

圃場抵抗性品種から分離したイネいもち病菌の 遺伝子型とレースの調査

鈴木 文彦^{a)}・安田 伸子^{a)}・芦澤 武人^{a)}・早野由里子^{a)}

農研機構 中央農業総合研究センター

[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1]

Analysis of SSR genotyping and pathogenic races of *Pyricularia oryzae* isolates
obtained from rice cultivars possessing different blast resistant genes

Fumihiko SUZUKI^{a)}, Nobuko YASUDA^{a)}, Taketo ASHIZAWA^{a)}

and Yuriko HAYANO-SAITO^{a)}

NARO Agricultural Research Center

1. 目的

近年、水稻の品種育成においては、いもち病に対する圃場抵抗性遺伝子の利用が進められている。これまでに、陸稲品種等に由来する圃場抵抗性遺伝子として、*pi21* (Fukuoka et al., 2009), *Pi34* (Zenbayashi-Sawata et al., 2007), *Pi35* (Fukuoka et al., 2014) 等が同定されている。圃場抵抗性は、いもち病菌のレースに関係なく量的な抵抗性を示す特徴があり、真性抵抗性に比べて侵害菌による抵抗性崩壊が起りにくいと考えられてきた。しかし、同定された圃場抵抗性遺伝子の多くは、単独でも真性抵抗性に匹敵する強い抵抗性を発揮し、遺伝子によっては強侵害菌の存在を示す例も報告されている。このため、圃場抵抗性品種の普及にあたっては、いもち病菌集団に対する選択圧などの影響も考慮した上で、持続的な利用法を構築することが求められる。本試験では、いもち病の常発圃場において圃場抵抗性遺伝子を導入した3つの準同質遺伝子系統・品種 (NIL) を栽培し、各系統上でのいもち病菌集団の多様性やレースを調査した。なお、レース判別を実施した菌株の一部については、ジーンバンクに登録保存した。

2. 材料および方法

1) 発病調査とサンプリング

本調査は、愛知県豊田市稲武町において2012年に実施した。コシヒカリおよびコシヒカリにいもち病抵抗性遺伝子 (*pi21*, *Pi34*, *Pi35*) を導入した準同質遺伝子系統・品種 (NIL-*pi21*, NIL-*Pi34*,

a) (現所属) 農研機構 中央農業研究センター Central Region Agricultural Research Center, NARO
[〒305-8666 茨城県つくば市観音台 2-1-18]

NIL-*Pi35*) を栽培し (各区 1.5 m²・75 株, 3 連制), 発病調査を行うとともに, 各系統・品種から葉いもちの病斑をサンプリングした. なお, 移植日は 6 月 7 日, 葉いもちの発病調査と病斑のサンプリングは 8 月 13 日に行った. 発病調査は, 浅賀の調査基準 (浅賀, 1981) を参考にして実施した.

2) 菌株の分離と遺伝子型の解析

サンプリングした病斑を供試し, 単孢子分離操作によって 1 病斑あたり 1 菌株を取得した. 分離菌株については, 8 種類の SSR マーカー (鈴木ら, 2012) を用いたジェノタイピングにより, 遺伝子型 (ハプロタイプ) に類別した. 使用した SSR マーカーは, Mgms01, Mgms02, Mgms04, Mgms06, Mgms08, Mgms09, Mgms14, および ms99-100 である. ハプロタイプ多様度は, 以下に記した Nei (1987) の計算式により行った. ハプロタイプ多様度 $h = n(1 - \sum xi^2) / (n-1)$; ただし, n はサンプル数, xi はハプロタイプ i の頻度.

