

試験研究成果普及情報

部門	花植木	対象	研究
課題名：複製酵素遺伝子導入によるオドントグロッサムリングスポットウイルス抵抗性ランの作出法			
<p>[要約] ランに発生する病原体である、オドントグロッサムリングスポットウイルス（ORSV）由来の複製酵素遺伝子を単離し、ラン科植物へ遺伝子導入を行ったところ、抵抗性の個体が認められ、導入遺伝子の有効性を確認した。この方法により、ORSV 抵抗性ランの作出ができる。</p>			
<p>キーワード ラン、ウイルス抵抗性、複製酵素遺伝子、遺伝子組換え、オドントグロッサムリングスポットウイルス</p>			
実施機関名	<p>主 査 農林総合研究センター・生産環境部・生物工学研究室 協力機関 千葉大学園芸学部</p>		
実施期間	2008年度～2011年度		

[目的及び背景]

ラン科植物では、ウイルス病による品質低下が問題となるため、茎頂培養により、効率的な種苗増殖とウイルスフリー化を行っているが、ウイルスの再感染や病原ウイルスの除去が不完全であること等により、時間の経過とともにウイルス病を発症する事例がある。

これまでに植物ウイルスの複製酵素遺伝子を単離し植物へ導入することにより、そのウイルスに対する抵抗性植物が得られることが報告され、本県においてもキュウリモザイクウイルス（CMV）抵抗性トマトを作出した。この手法により、ランに発生する病原体である、オドントグロッサムリングスポットウイルス（ORSV）由来の遺伝子の機能の評価を目的として、ウイルスの複製酵素遺伝子を単離し、ラン科植物への遺伝子導入実験を行い、その機能を確認する。

[成果内容]

- 1 ORSV の複製酵素遺伝子を単離し、ORSV 複製酵素遺伝子を組み込んだ遺伝子導入用ベクターを作製した（図1）。
- 2 1で作製したベクターを用いて、アグロバクテリウム法により千葉大で誘導され維持されてきたコショウラン無菌培養物（プロトコーム様体）に遺伝子導入操作を行った。抗生物質添加培地で選抜することにより得られた個体について、PCR法で遺伝子が導入されたことを確認した（図2、図3）。
- 3 2で作出した個体について、ORSVを接種し血清反応によりウイルス感染の有無を調べたところ、感染が認められない個体があり抵抗性が付与されたと考えられた。このことから、用いた遺伝子がランに抵抗性を付与する機能があることを確認した（表1）。
- 4 以上の方法により、ORSV 抵抗性ランの作出ができる。

[留意事項]

遺伝子導入が確認されたにもかかわらず、ウイルス感染が認められた個体については、遺伝子が挿入された染色体上の位置によって導入遺伝子の発現に差異が認められるポジションエフェクトと呼ばれる現象によるものと推察される。

[普及対象地域]

生物学及び育種関連の研究者

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

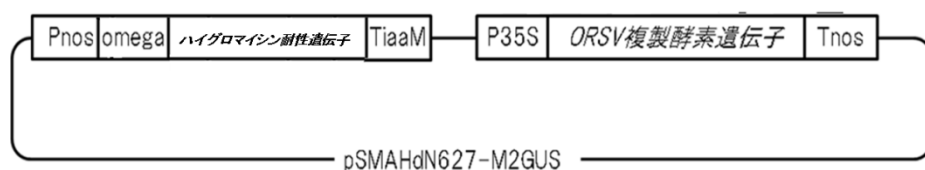


図1 使用した遺伝子導入ベクターの構造

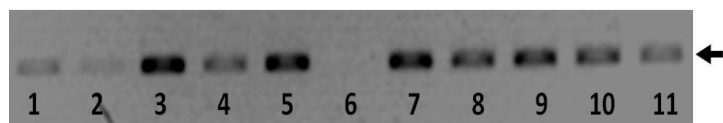


図2 遺伝子導入個体のPCR法による確認結果

注) 図中の番号は表1の個体番号と同じ。右の矢印の高さに黒いバンドが認められるものが遺伝子が導入された個体

図3 作出された遺伝子導入コチョウラン

表1 遺伝子導入個体におけるORSV接種試験の結果

個体番号	導入遺伝子*	ウイルス感染**
1	+	+
2	±	+
3	+	+
4	+	+
5	+	—
6	—	+
7	+	—
8	+	—
9	+	—
10	+	—
11	+	+

*) +は遺伝子導入が確認された個体

—は遺伝子導入されなかった個体

±は遺伝子導入が不明瞭だった個体

**) —はウイルス感染が認められず、抵抗性の付与が確認された個体

+はウイルス感染が認められた個体

[発表及び関連文献]

1 Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus resistant to the virus, Proc Natl Acad Sci USA 87, 1990

2 CMV複製酵素遺伝子導入トマトにおけるCMV抵抗性、平成13年度試験研究成果普及情報

3 *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Cattleya* with an *Odontoglossum ringspot virus* replicase gene sequence, Plant Biotechnology 27, 2010

[その他]

平成18～23年度千葉県・千葉大学連携推進協議会採択課題