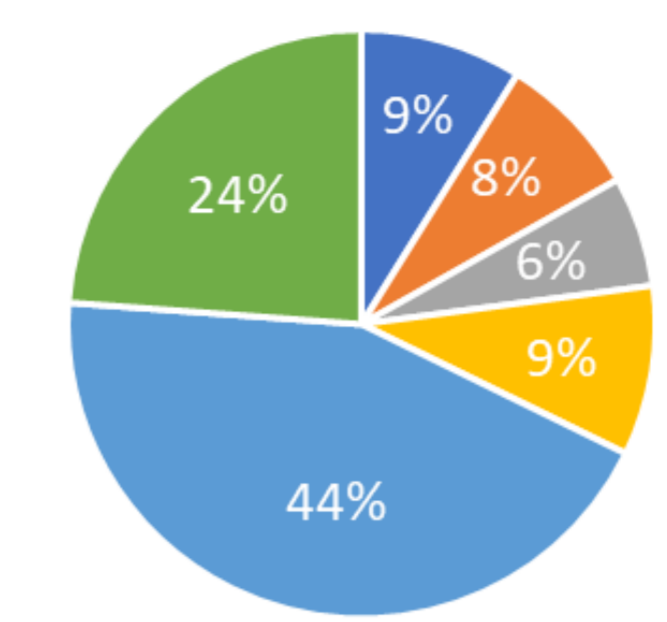
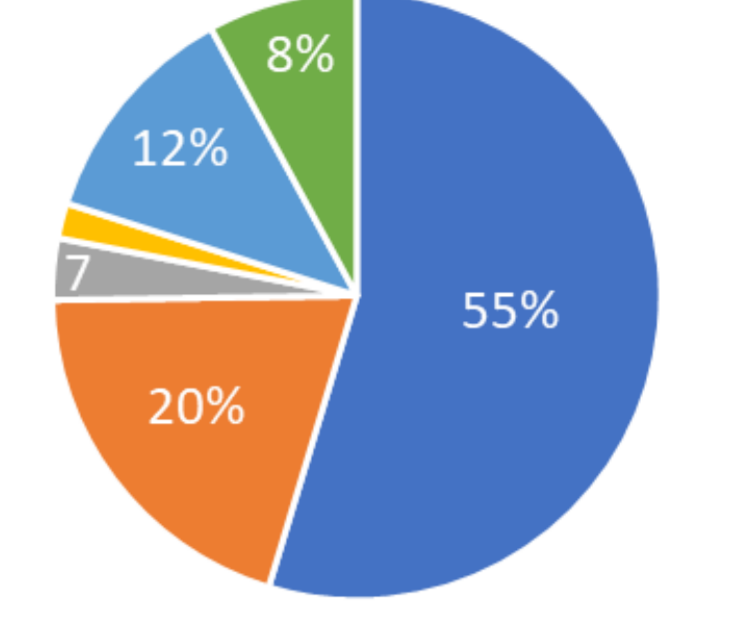


従来組織培養実験には、ニンジンの根の形成層をもちいる方法が一般的である。しかし実験には高価なクリーンベンチやオートクレーブを必要とする。そこで高価な設備のない学校でもできる組織培養実験の方法を開発した。組織培養実験にはキクの花弁が有効であることを、長崎南高校小幡先生より教示していただき、最終的には兵庫県花ノジギクの教材化も視野に入れて実験にとりくんだ。

