

不親和性いもち病菌レースに対するイネ品種とりで1号の葉身の細胞反応

古賀博則・小林尚志

Hironori KOGA and Takashi KOBAYASHI: Cytological reactions in leaves of the rice variety, Toride 1, to the incompatible race of *Pyricularia oryzae* Cav.

Summary

Early stages of infection process of *Pyricularia oryzae* Cav. in the rice leaves of the compatible combination of race 037 and var. Koshihikari, and the incompatible combination of race 037 and var. Toride 1 was microscopically compared with an aid of a whole-leaf clearing and staining technique. The difference at the stages of fungal penetration and mycelial growth became apparent. Host reactions at epidermal cells in the incompatible combination could be grouped into three types. The first group was no reaction type; unsuccessful penetration without any host reaction. The percentage of occurrence of no reaction type in the incompatible combination was almost as same as that in the compatible one. Thus, it seemed that no reaction type was independent of the specific resistance controlled by the major gene ($Pi-z'$) for resistance to rice blast. The second group was deep browning of a host epidermal cell which accompanied with browned parenchymatous cells. Fine-browned lesions were contained within this group. Occurrence of the deep browning of infected epidermal cells was less than 1% to all the infected sites observed in the incompatible combination. Frequency of occurrence of the deep browning was less in the incompatible combination than in the compatible one. Therefore, it was unlikely that occurrence of the deep browning was the primary determinants of the specific resistance. The third group was cytoplasmic granulation of a host epidermal cell. The rate of the infection sites with the host cytoplasmic granulation in the incompatible combination was remarkably higher than that in the compatible one. Moreover, both penetration and mycelial growth ceased in the epidermal cell with cytoplasmic granulation. Hence, it was suggested that the granulation of host cellular contents of the epidermal cell closely correlated with the expression of the specific resistance.

イネいもち病において、抵抗性発現に關与するイネ葉身の細胞反応として、これまで被侵入表皮細胞の過敏感壊死⁹⁾と柔細胞の褐変・壊死→褐変型病斑の形成^{1,2,9,15,16,19)}とが報告されている。河村・小野⁴⁾は本病抵抗性がこの兩者によって決定されることと、さらに抵抗性発現に壊死柔細胞が非収縮性であることが重要であると論述した。しかし、本菌の不親和性レースに対して高度抵抗性を示すイネ品種とりで1号(抵抗性遺伝子 $Pi-z'$ ¹⁰⁾)では、柔細胞の褐変・壊死→褐変型病斑の形成はほとんど観察されない。

したがって、本報ではとりで1号の特異的抵抗性発現に關与する葉身の細胞反応を明らかにするために、既

報⁹⁾の全葉透明化染色法(a whole-leaf clearing and staining technique)を用いて、本菌の侵入・伸展とそれらに対する葉身の細胞反応を観察した。

本報を草するにあたり、試験の遂行上有益な助言を頂いた当時病害第1研究室畑野修博士に厚く御礼申し上げます。

実験材料および方法

不親和性組合せとしては、いもち病菌レース037¹⁷⁾(菌株研60—19)とイネ品種とりで1号(抵抗性遺伝子 $Pi-z'$ ¹⁰⁾)の組合せを、親和性組合せとしては、レース037(同上菌株)とイネ品種コシヒカリとの組合せを供試した。供試イネの栽培、いもち病菌の培養、接種、接種後の諸条件は既報⁹⁾と同じ方法で行った。接種後24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144時間目に完全展開上位第1葉

を採取し、ラクトフェノール・アルコール溶液中に約1週間浸漬して、葉緑素を完全に除いた。その後は既報⁵⁾に従って、接種葉の透明化および染色を行い検鏡した。本菌の侵入の成否、伸展の程度、ならびに葉身の細胞反応の違いによって類別した各反応型の出現頻度は、約1,000個の感染部位の観察によって算出した。

実験結果

侵入率および菌糸伸展の経時的変化

観察した全付着器数に対する菌糸伸展の認められた付着器数の百分率を侵入率とし、その経時的変化を Fig.1 に示した。ただし、付着器下のイネ表皮細胞の褐変が濃く、侵入菌糸の有無が確認できない箇所 (Figs.3-E,11) については侵入率の計算から除外した。

