

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380007

研究課題名(和文) イネ白葉枯病抵抗性の遺伝育種学の再構築に向けて

研究課題名(英文) Toward the reconstruction of genetics and breeding of bacterial blight resistance in rice

研究代表者

吉村 淳 (YOSHIMURA ATSUSHI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：00182816

## 研究成果の概要(和文):

本研究では2つの小課題を設定して研究を進めた。

(1) *Xa7* のマップベースクローニング

*Xa7* 候補領域を供与親 DNA 領域で約 128kb に絞り込み、遺伝子予測を行った結果、20 の候補遺伝子が推定されたが、これまで報告されている R 遺伝子とすべて異なっていた。当該領域を比較的大きな6個の DNA 断片に分けて形質転換を行ったが、受容親が中度抵抗性を示したことから、T0 個体における相補性検定が困難となった。現在、T1 個体の検定を IRRI に依頼中である。

## (2) 野生イネ系統の抵抗性評価と抵抗性遺伝子のマッピング

国立遺伝学研究所所有の野生イネコアコレクション約 300 系統を対象に抵抗性の検定を行い、本病抵抗性遺伝子資源として有望な多数の系統を同定した。このことにより、野生イネが本病における恰好の遺伝子給源になることは明らかとなった。また、これまで、既知の抵抗性遺伝子 *Xa11* については、連鎖地図上の位置情報が明確になったので論文公表を行った。

## 研究成果の概要(英文): Two kinds of experiments were conducted in this study;

1. Map-based cloning of *Xa7* gene: The region in which *Xa7* was located was narrowed down to the 128 kb region on the donor DNA. There are 20 kinds of predicted genes in the region, where previously-known R genes are not included. Transformation of 6 subdivided DNA fragments was performed, but it was difficult to check gain-of function because the recipient used for transformation showed somewhat resistance. The experiment of complementation test would be done in IRRI, because IRRI can handle the many T1 plants for inoculation test.
2. Bacterial blight resistance in wild species of rice and gene mapping of Bacterial blight resistance: We evaluated about 300 strains of wild species. One-third of them showed the resistance to two Japanese races 1 and 3, demonstrating that wild species are apparently important materials as gene resource for bacterial blight resistance. The mapping study of *Xa11* was published in JARQ.

## 交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物、育種学、病理学、ゲノム、細菌病

## 1. 研究開始当初の背景

イネ白葉枯病は *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)によって引き起こされるイネの最重要病害の一つである。特に中国近隣諸国(ベトナム等)におけるハイブリッド稲生産における被害は甚大であり、安定生産の大きな阻害要因となっている。本病の防除には抵抗性品種の利用が最も効果的であり、これまでに 27 種類の主働抵抗性遺伝子(R 遺伝子)座が同定され(Table1)、抵抗性品種の育成に利用されているものの、病原菌側の病原性の多様性(報告されているレースは 30 以上に及ぶ)のために、R 遺伝子利用の育種には常に抵抗性の崩壊現象の脅威が存在する。この脅威に対処する基盤的ならびに基礎的課題として、直接的にはより広範なレースに対応する抵抗性遺伝子の探索・同定が、間接的には多様性に富む本病感染生理メカニズムの追求が急務と言える。

申請者は 1980 年から本病抵抗性の遺伝に関する研究を行い、新 R 遺伝子の同定(Yoshimura et al. 1983, Taura et al. 1989)、R 遺伝子のマッピング(Yoshimura, S. et al. 1995)ならびに DNA マーカー選抜によるピラミディング(Yoshimura et al. 1996)等を行い、これらの研究は *Xa1* の単離(Yoshimura, S. et al. 1998)に結びついた。申請者は、1997 年からはイントログレッション育種と野生イネ関連形質の遺伝解析に集中したことから、一時本病抵抗性に関する研究は中断した。しかしながら、2003 年にハノイ農大強化プロジェクト(国際協力事業団の技術協力)に参加した際、ベトナム国のハイブリッド稲生産現場における本病の被害を知り、また、申請者の本病抵抗性の遺伝に関するノウハウが必要とされたので、R 遺伝子導入による抵抗性ハイブリッド稲育種に関与することで、本病抵抗性研究を再開した。

