

## 論文の内容の要旨

氏名 溝淵律子

論文題目 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

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。擬似病斑葉変異体は、病原菌の存在の有無に関わらず過敏感反応に似た褐点を葉身などに形成するもので、今までにシロイヌナズナやオオムギなどの多くの植物において同定されてきた。さらに、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り、それらは植物の過敏感反応を解析するための有用な材料であると考えられている。イネにおいても、1965年に関口病斑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、複数の擬似病斑葉変異体 (*spotted leaf 1 (spl1) ~ spl11*) が見つけられている。しかしながら、それらの変異体間での擬似病斑の程度の比較や農業形質との関連についてはあまり明らかにされていない。

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、擬似病斑葉変異体を詳細に解析するとともに、それらの病害抵抗性およびPRタンパク質などの病害抵抗性関連の遺伝子の発現について解析した。さらに、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。

### 1. 擬似病斑葉突然変異体の表現型の解析

メチルニトロソウレアによる変異原処理を行ったM<sub>2</sub>又はM<sub>3</sub>世代の合計13000系統の中から、病原菌の接種なしで自発的に葉身に褐点が現れ、しかもイネいもち病菌を接種した時、原品種より病徴の伸展程度の低い5系統を同定した。遺伝分析の結果、2系統が単因子優性の突然変異であり、3系統が単因子劣勢の突然変異であった。また、これらの変異体および既知の擬似病斑葉変異体を用いた対立性検定の結果、これらの5つの擬似病斑葉変異体のうち、1つが*spl5-1*と対立関係にあることがわかり*spl5-2*とした。残りの4つの突然変異は新しい遺伝子座に由来することが明らかとなり、*Spl12, spl13, spl14* および *Spl15* と名付けた。

新しく見いだされた擬似病斑葉変異体と既知の擬似病斑葉変異体を用いて、擬似病斑の色、大きさ、発生する時期、発生する器官について調査した。

生育初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* では第 2 葉、*spl1* では第 3 葉、*spl3,spl4,spl5-1,spl7* および *Spl15* では第 4 葉から擬似病斑が現れた。*Spl5-2* および *spl6* では第 6 葉から擬似病斑が現れ、*spl8,spl9,spl10* および *spl13* では第 9 葉または第 10 葉から擬似病斑が初めて見られた。*spl14* は特異的な発現パターンを示し、第 2 葉、第 3 葉および第 4 葉で擬似病斑が出現したが、第 5 葉および第 6 葉では擬似病斑が見られず、第 7 葉から再び擬似病斑が現れた。擬似病斑の大きさは直径が 3mm 以下の系統が多かったが、*spl1* および *spl2* では擬似病斑同士がつながり広がった。擬似病斑の色は赤茶色の系統が多かったが、灰色、黄色なども存在した。

*spl3,spl5-1,spl5-2,spl7,spl9,Spl12*(ホモ)、*spl14* および *Spl15* においては、葉身以外に、止葉の葉鞘、外穎、内穎、枝梗のいずれにおいても擬似病斑が見られた。*spl1,spl2,spl4,Spl12*(ヘテロ) および *spl13* においては止葉の葉鞘、外穎、内穎、枝梗のいずれかで擬似病斑が見られた。*spl6,spl8* および *spl10* においては、葉身以外では擬似病斑が見られなかった。

次に農業形質を調査した。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小さかった。劣性の変異体の多くは、稈長、穂長、および一株籾重が原品種より小さかったが、*spl6,spl8* および *spl10* のように一株籾重が原品種と同程度またはやや大きい系統も存在した。

## 2. 擬似病斑葉突然変異体の病害抵抗性

新しく見いだされた擬似病斑葉変異体と既知の擬似病斑葉変異体に関して病害抵抗性を調査した結果、*spl4,spl5-1,spl5-2,spl7,spl10,Spl12,spl13,spl14* および *Spl15* いもち病および白葉枯病に対して抵抗性が誘導されていることが明らかになり、いずれもレース特異性はないと考えられた。

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比較した。*Spl12* のヘテロ個体は稈長、穂長および一株籾重について、*Spl12* のホモ個体と原品種の中間的な値を示し、擬似病斑の発現程度もホモ個体より少なかったが、いもち病および白葉枯病に対する抵抗性はホモ個体と同程度誘導されていた。

