

# A Study on the Management of Green Rice Leafhopper *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Homoptera: Cicadellidae) Using Resistant Rice Varieties

Masahiro Hirae

## Summary

The green rice leafhopper (GRH) *Nephotettix cincticeps* (Uhler) is a serious pest in temperate Asia. Populations of this insect, which multiply rapidly around the heading stage of rice, can considerably increase and cause considerable losses of rice yield in northern Japan, although the peak density of population is relatively low in southwestern Japan. The GRH also damages rice indirectly by transmitting virus and phytoplasma causing plant diseases.

Utilization of crop resistance is effective in integrated pest management. The advantages of this method are that it has a relatively small effect on the environment and involves minimum labor and low expenditure. In the present study, I developed a simple and rapid method for evaluating the resistance of rice to GRH on the basis of nymphal growth. Further, (1) the development of virulence in GRH was examined by subjecting the Joetsu (northern Japan) population to artificial selection on several resistant rice varieties, and (2) the virulence of selected GRH lines was evaluated to clarify the differences in virulence among resistant varieties. Moreover, I investigated the density of GRH population in relation to GRH-resistant near-isogenic lines (NILs) of rice plants in paddy fields and the resistance of NILs to the GRH populations. The results are summarized as follows.

### 1. A method for examining the resistance of rice to GRH on the basis of nymphal growth

A simple and rapid method based on nymphal growth was developed in order to evaluate the resistance level of rice to GRH. Nymphs grew to the second instar on seedlings of susceptible varieties of rice within 3 days and 8 hours to 4 days. Therefore, the proportion of nymphs that developed into second instars within 4 days can be considered as a reliable index. The B<sub>1</sub>F<sub>1</sub> population produced from a cross between Norin-PL6, a resistant rice line, and a susceptible variety of Toyonishiki was segregated into resistant and susceptible populations; the segregation was performed on the basis of the proportion of nymphs developing into second instars, as determined in a test using rice plant seedlings. The results of a leaf blade test conducted during the heading stage of rice plants correlated well with those of the seedling test. This indicates that determining the proportion of nymphs developing into second instars is effective for the accurate individual evaluation of rice plants with varying degrees of resistance. The evaluation method developed in this study could be used in various tests for rice plants, such as selection of crossed progeny and analysis of genes at the seedling stage.

### 2. GRH biotypes virulent to resistant rice varieties

Biotypes of pest insects virulent to resistant crop varieties pose a serious problem for resistant crops; therefore, it is important to (1) investigate the potential of pests to overcome resistance and (2) predict the emergence of such biotypes. A population of GRH collected from Joetsu was artificially selected on 5 resistant rice varieties in the laboratory. The GRH lines selected on Saikai 164, Saikai 182, and Kanto-PL 6 were able to survive and reproduce on their respective varieties. In these lines, the developmental period of nymphs was shortened by continuous

selection, although in the first generation the developmental period was longer than that of the GRH line reared on Nipponbare, which did not carry a resistance gene. This result shows that the GRH population from Joetsu has genetic variations to the resistance, which leads to development of the virulent. It also suggests that certain biotypes virulent to resistant varieties in the Joetsu district can overcome GRH resistance. It is important to note that I have not been able to establish GRH lines virulent to Norin-PL 5 or Norin-PL 6, which carry 2 complementary resistance genes *Grh2* and *Grh4*. This suggests that pyramiding resistance genes would be effective for providing durable resistance.

Six lines that are reared on IR 24, Chugoku 105, Saikai 164, Saikai 182, Kanto-PL 6, and Aichi 80 were assessed for virulence among different resistant varieties by conducting a seedling test. All the 6 GRH lines were highly virulent to the varieties on which they were selected. Virulence was similar for the IR 24 and Chugoku 105 lines, Saikai 164 and Saikai 182 lines, and Kanto-PL 6 and Aichi 80 lines. The Kanto-PL 6 and Aichi 80 lines were moderately virulent to Tadukan and Rantaj-emas 2. No GRH lines were virulent to Norin-PL 5, Norin-PL 6, and Pe-bi-hun. The results of the leaf blade test were similar to those of the seedling test. An allele test confirmed that the Kanto-PL 6 and Aichi 80 have the same GRH-resistance genes, and that the locus of the resistance gene in Norin-PL 2 differs from that of the resistance gene in Kanto-PL 6 and Aichi 80. These results suggest that the virulence of GRH biotypes is correlated to the resistance genes in the rice varieties; hence, the use of different biotypes allows the identification of groups of rice varieties that have similar resistance genes. I propose that the biotypes virulent to the *Grh1*-, *Grh2*-, and *Grh3(t)*-carrying varieties be designated "biotype 1," "biotype 2," and "biotype 3," respectively. The method for identifying resistance genes in resistant varieties was established on the basis of the relationship between resistance genes and GRH biotypes and could be used in the screening of new resistant varieties.

