

水生植物ヒシモドキの生息域外保全・遺伝資源

の保存に関する研究

－人工栽培法と無菌培養法の確立－

山形県立村山産業高等学校 農業部バイオテク班
○佐々木丈流、熊澤拓哉、○笠井健弘、泉亮太

1. 目的

ヒシモドキ (*Trapella sinensis*) とは、オオバコ科の水生植物である。葉や種子の形状がヒシ科のヒシに類似することからこのように名付けられた。日本の本州から九州、朝鮮半島、中国といった東アジアの暖温帯に分布し、丘陵の池沼に生息している。かつては独立のヒシモドキ科とされていた。また、果実の形態からゴマ科に含められたこともあった。山形県内には村山市内に1箇所の自生地が確認されており、山形県により、絶滅危惧ⅠA類に指定されている。村山市内のヒシモドキの自生地は、農業用水のため池である。近年の猛暑により、ため池の水位は浅く、真夏には自生する場所の水分が無くなるという可能性もある。毎年11月頃の調査では、種子の採取量に大きな変動があり、生育の不安定さが見られる。そのため、ヒシモドキを自生地以外の環境で安全に生育させ、遺伝資源として守る「生息域外保全」は非常に重要な問題であった。ヒシモドキの人工栽培に関する研究は少なく、無菌培養に関する事例は存在しない。水生植物の無菌培養は、無菌的な植物体を得ることが非常に難しい。無菌的な植物体を得るためには、通常、エタノールや次亜塩素酸ナトリウムなどの殺菌剤を使用する。しかし、これらの薬剤は植物の表皮に浸透しやすい。そのため、表皮が柔らかい水生植物の殺菌には不適切であり、植物の枯死を招くとかんがえられる。そこで、私たちは、ヒシモドキを人工的な栽培条件で生育させること、無菌条件の培養環境において継続的に生育させることを目標とした。

2. 材料と方法

実験1：ヒシモドキの人工栽培法の確立（培養液濃度及び切断処理の影響）

供試植物はヒシモドキ (*Trapella sinensis*) を用いた。山形県村山市内ため池（場所は未公開）より2015年8月に採取した。自生地より採取した個体は、流水で洗浄後、約3ヶ月間、栽培容器内で生育させた。栽培は25～30℃程度、蛍光灯下で生育させた。その後、生育したヒシモドキを1節、3節、5節、7節、9節ごとに切断し、3段階の肥料濃度（ハイポネックス2000倍、3500倍、5000倍）において約25日間、栽培した。その後、全長、葉数、節数及び生存数を調査した。

実験2：ヒシモドキの無菌培養法の確立

実験2-1：ヒシモドキの無菌化（種子の殺菌）

実験1の人工栽培において採取したヒシモドキの種子を以下の条件で処理した。すべての実験区において、中性洗剤で30分程度洗浄した。その後、A区では、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素1%）で10分間殺菌し、滅菌水で2回洗浄を行い、培地内に置床した。B区では、70%エタノールに数秒浸漬し、種子に着火し、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素1%）で10分間殺菌し、滅菌水で2回洗浄を行い、培地内に置床した。C区では、超音波洗浄を60分間行い、その後、70%エタノールに数秒浸漬し、種子に着火し、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素1%）で10分間殺菌し、滅菌水で2回洗浄を行い、培地内に

置床した。D 区では、中性洗剤で洗浄後、脱水し、室温で 1 週間程度、乾燥させた。その後、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素 1%）で 10 分間殺菌し、滅菌水で 2 回洗浄を行い、培地内に置床した。これらの実験で種子を置床した培地は、1/10 強度の Murashige&Skoog(1962)培地(以下 MS 培地)である。その後、2 週間程度生育させ、コンタミネーションについて測定した。

実験 2-2：ヒシモドキの無菌化（無菌状態の植物体の維持）

山形県村山市内のため池より採取したヒシモドキの種子を流水条件（水道水）で 3 ヶ月程度、洗浄した。そして、脱水し、室温で 1 週間程度、乾燥させた。その後、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素 1~5%）で 10 分間、洗浄した。滅菌水で 1 分間洗浄し、それを 3 回繰り返した。殺菌した種子を 1/5 および 1/10 強度の MS 培地に置床し、培養した。培養開始から 25 日後に発芽数を測定した。

