

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05607

研究課題名(和文) ヒメトビウンカ抵抗性イネ品種の抵抗性遺伝子座の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of resistance loci in rice varieties resistant to *Laodelphax striatellus*

研究代表者

松本 由記子 (MATSUMOTO, Yukiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：80414944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメトビウンカが媒介するイネの病害ウイルスに対する抵抗性遺伝子座はイネですでに利用されているが、ヒメトビウンカの増殖(生存)自体を抑制するイネ遺伝子は現在のところ利用されていない。本研究ではヒメトビウンカの増殖自体を抑制するイネの抵抗性遺伝子座を同定・機能解析することを目的とする。ジーンバンクのイネ69品種よりスクリーニングを行ったところ22品種が抵抗性であることが示唆された。このうち1品種で、RIL(組換え自殖系統)のバルクDNAを用いてQTL-seqを行ったところ、イネの染色体1, 4, 6, 9, 12の一部にヒメトビウンカ抵抗性遺伝子座が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネに病気を媒介するヒメトビウンカの増殖自体を抑制するイネの抵抗性遺伝子座を同定・機能解析することを目的とする。ジーンバンクのイネ69品種よりスクリーニングを行ったところ22品種が抵抗性であることが示唆された。このうち1品種で、RIL(組換え自殖系統)のバルクDNAを用いてQTL-seqを行ったところ、イネの染色体1, 4, 6, 9, 12の一部にヒメトビウンカ抵抗性遺伝子座が存在することが示唆された。さらに解析をすすめ、抵抗性遺伝子座をイネに導入することでヒメトビウンカ抵抗性イネを作出することにつながる。

研究成果の概要(英文)：The resistance loci to rice disease viruses transmitted by *Laodelphax striatellus* (small brown planthopper) have already been identified and used, however, rice resistant genes that suppress the growth (survival) of the small brown planthopper themselves are not identified yet.

The aim of our study is to identify and functionally analyze rice resistance loci that suppress survival of the small brown planthopper. Screening of 69 rice varieties in the Genebank suggested that 22 varieties are resistant to the small brown planthopper. QTL-seq of one of these varieties using bulk DNA from RILs (recombinant autograft lines) suggested resistance locus were present on chromosomes 1, 4, 6, 9, and 12.

研究分野：昆虫学

キーワード：ヒメトビウンカ 抵抗性 イネ QTL-seq

1. 研究開始当初の背景

ヒメトビウンカは篩管より栄養吸汁するとともに、ウイルス病を媒介するイネ重要害虫である。ウイルス病抵抗性遺伝子座を導入したイネは広く利用されている一方で、ヒメトビウンカの増殖自体を抑制するイネの抵抗性遺伝子座は未同定である。本研究ではヒメトビウンカ抵抗性イネ品種の抵抗性遺伝子座同定および機能解析を行う。申請者らは農業生物資源ジーンバンクのイネ品種から、ヒメトビウンカの生存率が減少する 6 品種を新規に見いだした(図 1)。このうち 1 品種はすでに CSSLs(染色体部分置換系統群)が利用できるため、抵抗性遺伝子座の同定と機能解析、NIL(準同質遺伝子系統)作出を行う。申請者らは現在、他のイネ害虫トビイロウンカ等に抵抗性のイネ系統を作出中である。ヒメトビウンカ抵抗性遺伝子を見出し、将来的に複数のイネ害虫や病気に対する抵抗性遺伝子を集積させたイネを作出し、稲作における減コスト・減労力・減農薬に大きく貢献したいと考えている。

