

トウモロコシごま葉枯病菌(*Bipolaris maydis*)のレース判別と病原力差異

誌名	草地試験場研究報告
ISSN	03850196
著者	月星, 隆雄 古賀, 博則 植松, 勉
巻/号	51号
掲載ページ	p. 12-22
発行年月	1995年3月

トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) の レース判別と病原力差異

月星隆雄・古賀博則・植松 勉

環境部・作物病害研究室

(平成6年8月15日受理)

要 旨

各地で採集したトウモロコシ罹病葉から、76菌株のごま葉枯病菌を分離した。これらは、交配試験の結果すべて *Bipolaris maydis* (NISIKADO et MIYAKE) SHOEMAKER と同定された。また、判別品種への噴霧接種および毒素検定により、分離菌株はすべてレース O と同定された。単孢子接種法により国内産菌株の病原力を検定した結果、菌株間で病斑面積に差は認められなかったが、病斑形成効率および孢子形成数で明確な差異が認められ、侵入能および孢子形成能で菌株間差があると結論した。病原力の差異を採集地域別にみると、いずれの形質についても差異は認められなかった。病原力に基づく主成分分析の結果、これら国内産菌株を類別化することはできなかった。

月星隆雄・古賀博則・植松 勉 (1995): トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) のレース判別と病原力差異. 草地試研報 51: 12~22.

キーワード: トウモロコシ, *Bipolaris maydis*, レース, 病原力

緒 論

トウモロコシごま葉枯病 (英名 Southern corn leaf blight) は、日本の飼料用トウモロコシの病害の中でも被害の大きい重要病害である。本病は葉や葉鞘に多数の黄褐色の斑点を形成し、生育後期には葉が完全に枯れ上り、収量も大きく低下する。しかも、病原菌の生育適温が広いこと、北海道から九州まで全国で発生する。このため、トウモロコシの病害抵抗性育種の第一の目標とされており、日本でも新品種登録の際の特性検定試験などでごま葉枯病抵抗性検定は必須である。また、ホールクロップサイレージ利用により、トウモロコシを黄熟期まで圃場におく栽培法が定着して以来、生育後期の病害であるごま葉枯病の発生は増加する傾向にある。

病原菌は *Bipolaris maydis* (NISIKADO et MIYAKE) SHOEM. (= *Helminthosporium maydis* NISIKADO et MIYAKE) で、自然条件ではほとんど有性世代を形成せず、分生孢子だけで増殖できるため、この無性世代の学名で呼ばれることが多い。有性世代は子のう菌類の *Cochliobolus heterostrophus* (DRECHSLER) DRECHSLER であり、植物組織中に半分埋まった形で偽子のう殻を形成し、偽子のう殻内部には子のうをもつ。子のうにはら

せん状に巻いた糸状、無色、7-11 個の偽隔壁をもった子のう胞子が通常 8 個ある。本菌はヘテロタリックであり、交配親和性は MAT 遺伝子座の A および a 遺伝子により支配され、それぞれ交配型 A と a とされている (Nelson 1957)。

本病菌のレースはトウモロコシの雄性不稔細胞質に対して特異的に分化しており、レース T, レース O およびレース C の 3 種が報告されている (Hooker *et al.* 1970, Wei *et al.* 1988)。レース T は宿主特異的毒素である T トキシンを産生し、この毒素はポリケトール構造を持ち、炭酸暗固定の阻害、ミトコンドリア酸素消費の阻害、根からのイオン漏出、気孔閉塞 (Arntzen *et al.* 1973, Payne *et al.* 1980) 等の作用により、T 型雄性不稔細胞質をもつ系統に特異的に強い病原性を示す。このレースはアメリカ合衆国のコーンベルト地帯で 1970 年に大発生した (Moore 1970, Mason and Zuber 1972)。一方、レース O は宿主特異的毒素を産生せず、トウモロコシの細胞質に関わらず病原性を示す (Tagtmeier *et al.* 1981)。また、最近 C 型雄性不稔細胞質をもつトウモロコシ系統に特異的に強い病原性を示すレース C が中国で広範囲にわたって発生したことが報告されて (Liu *et al.* 1986)、日本での発生も懸念されている。また、

レースCの宿主特異的毒素としてCトキシンが報告されている (Wei *et al.* 1988)。

日本における本病菌のレースについては、1970年代に長野および北海道でレースTの発生が報告されたが (梶原 1971, 成田・大高 1973), その後発生は徐々に減ったとされている。レースOについては最近の主要レースと推定されているが、正式に判別した報告はない。このような状況から、現在日本で発生しているレースに関する詳細な研究が望まれている。

また、一般的に同一レースであっても、菌株ごとの病原力は異なっていることが多い。病原力は量的形質であり、これまで様々な菌について病斑形成効率 (接種孢子数に対する病斑形成数の割合: 侵入能), 病斑拡大 (病斑面積: 拡大能), 孢子形成 (孢子形成数: 繁殖能) 等の側面から解析されており (Hill *et al.* 1981, Karki and Sharp 1986), 本病菌についても同様に検討する必要がある。また、本病菌は北海道から九州まで非常に広い範囲で発生しており、採集地域によって病原力が異なる生態型を形成している可能性もある。このような日本産菌株の病原力の菌株間および地域間の差異についても報告はない。

本研究では、本病菌の日本におけるレースの判別・分布および病原力の菌株間・地域間差を解明することを目的とした。

材料及び方法

1. 菌株の収集および分離

1981年から1991年にかけて北海道、宮城、栃木、長野、山口、宮崎など16道府県でトウモロコシのごま葉枯病罹病葉を採集した。採集にあたっては、同一地域内では最低でも数百メートルの距離を置いて採集することに留意した。病原菌の分離は単孢子分離法により行った。罹病葉から単一病斑を切り出して素寒天上に置き、25°C、白色蛍光灯照明下で2日間培養後、病斑上に形成された形態的に *B. maydis* と考えられる単一の分生孢子を実体顕微鏡下で細いガラス針を使って釣り上げ、素寒天上に置いた。これを25°C、暗黒下で2日間培養後、発芽して伸長した菌糸体を含む寒天片をV8ジュース培地 (組成: V8ジュース 200 ml, CaCO₃ 3 g/l) に移植、培養した。菌の保存は病原性の変異を防ぐために Slesman ら (1974) の方法を改変した方法により行い、MM液体培地 (組成: KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, NaCl 0.15 g, Ca(NO₃)₂·4H₂O 1.0 g, ブドウ糖 10 g/l) を添加した白色シリカゲル粒上で培養後、デシケーター内で乾燥保存した。

