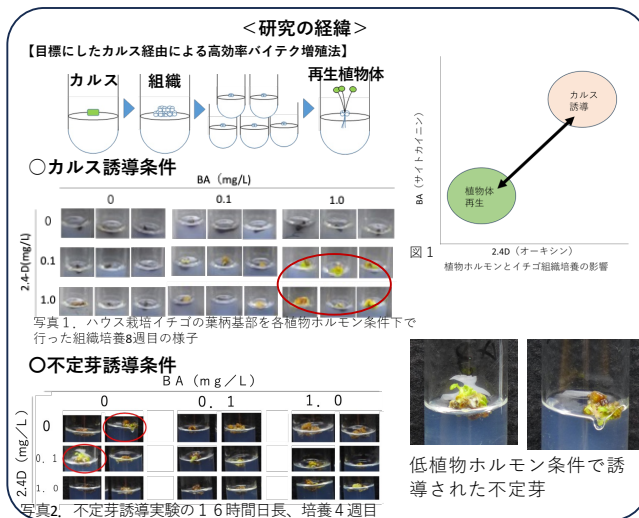


イチゴ組織培養で発生する DNA 突然変異とカルスの変性

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3年 檜原妃莉



＜研究1 突然変異発生リスク評価＞

カルスDNAのシーケンシングの過程で得られるエレクトロフェログラムの波形からカルス経由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、リバーサ両方に蛍光標識し、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>

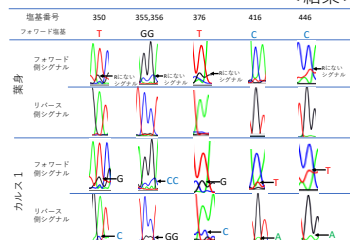
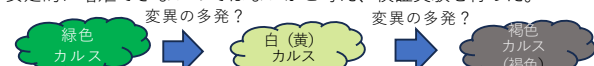


図3. イチゴの成長点培養株葉身とカルスの葉緑体DNAmatK領域の塩基配列解析におけるエレクトフェログラム上のノイズとフォワード、リバースに相補的に検出される塩基置換発生シグナルの例

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芽生(L1)	7 0 4	0
イチゴ誘導株		
C1	7 2 0	2 6
C2	7 0 9	1 8

＜研究2 カルスの変性実験＞

カルスの増殖を図っても、褐変していくものが多く発生した。そこで、私はカルス状態の細胞が不安定で突然変異が多発し、細胞の失活が進行し、安定的に増殖できないのではないかと考え、検証実験を行った。



<方法>

MS培地に＜2,4-Dを1.0 mg/L、BAを1.0, mg/Lで組み合わせ＞て添加した植物ホルモンの条件の培地を調整し、20℃で16時間明期8時間暗期で培養した。葉柄から誘導されたカルスを5 mm程度の切片に切り分け、緑色、白色、褐色の色調別に培養を開始した。2週間毎に4週まで状態を観察し、色調の変化を確認した。

<結果>

色調の変化を表2に示した。緑色のカルスは、供試19個全てが、4週間の間に白色または褐色に変性した。白色のカルスは、供試したほぼ半数はそのままであったが半数は褐色に変性した。褐色のカルスは、供試25個のうち3個だけ白色カルスを生成したが、残りは褐色のままであった。

表2. 分割継代時のイチゴカルス色調の経時的変化

実験開始 時カサ の色調	植付け 切片数	カサの色調								
		2週間後			4週間後			9週間後		
		緑	白	褐色	緑	白(黄)	褐色	緑	白(黄)	褐色
緑色	19	11	4	4	0	12	7	0	0	19
白色	20	1	10	9	0	9	11	0	3	17
褐色	25	0	1	24	0	3	22	0	4	21

