

[他誌掲載論文]

水草研究会誌, No. 102 (2015), 19～23 より転載

室内培養によるカワヂシャ *Veronica undulata* の
種子生産及び種子発芽率

加藤貴央, 石原 悟

独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部,
東京都小平市鈴木町 2-772

- ・本論文の著作権は、水草研究会が所有していますが、著作権所有者の許可を得て転載しています。

室内培養によるカワヂシャ *Veronica undulata* の 種子生産及び種子発芽率

加藤 貴 央¹⁾・石原 悟¹⁾

Takahiro Kato and Satoru Ishihara : Seed production and germination rate of
Veronica undulata cultured under laboratory conditions

はじめに

農薬は水田や畑など主として野外で使用されるため、その使用にあたっては生態系への影響に関するリスク評価が求められている。水生植物に対する農薬の影響評価では、国際的な試験指針が定められている藻類 (OECD, 2006a) とウキクサ (*Lemna* sp.) (OECD, 2006b) の生長阻害試験の結果が主に活用されており、我が国では藻類 (単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いた生長阻害試験 (農林水産省, 2000) が環境省の定める水産動植物への毒性に係る登録保留基準値の設定に活用されている。近年欧州を中心に、ホザキノフサモ (*Myriophyllum spicatum*) を供試生物とした生長阻害試験法 (OECD, 2014) が開発されるなど、供試可能な水生植物種の拡大が進められているものの、未だに水生植物に対する農薬の影響試験法は充実しているとは言えない。

農薬の生態系への影響に関するリスク評価法としては、曝露量と毒性値を比較し二者択一的にリスクの有無を評価する決定論的リスク評価が一般的であるが、より効率的な農薬のリスク管理を可能とする評価手法として、リスクを定量的な指標で表すことができる確率論的リスク評価が有効であると考えられている (永井ら, 2009)。確率論的リスク評価では、多種生物の薬剤感受性を統計学的に示した種の感受性分布 (SSD : Species Sensitivity Distribution) が用いられる。SSD

の推定には、最低でも5属以上の供試生物種が必要とされている (OECD, 1995 ; U.S. EPA, 1985) ことから、既に試験指針が定まっている生物種に加え、更なる生物種を追加することは意義深い。

これまでに我々は、国内に生息する単子葉水生植物のウキクサ (*Lemna* sp.)、ミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*)、水生シダ植物のサンショウモ (*Salvinia natans*) などを供試生物種とした生長阻害試験の開発を進めてきた (石原ら, 2010 ; 石原, 2011, 2012)。双子葉の水生植物としては、カワヂシャ (*Veronica undulata*) が新たな供試生物種として有望であると考え検討を進めている。

カワヂシャは日本の在来種であり、本州以西の川岸や水田などの水湿地に自生するオオバコ科の双子葉被子植物である。カワヂシャは種子の発芽率が高く (佐々木, 2004)、その植物体サイズ及び生長速度等の性質から、幼体を用いることで室内培養による省スペースでの生長阻害試験の設計が可能であり、供試生物種としての適性が高い種であると考えられた。

そこで本研究では汎用性の高い生長阻害試験法の確立を目標に、生長阻害試験の供試生物としてのカワヂシャの適性を評価するため、種子採取のための室内培養法の検討、室内培養で採取した種子の発芽率の調査及び種子の保存法の検討を行った。

¹⁾ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター 農薬検査部 e-mail: takahiro_kato@acis.famic.go.jp

材料と方法

(1) 供試生物種の準備

2013年5月21日に東京都東久留米市落合川より採取したカワヂシャを当センター農薬検査部内の敷地へ移植して栽培したところ開花・結実が認められた(図1)。褐色を帯び種子が成熟したと考えられた果実を適宜採取し、乾燥・低温(4℃)・暗黒条件下で保存した。試験には、単一個体から得られた種子を用いた。

(2) 種子生産のための室内培養条件の検討

1.5%の寒天 SIS 培地(OECD, 2006b)に(1)で調製した種子を播種し、明期24時間、温度 17 ± 2 ℃、光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の条件下で培養した。発芽後、明期16時間、温度18, 20, 22及び 24 ± 2 ℃の4段階の温度条件(各3連)で、播種後から90日間培養を行い、花芽形成に及ぼす温度条件を検討した。開花・結実した個体については開花時期、蕾数及び種子数を調査した。なお、本稿で示す全ての試験について、培養は光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ を維持するよう照明(NEC製、