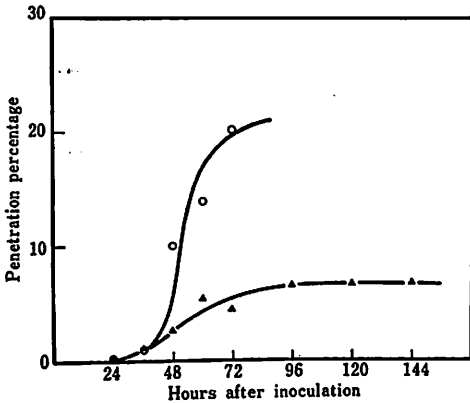


Fig. 1. Penetration percentages of *Pyricularia oryzae* into rice leaves in the compatible combination (O) of race 037 and var. Koshihikari, and the incompatible combination (▲) of race 037 and var. Toride 1.

接種後24時間目では、親和性および不親和性組合せのいずれにおいても、表皮細胞内に付着器からの侵入菌糸は観察されなかったが、接種後36時間目では両組合せとも1~2%の侵入率であった。接種後48時間目には親和性組合せで侵入率は10.1%、不親和性組合せでのそれは3.4%で両組合せ間に有意差が認められた。親和性組合せでは、侵入率はその後顕著に増加し、接種後72時間目の侵入率は20.1%であった。親和性組合せでは接種後96時間以降1個の感染部位が著しく拡大するため、他の感染部位をも包含するようになり、侵入率を正確に算出することはできなかった。一方、不親和性組合せでは侵入率は、接種後36時間と60時間との間に増加し、接種後60時間目では5.9%となり、その後は接種後144時間まで

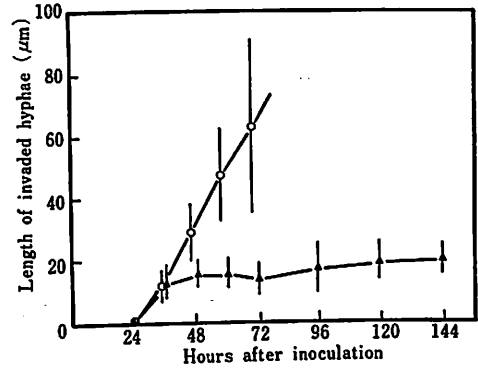


Fig. 2. Growth rates of invaded hyphae of *Pyricularia oryzae* in rice leaves in the compatible combination (O) of race 037 and var. Koshihikari, and the incompatible combination (▲) of race 037 and var. Toride 1. Bars show \pm standard deviation.

増加はみられなかった。

親和性組合せと不親和性組合せとの間での菌糸長の差異は、接種後36時間目では認められず、接種後48時間以降に認められた (Fig.2)。親和性組合せでは、その後侵入菌糸は著しく伸長し、接種後144時間目には紡錘形の病斑を形成した。他方、不親和性組合せでは接種後144時間目でも、被侵入細胞はほとんど1個の表皮細胞に限られており、接種後48時間以降は侵入菌糸はほとんど伸展しなかった。親和性組合せでは接種後48時間以降、大多数の侵入菌糸は分枝しているのに対し、不親和性組合せでは分枝していることは極めて稀であった。また表皮細胞内の侵入菌糸の直径も、不親和性組合せでは親和性組合せと比較すると小さく、接種後72時間目でそれぞれ2.16 μ mと3.70 μ mであり、両者間に有意差が認められた (Figs.8, 9, 10)。

菌の侵入・伸展に対するイネ表皮細胞の反応

付着器下の表皮細胞における本菌の侵入・伸展状態と、それらに対する表皮細胞反応の違いにより、感染部位を既報⁷⁾に従い次の6型 (Figs.3. N, A~E) に類別した。