県花ノジギクの認識率



県鳥コウノトリの認識率



### 今回の実験の目的

**オートクレーブ・クリーンベンチ  
不用の簡単組織培養技術の開発**

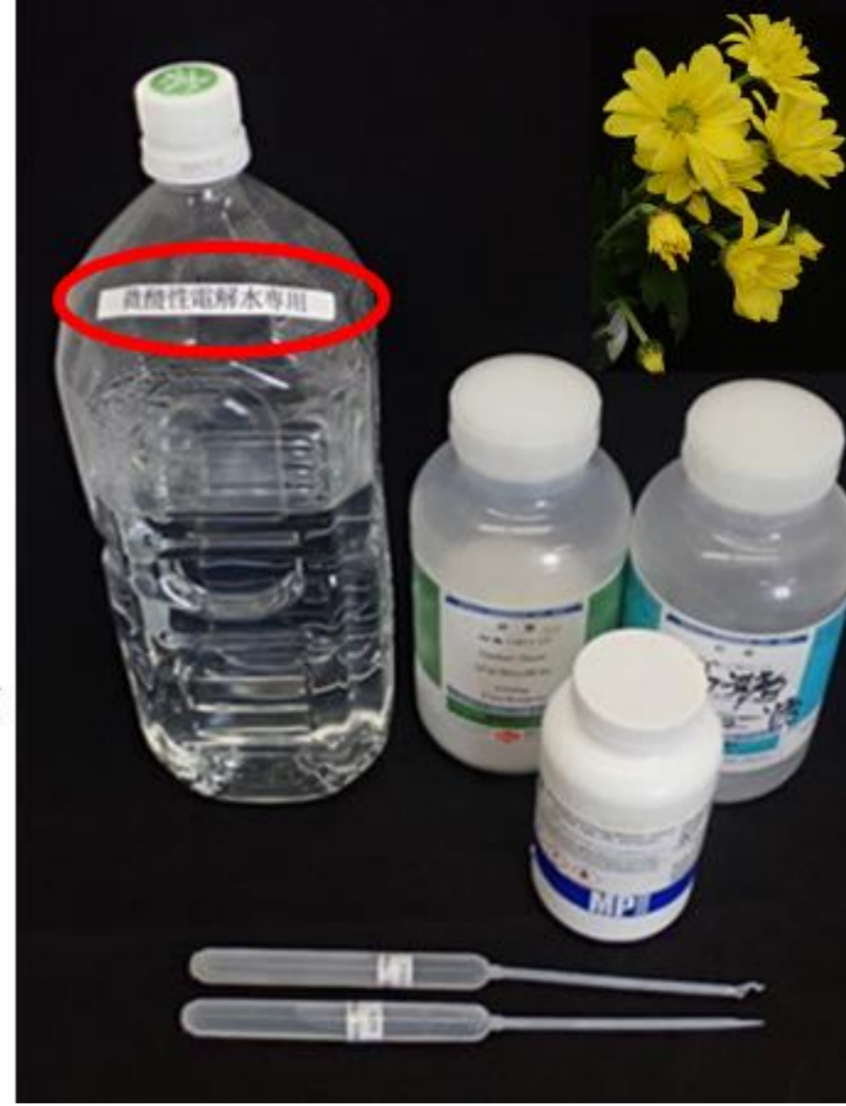
加熱・次亜塩素酸Na水溶液での滅菌  
→ **微酸性電解水で滅菌**

培地の滅菌 培養容器の滅菌  
植物体の滅菌 器具の滅菌

**兵庫県花ノジギクの組織培養の教材化**

### 準備物

- <材料>
- 培地
  - グラニュー糖 20g
  - MS培地 4.4g
  - ゼランガム 3.0g
  - 植物ホルモン
  - NAA1mg KIN1mg
  - 微酸性電解水500mL
  - スプレーギク
  - パラフィルム 密封用



### 実験方法



### 冬季 2022年1月15日 実施

表1 次亜塩素酸ナトリウム水溶液（ハイター10倍液）による花卉の滅菌 実験日 2022.1.15

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
殺菌時間	1分	2分	3分	4分	5分	6分	7分	8分
培地の滅菌	○	○	○	○	○	○	○	○
カルスの形成	+	++	++	+	+	+	+	+
管理期間中のコンタミ	-	-	-	-	-	-	-	-

表2 微酸性電解水による花卉の滅菌 実験日 2022.1.15

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
殺菌時間	3分以上	3分以上	3分以上	3分以上	3分以上	3分以上	3分以上	3分以上	3分以上	3分以上
培地の滅菌	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
カルスの形成	+	++	++	+	+	+	+	+	++	++
管理期間中のコンタミ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

評価基準 培地の滅菌 ○:コンタミ無し; ○:コンタミあり; ×:コンタミあり  
 評価基準 カルスの形成 +:形成している ++:大きく形成している +++:再分化が見られる  
 評価基準 管理期間中のコンタミ -:汚染が見られない +:カビや細菌の汚染がある

