

イネいもち病菌の準有性的組換による病原性変異

農業環境技術研究所 ^の ^{ぐち} ^{つじもと} ^{まさ} ^こ 野口(辻本)雅子

はじめに

いもち病は世界におけるイネの重要病害であり、子のう菌であるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* B. Couch (anamorph *Pyricularia oryzae* CAVARA) によって引き起こされる。本病の防除方法としては、殺菌剤などの農薬を用いた防除、肥培管理等の工夫による耕種的防除、抵抗性品種の開発利用等が行われている。現在、消費者の良食味志向によりいもち病に対する抵抗性の弱い品種の作付面積が増加していることもあり、より卓効のある薬剤に依存しているのが現状である。しかしながら、近年、消費者の食の安心・安全へのニーズ、環境汚染への懸念や薬剤耐性菌の出現などの理由から、薬剤偏重の防除体系が見直され、抵抗性品種の開発・利用が促進されている。抵抗性品種の育成・利用による本病害の防除に関しては、有望な外国イネ由来のイネいもち病真性抵抗性遺伝子を導入して作出された高度抵抗性品種が次々と抵抗性崩壊(ブレイクダウン)を受けた事例が過去に数多く報告されている。こうしたブレイクダウンに対応すべく、持続的抵抗性の考えが重視され、圃場抵抗性を重視した品種の開発や、多系品種を混植するマルチラインあるいは多様な品種の混合栽培が世界的にも実用化されている。すなわち、従来のように単一の真性抵抗性遺伝子だけに頼るのではなく、真性抵抗性遺伝子のみが異なるイネいもち病抵抗性同質遺伝子系統を複数混合した多系品種で、ブレイクダウンを抑制しようとする防除戦略である。この考え方にに基づき、宮城県では品種‘ササニシキ’のイネいもち病抵抗性同質遺伝子系統を混合した多系品種‘ささろまん’(佐々木ら, 2002)が1995年から普及し、一方、新潟県および富山県においては品種‘コシヒカリ’の多系品種が育成され実用化されている。しかし、これらの技術においても短期間はその効果が有効に発揮されると思われるが、いつかは用いたすべての同質遺伝子系統を侵害する病原性変異菌(スーパーレース)の出現により抵抗性の崩壊が起こる可能性が危惧されている。いもち病菌の病原性変異要因としては、①突然変異、②準有性的組換、③有性生殖(交配)が考えら

れる。本稿では、準有性的組換による病原性変異のメカニズムを中心に、準有性的組換菌の病原力やマルチラインにおける発病の可能性についてまとめた。

I 準有性的組換菌の病原性

日本国内では、これまでに野外において有性生殖器官である子のう殻が発見されていないこと、野外から分離されたイネいもち病菌同士を交配しても子のう胞子の形成が見られないことから、有性生殖が我が国におけるイネいもち病菌の主要な病原性変異菌出現要因である可能性は低いと考えられる。

突然変異による病原性変異については、点突然変異、トランスポゾンによる遺伝子挿入、染色体の欠失などが知られており、ランダムに変異すると考えられている。準有性的組換は、菌糸融合—2核共存体形成—核融合による複相核形成—複相の単相化—細胞分裂、によって起こるとされている(PONTECORVO, 1956)。イネいもち病菌で、これが起こる可能性については、山崎・新関(1965)が最初に報告し、生井・山中(1982)は、病原性の異なる2菌株の対峙培養および対峙接種(イネ葉身上の2箇所それぞれの菌株をパンチ接種する方法)を行い、両母菌株と異なる菌叢の特徴を示す部位からの単胞子分離菌から、両母菌の病原性を併せもつ病原性変異菌を得ている。また両母菌の病原性を併せもつレースだけでなく、様々なレースが出現するという報告もあるが(生井・山中, 1982; 農林水産技術会議事務局・愛知県農業総合試験場, 1995)、準有性的組換によりどのような病原性変異菌が出現するのか? という問いに対しての明確な答えは出ていなかった。そこで NOGUCHI et al. (2006; 2007b) は非病原性遺伝子の遺伝解析が行われている菌株(YASUDA et al., 2005)を用いて準有性的組換菌を作成し、それらについて非病原性遺伝子の遺伝解析を行った。遺伝解析のために、交配可能なイネいもち病菌2菌株にピアラホス耐性遺伝子とプラストサイジンS耐性遺伝子をそれぞれ導入し、ピアラホス耐性菌とプラストサイジンS耐性菌を作出した。この2菌株を混合培養し、出現した2剤耐性菌を単胞子分離し、導入した薬剤耐性遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い異なる薬剤耐性遺伝子を有する2剤耐性菌を準有性的組換菌として選抜した。準有性的組換菌に

