

スギナのモデル化に向けた培養室条件の検討

内田智尋（加藤研究室）

要旨

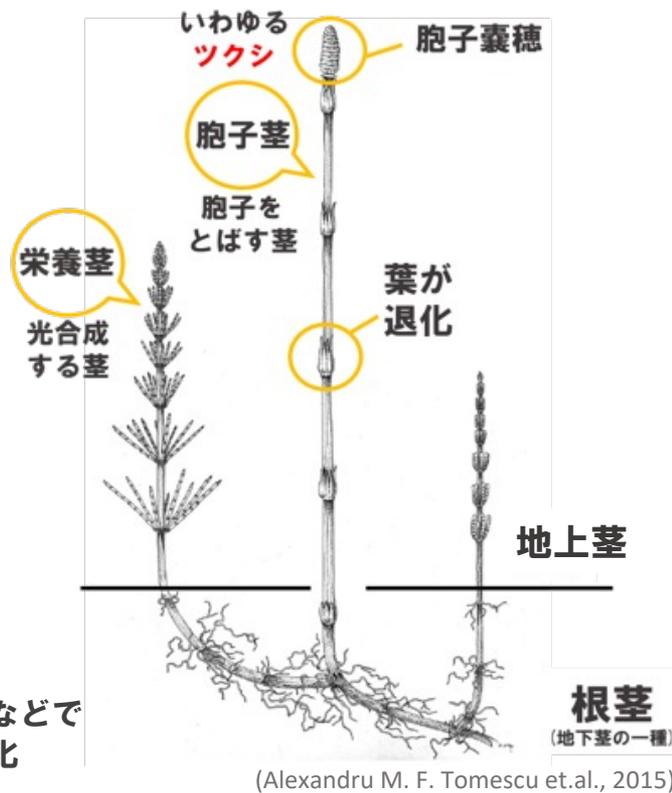
スギナ (*Equisetum arvense*) はシダ植物の一種で石炭紀に繁栄した口ボク類を含むトクサ綱で唯一現存するトクサ属に属する植物である。地上部は孢子茎(ツクシ)と栄養茎に分かれ、それらは地下部の根茎でつながっている。地上部を取り除いても根茎が地中で生き残り、また根茎が分断されることで個体数を増やす性質があり、畑地や畦畔の強害雑草である。またトクサ綱はシダ植物の中でも基部で分かれた系統であり維管束植物の進化を考える上で重要な位置を占める。しかし被子植物やコケ植物と比べるとシダ植物をモデルにした遺伝子レベルでの研究は進んでいない。そこで本研究ではスギナのモデル植物化を目指し、実験室におけるスギナの培養方法を確立するため、光の強さと液体肥料の濃度について検討した。PPFD = $215 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下の光条件では光が強くなると栄養茎の枝の数が増える傾向が観察された。また根茎を観察したところ、芽が出ていない根茎では内部が中空で水に浮き、芽が出た根茎は中身が詰まっており水に沈むことが分かり、発芽が根茎の状態に依存することが示唆された。液体肥料の濃度については今回検討した範囲ではスギナの成長に顕著な違いは観察されなかった。

導入: スギナ *Equisetum arvense* の形態・特徴



春の風物詩ツクシで有名

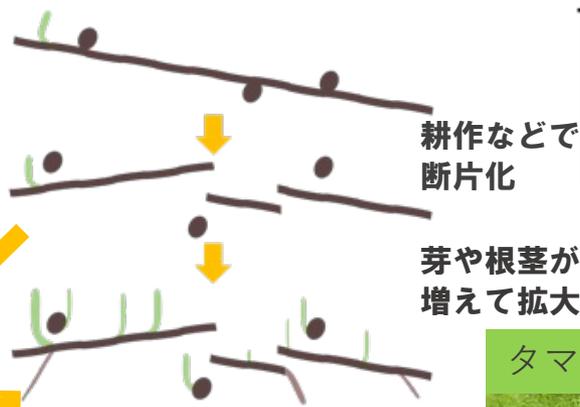
- ・ ツクシは食用になり、栄養茎は薬として利用された
- ・ 地上部は孢子茎 (ツクシ) と栄養茎に分かれ、それらは地下部の根茎でつながる



(Alexandru M. F. Tomescu et.al., 2015)

