

## イネいもち病の細胞学的研究

### II. 抵抗性の発現

古賀博則

Hironori KOGA:

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

#### II. Expression of resistance

#### はじめに

考古学的資料から、イネは今から7,000年ほど前に現れたと推測されている。一方、その病原菌であるいもち病菌は宿主植物ごとに分化しており、シコクビエ菌からキビ菌がさらにアワ・イネ菌が分化したと推定されている<sup>1</sup>。おそらく、太古の野生イネではいもち病が発生することはきわめて少なく、抵抗力の弱い出穂直後の穂など限られた部位だけが侵されたのではないだろうか？

その後、人々によってイネの品種改良が行われていくうちに、野生イネが持っていた種々の抵抗性遺伝子が失われていき、さらには窒素肥料の施用など栽培法の変化が、いもち病の発生を助長し、しばしば大発生するようになったものと思われる。稲作の安定化のために、いもち病抵抗性品種の育成は今日でも最重要課題の一つとして掲げられている。ここでは抵抗性育種の歴史と抵抗性の種類それに抵抗性発現について述べる。

#### 1. いもち病抵抗性育種の歴史

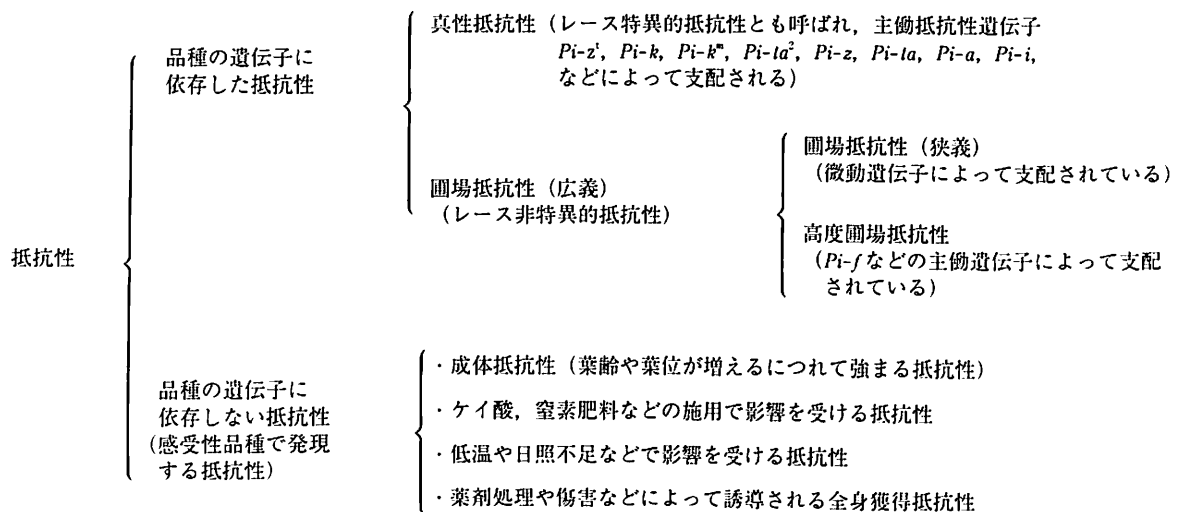
わが国のいもち病抵抗性育種の初期の頃の試験で特筆すべきことは、1920年代にすでに単一の優性の真性抵抗性遺伝子の存在を示す交配結果が得られており、また品種に対して違う病原性を示す菌系（レース）の存在が明らかにされたことである<sup>2</sup>。その後、1950年代から外国稲の持つ主働抵抗性遺伝子を導入するという育種事業が盛んに行われた。主働抵抗性遺伝子はいもち病菌のあるレースに対しては抵抗性を示すが、それとは違うレースにはまったく抵抗性を示さないで、感受性となるというレース特異性がある。この主働抵抗性遺伝子を導入したイネは、これを侵すことのできるレースに遭遇すると、在来品種以上に被害が甚大であった。このことがあって初めて、在来品種にはレースに関係なく働く弱い抵抗性

が存在することに植物病理や育種の研究者たちは気づいた。そして、この抵抗性は圃場抵抗性と呼ばれるようになった。圃場抵抗性のなかでも強いものはとりわけ陸稲に存在し、その遺伝子解析の結果、主働遺伝子によって支配されているものと、微動遺伝子によって支配されているものとに分けられ、それぞれ高度圃場抵抗性および狭義の圃場抵抗性と呼び、両者を併せて広義の圃場抵抗性と呼ぶことが提唱されている（第1図）<sup>3</sup>。

