



JAEA-Review
2013-059

JAEA Takasaki Annual Report 2012

(Ed.) Takuji KOJIMA

Takasaki Advanced Radiation Research Institute

March 2014

Japan Atomic Energy Agency

日本原子力研究開発機構

JAEA-Review

本レポートは独立行政法人日本原子力研究開発機構が不定期に発行する成果報告書です。
本レポートの入手並びに著作権利用に関するお問い合わせは、下記あてにお問い合わせ下さい。
なお、本レポートの全文は日本原子力研究開発機構ホームページ (<http://www.jaea.go.jp>)
より発信されています。

独立行政法人日本原子力研究開発機構 研究技術情報部 研究技術情報課
〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2 番地 4
電話 029-282-6387, Fax 029-282-5920, E-mail: ird-support@jaea.go.jp

This report is issued irregularly by Japan Atomic Energy Agency.
Inquiries about availability and/or copyright of this report should be addressed to
Intellectual Resources Section, Intellectual Resources Department,
Japan Atomic Energy Agency.
2-4 Shirakata Shirane, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1195 Japan
Tel +81-29-282-6387, Fax +81-29-282-5920, E-mail: ird-support@jaea.go.jp

© Japan Atomic Energy Agency, 2014

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3-30 | Production of ^{13}N -labeled Nitrogen Gas Tracer for the Imaging of Nitrogen Fixation in Soybean Nodules | 98 |
| 3-31 | Analysis of the Effect of O_2 Partial Pressure on Nitrogen Fixation in Soybean Plant Using Positron-emitting Tracer | 99 |
| 3-32 | RI Imaging Method to Analyze a Process of Radiocesium Contamination of Plants and to Develop Phytoremediation Techniques | 100 |
| 3-33 | Whole-plant Imaging of ^{107}Cd Distribution Using Positron-emitting Tracer Imaging System | 101 |
| 3-34 | Development of Ion Beam Breeding Technology in Plants and Creation of Useful Plant Resources | 102 |
| 3-35 | Ion Beam Breeding of Rice for the Mutation Breeding Project of the Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA) | 103 |
| 3-36 | Generating New Chrysanthemum Plant Varieties Using Ion Beams | 104 |
| 3-37 | Mutational Effects of Carbon Ions near the Range End in Arabidopsis | 105 |
| 3-38 | Homologous Recombination Induced by Low-dose Radiations in Arabidopsis | 106 |
| 3-39 | Screening of Salt Tolerant Mutants by Combination of Radiation Mutagenesis and <i>In vitro</i> Regeneration in Lombardy Poplar (<i>Populus nigra</i>) | 107 |
| 3-40 | Effects of Gamma-ray Irradiation on Oxalate Metabolism in <i>Rumex obtusifolius</i> L. | 108 |
| 3-41 | Determination of the Carbon Ion Beam Irradiation Condition for Barley | 109 |
| 3-42 | Mutagenic Effect of Carbon Ion Beams in <i>Deinococcus radiodurans</i> | 110 |
| 3-43 | Genetic Analysis of Novel DNA Cross-link Repair Genes Common to <i>Deinococcus</i> and <i>Thermus</i> | 111 |
| 3-44 | Molecular Analysis of Heavy Ion Induced Mutations in Budding Yeast <i>S. cerevisiae</i> | 112 |
| 3-45 | Improvement of Endophytic Bacteria Using Ion Beams and Application of Bio-pesticide with Plant Growth Promoter Made from Oligo-chitosan | 113 |
| 3-46 | Identification of DNA Mutation Sites in a High Temperature Tolerant Mutant of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110 Generated by Ion-beam Irradiation | 114 |
| 3-47 | Simultaneous Saccharification and Fermentation from Ionic Liquid-pretreated Biomass Using Ionic Liquid-tolerant Yeast Mutant | 115 |
| 3-48 | Benomyl-tolerant Mutation of Entomopathogenic Fungi Induced by Carbon Ion Beams | 116 |
| 3-49 | Mutation Analysis of High Ethyl Caproate Producing Sake Yeasts Generated by Ion Beam Breeding | 117 |
| 3-50 | Role of DNA Repair and Effect of Herbal Extract on LOH Induced by Ion Beam Radiations in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 118 |
| 4. | Advanced Materials, Analysis and Novel Technology | 119 |
| 4-01 | Preparation of Gasochromic MoO_3 Films by Reactive Sputtering Deposition | 123 |
| 4-02 | 1D Protein and Sugar Nanostructures by Single Particle Reactions | 124 |

3 - 48 Benomyl-tolerant Mutation of Entomopathogenic Fungi Induced by Carbon Ion Beams

T. Saito^{a)}, Y. Fitriana^{a)}, K. Satoh^{b)} and I. Narumi^{b)*}

^{a)}Faculty of Agriculture, Shizuoka University, ^{b)}Medical and Biotechnological Application Division, QuBS, JAEA, *Present affiliation: Faculty of Life Sciences, Toyo University

