

8 ハイポネックス培地で行うニンジンの組織培養

目的

ニンジン形成層の組織を無菌的に寒天培地で培養し、カルスの形成やカルスから芽や根の分化を観察して、オーキシンやサイトカイニンなど植物ホルモンの組織への作用を理解する。

準備

材料 ニンジンの根

器具 三角フラスコ、ビーカー、駒込ピペット、ピンセット、コルクボーラー、アルミホイル、メス、三脚、金網、ガスバーナー、圧力鍋(滅菌用)、無菌箱

薬品 70%エタノール、NAA(ナフタレン酢酸)100倍液(10mg/100mL)、寒天(市販)、スクロース、5%サラシ粉溶液、ハイポネックス65-6-19^{*}、滅菌蒸留水

※ハイポネックス65-6-19の成分量(%)

窒素全量 10.0 , リン酸 8.0 , カリウム 8.0 , マグネシウム 1.0
マンガン 0.10 , ホウ素 0.05

方法

[組織培養培地の作製 1班(4人)]

- 200mLビーカーに、NAA100倍液1mL、ハイポネックス0.3g、スクロース3.0g、寒天1.3gを加え、蒸留水で全体の体積を100mLにする。
- 1の溶液をガスバーナーにかけ、熱しながら溶かす。十分に溶解したら、各フラスコに25mLずつ分注し、二重のアルミホイルをかける。
※ハイポネックスには水に溶けない物質が含まれているため、完全には溶解しない。
- 圧力鍋で滅菌する。

[無菌ニンジン形成層片の作製と植え付け]



図1



図2



図3



図4



図5

- 手を石鹼で洗った後、さらに70%エタノール溶液で実験機の上と手を消毒する。
- ニンジン形成層を5%サラシ粉溶液に5分程漬けて洗う(図1)。そのニンジン形成層を1cm程の輪切りにして、コルクボーラーで形成層を含むように切り抜く(図2)。その片を5%サラシ粉溶液に漬ける(図3)、ただちに滅菌蒸留水の中に入れ、サラシ粉溶液を洗い流したものを実験に使用する(図4)。
- 無菌箱に組織培養培地、アルコールランプ、ピンセット等を入れておき、紫外線殺菌灯で無菌状態にしておく。
- 紫外線殺菌灯が消えているのを確認してから、無菌箱に滅菌蒸留水に入った無菌ニンジン片を入れる。
- ピンセットを70%エタノール溶液に漬けて、ただちにアルコールランプの炎でエタノールを燃焼させ殺菌する。
- そのピンセットを使って無菌ニンジン片をすばやく三角フラスコ内の組織培養培地へ植え付ける(図5)。

10. 元のようにアルミホイルできちんと入り口をおさえ、三角フラスコに植え付けた月日をマジックで書き、25℃で培養し、カルスの形成を観察する。

※8. 9. は無菌箱で行う。

[カルスの移植]

11. 40日ほどでカルスがかかなり形成されてくる。できたカルスをホルモンNAAの入っていない組織培養培地に移植し、芽や根の分化を観察する。

結果と考察

- 無菌ニンジン片植え付け後1ヶ月たった三角フラスコ内のニンジン片をスケッチし、その様子を記せ。
- カルスはニンジン片のどの組織の部分より形成されるか。
- もし培地に雑菌の混入があった場合、どの操作で汚染したと考えられるか。
- カルスを移植した後、40日ほどたった三角フラスコ内の様子を記せ。

実験の反省・感想

クラス _____ 番号 _____ 氏名 _____

◆◆◆ 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 ◆◆◆

組織培養の実験には、通常、培地滅菌にはオートクレーブを、ニンジン片の植え付けにはクリーンベンチを使用します。これらの機材がないため、オートクレーブの代わりに圧力鍋を、クリーンベンチの代わりに滅菌箱を使用しました。

培地には、通常、MS培地(ムラシゲ・スクーグ培地)を使用します。非常に高価(培地1L用で約1万円でした)のため、ハイポネックス65-6-19で代用しました。寒天も試薬用ではなく市販のものを使用しました。

