

短 報 (Note)

透析膜で包んだ人工種子は非無菌条件下で迅速に発芽する

木下 勲^{1)*}

Artificial Seeds Enveloped with Dialysis Membrane Germinate Quickly under Non-aseptic Conditions

KINOSHITA Isao^{1)*}

Abstract

Previously, we had found that double layered artificial seeds of Japanese white birch whose inner layer contained a large quantity of sucrose had germinated in non-sterilized perlite. However, this type of artificial seed did not germinate on other types of substrates, such as vermiculite. To prevent the diffusion of sucrose from artificial seeds to non-sterilized substrate, artificial seeds were enveloped in a dialysis membrane. The enveloped artificial seeds germinated quickly in non-sterilized vermiculite.

Key words: Artificial seed, Dialysis membrane, Japanese white birch, Non-sterilized vermiculite

もともと成長の速い樹種であるシラカンバから特に成長の速い個体を選抜し、それを組織培養で大量増殖して植林し、バイオマス資源として利用することを旨として、シラカンバの組織培養による大量増殖法が研究されてきた (Saitoら, 1985a; Saitoら, 1985b; Satoら, 1986)。さらに、そのようにして作られた無菌幼植物体を野外に馴化させる作業を簡略化し、輸送や貯蔵の利便性を向上させるために、幼植物体の腋芽を用いた人工種子の開発が行われた (木下ら, 1989a; 木下ら, 1989b; Kinoshitaら, 1990)。

人工種子は体細胞胚やシュートなどの組織を人工的に包埋したもので、*in vitro*や*ex vitro*の条件に蒔くために使うことができるものと最近定義されている (Aitken-Christieら, 1995)。

発表されている人工種子の研究には無菌条件下で培地成分の供給を受けて発芽・生育する人工種子の開発を目指すもの (Piccioniら, 1995; Piccioni, 1997; Brischiaら, 2002) と、野外の土壌に蒔いて発芽・生育する人工種子を目指すもの (Bapatら, 1987; Redenbaughら, 1991) があり、最近発表される論文は前者が多い。無菌条件下で栄養を与えられて発芽・生育する人工種子は植物工場などでの使用を目指して、作業の機械化 (Brischiaら, 2002) 等の方向へ発展していくと思われるが、休眠し土壌中で発芽することができる自然の種子と同様の機能を持った人工種子の開発や、将来的には自然の種子が発芽できな

いような厳しい環境で発芽する人工種子の開発も重要な課題である。当面、我々は野外の土壌に蒔いて発芽・生育する人工種子の開発を目指している。

我々は組織培養で増殖させたシラカンバ幼植物体から腋芽を持った節を含む断片を切り出し、アルギン酸ゲルで包埋して人工種子化する実験を行ってきた (木下ら, 1989a; 木下ら, 1989b; Kinoshitaら, 1990; Kinoshitaら, 1992)。その結果、内部に高濃度のショ糖を含むアルギン酸ゲルのビーズを入れた二重構造の人工種子で、外側の層に腋芽を含む節切片を入れたものが、滅菌していないパーライト (ネニサンソ、三井金属鉱業) 上で発芽し、完全な植物体まで生育した。Maruyamaら (1997) は少し改良した二重構造の人工種子を熱帯樹種ハカランダ、セドロ、及びポライナプランカの腋芽を含む切片で作り、やはり非無菌条件下で発芽して完全な植物体まで育てることができた。

しかし、シラカンバの腋芽を含む節切片を用いて作った二重構造の人工種子が発芽・生育できる非無菌の条件は非常に小さい粒子を多く含むパーライトであるネニサンソ上に限られており、その条件でもうまく発芽・生育させるためには播種後の注意深い管理が必要である。この人工種子をパーミキュライト上で発芽させることを何度か試みたが、一度も成功しなかった。将来の野外の土壌で発芽する人工種子を目指して、より多様な条件で発

原稿受付：平成14年10月24日 Received Oct.24,2002 原稿受理：平成14年12月18日 Accepted Dec.18,2002

1) 森林総合研究所 生物学研究領域 〒305-8687 つくば市松の里 1

Department of Molecular and Cell Biology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 1 Matsunosato, Tsukuba City, Ibaraki 305-8687, Japan ; e-mail: ikinos@ffpri.affrc.go.jp

