

# イネいもち病菌の準有性的組換菌の病原性と病原力に関する研究

野口 (辻本) 雅子\*

## 目 次

I. 緒言	1	3. パルスフィールドゲル電気泳動法による核型解析	15
II. 準有性による遺伝的組換の証明	5	4. 考察	17
1. 導入薬剤耐性遺伝子を用いた証明	5	V. 準有性的組換菌のレースの安定性と病原力	18
2. 考察	7	1. レースの安定性	18
III. 準有性的組換菌の核数および核相	9	2. 病斑長と胞子形成数	21
1. DAPI 染色法による核観察	9	3. 圃場における発病	22
2. フローサイトメーターによる核相の決定	10	4. 考察	25
3. 考察	10	VI. 総合考察	26
IV. 準有性的組換菌の病原性, 交配型および核型の分離	11	VII. 摘要	29
1. 準有性的組換菌の病原性の分離	12	引用文献	30
2. 準有性的組換菌の交配型の分離	14	Summary	37

## I. 緒 言

イネ (*Oryza sativa*) はアジアにおける主要な食用作物である。2005 年の世界における米 (粳) の総生産量は 61,465 万 t で、主な生産国は、中国、インド、インドネシア、タイなどアジア諸国である。しかし、アメリカ合衆国、EU 各国、アフリカ、南米等においても稲作が行われており、現在、南極を除く全ての大陸でイネが栽培されている<sup>(14)</sup>。いもち病は世界におけるイネの重要病害であり、子のう菌であるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* B.Couch (anamorph *Pyricularia oryzae* Cavara) によって引き起こされる<sup>(10)</sup>。中国では 1637 年に刊行された書物(天工開物) に本病の発生の記載があり、イタリアでは 1828 年、インドでは 1913 年に各々その発生が確認されている<sup>(72)</sup>。アメリカ合衆国ではいもち病による被害は稲作期間中湿潤な南部に限られていたが、1996 年にそうでないカリフォルニア州でも確認されている<sup>(21)</sup>。なお、現在では、イネいもち病による被害は 85 以上の国から報告され<sup>(21)</sup>、毎年、本病

により、世界で 6000 万人分の食料が失われていると推定されている<sup>(117)</sup>。

我が国は、温帯モンスーン地帯に属し、稲作期間中の気候が多湿であるため、いもち病が発生し易く、古くから本病は稲作に多大な影響を与えてきた。我が国における本病の発生については、延宝 7 年(1679 年) にその記録があり<sup>(43)</sup>、江戸時代にはソバの煮汁を用いる本病の防除方法が記載されている<sup>(29)</sup>。また、近代的な農業技術が発展した最近でも、2005 年には、全国の水稲作付け面積 170.6 万 ha のうち、本病による被害面積は 26.6 万 ha (被害面積率:15.6%) と報告されている<sup>(62)</sup>。さらに、1993 年と 2003 年のそれぞれの本病による被害面積は約 110 万 ha (被害面積率:51.7%) と約 65.2 万 ha (39.2%) であり、これらの年では冷害に付随し夏に低温多湿の気象が続いたため、本病が全国的に大発生し、甚大な被害をもたらされた<sup>(59,61)</sup>。この様に、本病はこれまでに歴史的に蓄積されてきた防除技術

をもってしてもなお防除しきれない病害となっている。

こうした甚大な被害を及ぼすイネいもち病の防除方法として、殺菌剤等の農薬を用いた防除、肥培管理等の工夫による耕種的防除、抵抗性品種の利用等が行われている。しかし、現行の栽培体系においては、消費者の良食味志向により「コシヒカリ」、「ひとめぼれ」、「ヒノヒカリ」や「あきたこまち」等のいもち病に対する抵抗性が弱い味の良い品種の作付け面積が優先しているため、本病の防除は卓効のある薬剤に依存しているのが現状である。一方、近年、消費者の食の安心・安全へのニーズ、環境汚染への懸念や薬剤耐性菌の出現などのため、薬剤偏重の防除体系が見直され、抵抗性品種の開発・利用が進められている。抵抗性品種の利用による本病の防除に関しては、有望な外国イネ由来のイネいもち病真性抵抗性遺伝子を導入して育成・普及された高度抵抗性品種における抵抗性崩壊（ブレイクダウン）の事例が過去に数多く報告されている。すなわち、我が国では1963年には「クサブエ」、1964年には「テイネ」、「ユーカラ」、1965年には「ウゴニシキ」、1968年には「峰光」、1969年には「フクニシキ」、「シモキタ」などの高度抵抗性品種において相次いでいもち病が発生した<sup>(54)</sup>。また、同様に、韓国でもインド型と日本型のイネを交配して育成された高度抵抗性多取品種「統一」にもいもち病が発生し大問題になった<sup>(57)</sup>。こうした抵抗性のブレイクダウンに対応すべく、近年、持続的抵抗性（Durable resistance）の考えが重視され、「まなむすめ」や「峰ひびき」など圃場抵抗性を利用した品種の開発とともに抵抗性の異なる同質遺伝子系統を混植した多系品種（マルチライン）あるいは様々な品種の混合栽培（Cultivar mixture）が世界的に実用化されている<sup>(1, 4, 8, 11, 38, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 83, 99, 100, 104, 118)</sup>。多型品種は、従来のように単一の真性抵抗性遺伝子にのみ頼るのではなく、真性抵抗性遺伝子のみが異なり、他の諸形質が同一なイネいもち病抵抗性同質遺伝子系統（Rice blast resistant isogenic line）を複数混合したもので、真性抵抗性のブレイクダウンを遺伝的多様性を持たせることで抑制しようとする防除戦略である。この考え方に基づき、宮城県では品種「ササニシキ」のイネいもち病抵抗性同質遺伝子系統を混合した多系品種「ササニシキ BL」<sup>(82)</sup>が1995年から

普及し、一方、新潟県および富山県においては品種「コシヒカリ」の多系品種が育成され実用化されている。しかし、これらの多系品種においても短期間はその効果が有効に発揮されると思われるが、いつかは用いたすべての同質遺伝子系統を侵害する病原性変異菌（スーパーレース）の出現により抵抗性崩壊がおこる可能性が指摘されている。

イネいもち病菌の病原性変異菌が出現する要因として、1) 有性生殖（交配）、2) 準有性的組換、3) 突然変異が考えられる。これまで日本の野外から分離されたイネいもち病菌同士の交配により、完全世代を形成した例は報告されていないことから<sup>(105)</sup>、我が国におけるイネいもち病菌の主要な病原性変異要因は有性世代によるのではなく、突然変異と準有性的組換であると考えられる。とくに複数の同質遺伝子系統が混植されている状態では同一圃場に病原性の異なる複数のいもち病菌レースが存在する可能性があり、それらが準有性的組換を起こして、複数の品種を同時に侵害できる病原性の幅の広いレースが出現することも考えられる。なお、病原性とは、van der Plank<sup>(97)</sup>やWatson<sup>(98)</sup>が定義した「Virulence」であり、イネのいもち病抵抗性に対応した病原側の寄生性に関する質的な性質である。

Pontecorvo and Roper<sup>(77)</sup>は *Aspergillus nidulans* で有性生殖以外の手段でも遺伝的組換が起る準有性的組換の存在を初めて明らかにし、準有性的組換の生じる生活環を Parasexual cycle<sup>(76)</sup>と呼んでいる。その後、準有性的組換は、その他の子う菌類や不完全菌類 *Aspergillus niger*<sup>(75)</sup>、*Penicillium chrysogenum*<sup>(78)</sup>、*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*<sup>(5)</sup>、*Aspergillus oryzae*<sup>(28)</sup>、*Aspergillus soyae*<sup>(28)</sup>、*Cephalosporium mycophilum*<sup>(94)</sup>、*Cochliobolus sativus*<sup>(93)</sup>、*Verticillium albo-atrum*<sup>(24)</sup>、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*<sup>(6)</sup>、*Penicillium expansum*<sup>(2)</sup> 等でも報告されている。これらの組換機構は、有性世代が発見されていない菌や有性世代形成の困難な菌類の遺伝地図の作製等にも応用されている。

イネいもち病菌の準有性的組換は疑似有性的組換<sup>(111)</sup>、無性的交雑<sup>(50, 79)</sup>あるいは菌糸融合<sup>(57)</sup>と様々に呼ばれているが、これらは、すべて Parasexual recombination を示していると考えられる。そこで本研究においては、これまでの Parasexual recombination を示す語句について、準有性的組換に

統一した。同様に、準有性的組換過程に関する語句も研究者により異なるが、後述のように統一して使用した。

イネいもち病菌における準有性的組換の可能性については、山崎・新関<sup>(111)</sup>が最初に見いだしている。すなわち、本菌が実験室内で準有性的生活環を持つことを確認し、その生活環が1) 菌糸融合 (Anastomosis) による2核共存体形成 (Heterokaryosis)、2) 2核融合による複相核形成 (Diploidization)、3) 体細胞組換 (Somatic recombination) による遺伝的組換型の形成、の3段階からなると考えている。これに関連した報告は多くなされており、Genovesi and Magill<sup>(10)</sup>は紫外線照射処理により作製した2つの栄養要求株を用いて、培地上で2核共存体を形成させ、得られた分生子由来の栄養要求性マーカーを調べた結果、母菌の栄養要求性に関してほとんど全ての組み合わせの組換型 (Recombinant) を確認している。Fatemi and Nelson<sup>(15)</sup>も同様に、イネ菌株間の対峙培養により母菌と同じ菌糸の形状・色を有するもの他に母菌間の中間型の性質を示す菌株を得ている。生井・山中<sup>(57)</sup>は、病原性の異なる2菌株の対峙培養および対峙接種 (イネ葉身上の2箇所それぞれにそれぞれの菌株をパンチ接種する方法) を行い、両母菌と異なる菌叢の特徴を示す部位からの単胞子分離菌から、両母菌の病原性を併せ持つ病原性変異菌を得て、準有性的組換により生じたと考えられるとしている。しかし、以上の研究は、厳密にはイネいもち病菌が準有性的に遺伝的組換を起こしていることを状況証拠として挙げて論述しているに過ぎず、直接的に証明しているものではない。

このように、イネいもち病菌は異なる病原性の株が共存する条件下では準有性的組換により、母菌のイネ品種に対する病原性等の遺伝形質の組換型 (菌) を生じ、母菌の病原性を併せ持つ新レースが出現する可能性がある。Aspergillus 属菌などでは準有性的組換菌が有性世代と同様の遺伝様式をとることが報告されていることから、イネいもち病菌の準有性的組換菌でも Aspergillus 属菌等と同様に交配型や品種に対する病原性等の遺伝形質が有性世代と同様の遺伝様式をとる可能性も考えられる。しかし、これまで、イネいもち病菌の準有性的組換菌の遺伝形質の分離比に関する研究は行われていない。

菌類の核数や核相は、菌の増殖に深く関わっている。すなわち、1細胞に遺伝的に異なる多数の核が共存している菌よりも遺伝的に同一の単相 (Haploid) で単核の菌の方が、遺伝的に同質で安定的に増殖すると考えられる。イネいもち病菌の核学的研究は、1950年代より行われ、山崎<sup>(109, 110)</sup>は主に DeLamater 法を用いて核染色を行った結果、分生子、菌糸および分生子柄のいずれの細胞において単核であると報告した。これに対し、鈴木<sup>(87, 88)</sup>はヘマトキシリン染色液、Feulgen 染色液および HCl-Giemsa 液等によって核染色を行い、菌糸および分生子の細胞は多核であり、1細胞当たり平均4-5個の核を有すると報告した。しかしながら水沢<sup>(45)</sup>、堀野・赤井<sup>(26)</sup>、Wu and Tsao<sup>(101)</sup>、Hashioka *et al.*<sup>(22)</sup>、Hashioka *et al.*<sup>(23)</sup>は電子顕微鏡観察により菌糸、分生子および分生子柄の細胞は1細胞1核であることを示し、現在ではイネいもち病菌は菌糸および分生子の細胞においても1細胞に1核の単核であるとされている。

また、田中・山崎<sup>(92)</sup>はイネ菌の国内外8菌系の菌糸と分生子の核のDNA量について顕微分光光度計を用いて2波長法により測定した。その結果、分生子の核は単相であり、菌糸の核は大多数が単相核であることを報告した。以上の研究より、現在はイネいもち病菌の菌糸、分生子および分生子柄の細胞における核数と核相は単核・単相とされている。しかし、イネいもち病菌の準有性的組換菌の核数および核相については、山崎・新関<sup>(111)</sup>や斉藤・藤<sup>(81)</sup>が単核・単相を示唆しているが、その詳細は必ずしも明らかでなく、これらを明らかにすることは、準有性的組換菌の遺伝的安定性を理解する上でも重要と考えられる。

一般に菌類の染色体の多くは、微小であるため観察するのが困難であるが、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis) を用いて染色体をバンドとしてとらえることができる。それらのバンドパターンは核型 (Karyotype) と呼ばれ、イネいもち病菌においても他の菌類と同様に解析が行われている<sup>(69, 85, 86, 91)</sup>。しかし、イネいもち病菌の準有性的組換菌の核型解析はこれまでに行われていない。準有性的組換により核型の多型が出現するのか、それとも有性生殖と同様の遺伝様式を示すのかを明らかにすることは、病原性変異菌

の出現機構を解明する手がかりとなると考えられる。

イネいもち病菌の圃場におけるレース構成は、栽培品種の持つ真性抵抗性遺伝子の種類と品種の栽培面積率などに影響され、最終的には、相対的な生存力の優るレースが優勢となることは一般的現象である<sup>(30)</sup>。これは、菌株間の病原力の差等総合的な競合力の差に起因していると解釈されている場合もある<sup>(30)</sup>。一方、イネいもち病菌の病原力には様々な評価法が存在し、明確な基準となるものがなかった。そうした中、生井らは、いもち病菌株間の病原力を相対的に数値で評価する指標として、罹病型病斑数、罹病型病斑形成率、パンチ接種による病斑面積およびその単位面積当たりの分生子数、の4項目を提案し、準有性的組換菌と考えられる各菌株の病原力も評価している<sup>(53)</sup>。その結果、母菌株の病原性を併せ持った病原性の幅の広い準有性的組換菌と考えられる菌株は単位面積あたりの孢子形成数で劣ることを示した。しかしながら、実際に圃場で準有性的組換菌と考えられる菌株を導入した場合の病原力に関する報告はない。

本研究は、以上のような背景のもと、1996年から2004年に北陸農業試験場（新潟県上越市）（現、中央農業総合研究センター 北陸研究センター）で行った。研究成果の一部は学会誌および機関誌で発表したが<sup>(64, 65, 66)</sup>、ここにこれらをまとめて報告する。

本論文は以下の4章からなる。第II章では、準有性的組換により遺伝的組換が行われることを薬剤耐性遺伝子を利用して証明した。第III章では、準有性的組換菌の核数と核相を調べ、その遺伝的安定性を考察した。第IV章では、準有性的組換菌の病原性、交配型および核型の分離比を有性生殖におけるそれらの分離比と比較し、準有性的組換菌の遺伝形質の遺伝様式を明らかにした。第V章では、準有性的組換菌のレースの安定性と病原力（病斑長と孢子形成数）及び準有性的組換菌による圃場における発病を母菌のそれらと比較した。

なお、本論文は、著者が筑波大学へ提出した学位論文を加筆修正したものである。

本論文のとりまとめに際して、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授・柿嶋真博士には、全般にわたって懇切な御指導・御助言をいただいた。衷心より感謝の意を表す。また、山形大学農学部食料生命環境学科教授・生井恒雄博士からは、イネいもち病菌の準有性的組換、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授・奥野員敏博士からは、イネいもち病抵抗性、筑波大学連携大学院教授（独立行政法人農業環境技術研究所生物生態機能研究領域）石井英夫博士からは、イネいもち病菌の生理・生態ならびに筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授・山岡裕一博士からは、いもち病菌の遺伝・生態に関してそれぞれ丁寧な御指導・御助言をいただいた。これらの方々に深く感謝申し上げる。

元独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター藤田佳克博士（現、日本大学生物資源科学部植物資源科学科）には、本研究の端緒を与えられ、研究の実施および取りまとめにあたり終始御指導をいただき、同センター安田伸子氏には、研究の過程で数々の御指導と御助言をいただいた。また、独立行政法人農業環境技術研究所對馬誠也博士、吉田重信博士ならびに旧北陸農業試験場病害研究室中島俊彦博士、荒井治喜氏および森脇丈治博士には本研究の御支援・御鞭撻をいただいた。

明治製菓・橘邦隆博士ならびに東京理科大学理工学部応用生物科学科教授・鎌倉高志博士からは、薬剤耐性プラスミドを分譲していただいた。また、独立行政法人農業生物資源研究所・林長生博士からは、イネいもち病菌株を分譲していただき、北海道大学大学院農学研究科准教授・曾根輝雄博士からは、パルスフィールドゲル電気泳動法を御教示していただいた。

さらに、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター北陸研究センター業務第4科職員各位ならびに同センター旧病害研究室加藤美千子氏および増田之穂氏からは、圃場試験を遂行するにあたり、多大なご協力をいただいた。

ここに記して、各位に深く感謝の意を表す。

## II. 準有性による遺伝的組換の証明

子の菌類、担子菌類や不完全菌類では、有性生殖以外の手段でも遺伝的組換を起こすことが可能とされ、その手段の一つとして準有性的組換が報告されている<sup>(19, 40, 74, 78, 89, 112)</sup>。イネいもち病菌の準有性的組換は山崎・新関<sup>(111)</sup>により初めて報告された。その後、これに関する報告は増え、準有性的組換により遺伝的組換が生じ、病原性変異菌が出現する可能性を指摘する報告がある<sup>(9, 12, 15, 19, 57, 102, 117)</sup>。そしてこれまでに栄養要求性、硫化水素発生能や硫酸銅耐性をマーカーとして、あるいは反復配列を用いた DNA フィンガープリンティングや RFLP 解析を行い、準有性による遺伝的組換の証明が試みられてきた<sup>(111, 117)</sup>。しかし、突然変異により変化する可能性のある栄養要求性や反復配列によるフィンガープリントは、準有性的組換による遺伝的組換の十分な証明方法とは言えない。

そこで、本章では、突然変異により生じることのないマーカーとしてイネいもち病菌が本来有していない外来遺伝子(薬剤耐性遺伝子プラスミド)をイネいもち病菌に導入した菌株同士を混合培養し、その混合培養液を薬剤添加培地に移し、2 剤耐性のコロニーを選抜し、そのコロニーから孢子形成させ、単孢子分離し、その分離株における導入遺伝子の確認により、準有性による遺伝的組換の証明を試みた。

