

カイワレの種子中に含まれる水分量と発芽の関係

石原良美, 高野二郎, 真下 悟, 山村雅一*

(平成5年4月21日受理)

Measurement of Free and Bound Water During Radish Seed Germination
— Effect of Water on Germination of Radish Seed —

Yoshinmi Ishihara, Jiro Takano, Satoru Mashimo and Masaichi Yamamura*

(Received April 21, 1993)

It was found that the water in seeds could be measured as bound and free water, and it was quantitated here by the TDR method.

When radish seeds were dried for 24 hours at 25°C, the water in the seeds suddenly decreased, and when the seeds were dried for 10 hours, the free water decreased more than the bound water, and germination was hardly affected. However if the seeds were dried for over 24 hours, the amount of bound water decreased more than the free water.

In this case, germination of seeds suddenly decreased. Germination was 20%, when the seeds were dried for 96 hours at 45°C, and it was 50% at 25°C.

Therefore both bound and free water are needed for germination, and it is the quantity of bound water which affects the germination of seeds, this can be called the vital water.

1. 緒 言

植物に対して水は発芽・成長・光合成・呼吸に重要な役割を持っている。植物は成長過程における水を、根や葉によって外部から必要量給水し植物内に保持させている¹⁾⁴⁾。しかし、種子の発芽に必要な水は予め種子中に適量保持されており、この水がある限度以下になるといくら外部から水を与えても発芽しなくなる。この現象

は厳しい乾燥状態におかれた種子にしばしば観察される。種子中に存在する水は双極子を有しており、 $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$ のような親水基に引きつけられその周囲に水和層を形成している⁵⁾⁶⁾。一般に生体組織中に存在する水は普通の水とは異なり、生体高分子などの相互作用によって水分子の運動が遅く束縛された状態にあることが報告されている⁷⁾¹⁰⁾。この束縛された水が生命を維持してゆく上で重要な役割を持っていると考えられるが、その研究についての報告はない。そこで我々は容易に入手することが可能であり、比較的固体差が少なく短期間に発芽するカイワレの種子を用いて実験を行い、種子を加熱乾燥させ種子中の水分減少量と発芽の関係について検討した。これまで生物試料中の水についての研究は低温示差熱測定で行われており、生物が生活する温度で自由水と結合水の分類を行うことは不可能であった。しかし本研究では、生物体としての種子を人工的に脱水させ、その試料についての常温示差熱測定を行なったとこ

東海大学理学部: 〒259-12 神奈川県平塚市北金目1117

* 東海大学医学部分子生命科学: 〒259-11 神奈川県伊勢原市望星台

School of Science, Tokai University, Kitakaname, Hiratuka-shi, Kanagawa 259-12, Japan.

* Department of Molecular life Science, School of Medical, Tokai University, Bohseidai, Isehara-shi, Kanagawa 259-11, Japan.

ろ、種子が発芽・成長する温度範囲内で熱天秤に変化があることがわかった。また、種子中の水の状態については時間領域反射(TDR)法¹¹⁾¹⁵⁾を用いて(a)結合水(b)自由水に分類^{16),17)}し、それぞれの回転緩和時間(τ_c)を(a) 10^{-9} sec (b) 10^{-10} secで測定しその水分量を定量した結果、発芽と結合水との間に相関関係が存在するところを見いだした。したがって、生物体が存在する温度においてのDTA-TG測定は可能であり、TDR法を組み合わせることで生物体中の水の挙動を知ることができた。

2. 実験

2.1 材料

使用したカイワレ種子は市販品を用いた。発芽に使用した再蒸留水はイオン交換水をさらに蒸留したものをを用いた。

2.2 装置

示差熱天秤: 島津示差熱・熱重量同時測定装置

DTG-40型(島津製作所)

時間領域反射法(TDR法)システム

孵卵器: INCUBATOR IS-4(ヤマト科学)

2.3 実験操作

2.3.1 種子の発芽条件の決定

培地はウレタンフォーム、ガラスビーズ(ϕ 3mm)、セラミックビーズ(ϕ 6mm)の3種類について検討した。

シャーレに各々の培地を厚さ1cmに敷き種子50個をセットした。外部から与える水分量を噴霧器を用いて、5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50mlとした。その後シャーレにフタをして、25℃の孵卵器中で7日間自然光下で培養し発芽成長の観察と発芽率を測定した。本実験は全て各ポイントで最低10回(種子500個)実験を繰り返し行い、その平均値を算出した。

