

日植病報 48: 466-470 (1982)

Ann. Phytopath. Soc. Japan 48: 466-470 (1982)

# イネいもち病菌の病原性の変異に関する研究

## I. 病原性の異なる2菌株の対峙培養および対峙接種による変異株の生成\*

生井恒雄\*\*・山中 達\*\*

Tsuneo NAMAI\*\* and Susumu YAMANAKA\*\*:  
Studies on Variation in Virulence of Rice Blast Fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara I. Variant Formation by the Pairing-cultivation and -inoculation of Two Different Pathogenic Isolates\*

### Abstract

This investigation was carried out to determine the appearance of variants in virulence by pairing-inoculation of 2 different pathogenic isolates (races 047 and 303) of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara, on both agar media and rice leaves. The mycelium-joining method on media, and the methods of the punch-inoculation of mixed spore suspension and the pairing-inoculation on leaves using the above 2 parent isolates, induced to arise some variants having virulence different from that of the parent isolates. These variants were divided into 2 groups; one contained the isolates (races 337, 317, 313, 137 and 037) that newly acquired the strong pathogenicity for 2 rice varieties, Kanto 51 and Tsuyuke, to which the parent isolates were non-pathogenic, and the other contained the isolates (race 347) that had both pathogenicity of the parent isolates. On the other hand, no variants in virulence appeared from the parent isolates. The race 337 isolate arised in both experiments on agar media and rice leaves. In addition, the variants were divided into 3 groups by the colony type and the color of culture on potato decoction agar medium. Thus, it was suggested that the variants in this experiment might be resulted from the anastomosis of the parent isolates.

(Received December 28, 1981)

**Key Words:** variation, pathogenicity, *Pyricularia oryzae*.

### 緒 論

イネいもち病菌は変異し易い病原菌で、過去において外国稲の抵抗性因子導入による本病の防除が試みられたが、本菌の変異により出現したと考えられる新レースの蔓延により、抵抗性品種が普及後数年で罹病化する事例が多く認められた。例えば、1960年代の我が国におけるクサブエ、最近の韓国での統一系イネ品種の急激な抵抗性の転落現象は著名な事実である<sup>9,10)</sup>。

本菌の変異の菌学的な原因は明らかではなく、イネ

いもち病菌の完全時代形成が自然条件下で確認されていない現在、主に突然変異により変異すると考えられている。一方、本菌は培地上において、異なる菌株を対峙培養すると、両菌菌そうの接触部に線状にヘテロカリオンを形成することが報告されている<sup>1)</sup>。また、菌糸融合現象は培地上において詳細に観察され、菌糸融合後の核の移動および核融合現象も確認されている<sup>11)</sup>。以上のことから、本菌は自然条件下でも菌糸融合によるヘテロカリオンの形成、準有性的組換が起こり、変異が生じ得ることは十分予想される。

\* 本研究の一部は昭和55年度文部省科学研究費補助金 (No. 576028) によった。

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

これまで、レースの異なる2菌株を培地上で混合培養した後、培地上に形成された分生胞子を単胞子分離し、分離菌の病原性を検討すると、変異株が高率に出現した組合わせがみられたことが報告されている<sup>7)</sup>。また、罹病性イネ葉上に病原性の異なる2菌株の分生胞子懸濁液を混合し、パンチ接種して形成された病斑上からの再分離菌株中に、両母菌の病原性を併有した変異株が出現したことも報告されている<sup>8)</sup>。これらの実験結果は、本菌の変異株が複数の菌株が混合された場合に生じたことを意味し、菌糸融合による変異株生成の可能性を示唆している。

以上のことから、本実験では、本菌の菌糸融合による病原性変異株生成を検討するために、培地上およびイネ葉上で2, 3の試験を行ったところ、菌糸融合の結果出現したと考えられる変異株の生成を認めたのでここに報告する。

### 材料および方法

**供試菌株** 供試したイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae* Cavara) は、当研究室保存の菌株中、病原性が明らかに異なること、病原性が安定していることおよび培地上で形成される菌そうの色、形状で菌株を容易に区別できることの3条件を満足する2菌株、F 67-54菌株 (レース 047, 黒色菌そう) と、研 62-89 菌株 (レース 303, 白色菌そう) である。なお、病原性の検定は、Yamada *et al.*<sup>9)</sup> の提案した9判別品種により行った。

