

組織培養の方法の確立

石川県立金沢泉丘高等学校理数科2年
6班 河合 莉瑚 桑原 椋太郎 高田 涼真 屈 日恵 向瀬 琴葉 渡辺 和奈

1. 研究動機

金沢のブランド野菜である「加賀野菜」は、栽培が難しく、農家戸数が少ない厳しい現状にある。加賀野菜は地元の固定種であるので、伝統的な栽培方法が大切にされ、自然交配しか行われていない。そのため、人工交配が主流である農産業の中で加賀野菜は人為的に病気に強い個体を安定して生産することができず、農家にとって不利益となりやすい。そこで、この課題を解決するために、組織培養の方法を明確にすることで、最終的に優良な植物体のクローンを増やせるのではないかと考えた。私たちの研究によって加賀野菜のあり方を新しい方向からアプローチし、地域に貢献したいと考える。

2. 先行研究

古川ら¹⁾によると、セリは0.2mg/L NAAと0.2mg/L BA併用の試験区がシュート伸長率、発根率ともに高い値を示した。

Hajime Arakiら²⁾によると、ワサビダイコンは0.02mg/L 2,4-Dと0.02mg/L BA併用の試験区が最も新しい植物が作成されやすかった。

3. 本研究で明らかにしたいこと

加賀野菜の組織片培養において、植物分化条件の検討と適切な培養方法を確立させる。

4. 実験計画

(準備する物品や使用施設・場所)

場所: 生物実験室

使用する物品:

ナフタレン酢酸(NAA、合成オーキシシン)/チジアズロン(TDZ、合成サイトカイニン)/ベンジルアデニン(BA、合成サイトカイニン)/蒸留水/ゲルライト/ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類/オートクレーブ/ショ糖(20g/L)/シャーレ/クリーンベンチ/カミソリ/ビーカー/ガラス棒/インキュベータ/70%エタノール/次亜塩素酸ナトリウム溶液/ホットプレートスターラ/ツイン80/種子(※)/水酸化ナトリウム

※金沢せり、源助大根の種子を使用する予定。

(実験手順)

- ①ホルモンフリーの培地を作成し、滅菌した種子を植える。
- ②ナフタレン酢酸(NAA、合成オーキシシン)、チジアズロン(TDZ、合成サイトカイニン)を蒸留水に溶かし、寒天(7.6%)、ショ糖(20g/L)植物培養用培地(ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類)を添加することで、以下の表1のようにA~Lの12個の条件の培地を作成し、オートクレーブ(121℃、20分)に入れて滅菌する。

表1 各シャーレに添加するNAAとTDZ

試験区	NAA(mg/L)	TDZ(mg/L)	不定胚(個)
A	0.0	0.0	結果を示す
B	0.01	0.0	
C	0.01	0.01	
D	0.01	0.1	
E	0.01	1.0	
F	0.1	0.0	
G	0.1	0.01	
H	0.1	0.1	
I	0.1	1.0	
J	1.0	0.0	
K	1.0	0.01	
L	1.0	0.1	
M	1.0	1.0	

表2 各シャーレに添加するNAAとBA

試験区	NAA(mg/L)	BA(mg/L)	不定胚(個)
N	0.01	0.0	
O	0.01	0.01	
P	0.01	0.1	
Q	0.01	1.0	
R	0.1	0.0	
S	0.1	0.01	
T	0.1	0.1	
U	0.1	1.0	
V	1.0	0.0	
W	1.0	0.01	
X	1.0	0.1	
Y	1.0	1.0	

③クリーンベンチ内で、滅菌済みシャーレにMS培地を厚さ7mm程度になるまで流し込み、斜めに傾けて固める。各試験区の培地を4つずつ作成する。

④カミソリで試料から1.5cm四方を切り出す。

⑤植物片を滅菌する。具体的な方法としては、70%エタノールに30秒間浸し、次に1.0%～5.0%(10～2倍希釈)次亜塩素酸ナトリウム溶液に5～10分間浸す。最後に滅菌した蒸留水で3回以上十分に洗い流す。

⑥クリーンベンチ内で、MS培地にそれぞれの植物片を置床する。

⑦27℃に設定したインキュベータに試験管を入れ、2週間様子を観察する。

5. 仮説

先行研究により、金沢せりはCの試験区、源助大根はOの試験区が最も新しい個体を形成しやすいと考えられる。得られた結果を表1、表2のようにまとめ、どの成長調整物質と濃度比で最も組織培養の成功率が高いかを見極める。

6. 参考文献

1) 古川 博, 他. 「セリ(*Oenanthe javanica* DC.)のin vitro培養体根組織からの不定胚誘導による増殖」.2004.

https://www.istage.jst.go.jp/article/ecb1963/42/4/42_4_315/_pdf/-char/en (参照: 2024年 7月)

2) Hajime Araki, 他. “Plantlet Regeneration By In Vitro Culture of Leaf Explants of Horseradish”. 1995.

https://www.academia.edu/59592327/Plantlet_Regeneration_By_In_Vitro_Culture_of_Leaf_Explants_of_Horseradish_Armoracia_rusticana_L (参照: 2024年 7月)