The development and reproduction in 3 GRH biotypes were examined on resistant rice varieties of Chugoku 105 (carrying the resistance gene *Grh1*), Saikai 182 (*Grh2*), and Aichi 80 (*Grh3(t)*). Biotypes 1, 2, and 3 exhibited a high survival rate, short developmental period, long adult longevity and high fecundity when grown on the respective varieties to which they are virulent. The total sugar content of honeydew excreted by these biotypes was high; this observation suggests that each biotype has the ability to suck phloem sap from the resistant variety to which it is virulent. Nymph survival and development, adult longevity, fecundity, and total sugar content of excreted honeydew in the 3 biotypes were similar to those observed in the unselected line reared on the Nipponbare variety carrying no resistance gene. These results indicate that there is no difference in fitness with respect to development and reproduction between the 3 biotypes and the unselected line of GRH grown on susceptible rice varieties. The result also suggested that the use of sequential release of single resistance genes in rice would not be a practical strategy for providing durable resistance.

### 3. Resistance of NILs to GRH in paddy fields

In order to evaluate resistance to GRH under field conditions, the density of GRH was investigated in relation to GRH-resistant NILs of rice plants in paddy fields in Joetsu, Niigata Prefecture. The GRH population on the rice cultivar "Kinuhikari," carrying no resistance gene, increased from late August and peaked during early to mid-September; however, the GRH population was suppressed in NILs carrying each of the GRH-resistance genes *Grh1*, *Grh2*, *Grh3(t)*, and *Grh2* and *Grh4*. The resistance of NILs to GRHs collected from Joetsu differed among NILs, as determined by the leaf blade test. Resistance decreased rapidly during the maturation stage of rice in lines carrying the *Grh2* or *Grh3(t)* gene, whereas it remained high in lines carrying the *Grh1* or *Grh2* and *Grh4* genes. Temporary resistance is effective for suppressing the GRH population in Joetsu paddy fields because in the maturation stage, the GRH density remained low on NILs with decreased resistance to GRH.

The resistance of NILs to the GRH population collected from Joetsu, Mito (Ibaraki Prefecture), and Chikugo (Fukuoka Prefecture) was evaluated in terms of the proportion of nymphs developing into second instars that was determined by conducting a seedling test. The proportion of nymphs of the Chikugo population developing into second instars was higher than that of the Joetsu and the Mito populations on NILs carrying *Grh1* or *Grh2*. In Chikugo, the number of GRH adults and nymphs on these NILs was slightly high in the field. This result indicates that the difference in the proportion of nymphs developing into second instars on NILs among GRH populations is related to the difference in the proportion of individuals that are virulent to the NILs among the populations. In Chikugo, a slightly high number of GRH adults and nymphs were found on NILs carrying the *Grh1*, *Grh2*, or *Grh3(t)* genes in the field.

This study confirmed the resistance of GRH-resistant NILs to s under field conditions. It also revealed that GRH populations differ in genetic structure with respect to virulence to resistant rice varieties. The widespread use of a single resistance gene may lead to the development of resistance-breaking biotypes. Further, there is no difference in fitness between different GRH biotypes on susceptible rice varieties. Pyramiding resistance genes, for example, combining *Grh2* and *Grh4*, is proposed to delay biotype development. In conclusion, to predict and prevent the development of resistance-breaking biotypes, it is important to use GRH-resistant rice varieties combined with monitoring the GRH population for variation in virulence to resistance genes before and after the use of resistant varieties. In addition, breeding GRH-resistant varieties with resistance genes from new sources and with more than one resistance gene is likely to be an effective strategy for achieving durable resistance against GRH.

