

3 結果および考察

1) 擬似病斑葉突然変異体のいもち病抵抗性

いもち病菌の接種後 12 日目に擬似病斑葉変異体の病斑の伸展程度を各々の原品種と比較した。レース 007 (Ina86-137) を接種した結果、原品種であるヒノヒカリ、台中 65 号、コシヒカリ、農林 8 号および金南風はいずれも病斑が拡大し罹病性を示した(図 3-1)。擬似病斑葉変異体のうち、*spl2* は接種した葉の擬似病斑の大きさが拡大したが、それ以外の擬似病斑葉変異体では、擬似病斑の色や大きさはほとんど変化しなかった(図 3-1)。原品種の農林 8 号に比較して、*spl3* および *spl9* はいもち病菌の接種により生じた病斑が拡大し、罹病性を示した(図 3-1)。*spl6* および *spl8* はいずれも原品種の金南風と病斑の伸展程度が同程度であり罹病性を示した(図 3-1)。*spl4*、*spl5-1*、*spl5-2*、*spl7*、*spl10*、*Spl12*、*spl13*、*spl14* および *Spl15* はいずれも、傷をつけて接種した直径 2mm の円の周辺が褐色に変化していたが、それ以上に病斑がほとんど進展せず、抵抗性を示すことが明らかになった(図 3-1, 表 3-1)。

また、レース 017 (Kyu92-22) を接種した場合、レース 007 を接種した時と同様に、ヒノヒカリ、台中 65 号、コシヒカリ、農林 8 号および金南風はいずれも病斑が拡大し罹病性を示した(図 3-2)。擬似病斑葉変異体のうち、*spl2* はレース 007 を接種した場合と同じく、接種した葉の擬似病斑の大きさが拡大したが、それ以外の擬似病斑葉変異体では擬似病斑の色や大きさはほとんど変化しなかった(図 3-2)。原品種の農林 8 号に比較して、*spl3* および *spl9* はいもち病菌の接種により生じた病斑が拡大し、罹病性を示した(図 3-2)。*spl6* および *spl8* はいずれも原品種の金南風と病斑の伸展程度が同程度であり罹病性を示した(図 3-2)。*spl4*、*spl5-1*、*spl5-2*、*spl7*、*spl10*、*Spl12*、*spl13*、*spl14* および *Spl15* はレース 007 を接種した場合と同じように、病斑がほとんど進展せず、原品種より強い抵抗性を示すことが明らかになった(図 3-2, 表 3-1)。*spl1* および *spl2* は原品種が不明であるため、レース 007 および 017 に対する抵抗性について判断することができなかったが、病斑はいずれも他の罹病性を示す変異体とほぼ同程度まで拡大した(図 3-1, 図 3-2, 表 3-1)。

レース 007 と 017 に対する反応は、ヒノヒカリでレース 017 を接種した場合に病斑の進展がやや少なかったが、それ以外の罹病性品種および変異体における病斑の進展程度はレースによる違いがなかった。また、抵抗性を示した変異体 *spl4*、*spl5-1*、*spl5-2*、*spl7*、*spl10*、*Spl12*、*spl13*、*spl14* および *Spl15* は、いずれのレースに対しても病斑の進展が見られず同程度の抵抗性を示したことから、これらの擬似病斑葉変異体の抵抗性

