

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07675

研究課題名(和文) 野生イネ由来病害抵抗性遺伝子の協働作用メカニズム

研究課題名(英文) Property of rice blast resistances gene with a moderately resistant phenotype of wild rice

研究代表者

林 敬子 (Hayashi, Keiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：40391437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病抵抗性の遺伝資源の効果的な活用は遺伝資源が限られている抵抗性育種において重要である。圃場抵抗性に総称される中度抵抗性を効果的に利用するには、基盤となる感染様式を把握し、得られた知見を元に適切に形質を評価することが重要となる。本課題では、野生イネが保有する中度抵抗性遺伝子領域を同定した。同定領域を保有する系統を用いて、客観的な評価の困難な中度抵抗性遺伝子の特性を把握できる「切り花染色剤イメージング法」を得られた感染様式の知見をもとに構築した。本方法により、葉いもち、穂いもちの特性と当該抵抗性遺伝子の効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネいもち病は植物病害研究においてモデル的役割を果たしており、抵抗性遺伝子を利用した持続性のある防除方法を提示するための基盤知見は他の作物等への抵抗性育種の適用を考えるうえで重要である。中度抵抗性遺伝子とその活用は、遺伝資源の活用の観点でも重要であるが、その性質を把握することが難しく詳細な解析が進んでいない。本課題で構築した「切り花染色剤イメージング法」を中心とした評価法とその知見となるいもち病の感染様式は、分子生物学的研究と抵抗性育種との間を繋ぐ手法および知見であり、様々な研究・育種場面で応用することができる。

研究成果の概要(英文)：Rice blast is one of the most destructive rice diseases worldwide.

Introducing resistance genes into cultivars is an economic strategy to protect plants from the disease. Knowing the property of resistance genes with a moderately resistant phenotype contributes to increased germplasm for disease-resistant breeding. However, such genes were visually assessed in the field, making it difficult to further analyze them. We revealed the location of the resistance gene that was derived from a donor of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and further revealed the resistance property of the gene. An image-based phenotyping method using cut-flower dye solution enabled the assessment of leaf and panicle blast without observer variability. The method revealed the progression of the rice blast disease, and the influence of the resistance gene on lesions formed on leaf and panicle.

研究分野：抵抗性育種

キーワード：イネいもち病 葉いもち 穂いもち

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抵抗性遺伝子の利用は抵抗性品種育成に不可欠であり、様々な病害で抵抗性遺伝子が同定・利用されている。一方、抵抗性遺伝子の利用が最も進んだ病害の一つであるイネいもち病においては、過敏感反応死を介した高度抵抗性(真性抵抗性)の崩壊により、真性抵抗性遺伝子を単純に導入しただけでは持続的な防除効果が得られないことが知られている。それ故、圃場抵抗性と総称される中度抵抗性を示す抵抗性遺伝子の探索やその効果的な利用法の提示が望まれている。圃場抵抗性遺伝子の集積は重要な戦略の一つである。圃場抵抗性は量的形質遺伝子座(QTL)を圃場検定で同定することが一般的であるが、特性を把握するための病斑レベルの詳細な解析は行われていない。

2. 研究の目的

第4染色体の長腕には、中度抵抗性を示す抵抗性遺伝子の存在が複数報告されている。日本菌系に対する抵抗性の報告が多い。海外菌系に関しても同領域に抵抗性遺伝子の存在が報告されていることから、ジャポニカ・インディカにおいて広くこの領域に中度抵抗性を示す抵抗性遺伝子が存在すると考えられる。栽培イネ(*Oriza sativa*)は、野生イネ(*Oryza rufipogon*)由来であることが知られている。祖先型である野生イネの同領域には、中度抵抗性遺伝子が存在している可能性が極めて高い。日本晴の第4染色体の長腕部位を野生イネに置換した染色体置換系統の抵抗性を試験圃場で予備検定を行ったところ、中度抵抗性を示す可能性が得られた。一方、圃場における抵抗性検定は検定者に依存する評価の揺らぎにより客観的な評価・解析が行えず解析精度が下がる。そこで、本研究においては中度抵抗性を示す領域を特定すると共に、同領域を保有した系統を用いて中度抵抗性を把握するための方法やその効果を解析する。

3. 研究の方法

野生イネ(*O. rufipogon*)の染色体の一部を残し、他の全ての染色体が日本晴に置き換わった日本晴系統(日本晴 1L)を導入親系統とし、日本晴と交配して作出した集団のマッピングにより遺伝子位置を同定する。次世代シーケンス等のデータ解析を通して、同系統におけるゲノム構造領域から特性を把握する。更に、人工接種試験、圃場試験等をおこない、いもち病の主な感染組織である葉や穂の抵抗性特性を把握するための基盤となる知見の把握と評価法を検討する。

4. 研究成果

(1) 日本晴 1L の特性解析

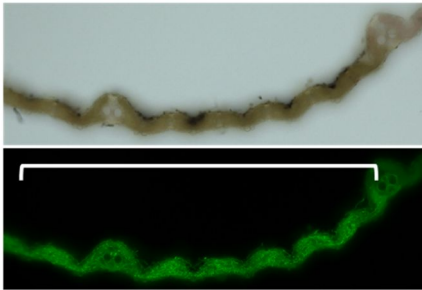
日本菌系7種を用い各菌系における日本晴 1L の特性を解析した結果、脆弱な若いステージのイネにおいて反応性にばらつきが見られた。展開葉において相対的に抵抗性を示した場合でも、抽出葉では明確な罹病性病斑を形成していることから、中度抵抗性と分類される抵抗性を保有し、本抵抗性は生育ステージや植物の状態に左右されることが明らかとなった。