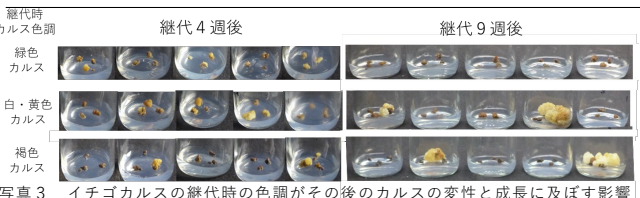


写真3. イチゴカルスの継代時の色調がその後のカルスの変性と成長に及ぼす影響

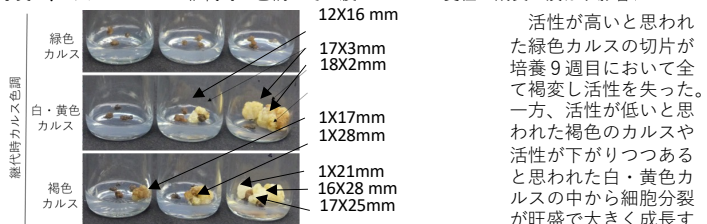


写真4. イチゴカルスの継代時の色調と培養9週目におけるカルスの変性および成長に及ぼす影響

＜研究3 長期カルス培養実験＞

長期間カルスの状態で維持増殖してきた細胞が当初に行い確かめた不定芽形成条件で植物体再生できることを確かめる実験を行った。

<方法>

MS培地に＜2,4-Dを1.0 mg/L、BAを1.0, mg/Lで組み合わせ＞で添加した植物ホルモンの培地を調整し、カルス維持培地として使用した。また、ホルモンフリーのMS培地を不定芽形成培地として使用した。研究2で得られた白色カルスと一旦褐変したカルスから発生した白色カルスをそれぞれ5 mm程度の切片に切り分けた。各切片をカルス誘導培地と不定芽形成培地に置かれ、8週間培養し、観察を行った。

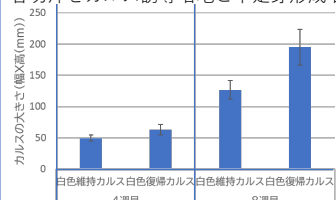


表3. カルス誘導培地での長期培養後における白色維持

<研究4 イチゴ苗の順化実験>

イチゴ苗を試験管内から外部環境へ順化させる条件を模索した。

<方法>

1/2MS培地に四季成リイチゴを播種し、25℃で培養した。得た、無菌植物体の根に<70℃、60℃、50℃、40℃、>の寒天を付着させた。そして、ポリポットに定植後、容器に入れ湿度を保ちながら順化させた。



60℃区	10	1	5	1	3	
50℃区	12	1	4	4	2	1
40℃区	12		3	1	4	4

※：写真6参照

写真6. 順化2週間のイチゴ苗の生育水準を示す尺度(Ⅰ～Ⅴ)

Ⅰ.一部の葉が生育 Ⅳ.生育が旺盛	Ⅱ.小さな葉が生育 Ⅴ.とても生育が旺盛	Ⅲ.葉が生育
----------------------	-------------------------	--------

まとめ

- ・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。
- ・カルス変性実験：イチゴのバクテラを利用した増殖について、カルス経由をした場合、DNA突然変異が発生することで、カルスそのものの、変性が進行し失活していくものが多発することが確かめらる一方、一部に安定的に増殖する白黄色のカルスを得ることができた。
- ・カルス長期培養実験：不定芽形成条件においたすべての切片が失活する一方、カルス誘導培地上では継続して細胞分裂したことは、カルスを長期培養すると細胞分裂は維持できるが、植物体を再分化する能力は消失する。
- ・イチゴ苗の順化実験：寒天処理区では褐変箇所がほとんど見られなかった。また寒天処理50℃区、40℃区では生育水準を示す尺度Ⅳ、Ⅴを確認できたことから寒天処理温度はより低温であることが望ましいことが確かめられた。

＜今後の課題＞

イチゴカルスが長期間、植物体再生能力を維持できる条件を明らかにする。

<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