

日本陸稲およびイネ野生種の縞葉枯病抵抗性に関する遺伝的解析

前田英郎*

Key words : 水稲, 陸稲, 野生種, イネ縞葉枯病, 準同質遺伝子系統, DNAマーカー, QTL解析, 育種

目 次

I 緒 論	71	5 準同質遺伝子系統の栽培特性の評価	89
II 日本陸稲由来の縞葉枯病抵抗性に関する QTL解析	74	6 小 括	89
1 緒 言	74	IV イネ野生種を用いた新規縞葉枯病抵抗性遺 伝子の探索	90
2 グラフィカルジェノタイプによる座乗領 域の推定	74	1 緒 言	90
3 縞葉枯病抵抗性に関するQTL解析	76	2 Aゲノム野生種 <i>O. rufipogon</i> からの抵抗 性遺伝子の探索	90
4 検出された2つのQTLの効果に関する 遺伝解析	79	3 Cゲノム野生種 <i>O. officinalis</i> の染色体断 片導入系統からの抵抗性遺伝子探索	92
5 小 括	84	4 Cゲノム野生種 <i>O. officinalis</i> の染色体断 片導入系統からのヒメトビウンカ抵抗性 系統の選抜	96
III 準同質遺伝子系統を用いた陸稲由来縞葉枯 病抵抗性の遺伝解析	84	5 小 括	98
1 緒 言	84	V 総 合 考 察	98
2 準同質遺伝子系統の作出	84	謝 辞	101
3 準同質遺伝子系統の縞葉枯病抵抗性検定	85	引 用 文 献	102
4 「中国40号」由来の第8染色体断片を除 去した準同質遺伝子系統の解析	87	Summary	105

I 緒 論

イネ縞葉枯病はイネを侵す代表的なウイルス病で、ヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus*) が媒介するウイルスによって発病する。この病気は東アジア地域、主に日本、韓国、中国を中心に発生が見られ、この地域の水稲栽培における重要な病害の1つとなっている。媒介虫であるヒメトビウンカは、セジロウンカやトビイロウンカなどの海外から飛来するウンカ類とは異なり、日本でも越冬する。ムギ

類やイネ科雑草で越冬したヒメトビウンカは春先の移植時期に水田に移動分散し、イネにウイルスを伝搬する。生育初期の苗が感染すると葉身に縞状の病斑が現れると同時に徒長し、枯死に至る場合も多く見られる。この特徴的な病徴は、徒長して垂れ下がった葉身がゆうれいの手のように見えることから「ゆうれい症状 (ゆうれい病)」と呼ばれることもある。生育後期にウイルス感染した場合は枯死に至ることは稀であるが、感染した茎の穂は葉鞘に包まれたまま出穂しないか、あるいは発育が停止した穂が出穂して不稔となる。

(平成19年9月20日受付, 平成19年12月11日受理)

作物開発部

*現 作物研究所 低コスト稲育種研究チーム

日本における縞葉枯病発生の記録は古く、すでに20世紀の始めには関東・東山地方を中心に被害が確認されていた。1960年代には栽培の早期化にともなう関東以西の東海・近畿・中国・四国・九州地方に広がり、最大で60万ヘクタールを超える大きな被害がもたらされた³⁴⁾。1972年以降被害面積は一時的に減少に転じたが、稚苗機械移植栽培が普及した1970年代後半には再び被害は拡大した。この被害を食い止めるため1970年代に縞葉枯病抵抗性品種の開発が進められ、その普及とともに被害面積は減少に転じていった。最近ではヒメトビウンカの保毒虫率(ウイルスを持つ虫の割合)が低位で安定しており、それほど大きな被害は見られなくなっている。しかし、イネ縞葉枯病は発生面積の年次変動が激しい病気であることが知られており、今後とも十分に注意すべき重要な病害となっている。また、中国ではこのところ縞葉枯病の被害が拡大しており、特に黄海沿岸地域の江蘇省において大面積に被害が拡大している状況が報告されている³⁷⁾。日本ではこれまで海外から飛来したヒメトビウンカによって縞葉枯病が引き起こされた例は確認されていないが、東シナ海洋上においてはセジロウンカ、トビイロウンカに次いでヒメトビウンカが多数捕獲されており^{10, 32)}、日本まで飛来する可能性は高い。九州地方では過去に被害が発生していなかった地域に突発的・局所的な被害が起こった事例があり³⁶⁾、これは飛来したヒメトビウンカによって縞葉枯病が引き起こされたのではないかと推察されている。

「コシヒカリ」、「日本晴」などの代表的な日本水稲はすべてこの病気に感受性である。Washio ら⁴⁵⁾は1960年代にこの病気に対する抵抗性(ウイルス抵抗性)を持つ遺伝子源の探索を行い、日本陸稲および外国水稲品種に多くの抵抗性品種が存在することを明らかにした。これらの抵抗性を示した品種については遺伝解析が行われ、インド型品種が持つ抵抗性遺伝子 $St2^i$ (後の $Stvb-i$)と日本陸稲が持つ抵抗性遺伝子 $St1$ および $St2$ (後の $Stva$ と $Stvb$)が同定されている^{46, 47)}。抵抗性品種の開発はこれらの遺伝資源を用いて開始され、インド型品種である「Modan」が持つ抵抗性遺伝子 $Stvb-i$ を「水稲農林8号」に戻し交雑によって導入した「St. No.1」および「中国31号」が中国農業試験場(現在の近畿中国四国農業

研究センター)において育成された⁴³⁾。これらの抵抗性系統を中間母本とする抵抗性品種の開発によって「むさしこがね」³⁵⁾、「青い空」²⁰⁾、「月の光」²¹⁾等の実用品種が次々と育成され、抵抗性品種の普及とともに縞葉枯病は次第に沈静化されていった³⁷⁾。そのため、現在栽培されている抵抗性品種のほぼすべてが「St. No.1」または「中国31号」の抵抗性遺伝子 $Stvb-i$ を保有するものとなっている。

縞葉枯病抵抗性品種の育成に大きな役割を果たしている抵抗性遺伝子 $Stvb-i$ は劣性に近い不完全優性とされており、インド型品種の多くはこの抵抗性遺伝子を持つと考えられている^{47, 48)}。作用力は非常に強く、この遺伝子を持つ系統は発病株率が大幅に低下し、感染した場合においても葉身にかすり状の病徴を示す程度で植物の生育そのものは順調に推移する。「Modan」から育成された抵抗性品種を用いた遺伝解析により、 $Stvb-i$ は第11染色体の長腕に座乗していることがHayano-Saitoら⁶⁾によって明らかとなっており、BACライブラリーを用いた抵抗性遺伝子座乗領域の詳細な解析が行われるとともに⁷⁾、遺伝子単離が試みられている。また、抵抗性遺伝子と密接に連鎖するDNAマーカーを用いた選抜システムが構築・特許化されており、実際の水稲育種の選抜にも利用されている⁹⁾。縞葉枯病の検定はウンカの飼育からウイルス保毒虫の選抜、接種から判定に至るまで多大な労力と熟練した技術が必要であるため、このマーカーを用いることにより、選抜効率は飛躍的に向上している。

1970年代に抵抗性品種が開発されてから約30年が経過したが、 $Stvb-i$ に関しては抵抗性が崩壊したという報告は無く、この遺伝子による抵抗性は非常に安定していると考えられる。しかし、グラッシースタント病では新ウイルスの出現によって抵抗性が崩壊した例^{4, 11)}が報告されていることから、縞葉枯病抵抗性品種に対してもこれを侵す新たなウイルスが出現しないとは言い切れない。現在栽培されている抵抗性品種の大部分が「Modan」由来の $Stvb-i$ を持つ状況下において、もし抵抗性が崩壊した場合は大きな被害の発生が予想される。そのため、 $Stvb-i$ 以外の遺伝子を導入した抵抗性品種の開発が必要であるが、積極的な取り組みはこれまでされてこなかった。

すでに述べたように、 $Stvb-i$ 以外の抵抗性遺伝子

としては、陸稲由来の*Stva*と*Stvb*が同定されている⁴⁶⁾。この陸稲由来の抵抗性遺伝子についても中国農業試験場において水稻系統への導入が図られたが、*Stva*と*Stvb*は優性の補足遺伝子であり、抵抗性の発現には2つの遺伝子が必要であるために選抜効率が悪く、いくつかの抵抗性水稻系統が作出されただけであった。しかも、これらの抵抗性水稻系統は品質や食味の低下など、抵抗性遺伝子に付随する陸稲の不良形質が導入されていたため、陸稲由来の抵抗性を持つ品種の育成には結びつかなかった。

インド型品種由来および陸稲由来の縞葉枯病抵抗性が見出されてから約40年が経過した。この間、抵抗性遺伝子の探索は栽培水稻について行われ、「関東P L 2号」および「関東P L 3号」¹⁴⁾、インド型品種「IR50」³⁰⁾が有する縞葉枯病抵抗性についての遺伝解析が試みられたが、明確な作用力を持つ新規の抵抗性遺伝子を同定したという報告はない。そのため、新たな抵抗性遺伝子の探索には、野生種を含めたより広範な遺伝資源について調査を行う必要があると考えられた。イネ属野生種は熱帯地域を中心に東南アジア、アフリカやオーストラリア地域など世界に広く分布し、さまざまな環境条件に適した多くの種が分化している。ゲノム種においても栽培種 *Oryza sativa* L. (2n=24, AA) と同じAゲノムを持つ近縁野生種から、B, C, D, E, FおよびKに分類されるゲノムを持つ野生種があり、また、倍数性においても2倍体だけではなくBBCCやCCDDといった異質4倍体野生種も存在する。このような多様な遺伝的・生態的特性を持つ野生種は、有用遺伝子の供給源として重要であり、世界的な規模で収集と保存が進められている。病虫害抵抗性に関して、野生種の抵抗性遺伝子を栽培水稻に導入する試みが古くから行われており、縞葉枯病抵抗性に関しても同様の試みを行うべきと考えた。

Aゲノム野生種は栽培種との交雑が可能であり、雑種不稔などの生殖的隔離が見られるものの通常の交雑育種法で形質を栽培種に導入することが可能であるため、白葉枯病抵抗性などに関しては野生種が持つ抵抗性遺伝子が栽培水稻へ導入された例が報告されている^{12, 18)}。病虫害抵抗性以外にも最近ではAゲノム野生種に収量性を向上させる量的形質遺伝子座 (QTL: Quantitative Trait Loci) が存在すること

が報告されており⁴⁹⁾、野生種にはその外見からは想像できないような遺伝的変異を含むことが明らかとなった。また、1980年代後半から国際イネ研究所 (IRRI) において開発されたAゲノム以外の野生種と栽培種との交雑法は、異なるゲノム種が持つ有用遺伝子の利用を可能とした²⁸⁾。Ishiiら¹⁵⁾はこの方法を用いてEゲノム野生種である *O. australiensis* の断片を導入した系統から新たなトビイロウンカ抵抗性遺伝子を同定しており、戻し交雑育種法と胚培養法を用いることで異種ゲノム野生種でも栽培種の育種に利用できることが明らかとなった。このような新たな野生種の利用法の開発により、新規のイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子探索の条件は整ったと考えられる。

本研究では、現在栽培されているイネ縞葉枯病抵抗性品種のほぼすべてに導入されている*Stvb-i*以外の新たな抵抗性遺伝子を同定し、これを抵抗性育種に導入、利用することを目的とした。第一に、日本陸稲由来の縞葉枯病抵抗性遺伝子*Stva*と*Stvb*について遺伝解析を行い、その座乗染色体を明らかにするとともに、これらの陸稲由来の抵抗性遺伝子に関するDNAマーカー選抜システムを構築し、育種効率の向上と陸稲形質の除去を試みた。第二として、陸稲由来の抵抗性遺伝子を水稻品種「コシヒカリ」に導入した準同質遺伝子系統を作出し、これを用いて抵抗性遺伝子が持つ作用機構を明らかにするとともに、それらの抵抗性育種への適用を試みた。最後に、これまでに報告されていない新規の縞葉枯病抵抗性遺伝子を探索するため、イネのAゲノム野生種である *O. rufipogon* およびCゲノム野生種である *O. officinalis* が持つ縞葉枯病抵抗性遺伝子に関して解析を試みた。

以上のように、本研究はイネ縞葉枯病抵抗性に関して新たな抵抗性遺伝子を育種に利用することを目的として行ったもので、陸稲由来縞葉枯病抵抗性遺伝子の座乗染色体の同定、抵抗性遺伝子の効果の違い、抵抗性遺伝子の「コシヒカリ」への導入と育成した準同質遺伝子系統の評価、イネ野生種を用いた新規縞葉枯病抵抗性の探索など、基礎から実際の品種育成までを含んだ総合的かつ包括的な研究である。

II 日本陸稲由来の縞葉枯病抵抗性に関するQTL解析

1 諸 言

Washioら⁴⁶⁾は、日本陸稲由来の縞葉枯病抵抗性は2対の優性補足遺伝子 $Stva$ と $Stvb$ の作用によって発現すると推定した。これら2つの遺伝子のうち、 $Stvb$ はインド型品種由来の抵抗性遺伝子 $Stvb-i$ と複対立の関係にあることが報告されている⁴⁸⁾。Andoら²⁾は陸稲由来の縞葉枯病抵抗性に関する遺伝解析を行った結果、第11染色体に抵抗性と有意な相関を持つRFLPマーカーが存在することを報告している。また、Hayano-Saitoら⁶⁾は $Stvb-i$ が第11染色体の長腕に座乗していることを明らかにしている。これらのことから $Stvb$ は第11染色体長腕にあると推察される。一方、 $Stva$ は感光性遺伝子 $Se1$ およびモチ性遺伝子 wx と連鎖関係にあることから、 $Stva$ は第6染色体に座乗していると報告されている⁴⁷⁾。しかし、 $Stva$ および $Stvb$ の正確な座乗位置に関する解析はこれまで行われておらず、このことが陸稲由来の縞葉枯病抵抗性遺伝子を育種に用いる際の妨げとなっていた。そのため、QTL解析を行って抵抗性遺伝子が座乗している染色体領域の同定を試みた。

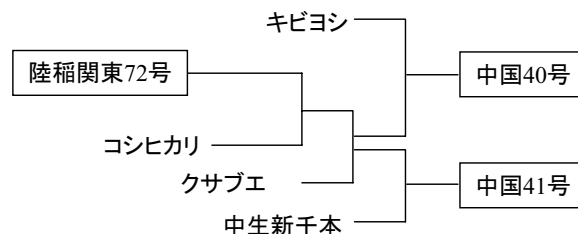
2 グラフィカルジェノタイプによる座乗領域の推定

鷲尾ら⁴⁸⁾は「陸稲関東72号」に水稻品種を交雑し、日本陸稲由来の抵抗性を導入した3つの水稻系統「中国40号」、「中国41号」および「中国42号」を選抜した。これらの抵抗性系統は染色体の大部分が日本水稻型となり、抵抗性遺伝子が座乗している領域が「陸稲関東72号」の染色体領域のまま残されていると考えられる。1990年代になってRFLPマーカーによる高密度連鎖地図が構築され^{5, 40)}、染色体の内部構成の解析が可能となった。そこで、これらを用いて陸稲由来の抵抗性遺伝子を持つ系統の染色体を解析することにより、これらの系統に導入された抵抗性遺伝子の座乗領域を推定できると考えられる。ここでは、抵抗性系統のグラフィカルジェノタイプを明らかにし、抵抗性遺伝子が座乗する染色体領域の推定を行った。

1) 材 料

縞葉枯病抵抗性系統として、日本陸稲「陸稲関東72号」に由来する「中国40号」と「中国41号」を用いた。これらの系統の育成系譜を第1図に示す。また、抵抗性系統の育成に用いられた感受性水稻品種「コシヒカリ」、「クサブエ」、「中生新千本」および「キビヨシ」も解析に供試した。

グラフィカルジェノタイプの作製には、イネゲノムプロジェクトにおいて作製された連鎖地図^{5, 22)}から12本の染色体に偏りなく配置されるように選ばれた328種のRFLPマーカーを供試した。また、Temnykhら⁴²⁾によって構築されたSSRマーカー連鎖地図上の221種のSSRマーカーについても解析を行った。



第1図 陸稲由来縞葉枯病抵抗性遺伝子が導入された水稻系統の育成系譜
□は抵抗性系統を示す。

2) 方 法

(1) ゲノムDNAの抽出

ゲノムDNAの抽出はMurray and Thompson²⁹⁾のCTAB法を一部改変した方法で行った。液体窒素中で凍結・粉碎した5gのイネの生葉に沸騰直前まで加熱したCTAB溶液(15% Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 75 mM Tris-Cl pH8.0, 15 mM EDTA pH8.0, 1.05 M NaCl)を15ml加えて混和し、55℃に設定した恒温槽で15分間加温した。クロロホルム・イソアミルアルコール溶液を15ml加えて15分間室温にて振とうした後、10分間遠心分離を行った。分離した上層の溶液を新しい50mlチューブに移し、1/10容量の10%CTAB溶液を加えてゆっくりと混和した。等容の沈殿バッファーをチューブに添加してゆっくりと攪拌し、DNAが析出するまで室温にて静置した。チューブを7分間遠心分離機にかけて上澄みの溶液を取り除き、沈殿したDNAに10mlの1

M NaCl-TE溶液とRNase溶液を加えて沈殿が完全に溶解するまで55℃の恒温器で加温した。イソプロパノールを10ml加えて再度析出したDNAを遠心分離機にかけて回収し、500 μ lのTE溶液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA) に溶解した。DNA溶液は一部を希釈し、0.8%アガロースゲルで電気泳動した後にエチジウムブロマイド (EtBr) で染色し、濃度を測定した。

(2) RFLP分析

抽出したDNA (3-5 μ g/レーン) を10種類の制限酵素 (*Apa*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*Iおよび*Xba*I) で消化した。0.8%アガロースで約12時間電気泳動した後にエチジウムブロマイド溶液で染色し、DNAが完全に消化されていることを確認した。ゲルを0.25Nの塩酸溶液に10分間、その後アルカリ溶液 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) に30分間浸漬した。処理後のゲル内のDNAはキャピラリーブロッティング法によりナイロンメンブレン (Hybond N+, Amersham) に転写した。転写後のメンブレンは2 $\times$ S S Cで軽く洗浄してゲルの断片などを取り除き、UV照射を行ってDNAをメンブレンに固定した。

プローブDNAの標識およびサザンハイブリダイゼーションはECLダイレクタベリング検出システム (Amersham Pharmacia 社) を用い、そのプロトコルに準じて行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、42℃の恒温器内で洗浄バッファー (0.4% SDS, 0.5 $\times$ SSC, 6 M Urea) を用いて20分間2回洗浄し、続いて2 $\times$ S S Cでメンブレンを5分間軽く洗浄した。検出試薬を処理したメンブレンをラップに包み、X線フィルムで約1時間露光した。

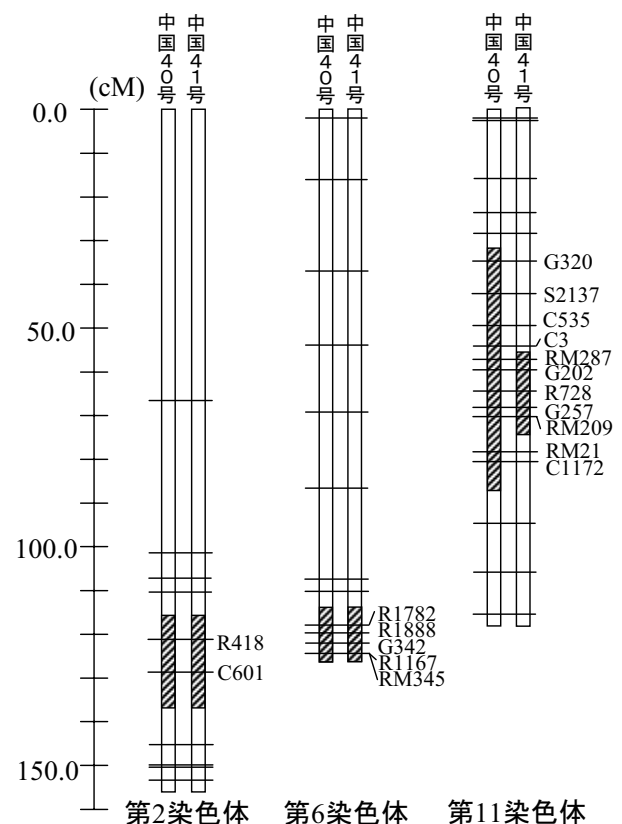
(3) S S R分析

PCRは20 μ lの反応液 (DNA 10 ng, 1 pmol プライマー, 0.4 unit *Taq* polymerase) を用いて行った。増幅反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer社) を用いて95℃ 1分, 55℃ 1分, 72℃ 1分の設定で35サイクル行い、続いて最終伸長を72℃で5分間行った。PCR増幅産物はジェノケンサーSSCP AE-6160N (アトー社) を用いて4%アクリルアミドゲル電気泳動を行った後、

