イネいもち病菌の野生 *Setaria* 属植物に対する病原性

宮司 貴浩¹⁾・藤田 佳克²⁾・草場 基章^{1)†}
(¹⁾佐賀大学農学部・²⁾日本大学生物資源科学部)

Pathogenicity of rice blast fungus on wild foxtail plants. Takahiro Miyashi¹⁾, Yoshikatsu Fujita²⁾, and Motoaki Kusaba^{1)†} (¹⁾Faculty of Agriculture, Saga University, Saga, Saga 840-8502, Japan. ²⁾College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252-0880, Japan)

野生 *Setaria* 属植物であるエノコログサ、アキノエノコログサ、キンエノコログサについて計12の植物株を供試し、イネいもち病菌6菌株を接種した。その結果、キンエノコログサでは全植物株で無病徴反応のみが観察された。エノコログサとアキノエノコログサでは中央に崩壊部のある小型病斑が観察され、2型感染型病斑と判定した。アキノエノコログサでは2型感染型病斑の形成が認められた供試植物株は少なかったが、エノコログサでは全植物株に認められた。一方、エノコログサでも2型感染型病斑が形成された植物の個体数は植物株間で大きく異なり、さらには同一株内でも接種した菌株により形成される場合とされない場合が認められた。2型感染型病斑の胞子形成能は全般的に極めて低かったが、エノコログサでは100個以上の胞子が形成される病斑も少数観察された。このような胞子形成能を有する病斑は特定の菌株と植物株の組合せで出現する傾向が認められた。

Keywords : giant foxtail, green foxtail, rice blast fungus

緒 言

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) はイネ (*Oryza sativa* L.) の栽培に深刻な被害をもたらす重要病原菌として知られる。本菌は主に保菌種子上に形成された分生胞子が苗に感染することで第一次伝染が起り、本田に移植された罹病苗が発病することにより二次感染が起こる (八重樫, 1997)。このように本菌の伝染環はイネ上に限定していると考えられるが、イネ以外の植物が本菌の二次宿主となり、そこからの分生胞子がイネへの伝染源になる可能性も否定できていない (八重樫, 1997)。イネいもち病菌のイネ以外の植物に対する病原性についてはこれまで多くの議論がなされてきた。本菌と同一種の *P. oryzae* は様々なイネ科植物から分離されているが、代表的なイネ科の栽培種を用いた接種実験により明確な寄生性分化を示す幾つかのグループに分けられる (Kato et al., 2000; Tosa et al., 2004)。これらのグループは *P. oryzae* の pathotype として類別されており、イネに

病原性を示す *Oryza* pathotype, アワ (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.) に病原性を示す *Setaria* pathotype, キビ (*Panicum miliaceum* L.) に病原性を示す *Panicum* pathotype, シコクビエ (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) に病原性を示す *Eleusine* pathotype, コムギ (*Triticum aestivum* L.) に病原性を示す *Triticum* pathotype, ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) 病原性を示す *Lolium* pathotype が知られている。また、各 pathotype は遺伝的にも分化していることから、イネを含めた各イネ科植物にはその植物種に対して特化した *P. oryzae* のみが感染し、異なる宿主間では菌の感染は起こらないと考えられる。その一方で、真逆の結論が得られた研究例もある。例えば、Asuyama (1963) は人工接種によりイネいもち病菌がイネ以外の様々なイネ科植物に病原性を示すことを報告している。加藤・山口 (1980) はネズミムギ (*Lolium multiflorum* Lam.), ハルガヤ (*Anthoxanthum odoratum* L.), クサヨシ (*Phalaris arundinacea* L.) から分離されたいもち病菌株にこれらの分離宿主植物に加えて、イネに病原性を有するものを見出した。後に、Kusaba et