**培地上における変異株の生成** 供試培地は、ジャガイモ煎汁寒天培地 (PDA) と、オートミール培地 (オートミール粉末 50g, 蔗糖 20g, 寒天 20g, 蒸留水 1l) で、後者は分生胞子形成用に用いた。培地上における変異株の生成法は次の通りである。すなわち、供試2菌株の栄養菌そう小片をそれぞれ PDA 培地に移植し、25°C, 暗黒条件下で7日間培養した。形成された菌そうを培地ごとカミソリを用いて長方形 (約 3 cm × 0.5 cm) に切断し、ただちに両菌そうの切断面を接合させた。接合された菌そうを素寒天培地上に移し、25°C で3日間静置した後、両菌の菌そうの接合部から菌糸小片をとり、これを PDA 培地に移植培養した。培養中にセクターが形成されることが認められ、このセクター部の菌そう小片をオートミール培地に移植し、培養後常法に従って分生胞子を形成させ、それから120個の単胞子分離株を得た。これらの分離菌株中、PDA 培地上で形成された菌そうの色が両母菌と肉眼的に異なる15菌株を選抜し、これらの菌株に

ついて病原性の検定を行った。対照区としては、供試2菌株をそれぞれオートミール培地上で培養し、常法により形成させた分生胞子から、それぞれ60個の単胞子分離株を得た。これらを PDA 培地上で培養し、菌そうの色がそれぞれの母菌と異なる菌株を F 67-54 菌から4菌株、研 62-89 菌から3菌株を選び、病原性の検定を行った。

**イネ葉上における変異株の生成** 供試イネ品種は、供試2菌株により典型的な罹病型病斑を形成するハツニシキである。変異株は畑苗状態で育苗したイネの6葉期の第5葉葉身にパンチ法で接種し、形成された病斑上から得た。接種法は混合接種法と対峙接種法である。前者は、第5葉葉身のパンチ部位に供試2菌株の分生胞子懸濁液 (10×10倍視野中約50個) を等量ずつ混合した胞子液を接種する方法である。一方、後者は葉身上に約5mmの間隔をおいて2か所にパンチし、2菌株の分生胞子懸濁液をそれぞれ対峙接種する方法である。接種後両者とも25°Cの接種箱中に24時間保ち、その後25~28°Cに保温したガラス室内に移して病斑を形成させた。接種後7日目に病葉をとり、湿らせた脱脂綿で病斑をふいてから、飽和状態にしたペトリ皿内に入れ、室温で48時間保ち、病斑上に分生胞子を形成させた。混合接種法で接種後形成された病斑上からは無作意に、また対峙接種法によるそれからは、両病斑の接触部付近からそれぞれ43および49菌株を単胞子分離し、病原性を検定した。対照区は、ハツニシキ葉上に両菌株を別々にパンチ接種し、形成された病斑上に前述と同じ方法で分生胞子を形成させた後、F 67-54 菌接種病斑上から40菌株、研 62-89 菌接種病斑上から43菌株をそれぞれ単胞子分離し、病原性を検定した。

### 実験結果

#### 培地上における変異株の生成

培地上において供試2菌株の菌そう接合部付近に形成されたセクターからの単胞子分離菌株中、菌そうの色が両母菌と異なる15菌株の病原性を検定した (Table 1)。その結果、検定した15菌株中レース 047 菌が3菌株、レース 303 菌が9菌株認められ、これら12菌株は病原性が母菌のいずれかと同じであった。残余の3菌株は両母菌とは異なる病原性を示し、変異株と判別された。これら3菌株はいずれも両母菌が侵害し得ない抵抗性遺伝子 *Pi-k* および *Pi-m* をそれぞれ持つイネ品種、すなわち、関東51号およびツユアケに典型的な罹病型病斑を形成し (Fig. 1)、新たに病原性を

Table 1. The virulence of variants produced on agar medium by the joining method of the mycelium of two different isolates, races 047 and 303

Differential varieties	Reaction			
	047	303	337	037
Shin 2	S	S	S	S
Aichiasahi	S	S	S	S
Ishikarishiroke	S	R	S	S
Kanto 51	R	R	S	S
Tsuyuake	R	R	S	S
Fukunishiki	S	R	R	R
Yashiromochi	R	S	S	R
Pi No. 4	R	S	S	R
Toride 1	R	R	R	R
Race number	047	303	337	037
No. of isolates	3	9	1	2

S: susceptible reaction, R: resistant reaction.