この間(特に、2000 年以降)、本病抵抗性の基盤的、基礎的研究の進展は著しいものがあり(総説;Liu et al. 2006, Iyer-Pascuzzi and McCouch 2007)、6種類の R 遺伝子の単離と4種類の非病原性遺伝子(*avr* 遺伝子)の単離が報告され(Table 2)、感染生理の分子メカニズムの知識は、主に中国、米国等で急速に蓄積されている(これら急速な進歩を遂げた研究成果において、日本人研究者の貢献が少ないことは残念である)。

申請者は、ここ数年、本病抵抗性ハイブリッド稲育種に関与しながら、本病抵抗性研究の動向を踏まえて、①本病感染生理の分子メカニズム解明に資するため単離された *avr* 遺伝子に対応する R 遺伝子の単離が不可欠である、②外国産菌も含めた広範なレースに対応する新たな抵抗性遺伝子の給源を野生イネに求める必要がある、

Table 1. Genes conferring resistance to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Gene	Chromosome*	Inheritance†	Source‡
<i>Xa1</i>	4	D	Kogyoku
<i>Xa2</i>	4	D	Tetep
<i>Xa3</i>	11	D	Wase Aikoku 3
<i>Xa4</i>	11	D	TKM 6
<i>xa5</i>	5	r	Aus Boro lines (e.g. DZ192)
<i>Xa7</i>	6	D	DV85
<i>xa8</i>	7	r	PI231129
<i>Xa10</i>	11	D	Cas 209
<i>Xa11</i>	ND	D	IR8, IR944
<i>Xa12</i>	4	D	Kogyoku
<i>xa13</i>	8	r	BJ1 (Aus Boro)
<i>Xa14</i>	4	D	TN1
<i>xa15</i>	ND	r	M41, a Harebare mutant line
<i>Xa16</i>	ND	D	Tetep
<i>Xa17</i>	ND	D	Asominori
<i>Xa18</i>	ND	D	IR24, Toyonishiki
<i>xa19</i>	ND	r	XM5
<i>xa20</i>	ND	r	XM6
<i>Xa21</i>	11	D	<i>O. longistaminata</i>
<i>Xa22</i>	11	D	Zhachanglong
<i>Xa23</i>	11	D	<i>O. rufipogon</i>
<i>xa24</i>	ND	r	DV86, DV85, Aus 295
<i>Xa25(a)</i>	4	D	HX-3, a somaclonal mutant of Minghui 63
<i>Xa25(b)</i>	12	D	Minghui 63
<i>Xa26</i>	11	D	Minghui 63
<i>Xa27</i>	6	SD	<i>O. minuta</i>
<i>xa28</i>	ND	r	Lota Sail
<i>Xa29(t)</i>	1	D	<i>O. officinalis</i>

\*ND, not determined.

†D, dominant; r, recessive; SD, semidominant.

‡*Oryza sativa* cultivar (roman type), or *Oryza species* (italics).

③既知の R 遺伝子の染色体位置情報を決定・整理するとともにイントログレッション育種において見出された興味ある遺伝現象の解明が不可欠である、との観点から研究の準備を進めてきた。

*Xa7*はインド型品種 DV85 から同定された優性の R 遺伝子で、多くの *Xoo* に対して広く抵抗性を示すことが知られている(Sidhu et al. 1978, Vera Cruz et al. 2000)。菌側の *avrXa7*はすでにカンザス州立大学のグループにより単離されている(Hopkins et al. 1992)ので、R 遺伝子との対応を図り本病抵抗性の分子メカニズム解明に向けた研究を展開するには非常に有意義な R 遺伝子である。*Xa7*の単離は *avrXa7*を単離したカンザス州立大学のグループが手がけた(Porter et al. 2003)が、現在は申請者らと共同で行う合意が得られている。

