

# 植物組織を観察する教材としてのハツカダイコン — 子葉組織に見られる核の消失 —

梶原 裕二・山川 さやか\*・田中 渚\*\*

Japanese radish (*Raphanus sativus*) as the material of observing the plant tissues

— disappearance of nucleus in the cotyledon —

Yuji KAJIWARA, Sayaka YAMAKAWA\* and Nagisa TANAKA\*\*

Accepted June 2, 2006

**抄録：**組織の観察実習は生物の体制を理解するのに必要な実習である。今回、新たにハツカダイコンの発芽種子を用いて、双葉の組織を観察する実習を開発した。軟らかい双葉をブロッコリーの茎に挟んで薄切した後、プロピディウム・イオディンで核を蛍光染色して観察した。発根種子はほぼ播種 3 日後には子葉は本来の大きさになり、6 日後には幼軸の成長を終える。播種 12 日後には、子葉が一部黄色化し始め、15 日後には本葉が出現する。組織の観察から、播種 5 日後の子葉では約 10% の細胞が核を含んでいなかった。核をもたない細胞の割合は増加し、播種後 25 日では約 50%、播種後 30 日には約 90% の細胞で核が確認できなかった。本研究から、植物の生活史の時間経過に伴う組織の動的な変化を、子葉の老化という視点で捉える身近な実習が開発できた。

**索引語：**植物組織、子葉、ハツカダイコン、核、老化

**Abstract :** Observations of the tissues in living organisms is important to study their own structures. Using the seedlings of Japanese radish, we have developed an experiment to observe the tissues of the cotyledons. Soft cotyledons are inserted into the stem of the broccoli, then the cotyledon are sliced into thin sections. The nuclei of the sections stained with propidium iodine are observed under a fluorescent microscope. Cotyledons and seeding are grown within 3 days and 6 days after sowing, respectively. Cotyledons changed their color at 12 days after sowing, a leaf appeared at 15 days after sowing. Histological observations showed that 40 % of cells without nucleus at 3 days after sowing, the rates of those were increased with days. Finally, all cells of the cotyledon had no nuclei. Thus, the present experiment was good for the histological observations of the senescence in the plants.

**Key Words :** plant tissue, cotyledon, Japanese radish, nucleus, cell death

---

註) 京都教育大学生物学教室

\* 京都教育大学総合科学課程自然科学コース平成 15 年度卒業

\*\* ファルコバイオシステムズ

## 1. はじめに

多細胞生物の体のつくりを理解するために、組織の構造を顕微鏡で観察する実習は重要なものの一つである。中学校では、教科書に植物の体制を理解する内容として、維管束組織や葉の組織の内容が記述されている<sup>1)</sup>。また、高等学校では、維管束組織や葉の組織の構造を知る実習が記述されている<sup>2) 3)</sup>。動物でも、上皮、筋肉、神経、結合組織という4つの組織として機能分担していることが取りあげられている<sup>4)</sup>。このような学習内容や実習で、多細胞生物が単なる細胞の無秩序な集団ではなく、細胞集団として組織的に機能していることが理解されている。

組織を学ぶ実習としては、植物細胞が硬い細胞壁をもっていることから、安全カミソリで茎や葉を薄切し、茎の維管束を通る水の移動を見る実験や葉の構造を観察する実験がある<sup>2)</sup>。他方、動物の体は軟らかく簡単に薄切できないために、固定、包埋、薄切などそれなりに複雑な実験手順が必要である<sup>5)</sup>。そこで、骨や軟骨組織などの硬組織は、酸で脱灰すると適度な硬さとなり簡単にカミソリで薄切できるために、動物組織の生徒実習で用いられることがある<sup>4) 6)</sup>。簡単な組織実習として、身近なツバキやヒイラギなどの硬い葉を用いた実習は広く行われているが、多様な組織実習が提供されているとは言えず、軟らかい葉を用いた具体的な教材例は多くはない。また、植物の生活史を通じた組織の変化を調べる実習はほとんどない。