N: 侵入菌糸および表皮細胞反応ともに全く観察されない (無反応型, Fig.6)。

A: 侵入菌糸は認められないが、表皮細胞の内容物が顆粒化している (Fig.7)。

B: 侵入菌糸は未分枝で、著しく細くて短いものが認められる (Fig.8)。

C: 分枝した侵入菌糸が認められるが、被侵入細胞の内容物の顆粒化は認められない (Fig.9)。

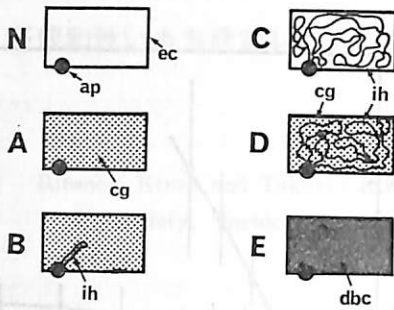


Fig. 3. Various infection types at epidermal cells of rice leaves inoculated with *Pyricularia oryzae*. N: unsuccessful penetration without any host reaction, A: unsuccessful penetration with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, B: a poorly-developed invaded hypha with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, C: well-developed invaded hyphae without host cytoplasmic granules in an epidermal cell, D: well-developed invaded hyphae with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, E: Deep browning of the infected epidermal cell. ap: appressorium, cg: cytoplasmic granules, dbc: deeply-browned cell, ep: epidermal cell, ih: invaded hypha.

D: Cと同様分枝した侵入菌糸が認められ、被侵入細胞の内容物が顆粒化している (Fig.10)。

E: 付着器下の表皮細胞が濃く褐変し、侵入菌糸の有無が確認できない (Fig.11)。

接種後72時間目の親和性および不親和性組合せにおける各型の出現率を Fig. 4 に、接種後144時間までの各型出現率の経時的变化を Fig.5 に示した。ただし、親和性組合せでは接種後96時間以降には、1 個の感染部位が著しく拡大するために、上記に従って各型を類別することが困難であった。

観察した全感染部位に対するN型(無反応型)の出現率は、両組合せとも接種後24時間目では100%であった。接種後72時間目のN型出現率は親和性および不親和性組合せで、それぞれ63.1%と62.0%に減少し、両組合せ間に有意差は認められなかった (Fig.4)。

不親和性組合せにおいてA型は接種後24時間では観察されず、接種後36時間目から観察された (Fig.5)。その後、観察した全感染部位に対するA型の出現率は接種後72時間目で33.1%と急速に増加し、接種後144時間目で39.8%であった (Fig. 5)。一方、親和性組合せではA型の出現率は不親和性組合せに比較すると著しく低く、接種後72時間目で6.5%であった (Figs. 4, 5)。細胞内容物が顆粒化した表皮細胞は、被侵入表皮細胞1個に限

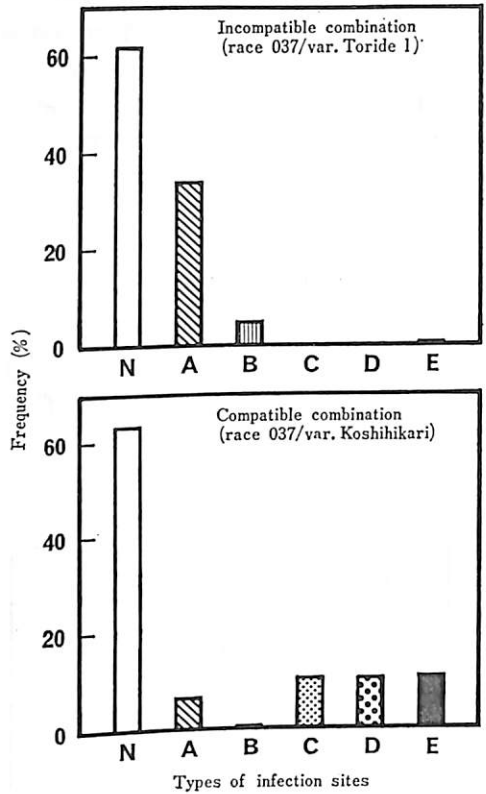


Fig. 4. Occurrence of each infection type at epidermal cells of rice leaves inoculated with *Pyricularia oryzae* in the compatible and the incompatible combinations 72 hr after inoculation. N: unsuccessful penetration without any host reaction, A: unsuccessful penetration with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, B: a poorly-developed invaded hypha with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, C: well-developed invaded hypha without host cytoplasmic granules in an epidermal cell, D: well-developed invaded hyphae with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, E: Deep browning of the infected epidermal cell.

