



| | |
|------------------|---|
| Title | イネの3種の紫葉遺伝子の形質発現に係わる環境反応 |
| Author(s) | 前川, 雅彦; MAEKAWA, Masahiko; 喜多, 富美治 他 |
| Citation | 北海道大学農学部農場研究報告, 25, 25-32 |
| Issue Date | 1987-03-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/13385 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 25_p25-32.pdf |



イネの 3 種の紫葉遺伝子の形質発現に係わる環境反応¹⁾

前川 雅彦・喜多富美治

(北海道大学農学部附属農場)

結 言

イネには紫葉遺伝子として 3 種 (Pl , Pl^w , Pl^i) が報告され、これらが Pl 遺伝子座を構成していることが明らかとなった^{3,7)}。これら 3 種の遺伝子による形質発現の特徴は Nagao *et al.*⁷⁾ と KINOSHITA and MAEKAWA³⁾ の報告に詳しいが、 Pl 遺伝子は葉と葉茎節を紫色とし、 Pl^w 遺伝子は、葉、節間と果皮を紫色とし、 Pl^i 遺伝子は葉のみ紫色とする。また、 Pl 遺伝子により切穎した穎果が着色することも知られている。前川・喜多⁴⁾ は Pl^w 遺伝子による紫色の葉身と玄米について分光特性を調べ、 Pl^w による葉身と玄米着色には同じアントシアニンが関与していることを明らかにした。本実験では 3 種の紫葉遺伝子のアントシアニン発現に係わる制御機構を明らかにする目的で、3 種の紫葉遺伝子による色素生成に関する環境反応を調べた。

材料および方法

本実験に供試した紫葉遺伝子を有する系統を Table 1 に示した。H-126 の有する Pl 遺伝子は日本稲の「紫稲」由来で、 Pl^w (H-406) と Pl^i (MA1-96) 遺伝子は、それぞれフィリピンの「Pirurutong」と IRRI の Fully Purple (I-102) 由来である。対照として緑葉の台中 65 号 (T-65) を用いた。これら 4 系統を 4 月 13 日に播種し、17 日間農林水産省北海道農業試験場のファイトロンの自然光室 (昼 24°C - 夜 19°C, 12 時間処理) で育成し、その後同ファイトロンの次の 4 環境に移動した。環境 C ; 昼 24°C - 夜 19°C の自然光室 (12 時間処理)。環境 1 ; 12 時間日長, 20°C 一定の人工光室。環境 2 ; 昼 26°C - 夜 23°C (12 時間処理) の人工光室。環境 3 ; 15°C 一定の自然光室。1 回目の葉身色素の抽出には、完全展開した第 6 葉 (環境 3 では第 5 葉) を用い、2 回目の抽出に

Table 1. List of lines in the experiment

| Line | Leaf color | Genotype for purple leaf | Source |
|--------|-------------|--------------------------|---|
| H-126 | Purple | $C^B A Pl$ | Progeny of the cross, N-45 (linkage marker bred true from the cross, Ebisu-mochi x Murasaki-ine) x Betong |
| H-406 | Purple wash | $C^B A Pl^w$ | Progeny of the cross, A-5 x H-121 (linkage marker bred true from the cross, A-13 x Pirurutong) |
| MA1-96 | Purple | $C^{Bp} A Pl^i$ | Progeny of the cross, H-79 x H-478 (linkage marker bred true from the cross, A-58 x I-102, Fully Purple) |
| T-65 | Green | $C^B A^+$ | Taichung 65 |

1) 文部省科学研究費 (奨励研究 A) 課題番号 61760001 による研究成果。

は第8葉展開時の第8葉を用いた。いずれも4反復とした。採取した葉身を先端から15cm切り取り、秤量後細断し1%メタノール塩酸で色素を抽出した。玄米の色素抽出には環境Cと環境1で育成した材料を用いた。材料の1部については、受精直後の穎花を切穎し完熟させた。玄米は完熟後収穫し、10粒を1単位として秤量後1%メタノール塩酸で色素を抽出した(3反復)。これらの粗抽出液のアントシアニン含量に関しては、分光光度計(Spectronic 20, Shimadzu, Bausch & Lomb)による535nmの吸光度を推定量とした。一部の粗抽出液については自記分光光度計(日立323型)で分光特性を調べた。

