ノート

イネいもち病真性抵抗性遺伝子座 *Pia*, *Pii* および *Pik* の遺伝子型を推定する DNA マーカーの検証

野々上慈徳・佐藤宏之・石井卓朗

農研機構・次世代作物開発研究センター, 茨城県つくば市, 〒305-8518

Verification of DNA markers to estimate genotype at blast resistance loci *Pia*, *Pii* and *Pik* in rice

Yasunori Nonoue, Hiroyuki Sato and Takuro Ishii

Institute of Crop Science, NARO, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan

キーワード

イネいもち病, 真性抵抗性, DNA マーカー

緒言

イネいもち病は、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) がイネに感染することで引き起こされる重要病害の一つである。

いもち病菌に対するイネの抵抗性は、一般的に真性抵抗性と圃場抵抗性に分けて考えられている。前者は一つの抵抗性遺伝子によってある特定のレースのいもち病菌には罹病しない完全な抵抗性を示し、後者は *Pbl* (Fujii *et al.* 2000, Hayashi *et al.* 2010) や *Pi39* (Liu X *et al.* 2007) のように一つの遺伝子で強い抵抗性を示すような遺伝子も見出されているが、一般的に複数の遺伝子が関与し、完全な抵抗性は示さないもののいもち病菌の変化による極端な影響も受けにくく永続的な抵抗性であると考えられている (Maruyama *et al.* 1983, Higashi 1995)。

イネの品種登録では、いもち病真性抵抗性遺伝子型、葉いもちおよび穂いもち圃場抵抗性の程度を明示することが求められている (農林水産省品種登録ホームページ 2015)。いもち病真性抵抗性遺伝子型は、いもち病菌レースが持つ非病原力遺伝子とイネ品種が持ついもち病真性抵抗性遺伝子 (以下、真性抵抗性遺伝子) の遺伝子対遺伝子の関係に基づいて推定する。具体的には、複数のいもち病菌レースを各検定系統に接種 (以下、接種法) 後、各レースに対する病斑型を判定し真性抵抗性遺伝子型の推定を行なう (林 2005, 2015, 山本ら 1996)。いもち病圃

場抵抗性 (以下、圃場抵抗性) の程度は、真性抵抗性遺伝子に対する親和性レースがイネの葉や穂などに及ぼす罹病の程度を基準品種と対比することによって評価する。その基準となる品種は、それぞれの栽培地域の熟期および3つの真性抵抗性遺伝子座 (*Pia*, *Pii* および *Pik*) の遺伝子型で細かく設定されている (農林水産省品種登録ホームページ 2015)。従って、共通の尺度で圃場抵抗性の程度を評価するためには、検定系統の3遺伝子座の遺伝子型が推定されていることが必要である。

近年、真性抵抗性遺伝子座 *Pia*, *Pii* および *Pik* については、遺伝子単離により遺伝子配列上の変異を利用した DNA マーカーがそれぞれ作出されている (Okuyama *et al.* 2011, Takagi *et al.* 2013, Zhai *et al.* 2011)。しかし、1) 真性抵抗性遺伝子型を推定する接種法が定着していること、2) 多様な対立遺伝子を利用する育種において DNA マーカーが接種法と同程度に遺伝子型を推定することができるかが不明であること、などの理由から遺伝子を直接判別できるにもかかわらずそれらの DNA マーカーはほとんど活用されていない。

一方、育種現場では、接種法が定着しているものの、いもち病菌の培養、接種および病斑型の判定に時間と手間がかかるため、DNA マーカーを用いた簡易な遺伝子型の推定手法の開発が求められている。

そこで本研究では、3つの真性抵抗性遺伝子座 *Pia*, *Pii* および *Pik* を対象とし、新たに開発した DNA マーカーが接種法と同程度の精度を示すかどうかを検証した。すなわち、*Pik* と *Pik-m* マーカーを制限酵素処理の必要ない PCR ベースの DNA マーカーに改良し、既報の *Pia* と *Pii* マーカーと合わせて4つの DNA マーカーを用いて、供試系統について3遺伝子座の遺伝子型を推定した。また、

