

イネの擬似病斑葉突然変異体の病害抵抗性に関する
育種学的研究

溝 淵 律 子

目 次

| | |
|---------------------------------------|-----|
| I 緒論 | 1 |
| II 擬似病斑葉突然変異体の表現型の解析 | 6 |
| 1 緒言 | 6 |
| 2 材料および方法 | 7 |
| 3 結果および考察 | 8 |
| 1) 擬似病斑葉突然変異体の遺伝分析 | 8 |
| 2) 擬似病斑の発生する時期と程度 | 9 |
| 3) 擬似病斑の発生する器官 | 39 |
| 4) 擬似病斑葉突然変異体の農業形質 | 42 |
| III 擬似病斑葉突然変異体の病害抵抗性 | 45 |
| 1 緒言 | 45 |
| 2 材料および方法 | 46 |
| 3 結果および考察 | 48 |
| 1) 擬似病斑葉突然変異体のいもち病抵抗性 | 48 |
| 2) 擬似病斑葉突然変異体の白葉枯病抵抗性 | 53 |
| 3) <i>Spl12</i> の病害抵抗性と遺伝子量効果 | 57 |
| 4) 擬似病斑葉突然変異体の葉鞘細胞の病害抵抗性 | 62 |
| 5) 擬似病斑の発現程度と病害抵抗性 | 65 |
| 6) 二重突然変異体の病害抵抗性 | 70 |
| IV 擬似病斑葉突然変異体における病害抵抗性関連遺伝子の発現 | 73 |
| 1 緒言 | 73 |
| 2 材料および方法 | 75 |
| 3 結果および考察 | 76 |
| 1) 自家蛍光物質の蓄積 | 76 |
| 2) <i>PR1</i> , <i>PBZ1</i> の発現 | 78 |
| 3) キチナーゼの発現 | 81 |
| V 擬似病斑葉突然変異体の実用品種への戻し交配系統の 農業形質の評価 | 84 |
| 1 緒言 | 84 |
| 2 材料および方法 | 85 |
| 3 結果および考察 | 86 |
| 1) BC_1F_2 の農業形質 | 86 |
| 2) BC_1F_3 の農業形質 | 88 |
| VI 総合考察 | 92 |
| 1 イネにおける病害抵抗性の機構 | 92 |
| 2 イネの病害抵抗性育種の展望 | 96 |
| VII 摘要 | 99 |
| VIII 謝辞 | 103 |
| 引用文献 | 104 |

I 緒論

イネは、世界における最も重要な作物の一つである。従って、生産量を減少させる要因である病害について、多くの研究が行われてきた。近年では、病害抵抗性遺伝子の単離や病害抵抗性反応の解析、抵抗性反応を誘導する情報伝達系の解明などが進められている (Kawasaki *et al.* 1999, Ono *et al.* 2001, Song *et al.* 2001, Shimamoto and Kyozuka 2002). 多くのイネの病害の中で最も重要なものが、イネいもち病 (*Pyricularia oryzae*)と白葉枯病 (*Xanthomonas compestris* pv. *oryzae*)であり、多数のいもち病抵抗性遺伝子および白葉枯病抵抗性遺伝子が見つけられている (Kinoshita 1995, Iwata 1996). 最近、白葉枯病抵抗性遺伝子の *Xa1* と *Xa21*, いもち病真性抵抗性遺伝子の *Pib* と *Pita* がクローニングされて分子レベルで詳細に解析がなされた (Song *et al.* 1995, Yoshimura *et al.* 1998, Wang *et al.* 1999, Bryan *et al.* 2000). *Pib* の遺伝子産物は nucleotide binding site (NBS)と leucine-rich repeats (LRRs) を含むと推定され、植物の多くの病害抵抗性遺伝子に共通して見られる NBS-LRR クラスのメンバーであることがわかった (Wang *et al.* 1999). 一方、*Pita* の遺伝子産物にも NBS が存在し、*Pib* の NBS 領域と高い相同性を示したが、LRR は存在していないことがわかった (Bryan *et al.* 2000). *Xa21* の遺伝子産物は LRR と serine-threonine kinase-like domain を含むと推定され、細胞表面での病原菌の認識と細胞内での防御反応の活性化に働いていると考えられた (Song *et al.* 1995). *Xa1* の遺伝子産物は NBS-LRR クラスのメンバーであることがわかったが、新しいタイプの LRR と推定され、推定されるタンパク質構造が *Xa21* とは大きく異なると考えられた (Yoshimura *et al.* 1998). しかしながら、これらの抵抗性遺伝子は、抵抗性遺伝子を侵すことが可能な病原菌が新たに発生する「ブレイクダウン」という現象を引き起こしやすいため、農業上の利用が限られている。従って、持続的な抵抗性遺伝子を開発して利用することが必要である。

植物体内への病原菌の侵入に対する抵抗性反応の一つに「過敏感反応 (Hypersensitive response, HR)」と言われる現象がある。これは、病原菌の侵入を受けた細胞およびその周辺の細胞が死ぬことにより、それ以上病原菌が広がるのを防ぐ現象である (Greenberg *et al.* 1994, Dangl *et al.* 1996, Mittler and Lam 1996). 動物細胞においても、アポトーシスと言われる細胞死 (programmed cell death) の現象が見られ、アポトーシスを防ぐ遺伝子としてハムスターで見つけられている *dnd1* (*defender against death 1*) のホモログが、イネとシロイヌナズナでも見つけられた (Mittler and Lam 1996). 植物における HR と動物におけるアポトーシスでは、細胞の収縮、ヌクレ

アーゼの活性化と核 DNA のフラグメンテーション化など共通して見られる現象も多いが、植物における HR では細胞壁があるため、細胞死によって生じた細胞残さを他の細胞が吸収する現象などは見られず、不明の点も多い(Mittler and Lam 1996)。

擬似病斑葉変異体は病原菌の存在の有無に関わらず HR に似た褐点を葉身などに形成し、いくつかの擬似病斑葉変異体は病原菌に対して抵抗性を示すことが明らかになったので、それらは植物の HR を解析するための有用な材料であると考えられている。従って、擬似病斑葉変異体は、シロイヌナズナ (Greenberg and Ausubel 1993, Dietrich *et al.* 1994, 1997, Greenberg *et al.* 1994, 2000, Weymann *et al.* 1995, Rate *et al.* 1999, Greenberg 2000, Mach *et al.* 2001), トウモロコシ (Johal *et al.* 1995, Hu *et al.* 1996, 1998, Gray *et al.* 1997), オオムギ (Wolter *et al.* 1993, Büschges *et al.* 1997, Jørgensen 1992), イネ (Sekiguchi and Furuta 1965, Kiyosawa 1970, Marchetti *et al.* 1983, Takahashi *et al.* 1999, Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000) などの多くの植物で解析されている。

シロイヌナズナの擬似病斑葉変異体には、病原菌の接種後の反応が野生型より早く現れることから *acd* (*accelerated cell death*)と名づけられた変異体と、病害抵抗性反応に似た病斑が現れることから *lsd* (*lesions simulating disease*) と名づけられた変異体がある。*acd*としては、今までに *acd1* から *Acd6* まで 6 個の擬似病斑葉変異体があり、そのうち *acd1*, *acd2*, *acd5* および *Acd6* について解析が進められている (Greenberg and Ausubel 1993, Greenberg *et al.* 1994, 2000, Rate *et al.* 1999, Mach *et al.* 2001)。*lsd*としては、今までに *lsd1* から *Lsd7* まで 7 個の擬似病斑葉変異体について解析が進められている (Dietrich *et al.* 1994, 1997, Weymann *et al.* 1995)。*acd1* は、親和性細菌の *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, 非親和性細菌の *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* およびエチレンに対してネクロシス反応が進行し、病原菌や傷害刺激が無くとも生育が進むにつれてネクロシスが現れた (Greenberg and Ausubel 1993)。*acd2* は、親和性細菌の *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* および非親和性細菌の *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* に対して HR に似た反応を示すことから、*acd1* とともに同定された変異体である (Greenberg and Ausubel 1993, Greenberg *et al.* 1994)。*acd1* は親和性細菌に対する抵抗性は誘導されていなかったが、*acd2* は親和性細菌に対して抵抗性を示し、生育が進み擬似病斑葉が現れると病害抵抗性関連遺伝子である *PR1*, *PR5* および 1,3- β -glucanase(*BGL2*)が発現し、内生のサリチル酸量が野生型より高まっていることがわかった (Greenberg *et al.* 1994)。最近、*Acd2* 遺伝子がクローニングされ、red chlorophyll catabolite reductase 遺伝子と相同性を示すことが明ら

かになり、病斑の伸展を抑制する働きがあると推定された (Mach *et al.* 2001). *acd5* は親和性細菌の *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* に対する抵抗性が野生型よりさらに弱くなっていることから同定されたが、生育が進み擬似病斑葉が現れると *PR1* の発現は誘導され、内生のサリチル酸量が野生型より高まっていることがわかった (Greenberg *et al.* 2000). *Acd6* は、親和性細菌である *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 接種後の病斑が野生型より少ない変異体として同定され、病害抵抗性関連遺伝子である *PR1*, *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 1 (GST1)* および *AVR-INDUCED GENE 1 (AIG1)* が発現していた (Rate *et al.* 1999). *lsd1*, *lsd3*, *Lsd4* および *lsd5* は擬似病斑葉変異体として同定され、*Lsd2* は恒常的に病害抵抗性関連遺伝子が発現している擬似病斑葉変異体であることがわかり、*lsd1*, *Lsd2*, *lsd3*, *Lsd4* および *lsd5* のいずれも親和性の糸状菌である *Peronospora parasitica* に対して抵抗性を示した (Dietrich *et al.* 1994). *Lsd1* 遺伝子はクローニングされ、その遺伝子産物は 3 つの zinc finger domain を持ち転写を制御している可能性が示唆された (Dietrich *et al.* 1997). *Lsd6* および *Lsd7* は病害抵抗性関連遺伝子である *PR1* および *PR2* が恒常的に発現している擬似病斑葉変異体であることがわかり、内生のサリチル酸量が高まっていることおよび親和性の糸状菌である *Peronospora parasitica* に対して抵抗性であることがわかった (Weymann *et al.* 1995). しかしながら、これらの擬似病斑葉変異体の個体レベルの形質を調査した報告は少ない. *acd1* は野生型に比べ、成葉が枯れるまでの時間が短く、植物体が小さく、種子 1 粒重が小さく、種子生産量が低いことが明らかにされている (Greenberg and Ausubel 1993).

トウモロコシにおいては、擬似病斑葉変異体として *les* (*lesion mimic mutations*) 変異体、*lls1* (*lethal leaf spot*) 変異体および *rpl* (*resistance to Puccinia sorghi*) 変異体が見つかっている (Johal *et al.* 1995, Hu *et al.* 1996, 1998, Gray *et al.* 1997). *les* 変異体は今までに 40 系統以上見つけられており、優性の変異体が劣性のものよりやや多く、擬似病斑の現れる時期、大きさ、色などは多様であるが、病害抵抗性が誘導されているかどうかはあまり明らかにされていない (Johal *et al.* 1995, Hu *et al.* 1998). *Les22* 遺伝子はクローニングされ、その遺伝子産物は UROD (*uroporphyrinogen decarboxylase*) というポルフィリン経路 (植物においてクロロフィルとヘムの両方を生産する経路) の鍵となる酵素の遺伝子をコードしていることが明らかになり、*Les22* では、過剰量のウロポルフィリンを蓄積することにより、ヒトにおいてポルフィリアと言われる状態を示していることが明らかになった (Hu *et al.* 1998). *Lls1* 遺伝子はクローニングされ、その遺伝子産物はフェノール性化合物の分解に関係するジオキシゲナーゼとして働

いている可能性が示唆された (Gray *et al.* 1997). さび病抵抗性遺伝子 *Rp1* の組換えやトランスポゾンの挿入により擬似病斑葉を示す劣性変異体が少なくとも4系統見出されており, これらはさび病菌 *Puccinia sorghi* に対するレース特異性に変化が生じていた (Hu *et al.* 1996). しかしながら, これらの擬似病斑葉変異体の農業形質については明らかにされていない.

育種的な利用が進められた唯一の例が, オオムギの擬似病斑葉変異体である. オオムギでは, 親和性のうどんこ病菌 *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* に抵抗性を示す *mlo* 変異体が擬似病斑葉変異体であることがわかった (Wolter *et al.* 1993). *Mlo* 遺伝子はクローニングされ, その遺伝子産物は 6 個の膜貫通領域を持つと推定された (Büschges *et al.* 1997). また, *mlo* 変異体では, 多くの対立遺伝子が見つけられており, そのうちのいくつかの対立遺伝子がうどんこ病抵抗性は保持したまま, 擬似病斑の発現程度を低くすることができることがわかり, 農業上の利用がヨーロッパを中心に進み, 1990 年には *mlo* を利用したうどんこ病抵抗性品種の作付が 70 万ヘクタールに及んだ (Jørgensen 1992).

イネにおいては, 1965 年に最初に関口病斑 (Sekiguchi legion, *sl*) という病斑状の褐点が葉身に現れる擬似病斑葉変異体が同定されて以来 (Sekiguchi and Furuta 1965, Kiyosawa 1970), *spl* (*spotted leaf*) 変異体および *cdr* (*cell death resistance*) 変異体などの擬似病斑葉変異体が同定されている (Marchetti *et al.* 1983, Takahashi *et al.* 1999, Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000). *spl* 変異体は今までに *spl1*~*spl11* まで見つけられているが全て劣性であり (Kinoshita 1995, Yin *et al.* 2000), *spl11* はいもち病および白葉枯病に対してレース非特異的な抵抗性を示した (Yin *et al.* 2000). 最近, *spl7* は高温や UV 光により擬似病斑の形成が誘導されること, およびその遺伝子産物は熱ストレスに関する転写因子 (HSF) と高い相同性があることが明らかにされた (Yamanouchi *et al.* 2002). *cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* はいもち病に対して抵抗性を示した (Takahashi *et al.* 1999). *spl* 変異体や *cdr* 変異体とは別に, 単因子劣性の擬似病斑葉変異体が見つかり (M1009), それはいもち病菌およびごま葉枯病 (*Cochliobolus miyabeanus*) に抵抗性を示した (Arase *et al.* 2000). しかし, イネにおいては, それらの擬似病斑葉変異体の擬似病斑の発生実態や病害抵抗性が生育過程においてどのように制御されているかはあまり明らかにされていない. また, これらの擬似病斑葉変異体の農業形質については明らかではなく, 育種的な利用の可能性については検討されていない.

そこで本研究では, イネにおける病害抵抗性がどのように制御されているかを明らか

にする目的で、擬似病斑葉変異体における擬似病斑の発現様式および病害抵抗性との関連について解析を行った。

第1に、新たにいくつかの擬似病斑葉変異体を同定し、既知の擬似病斑葉変異体とあわせてそれらの擬似病斑の発生する時期と程度、器官および農業形質について解析を行った。

第2に擬似病斑葉変異体の病害抵抗性として、イネにおける重要な糸状菌病であるいもち病と、細菌病である白葉枯病に対する抵抗性を調査した。また、擬似病斑葉変異体において、病害抵抗性と関係があると考えられている PR タンパクの遺伝子発現についても解析した。

第3に、有望と思われる擬似病斑葉変異体について実用品種への戻し交配系統を作出して、それらの農業形質の評価を試みた。

本研究は1994年から2003年まで九州沖縄農業研究センター(旧九州農業試験場)において実施された。

II 擬似病斑葉突然変異体の表現型の解析

1 緒言

擬似病斑葉変異体は、シロイヌナズナ (Greenberg and Ausubel 1993, Dietrich *et al.* 1994, 1997, Greenberg *et al.* 1994, 2000, Weymann *et al.* 1995, Rate *et al.* 1999, Greenberg 2000, Mach *et al.* 2001), トウモロコシ (Johal *et al.* 1995, Hu *et al.* 1996, 1998, Gray *et al.* 1997), オオムギ (Wolter *et al.* 1993, Büschges *et al.* 1997, Jørgensen 1992), イネ (Sekiguchi and Furuta 1965, Kiyosawa 1970, Marchetti *et al.* 1983, Takahashi *et al.* 1999, Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000) などの多くの植物で解析されている。

イネにおいては、1965 年に最初に関口病斑 (Sekiguchi legion, *sl*) という病斑状の褐点が葉身に現れる擬似病斑葉変異体が単離されて以来 (Sekiguchi and Furuta 1965, Kiyosawa 1970), *spl* (*spotted leaf*) 変異体および *cdr* (*cell death resistance*) 変異体などの擬似病斑葉変異体が同定されている (表 2-1) (Marchetti *et al.* 1983, Takahashi *et al.* 1999, Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000). *spl* 変異体は今までに *spl1* ~ *spl11* まで見つけられているが全て劣性である (Kinoshita 1995, Yin *et al.* 2000). RGC (Rice Genetics Cooperatives) に登録されている *spl1* ~ *spl10* は染色体上にマッピングされ、連鎖分析の際のマーカーとして利用されてきた。最近、*spl7* は高温や UV 光により擬似病斑の形成が誘導されること、およびその遺伝子産物は熱ストレスに関する転写因子 (HSF) と高い相同性があることが明らかにされた (Yamanouchi *et al.* 2002). *cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* は、すでに擬似病斑葉変異体として見つかった 93 個の変異体の中から、いもち病菌に対して抵抗性を示すものとして同定された (Takahashi *et al.* 1999). M1009 は *spl* 変異体や *cdr* 変異体とは別に見つけられ、いもち病およびごま葉枯病に抵抗性を示した (Arase *et al.* 2000). 最近、イネにおいて 8000 ラインのアクチベーションタギングラインから擬似病斑葉変異体が単離され、その T-DNA 挿入部位の下流の ORF がタバコで過敏反応が起こる際に誘導される遺伝子と相同性があることが明らかになった (森ら 2003). 従って、今までの研究結果から、いくつかの擬似病斑葉変異体は病害抵抗性反応になんらかの変異が生じていることが明らかになっている。

しかしながら、擬似病斑葉変異体の多くはいもち病抵抗性や白葉枯病抵抗性などの病害抵抗性が不明であり、擬似病斑の発現時期も明らかにされていない (表 2-1). また、擬似病斑葉変異体における、擬似病斑の発現過程や農業形質への影響につ

いての報告もない。

そこで本章では擬似病斑葉変異体の擬似病斑の発現過程や農業形質への影響について解析した。まず最初に、新たに同定した擬似病斑葉変異体の遺伝分析を行った。次に、新たに同定した変異体および既知の擬似病斑葉変異体を用いて、擬似病斑の発生する時期と器官およびその発生程度について調査した。最後に、それらの農業形質を調査した。