結 果

最初に、H-126 (*Pl*), H-406 (*Pl^w*), MA1-96 (*Plⁱ*) と T-65 (正常) の葉身から抽出した粗抽出液の420-700nmの可視部での分光特性を調べた(Fig. 1)。その結果、3種の紫葉遺伝子を有するそれぞれの系統は同じ535nmに吸収極大(λ_{max})を示した。この吸収極大はHARBORNE¹⁾によればアントシアニンの関与を示すもので、3種の紫葉遺伝子とも同じアントシアニンを葉身に分布させていることが判明した。また、対照として供試した緑葉のT-65も低くで

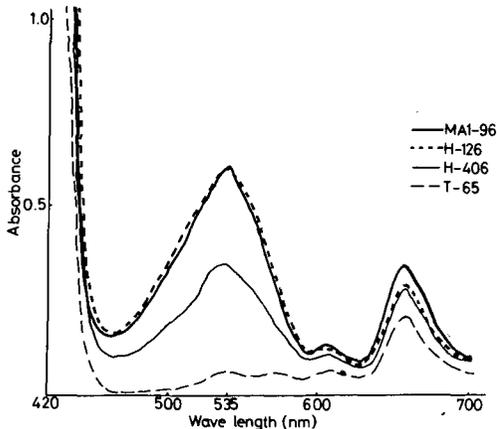


Fig. 1. Absorption spectra of crude extracts from fully expanded 6th leaves of three purple leaf lines, H-126 (*Pl*), H-406 (*Pl^w*) and MA1-96 (*Plⁱ*) grown in 24°C (day) - 19°C (night) condition with natural light with 1% MeOH-HCl.

はあるが同じ535nmに吸収極大を示し、緑葉であっても微量のアントシアニンを保有していることが推定された。このことから、3種の紫葉遺伝子によって同じアントシアニンが葉身に形成され、アントシアニンの推定含有量として535nmでの吸光度を比較することが可能であった。次に、各系統の葉身着色、すなわちアントシアニン形成量における環境反応についてファイトトロンを用い調べたところ(Fig. 2)、3系統全体で見れば、まず環境3で吸光度が最大となり、全体として、吸光度は環境3>環境1>環境C>環境2の順に減少した。ただし、H-126においては環境3と環境1における吸光度の差は殆ど認められなかつ

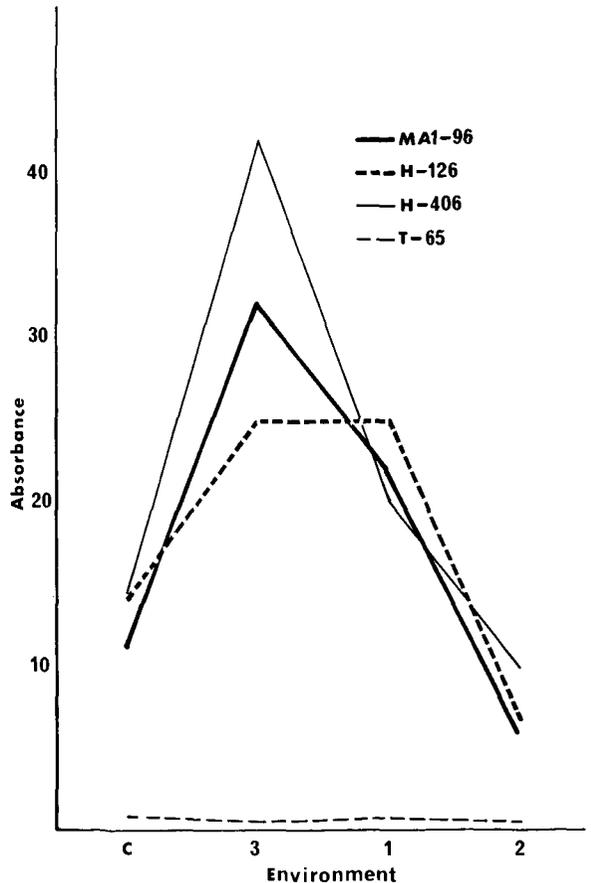


Fig. 2. Absorbance at 535nm of extracts from fully expanded 6th leaves (5th leaves in No. 3 environment) of three purple leaf lines, H-126 (*Pl*), H-406 (*Pl^w*) and MA1-96 (*Plⁱ*) grown in four controlled environments.