Entomopathogenic fungi, *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana*, are important agents to control insect pests, but the fungi could be negatively affected by conventional fungicides for plant diseases such as powdery mildew. The purpose of this study is to generate mutants highly tolerant to benomyl, a major fungicide, using carbon ion beams. We have obtained some benomyl-tolerant mutants and examined the tolerant levels to benomyl, response to other fungicides, and virulence to target insects. It has been shown that β -tubulin of fungi are involved in resistance to benzimidazole fungicides such as benomyl. In this study, in order to identify the mutation sites of β -tubulin in the benomyl-tolerant mutants, we determined the nucleotide sequences of β -tubulin locus and compared with those of the wild-type strains. In *B. bassiana* mutants, the mutation was identified to be an A:T to C:G transversion at position 924 in the β -tubulin gene. This mutation causes an amino acid substitution at position 198 (Glu to Ala) in the β -tubulin protein. This site might be a binding target of benomyl or adjacent to the center of benomyl interaction with the β -tubulin. On the other hand, in *I. fumosorosea* mutants, the β -tubulin sequences were identical to that of the wild-type, suggesting that other mechanisms might be responsible for the benomyl tolerance. These results suggest that mechanisms of benomyl tolerance were different between *I. fumosorosea* and *B. bassiana*.

昆虫病原糸状菌を用いて害虫を防除する微生物的防除法は殺菌剤と併用しにくいという難題を抱えている。この抜本的な解決策として、殺菌剤耐性という新機能を有する昆虫病原糸状菌を創出することが考えられる。本研究の目的は、炭素イオンビームの照射による突然変異育種技術を用いて、殺菌剤耐性の昆虫病原糸状菌 (*Beauveria bassiana* 及び *Isaria fumosorosea*) 変異体を創出することである。

これまでの研究によって、両菌種ともベノミル剤耐性変異体が得られ、耐性レベルの詳細、他剤に対する耐性、病原力の变化などについて明らかにした¹⁻³⁾。ここでは、ベノミル剤耐性に関与しているとされている β チューブリン遺伝子の解析を行った。

B. bassiana は親株と2種のベノミル剤耐性変異株、*I. fumosorosea* は親株と4種のベノミル剤耐性変異株を供試した。各菌株は、サブロー寒天培地で3日間培養したコロニーから分生子を採集し、Fast DNA SPIN Kit (MP Biomedicals)を用いてゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAをテンプレートとして、*B. bassiana* は *Ex Taq* DNA Polymerase (Takara Bio)、*I. fumosorosea* は PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio)を用いて、 β チューブリン遺伝子領域を増幅した。PCR産物は、電気泳動によりサイズを確認した後、MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて精製した。DNAシーケンス解析は、PCR産物をテンプレートとして、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 及び ABI Prism 377 DNA Sequencerを用いて行った。 β チューブリン遺伝子領域の塩基配列を SeqMan Pro (DNASTAR) と GENETYX-MAC (GENETYX) のソフトウェアを用いて解析し、変異部位を同定した。

電気泳動解析の結果、*B. bassiana* (親株及び2種の変異株) 及び *I. fumosorosea* (親株及び4種の変異株) において、目的サイズの β チューブリン遺伝子領域の増幅を確認した(それぞれ1,428及び1,424 bp) (Fig. 1)。

DNA塩基配列解析の結果、*B. bassiana* 変異株では決定した β チューブリン遺伝子領域の924番目の塩基AがC

に変異しており、これにより β チューブリンの198番目のアミノ酸がGluからAlaに変化していると推定された。 β チューブリン遺伝子の同部位での突然変異によるベノミル剤耐性獲得の事例は、植物病原菌や NaNO_2 によって誘導された*B. bassiana* 変異株でも過去に報告されている^{4,5)}。一方、*I. fumosorosea* の β チューブリン遺伝子領域の塩基配列解析の結果、親株と変異株では、推定されるアミノ酸配列が同一であることから、*I. fumosorosea* のベノミル剤耐性には別のメカニズムが関与していると考えられる⁶⁾。

以上のことから、*B. bassiana* と *I. fumosorosea* のベノミル剤耐性発現に関わるメカニズムは遺伝子レベルで異なることが明らかとなった。今後、*I. fumosorosea* におけるベノミル剤耐性獲得のメカニズムを究明したい。

References

- 1) T. Saito et al., JAEA Takasaki Annu. Rep. 2009 (2011) 76.
- 2) T. Saito et al., JAEA Takasaki Annu. Rep. 2010 (2012) 112.
- 3) T. Saito et al., JAEA Takasaki Annu. Rep. 2011 (2013) 109.
- 4) R. M. Davidson et al., J. Phytopathol. 154 (2006) 321.
- 5) G. Zou et al., Environ. Microbiol. 8 (2006) 2096.
- 6) T. T. Song et al., J. Appl. Microbiol. 112 (2011) 175.

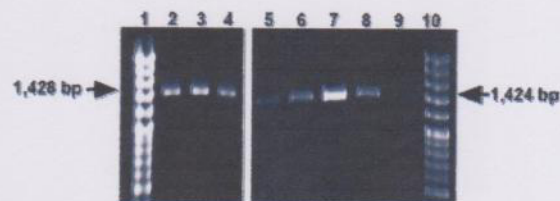


Fig. 1 PCR amplification of β -tubulin gene in *B. bassiana* and *I. fumosorosea*. Lanes 1 and 10, DNA ladder marker; lane 2, *B. bassiana* wild-type; lanes 3 and 4, *B. bassiana* mutants; lane 5, *I. fumosorosea* wild-type; lanes 6 to 9, *I. fumosorosea* mutants. Arrows indicate predicted PCR product sizes.