### 夏季 2022年7月18日 実施

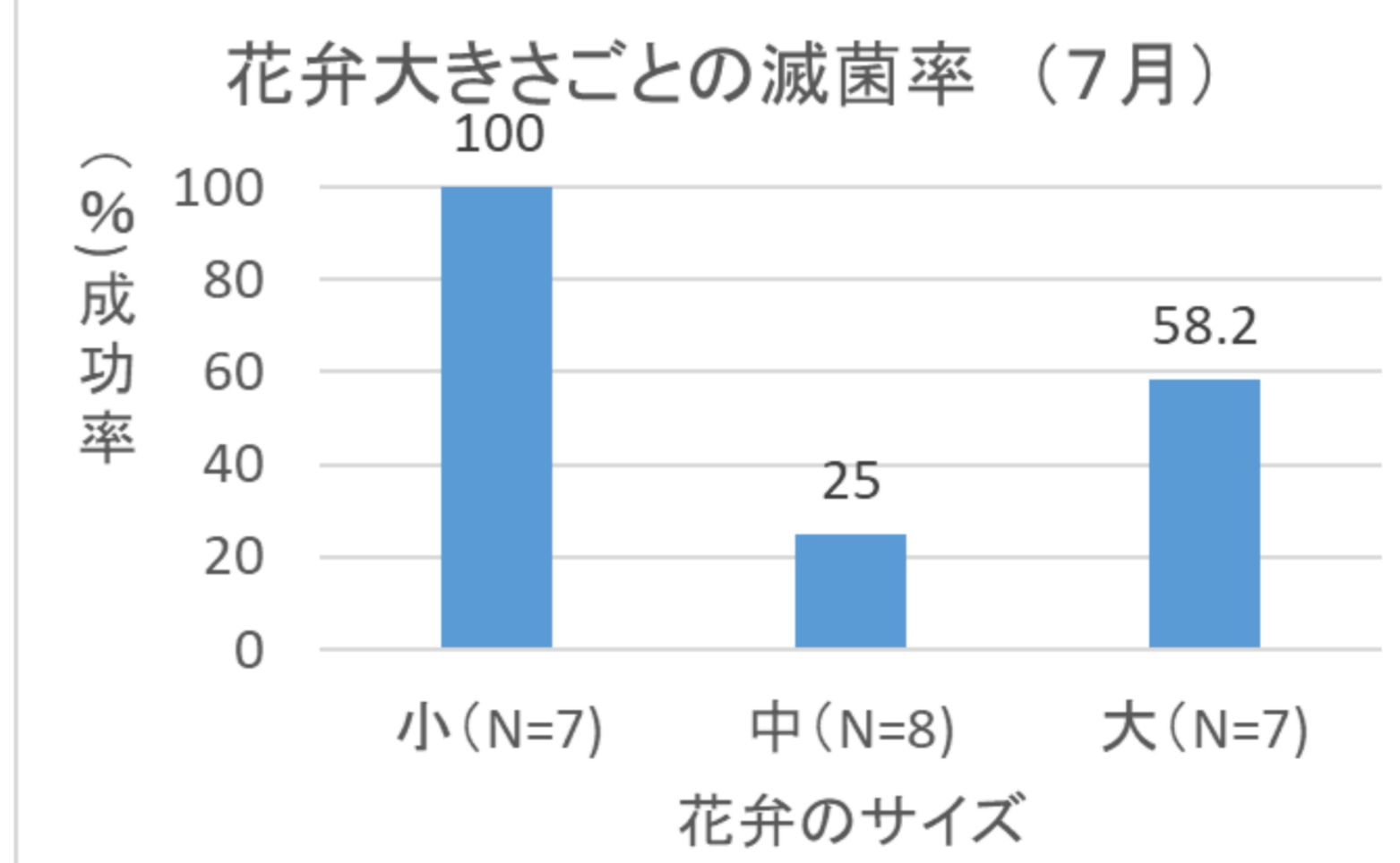