た。系統別に見ると、環境C、1、2では大きな差異は認められないが、環境3では大きな差異が存在していた。ここでは、 Pl^w を有するH-406が最大の吸光度を示し、 Pl^i を有するMA1-96が中程度、そして Pl を有するH-126が最小の吸光度を示した。分散分析の結果(Table 2)、系統間、環境間とそれらの交互作用も統計的に有意となり、葉身着色における環境反応が系統によって異なっていることが明らかとなった。また、不完全展開の第8葉における葉身着色に関して、環境C、1、2における反応を調べた(Fig. 3)。完全展開した第6葉の535 nmの吸光度と比較した場合、3系統ともかなり低くアントシアニン量が少ない

ことが明らかであった。3環境を比較した場合、第6葉では環境1で高い吸光度を示したが、不完全展開の第8葉では3環境で大きな差異は認められなかった。ただし、 Pl^i を有するMA1-96は3環境で第8葉の吸光度に殆ど差異は認められず、他の2系統とは反応を異にしていた。このことは分散分析の結果からも明らかで、不完全展開葉における系統間・環境間差は認められなかったが、系統と環境の交互作用は5%で有意となり、不完全展開葉の吸光度に関しても系統と環境との交互作用があることが判明した(Table 3)。

紫葉遺伝子による着色は葉身ばかりでなく玄米にも着色する(Pl^w)²⁷⁾。また、 Pl 遺伝子を有する

Table 2. Analysis of variance for absorbance at 535nm of crude extracts with 1% MeOH-HCl from fully expanded 6th leaves (5th leaves in Environment 3) of H-126 (Pl), H-406 (Pl^w) and MA1-96 (Pl^i) grown in four controlled environments

| Source of variation | d. f. | MS |
|---------------------|-------|-------------|
| Line (L) | 2 | 77.3644** |
| Environment (E) | 3 | 1477.7846** |
| L x E | 6 | 89.5988** |
| Error | 36 | 11.3252 |

** ; Significant at 1% level.

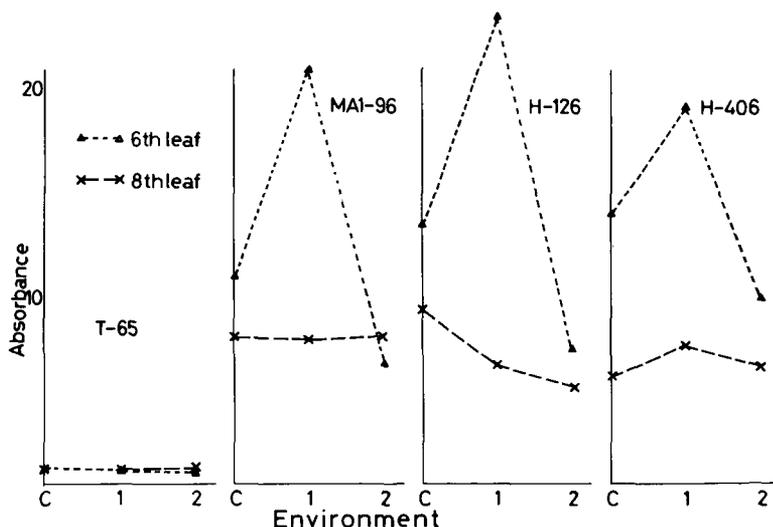


Fig. 3. Absorbances at 535nm of crude extracts from newly emerging 8th leaves of three purple leaf lines, H-126(Pl), H-406 (Pl^w) and MA1-96 (Pl^i) and T-65 as control grown in three controlled environments.

