

3 水中植物による組織培養 ～水中植物を水なしで育てることができるか？～

1 序 文

ミシマバイカモ（三島梅花藻）は、静岡県三島市楽寿園内小浜池で朝比奈泰彦、諸方正資により発見された。その後、工業化など環境の変化のため数が激減し絶滅の危険性があり、昭和29年に県の天然記念物に指定された。現在、ゆうすい会による保護活動も行われているが、文献がないということもあり、未だその生態系はほとんど知られてなく、未知の植物となっている。そのため、絶滅の危機にあるミシマバイカモをバイオテクノロジーの一種である組織培養技術で増やし、絶滅の危機から救おうというものである。ところが、この問題の解決には未だ誰も行ったことのない水中植物での組織培養を成功させなければならないということと、高校生という限られた条件のもとで実験を行わなければならないという問題がある。本研究では、クリーンベンチ、オートクレーブが無いために生じるコンタミの発生を防ぐ対策として培地にアンチフォルミン（次亜塩素酸ナトリウム）を混ぜる方法を採用し、実験を行った。

2 研究の目的

- (1) 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) 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) 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。
- (4) 組織培養に欠かすことのできないクリーンベンチやオートクレーブを使わずに組織培養ができるのか。

3 実験の方法

- (1) ミシマバイカモ、ニンジン合わせて50本

の試験官を使い、計10パターンの試験区を設け組織培養を行う。

- (2) クリーンベンチを用いて、ミシマバイカモに対する殺菌処理の強度と材料の受ける障害程度、及びコンタミの発生程度を確認するために、材料殺菌試験を行う。
- (3) 材料殺菌試験の結果が正しいのか、同じ条件のもと再度実験を行い確かめる。
- (4) クリーンベンチを用いずに、アンチフォルミンを添加した培地に材料を置床し、材料の受ける障害の程度、及びコンタミの発生程度を確認するために簡易無菌培養試験を行う。
- (5) 簡易無菌培養試験の結果が正しいのか、同じ条件のもと再度実験を行い確かめる。
- (6) クリーンベンチを用いずに簡易無菌培養試験の結果から、さらに細かい試験区での培地に混ざる塩素濃度の検討とミシマバイカモのエタノールによる殺菌の影響について実験を行う。
- (7) (6)の再実験を行う。

4 実験結果

- (1) ミシマバイカモとニンジンによる組織培養
50本全ての試験管からコンタミが発生した。予め試験管を煮沸殺菌やエタノールで滅菌したが、試験管の側面から多くのコンタミがみられた。ニンジンにもコンタミが発生したがコンタミが発生する以前は順調に成長していたことから、コンタミの問題以外組織培養の実験は成功していた。ミシマバイカモもわずかに成長したが塩素濃度が高すぎたためか白化してしまった。特に水を入れた試験区についてはその影響が強く、水を入れない方が良かったことがわかった。コンタミにより失敗に終わってしまったが、ミシマバイカモが成長の兆しをみせたことから、ミシマバイカモによる組織培養は可能であると推測された。コンタミの問題で培地に混ざる殺菌剤による材料

の白化が目立ったことから、材料の殺菌方法を再検討する必要がある結果となった。

【実験後 36 日目のニンジン】

5 本中 4 本からコンタミが発生している。試験管内に黒や青・赤く見えるものがコンタミ。コンタミ発生後すべて枯れる。



(2) クリーンベンチを用いた実験 (1)

前の実験で課題となった材料の殺菌方法を研究所の機材を使い検討した。材料の殺菌にはエタノールとアンチフォルミンを使い、それぞれ時間を変え 5 種の殺菌方法で実験を行った。尚、植え替え時に雑菌が入るのを防ぐためにクリーンベンチを使用する。

使用培地…1/2MS (BA1mg/ℓ, NAA0.1mg/ℓ)

① 試験区 1

ETOH5 秒 + AF10 分 (成功数 3、腐敗数 0)

② 試験区 2

ETOH5 秒 + AF5 分 (成功数 1、腐敗数 2)

③ 試験区 3

ETOH0 秒 + AF10 分 (成功数 3、腐敗数 0)

④ 試験区 4

ETOH0 秒 + AF5 分 (成功数 0、腐敗数 3)

⑤ 試験区 5

ETOH0 秒 + AF0 分 (成功後 0、腐敗数 3)

