

## イネいもち病の感染機作と抵抗性

古賀博則・中谷内修

Hironori KOGA and Osamu NAKAYACHI:

Studies of pathogenesis and resistance in rice blast disease in Hokuriku District

### はじめに

北陸地域においていもち病は稲作農家にもっとも恐れられている病害の一つで、歴史的にも本病の大発生が大凶作の原因となったことが記載されている<sup>25)</sup>。この疾病による被害を最小限に止めるため、発生予察、防除それに抵抗性品種の育種など様々な方面から研究が行われてきた。これらの研究を行う上でもっとも基本的で、重要であると考えられるのが、いもち病菌のイネ体への感染過程とそれに対する宿主抵抗性反応についての知見である。これまで、本病菌とイネとの接触場面の研究成果は、北陸地域で解明された部分が少なくない。ここでは北陸地域で明らかにされた研究成果と、現在進行中の研究内容、それに今後に残された問題点と将来展望について述べる。

### 1. 病斑および細胞反応の形態学的研究

いもち病斑には甚だしく性質を異にする型のあることは、かなり古くから知られていたが、小野<sup>31)</sup>はこれを褐点型、白点型、慢性型、および急性型の4種に大別し、その各々形態、孢子形成能力などを明らかにすると共にそれらの現れる品種、環境などを明らかにした。その中でも、いもち病の典型的病斑である慢性型病斑は外側から中毒部、壊死部、崩壊部からなっているのに対し、抵抗性品種では病斑は微細点状に止まり拡大することではなく、崩壊部はなく壊死部と中毒部からなっていること、また本病菌の侵入に対する宿主細胞反応は抵抗性品種では速やかに起きるのに対し、感受性品種では遅れて起きることを解剖学的研究により明らかにした<sup>4,31)</sup>。

### 2. 濡れの時間と侵入率

吉野<sup>37,38)</sup>はいもち病菌の密度変動に気象条件がどのように関わるか明らかにするために、イネ体上における本病菌の動態を顕微鏡レベルで追跡した。この研究は、圃場での本病の発生状況を予測する基礎データを得るものである。本病の発生にとって最も重要なポイントの一つが

本病菌のイネ体への侵入である。吉野<sup>37,38)</sup>は、イネ葉身内に侵入した菌糸の観察方法を開発することにより、葉身へのいもち病菌の侵入率には葉面の濡れの時間の長さが密接に関わっており、両者の関係は温度条件によっても異なることを明らかにした。これらの成果は、実際の圃場でのいもち病菌の侵入率を推定するときの必要不可欠な基礎データとなっており、その後、コンピューターを利用した発生予察のシミュレーションモデルの開発へとつながっていったことは周知の通りである。

### 3. イネいもち病菌の感染と宿主抵抗反応の全葉透明化法による観察

いもち病抵抗性が、侵入前である孢子の発芽、付着器形成の段階ですでに起きているかどうかを明らかにするために、発芽管と付着器を蛍光色素で染色して観察する方法で、判別9品種について実験がおこなわれた。その結果、これらの品種間では発芽率、付着器形成率に差異は認められなかったことから、イネ体への侵入前には抵抗性は発現されていないと結論づけられた<sup>6)</sup>。

いもち病菌の侵入を受けたイネ細胞の反応は、パラフィン切片の光学顕微鏡による観察が主であった<sup>4,31)</sup>。しかし、パラフィン切片では切片作製に時間がかかり、感染部位の観察が限定されるなどの問題がある。そこで、接種葉全体を透明化して、感染部位を観察するための全葉透明化法が考案された<sup>12,37)</sup>。この方法で、無病徴を呈するとりで1号(Pi-z)では、侵入を受けた表皮細胞は過敏感壊死反応である顆粒化を起こし、菌糸の伸展が最初に侵入した表皮細胞内で阻止されていることが明らかにされた<sup>11)</sup>。褐点病斑を呈するフクニシキ(Pi-z)でも表皮細胞に侵入したほとんどの菌糸は宿主の顆粒化反応によって最初に侵入した表皮細胞内で伸展を阻害されてしまうのに対し、ごく一部だけが柔組織に伸展して褐点病斑となることが明らかとなった<sup>13)</sup>。褐点病斑では侵入菌糸は奇形となりながらも伸展していることが、この部位の透過電顕観察によって明らかにされ