Panaudら³³⁾ の手順に従って銀染色法によりDNAバンドを可視化した。

3) 結果および考察

「コシヒカリ」と「陸稲関東72号」との間で多型を示すマーカーを調査した結果、76種のRFLPマーカーと38種のSSRマーカーで多型が得られた。これらのマーカーを用いて縞葉枯病抵抗性系統「中国40号」と「中国41号」および系譜上の感受性水稻品種である「コシヒカリ」、「クサブエ」、「中生新千本」および「キビヨシ」について解析を行った結果、「中国40号」と「中国41号」には第2、第6および第11染色体のいずれも長腕に「陸稲関東72号」の染色体領域が導入されていることが明らかとなった (第2図)。このように、抵抗性遺伝子*Stvb*が座乗していると推測される第11染色体長腕領域には、「中国40号」、「中国41号」共に「陸稲関東72号」由来の染色体領域が見いだされたが、「中国40号」にはRFLPマーカーG320からC1172までの長い領域が導入されていたのに対し、「中国41号」ではSSRマ



第2図 抵抗性水稻系統のグラフィカルジェノタイプ
斜線部は「陸稲関東72号」に由来する染色体領域を示す。

ーカーRM209からRM287までの短い領域が導入されていることが明らかとなった。Andoら²⁾が陸稲品種「戦捷」を用いた解析において、第11染色体長腕のRFLPマーカーが縞葉枯病抵抗性と有意に関係していることを報告していることから、抵抗性遺伝子 $Stvb$ は「陸稲関東72号」由来の染色体領域が「中国40号」と「中国41号」に共通して導入されている、第11染色体のSSRマーカーRM209からRM287までの領域に座乗しているものと推察された。

$Stva$ が座乗していると考えられた第6染色体領域は、「中国40号」、「中国41号」共に長腕側の末端領域に「陸稲関東72号」由来の染色体領域が見いだされた。このことは、 $Stva$ がこの領域に座乗していることを示唆している。しかし、これまでに抵抗性遺伝子が座乗しているとの報告がない第2染色体領域にも「陸稲関東72号」由来の染色体領域が導入されていることが明らかとなったため、さらに詳細な遺伝解析を行って抵抗性遺伝子の座乗領域を推定する必要があると考えられた。

3 縞葉枯病抵抗性に関するQTL解析

抵抗性系統「中国40号」と「中国41号」の第2、第6および第11染色体に導入されていた「陸稲関東72号」由来の染色体領域のうち、どの領域に抵抗性遺伝子が座乗しているのかを明らかにするため、解析を行った。「陸稲関東72号」は、抵抗性系統「中国40号」と「中国41号」に導入された抵抗性遺伝子以外にも縞葉枯病抵抗性遺伝子を持つ可能性が考えられるため、全染色体を対象としたQTL解析を行った。

1) 材 料

抵抗性系統として日本陸稲である「陸稲関東72号」を、感受性の比較品種として「日本晴」を用いた。「日本晴」と「陸稲関東72号」を交雑した F_2 120個体を作出し、各 F_2 個体から自殖 F_3 種子を得た。DNAの抽出と縞葉枯病抵抗性検定には、採種した自殖 F_3 種子を供試した。

QTL解析には前述した328種のRFLPマーカーおよび221種のSSRマーカーを用いて解析を行った。

2) 方 法

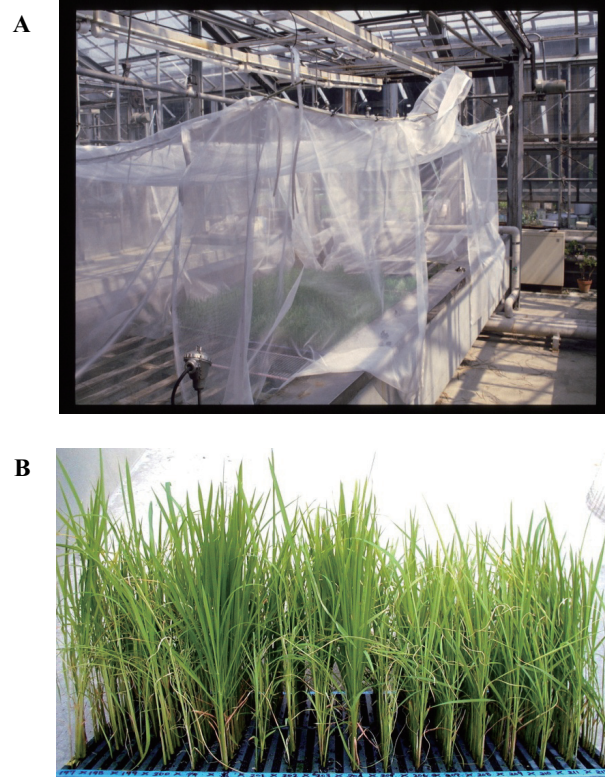
(1) ゲノムDNAの抽出とマーカー解析

「日本晴」、「陸稲関東72号」およびそれらを交雑して得た F_3 系統のDNAは、前述したCTAB改変法により抽出した。 F_3 系統のDNAは、1系統あたり30個体の幼苗から各個体が均等量になるように葉を採取して抽出し、マーカー解析を行って各 F_2 個体の遺伝子型を解析した。RFLP分析およびSSRマーカー解析に関しても前述した方法を用いた。

(2) 縞葉枯病抵抗性検定

a 網室検定法

網室検定法はNemotoら³⁰⁾の方法に準じて行った。苗箱に「日本晴」、「陸稲関東72号」および120個体の F_2 個体に由来する F_3 種子をそれぞれ1系統あたり20粒ずつ条播した。苗箱あたり30系統を播種して1.5葉期まで育苗した後、網室内に苗箱を移して縞葉枯病ウイルスを保毒しているヒメトビウンカの幼虫を3日間放飼した。ヒメトビウンカの偏りをなくするため、1日に1度苗からウンカを払い落とし、各系統



第3図 網室検定法による縞葉枯病検定

(A) は接種を行った網室

(B) は接種から3週間後の苗箱

に均等にウンカが行き渡るようにした。ウンカを取り除いた苗は病徴が確認できるまで温室内で3週間程度育苗した(第3図)。縞葉枯病の発病程度は、全個体中に発病している苗の割合(発病株率%)で評価した。測定は2反復で行い、発病株率の平均値を解析に用いた。比較品種の「日本晴」と「陸稲関東72号」は20列おきに配置し、合計20反復で測定した。

b 幼苗検定法

鷺尾ら⁴⁸⁾の方法に準じて検定を行った。粒状培土を詰めた9 cmシャーレに種子を1系統30粒播種し、1.5葉期まで育苗した。シャーレにガラス円筒をかぶせてガーゼで上を覆い、縞葉枯病ウイルスを保有しているヒメトビウンカの幼虫を1系統あたり約200頭放飼した。48時間後にヒメトビウンカの幼虫を取り除き、苗を30×40cmのプラスチックバットに移植して、そのまま約3週間生育させた後に発病程度の調査を行った(第4図)。

縞葉枯病発病程度は次のようにして評価した。まず、鷺尾ら⁴⁸⁾の分類に準じて病徴型をA(枯死)からD(軽微な病徴)までの6段階に分類し(第5図)、各病徴型を示す個体数を調査した。次いで、次式によって発病指数を算出した。

$$\text{発病指数} = \frac{(100 \times \text{A苗数} + 80 \times \text{B苗数} + 60 \times \text{Bt苗数} + 40 \times \text{Cr苗数} + 20 \times \text{C苗数} + 5 \times \text{D苗数})}{\text{供試個体数}}$$

各品種系統の発病指数から、感受性比較品種「杜稻」の発病指数を100としたときの発病指数比を求め、これを解析に用いた。F₃系統および感受性比較品種



第4図 幼苗検定法による縞葉枯病検定
左は抵抗性系統「陸稲関東72号」、右は感受性品種「コシヒカリ」。



第5図 幼苗検定法における病徴型の分類(鷺尾ら 1968c)
不連続な黒点は退緑病斑を、黒塗り部分は連続的退緑病斑を表す。

鷺尾ら(1968c)による分類では、Aは生育が著しく不良で、病葉の全部または一部が枯死したもの、Bは生育は著しく不良であるが、病葉が枯死しないもの、BtはBと同様であるが生育がやや良好なもの、Cは生育が良好で、病斑は淡黄色散点状、時に条斑状で、健全部との境界が明瞭なもの、CrはCと同様であるが病葉が多少捲葉するもの、または生育がやや不良のもの、Dは生育はきわめて良好で、病徴は苗の生育につれてマスクされるものとされている。

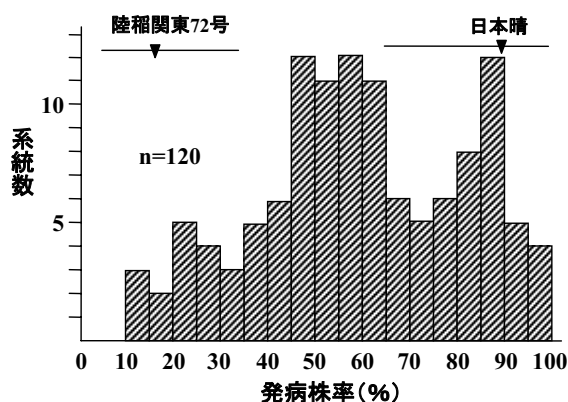
「杜稻」の調査は2反復で行い、比較品種の「日本晴」と「陸稲関東72号」は各6反復で行った。

(3) QTL解析

RFLP分析およびSSR分析によって得られた各マーカーのF₂分離データを基に、連鎖地図を構築した。連鎖地図の構築にはソフトウェアMAPMAKER/EXT 3.0²³⁾を用いた。縞葉枯病抵抗性に関与する領域を特定するため、F₃系統群の縞葉枯病抵抗性検定結果を基にQTL解析を行った。QTL解析にはソフトウェアMAPMAKER/QTL 1.1²⁵⁾を用い、LOD値が30以上のを示した領域にQTLが存在するとした。

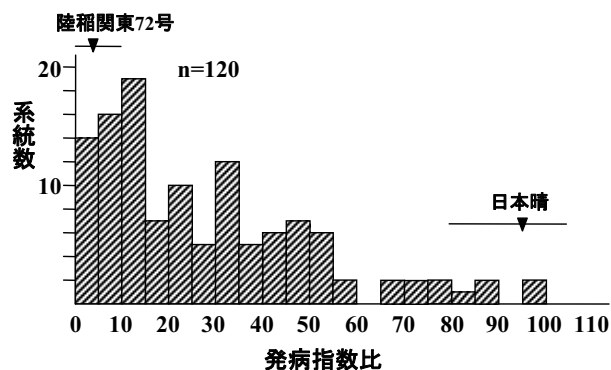
3) 結果および考察

F₃系統群120系統の網室検定法での発病株率の分布を第6図に示した。感受性品種である「日本晴」の発病株率は66%から100%の分布を示し、平均発病株率は88%であった。抵抗性系統である「陸稲関東72号」の平均発病株率は18%であり、5%から35%の分布を示した。各F₃系統群は11%から100%までの連続分布を示した。

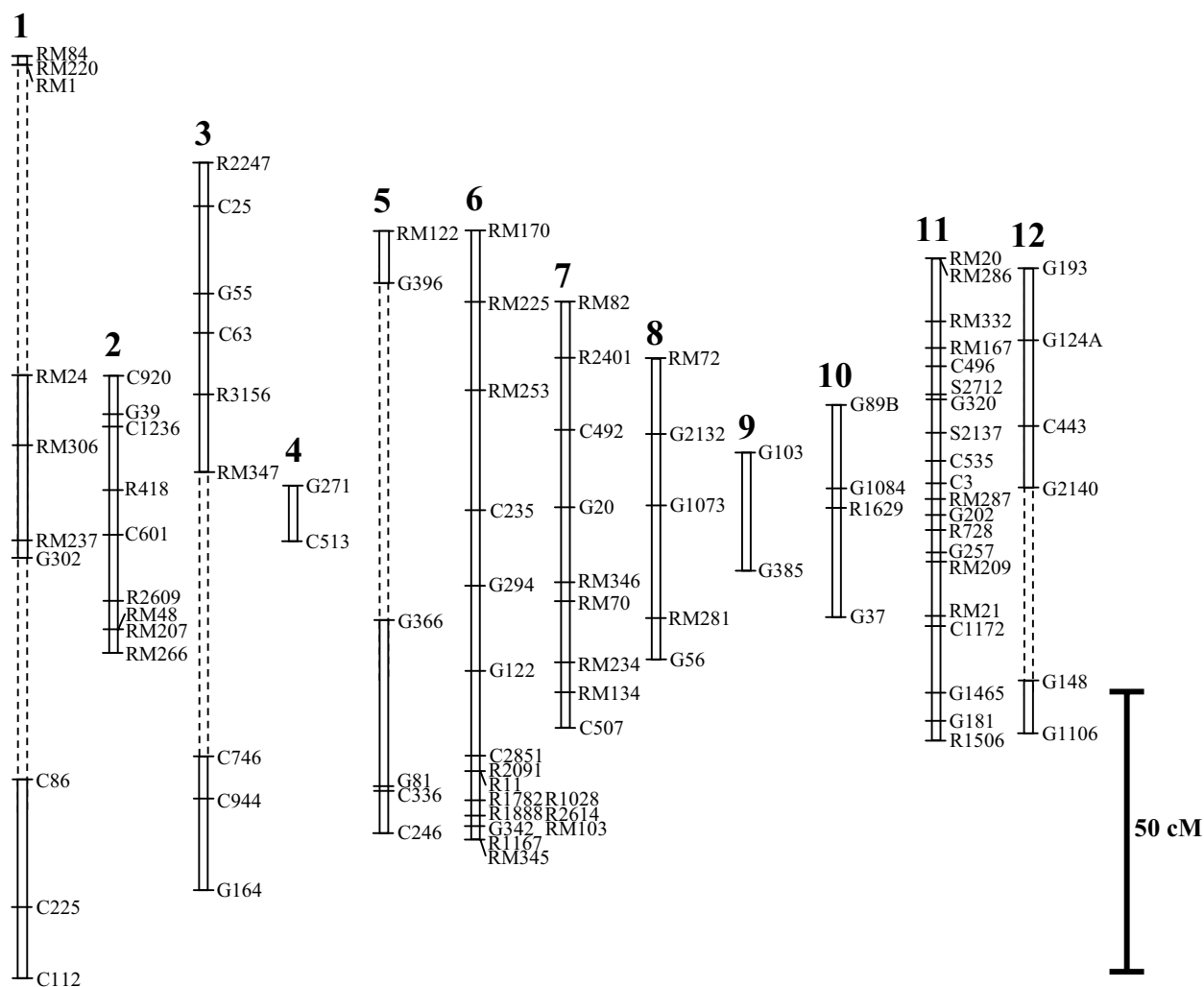


第6図 「日本晴」／「陸稲関東72号」 F₃系統群の網室検定法による発病株率の分布

▼は親系統の平均値を，— は分布の範囲を示す（以下の図においても同様）。



第7図 「日本晴」／「陸稲関東72号」 F₃系統群の幼苗検定法による発病指数比の分布



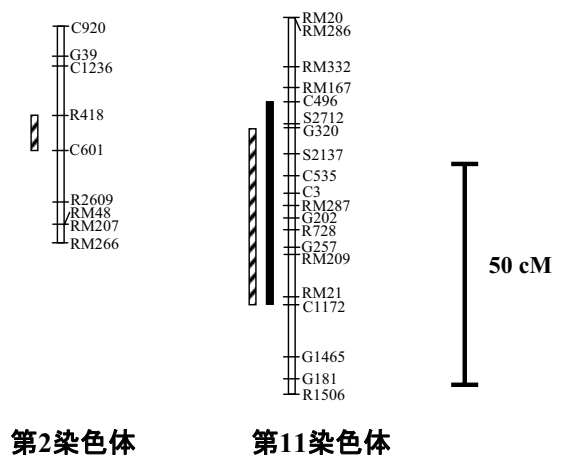
第8図 「日本晴」／「陸稲関東72号」 F₃系統群を用いて構築した連鎖地図

F₃系統群120系統の幼苗検定法での発病指数比の分布を第7図に示した。感受性品種である「日本晴」の発病指数比は80.3から105.0の分布を示し、平均発病指数比は96.4であった。抵抗性系統である「陸稲関東72号」の平均発病指数比は4.3であり、1.8から8.5の分布を示した。F₃系統群の発病指数比は0.0から98.3までの連続分布を示した。

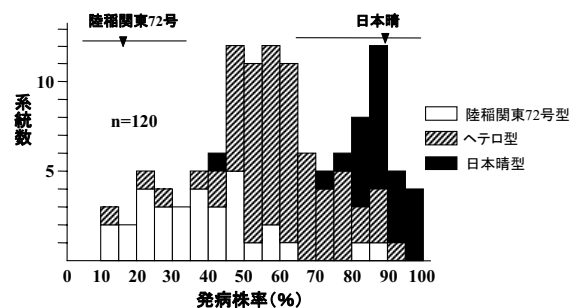
「日本晴」と「陸稲関東72号」との間で多型を示すマーカーを解析した結果、328種のRFLPマーカーのうち、76種(23%)のRFLPマーカーが多型を示した。221種のSSRマーカーの解析では38種(17%)のマーカーが多型を示した。両親間で多型を示したRFLPマーカーおよびSSRマーカーを用いてF₃系統群120系統の分離データから連鎖地図をMAPMAKER/EXPを用いて構築した結果、17連鎖群、715.3cMからなる連鎖地図を構築することができた(第8図)。

構築された連鎖地図情報と網室検定法で得られたF₃系統の発病株率を基にMAPMAKER/QTLを用いてQTL解析を行った結果、第11染色体にQTLが検出された(第9図)。このQTLは第11染色体の長腕に座乗するRFLPマーカーG257とR728の間にLOD値のピークが検出され、LOD値19.1で寄与率は64.1%と非常に強い作用力を示した。F₃系統群120系統を、QTLに最も近いRFLPマーカーG257の遺伝子型を基に色分けした発病株率の分布を第10図に示した。その結果、G257領域が「日本晴」型になった系統、ヘテロ型の系統、「陸稲関東72号」型の系統が3つのグループを形成するように分布し、G257近傍に検出されたQTLは非常に強い作用を持つことが示された。しかし、G257領域が「陸稲関東72号」型となった系統の分布は抵抗性親である「陸稲関東72号」の分布とは完全に一致しておらず、第11染色体以外にも縞葉枯病抵抗性に関与する領域の存在が示唆された。

次に、幼苗検定法で得られたF₃系統の発病指数比と連鎖地図情報を基にQTL解析を行った。その結果、第2染色体と第11染色体にLOD値が3.0を超える領域が検出された(第9図)。第11染色体に検出されたQTLは長腕に位置するRFLPマーカーG257とR728の間にLOD値のピークが検出されており、網室検定法における発病株率を用いたQTL解析と



第9図 「日本晴」／「陸稲関東72号」 F₃系統群で検出された縞葉枯病抵抗性に関するQTL LOD値3.0以上の領域を示した。



第10図 コシヒカリ／陸稲関東72号 F₃系統群の発病株率の分布とRFLPマーカーG257の遺伝子型による分類

同じ結果が得られた。幼苗検定法によって第11染色体に検出されたQTLはLOD値が11.3、寄与率が35.7%であり、網室検定法で得られた結果よりも作用力がやや弱いことが推察された。第2染色体に検出されたQTLはRFLPマーカーC601とR418の間に検出され、LOD値は6.6、寄与率は22.5%であった。

4 検出された2つのQTLの効果に関する遺伝解析

第2および第11染色体に検出されたQTLの効果を確認するため、それぞれのQTLを詳細に解析する必要があると考えられた。特に第2染色体に検出されたQTLは網室検定での発病株率を基にした解

析では検出されず、幼苗検定法による解析で作用力の小さなQTLとして検出されており、このQTLの存在を再確認すべきであると思われた。そのため、第2染色体と第11染色体のQTL領域について個別に解析する集団を作出し、詳細な解析を行った。

