

微酸性電解水を活用した人工種子の開発

光石統哉・堂野遥希・古川翔大・瀧谷咲月 (兵庫県立龍野高校自然科学部)

1. 動機及び目的

私たちは絶滅危惧種サギソウ自生地 of 保全活動を行っている。サギソウの生育を妨げる大型草本を駆除し、人工交配で結実率を上げたりしている。しかし、胚乳を持たないサギソウの種子は発芽時にラン菌と共生でないと発芽できない。

そこで、サギソウの人工種子の開発に取り組んだ。また、菌が常在する生物実験室で人工胚乳を作成したり、無菌操作を行ったりするために、殺菌水である微酸性電解水を利用した

2. 実験方法と結果

人工種子とは組織培養で作られた不定芽・不定胚などの植物体を人工膜で覆ったものである。

今回の目的は、サギソウの保全である。遺伝子多様性を維持するために、従来の不定胚などのクローンを用いない方法として、植物体には種子から人工胚乳で培養したプロトコームを使用することにした。

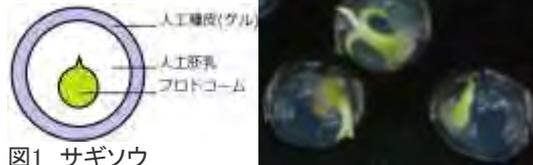


図1 サギソウ人工種子 種子の直径 5~8mm 胚乳の直径 4~6mm

人工種子の開発の過程

- 過程1 種子からプロトコームを生産するための人工胚乳の開発
- 過程2 簡易な人工種子製造技術の開発
- 過程3 人工種子の保存技術の開発

実験1 人工胚乳の開発

目的 プロトコームとはランの種子が発芽成長するとき、胚から成長した球状の細胞塊である。ラン菌と共生することなく、サギソウの種子を発芽させ、プロトコームまで育てるためには、人工胚乳が必要となる。そのため、まず人工胚乳を開発することにした。

方法 人工胚乳の組成は、ラン科植物の培地として一般的な、京都培地(ハイポネックス基本培地(狩野, 1976年)微粉ハイポネックス 3g ショ糖 35g 寒天 15g 水 1000mL)を参考に、5種類の人工胚乳を作成し、微酸性電解水で培地と種子を滅菌し発芽させた。

人工培地の作り方

- ① 微酸性電解水で、ショ糖, 園芸肥料の

粉末ハイポネックスを溶かした。(表参照)

- ② 50mL 瓶に、人工胚乳とサギソウの種子を入れた。
- ③ 瓶をよく振り、人工胚乳とサギソウの種子を滅菌した。
- ④ 瓶を、インキュベーター内で管理した(25℃, 12時間照明)。また仮根が絡まらないように、1~2日に1回程度瓶を振った。
- ⑤ 8月18日と8月25日に記録した。

結果

表1 各人工胚乳の組成と成長結果

試料番号	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	
培地	肥料(g/L)	0	0	1	1	2	2
	ショ糖(g/L)	0	5	5	10	0	20
調査日	8月18日	-	+	+	++	+	+++
	8月25日	-	-	-	+++	++	-

+: 生育良好 -: 生育不良または枯死が多い

肥料濃度2g/L, ショ糖濃度20g/L は成長が早いですが、急激に、プロトコームは褐色に変化し枯死するものが多くなりました。成長は少し遅れるが肥料1g/L, ショ糖10g/L のとき生育は安定していた。

実験2 簡易な人工種子製造技術の開発

人工種皮となるゲル被膜の製造は、人工イクラの製造にもつかわれる、アルギン酸ナトリウム水溶液を塩化カルシウム水溶液に滴下する方法を使った。

実験2-1 ゲル化剤の適切な濃度を調べる

目的 アルギン酸ナトリウム水溶液と塩化カルシウム水溶液の濃度によって、どのようなサイズのゲル玉ができるか調べる。

方法 塩化カルシウム水溶液(0.5%, 1%, 2%)の上方15cmから、口径3mmのピペットでアルギン酸ナトリウム水溶液(1%, 2%, 4%)を滴下した。

ゲル玉のサイズは、ボルトゲージで測定した。

結果 アルギン酸ナトリウム水溶液4%では粘性が高く、形状が涙型になることが多かった。また塩化カルシウム水溶液0.5%では、膜の厚さが薄く潰れやすいものが多かった。

