

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04438

研究課題名(和文) ゲノムシャッフリングによるトビイロウンカ高度抵抗性イネの開発

研究課題名(英文) Development of brown planthopper resistant lines in rice by genome-shuffling

研究代表者

安井 秀 (Yasui, Hideshi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70220142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,590,000円

研究成果の概要(和文)：トビイロウンカ高度抵抗性の在来イネ品種の遺伝的基盤の解明を目的として、高度抵抗性品種のゲノムの一部を置換することにより高度抵抗性に必須な未知のゲノム領域を特定し、既知の抵抗性遺伝子群の集積を行って遺伝子集積効果を検証した。さらに、ゲノムシャッフリングにより複数の抵抗性品種の抵抗性遺伝子を保有する個体を育成し、そのトビイロウンカ抵抗性の検証を行った。その結果、トビイロウンカ高度抵抗性品種PTB33の抵抗性の遺伝的基盤を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インド原産の在来イネ品種PTB33はトビイロウンカに対する高度抵抗性を保有し、複数のトビイロウンカ地域個体群に対して抵抗性を示すことが知られている。耐虫性育種における抵抗性イネ品種の利用においては、昆虫の加害性の変化によって植物の保有する昆虫抵抗性遺伝子の有効性が消失して育成されたイネ系統の抵抗性崩壊につながる例がよく知られている。本研究の目的は、まずトビイロウンカに対する高度抵抗性の遺伝的基盤を解明するために個々の抵抗性遺伝子を同定し、その遺伝効果ならびにこれら遺伝子の集積効果を明らかにすること、次にこれら抵抗性遺伝子資源の育種における有効利用方法を示すことである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the genetic basis of highly resistant rice varieties against the brown planthopper [BPH; *Nilaparvata lugens* (Stal.)], genomic regions essential for high resistance to BPH was identified by replacing a part of the genome of the highly resistant cultivar, Ptb33. In addition, individuals possessing multiple resistance genes from the cultivar each carrying their BPH resistance gene(s) were developed by genome shuffling. Finally, the gene accumulation effect of known brown planthopper resistance gene were verified.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 耐虫性 トビイロウンカ 近似同質遺伝子系統 遺伝子集積系統

## 1. 研究開始当初の背景

トビイロウンカ抵抗性の育種素材として在来品種や近縁野生種の有用遺伝子が利用されているが、昆虫が作物の抵抗性を克服するスピードは極めて早く、早晩に遺伝子資源の枯渇が危惧される。トビイロウンカ抵抗性遺伝子 *BPH1*, *BPH2*, *BPH4* による抵抗性は世界で最も強い加害力をもつ南ベトナムのトビイロウンカによって克服され、これまで抵抗性が持続していた高度抵抗性のインド型品種 (*Rathu Heenati* や *Balamawee*) でもしばしば抵抗性の劣化が見られる。

長年の遺伝分析から、トビイロウンカに対する抵抗性品種の主要な遺伝子座が特定されたが、これらの抵抗性遺伝子資源を利用して育成された品種や系統では、供与親の持つ高度抵抗性を再現できていない。高度抵抗性品種が保有する抵抗性アレルの集積が完了していないか、未知の遺伝要因の特定がなされていないことがその理由であると考えられる。

高度抵抗性が持続している在来品種の遺伝子資源を利用するためには、その遺伝要因を解明することが不可欠である。複数の遺伝子座が関与する複雑形質についても、イネの高密度な DNA マーカーの開発と世代促進を含むマーカー選抜育種法が確立され、十分に解析可能なレベルに達したと考えられる。そこで、高度抵抗性品種の抵抗性の遺伝要因を解明するとともに、複数の抵抗性品種に由来する抵抗性遺伝子の集積系統 (PYL) を育成し、トビイロウンカ高度抵抗性系統の開発を提案した。