#### 2. 抵抗性の分類

これまでのいもち病抵抗性の育種事業と研究の経過から、現在のいもち病抵抗性はいくつかの種類に分けられる（第1図）。まず、いもち病抵抗性は大きく分けて、イネ品種が抵抗性遺伝子を持っている場合と、持っていない場合とに分けられる。抵抗性遺伝子は、さらに真性抵抗性と圃場抵抗性（広義）とに分けられる。真性抵抗性と圃場抵抗性の両方を持つ場合もあるが、通常その場合は真性抵抗性が強すぎて圃場抵抗性はそれに隠れてしまう。

これらの抵抗性遺伝子を持たないイネでも、生育環境によって抵抗性は大きく変動する。それは従来から体質的抵抗性と呼ばれているものである。抵抗性と罹病性（感受性）は裏腹の関係であるので、それは罹病的体質とも言え、個体素因とも同じ意味である。抵抗的（罹病的）体質に密接に関わる要因としては、①葉齢や葉位、②ケイ酸や窒素肥料などの施用、③栽培時の温度や日照などがある。近年、注目されているものに、植物病原菌や薬剤などを下位葉に処理すると、上位葉に抵抗性が誘導されるという全身獲得抵抗性がある。いもち病では、この全身獲得抵抗性を誘導する薬剤が農薬として1970年代から利用されている。

第1図 抵抗性の分類 (浅賀<sup>3)</sup>を改変)

抵抗性について理解しやすくするために, イネ品種の遺伝子に依存した抵抗性とそうでないものに分けたが, 実際にはこの品種の遺伝子に依存しない抵抗性はすべてのイネで発現される抵抗性でもある。このため, 抵抗性の研究を行う場合は常にこのことを念頭に置いておく必要がある。また, 体質的抵抗性も品種間の差がないだけで, 究極的にはイネの遺伝子によって制御されていると考えられる。

このようにイネのいもち病抵抗性には種々の抵抗性があるが, 細胞学的に最も明らかにされているのは真性抵抗性についてである。ここでは, 主として真性抵抗性について, いもち病菌の胞子がイネ体表面に付着してからの侵入・伸展と, それに対するイネ細胞の反応といった両者の相互反応場面から見ていきたい。

### 3. いもち病菌の侵入・伸展とそれに対するイネ細胞の抵抗性反応

#### (i) 侵入前の抵抗性反応

葉身に接種したいもち病菌胞子の発芽および付着器形成を蛍光染色して観察した結果, 判別9品種間で差異は認められなかった<sup>11)</sup>。これと同様な結果は葉鞘裏面接種法による観察でも得られており<sup>12)</sup>, 侵入前に抵抗性反応は起きないと考えられている。

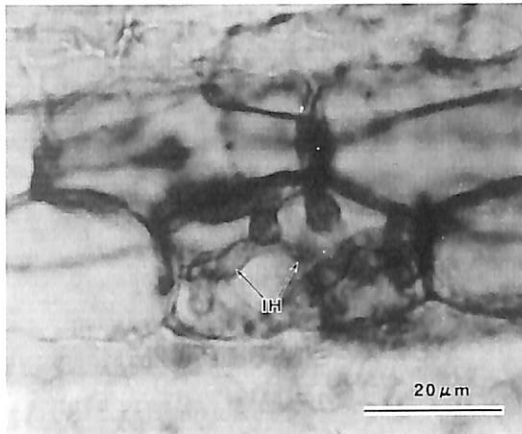
#### (ii) 葉身の光顕・電顕観察

葉身でのいもち病菌の侵入・伸展を, 全葉を透明化して光顕観察する方法が, 吉野<sup>13)</sup>によって開発され, その後, 宿主細胞反応も観察できるように改良され