られる場合と、その隣接表皮細胞も顆粒化している場合とがあった。しかし、その直下の柔細胞が褐変・壊死を起こしている頻度は極めて少なかった (Fig. 7)。内容物が顆粒化した表皮細胞はクリスタル紫で染色されたものが多かったが、無色～淡褐色を呈した表皮細胞も観察された。

B型の出現は親和性組合せでは認められなかったが、不親和性組合せでは多数観察された。不親和性組合せではB型の出現率は接種後36時間目で1.3%で、接種後60時間以降は7%前後でほぼ一定した (Fig.5)。また、ほ

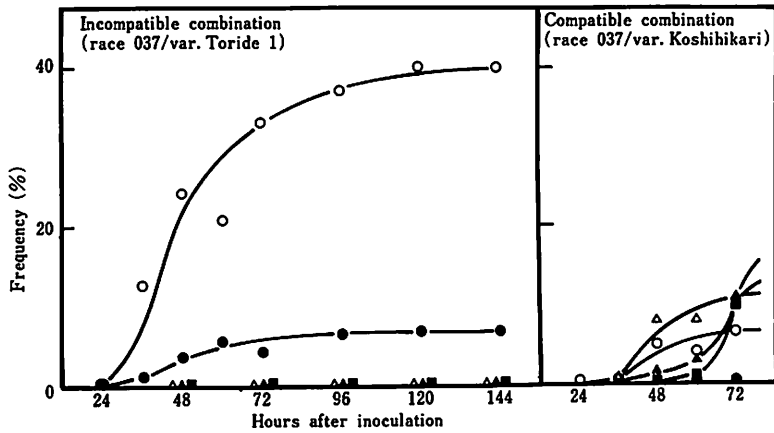


Fig. 5. Occurrence of each infection type at epidermal cells of rice leaves inoculated with *Pyricularia oryzae* in the compatible and the incompatible combination. ○: unsuccessful penetration with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, ●: a poorly-developed invaded hypha with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, △: well-developed invaded hyphae without host cytoplasmic granules in an epidermal cell, ▲: well-developed invaded hyphae with host cytoplasmic granules in an epidermal cell, ■: Deep browning of an infected epidermal cell.

とんどの被侵入細胞は内容物の顆粒化を伴っていた (Fig. 8)。

C型およびD型は親和性組合せだけに観察された。C型は接種後36時間目から観察され、その出現率は接種後48時間目にかけて8.2%と急増した。その後、C型の出現率には顕著な増加はなく、接種後72時間目で10.0%であった (Fig. 5)。D型は接種後48時間目から観察され、その出現率は接種後60時間目までは、C型の出現率と比較すると著しく低かった。しかし、接種後72時間目のC型とD型の出現率はほぼ同じ値であった (Fig. 5)。C型およびD型の感染部位では接種後72時間以降、被侵入表皮細胞の周囲の多数の表皮および柔細胞がしばしば濃く褐変していた。

E型の感染部位は、多数の表皮および柔細胞の濃い褐変を伴っており、肉眼的に褐点型病斑として観察されるものはこの型に含まれた (Fig. 11)。親和性組合せではE型は60時間以降に観察されるようになり、接種後72時間目の出現率は10.4%であった。不親和性組合せではE型はほとんど観察されず、接種後60時間から144時間までいずれも1%未満の出現率で、褐変部位の最大長径は接種後144時間でも約220μmであり、表皮細胞数で約50個であった。

