

植物培養 —鳴門金時でのカルスの形成と再分化—

筑後 桃子 濱口 景子 米田直美

【概要】

私たちは、先輩たちの研究を引き継ぎ、カルス形成による植物培養の研究を行った。まず、鳴門金時のカルスの形成実験を行った。すると、カルスを形成することができたので、そのカルスで再分化実験を行った。その際、培地に加える植物ホルモンとその割合を変えることによって分化する部分が変わるそうなので、植物ホルモンの割合を変えた様々なパターン of 培地を作り、再分化させようとした。しかし、観察期間が短かったため、はっきりとした再分化までは見られなかった。

We succeeded the seniors' researches, and researched the plant culture by the new plant body formation. First of all, the formation experiment of Naruto Kintoki's new plant body was done. Then, because new plant body was able to be formed, the experiment of the re-differentiation was done in the new plant body. In that case, it tried to make the medium of various patterns that change the ratio of the phytohormone because the part that differentiates by changing the phytohormone added to the medium and the ratio seems to change, and to differentiate it again. However, because the term of the surveillance was short, even a clear the re-differentiation was not seen.

【研究の目的】

鳴門金時でカルスを形成させる。
形成されたカルスを再分化させ、植物ホルモンの割合と再分化の関係を明らかにする。

【仮説】

培地のパターン及び仮説は次の表の通り。

	インドール酢酸	カイネチン	仮説
①	0.03ml/L	1ml/L	不定芽
②	3ml/L	0.2ml/L	未分化状態維持
③	3ml/L	0.02ml/L	不定根
④	1ml/L	0.03ml/L	不定根
⑤	0.2ml/L	3ml/L	不定芽
⑥	0.02ml/L	3ml/L	不定芽

①、②、③のパターン及び仮説は資料より抜粋。また、資料によると、カイネチンよりインドール酢酸が多いと根に再分化しやすくなり、インドール酢酸よりカイネチンが多いと芽や葉に再分化しやすくなるようなので、そのことから④、⑤、⑥の仮説を立てた。

【実験器具・材料】

i. 鳴門金時のカルス形成

鳴門金時、培養試験管、ガスバーナー、1L三角フラスコ、オートクレーブ、ホットスターラー、包丁、ピンセット、まな板、コルクボーラー、シャーレ、クリーンベンチ、アル

ミホイル、ワイドハイター、MS培地、植物ホルモン2,4-D、マイクロピペット、インキュベーター

ii. 様々なパターン of 培地の作成

培養試験管、1L三角フラスコ、ガスバーナー、ホットスターラー、オートクレーブ、アルミホイル、MS培地、インドール酢酸、カイネチン、マイクロピペット

iii. 鳴門金時の再分化

鳴門金時のカルス、クリーンベンチ、iiで作成した培地、アルミホイル、ガスバーナー、ピンセット、インキュベーター

【実験方法】

i. 鳴門金時のカルス形成

ア. 培養試験管の滅菌

培養試験管を洗剤で洗った後、オートクレーブにかける。121°Cで15分滅菌し、乾燥。

イ. 培地の作成

1Lの純水を三角フラスコに入れ、ホットスターラーにかけながら、MS培地1袋を少しずつ溶かす。MS培地が溶けきったら植物ホルモン2,4-Dを1ml入れる。培養試験管に分け入れ、アルミホイルでふたをした後、121°Cで15分オートクレーブにかける。

ウ. 植え付け

十分に洗い6～7cmの輪切りにした鳴門金時、包丁、まな板、シャーレ、コルクボーラーをワイドハイターで滅菌する。ピンセット、コルクボーラーは数回使用するごとにガスバーナーで滅菌。以後の作業はクリーンベンチ内で行う。コルクボーラーで鳴門金時の形成層をくりぬく。シャーレの上でくりぬいた形成層を3～6mmの厚さに切る。切った形成層を切り口が培地に接するようにピンセットで2,4-D入り培地の真ん中に植える。再度アルミホイルでふたをする。培養試験管48本に植えた。

エ. 観察

26℃のインキュベーターで保存し、観察する。

ii. 様々なパターンの培地の作成

ア. 培養試験管の滅菌 (i. アと同様)

イ. 培地の作成

1Lの純水を三角フラスコに入れ、ホットスターラーにかけながら、MS培地1袋を少しずつ溶かす。MS培地が溶けきったら、150mlずつ分ける。それぞれにインドール酢酸とカイネチンをマイクロピペットで測定して入れる。(表参照)よく全体を混ぜ、培養試験管10本に15mlずつ分け入れる。アルミホイルでふたをし、121℃で15分、オートクレーブにかける。

	インドール酢酸	カイネチン
①	0.0045ml	0.15ml
②	0.45ml	0.03ml
③	0.45ml	0.003ml
④	0.15ml	0.0045ml
⑤	0.03ml	0.45ml
⑥	0.003ml	0.45ml

iii. 鳴門金時の再分化

ア. 植え替え

以後の作業はクリーンベンチ内で行う。形成された鳴門金時のカルスをピンセットでつまみ取り、iiで作った培地に少しずつ植え替えていく。ピンセットは1回使うごとに純水ですすぎ、ガスバーナーで滅菌してから使う。再度アルミホイルでふたをする。①と③は9本、それ以外は10本すべてに植え替えた。

イ. 観察 (i. エと同様)

【実験結果】

i. 鳴門金時のカルス形成

- ・ 植え付け4日後、カビのため、15本廃棄。
- ・ 約4週間後、19本廃棄。
カルスが形成され始めた。
- ・ 約1ヶ月後、5本廃棄。順調にカルス形成。
- ・ 約6週間後、4本廃棄。残り5本。
その後、カビが生えることはなかったが、カルスの成長に差があった。

