

イネいもち病の細胞学的研究

I. いもち病菌の感染と発病

古賀博則

Hironori KOGA:

Cytological aspects of infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*

I. Pathogenesis

はじめに

いもち病はわが国をはじめ世界各地の稲作農家でもっとも恐れられている病害の一つである。それによる多大な被害を免れるために、発生態態に基づいた発生予察、抵抗性品種の育成そして防除薬剤の開発が行われてきた。

最近、イネの全DNA配列の読み取りがほぼ完了し、それに引き続きいもち病菌の全DNA配列の読み取りも完了した。このように、植物病原菌と宿主植物ともにゲノムが解析されているため、イネいもち病は植物-植物病原菌相互反応研究のモデル系となっている。このことも相まって、現在イネいもち病を用いた病原性および抵抗性の分子遺伝学的研究が世界中で精力的に推進されている。

これらの研究、事業の基礎となるのは、いもち病菌がイネ体に付着後、侵入・伸展して病斑・病徴を形成する過程、およびそれに対するイネ細胞の抵抗反応である。この過程はきわめて微細であるため、光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察が不可欠である。

ここでは、いもち病菌の感染から発病にいたる過程について述べる。

1. 胞子のイネ体表面への付着過程

イネ葉身や穂の病斑部で形成されたいもち病菌の胞子は成熟すると、離脱し、空中を飛散して、一部はイネ体の上に落下する。イネ葉身上の胞子は落下初期には、降雨が5 mm/時間より多くなると、病斑数が減少するという結果が得られている¹。このことから、胞子自体はイネ体にしっかりと付着するようにはできていないと考えられる。実際に、イネ葉身にいもち病菌を接種し、胞子の落下率を蛍光顕微鏡下で計測した実験では、接種直後

はほとんど胞子が落下するという結果が得られた¹⁸。接種30分後以降になると、胞子先端の発芽のための裂開部から多糖を含む粘質物が放出され、この物質によって胞子が人工膜表面に付着することが報告されている¹。

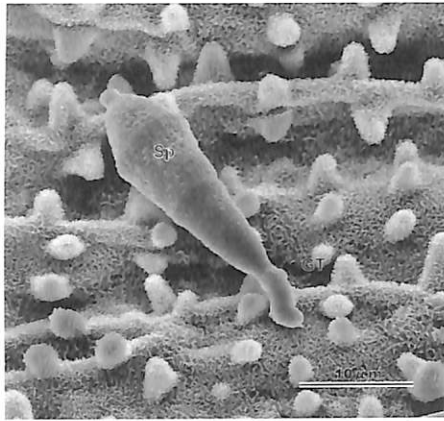
しかし、イネ葉身の表面構造は人工膜とはきわめて異なっていると考えられた。そこで、胞子の葉身への付着過程が蛍光顕微鏡と走査電子顕微鏡で観察された。その結果、葉身の表皮には凹凸があり、さらにその表面には高さ2~4 μmのいぼ状突起が散在しているため、発芽直後（接種1時間後）では発芽管が短く、発芽管の先端が表皮に達することができず、胞子の多くが表皮上を浮遊しており、葉身から容易に落下した。接種1.5時間後以降になると3 μm以上に発芽管が伸展し、その先端部が表皮に到着してクチクラ層に付着しているのが観察されるようになった。（第1図）。発芽管先端部と表皮との間に付着部位には粘着物が観察され、それが発芽管の表皮への付着に重要な役割を果たしていると考えられた¹⁸。

2. 付着器形成過程

発芽管の先端がイネ表皮に付着すると、発芽管の多くはそれまで表皮に向けて伸展していたのを、表皮と平行方向に転じ、その先端に半円球状に膨らんだ付着器を形成する。まれに、発芽直後の付着部位がそのまま嚢状となって付着器になることもあった。葉身の表面はワックスで覆われており、付着器が形成されるとその周辺部のワックスが溶解される（第2図）^{11,12}。一方、穂くびや籾はワックスで覆われていない。ワックスの有無はイネ体表面の濡れ時間や胞子の付着に影響を及ぼすと考えられるが、詳細なところは明らかでない。