芽する人工種子を作るため、本研究では滅菌していないパーミキュライト上で発芽する人工種子を目指した。

我々の二重構造の人工種子は内部のアルギン酸ゲルのビーズに高濃度（39%、w/v）のショ糖を含んでいる。しかし、アルギン酸ゲルの中では、ゲルに閉じこめられている溶液に溶けている物質はかなり自由に移動することができるため、人工種子中のショ糖は継続的に外に漏れだしている（木下，2001）。このショ糖を栄養源として微生物が繁殖することが、人工種子の発芽が妨げられる主な要因の一つであると考えられる。

本研究では、人工種子から周辺の非無菌の基質（パーミキュライト）へのショ糖の漏れを止めることを目的として、人工種子の外側を半透膜で包んだ人工種子を作製し、通常的人工種子は発芽できなかったパーミキュライト上で発芽するかどうかを調べた。

材料と方法

野外のシラカンバ (*Betula platyphylla* Skatchev var. *japonica* Hara) 成木の腋芽を表面殺菌して組織培養で増殖し、長期間継代培養しているクローン、MA1とMA3を植物材料として用いた。

通常二重構造の人工種子はクローンMA3を用いて前に報告した方法で製造した（木下ら，1989b）。半透膜で包むものを含めて、本研究で人工種子の製造に用いた培地成分とホルモン組成は以前の報告（Kinoshitaら，1990）と同じである。

半透膜で包んだ人工種子にはクローンMA1を用いた。その構造をFig.1に示す。半透膜としては透析膜（8/32、三光純薬）を用いた。透析膜の一端は木綿糸で縛って閉じた。透析膜の中には高濃度のショ糖を含むアルギン酸ゲルのビーズとアルギン酸ゲルで包埋した腋芽を含む切片を入れた。

アルギン酸ゲルのビーズは次に述べる方法で作った。培地成分とホルモンを含む溶液20mlに10gのショ糖を溶

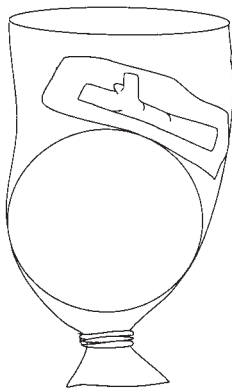


Fig.1. 透析膜で包んだ人工種子の模式図
Schematic representation of artificial seeds enveloped with dialysis membrane.

かし（ショ糖の最終濃度は39%、w/v）それに0.8gのアルギン酸ナトリウムを溶かしてアルギン酸溶液を作った。そのアルギン酸溶液を塩化カルシウム溶液（1.7gの塩化カルシウム二水和物を100mlの液体培地（培地成分、ホルモン及び0.5%ショ糖を含む）に溶かしたものに）に滴下して、アルギン酸ゲルを形成させた。

一方、アルギン酸ゲルで包埋した腋芽を含む切片は次の方法で作った。ここでは、塩化カルシウムを含む寒天ゲルの上に、アルギン酸ナトリウム溶液が周りに付着した節切片を乗せてゲル化させる方法（Dovzhenkoら，1998）を用いた。培地成分、ホルモン及び0.5%ショ糖を含む溶液に17g/lになるように塩化カルシウム二水和物を加え、さらに1%（w/v）になるように寒天を加えて9cmシャーレの中で固めた寒天ゲルを準備した。次に、培地、ホルモン、0.5%（w/v）ショ糖を含む溶液にアルギン酸ナトリウム（2%、w/v）を溶かしたものに節切片を混ぜた。ピンセットを用いて節切片にアルギン酸ナトリウム溶液を付着させて、塩化カルシウムを含む寒天の上に乗せ、30分間ゲル化させた。ここまでの操作はすべて無菌条件下で行った。

次に、高濃度ショ糖を含むアルギン酸ゲルのビーズとアルギン酸ゲルで包埋した節切片を透析膜の中に入れた。これが発芽するかどうかのテストは前に報告したのと同じ方法で（木下ら，1989b）非無菌条件下で行った。鉢の中のパーミキュライトに、上端が少し出るように透析膜で包んだ人工種子を埋め込み、下から水を供給しながら鉢の上にシャーレを乗せて乾燥を防ぎ、照明培養装置の中に置いて発芽の状態を観察した。温度は25℃、光強度は約75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ （白色蛍光灯）で16時間日長の条件を用いた。