2.3.2 加熱乾燥による種子の水分減少率と発芽率の測定

種子50個を1セットとし、その重量を測定した後デシケーターにいった。そのデシケーターに乾燥器(25, 35, 45℃)にいれ、乾燥を3, 6, 10, 18, 24, 48, 72, 96時間行った。その後、種子の重量減少量を求めた。2.3.1の実験より決定した培養条件で発芽させ、各々乾燥させた種子の発芽率を測定した。

2.3.3 種子の示差熱測定

2.3.2で乾燥させた種子を20~200℃で示差熱測定(DTA-TG)を行い、熱天秤と天秤を測定した。

2.3.4 TDR(時間領域反射)法による種子中の水の定性、定量測定

TDR法を用いて誘電緩和測定を行った。種子に電磁波(ステップパルス)を照射し、その反射波を測定した。この反射波は種子中に存在する物質の誘電率によって決定

されるため、この測定値をフーリエ変換し、種子の複素誘電率を求めた。得られたピークを分離して各々のパラメータを求め、そのうち、水分子の回転速度である回転緩和時間 τ_c とその時間における単位体積あたりの水分子の数を表す緩和強度 $\Delta\epsilon$ を算出した。

結合水の回転緩和時間: $\tau_c=10^{-9}$ sec, 自由水の回転緩和時間: $\tau_c=10^{-8}$ secとして測定を行った。

このTDR法を用いて種子中の水の状態とその水の残存量を測定した。乾燥させていない種子を標準サンプルとし、乾燥温度25, 35, 45℃で6, 10, 24, 96時間乾燥させた種子中の自由水及び結合水を定量した。

3. 結果

3.1 種子の発芽条件決定

ウレタンフォーム培地の場合、水量5~25mlでは発芽しなかった。これらの水量では水がウレタン培地の下に溜まり、種子が全く水にふれる環境ではなかった。このことから、種子は吸水を行わなければ発芽しないことが確認された。水量30, 35mlでは培養2日目から発芽し始め7日目には根、茎が2cm程度成長したが、発芽率は50%に達しなかった。水量40~50mlでは種子全体が水に浸り、1日目から発芽し始め7日目には根・茎が約3cmまで成長したが、カビが発生した。

ガラスビーズ培地の場合、水量5, 10mlでは発芽率は低く一定とならなかった。水量15~50mlでは3日目以降発芽率は50%を越えたが一定しなかった。

セラミックビーズ培地の場合、水量5~50mlのいずれも2日目で発芽率が50%を越し、3日目以降ほぼ一定となった。また培養期間中の培地内の温度は、ウレタンフォーム培地の場合27℃、ガラスビーズ培地の場合26.5℃、セラミックビーズ培地の場合25℃であり、発芽による温度変化はセラミックビーズ培地においては見られなかった。

本実験の発芽条件は、発芽時の外界からの水分摂取をできる限り最小限に抑え、種子中の水だけで発芽するような条件が最適である。以上の結果より、セラミックビーズ培地の場合水分量5mlで2日目以降の発芽率が一定となることから、本実験では以後セラミックビーズ培地を用い最小水分量5mlの条件で発芽させ、5日目の発芽率(80%)を最終発芽率とした。

3.2 種子の示差熱測定

乾燥による種子の重量減少量が水分減少量であることを確認するために種子の示差熱測定を行った。

乾燥させていない種子及び25, 35, 45℃で6, 10, 24, 96時間乾燥させた種子(1個=20mg)を20℃から200℃まで1℃/minの速度で温度を上昇させ、熱天秤と天秤を測

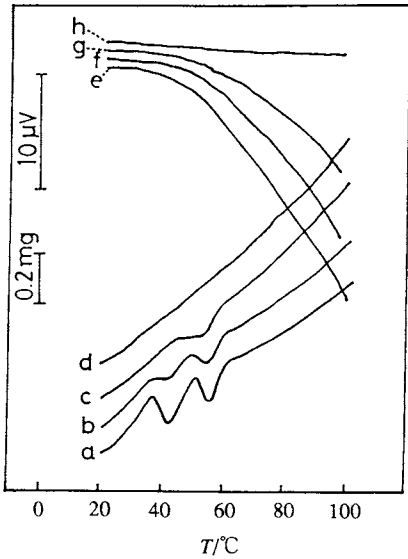


Fig.1 DTA (a,b,c,d) and TG (e,f,g,h) curve of dried seeds for 96hr in a desiccator at various temperatures and a not dried seed.