付着器の周囲には粘質物が観察され、それらが付着器をイネ体表面にしっかりと付着させている（第3

図)¹²⁾。このため、付着器がイネ体から落下するということは考えられない。



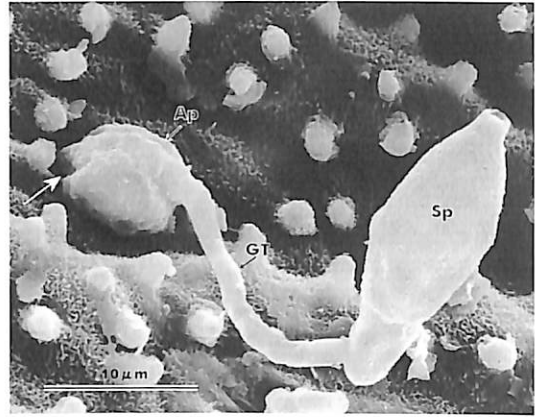
第1図 いもち病菌のイネ葉身表面への付着（接種1.5時間後）

胞子 (Sp) は発芽管 (GT) を出し、その先端がイネ表皮に付着している。イネ表皮上には多くのイボ状突起があるため、胞子の発芽裂開部位が表皮に直接接することは少ない。

3. 侵入

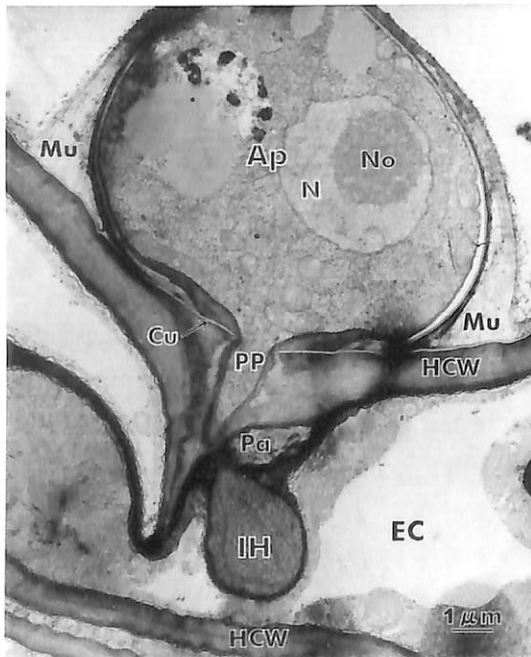
(1) クチクラ貫穿

いもち病菌の付着器は最初着色していないが、成熟するにしたがって淡褐色～黒褐色となる²⁾。メラニン合成



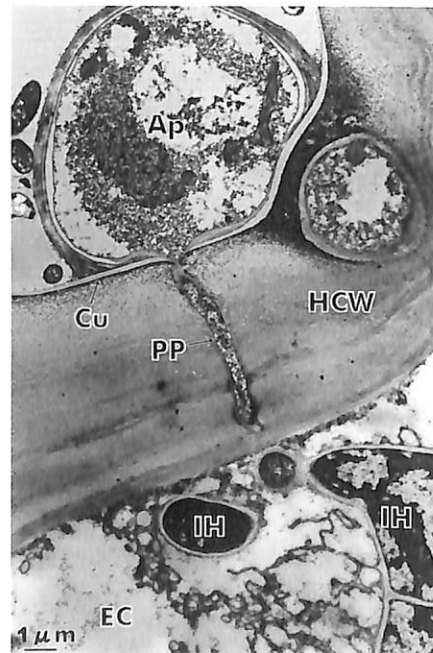
第2図 イネ葉身上での付着器形成（接種10時間後）

胞子 (Sp) は発芽管 (GT) を出し、その先端に侵入のための付着器 (Ap) を形成する。葉身の表面はワックスで覆われているが、付着器周辺部のワックスは溶解されている (矢印)。



