

龍野高校自然科学部では、サギソウ自生地の保全活動を行っている。その方法は、サギソウの生育を妨げているカモノハシなどの大型草本を駆除し、人工交配により結実率を上げたりしている。しかし、種子を散布しても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きないと発芽しない。そこで、ラン菌と共生しなくても発芽するサギソウの人工種子の開発に取り組んだ。また、普及を目指すためにクリーンベンチなど高価な設備を使用しない技術開発も目標とした。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活用した。

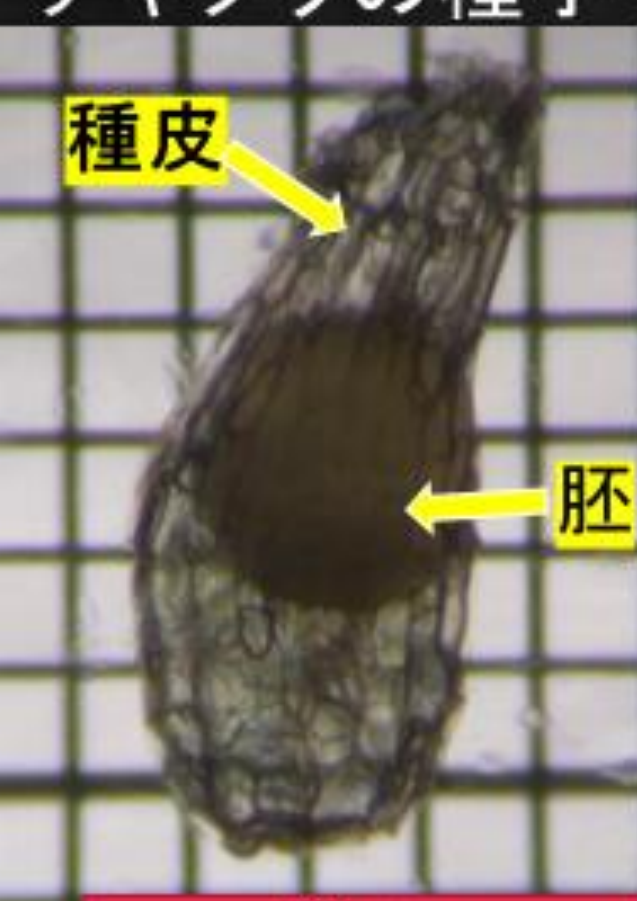
サギソウ ラン科
レッドデータカテゴリー
兵庫県 Bランク
環境省 準絶滅危惧種

絶滅の原因
鑑賞用盗掘
シカの食害
ため池の改修工事



サギソウの種子のつくり
ラン科植物の種子は、非常に小さく、胚乳をもたない。
ラン菌と共生し養分の供給がなければ発芽できない。

サギソウの種子



カキの種子



イネの種子(コメ)



研究課題 サギソウの人工種子の開発

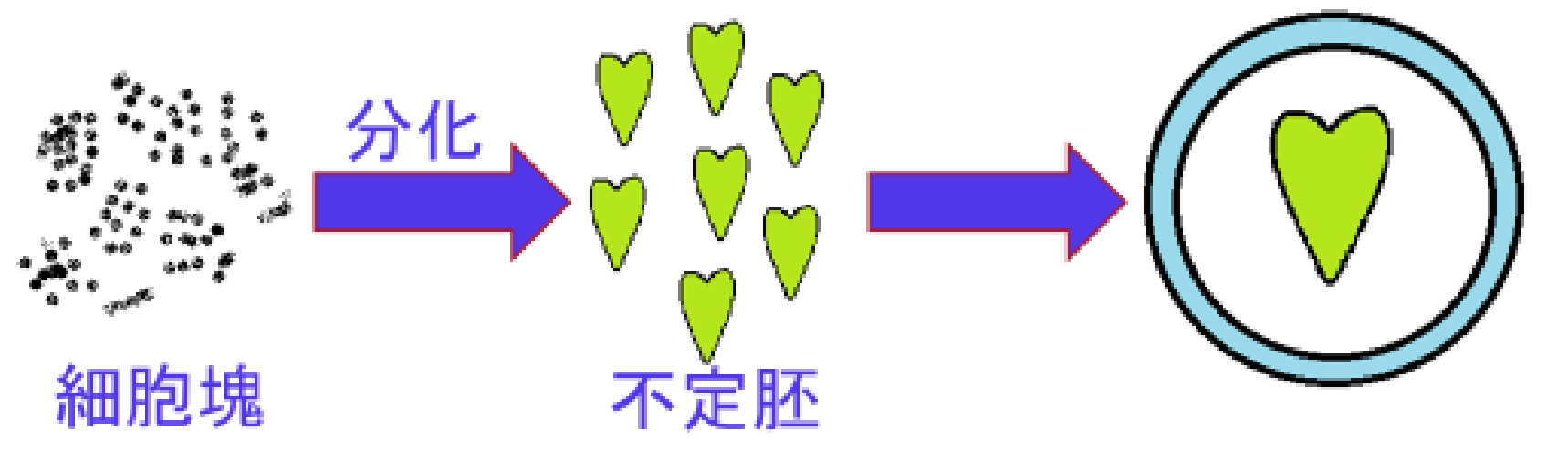


研究課題Ⅰ 人工胚乳の開発

研究課題Ⅱ 人工種子の製造方法の開発
a 種皮の開発 b 口径を調べる c 製造機の開発

研究課題Ⅲ 人工種子の保存方法の開発

人工種子とは



従来の方法は、**不定胚**をゲルで被う

新技術
育てた**プロトコーム**を、ゲルで被う
→ **遺伝子多様性を維持**できる

不定胚とは

組織培養でつくった細胞塊から、オーキシン・サイトカイニンなどの植物ホルモンにより誘導した胚。

同じ遺伝子をもつクローンのため、農園芸分野で優良品種の大量増殖に適しているが、遺伝子多様性はない。



引用 横浜市立大学 理学部 理学科 生命環境カリキュラム HP

プロトコームとは

ラン科植物の種子の初期発生で形成する、球状の細胞塊。

自然界では、ラン菌から養分の供給を受けて成長。



研究課題Ⅰ 人工胚乳の開発

素材の**入手が容易**で、かつ**安価**であるため、京都大学の狩野邦雄氏が考案した京都培地を参考に、人工胚乳をつくることにした。プロトコームまでは1~2ヶ月で成長すると思い、**低濃度の培地**にした。また、仮根が絡まないようにするために、**液体培地**とした。

京都培地(狩野培地)

微粉ハイポネックス 3g
ショ糖 35g
寒天 15g
水 1000mL

人工胚乳(試作)