Virulence and Aggressiveness of Parasexual Recombinants in *Magnaporthe oryzae*. By Masako T. NOGUCHI
(キーワード: スーパーレース, マルチライン)

ついで品種‘八反3号’と系統‘K59-1’（‘農林3号’と‘K59’のF3後代のうち*Pit*を有する系統）に対する病原性を調べた。さらに、ビアラホス耐性菌とプラストサイジンS耐性菌を交配し、得られた交配後代について病原性を調べた。交配後代の‘八反3号’および‘K59-1’に対する病原性の分離と、準有性的組換菌のそれらに対する病原性の分離を比較したところ同様であった（表-1, 2）。このことより、準有性的組換でも有性生殖と同様のレースが出現し、準有性的組換菌の病原性も、有性生殖と同様に母菌のもつ非病原性遺伝子の組み合わせにより決定すると考えられた。

II 準有性的組換菌の病原性の安定性と病原力

新しく出現したレースが圃場に定着し、圃場で被害をもたらすためには、その菌の病原性の安定性と既存のレースに対して相対的に勝るか、あるいは同等の病原力が必要であると考えられる（岩野・山田, 1973；生井ら, 1990）。しかし、菌の準有性的組換菌と推定される菌株の病原性の安定性と病原力についての報告は少なく（生井・山中, 1985；生井ら, 1990）、圃場における試験はこれまでに報告がない。そこで Noguchi et al. (2007 a)

表-1 品種‘八反3号’に対する準有性的組換菌と交配後代の病原性の分離の比較

	菌株数		χ^2 値 ^{a)}	P 値 ^{b)}
	非病原性	病原性		
準有性的組換菌 ^{c)}	12	37	0.47	0.50 ~ 0.70
交配後代 ^{d)}	21	49		

a), b) 期待値：交配後代の非病原性菌株と病原性菌株の分離比。
c) ビアラホス耐性菌（‘八反3号’に対して非病原性）とプラストサイジンS耐性菌（‘八反3号’に対して病原性）の混合培養により得られた菌。d) ビアラホス耐性菌とプラストサイジンS耐性菌の交配後代。

表-2 イネ系統‘K59-1’に対する準有性的組換菌と交配後代の病原性の分離の比較

	菌株数		χ^2 値 ^{a)}	P 値 ^{b)}
	非病原性	病原性		
準有性的組換菌 ^{c)}	24	25	1.82	0.10 ~ 0.20
交配後代 ^{d)}	43	27		

a), b) 期待値：交配後代の非病原性菌株と病原性菌株の分離比。
c) ビアラホス耐性菌（‘K59-1’に対して病原性）とプラストサイジンS耐性菌（‘K59-1’に対して非病原性）の混合培養により得られた菌。d) ビアラホス耐性菌とプラストサイジンS耐性菌の交配後代。

は、レース 133.1 と 047.0 の菌株を混合培養し、両母菌の病原性を併せもつ菌のみが侵害できる‘アキユタカ (*Pik, Piz*)’に接種して形成された病斑より菌を分離した。分離した菌株が準有性的組換菌であるかどうかを、RAPD 解析により検討した。その後、準有性的組換菌の病原性の安定性、孢子形成数、病斑長、単植圃場およびマルチラインを想定した混植圃場における発病進展状況を調査した。その結果、準有性的組換菌の病斑長（表-3）、孢子形成数（表-4）、単植圃場における発病進展、株当たり病斑数および発病株率は母菌の中間を示したが、混植圃場においては準有性的組換菌の株当たり病斑数および発病株率は母菌と比較して最も多かった（表-5）。

生井ら（1985）は、準有性的組換により生じたと推定される病原性の幅の広い菌株（レース 337）を品種‘愛知旭 (*Pia*)’に9回継代接種を行った試験で、*Pii, Pik, Pik-m, Pita*, と *Pita-2* に対する病原性を失うことを