1) 材料および方法

QTL解析に用いた「日本晴」／「陸稲関東72号」F₂ 120個体から2つの個体(NR8およびNR23)を選抜した。NR8は第2染色体のQTL領域が「陸稲関東72号」ホモ型で、第11染色体のQTL領域がヘテロ型、NR23は第2染色体のQTL領域がヘテロ型、第11染色体のQTL領域が「陸稲関東72号」ホモ型であった。NR8およびNR23ともに第6染色体は「日本晴」型に完全に置換されていた。NR8およびNR23は自殖種子を収穫して栽培し、それぞれ99個体、96個体からなるF₃集団を作出した。これら2つの集団を用いてQTLが検出された第2と第11染色体について個別にQTL解析を行った。

「日本晴」、「陸稲関東72号」およびF₃集団のDNAは、前述したCTAB改変法により抽出した。DNAはF₃個体の自殖種子を播種したF₄ 30個体の幼苗から各個体が均等量になるように葉を採取して抽出を行い、F₃個体の遺伝子型を決定した。RFLP分析およびSSR分析に関しても前述の方法を用いて行った。「日本晴」、「陸稲関東72号」およびF₄系統の縞葉枯病抵抗性の検定は幼苗検定法を用いた。各解析集団は2反復で検定を行い、感受性の比較品種「杜稲」との発病指数比の平均をQTL解析のデータとして用いた。

第11染色体領域に関しては、この領域に座乗する4種のRFLPマーカーと3種のSSRマーカーを用いて解析を行った。第2染色体領域に関しては、解析に使用できるマーカーが2種のRFLPマーカー(C601とR418)のみであったため、新たにSSRマーカーを作出した。イネゲノムプロジェクト(URL: <http://rgp.dna.affrc.go.jp/>)によって解読された第2染色体の塩基配列情報から、2塩基(AC, AG, AT, CG, CT, GT)および3塩基(ACC, AGG, CCG, CGG, CTT, TGG)が5回以上繰り返している配列を見だし、これを挟み込むようにプライマーを設計した。RFLPマーカーC601および

R418が座乗する領域に偏りなく配置されるように40種類のSSRマーカーを設計し、それぞれMS-1からMS-40として解析に供試した(第1表)。RFLP分析およびSSR分析によって得られた各マーカーのF₂分離データを基に、ソフトウェアMAPMAKER/EXT 3.0²³⁾を用いて連鎖地図を構築した。QTL解析にはソフトウェアMAPMAKER/QTL 1.1²⁵⁾を用い、LOD値が3.0以上の領域を解析した。

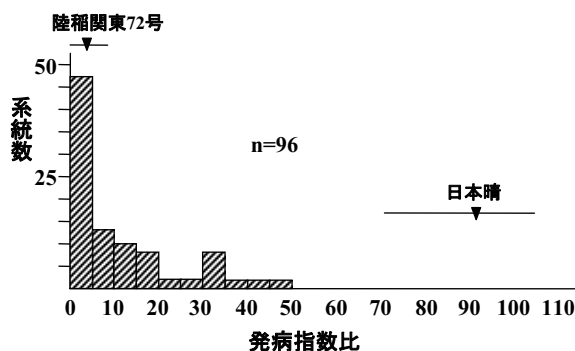
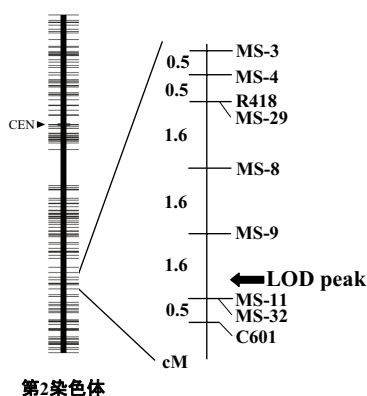
2) 結果および考察

NR23の自殖F₃集団における幼苗検定での発病指数比の分布を第11図に示した。この集団では、発病指数比は抵抗性側に大きく偏った分布を示した。NR23は第11染色体のQTL領域が「陸稲関東72号」ホモ型であるため、発病指数比の偏りはこのQTLの効果によるものと考えられた。この結果から、第11染色体のQTLは単独でも作用力を持つ可能性が示唆された。第2染色体のQTL領域に新たに設計したSSRマーカーMS-1からMS-40について分析を行った結果、「日本晴」と「陸稲関東72号」との間で多型を示す7種のマーカー(MS-3, -4, -8, -9, -11, -29および-32)が得られた。NR23の解析集団を用いて構築された連鎖地図においてはこれらの7種のSSRマーカーはRFLPマーカーC601およびR418の近傍に位置づけられた(第12図)。構築された連鎖地図と幼苗検定法で得られた発病指数比を基にQTL解析を行った結果、SSRマーカーMS-9とMS-11の間にLOD値11.8、寄与率43.1%のQTLが検出された(第12図)。LOD値のピークと最も密接に連鎖するSSRマーカーMS-11の遺伝子型によりNR23の自殖F₃集団を分類し、それぞれの発病指数比の分布を調査した結果、第13図のような分布を示した。MS-11が「陸稲関東72号」型となった系統は非常に強い抵抗性を示し、「陸稲関東72号」と同じ分布となった。MS-11がヘテロ型と「日本晴」型となった系統の発病指数比の分布はやや感受性側に広がる形となり、第2染色体に縞葉枯病抵抗性に関与するQTLの存在が確認できた。

NR8の自殖F₃集団における幼苗検定での発病指数比の分布を第14図に示した。この集団においても発病指数比の分布は大きく抵抗性側に偏る結果となった。この集団については4種のRFLPマーカーと3

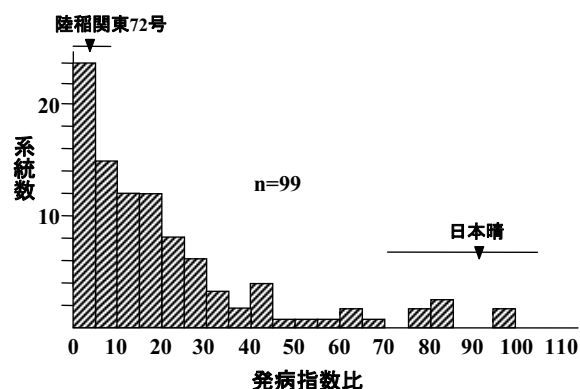
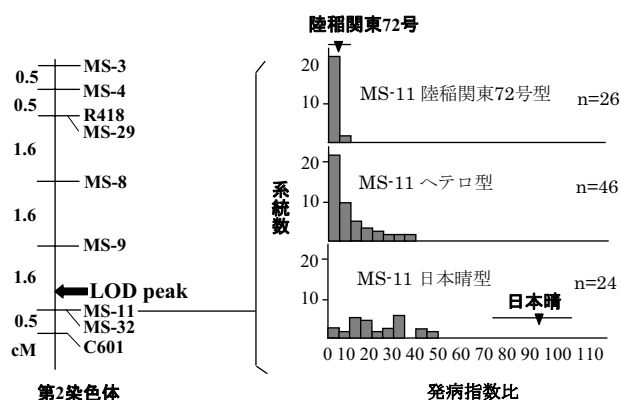
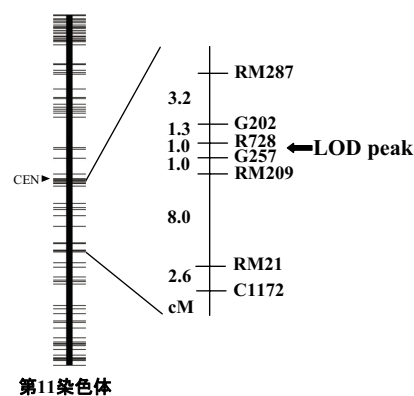
第1表 第2染色体長腕領域に設計したS S Rマーカーとプライマーの配列

マーカー名	モチーフ	プライマー配列	
		forwArd	reverse
MS-1	AT36	TATATTAATGAATCTAGACGC	ACTAATACTTCCTCCGTTT
MS-2	AT34	CAACGAACAAACCATGCAC	CGGTAAGTTCAGACAATAAGG
MS-3	AG22	TCGACATCTTCAGAAAGCATGG	GGTCTCAAGCAATATTCTAGAGGAC
MS-4	AG25	GAGCGCGCCTTCTCGTGTC	ACGCCGCGGTCTTTAGTAATG
MS-5	GTG11	GATGATTGTTTCGGATAATTGC	TGCGACTTCCTTCACTACCCT
MS-6	CT11+AT13	TGTTTCGGGGAGAAAAGAATAGTC	AATTTTGGGCGAATGTAGC
MS-7	AT33	CAGGTGTGTATCTCGGTATCCAG	AATTGTCACCGTAGCGTTAGC
MS-8	TA27	CCCCTGCTAACAAATTTGACTTCAC	AGCACTTGTACAGGCAATGACT
MS-9	AG24	CACAACACGAATTAGCTAGTACC	TTGATGCAGTGTACGAGACAAAG
MS-10	AT36	GGCACCATGGAGACCAAAC	GAGCCATCAGTGATGAGACCGTG
MS-11	CT18	CCGCTCCAACTCTCCTAAAC	AGCTCGCTGCCCATTGTTAC
MS-12	AT17	CCTGGTTACTGAAATAACTAACG	ACTTGAAGTGTGATTTATGCC
MS-13	AT37	TGGTGTCTAAAGATCGAG	ATTATGCATGTATATGTTTG
MS-14	AT29	ATCTATATACATATGCATTTG	GGACTAAAGATAGAGCTGACC
MS-15	AG13	TTCCCCGCGGCCAGTTG	GAGGCCCAGCATTAAAACGAGC
MS-16	CT20	GCGTTGATCAATGGCGTACTTTC	ACAACCTCTCAAACCGGCACGTC
MS-17	AT40	TCATACCTTAACAGTACTAGGC	ATACTCAATTTCAACAATGGTG
MS-18	AT48	TGTGCATTAGATACCATGTTG	ACGGACAAATTTATAGTGAC
MS-19	AT36	GCCAAAAAGAGAACTTTAGAC	TGTTGTGTACCCATTAAATTGAC
MS-20	AT28	GAATGAACGTGAACGAGCTAGGG	CTCCGACAACACGTCTTTTCTGC
MS-21	AT13	CGGGTCAAATACGTTAGAATG	ACAAGGGGGTAGGTAGAG
MS-22	AT19	ATTAATACTCCCTTCATTTTACG	AAGACTTTCTAGTATTACCCAC
MS-23	AT24	GTCTTACATTATGAAACGGATG	TGGCTTCCAGAACAACTACTG
MS-24	CT13	CCCTCCTTTAATTTGCACCCTC	GGAGAGAGCCTGCAGGGACTGAG
MS-25	CT12	GAGGTCGATGGGCCGAATCTC	GAGCTCGCGGAGAGGAG
MS-26	AG19	AAGACGACGCTACGCTACAGTACAG	CTGCTCTGCTTGCTATGGACACC
MS-27	CGG15	GGAGAGCACGAGAAGAGACCCACTC	GGGAAGAGAGAAGAGACGAAACAGG
MS-28	CG8	CCAGATCCGCGAAGCTCATC	AGGACCACCACCACCTTCGCTACCC
MS-29	AC10	ACCAGGGAGAGAAGGAAAGCGACTC	TCTTGGTGAAATTTGCGTTCTGC
MS-30	CT9+CTT8	TCCGTATTAGAGTAGACTAGCTG	CTTTAAGTAGCTGTTTGTGATGAAC
MS-31	CG8	GCTAAATCTCCTCAAACAACAACGC	ATTTCCACACCTCCAGTACGC
MS-32	CT12	CCCACAGCTCCCTCCCTCTATC	GCTGCTCATCATCTCCGTTCTGC
MS-33	CT14	CTCGAAATCGTATGACTAGGC	AGTTACGTGAATACTGATGATATGC
MS-34	AG11	GGGACCTTACCATTGCTCG	CGCCTCTCCCAGTCTATTGTAG
MS-35	AG+CG4	CAGTGAGCTGCAAGGAAGTAGATAC	GCCGATCCTGACACGACCAAC
MS-36	CT12	TAATTTGCCTCCCCGGGTTT	GAGGGAGGAGGGCTCGACTC
MS-37	CT8	CGATGATGTGGAGGAGACGTG	AGAAAAGCAGCACACTGAATCCTAC
MS-38	AG14	TACAGTTGAGATCGGGATCTAAC	TTGCTATATTTTCGGACGGAG
MS-39	AC8	TAACCGATGTCAGCAGCAGCTAGCG	ATGTGACGGTTGGCTCCATTATAGG
MS-40	CT13	TCGTATCTCGCCGTCGTCTC	GGCGCGGCGGAGTCAT
MS-41	TA9+AC7	GTACATGAAATATAATATCCCACAC	GACGTCGGGGGTGCTTTGACTGACC
MS-42	AG8	GAGGGGGTATTGAATAGTCTTACTC	CCTATGCAAGCGTAATCTATAATTC
MS-43	TCG8	CGGAGGTGGCACGTCTGTGCGGGAAG	GGCGGTAGCGGCAACACGAG
MS-44	GT5+TG5	TTTTATTGGAGTTGGCGAAGTTCAC	CCTTTAGAAAGTTGCCCTAAC
MS-45	CT7+TA7+A	CAGAGGCTTGCTTGCTTTTCGTTTAC	ACCTTCATACTATTGCGTTGACTTG
MS-46	AT17+GC7	ACTTCCTCCACTTTCTAGCATATTG	TGCTAGAGAAGTTATAACAACAAG
MS-47	CA13	AGTATTTTCGTAGTACAACCACAAC	TTTTCAAGTGAATGAGTGATGC
MS-48	CCA6+CG6	CGAGGGCTGCAGCTATTACG	ACACGAGAATTGAATGCACGAC
MS-49	TG10	CCCGGGTTCGTTGGCTTCTTCGCTC	ATTCCAGCAATCACCTGTCTTCGTG
MS-50	CT8+TC6	ATCCATTCTGTCATATAACCTAACC	GTGCTCTGATGAACCGATGGG
MS-51	GA20	ATAACAACCTCTCAAACCGGCACGTC	CTGCGTTGATCAATGGCGTACTTTC
MS-52	AG14	CGAAATAGATATGCAAACCTCGAATC	AACTCGAAATCGTATGACTAGGC
MS-53	CT23	GCTTTTTACTCTACTACCGTTGCTC	CTTCTTTATTCCCTCGCACTGAC

第11図 NR23自殖F₃集団における発病指数比の分布

第12図 第2染色体上のRFLPマーカーR418およびC601付近に構築された連鎖地図と検出されたQTL連鎖地図はNR23の自殖集団におけるRFLPおよびSSRマーカーの分離から構築した。MS-3, 4, 8, 9, 11, 29, 32は新たに作製したSSRマーカー。矢印は検出されたQTLのLOD値のピークの位置を示す。

種のSSRマーカーによって第11染色体の連鎖地図を構築した。この連鎖地図を用いてQTL解析を行った結果、RFLPマーカーG257とR728の間にLOD値18.1、寄与率57.7%のQTLが検出された(第15図)。この集団においてもLOD値のピークと最も密接に連鎖するRFLPマーカーG257の遺伝子型によりNR8の自殖F₃集団を分類し、それぞれの発病指数比の分布を調査した結果、この染色体領域にも強い効果を持つQTLが確認された。ヘテロ型の分布がやや抵抗性側に偏っていることから、第11染色体のQTLは優性効果を持つ可能性が示唆された(第16図)。NR8の自殖F₃集団における網室検定での発病株率の分布を第17図に示した。網室検定によっても第11染色体上のQTLの効果は明確となり、第2および第11染色体の両方のQTLをホモに持つ個体の分布は「陸稲関東72号」と同じ分布を示した。これ

第14図 NR8自殖F₃集団における発病指数比の分布第13図 NR23自殖F₃集団におけるSSRマーカーMS-11の遺伝子型による分類と発病指数の分布

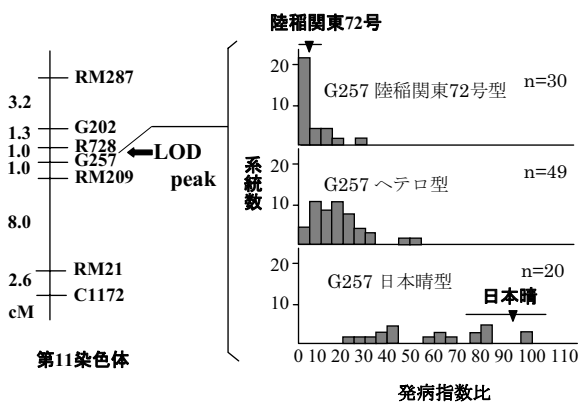
第15図 第11染色体上のRFLPマーカーR728とG257付近に構築された連鎖地図と検出されたQTL連鎖地図はNR8の自殖集団におけるRFLPおよびSSRマーカーの分離から構築した。矢印は検出されたQTLのLOD値のピークの位置を示す。

らの結果から、「陸稲関東72号」の縞葉枯病抵抗性遺伝子は第2染色体と第11染色体の長腕領域にそれぞれ座乗していることが明らかとなった。

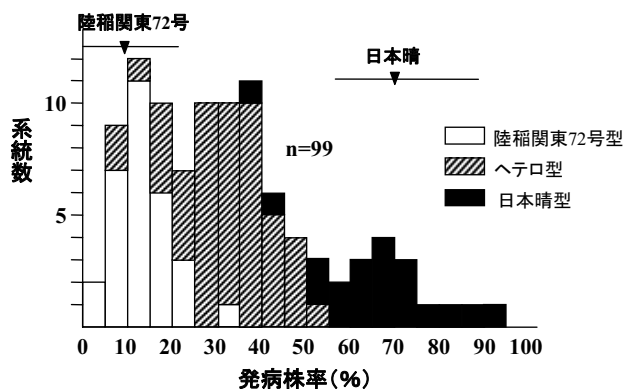
本研究においては、第6染色体には縞葉枯病抵抗性に関与すると思われるいかなるQTLも見いだされなかった。鷺尾ら⁴⁸⁾は、縞葉枯病抵抗性遺伝子 $Stva$ は第6染色体に座乗するモチ性遺伝子 wx と組換え価38%で、また、感光性遺伝子 $Se1$ とは21から44%で連鎖していることを報告した。また、同時に第6染色体に座乗するアントシアン色素源遺伝子 C と $Stva$ は連鎖関係にないと述べている。しかし、その後の遺伝解析結果から第18図に示すように、 C は wx と $Se1$ の間に位置することが明らかとなっているため^{13, 19, 41)}、 $Stva$ が wx および $Se1$ と連鎖関係にあり、かつ C とは連鎖していないとする結果には矛盾があると言える。これらの結果と本研究の結果を合わせて考えると、第6染色体には陸稲の縞葉枯病抵抗性

遺伝子は座乗していないことが示唆される。

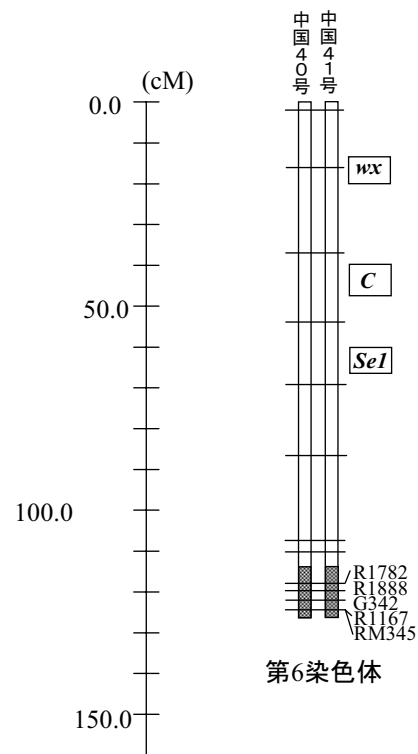
第11染色体に検出されたQTLは非常に作用力が強く、網室検定法および幼苗検定法の両方で安定した効果を示した。インド型品種「Modan」由来の縞葉枯病抵抗性遺伝子 $Stvb-i$ は第11染色体長腕のRFLPマーカーG257と密接に連鎖していることが報告されている⁶⁾。また、陸稲由来抵抗性遺伝子 $Stvb$ は $Stvb-i$ と複対立の関係にあることが報告されている⁴⁸⁾。したがって、本研究において検出された第11染色体のQTLは $Stvb$ を検出したものと考えられる。しかし、第2染色体に検出したQTL領域に関しては、これまでにこの染色体上に縞葉枯病抵抗性遺伝子が座乗しているという報告はなく、 $Stva$ との関係は不明である。第2染色体のQTLは網室検定法における発病株率を基にしたQTL解析では検出されず、幼苗



