

龍野高校では地域の生物多様性保全事業「生物多様性龍高プラン」を実施している。主な内容は、自生地の調査保全活動・栽培増殖技術の開発・地域への啓発活動・成果の公開である。今回は絶滅危惧種の繁殖のため開発した技術をバイオテクノロジーの生徒実験に応用することを試みた。

従来の「無菌播種」や「ニンジンの組織培養」などのバイオ実験では高価なオートクレーブやクリーンベンチが必要である。40名の生徒が50分の時間内で無菌操作を体験するためには、農業高校など設備の整った学校でなければ実施困難である。今回は、絶滅危惧種サギソウなどの増殖技術として開発された、微酸性電解水添加培地を活用することで、授業可能な無菌培養の生徒実験方法を開発した。

## 授業におけるバイオ実験

従来の「ニンジンのカルス形成」は授業での生徒実験が困難。

### 背景

培地の滅菌にオートクレーブが必要で、滅菌時間・冷却時間が長い。

ニンジンの形成層の取り出しや置床にクリーンベンチが必要で、生徒が同時に作業できない。



オートクレーブ（加熱滅菌）



クリーンベンチ（無菌操作）

### 目的

オートクレーブやクリーンベンチを使わずに微酸性電解水もちいて、非耐熱性培養容器や培地を滅菌し、組織培養実験を可能とする。

植物体はキク花卉を使用する。

## 実験の内容

### 従来の実験：スチュワートの実験 ニンジンの形成層⇒カルス⇒再分化



引用「ハイポネックス培地で行うニンジンの組織培養」茨城県高等学校教育研究会生物部

### ほんまにできるバイオ実験

#### キク花卉⇒脱分化⇒カルス⇒再分化



花卉⇒脱分化⇒カルス⇒再分化⇒根

## 実験方法

### 準備物

微酸性電解水・チャック付きミニポリ袋・スプレー・なべ・計量器具・培地(ゲル化剤・ショ糖・ハイポネックス・植物ホルモン(NAA KIN各1mg/L))  
植物体(種子や葉・花卉など)

### 手順

- ① 微酸性電解水(微酸水)を袋にスプレーして内部を滅菌する。
- ② 水に培地を入れ加熱しよく溶かす。にゲル化剤を完全に溶かす。
- ③ 培地で容器の口を汚さないように、培地を袋内に分注
- ④ 植物体を微酸水でしっかり滅菌する。
- ⑤ 培地が固まったら、微酸水で滅菌したピペットやピンセットを用いて花卉を置床する。最後に微酸水を噴霧して密閉。
- ⑥ 直射日光のあたらない明るい室内の壁面などを利用して管理。