2. 菌株の交配法

すべての菌株について、*B. maydis* 標準菌株 (HITO 7711, 交配型 A および BMZM7901, 交配型 a) との交配試験を行った。交配は Nelson (1957) の方法により、シャーレ (直径 9 cm) の中央部に滅菌稲わら片を置いた Sachs 培地 (組成: KNO₃ 1 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, Ca(NO₃)₂ 0.5 g, Ca₃(PO₄)₂ 0.5 g, FeCl₃(0.3%) 1 ml/l) 寒天平板上に、25°C、暗黒下で標準菌株と対峙培養し、稲わら上に形成される偽子のう殻と子のう孢子の形成を確認した。

3. レース検定

分離した *B. maydis* 76 菌株 (Table 1) を供試し、噴霧接種検定と毒素検定によるレース判別を行った。供試植物は、1/10,000 a のワグネルポットに那須野ヶ原産の黒ボク土をつめ、これに窒素 (N) 0.4 g, リン酸 (P₂O₅) 1.2 g, カリ (K₂O) 0.4 g を化成肥料 (17-17-17), 苦土石灰および熔燐で施用し、1ポット3本立てとして、25°Cの温室で第4葉期まで育苗した。

噴霧接種検定には核ゲノムが同じで細胞質のみが異なる系統を判別系統として用い、レースT判別のために WF9T×R2040 (T型雌性不稔細胞質, T-cms) と WF9×R2040 (N型細胞質, N-c) を、レースC判別のために Mo17HtC (C型雌性不稔細胞質, C-cms) と Mo17Ht (N型細胞質, N-c) を供試した。

接種の際は、病原性の変異を防ぐため各菌株をその都度保存用のシリカゲル粒から再分離し、V8ジュース培地上で3~4日間前培養後、気中菌糸を白金耳で除いてBLB蛍光管で光を2日間、間欠照射して分生孢子を形成させた。この菌叢の表面に滅菌水を注ぎ、滅菌した絵筆で表面を擦った後に、脱脂綿でろ過して孢子懸濁液を得た。

第4葉完全展開時に接種を行い、各菌株の孢子懸濁液 (10⁴ spores/ml, Tween20 0.01% 添加) を葉が完全に濡れるまで噴霧した。これを26°C、相対湿度100%に16時間保ち、その後25°C温室に移した。接種7日後に第4葉の病斑面積率について、Fryら (1983) の調査基準 (0:0%, 1:0.1%, 2:1%, 3:5%, 4:10%, 5:25%, 6:50%, 7:75%, 8:全葉枯死, Fig. 1) に従って調査を行った。1回の判別に5個体を供試し、これを3反復した。

毒素検定は Payneら (1980) の方法を若干改変した方法によった。各菌株をCM液体培地 (前述のMM培地に0.1%酵母エキス, 0.1%カゼインを添加) 上、暗黒下、25°Cで14日間培養し、その培養濾液を10, 100, 1,000倍に希釈して、これに各細胞質をもつトウモロコシ系統

Table 1. Origins, mating types and races of *Bipolaris maydis* collected in Japan.

Isolate No. (BMZM)	Origin	Date	Mating type	Spore spray test				Toxin test ^b			Race
				T ^a	N	C	M	T	C	N	
8110	Miyakonojo, Miyazaki	1983. 9	A	5.2	5.0	5.0	4.7	—	—	—	O
8144	Nasu, Tochigi	1981	A	3.7	4.2	3.3	3.9	—	—	—	O
8208	Kawanami, Miyazaki	1982	a	4.7	3.7	3.0	3.1	—	—	—	O
8221	Miyakonojo, Miyazaki	1982	A	5.3	6.7	4.5	5.3	—	—	—	O
8234	Oosumi, Kagoshima	1982	a	5.3	5.0	3.0	4.2	—	—	—	O
8257	Kitakoma, Yamanashi	1982	a	4.7	4.3	3.7	4.3	—	—	—	O
8273	Nasu, Tochigi	1982	a	3.3	3.7	3.0	5.2	—	—	—	O
8303	Miyakonojo, Miyazaki	1983	A	5.8	5.7	3.6	4.3	—	—	—	O
8308	Memuro, Hokkaido	1983. 9	A	5.0	6.3	5.0	4.1	—	—	—	O
8309	Memuro, Hokkaido	1983. 9	a	3.3	2.7	2.3	3.3	—	—	—	O
8310	Memuro, Hokkaido	1983. 9	a	5.3	5.3	5.0	4.4	—	—	—	O
8311	Memuro, Hokkaido	1983. 9	A	5.5	5.7	4.4	4.8	—	—	—	O
8313	Sapporo, Hokkaido	1983. 9	A	4.0	3.7	3.0	2.9	—	—	—	O
8314	Sapporo, Hokkaido	1983. 9	A	5.2	5.3	3.7	4.8	—	—	—	O
8315	Nakakoma, Yamanashi	1985. 8	a	4.3	3.3	2.5	3.8	—	—	—	O
8316	Fujinomiya, Shizuoka	1985. 8	A	4.3	3.3	3.0	3.3	—	—	—	O
8317	Ebina, Kanagawa	1985. 8	A	5.0	5.3	3.7	4.2	—	—	—	O
8318	Ebina, Kanagawa	1985. 8	a	5.3	6.0	4.3	4.8	—	—	—	O
8319	Ebina, Kanagawa	1985. 8	A	3.0	3.3	2.7	3.1	—	—	—	O
8320	Fukushima, Fukushima	1985. 8	A	5.7	4.7	4.3	3.3	—	—	—	O
8321	Tamatsukuri, Miyagi	1985. 8	A	5.7	5.5	4.0	4.7	—	—	—	O
8322	Tamatsukuri, Miyagi	1985. 8	a	4.3	4.5	3.2	3.6	—	—	—	O
8323	Fujinomiya, Shizuoka	1985. 8	A	5.3	6.3	4.0	4.0	—	—	—	O
8324	Kouga, Shiga	1985. 8	A	3.3	3.7	3.0	4.4	—	—	—	O
8327	Shiojiri, Nagano	1985. 8	A	5.7	6.7	5.3	5.3	—	—	—	O
8328	Shiojiri, Nagano	1985. 8	A	4.0	3.7	2.7	4.1	—	—	—	O
8329	Shiojiri, Nagano	1985. 8	A	4.3	5.3	3.3	3.9	—	—	—	O
8330	Memuro, Hokkaido	1985. 8	A	5.7	5.5	5.7	5.4	—	—	—	O
8332	Shiojiri, Nagano	1985. 8	A	4.0	3.3	2.7	3.1	—	—	—	O
8334	Yamaguchi, Yamaguchi	1986. 7	A	3.7	3.3	3.0	3.1	—	—	—	O
8335	Kikuchi, Kumamoto	1986. 7	A	3.3	3.3	2.5	4.8	—	—	—	O
8343	Miyazaki, Miyazaki	1986. 7	a	4.7	4.3	3.0	3.1	—	—	—	O
8344	Kuniwake, Kagoshima	1986. 7	A	4.0	5.0	3.0	4.8	—	—	—	O
8347	Yamaguchi, Yamaguchi	1986. 7	A	3.3	3.0	2.0	3.8	—	—	—	O
8348	Yamaguchi, Yamaguchi	1986. 7	A	5.7	5.5	4.7	4.9	—	—	—	O
8350	Kumamoto, Kumamoto	1986. 7	A	3.3	3.7	2.3	2.3	—	—	—	O
8351	Miyakonojo, Miyazaki	1986. 7	A	5.0	3.7	4.0	4.6	—	—	—	O
8355	Yaita, Tochigi	1986. 8	A	6.0	5.3	3.7	3.6	—	—	—	O
8356	Kikuchi, Kumamoto	1986. 8	a	5.3	6.0	4.3	4.7	—	—	—	O
8357	Tamatsukuri, Miyagi	1986. 8	a	3.3	4.0	2.5	4.3	—	—	—	O
8358	Higashine, Yamagata	1987. 8	a	4.7	6.0	6.3	4.6	—	—	—	O
8359	Fukushima, Fukushima	1987. 8	a	6.3	5.3	4.3	3.8	—	—	—	O
8360	Kuroiso, Tochigi	1988. 9	a	4.7	4.0	4.0	4.1	—	—	—	O
8361	Kuroiso, Tochigi	1988. 9	A	3.3	4.3	3.7	4.2	—	—	—	O
8362	Kuroiso, Tochigi	1988. 9	a	3.3	3.0	2.5	3.1	—	—	—	O
8364	Oosu, Ehime	1988. 9	A	5.7	6.7	3.3	3.6	—	—	—	O
8365	Fukue, Nagasaki	1989.10	A	6.3	5.7	5.0	4.3	—	—	—	O
8366	Shintomi, Miyazaki	1990. 9	a	4.0	3.7	3.0	3.2	—	—	—	O
8367	Shintomi, Miyazaki	1990. 9	a	5.7	4.3	3.7	4.8	—	—	—	O
8368	Kishiro, Miyazaki	1990. 9	a	5.5	5.5	5.5	5.3	—	—	—	O
8369	Miyakonojo, Miyazaki	1990. 9	A	5.3	5.7	3.0	4.3	—	—	—	O
8370	Miyakonojo, Miyazaki	1990. 9	a	6.3	6.7	5.7	5.8	—	—	—	O

