

実験成績証明書

平成16年6月7日

1. 実験日： 平成12年9月～平成13年3月
2. 実験場所： 中央農業総合研究センター北陸研究センター
稲機能解析実験棟ゲノム解析室、機器分析室及び稲開発温室
3. 実験者： 農業・生物系特定産業技術研究機構
中央農業総合研究センター 北陸地域基盤研究部
川田 元滋
4. 実験の目的
本願発明のタンパク質が、種々の病原菌（真菌及び細菌）に対する抵抗性を付与することを確認する。
5. 実験内容
 - (1) 緒論
本願発明のタンパク質は、複数の種類の病原菌に対する抵抗性（複合病害抵抗性）を植物に付与することができるという極めて優れた性質を有する。
そこで本実験では、本願発明のタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え植物を用いて、種々の病原菌に対する抵抗性を調べた。
 - (2) 実験方法
 - a) 本願発明のタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え植物の作出
組換え植物は、本願明細書【0050】～【0054】の項に記載の方法に従って、イネ品種「どんとこい」を用いて作出した。
 - b) 各種病原菌の接種
病原菌として、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*)、白葉枯病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)、苗立枯細菌 (*Pseudomonas plantarii*) 及び粉枯細菌 (*Burkholderia glumae*) を使用した。いもち病菌は、複数の系統 (007、037、047、077、137、337 及び 477 系統) を使用した。
いもち病菌は、病原性を保持していることを確認した菌糸集団をオートミール固形培地に接種し、培養して得られた胞子を界面活性剤を含む蒸留水に懸濁して調製した。
白葉枯病菌、苗立枯細菌及び粉枯細菌は、病原性を保持していることを確認した菌集団から分離したコロニーを、各病原菌に応じた液体培養液中で増殖させて調製した。

いもち病菌は、組換え植物を土壌に蒔き、4-5葉期に病原菌液を噴霧して感染させた。
白葉枯病菌は、組換え植物を土壌に蒔き、成葉期に病原菌液に浸漬した器具（ハサミ）で成葉の末端を切断して感染させた。

苗立枯細菌及び粉枯細菌は、組換え植物から得られる種子を、病原菌液に浸漬して感染させた。

c) 病原菌に対する抵抗性（発病度）の評価

いもち病菌に対する抵抗性は、組換え植物と非組換え植物について病斑面積率（%）を調査し、比較することによって調べ、非組換え植物を100とした場合の組換え植物の発病度として表した。

白葉枯病に対する抵抗性は、組換え植物と非組換え植物について、切断部からの病斑の伸張（cm）を測定し、比較することによって調べ、非組換え植物を100とした場合の組換え植物の発病度として表した。

苗立枯細菌に対する抵抗性は、感染させた種子を発芽及び生育させて、正常に生育する個体数と、同様に処理した非組換え植物の種子から生育する個体数とを比較することによって調べ、非組換え植物を100とした場合の組換え植物の発病度として表した。

粉枯細菌に対する抵抗性は、感染させた種子を発芽及び生育させて、正常に生育する個体数と、同様に処理した非組換え植物の種子から生育する個体数とを比較することによって調べ、非組換え植物を100とした場合の組換え植物の発病度として表した。

6. 結果

上記実験により得られた結果を図1及び2に示す。

図1に示すように、本願発明のタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え体は、細菌及び真菌を含む病原菌に対して顕著な抵抗性を示した。具体的には、組換え体においては、真菌により引き起こされるいもち病は、原品種（100）と比較してその発病度が約20以下となり、細菌により引き起こされる白葉枯病、苗立枯細菌病及び粉枯細菌病は、原品種（100）と比較してその発病度が約45～60未満となった。

また、図2に示すように、本願発明のタンパク質をコードする遺伝子を導入した組換え体は、いもち病菌（真菌）の種々の系統に対して非特異的に抵抗性を示した。具体的には、組換え体においては、種々の系統のいもち病菌により引き起こされるいもち病が、原品種（100）と比較してその発病度が約10未満～55となった。

従って、本実験により、本願発明のタンパク質は種々の病原菌に対する抵抗性を付与し、またその抵抗性も植物における病害防除にとって有効な程度に高いものである。従って、本願発明のタンパク質及びそれをコードする遺伝子を用いることにより、複合病害抵抗性植物を作出可能であることが確認された。

上記の本願発明のタンパク質の性質（複合病害抵抗性の付与）は、従来の抗菌性タンパク質には見出されていない顕著かつ有利な効果である。

