

同質遺伝子系統を用いた穂いもち真性抵抗性発現の病理解剖学的研究

古賀博則・三浦清之*

Hironori KOGA and Kiyoyuki MIURA*: Histopathology of *Pi-z'* mediated resistance to *Pyricularia oryzae* infection in rice panicle

Summary

The interaction of panicle tissues of rice containing the *Pi-z'* gene for resistance to blast fungi, *Pyricularia oryzae*, was examined by fluorescent microscopy and scanning electron microscopy. When the panicles at 5-10 days after heading were inoculated with spore suspension of *P. oryzae*, isolate Hoku 1 (rece 007), symptoms appeared in the primary branches, panicle axes and panicle necks of the susceptible line (ZTS), but in none of the resistant line (ZTR). However, symptoms appeared at the low percentages of panicle necks, primary axes and uppermost internode in the resistant line when spore suspensions of *P. oryzae* were injected into the panicles at a few days before heading. In the panicles neck showing white ears, invaded hyphae developed in the most of tissues of both resistant and susceptible lines, forming a plenty of conidiophores on the epidermis. Mesophyll cells were often disappeared due to the fungal digestion. On the other hand, in the small brown lesions of the panicles of the resistant line, invaded hyphae sparsely developed in the tissues, forming a small number of conidiophores on the epidermis, and cytoplasmic granules appeared in the collapsed cells. These cytoplasmic granules appeared in the resistant line, but not in the susceptible line and non-inoculated both lines.

イネの葉身では病原性を示さないいもち病菌レースが、穂では病原性を示す場合があり、抵抗性遺伝子型の組合せによって、抵抗性の様々な発現型が見られる⁹⁾。これはいもち病に対するイネの抵抗性が幼苗における葉身の病斑型によって判別されていることや、穂の形態が複雑なことがいもち病の発現に影響しているためと考えられる^{1,7,8,10)}。

筆者らは穂における真性抵抗性遺伝子の発現機構解明の一環として、葉身で全く病徴を示すことのないイネ・いもち病菌の組合せについて研究を行った。イネ品種間での穂のいもち病に対する抵抗性の比較では、出穂期を初めとして多くの遺伝的背景が異なる。このため本研究では、葉身で全く病徴を示すことのない抵抗性遺伝子 *Pi-z'* についての藤坂 5 号の同質遺伝子系統と感受性の同質遺伝子系統¹¹⁾を用いた。この両系統間で穂の生育段階と穂いもち抵抗性発現の比較観察を行い、それらの試料について蛍光顕微鏡および走査電子顕微鏡により病理解剖学的観察を行った。

本実験を行うにあたり、貴重なイネ種子を分譲して

いただいた農林水産省農業研究センター横尾政雄研究企画科長に対して感謝の意を表す。

材料および方法

イネいもち病菌菌株北 1 (レース 007) を、抵抗性遺伝子 *Pi-z'* についての藤坂 5 号の同質遺伝子系統 (ZTR) と感受性の同質遺伝子系統 (ZTS) の穂¹¹⁾に噴霧接種と注射接種の 2 種の方法で接種した。噴霧接種は 1×10^4 個/ml 濃度の孢子懸濁液に 0.02% の Tween 20 を添加して、出穂 5 ~ 10 日後の穂に噴霧し、接種したイネを $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の湿室に 24 時間保ち、その後ガラス室に置き、接種 18 日後に発病調査を行った。注射接種は穂ばらみ期の止葉葉鞘に噴霧接種と同一の孢子懸濁液を注射器で注入して行った。 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の湿室に 24 時間保ち、その後はガラス室に置き、接種 9 ~ 12 日後に発病調査を行った。淡黄色 ~ 灰白色の病斑を呈しているものを発病としたが、肉眼だけで本病による病徴と判定しがたい場合には、後述の蛍光顕微鏡観察法により本菌の孢子が形成されていることを確認した。なお、本報で出穂とは止葉葉節部より穂の先端穂が露出する状態に至ったことを示す。

病徴発現が認められた穂部を切り取り、蛍光色素カルコフルオールホワイトで染色後、分生子柄および分生子形成を蛍光顕微鏡下で観察した⁴⁾。蛍光顕微鏡下でい

農林水産省草地試験場 National Grassland Research Institute, Nishinasuno, Tochigi, 329-27

*農林水産省北陸農業試験場 Hokuriku National Agricultural Experiment Station, Joetsu, Niigata 943-01

