



いもち病圃場抵抗性遺伝学のマッピングと育種への利用に関する研究

善林, 薫

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2007-04-20

(Date of Publication)

2009-05-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2944

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002944>

※ 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。



神戸大学博士論文

いもち病圃場抵抗性遺伝子のマッピングと
育種への利用に関する研究

平成19年2月

善林 薫

目次

摘要	1
第1章 序論	6
第2章 イネ系統「中部32号」および「北海188号」のいもち病 圃場抵抗性の QTL 解析と主働遺伝子のマッピング	
1. 緒言	12
2. 材料および方法	13
3. 結果	19
4. 考察	23
5. 図表	27
第3章 イネ系統「中部32号」と染色体断片置換系統「CSSL」の 雑種後代集団を用いた <i>Pi34</i> の精密マッピングと遺伝子予測	
1. 緒言	37
2. 材料および方法	39
3. 結果	47
4. 考察	53
5. 図表	57
第4章 いもち病菌株が保有する <i>AVR<i>Pi34</i></i> の同定	
1. 緒言	65
2. 材料および方法	66
3. 結果および考察	68
4. 図表	71
第5章 いもち病菌レースの変動機構と真性抵抗性の利用	
1. 緒言	74
2. 材料および方法	76
3. 結果および考察	78
4. 図表	84
第6章 総合考察	87
謝辞	93
引用文献	95
付録	103

摘要

イネいもち病はイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* によって引き起こされるイネの最重要病害である。化学合成農薬の使用を中心としたいもち病防除には現在も多大なコストを要しているだけでなく、環境への影響も懸念されているため、環境保全型および低コスト農業を推進する観点から、イネの持ついもち病抵抗性の有効な利用が強く望まれている。本研究では、いもち病に有効な抵抗性遺伝子の品種への効率的導入および抵抗性品種の持続的利用方法の確立を目指し、主にイネ系統「中部 32 号」のいもち病圃場抵抗性に関する QTL 解析を行い、作用力の強い遺伝子 *Pi34* を遺伝地図に正確に位置づけた。また、「中部 32 号」は菌株特異性を示すことが明らかとなったため、本系統を強く侵害しないイネいもち病菌は *Pi34* に対応する非病原性遺伝子を保有すると仮定し、その証明を行った。さらに、*Pi34* について得られた結果と、真性抵抗性遺伝子の混植栽培における病害抑制効果および真性抵抗性の崩壊（分布いもち病菌レースの変化）についての疫学的解析から、圃場抵抗性遺伝子の永続性について考察した。

イネ系統「中部 32 号」および「北海 188 号」は、イネいもち病に対して強い圃場抵抗性を示す。両系統の保有するいもち病圃場抵抗性遺伝子の数と座乗領域および作用力を明らかにすることを目的として、QTL 解析を行った。「中部 32 号」について、いもち病圃場抵抗性弱系統の「農林 29 号」との交配により養成した F₃ 集団 (n=149) を用いて QTL 解析ソフト MAPMAKER/QTL による解析を行った結果、11 番染色体長腕上に、LOD スコアが 19.7、表現型分散に対する寄与率が 59.2% の QTL が検出された。

F₃を自殖して得た F₆および F₇ (n=139) を用いて上記の QTL を単一遺伝子としてマッピングしたところ、本 QTL は RFLP マーカー C1172 と E2021 の間(遺伝距離 11.5cM)に位置づけられた。そこで本遺伝子を *Pi34* と命名した。「北海 188 号」については、いもち病圃場抵抗性弱系統の「Danghang-Shali」との交配により養成した F₂および F₃ 集団 (n=129) を用いて、解析ソフト Qgene による QTL 解析を行ったところ、1 番および 8 番染色体の 2ヶ所に QTL が検出された。1 番染色体長腕上の QTL は「北海 188 号」ゲノム由来で、SSR マーカー RM1216 と RM5501 に見いだされ、LOD スコアは 30.5、寄与率は 69.4%であった。一方、8 番染色体に座乗する QTL は「Danghang-Shali」ゲノム由来であり、マーカー RM5068 と RM6999 間に LOD のピークを持ち、そのスコアは 3.9、寄与率は 13.4%であった。1 番染色体上の QTL についてマーカーおよび供試系統を追加し、単一遺伝子としてマッピングしたところ、本 QTL はマーカー RM1216-RM1003 (遺伝距離 3.6cM) に位置づけられたため、本遺伝子を *Pi35(t)* と命名した。

次に、QTL 解析により検出された「中部 32 号」のいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の座乗領域を正確に位置づけるために、本系統に染色体断片置換系統「CSSL」を交配して得られた後代系統 (F₃, F₄ および F₅) を用いて、精密連鎖解析を行った。2002~2005 年にかけて、延べ 4012 個体の後代系統から、STS マーカー Z115-C189 間における組換え個体を 264 個体選抜し、畑苗代および室内でこれらのいもち病抵抗性を調査して、*Pi34* 座乗領域を絞り込んだところ、本遺伝子はマーカー Z77-z150-5 間に位置づけられた。

つづいて、Z77-z150-5 間の物理距離を決定し、候補遺伝子を推定するために、平均インサート長約 150kb、クローン数約

16,000 個からなる「中部 32 号」ゲノムの BAC ライブラリーを作成した。 *Pi34* 座乗領域を含むクローンが 2 個選抜され，うち 1 個の塩基配列を解読したところ，上記のマーカー間の物理距離は 65.3kb であることが明らかとなった。 Z77-z150-5 間の「中部 32 号」塩基配列上に予測された ORF は 10 個であった。 これらを「日本晴」の Z77-z150-5 間（物理距離 58.1kb）で予測された 8 個の ORF と比較したところ，7 個は共通であり，2 個は「中部 32 号」のみに予測された転移因子（トランスポゾン）配列であった。 1 個は両品種で異なる遺伝子を予測していた。 これらのなかに既知のいもち病抵抗性遺伝子に見られるモチーフ（NBS-LRR）はなかったため， *Pi34* はいもち病菌認識に関わるレセプターである可能性は低いと考えられた。

一方， *Pi34* の精密マッピングの過程で，遺伝子座乗領域の遺伝子型と抵抗性検定によって決定された表現型が一致しない系統が出現した。 この原因が *Pi34* 以外のいもち病圃場抵抗性 QTL であるとの仮説を立て，その探索を行ったところ，6 番染色体のマーカー RM3034-RM2615 間に新たな QTL (*Piq6(t)*) があることが示された。 2003~2005 年にかけて *Piq6(t)* の圃場抵抗性に及ぼす効果を調査した結果，本遺伝子はいもち病小発生の場合には *Pi34* に匹敵する効果を示すが，中～多発生条件下では効果が判然としないことが示唆された。

「中部 32 号」の圃場抵抗性は菌株によってその強さが変動することが知られている。本研究では，本系統の菌株特異性が， *Pi34* に対するいもち病菌の非（弱）病原性遺伝子 *AVR*Pi34** に起因し，両者間に「遺伝子対遺伝子関係」が成り立つと仮定し，その検証を行った。「中部 32 号」に特異的に強い病原性を示すいもち病菌株 IBOS8-1-1 と，強い病原性は示さないが，イネいもち病菌に

対して高い交配能を有する菌株 Y93-245c-2 を交配して F₁ 菌株を 61 個体作出し，それらの「中部 32 号」に対する病原性の程度を調べた結果，強い病原性を示す菌株と弱い病原性を示す菌株が 1:1 の比率で出現した．また，この弱病原性遺伝子は，*Pi34* に対応する弱病原性遺伝子 *AVRPi34* であることが明らかとなり，これらの間に「遺伝子対遺伝子関係」が成立することが証明された．

これらの研究により，主働遺伝子によって制御されるいもち病圃場抵抗性では，いもち病菌の変異により抵抗性が崩壊する危険性があることが明らかとなった．そこで，抵抗性崩壊を回避した圃場抵抗性の利用の方向性を示す根拠を得ることを目的として，真性抵抗性遺伝子のマルチラインについて病害抑制効果を調査したところ，混植系統数が増加するほど病害抑制効果が高いこと，穂いもちの抑制効果は葉のそれよりも低いことが明らかとなった．また，2001 年に北海道および東北各県の一般圃場から分離されたいもち病菌のレースを調査して 1994 年の調査結果と比較し，分布レースと作付品種の変遷の関係から，レース分布頻度の変化におよぼす要因について検討した．その結果，分布レース頻度の変化は，作付けされるイネ品種の真性抵抗性遺伝子型に対応し，その変化は従来その地域で優占していたレースに新たな病原性が付加される場合が多いことから，「安定化選択」よりも「創始者効果」が働いている可能性が高いことが示唆された．また，東北地方におけるレースは品種の抵抗性遺伝子型頻度よりもさらに偏り，単一レースが独占している傾向がみられ，これは非栽培期間の「瓶の首効果」により，マイナーレースの頻度が著しく低下した結果である可能性が高いことが示された．

本研究の成果は，量的な形質であるいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の詳細なマッピングを行い，遺伝子単離のための基礎情報を

得ただけでなく，周辺の塩基配列が明らかになったことにより，他品種に本遺伝子を導入するために必要なマーカーを効率的に作出することが可能となったことである．さらに，本遺伝子といもち病菌の弱病原性遺伝子との間に「遺伝子対遺伝子説」が成り立つことが証明され，いもち病の発病程度に関わる抵抗性遺伝子であっても，それが主働遺伝子である場合は抵抗性の崩壊が起こることが示された．これらは，今後のいもち病抵抗性育種の中心になるであろう圃場抵抗性遺伝子の利用において，非常に重要な情報である．また，*Pi34*は，病原菌の認識の初期段階に関わるレセプター以外の機能を持つ可能性が示唆されたことから，本遺伝子は，真性抵抗性遺伝子とは異なる「宿主－病原体相互反応」解析材料として有用であると考えられ，今後の解析が期待される．

第1章 序論

糸状菌の一種である *Pyricularia oryzae* Cavara (完全世代 *Magnaporthe oryzae* B Couch, Couch and Kohn 2002) によって起こるイネいもち病は、イネに甚大な被害を及ぼす重要病害として、古くから膨大な量の研究が行われ、宿主植物と病原菌双方で最も研究が進んでいる植物病害の一つである。しかし、防除薬剤に対する耐性菌の出現やいもち病発生好適条件下での広域適期防除が困難であること、本病に対する真性抵抗性に永続性がない事等の理由から、本病を制御することは容易でなく、現在においても、いもち病はイネにしばしば深刻な減収やコメの品質低下などの被害をもたらしている。このようなイネいもち病による被害に対処する効果的な手段として、耕種的防除、薬剤防除および抵抗性品種の利用等が考えられているが、これらの中で抵抗性品種の利用は、減農薬の環境保全型農業や農業の低コスト・省力化の必要性が高まっている現代、ますますその重要性を増している。そこで、本研究では、いもち病防除効果の高い抵抗性遺伝子の品種への効率的導入技術の確立を目指し、強いいもち病圃場抵抗性を示すイネ系統を用いてこれらの圃場抵抗性に関与する QTL (Quantitative Trait Loci:量的形質遺伝子座) 解析を行った。そして、特に系統「中部 32 号」については、QTL 解析で見出された圃場抵抗性に関わる主働遺伝子を単離することを課題とした。また、抵抗性の永続性を評価する重要な根拠の一つとなる「遺伝子対遺伝子関係:gene-for gene relationship (Flor 1971)」が、圃場抵抗性遺伝子と病原菌の非病原性遺伝子の間に成り立つか否かを検討した。

植物の病害抵抗性については、その基準によっていくつかの分類がなされている。その中で最も一般的に用いられているのは真性抵

抗性 (true resistance, complete resistance) と圃場 (部分) 抵抗性 (field resistance, partial resistance) であろう (Müller et al. 1953) . この分類は, 宿主と病原菌の相互作用をもとに行われている. すなわち, 真性抵抗性は罹病性病斑を形成するか否かを支配する抵抗性であり, 圃場抵抗性は真性抵抗性が効果を示さない病原菌系統に対して, 発病は許すがその程度 (発病開始時期・病斑数・病斑面積割合・病斑の大きさ・病害増殖速度など病害により様々な要素で示される) を低く抑える抵抗性である (浅賀 1987) . なお, この分類には, 質的抵抗性, 量的抵抗性 (江塚 1977, 1978a, 1978b) と呼ばれているものも含まれると考えられる. 二つ目は, 病原菌の病原型 (レース) に対する反応の特性により分ける方法である. レース特異的抵抗性とレース非特異的抵抗性 (清沢 1970) , van der Plank (van der Plank 1963) の提唱した Vertical resistance (垂直抵抗性) と Horizontal resistance (水平抵抗性) がこの分類に属する. 3つ目が, 抵抗性に関与する遺伝子の数により分ける方法である. 主働遺伝子抵抗性, 微働遺伝子 (ポリジーン) 抵抗性の分け方がこれに属する (浅賀 1987) . 本論文では, 抵抗性の分類として真性抵抗性 (complete resistance) と圃場 (部分) 抵抗性 (partial resistance) を用いて議論を進める.

いもち病に対するイネの抵抗性は, 真性抵抗性はほぼ全てがレース特異的すなわち垂直抵抗性であり, 主働遺伝子に支配される抵抗性である. 一方, 圃場抵抗性はその殆どはレース特異性がないとされているが, 中には特定の菌株に対して特異性を有する圃場抵抗性も報告されている (柚木ら 1970) . また, 圃場抵抗性の多くは複数の作用力の小さい遺伝子やポリジーン (polygene) の相加的効果によって発現していると考えられているが, 一部には量的抵抗性を示すにもかかわらず主働遺伝子によって支配されているものもある

(柚木ら 1970, 藤井ら 1999) .

いもち病抵抗性品種の育種では, 1927 年から在来品種の抵抗性の品種への導入が開始され, 1940 年代から外国稲を遺伝資源とした抵抗性遺伝子を導入した品種が育成された. しかし, これらの品種に導入された外国稲由来の抵抗性は, 主働遺伝子支配の真性抵抗性であったために, それを侵す病原菌レースの出現によって次々と罹病化する事態 (抵抗性の崩壊) が生じた. 現在ではこれらの反省を踏まえて, 真性抵抗性の永続的な利用と, 圃場抵抗性強品種の育成がイネ育種の主要目標となっている. そして, 真性抵抗性の永続的な利用では, 異なる真性抵抗性遺伝子を一つずつ保有する同質遺伝子系統を数系統育成し, それら数系統を混植することで抵抗性の崩壊を回避する「多系品種 (マルチライン)」の利用が進められている (佐々木ら 2002, 小島ら 2003). 一方, 圃場抵抗性については, 1) 食味や外観形質等の不良形質を排除しつつ, ポリジーンによって制御されている圃場抵抗性を全て一つの品種に導入することは従来の育種技術では困難である (藤巻 1980, 八重樫 1991). 2) 抵抗性程度が環境条件によって左右されるため検定年や検定場所によってその評価が必ずしも一定しない. 3) 関与する遺伝子数や個々の遺伝子の作用力に関する研究は多くはなく (東・櫛淵 1978), 育種に利用可能な情報が少ない. 4) ポリジーン支配の抵抗性は一般に永続性があり崩壊の危険性は低い (江塚・鳥山 1987) といわれるものの, 主働遺伝子支配の圃場抵抗性の永続性に関する知見は少ない. などの理由から, 圃場抵抗性強品種の効率的育成は進んでいない.

しかし, 近年の分子生物学的手法を用いた遺伝子解析の進展に伴い, QTL 解析手法が確立され, 量的形質に関与する遺伝子の数とその座乗染色体領域, および各遺伝子の作用力を評価することが可能となった (Fisher et al. 1933, 鶴飼 2000). そして, この手法を用

いることで、有用ないもち病圃場抵抗性遺伝子を選択して効率的に品種へ導入することが可能になると考えられ、現在では育種現場においても、いもち病圃場抵抗性遺伝子近傍の DNA マーカーを用いた系統選抜 (MAS : Marker Assisted Selection) が行われている。一例として、愛知県では、DNA マーカー連鎖地図を用いた解析により検出された穂いもち圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* とイネ縞葉枯ウイルス抵抗性遺伝子 *Stvb-i* を、MAS を用いて優良品種「コシヒカリ」に効率的に導入し、我が国初の複合病害虫抵抗性水稻品種「コシヒカリ愛知 SBL」(杉浦ら 2004) を育成したことが挙げられる。しかし、このような MAS を用いたいもち病圃場抵抗性強品種の育成に利用できる遺伝子は限られている。そして、イネにおいて重要な育種目標の一つであるいもち病圃場抵抗性の付与の効率的達成のためには、座乗位置が精密に特定されており、かつ圃場における抵抗性の強さおよび永続性が明らかとなっている遺伝資源を探索することが重要である。一方、イネについては、以前から遺伝連鎖地図を用いた病害抵抗性遺伝子の単離 (positional cloning, map-based cloning) が進められていたが、2005 年にイネゲノムの全塩基配列が解読 (International Rice Genome Sequencing Project 2005) されたことにより、これらの研究が加速化した。すなわち、イネ白葉枯病抵抗性遺伝子である *Xa21* (Song et al. 1995) や *Xa1* (Yoshimura et al. 1998)、いもち病真性抵抗性遺伝子では *Pita* (Orbach et al. 2000)、*Pib* (Wang et al. 1999)、*Pi9* (Qu et al. 2006)、*Pi33* (Berruyer et al. 2003) をはじめとして、多くの遺伝子が単離され、その機能が明らかにされている。また、QTL 解析によって検出された遺伝子座についても単離が進められている。

本論文では、このような状況下、圃場抵抗性に関与する QTL 解析の材料としてイネ系統「北海 188 号」および「中部 32 号」を用い

て、DNA マーカー連鎖地図を利用した QTL 解析を行った。そして、「中部 32 号」については、保有する葉いもち圃場抵抗性に関与する遺伝子の単離と機能の解明を目標として、検出された QTL の座乗位置を遺伝地図上に詳細に位置づけ、候補遺伝子を推定した。また、本遺伝子の圃場における永続性について検討するため、「中部 32 号」に特異的に強い病原性を示すイネいもち病菌株を用いて、その交配後代菌株の病原性の分離を調査し、圃場抵抗性遺伝子において「遺伝子対遺伝子関係」が成り立つかどうかを検証した。

本論文は本章を含め 6 つの章で構成されている。第 2 章では、QTL 解析によって、イネ系統「中部 32 号」および「北海 188 号」のいもち病圃場抵抗性に関与する遺伝子の座乗染色体および座乗領域を特定した。第 3 章では、「中部 32 号」の解析で検出された QTL のうち作用力の大きいものを単離のターゲット遺伝子 (*Pi34* と命名) とし、大規模分離集団を用いた精密連鎖解析により、本遺伝子を遺伝地図上および物理地図上に位置付けた。また、*Pi34* を含む領域の「中部 32 号」ゲノムの塩基配列を解読し、圃場抵抗性弱品種「日本晴」との塩基配列の比較により候補遺伝子を推定した。第 4 章では、「中部 32 号」を特異的に強く侵害するいもち病菌株と同系統を強く侵害しないいもち病菌株との交配により得た後代集団について、*Pi34* に対する病原性の強弱の分離を調査し、*Pi34* に対応するいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR*Pi34** が存在するか否か、すなわち「遺伝子対遺伝子関係」が成り立つかを検証した。第 5 章では、抵抗性の崩壊を回避しうる真性抵抗性遺伝子の利用法として普及している「マルチライン」における病害抑制効果の検証と、北海道・東北地域における 1994 年および 2001 年の分布レース調査の結果から、マルチラインを含む真性抵抗性遺伝子利用におけるレース変動機構について考察した。そして第 6 章ではこれらの研究結果を総括し、量的形質を

示すいもち病圃場抵抗性に関する遺伝子の産物およびその機能について検討するとともに，抵抗性遺伝子の機能と抵抗性の永続性との関係についても考察し，真性抵抗性遺伝子での研究結果を踏まえて，抵抗性育種への *Pi34* の利用の可能性と問題点について検討した．

第2章 イネ系統「中部 32号」および「北海 188号」の いもち病圃場抵抗性のQTL解析と主働遺伝子のマッピング

緒言

イネ系統「中部 32号」は、中国農業試験場で育成された縮葉枯病抵抗性系統「中国 40号」を母本として愛知県農業総合試験場で育成された系統である。本系統のいもち病真性抵抗性遺伝子型は完全には固定しておらず、*Pik-s*型と *Pik-s, Pi-a*型が混在している（小泉・藤 1995）が、葉いもちおよび穂いもちに対して非常に強い圃場抵抗性を示す。すなわち、「中部 32号」の圃場抵抗性は、水田圃場ではいもち病常発地においてもほとんど進展性病斑を生じないほど強く、育種で用いられる抵抗性程度の基準では「強」から「やや強」に分類される。さらに、いもち病に対する感受性が高くなる畑晩播圃場においても、葉身上に生じた病斑は比較的早く進展を停止し、病斑周縁部が黄化する「止まり型」病斑（茂木 1987）となり、その抵抗性はいもち病が数度の感染サイクルを経る期間（約一ヶ月間）で急激に増強する。その結果、圃場抵抗性弱品種がほぼ完全に枯死する条件においても、本系統の病斑面積率（percentage of diseased leaf area : %DLA）は 35%~40%にとどまる（図 2）。また、愛知農業総合試験場山間農業研究所（以下、山間研究所と略す）では、「中部 32号」を交配した F_1 が強い圃場抵抗性を示すことが知られており（小泉, 私信）、以前から「中部 32号」の圃場抵抗性には、作用力の強い 1 個の優性の遺伝子が関わっていると考えられていた。なお、この圃場抵抗性は、系譜から陸稲品種「戦捷」に由来する可能

性が考えられる（図 1 A）.

一方，イネ系統「北海 188 号」は，中国中央部で栽培されていた *japonica* 品種「荔支江」を母本として北海道農業試験場（現在：北海道農業研究センター）で育成された系統であり，非常に強い葉いもち圃場抵抗性を示す（図 1 B）. 三上ら（1990）は，「北海 188 号」から育成された「ふ系 138 号」の圃場抵抗性に関する遺伝解析から，本系統の圃場抵抗性が主働遺伝子支配であることと，その遺伝子が「北海 188 号」に由来することを報告している. しかし，これまで「北海 188 号」の詳細な遺伝解析は行われていなかった.

そこで，本研究では，「中部 32 号」については試験 A，「北海 188 号」については試験 B で，各系統のいもち病圃場抵抗性に関する QTL 解析を行い，圃場抵抗性に関与する遺伝子座の座乗染色体および座乗領域の特定を目的として試験を行った.