Note, C: 24°C (day) – 19°C (night) in natural light room. 1: 20°C (day) – 20°C (night) in artificial light room. 2: 26°C (day) – 23°C (night) in artificial light room.

Table 3. Analysis of variance for absorbance at 535nm of crude extracts with 1% MeOH-HCl from newly emerging 8th leaves of H-126(*Pl*), H-406(*Pl^w*) and MA1-96(*Plⁱ*) grown in three controlled environments

| Source of variation | d. f. | MS |
|---------------------|-------|---------|
| Line (L) | 2 | 6.0619 |
| Environment (E) | 2 | 3.7526 |
| L x E | 4 | 8.2863* |
| Error | 27 | 2.3548 |

*; Significant at 5% level.

系統の穎花を切穎した場合、穎果も着色することが知られている。そこで、紫葉遺伝子による玄米着色反応を環境Cと環境1で調べた(Table 4)。Table 4には535 nmの吸光度ばかりでなく、421 nmと460 nmの吸光度も同時に示した。421 nmはC^BA⁺Pl^wの遺伝子型の玄米に認められる吸収極大の波長で、460 nmはRcRdの遺伝子による赤米に認められる吸収極大の波長である⁴⁾。対照として供試した白米のT-65は殆ど0で、緑葉で認められたような535 nmの吸収極大がなく、玄米にはアントシアニンが存在していないと推定された。Pl^wによるH-406の紫米については、切穎した場合、穎花のない部分は完全な黒紫色となってしまうが、実際の535 nmでの吸光度では切穎した場合としない場合で、若干切穎した場合に増加する傾向があるが、統計的な有意差は認められなかった。また、環境間では、環境Cで高くなり統計的に有意であった。Plを有するH-126では、切穎した場合穎花のない部分が紫色に着色するけれども、切穎玄米の粗抽出液からは、535 nmでの低い値しか得られなかった。通常の玄米の吸光度よりは高い値を環境Cで示してはいたが統計的に有意とはならなかった。また、環境1では、切穎玄米に着色が認められるものの吸光度では殆ど差異はなかった。切穎した玄米の環境Cと1における535 nmでの吸光度には有意差が認められた。Plⁱを有するMA1-96の切穎玄米の場合、無着色で、535 nmの吸光度も殆ど0に近い値を示しアントシアニンの存在しないことが判明した。また、環境Cと1を比較した場合、葉身の吸光度は環境1で高かったが、玄米の吸光度は逆に環境Cで高くなっていた。なお、H-406の場合、RcRdを有

し460 nmにも吸収極大を示し⁴⁾、切穎玄米でも環境1とCで通常の玄米とほぼ同じ吸光度を示していた(環境1では切穎玄米のほうが統計的に高い値を示した)。環境Cでは玄米、切穎玄米とも535 nmの吸光度より低い値を示したが、環境1では、むしろ460 nmの切穎玄米の吸光度が高かった。全般的に、環境Cでの吸光度は環境1より高い傾向にあった。

考 察

アントシアニン形成には光、特に紫外線が重要であることはMOHR⁹⁾が詳しく報告しているが、温度も関与している場合がある⁹⁾。特に、リンゴの果皮の場合は気温較差が影響しているとの報告もある¹⁵⁾。イネのPl遺伝子による紫葉にはアントシアニンが分布していることが明らかにされている^{8,10)}が、本報告では、まず3種の紫葉遺伝子(Pl, Pl^w, Plⁱ)を有する系統の葉身からの色素抽出液を調べ、同じアントシアニンが紫葉身に分布していることが明らかとなった。そこで、イネの3種の紫葉遺伝子による植物体のアントシアニン発現に関してファイトトロンを用い環境反応を調べた。しかし、ファイトトロンでは温度あるいは光といった単一要因制御環境を用いることはできず、温度と光の複合制御環境に対する反応を調べることとなった。それぞれ4環境下における3種の紫葉遺伝子による葉身のアントシアニン形成は環境3(自然光, 温度最低条件)で最大であった。また、自然光下では低温でアントシアニン形成量は増加し、人工光室でも温度が低い環境でアントシアニン量は多かった。環境3では、H-406の有するPl^wによるアントシアニン形成量が最大で、次