さて、生物の実習は材料の調達が季節や天候に強く影響を受けたり、時間をかけて生育を待ったり、野外での採集が必要であったりするなど制約が多い。このような状況から、季節を問わず多数の生徒に十分な量の実験材料をあまり労力を必要とせず準備できることが望まれる。カイワレダイコンの種子は種苗として広く市販され、種子を浸水すれば必要な日時に短時間に材料が入手できる利便性の高い生物材料である。カイワレダイコンの発芽種子を用いた実験としては、高校の生物で、植物ホルモンの影響を調べる実験が教科書に紹介されているが<sup>7)</sup>、他の実験には用いられる例はあまりない。本報告では、入手という点から利便性の高いカイワレダイコンを用いた植物組織の観察実験の開発を試みた。

ところで、植物の成長を通じた変化としては、発芽、開花、結実などが知られている。一方で、発芽した後の子葉の脱落、多年生草類の地上部の枯死、季節に応じた葉の落葉、一定期間後の葉の順序だった枯死も植物の大きな変化である。これらは植物の様々な老化現象である<sup>8)</sup>。老化は生とともに生物の重要な側面であるが、これらの枯死に関する具体的な教材はほとんどない。動物においても、自発的な細胞死はアポトーシスとして知られ、例えば、変態中に見られるオタマジャクシの尾の短縮、哺乳類胚における指間の水かきの消失、また成体に害を及ぼす細胞やX線など外来の要因で傷を受けた細胞の排除など、多くの現象が含まれる<sup>9)</sup>。動物の組織は前述したとおり、組織標本を作製するのに必要な手順があり、限られた授業時間で組織の経時的な変化を観察するには適しているとはいえない。そこで、本研究では、身近な材料であるハツカダイコンの貯蔵器官である子葉を材料に枯死に関する組織変化を観察する実習を検討した。



図1 播種直後



図2 発芽状況（播種後1日；上段、同2日；中段、同3日；下段）

## 2. 材料と方法

市販されているハツカダイコン (*Raphanus sativus*) の種子 (株式会社ウタネ No.359) を用いた。発芽用容器に脱脂綿を敷き、容器あたり種子 5ヶを播種した (図 1)。脱脂綿の表面が乾かないように朝・夜 2 回、霧吹きで散水 (1000 倍希釈した植物活性剤 V-30 (株式会社アイリスオーヤマ) を含む) した。予備実験として、10ヶの種子を 7 日間播種し、発芽状況、幼軸と子葉の大きさの変化を調べた (図 2)。



図 3 ブロッコリーの茎を利用した軟らかい葉の薄切法

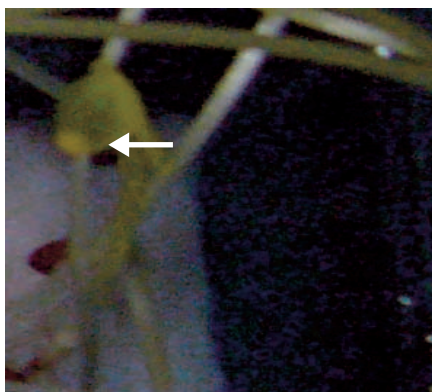


図 4 播種後 12 日に黄色化し始めた子葉 (左) と 15 日に出現し始めた本葉

次に、子葉の組織的な変化を観察するために、5 日おきに同様に 25ヶ播種した。その後、30 日間、時間経過とともに、緑色の子葉を採取し、薄切切片を作成し、柵状組織、海綿状組織の様子を観察した。子葉はやわらかいために、薄切に市販のブロッコリーの茎を利用した。ブロッコリーの茎を適当な大きさに切り、安全カミソリの刃で縦方向に切り込みを入れ、子葉をはさみ、安全カミソリの刃で薄切切片を作成した (図 3)。

切片をスライドグラスに取り、PROPIDIUM IODIDE (P-4170;Sigma 社) で核を蛍光染色した。PROPIDIUM IODINE はリン酸緩衝液で 3mg/ml の濃度に溶解し、室温 15 分間染色した。余分な染色液を蒸留水で流した後、細胞内の核を蛍光顕微鏡 (ECLIPSE-E400; ニコン) で観察し、冷却 CCD カメラ (PENGUIN600CL; ピクセラ) で撮影した。柵状組織・海綿状組織の細胞 50 個以上について、核の有無を観察した。

