

# 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.

## 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。