

## Selection of herbicide-tolerant soybean cells and mechanism of tolerance to oxyfluorfen

著者	Pornprom Tosapon
内容記述	Thesis (Ph.D. in Agriculture)--University of Tsukuba, (A), no. 1345, 1995.3.23
発行年	1995
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/4127">http://hdl.handle.net/2241/4127</a>

氏名(国籍)	トッサポン ポーンプロム (タイ)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,345号		
学位授与年月日	平成7年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Selection of Herbicide-Tolerant Soybean Cells and Mechanism of Tolerance to Oxyfluorfen (除草剤抵抗性大豆細胞の選抜とそのオキシフルオルフェンに対する抵抗性機構)		
主査	筑波大学教授	農学博士	石塚 皓造
副査	筑波大学教授	農学博士	白井 健二
副査	筑波大学教授	農学博士	上田 堯夫
副査	筑波大学助教授	農学博士	松本 宏

## 論文の要旨

本論文研究はダイズの培養細胞を用いて各種除草剤に対する抵抗性を検定し、その中からオキシフルオルフェンに対する抵抗性細胞を選抜したこと、その抵抗性の生理生化学的機構を攻究したことから成り立っている。

ダイズ (*Glycine max* L. cv. Enrei) 幼植物体胚軸組織よりカルスを誘導し、それを振盪培養することにより細胞懸濁液を得た。培地に化学構造や作用機構の異なる3種の除草剤オキシフルオルフェン、イマザキン、フルアジホップ-P-ブチルを加えて、細胞生長に対する阻害度を調べた。夫々  $5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-5}$ M が50%阻害濃度 ( $I_{50}$ ) であった。イマザキンおよびフルアジホップ-P-ブチルについてはそれらの50%阻害濃度より培地中濃度を高くすると細胞の生長が停止し、継代培養による抵抗性細胞の選抜は成功しなかった。しかしオキシフルオルフェンは  $10^{-6}$ M,  $5 \times 10^{-6}$ M と培地中濃度を高くしていても、ほぼ除草剤無処理細胞(平常細胞と稱す)と同じ生長速度を示す細胞が得られた。 $I_{50}$ により比較すると平常細胞の約100倍の抵抗性が示されたこととなる。更に、この抵抗性は細胞を除草剤を含まない培地を用いて継代培養を続け、少なくとも6ヶ月から1年間失われなことが確認された。

オキシフルオルフェンに対する抵抗性の生理生化学的機構について検討が加えられた。先ず $^{14}\text{C}$  標識除草剤を用いて、この化合物の細胞内への取り組みを調べた所、抵抗性細胞への取り込み量が平常細胞に比べて約10%小であったが、両種細胞ともよく取り込むことが明らかとなった。

オキシフルオルフェンがジフェニールエーテル系除草剤の作用の特徴となっている光要求性を示す

かどうか検討した。100 $\mu$ En<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>の光強度下で、平常細胞は10<sup>-8</sup>M オキシフルオルフェンにより生長が完全に停止したが、抵抗性細胞は10<sup>-7</sup>M でも生長抑制は認められなかった。オキシフルオルフェンの作用には光の存在が必要であるが、その条件下でも抵抗性細胞はオキシフルオルフェンの影響を受け難いことが明らかとなった。

一方、体内に取り込まれたオキシフルオルフェンは体内代謝により変化するが、両種の細胞共変換生成物の生成率は小であり、両者間の差は認められなかった。

ジフェニールエーテル系除草剤の作用機構として考えられている光増感中間体の集積、それらの代謝による活性酸素の生成、ならびに活性酸素消去系の活性化について検討を行った。平常細胞ではオキシフルオルフェンを与えると protoporphyrin IX の集積が認められるが、抵抗性細胞ではそれに比較して少量の集積が認められたのみであった。また、protoporphyrinogen oxidase の阻害度についても抵抗性細胞では比較的小であった。その時の I<sub>50</sub>は夫々 5 × 10<sup>-10</sup>、6 × 10<sup>-9</sup>M であり、当酵素の阻害度に約10倍の差が認められた。

活性酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 生成促進作用を持つローズベンガルによる生長阻害は両種の細胞共に認められたので、抗酸化系についての両者の差は無いものと判断された。

抵抗性細胞を用いて、他の除草剤に対する交叉抵抗性を調べた。作用発現に光を要求する除草剤数種に対して認められたが、ベンスルフロンメチルには示さなかった。

抵抗性機構としては protoporphyrinogen oxidase 阻害度が小であり、光増感中間体の生成が小となったことが主たる抵抗性の要因と結論された。

## 審 査 の 要 旨

本研究は除草剤に対する植物の抵抗性の作出への試みであると共に、除草剤の作用機構についての基礎的研究となるものである。

植物の培養細胞の培地中に除草剤を低濃度にて与え、継代培養を続ける中でその濃度を次第に増大させて抵抗性を示す細胞群を選抜するという方法を採用している。ダイズ細胞よりジフェニールエーテル系除草剤の1つであるオキシフルオルフェン抵抗性の細胞を選抜した点は新しい知見であり、更に後述の如く作用発現に光を必要とする一連の除草剤に対しても交叉抵抗性を示したので、広い範囲の化学物質にわたった除草剤抵抗性植物の作出に成功する礎を築いたものと評価できる。

第一次作用点として光増感中間体の集積に関与する protoporphyrinogen oxidase の阻害作用をつきとめ、抵抗性細胞はその阻害を受け難い点を明らかにした点は高く評価できる。ただ、その酵素の阻害度が両種細胞間で10倍程度であり、濃度—阻害度の関係がかなり低濃度域から直線的になっている点など未だ検討しなければならぬ点が指摘された。抵抗性細胞の選抜には成功したが、それらの細胞の染色体数の確認等抵抗性についての内容確認と植物体への再分化の試みが必要であり、今後の研究の発展が望まれる。

よって、著者は博士（農学）の学位をうけるに十分な資格を有するものと認める。