

近似同質遺伝子系統を用いたイネ品種DV85のツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子のRFLPマッピング

矢沢, さゆり
九州大学農学部育種学教室

安井, 秀
九州大学農学部育種学教室

吉村, 淳
九州大学農学部育種学教室

岩田, 伸夫
九州大学農学部育種学教室

<https://doi.org/10.15017/23613>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 52 (3/4), pp.169-175, 1998-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

近似同質遺伝子系統を用いたイネ品種 DV85の ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子の RFLP マッピング

矢 沢 さゆり・安 井 秀
吉 村 淳・岩 田 伸 夫

九州大学農学部育種学教室
(平成9年11月26日受付)

RFLP Mapping of Genes for Resistance to Green Rice Leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler) in Rice Cultivar DV85 Using Near Isogenic Lines

Sayuri YAZAWA, Hideshi YASUI,
Atsushi YOSHIMURA and Nobuo IWATA
Plant Breeding Laboratory, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒 言

ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps* Uhler) は日本、朝鮮半島および中国に分布するイネの重要害虫の一種であり、出穂期の穂や稈を吸汁することによってイネを加害する。ツマグロヨコバイは導管部と篩管部の両方から吸汁してイネを萎凋させる他に、イネ萎縮病や矮化病ウイルスを媒介して被害を増大させる。これら病虫害に対する耕種の防除法として本昆虫に対する抵抗性育種が行われてきた(金田ら1985, 井辺・岩崎 1987, 池田ら1989, Takita 1990)が、抵抗性遺伝子の染色体上の位置については明らかにされていない。一方、イネでは核 DNA の相同領域における塩基配列の違いを反映した RFLP (DNA 制限酵素断片長多型) や RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) などの DNA マーカーによる高精度の連鎖地図が作成され、イネ白葉枯病抵抗性遺伝子 (Yoshimura *et al.*, 1992) やトビイロウンカ抵抗性遺伝子 (Hirabayashi and Ogawa 1995) などの耐病虫害性遺伝子のマッピングに利用されている。

そこで本論文では、インド型イネ DV85 のもつツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子をマッピングするために、DV85 を抵抗性供与親、日本型イネ台中65号と金南風をそれぞれ反復親としてツマグロヨコバイ抵抗性に関する2種類の近似同質遺伝子系統群 (Near Isogenic

Lines) を育成し、それらを用いてツマグロヨコバイ抵抗性の RFLP 分析を行った。

材料及び方法

供試イネ

インド型イネ DV85 を抵抗性供与親とし、感受性品種台中65号ならびに金南風を反復親として育成した2種類の近似同質遺伝子系統群を供試した。台中65号を反復親とした場合には、 B_1F_1 世代と B_2F_1 世代においては抵抗性個体の選抜と戻し交配を繰り返した。 B_3F_1 世代においては抵抗性個体を選抜して、実験に供試した。一方、金南風を反復親とした場合には、 B_2F_1 世代で抵抗性個体を選抜した後、 B_4F_1 まで抵抗性の検定と戻し交雑を繰り返した。さらに、 B_4F_1 で抵抗性を示した20個体を自殖させて50-80個体から成る B_4F_2 集団を育成し、ツマグロヨコバイ抵抗性の評価ならびに RFLP 分析に供試した。

供試虫

1991年、福岡県粕屋郡粕屋町で採集したツマグロヨコバイ個体群を供試した。同個体群は、杉本 (1969) に従って25℃, 16時間人工照明, 湿度60%の恒温室内で累代飼育を行った。餌としてツマグロヨコバイ感受性である水稻品種日本晴の幼苗を与えた。