微粉ハイポネックス 0g・1g・2g
ショ糖 0g・5g・10g・20g
寒天 0g
水 1000mL

人工胚乳のつくり方

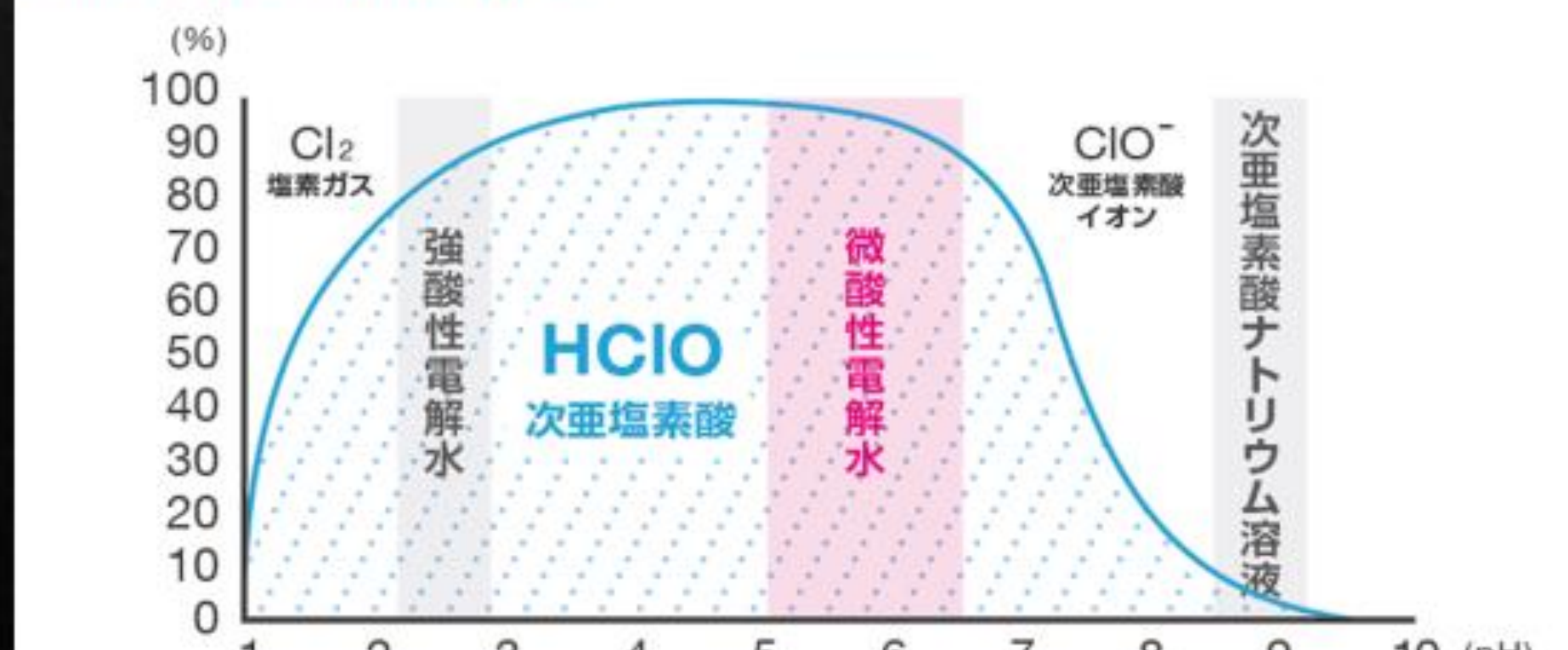
- ① **微酸性電解水**に、**微粉ハイポネックス**と**ショ糖**を溶かす。
- ② 培養容器の半分に人工胚乳を入れる。
- ③ 培養容器にサギソウの種子を入れて、30秒程度振り滅菌する。
- ④ インキュベーター内で管理する。
25℃ 12時間照明