編集委員: 加藤 浩

2017年11月16日受領 2018年1月9日受理

2018年3月6日 J-STAGE 早期公開

Correspondence: nonouey221@affrc.go.jp

接種法との対比により DNA マーカーの精度を検証した。

材料および方法

1. 供試イネ品種・系統

主要 26 品種および農研機構次世代作物開発研究センターで育成中の 237 系統（内訳、関東系統 28 系統および和系系統 209 系統）の合計 263 品種・系統を供試した（表 1, 付表 1）。また、DNA マーカーと接種法による反応を確認するため、異なる真性抵抗性遺伝子を個々に有するイネいもち病菌レースの判別品種 12 品種（表 1, 農研機構次世代作物開発研究センター産種子）および圃場抵抗性検定の基準品種 10 品種とムツニシキ（表 2, 農研機構遺伝資源センター農業生物資源ジーンバンクより提供）も本研究に用いた。

2. DNA マーカー情報

プライマー配列を表 3 に示す。Pik 座の DNA マーカーは AB462324（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB462324>）の配列および Zhai *et al.* 2011 の SNP 情報を利用し、Primer3Plus（<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>）を用いて設計した。

3. DNA マーカーおよび接種法による真性抵抗性遺伝子型の推定

各品種・系統は、幼苗 8 個体以上から葉をバルクにしてサンプリングし、倉俣ら（2015）の方法に従って DNA を抽出した。PCR は Go Taq mastermix（promega）を用い、反応条件は 95℃ 5 分で DNA を変性した後、95℃ 30 秒、59℃ 30 秒、72℃ 1 分を 35 サイクル行ない、72℃ 5 分で最後の伸長反応を行なった。増幅産物は、3%アガロースゲル（Seakem LE agarose, Lonza）を用い、電気泳動（NB-1017C, 日本エイドー）を行なった。遺伝子型は、ゲルをエチジウムブロマイド染色の後、ゲル撮影装置で撮影し、増幅バンドの多型を判定して決定した（図 1）。接種法による真性抵抗性遺伝子型の推定は、林（2005, 2015）および山本ら（1996）に従い実施した。いもち病菌はレース 035.1（TH68-140）、033.1（TH68-126）、007.0（稲 86-137）および 037.1（24-22-1-1）（農研機構中央農業研究センター芦澤武人氏より提供）を接種に用いた。DNA マーカーの検証は、接種法による真性抵抗性遺伝子型の推定と DNA マーカーによる遺伝子型との対比によって行なった。

結 果

1. 接種法による真性抵抗性遺伝子型の推定

いもち病菌 4 レースを用い、263 品種・系統それぞれの真性抵抗性遺伝子型の推定を行なった（表 1, 付表 1）。その結果、13 品種、19 関東系統および 124 和系系統の

156 品種・系統（59.3%）について真性抵抗性遺伝子型の推定が可能であった（表 1, 表 4, 付表 1）。残りの 107 品種・系統（40.7%）は、4 レースすべてに対して抵抗性であり、Pia, Pii および Pik 以外の真性抵抗性遺伝子を保有すると推定されたため遺伝子型を“不明”とした（表 4, 付表 1）。

2. Pik と Pik-m を識別する DNA マーカー

Pia および Pii の遺伝子配列上の変異を利用した DNA マーカーは、品種や系統の接種試験で推定した真性抵抗性遺伝子型と一致することが示されている（Okuyama *et al.* 2011, Takagi *et al.* 2013, 太田・野々上 2015）。新しく設計した制限処理を必要としない Pik と Pik-m マーカーについて、Pia および Pii マーカーと同様の反応条件でイネいもち病菌レース判別品種を PCR 法により増幅し、電気泳動により増幅断片のサイズを比較した（図 2）。その結果、Pik は優性マーカーとして Pik-m は共優性マーカーとして、特異的な一本のバンドが検出された。さらに「関東 51 号」（Pik）と「ツユアケ」（Pik-m）も明確に識別できた。