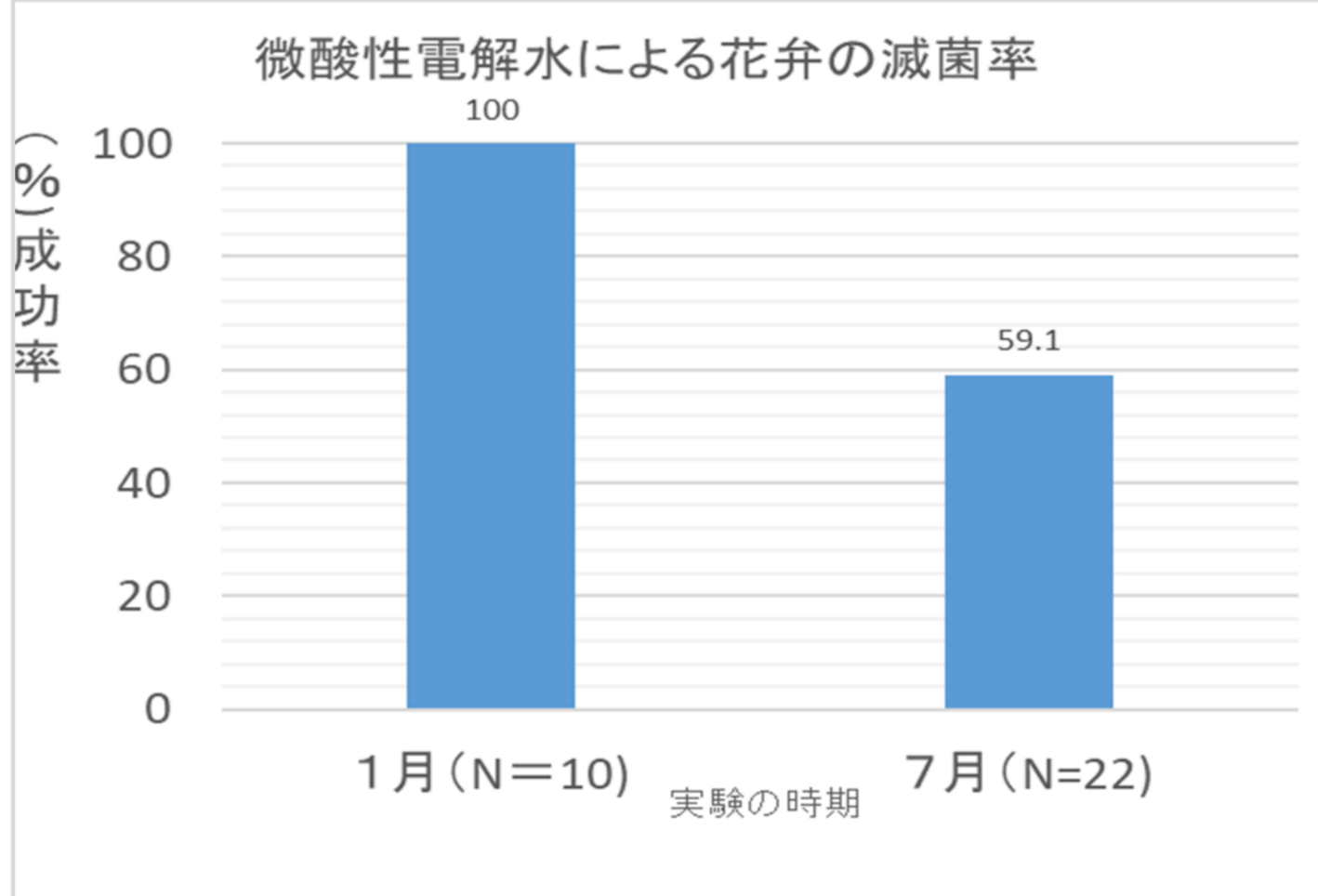
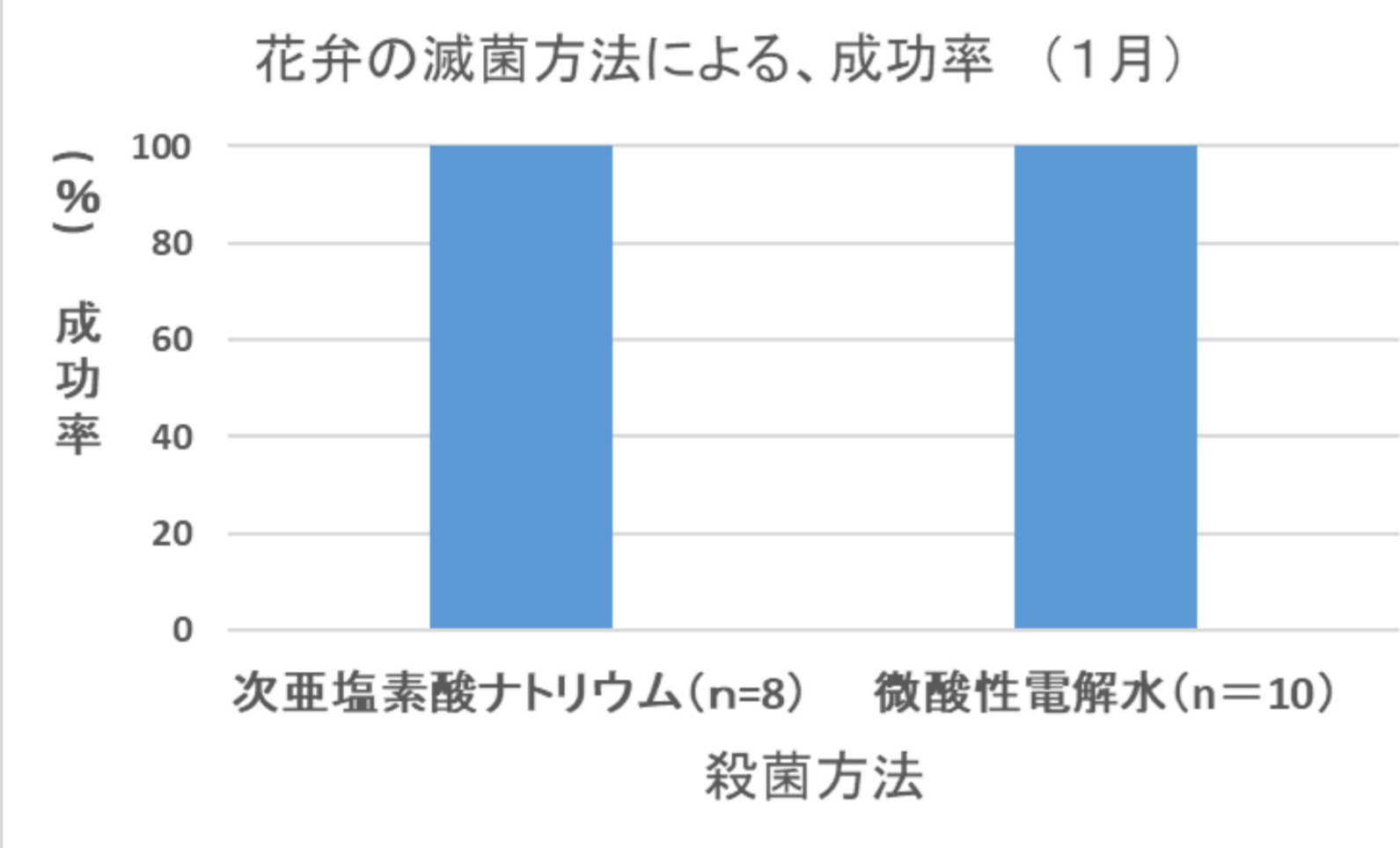
表3 水平培地でのカルスの形成 実験日 2022.7.18 調査日 2022.8.3

