

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450064

研究課題名(和文) イネいもち病菌における圃場抵抗性誘導エフェクター遺伝子座の構造解析

研究課題名(英文) Genomic analysis of avirulence effector gene locus in *Magnaporthe oryzae*

研究代表者

鬼頭 英樹 (KITO, HIDEKI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部企画調整部・主任研究員

研究者番号：40455308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：いもち病を防除するために抵抗性イネ品種を広域で栽培すると、変異いもち病菌が発生し、防除効果が消失する現象が知られている。近年、防除効果が消失しにくいと言われている圃場抵抗性に着目してイネ品種の育種が進められている。本研究では、圃場抵抗性は本当に効果が消失しにくい遺伝子を確認するため、いもち病菌のゲノム解析と遺伝解析を行った。その結果、圃場抵抗性に関与するいもち病菌の遺伝子の所在を部分的に明らかにし、より詳細な解析を可能にした。

研究成果の概要(英文)： When blast resistant rice cultivars were spread, rice blast mutants that overcome resistance have occurred frequently. Recently, the field resistance that was likely to be durable has been introduced to rice cultivars. In this study, we conducted genomic and genetic analysis of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in order to confirm the durability of the field resistance. As a result, we made partial genetic maps of fungal genes that associates to field resistance. This result made further analysis possible.

研究分野：植物病理

キーワード：イネいもち病 圃場抵抗性 非病原力遺伝子

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病に対して質的な抵抗性を示す真性抵抗性イネ品種を利用した病害防除では、真性抵抗性遺伝子を導入したイネ品種を広域で栽培した後、数年で効果がなくなる抵抗性崩壊が大きな問題となっている。イネのいもち病真性抵抗性は真性抵抗性遺伝子産物といもち病菌が生産する特異的な真性抵抗性誘導エフェクタータンパク質の相互作用によって引き起こされることが知られており、真性抵抗性誘導エフェクター遺伝子(非病原力遺伝子)について多くの研究が行われてきた。^{1)~4)}このうち真性抵抗性遺伝子 *Pi-ta* に特異的に対応する真性抵抗性誘導エフェクター遺伝子 *AVR-Pita* はテロメア近傍に座乗し、トランスポゾン挿入変異により抵抗性崩壊したことが示唆された。^{5)~6)}

真性抵抗性遺伝子 *Pi-a* に特異的に対応する真性抵抗性誘導エフェクター遺伝子 *AVR-Pia* はトランスポゾンに囲まれた遺伝子座に存在し、欠失変異により抵抗性崩壊したことが示唆された。²⁾イネいもち病菌では、トランスポゾンに富むテロメア近傍が減数分裂時に易変異性を示すことが明らかになり、自然条件でいもち病菌がイネへ感染する際に、いもち病菌ゲノムのテロメア近傍において欠失、挿入、塩基置換、転座といった変異が起きやすい可能性が示唆された。⁷⁾

圃場抵抗性は真性抵抗性に比べて、抵抗性崩壊の可能性が低いとされている。⁹⁾これまでに、イネいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* 及び *Pi35* を持つイネ品種に量的な抵抗性を発現させるいもち病菌の圃場抵抗性誘導エフェクター遺伝子(非病原力遺伝子) *AVR-Pi34*¹⁰⁾ および *AVR-Pi35*¹¹⁾ が同定されたが、詳細な解析は行われていないため、抵抗性メカニズムおよび、易変異性についての知見は得られていない。

2. 研究の目的

イネのいもち病圃場抵抗性は真性抵抗性に比べ持続的(抵抗性崩壊の可能性が低い)と考えられている。しかし、その科学的論拠は示されていない。いもち病抵抗性育種では、持続性について十分な検証が行われないうまま、遺伝資源の導入と普及面積の拡大が先行しており、抵抗性崩壊と遺伝資源の枯渇が懸念されている。

