

イネいもち病菌が生産する光誘導抵抗性に関わる因子の探索

上野誠・吉清恵介・久村由美子

目 的

イネいもち病は、イネの重要病害の一つである。本病は糸状菌の子囊菌類に属する *Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr (不完全世代, *Pyricularia oryzae* Cavara) によって引き起こされ、イネの収量や商品価値に多大な影響を与えることが知られている。植物病害の特異性は、品種・レース間における病原菌の非病原性遺伝子とそれに対する植物の抵抗性遺伝子により支配されている「遺伝子対遺伝子説」で説明されている。イネいもち病におけるイネの抵抗性及び感受性も品種とレースの組み合わせにより決定されることが知られているが、本病ではそれを説明できるような物質の同定には至っていない。

イネ品種関口朝日は、斑点性病害に対して特異的な反応を示す朝日の突然変異株として発見された (関口・吉田 1965)。この品種ではイネいもち病菌やごま葉枯病菌の感染のみならず、化学薬品の処理によっても橙黄色から黄褐色、大型不整形の病斑 (関口病斑) が光依存的に形成される。病斑形成は単一の劣性遺伝子 (*sl* 又は *spl1*) に支配されていることが明らかにされている (Kiyosawa 1970; Marchetti et al. 1983)。この変異体は光条件によってイネいもち病菌に対して異なる反応を示す (Arase et al. 2000)。即ち、暗黒条件下ではいもち病斑が多数形成されるのに対して、光条件下ではいもち病斑より大型の関口病斑が形成される変異型反応を示す。さらに、関口病斑における菌糸伸展はほとんど認められず、病斑上の孢子形成に至っては皆無であることも明らかにされた。このことは進行型変異イネ関口朝日が病原菌に対して強い抵抗性機構を持っていることを示した。

通常、非親和性イネいもち病菌レースの侵入に対してイネ側は、無病斑あるいは褐点病斑の形成を伴った抵抗性反応を示すが、イネ品種関口朝日の場合には光依存的な黄褐色、大型不整形の関口病斑の形成を伴った抵抗性反応を示す。このことは、今後大型の関口病斑という肉眼レベルで検出可能な変異イネの抵抗現象をマーカーにすれば野生型イネを用いた場合には困難であったイネ側の抵抗性機構の生理学的あるいは分子生物学的解明とエリクターや毒素等菌側の病原性決定因子の単離とその作用機構の解析なども可能であることを示唆した。

そこで本研究では変異イネ関口朝日の光依存的な抵抗性反応である関口病斑及びその関連物質をマーカーにイネいもち病菌の孢子発芽液中に含まれる因子の探索を行った。

材料と方法

供試植物

供試植物としてイネ品種関口朝日を供試した。イネ種子は2-3日間水道水に浸漬し、催芽後、イネ育苗用床土グリーンソイルを入れたシードリングケース (15×6×10 cm, Fujimoto Kagaku Co. Ltd., 東京) に播種し、ガラス室内で育成した。実験には4-5葉期まで生育させたイネを用いた。

供試菌

供試菌としてイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) を用いた。イネいもち病菌は米ぬか培地 (米ぬか40g, 水道水800ml) で2週間培養後、気中菌糸を除去し、インキュベーター (LP-200-D, 日本医化器械製作所) 内で2日間BLB蛍光灯 (FL20S, BLB National, Osaka, Japan: 300-420 nm) を照射して孢子を形成させた。

孢子発芽液の作成方法

上記の方法で孢子を形成させたシャーレに蒸留水を加えて、孢子を筆で懸濁し、ティッシュでろ過した後、血球計算盤を用いて 5×10^5 spores/ml に調整した。調整後にプラスチックバット内に流し込み、恒温室 (26°C) に24時間保持した後、液を回収してエバポレーターを用いて、元の量の1/100の量になるまで濃縮して孢子発芽液として実験に用いた。

