

イネ稲こうじ病の発生生態と今後の防除技術の開発に向けて

(独)農研機構 中央農業総合研究センター 芦 澤 武 人

はじめに

イネ稲こうじ病は、病原菌 *Ustilaginoidea virens* (完全世代 *Villosiclava virens*) (TANAKA et al., 2008) が引き起こすイネの重要な病害である。イネの幼苗期から出穂期に至るまでは病徴はなく、出穂した後の籾に暗緑色で球形の病粒が認められる。病粒中には厚壁胞子が含まれ、風雨や収穫等の物理的理由により土壌表面に落下し、翌年の伝染源になる。しかし、越冬した稲こうじ病菌にイネが感染し、穎花が発病するまでの発生生態は不明な点が多い。稲こうじ病の病粒にはかび毒の一つであるウスチロキシンが含まれ、玄米や飼料用のサイレージに混入すると食料・飼料の安全性が低下する (MIYAZAKI et al., 2009)。2004年に農産物規格規程が一部改正されたことにより、農産物の検査基準がより厳しくなり、病粒が玄米に混入すると規格外になるため、経済的にも被害が大きい。近年では2008年と2009年に全国的に稲こうじ病が多発生したことにより、規格外米が多量に発生して大きな問題となった。そこで本稿では、近年得られている稲こうじ病の発生生態に関する研究と、それに基づく新たな本病の防除技術の開発動向を紹介したい。

I 稲こうじ病菌 DNA の定量法の確立

稲こうじ病の発生量は地域内でも圃場間で差があり、土壌中に存在する伝染源量が影響していると考えられる。久田 (1936) は、秋期に形成された厚壁胞子が翌年の夏期に水中に浮かんで各株が感染することを初めて推定している。藤田ら (1990) は、培地上で形成された厚壁胞子を田面水中に散布・代かきをすると発生が増加することから、土壌・水媒伝染の可能性を示唆している。しかし、圃場に存在する菌量と病粒の発生量の関係については十分検討されてこなかった。そこで、土壌中の菌 DNA 量を測定し、病粒の発生量との関係が認められれば、土壌伝染性の可能性をより強く示唆すると考えた。菌 DNA の有無は、稲こうじ病菌を特異的に増幅するブ

ライマーセットを用いて nested-PCR を行うことにより、人工接種したイネ体 (ZHOU et al., 2003) や、圃場から採取した出穂前の葉鞘内の穂 (芦澤・片岡, 2005) からの検出により判定できるが、定量する方法は確立されてない。そこで、各種病原菌の定量 (OKUBARA et al., 2005) に汎用されているリアルタイム PCR 法により稲こうじ病菌 DNA の定量法を開発した (ASHIZAWA et al., 2010)。すなわち、イネの移植後に水田土壌の表層を採集し、室温で約2週間自然乾燥させた。次に、風乾土 0.5 g を用いて KAGEYAMA et al. (2003) の方法で全 DNA を抽出後に、Geneclean Spin Kit (MP-Biomedicals) で DNA を精製し、得られた DNA 溶液を5倍希釈し、リアルタイム PCR に供した。なお、土壌中に含まれる夾雑物が原因で PCR の増幅効率を下げることもあるために DNA 溶液を希釈することがあるが (KAGEYAMA et al. 2003)、本目的では得られる DNA 量が少ないために最低限の希釈を行った。反応液 (20 μ l) の組成は、5 μ l DNA 希釈液、10 μ l 2 \times Light Cycler 480 Probe Master (Roche), 1,000 nM 各プライマー、200 nM Universal Probe Library Probe #57 とした。用いたフォワードプライマー 5'-CCGCTGCCTAAGATAAAGT CC-3' とリバースプライマー 5'-AGGCTCCCGGTTG TTTTAC-3' の間に、上記プローブ #57 5'-GGCCCCA G-3' の配列があり、この組合せによる特異性を調べたところ、イタリアを含む日本全国で採集した稲こうじ病菌 48 菌株の DNA を増幅でき、イネの病原菌 23 種 70 菌株と植物のイネ・オオムギ・コムギ・ダイズの DNA は増幅しないことが確認されている。次に、新潟県上越市内の灰色低地土を対象に 10 圃場から土壌を採集し、リアルタイム PCR を行い、圃場でのコシヒカリ BL における病粒の発生量を調べたところ、土壌菌量 (Ct 値) と株当たり病粒数に関係が認められ、一次式 $y = -1.2299x + 42.594$ ($R^2 = 0.844$) が得られた (図-1)。以上から、土壌中の伝染源量が多い圃場ほど発生量が多くなることが明らかとなり、土壌伝染性であることが強く示唆された。リアルタイム PCR で測定される Ct 値は、厚壁胞子に含まれる DNA 量を反映していると考えられるので、圃場単位での本病発生の危険度を測定するのに便利なツールであると考えられた。ただし、厚壁胞子の生死は不明であるの