## 2. 研究の目的

最強の加害力を有するトビイロウンカ個体群に対しても、吸汁抑制作用が持続している高度抵抗性の在来品種が存在するが、その遺伝的基盤は不明である。本研究の目的は、まず、(1) 複数の抵抗性品種と感受性品種のゲノムを再編成させた上で高度抵抗性系統を選抜し、その全ゲノム遺伝子型構成を明らかにすることであった。次に、(2) 高度抵抗性品種のゲノムの一部を置換することにより高度抵抗性に必須な未知のゲノム領域の特定をめざした。最後に、(3) 既知の遺伝子群の集積育種を加えて、複雑形質であるトビイロウンカ高度抵抗性の遺伝要因の解明に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

トビイロウンカ高度抵抗性に関与する未知のゲノム領域の特定:

トビイロウンカ高度抵抗性品種 Ptb33 のゲノムの一部を、感受性品種台中 65 号のゲノムで置換することにより高度抵抗性に必須

な未知のゲノム領域の特定をめざした。まず在来品種 Ptb33 と T65 との F<sub>1</sub> を準備した (図 1)。トビイロウンカ高度抵抗性品種 Ptb33 と感受性品種台中 65 号の二親性の戻し交雑 F<sub>1</sub> 集団 (Ptb33/T65//Ptb33, T65/Ptb33//T65) を育成し (図 1)、トビイロウンカ個体群 (1966 日本採集トビイロウンカ個体群) に対する抵抗性検定を実施した。Ptb33 を戻し交雑した戻し交雑 F<sub>1</sub> 集団 (Ptb33/T65//Ptb33) ではすべて抵抗性を示した一方、台中 65 号を戻し交雑した戻し交雑 F<sub>1</sub> 集団では、抵抗性と感受性の分離が見られたので、Ptb33 を戻し交雑した戻し交雑 F<sub>1</sub> 集団 (Ptb33/T65//Ptb33) について抵抗性に関する QTL 解析を実施した。さらに、Ptb33 と T65 の F<sub>1</sub> に在来品種を戻し交雑して得られる戻し交雑自殖 F<sub>2</sub> 個体群を育成し、これらを用いて高度抵抗性に関与するゲノム領域を推定した。

既知のトビイロウンカ抵抗性遺伝子の遺伝子集積効果の検証:

4 つの染色体領域に関する 7 種類の NIL を準備した。4 つの染色体の抵抗性遺伝子座に関する遺伝子集積系統作出のための交配を実施した (図 2)。F<sub>2</sub> 集団を育成してマーカー選抜により遺伝子集積個体を選抜した。

## 4. 研究成果

トビイロウンカ高度抵抗性に関与する未知のゲノム領域の特定:

Ptb33 を戻し交雑した戻し交雑 F<sub>1</sub> 集団 (Ptb33/T65//Ptb33) を用いたトビイロウンカ抵抗性の QTL 解析の結果、染色体 4 上に極めて大きな効果を示す QTL が 1 つだけ検出されたほかに遺伝効果の大きな QTL は検出されなかった。

そこで、戻し交雑自殖 F<sub>2</sub> 集団を用いた QTL 解析を実施した。トビイロウンカ抵抗性 (羽化メス成虫の腹部肥大率) の頻度分布を図 3 に示した。QTL 解析の結果、Ptb33 のトビイロウンカ高度抵抗性には、染色体 4 のほかに染色体 3、染色体 6、染色体 7、染色体 11、染色体 12 上の QTL が関与していた (表 1)。さらに、詳細な解析の結果、染色体 4、染色体 6、染色体 7 (上記 B<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 集団で検出された QTL 領域とは異なる) 染色体 11、染色体 12 上の QTL の存在が実証された (表 2)。実証された QTL の座乗領域を既報のトビイロウンカ抵抗性遺伝子座の座乗位置と比較した (図 4)。これらの結果を統合して、複数の抵抗性遺伝子座の領域を保有する新規高度抵抗性育種素材を作出した。