細菌エンドファイト共生イネにおけるバイオタイプ発達モデルを開発し、細菌エンドファイト施用と土着天敵保護を組み合わせることにより、トビイロウンカとセジロウンカではバイオタイプ発達を10年以上遅延させることをモデルで示した。西日本では土着天敵であるキクズキコモリグモの捕食がツマグロヨコバイの発生動向に大きな役割を果たしていることが知られている<sup>(63,64)</sup>。このため、抵抗性品種を栽培している圃場において、土着天敵を保護することによってバイオタイプ発達を遅延させることが可能か否かについて、今後検討する必要がある。

以上、本研究において得られた結果から、抵抗性品種を安定的に利用するための今後の課題について(図10)にまとめた。まず、品種育成に関しては、抵抗性品種を加害するバイオタイプの発達により抵抗性の崩壊が起こった場合でも迅速に品種切り替えを行えるよう、新規のツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子を探索し、新しい抵抗性品種の育成を行う。この際、本研究で選抜されたバイオタイプを用いた抵抗性検定法で新しい遺伝子を探索することが可能である。また、抵抗性遺伝子の機能を解明し、バイオタ

イプが発達しにくい抵抗性遺伝子の組合せを明らかにし、抵抗性遺伝子集積系統を育成する。ツマグロヨコバイのバイオタイプに関しては、バイオタイプの品種加害性の遺伝分析を行い、本種の抵抗性品種に対する加害性の優性を明らかにする。一方、抵抗性品種を栽培する地域におけるツマグロヨコバイ個体群の加害性についてモニタリングし、バイオタイプ発達のリスクを予想し、栽培する抵抗性品種の選択に利用する。また、バイオタイプの加害性獲得機構を解析することで、抵抗性崩壊機構を明らかにする。ツマグロヨコバイの生態に関して、抵抗性品種から感受性品種やイネ科寄主植物への本種の移動分散・増殖や、本種の越冬中における適応度および加害性の変化、複数の抵抗性品種を栽培した時の本種の加害性の変化を解明することで、抵抗性品種の最適な栽培方法を明らかにする。抵抗性品種と土着天敵保護を組み合わせることにより、バイオタイプ発達の遅延の可能性を検討する。最後に、これらを総合化してツマグロヨコバイ管理技術の中に組み込むことにより、抵抗性崩壊の防止対策となると考えられる。

## 摘 要

ツマグロヨコバイ *Nephotettix cincticeps* (Uhler) はカメムシ目 (Hemiptera) ヨコバイ科 (Cicadellidae) に属する吸汁性昆虫であり、水稻の主要害虫の一種として知られている。抵抗性品種を利用した害虫管理技術は総合防除技術の有力な素材の1つである。本研究では、ツマグロヨコバイに対するイネの抵抗性に関し、早期に簡易かつ的確に判定できる抵抗性検定法を開発した。また、イネのツマグロヨコバイ抵抗性を加害できるバイオタイプの選抜およびバイオタイプの品種加害性、バイオタイプの加害特性および生活史特性の比較、野外における抵抗性準同質遺伝子系統のツマグロヨコバイ密度抑制効果および地域個体群の抵抗性品種加害能力の差異を明らかにした。主要な結果を以下に要約する。

### 1. 幼虫発育を指標とした簡易抵抗性検定法

最も簡便な抵抗性検定法であるイネの芽出し苗期における検定について、幼虫の発育程度を指標とした方法を検討した。抵抗性品種では幼虫発育の遅延

が1齢幼虫の段階から認められたため、1齢幼虫を放飼して4日後の2齢幼虫数を2齢到達率として求め、幼虫発育程度の指標とした。抵抗性品種の中母農6号と感受性品種のトヨニシキを交配した $B_1F_1$ 雑種集団では、芽出し苗期に2齢到達率を用いて抵抗性個体と感受性個体を明確に分離することができた。出穂期の抵抗性検定でも同様に判定されたことから、2齢到達率を用いた検定法の精度は高いと判断された。さらに、「キヌヒカリ/Pe-bi-hun」, 「キヌヒカリ/八仔」, 「キヌヒカリ/西海182号」の $F_2$ 雑種集団においても、2齢到達率を用いた検定で精度の高い判定が可能であった。

