

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850037

研究課題名(和文)トビイロウンカのイネの圃場抵抗性に対する適応の遺伝解析

研究課題名(英文)Genetic analysis of the adaptation of brown planthopper to rice variety IR64

研究代表者

小林 徹也 (Kobayashi, Tetsuya)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90355321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：トビイロウンカに対し圃場抵抗性を持つイネ品種IR64を用い、圃場抵抗性に対するトビイロウンカの加害性の遺伝解析を行った。IR64に対して高いパフォーマンス(成長速度と羽化率)を示すウンカ系統と、示さないウンカ系統をそれぞれ作出した。二つの系統を交配し、交配後代のIR64に対するパフォーマンスを検定したところ、F2において両親の中間のパフォーマンスを示し、メンデル遺伝しなかった。F2集団のゲノムDNAを個別別に抽出し、RAD法によってIR64上のパフォーマンスを決定する因子のマッピングを試みた。

研究成果の概要(英文)：IR64 is the rice variety that has stable field resistance against brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* for decades. Two BPH strains that show different performances on IR64 were produced and used for analyzing inheritance of the performance on IR64. F2 generation from parents of two strains exhibited intermediate performance. However, the inheritance did not follow the Mendelian law. RADseq and QTL analyses were performed to identify number and location of the genetic factors mediating performance on IR64.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：抵抗性作物 バイオタイプ 圃場抵抗性 イネ害虫

1. 研究開始当初の背景

トビロウンカはアジアにおけるイネの最重要害虫である。トビロウンカ抵抗性遺伝子を導入したイネ品種は 1970 年代から普及したが、これを加害するバイオタイプが次々と発達したために十分な効果を上げられていない。強い抵抗性を持つ単一遺伝子を導入したイネ品種の多くは短期間で抵抗性を失った一方で、圃場で実用的なレベルの抵抗性を維持し続けている品種もあった。これらの品種は意図的に導入した遺伝子以外のマイナーな抵抗性因子を複数持っていた。圃場抵抗性品種は加害に対する耐性が強いほか、ウンカの選好性、摂食、発育、産卵などに作用して増殖率を下げる。このため、従来利用されてきた抵抗性遺伝子が持つ強力な吸汁阻害作用とは異なる。圃場抵抗性の効果は穏やかであるものの、効果が数十年単位で安定して持続することから、新たな遺伝資源として期待されている。

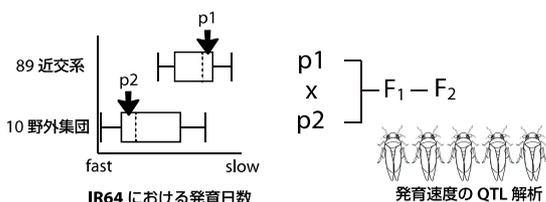
2. 研究の目的

- ・東南アジアにおいて圃場抵抗性品種 IR64 が普及する前と後の 2 つのトビロウンカの系統を用い、IR64 上で発育が著しく遅延する個体と発育が遅延しない個体があることを確認する。
- ・これらの個体の交配後代を作製し、IR64 上で発育速度を決定する遺伝因子を QTL 解析によってウンカゲノム上にマッピングして、遺伝因子の数、座乗位置と寄与度を明らかにする。
- ・また、圃場抵抗性品種の効果が持続する理由を、ウンカ側の遺伝的要因によって説明することを試みる。

3. 研究の方法

1. IR64 が普及する以前に採集したトビロウンカ C89 近交系(1989 年筑後市採集)と、近年採集した K10 野外集団(2010 年合志市採集)の 2 つのウンカ系統について、2 齢 0 日の幼虫を播種後 40 日の IR26、IR64 イネ体に放飼し、羽化までの日数を記録する。

2. 室内近交系のうち発育が遅い 20%に属する個体と、野外系統のうち発育が遅延しない(速い)20%に属する個体を用いてそれぞれ系統として樹立する。これらを交配し、F₂ 集団を育成する。



3. F₂ 集団において、2. と同様の方法で発育日数を調査し、調査後の個体の DNA を保存する。

4. F₁ 集団、F₂ 集団の発育日数の分布から発育日数の遺伝様式をおおまかに推定する。

5. Restriction site associated DNA sequencing 法 (RADseq 法) のためのライブラリ作製を行い、Hiseq2500 による塩基配列解析を行う。得られたマーカーを用いて F₂ 集団の遺伝子型を個体別に解析する。発育日数を量的形質として QTL 解析を行い、発育遅延に關与するウンカ側の遺伝的要因を連鎖地図上にマッピングする。