Isolate No. (BMZM)	Origin	Date	Mating type	Spore spray test				Toxin test ^b			Race
				T ^a	N	C	M	T	C	N	
8371	Miyakonojo, Miyazaki	1990. 9	A	5.7	6.0	—	4.2	—	—	—	O
8372	Miyakonojo, Miyazaki	1990. 9	A	3.0	3.0	3.0	3.8	—	—	—	O
8373	Miyakonojo, Miyazaki	1990. 9	A	6.7	7.0	6.5	4.7	—	—	—	O
8374	Miyakonojo, Miyazaki	1990. 9	a	4.0	6.3	4.3	3.8	—	—	—	O
8375	Miyakonojo, Miyazaki	1990. 9	a	6.7	7.0	5.0	5.1	—	—	—	O
8376	Fukiage, Kagoshima	1990. 9	a	3.3	3.0	3.0	3.0	—	—	—	O
8377	Izuin, Kagoshima	1990. 9	a	No sporulation				—	—	—	O
8378	Fukiage, Kagoshima	1990. 9	a	7.0	7.0	7.0	5.2	—	—	—	O
8379	Fukiage, Kagoshima	1990. 9	a	3.3	3.0	1.7	3.3	—	—	—	O
8380	Matsumoto, Kagoshima	1990. 9	A	3.0	3.7	3.0	3.2	—	—	—	O
8381	Ekishiro, Kumamoto	1990. 9	A	6.7	4.7	4.0	3.7	—	—	—	O
8382	Isui, Kumamoto	1990. 9	a	7.0	6.7	4.7	4.1	—	—	—	O
8383	Ekishiro, Kumamoto	1990. 9	a	7.0	5.3	2.0	3.9	—	—	—	O
8384	Goshi, Kumamoto	1990. 9	a	3.7	3.0	3.0	4.0	—	—	—	O
8385	Akahori, Gunma	1990. 9	A	4.7	4.3	3.7	3.3	—	—	—	O
8386	Akahori, Gunma	1990. 9	a	6.7	6.3	5.7	5.0	—	—	—	O
8387	Akahori, Gunma	1990. 9	a	5.3	4.3	3.0	5.1	—	—	—	O
8388	Akahori, Gunma	1990. 9	A	5.3	5.0	3.0	4.8	—	—	—	O
8389	Akahori, Gunma	1990. 9	a	3.7	3.7	3.3	3.1	—	—	—	O
8390	Nasu, Tochigi	1990. 9	a	3.7	6.0	6.0	4.9	—	—	—	O
8391	Shiojiri, Nagano	1975	A	2.7	3.0	2.3	3.2	—	—	—	O
8392	Shiojiri, Nagano	1975	A	5.7	4.3	2.7	4.4	—	—	—	O
8393	Miyakonojo, Miyazaki	1991.11	A	6.3	6.2	4.2	4.6	—	—	—	O
8394	Higashine, Yamagata	1991.11	A	5.3	5.2	4.2	4.2	—	—	—	O
			Avg.	4.9	4.8	3.7	4.1				
C1C2	U.S.A.			5.0	2.7	1.5	2.0	+	—	—	T

a : Differential lines of corn for identification of races of *B. maydis*.

T : WF9T×R2040 (T-cms), N : WF9×R2040 (N-c), C : Mol7HtC (C-cms), M : Mol7Ht (N-c)

b : Leaves were cut and incubated with the diluted (×1/100) culture filtrate (CM liquid medium).

+ : Severe wiltings, — : No wiltings.

