

ペットボトルで簡単組織培養

壺阪廉太郎・藤岡叶夢・川島笙寛 指導教員 田村 統
(兵庫県立龍野高等学校 自然科学部)

1. 動機及び目的

兵庫県花ノジギクは、県鳥コウノトリに比較して認知度が低く、実物も見ることがない県民が多い。ノジギクを理科や環境教育の教材として活用することができれば、兵庫県花ノジギクに対する認知度も高まると考えた。

そこで、滅菌に微酸性電解水を使いキク花卉を使った簡単な組織培養技術を開発することにした。目標値は培地の滅菌成功率90%、植物体の滅菌成功率90%、クリーンベンチをつかわない植物の移植成功率90%、カルス形成率90%以上とした。

2. 実験方法

材料 培養容器 (加熱滅菌しないのでペットボトルなど非耐熱性容器でよい)、ピンセット、プラスチックコップ、スプレーボトル、鍋、コンロ、オタマ、漏斗、スプレーギク、パラフィルム
培地 (1Lあたり)

グラニュー糖 20g、MS培地(粉末)4.4g、ゲランガム 3.0g、植物ホルモン (NAA 1mg KIN 1mg)
微酸性電解水 1000ml

手順

- ① 使用するペットボトルはよく洗い、内部に汚れがないようにする。
- ② ペットボトル内を滅菌するために、容器内に微酸性電解水を25ml入れた。ふたをし10秒程度、激しく容器を振って内部を滅菌した。
- ③ ペットボトル内部の微酸性電解水は、そのまま容器内に残しておき、⑦で植物ホルモンを添加した培地の滅菌につかった。
- ④ ビーカーなどに目的の濃度の2倍のショ糖、MS培地(粉末)、ゲランガムを量りとり、ガラス棒でよくかき混ぜた。
- ⑤ 微酸性電解水500mLを加熱し、④の培地を溶かした。
- ⑥ 培地の成分が十分に溶けたら、植物ホルモン(NAAとKIN各1mg)を加えてかき混ぜた。その後、微酸性電解水で滅菌した容器に25mLずつ分注した。
- ⑦ 培地の分注後、容器の滅菌に使用した容器内の微酸性電解水と分注した培地がよく混ざるように軽く揺すり、培地を滅菌した。
- ⑧ ふたとペットボトルの口に微酸性電解水を噴霧して滅菌してからふたをしめた。
- ⑨ 培地を固まるまで静置した。
- ⑩ ピンセットで総包外片を除去し、外気にふれていないつぼみ内の花卉を取りだした。
- ⑪ 小瓶に微酸性電解水と、花卉を10枚程度入れて激しく3分以上振り花卉を滅菌した。
- ⑫ 微酸性電解水で滅菌したピンセットでペットボトル内に花卉を数枚ずつ入れた。
- ⑬ ふたの内側と培養容器の口付近に微酸性電解水を噴霧し滅菌後にふたをした。
- ⑭ パラフィルムでふたと容器の隙間をふさいだ。

3. 結果 (実験は1月・7月・11月に実施)

2022年1月15日置床：スプレーギク(タンポポ型)

- ・18本のペットボトルを使って実験した。従来のオートクレーブによる培地の滅菌でなくても、植物ホルモンを添加した培地は、微酸性電解水で滅菌は可能であった。成功率 100% (18本中)

- ・ 花卉の滅菌についても、微酸性電解水で滅菌が可能であった。従来の次亜塩素酸ナトリウム水溶液による滅菌と比較してもかわらなかった。成功率 100% (10 本中)
- ・ 従来、組織培養はオートクレーブやクリーンベンチなどの高価な機器が必要だが、空気中のカビの胞子など、微酸性電解水を噴霧して落としたりすることで、クリーンベンチを使用せずとも花卉を置床することができた。成功率 100% (18 本中)
- ・ カルス形成後に 18 本中 3 本生物的汚染 (以下コンタミ) が起こった。汚染率 16.7%
- ・ 5 月以降カルスは褐色に変化しすべて枯死した。

2022 年 7 月 18 日置床：スプレーギク (ヒマワリ型)

1 月と比較し浮遊するカビの胞子などコンタミの原因物質は多いと考えられる。基本的な方法は 1 月と同様だが、花卉の滅菌は微酸性電解水のみでおこなった。容器の管理場所は、高温障害による枯死の避けるため、恒温培養器 (25℃) で管理した。

- ・ 22 本のペットボトルについて微酸性電解水ですべての培地の滅菌が可能であった。成功率 100% (20 本中)
- ・ 花卉の滅菌は、22 本中 6 本が十分に滅菌できていないため、培養中に花卉にカビが生えた。成功率 78.6% (22 本中)
- ・ 花卉の脱分化が確認されカルスの形成できたものは、コンタミがない容器については 100% 形成された。カルス形成率 100%

2022 年 11 月 18 日置床：ノジギク (ヒマワリ型)

雨露があたる校内の花壇で栽培しているノジギクを使用。成長しきった舌状花 6 つと、成長過程にある舌状花 8 つを置床した。結果、12 月 26 日に調べたところ、成長しきった舌状花は 4 つが枯死し 2 つがカルスをつくった。成長過程の舌状花は 1 つがコンタミし、1 つが枯死した。残る 6 つはカルスを形成した。