Table 4. Effect of glume-clipping and environment on anthocyanin production of caryopsis of H-126, H-406 and MAI-96

| Line | Genotype for leaf and pericarp coloration | Envir. | Coloration | | | Absorbance (/g) | | | | | | | | |
|--------|--|--------|------------|----------|----------------------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | | Leaf | Pericarp | Glume-clipped caryopsis | 421 nm | | | 460 nm | | | 535 nm | | |
| | | | | | | T-0 | T-1 | t-test | T-0 | T-1 | t-test | T-0 | T-1 | t-test |
| H-126 | <i>C^B A Pl</i> | C | Purple | White | Red purple | 0.204 | 0.183 | * | 0.071 | 0.097 | | 0.075 | 0.127 | |
| | | | do | do | Slightly red purple | ±0.010 | ±0.003 | | ±0.016 | ±0.006 | | ±0.016 | ±0.037 | |
| | | 1 | do | do | Slightly red purple | 0.148 | 0.100 | | 0.039 | 0.047 | | 0.038 | 0.037 | |
| | | | do | do | Slightly red purple | ±0.042 | ±0.004 | | ±0.017 | ±0.026 | | ±0.019 | ±0.035 | |
| t-test | | | | | ** | | | * | | | * | | | |
| H-406 | <i>C^B A Pl^w Rc Rd</i> | C | Purple | Purple | Blackish | 7.908 | 7.580 | | 11.597 | 11.408 | | 13.215 | 13.670 | |
| | | | wash | | purple | ±0.428 | ±1.039 | | ±0.519 | ±1.502 | | ±0.607 | ±2.068 | |
| | | 1 | do | do | do | 5.187 | 5.944 | | 7.911 | 9.257 | * | 8.005 | 8.183 | |
| | | | do | do | do | ±0.325 | ±0.379 | | ±0.390 | ±0.610 | | ±0.422 | ±0.920 | |
| t-test | | | | | ** | | | ** | | | ** | | | |
| MAI-96 | <i>C^{Bp} A Plⁱ</i> | C | Purple | White | White | 0.162 | 0.105 | | 0.036 | 0.018 | | 0.010 | 0.004 | |
| | | | do | do | do | ±0.052 | ±0.039 | | ±0.007 | ±0.010 | | ±0.013 | ±0.004 | |
| | | 1 | do | do | do | 0.157 | 0.100 | | 0.024 | 0.013 | | 0.037 | 0.009 | * |
| | | | do | do | do | ±0.047 | ±0.009 | | ±0.017 | ±0.008 | | ±0.011 | ±0.007 | |
| t-test | | | | | | | | | | | * | | | |
| T-65 | <i>C^B A⁺</i> | C | White | White | White | 0.087 | 0.089 | | 0.002 | 0.002 | | 0.000 | 0.000 | |
| | | | do | do | do | ±0.010 | ±0.030 | | ±0.003 | ±0.003 | | ±0.000 | ±0.000 | |
| | | 1 | do | do | do | 0.075 | 0.070 | | 0.012 | 0.015 | | 0.002 | 0.003 | |
| | | | do | do | do | ±0.047 | ±0.018 | | ±0.009 | ±0.013 | | ±0.003 | ±0.005 | |
| t-test | | | | | | | | | | | | | | |

*, **; Significant at 5% and 1% levels, respectively. T-0; Caryopsis encased in the floral glumes. T-1; Glume-clipped caryopsis.
 Environment-C; Natural light room under 24°C (day)-19°C (night).
 Environment-1; Artificial light room under 12 hours day at 20°C-12 hours night at 20°C.