第16図 NR8自殖F₃集団におけるRFLPマーカーG257の遺伝子型による分類と発病指数の分布



第17図 NR8自殖F₃集団における発病株率の分布とRFLPマーカーG257の遺伝子型による分類



第18図 抵抗性系統「中国40号」、「中国41号」の第6染色体のグラフィカルジェノタイプとマーカー遺伝子の座乗位置

灰色の領域は「陸稲関東72号」から導入された染色体領域。

座乗する3つのマーカー遺伝子の位置情報はそれぞれ、 wx (Ideta *et al.* 1993), C (Kishimoto *et al.* 1992) and $Se1$ (Tamura *et al.* 1995) のRFLPマーカーとの連鎖解析から推定した。

検定法における発病指数比を基にしたQTL解析でのみ検出された。その原因として、このQTLの作用力が比較的小さいことをあげることもできるが、第11染色体のQTLと第2染色体のQTLは縞葉枯病抵抗性に関して異なる作用を持つことも考えられる。また、陸稲由来の抵抗性遺伝子*Stva*と*Stvb*は優性の補足遺伝子で、単独での効果を持たないことが報告されているが^{46, 48)}、本研究において検出された第11染色体のQTLは単独でも強い作用を持つ可能性が示唆された。そのため、これらのQTLの作用についてはさらに詳細に調査を行う必要があると考えられた。

5 小 括

陸稲由来縞葉枯病抵抗性遺伝子の座乗染色体領域を明らかにするため、「陸稲関東72号」由来の抵抗性水稻系統「中国40号」および「中国41号」を材料として、それらに導入されている陸稲由来の染色体断片の解析を行った。まず、328種のRFLPマーカーおよび221種のSSRマーカーを用いて解析した結果、抵抗性系統には第2、第6および第11染色体のそれぞれ長腕に陸稲の染色体断片が導入されていることが明らかとなった(第2図)。

次に、第2、第6および第11染色体のどの領域に抵抗性遺伝子が座乗しているのかを調査するため、解析集団として「日本晴」と「陸稲関東72号」を交雑して得たF₂ 120個体を用いてQTL解析を行った。縞葉枯病抵抗性はF₂ 120個体の自殖種子を用い、網室検定法による発病株率と幼苗検定法による発病指数比により調査した。76種のRFLPマーカーと38種のSSRマーカーが「日本晴」と「陸稲関東72号」との間で多型を示した。これらのマーカーを用いて連鎖地図を構築した結果、17連鎖群、715.3cMからなる連鎖地図が構築できた(第8図)。構築された連鎖地図情報と網室検定法で得られたF₃系統の発病株率を基にQTL解析を行った結果、第11染色体に強い作用力を持つQTLが検出された(第9図)。また、幼苗検定法で得られたF₃系統の発病指数比を基にQTL解析を行った結果、第2染色体と第11染色体にLOD値が3.0を越える領域を検出した(第9図)。

検出された第2染色体と第11染色体のQTLの効果を確認するため、それぞれのQTLについて個別

に解析を行うことのできる集団を作出し、さらに詳細な解析を行った。その結果、第2染色体と第11染色体ともに、長腕領域に縞葉枯病抵抗性に関与するQTLが1つずつ確認できた。また、それぞれのQTLは縞葉枯病抵抗性に関して異なる作用力を持つことが示唆された。

Ⅲ 準同質遺伝子系統を用いた陸稲由来縞葉枯病抵抗性の遺伝解析

1 緒 言

第Ⅱ章において、「日本晴」／「陸稲関東72号」F₃系統群を用いたQTL解析で検出された第2染色体と第11染色体の2つのQTLは、縞葉枯病抵抗性に関して異なる作用力を持つことが示唆された。検出された2つのQTLが持つ縞葉枯病抵抗性について詳細な解析を行うためには、遺伝的背景をそろえた準同質遺伝子系統の利用が有効であると考えられる。そのため、以下の実験を行った。

2 準同質遺伝子系統の作出

第2染色体および第11染色体のQTL領域に関する「コシヒカリ」準同質遺伝子系統の作出を試みた。これには、QTL近傍に位置するDNAマーカーを用いた選抜を行った。また、第2染色体と第11染色体のQTLを併せ持つ準同質遺伝子系統を同時に作出し、QTL間の相互作用について調査した。

1) 材料および方法

感受性品種「コシヒカリ」を系譜上の親にもち、抵抗性親「陸稲関東72号」から抵抗性遺伝子が導入された「中国40号」(第1図)を用いた。「中国40号」に「コシヒカリ」を連続4回戻し交雑したBC₄F₁集団を作出し、QTL座乗領域に関するDNAマーカー選抜を行った。DNAマーカー選抜にはQTL近傍に位置するSSRマーカーを用いた(第12図、第15図)。選抜したBC₄F₁個体からは自殖種子を採種し、これを播種して得たBC₄F₂集団についてさらにDNAマーカー選抜を行い、それぞれ目的とするQTL領域がホモとなった系統を準同質遺伝子系統とした。第2および第11染色体のQTLを併せ持つ準同質遺伝子系統は、選抜した2つの準同質遺伝子系統

を交雑して作出したF₂集団からDNAマーカーを用いて選抜した。

第2染色体のQTLおよび第11染色体のQTLをそれぞれ導入した準同質遺伝子系統をNIL-STV2およびNIL-STV11と命名し、以後の実験に供試した。また、NIL-STV2とNIL-STV11とを交雑したF₂集団から選抜した、第2染色体のQTLおよび第11染色体のQTLを併せ持つ準同質遺伝子系統をNIL-STV2/STV11と命名した。「コシヒカリ」、「中国40号」および作出した3つの準同質遺伝子系統の遺伝的背景に関する調査は、McCouchら²⁶⁾によって構築されたマーカー連鎖地図上の528種のSSRマーカーを用いて行った。

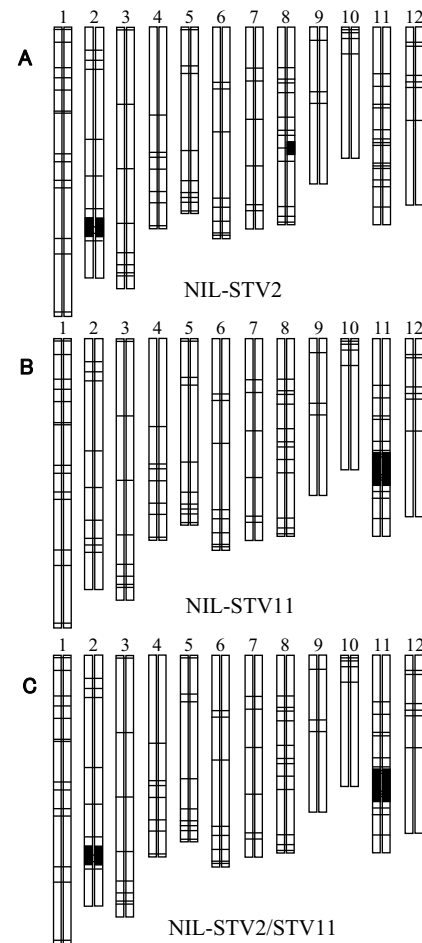
2) 結果および考察

528種類のSSRマーカーを用いて「コシヒカリ」と「中国40号」の間の多型について調べたところ、99マーカーで多型が検出された。これらのマーカーは12本の染色体に分布していたが、第4染色体の短腕と第9、第10および第12染色体の長腕領域については多型を示すSSRマーカーが得られなかった。「中国40号」の育成には「コシヒカリ」が父本として1回用いられているため(第1図)、おそらく「中国40号」におけるこれら4領域には、「コシヒカリ」由来の染色体断片が導入されているのではないかと推察された。

両親間で多型の見られたSSRマーカー99種を用いて3つの準同質遺伝子系統についてグラフィカルジェノタイプを調べたところ、第19図のような結果が得られた。NIL-STV11およびNIL-STV2/STV11については目的とするQTL領域以外に「中国40号」由来の染色体領域は検出されなかったが、NIL-STV2に関しては第8染色体の一部に「中国40号」由来の領域がヘテロで導入されていることが確認された。3つの準同質遺伝子系統に導入した「陸稲関東72号」由来の染色体断片についてのより詳しい領域を第20図に示す。第2染色体に関しては約5cM、第11染色体に関しては約15cM程度の領域が準同質遺伝子系統に導入されていた。

3 準同質遺伝子系統の縞葉枯病抵抗性検定

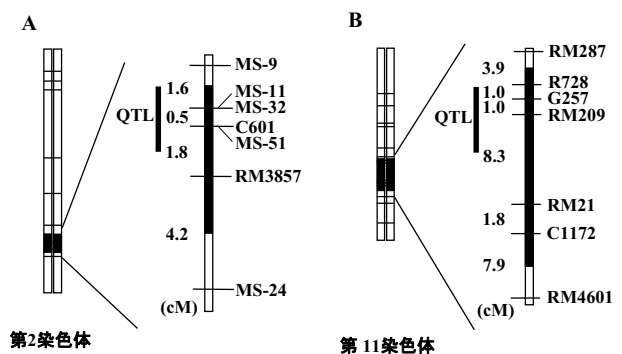
作出した3つの準同質遺伝子系統について縞葉枯



第19図 縞葉枯病抵抗性QTLを導入した3つの準同質遺伝子系統のグラフィカルジェノタイプ

(A) NIL-STV2, (B) NIL-STV11, (C) NIL-STV2/STV11.

白い部分は「コシヒカリ」由来の染色体領域。黒い部分は「陸稲関東72号」由来の染色体領域。横線は調査に用いたSSRマーカーの位置を示す。



第20図 縞葉枯病抵抗性に関する準同質遺伝子系統に導入された「陸稲関東72号」由来の染色体断片

(A) は第2染色体, (B) は第11染色体。

白い部分は「コシヒカリ」由来, 黒い部分は「陸稲関東72号」由来の染色体領域をそれぞれ示す。

病を検定し、第2染色体および第11染色体のQTLの効果を調査した。

1) 材料および方法

準同質遺伝子系統と比較品種として戻し交雑親である「コシヒカリ」、抵抗性系統の「中国40号」および「陸稲関東72号」の縞葉枯病抵抗性は幼苗検定法を用いて調査した。評価は6反復で行い、1反復あたり30個体を調査した。病徴はA（枯死）からD（軽微な病徴）までの6段階に分類し（第5図）、各病徴型を示した個体数から発病指数を算出した。感受性の比較品種「杜稲」の発病指数との比率から発病指数比を算出した。発病株率は（病徴が観察されたすべての個体）／（調査個体数）から算出した。有意差検定はTukey法を用いて行った。

2) 結果および考察

3つの準同質遺伝子系統と比較品種の幼苗検定法による縞葉枯病の抵抗性検定結果を第2表に示した。感受性親である「コシヒカリ」の発病指数比の平均は74.8となり、遺伝子供与親である「中国40号」の平均発病指数比は1.0となった。縞葉枯病抵抗性QTLに関する3つの準同質遺伝子系統の平均発病指数比はすべて「コシヒカリ」よりも低下する結果となった。これらのうち、第2染色体のQTLを導入したNIL-STV2の平均発病指数比は46.2とやや高い

ものの、「コシヒカリ」よりは有意に低かった。第11染色体のQTLを導入したNIL-STV11の発病指数比は15.0となり、このQTLは単独でかなり強い作用力を持つことが明らかとなった。2つのQTLを併せ持つ準同質遺伝子系統NIL-STV2/STV11の平均発病指数比は0.7となり、抵抗性親である「中国40号」および「陸稲関東72号」と同等の高度な抵抗性を示した。

「コシヒカリ」の平均発病株率は53.9%であり、「中国40号」の平均発病株率は8.3%となった。第2染色体のQTLを導入したNIL-STV2の平均発病株率は47.2%となり、「コシヒカリ」と有意差はなかった。一方、第11染色体のQTLを導入したNIL-STV11および両方のQTLを導入したNIL-STV2/STV11の平均発病株率はそれぞれ11.7%および6.1%となり、「コシヒカリ」よりも明らかに低い発病株率を示した。この結果から、第11染色体のQTLは発病株率を低下させる作用を持つことが示唆された。一方、幼苗検定法によって分類された6つの病徴型を示す個体の出現頻度は、品種間あるいは準同質遺伝子系統間で明確な違いが見られた。すなわち、感受性品種「コシヒカリ」の発病個体はAまたはBに分類されるような重度の被害を受ける個体が大部分を占めるのに対して、抵抗性系統「中国40号」ではCまたはDのような軽微な病徴を示す個体がほとんどであった。また、第11染色体のQTLを持つNIL-STV11

第2表 縞葉枯病抵抗性QTLに関する準同質遺伝子系統の幼苗検定結果

品種系統名	各病徴型の個体数 ³⁾							発病株率 ¹⁾ (%)	発病 指数比 ¹⁾²⁾
	A	B	Bt	Cr	C	D	無病徴		
コシヒカリ	11.5	2.7	1.7	0.0	0.0	0.3	13.8	53.9 ^{ab}	74.8 ^a
NIL-STV2	3.5	2.0	4.0	3.5	1.0	0.2	15.8	47.2 ^b	46.2 ^b
NIL-STV11	1.8	0.7	1.0	0.0	0.0	0.0	26.5	11.7 ^c	15.0 ^c
NIL-STV2/STV11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.5	28.2	6.1 ^c	0.7 ^d
中国40号	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	2.0	27.5	8.3 ^c	1.0 ^d
陸稲関東72号	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	2.5	27.3	8.9 ^c	0.8 ^d
杜 稲	13.5	3.0	2.0	0.5	0.0	0.0	11.0	63.9 ^a	(100)

1) 同じアルファベットは5%水準で有意差なし（Tukey法）。

2) 発病指数は以下の計算式で算出し、感受性比較品種「杜稲」の発病指数を100として発病指数比を計算した。

$$\text{発病指数} = \frac{100A + 80B + 60Bt + 40Cr + 20C + 5D}{\text{調査個体数}}$$

3) 病徴型は6段階に分類した（A：枯死～D：軽微な病徴）。

は発病株率が低いことからわかるように、病徴を示す個体は大幅に減少するが、発病個体はAからBtといった重度の病徴を示す傾向が見られた。第2染色体のQTLを持つNIL-STV2はAからDまでの様々な病徴型の個体が観察されたが、「コシヒカリ」と比較してAまたはBといった重度の病徴を示す個体は減少し、BtまたはCrといった中間的な病徴に分類される個体が増加する傾向があった。これらの結果から、第2染色体のQTLは、縞葉枯病ウイルスの感染後に病徴の進展を抑制する作用を持つと推察された。第II章において、第2染色体のQTLが発病株率を基にしたQTL解析では検出されなかったことから、このQTLが発病株率には影響せず、感染後にその作用を発現していることを示唆していると考えられる。2つのQTLを併せ持つNIL-STV2/STV11は、発病株率および病徴型のいずれにおいても、「中国40号」および「陸稲関東72号」と同等の縞葉枯病抵抗性を持つことが示唆された。

ただし、NIL-STV2に関しては第8染色体に「中国40号」由来の染色体断片が残っていたことから、この領域に抵抗性遺伝子が存在するか否かを調査する必要があると考えられた。

4 「中国40号」由来の第8染色体断片を除去した準同質遺伝子系統の解析

前節で述べたように、第2染色体のQTLを導入したNIL-STV2には、まだ第8染色体に「中国40号」由来の染色体断片が残っていた。そこで、この染色体領域と縞葉枯病抵抗性との関係を解析するため、第8染色体の領域を「コシヒカリ」に置き換えた新たな準同質遺伝子系統を選抜し、縞葉枯病抵抗性検定を行った。

1) 材料および方法

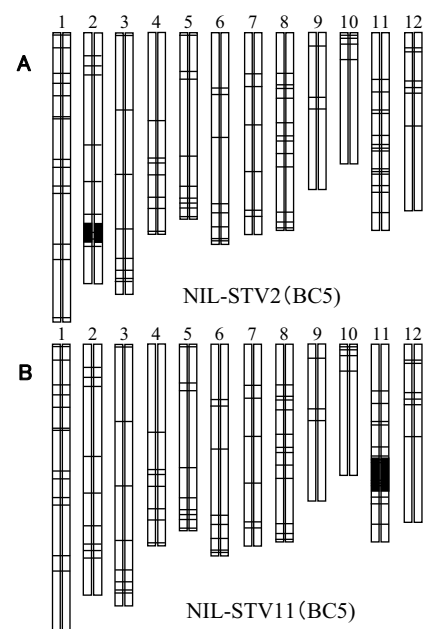
感受性品種「コシヒカリ」および抵抗性系統「中国40号」を用いた。「中国40号」に「コシヒカリ」を5回連続戻し交雑したBC₅F₂からQTLが座乗する領域に位置するSSRマーカーを用いて準同質遺伝子系統を選抜した。第2染色体のQTLおよび第11染色体のQTLを導入した準同質遺伝子系統はそれぞれNIL-STV2 (BC5) とNIL-STV11 (BC5) と命名し、以後の実験に供試した。

「コシヒカリ」、「中国40号」および作出した3つの準同質遺伝子系統のゲノムDNAは、第II章に述べたCTAB法により抽出した。RFLP分析についても第II章に述べたフィルター作製法およびサザンハイブリダイゼーション法に従って行い、SSRマーカー解析も同様に前述した方法を用いて行った。3つの準同質遺伝子系統の遺伝的背景の調査は528種のSSRマーカーを用いて行った。

準同質遺伝子系統の縞葉枯病抵抗性は幼苗検定法を用い、評価方法は3と同様に行った。

2) 結果および考察

選抜した2つの準同質遺伝子系統NIL-STV2 (BC5) とNIL-STV11 (BC5) のグラフィカルジェノタイプを第21図に示した。準同質遺伝子系統NIL-STV2の第8染色体に導入されていた「中国40号」由来の染色体断片は、NIL-STV2 (BC5) においては「コシヒカリ」型に置換されており、QTLが座乗する領域以外に「中国40号」由来の染色体断片を含んでいないことが明らかであった。感受性親の



第21図 BC₅F₂集団から選抜した準同質遺伝子系統のグラフィカルジェノタイプ

(A) はNIL-STV2 (BC5), (B) はNIL-STV11 (BC5)
 白い部分は「コシヒカリ」由来の染色体領域、黒い部分は「陸稲関東72号」由来の染色体領域、横線は調査に用いたSSRマーカーの位置を示す。

「コシヒカリ」、抵抗性親の「中国40号」および準同質遺伝子系統のNIL-STV2 (BC5) とNIL-STV11 (BC5) の縞葉枯病幼苗抵抗性検定の結果を第3表に示した。その結果、NIL-STV2 (BC5) は第8染色体に「中国40号」由来の領域を持つNIL-STV2と同様の縞葉枯病抵抗性を示した。すなわち、NIL-STV2 (BC5) においても発病株率は「コシヒカリ」と有意差はないが、重度の病徴型に分類される個体の出現頻度は「コシヒカリ」よりも明らかに減少した。このことから、第8染色体の陸稲由来領域は縞葉枯病抵抗性には関与せず、第2染色体のQTLが感染後の病徴の抑制効果を持つことが確認された。第11染色体のQTLを持つNIL-STV11 (BC5) においては、NIL-STV11と同様に発病株率が明らかに低下した。

縞葉枯病幼苗検定における発病株率は、接種に用いるヒメトビウンカの保毒虫率や放飼する幼虫の頭数などによって変動し、また、感染後の病徴は接種後の栽培環境によって影響を受けると考えられる。第2染色体のQTLの作用力は弱く、病徴の抑制効果は比較的小さなものであるが、本研究においては戻し交雑回数の異なる準同質遺伝子系統で同様の抵抗性反応が認められたことから、このQTLが持つ縞葉枯病抵抗性の効果は安定したものであると考えられた。