の切離した第3葉を葉挿した。これを25℃、蛍光灯照明下に48時間保った後に、葉の萎凋の有無を調査した。対照として、アメリカ合衆国産の*B. maydis* レース T 菌株 C1C2 を供試した。なお、T トキシンはガラス壁に付着しやすい性質があるため、器具はすべて実験ごとに10% KOH 水溶液に浸漬、洗浄後に使用した。

4. 病原性検定

日本産 *B. maydis* 39 菌株 (Table 2) の病原性検定をトウモロコシ幼苗を用いて行った。罹病性の自殖系統 Pa91 を供試し、既に報告した単孢子接種法 (月星・佐藤 1986) により、完全展開した第3葉に接種を行った。すなわち、1個の孢子がのった素寒天片を三角メスで切り出し、トウモロコシの第3葉に中肋を隔てて両側に5個ずつ計10個置くことにより接種した。接種した植物はそのまま25℃の湿室に16時間保った後に、素寒天片を除去して25℃の温室に移した。

各菌株の侵入能および拡大能を明らかにするため、接

種7日後に形成された病斑の数と面積を調査した。病斑形成効率 (IE) は接種孢子数に対する形成病斑数の比として算出し、病斑面積 (LA) は病斑を楕円形とみなし、病斑の長さおよび幅をそれぞれ長径および短径として算出した。孢子形成能について調査するため、罹病植物をそのまま25℃の湿室に24時間 (12時間照明, 12時間暗黒) 保って孢子を形成させた。次いで葉面が乾いた時点で、1病斑ずつに素寒天片を押しつけて孢子を採集し、実体顕微鏡下で採取された孢子を計数し、単位病斑面積当たりの孢子形成数 (SP) を測定した。なお、全病斑の中で孢子形成の見られた病斑の比率を孢子形成病斑割合 (SLR) として算出した。1菌株につきトウモロコシ5個体を供試し、3反復した。

また、得られたデータについては、病原性に関わる上述の病斑形成効率、病斑面積、孢子形成病斑割合および孢子形成数の4形質について主成分分析を行い、病原性に基づいた採集地域による菌株の類別を試みた。

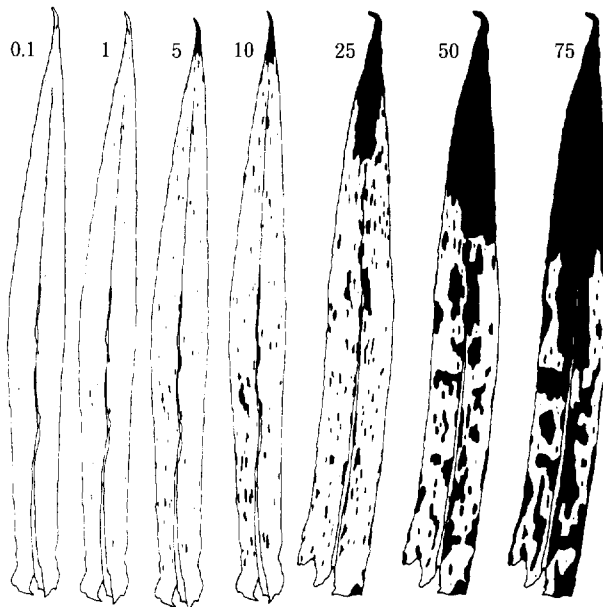


Fig. 1. Standard corn leaf diagrams illustrating various percentages infected by *B. maydis*. (Fry *et al.* (1983))

Disease rate ; 0 : no symptoms, 1 : 0.1% of leaf area diseased, 2 : 1%, 3 : 5%, 4 : 10%, 5 : 25%, 6 : 50%, 7 : 75%, 8 : whole leaf diseased and killed.

結 果

1. 菌株の分離および交配型

トウモロコシ罹病葉から Table 1 に示す 76 菌株を得た。また、全菌株が交配型 A あるいは a のいずれかの *B. maydis* 標準株と交配して子のう胞子を形成し、A 型が 43 菌株、a 型が 33 菌株で、両者の比はほぼ 4 : 3 であった (Table 1)。なお、両者はいずれの地域からも分離され、交配型の分布に地域間での差異は認められなかった (Fig. 2)。

2. レース検定

噴霧接種検定：供試菌株のレース T 判別の結果、WF9T×R2040 (T-cms) 上での罹病度は平均 4.9 (2.7~7.0) であり、WF9×R2040 (N-c) 上での平均罹病度 4.8 (2.7~7.0) とほぼ同じ値であった (Table 1)。菌株間の罹病度にはかなり大きな差異があったが、各菌株の T-cms と N-c 上の罹病度にはほとんど差がなかった (Fig. 3 A)。対照としたレース T 菌株 CIC2 は T-cms 上で強い病原性を示したが、N-c 上では弱い病原性しか示さなかった (Fig. 3B)。国内産菌株では T-cms に対する罹病度が N-c に比べて 1.0 以上高い値を示したのは BMZM 8351, 8367, 8381, 8383 の 4 菌株のみであったが、いずれも N-c に対しても強い病原性を示した。また、レース

C 判別でも、供試菌株は Mo17HiC (C-cms) および Mo17Hi (N-c) 上ではほぼ同等の病原性を示し (Fig. 3C)、C-cms 上での平均罹病度は 3.7 (1.7~7.0) で、N-c 上での平均罹病度 4.1 (2.3~5.8) とほぼ同じ値を示した。しかし、BMZM8358, 8373, 8390 の 3 菌株は C-cms 上での罹病度が N-c を 1.0 以上上回った。

毒素検定：対照としたレース T 菌株培養濾液の 10~1,000 倍のいずれの希釈濃度でも、WF9T×R2040 (T-cms) の葉身は激しく萎凋したが、WF9×R2040 (N-c) は 10 倍希釈濃度でも全く萎凋しなかった (Fig. 3D)。これに対し、国内産菌株を供試した場合、いずれの希釈濃度でも T-cms 系統の萎凋は全く認められず、噴霧接種検定で T-cms に対してやや強い病原性を示した 4 菌株も他の菌株と同様全く萎凋させることはなかった。また、C-cms に対してやや強い病原性を示した 3 菌株を含めて、国内産の菌株はいずれも C-cms 系統を萎凋させることはなかった。また、N-c 系統の葉身の萎凋はいずれの菌株でも全く認められなかった。