た<sup>15)</sup>。

#### 4. いもち病菌の侵入過程の電顕観察

いもち病菌のイネ体への侵入終了後の電子顕微鏡観察はすでにHashioka et al.<sup>2)</sup>によって報告されていたが、侵入開始時からの経時的観察の報告はなかった。Koga<sup>7-10,11)</sup>は、いもち病抵抗性遺伝子*Pi-z'*の同質遺伝子系統であるZTRとZTSを電顕観察することにより、両系統ともに付着器の底部中央からの突出部がクチクラ層を物理的な圧力で貫通し、酵素による分解により細胞壁を貫穿して侵入していく過程を明らかにした。また、抵抗性系統のZTRで宿主細胞の過敏感壊死が起きる時期と、感受性系統のZTSで表皮細胞内に細胞壁沈積物 (wall apposition) が形成される時期が、共にクチクラ層を貫穿した後の細胞壁の貫通時期であることから、この時期がを*Pi-z'* 遺伝子の最初の発現時期であると推定された。さらに、この時期にZTRでは過敏感壊死を、ZTSでは細胞壁沈積物の形成を誘導するシグナルが出ていることが推測された<sup>7)</sup>。

#### 5. 穂へのいもち病菌の侵入および蔓延過程の解明

穂へのいもち病菌の感染は被害に直結するために重要であるにもかかわらず、穂は形態が複雑で組織が硬いことなどから、本菌がどのような方法で侵入するか諸説があり、これまで納得いく結果が得られているとは言えなかった。そこで、Koga<sup>8,11)</sup>は穂首と籾にいもち病菌を接種し、その侵入過程を電顕観察し、ともに表皮細胞のクチクラ層と細胞壁を貫通して表皮細胞内に侵入する「クチクラ感染」であることを明らかにした。穂首や籾などの硬い組織の超薄切片の作製は、Park et al.<sup>34)</sup>が、硬い細胞壁で知られている*Alternaria*の胞子の超薄切片作製のために開発した固定・包埋法を応用することによって初めて可能であった。

圃場での穂いもちの発病過程の調査の結果、穂いもちの発病過程には籾から二次枝梗、一次枝梗、穂軸そして穂全体が枯れていく場合と、先に穂首や穂軸あるいは枝梗が感染し、それから先の部分が枯死していく、いわゆる「枯れ下がり」とが認められた<sup>22)</sup>。穂いもちの肉眼だけの観察だけでは、いもち病菌以外の穂枯れ菌による症状と区別が付きにくいいため、この圃場での試料は、蛍光色素カルコフルオールホワイトによる染色後、蛍光顕微鏡によっていもち病菌による発病であるか否かが確認された<sup>22)</sup>。また、同上の組織におけるいもち病菌の感染状態を電顕観察した結果、分生子柄および分生子の形成が、穎の小穂軸と護穎の隙間、二次枝梗が一次枝梗から分岐する隙間、穂軸から一次枝梗が分岐する隙間、穂首

から枝梗が分岐する隙間あるいは苞葉の部分などに頻繁に認められた<sup>21,23,24)</sup>。これらの部位は、小野・鈴木<sup>33)</sup>がいもちの感染を受けやすいところとして指摘している箇所、いずれも水滴が留まり易く、いつまでも乾燥しにくいという共通点がある。したがって、これらの部位は、感染の温床となり、多量の胞子を形成していることが多く、伝染源となっていることが指摘されている<sup>16,21-24)</sup>。

#### 6. 非切断葉鞘裏面接種法の開発

全葉透明化法は、葉身での本菌の侵入・伸展とそれに対する宿主細胞反応を広範囲に観察できるという利点があるが、葉身を透明化するために化学処理や煮沸など種々の処理を行う必要がある。そのため、生きた状態での両者の関係を把握することは不可能である。また、濃く褐変した病斑部位での侵入菌糸の観察はきわめて困難である。この点、従来の葉鞘裏面接種法 (以下、従来法と呼ぶ) は、菌も宿主も無処理で観察できるために、両者の相互作用を生きた状態で追跡できるという利点がある。しかし、従来法での本菌の伸展と宿主反応は、葉身でのそれとがかなり異なることが指摘されている<sup>32)</sup>。このため、本菌の感染とそれに対する宿主細胞反応が葉身の場合と同様に起きて、その感染部位を従来法と同じく無処理で観察できる非切断葉鞘裏面接種法 (以下、非切断接種法と呼ぶ) が考案された<sup>17)</sup>。

