

栽培学習におけるセントポーリアの 簡易培養増殖法

石塚英雄*, 織田弥三郎**

Simplified Method of Micropropagation in
Saintpaulia (*Saintpaulia ionantha* wendl)
for Educational Gardening.

Hideo ISHIZUKA, Yasaburo ODA

和文要旨

本研究では、茎頂培養のように切り出しに技術的習熟を必要とせず、葉片培養により大量増殖が可能なセントポーリアを供試することで培養の簡略化を試みた。培養の簡略化については、高価な機器の代替として報告されているが、中学校の設備の現状で行った場合、どの操作の過程が汚染率が高いか、要因効果、寄与率についての実態は明らかではない。そこで、培養室で行われる従来の方法と中学校の設備でできる方法とを7因子2水準に割り付け、汚染数と生長量を調査した。

その結果、一定数の汚染は避けられないが、歩留まりを考慮して培養することにより、設備の簡略化は可能であることが明らかとなった。また、増殖率を向上させ汚染数を減らすためには、MS培地ならびにイオン交換水を用いた方が望ましいことが判明した。

キーワード：セントポーリア，設備の簡略化，汚染数，生長量

1. 緒 言

現在、わが国で種苗の大量増殖が実用化されている種類の中にセントポーリアもあり、栄養繁殖できる種類は、ほとんど大量増殖が可能な時代⁽¹⁾を迎えようとしている。加えて、セントポーリアの葉片培養による増殖は、技術的にほぼ確立したものといわれている⁽²⁾。このバイオテクノロジーのブームによって、組織培養を特別活動や選択の授業に取り入れたいとする高校が増えているが、積極的に授業等に活用している学校は農業高校を除いて少ない⁽³⁾⁽⁴⁾。その理由として考えられる点は、高価な機器、たとえば高圧滅菌釜（オート

* 小田原市立城山中学校

** 横浜国立大学教育学部

クレーブ), 無菌箱 (クリーンベンチ), 恒温培養器 (インキュベータ) などを必要とするなどの設備的な問題, 無菌操作などの技術的な問題があげられる。

中学校では新教育課程で使用される教科書にも栽培技術の進歩として, 組織培養法の利用が紹介されている⁽⁶⁾。本研究では, これを単なる知識としてでなく実験的に確かめる手段として, 中学校段階で可能な組織培養の方法について検討した。

そこで, 茎頂培養のように切り出しに技術的習熟を必要とせず, 葉片培養により大量増殖が可能なセントポーリアを供試することで培養の簡略化を試みた。培養の簡略化については, 高価な機器の代替として報告されているが, 中学校の設備の現状で行った場合, どの操作の過程が汚染率が高いか, 要因効果, 寄与率についての実態は明らかではない。培養室で行われる従来の方法と中学校の設備でできる方法とを7因子2水準に割り付け, 汚染数と生長量を調査した。そして, 得られたデータを分散分析で解析し, 中学校の設備でどの程度まで簡略化できるか, それぞれの因子が及ぼす影響について考察した。

2. 材料及び方法

2. 1 供試材料と7因子

供試材料は雑菌の汚染を防ぐため, 室内の慣行栽培区で栽培された汚染の少ない生育良好なオプティマ系 'ミズリー' の株から採取した。外植体の部位は葉長約5cmの葉を供試し, 1切片の大きさは5~8mm角とした。

培養の設備・技術に関する7個の因子を設定した。第1水準は現行の方法, 第2水準は中学校の設備や技術の簡略化を考慮した方法である。

因子	第1水準	第2水準
A : 水	イオン交換水	水道水
B : 培地の種類	MS培地	ハイポネックス培地
C : 支持材料	寒天	ペーパーウィック
D : 培地の殺菌法	オートクレーブ	圧力釜
E : 洗浄方法	超音波洗浄	流水で洗う
F : 無菌操作	クリーンベンチ	簡易無菌箱
G : 培養場所	インキュベータ	育成棚

この7因子を直交表L₈(2⁷)に表1のように割り付けた⁽⁷⁾。

表1 直交表L₈による割り付け

因子	直交表L ₈ (2 ⁷)							実験の指示内容							汚染率	生長率
	A	B	C	D	E	F	G	水	培地の種類	支持材料	培地の殺菌法	洗浄法	無菌操作場所	培養場所		
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7		
1	1	1	1	1	1	1	1	イオン交換水	MS	寒天	オートクレーブ	超音波洗浄	クリーンベンチ	インキュベータ		
2	1	1	1	2	2	2	2	イオン交換水	MS	寒天	圧力釜	流水	簡易無菌箱	育成棚		
3	1	2	2	1	1	2	2	イオン交換水	ハイポネックス	ろ紙	オートクレーブ	超音波洗浄	簡易無菌箱	育成棚		
4	1	2	2	2	2	1	1	イオン交換水	ハイポネックス	ろ紙	圧力釜	流水	クリーンベンチ	インキュベータ		
5	2	1	2	1	2	1	2	水道水	MS	ろ紙	オートクレーブ	流水	クリーンベンチ	育成棚		
6	2	1	2	2	1	2	1	水道水	MS	ろ紙	圧力釜	超音波洗浄	簡易無菌箱	インキュベータ		
7	2	2	1	1	2	2	1	水道水	ハイポネックス	寒天	オートクレーブ	流水	簡易無菌箱	インキュベータ		
8	2	2	1	2	1	1	2	水道水	ハイポネックス	寒天	圧力釜	超音波洗浄	クリーンベンチ	育成棚		

2. 2 方法⁽⁹⁾

1) 培地調整

イオン交換水 (A₁ 実験区: 1, 2, 3, 4) をMS培地用に500cc, ハイポネックス培地用に500cc計1000cc用意した。水道水 (A₂ 実験区: 5, 6, 7, 8) もMS培地用に500cc, ハイポネックス培地用に500cc計1000cc用意した。

(B₁ 実験区: 1, 2, 5, 6) MS培地液500ccの調整 (イオン交換水の場合)

- ①1000のccビーカーにイオン交換水を250cc入れた。
- ②MS貯蔵液Iを10cc入れ, よく混合した。
- ③MS貯蔵液IIを5cc入れ, よく混合した。
- ④MS貯蔵液IIIを5cc入れ, よく混合した。
- ⑤MS貯蔵液IVを5cc入れ, よく混合した。
- ⑥MS貯蔵液Vを2.5cc入れ, よく混合した。

③~⑥の操作は, 全体が均質になってから, 次の貯蔵液を入れた。

⑦添加ホルモンとしてBA (ベンジルアデニン) およびNAA (ナフタレン酢酸) の貯蔵液をそれぞれ0.25cc加え, 濃度が0.1ppm⁽⁹⁾になるようにした。ただし, 添加ホルモン貯蔵液は冷凍庫から取り出した後, 室温で融解し, さらにスターラーで完全に融解したものを加えた。

⑧ショ糖を10g加え, さらにイオン交換水を加えて全量が500ccになるようにした。

⑨PHメーターを用い, NaOHを加えてPHを5.8に調整した。

(B₂ 実験区: 3, 4, 7, 8) ハイポネックス培地液500ccの調整 (イオン交換水の場合)

- ①1000ccのビーカーにイオン交換水を450cc入れた。
- ②ハイポネックス (N : P : K = 6.5 : 6 : 19) を1.5g計って入れた。ただし、ハイポネックスは乳鉢ですりつぶして溶け易くした。
- ③スターラーを用い、よく溶かした。
- ④ショ糖を10g加え、さらにイオン交換水を加えて全量が500ccになるようにした。
- ⑤PHメーターを用い、NaOHを加えてPHを5.8に調整した。