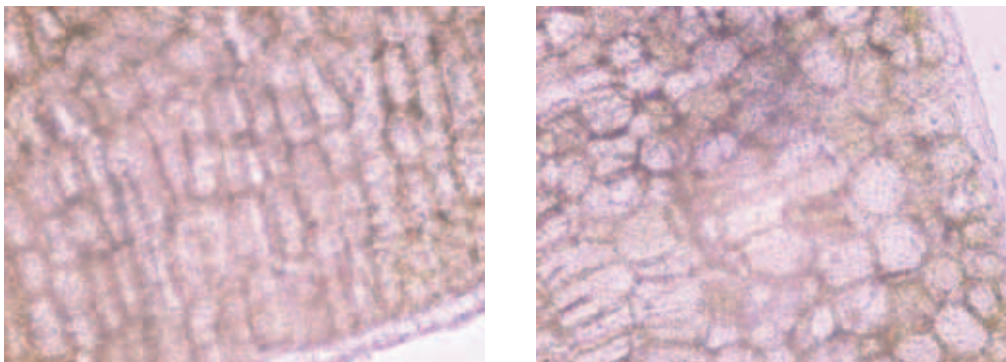


図5 発芽直後（播種後3日）の子葉の網状組織（左）と海綿状組織（右）

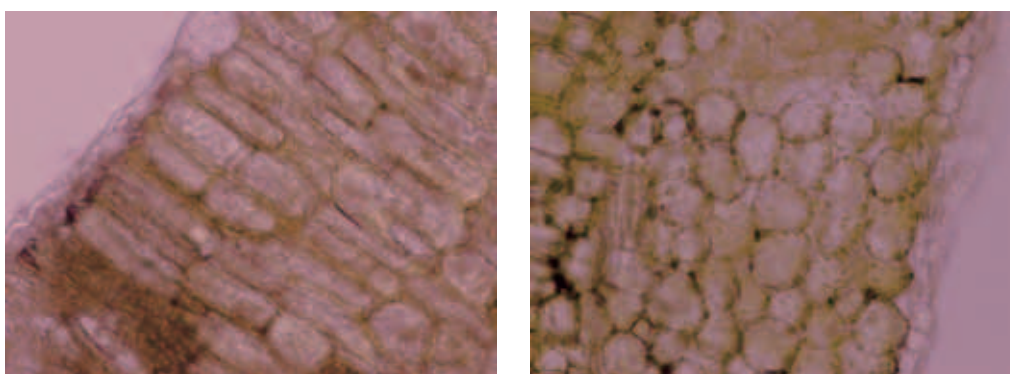


図6 播種後10日の子葉の網状組織（左）と海綿状組織（右）。葉緑体が生じていることがわかり、網状組織や海綿状組織の構造が観察できる。

### 3. 結果

播種した種子は翌日には発芽し始めた（発芽率；約98%）。予備実験として、発芽初期の子葉の大きさ、幼軸の長さを測定した。播種3, 4, 5, 6, 7, 8日後、子葉の大きさはそれぞれ平均6.3 mm, 9.0 mm, 9.6 mm, 8.8 mm, 8.6 mm, 8.2 mmとなり、播種後5日ではほぼ通常の大きさに成長した。子葉が完全に種皮から抜け出る播種3日後では子葉は白色であるが、播種5日後には緑色になった。また、芽生えの幼軸長は、播種後、おのおの平均5.4 mm, 11.1 mm, 55.2 mm, 67.5 mm, 70.6 mm, 66.4 mmとなり、幼軸は播種後約6－7日までに成長し、その後成長を止めた。発芽後、幼軸がほとんど成長しない種子は約25%あった。このように子葉は播種後5日に、また幼軸は播種6－7日に所定の大きさになると思われる。芽生えはその後、播種後12日頃には、子葉の縁が一部黄色く変色するものが出現し始めた。24日目以降では半数以上の子葉が黄色く変色した（図4）。また、播種後15日頃には幼軸端の成長点で本葉が出現した（図4）。播種後3日の白色の子葉のブロッコリーの茎を用いて薄切プレートを作成し子葉組織を観察した結果、網状組織（図5）や海綿状組織（図5）が観察できた。また、播種後10日の緑色の子葉を観察した結果、網状組織と海綿状組織ともに、緑色をした葉緑体が多数存在していた（図6）。このような予備実験の結果から、発芽後5－30日の子葉の組織変化をブロッコリーの茎を用いた薄切法で観察することとした。

