

生物

サギソウ共生菌の採集方法と培養技術の開発

兵庫県立龍野高等学校 自然科学部

2年 光石統哉

1年 八木理仁 寺田采矢 清水斗真

花谷充展 目木俊輔 出原滉平

菱田万葉

1. 動機及び目的

胚乳を持たないサギソウの種子は発芽時にラン菌と共生しないと発芽できない。そこで、去年はサギソウの人工種子の開発に取り組んだ。実験室内で播種実験したところ、正常に生育するものが少なかった。原因は、発芽だけでなく、初期苗は共生菌から養分を供給されていることが予想された。そこで人工種子に使うプロトコームに共生菌を接種することで生育が良くなると考えた。この点について高橋(2005)も同様の考えを示している。

そこで本研究では、生育地からサギソウの共生菌の採集方法と培養技術の開発を行うこととした。

2. 実験方法と結果

目的1 共生菌を採集する

肉眼で見えない共生菌を探すために、自生地の土にサギソウの種子を播き、密に発芽した場所に共生菌がいると考えた。

方法

- ① サギソウの種子の有菌発芽について調べるため、土の条件を変えた容器 A~C を用意した。

容器 A : 自生地の表土 (サギソウを植栽)

容器 B : 自生地の表土 (アメリカセンダングサなど植物が生育)

容器 C : 地表より 2~3 cm 下の自生地の土 (植物の枯れた根が多いもの)

- ② サギソウの種子を 6 月 21 日に播いて発芽するか観察した。

予想

容器 A : サギソウの根や地下茎には共生菌がいると予想されるので、多数発芽するのではないかと。

容器 B : 自生地では地表で発芽している。共生菌は表土にいるはずで、発芽する。

容器 C : 共生菌は少なく、あまり発芽しないのではないかと。

結果

7 月 12 日に発芽の様子を観察した。

容器 A : 容器 B, C に比較して発芽は少ない。

容器 B : まばらに発芽した

容器 C : 多数発芽した。

予想に反する結果となった。

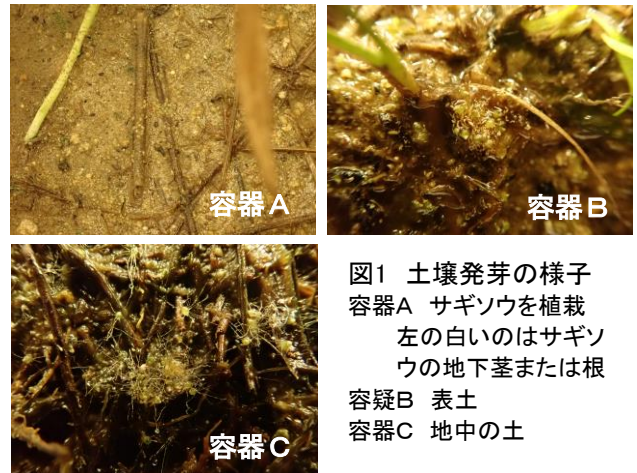


図1 土壤発芽の様子
容器A サギソウを植栽
左の白いのはサギソウの地下茎または根
容器B 表土
容器C 地中の土

考察

仮説に反して、容器 C の地中の土で多く発芽した。容器 A は、サギソウの地下茎や根周辺よりも、泥に含まれていた植物の枯れた茎の上や周辺で発芽していた。容器 B や C についても同様で、容器 C は特に植物の根が土に多く存在していたことが良好な発芽をもたらしたと考えられる。共生菌は、植物遺骸に付着していることがわかった。

目的2 採取した共生菌を培養する。

発芽した場所は植物遺骸の多いところである。植物の種類は湿地に生育する、カモノハシなどの単子葉植物なので、実験には単子葉植物を培地に利用した。校内には草刈り後のススキがあったので、ススキの枯れ葉や茎、さらに各種菌類の培養に使われることが多い、オートミール培地(オート麦の種子を含む)で共生菌の培養を試みた。

方法

- ① 培地を用意した。

ススキ培地 ススキの葉または茎 3 g と水 60 ml を培養瓶に入れて 120℃、20 分の加熱滅菌を行った。ゲル化剤は入れなかった。

オートミール培地 オートミール 2.5 g を水 1 L、ゲル化剤としてゲランガム 3 g とともに入れて 120℃、20 分の加熱滅菌を行った。

培地はそれぞれ 5 つ ①~⑤ を用意した。

- ② 菌を接種した。

各培地の ① と ② には、最も発芽率の良かった植物の根が多い容器 C の腐食植物片を入れた。各培地 ③ には、容器 B の表面の泥の腐食植物片を入れた。各培地 ④ には、サギソウを植えた容器 C の腐食植物片を入れた。容器 ⑤ にはサギソウ球根の表皮を入れ菌を培養した。※培地 ① と ② の条件が重複しているのは前の実験で発芽率が高かったためである。