そこで、本研究では、イネいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* および *Pi35* を持つイネ品種に対して特異的な抵抗性反応を誘導するいもち病菌側の因子として、申請者らが同定したいもち病菌の圃場抵抗性誘導エフェクター遺伝子 *AVR-Pi34* および *AVR-Pi35* を解析して、病原性の易変異性(抵抗性崩壊の要因)が示唆される構造の有無を明らかにする。これにより、圃場抵抗性メカニズムの一部を明らかにすると同時に、圃場抵抗性が持続性である論拠となる圃場抵抗性が崩壊するリスクの大小について分子レベルの特徴から評

価する。

3. 研究の方法

(1) 先行研究^{10)~11)}により次のことが報告された。イネいもち病菌株 IBOS8-1-1 は *Pi34* を持つイネ品種に対して特異的に強い侵害力(aggressiveness)を示すが、*Pi35* を持つイネ品種では圃場抵抗性により弱い侵害力しか示さない。イネいもち病菌株 Y93-245c-2 は *Pi35* を持つイネ品種に対して特異的に強い侵害力を示すが、*Pi34* を持つイネ品種には圃場抵抗性により弱い侵害力しか示さない。本研究ではこの2菌株を交配し、交配後代を作出した。

(2) 親株と交配後代を、*Pi34* もしくは *Pi35* を持つイネ品種・系統に接種し、交配後代の侵害力に基づいて *AVR-Pi34* および *AVR-Pi35* の分離を調査した。

(3) 親株と、侵害力に基づいて作成した交配後代の分離集団のゲノム DNA を抽出し、Miseq によってゲノム配列を解読した。

(4) ゲノム配列情報を基に遺伝子解析に用いる SSR、STS マーカーを開発した。

(5) 交配後代における DNA マーカーおよび侵害力の分離を基に、弱い侵害力に連鎖する DNA マーカーを選抜した。

(6) MAPMAKER3 と連鎖マーカーを用いて *AVR-Pi34* および *AVR-Pi35* を含む連鎖地図を作成した。

(7) 圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* もしくは *Pi35* を持つイネ品種に、いもち病菌の圃場分離株を噴霧接種し、特異的に強い侵害力を示す菌株を調査した。

4. 研究成果

(1) 交配後代の作出

いもち病菌 Y93-245c-2 株および F1 世代を交配した結果、BC1F1 世代 92 株を作出した。Y93-245c-2 株と BC1F1 世代を交配した結果、子のう殻および子のうは形成したが、成熟した子のう胞子を形成せず、BC2F1 の作出には至らなかった。培養期間、培地について検討を加えたが、BC2F1 の作出には至らなかった。

(2) 侵害力判定

いもち病菌の親株および F1 世代および BC1F1 世代を、*Pi34* もしくは *Pi35* を持ついもち病圃場抵抗性イネ品種・系統に接種したところ、*Pi35* を持つイネ品種「北海 188 号」に接種すると、明瞭な侵害力の判定ができた。一方、*Pi34* を持つコシヒカリ準同質遺伝子系統イネ系統

「中国 IL1 号」に親株および交配後代を接種すると、精密な病原性判定が不可能であることが分かった。予測された問題に対応するため、*Pi34* が導入され、かつ「コシヒカリ」とは異なる同質遺伝子系統を用いて、接種試験を行ったところ、明瞭に侵害力の判定ができるようになった。

Pi34 を持つイネ品種に対するイネいもち病菌 IBOS8-1-1 および Y93-245c-2 および F1 世代の侵害力は、Zenbayashi-Sawata et al.¹⁰⁾ によって報告された。既報では F1 世代において侵害力が 1 : 1 に分離し、*AVR-Pi34* は 1 遺伝子支配であることが報告された。また、*Pi35* を持つイネ品種に対する同菌株群の侵害力は安田ら¹¹⁾ によって報告された。既報では F1 世代において侵害力が 1 : 1 に分離し、*AVR-Pi35* は 1 遺伝子支配であることが報告された。

本研究の BC1F1 世代においても F1 世代と同様に 1 : 1 に分離することを確認することができた。そこで、BC1F1 を用いた遺伝解析が可能と考え、侵害力に基づいた交配後代の分離集団を作成した。

