

氏 名 (本籍) ^{たか}高 ^{やなぎ}柳 ^{けん}謙 ^じ治

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 146 号

学位授与年月日 昭和51年12月9日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 種子の活力検定に関する研究
—とくに種子溶出物法について—

論文審査委員 (主査)

教授 角田重三郎 教授 堀 裕

助教授 高橋成人

論文内容要旨

有用遺伝子源の保存と利用については、近年、自然保護および植物育種のうえから、世界的にその重要性が認識されてきている。そのため先進諸国をはじめ国際機関でも遺伝子源の長期保存を目的とした種子貯蔵室が設けられている。

種子を長期間にわたって安全、かつ合理的に保存するためには、その保存条件を確立するだけでなく、保存中の種子の活力が十分に高いという保証がなければならぬ。種子の活力は、発芽試験によって予測できるが、多数の保存材料について発芽試験を行うことは、労力的にも時間的にも困難である。しかも場合によっては、少量の貴重な材料を発芽試験によって費やしてしまったり、いたずらに再採種をくり返したりして材料の遺伝的構成が変わってしまうことがあれば、保存の目的に沿わないばかりか、貴重な遺伝子源を失う恐れすらある。そこで、できるだけ簡便・迅速に、しかも少量の試料で、ある程度正確に種子の活力を予測する方法の確立が望まれる。

本研究は、以上のような背景のもとで、主にナタネ種子を材料として、発芽力低下に伴う種子の生理・生化学的变化を調べ、簡便な種子活力検定法の開発をはかろうとしたものである。その結果、活力の低下した種子を水に浸漬すると種子外に糖などの可溶性物質を溶出することが分かった。この現象を利用して種子溶出物中の糖を簡便な方法で定量することにより、種子の活力検定が可能となり、これを「種子溶出物法」と名付けた。以下にその方法を提唱するに至った経過とその方法の概要を記す。

1. 種子の活力検定に関する既往の研究

発芽試験によらない種子の活力検定法として既往の代表的な方法のいくつかについて概観した。現在よく使われているテトラゾリウム法、電気伝導度法などにも一長一短がある。とくにアブラナ科種子のような小粒種子に適用できる方法が見当た

らないため、ナタネ種子を材料として新しい方法の確立を試みる必要がある。

II. 発芽力低下に伴う種子中の可溶性成分の変化

種子中の可溶性成分が発芽力の低下に伴ってどのように変化するかを、アミノ酸類と糖類についてペーパークロマトグラフィーによって調べ、さらに糖類の変化をガスクロマトグラフィーによって定量的に調べた。その結果、1) 乾燥種子中に含まれるこれら成分と種子の活力との間には明瞭な関係が認められなかった。2) 活力の低下した種子を水に浸漬すると、アミノ酸類や糖類が種子外に溶出した(図1)。3) 活力の高い種子では、吸水後ショ糖が〔加水分解酵素(インベルターゼ)によって(?)〕加水分解され、生じた単糖が直ちに代謝されるため、みかけ上は種子中のショ糖の減少のみが著しく、単糖の蓄積や種子外への溶出がほとんど認められな

