

事例Ⅲ〔植物〕ポーチュラカの組織培養

～ カルスの形成を実感できる教材の工夫 ～

指導の手引き

1 ねらい

ポーチュラカを材料として、短期間の培養で、雑菌感染の影響を受ける前に植物体の一部分からカルスを形成する様子を観察する。

2 指導のポイント

植物の組織培養の技術は、科学者が試行錯誤を生かして洗練させたものである。テキストに書かれた準備・手順など、マニュアルを覚えさせることよりも、それぞれの器具の選定や準備の意図、操作の意味などを生徒に考えさせることが大切である。このようなことから、この事例では観察・実験の準備の段階に、「ワーク」を設定し、考えさせるように工夫した。

また、植物の組織培養実験においては、カルス形成に長い期間を要するということが、教材化する上で大きな課題となる。たとえば、キク、ニンジンなどでは1か月、ムラサキツユクサは3～4週間かかる。比較的早いシロイヌナズナでも2週間を要するといわれている。生徒が実験に使用したときに、ニンジンのように時間がかかる材料では、せっかくカルスができて、生徒に与える印象は薄れてしまいかねない。さらに、生徒が無菌操作に十分慣れていないと、カビや細菌などの混入する率が高くなってしまう。ポーチュラカ（ハナスベリヒユ）の茎、葉は、培養開始後、およそ4日から1週間後にカルスの形成がはっきりと肉眼で観察できることが、文献や予備実験によっても確認されている。このため、実験の際、多少の雑菌が混入した場合でも汚染が進まないうちにカルスの観察が可能である。

3 材料の入手のポイント

開花期は6～11月と長く、夏の暑さにも強い丈夫で育てやすい植物である。ホームセンターなどでも入手が容易である。学校では、プランターなどで栽培し、初夏から晩秋まで実験に用いることができる。

4 参考文献

- (1) 森屋一：ハナスベリヒユの組織培養．生物教育学雑誌．3（1）．11-17(1992)
- (2) 楠元守・山川 宏：ポピュラーバイオテクノロジー(1)．
学校での組織培養の設備・用具．遺伝．42(11)．62-66(1988)
- (3) 楠元守・山川 宏：ポピュラーバイオテクノロジー(2)．
簡単な組織培養法．遺伝．42(12)．47-52(1988)
- (4) 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)．
初代培養にあたっての無菌化処理．遺伝．43(1)．72-76(1989)
- (5) 楠元守・森屋 一・難波純治・高橋節郎：ポピュラーバイオテクノロジー(4)．
材料として適する植物体の検討．遺伝．43(2)．40．45(1989)
- (6) 楠元守・後 正博・朝倉正海：ポピュラーバイオテクノロジー(5)．
コマツナの組織培養と分化．遺伝．43(3)．50-54(1989)

ワークシート 1〔生徒配付用〕

テーマ ポーチュラカの組織を培養しよう

1 目的

- ・ ポーチュラカの茎、葉の無菌培養を行い、脱分化した細胞塊のカルスを形成させる。
- ・ 植物の成長・分化について考える。

2 組織培養の準備について

(1) 事前学習で理解を深める。

■「ポーチュラカの組織培養」について

- ・ ポーチュラカの茎の一部を切り取り、養分入りの寒天培地上に置くと、茎の組織からカルスと呼ばれる細胞塊が形成される。
- ・ 培地は、市販のムラシゲ・スクーグ培地（MS 培地）とよばれるものを用いる。成分は、各種塩類、ビタミン類、アミノ酸類などが中心である。
- ・ 寒天培地をつくるとき、ムラシゲ・スクーグ培地のほかショ糖を加える。
- ・ カルスを形成させるときは、植物ホルモンの作用をもつナフタレン酢酸（NAA）とベンジルアデニン（BA）を寒天培地に加える。
- ・ カルスは細胞分裂をくり返し、さらに大きくなる。新しい培地に移しかえていくと、さらに細胞の増殖を続けさせることができる。
- ・ ある程度大きくなったカルスを、植物ホルモンを含まない培地に移しかえて、容器の外から光を当てると器官の分化を起こすことができる。
- ・ このような実験は、カルス以外に他の生物の細胞が増えないように無菌状態で行わなければならない。

【ワーク 1】 次のそれぞれの容器が、寒天培地での培養に適しているかどうか考えよう。

（※ 器具を手にしながらかえる。）

- | | |
|------------------|---|
| ① ペトリ皿 | |
| [|] |
| ② 三角フラスコ | |
| [|] |
| ③ 直径 8 mm の試験管 | |
| [|] |
| ④ 直径 15 mm の短試験管 | |
| [|] |
| ⑤ 市販のジャムのびん | |
| [|] |

【ワーク 2】 ムラシゲ・スクーグ培地には、どのような塩類が多く含まれているか、予想しよう。

（考えるヒント：肥料の成分は、肥料の三要素と一般に呼ばれている。）

【ワーク3】寒天培地にショ糖を加える理由として、主にどのようなことが考えられるか。

(2) 材料・器具・試薬など

- ・材料 ポーチュラカの茎
- ・器具 無菌箱（水槽なども利用できる）

ガラス器具
(※ ワーク後記入)

- ピンセット、メス（カミソリ）、
- オートクレーブ（あるいは家庭用圧力鍋）、pHメーター、
- ろ紙、アルミホイル、はさみ、ロート、ガラス棒、噴霧器、
- ・試薬 粉末のムラシゲ・スクーグ培地(MS培地)、ショ糖、ロウ、粉末寒天、
- ピューラックス(あるいはキッチンハイター)、70%エタノール、
- ナフタレン酢酸(NAA)、ベンジルアデニン(BA)、
- 0.1mol/l水酸化ナトリウム水溶液、0.1mol/l塩酸