新技術
微酸性電解水で、**液体培地・種子を同時に滅菌**する

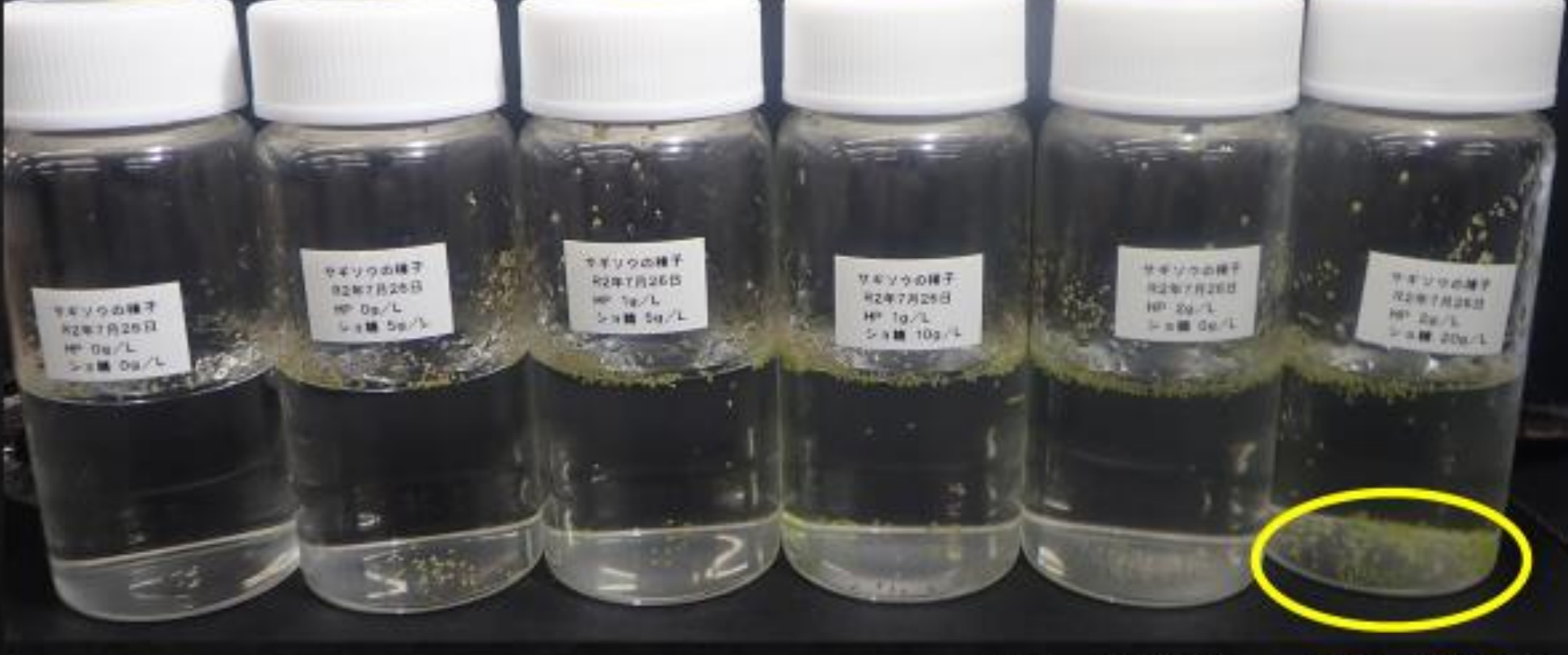
微酸性電解水とは

- ◇ 希塩酸を電気分解してつくる、「次亜塩素酸水」。
- ◇ 低濃度で強力な殺菌力がある。アルコールの代替品として今年注目をあつめた。

● 水中の有効塩素存在比率

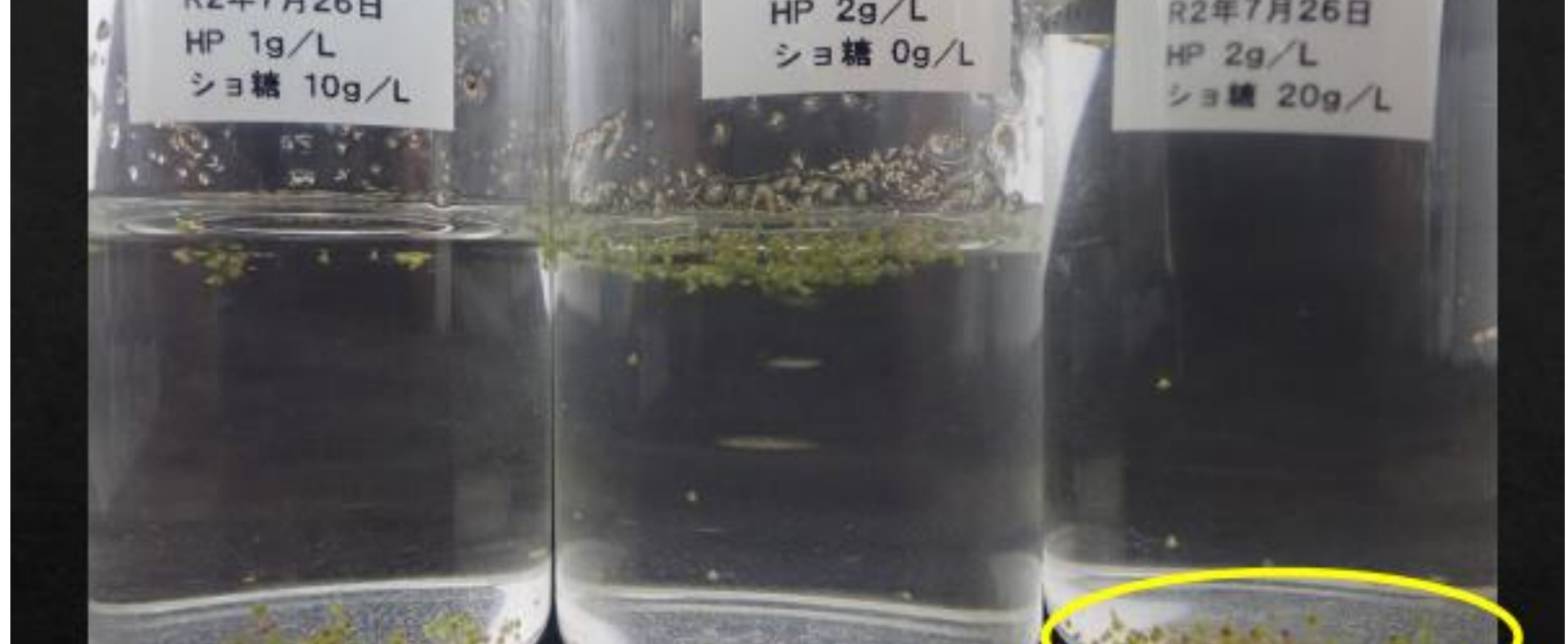


引用 微酸性電解水協議会HP



播種 7月26日 撮影 8月18日

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
培地 ショ糖(g/L)	0	5	5	10	0	20
調査日 8月18日	—	+	+	++	+	+++
調査日 8月25日	—	—	—	+++	++	—



播種 7月26日 撮影 8月25日

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
培地 ショ糖(g/L)	0	5	5	10	0	20
調査日 8月18日	—	+	+	++	+	+++
調査日 8月25日	—	—	—	+++	++	—

微酸性電解水と他の殺菌剤との比較

微酸性電解水は、多くの微生物に対して殺菌効果がある。
また、低濃度で強力な殺菌効果がある。

欠点

- ① 紫外線により分解されやすく長期保管ができない。
- ② アミノ酸に対して急速に分解されやすい。
- ③ 噴霧した場合、アルコールのように早く乾かない。

今回使用した微酸性電解水はホクエツ社の製造機ビアミで、龍野高校で希塩酸を電気分解して製造したものを使用した。

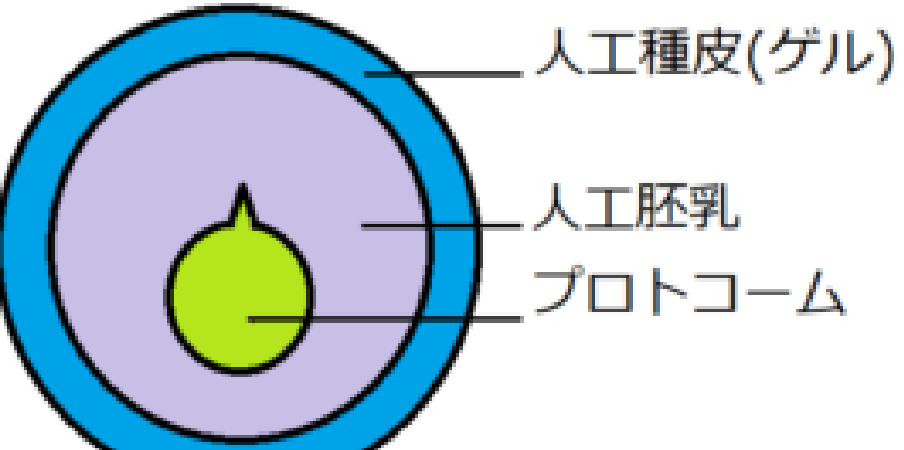


引用 jf-foods.jpより引用

結果と考察 微酸性電解水を活用すれば、オートクレーブを使わず短時間で人工胚乳(液体培地)と種子を同時に滅菌できた。培地濃度は、やや濃いめの方が成長速度は速いが、プロトコームの劣化も早かった。肥料微粉ハイポネックス1g/L・ショ糖10g/Lで培養するのがよいと考えた。播種後生育初期は栄養濃度を濃いめで育て、プロトコームに成長したら低濃度の培地に移植する方法も考えられる。