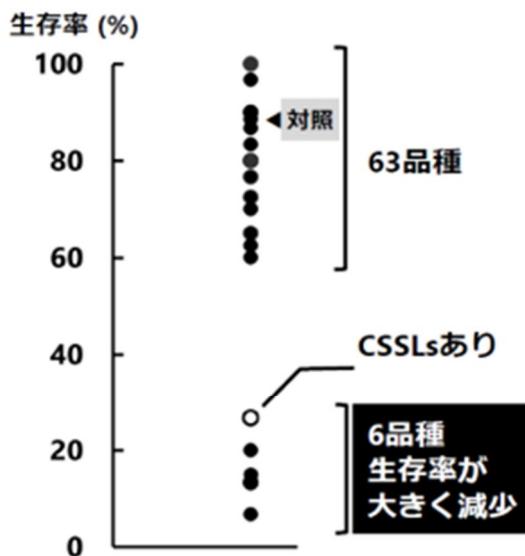


図1 ヒメトビウンカ抵抗性(予備実験)試験管内で69品種と対照(コシヒカリ)を1粒ずつ1.5-2葉期まで育て、ヒメトビウンカ幼虫を各10頭放飼して5日後の生存率。6品種で生存率の減少がみられた(反復1-4回、6品種は反復3-4回の平均)。

2. 研究の目的

ヒメトビウンカが媒介するイネの病害ウイルスに対する抵抗性遺伝子座はイネですでに利用されているが、ヒメトビウンカの増殖(生存)自体を抑制するイネ遺伝子は現在のところ利用されていない。本研究ではヒメトビウンカの増殖自体を抑制するイネの抵抗性遺伝子座を同定・機能解析することを目的とする。

3. 研究の方法

・検定

イネ幼苗×成虫：試験管に脱脂綿の小片および、液肥(木村氏B液)2mLを加え、数日浸種し発芽したモミを試験管に入れ、綿栓した。約1週間後飼育室(16L:8D, 26℃)で生育させた。伸長した幼苗1株に対しヒメトビウンカ成虫(メス、長翅、羽化1日、絶食6時間)を2頭ずつ入れ、1週間後までヒメトビウンカの生死を観察した。これはコシヒカリの場合はほとんど死亡しない期間である。

・イネ作成

供試イネ花粉をコシヒカリのめしべに受粉させてF1を作成、その後は自殖させた。

・Indel マーカー

一用品種のF2については、イネ各染色体で複数のIndelマーカーを設計し(TASUKE+, <https://ricegenome-corecollection.dna.affrc.go.jp/>による)PCRと電気

泳動で抵抗性遺伝子座を調査した。

・ QTL-seq

ヒメトビウンカ抵抗性を示した候補イネのうち、ある抵抗性イネ品種 A については A 品種 × コシヒカリの RIL F5 のイネを利用できたため、これを幼苗検定した。RIL F5 世代であるため、イネゲノムのヘテロ領域が減少し、ホモ化されていると考えられる (図 2)。約 150 の F5 イネを播種し、幼苗検定できたのが 110 株あった。そのうち幼苗 × ヒメトビウンカ成虫で、イネがヒメトビウンカ抵抗性を示すもの 14 株、感受性を示すもの 13 株という結果を得た。抵抗性 14 株、感受性 13 株のイネ葉から、均等に葉を取り、ゲノム DNA (バルク) を抽出した。イネ品種 A、コシヒ

カリからも DNA を抽出した。各 DNA を次世代シーケンサーによりシーケンスした。

SNP-index 値を計算し、ヒメトビウンカ抵抗性遺伝子座が示唆される領域を検出した。

4. 研究成果

本研究ではヒメトビウンカの増殖自体を抑制するイネの抵抗性遺伝子座を同定・機能解析することを目的とする。ヒメトビウンカ抵抗性イネ (ウンカ生存率が低くなるもの) をジーンバンクのイネ 69 品種よりスクリーニングした。幼虫 × 幼苗の組み合わせでイネ 6 品種、成虫 × 幼苗の組み合わせではその 6 品種に加え 16 品種、合計 22 品種が新たに候補となった。これらはこれまでヒメトビウンカ抵抗性が報告されていた品種とは異なっていた。

遺伝子座調査のためこれらをコシヒカリと交配させ、19 品種で F2 を作成した。F2 を作成した品種で少数の種子を使ってあらためて成虫 × 幼苗での抵抗性を確認したところ、18 品種で抵抗性が示唆された。また、一部イネでもう少し生育させた若い苗で実験したところ、成虫 × 苗でヒメトビウンカの生存率が下がることから、イネの抵抗性は成長したイネでも存在すると考えられた。