6. 発育遅延の度合いがウンカ側の遺伝的要因によってどの程度決定されているか、またウンカのいくつかの遺伝子がこれに關与しているかを明らかにする。

4. 研究成果

国際イネ研究所 (IRRI) が育成した抵抗性イネ品種のうち、トビロウンカ抵抗性遺伝子 *Bph1* をもつ IR26、*Bph1* に加えて圃場抵抗性を持つ IR64、抵抗性遺伝子 *bph2* をもつ IR42、*bph2* に加えて圃場抵抗性を持つ IR36 の種子を国内 2 カ所の機関から入手し、種子を増殖するとともに、トビロウンカ生存率を指標に抵抗性の強さを調査した。結果、国内 1 か所から入手した IR 品種は、トビロウンカに対する抵抗性をほとんど失っていた。一方、国内もう 1 か所から入手した種子は中程度のトビロウンカ抵抗性を示した。一方、IR64 は非常に強い抵抗性を示した。IR64 のみが強い抵抗性を示した理由として、IR64 が持つ抵抗性が、*Bph1*、*bph2* といった主要な抵抗性遺伝子が持つ抵抗性とは異なるメカニズムによって発現している可能性が示唆された。

トビロウンカ系統 C89 と K10 の 2 つについて、圃場抵抗性品種 IR64 と通常の抵抗性品種 IR26、感受性品種 IR22 の 3 品種の播種後 2 週間のイネ体に孵化幼虫を放飼し、羽化までの日数、発育ステージ構成の変化および羽化率を比較した結果は表 1 のようになった。また Development Index (Vird & Hodkinson, 2005) をもとめ、各品種に対する適応の程度を比較した。

トビロウンカの羽化率は、どちらの系統もイネ品種間で差がなかった。一方、発育日数は、C89 系統と圃場抵抗性品種 IR64 の組み合わせにおいてのみ一部の個体の発育の有意な遅延が認められた。K10 系統は全体的に発育が遅かったが、発育速度には品種間差は認められなかった。感受性系統においても C89 と K10 の発育日数に差があったのは、実験時期と条件が若干異なったためである。少

なくとも、圃場抵抗性 IR64 の普及前のトピロウンカ集団 C89 にはこの品種に対し適応度の低い個体が含まれていることが明らかになった。

表1. 各種 IR 品種上におけるトピロウンカ 2 系統の羽化率と発育日数

Variety/Strain	C89			K10				
	Survival rate ^{*1}	p^{*2}	Development time (days)	p^{*3}	Survival rate	p^{*2}	Development time (days)	p^{*3}
IR22	0.58±0.15	a	123±1.67	a	0.89±0.18	a	135±1.06	a
IR26	0.66±0.19	a	121±1.51	a	0.88±0.14	a	14.0±1.12	a
IR64	0.60±0.28	a	13.9±2.75	b	0.80±0.27	a	14.0±1.95	a

*1 平均値±SD
*2 異なる英字はTukey-KramerのHSD検定での有意差を示す (p<0.05, Arcsine変換)。
*3 異なる英字はTukey-KramerのHSD検定での有意差を示す (p<0.01)。

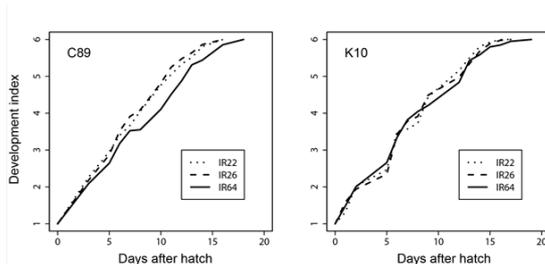


図1. 各 IR 品種上におけるトピロウンカ 2 系統の Development Index (Bird & Hodkinson, 2005)。

トピロウンカ K10 系統から IR64 上で発育の早い個体を集め、K10F 集団とした。また、C89 系統から IR64 上で発育の遅れた個体を集め C89S 系統とした。