ツマグロヨコバイ抵抗性の検定

岸野・安藤 (1978) および井辺・岩崎 (1987) の方

法に準じて成稲期の切葉検定によって個体ごとにツマグロヨコバイ抵抗性を評価した。試験管に約 2 ml の水と、成稲の最上位展開葉下第一葉の基部約 17cm を入れ、2 齢幼虫を 10 頭前後放飼した後、綿栓で封じた。検定は、25°C、16 時間人工照明、湿度 60% の恒温室内で行った。いずれの個体においても、出穂期前後の成葉を用いて 3 反復ないし 5 反復の検定を行い、幼虫放飼後 3 日目における幼虫生存率の平均を求めることで抵抗性の評価を行った。幼虫生存率が 0-30% の個体を強度抵抗性、31-70% の個体を中度抵抗性、71-100% の個体を感受性と判定した。

RFLP 分析

3 集団の近似同質遺伝子系統をもちいてツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子の RFLP 分析を行った。まず、BC₃F₁ ならびに BC₄F₂ 8 と BC₄F₂ 20 の成葉から、Rogers and Bendich (1988) を改変した CTAB 法により全 DNA を抽出し、バルク法 (Michelmor *et al.*, 1991) により抵抗性集団と感受性集団の多型検出を行った。各個体もしくは各集団の DNA は 6 種類の制限酵素、*Bam* HI, *Bgl* II, *Dra* I, *Eco*

RI, *Eco* RV, *Hin* dIII で消化し、プローブには、Saito *et al.* (1991) および Kurata *et al.* (1994) の RFLP 連鎖地図上に座乗する 67 個のクローンを用いた (Table 1)。RFLP の検出には ECL (direct nucleic acid labelling and detection systems: Amersham 社製) を使用した。台中 65 号もしくは金南風と DV85, ならびに 3 種類の近似同質遺伝子系統の抵抗性個体をバルクにした集団の多型検出の結果から、Young and Tanksley (1989) に基づいて、それぞれの近似同質遺伝子系統集団のグラフィカルジェノタイプを描いた。すなわち、マーカー間の距離が 31.6cM よりも短いときに、90% の確率でそのマーカー間の領域の遺伝子型を推測した。さらに B₄F₂ 8 および B₄F₂ 20 の抵抗性個体のバルク集団と感受性である金南風との間で多型が見られたクローンについては、B₄F₂ 8 および B₄F₂ 20 の全個体を用いてツマグロヨコバイ抵抗性との連鎖分析を行った。組換え価の算出は、最尤法 (Allard 1956) に拠り、組換え価を Kosambi (1944) の地図関数によって地図距離に変換して連鎖地図に示した。

Table 1. RFLP clones used in this whole genome survey

Chromosome	RFLP clone
1	C112 Npb346 Npb113 C86 Npb92 Npb343 Npb302 Npb297 Npb364 Npb252 C1211 C955
2	C560 R418 Npb39 Npb395 Npb42 Npb67 G1314 Npb132 Npb227 Npb349
3	Npb164 Npb249 Npb362 Npb144 Npb23 Npb74 Npb238 C563
4	Npb177 Npb331 Npb237
5	Npb208 C859 R569 G260 Npb105 Npb81 Npb255 C1447
6	Npb27 Npb172 Npb386 Npb342
8	Npb397 Npb41 Npb278
9	Npb36 Npb103 Npb108
10	C701 C148 C16
11	Npb181 G1465 C1003 Npb202 Npb44 Npb179 Npb115 C496 C794 Npb142 Npb52
12	C901 Npb148

Npb; Saito *et al.* (1991)

C, G, R; Kurata *et al.* (1994)