### 1. 導入薬剤耐性遺伝子を用いた証明

#### 1) 材料および方法

##### a 菌株

1990 年に中国雲南省において分離されたいもち病菌株 Y90-71 (MAT1-1, レース 102) にピアラフォス耐性遺伝子 (*bar*) を含むプラスミド (pBARKS1)<sup>(73)</sup> を REMI 法 (後述) により導入し、ピアラフォス耐性菌株 (Y90-71BI) を作出した。また、中国雲南省で分離されたイネいもち病菌株 CHINOS37-1-3 (レース 136) と南米で分離されたイネいもち病菌株 FR-10 (レース 136) の交配後代である 3514-R-2 (MAT1-2, レース 136) に、プラストサイジン S 耐性遺伝子 (*BSD*) を含むプラスミド (pBF101) を導入し<sup>(34)</sup>、プラストサイジン S 耐性菌株 (3514-R-2BS) を作出した。本試験には、イネいもち病菌 Y90-71BI と 3514-R-2BS を供試した。

##### b イネいもち病菌への遺伝子導入 (REMI 法)

いもち病菌のプロトプラストの調製は、Novozyme 234 を用いて Yelton *et al.*<sup>(115)</sup> の方法に準じて行った。いもち病菌株 Y90-71 と 3514-R-2 を各々 30ml の酵母エキス液体培地 (yeast extract, 5g/L) で 25°C, 3 ~ 7 日間前培養後、シャーレに移し、25ml の酵母エキス液体培地を加え 25°C で 2 日間培養した。培養後、プッフナー漏斗で濾過して菌糸を回収し、これを滅菌水で洗浄後、50ml ポリプロピレン遠心管中で 1M ソルビトール溶液に懸濁した。この菌糸懸濁液をフィルター濾過した Novozyme 234 (菌体新鮮重 1g 当たり 20mg) と、1M ソルビトール溶液を 30ml になるよう加えた溶液と穏やかに混合し、室温で 60 ~ 90 分間培養後、ガーゼとナイロンメッシュで濾過し、プロトプラスト懸濁液を調製した。この懸濁液を新しい 50ml ポリプロピレン遠心管に移し 3000 × g, 4°C で 10 分間遠心し、沈殿を 1M ソルビトール溶液で洗浄後、STC-50 (20% sucrose, 50mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM CaCl<sub>2</sub>) でプロトプラスト濃度が 4.0 × 10<sup>7</sup> 個/ml になるように調整してプロトプラスト懸濁液を得た。形質転換は Kimura *et al.*<sup>(33)</sup> の方法に準じて行った。すなわち、形質転換前に pBARKS1 は制限酵素 *EcoRI* (宝酒造株式会社, 大津) で、pBF101 は *Hind* III (宝酒造株式会社, 大津) で各々処理し、得られた直鎖状のプラスミド溶液 (25 μg/ml) 0.2ml をいもち病菌株の各プロトプラスト溶液 0.8ml と混合した。そして、この混合液に 2ml のポリエチレングリコール (PEG) 溶液 (60% w/v PEG4000, 50mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl [pH7.5]) を滴下して混和後、室温で 20 分間静置した。その後、STC-50 でこの混合液を 10 倍希釈し、室温で 3000 × g, 10 分間遠心し、得られた沈殿を STC-50 で洗浄し、PEG 溶液を除去後 10ml の YG1/2SC 培地 (0.5% w/v yeast extract, 2.0% w/v グルコース, 0.6 M ソルビトール, 25 mM CaCl<sub>2</sub>) を加え懸濁した。なお、安定した形質転換体を選抜するため、直径 100 mm のコラーゲンコートシャーレに 5, 10 あるいは 20 μl のプロトプラスト懸濁液と 10ml の新しい YG1/2SC 培地を加え、28°C で 3 時間培養した。また、Y90-71 では同様に、ピアラフォス 200 μg/ml を、3514-R-2 ではプラストサイジン S 50 μ

g/ml を培地に加え、2日間培養した。培養開始3日後にYG培地を交換し、Y90-71ではピアラフォス(最終濃度800  $\mu$ g/ml)、3514-R-2ではプラストサイジンS(最終濃度:100  $\mu$ g/ml)をさらに加え、その後3~5日間培養し、薬剤に対して耐性を示すコロニーをピンセットで拾い、PDA選択培地(Y90-71にはピアラフォスを800  $\mu$ g/ml、3514-R-2にはプラストサイジンS 100  $\mu$ g/mlを各々添加)で培養し、生育が確認された菌株をショ糖添加オートミール寒天培地(オートミール50g、ショ糖20g、寒天15g/L)に移し、単胞子分離後保存した。得られた各菌株についてはサザンハイブリダイゼーション解析を行い、各遺伝子の導入が確認されたものをそれぞれY90-71BI、3514-R-2BSと名付けた。

### c 混合培養

PSA培地(ジャガイモ煎汁(水1Lに200gのジャガイモを煮出した液を濾過したもの)20ml、ショ糖20g、寒天18g/L)に菌株Y90-71BIと菌株3514-R-2BSを別個に移植し、25°Cで3~7日間前培養を行った。その後2菌株の生育旺盛な菌叢片を酵母エキス液体培地に移植し、25°Cで7日間混合培養した。ショ糖添加オートミール寒天培地に菌体を含む混合培養液を移し、25°Cで7日間培養した。培養後に伸長した菌糸片をピアラフォス(800  $\mu$ g/ml)とプラストサイジンS(100  $\mu$ g/ml)を加えたPDA培地に移植し、さらに25°Cで5日間培養した。本培地上で生育した菌株のコロニーをショ糖添加オートミール寒天培地上に移植し、分生子を形成させ、単胞子分離後サザンハイブリダイゼーション解析を行い、導入したそれぞれの薬剤耐性遺伝子の存在を確認した。

### d DNAの抽出とサザンハイブリダイゼーション解析

PSA培地に移植し、25°Cで3~7日間前培養を行った。培養後、生育旺盛な菌叢片を切り取り、30mlの酵母エキス液体培地に移植し、7日間振とう培養した後、菌体を濾紙(No.2、アドバンテック、東京)を用いて回収した。菌体(0.2g)に液体窒素を加え乳鉢で磨砕し、4mlの1.5  $\times$  CTABバッファー(7.5g CTAB, 37.5ml 1M Tris-HCl [pH8.0], 15ml 0.5M EDTA, 105ml NaCl/500ml)を加え反転混和し、

56°C、15分間静置した。抽出液と等量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1 v/v)を加えて反転混和し、室温で18,700  $\times$  g、20分間の遠心分離後、得られた上清に1/10量の10% CTABを加え混和し、再び等量のクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1 v/v)を加えて反転混和し、室温で18,700  $\times$  g、20分間遠心分離し、得られた上清に1.5倍量のCTAB沈殿バッファー(5g CTAB, 25ml 1M Tris-HCl [pH8.0], 10ml 0.5M EDTA/500ml)を完全に混和し、30分間、室温で静置後、室温で18,700  $\times$  g、20分間遠心分離し、RNase A溶液(ニッポンジーン、東京)25  $\mu$ lを含む1M NaCl 4mlに沈殿を溶解後に、56°Cで30分間静置した。その後2倍量の100%エタノールを加えて遠心分離後、沈殿を70%エタノールで洗浄して4mlのTEバッファー(10mM Tris-HCl [pH 8.0], 1mM EDTA [pH 8.0])に溶解し、DNAを抽出した。DNAの濃度は分光光度計を用いて測定した。DNAは制限酵素EcoRIで消化後、0.7%アガロースゲルを用いて電気泳動し、ナイロン膜Hybond-N+(Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写し固定した。サザンハイブリダイゼーション解析はECL Direct Nucleic Acid Labeling/Detection System(ECL System:Amersham, Buckinghamshire, UK)を用いて、プロトコルに従い実施した。すなわち、DNAを固定したナイロン膜は標識プローブと5%のBlocking reagent(ECL systemに付属)と0.5M NaClを含むハイブリダイゼーションバッファー(ECL Systemに付属)中で42°C、16時間でハイブリダイゼーションを行った。その後ナイロン膜を1次洗浄バッファー(6M尿酸、0.4% SDS, 0.5  $\times$  SSC)中で42°C、20分間で2回、続いて2次洗浄バッファー(2  $\times$  SSC)を用いて室温で5分間、2回洗浄した。Detection reagent 1とDetection reagent 2の等量混合液を、ナイロン膜1cm<sup>2</sup>当たり0.125ml添加し、室温で1分間放置した後、暗黒下で、Hyperfilm ECL(Amersham, Buckinghamshire, UK)をナイロン膜に載せ、室温で1時間露光後、現像した。

## 2) 結果

Y90-71BIと3514-R-2BSの2菌株の混合培養により、ピアラフォスとプラストサイジンSの両薬剤に対して耐性を示す計302菌株(BIS1~BIS302と呼称)が得られた。BIS3~BIS302について写真で

示していないが、両薬剤に対して耐性を示す菌株は、それぞれ PDA 培地および PDA 選択培地上では、BIS2 の様に混合培養に用いた母菌の一つである Y90-71BI と同様の白色の菌叢を示すもの (図 1)、また、他方の母菌 3514-R-2BS と同様の灰色、あるいはこれらの 2 菌株の中間色や BIS1 の様に黒色の菌叢を示すもの (図 1) などが見られた。このうち 49 菌株は、ピアラフォス耐性遺伝子とプラストサイジン S 耐性遺伝子を共に有することがサザンハイブリダイゼーション解析により確認された。すなわち、pBARKS1 の約 280bp 断片をプローブとして用いた結果、4kbp から 23kbp 付近に Y90-71BI では 6 本、BIS1、BIS2、BIS3 では 4 本のバンドが検出された (図 2-A)。また、pBF101 の約 500bp 断片をプローブとして用いた結果、3514-R-2BS と BIS1、BIS2、BIS3 に約 500bp 付近に 1 本のバンドが検出された (図 2-B)。しかし、残りの 253 菌株ではピアラフォス耐性遺伝子あるいはプラストサイジン S 耐性遺伝子のいずれか一方のみが確認された。

## 2. 考察

本試験では、ピアラフォスとプラストサイジン S の両薬剤を含む培地で 2 剤に対して耐性を示すコロニーを分離し、その後、単孢子分離を行い、2 剤耐性菌を分離した。このため、得られた 2 剤耐性菌は母菌の混合菌ではない。また、培養中に有性生殖器官 (子のう殻) の形成が見られていないことから有性生殖により 2 剤耐性菌が生じた可能性も考えられない。2 剤耐性菌で異なる薬剤耐性遺伝子を有している菌株は、どちらかの母菌の突然変異菌であることはない。本研究では、混合培養により準有性的組換菌の作出を試みたため、準有性的組換過程 (菌糸融合 - 2 核共存体形成 - 核融合による複相核形成 - 複相核の単相化 - 細胞分裂) は直接観察していない。しかしながら、準有性的組換過程 (菌糸融合から複相核形成まで) が蛍光顕微鏡下で観察されていること<sup>(81)</sup> や栄養要求性の異なる 2 菌株の対峙培養の菌叢より 2 核共存体あるいは複相核と考えられる菌株が単菌糸分離されていること<sup>(12)</sup> 等のこれまでの報告を総合的に判断すると本研究においても、培養中に準有性的組換の過程が起こり準有性的組換菌が生じたと考えられる。本章では、両薬剤耐性遺伝子を持つ菌株が 49 菌株検出できたことからイネいもち

病菌の異なる菌株が準有性的組換を起こし、その結果として遺伝的組換が起こったことが強く示唆された。イネいもち病菌は有性生殖に加え、準有性的組換によっても様々な環境に適応する新しい変異菌を出現させている可能性が示唆された。

得られた 2 剤耐性菌の約 85% はピアラフォス耐性遺伝子かプラストサイジン S 耐性遺伝子のどちらかの遺伝子のみが検出された。このことから、これらの 2 剤耐性菌は混合培養に用いた Y90-71BI がプラストサイジン S に対する耐性を、あるいは 3514-R-2BS がピアラフォスに対する耐性を突然変異により獲得したと考えられた。プラストサイジン S は 1962 年にイネいもち病菌用に使用された農薬の原体 (2004 年 3 月農薬登録抹消) であり、圃場においても病防除薬剤として使用されていた。この農薬に耐性を示す変異菌が実験室的に分離された例は既に報告されている<sup>(95)</sup> もの、除草剤の原体であるピアラフォスに対して圃場条件下で耐性を示すイネいもち病菌は知られていない。しかしながら、イネいもち病菌の薬剤耐性菌に関する報告は多く、その例としては、イネいもち病の防除薬剤として全国で広く使用されているカスガマイシンでは、イネいもち病菌の薬剤耐性菌が実験室的に獲得できることが報告され<sup>(68, 95)</sup>、その後 1971 年に山形県庄内地方でカスガマイシンの防除効果の低下が確認され、カスガマイシン耐性菌が報告されている<sup>(44)</sup>。また、シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤 (MBI-D 剤) に対する耐性菌の出現が報告されている<sup>(107)</sup>。これらのことから、準有性的組換菌の選抜を薬剤耐性のみで行った場合、突然変異菌を選抜してしまう危険性がある。そこで、本研究では、薬剤耐性だけでなく、サザンハイブリダイゼーションで 2 つの異なる薬剤耐性遺伝子を有することを確認した菌株のみを準有性的組換菌として選抜をした。

ピアラフォス耐性遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、Y90-71BI には 6 本バンドが見られた (図 2-A)。遺伝子導入に用いた pBARKS1 は *EcoRI* サイトが 1ヶ所である。これらのことよりおそらくピアラフォス耐性遺伝子は Y90-71BI に 6 コピー存在する可能性が考えられた。2 剤耐性菌の 3 菌株は 4 本のバンドが見られ、ピアラフォス耐性遺伝子を 4 コピー有すると考えられる。母菌と比較してピアラフォス耐性遺伝子の数が

減少したのは、準有性的組換により失ったと考えられる。また、プラストサイジンS耐性遺伝子をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションの結果3514-R-2BSおよび2剤耐性菌では1本のバンド見られた。遺伝子導入に用いたpBF101は*EcoRI*サイトが2ヶ所ありプラストサイジンS耐性遺伝子はその酵素で切り出されてしまう。ゲノムDNAを制限酵素*EcoRI*で処理しており、プラストサイジンS耐性遺伝子はその酵素で切り出されてしまう。そのため、導入されたプラストサイジンS耐性遺伝子のコピー数に関わらず、1本のバンドと見られると考えられる。3514-R-2BSおよび2剤耐性菌のプラストサイジンS耐性遺伝子のコピー数を確認するためには、他の制限酵素を用いる必要があるが、今回は検討しなかった。

準有性的組換が起こるためには、混合培養に用いる菌株同士の組み合わせが重要であることが知られている。なぜなら、準有性的組換の第一段階である菌糸融合は、菌糸融合可能な菌の組み合わせでないと起こらないからである。イネいもち病菌には

VCG(菌糸融合群)が知られている<sup>(9)</sup>。斉藤ら<sup>(63)</sup>の報告では、日本産菌株間での菌糸融合の際に細胞死が観察されていないことから、日本産菌株の多くは同一の菌糸融合群に属し、いずれの組み合わせにおいても菌糸融合が可能と考えられる。本研究で用いた菌株は、中国産あるいは南米産であったが、準有性的組換が起こったことを強く示唆する菌株が分離されたことから、このように地理的にも離れている菌株でも同一菌糸融合群に属していると推察される。また、斉藤ら<sup>(63)</sup>は、植物体の病斑より分離直後の方が、長期間保存した菌株より、菌糸融合が起こりやすいと報告している。さらに、同一の菌株由来の単孢子分離菌株間では高頻度に菌糸融合が見られるが、異なる菌株間では低頻度であるという報告がある<sup>(19, 111)</sup>など菌糸融合の成立条件については不明な点が多い。さらに、菌糸融合は生じても、2核共存後に体細胞組換により生じた菌が何らかの理由により生育不能になる可能性も考えられる。このことから、準有性的組換の成立に関与する菌株の条件については、今後明らかにしていく必要がある。



図1 母菌と2剤耐性菌(BIS1,BIS2)の選択培地での生育

- 注) A:PDA 培地.  
 B:ピアラフォス(800  $\mu$ g/ml)添加PDA培地.  
 C:プラストサイジンS(100  $\mu$ g/ml)添加PDA培地.  
 D:ピアラフォス(800  $\mu$ g/ml)とプラストサイジンS(100  $\mu$ g/ml)添加PDA培地.  
 1:Y90-71BI(母菌).  
 2:3514-R-2BS(母菌).  
 3:BIS1(2剤耐性菌).  
 4:BIS2(2剤耐性菌).