既知のトビイロウンカ抵抗性遺伝子の 3 遺伝子集積効果の検証:

既知のトビイロウンカ抵抗性遺伝子の 3 遺伝子集積効果の検証を実施した。近似同質遺伝子系統 (NILs: 表 3) 間の交雑とマーカー選抜により、4 遺伝子座における抵抗性アリ

ル集積系統の作出を目指して4つのゲノム領域に座乗する7つの遺伝子座を対象とし、異なる遺伝子型構成をもつ3遺伝子集積ヘテロ個体の自殖種子を取得した。異なる遺伝子型構成をもつ3遺伝子集積系統について、加害性の異なるトビイロウンカに対する抵抗性強度を検証した。その結果、*BPH2*と*BPH3*と*BPH17*、*BPH2*と*BPH32*と*BPH17-ptb*、*BPH20*と*BPH21*と*BPH32*の3系統の3遺伝子集積系統では1966 Hadano 採集トビイロウンカ個体群に対する極めて強いトビイロウンカ抵抗性を示した(表4)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- 1) Nguyen, C. D., H. Verdeprado, D. Zita, S. Sanada-Morimura, M. Matsumura, P. S. Virk, D. S. Brar, F. G. Horgan, H. Yasui, and D. Fujita (2019) Development and characterization of near-isogenic and pyramided lines carrying resistance genes to brown planthopper with the genetic background of *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *Plants* 8(11), 498. 査読有
- 2) Thein, H.W., Y. Yamagata, T. V. Mai, H. Yasui (2019) Four resistance alleles derived from *Oryza longistaminata* (A. Chev. & Roehrich) against green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Uhler) identified using novel introgression lines. *Breed. Sci.*, 69(4): 573–584. 査読有
- 3) Nguyen, P.C., D. Fujita, A. Yoshimura, H. Yasui (2018) Fine-mapping of *Grh6* gene resistance to the green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler). *Breed. Sci.*, 69(3): 439–446. 査読有
- 4) Rumanzi, S.M., Y. Yamagata, A. Yoshimura and H. Yasui (2017) Genetic mapping and characterization of lethal necrotic mutants in rice (*Oryza sativa* L.). *Amer. J. Plant. Sci.* 8: 3350-3376.  
<http://doi.org/10.4236/ajps.2017.813226>, 査読有
- 5) Mai, T. V., A. Yoshimura and H. Yasui (2017) Characterization of resistance to the green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler), in a core collection of landraces in rice (*Oryza sativa* L.). *Amer. J. Plant. Sci.* 8: 236-256.  
<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2017.82018>, 査読有

[学会発表] (計5件)

- 1) 田畑周作, 山形悦透, 藤田大輔, 真田幸代, 松村正哉, 安井秀, 加害性が異なるトビイロウンカ個体群を用いたインド型イネ品種「PTB33」のトビイロウンカ高度抵抗性に関する QTL 解析 日本育種学会第 136 回講演会講演要旨集 育種学研究

21(2):411, 2019-9-7, 近畿大学.

- 2) Nguyen, D.C., T. Okano, M. Matsumura, H. Yasui and D. Fujita, Development of near-isogenic lines carrying resistance genes to brown planthopper with the genetic background of japonica rice variety, 日本育種学会第 133 回講演会講演要旨集 育種学研究 20(1):211, 2018-3-26, 九州大学.
- 3) Mai, T. V., 吉村淳, 安井秀, 在来イネのコアコレクションを用いたイネのツマグロヨコバイ抵抗性の探索, 日本育種学会第 131 回講演会講演要旨集 育種学研究 19(1):129, 2017-3-29, 名古屋大学.
- 4) 大城州人, 山形悦透, 松村正哉, 土井一行, 春原英彦, 田崎三香子, 吉村 淳, 安井秀, Genotyping-by-sequencing を利用したインド型イネ品種 ARC10239 に由来するセジロウンカ抵抗性の QTL 解析, 日本育種学会第 130 回講演会講演要旨集 育種学研究 18(2):112, 2016-9-25, 鳥取大学.
- 5) M. Matsumura, and H. Yasui, Status of insecticide resistance and virulence to resistant rice varieties in the brown planthopper in Asia, 2016-9-25, XXV International Congress of Entomology, Orland, Florida, USA.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安井 秀 (YASUI Hideshi)