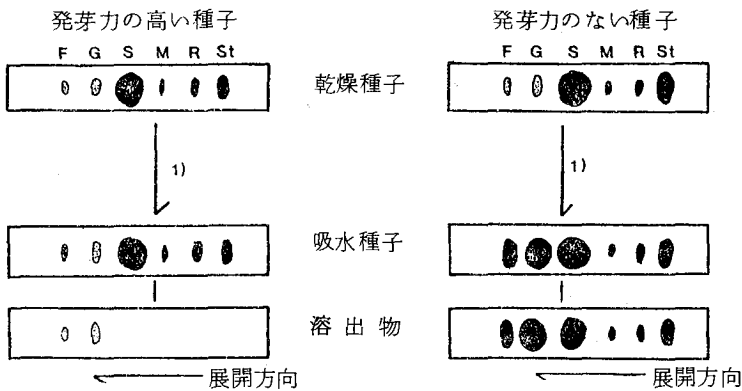


図1 発芽力の異なるナタネ種子の糖組成

乾燥種子、吸水種子および溶出物中の糖のペーパークロマトグラム

展開溶媒：n-ブタノール、酢酸、水(4:1:2)、3重展開。

検出試薬：還元糖にはアンモニア性硝酸銀、ケトースにはレゾルシンの1%エタノール溶液。

1) 種子を滅菌後、30℃で24時間浸漬した。

F：果糖、G：ブドウ糖、S：ショ糖、M：マルトース、

R：ラフィノース、St：スタキオース。

った(図2)。3) 活力の低下した種子では糖の消費が少ないため種子外への単糖の溶出が著しかった(図2)。4) 活力のない種子の場合は、図1にみられるように単糖のみでなく、少糖類も多量に溶出した。

この現象を利用して簡便な種子の活力検定をするには、次の4項目についての確認をする必要があると考えた。

- 1) 種子を水に浸漬したとき、種子外に溶出する糖の量が種子の活力と負の相関を示すかどうか。
- 2) 単糖の溶出に加水分解酵素が関与しているかどうか。関与しているとすればこの酵素は種子の活力とは無関係に活性を保持しているかどうか。
- 3) 活力の高い種子は、加水分解によって生じた単糖を直ちに代謝するが、活力の低い種子は単糖を速かに利用できない。
- 4) 種子中の糖が膜(外被組織)の完全性の喪失に伴い種子外に溶出する。このとき単糖は少糖よりも溶出し易い。

以上のうち4)を除く1)~3)については次章で検討する。4)については膜の性質の変化によると考えられるが、現段階でそれを解明することはできなかった。しかし、現象としては一般的に認められていることなので、本研究ではこれ以上の追求をしなかった。

Ⅲ. 種子の発芽力と糖代謝

1) 種子の発芽力と溶出物中の糖の量

種子を水に浸漬すると発芽力の低いものほど多量の糖を溶出することをアンスロン硫酸法、糖試験紙(ブドウ糖検出紙)を利用する方法で確かめた。浸漬時の温度が高いほど、および浸漬時間が長いほど多量の糖が溶出することを確かめた(図3)。