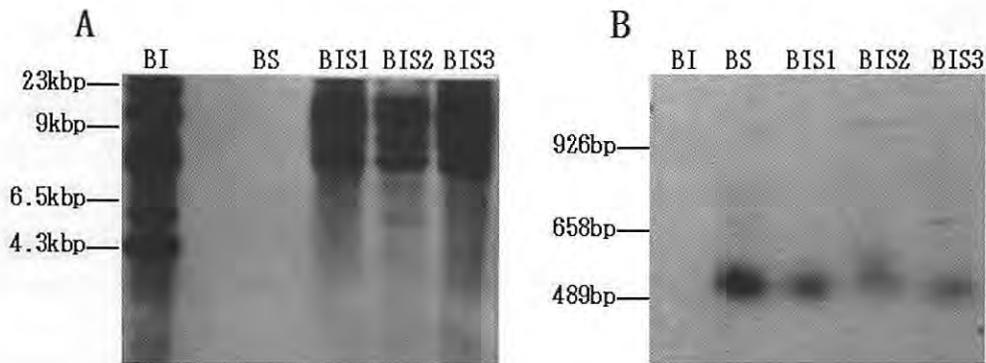


図2 ピアラフォス耐性菌株 (Y90-71BI) とプラストサイジン S 耐性菌株 (3514-R-2BS) の混合培養で得られた 2 剤耐性菌株 (BIS1, BIS2, BIS3) のサザン解析

注) A はピアラフォス耐性遺伝子, B はプラストサイジン S 遺伝子をプローブに用いた。

### Ⅲ 準有性的組換菌の核数および核相

イネいもち病菌の属する子のう菌類には、1つの細胞に1つの核を有する単核の菌と、複数の核を持つ多核の菌が存在する。また、菌糸と分生子で核数が異なる菌も存在する。しかし、イネいもち病菌の菌糸、分生子、分生子柄など細胞における核数および核相についてはこれまでの報告<sup>(22, 23, 26, 45, 92, 101)</sup>により、単核で単相であるとされている。

イネいもち病菌の準有性的組換菌の核数および核相については、山崎・新関<sup>(111)</sup>がイネいもち病菌の菌糸融合における核行動を HCl-Giemsa 法で、斉藤・加藤<sup>(80)</sup>が DAPI (6-diamine-2-phenylindole) 染色により観察し、菌糸融合後に核が移動し、2核が融合する様子を観察し、2倍核を形成していることを報告している。しかし、単孢子分離菌由来の準有性的組換菌と考えられる菌株の核数および核相の決定は行われていない。

そこで、イネいもち病菌の準有性的組換による変異機構および準有性的組換菌の遺伝的安定性について理解を深めるため、本章では、Feulgen 染色法や HCl-Giemsa 法より簡便で、的確に核染色を行うことができる DAPI 染色により準有性的組換菌の菌糸および分生子の1細胞当たりの核数の決定を試みた。また、核相については、植物や動物細胞の核相決定に用いられているフローサイトメトリーを用いて準有性的組換菌の菌糸の核相の決定を試みた。

#### 1. DAPI 染色法による核観察

##### 1) 材料および方法

Y90-71BI (母菌)、3514-R-2BS (母菌)、BIS2 (準有性的組換菌) をショ糖添加オートミール寒天培地で 26°C、11 ~ 12 日間培養し、培養菌叢表面を水彩画用の平筆 8 号 (サクラクレパス、大阪) でブラッシング後、回収した気中菌糸を蒸留水で懸濁し、DAPI 染色に用いた。また、気中菌糸を回収後、培養菌叢を 21°C で蛍光灯 (18W) 下で 3 ~ 4 日培養し、分生子を形成させた。分生子は蒸留水に懸濁後、遠心分離 (3000 × g, 10 分間) し、10<sup>7</sup> 個/ml に調製した。それぞれの試料 1 μl に対して DAPI 染色液 (1 μg/ml DAPI, Vectashield Vector Laboratories, Burlingame, CA) 9 μl を加えて混合し、10 分間室温で静置後、スライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡下で観察した。

##### 2) 結果

準有性的組換菌の気中菌糸を DAPI 染色し、蛍光顕微鏡下で観察した結果、菌糸直径が細いため個々の細胞が小さく、1細胞ごとの核を計測するのは困難であった。しかし、分生子を DAPI 染色した結果では、細胞あたりの核が明瞭に観察された。成熟した分生子は 3 細胞からなるが、1分生子に 3 個の核が観察され、1細胞に 1核が存在した (図 3)。1分

生子に2核のものも時折みられたが、それらの分生子は大きさが小さく未熟な胞子であり、隔壁も1つあるいははっきりと分からなかった。これらの分生子は未分化の胞子であると考えられた。このことから、準有性的組換菌の分生子は母菌と同様に1細胞当たり1核であることが確認された。

## 2. フローサイトメトリーによる核相の決定

### 1) 材料および方法

Y90-71BI (母菌), 3514-R-2BS (母菌), BIS1 (準有性的組換菌), BIS132 (準有性的組換菌) と BIS209 (準有性的組換菌) の菌系のプロトプラストを前章と同様の方法により調製後回収し、これに植物 DNA 解析用 Partec high resolution staining kit (Partec GmbH, Germany) の A 溶液を 0.2ml 加えた後、30  $\mu$  m の mesh filter で反応液をフィルター濾過し、1.5ml の B 溶液を加えた。直ちに核 DNA の蛍光強度を Partec PA フローサイトメーターにより測定し、母菌と準有性的組換菌の倍数性を比較した。

### 2) 結果

供試した母菌と準有性的組換菌のフローサイトメトリーによって得られたヒストグラムに、大きな違いなく、ほぼ同じ形状であった。それぞれの菌株の蛍光強度のピークは2つ見られた。第1のピークは1倍体であり、第2のピークはG2期のDNA量が倍化した細胞であることを示しているが、第1のピークの蛍光強度は Y90-71BI, 3514-R-2BS, BIS1, BIS132, BIS209 でそれぞれ、65.2, 67.6, 61.7, 61.9, 64.9 であった (図4)。また、第2のピークの蛍光強度はそれぞれ 121.9, 123.9, 118.3, 117.0, 119.3 であり (図4)、両ピークとも菌株間で明瞭な差異は認められず、いずれの菌株も単相 (n) であると判断された。

## 3. 考察

本研究により生じた準有性的組換菌菌株の菌系の核数を DAPI 染色により計測することはできなかったが、分生子細胞は同染色による観察から単核であ

ることが明らかになった。また、準有性的組換菌菌株の菌系の核相はフローサイトメトリー解析により、単相であると考えられた。

また、本試験で用いた準有性的組換菌菌株の分生子の DAPI 染色による観察では、核の染色体の大きさが母菌のそれとほぼ同等であった (図3)。このことから、これらの準有性的組換菌菌株は、両母菌同様、菌系および分生子細胞いずれも単核・単相であると推測できる。

前章で示した様に本試験で用いた準有性的組換菌菌株は導入した2種のマーカー遺伝子を有する。また、今回の試験でこれらはいずれも単核・単相であることが確認された。これらのことから、本研究で用いた菌株が準有性的組換によって生じたことが改めて証明された。

これまでに、準有性的組換における核の挙動は、①単核で単相 (n) の核が菌系融合により2核共存体形成  $n+n$ 、②核融合による2倍体 (2n) の形成、③複相の菌系-複相の分生子-複相の菌系形成の繰り返しによる、増殖 (この間に体細胞組換)、④染色体不分離等による核の単相化と考えられている。このうちイネいもち病菌において確認されているのは、①、②と複相の菌系までである<sup>(12, 63, 111)</sup>。複相の分生子が不安定なのか、それとも存在しないのか明らかではないが、複相の分生子の分離に成功したという報告がないことから、イネいもち病菌の準有性的組換過程で形成されると考えられる複相の分生子は生存に不利で、生き残りにくい、あるいは形成されない可能性が考えらる。また、準有性的組換過程における複相核の分生子形成様式については今後の課題であり、イネいもち病菌の菌系融合から分生子形成に至るまでの準有性的組換過程の核相の変化を継続的に観察することが必要である。

なお、多核で核が遺伝的に異なる (ヘテロカリオン) 菌株や、核相が倍数体の菌は変異菌を生じる可能性が高いことが知られているが、本試験の準有性的組換菌株はいずれも単核・単相であったことから、組換を起こさないときには遺伝的に安定しているものと考えられる。

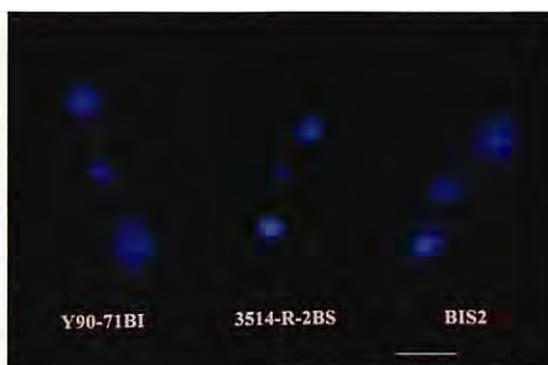


図3 母菌（Y90-71BIと3514-R-2BS）と準有性的組換菌（BIS2）の分生子のDAPIによる核染色

注）スケールバーは10 μm.

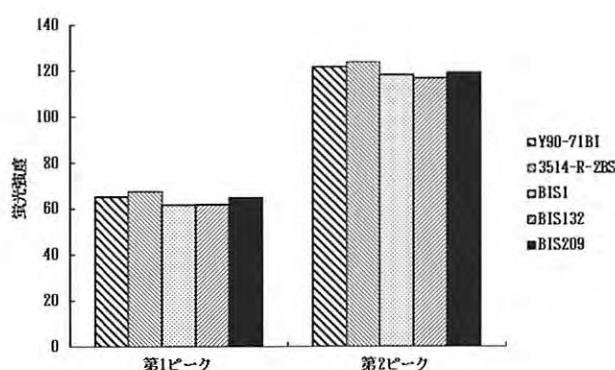


図4 供試イネいもち病菌5菌株のフローサイトメトリーによる2種類のピークの蛍光強度

注) Y90-71BI (母菌).  
3514-R-2BS (母菌).  
BIS1, BIS132, BIS209 (準有性的組換菌).

#### IV 準有性的組換菌の病原性，交配型および核型の分離

Flor<sup>(16)</sup>によりアマのさび病に関して報告された抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子が特異的に対応する「遺伝子対遺伝子関係」(Gene for gene relationship)は、イネのいもち病抵抗性遺伝子といもち病菌の非病原性遺伝子との間にも見られる<sup>(36)</sup>。以前はイネいもち病菌同士の交配系が確立されていなかったため、いもち病抵抗性遺伝子に対する非病原性遺伝子の解析は進まなかった。しかしながらGuy11などの稔性の高いイネいもち病菌が発見されて以来、遺伝解析が可能になり、イネのいもち病抵抗性遺伝子に対するいもち病菌の非病原性遺伝子の研究が進展した。

一方、イネいもち病菌の準有性的組換により生じたと推定される菌については、多くの関連報告があ

るにもかかわらず<sup>(50, 57, 71, 80, 81)</sup>、詳細な遺伝解析は行われていなかった。その理由として、イネ品種あるいは系統の持ついもち病抵抗性遺伝子に対する病原菌の非病原性遺伝子の同定のために、交配可能でかつ十分な交配後代を得られる菌株の組み合わせが必要であったこと、遺伝解析に用いるための準有性的組換菌を得るのが困難であったことが挙げられる。そこで前章で得られた準有性的組換菌について病原性の遺伝解析を試みた。なお、これらの母菌の一つであるY90-71BIの元菌Y90-71は非病原性遺伝子*Avr-Hattan 3*を有し、品種「八反3号」に対しては非病原性を示し、いもち病抵抗性遺伝子*Pit*を有するイネ系統「K59-1」に対しては病原性を示す。もう一方の母菌である3514-R-2BSの元菌3514-R-2

は非病原性遺伝子 *Avr-Pit* を有し、「K59-1」に対しては非病原性であるが「八反3号」に対しては病原性を示す。Y90-71 と 3514-R-2 の交配後代は「八反3号」および「K59-1」に対して非病原性：病原性が1:1に分離することが報告されている<sup>(114)</sup>。そこで、前章で得た準有性的組換菌について「八反3号」および「K59-1」に対する病原性の分離比を調べた。また、準有性的組換菌の母菌である Y90-71BI と 3514-R-2BS を交配し、その後代の「八反3号」および「K59-1」に対する病原性の分離も調べ、準有性的組換菌でみられた分離比との比較及び導入した遺伝子と非病原性遺伝子との連鎖の可能性を検証した。

有性世代が発見されていない不完全菌の中には、準有性的組換によって有性生殖と同様の遺伝的組換が生じ、栄養要求性や胞子の色などの遺伝形質に対する遺伝子座を決定することができる<sup>(40)</sup>。しかし、イネいもち病菌の準有性的組換菌の遺伝様式については不明な点が多く、他の糸状菌のように遺伝形質が有性生殖と同様に分離するかどうか不明である。そこで、本章では、次にいもち病菌の遺伝形質として代表的な交配型に着目し、準有性的組換菌の遺伝解析を行った。すなわち、いもち病菌の有性世代は、メヒシバいもち病菌 (*Pyricularia grisea*) で発見されて以降<sup>(25)</sup>、オヒシバ、シコクビエ、イネ菌などで確認されているが<sup>(31, 105)</sup>、いずれの菌も雌雄異株 (Heterotalic) であり、交配型は一對の対立遺伝子 (*Mat1-1*, *Mat1-2*) に支配されている。そこで、準有性的組換菌および Y90-71BI と 3514-R-2BS の交配後代について、交配型 (*MAT1-1*, *MAT1-2*)<sup>(116)</sup> の解析を試みた。

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) は、従来のアガロース電気泳動では分離不可能であった長い直鎖状 DNA 断片を分離、解析する目的で開発された技術である。一般に植物病原菌をはじめとする多くの菌類の染色体は、きわめて小さく、光学顕微鏡等で観察するのが困難な場合が多い。PFGE を用いることにより、染色体をアガロースゲル中にバンドとして検出することができる。植物病原系状菌においては 1988 年にトウモロコシ黒穂病菌で最初に行われ<sup>(32)</sup>、その後多くの植物病原菌で報告されている。一般に核型は生物種属に特有で正しく保存され伝達されるが<sup>3</sup>、報告された植物病原菌はいずれも

染色体 DNA のサイズおよび数に著しい多型を示した。DNA の欠失、増幅、転座などが多型をもたらす要因と考えられる。一般に多型を示すものでも比較的大きいサイズの染色体 (常染色体) は保持されていて、とくに比較的小さいサイズの染色体 (余剰染色体) で多型が著しい傾向が見られる。

イネいもち病菌の PFGE による核型解析はこれまでに数多く報告されている<sup>(69, 85, 86, 91)</sup>。Talbot *et al.*<sup>(91)</sup> は、アメリカ合衆国で採取した様々な病原性のイネいもち病菌株の核型解析を行った。一方、Sone *et al.*<sup>(85, 86)</sup> は日本で採取されたイネいもち病菌株の核型解析を行い、20 以上の核型を見いだした。これらの報告にはサイズが 2Mb 以下の余剰染色体の多型についても報告がある。特に、生存上必須ではないとされる余剰染色体において他の菌類と同様に高い頻度で多型が見られる。また、無性生殖の際の核型の変異が報告されている。これらの染色体多型はゲノムの再編成を導き、病原性変異に関わると考えられている。しかしながら、イネいもち病菌の準有性的組換菌の核型解析はこれまでに行われていない。そこで本章では病原性および交配型の遺伝解析に加えて PFGE によるイネいもち病菌の準有性的組換菌、母菌および交配後代の核型解析を行い、準有性的組換により病原性変異要因となる核型の多型が出現するのか、それとも有性生殖と同様の核型を示すのかを調べた。また、核型と遺伝的形質 (イネ品種に対する病原性や交配型) を調べ、イネいもち病菌で準有性的組換により新たな母菌とは遺伝的形質が異なる菌系が発生するかを調べた。

## 1. 準有性的組換菌の病原性の分離

### 1) 材料および方法

#### a 交配後代 (有性世代) の単離法

イネいもち病菌の交配法と子のう胞子の単離法は、八重樫<sup>(105)</sup>の方法に従った。Y90-71BI と 3514-R-2BS を PSA 培地上に移植し、25℃で 3～7 日間前培養を行い、生育の旺盛な菌叢片をショ糖添加オートミール寒天培地上に数センチ離して移植し、蛍光灯 (18W) 照射下で 25℃、15～25 日間対峙培養を行った。両菌株の菌叢境界線に形成された成熟した子のう殻を滅菌水中で破碎後、放出させた子のう胞子をガラス棒で PDA 選択培地 (ピアラフォス [800 μg/ml] とブラストサイジン S [100 μg/ml])

を添加) 上に拡げ、26℃で24～36時間培養後、発芽した単子のう胞子をニクロム線の環で培地ごと打ち抜いてPSA斜面培地に移植し、有性生殖の交配後代とした。

## b 病原性検定

イネいもち病菌株 Y90-71BI と 3514-R-2BS の混合培養により得られた準有性的組換菌 49 菌株と交配後代 70 菌株を供試した。母菌に対する抵抗性が異なるイネ品種「八反3号」と系統「K59-1」を供試した。「八反3号」は Y90-71BI の元菌の Y90-71 が持つ非病原性遺伝子 *Avr-PiHattan 3* に対応する *Pik* 遺伝子座に位置するいもち病抵抗性遺伝子を有する。「K59-1」は、品種「K59」と品種「農林3号」を交配した F<sub>3</sub> 世代のうち、いもち病抵抗性遺伝子 *Pit* を有する 1 系統である<sup>(11)</sup>。ホーネンス培土 1 号 (ホーネンアグリ, 長岡) を充填したシードリングケース (縦 15 cm × 横 5 cm × 高さ 10cm) にベノミル (ベンレート 50%水和剤) で消毒し、催芽させたイネ種子を播種し、ガラス温室内で育苗した。病原性の判別には、4～5 葉期のイネを供試した。イネいもち病菌の接種のため、ショ糖添加オートミール寒天培地上で 26℃で培養後、分生子を形成させ、その懸濁液を常法<sup>(67)</sup>に従い調製し、分生子懸濁液をダイヤスプレイ (フルプラ社, 東京) を用

いてイネに噴霧接種し、接種葉身に生じた病斑の病斑型から病原性の判定を行った<sup>(11)</sup>。接種試験は 2 回行った。病原性の分離比の解析では、カイ二乗分布による適合度の検定 ( $P>0.05$ ) を行った。

## 2) 結果

準有性的組換菌の「八反3号」に対する病原性を調べた結果、非病原性菌株が<sup>a</sup> 12 菌株、病原性菌株は 37 菌株であった。 $\chi^2$  値は 12.76 で  $P$  値は  $<0.01$  となり、非病原性菌株と病原性菌株の分離比は 1:1 に適合しなかった (表 1)。一方、「K59-1」に対する準有性的組換菌の非病原性菌株と病原性菌株の数は 24 および 25 で、 $\chi^2$  値は 0.02 で  $P$  値は 0.80～0.90 となり、1:1 に適合した。

次に Y90-71BI と 3514-R-2BS の有性生殖による交配後代 70 菌株について「八反3号」に対する病原性を調べた結果、非病原性菌株は 21 菌株、病原性菌株は 49 菌株であり、 $\chi^2$  値は 11.20、 $P$  値は  $<0.01$  で非病原性菌株と病原性菌株の比が 1:1 に適合しなかった (表 2)。一方、「K59-1」に対する交配後代の非病原性菌株:病原性菌株の分離は 43:27 で、同様に  $\chi^2$  値は 3.6 で  $P$  値は 0.05～0.10 であり、1:1 に適合した。

「八反3号」に対する病原性の分離比が<sup>a</sup>、準有性的組換菌と交配後代で適合するか  $\chi^2$  検定を行った

表 1 イネ品種「八反3号」と系統「K59-1」に対する準有性的組換菌の病原性の分離

品種・系統名	混合培養に用いた母菌		菌株数 A <sup>a</sup> :V <sup>b</sup>	$\chi^2$ 値 1:1	P 値
	Y90-71BI	3514-R-2BS			
八反3号	A	V	12:37	12.76	< 0.01
K59-1	V	A	24:25	0.02	0.80-0.90

注) <sup>a</sup> 非病原性  
<sup>b</sup> 病原性  
分離比率を 1:1 とし  $\chi^2$  分布による適合度の検定 ( $P>0.05$ ) を行った。