Epidemiology of Rice False Smut and Overview of the Control Strategies. By Taketo ASHIZAWA

(キーワード: イネ稲こうじ病, 厚壁胞子, リアルタイム PCR, 穎花, 感染動態)

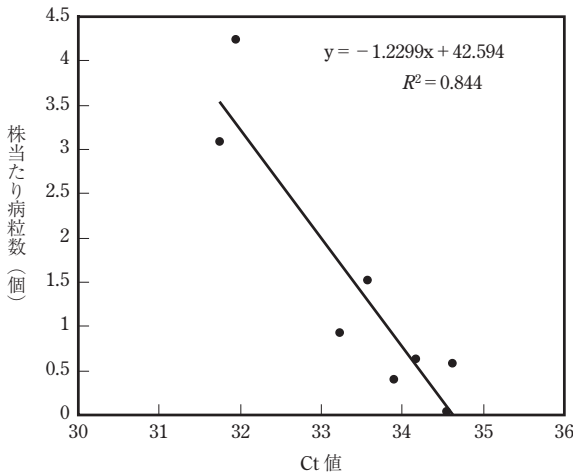


図-1 リアルタイム PCR によって検出された Ct 値と圃場で発病した株当たり病粒数との関係

で、発病への生菌の関与度は今のところ不明である。また、多くの圃場を対象とする場合は実験コストがかかるので、発生履歴を聞き取りなどで調査して、代表地点の Ct 値を測定し、広域での危険度を把握するのに利用できる。また、Ct 値と病粒数の関係は直接に因果関係を説明したものではないので、土壌からのイネ体への感染頻度やその後の感染過程を明らかにすることで伝染環を解明する課題は残されている。

II 感染過程

稲こうじ病菌にイネが感染する研究には次のような報告がある。池上 (1962) は、厚壁胞子をイネの幼芽期に噴霧接種し、圃場に栽植すると発病することから幼芽期感染の可能性を指摘している。また、顕微鏡観察により子葉鞘表皮の細胞間隙から侵入することを明らかにしている (IKEGAMI, 1963)。侵入菌糸は師管の細胞間隙を伸展し、接種 61 日目まで師管細胞に沿って存在するが、分けつ中期の幼穂形成部には存在しない。BEEST (2010) は、接種により根部から厚壁胞子由来の菌糸が侵入することを観察し、鈴木ら (2012)、田中ら (2012) も nested-PCR 法により圃場のイネの根部から高率に稲こうじ病菌の DNA を検出できることを報告している。厚壁胞子が含まれる土壌に接触する根部は、最も感染確率が高い場であると考えられるが、これらの知見を含め根から成長点に至る感染過程を明らかにすることが今後の課題である。その後菌糸は師管の細胞間隙を伸展することから、植物体の抵抗性を誘導せずにエンドファイトのように生存し、なんらかの方法で幼穂に至っていると考えら

