



# Brown planthopper (BPH) resistance evaluated based on differentially induced transcripts of rice and accumulation of BPH vitellogenin

GAMALATH, NIROSHA SAMANMALI

---

(Degree)

博士（学術）

(Date of Degree)

2009-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4738

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004738>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名                      GAMALATH NIROSHA SAMANMALI

博士の専攻分野の名称    博士（学術）

学 位 記 番 号            博い第 4738 号

学位授与の 要 件            学位規則第 5 条第 1 項該当

学位授与の 日 付            平成 21 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Brown planthopper (BPH) resistance evaluated based on differentially induced transcripts of rice and accumulation of BPH vitellogenin      (イネの誘導転写産物とトビイロウンカ(BPH)の卵黄タンパク質ビテロジェニンの蓄積を指標とした BPH 抵抗性の評価)

審 査 委 員

主 査    教 授    中村   千春

          教 授    竹田   真木生

          准教授   森     直樹

          教 授    石井   尊生

## 論文内容の要旨

氏 名 Gamalath Nirosha

専 攻 資 源 生 命 科 学

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Brown planthopper (BPH) resistance evaluated based on differentially induced transcripts of rice and accumulation of BPH vitellogenin

イネの誘導転写産物とトビイロウンカ (BPH) の卵黄タンパク質ビテロジェニンの蓄積を指標とした BPH 抵抗性の評価

指導教員 中 村 千 春

(注) 2, 000 字～4, 000 字でまとめること。

### Chapter I General Introduction

The brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Hemiptera, Delphacidae), is a serious insect pests of rice plants. It attacks rice plants and sucks fluid from the vascular bundle. Heavy infestation in the field causes *hopper burn*: complete death of the rice plants. In addition to sucking damage, BPH is a vector for the rice ragged stunt virus (RRSV) and rice grassy stunt virus (RGSV). Attack of this pest has caused intermittent serious famines in the East Asia including Japan since ancient times; it became conspicuous in the Southeast Asia after the so-called Green Revolution of the 1960s.

BPH takes two wing forms, long (macropterous) and short (brachypterous) ones, in its adult stage. Macropterous adults fly long distances and invade wide rice-growing areas. Most females of the subsequent generation of the immigrants are brachypterous – adapted for reproduction – and produce numerous offsprings in rice fields. The wing dimorphism is induced by environmental stimuli during nymphal stages. These biological properties of BPH are closely related to BPH distribution, BPH reproduction, and rice plant damage.

Methods of BPH control primarily include the application of insecticides; various chemicals such as organo-phosphorous, carbamate, pyrethroid and neonicotinoid insecticides have been used in the field. However, insecticide application poses two problems: appearance of insecticide-resistant BPH and stimulation of BPH propagation known as resurgence.

BPH-resistant varieties of rice, which are widely cultivated in Asian countries, are also used as means of controlling BPH. However, cultivation of the BPH-resistant varieties has engendered new virulent strains of BPH that can attack the resistant varieties. At least eighteen natural BPH resistance genes including quantitative trait loci have so far been identified, among which fine linkage maps have been constructed for at least five major resistance genes, *Bph1*, *Bph2*, *Bph15*, *Bph18* and *bph19*. However, the molecular mechanism of BPH resistance remains largely unknown. Cloning of these resistance genes is necessary to understand the structure, expression and function of the natural BPH resistant genes and also to understand how the host plant resistance affects BPH to ultimately understand the overall resistance mechanism. In this dissertation, rice transcripts that are specifically induced in a BPH resistance gene carrier (pyramid line) by BPH infestation were selected through differential cDNA-AFLP screening.

To cope with the occurrence of BPH biotypes causing resistance breakdown, novel techniques targeting some crucial gene(s) should be devised. The genes involved in insect reproduction like vitellogenin (Vg) could be an ideal target of practical importance in future pest control schemes. In this dissertation, another approach was taken to study the effect of host plant resistance on the expression of *Vg* gene and Vg protein and ultimately on the reproductive development of BPH.

