イネいもち病菌の病原性の変異に関する研究 II. 幅広い病原性スペクトラムを持つ1変異 株のイネ葉身上における継代接種に伴う 変異株の出現と優勢レースの変動

生井恒雄*・山中 達**

Tsuneo NAMAI and Susumu YAMANAKA: Studies on Variation in Virulence of Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. II. Appearance of Variants and Change of Predominant Race during Successive Inoculation of a Variant with Wide Spectrum of Virulence on Rice Leaves

Abstract

The occurrence of variants and change of predominant race of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara, during successive inoculation on rice plants were investigated using two isolates (race 337) which have wide spectrum of virulence and always sorted out some variants. Thus, the isolates were passed through the leaves of 6 susceptible rice varieties for 9 successive generations by punch-inoculation in a growth cabinet. In 4 among 12 combinations of 2 isolates and 6 rice varieties, predominant race changed until the 9th generation. On two varieties, Aichiasahi and Fujiminori with vartical blast resistance gene *Pi-a*, race 003 became predominant replacing the races 337 and 137 in 3 cases out of 4. Race 047 survived on Ishikari-shiroke with resistance gene *Pi-i* until the 9th generation. On the other hand, predominant race did not change in all combinations on Fukuyuki with resistance gene *Pi-i* and Kanto 51 and Kusabue with resistance gene *Pi-k* until the 9th generation.

These data suggested that race 337 sorted out many variants during the successive passage on rice leaves and some of the variants, race 003 or 047, survived and predominated in competition with others.

(Received December 4, 1984)

Key Words: change of predominant race, successive inoculation, *Pyricularia oryzae*.

緒 言

イネいもち病菌のレース構成が野外においてしばしば変動することはよく知られている事実である^{3,8,9,12,15,18)}。このようなレース構成変動の直接的原因は、従来の優勢レースを駆逐する新レースの生成、増殖によるが、栽培品種の作付変換がレース構成変動の原因となる例が多い^{3,9,12)}。新しい真性抵抗性遺伝子を導入して育成された高度抵抗性遺伝子の罹病化^{1,13,16)}は、

主に突然変異菌の増殖によるものと考えられ、すでに多くの真性抵抗性遺伝子に対する病原性獲得変異株の出現率も算出されている^{4,7)}。しかし、新潟、富山両県の調査例のように、外国稲由来の真性抵抗性遺伝子を持つ品種から在来種由来の品種への作付変換に伴い、従来の優勢レースが新品種上で増殖可能であるにもかかわらず漸次減少し、代って新品種の持つ抵抗性遺伝子に適応するような病原性スペクトラムの狭いレースが優勢となった事例^{3,9,12)}については、品種のもつ真性抵抗性遺伝子に対する適応レースの出現を示唆する

* 東北大学農学部 Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980, Japan

** クミアイ化学工業㈱ Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., Ikenohata, Taito-ku 110, Japan

ものと考えられる。

本実験では、前報⁹⁾において培地上で得た変異株の1つで、異なる病原性を示すレース（主に137）を分出する性質を持つレース337の菌株を供試し、本菌株が侵害しうる真性抵抗性遺伝子を持つ品種上で継代接種を繰り返すことにより、その抵抗性遺伝子に適応したレースが出現するか否か及び優勢レースの変動がみられるか否かについて検討した。

材料及び方法

供試菌はイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae* Cavara) のレース337の菌株で、本菌は既に報告したように、培地上でレース047と303の2種の菌株の栄養菌糸を切断後直ちに接着し培養する方法で、接着部付近から形成されたセクターより分離した1変異株である⁹⁾。本菌をオートミール培地上で常法により分生孢子を形成させ、再単孢子分離後病原性を再度確認した2菌株、337-1及び337-2を用いた。

