学会賞受賞者講演

イネの白葉枯病抵抗性機構に関する研究†

堀 野 修*,**

HORINO, O.*:**: Studies on resistance mechanisms of rice against bacterial blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

白葉枯病は、グラム陰性の桿菌で黄色・粘濁性のコロニーを形成する細菌、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* によって引き起こされるイネの重要病害の一つである。白葉枯病に罹病したイネは萎凋、葉枯れ、ペールイエロー (pale yellow) と称する病徴を示し、やがて枯死する。本病は、これまでアジア全域、オーストラリ

ア、アメリカなどで発生が報告されている。わが国では、農地の基盤整備や河川の改修により近年になって白葉枯病の発生は他のアジア諸国に比べて深刻な問題ではなく、毎年いくつかの発病事例が報告されているにすぎない。しかし、1993年には日照不足、低温、長雨に加えて数回の台風襲来により、九州地方の稲作は白葉枯病といもち病の大発生により大きな被害を受けた。

一方、白葉枯病は他のイネ病害と異なり、本病に対する既存の殺菌剤の効果が必ずしも十分でないので、専ら抵抗性品種の育成と栽培によって病害を回避しているのが現状である。しかし、このような耕種的防除の難しさは、アジアをはじめとした稲作国で白葉枯病による被害が大きいことの一因であると考えられる。本病の防除のためには、今後とも抵抗性品種の利用が特に重要な手段となるので、白葉枯病に対するイネの抵抗性機構の解明や白葉枯病菌の病原性機構の解明が急務とされてきた。

1. アジアのレース分布とイネ品種抵抗性

日本における白葉枯病菌レースの分布調査の結果、レース I と II はすべての地域で優勢に分布していたが、III, IV, V の割合が低く、また地域差がみられた。九州・沖縄地区においてレース II の分離頻度が高かったのは、長

年にわたり黄玉群品種の栽培が続いたことによるものと思われる。しかし、これまで金南風群の品種だけが栽培されてきた地方においても、II, III のレースがかなりの頻度で分離されることがあるが、その原因は明らかではない。しかし、抵抗性品種を導入する前から、その品種を侵しうるレースが低率にせよ分布しているということは、抵抗性品種の育成上見逃すことのできない問題である。

インドネシア産菌株の病原性を検定した結果、日本のレース I, II はインドネシアでは見いだされなかったが、少なくとも4種のレースが分布することを確認した。バングラデッシュ産20菌株の日本、IRRI (国際稲研究所) 両判別品種に対する病原性を検定した結果、3種のレースに類別された。バングラデッシュ産菌株はすべてのIRRI判別品種に病原性を示す菌株が高率に含まれていたため、他の国の白葉枯病菌に比べて病原性範囲が広いことが考えられる。フィリピン、日本両者の判別品種と代表レースの交互接種を行った結果、両判別品種間に共通の反応型を示すものではなく、したがって抵抗性遺伝子型の同じものは含まれていなかった。さらに、日本の判別品種の黄玉 (*Xa-1*, *Xa-kg*) と Te-tep (*Xa-1*, *Xa-2*) はすべてのフィリピン産菌に抵抗性を示さないことが判明した。また、フィリピン各地から採集した61菌株は、日本判別体系ではすべてレース III に分類されたが、IRRI (国際稲研究所) 判別品種に対する反応型が日本のレース III とは異なることが明らかとなった。以上のように、日本、インドネシア、バングラデッシュ、フィリピンなどアジアに分布している各レースの病原性は変異の幅が広く複雑に分化しているので、垂直抵抗性だけを利用することによって本病を防除することはもはや困難である。そのため、今後の抵抗性育種の方向としては、すでにいもち病の育種戦略として提唱されてい

† 平成14年4月3日 平成14年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

* 京都府立大学農学部 Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522, Japan

** 現在：滋賀県大津市仰木の里3丁目16-6 Present address: 3-16-6, Ogino-sato, Otsu-shi, Shiga 520-0246, Japan

る、(1) 水平抵抗性の利用、(2) 水平抵抗性と垂直抵抗性との結合、(3) 異なる垂直抵抗性をもつイネ品種の混合栽培 (多系品種の育成)、(4) 異なる垂直抵抗性をもつイネ品種の交替栽培など、白葉枯病にも抵抗性の多面的利用を積極的に適応すべきである。