従来法では葉鞘部分を植物個体から切り取って葉鞘裏面に胞子懸濁液を注射接種するのに対し、この新しい非切断接種法では、葉身と根を残したままの状態接種するという点が異なる。感受性品種での実験で、従来法では宿主抵抗反応が少なく侵入菌糸が一様に伸展するのに対し、非切断接種法では菌糸伸展の種々の段階で宿主の褐変反応がおきるため、種々の程度で伸展が停止している菌糸が大部分で、残りの一部の菌糸のみが病斑を形成するまで伸展するのが認められた<sup>18)</sup>。このような侵入菌糸の伸展のパターンは、葉身での菌糸の伸展の状況と類似している。また、イネの生育ステージや体質の違いが、本菌伸展と宿主反応の違いに反映された<sup>19)</sup>。これらの結果は、非切断接種法が従来法に比べて、より葉身に近い状態にあることを示している。種々の真性抵抗性の発現についても、非切断接種法で観察が行われたが、侵入菌糸の伸展と宿主細胞反応は従来法と非切断接種法とで顕著に異なることはなかった<sup>18)</sup>。このことから、真性抵抗性は切断した葉鞘組織でも同様に発現するのに対し、生育ステージや体質の違いによる抵抗性は個体から切り離すと発現しにくくなることが考えられる<sup>18,19)</sup>。

## 7. 抵抗性細胞反応に関与するリポキシゲナーゼ活性

いもち病菌の感染に対して自家蛍光を発生し過敏感壊死反応を起こしているイネ細胞では、抗菌活性を持つ物質が蓄積していると考えられ<sup>7</sup>、本菌の生育を阻害する酸化型不飽和脂肪酸がイネ葉身から単離、同定されている<sup>3)</sup>。これらの抗菌性酸化型不飽和脂肪酸は、その構造から、いずれもリポキシゲナーゼが関与する経路によって生合成されると考えられている。これまでの研究により、イネいもち病抵抗性にイネリポキシゲナーゼが関与していることが示唆されているが、細胞反応との関係やその局在性など不明な点が多く残されており、筆者らの研究室では、これらの点を明確にすることを目的に研究を行っている。

上記の非切断葉鞘裏面接種法を用いて、高度抵抗性、中程度抵抗性および感受性イネにおいて、リポキシゲナーゼ活性と宿主の細胞反応を調べると、抵抗性は感受性に比べて活性の増大と細胞反応の開始時間が非常に速く、また、抵抗性でも、抵抗性の強いものは弱いものに比べてより早期に活性の増大と反応細胞の増加が認められた<sup>28,29)</sup>。これらの結果は、いもち病に対して種々の真性抵抗性遺伝子をもつイネにおいて、宿主細胞の抵抗反応の出現とリポキシゲナーゼ活性の変動との間に密接な関係があることを示している。

一方、リポキシゲナーゼの局在性については、その代謝産物の組織レベルでの局在性がある程度明らかにされた<sup>27)</sup>。しかし、リポキシゲナーゼタンパク質、およびその遺伝子発現の局在性については明らかでない。イネのいもち病抵抗性におけるリポキシゲナーゼの役割をさらに明確にするために、*in situ* hybridization 法や免疫電顕法を用いてこれらの局在性を明らかにする必要があると考えている。また、抵抗性の発現に関与するリポキシゲナーゼには複数のアイソザイムが存在し、それらは抵抗性発現過程の異なる場面で機能していると予想される<sup>26)</sup>。今後、それぞれのアイソザイムの役割を明らかにする必要がある。さらに、リポキシゲナーゼ活性と圃場抵抗性との関連が示唆されていることから<sup>30)</sup>、圃場抵抗性品種においても、上記の観点からさらに詳細な研究を行う必要があると考える。

## 8. 今後に残された問題と将来展望

いもち病菌に対するイネの抵抗性は大きく分けて、品種の抵抗性遺伝子による抵抗性と、体質の違いによる抵抗性によるものに分けられる。品種による抵抗性には主働遺伝子による真性抵抗性とポリジーンによる圃場抵抗性とがある。体質の違いによる抵抗性とはイネの生育ステージ、窒素や珪酸などの施用量、栽培法の違い、栽

