

8 水中植物による組織培養

ー水中植物を水なしで育てることができるか？ー

1 研究の動機

今日、ミシマバイカモは絶滅の危険性があり、一時は三島から絶滅してしまったが、多くの人々により今もその姿を残している。しかし、ミシマバイカモの生態系はほとんど知られてなく、未知の植物である。そんな未知の植物の謎を少しでも解いていきたいと思い、研究し始めた。

そんな中でサイエンスキャンプと共に『組織培養』という言葉を目にした。そこで今年度は、今まで自分の研究にはなかったバイオテクノロジーとこれまでの自分の研究でつけた知識を使い、ミシマバイカモと組織培養を中心とした研究にしようと思った。そしてなにより、ミシマバイカモは水中植物なので、一般に陸上植物を使って実験を行う組織培養と水中植物であるミシマバイカモを組み合わせることにより、何らかの新しい発見があるのではないかと、また水中植物を陸上植物のように水なしで育てることがはたしてできるのか？と思い、今年の新しい研究に選んだ。

2 今年の研究の目的

- (1) 果樹の試験管内増殖やウイルス病の治療、遺伝子組み換え植物の作成など、植物バイオテクノロジーの基礎となる組織培養技術を使って、自分の手で実際に植物を育てることが可能であるのか？
- (2) 絶滅の危機に瀕し県の天然記念物とされている静岡県三島市にしか生息していないミシマバイカモを、組織培養により育てることができるか？
- (3) 一般に組織培養は陸上植物を使い実験が行われているが、水中植物を使って組織培養で水中植物を育てることができるか？

3 今年の研究の手順

- (1) まずは、書物を使い自分の今年の研究に対する基礎知識を高める。
- (2) ミシマバイカモについてのことは、ほとん

ど書物に載っていないため、古くからミシマバイカモのことを知っている方の話を伺う。

- (3) サイエンスキャンプに参加し、組織培養の知識をつけると共に、研究員の方の指導のもと、実際に組織培養の実験を自分でやってみる。

- (4) サイエンスキャンプで学んだ知識を生かし、足りない機材などについては工夫し補うと共に、陸上植物であるニンジンと水中植物であるミシマバイカモで組織培養を行ってみる。

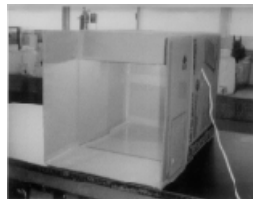
4 研究の方法

(1) オリジナルクリーンベンチの作成

本来クリーンベンチは手に入れるのに何十万もの費用がかかるが、そのような機材を購入することは不可能なので自分で作成した。

【クリーンベンチ作成の材料】

- ・ダンボール（大）×1
- ・蛍光灯×1
- ・電気コード
- ・アクリル板×2
- ・消毒用エタノール
- ・霧吹き



(2) オリジナル培養器の作成

植物材料を無菌操作し、寒天培地に培養し終えた試験管のうちミシマバイカモの試験管半分（20本）を平温ではなく、水中の温度である15℃に試験管内を保つために冷蔵庫を使って培養器を作成した。

【培養器作成の材料】

- ・冷蔵庫（中型）×1
- ・蛍光灯×1
- ・電気コード
- ・温度計×1
- ・蛍光灯を冷蔵庫に取り付けるためのフック×2



(3) 寒天培地（発根培地）の作成

- ア 5種類の貯蔵液を作る。
- イ 植物ホルモンの貯蔵液を作る。
- ウ 1.4のピーカーに純水を500mlはかりとる。
- エ ウのピーカーに貯蔵液1～5液、植物ホルモン、ショ糖を加える。最後に純水を加えて1.4にする。
- オ pHメーターで5.8に調整する。（pHの調整には0.1Nまたは1NのHCl、NaOHを使用する）
- カ オを半分に分け片方にはカビ防止の0.2%程度の殺菌剤を入れる。
- キ 寒天8gをはかり混合する。（培地は寒天の量が多いほど、またpHが中性に近いほどかたくなる。湯せんで加熱して寒天を完全に溶かす。完全に溶けると透明になる）
- ク オートクレープで121 15分間滅菌する。
- ケ クで完成した培地と50本の試験管同じに量だけ分けていれ、2重のアルミホイルでふたをする。（*試験管50本とアルミホイルは、オートクレープにかけ、熱湯による殺菌処理を施してある）
- コ ケを冷やし寒天培地を固める。