水道水の場合も同様に、MS培地液およびハイポネックス培地液を調整した（イオン交換水を水道水に読みかえる）。

2) 支持材料

(C, 実験区: 1, 2, 7, 8) 寒天

上記のMS培地液の半分の量にあたる250ccおよびハイポネックス培地液250ccに、それぞれ寒天を2g入れてよく溶かした後、試験管に40本ずつ分注した。

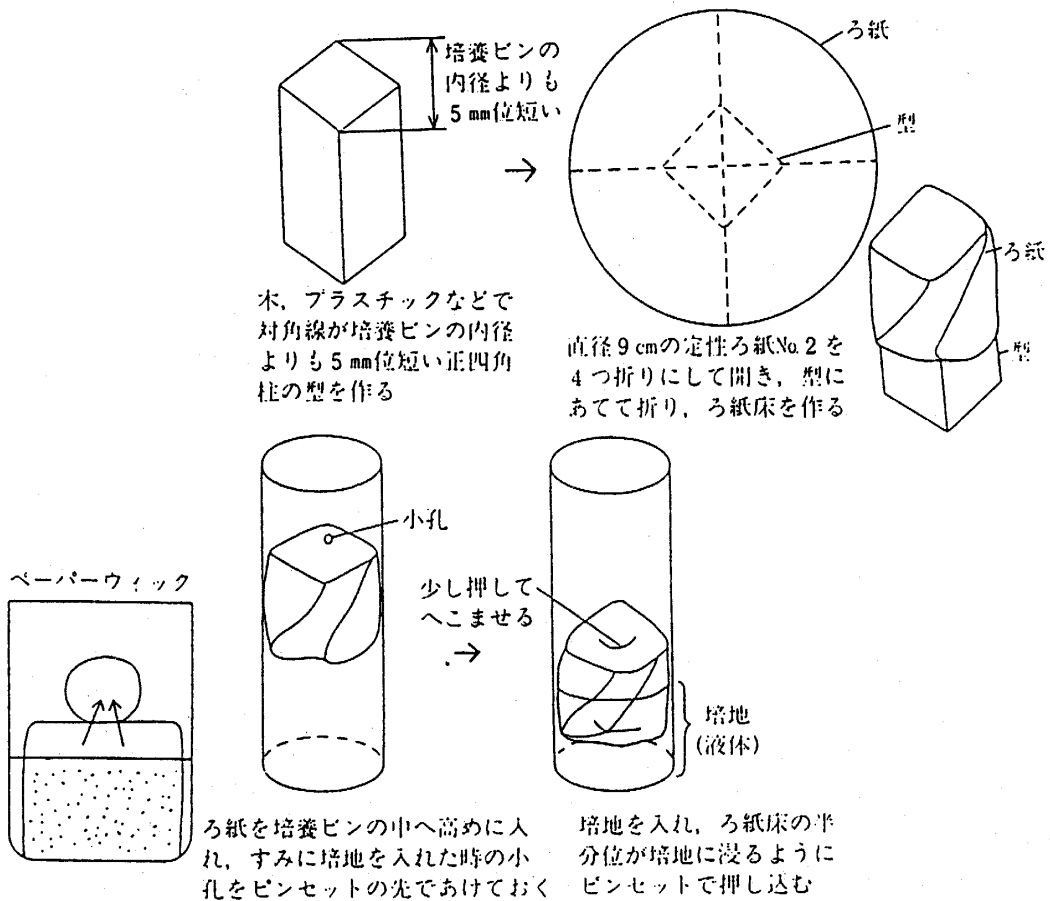


図1 ペーパーウィック培地の作り方

(C₂ 実験区：3, 4, 5, 6) ペーパーウィック(ろ紙)

残りのMS培地液250ccおよびハイポネックス培地液250ccは直接、試験管に40本ずつ分注した。その後、図1のようにろ紙を加工したものを各試験管にセットした⁽⁶⁾。

その後、C₁およびC₂の試験管計160本のそれぞれにアルミホイルで栓をした。

3) 培地の殺菌法

(D₁ 実験区：1, 3, 5, 7) オートクレーブに試験管80本を入れ、1.2気圧120°Cで20分殺菌をした。

(D₂ 実験区：2, 4, 6, 8) 残り試験管80本については、20本ずつ圧力釜にて30分殺菌をした。

4) 洗浄方法

①セントポーリアの葉28枚をスポンジに中性洗剤を付け、葉の表面を軽く、傷付けないように水洗いした。

②(E₁ 実験区：1, 3, 6, 8) 半分の14枚は中性洗剤を2～3滴落としたビーカーの中に入れ、超音波洗浄器で5分間処理をした。

③(E₂ 実験区：2, 4, 5, 7) 残り14枚をビーカーの中に入れ、上にガーゼをして流水で一晩処理をした。

④②③で処理した葉をピンセットでつまみ、水道水で2回水洗いした。

⑤殺菌ずみのビーカーに入れて、無菌条件下に移した。

5) 無菌操作

①作業中の指からの汚染が多いため、石鹸で手を洗い、さらに70%エタノールで手を消毒した。

②クリーンベンチ使用(F₁ 実験区：1, 4, 5, 8) 60分前に70%エタノールを内部に充分散布し、始動させ、殺菌灯を点灯した。浄化5～10分後に使用器具を搬入した。

簡易無菌箱(F₂ 実験区：2, 3, 6, 7)は使用前日に70%エタノールを内部に充分散布し、消毒済みの使用器具、培地を入れ、殺菌灯を一晩つけておいた。

③すべての用具類を入れ終わったら、滅菌水をスプレーして空気を洗浄し、空中にチリの浮遊している状態をなくしてから、アルミホイルの包みを開いて器具類を取り出し、さらにもう一度滅菌水をスプレーしてから、以下の作業に取りかかった。

④次亜鉛素酸ナトリウム溶液(有効塩素0.3%)の消毒液に供試材料を入れ、5分間消毒をした(ガラス棒で2～3回かき混ぜる)。

⑤滅菌水で3回水洗いした。

6) 調整

①シャーレの中にもろ紙を敷いた(ともに滅菌済み)。

②ピンセットで消毒した葉をろ紙上に置いた。

- ③葉の中肋および周縁部を除いた葉身を5～8mm角に分割した。
- ④試験管の口の部分を回しながら焼いた後、ピンセットでアルミキャップを取り除いた。
- ⑤分割した葉片を培地に置床し、試験管の口元を炎で焼いた。
- ⑥滅菌したアルミホイルをかぶせ、上から手の平でおさえ回しながら閉栓した。

7) 培養場所

- ① (G_1 実験区: 1, 4, 6, 7) インキュベータ内に置床した試験管80本を置いた。
- ② (G_2 実験区: 2, 3, 5, 8) 残り80本は、セントポーリアの慣行栽培区の育成棚に置いた。

ただし、 G_1 も G_2 も培養環境は、25℃、3000lx、16時間照明で培養した。また、培養小植物体の光条件を均一にするため、時々試験管の位置をローテーションした。

上記のこれらの操作を直交表を見て、確認しながら行った。

置床60日後、汚染数及び生長量を調査した。ただし、培養期間中に汚染した試験管は、そのつど除去した。また、生長量については、各区において生長のよいものとわるいものを除いた代表5本で調査し、平均値を算出した。得られたデータを分散分析により解析し、F検定を行うとともに、要因効果ならびに寄与率を算出した⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

3. 結 果

3.1 汚染数

汚染数の結果を表2、表3ならびに図2に示した。従来方法である1区が20本中1本で最も少なく、8区が20本中10本で最も多かった。全体では平均すると20本中5本にカビの発生が認められたことになり、カビは8種類に及んだ。