*試験区 4、5 にはコンタミが発生した。

【第一次植え替え】

上の実験により、試験区 1～3 ではコンタミを防ぎ、材料を白化させることなく培養できることがわかった。実験開始後約 2 ヶ月が経ったため植物ホルモンの効果が薄れる。そこで、クリーンベンチを使い培養に成功した試験区 1～3 の材料の植え替えを行う。これまで材料の殺菌方法で区別してきたが、その必要がなくなったため、クリーンベンチを使いすべて同じ方法で行い、増殖を目的とする。



(左)

【実験開始日の試験区 1】
2 セット作成し 1 セットは研究所の 25℃ に設定してある培養室で保管

(右) 【第一次植え替え直後の試験区 1】

第一次植え替えてシャーレに植え替えたが予想以上に成長し天井に着くほど背丈が伸びた。根はみられなかったものの、どの試験区でも多くの葉が見られた。中には乾燥のため葉先が黒色化し、その葉が枯れるものもあったが、生えてくる葉の方が多く順調に生育した。第一次植え替えを行ったミシマバイカモはすべて枯れることなく育った。

【第二、三次植え替え】

増殖を目的とし第一次植え替えを行った。植え替えも順調に成長しシャーレの天井に着くまでになったため、容器をシャーレからプラントボックスに変え第二、三次植え替えを行った。第二、三次植え替えでプラントボックスに植え替えたことで、乾燥の問題が発生したが、順調に成長した。プラントボックスに植え替えてから、ミシマバイカモの葉が自然のものとは比べ、短い特徴がある。試験区の中にはミシマバイカモの特徴である浮き葉も見られた。



【第三次植え替え直後の試験区 1】

(3) クリーンベンチを用いた実験 (2)

一度目の実験結果が正しいか再実験を行い確かめる。一度目の実験では各試験区を 2 セット作成し、片方は研究所の 25℃ に設定してある培養室で保管したが、あまり生育せず腐敗してしまった。そのため、この再実験では 2 セットとも 15℃ に設定したオリジナル培養器で保管した。使用培地は同じである。

① 試験区 1-1

ETOH5 秒 + AF10 分 (成功数 3、腐敗数 0)

② 試験区 1-2

ETOH5 秒 + AF10 分 (成功数 3、腐敗数 0)

③ 試験区 2-1

ETOH5 秒 + AF5 分 (成功数 3、腐敗数 0)

④ 試験区 2-2

ETOH5 秒 + AF5 分 (成功数 3、腐敗数 0)

⑤ 試験区 3-1

ETOH0 秒 + AF10 分 (成功数 3、腐敗数 0)

⑥ 試験区 3-2

ETOH0 秒 + AF10 分 (成功数 3、腐敗数 0)

⑦ 試験区 4-1

ETOH 0 秒 + AF5 分 (成功数 0、腐敗数 3)

⑧ 試験区 4-2

ETOH 0 秒 + AF5 分 (成功数 3、腐敗数 0)

⑨ 試験区 5-1

ETOH 0 秒 + AF0 分 (成功数 0、腐敗数 3)

⑩ 試験区 5-2

ETOH 0 秒 + AF0 分 (成功数 0、腐敗数 3)

〔試験区 4-1、5-1、5-2 にはコンタミが発生した〕

結果は一度目の実験とほぼ同じ結果となった。2セットのうち1つには見られなかったが試験区 4 と 5 にコンタミが発生した。この実験では材料であるミシマバイカモの状態が良かったためか一度目と比べ全体的に腐敗数が少ない。組織培養の実験に慣れてきたことでクリーンベンチ内での作業が効率よく進んだことが材料の乾燥を防ぎ、結果腐敗したものが少なかった。特に試験区 1 と 3 は一度目の実験でも全て培養に成功している。アンチフォルミンは材料を白化させてしまう難点があるが、10 分程度では影響も少なく殺菌も完全である。意外なことではあるが、殺菌の強い試験区 1 の方が試験区 3 よりも生育が良い。

【第一次植え替え】

一度目の実験同様、2ヶ月が経ったため第一次植え替えを行った。再実験は上記の通り2セット作成した上に成功するものが多かった。そのためこの第一次植え替えでは2セットある各試験区で3本のうちもっとも状態の良いものを1本を選び、前回の経験からプラントボックスへと植え替えた。植え替え後、天井の高いプラントボックスの乾燥による影響を受けながらも順調に生育した。植え替えをするまでコンタミが確認されなかった試験区 4 であったが、植え替え後コンタミが発生した。作業はクリーンベンチで行ったため、植え替え前に材料に菌が付いていたことがわかった。これで試験区 4 全てからコンタミが

発生したことになり、試験区 4 では殺菌が不完全である。



【第一次植え替え直後の試験区 1】

(4) クリーンベンチを用いない実験・簡易無菌培養試験 (1)