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
培地の滅菌	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
花卉のサイズ	小	小	小	中	中	大	大	大	大	大	大	大
カルスの形成	○	○	○	+	+	+	+	+	+	+	+	+
管理期間中のコンタミ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
カルスのサイズ	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

表4 傾斜培地でのカルスの形成 実験日 2022.7.18 調査日 2022.8.3

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
培地の滅菌	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
花卉のサイズ	小	小	小	中	中	大	大	大	大	大	大
カルスの形成	○	○	○	+	+	+	+	+	+	+	+
管理期間中のコンタミ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
カルスのサイズ	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

評価基準 培地の滅菌 ○:コンタミ無し; ○:コンタミあり; ×:コンタミあり  
 評価基準 花卉の位置 内:つぼみの内側(花卉小さい) 外:つぼみの外側(花卉大きい) 中:内と外の間  
 評価基準 培地の滅菌 ○:コンタミ無し; ×:コンタミあり  
 評価基準 管理期間中のコンタミ -:汚染が見られない +:カビや細菌の汚染がある  
 評価基準 カルスの形成開始 ○:形成していない; +:形成している

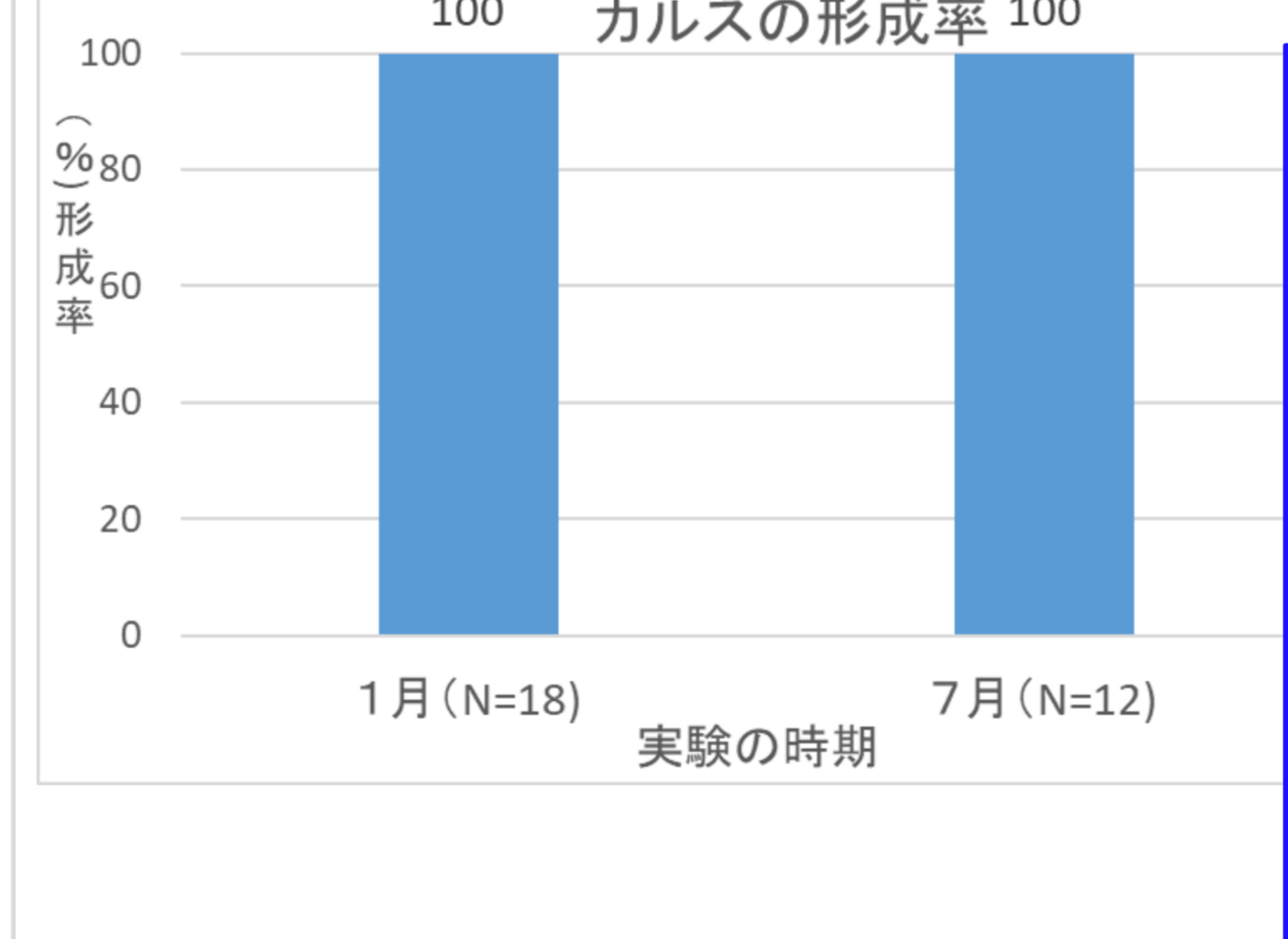
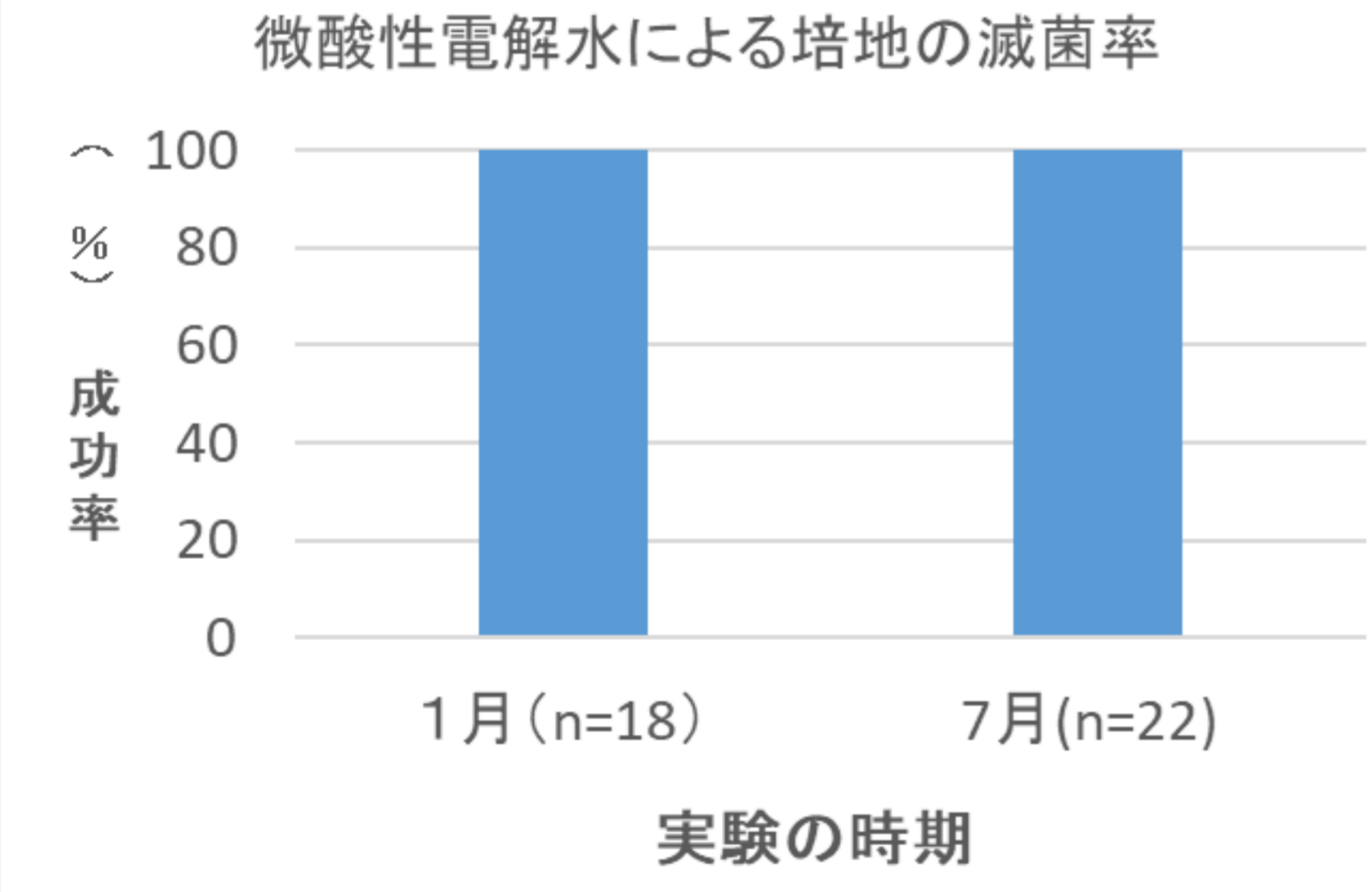