2 材料および方法

[擬似病斑葉変異体の選抜と同定]

擬似病斑葉変異体は、受精卵にメチルニトロソウレア(MNU)による変異原処理を行った M_2 又は M_3 系統から選抜を行った。実験を始めた当初は、いもち病抵抗性を示す変異体の選抜を行っていたが、いもち病抵抗性候補変異体の中に、擬似病斑葉変異体が含まれていたため、途中から擬似病斑葉を示す変異体をまず選抜し、それらの中からいもち病抵抗性を示す変異体を選抜するという手法をとった。実験に供試した $M_2 \cdot M_3$ 系統はヒノヒカリ 3600 系統、台中 65 号 2700 系統およびコシヒカリ 7300 系統であった。原品種が異なるので、各 $M_2 \cdot M_3$ 系統のいもち病に対する抵抗性については各々の原品種と比較した。いもち病菌の接種試験以外は、すべて圃場で材料を養成した。いもち病菌の接種試験は、温室 ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) で材料を養成した。

台中 65 号とコシヒカリは日本における主要なイネいもち病菌に対する真性抵抗性遺伝子を持たないが、ヒノヒカリは *Pii* と *Pia* といういもち病真性抵抗性遺伝子を有する。従って、いもち病抵抗性検定には、*Pii* と *Pia* を侵すことが可能なレース 007 (kyu90-20)を用いた。

[いもち病菌の接種]

いもち病菌(*Pyricularia oryzae*)のレース 007 (kyu90-20)は岩野正敬博士(元中央農業総合研究センター)から分譲していただいた。イネいもち病菌はオートミール培地 (50g/L オートミール, 10g/L ショ糖および 15g/L 寒天)に置床し 28°C で培養した。いもち病菌に対する検定法として、噴霧接種法を用いた。いもち病菌を 5×10^5 (孢子数/ml) の濃度に調製した孢子液を植物体に接種した。噴霧接種された植物体は、 24°C の接種箱(湿度約 100%)に1日置いた後、温室 ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) に戻した。接種後 7~10 日後に、植物体のいもち病菌に対する病斑の伸展程度を調査した。

$M_2 \cdot M_3$ 系統 (1 系統あたり約 20~50 個体、播種後約 20 日目)に、レース 007 (Kyu90-20)を噴霧接種法で接種し、 $M_2 \cdot M_3$ 系統の病斑を各々の原品種と比較し、原

品種より病斑の伸展程度が低い個体を選抜した。次に、それらの $M_2 \cdot M_3$ 系統の後代で同様の接種試験を行い抵抗性を確認した。

また、レース 007 以外の複数のイネいもち病菌に対する接種試験の結果から、選抜された変異体は、各々の原品種と同じいもち病真性抵抗性遺伝子型を持つことが確認されたこと(データ省略)、およびレース 007 (Ky90-20) を高い孢子濃度で接種した場合にはこれらの変異体もいもち病に対して原品種とほぼ同じ程度の罹病性を示すことから(データ省略)、これらの変異体は、他の品種との交雑により他のいもち病真性抵抗性遺伝子を過って有するという可能性はないと考えられた。

[対立性検定]

対立性検定に用いた *spl1*~*spl10* の種子は、九州大学の吉村淳教授、佐藤光教授から分譲していただいた。*spl11* の種子は Yin 博士から分譲していただいた。新たに見出した変異体と既知の変異体を交配し、播種後 100 日目に F_1 および F_2 個体の擬似病斑葉の有無を調査した。

[擬似病斑葉の調査]

擬似病斑の発生する時期と程度については、播種後 10 日おきに、各系統 5 個体の主茎の展開葉および未展開葉について達観で調査した。また、止葉の展開直後、7 日後、14 日後、21 日後および 28 日後に、擬似病斑の発現の様子をデジタルカメラで記録した。

擬似病斑の発生する器官については、播種後 110 日目に、止葉の葉鞘、外穎、内穎、枝梗について擬似病斑の発現の有無を各系統 5 個体につき達観で調査した。

[農業形質の評価]

農業形質の評価および擬似病斑の発生する時期と器官および発生する程度の調査は、2002 年に九州沖縄農業研究センターの水田で材料を養成して行った。5 月 30 日に播種、6 月 20 日に移植を行い、いずれも基肥に緩効性肥料で $N \cdot P \cdot K$ を各々 0.8kg/a を施した。農業形質として、稈長、穂長、一株あたりの穂数および一株あたりの籾重を各系統 5 個体調査した。

3 結果および考察

1) 擬似病斑葉突然変異体の遺伝分析

メチルニトロソウレア(MNU)による変異原処理を行った M_2 又は M_3 系統の合計 13000 系統のうち、まず擬似病斑葉を示す変異体を選抜し、それらの中からいもち病

抵抗性を示す変異体を選抜した。その結果、5つの系統(2つ (H13, H7) がヒノヒカリ, 2つ (T94, T96) が台中 65 号, 1つ (K62) がコシヒカリに由来する)がいもち病に対する抵抗性を示すことが明らかになった。従って、これらの系統を擬似病斑葉変異体 *spl* (*spotted leaf*) と名付けた。

各変異体をそれぞれの原品種と交配し、 F_1 および F_2 世代における擬似病斑葉を示す個体の頻度を調査した結果、これらの5つの擬似病斑葉変異体のうち、2つが単因子優性の突然変異であり (H13 および K62), 3つが単因子劣性の突然変異である(H7, T94 および T96)と推定された(表 2-2)。更に、対立性検定を行った結果、これらの変異体は独立した遺伝子座に由来することがわかった(表 2-3)。

次に、これらの新しく見いだされた擬似病斑葉変異体について、既知の擬似病斑葉変異体との対立性検定を行った。既知の擬似病斑葉変異体として RGC (Rice Genetics Cooperatives) に登録されている *spl1*~*spl10*(Kinoshita 1995), および最近報告された *spl11* (Yin *et al.* 2000) を用いた。その結果、T96 を *spl5* と交配した組み合わせ以外の全ての組み合わせにおいて、 F_2 世代で野生型個体が現れた(表 2-4)。一方、T96 を *spl5* と交配した F_1 個体は全て変異型を示し(データ省略)、 F_2 世代では野生型個体が全く現れなかった(表 2-4)。従って、新しく見いだされた擬似病斑葉変異体 T96, H13, H7, T94, K62 をそれぞれ *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* と名付けた(表 2-5)。

本実験では播種後約 20 日目(4~5 葉期)にいもち病菌の接種試験を行い選抜を行っていることから、生育後期から抵抗性を示す変異体を選抜できなかった可能性が考えられる。また、いもち病の接種方法として厳しい条件である噴霧接種法を用い、接種後に最終的には原品種が枯死するような条件設定で選抜を行ったことから、弱から中程度の抵抗性を示す変異体を選抜できなかった可能性が考えられる。しかしながら、本実験では1つの苗箱あたり 20~60 系統を条播して生育初期に選抜をすることにより、1回に多くの系統の検定が可能である。また、接種後に最終的には原品種が枯死するような条件設定であることから、接種後の調査時間が比較的少ない。従って、本章で用いた方法は、多数の系統に対して、生育初期から抵抗性を示す変異体を選抜するための有用な方法であると考えられる。

2) 擬似病斑の発生する時期と程度

spl5-2, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* の擬似病斑の色や形は各々異なっていた(図 2-1)。そこで、今回新たに得られた変異体と既知の変異体(表 2-5)を用いて、擬似

表 2-1. 既知の擬似病斑葉突然変異体

| 変異体 | 座乗染色体 | いもち病抵抗性 | 白葉枯病抵抗性 | 擬似病斑 発生時期 | 文献 |
|--------------|-------|---------|---------|--------------|--------|
| <i>spl1</i> | 12 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl2</i> | 2 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl3</i> | 3 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl4</i> | 6 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl5</i> | 7 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl6</i> | 1 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl7</i> | 5 | 罹病性? | 不明 | 不明 | 1), 2) |
| <i>spl8</i> | 5 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl9</i> | 7 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl10</i> | 10 | 不明 | 不明 | 不明 | 1) |
| <i>spl11</i> | 12 | 抵抗性 | 抵抗性 | 不明 | 3) |
| <i>cdr1</i> | 不明 | 抵抗性 | 不明 | 播種後 20 日以内 | 4) |
| <i>cdr2</i> | 不明 | 抵抗性 | 不明 | 播種後 50 日以内 | 4) |
| <i>Cdr3</i> | 不明 | 抵抗性 | 不明 | 播種後 20 日以内 | 4) |
| M1009 | 不明 | 抵抗性 | 不明 | 不明 | 5) |

¹⁾Kinoshita (1995). ²⁾Yamanouchi *et al.* (2002). ³⁾Yin *et al.* (2000).

⁴⁾Takahashi *et al.* (1999) . ⁵⁾Arase *et al.* (2000) .

表 2-2. 新たに同定した擬似病斑葉突然変異体の遺伝分析

| 交配組合せ (母親×花粉親) | 世代 | 個体数 合計 | 表現型 ¹⁾ | | χ^2 | 分離比 |
|----------------------------|----------------|-----------|-------------------|------------|--------------------|-------------------|
| | | | 野生型 個体数 | 変異型 個体数 | | |
| H13×ヒノヒカリ ²⁾ | F ₂ | 299 | 74 | 225 | 0.01 ⁵⁾ | 1:3 ³⁾ |
| H7×ヒノヒカリ ²⁾ | F ₂ | 165 | 125 | 40 | 0.05 ⁵⁾ | 3:1 ⁴⁾ |
| K62×コシヒカリ ²⁾ | F ₂ | 112 | 30 | 82 | 0.19 ⁵⁾ | 1:3 ³⁾ |
| T94×台中 65 号 ²⁾ | F ₂ | 112 | 85 | 27 | 0.05 ⁵⁾ | 3:1 ⁴⁾ |
| 台中 65 号 ²⁾ ×T96 | F ₂ | 156 | 124 | 32 | 1.67 ⁵⁾ | 3:1 ⁴⁾ |

¹⁾ 播種後 100 日目の成葉における擬似病斑の有無を調査した。

²⁾ 各々の原品種。

³⁾ 単因子優性の突然変異によると推定される。

⁴⁾ 単因子劣性の突然変異によると推定される。

⁵⁾ $\chi^2_{1,0.05}=3.84$ (自由度 1, 5%有意水準)。

表 2-3. 新たに同定した擬似病斑葉突然変異体間における
対立性検定

| 交配組合せ (母親×花粉親) | F ₁ の 表現型 ¹⁾ | F ₂ | | 対立性検定結果 |
|-------------------|---------------------------------------|----------------|----------------------------|-------------|
| | | 調査個体数 | 野生型 個体の有無 ¹⁾ | |
| H7×H13 | 変異型 | 91 | 有 | Allelic でない |
| T94×H13 | 変異型 | 78 | 有 | Allelic でない |
| T96×H13 | 変異型 | 189 | 有 | Allelic でない |
| H13×K62 | 変異型 | 150 | 有 | Allelic でない |
| T94×H7 | 野生型 | 60 | 有 | Allelic でない |
| T96×H7 | 野生型 | 56 | 有 | Allelic でない |
| H7×K62 | 変異型 | 46 | 有 | Allelic でない |
| T94×T96 | 野生型 | 67 | 有 | Allelic でない |
| T94×K62 | 変異型 | 45 | 有 | Allelic でない |
| T96×K62 | 変異型 | 101 | 有 | Allelic でない |

¹⁾ 播種後 100 日目の成葉における擬似病斑の有無を調査した。

表 2-4. 新たに同定した擬似病斑葉突然変異体と
既知の突然変異体(*spl1* ~ *spl11*) との対立性検定

| 交配組合せ (母親×花粉親) | 世代 | 個体数 合計 | 表現型 ¹⁾ | | 対立性検定結果 |
|-------------------|----------------|-----------|-------------------|------------|-------------|
| | | | 野生型 個体数 | 変異型 個体数 | |
| H13× <i>spl1</i> | F ₂ | 172 | 46 | 126 | Allelic でない |
| H13× <i>spl2</i> | F ₂ | 237 | 48 | 189 | Allelic でない |
| H13× <i>spl3</i> | F ₂ | 149 | 9 | 140 | Allelic でない |
| H13× <i>spl4</i> | F ₂ | 361 | 94 | 267 | Allelic でない |
| H13× <i>spl5</i> | F ₂ | 260 | 74 | 186 | Allelic でない |
| H13× <i>spl6</i> | F ₂ | 424 | 85 | 339 | Allelic でない |
| H13× <i>spl7</i> | F ₂ | 145 | 25 | 120 | Allelic でない |
| H13× <i>spl8</i> | F ₂ | 178 | 58 | 120 | Allelic でない |
| H13× <i>spl9</i> | F ₂ | 30 | 9 | 21 | Allelic でない |
| H13× <i>spl10</i> | F ₂ | 187 | 51 | 136 | Allelic でない |
| H13× <i>spl11</i> | F ₂ | 83 | 33 | 50 | Allelic でない |
| <i>spl1</i> ×H7 | F ₂ | 82 | 40 | 42 | Allelic でない |
| <i>spl2</i> ×H7 | F ₂ | 76 | 50 | 26 | Allelic でない |
| <i>spl3</i> ×H7 | F ₂ | 39 | 25 | 14 | Allelic でない |
| <i>spl4</i> ×H7 | F ₂ | 64 | 30 | 34 | Allelic でない |
| <i>spl5</i> ×H7 | F ₂ | 43 | 28 | 15 | Allelic でない |
| <i>spl6</i> ×H7 | F ₂ | 48 | 34 | 14 | Allelic でない |
| <i>spl7</i> ×H7 | F ₂ | 47 | 32 | 15 | Allelic でない |
| <i>spl8</i> ×H7 | F ₂ | 44 | 28 | 16 | Allelic でない |
| <i>spl9</i> ×H7 | F ₂ | 48 | 33 | 15 | Allelic でない |
| <i>spl10</i> ×H7 | F ₂ | 52 | 27 | 25 | Allelic でない |
| H7× <i>spl11</i> | F ₂ | 48 | 28 | 20 | Allelic でない |
| <i>spl1</i> ×T94 | F ₂ | 44 | 25 | 19 | Allelic でない |
| <i>spl2</i> ×T94 | F ₂ | 42 | 20 | 22 | Allelic でない |
| <i>spl3</i> ×T94 | F ₂ | 56 | 18 | 38 | Allelic でない |
| T94× <i>spl4</i> | F ₂ | 30 | 17 | 13 | Allelic でない |
| <i>spl5</i> ×T94 | F ₂ | 49 | 30 | 19 | Allelic でない |
| <i>spl6</i> ×T94 | F ₂ | 52 | 28 | 24 | Allelic でない |
| <i>spl7</i> ×T94 | F ₂ | 51 | 15 | 36 | Allelic でない |
| <i>spl8</i> ×T94 | F ₂ | 52 | 26 | 26 | Allelic でない |
| <i>spl9</i> ×T94 | F ₂ | 59 | 41 | 18 | Allelic でない |
| <i>spl10</i> ×T94 | F ₂ | 56 | 37 | 19 | Allelic でない |
| T94× <i>spl11</i> | F ₂ | 86 | 66 | 20 | Allelic でない |
| <i>spl1</i> ×T96 | F ₂ | 29 | 17 | 12 | Allelic でない |
| <i>spl2</i> ×T96 | F ₂ | 146 | 93 | 53 | Allelic でない |
| <i>spl3</i> ×T96 | F ₂ | 48 | 31 | 17 | Allelic でない |
| <i>spl4</i> ×T96 | F ₂ | 122 | 77 | 45 | Allelic でない |
| <i>spl5</i> ×T96 | F ₂ | 112 | 0 | 112 | Allelic |
| <i>spl6</i> ×T96 | F ₂ | 44 | 28 | 16 | Allelic でない |
| <i>spl7</i> ×T96 | F ₂ | 92 | 58 | 34 | Allelic でない |
| <i>spl8</i> ×T96 | F ₂ | 48 | 30 | 18 | Allelic でない |
| <i>spl9</i> ×T96 | F ₂ | 54 | 31 | 23 | Allelic でない |
| <i>spl10</i> ×T96 | F ₂ | 54 | 34 | 20 | Allelic でない |
| <i>spl1</i> ×K62 | F ₂ | 104 | 15 | 89 | Allelic でない |
| <i>spl2</i> ×K62 | F ₂ | 111 | 20 | 91 | Allelic でない |
| <i>spl3</i> ×K62 | F ₂ | 119 | 27 | 92 | Allelic でない |
| <i>spl4</i> ×K62 | F ₂ | 62 | 10 | 52 | Allelic でない |
| <i>spl5</i> ×K62 | F ₂ | 55 | 8 | 47 | Allelic でない |
| <i>spl6</i> ×K62 | F ₂ | 40 | 10 | 30 | Allelic でない |
| <i>spl7</i> ×K62 | F ₂ | 92 | 20 | 72 | Allelic でない |
| <i>spl8</i> ×K62 | F ₂ | 38 | 8 | 30 | Allelic でない |
| <i>spl9</i> ×K62 | F ₂ | 47 | 11 | 36 | Allelic でない |
| <i>spl10</i> ×K62 | F ₂ | 48 | 8 | 40 | Allelic でない |
| K62× <i>spl11</i> | F ₂ | 82 | 20 | 62 | Allelic でない |

¹⁾ 播種後 100 日目の成葉における擬似病斑の有無を調査した。

表 2-5. 供試した擬似病斑葉突然変異体と原品種

| 変異体 | 系統名 | 優劣性 | 原品種 | 変異源 | いもち病真性 抵抗性遺伝子 ¹⁾ | 白葉枯病抵抗 性遺伝子群 ²⁾ |
|---------------|--------|-----|---------|------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>spl1</i> | KL404 | 劣性 | ? | 自然 ³⁾ | + ⁴⁾ | 金南風群 |
| <i>spl2</i> | KL808 | 劣性 | ? | 自然 | + | 金南風群 |
| <i>spl3</i> | KL518 | 劣性 | 農林 8 号 | γ 線 | <i>Pii</i> or <i>Pia,pii</i> | 金南風群 |
| <i>spl4</i> | KL603 | 劣性 | 農林 8 号 | γ 線 | + | 金南風群 |
| <i>spl5-1</i> | KL1004 | 劣性 | 農林 8 号 | γ 線 | + | 金南風群 |
| <i>spl5-2</i> | T96 | 劣性 | 台中 65 号 | MNU | + | 金南風群 |
| <i>spl6</i> | KL302 | 劣性 | 金南風 | MNU | <i>Pia</i> | 金南風群 |
| <i>spl7</i> | KL210 | 劣性 | 農林 8 号 | γ 線 | + | 金南風群 |
| <i>spl8</i> | KL206 | 劣性 | 金南風 | MNU | <i>Pia</i> | 金南風群 |
| <i>spl9</i> | FL331 | 劣性 | 農林 8 号 | γ 線 | + | 金南風群 |
| <i>spl10</i> | KL705 | 劣性 | 金南風 | MNU | <i>Pia</i> | 金南風群 |
| <i>Spl12</i> | H13 | 優性 | ヒノヒカリ | MNU | <i>Pia,pii</i> | 金南風群 |
| <i>spl13</i> | H7 | 劣性 | ヒノヒカリ | MNU | <i>Pia,pii</i> | 金南風群 |
| <i>spl14</i> | T94 | 劣性 | 台中 65 号 | MNU | + | 金南風群 |
| <i>Spl15</i> | K62 | 優性 | コシヒカリ | MNU | + | 金南風群 |
| ヒノヒカリ | - | - | - | - | <i>Pia,pii</i> | 金南風群 |
| 台中 65 号 | - | - | - | - | + | 金南風群 |
| コシヒカリ | - | - | - | - | + | 金南風群 |
| 農林 8 号 | - | - | - | - | + | 金南風群 |
| 金南風 | - | - | - | - | <i>Pia</i> | 金南風群 |

¹⁾ 幼苗におけるいもち病菌の噴霧接種による推定.