3. 4 つの DNA マーカーの精度の検証

3 遺伝子座の遺伝子型を推定する 4 つの DNA マーカー（Pia, Pii, Pik および Pik-m）を用いて 263 品種・系統の遺伝子型調査を行なった（表 1, 付表 1）。接種法での真性抵抗性遺伝子型が推定可能であった 156 品種・系統について遺伝子型を対比した結果、152 品種・系統（97.4%）で完全に一致し（表 1, 表 5, 付表 1）、4 つの DNA マーカーによる遺伝子型は、接種法とほぼ同等であることが示された。しかしながら、4 系統は遺伝子型が異なった（表 6）。また、接種法で Pia, Pii および Pik 座以外の真性抵抗性遺伝子を保有することが推定された品種・系統も、この 3 遺伝子座について DNA マーカーによる遺伝子型を示すことは可能であった（付表 1）。

考 察

品種登録出願では接種法によって真性抵抗性遺伝子型の推定が求められる。育種を行なう多くの機関では、品種登録出願を毎年行なうことはまれである。一方で、育成中の系統の圃場抵抗性検定はほぼ毎年実施しており、基準品種との罹病程度を対比する際に各検定系統の真性抵抗性遺伝子型情報が必要となる。従って、育成段階の若い世代において速やかに真性抵抗性遺伝子型を推定することが選抜に有効であると考えられる。接種法では真性抵抗性遺伝子型の推定までに手間と時間がかかることから、育種現場では簡易に遺伝子型を推定できる手法の開発が求められている。