表-3 母菌 (NAO-02 と TH77-1) と準有性的組換菌 (KZB) の病斑長 (mm)^{a)}

菌株 (レース)	品種			
	愛知旭	関東 51 号	フクニシキ	アキユタカ
NAO-02 (133.1)	24.8 ± 7.9a ^{b)}	22.4 ± 5.7a	nd ^{c)}	nd
TH77-1 (047.0)	13.6 ± 3.9b	nd	11.7 ± 3.3a	nd
KZB (177.1)	18.8 ± 4.8ab	12.5 ± 5.2b	12.8 ± 5.7a	16.8 ± 5.5

a) 6 葉期のイネ苗の第 6 葉にパンチ接種を行い、接種 21 日後の病斑長を調べた。b) 4 ~ 12 個の病斑について平均±標準偏差を算出し、Tukey の多重検定を行った ($P < 0.05$)。同一英文字を付した数値間には有意差がないことを示す。c) nd は非親和性の組み合わせのため未調査。

表-4 母菌と準有性的組換菌の 1 病斑当たりの孢子形成数^{a)}

菌株	孢子形成数 (× 10 ³ 個)
母菌	NAO-02 50.2 ± 39.1a ^{b)}
	TH77-1 5.9 ± 8.3b
準有性的組換菌	KZA 43.3 ± 32.1a
	KZB 29.4 ± 29.6ab
	KZC 29.6 ± 55.2ab

a) 6 葉期の品種‘愛知旭’の第 6 葉にパンチ接種を行い、接種 8 日後の病斑を採取し、26℃, 24 時間温室条件下で孢子を形成させた。1 病斑当たりの分生子形成数を表す。b) 1 菌株当たり 5 ~ 8 個の病斑について平均±標準偏差を算出し、Tukey の多重検定を行った ($P < 0.05$)。同一英文字を付した数値間には有意差がないことを示す。

表-5 母菌 (NAO-02 と TH77-1) と準有性的組換菌 (KZB) の株当たり病斑数と発病株率 (%)

接種菌株 (レース)	単植区 ^{a)}	混植区 ^{b)}
NAO-02 (133.1)	129.7 ± 130.9 (100)	5.2 ± 9.6 (69.4)
TH77-1 (047.0)	26.5 ± 9.0 (100)	0.4 ± 1.5 (15.6)
KZB (177.1)	90.7 ± 33.0 (100)	19.1 ± 23.2 (90.6)

^{a)} 作付品種 ‘愛知旭’。 ^{b)} ‘愛知旭’, ‘関東 51 号’ と ‘フクニシキ’ の種子を等量混合し, 作付けした。株当たり葉いもち病斑数: 平均 ± 標準偏差。

見いだしている。Noguchi et al. (2007 a) は, 両母菌の病原性を併せもつレースしか感染できない ‘アキユタカ’ と, 両母菌が感染できる ‘愛知旭’ を継代接種に用いて病原性の安定性を検討した。 *Pik* と *Piz* をもたない ‘愛知旭’ 上で同様に継代接種した後に再分離された準有性的組換菌は, *Pik*, *Piz* に対する病原性を失うのではないかと考えたが, 予想に反してレースの変化は見られなかった。このことから, 準有性的組換菌でもレースの安定した菌株も生じることが示された。母菌と比較して侵害できる品種が多く, しかも病斑長や胞子形成数などの病原力が母菌と同等あるいは片方の母菌より勝っている菌が得られたことは, 準有性的組換によっても, 圃場に優占しているレースと同等または相対的に勝る病原力を有するレースが出現しマルチラインに被害を与える可能性を示唆している。

突然変異により出現したと考えられる変異菌の病原力は発生当初は母菌より劣るが, イネ体上で増殖を繰り返すにつれだいに増大する可能性が品種 ‘やまてにしき’ に出現した変異菌で報告されている (藤田・鈴木, 1982)。生井ら (1990) は, 病原性の幅広い菌株 (レース 337) の継代接種を行い, 継代接種後の菌株と母菌の病原力 (葉身上の罹病型病斑形成率, 病斑一定面積当たりの分生子形成数すなわち胞子形成能) を評価した。その結果, 継代接種後の再分離菌株の病原力は, 母菌よりも勝ったとしている。これらのことより, 発生当初は母菌と同等あるいは両母菌の中間の病原力をもつ準有性的組換菌が世代を重ね, 病原力を増大させることで, 圃場に優占し, スーパーレースとなる可能性も考えられる。

