

## セロファンテープを用いた穂いもち接種法について

古賀博則・塚本昇市\*

Hironori KOGA, Shouichi TSUKAMOTO :

A novel method to inoculate rice panicles with *Magnaporthe oryzae* using cellophane tape and wet paper twine

### Abstract

A novel inoculation method, designated the cellophane tape method, to infect rice panicle necks with the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, was devised. More than 66% of the panicle necks inoculated using this method showed symptoms of neck blast disease. This inoculation method does not require any special facility to maintain inoculated rice plants at 100% relative humidity. It is particularly noteworthy that no symptoms appeared in the resistant line, ZTR, while typical symptoms appeared in 67% of plants from the susceptible line, ZTS. This inoculation method represents a useful technique for examining the resistance of the panicle neck to blast fungi.

Key words : 穂いもち, イネ, イネいもち病菌, 接種法, 抵抗性, panicle blast, rice, *Magnaporthe oryzae*, inoculation method, resistance

### 緒言

穂いもちは、発病が被害と直結することから、稲栽培ではとりわけ恐れられている病気である<sup>3,15)</sup>。そのため、これまで穂いもちの感染過程や、品種抵抗性、発生生態、防除などの研究に、自然感染、噴霧接種、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) 接種など種々の接種法が用いられている<sup>17)</sup>。葉いもちでは、パンチ接種法<sup>17)</sup>や針接種法<sup>9)</sup>、さらにマイクロピペット<sup>5,9)</sup>を用いた接種法が開発されており、これらの方法では簡便に、葉身の任意の場所に病斑を発生させることができる。穂の任意の場所に接種する方法にはCMC接種法があるが、この方法は接種後のイネを湿室に保持する設備が必要である。

そこで、湿室の設備がなくても高率に穂いもちを発生させることのできる新接種法の開発を目指した。さらに、本実験で開発した接種法が、窒素やケイ酸施用を異にしたイネの穂いもち抵抗性の差異を検出できるかどうかについて検討した。同様に、抵抗性系統と感受性系統間の穂いもち抵抗性の差異についても検討した。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌

イネいもち病菌株は、北1および稲86-137 (いずれもレース007) を供試した。供試菌株をオートミール培地上に移植後、24℃の暗黒条件下で培養した。約3週間後、気中菌糸をブラッシングして除去し、25℃の蛍光灯下に3日間静置した。そこで形成された胞子を接種に用いた。穂いもち接種法を異にする実験、接種後の温度条件を異にする実験、そして窒素およびケイ酸施用量を異にする実験では稲86-137菌株を、感受性系統と抵抗性系統への接種実験には北1菌株を供試した。

#### 2. 供試イネ

コシヒカリの幼苗を、2006年5月6日と2007年5月12日に石川県能美市金剛寺町の水田圃場に機械移植した。両年共に圃場の基肥として窒素成分で6.0kg/10aを施用し、それ以外の管理は現地の慣行に従った。穂肥として硫酸を用い、倍量施用区では窒素成分7.0kg/10aを、標準量施用区では3.5kg/10aを2回に分けて施用し、無施用区では施用しなかった。ケイ酸施用区では、最高分けつ期にシリカゲル肥料 (可溶性ケイ酸17%) を200kg/10a施

用した。2006年8月1日と2007年8月6日に1/5,000aワグネルポットに株上げしたものを接種に用いた。

また、抵抗性のZTR (*Piz1*遺伝子を持つ) と感受性のZTS (ZTRの準同質遺伝子系統で、*Piz1*遺伝子を持たない) の2系統を、1/5,000aワグネルポットにポット当たり2株栽培した。基肥として1ポット当たり窒素成分で4.0g、穂肥として0.4g施用し、穂くび節抽出直後の穂を接種に用いた。

### 3. 穂いもち接種法

いもち病菌の胞子を形成させた直径9cmのシャーレ内に2mlの蒸留水を注ぎ、そこに長さ約5mmに切断した紙ひも (マルアイ社製, 12号, 直径2mm) を30本入れ、紙ひもにいもち病菌の孢子懸濁液 (孢子濃度  $2 \times 10^5$ /ml) を吸着させた。その紙ひもを抽出直後の穂くびに付着させ、セロファンテープで紙ひもと穂の接種部位を巻いて乾燥しないようにした (第1図)。

