

秋田伝統野菜と山菜のカルス誘導と関連遺伝子についての研究

生物資源科学部 応用生物科学科

2年 長木 麻里奈

2年 野崎 ののこ

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

准教授 水野 幸一

【目的】

秋田には伝統野菜・山菜がある。しかし、収穫の季節が限られていることから、広く流通させることが難しい側面がある。そこで本研究ではまず、秋田の伝統野菜や山菜からカルス誘導を試み、さらに細分化に至る過程を調べることで、それらを次期にかかわらず効率的に作れるようにするきっかけとなるデータが得られるのではないかと考えた。

【研究計画】

秋田の伝統野菜(八木ニンニク、五葉豆)や山菜(コシアブラ)のカルス誘導をめざす。まず、各種植物の文献を参考に、特定の培地組成条件下で効率的にカルスを作成していく。つぎに誘導したカルスからの細分化を目指す。

【試料や試薬など】

1. 実験に用いた地野菜・山菜

コシアブラ・八木ニンニク・五葉豆・市販のニンニク(青森県産)・一般の大豆(江戸緑、福獅子)

2. 試薬・培地

〈植物ホルモン〉ナフチル酢酸(NAA)・ベンジルアデニン(BA)・2iP(イソペンテニルアデニン) 2,4-D(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)・KIN(カイネチン)(滅菌関係) 殺菌用エタノール・1% NaOCl 溶液・有機洗剤〈培地〉アガロース・ゲランガム・ショ糖(スクロース)・0.1 N NaOH 水溶液・1 M HCl 水溶液・MS 培地・MS 培地用ビタミン

表. 1 MS 培地の組成

成分	含有量(mg/L)	成分	含有量(mg/L)
NH ₄	1650	KI	0.83
K	1900	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	CuSO ₄ ·H ₂ O	0.025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170	myo-イノシトール	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	ニコチン酸	0.5
Na ₂ -EDTA	37.8	塩酸ピリドキシン	0.5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	塩酸チアミン	0.1
ZnSO ₄ ·H ₂ O	8.6	グリシン	2
H ₂ BO ₃	6.2	ショ糖	20000

MS 培地の組成は表 1 に記す。また、植物ホルモンと培地の構成は、対象の地野菜・山菜により変えたため、各培地組成は表 2~に記す。

◎MS 培地の作製法(植物ホルモン入り・無し)植物ホルモン有無・培地希釈などの条件をもとに、コーヒー培地・ニンニク培地・もやし発芽培地・もやし不定胚誘導培地を作製した。すべての培地は共通に、ショ糖・MS 培地混合塩類(和光純薬工業)・イオン交換水を混合し、0.1 N NaOH 水溶液・1 M HCl 水溶液により、pH5.7にあわせた。オートクレーブ 120 °C 15分で行った。そして各培地で必要な植物ホルモンをイオン交換水混合の際に加えた。コーヒー培地の場合、植物ホルモンは 2iP を加えた。ニンニク培地では、オーキシンとして 2,4-D、サイトカイニンとして KIN

を各 1 μM ずつ加えた。もやし発芽培地には、植物ホルモンは加えていないが、3 種類の MS 培地に加え、MS Fe-EDTA・B5 ビタミン (MS 培地用ビタミンの代わり) を加えた。もやし不定胚誘導培地には植物ホルモンとして 2,4-D を加えた。また、もやし不定胚誘導培地に限り pH は 7.0 に調整した。

【各試料の方法・結果・考察】

〈コシアブラ〉

【方法】

表面を水洗いしてから、洗剤に 30 秒間浸した。葉を約 1~3 cm^2 に切り、再び洗剤に 30 秒、流水で 30 秒、70%エタノールで一分間、流水で 5 回すすぎ消毒した。1%次亜塩素酸水溶液に三分間つけ 5 回以上すすいだ。コーヒー培地に適当な枚数を植え付け、明条件・暗条件下観察した。