がMA 1-96の有する Pl^i , 最低がH-126の Pl 遺伝子によるものであった。また, Pl は, Pl^w と Pl^i によるアントシアニン量が大きく変化した環境3と環境1では殆ど差異を生じなかった。分散分析の結果からも, 遺伝子によって環境反応が大きく異なることが判明した。すなわち, Pl^w を有するH-406が強い環境反応を示し, Pl^i を有するMA1-96が中程度を示し, Pl を有するH-126は環境反応が鈍かった。また展開中の新葉では, 3種の紫葉遺伝子間に有意差がなかったものの, 3種の遺伝子とも新葉ではその作用性が低いことが明らかとなった。しかし, 環境との交互作用では有意差が認められ, 系統によって環境反応が異なっていた。新葉では, Pl^i を有するMA1-96は環境反応が最低で, 3環境下でアントシアニン形成量は殆ど変化しなかった。また, 3種の紫葉遺伝子のうちの1つの Pl^w は玄米にもアントシアニンを分布させることが報告され⁴⁾, Pl では切穎玄米が着色することが知られていることから, 環境Cと1で玄米と切穎玄米におけるアントシアニン量を調べた。 Pl^w を有するH-406では切穎した場合, わずかにアントシアニン量が増加しているが, 有意差は認められなかった。また, 環境Cより環境1でアントシアニン量が玄米, 切穎玄米とともに減少していて, この反応性は葉身の場合と逆であった。この原因については不明である。一方, Pl を有するH-126の切穎玄米で環境Cにおいてアントシアニンの存在を示唆する数値が得られたが, 通常のエ米(無着色)との間に統計的有意差は認められなかった。また, 環境1では殆ど差異はなかった。これらのことから, H-126の着色した切穎玄米がアントシアニンによるものかどうかは特定できなかった。 Pl^i を有するMA1-96の場合, 玄米, 切穎玄米ともにアントシアニンは形成されていなかった。以上のことから, 3種の紫葉遺伝子の葉身におけるアントシアニン形成に関する温度反応を明らかにすることができた。玄米着色に関しては今後更に詳細に調べる必要がある。

摘 要

3種の紫葉遺伝子(Pl , Pl^w , Pl^i)の形質発現に

係わる環境反応をファイトトロン(農林水産省北海道農業試験場)の4環境を用い調べた。3種の紫葉遺伝子を有する系統, H-126(Pl), H-406(Pl^w), MA1-96(Pl^i)とT-65(正常)の葉身から色素を抽出し分光特性を調べたところ, 535nmに吸収極大が認められ, 同じアントシアニンが分布していた。葉身色素の吸光度は環境3で最大となり, 環境1, 環境C, 環境2の順で吸光度は低くなった。環境3における, 吸光度はH-406(Pl^w) > MA1-96(Pl^i) > H-126(Pl)の順に減少した。また, H-126は環境1と環境3では吸光度に差異を示さなかった。展開中の新葉では3系統とも完全展開葉より低い吸光度を示し系統間差はなかった。しかし, 環境と系統との交互作用は有意であった。H-406の玄米における535nmの吸光度は, 切穎玄米でわずかに増加するものの有意差はなかった。また, 環境Cより環境1で吸光度が減少した。H-126の着色した切穎玄米では環境Cでわずかに吸光度が増加したが, 有意差はなかった。

謝 辞

本実験を遂行するにあたり, 農林水産省北海道農業試験場稲第3研究室の佐竹徹夫博士をはじめ, 伊藤延男博士・西山岩男博士・小池説夫博士ならびに星千鶴子氏に種々の御助言および便宜をはかって戴いた。ここに記して心からの謝意を表する。

引用文献

1. HARBORNE, J. B. : Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* **70** : 22-28. 1958
2. 木下俊郎 : 日本型・インド型間における連鎖群の異同. 育種学最近の進歩 第17集 : 19-34. 1976
3. KINOSHITA, T. and MAEKAWA, M. : Genetical studies on rice plant, XICV. Inheritance of purple leaf color found in Indica rice. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **63** : 453-466. 1986
4. 前川雅彦・喜多富美治 : イネにおける遺伝的着色粒の抽出色素の分光特性. 北大農場研究報告 **23** : 11-21. 1983
5. 増田哲男・三野義雄・今河茂・田村勉 : リンゴの成熟機構と品種に関する研究, 第2報 成熟期の温度が着

