

簡易接種ボックスによるイネいもち病菌の室内接種法

高原 浩之・清水 琢斗

Hiroyuki TAKAHARA and Takuto SHIMIZU :

A simple inoculation method for rice blast fungus *in vitro*

We developed a simple method for inoculation of rice plants with rice blast fungus *in vitro*. We tested this method to verify disease severity in 10 different rice varieties, and we detected clear differences in symptoms between susceptible and resistant ones. Here, we describe the construction of a low-tech inoculation box, inoculation conditions, and a simple technique to evaluate the symptoms of rice blast disease.

Key words : いもち病菌, イネ, 室内接種法, 罹病性, 抵抗性

いもち病は、我が国をはじめとする世界各国の温帯地域や熱帯地域においてイネに多大な被害を与える病害である。よって、イネにおけるいもち病抵抗性の賦与は、新品種作出における育種目標の一つでもある。

いもち病抵抗性は、真性抵抗性遺伝子に支配されたレース特異的な抵抗性と、一般に複数の圃場抵抗性遺伝子の積み重ねによる結果と考えられるレースに依存しない抵抗性がある^{5,6)}。これらの抵抗性の遺伝子型や病斑、また罹病程度を判断するために、様々な接種方法が考案されている。例えば、いもち病の感染型や葉いもちの病斑の評価には、パンチ接種や針接種^{2,7)}、マイクロピペットなどの器具を利用した接種法^{3,4)}などが用いられている。これらの方法は、主に室内環境で行われる場合が多く、環境変化に左右されないという利点があり、また病斑を任意の場所に発生させることができることから、顕微鏡レベルでの細胞学的な解析にも適している^{3,4)}。その一方で、品種・圃場レベルでの抵抗性、発生生態、防除試験などには、自然感染や噴霧接種などできるだけ物理的な接種圧の少ない方法が用いられている⁷⁾が、実験遂行上、いくつかの制限もある。例えば、畑晩播¹⁾に代表される圃場を利用した試験では、比較的大規模な研究スペースが必要となる。また室内試験においても接種可能な温室の整備や高価な接種箱を必要とすることから、設備を持たない事業所や出先機関、大学の研究室レベルで、そのような評価を行うことは困難であった。

そこで本研究では、いもち病の接種試験を小規模で安価に行うために、自家製作した簡易接種ボックスと人工気象器を使用し、簡易的にいもち病の感染評価を行う室内接種法を開発した。特に達成すべき項目を、1) 省スペースで多検体を扱うこと、2) 安定した室内環境で十分に発病させることとした。さらに確立した方法で、異なるイネ10品種に対する発病程度をイネ体の新鮮重で評価することも試みた。

イネ体の育苗は、まず籾を水稲用総合種子消毒剤（モミガードC、銅・フルジオキシニル・ペフラゾエート水和剤、北興化学）200倍希釈液に浸漬し、15℃の暗所で24時間消毒した。水を毎日交換しながら、5日間浸漬させた後、28℃の暗所で1~2日間催芽させた。穴径3cm×3cmの育苗セルトレイに粗粒状土壌（キセキ培土ラブリー、キセキ北陸）を敷き詰め、発芽したイネを5粒ずつ3反復で播種し、ガラス室内で約2週間、2.5葉期まで生育させた。

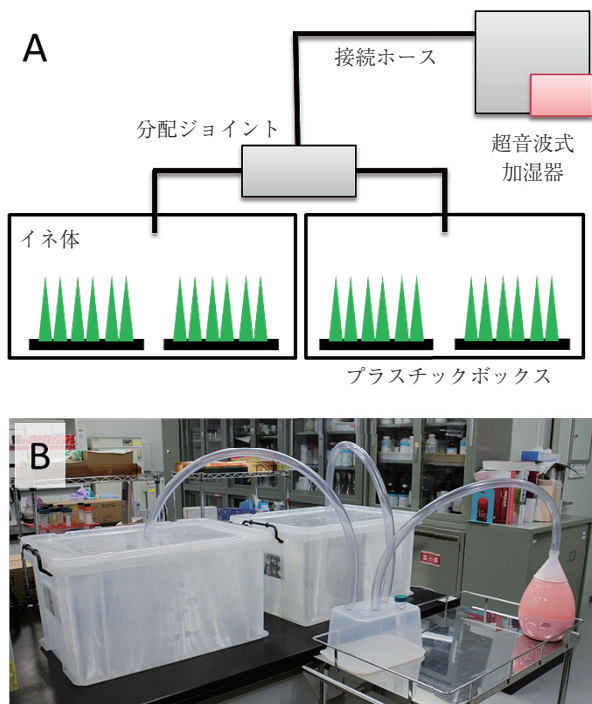
イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) は、北1株（レース007）および24-22-1-1株（レース037.1）を用いた。供試菌をシェーククロス添加オートミール寒天培地上に移植後、24℃の暗黒条件で培養した。3週間後に気中菌糸をブラッシングにより除去し、さらに24℃の蛍光灯下で3日間静置して孢子形成させた。シャーレに0.02%のTween20水溶液を添加してコンラージ棒で表面を軽くこすり、浮遊してきた孢子を1重キムワイブで