結果と考察

人工種子を透析膜で包む方法としては二重構造の人工種子を透析膜の中に入れるやり方も考えられる。しかし、その方法を試したところ発芽の仕方はあまり良好でなかったため、高濃度のショ糖を含むアルギン酸ゲルのビーズとアルギン酸ゲルで包埋した節切片を別々に作って透析膜に入れる方法を用いた。

透析膜で包んだ人工種子は高濃度ショ糖を含むビーズが中に入っているため、自力で吸水することができる。実際、パーミキュライトに埋め込んだ後、透析膜の内側に水がたまっているものがいくつも見られた。

透析膜で包んだ人工種子は2週間で半数以上が発芽した。ここで言う発芽とは腋芽が成長して葉がアルギン酸ゲルの外に出ることを言っている。Fig.2に21日目の写真を示す。この時期になると透析膜で包んだ人工種子ではシュートが伸長していることが明瞭にわかる。一方、二重構造の人工種子は、節切片は緑色を保っているものの、ほとんど発芽しておらず、29個中1個だけが葉がアルギン酸ゲルの外に出ていた（Fig.2b）。ここで用いた

二つのクローン間で人工種子化したときの成長に差がないことは既に解っているので (Kinoshitaら, 1992)、二重構造の人工種子と透析膜で包んだ人工種子の発芽に違いが起こった原因はクローンの違いではない。

30日目に調査したところ、透析膜で包んだ人工種子は34個すべてが発芽し、シュートは1 cm程度伸長してい

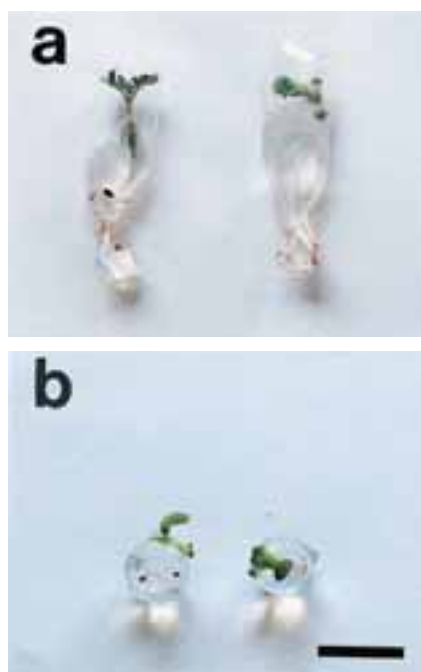


Fig.2. 透析膜で包んだ人工種子 (a) と二重構造の人工種子 (b) の発芽
バー = 1cm

Bud emergence of artificial seeds.

a: Artificial seeds enveloped with dialysis membrane

b: Double layered artificial seeds

Bar = 1cm

た。ところが、二重構造の人工種子は29個のすべてが緑色を維持していたものの、1、2枚の葉が出ていたものが7個、茎頂が確認できるものは1個しかなかった。

今回と同様な実験は今までに数回行っているが、二重構造の人工種子は今回がもっとも良い結果である。前回までは葉がアルギン酸ゲルの外に出る段階まで成長するものはほとんどなかった。二重構造の人工種子は、パーライト上に蒔いた場合を含めて、実験ごとの結果の違いが大きいことが問題であったが、透析膜で包んだ人工種子はどの実験においても再現性良く発芽し、シュートが成長した。このことは透析膜で包んだ人工種子が環境の違いにあまり影響されず、発芽することを示している。さらに、発芽の始まる時期が、透析膜で包んだ人工種子の約10日に対して、二重構造の人工種子では20日以上経過してからであり、かなり遅い。人工種子の発芽に際しては、パーミキュライトが適度な水分を含んでおり、透析膜を用いない通常の人工種子では人工種子から栄養分がまわりに拡散することなど、微生物の繁殖に都合の良