れる。ただし、幼穂へ至るまでの過程はエンドファイトとは異なるかもしれない。エンドファイトは、生殖成長期であっても師管内を伸展して穂が感染し師管に沿って多くの穎花が発病する。しかし、稲こうじ病菌では 1 穂内の病粒の分布はランダムであるように観察される (園田ら, 1988)。つまり、栄養成長期から生殖成長期に遷移する過程での菌の動態が異なる可能性が高い。その後の穂への感染の最終段階である幼穂への侵入過程が明らかになってきた。藤田ら (1989) は、圃場において出穂前の約 1 か月から 1 週間以内に分生子を噴霧接種すると発病が認められるが、出穂後の接種では発病しないことを報告している。薬剤の散布では、出穂 1~2 週間前で発病抑制効果が高いが、出穂後ではその効果が認められない。園田ら (1997) は、圃場に栽培したイネを出穂前に株上げし、低温に 2 日間、続いて高温高湿に 5 日間処理することにより、出穂前の 10 日前後に感染が起り、出穂前 6 日ごろから急速に感染が増加することを推定している。芦澤・片岡 (2005) は、圃場から得た穂ばらみ期の葉鞘内の未抽出穂を採取し、nested-PCR により稲こうじ病菌が検出できることを報告している。このように、穂ばらみ期が本菌にイネが感染する重要な時期であり、穎花内への侵入が起こっていると考えられるが、どのように穎花が感染するのかについては不明であった。

圃場から得たイネ体のサンプルを用いて、穂ばらみ期に穎花に感染する過程を観察するための実験系を確立するのは極めて難しい。そこで、藤田ら (1989) が開発した穂ばらみ期の葉鞘に分生子を注射接種する方法を用いることで、穎花への侵入過程を明らかにしようとした (ASHIZAWA et al., 2012)。接種法は、ASHIZAWA et al. (2011) により改変した。すなわち、直径 10.5 cm サイズのポリポットに育苗培土を詰め、これに生育させたイネの分けつを切除しながら主茎イネのみを穂ばらみ期まで育成する。稲こうじ病菌は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した組換え体を作成する。組換え稲こうじ病菌は、培養した含菌オオムギ粒を乾燥して作成し、これを 2% ショ糖加用 PDB 培地で振とう培養 (115 rpm) し、4~5 日目に得られた分生子を葉鞘内に注射接種する。16℃ の低温に 2 日間、続いて 26℃ の高温飽和湿度に 5 日間置き、出穂後は 25℃ の温室内で管理する。このようにして得た接種穂を蛍光顕微鏡で継時的に観察することにより、穂のどの部位で感染が起こるかを明らかにしようとした。接種 48 時間後までは、穎花の表面に分生子が沈着するだけで、発芽は認められず、穎花内や花器にも稲こうじ病菌は認められなかった。これにより、接種時の注射器の水圧で穎花内に分生子懸濁液が入り込む

可能性はないことを確認した。接種 48 時間以降 120 時間目にかけて、分生子が発芽し菌糸が穎花表面を取り囲むように生育した。この期間でも穎花内へ角皮侵入することはなく、護穎や副護穎、枝梗等の組織への侵入も認められなかった。接種 144 時間後になると、穎花の外穎と内穎が咬合する先端部で穎花内に通じているわずかな隙間や（図-2）、粉の形態形成過程で十分に咬合せずにできた隙間（鳥の嘴状の部位）から菌糸が侵入しているのが観察された。侵入菌糸は穎花内の表皮細胞に接触し、時に分岐しながら穎花に直線的に菌糸が伸展し（図-3）、葯、花糸、柱頭、子房、鱗皮等すべての組織に菌糸が付着しているのが観察された。接種 9 日後には徐々に花器が菌糸に覆われ、接種 11 日後には全体が菌糸に覆われた。葯やその周辺に付着した菌糸は、主に葯が接する花糸の最先端部から侵入し、菌糸がまん延することが明らかになっている（TANG et al., 2012）。これらの感染過程の中で、稲こうじ病菌に感染した穎花は開花しないことから、鱗皮が外穎と内穎を膨圧により押し広げて開花する機能を停止させ、紫外線や乾燥の暴露から逃れていると考えられる。また、どのように咬合部を見つけて花器にまで至るのかその認識機構は不明である。以上のように、穎花への感染過程は明らかになったが、一般圃場のイネで同様の動態であるかは不明であることに変わりはない。穂に着生する病粒は、1 穂内にランダムに分布することから、感染は穎花での独立したイベントであると考えられる。このため、穂首や枝梗内を伸展し穎花に至ることはないであろう。そう考えると、詳細