2) 種子の発芽力と加水分解酵素

ナタネ種子中の可溶性糖は主としてショ糖なので、種子の活力が低下しても種子中の加水分解酵素の活性が保持されていないと、種子を水に浸漬したときブド

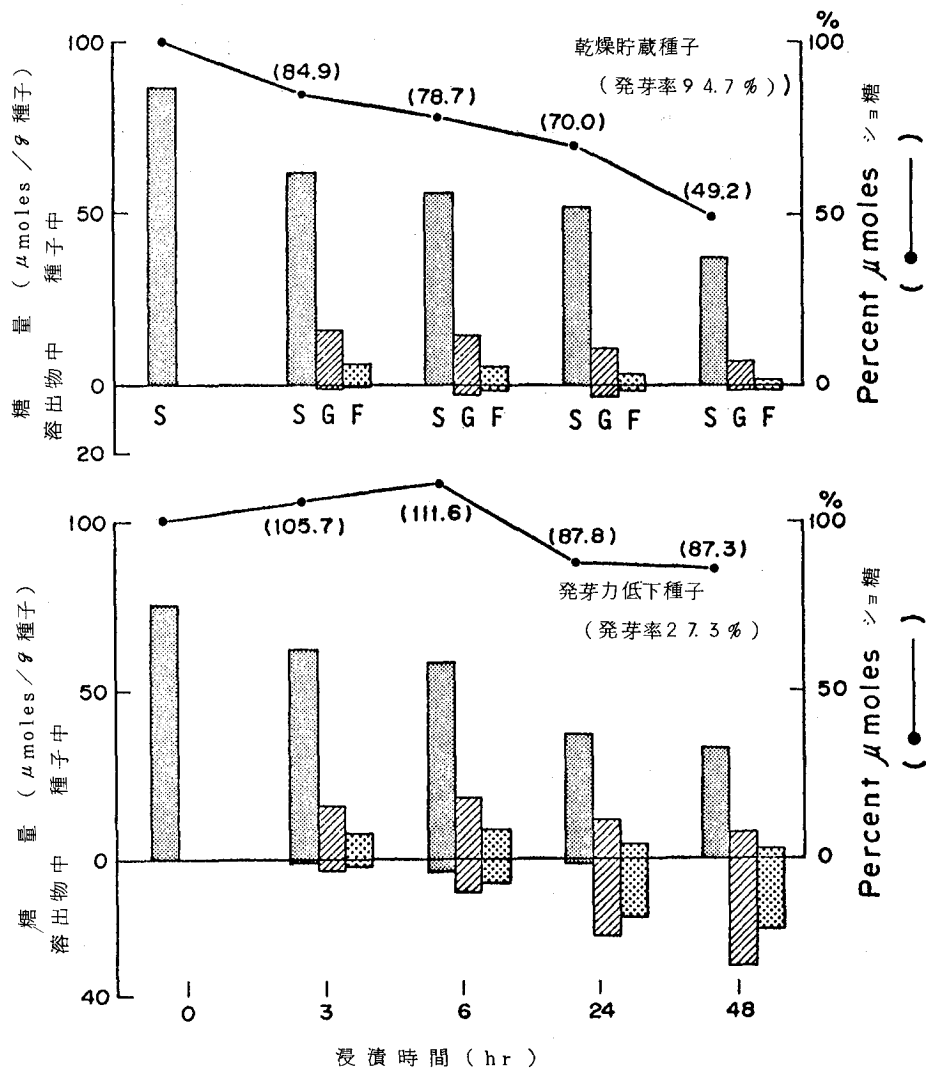


図2 発芽力の異なる種子を水に浸漬したときの種子中および溶出物中の糖組成の変化

糖量は1g種子当たりの μmoles で表した。S:ショ糖、G:ブドウ糖、F:果糖(糖の定量はTMS化糖のガスクロマトグラフィーになった。) 図中の折線は、乾燥種子中のショ糖の分子数を100とし、浸漬時間の経過とともに、種子と溶出物に含まれる全糖の変化をショ糖の分子数に換算し、百分率で示した。