表 2 イネ品種「八反3号」と系統「K59-1」に対する Y90-71BI と 3514-R-2BS の交配後代の病原性の分離

品種・系統名	菌株数	$\chi^2$ 値 1:1	P 値
	A <sup>a</sup> :V <sup>b</sup>		
八反3号	21:49	11.20	< 0.01
K59-1	43:27	3.60	0.05-0.10

注) <sup>a</sup> 非病原性  
<sup>b</sup> 病原性  
分離比率を 1:1 とし  $\chi^2$  分布による適合度の検定 ( $P>0.05$ ) を行った。

表3 イネ品種「八反3号」に対する準有性的組換菌と交配後代の病原性の分離の比較

	菌株数		$\chi^2$ 値 <sup>c</sup>	P 値 <sup>d</sup>
	A <sup>a</sup> :V <sup>b</sup>			
準有性的組換菌	12:37		0.47	0.50-0.70
交配後代	21:49			

注) <sup>a</sup>非病原性<sup>b</sup>病原性<sup>c,d</sup> 交配後代の非病原性菌株と病原性菌株の分離比に準有性的組換菌の分離が適合するか $\chi^2$ 分布による適合度の検定 ( $P>0.05$ ) を行った。

表4 イネ系統「K59-1」に対する準有性的組換菌と交配後代の病原性の分離の比較

	菌株数		$\chi^2$ 値 <sup>c</sup>	P 値 <sup>d</sup>
	A <sup>a</sup> :V <sup>b</sup>			
準有性的組換菌	24:25		1.82	0.10-0.20
交配後代	43:27			

注) <sup>a</sup>非病原性<sup>b</sup>病原性<sup>c,d</sup> 交配後代の非病原性菌株と病原性菌株の分離比に準有性的組換菌の分離が適合するか $\chi^2$ 分布による適合度の検定 ( $P>0.05$ ) を行った。

ところ、 $\chi^2$  値 0.47、P 値は 0.50 ~ 0.70 となり適合した (表 3)。同様に、「K59-1」でも、 $\chi^2$  値 1.82、P 値は 0.10 ~ 0.20 となり適合した (表 4)。

## 2. 準有性的組換菌の交配型の分離

### 1) 材料および方法

交配型の検定には、交配能が高く、交配型遺伝子 *MAT1-1* を持つ Y93-164a-1 (レース 132) と *MAT1-2* を持つ Y93-245c-2 (レース 137) を用いた。両菌株は 1993 年に中国の雲南省で分離されたもので、イネに病原性のある菌株である。以上の検定用 2 菌株と準有性的組換菌 49 菌株および交配後代 60 菌株を用いて組み合わせ、対峙培養し、どちらの検定用菌株との菌叢境界線に子のう殻を形成するか調査し、交配型を決定した。

### 2) 結果

準有性的組換菌 49 菌株についてみると、混合培養に用いた母菌 Y90-71BI と同じ交配型と判定された MAT1-1 は 21 菌株であり、一方、母菌 3514-R-2BS と同じ交配型である MAT1-2 は 28 菌株であった。交配型の分離が 1:1 に適合するかどうか調べるために $\chi^2$  検定を行ったところ、 $\chi^2$  値は 1.00 で P 値は 0.30 ~ 0.50 となり、1:1 に適合した (表 5)。また、Y90-71BI と 3514-R-2BS 交配後代の交配型の分離状況を調べた結果、MAT1-1 は 26 菌株、MAT1-2 は 34 菌株であった。同様に、 $\chi^2$  値は 1.07、P 値は 0.30 ~ 0.50 となり、1:1 に適合した。

準有性的組換菌の交配型の分離と交配後代の交配型の分離が適合するか $\chi^2$  検定を行った結果、 $\chi^2$  値 0.02、P 値は 0.95 ~ 0.98 となり 1:1 に適合した (表 6)。

表5 準有性的組換菌と交配後代の交配型の分離

	菌株数		$\chi^2$ 値	P 値
	MAT1-1:MAT1-2			
準有性的組換菌	21:28		1.00	0.30-0.50
交配後代	26:34			

注) 分離比率を 1:1 として $\chi^2$ 分布による適合度の検定 ( $P>0.05$ ) を行った。

表 6 準有性的組換菌と交配後代の交配型の分離の比較

	菌株数		$\chi^2$ 値 <sup>a</sup>	P 値 <sup>b</sup>
	MAT1-1:MAT1-2			
準有性的組換菌	21:28		0.02	0.95-0.98
交配後代	26:34			

注) <sup>a</sup> 交配後代の交配型の分離比に準有性的組換菌の分離が適合するか  $\chi^2$  分布による適合度の検定 ( $P > 0.05$ ) を行った。

### 3. パルスフィールドゲル電気泳動法による核型解析

#### 1) 材料および方法

母菌の Y90-71BI, 3514-R-2BS と準有性的組換菌 35 菌株, 交配後代 19 菌株を用い, Yelton *et al.* <sup>(115)</sup> の方法により, プロトプラストを調製し, 0.7% ソルビトールで約  $5 \times 10^8$  個/ml の濃度に調整した. プロトプラスト懸濁液と 1% 低融点アガロース (0.7% ソルビトール, 0.125M EDTA:pH7.5) とを等量混合し, サンプルモールド (ディスポーザブルプラグモールド, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) に注入し, ゲル化した. このサンプルゲルブロックを細胞溶解および除タンパク処理液 (0.01M Tris-HCl[pH 7.5], 0.5M EDTA[pH 8.0], 1% Lauroyl sarcosine, 1mg/ml プロテナーゼ K) に浸し, 50°C で 24 時間ゆっくりと振とうし, 処理液を交換して, さらに 24 時間処理した. その後 0.05M EDTA[pH 8.0] で数回洗浄し, PFGE サンプルとした. ゲルは 0.5 × 改変 TBE バッファー (25mM Tris-HCl[pH 7.5],

22.5mM ホウ酸, 50mM EDTA[pH7.5]) で溶解した 0.8% アガロースゲル (Megabase, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を, 泳動には 0.5 × 改変 TBE バッファーを用いた. 電気泳動槽 (CHEF MAPPER, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて, パルスタイムを 5400 秒, 電圧 35V の条件で 120 時間泳動し, 続いてパルスタイムを 3600 秒, 電圧 35V の条件で 48 時間泳動した. 泳動後, ゲルを 0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド溶液に約 1 時間浸して染色を行い, UV トランスイルミネーターで可視化した.

#### 2) 結果

母菌の Y90-71BI および 3514-R-2BS を用いて PFGE を行った結果, 5 本のバンドが検出され, そのうち 4 本はサイズが同じであった (図 5). Y90-71BI で見られる 5.7Mb 付近のバンドは, 3514-R-2BS では見られなかった.

準有性的組換菌では, 母菌と同様にバンドが 5 本

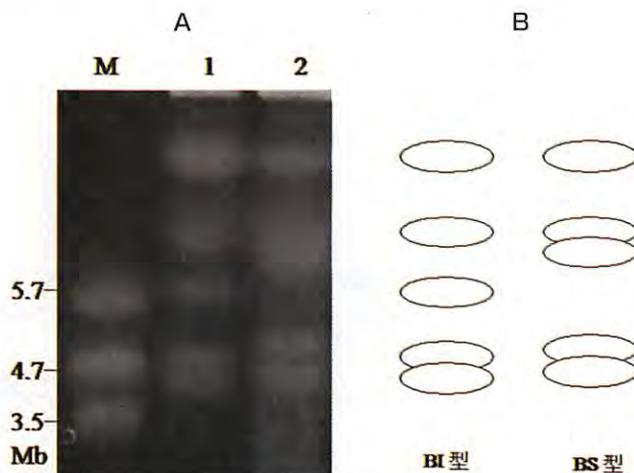


図 5 母菌 Y90-71BI および 3514-R-2BS パルスフィールドゲル電気泳動による核型解析

注) A, パルスフィールドゲル電気泳動写真.  
M: サイズマーカー (*Schizosaccharomyces pombe*).  
1: Y90-71BI, 2: 3514-R-2BS.  
B, BI 型と BS 型のバンドパターン の模式図.

検出され、母菌のいずれかと同様の核型が見られ (図6), その他の核型は見られなかった. すなわち供試35菌株中, 母菌 Y90-71BI と同様の核型 (BI型) に属するものは16菌株であり, 母菌 3514-R-2BS と同じ核型 (BS型) のものは19菌株であった. 交配後代の菌株も準有性的組換菌と同様にバンドが5本検出され, 核型は母菌のいずれかと同様であった. 19菌株中で, BI型は8菌株あり, BS型は11菌株であった.

準有性的組換菌の核型の分離比が交配後代の核型の分離比に適合するかを  $\chi^2$  検定で調べた結果,  $\chi^2$  値 0.07,  $P$  値 0.80 ~ 0.70 で適合した (表7).

「八反3号」に対する病原性について調べた結果, 核型 BI 型の16菌株において非病原性菌が6菌株, 病原性菌が10菌株で, BS 型の19菌株においては非病原性菌が4菌株, 病原性菌が15菌株であった (表

8). 一方, 「K59-1」に対する病原性は, BI 型の16菌株においては非病原性菌が8菌株, 病原性菌が8菌株, BS 型の19菌株においては非病原性菌が6菌株, 病原性菌が13菌株であった (表8).

さらに, 準有性的組換菌の核型と交配型について調べた結果, BI 型の16菌株において MAT1-1 は6菌株, MAT1-2 は10菌株であり, BS 型の19菌株において MAT1-1 は7菌株, MAT1-2 は12菌株であった (表9). 例えば, 準有性的組換菌 BIS1 は核型が BI, 品種「八反3号」と「K59-1」に対して非病原性, 交配型は MAT1-2 であり, 核型と「八反3号」に対する病原性は母菌 Y90-71BI と同様であるが, 「K59-1」に対する病原性と交配型は母菌 3514-R-2BS と同様である. このように, 両母菌の核型, 「八反3号」や「K59-1」に対する病原性および交配型が両母菌の組換型の準有性的組換菌も認められた.

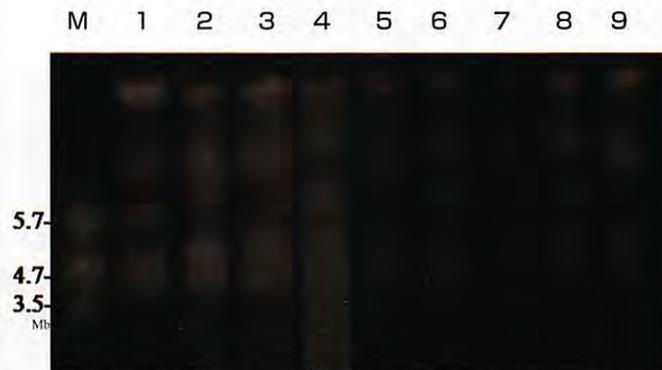


図6 準有性的組換菌および交配後代のパルスフィールドゲル電気泳動による核型解析

注) M: サイズマーカー (*S.pombe*).  
 1: Y90-71BI (母菌).  
 2: 3514-R-2BS (母菌).  
 3 ~ 6: 準有性的組換菌.  
 7 ~ 9: 交配後代.  
 1, 4, 6 および 8 は BI 型.  
 2, 3, 5, 7 および 9 は BS 型.

表7 準有性的組換菌の核型と交配後代の核型の分離の比較

	菌株数		$\chi^2$ 値 <sup>a</sup>	$P$ 値 <sup>b</sup>
	BI型	BS型		
準有性的組換菌	16	19	0.07	0.70-0.80
交配後代	8	11		

注) <sup>a</sup> 交配後代の BI 型の菌株と BS 型菌株の分離比に準有性的組換菌の分離が適合するか  $\chi^2$  分布による適合度の検定 ( $P > 0.05$ ) を行った.

表 8 準有性的組換菌の核型別のイネ品種「八反3号」と系統「K59-1」に対する病原性の分離菌株数

核型	八反3号		K59-1	
	非病原性	病原性	非病原性	病原性
BI 型	6	10	8	8
BS 型	4	15	6	13

注) 母菌 Y90-71BI は核型が BI 型で「八反3号」に非病原性、「K59-1」に病原性を示す。  
母菌 3514-R-2BS は核型が BS 型で「八反3号」に病原性、「K59-1」に非病原性を示す。

#### 4. 考察

これまでに、準有性的組換菌と推定される菌株のレース出現に関しては両母菌の病原性を併せ持つレースだけでなく、様々なレースが出現するという報告があるが<sup>(57, 63)</sup>、「準有性的組換によりどのようなレースが出現するのか?」という問いに対しての明確な答えはなかった。本研究の結果より、準有性的組換でも有性生殖の結果、出現するレースと同様のレースが出現することが明らかになった。すなわち、交配後代に出現する病原性は親菌の持つ非病原性遺伝子の組合せによって決まるが、準有性的組換菌の病原性においても、母菌の有する非病原性遺伝子の組み合わせにより決定すると考えられた。準有性的組換菌の中には、母菌の病原性を併せ持つ菌株、すなわち「八反3号」と「K59-1」の両品種と系統に対して病原性を示す菌株が見られた。これは、両母菌由来の非病原性遺伝子 (*Avr-Hattan3* と *Avr-Pit*) を持たない菌株が有性生殖と同様に準有性的組換により生じた結果であると考えられた。

Y90-71 と 3514-R-2 菌株の交配後代は「八反3号」および「K59-1」に対して非病原性：病原性が 1:1 に分離することが報告されている<sup>(114)</sup>。そこで、Y90-71 にピアラフォス耐性遺伝子を導入して作出した Y90-71BI と、3514-R-2 にプラストサイジン S 耐性遺伝子を導入して作出した 3514-R-2BS の混合培養により得られた準有性的組換菌の病原性が有性生殖と同様に分離するならば、「八反3号」および「K59-1」に対する準有性的組換菌の病原性の分離比も 1:1 に分離すると考えられた。しかし、本研究では準有性的組換菌の「K59-1」に対する病原性の分離は 1:1 に適合したが、「八反3号」に対する分離は 1:1 に適合しなかった。この結果から、以下の 2つの可能性が考えられる。すなわち、1) 非病原性遺伝子の種類によっては、準有性的組換により有性生殖と同様に病原性 (非病原性) 遺伝子が分離す

る場合と分離しない場合がある。2) 母菌は薬剤耐性遺伝子の導入によって得られた菌株であり、導入した遺伝子と非病原性遺伝子の間に何らかの連鎖が生じ、交配後代では「八反3号」に対する分離比が 1:1 にならない。この 2) の可能性を検証するために、混合培養に用いた Y90-71BI と 3514-R-2BS 菌株同士を交配し、その交配後代の「八反3号」と「K59-1」に対する病原性の分離比をそれぞれ調べた結果、準有性的組換菌の病原性の分離比と一致した。このことから、導入した薬剤耐性遺伝子と非病原性遺伝子の間に連鎖が生じていることが強く示唆された。

準有性的組換菌および Y90-71BI と 3514-R-2BS の交配後代の交配型の分離比を調べた結果では、交配型 MAT1-1:MAT1-2 はそれぞれ 1:1 に一致し、さらに準有性的組換菌の交配型の分離と交配後代の交配型の分離比も適合した。このことから、準有性的組換による交配型の分離は、有性生殖による分離と同じ結果をもたらすと考えられる。

有性世代の知られていない *Aspergillus niger* 等では、栄養要求性に関する遺伝子座等の決定に準有性的組換が重要な役割を果たすことが知られており<sup>(40, 89)</sup>、イネいもち病菌においても、準有性的組換は、有性生殖と同様に遺伝形質の分離に深く関わっていると考えられる。すなわち、前章でも述べたように、イネいもち病菌は準有性的組換により新しい遺伝子型をもつ系統を生じることが示唆された。

イネいもち病菌の常染色体は 7 本とされるが、本試験条件下で PFGE を行うとおよそ 5 本のバンドが得られ、染色体上に連鎖する遺伝子マーカーでサザンハイブリダイゼーションをおこなうと 7 本のバンドとして見ることができ<sup>(85, 90)</sup>。本研究結果ではこれまでの報告と同様、染色体は 5 つのバンドとしてとらえることができた。染色体上で連鎖する遺伝子マーカーでサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、7 本の染色体が 5 つのどのバンドに

対応しているかが明らかにできると思われるが、おそらく分子量の大きい2番目のバンドは複数の染色体から構成され、本実験条件ではそれらを分離することができなかつたと考えられる<sup>(84, 90)</sup>。バンドの数と染色体数は一致していないものの、PFGEの結果は再現性のあるバンドパターンを示し、核型解析に用いることができると判断した。

イネいもち病菌の準有性的組換過程では、複相核が体細胞分裂を繰り返す際に染色体の非分離などにより単相化すると考えられている<sup>(11)</sup>。単相化の際に染色体の数や大きさが変化した準有性的組換菌があれば、PFGEの核型が母菌と異なると考えられた。しかし、準有性的組換菌は、いずれかの母菌の核型を示した。これらのことから、イネいもち病菌は、母菌と染色体の数や大きさの異なる菌株は生存できない、あるいは準有性的組換の過程で染色体非分離が起こらない可能性が考えられる。イネいもち病菌は無性生殖を繰り返すが、これまでに元菌と核型が異なる変異菌の出現、サイズが2Mb以下の余剰染色体の核型の多型について報告がある<sup>(85, 86)</sup>。このことから、母菌と異なる核型の準有性的組換菌が生存できない可能性は低いと考えられる。イネいもち病菌では準有性的組換過程で核融合後の複相核形成以降の核の挙動については報告がない。単相化がどのように起こっているのかを明らかにするために、今後、詳細な研究が必要である。

一般的に無性生殖で増殖する菌類の集団内にはPFGEにより得られる核型に多様性が見られるのに対し、主に有性生殖で増殖する菌類の集団内では核

型がそれほど多様でないという報告がある<sup>(35, 103)</sup>。イネいもち病菌においては、有性世代形成を行う菌株同士の核型には相同性が見られ、核型において高い相同性が見られる菌株間で形成された子のう胞子の生存率は高いことが報告されている<sup>(69)</sup>。これらのことより、子のう菌類の菌株間の有性世代形成能と核型の相同性には何らかの関係があることが示唆される。本研究において、用いた準有性的組換菌の母菌2株の核型にはわずかに違いが見られるものかなりの相同性(5本のバンド中4本がほぼ同じ大きさ)が見られたことから、準有性的組換菌形成能には、母菌間の核型の相同性が関与している可能性が示唆される。

本研究においては、準有性的組換菌の核型の分離と交配後代の核型の分離は同様であった。準有性的組換菌のイネ品種および系統に対する病原性や交配型の遺伝様式が有性生殖と同様であったことと同じく、核型についても準有性的組換は有性生殖と同様の遺伝様式を取ることが示唆される。以上のことは、準有性的組換において様々な遺伝形質が有性生殖と同様に遺伝することを明示している。