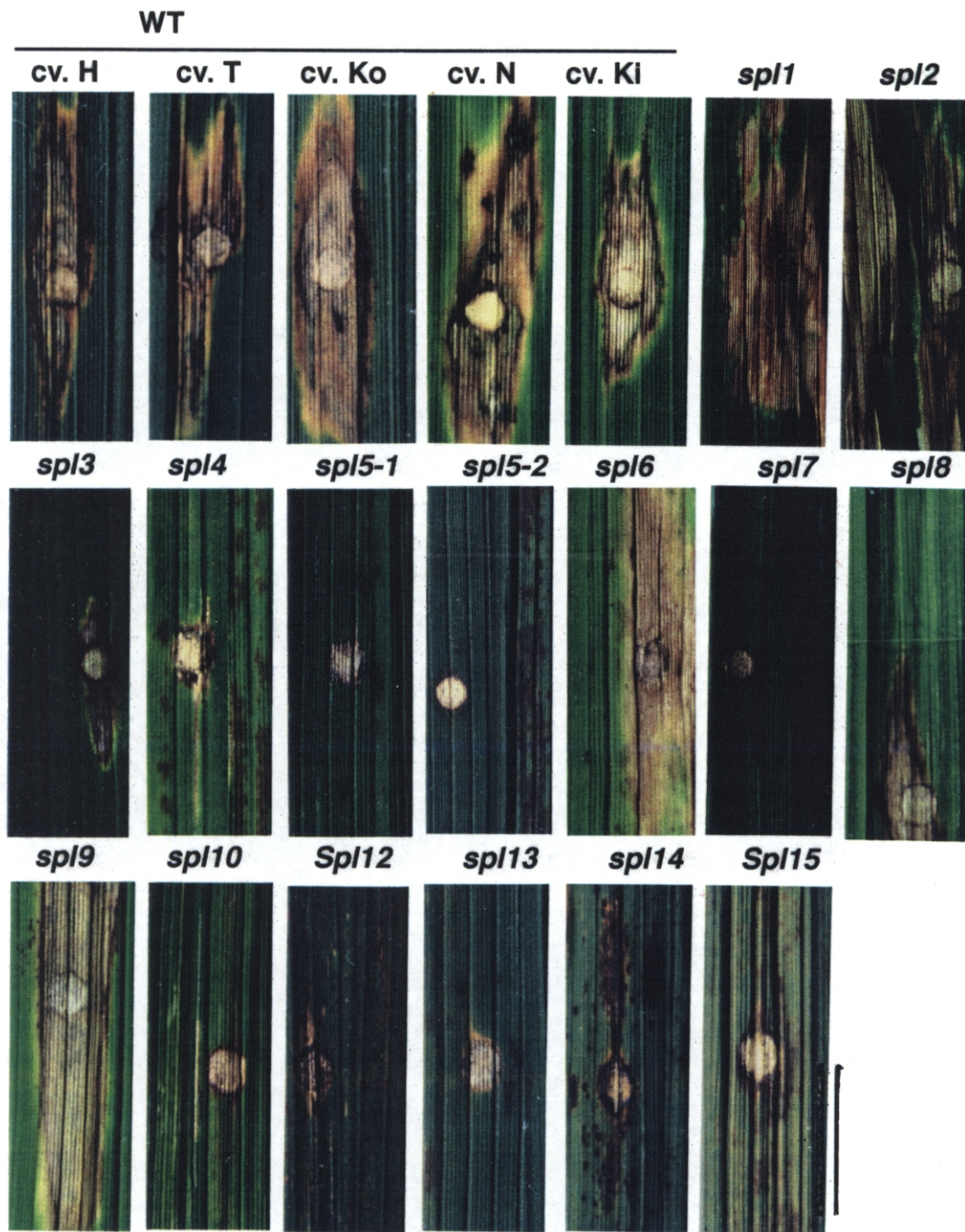


図3-1. いもち病菌(レース007)パンチ接種後12日目の病斑。
 各変異体の原品種(WT): *Spl12* および *spl13* はヒノヒカリ(H), *spl5-2* および *spl14* は台中65号(T), *Spl15* はコシヒカリ(Ko), *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl7* および *spl9* は農林8号(N), *spl6*, *spl8* および *spl10* は金南風(Ki). バーは1cm.

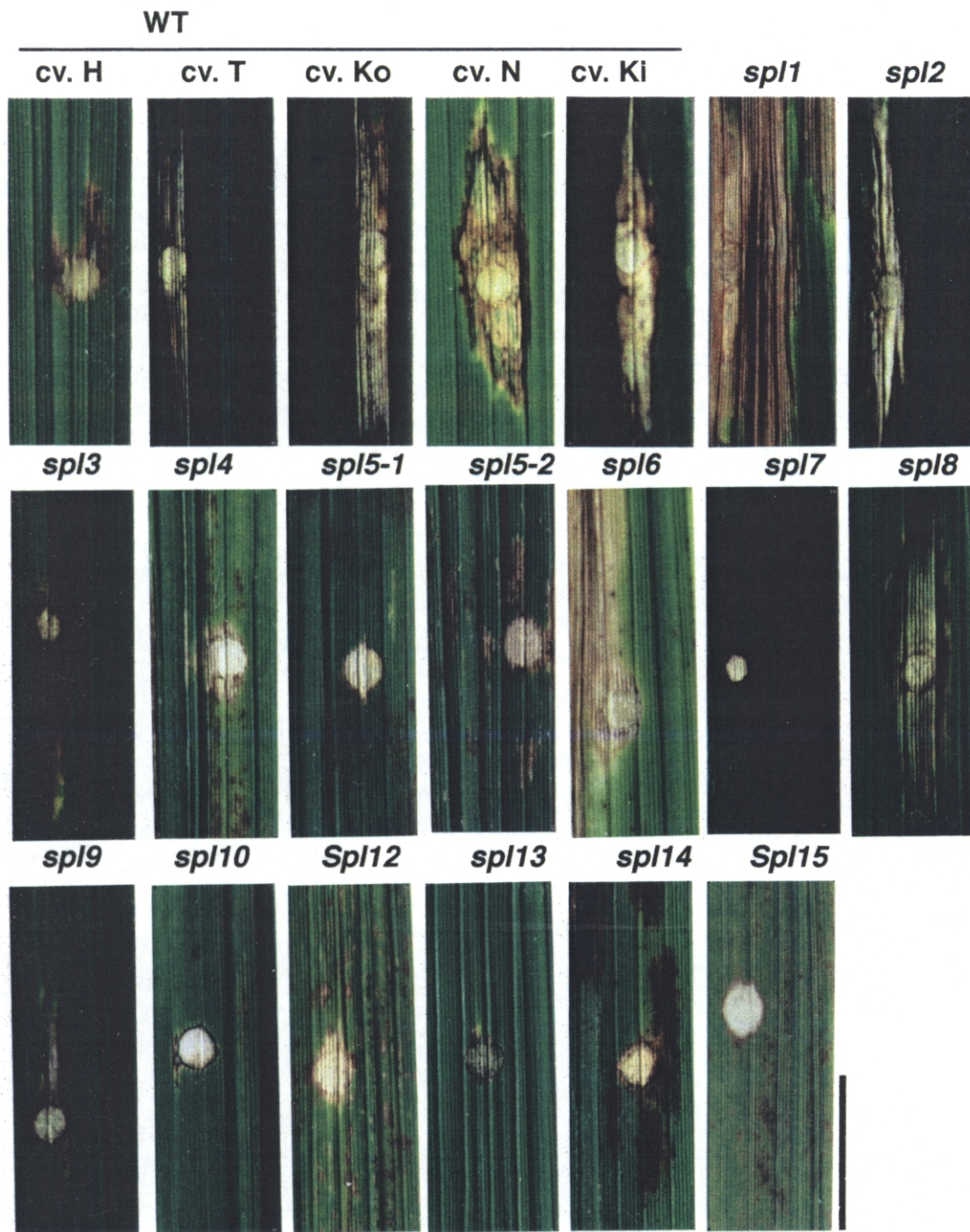


図3-2. いもち病菌(レース017)パンチ接種後12日目の病斑。
 各変異体の原品種(WT): *Spl12* および *spl13* はヒノヒカリ(H), *spl5-2* および *spl14* は台中65号(T), *Spl15* はコシヒカリ(Ko), *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl7* および *spl9* は農林8号(N), *spl6*, *spl8* および *spl10* は金南風(Ki). バーは1cm.