CSSLs を利用できた 1 品種 (コシヒカリがバックグラウンド) については、CSSLs 41 種それぞれをテストしたところ、ヒメトビウンカ抵抗性が有意に高いものが少なくとも 1 つ見つかった。隣接する領域の CSSLs には抵抗性が見られなかった。ただし、もとの品種ほど抵抗性は高くなかったため (7 日後の生存率が、コシヒカリ: 約 84%、親品種: 約 3%、CSSL: 約 57%)、抵抗性遺伝領域が複数ある可能性がある。

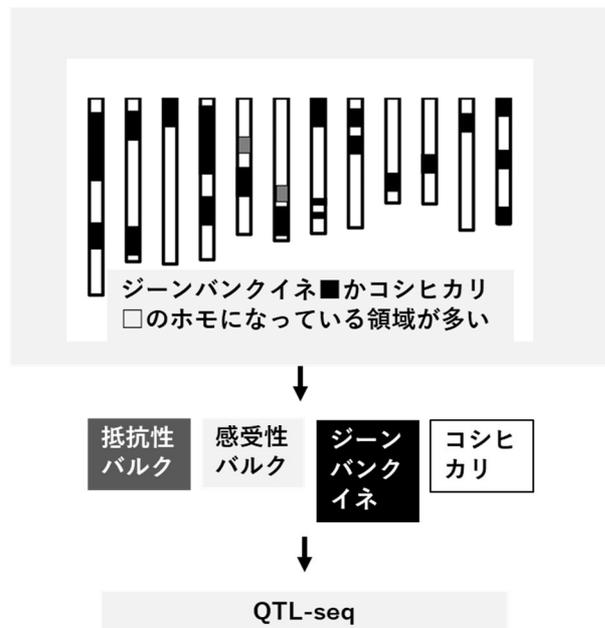


図2 RIL F5イネ 染色体イメージ

自殖をくりかえすと、染色体の領域はモザイクであるが、ホモになっている領域が多いと考えられる (抵抗性を検出する場合、ヘテロのときを考慮する必要が少なくなる利点がある)。

F2 を作成した品種については、抵抗性を検定後、DNA を抽出し、Indel マーカーを設計して PCR と電気泳動で抵抗性遺伝子座を調査したが、はっきりしたデータは得られなかったため、QTL-seq データによる解析に切り替えた。