他方、核型は母菌Y90-71BIと同じBI型で、イネ品種および系統に対する病原性や交配型は母菌3514-R-2BSと同じというような両母菌の組換型の遺伝的形質をもつ準有性的組換菌が得られた。このことは、イネいもち病菌においても準有性的組換が遺伝子型の異なる新たな菌株を出現させる手段となることを示している。

## V 準有性的組換菌のレースの安定性と病原力

新レースが圃場でイネに被害をもたらすためには、その菌の病原性の安定性と病原力が重要と考えられる。しかし、イネいもち病菌の準有性的組換菌と推定される菌株の病原力について研究した報告は少なく<sup>(53, 58)</sup>、圃場における試験はこれまでに報告がない。そこで、本章では、日本産の2菌株を混合培養し、両母菌の病原性を併せ持つ菌を作出し、得られた菌のみが侵害できるイネ品種に接種して選抜し、分離した菌株が準有性的組換菌であるかどうかをRAPD解析により検討した。その後、継代接種による病原性の安定性、孢子形成数、病斑長、圃場

における発病進展状況を調査し、それらを母菌と比較することにより、病原性の幅が拡大した準有性的組換菌が圃場で発病を増大させる可能性について検討した。

### 1. レースの安定性

#### 1) 材料および方法

##### a 混合培養

供試母菌は、1977年に秋田県大曲市(現大仙市)の旧東北農業試験場水田利用部(現東北農業研究センター)の圃場において品種「フクニシキ」より分離されたTH77-1(レース047.0)と、新潟県上越市

の圃場において分離された NAO-02 (レース 133.1, 分離年不明) である。PSA 培地にそれぞれの菌株を移植し、25°C で 3-7 日間前培養を行った。その後 2 菌株の生育旺盛な菌叢片を酵母エキス液体培地に移植し、25°C で 7 日間混合培養した。混合培養液をショ糖添加オートミール寒天培地に移し、25°C で 7 日間培養した後、常法<sup>(67)</sup>により調整した孢子懸濁液を両母菌の病原性を併せ持つ菌のみが侵すことのできる品種「アキユタカ」(イネいもち病抵抗性遺伝子 *Pik*, *Piz* を保有) に噴霧接種し、接種葉身に生じた病斑より菌を単孢子分離して、菌株を保存した。

### b RAPD 解析

DNA の抽出は II 章の 1 項で述べた方法により行った。オペロン社のプライマーキット A から K および AA から AI の合計 400 のプライマーを供試した。増幅条件は、Yasuda *et al.* <sup>(114)</sup> の報告に準じた。すなわち、PCR は反応液 25  $\mu$  l (1 ユニットの TaKaRa *Taq* DNA polymerase (宝酒造, 大津), 1  $\times$  PCR buffer, 100  $\mu$  M 各 dNTP, 0.4  $\mu$  M プライマー, 20ng の鋳型 DNA) をサーマルサイクラー 480 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) を用いて、45 サイクル (94°C 1 分間, 36°C 1 分 30 秒間, 72°C 2 分間) 行い、その後 72°C 7 分間で増幅を行った。増幅産物は 1 ~ 1.5% のアガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行い可視化した。

### c 継代接種

NAO-02 と TH77-1 の混合培養により得られた両母菌の病原性を併せ持った準有性的組換菌 (KZB と KZC) を用いた。継代接種のためにイネ品種「愛知旭」(イネいもち病抵抗性遺伝子 *Pia* を保有) と「アキユタカ」(同 *Pik*, *Piz* を保有) を用いた。常法により形成させた両菌株の孢子懸濁液を (約  $5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$  個/ml) の 15 ml を 4 葉期まで育苗した供試 2 品種にエアブラシ PCB.102C (Olympos, 大阪) を用いて孢子懸濁液を噴霧接種した。接種 1 週間後、葉に形成された病斑を採取し、滅菌水で湿らせた濾紙 (No2, アドバンテック, 東京) を敷いたペトリ皿の中に並べ、26°C で 24 時間静置した。その後、病斑上に形成された分生子を八重樫・小林<sup>(106)</sup>の方法に従い超音波洗浄器を用いて回収後、0.01% の

Tween20 に懸濁し、孢子濃度を約  $5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$  個/ml に調整した。15ml の孢子懸濁液を供試品種の葉に噴霧接種後、直ちに 25°C, 相対湿度 100% の接種箱に移し、20 時間静置した。その後 26 ~ 27°C のガラス室に移し、接種 1 週間後に形成された病斑を切り取り、前述と同様の手順で孢子懸濁液を調製した。このようにして同一品種に連続的に 7 回噴霧接種を繰り返した後、8 世代目の病斑から単孢子分離を行い、得られた 37 菌株のレースを調べた。レースの判別は、Yamada *et al.* <sup>(108)</sup> が定めた 9 判別品種に Kiyosawa<sup>(37)</sup> の 3 判別品種 (「K60」, 「BL1」, 「K59」) を加えた 12 判別品種を用いて行った。

## 2) 結果

混合培養液由来の分生子を接種した品種「アキユタカ」の葉身に形成した罹病性病斑より 9 菌株を分離し、レースを判別するとともに「アキユタカ」に対する病原性を調べた (表 10)。分離菌株は、混合培養に用いた両母菌が病原性を示す「新 2 号」, 「愛知旭」に対しては病原性を、両母菌が非病原性を示す「Pi No.4」, 「とりで 1 号」, 「BL 1」 と 「K59」に対しては非病原性を示した。母菌間で病原性反応が異なる「石狩白毛」, 「関東 51 号」, 「ツユアケ」, 「フクニシキ」, 「ヤシロモチ」, 「K60」に対しては、分離菌株の病原性はいずれかの母菌の病原性と同様であった。また、分離菌株は「アキユタカ」に対しては、8 菌株が病原性を示し、1 菌株は非病原性を示した。ここでは、混合培養により出現した準有性的組換と考えられる病原性の幅が広い菌株の病原力を調べることを目的としたため、分離菌株のうち最も病原性の幅が広いレース 177.1 の 3 菌株 (KZA, KZB, KZC と命名) を以降の試験に用いた。

準有性的組換の証明のため、母菌間で再現性のある多型が得られたプライマー 11 個 (表 11) を RAPD 解析に用いた。プライマー AA-2, AA-14 (図 7), AI-18 (図 7), F-7 (図 7), I-16 と J-8 では、分離 3 菌株と母菌 NAO-02 において同じバンドパターンが形成された。また、AB-11 (図 7), AK-12, E-4 (図 7), J-6 と J-18 (図 7) では、分離 3 菌株と母菌 TH77-1 において同じバンドパターンが形成された。これらのことより、分離 3 菌株は両母菌の遺伝子マーカーを共有していることから準有性的組換菌であることが確認された。

供試3菌株の病原性の安定性を調べるために、うち2菌株 KZB (レース 177.1) または KZC (レース 177.1) をランダムに選び、分生子を「愛知旭」および「アキュタカ」に7回繰り返し接種後、8代目

の病斑から再分離した計37菌株のレースを判別した。その結果、いずれの品種由来の菌株も全てレース 177.1 であった (表 12)。

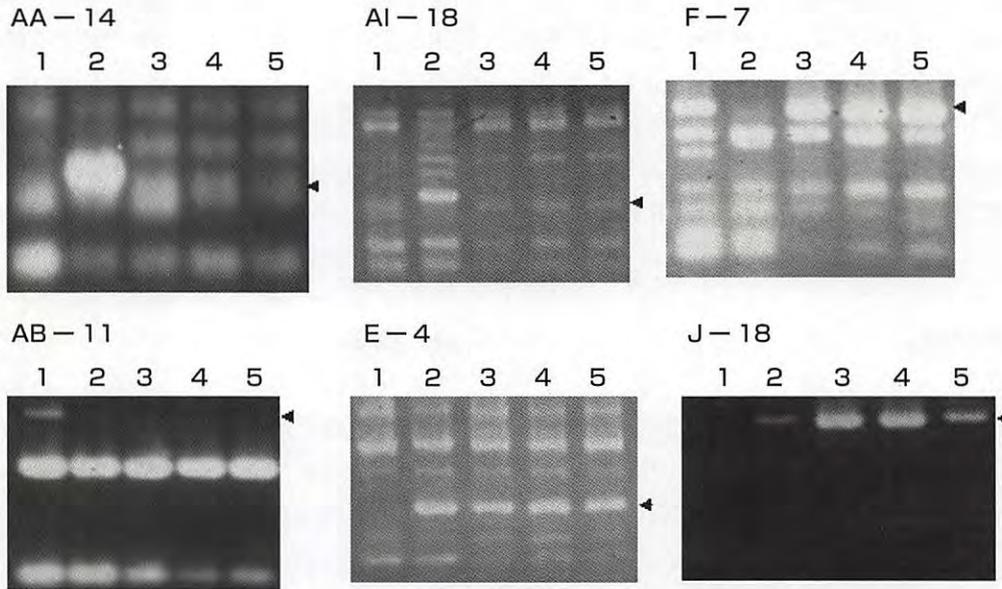


図7 品種「アキュタカ」に生じた病斑より分離した菌株のRAPD解析

注) 1:NAO-02 (母菌)  
 2:TH77-1 (母菌)  
 3:KZA(分離菌株)  
 4:KZB(分離菌株)  
 5:KZC(分離菌株)  
 ◀:多型を示すバンド

表 10 NAO-02 と TH77-1 の混合培養により得られた菌株の病原性及びレース

判別品種	母菌		変異菌		
	NAO-02	TH77-1		KZA, KZB, KZC	
アキュタカ	- <sup>a</sup>	-	-	V <sup>b</sup>	V
新2号	V	V	V	V	V
愛知旭	V	V	V	V	V
石狩白毛	-	V	V	-	V
関東51号	V	-	V	V	V
ツユアケ	V	-	V	V	V
フクニシキ	-	V	-	V	V
ヤシロモチ	V	-	V	V	V
Pi No. 4	-	-	-	-	-
とりで1号	-	-	-	-	-
K60	V	-	V	V	V
BL1	-	-	-	-	-
K59	-	-	-	-	-
レース	133. 1	047. 0	137. 1	173. 1	177. 1
変異菌株数			1	5	3

注) <sup>a</sup> 非病原性, <sup>b</sup> 病原性  
 レース 177.1 の変異菌については KZA, KZB, KZC と命名。

表 11 RAPD 解析に用いたプライマーの配列

プライマー	配列 (5' -3')
AA-2	GAGACCAGAC
AA-14	AACGGGCCAA
AB-11	GTGCGCAATG
AI-18	TCGCGGAACC
AK-12	AGTGTAGCCC
E-4	GTGACATGCC
F-7	CCGATATCCC
I-16	ACCTGGACAC
J-6	TCGTTCCGCA
J-8	CATACCGTGG
J-18	TGGTCGCAGA

表 12 準有性的組換菌の継代接種における「アキユタカ」と「愛知旭」に対するレースの安定性

菌株 (レース)	品種 (抵抗性遺伝子)	単孢子分離菌株のレース <sup>a</sup>	
		分離菌株数	レース177.1の分離率 (%)
KZB (177.1)	アキユタカ ( <i>Pik, Piz</i> )	10	100
	愛知旭 ( <i>Pia</i> )	9	100
KZC (177.1)	アキユタカ ( <i>Pik, Piz</i> )	7	100
	愛知旭 ( <i>Pia</i> )	11	100

注) <sup>a</sup>「アキユタカ」および「愛知旭」に7回継代接種を行った後、形成された病斑より単孢子分離を行い、得られた分離菌株についてレース判別した。

## 2. 病斑長と孢子形成数

### 1) 材料および方法

#### a 病斑長

供試イネ品種として「愛知旭」, 「関東 51 号」, 「フクニシキ」および「アキユタカ」を用いた。母菌の NAO-02 と TH77-1 および分離菌株のうち、圃場試験に供試した KZB を用い、常法により形成させた分生子を用い、0.01% に調整した Tween20 の溶液に約  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  個/ml の孢子濃度に調整し、大きさ  $3 \times 3$  mm の濾紙 (No.2, アドバンテック, 東京) 片にしみ込ませた。病菌接種用パンチ (藤原製作所, 大阪) を用いて、ガラス室内で育苗したイネの 6 葉期の第 6 葉の葉身を付傷し、そのパンチ部位に孢子懸濁液をしみ込ませた濾紙片を乗せて接種した。接種イネを 25°C で相対湿度 100% の接種箱に 20 時間静置させた後、26 ~ 28°C のガラス室内において病斑を形成させた。病斑長は、接種 7, 14, 21 日後に測定した。1 処理区あたり、4-12 病斑を調査し、2 反復で行い、菌株間の病斑長の平均値を算出

し、Tukey の多重検定を行った ( $P < 0.05$ )。

#### b 孢子形成数

品種「愛知旭」を供試し、NAO-02, TH77-1, KZA, KZB および KZC 菌株を用いて測定した。病斑長の試験と同様の条件で、供試菌株の孢子懸濁液をパンチ接種した。接種 8 日後の病斑を形成した葉身を含む病斑を切り取り、0.5ml の滅菌水を加えたガラス管 (高さ 10cm × 直径 1.5cm) に 1 枚ずつ入れ、26°C の恒温器に移し、24 時間保持後、孢子を形成させた。その後、0.01% に調整した Tween20 の溶液を 2.5ml 加え、上述の八重樫・小林<sup>(106)</sup>の方法に従い、超音波洗浄器にかけて孢子懸濁液を調製した。血球計算盤を用いて顕微鏡下で孢子数を測定し、病斑当たり孢子形成数を計算して求めた。1 菌株に当たり 5 ~ 7 病斑を供試し、3 反復で行い、菌株間の孢子数の平均値を算出し、Tukey の多重検定を行った ( $P < 0.05$ )。

## 2) 結果

KZB 菌株の接種葉の病斑長は接種後の日数や品種に関わらず、NAO-02 より小さかったものの、TH77-1 より大きく、一部で有意差も認められた (表 13)。「愛知旭」で形成された病斑長は、NAO-02 と TH77-1 で有意な差が認められたが、KZB では両母菌と有意な差が認められなかった。「関東 51 号」で形成された病斑長については、NAO-02 と KZB で有意な差が認められた。「フクニシキ」で形成さ

れた病斑長については、TH77-1 と KZB で有意な差が認められなかった。

また、準有性的組換菌の病斑当たり孢子形成数は、NAO-02 より少なく、TH77-1 より多かった (表 14)。しかし、NAO-02 と TH77-1 の孢子形成数に有意な差は認められたものの、KZB、KZC の両菌株は両母菌と有意な差が認められず、KZA のみで TH77-1 のものと有意差がみられた。

表 13 母菌と準有性的組換菌 (KZB) の罹病性病斑の病斑長 (mm)<sup>a</sup>

菌株	品種			
	愛知旭	関東51号	フクニシキ	アキユタカ
NAO-02	24.8 ± 7.9a <sup>b</sup> (4) <sup>c</sup>	22.4 ± 5.7a (10)	nd <sup>d</sup>	nd
TH77-1	13.6 ± 3.9b (6)	nd	11.7 ± 3.3a (4)	nd
KZB	18.8 ± 4.8ab (9)	12.5 ± 5.2b (12)	12.8 ± 5.7a (9)	16.8 ± 5.5 (7)

注) <sup>a</sup> 第 6 葉のイネ葉身にパンチ接種し、接種 21 日後に病斑長を調べた。

<sup>b</sup> 4-12 個の病斑について平均 ± 標準偏差を算出し、Tukey の多重検定を行った ( $P < 0.05$ )。

同一英文字を付した数値間には有意差がないことを示す。

<sup>c</sup> 括弧内の値は供試病斑数を示す。

<sup>d</sup> nd は非親和性の組み合わせで、罹病性病斑が生じなかったため未調査。

表 14 母菌と準有性的組換菌の病斑当たり孢子形成数

	菌株	孢子形成数 ( $\times 10^3$ 個) <sup>a</sup>
母菌	NAO-02	50.2 ± 39.1a <sup>b</sup>
	TH77-1	5.9 ± 8.3b
準有性的組換菌	KZA	43.3 ± 32.1a
	KZB	29.4 ± 29.6ab
	KZC	29.6 ± 55.2ab

注) <sup>a</sup> 品種「愛知旭」の第 6 葉の葉身にパンチ接種をし、接種 8 日後の病斑を採取し、26℃で 24 時間湿室条件下で孢子を形成させた。

<sup>b</sup> 菌株あたり 5 ~ 8 個の病斑について平均 ± 標準偏差を算出し、Tukey の多重検定を行った ( $P < 0.05$ )。同一英文字を付した数値間には有意差がないことを示す。

## 3. 圃場における発病

### 1) 材料および方法

#### a 単植圃場における発病

1997 年の試験は、新潟県上越市の北陸農業試験場 (現中央農業総合研究センター北陸研究センター) 内の水田で行った。準有性的組換菌 3 菌株中、孢子形成数の平均値の標準偏差が小さい KZB 株を圃場試験に供試し、用いたイネ品種は供試菌株 NAO-02 が侵害できる「関東 51 号」、TH77-1 が侵害できる「フクニシキ」および準有性的組換菌が侵害できる「アキユタカ」で、面積 4.35a の圃場の 1 区 (約 8 列 × 約 20 株、栽植距離 30 × 30cm、4 本植) に各品種

の稚苗を機械移植した。施肥は化成肥料を用いて基肥 (窒素成分 12kg/10a) と追肥 (窒素成分 6kg/10a) で行った。次いで、NAO-02、TH77-1 および KZB の孢子懸濁液を 4.5 葉期の「愛知旭」各 12 株に噴霧接種して発病させた苗を、6 月 5 日に「関東 51 号」区、「フクニシキ」区および「アキユタカ」区のそれぞれ中央に設置した。7 月 14 日に周囲のイネへの病勢進展を明らかにするため、発病株数と株当たり病斑数を調査した。反復は行わなかった。

1998 年の試験は、面積 5.8a の圃場に「愛知旭」を機械移植した。1 区を 8 列 × 20 株とし、3 区設けた。上述と同様の方法で調製したそれぞれの菌株に

よる罹病苗を、6月1日に区の中央に菌株ごとに植え込み、7月14日に周囲のイネへの病勢進展を明らかにするため、発病株数と株当たり病斑数を調べた。反復は行わなかった。

1999年は面積4.35aの圃場に「愛知旭」を機械移植した。1998年に準じて試験区を設置し、6月4日にそれぞれの菌株の罹病苗を区の中央に植え込んだ。7月13日に周囲のイネへの病勢進展を明らかにするため、発病株数と株当たり病斑数を調査した。反復は行わなかった。