第3図 イネ葉鞘裏面の表皮細胞内に侵入した侵入菌糸（接種25時間後）

付着器 (Ap) 底部中央部から突出した侵入糸 (PP) は、表皮細胞のクチクラ層 (Cu)、細胞壁 (HCW) それにパピラ (Pa) を貫通して、侵入菌糸 (IH) となっている。侵入菌糸は表皮細胞の細胞質に包まれながら伸展している。EC: 表皮細胞, Mu: 粘質物, N: 核, No: 仁



第4図 靱組織へのいもち病菌の侵入（接種48時間後）
靱表皮上の付着器が侵入糸でクチクラ層と細胞壁を貫通して表皮細胞内に侵入して、菌糸を伸展させている。

阻害剤を処理すると、附着器の原形質膜と細胞壁の間にメラニン層が形成されないために侵入できなくなる²⁶⁾。これは、細胞壁の貫穿に必要な物理的な力となる膨圧が高まらないためである^{9,10)}。いもち病菌のイネ体への侵入は、附着器底部中央の細胞壁がほとんどなくなったところから原形質が突出することから始まる。この部位に電子密度の高い顆粒が出現し、そこからの侵入を指示しているようである¹²⁾。この突出部はクチクラ層を貫通し、侵入糸となって細胞壁の中に侵入していく(第3図)¹²⁾。この侵入糸の貫穿行動にはアクチンが関与している³⁾。侵入糸によって貫通されたクチクラ層はしばしば内側に曲げられており、このことはクチクラ層の貫穿に物理的な力が作用していることを示唆している¹²⁾。