次に、病害抵抗性を示した擬似病斑葉変異体のうち *spl5-2,Spl12,spl13,spl14* および *Spl15* について、いもち病および白葉枯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調査した。播種後 8 週目の植物体の葉鞘向軸面にいもち病菌を接種したところ、葉身に擬似病斑が見られた。*Spl12,spl5-2* および *Spl15* のうち、*Spl12* ではいもち病菌の付着器からの菌糸の伸びは原品種より抑制されていたが、*spl5-2* および *Spl15* の付着器からの菌糸の伸展程度はほぼ原品種と同程度であり、まだ抵抗性は誘導されていなかった。播種後 8 週目の *spl13* と *spl14* の葉身には擬似病斑がまだ見られなかったが、付着器は形成されるものの菌糸の伸展は極めて抑制されており抵抗性が誘導されていた。播種後 12 週目では、*spl5-2,Spl12,spl13,spl14* および *Spl15* のいずれも葉身に擬似病斑が現れ付着器からの菌糸の伸展が原品種より抑制されていた。*spl13* は播種後 8 週目および 12 週目のいずれに

においても、いもち病菌の付着器の付いた細胞の細胞質が褐色に変化していた。

*spl5-2,Spl12* の止葉および止葉から数えて連続する 3 枚の葉について、出穂期に白葉枯病菌を接種したところ、全ての葉が抵抗性を示した。また、抵抗性の程度は *spl5-2,Spl12* および各々の原品種のいずれも、下位葉より上位葉で大きかった。*spl5-2,Spl12,spl13,spl14* および *Spl15* について、播種後 2,4,6,8, および 10 週の最上位展開葉に、白葉枯病菌を接種するとともに、各生育ステージにおける擬似病斑面積比率を調査したところ、優性の変異体である *Spl12* および *Spl15* は、劣性の変異体である *spl5-2,spl13* および *spl14* と比較し、生育初期から擬似病斑が現れ、擬似病斑面積比率も高く、病害抵抗性の程度も強かった。

二重変異体 *Spl12spl14* では、擬似病斑の発現程度は *Spl12,spl14* より激しく、相加的であったが、白葉枯病菌に対する抵抗性は *spl14* とほぼ同程度であり、相加的ではなかった。

### 3. 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

病害抵抗性を示した *spl5-2,Spl12,spl13,spl14* および *Spl15* を用いて、植物体内での病害抵抗性関連の遺伝子の発現について調査した。

病害抵抗性関連遺伝子の *PR1,PBZ1* およびキチナーゼ(*Chit3*)は、擬似病斑の出現後抵抗性を示した *spl5-2,Spl12* および *Spl15* では、擬似病斑の現れた後で発現が誘導された。擬似病斑出現前に抵抗性を示した *spl13* および *spl14* では、擬似病斑の現れる前から発現が見られた。従って、これらの変異体の病害抵抗性は病害抵抗性関連遺伝子の発現と強く相関していた。

### 4. 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

*spl13,spl14,Spl15* および *spl5-2* の農業形質を改良する目的で、ヒノヒカリあるいはコシヒカリとの F<sub>2</sub> に対し戻し交配を行ったところ、いずれの戻し交配系統(BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>)においても、一株籾重の標準偏差が大きく、系統内での個体間のばらつきが大きいことが示唆された。*spl13* および *spl14* の戻し交配系統では、一株籾重がヒノヒカリと同程度又はやや小さい程度まで改良されていたが、*spl5-2* の戻し交配系統では、一株籾重があまり増えていなかった。*Spl15* の戻し交配系統ではコシヒカリより小さいが、*Spl15* より極めて大きくなっていた。

BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> でもほとんどの系統において、依然として一株籾重がヒノヒカリ又はコシヒカリより小さかった。一株籾重が小さくなる原因として、*spl13* では穂長および籾百粒重、*spl5-2* では稈長、穂長および籾百粒重、*spl14* では籾百粒重、*Spl15* では稈長、一株穂数、および籾百粒重が少ないことによると考えられた。しかし、BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 系統よりも農業形質は全体的に改良されており、さらに戻し交配と選抜を進めることにより、実用化の可能性があると考えられた。

以上、本研究では、イネの擬似病斑葉変異体を用いて、イネの発育と擬似病斑の発現との関係を詳細に明らかにするとともに、多くの変異体は、いもち病、白葉枯れ病に対する抵抗性を示すことを明らかにした。さらに戻し交配を行い、農業形質改善の可能性について検討した。