トリプタミン及びトリプタミン関連酵素の測定法

葉からのトリプタミン抽出及び検出は Arase et al. (2001) の方法を用いた。また、トリプタミン関連酵素であるトリプトファン脱炭酸酵素及びモノアミン酸化酵素の抽出及び酵素活性測定は Ueno et al. (2003) の方法を用いた。

糖分解酵素処理

糖分解酵素として β -グルコシダーゼ (400U/ml)、 β -ガラクトシダーゼ (107U/ml) 及び α -マンノシダーゼを用いた。それぞれの酵素をSGF (90 μ l) に10 μ l加えた。 β -グルコシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼ処理区は37°Cで5時間処理し、 α -マンノシダーゼ処理区は25°Cで24時間処理した。処理後、それぞれの孢子発芽液を関口朝日のイネ葉に処理し、関口病斑形成とトリプタミン蓄積の有無を調査した。

結果及び考察

イネいもち病菌の発芽液処理が関口病斑形、トリプタミ

ン蓄積及びトリプタミン関連酵素活性に与える影響

イネの光誘導抵抗性に関わるイネいもち病菌側の因子が胞子発芽液中に存在するか否かを明らかにするために、イネ葉に胞子発芽液を処理し、関口病斑形、トリプタミン蓄積及びトリプタミン関連酵素活性を調査した。その結果、胞子発芽液を処理後に光照射下に保ったイネ葉では、関口病斑が形成された。一方、胞子発芽液を処理後に暗黒下に保ったイネ葉では、関口病斑の形成は確認されなかった。また、トリプタミン蓄積とその関連酵素であるトリプトファン脱炭酸酵素及びトリプタミン酸化酵素の活性も、胞子発芽液を処理後に光照射下に保ったイネ葉では、暗黒下に保ったイネ葉よりもトリプタミン蓄積とその関連酵素の活性が著しく増加した。このことはイネいもち病菌の胞子発芽液中にイネの光誘導抵抗性に関わる菌側の因子が存在することを示した。

イネいもち病菌の発芽液処理への糖分解酵素処理が関口病斑形及びトリプタミン蓄積に与える影響

イネいもち病菌の胞子発芽液に糖分解酵素である β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ及び α -マンノシダーゼを処理し、光照射下でのイネ葉での関口病斑形成とトリプタミン蓄積を調査した。その結果、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ処理による関口病斑形成とトリプタミン蓄積の抑制は観察されなかった。さらに、光誘導抵抗性に関わる因子の性質を明らかにするために、胞子発芽液の透析膜による分離、酢酸エチルによる分配抽出、熱処理を行った。その結果、胞子発芽液中の因子は酢酸エチルに不溶で、分子量1万以上であった。このことは胞子発芽液中に含まれる活性成分は分子量1万以上

のマンノースに活性中心をもつ糖関連物質であることが示唆された。

引用文献

- Arase, A., Zhao, C., Akimitsu, K., Yamamoto, M. and Ichii, M. (2000). A Recessive lesion mimic mutant of rice with elevated resistance to fungal pathogens. *J. Gen. Plant. Pathol.* 66, 109-116.
- Arase, S., Ueno, M., Toko, M., Honda, Y., Itoh, K. and Ozoe, Y. (2001). Light dependent accumulation of tryptamine in the rice Sekiguchi lesion mutant infected with *Magnaporthe grisea*. *J. Phytopathol.* 149, 409-413.
- Kiyosawa, S. (1970). Inheritance of a particular sensitivity of the rice variety, Sekiguchi-asahi, to pathogens and chemicals, and linkage relationship with blast resistance genes. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., Ser. D.* 21, 61-71.
- Marchetti, M.A., Bollich, C.N. and Uecker, F.A. (1983). Spontaneous occurrence of the Sekiguchi lesion in two American rice lines: Its induction, inheritance, and utilization. *Phytopathology.* 73, 603-606.
- 関口義兼・吉田 力 (1965). 斑点性病害に特異な反応を示す変異イネについて (予報). *日植病報* 30, 71-72.
- Ueno, M., Shibata, H., Kihara, J., Honda, Y. and Arase, S. (2003). Increased tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities induce Sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*. *Plant J.* 36, 215-228.