これらの結果から、「陸稲関東72号」の縞葉枯病抵抗性は第2染色体と第11染色体の2つのQTLによって成り立っていることが示唆された。抵抗性遺

伝子 $Stvb$ は第11染色体に座乗する $Stvb-i$ と複対立の関係にあるという報告⁴⁸⁾を考慮すると、第11染色体上で検出されたQTLは $Stvb$ であると考えられる。しかし、 $Stvb$ は単独では効果を持たないことが報告されており⁴⁸⁾、本研究において確認された第11染色体のQTLが持つ効果はこれまでの報告と大きく異なっているとみられる。幼苗検定においては発病指数比が抵抗性を分類する指標とされており、一般に発病指数比が0.0から30.0までを「抵抗性」、30.1から60.0までを「中程度抵抗性」、60.0以上を「感受性」と分類している。この分類によれば、NIL-STV11およびNIL-STV11 (BC5) は、その発病指数比がそれぞれ15.0および19.6であることから（第2表および第3表）、これらの系統は「抵抗性」と判定される。このことは、これらの系統が持つ第11染色体のQTLが非常に強い作用を持つことを改めて示唆するものであると考えられる。ただし、Washioら^{46, 48)}は陸稲由来の2つの抵抗性遺伝子 $Stva$ と $Stvb$ の遺伝解析に、感受性品種として「キビヨシ」を用いて解析を行っており、本研究で用いた「コシヒカリ」との遺伝的背景の相違がQTLの効果に影響した可能性がある。したがって、陸稲由来の抵抗性遺伝子 $Stva$ および $Stvb$ と本研究で検出した2つのQTLとの関係を厳密に解明するためには、感受性品種として「キビヨシ」を用いた解析が必要であると思われる。

本研究では、陸稲由来の抵抗性遺伝子 $Stva$ および $Stvb$ と、第2および第11染色体に検出された2つの

第3表 縞葉枯病抵抗性QTLに関する準同質遺伝子系統の幼苗検定結果

品種系統名	各病徴型の個体数 ³⁾							発病株率 ¹⁾ (%)	発病 指数比 ¹⁾²⁾
	A	B	Bt	Cr	C	D	無病徴		
コシヒカリ	10.7	2.7	1.7	0.0	0.0	0.3	14.7	51.1 ^{ab}	71.2 ^a
NIL-STV2 (BC5)	2.3	2.0	3.7	3.3	1.3	0.0	17.3	42.2 ^b	39.8 ^b
NIL-STV11 (BC5)	2.7	0.7	1.0	0.0	0.0	0.0	25.7	14.4 ^c	19.6 ^{bc}
中国40号	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	2.0	27.3	8.9 ^c	1.2 ^c
杜 稲	14.3	5.3	1.3	0.0	0.0	0.0	9.0	70.0 ^a	(100)

1) 同じアルファベットは5%水準で有意差なし (Tukey法)。

2) 発病指数は以下の計算式で算出し、感受性比較品種「杜稲」の発病指数を100として発病指数比を計算した。

$$\text{発病指数} = \frac{100A + 80B + 60Bt + 40Cr + 20C + 5D}{\text{調査個体数}}$$

3) 病徴型は6段階に分類した (A: 枯死～D: 軽微な病徴)。

QTLとの関係について不明な点が多く残された。しかし、準同質遺伝子系統を用いた解析によって示された2つのQTLの効果は、縞葉枯病感染率の低下と感染後の病徴の抑制に関与する遺伝子の存在を初めて明らかにしたものであり、この成果は縞葉枯病抵抗性の作用機構の解明に役立つものと考えられる。また、これら2つのQTLは抵抗性品種の育成にも貢献できるものと考えられる。

5 準同質遺伝子系統の栽培特性の評価

近年、「コシヒカリ」や「キヌヒカリ」といった良食味品種に関しては、いもち病真性抵抗性遺伝子やトビイロウンカ抵抗性などを導入した準同質遺伝子系統が育成され、普及・利用が進められている。そのため、本研究において選抜した準同質遺伝子系統の栽培特性を調査し、それらの実用化に対する評価を行った。

1) 材料および方法

「コシヒカリ」ならびに3つの準同質遺伝子系統「NIL-STV2」、「NIL-STV11」および「NIL-STV2/STV11」を2005年に圃場栽培した。各系統は3反復で栽培し、出穂期、成熟期、稈長、穂長および千粒重を調査した。稈長、穂長については各反復10個体について調査し、平均値を算出した。各形質の「コシヒカリ」との有意差検定はTukey法を用いて行った。

2) 結果および考察

「コシヒカリ」および3つの準同質遺伝子系統の調査結果を第4表に示した。調査を行った出穂期、成熟期、稈長、穂長および千粒重の全ての形質において「コシヒカリ」と準同質遺伝子系統との間で有意な差は見られなかった。「コシヒカリ」の出穂期は8月13日、成熟期は9月23日で、3つの準同質遺伝子系統は「コシヒカリ」とほぼ同じ出穂期と成熟期であった。稈長と穂長に関しても「コシヒカリ」とほぼ同じで、外見からは「コシヒカリ」と3つの準同質遺伝子系統は相違点が見出されなかった(写真1)。

「コシヒカリ」の準同質遺伝子系統に関しては、いもち病の真性抵抗性遺伝子を導入した系統が作出

第4表 縞葉枯病抵抗性QTLに関する準同質遺伝子系統の栽培特性

品種系統名	出穂期 (月. 日)	成熟期 (月. 日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	千粒重 (g)
コシヒカリ	8.13	9.23	91	19.0	22.2
NIL-STV2	8.14	9.24	88	19.4	22.0
NIL-STV11	8.13	9.24	89	19.7	21.7
NIL-STV2/STV11	8.14	9.23	93	19.8	22.2

- 1) 調査は2005年に近中四農研センター福山圃場にて行った。(5月27日播種)
- 2) 調査を行った5つの形質については準同質遺伝子系統と「コシヒカリ」との間に有意な差はなかった。



写真1 コシヒカリ準同質遺伝子系統の草姿
左は「コシヒカリ」、右は準同質遺伝子系統「NIL-STV11」。

され、「コシヒカリBL」として栽培、利用が進められている¹⁶⁾。そのため、本研究において作出された準同質遺伝子系統は縞葉枯病抵抗性の「コシヒカリ」として、また、縞葉枯病抵抗性育種の素材として有望であると思われる。ただし、陸稲由来の抵抗性遺伝子を持つ「中国40号」と「中国41号」は玄米品質、食味が劣ったため、これまで実際の栽培には用いられてこなかった。したがって、本研究で育成された準同質遺伝子系統についても、玄米品質、食味などの重要な形質に関しては今後慎重に評価すべきである。

6 小 括

第2染色体と第11染色体に検出された2つのQTLに関する詳細な解析を行うため、これらのQTLを感受性水稻系統である「コシヒカリ」に導入した準同質遺伝子系統を作出し、抵抗性検定を行った。また、2つのQTLを併せ持つ準同質遺伝子系統を作出し、QTL間の相互作用についても解析した。

幼苗検定法を用いて抵抗性検定を行った結果，作出した3つの準同質遺伝子系統はそれぞれ異なる反応を示した（第2表）．第11染色体のQTLを導入した系統は，発病株率が大幅に低下したが，感染した個体は枯死するような進行した病徴を示すものが多かった．第2染色体のQTLを導入した系統は，発病株率は「コシヒカリ」と有意差はないものの，枯死するような病徴を示す個体は減少した．2つのQTLを導入した系統は発病株率の低下と，病徴の進展が抑制され，抵抗性系統「中国40号」および「陸稲関東72号」と同等の縞葉枯病抵抗性を示した．これらの結果から，「陸稲関東72号」の縞葉枯病抵抗性は第2染色体と第11染色体の2つの抵抗性遺伝子によって成り立っており，第11染色体のQTLは感染株率を，第2染色体のQTLは病徴の進展をそれぞれ抑制する作用を持つことが示唆された．

抵抗性遺伝子 $Stvb1$ は第11染色体に座乗する $Stvb-i$ と複対立の関係にあり⁴⁸⁾，第11染色体のQTLは $Stvb$ であると考えられた．しかし， $Stvb$ は単独では効果を示さないことが報告されており，本研究において確認された第11染色体のQTLが持つ効果はこれまでの報告と大きく異なっているものであった．そのため，陸稲由来の抵抗性遺伝子 $Stva$ および $Stvb$ と本研究で検出された2つのQTLとの関係についてはまだ不明な点も多い．しかし，準同質遺伝子系統を用いた2つのQTLの効果についての解析結果は，縞葉枯病感染株率の低下と感染後の病徴の抑制に関与する遺伝子の存在を初めて明らかにしたものであり，縞葉枯病抵抗性の作用機構の解明に役立つものと考えられる．また，これらのQTLは，縞葉枯病抵抗性品種の育成に貢献できるものと考えられる．

本研究において選抜した準同質遺伝子系統の実用化についての評価を行うために，それらの出穂期，成熟期，稈長，穂長および千粒重を調査した結果，いずれの形質においても「コシヒカリ」と準同質遺伝子系統との間で有意な差は見られなかった．このことから，本研究において作出された準同質遺伝子系統は，縞葉枯病抵抗性の「コシヒカリ」準同質遺伝子系統として，また，縞葉枯病抵抗性の育種素材として有望であると思われる．

Ⅳ イネ野生種を用いた新規縞葉枯病抵抗性遺伝子の探索

1 緒 言

イネ縞葉枯病に関してはこれまでにインディカ品種由来と日本陸稲由来の2種類の抵抗性が報告されているだけであり^{45, 46, 47, 48)}，さらなる抵抗性遺伝子の探索が急務となっている．野生種の縞葉枯病抵抗性に関してはこれまで報告がないが，筆者らがこれまでに行った検定においては，いかなるゲノム種の野生種においてもほぼ全てが縞葉枯病に抵抗性を持つことが明らかとなっている．そこで，本研究ではAゲノム野生種の *Oryza rufipogon* およびCゲノム野生種である *O. officinalis* を用いて，新たな抵抗性遺伝子を探索することとした．また，縞葉枯病の媒介虫であるヒメトビウンカに対する抵抗性についても抵抗性遺伝子の探索を試みた．

2 Aゲノム野生種 *O. rufipogon* からの抵抗性遺伝子の探索

Aゲノム野生種は栽培種との交雑が可能であり，これまでも病虫害抵抗性遺伝資源として利用されてきた．しかし，野生種は脱粒性や収量の低下など，栽培には適さない劣悪な形質を保持している場合が多く，育種への利用は困難であった．近年，DNAマーカー選抜技術の開発により，遺伝子と連鎖する劣悪形質の除去が可能となった．その結果，この技術を用いて野生種の染色体断片を「コシヒカリ」などの良食味水稻品種に導入した染色体断片置換系統も開発されており，Aゲノム野生種の持つ遺伝子の解析およびその利用が進められている．ここでは，Aゲノム野生種の *O. rufipogon* が持つ縞葉枯病抵抗性についてQTL解析を行い，新規の抵抗性遺伝子の探索を試みた．

1) 材料および方法

縞葉枯病に対して抵抗性を持つAゲノム野生種として *O. rufipogon* (IRGC Acc. 104814) を，感受性品種として「コシヒカリ」を供試した．QTL解析には *O. rufipogon* に「コシヒカリ」を戻し交雑して得たBC₂F₂ 172系統を用いた．これらの材料は作

物研究所の平林秀介主任研究官から分譲を受けたものである。QTL解析には145種のSSRマーカーを用い、ソフトウェアMAPMAKERで連鎖地図を構築した。縞葉枯病抵抗性は網室検定法により発病株率を2反復で調査し、平均発病株率を基にQTL解析ソフトウェアqGENEを用いてLOD値2.0以上の領域の検出を試みた。

2) 結果および考察

145種のSSRマーカーを用いてBC₂F₂ 172系統の分析を行った結果、約1560cMからなる12染色体に対応した連鎖地図が構築できた。この連鎖地図はほぼすべての染色体をカバーできているものと思われた。網室検定法での平均発病株率を用いてQTL解析を行った結果、第10および第11染色体上にLOD値2.0以上の領域が検出された(第22図)。第10染色体に検出されたQTLは、長腕末端領域に位置するSSRマーカーRM333近傍にLOD値で2.57、寄与率7.7%の効果を示した。第11染色体にはSSRマーカーRM229の領域にLOD値6.07、寄与率16.1%のQTLが検出された(第5表)。

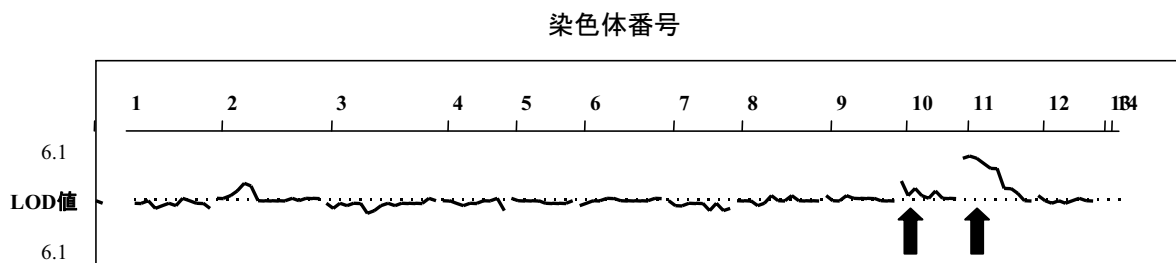
第10染色体にはこれまで縞葉枯病抵抗性遺伝子が座乗しているといった報告はないため、本研究により新たな抵抗性遺伝子を検出することができたと考えられたが、その寄与率は約7.7%と効果の小さいものであった。縞葉枯病抵抗性の検定結果は接種に用いるヒメトビウンカのウイルス保毒率や接種後の栽培条件などによって大きく影響されるため、このような作用力の小さいQTLに関してはさらに詳細な解析を行い、縞葉枯病抵抗性の評価を行う必要があ

ると思われる。

第11染色体に検出されたQTLは作用力が強いことから、*O. rufipogon* 由来の抵抗性遺伝子を検出できたものと考えられた。QTLを検出した第11染色体上のSSRマーカーRM229は、インド型品種「Modan」由来の抵抗性である*Stvb-i*³が座乗している領域⁶⁾であり、また、第Ⅱ章において「陸稲関東72号」由来の抵抗性QTLが検出された領域でもあった。これらの結果から、この第11染色体の長腕領域は、縞葉枯病抵抗性遺伝子の変異に富む領域であると考えられる。しかし、鷲尾ら⁴⁸⁾は大部分のインド型品種が縞葉枯病抵抗性遺伝子*Stvb-i*を持つと報告しており、本研究において検出されたこの領域のQTLは*Stvb-i*であることも考えられる。そのため、検出された第11染色体のQTLに関しては、今後さらに詳細な解析と対立性検定が必要である。また、第Ⅲ章においてその効果が確認された「陸稲関東72号」由来の第2染色体のQTLのように、Aゲノム野生種が発病株率には影響しない抵抗性遺伝子を持つ可能性もあるため、今後は幼苗検定法を用いたQTL解析も進める必要がある。

第5表 *O. rufipogon* に由来する縞葉枯病抵抗性のQTL解析結果

近傍マーカー	染色体	LOD値	寄与率(%)
RM333	第10染色体	2.57	7.7
RM229	第11染色体	6.07	16.1



第22図 *O. rufipogon*に由来する縞葉枯病抵抗性のQTL解析結果
*O. rufipogon*に「コシヒカリ」を戻し交雑したBC₂F₂ 172系統を用いた解析結果。
 LOD値は上方向が野生種の遺伝子が抵抗性として作用する効果を示す。
 矢印はLOD値2.0以上を示した領域。

3 Cゲノム野生種 *O. officinalis* の染色体断片導入系統からの抵抗性遺伝子探索

上記のように、Aゲノム野生種 *O. rufipogon* (IRGC Acc. 104814) を用いたQTL解析においては、明確な作用を持つ新規の抵抗性遺伝子は検出されなかった。Aゲノム野生種に関しては、*O. rufipogon* 以外にも多くの野生種が存在しており、これらについても解析を継続する必要があるが、Aゲノム以外の野生種について調査を行うことも新たな抵抗性遺伝子を探索する上で有効な手段の一つであると考えられた。しかし、Aゲノム以外の野生種は一般に通常の方法では栽培種と交雑ができないため、育種への利用は困難であった。1980年代後半から国際イネ研究所 (IRRI) においてAゲノム以外の野生種と栽培種との交雑法が開発され、異なるゲノム種が持つ有用遺伝子の利用が可能となった¹⁷⁾。この方法は、コルヒチン処理により4倍体とした栽培種(AAAA)に異種ゲノム野生種(XX)を交雑し、胚培養を行ってF₁雑種個体を得る方法で、F₁個体はAAXのゲノム構成となる。このF₁個体に数回の戻し交雑と胚培養を行い、その後自殖によってF₃からF₄世代まで進めると、異種ゲノムの染色体が取り除かれて種子稔性を回復した系統が得られる。稔性を回復した系統はAAゲノムにXゲノムの染色体が1, 2本残されているもの、あるいは野生種の全染色体が取り除かれてAAゲノムだけになったものが混在した状態となる。しかし、Aゲノムの染色体だけとなった系統でも、Aゲノム染色体の中に異種ゲノムの短い染色体断片が取り込まれる現象が報告されている²⁸⁾。Ishii ら¹⁵⁾ はこの方法を用いて、Eゲノム野生種である *O. australiensis* の断片を導入した系統から新たなトビイロウンカ抵抗性遺伝子を同定しており、戻し交雑育種法と胚培養法を用いることで異種ゲノム野生種でも栽培種の育種に利用できることが明らかとなった。野生種は有用な遺伝子を保持していると同時に、倒伏性、脱粒性、玄米品質の低下などの栽培種には望ましくない形質を有するが、染色体断片導入系統は栽培種の染色体に取り込まれる異種ゲノムの染色体断片の大きさが数cM程度と短いため、野生種の劣悪形質が導入されにくいという利点を有している。

そこで本節では、まずCゲノム野生種である *O.*

officinalis の縞葉枯病抵抗性遺伝子についての解析を試みた。すなわち、*O. officinalis* (IRGC Acc. 100947) の染色体断片を導入した水稻系統から、縞葉枯病抵抗性遺伝子を持つと思われる系統の選抜を行った。また、選抜された抵抗性系統の縞葉枯病抵抗性の遺伝様式と抵抗性遺伝子の座乗領域を明らかにするため、QTL解析を行った。

1) 材料および方法

抵抗性系統の選抜はCゲノム野生種である *O. officinalis* (IRGC Acc. 100947) の染色体断片導入系統139系統を用いて行った。この染色体断片導入系統の種子は九州沖縄農業研究センターの平林秀介主任研究官(現：作物研究所)および梶 亮太主任研究官に分譲して頂いたものである。平林らは *O. officinalis* をコルヒチン処理により4倍体とした「水稻農林29号」に交雑し、胚培養を経てF₁個体を得た。このF₁個体に「コシヒカリ」を交雑して胚培養を行い、稔性のあるF₁ 13個体を得た。得られたF₁個体から自殖種子を取り、F₂個体を栽培した。本研究における縞葉枯病抵抗性の選抜は、こうして得られたF₂個体の自殖種子(F₃系統)を用いて行った。選抜に供試したF₃ 139系統は、稔性のあるF₁ 13個体の後代が大体10系統ずつとなるように選んだ。

縞葉枯病抵抗性系統の選抜は網室検定法によって行った³⁰⁾。感受性の比較品種として「コシヒカリ」、抵抗性の比較品種として抵抗性遺伝子 *Stvb-i* を有する「月の光」²¹⁾ を用いた。中程度以上の抵抗性を示した系統については、抵抗性遺伝子が分離している可能性があるため、発病していない苗を栽培して得た自殖種子を用いて再度縞葉枯病抵抗性検定を行った。その結果、抵抗性を示した系統については、さらに「コシヒカリ」と交雑を行い、それらのF₂ 96個体由来のF₃系統群をそれぞれ作出し、QTL解析を行って抵抗性遺伝子の座乗染色体を解析した。DNAは第II章に記したCTAB法を用いて抽出した。F₃系統群については各系統20個体の幼苗をまとめてサンプリングし、DNAを抽出した。DNAマーカーには12本の染色体に偏り無く配置されたSSRマーカー528種類を用いた。第2染色体領域の一部については筆者らが設計したSSRマーカー51種類(MS-1からMS-51)も解析に使用した。連鎖地図の

