

ムシトリスミレの葉にみられる可塑性について

静岡市立高等学校

科学探究科 2 年 6 班 海野快晴 井村心施 袴田彩月 森房亮太 (指導教諭 曲田澄子)

1. 概要

移動することが出来ない植物は、光や食害に反応し同一個体内での葉の厚さや形状を変えるという表現型の可塑性が広く知られる。私たちはムシトリスミレの個体を増やす中、偶然に葉の形質が変化した個体に遭遇した。そこでその形質の変化が、十分な栄養によるものであるという仮説を証明するため、実験を行った。

2. 初めに

(1) ムシトリスミレの葉挿し

実験用に 3 個体購入した、ムシトリスミレのピンギキュラ アフロディーテは園芸品種 (Fig. 1) であり、3 月から 5 月にかけて花芽を形成し続けるが、種子ができない。そこで実験に用いる個体を増やすため、多肉植物の増殖などに用いられる葉挿しを行い、個体数を増やした。



Fig. 1 ムシトリスミレ

抜いた葉を湿らせたキムワイプに乗せ、水を絶やさないうち注意し、観察を続けると 3 週間後、挿し穂の根元が膨らみ、カルスが生じた (Fig. 2(a))。5 日後、葉のような構造体がみられ (Fig. 2(b))、さらにその 5 日後には薄い緑の葉がついた (Fig. 2(c))。成長した葉からはトライコームという毛のような構造物が見られるだけだったが、葉が 3 mm 程度に成長すると、トライコームの先端から球状の粘液を分泌するようになった。葉挿しの開始から 39 日目には、根の形成を確認した (Fig. 2(d))。

さらに観察を続けると、葉挿しに用いた葉の先端 (新個体を形成した部分と反対側) から枯れ始め、完全に枯れると、新たに形成した個体が葉から離れた。

1 枚の葉から形成される幼個体は 1 ~ 6 程度で、葉挿しの開始から、1 個体が独立するまでに、用いる葉の大小に関わらず 2 か月程度要することが分かった。

(a)



(b)



(c)



(d)



Fig. 2 葉挿し (3/19 開始) による個体の増殖

(a) カルス形成 22 日目 (4/9), (b) 黄緑色への変化 27 日目 (4/14) (c), 葉の形成 32 日目 (4/19), (d) 根の確認 39 日目 (4/28)

(2) 1/2MS 培地を用いたムシトリスミレの葉挿し

効率よく実験に用いる個体を育てるために、ヴィトロプランツ社の ViP キットに含まれる、組織培養に適した成分とされる 1/2MS 培地 (組成は Table 1) を用いて、滅菌した瓶の中で培養を行った (Fig. 3(a))。入れる葉は、抜いてすぐのものではなく、葉の付け根に複数の幼個体が形

成されたもの (Fig. 2(d) 程度に成長したもの) を使用した。また植物体に付着した微生物を取り除くため、殺菌剤として ViP キット付属の殺菌補助の vipSupporter と次亜塩素酸カルシウムを用いた。

水で成長させたときと生育のスピードは変わらなかったが、幼個体の葉の緑が濃くなり、葉の成長を待っても表面の特徴的なトライコーム (球状の粘液を分泌したもの) が見られないという変化が観察できた。継続的な観察を行いたかったが、2週間後にカビが生えてきてしまい個体が弱ったため (Fig. 3(b))、培地から個体を取り出した。培地から取り出した個体は、水苔の上で育て2週間ほど経つと、葉の表面に粘液を分泌するトライコームを形成するようになった。

Table 1 MS 培地 組成

多量要素

- ・硝酸アンモニウム (NH_4NO_3) 1,650 mg/L
- ・硫酸マグネシウム ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 370 mg/L
- ・硝酸カリウム (KNO_3) 1,900 mg/L
- ・塩化カルシウム ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 440 mg/L
- ・リン酸カリウム (KH_2PO_4) 170 mg/L

微量元素

- ・ホウ酸 (H_3BO_3) 6.2mg/L
- ・硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L
- ・硫酸マンガン(II) ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3mg/L
- ・モリブデン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25mg/L
- ・ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 mg/L
- ・塩化コバルト ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025mg/L
- ・硫酸鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/L
- ・ヨウ化カリウム (KI) 0.83mg/L
- ・硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6 mg/L