FL8N, 昼白色蛍光灯)付き培養器(İKUTA製, A4201D 2L)内で行い、培養器内の水温は温度データロガー(T&G社製, RTR-52A)を、光量子量は光量子計(Senecom社製, SE-MQ200)を使用して測定した。

(3) 室内培養における種子の成熟期間

1.5%の寒天 SIS 培地に(1)で調製した種子を播種し、明期24時間、温度 17 ± 2 ℃、光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の条件下で培養した。発芽後、明期16時間、温度 24 ± 2 ℃の温度条件で培養し、開花12日後、16日後及び20日後にそれぞれ種子を採取し、発芽試験を行った。発芽試験は、培地;液体 SIS 培地(1ウェル当たり200 μL)、明期24時間、温度 17 ± 2 ℃、光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の環境条件で、96ウェルマルチディッシュプレート(nunc社製、丸形/平底)を用いて行った。

(4) 種子の保存法の検討

種子の保存法については、湿潤・低温(4℃)・暗黒条件及び乾燥・低温(4℃)・暗黒条件下で



図1. 試験に用いたカワヂシャ A: 野外での栽培の様子, B: 花及び葉緑の形態



図2. 各温度区における播種90日後の様子



図3. 室内で培養したカワヂシャの花及び果実

の保存を検討した。発芽試験は(3)と同条件で行い、保存種子の発芽率を調査した。

結果と考察

(1) 種子生産のための室内培養条件

90日間室内培養した結果、野外で栽培した場合よりも生育が劣るが、22及び24℃区において平均50日以内、20℃区において平均60日以内に花芽が形成された(図2)。18℃区では他温度区よりも強い矮化が認められ、90日後においても花芽は形成されなかった(図2)。また、90日後の20、22、

24℃区において、蕾は平均で13以上、種子は平均で200以上、最低でも100以上が得られた(表1)。一度の生長阻害試験の実施に必要な供試生物の最低数は45個体(対照区10連、溶剤対照区10連、曝露区5濃度×5連で試験を行った場合)であることから、検討した条件下において、1個体から播種後2ヶ月以内に生長阻害試験に供試するのに十分な数の種子が得られることが明らかになった。

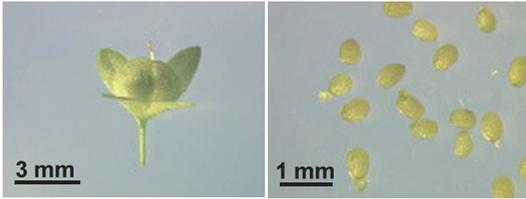
(2) 室内培養における種子の成熟期間

種子の外観は開花12日後で緑色、16日後でやや褐色に変色、20日以降では褐色であった(図4)。成熟度合いの異なる種子を用いて発芽試験を実施した結果、開花12日後の種子では発芽は見られなかったが、開花16日後、20日後の種子では高い発

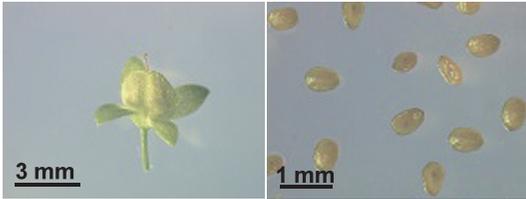
表1. 平均開花日数、種子数と発芽率

温度区(℃)	平均開花日数	1個体当たり平均		発芽率
		蕾数	種子数	
18	>90	-	-	-
20	57	14	232	98%
22	47	13	322	97%
24	47	15	316	98%

◆開花12日後



■開花16日後



▲開花20日後

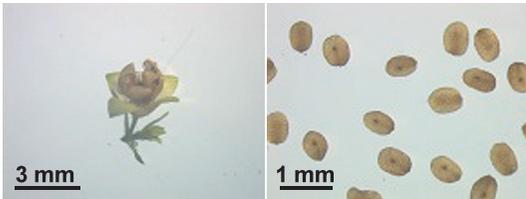


図4. 各成熟度合いの果実及び種子

芽率 (>97%) を示した (図5). このことから野外から採取された種子 (佐々木, 2004) に限らず室内培養における種子についても休眠性は認められず, 目視で成熟 (褐色化) が確認できた種子は直ちに試験に用いることができると考えられた.

(3) 種子の保存法の検討

湿潤・低温 (4℃)・暗黒条件下では, 6ヶ月後には, 発根及びカビの発生が認められた. 一方, 乾燥・低温 (4℃)・暗黒条件下では, 1年間保存していた種子でも高い発芽率 (>97%) が認められた. 本結果より, カワヂシャの種子は, 乾燥・低温 (4℃)・暗黒条件下で高い発芽率を維持したまま長期保存 (1年以上) が可能であることが明らかになった.