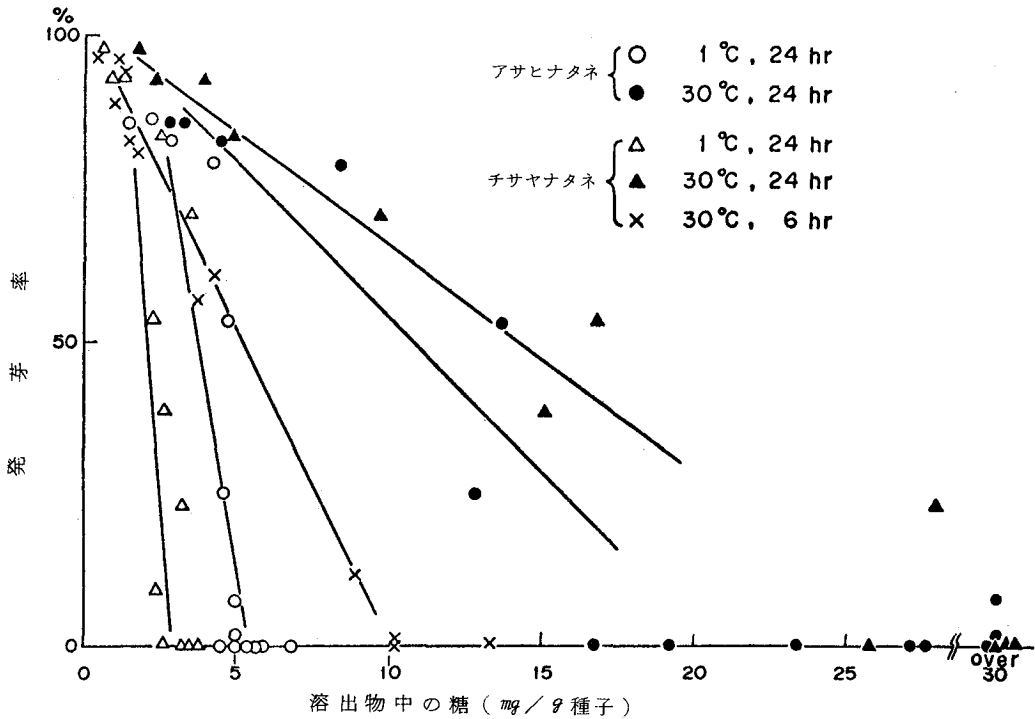


図3 種子の発芽力と溶出物中の糖

溶出物中の糖の定量：一定温度で一定時間種子を水に浸漬したのち、
アンスロン硫酸法によって全糖を定量した。

各浸漬条件での溶出糖量と発芽率との相関は、次の通りであった。

チサヤナタネ、	1℃、24時間	$r = -0.85^{**}$
	30℃、24時間	$r = -0.74^{**}$
アサヒナタネ、	1℃、24時間	$r = -0.80^{**}$
	30℃、24時間	$r = -0.96^{**}$
	30℃、6時間	$r = -0.98^{**}$

ウ糖の溶出が起こらないこともありうる。しかし、劣悪な条件（30℃、相対湿度87%）に18ヶ月間おかれ、発芽力が完全になくなった種子でも、これを水に浸漬すると水中にブドウ糖を溶出することが確かめられた。しかし、種子を加熱処理（120℃、3時間）によって殺し水に浸漬すると、ブドウ糖を溶出する場合としない場合とがあった（図4）。これは加熱処理前の種子含水率に関係し、含水率が低いときには加熱処理によって加水分解酵素が不活性化されないため単

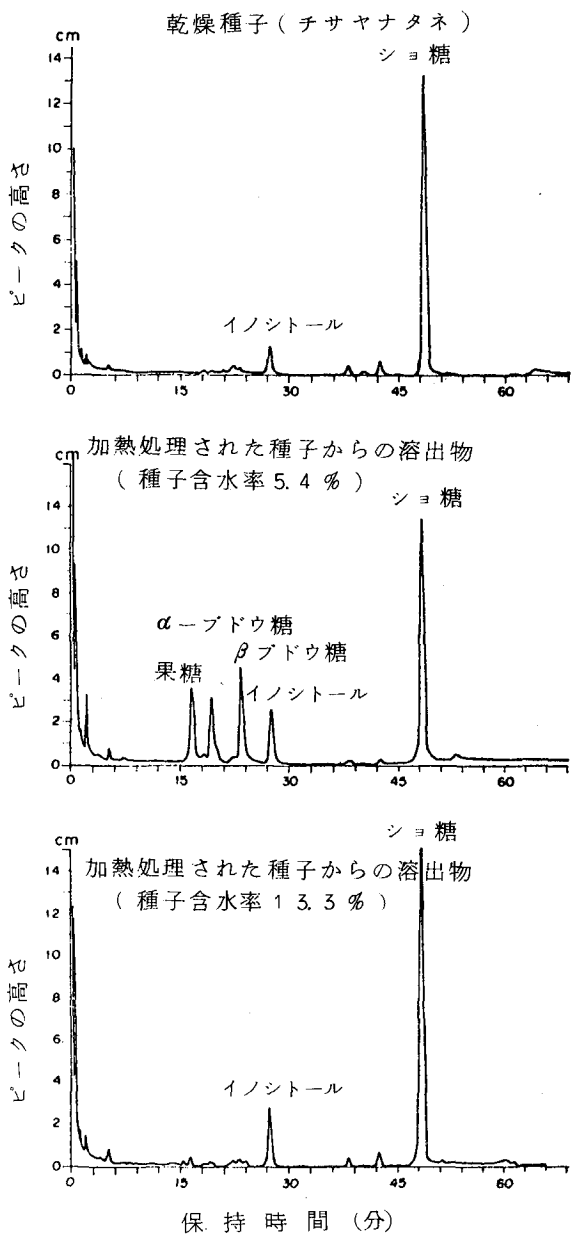


図4 乾燥種子および加熱処理(120℃、3時間)によって発芽力のなくなった種子からの溶出物中の糖組成(TMS化糖のガスクロマトグラム)

