

## ジャガイモの環境ストレス耐性向上に関する研究

山田 佳穂 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 菊池 彰 (筑波大学 生命環境系)

## 【導入】

植物は環境ストレスにより、その生育に悪影響を受ける。体内の耐性機構により対抗するが、生育が抑制され、高い塩ストレス下では枯死してしまうものが多い。地球温暖化の影響による気候変動などにより、世界的に塩類の蓄積した土壌の割合が増加しているため、現在農作物を生産している地域で将来的に耕作が不可能になることも考えられる。

生産量がトウモロコシ、コムギ、米に次ぐ世界四大作物のジャガイモ(*Solanum tuberosum*)は、可食部が地下に形成されるため塩害に弱く、ストレス耐性の向上に伴うジャガイモの生産可能地域の拡大は食糧問題解決の手段になり得ると考えられる。

ストレス耐性を向上させる手段の一つとして、遺伝子組換えを用いた方法が挙げられる。本研究では、海浜の湿地に生育するアッケシソウから単離された FLA をジャガイモに導入することにより耐塩性が強化されたジャガイモの作出を目指している。

## 【材料】

・ジャガイモ：オランダ由来の品種で、耐塩性や乾燥耐性が比較的高い Desiree を用いた。世界各地で栽培されており、研究材料としても用いられてきた<sup>\*)</sup>。実験に使用する個体は、25°C、16 時間明期、8 時間暗期の条件下で固形 Murashige and Skoog (MS) 培地を使用して継代培養により維持している。

・導入遺伝子：共同研究先の東京農工大学山田研究室により、耐塩性が知られる植物種から耐性に関わる遺伝子の探索が行われ、cDNA ライブラリーを導入した大腸菌の耐塩性スクリーニングにより幾つかの遺伝子が単離された。本研究では、その中からアッケシソウ (*Salicornia europaea*) 由来の Fascicline-like Arabinogalactan Protein (FLA) を使用した。この遺伝子は植物由来で大腸菌の耐塩性を強化することから、多様な生物種で耐塩性を付与する事が期待される。

## 【方法】

1. FLA 導入コンストラクトを保有するアグロバクテリウムの作成

Gateway クローニングシステムによりアグロバクテリウムが保有可能なディステーションベクター pGWB602、pGWB605 にそれぞれ導入した。

これらのベクターは、目的遺伝子を植物の全身で高発現させる 35S プロモーターの下流に連結させるものである。また、pGWB605 は目的遺伝子の下流に GFP が連結されるよう設計されている。

作出されたそれぞれのベクターは、凍結法を用いて LBA4404 株に導入した。

2. アグロバクテリウム法による形質転換体の作出

FLA(pGWB602-FLA、pGWB605-FLA)を導入したアグロバク

テリウムを使用し、非組換え体の葉切片に感染させた。感染後の葉切片は適切なタイミングで培地交換を行った。培地は植物ホルモンを加えた固形 MS 培地を使用した。感染後 6 日間は暗条件下で培養し、その後は明条件下でカルスの形成を誘導した。形質転換体の選抜には除草剤の一種であるバスタを使用した。

## 【結果、考察】

1. FLA 導入コンストラクトを保有するアグロバクテリウムの作成

pGWB602-FLA、pGWB605-FLA の二種類を作成した。シーケンス解析によりベクターへ目的遺伝子が正しく挿入されたことを確認した後、それぞれのコンストラクトを有するアグロバクテリウム(LBA4404 株)を得た。

2. 形質転換体の作出

約 500 枚の葉切片において感染作業を行った。現在まで、形質転換体は得られていないため、カルス形成と再分化形成の二点について考察する。

① カルスが形成されない点

感染を行った後の葉が褐変し、カルスが形成されない外植片が複数見られた。この要因として、継代培養後の経過時間が問題であると推測された。継代作業では、成長した個体の茎頂を約 2~3cm 程度切断し、新しい培地に移植する。移植した茎頂が成長し、葉が感染に使える程度まで大きくなるには 2 週間以上を要する。感染作業上、葉の周囲を切り落とすことから、葉が大きく成長した継代後 4~5 週の葉を用いていた。しかし、継代後時間をおかず 2.5 週が経過した葉を使用すると褐変が起らず、複数のカルスを獲得することが出来た。この結果を基に、今後の感染では継代培養後 2.5~3 週程度の葉を使用することとした。

② 再分化体が形成されない点

カルスの形成後、選抜マーカーであるバスタを添加すると全てのカルスが褐変し、結果として再分化体が得られていない。しかしながら、感染を行わず同じ条件下で培養した葉切片については全ての個体においてカルスの成長が比較的良好なことから、アグロバクテリウムの感染過程、若しくは感染後の培養条件に問題があると考えられる。原因の一つとして、再分化中にアグロバクテリウムと思われる菌が再増殖してくることが培養条件の悪化に関与していることが想定された。

この問題の解決策は現在検討中である。

## 【参考文献】

\*1 Life 11,545 (2021)

\*2 ジャガイモ辞典：財団法人いも類振興会 (2012)