表 3-1. いもち病に対する抵抗性と擬似病斑の関係

変異体	いもち病抵抗性 ¹⁾	擬似病斑の特徴			
		発現開始葉位 ³⁾	大きさ ⁴⁾	色	タイプ
<i>spl1</i> ²⁾	罹病性	3	大	薄茶色	進行型
<i>spl2</i> ²⁾	罹病性	2	大	灰色	進行型
<i>spl3</i>	罹病性	4	中	赤茶色	開始型
<i>spl6</i>	罹病性	6	小	赤茶色	開始型
<i>spl8</i>	罹病性	10	小	黄色	開始型
<i>spl9</i>	罹病性	10	中	暗褐色	開始型
<i>spl4</i>	抵抗性	4	小	赤茶色	開始型
<i>spl5-1</i>	抵抗性	4	小	赤茶色	開始型
<i>spl5-2</i>	抵抗性	6	小	赤茶色	開始型
<i>spl7</i>	抵抗性	4	小	赤茶色	開始型
<i>spl10</i>	抵抗性	9	小	黄色	開始型
<i>Spl12</i>	抵抗性	2	小	赤茶色	開始型
<i>spl13</i>	抵抗性	10	小	黄～茶色	開始型
<i>spl14</i>	抵抗性	7(2,3,4) ⁵⁾	中	暗褐色	開始型
<i>Spl15</i>	抵抗性	4	中	薄茶色	開始型

¹⁾パンチ後種後 12 日目に原品種と比較して判定した (図 3-1, 図 3-2 参照).

(各々の原品種との対応は表 2-5 参照).

²⁾原品種不明であるが, 他の罹病性を示す系統と同様の病徴の伸びを示した.

(図 3-1, 図 3-2 参照).

³⁾ 擬似病斑が達観で明らかに確認できた葉位を示す.

⁴⁾ 小, 直径 3mm 以下; 中, 3mm~10mm; 大, 10mm 以上.

⁵⁾ 第 2,3,4 葉および第 7 葉以後に擬似病斑が現れた.

にレース特異性はなかった。本実験で供試しなかった擬似病斑葉変異体のうち、いもち病抵抗性があることを報告されている変異体は、*spl11*, M1009, *cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* である (Takahashi *et al.* 1999, Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000)。*spl11* および M1009 はいもち病菌を噴霧接種後に葉身に生じる病斑を原品種と比較しており、本実験で用いたパンチ接種法とは異なるため、*spl11* および M1009 と本実験で供試した変異体との間で抵抗性程度の比較はできなかった (Arase *et al.* 2000, Yin *et al.* 2000)。*cdr1*, *cdr2* および *Cdr3* はパンチ接種法で接種後に原品種と比較しているが、接種した植物体の生育ステージおよび抵抗性程度については不明であるため、本実験で供試した変異体との間で抵抗性程度の比較はできなかった (Takahashi *et al.* 1999)。

また、いもち病菌に対して抵抗性を示した *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* はいずれも擬似病斑の拡大がある境界を持って止まり、病斑同士が連続しないで存在する開始型の擬似病斑を示す変異体であった (図 2-1, 表 3-1)。一方、擬似病斑の拡大が進行する進展型病斑の *spl1* および *spl2* はいずれも罹病性を示した。従って、擬似病斑葉変異体における病害抵抗性の誘導に関しては開始型病斑であることが必要条件であると考えられた。しかし、同じく開始型の擬似病斑を示す *spl3*, *spl6*, *spl8* および *spl9* は抵抗性を示さなかった (図 2-1, 表 3-1)。*spl8* は擬似病斑の色が黄色く抜けるようになり、他の擬似病斑葉変異体の病斑の色とは大きく異なっていることから、病害抵抗性の誘導とは無関係である可能性が示唆された (図 2-1, 表 3-1)。また、*spl3* および *spl9* は擬似病斑の大きさが 3mm から 10mm 程度まで拡大するため、開始型と進展型の間中型である可能性が考えられた (図 2-1, 表 3-1)。*spl6* は他のいもち病抵抗性を示す変異体との擬似病斑の違いは見いだせなかった (図 2-1, 表 3-1)。

いもち病菌に対して抵抗性を示した擬似病斑葉変異体の擬似病斑の大きさは直径が 3mm 以下の変異体が多かった (図 2-1, 表 3-1)。しかし、*spl14* および *Spl15* は擬似病斑の大きさが 3mm から 10mm 程度まで拡大していた。*Spl15* は小さな擬似病斑が激しく発現するために、病斑自体が拡大したように見えたが、*spl14* は罹病性の *spl3* および *spl9* と似たように病斑自体が拡大していた (図 2-1, 表 3-1)。

いもち病菌に対して抵抗性を示した擬似病斑葉変異体の擬似病斑の色や発現する時期および葉身以外で発現があるかどうかについては、共通性が見いだせなかった (図 2-1, 表 2-7, 表 3-1)。

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). 今後, *spl7* 以外の遺伝子についても単離し, その機能を明らかにしていく必要がある.