加熱処理時の種子含水率によって、水に浸漬(30℃で24時間)したときの溶出物中の糖組成に差がみられる。イノシトールは、糖定量のための内部標準である。

糖を溶出するが、含水率が8%以上だと加水分解酵素が不活性化されるため、単糖は形成されずショ糖のみが溶出すると考えれば説明できる。

このことから単糖の溶出には加水分解酵素が関与し、種子が極端な高温に遭遇しない限り加水分解酵素インベルターゼの活性は保持されるものと考えた。

3) 種子の発芽力と発芽準備期のブドウ糖代謝

吸水時に、種子に ^{14}C でラベルしたブドウ糖を与え、一定時間後に発生した $^{14}\text{C}\text{O}_2$ の量から種子のブドウ糖代謝(酸化)速度を調べた。活力の高い種子は活力の低い種子より、より速くブドウ糖を酸化し(表1)、その酸化経路は、解糖系よりもむしろ五炭糖リン酸経路であることを確かめた(図5)。これは、ブドウ糖の1位の炭素と6位の炭素を ^{14}C で別々にラベルしたものを種子に与え、一定時間後に $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 量の比較(C-6/C-1比)をする方法によった。

表1 活力の異なる種子の発芽初期(0~18hr)における
ブドウ糖-u-¹⁴C → ¹⁴C O₂ の代謝*

(1970年産アサヒナタネ)

種子の発芽力	全CO ₂ 放出量 (m moles)	¹⁴ CO ₂ 放出 (cpm/0.5g種子)
高(91.3%)	0.1540±0.0250	1666.8±292.8
低(49.0%)	0.1795±0.0095	855.2±72.3
なし(0%)	0.0770±0.0120	134.4±3.7

* 0.5gの種子に2mlの水と1μCiのブドウ糖-u-¹⁴Cとを与え、30℃で18時間 incubateし、その間に放出されたCO₂を0.1NKOHで吸収した。塩化バリウムで沈澱させ、濾紙上に集めて乾燥後ラジオーションカウンター(理研科学、RSC-2、E-4)で測定した。