2. 抵抗性の遺伝子分析

IRRI で育成された抵抗性品種、IR26 のレース I ~ V に対する抵抗性の遺伝解析を行った結果、IR26 のレース I ~ V に対する抵抗性はポリジーン支配による水平抵抗性であり、これらレースに対する抵抗性の F_2 世代における広義の遺伝力は 0.7 ~ 0.9 と高い値を示すことを明らかにした。このように、水平抵抗性の遺伝力が高いことから抵抗性選抜も効率よく行われること、さらに異なるレースに対する水平抵抗性に関して多面発現効果をもつ遺伝子群が存在することがわかった。次に、IR28 のレース I ~ V に対する抵抗性の遺伝解析を行うため、感受性品種、トヨニシキとの交雑 F_1 、 F_2 集団の抵抗性を検定した。IR28 のレース I、V に対する抵抗性は垂直抵抗性であって、各々 1 個の優性主働遺伝子に支配されること、および両遺伝子は組換え価 4 % で密接に連鎖していることがわかった。一方、IR28 のレース II, III, IV に対する抵抗性はポリジーン系に支配される水平抵抗性で、これらのレースに対する抵抗性の F_2 世代における遺伝力は 0.718 (II), 0.909 (III), 0.835 (IV) と高い値を示した。このように、 F_2 世代における遺伝力は高い値を示したことから、水平抵抗性が遺伝的支配を受けていることは明らかであり、選抜の対象となりうる形質であることを指摘した。

3. 抵抗性の誘導

あるイネ品種の葉身に白葉枯病菌の不親和性レースを針接種したあと、その近くに親和性のレースを追加接種すると、あとから接種された親和性レースによる病斑伸長が抑制されることを明らかにした。この現象はエンバク冠さび病やオオムギうどんこ病などで報告されている「抵抗性の誘導」に相当すると考えられる。この試験では、一次接種には不親和性レースを、二次接種には親和性レースを常に用いた。4, 6, 10 cm ずつ離れた 2 ヶ所に一次接種を行い、その 3 日後に、一次接種 2 ヶ所の中間点すなわち 2, 3, 5 cm ずつ離れた部位に親和性レースを二次接種した。その結果、一次接種点と二次接種点に近いほど病斑抑制の程度は強く、一次接種から二次接種までの日数は 2 日の場合が最も抑制作用が強く、次いで 0 日、4 日であった。なお、一次接種に白葉枯病菌以外のイネに非病原性のカンキツかいよう病菌、野菜類軟腐病菌を供試しても、病斑抑制が認められた。この現象はおそらく不親和性レースの接種

によってイネの葉組織内に抵抗性物質が生成され、あとから接種された親和性レースに作用するために起こると推察した。

4. 抵抗性発現機構の電子顕微鏡による知見

親和性と不親和性のイネ品種・レースの組合せを用いて接種部付近を電顕観察した。その結果、不親和性の組合せでは接種後速やかに (3 日以内) 導管内に繊維状物質 (FM) が生成され病原細菌はこの物質に包囲されて変形し、死滅に近い状態となって増殖を停止することが判明した。親和性の組合せでは、細菌は導管内で正常に増殖し発病した。FM の起原を明らかにするため、通常の電子染色だけでは染色されにくい多糖質を濃く染色できる塩基性ビスマス法を用いて検討した。その結果、導管内には高電子密度の FM (DFM) と低電子密度の FM (LFM) が確認された。さらに、FM の起原を明らかにするためイネに $^{14}\text{CO}_2$ を同化処理後、電顕オートラジオグラフにより検討した。その結果、高電子密度の DFM 上に ^{14}C のシグナルが認められたので、DFM は宿主で合成された成分を含んでいると考察した。

5. 菌体外多糖質とイネ葉導管内での細菌の移動

これまで本菌の菌体外多糖質 (EPS) の生産量と病原力の間に正の相関があるとされているが、接種イネ葉では本菌の増殖に先立って病斑が形成されないこと、および EPS をほとんど産生しない変異株でも病原力を保持していることから、EPS を病原因子であると断定することは困難である。そこで、EPS を産生しない変異株を作出し、変異株をイネに接種して病原力を調べた。接種後 28 日目の親株の発病指数は 5.4 であったのに対して、EPS 変異株の発病指数は 0.4 ~ 3.2 であった。EPS 産生量が最も少ない菌株でも病原力を完全に失うことはなく、28 日目には病斑が形成された。イネ体内における EPS 変異株の増殖と移行を調べたところ、EPS 産生量が親株の 5 % の菌株でも接種部近傍における増殖は親株と差異が認められなかった。しかし、3 cm 以上離れた部位における EPS 変異株の細菌数は親株と比較して顕著に少なく、EPS 産生量の低下がイネ体内における本菌の移行に影響を及ぼすことが示唆された。このことから、EPS 産生能力の差異はイネ体内における細菌の増殖・移行に影響し、病徴発現に間接的に関与すると考察した。

6. 感染イネ葉導管内における本菌の菌体外多糖質の存在部位

本菌が産生する菌体外多糖質 (EPS) に対する抗体を作成し、蛍光抗体法および免疫電顕法により、感染イネ葉の導管内における EPS の存在部位を明らかにした。イネ葉

