

試験研究成果普及情報

部門	バイテク	対象	研究
課題名:エレクトロポレーション法による除草剤耐性ベントグラスの作出			
[要約]エレクトロポレーション法(電気穿孔法)によるベントグラスへの遺伝子導入条件を検討し、バッファー液の最適pH値やパルス幅等を明らかにした。その条件により「チバグリーン B-2」等へ ビアラホス耐性(bar)遺伝子を導入し、除草剤(ビアラホス剤)散布に対して耐性を示す形質転換体を獲得した。			
キーワード(専門区分)バイテク(研究対象)その他(花き)ー対象作物なし			
(フリーキーワード)エレクトロポレーション、bar遺伝子、高pH、除草剤耐性			
実施機関名(主 査) 農業試験場 生物工学研究室			
(協力機関) 農業試験場 花植木研究室			
(実施期間) 1994年度～1997年度			

[目的及び背景]

ゴルフ場での無農薬管理技術の確立を最終目的に、組換えDNA技術を用いてベントグラスへの有用遺伝子導入を行い、耐病虫性等の形質を付与した芝草の作出に取り組んでいる。そこで先ず、有用遺伝子を導入した形質転換体を安定的に作出するため効率的な遺伝子導入条件を確立し、選抜マーカーとしても利用できるbar遺伝子を導入した形質転換体を作成する。

[成果内容]

- ベントグラス(品種:「ペンクロス」)について、カルス誘導、再分化、液体振とう培養およびプロトプラストの単離・培養の諸条件を明らかにし、プロトプラスト培養系を確立した。
- 遺伝子導入機種ECM-600(BTX社)における導入条件を調べるため GUS遺伝子を用いた形質発現による比較試験を実施し、電界強度550V/cm、静電容量2750 μ Fおよび抵抗値720 Ω を最適条件として設定した。また、導入効率およびプロトプラストの生存率はパルス幅を39～40msecにした時最も効果が高かった。さらに電極間を4mmに修正したチャンバー191BC(盟和商事)を用いて、プロトプラストとDNAの混合液を2.5ml加えることによりその条件が達成できる(表1)ことを明らかにした。
- 導入に用いるバッファー液はアスパラギン酸バッファーの効果が高いことを確認した。さらに添加するカルシウムをグルコン酸CaからCa(NO₃)₂に換え、pHを高めることにより導入効率が上昇することを確認した。最適値はpH 9.0であった(図1)。
- 上記の方法を用いてビアラホス耐性遺伝子(bar)を導入した形質転換体を獲得した。順化個体に対して除草剤ビアラホス剤(1.0%)を散布した2週間後の結果は、対照では0.1%の低濃度でもほぼ枯死状態であったのに対して、組換え体では強弱はあるもののいずれの系統でも耐性を示した(表2)。また、散布後3日目の葉内アンモニア発生量は、散布試験で強い耐性を示した系統の発生量は明らかに少なかった(図2)。また比較的弱い系統の発生量は3日後では対照と同程度であったが枯死には到らず、その後回復したものと推察された。
- 同様にして耐病性ベントグラス「チバグリーン B-2」についても、除草剤散布に対して耐性を示す系統を数系統獲得した(図3)。

[留意事項]

作出した形質転換体を実用化するにあたっては、文部科学省、農林水産省の定めたガイドラインに従った安全性審査の評価を実施しなければならない。

[普及対象地域]

[行政上の措置]

[成果の概要]

[普及状況]

[成果の概要]

表1 エレクトロポレーション法におけるチャンパーへのDNA混合液充てん量の影響

DNA液量 ml	パルス幅 msec	生存率 %	GUS活性値 4MU pmol/min /mg protein
2.0	46.7	78.6	183.8
2.5	39.7	74.3	197.4
3.0	32.3	91.7	112.3

注)導入装置:ECM-600(BTX),チャンパー:修正191BC
電界強度:550V/cm,静電容量:2750 μ F,抵抗値:720 Ω

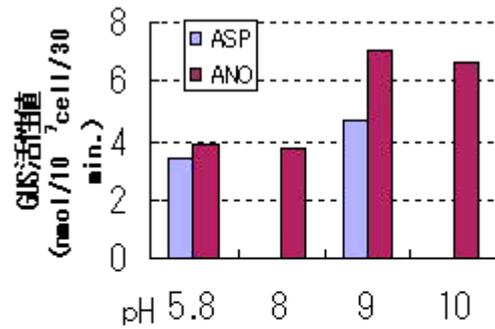


図1 エレクトロポレーション法における導入効率に及ぼすバッファのpHの影響
ASP:70mMアスパラギン酸, 5mMグルコン酸Ca
5mM MES, 0.4Mマンニトール
ANO:ASPのグルコン酸CaをCa(NO₃)₂に変更

表2 組換え体の除草剤(ピアラホス剤)散布に対する耐性調査

系統	散布濃度別の被害程度				
	0	0.1	0.5	1.0	2.0%
①	-	-	-	-	±
②	-	-	-	-	±
③	-	-	-	±	±
④	-	-	-	±	±
⑤	-	-	-	±	±
⑥	-	-	±	+	+
CONT	-	++	+++	+++	+++

注1)調査日:散布14日後
2)被害程度(-~+++):5段階
-:無,±:微,+ :少,++:多,+++ :甚

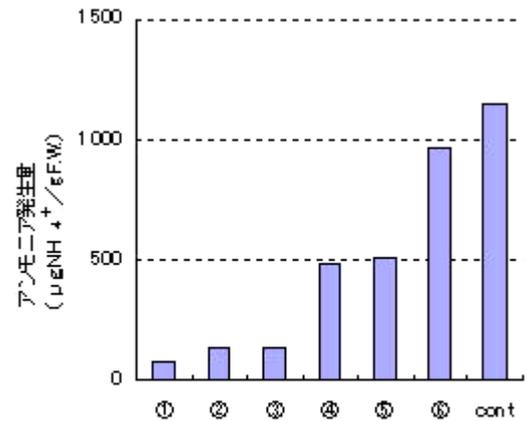


図2 ピアラホス剤(1.0%)散布後3日目の葉内のアンモニア発生量



図3 除草剤耐性遺伝子を導入した「チバグリーンB-2」の形質転換体
左:形質転換体、右:非形質転換体
ピアラホス剤(1.0%液)散布1週間後

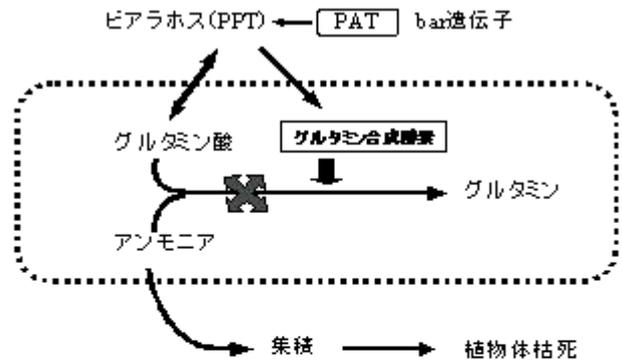


図4 ピアラホス耐性遺伝子の発現機作
ピアラホス剤を散布するとその殺草成分であるPPTがグルタミン合成を阻害するためアンモニアが集積して植物が枯死する。
bar遺伝子はPPTをアセチル化する酵素(PAT)をコードした遺伝子で、その反応を不活化することができる。

[発表及び関連文献]

平成6、9年度生物工学試験成績書
芝草研究大会誌24号(1995)、同28号(1999)
Plant Cell Reports(1998)17:963-967