は不明であるが、栄養成長が終わる時期にはいったん師管外に出て穂への感染に移行するのかもしれない。また、穂ばらみ期に厚壁胞子の噴霧接種によっても発病に至ることを考えると、イネの葉身・葉鞘表面に菌が存在し感染に至る可能性も現段階では否定できない。今後、イネの栄養成長から生殖成長の生育過程における菌の動態を解明する必要がある。

III 発生生態の現在までの知見

稲こうじ病菌の生活環は図-4 に要約される。主な伝染環は次の通りである。①病粒に形成された厚壁胞子が地表面に落下・越冬し、②田植え後に厚壁胞子から発芽した菌糸がイネ体（根など）に侵入し、③イネの生長点に伸展し、④師管などの隙間をぬって伸展後、幼穂に至り、⑤葉鞘内で分生子を形成し、⑥外穎表面に沈着後に菌糸で覆い、外穎と内穎の咬合部先端の隙間から菌糸が侵入して花器に至り、⑦花器を取り巻くように菌糸がまん延し、病粒を形成する。

厚壁胞子を主な伝染源とする生活環以外には次の動態が示唆されているが、いずれも本病発生の寄与度は低いと考えられている。病粒上に生じた菌核が、地表面に落下・越冬後に子実体を形成して子嚢胞子が形成される実験がなされているが（本藏・三浦, 1988）、菌核の形成率は一般に低い。また、圃場に埋没させた菌核の約半数は子実体を形成せず（園田・八重樫, 1988）、自然界での子実体形成の報告もない。厚壁胞子が隣接圃場へ飛散する様子は、晴天の風のある日に観察されることがあるが、近隣の圃場にまん延するのであれば、伝染源を中心

