびにほう素のす入り防止効果. *園学雑*. 34 : 315—320.
15. 苔名 孝. 1956. 根菜類のすいりに関する研究(第1報)廿日大根の体内窒素含量と発現の関係について. *山形大学紀要(農学)* 2 : 27—34.
16. Torrey, J. G. 1976. Root hormones and plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27 : 435—459.
17. Torrey, J. G. and R. S. Loomis. 1967. Ontogenetic studies of vascular cambium formation in excised roots of *Raphanus sativus* L.. *Phytomorphology* 17 : 401—409.
18. Torrey, J. G. and R. S. Loomis. 1967. Auxin-cytokinin control of secondary vascular tissue formation in isolated roots of *Raphanus*. *Amer. J. Bot.* 54 : 1098—1106.
19. Wheeler, A. W. 1968. Changes in auxin in expanding and senescent primary leaves of dwarf french bean. *J. exp. Bot.* 19 : 102—107.