考 察

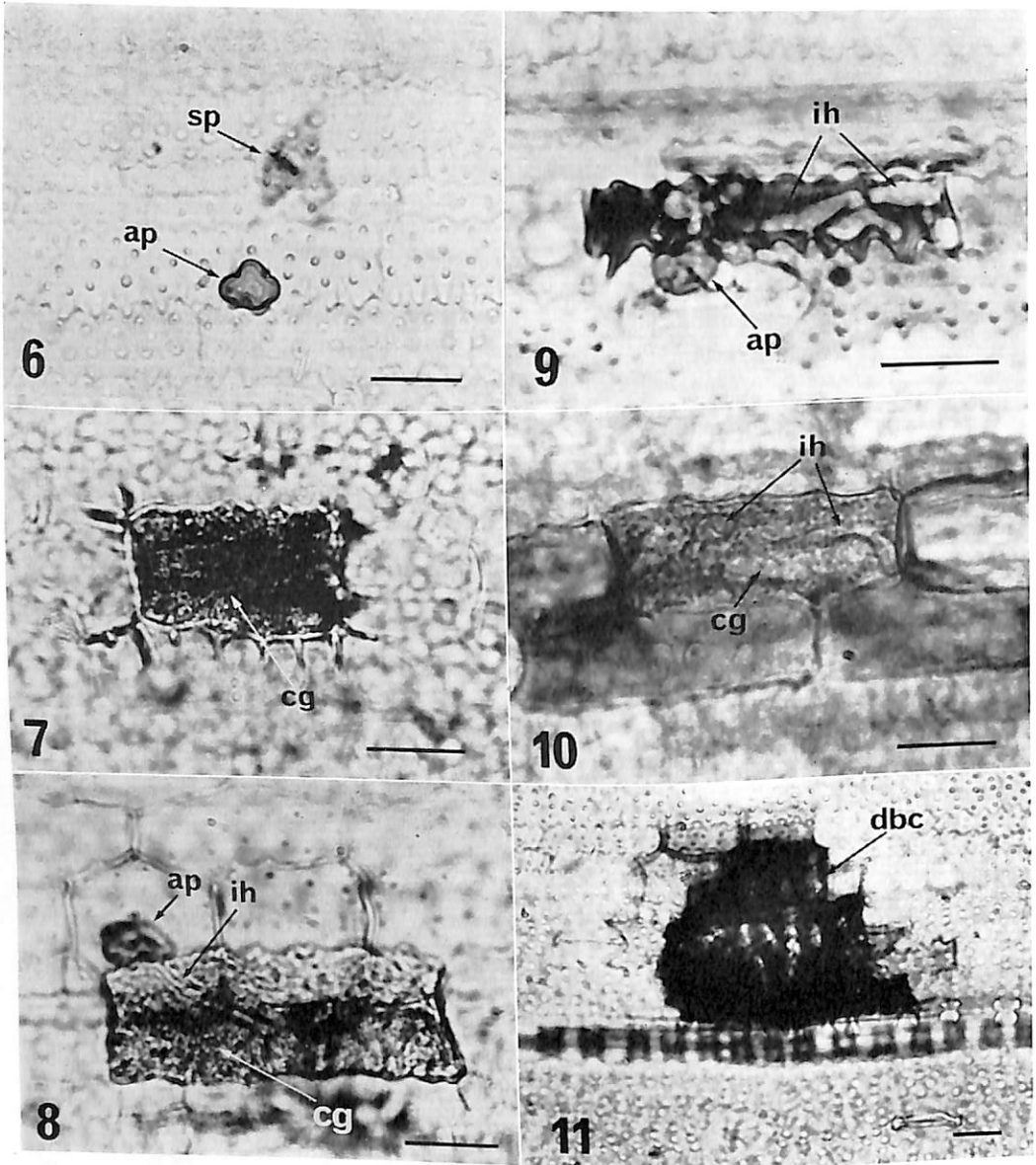
いもち病菌侵入に対するイネ葉身の細胞反応に関する研究^{2,3,4,9,10)}は、主としてパラフィン切片の顕微鏡観察によ

って行われてきた。しかし、パラフィン切片法による観察は、感染部位の切断面に限られることから、本菌の侵入率や菌糸長を算出することが困難であり、また観察できる感染部位数も限定される。したがって、既往の研究成果において次のような点は必ずしも明確にされているとは言い難い。(i)1感染部位(表皮細胞上の1付着器を1感染部位とみなす)あたりの、内容物の顆粒化した表皮細胞の出現率、(ii)この顆粒出現の有無と本菌侵入の成否や菌糸伸展との関係、(iii)表皮細胞内容物の顆粒化と柔細胞の褐変・壊死→褐点型病斑形成との関係。

パラフィン切片法による観察の欠点を補うため、吉野^{20,21)}はアルカリ処理ラクトフェノール法による観察法を開発し、本菌の侵入率や菌糸伸展の経時的变化を明らかにした。しかし、吉野²¹⁾はアルカリ処理が宿主細胞質を破壊するため、被侵入細胞反応の観察に当ってはこの方法が適当でないと記述している。Koga and Kobayashi³⁾はアルカリ処理ラクトフェノール法を改良した全葉透明化染色法を考案し、葉身上的個々の感染部位における本菌の侵入・伸展と、それらに対する葉身細胞反応との関係を顕微鏡観察することを可能にした。