3. 病原力検定

供試菌株の病原力検定の結果を Table 2 に示した。菌株ごとに各形質をみると、病斑形成効率 (IE) は平均 0.90 (0.74~0.97) で、接種した胞子のうち平均して 90% が病斑を形成した。菌株間の差異も明瞭で、F 値も 1.58 ($P < 0.05$) と菌株間で IE に有意差が認められた。病斑面積 (LA) は平均 10.7 (7.1~13.6) mm² で、数値の上では菌株間差異は大きかったが、実験の反復ごとのふれも大きく、F 値は 1.26 と菌株間で有意差は認められなかった。胞子形成病斑割合 (SLR) は平均 0.67 (0.29~0.97) で、接種後 7 日で 90% 以上の病斑が胞子を形成した菌株から 30% 以下しか形成しなかった菌株まで、菌株間で大きな差異が認められ、F 値も 2.28 と 1% 水準で有意であった。単位病斑面積 (mm²) 当たりの胞子形成数 (SP) は平均 2.6 (0.2~7.3) で、菌株間で SP 値に 35 倍以上の開きがあり、F 値も 2.47 と 1% 水準で有意で、非常に大きな差異が認められた。また、仮に病原力を 1 胞子が次世代において形成する胞子数とするなら、

$$\text{病原力} = \text{IE} \times \text{LA} \times \text{SLR} \times \text{SP}$$

と表され、この値は菌株間で最小値 0.8, 最大値 70.2 と大きく異なった。

B. maydis 菌株の病原力差異を採集地域別にみると、北海道、東北・関東、中部・関西、九州の 4 地域間では IE, LA, SLR, SP いずれの形質でも菌株間のような差異は全く認められず、F 値も有意ではなかった (Table 3)。また、主成分分析の結果、主に胞子形成能力を表す合成変数 (第 1 主成分, 寄与率 51.7%) と主に侵入拡大

Table 2. Infection efficiency (IE), lesion area (LA), sporulating lesion ratio (SLR) and sporulation (SP) on corn seedlings of the *B. maydis* race O isolates collected in Japan^a.

Isolates	Origin	IE	LA	SLR	SP	Aggressiveness
8110	Miyazaki	0.95	9.0	0.87	5.8	43.1
8144	Tochigi	0.88	7.5	0.35	0.9	2.1
8208	Miyazaki	0.95	13.6	0.70	1.3	11.7
8221	Miyazaki	0.89	8.8	0.49	1.6	6.1
8234	Kagoshima	0.95	13.4	0.72	1.4	12.8
8257	Yamanashi	0.79	8.7	0.71	1.7	8.3
8273	Tochigi	0.82	9.9	0.82	1.1	7.3
8303	Miyazaki	0.94	12.0	0.75	2.2	18.6
8308	Hokkaido	0.95	10.7	0.52	1.4	7.4
8309	Hokkaido	0.87	11.0	0.84	3.8	30.5
8310	Hokkaido	0.91	8.1	0.46	1.0	3.4
8311	Hokkaido	0.88	13.2	0.78	2.9	26.3
8313	Hokkaido	0.94	12.7	0.90	5.9	63.4
8314	Hokkaido	0.87	11.4	0.97	7.3	70.2
8315	Hokkaido	0.92	11.7	0.56	1.3	7.8
8316	Shizuoka	0.88	10.8	0.72	1.9	13.0
8317	Kanagawa	0.92	11.6	0.39	0.2	0.8
8318	Kanagawa	0.94	11.7	0.64	2.1	14.8
8319	Kanagawa	0.97	10.8	0.34	0.7	2.5
8320	Fukushima	0.91	11.1	0.77	2.9	22.6
8321	Miyagi	0.86	9.0	0.46	1.4	5.0
8322	Miyagi	0.95	11.8	0.86	5.2	50.1
8323	Shizuoka	0.78	7.7	0.29	1.0	1.7
8324	Kyoto	0.95	9.1	0.71	1.2	7.4
8327	Nagano	0.97	9.7	0.30	0.4	1.1
8328	Nagano	0.92	11.6	0.74	4.1	32.4
8329	Nagano	0.97	9.0	0.49	0.9	3.8
8330	Hokkaido	0.89	9.3	0.67	1.6	8.9
8332	Nagano	0.90	12.0	0.84	5.5	49.9
8334	Yamaguchi	0.96	12.4	0.86	3.4	34.8
8335	Kumamoto	0.92	11.2	0.65	4.9	32.8
8343	Miyazaki	0.85	11.8	0.63	2.1	13.3
8344	Kagoshima	0.91	9.5	0.85	5.1	37.5
8347	Yamaguchi	0.94	10.5	0.91	2.4	21.6
8348	Yamaguchi	0.95	12.5	0.64	1.7	12.9
8350	Kumamoto	0.94	11.6	0.73	5.3	42.2
8351	Miyagi	0.91	9.0	0.72	4.1	24.2
8355	Tochigi	0.85	11.3	0.77	5.7	42.2
8356	Kumamoto	0.74	9.5	0.74	3.2	16.6
Avg.		0.90	10.7	0.67	2.7	20.8
F ratio ^b		1.58*	1.26	2.28**	2.47**	—

a : Ten spores were inoculated on the third leaf of corn seedlings of the inbred line, Pa91, using the single spore inoculation method. All the data were obtained 7 days after inoculation.

b : Asterisks indicate statistical significance. (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

IE : The ratio of the number of appeared lesions to that of inoculated spores.

LA : Lesion area (mm^2)

SLR : The ratio of the number of sporulating lesions to that of all the lesions.

SP : Sporulation (spores/ mm^2/day)

Aggressiveness = $\text{IE} \times \text{LA} \times \text{SLR} \times \text{SP}$

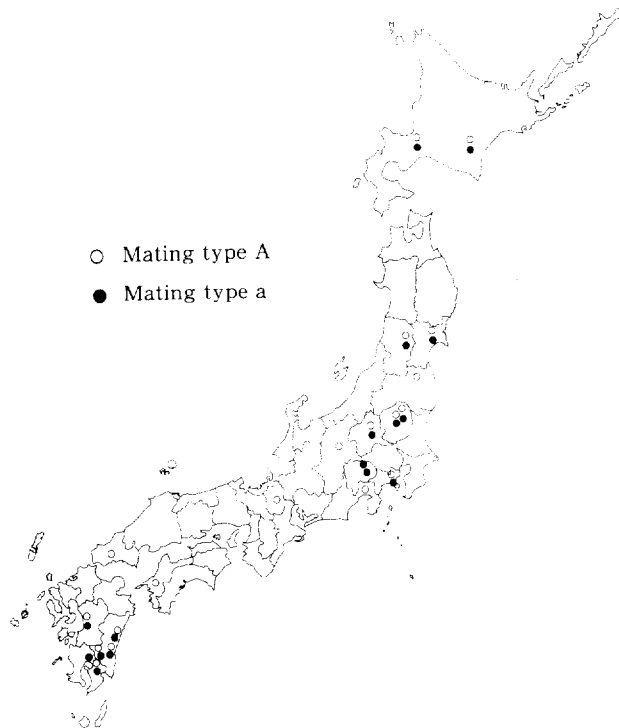


Fig. 2. Geographical distributions of the mating types of the isolates of *B. maydis* in Japan.