畑地の強害雑草

- ・ 根茎が分断されることで増殖
根茎の一部が移動することで
さらに拡大→繁殖能力が高い



生息範囲や栄養分の
取り合いが起こる

新しい土地
への侵入



タマネギ畑に繁殖したスギナ



タマネギの収穫20~60%減少

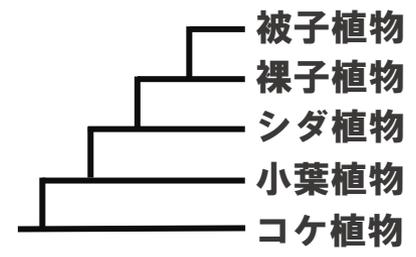
スギナの生態や生理機構を理解することは
雑草防除の技術につながる

農研機構 スギナの地下はどうなっている？
<https://www.youtube.com/watch?v=x0Vtr44Snn4>

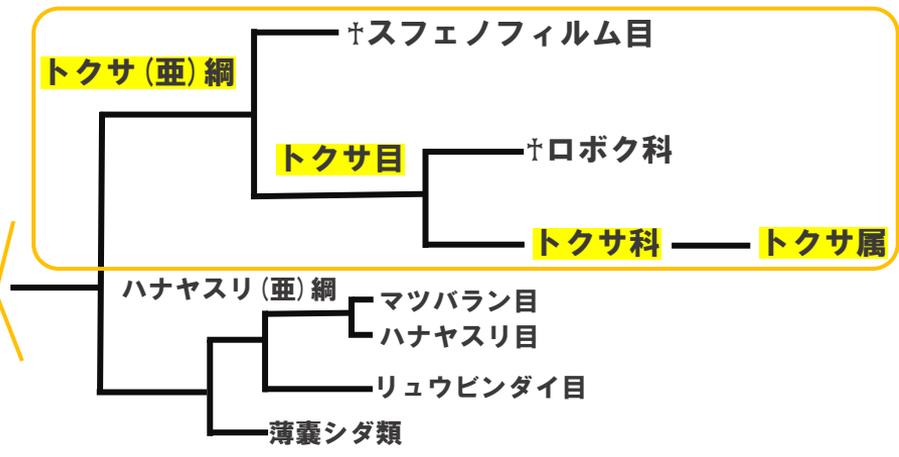
導入: スギナの進化的位置づけ

シダ植物の仲間

- シダ植物は維管束植物の中でも比較的基部で分かれた



- 葉や根は、シダ植物と木質植物(種子植物を含む)で独立に進化



シダ植物を研究することは維管束植物の進化を考える上で重要

トクサ属の仲間

トクサ (亜) 綱で
唯一現存の属

- トクサ綱はシダ植物の基部で分かれた
- 祖先は石炭紀に大繁栄
- 生きた化石とも呼ばれる



Illustration by Mary Parrish © Smithsonian Institution

トクサ類の大繁栄の秘密やシンプルな形態の利点を探れるかもしれない

大目標: スギナをモデル化する

→スギナについて遺伝子レベルでの機能解析が進めることができる

スギナのモデル植物向きの特徴

- ・植物体が小さい
(育てるのに場所をとらない)
- ・繁殖能力が高い
(増やしやすい)
- ・世界中に分布
(遺伝的多様性が高い)

モデル化をするために行いたいこと

培養

- ・栄養茎の培養, 増殖
- ・無菌培養
- ・生活環の完結

形質転換

- ・アグロバクテリウムを用いた形質転換

配列情報

- ・ゲノム解読



モデル化する上での初めの問題点: 実験室での培養方法が確立されていない

培養条件はどうしたらよいのか検討

<1>光の強さ: 1. 栄養茎の生育 2. 根茎の状態, <2>肥料の濃度

手法<1>光の強さ: 1. 栄養茎の生育

目的: 光の強さを変えるとスギナがどのように成長するかを調べる
ポット1個当たり6cmの根茎を3本入れ、各区画でポットを3個ずつ置いた

培養条件:

(1) 光の強さ

LED (プラントフレック; 電球色)

1・2・3本の区画を作成

PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

1本→70.2~75.4

2本→124.4~129.2

3本→208.7~215.8



培養期間

Part1 (10/4~11/7)

Part2 (11/15~12/21)

ポット3×3

(2) 日長

明期: 16時間

暗期: 8時間

(3) 気温 25°C

(4) バーミキュライト
+液体肥料
(ハイポネックス
1000倍希釈)

測定項目:

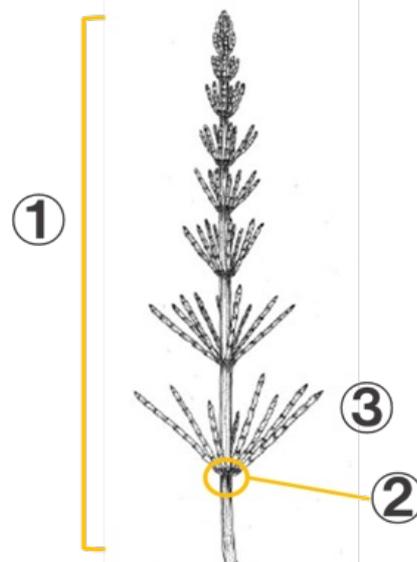
発芽0, 2, 4, 7, 10, 14日後の

①背丈の高さ

②節の数

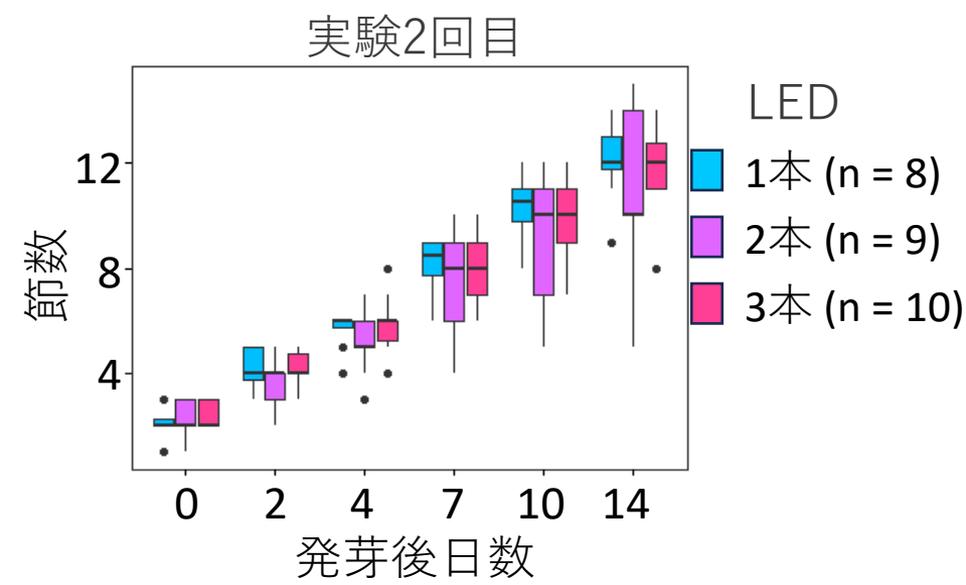
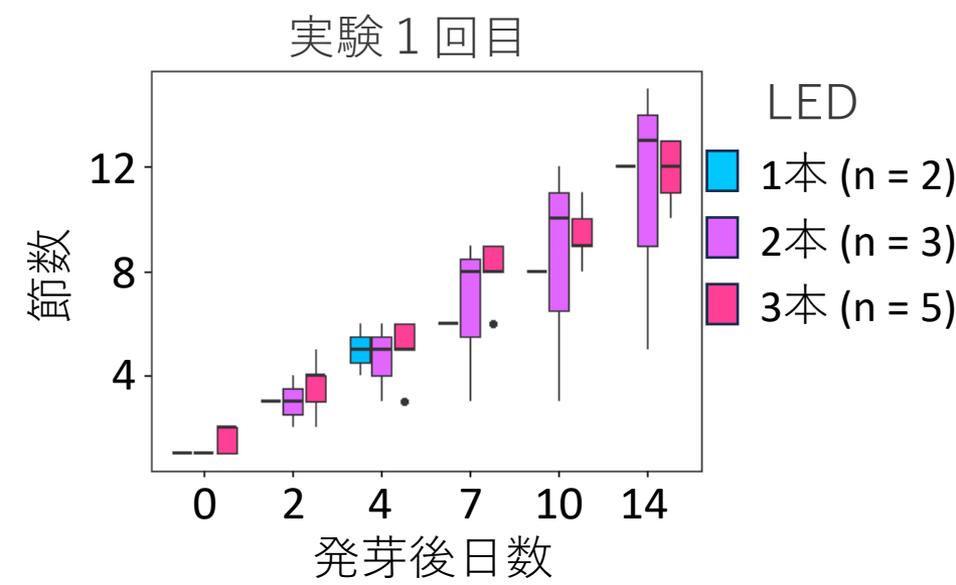
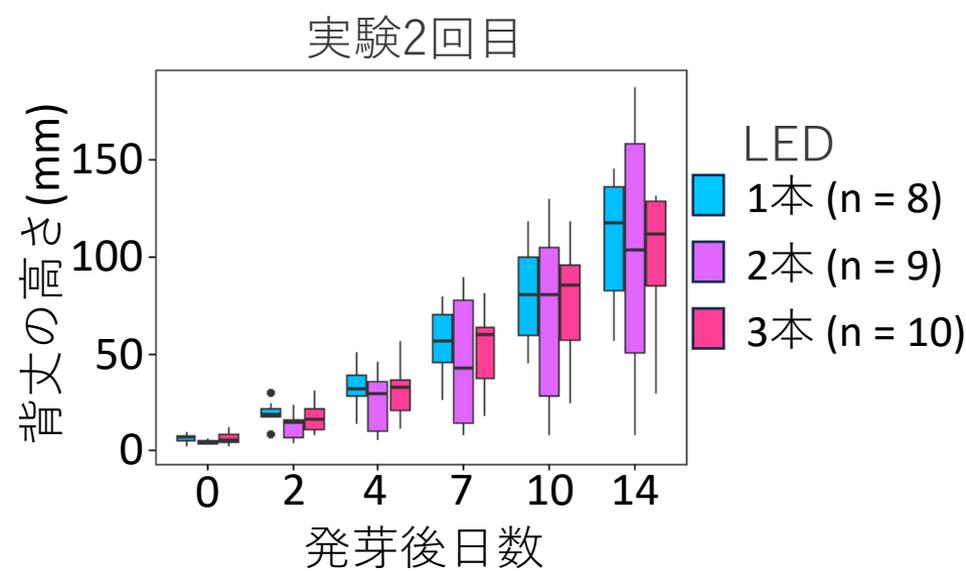
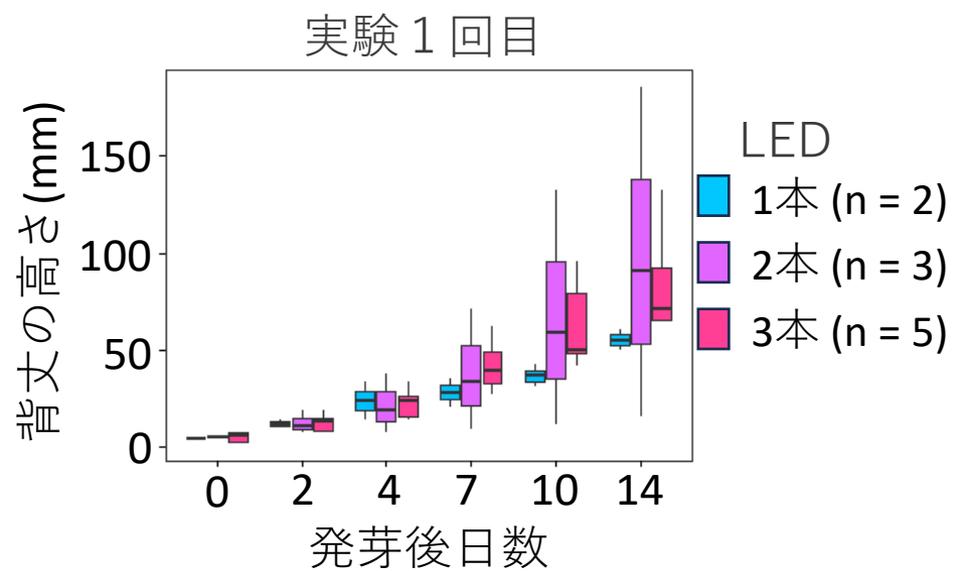
③各節の枝の数を計測する

発芽のタイミングが個体ごとに異なっていたため、栄養茎の発芽を計測の基点(0日)とした



(Alexandru M. F. Tomescu et.al)