第1表 出穂5～10日の穂にイネいもち病菌を噴霧接種した場合の穂の部位別の発病¹⁾

イネの系統	みご	穂くび	穂軸	一次枝梗	一穂あたりの白穂率
ZTR (抵抗性)	0/55 ²⁾	0/55	0/55	0/55	0%
ZTS (感受性)	0/64	1/64	8/64	44/64	10.3%

1) イネいもち病菌菌株北1を1989年8月25日に接種し、接種18日後に調査した。

2) 発病部位数/調査部位数

もち病菌の分生子柄および分生胞子形成が観察された穂組織を、グルタルアルデヒド・四酸化オスミウムで二重固定し、脱水後、100%エタノール中で凍結切断した⁹⁾。それらの試料を臨界点乾燥後、白金蒸着して電界放射型走査電子顕微鏡(日立S800)で検鏡した。

結 果

1. 出穂5～10日後の穂に噴霧接種した場合の穂の部位別の発病

接種18日後の発病は、ZTS(感受性系統)では一次枝梗で最も高く、調査した穂の約70%が発病した。次いで、穂軸が13%で、穂くびは1本のみで、みごでは発病は認められなかった。一穂あたりの白穂の占める割合は、10.3%であった(第1表)。穂での発病については、ここでは調査対象外とした。それに対して、ZTR(抵抗性系統)では一次枝梗、穂軸、穂くび、みごのいずれの部位でも発病は認められなかった。

2. 穂ばらみ期に止葉葉鞘に注射接種した場合の穂の部位別の発病

穂ばらみ期の葉鞘へのイネいもち病菌の注射接種については2反復実験を行い、第1回目の実験では接種9日後に、第2回目の実験では接種12日後に発病調査を行っ

た。その結果ZTS(感受性系統)では2回の実験ともに噴霧接種と比較して、みご、穂くび、穂軸での発病が著しく増加し、みごでの発病は調査穂の26～40%に、穂くびでは40～77%に、穂軸では60～83%認められ、一穂あたりの白穂も70.7～88.3%と高率であった(第2表)。

一方、ZTRではみごの発病はなかったが、穂くびでの発病は調査穂の6～7%、穂軸では4～8%と低率ながら認められ、白穂率も2～8%あった。穂くびが発病したものでは、第1図に示すように穂くびより上部が完全に白穂となるものが出現し、この穂くび部分を蛍光顕微鏡で観察すると、いもち病菌の分生子柄と分生胞子が多量に形成されているのが認められた(第3図)。また、穂によっては第2図のように病徴幅が1-2mmの細長い褐変・壊死斑で進展を停止しているものが認められた。この部位も蛍光顕微鏡で感染すると、少量ではあるがいもち病菌の分生子柄形成が認められた。しかし、分生胞子の形成は全くない場合が多く、形成していても極めてわずかであった。

3. 穂いもち感染部位の走査電子顕微鏡による観察

穂ばらみ期に葉鞘に注射接種した穂くびを、接種10日後に凍結切断し、その切断面を走査電子顕微鏡で観察した。無接種の穂くびは、表皮細胞の内側に厚膜細胞組織

第2表 穂ばらみ期の止葉葉鞘内にイネいもち病菌を注射接種した場合の穂の部位別の発病¹⁾

実験区	イネ系統	みご	穂くび	穂軸	一穂あたりの白穂率
I	ZTR	0/43 ²⁾	3/43	2/42	2.4%
	ZTS	17/42	31/40	6/10 ³⁾	88.3%
II	ZTR	0/100	6/100	8/100	7.6%
	ZTS	11/43	15/37	25/30	70.7%