材料および方法

1. 供試材料

試験 A：山間研究所において養成された「中部 32 号」といもち病圃場抵抗性弱品種「農林 29 号（真性抵抗性遺伝子型：*Pik-s*）」との交配後代 F₃ 149 系統からなる集団および両親系統・品種を用いた. 本集団のいもち病圃場抵抗性程度は畑晩播検定により評価した. また，F₂ 個体の DNA が得られなかったため，F₃ 一系統あたり 10 個体の幼植物体の葉身を混合した試料からトータル DNA（Bulked DNA）を

抽出し，DNA マーカー連鎖地図作成に供した．検出された QTL の単一遺伝子としてのマッピングには，F₃ 系統を SSD (Single Seed Decent:一穂一粒法) で世代促進して得られた F₆ および F₇139 系統を用いた．

試験 B:「北海 188 号」のいもち病圃場抵抗性解析用集団として，1999～2001 年にかけて，本系統に圃場抵抗性の弱い *indica* 品種「Danghang-Shali」を交配して F₂190 個体および各個体由来の F₃ 集団を養成した．F₂ 個体からは DNA を抽出し，F₃ 集団は圃場抵抗性の検定に供試した．なお，「Danghang-Shali」はレース 001.0 に対して罹病性であることから，日本国内で有効な抵抗性遺伝子は保有していないと考えられた．

2. 葉いもち圃場抵抗性検定

圃場におけるいもち病検定を自然感染で行う場合，圃場に分布するいもち病菌レースに対して，供試系統が感受性である（真性抵抗性を保有していない）ことが必要である．検定圃場を含む地域一帯には，例年レース 007.0 が優占していることが確認されている．「中部 32 号」，「農林 29 号」 「北海 188 号」 および 「Danghang-Shali」 のいずれの品種 および系統も，007.0 に対しては感受性であった．

各系統および両親系統の発病度スコアは，浅賀の調査基準（浅賀 1981）を 21 段階に細分化したものをを用いて調査し，試験 A については，以下の式により病斑面積率（%DLA）に変換した（浅賀 1976）．

$$\log(y/(1-y)) = 0.3687375x - 2.3644375$$

ここでは， $y = (\text{病斑面積率}) / 100$ ， $x = \text{発病度スコア}$ を

表す。

試験 A: 1997年に秋田県大曲市の東北農業試験場（現在：秋田県大仙市 東北農業研究センター）の畑圃場において、畑晩播検定試験を行った。6月9日に、条長40cm、条間10cmの畝間に、F₃系統の間に両親系統が交互に入るようにして一系統あたり約50粒の乾籾を播種し覆土した。試験は3区制・乱塊法により行った。いもち病の感染を促進させるため、いもち病圃場抵抗性が弱く、試験圃場で優占しているイネいもち病菌レース007.0に感受性のイネ品種「ササニシキ」の種を各ブロックの周囲に播種した。基肥として播種当日に硫化アンモニウムを1000m²あたり窒素成分で20kg鋤き込み、いもち病感受性を高めるために追肥として5kg/1000m²を7月8および18日に散布した。自然感染によって発病したため、圃場への伝染源曝露は行わなかった。発病調査は7月15,18,22,25および28日に行い、7月22日から28日にかけての抵抗性レベルを病勢進展曲線下面積（area under disease progress curve : AUDPC）（Parlevliet 1988）として算出し、QTL解析の表現型データに用いた。

試験 B:「北海188号」×「Danghang-Shali」のF₃系統については、上記と同一圃場において2002年に検定試験を行った。播種は6月6日、硫化アンモニウムの追肥（5kg/1,000m²）は6月27日に行った。伝染源として、レース007.0のイネいもち病菌保存菌株である稲86-137を接種した「ササニシキ」罹病葉を7月5日に圃場に散布した。発病調査は7月19および23日に行った。基肥、播種量、試験区の大きさおよび区制は試験Aと同様とした。

3. DNA マーカー連鎖地図の作成

F₃ 149 系統 (試験 A), F₂ 190 個体 (試験 B) および各集団の両親系統・品種のトータル DNA (ゲノミック, ミトコンドリアおよび葉緑体 DNA を含む) を, CTAB 法 (Murrey and Thompson 1980) を一部改変して抽出した (付録 M 1).

DNA マーカー連鎖地図の作成には, 地図作成プログラム MAPMAKER/EXP ver. 3.0 (Lander et al. 1987) を用いた. bulked F₃ DNA が示すマーカーの遺伝子型は, 各 F₃ 系統の由来である F₂ 個体の遺伝子型と同一であると考えられることができるため, マーカーの順序とマーカー間の遺伝距離は, 試験 A では bulked F₃ DNA, 試験 B では F₂ DNA のマーカー遺伝子型の分離データに基づき, 本プログラムの F₂ アルゴリズムを用いて計算した. 地図の遺伝距離は Kosambi centimorgans (cM) で表した. また, MAPMAKER/EXP で同一連鎖群とされたマーカーグループの染色体番号は, マーカーの「日本晴」/「Kasalath」の RFLP 連鎖地図 (Harushima et al. 1998) に基づいて決定した.

試験 A: 両親系統間におけるゲノム DNA の塩基配列多型は, 両系統のゲノム DNA を 8 種の制限酵素 (*Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RV, *Hind* III, *Apa* I, *Dra* I, *Eco* RI, *Kpn* I) で切断・電気泳動後にブロッティングしたナイロンメンブレンフィルターと, イネゲノム研究プロジェクト (Rice Genome Research Program : RGP) より分譲されたイネの cDNA およびゲノミック DNA の部分配列クローンのプローブを, ECL direct-labeling and detection system (GE Healthcare Life Science) を用いてサザンハイブリダイゼ

ーションし，検出した（付録M2）．cDNAおよびゲノミック DNA クローンは，イネ品種「日本晴」と「Kasalath」の F₂ 集団を用いて作成された遺伝地図上にあらかじめ位置づけられたクローン（Harushima et al. 1998）の中から，12本の染色体をほぼ均等に網羅するように 558 個を選んだ．両親系統間で多型を示したプローブ（DNA マーカー）については，親系統と同様の方法で作成した F₃ 149 系統のフィルターを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い，各系統におけるマーカーの遺伝子型を調査した．

また，両親系統間における多型マーカー数を増やすために，Temnykh ら（2000）が開発した SSR マーカー（論文では microsatellite marker と記載）のうち，1,2,3,4,9,10,11 および 12 番染色体上に座乗する 62 個のマーカーを用いて多型の検出を行った（付録M3）．親系統間で多型を生じたマーカーについては，F₃ 系統におけるマーカーの遺伝子型を調査した．さらに，RFLP プローブとして用いたクローンのインサート配列からプライマーを設計し，ゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅後，制限酵素処理により多型を検出する CAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequence）マーカーも作出して使用した（付録M4）．

試験 B： F₂ 190 個体から任意に 126 個体を選び，連鎖地図作成と QTL 解析に用いた．RGP から提供された 1364 個の SSR マーカーについて，両親系統間の多型を調査した．多型を生じたマーカーについて，F₂ 126 系統におけるマーカー遺伝子型を調べた．構築された連鎖群は，McCouch らが作成した IRMI SSR map に基づいて各染色体との対応付けを行った．

4. QTL 解析

試験 A: いもち病圃場抵抗性に関与する QTL を検出するために、QTL 解析プログラム MAPMAKER/QTL ver.1.1 (Lincoln et al. 1993) を用いてインターバルマッピングを行った。畑晩播検定における病斑面積割合および AUDPC の 3 反復の平均値を、表現型データとして用いた。QTL は、対数尤度比の値 (LOD Score) 2.0 を閾値として検出した。本プログラムを用いて、検出された各 QTL の「優性効果」、「相加効果」および表現型への「寄与率」についても解析した。

試験 B: QTL 解析には MAPMAKER/QTL ver.1.1 を用いた。表現型データは 7 月 23 日の発病度スコアを用い、QTL 解析の LOD score は 3.0 を閾値とした。

5. 主働遺伝子のマッピング

試験 A: QTL が検出された 11 番染色体上の 8 個のマーカーを用いて、SSD により得た F₆139 個体の QTL 領域の遺伝子型を調査するとともに、2000 年および 2001 年に F₇ 系統の畑晩播検定を行い、各系統を両親系統の発病程度を基準に、'r (圃場抵抗性強)' もしくは 's (同弱)' と判定した。得られた遺伝子型および表現型データを用いて、MAPMAKER/EXP により QTL を単一主働遺伝子としてマッピングした。

試験 B: QTL が検出された染色体について、40 個の SSR マーカーを追加して、190 個の F₂ 全個体を用いてマッピングを行った。検出された QTL については QGene 3.06z

(<http://www.qgene.org/>) を用いて単一遺伝子として連鎖解析を行った。

結果

1. 圃場抵抗性の分離

試験 A: 検定圃場において、いもち病は播種約一ヶ月後に発病し、病徴は7月中旬にかけて急速に進展した。最終調査日における「中部 32 号」の平均発病スコアは 6.29 であり、DLA に換算すると約 45% となった。同日の「農林 29 号」では平均発病スコアは 9.19 であり、DLA は 92% に達した。両親系統間では葉いもち抵抗性において有意な差が認められた ($P < 0.01$)。F₃ 集団における 7 月 22 日から 28 日にかけての AUDPC の頻度は 2.0~5.5 間に分布し、4.2 で谷となる二峰性を示した (図 3A)。AUDPC と発病度スコアとの関係を調べたところ、両者には非常に高い相関があることが明らかとなった ($r = 0.951$, $P < 0.001$)。このことから、F₃ 系統を、発病度スコアの頻度分布の谷である 8.5 を境として圃場抵抗性強 (r) と同弱 (s) の 2 グループに分け、r および s の系統数の分離比率を算出し、抵抗性が一遺伝子によると仮定した場合に期待される分離比率である r:s=3:1 に適合するかをカイ二乗検定した。その結果、仮説は棄却されず ($0.2 < P < 0.3$)、実際の実験分離比率は期待比率に適合していることが明らかとなった。同様の試験を、AUDPC データを用いて行った場合も分離比率は期待値の 3:1 に適合した ($0.3 < P < 0.5$)。これらのことから、「中部 32 号」の圃場抵抗性には、1 個の優性遺伝子が関与することが明らかと

なった。

試験 B：検定圃場における「Danghang-Shali」の平均発病スコアは 9.9 (DLA で 94.9%)，「北海 188 号」は 6.1 (同 43.7%) であった。F₃ 系統における発病スコアの頻度分布は，その範囲が 5.0 から 10.0 であり，9.0 を谷とする二峰性を示した (図 3 B)。発病スコア 9.0 を境として r および s の 2 グループに分け，系統の分離比率が r:s=3:1 に適合するかをカイ二乗検定したところ，分離比率は期待値の 3:1 に適合した (0.9<P<0.95)。これらから，「北海 188 号」のいもち病圃場抵抗性にも主に 1 個の優性遺伝子が関与することが明らかとなった。

2. DNA マーカー連鎖地図

試験 A：供試した 556 個の RFLP, 62 個の SSR, 2 個の CAPS マーカーのうち，「中部 32 号」と「農林 29 号」間で多型を生じたマーカーは 89 個あり，両親間での多型検出率は 12.5% であった。このうち，明瞭な多型を示した 50 個のマーカーを用いて bulked F₃ 149 系統について分離分析を行った。その結果，36 個のマーカー (RFLP 32 個，SSR 3 個，CAPS 1 個) が，ゲノムのヘテロを識別できる共優性マーカーとして，全長 327cM，6 本の染色体をカバーする 8 個の連鎖群からなる DNA マーカー連鎖地図上に位置づけられた (図 4)。各連鎖群内におけるマーカーの順序は，ほぼ RGP が作成した地図と対応していた。

試験 B：供試した 364 個の SSR マーカーのうち，172 個が両親間で多型を示した。両親間での多型検出率は 12.6% であった。このうち，共優性で，明瞭な多型バンドを示した

147 個のマーカーを, F_2 126 個体を用いた連鎖地図作成に用いた. 構築された DNA マーカー連鎖地図は総遺伝距離 1710.4cM で 12 本の全染色体をカバーしており, マーカー間の平均遺伝距離は 11.6cM であった. 各連鎖群内におけるマーカーの順序は McCouch et al (2002) の報告とほぼ一致していた.

3. いもち病圃場抵抗性関連 QTL の検出

試験 A: MAPMAKER/QTL を用いて, single-QTL model に基づいた葉いもち圃場抵抗性に関与する QTL のインターバルマッピングをおこなったところ, 2 個の QTL が 11 番染色体上に検出された. 第 1 の QTL ($QTL1$ とする) は, マーカー RM209-C50 (遺伝距離 26.0cM) 間に見いだされ, LOD Score のピークはマーカー C1172-RG702 間 (遺伝距離 0.8cM) で, その値は 19.7 であった. 第 2 の QTL ($QTL2$) は, マーカー G320-G202 間 (遺伝距離 30.9cM) にマップされ, LOD Score は 10.7 であった. これら 2 個の QTL が実際に表現型に影響を及ぼすものであるか否かを確認するために, 本プログラムの multiple-QTL model に基づき, 一方の効果を排除 (「固定」) した上での他方の QTL の効果を検証した. $QTL2$ を「固定」してインターバルマッピングを行った場合, 個々の対数尤度の和 (19.7+10.7=29.7) よりもかなり低い QTL (対数尤度 20.7) が検出された. この結果は, $QTL1$ は確かに存在するが, 2 個の QTL 間にエピスタシスが存在するか, もしくは $QTL2$ は偽 QTL であることを示している. 一方, $QTL1$ を「固定」して同様の操作を行ったところ, 閾値を超える LOD を示すピークは検出されな

った。さらに，マーカー G320-G202 間のインターバルは 24.9cM と非常に長く，検出された LOD のピークはほぼその中央に位置していた。これらの結果から，*QTL2* は偽 QTL であると結論づけた。存在が確定した *QTL1* は RM209-C50 間に位置づけられ，その遺伝効果は，優性効果はあるが相加効果はほとんど無かった。この QTL の F₃ における全表現型分散に占める寄与率は 59.2%であった（図 5 A）。検出された QTL はいもち病圃場抵抗性に関する主働遺伝子であると考えられたため，*Pi34(t)* と命名した。

試験 B: インターバルマッピングの結果，1 番および 8 番染色体の 2 ヶ所に QTL が検出された（図 5 B）。圃場抵抗性との強い関連が認められた QTL は，1 番染色体の長腕上のマーカー RM1216 と RM5501 間に検出された。この QTL の全表現型分散に占める割合（寄与率）は 69.4%であり，抵抗性 allele は「北海 188 号」であった。この領域に高い LOD score が検出されたことから，「北海 188 号」は主働抵抗性遺伝子を保有していることが示唆された。そこでこの QTL を *Pi35(t)* と命名した。第 2 の QTL は 8 番染色体に座乗するマーカー RM5068 と RM6999 間に見いだされ，その寄与率は 13.4%であった。この抵抗性遺伝子座は「Danghang-Shali」由来であった。

4. 主働遺伝子のマッピング

試験 A: 11 番染色体の QTL を含む領域について，6 個のマーカーからなる 27.0cM の連鎖地図を作成して連鎖解析を行った結果，*Pi34(t)* はマーカー C1172 他 2 マーカーと E2021 間（遺伝距離 11.5cM）に位置づけられた（図 6 A）。

試験 B : マーカーおよび解析個体数を追加して, 1 番染色体の *Pi35(t)* を含む領域において 13 個のマーカーからなる 47.6cM の連鎖地図を再作成した. マーカー間の平均距離は 3.5cM であった. 連鎖解析の結果, *Pi35(t)* はマーカー RM1216 – RM1003 間に位置づけられ, その遺伝距離は 3.5cM であった (図 6 B).

考察

これまで, 「圃場抵抗性 (Field Resistance)」や「部分抵抗性 (Partial Resistance)」といわれる植物の抵抗性は, 通常ポリジーンに支配されていると考えられていた. しかし, 本研究で QTL 解析によって検出された「中部 32 号」の葉いもち圃場抵抗性に関与する QTL は, 単一の優性遺伝子であり, 「北海 188 号」にも, 強い作用力を持つ優性遺伝子が見いだされた. これらは, 畑晩播検定における交配後代系統の発病程度の分離頻度の結果とも一致する. 後代系統における発病程度および AUDPC の頻度が連続分布を示した理由については, ①今回検出された QTL が不完全優性であるために, QTL 領域がヘテロ接合体の系統は両親の中間程度の抵抗性を示す. ②検出された QTL 以外のマイナー遺伝子が存在している. ③畑晩播検定は複数回の伝染サイクルを経た結果を評価するため, 圃場内における 1 回目の感染時期のずれや, 隣接系統の抵抗性程度の違いによるいもち病菌の増殖速度の差が圃場内の発病ムラとなる. すなわち, 環境要因による分散が大きい. 等が考えられた. 同時にこれらは, QTL を連鎖地図上に正確にマッピングして単離する上での大きな障害になりうるため,

遺伝子型と表現型の対応についての詳細な観察や、より高い検定精度を得られる試験法の開発等を行ってこれらの問題に対処する必要がある。

興味深いことに、福岡・奥野（1999）や宮本ら（1999）が報告している在来陸稲品種「オワリハタモチ」および「嘉平」のいもち病圃場抵抗性遺伝子の QTL 解析では、最も作用力の大きい QTL はいずれの品種においても 4 番染色体に見いだされているが、本研究で検出された *Pi34(t)* とほぼ同じ領域にも、比較的作用力の弱い QTL が検出されている。これら 3 品種はいずれもいもち病圃場抵抗性の強い在来陸稲品種「戦捷」に由来することから、*Pi34(t)* の遺伝子源は「戦捷」である可能性が高いと推察され、「中部 32 号」については育種の過程で「オワリハタモチ」等が保有する作用力の大きい 4 番染色体の QTL が欠落し、*Pi34(t)* だけで強い圃場抵抗性を保持していると考えられる。東（1995）は、ダイヤレル分析、雑種後代系統の分散分析および標識遺伝子を用いて「戦捷」の圃場抵抗性遺伝子の遺伝分析を行い、同品種の圃場抵抗性は 1, 2, 3, 4, 7 および 11 番染色体に座乗する最多で 8 個の遺伝子が関与すること、抵抗性の遺伝効果は主に相加効果であるが、8 個のうち、一部の遺伝子が他と比較して大きな作用力を有し、部分優性効果があることを示している。また、11 番染色体に座乗する「戦捷」の圃場抵抗性遺伝子は *Pi-se* と命名され、「陸稲農林糯 4 号」および「陸稲農林糯 26 号」に導入されている（後藤・アリ 1983）ことから、本遺伝子は比較的作用力が強く、単独遺伝子として選抜が可能であった可能性が示唆される。*Pi-se* と *Pi34(t)* は同一遺伝子である可能性が高いが、*Pi-se* の詳細なマッピングは行われていないためその異同は明らか

でない。

「中部 32 号」の交配後代系統を用いた DNA マーカー連鎖地図作成では、600 以上のクローンを試したにもかかわらず、地図上に位置付けられたマーカーはわずか 36 個であった。通常、供試品種間における遺伝的類似度が高くなるほど、それらの間で検出される多型の頻度は低くなる。この研究において用いられた両親系統はいずれもジャポニカの水稲系統であったため、2 系統間における遺伝的類似度は比較的高かったと推察される。そのため、今回構築した DNA マーカー連鎖地図は 12 本のイネ全染色体をカバーしておらず、また、QTL 領域を含めマーカー密度は非常に低かった。また、マーカー密度が粗かったために、作用力の小さい QTL が検出できなかった可能性も考えられる。これらの理由から、「中部 32 号」と「農林 29 号」を両親に用いた交配後代集団を用いて、マーカー密度の高い連鎖地図を作製し、検出された QTL の正確な位置を特定して本遺伝子の物理地図を作製することは困難であると考えられた。

この問題を解決するため、今回検出された QTL をカバーする領域は「中部 32 号」と遺伝的類似度の低い *indica* 品種「Kasalath」ゲノムで、それ以外のゲノム領域は *japonica* 品種「コシヒカリ」である染色体断片置換系統 CSSL (Chromosomal Segment Substitution Line) を、「中部 32 号」と交配して後代集団を養成した。接種試験により、ここで用いた CSSL は、圃場抵抗性検定の障害となるようないもち病真性抵抗性遺伝子を持たず、圃場抵抗性についても「コシヒカリ」とほぼ同等で「弱」であることを確認している。この系統を交配した後代集団を用いることで、QTL 領域にお

いて、物理地図作成に不可欠な高密度マーカー連鎖地図の作成が可能になると考えられたため、第3章および第4章では、新たに養成したこれらの交配後代系統を用いた精密連鎖解析を行った。

一方、「北海188号」に見出されたいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi35(t)* については、1番染色体上に座乗する既知のいもち病抵抗性遺伝子 *Pi-t* (Kaji et al. 1997), *Pi-24(t)* (Sallaud et al. 2003), *Pi-27(t)* (Zhu et al. 2004) および *Pish* (Araki et al. 2003) との異同について調べた。*Pi-t*, *Pi24(t)* および *Pi27(t)* とは連鎖地図上へマップされた位置が異なることから、*Pi35(t)* はこれらとは別の遺伝子であると考えられた。*Pish* とはマップされた領域に近いが、*Pish* は日本に分布する大部分のイネいもち病菌には真性抵抗性を発揮しないことが知られていることから、本遺伝子は *Pish* と異なる遺伝子である可能性が高い。しかしながらこのことを確認するためには、検定圃場に分布しているいもち病菌の *Pish* に対する病原性を調べる必要があるため断定はできない。*Pi35(t)* についても、単離を目標に Fine mapping が進められている。

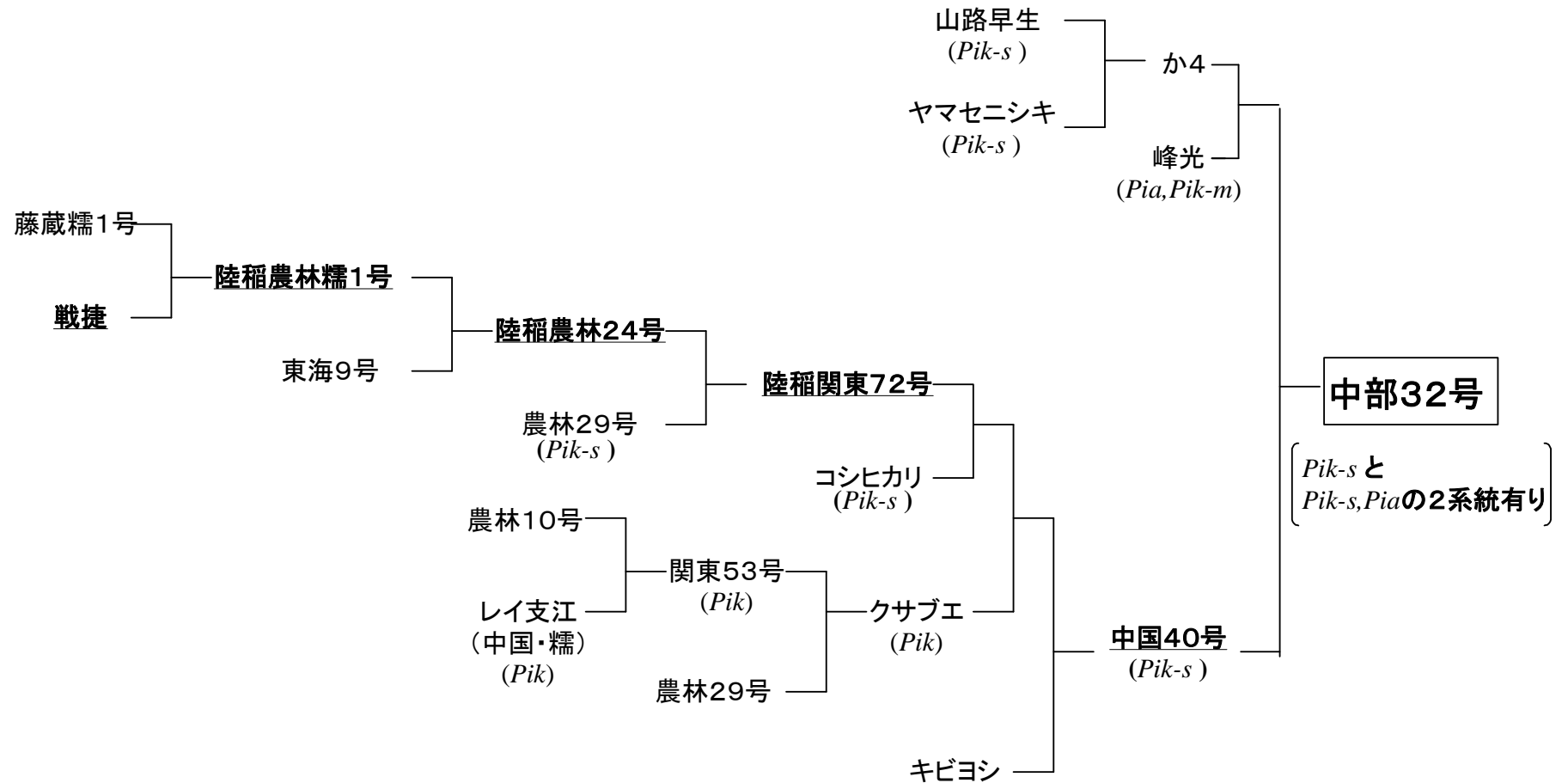


図1-A イネ系統「中部 32 号」のいもち病圃場抵抗性および真性抵抗性遺伝子に関する系譜

注1) 各品種の下の括弧内の遺伝子記号は判明している真性抵抗性推定遺伝子型を示す.

2) 品種・系統名に下線のあるものは、「中部 32 号」の圃場抵抗性の供与親であると推定される.