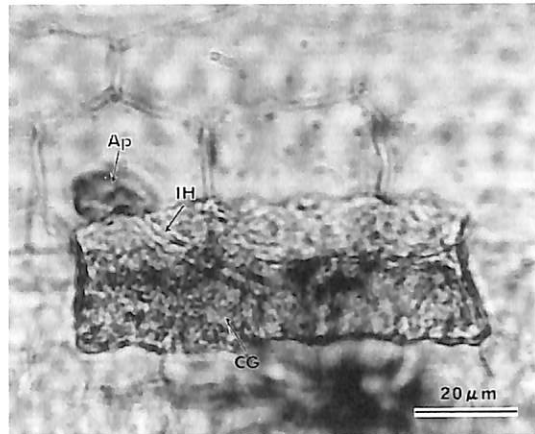
た<sup>15, 26)</sup>。この観察方法によって, 感受性品種では侵入初期には宿主反応を伴うことは少なく, 接種72時間以降には一部の侵入菌糸は宿主反応を伴わずに急激に伸展する<sup>35)</sup> (第2図) が, それ以外の大部分の侵入菌糸は種々の伸展段階で褐変変化反応を伴って伸展を停止しているのが光顕観察された。この作用機構については, 後述の非切断葉鞘裏面接種法を用いることによって解明されつつある<sup>21-23)</sup>。

それに対して, 高度抵抗性品種では, 侵入菌糸は表皮細胞内容物の顆粒化を伴って, ほとんどが最初に侵入した表皮細胞内で伸展を停止していることが明らかにされた<sup>9, 13, 16, 17, 27, 28, 35)</sup> (第3図)。圃場抵抗性の強い品種でも, 表皮細胞内容物の顆粒化の出現率が, 圃場抵抗性の弱い品種より高いことが報告された<sup>36)</sup>。褐点を生じる抵抗性品種では, 多くの侵入菌糸は高度抵抗性と同様に表皮細胞で伸展を停止するが, 一部は柔組織まで菌糸が伸展して柔組織の褐変・壊死によって褐点病斑となっていた<sup>16)</sup>。この褐点部位は濃い褐変のため, 侵入菌糸の光顕観察はほとんどできなかったが, 透過電子顕微鏡による観察は可能で, 崩壊壊死した柔細胞内にミトコンドリアなどが変性した侵入菌糸や死滅した菌糸が認められた (第4図)<sup>16)</sup>。

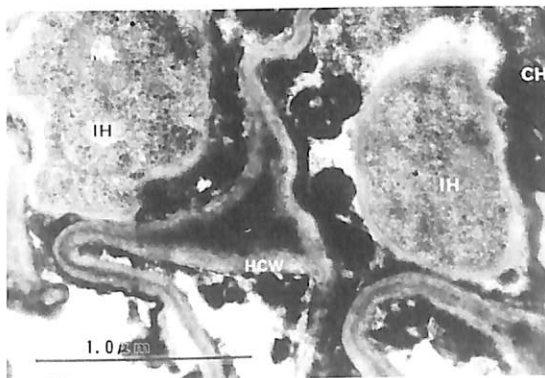
一方, イネいもち病菌胞子の発芽液からイネ葉身に壊死斑を誘起する物質が抽出され, この物質と非病原性の *Alternaria alternaria* 菌の胞子を一緒に噴霧接種するとイネ, オオムギ, コムギなどに褐点病斑を形成した。このことから, この物質は非病原性の *A. alternaria* 菌に病原



第2図 感受性品種コシヒカリの葉身の表皮細胞内で伸展しているいもち病菌菌糸 (IH) の光学顕微鏡写真 (接種72時間後)

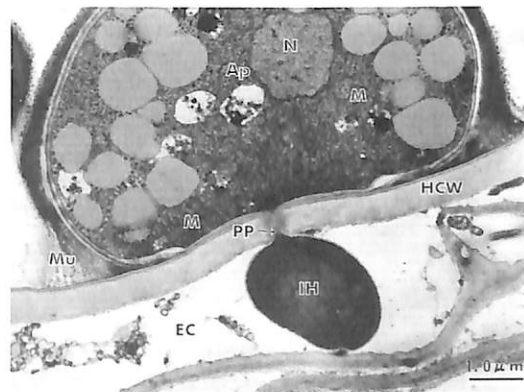


第3図 いもち病菌の侵入を受けた高度抵抗性品種とりで1号 (抵抗性遺伝子 *Pi-z1* を持つ) の葉身の表皮細胞の光学顕微鏡写真 (接種144時間後) 細胞内容物の顆粒化と侵入菌糸の伸展阻害が見られる。Ap: 付着器, CG: 細胞内顆粒



