

水田圃場におけるイネいもち病菌の病原性突然変異頻度の推定

中央農業総合研究センター ^{たか}高 ^{はし}橋 ^ま真 ^み実

はじめに

イネいもち病菌に対する真性抵抗性遺伝子は、20以上知られている (BRYAN et al., 2000)。これらの遺伝子は、抵抗性品種の育成に利用されることが期待されるが、導入した抵抗性を侵害する突然変異菌がまん延し、新品種が罹病化する可能性がある。これまでに、外国稲由来の抵抗性遺伝子を導入した新品種が、栽培を始めてから数年間で罹病化した事例が多数報告されている (浅賀, 1995)。

罹病化を回避しながら真性抵抗性遺伝子を有効に利用する方法として、異なる抵抗性遺伝子をもつ系統 (品種) を混合栽培する方法、さらには、抵抗性以外の形質が類似する同質遺伝子系統を混合するマルチラインが実用化された (小泉, 1983)。しかし、抵抗性を侵害する突然変異菌のまん延の問題が根本的に解決されるわけではなく、混合した品種をすべて侵害できるスーパーレースの出現の可能性もある。そのため、マルチライン栽培下での突然変異菌の出現とまん延の過程を予測し、真性抵抗性の効果を持続させる対策をとることが必要と考えられる。突然変異頻度は、変異菌の動態を予測するために必要とされる基本的な数値である。しかしながら、既報では突然変異頻度として $10^{-6} \sim 10^{-2}$ という著しく異なる数値が示されている。筆者らは、圃場試験により病原性突然変異頻度を推定した。本稿では、この結果を既報の結果と比較しながら述べる。

I 病原性突然変異頻度の推定

清沢 (1966) は、糸状菌の病原性突然変異頻度を突然変異胞子率 (Mu) として、胞子の接種によって求める方法を示した。胞子を抵抗性品種および罹病性品種の両方に接種し、抵抗性品種に生じた罹病性病斑数を Ra 、罹病性品種に生じた罹病性病斑数を Sa とした場合、

$$Mu = Ra/Sa$$

であるとした。その後、突然変異頻度を求める試験が行

われたが、基本的に上記の式のように抵抗性品種に生じた病斑数を罹病性品種の病斑数で除する方法で求められている (辻本ら, 2002; 石川, 2008; 高橋ら, 2008)。

II 温室での接種試験

清沢 (1966) は、真性抵抗性遺伝子 Pik の保有品種に対するイネいもち病菌株 (北 1 菌株, 研 54-04 菌株) の病原性突然変異胞子率を注射接種によって求めた。また、同様に Pia の保有品種に対する突然変異胞子率 (稲 72 菌株, 稲 168 菌株) も求めた。その結果、 $10^{-3} \sim 10^{-2}$ という高い数値が示された。

その後、噴霧接種等による試験で突然変異頻度が推定された。表-1 にそれらの試験の概要と突然頻度を示した。岩野 (1987) は、レース 001 の菌株を各判別品種に噴霧接種した試験によって、病原性突然変異頻度を $10^{-6} \sim 10^{-5}$ とした。この試験では、罹病性品種に生じた罹病性病斑数の代わりに石狩白毛 (Pii) に生じた褐点型病斑数をデータとして用いた。これは、レース 001 の菌株を罹病性品種の新 2 号に接種した場合、多数の病斑により枯死しやすく、罹病性病斑数の調査が不可能であるという特殊な事情からである。

筆者らも、後述の圃場試験と同じ菌株を噴霧接種して、病原性突然変異菌の出現頻度を $10^{-5} \sim 10^{-4}$ と推定した (高橋ら, 2008)。

石川 (2009) は、胞子形成の方法の違いにより推定される突然変異頻度が変わる可能性を考えて、オートミール平板培地上で形成させた胞子を噴霧接種する試験と、湿室内に伝染源として病斑が形成されたイネと調査対象の健全苗を置き、加湿器を使って感染を促す試験を行った。その結果、オートミール平板培地上で形成させた胞子を噴霧接種した場合の突然変異頻度は、 10^{-4} 以下であり、葉身上の病斑を伝染源とした場合は、 10^{-5} 以下であるとした。異なる試験で得られた数値は、使用した菌株、対象とする真性抵抗性遺伝子が異なるために、単純に比較はできないが、オートミール上で胞子形成させた筆者らの試験でも 10^{-4} の値が求められている。胞子形成の方法が突然変異頻度の推定に影響するかいなかは今後の検討が必要である。

以上のように、注射接種では、 $10^{-3} \sim 10^{-2}$ という非

Estimating the Mutation Rate of the Rice Blast Fungus from Avirulence to Virulence in Paddy Fields. By Mami TAKAHASHI

