

野生 *Setaria* 属植物であるエノコログサおよびアキノエノコログサから
分離された日本産いもち病菌の
分類学的位置付けおよび生態学的諸性質に関する研究

Taxonomic and ecological studies on *Pyricularia* isolates
from wild foxtails, green foxtail and giant foxtail, in Japan

山頭 亜紀子

2009

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 日本において採集されたエノコロおよびアキノ菌の分類学的位置付け の検討	8
2-1. 目的	8
2-2. 材料および方法	11
2-1-1. 供試菌株	11
2-1-2. 交配能検定	11
2-2-3. PCR-RFLP 分析	14
2-2-4. 病原性検定	15
2-2-5. scRFLP 分析に基づくデンドログラムの作成	16
2-3. 結果	17
2-3-1. エノコロおよびアキノ菌の交配能	17
2-3-2. PCR-RFLP 分析による種識別	17
2-3-3. 各種イネ科植物に対するエノコロおよびアキノ菌の病原性	18
2-3-4. scRFLP 分析に基づく系統学的解析	22
2-4. 考察	25
第 3 章 日本において採集されたエノコロおよびアキノ菌の DNA フィンガー プリント分析に基づく集団解析	29
3-1. 目的	29
3-2. 材料および方法	31
3-2-1. 供試菌株	31

3-2-2.	DNA フィンガープリント分析	36
3-2-3.	交配能検定	36
3-3.	結果	36
3-3-1.	DNA フィンガープリント分析に基づくエノコロおよびアキノ菌の 集団構造	37
3-3-2.	エノコロおよびアキノ菌の交配能	45
3-4.	考察	45

第 4 章	エノコログサおよびアキノエノコログサの種子に感染したいもち病菌 の野外における越冬	52
4-1.	目的	52
4-2.	材料および方法	53
4-2-1.	供試種子の増殖および菌株の接種	53
4-2-2.	越冬調査地点における播種および植物体の育成	54
4-2-3.	供試菌株の分離	55
4-2-4.	DNA フィンガープリント分析	58
4-3.	結果	58
4-3-1.	2006 年の育苗期間、採種圃場におけるいもち病の発生、ならびに、 増殖種子中の保菌種子率	58
4-3-2.	播種地点における 2007 年のいもち病の発生	59
4-3-3.	2006 年の保菌種子および 2007 年の罹病葉から分離したいもち病菌 におけるハプロタイプの分布	59
4-3-4.	ハプロタイプ間の類縁関係	61
4-4.	考察	62

第5章 総合考察	71
引用文献	79
謝辞	88
要旨	90
Abstract	92

第1章 緒言

イネ科植物いもち病菌(*Pyricularia* spp.)は、イネ(*Oryza sativa* L.)、アワ[*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]、シコクビエ[*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.] およびコムギ(*Triticum aestivum* L.)などの栽培植物や、エノコログサ[*S. viridis* (L.) Beauv.]、アキノエノコログサ(*S. faberii* Herm.)およびメヒシバ[*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.]などの野生植物を含む多くのイネ科植物で感染が認められている。イネ科植物から分離されたいもち病菌については、*Magnaporthe grisea* およびその不完全世代名である *Pyricularia grisea* が学名として一般的に用いられてきた(Barr et al. 1977; Rossman et al. 1990)。本学名はメヒシバいもち病菌を基準種とするものであるが、Couch および Kohn(2002)はイネを始めとする幾つかのイネ科植物から分離されたいもち病菌については、メヒシバいもち病菌とは別種にすべきと主張した。そして、彼らは、これらいもち病菌に完全世代名 *M. oryzae*、および、不完全世代名 *P. oryzae* とする新学名を与えた。その後、この新学名については、イネを始めとする多くのイネ科の栽培植物種ならびにそれらの近縁種はいもち病菌で正当性が認められている(Tosa et al. 2004; Hirata et al. 2007)。すなわち、現在では、イネ科植物いもち病菌には主に種として、メヒシバいもち病菌である *M. grisea* (*P. grisea*)、およびイネいもち病菌を中心とした *M. oryzae* (*P. oryzae*)の2つが含まれるとされている。また、*M. oryzae* は極めて寄生性分化が進んだ菌として知られ、それぞれの分離宿主に対して寄生特異性を示し、かつ、遺伝的にも分化した pathotype(病原型)が存在する(Kato et al. 2000; Tosa et al. 2004)。現在までのところ、少なくともイネ、アワ、キビ(*Panicum miliaceum* L.)、シコクビエ、コムギ、ペレニアルライグラス(*Lolium perenne* L.)のいもち病菌については、pathotype として類別可能とされ、それぞれ *Oryza*、*Setaria*、*Panicum*、*Eleusine*、*Triticum*、*Lolium* pathotype とすることが提唱されている(Kato et al. 2000; Tosa et al.