九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：70220142

##### (2) 研究分担者

松村 正哉 (MATSUMURA Masaya)

(独)農研機構・九州沖縄農業研究センター・難防除害虫研究チーム・チーム長  
研究者番号：00370619

藤田 大輔 (FUJITA Daisuke)

佐賀大学・農学部・生物科学コース・熱帯作物改良学分野・准教授  
研究者番号：80721274

山形 悦透 (YAMAGATA Yoshiyuki)

九州大学・大学院農学研究院・学術研究員(特任助教)  
研究者番号：00600446

##### (3) 研究協力者

Phuong, Tran Tang

ベトナムソクチャン省農業開発局・研究員  
研究者番号：なし

表 1. トビイロウンカ腹部肥大率に関する QTL

T65 戻し交雑由来集団における放飼5日後の腹部肥大率に関する QTL

BPH 個体群	QTL <sup>a)</sup>	染色体	位置 (Mbp)	LOD	相加効果 <sup>b)</sup> (%)	優性効果 (%)	寄与率 (%)
1966-栗野	<i>qRFWSA4a</i>	4	6.4	22.4	-28.8	-23.9	43.0
	<i>qRFWSA6</i>	6	2.2	5.1	-13.9	7.5	6.5
	<i>qRFWSA11</i>	11	24.3	4.1	-16.9	9.0	5.0
	<i>qRFWSA7a</i>	7	1.6	3.5	-15.8	11.9	4.3
1989-筑後	<i>qRFWSA3</i>	3	10.3	3.3	-9.6	-4.2	4.0
	<i>qRFWSA4b</i>	4	13.0	6.2	-20.8	-5.6	20.6
1999-合志	<i>qRFWSA12</i>	12	23.5	3.8	-15.8	-13.7	11.9
	<i>qRFWSA4a</i>	4	7.4	5.6	-15.3	-11.9	22.6

<sup>a)</sup>下線は単回帰解析によって検出されたQTLを示す。  
<sup>b)</sup>PTB33アレルの効果を表し、正の値はPTB33アレルが形質値を大きくすることを示す。

表 2. 遺伝的効果が実証された QTL

T65 戻し交雑由来 B<sub>1</sub>F<sub>4</sub> 集団から検出されたトビイロウンカ放飼5日後の腹部肥大率に関する QTL

集団	QTL	染色体	最近傍マーカー	位置 (Mbp)	LOD 値	相加効果 <sup>a)</sup> (%)	優性効果 (%)	寄与率 (%)
102	<i>qRFWSA4a</i>	4	RM5953-RM16624	9.4-12.4	2.3	-8.9	-16.8	10.5
113	<i>qRFWSA4c</i>	4	RM5503	30.4	2.4	-15.5	10.1	11.5
	<i>qRFWSA11</i>	11	RM224	27.7	2.4	-15.2	-0.6	11.7
105	<i>qRFWSA6</i>	6	RM588	1.6	1.9	-7.7	4.3	9.6
107	<i>qRFWSA7b</i>	7	RM3831	25.9	1.6	-4.8	7.1	7.5
109	<i>qRFWSA11</i>	11	RM224	27.7	4.1	-13.2	-17.8	18.3
110	<i>qRFWSA12</i>	12	RM28466	23	2	-11.5	-9.9	8.6