結 果

近似同質遺伝子系統の育成

台中65号を遺伝的背景にもつ2系統の B₂F₁ と金南風を遺伝的背景にもつ各系統4ないし10個体から成る13系統の B₄F₁ とを育成し、ツマグロヨコバイ抵抗性の検定を行ったところ、中度抵抗性を示す個体は見られずほとんどの系統では強度抵抗性個体と感受性個体に分離した。そこで、B₂F₁ で抵抗性と判定された6個体について戻し交配を行い B₃F₁ 集団を育成した後、B₃F₁ の抵抗性の検定を行って台中65号を遺伝的背景にもつ DV 85由来のツマグロヨコバイ抵抗性に関する近似同質遺伝子系統を選抜した。同様にして、抵抗性を示した B₄F₁ に由来する20系統の B₄F₂ 集団を育成し、各系統10個体を供試した予備検定で中度抵抗性個体が見られず強度抵抗性個体と感受性個体が分離した B₄F₂ 8, B₄F₂ 14, B₄F₂ 20の3集団の全個体について抵抗性の検定を行い、金南風を遺伝的背景にもつ DV 85由来のツマグロヨコバイ抵抗性に関する近似同質遺伝子系統を選抜した。

ツマグロヨコバイ抵抗性の遺伝分析

親品種である台中65号、金南風、および DV 85の検定を行ったところ、台中65号と金南風は感受性、DV 85は強度抵抗性であった。また、台中65号と DV 85の交雑 F₁、ならびに金南風と DV 85の交雑 F₁ における抵抗性の検定を行ったところ、いずれも強度抵抗性であった。

B₂F₁ と B₃F₁、ならびに各系統4ないし10個体から成る13系統の B₄F₁ を育成し、戻し交雑雑種集団におけるツマグロヨコバイ抵抗性の検定を行った結果、B₂F₁、B₃F₁ ならびに B₄F₁ では、抵抗性個体と感受性個体がそれぞれ7:14, 18:69, 25:66に分離し、

これらは抵抗性が独立な2個の優性補足遺伝子に支配されるとした場合の戻し交雑雑種集団における理論分離比1:3に適合した (Table 2)。

DV 85を抵抗性供与親、金南風を反復親とした3集団の近似同質遺伝子系統である B₄F₂ 8, B₄F₂ 14および B₄F₂ 20においてツマグロヨコバイ抵抗性の検定を行った結果、抵抗性個体と感受性個体がそれぞれ28:27, 31:30, 44:24に分離し、いずれも抵抗性が独立した2個の優性補足遺伝子に支配されている場合の F₂の理論分離比9:7に適合していた (Table 3)。

RFLP 分析

染色体7を除く11の染色体に座乗する67個の RFLP マーカーの各遺伝子座において、バルク法により DV 85の染色体断片の導入を推定したところ、抵抗性バルク集団では、染色体3, 9, および11において DV 85の染色体領域が導入されており、その他の染色体においては DV 85の染色体領域は導入されていなかった。各近似同質遺伝子系統の抵抗性バルク集団の、染色体3, 9および11の遺伝子型を調査し、グラフィカルジェノタイプを作成した (Fig. 1)。

台中65号を遺伝的背景にもつ B₃F₁ の抵抗性バルク集団 (11個体) では、染色体3の XNpb362-XNpb144の領域と、染色体9の XNpb103, 染色体11のそれぞれ G1465, XNpb44および XNpb52の領域において DV 85の染色体領域が導入されていた。

金南風を遺伝的背景にもつ B₄F₂ 8の抵抗性バルク集団 (10個体) では、染色体3の XNpb144-XNpb23-XNpb74-XNpb238の領域で DV 85の染色体が導入されていた。このうち XNpb144, XNpb23, XNpb238の分離と抵抗性との連鎖分析を行った結果、明らかに連鎖関係が認められ、各 RFLP マーカーと抵抗性遺伝子との組換え価 (%) は、それぞれ 0, 11.1±6.6,

Table 2. Segregation for green rice leafhopper resistance in the backcrossed F₁ populations derived from the cross of Kinmaze with DV 85

Population	Number of plants			χ^2 (1:3)
	R ^{a)}	S ^{b)}	Total	
B ₂ F ₁	7	14	21	0.78
B ₃ F ₁	18	69	87	0.86
B ₄ F ₁	25	66	91	0.30

a): Resistant, b): Susceptible

Table 3. Segregation for green rice leafhopper resistance in the backcrossed F₂ populations derived from the cross of Kinmaze with DV 85