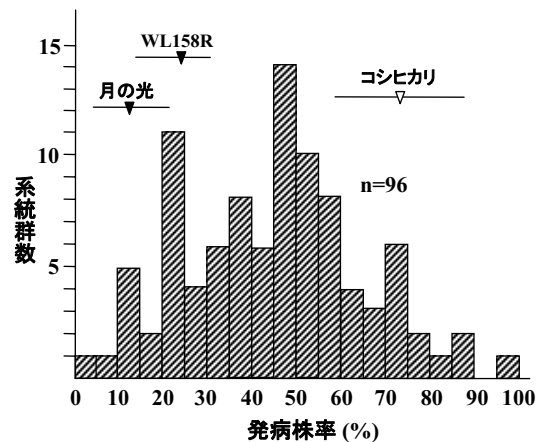
構築は両親間で多型を示した S S R マーカーの F₂ 分離データに基づいて行った。Q T L 解析のための縞葉枯病抵抗性検定は、網室検定法を用いた。調査は 2 反復で行い、発病株率の平均値を解析に用いた。比較品種の「コシヒカリ」と「月の光」は 20 列おきに配置し、合計 10 反復の調査を行い、野生種由来の抵抗性系統「WL158R」および「WL162」については 5 反復調査した。

縞葉枯病抵抗性に関与する Q T L の解析は、連鎖地図情報と縞葉枯病抵抗性検定結果を基に解析ソフトウェア MAPL⁴⁴⁾ を用いて行い、L O D 値が 3.0 以上の領域を検索した。

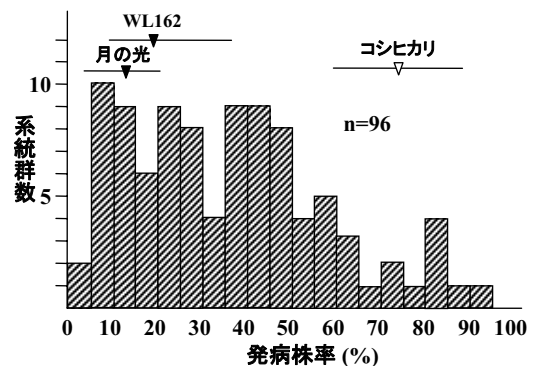
2) 結果および考察

O. officinalis の染色体断片を導入した F₃ 139 系統について縞葉枯病抵抗性検定を行った結果、明確な抵抗性を示す系統は得られなかったが、中程度以上の抵抗性を示す 5 系統が選抜できた。これらの系統については系統内で抵抗性が分離しているために中程度の抵抗性と判定された可能性が考えられた。そのため、検定に用いた苗から発病していない個体をポットに移植し、自殖種子を得た。この種子を用いて再度縞葉枯病抵抗性検定を行った結果、5 系統のうち 2 系統が抵抗性を示し、3 系統が罹病性と判定された。抵抗性を示した 2 系統をそれぞれ「WL158R」および「WL162」と命名し、以後の実験に供試した。

網室検定法での感受性比較品種「コシヒカリ」の発病株率は 58.3% から 90.9% であり、平均値は 74.2% であった。抵抗性比較品種である「月の光」の発病株率は 4.0% から 20.8% であり、平均発病株率は 12.8% となった。WL158R の平均発病株率は 23.7% (14.3% から 31.3%) であり、WL162 の平均発病株率は WL158R よりもやや低い 19.1% (9.1% から 38.1%) であった。WL158R と感受性系統「コシヒカリ」との交雑後代 F₃ 96 系統群における縞葉枯病抵抗性検定の結果を第 23 図に示す。この集団における発病株率は 0 ~ 100% までの連続分布となり、50% 前後の発病株率が分布の頂点となった。一方、WL162 / 「コシヒカリ」F₃ 96 系統群の発病株率は、第 24 図に示すように WL158R / 「コシヒカリ」の集団よりもやや抵抗性側に偏る分布となった。



第23図 WL158R / コシヒカリ F₃ 系統群の発病株率の分布



第24図 WL162 / コシヒカリ F₃ 系統群の発病株率の分布

S S R マーカー 528 種類を用いて「コシヒカリ」、WL158R および WL162 について多型性のスクリーニングを行った結果、「コシヒカリ」と WL158R との間では 61 種類、「コシヒカリ」と WL162 との間では 90 種類のマーカーが多型を示した。これらの多型を示したマーカーに関しては *O. officinalis* についてもスクリーニングを行い、*O. officinalis* 由来の染色体が WL158R および WL162 のどの領域に導入されているかを調査した。その結果、WL162 については第 5 染色体の S S R マーカー RM153 付近に *O. officinalis* 由来の染色体領域が見いだされたが、WL158R については *O. officinalis* 由来の染色体領域は検出できなかった。このことから、多型が得られたマーカーは、すべて「コシヒカリ」と「農林 29 号」の多型を検出したものと考えられる。

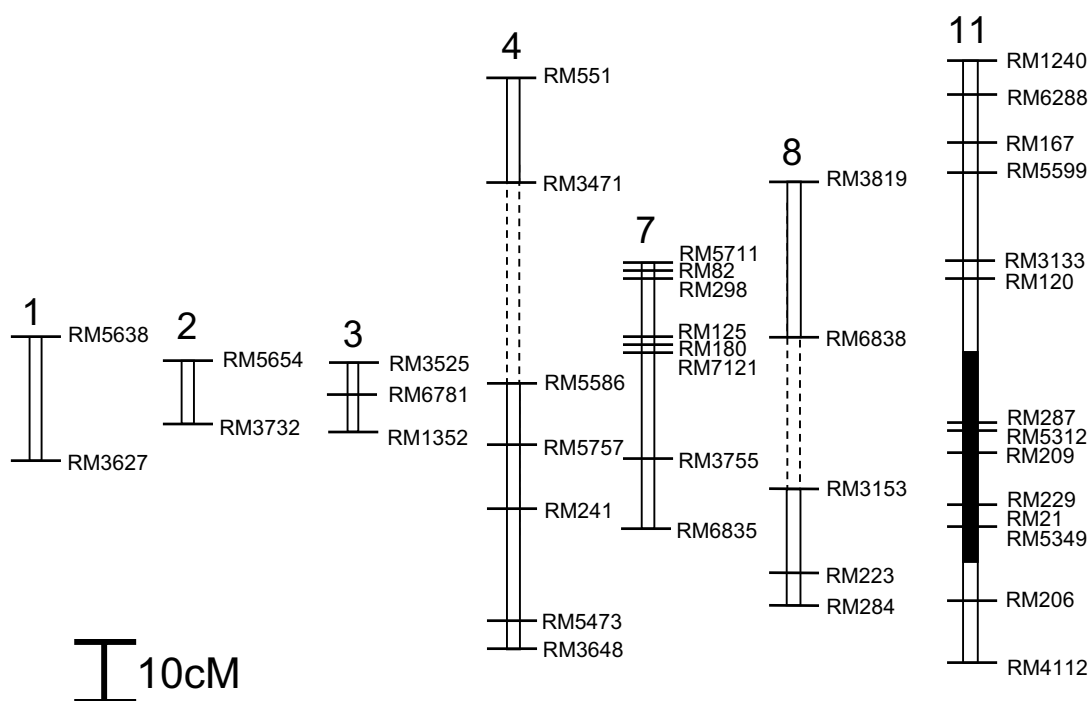
WL158R / 「コシヒカリ」F₃ 系統群において、両親間で多型を示した 61 種類の S S R マーカーの分離

を調査し、連鎖地図を構築した。その結果、41マーカー、9連鎖群で7本の染色体からなる合計318.2cMの連鎖地図が構築された(第25図)。第5、第6、第9、第10および第12染色体には多型を示すマーカーが少なく、連鎖地図は構築されなかった。このように多型の検出頻度が低かった原因は、「コシヒカリ」の親である「水稻農林22号」が「水稻農林29号」と同じ組合せ(「農林8号」/「農林6号」)から育成されており、「コシヒカリ」と「水稻農林29号」の近縁度が高いためと考えられた。F₃系統の縞葉枯病抵抗性検定における発病株率(%)と連鎖地図を基にQTL解析を行った結果、第11染色体の長腕にL O D値で7.97(寄与率64.5%)のQTLが検出された(第25図)。L O D値のピークはS S RマーカーRM209の近傍にあった。

WL162/「コシヒカリ」F₃系統群では61マーカー、11連鎖群で9本の染色体からなる520.6cMの連鎖地図が構築された(第26図)。この連鎖地図を基にQTL解析を行った結果、この集団に関してもWL158R/「コシヒカリ」F₃系統群で検出されたのと同様第11染色体の長腕部分にQTLが検出された(第26図)。L O D値のピークもS S Rマーカー

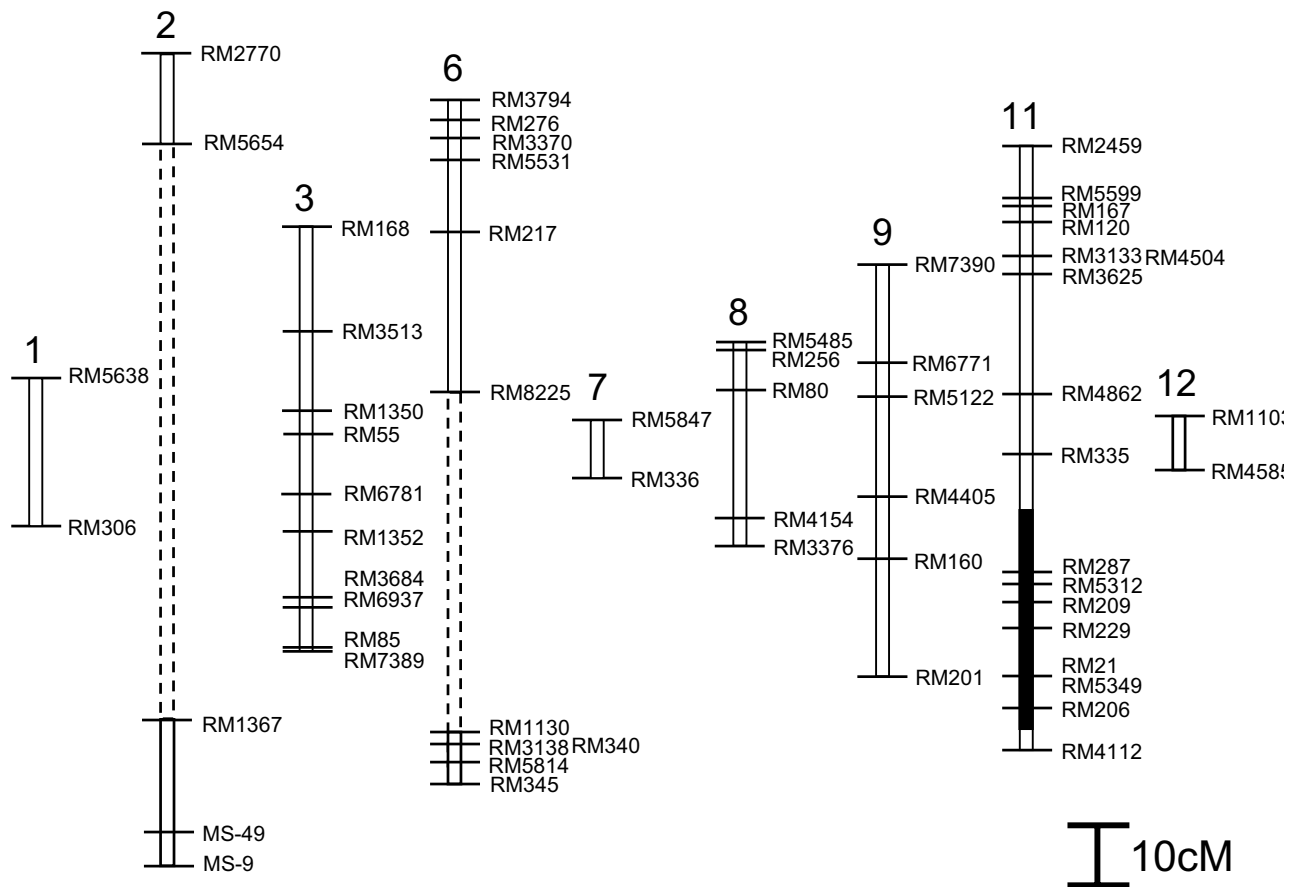
RM209の近傍にあり、L O D値は8.99(寄与率52.6%)であった。連鎖地図に位置づけられなかったマーカーに関してはt検定を行い、その近傍領域におけるQTLの有無を検証したが、縞葉枯病抵抗性に関与すると思われるマーカーは見いだされなかった。WL162は第5染色体長腕領域に*O. officinalis*の染色体が導入されていたが、この領域も抵抗性には関与しないことが判明した。

上記のように、WL158R/「コシヒカリ」のF₃集団において検出された第11染色体長腕のQTLのL O D値のピークはS S RマーカーRM209近傍に検出されたので、このマーカーRM209の遺伝子型によりF₃系統群をWL158R型、ヘテロ型および「コシヒカリ」型に分類し、それぞれの発病株率の分布を調べた。その結果、第27図に示すようにRM209がWL158R型となった系統は、「月の光」よりもやや感受性側に偏った分布を示すものの、他の2つの遺伝子型を示す系統群と比べると、抵抗性を示す系統が多かった。RM209の領域にはこれまでにインド型品種由来の縞葉枯病抵抗性遺伝子*Stvb-i*が座乗していることが報告されており⁶⁾、検出されたQTLはこの遺伝子と同一かまたは複対立の関係にあると考



第25図 WL158R/コシヒカリ F₃集団における連鎖地図と縞葉枯病抵抗性に関するQTL

■はL O D値3.0以上の領域を示す。



第26図 WL162/コシヒカリ F₃集団における連鎖地図と縞葉枯病抵抗性に関するQTL
 ■はLOD値3.0以上の領域を示す。

えられた。WL162/「コシヒカリ」F₃集団におけるQTL解析の結果、この解析集団でも同様に第11染色体のRM209近傍にQTLが検出された。これらのことから、*O. officinalis* は第11染色体長腕に縞葉枯病抵抗性遺伝子を持ち、WL158RとWL162にはその抵抗性が導入されているものと考えられる。ただし、いずれの系統においても第11染色体のQTLが検出された領域に *O. officinalis* の染色体断片を確認できなかったため、染色体のどの位置に抵抗性遺伝子が座乗しているのかについては明らかにすることはできなかった。SSRマーカーRM209とRM229の間にはマーカー数が少ない領域が約10cM程度あるが、その領域に *O. officinalis* の染色体断片が存在すると推定されるため、今後はこの領域についてマーカーを増やし、さらに解析を進める必要がある。

WL162/「コシヒカリ」F₃集団の発病株率の分布はWL158R/「コシヒカリ」のF₃集団よりも抵抗性側に分布が偏っていたため、WL158RとWL162は異

なる縞葉枯病抵抗性遺伝子を持つか、あるいはWL162は複数の抵抗性に関与する領域を持つものと考えられた（第23図および第24図）。しかし、WL162/「コシヒカリ」解析集団においても第11染色体長腕のRM209近傍に作用力の強いQTLが1つ検出されたのみであった。WL162/「コシヒカリ」の解析集団においては第4、第5、第10染色体に多型を示すマーカーが少なく、連鎖地図が構築できなかったため、QTL解析ができなかった領域も多い。しかし、528種類のSSRマーカーを用いたスクリーニングにおいて多型が検出できなかったことから、これらの領域には *O. officinalis* の染色体断片は挿入されていない可能性が高い。RM209の遺伝子型によってWL162/「コシヒカリ」F₃系統群をWL162型、ヘテロ型、「コシヒカリ」型に分類した結果、第28図のような分布を示した。RM209が「コシヒカリ」型となった系統は1個体が抵抗性側に位置していたが、全体の分布はWL158R/「コシヒカ

り」のF₃集団における「コシヒカリ」型の分布と大差はなく、第11染色体以外の領域にQTLが座乗しているという確証は得られなかった。これらの結果から、*O. officinalis* に由来するWL158RおよびWL162の縞葉枯病抵抗性は第11染色体の抵抗性遺伝子によるものと推察された。

WL162／「コシヒカリ」解析集団においてRM209の遺伝子型がWL162型となった系統の分布はWL162の分布とほぼ一致しており、平均発病株率は18.0%であった。これはWL158R／「コシヒカリ」解析集団のWL158R型の平均発病株率（30.5%）よりも抵抗性側に偏った分布となっており、検出されたQTLは両集団において作用力が異なっている可能性が示唆された（第27図、第28図）。しかし、本研究で縞葉枯病抵抗性検定に用いた網室検定法は集団で接種を行うために、各系統に着生するヒメトビ

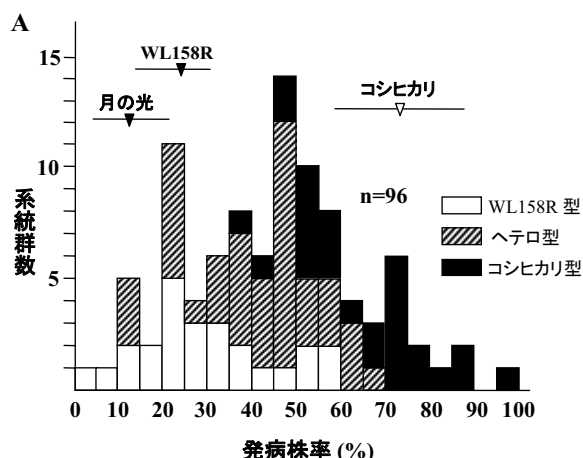
ウンカの数によって発病株率は大きく影響される。実際に、感受性比較品種「コシヒカリ」の発病株率は58.3%から90.9%と大きく変動しており、各遺伝子型の系統の分布からQTLの作用力を解析することはできない。そのため、WL158RおよびWL162が持つ縞葉枯病抵抗性遺伝子の異同を明らかにするためには、より詳細な抵抗性検定法である幼苗検定法を用いてさらに調査を行う必要がある。

4 Cゲノム野生種 *O. officinalis* の染色体断片導入系統からのヒメトビウンカ抵抗性

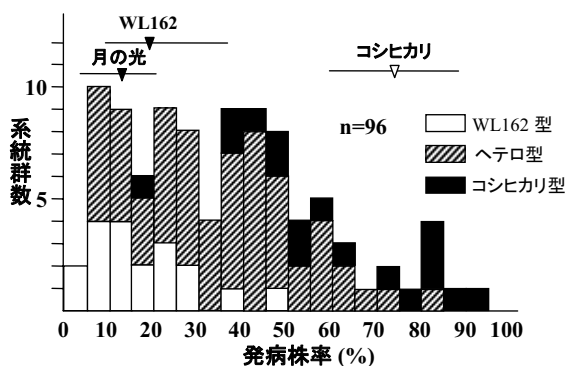
縞葉枯病を防ぐ方法としてはウイルスに対する抵抗性を利用するだけでなく、媒介虫であるヒメトビウンカに対する抵抗性を導入することも1つの手段としてあげられる。そのため、野生種が持つヒメトビウンカ抵抗性についても調査を行い、抵抗性遺伝子の探索を試みた。ヒメトビウンカ抵抗性についてはNemotoら³⁰⁾の報告があり、インディカ品種の「IR50」が抵抗性を持つことが知られている。試験管内で抵抗性を持たない系統を用いてヒメトビウンカを飼育した場合の5日後の生存率は約90%であるのに対し、「IR50」で飼育した場合には約60%まで低下する。また、「IR50」は抵抗性を持たない系統と比較してヒメトビウンカが集まりにくい性質（選好性）も併せ持っている³⁰⁾。しかし、明確なヒメトビウンカ抵抗性を示す遺伝子はこれまで報告はなく、野生種のヒメトビウンカ抵抗性についても研究されていない。そのため、本研究では *O. officinalis* のヒメトビウンカ抵抗性について試験を行った。

1) 材料および方法

縞葉枯病感受性品種「コシヒカリ」、抵抗性遺伝子 *Stvb-i* を有する「中国31号」、*O. officinalis* (IRGC Acc. 100947) およびWL158RとWL162を含む *O. officinalis* 由来の染色体断片導入系統139系統について、ヒメトビウンカに対する抵抗性の調査を行った。1本の試験管に2－3葉期の苗3本とヒメトビウンカ幼虫6頭を入れ、上からガーゼでふたをして25℃にて静置した。24時間毎に生存しているウンカの頭数を各系統3反復調査し、7日目までの生存率を算出した。