いもち病菌に対して *spl1*, *spl2*, *spl3*, *spl6*, *spl8* および *spl9* は抵抗性を示さなかったが, いずれも原品種と病斑の進展程度がやや少ないか同程度であり, 原品種より抵抗性がさらに弱まっているかどうかはわからなかった. しかし, *spl2* は接種後に接種した葉の擬似病斑そのものが拡大しており, 接種という傷害ストレスにより擬似病斑の形成が誘導される可能性が示唆された.

2) 擬似病斑葉突然変異体の白葉枯病抵抗性

前節では, 擬似病斑葉変異体のうちいくつかの変異体は複数のいもち病菌に対して抵抗性を示すことが明らかになった. 次に, これらの擬似病斑葉変異体の白葉枯病に対する抵抗性を調査した.

まず, 播種後 100 日目の植物体の最上位展開葉に白葉枯病菌のⅢ群菌 (T7133) を接種して, 20 日後に病斑の長さを各々の原品種と比較した. *spl2* は接種した葉の擬似病斑の大きさが拡大したが, それ以外の擬似病斑葉変異体の擬似病斑の色や大きさはほとんど変化しなかった (図 3-3). 原品種のヒノヒカリ, 台中 65 号, コシヒカリ, 農林 8 号および金南風はいずれも病斑の長さが約 10~15 センチまで伸長し罹病性を示した (図 3-3, 図 3-4). 原品種の農林 8 号に比較して, *spl3* および *spl9* は病斑の進展程度がやや少なかったが, 罹病性を示した (図 3-3, 図 3-4). *spl6* および *spl8* も原品種の金南風より病斑の進展程度がやや少なかったが, 罹病性を示した (図 3-3, 図 3-4). *spl7* および *spl10* は病斑がやや伸長したが, 各々の原品種である農林 8 号および金南風の病斑より短く抵抗性を示した (図 3-3, 図 3-4). *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* は病斑がほとんど進展せず, 原品種より強い抵抗性を示すことが明らかになった (図 3-3, 図 3-4). *spl1* および *spl2* は原品種が不明であるため, Ⅲ群菌に対する抵抗性について判断することができなかったが, 病斑の伸長はいずれも他の罹病性を示す変異体とほぼ同程度であった (図 3-3, 図 3-4).

次に, 播種後 100 日目の植物体の最上位展開葉に白葉枯病菌のⅠ群菌 (T7174) を接種して, 20 日後に病斑の長さを各々の原品種と比較した. 原品種のうちコシヒカリの病斑がⅢ群菌を接種した場合より短かったが, それ以外のヒノヒカリ, 台中 65 号, 農林 8 号および金南風はいずれも病斑の長さが約 10~20cm まで伸長し罹病性を示した (図 3-4). 擬似病斑葉変異体のうち, *spl2* は接種した葉の擬似病斑が拡大したため接種による病斑の長さを測定することができなかったが, それ以外の擬似病斑葉変異