²⁾ I 群菌に対して罹病性であることによる推定.

³⁾ 自然突然変異による.

⁴⁾ 日本の主要ないもち病菌に対する抵抗性遺伝子を持たない.

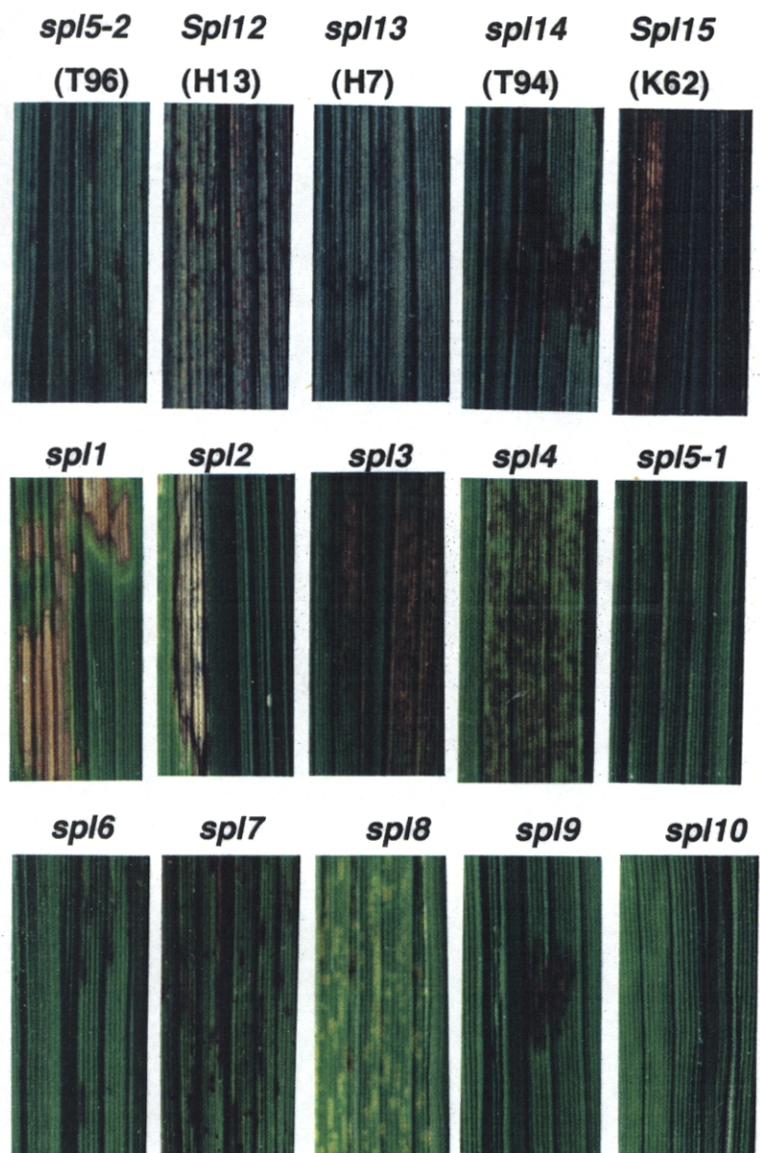


図 2 - 1 . 擬似病斑葉突然変異体の成葉葉身における擬似病斑の出現
(播種後 100 日). バーは 1cm.

病斑の発生する時期と程度について調査した。

spl1 では第3葉以降の上位葉に薄茶色の擬似病斑が現れ、葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は高かった(図 2-2)。葉身の展開直後には擬似病斑は現れず、展開 7 日後に 1 枚の葉あたり 1~3 個の長さ約 3mm の擬似病斑が現れた(図 2-18)。展開 14 日後には、擬似病斑と擬似病斑がつながって広がり、葉の面積の約半分程度を占め、展開 21 日後には、さらに広がり、葉の面積の約 2/3 程度を占めた(図 2-18)。

spl2 では第2葉以降の上位葉に灰色の擬似病斑が現れ、葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は極めて高かった(図 2-3)。葉身の展開直後から葉先に擬似病斑が現れた(図 2-3, 図 2-18)。展開 7 日後には、擬似病斑と擬似病斑が葉先から葉の中央部分までつながって広がり、展開 14 日後には、葉全体まで擬似病斑と擬似病斑がつながった(図 2-18)。展開 21 日後には、さらに擬似病斑が広がり葉先は枯れて白く巻いたようになった(図 2-18)。

spl3 では第4葉以降の上位葉に赤茶色の擬似病斑が現れ、葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は高かった(図 2-4)。葉身の展開直後には擬似病斑は現れず、展開 7 日後に葉先に直径約 3mm 以下の擬似病斑が現れた(図 2-18)。展開 14 日後には、葉身の先端部と基部に擬似病斑が現れ、擬似病斑の大きさはやや大きくなった(直径約 5mm~10mm)(図 2-18)。展開 21 日後には、葉の先端部に擬似病斑が増え、擬似病斑同士が重なって褐色を呈する部分が生じた(図 2-18)。

spl4 では第4葉以降の上位葉に赤茶色の擬似病斑が現れ、第10葉以上の上位葉では葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合が高くなっていた(図 2-5)。葉身の展開直後には擬似病斑は現れず、展開 7 日後に葉身全体に直径約 3mm 以下の擬似病斑が複数個現れた(図 2-18)。展開 14 日後には、葉全体に擬似病斑が増え、展開 21 日後には、さらに擬似病斑が増えた(図 2-18)。

spl5-1 では第4葉以降の上位葉に赤茶色の擬似病斑が現れ、第12葉以上の上位葉では葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合が高くなっていた(図 2-6)。葉身の展開直後および展開 7 日後にはまだ擬似病斑は現れなかった(図 2-18)。展開 14 日後に葉身全体に直径約 3mm 以下の擬似病斑がうっすらと現れた(図 2-18)。展開 21 日後には少し擬似病斑が増え、展開 28 日後には、葉先に擬似病斑が増えた(図 2-18)。

spl5-2 では第6葉以降の上位葉に赤茶色の擬似病斑が現れ、葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は他の変異体と比較して、中程度であった(図 2-7)。*spl5-2* の擬似病斑は *spl5-1* と似ていたが、葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合はやや少

なかった(図 2-6, 図 2-7). 葉身の展開直後にはまだ擬似病斑は現れず, 展開 7 日後には葉身の中央部から先端にかけて直径約 3mm 以下の擬似病斑がうっすらと現れた(図 2-18). 展開 14 日後には葉身の中央部から先端にかけて擬似病斑が増え, 展開 21 日後には葉身の中央部から先端にかけてさらに擬似病斑が増えた(図 2-18). *spl5-1* と *spl5-2* には, 擬似病斑が葉身の先端に多いという共通点があった(図 2-18).

spl6 では第 6 葉以降の上位葉に赤茶色の擬似病斑が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は中程度であった(図 2-8). 葉身の展開直後にはまだ擬似病斑は現れず, 展開 7 日後には葉身全体に直径約 3mm 以下の擬似病斑がうっすらと現れた(図 2-18). 展開 14 日後には擬似病斑が増えたが, その後はあまり変化しなかった(図 2-18).

spl7 では第 4 葉以降の上位葉に赤茶色の擬似病斑が現れ, 第 9 葉以上の上位葉では葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合が極めて高くなった(図 2-9). 葉身の展開直後には葉身全体に直径約 3mm 以下の擬似病斑がうっすらと現れた(図 2-18). 展開 7 日後, 14 日後には全体的に擬似病斑が増えたが, その後はあまり変化しなかった(図 2-18).

spl8 では第 10 葉以降の上位葉に黄色の擬似病斑が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は中程度であった(図 2-10). 葉の展開直後, 7 日後, 14 日後にはまだ擬似病斑は現れず, 21 日後に葉全体に直径約 3mm 以下の擬似病斑がうっすらと現れた(図 2-18). 28 日後には少し擬似病斑が増え, 葉色が抜けたような感じになった(図 2-18).

spl9 は第 10 葉以降の上位葉に暗褐色の病斑が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は中程度であった(図 2-11). 葉身の展開直後にはまだ擬似病斑は現れず, 展開 7 日後に葉身の中央から先端にかけてやや大きい(直径約 5mm~10mm)擬似病斑が 5~6 個現れた(図 2-18). 展開 14 日後には擬似病斑が約 10 個まで増え, 展開 28 日後にはさらに増えた(図 2-18).

spl10 では第 9 葉以降の上位葉に黄色の擬似病斑が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は中程度であった(図 2-12). 葉身の展開直後にはまだ擬似病斑は現れず, 展開 7 日後に葉全体に直径約 3mm 以下の擬似病斑が現れ, 葉色が抜けたような感じになった(図 2-18). 展開 14 日後, 21 日後にはさらに擬似病斑が増え, 葉は黄色を呈した(図 2-18).

Spl12 (ホモ)では第 2 葉以降の上位葉に赤茶色の直径約 3mm 以下の擬似病斑が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は極めて高かった(図 2-13). 葉身が

半分程度抽出している時期から葉先に擬似病斑が現れる場合があった(図 2-13). 葉身の展開 7 日後には, 葉身の中央部と先端部に擬似病斑が現れた(図 2-18). 展開 14 日後には葉身の中央部と先端部の擬似病斑の数が増え, 展開 21 日後には葉身全体に擬似病斑が広がった(図 2-18).

Spl12 (ヘテロ)では, 第 2 葉以降の上位葉に赤茶色の擬似病斑が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は極めて高かった(図 2-14). 葉身の展開直後にはまだ擬似病斑は現れず, 展開 7 日後に葉身全体に *Spl12* (ホモ)よりやや長めの擬似病斑が現れた(図 2-18). 展開 14 日後には擬似病斑が増え, 展開 21 日後にはさらに擬似病斑が増えた(図 2-18).

spl13 では, 第 10 葉以降の上位葉にやや茶色を帯びた黄色の擬似病斑(直径約 3 mm以下)が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は中程度であった(図 2-15). 葉身の展開直後にはまだ擬似病斑は現れず, 展開 7 日後に葉身全体にうっすらと擬似病斑が現れた(図 2-18). 展開 14 日後にはあまり変化が見られなかったが, 展開 21 日後には少し擬似病斑が増え, 葉は少し黄色を呈した(図 2-18).

spl14 では, 第 2 葉に初めて暗褐色の擬似病斑が現れた(図 2-16). その後第 3 葉と第 4 葉には擬似病斑が出現したが, 第 5 葉と第 6 葉には見られず, 第 7 葉以上の上位葉ではふたたび擬似病斑が現れた. 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は中程度であった(図 2-16). 葉身の展開直後にはまだ擬似病斑は現れず, 展開 7 日後には, 葉身全体に 1~3 個のやや長め(直径約 5mm~10mm)の擬似病斑が現れた(図 2-18). 展開 14 日後には 5~10 個に擬似病斑が増え, 展開 21 日後にはあまり変化が見られないが, 展開 28 日後には小さめの擬似病斑が増えた(図 2-18).

Spl15 では第 4 葉以降の上位葉に薄茶色の擬似病斑が現れ, 葉身面積に占める擬似病斑の面積の割合は極めて高かった(図 2-17). 葉身の展開直後から葉身全体に擬似病斑が現れ, 特に先端部の擬似病斑の頻度が激しかった(図 2-18). 展開 7 日後には擬似病斑の数が増え, 葉はオレンジ色を呈し, 展開 14 日後には擬似病斑の数がさらに増えて, 葉はさらに強いオレンジ色を呈した(図 2-18).

擬似病斑の色は薄い茶色から濃い褐色を呈する系統が多かった(表 2-6). それらの変異体間で, 擬似病斑の大きさ, 発現時期や程度には共通性はなかった. *spl2* は灰色の擬似病斑が第 2 葉という生育の早い時期から現れ, 葉先は枯れて白く巻いたようになった. 従って, *spl2* は HR とは異なる現象を示す変異体であると考えられる. *spl8*, *spl10* および *spl13* は黄色の病斑が第 9~10 葉という生育の遅い時期に表れ, いずれも葉色がぬけたような感じになった. 一般的に老化現象

sp17

播種後日数

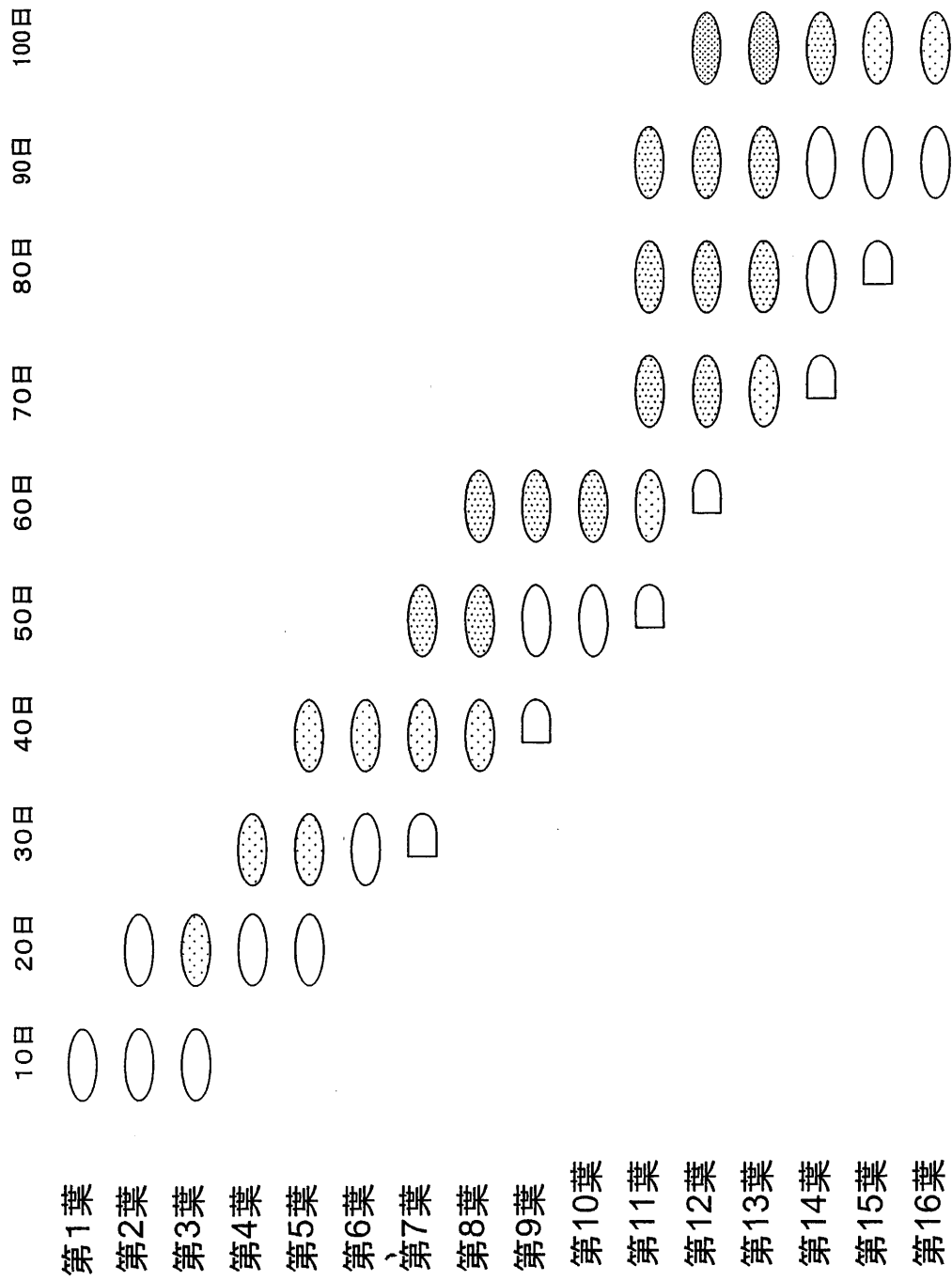


図2-2. *sp17* における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: □ 多: ●

sp/2

播種後日数

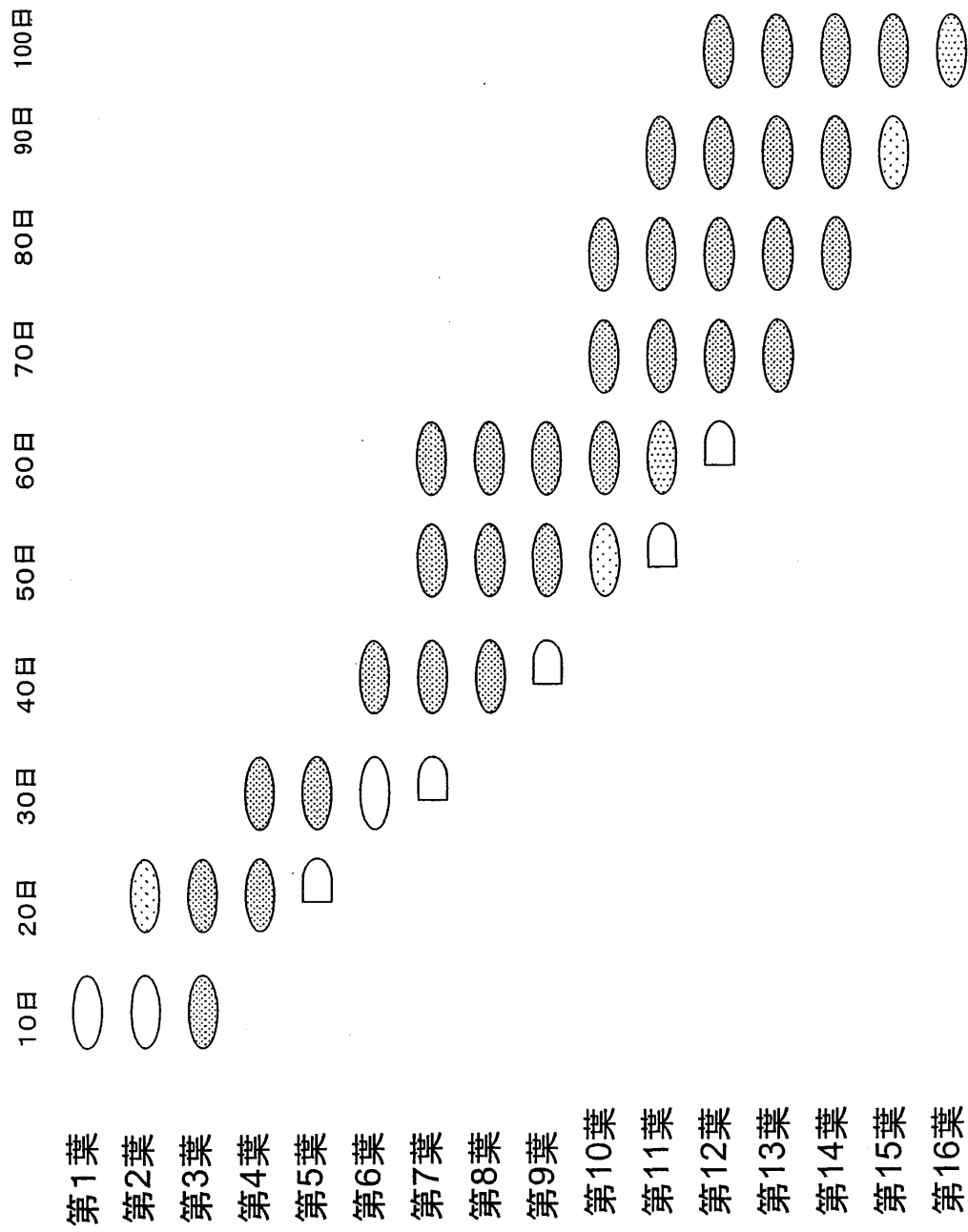


図2-3. sp/2 における疑似病斑の出現時期および出現程度.