(3) 培地の作り方

- ・市販のMS培地の作り方は、試薬の説明書にあるので省略する。
- ・植物ホルモンは、水に溶けにくいので薄い塩基や酸に溶かす。

- ① NAAは、100 mg を100mlの0.1mol/l水酸化ナトリウム溶液に溶かす。
 - ② BAは、100 mgを、100mlの0.1mol/l塩酸に溶かす。

これらはふたをして冷蔵庫に保存しておき、必要に応じて希釈して使用する。
(希釈例) 1ℓの培地に①のNAA10ml、②のBA1mlを加える。

(4) オートクレーブ（圧力釜）による高圧滅菌〔120℃ 2気圧、15分程度〕

- ・高温加圧可能な液体類は、ガラス容器に入れ、アルミホイルを二重にしてふたをする。
(寒天やショ糖など加えた培地の液、洗浄用水)
- ・ガラス器具、金属類は、キムワイプなどで包んでからアルミホイルをかけて包む。

(5) 無菌操作のための準備

無菌箱の内部に70%エタノールを噴霧器で噴霧したり、70%エタノールに浸したガーゼでよく拭いたりして殺菌する。その後で、オートクレーブから出した(4)の滅菌済み器具を無菌箱に入れる。

月 日		学年 組 氏名
感想		

ワークシート 2〔生徒配付用〕

3 無菌操作による組織の切り出しと培地への植付け

(1) 無菌箱に入れる前の操作

- ① 鉢などで育てたポーチュラカの枝の中から、虫などが付いていない茎を選ぶ。
- ② 茎をはさみで切断し、切り口を小さなビーカー中であらかじめ熱融解したロウにつけて封じる。
→〔ワーク 4〕この操作はどのような目的があるか。

- ③ 3.7%エタノールに約30秒間浸してから、20%ピューラックスを入れたビンの中に移し、時々振りながら約15分間浸ける。

(2) 無菌箱に入れてからの操作

- ① ビンごと無菌箱中に移し、滅菌水の入れてあるビーカーの中に植物材料をピンセットで移して、すすぐ。
 - ② さらに2回、別の滅菌水中で植物材料をすすぐ。
 - ③ 底面にろ紙を敷いたペトリ皿中に茎を置き、ピンセットとメス（カミソリ）で切断する。
茎は5～10mmの長さに切る。（葉は1枚を3～6の切片に分ける。）
 - ④ 切片をピンセットでつまみ、培地の上に置く。この時、切片は培地中に埋め込むのではなく、寒天培地上に置くだけでよい。
 - ⑤ 培養容器に滅菌済みの二重にしたアルミホイルで栓をする。
- (3) 培養容器は、20～30℃の直射日光の当たらない場所に置く。

4 実験結果

翌日から観察を続け、何日目でカルスが観察されたか記録する。

容器No.	4日	7日後	14日後	21日後	28日後
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

記録の仕方
○カルス形成
×カビなど雑菌発生

5 考察

(1) 観察されたカルスの特徴を説明しよう。

(2) 実験操作で、カビや雑菌が発生を防ぐ工夫はどんなところにあるか指摘しよう。

月 日		学年 組 氏名
感想		

ポーチュラカの組織培養について

茎や葉を培地上にのせておくと切り口にカルスが形成されてくる。しかも培養を開始して4日後にはカルスが肉眼で見られるようになり、日を追って大きくなっていく。茎は切り口の両端が、鉄垂鈴（てつあれい）状に膨らんでくる。このような、短期間でのカルス形成が、本教材の魅力である。

次の表は、本事例作成に先立って行った予備実験の結果である。ロウにより、切り口を覆う方法を使わなかったため、雑菌感染が非常に多かった。しかし、すべての班で、4日目にはカルス形成を確認できることが確かめられた。

実験結果の例

容器No.	4日	7日後	14日後	21日後	28日後
1	○	×			
2	○	×			
3	○	×			
4	○	×			
5	○	×			
6	○	×			
7	○	×			
8	○	○	×		
9	○	○	×		
10	○	○	×		
11	○	○	○	×	
12	○	○	○	○	×
13	○	○	○	○	○

「指導のポイント」で述べたこと以外に、ポーチュラカが組織培養の教材として優れている点を次に挙げる。

(1) 滅菌が容易であること。

今回の方法でほぼ完全に雑菌の混入を防ぐことができる。

(2) 茎や葉がメスで切断しやすいこと。

キクなどの茎は固くて切りにくいが、ポーチュラカの茎は、メスを使わなくても、カミソリなどでもうまく切断できる。葉も肉厚で切りやすい。

(3) 一度に多量の植物体を用意できること。

旺盛な生育をするので、多人数の生徒実験にも対応できる。

(4) ガラス容器内でも増殖させやすいこと。

植物ホルモンを含まない培地に節を持つ茎を植えると、ガラス容器内でも旺盛に成長する。中で開花させることも可能である、蛍光灯を取り付けただけの簡易温室内で、大きめの容器を数個使って培養しておけば、冬の時期にも生徒実験の材料として用いることができる。

(5) カルス形成、不定根形成に与える植物ホルモンの影響が明瞭であること。

- ・カルス形成は、NAA、BAがともに高濃度のときよく起こる。
- ・不定根形成は、NAA濃度が高く、BA濃度の低いときよく見られる。