

イネいもち病の DNA マーカーを用いた伝染源の解明

宮城県古川農業試験場作物保護部 ^{ささ} 笹 ^{はら} 原 ^{まさ} 剛 ^し 志

はじめに

作物病害において、その伝染源や伝染環を明らかにすることは、伝染源の除去や伝染環の遮断により、病害に対し有効な防除手段を開発できるため極めて重要である。特にイネいもち病では、これまで伝染源や本田初発要因に関し様々な生態学的報告があり、それらを根拠とし様々な防除対策が取られてきた。しかし、これらを直接的な根拠で示した報告は少なく、時として、それが本病に対する防除効果の低下を招いてきた可能性もある。そこで、イネいもち病の伝染源から本田初発に至るプロセスを解明し、最小限の防除により本病を効率的に制御する技術を確認するため、1999年から2003年にかけて地域基幹農業技術体系化促進研究「イネいもち病の本田初発プロセス解明による高度防除システム」が実施された。

本研究は DNA マーカーを利用したいもち病菌個体群の追跡調査により、今日までブラックボックスとされてきたイネいもち病の伝染源、伝染環、病勢拡大範囲等を強い根拠で提示しようとした点で、これまでの疫学的研究と異なる。ここでは、この研究で得られた成果の一部を本研究に参画した各研究機関を代表して紹介させていただく。なお、本研究に参画した研究機関と研究担当者を表-1に示した。

I イネいもち病菌の DNA フィンガープリント

本研究実施当初は、DNA フィンガープリント法として、AFLP法(平八重ら, 1999; 石黒ら, 1999)を利用する予定であった。しかし、本法は酵素処理や2回のPCRなど、行程が複雑で、解析にも高価なDNAシーケンサを必要とする。そこで、サンプリング、DNAの調整、PCRまでを各農業試験場で実施し、その後の解析には東北農業研究センターのDNAシーケンサを拝借して実施する体制をとった。ところが、そのころ北海道立中央農業試験場では、GEORGE et al. (1998)の*Pot-2 rep-PCR*法を利用して道内のいもち病菌を既に遺伝子

型で分類していた。この手法はいもち病菌のゲノムに100個程度挿入されている反復領域の塩基配列を基にしたDNAフィンガープリント法で、サーマルサイクラーや試薬などのPCRができる環境さえ整っていれば容易にDNAの多型が得られ、菌株間の差を出しやすく再現性も高いというメリットがあった。そして、実際DNA操作の素養が少ない筆者でも、DNA抽出からPCR、電気泳動まで、ほぼ2日程度で操作が完了し、宮城県産いもち病菌も図-1のように十数種の遺伝子型に容易に分類することが可能であった。そこで、各試験場は、この手法を中心に解析を実施し、さらに詳細な解析が必要な場合のみ、AFLP法を利用することとした。しかし、この試験研究では、DNA解析に加え、発生状況や伝染勾配などの詳細な現地調査結果があったことから、DNA

表-1 本共同研究に参画した研究機関と担当者

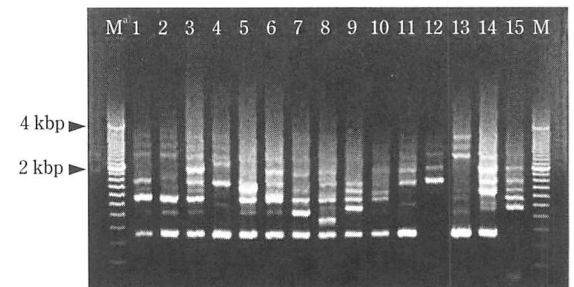
参画道県	研究機関	担当者
北海道	中央農業試験場	竹内 徹・白井佳代
	上川農業試験場	小倉玲奈・西脇由恵
山形県	農業試験場	梁瀬正裕
	庄内支場	早坂 剛
新潟県	農業総合研究所	石川浩司・原澤良栄 堀 武志
宮城県	古川農業試験場	笹原剛志・三上綾子
		石川志保・大場淳司

研究支援

独立行政法人農業技術研究機構

東北農業研究センター

石黒 潔・小林 隆

図-1 *Pot-2 rep-PCR*による宮城県産いもち病菌のDNAフィンガープリント

a) Lane M: 200 bp DNA Ladder.