継代接種に供試したイネ品種は、愛知旭、フジミノリ（真性抵抗性遺伝子：*Pi-a*）、石狩白毛、ふくゆき（同：*Pi-i*）及び関東51号、クサブエ（同：*Pi-k*）の6品種である。シードリングケース（10×5×15 cm）に川砂を入れ播種し、24℃に空調した専用のファイトロン内で多肥状態で育苗したが、育苗中は過湿を避けるため葉上からの散水は行わないようにし、又必要以上の灌水は控えた。このようにして育苗した7葉展開期の第6葉葉身上に、あらかじめオートミール培地上で形成させた供試菌株の分生孢子懸濁液をパンチ法で接種した。接種後25℃に保った接種箱内で約20時間保持した後、育苗に用いたのとは別の24℃に保持したファイトロン内に移し病斑を形成させた。接種後10～12日目に病斑上に新鮮な分生孢子を形成させるため、湿らせた脱脂綿で病斑両面をよくふいてから鉢ごとビニール袋に入れ密封した。24時間後に病斑約30個を切り取り、界面活性剤（Tween 80）を含む蒸留水を加え、毛筆でよく混合して孢子懸濁液（ 2×10^5 個/ml）を調整し、次世代のイネ、即ち10日遅れで播種した同品種の6葉葉身上にパンチ法で接種する方法で、連続的に9世代まで継代した。継代2世代、5世代及び9世代目にそれぞれ無作為に4個の病斑から5個ずつ単孢子分離を行い、合計20分離株について常法に従って病原性を検定した。また、供試菌株が、分離当初のレース337の菌株の他にレース137の菌株をも分出する性質を保持しているかをみるために、培地上で形成され

た分生孢子の病原性を検定した。即ち、供試した2菌株の菌叢小片をそれぞれジャガイモ寒天培地（PDA）上で9回植え継いだ。2及び9回継代培養した菌株をオートミール培地上で常法により孢子形成させ、培地上4ヶ所の菌叢部位から5個ずつ単孢子分離し、20分離株の病原性を調査した。なお、病原性の検定は反復して行ったが、病原性が変動しレース検定できなかった菌株は非同定菌株として示した。

結 果

PDA 培地上における 継代培養中に分離された菌株のレース構成

供試菌株 337-1 及び 337-2 の PDA 培地上における継代培養 2 及び 9 回目の菌叢上から単孢子分離した菌株のレース構成を調べた。その結果、レース337（母菌と同じ）とレース137が大多数を占め、その他はわずかにレース133が分離されたが、菌株間、継代数でのレース構成の差は、ほとんどみられなかった（Table 1）。この結果は、供試菌株が分離当初から持

Table 1. Pathogenicity of isolates from the subcultures of race 337 of *P. oryzae* transplanted successively 2 and 9 times on PDA slant medium

Transplanting Race	337-1		337-2	
	2	9	2	9
337	9	10(1*)	11	9
137	10	7	6	10
133	1		2	1
?		2		

? : unidentified isolate

* : formed a few susceptible lesions on Fuku nishiki leaves

っていたレース137を高率に分出する性質を、継代培養をくり返しても消失することなく安定して保持していることを示している。なお、337-1 菌株では、継代培養9回目の菌叢からフクニシキ上に少数の罹病型病斑を形成する菌株が1菌株分離されたが、病斑数が極めて少ないことからレース337と検定した。

Pi-a 遺伝子を持つ品種上における継代接種に伴うレース構成の変動

愛知旭の葉身上における337-1菌株の継代接種の結果、2世代目には母菌と同じレース337のほか多数のレース137が主に分離された。5世代目になると、両

レース以外に石狩白毛に対して病原性を消失したレース333, 133が分離され、レース構成が複雑となった。これらの分離株の PDA 培地上に形成される菌叢は、黒色の菌叢上に黄褐色に着色した気中菌糸が生育し、母菌の菌叢の特徴と同じであった。9世代目になると、外国稲及び石狩白毛に対して病原性を示さないレース003が多数分離され、レース337及び137に代って優勢となった。レース003は PDA 培地上での菌叢の特徴からも母菌とは容易に区別できた。337-2 菌株では、2世代目から9世代目まで 337-1 菌株の結果とほとんど同様の傾向が認められた。すなわち、5世代目まではレース337と137が優勢であったが、9世代目には分離株の大多数がレース003となり、337-1 菌株の場合と同様に優勢レースとなった (Table 2)。

Table 2. Pathogenicity of isolates from the lesions on Aichiasahi leaves at the 2nd, 5th and 9th generations of two isolates of race 337 of *P. oryzae*

Generation	337-1			337-2			
	Race	2nd	5th	9th	2nd	5th	9th
337		8	9	2	10	6	
333			1	1	1		
137		11	8	1	7	8	
133			1	1	1	1	
103							1
003				13			15
?			1	2		1	3

? : unidentified isolate.