培期間中の温度、光などの条件によって影響を受ける抵抗性である。抵抗性誘導性農薬や虫の食害などによる誘導抵抗性も広義には、これに含めることができよう。

細胞学的には、先に述べた非切断葉鞘裏面接種法の考案により主働遺伝子については、ほぼ明らかにできた<sup>18)</sup>が、圃場抵抗性と体質の違いによる抵抗性についての研究は、現在進行中である<sup>19)</sup>。いもち病菌に対して抗菌活性をもつファイトアレキシンについては、ジテルペン系およびフラバン系など多種の物質が同定されている<sup>1)</sup>が、上記の種々の抵抗性のどの時期にどのように作用しているのか、またその誘導機構はどのようになっていくのか、すでに一部の抵抗性については解明されつつあるが、まだ大部分は今後の研究に委ねられている。

最近特に、いもち病抵抗性に関わる分子生物学的研究が進み、*JAmyb*, *PBZ1*, *Rac*, *RPR10*, *RC11*などの遺伝子やPR1, PR2, PR3, PR10などの病原性関連タンパク質など遺伝子産物の研究が多数報告されている<sup>35)</sup>。また、感染防御関連遺伝子も多数見出し出されつつある<sup>5,36)</sup>。現在のところ、いずれの研究も緒についた段階である。今後、上記の種々の抵抗性発現において、どのようにして遺伝子および遺伝子産物が誘導され、宿主細胞反応として発現し、本菌の伸展を抑制するのか、*in situ* レベルでの発現機構の解明が期待される。

## 引用文献

- 1) 赤塚尹巳・児玉 治 (1997) 15. イネのファイトアレキシン—化学構造, 生合成, 動的防御機構. 植物病害の化学 (市原耿民・上野民夫編), 156-164, 学術出版センター, 東京.
- 2) Hashioka, Y., Ikegami, H. and Murase, T. (1968) Fine structure of the rice blast. III. The mode of invasion of *Pyricularia oryzae* into rice epidermal cells. Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. 26: 23-30.
- 3) 加藤忠弘・山口仁宏・上原忠夫・生井恒雄 (1985) イネのいもち病抵抗性と酸化型不飽和脂肪酸. 化学と生物 24: 183-188.
- 4) 河村栄吉・小野小三郎 (1948) 稲熱病に対する外国稲の抵抗性に関する研究. 農事試験報 4: 13-22.
- 5) Kim, S., Ahn, I. and Lee, Y. (2001) Analysis of gene expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. Mol. Plant-Microb. Interact. 14: 1340-1346.
- 6) 古賀博則 (1983) 親和性および不親和性組合せのイネ葉身上におけるいもち病菌 (*Pyricularia oryzae* Cav.) の胞子発芽率と付着器形成率. 北陸病虫研報