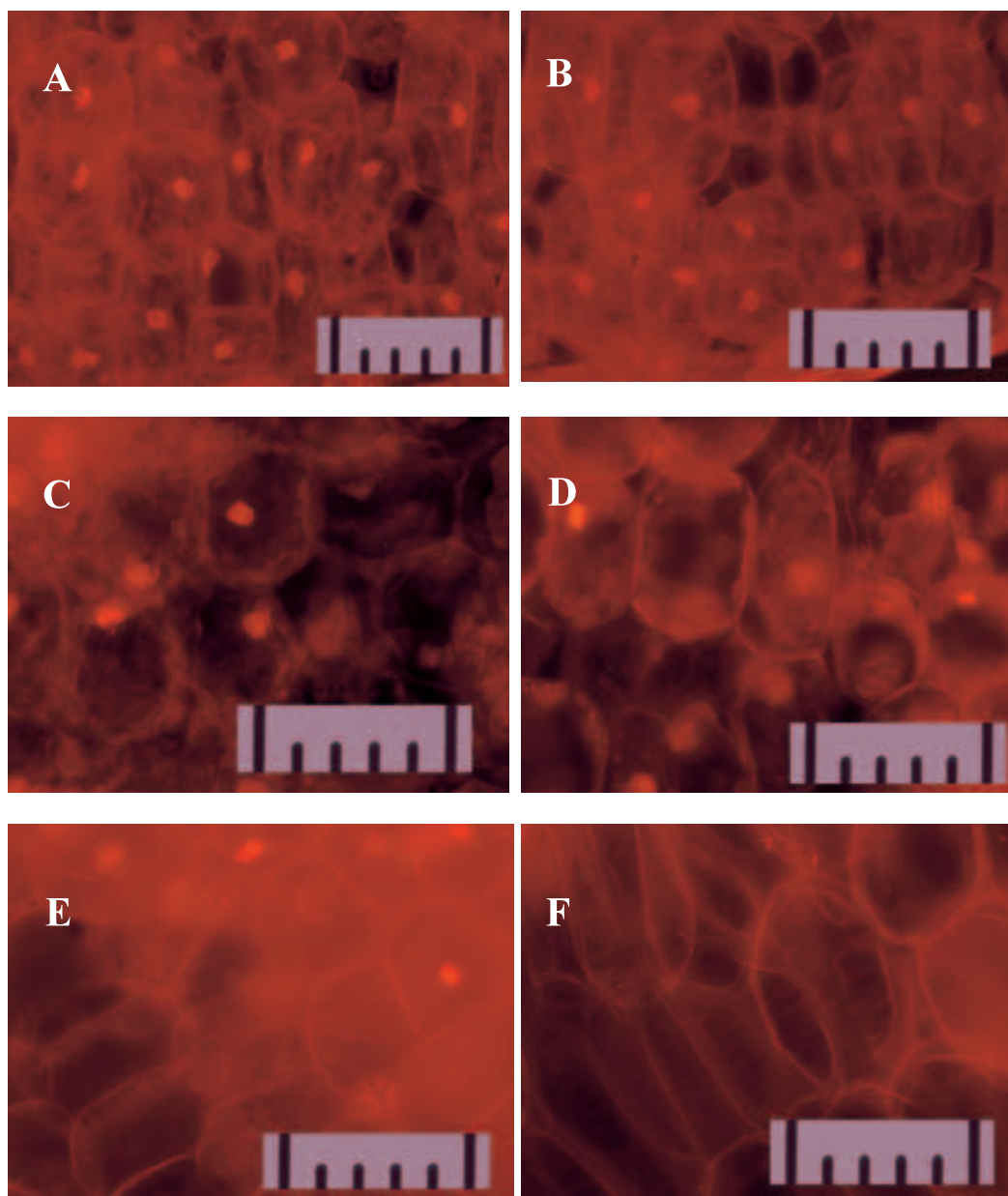


図7 播種後5日 (A), 10日 (B), 15日 (C), 20日 (D), 25日 (E), 30日 (F) の子葉（緑色のもの）の組織像。播種後5日の子葉では、ほとんどの細胞に核が存在するのに対し、15日、20日の子葉では核をもつ細胞が減少し始め、25日、30日の組織にはほとんどの細胞で核が存在しない。スケールは0.01 mm。