疑似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: D 多: ●

sp/3

播種後日数

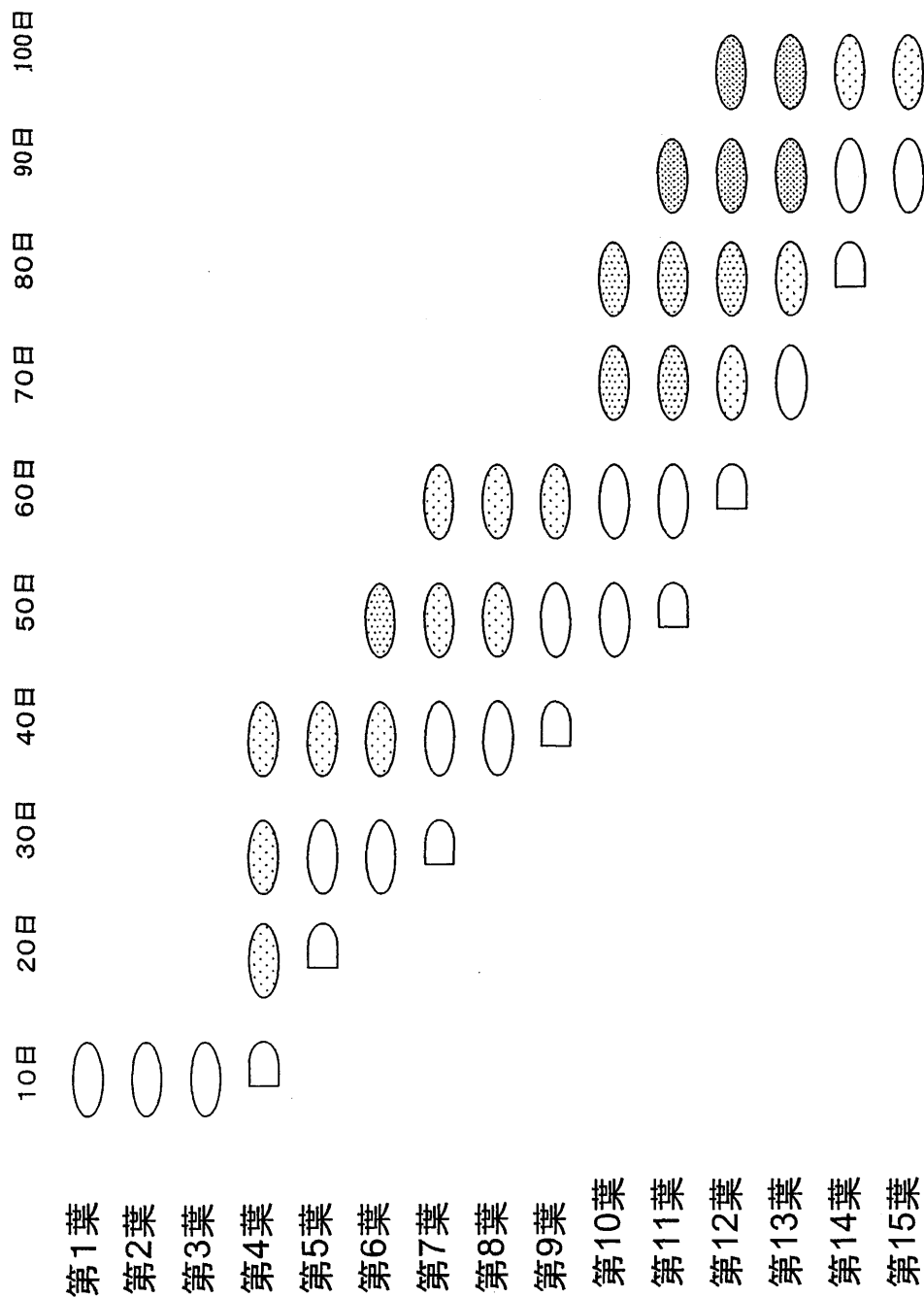


図2-4. sp/3 における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: ● 多: ●

sp14

播種後日数

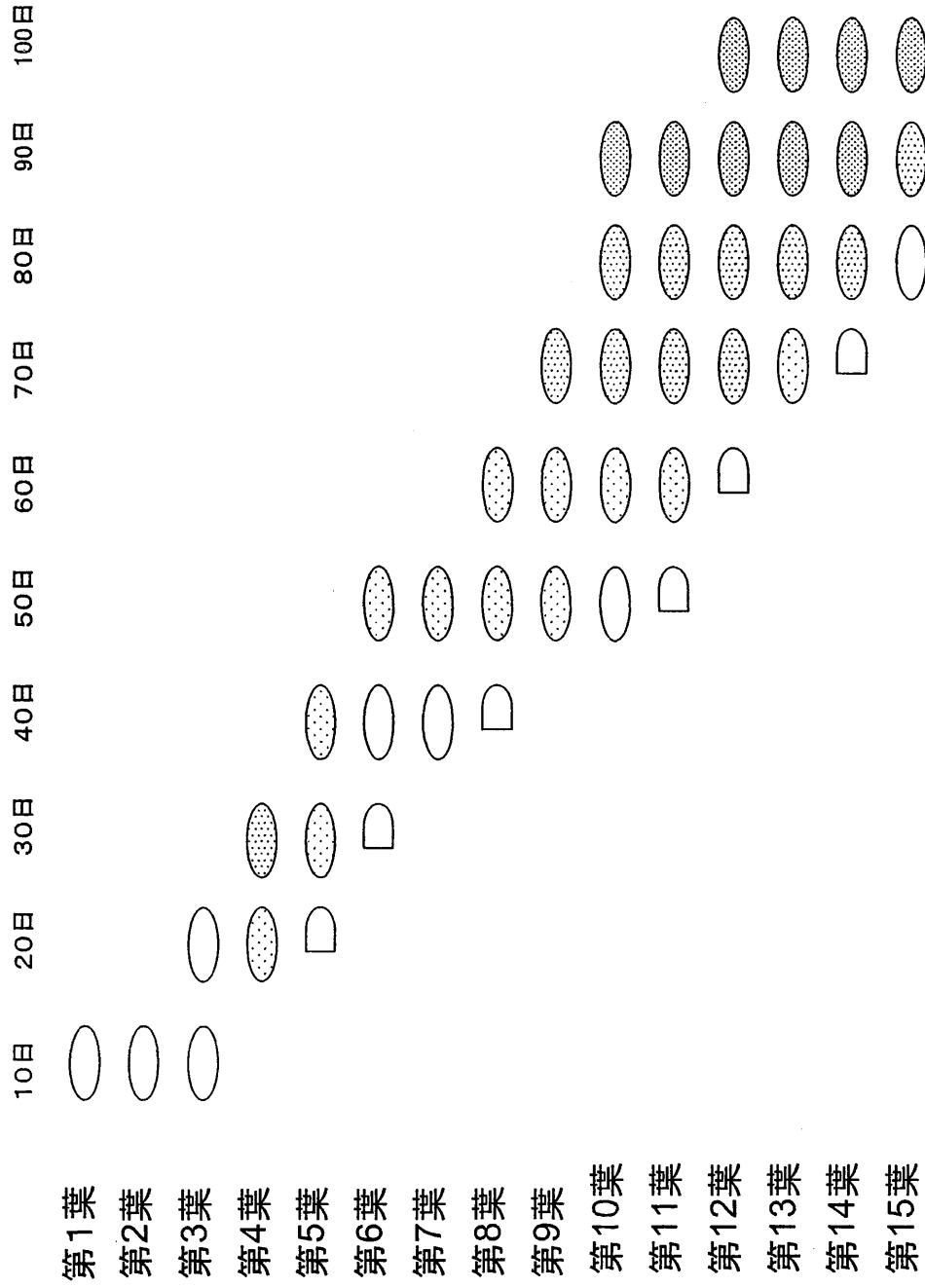


図 2-5. sp14 における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ○ 中: ○ 多: ○

sp/5-1

播種後日数

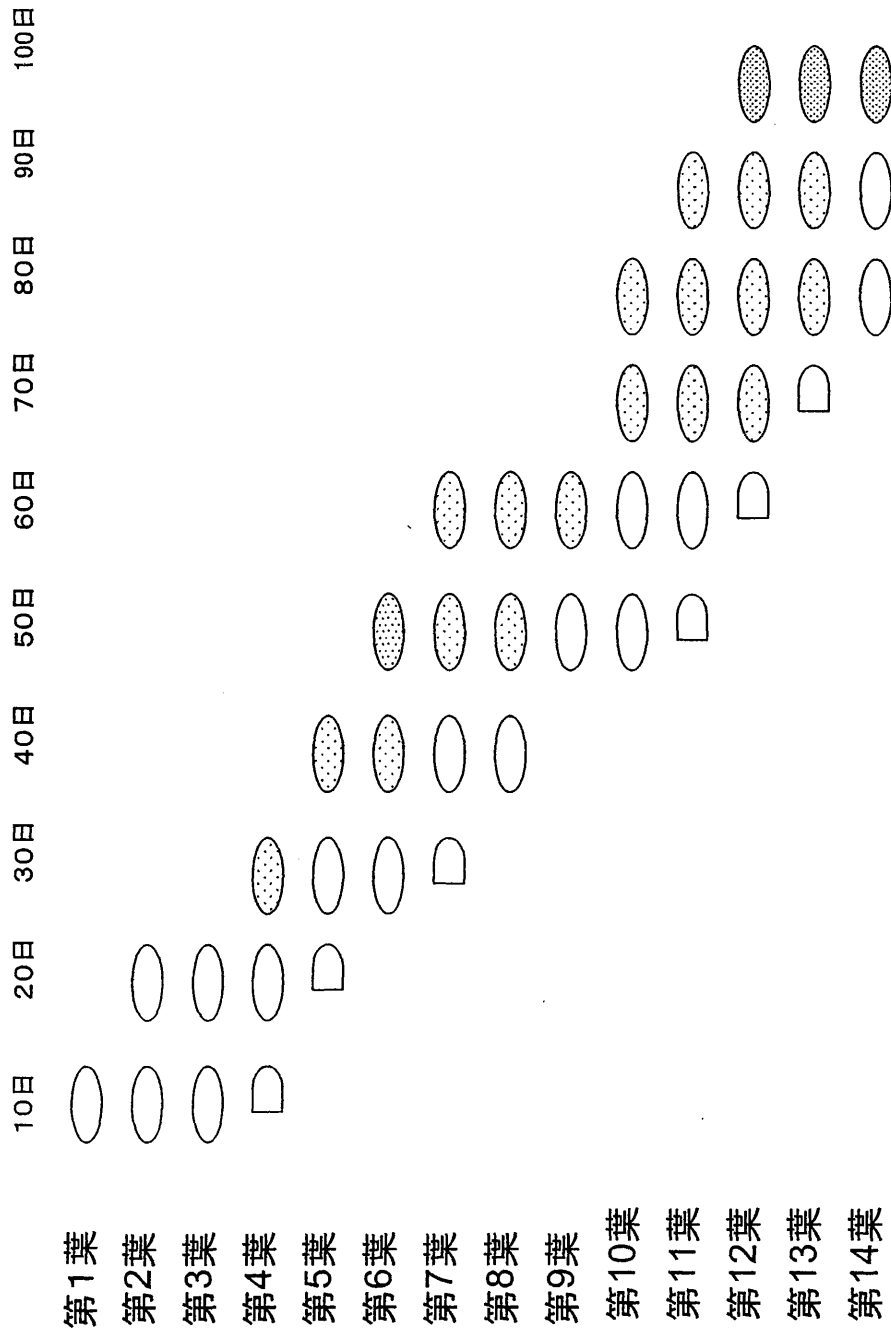


図2-6. sp/5-1における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ○ 中: ○ 多: ○

sp/5-2

播種後日数

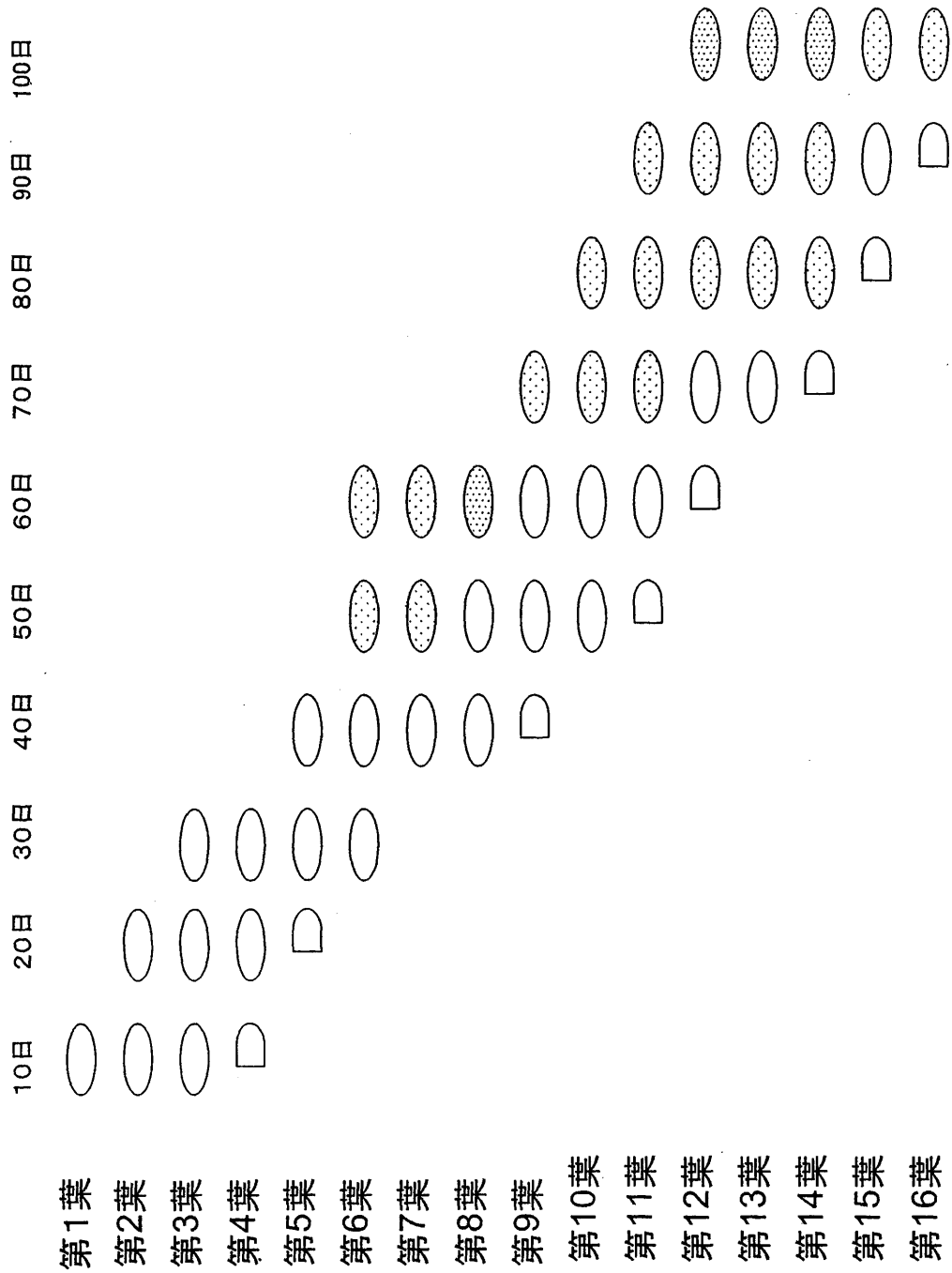


図2-7. sp/5-2 における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ○ 中: ○ 多: ○