(4) 培養材料の殺菌

- ア 実験で使う植物を中性洗剤で汚れをよく洗い流し、次に水道水（流水）で何回もすすぎ、洗剤を洗い落とす。その後、材料をクリーンベンチへ搬入し、無菌操作に移る。
- イ 70%エタノールに材料を5～10秒間ひたし、殺菌液の植物組織内への浸透性を高める。処理時間が長すぎると、材料が損傷しやすいので、処理時間は材料に応じて決める。
- ウ 滅菌水で十分に水洗いする。
- エ 材料が十分に浸る量の殺菌液（次亜塩素酸ナトリウム溶液など）をとり、材料をこの中にいれ、攪拌する。材料に応じて殺菌液の濃度・処理時間を決める。この時、表面張力を低下させ、殺菌液と材料を馴染み易くする。界面活性剤を微量添加すると、殺菌効果が高まる。
- オ 材料を滅菌水ですすぐ。ふたをしてよく振って攪拌してから滅菌水を取り替える。

これを3～4回繰り返す。

- カ ろ紙をしいたシャーレに移し、水切りして保存する。

(5) 器具の殺菌

あらかじめ洗剤でよく洗ったメス、ピンセット、はさみなどは、一つずつアルミホイルで包む。さらに、一回の操作に使うものをひとまとめにするなど、使用しやすいようにまとめてアルミホイルで包んでオートクレープで殺菌する。シャーレ、ピーカー、純水などの殺菌も同時に行う。

(6) 服装と手・指の消毒

衣服や頭髮、はきものなどからの雑菌の進入を防ぐために、殺菌した専用の白衣、帽子、マスク、はきものを着用する。つめは必ず短く切り腕時計などをはずし、ひじから指先まで石鹸でよく洗う。手に付着している水を振って落とし、70%エタノールを腕、手、指に散布する。

(7) クリーンベンチ内での無菌操作

- ア クリーンベンチ内に殺菌用エタノールを霧吹きで吹きかけ殺菌する。
- イ 必要な器具をエタノールで殺菌した後、クリーンベンチのアクリル板をスライドさせ中へ搬入する。
- ウ クリーンベンチ内に、70%エタノールの入った容器と、滅菌水の入った容器を区別して並べておく。
- エ クリーンベンチ内で、切り分けた苗を、寒天培地の入った試験管のアルミホイルのふたを取り、ピンセットで挿芽した試験管にアルミホイルのふたをし、雑菌が入るのを防ぐ。
- カ 尚、ミシマバイカモの試験管の半数には殺菌した水を加える。
- キ 全体の半数の試験管を、温度を15℃に保ち証明器具を入れた冷蔵庫へ入れる。

5 サイエンスキャンプに参加しての組織培養

(1) 実習内容

- ア 寒天培地（発根培地）の作成手順の概略
蒸留水にMS培地作成用の溶液を所定濃度となるように入れ、スターラーで攪拌する。
オーキシン（ナフタレン酢酸（NAA））を

10-7Mの濃度になるように加える。

ショ糖を3%の濃度になるように加え、pHを5.8に調整する。

寒天（アガー）を加え、蒸留水を所定量になるまでつぎ足す。

寒天を沸騰水中または電子レンジで加熱溶解し、管ピンに20m1ずつ分注する。

管ピンのふたをして、滅菌（オートクレーブ、121度、15分）する。

管ピンを取り出して、冷まし、寒天培地を固める。

イ 培養の手順

ガラスの瓶の中で無菌的に生育中の苗を、ピンセットでシャーレまたは紙上に取り出し、適当な大きさに切り分ける。

切り分けた苗を、新しい管ピンの培地に移し、挿し芽する。

管ピンのふたをして、照明付きの培養室内で管理する。

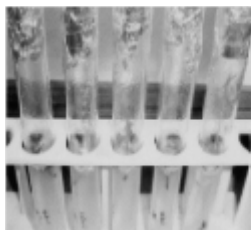
6 研究のまとめ

(1) 研究のまとめ 1

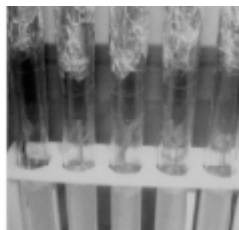
《殺菌剤を入れる・入れない》

サイエンスキャップでは最先端の科学技術を駆使した施設を使い組織培養の実験を行ったが、自分で行う組織培養ではそのような施設を使うことはできない。そのためクリーンベンチなど、自作のものにした。サイエンスキャンプで実験したネオマスカット・イチジクには菌の混入を防ぐことができ、カビなどの繁殖を防いだが、自分で行う実験では菌を完全に防ぐことは難しい。そこで、カビなどを防止するために殺菌剤を培地に混ぜたものを全体の半分だけつくる。