## 結果

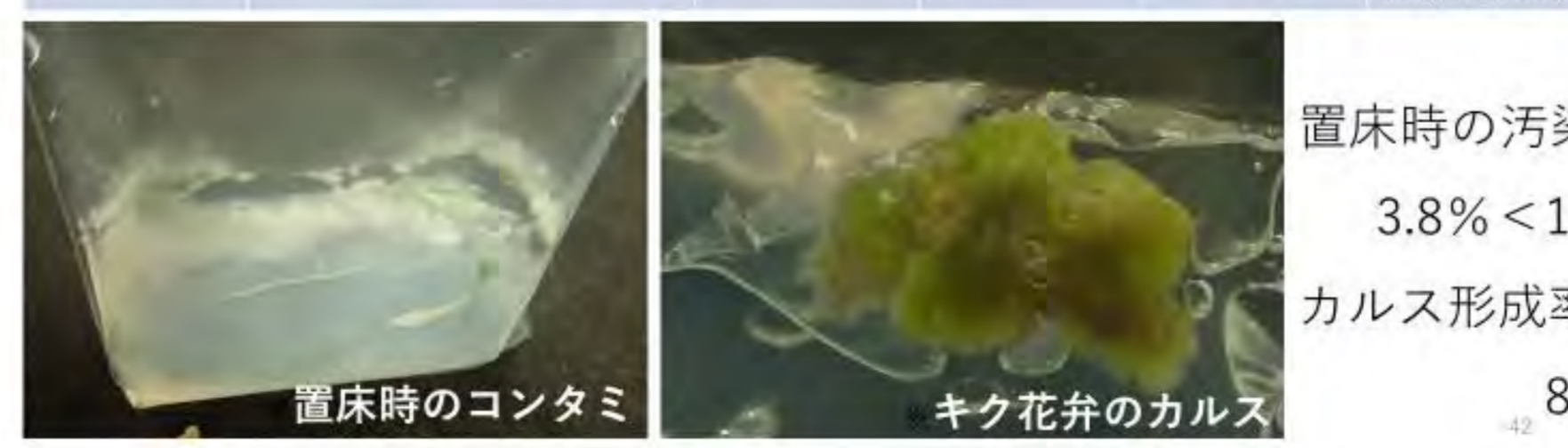
### 結果 チャック付きポリ袋で培地をつくる

培地製造日	培地確認日	製造数	汚染数	滅菌率(%)	培地
2023.1.20	2023.3.21	16	0	100	MS培地
2023.3.31	2023.4.14	20	0	100	MS培地 植物ホルモン
2023.6.28	2023.7.12	32	0	100	MS培地 植物ホルモン
2023.7.15	2023.7.26	71	1	98.6	MS培地 植物ホルモン

チャック付きポリ袋でもほぼ100%近く、無菌培地を製造できた。一袋あたり培地15mL（ペットボトルで50mL）の使用で、60袋以上の培養容器を作ることができた。

### 結果 キクの花弁の組織培養

置床日	培地確認日	置床数	汚染数	滅菌率(%)	カルス形成率(%)	培地
2023.3.31	2023.4.14	20	0	100	45	MS培地 植物ホルモン
2023.7.15	2023.8.2	23	2	91.4	※100	MS培地 植物ホルモン
2023.7.16	2023.8.2	9	0	100	100	MS培地 植物ホルモン



置床時の汚染率 3.8% < 10%  
カルス形成率 82%

### 結果 小さな袋で育つのか サギソウの無菌播種

播種日	培地確認日	播種数	汚染数	滅菌率(%)	発芽率(%)	培地
2023.1.20	2023.3.20	13	0	100	100	MS培地



サギソウは、小さなポリ袋内で培養瓶同様に球根を形成した。

実験に熟練した部員だから成功するのは？

## 初めてでもできるのか？

目的 はじめて、実験する場合の成功率を調べる  
もちろん、クリーンベンチは不使用。  
培地は95%以上の製造成功率。  
置床時のコンタミ率は50%以下を目指す。  
※ 周囲でヒトの移動があるため目標値は低め