Elucidation of Infection Sources of Rice Blast Disease Using DNA Marker. By Masashi SASAHARA

(キーワード: いもち病, 伝染源, 病勢進展, DNAマーカー)

フィンガープリント法は *Pot-2 rep-PCR* 法で十分な場合が多く、本研究の目的達成には、AFLP 法の出番は少なかった。

II 各参画道県の取り組み

1 地域での発生といもち病菌個体群の分布 (宮城県)

1999年に宮城県名取市において、補植苗の放置や罹病苗の本田移植の実態およびこれらが当地域の葉いもち発生に及ぼす影響について調査した(笹原ら, 2000)。その結果、補植苗の放置は約半数の圃場で確認され、これら補植苗を回収して湿室で発病を促したところ、8筆の水田から回収した苗で発病が確認された。そして、これら8筆の苗のうち、3筆の苗がほかの苗に比べ病斑数も多く、比較的重度の発病であった。放置苗は、除草や中干しなど中間管理作業の際に随時取り除かれたが、新たに試験地で発病する苗は認められなかった。7月上旬の本田における葉いもち発生状況は、重度発病苗放置圃場3筆(圃場I~III)と圃場Iと同一耕作者の圃場I'で発病株率が高く、さらにこの4筆の圃場を中心に、その周辺の圃場へ発生が拡大している傾向があった(図-2)。

重度の発病苗および当該地域の各圃場の本田発病株から分離したいもち病菌について、その遺伝子型を *Pot-2 rep-PCR* により比較した。その結果、発病苗から分離されたいもち病菌は三つの遺伝子型に分類された。また、発病苗放置圃場の本田発病株から分離した菌の遺伝子型は、圃場IとI'では発病苗からとは異なる遺伝子型が優占していたが、圃場IIとIIIでは発病苗分離菌と遺伝子型がよく類似していた(表-2)。さらに、同地域の各圃場での本田イネ株分離菌の遺伝子型は、発病苗放置圃場を中心に同一遺伝子型が広範囲に分布していた(図-3)。

なお、同地域において発病苗放置圃場農家5軒およびその他の圃場農家8軒に育苗作業に関するアンケートを実施したところ、発病苗放置圃場農家では「塩水選の未実施」や「播種量が多い」、「育苗期間が長い」等の回答が多く得られた。また、5軒中4軒で苗いもちの発生を助長する無加温出芽法(早坂, 1999)を採用していた。

以上の結果から、当地域に放置されていた発病苗は、放置後の孢子飛散により発病したのではなく、育苗期に既に感染していると考えられた。また、本地域の主要伝染源は育苗期に感染した罹病苗の移植いわゆる「持ち込み」が主体であり、これらの圃場が当地域の本田初発に影響しているものと推察された。

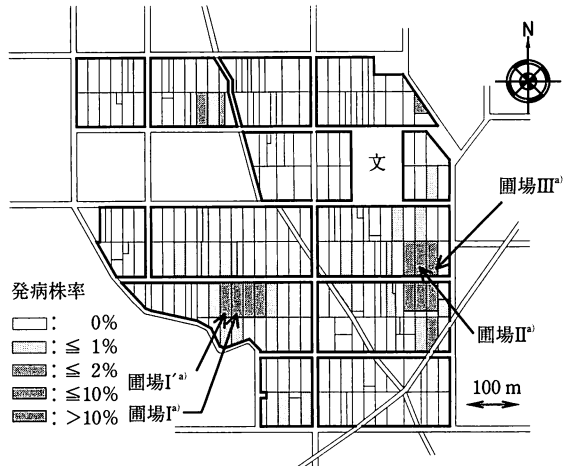


図-2 圃場別の葉いもち発生状況(宮城県名取市)