- 色に及ぼす影響。園芸学会発表要旨昭54年秋：76-77. 1979
6. MOHR, H. : Light and pigments. In CZYGAN, F. C. (ed.) : Pigments in plants. 7-30. Bustav Fischer Verlag., Stuttgart., New York. 1980
 7. NAGAO, S., TAKAHASHI, M. and KINOSHITA, T. : Genetical studies on rice plant, XXX. Heterotic effect of alleles at *Pl*-locus in rice plant. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **56** : 45-56. 1968
 8. NAGAO, S., TAKAHASHI, M. and MIYAMOTO, T. : Genetical studies on rice plant, XX. Some chemical aspects on anthocyanin coloration caused by *C* and *Sp* allelomorphous series of genes. *Bot. Mag. Tokyo* **69** : 430-434. 1956
 9. RABINO, I. and MANCINELLI, A. L. : Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiol.* **81** : 922-924. 1986
 10. TAKAHASHI, M. : Analysis on apiculus color genes essential to anthocyanin coloration in rice. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **50** : 266-359. 1957
 11. UOTA, M. : Temperature studies on the development of anthocyanin in McIntosh apples. *Proc. Amer. Soc. Hor. Sci.* **59** : 231-237. 1952

Response of Three Purple Leaf Genes of Rice for Their Character Expressions to Environments

Masahiko MAEKAWA and Fumiji KITA

(Experiment Farms, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, 060 Japan)

Summary

These studies were conducted to investigate response of three purple leaf genes (*Pl*, *Pl^w* and *Plⁱ*) of rice for their character expressions to environments. Four environments used for these studies at the Phytotron of Hokkaido Agricultural Experiment Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery, were as follows ; Environment C-natural light room under 24°C(day)-19°C(night)(12 hours treatment), Environment 1-artificial light room kept at 20°C with light on for 12 hours and off for another 12 hours, Environment 2-artificial light room under 26°C(day)-23°C(night) with light on for 12 hours and off for another 12 hours, Environment 3-natural light room kept at 15°C through a whole day. Spectral properties of crude extracts from leaf blades of H-126(*Pl*), H-406(*Pl^w*), MA1-96(*Plⁱ*) and T-65 (normal) with 1% MeOH-HCl were examined. It was found that these extracts had the same absorption maximum wave length (535nm), indicating that three purple leaf genes produced the same anthocyanin in leaf blades and the same anthocyanin as they produced in leaf blades was contained slightly in leaf blades of T-65. Absorbances at 535nm of crude extracts from purple leaf blades of H-126, H-406 and MA1-96 depended on environments in the following ranking; Environment 3>1>C>2. At Environment 3, the absorbances decreased in the following sequence, H-406(*Pl^w*), MA1-96(*Plⁱ*) and H-126(*Pl*). H-126 which carried *Pl*, however, showed similar absorbance intensity at Environment 3 and at Environment 1. Absorbances at 535nm of crude extracts from newly emerging 8th leaves of three purple leaf lines were lower than those fully expanded 6th leaves. Although they showed almost the same absorbance at each three environments, significant Line x Environment interaction was found. Furthermore, absorbance of crude extract from glume-clipped caryopsis of H-406(*Pl^w*) increased slightly, as compared with normal caryopsis, and the absorbance of crude extract from colored glume-clipped caryopsis of H-126 was slightly higher than that of non-colored normal caryopsis at Environment C. However, no significant difference of the absorbance between glume-clipped and normal caryopsis was detected. At Environment 1, colored glume-clipped and non-colored normal caryopsis showed similar absorbance intensity. MA1-96 had non-colored glume-clipped caryopsis, and both glume-clipped and normal caryopsis showed almost no absorbance. At Environment C, both glume-clipped and normal caryopsis showed high absorbance, as compared with that at Environment 1.