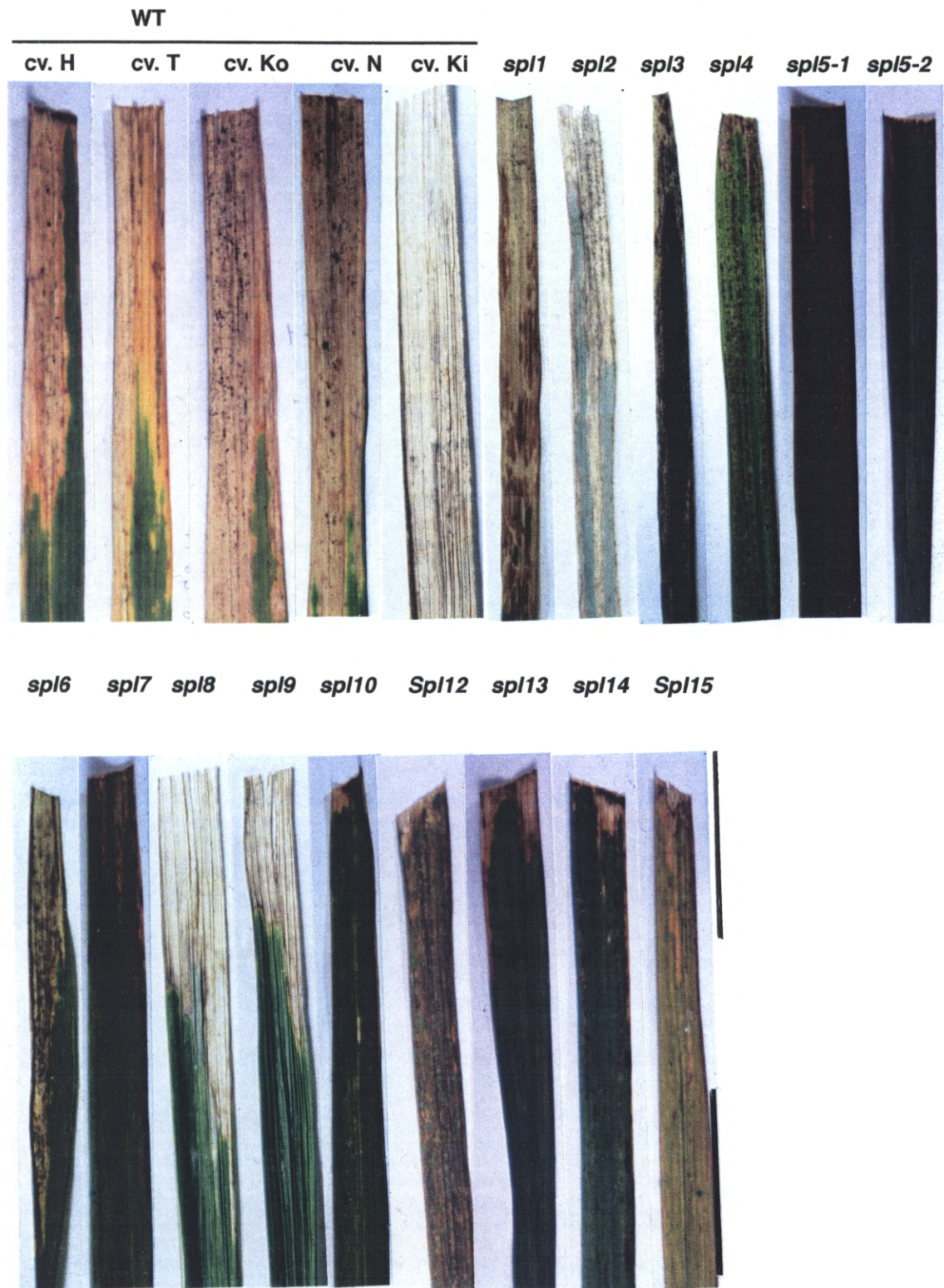
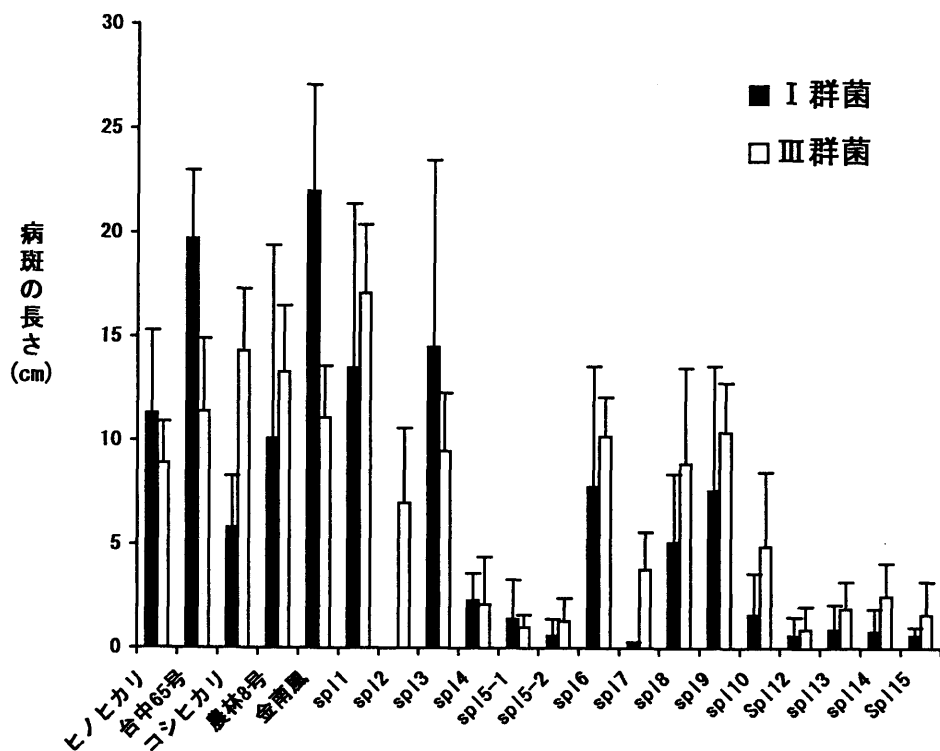


図3-3. 白葉枯病菌(Ⅲ群菌)剪葉接種後20日目の病斑。
 播種後100日目の植物の最上位展開葉に接種。各変異体の原品種(WT):*Spl12* および *spl13* はヒノヒカリ(H), *spl5-2* および *spl14* は台中65号(T), *Spl15* はコシヒカリ(Ko), *spl3*, *spl4*, *spl5-1*, *spl7* および *spl9* は農林8号(N), *spl6*, *spl8* および *spl10* は金南風(Ki)。バーは3cm。



変異体

図3-4. 白葉枯病菌(I群菌およびIII群菌)接種後20日目の病斑の長さ。播種後100日目の植物の最上位展開葉に接種。spl1からspl14およびそれらの原品種に対するI群菌接種は2針接種法,それ以外は剪葉接種法による。(spl2に対するI群菌接種では擬似病斑と白葉枯病菌感染による病斑の見分けがつかなかった。)各変異体の原品種(WT):Spl12およびspl13はヒノヒカリ(H), spl5-2およびspl14は台中65号(T), Spl15はコシヒカリ(Ko), spl3, spl4, spl5-1, spl7およびspl9は農林8号(N), spl6, spl8およびspl10は金南風(Ki)。バーは標準偏差。

体は擬似病斑の色や大きさにはほとんど変化は見られなかった。原品種の農林 8 号に比較して, *spl3* の病斑はやや長く, *spl9* はやや短かったが, 罹病性を示した(図 3-4). *spl6* および *spl8* の病斑は原品種の金南風よりやや短かったが, 罹病性を示した(図 3-4). *spl7* および *spl10* は約 5cm 病斑が伸長したが, 各々の原品種である農林 8 号および金南風の病斑より短く抵抗性を示した(図 3-4). *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* は病斑がほとんど進展せず, 原品種より強い抵抗性を示すことが明らかになった(図 3-4). *spl11* は原品種が不明であるため, I 群菌に対する抵抗性について判断することができなかったが, 病斑の伸長はいずれも他の罹病性を示す変異体とほぼ同程度であった(図 3-4).