### b 混植圃場における発病

1998年に、4.35aの圃場に「愛知旭」、「フクニシキ」、「関東51号」の3品種の重量を等しく混合した種子からなる苗を上述の栽植密度で機械移植し、混植圃場に3区を設けた。移植後、単植圃場における試験と同様に肥培管理を行った。6月1日に各区の中央に各菌株による罹病苗を植え込み、7月14日に同様の発病調査を行った。反復は行わなかった。

## 2) 結果

単植圃場における発病を調べた結果、1997年の試験における病勢は、NAO-02区でもっとも進展し、次いでKZB区、TH77-1区の順であった(図8)。すなわち、発病株率と株当たり病斑数がNAO-02区で最も多く、KZB区、TH77-1区の順に少なくなった(表15)。1998年「愛知旭」単植でも、病勢進展、発病株率、株当たり病斑数のいずれも1997年と同様であった(図9、表15)。1999年は少発生のため接種菌株間の発病の差が小さかったが(図10)、発病株率と株当たり病斑数は、NAO-02区、KZB区、TH77-1区の順であった(表15)。

混植圃場における発病を調べた結果、病勢進展は、単植圃場の結果と異なり、KZB区で最も拡大し、次いでNAO-02区、TH77-1区の順であった(図11)。発病株数と株当たり病斑数も同様の傾向を示した(表15)。

表15 母菌 (NAO-02 と TH77-1) 及び準有性的組換菌 (KZB) の株当たり病斑数 (個) と発病株率 (%)

菌株	単植試験 <sup>a</sup>			混植試験 <sup>b</sup>
	1997年	1998年	1999年	1998年
NAO-02	193.1 ± 93.9 (100) <sup>d</sup>	129.7 ± 130.9 (100)	3.2 ± 3.9 (100)	5.2 ± 9.6 (69.4)
TH77-1	1.2 ± 2.0 (41.9)	26.5 ± 9.0 (100)	1.1 ± 2.1 (38.8)	0.4 ± 1.5 (15.6)
KZB	19.4 ± 26.2 (96.3)	90.7 ± 33.0 (100)	1.2 ± 2.3 (41.9)	19.1 ± 23.2 (90.6)

注) <sup>a</sup>1997年は品種「関東51号」(NAO-02接種区)、「フクニシキ」(TH77-1接種区)、「アキユタカ」(KZB接種区)を栽培した。1998年と1999年は品種「愛知旭」を栽培した。

<sup>b</sup>品種「愛知旭」、「関東51号」と「フクニシキ」の種籾を等量混合した。

<sup>d</sup>表中の数値は、株当たり病斑数の平均値(個) ± 標準偏差を表す。括弧内の数値は発病株率を示す。

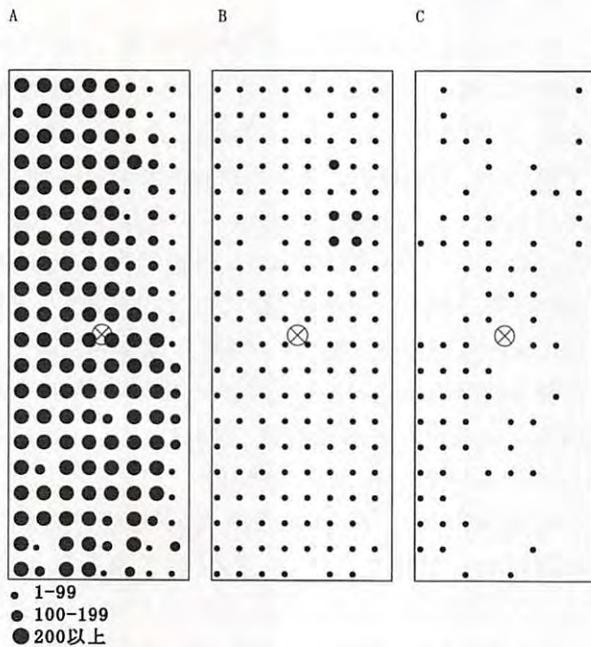


図8 試験区中央に植え込んだ罹病苗からの葉いもちの病勢進展 (1997年)

注) 作付け品種と接種菌株  
 A: 「関東51号」, NAO-02(母菌).  
 B: 「アキユタカ」, KZB(準有性的組換菌).  
 C: 「フクニシキ」, TH77-1(母菌).  
 凡例は1株当たり葉いもち病斑数を示す.  
 ⊗: 感染源となる罹病苗を設置した位置.

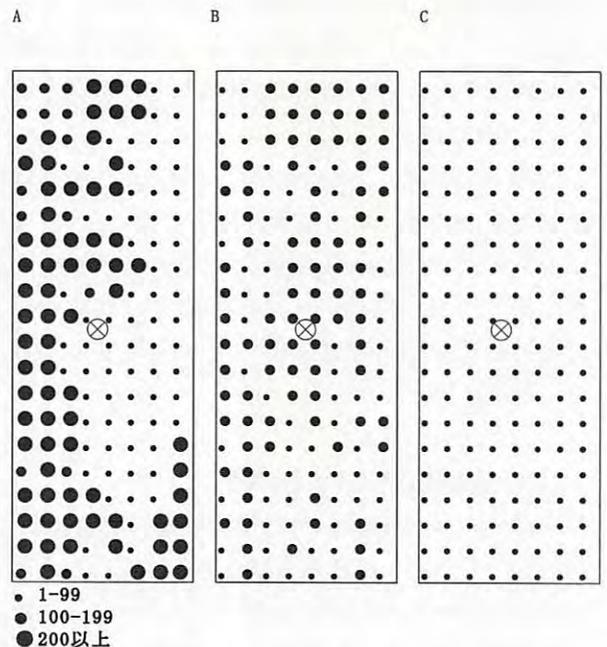


図9 試験区中央に植え込んだ罹病苗からの葉いもちの病勢進展 (1998年)

注) 作付け品種「愛知旭」接種菌株  
 A: NAO-02(母菌).  
 B: KZB(準有性的組換菌).  
 C: TH77-1(母菌).  
 凡例は1株当たり葉いもち病斑数を示す.  
 ⊗: 感染源となる罹病苗を設置した位置.

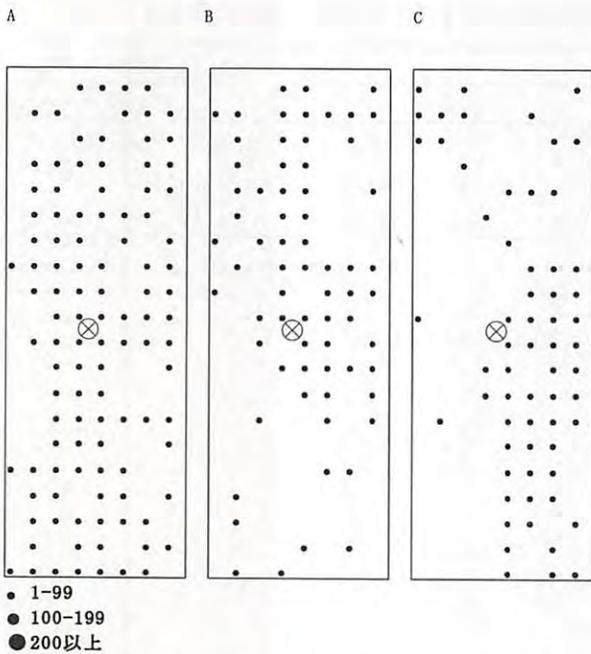


図10 試験区中央に植え込んだ罹病苗からの葉いもちの病勢進展 (1999年)

注) 作付け品種「愛知旭」接種菌株  
 A: NAO-02(母菌).  
 B: KZB(準有性的組換菌).  
 C: TH77-1(母菌).  
 凡例は1株当たり葉いもち病斑数を示す.  
 ⊗: 感染源となる罹病苗を設置した位置.

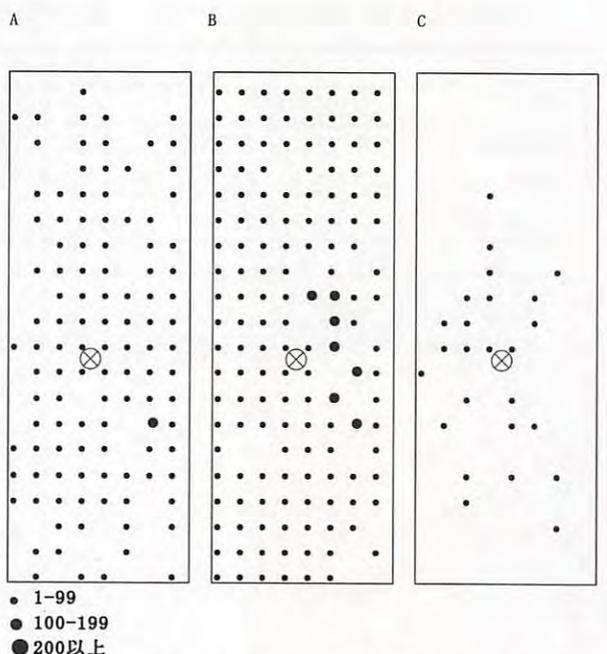


図11 試験区中央に植え込んだ罹病苗からの葉いもちの病勢進展 (1998年)

注) 作付け品種「愛知旭」, 「関東51号」と「フクニシキ」の種籾を等量(重量)混合 接種菌株  
 A: NAO-02(母菌).  
 B: KZB(準有性的組換菌).  
 C: TH77-1(母菌).  
 凡例は1株当たり葉いもち病斑数を示す.  
 ⊗: 感染源となる罹病苗を設置した位置.

#### 4. 考察

野外の植物体上で準有性的組換菌を分離する場合には、外部からの混入菌や母菌の突然変異菌を分離する恐れがある。しかし、本研究が行われた1997～1999年の新潟県では、いもち病菌の優占レースは001.0であった<sup>(27)</sup>。また、これまでにレース177.1は確認されていない。レース177.1に関しては本試験で母菌に用いたTH77-1(レース047.0)から突然変異により変わるためにはいもち病抵抗性遺伝子 *Pik*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pita* に対して、もう一方の母菌NAO-02(レース133.1)から変わるためには、少なくともいもち病抵抗性遺伝子 *Pii* と *Piz* に対して病原性を獲得しなくてはならない。また、RAPD解析により、分離したレース177.1については両母菌のバンドパターンを共有することから、この分離菌は、外部からの混入菌や母菌の突然変異菌ではないと判断される。

準有性的組換菌の病原性は、イネ品種「愛知旭」の葉身上での継代接種によっても変異せず、安定していることが明らかになった。イネいもち病菌の病原性の安定性については、1病斑より単孢子分離した菌株が8レースに分かれたという報告<sup>(71)</sup>がある一方、10～20年間保存した菌株がほとんどレース変異を起こしていなかったという報告<sup>(39)</sup>もある。このように、イネいもち病菌の病原性は安定しているものと不安定なものがあることがうかがえる<sup>(70)</sup>。これを裏付けるように、イネいもち病菌の非病原性遺伝子には、変異が多く見られるものとそれほど見られないものがあることが知られている。すなわち、*AVR-Pik*<sup>(41)</sup>、*AVR-Pita* および *AVR-TSUY* 等は病原性変異菌が頻繁に突然変異により分離されることから、変異しやすい遺伝子と報告されているが<sup>(46)</sup>、その一方で *AVR1-CO39*、*ACE 1*<sup>(3)</sup> と *AVR1-MARA*<sup>(42)</sup> は変異がそれほど見られないとされている。このことから、病原性の変異には、染色体上の非病原性遺伝子の座位や非病原性遺伝子産物の菌の生存に対する重要度等が影響している可能性が考えられる。

生井・山中<sup>(58)</sup>は、準有性的組換により生じたと推定される病原性の幅の広い菌株(レース337)を品種「愛知旭」に9回継代接種を行った試験で、*Pii*, *Pik*, *Pik-m*, *Pita* と *Pita-2* に対する病原性を失うことを見だしている。本研究では、両母菌の病原性を併せ持つレースしか感染できない「アキユタ

カ」だけではなく、両母菌が感染できる「愛知旭」を継代接種に用いて検討した。*Pik* と *Piz* を持たない「愛知旭」上で同様に継代接種した後に再分離された準有性的組換菌は、*Pik*, *Piz* に対する病原性を失うのではないかと考えたが、予想に反してレースの変化はみられなかった。このことから、準有性的組換菌でもレースの安定した菌株が生じることが示唆された。

突然変異により出現した病原性変異菌の病原力は突然変異する前の元菌と同等か劣るという報告がある<sup>(17)</sup>。しかし、本研究で発生した準有性的組換による病原性変異菌は病斑長や1病斑当たりの孢子形成数が両母菌の中間型で、一方の母菌に比べると優った。このように、母菌と比較して侵害できる品種が多く、しかも病斑長や孢子形成数等の病原力が同等あるいは片方の母菌より優っている菌が得られたことは、準有性的組換によっても、圃場に優占しているレースと同等または相対的に優る病原力を有するレースが出現する可能性を示唆している。

突然変異により出現したと考えられる変異菌の病原力は発生当初は母菌より劣るが、増殖を繰り返すにつれ、次第に増大する可能性が品種「やまてにしき」に出現した変異菌で報告されている<sup>(18)</sup>。生井ら<sup>(53)</sup>は、病原性の幅広い菌株(レース337)の継代接種を行い、継代接種後の菌株と母菌の病原力(葉身上の罹病型病斑形成率、病斑一定面積当たりの分生子形成数すなわち孢子形成能)を評価した。その結果、継代接種後の再分離菌株の病原力は、母菌よりも優ったとしている。これらのことより、発生当初は母菌と同等あるいは母菌の中間の病原力をもつ準有性的組換菌が世代を重ね、病原力を増大させることで、圃場に優占する可能性も考えられる。

そこで、本試験で発生した準有性的組換菌の単植圃場における発病試験を行った結果、病勢進展や株当たり病斑数と発病株率だけでなく、病斑長や孢子形成数についても両母菌の中間であった。しかし、混植圃場においては、用いた3菌株の中で最も病勢進展が著しく、株当たり病斑数も多く発病株率が高かったのは準有性的組換菌であった。準有性的組換菌の発病が混植圃場において最も大きかった要因としては、混植に用いた「愛知旭」、「関東51号」および「フクニシキ」のすべてを侵害できるのは準有性的組換菌KZBのみで、母菌はそれら3品種の

うち2品種しか侵害できない、すなわちKZBの病原性の幅が母菌より広く、レースが安定していること、病原力(病斑長や胞子形成数)が母菌の間であることなどが考えられる。このことは、準有性的組換により出現した病原性変異菌が、マルチラインにおいてはスーパーレースとなる可能性があることを示唆するものである。

しかし、混植区における発病は両母菌、準有性的組換菌いずれの接種においても、単植区における発病と比較すると発病株率は低く、株あたり病斑数も少なかった。母菌においては、混植に用いられている3品種の中で1品種に対しては非病原性であり、そのため、混植区において発病株率および株当たり病斑数が少なくなったと考えられる。単植区と混植区では試験に用いた圃場が異なり、圃場の位置や栽

培歴等により、いもち病の発病に差が出る事も考えられる。また、本研究では、同質遺伝子系統ではなく、異なる品種を混合栽培したため、試験に用いた準有性的組換菌の「関東51号」および「フクニシキ」に対する病原力の差が圃場試験に現れている可能性も考えられる。しかしながら、混植区では単植区に比較して1/3の「愛知旭」が混植されているにもかかわらず、混植区の発病は1/3以下であった。このことは、異なる抵抗性遺伝子系統の混植による発病抑制効果が示された<sup>(51, 52, 83)</sup>。混植区は準有性的組換菌KZB株の発病においても顕著に抑えていたこと等から、混植区における試験結果は1998年のみの試験ではあるが、マルチラインにおけるスーパーレース抑制技術の一助になる可能性が考えられた。

## VI 総合考察

準有性的組換は、有性世代が発見されていないかあるいは形成が困難な菌において、遺伝的組換を起こし新しい系統を生じるための重要な手段の1つと考えられている。準有性的組換は、子のう菌類とそのアナモルフの*Penicillium*属菌、*Fusarium*属菌、*Verticillium*属菌、*Aspergillus*属菌、*Cochliobolus*属菌、*Cephalosporium*属菌等の不完全菌類<sup>(2, 5, 6, 24, 28, 75, 77, 78, 93, 94)</sup>で知られている。本研究により、イネいもち病菌においても準有性的組換により有性生殖と同様に品種に対する病原性や交配型などの遺伝形質の組換型を生じ、新たな系統を出現させることが明らかになった。

これまで実験室内では、イネいもち病菌の準有性的組換によると推定される菌株の出現が多く報告されている<sup>(9, 12, 15, 19, 53, 57, 102)</sup>。また、自然界でも、準有性的組換による菌株が生じている傍証がいくつか報告されている。すなわち、Zeigler *et al.*<sup>(117)</sup>は、ヒマラヤの一地域のイネより分離した菌株を用い、DNAフィンガープリンティングとRFLP解析により圃場で準有性的組換が生じた可能性を示唆している。さらに、Chen *et al.*<sup>(7)</sup>は中国の13省からイネいもち病菌を採取し、*rep*-PCR<sup>(20)</sup>を用いたDNAフィンガープリンティングを行い、多様なパターンの菌株が得られたことから、中国では有性生殖と準有性的組換が行われている可能性を示唆している。この

様に、実験室内と自然界の両方において準有性的組換が起こる可能性は報告されている。しかし、この直接的証明はこれまで充分行われてこなかった。

そこで、本研究では、いもち病菌の準有性的組換を直接証明する目的で、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子を導入したイネいもち病菌2菌株を用いて、試験を行った結果、単胞子由来の菌株において2種類の薬剤耐性遺伝子の共存を確認し、準有性により遺伝的組換が行われていることを明らかにした。

そして、自然界においても、イネいもち病菌は準有性的組換によっても新しい菌系を出現させ、様々な環境に適応している可能性を示した。しかし、これまでに植物体上では、準有性的組換菌を分離した報告はなく、今後、植物体上で、両菌を接触させて準有性的組換菌の分離を試みる必要がある。

本研究は、いもち病菌の新レースの発生やレース構成の変化のメカニズムを明らかにし、本病の防除を考える上でその意義は大きい。なぜなら、イネいもち病菌の有性生殖は、交配型の異なる菌株間においてのみ交配が成立するが、準有性的組換は交配型による制約は無い<sup>(12)</sup>ため、イネいもち病菌の交配型が一方に偏った地域では、準有性的組換が様々な環境に適応した新しい菌株を出現させる重要な手段となると考えられるからである。日本産のいもち病菌の菌株には交配型の偏りはみられないとされるにも

