

植物細胞の脱分化と再分化(組織培養)

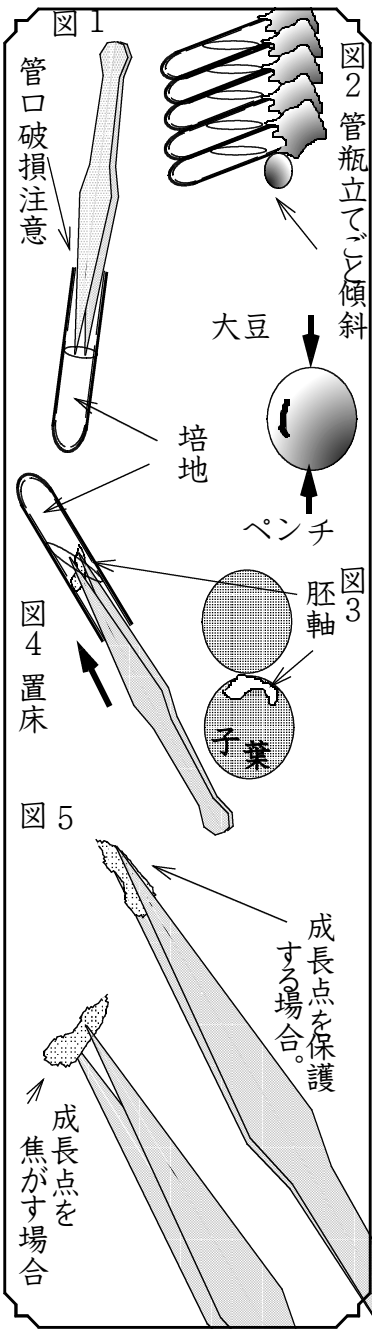
目標： 豆胚軸を用いてカルス形成を誘導し、脱分化現象を観察する。

仮説： 成長点は組織の脱分化によるカルス形成を阻害する。

材料と方法：

ダイズ、三温糖、寒天粉、(リポビタンD)、ハイポネクス(粉末)、NAAまたは2・4-Dかナフタレン酪酸、三角フラスコ、10φ管瓶(培養管)、10φ管瓶用試験管立て、先細ピンセット、アルミフویل、分注器(シリンジ型簡易真空ポンプ)、ミニ試験管立てまたは100mℓピーカ、ペンチ、99%エタノール、ミニシャーレ(エタノール入れ)、プロパノール、プロパノールスプレー

1. 培地調整 1日目
- a. 三温糖30g、寒天粉12g、ハイポネクス(粉末)1g、(リポビタンD・10mℓ)、NAAまたは2・4-D 1mgを2ℓ三角フラスコの水500mℓに分散し、完全に溶けたら1ℓまで水を加える。
- b. 湯煎かオートクレーブで、寒天を完全に溶かす。
- c. 10φ管瓶(培養管)に分注する(1人2本または4本)。培地量は管瓶の4割程度が望ましいが、先細ピンセットが管瓶内部に入る(届く)程度がよい(図1)。分注後すぐアルミフویلで蓋をする。
- d. 翌日滅菌し1日放冷。これを3回繰り返す。ただし原料に生の材料を用いていないため、滅菌1回でもコンタミ(雑菌の混入)例はほぼない。最終滅菌後管瓶を斜めに放置し、斜面培地とする。(図2)
2. 置床(胚軸の植え込み) 2日目
- クリーンベンチがあれば用いる。無い場合はガスバーナーを大きく焚き、炎のできるだけ傍の上昇気流内で行う。以後の手順は後者環境。バーナー炎で上を焼かぬため、コンタミを防ぐため、ボサボサの頭髮は手ぬぐいなどで覆った方がよい。
- a. 事前に机上やペンチをプロパノールで拭く。
- b. 滅菌した実験道具をすべて用意し、手順をイメージトレーニングしたあと手をプロパノールスプレーで清める。プロパノールは指や爪の間にも刷り込む。引火に注意。
- c. ダイズ3個を子葉方向に割り、胚軸を取り出す。
- d. アルミフویلをかぶせたまま管口を軽く焼いたのち管口を下に向けたままアルミフویلを除く。以後、再びアルミフویلで封ずるまで管口は下に向けたままとする。(図4)
- e. 滅菌のため胚軸をピンセットの先に保持し、99%エタノールに瞬時浸した後、即座にガスバーナーの炎にて点火する。エタノールと熱で十分な滅菌がなされるが、胚軸は乾いているため内部の細胞には害がない。ただし、70%エタノールを用いたり、エタノールが飛び



- らないうち消火したり、バーナー炎で胚軸を強熱する場合は胚軸が死んでしまう。尚実験仮説に従い一方の胚軸は成長点が焼けて焦げるよう、もう一方の胚軸は焦がさないように焼く。(図5)
- f. 培地斜面に胚軸を置床する。ピンセットの先が培地に届かない場合は、管内水分の表面張力で、胚軸を管壁に付着させておく。
- g. 蓋となる新しいアルミフویلを火炎滅菌する。酸化アルミニウムができないよう留意する。
- h. 管口をまんべんなく火炎滅菌し、わずかにさましてアルミフویلをかぶせる。その後再び管口を火炎滅菌する。
- i. 置床できなかった試験管は管底を下にしたまま机に軽くあて、慣性で胚軸を培地面まで落とす。
- 3 培養
- a. 恒温器で培養する。最初の10日間は光に当てない。約3週間後カルス形成を観察する。
- b. さらに再分化させたい場合は先の培地に6-BAを加えた培地に植え替える。

結果

結果はクラス全体で集計し、コンタミが起こった試験管数を分母から除いたあと(試験管数)、①カルス形成個体。②カルスと根の形成個体。③カルスと芽の形成個体、④カルスと芽と根の形成個体、⑤芽か根の形成個体。それぞれの割合を求め考察します。

試験管数	カルスのみ	カルスと根	カルスと芽	カルスと芽と根	芽や根
本	本	本	本	本	本
	%	%	%	%	%
特記事項					

考察

- 1 「仮説：成長点は組織の脱分化によるカルス形成を阻害する。」を検討してみよう。
- 2 本実験は一般試験管や、培養瓶では失敗する。なぜ10φ管瓶で成功するか考えよう。
- 3 本実験では一般の組織培養に用いるMS培地と比較して、14種の無機塩類の代わりにハイポネクス。6種の有機物(糖・ビタミンB・葉酸など)の代わりに三温糖を用いている。白砂糖と三温糖の違いを考えよう。

感想