B ₄ F ₂	Number of plants			χ^2 (9:7)
	R ^{a)}	S ^{b)}	Total	
8	28	27	55	0.64
14	31	30	61	0.73
20	44	24	68	1.98
Total	103	81	184	0.01

a): Resistant, b): Susceptible

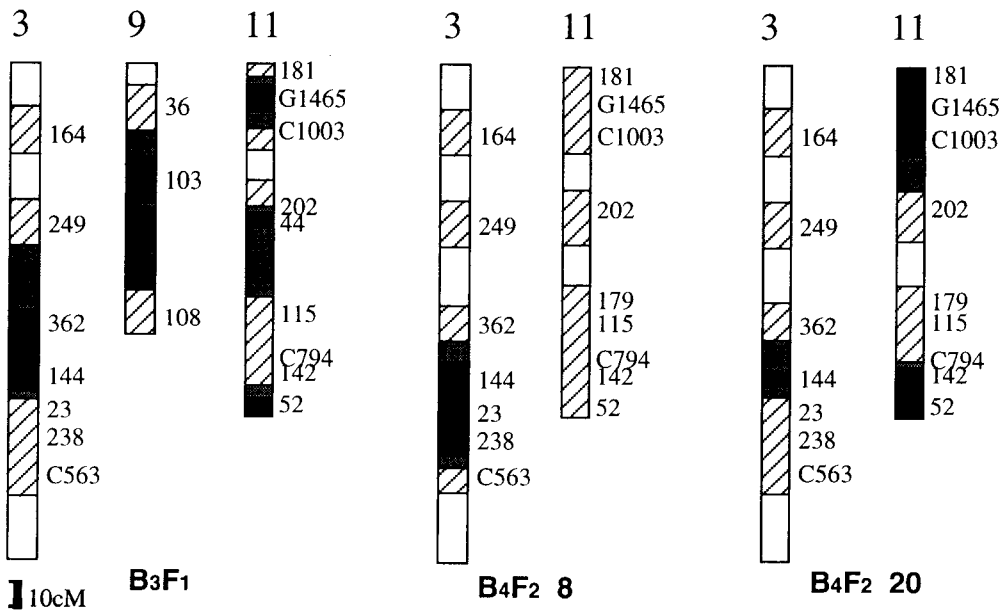


Fig. 1. Graphical genotypes of near isogenic populations with green rice leafhopper resistance derived from rice cultivar DV 85

■ Genotype of DV 85 ▨ Recombination
 ▨ Genotype of susceptible cultivar □ Unknown

Table 4. Linkage analysis of green rice leafhopper resistance with RFLP markers in the backcrossed F₂ populations derived from the cross of Kinmaze with DV 85

Population	Gene (Chromosome number)		Segregation in F ₂						$\chi^{(2)}$	R.V. (%)
	A	B	A-BB	A-Bb	A-bb	aaBB	aaBb	aabb		
B ₄ F ₂ 8	<i>Grh-a(t)</i> (3)	<i>XNpb144</i> (3)	8	20	0	4	7	16	23.58**	0.0
	<i>Grh-a(t)</i> (3)	<i>XNpb23</i> (3)	8	17	3	3	8	16	14.39**	11.1±6.6
	<i>Grh-a(t)</i> (3)	<i>XNpb238</i> (3)	10	15	3	4	8	15	12.69**	12.4±7.0
B ₄ F ₂ 20	<i>Grh-a(t)</i> (3)	<i>XNpb144</i> (3)	16	26	0	4	9	11	23.28**	0.0
	<i>Grh-b(t)</i> (11)	<i>XNpb181</i> (11)	23	20	1	4	7	13	26.31**	4.3±3.9
	<i>Grh-b(t)</i> (11)	<i>G1465</i> (11)	24	20	0	1	7	16	41.09**	0.0
	<i>Grh-b(t)</i> (11)	<i>XNpb52</i> (11)	8	20	15	9	15	0	11.29**	>50.0

1) A, B: Allele derived from DV 85; a, b: Allele derived from Kinmaze.