3) レース検定

コシヒカリおよび各 NIL から取得した葉いもち分離集団から一部菌株を系統抽出し, レース検定を実施した. コシヒカリ分離集団からは 28 菌株 (うち 15 菌株をジーンバンクに登録: MAFF 101740, MAFF 101741, MAFF 101742, MAFF 101743, MAFF 101744, MAFF 101745, MAFF 101746, MAFF 101747, MAFF 101748, MAFF 101749, MAFF 101750, MAFF 101751, MAFF 101752, MAFF 101753, MAFF 101754), NIL-*pi21* 分離集団からは 29 菌株 (うち 17 菌株をジーンバンクに登録: MAFF 101770, MAFF 101771, MAFF 101772, MAFF 101773, MAFF 101774, MAFF 101775, MAFF 101776, MAFF 101777, MAFF 101778, MAFF 101779, MAFF 101780, MAFF 101781, MAFF 101782, MAFF 101783, MAFF 101784, MAFF 101785, MAFF 101786), NIL-*Pi34* 分離集団からは 29 菌株, NIL-*Pi35* 分離集団からは 10 菌株についてそれぞれ調査した. 各菌株は, オートミール寒天培地 (蒸留水 11 当たりオートミール 30 g, ショ糖 5 g, 粉末寒天 16 g) で 25 °C で培養後, 常法 (日本植物防疫協会, 1995) により分生孢子懸濁液を作成し, 判別品種に噴霧接種した. 判別品種には Yamada et al. (1976) の 9 品種に清沢 (1979) の 3 系統 (K60, BL1 および K59) を参考品種として加え, 接種葉身に生じた病斑の病斑型からレース判別を行った. なお, 清沢の 3 系統の K60 にはコード番号 000.1, BL1 には 000.2, K59 には 000.4 を与えた. また, 各判別イネ品種は, 粒状培土を充填したシードリングケース (縦 15 cm×横 5 cm×高さ 10 cm) に播種し, ガラス温室内で育苗し, 4~5 葉期にレース検定に供した.

3. 結果と考察

葉いもちの発病度の調査では, 原品種のコシヒカリに比較して各 NIL の発病程度が段階的に軽減され, 抵抗性遺伝子の強弱の程度を評価すると, *Pi34* < *pi21* < *Pi35* となった. サンプリングと単孢子分離作業の結果, コシヒカリ, NIL-*pi21* および NIL-*Pi34* からは, それぞれ 100 菌株前後が取得でき, 集団解析に必要な菌株数が確保できた. 一方, NIL-*Pi35* では病斑がほとんど形成されな

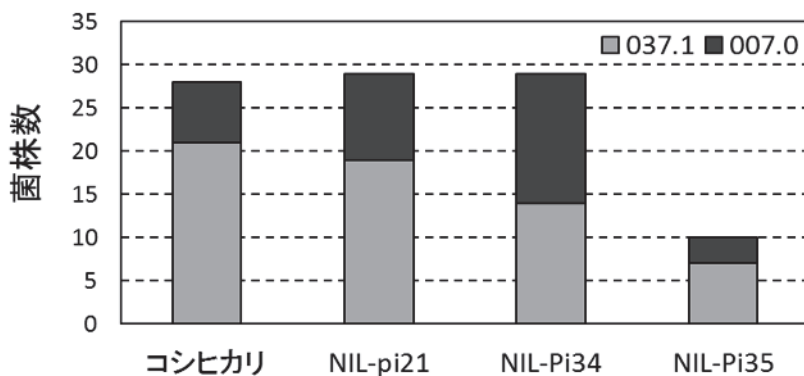


図 1. 葉いもち集団のレース構成

A および B) が 4 集団すべてで多数を占めた。

4 集団のハプロタイプ多様度については 0.483~0.605 となり、全体的に多様度は低く集団間差も小さかった。このことから、圃場抵抗性を導入した NIL 間で発病程度は異なるが、構成するハプロタイプや多様度への影響は小さいことが明らかになった。一方、全集団で 2 種類のハプロタイプが優占化したことや、全体的に低い多様度となった要因については特定できなかった。