一方、野生イネに病虫害抵抗性遺伝子を求める研究は 1980 年代に国際イネ研究所において大々的に展開され、一定の成果を得た (Heinrichs et al. 1980) が、評価のきめ細かさの点では疑問が残った。本研究では国立遺伝学研究所所有の野生イネは第1期ナショナルバイオリソースプロジェクトにおいて整備されたので、これらを用いて抵抗性の評価と遺伝子マッピングを開始する。

## 2. 研究の目的

上記した背景を基盤にして、本研究では2つの小課題を設定して研究を進めた。

### (1) *Xa7* のマップベースクローニング

*Xa7* 候補領域は約 83kb にまで絞り込んでいるので、さらなる絞り込み、*Xa7* を含む BAC クローンの選抜、塩基配列の解読、遺伝子予測を行う。同時に、相補性検定と発現解析等を開始し、期間中に *Xa7* を単離する。

### (2) 野生イネ系統の抵抗性評価と抵抗性遺伝子のマッピング

野生イネは本病において恰好の遺伝子給源になることは明らかであるので、国立遺伝学研究所所有の野生イネコアコレクション約 240 系統を対象に抵抗性の検定を行う。また、これまで、既知の抵抗性遺伝子 *Xa11* や *Xa17* は連鎖地図上の位置情報が得られていないので、マッピングを進めてきた。期間中にその結果をまとめる。

## 3. 研究の方法

### (1) *Xa7* のマップベースクローニング

*Xa7* 候補領域は日本晴ゲノム領域で約 63kb にまで絞り込まれているので、さらなる絞り込みを行い、DV85 由来の当該 BAC クローンの選抜、塩基配列の解読、遺伝子予測を行う。同時に、相補性検定と発現解析等を開始して、*Xa7* の単離を行う。

### (2) 野生イネ系統の抵抗性評価と抵抗性遺伝子のマッピング

国立遺伝学研究所所有の野生イネコアコレクション約 240 系統を対象に抵抗性の検定を行う。抵抗性が確認されればただちに交配を行い、マッピングに進む。加えて、既知の抵抗性遺伝子 *Xa11* や *Xa18* の連鎖地図上の位置情報が得るためにマッピングを進める。

### 研究の役割分担と計画

研究代表者の吉村が研究総括と抵抗性遺伝子の分析を行い、研究分担者の土屋、古屋は植物病理学的見地から研究を分担する。(1) *Xa7* のマップベースクローニングの実験実施においては、植物病理学研究室の博士後期課程 3 年の後藤高弘が主たる役割を果たすので、吉村、土

屋とで協力して研究を進める。(2) 野生イネ系統の抵抗性評価と抵抗性遺伝子のマッピングにおいては、植物病理学研究室保有の外国産白葉枯病菌を駆使して、多くの *Xoo* に対して広く抵抗性を示す野生イネの特定と、その抵抗性の遺伝解析を吉村、古屋を中心に行う。IRRI の C. M. Vera Cruz には、海外研究協力者として参加してもらい、*Xa7* 単離後の *avrXa7* との相互作用の解析に関する実験計画の議論を行う。