sp/6

播種後日数

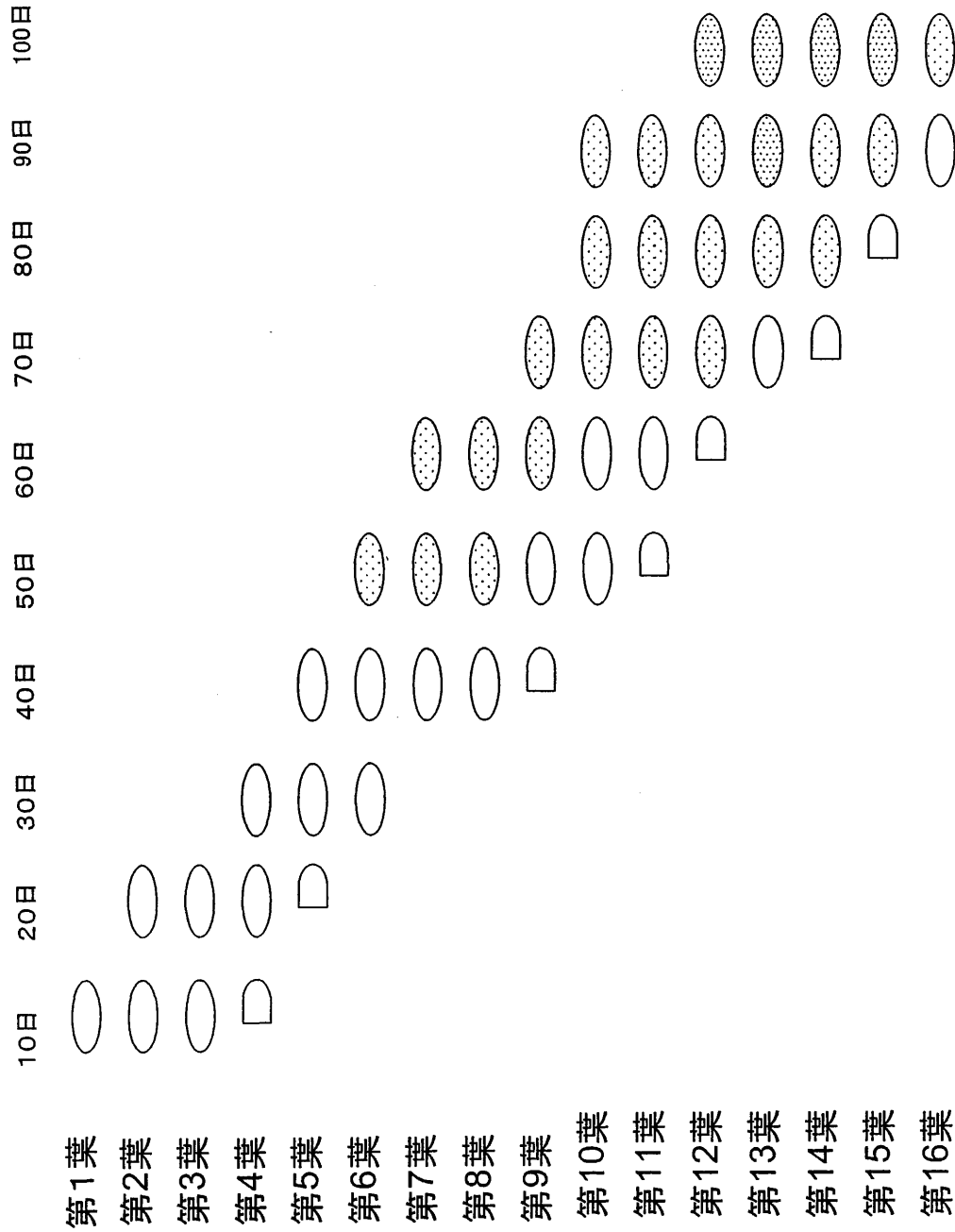


図2-8. sp/6 における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ○ 中: ○ 多: ○

sp/7

播種後日数

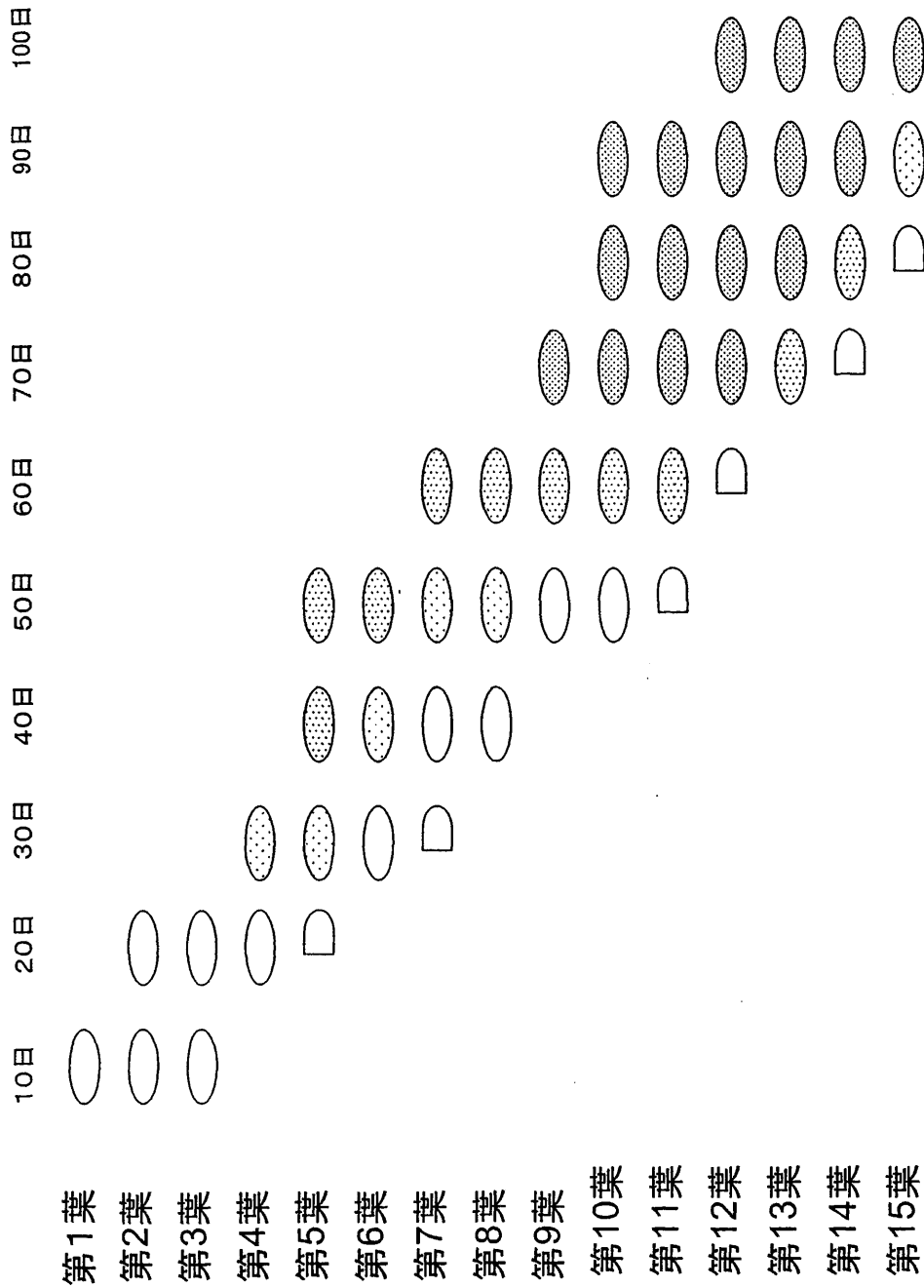


図2-9. sp/7 における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: ● 多: ●

sp/8

播種後日数

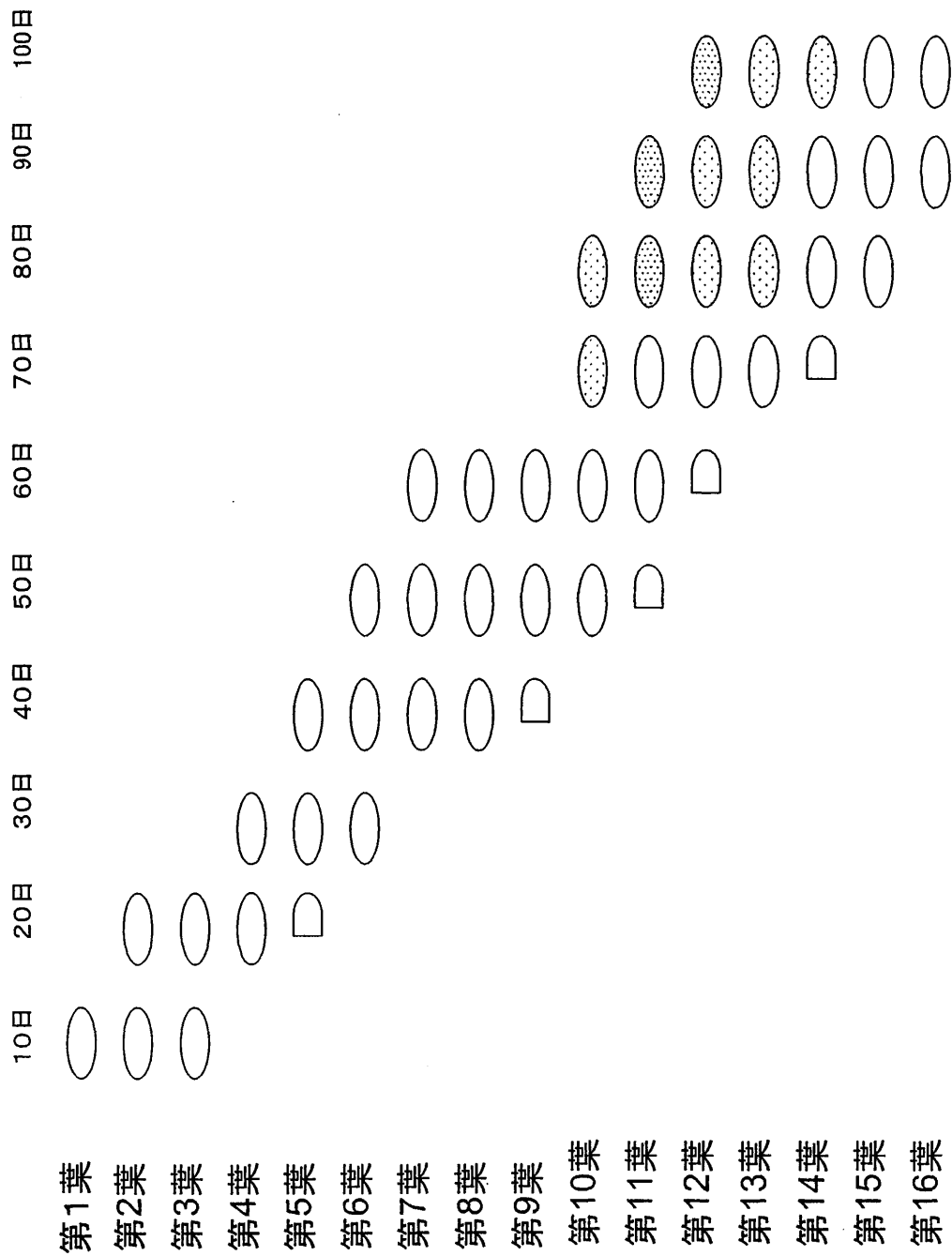


図2-10. sp/8 における疑似病斑の出現時期および出現程度.

疑似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ○ 中: ○ 多: ○

sp/9

播種後日数

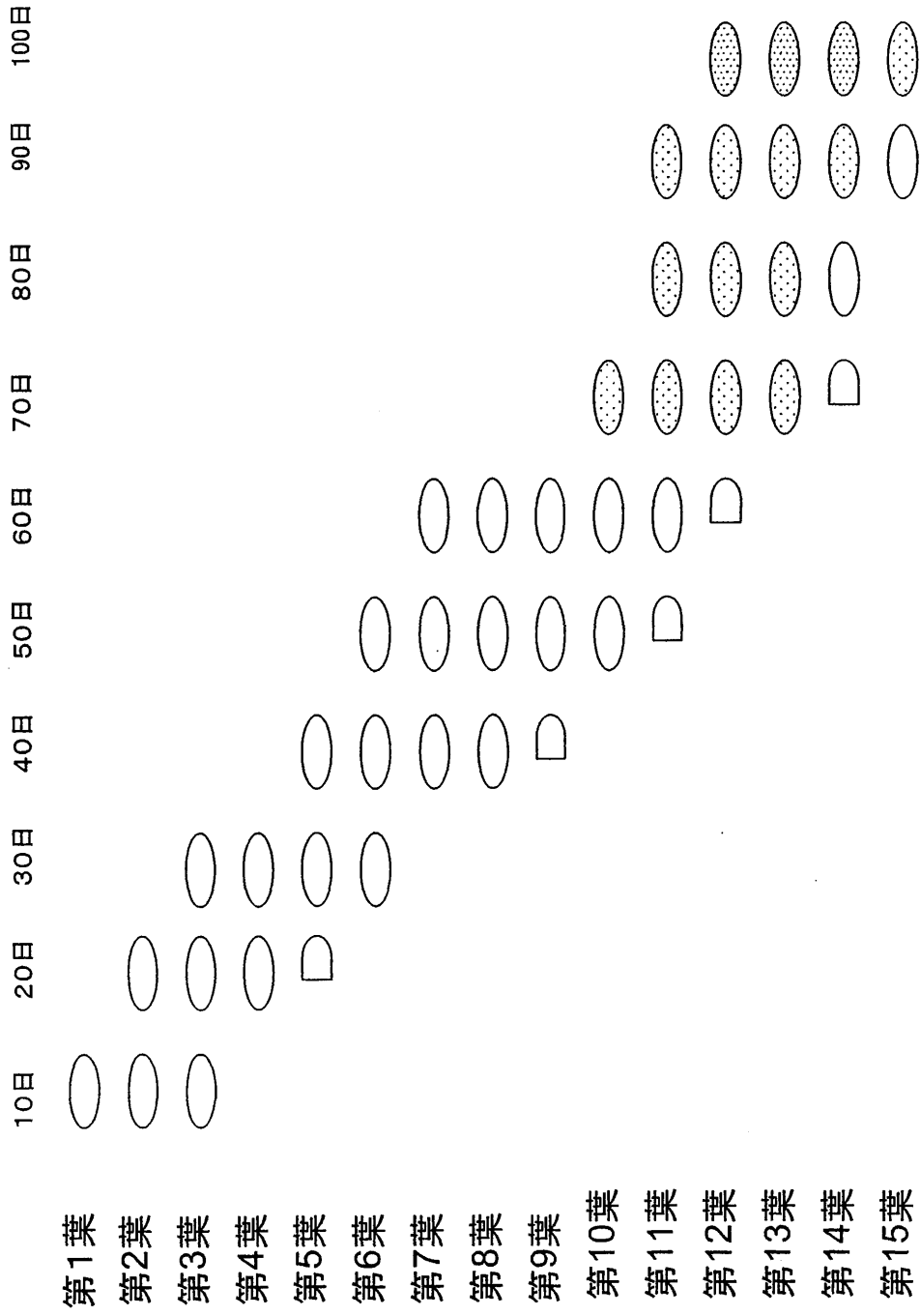


図2-11. sp/9 における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ○ 中: ○ 多: ○

spl10

播種後日数

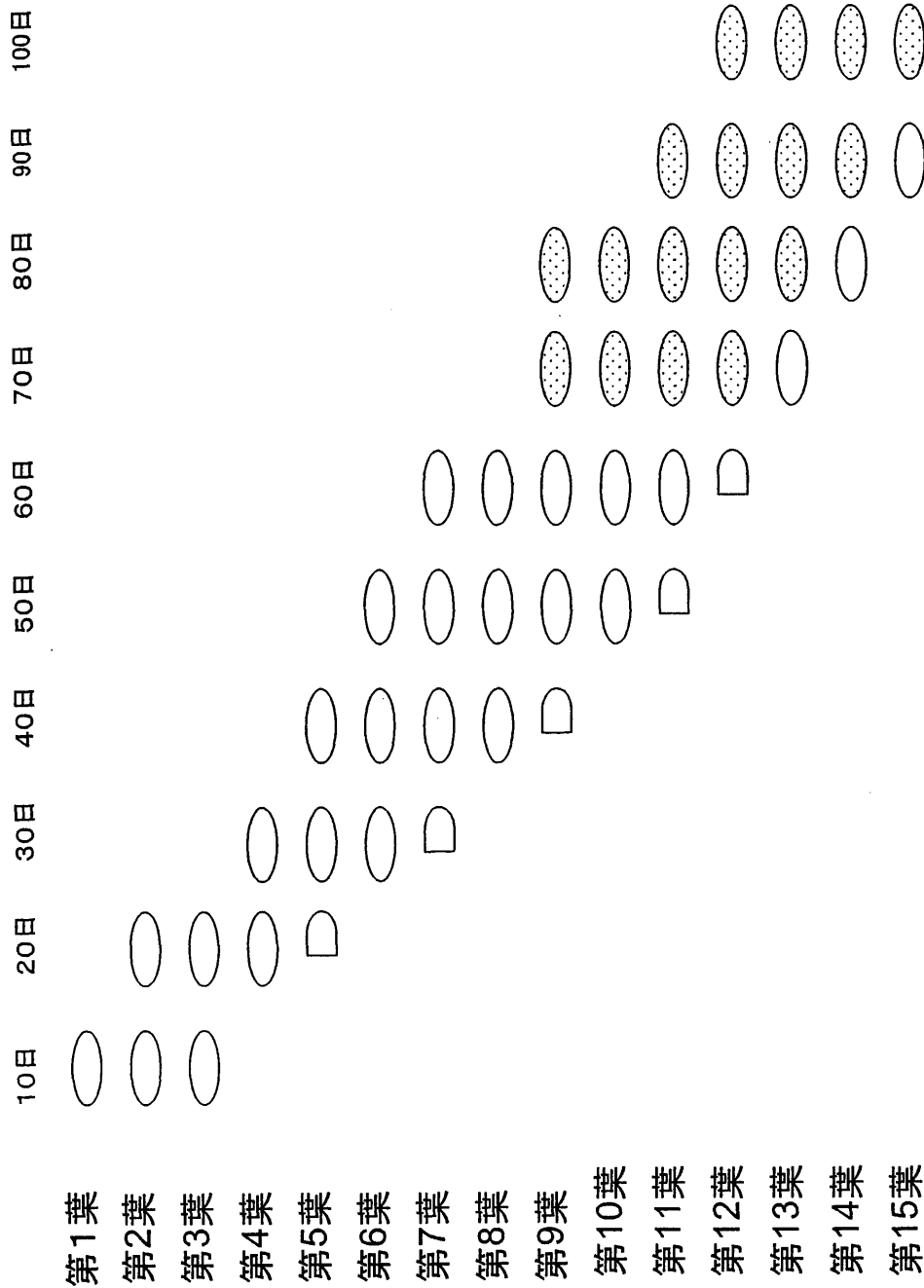


図2-12. *spl10* における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ○ 中: ○ 多: ○

