

カルス経路のイチゴの大量増殖技術開発と DNA塩基配列シグナルによる突然変異発生リスク評価

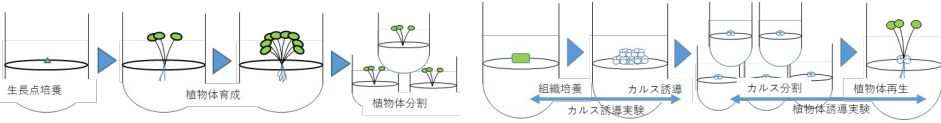
大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 バイオ研究部 2年

<はじめに>

イチゴの生産性を上げるために植物バイオ技術による効率的な苗の大量生産方法の開発に挑戦した。また新しい増殖法における突然変異発生リスクの評価をDNAダイレクトシーケンス分析におけるエレクトロフェログラムの波形を解析することによって行った。

<研究1 大量増殖技術開発>

【現在のイチゴのバイテク増殖法】 【目標とするカルス経路による高効率バイテク増殖法】



<実験計画>

- カルス誘導実験<培養組織：生長点培養苗、葉柄基部と葉身>
植物ホルモン<2,4-DとBAを無添加、0.1 mg/L、1.0 mg/Lで組み合わせた9条件の検討。
- 不定芽誘導実験

植物ホルモン：2,4-Dが無添加、0.1mg/L、1.0mg/L、
BA が無添加、1.0mg/L、2.0mg/L
で組み合わせた9条件の検討。

日長条件：24時間照明4週間から16時間照明へ。

カルス誘導実験

<材料>

園芸高校のバイオ科イチゴハウスで育成している「宝交早生」葉柄、葉身を使用した。またランナー先端の成長点培養で得られた無菌状態の植物体を使用した。

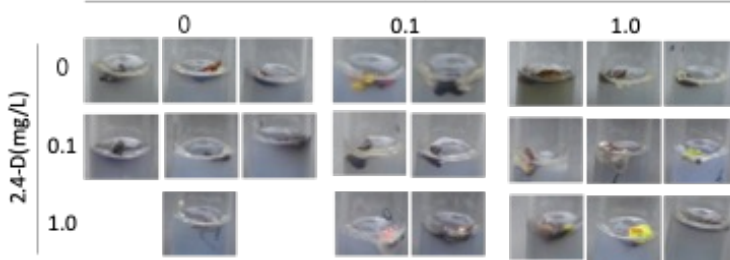


写真1.生長点培養で準備した無菌イチゴ苗(右)

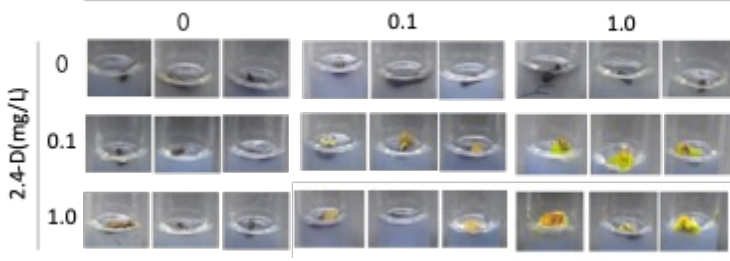
表1.外植体ごとの8週目におけるカルス化率の比較

植物ホルモン (mg/L)		外植体								
		無菌苗			屋外苗(葉柄片)			屋外苗(小葉)		
2,4-D	BA	植付本数	カルス化切片	カルス化率	植付本数	カルス化切片	カルス化率	植付本数	カルス化切片	カルス化率
0	0	3	0	0.0	5	0	0.0	5	0	0.0
	0.1	3	0	0.0	5	0	0.0	5	0	0.0
	1.0	3	0	0.0	5	0	0.0	5	0	0.0
0.1	0	3	0	0.0	5	0	0.0	5	0	0.0
	0.1	3	1	33.3	5	4	80.0	5	1	20.0
	1.0	3	0	0.0	5	1	20.0	5	0	0.0
1.0	0	3	0	0.0	5	2	40.0	5	1	20.0
	0.1	3	0	0.0	5	2	40.0	5	1	20.0
	1.0	3	1	33.3	5	5	100.0	5	2	40.0

BA (mg/L)



BA (mg/L)



BA (mg/L)