2) χ^2 for independence (df=2). **; Significant at the 1% level.

12.4±7.0であった (Table 4)。そこでツマグロヨコバイ抵抗性と RFLP マーカーとの組換え価をもとにして、染色体 3 に座乗するツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子と RFLP マーカーとの連鎖地図を作成した (Fig. 2)。

また金南風を遺伝的背景にもつ B₄F₂ 20 の抵抗性バルク集団 (10 個体) では、染色体 3 の *XNpb144* の領域、染色体 11 の *XNpb181-G1465-C1003* の領域と *XNpb142-XNpb52* の領域で DV 85 の染色体領域が導入されていた (Fig. 1)。これらの RFLP マーカー

とツマグロヨコバイ抵抗性の連鎖分析を行ったところ、染色体 3 の *XNpb144* と染色体 11 の *G1465* については B₄F₂ 8 の抵抗性バルク集団における *XNpb144* と同様に、組換え価が 0 % となり、ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子と密接に連鎖していた (Table 4)。また、染色体 11 の *XNpb181* の分離とツマグロヨコバイ抵抗性との組換え価 (%) は、4.3±3.9 であった。これらの RFLP マーカーとツマグロヨコバイ抵抗性との組換え価をもとにして、染色体 11 に座乗するツマグロヨコバ

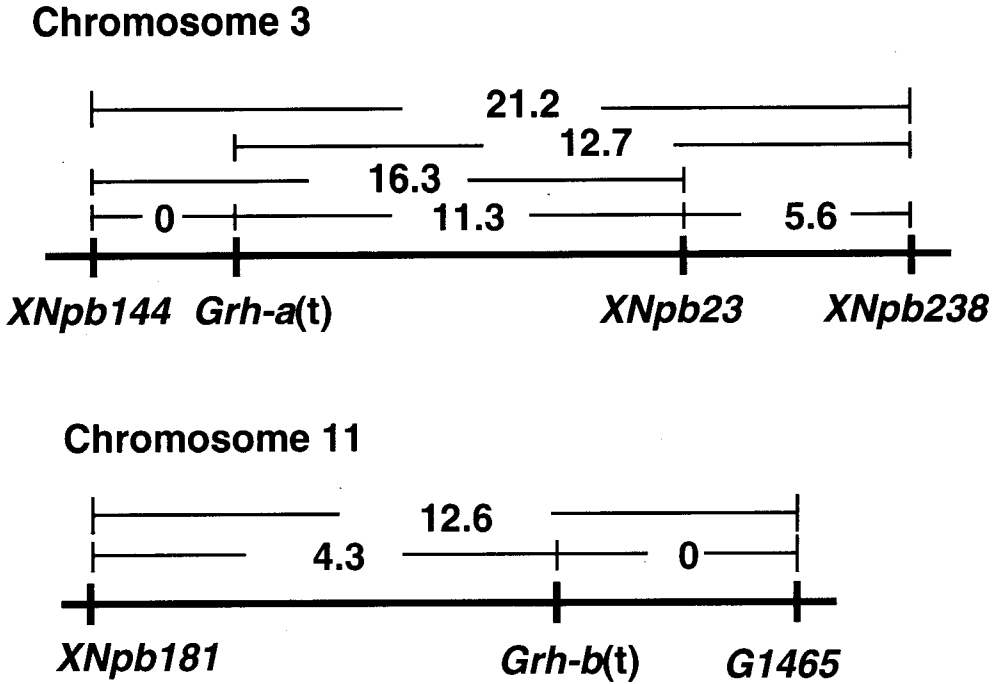


Fig. 2. Linkage map of green rice leafhopper resistant gene with RFLP markers (cM)