ビタミンと有機化合物

- ・myo-イノシトール 100 mg/L
- ・塩酸ピリドキシン 0.5 mg/L
- ・インドール-3-酢酸 (IAA) 1-30 mg/L
- ・グリシン (再結晶して精製してから用いる) 2.0 mg/L
- ・加水分解処理したラクトアルブミン 1.0 g/L
- ・ニコチン酸 0.5 mg/L
- ・チアミン $\cdot \text{HCl}$ 0.1 mg/L
- ・キネシン 0.04-10 mg/L
- ・寒天 10 g/L

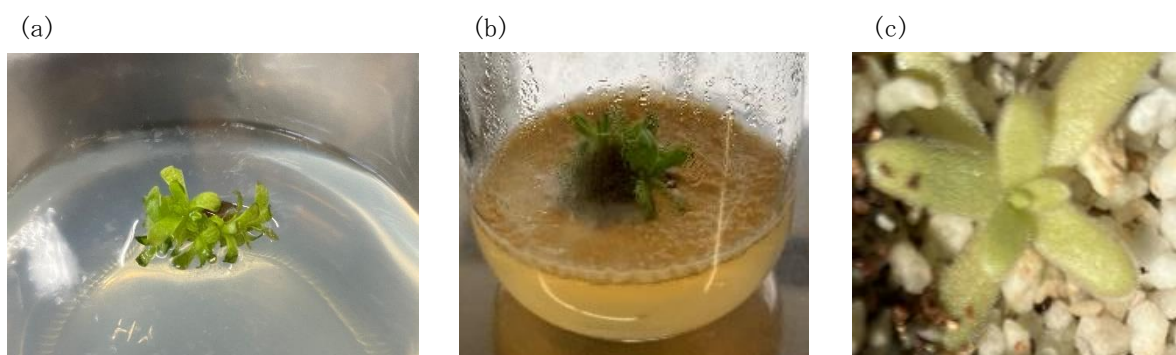


Fig. 3 1/2MS 培地とムシトリスミレ

- (a) MS 培地上で生育するビン内の再生個体 (5/6), (b) カビが繁殖した MS 培地上の再生個体 (5/19)
(c) 比較 土壌で育てたムシトリスミレ

栄養の多い 1/2MS 培地を用いてムシトリスミレの幼個体の培養を行うと、球状の粘液を分泌するトライコームの形成が特徴的な葉の表面で、それが見られないこと、また 1/2MS 培地の栄養を得られなくなると、トライコームの先端から粘液の分泌が観察できるようになることを、双眼実体顕微鏡を用いて確認した。

しかし、防カビ対策として殺菌剤を強めるとムシトリスミレが枯れ、そうでないとカビが繁殖

してしまい、再現実験はうまくいかなかった。また 1/2MS 培地の上に、寒天培地(寒天と水のみ)を広げるなど、防カビ対策を行ったが、1/2MS 培地を用いた実験ではうまくいかなかった。

3. 仮説

ムシトリスミレは十分な栄養を得ると、葉の形質を変化させ粘液を分泌しなくなる。

仮説設定理由

1. における観察で、1/2MS 培地を用いビンの中で培養したムシトリスミレの幼個体において、初めトライコームからの粘液の分泌が見られなかったが、取り出して観察を続けると、粘液の分泌するようになるという葉の形質の変化を目の当たりにした。しかし、葉挿しを行い生じたばかりの個体にみられた変化であること、また、粘液の分泌をしている状態から、分泌が停止したのではなく、分泌を始めるはずの大きさに育ったのに、分泌をしなかった状態から、状況を変える(1/2MS 培地から離れる)ことで粘液の分泌を開始した、というものだった。

そこでより成長した個体において、トライコームから粘液の分泌をしている個体が、十分な栄養を得ると、粘液の分泌をしなくなる、という表現型の可塑性を示すことを実験で証明したいと考えた。また、1/2MS 培地ではカビの繁殖を防ぐことができなかったため、寒天を成分から除外した MS 溶液を用いて、本実験を進めることとした。