1) 実験Iでは1989年8月19日に接種し、接種9日後に調査した。実験IIでは1989年8月22日に接種し、接種12日後に調査した。

2) 発病部位数/調査部位数

3) みごあるいは穂くびが発病し、それより上部が白穂となっており、穂軸での発病が確認できない穂については穂軸での発病調査の対象外としたため、調査穂数が少ない。

が、さらにその内側には柔細胞組織が、柔細胞組織の間には小維管束の環列が、小維管束のさらに内側には大維管束が認められた(第4図)。

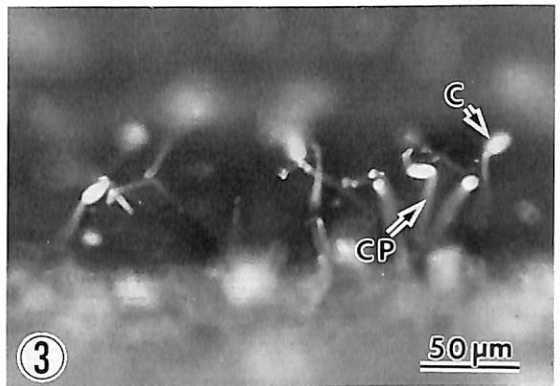
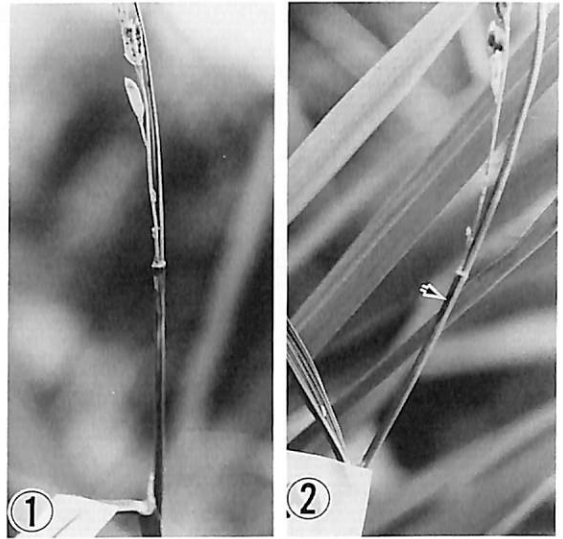
ZTS(感受性系統)の白穂を呈している穂くびでは、いもち病菌は穂くびのほとんどの組織で蔓延しており、柔細胞組織の細胞は崩壊・消失していることが多かった。

ZTR(抵抗性系統)でも白穂を呈した穂くび(第1図)の断面を走査電子顕微鏡で観察すると、第5、6図に見られるようにほとんどの組織で本菌が蔓延しており、宿主細胞の細胞質は消失していた(第5図)。同じZTRでも第2図のように穂くびに褐変・壊死斑が認められた部位では、いもち病菌の分生子柄が蛍光顕微鏡下で観察されたが、その数は白穂の場合に比べて極めて少なかった。この穂くびの断面を走査電子顕微鏡で観察すると、本菌の侵入菌糸が疎らに伸展しているのが観察され、無接種組織や白穂の組織には観察されなかった顆粒が宿主細胞内に認められた(第7図)。

考 察

非親和性いもち病菌レースを出穂前の穂ばらみ期の止葉葉鞘に注射接種した場合、イネ品種シモキタ(抵抗性遺伝子 $Pi-a$ と $Pi-ta$ をもつ)、フクニシキ($Pi-z$)、石狩白毛($Pi-i$)などでは穂の大部分が白穂となることが報告されている^{7,8,10)}が、本実験で $Pi-z$ 遺伝子を持った系統ZTRでも北1菌株に対してほぼ同様の現象が起こることが示された。本実験でZTRでは出穂後5~10日の穂に非親和性菌レース北1菌株を噴霧接種しても発病は認められなかったことから、さらに出穂後の経過日数と穂くび・みご・穂軸での発病を詳細に追究した結果、出穂の極く初期ほど穂は発病し易く、出穂後日数が経過するにつれて急速に発病しなくなることが明かとなった⁶⁾。

出穂の極く初期では穂組織が非親和性菌レースに対して感受的である理由として、この時期では穂組織が物理的に柔らかいため本菌は容易に侵入でき菌糸の蔓延も速いことが考えられる。しかし、いもち病菌の表皮細胞の細胞壁貫通までは、ZTR・ZTS間で差異は認められなかった⁵⁾ことから、上記のことよりも出穂の極く初期では宿主細胞の抵抗性発現が十分でないため、本菌の侵入・伸展を阻害できないものと推察される。実際に、ZTRの穂ばらみ期の穂くびで褐変・壊死斑が出現したことは、このことを支持している。すなわち、ZTRは葉身では非親和性菌レース北1菌株の接種に対して表皮細胞で過敏反応を起こし無病徴しか呈しない³⁾が、フクニシキのように本菌の菌糸が柔組織まで伸展する場合には褐点病斑を生ずる²⁾。本実験で観察された穂くびの褐変・壊死斑では葉身の褐点病斑の場合と同様に、褐変化した柔細胞内に多数の顆粒が形成され、菌糸は伸展してはいるもの

