

高価な設備をつかわない無菌播種

壺阪 廉太郎・川島 笙寛

顧問 田村 統 (兵庫県立龍野高等学校自然科学部)

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必要不可欠であり、オートクレーブを使用した培地の滅菌は加熱から冷却まで長時間かかり、高価な耐熱性の培養容器が必要である。

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、培地も多く必要であった。

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可能な実験方法の開発に取り組んだ。

培地などの滅菌には微酸性電解水を使い、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置床成功率90%、カルス形成率90%以上とした。

実験

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の培地い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り、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。
- ⑥ 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。またキクは、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

直射日光は容器の内部温度が上昇するため、室内の明るい日陰で管理した。

結果 チャック付きポリ袋で培地を滅菌できたのか？

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。

表1 チャック付きポリ袋を使用した無菌

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

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。

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

小さな空間で植物は育つのか？

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。

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

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

キク花卉はカルスを形成するのか？

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

カルスの形成率は実験日により異なった。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。



図1 サギソウのポリ袋無菌播種

まとめ

100%の成功率を求めないのであれば、オートクレーブ・クリーンベンチを使用しなくても、微酸性電解水を使用することで、ミニチャック付きポリ袋でサギソウの無菌播種やキク花卉の組織培養は可能である。なお成功率は低下するが、微酸性電解水を使用せずに、培地を十分に加熱し、ポリ袋の口付近を培地で汚さないようにすばやく内部に分注すれば、無菌培地は製造できる。



図2 キク花卉から生じたカルス

参考文献

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>