(2) 日本晴 1L における抵抗性遺伝子同定

従来報告されてきた圃場抵抗性の特性は、上記の菌の反応を反映した結果と考えられる。従来法である圃場検定は時間的・場所的制約があり、人工接種で形質評価を行う方が望ましい。そこで、人工接種法で対応できるよう比較的安定な抵抗性形質を示す菌系を選抜する、植物の強度を持たせるように育成した植物に対して人工接種を行う等、中度抵抗性を評価できる方法を構築した。日本晴 1L と日本晴と交配して作成した集団(1293 系統)を用いたマッピングを行った。上記の構築系統をもちいることにより安定的に各系統を評価することで 200kbp 程度の領域に限定し

た。

葉いもち



穂いもち

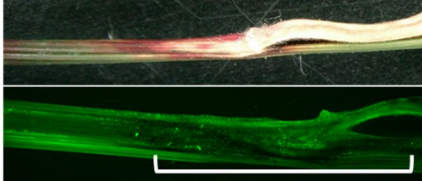


図1. 染色剤によるダメージ部位の可視化と
維管束の蛍光染色による検出

(3) 中度抵抗性の葉いもち評価法の構築

壊死線はイネいもち病の病斑識別において特徴的なポイントである。いもち病菌は維管束に沿って進展する際、維管束崩壊における断水により葉組織にダメージを与えると考えられる。上記仮説を確認するため、組織に侵入した菌糸を観察する染色法と断水部位の特定するための切り花染色法を構築した(図1上)。病斑は維管束に沿って進展して水分を遮断し、ヒトが罹病性の病斑と判断するより広範囲に植物に影響を及ぼすことが明らかとなった。中度抵抗性が圃場検定により評価されることを考慮すると圃場での達観調査は断水によるダメージを勘案して判断していると考えられる。得られた知見を元に、発病した葉を切り花染色剤により着色し、画像解析で病斑率を検定する切り花染色剤を用いたイメージング法(「切り花染色剤イメージング法」)を構築した。

(4) 同定領域の葉いもち抵抗性特性

同定領域の正確性を確認するためホモ型にした系統を作り切り花染色剤イメージング法により抵抗性を評価するとともに、当該領域のゲノム構造を比較解析した。絞り込んだ領域は野生イネの日本晴のゲノム構造の違いにより抵抗性の付与にゆがみが起き、強度の異なる抵抗性を示すことが示唆された。

(5) 中度抵抗性の穂いもち評価法の構築

穂いもちの評価は稔実した種子量やダメージを受けた穂(白穂現象)に着目し、達観で調査が行われる。従来法では抵抗性の強弱は評価できるが中度抵抗性等の詳細な形質評価を行うのは困難である。圃場サンプルでは解析し難い欠点を人工接種法の構築で克服しつつ、圃場サンプルで最終検証を行い穂いもちを解析した。葉の病斑解析と同様の手法(図1下)を用いた結果、穂いもちの白穂は葉いもちと同様、穂の維管束に侵入した菌糸が維管束を破壊し、水の移動を止めたことにより引き起こされることが明らかとなり、本現象も「切り花染色剤イメージング法」で評価できることを確認した(図2)。

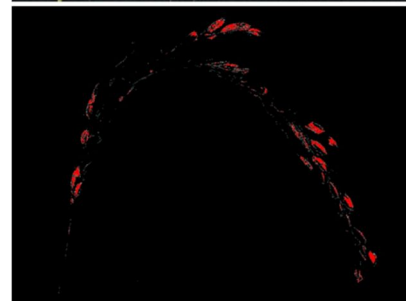


図2. 切り花染色剤イメージング法

(6) 同定領域の穂いもち抵抗性特性

得られた知見をもとに圃場における当該領域を持つ系統の穂いもちの評価を行った。その結果、抵抗性系統は罹病性品種である日本晴より白穂がより遅く進行することが明らかとなった。更に、抵抗性がより効果的に発揮する時期があることが明らかとなった。

以上の知見・方法により、圃場検定が主流であった中度抵抗性の遺伝子同定や特性解析に必要な評価法とその基盤となるいもち病の感染様式を明らかにした。特に「切り花染色剤イメージング法」は、病気の評価に慣れていない者でも利用可能であり、他の病害や生理障害等の解析に幅広く応用できる可能を示した。更に、GFP等の組換え体を用いることなく組織に侵入したイネいもち病菌を観察できる手法の確立は、これまで解析が進まなかった自然感染状態の病斑解析を可能とした。更に、これまで感覚的に評価されていた穂いもちの感染様式の一部を明らかにし、穂いもち抵抗性の効果が高いと思われる時期を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keiko Hayashi, Tomofumi Yoshida, Yuriko Hayano_Saito	4. 巻 15
2. 論文標題 Detection of white head symptoms of panicle blast caused by Pyricularia oryzae using cut flower dye	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Methods	6. 最初と最後の頁 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1186/s13007-019-0548-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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	石川 亮 (Ishikawa Ryo) (70467687)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	
研究 協 力 者	吉田 朋史 (Yoshida Tomofumi)		