《結果》



殺菌剤を入れなかったニンジン
5本すべての試験管内にカビが生える



殺菌剤を入れたニンジン
5本すべてカビは出ていない

《考察》

結果は写真で確認できる程ははっきりとしたものとなった。殺菌剤を入れなかったほうは2日目にしてカビが繁殖を始め、5日目には寒天培地の表面全体を完全にカビが覆ってしまった。寒天培地だけでなく試験管内の周りにもカビが繁殖をしているため自作クリーンベンチ内の作業で雑菌が試験管内に混入してしまったと思われる。しかし、1本だけは寒天培地にカビが生えていたものの成長を続け、殺菌剤を入れる・入れないに関係なく10本のニンジンの試験管のなかで一番の伸びをみせていた。それに比べ殺菌剤をいれたニンジンではカビの繁殖は完全ではないが防ぐことができた。5本の試験管のうち4本が、ゆっくりではあるが成長を続けた。しかし、植物の色がうすくなるなどの問題が生じ、なにか弱々しい感じが見られた。この2つの結果から考えられることは『殺菌剤を入れればカビを防ぐことはできるが、植物の成長には悪い影響を及ぼしてしまう』ことである。殺菌剤がまったくないと培地に栄養素がとて多く含まれているため写真左のようにカビがものすごい勢いで繁殖してしまう。だからといって殺菌剤を入れすぎて殺菌が強すぎると写真右の一番左に写っているニンジンのように、すぐ枯れてしまう。殺菌剤はカビを防ぐにとて有効ではあるが、植物のことなどを考えるとやはり使いたくない。殺菌剤に頼るのではなく、まず自作クリーンベンチの改良に取り組みたいと思う。

(2) 研究のまとめ 2

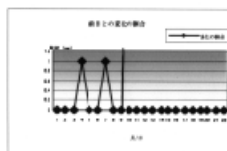
《水を入れる・入れない》

ニンジンやサイエンスキャップに参加して実験したネオマスカット、イチジクはともかくミシマバイカモは水中植物である。普段、水中の中で生育している植物を無菌とはいえ、まったく水のない試験管の中に入れ栽培する。そのため、ミシマバイカモの組織培養できるかどうかの結果が出る前に、水が無いために枯れてしまうかもしれない。そこで普通、組織培養に水を入れるなど聞いたこともなく、成功した例を聞いたことも見たこともないが今回水を入れる・入れないの実験の比較をし

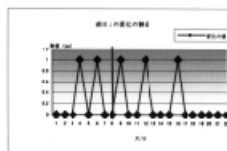
てみる。

《結果》

ミシマバイカモにおける前日との伸びの割合のグラフ



ミシマバイカモ
【殺菌剤なし・水なし・常温】



ミシマバイカモ
【殺菌剤なし・水あり・常温】

《考察》

上の二つのグラフからもわかるように、水をいれなかったほうのミシマバイカモが合計2mmしか成長していないのに対し、水を入れたほうのミシマバイカモは入れなかったほうの2倍以上となる5mmも伸びている。一般的にものごとを考えると当たり前ともいえる結果となった。しかし、水を入れなかったほうは途中からカビの影響を大きく受けたと思われる。実験を始めてから20日経った頃、水を入れてないミシマバイカモの成長が止まった理由は、水のあるなしではなく、カビの繁殖に問題があったのではないかなと思う。

上のグラフで赤い線がはいった日まではカビの影響を受けていないものと思われる。とすると、その赤い線までの一週間全く同じ変化をしていた。このことからカビさえなければ、この二つのグラフは同じ形になっていたのではないかと考えられる。これらのことを考えると、水はあってもなくてもそれほど影響はないのではないかなと思われる。

(3) 研究のまとめ3

《培養する影響の温度について》

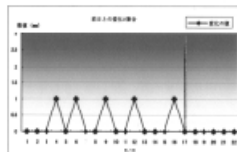
ミシマバイカモは本来、水温が15±の水で生育する。そのため水温が少しでも上がるとすぐに腐ってしまう。組織培養ではサイエンスキャンプで行ったネオマスカットやイチジクのように常温で管理することが多い。しかし、今回私が取り組むミシマバイカモの組織培養では管理する温度も大きな影響を与えるのではないかなと思い、冷蔵庫を使いなんとか