## 4. 研究成果

### (1) *Xa7* のマップベースクローニング

- *Xa7* 座は日本晴ゲノム領域で約 83kb に相当することが明らかにされていた。そこで、*Xa7* の供与親である DV85 由来の BAC クローンの選抜と塩基配列の解読を行った結果、*Xa7* 候補領域は DV85 のゲノム塩基配列では約 128kb に含まれるが判明した(別紙1の図1参照)。
- 遺伝子予測の結果、20の候補遺伝子が推定されたが、これまで報告されている R 遺伝子とすべて異なっていた。
- そこで、*Xa7* 候補領域すべてを対象にして、DV85 の BAC DNA を断片化して、pYLTAC7 をベクターとしてクローニングした(別紙1の図1参照)。
- 受容体品種を Kasalath として、*Xa7* 候補領域すべてを対象に計6種のゲノム断片の形質転換実験を行い、T0 植物29 個体を得るとともに発現解析のためのサンプリングを実施した(別紙1の表1参照)。
- 得られた形質転換体の抵抗性の評価を行ったが、受容体として用いたインド型品種 Kasalath が日本産菌に対して抵抗性を示したため、トランスジーンによる gain of function が検定できなかった。従来、形質転換実験には日本型品種 Taichung 65 を用いているが、Taichung 65 も *Xa7* を導入した時には、*Xa7* の反応が明確でないため、形質転換能を考慮して Kasalath を用いた。このことにより、相補性検定が頓挫した。
- 現在、国際イネ研究所において、形質転換体の詳細な抵抗性検定および受容体の変更した実験を計画中であるが、フィリピン国における形質転換体持ち込みの許可に手間取り、4月に実験の許可がおりそうな状況となった。

### (2) 野生イネ系統の抵抗性評価と抵抗性遺伝子のマッピング

イネ白葉枯病抵抗性遺伝子資源としての野生イネの重要性を再認識する目的で、国立遺伝学研究所所有の野生イネコアコレクション約 240 系統を対象に同病抵抗性の評価を行った。実際

には、3カ年で評価した野生イネは、19種、約300系統にのぼり、日本産I群菌(レース1)とIII群菌(レース3)を用いて、剪葉接種を行い、HR, R, MR, M, Sの5段階で評価を行った。その結果を別紙2表3に示した。評価した系統の約3分の1は両レースに対して抵抗性を示したことから、野生イネの同病抵抗性遺伝子資源としての潜在的 가능성이窺われた。種レベルでは、*O. longistaminata*, *O. punctata* (4X), *O. minuta*, *O. eichingeri*, *O. granulata*, *O. meyeliana* 等には高い頻度で抵抗性遺伝子資源が存在し、中には栽培種には見られない顕著な過敏感反応を示す系統も存在した。また、抵抗性反応を可視化して、イネ遺伝育種関係者に提供するため、各系統の剪葉接種箇所を写真撮影して、画像データベース化を図った。

既知の抵抗性遺伝子 *Xa11* のマッピングを行い、その成果をJARQに公表した(別紙2参照)。

遅れていた *Xa18* のマッピングの成果公表については、投稿準備を進めている。

## 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1件)

T. GOTO, T. MATSUMOTO, N. FURUYA, K. TSUCHIYA and A. YOSHIMURA (2009)

Mapping of bacterial blight resistance gene *Xa11* on rice chromosome 3. JARQ43: 221-225.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉村 淳 (YOSHIMURA ATSUSHI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：00182816

### (2) 研究分担者

土屋 健一 (TSUCHIYA KENICHI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：40150510

古屋 成人 (FURUYA NARUTO)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：10211533

### (3) 連携研究者

なし

(別紙1)

図1.