第4図 抵抗性品種フクニシキ (抵抗性遺伝子 *Pi-z* を持つ) の葉身の褐変部位において観察された侵入菌糸の電子顕微鏡写真 (接種5日後)

壊死した葉肉細胞内に変性した菌糸が観察される。CH: 葉緑体, HCW: 宿主細胞壁, M: ミトコンドリア



第5図 いもち病菌の侵入を受けた抵抗性系統ZTR (抵抗性遺伝子 *Pi-z* を持つ) での過敏感壊死した葉鞘表皮細胞の電子顕微鏡写真 (接種25時間後)。

EC: 表皮細胞, HCW: 宿主細胞壁, M: ミトコンドリア, Mu: 粘質物, N: 核, PP: 侵入糸

性を誘導する感染誘導因子と考えられている<sup>1,2,4-6</sup>。また、この物質をイネ葉に浸透させた時のイネ細胞の微細構造変化が観察された<sup>32</sup>。最近、関口病斑以外の疑似病斑についても、いもち病抵抗性発現との関係で研究されている<sup>30,33</sup>。

### (iii) 葉鞘裏面接種法

葉鞘裏面接種法を用いて、真性抵抗性遺伝子の発現が光顕・電顕によって観察され、過敏感壊死反応が宿主の主要な細胞反応であり<sup>10-13,31</sup> (第5図)、葉身での反応と本質的に同じであると考えられている。一方、感受性

品種・系統では、大部分の侵入菌糸は宿主細胞反応をほとんど伴わず同調化して蔓延することから、種々の伸展段階で褐変を伴って伸展停止する葉身の場合とはかなり異なる。従来の葉鞘裏面接種法を改良した非切断葉鞘裏面接種法<sup>31</sup>では、真性抵抗性の反応<sup>22</sup>だけでなく、感受性での反応も葉身の場合ときわめて相似していた<sup>23</sup>。この方法を用いて、葉齢や葉位が進むことによって抵抗性発現が高まることが細胞学的に解析された<sup>23</sup>。この方法では、光顕観察とりボキシゲナーゼの酵素活性や遺伝子発現の研究が同じ試料を使って行えるという利点があ

る<sup>25)</sup>。

#### (IV) 穂いもち抵抗性

穂では、葉身に病原性を示さない非親和性レースによっても発病することがあり、噴霧接種での結果では稈や枝梗の方が穂くびより発病しやすい<sup>29)</sup>。いもち病抵抗性遺伝子 *Pi-z'* の同質遺伝子系統の穂ばらみ期に注射接種を行うと、抵抗性系統でも穂くびや枝梗に病徴が出現した。その組織内には蔓延した菌糸が、そして表皮上には多量に形成された分生子柄と分生胞子が、蛍光顕微鏡と走査電顕によって観察された<sup>20)</sup>。しかし病斑の形成率は感受性系統のそれより著しく低く、褐変・壊死部では宿主細胞内に顆粒状物質を伴って侵入菌糸が変性しているのが認められた<sup>20)</sup>。同じ系統を供試して、出穂後の経過日数毎に分生子柄形成数を観察すると、出穂直後には抵抗性系統でも多量の分生子柄が低率で形成されたが、出穂後数日でその形成数は激減していった<sup>19)</sup>。このように、穂では出穂後の日数が経過するにつれて、急速に抵抗性が增大するという結果が得られている。

#### おわりに

ここでは真性抵抗性の発現を中心に述べたが、真性抵抗性でも種々の主働抵抗性遺伝子があり、発現部位も葉身、穂など各部位があるので、その一端を述べたに過ぎない。他の抵抗性については細胞学的な解析がまだ緒についたばかりというのが現状である。

コシヒカリなどの良食味の銘柄米は、真性抵抗性遺伝子を持っておらず、圃場抵抗性も弱いものが多い。それでも、発病が栽培年度によって大きく変動するのは、その年の気象によって感染に好適な日数が異なることと、抵抗(罹病)的体質が異なるためである。感染に好適な条件の解析は、かなり研究がすすんでいるが、抵抗(罹病)的体質についてはほとんど明らかになっていない。圃場では、いもち病菌とイネ細胞とのミクロでのせめぎ合いが常に起きており、その結果が様々な型の病斑となって現れてくる。この時のイネの体質がわかれば、その後の発病がどのように推移するのかがかなり推測でき、発生子察の精度も高まると考えられる。今後、この抵抗的体質のメカニズムが解明されることを期待したい。

#### 引用文献

1) 荒瀬 栄 (1993) イネいもち病の感染成立機構. 化学と生物 31: 235~241.