能力を表す合成変数（第2主成分，寄与率28.1%）を得た。これらの変数により供試菌株の類別を試みたが，採集地域等によるグループ化はできなかった（Fig. 4）。しかし，第1主成分では菌株間の差が大きく，どの採集地域の菌株であれ，総合的な孢子形成能力に大きな差異があることが示された。

考 察

1. 病原菌の同定およびレース判別

B. maydis の同定には，形態の他に標準菌株との交配能の確認が必要である。交配試験の結果，分離した76菌株のすべてが *B. maydis* 標準株と良好に交配した。従って，全菌株を *B. maydis* と同定した。また，Aおよびaの交配型の比率は4:3と等比に近かった。Leonard (1972) は，レースOの交配型の比率が1:1に近かったのに対して，レースTでは1:1からかけ離れていたことを示し，これはレースT発生の歴史がレースOに比べて新しいことと一致したとしている。日本でも本病の発生の歴史が長く，交配等を繰り返すうちに本来の交配型の比率である1:1に近づいたものと考えられる。

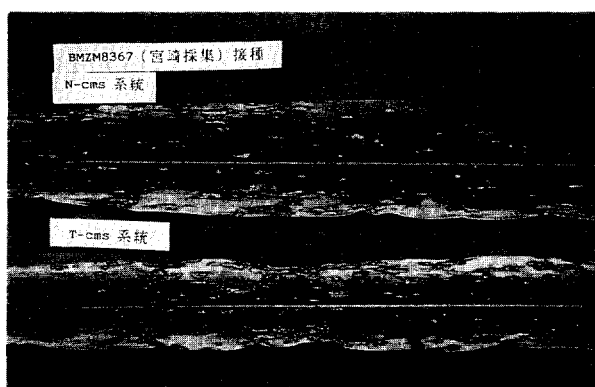
また，レースの噴霧接種検定の結果，国内産菌株はほとんどがT-cmsおよびN-c，C-cmsおよびN-cに対してそれぞれ同等の病原性を示し，細胞質の違いによる

病原性の差異はほとんどなかった。T-cms系統にやや強い病原性を示す菌株が幾つかあったが，いずれもN-cに対しても強い病原性を示した。このことはレースT菌株がT-cms系統に対しては強い病原性を示したが，N-cに対しては病原性が弱かったことと対照的である。本病菌のレースについてはレースOが各細胞質をもつ系統に対して同等の病原性を示し，レースTはT-cms以外の系統に対する病原性はレースOよりも弱いことが知られている（Leonard 1977, Klittich and Bronson 1986）。このことから国内産菌株はレースOと考えられた。

供試菌株の培養濾液が葉身に萎凋を引き起こすことを応用した毒素検定により，レースTは判別できる。この毒素検定の結果からも，国内産菌株はレースT菌株のような激しい萎凋を引き起こすことはなく，Tトキシンを産生していないことは明らかであった。このことから収集した国内産菌株はいずれもレースTではないと結論した。

Liuら（1986）はレースCの宿主特異的な毒素を発見し，葉の萎凋，根の伸長阻害等を引き起こすことを明らかにしている。国内産菌株がC-cms系統に対しても萎凋を全く引き起こさなかったことは，Cトキシンを産生していないことを示しており，国内産菌株はレースCではないと結論した。

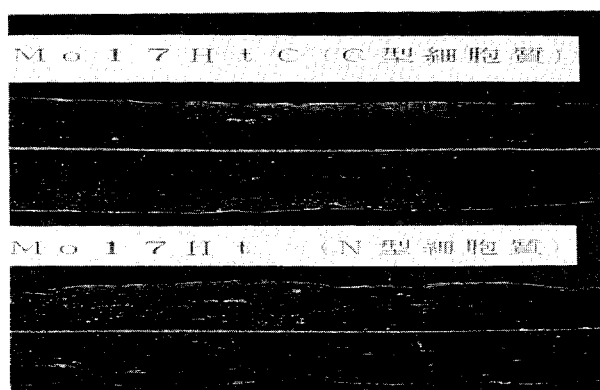
以上，いずれの細胞質を持つ系統にも同等の病原性を示したこと，毒素検定の結果T-cmsおよびC-cms系統の葉身に全く萎凋を引き起こさなかったことから，今回収集した国内産76菌株をすべてレースOと判別し，現在日本で発生している主要レースと推定した。レースOが日本で正式に同定されたのはこれが初めてである。レースOは宿主特異的な病原性はないが，レースTとは異なり，雄性不稔細胞質のトウモロコシ系統だけでなく通常の系統にも強い病原性を示すことが特徴である。このため，現在市販されているいずれのトウモロコシ品種に対してもある程度強い病原性をもち，気象条件によっては大発生する可能性がある。また，1970年代にレースTの発生が報告された長野および北海道からもレースT菌株が発見されなかったことから，日本でのレースTの分布頻度はかなり低下しているものと考えられた。しかし，菌は低密度であっても生存していると考えられるため，T-cms系統の大規模な栽培をすれば再び大発生する可能性は高い。レースCについては今回の調査では発見されなかったが，中国でかなり大規模に発生しており，いずれは発生するものと予想される。



A: Spore spray test.
Spores of the Japanese isolate (BMZM8367) were sprayed on the corn leaves; upper: WF9×R2040 (N-c), lower: WF9T×R2040 (T-cms)



B: Spore spray test.
Spores of the race T isolate (C1C2) were sprayed on the corn leaves; upper: WF9×R2040 (N-c), lower: WF9T×R2040 (T-cms)



C: Spore spray test.
Spores of the Japanese isolate (BMZM8367) were sprayed on the corn leaves; upper: Mo17HtC (C-cms), lower: Mo17Ht (N-c)



D: Leaf toxin assay.
O-N: A leaf of WF9×R2040 (N-c) was incubated with culture filtrate of the Japanese isolates (BMZM8367).
O-T: WF9T×R2040 (T-cms) and BMZM8367, as described above.
T-N: WF9×R2040 (N-c) and race T
T-T: WF9T×R2040 (T-cms) and race T

Fig. 3. The symptoms of the *B. maydis* isolates on the differential corn lines for race identification.