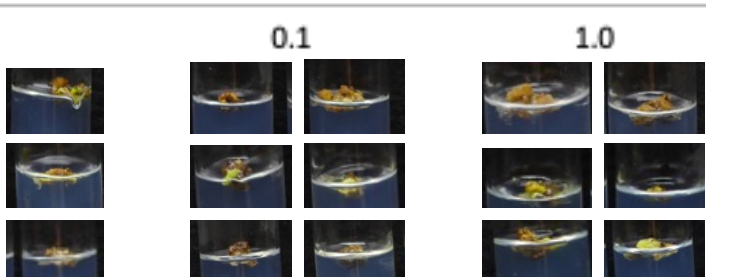


写真4.不定芽誘導実験の16時間日長、培養4週目の様子

<研究2 突然変異発生リスク評価>

カルス経路の再生植物体には、突然変異が発生しやすいといわれている。生産用の苗としては変異の多発はリスクとなる。バイオ研究部では2種の動物が混在する環境DNAのシーケンス分析でのエレクトロフェログラム上の波形シグナルから混在を確認できることを報告している。そこでカルスDNAのエレクトロフェログラムの波形からカルス経路の大量増殖法について突然変異の発生リスクの評価を行った。

<材料>

成長点培養から育成したイチゴ株の葉身(L1)と葉柄から脱分化させた2個のカルス(c1,c2)からキアゲン社DNeasyPlantMiniKitを用いて抽出したゲノムDNAを使用した。

<方法>

抽出したゲノムDNAをテンプレートとし葉緑体DNAmatK領域ユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅した。得られたPCR産物にABI社BigDyeTerminator Ver1.1を用いてフォワード、リバース両方に蛍光標識し、オートシーケンサーSeqStudioを用いて解析した。解析経過で得られたエレクトロフェログラムについて相補的な塩基置換発生シグナルを探索した。

<結果>

オートシーケンサーで得られた塩基配列に多型は認められなかった(図1)。エレクトロフェログラム上で、F側とR側双方に同じ塩基置換が発生している可能性があるシグナルは、カルス抽出DNAに頻発していた(図2、表1)。

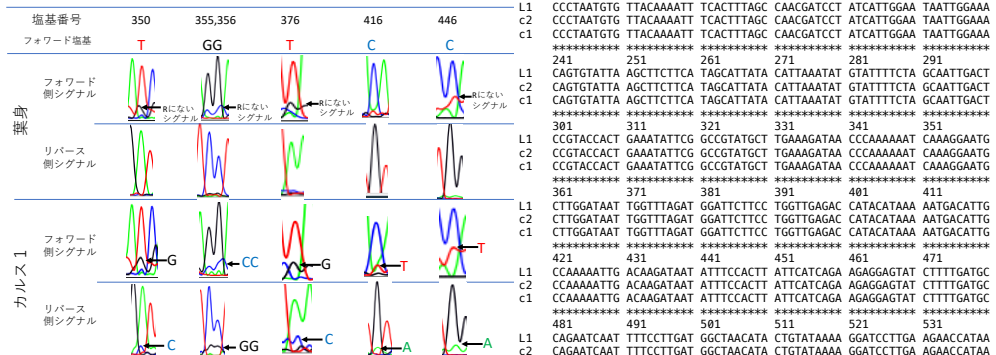


図2.イチゴの成長点培養株葉身とカルスの葉緑体DNAmatK領域の塩基配列解析におけるエレクトロフェログラム上のノイズとフォワード、リバースに相補的に検出される塩基置換発生シグナルの例

表1.イチゴの葉身とカルスの葉緑体DNA matk領域塩基配列解析におけるエレクトロフェログラム上の多型探索

DNA抽出材料	重複解析塩基数	相補的塩基置換シグナル箇所
生長点培養誘導植物体葉身(L1)	704	0
イチゴ誘導カルス		
c1	720	26
c2	709	18

図1.イチゴの成長点培養再生植物体(L1)および誘導カルス(c1,c2)のダイレクトシーケンシングによりオートシーケンサーで得られた葉緑体DNAのmatk領域塩基配列(サンプル間の変異検出なし)

まとめ

- ・大量増殖技術開発
- カルス誘導の培養組織には無菌培養中の幼苗よりもハウス栽培中の葉柄基部が良好である。
- カルス誘導用の植物ホルモンには、2,4-D 1.0 mg/L、BA 1.0 mg/Lの組み合わせが最適である。
- カルスからの不定芽誘導には、16時間日長条件で2,4-Dが0または1.0 mg/L、BAが0mg/Lのホルモン条件の培地が適正である。
- ・突然変異発生リスク
- 成長点培養に比べ、カルス誘導にはDNA上の突然変異発生リスクが高いことが具体的に確かめられた。
- 生産苗の育成時には、苗の品質管理に注意する必要があるといえる。

<参考文献>

植物バイオテクノロジー、農文協、平成14年、P96~99
組織培養による種苗の大量増殖マニュアル
近畿中国試験研究推進会議、平成5年、P33~36