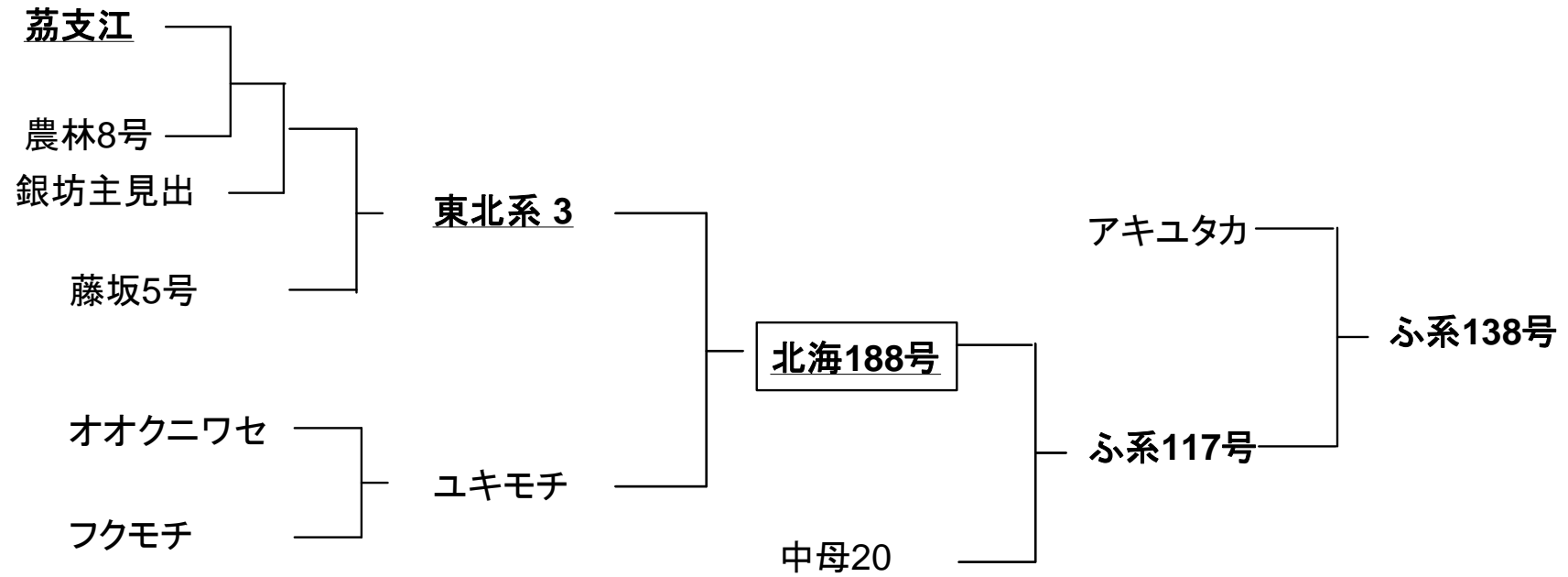


図1-B イネ系統「北海188号」のいもち病圃場抵抗性に関する系譜

注) 品種・系統名に下線のあるものは、「北海188号」の圃場抵抗性の供与親であると推定される。



図2 畑晩播圃場における「中部 32 号」の葉いもち圃場抵抗性

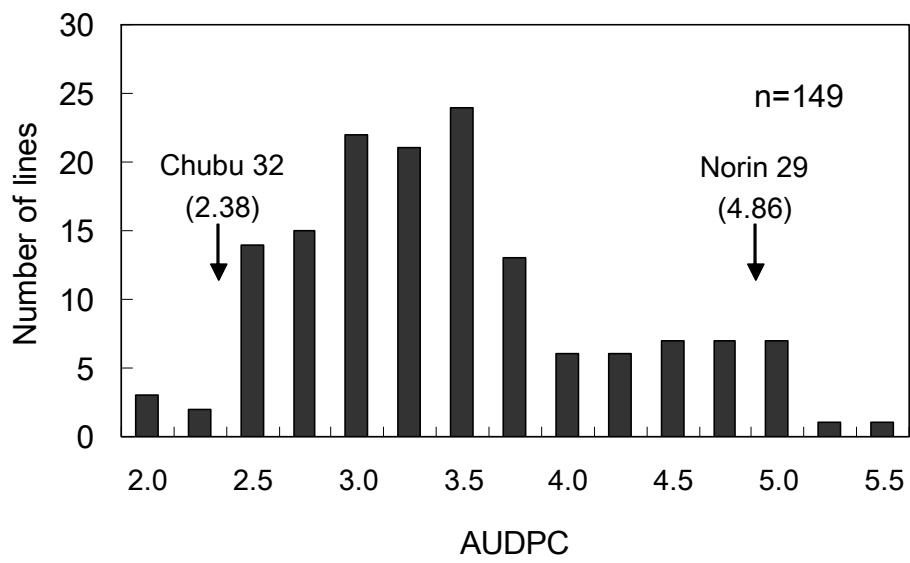


図3-A 「中部 32 号」と「農林 29 号」の F_3 系統における AUDPC の頻度分布
 注) 矢印は両親系統の AUDPC の位置を示す.

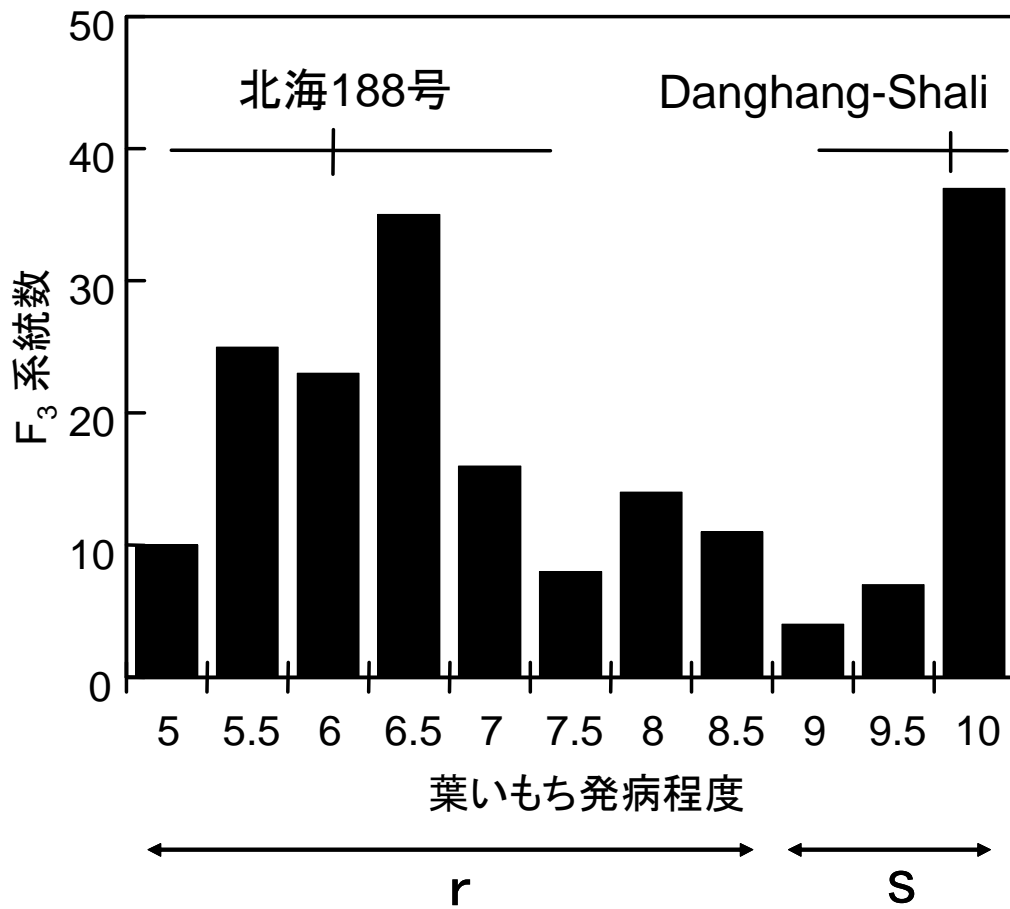


図3-B 「北海 188 号」と「Danghang-Shali」の F₃ 系統における葉いもち発病程度の頻度分布.

注1) 図中の+は各両親系統が示した発病程度の範囲を示す.

2) F₃ 系統は境界値である発病程度 9.0 で圃場抵抗性強(r)と同弱(s)に分けられる.

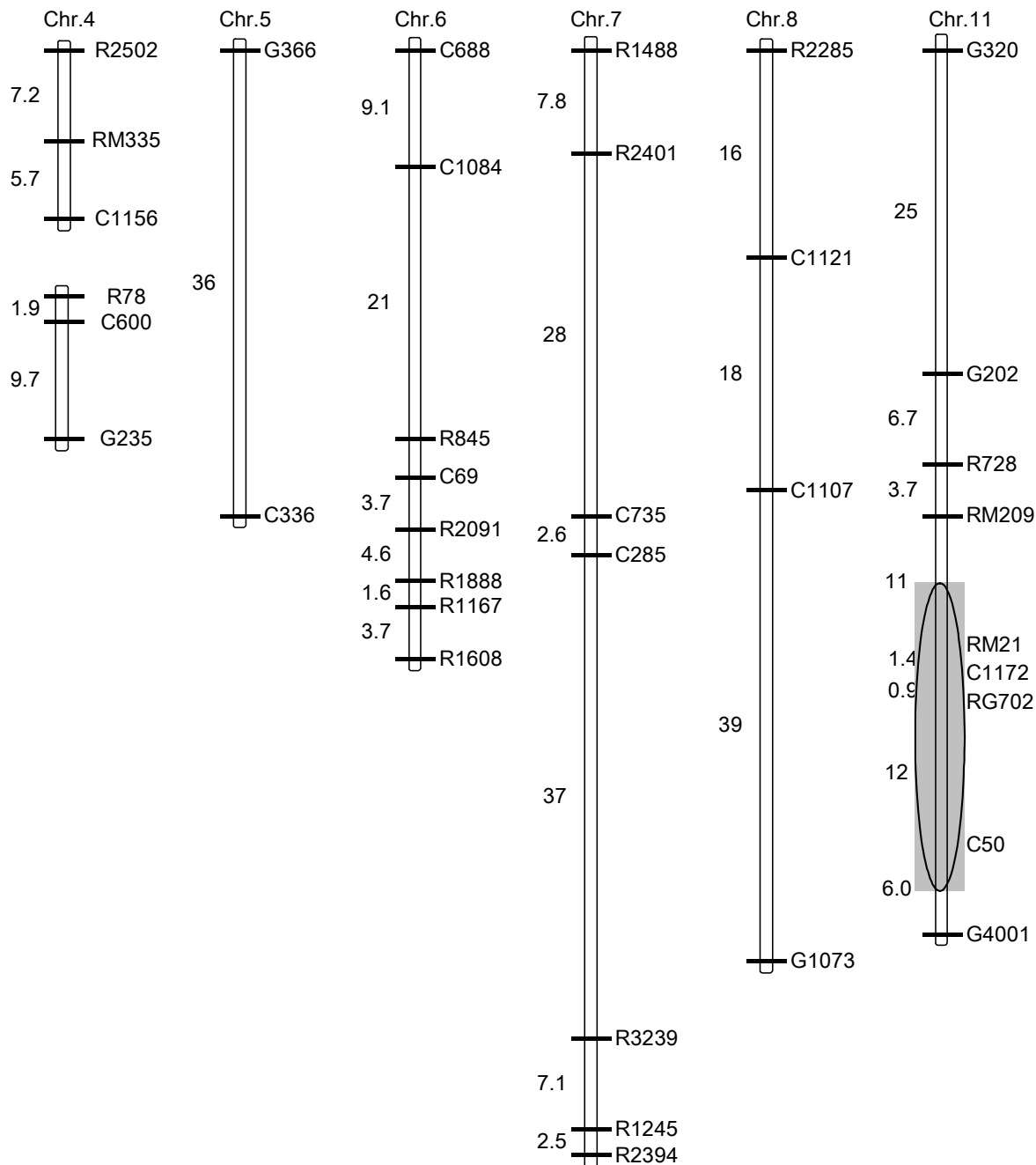


図4 「中部 32 号」と「農林 29 号」の F₃ 系統の DNA マーカー連鎖地図および葉いもち圃場抵抗性関連 QTL

注1) 頭文字が C はカルス由来, R は根由来の cDNA ライブラリークローン, G はゲノミッククローンから作成した RFLP マーカーで, RGP から分譲されたもの. RFLP マーカー RG702 はコーネル大学から分譲されたクローン. 頭文字が RM は SSR マーカー.

2) マーカー間の数字は遺伝距離 (cM) を示す.

3) 楕円で示した領域が MAPMAKER/QTL1.1 で検出されたいもち病圃場抵抗性に関する QTL.

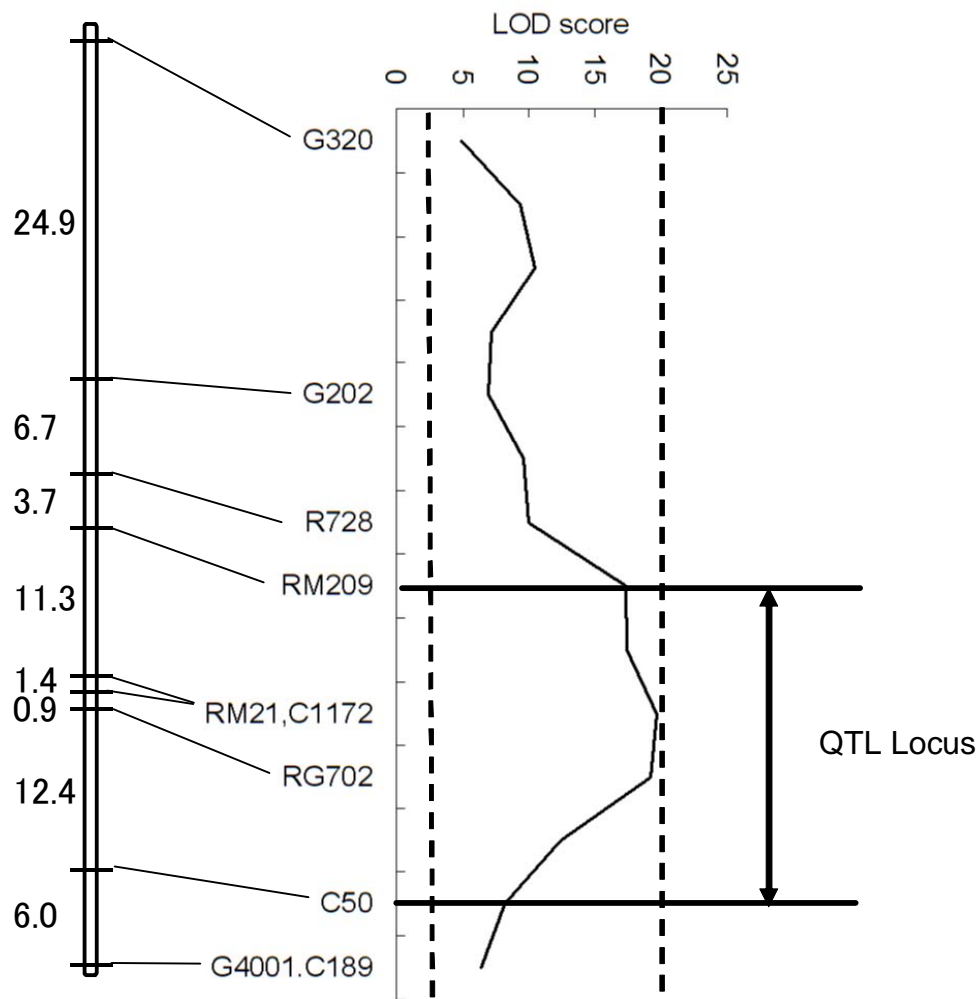
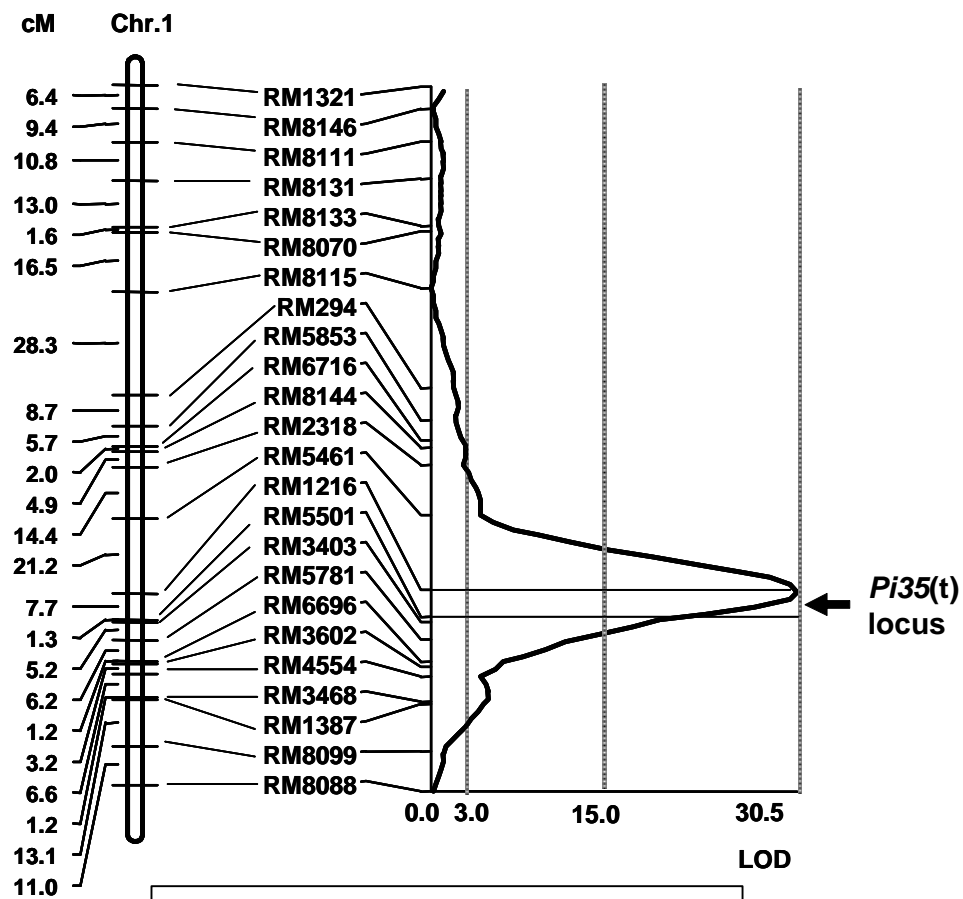


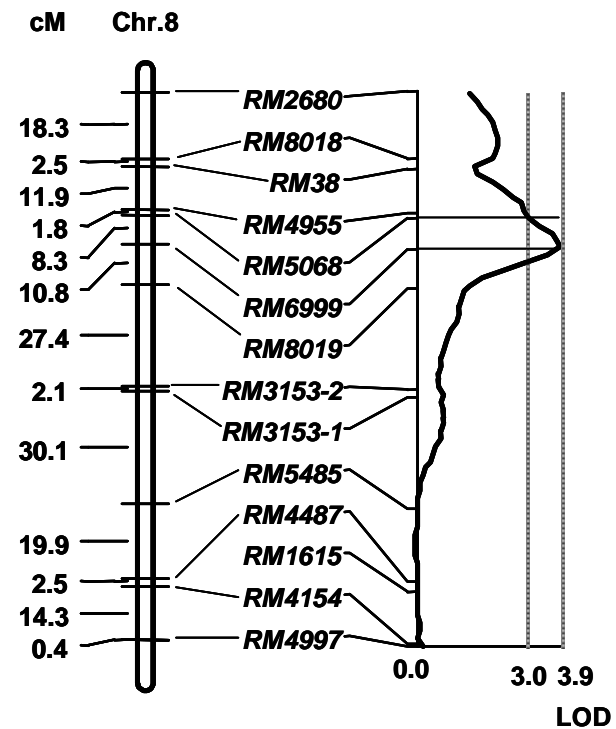
図5-A 「中部 32 号」と「農林 29 号」の F₃ 集団を用いて 11 番染色体上に検出された
葉いもち圃場抵抗性の QTL マップ



LOD peak location: RM1216-RM5501

LOD score: 30.5

寄与率: 69.4%



LOD peak location: RM5068-RM6999

LOD score: 3.9

寄与率: 13.4%

図5-B 「北海 188 号」と「Danghang-Shali」の F₃ 集団を用いて検出された葉もち圃場抵抗性の QTL マップ

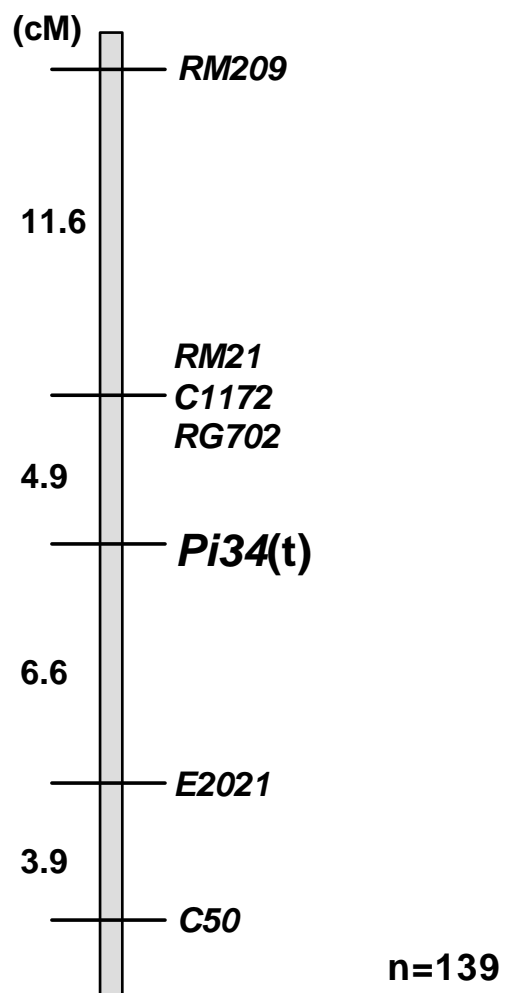


図6-A 「中部 32 号」と「農林 29 号」の F_6 系統を用いた DNA マーカー連鎖地図上への *Pi34(t)* のマッピング

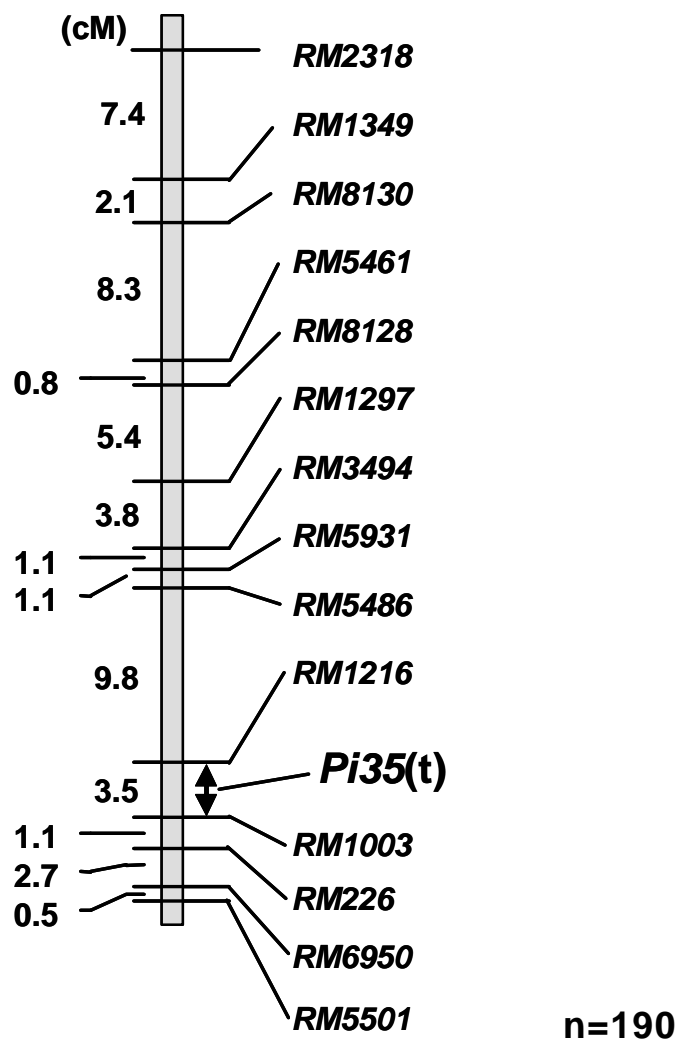


図6-B 「北海 188 号」×「Danghang-Shali」の F₂ 個体を用いた DNA マーカー連鎖地図上への *Pi35(t)* のマッピング

第 3 章 イネ系統「中部 32 号」と染色体断片置換系統 「CSSL」の雑種後代集団を用いた *Pi34* の精密マッピングと遺伝子予測

緒言

「中部 32 号」のいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34(t)* は、QTL 解析によって 11 番染色体の長腕上にある DNA マーカー C1172 と E2021 に挟まれた 11.5cM の領域内に位置づけられた。本遺伝子は単一遺伝子としての解析が可能であると考えられたため、(t) を削除し *Pi34* と命名した。標的遺伝子を DNA マーカー連鎖地図上に正確に位置づけるためには、マーカー密度の高い連鎖地図を構築する必要がある。一般的に DNA マーカー密度は、連鎖地図作成に用いた親品種の塩基配列の違いの程度に依存するため、交配相手には遺伝子の供与親と遺伝的類縁性ができるだけ低い品種を選ぶことが重要である。しかし同時に、交配相手は、①抵抗性検定の障害となるいもち病真性抵抗性遺伝子を有しておらず、圃場抵抗性程度も低い。②雑種不稔が生じない。という条件を満たしている事も必要であるため、通常の *indica* 品種を利用することは難しい。一方、*Pi34* は 11 番染色体の長腕上に位置づけられており、本遺伝子の精密マッピングの際に遺伝的類縁性の程度が問題となるのは、この領域のみである。これらのことから、新たな解析集団のための交配相手として、

RGP で養成中であった染色体断片置換系統 (Chromosomal Segment Substitution Lines : CSSL) から, 11 番染色体の長腕領域が *indica* 品種「Kasalath」で置換され, その他のゲノム領域はほぼ *japonica* 品種「コシヒカリ」である系統の分譲を受け, 精密連鎖解析用の雑種集団を養成した.