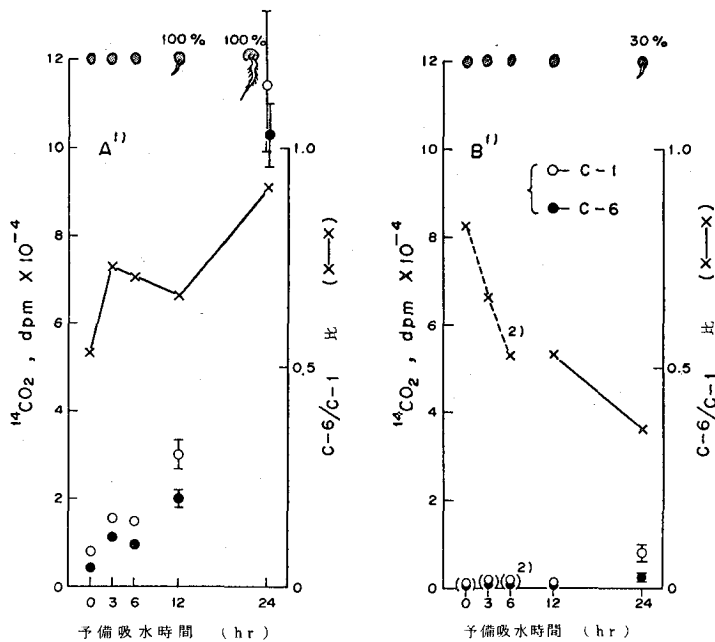


図5 活力の異なる種子の発芽初期におけるブドウ糖-1-¹⁴Cとブドウ糖-6-¹⁴Cの¹⁴CO₂への代謝速度とC-6/C-1比

- 1) 1970年産アサヒナタネ、Aは乾燥貯蔵種子、発芽率98.7%；Bは老化促進処理により発芽率82.0%となった種子。
- 2) 0~6時間の予備吸水後、1g (Bでは300mg)の種子を2ml (Bでは1ml)の水と1μCiのブドウ糖-1-¹⁴Cまたはブドウ糖-6-¹⁴Cとともに30℃で3時間振とう。発生した¹⁴CO₂を20%KOHでとらえ、液体シンチレーションカウンターにより測定した。12~24時間予備吸水種子の場合は、300mgの種子を2mlの水と1μCiのRI(ブドウ糖)とともに上と同様に処置した。

以上のことから、活力の低下に伴って種子の糖代謝機能が低下するため、吸水後シヨ糖の加水分解によって生ずる単糖を消費しきれずに種子外に溶出すること、また活力低下の著しいときは膜の完全性の喪失とあいまって、単糖のみならず少糖類をも溶出するものと判断される(図6)。溶出物中の糖の量、とくにブドウ糖の量は、糖試験紙で簡便に検査されるので種子活力の指標として有望と考えた。

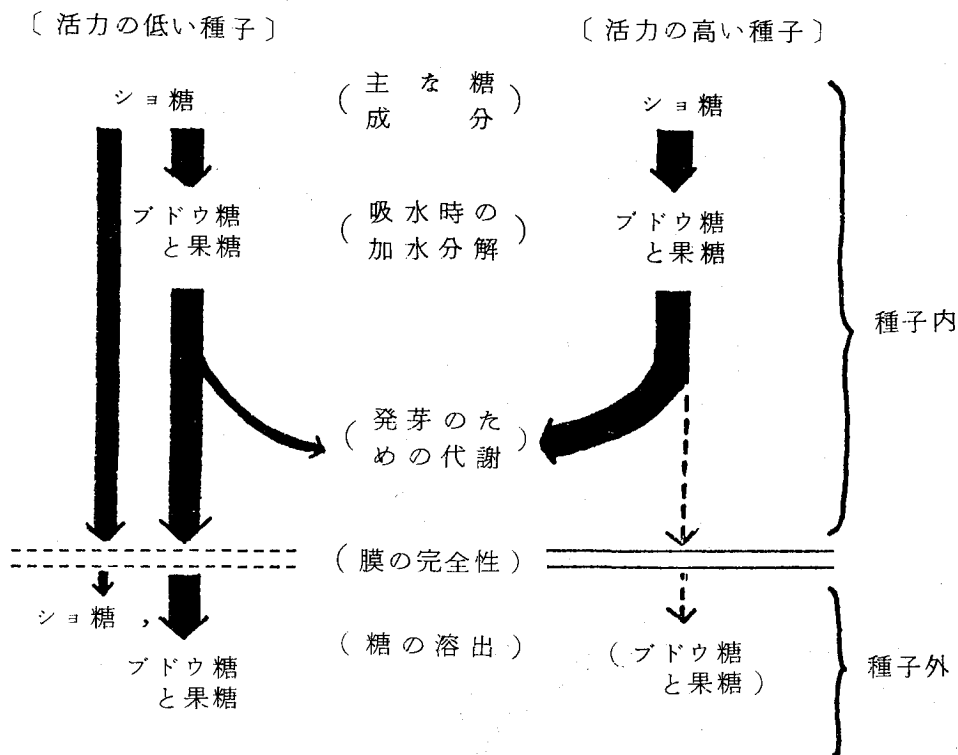


図6 吸水時におけるナタネ種子中の糖の動き

IV. 種子溶出物法による種子の活力検定

前章までの結果をもとに、種子活力検定のための『種子溶出物法 (seed exudate method)』の提唱を行った。それは 1) 重量法 (mass test) と 2) 1粒法 (a single seed test) のいずれかによるもので、一定重量 (または1粒) の種子に、その重量の2倍量の水 (ナタネ種子1粒あたり0.02 ml)