穂いもち接種法の比較には、2006年の株上げイネのうち、穂肥として窒素成分を7.0kg/10a施用したケイ酸無施用区の株を供試した。セロファンテープを用いた接種法 (以下、セロファンテープ接種法と表記) の比較として、噴霧接種法とCMC接種法を用いた。噴霧接種法では、0.02%のTween20水溶液で孢子懸濁液 (濃度  $5 \times 10^4$ 個/ml) を作製し、穂くび抽出直後の穂に株当たり5mlを噴霧接種した。CMC接種法では、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) を孢子懸濁液 (濃度  $2 \times 10^5$ 個/ml) と混ぜて、穂くび抽出直後の穂くび節に塗布して接種した。噴霧接種法あるいはCMC接種法で接種したイネは、25℃で相対湿度100%条件下に24時間保持した後に、14時間照明 (4,000lux), 10時間暗黒

で25℃に調整した陽光定温器内に静置し、接種24日後に穂くびの発病を調査した。

### 4. 接種後の温度条件を異にする接種試験

2006年の株上げイネのうち、穂肥として窒素成分を7.0kg/10a施用したケイ酸無施用区の株を供試した。穂くび節抽出直後の穂に、セロファンテープ接種法で接種し、接種後は25℃で14時間照明 (4,000lux), 10時間暗黒に保持した後に、17℃, 20℃および25℃に調整した陽光定温器内に静置し、接種16, 24, 31日後に穂くびの発病を調査した。

### 5. 窒素とケイ酸施用量を異にする接種試験

2006年と2007年の圃場で栽培したイネを用いた。穂肥として窒素成分を0kg/10a, 3.5kg/10a, 7.0kg/10a施用し、これら3段階の窒素施用に対してケイ酸無施用と200kg/10a施用区の計6区からイネ株を採取して、接種に供試した。セロファンテープ接種法で接種し、接種後は25℃で14時間照明 (4,000lux), 10時間暗黒に保持した。接種3週間後に穂くびの発病を調査した。

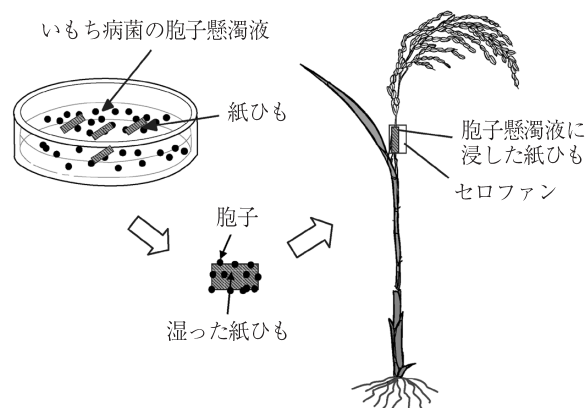
### 6. 抵抗性と感受性系統に対する接種試験

ZTSとZTRの穂くび節抽出直後に、セロファンテープ接種法で北1菌株を接種し、接種後は25℃に静置し、接種3週間後に穂くびの発病を調査した。

## 結果

### 1. 噴霧接種法、CMC接種法およびセロファンテープ接種法での穂いもち発生の比較

噴霧接種法、CMC接種法およびセロファンテープ接種法で接種し、穂くびいもち発病穂率の比較を行った (第1表)。その結果、穂くび発病穂率は、噴霧接種法とCMC法ではそれぞれ12.5%と15.6%と低かったのに対し、セロファンテープ接種法で50.0%と高い結果が得



第1図 穂くび節へのセロファンテープ接種法の模式図

第1表 3種類の接種法による穂くび発病穂率<sup>a)</sup>

接種法	接種穂数 (本)	穂くび発病穂率 <sup>b)</sup> (%)
噴霧法	128	12.5
CMC法	141	15.6
セロファンテープ法	180	50.0

- a) イネは圃場からポットに株上げしたコシヒカリを供試し、穂くび節抽出直後にイネいもち病菌菌株86-137 (レース007) を接種した。  
b) 接種24日後に調査した。

られた。セロファンテープ接種法で現れた病徴は、中央が灰白色でその周辺部が淡褐色であった（第2図）。



第2図 セロファンテープ接種法で穂くびに出現した病徴（接種10日後）

## 2. 接種後の温度条件がセロファンテープ接種法による穂くびいもちの発病に及ぼす影響

セロファンテープ接種法で穂くび節に接種後、異なる温度下に保持したときの穂くびいもちの発病穂率を第2表に示した。接種16日後の穂くび発病率は17℃では20℃および25℃と比較すると、実験Ⅰ、Ⅱともに低かった。しかし、接種後24日と31日の穂くび発病穂率には接種後の保持温度の影響は認められず、接種31日後の穂くびいもち発病穂率はいずれも67%以上と高かった（第2表）。