<sup>a)</sup>PTB33アレルの効果を表し、正の値はPTB33アレルが形質値を大きくすることを示す。

表 3. トビイロウンカ抵抗性遺伝子の近似同質遺伝子系統

NIL	Donor	No. of SSR Markers		Genome Ratio (%)		Total Physical Distance of Donor Segment (Mbp) *		
		T65	Donor	T65	Donor	T65	Donor	
<i>lpl32-NIL</i>	PTB33	183	20	203	85.2-90.9	9.1-14.8	33.9	55.0
<i>Bph3-NIL</i>	Rathu Heenati	181	14	195	97.0-99.0	1.0-3.0	3.8	11.3
<i>Bph17-NIL</i>	Rathu Heenati	170	3	173	95.2-99.0	1.0-4.8	3.8	17.6
<i>BPH17-ptb-NIL</i>	PTB33	219	10	229	92.4-97.2	2.8-7.6	10.5	28.1
<i>Bph20-NIL</i>	IR71033-121-15	224	13	237	90.4-94.4	5.6-9.6	20.6	35.5
<i>Bph21-NIL</i>	IR71033-121-15	210	19	229	88.4-92.9	7.1-11.6	26.4	43.1
<i>BPH32-NIL</i>	PTB33	220	13	233	95.9-98.1	1.9-4.1	7.1	15.1

\* The minimum physical distance of donor segment was calculated by the distance between two markers delimiting the substituted segment and the maximum amount was calculated by two flanking markers of substituted segments.

表 4. 近似同質遺伝子系統と遺伝子集積系統のトビイロウンカ抵抗性

Entry	Adult Mortality (%)	
	Hadano-66	Koshi-2013
<i>BPH2-NIL</i>	68.9 ± 28.5 abcde	4.0 ± 8.9 b
<i>BPH3-NIL</i>	30.0 ± 38.0 def	0.0 ± 0.0 b
<i>BPH17-NIL</i>	59.0 ± 25.1 abcde	20.0 ± 14.1 b
<i>BPH20-NIL</i>	24.0 ± 22.7 def	4.0 ± 8.9 b
<i>BPH21-NIL</i>	36.0 ± 37.5 cdef	12.0 ± 17.9 b
<i>BPH25-NIL</i>	16.0 ± 15.8 f	16.0 ± 16.7 b
<i>BPH26-NIL</i>	50.0 ± 41.4 abcdef	4.0 ± 8.9 b
<i>BPH32-NIL</i>	14.0 ± 16.5 f	12.0 ± 17.9 b
<i>BPH17-ptb-NIL</i>	22.0 ± 19.9 ef	20.0 ± 20.0 b
<i>BPH2+BPH17-PYL</i>	75.0 ± 19.5 abcde	32.0 ± 17.9 b
<i>BPH2+BPH25-PYL</i>	87.5 ± 17.9 abc	12.0 ± 11.0 b
<i>BPH2+BPH32-PYL</i>	84.0 ± 16.7 abc	16.0 ± 16.7 b
<i>BPH2+BPH17-ptb-PYL</i>	84.0 ± 16.7 abc	16.0 ± 16.7 b
<i>BPH3+BPH17-PYL</i>	50.0 ± 32.5 abcdef	24.0 ± 16.7 b
<i>BPH17+BPH21-PYL</i>	58.3 ± 27.5 abcdef	16.0 ± 21.9 b
<i>BPH20+BPH21-PYL</i>	33.3 ± 22.2 cdef	24.0 ± 16.7 b
<i>BPH20+BPH32-PYL</i>	62.5 ± 38.5 abcde	36.0 ± 21.9 b
<i>BPH21+BPH25-PYL</i>	64.0 ± 26.1 abcde	24.0 ± 16.7 b
<i>BPH21+BPH17-ptb-PYL</i>	54.2 ± 35.0 abcdef	8.0 ± 17.9 b
<i>BPH25+BPH17-ptb-PYL</i>	68.0 ± 26.8 abcde	16.0 ± 16.7 b
<i>BPH32+BPH17-ptb-PYL</i>	62.5 ± 32.9 abcde	20.0 ± 14.1 b
<i>BPH2+BPH3+BPH17-PYL</i>	96.0 ± 8.9 ab	36.0 ± 38.5 b
<i>BPH2+BPH32+BPH17-ptb-PYL</i>	95.8 ± 8.9 ab	20.8 ± 20.1 b
<i>BPH20+BPH21+BPH32-PYL</i>	92.0 ± 11.0 ab	28.0 ± 26.8 b
IR71033-121-15	100.0 ± 0.0 a	44.0 ± 16.7 ab
PTB33	100.0 ± 0.0 a	36.0 ± 21.9 b
Rathu Heenati	100.0 ± 0.0 a	84.0 ± 35.8 a
Taichung 65	17.6 ± 16.7 f	5.0 ± 10.0 b