を加え、30℃で6時間（または10～24時間）静置し、テスト・テープ（尿糖試験紙）によってブドウ糖の溶出の多少を検査するものである（図7、8）。テスト・テープの呈色が、例えば黄～黄緑色（指数で0～0.5）では発芽力あり、淡緑色（1～1.2）では発芽力低下、および緑～暗緑色（1.5～4.0）では発芽力なしと判定される。

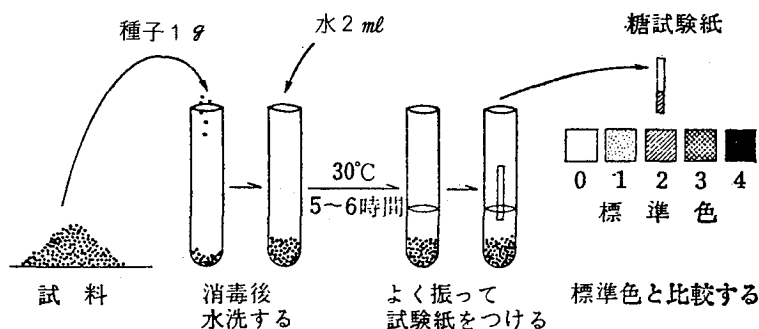


図7 種子溶出物法（重量法）

糖試験紙（テスト・テープ）の呈色程度によって種子の活力が分かる。ブドウ糖の溶出が多いとテスト・テープは緑色～濃緑色（指数1.5～4）になり、種子は発芽力なし、ブドウ糖の溶出が少ないとテスト・テープはもとの色（黄）のままか、黄緑色（0.2～0.5）で、発芽力ありと判定できる。その中間（0.7～1.2）では、発芽力が低下している。

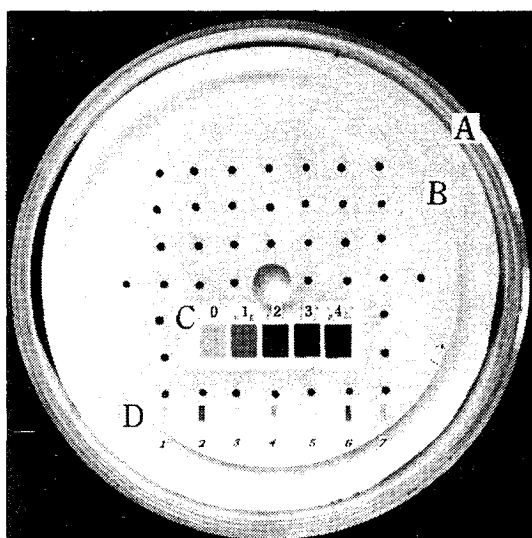


図8 種子溶出物法
（ナタネ種子 1粒法）

径12cmのシャーレ(A)の底に水を入れ、濾紙を敷き、その上に径9cmのプラスチックまたは陶器製の検定板(B)を置く。検定板上には小さな穴（径5mm、深さ3mm）がある。その中に滅菌した種子1粒と水0.02mlを入れ、シャーレのフタをして30℃の恒温器に10～24時間おく。テスト・テープの小片(D)で各種子の溶出物中のブドウ糖の検査をし、標準色(C)と比較し、種子の活力を判定する。

種子溶出物法によると、従来のテトラゾリウム法や電気伝導度法に比べて、より少量の種子でしかも簡便迅速に種子の活力検定ができた。また、種子溶出物法を実際に農業技術研究所種子貯蔵管理室に保存されている育種材料、同遺伝第2研究室に保存中の試験材料に適用したところ、ほぼ満足しうる結果が得られた。とくに採種後の活力検定結果から、その後の貯蔵性の予測も可能なことが分かった。