a) 圃場I, II, IIIは重度発病苗確認圃場、I'はIと同一耕作者。

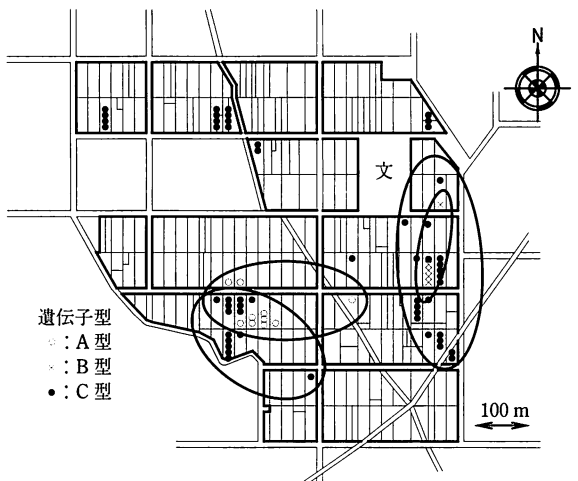


図-3 遺伝子型別いもち病菌の分布状況(宮城県名取市)

表-2 取置苗と本田イネ株から分離したいもち病菌の遺伝子型の比較

分離苗	取置苗分離菌の遺伝子型				圃場	本田イネ株分離菌の遺伝子型			
	A	B	C	その他		A	B	C	その他
苗I ^{a)}	5				圃場I	1	3	1	
					圃場I' ^{b)}				5
苗II ^{a)}			6		圃場II				6
苗III ^{a)}			5		圃場III		4	1	

a) 苗I, II, IIIはそれぞれ圃場I, II, IIIに放置されていた重度発病苗を表す。b) 圃場I'は圃場Iに隣接する同一耕作者の圃場で、苗の放置はなかった。

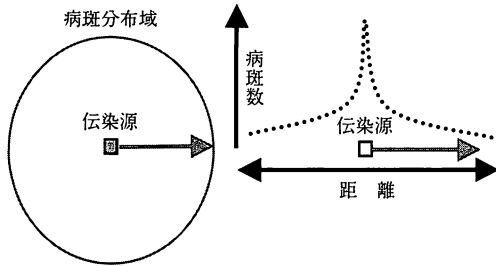


図-4 全般発生開始期の病斑分布のイメージ

2 発病補植苗からの病勢進展 (新潟県)

発病補植苗の本田での伝染源としての影響範囲を明らかにした試験を紹介する。本試験は1999年に新潟県西蒲原郡中之口村で実施された(原澤ら, 2000)。接種により発病させた箱苗2箱を試験地に設置し、葉いもちの全般発生開始期直後および第2世代病斑発生期にイネ株50m×3条(以下、単位とする)の見歩き調査を行い、単位当たりの検出病斑数または坪状発生数を調査した。その結果、単位当たりの病斑数を発病補植苗から100mごとにみると、病斑数は発病補植苗近くでは極めて多く、100m範囲以内で急激に減少し、100m以上離れた範囲においては低密度で緩やかに減少した。また、病斑は600~700m範囲においても認められた。その後、各圃場の本田株から分離されるいもち病菌について、AFLPおよびPot-2 rep-PCRにより遺伝子型を比較したところ、その遺伝子型はすべて類似した。

以上、発病補植苗からの伝染勾配には、補植苗近くの急勾配と広範囲な緩勾配の異なる2種の勾配があることが示唆され、発病補植苗からの病勢進展は1回の感染好適条件の出現により、伝染源を中心に約700mにまで拡大することが判明した。

3 育苗期感染苗の移植「持ち込み」(宮城県)