研究課題Ⅱ 人工種子の製造方法の開発

サギソウ人工種子のイメージ



人工種皮(ゲル)
人工胚乳
プロトコーム

種子の直径 5～8mm
胚乳の直径 4～6mm
プロトコーム 2～6mm

a 人工種皮の開発

ゲル化剤
アルギン酸ナトリウム
塩化カルシウム
何%水溶液が適切か

b 人工胚乳用のピペットの口径を調べる

人工胚乳の液滴は
4～6mmを目標とする。

c 人工種子の製造機を創る

実験室の道具や100円均一店などで入手できるもので考案する。

研究課題Ⅱ 人工種子の製造方法の開発

課題Ⅱ-a 人工種皮の開発

◇ 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。



ゲル玉(人エイクラ)



ボルトゲージ

課題Ⅱ-a ゲル化剤の濃度を決める									
水溶液の質量%濃度		ゲル玉の直径(mm)と分布					試料数	ゲル直径	
アルギン酸Na	CaCl2	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	(個)	最頻値(mm)	
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	4		25	5.5	
4%	1.0%		18	7			25	5.5	
4%	2.0%		16	9			25	5.5	

研究課題Ⅱ 人工種子の製造方法の開発

課題Ⅱ-b 人工胚乳用のピペットの口径を調べる

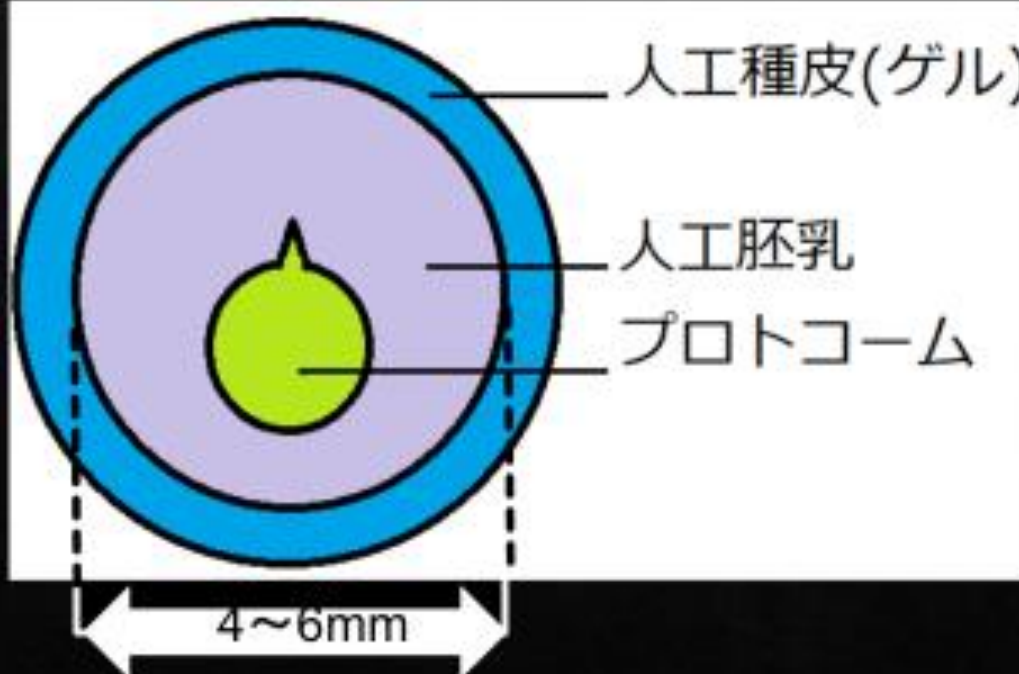
人工胚乳の液滴は4～6mmを目標とする

先端を切断した口径1～6mmの使い捨てピペットを用いて水を滴下した。電子天秤で水滴の質量を測定し、液滴の直径を計算した。

各ピペットで10回ずつ計測を行った。

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3$$

V: 液滴の体積
r: 液滴の半径
π: 円周率



人工種皮(ゲル)
人工胚乳
プロトコーム

4～6mm

課題Ⅱb 人工胚乳用のピペットの口径を決める結果

ピペットの材質		ピペットの口径(mm)	液滴(水)の直径(mm)
プラスチック	使い捨て	1	4.4
プラスチック	使い捨て	2	4.6
プラスチック	使い捨て	3	4.8
プラスチック	使い捨て	4	4.9
プラスチック	使い捨て	5	4.9
プラスチック	使い捨て	6	5.4
ガラス		1.5	3.3
プラスチック	ピペッター	0.8	4.2

試しに、ガラスピペットなども使用した。



結果と考察 ゲル化剤の濃度について、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。人工種子にはアルギン酸ナトリウム水溶液1～2%と塩化カルシウム水溶液1～2%が適切と判断した。

使い捨てピペットの口径について、口径1～6mmのとき、すべてのピペットで水1滴あたりの直径が4～6mm程度となった。ただし、プロトコームの大きさを考えると、口径1～2mmでは、プロトコームの吸引・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ームの成長サイズに合わせ使用することにした。