まず, 「中部 32 号」と「CSSL」の F₂ 個体を用いて *Pi34* のラフマッピングを行い遺伝子の位置を確認した後, *Pi34* 領域がヘテロの個体の後代である F₃ 個体について近傍領域の遺伝子型を調査し, *Pi34* 近傍で染色体の乗り換えが生じた「組換え個体」を選抜した. 組換え個体を自殖して得た F₄ 系統種子を用いて畑晩播検定による表現型調査を行い, 連鎖地図上における *Pi34* 座乗領域の絞込みを行った.

これまでの解析から, *Pi34* は完全な優性ではなく形質も量的であることから, 本遺伝子をヘテロに保有する個体の場合, 次世代を用いた抵抗性検定の結果にはかなりのばらつきが生じ, 検定精度が低くなる可能性がある. 従って, *Pi34* 近傍における組換え個体については, 当該領域がホモ化した個体を次世代種子から選抜して遺伝子のマッピングに用いた.

一方, 精密マッピングの過程で, 遺伝子型から予測される表現型を示さない組換え個体および系統が複数出現した. これら「(遺伝子型・表現型の) 矛盾個体」が出現した原因としては, ①圃場検定の精度が低いことによる表現型の誤評価. ② *Pi34* 以外に「中部 32 号」のいも

ち病圃場抵抗性に關与する遺伝子座が存在していること。の二つが考えられる。そこで、①については、畑晚播検定を複数回行うとともに、室内検定の方法を確立して、個体レベルでの表現型の調査を試みた。②については、矛盾個体が示した表現型から、*Pi34* 以外の QTL が示すであろう遺伝子型を予測し、「中部 32 号」と「コシヒカリ」間で多型を示す SSR マーカーを用いて「矛盾個体」の遺伝子型を調査し、予測遺伝子型と一致するマーカーを探索した。

次に、精密マッピングで決定された *Pi34* 領域の塩基配列を解読するために、「中部 32 号」ゲノム DNA の BAC (バクテリア人工染色体 : Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーを作成し、*Pi34* を含むクローンを選抜してその塩基配列を解読した。「中部 32 号」および公開されている「日本晴」の塩基配列から、RiceGAAS (rice genome automated annotation system) を用いて ORF (open reading frame) を予測し、*Pi34* 候補遺伝子の推定を行った。

材料および方法

1. 供試材料

「中部 32 号」との交配に用いた染色体断片置換系統「CSSL」は、11 番染色体の長腕の DNA マーカー S2137 - S12886 (「日本晴」×「Kasalath」F₂ 連鎖地図上の位置は 45.6 - 117.0cM) 間が「Kasalath」染色体に

置換し，それ以外のゲノムがほぼ「コシヒカリ」に固定した系統である．本系統は，秋田県大仙市の畑晩播検定圃場周辺に分布するイネいもち病菌レース 007.0 に対して有効な真性抵抗性遺伝子を保有せず，またその圃場抵抗性程度は「中部 32 号」より明らかに低いことを接種試験によって確認している．2000～2004 年にかけて，精密マッピング用雑種集団を以下のように養成した．

2000 年：「中部 32 号」と「CSSL」を交配し，1 個体の F_1 から F_2 種子（34 粒）を得た．

2001 年：各 F_2 個体から F_3 種子を採種し，そのうち *Pi34* 領域がヘテロであった F_2 5 個体由来の F_3 個体から，MAS により C1172－C189 間における *Pi34* 近傍組換え F_3 個体を選抜した．

2002 年：組換え F_3 個体を自殖して F_4 種子を採種した．

2003 年：1～3 月に，組換え F_3 個体ではヘテロであった組換え領域が， F_4 では「中部 32 号」もしくは「Kasalath」に固定した「組換え固定個体」を MAS により選抜して育苗後，3 月に宮崎県農業試験場内の圃場に移植し，7 月に組換え固定系統（ F_5 ）を得た．

2004 年：組換え F_3 または F_4 個体を選抜（2 回目）し，自殖種子（ F_4 または F_5 ）を採種した．一部の選抜個体由来の自殖種子から組換え固定個体を選抜して次世代種子を採種した．

また，組換え個体の選抜に用いた集団の親個体のグ

グラフィカルジェノタイプは図 7 に示した。2002 年に選抜した組換え個体を用いた *Pi34* のマッピングでは、遺伝子領域を特定できなかつたため、2004 年および 2005 年に F₂ および F₃ 個体から、RM21 よりもよりセントロメアに近い位置にあるマーカー Z115 を用いて、Z115-C189 間(2004 年)および Z115-C1172 間(2005 年)における組換え個体を選抜した。なお、組換え個体の遺伝子型および次世代種子を用いた抵抗性検定結果(表現型)を統合することにより得られるマッピング結果によって、遺伝子のより近傍で染色体の乗換えが生じていることが明らかとなった組換え個体については、2003~2005 年にかけて東北農業研究センター水田利用部内の圃場において、2002~2003 年と同様の方法で、随時組換え固定個体を選抜して次世代種子を採種し、表現型の検定に供試した。

2. CSSL/中部 32 号 F₂ 個体を用いた *Pi34* のマッピング

DNA抽出：交配により得られた F₂ 34 個体から CTAB 法 (M1) によりゲノミック DNA を抽出した。

使用マーカー：11 番染色体上の 8 個の RFLP (S2137, G44, C3, S6537, E51178, RG702, E1126 および C1003), 1 個の SSR (RM21), 2 個の STS (S723 および C189) および 4 個の CAPS (C1172, E51236, C30038 および C50) マーカーを用いて、各個体の遺伝子型を調査しグラフィカルジェノタイプを明らかにした。各マーカーの検出方法は、第 2 章第 3 項に準じ

た．なお，「中部 32 号」と「農林 29 号」の交配後代におけるマッピングに用いた RFLP マーカー G202, G320 および E2021 は，「CSSL」との交配後代においては多型を生じなかったため使用しなかった．

抵抗性検定：F₂ 34 個体のうち，採種できた 32 個体由来の F₃ 系統種子を用いて，2002 年に畑晩播による抵抗性検定を行った．抵抗性程度すなわち DLA を両親系統と比較して，各系統を r（抵抗性強），s（抵抗性弱）または m（抵抗性程度が系統内で分離し，DLA は r と s の中間程度）と判定した．

Pi34 のマッピング：MAPMAKER/EXP ver.3.0 を用いて，11 番染色体の連鎖地図に Pi34 を位置づけた．

3. 大規模分離集団を用いた Pi34 の精密マッピング

DNA 抽出：2002 年は F₂ 番号 3,7,18,25 および 29 由来の F₃ 1054 個体，2004 年は F₃ 番号 3-4, 3-20, 3-22, 3-27, 7-4,18-20,29-10,29-20 および 29-22 由来の F₄ 1515 個体，2005 年は F₂ 番号 8 由来の F₃, F₃ 番号 3-2,3-3,7-17,18-1,18-20,29-15 および 29-17 由来の F₄ 計 1443 個体を育苗用セルトレイ（288 穴）の 8 行×12 列（計 96 穴）に一粒ずつ播種し，第 3 または 4 葉の葉身から簡易抽出法（Aljanabi and Martinez 1997）を一部改変した方法（付録 M 5）で DNA を抽出した．選抜マーカー間における組換えが確認された個体については，本田あるいは 1/5000a ワグネルポットへ移植し，第 6 葉～止葉出葉時期に葉身から CTAB 法で高純

度ゲノミック DNA を抽出した。

選抜マーカー：2002年はRM21およびSTSマーカー化したC189, 2004年はSTSマーカーZ115およびC189, 2005年はZ115およびCAPSマーカー化したC1172を選抜マーカーとして使用した。各マーカーの検出方法は、第2章第3項に準じて行った。

抵抗性検定：畑晩播検定と室内検定を実施した。畑晩播検定は、6月に播種して7~8月に調査を行う夏検定と、8月に播種して9月に調査する秋検定を行った。室内検定は、2000年に、検定に最適な接種葉齢について予備的に検討した。すなわち、縦6cm×横15cm×深さ10cmのシードリングケースにケース当たり3.0gのタキホスカ肥料(N-P-K:13-13-13)を添加した培養土を詰め、「中部32号」、「農林29号」および「コシヒカリ」の種子を5粒で2列の計10粒播種して育苗した。6葉から10葉の各最上位葉展開期に、当研究室保存の親和性イネいもち病菌株「稲85-182」および「Kyu89-246」(レース003.0)の分生孢子懸濁液(孢子濃度 2.0×10^5 個/ml)を、6葉期接種ではケース当たり10ml, 7葉期では13.3ml, 8~10葉期では16.6ml噴霧接種し、接種7~10日後の接種葉のDLAを調査した。組換え系統の室内検定では、予備試験で得た接種条件を参考にして、3.0gのタキホスカ肥料を添加した培養土を詰めた1/5,000aワグネルポットに、10粒の種子を円形に播種し、分けつを切除しながら育苗した。接種にはいもち病菌株「稲86-137」(レース007.0)

を用いた。各年に実施した検定内容を以下に示した。

2003年：夏検定で2002年選抜組換え個体由来のF₄系統を，秋検定でそれらの固定系統を調査した。

2004年：秋検定で同年に選抜した組換えF₄個体由来のF₅系統を用いて表現型を調べた。

2005年：夏および秋検定で同年に選抜した組換えF₄個体由来のF₅系統を調査するとともに，前年までに調査した系統およびそれらの固定系統の再調査を行った。

室内検定は，遺伝子近傍組換え系統の表現型データの確認のために，冬期間（12～3月）を除き，毎年随時実施した。

遺伝子型の解析：上記のマーカーを用いて選抜されたマーカー間における組換え個体について，マーカー間の遺伝子型およびより詳細な組換え領域を特定するため，RFLP, SSR, STS, CAPSに加え，一塩基の多型を検出出来るSSCP（一本鎖高次構造多型：Single Strand Conformation Polymorphism (Orita et al. 1989) マーカーを検出（付録M6）し，遺伝子型を調査した。マーカー作成には，イネゲノム研究プロジェクト（<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>），Gramene（<http://www.gramene.org/>），CUGI（Clemson University Genomics Institute；<http://www.genome.clemson.edu/>）およびTIGR（The Institute for Genomic Research；<http://www.tigr.org/>）等で公

開されているイネ品種「日本晴」の BAC クローンの挿入断片塩基配列情報やそれらを連結することにより得られたゲノム塩基配列情報を利用した。

4. *Pi34* 以外のいもち病圃場抵抗性関連 QTL の解析

Pi34 の遺伝子型と表現型が一致しない「矛盾個体」について、本遺伝子以外の QTL（ここでは仮に *qtlx* とする）が存在しており両遺伝子が圃場抵抗性に対して相加的に作用していると仮定し、A) *Pi34* を保有していない（*Pi34* 座乗領域のグラフィカルジェノタイプは「Kasalath」）がやや強い抵抗性を示す個体は *qtlx* を保有する、B) *Pi34* を保有する（グラフィカルジェノタイプは「中部 32 号」）が、抵抗性がやや弱い個体は *qtlx* を保有していないと予測した。A の性質を示す 9 個体を「矛盾抵抗性強個体」、B の 11 個体を「矛盾抵抗性弱個体」として、*qtlx* の検出に供試した。

効率的にマーカーを選抜するため、*japonica* 品種同士間でも比較的多型頻度の高い SSR マーカーを用いて *qtlx* の探索を行った。すなわち、RGP で作成中であつた IRMI SSR Marker Set (http://www.gramene.org/db/cmap/map_set_info?map_set_acc=irmi-2003) から SSR primer の分譲を受けるとともに、McCouch et al. (2002) の情報を利用してプライマーを合成し、計 203 個のマーカーを用いて親品種間多型を調査した後、多型を示したマーカー 30 個を用いて矛盾個体 21 系統の遺伝子型を調査し、予測された遺

伝子型と一致する遺伝子型を示すマーカを探索した。

5. BAC ライブラリーの作成と塩基配列解読

BAC ライブラリー作成：「中部 32 号」の葉身から Zhang et al. (1995) の方法に従ってメガベースサイズのゲノム DNA を抽出したのちアガロースプラグに包埋し、*Mbo*I で部分消化して、プラスミドベクター pIndigoBACS (EPISENTRE) とライゲーションした。ベクターは、Osoegawa et al. (1998) の方法に従って大腸菌株 DH10B (Invitrogen Corporation) に形質転換し、ライブラリーを作成した。

ポジティブクローン選抜と塩基配列解読：384 ウェルプレートにプールされたライブラリーから、DNA マーカー RM2596 および Z82 を用いて *Pi34* 座を含む DNA 断片を有するクローンを選抜した。選抜されたクローンは、ショットガンシーケンス法を用いて塩基配列を解読した。すなわち、大腸菌クローンから BAC の DNA を精製し、超音波処理によりインサート断片をランダムに切断したのちに、得られた DNA 断片をプラスミドベクター pUC18 (TAKARA BIO Inc) に連結してショットガンライブラリーを作成した。ライブラリー中の 10,000 個のクローンについて、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてキャピラリーシーケンサー ABI3700 および ABI3730x1 (Applied Biosystems) により塩基配列を解読した。得られたショットガンシーケンスを、Phred/phrap

program (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>)を用いて統合した。得られたシーケンスコンティグは、ベクターのクローニングサイトおよびサブクローンの末端配列同士をつなぎ合わせるにより並び順を決定した。コンティグのギャップは、プライマーウォーキングあるいはGPS-1 (New England Biolabs, Inc.)を用いてコンティグの端のクローンの全塩基配列を解読して連結した。

6. *Pi34* 候補遺伝子の推定

RiceGAAS (rice genome automated annotation system : <http://RiceGAAS.dna.affrc.go.jp/>)を用いて、「中部 32 号」および「日本晴」の Z77 から z150-5 間において予測される遺伝子について、その機能や予測タンパクの局在性・膜タンパクにおける二次構造の分類予測等を行った。

結果

1. F₂ 個体を用いた *Pi34* のマッピング

「CSSL」と「中部 32 号」の F₂ 32 個体を用いて *Pi34* のマッピングを行ったところ、同遺伝子は E51178 と C189 他 2 マーカーの間の遺伝距離 13.0cM の間に位置づけられた (図 7)。これは、「農林 29 号」と「中部 32 号」の F₂ 個体を用いた QTL 解析および F₆ 系統を用いたマッピングの結果と一致した。

2. 室内検定法の検討

接種検定の結果，イネいもち病菌株「Kyu89-246」を接種した場合，6,7および8葉期では「中部32号」とそれ以外の2品種のDLAの間でTukeyの多重比較において有意な差が認められた．9葉期以降の接種では，DLAが低く，有意な差は認められなかった（図8-A）．「稲85-182」を接種した場合は，接種に失敗したと考えられた7葉期を除き，6から10葉期の全てで「中部32号」とそれ以外の2品種のDLAに有意な差が認められた（図8-B）．DLAの差が最大であったのは，両菌株ともに8葉期接種であったため，*Pi34*の保有の有無を室内検定で評価する場合，8葉展開期に接種するのが最適であると考えられた．以後，播種方法や接種菌株は適宜変更したが，それ以外の条件は本試験方法に準じて行った結果を表現型データとして*Pi34*マッピングに用いた．

3. *Pi34*の物理地図上へのマッピング(2002年～2003年)

2002～2005年の4ヶ年に遺伝子型決定に用いたマーカーと，「日本晴」塩基配列に基づく物理地図上におけるそれらの位置関係を図9に示した．

2002年にF₃1054系統から選抜した，RM21-C189間の組換え系統は66系統であった．これらの自殖後代およびその固定系統を用いた*Pi34*のマッピングを行ったが，*Pi34*領域を特定することができなかった．

その理由は，組換え系統番号 29-18 は，*Pi34* が 4B10r よりもセントロメア側にあることを示したのに対し，同 7-1 および 18-7 は *Pi34* が Z01 よりもテロメア側にあることを示したため，候補領域を挟み込むことが出来なかったためである．また 66 系統のうち，表現型が組換え領域よりもテロメア側の遺伝子型と一致している系統は 7-1, 18-7 を含めわずか 3 系統のみで，残りの 63 系統では表現型がゲノムの乗り換え領域よりもセントロメア側の遺伝子型と一致していた．これらの結果から，上記の 3 系統は何らかの要因で表現型を誤評価した可能性が高く，この解析では遺伝子候補領域のテロメア側のみを絞り込んでいる可能性が示唆された．さらに，RM21-C189 間の遺伝子型とは一致しない表現型を示す個体（18-9）も生じたことから，*Pi34* は今回解析した領域外（特にセントロメア側）にあると考えられた．

4. *Pi34* の精密マッピング(2004 年)

前年度までの結果から，*Pi34* は RM21 よりもセントロメア側にある可能性が考えられたため，RM21 よりもさらにセントロメア側に位置するマーカー Z115 と C189 を用いて組換え個体を選抜したところ，137 個体の組換え個体を選抜された（図 9）．これらの系統の表現型を調査し，遺伝子候補領域の絞り込みを行ったが，今回も遺伝子型と表現型が一致しない「矛盾固体」が生じたため，*Pi34* を正確に位置づけることは出来な

かった。

5. 新たないもち病圃場抵抗性関連 QTL の解析

9 個の「矛盾抵抗性強個体」および 11 個の「矛盾抵抗性弱個体」について、12 本のゲノム上に位置する 30 個の SSR マーカーの遺伝子型を調査した結果、6 番染色体上のマーカー RM3034 および RM2615 がこれら矛盾個体の表現型を説明できる遺伝子型を示した。すなわち、「矛盾抵抗性強個体」では RM3034 は全ての個体、RM2615 では 9 個体中 6 個体で「中部 32 号」型を示し、「矛盾抵抗性弱個体」ではいずれのマーカーも「コシヒカリ」型を示した（表 1）。これら 2 マーカーは、「日本晴」/「Kasalath」連鎖地図上で 16.9cM の遺伝距離で連鎖していた。この結果から、「中部 32 号」ゲノムの RM3034-RM2615 間の領域に、いもち病圃場抵抗性を強める働きのある QTL が存在することが示唆されたため、本遺伝子座を *Piq6(t)* と命名した。

Piq6(t) の作用力を調査するため、2003~2005 年に表現型を調査した組換え系統を、*Pi34* および *Piq6(t)* の遺伝子型組合せ別に 4 グループに分別し、各グループの 3 ヶ年の平均病斑面積率を算出して、*Piq6(t)* の表現型に及ぼす影響を調査した。その結果、圃場におけるいもち病の発生が中程度であった 2003 年は、*Pi34* 保有系統が明らかに強い圃場抵抗性を示したことから、*Pi34* の保有の有無が抵抗性程度に大きく影響しており、*Piq6(t)* の有無による抵抗性程度の差は判然としな

かった（表 2）。一方，多発生年であった 2004 年は，両遺伝子を保有する系統と保有しない系統の抵抗性程度には差があったが，両遺伝子保有系統およびいずれか一方の遺伝子のみを保有する系統の抵抗性程度はほぼ同じであり，表現型からこれらを判別することは困難であった。発病程度が低かった 2005 年も，いずれか一方の遺伝子を保有する系統の抵抗性程度はほぼおなじであった。これらのことから，*Piq6(t)*は「中部 32 号」ゲノム由来の圃場抵抗性 QTL であるが，その作用力はいもち病の発生程度により異なることが示唆された。特に少発生条件下では，*Pi34*並の強い作用力を示す可能性が考えられた。これらのことから，*Pi34*近傍組換え個体の表現型調査の際には，*Piq6(t)*の遺伝子型を調査して，*Piq6(t)*を保有しない系統を用いることが重要であることが明らかとなった。

6. *Pi34* の精密マッピング (2005 年)

2005 年は， F_4 1443 個体から，Z115-C1172 間における組換え個体を 61 個体選抜した。2002～2004 年に選抜した組換え個体および 2005 年組換え個体の一部のなかから，*Piq6(t)*の遺伝子型が「Kasalath」ホモ型の個体を選んで *Pi34* を連鎖地図上にマッピングした結果，*Pi34* は Z77 と z150-5 の間に位置づけられた（図 10）。この 2 マーカーを含む「日本晴」BAC クローンは 2 個（OSJNBa0019A16: accession AC108223 および OSJNBa0038F07: accession AC108224）存在し，

それらの塩基配列から算出される 2 マーカー間の物理距離は 58.1kb であった (図 1 1) .

7. *Pi34* 領域の塩基配列解読と候補遺伝子の推定

平均インサート長 150kb, クローン数 15,975 個からなる「中部 32 号」ゲノムの BAC ライブラリーを作成した. ライブラリーに含まれるゲノムの全長は, イネゲノム全長の約 6 倍であった. RM2596 および Z82 を用いて *Pi34* 含有クローンを選抜した結果, Ch46F14 および Ch41M22 の 2 個のクローンが得られた (図 1 1) . そのうちの Ch46F14 のインサートの全塩基配列を解読したところ, 塩基数は 183.7kb であり, Z77 と z150-5 間の物理距離は 65.3kb であった.