- (a)(e) not dried
- (b)(f) dried at 25°C for 96hr
- (c)(g) dried at 35°C for 96hr
- (d)(h) dried at 45°C for 96hr

定した。Fig.1に25, 35, 45°Cで96時間乾燥させた種子と乾燥させていない種子の20°Cから100°Cまでの熱天秤と天秤の結果を示した。その結果、乾燥させていない種子の熱天秤は35°Cから60°Cの間に2つのピークが認められた。25°Cで96時間乾燥させた種子についてはこの2つのピークは小さくなり、35°Cで96時間乾燥させた種子については低温側のピークはなくなり高温側のピークのみが認められ、45°Cで96時間乾燥させた種子については2つのピークは全く認められなかった。天秤については乾燥させていない種子は徐々に減少する傾向が認められたが、乾燥温度が上昇するにつれて天秤に変化は認められなかった。

3.3 TDR法による種子中の水の定性、定量

TDR法より種子中には回転緩和時間が 10^{-9} secの結合水と 10^{-10} secの自由水が存在することが確認できた。

Table 1-(a), (b), (c)に25, 35, 45°Cで6, 10, 24, 96時間乾燥させた種子の重量減少量と種子中の結合水と自由水及び減少した種子中の結合水と自由水を算出し示した。

また乾燥温度25, 35, 45°Cにおける種子中の結合水と自由水の残存率を標準種子に含まれる結合水、自由水を100%として換算して算出し、発芽率との関係をFig.2-(a), (b), (c)に示した。その結果、Table 1により重

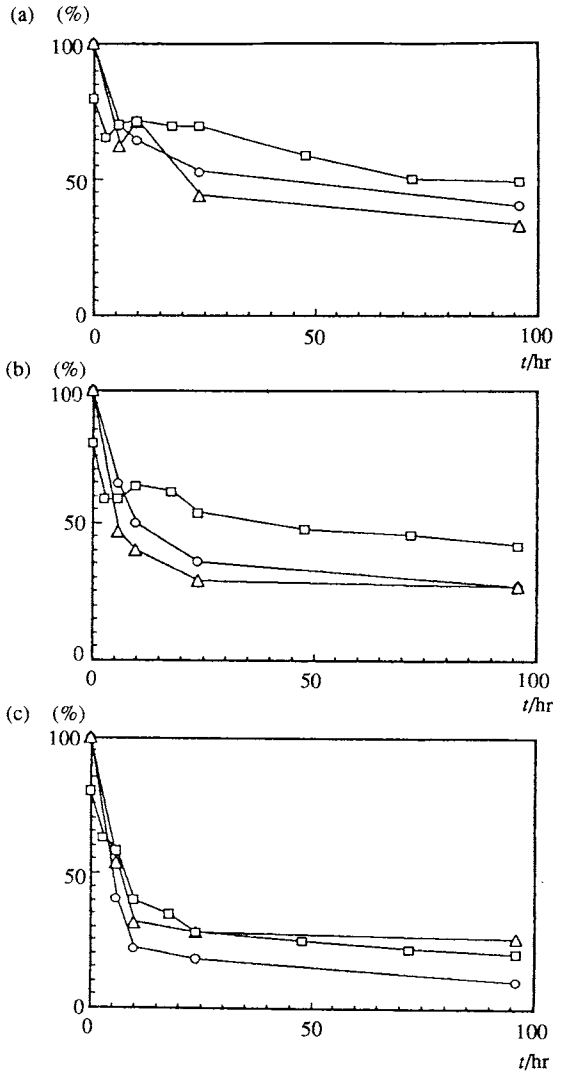


Fig.2 Bound water and free water in seed and germination

- : bound water
- △ : free water
- : germination
- (a) Temp. 25°C
- (b) Temp. 35°C
- (c) Temp. 45°C

量減少量とTDR法により求めた減少した結合水と自由水の全量はほぼ一致することが認められた。したがって、乾燥による種子の重量減少は種子中の結合水と自由水の減少によるものと考えられる。Fig.2よりどの乾燥温度においても、乾燥時間24時間までは自由水・結合水共に減少し、それに伴い発芽率も減少した。乾燥温度が高くな

Table 1 Decreased weight, germination and bound water and free water in the seed by the TDR method. The seeds were dried for up to 96hr in a desiccator at various temperatures.