この実験は、組織培養培地の作製に1時間、無菌ニンジンの形成層片の作製と植え付けに1時間、カルスの植え付けに1時間と作業だけで計3時間かかります。教師側で組織培養培地を用意し、無菌ニンジンの形成層片の作製と植え付けだけを生徒にやらせることも可能ですが、達成感という面においては、組織培養培地の作製からやらせた方がよいと思います。

1. 機材の説明



図1 圧力鍋



図2 圧力鍋内の様子



図3 無菌箱



図4 ピンセット

(1) 圧力鍋(図1)

市販の調理用圧力鍋です。まず鍋に適当な皿を入れ、その上に組織培養培地が入った三角フラスコをのせて、三角フラスコが浸らない程度に水を入れてしっかり蓋をしめます(図2)。ガスコンロで水蒸気がでなくなるまで加熱します。滅菌蒸留水を作るときも同様です。

(2) 無菌箱(図3)

この無菌箱は約30年前に購入したもので紫外線殺菌灯が付いています。無菌箱の前方にある2つの大きい丸い穴は専用のゴム手袋をつける場所です。手袋を使わないで、この穴から直接手を入れて操作することにしました。殺菌するときは、この穴をビニールで閉じ、かつ紫外線が漏れないように蓋をしてから紫外線殺菌灯を点灯します。無菌箱は構造が簡単なので、十分に自作可能です。紫外線殺菌灯も安価で入手できます。インターネットに無菌箱の作り方を説明したホームページも多数見られます。

(3) ピンセット(図4)

培養用ピンセットで、三角フラスコ中のカルスを他の培地に移植するのに便利です。価格は4600円程で高価ですが、無菌箱1つに1本あれば事足ります。

2. 試薬の説明

(1) NAA(ナフタレン酢酸)100倍液(10mg/100mL)

植物ホルモンであるオーキシンの仲間です。細胞分裂を促進します。作り方はNAA0.1gを少量のエタノールに溶解させ、溶解したら蒸留水を加え1Lにします。

(2) ハイポネックス65-6-19

粉末で水に溶けやすく、非常に安価です。カルス形成もMS培地を使用したときとまったく同じでした。

(3) 寒天(市販)

スーパー等で販売している寒天です。試薬用の寒天が高価なため使用しました。寒天は古くなると変質してやや黄色っぽくなるようです。このような寒天は、水に溶かしたときは固まりますが、オートクレーブや圧力鍋で圧力をかけて熱するとゲル状になって固まりません。古い寒天は使用しない方が良いでしょう。

3. 方法

本実験は雑菌との戦いです。1個でも菌の胞子が入ってしまえば、実験は失敗です。消毒をまめに行う必要があります。シャーレにつくったハイポネックス培地に生徒の手を触れさせ、培養した結果を見れば、我々がいかにか多くの雑菌に囲まれているかを実感させることができると思います。



図5 ニンジンの根断面

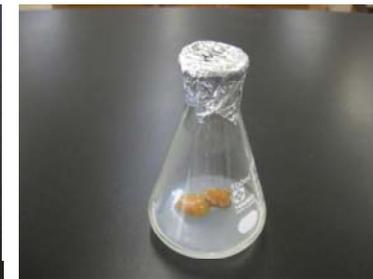


図6 培養中のカルス



図7 カルス

(1) 無菌ニンジンの形成層片の作製

ニンジンの根の形成層(図5)を含むようにコルクボーラーで切り抜きます。双子葉植物の茎、根の維管束の配列の復習を行うよい機会です。

(2) 無菌ニンジン片の培養

25℃で培養と実験書には書いておきましたが、温度にはそれほどこだわる必要はありません。強い光が当たらない暖かい場所で培養するのがよいでしょう。10日ほどでニンジン片がふくらみ、やがてひび割れ形成層から橙色のカルスが形成されるのがわかります。40日ほどで移植可能となります。(図6、図7)。

強光下で培養すると緑色のカルスが形成され、NAAの入っていない組織培養培地に移植しても芽や根が分化しませんでした。カルス細胞で葉緑体が多数形成されてしまったのが分化しない原因かもしれません。

(3) カルスの植え付け

雑菌が最も入りやすい作業です。光が良く当たる暖かい場所で培養します。25℃で培養した場合、1ヶ月後には芽と根が分化しクローンニンジン(図8)が誕生します。



図8 クローンニンジン