† mkusaba@cc.saga-u.ac.jp

al. (1998) は加藤・山口 (1980) の供試菌株に加えて、イネと分離宿主に交互感染するオニノウシノケグサの菌株について分子生物学的手法による解析を行い、これらの菌株がイネいもち病菌であることを確認した。加藤 (1983) はイネいもち病菌 3 菌株をアワ、エンバク (*Avena sativa* L.), オオアワガエリ (*Phleum pratense* L.), ネズミムギ, ホソムギ (*Lolium perenne*) の多様な品種に接種した。その結果、これら植物種に対し、菌株と品種の組合せによっては時として罹病性反応が起こり、胞子を形成する病斑が出現したことを報告している。糸井ら (1979) はタケ類 (*Phyllostachys* spp.) およびササ類 (*Sasa* spp.) にイネいもち病菌が感染し、そこで越冬することを報告した。さらに、近年、Choi et al. (2013) は韓国の広域からメヒシバいもち病斑を採集し、これら病斑からの分離菌株にイネとメヒシバ (*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler) に交互感染するイネいもち病菌が含まれることを見出した。このように他種植物がイネいもち病菌の二次宿主となるかについては断定的な結論が下せない状況にあり、さらなる検討が必要とされている。

本研究では野生 *Setaria* 属植物であるエノコログサ (*S. viridis* (L.) P. Beauv.), アキノエノコログサ (*S. faberii* Herrm.) およびキンエノコログサ (*S. glauca* (Weigel) Hubb.) についてイネいもち病菌の二次宿主となる可能性を検討した。これらの野生 *Setaria* 属植物は何れも水田随伴雑草であり、農業生態系でイネいもち病菌と遭遇する機会がある。また、上述の通り、イネいもち病菌は品種と菌株の組合せによってはアワに罹病性病斑を形成することが報告されているが (加藤 1983), エノコログサとアキノエノコログサはアワに極めて近縁とされている (Dekker, 2003)。従って、これらの野生 *Setaria* 属植物はイネいもち病菌の二次宿主となる潜在的な可能性を有すると考えられるが、詳細な検討はこれまで行われてこなかった。本研究では 3 種の野生植物とイネいもち病菌について複数の植物株と菌株の組合せで接種実験を行った。そして、各接種組合せで観察された反応から、これらの野生 *Setaria* 属植物にイネいもち病菌が感染する可能性について考察を行った。

材料および方法

1. 供試菌株および供試植物

供試菌株として多様なレースを含むように選んだイネいもち病菌 6 菌株を用いた (第 1 表)。供試菌株の

第 1 表 供試したイネいもち病菌菌株のレースと来歴

菌株名	レース	採集地	採集年
TH68-9	071.0	福島	1969
Ken54-20	003.0	山口	1954
Ken54-04	003.0	岐阜	1954
Ao92-06-2	337.7	青森	1992
Ai74-134	477.1	愛知	1974
84R-62B	447.0	愛知	1984

長期保存は、既報 (Luo et al., 2002) に従い、滅菌したろ紙片に培養した菌叢を -25℃ 下で保存する方法で行った。また、使用に際しては、保存したろ紙片を試験管内のショ糖添加ジャガイモ煎汁寒天培地 (PSA) [ジャガイモ 200g, ショ糖 20g, 寒天 20g, 蒸留水 1000ml] に移し、25℃ 下で培養して菌叢を形成させた。このようにして得られた試験管保存菌株は培養開始から随時使用し、3 ヶ月ごとに更新した。供試植物としてエノコログサ 7 株、アキノエノコログサ 3 株、キンエノコログサ 2 株を用いた (第 1 図)。これら植物株のうち、本研究で初めて供試した植物株は、SV8 が 2004 年に、SV18 が 2006 年に、SG13 と SG14 が 2008 年にそれぞれ佐賀県で採集されたものである。その他 8 株の採集地は既報 (堤・草場, 2015) で述べており、採集年は SV1, SV3, SV10, SF1, SF6, SF7 は 2004 年、SV12 は 2005 年、SV19 は 2009 年である。また、各供試植物の種子増殖は既報 (堤・草場, 2015) の方法に従い、可能な限り植物株間の交雑を防ぐようにして行った。増殖した種子は使用時まで 10℃ で保管した。

