

イロハモミジ (*Acer palmatum*) の無菌培養

大阪府立園芸高等学校バイオサイエンス科

バイオ研究部 3年 金市 健

＜序論＞カエデ(イロハモミジ)は、日本庭園植栽として利用され、箕面国定公園では観光的な景観を構成する重要な植物資源となっている。バイオ研究部では新たなインビトロプラントの資源としての可能性がカエデにあると考え、無菌培養化の実現に向けて研究を始めた。バイオ研究部の寺田は2019年に採種したカエデ種子を用い、無菌は種を試み、種子殺菌が困難であることと、種子を低温処理することで発芽促進されることを報告している。

本研究では、寺田が播種し、コンタミ状態で寒天培地上で発芽した実生を再殺菌処理により無菌化を試みるとともに、無菌化に成功した株を用い、培地中の糖条件について検討を行った。また、2020年9月に採種し、再度種子殺菌実験を行った。

＜材料＞2019年12月2日に採種し、9週間後低温処理した後、25℃、コンタミ状態で発芽した実生を2月17日の時点で再殺菌実験に使用した。再殺菌実験で無菌化に成功した株を3月31日の時点で培地中の糖濃度検討実験に使用した。2020年9月、環境緑化科が管理するイロハカエデ標本樹から採種し、この種子を種子殺菌実験に使用した。2020年11月10日から2週間ごとに3反復、イロハカエデ標本樹から採種し、それぞれ9週間低温処理した種子を発芽試験に使用した。発芽試験より獲得した発芽実生を実生殺菌実験に使用した。

＜方法＞

【実験1:発芽実生の殺菌処理】雑菌が発生した寒天培地上で発芽した実生にアルコールスプレー後、1%アンチホルミンで5～30分殺菌した後、滅菌水で濯ぎ、H培地に置床した。その後25℃で5週間培養した。

【実験2:培地中の糖条件】実験1で得られたカエデ無菌株を草丈により5階級に分け、スクロース濃度0、3、6%濃度のH培地に各階級の株を植え、12週間25℃で培養した。

【実験3:高濃度アンチホルミンによる種子殺菌】種子を1～5%のアンチホルミンで10～20分間殺菌後、滅菌水ですすぎ、シャーレ内の寒天培地上に置床した。その後、シャーレを5℃の低温条件に0～9週の間置いた。低温処理の後、25℃の24時間の蛍光灯照明下で培養を行い、4週間観察を行った。

【実験4:カエデ種子の発芽率の検証】シャーレ中に濡らした不織布、濾紙を置き、濾紙上に5℃を低温条件に0～9週間低温処理を行ったカエデ種子を置床した。その後25℃の24時間の蛍光灯照明下で培養を行い、2週間観察した。

【実験5:アンチホルミンによる実生殺菌】実験4で得られたカエデの実生を1、2%のアンチホルミンで10～20分殺菌後、滅菌水ですすぎ、三角フラスコ内のH培地上に置床した。その後25℃の蛍光灯照明下で培養を行い、4週間観察を行った。

【実験6:緩効性肥料による長期培養の可能性】H培地に緩効性肥料(マグアンプK)を添加した6区分の培地を作成した(すべての区分においてスクロース濃度は3.0%とする)。

各区分の内容は表1に示した。作成したH培地に無菌株を置床した後、25℃で培養し、2週間ごとに観察記録を取った。

＜結果＞

【実験1】発芽実生の殺菌処理の結果を表2に示した。

表2.有効塩素濃度1%アンチホルミンを用いた発芽実生の殺菌処理

殺菌区分	供試数 (株)	コンタミ (本)	無菌化	
			枯死 (株)	生育 (株)
5分	13	3	6	4
10分	13	5	1	7
20分	13	3	0	10
30分	13	3	5	5

【実験2】培地中のスクロース濃度がカエデの生育に及ぼす影響の結果を図1に示した。

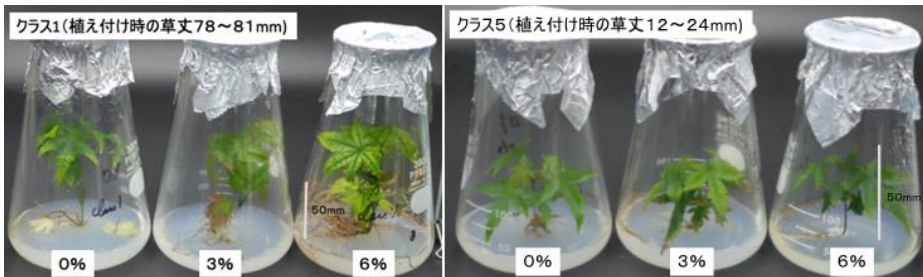


図1.スクロース濃度の異なる培地中でカエデを12週間培養後の様子

培地の糖濃度によってカエデの成長をコントロールすることができなかった。葉の退色、変色がいずれの条件でも発生し、これを解消したい。

【実験3】高濃度アンチホルミンを用いた種子殺菌実験の結果を表3に示した。

表3. アンチホルミン濃度と殺菌時間がカエデ種子の殺菌におよぼす影響

塩素 (%)	時間 (分)	植付け試験 管数 (本)	コンタミ (本)	無菌化 (株)	
				枯死	生育
1	10	47	47	0	0
2	10	25	25	0	0
2	20	18	17	1	0
5	10	25	23	2	0