4. 実験

(1) 栄養以外に、温度、水の影響も考慮し 5 つの条件に分け、それぞれ葉の表面のトライコームの形状がどのように変化するかを定期的に調べた。

項目は下記の通り。①～④は室温で実験を行った。

④の乾燥条件は、栽培過程で水を与えないと粘液の分泌が停止したため、幼個体でみられたトライコームからの粘液を分泌しなかったことが、寒天培地上で十分に水を得られなかったという可能性を考えての設定である。また、⑤の高温下に置く温度設定は、8月に栽培個体の粘液分泌が止まったときの室内温度から決定した。

- ① 水のみを与える。(対照)
- ② 通常使用濃度の 1/4 の濃度の MS 溶液を与える。(1/4 MS)
- ③ 通常使用濃度の 1/2 の濃度の MS 溶液を与える。(1/2 MS)
- ④ 水を与えない。(乾燥)
- ⑤ 水を与え、恒温器(34℃)に置く。(高温)



Fig. 4 1セット 20 個体のムシトリスミレ

(2) 各条件につき 20 個体ずつ、葉の状態がすべて評価 A のものを用意した。(Fig. 4)

卵パックの各窪みに穴を 3 つあけ、パーライトとバーミキュライトを 1 : 1 で混ぜた土を 200g 程度敷き詰めた。各窪みに一株ずつムシトリスミレを植え、各条件でのプラスチックのカゴに 2 つずつ入れ、1 ~ 20 の番号を付けたものを 5 セット用意した。(ただし、初めに①～③の条件で実験を開始し、個体がそろったところで④、および⑤の実験を開始したため、実験期間が①～③と④、⑤で異なる。)

(3) ①, ②, ③については、月・水・金曜日に 1 mL の各溶液を 20 個体の根本に与えた。

④以外の①～③と⑤は乾燥を防ぐため、容器に水を張った状態を保った。

(4) ムシトリスミレはロゼット状に葉をつけるため、葉の中央部分が新葉であり、中心部分の第1、第2葉は、いずれも粘液を分泌しない。また外に(下)に行く程、古い葉であり朽ちる前には粘液の分泌がなくなることを観察している。よってトライコームの形状観察はそれぞれの個体の中心部分から3枚目の葉で判断することとした。中心から(開いていないものを含めて)3枚目の葉のトライコーム及び粘液の様子を、双眼実体顕微鏡を用いて観察し、4段階で評価(A, B, C, D)した。(Fig. 5)

- A 球状の粘液を分泌したトライコームが並んでいる。
- B 粘液の分泌量が減少したトライコームが並んでいる。
- C トライコームは確認できるが、粘液の分泌が見られない。
- D トライコームがない。(葉の表面の突起物がない。)



Fig. 5 4段階評価基準

5. 結果



Fig. 6 結果

左から① 水(対象), ② 1/4MS 溶液, ③ 1/2MS 溶液, ④ 乾燥, ⑤ 高温(34℃)

実験開始から①～③は78日, ④は64日, ⑤は43日 経過

(1) 水を与えた20個体 (Fig. 6 ① 実験 開始10/7, 終了12/23 78日間)

2ヶ月間での成長による変化は確認されたが、葉表面のトライコーム及び粘液の様子に変化は見られず、常にトライコームの先端に玉のように見える粘液を分泌していた。

Table 2 ① 水 各個体の4段階評価

回数	水	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	10/14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	10/28	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	11/4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4	11/18	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	12/9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
6	12/23	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

(2) 1/4MS 溶液を与えた 20 個体 (Fig.6 ② 実験 開始 10/7, 終了 12/23 78 日間)

水を与えた 20 個体と同様、葉表面のトライコーム及び粘液の様子に変化は見られなかったが、生育状態がよく、色が濃いなど葉緑素が多いことが確認できる。

Table 3 ② 1/4MS 溶液 各個体の 4 段階評価

回数	1/4MS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	10/14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	10/28	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	11/4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4	11/18	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	12/9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
6	12/23	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