次に、K10F と C89S の交配を行い、後代 F₂ 世代を作製して、IR64 における発育を検定した。K10F x C89S 交配 F₂ 集団と C89S x K10F 交配 F₂ 集団それぞれ 3 集団ずつについて、孵化幼虫を播種後 7 日後の IR64 芽出しを準備したプラスチックカップに移して飼育した。最も早く羽化した個体が得られた日 (14 日) に残りの個体もすべてサンプリングし、体重を個体別に測定した。また、コントロールとして K10F 系統と C89S 系統についても同様のデータを取得した (表 2、図 2)。F₂ 世代 458 個体の体重は平均 1.52g で、親系統 (K10F: 1.68g、C89S: 0.73g) の中間の値を示した。

表2 IR64 上での発育の速い系統 (K10F)、遅い系統 (C89F)、これらを親とした交配 F₂ 集団の IR64 上での体重

交配	n	14日後羽化率	体重 (mg±SE)
Parent (Fast)	76	73.7%	1.68 ± 0.31 a 1)
Parent (Slow)	39	0.0%	0.73 ± 0.13 b
F ₂ (FxS) 1	65	36.9%	1.54 ± 0.22 a
F ₂ (FxS) 2	100	17.0%	1.55 ± 0.18 a
F ₂ (FxS) 3	88	29.5%	1.53 ± 0.19 a
F ₂ (SxF) 1	56	44.6%	1.83 ± 0.22 a
F ₂ (SxF) 2	78	33.3%	1.38 ± 0.22 c
F ₂ (SxF) 3	71	25.4%	1.35 ± 0.18 c

1) 同一英字の間には角変換後にTukey-Kramer検定による有意差なし (P>0.05)

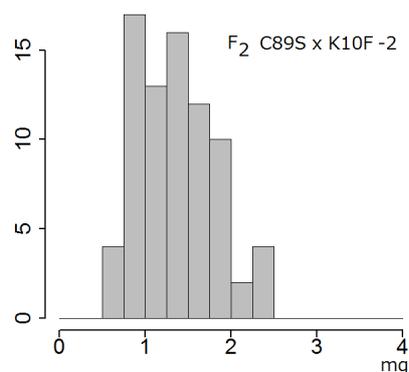
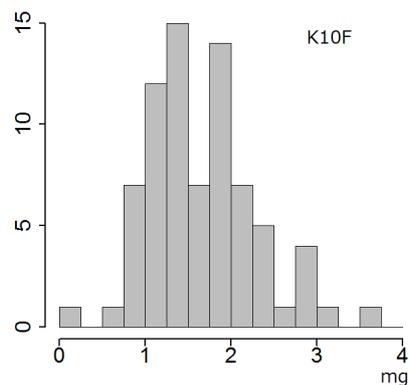
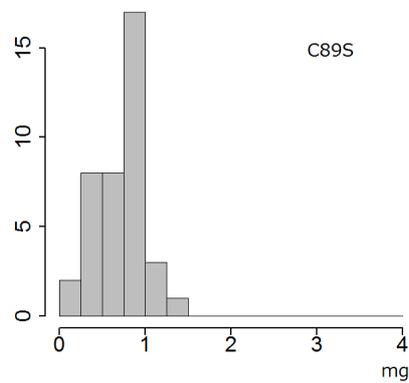


図2. IR64 上での発育の速い系統 (K10F)、遅い系統 (C89F)、これらを親とした交配 F₂ 集団の IR64 上での体重の分布

回収した 6 つの F₂ 集団について個体別にゲノム DNA を抽出した。このうち C89S x K10F 交配 F₂ 世代 1 集団 (表 2 の F₂(SxF)2) 78 個体と F₀ 親 2 個体を用いて、Double-digested Restriction-site associated DNA sequences (ddRADseq) ライブラリを作製した。作製したライブラリはイルミナ HiSeq2500 で解読し、ソフトウェア stacks で解析した。結果、全 48Gbp の塩基情報から 13 万の SNP マーカーが得られ、そのうちマッピング可能な共優性のマーカーが 4000 以上得られた。現在、表現型データと合わせて QTL 解析を行っている。

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)

Kobayashi Tetsuya. Evolving ideas about genetics underlying insect virulence to plant resistance in rice-brown planthopper interactions. Journal of Insect Physiology 84:32-39, 2016、査読あり

〔学会発表〕(計1件)

小林徹也、末次克行、真田幸代、松村正哉 抵抗性イネとこれを加害するトビイロウンカを用いたイネ-ウンカ相互作用研究の進展
2016.03 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 261

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 徹也 (KOBAYASHI, Tetsuya)
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・
加害・耐虫機構研究ユニット
主任研究員
研究者番号：90355321