2004)。さらに、イネいもち病菌については、宿主の品種に対して寄生性が分化した多様なレースが存在する。なお、本論では混乱を避けるため、以降、菌の名称を「イネいもち病菌」のように、分離宿主の一般名称とともに表記した。また、pathotype は異なる宿主種から得られた同一の寄生特異性を示すグループを表現する用語として用いた。たとえば、シコクビエいもち病菌とオヒシバいもち病菌はそれぞれ分離宿主の種が異なるが、シコクビエに対する特異的病原性から *Eleusine* pathotype に分類されている(Kato et al. 2000; Tosa et al. 2004)。そこで、これら菌をグループとして論じる場合は *Eleusine* pathotype、分離宿主の異なる個別の菌として論じる場合には、シコクビエいもち病菌およびオヒシバいもち病菌と記述する。

上記の通り *M. oryzae* の宿主には様々なイネ科植物が含まれるが、中でもイネは最も重要な栽培植物の一つであり、かつ、そのいもち病はイネに深刻な被害をもたらす病害として恐れられてきた。そのため、防除の重要性から、イネいもち病菌については生態学的研究が精力的に進められており、既に莫大ともいえる知見の集積がある。一方、他の分離宿主の菌については、生態学的情報が極めて乏しいのが現状となっている。その要因としては、コムギおよびペレニアルライグラスを除くと、*M. oryzae* の宿主は雑穀等の経済的価値の低いものが多く、それらのいもち病菌については生態学的研究の対象となりにくかったことが挙げられる。さらに、本菌の宿主には野生植物も多く含まれるが、同様の理由によりこれらの菌の生態に関する研究はこれまでほとんど行われていない。このような知見の偏りは、イネいもち病菌の生態学的諸性質の解明の障壁となっている。例えば、イネいもち病菌ではレース変動などのメカニズムの解明に、分子マーカーを利用した個体識別法が取り入れられてきた(Chen et al. 1995; Don et al. 1999a, b; Kumar et al. 1999; Levy et al. 1991, 1993; Xia et al. 1993, 2000; Park et al. 2003, 2008; Roumen et al. 1997; Zeigler et al. 1995; Suzuki et al. 2006, 2007;

Brondani et al. 2000; Correll et al. 2000; George et al. 1997)。特に、イネいもち病菌からはトランスポゾン因子に由来する各種散在型反復配列が単離されている (Dobinson et al. 1993; Hamer et al. 1989; Kachroo et al. 1994, 1995; Leong et al. 1994; Nakayashiki et al. 2001; Farman et al. 1996a)。これらをプローブとした DNA フィンガープリント分析は本菌の生態に新規知見をもたらしてきた。このような研究では、菌株間で得られた DNA フィンガープリントパターンの比較から遺伝的類縁度を算出し、平均距離法に基づくデンドログラムの作成が一般的に行われる。このような手法により、これまで幾つかの地域や国のイネいもち病菌の菌株集団について解析がなされた結果、それぞれの地域および国の菌株集団には祖先菌株からクローナルに増殖したと考えられるサブ集団、すなわち、リネージが存在すること、さらに一部の例を除き、これら地域・国の菌株集団の多くはリネージ構成が比較的単純であることが明らかとなっている (Chen et al. 1995; Don et al. 1999a, b; Kumar et al. 1999; Levy et al. 1993; Park et al. 2003, 2008; Roumen et al. 1997; Zeigler et al. 1995; Xia et al. 1993)。近代育種の発達以降、イネ栽培地域では相次ぐ新規抵抗性品種の導入や単一品種の広域における栽培が行われるようになった。これにより、イネいもち病菌の集団では、ボトルネック効果が働き、集団の遺伝的多様度が減少したと推定されている (Couch et al. 2005)。また、実際に日本では抵抗性品種の導入によるいもち病菌の大量絶滅により、過去、リネージの減少が生じたことが予想されている (Don et al. 1999a; Sone et al. 2007)。しかしながら、このような品種更新等の人為的選択圧がリネージ構成の単純化を引き起こしたとする仮説は、異なる視点からの検証が必要となる。つまり、近代育種や大規模な商業栽培の行われていない雑穀、さらには、野生植物については、イネのような集団の単純化にさらされておらず、遺伝的に異なる多様な品種あるいは系統が集団中で維持されていると推論できる。したがって、もし、上記仮説が正しいのであれば、これら植物のいもち病菌については、菌株集団