V. 種子溶出物法の他作物種子への応用

種子溶出物法を数種の野菜種子および禾穀類種子に応用しようとしたが、アブラナ科およびマメ科種子外には適用できなかった。この理由は不明であるが、種子の外被組織の違いなどによるものと考えられる。

ウリ科、ナス科および禾穀類種子を一定時間吸水させ、胚または胚軸を露出してその部分のブドウ糖量をテス・テープにより検査すると、活力の低い種子ではブドウ糖がより多く含まれていた。これは、胚によるブドウ糖利用率の低下によるものと考え、「胚のブドウ糖検査 (embryo glucose test)」と称し、種子の活力検定法として有望であろうと述べた。

VI. 結 論

本研究で提唱した「種子溶出物法」は、1) ナタネのような小粒種子に適用でき、2) 糖試験紙による簡便な方法で、3) 短時間にしかも、4) 種子1粒でも検査できるほどの鋭敏さで、かつ、5) 発芽力が低下し始める極く初めの兆候(ブドウ糖の溶出)をもとらえうるなどの特徴をもつものである。種子溶出物法は、原理的には種子の活力とくに発芽準備期の糖代謝活性、および膜の完全性を反映しているものと考えられる。本法は従来の他の活力検定法の欠点を補い、アブラナ科種子などに十分適用できるものである。

また、遺伝子源の長期保存技術の一環として本法のような簡便・迅速な方法が果たす役割について考察すると、1) まず少量の試料で保存前に活力検定を行うことにより、それ以後の貯蔵性(あるいは寿命)の予測が可能となること、2) その結果

を基に、保存中計画的に活力検定を行い活力低下の兆しが認められた材料については、適宜再採種を行い遺伝子源の喪失を未然に防ぐことが可能となる。しかも、再採種の回数を最少限に止めることができるので、遺伝的変更や人為的過誤をも最少限に止めることができるものと期待される。

審査結果の要旨

著者は、ナタネを材料として、発芽力の低下した種子を水に浸漬すると種子外に糖類、アミノ酸類など可溶性物質が溶出する現象を認め、このうち特に糖類の溶出現象について研究を進め、(1)溶出量には温度、時間が関係するが、発芽力の低いものほど多量の糖を溶出すること、(2)ブドウ糖など単糖の溶出にはショ糖を加水分解するインペルターゼの活性が保存されていることが必要であるが、種子が極端な高温に遭遇しない限りこの酵素の活性が保存されること、また加熱処理(120℃、3時間)による不活性化は種子含水率8%以上で起り、含水率が低いときには起らないこと、(3)活力の高い種子は浸水下で速くブドウ糖を酸化し、その酸化経路は主に五炭糖リン酸経路であること、一方活力の低下に伴って糖代謝機能が低下し単糖を消費しきれず種子外に溶出すること、などをそれぞれ適切な生理学的・生化学的手法によって確かめている。なお、膜の性質変化の実態については追求していないが、著者は糖の溶出には膜(外被組織)の完全性の喪失も関係していると推定している。

以上の研究結果を基に、著者はブドウ糖の溶出量をテス・テープ(尿糖試験紙)で検査して、種子の活力を検定する方法、著者が「種子溶出物法」と名づけた簡便で鋭敏な新しい種子活力検定法を開発した。また、他作物種子に対する応用についても検討し、「胚のブドウ糖検査」の可能性をも指摘している。

近年有用遺伝子源の保存などを目的として種子の長期保存が行なわれているが、それに関連して少量の試料で簡便鋭敏に種子活力低下を予測する方法の確立が望まれている。

本論文は、種子の活力低下と糖代謝活性の変化との関係を追究して新知見を加え、それに基づいて、簡便鋭敏な新しい種子活力検定法を考案し提唱したものであり、著者に農学博士の学位を授与してしめるべきものと認めた。