III マルチラインにおける準有性的組換

2005 年に新潟県全域でコシヒカリがコシヒカリマルチラインに一斉に切り替えられたこともあり, 近年, 農薬の出荷量が減少している (日本植物防疫協会, 2006)。消費者の食の安全性志向と生産現場の環境負荷軽減の観点から, 今後さらに減農薬栽培が推奨され, 様々な品種

においてもマルチラインが育成され, 実用化されていくと考えられる。複数のイネ同質遺伝子系統が混植されている状態では, 同一圃場に病原性の異なるいもち病菌レースが共存する可能性があり, それらが準有性的組換を起こして, 複数の品種を同時に侵害できる病原性の幅の広いレースが出現することも考えられる。

しかしながら, これまでに実験室内では, イネいもち病菌の準有性的組換によると推定される菌株の出現が多く報告されているが, 自然条件下における準有性的組換による病原性変異菌出現は証明されていない。GENOVESI and MAGILL (1976) は紫外線照射処理により作製した二つの栄養要求株を用いて, 培地上で 2 核共存体を形成させ, 得られた分生子由来の菌株の栄養要求性マーカーを調べた結果, 母菌の栄養要求性に関してほとんどすべての組み合わせの組換型を確認している。FATEMI and NELSON (1978) も同様に, イネいもち病菌の異なる菌株間の対峙培養により母菌と同じ菌糸の形状・色を有するもののほかに両母菌間の中間型の性質を示す菌株を得ている。準有性的組換過程 (菌糸融合から複相核形成まで) が蛍光顕微鏡下で観察されていること (齊藤・加藤, 1991) や栄養要求性の異なる 2 菌株の対峙培養の菌叢より 2 核共存体あるいは複相核と考えられる菌株が単菌糸分離されていること (CRAWFORD et al., 1986) なども報告されている。また, 自然界での準有性的組換の間接的な証明はいくつか報告され, ZEIGLER et al. (1997) は, ヒマラヤの一地域のイネより分離した菌株を用いて, DNA フィンガープリンティングと RFLP 解析により圃場での準有性的組換菌の出現を示唆している。CHEN et al. (2006) は, 中国の 13 省からイネいもち病菌を採取し, *rep*-PCR (GEORGE et al., 1998) を用いて DNA フィンガープリンティングを行い, 多様なパターンが得られたという結果から, 有性生殖と準有性的組換が行われている可能性を示唆している。これらの報告を総合的に判断すると, 野外においても準有性的組換が行われている可能性は高いと考えられる。

おわりに

宮城県の ‘ささろまん’ (ササニシキの同質遺伝子系統) では, 1995 年の導入当初は真性抵抗性遺伝子 *Pik*, *Pik-m*, *Piz* をそれぞれ有する同質遺伝子系統を混植に用いていたが, その後この 3 系統に病原性を示すレースが認められた。そこで, 病原性レースの分布拡大を抑制するため, 1997 年にさらに *Piz-t* を有する系統を追加して 4 系統を混植している。マルチラインを持続的に利用していくためには, このように圃場に分布するレースの変動

と病原性変異菌の出現を把握するためのレースのモニタリング、レースの変動に応じて混植に用いる系統の入れ替え、あるいは混植系統の構成割合の変更が重要と考えられる。

そのために、病原性変異菌の出現頻度の推定が重要である。しかしながら準有性的組換菌の出現頻度は、実験室においてさえも明らかにされていない。その理由の一つとして、準有性的組換菌を簡易に選別できる技術が開発されていないことが挙げられる。分子生物学的手法や細胞学的手法などにより、今後準有性的組換菌の出現頻度を明らかにしていく必要がある。