次にフジミノリの葉身上における 337-1 菌株の継代接種に伴うレース構成の変動を調べた結果、2, 5及び9世代目ともレース337と137の他に、少数のレース333及び133が常に分離されたが、大きなレース構成の変動はみられずレース337と137が優勢を保持した。これに対して 337-2 菌株の場合は、2世代目までは 337-1 菌株の結果とほぼ同様のレース構成がみられたが、5世代目にはレース 337と137の他にレース003が3菌株分離された。更に9世代目になると、レース003が分離株の大多数となり、母菌と同じレース337及びレース137に代って優勢レースとなった (Table 3)。

Pi-i 遺伝子を持つ品種上における継代接種に伴うレース構成の変動

石狩白毛の葉身上における 337-1 菌株の継代接種の結果、9世代目までレース337及びレース137と、少

Table 3. Pathogenicity of isolates from the lesions on Fujiminori leaves at the 2nd, 5th and 9th generations of two isolates of race 337 of *P. oryzae*

Generation	337-1			337-2			
	Race	2nd	5th	9th	2nd	5th	9th
337		9	6	7	14	7	2
333		2	1	2	1		
137		6	9	5	4	8	
133		2	3	3	1		
003						3	16
?				3		2	2

? : unidentified isolate.

数ではあるが *Pi-i* 遺伝子を持つ品種に対して病原性を持たないレース133が常時分離され、継代に伴うレース構成の変動は認められなかった。しかし、9世代目には母菌と明らかに区別できる菌叢を形成するレース047が1菌株分離された。一方、337-2 菌株では、2世代目には母菌と同じレース337のほか、多数のレース137及び少数のレース133が得られたが、5世代目になるとこれらのレースのほかにはレース047が3菌株分離された。9世代目には、レース047が最も高率に分離され、明らかに優勢レースとなった (Table 4)。

Table 4. Pathogenicity of isolates from the lesions on Ishikari-shiroke leaves at the 2nd, 5th and 9th generations of two isolates of race 337 of *P. oryzae*

Generation	337-1			337-2			
	Race	2nd	5th	9th	2nd	5th	9th
337		13	17	10	14	10	
137		6	2	6	4	4	2
133				1	1	1	
047				1		3	15
?			1	2		2	2

? : unidentified isolate.

次に、ふくゆき葉身上における両菌株の継代接種とレース構成との関係を見ると、両菌株とも9世代目までレース337と137が分離株の大多数を占め、継代に伴うレース構成の変動は認められなかった (Table 5)。

Pi-k 遺伝子を持つ品種上における継代接種に伴うレース構成の変動

関東51号の葉身上における 337-1 菌株の継代接種

Table 5. Pathogenicity of isolates from the lesions on Fukuyuki leaves at the 2nd, 5th and 9th generations of two isolates of race 337 of *P. oryzae*

Generation Race	337-1			337-2		
	2nd	5th	9th	2nd	5th	9th
337	2	9	12	15	12	10
333		1				
137	14	7	5	3	6	7
133	4	1	2	1	1	
037		1				
033			1			
?		1		1	1	2

? : unidentified isolate.

の結果、2世代目ではレース137の分離数がレース337のそれより多かったが、5世代、9世代目と世代数が進むとその比率は逆転し、レース337の分離数が多くなった。また、5世代目には *Pi-k* 遺伝子を持つ品種上から野外で高率で分離されるレース033が2菌株得られたが、9世代目には増加せず、優勢レースとはなり得なかった。337-2菌株でも、レース337と137が分離株の大多数を占め、337-1菌株の結果と同様に優勢を保持した (Table 6)。

Table 6. Pathogenicity of isolates from the lesions on Kanto 51 leaves at the 2nd, 5th and 9th generations of two isolates of race 337 of *P. oryzae*

Generation Race	337-1			337-2		
	2nd	5th	9th	2nd	5th	9th
337	4	7	9	14	17	12
333		1	1			1
137	12	7	4	4	2	4
133	3	3	1		1	1
033		2	1			
?	1		2			2

? : unidentified isolate.