RiceGAAS により, マーカー Z77 と z150-5 の間には「中部 32 号」で 10 個, 「日本晴」で 8 個の ORF が予測された (図 1 1) . 「日本晴」と比較した場合, この 2 マーカー間において「中部 32 号」には, 11.2kb の挿入があり, 挿入断片にはトランスポゾンタンパク質およびレトロトランスポゾンタンパク質をコードする 2 つの ORF (ORF6 および ORF7, 表 3) が含まれていた. 「中部 32 号」で予測された残りの 8 個の ORF は「日本晴」においても予測されたものであった. その中の ORF1,2 および ORF3 は, 相同性の高い EST はデータベース上にはなく, またそれらの推定機能は不明であった (表 3) . ORF5 は EST とヒットし, その機能は不明であったが, 疎水性タンパク質をコードし

ており、膜タンパク質の一種であると推定された。
ORF8,9 および ORF10 は、EST とヒットし、それらが
コードするアミノ酸配列から予測された機能は、それ
ぞれ nuclear transportin, fiber protein および alpha/beta
hydrolase であった。ORF4 については、推定される機
能は不明であったが、「中部 32 号」および「日本晴」
間において、予測された mRNA 配列およびアミノ酸配
列が大きく異なっていた。

考察

Pi34 を DNA マーカー連鎖地図上に精密に位置づけ
るため、マーカー密度の高い連鎖地図の作成およびより
遺伝子近傍で組換えが生じた組換え個体の選抜を行った。
また、選抜された組換え個体の抵抗性の検定は、圃場お
よび温室で複数回行うとともに、検定精度を高めるため
に、当該遺伝子を含む領域がホモ型に固定した組換え固
定系統を養成して表現型の確認に供した。しかしながら、
遺伝子領域の絞り込みの過程で、当該領域の遺伝子型と
は異なる表現型を示す個体が出現し、正確な遺伝子マッ
ピングの大きな障害となった。この問題を解決するため
に、*Pi34* 以外にいもち病圃場抵抗性に関与する遺伝子座
が存在すると仮定してその座乗領域を探索したところ、
6 番染色体上に新たな QTL (*Piq6(t)*) が検出された。「農
林 29 号」と「中部 32 号」の後代集団および CSSL を用
いた F₂ 集団で *Piq6(t)* が検出されなかった主な理由とし

て、①どちらの集団もゲノムの殆どの領域が *japonica* 品種であったため、QTL 検出に十分な DNA マーカー密度が得られなかった。② CSSL/中部 32 号の F₂ では個体数が少なかったため、QTL 検出が可能な組換え個体が生じなかった。③ QTL の作用力が小さかった、または環境条件によって作用力が変動した。等が考えられた。本研究では、これらの問題に対して以下のように対処した。すなわち、①ゲノムの塩基配列情報やマーカー情報を利用して、比較的多型が検出しやすい SSR マーカーを用いて、QTL 連鎖マーカーの検出を行った。② QTL 解析に供試可能な選抜による偏りがなく個体数も十分な分離集団がなかったため、遺伝子型と表現型が矛盾する個体を選抜して、矛盾を解消できる遺伝子型を示す領域を探索して候補領域を決定した。③ 矛盾個体以外の個体も含め、発病条件の異なる複数年の表現型調査結果を基に、QTL の作用力について検討した。こうして、*Piq6(t)* を検出し、本遺伝子の遺伝子型が同一 (*Piq6(t)* が劣性ホモ型) の組換え系統のみを用いて *Pi34* の抵抗性を評価することにより、*Pi34* を連鎖地図上に位置づけることが出来た。また、公開されている「日本晴」の全塩基配列情報を用いてマーカー間の物理距離を決定することで、*Pi34* は物理地図上にもマッピングされた。

これまで述べたように、マイナー遺伝子 *Piq6(t)* を見落としていたことが、結果として *Pi34* の精密マッピングに時間を要した原因となった。このことから、イネいもち病圃場抵抗性のような量的形質に関与する遺伝子を

精密にマッピングする場合には，以下の点を十分考慮した材料養成と試験設計を行う必要があると考えられた．

- 1) QTL 解析用の交配後代集団を作出する際には，マーカー密度を高めるために，遺伝的バックグラウンドのなるべく遠い品種を交配することが望ましい．この点では，解析対象遺伝子保有品種が *japonica* である場合，*indica* 品種が有用であるが，遠縁同士の交配では，不稔や草姿の著しい差異等，形質評価を困難にする現象が起こる危険性も高まる（いもち病抵抗性の場合には，*indica* 由来の未知の真性抵抗性遺伝子が抵抗性検定を不可能にすることがある）．この点を考慮して，交配する品種を選定する．
- 2) 精度の高い QTL 解析を行い，精密マッピングおよび単離の対象とする遺伝子を決定したら，それ以外の QTL を含まない，準同質遺伝子系統（Near Isogenic Line: NIL）等を作成して以後の試験に用いる．
- 3) 単離のターゲットとなる QTL が完全優性（または劣性）でない場合，遺伝子型がヘテロの個体（または系統）の表現型を正確に評価することは困難である．従って，QTL 領域をホモ化することで，検定の精度を高めることが重要である．

精密マッピングによって位置づけられた *Pi34* 候補領域には，10 個の遺伝子が予測された．その中で機能が推定されたものはトランスポゾン様配列の 2 個を除くと 3 個であったが，ロイシンリッチリピート (LRR) や核結合領域 (NBS) およびキナーゼ等の既知の病害抵抗性遺伝子

に特有のモチーフをコードする遺伝子はなかった。今回予測された ORF の中で、抵抗性品種「中部 32 号」に特有な遺伝子としては ORF4 が候補として挙げられるが、*Pi34* を確定するためには、本 ORF を含め全ての候補遺伝子について、それらの発現の有無および発現していた場合は mRNA の塩基配列、接種の有無や接種後時間による発現パターンの差異について調べると共に、遺伝子を導入した形質転換体を用いた相補性検定を行う必要があると考えられる。

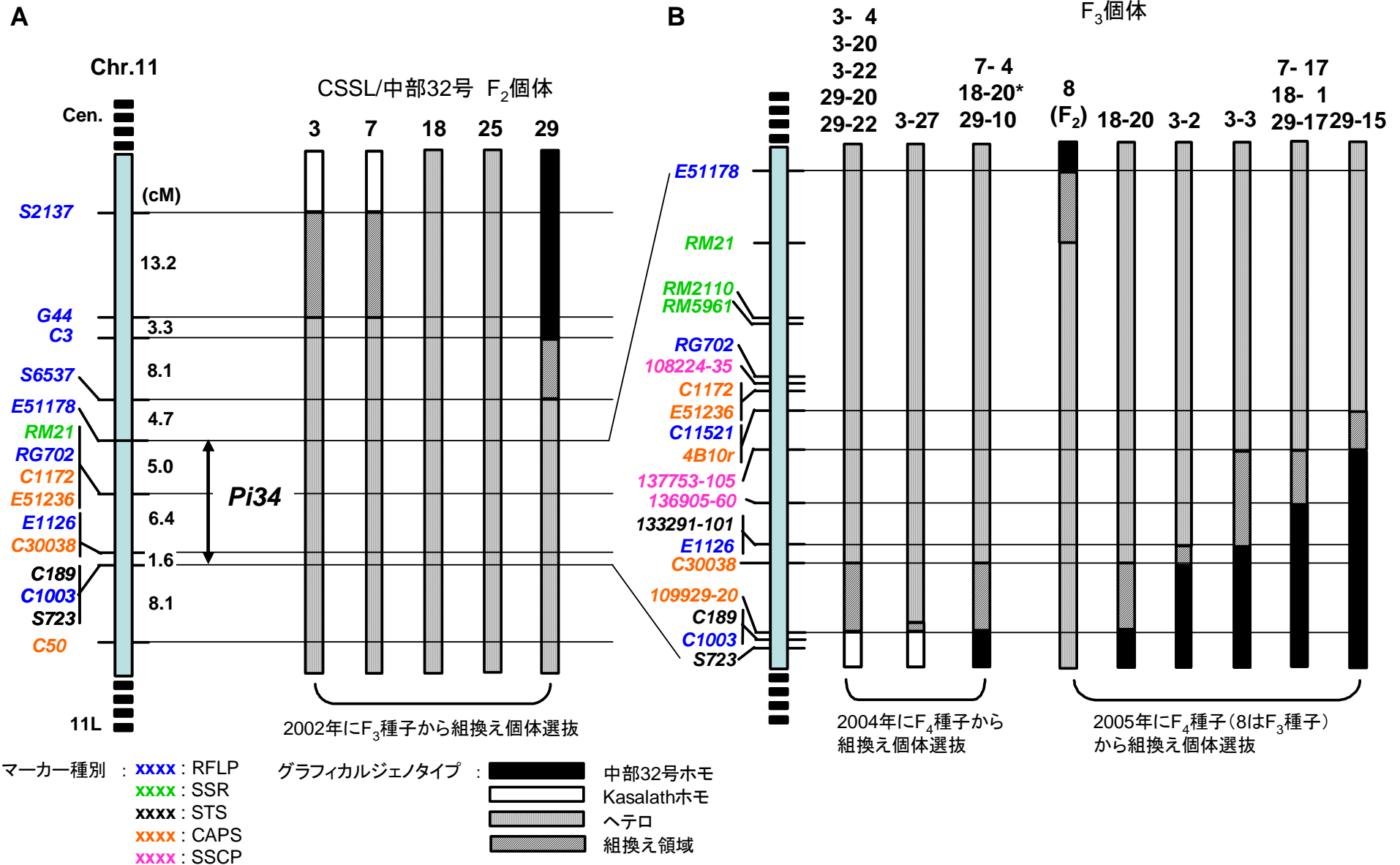
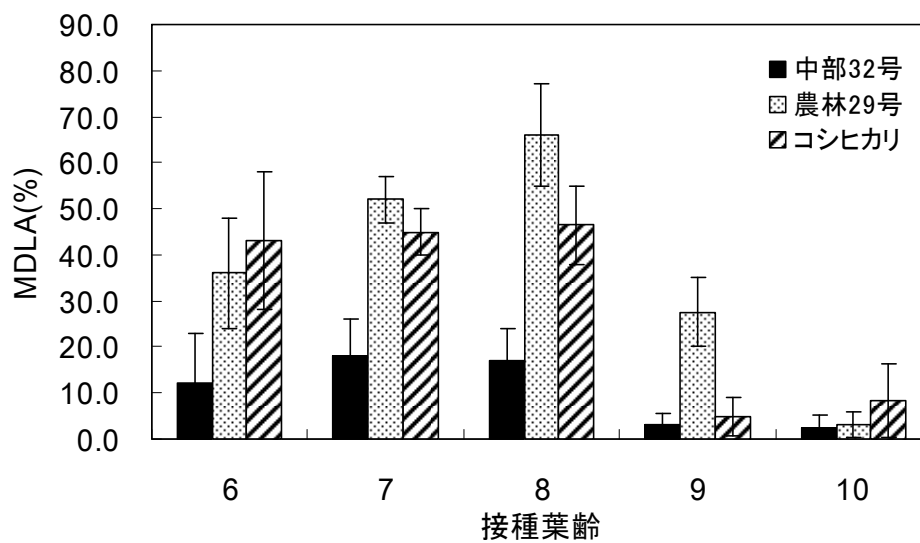


図7 2002,2004および2005年に*Pi34*近傍組換え個体の選抜に用いたCSSL/中部32号の雑種後代個体のグラフィカルジェノタイプ

注1) *18-20は2005年の選抜にも用いた。

2) 図中の11LおよびCen.はそれぞれ染色体長腕末端側およびセントロメア側を示す。

A. Kyu89-246



B. 稲85-182

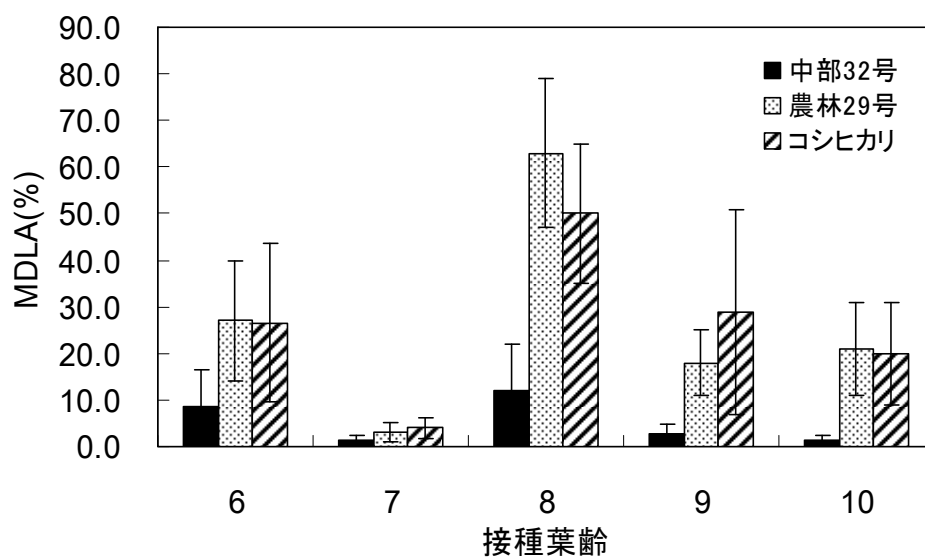


図8 イネ系統「中部 32 号」, 「農林 29 号」および「コシヒカリ」の接種葉齡別平均病斑面積率 (MDLA)

注) 図中のバーは標準偏差を示す.

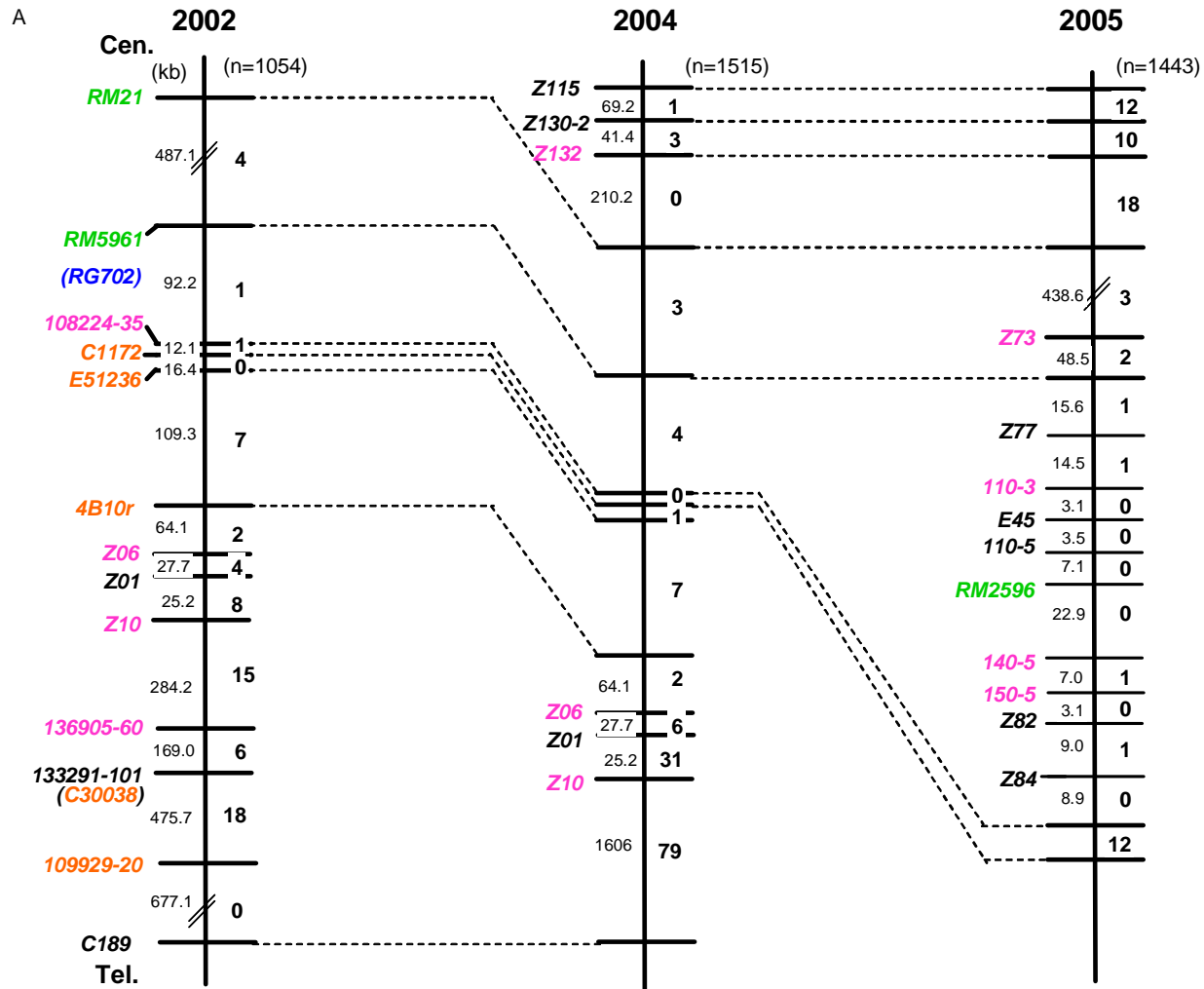


図9 2002,2004および2005年のPi34近傍組換え個体の選抜に用いたDNAマーカーの物理地図上の位置および選抜組換え個体数
 注1) マーカー間の物理距離(kb)は、「日本晴」ゲノムにおける距離を示す。
 2) 各連鎖地図右側の数字は、各年度に選抜された、2マーカー間における組換え個体数を示す。

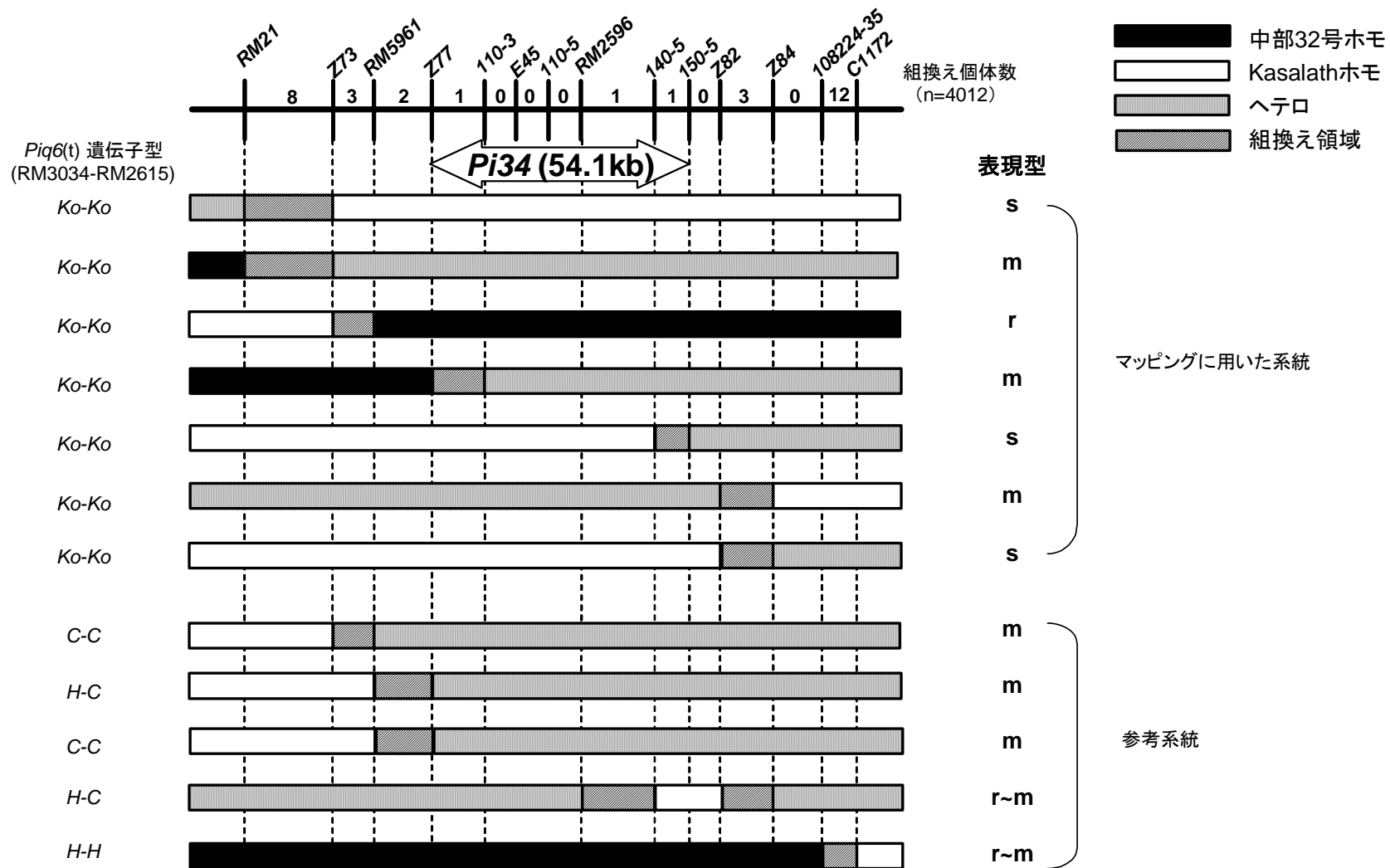


図10 *Piq6(t)*の遺伝子型を考慮した*Pi34*の物理地図上への精密マッピング

注1) グラフィカルジェノタイプは、2006年3月現在で抵抗性検定が終了している系統についてのみ示した。

2) C, KaおよびHは、RM3034およびRM2615の遺伝子型がそれぞれ「中部32号」、「コシヒカリ」および「ヘテロ」であることを示す。

3) r, sおよびmは抵抗性程度がそれぞれ「強」、「弱」および「中程度」であることを示す。

表1 *Pi34* 以外の圃場抵抗性関連遺伝子連鎖マーカー

グループ	個体番号	%MDLA±SD ^a	予測されるQTL遺伝子型	マーカー遺伝子型		
				<i>Pi34</i> 近傍マーカー ^b	RM3034 (chr. 6)	RM2615 (chr. 6)
矛盾抵抗性強個体	1	38.80± 5.65	抵抗性ホモ	<i>Ka</i> ^d	<i>C</i>	<i>C</i>
	2	41.34± 0.00		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
	3	41.34± 0.00		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
	4	38.32± 5.80		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>Ko</i>
	5	41.58± 5.00		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>Ko</i>
	6	31.55± 0.00		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
	7	44.85± 6.07		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>Ko</i>
	8	38.08± 5.60		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
	9	41.58±10.16		<i>Ka</i>	<i>C</i>	<i>C</i>
矛盾抵抗性弱個体	1	32.73±16.57	感受性ホモ	<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	2	41.58±10.16		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	3	38.79±14.52		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	4	43.13±27.59		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	5	32.02± 9.10		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	6	41.58±10.16		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	7	35.28±10.49		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	8	32.02± 9.09		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	9	36.56±18.17		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	10	32.02± 9.10		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
	11	34.81± 5.65		<i>C</i>	<i>Ko</i>	<i>Ko</i>
Chubu 32(Resistant control)		17.70± 2.54	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	
Koshihikari(Susceptible control)		83.61± 5.60	<i>Ka</i>	<i>Ka</i>	<i>Ka</i>	

a) %MDLA およびSD は、それぞれ平均病斑面積率 および標準偏差を示す。抵抗性検定は2005年に畑晩播にて行った。

b) *Pi34* 近傍マーカーはRM21およびC1172。

c) *C*, *Ka* および*Ko*はそれぞれ「中部32号」, 「Kasalath」および「コシヒカリ」ホモ型を示す。

表2 「中部 32 号」/「CSSL」の F₃ および F₄ における *Pi34* および *Piq6(t)* の遺伝子型組合せグループの平均病斑面積率 (%MDLA)

遺伝子型グループ ^x		%MDLA±SD ^{y,z}		
<i>Pi34</i>	<i>Piq6(t)</i>	2003	2004	2005
<i>C</i>	<i>C</i>	37.5± 7.5 a	67.7± 8.5 a	25.9±2.5 a
<i>C</i>	<i>Ko</i>	33.1±11.9 a	66.7±10.4 ab	34.2±6.7 ab
<i>Ka</i>	<i>C</i>	79.9± 8.6 b	78.6± 7.1 abc	39.3±3.4 b
<i>Ka</i>	<i>Ko</i>	75.1±10.2 b	87.6± 5.9 c	80.6±6.0 c
中部 32 号 (抵抗性)		23.9± 3.3	51.6± 3.7	17.7±2.5
コシヒカリ (感受性)		91.4± 3.6	93.0± 2.3	83.6±5.6

x) *Pi34* および *Piq6(t)* の遺伝子型は、それぞれの最近傍 SSR マーカーである RM5961 および RM3034 の遺伝子型で示した。*C*, *Ka* および *Ko* はそれぞれ 中部 32 号、カサラスおよび コシヒカリ allele を示す。

y) SD は標準偏差を示す。

z) 同一年度内の同一文字は Steel-Dwass の多重比較検定で有意な差がない ($P=0.05$) ことを示す。

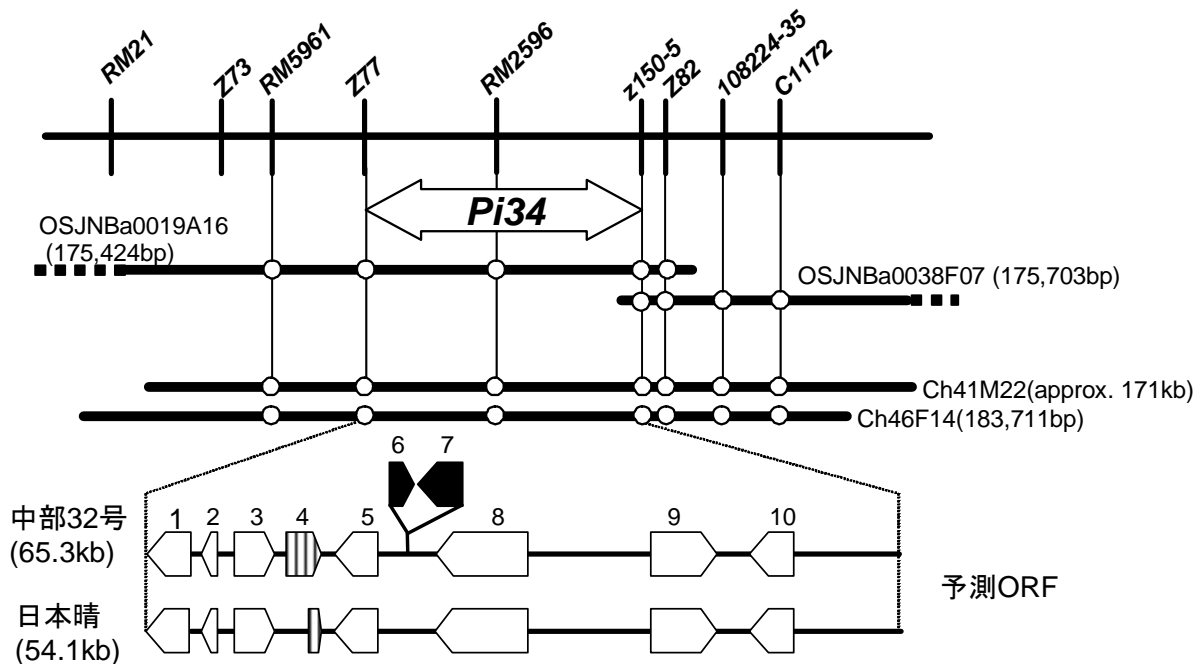


図 11 *Pi34* 精密連鎖地図をカバーする「日本晴」および「中部 32 号」の BAC クローンとマッピング領域に予測された ORF

注 1) OSJNBa0019A16 および OSJNBa0038F17 は IRGSP で配列が公開されている「日本晴」BAC クローン, Ch41M22 および Ch46F14 は「中部 32 号」BAC クローン.