(3) ゲノム配列解読

親株および侵害力に基づいて作成した分離集団を MiSeq でシーケンズした結果、scaffold 数は、IBOS8-1-1 で 3429、Y93-245c-2 で 2638 となった。

(4) DNA マーカー開発

ゲノム配列情報を基にして BC1F1 における遺伝解析可能なマーカーを開発した。SSR マーカーは 34 個、STS マーカーは 96 個、それぞれ開発した。また、Zheng et al.⁸⁾ の SSR マーカーから、BC1F1 の親株間で多型を示す SSR マーカー 26 個を選抜した。

(5) 連鎖マーカーの選抜

AVR-Pi34 および *AVR-Pi35* に連鎖する DNA マーカーとして、それぞれ 8 個および 12 個を選抜した。

(6) 遺伝地図の作成

MAPMAKER3 で遺伝地図を作成した結果、*AVR-Pi35* と密接に連鎖する DNA マーカーが得られ、*AVR-Pi35* が座乗するゲノム領域の一部を明らかにすることができた。一方、*AVR-Pi34* と密接に連鎖する DNA マーカーは残念ながら得られなかった。

(7) 圃場抵抗性イネ品種を侵害する圃場分離株の探索

Pi34 および *Pi35* を持つイネ品種に対して、特異的に強い侵害力を示す菌株を探索した結果、*Pi34* を持つイネ品種を特

異的に強く侵害するいもち病菌は見つかったが、*Pi35* を持つイネ品種を特異的に強く侵害するいもち病菌は見つからなかった。

引用文献

- 1) Miki, S. et al. Mol Plant Pathol. 2009; 10(3): 361-74.
- 2) Yasuda, N. et al. Plant Disease. 2008; 92(8), 1144-9.
- 3) Yoshida, K. et al. Plant Cell. 2009; 21(5): 1573-91.
- 4) Orbach, M.J. et al. Plant Cell. 2000; 12(11): 2019-32.
- 5) Kang, S. et al. Mol Plant Microbe Interact. 2001; 14(5): 671-4.
- 6) Dai Y et al. Fungal Genet Biol. 2010; 47(12): 973-80.
- 7) Chuma, I. et al. J Gen Plant Pathol. 2011; 77(6): 317-25.
- 8) Zheng, Y. et al. Fungal Genet Biol. 2008; 45(10): 1340-7.
- 9) Vergne, E. BMC Plant Biol. 2010; 10; 206.
- 10) Zenbayashi-Sawata, K. J Gen Plant Pathol. 2005; 71(6): 395-401.
- 11) 安田ら. 日植病報. 2008; 74(3) :191.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

鬼頭英樹、イネいもち病管理技術としてのマルチラインと圃場抵抗性、農研機構中央農業総合研究センターシンポジウム、2014 年 11 月 12 日、農林水産技術会議事務局筑波事務所 つくば農林ホール (茨城県・つくば市)

安田伸子、非病原力遺伝子 *AVR*Pi34**, *AVR*Pi35**、平成 25 年度農研機構セミナー、2013 年 11 月 11 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

Hideki Kito, Kaoru Zenbayashi, Molecular Cloning of the Partial Resistance Gene *Pi34* and Early Response of Partial resistant Rice Cultivar Chugoku IL1 to Infection of *Magnaporthe oryzae*, 6th International Rice Blast Congress, 2013 年 08 月 26 日 ~ 2013 年 08 月 30 日, Ramada Plaza Jeju Hotel (Jeju, Korea)

〔その他〕

農研機構セミナー

<https://www.naro.affrc.go.jp/event/list/2013/10/048726.html>

農研機構中央農業総合研究センターシンポジウム

<https://www.naro.affrc.go.jp/event/list>

/2014/09/054134.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭英樹 (KITO, Hideki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部総合企画調整部・主任研究員

研究者番号：40455308

(2) 研究分担者

安田伸子 (YASUDA, Nobuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター病害虫研究領域・主任研究員

研究者番号：00355504

(3) 連携研究者

寺内 良平 (TERAUCHI, Ryohei)

岩手生物工学研究センター・研究部長

研究者番号：50236981