「持ち込み」が本田初発に及ぼす影響を明らかにするため、2000年に宮城県名取市で試験を実施した。ここでは、Pot-2 rep-PCRにより異なる遺伝子型に分類されるいもち病菌を接種した苗を、時期(5月12日、18日、26日、6月2日、9日)を変えて本田に移植し、その後、接種苗上での接種病斑および新病斑の消長を調査した。また、接種イネ株に出現した新病斑から分離されるいもち病菌の遺伝子型を比較した。

その結果、5月12日、5月18日移植区では本田初発時期までには接種病斑は消失してしまうが、その後の移植区では接種病斑は消失しないうちに新病斑が出現し

表-3 罹病苗移植後の接種病および新病斑の消長

接種の有無	接種菌株の遺伝子型	移植月日	調査日						
			5/12	5/18	5/26	6/02	6/09	6/16	6/23
有	A	5/12	○ ^{a)}	○	○	○	× ^{b)}	● ^{c)}	●
有	—	5/18	—	○	○	○	×	●	●
有	B	5/26	—	—	○	○	○	○●	○●
有	C	6/02	—	—	—	○	○	○●	○●
有	D	6/09	—	—	—	—	○	○	●
無	—	5/12	—	—	—	—	—	—	●

^{a)} 接種病斑, ^{b)} 消失, ^{c)} 新病斑.

表-4 接種に用いたいもち病菌と接種イネ株に出現した新病斑の遺伝子型

移植月日	接種菌株の遺伝子型	分離菌株数	新病斑の遺伝子型			
			A	B	C	D
5/12	A	5	5			
5/26	B	4		4		
6/02	C	3			3	
6/09	D	3				3

表-5 試験地に分布したいもち病菌と供試種子分離いもち病菌

分離地	遺伝子型										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
試験地 ^{a)}	12			2	3		47	2			2
供試種子 ^{b)}		2	18								

^{a)} 道立上川農業試験場. ^{b)} 道立中央農業試験場産.

た。一方、新病斑はいずれの試験区でも接種イネ株に出現し、出現時期は、6月9日移植区を除き、同時期であった。また、無接種区に比較し本田初発は早期化し(表-3)、その後の発生量も無接種区に比べ明らかに多くなった。さらに、移植株の葉身に出現する新病斑から分離されるいもち病菌の遺伝子型を検討したところ、接種に用いたいもち病菌の遺伝子型とそれぞれ類似した(表-4)。これらのことは、持ち込まれた病斑が肉眼では観察されなくても、その後の伝染源となり得る根拠を示す。また、初発時期の早期化や発生量の増加は、1999年に実施した試験でも認められ(三上ら, 2000)、「持ち込み」が本田初発の伝染源として重要で、早期多発の原因となることが推察された。

4 第一次伝染源の解明 (北海道)

北海道立上川農業試験場および北海道立中央農業試験場では、採種地と試験地とのいもち病個体群の遺伝子型頻度の違いを利用し、汚染種子から本田初発に至るいもち病菌の挙動解明を試みた (小倉, 2001)。

上川農試水田に分布するいもち病菌個体群の遺伝子型頻度を調査したところ、A 型と G 型が優占していた。一方、中央農試産の種子は、上川農試には存在しない C 型のいもち病菌に汚染されていた (表-5)。そこで、2000 年に中央農試産種子を用いて、慣行に従って播種育苗後、上川農試内の試験田に移植した。移植後は、各段階で発生したいもち病菌を分離し、*Pot-2 rep-PCR* によりその遺伝子型を確認した。

その結果、7 月 11 日に第一次伝染源からの感染とみられる孤立初発病斑が試験田で確認され、分離菌を解析したところ、その遺伝子型は C 型が優占していた。この時点で、試験田以外の水田ではいもち病の発生は確認されなかった。また、その後に周辺水田で発生した初発病斑から分離したいもち病菌に C 型は存在しなかった。

これらの結果は、罹病種子の使用が本田初発要因となり得ることを強く示唆し、種子から本田初発に至る動態が証明された。なお、DNA マーカーを利用していもち病菌の動態追跡をする場合、そのバックグラウンドとして試験地に存在するいもち病菌の個体群の遺伝子型を把握することは必要不可欠である。