### 2. ツマグロヨコバイ抵抗性品種を加害するバイオタイプ

#### 1) ツマグロヨコバイ抵抗性を加害できるバイオタイプの選抜

新潟県上越市のツマグロヨコバイ個体群から、抵抗性品種の西海164号、西海182号、関東PL6で選抜を繰り返すことにより、累代飼育が可能な系統

を得た。このことから、上越市の個体群には抵抗性品種を加害する遺伝変異が存在し、抵抗性品種を栽培するとバイオタイプが発達する可能性が示された。中母農5号と中母農6号で発育できる系統は選抜できなかった。

## 2) バイオタイプの品種加害性

抵抗性品種のIR 24, 中国 105 号, 西海 164 号, 西海 182 号, 関東 PL 6, 愛知 80 号で選抜されたツマグロヨコバイ系統は、それぞれ選抜を行った品種に対して高い加害性を示し、他の抵抗性品種に対する加害性から3つのグループに分けられた。抵抗性品種の持つ抵抗性遺伝子は、選抜系統の品種加害性から推測される遺伝子の異同と一致し、バイオタイプを用いて抵抗性遺伝子を推定できることが示された。抵抗性遺伝子 *Grh1* を持つ品種を加害できる系統を Biotype 1, *Grh2* あるいは *Grh3(t)* を加害できる系統をそれぞれ Biotype 2, Biotype 3 とし、抵抗性品種に対する加害性から抵抗性遺伝子を判別するシステムを提案した。選抜系統は幼穂形成期～出穂期のイネに対して加害性を示したことから、イネの生育期間を通じて加害可能であることが示された。

## 3) バイオタイプの加害特性および生活史特性の比較

抵抗性品種の中国 105 号, 西海 182 号あるいは愛知 80 号をそれぞれ加害できる系統では、抵抗性品種上で幼虫発育期間が短く、幼虫生存率が高く、成虫の平均生存日数および雌当たり総産卵数が増加し、バイオタイプは選抜を行った抵抗性品種に適

応していると考えられた。抵抗性品種上でバイオタイプから排泄された甘露中の糖量は、無選抜系統と比べて有意に増加しており、バイオタイプは師管からの吸汁を可能にすることによって加害性を獲得していると考えられた。日本晴における羽化率、幼虫発育期間、成虫生存日数、産卵数、糖排泄量は各バイオタイプと無選抜系統との間で有意差は認められず、本種の抵抗性品種に対する加害性獲得には適度コストを伴っていないと考えられた。

## 3. 野外におけるツマグロヨコバイ準同質遺伝子系統の密度抑制効果

ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子を保有するキヌヒカリ準同質遺伝子系統 (NILs) を新潟県上越市の水田で栽培したところ、ツマグロヨコバイ生息密度は低く推移し、密度抑制効果は高かった。*Grh2*, *Grh3(t)* を持つ系統ではイネの出穂期以降に抵抗性が弱まるが、野外では生息密度を低く抑えており、出穂期前後の一時的な抵抗性の高まりが以後の密度上昇を抑制する要因であると考えられた。

福岡県筑後市のツマグロヨコバイ個体群は *Grh1* および *Grh2* を持つ系統上で2齢到達率が高く、これらの系統に対し加害性が高かった。筑後市の水田では *Grh1*, *Grh2* をそれぞれ保有する NILs でツマグロヨコバイ成幼虫が少ないながらも発生し、筑後市の個体群中にはこれらの系統を加害できる個体が存在することが示された。抵抗性品種をツマグロヨコバイ防除に利用する際には、導入する地域の個体群の品種加害性を明らかにし、有効な抵抗性品種を選択することが重要である。

## 謝 辞

本研究の取りまとめにあたり、懇切なご指導とご助言をいただき、さらに本論文のご校閲をいただいた筑波大学生命環境科学研究科本田洋教授に対し厚くお礼申し上げます。筑波大学生命環境科学研究科奥野員敏教授ならびに戒能洋一准教授、独立行政法人農業生物資源研究所服部誠氏には、本稿のご校閲をいただき、深く感謝を申し上げます。独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター北陸研究センター樋口博也氏には、本研究の遂行および取りまとめにあたり多くの有益なご助

言、ご指導いただくとともに、本論文のご校閲をいただき、心からお礼申し上げます。

元北陸農業試験場虫害研究室長大矢慎吾氏には、本研究の端緒を与えられご指導いただいた。独立行政法人国際農林水産業研究センター福田善通氏、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター田村克徳氏には、本研究の開始以来数々の有益な議論をしていただいた。独立行政法人農業環境技術研究所田中幸一氏、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究