

コリンオキシダーゼ遺伝子導入ユーカリ(*E. globulus*)の特定網室における耐塩性評価と 生物多様性影響評価

増田 崇人 (筑波大学 生物学類)

指導教員：菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

近年、地球規模の環境変動や環境破壊により植物が生育できない土地が拡大している。人類活動による土壌の塩類集積もその一例で、さらなる砂漠化の原因にもなっている。そこで、環境悪化に歯止めをかける手段の一つとして塩類集積地でも生育可能な耐塩性植物の環境植林が挙げられる。本研究では遺伝子組換え技術を用いた耐塩性ユーカリの開発、および評価手法に関する研究に取り組んでいる。塩生土壌微生物 (*Arthrobacter globiformis*) 由来のコリンオキシダーゼ遺伝子 (*codA*) の植物への導入は、適合溶質として知られるグリシンベタイン (GB) を増加させることで耐塩性に寄与することが知られており、本研究でも既にユビキチンプロモーターで *codA* を発現誘導した組換え *Eucalyptus globulus* (*Ubi-p::codA*)、および *Eucalyptus camaldulensis* における耐塩性向上を確認している。本研究では、新たに作出した CaMV35S プロモーターで *codA* を発現誘導した *E. globulus* (*35S-p::codA*) について、特定網室における耐塩性および生物多様性影響に関する評価試験を実施した。

材料と方法

1. 植物材料： 宿主植物はユーカリ (*E. globulus*) とした。*35S-p::codA* 4 系統 (N3-1, N3-15, N3-26, N6-9)、*Ubi-p::codA* 5 系統 (P1-12, P1-9, P2-1, P12-1, P105-2)、および非組換え体 2 系統 (Au1, M001) の培養苗は共同研究先の日本製紙 (株) から提供された。培養苗は、四角錐ポットに移植して栽培室で馴化した後、特定網室で直径 10.5 cm の黒丸ポットに移植し、10 週間の馴化を行った。馴化後、高さを基準に通常灌水と塩水処理の 2 つのグループに分け、耐塩性評価試験に供した。

2. 耐塩性評価試験： 塩処理は、昨年度石川が *E. camaldulensis* を用いて開発した方法 (75 mM NaCl 水溶液を週 3 回ポット底面から吸水) に従った。水道水を底面吸水したものを対照区とした。試験には各系統 4~15 個体を供した。塩処理は、2013 年 5 月 21 日から 2013 年 7 月 19 日まで 9 週間実施した。処理期間終了後、さらに 7 週間、水道水による通常灌水に切り替え観察を継続した。試験期間中は、およそ 1 週間毎に植物の外形観察、樹高および基部直径の計測、吸水毎に土壌の電気伝導度 (EC 値) の測定をした。

3. 生物多様性影響評価： サンドイッチ法によるアレロパシー検定と、平板培養法による土壌微生物調査を実施した。サンドイッチ法は 6 穴プレートの各穴に乾燥ユーカリ葉および寒天を入れ、各穴の各培地表面に検定植物としてレタス種子 5 粒を播種、室温暗所で培養し、3 日後の発芽率、胚軸長および根長から評価した。平板培養法は、ユーカリを栽培したポット中の土壌を採取し、リン酸バッファーに懸濁し、懸濁液を OGYE 培地および PTYG 培地に塗布し、それぞれ 3 日および 5 日間室温暗所で培養し、生菌数を計測することで評価した。

結果と考察

1. 耐塩性試験： 塩処理開始後 2 週間で EC 値 8 mS/cm に達し、その後試験期間中 EC 値 8~10 mS/cm の範囲で保持された。このことから本処理方法は長期間にわたり一定の塩ストレス条件の土壌環境を模すのに適することが確認された。塩処理開始から 7 週後で非組換え系統はすべて枯死したが、組換え系統では生存するものが認められ、特に *35S-p::codA* 系統では多くの系統が生存した (図)。*35S-p::codA* 系統の高い生存率は *codA* の高発現により、*Ubi-p::codA* 系統よりも GB が多く蓄積したためと考えられる。しかし、対照非組換え系統がすべて枯死したのをはじめ、多くの個体が枯死したため、成長量による比較はできなかった。これは、本処理方法が別種のユーカリの結果に基づいて設計されたものであり本試験に用いた *E. globulus* への塩ストレスとしては強かったことが考察され、*E. globulus* に対して塩ストレス下の成長量による耐塩性評価を行うには、より低濃度の塩水による試験が有効と考えられる。

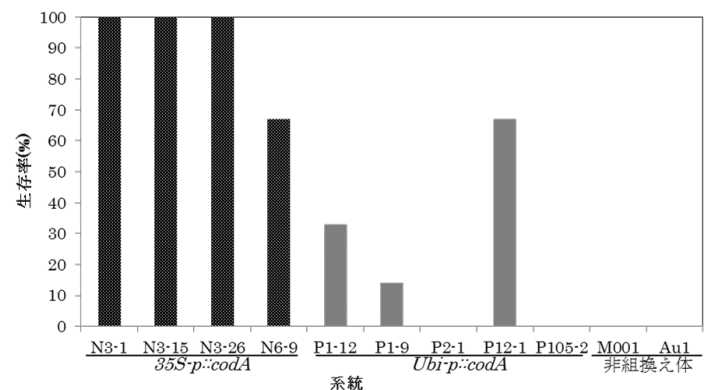


図 塩処理終了時の生存率

2. 生物多様性影響評価： アレロパシー検定および土壌微生物への影響は、組換え体 (*35S-p::codA*) と非組換え体の間で有意な差は認められなかった。一方、アレロパシー検定では、塩処理区と対照区の間で有意な差がみられた。そこで、検定に用いた葉の Na⁺イオン含量を測定したところ、塩処理区の葉の含塩量が対照区より高かったことから、葉に含まれる塩が検定植物の生育に影響したものと推察した。

まとめ

CaMV35Sプロモーターにより従来型系統よりも *codA* を高発現することでより多くの GB を蓄積した新たな系統は、従来型 *codA* 発現系統よりも優れた耐塩性を示した。また、生物多様性に対する影響は対照非組換え体と同等であることを確認した。今後、本研究の結果をもとに詳細な耐塩性評価や隔離ほ場試験等が実施され、将来の本組換えユーカリの塩類集積地への環境植林へとつながることを期待する。