実験 3-1：無菌条件における効率的な増殖方法の確立（培地支持剤の影響）

実験 2 において発芽したヒシモドキの植物体を材料とし、1/10 強度の MS 培地に置床した。これらの培地には、0.4%のゲランガムを添加した固体培地区、0.2%のゲランガムを添加した半固体培地区と培地支持剤を入れていない液体培地区を設けた。植物体は 1 節ごとに切断し、移植した。培養開始から 25 日後に生存数、根数、葉数、全長を測定した。

実験 3-2：無菌条件における効率的な増殖方法の確立

（切断節数および培地支持剤の影響）

実験 2 において発芽したヒシモドキの植物体を材料とし、1/10 強度の MS 培地に置床した。これらの培地には、0.4%のゲランガムを添加した固体培地区、0.2%のゲランガムを添加した半固体培地区と培地支持剤を入れていない液体培地区を設けた。植物体は 1~5 節ごとに切断し、移植した。培養開始から 25 日後に生存数、葉数を測定した。

3. 結果

実験 1：ヒシモドキの人工栽培法の確立（培養液濃度及び切断処理の影響）

実験中の個体数の減少は、3 節・2000 倍区、3 節・5000 倍区、5 節・5000 倍区において、見られた。特に 5 節・5000 倍区で最も高かった。

節数では、すべての実験区において、増加を示した。1 節区において、423%の増加を示し、最も高い数値であった。3 節・3500 倍区と 3 節・5000 倍区においても 140%以上の増加を示した。また、5 節区、7 節区、9 節区では、1 節区や 3 節区に比べて増加率が低かった。

葉数では、すべての実験区において増加を示した。1 節区と 7 節区において 500%以上の増加を示した。3 節・3500 倍区、3 節・5000 倍区、5 節・5000 倍で 140%以上の増加を示した。

全長では、すべての実験区において増加を示した。1 節区において 361%の増加を示し、最も高い数値であった。また、3 節・3500 倍区、3 節・5000 倍区と 7 節区において 100%以上の増加を示した。

実験 2：ヒシモドキの無菌培養法の確立

実験 2-1：ヒシモドキの無菌化（種子の殺菌）

A 区および B 区においては、コンタミネーションが発生し、無菌化率は 0%であった。また、C 区では、14%が無菌化に成功した。さらに、D 区では、80%の無菌化率を得ることができた。

実験 2-2：ヒシモドキの無菌化（無菌状態の植物体の維持）

MS 培地を用いて培養を行った場合、どのような殺菌条件でもコンタミネーションが発生した。また、1/5MS 培地では、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素 3%）において 50%の生

存率であった。さらに 1/10MS 培地では、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素 3%、5%）において、50%以上の生存率であった。

実験 3-1：無菌条件における効率的な増殖方法の確立（培地支持剤の影響）

根数は、液体培地区では最も多かった。半固体培地区では、固体培地区より多かった。固体培地区では見られなかった。葉数では、すべての実験区で違いがなかった。全長では、液体培地区と半固体培地区で違いはなかった。液体培地区と半固体培地区は固体培地区より大きかった。

実験 2 において発芽したヒシモドキの植物体を材料とし、1/10 強度の MS 培地に置床した。これらの培地には、0.4%のゲランガムを添加した固体培地区、0.2%のゲランガムを添加した半固体培地区と培地支持剤を入れていない液体培地区を設けた。植物体は 1 節ごとに切断し、移植した。培養開始から 25 日後に生存数、根数、葉数、全長を測定した。

実験 3-2：無菌条件における効率的な増殖方法の確立

（切断節数および培地支持剤の影響）

葉数は、液体培地区では、1 節区よりも 3 節区と 5 節区において多かった。3 節区と 5 節区に差はなかった。半固体培地区に差はなかった。固体培地区では、1 節区よりも 3 節区で多かった。5 節区と他の実験区では差がなかった。各切断処理区においては、液体培地区が最大で、次に半固体培地区、固体培地区と少なくなった。

4. 考察

実験 1：ヒシモドキの人工栽培法の確立（培養液濃度及び切断処理の影響）

すべての切断処理の中で、1 節ごとの切断によって植物体が大きく成長した。また、切断処理の節数が増加すると植物体の増加が抑制される傾向にあった。肥料濃度が高いことによって植物体が大きく成長する傾向にあった。しかし、5000 倍においてはその影響が現れなくなる傾向にあった。また、切断節数が増加することで、植物体の成長にも影響が現れにくくなる傾向があった。これらのことから、肥料濃度 5000 倍や切断処理 5 節、7 節などが植物体の成長を抑制すると考えられる。本実験からは、1 節や 3 節の切断処理によって、肥料濃度が 3500 倍程度の場合に最も効率的に増殖が可能であることがわかった。