第27図 WL158R／コシヒカリ F₃系統群の分布とS S RマーカーRM209の遺伝子型による分類

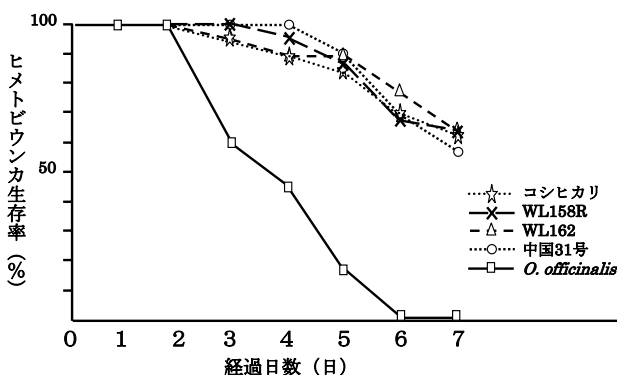


第28図 WL162／コシヒカリ F₃系統群の分布とS S RマーカーRM209の遺伝子型による分類

2) 結果および考察

O. officinalis, 「コシヒカリ」, 「中国31号」, WL158RおよびWL162におけるヒメトビウンカ生存率の変化を第29図に示した。試験に供試した5系統に接種したヒメトビウンカは、いずれも2日後までは100%の生存率を示したが、*O. officinalis* では2日目以降の生存率が急激に低下し、6日目にはすべてのウンカが死滅した。「コシヒカリ」では4日目まではほぼ100%のウンカが生存していたが、その後徐々に生存率が低下した。「中国31号」における生存率の推移は「コシヒカリ」とほぼ同じであり、ウイルスに対する抵抗性遺伝子 *Stvb-il* はヒメトビウンカの生存率に対して影響を及ぼさないことが明確となった。「コシヒカリ」と *O. officinalis* における生存率に最も開きが生じたのは実験開始から5日後で、「コシヒカリ」における生存率が89%であったのに対して *O. officinalis* では生存率が17%となった。この結果から、*O. officinalis* はヒメトビウンカに対して強度の抵抗性を持つことが明らかとなった。WL158RおよびWL162における5日後の生存率は「コシヒカリ」と同程度であり、WL158およびWL162が持つ縞葉枯病抵抗性はヒメトビウンカに対する耐虫性ではなく、縞葉枯病ウイルスに対する抵抗性であることが示唆された。

O. officinalis の染色体断片が導入された139系統についても同じ試験を行ったが、明確なヒメトビウンカ抵抗性を示す系統は見出されなかった。しかしながら、「3反復のうち1反復でも5日後のヒメトビウンカ生存率が「コシヒカリ」よりも低下する」という基準でみると、それに合致する系統が6系統



第29図 *O. officinalis*のヒメトビウンカに対する抵抗性

存在した。これらの系統については系統内で抵抗性が分離している可能性があったため、各系統10株から自殖種子を採種し、これらの種子を用いて再度ヒメトビウンカ抵抗性検定を行った。抵抗性検定は各系統5反復の調査を行ったが、「コシヒカリ」と明確な差を示す系統は選抜できなかった。そのため、5反復のうちの1反復でも生存率の低下が見られた系統については再度自殖種子を取り、検定を繰り返した。しかし、最終的に明確なヒメトビウンカに抵抗性を示す系統は得られなかった。

Nemotoら³⁰⁾はIR50の苗を用いて試験管内でウンカを飼育した場合の5日後の生存率は約60%となることを示した。また、このヒメトビウンカ抵抗性は複数の遺伝子が関与していることを示唆している。本研究における *O. officinalis* の5日後のヒメトビウンカ生存率は16.7%であり、IR50よりも強い抵抗性を持つと考えられる。しかし、この *O. officinalis* に関しては通常の交雑ができないため、抵抗性の遺伝様式および関与する遺伝子数を明らかにすることはできなかった。また、ヒメトビウンカに対してどのように作用しているのかも不明であるが、2日目までは試験管内で100%生存していることから、その抵抗性は、吸汁を完全に阻害するような物理的な作用に起因するものではないと推察される。

異種ゲノム野生種由来の染色体断片導入系統は、一般に感受性親の染色体に取り込まれる断片の大きさが数cM程度と短いため、作用力の弱いポリゾーンなどの選抜は非常に困難である。そのため、*O. officinalis* が持つヒメトビウンカ抵抗性がIR50の抵抗性と同様に作用力の小さい複数の抵抗性遺伝子によって成り立っているとすれば、ヒメトビウンカ抵抗性を導入した系統の選抜は不可能であると思われる。本試験においても *O. officinalis* の染色体断片を導入した139系統からヒメトビウンカに抵抗性を示す系統の選抜を試みたが、最終的に抵抗性を示す系統は得られなかった。これは選抜に用いた系統数が少なかったためとも考えられるが、むしろヒメトビウンカ抵抗性は作用力の小さい複数の遺伝子に支配されているためである可能性が高いと考えるのが妥当であろう。これまでに報告されている縞葉枯病抵抗性は、インド型品種由来と日本陸稲由来のウイルス抵抗性の2種類だけであるので、縞葉枯病抵抗性

の遺伝資源の拡大のためにはヒメトビウンカに対する抵抗性についても野生種の利用を図る意義は大きいと言える。また、耐虫性に関してはセジロウンカやトビイロウンカで抵抗性が崩壊する現象が数多く報告されており、ヒメトビウンカ抵抗性に関しても例外ではないと思われる。このことから、このような耐虫性遺伝子とウイルス抵抗性遺伝子を組み合わせることによって、ウイルス抵抗性が崩壊する危険性を低減できるような手法を開発することが重要であると考えられる。

5 小 括

本章では、Aゲノム野生種 *O. rufipogon* およびCゲノム野生種である *O. officinalis* を用い、新たな縞葉枯病抵抗性遺伝子を探索して解析を行った。また、縞葉枯病の媒介虫であるヒメトビウンカに対する抵抗性遺伝子の探索も行った。

O. rufipogon (IRGC Acc. 104814) に「コシヒカリ」を戻し交雑したBC₂F₂ 172系統を用いてQTL解析を行った結果、第10および11染色体上にLOD値2.0以上のQTLが検出された(第22図)。第10染色体にはこれまで縞葉枯病抵抗性が座乗しているという報告はなく、新たな抵抗性遺伝子を検出した可能性があると考えられた。しかし、その効果は小さいものであったため、さらに詳細な解析を行って縞葉枯病抵抗性を評価すべきであると思われた。第11染色体長腕にはSSRマーカーRM229近傍に強い作用力を持つQTLが検出された。QTLが検出された領域は、既存の抵抗性遺伝子である *Stvb-i* が座乗している領域と同じであったことから、このQTLは *Stvb-i* を検出した可能性が示唆された。そのため、第11染色体のQTLに関しては、今後さらに対立性検定など詳細な解析が必要と考えられた。

Cゲノム野生種である *O. officinalis* (IRGC Acc. 100947) の染色体断片を導入した水稻系統から、縞葉枯病抵抗性遺伝子を持つ系統の選抜を試みた結果、2つの抵抗性系統(WL158RおよびWL162)が選抜された。これらの抵抗性系統については「コシヒカリ」と交雑したF₂集団を作出し、QTL解析を行った結果、いずれの抵抗性系統も第11染色体長腕のSSRマーカーRM209近傍に作用力の強いQTLを持つことが明らかとなった。このQTLは既存の

抵抗性遺伝子である *Stvb-i* が座乗している領域と同じであり、縞葉枯病抵抗性に関しては供試したいずれの材料を用いても第11染色体長腕の同じ領域にQTLが検出される結果となった。そのため、このQTLについても今後さらに対立性検定など詳細な解析を行い、*Stvb-i* との異同を明らかにする必要があると考えられた。

O. officinalis (IRGC Acc. 100947) については、さらにヒメトビウンカ抵抗性を調査したところ、この系統はウンカに対して強い抵抗性を持つことが明らかとなった(第29図)。そこで、この *O. officinalis* の染色体断片を導入した水稻系統から、ヒメトビウンカ抵抗性を示す系統の選抜を試みたが、抵抗性を示す系統は得られなかった。異種ゲノム野生種由来の染色体断片導入系統は、一般に感受性親の染色体に取り込まれる断片の大きさが数cM程度と短いため、作用力の強い遺伝子以外の選抜は非常に困難である。本研究においてヒメトビウンカ抵抗性系統が得られなかった原因は、選抜に用いた系統数が少なかったためとも考えられるが、むしろヒメトビウンカ抵抗性は作用力の小さい複数の遺伝子に支配されているためと考えるのが妥当であろう。このように、ヒメトビウンカ抵抗性は野生種からの導入が難しい形質であることが示唆されたが、縞葉枯病抵抗性の遺伝資源の拡大のためには、今後ともヒメトビウンカ抵抗性系統の開発に積極的に取り組む必要があると考えられた。

V 総 合 考 察

インド型品種「Modan」に由来する縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* が日本で育種に導入されてから約30年が経過しているが、この抵抗性が崩壊したという報告はなく、安定した抵抗性を保ち続けている。そのため、現在栽培されている抵抗性品種のほぼすべてに *Stvb-i* が導入されている状況にある。しかし、ウイルスの変化によってこの抵抗性が崩壊した際には、大きな被害が予想される。このような観点から、*Stvb-i* 以外の抵抗性を導入した品種を育成すべきであるとの指摘が数多くなされてきたが、実際の取り組みはほとんど行われてこなかった。本研究は、*Stvb-i* 以外の抵抗性遺伝子を縞葉枯病抵抗性育種に

利用することを目的とし、日本陸稲に由来する縞葉枯病抵抗性に関する遺伝解析を行ったものである。

日本陸稲に由来する縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stva* と *Stvb* に関するこれまでの研究によると、*Stva* は第 6 染色体のモチ性遺伝子 *wx* および感光性遺伝子の *Se1* と連鎖しているとの報告があり⁴⁸⁾、*Stvb* は第 11 染色体上に位置づけられた *Stvb-i* と複対立の関係にあることが明らかにされていたが⁶⁾、正確な遺伝解析は行われておらず、座乗位置は不明であった。本研究において、「陸稲関東72号」由来の抵抗性を導入した水稻系統である「中国40号」および「中国41号」のグラフィカルジェノタイプを解析した結果、第 2、第 6 および第 11 染色体のそれぞれ長腕部分に陸稲の染色体断片が導入されていることが明らかとなり、これらの領域のいずれかに抵抗性遺伝子が座乗しているものと思われた。そこで、座乗領域を特定するために QTL 解析を行った結果、第 2 染色体および第 11 染色体のそれぞれ長腕部分に QTL が存在することが明らかとなった。Ando ら²⁾ は陸稲「戦捷」が持つ縞葉枯病抵抗性の 1 つが第 11 染色体の RFLP マーカーと連鎖していることを報告しており、本結果はこれと一致するものであった。一方、第 6 染色体には縞葉枯病に関与する QTL は検出されなかったことから、この染色体には抵抗性遺伝子は存在しないものと思われた。しかし、上記のように第 6 染色体長腕部分には「中国40号」、「中国41号」共に「陸稲関東72号」由来の染色体領域が導入されており、この領域が育成の過程で抵抗性系統に残された理由は不明であった。第Ⅲ章における準同質遺伝子系統の育成課程において、この第 6 染色体長腕領域の有無による育成系統の差異を調査したが、栽培特性および縞葉枯病抵抗性に関与する遺伝子の存在は確認できなかった。

第 2 染色体と第 11 染色体の QTL は、縞葉枯病に対してそれぞれ異なる作用力を持つことが示唆された。第 11 染色体上の QTL は強い作用力を持ち、網室検定による発病株率、幼苗検定における発病指数比のいずれにおいても検出され、安定した効果を示した。一方、第 2 染色体の QTL は作用力がやや弱く、幼苗検定による発病指数比においてのみ検出できた。このように、第 2 および第 11 染色体の 2 つの QTL は作用力が異なるものの、それぞれ単独で縞

葉枯病に対する作用を持つことが推測された。

検出された 2 つの縞葉枯病抵抗性 QTL については、「コシヒカリ」を遺伝的背景とする準同質遺伝子系統を作出し、それぞれの効果に関する詳細な解析を試みた。第 2 および第 11 染色体の QTL 領域をそれぞれ導入した準同質遺伝子系統と 2 つの QTL を併せ持つ準同質遺伝子系統の 3 つの系統について、幼苗検定法による縞葉枯病抵抗性検定を行った結果、2 つの QTL は異なる作用を持つことが明らかとなった。第 11 染色体の QTL は、発病株率を大幅に低下させる作用を示すのに対し、第 2 染色体の QTL は、発病株率には作用せず、病徴の進展を抑制する作用を示した。2 つの QTL を併せ持った系統では、発病株率の低下と病徴の軽減の両方が確認され、抵抗性系統「中国40号」および「陸稲関東72号」と同等の縞葉枯病抵抗性を示した。これらの結果から、第 2 染色体の QTL は病徴の軽減、第 11 染色体の QTL は感染率の低下という異なる効果を持ち、「陸稲関東72号」の縞葉枯病高度抵抗性は、これら 2 つの QTL の補足的な作用によって成り立っていることが示唆された。第 2 および第 11 染色体の QTL はそれぞれ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stva* と *Stvb* に対応すると考えられたが、Washio ら^{46, 48)} は、*Stva* と *Stvb* は単独では作用力を持たない補足遺伝子であるとしており、本研究で得られた QTL の効果はこれと矛盾するものであった。そのため、両者の関係を明確にするためにはさらに詳細な解析が必要であると考えられた。

著者らのこれまでの観察によると、インド型品種由来の抵抗性である *Stvb-i* を持つ系統は感受性系統よりも発病株率が低く、感染率を低下させる効果を持つことは明らかである。野田ら³¹⁾ は罹病した個体のウイルス濃度は感受性品種と抵抗性品種に差がないことを認め、*Stvb-i* の抵抗性はウイルス感染に対する効果であることを示した。一方、早野⁸⁾ は *Stvb-i* を持つ系統は幼苗検定において C_r や C といった中間的な病徴（第 5 図）の個体が増加することから、*Stvb-i* が感染後の病徴の抑制にも関与する可能性を示唆しており、その抵抗性機構は不明確と思われる。本研究において示された日本陸稲由来の 2 つの QTL は、感染率の低下と感染後の病徴軽減という、それぞれ別個の効果を示す遺伝子の存在を初め

て確認させるものであった。

感染率の低下と感染後の病徴軽減がそれぞれどのような機構によって成り立っているのかについては今後解析が必要であるが、これらの効果はそれぞれウイルスの感染阻害と増殖抑制に関与すると推測される。縞葉枯病ウイルスはヒメトビウンカの吸汁によってイネへ伝搬されるが、イネ体内に侵入したウイルスは成長点へと移行し、そこで増殖することによって病徴が発現すると考えられる^{38, 39)}。この2つの段階と本研究で見出された2つのQTLの効果との関係を考えて、第11染色体に検出されたQTLは、ウイルスの成長点への移行を阻害し、第2染色体のQTLは成長点でのウイルスの増殖を抑制する作用があるとの仮説を立てることができる。これを検証するためには、本研究において作出した準同質遺伝子系統の感染個体のウイルス濃度を調査し、解析を進める必要がある。ただし、ここで述べた2つのQTLの抵抗性機構についてはあくまで仮説であり、単にウイルス感染、増殖しても表面上に病徴があらわれない「耐性 (tolerance)」としての効果を2つのQTLが持っている可能性も示唆される。そのため、抵抗性機構の真の解明には抵抗性遺伝子の単離とその機能解析が必要であろう。本研究ではこれらについての解析を行うことができなかったが、ここで得られた知見は遺伝子の同定と機能解明のための重要な情報を提供するものと考えられる。

日本陸稲由来の縞葉枯病抵抗性に関しては解析が進み、抵抗性育種への利用が可能となった。しかし、現段階においてはインド型品種由来と日本陸稲由来の2つの抵抗性遺伝子以外は見つかっておらず、縞葉枯病ウイルスの変化に対する備えとしては貧弱な状況にあると言える。そのため、本研究ではAゲノム野生種 *Oryza rufipogon* およびCゲノム野生種 *O. officinalis* の縞葉枯病抵抗性について解析を試みた。まずAゲノム野生種 *O. rufipogon* についてはIRGC Acc. 104814を材料に新規抵抗性遺伝子の探索を試みた。*O. rufipogon* と「コシヒカリ」とを交配して得たBC₂F₂ 172系統を用いてQTL解析を行った結果、第10染色体と第11染色体のいずれも長腕部分にQTLが検出された。第10染色体にはこれまで縞葉枯病抵抗性遺伝子が座乗しているという報告はないため、新たな抵抗性遺伝子を検出した可能性が

考えられる。このQTLは、作用力が小さいために抵抗性遺伝子としての利用は難しいと予想されるが、このような作用の小さい遺伝子を集積することで、新たな抵抗性系統を作出できる可能性もあるため、これに関してはさらに詳細な解析を行う必要があると考えられる。また、第11染色体に検出されたQTLは作用力が強いことから、抵抗性遺伝子を検出したものと考えられた。そのQTLは*Stvb-i*が座乗している領域⁶⁾に検出されており、本研究において検出されたこの領域のQTLは*Stvb-i*であることも考えられる。そのため、検出された第11染色体のQTLに関しては、今後対立性検定を行い、既存の抵抗性遺伝子との異同を明らかにする必要がある。

次に、Cゲノム野生種の縞葉枯病抵抗性について解析を試みた。Cゲノム野生種 *O. officinalis* (IRGC Acc. 100947) の染色体断片を導入した系統について、縞葉枯病抵抗性の選抜を行った結果、2つの抵抗性系統 (WL158RおよびWL162) が得られた。WL158RおよびWL162を「コシヒカリ」と交雑してそれぞれ96系統からなるF₃系統群を作出し、QTL解析を行った。その結果、WL158R/コシヒカリおよびWL162/コシヒカリの両集団において第11染色体長腕に作用力の強いQTLが検出された。Cゲノム野生種を用いて検出した第11染色体のQTLに関しても既知の抵抗性遺伝子との関係は明らかではないため、これらの系統についても対立性検定を行う必要があるが、ゲノム種の異なる野生種において同じ領域に縞葉枯病抵抗性遺伝子が検出されたことは興味深い。インド型品種、日本陸稲、Aゲノム野生種、Cゲノム野生種において縞葉枯病抵抗性遺伝子が第11染色体長腕の同じ領域に座乗していることから、縞葉枯病抵抗性に中心的な役割を果たす遺伝子が第11染色体長腕領域にある可能性が考えられる。著者らがこれまでに数十種のAゲノム野生種、Cゲノム野生種を用いて行った縞葉枯病抵抗性検定では、全ての野生種は縞葉枯病に抵抗性を示した。また、インド型品種および日本陸稲品種の大部分が縞葉枯病抵抗性を持つことを合わせて考えると、縞葉枯病に感受性である日本水稲品種はむしろ特異的であり、日本水稲は分化の過程において縞葉枯病抵抗性を失った可能性があると考えられる。

縞葉枯病抵抗性遺伝子が座乗する第11染色体長腕はイネの病害抵抗性遺伝子が密集している領域であり、葉いもち病や白葉枯病などに対する抵抗性遺伝子がこの領域に多く報告されている^{1, 24, 27}。抵抗性品種育成の過程において「Modan」から*Stvb-i*を導入された抵抗性品種は、縞葉枯病と同時に穂いもち病にも抵抗性を示すことが明らかとなっており、この穂いもち抵抗性遺伝子は*Pb1*と命名され、連鎖解析の結果から*Stvb-i*から約6 cMの距離に位置していることが判明した³。縞葉枯病抵抗性といもち病抵抗性遺伝子との連鎖関係は日本陸稲においても確認されており、葉いもち圃場抵抗性遺伝子である*Pi34*が本研究において縞葉枯病抵抗性のQTLが検出された第11染色体の領域から数cMの距離に位置していることが明らかにされている⁵⁰。このように*Stvb-i*と*Pb1*、第11染色体のQTLと*Pi34*は連鎖関係にあり、第11染色体長腕領域は縞葉枯病だけでなく、他の病害抵抗性についても多様性を保持しているものと推測された。

本研究における、AゲノムおよびCゲノム野生種を用いた解析結果からは、新規の縞葉枯病抵抗性遺伝子を同定することはできなかったが、野生種を用いた探索は今後も継続し、縞葉枯病抵抗性の遺伝資源の拡大に取り組むべきであると考えられた。また、現在ある抵抗性遺伝子を組合せた抵抗性系統を育成し、ウイルスの変化に対応できるような多様性を持たせることも重要である。*Stvb-i*は劣勢に近い不完全優性とされており、この遺伝子をヘテロに持つ個体は明確な抵抗性を示さないが、*Stva*の存在下では完全な抵抗性を示すことが知られており、*Stva*は*Stvb-i*に対して補足的な作用を持つことが報告されている（鷲尾ら1968c）。このことから、本研究で検出された第2染色体のQTLと*Stvb-i*の両方を持つ個体の育成は、ウイルスの変化に対する備えの1つの手段になりうると思われる。また、ヒメトビウンカに対する耐虫性とウイルス抵抗性とを併せ持つ系統の開発も有効な手段であると考えられるため、ヒメトビウンカ抵抗性の研究も今後は必要になるとと思われる。本研究においてヒメトビウンカ抵抗性は野生種からの導入が難しい形質であることが示唆されたが、縞葉枯病抵抗性の遺伝資源の拡大のためには積極的に取り組むべき課題であると考えられる。

