

無菌マゴケの大量増殖技術の開発

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年安原花耶

研究の経緯 令和元年から2年にかけてコケの効率的な増殖方法として無菌培養による大量増殖技術を適用するための基礎的知見を得ることを目的とした実験を行った。その成果をもとに、私たちはより効率的増殖の具体的な技術としてあらたな成長調整物質の可能性について研究した。

実験1. 配偶体の植物ホルモン実験 (培養8週間)

1000倍希釈H培地に2,4-D、IAA、NAA、BA、GAの植物ホルモンをそれぞれ1mg/Lで添加したものと無添加の6区分の培地を準備した。胞子嚢から得たコケを分割し各ホルモンをいれた培地に置床した。25℃、24時間蛍光灯照明下で8週培養した。

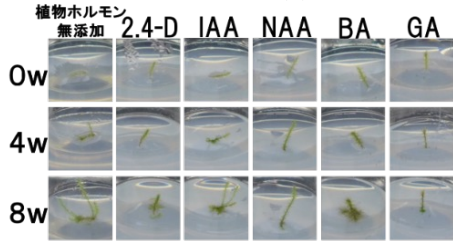


図1. 配偶体の植物ホルモンの種類別の生育の様子

結果 植物ホルモン無添加と、植物ホルモン添加の間で生育に差はみられず、原始的なコケに植物ホルモンに対する感受性は認められなかった。

実験2. DNA分析によるマゴケの同定

実験に用いたマゴケの抽出DNAに対し、植物用ユニバーサルプライマー数種を用いPCRを行った。PCR増幅できたrbcL領域についてダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定し、NCBI(アメリカ国立生物工学情報センター)のサイトで相同検索を行った。

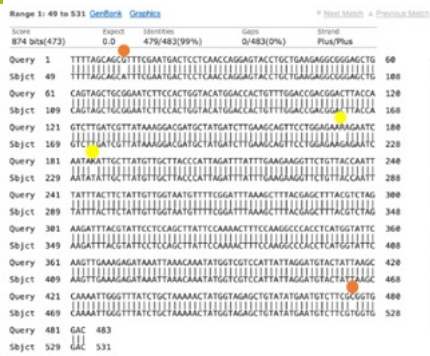


図2. ダイレクトシーケンシングによる得られた供試マゴケ株のITS領域塩基配列 (Query/1-483bp) とNCBI相同検索サービスで検出された *Pseudoscleropodium purum* の塩基配列 (Sbjct/49-531) のアライメント
●:置換 ●:解析エラー

結果 配列が100%一致するアクセッションはなかった。一致率の高いものは、99%一致の *Pseudoscleropodium purum* ヒヨウノオゴケ (マゴケ亜綱ハイゴケ目ツヤゴケ科) であった。

実験3. 植物ホルモンによる影響

実験2では12週間で違いを得ることができなかったため48週目まで継代培養を用いて観察を行った。実験2と同じ条件で行った。

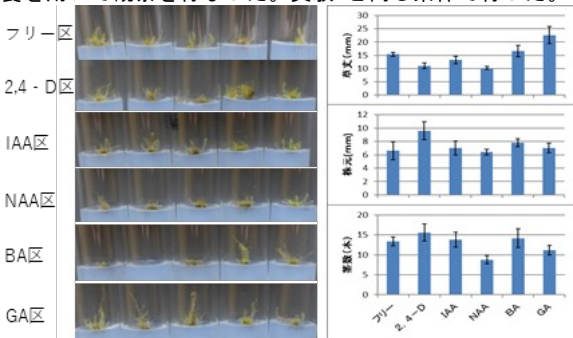


図3. 無菌培養下48週目のマゴケの成長に及ぼす植物ホルモンの影響

結果 培養開始後8週目の観察では、その差異は認められなかった。IAA、BA区は、ホルモンフリー区に比べ明らかな違いはなかった。2,4-D区は株元の直径を大きくし、草丈は小さくなった。NAA区は茎の数が減少し、草丈は小さくなった。GA区は草丈が大きくなった。