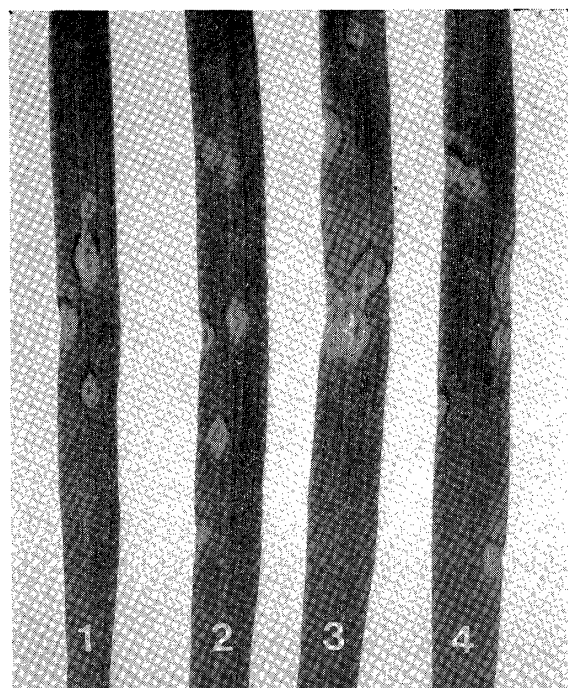


Fig. 1. Susceptible lesions produced on the leaves of 4 differential varieties by spray inoculation of a variant isolate, race 337.

1: Aichiasahi 2: Kanto 51  
3: Tsuyuake 4: Yashiromochi

獲得しているのが特徴であった。3変異株中1菌株はレース337菌で、ヤシロモチ (*Pi-ta*) と Pi No. 4 (*Pi-ta*<sup>2</sup>) に病原性を示したが、2菌株はレース037菌で上記の2品種には病原性を示さなかった。これら3菌株の PDA 培地上における菌そうの色は相互に区別し難く、黒色で一方の母菌 F 67-54 菌に似ているが、培養日数が10日以上になると菌そうの中心部から茶褐色の気中菌糸を形成する点で F 67-54 菌とは明らかに区別することができた。一方、対照区では、検定した7菌株ともそれぞれの母菌と同一の病原性を示し、変異株は出現しなかった。

#### イネ葉上における変異株の生成

供試2菌株の分生孢子懸濁液の混合接種により形成された病斑からの単孢子分離株の病原性を調べた (Table 2)。分離した43菌株中、38菌株はレース047菌、4菌株はレース303菌で、これら42菌株はそれぞれ母菌と判定された。残余1菌株はレース137菌と判定され、変異菌と考えられた。この変異株は培地上における前実験で出現したレース337およびレース037の2変異菌と同様に関東51号、ツユアケの両品種に典型的な罹病型病斑を形成し、PDA培地上で形成される菌そうの色もそれらと酷似していた。

次に、対峙接種法により形成された病斑接触部からの単孢子分離菌の病原性を調べた (Table 3)。その結

Table 2. The virulence of a variant produced on rice leaves by the punch-inoculation method of the mixed spore suspension of two different isolates, races 047 and 303

Differential varieties	Reaction		
	047	303	137
Shin 2	S	S	S
Aichiasahi	S	S	S
Ishikarishiroke	S	R	S
Kanto 51	R	R	S
Tsuyuake	R	R	S
Fukunishiki	S	R	R
Yashiromochi	R	S	S
Pi No. 4	R	S	R
Toride 1	R	R	R
Race number	047	303	137
No. of isolates	38	4	1

S: susceptible reaction, R: resistant reaction.