- 2) 荒瀬 栄 (1994) いもち病菌の生成する感染誘導因子. 植物防疫 48: 379~382.
- 3) 浅賀宏一 (1987) 品種の抵抗性, 稲いもち病 (山中達・山口富夫編) 216~249, 養賢堂, 東京.
- 4) Fujita, K., Arase, S., Hiratsuka, H., Honda, Y. and Nozu, M. (1994) The role of toxin(s) produced by germinating spores of *Pyricularia oryzae* in pathogenesis. J. Phytopathology 142: 245~252.
- 5) Fujita, K., Arase, S., Honda, Y. and Nozu, M. (1995) Susceptibility-inducing factor(s) in ethyl acetate extract from germination fluids of *Pyricularia oryzae* as determinants of basic compatibility in rice blast. Ann. Phytopath. Soc. Japan 61: 185~188.
- 6) Fujita, K., Arase, S., Honda, Y. and Nozu, M. (1995) Studies on host-selective infection mechanism of *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (9) : Possibility of phytotoxicity-nondependent induction of susceptibility by susceptibility-inducing factor(s). Ann. Phytopath. Soc. Japan 61: 194~196.
- 7) 加藤 肇 (1997) いもち病菌の起源・伝播. いもち病—研究と防除 (内藤秀樹・八重樫博志編), 14~17. 日本バイエルアグロケム, 東京.
- 8) 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.) の孢子発芽率と付着器形成率. 北陸病虫研報 31: 7~12.
- 9) Koga, H. (1989) Histopathology of resistant and susceptible rice plants inoculated with *Pyricularia oryzae* Cavara. JARQ 23: 8~15.
- 10) 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.
- 11) 古賀博則 (1997) いもち病菌の感染行動の微細構造. 植物病害防除戦略としての感染生理学. (小島誠・古市尚高編), 79~87, 日本植物病理学会, 平成9年度植物感染生理談話会, 新潟.
- 12) 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.

- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 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: 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) 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.
- 19) 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.
- 20) 古賀博則・三浦清之 (1991) 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. 北陸病虫研報 39: 29~33.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 森本 武 (1980) イネのいもち病と抵抗性育種 (山崎義人・高坂淳爾編), 25~34, 博友社, 東京.
- 25) 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ボキシゲナーゼ活性とその遺伝子発現. 日植病報 63: 507.
- 26) Peng, Y. L., Shishiyama, J. and Yamamoto, M. (1986) A whole-leaf staining and clearing procedure for analysing cytological aspects of interaction between rice plant and rice blast fungus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 801~808.
- 27) Peng, Y. L., and Shishiyama, J. (1988) Temporal sequence of cytological events in rice leaves infected with *Pyricularia oryzae*. Can. J. Bot. 66: 730~735.
- 28) Peng, Y. L. and Shishiyama, J. (1989) Timing of a cellular reaction in rice cultivars associated with differing degrees of resistance to *Pyricularia oryzae*. Can. J. Bot. 67: 2704~2710.
- 29) 進藤敬助 (1980) 葉いもち抵抗性と穂いもち抵抗性. イネのいもち病と抵抗性育種 (山崎義人・高坂淳爾編), 303~321, 博友社, 東京.
- 30) Takahashi, A., Kawasaki, T., Henmi, K., Shii, K., Kodama, O., Satoh, H. and Shimamoto, K. (1999) Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. The Plant J. 17: 535~545.
- 31) 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: 514~521.
- 32) Uehara, T., Arase, S., Honda, Y., Park, P. and Nozu, M. (1997) Primary effects of *Magnaporthe grisea* toxin(s) on mitochondria of rice leaf cells. Ann. Phytopath. Soc. Japan 63: 29~35.
- 33) Yin, Z., Chen, J., Zeng, L., Goh, M., Leung, H., Khush, G. S. and Wang, G.-L. (2000) Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 869~876.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 善林 薫・芦澤武人・園田亮 (1997) 圃場抵抗性程度異なるイネ品種のいもち病菌感染に対する表皮細胞の反応. 北日本病虫研報 48: 36~38.