5 転換畑での敷きわら由来の本田初発 (山形県)

転換畑敷きわら由来の本田初発を明らかにする試験は、山形県で行われた (梁瀬ら, 1998)。本試験を行った山形県の村山地域は転換作物としてスイカが盛んに栽培されており、稲わらをスイカ畑に敷きつめている。スイカ苗の定植時期は、水稻の移植時期より早く、このような地域では伝染源が移植前から存在する状況にある。

敷わら作業が完了してほぼ 1 か月経過した 6 月下旬に任意に稲わらを採取し、穂首節におけるいもち病菌分生胞子の形成を調査したところ、592 本中 3 本に分生胞子の形成が認められた。稲わら分離菌と 7 月下旬に確認された本田初発病斑から分離されたいもち病菌について、*Pot-2 rep-PCR* によりその遺伝子型を比較した結果、稲わら分離菌と同一クローンと考えられるいもち病菌が本田での病斑で認められ、敷わら上のいもち病菌が転換畑周辺水田での葉いもち発生伝染源になり得ることが示唆された。

III イネいもち病の主要伝染環

上記で紹介した DNA マーカーを利用した追跡調査や、これに付随して行った発生状況調査などから、いもち病本田初発要因として、前年の被害残渣や取置苗、移植罹病苗等の重要性が明らかとなった。特に、本研究から罹病した種子を使用すると本田での伝染源になり得ることが強く示唆され、種子から本田初発に至る動態が証明された。山形県では、圃場周辺転作畑の敷きわらからの伝染を DNA マーカーにより確認しているが、これは地域特性とみるべきであろう。以上のことから、葉いもち本田初発の主要伝染経路は、罹病種子由来の苗いもちまたは前年の被害残渣を第一次伝染源とする育苗ハウス内感染であり、これらが移植あるいは放置されることにより、地域の伝染源となる強い根拠を得た。また、発病苗が放置された場合、その伝染源を中心に 700 m まで葉いもちの発生が拡大し、地域全体の発生に大きな影響を与えることが明らかとなった。

おわりに

「丸い月を裏側から見たら、やっぱり丸かったでは済みませんよ」とは、中間評価時のある試験評価委員の言葉である。「イネいもち病の DNA マーカーを用いた伝染源の解明」は、結果として、数ある諸先輩方の報告を裏付けるだけの成果と取られかねないが、この言葉は我々に対する熱いエールであったと思っている。ここで紹介した結果は本研究課題の出発点であって、今回ここで紹介はできなかったが、本研究の結果は種子消毒や育苗期防除、種子更新などの防除対策により、伝染環を遮断することで効率的にイネいもち病を防除できることを成果として示している。これが、DNA マーカーを利用したこの共同研究の最終的な目的である。本研究のような疫学的研究は、まだ始まったばかりであるが、このような研究が今後さらに進展することで、より効率的な作物病害の防除が可能になるものと思われる。

引用文献

- 1) GEORGE, M. C. et al. (1998) : *Phytopathology* 88 : 223 ~ 229.
- 2) 平八重一之ら (1999) : 九病虫研報 45 : 12 ~ 16.
- 3) 早坂 剛 (1999) : 北日本病虫研報 50 : 228.
- 4) 原澤良栄ら (2000) : 日植病報 66(2) : 107.
- 5) 石黒 潔・小林 隆 (1999) : 化学と生物 37(7) : 433 ~ 434.
- 6) KIYOSAWA, S. (1972) : 日植病報 38(1) : 30 ~ 40.
- 7) 小倉玲奈ら (2001) : 同上 67(2) : 194.
- 8) 三上綾子ら (2000) : 北日本病虫研報 51 : 290.
- 9) 笹原剛志ら (2000) : 同上 51 : 290.
- 10) 梁瀬正裕・武田富一 (1998) : 同上 49 : 19 ~ 23.