(キーワード: イネいもち病菌, 突然変異頻度, 真性抵抗性, 病原性)

表-1 噴霧接種試験によるイネいもち病菌株の突然変異頻度

試験	胞子形成	接種した菌株 (レース)	接種した抵抗性品種 (真性抵抗性遺伝子)	突然変異頻度	
岩野 (1987) ^{a)}	オートミール平板培地上	新 84-34 (001)	愛知旭 (<i>Pia</i>)	2.7×10^{-5}	
			石狩白毛 (<i>Pii</i>)	4.4×10^{-6}	
			関東 51 号 (<i>Pik</i>)	3.7×10^{-6}	
			ツユアケ (<i>Pik-m</i>)	7.1×10^{-6}	
			ヤシロモチ (<i>Pita</i>)	1.1×10^{-5}	
			Pi No.4 (<i>Pita-2</i>)	8.2×10^{-6}	
		新 84-64 (001)	愛知旭 (<i>Pia</i>)	2.1×10^{-5}	
			石狩白毛 (<i>Pii</i>)	2.0×10^{-5}	
			ヤシロモチ (<i>Pita</i>)	3.3×10^{-5}	
			Pi No.4 (<i>Pita-2</i>)	4.3×10^{-5}	
	新 84-142 (001)	フクニシキ (<i>Piz</i>)	7.9×10^{-6}		
		BL1 (<i>Pib</i>)	3.7×10^{-6}		
高橋ら (2008) ^{a)}	オートミール平板培地上	OS99-G-7a (007)	ササニシキ BL6 号 (<i>Pita</i>)	5.9×10^{-5}	
				3.2×10^{-4}	
				7.6×10^{-5}	
				1.1×10^{-4}	
石川 (2008) ^{a)}	オートミール平板培地上	M176 (007)	コシヒカリ新潟 BL3 号 (<i>Pita-2</i>)	5.0×10^{-5}	
				3.0×10^{-5}	
				3.0×10^{-6}	
				2.8×10^{-6}	
				コシヒカリ新潟 BL8 号 (<i>Pib</i>)	9.4×10^{-5}
					6.3×10^{-6}
			M716 (001)	コシヒカリ新潟 BL3 号 (<i>Pita-2</i>)	3.7×10^{-5}
				コシヒカリ新潟 BL4 号 (<i>Piz</i>)	2.2×10^{-4}
			コシヒカリ新潟 BL8 号 (<i>Pib</i>)	1.2×10^{-4}	
		M176 (007)	コシヒカリ新潟 BL4 号 (<i>Piz</i>)	2.7×10^{-6}	
			コシヒカリ新潟 BL7 号 (<i>Piz-t</i>)	2.6×10^{-6}	
		OS99-G-7a (007)	コシヒカリ新潟 BL8 号 (<i>Pib</i>)	1.1×10^{-5}	
葉身上	M716 (001)	コシヒカリ新潟 BL3 号 (<i>Pita-2</i>)	2.3×10^{-6}		
			7.6×10^{-6}		
			2.0×10^{-5}		
			1.4×10^{-5}		

^{a)} 突然変異菌が検出できなかった試験結果も示されているが、本表からは除外した。

常に高い頻度が推定されたが、噴霧接種では $10^{-6} \sim 10^{-4}$ であった。注射接種による試験での突然変異胞子率が高い理由は不明であるが、いもち病菌の胞子が葉上に落下して感染することを考えると、噴霧接種のほうが自然状態に近い試験といえる。

III 圃場試験

噴霧接種による試験と比較して、圃場試験は実際の栽培に近い条件で病原性突然変異頻度を推定できる。辻本ら (2002) は、フクニシキと *Pik* を保有するアキユタカ

を移植した圃場に Kyu9439013 菌株 (レース 047) をまん延させて試験を行い、突然変異頻度を 10^{-4} と推定した。しかし、圃場試験で求められた突然変異頻度はこれのみであり、正確な結果を得るためにさらに試験を行う必要があった。

筆者らは、2006年に水田圃場、07年に畑晩播圃場および水田圃場で試験を実施した。水田圃場では、*Pita* を保有する抵抗性品種 (ササニシキ BL6 号) と罹病性品種 (ササニシキ、あるいはコシヒカリ) を列混植し、畑晩播圃場では、抵抗性品種 (ササニシキ BL6 号) を植えた

畝と罹病性品種（ササニシキ）を植えた畝を交互に設置して試験を行った。いもち病菌（レース 007）を接種したイネを圃場内に均等に配置して伝染源とし、いもち病をまん延させた。そして、抵抗性品種上に生じた罹病性病斑数と罹病性品種上に生じた罹病性病斑数を調べた。

圃場試験では、温室内の噴霧試験では問題とならないことが結果に影響する可能性がある。当試験ではこれらの事項に留意し、影響を及ぼさないように配慮した。以下に検討事項とその対策を示す。

