

2 ミシマバイカモによる組織培養

ー組織培養で増殖したミシマバイカモを川へ戻すー

1 概要

現在、静岡県三島市に生息し、絶滅の危機に瀕しているミシマバイカモという沈水植物は、条件の整った清流でしか生息できないため、増やすことが大変困難とされている。私の兄は昨年、植物組織培養技術を使い、ミシマバイカモを培養することに成功した。培養する過程において、沈水植物を水の少ない状況下で育てることに着手し成功した。また、組織培養を行うにあたり、必需品とされているクリーンベンチを使用せずに組織培養する方法を検討し、導き出した。しかし、組織培養したミシマバイカモを川へ戻そうとしたところ根がないため流されてしまった。

この研究は、組織培養したミシマバイカモを川へ戻すことを目的とし、その過程において組織培養する際、根の分化を促す植物ホルモンであるオーキシシン(NAA)にも着目し、川へ流されない方法を探し出し「ミシマバイカモによる組織培養」を完成させた論文である。

2 序文

ミシマバイカモ(三島梅花藻)は、静岡県三島市にある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。【植物学雑誌(東京植物学会)42巻502号より】また、諸方正資が1927年に採取した標本が東京大学理学部にありこの標本が1946年に東京大学・原教授によりミシマバイカモと命名された。【昭和52年11月4日静岡大学・米田教授より】年間水温約15℃の清流にしか生息できない沈水植物であり、その後工業化などの環境変化のため数が激減し絶滅の危険性にさらされた。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少なく未だその生態系はほとんど知られていない。

私の兄である石井英貴は、この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を使って増やし、絶滅の危機から救おうとして研究を重ね、昨年クリーンベンチ、オートクレープ

を使わない組織培養に成功した。【石井2004】しかし、最終目的である「ミシマバイカモを三島の川へ戻す」という実験を行っていないため、私がこの研究を受け継ぎ「ミシマバイカモによる組織培養」の研究を完成させた。

3 研究の目的

この研究の最終目的は、『組織培養技術を使って育てた沈水植物であるミシマバイカモを、一度は絶滅してしまった三島の川に戻すことができるか。』である。そのため

- (1) クリーンベンチやオートクレープを使わずに自分の手で実際に組織培養ができるのか、ということを検討し、実験用のミシマバイカモを増殖させる。
- (2) それと共に、昨年川に戻そうとした際、根がほとんど無いため川に流されてしまったので、組織培養する際に根の分化を促す植物ホルモン[オーキシシン(NAA)]を培地に加え、できるだけ根を発育させるようにする。
- (3) 組織培養で根が育たない場合を考え、植物ホルモンを使った実験と並行し、培養で増殖したミシマバイカモを水中で育てる方法で根をできるだけ発育させ、川に放流する。

4 研究の方法・結果

(1) ミシマバイカモの増殖実験

ア 目的

- ① 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、雑菌による汚染発生程度の再確認
- ② 根の分化を促す植物ホルモン[オーキシシン(NAA)]の濃度確認
- ③ 川へ戻すことを目的とする培養・増殖

イ 方法

- ① クリーンベンチ無し、オートクレープ無し

② 材料殺菌方法

ETOH(70%) 5 sec→AF(1%)10min→
滅菌水 3 回→滅菌水保存

③ 試験構成

試験区 1…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.1mg/ℓ、0.001%塩素添加)

試験区 2…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.1mg/ℓ、0.0025%塩素添加)

試験区 3…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.2mg/ℓ、0.001%塩素添加)

試験区 4…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.2mg/ℓ、0.0025%塩素添加)

試験区 5…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.5mg/ℓ、0.001%塩素添加)

試験区 6…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.5mg/ℓ、0.0025%塩素添加)

試験区 7…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.75mg/ℓ、0.001%塩素添加)

試験区 8…MS(BA1mg/ℓ、

NAA0.75mg/ℓ、0.0025%塩素添加)

試験区 9…MS(BA1mg/ℓ、

NAA1.0mg/ℓ、0.001%塩素添加)

試験区 10…MS(BA1mg/ℓ、

NAA1.0mg/ℓ、0.0025%塩素添加)