分散分析の結果より、イオン交換水、MS培地ならびにインキュベータを用いた従来方法が1%水準の有意差で優れていた。寄与率で見ると、この3つの要因で90%を占め、その中でも培地の種類の寄与率が51.62%と高い値を示した。他の要因である培地の殺菌法、洗浄方法ならびに無菌操作場所については、寄与率も低く、差異は認められなかった。一方、支持材料として寒天を用いたものより、ろ紙を用いたペーパーウィック方式が5%水準の有意差で汚染数が少なかった。

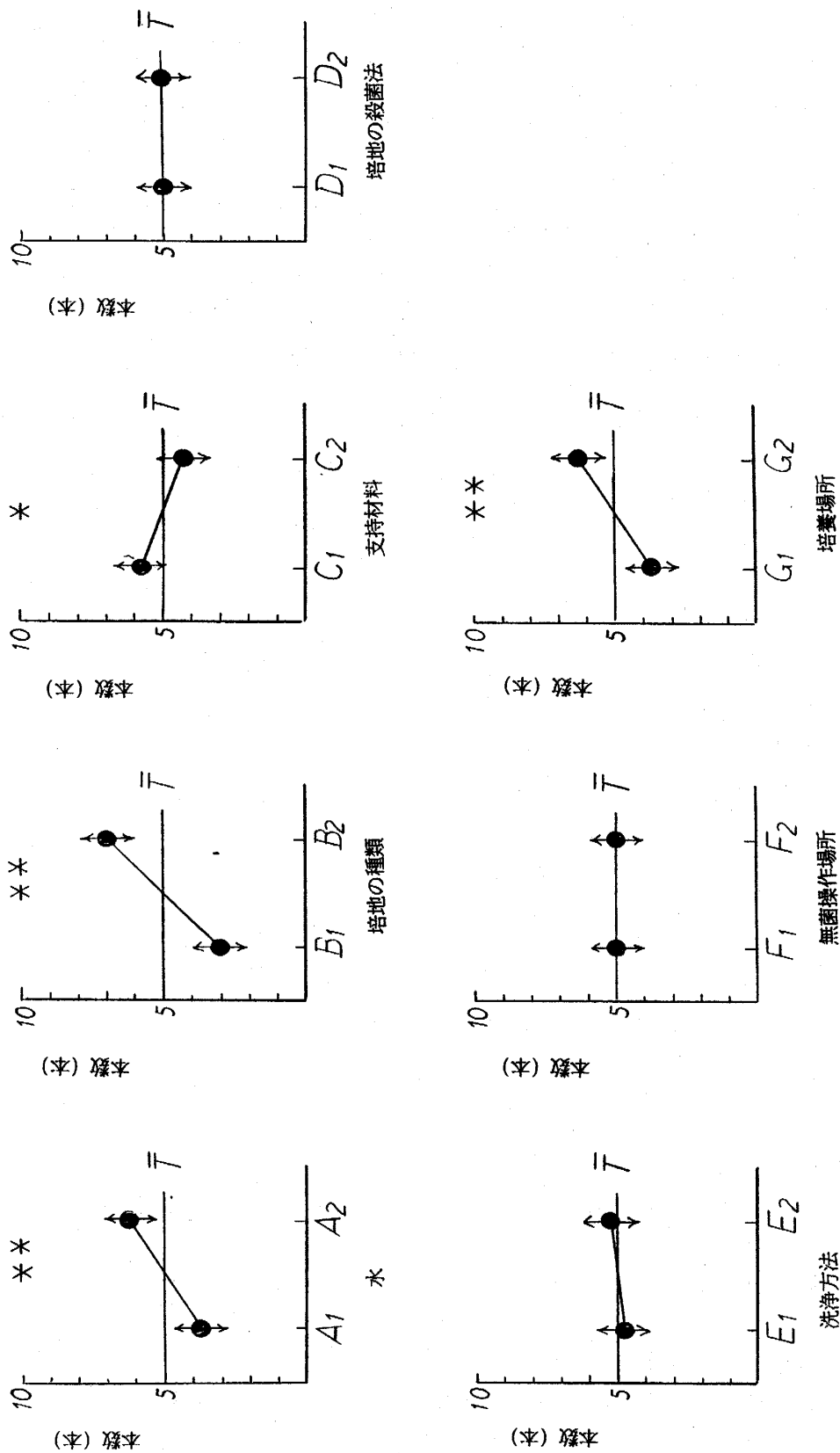


図2 汚染数の要因効果図

表2 直交表L₈による割り付けの結果

因子	直交表L ₈ (2 ⁷)							汚染数	生長量							
	A	B	C	D	E	F	G		茎葉重	根重	カルス重	新鮮重	乾物重	全乾物率	不定芽数	不定根数
	1	2	3	4	5	6	7		(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(%)	(本)	(本)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	868	190.3	134.42	1193.2	68.04	5.7	100.6	51
2	1	1	1	2	2	2	2	4	689.42	64.62	135.26	889.3	36.18	4.14	100.4	16
3	1	2	2	1	1	2	2	6	46.38	27.68	13.8	87.8	7.3	8.31	21.2	13.4
4	1	2	2	2	2	1	1	4	14.16	6.16	10.6	30.9	4.46	14.42	7.6	2.6
5	2	1	2	1	2	1	2	5	75.82	28.02	2.14	106	7.4	6.98	21.4	15.2
6	2	1	2	2	1	2	1	2	12.96	26.06	1.06	40	3.64	9.08	6.2	5.6
7	2	2	1	1	2	2	1	8	395.84	45.56	57.44	498.8	38.82	7.78	39.8	7.4
8	2	2	1	2	1	1	2	10	445.88	60.86	102.08	608.8	30.78	5.06	61.6	10.4

表3 汚染数の分散分析表

要因	S	ϕ	V	F ₀	寄与率 ρ (%)
A (水)	12.5	1	12.5	74.8**	20.16
B (培地の種類)	32	1	32	191.6*	51.62
C (支持材料)	4.5	1	4.5	26.9**	7.25
D (培地の殺菌法)	0	1			0
E (洗浄方法)	0.5	1			0.81
F (無菌操作)	0	1			0
G (培養場所)	12.5	1	12.5	74.8	20.16

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 4$ $V_0 = 7108.17$

F (1,3 : 0.05) = 10.1 F (1,3 : 0.01) = 34.1

* 5%水準で有意

** 1%水準で有意

3.2 生長量

生長量の結果を表2に示した。

1) 各実験区の生長の特徴

1区: 不定芽密集, 不定根数も多い。母葉片の褐変に加え, 不定芽の葉縁も褐変。葉色は淡く, 葉柄短い。

2区: 不定芽の葉縁と母葉片に褐変はみられず, 葉色は緑濃く生き生きしている。また, 葉柄が長く継代培地に分割しやすい状態に苗が均一化している。

3区: 不定芽よりも不定根の発生が目立ち, 根長も長い。

4区: 不定芽数及び不定根数が少なく, 生長が悪い。また, 母葉片が褐変。

5区: 不定根長の長いのが目立つ。母葉片の褐変はない。

6区：褐変が母葉片と根に及ぶ。不定芽数は最も少なく、生長が悪い。

7区：母葉片の褐変に加え、不定芽の葉縁も褐変。葉色は淡く、みずみずしさに欠ける。カルス大で、葉柄が短く未分化が目立つ。

8区：葉柄が長く、みずみずしさがあり生き生きしている。継代培地に分割しやすい大きさに生長し、不定芽の密集はない。

2) 茎葉重

茎葉重の結果を表4及び図3に示した。ろ紙を用いたペーパーウィック方式の茎葉重が極端に少なく、1%水準で有意差が認められ、寄与率も80.15%と高かった。

イオン交換水及びMS培地を用いた従来の方法が5%水準の有意差で優れていた。また、育成棚で培養した方が、茎葉重は重かったが有意差を認めるまでには至らなかった。

表4 茎葉重の分散分析表

要因	S	ϕ	V	Fo	寄与率 ρ (%)
A (水)	59075.16	1	59075.16	8.31*	7.5
B (培地の種類)	69180.84	1	69180.84	9.73*	8.76
C (支持材料)	632711.25	1	632711.25	89.01**	80.15
D (培地の殺菌法)	6250.74	1			0.79
E (洗浄方法)		1			0.62
F (無菌操作)		1			1.06
G (培養場所)		1			1.12

