

高等植物種子の無菌培養

田島良男, 首藤三吾
黒木晴輝, 田畑旬子

Sterile Culture of Seeds in higher Plants

Yoshio TASHIMA, Sango SHUTO, Seiki KUROKI & Junko TABATA

はじめに

G. Haberlandt によりはじめられ, P. R. White, R. Gautheret, F. C. Steward 等により展開された全植物又は植物の器管, 組織, 単一細胞等の無菌的培養法は, その技術的進歩に伴い, 器管形成, 組織分化, その他の生理現象の研究に重要な役割をはたしつつある。われわれは各種高等植物種子の無菌的培養を試みて来たが, ここにその手法経験等を報告することは, 今後の林木生理等の研究に何らかの寄与をなすものと考え, 浅薄な経験にもかかわらず筆を取った次第である。

I. 種子無菌培養の目的

大別して2つに分けられる。

イ) 無菌種子そのものの発芽, その後の生長生育成熟等の成形分化の過程を全植物を対象として試験管内(限定環境内)にて温度, 光線, 培地条件等の各種環境と対比させつつ研究するを目的とし, われわれの無菌種子培養の主要目的もここに存する。

ロ) 無菌発芽種子, 植物体等の全植物体を目的とせず, 無菌植物体の1部(器官, 組織, 細胞)を分離, そのものを無菌的に培養し, それ等の行なう生理現象を究明するを目的とする。即ち, 無菌種子の培養は無菌的器官, 組織, 細胞等を得るための手段である。

II. 種子滅菌法

樹木その他高等植物の種子はその形状より見ても雑多であり, 堅硬種皮及び, 種皮に各種模様を有するもの等一般に見られており, また大きさにおいても大は径数 cm を越すものより, 小は数 μ にすぎないものまで存在する。われわれは便宜上目視にて確実に種子の形状を認め得るものを普通種子(一般の樹木その他高等植物の大半はこれに属する), ルーペもしくはビノキュラー等によらなければ形状判定困難である種子を微細種子(ラン科その他全寄生植物等に属するもの), としてそれぞれやや異つた方法により滅菌する。

イ) 滅菌及び培養等のため準備する器具

イ1. 乾熱滅菌器

主としてガラス器具その他(150°C以上の温度で破壊されないもの)の滅菌に使用。一般に150°C—1時間。(電熱乾燥器で代用し得るが, 常時使用の場合は乾燥器の性能低下をまねく)

イ2. 高圧滅菌釜(オートクレイブ)

培養基，滅菌水，濾過滅菌器等の滅菌。われわれは 1.5 kg/cm^2 加圧蒸気滅菌 20 分 (127°C) を基準とする。

イ 3. 濾過滅菌器

加熱滅菌により破壊変質するようなビタミン類，植物体よりの浸出液，植物組織汁等は Seiz や Chamberland 等の濾過器を使用するが，最近では Milliphora (ミリポア) 濾過滅菌器が市販され大変便利。これ等の滅菌には高圧滅菌釜を用う。

イ 4. 接種培養のための器具

イ 4 a. 綿

綿栓用。未脱脂綿で繊維の長い良質のもの（出来得るかぎり合成繊維を含め純綿）を良とする。綿栓代用としてエコプラ（合成ゴム，フィルター付）も用いられるがやや高価，乾熱滅菌，焰消毒不可。高圧滅菌可。培地の乾燥をおさえる故長期培養にはよろしい。

イ 4 b. ガラス器具

培養容器として試験管 ($18 \text{ mm} \times 15 \text{ cm}$) が使用されるが，長期培養等では三角フラスコ ($50 \sim 200 \text{ ml}$)，大径（径 $2 \sim 3 \text{ cm}$ ）試験管，または長管（径 $18 \text{ mm} \sim 30 \text{ mm}$ ，管長 $20 \sim 35 \text{ cm}$ ）試験管を用い，綿栓の代りにエコプラ栓を使用。

種子滅菌用容器は，各種径シャーレ，ビーカー ($50 \sim 300 \text{ ml}$ ，ビーカーに合致するシャーレを蓋とする) を用い，これ等は前もつて乾熱滅菌する。微細種子は注射筒 ($2 \sim 10 \text{ ml}$) を使用するがこれは 75% アルコール滅菌にて充分。

