

1. 動機及び目的

私たちは「生物多様性龍高プラン」の一環としてサギソウの無菌播種に取り組んでいる。この技術を小学校の環境教育でも活用できるようにクリーンベンチやオートクレーブなど高価な設備を必要としない実験方法について開発することにした。

またこの技術を高校生のバイオテクノロジー生徒実験にも応用できると考えた。従来の方法は「ニンジン形成層からのカルス形成と再分化」であるが、ニンジンの形成層の切り出しなどにクリーンベンチが不可欠であり、オートクレーブを使用した培地の滅菌では加熱から、冷却まで長時間かかる。

昨年はペットボトルを培養容器として「キク花卉のカルス形成」を行ったが、花卉の置床後広い管理場所が必要であり、培地も多く使用する欠点があった。

そこで、今回はより小型で密封できる容器としてチャック付きミニポリ袋を培養容器として、サギソウの無菌播種。および、キク花卉のカルス形成ができる実験方法の開発に取り組んだ。

滅菌には微酸性電解水を使う。目標値は培地の滅菌成功率95%、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（小型チャック付きビニル袋）、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、パラフィルム、スプレーギク、サギソウの種子

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（NAA1mg KIN1mg）
微酸性電解水1000ml、

培地の製造手順

- ① 培養容器となるチャック付きポリ袋内に微酸性電解水を噴霧し滅菌する。
- ② ビーカーなどに規定の濃度となるようにショ糖、MS 培地（粉末）、ゲランガムを量り、ガラス棒でよくかき混ぜた。
- ③ 鍋に微酸性電解水1000ml と②の培地入れて加熱して溶かした。オートクレーブで加熱滅菌

しないのでここで完全にゲランガムを溶解させておく。

- ④ 培地の成分が十分に溶けたら、植物ホルモン（IAA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ミニポリ袋に15mL ずつ分注した。
※ サギソウ無菌は種の場合植物ホルモンを添加しなかった。
- ⑤ 培地を固まるまで静置した。

サギソウの無菌播種

- ① 微酸性電解水とサギソウ種子を小瓶に入れて5~10分程度良く振って種子を滅菌した。
- ② 銅線で作製した、播種棒でサギソウ種子をすくいと、ミニポリ袋内に播いた。種子の落下とコンタミの防止のため微酸性電解水を袋内に噴霧した。

キク花卉の置床

- ① ピンセットで総包外片を除去し、外気にあまりふれていないつぼみ内の花卉を取り出す。
- ② あらかじめ、小瓶に微酸性電解水と、花卉を10枚程度入れて激しく3分以上振り滅菌する。
- ③ 微酸性電解水で滅菌したピンセットを使用して、小型チャック付きビニル袋に花卉を2枚ずつ入れた。
- ④ 微酸性電解水を噴霧して、滅菌し袋を閉じた。
※キクは多数の花が咲くスプレーギクを使うことで、開花間もない花を選択できる。外気にあまり触れていない花卉を使用した。
スプレーギクは、タンポポのようにすべて舌状花の品種を使用した。

播種や花卉の置床後の管理

実験後は、室内の明るい日陰で管理した。

3. 結果

チャック付きポリ袋で培地を滅菌できたのか？

表1 チャック付きポリ袋を使用した無菌培地の製造

製造日	確認日	播種数	汚染数	滅菌率 (%)	培地
1.20	3.21	16*1	0	100	MS培地
3.31	4.14	20*1	0	100	MS培地*2
6.28	7.12	32*1	0	100	MS培地*2
7.15	7.26	71	1	98.5	MS培地*2

リ袋以外の容器にも分注 *2 植物ホルモン(NAA,KIN)を添加

1月から7月にかけて4回の実験で139袋の培地を製造したところ、コンタミが起こったのは1袋のみであった。

培地を注入するときに、袋の口や口付近を汚さなければ、微酸性電解水で十分に培地や袋を滅菌

できる。

また、培地1L あれば、60袋以上の培地を製造できるので、1クラス（40人）分の材料としては十分である。

小さな空間で植物は育つのか？

表2 サギソウの無菌播種 2023年1月実施

播種日	確認日	播種数	汚染数	発芽率 (%)	培地
1.20	3.2	13	0	100	MS培地

13個のポリ袋にサギソウを播種した。播種時のコンタミはなかった。球根の形成は袋により多少の早い遅いや大小はあったが、球根は形成した。



図1 サギソウのチャック付きポリ袋栽培

キク花卉はカルスを形成するのか？

表3 キク花卉の組織培養 2023年度1月・7月実施

置床日	確認日	置床数	汚染数	汚染率 (%)	形成率 (%) ^{*1}	培地
1.20	4.14	20	0	0	45	MS培地 ^{*3}
7.15	8.2	23	2	8.6	100 ^{*2}	MS培地 ^{*3}
7.16	8.2	9	0	0	100	MS培地 ^{*3}

*1 脱分化後のカルスの形成率 *2 コンタミを除く

*3 植物ホルモン(NAA,KIN)添加

4月～8月にかけて52の植物ホルモンを添加した培地に花卉を置床した。うち、2つで置床時のコンタミが発生した。

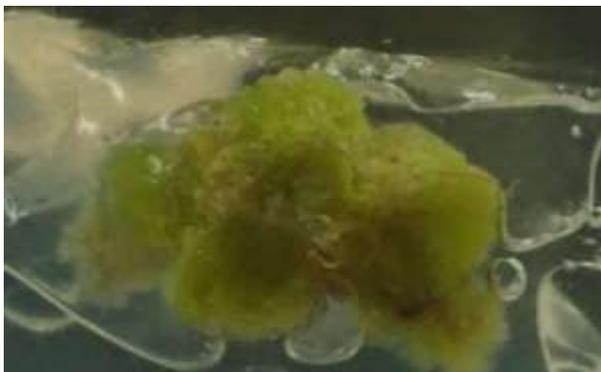


図2 キク花卉が脱分化し生じたカルス

カルスの形成率は実験日より異なった。3月31日に実験したものはカルス形成率が45%と低調で

あった。これは、気温が低いと花卉が脱分化するまえに枯死したためと予想された。

気温が高くなった、7月では置床時にコンタミしたものを除けば、100%カルスを形成した。

播種や置床時に微酸性電解水を噴霧することでコンタミを防止することはできた。

すべての目標値を達成したが、これらの結果は実験慣れした部員の技術に依存している可能性がある。そこで日本生物教育会全国大会大阪大会で「ほんまにできるバイオ実験」として発表し、20名の先生方や生徒にポスター発表の会場でキク花卉の置床をおこなってもらった。2回実験をして、1つを龍野高校で管理した。クリーンベンチはもちろん使用していない。結果は20名中置床時のコンタミは2名で



図3 日本生物教育会で実習



図4 明るい日陰で管理

あった。その後カルス形成後にコンタミするものがいくつかあった。

4. 考察

100%の成功率を求めないのであれば、クリーンベンチ・オートクレーブがなくても、微酸性電解水の使用により、サギソウ無菌播種やキク花卉の組織培養は可能である。

なお、サギソウの球根形成においては同時期に培養瓶に播種したものよりも良好であった。

6. 謝辞

長崎県立長崎南高校土橋先生から「簡単にできる組織培養」を直接ご指導いただいた。

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。

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
- 4) 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>
- 5) 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