ゲノム解析や遺伝解析の進展により、SSR, SNP あるいは insertion/deletion を利用していもち病抵抗性遺伝子と

表 1. 供試系統といもち病真性抵抗性遺伝子型の推定

試験番号	品種・系統名	世代	稲 86-137 (007.0)	TH68-126 (033.1)	TH68-140 (035.1)	24-22-1-1 (037.1)	推定 遺伝子型 ¹⁾	マーカー 遺伝子型 ²⁾	整合性 ³⁾	備考
判別-01	新 2 号	—	S	S	S	S	+	+	○	
判別-02	愛知旭	—	S	S	Rh	S	<i>Pia</i>	a	○	
判別-03	藤坂 5 号	—	S	R	S	S	<i>Pii</i>	i	○	
判別-04	クサブエ	—	Rh	S	S	S	<i>Pik</i>	k	○	
判別-05	ツユアケ	—	Rh	S	S	S	<i>Pik-m</i>	k-m	○	
判別-06	フクニシキ	—	Rh	R	MR	R	<i>Piz</i>	+	不明	
判別-07	ヤシロモチ	—	Rh	Rh	Rh	R	<i>Pita</i>	+	不明	
判別-08	Pi No. 4	—	Rh	Rh	Rh	Rh	<i>Pita-2</i>	+	不明	
判別-09	とりで 1 号	—	Rh	Rh	Rh	Rh	<i>Piz-t</i>	+	不明	
判別-10	K60	—	Rh	S	S	S	<i>Pik-p</i>	+	×	
判別-11	BL1	—	Rh	Rh	Rh	Rh	<i>Pib</i>	+	不明	
判別-12	K59	—	R	Rh	Rh	MR	<i>Pit</i>	+	不明	
品種-01	あきさかり	—	S	MR	Rh	S	a, i	a, i	○	
品種-02	あきたこまち	—	S	R	Rh	S	a, i	a, i	○	
	あきたこまち	—	S	Rh	Rh	S	a, i	a, i	○	
品種-03	朝の光	—	S	MR	Rh	S	a, i	a, i	○	
	朝の光	—	S	R	Rh	S	a, i	a, i	○	
品種-04	コガネマサリ	—	S	MS	MS	S	+	+	○	
品種-05	こがねもち	—	S	S	Rh	S	a	a	○	
品種-06	コシヒカリ	—	S	S	S	S	+	+	○	
	コシヒカリ	—	S	S	S	S	+	+	○	
品種-07	にこまる	—	S	Rh	Rh	S	a, i	a, i	○	
品種-08	日本晴	—	S	S	S	S	+	+	○	
	日本晴	—	S	S	S	S	+	+	○	
	日本晴	—	S	S	S	S	+	+	○	
品種-09	ひとめぼれ	—	S	Rh	S	S	i	i	○	
	ひとめぼれ	—	MS	MR	S	S	i	i	○	
品種-10	ほしじるし	F17	S	MS	S	S	+	+	○	
	ほしじるし	—	MS	S	MS	MS	+	+	○	
品種-11	ほしみのり	F17	S	S	Rh	S	a	a	○	
	ほしみのり	—	S	MS	R	S	a	a	○	
品種-12	マンゲツモチ	—	Rh	S	S	S	k	k	○	
	マンゲツモチ	—	Rh	S	S	S	k	k	○	
品種-13	あきだわら	F20	S	MR	S	S	i	i	○	
	あきだわら	—	S	MR	S	S	i	i	○	
関東-01	関東 221 号	—	S	S	Rh	S	a	a	○	
関東-02	関東 261 号	F12	S	R	S	S	i	i	○	
関東-03	関東 262 号	F13	S	MR	Rh	S	a, i	a, i	○	
関東-04	関東 263 号	F12	R	S	Rh	MS	a, k	a, k-m	○	
関東-05	関東 266 号	F11	S	S	S	S	+	+	○	
関東-06	関東 267 号	F11	S	MR	Rh	S	a, i	a, i	○	
関東-07	関東 270 号	F11	S	R	Rh	S	a, i	a, i	○	
関東-08	関東 273 号	F10	S	MR	S	S	i	i	○	
関東-09	関東 275 号	B3F7	S	Rh	Rh	S	a, i	a, i	○	
関東-10	関東 276 号	F10	S	S	S	S	+	+	○	
関東-11	関東 277 号	F10	S	R	Rh	S	a, i	a, i	○	
関東-12	関東 280 号	F9	Rh	R/S	S	MS	i, k または k	i, k-m	○	
関東-13	関東 281 号	F10	S	Rh	MS	S	i	i	○	
関東-14	関東 282 号	F11	S	R	Rh	S	a, i	a, i	○	
関東-15	関東 283 号	B3F7	Rh	S	S	S	k	+	×	あきだわら*3/和 1963 ⁴⁾
関東-16	関東 HD2 号	—	S	S	S	S	+	+	○	
関東-17	関東 IL18 号	F5	S	Rh	Rh	S	a, i	a, i	○	
関東-18	関東 IL19 号	B3F5	S	MR	S	S	i	i	○	
関東-19	関東 IL1 号	B3F9	S	S	S	S	+	+	○	

供試系統は、付表 1 に続く。ここでは、4 レースでいもち病真性抵抗性遺伝子型を推定可能であった品種と関東系統のみを表記した。
S・MS (罹病性), R・MR (抵抗性), Rh (高度抵抗性, 無病斑) を示す。

¹⁾ 4 レースを用いたいもち病真性抵抗性遺伝子型の推定。+: 該当遺伝子無し, a: *Pia*, i: *Pii*, k: *Pik* 群を示す。

²⁾ 4 つの DNA マーカー (*Pia*, *Pii*, *Pik* および *Pik-m*) を用いて遺伝子型を決定した。+: 該当遺伝子無し, a: *Pia*, i: *Pii*, k: *Pik* および k-m: *Pik-m* を示す。

³⁾ 接種法と DNA マーカーの結果を対比した。○は一致, ×は不一致を示す。不明は対比できなかったことを示す。

⁴⁾ あきだわら (関東 222 号) の組み合わせは、関東 188 号 (ミレニシキ: *Pik*) / 越南 176 号 (イクヒカリ: *Pii*, *Pita-2*)。

表 2. ムツニシキといもち病圃場抵抗性基準品種の *Pik* 座の遺伝子型

品種 ¹⁾	JP 番号	遺伝子型 ²⁾	備考
ムツニシキ ³⁾	5995	—	<i>Pik-h</i> を保有する参考品種
でわのもち	5345	<i>Pik</i>	
ふ系 69 号	5957	<i>Pik</i>	
タツモチ	5991	<i>Pik</i>	
サカキモチ	5994	<i>Pik</i>	
ヒメノモチ	6113	<i>Pik-m</i>	
ツキモチ	6831	<i>Pik</i>	
マンゲツモチ	6832	<i>Pik</i>	
中部 7 号	9198	<i>Pik-m</i>	
関東 51 号	15010	<i>Pik</i>	
奥羽 321 号 ⁴⁾	54141	—	<i>Pik-h</i> と推定される