研究の成果

無菌マゴケ作出技術の開発
外生の生理活性物質に反応することを発見
共生糸状菌のコケ成長調整物質の可能性を発見

研究の課題

成長速度を上げるための培地条件の検討

謝辞

兵庫教育大学大学院名誉教授渥美先生、バイオサイエンス科教諭西村先生お忙しい中研究についてご助言いただき、ありがとうございました。

実験4. 分離糸状菌の接種によるコケの成長の影響

・ブイヨン培地上で得られた菌: K1-1株、K1-2株
・酵母カビ培地上で得られた菌: K1-3株、K1-4株
無菌コケ茎葉体を1000倍希釈H培地に置床後、各株を接種し、25℃、24時間蛍光灯照明下で13週間培養を行なった。

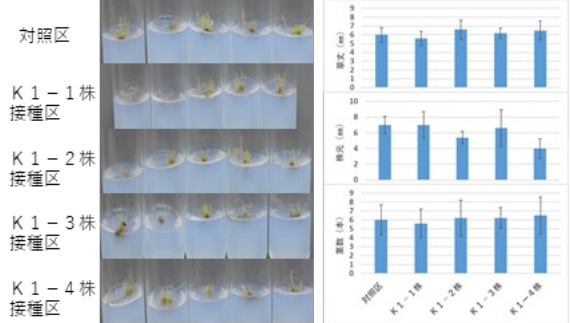


図4. 分離菌の接種がコケの成長に及ぼす影響

結果 K1-1株、K1-2株、K1-3株、K1-4株とも接種区は対照区と差はなかった。なお、コケの成長に阻害または影響を及ぼす効果も見られなかった。

実験5. 分離糸状菌の破碎液によるコケの成長の影響

菌体を10倍量の蒸留水で約30秒ミキサーで破碎した。破碎した菌体を濾過し、得られた破碎液を10%50%にそれぞれ純水で希釈し、1000倍希釈H培地の溶媒とした。破碎液を添加したH培地に無菌状態のコケを植え付け、25℃、24時間蛍光灯照明下で13週間培養を行った。

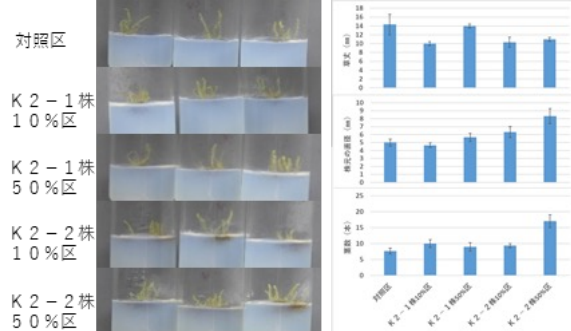


図5. 破碎液添加が13週目のコケの成長に及ぼす菌の影響

結果 K2-1株ではいずれも対照区に対して成長を促進させる効果はみられなかった。K2-2株の草丈はいずれの区分も明らかな違いがみられなかったが、10%区、50%区が対照区より株元の直径を大きくし、茎数も増加した。

実験6. DNA分析による分離糸状菌の同定

DNA抽出にはDNA Extraction Solutionを使用し、エタノール沈殿法で精製し分析用DNA溶液を作成した。DNA濃度調整後、真菌用ITS領域ユニバーサルプライマーを用いPCR増幅した。その後、アガロースゲル電気泳動で増幅を確認した。増幅したDNAをエタノール沈殿法で精製し、ダイナーミネータ法による蛍光標識でDNSの色別した。塩基配列分析ではSeqStudio Genetic Analyzerを使用。得られた塩基配列からアメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) データバンクの相同検索からK2-2株の同定を行った。

結果

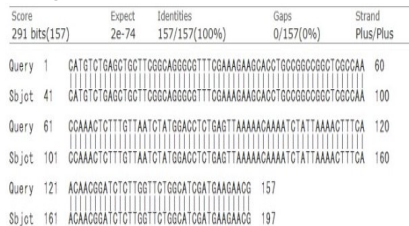


図6. ダイレクトシーケンシングによる得られた分離糸状菌K2-2株のITS領域塩基配列 (Query/157bp) とNCBI相同検索サービスで検出された Fungal endophyte (植物共生糸状菌) の塩基配列 (Sbjct/41-197) のアライメント

参考文献

高橋美乃, 2020年度.
大阪府立園芸高等学校バイオサイエンス科卒業論文
Melinda Greenfieldら, 2015.
A novel method to scale up fungal endophyte isolations.
Vol, 25 No. 10, 1208-1211

受賞歴

第6回IBLユースカンファレンス 銀賞
第84回SSH全国大会 学校代表
第66回大阪府学生化学賞 最優秀賞