アルギン酸ナトリウム水溶液2%と塩化カルシウム水溶液1~2%が適切と判断した。

表2 ゲル化剤の濃度とゲル玉の直径

水溶液の質量濃度 アルギン酸NaCaC12	ゲル玉の直径 (mm) と分布					試料数 (個)	ゲル直径 最頻値 (mm)
	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5		
1%	0.5%		10	9		19	5.5
1%	1%	1	19			20	4.5
1%	2%	2	18			20	4.5
2%	0.5%		8	15		23	5.5
2%	1%		5	21		26	5.5
2%	2%		5	16	3	24	5.5
4%	0.5%		1	15	5	25	5.5
4%	1.0%			18	7	25	5.5
4%	2.0%			16	9	25	5.5

実験2-2 ピペットの口径と液滴の直径について

目的 直径1~2mmのプロトコムを入れるためには直径4~6mm程度の液滴(人工胚乳)が適当である。そこで、ピペットの口径(1~6mm)と液滴の直径の関係を調べた。

方法 口径を変えた使い捨てピペットを用いて水を滴下し電子天秤で質量を測定し、液滴の直径を計算した。各ピペット10回ずつ計測した。

結果 口径1~6mmすべて水1滴あたりの直径が目標の4~6mm程度となった。

考察 口径1~2mmでは、プロトコムの吸引・排出時につまる可能性があることから、3~6mmの口径のピペットをプロトコムの成長サイズに合わせ使用するのがよいと考えた。

実験2-3 簡易人工種子製造用のピペットの開発

目的 人工胚乳をゲルで被覆するための製造機を製作する。実験は、結果を視認しやすいように食紅で染めた水を人工胚乳の代用とした。

方法 人工イクラの製造方法を参考に分岐型の2重ノズルピペットを試作した。しかし加工が難しいこともあり、さらに製作容易な滴下型やタンク貫通型人工種子製造機を考案した。

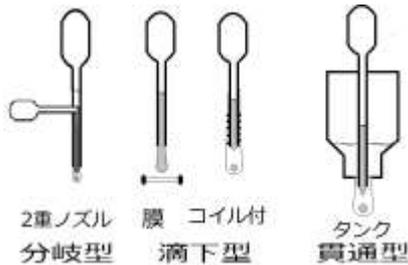


図2 各種の製造機の構造

結果

2重ノズル分岐型ピペット

2重ノズル式ピペットでは、人工種子の食紅で染めた水が中心からずれているものが多かった。中心まで固まっているものもあった。ノズルの隙間を均一にするなど、加工が難しい。

膜滴下式ピペット

食紅で染めた水がゲル玉の中心からずれているものが多かった。直径6.5mmのものが多い。連続的な滴下が困難である。

コイル付きピペット

ピペット先端にコイルを巻き、その部分をアル

ギン酸水溶液に浸し、滴下速度を低下させた。滴下速度の調節は困難で、量も調節できない。

タンク貫通式ピペット

連続的にアルギン酸を滴下できるようにタンクを設け、タンクを貫通するように人工胚乳用ピペットを取り付けた。アルギン酸の滴下量は指でタンクを加圧することで調節することが可能である。

ゲル玉の中心に染めた水が入っているものが多かった。直径5~6mmのものが多い。

考察 2重ノズル式は精密な加工が必要で、また、使用後の洗浄も構造上難しい。タンク貫通式は連続的にアルギン酸を滴下でき便利である。また構造が簡単でタンクとピペットを分離し洗浄も容易である。

作成した中心の赤いゲル玉は乾燥防止のため水中保管したところ、時間とともに色が拡散した。このことから人工胚乳の内部の養分もまた拡散により失われることが予想された。

実験3 人工種子保存方法の開発

目的 人工種子の製造から、使用するまでの間、保存方法を開発する。

条件1 乾燥させない。

条件2 プロトコムは光を必要とする。

条件3 養分を流出させない。また保存期間が長いと、養分の供給が必要。

条件4 カビを生えさせない。

方法 以上の条件を満たすためには、透明な密封できる容器に、滅菌した人工種子と人工胚乳を入れる必要がある。そこで作成した人工種子を微酸性電解水で滅菌した後、ビンで無菌的に保存した。

結果 人工種子は1週間後もカビが生えなかったことから、微酸性電解水で無菌化できることがわかった。今後、さらに発芽できるか継続して、観察する必要がある。

3.まとめ

微酸性電解水は、培養容器だけでなく、液体培地(人工胚乳)、サギソウの種子、人工種子の滅菌が可能であった。結果として、クリーンベンチを使用しなくても人工種子をつくることができた。今後は、野外実験で発芽率など調査実験を行いたい。

4.参考文献

1)新潟大微粒子研究室, “人工イクラの作り方(実験用簡易版)”, <http://capsule.eng.niigata-u.ac.jp/howto.html> (2020/09/19)