¹⁾ いもち病圃場抵抗性基準品種（農林水産省品種登録ホームページ 2015）

²⁾ *Pik* と *Pik-m* マーカーによる真性抵抗性遺伝子座 *Pik* の遺伝子型. — : *Pik* および *Pik-m* マーカーで認識できないことを示す.

³⁾ 前田ら（2005）.

⁴⁾ 組み合わせ（中部 40 号/青系 85 号（むつかおり : *Pik-h*））.

表 3. 使用した DNA マーカー

遺伝子	プライマー名	配列	引用文献
<i>Pia</i> ¹⁾	Pia-F	GCGACTGACACTTTCAATAGC	Okuyama <i>et al.</i> 2011
	Pia-R	CGGTAGAGCAATTTAGAAGCAG	
<i>Pii</i> ²⁾	Pii-IBRC-F	TCCAATGCTTCTGAAAGGTAGC	Takagi <i>et al.</i> 2013 太田・野々上 2015
	Pii_2_SNP02	GATCATCTCATGGATCTTTTAATGC	
	Pii_2_SNP03	agctcttcagcgctgttttc	
	Pii-IBRC-R	TGGAAACATGAACCCATATCC	
<i>Pik</i> ³⁾	Pik1_t2944gSNP01	TCCCTTGTTGGGATATTCA	Zhai <i>et al.</i> 2011
	Pik1_t2944gSNP02	CGTGTGACAGCCGGT	
	Pik1_t2944gSNP03	ggaaggctatccttggcac	
	Pik1_t2944gSNP04	GCATTGATGAGGAGGGTGAT	
<i>Pik-m</i> ³⁾	Pik1_g685cSNP01	ATTCCCATGGTGGACGATAA	Zhai <i>et al.</i> 2011
	Pik1_g685cSNP02g	GCCGGTGACCTAAGAGACG	
	Pik1_g685cSNP03	accgaccaccacaacctg	
	Pik1_g685cSNP04	GTACTCGGGCAATCGTTGTT	

¹⁾ Okuyama *et al.* 2011.

²⁾ Takagi *et al.* 2013, 太田・野々上 2015.

³⁾ 本研究で新たに設計したプライマー配列.

強く連鎖する DNA マーカーの作出が行なわれている（Hayashi *et al.* 2006, Koide *et al.* 2009）. また、遺伝子単離により *Pia*, *Pii*, *Pik* など真性抵抗性遺伝子配列上の DNA マーカーも作出されている（Okuyama *et al.* 2011, Takagi *et al.* 2013, Zhai *et al.* 2011）. 多様な対立遺伝子を利用する育種においては交配による抵抗性遺伝子の導入確認などに利用されているものの、それら DNA マーカーの遺伝子型と表現型を検証しながら使用する必要があった. このためそれらの利用は限られていた（富田ら 2006）. さらに、イネの品種登録では、接種法での真性抵抗性遺伝子型の推定が求められていることから、直接遺伝子を判別することが可能な *Pia*, *Pii*, *Pik* 等の DNA マーカーはほとんど利用されていない.

多数の系統および個体を扱う育種においては、DNA マーカーは簡易に分析できることが重要である. そして、

1) 共優性であること、2) 簡易抽出した DNA で分析が可能であること、3) 制限酵素処理など追加処理を必要としないこと、4) 多検体に対して低コストで分析できること、などの条件を満たす DNA マーカーが求められている. 従って、育種現場での DNA マーカーの利用においては、必要に応じて積極的な改良を行なうことが必要である. このため、太田・野々上（2015）は *Pii* マーカーについて制限酵素処理を必要としない PCR ベースのマーカーに改良し、育成品種を用いて 2 つの DNA マーカー（既報の *Pia* および改良した *Pii*）と接種法の結果を対比し、DNA マーカーの精度を検証している.