Parameter values (means ± standard deviations) followed by the same letter are not significantly different between each *Nilaparvata lugens* population ( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer multiple comparison tests).

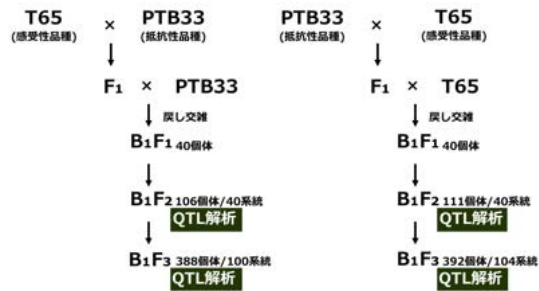


図 1. 実験材料の育成

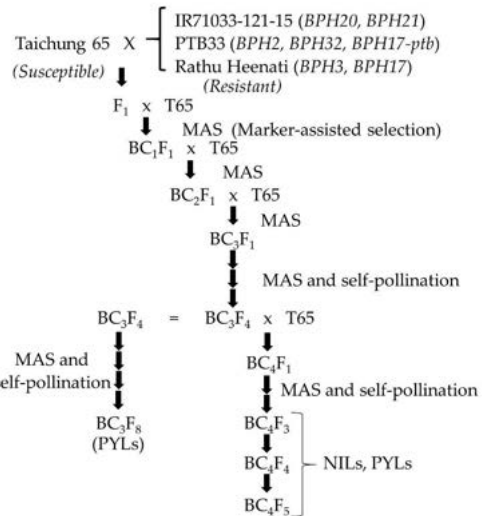


図 2. イネのトビイロウンカ抵抗性遺伝子集積系統の育成

T65 戻し交雑由来集団におけるトビイロウンカ放飼5日後の腹部肥大率に関する頻度分布

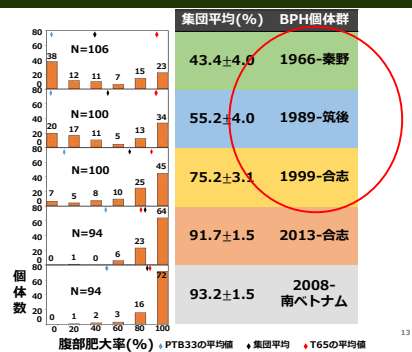


図 3. トビイロウンカ腹部肥大率の頻度分布

検出されたQTLと既報のトビイロウンカ  
抵抗性遺伝子座との比較

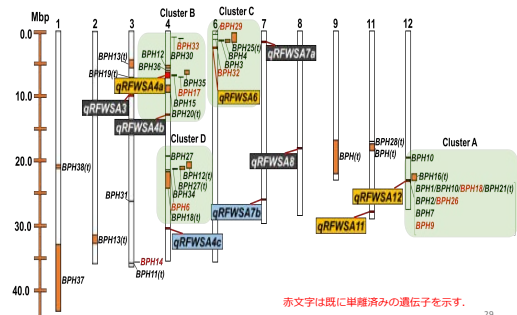


図 4. 検出されたトビイロウンカ抵抗性 QTL と既報のトビイロウンカ抵抗性遺伝子座との比較