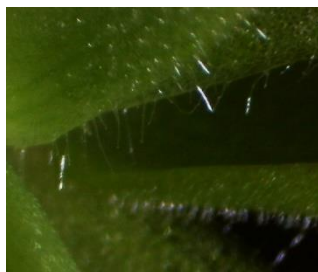
(3) 1/2MS 溶液を与えた 20 個体 (Fig.6 ③ 実験 開始 10/7, 終了 12/23 78 日間)

1/4MS 溶液を与えた 20 個体同様、明らかに色が濃く、葉緑素が多いことが確認できる。さらに比較的小型の 2 個体において、葉表面のトライコームの減少が見られ、粘液の分泌がなくなったことが確認され、仮説の通り、十分な栄養を得ると、葉の形質を変化させ、粘液を分泌しなくなるという形態を示した。(Fig.7(a)-1, 2))

またトライコームからの粘液の分泌を停止した葉では、その形状が変化しており、葉のカーブの向きが明らかに他と異なることがわかる。(分泌中は外向きにカーブし葉の先端が半円形となるが、分泌を停止すると内側にカーブし葉先が尖る。) (Fig.7(a)-1 と (b)-1)



(a)-1



(a)-2



(b)-1



(b)-2

Fig.7 1/2MS 溶液を用いたムシトリスミレ

(a)-1 トライコームからの粘液分泌がなくなった個体(番号 13), (a)-2 トライコームの様子(番号 13)

(b)-1 比較 同じ条件下で粘液を分泌している個体, (b)-2 比較 トライコームの様子(ただし(b)-1 とは別個体)

Table 4 ③ 1/2MS 溶液 各個体の 4 段階評価

回数	1/2MS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	10/14	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	10/28	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	11/4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4	11/18	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	12/9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	B	A	B
6	12/23	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	C

(4) 水を一切与えなかった乾燥条件 (Fig. 6 ④ 実験 開始 10/21, 終了 12/23 64 日間)

すべての個体でトライコームからの粘液の分泌は見られなくなったため、水を与えないことで粘液の分泌が停止することが明らかとなった。しかし明らかに各個体の生育状態が悪くなったうえ、葉そのものの形状変化は観察できず、Fig. 7(a)-1 とは異なっていた。

また 1 か月間水を与えなくても枯れることがなく、実験終了までに枯れた個体は 3 個体だった。比較で育てた緑豆は、水がない条件に移すと 3 日目で完全に枯死したことからも、ムシトリスミレの耐乾性が非常に高いことがわかる。

Table 5 ④ 乾燥 各個体の 4 段階評価

回数	乾燥	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	10/28	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	11/4	A	A	A	A	A	C	B	A	A	A	B	A	A	B	A	B	B	B	C	B
3	11/18	C	A	B	C	B	D	B	C	C	C	C	C	B	B	C	C	B	B	B	C
4	12/9	B	B	B	C	C	C	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	D	B	B	C
5	12/23			C	D	D		C	D	D	D	D	C	C	C	C	D	D	D	C	C

(5) 高温下に置いたもの (Fig. 6 ⑤ 実験 開始 11/11, 終了 12/23 43 日間)

乾燥以上に個体へのダメージが大きく、粘液の分泌は停止した。実験期間中 20 個体のうち 17 個体が枯れた。

Table 6 ⑤ 高温 各個体の 4 段階評価

回数	高温	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	11/18	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	12/9	D	D	C	D	D	C	B	B	D	D	D	C	B	B			D	D	D	
3	12/23						D				D								D		

6. 考察

- 1/2MS 溶液を与えて観察した個体群において 2 個体のみ粘液を分泌しなくなった。ムシトリスミレは、十分な栄養を得ると、葉の形質を変化させ、粘液を分泌しなくなる、という仮説の沿う結果を得たが 20 個体のうち 2 個体(10%)のため、仮説の実証にはさらなる継続的な観察が必要である。
- 1/2MS 培地(寒天培地)を用いたときには 10 日程でトライコームの形状に変化が見られたため、1/2 または 1/4MS 溶液を用いた場合でも、短時間で粘液の分泌をやめることを期待したが、変化が見られるのに 1/2MS 溶液で 2 か月以上要し、1/4MS 溶液では変化が現れなかった。また変化がみられる途中の段階のものが見つからず、分泌するのか、しないのか、というどちらかの形態をとっているのではないかと考えた。
- ムシトリスミレを栽培し、生育に不向きな夏の暑い時期に粘液の分泌が見られないことを確認したため、④, ⑤の条件も加えて実験を行ったが、明らかに個体の生育に悪影響を及ぼしており、生育条件のよい状態のままトライコームからの粘液の分泌をやめた 1/2MS 溶液の 2 個体とは異なっていた。