かわらず、日本産菌株同士の有性世代の形成はこれまでに報告がないことから、我が国においては、準有性的組換がイネいもち病菌の新レース生成に重要な役割を果たす可能性がある。

イネいもち病の多発圃場では、1枚の葉身に多数の病斑が形成され、病斑同士が融合している状態もしばしば見られることや、同一病斑から異なる遺伝子型の菌株が分離されることも報告されている<sup>(55)</sup>ことから、イネいもち病菌が野外において準有性的組換を行う機会はあると考えられる。特にマルチラインにおいては、複数の異なるいもち病抵抗性遺伝子系統が混植されるため、それらの系統が感染する異なるレースが圃場内に存在する可能性も否定できない。また、準有性的組換によって新レースが出現する機会も多くなることも考えられる。

本研究で得られた準有性的組換菌について菌糸の核の状態は確認できなかったが、分生子はDAPI染色による観察により単核であることが、またフローサイトメトリーにより菌糸は単相であることが証明された。いもち病菌の分生子の形成過程における核の動向は、まず、分生子柄の先端細胞に含まれる核が2分裂し、その1つが形成段階の分生子に移動し1細胞1核の状態となり、その後、その核が分裂して2核となってその間に隔壁が形成されることで、個々に1核を持つ3細胞となるとされている<sup>(11)</sup>。このように分生子の核は分生子柄の先端細胞の1核起源で、すべての核が同一性をもつ。

最近20年の間に、イネいもち病菌の遺伝子解析は飛躍的な進歩を遂げ、2005年には、ゲノムDNAの全塩基配列が公表され<sup>(13)</sup>、同様に様々な非病原性遺伝子が同定された。Yasuda *et al.*<sup>(113, 114)</sup>はイネいもち病菌の非病原性遺伝子の解析を行い、品種「八反3号」とイネ系統「K59-1」に対する非病原性遺伝子を同定した。これまでの準有性的組換菌と推定される菌株の病原性についての報告は、レースを決定するだけであった<sup>(57, 58)</sup>が、本研究では準有性的組換菌の品種「八反3号」とイネ系統「K59-1」に対する病原性の遺伝解析の結果、準有性的組換による病原性の遺伝様式が有性生殖と同様であることが明らかとなった。また、本研究では準有性的組換菌の交配型および核型の遺伝解析を行い、準有性的組換菌の交配型および核型の遺伝様式は、有性生殖と同様であることを示した。これらの二つの事実から、

準有性的組換菌の遺伝形質は有性生殖と同様に遺伝する可能性が示唆された。

Y90-71BIと3514-R-2BSの準有性的組換菌は、菌糸および分生子の細胞がいずれも単核・単相であると考えられ、病原性、交配型および核型とその遺伝様式、核型は有性生殖と同様であった。唯一有性生殖と異なる点は、混合培養中に子のう殻等の有性生殖器官の形成が見られなかった点であった。イネいもち病菌の準有性的組換過程で作られていると考えられる複相核の分生子がこれまでに分離されていないこと、様々な核型を示す準有性的組換菌が分離されなかったことや遺伝形質の分離が有性生殖と同様であったこと等を考えると複相核の単相化過程では、有性生殖で見られる減数分裂に類似した過程が起きている可能性が考えられる。このことを明らかにするため、今後、複相核の単相化過程における染色体の挙動を解析することが必要である。

ところで、いもち病菌では、いもち病抵抗性品種の開発・普及後に短期間で抵抗性品種を侵害できる新しいレースがしばしば出現している。新しく出現したレースが圃場に定着するためには、既存のレースに対して相対的に優るか、あるいは同等の病原力が必要であると考えられる<sup>(30, 53)</sup>。本研究においては、準有性的組換菌の継代接種により病原性の安定性を調査し、病原力(病斑長と病斑当たり胞子形成数)およびイネ品種の単植・混植圃場における発病の状況を母菌のそれと比較した。その結果、準有性的組換菌の病原性はイネ葉身上でかなりの世代にわたり安定で、母菌と同等あるいは一方の母菌より病原力が優り、実際の圃場における発病も母菌と同様あるいは一方の母菌より優ることが明らかとなった。本研究では混植にいもち病抵抗性の異なるイネ品種を用い、マルチラインを用いていない。しかし、異なるいもち病抵抗性遺伝子を持つイネが圃場に混植されていることはマルチラインと同じである。本研究結果は、マルチラインにおいては、準有性的組換菌が圃場で強い病原力を発揮し、マルチラインを崩壊させる可能性があることを示唆している。

いもち病防除のためにはマルチラインにおいて、準有性的組換による新レースの出現頻度の推定が重要であるが、準有性的組換菌の出現頻度は、実験室においてさえも明らかにされていない。その理由の一つとして、準有性的組換菌を簡易に選別できる技

術が開発されていないことが挙げられる。分子生物学的手法や細胞学的手法等により、今後準有性的組換菌の出現頻度を明らかにしていく必要がある。

Watson<sup>(98)</sup>は広い寄主範囲を持つコムギ黒さび病菌が、狭い寄主範囲を持つ菌と罹病性品種上に混在した場合、生存が不適になると述べている。また、van der Plank<sup>(97)</sup>は、単純な遺伝子型の品種上では病原性の複雑なレースよりも単純なレースが生存に適していると述べ、この効果を安定化選択 (Stabilizing selection) と呼んだ。複数の抵抗性遺伝子を侵害できるレースは、それらの抵抗性遺伝子に対応する非病原性遺伝子を失ったか、あるいはその機能を欠損したことにより適応度の負担 (Fitness cost) がかかり、マルチラインや品種の混合栽培において増殖できないとも言われている。しかしながら、いもち病菌の中には、これらの説を全面的に肯定できない事例が報告され<sup>(30)</sup>、本研究の結果も上述の説を否定する結果となった。すなわち、イネいもち病菌は、準有性的組換により、品種に対する病原性の幅を拡げるだけでなく、一方の母菌よりも強いかあるいは同等の病原力を得られる場合があることを示した。これらの違いが、岩野・山田<sup>(30)</sup>が述べているように、菌株の違い (菌株の遺伝的背景の違い) に起因するのか、あるいは、非病原性遺伝子の違いによるものかは明らかではないが、今後、個々の非病原性遺伝子の単離および機能解析により適応度の負担に関する情報が集積し、解明されることが期待される。

イネいもち病菌においては、形態的特性、品種に対する病原性、生理・生化学的特性や薬剤耐性などの変異に関する報告があり、それらの要因として突然変異や準有性的組換が考えられる。突然変異による病原性変異 (レース変異) の方向性については、生井ら<sup>(54, 56)</sup>がイネいもち病菌が通過するイネの穂のイネいもち病抵抗性遺伝子の種類との関係を調査している。その中で、新レース発生のメカニズムとして、イネ品種が元来持ついもち病抵抗性遺伝子の種類に影響されるのではなく、その穂を通過する際にランダムに起こる菌の変異の結果、その品種の持

ついもち病抵抗性遺伝子を侵害できるレースが発生すると報告している。本研究の結果より、イネ品種のいもち病抵抗性遺伝子に対する準有性的組換菌の病原性は、有性生殖と同様の遺伝様式をとると考えられることから、準有性的組換により出現する新レースの病原性は母菌が持つ非病原性遺伝子の組合せにより決定され、ランダムではなく、方向性があると考えられる。その方向性を予め把握できる手法を見出すことで、本病のより効果的な防除手法の開発につながることを期待される。

2005年に新潟県全域でコシヒカリがマルチラインのコシヒカリ BL に一斉に切り替えられて以来、農薬の出荷量が格段に減少した<sup>(60)</sup>。消費者の食の安全性志向と生産現場の環境負荷軽減の観点から、今後さらに減農薬栽培が推奨され、様々な品種においてもマルチラインが育成され、実用化されていくことが期待される。本研究により、イネいもち病菌は準有性により、遺伝的組換を起こし、母菌の病原性を併せ持つ、病原性の安定した準有性的組換菌が出現させることが明らかになった。病原力 (病斑長、胞子形成数および圃場における病勢進展) も母菌と同等もしくはそれ以上の菌株も得られることから、準有性的組換菌はスーパーレースとなり、混植に用いている全ての系統を侵害し、マルチラインの発病抑制効果を減退させる可能性がある。

宮城県のササニシキ BL (ササニシキのマルチライン) では、1995年の導入当初は真性抵抗性遺伝子 *Pik*, *Pik-m*, *Piz* をそれぞれ有する同質遺伝子系統を混植に用いていたが、その後この3系統に病原性を示すレースが認められた。そこで、病原性レースの分布拡大を抑制するため、1997年にさらに *Piz-t* を有する系統を追加し、4系統を混植している。マルチラインを持続的に利用していくためには、このように圃場に分布するレースの変動と病原性変異菌の出現を把握するためのレースのモニタリング、レースの変動に応じて混植に用いる系統の入れ替えあるいは混植系統の構成割合の変更が重要と考えられる。

## Ⅶ 摘 要

いもち病はイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) により引き起こされるイネの重要病害である。本病の防除法として、マルチライン (いもち病抵抗性同質遺伝子系統の混植) が実用化されている。しかし、イネいもち病菌の病原性変異により、混植に用いているすべての系統を侵害することのできる病原性変異菌 (スーパーレース) が出現し、発病抑制効果が減退する可能性が考えられる。そこで本研究では、イネいもち病菌の無性世代における準有性による遺伝的組換を証明するとともに、準有性的組換菌の病原性、交配型および核型の遺伝様式、核数、核相、レースの安定性と病原力 (病斑長、孢子形成数、圃場における発病) の解析を行い、準有性的組換による新レース生成機構の解明と準有性的組換菌のマルチラインにおける発病の可能性の検証を試みた。

遺伝的組換の証明のため、イネいもち病菌株 Y90-71 にピアラフォス耐性遺伝子を、同 3514-R-2 にプラストサイジン S 耐性遺伝子をそれぞれ導入し、異なる薬剤耐性菌 (Y90-71BI, 3514-R-2BS) を作出した。それら 2 菌株を混合培養後、2 薬剤を添加した培地上で生育させ、2 剤耐性菌を選抜した。2 剤耐性菌が、準有性的組換により生じたことを示すために、導入した薬剤耐性遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を行った結果、2 剤耐性菌は遺伝子導入した異なる 2 種類の薬剤耐性遺伝子を有することを明らかにした。このことから、イネいもち病菌において、準有性的組換により遺伝的組換が起こることを実験室内で証明した。

核学的知見を得るために、準有性的組換菌の分生子を、DAPI 染色した結果、単核であった。また、フローサイトメトリーにより、菌糸の核相を調べた結果、単相であった。これらから、本研究で取得した準有性的組換菌は、母菌と同様に単核で単相であると考えられた。

準有性的組換による病原性の遺伝様式を明らかにするために、準有性的組換菌 49 菌株と有性生殖による交配後代 70 菌株について、イネ系統「K59-1」および品種「八反 3 号」に対する非病原性菌株と病原性菌株の分離比を調べ、比較した。その結果、準

有性的組換菌と交配後代の病原性の分離比は同様の値を示した。また、準有性的組換菌の交配型 (MAT1-1 と MAT1-2) の分離比を調べた結果、有性生殖による交配後代における分離比と同様であった。パルスフィールドゲル電気泳動法を用いて両母菌、有性生殖による交配後代および準有性的組換菌の核型を解析した結果、準有性的組換菌も交配後代も母菌のいずれかと同様の核型を示し、準有性的組換菌の核型の分離と交配後代の核型の分離比も同様であった。これらのことから、準有性的組換による病原性、交配型の遺伝様式および核型は有性生殖による交配と類似すると考えられた。

準有性的組換菌の病原性と病原力を明らかにするために、菌株 NAO-02 (レース 133.1) と TH77-1 (047.0) を混合培養し、両母菌の病原性を併せ持つ準有性的組換候補菌株 (177.1) を選抜した。RAPD 解析によりこれらの菌株が準有性的組換菌であることを確認し、品種「アキユタカ」および品種「愛知旭」に 7 回繰り返して接種を行い再分離された菌株のレースを調べた結果、レースに変化がなかった。このことから、本研究で用いた準有性的組換菌のレースは継代しても安定していることを明らかにした。準有性的組換菌の病斑長と孢子形成数および「愛知旭」の単植圃場での病勢進展および株当たりの病斑数と発病株率は母菌の中間の値を示した。混植圃場 (「愛知旭」、「関東 51 号」、「フクニシキ」を等量種糶混合) における準有性的組換菌は、病勢進展、株当たり病斑数および発病株率においては両母菌より優れていた。このため、準有性的組換菌は、一方の母菌より優るか、あるいは同等の病原力を有し、マルチラインにおいても被害をもたらす可能性が示唆された。

以上から、イネいもち病菌は準有性による遺伝的組換を行い、単核単相の準有性的組換菌を出現させることが明らかになった。また、準有性的組換による病原性、交配型の遺伝様式および核型は有性生殖と類似することを示した。そして、母菌の病原性と病原力を併せ持つ準有性的組換菌がマルチラインで大きな被害をもたらす可能性を示唆した。

## 引用文献

1. Abbott, D.C., J.J.Burdon, A.H.D.Brown, B.J.Read and D.Bittisnich(2000) The incidence of barley scald in cultivar mixtures. *Aust. J. Agric. Res.*,51, 355-360
2. Barron,G.L.(1962) The parasexual cycle and linkage relationship in the storage rot fungus *Penicillium expansum*.*Can. J. Bot.*,40, 1903-1913
3. Böhnert,H.U., I.Fudal, W.Dioh, D.Tharreau, J.-L. Notteghem and M.-H.Lebun(2004) A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *The Plant Cell*, 16, 2499-2513
4. Browning,J.A. and K.J.Frey(1969) Multiline cultivars as a means of disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 7, 355-382
5. Buxton,E.W.(1956) Heterocaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *J.Gen. Microbiol.*, 15, 133-139
6. Buxton,E.W.(1962) Parasexual recombination in the banana-wilt *Fusarium*. *Tran. Brit. Mycol. Soc.*, 45, 274-279
7. Chen,Q.H., Y.C.Wang and X.B.Zheng(2006) Genetic diversity of *Magnaporthe grisea* in China as revealed by DNA fingerprints haplotypes. *J. Phytopathol.*,154, 361-369
8. Chin,K.M. and M.S.Wolfe(1984) The spread of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in mixtures of barley varieties. *Plant Pathology*, 33, 89-100
9. Correll,J.C., T.L. Harp,J.C.Guerber, R.S. Zeigler, B.Liu, R.D.Cartwright and F.N.Lee(2000) Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology*, 90, 1396-1404
10. Couch,B.C. and L.M.Kohn(2002) A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94, 683-693
11. Cowger,C. and C.C.Mundt(2002) Effects of wheat cultivar mixtures on epidemic progression of *Septoria tritici* blotch and pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*.*Phytopathology*, 92, 617-623
12. Crawford,M.S., F.G.Chumley, C.G.Weaver and B.Valent(1986)Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. *Genetics*, 114, 1111-1129
13. Dean, R. A., N. J. Talbot, D. J. Ebbole, M.L.Farman,T.K.Mitchell,M.J.Orbach, M.Thon, R.Kulkarni, J.-R.Xu, H.Pan, N.D. Read, Y.-H. Lee, I. Carbone, D. Brown, Y.Y.Oh, N.Donofrio, J.S.Jeong, D.M.Soanes, S.Djonovic, E. Kolomiets, C.Rehmeyer, W.Li, M.Harding, S. Kim, M.-H. Lebrun,H. Bohnert,S.Coughlan, J.Butler, S.Calvo, L.-J.Ma, R.Nicol, S.Purcell, C.Nusbaum, J.E.Galagan and B.W.Birren(2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434, 980-986
14. FAO, FAOSTAT (<http://www.faostat.fao.org/>) .
15. Fatemi,J. and R.R.Nelson(1978) Inter-isolate heterokaryosis in *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 68, 1791-1794
16. Flor,H.H.(1956) The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.*, 8, 29-54
17. Fujimaki,H., S.Kiyosawa and M.Yokoo(1975) A gene action for avirulence partially affected by mutation in rice blast fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 41, 176-184
18. 藤田佳克・鈴木穂積 (1982) イネいもち病菌レース 007 の発生後の年次経過と病原力の増大. *日植病報*, 48, 290-294
19. Genovesi,A.D.and C.W.Magill(1976) Heterokaryosis and parasexuality in *Pyricularia oryzae* Cavara. *Can. J. Microbiol.*, 22, 531-536
20. George,M.L.C., R.J.Nelson, R.J.Zeigler and H.Leung(1998) Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using *rep*-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, 88, 223-229

21. Greer, C.A.P. and R.K. Webster (2001) Occurrence, distribution, epidemiology, cultivar reaction, and management of rice blast disease in California. *Plant Dis.*, 85, 1096-1102
22. Hashioka, Y., H. Ikegami, O. Horino and T. Kamei (1966) Fine structure of the rice blast. VI. Electronmicrographs of *Pyricularia oryzae* and the epidermal cell wall of rice plants. *Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.*, 22, 66-77
23. Hashioka, Y., H. Ikegami and N. Kitano (1970) Fine structure of the rice blast. Subcellular structure of conidia, germ tubes and appresoria of *Pyricularia*. *Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.*, 29, 21-32
24. Hastie, A.C. (1962) Genetic recombination in the hop-wilt fungus *Verticillium albo-atrum*. *J. Gen. Microbiol.*, 27, 373-382
25. Hebert, T.T. (1971) The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*, 61, 83-87
26. 堀野修・赤井重恭 (1965) イネいもち病菌およびごま葉枯病菌分生胞子の電子顕微鏡像の比較. *日菌報*, 6, 41-46
27. 石川浩司・小瀧慶司・堀武志・原澤良栄・佐々木行雄 (2005) 新潟県において 1998 ~ 2002 年に分布したイネいもち病菌のレース. *北陸病害虫研究会報*, 54, 1-6
28. Ishitani, C., Y. Ikeda and K. Sakaguchi (1956) Hereditary variation and genetic recombination in Koji-molds (*Aspergillus oryzae* and *A. soyae*) VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *J. Gen. Microbiol. (Japan)*, 2, 401-430
29. 伊藤誠哉 (1935) 稲熱病並びに稲熱病文献抄録集. 養賢堂, 東京., 253p.
30. 岩野正敬・山田昌雄 (1973) イネいもち病菌のレース分布とその変動要因に関する研究. *北陸農業試験場報告*, 25, 1-64
31. Kato, H., T. Yamaguchi and N. Nishihara (1976) The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. in culture. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 42, 507-510
32. Kinscherf, T. and S. Leong (1988) Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. *Chromosoma*, 96, 427-433
33. Kimura, M., K. Izawa, K. Yoneyama, T. Arie, T. Kamakura and I. Yamaguchi (1995) A novel transformation system for *Pyricularia oryzae*: adhesion of regenerating fungal protoplasts to collagen-coated dishes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1177-1180
34. Kimura, M., T. Kamakura, Z. Q. Tao, I. Kaneko and I. Yamaguchi (1994) Cloning of the blastocidin S deaminase gene (*BSD*) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol. Gen. Genet.*, 242, 121-129
35. Kistler, H.C. and V.P.W. Miao (1992) New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30, 131-152
36. 清沢茂久 (1969) 特異的病害抵抗性の遺伝学的諸性質. *植物防疫*, 23, 465-471
37. Kiyosawa, S. (1984) Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast. *Rice Genet. Newslett.*, 1, 95-97
38. 小泉信三・谷俊男 (1996) イネいもち病の発病抑制効果におけるササニシキ多系品種とほ場抵抗性強品種及び薬剤散布の比較. *愛知県農業総合試験場研究報告*, 28, 53-68
39. Latterell, F.M. and A.E. Rossi (1986) Longevity and pathogenic stability of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 76, 231-235
40. Lhoas, P. (1967) Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genet. Res. (Camb)*, 10, 45-61
41. Luo, C.X., L.F. Yin, S. Koyanagi, M.L. Farman, M. Kusaba and H. Yaegashi (2005) Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. *Phytopathology*, 95, 640-647
42. Mandel, M.A., V.W. Crouch, U.P. Gunawardena, T.M. Harper and M.J. Orbach (1997) Physical mapping of the *Magnaporthe grisea* *AVR1-MARA* locus reveals the virulent allele contains two deletions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 10, 1102-1105
43. 松本和夫 (1982) 永禄以来当院記録年間, いもち病の発生と被害を伝える最初の記録. 農