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 4$ $V_0 = 7108.17$

F (1,4 : 0.05) = 7.71 F (1,4 : 0.01) = 21.2

* 5%水準で有意

** 1%水準で有意

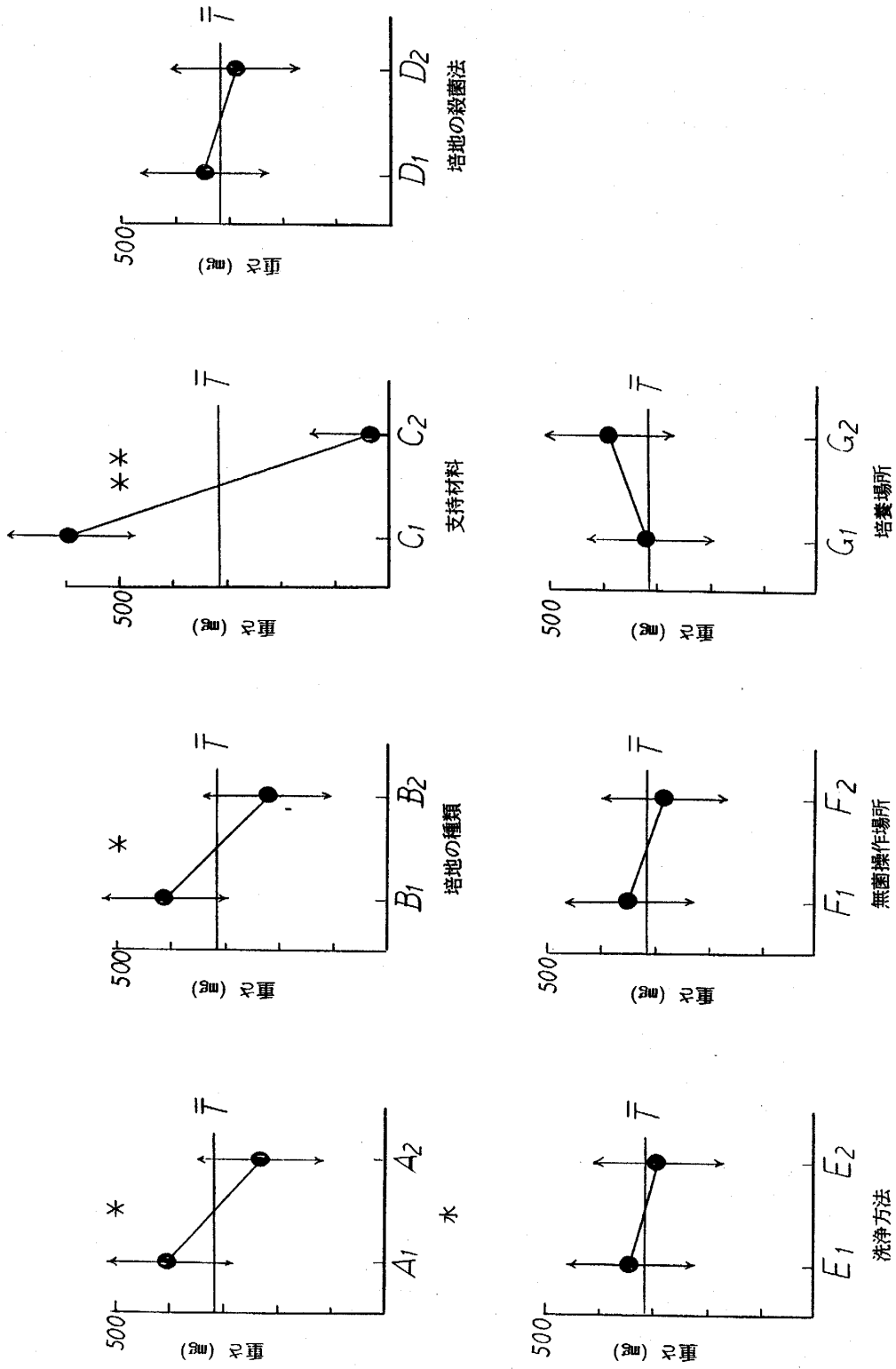


図3 茎葉重の要因効果図

3) 根重

根重の結果を表5に示した。根重においては有意差を認める要因はなかった。

表5 根重の分散分析表

要 因	S	ϕ	V	Fo	寄与率 ρ (%)
A (水)	2055.05	1	2055.05	2.18	8.85
B (培地の種類)	3560.84	1	3560.84	3.78	15.34
C (支持材料)	9342.08	1	9342.08	9.91	40.26
D (培地の殺菌法)	2241.15	1	2241.15	2.38	9.66
E (洗浄方法)	3220.03	1	3220.03	3.41	13.88
F (無菌操作)	1844.07	1	1844.07	1.96	7.95
G (培養場所)	943.08	1			4.06

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 1$ $V_0 = 943.08$
 $F(1,1:0.05) = 161$ $F(1,1:0.01) = 4052$
 * 5%水準で有意 ** 1%水準で有意

4) カルス重

カルス重の結果を表6及び図4に示した。ろ紙を用いたペーパーウィック方式のカルス重が極端に少なく、1%水準で有意差が認められ、寄与率も82.93%と高かった。

表6 カルス重の分散分析表

要 因	S	ϕ	V	Fo	寄与率 ρ (%)
A (水)	2156.93	1	2156.93	5.41	8.87
B (培地の種類)	989.24	1			4.08
C (支持材料)	20160.32	1	20160.32	50.61**	82.93
D (培地の殺菌法)	212.18	1			0.87
E (洗浄方法)	263.58	1			1.08
F (無菌操作)	217.15	1			0.89
G (培養場所)	309.51	1			1.28

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 5$ $V_0 = 398.33$
 $F(1,5:0.05) = 6.61$ $F(1,5:0.01) = 16.3$
 * 5%水準で有意 ** 1%水準で有意