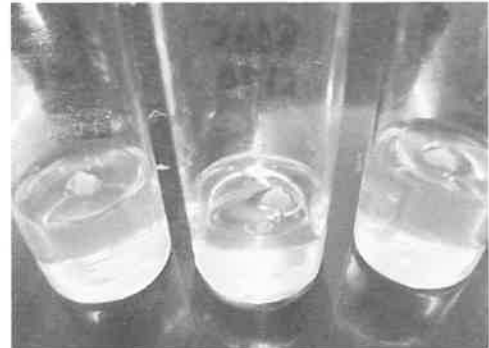


図1 植え付け直後



図2 植え付け約6週間後

iii. 鳴門金時の再分化

- ・ 植え替え4日後、カビのため数本廃棄。
特に変化は見られなかった。
- ・ 約2週間後、カビのため再度廃棄。
カルスが大きくなっている。
- ・ 約3週間後、カビのため再度廃棄。
カルスの変化は次の表の通り。

	仮説	結果
①	不定芽	カルスの成長
②	未分化状態維持	カルスの成長
③	不定根	不定芽
④	不定根	不定根
⑤	不定芽	不定根
⑥	不定芽	不定根

今回は実験期間の関係により、再分化まで観察できなかった。



図3 植え替え直後 (①・②・③)



図4 植え替え直後 (④・⑤・⑥)

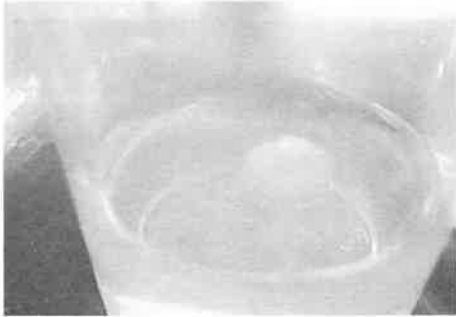


図5 植え替え4週間後①



図6 植え替え4週間後②



図7 植え替え4週間後③



図8 植え替え4週間後④

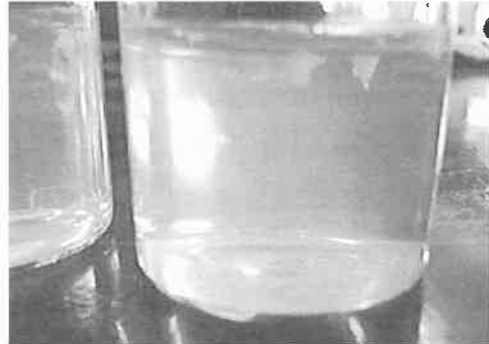


図9 植え替え4週間後⑤

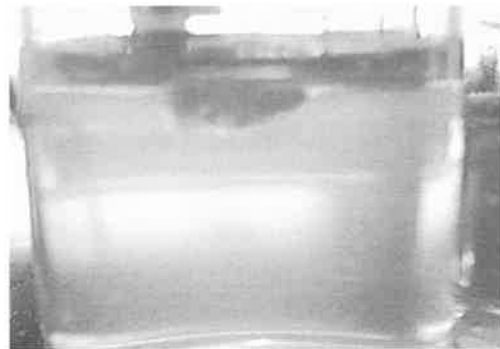


図10 植え替え4週間後⑥

【考察】

- ・カビが生えてしまった原因として、培地をオートクレーブにかけた後、培養試験管内に水滴が付着していたこと、保存していたインキュベーター内に乳酸菌、植物を植えたバットなども入っていたため、そこから雑菌が入ったことなどが考えられる。
- ・カルスが形成されたものと形成されなかったものがあったことに関しては、培地に植物ホルモンが均一に混ざっていなかった可能性があること、滅菌する際のワイドハイターで鳴門金時の断面の細胞が死んでしまった可能性があること、コルクボーラーから抜く際に形成層からずれていた部分があったことなどが考えられる。
- ・今回の実験では、植物ホルモンを一切含まないMS培地に植え替えず、それぞれのパターンの培地に植え替えたため、2,4-D がカルスに付着して残っており、それによって植物ホルモンの割合が変わってし

まっただと考えられる。よって、今回の実験から、植物ホルモンの割合と再分化に関する関係を言うことはできない。

- ・再分化実験では、カルス形成実験の培地全体に対する2,4-Dの割合に比べ、植物ホルモンの割合が大きかった。すると、カルス形成時よりも大きなカルスが形成された。よって、植物ホルモンが多いほど、大きなカルスが形成されると考えられる。

【結論】

- ・実験 i で鳴門金時のカルスを形成することができた。よって、植物ホルモン2,4-Dによって、カルスを形成することができる。
- ・植物ホルモンが多いほど、より大きなカルスを形成することができる。
- ・今回の実験では、植物ホルモンと再分化の関係を正確に考察できない。よって、植物ホルモンと再分化との関係を言うことはできない。

【感想】

今回の実験では、再分化を観察できなかった。しかし、資料によると難しいとされていた鳴門金時のカルス形成に成功でき、嬉しかった。カルスが成長していく様子は観察していてとても興味深かった。

私たちの研究で再分化の手前までいくことができたので、私たちのように、私たちの研究も後輩に引き継いでもらえたら、と思う。

【引用文献】

- 『植物組織培養の技術』朝倉書店
竹内正幸・中島哲夫・古谷力編集
- 『植物組織培養の生物学』朝倉書店
- 『NEW PHOTO GRAPHIC
生物図説』秀文堂 秀文堂編集部編