Sp112(ホモ)

播種後日数

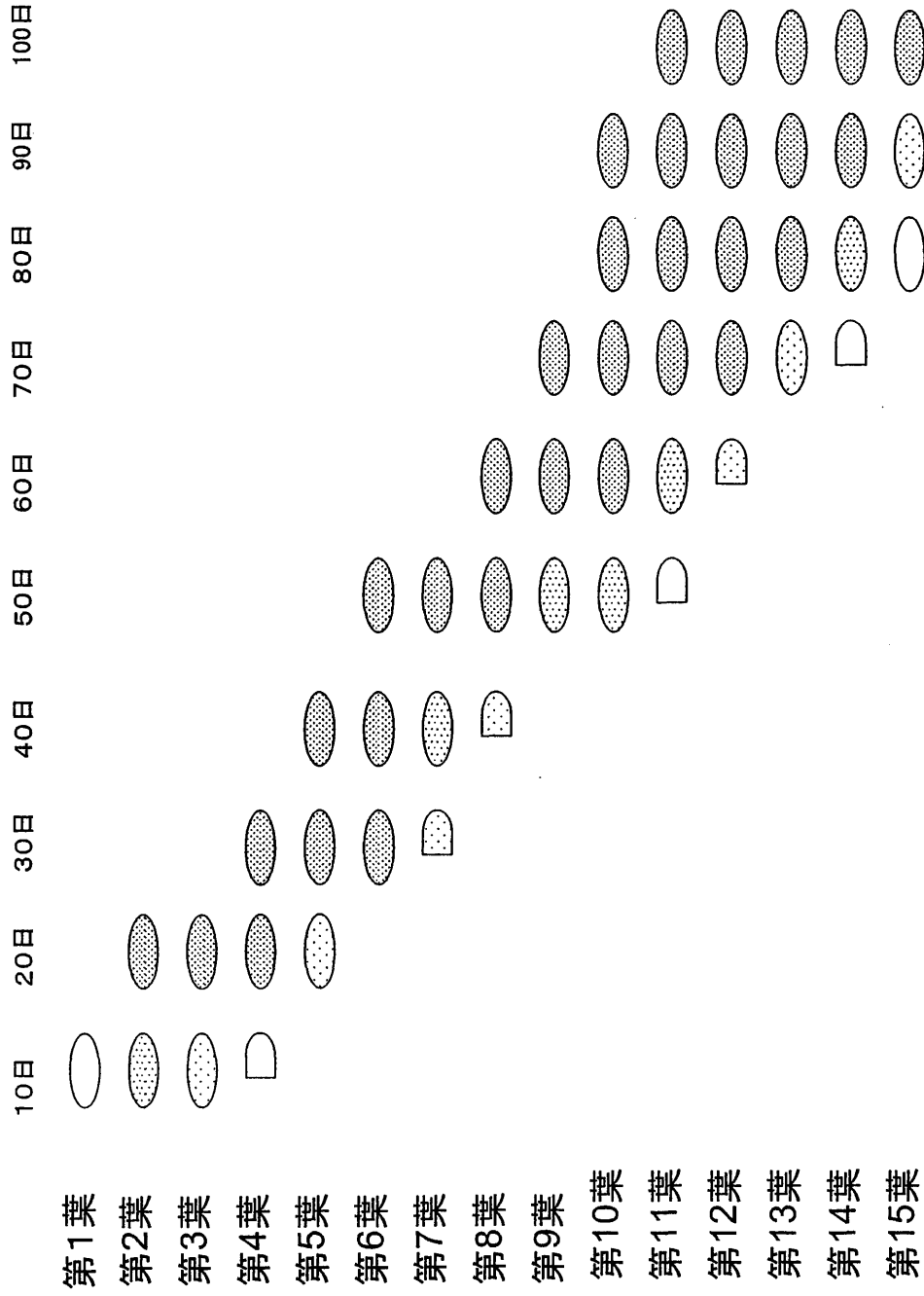


図2-13. Sp112(ホモ)における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: ◐ 多: ◑

Sp112(ヘテロ)

播種後日数

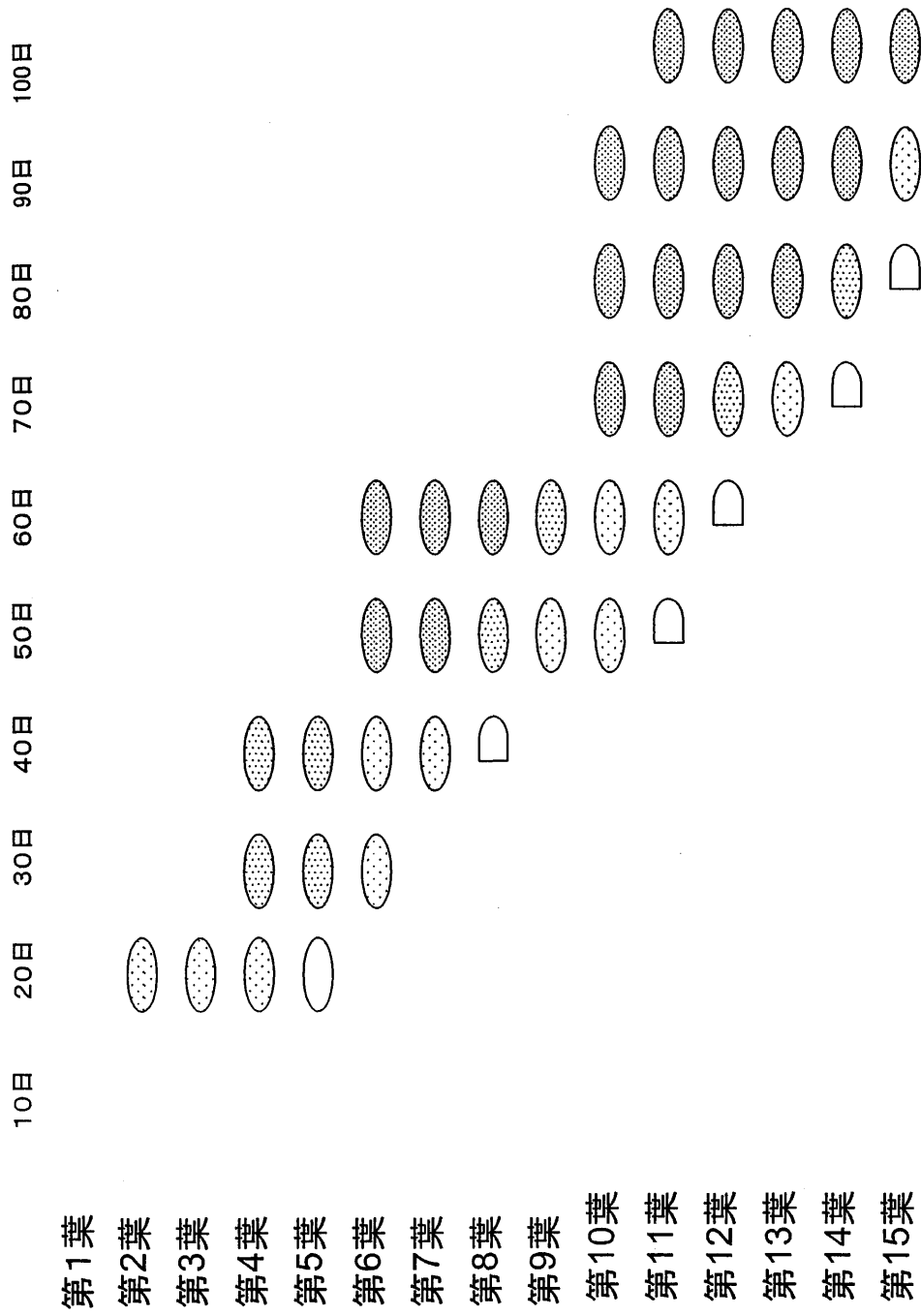


図2-14. Sp112(ヘテロ)における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: ● 多: ●

sp113

播種後日数

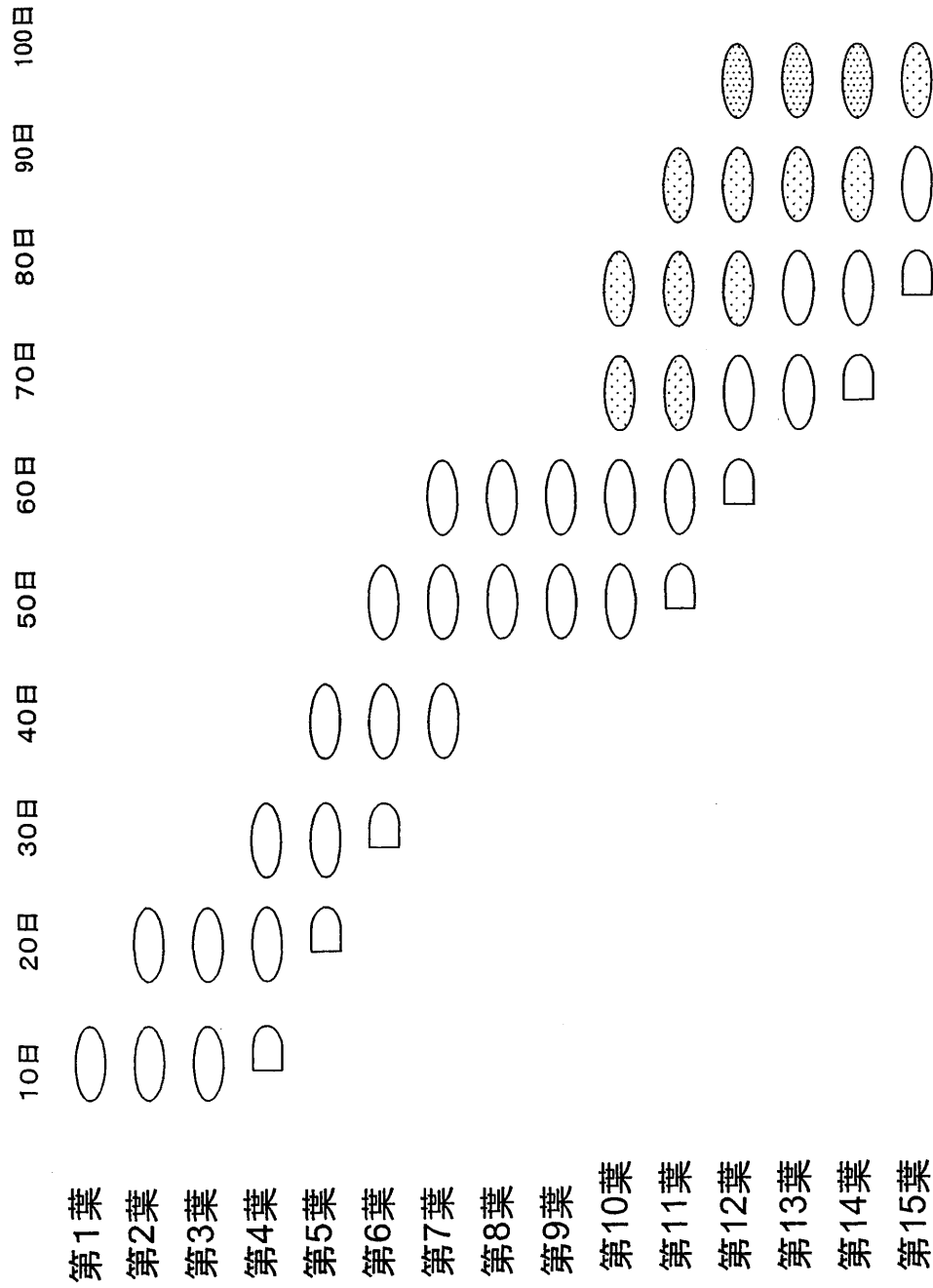


図2-15. sp113 における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ◐ 中: ◑ 多: ◒

sp/14

播種後日数

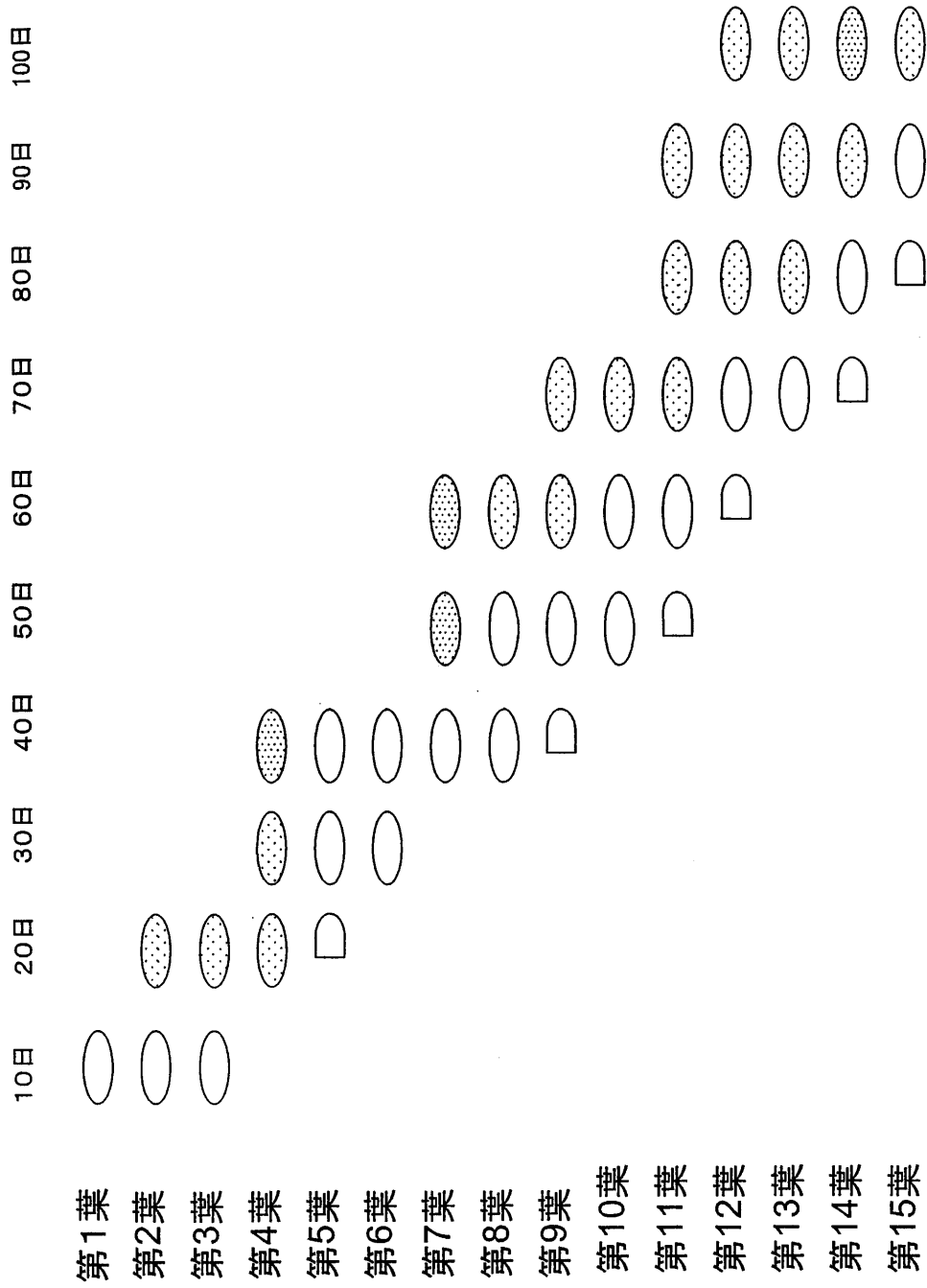


図2-16. sp/14における擬似病斑の出現時期および出現程度.

擬似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: ○ 多: ○

Sp175

播種後日数

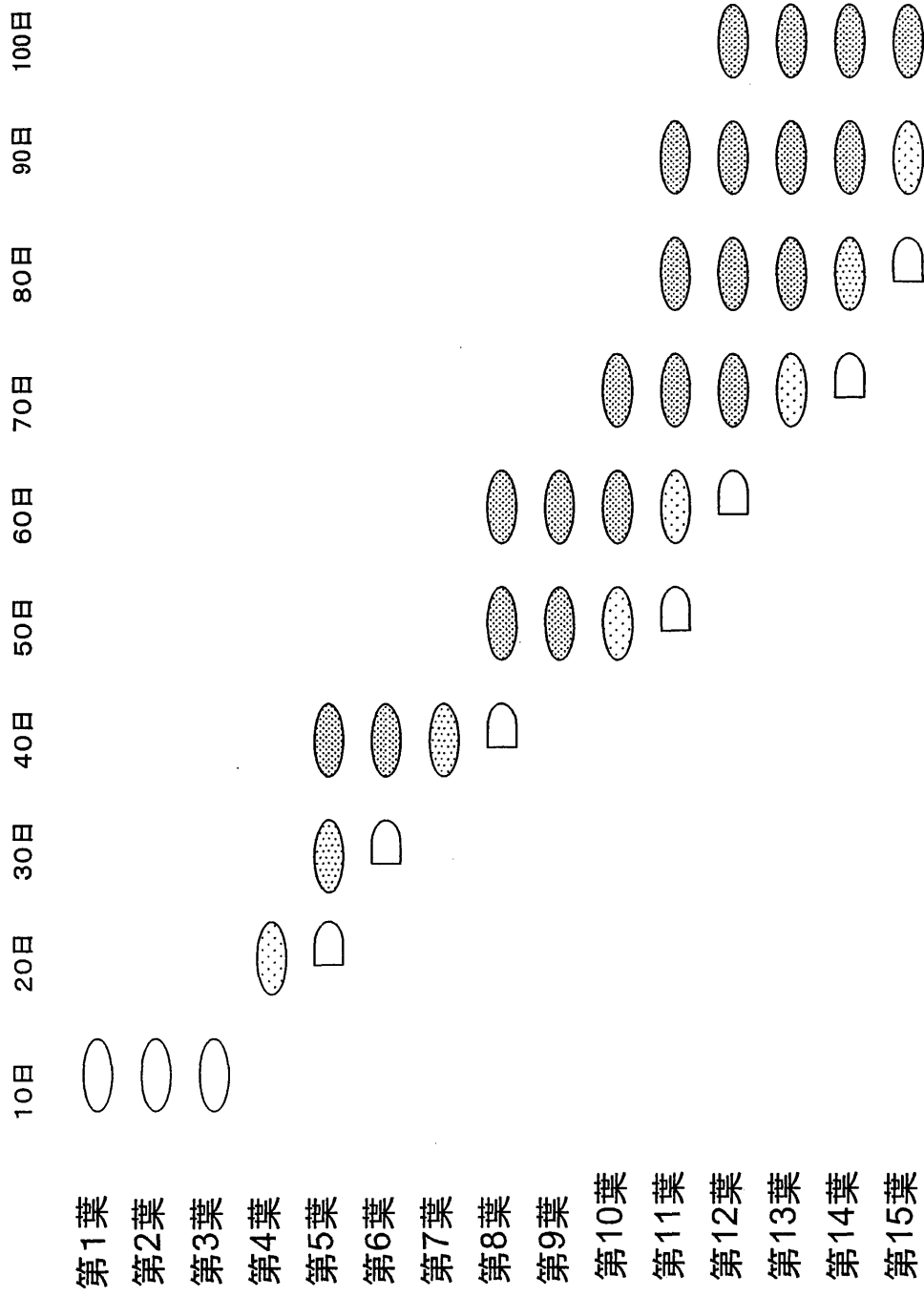


図2-17. Sp175 における疑似病斑の出現時期および出現程度.