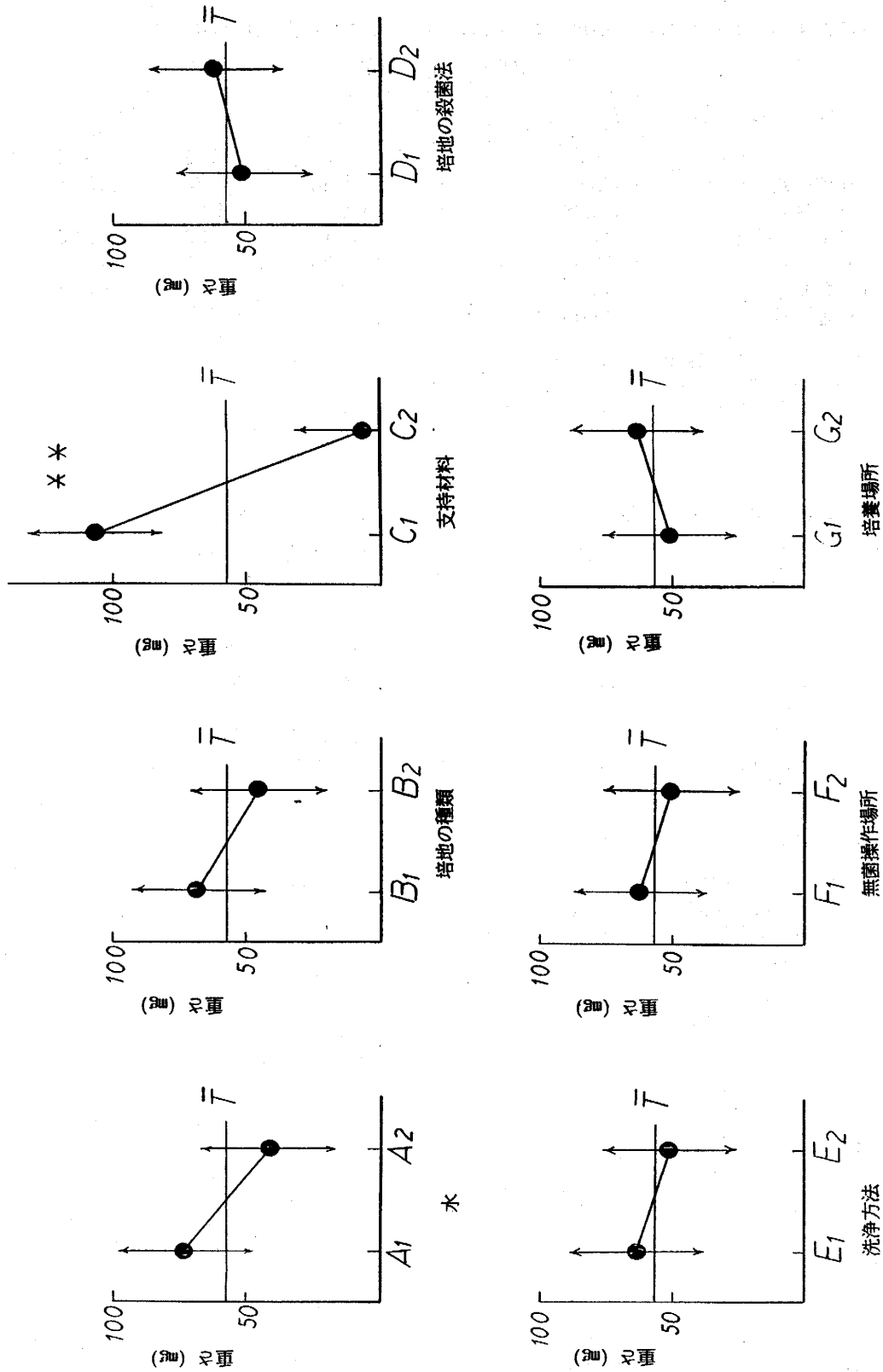


図4 カルス重の要因効果図

5) 新鮮重

新鮮重の結果を表7及び図5に示した。ろ紙を用いたペーパーウィック方式の新鮮重が極端に少なく、1%水準で有意差が認められ、寄与率も78.5%と高かった。一方、イオン交換水及びMS培地を用いた従来の方が5%水準の有意差で優れていた。

表7 新鮮重 (FW) の分散分析表

要 因	S	ϕ	V	Fo	寄与率 ρ (%)
A (水)	112224.27	1	112224.27	8.01*	8.2
B (培地の種類)	125540.58	1	125540.58	8.96*	9.2
C (支持材料)	1069657.88	1	1069657.88	76.38**	78.5
D (培地の殺菌法)	12545.28	1			0.9
E (洗浄方法)	20490.98	1			1.5
F (無菌操作)	22353.44	1			1.6
G (培養場所)	630.83	1			—

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 4$ $V_0 = 14005.13$

F (1,4 : 0.05) = 7.71 F (1,4 : 0.01) = 21.2

* 5%水準で有意

** 1%水準で有意

6) 乾物重

乾物重の結果を表8及び図6に示した。ろ紙を用いたペーパーウィック方式が1%水準の有意差で劣っていた。他の要因については、有意差を認めるまでには至らなかったが従来の方が優れていた。

表8 乾物重 (DW) の分散分析表

要 因	S	ϕ	V	Fo	寄与率 ρ (%)
A (水)	156.1	1			4.22
B (培地の種類)	143.65	1			3.88
C (支持材料)	2850.88	1	2850.88	24.56**	77.02
D (培地の殺菌法)	270.28	1	270.28	2.33	7.3
E (洗浄方法)	65.55	1			1.77
F (無菌操作)	76.51	1			2.07
G (培養場所)	138.61	1			3.74