本研究では、育種現場で利用することを前提として、*Pik* と *Pik-m* マーカーを粗抽出した DNA から増幅可能で、かつ同様に制限酵素処理を必要としないものに改良した. この改良により *Pik* 座の DNA マーカーも、既報の

図 1. DNA マーカーを用いた 3 遺伝子座の遺伝子型の決定例。

4 つの DNA マーカー (*Pia*, *Pii*, *Pik* および *Pik-m*) を用いて遺伝子型を決定した。1) 遺伝子型は, DNA マーカーによって得られた各品種の遺伝子型を示す。矢頭は, 真性抵抗性遺伝子の PCR 増幅バンドを示す。

表 4. 4 レースを用いたもち病真性抵抗性遺伝子型の推定

	全系統数	4 レース 推定可	4 レース 推定不可
品種	26	13 50.0%	13 50.0%
関東系統	28	19 67.9%	9 32.1%
和系	209	124 59.3%	85 40.7%
全体	263	156 59.3%	107 40.7%

Pia および *Pii* と同じ反応系で遺伝子型調査を行なうことが可能になった。また, *Pia*, *Pii* および *Pik* の 3 遺伝子座の 4 つの DNA マーカーについて, 接種法との比較による精度の検証を実施した結果, 4 つの DNA マーカーは, 一般的な PCR 反応で容易に増幅可能で識別性が高いことが示されるとともに, 接種法による推定遺伝子型とよく一致することが明らかになった。さらに, 優性マーカーである *Pik* マーカーを除き, 接種法では識別が困難なヘテロ型もこれらのマーカーにより識別が可能であることも示された (附表 1)。

しかしながら, ごく一部の系統ではあるが, DNA マーカーと接種法の結果が一致しなかった。太田・野々上 (2015) は, 多様な遺伝資源を利用する育種では, DNA マーカーが接種法の真性抵抗性遺伝子型の推定と一致しない場合があることを指摘している。供試系統のうち「和 3526」および「和 3566」は, DNA マーカーと接種法の

図 2. DNA マーカー *Pik* と *Pik-m* の電気泳動。

レーン 1~12 は, イネいもち病菌レース判別品種, レーン 13 は *Pik-h* を保有するムツニシキ, レーン 14~23 は, いもち病圃場抵抗性検定の基準品種 (*Pik* 座の真性抵抗性遺伝子を保有)。矢頭は, 真性抵抗性遺伝子の PCR 増幅バンドを示す。() 内の符号と英字はそれぞれ以下の真性抵抗性遺伝子を示す。+: 該当遺伝子無し, a: *Pia*, i: *Pii*, k: *Pik*, km: *Pik-m*, z: *Piz*, ta: *Pita*, ta-2: *Pita-2*, z-t: *Piz-t*, k-p: *Pik-p*, b: *Pib*, t: *Pit*, k-h: *Pik-h*。

表 5. 接種法と DNA マーカーで推定された遺伝子型の整合性

	4 レース 推定可	整合性	
		一致	不一致
品種	13	13 100.0%	0 0.0%
関東系統	19	18 94.7%	1 5.3%
和系	124	121 97.6%	3 2.4%
全体	156	152 97.4%	4 2.6%

結果が一致しなかった (表 6)。また, 「和 3526」では親系統の遺伝子型から想定される遺伝子型とも一致しなかった。このことは接種法での真性抵抗性遺伝子型の推定に誤りがあった可能性の他, 親系統の持つ対立遺伝子を DNA マーカーで識別できなかった可能性も考えられる。また, *Pik* と *Pik-m* マーカーは判別品種「K60」の保有する *Pik-p*, 「ムツニシキ」および圃場抵抗性検定の基準品種の「奥羽 321 号」の保有する *Pik-h* を識別できなかった (図 2, 表 2)。「関東 283 号」および「和 3306」では接種法で *Pik* を保有すると推定されたが, DNA マーカーの遺伝子型はこれと一致しなかった (表 6)。系譜か