クサブエ葉身上における継代接種の結果、両菌株とも関東51号葉上での結果とほとんど同様で、9世代目までレース337と137が常に優勢を保持し、継代に伴うレース構成の変動は認められなかった (Table 7)。

Table 7. Pathogenicity of isolates from the lesions on Kusabue leaves at the 2nd, 5th and 9th generations of two isolates of race 337 of *P. oryzae*

Generation Race	337-1			337-2		
	2nd	5th	9th	2nd	5th	9th
337	4	9	10	9	9	11
333	1	1		1		
137	7	6	6	8	9	7
133	5		1			1
?	2	1	2	1	1	

? : unidentified isolate.

考 察

本実験で供試したイネいもち病菌菌株 (レース337) は既に報告したように、2種のイネいもち病菌の菌株 (レース047と303) の栄養菌糸を切断後直ちに接着させて培養し、接着部付近から形成されたセクターより分離した1変異株で、本菌株は菌糸融合の結果生成された変異株と考えられた⁶⁾。病原性に関しては、レース337の他に、*Pi*No. 4 に対して病原性を欠いたレース137を同時に分出する性質がみられた⁹⁾。本実験の結果でも、培地上及び継代接種に供試したイネの葉身上においても、母菌と同じレース337のほか、多数のレース137が常時分離されたことから、本菌のこの性質は安定して維持されていることが明らかとなった。更に本実験では、レース137以外に、少数ではあるが石狩白毛に対して病原性を示さない変異株もしばしば分離された。これらのことから、本菌は極端に変異性に富む菌株とは言えないが、特に *Pi*No. 4 や石狩白毛に対して病原性が不安定な性質を持つものと考えられる。

本実験において継代接種中に明らかに優勢レースの変動が認められたのは3品種上の4組合せであった。特に真性抵抗性遺伝子 *Pi-a* を持つ2品種上では、9世代目までに4組合せのうち3組合せで優勢レースが変動し、いずれもレース003が優勢レースとなった。レース003は、*Pi-a* 遺伝子を持つ品種上から野外で最も高率に分離されるレースであり、最も適応したレースと考えられる。また、本実験で分離されたレース003の菌株のPDA培地上で形成される菌叢は灰白色を示し、母菌とは明らかに区別できた。一方、石狩白毛上における337-2菌株の継代接種の結果、レース

047が優勢レースとなったが、これは供試菌株の母菌の1つであるレース047が分出し、優勢になったものと推察される。337-1菌株でも9世代目にレース047が分離されたことから、この組合せでも更に継代接種を繰り返せば、レース047が優勢レースとなる可能性があるものと思われる。

本実験では、外部からの自然感染を防ぐため、育苗及び継代接種はそれぞれ別個のファイトトロン内で行った。本ファイトトロンの内部は空調のため常時かなりの乾燥風があり、又、育苗中は葉面からの散水や必要以上の灌水を控えたため、かなり乾燥気味であった。しかも、継代接種の接種源には、パンチ部から伸展した病斑上に再孢子形成させたもののみを用いたことなどから、自然感染の恐れはほとんどないと考えられる。したがって、以上の様な継代接種に伴う優勢レースの変動現象は、イネ葉身上における継代接種の過程で分出した変異株のうち、レース003あるいは047が、その後の継代の間にVan der Plankが提唱している安定化選択現象(stabilizing selection)¹⁰⁾に従って、母菌及びその他の変異株を駆逐し、代って優勢レースとなったものと推測される。残余の7組合せでは、継代接種中にレース137以外に母菌より病原性スペクトラムが狭くなった変異株(レース333, 133, 037, 033)が分離されたが、いずれも優勢とはならず、レース337および137が優勢を維持した。特に関東51号の葉身上では、*Pi-k*遺伝子を持つ品種に対して最も適応したレース033が出現したが、結果的には優勢レースとはなり得なかった。これらの結果は、単に病原性スペクトラムが狭くなったり、あるいは抵抗性遺伝子に適応した病原性を示す変異株が出現しても、その後の競合に打ち勝つ能力、即ち旺盛な病斑伸展能力^{2,19)} 或いは孢子形成能力^{3,11)}などを併せて持たないと優勢レースとはなり得ないことを示すものと考えられる。