2) 白抜き矢印は「中部 32 号」および「日本晴」においてほぼ同じ(相同性 95%以上), 縞模様は両品種で異なるアミノ酸配列が予測された ORF を示す. 黒矢印は「中部 32 号」のみに予測された ORF を示す。

表3 *Pi34* のマッピング領域内に予測された遺伝子

ORF	予測される機能	イネ ESTs ×	EST source	
			品種	組織
1	不明	no hit		
2	不明	no hit		
3	不明	no hit		
4	不明	no hit		
5	不明	*YAK072076	日本晴	芽
6	transposon protein	no hit		
7	retrotransposon	no hit		
8	Nuclear transportin / protein transporter	AK109206	日本晴	不明
9	fiber protein	*AK066017	日本晴	芽
		*AK071393	日本晴	花
		CB633186	IR36	いもち病感染葉
10	alpha/beta hydrolase fold	CR287329	不明	不明
		CR283925		

x) イネ ESTs は予測 ORF と 少なくとも 98% の相同性を示す.

Y) アスタリスク(*)のついた EST は完全長 cDNA, その他の EST は cDNA の部分配列.

第 4 章 いもち病菌株が保有する *AVR*Pi34** の同定

緒言

「中部 32 号」のいもち病圃場抵抗性には、少なくとも 11 番染色体上の遺伝子 *Pi34* と 6 番染色体上の *Piq6(t)* が関与していることが明らかとなり、この 2 遺伝子座の遺伝子型で表現型がほぼ決定することから、本系統の抵抗性は比較的少数の遺伝子によって制御されていると考えられる。一方、小泉・藤（1995）は、「中部 32 号」の圃場抵抗性の程度は、感染するいもち病菌株によって変動することを報告している。また、陸稲圃場から分離されたいもち病菌株の中から、本系統を強く侵す菌株が見出された（林氏 私信）。このことから、「中部 32 号」を強く侵害しないいもち病菌は、本系統の圃場抵抗性遺伝子、特に主働遺伝子である *Pi34* に対応する非病原性遺伝子を保有しており、圃場抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子との間に「遺伝子対遺伝子関係（gene-for-gene relationship）」が成立するという仮説が考えられた。なお、ここでの「非病原性」とは、“「中部 32 号」を強く侵さない”こと、「病原性」とは“同系統を強く侵す”ことを意味するため、本論文では、それぞれを「弱病原性」および「強病原性」と呼称する。本章では、この仮説を検証するために、「中部 32 号」に対する強病原性いもち病菌株 IBOS8-1-1 を弱病原性菌株 Y93-245c-2 と交配し、得られた F₁ 菌株の「中部 32 号」に対する病原性を調査して、強病原性と弱病原性菌株が 1:1 の比率で出現するか否かを検定することで、Y93-245c-2 が中部 32

号の圃場抵抗性に対する弱病原性遺伝子を保有するか否かを検証した。また、「中部 32 号」に対する弱病原性は、*Pi34* に対するものであるかどうかを検討するために、*Pi34* の連鎖解析に用いた「CSSL」/「中部 32 号」の F₃ 個体を *Pi34* の遺伝子型別のグループに分け、弱病原性菌株を接種して、各グループの抵抗性程度と *Pi34* の遺伝子型の相関を検証した。

材料および方法

1. いもち病菌株

Y93-245c-2 (MAT1-1, race137.0) は中国雲南省で採集されたイネいもち病菌株であり、イネに病原性を有するいもち病菌株に対して非常に高い稔性を示す。本菌株は「中部 32 号」、「農林 29 号」、「CSSL」および「コシヒカリ」に対する病原性を有しているが、「中部 32 号」の葉身上には少数の病斑しか形成せず、また進展型病斑の拡大も緩慢でありその多くは止まり型病斑となる。従って「中部 32 号」は本菌株に対して圃場抵抗性を示す (図 1 2), (付録 M 7)。

一方、イネいもち病菌株 IBOS8-1-1 (MAT1-2, レース 003.0) は茨城県的一般陸稲圃場から分離され、上記のイネ 4 品種に対して病原性を示し、「中部 32 号」を強く侵す性質を有する。このため、本菌株に対して「中部 32 号」は圃場抵抗性を示さない。Y93-245c-2 は中央農業総合研究センターの安田伸子氏、IBOS8-1-1 は農業生物資源研究所の林長生博士より分譲された。両菌株をショ糖加用オートミール寒天培地 (蒸留水 1 リットルに粉末オートミール 30g, ショ糖 5g, 寒天 15g を添加) 上で対峙培養し、22°C, 暗黒

下で 1 週間培養後，20℃ 蛍光灯照射下で 3 週間培養した．培地上に進展した両菌株の菌糸の接触境界線上に形成された子のう殻から，子のう胞子を含む子のうを取り出し，素寒天培地に置床した．発芽した子のう胞子を無作為に選び単胞子分離して，F₁ 菌株として保存した．

2. F₁ 菌株の病原性の分離

Y93-245c-2, IBOS8-1-1 およびそれらの F₁ 菌株の「中部 32 号」および「コシヒカリ」に対する病原性検定は，第 3 章の温室内検定法に準じて行った．検定菌株の分生胞子懸濁液は孢子濃度 2.0×10^5 個/ml に調整し，1 菌株あたり 10ml を第 8 葉展開期の供試品種 5 個体に噴霧接種して 7 日後の病斑面積率を調査し，平均病斑面積率 (%MDLA) を算出した．F₁ 菌株については，「中部 32 号」と「コシヒカリ」に対する病原性反応に基づいて「I タイプ」および「Y タイプ」の 2 種類に分類した．すなわち，*t* 検定により「中部 32 号」と「コシヒカリ」の %MDLA に有意差がなく，両品種を同程度強く侵す菌株は IBOS8-1-1 と同じ病原性タイプであるため「I タイプ」，「中部 32 号」に対する病原性は強くなく「コシヒカリ」のみを強く侵し，*t* 検定で %MDLA に有意差がある菌株は Y93-245c-2 と同じ病原性タイプであるとして「Y タイプ」とした．F₁ 菌株のタイプ別出現割合についてカイ二乗検定を行い，一遺伝子のメンデル遺伝様式（「I タイプ」:「Y タイプ」= 1 : 1 に分離）に従うか否かについて分析した．

3. 弱病原性遺伝子に対応する抵抗性遺伝子の推定

いもち病菌株 IBOS8-1-1 の「中部 32 号」に対する強病原性が本系統の圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* に対応するものであるか否か、すなわち、Y93-245c-2 の持つ「中部 32 号」に対する弱病原性遺伝子は、*Pi34* に対する *AVRPi34* (正確には *avirlence* ではないがここでは便宜上 AVR とする) であるか否かを検討するために以下の試験を行った。

Pi34 近傍領域の遺伝子型が既知である「CSSL」と「中部 32 号」の交配後代 F₃32 系統を DNA マーカー C1172 および C189 の遺伝子型から「*Pi34*+ (マーカー遺伝子型は中部 32 号ホモ型)」、「ヘテロ」および「*Pi34*- (同 Kasalath ホモ型)」の 3 グループに分類し、各系統を 10 個体育苗して第 7 葉展開期に Y93-245c-2 (孢子濃度 1.6×10^5 個/ml, 2.4ml/個体) および対照菌株の IBOS8-1-1 を噴霧接種した。接種 10 日後に病斑面積率を調査して各系統の %MDLA を算出し、各系統の Y93-245c-2 に対する抵抗性が *Pi34* の有無と一致するか否かを検討した。

結果および考察

1. 「中部 32 号」に対する Y93-245c-2 の弱病原性の分離分析

いもち病菌株 Y93-245c-2 と IBOS8-1-1 を交配し、計 108 の F₁ 菌株を得た。その中から菌糸伸長および孢子形成の良好な 61 菌株を選び、「中部 32 号」および「コシヒカリ」に接種して各菌株の病原性タイプを調査したところ、「Y タイプ」が 37 菌株、「I タイプ」が 24 菌株であった。Y および I タイプの反応例を図 1 2 に示した。期待される両タイプの分離比率を 1:1 としてカイ二乗検定を行ったところ $P=0.09$

となり，仮説は棄却されなかった（表 4）．従って，Y93-245c-2 は「中部 32 号」に対する 1 個の弱病原性遺伝子を保有していると考えられた．

2. F₃ 系統の遺伝子型と Y93-245c-2 に対する抵抗性の関係

F₃ 32 系統中，「*Pi34+*」は 11，「ヘテロ」は 9，「*Pi34-*」は 12 個体であった．

いもち病菌株 Y93-245c-2 に対し，「*Pi34+*」および「ヘテロ」系統の %MDLA はそれぞれ 3.36 ± 0.35 および 3.33 ± 0.41 であり，「中部 32 号」(1.33 ± 0.39) とほぼ同等かやや弱い程度の圃場抵抗性を示したが，「*Pi34-*」系統の %MDLA は 9.85 ± 0.85 であり，「コシヒカリ」(9.00 ± 1.70) と同程度発病した．このことから，Y93-245c-2 の保有する「中部 32 号」に対する弱病原性遺伝子は *Pi34* に対応する *AVR*Pi34** であることが明らかとなった（図 1 3）．一方，IBOS8-1-1 に対しては，「*Pi34+*」および「ヘテロ」系統と「*Pi34-*」系統の発病程度には，遺伝子型による差は観察されなかった．

これらの結果から，「中部 32 号」のいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* と，イネいもち病菌株 Y93-245c-2 の保有する弱病原性遺伝子 *AVR*Pi34** の間には gene-for-gene relationship が成り立つことが証明された．これまでに明らかになっている gene-for-gene が成立する抵抗性遺伝子は，そのほとんどが質的抵抗性を制御するものであるが，*Pi34* のように，病斑数・病徴進展速度等の抵抗性程度に関わる量的形質を制御する遺伝子においてもこの関係が成り立つことが示された．一方，IBOS8-1-1 は何らかの理由で *AVR*Pi34** の機能を失って，「中部 32 号」に対する強い病原

性を獲得したと考えられるが，このことは同時に，量的形質を制御する抵抗性遺伝子であっても，それが主働遺伝子の場合には，菌の非（弱）病原性遺伝子の変異により圃場抵抗性が崩壊する危険性があることを示唆している．イネの抵抗性遺伝子産物，いもち病菌の非病原性遺伝子の分布および変異と抵抗性の永続性の関係については第5章で詳述する．

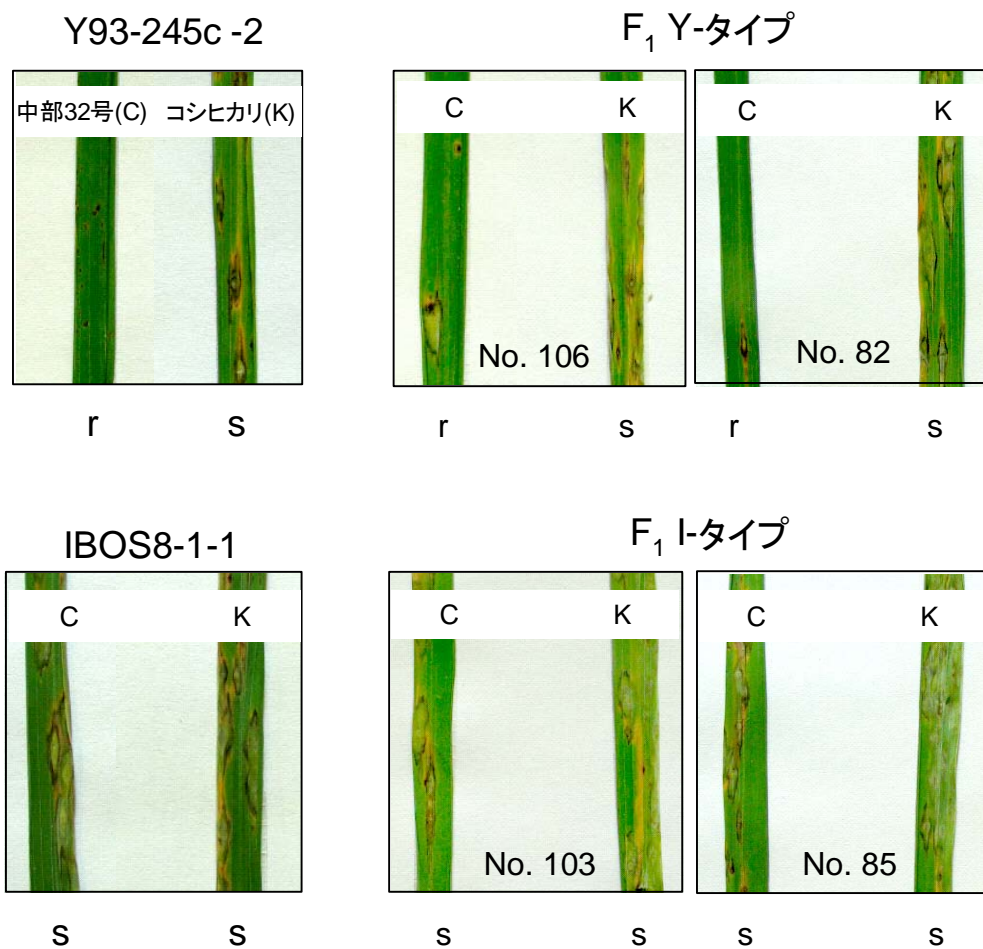


図12 「中部32号」および「コシヒカリ」に、いもち病菌株Y93-245c-2, IBOS8-1-1および両菌株のF₁を接種した場合の葉身の反応
 注1) Yタイプは「コシヒカリ」のみを強く侵し, Iタイプは「中部32号」「コシヒカリ」の両品種を強く侵すF₁菌株.
 2) 'C' は「中部32号」, 'K' は「コシヒカリ」の接種葉.
 3) 'r' は抵抗性強の反応, 's' は抵抗性弱の反応を示す.

表4 いもち病菌株 Y93-245c-s と IBOS8-1-1 の F₁における Y および I タイプの分離

F ₁ 菌株 (n=61)		期待比率	χ^2	<i>P</i>
Y タイプ	I タイプ			
37	24	1:1	2.78	0.09

注) Y タイプ: *t*検定で「中部 32 号」と「コシヒカリ」の%MDLA に有意差がある.
 I タイプ: *t*検定で「中部 32 号」と「コシヒカリ」の%MDLA に有意差が無い.

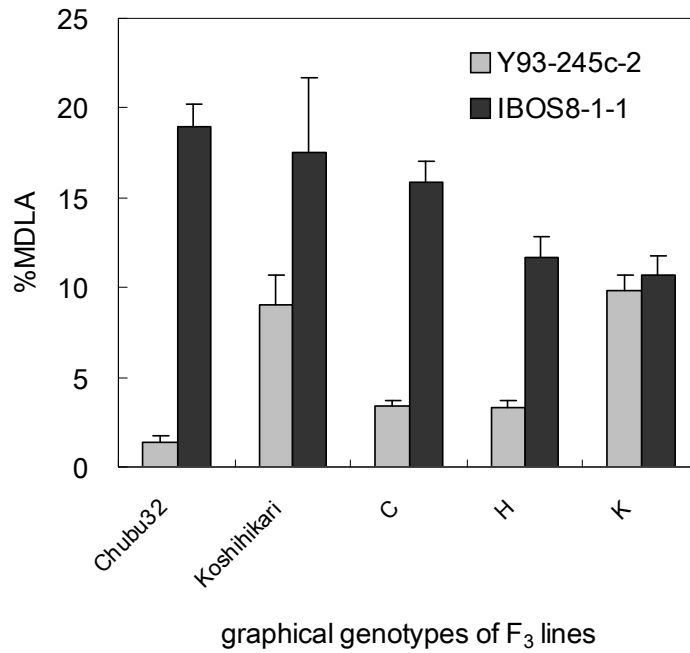


図13 *Pi34*含有領域の遺伝子型別F₃グループにおける イネいもち病菌株 Y93-245c-2および IBOS8-1-1に対する圃場抵抗性
 注1) 各F₃系統の*Pi34*含有領域の遺伝子型は、DNAマーカーC1172およびC189の遺伝子型により判別した。
 2) C, H および K は、それぞれ対象領域の遺伝子型が中部32号ホモ、ヘテロおよび Kasalath ホモ型であることを示す。
 3) エラーバーは標準誤差を示す。

第5章 いもち病菌レースの変動機構と真性抵抗性の利用

緒言

本研究で我々は、「中部 32 号」の示すいもち病圃場抵抗性が、11 番染色体上の主働遺伝子 *Pi34* と 6 番染色体上の *Piq6(t)* によって主に制御されていること、また *Pi34* は、真性抵抗性遺伝子産物で一般的な LRR-NBS 構造をコードしている可能性は低いこと、さらに、*Pi34* といもち病菌の弱病原性遺伝子 *AVRPi34* の間には「遺伝子対遺伝子関係」が成立していることを明らかにした。これらの結果から、*Pi34* を抵抗性遺伝資源として利用する際には、真性抵抗性遺伝子の利用でみられる「抵抗性の崩壊」を回避する方法を確立することが重要であると考えられる。

いもち病真性抵抗性で知られている抵抗性の崩壊は、2 つのレベルで考えることができる。第 1 はマイクロレベルである。これは、いもち病菌の非病原性遺伝子の変異により遺伝子産物の構造が変化し、抵抗性遺伝子（病原菌を認識するレセプター）が非病原性遺伝子産物、すなわちいもち病菌の侵入を認識できなくなることである。第 2 はマクロレベルな抵抗性崩壊現象として認識される。すなわち、マイクロレベルで出現した病原性を獲得した変異菌が圃場で観察されるようになり、やがて優占して作付されているイネ品種の抵抗性が無力化することである。

現在、真性抵抗性遺伝子の持続的利用の方法としては、異なる真性抵抗性遺伝子を保有する同質遺伝子系統を混植する「マルチライン」が普及している。品種の混合による病害抑

制効果としては、1) 希釈効果：感受性系統同士の距離が遠くなることにより圃場空間における病原体の濃度が希釈され、病勢の進展が遅延する、2) バリヤー効果：抵抗性系統が感受性系統上に形成された胞子の拡散や移動の物理的障壁となり、発病程度が低下する、3) 誘導抵抗性：非病原性レースの侵入が引き金となって抵抗性反応が誘導され、病原性レースの感染および増殖が阻止または遅延される (APSnet Education Center Advanced Topics, <http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/cultivarmixtures/top.htm>) 等が考えられるが、イネにおいては、誘導抵抗性は主に葉にみられる現象であり (岩野ら, 1987)、穂いもちにおいては非病原性いもち病菌の感染圧がかなり高くないと効果が認められない (芦澤ら, 2002) ことから、圃場における「マルチライン」の病害抑制効果は主に希釈効果およびバリヤー効果によるものであると考えられる。マルチラインはすでに「ササニシキ」や「コシヒカリ」で実用化しているため、持続的利用方法の確立は急務であり、現在、より効果的な混合系統数・混合比率および遺伝子構成の変更方法の決定や、いもち病菌レースの変化の予測方法についての研究が進められている。

一方、「抵抗性崩壊」を回避するためには、作付け品種の変化に伴って生じるいもち病菌レースの変動についての機構解明もまた重要である。

そこで本章では、品種あるいは同質遺伝子系統の混植が、いもち病の病害抑制および収量増加に及ぼす効果を分析すると共に、東北地域における分布レースの長期的変化から、抵抗性崩壊の機構について疫学的側面からの解析を試みる。また、これらの結果を踏まえた、現状における圃場抵抗性利用

の有用性および問題点については，第6章で考察する．

材料および方法

1. 同質遺伝子系統混植が葉および穂いもちの病害抑制と収量増加に及ぼす効果

これまで国内で行われた，異なる真性抵抗性を保有する品種の混植あるいはいもち病抵抗性同質遺伝子系統（以下ILと称す）の混植試験のなかから，2,3,4および10種類の品種あるいはILをそれぞれ等量混合して，自然感染条件下での発病程度および収量を単植区と比較した試験結果を収集し，Mundt（1994）の方法に従って病害抑制効果および収量増加を計算した．

2. 北海道および東北地方におけるいもち病菌レース分布頻度の変化

2001年に，北海道および東北6県に分布するいもち病菌レースを調査し，1994年に行われた同様の調査結果と比較して，分布レースの変動およびその要因の解析を行った．なお，1994年のいもち病菌レース分布は，芦澤ら（1997）の調査結果を利用した．

いもち病菌株の収集：2001年の7月から9月にかけて，北海道および東北各県の農業試験場・病害虫防除所の協力により，いもち病の発生がみられた発生予察圃場および一般圃場から，いもち病罹病葉および罹病穂を採集した．なお，採集圃場は，一定の標本抽出法で選定されたものではないが，各道県内でいもち病の発生が見られた稲作地帯から満遍なく選定されている．罹病標本のイネ品種は可能な限り聞き取り調査を行った．

菌株の分離：採集を行った圃場毎に採集地番号をつけ，同一番号の複数の罹病標本から，無作為に単孢子分離に供する標本を抽出し，滅菌水で湿らせた濾紙を敷いたシャーレ内に 24 時間静置していもち病菌の分生孢子を形成させた．そして，これらのうち 1 病斑から分生孢子を単孢子分離し，これら単孢子分離菌を PSA 斜面培地に移植して分離菌株とした．

レース検定：分離菌株のレース検定は 2001 年の 8 月から 11 月にかけて行った．採集地 1 地点あたり 1 菌株をレース検定用菌株として選んだ．なお福島県の 5 カ所の採集地からは一カ所につき異なる 2 もしくは 3 病斑由来の菌株を分離し，計 13 菌株を検定に用いた．検定菌株は，オートミール寒天培地上で 25℃，2 週間培養し，培地上に生じた気中菌糸を滅菌ブラシで擦って取り除いた後，これらの培養菌を 25℃の蛍光灯照射下に 3 日間置き，分生孢子を形成させた．

レース検定には Yamada *et al* (1976) の提案した 9 判別品種に真性抵抗性遺伝子 *Pik-p*, *Pib* および *Pit* をそれぞれ単独に有する品種 K60, BL1 および K59 と，*Pii* に対する病原性判別の予備品種として藤坂 5 号を加えた計 13 品種を供試した．これらの品種を，1 品種あたり 10 粒ずつ，5 品種を 1 シードリングケース（縦 15cm×横 5cm×高さ 10cm）に播種し，25 から 35℃の温室内で 4 から 5 葉期まで育苗し，検定に供した．シードリングケースには育苗用山土を詰め，肥料は基肥として，N, P₂O₅ および K₂O をそれぞれ分量でケース当たり 0.3g 施用した．0.02% の Tween20 を加えた検定菌株の分生孢子懸濁液（孢子濃度 5.0~10.0×10³ 個/ml）を育苗した判別品種の苗に 3 ケースあたり 50ml 噴霧接種し，25℃湿度 100% の接種箱に 16 時間静置した．その後，