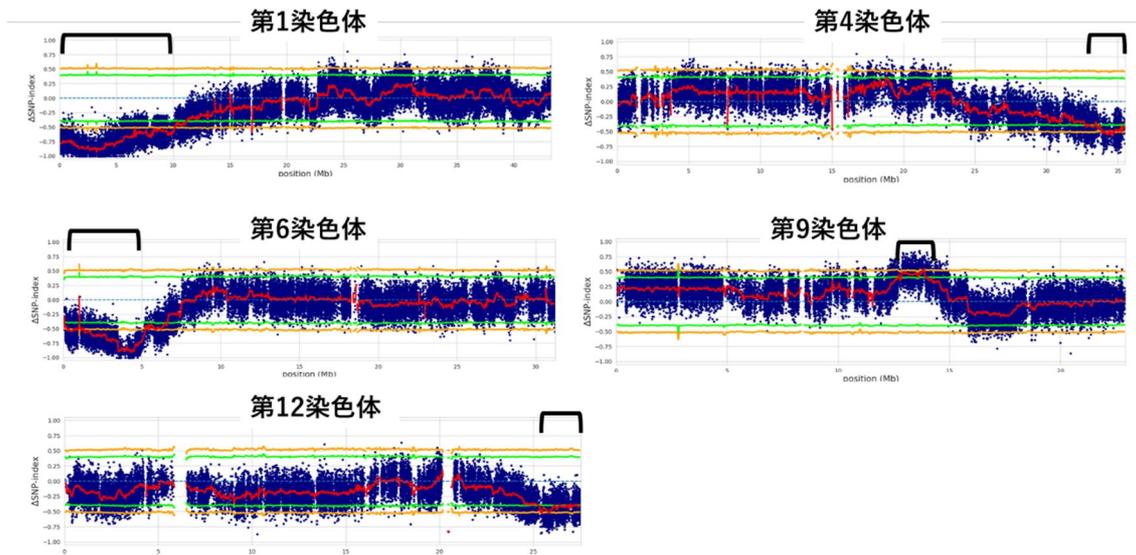


図3 ΔSNP-index 値から示唆されるイネ染色体上のヒメトビウンカ抵抗性領域
RIL F5イネを利用できたイネ品種A について、バルクDNAを用いてQTL-seqを行った。イネの各染色体の領域を横軸で示す。ΔSNP-index 値が統計的に有意に偏って高い領域を抵抗性遺伝子(座)が存在する領域と考える。括弧で示した、赤線がオレンジ線を越える領域は、ΔSNP-index 値が信頼区間99%を示す。赤線が緑色の線を越える領域は、同95%であることを示す。

RIL F5 世代のイネが利用できて、QTL-seq 解析を行ったイネ品種 A についてのデータを示す(図3)。 SNP-index 値を計算し、ヒメトビウンカ抵抗性遺伝子座が示唆される領域は、第1、第4、第6、第9、第12染色体のそれぞれ一部分であった(図3)。

		A: コシヒカリ型			B: イネA品種								
SNP-index 99%領域		Ch1 1-10M			Ch4 33.8-34.8M		Ch6 0.2-6M			Ch9 13.7-13.9M		Ch12 25.3-25.5M	
RIL F5 抵抗性株		C1-0.08M	C1-10M	C1-15M	C4-30M	C4-35M	C6-0.1M	C6-5M	C6-10M	C9-10M	C9-15M	C12-20M	C12-25M
F5株 抵抗性	3	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	4	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	5	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	41	B	B	B	B	A	B	B	A	B	B	H	B
	51	B	B	A	B	B	B	B	A	A	A	A	B
	52	B	B	A	A	A	A	A	B	B	A	H	B
	79	B	A	A	A	A	B	B	H	B	A	H	B
	85	H	A	H	A	B	B	A	B	A	A	A	A
	89	B	B	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B
	122	B	B	B	H	H	B	B	A	A	A	A	A
	150	B	A	A	B	H	A	B	H	A	B	H	B
	151	B	A	A	B	B	A	B	H	A	B	A	B
153	B	B	B	A	B	A	B	B	A	B	A	A	
155	A	A	A	B	B	B	B	H	A	B	B	A	
F5株 感受性	31	A	A	A	B	A	A	A	B	H	B	B	B
	64	A	A	A	A	H	A	A	B	B	A	A	A
	65	A	A	B	A	A	A	A	A	B	B	B	A
	78	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A
	97	A	A	A	B	B	A	A	B	B	B	A	A
	106	A	A	A	B	H	A	A	B	B	B	A	A
	131	B	H	H	A	A	H	A	B	B	B	A	A
	144	H	A	A	B	B	A	B	B	A	B	B	H
	145	A	A	B	A	A	A	B	B	A	A	A	H
	170	A	A	B	A	A	A	A	A	B	H	A	A
	175	A	A	A	A	A	B	B	B	A	B	B	A
	203	A	A	B	A	A	A	A	B	A	B	B	A
211	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	

図4 イネ染色体上で示唆されるヒメトビウンカ抵抗性領域
RIL F5イネを利用できたイネ品種A について、バルクDNAを用いてQTL-seqを行った。バルクDNAの元のイネのそれぞれのDNAからIndelマーカーによって、示唆された領域が実際にイネ品種Aタイプであるかどうかを確認した。

これはバルク DNA に基づくデータであるので、バルクの元となった各イネそれぞれから DNA を抽出し、Indel マーカーに基づいて設計したプライマーで、図 3 に示唆された領域のゲノムが実際にイネ品種 A のタイプであるかどうかを確認した（図 4）。これで判明できるのは領域の一部ではあるが、イネの第 1、第 4、第 6 染色体のその領域がイネ品種 A であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田村 泰盛 (TAMURA Yasumori) (90370668)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関