イ 4 c. ピンセット，白金耳，その他

種子接種植込用としてピンセット，白金耳が用いられるがピンセットは先の鋭いもの，鈍頭のもの等を用意すべきで時計用，眼科用，昆虫用等より選択すれば使用し易いものを揃える事が出来る。種子植込に長時間を要する場合は腰の弱いピンセットを使う方がよいようである。白金耳はニクロム線で代用し線その他，種々の大きさ，型のものを用意すると便利。メスは眼科用のものが使い易いが，安全カミソリの刃を細く割つて白金耳に設置しても可。この際焰消毒のため刃がなまる故，替刃用に細割刃 $5 \sim 10$ 枚用意しておくことよい。ハサミは眼科用のものが取扱い便利。

イ 5. 無菌箱

いわゆるカステンと称するもので，手前の穴から両手を入れて操作するのであるが，比較的大き目につくつておけば（巾 100 cm × 奥行 50 cm × 高 70 cm ），種子滅菌，植込等には充分事足りる。前方ガラス面は垂直でもよいが，少し傾斜をつけると箱内が見やすい。ガスバーナーは外部より引入れるようにし，蛍光灯は $15 \sim 20 \text{ W}$ ，上面壁 1 コ両側面各 1 コつけると照明は充分である。蛍光筒のみ箱内に入れ他の附属品は箱の外面上に取りつけ箱内の温度上昇を防ぐ。なお上内面にはブリキまたはトタンをはり開閉自在の小空気抜 $2 \sim 3$ コ取りつける。箱内の滅菌は $5 \sim 10\%$ ホルマリン液を用いて清掃し，噴霧器にてホルマリン液を噴霧しておく。ホルマリン液は特別の事情ないかぎり広口ビン等に入れて無蓋にて無菌箱内に静置し常時滅菌を兼ねるようにする。

イ 6. 振盪培養器

液体培養基にて培養する場合必要であるが，種子の場合，回転培養器より振盪培養器（往復式または回旋式）の方が生育等には良好な結果をもたらすようである。

イ 7. 定温培養器，冷蔵庫

いわゆるフラン器で， 20°C ， 25°C ， 30°C ， 35°C 等の温度のフラン器は常に用意しておく事が望ましい。そのためには $10 \sim 15^\circ\text{C}$ 定温室を設け，その中にフラン器を持込めば，望みの温度が比較的

確にとれる。冷蔵庫は家庭用で充分であるが、季節ごとに注意して温度調節器で 5~7°C に調節しておく并使用しやすい。

ロ) 滅菌剤

各研究者により種々の薬剤が用いられるが、基本的にはバクテリア、菌等のいわゆる雑菌を殺し植物体自体には出来得るかぎり、薬害を及ぼさぬもので、残存効果少なく、殺菌後滅菌水等により速やかに洗滌し得るものが望ましい。種子滅菌の場合、表面消毒が主体となる故、浸透性の強いものは出来得るかぎりさけるかまたは滅菌時間を短縮しなければならない。浸透性の弱いものでも長時間の浸漬は薬害を表わす故出来得るかぎり殺菌時間を短かくすべきであるが、滅菌時の種子の状態(風乾種子は薬剤抵抗性強く、長時間でも可、湿潤種子、未熟種子は長時間は危険)、環境状態特に温度(高温時は低温時に比して滅菌時間を短縮する)等により異なる故、文献等に依り、または自己の経験に基づいて決定する。

滅菌剤としては 75~95% アルコール、5% 次亜塩素酸カリウム液、0.1% 昇汞水、1% ブローム水、2~5% 石炭酸液、10% 前後漂白粉液、3% 過酸化水素液(オキシフル)、5~10% 有機水銀剤等が一般に使用され、これ等薬剤を単独もしくは併用して滅菌する。

われわれが樹木種子、作物種子その他に行なっている方法は、先づ種子を 75% アルコールに 2~4 分浸漬(種子により浸漬中減圧、即ち種子表面に微細な毛等を有する種子等で空気除去の困難と思われるもの)、直ちに 10% エチル燐酸水銀剤(主として 10% ルベロン液使用) 60 分浸漬後、流水中で充分洗滌、次いで 10% 漂白粉液 3~30 分浸漬(一般には 20 分で充分と考えられる。漂白粉はよく乾燥した新鮮なものを用い、10g を 100ml の水によく練りつつ混じその濾液を使用)、滅菌水にて 1~2 回洗滌後 3% 過酸化水素水に 5~30 分浸漬(普通 15 分で充分)、再び滅菌水にて 3~7 回洗滌後滅菌種子として使用する(種子によりは、10% 有機水銀剤や 3% 過酸化水素水を併用しない事もある)。