濾過し、菌糸片や残渣を取り除いた後にトーマ血球計算盤で計測し、孢子濃度を 5×10^4 個/mL に調整した。

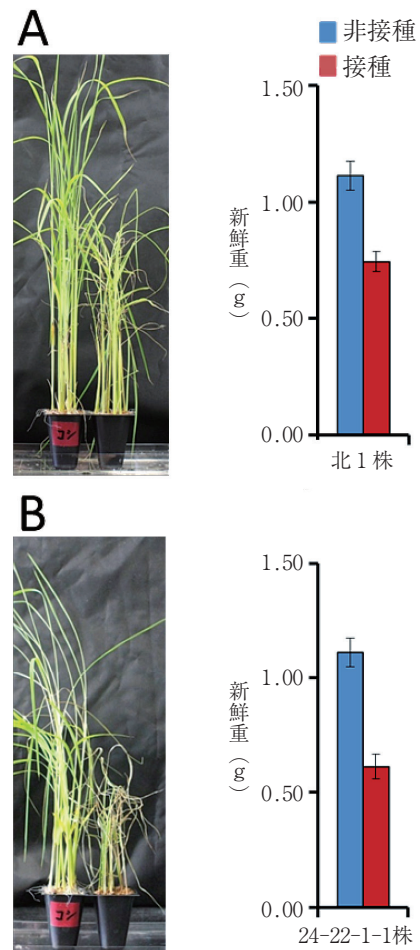
接種ボックスは、ロック式のフタがついたプラスチックボックス（タッグボックス07：内寸W540×D370×H285mm、伸和）を用いた。超音波式加湿器（SHIZUKU mini, AHD-035, アピックスインターナショナル）を連結するために、接種ボックスの上部もしくは側面に直径25mmの穴をあけた。非接種区や複数菌株を接種するなど、複数試験区に対応するために、小型のタッパーに必要試験区数に応じて同様の穴をあけた分配ジョイントを用意し、加湿器、分配ジョイント、接種ボックスを透明ビニールホース（外径26mm）で連結した（第1図A, B）。接種ボックスに2.5葉期程度にまで生育したイネ体を育苗セルトレイごと移し、株元が少し浸かる程度の水を加え、植物全体にいもち病菌の分生孢子懸濁液を1ボックス当たり約20mL噴霧した。対照区として水を噴霧したものをMock処理とした。フタをして加湿器を連続稼働させながら室温で静置した。24時間後にフタを少しだけあけ、外気の湿度に数時間ならした後、接種イネを明期14時間、暗期10時間、温度27℃のインキュベーターに入れ、6日間生育させた。さらに発病を促すために、同一

菌株を再度接種し、同様の条件下で生育させた。接種試験は1回につきイネ5個体を3反復で用意し、それを1セットとして独立した3セットの接種試験を行った。

この方法で罹病品種コシヒカリについて評価したところ、接種区において激しい病徴を示した（第2図）。このことから、高価な接種箱を使用しなくてもいもち病の発病に成功し、その病徴を評価できることが示された。また接種区でいもち病に特有の枯れあがるような病徴を示したことから、イネ体地上部を地際からハサミで切り取って新鮮重を計測した。その結果、非接種対照区と比較していもち病菌の接種区でイネ体地上部の生重量が顕著に低下していた（第2図）。そこで本法を用いて、いもち病判別品種である新2号（*Pik-s*）、愛知旭（*Pia*）、