表 6. 接種法のいもち病真性抵抗性遺伝子型の推定に一致しない系統

試験 番号	品種・ 系統名	世代	稲 86-137 (007.0)	TH68-126 (033.1)	TH68-140 (035.1)	24-22-1-1 (037.1)	推定 遺伝子型 ¹⁾	マーカー 遺伝子型 ²⁾	整合 性 ³⁾	備考
判別-10	K60	—	Rh	S	S	S	<i>Pi k-p</i>	+	×	イネいもち病菌レース判別品種
関東-15	関東 283 号	B3F7	Rh	S	S	S	k	+	×	あきだわら*3/和 1963 ⁴⁾
和-018	和 3306	F8	Rh	S	MS	S	k	+	×	和 2204 (和系 503/関東 222 号) /ほしじるし ⁴⁾
和-073	和 3526	F6	S	S	Rh	S	a	k	×	ほしじるし/北陸 255 号 ⁵⁾
和-103	和 3566	F6	S	Rh	Rh	S	a, i	i	△	ほしじるし/和 2304 (中国 193 号/関東 222 号)

S・MS (罹病性), Rh (高度抵抗性, 無病斑) を示す。

¹⁾ 4 レースを用いたいもち病真性抵抗性遺伝子型の推定。a: *Pia*, i: *Pii*, k: *Pik* 群を示す。

²⁾ 4 つの DNA マーカー (*Pia*, *Pii*, *Pik* および *Pik-m*) を用いて遺伝子型を決定した。+: 該当遺伝子無し, i: *Pii*, k: *Pik* を示す。

³⁾ 接種法と DNA マーカーの結果を対比した。△は一部一致, ×は不一致を示す。

⁴⁾ あきだわら (関東 222 号) の組み合わせは, 関東 188 号 (ミレニシキ: *Pik*) /越南 176 号 (イクヒカリ: *Pii*, *Pita-2*)。

⁵⁾ ほしじるし (+) /北陸 255 号 (*Pii*, *Pik*)。

らこの 2 系統は, レース 007.0 で抵抗性, レース 037.1 で罹病性を示す「ミレニシキ」に由来し (井辺ら 2001), *Pik* と *Pik-m* マーカーでは識別できない *Pik-p* あるいは *Pik-h* を保有している可能性がある。このように, 4 つの DNA マーカーは, 一部の対立遺伝子を識別できないことも明らかとなった。

いもち病真性抵抗性遺伝子型の推定に DNA マーカーを利用することには多くの利点がある。一点目は, 種子が準備できればいつでも作業が可能であることから育種現場の繁忙期を避けて遺伝子型を推定できること, 二点目は接種法に比べ調査期間を短縮することが可能であることが挙げられる。本研究で供試した系統数は, 反復試験系統を合わせた 263 系統である。接種試験に要した期間の概要は以下のとおりである。1) 播種 (263 系統×4 (4 レース分): 1 日/2 人, 2) 培地づくり・菌の培養準備: 半日/人, 3) 病斑型判定: 半日/2 人となる。播種 3 週間後に接種を行ない, その 1 週間後に病斑型の判定を行なった。DNA マーカー調査では, 遺伝子型が固定した系統の反復調査は不要である。本研究において反復試験系統を除いた系統数は 141 系統である。4 つの DNA マーカーで 141 系統の遺伝子型調査実施する場合, 384 穴 PCR プレート 2 枚で遺伝子型の推定が可能となる。仮に 141 系統を倉俣ら (2015) の方法で DNA 抽出および遺伝子型調査を実施する場合, 調査に要する期間は以下のとおりである。1) 播種 (141 系統): 半日/人, 2) 葉のサンプリング: 半日/人, 3) DNA 抽出・PCR 反応・ゲル作成・電気泳動: 2 日/人となる。全体の流れとしては, 播種して 2 週間後に幼苗のサンプリングを行ない, その 2 日後には遺伝子型調査が完了する。

