

インビトロクローバーのよつ葉誘導に挑戦

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 バイオ研究部 2年 大原日菜子

1. 背景と目的

インビトロプランツとしてよつ葉のクローバーを培養することができたら面白く、かつ販売をすることにより自然に触れるきっかけになるのではという思いと、幸運とされているよつ葉のクローバーの発生条件について興味を持ち、実験を開始した。予備実験で基本培地の検討を行った。



2. 実験概要

実験① 培地中の成長調整物質等による影響

実験② 成長調整物質等の培養土発芽直後のクローバー実生への直接滴下の影響

実験③ 処理物質の浸漬時間の違いにおける植物体への影響

3. 材料

・市販ホワイトクローバー種子



4. 実験方法

・基本培地には $\frac{1}{2}$ MS基本塩類を使用した。

【実験①培地中の成長調整物質等による影響】

・培地調整時に8つの成長調整物質等を、3段階の濃度になるように調整を行った。

・種子殺菌を行い、調整した培地に置した。

【実験②成長調整物質等の培養土発芽後のクローバー実生への直接滴下による影響】

・セルトレイに実験①で余った殺菌済みの種子を播種した。

・全体的にホワイトクローバーが発芽したら、クローバーの実生に各種成長調整物質等を直接滴下した。それを2日間の間隔あけて行い、1回目滴下、2回目滴下、3回目滴下の3区分となるようにした。

・ある程度ホワイトクローバーが育ってきたらポリポットを用意し、セルトレイから移植した。

【実験③処理物質の浸漬時間の違いにおける植物体への影響】

・まず培地の調整を行った。 $\frac{1}{2}$ MS基本塩類を調整し、それを3種類となるように分けてそれぞれの調整を行った。調整した培地を培養容器に分注し、オートクレーブにかけた。

・処理物質×浸漬時間+control分の枚数シャーレを用意して無菌状態で素寒天を流し込み、固化した後そこに殺菌済みの種子をまきシャーレ内で発芽させた。全体的に発芽したらシャーレに処理物質を流し込んで処理を行った。それぞれ時間になったら流し込んでいた処理物質を捨て蒸留水を流し込んで植物体の表面についた処理物質を洗い流し、処理時間の確定を行った。

・処理をした植物体一つずつ置床

して経過観察を行った。

5. 実験結果

【実験①培地中の成長調整物質等による影響】

実験①

・オーキシンの分類に当たるNAAと2,4-Dを含ませた培地では、濃度の高い1.0mg/l区で成長阻害、カルス化がみられた。

・サイトカイニンの分類に当たるカイネチンでは濃度の低い0.01mg/l区で矮小化がみられ、同じくBAでは0.1mg/l区と濃度の高い1.0mg/l区で矮小化がみられた。

実験②

・結果としては表の所見通りだが、2,4-Dの2回目滴下で四つ葉の発生、3回目滴下で五つ葉の発生がそれぞれ一つずつみられ、スベルミジンの2回目滴下でも四つ葉の発生がみられた。

実験③

・この実験では四つ葉が発生するかどうかのみに着目したが、四つ葉の発生を確認することはできなかった。

表1・培地中の成長調整物質等が無菌培養後のクローバーの成長に及ぼす影響																							
実験区分	成長調整物質等	濃度	試験 枚数	無菌培養7日後								無菌培養7日後								所見			
				葉丈(mm)								カルス											
		μg/L		発芽数	3	4	6	7	9	10	12	発芽数	変化	5	6	30	31	50	51	60	70		
Control	NAA	0	10	6	3	1	3	1	1			9	2	1	1							阻害で伸長を抑制する。また高濃度で発生を阻害する。	
		0.01	9	6	3	3						6	1										高濃度で伸長を抑制する。また高濃度で発生を阻害する。
		0.1	10	3	2	1						1	1										高濃度で伸長を抑制する。また高濃度で発生を抑制し、カルス化を促進する。
オーキシシン	2,4-D	0.01	9	5	1	4					8	1									7	高濃度で発生を抑制する。また高濃度で発生を抑制し、カルス化を促進する。	
		0.1	9	6	6							9	3	3	3								高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。
		1.0	10	0								8	8										高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。
サイトカイニン	カイネチン	0.01	10	6	6							9	2	2	5							高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。	
		0.1	10	10	7	3						10	10										高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。
		1.0	10	10	7	3						10	10										高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。
サイトカイニン	BA	0.01	10	5	5						7	1	1									高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。	
		0.1	9	7	4	3						7	3	2	2								高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。
		1.0	10	10	1	7	1					10	10										高濃度で発生を促進し、伸長を抑制する。
アブジン酸	ジベレリン酸三	0.01	8	4	1	3					4										1	3	阻害で発生を抑制、阻害する。
		0.1	10	5	3	2						6	1	1	4								阻害で発生を抑制、阻害する。
		1.0	9	1	1	1						3	1	2									阻害で発生を抑制、阻害する。
ジベレリン酸三	ビタミン類	0.01	10	8	2	5	1				9										2	7	高濃度で伸長を促進する。
		0.1	10	6	2	3	3	1				9									1	8	高濃度で伸長を促進する。
		1.0	10	8	5	2	1					10	10										高濃度で伸長を促進する。
アブジン酸	ジベレリン酸三	0.01	10	6	2	4						9	2	7									明確な影響が認められない。
		0.1	10	3	3	4						7											明確な影響が認められない。
		1.0	10	8	4	4						10											明確な影響が認められない。
成長因子	スベルミジン	0.01	8	6	3	3	2	1			8												明確な影響が認められない。
		0.1	9	7	7							8											明確な影響が認められない。
		1.0	9	6	3	3						8	1										明確な影響が認められない。