(a) 25°C (b) 37°C (c) 45°C

(a)

Time / hr	Decreased weight / g	Bound water / g	Free water / g	Total water / g	Decreased bound and free water / g	Germination / %
0	0	2.43×10^{-4}	1.19×10^{-3}	1.43×10^{-3}	0	80
6	5.38×10^{-4}	1.71×10^{-4}	7.48×10^{-4}	9.19×10^{-4}	5.11×10^{-4}	70
10	4.78×10^{-4}	1.59×10^{-4}	8.53×10^{-4}	1.01×10^{-3}	4.20×10^{-4}	72
24	7.96×10^{-4}	1.28×10^{-4}	5.18×10^{-4}	6.46×10^{-4}	7.84×10^{-4}	70
96	9.14×10^{-4}	9.72×10^{-5}	3.94×10^{-4}	4.91×10^{-4}	9.39×10^{-4}	50

(b)

Time / hr	Decreased weight / g	Bound water / g	Free water / g	Total water / g	Decreased bound and free water / g	Germination / %
0	0	2.52×10^{-4}	1.42×10^{-3}	1.67×10^{-3}	0	80
6	9.68×10^{-4}	1.63×10^{-4}	6.14×10^{-4}	7.77×10^{-4}	8.93×10^{-4}	59
10	1.09×10^{-3}	1.26×10^{-4}	5.42×10^{-4}	6.68×10^{-4}	1.00×10^{-3}	65
24	1.20×10^{-3}	8.59×10^{-5}	3.90×10^{-4}	4.80×10^{-4}	1.19×10^{-3}	56
96	1.26×10^{-3}	6.70×10^{-5}	3.90×10^{-4}	4.57×10^{-4}	1.21×10^{-3}	42

(c)

Time / hr	Decreased weight / g	Bound water / g	Free water / g	Total water / g	Decreased bound and free water / g	Germination / %
0	0	2.27×10^{-4}	9.56×10^{-4}	1.18×10^{-3}	0	80
6	5.50×10^{-4}	9.27×10^{-5}	5.18×10^{-4}	6.11×10^{-4}	5.69×10^{-4}	58
10	8.60×10^{-4}	4.64×10^{-5}	3.02×10^{-4}	3.48×10^{-4}	8.32×10^{-4}	40
24	8.96×10^{-4}	4.13×10^{-5}	2.71×10^{-4}	3.12×10^{-4}	8.68×10^{-4}	28
96	9.43×10^{-4}	2.36×10^{-5}	2.44×10^{-4}	2.68×10^{-4}	9.12×10^{-4}	20

るほどそれぞれの減少率は高くなり、結合水の減少が多くなると発芽率がより減少する傾向が見られた。

4. 考 察

加熱乾燥により種子中に存在する水分の減少が起こり、その減少率は温度によって異なることがわかった。

TDR法により種子中に存在する水が結合水及び自由水であることが確認でき、各温度において定量することができた。種子中の自由水についてはどの乾燥温度においても同じ様な減少傾向を示し、最終的に75%以上減少することはなかった。それに比較して結合水は乾燥温度によって減少傾向が異なり、45°Cにおいては90%減少した。自由水は温度に関係なく蒸発可能な水つまり種子中

であり束縛されていない水であった。しかし、結合水は自由水に比較して種子内で束縛された構造化の高い水の状態になっているため、乾燥温度の上昇と共に蒸発の仕方が異なる減少を示したものと考えられる。

どの乾燥温度においても96時間では、種子中の自由水量にはほとんど差がないにもかかわらず、発芽率に差が見られた。これは種子中の結合水量によるものと考えられる。このことより種子中には発芽に必要な水が結合水の状態で保持されており、その結合水は環境温度が高くなると徐々に失われ始め、この結合水の減少に対応して発芽率が減少したものと考えられる。したがって、通常行われている種子の低温での保存法は、ある程度の乾燥を伴うが種子中の結合水にはほとんど影響を与えない

