

第2節 アセトインの比色分析法による除草剤抵抗性の迅速検定法

スルホニルウレア (sulfonylurea: SU) 系化合物は比較的低薬量で多くの雑草に対して高い除草効果を持ち、作物選択性が高いこと、人畜毒性が低いことなど、優れた特性を持つ除草剤成分である。しかしながら、近年、SU系除草剤 (SU剤) に対して抵抗性を示す雑草の生物型が数多くの国や地域で見つかり、日本でも水田雑草にSU剤抵抗性生物型が見つかっている。本実験では、SU剤の作用点であるアセト乳酸合成酵素 (acetolactate synthase: ALS) の活性測定を利用した除草剤抵抗性の迅速検定法について学ぶ。

2.1 検定法の原理

ALS阻害型除草剤によって阻害されるALSは分岐鎖アミノ酸合成経路の酵素である。その合成経路においてALSによって合成されたアセト乳酸は、ケトール酸リダクトイソメラーゼ (ketol-acid reductoisomerase: KARI) によってさらに代謝されるが、この酵素の阻害剤を処理すると、アセト乳酸は代謝されずに蓄積することになる。この場合、アセト乳酸の蓄積量はALS活性に依存することから、アセト乳酸の蓄積量を定量することでALSの活性 (ALS活性阻害の有無) が測定できる。蓄積したアセト乳酸は、アセトインに変換して比色分析すれば、容易に定量できる。したがって、KARI阻害剤を処理した植物組織と、KARIに加えてSU系化合物を処理した植物組織との間でアセトインの蓄積量を比較すれば、ALS活性が阻害されているかどうかを判明する。即ち、SU系化合物を処理してもアセトインの蓄積が阻害されていなければ、ALSの活性が阻害を受けていないこととなり、SU剤抵抗性と判定できる。一方、SU系化合物の処理でアセトインの蓄積が阻害されていれば、ALSの活性も阻害されていることになり、SU剤感受性と判定できる。アセトインは比色分析によって赤色に発色することから、アセトインの蓄積量は視覚的に容易に判別できる。

2.2 実際の操作

実際の検定の操作は、①対象雑草の組織に対して試薬・除草剤処理を行う；②処理した組織からアセト乳酸を抽出してそれをアセトインに変換して比色分析する、という手順となり、比色分析の結果の赤色の発色程度で抵抗性診断をする。以下に各段階での操作を記す。

① 試薬・除草剤処理

- 1) 5本の15ml試験管を用意して、それぞれの試験管に4mlの処理溶液¹を入れる。
- 2) 5本の試験管のうち、4本に除草剤²を加える。
- 3) 検定試料を40~60mg程度試験管に入れる。
- 4) 試験管を30°C、明条件で約2日 (40~55時間程度) 静置する。
- 5) 試料を試験管から取り出し、冷凍保存する (-80°C, 30 min)。

検定に使用するSU系化合物であるチフェンスルフロンメチル水和剤は畑地用除草剤として市販されているものであるが、SU系化合物の単剤であること、水溶性が高いことなど、実験に用いやすいことから使用している。

¹ 25% ムラシゲスクーグ培地用混合塩類、500 μM 1,1-cyclopropanedicarboxylic acid、10mM ピルビン酸 Na (この処理溶液は冷凍保存が可能であるから、あらかじめ調製したものを小分けして使う)。

² 試験管内で10 ng/mlとなるように、10 mg/lに調整したチフェンスルフロンメチル水和剤を4 μl加える。

② アセト乳酸の抽出と比色分析

- 1) 1.5 mlのチューブに 300 μ lの蒸留水を入れて凍結試料を浸し、60°C で 10 分間静置する。
- 2) 常温で 45 分間静置する (15 分ごとに攪拌する)。
- 3) 試料が入らないように抽出液を 100 μ l取り、新たな 1.5 mlチューブに移す。
- 4) 10 μ lの 5% (v/v) H_2SO_4 を加え、60°Cで 30 分間静置する。
- 5) 50 μ lの 0.5% (w/v) クレアチン溶液と 50 μ lの 5% (w/v) 1-ナフトール溶液³を加える。
- 6) 37°C で 30 分間静置し、赤色の発色により抵抗性を検定する。除草剤無処理試料で赤色の発色がない時は、再検定が必要である。

以上が実際の手順である。特に雑草の葉齢、採取部位、除草剤処理条件、除草剤無処理での ALS 活性の検出の確認などには注意する必要がある。また、検定に使用する SU 系化合物は、チフェンスルフロロンメチル水和剤でなく別の化合物を使用する場合は、処理濃度が異なると考えられるので、除草剤処理濃度についての検討も必要である。

引用文献

- Gerwick, B. C., L. C. Mireles and R. J. Eilers. 1993. Rapid diagnosis of ALS/AHAS-resistant weeds. *Weed Technol.* 7: 519-524.
- 内野 彰 2001. 作用点感受性試験法. 日本雑草学会 編 「雑草科学実験法」. 全国農村漁村文化協会. pp. 363-367.
- Uchino, A., H. Watanabe, G.-X. Wang and K. Itoh. 1999. Light requirement in rapid diagnosis of sulfonylurea-resistant weeds of *Lindernia* spp. (Scrophulariaceae). *Weed Technol.* 13: 680-684.

³ 1-ナフトールは 2.5M NaOH 溶液に溶かして 5% (w/v) 溶液とする。使用直前に調整すること。