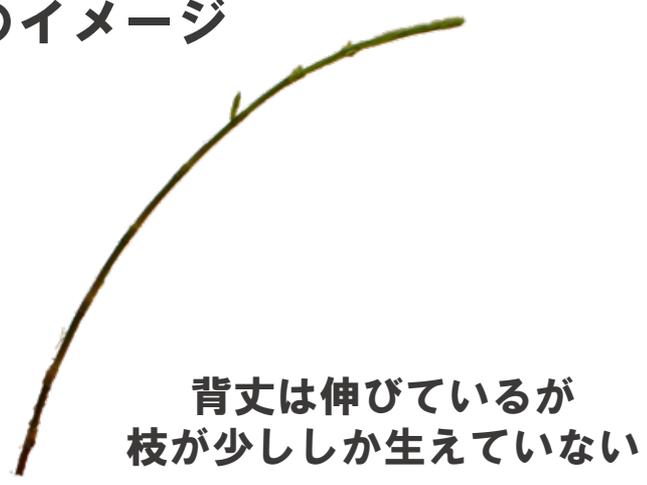
結果<1>光の強さ: 1. 栄養茎の生育



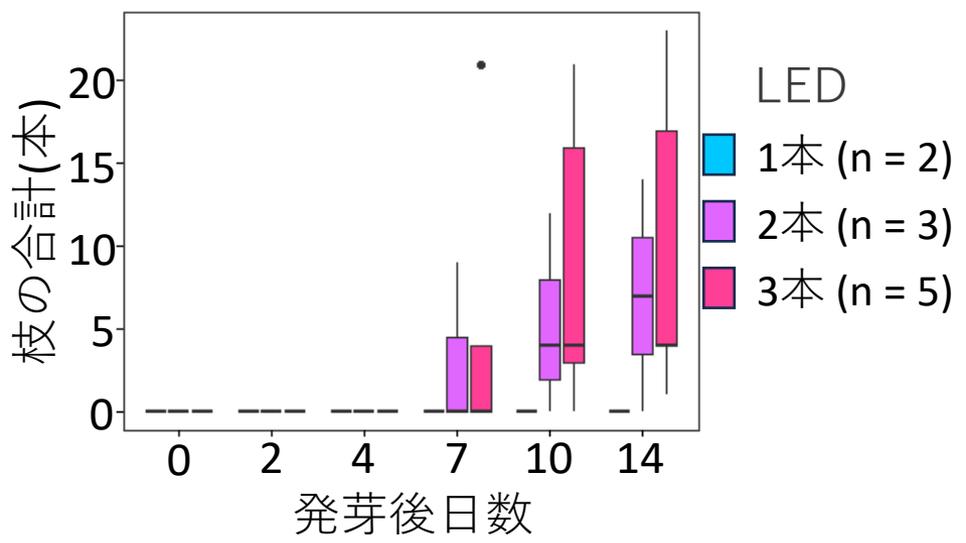
背丈の高さや節の数は光の条件で顕著な違いがなかった

結果<1>光の強さ: 1. 栄養茎の生育

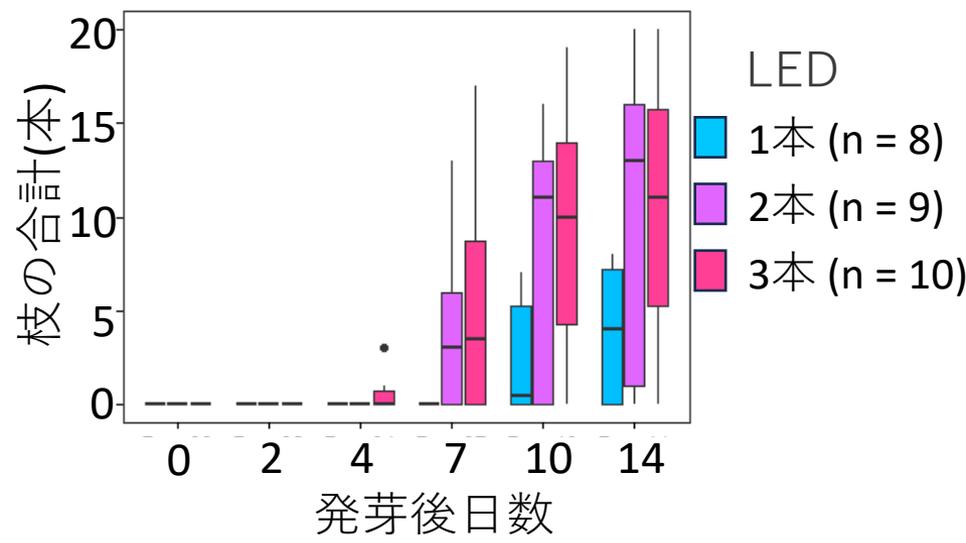
栄養茎のイメージ



実験 1 回目

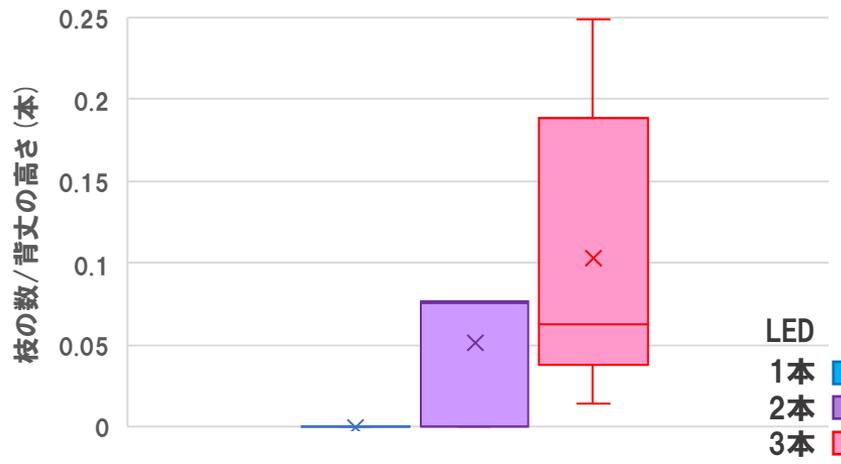


実験2回目

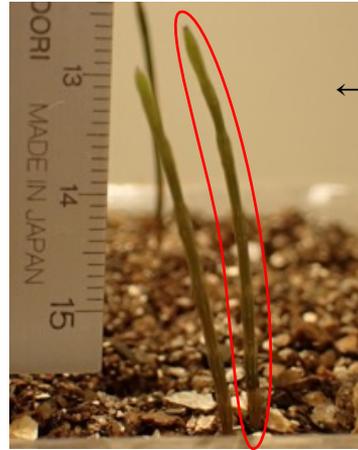
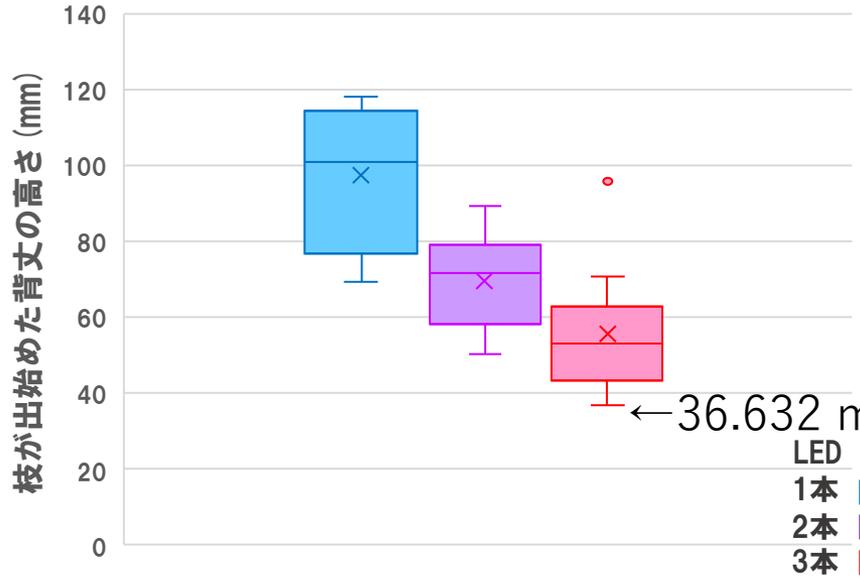
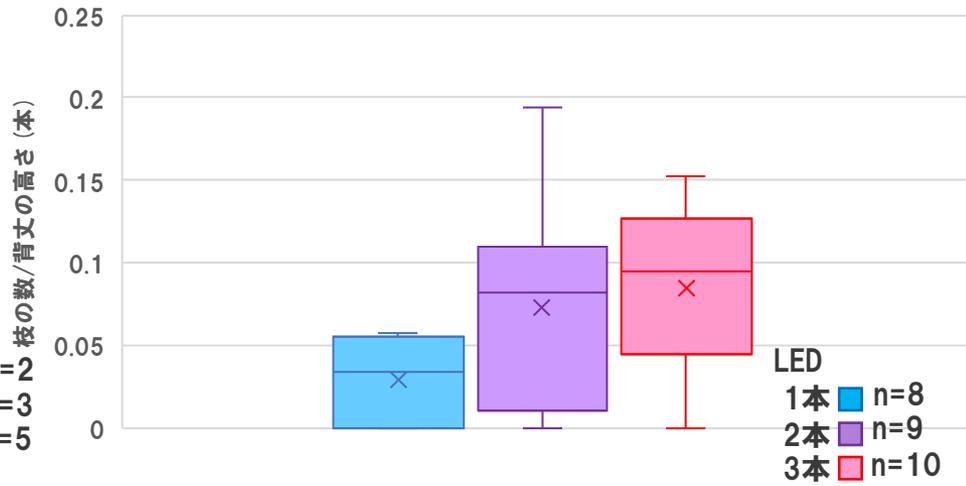


結果<1>光の強さ: 1. 栄養茎の生育

実験1回目 (発芽14日目)



実験2回目 (発芽14日目)



(例)
←LED3本発芽14日目
35.086 mm
枝が生えていない

光の強さによって枝が出始める背丈の高さが異なる
ある一定の高さになると枝が生える可能性がある