組織内のEPSを蛍光抗体法で観察した結果、FITC染色による緑色の蛍光は感染イネ葉の導管内および導管連絡糸内に認められた。しかし、師管部や柔組織にはFITCによる蛍光は認められなかった。蛍光抗体法によるFITCの蛍光の分布と侵入細菌の分布が一致していたので、EPSの存在部分はほぼ菌体周囲に限られていることが示唆された。さらに、免疫電顕法により感染したイネ葉の導管内を観察したところ、EPSの存在部位は菌体周辺および菌体表層に限定されていた。とくにEPSの存在を示す金コロイド粒子のシグナルが認められる菌体から100 nm以内の部分には、電子密度の低い繊維状物質であるLFMとして確認された部分であった。一方、感染イネ葉の導管内を充滿しているDFMには金コロイド粒子の特異的なシグナルは認められず、DFMは白葉枯病菌のEPSではないことが強く示唆された。以上の結果から、白葉枯病菌のEPSはVidhyasekaranら(1989)が報告しているように導管閉塞を引き起こす物質ではないことが示され、この点についてもEPSを直接的な病原因子であると考えすることは困難であると思われた。

7. 静的抵抗性の機構

(1) 抗白葉枯病菌物質

抵抗性程度の異なる品種の健全葉中および各品種の接種葉中に含まれる抗白葉枯病菌成分について検討した。健全葉抽出液の抗菌活性は中国45号≡Te-tep>黄玉>金南風の順で、抵抗性範囲の広い品種ほど抗菌活性が高かった。健全葉の抗菌成分を単離・精製し、8種の抗菌物質の化学構造を決定した。なお、健全葉と接種葉の間には抗菌物質の量的および質的差異は認められなかった。8種の抗菌物質の中で、トランス-2-ヘキセナールは50 µg/mlの濃度で、トランス-2-ヘキセン酸とシス-3-ヘキセン酸は100 µg/mlの濃度でそれぞれ細菌の生育を完全に阻止し、高い抗菌活性を示した。同定されたイネに含まれる抗菌物質は、ヘキセン酸を除き、いずれもアルデヒド基、フェノール基をもつリグニンの酸化生成物として知られており、白葉枯病が導管病の一種であることから、これらの抗菌物質がイネ体内で静的抵抗性にどのように関与しているのか興味もたれる。

(2) 水孔の形態による抵抗性

水辺雑草のアシカキはサヤヌカグサと同じ *Leersia* 属(サヤヌカ属)に属するが、自然条件下でサヤヌカグサは発病するが、アシカキは発病しない。その原因を透過電顕と走査電顕により病理解剖学的に検討した。アシカキの水

孔にはイネやサヤヌカグサの水孔とは異なり、孔辺細胞の上部に発達した突起(outer ledge)が存在するため、この突起が物理的に病原細菌の水孔からの侵入を妨げるので自然条件下でアシカキは発病をまぬがれると考察した。

8. *hrp* 遺伝子群と抵抗性誘導、病原性

植物病原細菌は植物体内で栄養を摂取して増殖し、さらに何らかの病原性因子をもつことにより、宿主に病原性を発揮する。白葉枯病菌についても、とくに後者について *hrp* 遺伝子群の病原性への関与が明らかにされつつある。まず、白葉枯病菌のイネ葉内での動態を同一試料で経時的に解析するため本菌に発光遺伝子を導入して発光菌株を作成し、発光を利用することにより、病原性を欠損した本菌 *hrp* 変異株が野生株との混合接種によりその増殖が相補されうること、また本菌とイネの不親和性関係における抵抗反応の誘導にも *hrp* が関与している可能性を示した。一方、白葉枯病菌のイネ葉内での栄養要求性を明らかにするために、とくに植物体に最も豊富に存在し、多くの生物のエネルギー源として最も多く利用されているグルコースの利用と病原性との関係について調べた。その結果、白葉枯病菌のグルコース吸収経路、あるいはβグルコシダーゼ遺伝子を破壊した変異株はグルコースやその2量体のセロビオース吸収能を欠損するにもかかわらず病原性を保持しており、これらの糖が本菌の宿主植物体内での増殖に必須でないことが明らかになった。

9. おわりに

イネ白葉枯病に対する抵抗性の発現機構については、この10年間でかなり多くの知見が蓄積されつつあるが、まだ研究が始められて年数が浅いため、その本質の詳細は明らかでない。そのため、イネ品種間の抵抗性差異がイネと病原細菌との接触場面でどのような機構に基づいて発現するのかという基礎的課題の研究はやっとその緒についたばかりである。今後、分子生物学的、遺伝子工学的手法を駆使し、病徴発現や抵抗性の機構、さらには白葉枯病菌の本質的な病原性因子の解明を期待するものである。

本研究の大部分は、著者が東海近畿農業試験場、北陸農業試験場、京都府立大学農学部 に在籍中に多くの方々の共同、協力によって行われたものである。加来久敏博士、渡部光朗博士、山田利昭博士、Dr. T. W. Mew (IRRI)、江塚昭典博士、稲葉忠興博士、佐藤善司室長、津下誠治博士には心から感謝申し上げます。