4 集団から抽出した 96 菌株を対象にレース調査を実施した結果、レース 007.0 とレース 037.1 の 2 種類が検出された (図 1)。NIL-*Pi34* では、007.0 と 037.1 の分離割合が拮抗していたが、その他の 3 集団では、037.1 の割合が高かった。レースとハプロタイプの関係では、レース 037.1 はすべてハプロタイプ A と特定され、レース 007.0 は、ハプロタイプ B を中心に 6 種類のハプロタイプが含まれていた。前年の同圃場で行ったレース調査では、007.0 のみが検出されていたため、037.1 の菌系は調査年に急速に優占化したものと推察される。近年は、真性抵抗性遺伝子の *Pik* を

表 1. MAFF 登録菌株とレース検定結果

菌株 (MAFF番号)	レース 検定結果	菌株 (MAFF番号)	レース 検定結果
101740	037.1	101771	037.1
101741	037.1	101772	037.1
101742	037.1	101773	037.1
101743	037.1	101774	037.1
101744	037.1	101775	037.1
101745	007.0	101776	037.1
101746	037.1	101777	037.1
101747	037.1	101778	037.1
101748	037.1	101779	007.0
101749	037.1	101780	007.0
101750	007.0	101781	037.1
101751	007.0	101782	007.0
101752	007.0	101783	037.1
101753	037.1	101784	007.0
101754	037.1	101785	007.0
101770	037.1	101786	007.0

かったため、分離できた菌株が 10 菌株程度となった。次に、分離したすべてのいもち病菌株を対象として、8 種類の SSR マーカーを用いてジェノタイピングした結果、約 300 菌株の解析集団からは 17 のハプロタイプが検出された。このうち、分離頻度の高い 2 種類のハプロタイプ (ハプロタイプ

導入した品種を中心に 037.1 の菌系は全国的に観察されているが、本調査の供試系統・品種はすべて *Pik* を保有しない。本調査結果に関しては、多様な品種・系統が作付される試験地特有の環境が影響したとも考えられる。なお、調査対象菌株のうち、2015 年度までにジーンバンクに登録保存した 32 菌株について、レース検定結果を表 1 に

示した。今後も引き続き、いもち病菌集団のハプロタイプやレース構成の解析を通して、圃場抵抗性品種の持続的利用の可能性を明らかにしていく。

4. 参考文献

- 浅賀宏一 (1981). イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究. 農事試研報 35: 51–138.
- Fukuoka, S., Saka, N., Koga, H., Ono, K., Shimizu, T., Eban, K., Hayashi, N., Takahashi, A., Hirochika, H., Okuno, K. and Yano, M. (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325: 998–1001.
- Fukuoka, S., Yamamoto, S., Mizobuchi, R., Yamanouchi, U., Ono, K., Kitazawa, N., Yasuda, N., Fujita, Y., Nguyen, T.T.T., Koizumi, S., Sugimoto, K., Matsumoto, T. and Yano, M. (2014). Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Scientific Reports* 4:45–50.
- 清沢茂久(1979). 作物の病害抵抗性育種とその基礎研究. 農及園 54: 1427–1432.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- 日本植物防疫協会 (1995). 作物病原菌研究技法の基礎—分離・培養・接種 (大畑貫一・荒木隆男・木曾皓・工藤晟・高橋廣治編). 日本植物防疫協会. 東京. pp. 342.
- 鈴木文彦・藤 晋一・古場文子・中島 隆・荒井治喜 (2012). SSR マーカーによる西日本から分離されたイネいもち病菌の多様性と集団解析. 日本植物病理学会報 78: 10–17.
- Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. (1976). Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42: 216–219.
- Zenbayashi-Sawata, K., Fukuoka, S., Katagiri, S., Fujisawa, M., Matsumoto, T., Ashizawa, T. and Koizumi, S. (2007). Genetic and physical mapping of the partial resistance gene, *Pi34*, to blast in rice. *Phytopathology* 97: 598–602.