## 3. セロファンテープ接種法による窒素およびケイ酸施用したイネの穂いもち感受性検定

穂肥としての窒素とケイ酸施用量を異にしたイネに、セロファンテープ接種法を用いて接種した結果を第3表に示した。窒素の施用量やケイ酸施用の有無にかかわらず、発病穂率はいずれも93%以上と高い値を示したことから、穂肥施用量およびケイ酸施用の有無による発病穂率の差異は認められなかった。

第2表 接種後の温度条件を異にした場合の穂くびいもち発病穂率の経時的変化

接種後の温度	調査本数 (本)	穂くびいもち発病穂率 (%)		
		接種16日後	24日後	31日後
実験Ⅰ (2006年8月7日接種)				
17℃	169	13.6	56.2	66.9
20℃	162	25.3	58.0	73.5
25℃	180	23.3	50.0	75.3
実験Ⅱ (2006年8月9日接種)				
17℃	160	0.6	76.3	90.0
20℃	181	8.3	60.2	81.2
25℃	151	9.9	74.8	84.8

注) いもち病菌の胞子懸濁液を浸けた紙ひもを穂首側に付け、セロファンテープで巻きつけて接種した(第1図参照)。イネは圃場からポットに株上げしたコシヒカリを供試し、接種にはいもち病菌菌株稲86-137(レース007)を用いた。

第3表 窒素およびケイ酸施用量が穂くびいもち発生に及ぼす影響

穂肥窒素施用量 (kg/10a)	ケイ酸施用量 (kg/10a)	実施年	接種穂数 (本)	穂くび発病穂率 (%)
0	0	2006	40	90.0
	0	2007	49	100.0
	200	2006	34	94.0
	200	2007	42	93.0
3.5	0	2006	25	100.0
	0	2007	9	100.0
	200	2006	34	100.0
	200	2007	50	96.0
7.0	0	2006	31	100.0
	0	2007	42	100.0
	200	2006	38	100.0
	200	2007	45	100.0

注) いもち病菌の胞子懸濁液を浸けた紙ひもを穂くびに付け、セロファンテープで巻きつけて接種した(第1図参照)。イネは圃場からポットに株上げしたコシヒカリを供試し、接種にはいもち病菌菌株稲86-137(レース007)を用いた。

第4表 感受性系統(ZTS)と抵抗性系統(ZTR)の穂くびにセロファンテープ接種法でいもち病菌を接種した場合の穂くびいもち発病率

イネ系統	調査穂数 (本)	穂くびいもち発病率 (%)
実験Ⅰ (2009年9月1日接種)		
ZTS	99	48.5
ZTR	49	0.0
実験Ⅱ (2009年10月7日接種)		
ZTS	93	86.0
ZTR	181	0.0

注) いもち病菌の孢子懸濁液を浸けた紙ひもを穂くびに付け、セロファンテープで巻きつけて接種した(第1図参照)。接種にはいもち病菌菌株1菌株(レース007)を用いた。

#### 4. セロファンテープ接種法による感受性・抵抗性系統間の穂いもち発生の比較

抵抗性系統ZTRと感受性系統ZTSに、セロファンテープ接種法を用いて接種した結果を第4表に示した。ZTSでは、48.5%と86.0%の穂いもち発生が認められたのに対し、ZTRではまったく発生は認められなかった。

#### 考 察

セロファンテープ接種法は、いもち病菌の孢子懸濁液を吸着させた紙ひもを穂くびに付着させ、セロファンテープで紙ひもと穂を巻いて乾燥しないようにして接種する方法である。セロファンテープ接種法は高湿度を保持する設備がなくとも、高率で安定的に穂くびいもちを発病させることができた。これはセロファンテープで覆われた接種部位が濡れた状態で長時間保たれるためと考えられる。今後その部位で接種孢子がどのようにして侵入・伸展しているか、これまでの感染過程の観察報告<sup>6,7,11,12,13</sup>と同一機構で侵入・伸展しているのか否かを比較検討する必要がある。

