

ダイズわい化病抵抗性素材獲得を目指したパーティクルボンバートメント法による ダイズ形質転換体の作出

藤郷誠・吉田泰二・日高操

(東北農業研究センター)

Production of transgenic soybean by particle bombardment toward the acquirement of Soybean Dwarf Virus resistant lines

Makoto Tougou, Taiji Yoshida and Soh Hidaka

(National Agricultural Research Center for Tohoku Region)

1 はじめに

ダイズわい化病は北日本におけるダイズ生産に深刻な被害を与えており、本病抵抗性品種の早急な育成が望まれているが、有効な遺伝資源が見いだされていないために人工交配等による育種が遅れている。

本研究では、SbDVの全塩基配列をもとに外被タンパク質遺伝子等の抵抗性付与領域を単離して、ダイズへの導入をパーティクルボンバートメント法により図り、SbDVに対する抵抗性を持つ素材の開発を目指している。

2 試験方法

古谷らの方法¹⁾によりダイズ形質転換体の作出を試みた。ダイズ(品種名 Jack)の未熟子葉を2.4-D(40mg/L)を含んだMS培地(D40培地)に置床し、2週間毎に2回継代し、不定胚を誘導した(図1)。誘導された不定胚を2.4-D(20mg/L)を含んだMS培地(D20培地)に置床し、2週間毎に継代し、不定胚を増殖させた。パーティクルガン(PDS-1000/He)を用い、ガス圧1,100psi、発射距離9cm、金粒子直径1.6 μ mで導入した。co-transformationにより選抜マーカーとしてプラスミドEI2 Ω -HPT(ハイグロマイシン耐性遺伝子)、抵抗性付与領域としてEI2 Ω -SbDVCP(SbDVの外被タンパク質遺伝子)をそれぞれ用いた。不定胚はその後、ハイグロマイシンを含む液体培地で選抜した。ハイグロマイシン濃度を15mg/Lから20mg/Lに、更に30mg/Lへと段階的に選抜圧を高めていった。不定胚塊を成熟液体培地に移し、増殖させた後に、シャーレの上で乾燥させた。4日後にホルモンフリーのMS培地に移植して発根を促した。その後、正常に発育する個体を適宜パーミキュライト入りのポットに移植し、馴化させた後、閉鎖温室に移し、生育させた(図2)。

導入遺伝子は選抜個体の葉よりゲノムDNAを抽出して、PCRによりハイグロマイシン耐性遺伝子および外被タンパク質遺伝子検出用プライ

マーを用いて、それぞれ確認した。

3 試験結果及び考察

ダイズ不定胚誘導からハイグロマイシン耐性選抜個体を鉢上げするまで約8ヶ月、種子を採取するまでさらに約4ヶ月を要した。草型は蔓化し、稔性がやや劣る傾向を示した。

T₀世代においてPCRによりハイグロマイシン耐性遺伝子および外被タンパク質遺伝子検出用プライマーを用いて、それぞれ導入遺伝子の確認を行ったところ、両方の遺伝子が導入されていると思われる個体が存在した(図3)。T₀世代でのゲノミックサザンを行ったところ、ハイグロマイシン耐性遺伝子および外被タンパク質遺伝子が導入されていることが確認された。外被タンパク質遺伝子の導入が確認された任意のT₀世代1個体から採取された種子を播き、T₁世代を生育させてPCRによる導入遺伝子の確認を行ったところ、分離が見られるが導入遺伝子が後代へと遺伝していると思われる個体が存在した(図4)。

4 まとめ

以上の結果よりパーティクルボンバートメント法によりSbDVの外被タンパク質遺伝子をダイズに導入することが出来た。今後はT₁世代において外被タンパク質遺伝子の遺伝が確認された個体より採種し、T₂世代を得て、SbDVに対する抵抗性を検定する。また、上記の方法を用いて多数の遺伝子導入系統を得るとともに、他の抵抗性付与領域を選定し、導入を試みる。