組織培養の実験を行うにあたってクリーンベンチは必需品とされているが、クリーンベンチやオートクレーブを使用せずとも組織培養が可能か実験して確かめた。クリーンベンチを使用しないため雑菌が多く入ってしまう。そこでアンチフォルミンを培地に混ぜ、コンタミの発生を防ぐ。培地に混ぜる塩素濃度が高いと材料が白化してしまうためコンタミを防ぎ、尚且つ材料が白化しない塩素濃度を見つけ出す。

使用培地:①/②MS (BA1mg/ℓ, NAA0.1mg/ℓ)
培地にアンチフォルミン (0.005%、0.01%、0.05%、0%) 添加

① 試験区 1

塩素濃度 0.005% (成功数 2、腐敗数 1)

② 試験区 2

塩素濃度 0.01% (成功数 1、腐敗数 2)

③ 試験区 3

塩素濃度 0.05% (成功数 0、腐敗数 3)

④ 試験区 4

塩素濃度 0% (成功数 0、腐敗数 3)

〔試験区 3 は白化し、試験区 4 にはコンタミが発生した〕

培地に混ぜたアンチフォルミンの影響は大きく、白化するものが多く見られた。右の2枚の写真は培地に混ぜた塩素濃度が0.005% (上)と0.05% (下)のものであるが0.05%の材料は3本とも白化した。



【写真上: Cl 0.005%、
下: Cl 0.05%】

試験区 2 の 0.01% は成功例が出たものの白化の影響が大きくほとんど生育していない。0.005% でもかなりの影響を受けているが 0% ではコンタミが発生してしまう。0 ~ 0.005% 間の塩素濃度を再検討する必要がある結果となった。

【第一次植え替え】

実験開始後、約 2 ヶ月が経ち十分なデータがとれたため目的を増殖に変え、試験区 1・2 で成功した計 3 本を植え替えする。植え替えの際には、クリーンベンチを使用し、新しい培地の入ったシャーレに植え替える。クリーンベンチを使用するため、培地にアンチフォルミンは混ざらない。植え替え後、塩素濃度 0% であることで急激に生育し始め、第一次植え替え前の約 2 倍まで成長した。



【第一次植え替え後の
ミシマバイカモ】

【第二、三次植え替え】

第一次植え替え後、急激に成長しシャーレの天井に着くまでになった。そのため第二、三次と植え替えを行った。二次、三次共クリーンベンチを使用し、プラントボックスへ植え替えた。第二、三次植え替え後も止まることなく生育し続け、大きいもので底を埋め尽くす程度まで成長した。自然界のミシマバイカモと比べ葉が短く、数が多い。容器をプラントボックスに変えたことで乾燥の影響を受け枯れる葉が目立った。ミシマバイカモは水中植物であるため体全体から養分を吸収することができる。そのため中には葉が培地に潜るものも見られた。



【第三次植え替え後の
ミシマバイカモ】

(5) クリーンベンチを用いない実験・簡易無菌培養試験 (2)

使用培地: ①/②MS (BA1mg/ℓ, NAA0.1mg/ℓ)
培地にアンチフォルミン (0.005%, 0.01%)

- ① 試験区 1-1
塩素濃度 0.005% (成功数 3、腐敗数 0)
- ② 試験区 1-2
塩素濃度 0.005% (成功数 3、腐敗数 0)
- ③ 試験区 2-1
塩素濃度 0.01% (成功数 1、腐敗数 2)
- ④ 試験区 2-2
塩素濃度 0.01% (成功数 1、腐敗数 2)
- ⑤ 試験区 3-1
塩素濃度 0.05% (成功数 0、腐敗数 3)
- ⑥ 試験区 3-2
塩素濃度 0.05% (成功数 0、腐敗数 3)
- ⑦ 試験区 4-1
塩素濃度 0% (成功数 0、腐敗数 3)
- ⑧ 試験区 4-2
塩素濃度 0% (成功数 3、腐敗数 0)

[試験区 3-1、3-2 は白化し、試験区 4-1 にはコンタミが発生した]

【第一次植え替え】

一度目の実験に比べ成功数が多く見られ、試験区 3 では一度目同様白化した。ほとんどの試験区が一度目の実験と同じ結果だったが試験区 4-1 にコンタミが発生しなかった。時によって雑菌が入り込まないこともあることがわかる。2 度の実験の結果が類似していることから上記の結果は正しい。

(6) クリーンベンチを用いない実験・於化学室(1)