- 31 : 7-12
- 7) Koga, H (1994). Hypersensitive death, autofluorescence, and ultra-structural changes in cells of leaf sheaths of susceptible and resistant near-isogenic lines of rice (*Pi-z'*) in relation to penetration and growth of *Pyricularia oryzae*. *Can. J. Bot.* 72 : 1463-1477.
- 8) Koga, H. (1994). Electron microscopy of early infection processes in the panicle neck of rice inoculated with *Pyricularia oryzae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 60 : 89-98.
- 9) Koga, H. (1995). An electron microscopic study of the infection of spikelets of rice by *Pyricularia oryzae*. *J. Phytopathology* 143 : 439-445.
- 10) 古賀博則 (1997) いもち病の感染機作と抵抗性発現. いもち病-研究と防除 (内藤秀樹・八重樫博志編), 48-54, 日本バイエルアグロケム, 東京.
- 11) Koga, H. (2001) Cytological aspects of infection by the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. Sreenivasapasad, S. and Johnson, R (eds.) Major Fungal Diseases of Rice Recent Advances, Prof. Manibhushan K. Rao Festschrift, 87-110, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 古賀博則・小林尚志 (1982) 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. *北陸病虫研報* 30 : 12-18.
- 15) 古賀博則・小林尚志・堀野 修 (1982) 親和性および不親和性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.
- 16) 古賀博則・小林尚志・吉野嶺一 (1988) 自然感染による穂いもち発生と気象要因. *北陸病虫研報* 36 : 1-5.
- 17) 古賀博則・中谷内 修 (1997) イネいもち病抵抗性発現のための非切断葉鞘裏面接種法について. *日植病報* 63 : 507.
- 18) 古賀博則・中谷内修 (2000) 非切断葉鞘裏面接種法によって接種したいもち病菌の侵入・伸展とそれに対するイネ細胞の反応. *日植病報* 66 : 282.
- 19) 古賀博則・中谷内修 (2002) いもち病菌の感染に対するイネの個体素因の非切断葉鞘裏面接種法による細胞学的解析. *日植病報* 68 : 165.
- 20) 古賀博則・吉野嶺一 (1988) 蛍光色素染色による穂いもち感染部位の観察. *日植病報* 54 : 229-232.
- 21) 古賀博則・吉野嶺一 (1990) 穂いもちにおける分生子柄形成部位の走査電子顕微鏡による観察. *北陸病虫研報* 38 : 3-8.
- 22) 古賀博則・吉野嶺一 (1991) 自然感染による穂いもち病伸展過程について. *北陸病虫研報* 39 : 11-15.
- 23) 古賀博則・吉野嶺一 (1991) 穂いもち自然感染部位の微細構造. *北陸病虫研報* 39 : 17-22.
- 24) 古賀博則・吉野嶺一 (1991) 稈いもち自然感染部位の微細構造. *北陸病虫研報* 39 : 23-28.
- 25) 茂木静夫・吉野嶺一 (1977) 新潟県におけるいもち病発生の古い記録について. *北陸病虫研報* 25 : 96-97.
- 26) 中谷内修・古賀博則 (1998) いもち病菌を接種したイネ葉鞘において感染特異的に発現するリポキシゲナーゼのアイソザイム分析. *日植病報* 64 : 350.
- 27) 中谷内修・古賀博則 (2000) いもち病菌を接種したイネ葉鞘裏面組織におけるリポキシゲナーゼ代謝産物の *o*-dianisidine による検出. *日植病報* 66 : 114-115.
- 28) 中谷内修・古賀博則 (2001) イネいもち病真性抵抗性反応とリポキシゲナーゼ活性の変動. 第53回北陸病害虫研究会講演要旨集 p.10.
- 29) 中谷内修・白野由美子・柴田大輔・古賀博則 (1997) いもち病抵抗性遺伝子 *Pi-z'* の同質遺伝子系統におけるリポキシゲナーゼ活性とその遺伝子発現. *日植病報* 63 : 507.
- 30) Namai, T., Kato, T., Yamaguchi, Y. and Togashi, J. (1990) Time-course alternation of lipoxygenase activity in blast-infected rice leaves. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 56 : 26-32.
- 31) 小野小三郎 (1953) 稲熱病及び稲小粒菌核病に関する形態学的研究. *北陸農業研究* 2 : 1-77.
- 32) Ono (1963) Principles, methods, and organization of blast disease forecasting. The rice blast disease. Proceedings of a symposium at the International Rice Research Institute. 173-194. The John Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
- 33) 小野小三郎・鈴木穂積 (1960) 稲熱病及び稲小粒菌核病の発生機作並びに発生生態に関する研究. 農林省振興局植物防疫課, 病害虫発生予察特別報告 4 : 1-156.

- 34) Park, P., Ohno, T., Nishimura, S., Tanabe, K., Kohmoto, K. and Otani, H. (1990) Improved fixation and embedding methods for electron microscopy of *Alternaria alternata* spores. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 56 : 16-25.
- 35) Song, F. and Goodman, R. M. (2001). Molecular biology of disease resistance in rice. Physiol. Mol. Plant Pathol. 59 : 1-11.
- 36) Xiong, L., Lee, M. and Yang, Y. (2001). Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. Mol. Plant-Microb. Interact. 14 : 685-692.
- 37) 吉野嶺一 (1972) イネいもち病菌の侵入に関する予察的研究. I. イネ葉身内侵入率と菌糸伸展の経時的変化. 北陸病虫研報 20 : 4-9.
- 38) 吉野嶺一 (1979) いもち病菌の侵入に関する生態学的研究. 北陸農試報 22 : 163-221.
-