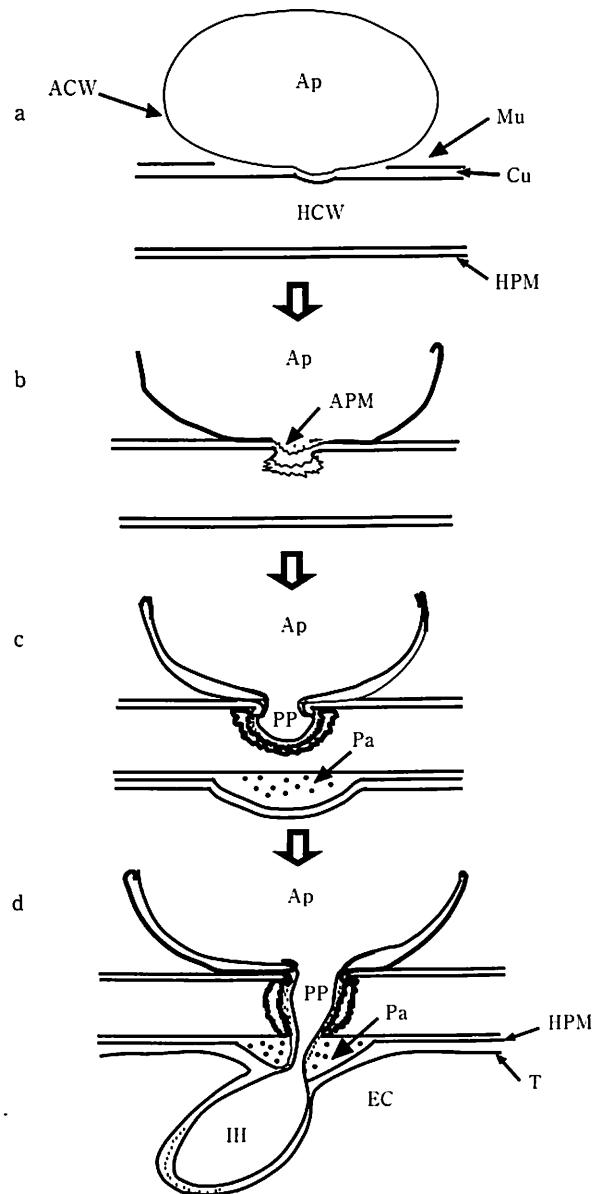
(2) 細胞壁貫穿

侵入糸の先端およびその周りでは、イネ体の細胞壁の電子密度が高くなり、ミクロフィブリルの配列が乱されているのが観察された¹²⁾。このことから、侵入部位には物理的な力の他に、イネ体の細胞壁を酵素的に分解する化学的な力がはたらいており、侵入糸はその分解物を養分として吸収しながら、その空いたスペースに伸展していくものと考えられた¹²⁾。また侵入糸の細胞壁は、侵入初期には明瞭でなく、侵入後期にははっきりと認められるようになった¹²⁾。穂くびや稈についても、侵入部位の透過電顕観察によりクチクラ貫穿が主であることが明らかにされた(第4図)^{11,13)}。

侵入糸が表皮細胞の細胞壁を貫通中に、その細胞壁の内側にパピラやカルス(カロシテイー)と呼ばれる沈積物(wall apposition)がすでに形成されていた^{6,12,14)}が、それ以前のクチクラ層の貫穿時にはまだ認められなかった¹²⁾。このことから、クチクラ層の貫穿が完了して、細胞壁の貫穿が始まると、パピラ形成が始まるものと推測される。このことは、細胞壁の貫穿時に侵入糸からイネ細胞に何らかのシグナルが出ており、それに応答してパピラ形成が起きているものと考えられる¹²⁾。

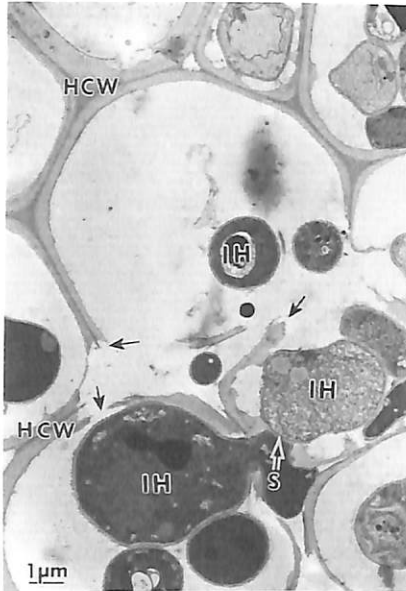
4. 侵入菌糸の伸展

侵入糸はパピラを貫通して表皮細胞内に侵入して、侵入菌糸となる(第3図)。葉鞘や葉身ではいもち病菌は、表皮細胞に侵入すると、宿主細胞を死滅させることなく、表皮細胞内に菌糸を充満させ、接種2~3日後に、隣接の表皮および柔細胞へと伸展していた^{16,17,25)}。第5図に附着器から侵入菌糸形成までの侵入過程の模式図を示した。



第5図 いもち病菌のイネ葉鞘裏面表皮細胞への侵入過程の模式図

- (a) 附着器下部の中央部に電子密度の高い顆粒が出現し、そこから、原形質膜が突出を始める。この突出部位の圧力によって、直下のクチクラ層は押しつぶされる。
- (b) 突出部がクチクラ層を貫通して、細胞壁へ貫穿を始める。突出部の前方で細胞壁の酵素的分解が始まる。
- (c) 突出部は侵入糸となって、細胞壁を酵素的に分解して貫穿する。イネの表皮細胞の細胞壁と原形質膜との間にパピラが形成される。
- (d) 侵入糸は細胞壁そしてパピラを貫通して、表皮細胞内で侵入菌糸となる。
- ACW: 附着器の細胞壁, Ap: 附着器, APM: 附着器の原形質膜, Cu: クチクラ層, EC: 表皮細胞, HCW: 宿主細胞壁, HPM: 宿主原形質膜, IH: 侵入菌糸, Mu: 粘質物, Pa: パピラ, PP: 侵入糸, T: 液胞膜