**Chapter II Differential cDNA-AFLP screening of transcripts associated with brown planthopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.)**

Screening based on cDNA-amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) has been used as an efficient method for isolation of differentially expressed genes. cDNA-AFLP was previously employed to identify differentially expressed genes in BPH nymphs feeding on rice varieties. A major objective of this dissertation study was to apply the differential screening method using cDNA constructed from resistance and susceptible rice seedlings under infestation condition for identifying BPH resistance-associated transcripts.

In differential screening, 423 different primer combinations were first examined to select transcripts that showed clear amplification in the pyramid line. Then the transcript profiles were compared between the pyramid line and Tsukushibare to obtain 41 polymorphic fragments that were detected only in the pyramid line or Tsukushibare. Among these differentially expressed transcript-derived fragments, 10 were expressed only in the pyramid line. Since the genomic background of the pyramid line and Tsukushibare is mostly common except for the presence of the introgressed chromosomal segment carrying *Bph1/Bph2* genes and some unknown segments from the resistant donors, it was expected that fragments unique to the pyramid line in comparison with the control Tsukushibare under the infestation condition should include ones derived from transcripts from the introgressed chromosomal region. Hence, these 10 differentially expressed fragments were cloned and sequenced. Based on the homology search, these fragments showed high similarity with genes that were reported to be involved in disease resistance, signal transduction, metabolism and regulation of topological links between two DNA strands and also those with unknown function. Among the genes corresponding to three of the 10 fragments, two were located in the region covering the two BPH resistant genes on the long arm of chromosome 12. It was thus suggested that these two fragments were derived from the introgressed segment on the long arm of rice chromosome 12 at the location close to the *Bph1* locus. Since we did not study transcript profiles under non-infestation conditions, however, if they represent infestation specific transcripts or constitutive ones remains unknown. The clone Me2014 locating at the proximity of the *Bph1* locus encodes disease resistance protein (RPP8-like protein; Recognition of Peronospora Parasitica 8) in *Arabidopsis thaliana*. After confirmation of the specificity to BPH resistance, these clones can be used as markers in the further work for fine mapping and cloning at least of *Bph1*.

Gamalath N. et al. Differential cDNA-AFLP screening of transcripts associated with brown planthopper resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Australian Journal of Crop Science, ISSN 1835-2707 (Accepted on 27/02/2009)

**Chapter III Effect of host plant resistance on the accumulation of female specific yolk protein, Vitellogenin, in brown planthopper**

Accumulation of vitellogenin(Vg) protein and expression of *Vg* transcript was examined in virulent and non virulent BPH strains after feeding on susceptible and resistant rice lines. RT-PCR and qPCR results showed that expression of *Vg* transcript has been vastly reduced when even virulent strain feed on resistant rice lines. Western blot analysis further confirmed the reduction of Vg protein in virulent strains fed on resistant rice lines compared to the susceptible line. Non-virulent strains could expressed Vg transcript and accumulated Vg protein normally on the susceptible line but very low expression of *Vg* transcript and no Vg protein accumulation occurred on the resistant lines. These results clearly indicate that resistance genes can reduce the accumulation of vitellogenine protein and ultimately the normal reproduction of BPH.

**Chapter IV**

Plant responses to herbivores are complex. Genes regulated by herbivore injury are strongly related to the mode of herbivore feeding and the degree of tissue damage at the feeding site. To date, most of the data concerning the molecular responses in plants to insects have been obtained with plants subjected to chewing insects. And little is known about the effects of phloem-feeding insects including BPH. A very few studies have been conducted to identify differentially expressed fragments in response to BPH feed on resistant varieties. It was found that feeding on resistant host plants causes inhibition of ovarian development via drastically reducing the expression of *Vg* transcript and the amount Vg protein in BPH. Since the juvenile hormone produced by the corpus allatum (CA) induces the fat body of adult females to synthesize and secrete Vg, the resistance effect might be mediated by interference with the normal functioning of juvenile hormones in BPH.

Within an insect JH levels may be affected by JH esterases, JH binding proteins, JH analogues, precocene and azadirachtin, or by allatostatins or allatotropins, which regulate CA activity. CA activity can also be regulated by variation of the protein concentration in the haemolymph. Resistance factors may affect any of these regulatory processes. It is also possible that all of these mechanisms lie downstream from the site where this resistance acts initially. Additional genes other than *Vg* may also be differentially expressed in insects feeding on resistant as opposed to susceptible hosts. Therefore monitoring the expression of the *Vg* gene and also some other candidate genes will provide a sensitive test for detecting, isolating and identifying resistance factor(s) in the host rice plants.

