耐塩性遺伝子マンダリンを導入したジャガイモのストレス耐性と生産量についての評価

大森 圭悟 (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】

過剰な塩を含む土壌で植物を生育させると、吸収された塩による浸透圧ストレスやイオンの恒常性の崩壊を引き起こし、その生育が著しく抑制される。近年、地球規模の気候変動や不適切な灌漑によって、世界中で塩害地が拡大しているが、これは作物の耕作に利用可能な農地が減少しているとも言え換えられる。その一方で、現在、増え続ける世界人口に伴う食料需要の増加が発生しており、その需要を賄うための作物生産量の向上が必要とされている。

これらの背景から、対策の一つとして、主要作物の耐塩性を強化することが考えられている。本研究で扱うジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) は、世界中で広く栽培されている重要作物であるが、可食部が土中の塊茎であるため土壌からの塩ストレスに曝されやすい。本研究では、耐塩性遺伝子「マンダリン」を導入した新規系統の作出を目指すとともに、既存の組換え体を用いて、塩ストレス条件下での成長性と生産量、葉における活性酸素量を可視化し、マンダリン導入系統の耐塩性評価を試みた。

【材料】

・ジャガイモ：本研究では、古くから研究材料として使用され^{*1}、耐塩性が比較的高いオランダ由来の品種 Desiree を用いた。また、使用したマンダリン遺伝子組換え系統(114-1、144-6)は先行研究により Desiree を用いて作出された。非組換え体(NT)を含む系統は Murashige and Skoog (MS) 固形培地上で継代培養 (25°C、16 時間明期、8 時間暗期)し維持している。

・導入遺伝子：マンダリン遺伝子は熱帯および亜熱帯地域の河口汽水域で生育する塩生植物であるマンダローブの一種、オバナヒルギ (*Bruguiera sexangula*) から単離された耐塩性遺伝子である^{*2}。マンダリンタンパク質は葉緑体に局在し、分子シャペロン様の活性を持つことやマンダリン遺伝子の導入によってタバコ (*Nicotiana tabacum*) やユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*) で耐塩性が向上したことが報告されている^{*3}。

【方法】

1. 組換え体作出：継代後 3~5 週間後の植物体の葉を用いて、アグロバクテリウム法によりジャガイモにマンダリン遺伝子を導入した。アグロバクテリウムを感染させた外植片を、植物ホルモンを加えた MS 固形培地の上で培養し、カルスの形成と再分化体の形成を誘導した。導入した遺伝子にはマンダリン遺伝子の他に除草剤 (グルホシネート) に対する耐性遺伝子も含まれており、適当な時期に再分化誘導用の培地に除草剤を加えることで、除草剤耐性をもつ組換え体のみ再分化体を誘導した。さらに、得られた再分化体を除草剤が含まれる MS 固形培地上で培養し、発根が確認できた個体を組換え体候補系統とした。

2. 成長・生産量評価：NT と組換え体について、約 1 ヶ月間の順化後、特定網室に移動し、0、50、150 mM NaCl の灌水処理区に分けて、13 週間の栽培評価を行った(2023.11.01~2024.01.31)。

評価項目は、成長量、光合成量子収量(QY)、葉緑素量の指標となる SPAD 値、生産量の 4 つである。前者 3 項目は 1 週間毎に計測を行い、QY は FluorPen 100 を、SPAD 値は葉緑素計 SPAD-502 を使用した。生産量は栽培終了後、地上部の乾燥重量、塊茎の個数、塊茎重量、塊茎比重を測定することで評価を行った。

3. 生理的耐性評価：通常、環境ストレスに曝された植物では体内の活性酸素(ROS)を除去しきれなくなり酸化障害を被るが、マンダリン導入系統では ROS による障害の抑制が期待される。そこで、ROS の 1 種である H₂O₂ により酸化重合し、茶褐色の沈殿を生じる 3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB) を用いた染色を行い、組換え体の環境ストレス耐性を評価した。

継代後 4 週間の植物体の茎頂側から数えて 3 番目の葉をシャーレに乗せ、チャンバー内で 2 週間、低温下で光ストレスを与えた (10°C、150 μmol/m²/s)。ストレス期間終了後、取り出した葉に対して、10 mM MES バッファー(pH 6.5)を含む 1 mg/ml DAB を用いた 5 分おき 3 回の真空浸潤を行い、暗所で一晩浸した。その後、70°C の 90% エタノールで 3 時間インキュベートして反応を停止させ、70% エタノール中で観察、撮影を行った。さらに、撮影した写真を解析し、染色度合いを数値化した。

【結果と考察】

1. 組換え体作出：これまでに約 200 枚の葉切片に対し感染作業を行い、十数個体の再分化体を得ることができたが、いずれも除草剤を含む培地での発根が見られなかったことから組換え体ではないと考えられる。今後も新たな組換え体の獲得を目指すとともに、形質転換に用いるアグロバクテリウム株をより感染効率の高い株に変更することを検討している。

2. 成長・生産量評価：栽培 11 週目までの経過として、114-1、144-6 は NT と比較して塩ストレス下において有意に成長量が大きく、150 mM の塩ストレス下において有意に高い SPAD 値を維持している。また、葉の健全度の指標となる QY については系統間での差は見られていない。最終的な生育状況や収量については、栽培終了後に測定結果をまとめ、発表会にて報告する。

3. 生理的耐性評価：現在評価中であるため、詳細は発表会にて報告する。

【参考文献】

- *1 ジャガイモ辞典：財団法人いも類振興会 (2012)
- *2 Plant Cell Physiology 43: 903-910 (2002)
- *3 Journal of Plant Research 126: 141-150 (2013)