### Xa7 BAC cloneのPartial digest libraryの構築

BAC DNAをBamHIで部分消化、Asc I・Not Iで完全消化し、pYLAC7のMCSのBamHI、Asc I、Not I siteにクローニングした

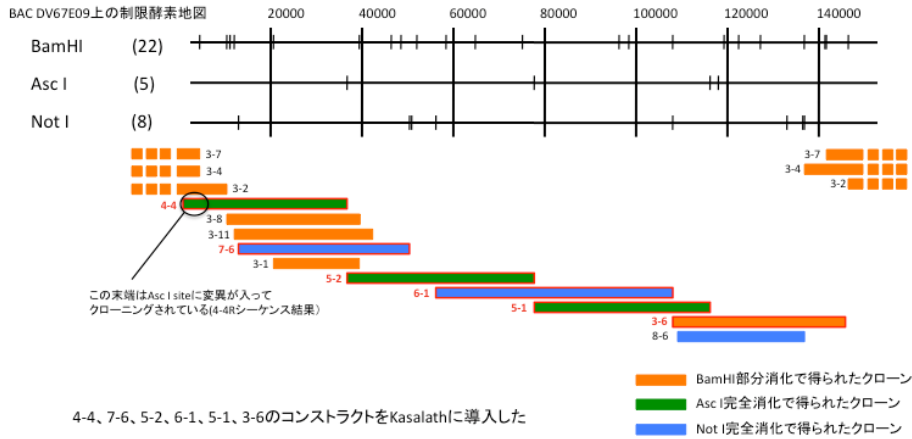


表1.

T0 植物の育成経過と得られたT1種子			
DNA断片	T0個体	種子稔性(%)	得られたT1種子
5-1	1	枯死	-
	2	<10	0
	3	<10	1
	4	<10	20
	5	30<F<70	13
	6	>70	118
	7	30<F<70	76
6-1	1	>70	184
	2	<10	32
	3	<10	0
	4	>70	230
	5	>70	250
	6	10<F<30	23
5-2	1	>70	190
	2	<10	0
	3	30<F<70	31
	4	>70	136
	5	>70	70
	6	枯死	-
	7	枯死	-
	8	>70	175
4-4	1	>70	144
	2	>70	185
	3	30<F<70	34
	4	>70	136
	5	30<F<70	120
	6	>70	124
	7	>70	250
	8	枯死	-
3-6	1	<10	0
	2	>70	47
	3	30<F<70	140
	4	>70	79
	5	枯死	-
	6	10<F<30	25
	7	枯死	-
	8	枯死	-
	9	<10	12
7-6	1	<10	9
	2	<10	0
	3	30<F<70	28
	4	枯死	-

表 2.

野生イネの抵抗性検定の結果								
	種名	ゲノム構成	両レースに抵抗性	レース1に抵抗性	レース3に抵抗性	両レースに感受性	その他	計
1	<i>O. rufipogon</i>	AA	2	7	3	18	6	36
2	<i>O. barthii</i>	AA	3	0	1	15	13	32
3	<i>O. glumaepatula</i>	AA	1	0	0	25	3	29
4	<i>O. meridionalis</i>	AA	0	0	0	23	4	27
5	<i>O. longistaminata</i>	AA	23	3	0	0	1	27
6	<i>O. punctata (2X)</i>	BB	0	0	0	3	6	9
7	<i>O. punctata (4X)</i>	BBCC	8	0	0	1	0	9
8	<i>O. minuta</i>	BBCC	11	0	0	1	0	12
9	<i>O. officinalis</i>	CC	14	5	0	0	6	25
10	<i>O. cichingeri</i>	CC	5	0	0	0	0	5
11	<i>O. latifolia</i>	CCDD	3	7	0	2	8	20
12	<i>O. alta</i>	CCDD	3	0	0	0	2	5
13	<i>O. grandiglumis</i>	CCDD	0	0	0	2	6	8
14	<i>O. australiensis</i>	EE	0	1	1	17	2	21
15	<i>O. brachyantha</i>	FF	4	3	1	0	5	13
16	<i>O. granulata</i>	GG	5	0	0	0	0	5
17	<i>O. meyeliana</i>	GG	6	0	0	0	0	6
18	<i>O. longiglumis</i>	HHJJ	4	2	0	1	2	9
19	<i>O. ridleyi</i>	HHJJ	0	1	0	0	2	3
	計		92	29	6	108	66	301