接種された苗を 20～30℃の温室に 7 日間置き，葉身に生じた病斑の病斑型を調査した。

結果および考察

1. 同質遺伝子系統混植が葉および穂いもちの病害抑制と収量増加に及ぼす効果

いもち病真性抵抗性同質遺伝子系統を混植した区では，単植区と比較して葉および穂いもちの発病程度は低く抑えられ，収量は増加した（表 5）。葉および穂いもちのいずれにおいても，混植した系統数が増加するほど発病程度は低くなる傾向がみられたが，収量増加については混植系統数との関係は判然としなかった。また，穂いもちの病害抑制効果は葉いもちよりも小さかった。これは，穂いもちでは真性抵抗性遺伝子の効果が葉いもちよりも明瞭でなく，個体内における再感染の割合が高いために希釈効果やバリアー効果が小さいことが原因であると考えられた。また，2,3 および 4 系統の混植において病害抑制の効果に大きなばらつきがみられたのは，試験圃場によって，分布するレースに対する混植区の抵抗性系統割合が異なっていたためと推察された。

2. 北海道および東北地方におけるいもち病菌レース分布頻度の変化

北海道および東北各県から分離されたイネいもち病菌 289 菌株をレース検定に供試した結果，分離されたレースは，001.0，003.0，005.0，007.0，007.2，017.1，017.3，033.1，037.1 および 103.0 の 10 種類であった。表 6 にこれらの菌株のレース検定結果を 1994 年に行われた同様の

調査（芦澤ら，1997）と比較し，レース別分離頻度で示した．道県別では，北海道から分離されたレースはすべてレース 037.1 で，青森県および岩手県からはほとんど全部がレース 007.0，宮城県，秋田県および山形県からはすべてレース 007.0 が分離された．一方，福島県からは 9 種類のレース（001.0，003.0，005.0，007.0，007.2，017.1，033.1，037.1 および 103.0）が分離された．同県で最も分離頻度の高かったレースは 007.0 であったが，レース 003.0 および 005.0 もそれぞれ全菌株中 16% および 9% 分離された．病斑を採集したイネの品種名が明らかなものについて，いもち病菌レースとそれらが分離された品種の真性抵抗性遺伝子型の関係を検討した結果，すべて親和性のレースのみが分離されたことを確認した（データ示さず）．

1994 年に行われた同様の調査と本年の調査を比較すると，1994 年から 2001 年の 7 年間で，北海道では分離されたレースが 033.1 から 037.1 に変わり，青森，岩手，宮城，秋田および山形の各県ではいずれもレース 003.0 の分離頻度が減少し，007.0 の頻度が増加した．また福島県ではレース 007.0 の分離頻度が減少し，レース 001.0，005.0 を含む 7 レースが新たに確認された．

いもち病菌の分布レースの変動要因について，岩野・山田（1983）は，特定のいもち病真性抵抗性遺伝子を持つ品種の導入とその栽培面積の増加，またある程度の栽培年数を経ることにより，その品種に親和性のレース頻度が高まること，また，親和性のいもち病菌レース間においても，罹病性品種上における増殖力に違いがあると増殖力の強いレースが優占することを挙げている．また，van der Plank（1963）は，単純な抵抗性遺伝子型の品種上では多くの病

原性因子を持つレースの方が生存に不適となる傾向があるとし、その効果のことを「安定化選択」と名づけている。以下、これらの学説と今回の調査結果を比較し、各県におけるレースの変動機構について考察する。

北海道：レース 033.1 が優占していた 1994 年頃は、真性抵抗性遺伝子 *Pia* あるいは *Pik* を単独に有する品種が多く作付けされていた。その後、これらの抵抗性遺伝子に加え真性抵抗性遺伝子 *Pii* を保有する品種「きらら 397 (いもち病真性抵抗性遺伝子型 *Pii, Pik*)」および「ほしのゆめ (同 *Pia, Pii, Pik*)」の作付面積が増加したが、2001 年の優占レース 037.1 はこれらを全て侵害できるレースであることから、この結果は岩野・山田の学説と良く一致している。

しかし、北海道では、優占するレース 037.1 が、主要作付品種である '*Pia, Pii, Pik*' 型等の品種と親和性であるには不要な真性抵抗性遺伝子 *Pik-m* および *Pik-p* に対する病原性も有しており、これは、van der Plank が提唱した「安定化選択」説では説明が困難である。それよりも、北海道では 1994 年時点でレース 033.1 がほぼ優占しており、それ以外のレースがほとんど存在しなかったため、「創始者効果」(もとの集団が非常に少数の遺伝子型だけで構成されていた場合には、その後の集団内の遺伝子型構成がその影響を強く受ける) (Mayr 1963) が顕著となり、レース 033.1 が上記の主要品種と親和性であるためには不要な病原性を有したまま、*Pii* に対応する病原性を獲得して 037.1 が生じて優占化したと考えられる。

秋田・山形・青森：「むつほまれ」「ササニシキ」等のいもち病真性抵抗性遺伝子型 '*Pia*' の品種の作付けが減少し、「ゆめあかり」「つがるロマン」「あきたこまち」「はえぬき」等

の遺伝子型 '*Pia,Pii*' の品種の作付けが増加したのに伴い (第7表), これらに対する親和性レース 007.0 の頻度が高まった。これは, 岩野・山田の説とよく一致する結果となった。しかし, これらの県では, '*Pia,Pii*' 型品種の作付割合から予想される以上にレース 007.0 の頻度が高い。この原因の可能性として, いもち病菌の個体群の規模が冬期間に小さくなったときに, 頻度の低かったレースが「瓶の首効果 (bottleneck effect)」による遺伝的浮動 (genetic drift) により偶然に消失し, 主要作付品種に対する親和性レースであるレース 007.0 だけが独占するようになった可能性が考えられる。

岩手・宮城 : 抵抗性遺伝子型別の品種作付割合は, この7年間で, '*Pia,Pii*' 型品種の作付割合は比較的低く維持されている一方で, '*Pia*' 型品種は減少し, '*Pii*' 型品種が大幅に増加して過半数を占めるようになった。このような条件下で, '*Pia,Pii*' 型品種だけでなく '*Pia*' あるいは '*Pii*' 型品種からもレース 007.0 が分離され, 1994年よりレース 007.0 の分離頻度が増加した。抵抗性遺伝子の変化の過程で, *Pia* を侵さないレースの分離頻度の増加が見られないため, この現象を「安定化選択」で説明するのは困難である。宮城および岩手県において, レース 007.0 が優占している原因については, 両県の '*Pia*' および '*Pii*' 型品種栽培地域のいずれの品種上においても, レース 007.0 の増殖力が他のレースよりも高いのか, あるいは, 強い「瓶の首効果」によりもともと頻度の低かった他のレースが機会的な遺伝的浮動で激減した可能性が考えられる。

福島 : 福島県では, '*Pik-s*' 品種である「コシヒカリ」の作付割合が全体の過半数を超え, *Pia* 保有品種の作付割合

が減少し、*Pia* 非保有品種（‘*Pik-s*’ および ‘*Pii*’ 型品種）の作付割合が増加した。このような条件下で、レース頻度は、①レース 001.0 や 005.0 など ‘*Pik-s*’ 型品種に病原性を有し、*Pia* 保有品種には非病原性のレースの分布がある程度拡大し、② *Pia* に対する親和性レース（003.0 および 007.0）の頻度が減少したが、③ 1994 年当時主要であったレース 007.0 の頻度は依然最も高かった。

このうち①と②の現象は「安定化選択」の考え方に従うものと考えられるが、③の現象は「安定化選択」の考え方からは説明が困難な現象である。また、各レースの増殖力については調査していないので、この差異によりレースの分布頻度が影響を受けているかは明らかではない。

これらの研究から、広域的なレース変動機構には、新レースの顕在化までの過程では、①既存レースの突然変異等による新レースの出現、②ごく低頻度で存在していた親和性レースの抵抗性遺伝子の変化に伴う増加等の要因が考えられる。また、優占レースが交代するに至るまでの過程では、①親和性レース間での増殖力の差、②病原性の獲得における「安定化選択」の有無、③病原菌集団サイズの縮小に伴う「瓶の首効果」による生存レース頻度の変化と次年度集団における「創始者効果」の有無等が複雑に影響していると考えられる。これらは、マルチライン等の混植栽培におけるレース変動の要因にも当てはまると考えられる。また、Koizumi (2001) は、ササニシキマルチラインの病害抑制効果は、試験区の面積が大きい（150m²）ほうが小さい（5.8m²）場合よりも大きいことを示しているほか、石黒ら（2000）は、これまで知られていた 1 圃場もしくは隣接圃場内で起こる比較的急ないもち病の伝染勾配に加え、1 回の感染好適条件で胞子が数百メートル

ル拡散し，それらの孢子により新たな病斑を生じるという緩い伝染勾配もあることを報告している．このように，イネ群落の規模といもち病菌の集団サイズおよび空間的移動も，本菌の病原性変異とその定着・優占機構の解明には重要な要因となるであろう．

これらを踏まえた上で真性抵抗性品種およびマルチラインの罹病化を予測することは非常に重要な課題であるが，圃場を用いた大規模な介入試験を行うことは現実には困難である．そこで現在では，種々の理論モデルおよびシミュレーションモデルを用いたレース頻度変動予測の研究が行われている．

現在進められているいもち病圃場抵抗性の利用方法は，比較的強度な抵抗性を示す主働遺伝子支配の圃場抵抗性遺伝子を，DNA マーカー技術を用いて別個に従来品種に導入して同質遺伝子系統を作成するというものである．これら圃場抵抗性同質遺伝子系統の利用の際には，真性抵抗性マルチラインにおける研究蓄積が非常に有用であり，それらを参考に育種および作付戦略を決定することが，限られた遺伝資源をより効率的また永続的に利用するために重要であると考えられる．

表5 単植に対する品種混合およびマルチラインのいもち病抑制と収量増加効果

混植系統数	試験数	病害抑制割合(%)						収量増加割合(%)		
		葉いもち			穂いもち			最小	最大	平均
		最小	最大	平均	最小	最大	平均			
2	27	-51	94	48	-23	77	24	-11.4	28.1	9.7
3	8	-40	93	60	-15	86	39	2.8	16.5	9.7
4	3	28	33	31	-44	37	0	2.0	7.1	5.1
10	4	59	97	74	16	53	41	0.2	14.1	9.2

注1) 平均は、混植系統数毎の全ての試験区の平均値を示す。

2) 最小および最大は、同一混植系統数の中で病害抑制割合および収量増加割合がそれぞれ最小および最大値を示した試験区の数値を示す。

表6 1994年^{a)}と2001年に北海道および東北地方で分離されたイネいもち病菌のレース

道・県	年	検定 菌株数	レース別分離比率(%) ^{c)}											
			001.0	003.0	005.0	007.0	007.2	017.1	017.3	033.1	037.0	037.1	047.0	103.0
北海道	1994	6								100				
	2001	27										100		
青森	1994	12		17		66				17				
	2001	49				94						6		
岩手	1994	35		3		94				3				
	2001	21				95			5					
宮城	1994	47		28		70						2		
	2001	30				100								
秋田	1994	10		10		88						1	1	
	2001	54				100								
山形	1994	47		45		52					3			
	2001	41				100								
福島	1994	6		17		83								
	2001	68	2	16	9	63	2	3		1		3		1
全域	1994	257		19		76				4	<1	1	<	
	2001	290	<1 ^{b)}	4	2	80	<1	<1	<1	<1	<1	11	1	<1

a) 1994年の結果は芦澤ら(1)による。

b) <1は小数点第1位を四捨五入して1%未満のもの。

c) 各地域の年次毎総菌株数に対する割合。

表7 1994年^{a)}と2001年の北海道と東北地方におけるイネ品種のいもち病真性抵抗性遺伝子型別作付率(%^{b)})

道・県	年	作付率(%)										
		<i>k-s</i> ^{c)}	<i>a</i>	<i>i</i>	<i>a,i</i>	<i>k</i>	<i>a,k</i>	<i>i,k</i>	<i>a,i,k</i>	<i>z</i>	<i>k,k-m,z,z-t</i>	その他
北海道	1994		48.0					41.7	7.2			3.1
	2001		7.8		3.5			59.2	26.6			2.9
青森	1994		78.2		1.0		8.0		8.9			3.9
	2001		26.5		70.0		1.1					2.4
岩手	1994		12.2	39.0	25.0	6.6						17.2
	2001		7.8	59.3	26.1	4.6						2.3
宮城	1994		44.3	52.9	0.6							2.2
	2001		15.6	79.8		0.1				0.8		3.7
秋田	1994		22.7	7.6	70.1							7.2
	2001		6.2	7.6	81.8				0.7			3.5
山形	1994		35.1	9.3	45.6	2.9						7.1
	2001	6.6	4.1	11.3	72.8	2.6						2.6
福島	1994	38.7	8.4	22.7	21.3	1.9						7.0
	2001	59.5	5.2	25.1	5.1	0.8						4.1

a) 1994年の結果は芦澤ら(1997)による。

b) 北海道米麦改良第486号および平成13年度東北地域水稲品種・系統検討会資料の数値を参考とした。数値は各年次、地域ごとの総作付面積あたりの作付割合。

c) 各遺伝子型はそれぞれ *Pi* を略して表記した。

第6章 総合考察

イネ品種の育種では、有効ないもち病抵抗性の付与が主要な育種目標の一つであり、イネの真性抵抗性遺伝子がこれまで積極的に新品種に導入されてきた。しかし、当該遺伝子に親和性を示すいもち病菌レースの出現により、現在国内で普及している良食味イネ品種のほとんどは有効な抵抗性を有しておらず、薬剤防除無しでは安定生産が困難な状況にある。そのため、いもち病菌レースに関わらず比較的高い抵抗性を示す‘圃場抵抗性’の新品種への導入が試みられてきたが、抵抗性と他の重要育種形質を併せ持つ品種の育成には、現在でも多大な労力と時間を要している。

本研究は、いもち病圃場抵抗性の有効利用によって化学合成農薬の使用量を削減する環境保全型農業の確立を目指して、強いいもち病圃場抵抗性を示すイネ系統「中部 32 号」のいもち病圃場抵抗性遺伝子に関する遺伝解析を行い、本形質に関わる遺伝子座から作用力の強い遺伝子の Map-based cloning を行い候補遺伝子を推定すること、育種に利用可能な DNA マーカー情報を提供すること、および圃場抵抗性の永続性に関する解析を行い、その抵抗性育種への実用性を明らかにすることを目的としたものである。

はじめに、いもち病に対して強い圃場抵抗性を示すことが知られていたイネ系統「中部 32 号」と「北海 188 号」について、いもち病圃場抵抗性に関する QTL 解析を行った。その結果、「中部 32 号」の 11 番染色体上に寄与率 59.2% の QTL が検出され、本 QTL を *Pi34(t)* と命名した。また、「北海 188 号」の 1 番染色体上に寄与率 69.4%、8 番染色体上

に寄与率 13.4%の QTL が検出され，1 番染色体上の QTL を *Pi35(t)* と命名した．

次に，*Pi34* について，染色体断片置換系統を交配相手とした後代集団を用いて精密マッピングを行った．その結果，*Pi34* は物理距離 58.1kb（「日本晴」の塩基配列を基準に計算された値）の領域内に座乗することが明らかとなった．領域内の塩基配列を解読して遺伝子予測を行ったところ，既知の病害抵抗性遺伝子，特に病原菌の認識に関わる遺伝子に特有のモチーフは予測されなかったことから，*Pi34* の遺伝子産物は，既に単離されているいもち病抵抗性遺伝子がコードするようなレセプター遺伝子とは異なる可能性が高いと考えられた．

この精密マッピングの過程で，当初の QTL 解析では検出されなかったいもち病圃場抵抗性 QTL（*Piq6(t)*）が検出され，これが *Pi34* マッピングの障害となっていたことが明らかとなった．量的形質に関する遺伝子解析の際には，*Piq6(t)* の様な作用力の小さい，またその効果が環境条件によって変動する QTL を解析の初期段階で検出し，これらが影響しない試験設計を行うことの重要性が再認識された．

一方，陸稲のいもち病斑から分離されたいもち病菌株の中に，「中部 32 号」を特異的に強く侵害する菌株が見出されていた．このことから，「中部 32 号」を強く侵さないいもち病菌は，本系統の圃場抵抗性を主に制御している *Pi34* に対する弱（非）病原性遺伝子 *AVRPi34* を保有している，すなわち *Pi34* と *AVRPi34* の間には「遺伝子対遺伝子関係」が成立するという仮説を立て，交配後代菌株の病原性分離検定により本仮説は証明された．これは，いもち病菌に対する抵抗性程度を決定している量的形質遺伝子について

「遺伝子対遺伝子関係」が証明された最初の事例である。

Pi34 のクローニングおよび機能については、今後の研究によって解明されて行くであろうが、本遺伝子については、精密マッピングの過程で遺伝子近傍マーカーが作出されていることから、既にこれらのマーカーを用いた MAS による実用品種への遺伝子導入が行われている。しかしながら、*Pi34* を強く侵すいもち病菌の存在が確認されていることから、導入品種の利用に際しては、抵抗性の崩壊を回避する利用方法の確立が必要である。

圃場抵抗性遺伝子と抵抗性の永続性の関係については、以下のように整理される。まず、以前から抵抗性が崩壊しないことが経験的に認められている圃場抵抗性はポリジーン支配であり、それらにはレース特異性もみられないとされている。それに対し、ここで報告した *Pi34* だけでなく、*indica* 由来のゲノム領域を持つイネ品種 St. No.1 が保有する高度圃場抵抗性遺伝子 *Pif* にも菌株特異性があることが報告されている（柚木ら 1970）。また、Talukder et al（2004）は、異なる3つのレースを接種していもち病抵抗性に関する QTL 解析を行い、検出された QTL の多くがレース特異的であったことを報告している。これらのことから、現時点では、圃場抵抗性が永続性を持つのは、抵抗性に関与する遺伝子の機能が量的であるからというより関与する遺伝子数が多いことが原因である可能性が高いと考えられる。

複数の独立する遺伝子座が一つの量的形質に関与している場合それを「ポリジーン遺伝」と称しているが、ポリジーンの数や個々の遺伝子の作用力およびそれらの相互作用については、ダイアレル分析や QTL 解析によって明らかに

する必要があり，そのような研究事例はそれほど多くないため，「何個の遺伝子が関与していればポリジーンといえるのか」等の明確な定義はない．では，ポリジーン支配といわれているいもち病抵抗性は必ず永続性を持つのであろうか．前述したように，判断の根拠となる詳細な遺伝解析事例は少ないが，東（1995）は，有用な抵抗性育種資源となりうる「戦捷」をはじめ，いくつかの品種においてダイアレル分析により関与する遺伝子数の推定を行い，5~8個の遺伝子が関与することを明らかにしている．これらの品種は一般圃場レベルでは抵抗性の崩壊は報告されていない．また，「戦捷」についてはその後 QTL 解析が行われ，4個の QTL が圃場抵抗性に関与していることが明らかとなった（加藤ら 2002）．しかし，筆者は茨城県農業総合センターの試験圃場（畑圃場）では，「戦捷」のいもち病圃場抵抗性がさほど強くないことを観察している．この圃場では毎年「戦捷」とその子孫系統をある程度大面積で栽培していること，種子消毒および圃場におけるいもち病防除を行っていないこと等から，ある程度の年月を経て，「戦捷」等が保有する主要な圃場抵抗性関連遺伝子に対して強い病原力を有する菌系が選抜され，同圃場で優占した可能性が高いと考えている．しかし一方では，同圃場で長期間高度の圃場抵抗性を示している系統も存在する（これらの抵抗性系統に関する遺伝解析は行われていない）．もちろん，この事実のみをもって，何個の QTL であれば水稻のいもち病圃場抵抗性における崩壊の危険性が少ないのかを結論づけることは困難であろう．なぜならば，抵抗性の永続性には，栽培面積や栽培年数，圃場における伝染サイクル数および防除等の淘汰圧の大きさ等が複雑に関与し合っていると考えら

れるからである。さらに、陸稲と水稲では、病原菌の伝搬様式が異なる（陸稲は水稲とは異なり、広域で単一栽培されていないため、胞子の拡散による広域伝搬は起こりにくい反面、防除圧は低いため種子伝染による次作への伝搬は容易である）ため、陸稲での知見がそのまま水稲に当てはまるかどうかは不明である。しかし、単に遺伝学的側面から見た場合、我々が‘圃場抵抗性’として認識している抵抗性も、遺伝子の数が1～数個の場合は永続性があるとはいえず、この点においては圃場抵抗性も真性抵抗性と同様であると考えられる。

一方、穂いもち圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* は、抵抗性品種の普及後20年以上を経た現在においても抵抗性の崩壊現象は認められず（藤井ら 2005）、安定した主働遺伝子支配の圃場抵抗性として抵抗性育種に利用されている。藤井ら（1999）は、*Pb1* の永続性は、本抵抗性が葉いもちに対して強い抵抗性を示さないことに起因すると述べている。すなわち、病原性変異によって *Pb1* を特異的に侵す菌（以下侵害菌）が出現する、もしくは抵頻度で侵害菌が存在しているとしても、葉いもちの段階では圃場に優占する通常がいもち病の増殖は妨げられないため、これら侵害菌の選択的増殖を助ける淘汰圧は高くないと考えられること、さらに、穂いもちに関しても強い抵抗性を発揮するものの低いレベルでの罹病は許すために、これも選択的増殖を抑える働きをしていると推察している。我々は、上記の理由に加え、*Pb1* の効果が顕著に表れる止葉の出葉時期以降、穂が登熟して感染が不可能になるまでに可能な伝染サイクル数が、侵害菌が種子消毒時のボトルネックを経ても生存可能な程度にまで増殖するのには十分でないため、抵抗性崩壊

が生じないのではないかと考えている。これは、遺伝子の機能によっては抵抗性の永続性が得られる可能性がある貴重な事例であると考えられ、疫学的試験による仮説の検証が待たれる。

現在、QTL解析によって見いだされた比較的作用力の強いいもち病圃場抵抗性を、戻し交雑とMASによりコシヒカリ等の優良品種に導入して圃場抵抗性に関する同質遺伝子系統を育成する研究が進められている。これらに用いられた遺伝資源はまださほど多くはなく、遺伝子の機能がまだ不明なものもあるが、真性抵抗性マルチラインに準じた使用が予定されている。

今後、圃場抵抗性遺伝子の機能といもち病菌との相互作用に関する研究を進めるとともに、抵抗性崩壊を招くいもち病菌個体群の変動機構の解明を目指すことが、圃場抵抗性遺伝資源を持続的かつ効果的に利用する方法の確立に必要であり、いもち病抵抗性遺伝子 *Pi34* と弱病原性遺伝子 *AVR*Pi34** は、それらを解明するための研究材料として非常に有用であると考えられる。

謝辞

この論文を執筆するにあたり、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）東北農業研究センターの小泉信三博士には研究の端緒となる試験材料の提供と長年に渡る懇切な御指導および本論文の御校閲をいただいた。また論文の取りまとめにあたっては、神戸大学教授 土佐幸雄博士，眞山滋志博士および上島脩志博士，同助教授中屋敷均博士から有益な御助言と御校閲を頂いた。ここに心より感謝の意を表す。

本研究の遂行にあたっては、小泉信三博士，（独）農研機構中央農業総合研究センター北陸研究センター 芦澤武人博士から，絶えることのない御鞭撻とご援助を頂き，（独）農業生物資源研究所 矢野昌裕博士ならびに福岡修一博士からは，研究遂行の節目で有益および的確な御助言を賜わった。また，本研究は，（社）農林水産先端技術産業振興センター（STAFF）の片桐 敏博士，藤澤雅樹博士，山根弘子博士，当研究センターの今野純子氏および業務第4課の職員諸氏のご協力によって行われた。ここに篤く感謝の意を表す。

農研機構北海道農業研究センターの早野由里子博士には，様々な実験手法および試験遂行に関する御助言をいただいた。愛知県農業総合試験場の藤井 潔博士，坂 紀邦氏ならびに茨城県農業総合センターの眞部 徹氏には本研究にご理解を頂き水稻および陸稻の抵抗性に関する貴重な情報をいただいた。農林水産技術会議事務局研究交流管理監 石黒 潔博士には，抵抗性の永続性についての考察についてご教示いただいた。また，東北農業研究センター水田利用部長堀末 登博士（現国際農林水産業研究センター）および同センター研究管理監 荒木 均博士には，研究の継続へのご理解と熱心

な励ましをいただいた。心から感謝申し上げます。

本試験に供試した品種・系統種子およびいもち病菌株を分譲していただいた（独）農研機構作物研究所 竹内善信博士，農業生物資源研究所 林 長生博士および中央農業総合研究センター 安田伸子氏の諸氏に対し篤く御礼申し上げます。

最後に，本研究遂行に際し，常に理解と協力を惜しまず励ましてくれた夫である沢田明彦氏にここに心から感謝の意を表する。

引用文献

- Aljanabi, S.M. and Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25:4692-4693.
- Araki, E., Yanoria, M.J.T., Ebron, L.A., Mercado-Escueta, D., Takai, T. and Fukuta, Y. (2003) Mapping of a rice blast resistance gene *Pish*. *Breeding Research* 5 (Suppl. 2):333.
- 浅賀宏一(1976) 畑苗代における葉いもちの調査基準. 農業技術 31:156-159.
- 浅賀宏一(1987) 稲いもち病 (山中 達・山口富夫 編), 養賢堂, 東京 : pp. 226-228.
- 浅賀宏一 (1981) イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究. 農事試験場研究報告 35:51-138.
- 芦澤武人・園田亮一・齊藤初雄・古賀博則 (1997) 1994年に北海道および東北地方に分布したイネいもち病菌のレース. 北日本病虫研報 48:30-32.
- 芦澤武人・善林 薫・小泉信三 (2002) ササニシキ同質遺伝子系統の非病原性いもち病菌接種による穂いもち発病と同菌株の前接種による穂いもちの発病抑制 日植病報 68:305-307.
- Barr, M.E. (1977) *Magnaporthe*, *Telimenella* and *Hyponectria* (Physosporiaceae). *Mycologia* 69:952-966.
- Berruyer, R., Adreit H., Milazzo, J., Gaillard, S., Berger, A., Dioh, W., Lebrun, M. H. and Tharreau, D. (2003) Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. *Theor Appl Genet* 107:1139-1147.
- Couch, B.C. and Kohn, L.M (2002) A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new

species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94:683-693

Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275-296.