この全葉透明化染色法を用いた本実験結果と既報の顕微鏡観察⁷⁾および顕微鏡観察の結果^{6,8)}から、上述した従来明確にされていない点は次のように考察される。

(i)不親和性組合せでは、表皮細胞内容物の顆粒化 (Fig. 3, A, B) が無反応型 (Fig. 3, N) を除くと感染部位のほとんどを占めていた (Figs. 4, 5, 7, 8)。



Figs. 6-11. Photomicrographs of infection sites in rice leaves inoculated with *Pyricularia oryzae* Cav. in the compatible combination of race 037 and var. Koshihikari (Figs. 9, 10, 11), and the incompatible combination of race 037 and var. Toride 1 (Figs. 6, 7, 8). Each bar in the micrographs represents 20 μ m.

- Fig. 6. Unsuccessful penetration without any host reaction 72 hr after inoculation.
 Fig. 7. Unsuccessful penetration with host cytoplasmic granules in an epidermal cell 72 hr after inoculation.
 Fig. 8. A poorly-developed invaded hypha with host cytoplasmic granules in an epidermal cell 144 hr after inoculation.
 Fig. 9. Well-developed invaded hyphae without host cytoplasmic granules in an epidermal cell 72 hr after inoculation.
 Fig. 10. Well-developed invaded hyphae with host cytoplasmic granules in an epidermal cell 72 hr after inoculation.
 Fig. 11. Deep browning of infected host cells 72 hr after inoculation.

Abbreviations

ap : appressorium, cg : cytoplasmic granules, dbc : deeply-browned cell, ih : invaded hypha, sp : spore.

しかし親和性組合せでは、この表皮細胞内容物の顆粒化 (Fig. 3. A, B) は低率でしか出現せず、その出現時期も不親和性組合せより12時間遅かった (Fig. 5)。以上のことは表皮細胞内容物の顆粒化が、特異的抵抗性発現と密接に関連していることを示唆する。

(ii) 表皮細胞内容物の顆粒は、親和性・不親和性の両組合せ間に侵入率・菌糸伸長の差異が見出される時期 (接種後48時間目) より12時間早く出現し、顆粒の出現部位では本菌の侵入・伸展は停止していた (Figs. 1, 2, 5)。このことも、顆粒の出現が特異的抵抗性の発現と密接に関連していることを支持する。

(iii) 既報の電顕観察^{8,9)}による知見から、不親和性組合せにおいて表皮細胞に侵入した菌糸の進展が、表皮細胞内で完全に阻止されずに、さらに柔細胞に侵入・伸展した場合、柔細胞の褐変・壊死→褐点型病斑の形成が起こると推察された。とりで1号の光顕観察による本実験の結果は電顕観察の結果⁹⁾と一致し、表皮細胞内容物の顆粒化は接種後144時間でも隣接表皮細胞に留まり、柔細胞の褐変・壊死→褐点型病斑形成へと進展することはほとんど認められなかった (Figs. 4, 5, 7, 8)。

以上のことから、とりで1号葉身の特異的抵抗性発現と密接に関連する細胞反応は、表皮細胞内容物の顆粒化であることが示唆される。この顆粒化がイネ葉鞘裏面表皮細胞で報告された宿主細胞の顆粒状変性^{1,10,11,12,13,14)}と同種のものであるか否かは、今後さらに追究する必要がある。

摘 要

とりで1号の特異的抵抗性発現に関与する葉身細胞の反応を知るため、全葉透明化染色法を用いて親和性組合せ (レース 037 と コシヒカリ) と不親和性組合せ (レース 037 と とりで1号) 間での、初期感染過程の比較観察を行った。

1. とりで1号の葉身における抵抗性発現は、侵入時と侵入菌糸の伸展時の2段階で起きていることが認められた。

2. とりで1号接種葉の葉身の細胞反応としては、無反応型と表皮細胞内容物の顆粒化とが感染部位のほとんどを占め、濃い褐変 (褐点型病斑形成を含む) が観察された感染部位は極めて稀であった。