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 5$ $V_0 = 116.08$

F (1,5 : 0.05) = 6.61 F (1,5 : 0.01) = 16.3

* 5%水準で有意

** 1%水準で有意

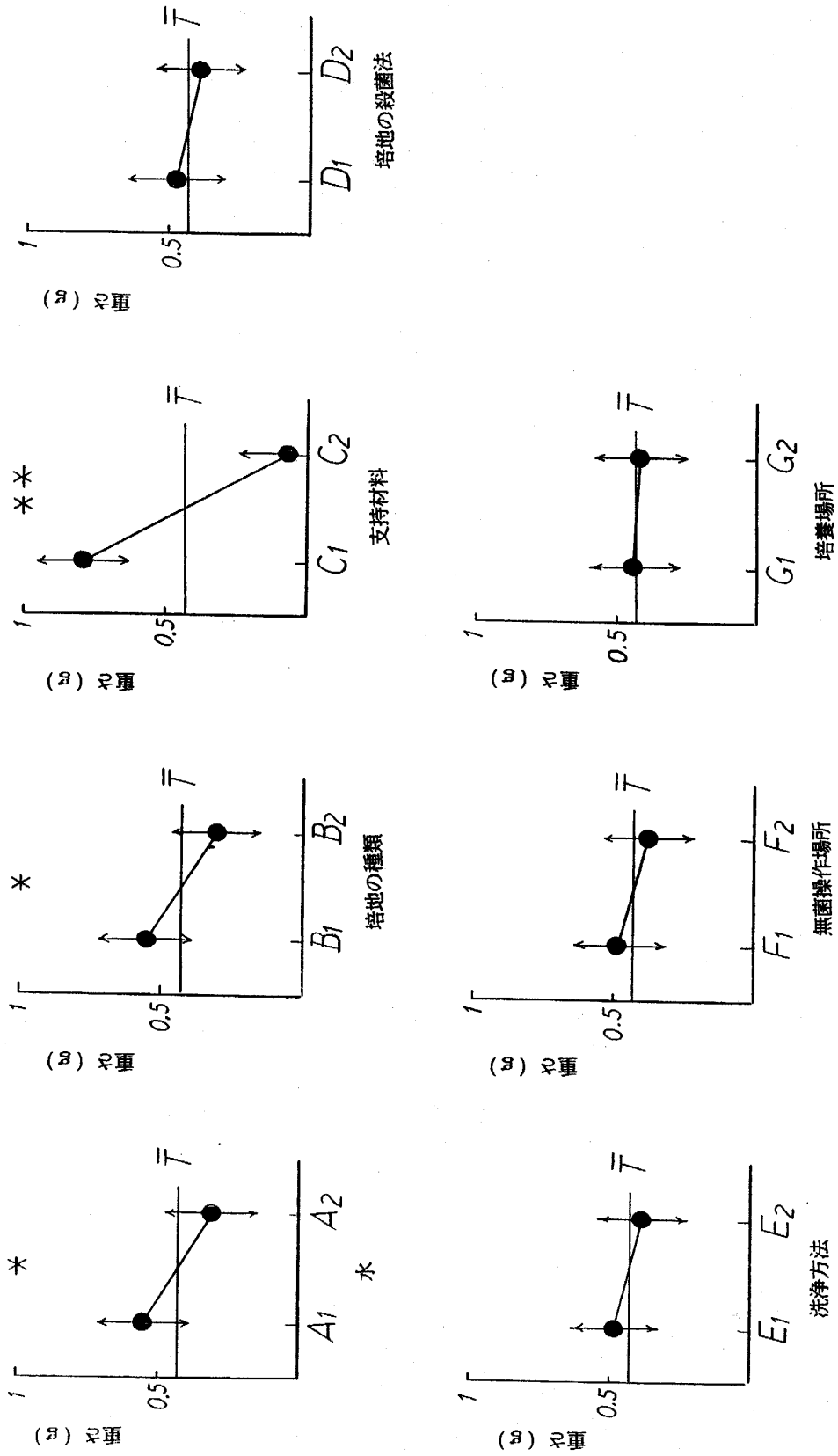


図5 新鮮重 (FW) の要因効果図

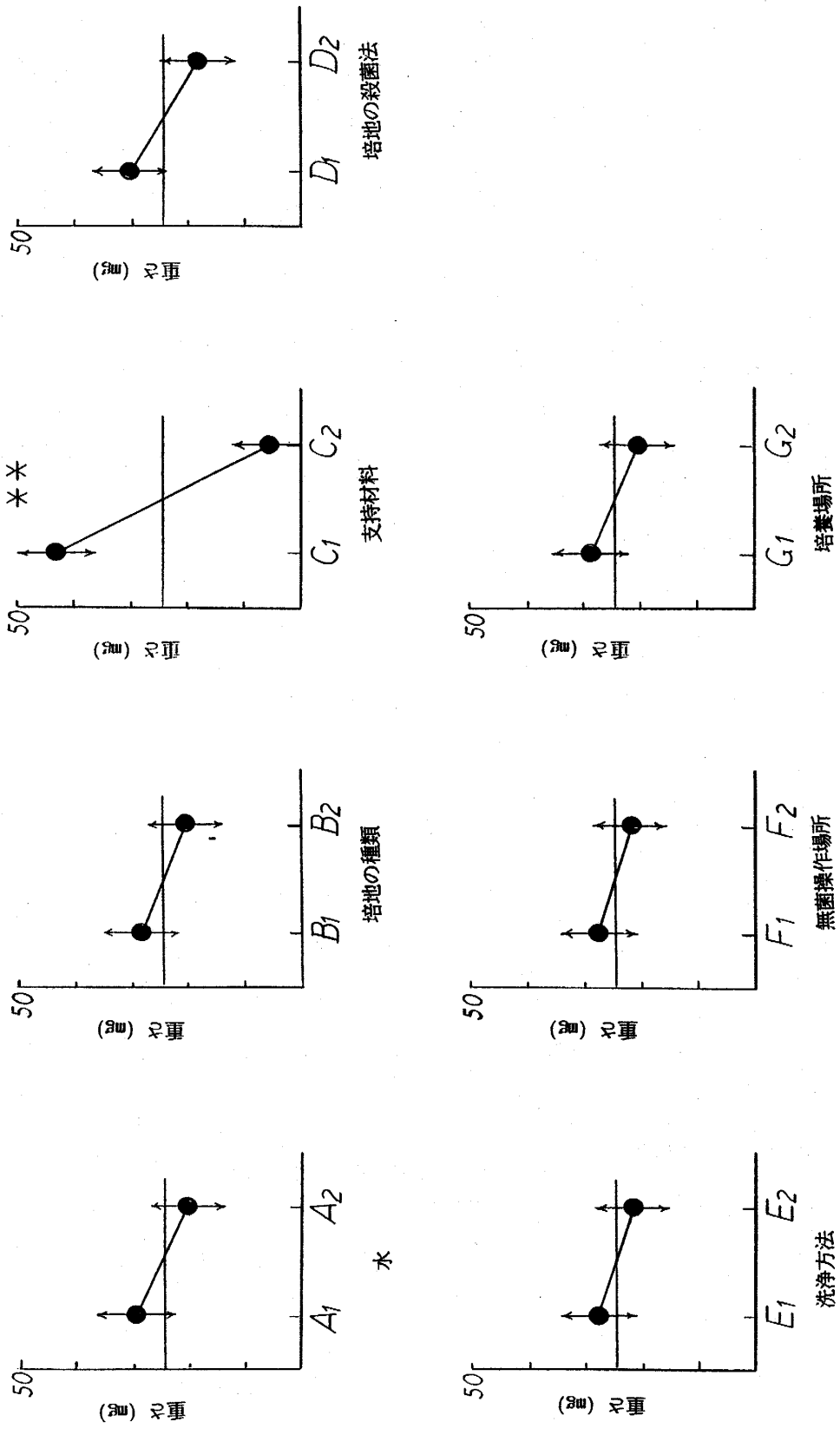


図6 乾物重 (DW) の要因効果図

7) 全乾物率

全乾物率の結果を表9及び図7に示した。支持材料としてペーパーウィック方式を用いた培養小植物体は、みずみずしさに欠け、1%水準の有意差で全乾物率が大きかった。一方、育成棚での培養小植物体は、みずみずしく生き生きとしており、5%水準の有意差で全乾物率が小さかった。

表9 全乾物率の分散分析表

要因	S	ϕ	V	F ₀	寄与率 ρ (%)
A (水)	1.68	1			2.35
B (培地の種類)	11.69	1	11.69	5.87	16.33
C (支持材料)	32.44	1	32.44	16.3*	45.3
D (培地の殺菌法)	1.93	1			2.7
E (洗浄方法)	3.34	1			4.67
F (無菌操作)	1.02	1			1.42
G (培養場所)	19.5	1	19.5	9.8	27.23

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 4$ $V_0 = 1.99$
 $F(1,4; 0.05) = 7.71$ $F(1,4; 0.01) = 21.2$
 * 5%水準で有意 ** 1%水準で有意

8) 不定芽数

不定芽数の結果を表10及び図8に示した。支持材料としてペーパーウィック方式を用いたものは、1%水準の有意差で不定芽数が少なかった。また、水道水及びハイポネックスを用いたものも5%水準の有意差で不定芽数が少なかった。

育成棚で培養されたものは、有意差を認めるまでには至らなかったが、インキュベータで培養されたものより不定芽数が多かった。

表10 不定芽数の分散分析表

要因	S	ϕ	V	F ₀	寄与率 ρ (%)
A (水)	1270.08	1	1270.08	11.4*	12.1
B (培地の種類)	1210.32	1	1210.32	10.86*	11.54
C (支持材料)	7564.5	1	7564.5	67.89**	75.11
D (培地の殺菌法)	6.48	1			0.06
E (洗浄方法)	52.02	1			0.49
F (無菌操作)	69.62	1			0.67
G (培養場所)	317.52	1			3.03

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 4$ $V_0 = 111.41$
 $F(1,4; 0.05) = 7.71$ $F(1,4; 0.01) = 21.2$
 * 5%水準で有意 ** 1%水準で有意