JARQ に公表した論文のトップページ

JARQ 43 (3), 221-225 (2009) <http://www.jircas.affrc.go.jp>

**Mapping of Bacterial Blight Resistance Gene *Xa11* on Rice Chromosome 3**

Takahiro GOTO, Tadayuki MATSUMOTO, Naruto FURUYA, Kenichi TSUCHIYA and Atsushi YOSHIMURA\*

Faculty of Agriculture, Kochi University (Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan)

**Abstract**

The bacterial blight (BB) resistance gene *Xa11* confers resistance in rice to Japanese races IR, II, IIA, and V of the BB pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Here, we report the mapping of *Xa11* by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS), and simple sequence repeat (SSR) markers. To detect DNA markers linked to *Xa11*, we used an *Xa11* near-isogenic line, IR-BB11 (in genetic background of IR24), and the susceptible cultivar IR24. The RAPD fragment L19<sub>100</sub> putatively linked to *Xa11* was identified. Cloning and sequencing of the L19<sub>100</sub> product indicated that it was held in the Rice Genome Program database as accession number AC097277, and that it occurs on chromosome 3. On the basis of the sequences of L19<sub>100</sub> and the flanking genomic region, we designed CAPS marker KUX11 and selected two SSR markers, RM347 and RM1350, for mapping *Xa11*. To confirm the putative linkage among *Xa11* and the three markers, we conducted linkage analysis using the F<sub>2</sub> population of a cross between IR24 and IR-BB11. Each F<sub>2</sub> plant was inoculated with strain T7156 (race IB) and genotyped with KUX11, RM347, and RM1350. Segregation in the F<sub>2</sub> located *Xa11* between the loci of RM347 (2.0 cM) and KUX11 (1.0 cM) on the long arm of chromosome 3. These results should be useful for the marker-assisted selection of *Xa11* in breeding programs and for cloning *Xa11* by map-based cloning.

**Discipline:** Plant Breeding

**Additional key words:** cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS), linkage, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), simple sequence repeat (SSR), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

**Introduction**

Bacterial blight (BB) caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) is one of the most serious diseases in rice (*Oryza sativa* L.) worldwide. Breeding and deployment of resistant cultivars carrying major resistance (*R*) genes have given the most effective approach in controlling BB. More than 20 major genes which confer resistance to various Xoo strains have been identified and are used as the main sources for genetic improvement of rice for resistance to Xoo in Asia.

Genetic and physical mapping of these *R*-genes not only permits marker-assisted breeding in rice, but also facilitates isolation and characterization of these genes at the molecular level. So far, 17 BB *R*-genes have been mapped on rice chromosomes and used for transferring and pyramiding in marker assisted selection (MAS) [1,2].

In particular, six *R*-genes, *Xa1*, *xa5*, *xa13*, *Xa21*, *Xa26*, and *Xa27*, were cloned by map-based cloning [3-5,6,32]. However, *Xa11*, *xa15*, *Xa16*, *Xa17*, *Xa18*, *xa19*, *xa20*, *xa24*, and *xa28* have not been mapped yet.

Ogawa and Yamamoto<sup>1</sup> identified the BB resistance gene *Xa11*, and Ogawa et al.<sup>2</sup> found it in the cultivars or lines IR8, Flower, RP9-3, Peda, and IR944-107-3-7. *Xa11* confers specific resistance in strains T7156, T7147, T7133, and IIF5304 (Japanese Xoo races IB, IIIA, and V, respectively)<sup>1,2</sup>. IR-BB11, a near isogenic line (NIL) carrying *Xa11*, was developed at the International Rice Research Institute (IRRI) and the former Tropical Agriculture Research Center (TARC), now the Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS)<sup>3,4</sup>. In this study, we report the identification of molecular markers closely linked to *Xa11*, and the mapping of *Xa11* in an IR24 × IR-BB11 cross.

\*Corresponding author: e-mail: [yoshit@ags.kyushu-u.ac.jp](mailto:yoshit@ags.kyushu-u.ac.jp)  
Received 28 May 2008; accepted 13 August 2008.