第6図 穂くび組織でのいもち病菌菌糸の伸展（接種48時間後）

イネの細胞壁（HCW）が分解されているのが観察される（矢印）。これはいもち病菌菌糸（IH）から分泌される消化酵素による分解と推定される。S：隔膜

一方、穂くびや稈では葉鞘や葉身と異なって、侵入菌糸は表皮細胞からその直下の厚膜細胞組織などへ短時間で伸展しており、接種48時間後にはすでに柔組織まで伸展していた^{11,13}。それらの厚膜組織には細胞間にピット・ペアー（pit-pair）と呼ばれる細胞壁のきわめて薄い部分があり、侵入菌糸はそこを貫通することによって隣接細胞へ短時間で容易に伸展できるものと考えられる^{11,13}。いもち病菌の侵入を受けた柔組織細胞では、葉緑体やミトコンドリアなどのオルガネラそして核の変性が認められ、接種4～5日後には、イネ組織は厚膜細胞の細胞壁を残すのみで、ほとんど跡形がないほどに消化されていた^{11,13,15,22,23}（第6図）。

白穂の原因として、本菌の感染によって穂組織が崩壊し、水分補給が阻害されるためという説²⁷と、本菌の産生する糖ペプチドが道管を閉塞するために起きるとい説²⁴が報告されている。穂いもち感染部位の電顕観察から、本菌菌糸が維管束の道管をはじめほとんどの穂組織で蔓延し、そこでは穂組織が壊死・崩壊しているのが認められた。しかし、道管閉塞は認められなかったことから、道管組織の崩壊によって水分補給が遮断される説が支持された¹¹。



第7図 穂軸の気孔（St）から突出したいもち病菌の分生子柄（Cp）と、そこに形成された孢子（Sp）

5. 孢子形成

穂枯れ症状の病原としては数種の植物病原菌が考えられ、病徴が酷似しているため肉眼観察だけでは病原菌を特定することが難しい場合が多い。そこで、蛍光色素で穂組織を染色して、病斑部に形成されている分生子柄や分生子柄を簡便に観察できる方法が考案され¹⁹、この方法によっていもち病菌による発病を他の菌による発病から識別することができた。この蛍光顕微鏡による方法と走査電子顕微鏡による観察によって、穂くびや枝梗でも葉身の場合⁷と同様に、分生子柄は気孔から直接の場合（第7図）と表皮を貫通して形成される場合が観察された^{22,23}。また、分生子柄が形成される部位は、稈では穎の表皮、剛毛、小突起、護穎、まれに小穂軸や副護穎で、穂くび、穂軸、枝梗では小突起、剛毛それに表皮であった。穂くびと枝梗、一次枝梗と二次枝梗などの分岐箇所の際に挟まれた内側や小穂軸と護穎の間などには、少雨年でも、分生子柄や孢子形成が認められた^{20,22,23}。このような部位は、溢泌液、露そして雨滴などが乾燥しにくいいため、少雨年でも感染を受けやすいことが、圃場の発病調査でも報告されている²¹。

6. 今後の研究課題

葉いもちでは病斑形成の他に、それが原因で起きるズリコミ症状の発現がある。ズリコミ症状については、その発生機構が明らかでなく細胞学的研究がほとんど行われていないのが現状であり、今後解析されるべき大きな研究課題の一つである。

穂は形態が複雑で、硬組織であるため、いもち病菌の侵入過程などごく一部が観察された程度で、感染過程に不明な点が多く、細胞学的な解明が求められている。

最近では、汚染種子が第一伝染源である可能性が高いとされているが、罹病種子からいもち病菌がどのように伸展していくかについても、今後、細胞学的に解明されることが期待される。