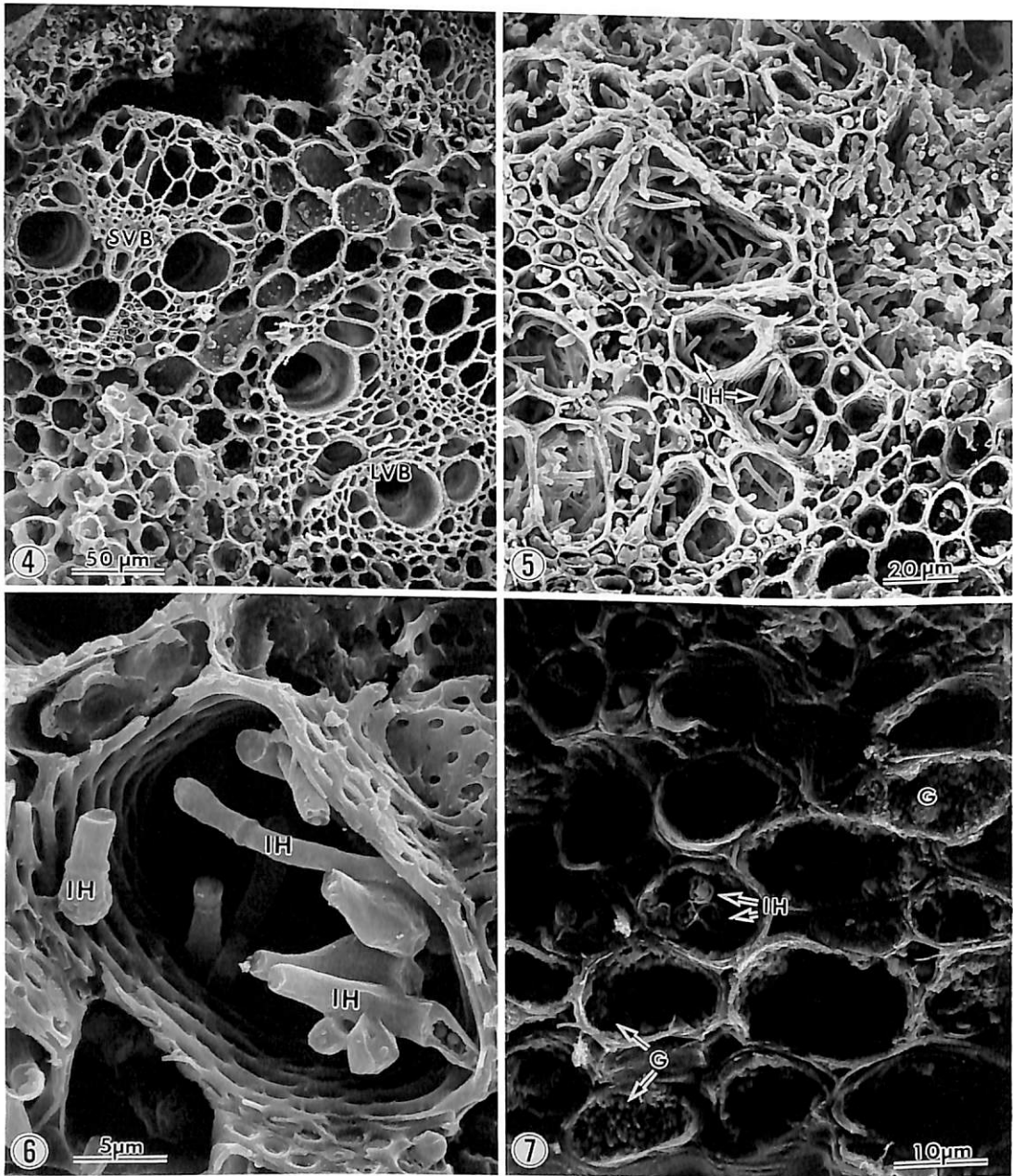


第1、2図 抵抗性系統ZTRの穂ばらみ期の止葉葉鞘内に、非親和性いもち病菌菌株北1の注射接種を行ない、接種10日後に見られた穂くびの病徴。

第1図 穂くびいもちによって穂は完全に白穂となっている。

第2図 穂くび節の下に幅1~2mmの褐変・壊死斑が見られる(矢印)。

第3図 抵抗性系統ZTRの穂くび上に形成されたイネいもち病菌の分生子柄(CP)と分生子(C)の蛍光顕微鏡写真。



第4-7図 抵抗性系統ZTRの穂くび断面の走査電子顕微鏡写真。

第4図 無接種の穂くび。LVB：大維管束，SVB：小維管束。

第5，6図 接種10日後の穂くび（第1図の穂くびの断面）。IH：侵入菌糸

第7図 接種10日後の穂くび（第2図の穂くび褐変・壊死部の断面）。G：顆粒状物質

の疎らであることが本電顕観察によって明かとなった。今後、これらの細胞内顆粒の形成過程などの宿主細胞反応と菌糸伸展阻害との関係をさらに詳細に追究する必要がある。

摘 要

抵抗性遺伝子 $Pi-z'$ についての藤坂 5 号の同質遺伝子系統 (ZTR) と感受性の同質遺伝子系統 (ZTS) 間で、穂いもち抵抗性発現の比較観察を行った。

1. 出穂 5～10 日後の穂にイネいもち病菌菌株北 1 (レース 007) を噴霧接種した結果、ZTS (感受性系統) では一次枝梗・穂軸・穂くびでは発病が認められたが、ZTR (抵抗性系統) では一次枝梗・穂軸・穂くび・みごのいずれの部位でも発病は認められなかった。
2. 穂ばらみ期の葉鞘へイネいもち病菌を注射接種した結果、ZTS (感受性系統) では噴霧接種と比較して、発病が著しく増加した。一方、ZTR では穂くび・穂軸・みごでの発病が低率ながら認められ、穂によっては完全に白穂となるものや褐変・壊死斑を呈するものが出現した。
3. ZTS (感受性系統) と ZTR (抵抗性系統) の白穂を呈している穂くびの断面を走査電子顕微鏡で観察すると、ZTS・ZTR ともにいもち病菌は穂くびのほとんどの組織で蔓延しており、柔細胞組織の細胞は崩壊・消失していることが多かった。同じ ZTR でも穂くびに褐変・壊死斑が認められた部位では、いもち病菌の分生子柄が少数ながら蛍光顕微鏡下で観察された。この穂くびの断面を走査電子顕微鏡で観察すると、本菌の侵入菌糸が疎らに伸展しているのが観察され、無接種組織や白穂の組織には観察されなかった顆粒が宿主細胞内に認められた。