引用文献

1) CHEN, Q. H. et al. (2006) : J. Phytopathol. 154 : 361 ~ 369.
 2) CRAWFORD, M. S. et al. (1986) : Genetics 114 : 1111 ~ 1129.
 3) FATEMI, J. and R. R. NELSON (1978) : Phytopathology 68 : 1791 ~ 1794.
 4) GEORGE, M. L. C. et al. (1998) : ibid. 88 : 223 ~ 229.
 5) GENOVESI, A. D. and C. W. MAGILL (1976) : Can. J. Microbiol. 22 : 531 ~ 536.
 6) 藤田佳克・鈴木穂積 (1982) : 日植病報 48 : 290 ~ 294.
 7) 岩野正敬・山田昌雄 (1973) : 北陸農業試験場報告 25 : 1 ~ 64.
 8) 生井恒雄ら (1990) : 日植病報 56 : 1 ~ 9.
 9) ———・山中 達 (1982) : 同上 48 : 466 ~ 470.
 10) ———・———— (1985) : 同上 51 : 206 ~ 211.
 11) 日本植物防疫協会 (2006) : 農薬要覧 2006, 日本植物防疫協会, 東京, p. 3.
 12) 農林水産技術会議事務局・愛知県農業総合試験場 (1995) : 指定試験 (病害虫) 24 : 31 ~ 37.
 13) NOGUCHI, M. T. et al. (2006) : Phytopathology 96 : 746 ~ 750.
 14) ——— et al. (2007 a) : JARQ 41 : 123 ~ 131.
 15) ——— et al. (2007 b) : ibid. 41 : 207 ~ 210.
 16) PONTECORVO, G. (1956) : Ann. Rev. Microbiol. 10 : 393 ~ 400.
 17) 斉藤初雄・加藤晋郎 (1991) : 日植病報 57 : 96.
 18) 佐々木武彦ら (2002) : 宮城県古川農業試験場研究報告 3 : 1 ~ 35.
 19) 山崎義人・新関宏夫 (1965) : 農技研報 D13 : 231 ~ 273.
 20) YASUDA, N. et al. (2005) : Phytopathology 95 : 768 ~ 772.
 21) ZEIGLER, R. S. et al. (1997) : ibid. 87 : 284 ~ 294.

！発行図書！

「農薬概説 (2007)」

監修 農林水産省消費・安全局 農産安全管理課, 植物防疫課
 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター B5判 280頁 定価1,890円 (本体1,800円) 送料340円
 農薬取扱者が知っておかなければならない農薬に関する法令とその解説, 基礎知識についての詳細を掲載。

<p>第1章 作物保護と農薬</p> <p>1 作物保護の目的</p> <p>2 病害虫と雑草による被害</p> <p>3 作物保護における農薬の位置づけ</p> <p>第2章 植物防疫行政</p> <p>1 農業と植物防疫</p> <p>2 植物防疫行政の組織体制</p> <p>3 病害虫発生予察事業</p> <p>4 防除事業</p> <p>5 農林水産航空事業</p> <p>6 植物検疫</p> <p>第3章 農薬行政</p> <p>1 農薬行政の歴史</p> <p>2 農薬行政の概況</p> <p>3 農薬の登録</p> <p>4 農薬の果たす役割</p> <p>5 指導者の認定等</p>	<p>第4章 関係法令 解説</p> <p>1 農薬に関わる法体系</p> <p>2 農薬取締法解説</p> <p>3 関係法令と動向</p> <p>(1) 毒薬及び劇物取締法</p> <p>(2) 食品衛生法</p> <p>(3) 環境基本法</p> <p>(4) 水質汚濁防止法</p> <p>(5) 水道法</p> <p>(6) 消防法</p> <p>(7) 廃棄物の処理及び清掃に関する法律</p> <p>(8) 食品安全基本法</p> <p>第5章 農薬の一般知識</p> <p>1 農薬の種類</p> <p>2 農薬の特性</p> <p>3 農薬の開発</p> <p>4 農薬の生産と流通</p> <p>第6章 施用技術</p> <p>1 散布技術の基礎</p> <p>2 施用 (散布) 方法</p>	<p>第7章 農薬のリスクと安全性評価</p> <p>1 農薬のリスク</p> <p>2 安全性評価</p> <p>3 農薬リスクの実態</p> <p>第8章 農薬の安全・適正使用</p> <p>1 農薬使用者の責務</p> <p>2 安全使用の基本事項</p> <p>3 安全使用のための知識</p> <p>4 使用上の諸注意</p> <p>5 農薬散布時の飛散防止対策</p> <p>第9章 病害虫・雑草とその防除</p> <p>1 病害</p> <p>2 害虫</p> <p>3 雑草</p> <p>4 植物の生育調節</p> <p>資 料</p> <p>農薬取締法および関連する法令通知等</p>
--	---	--