イ抵抗性遺伝子と RFLP マーカーとの連鎖地図を作成した (Fig. 2)。

考 察

イネのツマグロヨコバイ幼虫に対する抗生作用は、生育初期において強く、その後一時弱くなった後、出穂期前後に再び強くなり、出穂後再び弱くなる傾向があると報告されている (岸野・安藤1979)。本研究において、台中65号、金南風をそれぞれ遺伝的背景を持つ DV 85 に由来するツマグロヨコバイ抵抗性に関する近似同質遺伝子系統を育成し、これらの抵抗性検定の結果から、DV 85 のもつ出穂期前後のツマグロヨコバイ抵抗性は、独立した 2 個の優性補足遺伝子に支配されていると推測された。

また DV 85 に由来するツマグロヨコバイ抵抗性に関する近似同質遺伝子系統の RFLP 分析の結果から、DV 85 のもつ独立した 2 個の優性補足遺伝子のうち、1 つは染色体 3 上の RFLP マーカー *XNpb144* に密接に連鎖していることがわかった。2 個の優性補足遺伝子のうち他の 1 つは B₄F₂ 20 の抵抗性パルク集団を用いた連鎖分析の結果から、染色体 11 上の RFLP マーカー *XNpb181* および *G1465* と連鎖が検出された。田

村ら (1994) は、ツマグロヨコバイ抵抗性を示す中間母本系統である農 5 号、農 6 号の抵抗性供与親である C203-1 および *Lepedumai* のツマグロヨコバイ抵抗性に関与する領域の推定を行い、グラフィカルジェノタイプの結果から農 5 号、農 6 号に共通に見られた染色体 3、11 の供与親に由来する領域が関与している可能性が高いと報告している。田村ら (1994) の報告では、C203-1 および *Lepedumai* に由来するツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子のうち、染色体 11 上のツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子の位置は明らかにされていないが、染色体 3 上の抵抗性遺伝子は RFLP マーカー *XNpb144* の近傍に位置すると推測しており、本論文においてマッピングされた DV 85 のもつツマグロヨコバイ抵抗性を支配する 2 個の優性補足遺伝子のうちのひとつと同座である可能性が高いと思われる。

本研究において、金南風を遺伝的背景にもつ近似同質遺伝子系統 (B₄F₂ 20) の RFLP 分析の結果、2 個のツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子とそれぞれに連鎖のみられた RFLP マーカーである染色体 3 上の *XNpb144*、あるいは染色体 11 上の *G1465* のいずれかが DV85 型に固定している抵抗性個体を選抜することができた。今後はこれらの抵抗性個体の自殖後代 (B₄F₃) を育

成してより精度の高い連鎖分析を行うことにより、DV 85のもつツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子の詳細なマッピングが可能と考えられた。

要 約

ツマグロヨコバイ抵抗性品種 DV 85を供与親、感受性品種台中65号および金南風をそれぞれ反復親として戻し交配を繰り返し、それぞれの近似同質遺伝子系統である B₃F₁, B₄F₂を育成した。このうち、3集団の B₄F₂における抵抗性検定の結果、抵抗性個体と感受性個体は103:81に分離し、DV 85が示すツマグロヨコバイ抵抗性は独立した2個の優性補足遺伝子を仮定した場合の理論分離比9:7に適合した。そこで、B₄F₂ 8と B₄F₂ 20の2集団において、DNA マーカーと抵抗性との連鎖分析を行ったところ、両集団とも染色体3上のDNA マーカーである *XNpb144*がツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子と密接に連鎖していた。また B₄F₂ 20の集団においては、染色体11上のDNA マーカーである *XNpb181*と *G1465*でツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子との連鎖が見られた。

以上の結果から、DV 85の示す出穂期前後のツマグロヨコバイ抵抗性は独立した2個の優性補足遺伝子に支配されており、そのうち1個は染色体3上の *XNpb144*の近傍に位置づけられた。また、ツマグロヨコバイ抵抗性を支配するもう1個の遺伝子は染色体11上のRFLP マーカー *G1465*の近傍に位置するものと推測された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、九州大学生物環境調節センターには、供試昆虫の飼育ならびに抵抗性の検定のために昆虫飼育室の使用にご協力戴きました。ここに記して深謝申し上げます。