I 群菌とⅢ群菌を接種した時の病斑の長さは, 罹病性品種・系統では 5cm 以上差があるものが多かった(図 3-4). しかし, 抵抗性を示した擬似病斑葉変異体 *spl4*, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* は, いずれのレースに対しても病斑の伸びは 5cm 以下であり, 同程度の抵抗性を示したことから, これらの擬似病斑葉変異体の抵抗性にはレース特異性はないと考えられた(図 3-4).

本実験で供試しなかった擬似病斑葉変異体のうち, *spl11* は白葉枯病抵抗性であることが報告されているが, 接種しているレースが異なるため, 本実験で供試した変異体との間で抵抗性程度の比較はできなかった(Yin *et al.* 2000).

spl4, *spl5-1*, *spl5-2*, *spl7*, *spl10*, *Spl12*, *spl13*, *spl14* および *Spl15* は, いもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示し, いずれに対してもレース特異性はないと考えられた. 従って, これらの *spl* 遺伝子はいもち病菌および白葉枯病菌に対して共通した抵抗性反応経路で働く遺伝子であると推定された. いもち病に対する抵抗性はパンチ接種法による病斑の進展程度を調査する方法のため, 定量的に判断することが難しい. 従って, 各変異体についてのいもち病と白葉枯病に対する抵抗性の程度の比較はできなかった. 本実験で供試しなかった擬似病斑葉変異体のうち, *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すことが報告されている (Yin *et al.* 2000). イネ以外でレース特異性のない抵抗性を示す擬似病斑葉変異体として, オオムギの *mlo* とシロイヌナズナの *lsd1* が報告されている(Wolter *et al.* 1993, Dietrich *et al.* 1994). *lsd1* は細菌および糸状菌に抵抗性を示す (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). *mlo* 変異体は, 親和性のうどんこ病菌 *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* に対してレース非特異的な抵抗性を示し (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). しかし, *mlo* 変異体はうどんこ病菌以外に対して抵抗性は誘導されていない (Wolter *et al.* 1993). 従って, 本実験で見出したいもち病および白葉枯病に対する抵抗性を示す擬似病斑葉変異体とは抵抗性の機構が異なると考えられた.

3) *Spl12* の病害抵抗性と遺伝子量効果

Spl15 はホモ個体とヘテロ個体を区別することができないが, *Spl12* は播種後 20 日以降ではホモ個体とヘテロ個体を区別することができる. そこで, *Spl12* の擬似病斑の発現程度, 病害抵抗性と遺伝子量効果の関係を検討した.

Spl12 (ヘテロ) は稈長, 穂長および一株籾重について, *Spl12* (ホモ) と原品種のヒノヒカリの中間的な値を示し (表 2-8), 擬似病斑の発現程度も *Spl12* (ホモ) より少なかった (図 3-5). まず, *Spl12* のホモ個体およびヘテロ個体に対して複数のいもち病菌に対する抵抗性を調査した. レース 007, 017, 037, 047 および 437 を用いてパンチ接種を行った結果, 原品種ではいずれのレースにおいても病斑が拡大した (図 3-6). 一方, *Spl12* のホモ個体およびヘテロ個体ではいずれのレースにおいてもほとんど病斑の拡大が見られず原品種より強い抵抗性を示し, その抵抗性の程度はホモ個体およびヘテロ個体間にほとんど差がなかった (図 3-6).

次に, *Spl12* のホモ個体およびヘテロ個体に対して複数の白葉枯菌に対する抵抗性を検定した. I 群菌, II 群菌および III 群菌を用いて剪葉接種を行った結果, 原品種ではいずれのレースにおいても病斑が拡大した (図 3-7, 図 3-8). 一方, *Spl12* のホモ個体およびヘテロ個体はいずれのレースにおいても原品種より病斑の長さが短く, 強い抵抗性を示し, その抵抗性の程度はホモ個体およびヘテロ個体間にほとんど差がなかった (図 3-7, 図 3-8).

本実験において, *Spl12* のヘテロ個体はホモ個体に比較して擬似病斑の発現程度は少ないにも関わらず, 病害抵抗性はホモ個体とほぼ同程度であることが明らかになった. 従って, ヘテロ個体における抵抗性関連遺伝子の発現量は, いもち病および白葉枯病に対して抵抗性を示すのに十分であると考えられた.

シロイヌナズナの優性の擬似病斑葉変異体である *Acd6* においては, ホモ個体は野生型よりかなり小さく, ヘテロ個体は野生型とホモ個体の中間の大きさを示すが, 抵抗性関連遺伝子の誘導程度および病原菌に対する抵抗性程度は, ホモ個体とヘテロ個体ではほぼ同程度であり, ヘテロ個体における抵抗性関連遺伝子の発現量は, 病原菌に対して抵抗性を示すのに十分であると考えられた (Rate *et al.* 1999). イネの *Spl12* の