Table 3. The virulence of variants produced on the contact zone between each spot on rice leaves by the pairing inoculation method of two different isolates, races 047 and 303

Differential varieties	Reaction					
Shin 2	S	S	S	S	S	S
Aichiasahi	S	S	S	S	S	S
Ishikarishiroke	S	R	S	S	S	R
Kanto 51	R	R	R	S	S	S
Tsuyuake	R	R	R	S	R	R
Fukunishiki	S	R	S	R	R	R
Yashiromochi	R	S	S	S	S	S
Pi No. 4	R	S	S	S	S	S
Toride 1	R	R	R	R	R	R
Race number	047	303	347	337	317	313
No. of isolates	31	12	3	1	1	1

S: susceptible reaction, R: resistant reaction.

果、分離した49菌株のうち、31菌株はレース 047 菌、12菌株はレース 303 菌で、これら43菌株はそれぞれ母菌と判定された。残余の6菌株は4種類の異なる病原性を示す変異菌で、これらは病原性から2つの型にわけられた。第1の型は両母菌の病原性を併有した型の変異菌で、レース 347 菌であり、合計3菌株分離された。第2の型は、両母菌とも侵害し得ないイネ品種、すなわち、関東51号およびツユアケに病原性を獲得したレース 337 菌と、関東51号のみに病原性を獲得したレース317およびレース313菌であった。これらの変異株の PDA 培地上で形成される菌そうの色をみると、レース 347 菌では均一ではなく、移植源を中心として黒色の菌そうが生育し、その外側には白色の菌そうが生育した。一方、レース 337 およびレース 317 菌は黒色の均一な菌そうを形成し、これらは培地上の実験で出現した変異株と酷似した。これに対して、レース 313 菌は白色の菌そうを形成し、母菌の1つである研 62-89 菌のそれに類似した。また、対照区として両母菌から分離した83菌株、すなわち F 67-54 菌接種病斑から40菌株、研 62-89 菌からの43菌株は、それぞれの母菌と同一の病原性を示し、変異菌は得られなかった。

### 考 察

イネいもち病菌は異なる菌株間で菌糸融合を起す

ことが知られ<sup>2)</sup>、すでに培地上で菌糸融合現象が詳細に観察されており、菌糸融合の際の核の移動、核の融合も確められている<sup>1)</sup>。一方、イネいもち病菌とマコモのいもち病菌を培地上で菌糸融合させ、数種の奇形胞子が高頻度に出現する菌そうを得たことも報告されている<sup>4)</sup>。これらの点から、本菌の新レースは菌糸融合の結果生成される可能性も考えられ、それを示す既往の報告として先に挙げた2つの事例がある<sup>3,7)</sup>。本実験では、病原性の異なる2菌株を用いた培地上およびイネ葉上の実験で、両母菌とは異なる病原性を示す変異菌が分離された。培地上の実験で得られた変異株の1つであるレース 337 菌の病原性についてみると、日本型イネ品種の新2号、愛知旭および石狩白毛に対しては、母菌 F 67-54 菌 (レース 047) と、またインド型イネ品種のヤシロモチ、Pi No. 4 に対するそれは、もう一方の母菌、研 62-89 菌とそれぞれ同一で、両母菌の病原性の一部を併有していると解釈できる。このレース 337 菌は、現在までその発生が報告されていないことから、外部からの汚染の可能性は考え難い。一方、本変異菌が両母菌の持たない病原性、すなわち、関東51号およびツユアケに対して典型的な罹病型病斑を形成し、新たに病原性を獲得したが、このように母菌が侵害し得ない品種上に典型的な罹病型病斑 (Fig. 1) を形成する変異菌が得られた例は、従来の実験結果ではほとんどみられていない。また、これは野外でしばしばみられる新レースの生成現象と関連しても極めて興味ある結果である。これまでに培地上でNレースとCレースの2菌株を混合培養したものから52の単胞子分離株を分離して病原性を調べたところ、両母菌の持たない病原性を新たに獲得した変異株、Tレースが同時に5菌株得られたことが報告されている<sup>7)</sup>。本実験においてもレース 337 菌が培地上とイネ葉上から共通して分離された。以上のように、新しい病原性を獲得した変異株が2菌株を接触させたことによって形成されることから、このような変異菌は菌糸融合の結果生成された可能性が高いと推測される。また、イネ葉上の実験では、更に異なる変異菌、レース 347 菌が同時に3菌株得られた。この変異菌は両母菌の病原性を併せ持っており、かつて後藤ら<sup>3)</sup>が報告した変異菌と類似している。