有効塩素濃度2%と5%で無菌状態の試験管が成立したが、いずれの試験管も種子は発芽しなかった。設定した範囲で無菌状態で生育する株を得ることはできなかった。

【実験4】カエデ種子の発芽率の検証の結果を図2に示した。

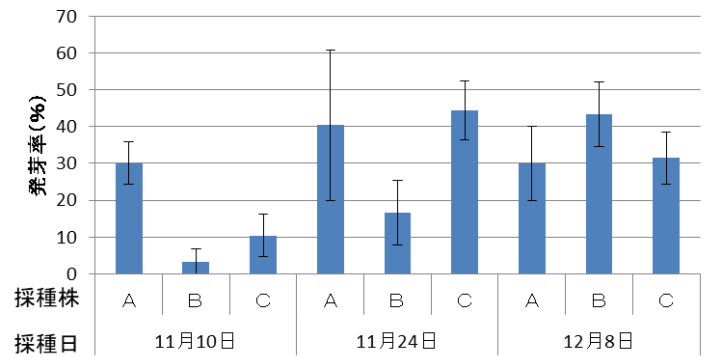


図2.カエデ種子の発芽率

A株は11月24日以降、B株は12月8日、C株は11月24日以降で発芽率が最大となった。

【実験5】アンチホルミンによる実生殺菌の結果を表4に示した。

表4. アンチホルミンの長時間処理によるカエデ種子の殺菌処理

塩素 (%)	時間 (分)	植え付け本数 (本)	コンタミ本数 (株)	無菌	
				枯死(株)	生育(株)
1%	10	14	6(43%)	2(14%)	6(43%)
	20	15	5(33%)	3(20%)	7(47%)
2%	10	14	5(36%)	2(14%)	7(47%)
	20	13	1(8%)	4(31%)	8(62%)

【実験6】無菌培養培地への緩効性肥料添加がカエデの草丈の伸長及び、葉数の増加、葉の退色・変色に及ぼす影響を図3、4、5に示した。

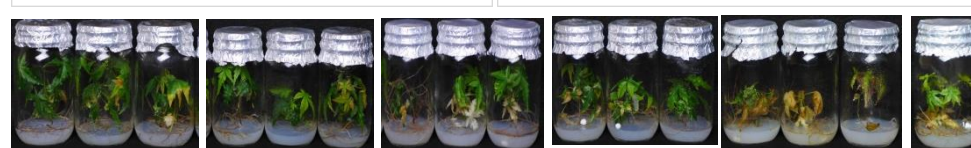
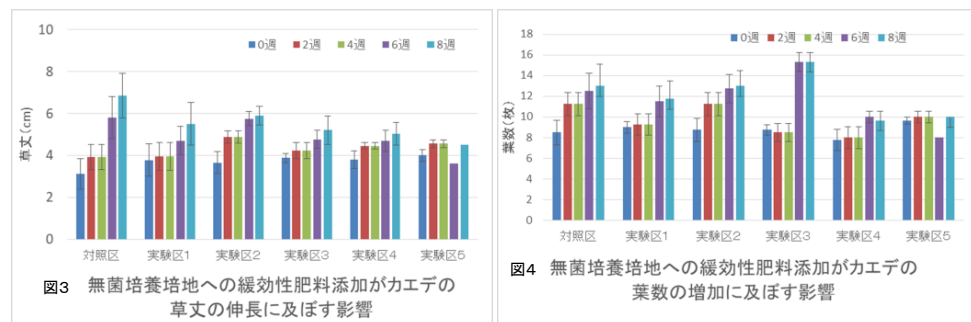


図5. 実験6の各区分における8週間培養後のカエデ植物体の様子

対照区と実験区1～5を比較すると、すべての実験区において、草丈の生長に抑制効果がみられる。また、葉数の増加については、対照区が順調に増加していることに対して、実験区4,5は増加に抑制がみられた。実験区1,2,3は、4週目までは増加に抑制がみられたが、最終的に対照区と同等の水準まで葉数が増加した。写真から、実験区2,3の葉の退色、変色を抑制されているのが分かる。

＜まとめ＞

- 発芽実生を殺菌処理することでカエデの無菌株をえることができた。
 - H培地中の糖濃度による成長速度に差はなかったが、3ヶ月の培養で栄養障害が散見した。
 - カエデを無菌植物とするためには、種子の段階ではなく、発芽後の実生の段階が殺菌に適している。
 - カエデの採種時期は、株間での成熟差が少ない12月上旬が適している。
 - 無菌培養中の成長抑制の方法として、培地の糖濃度は期待できない。しかし、緩効性肥料の添加は葉の退色防止を含め期待できる手法である。
- [参考文献]寺田亜郁. 2019 モミジ種子の低温処理による発芽促進, BS科バイオ研究部研究レポート