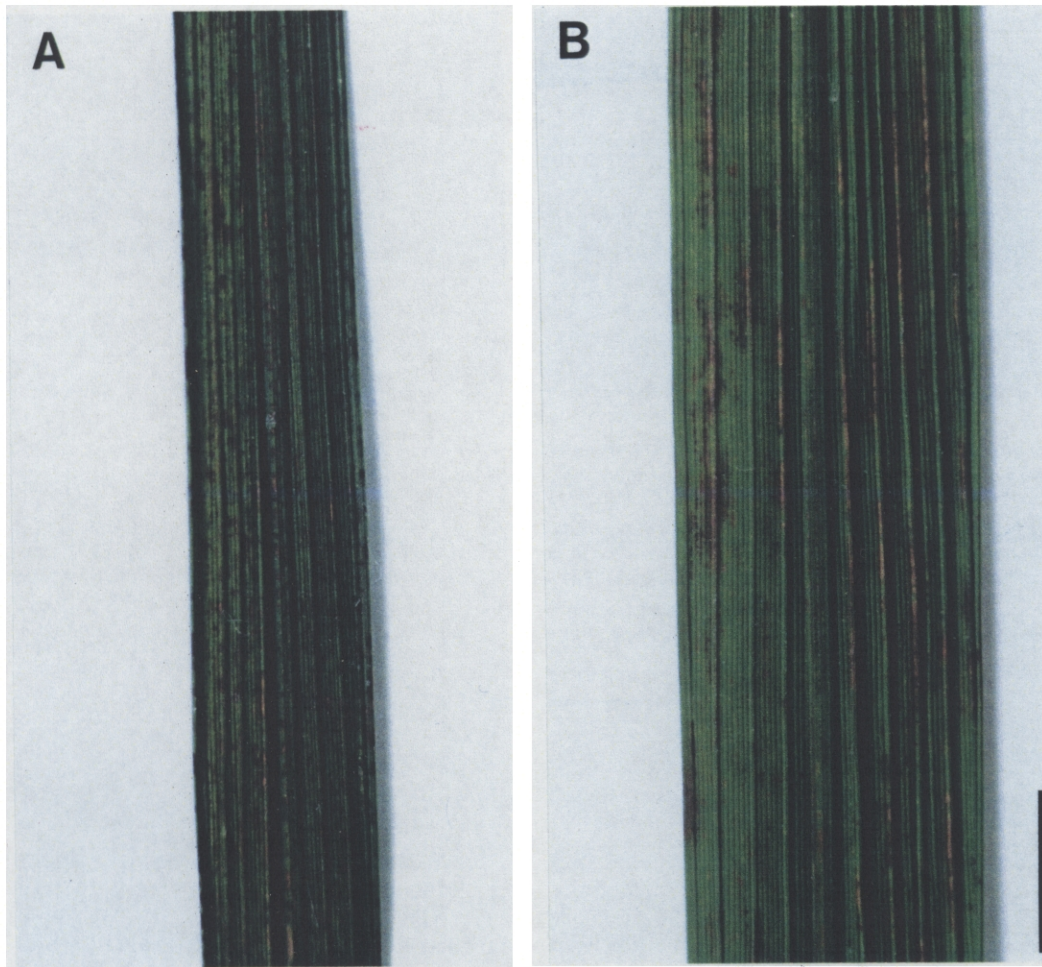


図3-5. *Spl12* のホモ個体, ヘテロ個体の播種後100日目の成葉における擬似病斑の発生. (A) ホモ個体, (B) ヘテロ個体. バーは1cm.