しかし栄養条件により葉に可塑性がある、ということを立証するにはさらに経過観察が必要であるうえ、水不足や高温による影響についてももう少しダメージの少ない状態では粘液の分泌停止から、葉の可塑性を引き起こす可能性があることも考えられる。

7. 展望

- 1/2MS 溶液で育てた個体の中に、粘液の分泌がなくなった2個体を見つけたが、どのような過程でそうなったのか、遺伝子のオン、オフのように切り替わるものなのか、他の個体や 1/4MS 溶液の個体群の粘液の分泌量は変化するのか、もし変化するのならどれくらいの期間が必要かなど検証をしたい。
- 粘液の分泌停止は、1/2MS 溶液に含まれる栄養が影響したと考えるが、それ以外の要因があることも否定できないため、別の条件を考え更なる継続的な観察が必要である。
- MS 培地を用いて葉挿しで得た個体を育てたときには、短時間で粘液の形成が確認できなくなったため、幼個体の方が、MS 溶液の影響を受けやすいのかもしれない。葉挿しを行う時期は、4～6月と限られているため、この時期に再度実験を行うのが望ましいと考える。
- ムシトリスミレは貧栄養地で生息できるため、希釈しないMS溶液を用いると生育にマイナスではないか、と考え実験の設定に入れなかった。しかし 1/2MS 溶液で観察を続けた場合でも、粘液を分泌しなくなるまでに2か月以上要したので、MS 溶液を用いた方が、短時間で結果が得られる可能性があり、条件の中に希釈をしないMS溶液を用いてもよいと考える。
- 今回の実験では、粘液の量を計測する手段として顕微鏡を使用したけど、先に観察した個体と比較してしまい、判断基準がぶれてしまう可能性を否定できないため、粘液の様子を観察する有効な手段を見つけない。

8. 感想

葉挿しを行った時に見られた変化から、この実験の仮説を立てたが、変化が見られたのは2個体であり、ハエトリスミレの葉の可塑性を完全に実証することはできなかった。しかし期待する変化を見せた個体が生じているので、新たに条件を加え実験することで、仮説を確かなものにした。

私たちの取り組んだ生物分野の研究は、結果が正確に出にくいため、思い通りにいかないことが多かった。しかし、「次にどのような実験をするのか」や「どのようなデータのとり方をすればいいのか」などを話し合い、静岡大学の竹本先生や担当教諭の指導を受けることで、より良い研究にすることができた。まだ足りない部分もあるため、もっと客観的な研究にできるように工夫を重ねたい。

9. 謝辞

研究を進めるに際し多くのアドバイスをくださり、また双眼実態顕微鏡を快く貸与してくださいました静岡大学グリーン科学研究所研究支援室技術専門職員 竹本裕之先生に心から感謝いたします。

10. 参考文献等

- Journal of Animal Ecology
Foraging modality and plasticity in foraging traits determine the strength of competitive interactions among carnivorous plants, spiders and toads/David E. Jennings, James J. Krupa' and Jason R. Rohr" 'Department of Integrative Biology, University of South Florida, 4202 East Fowler Avenue, Tampa, FL 33620, USA; and Department of Biology, University of Kentucky, Lexington, KY 40506, USA

- 生物物理 56 (5), 255-261 (2016)
食虫植物における形態複雑化メカニズムの解明
福島健児, 藤田浩徳
- 日本農芸学会 化学と生物 Vol. 55, No. 5, 2017
植物の根毛を作る遺伝子の働き 根毛・非根毛型を決めるしくみの遺伝的解析
富永るみ
- https://www.kyoto-su.ac.jp/project/st/st15_07.html
植物はどこで環境変化を感知しているのか
－ 環境によって姿を変えるニューベキアを用いた表現型の可塑性についての研究 －
京都産業大学 総合生命科学部 生命資源環境学科 木村成介