低温下でいもち病が多発生することが、これまで多数報告されていることから<sup>2,8,14</sup>、本実験では接種後に接種穂を低温下に保持した場合に、常温区と比較して発病率が増加するか否かを調べた。その結果、接種後に低温に保持しても発病率の増加は認められなかった。既報<sup>2,8,14</sup>では、接種前の時期からイネを低温下に保持して、イネの抵抗的体質が弱まっている時期に、いもち病菌に感染したために多発生したものと考えられている。本実験の場合は、接種前は常温で、接種後だけ低温下に保持したため、低温処理によるイネの抵抗的体質の低下が十分に起きなかったものと推察される。

窒素の施用量とケイ酸施用の有無は、穂いもち自然発生あるいは噴霧接種による発病程度に顕著な影響を及ぼすことが報告されている<sup>16</sup>。しかし、セロファンテープ

接種法で穂くびにいもち病菌を接種する方法では、窒素とケイ酸の施用量が穂いもちの発生に影響を与える以上に、発病を助長した結果となった。この原因の一つとして、今回用いた接種濃度(孢子濃度 $2 \times 10^5$ 個/ml)が高かったことが考えられる。今後、種々の孢子濃度で接種した場合について検討する必要がある。

一方、このセロファンテープ接種法によって、感受性系統のZTSでは発病穂が高率で出現したのに対し、抵抗性系統のZTRでは発病は認められなかった。これまで、真性抵抗性遺伝子を持つイネ品種において、葉身ではいもち病菌の接種に対して無病徴であっても、穂では病徴を出現することが報告されている<sup>1,10</sup>。これらの報告では出穂前の止葉葉鞘内にいもち病菌を注射接種したため、葉鞘内の穂組織が抵抗性を発現できる態勢になっていなかったものと推測される。このように、穂いもち抵抗性は穂のエイジ、特に出穂の前後によって大きく影響を受ける。本試験では穂くび節抽出直後の穂くびに接種したため、ZTRで発病しなかったものと考えられる。

以上のことから、セロファンテープ接種法は、窒素やケイ酸施用による抵抗的(罹病的)体質の検定には適していないが、真性抵抗性の検定には適していると考えられた。とりわけ高湿度を保持する設備のない圃場や実験室での穂いもち抵抗性検定に利用できることが示唆された。

#### 引用文献

- 1) Hao, Z. N., Wang, L. P. and Tao, R. X. (2009) Expression patterns of defence genes and antioxidant defence responses in a rice variety that is resistant to leaf blast but susceptible to neck blast. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74: 167~174.
- 2) Hashioka Y. (1965) Effects of environmental factors on development of causal fungus, infection, disease

- development, and epidemiology in rice blast disease. In *The Rice Blast Disease*. 153-161, Johns Hopkins Press, Baltimore.
- 3) 平野喜代人・後藤和夫 (1963) 枝梗イモチの発病機構並びに生態に関する研究. 農技研報 C-16: 1~66.
  - 4) 岩野正敏 (1973) いもち病菌の針接種法とそれによるレースの簡易検定. 北陸病虫研報 25: 1~3.
  - 5) Jia, Y., Valent, B. and Lee, F. N. (2003) Determination of host responses to *Magnaporthe grisea* on detached rice leaves using a spot inoculation method. *Plant Dis.* 87: 129~133.
  - 6) 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.
  - 7) Koga, H. (1995) An electron microscopic study of the infection of spikelets of rice by *Pyricularia oryzae*. *J. Phytopathology* 143: 439~445.
  - 8) Koga, H., Dohi, K., Mori, M. (2004) Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65(1): 3~9.
  - 9) Koga, H., Dohi, K., Yoshimoto, R. and Mori, M. (2008) Resistance in leaf blades assessed by counting conidia correlates with whole plant-specific resistance in leaf sheaths in a compatible rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 246~249.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) 古賀博則・吉野嶺一 (1991) 籾いもち自然感染部位の微細構造. 北陸病虫研報 39: 23~28.
  - 14) 大畑貫一・後藤和夫・高坂淳爾 (1966) イネいもち病抵抗力に及ぼす低温の影響, ならびに抵抗力の変動とイネ体内成分との関係. 農技研報 C-20: 1~65.
  - 15) 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. 病害虫発生予察特別報告 4: 1~156.
  - 16) 塚本昇市・吉本玲子・古賀博則 (2008) 窒素およびケイ酸の施用による穂いもち抵抗性の変動. 北陸病虫研報 57: 60 (講要).
  - 17) 山口富夫 (1980) 第2章 IV. いもち病菌の一般的試験法. イネのいもち病と抵抗性育種 (山崎義人・高坂淳爾編), 140~174, 博友社, 東京.
- (2011年12月8日受理)
-