研究課題Ⅱ 人工種子の製造方法の開発

課題Ⅱ-c 人工種子製造機を創る

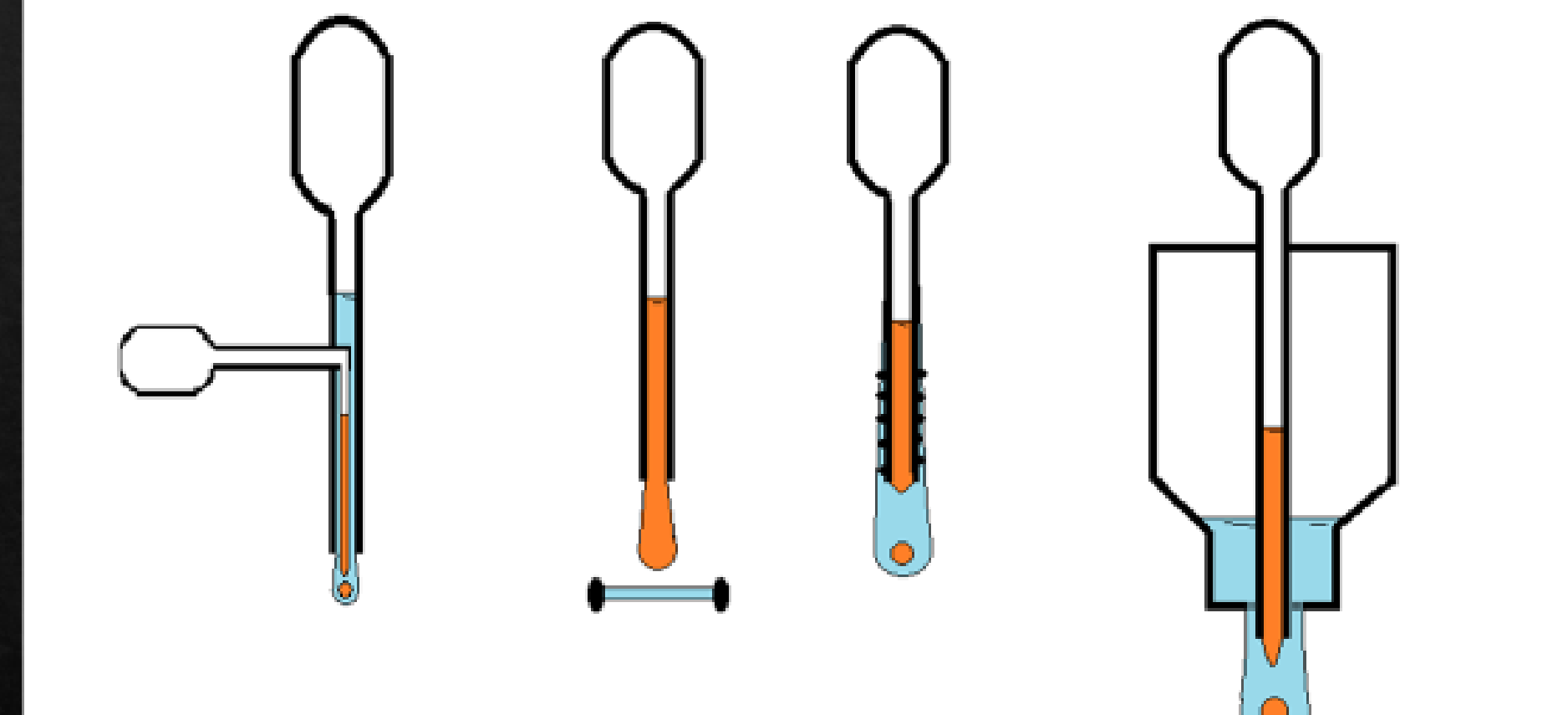
ゲルの中に、人工胚乳とプロトコームを封入するための製造機を考案した。人エイクラの製造機を参考に実験室の道具や100円均一店などで入手できるもので作った。

はじめ、人エイクラの製造機をもとに、2重ノズル式ピペットをつくった。さらに、製造機の加工の容易な、製造機の考案に取り組んだ。



2重ノズル 分岐型
滴下型
タンク貫通型

人工種子製造機の構造



2重ノズル 分岐型 膜式 滴下型 コイル式 タンク貫通型

■ アルギン酸ナトリウム水溶液 ■ 色水(人工胚乳)