3. 無反応型は親和性および不親和性組合せのいずれにおいてもほぼ同率で出現することから、特異的抵抗性発現との関連は少ないと考えられる。

4. 表皮細胞内容物の顆粒は接種後36時間目に出現し、顆粒の出現率は不親和性組合せにおいて親和性組合せより著しく高率で、この顆粒出現部位では本菌の侵入

・伸展は停止していた。

5. 以上のことから表皮細胞内容物の顆粒化が、とりで1号の特異的抵抗性の発現と密接に関連していると考えられる。

引用文献

- 1) 錠谷大節 (1959) 稻熱病抵抗性品種育成に関する植物病理学的研究, 葉イモチの進展抵抗性とその検定法並びに内外稲品種の抵抗性の遺伝について. 東北農試研報17: 1~101.
- 2) Hashioka, Y. (1950) Studies on the mechanism of prevalence of the rice blast disease in the tropics. Tech. Bull. Taiwan Agr. Res. Inst. 8: 1~237.
- 3) 鐙方末彦・松浦義・田口重良 (1931) 稻熱病ノ防除=関スル試験研究成績. 1. 稲品種ノ稻熱病抵抗性=関スル試験研究成績. 農事改良資料20: 1~140.
- 4) 河村栄吉・小野小三郎 (1948) 稻熱病に対する外国稲の抵抗性に関する研究. 農事試彙報4: 13~22.
- 5) Koga, H. and Kobayashi, T. (1980) A whole-leaf clearing and staining technique to observe the invaded hyphae of blast fungus and host responses in rice leaves. Ann. Phytopath. Soc. Japan 46: 679~681.
- 6) 古賀博則・小林尚志・堀野修 (1982) 親和性および不親和性組合せでのイネいもち病菌感染葉の電顕観察. I 侵入菌糸の観察. 日植病報48: 281~289.
- 7) 古賀博則・小林尚志 (1982) 親和性および不親和性イネ・いもち病菌組合せにおける葉身での初期感染過程の比較. 日植病報48: 506~513.
- 8) 古賀博則・堀野修・小林尚志 (1982) 不親和性いもち病菌の接種によって起こるイネ表皮細胞内容物の顆粒化の電顕観察. 日植病報48: 344.
- 9) 小野小三郎 (1952) イモチ病の防除と病斑の類型. 農業技術7: 24~26.
- 10) 大畑貫一・後藤和夫・高坂卓爾 (1963) Race の異なるいもち病菌に対するイネ品種の細胞反応の差異. 日植病報28: 24~30.
- 11) 坂本正幸 (1968) 水稻の稻熱病抵抗性に関する研究. 坂本教授還暦記念論文集1~139.
- 12) 高橋喜夫 (1956) 稻熱病抵抗性の機作 (II) 稻熱病抵抗に伴う寄主細胞の形体的変質. 山形大学紀要(農学)2: 37~51.
- 13) 富樫邦彦 (1962) 稲の葉鞘内面細胞におけるイモチ菌糸の伸び方について. II 大型菌叢についての観察. 新潟農林研究14: 25~31.
- 14) 富田啓文・山中達 (1981) 葉鞘裏面組織におけるいもち病菌感染細胞の病態変化. 日植病報47: 361~362.
- 15) 豊田栄・鈴木直治 (1952) 稻熱病斑の組織化学的研究 1. 同一品種上における病斑の進展と病斑上における孢子形成に関する研究. 日植病報17: 1~4.
- 16) 氏原光二・中西勇 (1953) 外国稲のイモチ

- 病耐病性に関する研究(第1報). 病斑型とそれの環境に依る変異. 愛知県農事試験報7:15~31. 17) Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K., and Watanabe, S. (1976) Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42:216~219.
- 18) Yokoo, M. and Kiyosawa, S. (1970) Inheritance of blast resistance of the rice variety, Toride 1, selected from the cross Norin 8 × TKM. 1. Japan. J. Breed. 20:129~132. 19) 吉井甫 (1937) 稻熱病に関する研究. III 病組織所見, 日植病報6:289~304. 20) 吉野嶺一 (1971) イネいもち病菌の葉身組織内菌糸の観察法. 北陸病虫研報19:14~17. 21) 吉野嶺一 (1972) イネいもち病菌の侵入に関する予察的研究. 1. イネ葉身内侵入率と菌糸伸展の経時変化. 北陸病虫研報20:4~9.

(1982年7月13日受領)