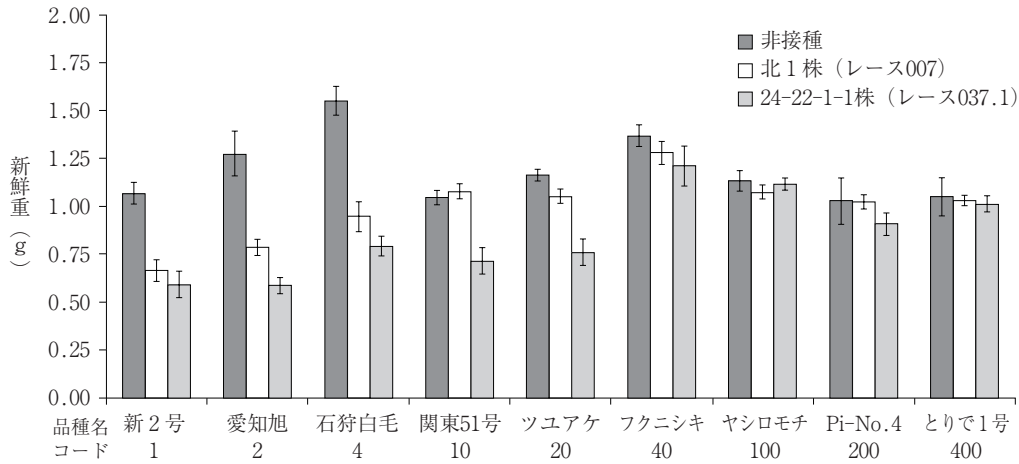
第1図 プラスチックボックスと超音波加湿器を連結した接種法の概略図（A）と実際の接種実験の様子（B）



第2図 罹病性品種「コシヒカリ」におけるいもち病の病徴と地上部の新鮮重

接種試験は1回につきイネ5個体を3反復で行った。グラフは独立した3回の接種試験の平均値。エラーバーは標準誤差。

A：北1株の接種，B：24-22-1-1株の接種



第3図 いもち病菌の接種による判別9品種の新鮮重

接種試験は1回につきイネ5個体を3反復行った。グラフは独立した3回の接種試験の平均値。エラーバーは標準誤差。

石狩白毛 (*Pii*), 関東51号 (*Pik*), ツユアケ (*Pik-m*), フクニシキ (*Piz*), ヤシロモチ (*Pita*), Pi-No. 4 (*Pita-2*), とりで1号 (*Piz-t*) の計9品種に接種実験を行った。その結果, 接種に使用した2菌がそれぞれ持つ病原性に対し親和性を示す品種にのみ顕著な病徴が現れ, その新鮮重も低下していた(第3図)。以上のことから, 本法で設計した安価で簡易な接種ボックスは, いもち病を発病させるのに十分であると考えられた。

ここで紹介した接種技術は, 2.5葉期のイネ幼苗を用いることから, 省スペースで多検体に対するいもち病の接種試験を行うのに適している。また, 菌レースに依存した発病が確認できたことから, 簡易なレース判別試験にも利用できる可能性がある。ただし, 新鮮重を用いた発病評価は, いもち病の感染による枯死や葉の乾燥, 発病による生育不良などによってグレード付けされる圃場抵抗性¹⁾のような評価に近く, 病斑形成の有無や形, 大きさ, 伸展程度などを評価基準とした罹病性や抵抗性を示す絶対的な評価とは異なる点を強調しておきたい。

謝 辞

いもち病菌24-22-1-1株は農研機構・中央農業研究センター北陸研究拠点(旧北陸研究センター)より分譲していただいた。

引用文献

- 1) 浅賀宏一(1981) イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究. 農事試研報35: 51~138.
- 2) 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. 北陸病害虫研究会報25: 1~3.
- 3) Jia, Y., Valent, B. and Lee, F. N. (2003) Determination of host responses to *Magnaporthe grisea* on detached rice leaves using a soft inoculation method. Plant Dis. 87: 129~133.
- 4) 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.
- 5) 林 長生(2005) イネいもち病. 微生物遺伝資源マニュアル18: 1~34.
- 6) 林 長生(2015) イネいもち病真性抵抗性遺伝子型の推定とその供試菌系. 微生物遺伝資源マニュアル38: 1~11.
- 7) 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・高坂卓爾編), 140~174, 博友社. 東京.

(2018年6月2日受理)