光の強さの間で「枝の合計」や「背丈の高さあたりの枝の数」に有意差は見られなかったが (Tukey-Kramer, $P > 0.05$)

枝が出始めた背丈の高さでは弱い光 (1本) と強い光 (2・3本) の間で有意差が見られた ($P < 0.05$)
 ■強い光では枝が出るのが速く、多い (■弱い光は枝が出るのが遅く、少ない) 傾向にある

手法<1>光の強さ: 2. 根莖の状態

目的: スギナの地下部はどのように成長するのか調べる
光の条件で使用したスギナ掘り出し、以下の項目で測定行った

測定項目:

①光と発芽

掘り出した根莖の芽の状態を**栄養莖**・**地下部の芽**(栄養莖予備軍)
・芽なしに分けて計測し、それらは光の強度によって変わるのか調べた

②芽の有無と水に対する根莖の浮き沈み

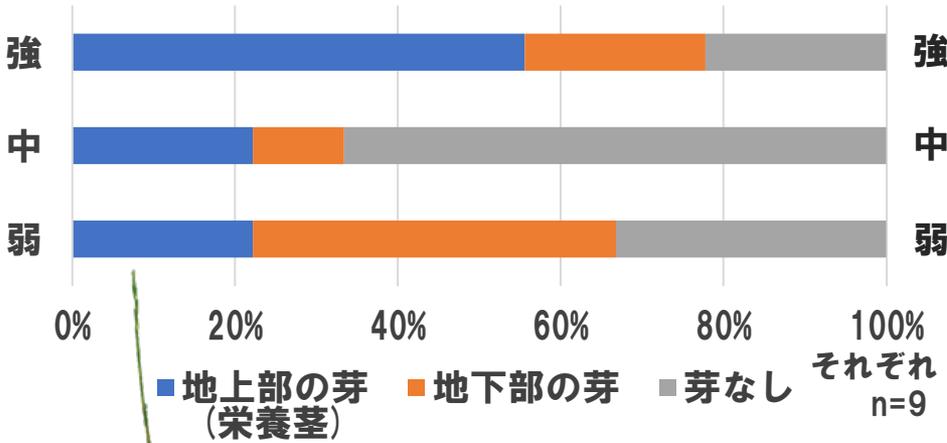
掘り出した根莖を水に浸けて、浮くか沈むかを観察した
そして、それらは芽の有無によって変わるのか調べた

③栄養莖と新生根莖の有無

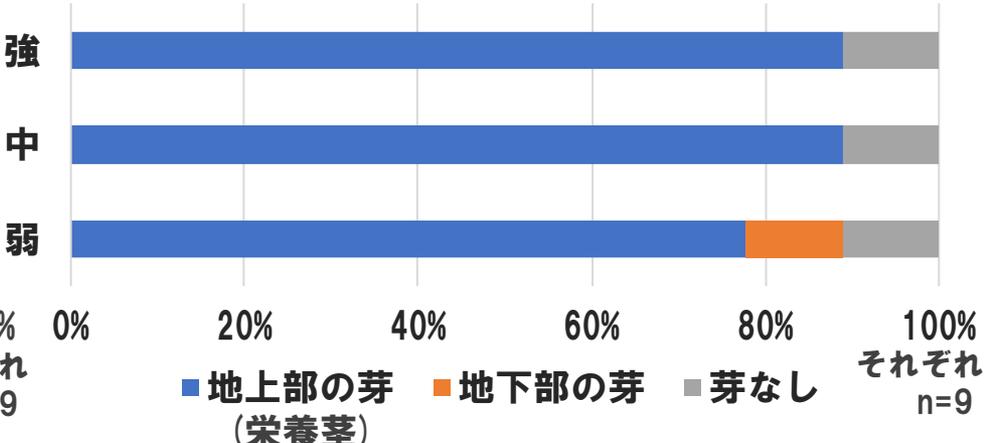
掘り出した根莖の栄養莖と新生根莖の有無を計測し、
栄養莖の有無は根莖の有無に影響するのか調べた