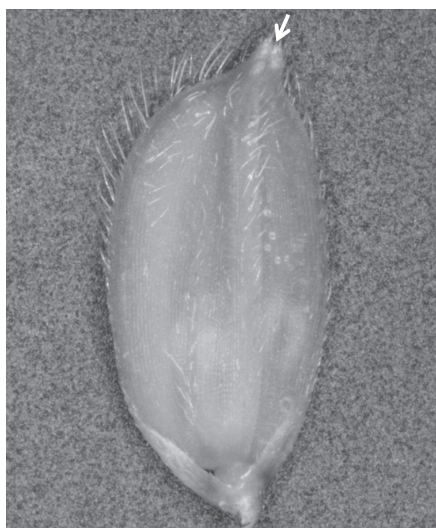


図-2 稲こうじ病菌の菌糸が侵入する穎花の部位（矢印）
（外穎と内穎が咬合する先端にわずかな隙間がある）

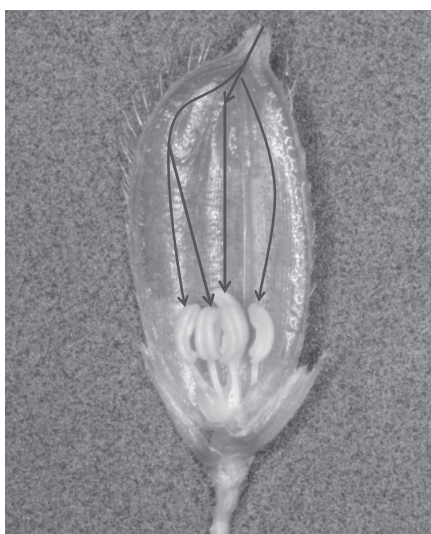


図-3 菌糸が侵入後に穎内を伸展する模式図

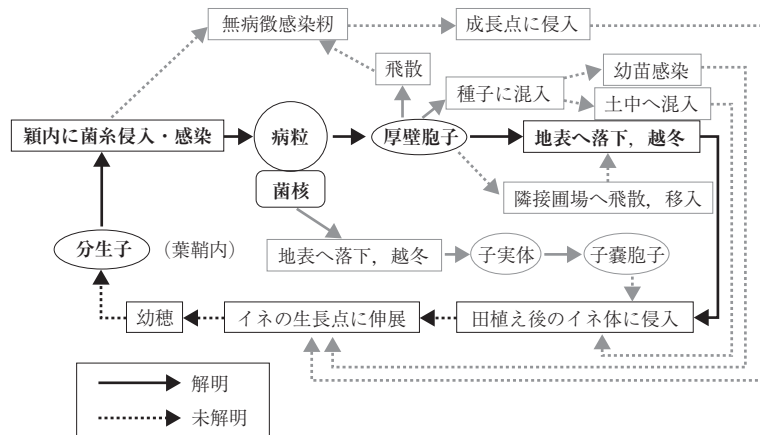


図-4 稲こうじ病の伝染環

とした伝染勾配が空気伝染性病害のように認められるはずであるが、そのような報告はない。ほかに種子伝染の可能性として、厚壁胞子をイネ葉鞘内に注射接種すると発病が認められないが、採集した種子を翌年にポット栽培すると、発病が認められる無病徴感染の事例がある(辻, 2001)。また、病粒が種子に混入し、厚壁胞子が幼苗に付着したり土壌中へ拡散したりして発病に与与する可能性がある。これらについては、今後個体識別が可能なDNAマーカーなどを開発して、その異同を解明する必要がある。

おわりに

現在の知見を総合すると、厚壁胞子を主体として稲こうじ病の伝染環が成り立っていることに間違いはないであろう。リアルタイムPCRによる定量法が開発されたことで、本病が土壌伝染性病害であることが強く示唆された。このことは、防除のあり方を再考する時期にきていることを示している。安達ら(2012)は、シメコナゾール粒剤を移植直後に施用すると発病抑制効果が高いことを示しており、伝染源からの初期感染を抑制できる可能性を示唆している。また、田畑輪換が稲こうじ病菌の伝染源量を減少させることから(笹原ら, 2008)、転作により本病に対する薬剤散布の回数を削減できる可能性

がある(佐藤ら, 2012)。地上部のイネを対象とした防除体系でなく、土壌中の病原菌を防除の対象とするパラダイムシフトが起これば、今後、紋枯病やその他の病害も含めて根本的に防除体系を変えることができると期待される。

引用文献

- 1) 安達直人ら (2012): 日植病報 78: 193.
- 2) ASHIZAWA, T. et al. (2010): Eur. J. Plant Pathol. 128: 221 ~ 232.
- 3) ——— et al. (2011): J. Gen. Plant Pathol. 77: 10 ~ 16.
- 4) ——— et al. (2012): ibid. 78: 255 ~ 259.
- 5) 芦澤武人・片岡由希子 (2005): 日植病報 71: 16 ~ 19.
- 6) BEEST, D. T. (2010): Phytopathology 100: S125.
- 7) 藤田佳克ら (1989): 日植病報 55: 629 ~ 634.
- 8) ———ら (1990): 同上 56: 383.
- 9) 久田勝次郎 (1936): 日植病報 6: 72 ~ 76.
- 10) 本藏良三・三浦善夫 (1988): 北日本病虫研報 39: 88 ~ 91.
- 11) 池上八郎 (1962): 同上 27: 16 ~ 23.
- 12) IKEGAMI, H. (1963): J. Gen. Plant Pathol. 18: 54 ~ 60.
- 13) KAGEYAMA, K. et al. (2003): ibid. 69: 153 ~ 160.
- 14) MIYAZAKI, T. et al. (2009): J. Vet. Med. Sci. 71: 239 ~ 241.
- 15) OKUBARA, P. A. et al. (2005): Can. J. Plant Pathol. 27: 300 ~ 313.
- 16) 笹原剛志ら (2008): 北日本病虫研報 59: 18 ~ 21.
- 17) 佐藤直紀ら (2012): 日植病報 78: 193.
- 18) 園田亮一・八重樫博志 (1988): 同上 55: 84.
- 19) ———ら (1988): 北日本病虫研報 39: 92 ~ 93.
- 20) ———ら (1997): 同上 48: 39 ~ 42.
- 21) 鈴木恵理ら (2012): 同上 (印刷中).
- 22) TANAKA, E. et al. (2008): Mycotaxon 106: 491 ~ 501.
- 23) 田中栄爾ら (2012): 日植病報 78: 193.
- 24) TANG, X. Y. et al. (2012): Plant Pathol. (in press).
- 25) 辻 英明 (2001): 北日本病虫研報 52: 24 ~ 26.
- 26) ZHOU, L. Y. et al. (2003): J. Phytopathology 151: 513 ~ 518.