疑似病斑の出現程度は 無, 少, 中, 多で判定.

無: ○ 少: ● 中: ◐ 多: ◑

変異体

展 開 後 日 数

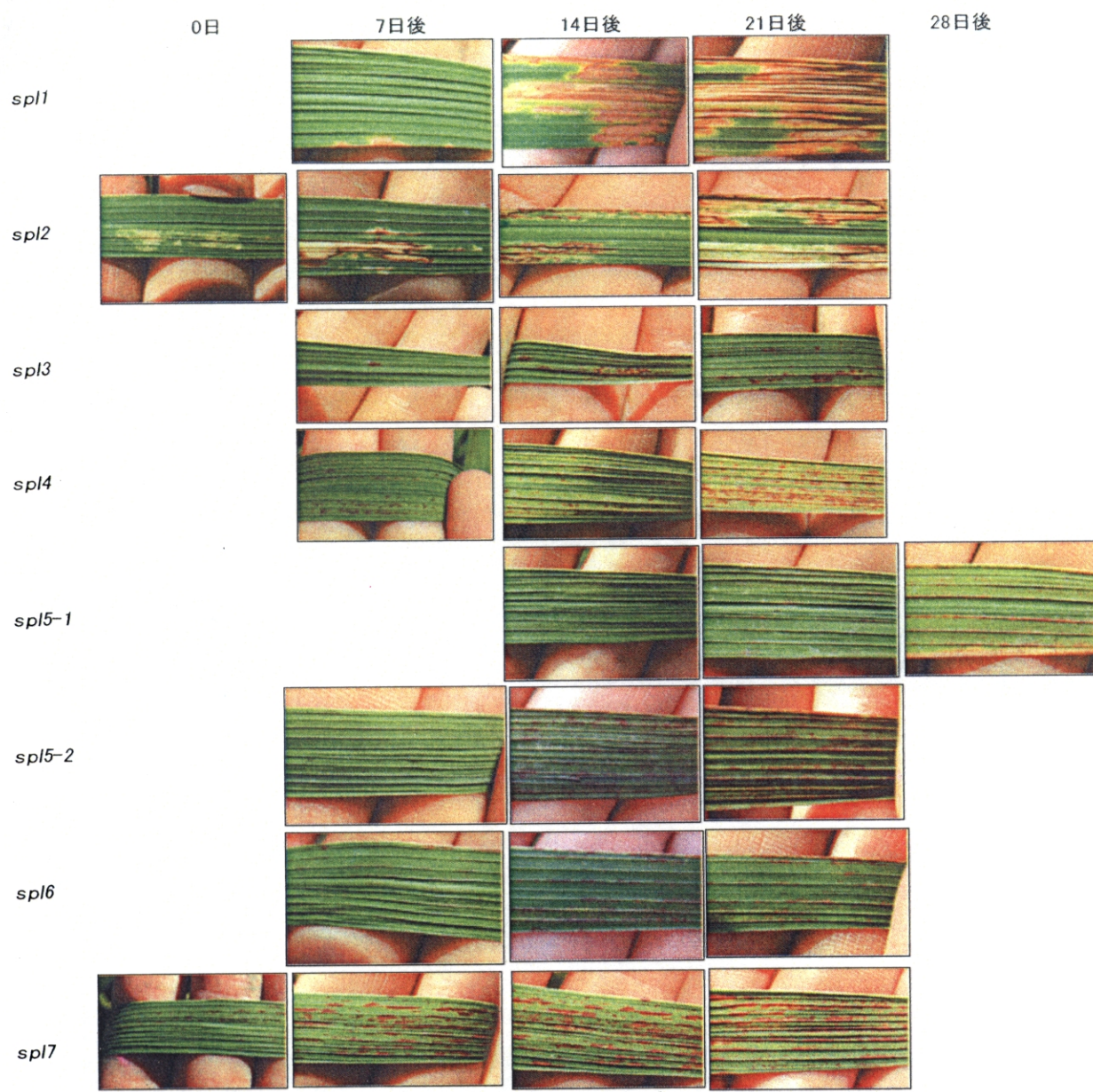


図2-18. 止葉における擬似病斑の発生
バーは1cm.

変異体

展開後日数

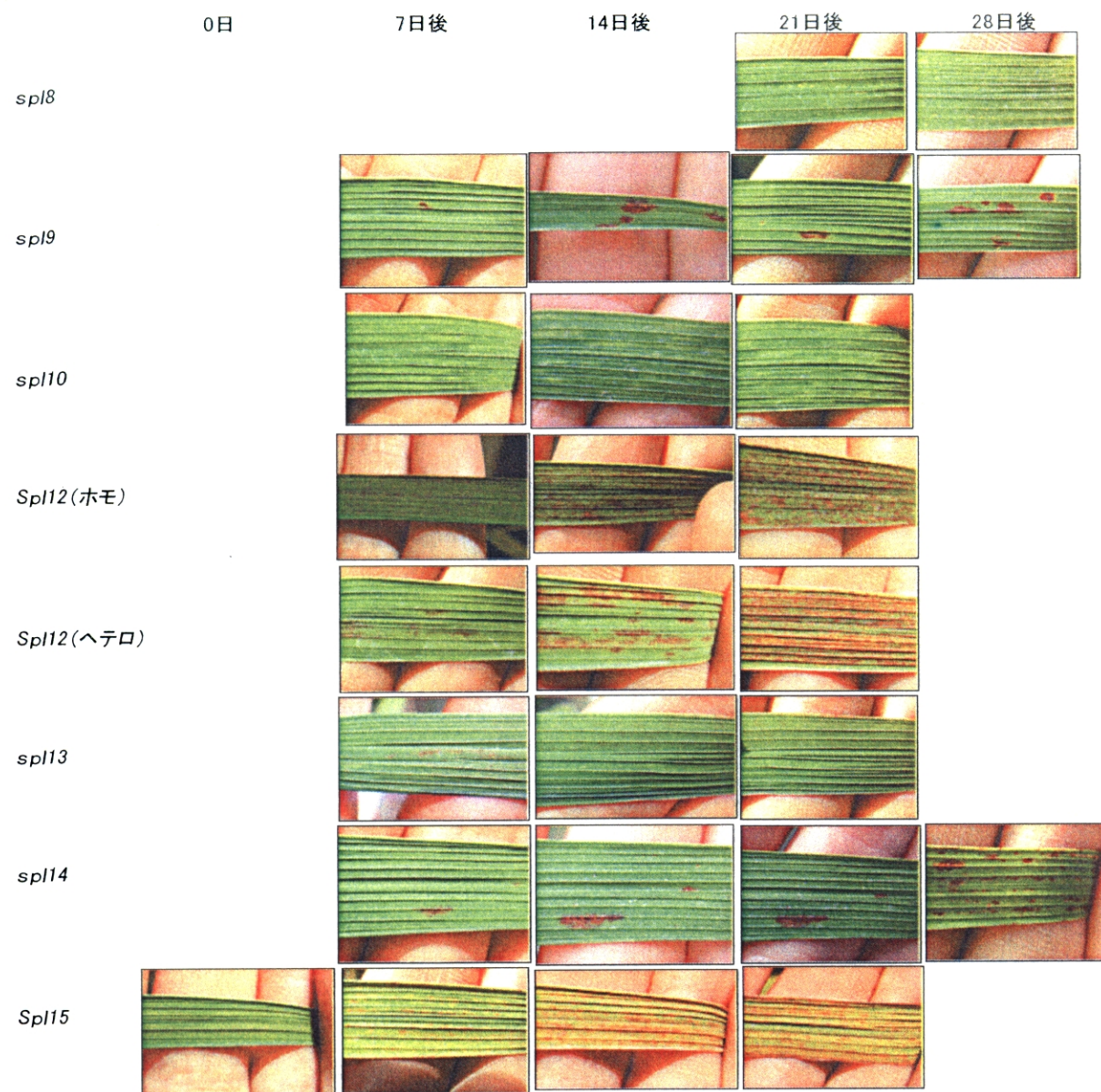


図2-18. 止葉における擬似病斑の発生(続き)
バーは1cm.

表 2-6. 擬似病斑葉突然変異体における擬似病斑の特徴

| 変異体 | 優劣性 | 草丈 | 擬似病斑の特徴 | | | |
|---------------|-----|--------|------------------------|-------------------|------|-----|
| | | | 発現開始葉位 ¹⁾ | 大きさ ²⁾ | 色 | タイプ |
| <i>spl1</i> | 劣性 | — | 3 | 大 | 薄茶色 | 進行型 |
| <i>spl2</i> | 劣性 | — | 2 | 大 | 灰色 | 進行型 |
| <i>spl3</i> | 劣性 | 半矮性 | 4 | 中 | 赤茶色 | 開始型 |
| <i>spl4</i> | 劣性 | 半矮性 | 4 | 小 | 赤茶色 | 開始型 |
| <i>spl5-1</i> | 劣性 | 半矮性 | 4 | 小 | 赤茶色 | 開始型 |
| <i>spl6</i> | 劣性 | Normal | 6 | 小 | 赤茶色 | 開始型 |
| <i>spl7</i> | 劣性 | 半矮性 | 4 | 小 | 赤茶色 | 開始型 |
| <i>spl8</i> | 劣性 | Normal | 10 | 小 | 黄色 | 開始型 |
| <i>spl9</i> | 劣性 | Normal | 10 | 中 | 暗褐色 | 開始型 |
| <i>spl10</i> | 劣性 | 半矮性 | 9 | 小 | 黄色 | 開始型 |
| <i>spl5-2</i> | 劣性 | 半矮性 | 6 | 小 | 赤茶色 | 開始型 |
| <i>Spl12</i> | 優性 | 矮性 | 2 | 小 | 赤茶色 | 開始型 |
| <i>spl13</i> | 劣性 | 矮性 | 10 | 小 | 黄～茶色 | 開始型 |
| <i>spl14</i> | 劣性 | 半矮性 | 7(2,3,4) ³⁾ | 中 | 暗褐色 | 開始型 |
| <i>Spl15</i> | 優性 | 矮性 | 4 | 中 | 薄茶色 | 開始型 |

¹⁾ 擬似病斑が最初に確認できた葉位を示す.

²⁾ 小, 直径 3mm 以下; 中, 3mm～10mm; 大, 10mm 以上.

³⁾ 第 2,3,4 葉および第 7 葉以後に擬似病斑が現れた.

はクロロフィルの減少による葉色の変化として観察される。シロイヌナズナの擬似病斑葉変異体である *acd1* では野生型とは異なり、老化現象の一つであるクロロシスが見られる前に擬似病斑が拡がり、野生型より葉の寿命が短かった (Greenberg and Ausubel 1993)。また、*acd1* では播種後 5 週目に擬似病斑が現れ、その後古い葉から順に擬似病斑が生じるが、抽出途中の若い葉には擬似病斑は現れなかった (Greenberg and Ausubel 1993)。従って、*acd1* の遺伝子発現は生育ステージにより制御されていると考えられる。*spl8*, *spl10* および *spl13* も生育の早い時期には擬似病斑が現れないこと、およびいずれも葉色がぬけたような感じになることから、生育ステージにより発現が制御されている遺伝子に変異が生じている可能性が考えられる。

擬似病斑の大きさは直径が 3mm 以下の系統が多かった (表 2-6)。これらの系統では擬似病斑の輪郭がはっきりとしており、擬似病斑の数が増えても擬似病斑同士はつながらないように見えた。一方、*spl1* および *spl2* は擬似病斑同士がつながり拡大した。一般的に、擬似病斑葉変異体は、その病斑の形態から開始型 (initiation class) と進行型 (propagation class) に分けられている (Dangle *et al.* 1996, 川崎と島本 1997)。開始型の変異体では、各々の擬似病斑の拡大がある境界を持って止まることから、病原菌侵入の初期認識に関係している抵抗性遺伝子の変異である可能性、または誤ったプログラム細胞死を止める因子の遺伝子に変異が生じている可能性が考えられている (川崎と島本 1997)。一方、進行型の変異体では、一度擬似病斑形成が始まると拡大を止めることができないので、非親和性の抵抗性反応が起こった過敏感細胞死が、必要以上に周りの細胞に広がらないように抑制する因子に変異が生じているのではないかと考えられている (川崎と島本 1997)。しかしながら、擬似病斑の形成が開始されるメカニズムについては、開始型と進行型のいずれにおいても明らかにされていない。開始型の *spl7* は高温や UV 光により擬似病斑の形成が誘導されることが明らかにされている (Yamanouchi *et al.* 2002)。開始型の擬似病斑葉変異体として、シロイヌナズナでは *Lsd2*, *lsd3*, *Lsd4*, *lsd5*, *Lsd6*, *Lsd7* (Dietrich *et al.* 1994, 1997, Weymann *et al.* 1995), トウモロコシでは *Les1*, *lls1*, *rp1-NC3* (Johal *et al.* 1995, Hu *et al.* 1996, Gray *et al.* 1997), オオムギでは *mlo* (Wolter *et al.* 1993), イネでは *spl11*, M1009, *cdr1*, *cdr2*, *Cdr3* (Takahashi *et al.* 1999, Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000) が見つかっており、進行型としては、シロイヌナズナでは *acd1*, *lsd1* (Greenberg and Ausubel 1993, Dietrich *et al.* 1994, 1997), トウモロコシでは *RPI-D21* (Hu *et al.* 1996) が見つかる。

っている（川崎と島本 1997）. 今回の観察結果から, *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl6*, *spl7*, *spl8*, *spl9*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* は開始型, *spl1* および *spl2* は進行型であると考えられる（表 2-6）. 現在までに開始型の変異体である *Lls1* 遺伝子, *Mlo* 遺伝子および *spl7* 遺伝子（Büschges *et al.* 1997, Gray *et al.* 1997, Yamanouchi *et al.* 2002）, 進行型の変異体である *Lsd1* 遺伝子がクローニングされたが（Dietrich *et al.* 1997）, 各遺伝子の推定される機能に共通性は見られない. また, シロイヌナズナの *acd2* は植物体が若いときは擬似病斑が小さいが, 葉齢が進むと擬似病斑が大きくなり, 開始型と進行型のいずれかに分けることは難しい（Greenberg *et al.* 1994）. 従って, 擬似病斑葉変異体の擬似病斑の大きさや拡大する様子とその変異遺伝子の機能との間に関連があるかどうかは, 複数の *Spl* 遺伝子についてクローニングを行い, 各々の遺伝子産物を推定していく必要があると考えられる.

植物体が若い時期から擬似病斑が現れるのは *spl1*, *spl2*, *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl7*, *Spl12* および *Spl15* であり, *spl2* および *Spl12* は第 2 葉, *spl1* は第 3 葉, *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl7* および *Spl15* は第 4 葉から擬似病斑が現れた（表 2-6）. *spl5-2* および *spl6* は第 6 葉から擬似病斑が現れ, *spl8*, *spl9*, *spl10* および *spl13* は第 9 葉または第 10 葉から擬似病斑が初めて見られた（表 2-6）. 本実験で示した結果は 2002 年に行った結果であるが, 他の年に栽培した場合も *spl1*, *spl2*, *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl7*, *Spl12* および *Spl15* では下位葉から擬似病斑が現れ, *spl8*, *spl9*, *spl10* および *spl13* においては擬似病斑の現れる時期が遅かった（データ省略）. 従って, 擬似病斑葉変異体において, 擬似病斑が生育ステージのいつ現れるかは遺伝的に制御されていると考えられる. *spl14* は第 2 葉, 第 3 葉および第 4 葉には擬似病斑が出現したが, 第 5 葉および第 6 葉には見られず, 第 7 葉以上の上位葉では再び擬似病斑が現れたが, 他の年に栽培した場合も同様の傾向を示した（データ省略）. この現象は遺伝的に制御されているものなのか, 環境によるものかは今後明らかにする必要がある.

3) 擬似病斑の発生する器官

全ての変異体は葉身における擬似病斑の発生により同定されたものであるが, 葉身以外の器官においても擬似病斑が発生するかどうかを, 播種後 110 日目の止葉の葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗について調査した（表 2-7）.

spl1 では葉鞘および枝梗の一部が薄茶色に変化し, 擬似病斑が見られた（表 2-7）. *spl2* では外穎および内穎に擬似病斑が見られた（表 2-7）. *spl3* では葉鞘, 外

穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られ, 特に枝梗は擬似病斑によると思われる濃い褐色を呈した(表 2-7). *spl4* では葉鞘が褐色を呈したが, 擬似病斑によるのかどうかはわからなかった(表 2-7). *spl5-1* および *spl5-2* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られた(表 2-7). *spl6* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られなかった. *spl7* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られ, 特に葉鞘, 枝梗で擬似病斑が多数見られた(表 2-7). *spl8* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られなかった. *spl9* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られた(表 2-7). *spl10* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られなかった. *Spl12* (ホモ)では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られ, 特に葉鞘, 外穎, 内穎の色の変化が大きかった(表 2-7). *Spl12* (ヘテロ)では葉鞘, 外穎, 内穎に擬似病斑が見られたが, 色の変化は *Spl12* (ホモ)より小さかった(表 2-7). *spl13* では葉鞘に擬似病斑が見られ, 外穎と内穎がやや黄色を呈したが擬似病斑によるのかどうかはわからなかった(表 2-7). *spl14* では, 葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られたが, 特に葉鞘に擬似病斑が多数見られた(表 2-7). *Spl15* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られ, 特に葉鞘, 枝梗は擬似病斑によると思われる褐色を呈した(表 2-7).