ハ) 普通種子滅菌法

前述の方法で滅菌を行なうのであるが、エチル燐酸水銀剤浸漬までは普通のビーカー、シャーレ等に入れて殺菌するが、それ以後は乾熱滅菌ビーカーまたはシャーレ(ビーカーの方が使用に便)を用う。即ち有機水銀剤浸漬、流水洗滌後、充分水を切り、注意しつつ当種子を滅菌ビーカーにうつし(種子の大小、使用種子量等によって、ビーカーの大きさをきめる) 10% 漂白粉液をそそぎ込み、シャーレ蓋を覆い軽く振盪し、種子が薬液に充分に接するようにし、所定時間後、蓋を取る事なく種子の流失を防ぎつつ斜傾して薬液を捨て、続いて滅菌水洗滌、3% 過酸化水素水浸漬、滅菌水洗滌。このようにして 10% 漂白粉液の場合と同様な操作をくり返し、滅菌容器の蓋を取る事なく滅菌種子を得るようにする(この操作は滅菌シャーレを用う場合も同様)。

何らかの前処理を必要とする種子には適当な処理をほどこさねばならない。一般にみうけられるものに硬実種子があるが普通濃硫酸処理が有効のようで、例えばアサガオ、ネナシカズラ、ダンドク等は濃硫酸に 30~180 分(一般には 30 分で充分であるが、ダンドク等は 3 時間も必要)浸漬後濃硫酸を捨て速やかに流水にて洗滌、充分洗滌後は前述の方法で滅菌する。

なお種皮の存在が発芽を遅延させたり、雑菌汚染の懸念がある場合(クヌギ、シヒ、クス、アカマツ、クロマツ、イネ、ソバ等)は種実が傷付かぬよう丁寧に種皮を除き滅菌する。この際有機水銀剤は使用しなくてもよいようである。

ニ) 微細種子滅菌法

ブローム水、昇汞水、次亜塩素酸カリ液等を殺菌剤として低速または手廻し遠心機を併用し滅菌

種子を得る方法もあるが、われわれが用いているのはミリポア注射器を利用する方法で、ここに1例をあげて説明する。使用種子：ナンバングセル種子 (0.25 mm×0.13 mm, 風乾重 3 μg)。注射筒 (5~10 ml) にミリポア (フィルターと注射針は除く) を設置し、前もつて75%アルコールに浸しアルコール消毒を行なつておき、無菌箱中で注射器のピストンを抜き、筒内に必要量の種子を入れ再びピストンを挿入し、75%アルコールに2分浸漬後アルコールを押出し、10%漂白粉液をミリポア部よりピストンを引きつつ筒内に導入し、注射器を手にて振盪させ、充分薬液中に種子を浸漬し5分後ピストンを押して漂白粉液を押出し、続いて滅菌水を吸入2~3回上記の操作を行ない洗滌後3%過酸化水素水を導入4分浸漬後押出し、7~10回滅菌水にて洗滌、少量の滅菌水を筒内に残し、注意しつつミリポアを脱し、濾紙を敷いたシャーレ (乾熱滅菌済) 中に残つた滅菌水と共に滅菌種子を吹出す。このシャーレをそのまま無菌箱中に静置し、14~15時間後 (滅菌種子はほぼ乾燥状態となる) 所定の培地に白金耳を用いて植付ける。

Ⅲ. 種子保存法

年間を通じて種子採取の可能なものは、特別保存の必要はないが、樹木種子その他一般には1年もしくは隔年にしか種子採取が出来ない場合が多々ある。種子は成熟中汚染する事が多い故、採取した種子は出来得る限り早目に殺菌処理を施して保存する事が種子無菌培養を行なう場合甚だ必要な事となる。ガラス室内等で注意して完熟させた後採取した種子等は消毒石鹼等で洗い、流水で充分洗滌、または流水のみで充分洗滌し天日乾燥後保存するだけで、保存中雑菌による汚染度はあまり進行しないが、戸外で採取した種子は以上の処理位では応々にして汚染度が進み、無菌培養の能率を低下させ、時としては1年間の実験を棒にふる事すらあり得る。

採取した種子は風選、水選、塩水選等にて完熟し発芽力を有すると思われる種子を選取し、直ちに常法により発芽試験を行なわねばならない。この際種子の性質をよく調べ、必要とあれば各種前処理 (温度処理、光処理、薬剤処理等) を行ない発芽力の良否を適確に把握する事が必要である。続いて種子の1部を取り各種殺菌剤で処理し、再び処理種子について発芽試験を行ない、最初の発芽試験の結果と比較し発芽力を低下させるような殺菌剤は取除かねばならない。