結果<1>光の強さ: 2. 根莖の状態

光と発芽 (1回目)

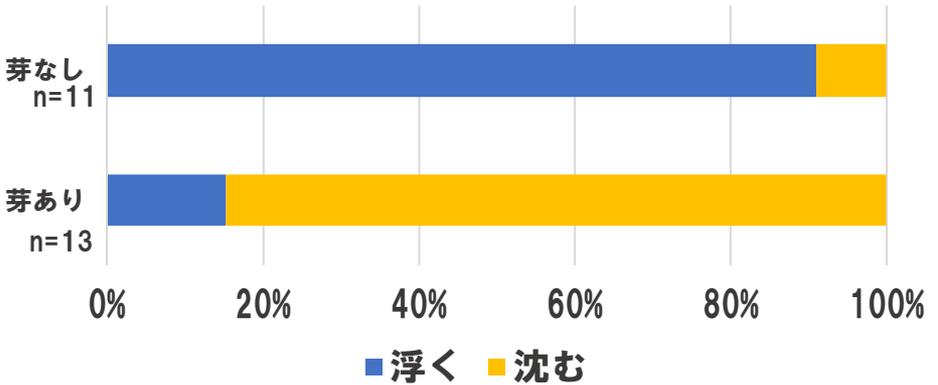


光と発芽 (2回目)

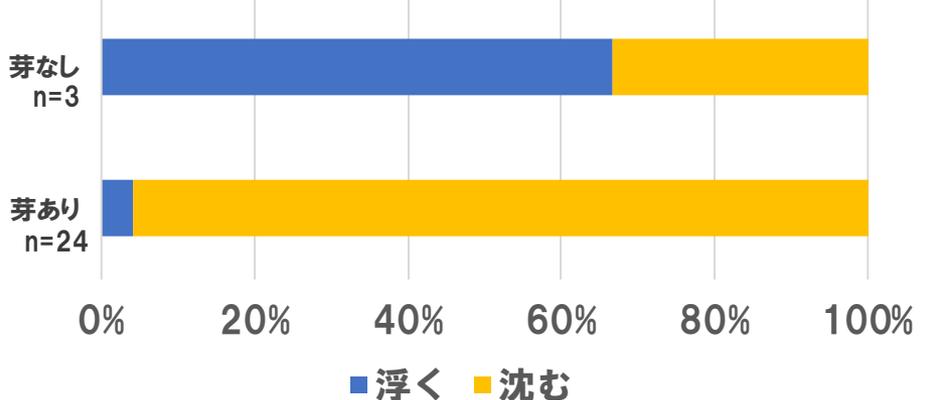


光の強さによって発芽率に差はなかった

芽の有無と水の浮き沈み (1回目)



芽の有無と水の浮き沈み (2回目)

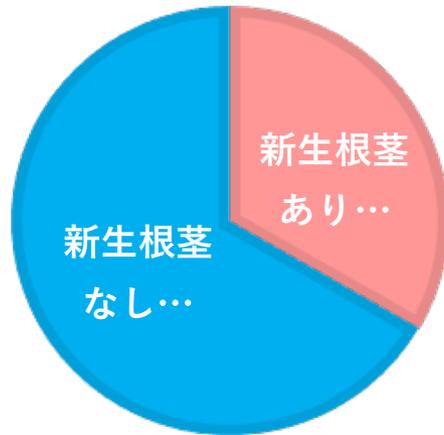


芽がない根莖は水に浮き、芽がある根莖は水に沈んだ
 →芽がない根莖は腐敗し、軽くなっていた可能性がある

結果<1>光の強さ: 2. 根茎の状態

栄養茎の有無に対する新生根茎の有無

栄養茎あり(1回目)



n=9

栄養茎なし(1回目)



n=11

栄養茎あり(2回目)

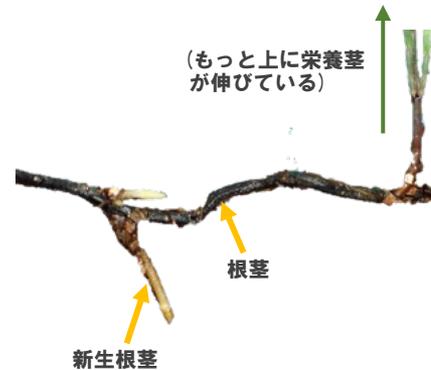


n=23

栄養茎なし(2回目)



n=4



栄養茎が生えている根茎だけ、新生根茎が生えていた
→まず栄養茎を生やしてから新生根茎を生やす可能性がある

手法<2>肥料の濃度

目的: 肥料の濃度によってスギナの成長が変わるかを調べる

ポット1個当たり6cmの根茎を5本入れ、各区画でポットを2個ずつ置いた

培養条件:

(1) ハイポネックスの濃度

4000倍希釈

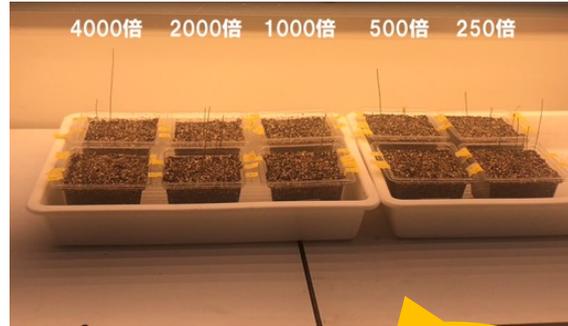
2000倍 //

1000倍 //

500倍 //

250倍 //

液体肥料



培養期間
12/31~2/5

(2) 日長

明期: 16時間

暗期: 8時間

(3) 気温 27°C

(4) PPFD ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

122.8~123.9

測定項目:

① 発芽0, 2, 4, 7, 10, 14日後の

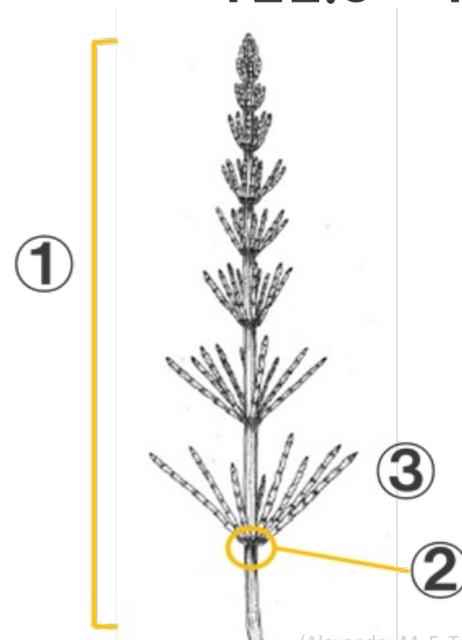
① 背丈の高さ

② 節の数

③ 各節の枝の数

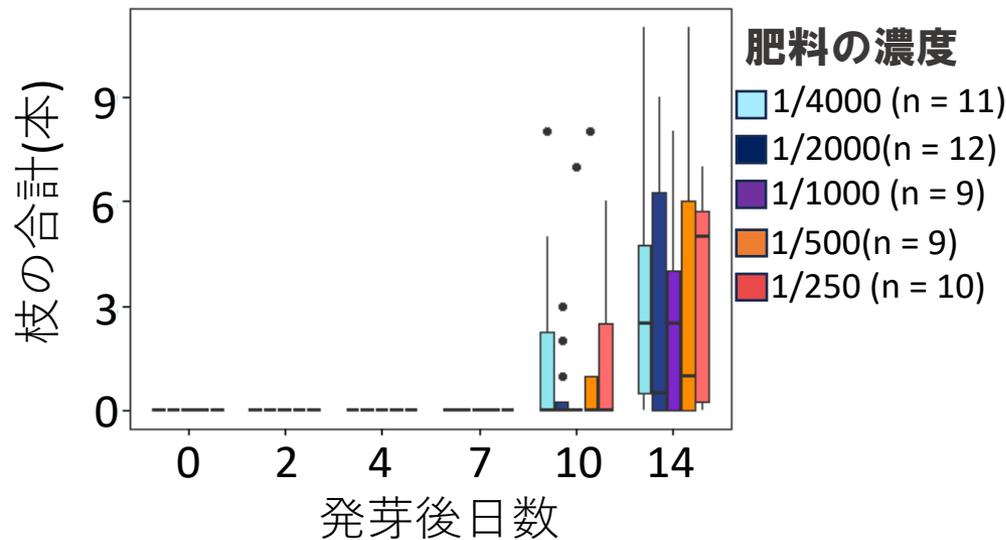
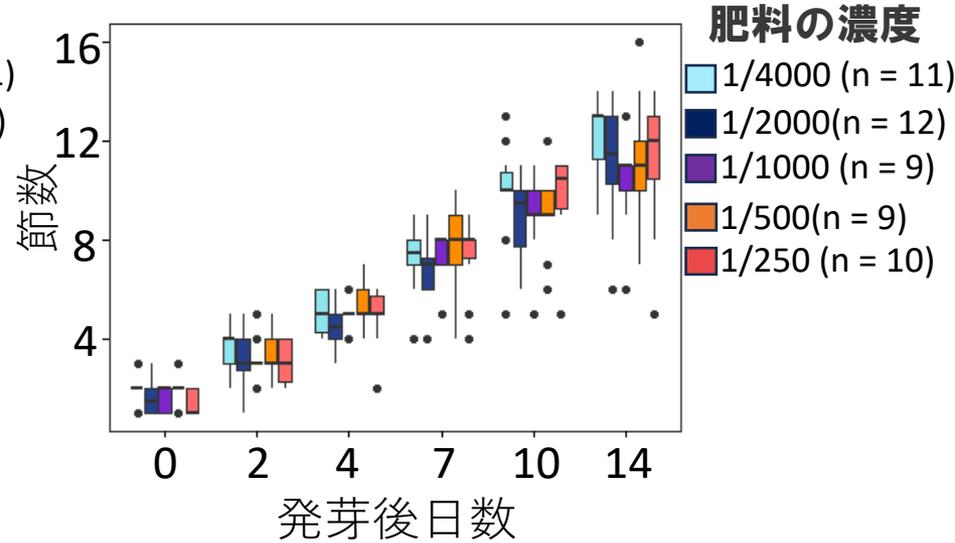
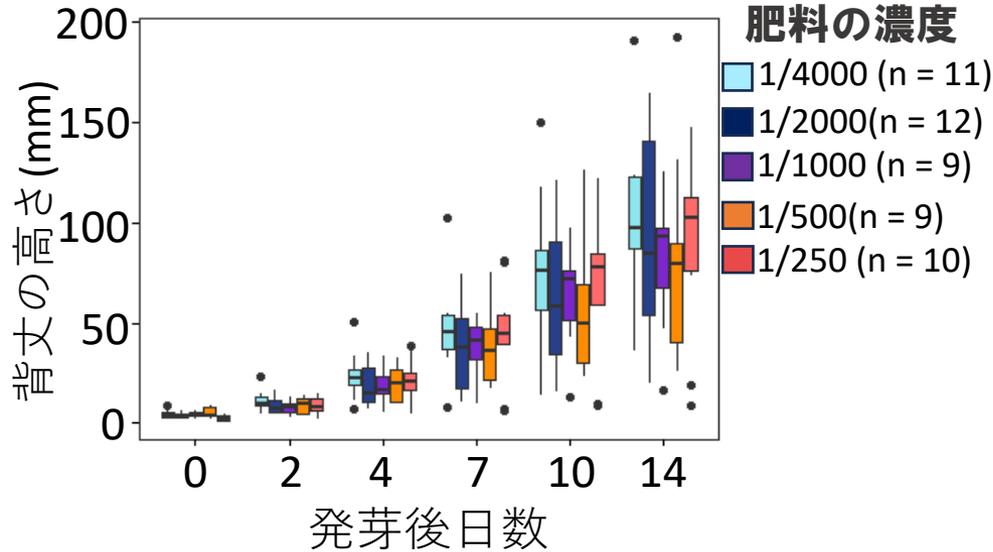
を計測する