ノジギクでもカルスの形成は容易であるが、花卉が小さいのでカルスも小さく、置床するときにピンセットで花卉を傷つけると茶変し枯れやすいことがわかった。

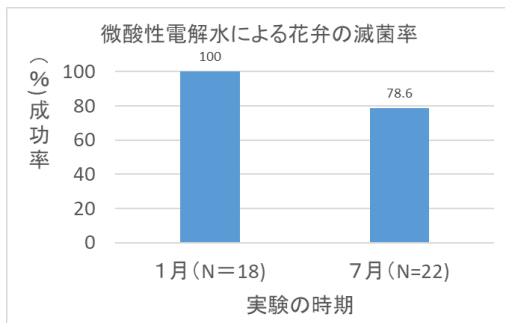


図1 時期による花卉の滅菌成功率

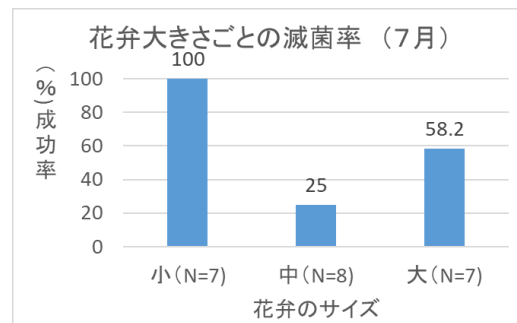


図2 花卉のサイズと滅菌成功率

4. 考 察

1 月のスプレーギク (すべて舌状花型) を材料にした実験において、18 本すべての培地を滅菌できたが、カルス形成後にコンタミをおこすものが 18 本中 3 本あった。これは、従来クリーンベンチをつかう場合であっても起こることなので微酸性電解水添加培地が劣っているわけではない。また、気温の上昇に伴いカルスが褐色に変化し枯死した。7 月の実験では 25℃で管理しているが、同様にカルスが枯死しており、原因は培地の養分切れの可能性もある。

7 月のスプレーギク (中心部は筒状花) を材料にした実験ではコンタミが多く発生した原因を調べたところ、中型の花弁での発生が多かった。植え込み前の花卉の写真を確認したところ、花卉の基部が褐色に変化していた。つまり、傷んだ花卉は微酸性電解水では滅菌できないことがわかった。

実験に使用する時、花卉の傷にか留意すべきであることが分かった。

また花卉が大きい場合、微酸性電解水で滅菌するとき、容器内の花卉数が多いと花卉の重なる部分がうまく滅菌できないため、小さい花卉よりも滅菌成功率が低いと考えられた。

11月のノジギクを材料にした実験では、校内で露地栽培していたノジギクを使った。ノジギクは花卉の大きさがスプレーギクよりもかなり小型で、置床時にピンセットで花卉を痛めると花卉の枯死が多くなるようであった。しかし、カルスの形成はスプレーギクと変わらず容易であった。

組織の脱分化およびその後のカルス化については、微酸性電解水を含む植物ホルモン添加培地であっても問題はなかった。

高校生の実験として、脱分化やカルスの形成などを観察するのであれば、ハウス栽培されているスプレーギクのすべて舌状花のつぼみの内側の花卉であれば、滅菌しやすく置床時の傷みもあまり問題にならない。



中型花卉の基部が褐変

5. 反省と課題

植物ホルモンを含有した培地であっても微酸性電解水で100%滅菌できたが、花卉の微酸性電解水による滅菌は、目標値90%を下回った。花卉に傷みがないことを確認することで目標値に達すると考えられる。微酸性電解水を含む培地でも正常に脱分化が起こりカルスは形成された。高価なオートクレーブやクリーンベンチやクリーンボックスなしにキク花卉を培地に置床することができた。

また、微酸性電解水をつかえばペットボトルなど非耐熱性容器を利用できるので、コスト面でも従来の方法よりも利点がある。

今後はカルスからの再分化による個体の増殖について挑戦したい。できれば応用として、希少植物の増殖技術の開発に挑戦したい。

微酸性電解水製造機が各学校の保健室などで使われるようになれば、「エンジンの組織培養」よりも簡単にできる実験として定着する可能性がある。



図4 スプレーギクのカルス



図5 カルスの再分化（枯死）

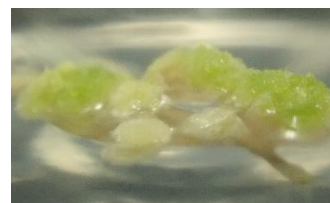


図6 ノジギクのカルス

6. 謝辞

長崎県立長崎南高校土橋先生からキク花卉の組織培養を直接御指導いただいた。

兵庫県農業総合センターより、論文「キク小花培養の利用法」を提供していただいた。

ノジギクは株式会社日本触媒より提供していただいた。

7. 参考文献

- 1) 市橋万貴子・藤野守弘 (1976) : キク小花培養の利用法, 兵庫県農業総合センター研究報告第5号: 1-6
- 2) 土橋敬一 (2019) : 簡単にできる組織培養 ~授業実験でできるキクの花弁培養~, 啓林館生物授業実践記録 <https://www.shinko-keirin.co.jp/keirinkan/kou/science/seibutsu-jissen.html>
- 3) 田村統ほか (2010) : 生物多様性の保全のために 微酸性電解水をもちいた無菌培養, 共生のひろば 5号, 53-54