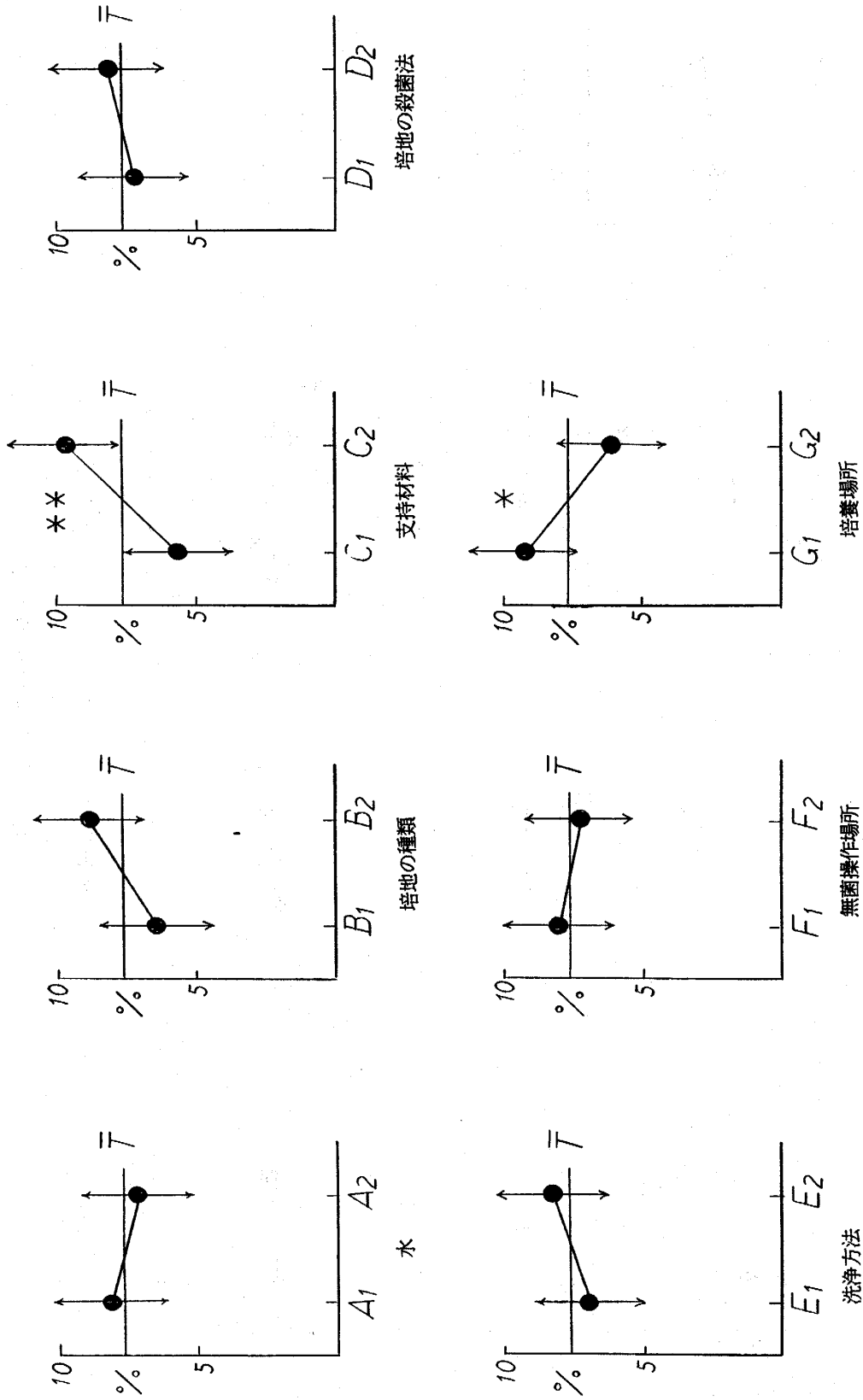


図7 全乾物率の要因効果図

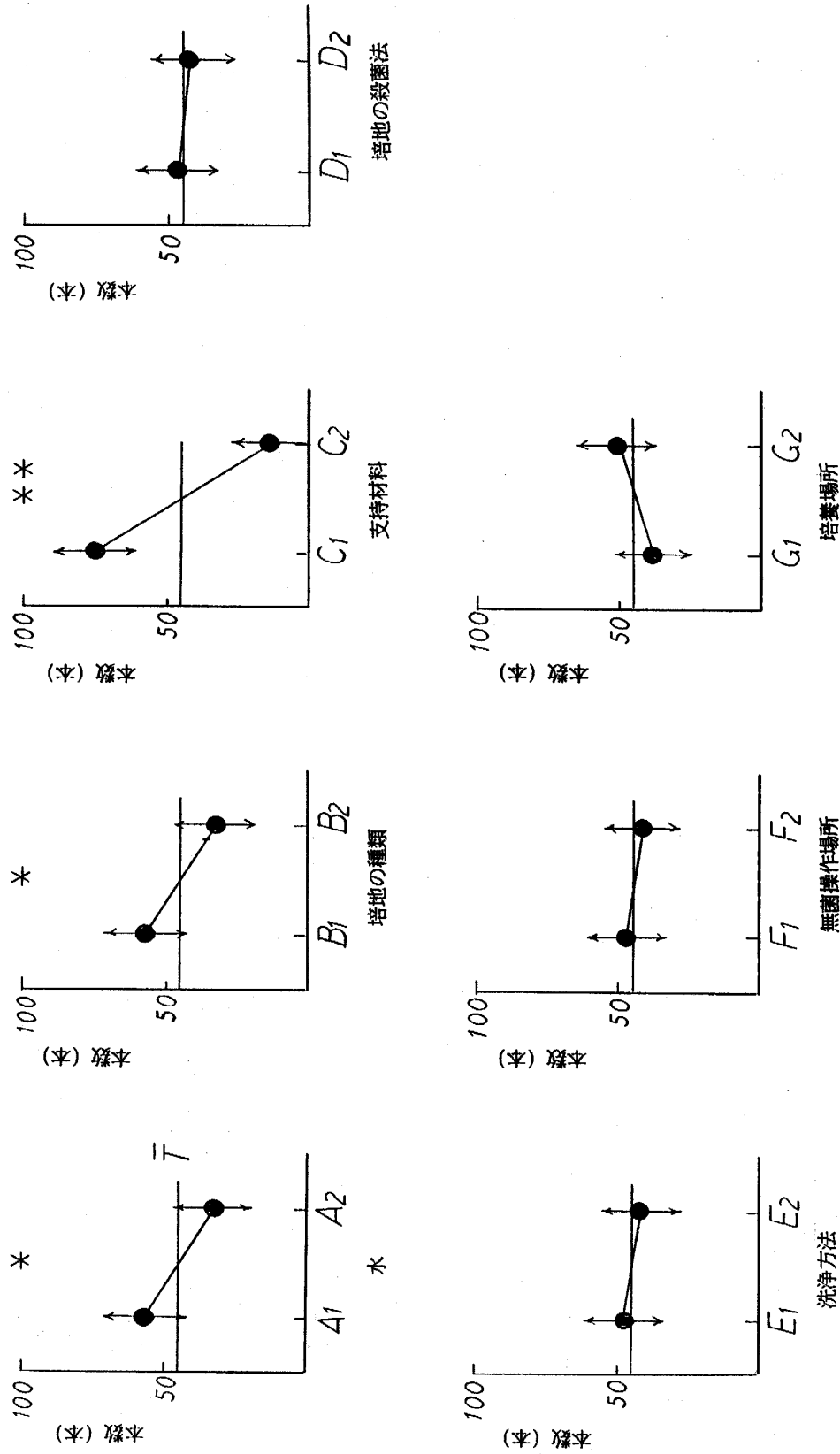


図8 不定芽数の要因効果図

9) 不定根数

不定根数の結果を表11に示した。不定根数において有意差を認める要因はなかった。

表11 不定根数の分散分析表

要 因	S	ϕ	V	Fo	寄与率 ρ (%)
A (水)	246.42	1	246.42	15.72	16.3
B (培地の種類)	364.5	1	264.5	21.67	22.5
C (支持材料)	288	1	288	17.12	17.7
D (培地の殺菌法)	343.22	1	343.22	20.41	21.2
E (洗浄方法)	192.08	1	192.08	11.42	11.8
F (無菌操作)	169.28	1	169.28	10.06	10.4
G (培養場所)	16.82	1			0.1