2. 菌株間および地域間の病原力差異

収集した日本産菌株はすべてレースOであったが、噴霧接種の結果からも各菌株の罹病度は大きく異なり、レースOの中でも菌株間に病原力差異があることは明らかであった。これらのことは、Nelsonら(1973)がレースTおよびレースO菌株間で病原力の差異を認めたことと一致する。この病原力差異を単孢子接種法によ

り検定した結果、侵入能および孢子形成能で明らかな差異を認めた。

病斑形成効率(IE)は病原菌の侵入頻度で、菌の侵入能を表す。供試した分離菌株はIE値が平均して0.90と高く、接種した孢子の多くが病斑を形成し、概して侵入能は高かった。さらに、菌株間のF値が有意であったことから、供試した菌株間で侵入能に差異が認められた。

Table 3. Differences of IE, LA, SLR and SP among the *B. maydis* race O isolates collected in different regions of Japan.

Origin (District)	Number of isolates	IE	LA (mm ²)	SLR	SP (spores/mm ²)
Hokkaido	8	0.90	11.0	0.71	3.2
Tohoku/Kanto	11	0.89	10.2	0.62	2.4
Chubu/Kansai	10	0.92	10.5	0.65	2.3
Kyusyu	10	0.90	11.0	0.71	3.3
F ratio (among Districts)		0.01 ^a	1.26 ^a	0.89 ^a	0.97 ^a

a : All the values were not significant. ($P < 0.05$)

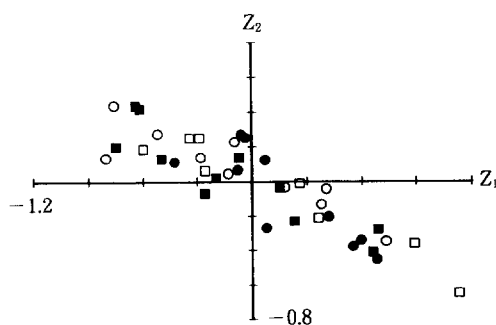


Fig. 4. Distribution of the first (Z_1) and second (Z_2) principal component based on the data of aggressiveness (IE, LA, SLR, SP) in 39 isolates of *B. maydis* race O.

□ : Hokkaido isolates, ■ : Tohoku and Kanto isolates, ○ : Chubu and Kansai isolates, ● : Kyusyu isolates.

The traits responsible for Z_1 component are SLR (0.61), SP (0.57), LA (0.51) and IE (0.22); for Z_2 component are IE (0.82), LA (0.36), SLR (-0.27) and SP (-0.36).

Hill ら (1981, 1983) も *B. maydis* レース T について、IE の菌株間差は明瞭で後代への遺伝率も高く、この形質は病原菌側の形質であるとしており、レース O を用いた本実験でも同様の結果であった。

病斑面積 (LA) は病原菌の拡大速度、すなわち菌の拡大能を示す。本実験では LA 値については、菌株間での F 値が有意ではなく、菌株間の差異は認められなかった。本病菌の宿主植物内での拡大能については、これまで病斑拡大速度が宿主側の抵抗性要因によって左右されることがレース T、レース O のいずれについても報告されており (Lim 1974, Burnette and White 1985)、国内産レース O を用いた本実験の結果はこれと一致した。

孢子形成に関わる形質すなわち孢子形成病斑割合 (SLR) および孢子形成数 (SP) の菌株間差異は、最も明瞭であった。孢子形成能は本病菌に限らず、数多くの菌

で菌株間差異の最も大きな形質とされており (Parlevliet 1979)、本実験の結果もこれと一致した。ここでは孢子形成数を培地上ではなく、植物体上で測定しているため、より自然条件に近い孢子形成能が観察されていると考えられる。しかし、SLR および SP のいずれも接種 7 日後の値のみを測定しており、一病斑の孢子形成開始から終了までを観察していないため、正確に病原菌の孢子形成能を反映していない可能性もある。

菌株間での病原力差異は明らかであったが、採集した地域間では病原力差異は認められなかった。採集地により北海道菌、東北・関東菌、中部・関西菌、九州菌の 4 グループに分けたが、これらの病原菌の侵入、拡大、孢子形成に関わるいずれの形質の値も同じで、F 値も有意ではなかった。また、これらの形質に基づく主成分分析を行った結果でも、各菌株を採集地域によりグループ化することはできなかった。したがって、地域によって *B. maydis* の病原力の強弱はないと推測された。但見ら (1985) はパンチ接種による数品種の反応の差異をもとに、西日本各地で採集した本病菌の病原性による類別を試みているが、本実験と同様に類別できないとしている。従って、国内産の *B. maydis* が明らかな病原力差異に基づく生態的に独立したグループを形成していることはないと推測された。しかし、このデータは全く同じ温度 (25°C)・光 (20,000~30,000 lux) 条件で得られたものであり、Jenns ら (1985) が低照度条件下で病原力差異による類別に成功しているように、環境条件によっては特定地域から採集された菌群が強い病原力を示す可能性はある。

以上の結果から、*B. maydis* の病原力には少なくとも菌株間で差異があることは明らかである。菌の病原力差異は抵抗性検定に際しては大きな問題であり、本菌を圃場接種しても病害の発生程度が低いなどの事例は、明らかに病原力の低い菌株の使用が原因と考えられる。従って、接種に際しては供試菌の病原力に十分留意する必要がある。

トウモロコシの抵抗性とごま葉枯病菌の病原力はいずれも量的形質であり、既に報告しているようにトウモロコシの抵抗性は主に病斑拡大時に働く (Tsukiboshi *et al.* 1992)。菌の病原力は本実験で明らかになったように、侵入および孢子形成時に主に働き、両者の発現段階は異なっているように見える。しかし、量的抵抗性系統上で何代か過ごした菌は病原力が高まるとの知見もあり (Kolmer and Leonard 1986)、宿主の量的抵抗性と病原菌の病原力とは相互に密接に関連している可能性がある。