江塚昭典 (1977) 今月の農薬 21 (13):40-45.

江塚昭典 (1978a) 今月の農薬 22 (1):70-76.

江塚昭典 (1978b) 今月の農薬 22 (2):74-79.

江塚昭典・鳥山國士 (1987) イネいもち病圃場抵抗性の安定性に関する問題点. *農業技術* 42:337-340.

Fisher, R.A., Immer, F.R. and Tedin, O. (1933) The genetical interpretation of statistics of the third degree in the study of quantitative inheritance. *Genetics* 17:107-124.

藤井 潔・早野由里子・荒川 誠 (2005) イネ病害虫複合抵抗性品種の育成とその普及. *植物防疫* 59:226-230.

藤井 潔・遠山孝通・杉浦直樹・坂 紀邦・井澤敏彦・井上正勝・主宮昭男 (1999) イネ縞葉枯ウイルス抵抗性の日本型イネ品種月の光と姉妹系統に見いだされた穂いもち抵抗性の性質と家系分析. *育種学研究* 1:69-76.

藤巻 宏 (1980) いもち病抵抗性と他の病害虫抵抗性その他主要形質との組み合わせ育種の可能性, イネのいもち病と抵抗性育種 (山崎義人・高坂卓爾編著) 博友社, 東京, pp.497-523.

Fukuoka, S. and Okuno, K (1999) A gene, *Pi21(t)* conferring field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Breeding Res Suppl No* 1(1):255.

後藤岩三郎・バルチアフメリッド アリ (1983) いもち病抵抗性の遺伝 第 V 報. *陸稲農林籾* 4号, 同 26号に導入された戦捷のいもち病抵抗性遺伝子 *Pi-se*. *山形大紀要 (農学)* 9(2):121-125.

Harushima, Y., Yano, M., Shomura, A., Sato, M., Shimano, T., Kuboki, Y., Yamamoto, T., Lin, S.Y., Antonio, B.A., Parco, A., Kajiya, H., Huang, N., Yamamoto, K., Nagamura, Y., Kurata, N., Khush G.S. and Sasaki, T. (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2,275 markers using a single F₂ population. *Genetics* 148:479-494.

東 正昭 (1995) イネのいもち病圃場抵抗性の遺伝様式. 東北農業試験場報告 90 (別) .

東 正昭, 櫛渕欽也 (1978) イネの葉いもち病圃場抵抗性の遺伝分析. 育雑 28:277-286.

International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800.

石黒 潔・小林 隆・原沢良栄・中島 隆・兼松誠司 (2000) イネいもち病は 1 回の感染好適条件で伝染源から 1km 近くまでの範囲に拡散する. 東北農業試験場 平成 12 年度研究成果情報 71-72.

岩野正敬・山田昌雄 (1983) イネいもち病菌レース分布とその変動要因に関する研究. 北陸農試報 25:1-64.

Kaji, R., Ogawa, T., and Nishimura, M. (1997) RFLP mapping of a blast resistance gene, *Pit*, in rice. *Breed Sci (Suppl. 1)* 47:37.

加藤恭宏・遠藤征馬・矢野昌裕・佐々木卓治・井上正勝・工藤悟 (2002) 陸稲戦捷の葉いもち圃場抵抗性に関与する量的形質遺伝子座の連鎖分析. 育種学研究 4:119-124.

清沢茂久 (1970) 農業技術 25:21-25.

Kiyosawa, S. (1978) Identification of blast-resistance genes in some rice varieties. *Japan J Breed* 28:287-296.

Koizumi, S. (2001) Rice blast control with multilines in Japan. *in Exploiting biodiversity for sustainable pest management*. Mew, T.

- W., Borromeo, E., Hardy, B. eds., IRRI, Los Banos, Philippines, pp.143-157.
- 小泉信三・藤 晋一 (1995) 水稻「中部 32 号」の葉いもちほ場抵抗性のいもち病菌菌株による変動 愛知農総試研報 27:85-93.
- 小島洋一郎・蛭谷武志・金田 宏・土肥正幸・石橋岳彦・木谷吉則・向野尚幸・山口琢也・表野元保・山本良孝 (2003) 水稻新系統「コシヒカリ富山 BL」の育成と有効利用 I. 「コシヒカリ富山 BL1 号～6 号」の育成. 富山農技センター研報 20:13-31.
- Konieczny, A. and Ausubel, F.M. (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4:403-410.
- Lander, E.S., Green, S.P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. and Newbury, L. (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Lincoln, S.E., Daly, M.J. and Lander, E.S. (1993) Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL version1.1 : a tutorial and reference manual, 2nd edn. Whitehead Institute for Biometrical Research, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Mayr, E. (1963) *in* Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 811pp.
- McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghilang, R., Li, Z., Xing, Y., Zhang, Q., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res* 9:199-207.
- 三上泰正・川村陽一・堀末 登(1990) ふ系 138 号のいもち病抵抗性について 日作東北支部報 33:87-88.

- 宮本 勝・矢野昌裕・平澤秀雄・平山正賢・岡本和之・須賀立夫
(1999) 日本在来陸稻“嘉平”より見いだされた新規のいもち
病圃場抵抗性に関する QTL. 育種学研究 1(別 2):92.
- 茂木 静夫 (1987) 稲いもち病 (山中 達ら編) 養賢堂, 東京,
pp13-15.
- Müller, K. O. and Haigh, J. C. (1953) Nature of field resistance of the
potato to *Phytophthora infestans* de Bary. *Nature* 171:781-783.
- Mundt, C. C. (1994) Use of host genetic diversity to control cereal
diseases: Implications for rice blast. *in* Rice Blast Disease, R. S.
Zeigler, S. A. Leong and P.S. Teng eds., Cab International and
IRRI, Cambridge, pp.293-308.
- Murrey, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of
high-molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*
8:4321-4325.
- Nguyen, T. T. T., Koizumi, S., La, T. N., Zenbayashi-Sawata, K.,
Ashizawa, T., Yasuda, N., Imazaki, I. and Miyasaka, A. (2006)
Pi35(t), a new gene conferring partial resistance to leaf blast in the
rice cultivar Hokkai 188. *Theor Appl Genet* 113:697-704.
- Orbach, M.J., Farrall, L., Sweigard, J.A., Chumley, F.G. and Valent,
B. (2000) A telomeric gene determines efficacy for the rice blast
resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2019-2032.
- Orita, M., Iwahara, H. Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T.
(1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel
electrophoresis as single strand conformation polymor-
phisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766-2770.
- Osoegawa, K., Woon, P. Y., Zhao, B., Frengen, F., Tateno, M.,
Catanese, J. J. and de Joung, P. J. (1998) An improved approach
for construction of Bacterial Artificial Chromosome libraries.
Genomics 52:1-8.
- Parlevliet, J.E. (1988) Identification and evaluation of quantitative

resistance. *in* Plant disease epidemiology, genetics, resistance, and management, Leonald, K.J. and Fry, W.E. eds., McGraw-Hill, New York, vol 2, pp.79-137.

Rossman, A.Y., Howard, R.J. and Valent, B (1990) *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia* 82:746-749.

Qu, S., Liu, G., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L., Dai, L., Han, B. and Wang, G.L. (2006) The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family. *Rice Genetics* 172:1901-1914.

Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O., Guesquiere, A. and Notteghem, J.L. (2003) Identification of five new blast resistant variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor Appl Genet* 106:794-803.

佐々木武彦・阿部眞三・松永和久・岡本栄治・永野邦明・丹野耕一・千葉芳則・狩野 篤・植松克彦・滝沢浩幸・早坂浩志・涌井 茂・黒田倫子・薄木茂樹・千葉文弥・宮野法近・佐々木都彦・遠藤貴司 (2002) ササニシキの多系品種「ササニシキ BL」について. 宮城古川農試報 3:1-35.

杉浦直樹・辻 孝子・藤井 潔・加藤恭宏・坂 紀邦・遠山孝通・早野由里子・井澤敏彦 (2004) 水稻病害抵抗性付与のための連続戻し交雑育種における DNA マーカー選抜の有効性の実証. 育種学研究 6:143-148.

Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C. and Ronald, P. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270:1804-1806.

Swiderski, M.R. and Innes, R.M. (2001) The *Arabidopsis* *PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant Journal* 26:101-112.

Talukder, Z.I., Tharreau, D. and Price, A.H. (2004) Quantitative trait

loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. *New Physiol* 162:197-209.

Temnykh, S., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T. and McCouch, S.R. (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 100:697-712.

鵜飼保雄 (2000) ゲノムレベルの遺伝解析 MAP と QTL, 東京大学出版会, 東京, pp.238-317.

van der Plank, J. E. (1963) *in Plant Disease : Epidemics and Control*, Academic Press, New York and London, 1-349pp.

Wang, Z. X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y. and Sasaki, T. (1999) The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *The Plant Journal* 19:55-64.

八重樫博志 (1991) 水稻良食味品種の作付拡大といもち病. *植物防疫* 45:456-459.

Yaegashi, H. and Udagawa, S. (1978) The taxonomical identity of the perfect state of *Pyricularia grisea* and its allies. *Can J Bot* 56:180-183.

Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. (1976) *Ann Phytopath Soc Japan* 42:216-219.

Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z., Kono, I., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N. and Sasaki, T. (1998) Expression of *Xal*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *PNAS* 95:1663-1668.

柚木利文・江塚昭典・守中 正・桜井義郎・篠田治躬・鳥山国士

(1970) いもち病に対するイネ品種の抵抗性に関する研究（第4報）ほ場抵抗性の菌系による変動．中国農業試験場報告 E6:21-41.

Zhang, H. B, Zhao, X. P., Ding, X. L., Paterson, A. H. and Wing, R.A. 1995. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant J* 7:175-184.

Zhu M, Wang L, Pan QH (2004) Identification and characterization of a new blast resistance gene located on chromosome 1 through linkage and differential analysis. *Phytopathology* 94:515-518.

付録

M1:ゲノミック DNA 抽出法(CTAB 法)

- (1) 生葉を液体窒素で急速に凍結し、乳棒および乳鉢を用いて磨砕する。
- (2) 生葉 10g に対して約 20ml の CTAB 抽出バッファー (1.5% CTAB, 75mM Tris-HCl pH8.0, 15mM EDTA pH8.0, 1.05M NaCl) を沸騰直前まで加熱し磨砕したサンプルに加え、56°C のウォーターバスで 100rpm, 20 分振とうする。
- (3) クロロホルム・イソアミルアルコール溶液 (Chloroform : Isoamylalcohol=24:1) を CTAB 抽出バッファーと等量加える。
- (4) 振とう培養器で 120rpm, 20 分間振とうする。
- (5) 3,000rpm で 20 分間遠心分離する。
- (6) 上層を 50ml 遠心チューブに移す。
- (7) 加温した 10% CTAB (10% CTAB, 0.7M NaCl) を液量の 1/10 量加え、混合する。
- (8) クロロホルム・イソアミルアルコール溶液を等量加え、20~30 分、ゆっくりと転倒混和する。
- (9) 3,000rpm で 20 分間遠心分離する。
- (10) 上層を新しい 50ml 遠心チューブに移す。
- (11) (10) に 1.5 倍量の CTAB 沈殿バッファー (1% CTAB, 50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0) を加え、ゆっくりと 2 層を混合し、DNA を析出させる。
- (12) 3,000rpm で 20 分間遠心分離する。
- (13) 上清を捨て、沈澱に 1M NaCl を約 5ml および RNase (10mg/ml) を 5 μ l 加える。
- (14) 56°C に 2~3 時間静置し、完全に溶解させる。
- (15) (14) に -20°C の 99.5% エタノールを 10ml 加え、析出した DNA をイノキュレーションループ等に巻き付ける。
- (16) イノキュレーションループ先端の DNA を 70% エタノールに 7 分間浸漬する。
これを 2 回繰り返す、DNA を洗浄する。
- (17) ループを 99.5% エタノールに 5 分間浸漬し、脱水する。
- (18) 適量の 1/10 TE に溶解する。
- (19) 分光光度計等を用いて濃度を測定し、4°C で保存する。

M2：サザンハイブリダイゼーション

- (1) ゲノム DNA 2 μ l (400ng/ μ l を 5 μ l) を, 10 unit の制限酵素 (*Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RV, *Hind* III, *Apa* I, *Dra* I, *Eco* RI, *Kpn* I) で 消化する.
- (2) 0.5 \times TBE Buffer (0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA) で 0.6% Agarose gel (8.5 \times 8.5 cm)を作成する.
- (3) 1/10 量の Loading Dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol) を添加した消化済みゲノム DNA をゲルのウェルにアプライし, 20~30V で約 16 時間泳動する. サイズマーカーには λ *Hind* III digest marker を用いる.
- (4) アルカリブロッキング:ブロッキング台に濾紙をセットし, アルカリ溶液 (0.4M NaOH) で十分濡らしながら, 泳動後のゲル (ゲルトレイ接着面を上側), ゲルの大きさに調整したナイロンメンブレンフィルター (Nylon membrane positively charged ; Roche Diagnostics K.K.), 濾紙 2 枚 (Whatman Chromatography paper, 3MM) の順に気泡が入らないように重ねる. キムタオル等 (厚さ 5~8cm) と適当な重し (500g 前後) をのせて, 台周囲に十分量のアルカリ溶液を注いで 12 時間以上静置し, ゲルからフィルターに DNA を転写 (ブロッキング) させる.
- (5) ブロッキング終了後, フィルターを取り出し, ゲルとの接着面に必要事項を 4 B の鉛筆で記入する. フィルターを 2 \times SSC (300mM NaCl, 30mM tri-Sodium Citrate Dihydrate) で 10 分間振とうし, 中和・洗浄する. これを 2 回繰り返す.
- (6) 風乾後, 120 $^{\circ}$ C の乾熱滅菌器で 20 分間処理し, DNA を固定させる.
- (7) サザンハイブリダイゼーション用のプローブは, クローニング用ベクター等に挿入されている cDNA 断片を, M4 と RV 等のユニバーサルプライマーを用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) で増幅させて作成する.

PCR Mixture の組成 (total volume 50 μ l) : 10 \times PCR Buffer 5.0 μ l, 2mM dNTP Mixture 5.0 μ l, 2.5mM MgCl₂ 5.0 μ l, 20pmol M4 primer 1 μ l, 20pmol RV primer 1 μ l, template DNA 1 μ l, *Taq* DNA polymerase(TaKaRa *Taq*) 1.25U, H₂O 31.75 μ l

PCR Program : Denature (DNA の変性)	94 $^{\circ}$ C 1 分	} 25 サイクル
Annealing (プライマーの結合)	55 $^{\circ}$ C 2 分	
Extension (伸長反応)	72 $^{\circ}$ C 3 分	

- (8) PCR サンプルは, 1.0% agarose gel, 0.5 \times TBE Buffer を用いて, MUPID 等のミニ電気泳動システムで 100V, 20 分間泳動し, 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイ

ド溶液で 20~30 分間染色した後にトランスイルミネーター上で DNA 断片の増幅を確認する。

- (9) PCR 産物を MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN K.K.) を用いて精製し、濃度を測定する。
- (10) (6) で作成したフィルターを $2\times$ SSC に浸漬・洗浄する。
- (11) ハイブリダイゼーション容器にハイブリダイゼーションバッファー（フィルター面積 100cm^2 に対してバッファー 10ml を基準とする）を入れ、 42°C に予熱した振とう培養器に入れ加温した後、洗浄したフィルターをバッファーに入れ、 42°C 、30 分~1 時間振とうする（プレハイブリダイゼーション）。
- (12) マイクロチューブに $10\text{ng}/\mu\text{l}$ の DNA を $10\mu\text{l}$ 調整する（プローブ DNA 量はバッファー 10ml あたり 100ng ）。
- (13) チューブを沸騰水中で 5 分間加熱し DNA を変性させる。
- (14) チューブを氷水中に入れ 5 分間急冷させる。以下氷水中で行う。
- (15) DNA 溶液と等量のラベリング試薬($10\mu\text{l}$)を加え混合する。
- (16) DNA 溶液と等量のグルタルアルデヒド溶液($10\mu\text{l}$)を加え混合する。
- (17) フラッシング後、 37°C のウォーターバス中で 10 分間加熱する（ラベリング反応）。
- (18) フィルターの分子量マーカー（ λ *Hind* III digest 等）のラベリングも同様に行う。
- (19) ラベリングしたプローブ DNA をフィルターの入ったプレハイブリダイゼーションに加え、十分に混合する。
- (20) 42°C の振とう培養器中で緩やかに振とうしながら 12 時間以上ハイブリダイゼーションを行う。

M3 : SSR マーカーの検出

- (1) PCR Mixture の組成 (total volume 25 μ l) : 10 \times PCR Buffer 2.5 μ l, 2mM dNTP Mixture 2.0 μ l, 2.5mM MgCl₂ 2.0 μ l, 20pmol/ μ l forward/reverse SSR primer 1 μ l each, 50ng/ μ l template DNA 2 μ l, *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Taq) 1.0U, H₂O 14.4 μ l
- (2) PCR program :
- | | |
|----------|-----------|
| 94°C 5 分 | } 35 サイクル |
| 94°C 1 分 | |
| 55°C 2 分 | |
| 72°C 2 分 | |
| 72°C 5 分 | |
- (3) 電気泳動 : 2.5% NuSieve GTG Agarose gel にアプライしたサンプルを 1 \times TBE buffer 中で 100V, 90 分泳動し, 終了後のゲルをエチジウムブロマイドで染色してトランスイルミネーター上でバンドを確認した.

M4: STS および CAPS マーカーの検出 (Konieczny and Ausubel 1993)

(1) プライマーの設計

RFLP マーカーとして連鎖地図上にすでに位置づけられているゲノミッククローンあるいは cDNA クローンの塩基配列情報を入手し、ゲノミック DNA からそのマーカー部位特異的に DNA 断片が増幅するプライマー (長さは 20 塩基程度) を設計する。

(2) PCR Mixture の組成 (total volume 25 μ l) : 10 \times PCR Buffer 2.5 μ l, 2mM dNTP Mixture 2.5 μ l, 25mM MgCl₂ 2.5 μ l, 20pmol/ μ l forward/reverse primer 0.5 μ l each, 50ng/ μ l template DNA 1 μ l, *Taq* DNA polymerase (TaKaRa *Taq*) 1.0U, H₂O 16.4 μ l

(3) PCR program : 94 $^{\circ}$ C 2 分

94 $^{\circ}$ C 1 分

60 $^{\circ}$ C 2 分 30 サイクル

72 $^{\circ}$ C 3 分

(アニーリング温度はプライマーの T_m 値により調整する)

(4) 電気泳動 M2 : サザンハイブリダイゼーションの (8) を参照。

(5) 電気泳動の結果, 解析集団の両親系統間に多型が検出された場合は, それが STS (Sequence Tagged Site) マーカーとなる。

(6) 多型が検出されなかった場合は, 制限酵素処理用の PCR 産物大量増幅を行う。
(2) の Mixture を Total volume 100 μ l となるよう調製し, PCR を行う。

(7) 制限酵素処理 : PCR 産物 10 μ l を適当な制限酵素で消化し, 消化された断片のサイズの違いを電気泳動で確認する。

M5:DNA 簡易抽出法

- (1) 96 穴 PCR プレートに 60 μ l の簡易抽出バッファーを入れておく.
- (2) セルトレイの苗の位置と対応させて, イネ葉片 (1~2cm, 7~8 枚) を葉がバッファーに完全に浸かるように入れる.
- (3) 先を丸めたピペットチップを用いて, バッファーが黄緑色になるまで押しつぶす.
- (4) 65 $^{\circ}$ C で 60 分インキュベートする.
- (5) PCR プレート用スタンドに PCR 8 連チューブをセットし, クロロホルムを 40 μ l 加える.
- (6) 4 の抽出液(約 40 μ l)を 5 のチューブに移し, ピペッティングで混合する.
- (7) プレートシールで蓋をして 2,000rpm で 10 分間遠心分離する.
- (8) 8 連ピペットを用いて 7 の上層を約 30 μ l 吸いとり, イソプロパノール 40 μ l を入れておいた新しい 96 穴プレートに加えてピペッティングで混合する.
- (9) 2,000rpm で 10 分間遠心分離.
- (10) ペレットを吸い込まないように注意して, 液を吸い出して (約 60 μ l) 捨てる.
- (11) 10 のプレートに 70%エタノールを 50 μ l 加える.
- (12) 2,000rpm で 10 分間遠心分離する.
- (13) エタノールを 40 μ l 吸い出し捨てる.
- (14) 11 - 13 を再度行う.
- (15) 凍結乾燥する (30 分).
- (16) 1/10 TE バッファーを 40 μ l 加える.

M6:SSCP 検出法

- (1) ゲノムの塩基配列情報をもとに 20 塩基のプライマーを設計し，合成後濃度を 20 μ M に調整する.
- (2) 両親系統の DNA を鋳型にして PCR を行う. PCR Mixture の組成および PCR 条件は M4 の STS および CAPS マーカー検出の (2) に準じて行う.
- (3) PCR 産物を 1 μ l とり，電気泳動により DNA 増幅を確認する.
- (4) 二層式の非変性アクリルアミドゲルを作成する.
分離ゲル : 0.38M Tris-HCl pH8.8, 13.0% Acrylamide, 0.35% c, 0.02% APS, 0.1% TEMED
濃縮ゲル : 0.13M Tris-HCl pH 6.8, 5.0% Acrylamide, 0.13% N,N'-methylene-bisacrylamide, 0.1% APS, 0.1% TEMED
- (5) 18 μ l のホルムアミド色素液 (Xylenecyanol FF 10mg, Bromophenol Blue 10mg, 0.5M EDTA(pH8.0) 0.4ml in 10ml Formamide) に 2 μ l の PCR 産物を加えて混合し，85 $^{\circ}$ C で 5 分熱した後，氷上で急冷する.
- (6) 1 \times Tris-Glycine Buffer (25mM Tris, 190 mM Glycine) で，ゲルを 30 分，200V で前泳動する.
- (7) DNA を一本鎖に解離させたサンプルを 2~5 μ l アプライし，200~300V で Xylenecyanol がゲルの八分目に到達するまで泳動する.
- (8) SYBR[®] Green (Molecular Probes) Vista-Green[™] (Amersham Biosciences) 等の染色試薬を用いて染色し，撮影する.
- (9) 泳動温度を下げたり (5 $^{\circ}$ C)，ゲルにグリセロールを添加することで SSCP パターンが変化するので，多型が検出されない場合は試す.

M7:いもち病菌株 IBOS8-1-1 および Y93-245c-2

	菌株名	
	IBOS8-1-1	Y93-245c-2
レース	003.0	137.0
交配型	MAT1-2	MAT1-1
採集年	1988	1993
採集地	茨城県旧山形町 一般圃場	中華人民共和国 雲南省 Simao lancang Zhutangxing 一般圃場
採集部位	穂首いもち	穂いもち
採集者	林 長生	藤田 佳克
特徴		イネ菌に対して高い交配能を有する