ち病の伝染環における二次伝染源としての穂いもちの意義について。東北農研報 39: 33～54。

- 2) 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 1. 侵入菌糸の観察・日植病報 48: 281～289。
- 3) Koga, H. (1988). Ultrastructure of compatible and incompatible reactions of rice to *Pyricularia oryzae* Cav. 5th International Congress of Plant Pathology Abstracts of Papers, Kyoto, Japan, 1988, 20～27, p239.
- 4) 古賀博則・吉野嶺一 (1988) 蛍光色素による穂いもち感染部位の染色。日植病報 54: 229～232。
- 5) 古賀博則 (1990) 穂へのいもち病菌の侵入・伸展過程の電顕観察。日植病報 56: 360 (講要)。
- 6) 古賀博則・三浦清之 (1990) 出穂後の経過日数と穂いもち抵抗性。日植病報 56: 360 (講要)。
- 7) 進藤敬助・柳田騏策 (1966) いもち病菌型に対する穂いもち抵抗性。北日本病虫研報 1. 17: 36。
- 8) 進藤敬助 (1980) イネのいもち病と抵抗性育種。博友社, V. 葉いもち抵抗性と穂いもち抵抗性。303～321。
- 9) 田中敬一・永谷 隆 (1980) 図説走査電子顕微鏡—生物試料製作法—。朝倉書店, 東京, 282pp。
- 10) 山中 達・進藤敬助・柳田騏策 (1970) いもち病菌の菌糸に関する研究。1. 葉身以外の部位を侵害しているいもち病菌の病原性。東北農試研報 39: 1～10。
- 11) Yokoo, M. (1983). Near-isogenic lines of rice with respect to a $Pi-z'$ gene for resistance to blast disease. Japan. J. Breed. 33: 341～345。

(1991年7月31日受領)

引用文献

- 1) 加藤 肇・佐々木次雄・越水幸夫 (1970) イネいもち