(1) 試験圃場の近辺に生息するいもち病菌が圃場内に侵入し、病斑を形成する可能性がある。特に、抵抗性品種上の病斑数が多く数えられると頻度の推定に大きな影響を与える。当試験では、特異的 DNA マーカーをもついもち病菌株（OS99-G-7a；平八重ら，2008）を供試菌とし、抵抗性品種上に病斑を形成したいもち病菌の由来を確かめた。

(2) 圃場試験では、いもち病をまん延させるので、世代が複数経過する。また、自然条件下の試験であり、世代の推移を調整することはできない。本試験では、抵抗性品種上に病斑が初めて観察された日のデータから、突然変異菌の出現頻度を推定し、病原性変異菌が世代を重ねないように配慮した。また、定期的な病斑数の調査結果と気象データからいもち病菌の世代の推移について推察した。

(3) 圃場に突然変異菌をもち込み、増殖させる可能性がある。当試験では、伝染源とする苗にいもち病菌をパンチ接種し、畑晩播試験では、900 個の病斑、水田圃場試験では、3,000 個（2006 年）あるいは、3,720 個（2007 年）の限られた数の病斑を伝染源とした。いずれの試験でも第一世代の病斑が形成された調査日に抵抗性

品種上に病斑が認められていないことから、伝染源として突然変異菌をもち込んだ可能性は低いと考えられた。

調査結果から、抵抗性品種の株当たり病斑数を算出し、これを罹病性品種の株当たり病斑数で除して病原性突然変異頻度を求めた（表-2, 3）。これらの結果から、イネいもち病菌の病原性突然変異菌の出現頻度は 10^{-5} のオーダーと考えられた。また、圃場内の病斑数の定期的な調査と気象データから、2007 年の畑晩播圃場試験と水田圃場試験では、世代の推移を推定することが可能であった。これを利用して一世代当たりの突然変異菌の出現頻度も推定したが、前述の結果と変わらない 10^{-5} のオーダーであった（高橋ら，2008）。

おわりに

筆者らは、前述の試験で分離された病原性変異菌株や日本各地の分離菌株の非病原性遺伝子 *AVR-Pita1* を解析した。その結果から、日本菌株の多くは *AVR-Pita1* の重複遺伝子を 2 種類もっており、非病原性遺伝子として機能する一方の遺伝子を欠失して病原性を獲得していると考えられた（TAKAHASHI et al., 印刷中）。最近、非病原性遺伝子 *AVR-Pii*, *AVR-Pik*, *AVR-Pia* が単離された。これらの遺伝子について、異なる病原性の菌株を調べたところ、非病原性遺伝子の有無と病原性が一致していた（MIKI et al., 2009; YOSHIDA et al., 2009）。この結果から、病原性を獲得するいもち病菌は、*Pita* の場合と同様に非病原性遺伝子を欠失するのではないかと推察される。また、これらの非病原性遺伝子は、その周囲にゲノムに散在するトランスポゾン配列が存在することやテロメア近辺にある可能性が示されており、比較的高頻度で欠失が起こるのは、これらの構造によるのではないかと

表-2 畑晩播試験におけるイネいもち病菌株 OS99-G-7a の病原性変異菌の出現頻度

試験区	ササニシキ BL6 号の病斑数	ササニシキ BL6 号の苗の本数	ササニシキの苗当たり病斑数	病原性変異菌出現頻度
1	3	22,932	9.0	1.5×10^{-5}
2	5	26,107	9.9	1.9×10^{-5}
3	2	24,948	6.4	1.3×10^{-5}
平均	3.3	24,662.3	8.4	1.6×10^{-5}

表-3 水田圃場試験におけるイネいもち病菌株 OS99-G-7a の病原性変異菌の出現頻度

試験年	圃場面積 (a)	ササニシキ BL6 号の総病斑数	ササニシキ BL6 号総株数	罹病性品種の株当たり病斑数	突然変異菌の出現頻度
2006	5	4	5,427	15.8	4.7×10^{-5}
2007	6	11	5,904	21.1	8.8×10^{-5}

考えられる (ORBACH et al., 2000 ; MIKI et al., 2009 ; YOSHIDA et al., 2009)。

イネいもち病菌の病原性突然変異頻度として推定された数値 10^{-5} は、結果に影響を及ぼす要因をできるだけ排除した試験で推定された値である。現在、この数値は、中央農業総合研究センター北陸研究センターのホームページで公開されているマルチラインにおけるいもち病流行予測システムで使用されている。