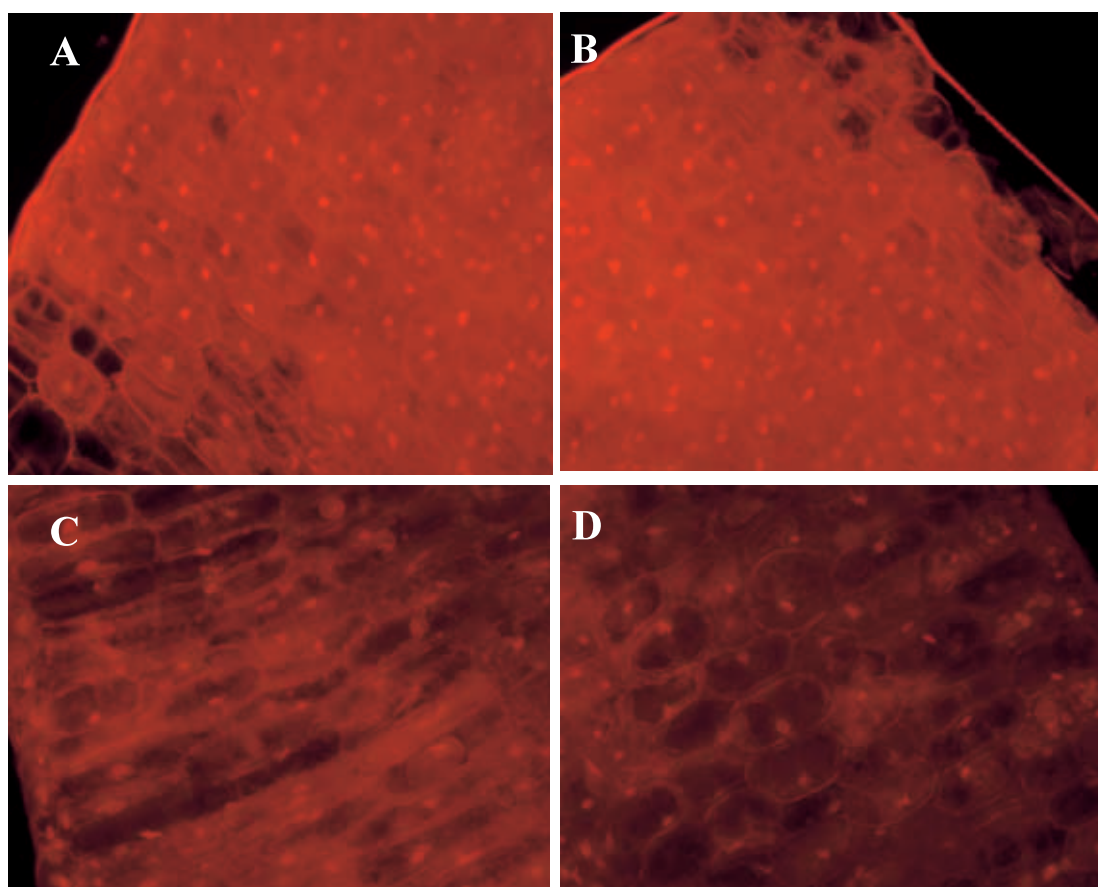
播種後5-30日の緑色の子葉の薄切プレパラートを作成し、柵状組織、海綿状組織の細胞の核を観察したところ、それぞれの組織に核をもたない細胞が存在し（図7）、播種後の日数が経過するにつれて核をもつ細胞が減少した（表1）。発芽直後の5日でも、核をもたない細胞が少数（約10%）存在し、その数は播種後の日数が経過するにつれ徐々に増加し、播種後20日から増加が顕著になり、播種後30日ではほとんどの細胞は核を失っていた（表1）。子葉を構成する各組織の細胞を観察したところ、海綿状組織・柵状組織の間では核をもたない細胞の割合に違いはみられなかった。このように、緑色の