葉身以外の器官でも擬似病斑が現れていた変異体は *spl1*, *spl2*, *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl9*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* であった(表 2-7). また, *spl3*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl9*, *Spl12*, *spl14* および *Spl15* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られたことから, これらの *Spl* 遺伝子の発現には組織特異性がない可能性が示唆された. また, これらの変異体のうち, *spl3*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *Spl12* および *Spl15* では葉身において生育初期から擬似病斑が現れることから(表 2-6), これらの *Spl* 遺伝子は恒常的に発現している可能性が示唆された. シロイヌナズナにおいて, 葉身以外の器官でも擬似病斑が現れる変異体は *acd1* および *lsd1* である(Greenberg and Ausubel 1993, Dietrich *et al.* 1994). 茎や花でも擬似病斑を示す *lsd1* の原因遺伝子はクローニングされ, その遺伝子産物は 3 つの zinc finger domain を持ち転写を制御している可能性が示唆されている(Dietrich *et al.* 1997). 最近, *spl7* は高温や UV 光により擬似病斑の形成が誘導されること, およびその遺伝子産物は熱ストレスに関する転写因子(HSF)と高い相同性があることが明らかにされている(Yamanouchi *et al.* 2002).

spl6, *spl8* および *spl10* では葉鞘, 外穎, 内穎, 枝梗のいずれにおいても擬似病斑

表 2-7. 葉鞘, 穎, 枝梗における擬似病斑の発現程度

| 変異体 | 止葉葉鞘 | 外穎 | 内穎 | 枝梗 |
|--------------------------------|------|-----|-----|----|
| <i>spl1</i> | + | — | — | + |
| <i>spl2</i> | — | + | + | — |
| <i>spl3</i> | + | + | + | ++ |
| <i>spl4</i> | (+) | — | — | — |
| <i>spl5-1</i> | + | + | + | + |
| <i>spl7</i> | ++ | + | + | ++ |
| <i>spl9</i> | + | + | + | + |
| 農林 8 号 | — | — | — | — |
| <i>spl6</i> | — | — | — | — |
| <i>spl8</i> | — | — | — | — |
| <i>spl10</i> | — | — | — | — |
| 金南風 | — | — | — | — |
| <i>Spl12(SS)</i> ¹⁾ | ++ | ++ | ++ | + |
| <i>Spl12(S+)</i> ²⁾ | + | + | + | — |
| <i>spl13</i> | + | (+) | (+) | — |
| ヒノヒカリ | — | — | — | — |
| <i>spl5-2</i> | + | + | + | + |
| <i>spl14</i> | ++ | + | + | + |
| 台中 65 号 | | — | — | — |
| <i>Spl15</i> | ++ | + | + | ++ |
| コシヒカリ | | — | — | — |

¹⁾ホモ個体.

²⁾ヘテロ個体.

擬似病斑については達観で、— (無)、+ (少)、++ (中) と判定. (+) は不明.

が現れていなかった(表 2-7)。従って、これらの *Spl* 遺伝子の発現は葉身に特異的であると推定された。トウモロコシの擬似病斑葉変異体の *lls1* では葉以外の他の器官での発現はほとんど見られなかった(Gray *et al.* 1997)。*Lls1* 遺伝子はクローニングされ、その遺伝子産物はフェノール性化合物の分解に関係するジオキシゲナーゼとして働いている可能性が示唆された(Gray *et al.* 1997)。まだ、*Lls1* 遺伝子の発現パターンなどは明らかにされていないが、*spl6*, *spl8* および *spl10* の原因遺伝子は葉身でのみ機能する可能性も考えられた。

4) 擬似病斑葉突然変異体の農業形質

農業形質として、稈長、穂長、一株穂数および一株籾重を調査し、各々の擬似病斑葉変異体の原品種と比較した。

稈長は、*spl6* は原品種と同程度で、*spl8* および *spl9* では長くなっていたが、それ以外の変異体(*spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15*)では短くなっていた(表 2-8)。特に、*Spl12*, *spl13* および *Spl15* の稈長は極めて短くなっていた(表 2-8)。

穂長は、*spl14* は原品種と同程度で、*spl6*, *spl8* および *spl10* では長くなっていたが、それ以外の変異体(*spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl9*, *Spl12*, *spl13* および *Spl15*)では短くなっていた(表 2-8)。特に、*spl13* および *Spl15* の穂長は極めて短くなっていた(表 2-8)。

一株穂数は、*spl8* および *spl10* では原品種と同程度で、*spl6* ではやや多くなっていたが、それ以外の変異体(*spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl9*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15*)では少なくなっていた(表 2-8)。特に、*Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* の一株穂数は極めて少なくなっていた(表 2-8)。

一株籾重は、*spl10* では原品種と同程度で、*spl6* および *spl8* ではやや重くなっていたが、それ以外の変異体(*spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl9*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15*)では軽くなっていた(表 2-8)。

Spl12(ヘテロ)は、一株穂数が原品種とほぼ同じである以外は、稈長、穂長および一株籾重のいずれも極めて低かったが、*Spl12*(ホモ)と原品種の中間的な値を示した(表 2-8)。

spl11 は原品種が不明であるが、稈長、穂長、一株穂数および一株籾重が金南風とほぼ同程度であった。*spl12* は原品種が不明であるが、農林 8 号などと比較し、稈長がやや短く、一株穂数および一株籾重が少なかった。

優性の変異体である *Spl12* および *Spl15* は、稈長、穂長、一株穂数および一株籾重のいずれも極めて低く、劣性の変異体は稈長、一株穂数および一株籾重が原品種より少ない系統が多かったが、*spl6* および *spl8* のように一株籾重が原品種より多い系統も存在した(表 2-8). *spl6* および *spl8* では葉身における擬似病斑の発現が生育の遅い時期に現れることや葉鞘、外穎、内穎、枝梗のいずれにおいても擬似病斑が現れていなかった(表 2-7)ことが、収量の減少程度を抑えていると考えられた。

細胞核における突然変異は、ゲノム突然変異、染色体突然変異、遺伝子突然変異に分けることができる(松尾 1990). アルキル化物質である MNU 処理によってアルキル化された DNA 塩基の挙動については複雑でよくわかっていない部分も多いが、塩基転位、塩基置換などが生じていると考えられている(松尾 1990). また、オオムギでの化学物質による突然変異における染色体異常の頻度は、放射線の場合より低く、アルキル化物質による変異は点突然変異か微小な染色体欠失によると考えられている(松尾 1990).

本実験で調査した擬似病斑葉変異体は自然突然変異、 γ 線処理、MNU 処理のいずれかによって生じた変異体であるが、変異原の違いが農業形質に及ぼす影響はわからなかった。

他の擬似病斑葉変異体でも植物体の矮化はよく見られる現象であるが、収量まで調査した報告は少ない. シロイヌナズナの *acd1* は野生型に比べ、成葉が枯れるまでの時間が短く、植物体が小さく、種子1粒重が小さく、種子生産量が低かった(Greenberg and Ausubel 1993). 従って、擬似病斑葉変異体の育種的な利用方法としては、まず戻し交配を行って劣悪形質を除くことができるかどうかを確認することである. 劣悪形質が多面発現による場合は、遺伝子をクローニングして改変遺伝子を利用する必要があると考えられる。

表 2-8. 擬似病斑葉突然変異体の農業形質 (2002 年)

| 変異体 | 原品種 | 稈長(cm) | 穂長(cm) | 一株穂数(本) | 一株初重(g) |
|--------------------------------|---------|--------------------------|------------|------------|------------|
| <i>spl1</i> | 不明 | 80.0±2.8 | 19.3±1.6 | 17.0±3.0 | 23.8±6.2 |
| <i>spl2</i> | 不明 | 67.6±2.5 | 19.0±1.3 | 8.8±1.3 | 12.8±2.8 |
| <i>spl3</i> | 農林 8 号 | 66.8±2.2** ³⁾ | 20.3±1.1** | 14.2±2.0** | 17.7±2.2** |
| <i>spl4</i> | 農林 8 号 | 64.4±2.2** | 19.8±1.2** | 11.2±2.0** | 16.8±3.8** |
| <i>spl5-1</i> | 農林 8 号 | 71.2±3.4** | 16.6±1.0** | 14.6±1.8** | 18.2±3.1** |
| <i>spl7</i> | 農林 8 号 | 62.2±2.3** | 20.7±1.1** | 12.8±1.3** | 12.2±1.2** |
| <i>spl9</i> | 農林 8 号 | 92.4±4.3** | 16.3±4.5** | 16.4±0.9* | 27.5±1.7** |
| 農林 8 号 | | 81.4±2.6 | 23.5±1.5 | 18.9±3.3 | 57.1±9.8 |
| <i>spl6</i> | 金南風 | 71.8±3.0 | 19.0±1.1** | 17.6±2.1* | 32.8±3.5** |
| <i>spl8</i> | 金南風 | 86.0±4.2** | 19.1±1.4** | 17.2±3.3 | 31.4±7.3* |
| <i>spl10</i> | 金南風 | 65.2±2.6** | 19.2±0.8** | 14.0±4.2 | 25.1±8.4 |
| 金南風 | | 74.1±1.9 | 17.1±1.0 | 15.2±2.4 | 23.7±5.3 |
| <i>Spl12(SS)</i> ¹⁾ | ヒノヒカリ | 40.8±2.1** | 17.1±1.8** | 6.7±2.1** | 6.0±2.5** |
| <i>Spl12(S+)</i> ²⁾ | ヒノヒカリ | 59.8±3.8** | 17.4±1.4** | 15.2±2.7 | 17.5±2.9** |
| <i>spl13</i> | ヒノヒカリ | 46.3±1.7** | 13.9±0.9** | 7.6±1.9** | 7.2±1.6** |
| ヒノヒカリ | | 79.2±3.9 | 19.4±1.6 | 15.2±2.4 | 30.4±3.5 |
| <i>spl5-2</i> | 台中 65 号 | 76.4±2.1** | 18.4±0.9** | 12.3±3.2* | 18.4±4.0** |
| <i>spl14</i> | 台中 65 号 | 82.8±1.8** | 22.1±0.9 | 9.9±1.3** | 17.7±3.0** |
| 台中 65 号 | | 91.3±2.2 | 22.1±1.1 | 15.4±3.7 | 50.2±11.8 |
| <i>Spl15</i> | コシヒカリ | 48.2±2.8** | 16.9±1.6** | 5.7±2.1** | 4.7±1.8** |
| コシヒカリ | | 86.9±2.9 | 21.4±2.0 | 16.8±1.6 | 38.4±5.6 |

¹⁾ホモ個体.

²⁾ヘテロ個体.

³⁾原品種に対して, **は 1 % 有意, *は 5 % 有意.

Ⅲ 擬似病斑葉突然変異体の病害抵抗性

1 緒言

植物における病害抵抗性反応として、過敏感反応, oxidative burst, ファイトアレキシンの生合成, 防御遺伝子の発現などが観察されている (Shimamoto and Kyozyuka 2002). なかでも過敏感反応 (Hypersensitive response, HR) は病原菌の侵入に対して細胞死 (programmed cell death) を起こすことによって周りの細胞への病原菌の感染の拡がりを防ぐ植物固有の防御応答としてよく知られている現象である. 動物細胞においてもアポトーシスと言われる細胞死 (programmed cell death) の現象が見られるが, 最近の研究で植物細胞においてもアポトーシスの調節因子の一つとして知られている Bax が機能することが明らかになった (Kawai *et al.* 2001).

Rac GTPase は動物細胞のシグナル伝達系で働くことが知られているが, 多くの植物細胞においても病害抵抗性反応に関係していることが明らかになってきた (Shimamoto and Kyozyuka 2002). ヒトの Rac GTPase のイネのホモログである *OsRac1* を恒常的に活性型にした形質転換体は擬似病斑葉を示し, 活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を産生し, 細胞死を起こしてもち病と白葉枯病に対して抵抗性を示すことが明らかになった (Kawasaki *et al.* 1999, Ono *et al.* 2001). 逆に, dominant negative な *OsRac1* を擬似病斑葉変異体 (*sl*) に導入して *OsRac1* を不活性型にした場合, 擬似病斑の発現が妨げられることが明らかになった (Ono *et al.* 2001). 従って, 病害抵抗性反応に変異が生じることにより, 擬似病斑が生じる場合があると考えられる. 実際に, イネにおいて単離されている擬似病斑葉変異体のうち, 最近いくつかの擬似病斑葉変異体が病原菌に対して抵抗性を示すことが明らかになった (Sekiguchi and Furuta 1965, Kiyosawa 1970, Marchetti *et al.* 1983, Takahashi *et al.* 1999, Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000) (表 2-1). *spl11* はいもち病および白葉枯病に対してレース非特異的な抵抗性を示し (Yin *et al.* 2000), *cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* はいもち病に対して抵抗性を示した (Takahashi *et al.* 1999). M1009 はいもち病菌およびごま葉枯病 (*Cochliobolus miyabeanus*) に抵抗性を示した (Arase *et al.* 2000). しかしながら, 病害抵抗性が誘導される時期, 擬似病斑の発現程度と病害抵抗性程度の関連などについては明らかにされていない.

そこで本章では, 新たに見出した擬似病斑葉変異体と既知の擬似病斑葉変異体について, 糸状菌病であるいもち病および細菌病である白葉枯病に対する抵抗性検定を詳細に行った. まず, 擬似病斑葉変異体のいもち病および白葉枯病の複数のレー

スに対する抵抗性検定を行うことにより抵抗性が誘導されているかどうか、抵抗性にレース特異性があるかどうかを調査した。次に、優性の変異体である *Spl12* のホモ個体とヘテロ個体の擬似病斑の発現程度と病害抵抗性を調査することによって、擬似病斑葉突然変異遺伝子の遺伝子量の効果を検討した。次に、病害抵抗性を示した擬似病斑葉変異体について、いもち病抵抗性が植物体のどの生育ステージから誘導されているか検討するため、いもち病菌を葉鞘向軸面に接種した。また、病害抵抗性を示した擬似病斑葉変異体を用いて、白葉枯病菌を最上位展開葉およびその連続する下位葉に接種することにより、同一植物体内で葉の位置によって抵抗性程度の差異があるかどうかを調査した。また、播種後に白葉枯病菌の接種時期を変えることにより、擬似病斑の発現程度と病害抵抗性程度の関連について調査した。最後に、二重変異体における擬似病斑の発現程度と病害抵抗性程度を調査した。

2 材料および方法

[いもち病菌の接種]

擬似病斑葉変異体 (*spl1*~*Spl15*) は原品種が異なるため、いもち病抵抗性検定においては、各々の原品種(ヒノヒカリ, 台中 65 号, コシヒカリ, 農林 8 号および金南風)と比較した(表 2-5)。また、幼苗におけるいもち病菌の噴霧接種により、いずれの擬似病斑葉変異体も *Pii* と *Pia* 以外のいもち病真性抵抗性遺伝子を持たないことを確認した(表 2-5)。

擬似病斑葉変異体の原品種のうち、台中 65 号, コシヒカリおよび農林 8 号は日本における主要なイネいもち病菌に対する真性抵抗性遺伝子を持たないが、金南風は *Pia*, ヒノヒカリは *Pii* と *Pia* といういもち病真性抵抗性遺伝子を有する。従って、*Pii* と *Pia* を侵すことが可能なレース 007 (Ina86-137), 017 (Kyu92-22), 037 (TH90-6), 047 (Kyu9439013) および 437 (IW81-04) を用いた。全てのいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) は岩野正敬博士から分譲していただいた。いもち病に対する抵抗性検定として、パンチ接種法および葉鞘向軸面接種法を用いた。葉鞘向軸面接種法はいもち病菌の植物細胞への付着器の形成や菌糸の伸展を直接観察することができる(山崎と高坂 1980)。いもち病菌の培養法はⅡ章と同様である。パンチ接種法では、播種後 100 日目の最上位展開葉にパンチ(藤原製作所, 東京, 日本)を用いて、直径 2mm の円形の傷をつけ、その傷に胞子を付着させた寒天を密着させ、24 °C の接種箱(湿度約 100%)に 1 日置いた後、温室(28±3°C)に移した(Iwata *et al.* 1980)。接種後 12 日目に、病斑の大きさを調査した。各々の系統につき 10 枚以上の葉について接種を行

った。葉鞘向軸面接種法 (Koga 1994) においては、孢子濃度を 5×10^5 (孢子数/ml) に調整し、植物体から葉鞘を切り取り、葉鞘の内側に孢子けんだく液を注入して、24 °Cの接種箱(湿度約 100%)に置き、42 時間後に葉鞘向軸面の細胞におけるいもち病菌の伸展程度を光学顕微鏡で観察した。植物体は温室で(28±3°C)養成し、冬期に栽培した場合には、短日による出穂を防ぐ目的で適宜補光を行った。

[白葉枯病菌の接種]

擬似病斑葉変異体 (*spl1*~*Spl15*) は原品種が異なるため、白葉枯病抵抗性検定においては、各々の原品種(ヒノヒカリ, 台中 65 号, コシヒカリ, 農林 8 号および金南風)と比較した(表 2-5)。また、いずれの擬似病斑葉変異体も I 群菌に対して病斑が現れて罹病性であることから、白葉枯病抵抗性遺伝子群は金南風群に属することを確認した(表 2-5)。白葉枯病菌に対する抵抗性検定として、剪葉接種法および2針接種法を用いた(Ogawa and Sekizawa 1980)。白葉枯病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) は、ジャガイモ培地(33g/L つぶしたジャガイモ, 5g/L ペプトン, 15g/L ショ糖, 0.5g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 15g/L 寒天)で培養した。擬似病斑葉変異体の原品種はいずれも白葉枯病抵抗性遺伝子群が金南風群に属し、日本の主要な白葉枯病菌に対する抵抗性遺伝子を持たないと推定されたので、金南風群の品種を侵すことができる日本のレースである I 群菌(T7174), II 群菌(T7147)およびIII群菌(T7133)を実験に用いた。基本的には、菌濃度を 2×10^9 cfu/mL ($\text{OD}_{560}=0.1$) に調整し、接種後 20 日目に病斑を調査した。若い植物体に接種した場合には、菌濃度を 5×10^8 cfu/mL に調整し、接種後 10 日目または 14 日目に病斑を調査した。剪葉接種法と2針接種法による病斑の伸展程度の違いはほとんどなかった。各々の系統につき 10 枚以上の葉について接種を行った。

[擬似病斑面積比率の測定]

擬似病斑面積比率は、播種後 2, 4, 6, 8, 10 週の最上位展開葉(1 系統あたり各 10 枚)の葉身中央部約 1cmの画像をデジタルマイクロスコープ (Keyence 社製) で取り込み、画像解析ソフト (Photoshop および NIH Image) を用いて、葉面積に占める擬似病斑の割合(擬似病斑面積比率)を計算した。NIH Image は The National Institutes of Health からオンラインで利用可能なソフトである。