引用文献

- 1) Arase, S., Miyahara, K., Honda, Y. and Nozu, M. (1994) Preinfectious interactions between *Magnaporthe grisea* spores and rice plants. *Bull. Fac. Agr. Shimane Univ.* 28 : 45~51.
- 2) Bourett, T. M. and Howard, R. J. (1990) *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can. J. Bot.* 68 : 329~342.
- 3) Bourett, T. M. and Howard, R. J. (1992) Actin in penetration pegs of the fungal rice blast pathogen, *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* 168 : 20~26.
- 4) Hamer, J. E., Howard, R. J., Chumley, F. G. and Valent, B. (1988) A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* 239 : 288~290.
- 5) 橋本 見・平野喜代人・松本和夫 (1984) シミュレーションによる葉いもちの発生予察に関する研究. 福島県農業試験場特別研究報告 14 (2) : 1~104.
- 6) 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.
- 7) Hashioka, Y. and Nakai, Y. (1974) Fine structure of the rice blast. XI. Outthrust of conidiophore cells of *Pyricularia oryzae*, etc., through an epidermal outer wall of a host leaf. *Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.* 36 : 9~18.
- 8) Hirooka, T., Miyagi, Y., Araki, F., Kunoh, H. and Ishizaki, H. (1982) The effect of isoprothiolane on the emergence of infection pegs from appressoria of *Pyricularia oryzae*. *Pestic. Sci.* 13 : 379~386.
- 9) Howard, R. J., Bourett, T. M. and Ferrari, M. A. (1991) Infection by *Magnaporthe* : an *in vitro* analysis. *In Electron microscopy of plant pathogens.* (edited by Mendgen, K. and Lesemann, D. E.), 251~264, Springer-Verlag Berlin, Germany.
- 10) Howard, R. J. (1994). Cell biology of pathogenesis. *In Rice blast disease.* (edited by Zeigen, R. S. Leong, S. A. and Teng, P. S.), 3~22, CAB International & IRRI, University Press, Cambridge.
- 11) 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.
- 12) Koga, H. (1994) Hypersensitive death, autofluorescence, and ultrastructural 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.
- 13) Koga, H. (1995) An electron microscopic study of the infection of spikelets of rice by *Pyricularia oryzae*. *J. Phytopathology* 143 : 439~445.
- 14) Koga, H. (2001) Cytological aspects of infection by the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *In Major fungal diseases of rice recent advances.* (edited by Sreenivasaprasad, S. and Johnson, R.), 87~110, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- 15) 古賀博則・堀野 修・小林尚志 (1986) イネいもち病の抵抗性機構に関する微細構造的な研究. 北陸農試研報 28 : 1~56.
- 16) 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(4) : 506~513.
- 17) 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.
- 18) Koga, H. and Nakayachi, O. (2004) Morphological studies on the attachment of the spores of

- Magnaporthe grisea* to the leaf surface of rice. J. Gen. Plant Pathol. 70 : (in press)
- 19) 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(2) : 229~232.
- 20) 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. 北陸病害虫研報 38 : 3~8.
- 21) 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. 北陸病害虫研報 39 : 11~15.
- 22) 古賀博則・吉野嶺一 (1991) 穂いもち自然感染部位の微細構造. 北陸病害虫研報 39 : 17~22.
- 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. 北陸病害虫研報 39 : 23~28.
- 24) 高坂淖爾・土沢 誠・花上雅美・渡辺 実 (1985) イネいもち病の産生する白穂誘起物質. 糖ペプチドについて. 日植病報 51(2) : 199~205.
- 25) 富田啓文・山中 達 (1983) イネいもち病における抵抗反応に関する研究 : I. 感染初期細胞の病態変化. 日植病報 49(4) : 514~521.
- 26) Woloshuk, C. P., Sisler, H. D. and Vigil, E. L. (1983) Action of the antipenetrant, tricyclazole, on appressoria of *Pyricularia oryzae*. Physiol. Plant Pathol. 22 : 245~259.
- 27) 吉井 甫 (1937) 稲熱病に関する研究. II. 病原菌の侵入法について. 日植病報 6 : 205~218.
-