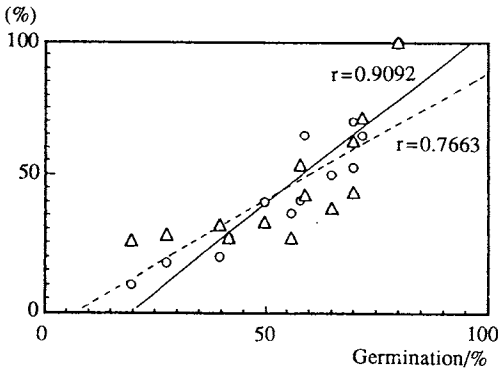


Fig.3 Relationship of bound water or free water and germination

○ : bound water
△ : free water

め、発芽にも影響を与えないものと結論できる。

そこで乾燥温度に関係なく、自由水および結合水の残存率と発芽率の関係をFig.3に示した。その結果、相関係数は結合水の場合 $r=0.9092$ 、自由水の場合 $r=0.7663$ となり、各々発芽率との間に相関性があり、特に結合水は極めて高い相関性を示した。

Table 1より実際に種子中に存在する結合水量は自由水量に比較して1/5程度しか存在していない。量的に非常に少ない結合水が発芽に影響を与えることから、種子に対して結合水はvitalな水であると考えられる。また自由水はその水分子の回転速度が遅いことから、外部からある程度補給できる水であり、結合水は補給されにくい水であると考えられる。

本研究より、通常種子が存在する環境下において、TDR法を用いて種子中の結合水と自由水を定量することができ、種子の発芽は予め種子中に存在している水に大きく影響されることがわかった。

文 献

- 1) N. A. Gusev, "Sostayanie Vody v rastenii", Nauka (1974) Chap.4.
- 2) N. N. Ishmkhmetova, "Thesis" (in Russian), Kazan (1971).
- 3) D. J. F. Bolwling, "Uptake of Ions by Plant Roots", Chapman and Hall Ltd, Aberden (1976).
- 4) W. Crocker, "Growth of Plants", Reinhold Publ. Corp., New York (1948).
- 5) G. G. Prive, U. Heinemann, S. Chandrosegan, L. S. Kan, M. L. Kopka and R. E. Dickerson, *Sicience*

203, 498 (1987).

- 6) E. Westhof, *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 125 (1988).
- 7) C. F. Hazlewood, "Cell-Associated Water", 165, Academic Press New York (1979).
- 8) Y. Ikada, M. Suzuki, H. Iwata and S. P. Powland, *ACS Symposium Series* **127**, Water in Polymer 287 (1980).
- 9) K. Yoshikawa and A. Ohsaka, *Physiol. Chem & Physics* **12**, 515 (1980).
- 10) P. T. Beall, *Cryobiology* **20**, 770 (1982).
- 11) S. Kuwabara, T. Umehara and S. Mashimo, *J. Phys. Chem.* **92**, 4839 (1988).
- 12) S. Mashimo, T. Umehara and S. Kuwabara, *J. Phys. Chem.* **93**, 4963 (1989).
- 13) N. Asaka, N. Shinyashiki, T. Umehara and S. Mashimo, *J. Chem. Phys* **93**, 8273 (1990).
- 14) N. Shinyashiki, N. Asaka, S. Mashimo, S. Yagihara and N. Sasaki, *Biopolymers* **29**, 1185 (1990).
- 15) T. Umehara, S. Kuwabara, S. Mashimo and S. Yagihara, *Biopolymers* **30**, 649 (1990).
- 16) 上平 恒, 化学と生物 **18**, 770 (1980).
- 17) C. F. Hazlewood, C. F. Chang and D. E. Woessner, *Biochem. Biophys. Acta.* **437**, 253 (1976).

要 旨

カイワレの種子中に予め存在している水は発芽に影響を及ぼす。種子を25℃, 35℃, 45℃で乾燥させると種子中の水分含有量が減少し常温の示差熱測定(DTA-TG)によって各々の種子の熱天秤及び天秤に差が認められた。

また、TDR法によって種子中の水は結合水と自由水の状態で存在することが確認でき、各々の水を定量することができた。種子を25℃, 35℃, 45℃で加熱乾燥させると、乾燥温度が高くなる程種子中の結合水と自由水は短時間に急激に減少し、それに伴い発芽率も減少した。特に、45℃においては結合水の急激な減少が認められ、発芽率も急激に減少した。自由水はどの乾燥温度においても75%以上減少することはなかったが、結合水は45℃ので96時間乾燥させると90%減少した。発芽率の減少はどの温度においても自由水よりも結合水の減少に影響されている傾向があり、45℃においてはその傾向は顕著に現れた。以上の結果より、常温示差熱測定により種子中には水が保持されていることが確認でき、その水は発芽に必要な結合水と自由水であり、特に結合水量が発芽に影響を及ぼすことがわかった。