アルギン酸がゲル化するしくみ

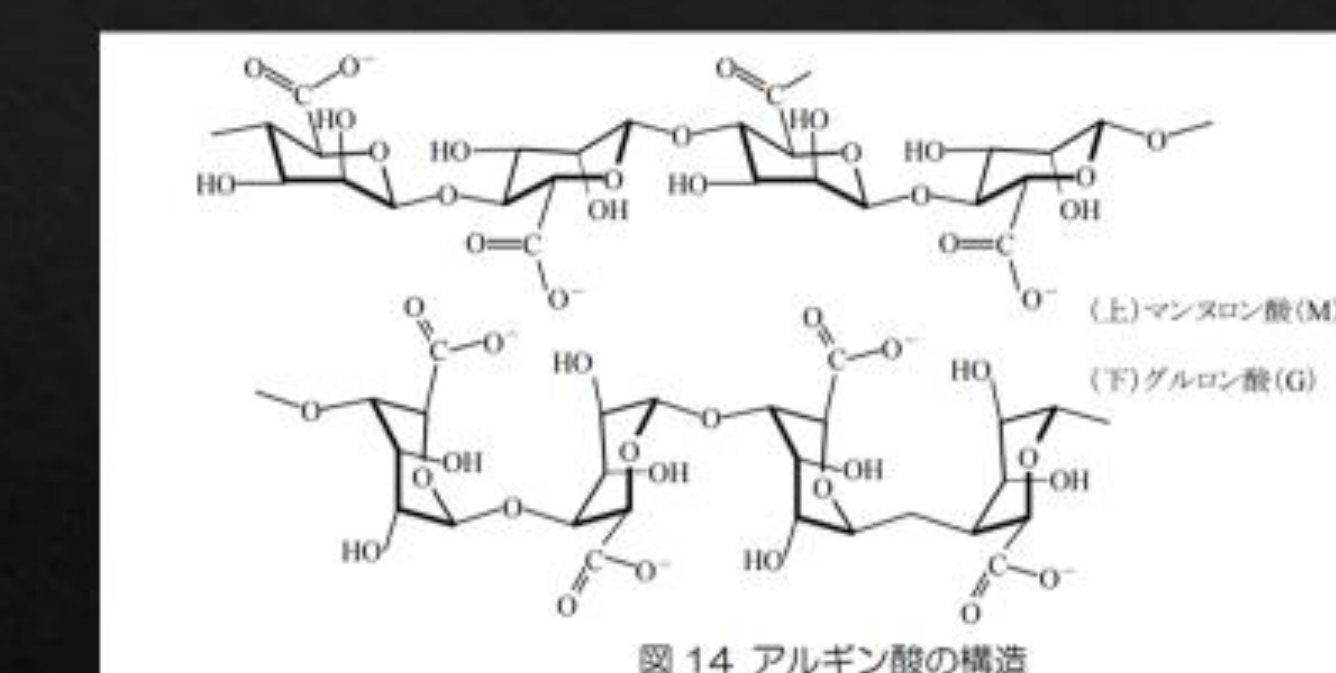


図 14 アルギン酸の構造

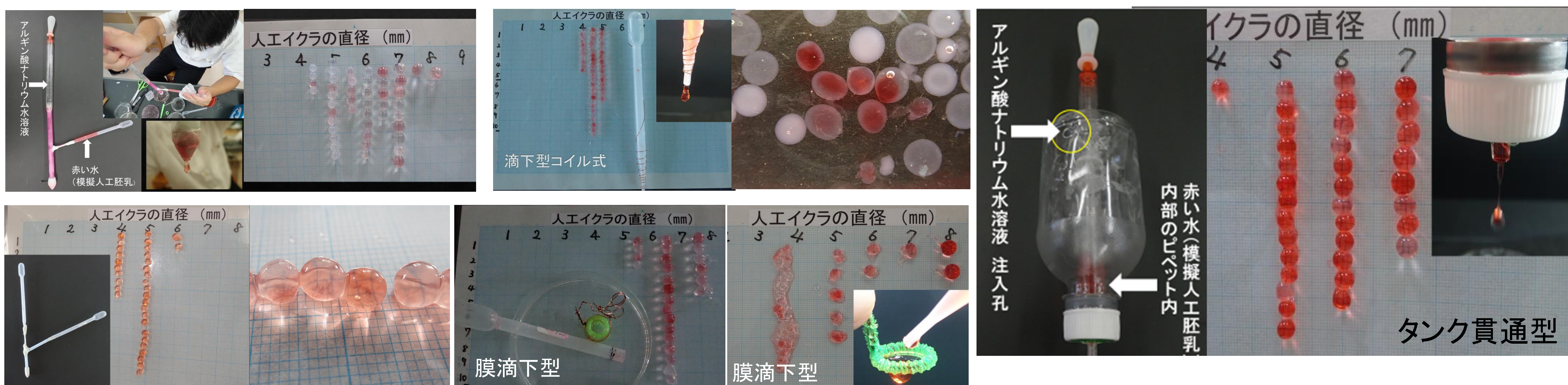
Ca2+を加えると



図 15 アルギン酸のゲル化(架橋)(共同的結合)

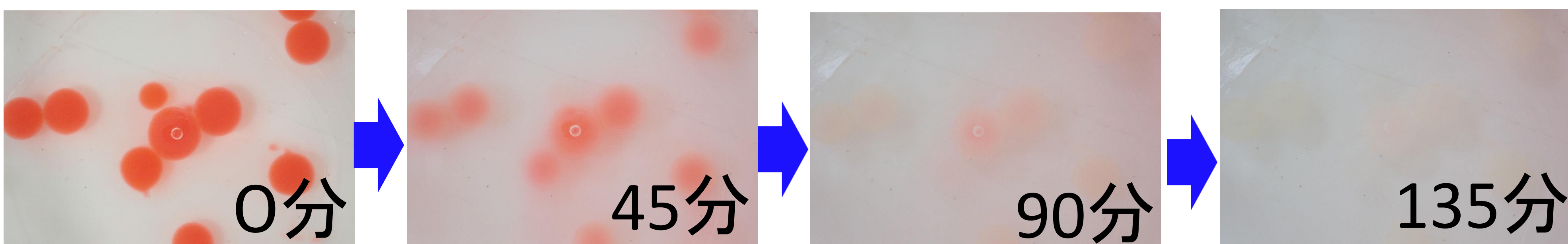
カルシウムイオンがアルギン酸に含まれるグルロン酸どうしを結合させることで、水に溶けないゲルになります。

引用
2009 夢化学 青い人エイクラを作ってみよう
新潟大学 工学部化学システム工学科

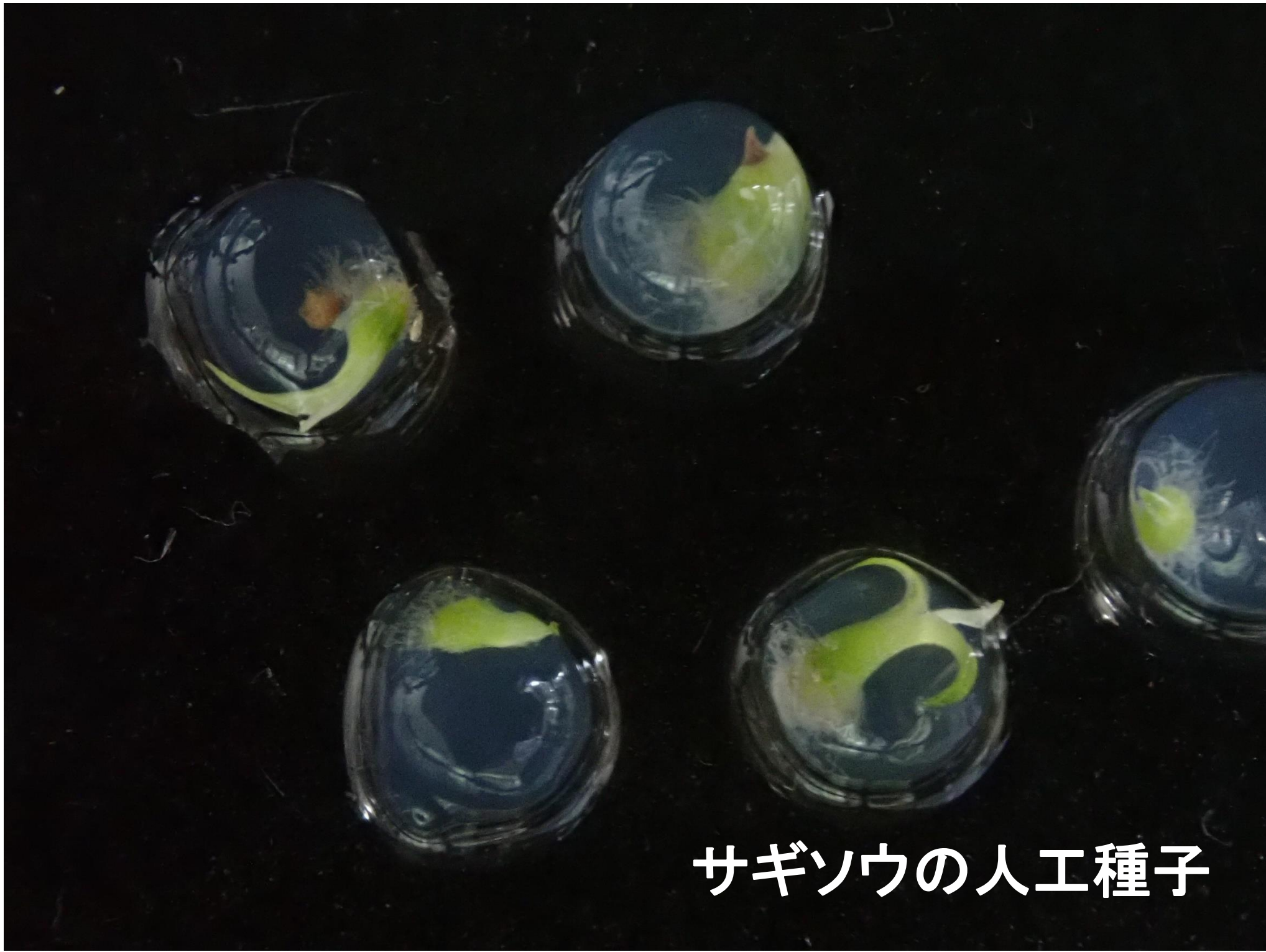


結果と考察 インターネットなどで紹介されている2重ノズル式製造機は精密な加工が必要で、また使用後の洗浄も構造上難しい。作ったゲル玉の中心に色水が入りにくかった。製作容易な滴下型は、アルギン酸ナトリウムの滴下量の調節が困難で連続滴下もできない。タンク貫通式は連続的にアルギン酸ナトリウムを滴下できるので便利である。また、構造が簡単でタンクとピペットを分離できるので洗浄も容易である。