2. 供試菌株の接種および病原性の評価

接種には 1 接種組合せ当たり 10~21 の植物体を用いた。植物体の育成は既報 (堤・草場, 2015) に従って行い、播種後、3 週間温室内で管理して 1~3 葉齢の植物体に育成した。植物体への菌株の接種は分生孢子懸濁液の噴霧接種により行った。孢子形成のための菌株の培養、孢子懸濁液の調整は既報の方法 (Luo et al., 2002; Yamagashira et al., 2008) に従って行った。なお、孢子懸濁液は 1 ml 当たり 2×10^5 個の孢子を含むようにした。接種後の植物体は 25℃ の湿室中で 24 時間静置後、温室内で育成した。接種した菌株の病原性の評価は接種 1 週間後に行った。各供試植物体の全葉を肉眼で観察し、各葉の反応および形成された病斑をイネいもち病菌のイネに対する接種実験で用いられる基準 (Luo et al., 2002) に従い、以下の感染型に類別した。

0 型：無病徴

1 型：微細褐点

2 型：2 mm以下の褐色病斑，時として中央に崩壊部を有する

3 型：中央に崩壊部を有する円形の病斑

4 型：中央に崩壊部を有する眼点病斑

また，同一個体内で最も罹病性の高い反応あるいは病斑の感染型をその個体の接種菌株に対する反応とした。各供試植物体から中央に崩壊部を有する最も大きな病斑を選び，胞子形成能を調査した。採集した病斑を25℃暗黒条件下の湿室で18時間培養した。培養後，病斑の胞子形成面を1%素寒天平板培地に3回押し付け，病斑に形成された胞子を培地表面に移した。顕微鏡下での観察により，素寒天培地上の3ヶ所の全胞子を計数した。

結 果

供試菌株と植物株の各接種組合せで観察された感染型の割合を第1図に示す。全72の接種組合せで観察された供試植物個体の感染型は最も高くても2であり，3型以上は観察されなかった。キンエノコログサ（図1；C）について見てみると，全ての供試菌株はSG13とSG14のどちらの植物株にも全く病斑を形成せず，各接種組合せで供試植物個体からは無病徴反応（0型）のみが観察された。キンエノコログサとは対照的に，エノコログサ（図1；A）およびアキノエノコログサ（図1；B）への接種では0型に加え1型さらには2型の植物個体が観察された。エノコログサでは試験した42接種組合せ全てに1型の植物個体が含まれ，このうち32組合せでは2型の植物個体も含まれていた。アキノエノコログサでは1型および2型の感染型を含む接種組合せの割合はエノコログサよりも少なく，1型は試験した18接種組合せのうち11組合せに，2型は4組合せに含まれていた。また，2型に着目すると，2型の植物個体が含まれる接種組合せの数がエノコログサの株間では大きく異なる場合が認められた。すなわち，SV3，SV10およびSV12では全ての接種組合せに2型が含まれていた一方で，SV1とSV19ではそれぞれ3および2組合せに留まった。また，同じエノコログサの株でも菌株との接種組合せによっては2型が含まれる割合が大きく異なる場合も観察された。例えば，SV8ではKen54-20の接種により供試した12個体中7が2型に類別されたが，同じSV8でもTH68-9とKen54-04の接種では供試植物個体には2型の感染型は全く含まれていなかった。