文 献

- Allard, R. W. 1956 Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* 24(10): 235-278
- Hirabayashi, H. and T. Ogawa 1995 RFLP mapping of *Bph-1* (Brown planthopper resistance gene) in rice. *Breed. Sci.* 45: 369-371
- 池田良一・武田光能・東 正昭 1989 水稻中間母本農6号におけるツマグロヨコバイ抵抗性の遺伝分析. 北日本病虫研報 40: 84-86
- 井辺時雄・岩崎真人 1987 水稻中間母本農5号のツマグロヨコバイおよび萎縮病に対する抵抗性の遺伝. 育種 37: 177-184
- 金田忠吉・横尾政雄・池橋 宏・小林 陽・池田良一・根本 博 1985 ツマグロヨコバイ・萎縮病に抵抗性の水稻中間母本農2号の育成. 農研センター研報 5: 81-91
- 岸野賢一・安藤幸夫 1978 水稻のツマグロヨコバイ耐虫性に関する研究. 1. 抗生作用の検定法について. 応動昆 22: 169-177
- 岸野賢一・安藤幸夫 1979 水稻のツマグロヨコバイ耐虫性に関する研究. 2. 稲の生育時期による抗生作用の変動. 応動昆 23: 129-133
- Kosambi, D. D. 1944 The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175
- 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. Kuboki, T. Toyama, Y. Miyamoto, T. Kirihara, 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 genetics map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* 8: 365-372
- Michelmore, R. W., I. Paran and R. V. Kesseli 1991 Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832
- Rogers, S. O., and J.A. Bendich 1988 Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* A6: 1-10
- Saito, A., M. Yano, N. Kishimoto, M. Nakagahra, A. Yoshimura, K. Saito, S. Kuhara, Y. Ukai, M. Kawase, T. Nagamine, S. Yoshimura, O. Ideta, R. Ohsawa, Y. Hayano, N. Iwata and M. Sugiura 1991 Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Japan. J. Breed.* 41: 665-670
- 杉本 渥 1969 ツマグロヨコバイの大量飼育装置. 農薬検査所報告 9: 19-24
- Takita, T. 1990 Gene analysis for resistance to green rice leafhoppers. *Rice Genetics Newsletter* 7: 117-118
- 田村克徳・福田普通・平江雅宏・福井希一・大矢慎吾 1995 イネのツマグロヨコバイ耐虫性に関する遺伝機構の解明. 1. グラフィカルジェノタイプによる耐虫性関連領域の推定. 育種 45(別1): 110

Yoshimura, S., A. Yoshimura, A. Saito, N. Kishimoto, M. Kawase, Y. Yano, M. Nakagahara, T. Ogawa and N. Iwata 1992 RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near-isogenic lines of rice for bacterial bright resistance genes,

Xa-1, Xa-3 and Xa-4. Jpn. J. Genet. **67**: 29-37

Young, N. D. and S. D. Tanksley 1989 Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 95-101

Summary

Genetic analyses were carried out to determine the loci of resistance to green rice leafhopper (GRLH) (*Nephotettix cincticeps* UHLER). Near isogenic lines with GRLH resistance genes were developed by backcrossing four times using GRLH susceptible cultivar, Kinmaze as recurrent parents and DV 85 as a donor parent. Genetic segregation ratios in the backcrossed F₂ populations indicated two dominant complementary genes govern GRLH resistance of DV 85. RFLP analysis revealed that one of the resistance genes was tightly linked with RFLP marker, *XNpb144* on chromosome 3, in both of the two backcrossed F₂ populations, and that the other resistant gene was linked with RFLP markers, *XNpb181* and *G1465* on chromosome 11 in one of the backcrossed F₂ populations. Among the two RFLP markers on chromosome 11, *G1465* was most tightly linked to the resistance gene.