謝 辞

本論文の御校閲を頂いた当試験場環境部長但見明俊博士、本病菌の標準菌株を分譲していただいた京都大学農薬研究施設助教授 津田盛也博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Arntzen, C.J., M.F. Haugh and S. Babick (1973): Induction of stomatal closure by *Helminthosporium maydis* pathotoxin. *Plant Physiol.* **52**: 569~574.
- Burnette, D.C. and D.G. White (1985): Inheritance of resistance to *Bipolaris maydis* race O in cross derived from nine resistant inbred lines of maize. *Phytopathology* **75**: 1195~1200.
- Fry, W.E., O.C. Yoder and A.E. Apple (1983): Influence of naturally occurring marker genes on the ability of *Cochliobolus heterostrophus* to induce field epidemics of southern corn leaf blight. *Phytopathology* **74**: 175~178.
- Hill, J.P. and R.R. Nelson (1981): The heritability of three parasitic fitness attributes of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology* **72**: 525~528.
- Hill, J.P. and R.R. Nelson (1983): Genetic control of two parasitic fitness attributes of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology* **73**: 455~457.
- Hooker, A.L., D.R. Smith, S.M. Lim and J.B. Beckett (1970): Reaction of corn seedlings with male-sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis*. *Plant Dis.* **54**(8): 708~712.
- Jenns, A.E. and K.J. Leonard (1985): Effects of temperature and illuminance on resistance of inbred lines of corn to isolates of *Bipolaris maydis*. *Phytopathology* **75**: 274~280.
- 梶原敏宏 (1971): トウモロコシごま葉枯病と雌性不稔. *植物防疫* **25**: 271~274.
- Karki, C.B. and E.L. Sharp (1986): Pathogenic variation in some isolates of *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* on barley. *Plant Dis.* **70**: 684~687.
- Klittich, C.J.R. and C.R. Bronson (1986): Reduced fitness associated with TOX1 of *Cochliobolus heterostrophus*. *Phytopathology* **76**: 1294~1298.
- Kolmer, J.A. and K.J. Leonard (1986): Genetic selection and adaptation of *Cochliobolus heterostrophus* to corn hosts with partial resistance. *Phytopathology* **76**: 774~777.
- Leonard, K.J. (1972): Association of mating type and virulence in *Helminthosporium maydis*, and observations on the origin of the race T population in the United States. *Phytopathology* **63**: 112~115.
- Leonard, K.J. (1977): Virulence, temperature optima, and competitive ability of isolines of races T and O of *Bipolaris maydis*. *Phytopathology* **67**: 1273~1279.
- Lim, S.M. (1974): Diallel analysis for reaction of eight corn inbreds to *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology* **65**: 10~15.
- Liu, K.M., P. Luo, A.G. Liu, J.K. Wei and R.J. Cui (1986): The responses of *Zea mays* with different male-sterile cytoplasm to infection of *Helminthosporium maydis* in our country and their prospects in application. *Acta Agric. Boreali Sin.* **1**: 33~40.
- Mason, L. and M.S. Zuber (1972): 1971 results of inter-regional and regional corn leaf blight ratings. *Plant Dis.* **56**: 485~489.
- Moore, W.F. (1970): Origin and spread of southern corn leaf blight in 1970. *Plant Dis.* **54**: 1104~1108.
- 成田武四・大高 優 (1973): 特異な病原性を示すトウモロコシごま葉枯病菌について. *北日本病害虫研報* **24**: 64.
- Nelson, R.R. (1957): Heterothallism in *Helminthosporium maydis*. *Phytopathology* **47**: 191~192.
- Nelson, R.R., J.E. Ayers, H. Cole, L.B. Massie and L. Forer (1973): Distribution, race frequency, virulence, and mating type of isolates of *Helminthosporium maydis* in the northwestern United States. *Plant Dis.* **55**: 495~498.
- Parlevliet, J.E. (1979): Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Ann. Rev. Phytopathol.* **17**: 203~222.
- Payne, G.A. and O.C. Yoder (1977): Effect of the nuclear genome of corn on sensitivity to *Helminthosporium maydis* race T-toxin and on susceptibility to *H. maydis* race T. *Phytopathology* **68**: 331~337.
- Payne, G.A., H.W. Knoche, Y. Kono and J.M. Daly (1980): Biological activity of purified host-specific pathotoxin produced by *Bipolaris (Helminthosporium) maydis*, race T. *Physiol. Plant Pathol.* **16**: 227~239.
- Sleesman, J.P., O.P. Larsen and J. Safford (1974): Maintenance of stock cultures of *Helminthosporium maydis* (races T and O). *Plant Dis.* **58**: 334~336.
- Tagtmeier, K.J., J.M. Daly and O.C. Yoder (1981): T-toxin production by near-isogenic isolates of *Cochliobolus heterostrophus* races T and O. *Phytopathology* **72**: 1492~1495.
- 但見明俊・安藤則明・寺中理明 (1985): トウモロコシごま葉枯病抵抗性の温室内検定. III. 西日本各地で採集したトウモロコシごま葉枯病菌の病原性比較. *草地試研報* **31**: 68~72.
- 月星隆雄・佐藤 徹 (1986): トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* Shoem. の分生孢子の形態および病原力に及ぼす光の影響. *草地試研報* **33**: 50~56.
- Tsukiboshi, T., H. Koga and T. Uematsu (1992): Components of partial resistance to southern corn leaf blight

caused by *Bipolaris maydis* race O in six corn inbred lines.
Ann. Phytopath. Soc. Japan 58(4) : 528~533.
Wei, J., K. Liu and J. Chen (1988) : Pathological and physio-

logical identification of race C of *Bipolaris maydis* in
China. Phytopathology 78 : 550~554.

Identification of Pathogenic Races of *Bipolaris maydis* Occurring in Japan and Differences in Their Aggressiveness

Takao TSUKIBOSHI, Hironori KOGA and Tsutomu UEMATSU

Department of Environment, National Grassland Research Institute,
Nishinasuno, Tochigi, 329-27 Japan

(Received August 15, 1994)

ABSTRACT

All the isolates obtained from corn leaves infected with southern leaf blight that were collected from various regions of Japan were assigned to *Bipolaris maydis* (NISIK. et MIYAKE) SHOEM. on the basis of their morphology and cross fertility. All the *B. maydis* isolates were equally virulent to corn lines with T-cms, C-cms and N type cytoplasm based on spore-spraying inoculation tests. None of the culture filtrates of the isolates caused wilting of leaves of lines with T-cms and C-cms and no host-specific toxin was detected. As a results, all the Japanese isolates were assigned to race O.

Four components of aggressiveness, i.e. infection efficiency, lesion area, sporulating lesion ratio and sporulation, of 39 isolate of *B. maydis* race O were analyzed using the single-spore inoculation method in corn seedlings of the susceptible inbred line, Pa91. There were distinctive differences in the infection efficiency and sporulation among the isolates, but no difference was detected in their ability of lesion enlargement. However, the components of aggressiveness did not differ among the regions where the isolates were collected. It was concluded that the Japanese isolates could not be separated into different groups based on the four components of aggressiveness as a result of principal component analysis.

Tsukiboshi, T., H. Koga and T. Uematsu (1995) : Identification of pathogenic races of *Bipolaris maydis* occurring in Japan and differences in their aggressiveness. Bull. Natl. Grassl. Res. Inst. 51 : 12~22.

Key words : corn, *Bipolaris maydis*, race, aggressiveness