本研究で2型に類別された病斑の多くは中央に崩壊

第2表 2型感染型病斑の胞子形成能

接種組合せ ^{a)}		供試 ^{b)}		胞子数 ^{c)}
植物株	菌株	病斑数		
エノコログサ				
SV1	Ken54-20	1	1	
	Ao92-06-2	1	0	
	84R-62B	1	1	
SV3	TH68-9	2	0, 0	
	Ken54-20	3	0, 0, 71	
	Ken54-04	6	0, 0, 0, 0, 1, 14	
	Ao92-06-2	2	0, 19	
	Ai74-134	2	3, 65	
	84R-62B	4	0, 0, 0, 14	
	SV8	Ken54-20	7	0, 0, 0, 0, 1, 5, 160
	Ao92-06-2	2	34, 204	
	Ai74-134	2	0, 4	
	84R-62B	3	0, 2, 7	
SV10	TH68-9	4	0, 0, 0, 1	
	Ken54-20	10	0, 0, 1, 3, 3, 4, 6, 6, 172, 390	
	Ken54-04	3	0, 0, 0	
	Ao92-06-2	1	1	
	Ai74-134	1	0	
	84R-62B	4	0, 0, 0, 3	
	SV12	TH68-9	2	0, 0
	Ken54-20	3	0, 0, 20	
	Ken54-04	1	0	
	Ao92-06-2	2	0, 2	
	Ai74-134	1	0	
	84R-62B	1	3	
SV18	TH68-9	1	0	
	Ken54-20	7	0, 8, 8, 15, 26, 69, 93	
	Ken54-04	2	0, 0	
	Ao92-06-2	3	0, 1, 7	
	84R-62B	7	0, 0, 0, 0, 0, 20, 28	
SV19	TH68-9	1	0	
	Ken54-20	1	0	
アキノエノコログサ				
SF1	Ao92-06-2	2	1, 34	
SF6	Ai74-134	2	0, 37	
SF7	Ken54-20	1	0	
	Ao92-06-2	1	0	

a) 2型感染型病斑が観察された接種組合せ。b) 各植物個体から最大の2型感染型病斑を1つ選び供試した。c) 各供試病斑に形成された胞子数を記録した。

A

第1図 イネいもち病菌に対する野生 *Setaria* 属植物の反応. イネいもち病菌6菌株 (TH68-9, Ken54-20, Ken54-04, Ao92-06-2, Ai74-134, 84R-62B) をエノコログサ (A), アキノエノコログサ (B) およびキンエノコログサ (C) の各植物株にそれぞれ接種した. 接種7日後に各植物体で観察された最も罹病性の高い反応あるいは病斑の感染型をその個体の接種菌株に対する反応とした. 各接種組合せで各感染型 (□, 0型; ■, 1型; ■, 2型) に類別された植物個体の数および割合を棒グラフで示した.

C

第1図 続き

部が観察された。そこで、各植物個体から最も大きい2型の病斑を採集し、97個の病斑について孢子形成能を検討した(第2表)。その結果、78病斑では孢子を全く形成しないか、あるいは、10個以下の孢子を形成するに留まった。したがって、エノコログサ、アキノエノコログサともに2型の病斑は基本的に孢子形成能が低いことが明らかとなった。しかしながら、エノコログサでは4病斑に100個以上の孢子形成が認められ、最多ではSV10とKen54-20の組合せの1病斑が390個の孢子を形成した。また、これら4病斑のうち3病斑はKen54-20の接種により形成され、残りの1病斑はAo92-06-2の接種により形成された。さらに、50から100個未満と比較的多数の孢子を形成した病斑が4個認められたが、このうち3病斑はKen54-20の接種により形成されたものであった。

考 察

イネいもち病菌のイネへの接種実験では3型以上の感染型は罹病性反応として判別される(Luo et al., 2002)。一方、2型以下は抵抗性反応でありイネいもち病菌の増殖・伝染には寄与しないものとして判別される(Luo et al., 2002)。本研究では全ての接種組合せで3型以上の感染型は観察されず、供試した3種の*Setaria* 属植物はイネいもち病菌に対して基本的に抵抗性と考えられた。その一方で、キンエノコログサでは小褐点さえ生じない免疫性反応の0型のみが観察されたのに対し、エノコログサとアキノエノコログサでは1型および2型の病斑も形成された。エノコログサ

とアキノエノコログサはアワに近縁なのに対し、キンエノコログサとアワは系統関係が離れていることが報告されている(Li et al., 1998)。キンエノコログサと他の2種の*Setaria* 属植物間で観察された反応の差異はアワとの系統関係を反映する現象と考えられる。