果樹研究所で簡易無菌培養試験を行い培地に塩素濃度 0.005% を混ぜることでクリーンベンチを使用せずとも組織培養の実験が可能であることがわかった。しかし、塩素濃度 0.005% でも材料への影響が大きいため 0% ~ 0.005% をさらに細分化し、材料への影響が極力少ない塩素濃度を探す。さらに、材料の殺菌方法でエタノールの材料に及ぼす影響についても検討する。

使用培地: 1/1MS (BA1mg/ℓ, NAA0.1mg/ℓ)

- ① 試験区 1-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.0001% (成功数 0、腐敗数 4)
- ② 試験区 1-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.0001% (成功数 2、腐敗数 2)
- ③ 試験区 2-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.0005% (成功数 0、腐敗数 4)

- ④ 試験区 2-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.0005% (成功数0、腐敗数4)
- ⑤ 試験区 3-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.001% (成功数3、腐敗数1)
- ⑥ 試験区 3-2 (ETOH0 - AF10)
C 0.001% (成功数4、腐敗数0)
- ⑦ 試験区 4-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.0025% (成功数2、腐敗数2)
- ⑧ 試験区 4-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.0025% (成功数4、腐敗数0)
- ⑨ 試験区 5-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.005% (成功数1、腐敗数3)
- ⑩ 試験区 5-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.005% (成功数2、腐敗数2)

【試験区1-1、2-1、2-2でコンタミが発生した】

【第一次植え替え】

材料の状態が良くなかったため白化がやや多く見られた。この実験で塩素濃度0.0005%ではコンタミを防ぐことができないことがわかった。0.005%では白化が起こり0.001%、0.0025%がもっともよく生育していた。エタノールは植物組織に対する浸透力が強いいため材料への影響が大きいと思われるが、それほど影響はなかった。

白化やコンタミの影響を受けなかった試験区を植え替えたが、急激に成長した。研究所で作成した試験区に比べ、よりミシマバイカモに近い姿で生育した。



【塩素濃度0.0025%での試験区】

(7) クリーンベンチを用いない実験・於化学室(2)

一度目の実験同様の条件で再実験を行おうと試みたが材料の殺菌時間を間違えてしまい1%アンチフォルミンに浸ける時間を一度目の半分の5分にして実験を行ってしまった。その他の条件は一度目と同じである。

使用培地:1/1MS(BA1mg/ℓ、NAA0.1mg/ℓ)

- ① 試験区 1-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.0001% (成功数0、腐敗数4)
- ② 試験区 1-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.0001% (成功数0、腐敗数4)

- ③ 試験区 2-1 (ETOH5 - AF10)
C 0.0005% (成功数0、腐敗数4)
- ④ 試験区 2-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.0005% (成功数0、腐敗数4)
- ⑤ 試験区 3-1 (ETOH5 - AG10)
Cℓ 0.001% (成功数0、腐敗数4)
- ⑥ 試験区 3-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.001% (成功数2、腐敗数2)
- ⑦ 試験区 4-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.0025% (成功数1、腐敗数3)
- ⑧ 試験区 4-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.0025% (成功数4、腐敗数0)
- ⑨ 試験区 5-1 (ETOH5 - AF10)
Cℓ 0.005% (成功数1、腐敗数3)
- ⑩ 試験区 5-2 (ETOH0 - AF10)
Cℓ 0.005% (成功数4、腐敗数0)

【試験区1-1、2-1、2-2でコンタミが発生した】

材料の殺菌時間を一度目の半分にし実験を行ったためコンタミが多く発生した。一度目の実験で良いとされた試験区3の0.001%も多くのコンタミが発生し、菌を完全には殺しきれていない。0.0025%では一部コンタミが発生したが殺菌の役割は十分なされていた。

5 結論

これまでの実験結果を通し、ミシマバイカモを組織培養技術で増殖させることは可能であることがわかった。次の3つは最低条件である。

- ①培養は温度を15℃で管理する
- ②水を入れない
- ③植え替えの際に材料が乾燥しないようにする

以上の3つの条件を基に組織培養によるミシマバイカモの培養は成功する。クリーンベンチを使用せずに実験を行うときは、培地にアンチフォルミンを加える必要がある。材料に白化などの影響が少なく、コンタミの発生を防ぐことができる塩素濃度は0.0025%である。また、材料の殺菌方法はETOH 5秒+ AF10分がもっとも良いとされる。それ以上浸けていると材料が死んでしまう。材料の殺菌方法についてはクリーンベンチを用いた場合でもこの殺菌方法が良いとされる。これらの条件を整えればミシマバイカモを増殖させることができる。