② 発芽14日目に栄養茎の重量を測る



(Alexandru M. F. Tomescu et.al)

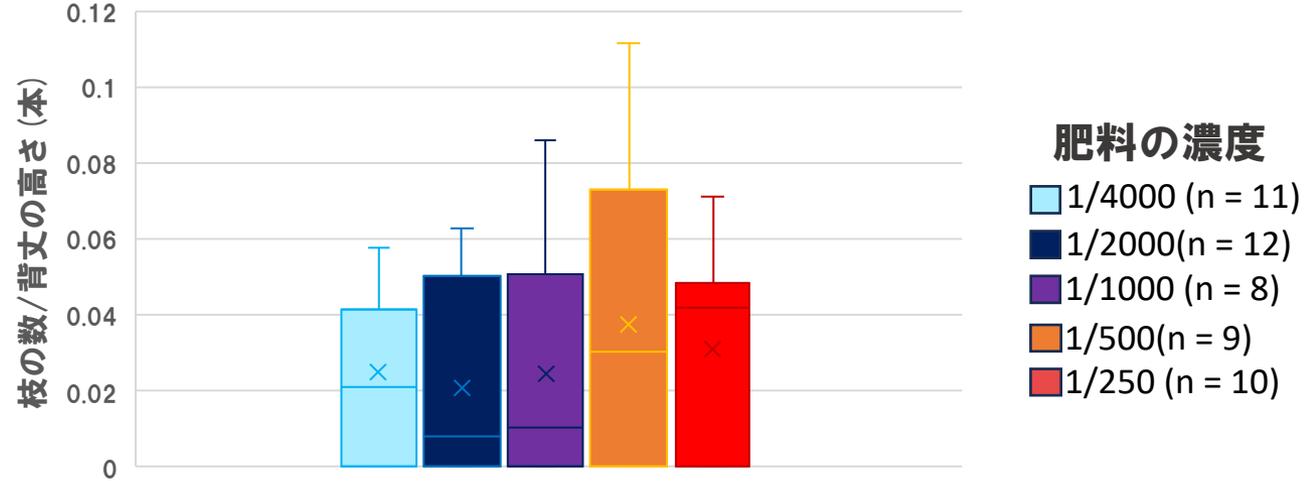
結果<2>肥料の濃度



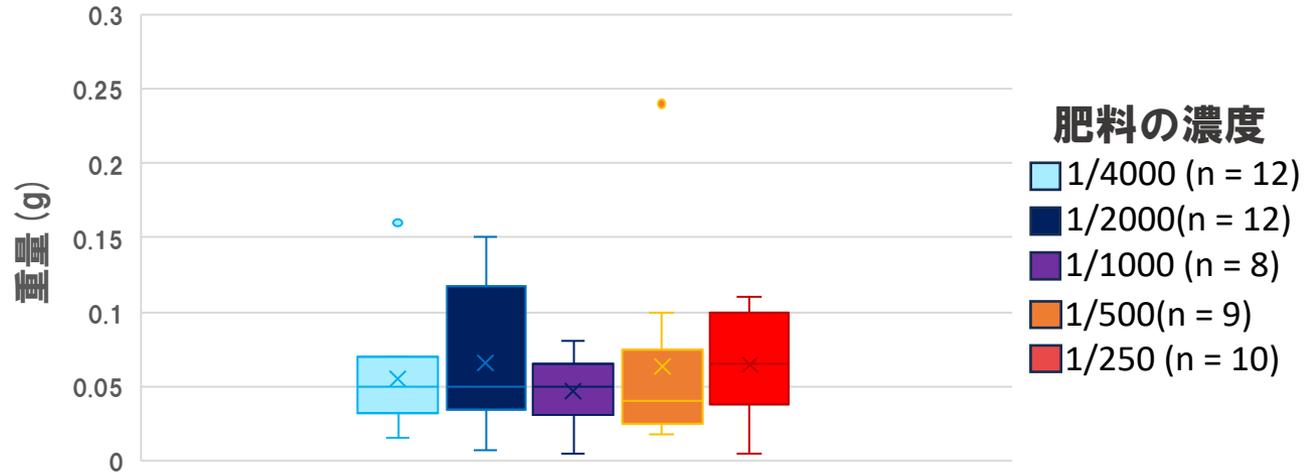
背丈の高さ・節数・枝の合計は
肥料の濃度による顕著な差は
見られなかった

結果<2>肥料の濃度

発芽14日目



発芽14日目



枝の数/背丈の高さ・重量に顕著な差はなかった

まとめと考察

<1>光の強さ

1. 栄養茎の生育

- ・光の強さの間で「枝の合計」や「背丈の高さあたりの枝の数」に有意差は見られなかったが、強い光では枝が出るのが速く、多い傾向にある

[有意差が見られない理由]

背丈の高さが低いままの個体が含まれていることが要因にあると考えられる

2. 根茎の状態

- ・芽がない根茎は水に浮き、芽がある根茎は水に沈んだ
→芽がない根茎は腐敗し、軽くなっていた可能性
⇒サンプルを増やすための根茎は、中身がしっかりつまっているものを選ぶ
- ・栄養茎が生えている根茎だけ、新生根茎が生えていた
→新しい根茎は、栄養茎で光合成産物をつくってから生え、
まず栄養茎を生やすという順番があるのではないか

<2>肥料の濃度

- ・ハイポネックスの濃度の違いによって、スギナの成長に差はなかった
⇒今まで通りの濃度で育ててもよさそう(1000倍希釈)

〔成果〕
・光が強くなると枝が多くなる傾向にあることが分かった！
・スギナの根茎の選択方法が分かり、大量増殖に成功した！