エノコログサとアキノエノコログサで観察された2型の病斑は中央に崩壊部があり、かつ、孢子を形成するものも存在した。これらのことより、2型の病斑では接種したイネいもち病菌の増殖が生じているものがあつたと考えられる。一方、各接種組合せで2型の病斑は全ての供試植物個体で観察されたわけではなく、同一の接種組合せ内でも植物個体が異なれば形成されなくなる不安定なものであると考えられた。さらに、孢子形成能を調査した2型の病斑の過半数は全く孢子を作らないか、あるいは、極めて少数の孢子が形成されるかに留まった。従って、2型の病斑はその孢子形成能についても不安定であると考えられた。アワのコムギいもち病菌に対する抵抗性にアダルトレジスタンスが大きく関与することが報告されている(Murakami et al., 2006)。このような抵抗性は量的形質であるため菌の感染を完全に抑制するものではなく、環境条件により時として病原菌の侵入・増殖を許してしまう場合がある。本研究で認められた2型病斑の形成さらにはその孢子形成の不安定さは、環境変動の大きいアダルトレジスタンスの特性から説明できるように思われる。

1型および2型の感染型を含む接種組合せはエノコログサがアキノエノコログサよりも圧倒的に多く、エノコログサの方がよりイネいもち病菌に対して感受性が高いことが示唆された。感受性が高いと考えられたエノコログサについても、SV1のように2型を含む接種組合せの数が他の植物株よりも少ないものも認められた。したがって、イネいもち病菌に対する感受性はエノコログサの株間でも異なる可能性が考えられた。一方、SV8やSV18で観察されたように、同一植物株内にも接種した菌株により2型の感染型を示す植物個体が多数含まれる場合と全く含まれない場合があつた。また、これらの植物個体に形成された2型病斑には多数の孢子を形成するものが含まれていたことを考え合わせると、アワで報告されたのと同様にエノコログサについてもイネいもち病菌に対する感受性は植物株と菌株の組み合わせにより決定されている可能性も考えられる。本研究では接種を反復していないため、このような可能性の検証には接種組合せ間の2型病斑形成に関する差異について再現性を確認する必要がある。

また、遺伝学的なアプローチによる検証も必要であろう。植物株と菌株の組合せ間における2型病斑形成の差異はレース・品種間特異性に類似した現象のようにも見える。アワのコムギいもち病菌に対する抵抗性には上述のアダルトレジスタンスに加え、遺伝子対遺伝子説で説明される主働型の抵抗性遺伝子も関与することが報告されている (Murakami et al., 2002)。このような抵抗性遺伝子、さらには、菌側の非病原力遺伝子の同定によりイネいもち病菌の菌株とエノコログサの株間の関係を説明できるかもしれない。

以上の本研究の結果からイネいもち病菌がキンエノコログサを二次宿主とする可能性は極めて低いと考えられる。アキノエノコログサではイネいもち病菌が感染するものの、2型の病斑の出現率やその孢子形成能が極めて低いため、本植物種が自然界でイネいもち病菌の二次宿主となる可能性は低いと考えられる。一方、エノコログサについてはイネいもち病菌の感染により時として多数の孢子を形成する病斑が出現する可能性は否定できないと考えられる。しかしながら、このような孢子形成能を有する病斑が自然界におけるイネいもち病菌の感染で生じるかについては慎重な検討が必要となるであろう。孢子形成能を有する病斑は人工接種の条件でのみ形成されるものかも知れない。その一方で、Ken54-20の接種では他の菌株と比較して孢子形成能高い2型病斑が出現する傾向があり、他の菌株よりもエノコログサに対する病原性が強い可能性も考えられた。病原性の強い菌株が存在するならば、そのような菌株が感受性の極めて高いエノコログサの株と組み合わせることにより、自然界でも本研究で観察されたのと同程度の孢子形成能を有する病斑が出現する可能性もあるかもしれない。現在、筆者らはイネいもち病が激発している水田の畦畔からエノコログサのいもち病斑を多数採集し、これら病斑からの分離菌株にイネいもち病菌が存在するかを検討している。このような検討により自然界でのイネいもち病菌のエノコログサへの感染率、さらには、本種がイネいもち病菌の二次宿主となるかについて結論を得ることができると考える。