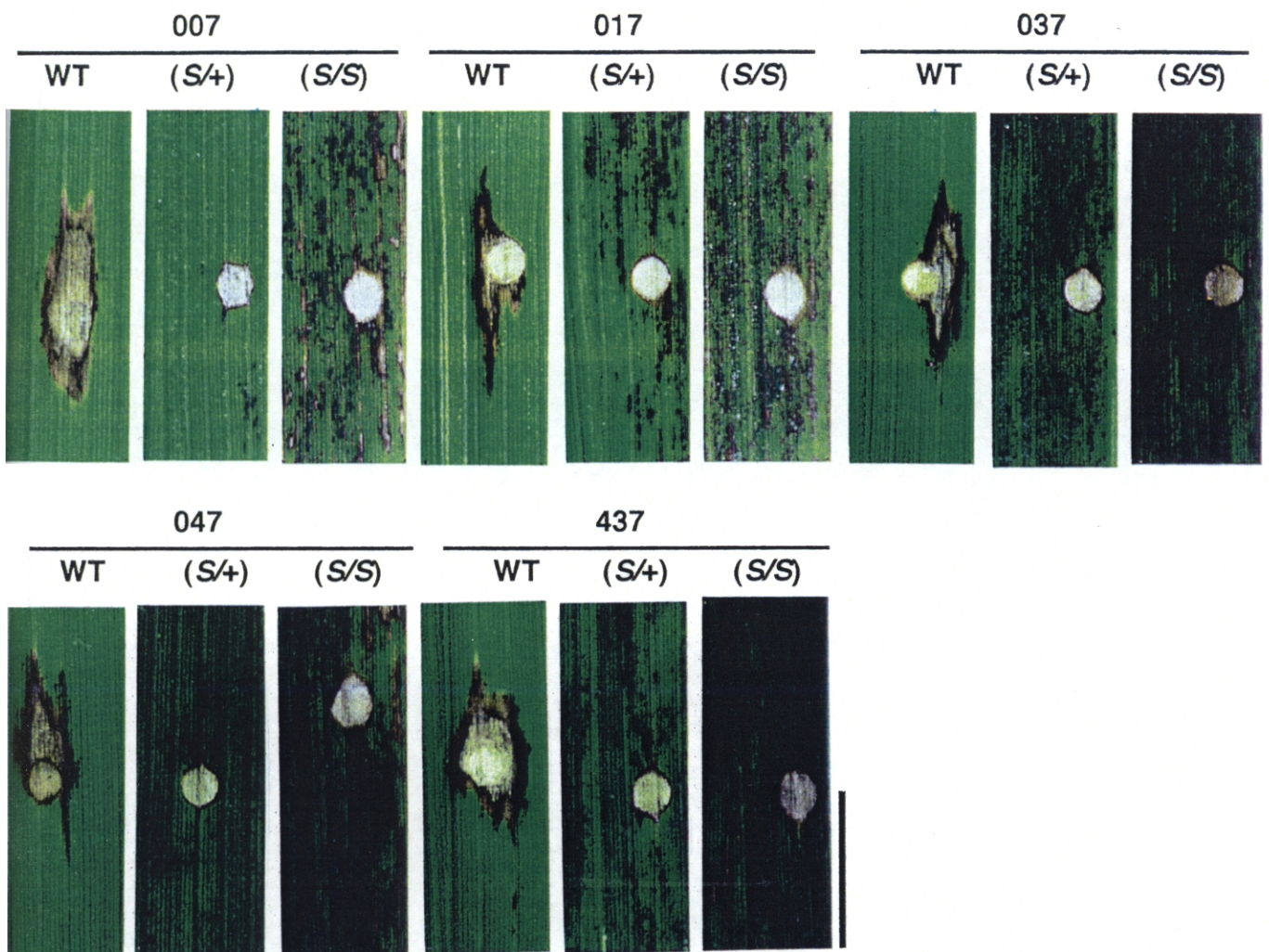


図3-6. *Spl12* のいもち病菌(レース 007, 017, 037, 137 および 437)パンチ接種後 12 日目の病斑. (*Spl12*/+)はヘテロ個体, (*Spl12*/*Spl12*)はホモ個体, 原品種(WT)はヒノヒカリ. バーは 1cm.

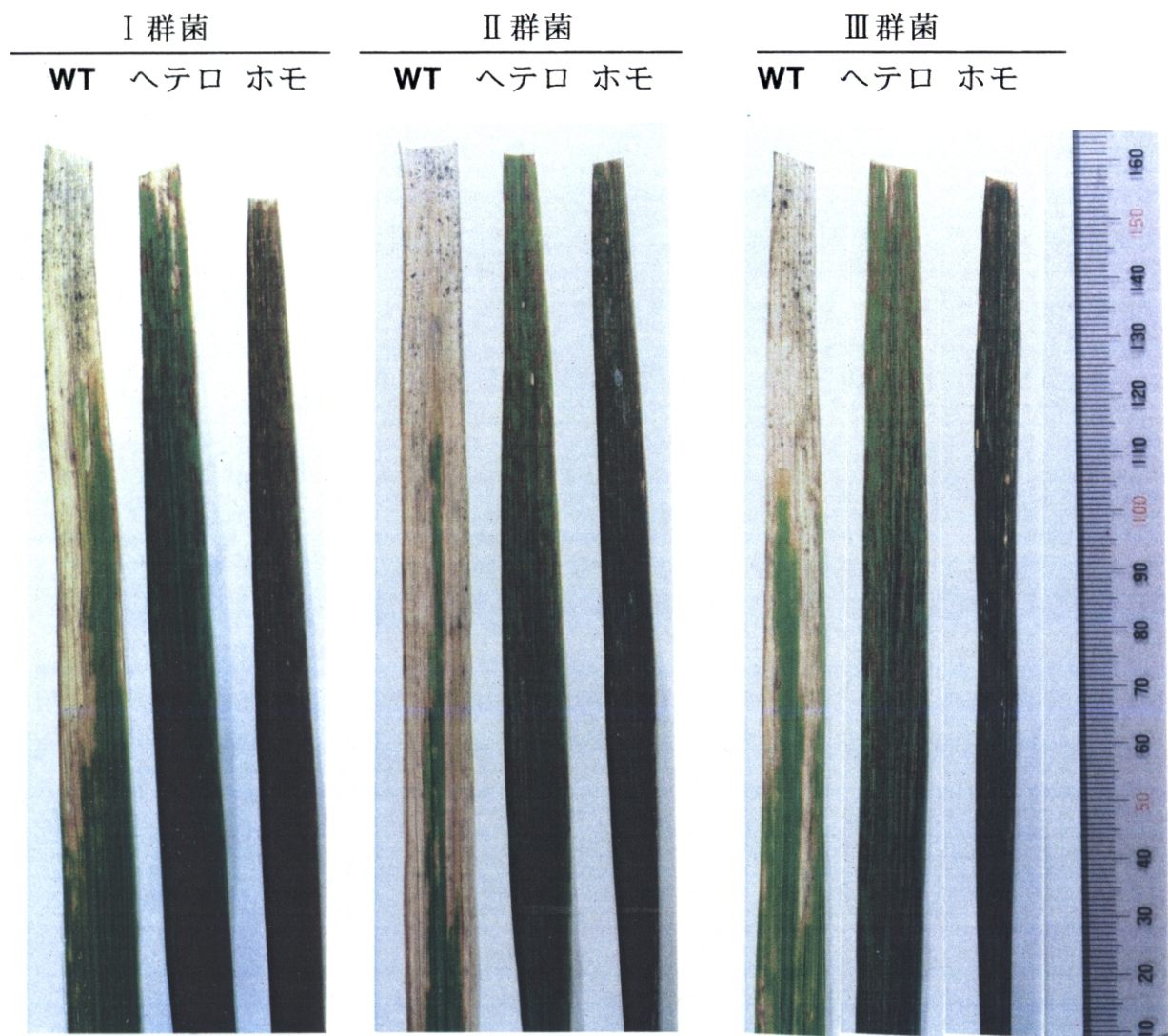


図3-7. *Spl12* の白葉枯病菌 (I 群菌, II 群菌およびIII群菌) 剪葉接種後 20 日目の病斑. 播種後 100 日目の植物の最上位展開葉に接種. 原品種(WT)はヒノヒカリ.