【結果】

明条件

葉を植え付けてから何度か培地を移し替え、培養を続けたもののカルスが形成されるものはなかった。

暗条件

明条件に比べると、葉は枯れにくく生き生きとしていたが、カルスが形成されるものはなかった。

【考察】

昨年度の学生自主研究「秋田伝統野菜と山菜のカルス誘導と関連遺伝子についての研究」において、コーヒー培地でのカルス形成が確認されたため、初めからコーヒー培地での培養を試みた。今回は明条件と暗条件に分け培養し、葉が生きている期間に差は現れたものの、どちらの条件でもカルスの形成は確認できなかった。昨年度の自主研究では、NAA 50 μM で BA が 50 μM 前後の濃度条件下でカルスが形成されており、そこからコーヒー培地に移すことでカルス形成が盛んになっていた。このことから、コシアブラのカルス誘導ではまず、NAA・BA が一定の濃度である培地でカルス誘導を始めることが重要であるとわかった。また、採集した元株や時期なども関係していると考えられ、野生の植物を材料とする難しさを知った。

〈八木ニンニク〉

【方法】

1 回目

鱗片の保護葉を剥き、鱗片の貯蔵葉、発芽葉、普通葉を実体顕微鏡下で取り除き、成長点を露出させた。成長点をメスで摘出し盤茎部を切り出した。盤茎部を洗剤に 30 秒、水洗いを 3 回、70%エタノールに 30 秒、水洗いを 3 回した。その後、10%次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間滅菌

し、水洗いを3回行った。その後、培地に着床した。

2回目

1回目の方法で不定胚が観察できたため同様の方法で2回目を行った。

3回目

1回目の方法で不定胚が観察できたため同様の方法で3回目を行った。

【結果】

1回目は1つの試験管内で培地に着床後44日目に不定胚を観察することができた。2回目、3回目で不定胚を観察することはできなかった。



写真1. 八木ニンニクの不定胚

【考察】

不定胚が観察できた試験管以外はコンタミネーションや枯死によって死滅してしまった。原因としてニンニクの滅菌が完全に行われていなかったと考えられる。一方で、不定胚を形成した原因としては滅菌が完全に行われていたこと、培地に含まれていたビタミンが適正濃度であったことが考えられる。

〈五葉豆〉

【方法】

①土で栽培する

1回目

ポリポットに農業試験場からいただいた種を手を加えず植えた。

2回目

3週間ほど経過しても芽が生えなかったため、種の周りの農薬をやすりで削り落としポリポットに植えた。



写真2. 枝豆を育てる様子

②培地で栽培する

1回目

農業試験場からいただいた種を洗剤に30秒、水洗いを3回、70%エタノールに30秒、水洗いを3回した。その後、10%次亜塩素酸ナトリウムで10分間滅菌し、水洗いを3回行った。その後、発芽培地に植え付けた。

2回目

2週間ほど経過したが変化が見られなかったため、種の周りの農薬を落とすため1日間水に浸した。その後、1回目と同様の滅菌処理を行い、発芽培地に植え付けた。

【結果】

①、②のどちらの方法で行った場合も発芽は見られなかった。

【考察】

いずれの培地でもカルス化することはなく、枯死またはコンタミネーションしていた。しかし、コントロール実験で②の方法で行った江戸緑と福獅子は発芽が見られた。このことから、農業試験場からいただいた豆に付着していた農薬を完全に除去できなかったことに原因があると考えられる。



写真3. 育たない五葉豆

【総合考察】

八木ニンニクについて、さらによい培地組成があるかもしれないものの、今回用いた培地条件でカルスを形成していく過程の様子は明らかになったといえると考えている。コシアブラのカルス誘導では、二種類の培地を用いることがカルス誘導への第一歩ではなかったのではないかとと思われる。昨年度の研究成果を参考にしたにも関わらず、カルス化できなかったことは、野外から採集した元株の違いによる個体差や採集時期の違いによる生育段階の差なども関係していると考えられ、野生の植物を材料とする難しさを知った。大豆の一種である五葉豆は、種子を県農業試験場から分与頂いた。コントロールとして用いた一般的な大豆の種子は簡単に発芽したものの、五葉豆は種子に塗布された農薬の影響で、培地上では発芽させることすら困難であった。季節的な問題もあるかもしれないが、人工気象器内でも発芽困難であり、さらに塗布された農薬を除去する操作も行ったものの発芽せず、その影響は想像以上に大きかったと考えられる。

本自主研究を通して植物のカルス誘導における実験の全体的な手順は習得・理解できた。しかし、今回材料とした植物はカルス誘導がまず困難であったため、再分化に至る過程まで調べることができず、その点は残念だった。

【参考文献】

形質転換プロトコール【植物編】 田部井豊 化学同人

目指せにんにく産地！北秋田地区にんにくプロジェクト 川上寛子