氏名	Gamalath Nirosha		
論文 題目	Brown planthopper (BPH) resistance evaluated based on differentially induced transcripts of rice and accumulation of BPH vitellogenin イネの誘導転写産物とトビイロウンカ (BPH) の卵黄タンパク質ビテロジェニンの蓄積を指標とした BPH 抵抗性の評価		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	中 村 千 春
	副 査	教 授	竹 田 真 木 生
	副 査	准教授	森 直 樹
	副 査	教 授	石 井 尊 生
	副 査		
要 旨			
<p>トビイロウンカ (BPH) は、熱帯および亜熱帯から日本を含む温帯アジア稲作地域におけるイネの深刻な害虫である。日本では、BPH による甚大な被害が古くから報告されているが、今日でも九州、四国、中国地方に被害をもたらしている。</p> <p>BPH の防除には、イネ遺伝資源が保有する抵抗性遺伝子を利用した総合防除 (IPM: Integrated Pest Management) が望ましく、BPH 抵抗性遺伝子の探索と導入育種による抵抗性品種の育成がアジア各国で進められている。同時に、新たな加害性を獲得した BPH バイオタイプの出現によるイネ抵抗性の崩壊への有効な対処法の開発が求められている。このためには、BPH 抵抗性遺伝子をクローニングする必要がある。本研究では、1) BPH による吸汁で発現誘導を受けるイネ転写産物の同定と、2) BPH の加害力およびイネ抵抗性と BPH 卵黄タンパク質ビテロジェニンの関係解明を目指した。</p> <p>第1章 General Introduction—総合序論</p> <p>イネ遺伝資源に存在する BPH 抵抗性遺伝子の探索および BPH 抵抗性遺伝子を利用した抵抗性導入育種の歴史を概観し、さらに卵黄タンパク質ビテロジェニンの役割と遺伝子クローニングに関する最近の知見を概説し、本研究の目的を述べた。</p> <p>第2章 Differential cDNA-AFLP screening of transcripts associated with brown planthopper resistance in rice (<i>Oryza sativa</i> L.)—BPH 抵抗性と関連したイネ転写産物の分別 cDNA-AFLP 法によるスクリーニング</p> <p>インディカイネ遺伝資源がもつ2つのイネ第12染色体上の BPH 抵抗性遺伝子 <i>BPH1</i> と <i>BPH2</i> を DNA マーカー選抜法を利用して同時導入したピラミッドシステムを用いて、BPH 吸汁によって抵抗性遺伝子特異的に発現誘導を受けるイネ転写産物の分別スクリーニングを行った。供試した BPH 系統には、植物遺伝学研究室で継代培養を行ってきたバイオタイプ1を用いた。先の研究から、ピラミッドシステムがもつ2抵抗性遺伝子は BPH バイオタイプに対して有効であることが分かっている。なお、感受性イネ系統としては、抵抗性遺伝子導入の受容親となった遺伝的背景をもつツクシバレを用いた。</p> <p>ピラミッドシステムと感受性系統に BPH バイオタイプ1の成虫を1幼苗あたり15-20匹放飼し、6時間後に RNA を抽出した。Poly (A)+RNA を精製後、cDNA 合成キットを用いて2本鎖 cDNA を合成し、さらに cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法を用いて、ピラミッドシステム特異的な cDNA 断片を探索した。</p> <p>まず、423組のプライマーを用いて、ピラミッドシステムとツクシバレを比較し、41個の多型断片を得たが、そのうち10断片はピラミッドシステムでのみ発現した。ピラミッドシステムの</p>			

