

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。

過去にバイオ研究部で開発されたインビトロプランツ



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による影響

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、調整した培地に置床した。

【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回目滴下列、2回目滴下列、3回目滴下列の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、オートクレープにかけた。

・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。

・処理をした植物体を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

一つづつみられ、スペルミジンの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にのみ着目したが、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播種後のクローバーの成長に及ぼす影響										
実験区分	濃度	試験	無菌播種7日後							所見
			無菌播種7日後							
成長調整物質等	($\mu\text{g/l}$)	管数	無菌播種7日後	カル	カル	カル	カル	カル	カル	
Control	0	10	6	1	3	1	1	9	1	所見
NAA	0.01	9	6	3	3	3	3	9	2	1
オーキシン	0.1	10	3	2	1	1	1	6	1	5
2.4-D	0.01	9	5	1	4	8	1	7	1	1
	0.1	9	6	6	6	9	3	3	3	3
カイネチン	0.01	10	3	2	1	8	1	2	6	2
サイトカイニン	0.1	10	10	7	3	10	1	1	5	2
ニン	0.01	10	5	5	5	1	1	1	1	1
BA	0.1	10	5	5	5	1	1	1	1	2
アブシジン酸	0.1	10	8	4	3	10	10	10	10	10
ジベレリン酸三	0.1	10	8	2	5	9	9	2	7	7
ビタミン類 ピオチン	0.1	10	3	3	3	10	10	10	10	10
成長因子	スペルミジン	0.01	8	6	3	3	3	3	3	3
	0.1	9	7	7	7	8	8	8	8	8
	1.0	9	6	3	3	3	3	3	3	3
	2.4-D	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	カイネチン	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	サイトカイニン	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	ニン	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	BA	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	アブシジン酸	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	ジベレリン酸三	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	ビタミン類 ピオチン	1.0	10	0	0	0	0	0	0	0
	成長因子	スペルミジン	1.0	9	7	7	7	7	7	7
	ミジン	1.0	9	6	3	3	3	3	3	3

【実験②成長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)】



1回滴下 2回滴下 3回滴下



図3. 2.4-Dを1回滴下し四つ葉を形成した株とその四つ葉。



図4. 2.4-Dを2回滴下し五つ葉を形成した株とその四つ葉。



図5. スペルミジンを1回滴下し四つ葉を形成した株とその四つ葉。

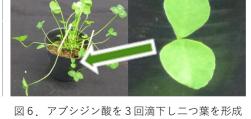


図6. アブシジン酸を3回滴下し二つ葉を形成した株とその二つ葉。

図2. 培養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1. 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週目ににおける生存の生存率、発生葉柄数および小葉数に及ぼす影響

実験区分	種植	生存ボット	生存株数	発生葉柄数	小葉数					所見
					2	3	4	5		
成長調整物質等	満下回数*	ボット	ト数	数	87 (4.1)	87				明らかな影響なし。
Control	0	10	5	14	49 (3.5)	49				
NAA	2	5	5	17	51 (3.0)	51				
オーキシン	3	5	5	15	52 (3.5)	52				
2.4-D	2	5	4	6	21 (3.5)	20	1			
	3	5	0							
	1	5	5	13	49 (3.8)	49				
カイネチン	2	5	2	4	9 (2.3)	9				
サイトカイニン	3	5	1	1	2 (2.0)	2				
ニン	1	5	4	9	37 (4.1)	37				
BA	2	5	1	1	3 (3.0)	3				
	3	5	2	2	8 (4.0)	8				
アブシジン酸	1	5	5	15	51 (3.4)	51				
	2	5	5	12	35 (2.9)	35				
	3	5	5	12	38 (3.2)	1	37			
ジベレリン酸三	1	5	4	9	38 (4.2)	38				
	2	5	5	11	42 (3.8)	42				
	3	5	5	11	30 (2.7)	30				
ビタミン類 ピオチン	1	5	5	15	61 (4.1)	61				
	2	5	5	16	59 (3.7)	59				
	3	5	5	13	49 (3.8)	49				
スペルミジン	1	5	5	14	56 (4.0)	56				
	2	5	5	16	56 (3.5)	55	1			
	3	5	5	12	41 (3.4)	1	40			

0 : 生存1株あたりの発生葉柄数

* : 2回目、3回目の管は前回の3日後に行った。



図8. controlと2.4-D時間処理、スペルミジン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、スペ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

試薬	培地	発生葉柄数					所見
		無	2.4-D	スペルミジン	対照	2.4-D+BA	
		平均8本	平均11本	平均9本	平均3本	平均9本	全3株
		30m	平均7本	全3株	平均7本	全3株	平均6本
		3h	平均9本	全3株	平均10本	全3株	平均10本
		24h	平均7本	全3株	平均7本	全3株	平均10本
		30m	平均8本	全3株	平均12本	全3株	平均9本
		3h	平均8本	全3株	平均9本	全3株	平均9本
		24h	平均7本	全3株	平均7本	全3株	平均9本

×はすべてコンタミとしてしまいデータが取れなかった区分

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