### ほんまにできるバイオ実験 in 大阪

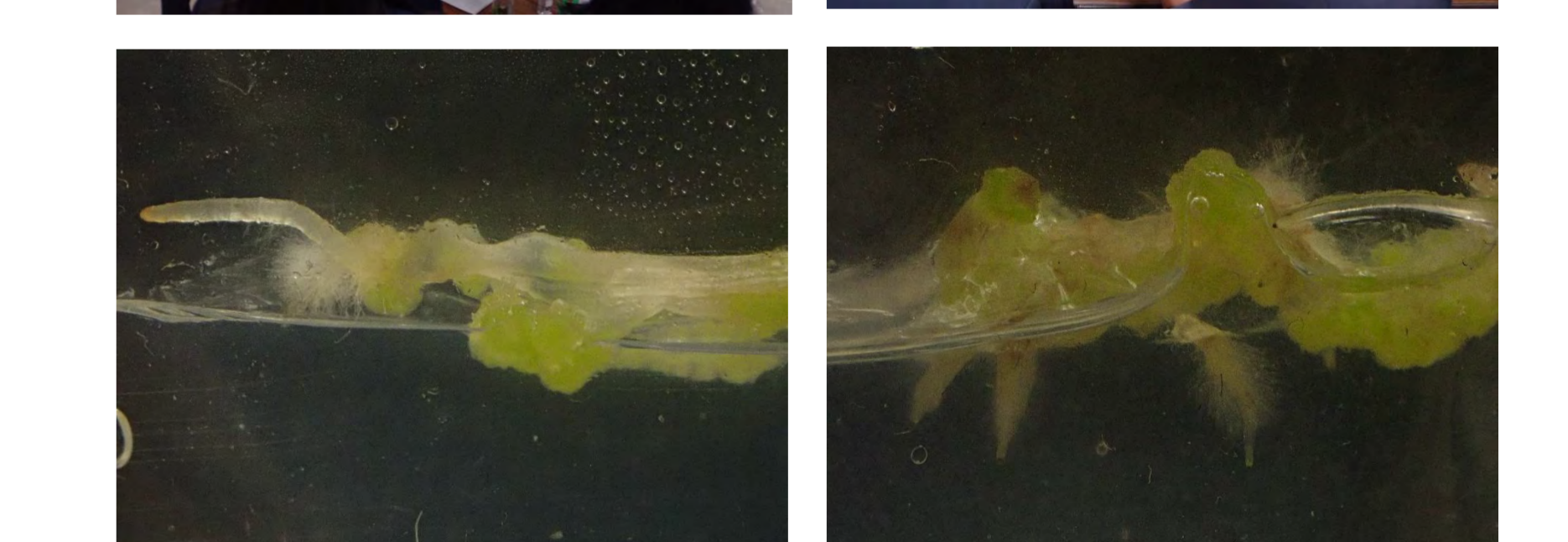
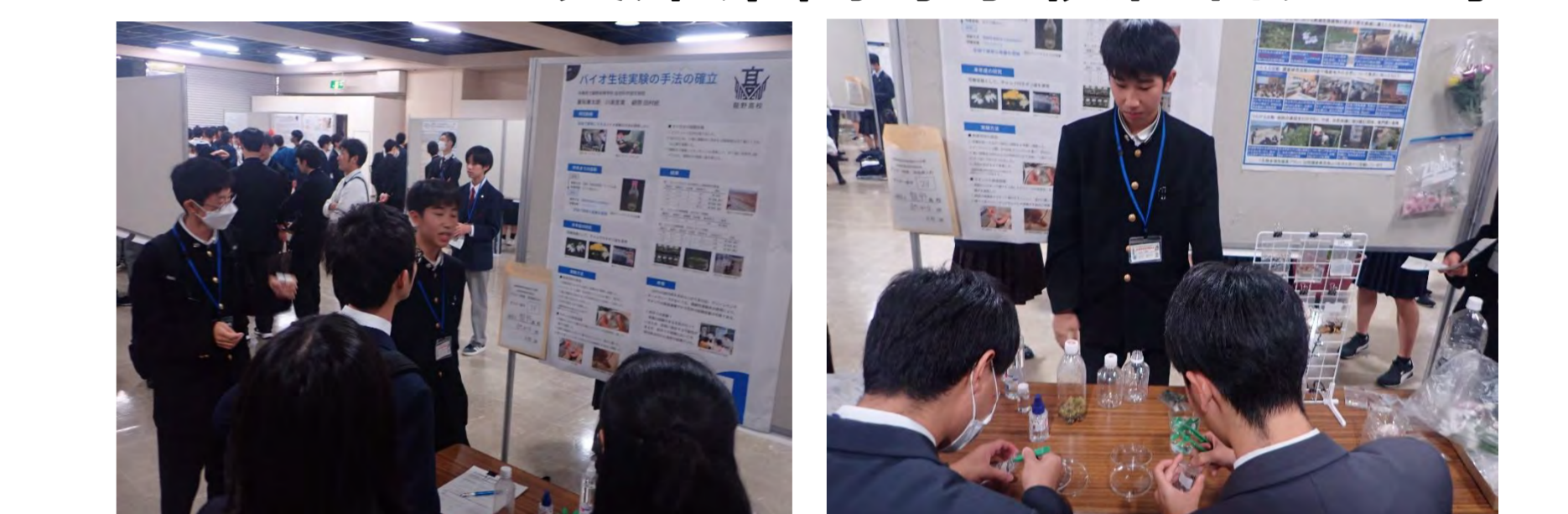
2023.8.9 日本生物教育会



発表を見に来た先生・生徒(20名)に挑戦して頂きました	コンタミの数
1人2回実験 1回目を回収(左写真)	置床時 2/20 成功率 90% 管理中 3/20 最終成功率75% カルス形成率100%
8/10置床 8/16(6日め) コンタミ2個	

### ほんまにできるバイオ実験 in 神戸

2023.11.11 兵庫県高等学校総合文化祭



体験者数 25名  
コンタミの数 11/25 置床成功率 14/25 56%  
カルス形成率14/14 100% 再分化率10/14 71.4%  
やや成功率が低くなった理由として、ポスター発表会場が混雑しており、10分の発表時間(3回)内の体験実験のため説明不十分等のためか？  
置床成功したもののうち71.4%が再分化(根)

### ほんまにできる無菌播種 in 人博

2024.2.11 兵庫県立人と自然の博物館

絶滅危惧種サギソウの無菌播種に挑戦しよう。成功すれば、3月下旬に緑化(発芽)し、秋に球根が形成。その後は水苔で栽培します。

## 引用文献・参考文献

- 1) 茨城県高等学校教育研究会生物部(2009):ハイポネックス培地で行うニンジンの組織培養について,生物実験プリント集 8.植物の組織培養
- 2) 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-jissen.html
- 3) 田村統ほか(2010):生物多様性の保全のために 微酸性電解水をもちいた無菌培養,共生のひろば 5号, 53-54

### 謝辞

土橋敬一先生(当時長崎南高校)にはキク花卉の組織培養方法についてご指導いただきました。