おわりに

カワヂシャの供試生物としての適性を評価するため, 室内培養での種子採取のための室内培養法の検討, 室内培養で採取した種子の発芽率の調査, 種子の保存法の検討を行った. その結果, カワヂシャは室内培養により容易かつ安定して発芽率の高い種子を供給できることから, 生長阻害試

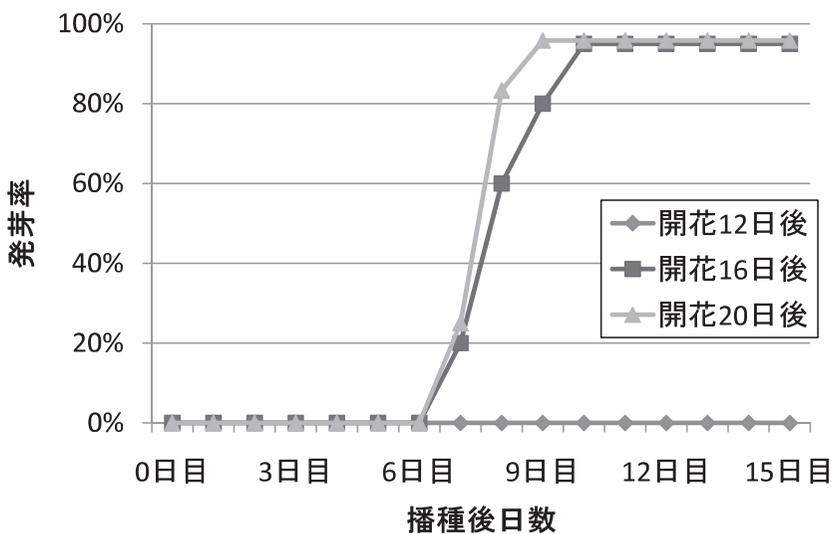


図5. 成熟度合いが異なる種子の発芽率

験の供試生物としての適正が高いことを確認した。

双子葉水生植物に対する化学物質の影響評価を行う試験としては、ホザキノフサモを用いた生長阻害試験 (OECD, 2014) が定められているが、当該試験は栄養繁殖体を供試生物に用いるため、試験準備として常に植物体の維持管理が必要である。また、培地にショ糖を用いるため、カビ等による汚染の危険性が高く、無菌的な供試生物の維持は難しいことから、藻類やウキクサの生長阻害試験と比較すると難易度が高い試験であると考えられる。一方、カワヂシャは概ねウキクサの生長阻害試験指針に沿った条件で試験が可能であると考えられることから、双子葉水生植物に対する化学物質の影響評価を行う簡易な試験方法としての活用が期待される。

引用文献

- 石原 悟, 2011. ミジンコウキクサを供試生物とした生長阻害試験法の検討. 農林水産消費安全技術センター 平成23年度調査研究報告.
- 石原 悟, 2012. 水生シダサンショウモ (栄養繁殖個体) を供試生物とした生長阻害試験法の検討. 農林水産消費安全技術センター 平成24年度調査研究報告.
- 石原 悟・佃 美和, 2010. *Lemna* 属ウキクサを用いた生長阻害試験の試験条件の検討. 雑草研究 55 : 152.
- 永井孝志・稲生圭哉・横山淳史・岩船 敬・堀尾剛, 2009. 水稲用除草剤の確率論的生態リスク評価. 日本リスク研究学会第21回年次大会講演論文集 22 : 397-402.
- 農林水産省, 2000. 農薬の登録申請に係る試験成績について (平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知).
- OECD, 1995. Guidance document for aquatic effects assessment. Organization for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2006a. OECD guidelines for the testing of chemicals freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Organization for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2006b. OECD guidelines for the testing of chemicals *Lemna* sp. growth inhibition test. Organization for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2014. OECD guidelines for the testing of chemicals Sediment-free *Myriophyllum spicatum* toxicity test. Organization for Economic Co-operation and Development.
- 佐々木英代, 2004. カワヂシャ. オオカワヂシャの発芽特性について一家庭用電気冷蔵庫を利用した発芽試験一. 水草研究会誌 80 : 6-10.
- 山崎 敬, 2003. ゴマノハグサ科. 清水建美編, 日本の帰化植物. pp.184-191. 平凡社.