- 葉グラフ, 84,10-13
44. Miura,H., M.Katagiri, T.Yamaguchi, Y.Uesugi and H.Ito(1976)Mode of occurrence of Kasugamycin-resistant rice blast fungus. 日植病報, 42, 117-123
45. 水沢芳名 (1959) いもち病菌分生子の超薄切片による電子顕微鏡像. 植物防疫, 13, 17-18
46. Mundt,C.C.(2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. Annu. Rev. Phytopathol., 40,381-410
47. Mundt,C.C. and J.A.Browning(1985) Development of crown rust epidemics in genetically diverse oat populations: effect of genotype unit area. Phytopathology, 75, 607-610
48. Mundt,C.C. and K.J.Leonard(1986). Analysis of factors affecting disease increase and spread in mixtures of immune and susceptible plants in computer-simulated epidemics. Phytopathology, 76, 832-840
49. Mundt,C.C., L.S.Brophy and M.S.Schmitt(1995) Choosing crop cultivars and cultivar mixtures under low versus high disease pressure: A case study with wheat. Crop Protection, 14, 509-515
50. 内藤秀樹・平野哲司 (1988) いもち病菌レース間の無性的交雑による新レースの生成. 日植病報, 54, 343
51. Nakajima,T., R.Sonoda and H.Yaegashi(1996a) Effect of a multiline of rice cultivar Sasanishiki and its isogenic lines on suppressing rice blast disease. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.,62,227-233
52. Nakajima,T., R.Sonoda, H.Yaegashi and H.Saito(1996b)Factors related to suppression of leaf blast disease with a multiline of rice cultivar Sasanishiki and its isogenic lines. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.,62, 360-364
53. 生井恒雄・江原淑夫・富樫二郎 (1990) 異なるイネいもち病抵抗性遺伝子を持つイネ品種を継代通過したいもち病菌 *Pyricularia oryzae* レース 337 の病原力の変動. 日植病報, 56, 1-9
54. 生井恒雄・福島朗山・石橋優子・大場淳司・富樫二郎 (1997) イネ新品種はえぬきおよびどまんなかの穂を通過した非親和性いもち病菌レースの病原性変異. 日植病報, 63,37-43
55. 生井恒雄・上林千裕・芦澤武人 (2006) いもち病罹病イネ株内におけるいもち病菌の *Pot2* 遺伝子型およびレースの垂直分布. 日植病報, 72, 101-108
56. 生井恒雄・大場淳司・菅原秀治・富樫二郎 (1999) 抵抗性イネ品種の穂から再分離したいもち病菌の病原性変異に及ぼす通過イネの真性抵抗性遺伝子の影響. 日植病報, 65,67-75
57. 生井恒雄・山中達 (1982) イネいもち病菌の病原性変異に関する研究 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作成. 日植病報, 48, 466-470
58. 生井恒雄・山中達 (1985) イネいもち病菌の病原性変異に関する研究 II. 幅広い病原性スペクトラムを持つ 1 変異株のイネ葉身上における継代接種に伴う変異株の出現と優勢レースの変動. 日植病報, 51, 206-211
59. 日本植物防疫協会 (1996) 農薬要覧 1996. 日本植物防疫協会, 683p
60. 日本植物防疫協会 (2006) 農薬要覧 2006. 日本植物防疫協会, 3p
61. 農林水産省大臣官房統計部 (2003) 農林水産統計. 平成 15 年産水陸稲の収穫量., 1-8p
62. 農林水産省大臣官房統計部 (2005) 農林水産統計. 平成 17 年産水陸稲の収穫量., 1-8p
63. 農林水産省技術会議事務局・愛知県農業総合試験場 (1995) いもち病抵抗性と菌の変異に関する研究. 指定試験 (病害虫) 第 24 号, 31-37p
64. Noguchi,M.T., N.Yasuda and Y.Fujita(2006) Evidence of genetic exchange by parasexual recombination and genetic analysis of pathogenicity and mating type of parasexual recombinants in rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Phytopathology,96, 746-750
65. Noguchi,M.T., N.Yasuda and Y.Fujita(2007a) Fitness characters in parasexual recombinants of the rice blast fungus,*Pyricularia oryzae*. Japan Agricultural Research Quarterly, 41, 123-131
66. Noguchi,M.T., N.Yasuda and Y.Fujita(2007b)

- Parasexual cycle provides genetic segregants equivalent to sexual progeny in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Japan Agricultural Research Quarterly, 41,207-210
67. 大畑貫一他編(1995) 作物病原菌研究技法の基礎, 日本植物防疫協会, 342p
68. 大森秀雄(1980) 空中散布, 特に微量散布試験をふりかえって. 農薬春秋, 40, 17-21
69. Orbach, M.J., L.Farrall, J.A.Sweigard, F.G.Chumley and B.Valent(1996) Electrophoretic karyotypes of *Magnaporthe grisea* pathogens of diverse grasses. Mol. Plant-Microbe Interact., 9, 261-271
70. Ou, S.H.(1980) Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. Annu. Rev. Phytopathol., 18, 167-187
71. Ou, S.H. and M.R.Ayad(1967) Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. Phytopathology, 58, 179-182
72. Ou, S.H.(1985) Rice Diseases, 2nd edn. Kew, UK. CMI.380p
73. Pall, M.L. and J.P.Brunelli(1993) A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites. Fungal Genetics Newsletter., 40, 59-62
74. Papa, K.E.(1978) The parasexual cycle in *Aspergillus parastictus*. Mycologia, 70, 766-773
75. Pontecorvo, G.(1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. In Genetics, 5, 141-238
76. Pontecorvo, G.(1956) The parasexual cycle in fungi. Annu.Rev. Microbiol., 10, 393-400
77. Pontecorvo, G. and J.A.Ropper(1952) Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. J.Gen. Microbiol., 6, vii, (Abst.)
78. Pontecorvo, G. and G.Sermonti(1954) Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. J.Gen. Microbiol., 11, 94-104
79. 斉藤初雄・平野哲司・内藤秀樹(1989) イネ体上におけるいもち病菌の無性的交雑とレース生成. 日植病報, 55, 91
80. 斉藤初雄・加藤晋郎(1991) イネいもち病菌菌糸の核の DAPI 染色法. 日植病報, 57, 96
81. 斉藤初雄・藤晋一(1992) イネいもち病菌の病原性変異機構に関する研究 I. いもち病菌菌糸の無性的交雑 (菌糸融合) 過程. 日植病報, 58, 556-557
82. 佐々木武彦・阿部眞三・松永和久・岡本栄治・永野邦明・丹野浩一・千葉芳則・狩野篤・上松克彦・滝沢浩幸・早坂浩志・涌井茂・黒田倫子・薄木茂樹・千葉文弥・宮野法近・佐々木都彦・遠藤貴司(2002) ササニシキの多系品種「ササニシキ BL」について. 宮城県古川農業試験場研究報告, 3, 1-35
83. 進藤敬助・堀野修(1989) 多系品種の利用によるいもち病の発病抑制. 東北農業試験場研究報告, 79, 1-13
84. Skinner, D.Z., A.D.Budde, M.L.Farrman, J.R.Smith, H.Leung and S.A.Leong(1993) Genome organization of *Magnaporthe grisea*: genetic map, electrophoretic karyotype, and occurrence of repeated DNAs. Theor. Appl. Genet., 87, 545-557
85. Sone, T., T.Abe, M.Suto and F.Tomita(1997a) Identification and characterization of a karyotypic mutation in *Magnaporthe grisea*. Biosci. Biotech. Biochem., 61, 81-86
86. Sone, T., T.Abe, N.Yoshida, M.Suto and F.Tomita(1997b) DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping of Japanese isolates of rice blast fungus. Ann Phytopathol. Soc. Jpn., 63, 155-163
87. 鈴木橋雄(1953) 稲熱病菌の生態的分化現象に関する研究第6報ヘテロカロシス. 日植病報, 17, 167
88. 鈴木橋雄・田村友一・土志田武彦(1955) 稲熱病菌の生態学的分化現象に関する研究第10報ヘテロカロシス(その4). 日植病報, 20, 37
89. Swart, K., A.J.M.Debets, C.J.Bos, M.Slakhorst, E.F.Holub and R.F.Hoekstra(2000) Genetic analysis in the asexual fungus *Aspergillus niger*. Acta. Biol. Hungar., 52, 335-343
90. Sweigard, J.A., B.Valent, M.J.Orbach, A.M.Walter, A.Rafalski and F.G.Chumley(1993)

- Genetic map of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* (n=7), in genetic maps; Locus Maps of Complex Genomes. Six edition, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3112-3117p
91. Talbot, N. J., Y. P. Salch, M. Ma and J. E. Hamer (1993) Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 585-593
92. 田中良高・山崎義人 (1977) イネいもち病菌の変異に関する核学的研究. *日植病報*, 43, 313
93. Tinline, R. D. (1962) *Cochliobolus sativus* V. Heterokaryosis and parasexuality. *Can. J. Bot.*, 40, 425-437
94. Tuveson, R. W. and D. O. Coy (1961) Heterocaryosis and somatic recombination in *Cephalosporium mycophilum*. *Mycologia*, 53, 244-253
95. 上杉康彦・片桐政子・福永一夫 (1969) いもち病菌の抗生物質および有機燐剤に対する耐性. *農技研報*, C23, 93-112
96. Valent, B. and F. G. Chumley (1994) Avirulence genes' mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus. *Rice Blast Disease*. R. S. Zeigler, S. A. Leong and P. S. Teng, eds. Wallingford, UK. CAB International, 111-134.
97. Van der Plank, J. E. (1968) Disease resistance in plants. New York and London, Academic Press, 206p.
98. Watson, I. A. (1970) Change in virulence and population shifts in plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopath.*, 8, 209-230
99. Wilson, J. P., R. N. Gates and M. S. Panwar (2001) Dynamic multiline population approach to resistance gene management. *Phytopathology*, 91, 255-260
100. Wolfe, M. S. (1985) The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23, 251-273
101. Wu, H. K. and T. H. Tsao (1967) The ultrastructure of *Pyricularia oryzae* Cav. *Bot. Bull. Acad. Sinica.*, 8, 353-363
102. Wu, H. K. and M. M. Tsai (1974) Studies on variation in pathogenicity of *Pyricularia oryzae* Cav. 1. The mechanism of the genetical variation. *Mem. Coll. Agr. Nat. Taiwan Univ.*, 15, 7-21
103. Xu, J. R., K. Yan, M. B. Dickman and J. F. Leslie (1995) Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8:74-84
104. Xu, X. M. and M. S. Ridout (2000) Stochastic simulation of the spread of race-specific and race-nonspecific aerial fungal pathogens in cultivar mixtures. *Plant Pathology*, 49, 207-218
105. 八重樫博志 (1981) いもち病菌の完全世代に関する研究. *東北農業試験場研究報告*, 63, 49-125
106. 八重樫博志・小林尚志 (1972) 超音波洗滌機によるいもち病菌胞子の採取. *植物防疫*, 26, 245-247
107. 山口純一郎・口本文孝・平八重一之・宗和弘 (2002) 佐賀県西北部地区におけるイネいもち病に対するカルプロパミド箱粒剤の防除効果の低下. *日植病報*, 68, 262
108. Yamada, M., S. Kiyosawa, T. Yamaguchi, T. Hirano, T. Kobayashi, K. Kushibuchi and S. Watanabe (1976) Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 42, 216-219
109. 山崎義人 (1953a) イモチ病菌の核学的研究 (予報). *育種学雑誌*, 3, 59-60
110. 山崎義人 (1953b) イモチ病菌の遺伝学的研究補遺. *遺伝学雑誌*, 28, 192
111. 山崎義人・新関宏雄 (1965) いもち病菌の変異に関する研究. 第1報. 変異に関する核学的ならびに遺伝学的研究, *農技研報*, D13, 231-273
112. Yang, H. A., I. C. Tommerup, K. Sivasithamparam and P. A. O' Brien (1992) Heterokaryon formation with homokaryons derived from protoplasts of *Rhizoctonia solani* anastomosis group eight. *Experimental Mycology*, 16, 268-278

113. Yasuda, N., Y. Fujita and M. Noguchi (2004) Identification of avirulence genes in the rice blast fungus corresponding to three resistance genes in Japanese differentials. *J. Gen. Plant. Pathol.*, 70, 202-206
114. Yasuda, N., M. T. Noguchi and Y. Fujita (2005) Identification of an avirulence gene in the fungus *Magnaporthe grisea* corresponding to a resistance gene at the *Pik* locus. *Phytopathology*, 95, 768-772
115. Yelton, M. M., J. E. Hamer and W. E. Timberlake (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 1470-1474
116. Yoder, O. C., B. Valent and F. Chumley (1986) Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 76, 383-385
117. Zeigler, R. S., R. P. Scott, H. Leung, A. A. Bordeos, J. Kumar and R. J. Nelson (1997) Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology*, 87, 284-294
118. Zhu, Y., H. Chen, J. Fan, Y. Wang, Y. Li, J. Chen, J. Fan, S. Yang, L. Hu, H. Leung, T. W. Mew, P. S. Teng, Z. Wang and C. C. Mundt (2000) Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*, 406, 718-722

# Virulence and Aggressiveness of Parasexual Recombinants of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*

Masako Tsujimoto Noguchi

## Summary

Blast disease, caused by *Magnaporthe oryzae* B.Couch, is the most serious diseases of rice. Multilines, which are mixtures of lines that are genetically uniform except for a single trait such as disease resistance, have been used to prevent rice blast; however, their usefulness may be nullified when pathogenic variants (super races) arise that can attack all of lines in a multiline field. Parasexual recombination is considered one source of variation in the pathogenicity of *M.oryzae*. To understand the mechanism of pathogenic variation through parasexual recombination with a potential for new variants to cause severe damage in a multiline field, I analyzed the ploidy, number of nuclei per cell, and the segregation of pathogenicity in parasexual recombinants of *M.oryzae*. In addition, I determined the mating type and karyotype of the recombinants. The pathogenic stability of recombinants was evaluated by successive inoculation. The aggressiveness of recombinants were determined by measurements of lesion size, amount of sporulation, and blast development in a field planted with a single cultivar or a cultivar mixture.

To demonstrate genetic exchange through parasexual recombination, a selectable marker gene conferring resistance to bialaphos(BI) was introduced into *M.oryzae* isolate Y90-71BI, whereas another to conferring resistance to blasticidin S (BS) was introduced into the isolate 3514-R-2BS. Colonies obtained from co-cultures of the two isolates were resistant to both BI and BS, and presence of the resistance genes was confirmed by southern hybridization using genomic DNA. These results indicated genetic exchange by parasexual recombination.

The staining of conidia from the BI-BS-resistant parasexual recombinants with 4', 6-diamine-2-phenylindole (DAPI) revealed only one nucleus per cell. Flow cytometric analysis indicated that the recombinants were haploid. Thus, the number of nucleic per cell and the ploidy of the recombination were identical to that of the parental isolates.

To examine the heritability of pathogenicity, I compared the segregation of avirulence and virulence in the 49 BI-BS-resistant parasexual recombinants with that in the 70 BI-BS-resistant progeny derived from a cross of Y90-71BI and 3514-R-2BS. The segregation of avirulence and virulence on cv. Hattan 3 and a line K59-1 in the parasexual recombinants were consistent with that in sexual progeny. The mating types of the parasexual recombinants were also consistent with those of sexual progeny. Using pulse-field gel electrophoresis (PFGE), the karyotype variation in the parasexual recombinants appeared corresponding with that in the sexual progeny. The karyotype segregation of the parasexual recombinants was consistent with that of the sexual progeny. Thus, the genetic characters of the parasexual recombinants segregated in a manner similar to those of the sexual recombinants.

To determine the virulence and aggressiveness of the parasexual recombinants, I obtained pathogenic variants derived from co-cultures of two *M.oryzae* isolates, i.e., NAO-02, race 133.1 and TH77-1, race 047.0 in liquid yeast extract medium. The cocultured isolates were transferred to oatmeal agar to produce a conidial inoculum, and the suspension was sprayed onto cv. Akiyutaka, which has two rice blast resistance genes; *Pik* and *Piz*. Three pathogenic variants isolated from typical leaf blast lesions were examined randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) to determine whether they were the result of parasexual recombination. Based on the RAPD patterns, the variants possessed genomic DNA from both parents. After successive seven inoculations onto cv. Akiyutaka, the variants maintained their original level of pathogenicity. The parasexual recombinants produced more conidia and larger lesions on the host than one parent, TH77-1; however, they produced fewer conidia and smaller lesions than other parent, NAO-02. The disease development in the rice plants inoculated with the variants was more severe than in those inoculated with TH77-1, but less severe than in those inoculated with NAO-02.

Thus, genetic exchange in the blast fungus occurs via parasexual recombination, and the resulting recombinants are

haploid and mononuclear. Parasexuality is similar to sexuality in terms of the heritability of virulence, mating type, and karyotype. In addition, a biparental pathogenic race that is capable of causing severe losses in multiline fields can arise through parasexual recombination.