注 要因D, E, Fを誤差にプーリングした。 $\phi_0 = 1$ $V_0 = 16.82$

F (1,1 : 0.05) = 161 F (1,1 : 0.01) = 4052

* 5%水準で有意 ** 1%水準で有意

4. 考 察

4. 1 材料の調整

各実験区とも供試した葉切片の部位によって増殖率に差がみられ、先端部を置床したものは、褐変枯死か増殖率が低い傾向がみられた。一方、葉柄に近い太い主葉脈のある部分はシュート分化も早く、分化数も多いなど増殖率が高かった。葉の先端部は粗調整の処理で傷みやすく、太い主葉脈が通っていないためと思われる。したがって、葉柄に近い部分を培養することが増殖率向上に有効であると思われる。また、病虫害のない健全な若い葉を用いることは、初代培養が成功するかどうかの大切なポイントである⁽⁹⁾ことから、日常の親株の管理をきちんと行う必要があることが推察された。

分化の効率は、培養する組織切片の部位、組織の齢、切片の大きさ等によって大きな差を生じることがわかっている⁽¹²⁾。特に、組織の齢は若いほど芽の形成率が上がるという指摘から、今回供試した葉長約5cmの葉は、葉齢から推測すると、もう少し若い葉を用いた方がよいものと思われる。また、切片の大きさも検討の余地があると考えられた。

4. 2 培養の簡略化

1) 水

汚染数においては、1%水準の有意差でイオン交換水の方が優れていた。生長量においても、茎葉重、新鮮重ならびに不定芽数は5%水準の有意差でイオン交換水の方が優れていた。このことから水道水には、不純物がある程度混入していることが予想され、残留塩素の影響もあるように思われた。しかし、筆者の予備実験で、継代培養で水道水を用いた場合には汚染数が少なかったことから、培養が成功したものについては水道水でも可能であることが窺えた。

2) 培地調整

汚染数においては、1%水準の有意差でMS培地の方が優れていた。生長量においても、茎葉重、新鮮重ならびに不定芽数は5%水準の有意差でMS培地の方が優れていた。このことからMS培地が含有成分において汚染されにくく、栄養分が豊富で培養に適していることが明らかとなった。しかし、MS培地は、薬品の種類や量が多く、少量の調合は難しい。その点ハイポネックス培地は面倒な薬品の調合がないために扱いやすい利点がある。さらに、液体ハイポネックスも手軽に入手できるため、中学校レベルではハイポネックス培地でも十分であるように思われた。

3) 支持材料

寒天は湯煎をして溶かす必要があったり、使用後の処理が面倒である等の不便さがあるため、それに代わるものとして、ろ紙を使用してみた。汚染数においては、5%水準の有意差でろ紙を用いたペーパーウィック方式が優れていた。しかし、生長量においては、どの項目も大きく劣り、分化の様相が異なっていた。増殖率が悪いのは、葉切片が養分を吸収しにくいためと思われ、セントポーリアの培養には支持材料として不適であることが明らかとなった。

4) 培地の殺菌法、洗浄方法及び無菌操作

汚染数において培地の殺菌法、洗浄方法ならびに無菌操作場所については、寄与率も低く、差異は認められなかった。また、生長量においても、これらの要因は関与していなかった。したがって、圧力釜、流水ならびに簡易無菌箱で十分代用可能であり、設備が簡略化できることが明らかとなった。

添野は⁽⁹⁾殺菌剤の中に界面活性剤であるツィーン20を0.1~1%程度添加すると、外植体表面への殺菌剤の付着を促進し、殺菌効果を大幅に向上させ、殺菌時間を短縮できたと報告している。無菌操作をおろそかにすると、多くの時間と費用をかけた準備がすべて無駄になってしまうことから、設備を簡略化する場合には、一つの過程として必要な操作であると思われた。

5) 培養場所

汚染数においては、1%水準の有意差でインキュベータの方が優れていた。育成棚はインキュベータに比べ温度変化が大きいことが汚染の原因になっていると思われた。生長量においては、有意差は認められなかったが、生長の特徴として、インキュベータで培養した場合、不定芽の葉縁及び母葉片に褐変がみられた。

近は⁽⁹⁾、培養時期の検討の中で、一般に恒温条件の方が結果は良好であるが、セイヨウタンポポが開花し始める4月下旬ごろの花茎組織は、恒温条件では組織が褐変したが、室温条件では日数がかかるものの不定芽形成、および葉の展開は観察されたと報告している。本実験の培養は10月上旬に行ったが、筆者が過去2月及び5月に予備実験を行ったときには、このような傾向はみられなかった。このことから、材料の生理的状态が時期によってかなり変化することが推察された。したがって、培養にあたっては材料の生理的状态も考慮し、室温条件で行う場合に温度変化の少ない時期と場所を検討する必要があることが判明した。

5. 結 論

培養室で行われる従来の方法と中学校の設備でできる方法とを7因子2水準に割り付け、汚染数と生長量を調査した結果、次の諸点が明らかになった。

- 1) 供試葉は若い葉を用い、葉切片は葉柄に近い部分を置床したほうが褐変枯死がなく、増殖率が高い。
- 2) 支持材料としては寒天が適し、ろ紙は不適である。
- 3) 一定数の汚染は避けられないが、歩留まりを考慮して培養することにより、培養技術の導入及び設備の簡略化は可能である。
- 4) MS培地は汚染されにくく、栄養分も豊富なため、ハイポネックス培地よりも培養に適している。
- 5) 増殖率を向上させ汚染数を減らすためには、MS培地ならびにイオン交換水を用いた方が望ましい。
- 6) 室温条件で培養する場合は、温度変化の少ない時期と場所を考慮する必要がある。
- 7) 培養にあたっては材料の生理的状态も考慮する必要がある。
- 8) 生徒に苗を供給するためには、組織培養を2年生の時期に行うことが望ましい。

引用文献

- (1) 藤野守弘他：ハイテク花づくり－花栽培の最新情報2－，化学工業日報社，pp9-18，(1990)
- (2) 亀井千鶴子・大内 衛：セントポーリアの葉片培養による増殖，園学雑，pp526-527，(59別1，'90)
- (3) 初見 豊：バイオテクノロジーと生物教育の現状・遺伝，45巻4号，pp18-20，1991
- (4) 近 芳明：組織培養を使用した形態形成の観察－材料の選択と培養の簡略化－，遺伝，41巻4号，pp105-110，(1987)
- (5) 鈴木寿雄他：技術・家庭下巻，開隆堂，pp88-89，(1993)
- (6) 石田晴久他：新しい技術・家庭下，東京書籍，pp98-100，(1993)
- (7) 田口玄一：実験計画法(上)，丸善，pp143-157，(1956)
- (8) 古川仁朗：図解バイテクマニュアル 花・野菜・果樹の組織培養操作，誠文堂新光社，pp2-35，pp82-83，(1988)
- (9) 石光照彦，三位正洋：Saintpauliaの組織培養による増殖，園芸学会発表要旨，pp362-363，(1981)
- (10) 中里博明，川崎浩二郎，平栗 昇，大滝 厚：品質管理のための実験計画法テキスト，日科技連，pp179-186，(1985)
- (11) 石川 馨，中里博明，松本 洋，伊東静男：初等実験計画法テキスト，日科技連，pp214-219，(1968)
- (12) 楠元 守，高橋節郎，森屋 一，難波純治：ポピュラーバイオテクノロジー(3)－初代培養にあ

たつての無菌処理一, 遺伝, 43巻1号, pp72-76, (1989)