本実験の結果分離された数種の変異菌は、病原性から2つの型に類別することができた。1つは、母菌の病原性の一部を有している上に、両母菌が持たない病原性を新しく獲得した型で、レース 337, 317, 313, 137 および 037 の各変異菌がこの型に属する。他は、両

母菌の病原性を併せ持った型で、レース 347 がこれに属する。一方、PDA 培地上での菌そうの色および形状からもいくつかの型に分けられる。すなわち、その1つは新しく病原性を獲得した型の変異菌で、レース 313菌を除いたすべての菌株が母菌、F 67-54菌に似た均一な黒色の菌そうを形成するが、培養日数の増加に伴い菌そうの中央部から茶褐色の気中菌糸を生じ、両母菌とは明らかに異なった特徴を持つものである。これに対して、両母菌の病原性を併せ持つ型の変異株、レース 347 菌は、菌そうが均一ではなく、菌そうの中央部に母菌、F 67-54 菌に類似した黒色の菌そうが形成され、その外縁部には他の母菌、研 62-89 菌の菌そうに似た白色の菌そうが囲み、あたかも両母菌が共存しているかの様相を示した。更に、著者らの別の実験結果等<sup>5,6)</sup>から、レース 337, 037, 137および347の各菌の病原性が不安定であることが確められた。

以上の様に、本実験で得られた変異株は、供試2菌株の菌糸融合の結果生成された可能性が高い。新しく病原性を獲得した現象については、その理由は判然としないが、その現象の解明により病原性の喪失あるいは獲得が明らかにされよう。今後、更に多くの菌株の組み合わせによる検討を行い、変異菌の生成あるいは病

原性の問題を解明したい。

### 摘 要

イネいもち病菌の病原性の異なる2菌株(レース047と303)を供試し、培地上およびイネ葉上における変異株の生成を試みた。培地上における菌そう接合法、イネ葉上における混合パンチ接種法および対峙パンチ接種法により、両母菌とは異なる病原性を示す変異株が得られた。この変異株には、両母菌が侵害し得ないイネ品種、関東51号やツユアケに対して典型的な罹病型病斑を形成して、新たに病原性を獲得したもの(レース337, 317, 313, 137と037の各菌)と、両母菌の病原性を併せ持ったもの(レース347菌)の2種類が含まれた。また、これらの変異株のうち、レース337菌は培地上およびイネ葉上の両者から得られた。これに対して、両母菌からは病原性変異株の出現は認められなかった。一方、出現した変異株は、PDA 培地上で形成される菌そうの色、形状が母菌とは異なり、これらは3種類に分けられた。以上の実験結果から、本実験で得られた変異株は両母菌の菌糸融合の結果生成された可能性が高いと推察された。

### 引 用 文 献

1. Fetemi, J. and Nelson, R. R. (1977). *Phytopathology* 67: 1523-1525.
2. Genevesi, A. D. and Magill, C. W. (1976). *Can. J. Microbiol.* 22: 531-536.
3. 後藤和夫・山中 達 (1968). 宇大農学報 7: 27-71.
4. 橋岡良夫・稲垣公治 (1968). 日植病報 34: 391.
5. 生井恒雄・山中 達 (1980). 同上 46: 74.
6. 生井恒雄・山中 達 (1981). 同上 47: 361.
7. 農林水産技術会議事務局 (1968). 抵抗性品種のいもち病激発の育種的対応に関する特別研究推進会議資料. 101-102.
8. Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. (1976). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42: 216-219.
9. 山田昌雄 (1977). 育雑 27: 377-381.
10. 山田昌雄・李 銀鐘 (1978). 植物防疫 32: 238-242.
11. 山崎義人・新関宏夫 (1965). 農技研報 D 13: 231-273.