*各試験区シャーレ 2 枚とした。シャーレには 20ml の培地を入れた。

④ 培地の貯蔵液作成

a 500ml のビーカーを 5 つ用意し、マグネチックスターラーでそれぞれ攪拌しながら薬品を適量入れ、5 種類の貯蔵液を作る。

b 貯蔵用の容器に移し、冷蔵庫で保存する。

c 必要とする植物ホルモン(NAA、BA)50mg を NAA は特級エタノール、BA は 1 N の NaOH で溶かす。

d 植物ホルモンが溶けたのを確認し、純水を加え 500ml にする。

e 貯蔵用の容器に移し、冷蔵庫で保存する。

⑤ 培地作成と置床

a オートクレーブがないため、器具は煮沸殺菌する。

b 1ℓ のビーカーに純水を 500ml 入れる。

c マグネチックスターラーで攪拌しながら、貯蔵液 1～5 液、植物ホルモン(BA)、ショ糖を加え、200ml ビーカー 5 つに分注した後、植物ホルモン(NAA)をそれぞれ適量入れる。

d HCl・NaOH を使い pH メーターで 5.8 に調節する。

e アガー 4.8g はかり、pH を 5.8 にしたビーカーに入れ湯せんで完全に溶かす。

f 100ml ビーカーを用意し、塩素濃度がそれぞれ 0.0025%、0.001% になるようあらかじめ適量入れておく。

g 煮沸殺菌した培地を、塩素の入った 100ml ビーカーにそれぞれ 80ml になるよう入れ、よく混ぜる。

h 80ml を滅菌シャーレに、それぞれ 20ml になるよう移す。

i シャーレのふたをし、雑菌が入らないよう注意しよく冷ます。

j 2 種類の殺菌処理をしたミシマバイカモを置床し、雑菌が入らないようすぐにテープでシャーレのふちを止める。

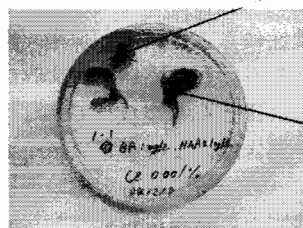
k シャーレは 15℃ に設定してあるオリジナル培養器で管理する。



オリジナル培養器の内部の様子

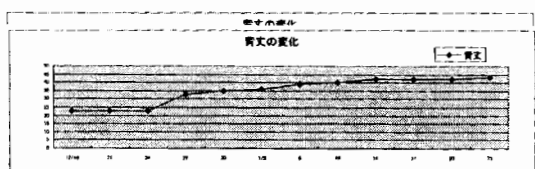
ウ 実験結果

【試験区 1】



2005年 1 月 23 日【35 日後】





2004年12/18～1/23までのグラフ

(2) プラントボックスへの植え替え実験

ア 目的

実験を開始してから2ヵ月経つと、シャーレ内の植物ホルモンの効き目が下がってくる。また、今の状態で水に戻すと発育が不十分である。そこで、新しい培地を作成し、容器もシャーレより大きいプラントボックスへ植え替えることにする。引き続きNAAによる根の分化にも着目する。

イ 方法

- ① クリーンベンチ無し、オートクレーブ無し
- ② 材料殺菌無し
- ③ 試験構成
増殖実験と同じ試験構成
- ④ 培地の貯蔵液を作成する
- ⑤ 培地を作成し置床する

ウ 実験結果

【試験区1】



2005年4月16日【77日後】

エ 考察

この実験では、ミシマバイカモに対する殺菌処理と、材料の受ける障害程度、及び雑菌による汚染発生の再確認、また川に戻すために根の分化を促す植物ホルモン・オーキシシン(NAA)の濃度確認を行った。

この殺菌処理の濃度確認では、再度同じ0.001%と0.0025%の2パターンで実験を行ったところ0.001%が10個中2個、0.0025%が10個中0個に雑菌による汚染が発生した。よって、雑菌による汚染発生を抑えらるとともに、

植物自体の白化の程度を抑えられる塩素濃度は0.0025%が適切であるということがわかり、2004年度の兄・石井英貴の実験と同じになった。

根の分化を促す植物ホルモンのオーキシシンの濃度も、前と同じように変えて実験してみたところ、根の発生がみられたのは全20個のプラントボックス中試験区1の2個、試験区2の1個、試験区3の1個、試験区7の2個、試験区8の2個、試験区9の2個、試験区10の2個の12個であった。これをみると試験区7のNAA0.75mg/l以上の濃い方の根は、確実に発生することがわかる。