本実験において優勢レースが変動した組合せにおける新優勢レースの出現はかなり遅く、いずれも5世代目以降であった。このことは、抵抗性遺伝子に適応した変異株が分離されるようになるまでには、その遺伝

子を持つ品種上で幾代か世代を繰り返す必要があることを示すものであろう。また、圃場においても、イネいもち病菌のレース構成は発病当初は単純であるがしだいに複雑化することが知られている^{3,10)} ことから、世代が進むにつれて変異株が漸増するものと推察される。

圃場から分離されるイネいもち病菌には、病原性が安定な菌株と不安定な菌株が共存していることが知られている¹⁷⁾ が、本実験で認められたような現象が圃場においても一般にみられるか否か、更に、病原性の極めて安定な菌株を供試した場合にも同じ結果が得られるか否か等については、今後の研究課題であらう。

摘 要

幅広い病原性スペクトラムを持ち、同時に病原性の異なる菌株を分出する性質を持つイネいもち病菌の1変異株(レース337)から2菌株を供試し、3種類の真性抵抗性遺伝子の一つずつ持つ6品種のイネ葉身上で連続的に9世代目まで継代接種することにより、変異株の出現及び優勢レースの変動について検討した。

供試した2菌株を6品種のイネ上でそれぞれ継代接種した12組合せのうち4組合せで、9世代目までに優勢レースが変動した。特に、真性抵抗性遺伝子 *Pi-a* を持つ愛知旭及びフジミノリの2品種上では、4組合せ中3組合せで、通常野外で同品種から最も高率に分離されるレース003が出現し、母菌のレース337に代って優勢レースとなった。また、*Pi-i* 遺伝子を持つ石狩白毛葉身上では、レース047が優勢となった組合せがみられた。しかし、*Pi-i* 遺伝子を持つ他の品種ふくゆき、更に、*Pi-k* 遺伝子を持つ関東51号及びクサブエ葉身上では、いずれの場合も優勢レースの変動は認められず、母菌のレース337及び137が優勢を保持した。

これらの結果から、本実験で優勢レースが変動した組合せでは、母菌のレース337が継代接種中に多くの変異株を分出し、その中の特にイネの抵抗性遺伝子に適応した変異株が他の菌株との競合に打ち勝ち、代って優勢となったものと推察された。

引用文献

1. 平野喜代人・加藤公光・橋本 晃 (1967). 日植病報 (講要) 33 : 76.
2. 岩野正敬・山田昌雄 (1973). 北陸病虫研報 21 : 22-28.
3. 岩野正敬・山田昌雄 (1983). 北陸農試報 25 : 1-64.
4. 清沢茂久 (1966). 植物防疫 20 : 11-14.
5. 生井恒雄・山中 達 (1980). 日植病報 (講要) 46 : 47.
6. 生井恒雄・山中 達 (1982). 同上 48 : 466-470.
7. 新関宏夫・岩永喜裕・大野清春 (1968). 農林水産技術会議研究成果 63 : 91-99.
8. 進藤敬助 (1976). 北日本病虫研報 27 : 27-30.
9. 梅原吉広・山口富夫・松山宣明 (1971). 北陸病虫研報 19 : 25-27.
10. Van der Plank, J. E. (1968). Disease resistance in plant. Academic Press, New York pp. 71-73.
11. Yaegashi, H. and Kobayashi, N. (1976). Ann. Phytopath. Soc. Japan 42 : 272-278.
12. 矢尾板恒雄・岩田和夫・山田昌雄・岩野正敬 (1977). 新潟農試研報 26 : 53-62.
13. 山田昌雄 (1965). 植物防疫 19 : 231-234.
14. 山田昌雄 (1967). 同上 21 : 153-159.
15. 山田昌雄・岩野正敬 (1970). 北陸病虫研報 18 : 18-21.
16. 山田昌雄 (1977). 育種 27 : 378-381.
17. 山田昌雄 (1980). 植物感染機作, 病理化学談話会講要 10-19.
18. 山中 達・池田正幸・小林尚志・柳田騏策 (1968). 坂本教授還暦記念論文集 pp. 205-210.
19. Yamanaka, S. (1974). Tohoku Agri. Res. 25 : 125-129.