引用文献

1) 浅賀宏一 (1995) : 品種の抵抗性, 稲いもち病, 養賢堂, 東京,

- p. 216 ~ 249.
 2) BRYAN, G. T. et al. (2000) : Plant Cell **12** : 2033 ~ 2046.
 3) 平八重一之ら (2008) : 九病虫研報 **54** : 1 ~ 6.
 4) 石川浩司 (2009) : 平成 20 年度関東東海北陸農業研究成果情報, 北陸・生産環境部会 **9**.
 5) 岩野正敬 (1987) : 北日本病虫研報 **38** : 5 ~ 9.
 6) 清沢茂久 (1966) : 植物防疫 **20** : 159 ~ 162.
 7) 小泉信三 (1983) : 同上 **37** : 447 ~ 480.
 8) MIKI, S. et al. (2009) : Mol. Plant Pathol. **10** : 361 ~ 374.
 9) ORBACH, M. J. et al. (2000) : Plant Cell **12** : 2019 ~ 2032.
 10) 高橋真実ら (2008) : 北陸病害虫研報 **57** : 11 ~ 17.
 11) TAKAHASHI, M. et al. (2010) : Phytopathology (in printing).
 12) 辻本雅子ら (2002) : 日植病報 **68** : 172.
 13) YOSHIDA, K. et al. (2009) : Plant Cell. **21** : 1573 ~ 1591.

登録が失効した農薬 (22.4.1 ~ 4.30)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造者又は輸入者）登録失効年月日。

「殺虫剤」

- **トラロメトリン水和剤**
17254 : 三共スカウトフロアブル (三井化学アグロ) 10/04/01
- **ピフェントリン水和剤**
18083 : 兼商テルスター水和剤 (アグロ カネシヨウ) 10/04/01
- **チャハマキ顆粒病ウイルス・リンゴコカクモンハマキ顆粒病ウイルス水和剤**
21268 : カヤクハマキ天敵 (日本化薬) 10/04/07
- **ベンスルタップ粉剤**
16298 : ルーバン粉剤 DL (住友化学) 10/04/14
- **イミダクロプリド粉剤**
20612 : 三共アドマイヤー粉剤 DL (北海三共) 10/04/16
- **ECP 粉剤**
5178 : ホクコー VC 粉剤 3 (北興化学工業) 10/04/25
- **シラフルオフエン粉剤**
18961 : 三共 MR. ジョーカー粉剤 DL (三井化学アグロ) 10/04/26
- **シラフルオフエン粒剤**
18964 : MR. ジョーカー粒剤 (バイエルクロップサイエンス) 10/04/26
- **シラフルオフエン粒剤**
18965 : 石原 MR. ジョーカー粒剤 (石原産業) 10/04/26
- **シラフルオフエン粒剤**
18966 : 三共 MR. ジョーカー粒剤 (三井化学アグロ) 10/04/26
- **シラフルオフエン乳剤**
18971 : 三共 MR. ジョーカー EW (三井化学アグロ) 10/04/26
- **シラフルオフエン・チオシクラム粉剤**
18984 : エピセクトジョーカー粉剤 DL (三井化学アグロ) 10/04/26
- **インドキサカルブ MP 水和剤**
20615 : 三共トルネードフロアブル (三井化学アグロ) 10/04/26

● **アセフェート水溶剤**

- 20638 : オルトラン顆粒水溶剤 95 (アリスト ライフサイエンス) 10/04/27
 ● **アセフェート水溶剤**
20640 : ホクコーオルトラン顆粒水溶剤 95 (北興化学工業) 10/04/27

「殺虫殺菌剤」

- **フィプロニル・プロベナゾール粒剤**
21265 : Dr. オリゼプリンス粒剤 6H (明治製菓) 10/04/07
- **フィプロニル・プロベナゾール粒剤**
21266 : ホクコー Dr. オリゼプリンス粒剤 6H (北興化学工業) 10/04/07

「殺菌剤」

- **イミノクタジン酢酸塩・有機銅水和剤**
18089 : [DIC] ベフキノン水和剤 (日本曹達) 10/04/10
- **イプロジオン・キャプタン水和剤**
15495 : 日産ロブキャプタン水和剤 (日産化学工業) 10/04/22
- **イミノクタジン酢酸塩塗布剤**
18116 : [DIC] デイクタジン塗布剤 (日本曹達) 10/04/24
- **トリホリン乳剤**
13726 : クミアイサプロール乳剤 (クミアイ化学工業) 10/04/25

「除草剤」

- **DCMU 粉粒剤**
19938 : タケダ園芸ダイロン微粒剤 (住友化学園芸) 10/04/06
- **ピラゾキシフェン・プロモブチド粒剤**
16307 : 石原ノックワン粒剤 (石原産業) 10/04/14

「殺そ剤」

- **モノフルオル酢酸塩液剤**
6846 : テンエイテイ (大塚薬品工業) 10/04/30