われわれが行なつた実験より、発芽力を低下させず保存中の汚染度の進行をおさえ得るものとして有機水銀剤が最適であるとの結果を得た。この薬剤はわれわれが取扱つた普通種子、微細種子にも好適であるようである。

風選、水選、塩水選等を行なつた種子を5%消毒用石鹼液 (ミューズ石鹼を用う) にて洗い消毒をかねて汚れ等も取除き水洗、出来るだけ水を切り、ついで有機水銀剤10%ルベロン液に60分浸漬、水道水にて充分水洗 (微細種子の場合硝子フィルター付大型ロートをを用い、サッカーで吸引しつつ水洗) 後、ガーゼまたは濾紙上に広げ、風等により飛散する事に注意しつつ、天日乾燥を行ない、充分に乾燥させ、デシケーター中に保存する。果皮を有するものは、それを取除き、種皮は絶対に取除かない事が肝要で普通種子滅菌法の項で述べた如く、培地植込のための滅菌時のみ取除くようにする。種皮を取去つて保存すると一般に強く発芽力を害するようである。なお、かように予備滅菌を行ない保存した種子は今後の滅菌には有機水銀剤は不用。

Ⅳ. 培 養 基

種子の発芽を研究する場合も無菌培養によれば発芽現象を適確に追求する事が出来るが、普通種子の場合、培地組成はあまり問題とならず、物質的なものが発芽において主役をなすと考えられて

いた菌共生植物（ラン科等）完全寄生植物等においても最近、物質的なもの（ジベレリン、IAA、カイネチン、ビタミン類、植物根浸出液等）は脇役的な作用をなし、普通種子と同様、光、温度、水分、ガス圧等物理的要因が発芽の主因となると解されるようになってきた。例えば完全地下寄生植物であるナンバンギセルは最近まで寄主植物根よりの浸出物が発芽を促進すると考えられ、実験もそのような結果を得ていたが、無菌培養法による実験より、ジベレリン、IAA は発芽を促進するが発芽そのものの主因とはならず、発芽の主因はむしろ水分（膨潤種子である事が必要）、温度（3日以上 30°C である事が必要）、光（4日以上の連続照明で完全発芽阻害）条件が重要で、寒天のみの培地にて、水分、温度、光条件が適当であれば、発芽を行なう事が示された。このような事実は菌共生のラン科の植物でもたしかめられ（CO₂ ガス圧も関係）、無菌培養法により今後ますます、かかる事実の集積がなされてくる事が予想される。発芽においては種子そのものの所有する物質でまかない得て、発芽生理の主因は物理的要因にあるようであるが、生長、分化過程に入ると各種無機有機物質を必要とするようになり、発芽のみを実験する場合に比して、培養基組成も一段と複雑化してくる。培養基組成は材料、目的によつて種々あるが、実験の進行に伴い、上述の如く複雑化の道をたどる。しかしながら、われわれ全植物体培養の場合、組織培養と異り、培地組成の単純化を強く念頭におき、出来得る限り単純な培養基をもととして核心をつくる実験を組立てるよう、心掛けるべきである。われわれは主として別表にかかげた培養基を使用しているが、一般的実験では White 氏液が最も無難のようで依存栄養研究の際は Spoerl 氏培養基が良好。マツ類等の培養には B. K. P. が適しているようであるが White 氏液との比較等現在追求中である。培養基の塩類（純度の高いもの、特級）は、それぞれ 500 ml 褐色ビンに 100 倍濃厚液（再蒸溜水）をつくり、冷暗所に保存し、培養基作製時、各液より 10 ml づつとり、1 ℓ になるよう、蒸溜水を加へ、炭素源としてはショ糖（時としてはブドウ糖）を用い、2～5%とし、乾燥酵母 0.1～0.5%加へ、固形培地の場合、寒天 0.75～1.5%を加え、加熱融解後、培養容器に必要量づつ分注し、綿栓またはエコプラ栓しオートクレイブで加圧滅菌、平面培地（大、中形普通種子）、または斜面培地（小形普通種子及び微細種子）とする。液体培養基を利用すれば、無菌植物根よりの浸出液等、簡単に無菌的には採る事等が可能で種々の利点があるが、高等植物の場合やや困難。液体を用いたフラスコ培養は振盪培養が行ない得るが、多くの場合、根部は発達不良（クロマツ、ダイコン）で茎葉部は異状形をとり、茎は屈曲する。甚だしい時はからみ合いマリモ状を呈する（ネナシカズラ）。試験管培養では濾紙を短冊状や小ロート状にして液面に接着させ、その上に無菌種子を播種するが、現在の所固