い環境が作られる。その中で、微生物の繁殖よりも先にシュートと根を形成して抵抗力のある完全な植物体になるために、早く発芽が起きることは人工種子の性能としてきわめて重要である。この意味で蒔く場所の微生物の多少など、環境の違いに影響されにくく、発芽が早く起きるといった特性を持った透析膜で包んだ人工種子は、将来自然の種子と同じように地面に蒔くことのできる人工種子を開発するための一つの方向性を示している。

予備的な実験では、透析膜で包んだ人工種子は苗畑から持ってきた土壌に蒔いても20-30%は発芽した。今まで野外の土壌に蒔いて発芽する人工種子の報告は少数はあるが (Redenbaughら, 1991)、企業秘密のためか、その構造や内部に入れる成分は全く報告されていない。自然の植物も根の細胞の細胞膜の選択透過性によって土壌中の水や栄養を取り込んで成長している。人工種子の開発にもそのような方向性が可能なことを本研究の結果は示している。

透析膜で包んだ人工種子は非無菌条件下で良好な発芽を示したが、まだ人工種子としては完成していない。発芽の後発根も起きることは確認されたものの、透析膜が糸で縛られているため根が外に出ることができず、植物体が成長できない。これが今後解決すべき問題である。

引用文献

- Aitken-Christie, J., Kozai, T., and Smith, M.A.L. (1995) "Glossary" In Aitken-Christie, J., Kozai, T., and Smith, M.A.L. (eds.) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. ix-xii
- Bapat, V.A., Mhatre, M., and Rao, P.S. (1987) Propagation of *Morus indica* L. (Mulberry) by encapsulated shoot buds, Plant Cell Rep. 6, 393-395
- Brischia, R., Piccioni, E., and Standardi, A. (2002) Micropropagation and synthetic seed in M.26 apple rootstock () A new protocol for production of encapsulated differentiating propagules, Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 68, 137-141
- Dovzhenko, A., Bergen, U., and Koop, H.-U. (1998) Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks, Protoplasma 204, 114-118
- 木下 勲・斉藤 明 (1989a) アルギン酸ゲルで包埋したシラカンバ腋芽の無菌条件下での発芽, 第41回日林関東支論, 65-67
- 木下 勲・斉藤 明 (1989b) アルギン酸ゲルで包埋したシラカンバ腋芽の非無菌条件下での発芽, 第41回日林関東支論, 69-70
- Kinoshita, I., and Saito, A. (1990) Propagation of Japanese white birch by encapsulated axillary buds 1. Regeneration of plantlets under aseptic

- conditions, J. Jpn. For. Soc. 72, 166-170
- Kinoshita, I., and Saito, A. (1992) "Regeneration of Japanese white birch plants from encapsulated axillary buds" In Kuwahara, M., and Shimada, M. (eds.) *Biotechnology in Pulp and Paper Industry*, Uni Publishers Co., Ltd., Tokyo, p. 493-496
- 木下 勲 (2001) "人工種子の未来" 斉藤 明 (編著) *明日の組織培養*, 林木育種協会 p. 123-144
- Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K., Shigenaga, H., Ohba, K., and Saito, A. (1997) Alginate-encapsulated technology for propagation of the tropical forest trees: *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., *Silvae Genetica* 46, 17-23
- Piccioni, E., and Standardi, A. (1995) Encapsulation of micropropagated buds of six woody species, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 42, 221-226
- Piccioni, E. (1997) Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 47, 255-260
- Redenbaugh, K., Fujii, J.A., and Slade, D. (1991) "Synthetic seed technology" In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 8, Academic Press, Inc., p. 35-74
- Saito, A., and Ide, Y. (1985a) In vitro plantlet regeneration from adventitious buds on induced cuttings of peeled twigs of Japanese white birch, *J. Jpn. For. Soc.* 67, 282-284
- Saito, A., and Ide, Y. (1985b) In vitro plantlet regeneration from adventitious buds induced by petiole culture in Japanese white birch, *J. Jpn. For. Soc.* 67, 373-375
- Sato, T., Ide, Y., and Saito, A. (1986) Tissue culture technology in the rapid clonal propagation of Japanese white birch, *J. Jpn. For. Soc.* 68, 343-346