

## 液体振盪発芽実生によるユーカリ属林木の新規形質転換法の開発

熊岡未奈子 (筑波大学 生物学類)

小口太一 (筑波大学 生命環境系)

### <背景・目的>

近年、大気中の二酸化炭素濃度の急激な上昇により地球温暖化が深刻化している。それにより、気温や海水温の上昇、海水面の変動、異常気象など様々な問題が生じている。そこで、この問題への効果的な解決策の1つとして、木本バイオマスの増産・活用や環境植林が挙げられる。そして、植林木の中でも特に注目されているのがユーカリ属林木である。ユーカリ属はオーストラリア原産であり、600種以上あると言われている。そのうち、*Eucalyptus globulus*、*E. camaldulensis*、*E. nitens*を含む10種程度が主に林木として利用されている。他の温帯林木と比べ成長速度が速く、非生物ストレス耐性が高い。更に、材は質のよいパルプ、材木、燃料として利用できる。そのため環境植林と商業植林の両方に使用されており、世界2000万ha以上で栽培されている。

遺伝子組換え技術による分子育種は、トウモロコシ等の作物で既に効果を上げている。永年性の木本植物では交配育種による改良は困難であるため、分子育種による改良は非常に有効と考えられる。ユーカリ属林木の形質転換については、既にいくつかの報告があるが、形質転換効率や完全な個体への再分化、研究室間での再現性などに課題がある。そこで、本研究では液体振盪発芽実生を使用することで簡便かつ高効率なアグロバクテリウム媒介形質転換法を開発することを目的とする。

### <実験材料>

植物材料には、Australian Tree Seed Centre, CISRO Plant Industry から購入したオーストラリア産の *E. camaldulensis* var. *camaldulensis* 種子を用いた (19871)。

### <実験方法>

#### 1) 液体振盪発芽実生の調製及び再分化シュートの誘導

*E. camaldulensis* 種子 400 mg は、を3日間、明所、25°Cで振盪し吸水後、次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した。その後、種子を液体培地 (Gamborg B5 基本培地+ 4-PU 0.2 mg/mL + NAA 0.1 mg/mL) 50 mL を含む xx mL 容三角コルベシへ移し、14日間、暗所、25°C、100 rpm で振盪培養した。得られた実生は、再分化培地 1 (McCown 基本培地 + NAA 0.1 mg/mL + tZatin riboside 10 mg/mL) へ移植し7日間、暗所、25°Cで静置した。7日後、実生の茎頂と子葉を除去し、新たな再分化培地 1 で14日間、明所、25°Cで静置した。その後、再分化培地 2 (1/2 McCown 基本培地 + 1/2 MS 基本培地 + NAA 0.1 mg/mL + tZatin riboside 10 mg/mL) へ移植し14日間、明所、25°Cで静置した。以降14日毎に再分化培地 2 へ移植した。

#### 2) 再分化効率の検証

培地交換の際に再分化シュートを形成した外植片 (実生) 数を計測した。再分化効率は、再分化体数 / 再分化培地 1 へ移植した実生数として算出した。また、最初に再分化培地 1 に移植した際

の胚軸長を画像解析により計測し、胚軸長と再分化効率の関係を調査した。

### <結果>

液体振盪培養により種子400 mgから約370の実生が得られた。得られた実生の胚軸の長さを image-j を用いて測定したところ、1.1~20 mm に分布し、5~10 mm のものが最も多いことが分かった。シュートの再分化培地に移植してから約3週間目から再分化シュートが見られはじめた6週目での再分化効率は、全体で5.7%であった。また、それぞれの胚軸の長さにおける再分化効率を見ると、0~5 mm の長さの胚軸を使用したときに、16.4%と最も高い値を示した。胚軸の長さが長くなるにつれ、再分化効率は減少し、15 mm 以上では0.0%であった。

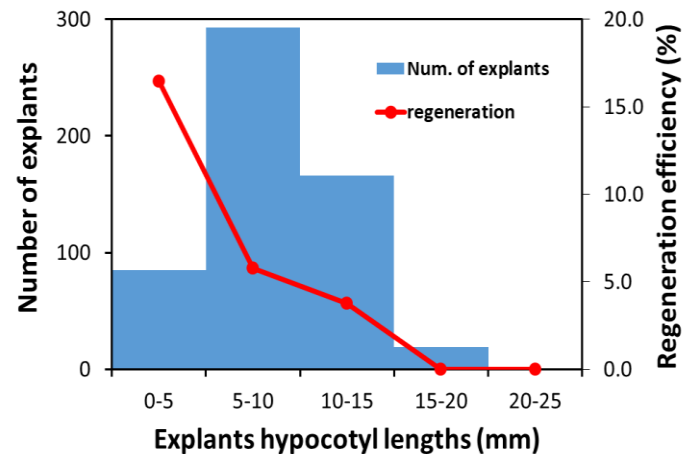


図 胚軸の長さと再分化効率の関係

### <考察と展望>

胚軸の長さが0~5 mm の外植片を使用することで高い再分化効率を得られたことから、液体振盪培養の条件を検討することにより短い外植片を多く調整することでより再分化効率が向上できると考えられる。今後は、今回の結果を踏まえ、更に再分化効率を上げ、形質転換効率を向上させるために培地組成や条件、ホルモン濃度などを検討したいと考えている。今後、形質転換体の選抜条件も検討する。