表 1 培 養 基 組 成

	White (mg/l)	Spoerl (mg/l)	B. K. P. (mg/l)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	360	240	200
Ca(NO ₃) ₂	200	—	300
Na ₂ SO ₄	200	—	—
KNO ₃	80	—	—
KCl	65	—	—
NaH ₂ PO ₄	16.5	—	—
KH ₂ PO ₄	—	270	300
CaSO ₄ ·2H ₂ O	—	80	—
CaH ₄ (PO ₄) ₂ ·2H ₂ O	—	100	—
NH ₄ NO ₃	—	400	—
H ₃ BO ₃	—	—	100
シ ヨ 糖	20(g/l)	20(g/l)	20(g/l)
寒 天	15	15	15
酵 母	5	5	5

形培地のものより生育不良のようである。加熱滅菌出来ない水溶性物質（ある種のビタミン類、植物組織汁等）は加圧滅菌したミリポア濾過器を通して与える。なお実験中滅菌水はしばしば使用する故、多量つくっておく事が望ましい。滅菌水は普通蒸溜水を用い 50, 100, 200, 300, 500, 1,000 ml 等の三角フラスコに所要量とり（フラスコ容量の 2/3 以上不可）各フラスコに適合したビーカー（200 ml までは 50 ml ビーカー、300ml 以上 100ml ビーカー）を蓋とし加圧滅菌しておく。

接種に際しては実験室の床は清掃し、実験前、水を床上に撒いて埃の立つのを防ぎ、窓や扉は密閉して気流を出来るだけおさえ、実験者自身も静かに行動する。実験者は常に心身を清潔にし、特に手指の清浄には充分注意し、爪は常に短かく切り、実験に先立ち消毒用石鹼にて腕手を洗い、歯ブラシに石鹼液をつけ爪の間等特に注意して洗う。口鼻はこれをおおりに充分な大きなマスクをかけ、頭には手術帽をかぶる。

無菌箱には向つて右側に培養容器をおき、中央に滅菌種子を入れた滅菌ビーカーまたはシャーレを置く。石鹼液洗滌後腕手は 75 % アルコールにて充分消毒し接種用具のピンセット、白金耳等も 75 % アルコールで殺菌、滅菌ビーカーの右横におく。両手を無菌箱内へ静かに挿入し、右手で培養容器をとり左手に渡す（一般に試験管なら 4 本、50 ml フラスコなら 2 コ）。左手で培養容器をしつかり握り（試験管は出来るだけ横たえ、上に向けるのを避ける）、綿栓を取り試験管口を万遍なく充分焼き、滅菌ビーカーの蓋を取り次いで右手で白金耳を持ち焰の中を通し培養容器内の培地に入れて冷し、滅菌ビーカー中より滅菌種子をすくい上げ培養容器に植付ける。白金耳は直ちに所定の位置にかえし滅菌ビーカーに蓋を覆い再び試験管口を焼き綿栓の先端部を焼き試験管に綿栓し左側におく。この操作を反復し予定の本数の植付が終れば接種植付操作は完了する。予定の植付が終るまでは無菌箱より離れず、正確に静かに操作を行なうべきである。植付終れば 10~20 本ずつゴム輪でまとめ、ラベル（植付年月日、植物種、植付後の処置の概要、植付者名を記入）を付け所定の場所に置く。暗黒培養の場合は 10 本 1 組として不透光黒紙にてつつみ植付本数の 5~10 % をパイロット試験管として 1 本ずつ黒紙で覆い時々取出して生育状態を調べ、暗黒培養植物の生長生育状態を推定する。

無菌箱付の椅子は上下出来る丸椅子が適当で接種前必ず調節して高すぎたり低すぎたりしないようにする（低すぎると接種が不正確になり、高すぎると疲労がはげしい）。

終りにあたり適当と思われる成書をあげる。

◎植物栄養学実験 植物栄養学実験編集委員会 内第 9 : 組織培養法 355~368 (1959. 朝倉書店)

◎中井準之助 他 5 名 : 組織培養—植物組織の培養 583~598 (1964. 朝倉書店)

◎加藤幸雄 : 植物組織培養法 (1966. 誠文堂新光社)