人工種子の保存技術の開発の前に

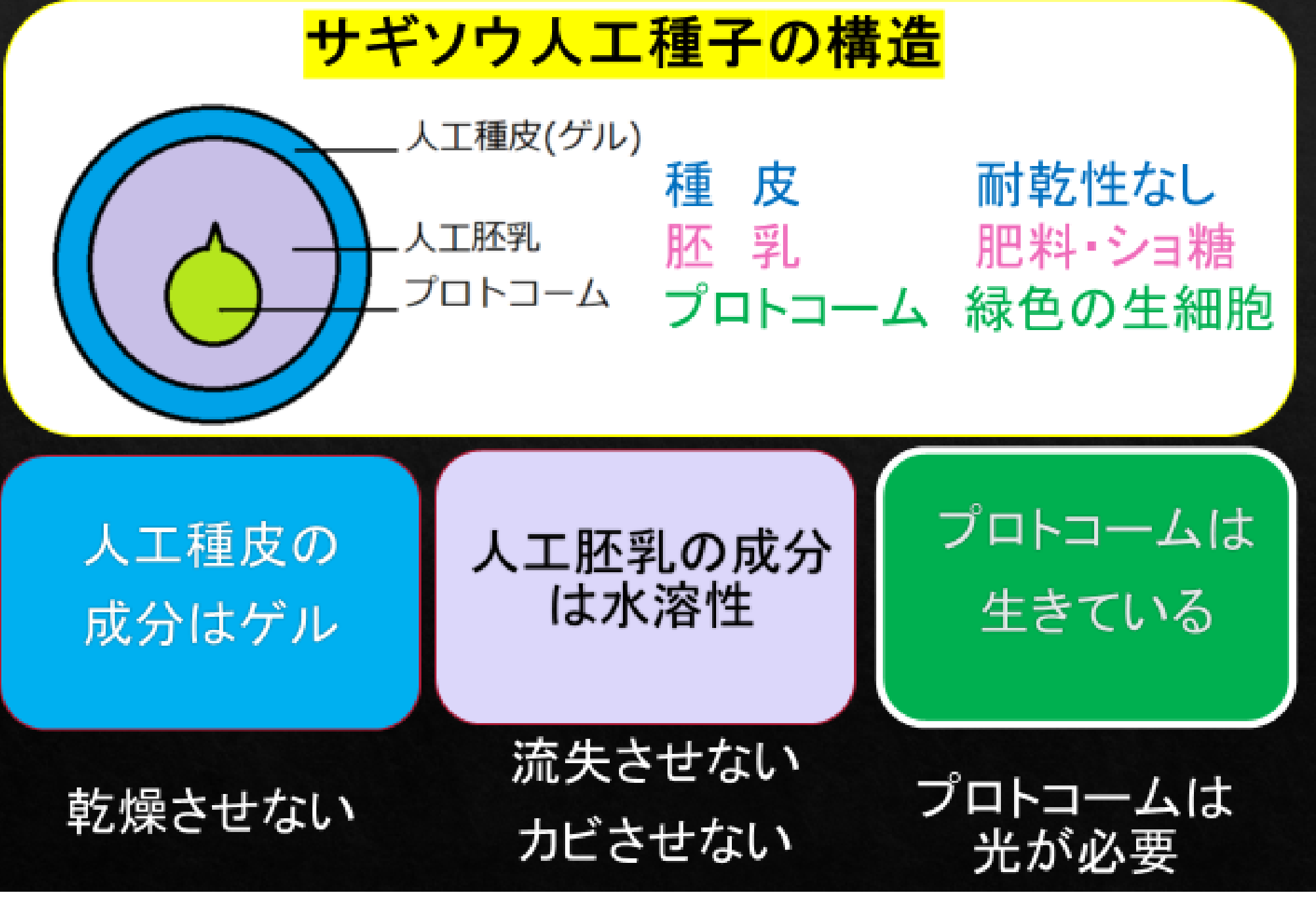


作成した中心の赤いゲル玉は乾燥防止のため水中で保管したところ、時間とともに色が拡散した。このことから、人工種子の養分もまた拡散により失われることが予想された。



サギソウの人工種子

研究課題Ⅲ 人工種子の保存方法の開発



研究課題Ⅲ 人工種子の保存方法の開発

乾燥させない 水中・または湿度100%の密封できる容器で保存する

**流失させない
カビさせない** 周囲は空気・または人工胚乳で栄養の流出を防ぐ。微酸性電解水で滅菌する。

プロトコームは光が必要 ガラスやペットボトルなど光を透過する透明容器を使用する。長期保存は、人工胚乳必要。

課題Ⅲ 透明ガラスビンで保管してみた
微酸性電解水で内部を滅菌
25℃ 12時間照明で管理

微酸性電解水 中で沈めて保管
人工胚乳に沈めて保管
微酸性電解水 を少し入れ保管
京都培地(ゲル) 上で保管
キッチンペーパー に人工胚乳を染みこませて保管

養分流出し 酸素吸収困難
養分多すぎ 酸素吸収困難
人工種皮が 空気と培地に接する。
人工種皮が、人工胚乳(液体)と紙に接する。

結果と考察

微酸性電解水の中に沈めて保管
養分はない

結果 不調。褐色に変化するものが多い。

人工胚乳中に沈めて保管
養分はある

結果 良好。緑色で、子葉が少し伸びた。

微酸性電解水を少し入れて保管 人工種皮が空気と接する。

結果 少し褐色に変化するものがある。

京都培地上で保管 人工種皮が、空気と培地に接する。

結果 緑色で良好。

キッチンペーパーに人工胚乳を染み込ませて保管。人工種皮が、人工胚乳(液体)と紙に接する。

結果 カビにより汚染。

キッチンペーパーに微酸性電解水を染み込ませて保管 養分はない

結果 カビにより汚染はない。

微酸性電解水をもちいて、人工種子の滅菌が可能であることがわかった。9月25日に播種し10月4日に撮影した。短期間であったが養分がなければプロトコームは白化することがわかった。キッチンペーパーを微酸性電解水で、滅菌するのは難しいかもしれない。