引用文献

1) 古谷規行, 日高操 ボンバートメント法によるダイズモザイクウイルス外被タンパク質遺伝子のダイズへの導入 育種学研究 3(別2), 2001 p.104

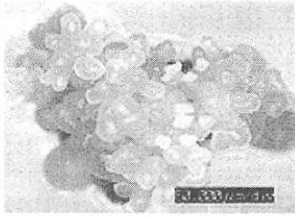


図1 ダイズ未熟種子子葉から誘導した不定胚(品種 Jack)

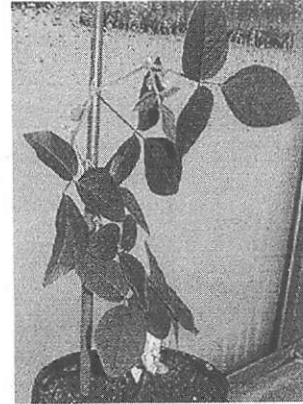


図2 パーティクルボンバートメント法による SbDV の外被タンパク質遺伝子導入個体(T₀)

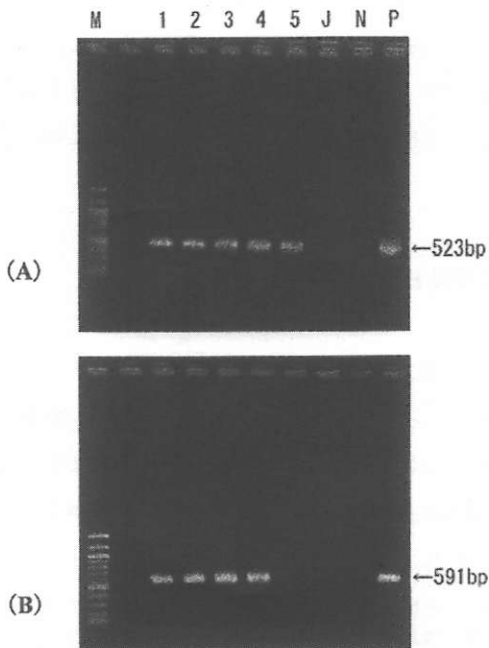


図3 選抜ダイズ(T₀)の PCR 法による導入遺伝子の確認
(A)ハイグロマイシン耐性遺伝子
(B)SbDV の外被タンパク質遺伝子
M: 分子量マーカー(100bpDNA Ladder NEB)
1~5: 選抜個体(T₀)
J: 非形質転換体 (Jack)
N: Negative control (Water)
P: Positive control (Plasmid)

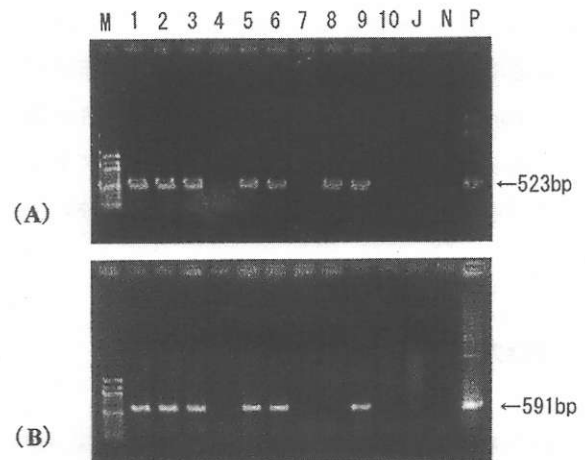


図4 選抜ダイズ(T₁)の PCR 法による導入遺伝子の確認
(A)ハイグロマイシン耐性遺伝子
(B)SbDV の外被タンパク質遺伝子
M: 分子量マーカー(100bpDNA Ladder NEB)
1~10: T₁ 個体
J: 非形質転換体 (Jack)
N: Negative control (Water)
P: Positive control (Plasmid)

謝辞

ダイズ形質転換体作成に当たり、京都府農業資源研究センターの古谷規行主研(現京都府農産流通課)に技術的な指導と助言をして頂き感謝いたします。