子葉を観察しているにも関わらず，両組織において核を消失した細胞が見られた。

発芽直後の播種後 5 日の柵状組織と海綿状組織を構成する細胞の中では，核は各細胞のほぼ中央に存在し，そのため全体の組織像では核が整然と配置しているように見える（図 8）。しかし，播種後 10 日では，核は細胞の片側に押しやられ，細胞壁に付着しているものが多数見られる（図 8）。そのため播種後 5 日に見られたような整然とした核の配置は 10 日では観察できなかった。

**表 1 子葉の成長と老化に伴う有核細胞の減少**

| 播種後日数                 | 5 日              | 10 日            | 15 日            | 20 日              | 25 日            | 30 日          |
|-----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------|
| 有核細胞 /<br>観察細胞<br>(%) | 91/104<br>(88 %) | 47/53<br>(89 %) | 64/82<br>(77 %) | 120/173<br>(69 %) | 31/60<br>(52 %) | 5/59<br>(8 %) |



**図 8** 播種後 5 日の子葉柵状組織像 (A) と海綿状組織像 (B) と，播種後 10 日の子葉柵状組織像 (C) と海綿状組織像 (D)。播種後 5 日の子葉では，ほとんどの核が細胞の中央に位置する。特に，整然と細胞が配列している柵状組織ではこの状況がよくわかり，各細胞の核が一行に並んで直線上に存在している（図 A の左上方側に 3 列に並んだ核が観察できる）。海綿状組織でも，細胞の中央に核が存在しているため各々の核がほぼ均等に分布している。ところが，播種後 10 日では，核が細胞の一方に押しやられて，整然とした核の配置は確認できない。

#### 4. 考察

植物の組織を観察する実習は多くの場合、比較的薄切しやすいハウセンカやコスモスなどの茎を用いた維管束の観察や、硬いツバキの葉を用いた組織観察が一般的である<sup>1) 2)</sup>。本報告で示した方法によると、硬い葉や茎以外の軟らかい葉でも組織実習に使用できる。通常、植物組織を薄切する際には、ニワトコの髓（ピス）に対象物を挟み、カミソリの刃で切断する。あるいは、発泡ポリスチレンを利用する例もある<sup>2)</sup>。本報告で利用したブロッコリーの茎は食材の余りで費用がかからず大量に手に入る身近な材料であるが、組織実習の材料として紹介された例はほとんどない。薄切すると実感するが、植物の生組織と同様な硬さを持つことや、十分に水分を含むために張りがあることから、水分の多い軟らかい植物組織の薄切については、ニワトコの髓や発泡ポリスチレンに比べ大変都合がよい。例えば、市販の軟らかいダイコンの葉でも、観察に十分な薄切プレパラートが作成できる。また、発芽直後のハツカダイコンの柔らかい白色の子葉も、この方法で観察に十分な薄切プレパラートが作成できる（図 5）。従来から、植物の組織実習といえば、ツバキやヒイラギの硬い葉やハウセンカの茎といった利用しやすい材料が用いられてきた。本研究で示した方法を用いると、上記の限られた植物以外にも、柔らかい葉をもった多様な植物を組織の実習として取り上げることができる。さらに、花の組織切片の観察、多様な植物の葉の比較、あるいは、葉の成長における組織の比較など、従来にない幅広い実習や実験が考えられる。

組織の実習は、生物体の構造を知ることが第一の目的として実施される。しかし、生物は生活史の中でダイナミックに生命活動を行っているため、外見の観察ばかりでなく、内部の組織的な変化を捉える実習があると望ましい。本研究では、身近な材料であり、準備の労力をあまり必要としない、ハツカダイコンの発芽種子を用いることで、発芽後の成長に伴う子葉内の核の変化を観察する実験を示した。開花後に花が枯れたり、結実後に植物本体が枯死する植物の老化<sup>9)</sup>は、日常よく目にするが、教材として利用される例はほとんどない。双葉に関しては、小学校では栽培実習の観察対象とされ、また中学校でも植物の成長・組織を観察する対象とされ、ほとんどの生徒が目にする生物の成長段階である。多くの植物では、双葉は初期の成長を担う栄養貯蔵や栄養供給器官であるが、その重要性にも関わらず、双葉の構造や変化を示す実習はほとんどない。芽生え自体は次世代の始まりの大切な段階であるため、広く教材として取り上げられる。その芽生えを支える双葉に、時間経過とともに細胞死が生じることを観察するこの実習は、生物の複雑な一面を知る機会になるだろう。