全体の成長をみても試験区1、2の方が成長が良く、試験区7～10では悪いことから、NAAの濃度が薄い方が成長が早く、濃度が濃い方が成長が悪いと考えられる。やはりNAAには適した量というのがあり、それを超えてしまったので全体の成長が悪くなってしまったと予想される。

(3) 組織培養したミシマバイカモを水へ戻す

ア 目的

組織培養したミシマバイカモは、根の発育が不十分なため、いきなり川へ戻すと流されてしまうので、水に戻すための専用の容器を作成し、組織培養つまり陸上で育てたミシマバイカモを水に戻すことができるかを検討する。

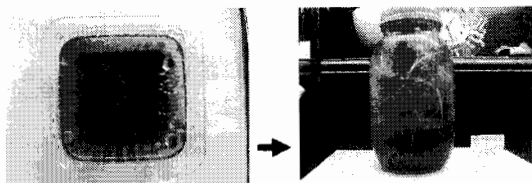
イ 方法

- ① 専用の容器を作成する。プラスチックの容器の底にキリで複数の穴を開け、開けた穴の上をガムテープでふさぎ、水が漏れないようにする。さらに、それに穴の開いていない容器を重ね、完全に水が漏れるのを防ぐ。
- ② 容器の中に、土(ハイドロサンド)を敷く。
- ③ 水草育成剤(GREEDEN)0.25mlを混ぜた井戸水を入れる。
- ④ そこに、ぬるま湯で寒天を落としたミシマバイカモを植える。
- ⑤ オリジナル培養器の中で培養する。
- ⑥ 容器に収まらなくなったらガラス瓶に植え替える。

エ 実験結果



プラスチック培養器



2005年2月11日

2005年7月3日

オ 考察

水に入れて数日経過して葉の色が薄くなるが、2ヵ月位経つと葉も濃くなり、根も急激な成長を始めた。組織培養している時には、根の成長はあまり見られなかったが、水に戻してからは、ハイドロサンドの中へ根を張っていった。

(4) 組織培養したミシマバイカモを川へ戻す

ア 目的

組織培養したミシマバイカモを、専用の容器で培養したものを、さらに川へ戻すという最終実験を行う。

イ 実験方法

- ① ビンで培養していたミシマバイカモに目印としてビニールひもを巻く。
- ② 根を傷つけないように丁寧に取り出し流さないように場所を選び植えつける。

ウ 実験結果



2005年7月10日



水面上に花が咲いている。
5枚の花びらを持ち梅の花の形をしている。

エ 考察

川へ戻してからは、川が清流のため成長も早くなり茎も太くなるのがわかる。土がちゃんとあるために、専用の容器より固定できた。この実験から組織培養をしたミシマバイカモを川に戻すことは可能であることがわかる。

5 研究のまとめ

- (1) 雑菌による汚染発生を抑えるとともに植物自体の白化程度を抑えられる殺菌処理の塩素濃度は0.0025%が最適である。
- (2) 根の分化を促す植物ホルモン・オーキシンの濃度が高い方が根がよく成長する。
- (3) 組織培養を行うことにより、ミシマバイカモを培養・増殖させることは可能である。
- (4) 組織培養したミシマバイカモは根が無いため、いきなり川へ戻すことはできないが、水中という環境に慣らすため一度専用の培養器で育成させた後川へ戻すことは可能である。

6 研究の反省、発展、感想

ミシマバイカモを組織培養技術を使って増やすという目的を達成することができて良かったと思う。しかし、この実験を進めるうちに『ミシマバイカモ自体を切断して組織培養することは、まったく同じ遺伝子を持つミシマバイカモを増やすことであり、気温差や環境の変化が起こった時に、同じ遺伝子なので一度に絶滅してしまう恐れがある。』ということに気付かされたため、この方法だけでミシマバイカモを増やすことは、その場所の環境的にもミシマバイカモ自体にも大変危険なことであると思った。そこで、この組織培養技術を踏まえて種子で培養することにより、違う遺伝子を持つミシマバイカモを増やす方法を考えていかなければいけないと考えている。今後は、この方法を確立すべく努力していきたいと思っている。