結果

表1 培地による微生物の繁殖状況

培地	①	②	③	④	⑤
Aススキの葉	変化なし	白菌糸多い	白菌糸少ない	白菌糸少ない	白菌糸少ない
Bススキの茎	水が白濁	液面に膜	茶色の付着物	茶色の付着物	白色の付着物
Cオートミール	一部黄色に変化	白色の付着物	緑色多く白少ない	白色多く茶色少ない	茶色多く黒少ない

各培地には、複数の菌類・細菌類が混在していると考えられるが、培地Aのススキの葉は、4つの培養瓶で葉が水面よりも上の部分に白い菌糸が確認できた。培地Bはススキの茎が水没し、菌類だけでなく細菌類などさまざまな微生物が繁殖していた。培地Cのオートミール培地は培地が白く白い菌糸はあまり目立たず、緑色の菌類や、茶色や黒色の細菌類と思われるコロニーを確認できた。

考察

湿地に生育する植物ではない、ススキやオートでも分解者の培養はできるが、この中に共生菌がいるかどうかは不明である。

共生菌の存在について確認するため、サギソウ種子を播き、発芽率を調べることにした。

目的3 培養した菌が共生菌であることを確認する

サギソウの共生菌が培養できていたら、サギソウの種子は発芽することができる。

方法

- ① シャーレに浅く水をいれた。
- ② 種子が観察しやすい、黒画用紙で播種床をつくり、シャーレに入れた。
- ③ 培地ごと培養菌を黒画用紙の上にのせた。
- ④ 8月26日に種子を画用紙上に播いた。
- ⑤ 乾燥しないように注意し、シャーレを直射日光の当たらない窓辺で常温管理した。

結果

2週間後、発芽率を調べた。

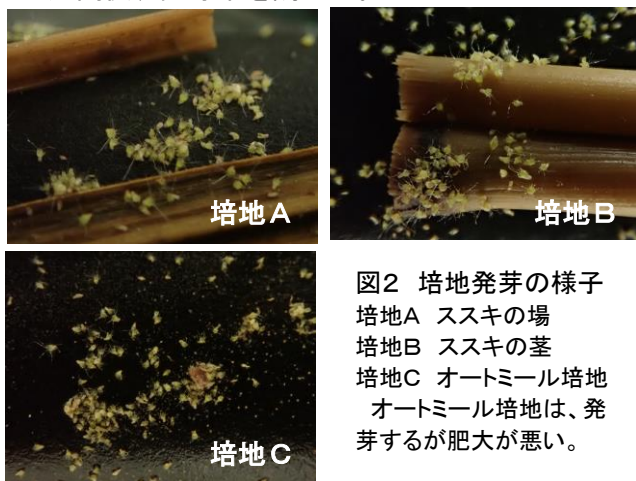


図2 培地発芽の様子
培地A ススキの場合
培地B ススキの茎
培地C オートミール培地
オートミール培地は、発芽するが肥大が悪い。

発芽率は以下の6段階で評価した

発芽率	0%~	10%~	20%~	40%~	60%~	80%~
評価	0	1	2	3	4	5

表2 培養菌によるサギソウの発芽状況

培地の種類	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	評価平均
ススキの葉	5	2	5	5	5	4.4
ススキの茎	5	3	5	5	4	4.4
オートミール	5	1	5	5	5	4.2

考察 どの培地で菌を培養しても、発芽率80%以上の評価5が多かった。オートミールに1があるが、プロトコムの肥大化も遅れているようである。オートミールは共生菌以外の微生物も繁殖しやすいようで、それが一因となっているかもしれない。

目的4 本当に共生菌が感染しているのか

共生菌による発芽であれば、共生菌の菌糸がサギソウに接触しているはずである。そこで光学顕微鏡をもちいてサギソウのプロトコームに菌糸が感染していないか観察した。

方法

- ① 生育の良いプロトコームを取り出した。
- ② メチレンブルー水溶液で5分染色した。
- ③ ホールスライドガラスに置いて観察。

結果

共生菌の菌糸が切れやすいのか、すべてのプロトコームで観察できたわけではないが、プロトコームの仮根に、伸びてきた菌糸が付着する様子を確認できた。このことから、共生菌であることが確認できた。



図3 感染する共生菌

結論

サギソウの共生菌の居場所の特定は、サギソウの種子をまき発芽させることで可能である。そのとき、共生菌が何を分解して生活しているのか観察し、共生菌の培養には、その植物遺骸や近縁種の遺骸を利用することで可能になる。

今後は、共生菌を単離培養して、人工胚乳で発芽させたプロトコームに感染させる。さらに、感染プロトコームを用いた人工種子の実用化をめざしたい。

また、人工種子に頼らず共生菌を培養したススキの葉などを湿地に播くことで自然下での発芽を促す実験にも取り組みたい。

参考文献 ラン菌根菌を接種したゲル被覆サギソウプロトコームによるサギソウの実生育成および自生地における生育 園学研2005高橋和彦ほか