今回、ハツカダイコンの子葉は播種後 12 日には一部で黄化が始まり、15 日後頃には本葉も分化し始める（図 4）。播種後 30 日には多くの双葉が黄化する。ハツカダイコンの子葉の観察には、播種後 30 日目まで緑色の葉を用いたが、20 日以後の子葉に核をもたない細胞が増加したことから、子葉の細胞死の進行として、葉緑体の黄化よりさきに核の変化が生じると考えられる。また、播種後 15 – 30 日というある程度決まった時間経過の中で、このような核の消失、黄化現象が生じることは、子葉のおそらく決まっている老化プログラムを考えると興味深い。

また、予備的な実験で、ハツカダイコンの子葉と本葉からカルス誘導を試みた結果、幼軸や本葉からカルス誘導は見られたが、子葉からのカルス誘導は見られなかった。本葉ではカルス誘導用培地で培養を開始して 2 週間でカルスができた。幼軸では培養を開始してから 1 ヶ月でカルスが確認できた。カルスを形成した割合は、本葉（2/54）、幼軸（3/49）、子葉（0/58）であった。例数が少なくカルス形成頻度の比較をさらに検討する必要があるが、子葉からカルス形成が難しい傾向があると思われる。

さらに、双葉の成長の初期段階で細胞内の核の位置が変わるという現象が本実験で確認できた。播種 5 日後の細胞では、核が細胞の中央に位置するが、10 日後になると、核は細胞の一端に細胞壁に接するように位置する。植物細胞が伸長する生長において、液胞に水が入り膨張し、結果的に細胞質や細胞質に含まれる核が細胞の一端に押しやられる現象が知られている<sup>11)</sup>。今回のハツカダイコンの子葉を考えた場合、おそらく子葉が発芽した直後の播種 5 日後から 10 日後にかけて、液胞の膨張と核の移動を伴う、細胞のわずかな生長が生じていると考えられる。

これらのことから、ハツカダイコンの子葉は身近な材料でありながら、植物の生活史をとおした動的な葉の生長と枯死・老化を、実習や観察を通して知ることができる良い教材と思われる。

なお、本文中の組織図は核を赤色蛍光で発色させているため判別しにくいものが含まれる。Web で公開されている紀要のカラー図版を参照されたい。

## 5. 引用文献

- 1) 竹内敬人, 山極隆他 (2004) 中学校理科 2 分野上 (平成 16 年度用) . pp. 20-25. 啓林館 .
- 2) 太田次郎, 本川達雄他 (2002) 高等学校生物 I (平成 16 年度用) . pp. 48-56. 啓林館
- 3) 吉里勝利 (監修) (2004) 最新図説生物 (2004 年度用) . pp. 24-25. 第一学習社 .
- 4) 太田次郎, 本川達雄他 (2002) 高等学校生物 I (平成 16 年度用) . pp. 52-57. 啓林館
- 5) 宇津木和夫, 玉野井逸郎, 吉田治 共編 (1982) 生物の実験法 II —動植物の解剖—初版 12 刷, pp. 188-204. 培風館 .
- 7) 岩波洋造, 森脇美武 (1995) 絵をみてできる生物実験 (第 10 刷) . pp. 52-53. 培風館 .
- 8) 太田次郎, 本川達雄他 (2002) 高等学校生物 I (平成 16 年度用) . pp. 216-217. 啓林館
- 9) L. テイツと E. ザイガー (2004) 植物生理学第 3 版 16 章成長と発生. 西谷和彦, 島崎研一郎 監訳 . pp. 376-379. 培風館
- 10) Jacobson, M.D., Weil, M. and Raff, M.C. (1997) Programmed Cell Death in Animal Development. Cell, 88; pp. 347-354.
- 11) Wolpert, L. (2002) Principles of Development, 2nd ed.; pp. 289-290, Oxford Univ. Press.