まとめ

微酸性電解水を活用することで、オートクレーブやクリーンベンチを使用しなくてもサギソウの人工種子の製造は可能である。

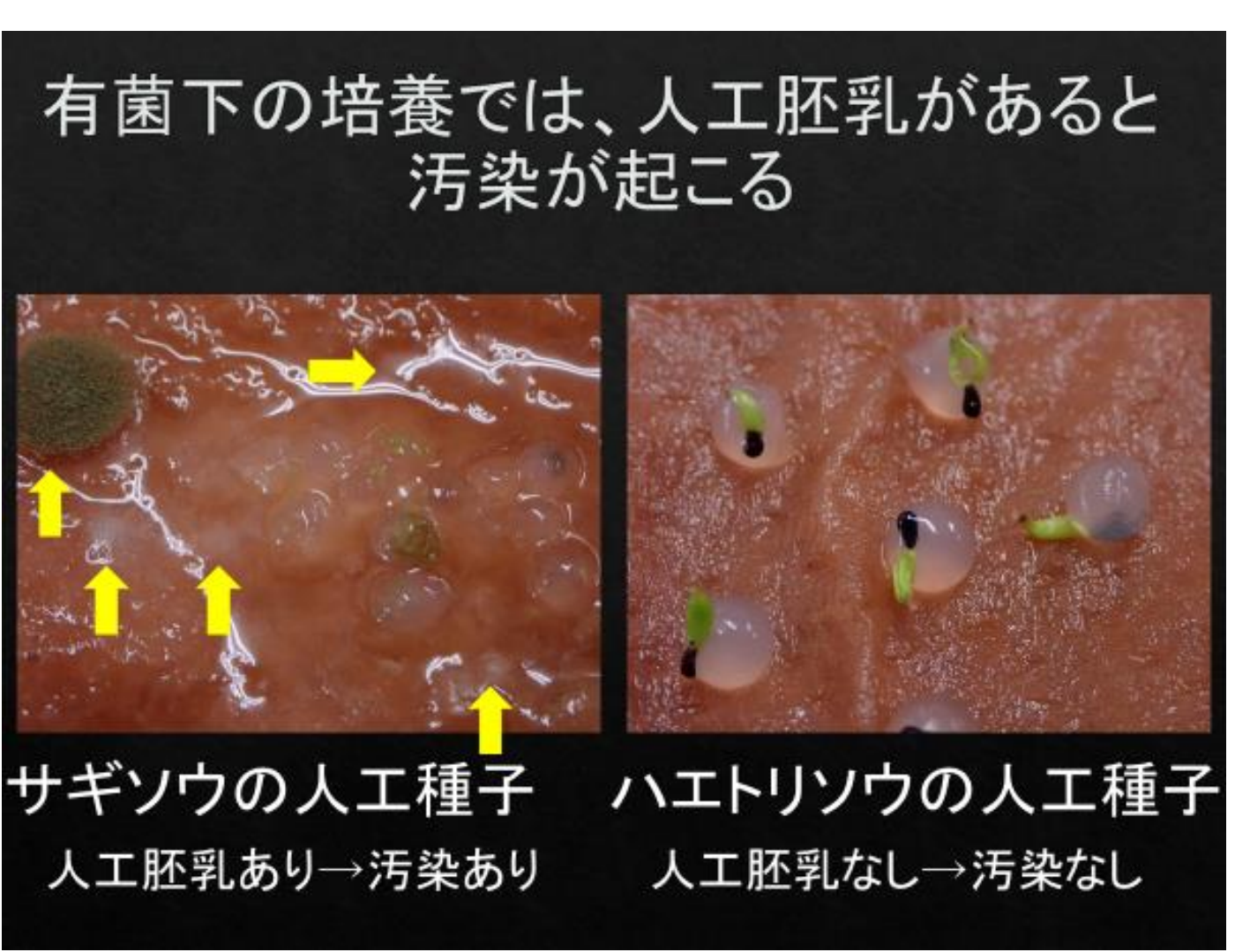
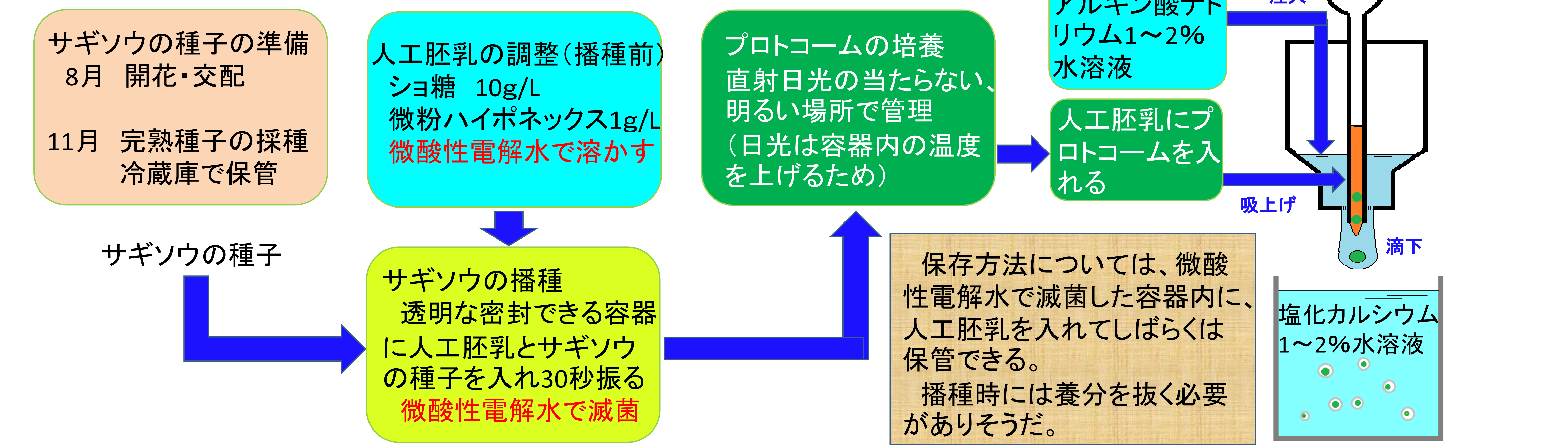
種子の保管方法については、実験してからまだ期間や回数が不十分であるが、滅菌した容器内で、人工胚乳を入れての培養は可能だと思われる。

有菌下の播種については、人工胚乳があると、カビが生えてしまう。野外で播種する場合、播種前日から、人工種子を水に浸して、養分を抜く必要があると考えた。

サギソウ人工種子の発芽

環境条件 無菌 25℃ 12照明

サギソウ人工種子の製造過程



今後の課題

有菌の野外で人工種子を播種する場合は、事前に人工胚乳の養分を水で拡散し除去するとよいと考える。実験で確認したい。

ゲル化剤の塩化カルシウムのかわりに植物活性剤リキダスの活用を考えたい。

1) 織田博 他, “人工種子技術の開発の現状と問題点”, 化学と生物 Vol. 30, No. 6, 1992

2) 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)

3) 大澤勝次, 植物バイテクの基礎知識, 農文協 (1994)

4) 太田和子” サギソウの無菌は種による増殖Ⅲ 順化について”, 岐阜女子大学紀要, 第44号 (2015)