**汚染の原因**

今回、中型の花弁で汚染が多発した。

写真を確認すると、花弁基部が茶色になっており、痛んでいたりと考えられる。

痛みのある花弁は微酸性電解水では滅菌できないことがわかった。



**まとめ**

①微酸性電解水で植物ホルモンを含有する培地を100%滅菌可能である。  
 ②微酸性電解水を含む培地でも、100%脱分化し、カルスは形成した。  
 ③微酸性電解水では、傷のある花弁については、十分に滅菌することができなかった。また、大型の花弁を滅菌するときは花弁の重なりが少なくなるように容器のサイズを大きくし、一度に滅菌する花弁の量を減らす必要がある。

**微酸性電解水を使えば、キク花弁の組織培養（脱分化とカルスの形成）のバイオ実験は容易である。**

**微酸性電解水とは**

微酸性電解水とは乳製品工場の製造ラインの滅菌のために開発された希塩酸を電気分解して製造した次亜塩素酸水。有効塩素濃度20ppm前後、pH6.0前後。

コロナ禍により消毒用アルコール代替品として注目を集めました。弱点として長期保存が困難です。また、アミノ酸など有機質にたいして分解されやすく、培地にバナヤジャガイモの煮汁などを混ぜた場合は滅菌することはできません。

●水中の有効塩素存在比率

次亜塩素酸の割合が高いため低濃度で使用可能  
 次亜塩素酸の割合が低いため高濃度で使用

**微酸性電解水生成器・原液の価格**

原液 13200円  
 3%希塩酸 1kg×3個  
 製造1回25g 1kgで40回分  
 20Lで約100円程度

NOKUTSU 微酸性電解水生成器 Apia mini

価格情報  
 送料別価格(税込) 146,617円

このクーポンで145,617円で購入できます  
 エントリークーポン(送料別) 1,000円(送料別) 1,000円  
 利用期限: 2022/8/31 10:00まで

一般的な殺菌法の欠点  
 加熱・次亜塩素酸ナトリウム・アルコール

	加熱方法	次亜塩素酸ナトリウム	アルコール
概要	加熱調理、液体の加熱殺菌、器具消毒の熱湯や蒸気などによる殺菌等広く利用されている。	手指の消毒、器具環境の殺菌、食品の殺菌など加熱の出来ない場合の殺菌に広く利用されており、長い歴史をもっている。	手指の殺菌が主であるが、まれに器具や食品(生鮮食品)に使用されている。
欠点	●エネルギーコストがかかり、温度を高くし消毒を強化する ●温度と時間の管理を厳密にしなければ効果がなくなる ●生食(刺身、サラダ)などに使用できない ●再汚染に対する防衛が出来ない	●手拭れを起こしやすい ●食品の味、香り、食感を損なう ●発ガン原因物質のクロロホルムを生成することがある ●高圧使用のため高圧の半導体や電子機器の故障の原因となる ●食品への侵入事故の原因となる ●ゆすぎに大量の水を使う ●濁水が問題を起こす	●価格が高く、広範囲に使用することができない ●火災や爆発の危険がある ●手拭れの原因になる ●食品の味、香りを損なう ●ウイルスや細菌芽胞には全く効果が無い ●濡れた場所を使用しても効果が無い

微酸性電解水は、長期保存が困難なので、店舗ではあまり販売されていない。ネット上では入手容易。  
 希塩酸ではなく食塩水を電気分解して製造する製造機もあるので注意が必要。

**ノジギクとは**

兵庫県の花  
 植物学者の牧野富太郎が姫路市のノジギク群落を「日本の群落」と評価したことがきっかけ、海岸の崖地に自生している。

兵庫県 R D C ランク  
 の絶滅危惧種

**兵庫県花ノジギクの花弁でやってみた**

ノジギクは花弁が小さい分、生じるカルスも小さい。開花期が11月で実験の時期が限定されてしまう。植物ホルモンによる脱分化やカルス形成の実験・観察が目的なら、通年花屋で購入できるスプレー菊が便利である。また屋外で栽培され風雨にさらされた花弁は滅菌を丁寧にする必要がある。

実験 11月18日  
 写真撮影 1月6日

11月に実施

**参考文献**

- 小山田士・高野泰吉 (1981) : 無機多量養素の培地組成がキクの小花培養に及ぼす影響, 名城大農学報17 : 21-32
- 古谷博 (1992) : キク花弁培養による多芽体形成と植物体再生, 広島農技研報55 : 133-143
- 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.shinkokeirin.co.jp/keirinkan/kou/science/seibutsu-jiissen.html> 長崎県立長崎南高等学校
- 田村統ほか (2010) : 生物多様性の保全のために 微酸性電解水を用いた無菌培養, 共生のひろば 5号, 53-54, 2010年
- 微酸性電解水とは | 微酸性電解水協議会 <http://bisan.fwf-aew.jp>