



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。



【 391 】

氏 名・(本 籍)	善林 薫 (秋田県)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)
学 位 記 番 号	博ろ第74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19年4月20日

【 学位論文題目 】

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

審 査 委 員

主 査	教 授	土佐 幸雄
	教 授	眞山 滋志
	教 授	上島 脩志
	助教授	中屋敷 均

(別紙様式3)

論文内容の要旨

氏名 善林 薫

論文題目 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

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ことから、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*AVR*Pi34**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りうることを示された。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。

氏名	善林 薫		
論文題目	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		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	土佐幸雄
	副査	教授	眞山滋志
	副査	教授	上島楯志
	副査	助教授	中屋敷均
要 旨			
<p>イネいもち病は、糸状菌 <i>Magnaporthe oryzae</i> によって引き起こされるイネの最重要病害である。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、圃場抵抗性遺伝子の同定とそのクローニングを試みたものである。</p> <p>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。第 1 章でいもち病抵抗性育種の現状と圃場抵抗性に関するこれまでの知見を概観したのち、第 2 章では、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」との交配により育成した F₃ 集団を用いて QTL 解析を行った結果、11 番染色体長腕上に作用力の強い QTL が 1 個検出された。そこで本遺伝子を <i>Pi34</i> 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」との交配により育成した F₂ および F₃ 集団を用いて 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」ゲノム由来であることが判明した。これを <i>Pi35(t)</i> と命名した。一方、8 番染色体に座乗する QTL は「Danghang-Shali」ゲノム由来であった。</p> <p>第 3 章では、<i>Pi34</i> 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。その結果、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。<i>Pi34</i> 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「日本育」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」のみに存在する転移因子 (トランスポゾン) 配列であった。残る 1 個は、塩基配列から両品種で異なる遺伝</p>			

氏名 善林 薫

子であると予測された。

一方、「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。そこで第 4 章では、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「Gene-for-gene relationship」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 *AVR*Pi34** であることが明らかとなり、これらの間に「Gene-for-gene relationship」が成立することが証明された。

Pi34 が Gene-for-gene theory に支配されているということは、*Pi34* の効果が、分布するいもち病菌レースの変動に影響されるということを示唆する。そこで第 5 章では、2001 年の東北地方をモデルとして、レース変動の実態を調査した。その結果、抵抗性遺伝子の分布の変動に敏感に反応して増減する非病原力遺伝子と、あまり敏感に反応しない非病原力遺伝子があることが明らかとなった。一方、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。その結果、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。以上のことから、もし *AVR*Pi34** が「抵抗性遺伝子の分布の変動に敏感に反応して増減する非病原力遺伝子」であれば、*Pi34* をマルチラインに組み込むことはその抵抗性を増強する上で有効であると考えた。

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りうることが示された。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り、価値ある業績と認める。よって、学位申請者の善林薫は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。

- ・ 特記事項 特になし
- ・ 特許登録数 0 件
- ・ 発表論文数 7 報