引用文献

- Asuyama, H. (1963) Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Pyricularia oryzae*. In: The rice blast disease (Ou S.H. ed.). The Johns Hopkins Press (Baltimore) : pp. 9-22.
- Choi, J., S-Y. Park, B-R. Kim, J-H. Roh, I-S. Oh, S-S. Han and Y-H. Lee (2013) Comparative analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe grisea* species complex. PLoS ONE 8 : e57196.
- Dekker, J. (2003) Evolutionary biology of the foxtail (*Setaria*) species-group. In: Weed Biology and Management (Inderjit ed.). Kluwer (The Netherlands) : pp. 65-114.
- 糸井節美・佐藤文男・山本淳・内田利久・野田千代一 (1979) *Pyricularia* 属菌のタケ・ササ類生葉上での越冬とイネいもち病菌 (*P. oryzae* Cavara) のタケ・ササに対する病原性. 日植病報 45 : 375-385.
- 加藤 肇 (1983) イネ科植物より分離したいもち病菌のアワ、カラスムギ、オオアワガエリ、ネズミムギ、ホソムギに対する病原性. 関東東山病虫研報 30 : 22-23.
- 加藤 肇・山口富夫 (1980) イネ科、シヨウガ科植物より分離したいもち病菌の宿主範囲. 関東東山病虫研報 27 : 14-15.
- Kato, H., M. Yamamoto, T. Yamaguchi-Ozaki, H. Kadouchi, Y. Iwamoto, H. Nakayashiki, Y. Tosa, S. Mayama and N. Mori (2000) Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. J. Gen. Plant. Pathol. 66 : 30-47.
- Kusaba, M., L. D. Don, A. S. Urashima, Y. Eto, Y. Tosa, H. Nakayashiki, M. Yamamoto and S. Mayama (1998) Natural infection of wild grass species with rice blast fungus suggested by DNA fingerprinting. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64 : 125-128.
- Li, Y., J. Jia, Y. Wang and S. Wu (1998) Intraspecific and interspecific variation in *Setaria* revealed by RAPD analysis. Genet. Resour. Crop Evol. 45 : 279-285.
- Luo C. X., H. Hanamura, H. Sezaki, M. Kusaba and H. Yaegashi (2002) Relationship between avirulence genes of the same family in rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. J. Gen. Plant. Pathol. 68 : 300-306.
- Murakami, J., V. T. B. Hau, S. Mayama and Y. Tosa (2006) Reduction in aggressiveness among hybrids between host-specific pathotypes of

- Magnaporthe oryzae* is caused by reduced ability to overcome adult resistance at the level of penetration. J. Gen. Plant. Pathol. 72 : 284-291.
- Murakami, J., R. Tomita, T. Kataoka, H. Nakayashiki, Y. Tosa, and S. Mayama (2002) Analysis of host species specificity of *Magnaporthe grisea* toward foxtail millet using a genetic cross between isolates from wheat and foxtail millet. Phytopathology 93 : 42-45.
- Tosa, Y., K. Hirata, H. Tamba, S. Nakagawa, I. Chuma, C. Isobe, J. Osue, A. S. Urashima, L. D. Don, M. Kusaba, H. Nakayashiki, A. Tanaka, T. Tani, N. Mori and S. Mayama (2004) Genetic constitution and pathogenicity of *Lolium* isolates of *Magnaporthe oryzae* in comparison with host species-specific pathotypes of the blast fungus. Phytopathology 94 : 454-462.
- 堤一礼・草場基章 (2015) イネ科植物いもち病菌アワ病原型菌株の野生 *Setaria* 属植物に対する病原性. 九病虫研究会報 61 : 26-30.
- 八重樫博志 (1997) いもち病菌の生活史. いもち病—研究と防除 (内藤秀樹・八重樫博志編). 日本バイエルアグロケム株式会社 (東京) : pp. 20-24.
- Yamagashira, A., C. Iwai, M. Misaka, K. Hirata, Y. Fujita, Y. Tosa and M. Kusaba (2008) Taxonomic characterization of *Pyricularia* isolates from green foxtail and giant foxtail, wild foxtails in Japan. J. Gen. Plant. Pathol. 74 : 230-241.
- (2016年4月29日受領, 7月26日受理)