温度15 に保つことができた。実験を行った時期が夏であるため、冷蔵庫で15にしたものと常温のものでは成長のしかたに何らかの変化が表れるのではないかなと思われる。

《結果》

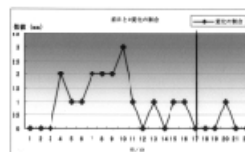
ミシマバイカモにおける前日との伸びの割合のグラフ

図 1



ミシマバイカモ
【殺菌剤なし・水なし・常温】

図 2



ミシマバイカモ
【殺菌剤なし・水あり・15】

《考察》

予想以上に結果に大きな違いがグラフにもはっきりと表れた。自分が予想していたように15 で管理された冷蔵庫での培養で大きいときは常温の3倍も伸びている。冷蔵庫で15 に温度を保ち続けたため、グラフも一定の割合で成長を続けていくのではないかと考えていたが、まったくそのような傾向は見られなかった。それどころか図-1のほうが成長の速度には安定性が見られる。

このことから、ミシマバイカモの成長速度を左右している要因は温度以外にあるのではないかなと思われる。そこで植物には不可欠である光を考えたが、図-2のミシマバイカモは冷蔵庫内に付けた蛍光灯の光を毎日一定量浴びている。だから光も温度と同様に直接は試験管内の植物に影響を及ぼしていないのではないかなと思われる。

ではなぜ図-1とは違い図-2は成長速度に大きな変化が表れたのか。それはもともとミシマバイカモに残された栄養素で成長を続けていたのではないかなと思われる。

グラフの縦に入った線以降、図-1・図-2共に成長が明らかに減少している。おそらく赤い線のところまではミシマバイカモがもともと残っていた栄養素だけで成長し続けたが赤い線のところにきて、ミシマバイカモにその残された栄養素が底をつき始めたのではない

かと考えられる。そのためか赤い線を過ぎると図-2では1mmしか伸びていない。

そう考えると、この実験で重きをおいた管理する温度については、発展を期待できる結果を出すことができた。やはり、温度は植物の成長に大きな役割を果たしていると思われる。黄色の矢印のところから黄緑色の矢印のところへ値が変わるのをみると図-2は図-1に比べ2倍も伸びている。同じ日に伸び始め、これだけの結果に大きな差が出ていることから、温度を植物にとって適温にしたため、ミシマバイカモ本来が持つ成長するための力が無駄なく発揮されたのではないと思う。植物によって適温は変わってくるが、その植物にあった温度にすることは少なくとも植物の成長を促進させる要因であると考えられる。

7 感想・反省

これまで7年間続けてきた富士山麓から湧き出る湧水についての研究から今年は、まったく新しい研究を行ってみようと思い今回組織培養の実験を行った。しかし、小学校4年から継続させてきた研究から無縁の研究を行うより、今までの知識や体験を少しでも今年の新たな研究に生かしたいと思いミシマバイカモを実験に取り入れてみようと考えた。ミシマバイカモは地元の人はもちろん、研究員の方にも未だその生態系が知られていない。“研究は同じことを繰り返すのではなく、新しく発見するためにある”という言葉が常に頭の中にあったため是非とも今年未知の分野を調べてみたいと思った。まずはミシマバイカモの生態について調べてみようと思い、いろいろな図書館などの書物を探してはみたものの、ミシマバイカモについての本はもちろんミシマバイカモの生態について詳しく論じてある本は1冊もみられなかった。昔からミシマバイカモの事を知っている人に聞いてようやく参考となる資料と話を聞く事ができた。それに、組織培養は一般的に陸上植物を使って実験を行うが、私が使ったミシマバイカモは水中植物である。今年の研究で特に調べたかった“水中植物による組織培養”についての実験を幾度か行ったが、寒天培地にカビが生えるなど失敗ばかりだった。“水中植物を水無しで育成させる”というある意味常識はずれの、今までの自分の研

究に無かったものを見出すことができたように思う。これまでの7年間続けてきた研究とはまるで違う内容に、やはり自分の知識の無さというものを嫌なほど味わった。それと共にこれからの自分の研究に新たな可能性をはっきりと自覚することができた。私は今まで頭でものごとを考え、実験をする以前に結果を生み出していた。しかし、今年はこれまでのものと違い自分のまったく未知となる研究ができたため奇想天外な発見と驚きがあった。

今年は今まで行ってきた研究とは全く違う物にした為この研究はまだ未完成である。それどころかまだ1年目でやっと組織培養の世界に入ったばかりで結果不足のところも多い。しかし、だからこそこれからこの新しい研究を時が経てば経つほど良くなるよう、より一層努力していきたいと思う。そしていつか、自分の研究で一般常識を打ち破るような結果を出してみたいと考えている。常識にとらわれない柔軟な思考力でこれからも自分にしかできない、自分だからできる研究をしていきたいと思う。