実験 2：ヒシモドキの無菌培養法の確立

実験 2-1：ヒシモドキの無菌化（種子の殺菌）

ヒシモドキの種子を無菌化する場合には、次亜塩素酸ナトリウムやエタノールなどの殺菌剤を単用することは効果がないと考えられる。これらの処理は種子を死滅させる可能性もあるため、濃度や殺菌時間を増加させることも現実的ではない。これらのことから、ヒシモドキの人工栽培で得た種子であっても表面に多くの雑菌が付着していることがわかった。また、超音波洗浄により、若干の無菌化は可能となったが、最も効果的であったのは、洗浄後の乾燥であった。この結果は、中性洗剤による洗浄後も種子に付着する雑菌が表面殺菌によって若干は低減されたことがわかる。しかし、それでは不十分であり、残存する雑菌を乾燥処理によって死滅させることができたと考えられる。

実験 2-2：ヒシモドキの無菌化（無菌状態の植物体の維持）

MS 培地の培地濃度が高い場合、コンタミネーションが多く発生した。表面には殺菌しきれていない雑菌が未だに存在し、高い培地濃度に反応し、増殖したと考えられる。1/10MS 培地では、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素が高くなると無菌化と発芽率が増加する傾向にある。

実験 3-1：無菌条件における効率的な増殖方法の確立（培地支持剤の影響）

固体培地においては、根の発生が見られなかった。これによって成長が抑制され、全長が小さかったと考えられる。半固体培地と液体培地の全長に違いはなかった。根数には違いはあったものの、根数が全長などの生育に影響は与えないと考えられる。ヒシモドキは水生植物であるため、液体培地での成長が本来の生育スタイルに近く、最も良い成長を示したと考えられる。

実験 3-2：無菌条件における効率的な増殖方法の確立

（切断節数および培地支持剤の影響）

各培地区において、切断処理では、3節区が最大であり、5節区とは差がない、または、半固体培地区および固体培地区では下がる傾向にあった。切断処理が1節の場合は、液体培地でも半固体培地でも差はない。固体培地では、葉数が低下しているが、これは酸素の吸収のしやすさが影響したと考えられる。植物体が大きくなる3節区や5節区では、酸素や養分吸収のし易い液体培地区において多い傾向にあった。

5. 総合考察

ヒシモドキの人工栽培においては、培養液の肥料濃度が高すぎることで生育を抑制することがわかった。さらに、増殖を試みる場合は、切断節数が多いとその後の生育を抑制し、少ないと促進することがわかった。これらの結果より、人工栽培を行う場合は、1節または3節で切断し、肥料濃度3500倍程度で栽培することが最も効率的に増殖できることがわかった。

ヒシモドキの無菌化においては、種子を十分に洗浄し、表面の雑菌を低減させた上で、乾燥処理によって死滅させたあとに、殺菌剤処理を行うことが効果的であることがわかった。また、培地濃度が低い1/10MS培地を使用することによって、雑菌の繁殖を抑制することに効果的であることがわかった。さらに、液体培地を用いることで、根数や全長が増加した。これらの結果より、ヒシモドキを無菌化する場合は、1/10MS培地を用いて、種子を洗浄し、乾燥処理後に殺菌処理を行うことが重要であることがわかった。さらに、無菌条件で植物体を継代培養する場合は、3節から5節程度で切断し、液体培地で培養することが適切であることがわかった。半固体培地や固体培地も培養可能であるが、効率的ではなく、増殖スピードが大きく減少すると考えられる。ただし、試験管内保存などの方法としては、固体培地への置床が可能であり、長期保存を行う上で生育スピードを低下させ、有効であると考えられる。

これらの結果から、生息域外保全に有効な人工栽培法と無菌培養を確立することができた。さらに、無菌化と無菌培養法の確立については既知の報告がなく、初めての報告となる。これらの方法の確立によって、気候の変化や環境の悪化に影響されない遺伝資源の保存や効率的な生息域外保全の確立につながる非常に大きな成果であると考えられる。