【実験②成長調整物質等の培養土発芽後のクローバー実生への直接滴下による影響 (写真と表)】

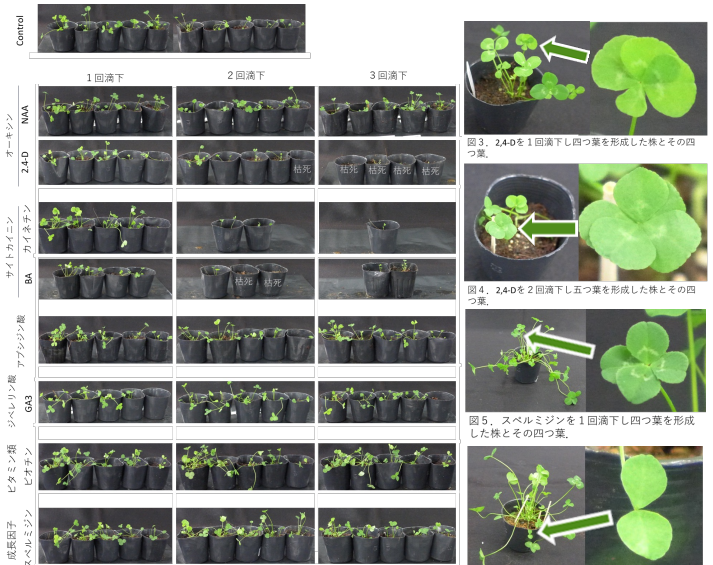


図2. 培養用土での発芽直後のクローバー実生に成長調整物質等の滴下開始4週目における滴下回数による植物体成長の相違

表2・成長調整物質等を培養土発芽直後のクローバー実生へ滴下した場合、その回数が滴下開始6週目における実生の生存、発生葉柄数および小葉数に及ぼす影響

実験区分	成長調整物質等	滴下回数*	値付	生存ポット	生存株	発生葉柄数	小葉数				所見
							2	3	4	5	
Control	NAA	0	10	10	21	87 (4.1)	87				明らかな影響なし。
		1	5	5	14	49 (3.5)	49				
		2	5	5	17	51 (3.0)	51				
		3	5	5	15	52 (3.5)	52				
オーキシシン	2,4-D	1	5	5	9	33 (3.7)	32	1			3回目滴下で全株枯死した。1回目滴下で四つ葉、2回目滴下で五つ葉の葉柄が発生し
		2	5	4	6	21 (3.5)	20		1		2回目滴下、3回目滴下で枯死株が発生した。生存株も発生葉柄の減少傾向があつた。
		3	5	0							2回目滴下、3回目滴下で枯死株が発生した。
		0	5	5	13	49 (3.8)	49				3回目滴下で二つ葉が発生した。
サイトカイニン	カイネチン	1	5	5	14	51 (3.4)	51				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		2	5	2	4	9 (2.3)	9				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		3	5	1	1	2 (2.0)	2				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		0	5	4	9	37 (4.1)	37				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
サイトカイニン	BA	1	5	1	1	3 (3.0)	3				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		2	5	2	2	8 (4.0)	8				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		3	5	5	15	51 (3.4)	51				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		0	5	5	12	35 (2.9)	35				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
アブジン酸	ジベレリン酸三	1	5	5	12	38 (3.2)	1	37			3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		2	5	5	11	42 (3.8)	42				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		3	5	5	11	30 (2.7)	30				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		0	5	5	15	61 (4.1)	61				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
ビタミン類	ビオチン	1	5	5	16	59 (3.7)	59				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		2	5	5	13	49 (3.8)	49				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		3	5	5	14	56 (4.0)	56				3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		0	5	5	16	56 (3.5)	55	1			3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
成長因子	スベルミジン	1	5	5	12	41 (3.4)	1	40			3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		2	5	5	12	41 (3.4)	1	40			3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		3	5	5	12	41 (3.4)	1	40			3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。
		0	5	5	12	41 (3.4)	1	40			3回目滴下で発生葉柄の減少傾向が認められた。

0 : 生存1株あたりの発生葉柄数
*: 2回目、3回目の滴下は前回の3日後に行った。

			試験薬		
培地	無	2,4-D	スベルミジン		
Control					
2,4-D					
BA					

図 8. controlと2,4-D 3時間処理、スベルミジン 3時間処理を行ったクローバーの成長の相違（10 週目）

表 3. 2,4-D、スベルミジン処理を行ったクローバーの培養10週目における発生葉柄数と小葉数

	対照	2,4-D				BA			
		発生葉柄数	小葉数	発生葉柄数	小葉数	発生葉柄数	小葉数		
2,4-D	対照	平均8本	全て3枚	平均11本	全て3枚	平均9本	全て3枚		
	30m	平均7本	全て3枚	平均7本	全て3枚	平均6本	全て3枚		
	3h	平均9本	全て3枚	平均10本	全て3枚	平均10本	全て3枚		
	24h	平均7本	全て3枚	平均7本	全て3枚	平均7本	全て3枚		
スベルミジン	対照	平均8本	全て3枚	平均12本	全て3枚	平均9本	全て3枚		
	30m	平均8本	全て3枚	平均12本	全て3枚	平均9本	全て3枚		
	3h	平均8本	全て3枚	平均12本	全て3枚	平均9本	全て3枚		
	24h	平均7本	全て3枚	平均9本	全て3枚	平均9本	全て3枚		

×はすべてコンタミしてしまいデータが取れなかった区分別

図 1. 成長調整物質等を含ませた培地での培養開始6週目における植物体成長の相違