謝 辞

本論文の取りまとめにあたっては、神戸大学農学部植物資源学科植物育種学講座上島脩志教授および石井尊生助教授に懇切丁寧な指導とともに綿密な校閲を賜りました。また、神戸大学農学部生物環境制御学科植物機能制御学中村千春教授、同植物病理学講座土佐幸雄教授には貴重なご助言とご校閲を賜りました。ここに謹んで深く感謝の意を表します。

イネゲノムプロジェクト（農業生物資源研究所、農林水産先端技術研究所）関係各位にはRFLPマーカーを分譲して頂きました。縞葉枯病抵抗性遺伝子の解析にあたっては、石井清子氏（元中国農業試験場）に縞葉枯病抵抗性検定の協力を賜りました。平林秀介主任研究官（作物研究所）および梶 亮太主任研究官（九州沖縄農業研究センター）には、野生種の染色体を導入した系統の貴重な種子を分譲して頂きました。福岡浩之博士（野菜茶業研究所）には、研究の遂行にあたって多くのご助言と激励を賜りました。池田達哉博士（近畿中国四国農業研究センター）には、研究遂行にあたってご配慮頂きました。ここに謹んで深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたっては、近畿中国四国農業研究センター（旧中国農業試験場）の元部長 小川紹文博士（宮崎大学農学部）、研究管理監 長峰 司博士、元室長 中川宣興氏、元室長 根本 博博士（作物研究所）、現室長 春原嘉弘氏、作物研究所の安東郁男チーム長にご指導を頂きました。飯田修一主任研究官、石井卓朗博士（作物研究所）、松下景研究員には多大なご協力とご助言を賜りました。杉澤 武研究員（種苗管理センター）には本研究の遂行に多大なご協力とご支援を頂きました。近畿中国四国農業研究センター業務第1科職員の皆様には本研究の遂行に多大なご協力を頂きました。また、近畿中国四国農業研究センター稲育種研究室の非常勤職員の方々にも多くのご協力を頂きました。特に、非常勤職員 小林統子氏には縞葉枯病抵抗性の検定およびDNAマーカー解析などにご協力を賜りました。これらのの方々には心から深く感謝の意を表します。

なお、本研究は農林水産省のプロジェクト研究

“有用遺伝子活用のための植物（イネ）・動物ゲノム研究「DNAマーカーによる効率的な新品種育成システムの開発」(DM-1104) および “ゲノム育種プロジェクト食糧供給向上のためのグリーンテクノ計画ゲノム育種による効率的品種育成技術の開発「ゲノム育種技術の開発と実証」(GB-1004-8) の課題の一部として遂行した。

引用文献

- 1) Ahn, S. N., Y. K. Kim, S. S. Han, H. C. Choi, H. P. Moon and S. R. McCouch. 1996. Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate rice blast. *Rice Genet. Newsl.* 13: 74-76.
- 2) Ando, I., T. Yoshida and N. Kishimoto. 1993. Genetic analysis of some traits of paddy and upland rice using doubled haploid derived from the F₁ plants of Koshihikari × Sensho. *Rice Genet. Newsl.* 10: 102-105.
- 3) Fujii, K., Y. Hayano-Saito, K. Saito, N. Sugiura, N. Hayashi, T. Tsuji, T. Izawa and M. Iwasaki. 2000. Identification of a RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, *Pb1*, in rice. *Breed. Sci.* 50: 183-188.
- 4) Ghosh, A., V. T. John and J. R. Rao. 1979. Studies on grassy stunt disease of rice in India. *Plant Dis. Rep.* 63: 523-525.
- 5) Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush and T. Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* 148: 479-494.
- 6) Hayano-Saito, Y., K. Saito, M. Iwasaki and A. Saito. 1998. Localization of the rice stripe disease gene, *Stv-bi*, by graphical genotyping and linkage analyses with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1044-1049.
- 7) Hayano-Saito, Y., K. Saito, S. Nakamura, S. Kawasaki and M. Iwasaki. 2000. Fine physical mapping of the rice stripe resistance gene locus, *Stvb-i*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 59-63.
- 8) 早野由里子. 2002. イネ縞葉枯病ウイルスのゲノム構造およびイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する研究. 北海道農業研究センター報告 第175号 1-45.
- 9) 早野由里子・藤井 潔. 2003. 特許DNAマーカーの利用と許諾の実際－イネ縞葉枯病および穂いもち抵抗性識別用マーカーの場合－ 育種学研究 5 : 121-125.
- 10) 林 薫, 鈴木 博, 牧野芳大. 1979. 東支那海における海上飛来昆虫の3年間 (1976年～1978年) の調査成績. *熱帯医学* 第21巻 第1号 1-10.
- 11) Hibino, H., P. Q. Cabauatan, T. Omura and T. Tsuchizaki. 1985. Rice grassy stunt virus strain causing tungrolike symptoms in the Philippines. *Plant Dis.* 69: 538-541.
- 12) Huang, N., E.R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadivel, J. Bennett and G. S. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice, marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet.* 95: 313-320.
- 13) Ideta, O., A. Yoshimura, T. Matsumoto, H. Tsunematsu, H. Satoh and N. Iwata. 1993. Integration of conventional and RFLP linkage maps in rice, II. Chromosomes 6, 9, 10 and 11. *Rice Genet. Newsl.* 10: 87-89.
- 14) Ikeda, R. and C. Kaneda. 1982. Genetic relationships of brown planthopper resistance to dwarf and stripe disease resistance in rice. *Jpn J Breed* 32: 177-185.
- 15) Ishii, T., D. S. Brar, D. S. Multani and G. S. Khush. 1994. Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice *O. sativa*. *Genome* 37:217-221.
- 16) Ishizaki, K., T. Hoshi, S. Abe, Y. Sasaki, K. Kobayashi, H. Kasaneyaama, T. Matsui and S. Azuma. 2005. Breeding of blast resistant

- isogenic lines in rice variety "Koshihikari" and evaluation of their characters. *Breed. Sci.* 55: 371-377.
- 17) Jena KK and G. S. Khush 1989. Monosomic alien addition lines of rice: production, morphology, cytology and breeding behavior. *Genome* 32: 449-455.
 - 18) Khush, G. S., E. Bacalangco and T. Ogawa. 1991. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genet. Newsl.* 7: 121-122.
 - 19) Kishimoto, N., E. Shimosaka, S. Matsuura and A. Saito. 1992. A current RFLP linkage map of rice: Alignment of the molecular map with the classical linkage map. *Rice Genet. Newsl.* 9: 118-124.
 - 20) 香村敏郎, 高松美智則, 枳 一郎, 朱宮昭男, 芳賀光司, 谷口 学, 工藤 悟, 田辺 潔, 伊藤和久, 中島泰則, 沓名吉弘 1983. イネ縞葉枯病抵抗性の新品種「青い空」の育成 愛知県農業総合試験場研究報告15号: 1-13.
 - 21) 香村敏郎, 朱宮昭男, 枳 一郎, 高松美智則, 伊藤俊雄, 工藤 悟, 加藤恭宏, 坂 紀邦 1985. イネ縞葉枯病抵抗性の新品種「月の光」の育成 愛知県農業総合試験場研究報告17号: 1-16.
 - 22) Kurata, N., Y. Nagamura, K. Yamamoto, Y. Harushima, N. Sue, J. Wu, B. A. Antonio, A. Shomura, T. Shimizu, S. Y. Lin, T. Inoue, A. Fukuda, T. Shimano, Y. Kobuki, T. Toyama, Y. Miyamoto, T. Kiriara, K. Hayasaka, A. Miyao, L. Monna, H. S. Zhong, Y. Tamura, Z. X. Wang, T. Momma, Y. Umehara, M. Yano, T. Sasaki and Y. Minobe. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* 8: 365-372.
 - 23) Lander, E. S., S. P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newbury. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
 - 24) Lin, X-H., D. P. Zhang, Y. F. Xie, Q. F. Zhang and H. P. Gao. 1995. Mapping a new gene for resistance to bacterial blight based on RFLP markers. *Rice Genet. Newsl.* 12: 234-236.
 - 25) Lincoln, S. E., M. J. Daly and E. S. Lander. 1993. Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual, 2nd edn. Whitehead Institute Technical Report. Cambridge, Massachusetts.
 - 26) McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9:199-207.
 - 27) Mew, T. W., A. S. Parco, S. Hittalmani, T. Inukai, R. J. Nelson, R. S. Zeigler and N. Huang. 1994. Fine-mapping of major genes for blast resistance in rice. *Rice Genet. Newsl.* 11: 126-128.
 - 28) Multani, D. S., K. K. Jena, D. S. Brar, B. G. de los Reyes, E. R. Angeles and G. S. Khush. 1994. Development of monosomic alien addition lines and introgression of genes from *Oryza australiensis* Domin. to cultivated rice *O. sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 88:102-109.
 - 29) Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
 - 30) Nemoto, H., K. Ishikawa and E. Shimura. 1994. The resistance to rice stripe virus and small brown planthopper in rice variety, IR50. *Breed. Sci.* 44:13-18.
 - 31) 野田 総, 大村敏博, 村上正雄, 土崎常男 1991. イネ縞葉枯病抵抗性品種に対するイネウイルス感染性. *日植病報* 57: 259-262.
 - 32) 小川義雄, 市川伊三郎, 西野敏勝, 渡邊朋也 1988. 1987年梅雨期東シナ海洋上と長崎県におけるウンカ類の飛来状況. *九州農業研究* 50:

124

- 33) Panaud, O., X. Chen and S. R. McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Gen. Genet. 252: 597-607.
- 34) 新海 昭 1985. イネ縞葉枯病をめぐる諸情勢と問題点 植物防疫 39: 503-507.
- 35) 塩原比左雄, 庭山 孝, 笠原直子, 森田久也, 小川信太郎 1982. 水稻新品種「むさしこがね」について 埼玉県農業試験場研究報告38号: 1-14.
- 36) 寒川一成 1992. イネウンカの発生生態に関わる最近の問題 植物防疫 46: 183-186.
- 37) 寒川一成 2005. 中国江蘇省におけるイネ縞葉枯病の大流行 農業技術 60(9): 405-409.
- 38) 孫工弥寿雄, 桜井義郎 1964. イネ縞葉枯病に関する研究 (Ⅶ), ウイルスの組織内の転流と初期増殖について 日植病報 29: 271.
- 39) 孫工弥寿雄 1973. イネ縞葉枯病に対するイネ品種抵抗性と病原ウイルスの感染ならびに増殖機構に関する研究 中国農業試験場報告 E 8: 1-86.
- 40) Tanksley, S. D., M. A. Causse, T. M. Fulton, S. A. Ahn, Z. Wang, K. Wu, J. Xiao, Z. Yu, G. Second and S. R. McCouch. 1992. A high density molecular map of the rice genome. Rice Genet. Newsl. 9: 111-115.
- 41) Tamura, K., M. Yano, T. Sasaki, K. Nomura, H. Namai and F. Kikuchi. 1995. Linkage analysis using RFLP for a photoperiod-sensitive gene *Se-1* locus with neighboring loci in rice. Breed. Sci. 44 (Suppl.1): 213 (in Japanese).
- 42) Temnykh, S., W. D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y. G. Cho, T. Ishii and S. R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 100: 697-712.
- 43) 鳥山国土, 桜井義郎, 江塚昭典, 鷺尾 養 1966. イネ縞葉枯病抵抗性品種の育成 農業技術 21: 16-20.
- 44) Ukai, Y., R. Ohsawa, A. Saito and T. Hayashi. 1995. MAPL: A package of computer programs for construction of DNA polymorphism linkage maps and analysis of QTL. Breed. Sci. 45:139-142.
- 45) Washio, O., A. Ezuka, Y. Sakurai and K. Toriyama. 1967. Studies on the breeding of rice varieties resistant to stripe disease. I. Varietal difference in resistance to stripe disease. Jpn. J. Breed. 17: 91-98.
- 46) Washio, O., A. Ezuka, Y. Sakurai and K. Toriyama. 1968a. Studies on the breeding of rice varieties resistant to stripe disease. II. Genetic studies on resistance to stripe disease in Japanese upland rice. Jpn. J. Breed. 18: 96-101.
- 47) Washio, O., A. Ezuka, Y. Sakurai and K. Toriyama. 1968b. Studies on the breeding of rice varieties resistant to stripe disease. III. Genetic studies on resistance to stripe in foreign varieties. Jpn. J. Breed. 18: 167-172.
- 48) 鷺尾 養, 江塚昭典, 鳥山国土, 桜井義郎 1968c. イネ縞葉枯病抵抗性の簡易検定法ならびに抵抗性品種の育成に関する研究 中国農業試験場報告 A16: 39-197.
- 49) Xiao, J., S. Grandillo, S. N. Ahn, S. R. McCouch and S. D. Tanksley. 1996. Genes from wild rice improve yield. Nature 384:223-224.
- 50) Zenbayashi, K., T. Ashizawa, T. Tani and S. Koizumi. 2002. Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32. Theor. Appl. Genet. 104: 547-552.

Genetic analysis for the rice stripe resistance of Japanese upland rice varieties and wild rice species.

Hideo MAEDA*

Summary

Rice stripe disease is one of the most important viral diseases affecting the rice (*Oryza sativa* L.) production in the temperate regions of East Asia, especially in China, Korea and Japan. The small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallen, transmits the rice stripe virus (RSV), a causal agent of the disease. This disease spreaded in the 1960s in Japan, and an estimated over 600,000 hectares of paddy field was damaged. Screening of RSV-resistant rice varieties was initiated in the early 1960's, and some Indica type rice varieties and Japanese upland rice varieties showed high resistance. An incompletely dominant gene, *Stvb-i*, controls RSV resistance in Indica type varieties. Resistance in Japanese upland rice varieties was controlled by two complementary genes, *Stva* and *Stvb*.

Breeding program of RSV-resistant rice was started using *Stvb-i* gene in Pakistan variety, Modan. Many resistant varieties have been cultivated widely in Japan and these resistant varieties have shown a stable resistance against RSV during the last 40 years. Consequently, almost all the resistant paddy rice varieties cultivated in Japan were expected to harbor this gene. Varieties with a single resistance gene may lose their resistance once the strain of virus changes virulence. For that reason, the other resistant genes should be introduced to the breeding programs of RSV-resistant rice. Some resistant paddy lines were introduced the resistance genes, *Stva* and *Stvb*, from Japanese upland rice varieties. However, these lines were also introduced inferior characteristics of grains and eating qualities from the donor parents.

In this study, the QTL analysis for rice stripe resistance in the Japanese upland rice Kanto72 (URK72) was performed. Detected QTLs were evaluated and characterized their resistance to RSV using near-isogenic lines (NILs). DNA marker-assisted selection system for rice stripe resistance was examined. Furthermore, novel resistant genes of wild species *Oryza rufipogon* and *O. officinalis* were studied.

1. QTL analysis for rice stripe resistance in the Japanese upland rice, Kanto72

To identify the chromosomal segments introduced from upland rice Kanto72 (URK72) into resistant progeny lines, RFLP and SSR marker analysis was performed. Two resistant lines, Chugoku40 and Chugoku41, were investigated their graphical genotypes using 328 RFLP markers and 221 SSR markers distributed on 12 rice chromosomes. In these two resistant lines, chromosomal segments of URK72 were introgressed into chromosomes 2, 6 and 11. RSV resistance genes were thought to be located on these chromosomal regions.

A total of 120 F₃ lines derived from a cross between a susceptible variety, Nipponbare, and URK72 was used for QTL analysis for RSV resistance. As a result, two QTLs were detected on the chromosomes 2 and

11. The QTL on chromosome 11 showed large effect for RSV and the LOD peak was detected near a RFLP marker G257. On the other hand, the QTL on chromosome 2 showed small effect for RSV resistance and the LOD peak was detected near a RFLP marker C601. Although the *Stva* gene was reported to be located on chromosome 6, no QTL for RSV resistance was detected on this chromosome.

In order to verify the two QTLs, we selected two informative plants NR8 (heterozygous at the QTL on chromosome 11) and NR23 (heterozygous at the QTL on chromosome 2) from F₂ plants and I used the self-pollinated progenies of NR23 (99 plants) and NR8 (96 plants) for further QTL analyses. In these secondary analyses, one QTL was mapped near the RFLP marker G257 on chromosome 11 and the other QTL was mapped near SSR marker MS-11 on chromosome 2. Since the *Stvb* gene is allelic with the other RSV resistance gene *Stvb-i*, which is closely linked to G257, the QTL detected on chromosome 11 was thought to correspond to the *Stvb* gene. However, the relationship between the QTL on chromosome 2 and the resistance gene *Stva* was unknown.

2. Characterization of two QTLs controlling resistance to RSV detected in the Japanese upland rice, Kanto 72.

The effects of two QTLs were evaluated using near-isogenic lines (NILs). The target QTL regions were introduced from the donor parent Chugoku 40 in the genetic background of Koshihikari. Two NILs possessing a single QTL (QTL-NILs) on chromosomes 2 and 11, respectively, were selected from BC₄F₂ population of the cross between Koshihikari and Chugoku 40 with marker-assisted selection (MAS). Another line, which was a combined QTL-NIL, was developed from the cross between the two QTL-NILs to analyze the interaction of the two QTLs.

Investigation of RSV resistance using three NILs revealed that the effects of the two QTLs were clearly differed in the reaction to RSV. The QTL on chromosome 11 had a major effect on reducing the infection rate of RSV. The QTL on chromosome 2 did not affect the infection rate, but made symptoms of diseased plants milder. The combined QTL-NIL showed high resistance to RSV, the infection rate and the symptom types of diseased plants were equivalent to those of URK 72 or Chugoku 40. From these results, RSV resistance identified in URK 72 was thought to be consisted of complementary effect of the two QTLs located on chromosomes 2 and 11.

It was reported that the resistance genes, *Stva* and *Stvb*, were complementary dominant genes and each gene has no effect against RSV independently. Although the complementary effect of the two QTLs was corresponding to the *Stva* and *Stvb* genes, each QTL provided the effects on the suppression of RSV infection and on the suppression of the symptom after infection of RSV. Major agricultural traits of the three QTL-NILs were the same to those of Koshihikari, therefore, these QTL-NILs were thought to be useful in rice breeding for RSV resistance as the gene sources.

3. Screening and QTL analysis of the RSV resistance using wild rice species, *Oryza rufipogon* and *O. officinalis*.

In order to identify novel RSV resistant genes, resistance of wild species was investigated. Firstly, wild species *O. rufipogon* (A genome) was studied. The QTL analysis was performed using 172 BC₂F₂ lines derived from the crossing between Koshihikari and *O. rufipogon* (IRGC Acc.104814). A linkage map of 12 chromosomes covering a genetic distance of 1560 cM was constructed using 145 SSR markers. As a result, two QTLs were detected on chromosomes 10 and 11. On chromosome 10, the QTL (LOD=2.6) was found

near SSR marker RM333 and this QTL explained about 7.7% of the total phenotypic variation. This QTL was thought to be detected new RSV resistance gene, but it showed small effect against RSV. The QTL on chromosome 11 (LOD=6.1) was detected near SSR marker RM229 and explained about 16.1% of the variation.

Secondly, wild species *O. officinalis* (C genome) was studied. Two resistant lines, WL158R and WL162, were selected from 139 BC₁F₃ lines introgressed chromosomal segment from *O. officinalis* into cultivated rice. Using 96 F₂ plants/F₃ lines derived from the crossing between Koshihikari (susceptible) and the two resistant lines, QTL analyzes were performed using SSR markers. As results, one major QTL was detected on the long arm of the chromosome 11 in both populations of WL158R and WL162.

In this study, the QTLs for RSV resistance were detected on the long arm of chromosome 11 using wild species *O. rufipogon* and *O. officinalis*. The detected QTL region of the chromosome 11 was known to be located on the resistant genes *Stvb-i* and *Stvb*. The relationships between the QTLs on the chromosome 11 and the two resistant genes were still unknown. Therefore, the relationships should clear through the allelism tests.