氏名	Gamalath Nirosha
<p>遺伝的背景はほぼツクシバレと同等であることから、10断片は抵抗性遺伝子を含む導入染色体断片に由来するものと推定した。そこで、10個の cDNA 断片をクローニングし、塩基配列を決定後に、相同性探索を行ったところ、多くが病害抵抗性遺伝子や情報伝達に関わる遺伝子と高い相同性を示した。そのうち2断片 (Me2014, Me2042) は、イネ第12染色体長腕の抵抗性遺伝子 <i>BPH1</i> 導入領域に存在することが分かった。特に、<i>BPH1</i> と 0.5-0.8Mb の距離に位置する Me2014 は、シロイヌナズナの病害抵抗性遺伝子 RPP-8 様遺伝子と相同であった。</p>	
<p>第3章 Effet of host plant resistance to the accumulation of female specific yolk protein, vitellogenin, in brown planthopper —BPH 感受性および BPH 抵抗性イネ系統上に放飼した BPH 2 系統におけるビテロジェニン転写産物とタンパク質の蓄積</p> <p>ビテロジェニンは、昆虫を含む卵生動物の主要な卵黄タンパク質であるビテリンの前駆体で、脂肪体で合成され血リンパへ分泌された後、ビテロジェニン受容体によって卵母細胞へ運ばれて蓄積する。BPH 制御にビテロジェニンを利用する可能性を探るため、抵抗性および感受性イネ上での BPH ビテロジェニン遺伝子転写産物とタンパク質の蓄積を継時的に解析した。</p> <p>イネ系統には、抵抗性遺伝子 <i>BPH1</i> と <i>BPH2</i> の単独導入系統 (農林 PL3 と農林 PL4)、両系統の交配後代から DNA マーカーを用いて選抜した2遺伝子同時導入系統 (ピラミッド系統)、および感受性の反復戻し親系統 (ツクシバレ) を供試した。用いた BPH 系統は、2抵抗性遺伝子に対して感受性の秦野66と2抵抗性遺伝子に対して加害力を獲得した長崎03の2系統である。以上の8組み合わせで、BPH 放飼後のビテロジェニン遺伝子 (<i>BPH-Vg</i>) 転写産物量を RT-PCR 法及び qPCR 法で、ビテロジェニンタンパク質 (BPH-Vg) 量を SDS-PAGE 法とウエスタンブロッティング法で追跡測定した。</p> <p>秦野66とツクシバレの組み合わせでは、<i>BPH-Vg</i> 転写産物量が放飼後の時間経過とともに増大したが、秦野66と抵抗性遺伝子導入系統の組み合わせでは、<i>BPH-Vg</i> 転写産物量の蓄積が大きく抑制された。一方、加害力を獲得した長崎03と抵抗性遺伝子導入系統の組み合わせでは、<i>BPH-Vg</i> 転写産物量の減少程度が秦野66で見られたより小さかった。SDS-PAGE 法とウエスタンブロッティング法で測定したビテロジェニンタンパク質の変動は、<i>BPH-Vg</i> 転写産物量の変動とよく似たパターンであり、BPH の加害力および抵抗性遺伝子の効果をよく反映していた。以上の結果から、抵抗性遺伝子は BPH におけるビテロジェニンの蓄積抑制、従って BPH の繁殖抑制と密接に関係していることが示唆された。</p> <p>多くの昆虫では、アラタ体で合成される幼若ホルモンが、雌成虫の脂肪体におけるビテロジェニンの合成と分泌を誘導することが知られている。従って、以上の結果は、抵抗性遺伝子の効果が BPH における幼若ホルモンの機能阻害を介している可能性を示唆した。</p>	
<p>第4章 General Discussion—総合議論</p> <p>本研究の総括を行い、今後の研究方向について議論した。</p>	
<p>以上のように、本論文では、イネ栽培における最重要害虫のひとつであるトビイロウンカ (BPH) の防除に向けて、1) BPH 吸汁によって、イネゲノムに導入した抵抗性遺伝子特異的に発現誘導を受けるイネ転写産物の分別スクリーニングを行い、抵抗性遺伝子が導入された部位の近傍に位置する候補遺伝子断片を選抜し、さらに、2) 抵抗性および感受性イネ上での BPH ビテロジェニン遺伝子転写産物とタンパク質の蓄積を継時的に解析して、抵抗性遺伝子による BPH ビテロジェニンの蓄積抑制を明らかにした。以上、本研究成果は、BPH 抵抗性イネ育種に貢献する価値ある業績であると認める。よって本論文は、学位申請者の Gamalath Nirosha は、博士 (学術) の学位を得る資格があると認める。</p>	