上記のように反復試験を減らすことが可能である他に, DNA マーカーを利用する利点として罹病性病斑を出しやすくするための特別な温度や湿度の管理を必要としないことなど, 作業負担を軽減することが可能であることも挙げられる。さらに, DNA マーカーで得られる情報は, 品種登録で求められている接種法に用いるいもち病菌レースの選定に活用することが可能である。すなわち, いもち病菌レースへの反応をあらかじめ推測することが

可能であり, 効率的に接種法で真性抵抗性遺伝子型を推定することができることも挙げられる。以上のことから, 本研究で利用した 4 つの DNA マーカーは, 育種現場において利用しやすい DNA マーカーとして十分活用できると考えられる。

電子付録

付表 1. 供試系統といもち病真性抵抗性遺伝子型の推定

謝 辞

農研機構遺伝資源センター農業生物資源ジーンバンクより, いもち病圃場抵抗性検定の基準品種の種子の提供を受けた。ここに記して謝意を表します。

引用文献

- Fujii, K., Y. Hayano-Saito, K. Saito, N. Sugiura, N. Hayashi, T. Tsuji, T. Izawa and M. Iwasaki (2000) Breed. Sci. 50: 183–188.
- Hayashi, K., H. Yoshida and I. Ashikawa (2006) Theor. Appl. Genet. 113: 251–260.
- Hayashi, N., H. Inoue, T. Kato, T. Funao, M. Shirota, T. Shimizu, H. Kanamori, H. Yamane, Y. Hayano-Saito, T. Matsumoto *et al.* (2010) Plant J. 64: 498–510.
- 林 長生 (2005) 微生物遺伝資源利用マニュアル 18: 1–34.
- 林 長生 (2015) 微生物遺伝資源利用マニュアル 38: 1–11.
- Higashi, T. (1995) Bull. Tohoku Natl. Agric. Exp. Sta. 90: 19–75.
- 井辺時雄・赤間芳洋・堀末 登・坂井 真・佐藤宏之・田村和彦・安東郁夫・須藤 充・高館正男・沼田憲治ら (2001) 農業研究センター研究報告 34: 37–48.
- Koide, Y., N. Kobayashi, D. Xu and Y. Fukuta (2009) JARQ 43: 255–280.
- 倉俣正人・安部 匡・石川 覚 (2015) 「コシヒカリ環 1 号」の判別マーカーによるハイスループットな DNA マーカー選抜実験プロトコル ver1.0—DNA 抽出から電気泳動まで— [http://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/manual.html].
- Liu, X., Q. Yang, F. Lin, L. Hua, C. Wang, L. Wang and Q. Pan (2007) Mol. Genet. Genomics 278: 403–410.
- 前田一春・三上泰正・小林 渡・小林健一 (2005) 東北農業研究 58: 5–6.

- Maruyama, K., F. Kikuchi and M. Yokoo (1983) Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Series D 35: 1–31.
- 農林水産省品種登録ホームページ (2015) 農林水産植物種類別審査基準「稲種」[http://www.hinsyu.maff.go.jp/info/sinsakijun/botanical_taxon.html].
- Okuyama, Y., H. Kanzaki, A. Abe, K. Yoshida, M. Tamiru, H. Saitoh, T. Fujibe, H. Matsumura, M. Shenton, D. C. Galam *et al.* (2011) Plant J. 66: 467–479.
- 太田裕貴・野々上慈徳 (2015) 東北農業研究 68: 53–54.
- Takagi, H., A. Uemura, H. Yaegashi, M. Tamiru, A. Abe, C. Mitsuoka, H. Utsushi, S. Natsume, H. Kanzaki, H. Matsumura *et al.* (2013) New Phytol. 200: 276–283.
- 富田 桂・堀内久満・寺田和弘・小林麻子・田中 勲・田野井真・見延敏幸・古田秀雄・山本明志・正木伸武ら (2006) 福井県農業試験場研究報告 43: 1–19.
- 山本隆一・堀末 登・池田良一共編 (1996) “イネ育種マニュアル”, 養賢堂, 東京. 3–6.
- Zhai, C., F. Lin, Z. Dong, X. He, B. Yuan, X. Zeng, L. Wang and Q. Pan (2011) New Phytol. 189: 321–334.