のりネージ構成が多様となるはずである。また、イネいもち病菌では伝染環の解明に向けた研究が行われており、これら研究成果はイネいもち病の防除に大きく貢献してきた(栗林 1928; 鈴木・藤田 1977; Lamey 1970; Manandhar et al. 1998; Sesma and Osbourn 2004)。イネいもち病の第一次伝染源の一つはいもち病菌が感染した種子(以下、保菌種子)であり、その種子が発芽して苗に菌が感染し、その苗が持ち込まれることにより本田での初発が起こると考えられている(栗林 1928)。また、本菌は、被害わらにおいても越冬可能であり屋内の乾燥条件であれば胞子は約1年、菌糸は約4年生存できることが報告されているが(栗林 1928)、近年わらを農業資材として利用する機会が少なくなり、伝染源として無視できる対象となっている。しかしながら、これら研究の多くは保菌種子および被害わらが収穫物あるいは農業資材として冬場屋内に保存されることを前提に行われており、種子や被害わらに感染したいもち病菌の野外における越冬について検討された例が極めて少ない。さらに、イネいもち病菌については、確たる証拠も無いまま、野外における菌の越冬については不可能とする見解が一般的となってしまう。一方、野生植物のいもち病菌については、植物体が冬場に屋内で保管される状況に無いため、必ず野外で越冬していると推論される。もし、野生植物のいもち病菌が野外での越冬が可能であることを証明できれば、イネいもち病菌についても同様の可能性を検討する必要があることを明示できると考えられる。

このような背景の下、本研究はこれまであまり生態学的研究がなされていない、イネ以外の分離宿主のいもち病菌について、その生態学的諸性質の解明を目的として行われた。また、その研究対象としては、エノコログサおよびアキノエノコログサから分離されるいもち病菌を選択した(Fig. 1)。なお、本論では、これら菌をエノコロおよびアキノ菌と省略して以下記述する。両宿主植物種は栽培植物であるアワと同じ *Setaria* 属に含まれる野生植物であり、アワと極めて

A



B



Fig. 1. *Setaria viridis* (A) and *S. faberii* (B).

近縁なことが知られている。すなわち、エノコログサは、アワの直接の祖先植物種であると考えられており、アキノエノコログサは、エノコログサと未知の *Setaria* 属植物との交雑種であると考えられている(Dekker 2003)。つまり、エノコログサのゲノム構成はアワと同じ2倍体($2x = 18$)であるが、アキノエノコログサは4倍体($4x = 36$)となっている(Dekker 2003)。*Setaria* 属には栽培種および野生種を含め、約125種が報告されているが、エノコログサおよびアキノエノコログサはこれらの中でも最も普遍的な野生種であり、亜熱帯・温帯を中心に世界各国に分布する(Dekker 2003)。また、両種とも強害草としても知られ、畑地、水田の畦畔、宅地、公園さらには街路樹の植え込み等、農業地帯から都会に到るありとあらゆる場所に自生し、時として大群落を形成する。これら植物のいもち病については古くから経験的に発生が知られており、野外で頻繁に目にすることができる。そのため、栽培がほとんど行われていない雑穀の菌や経験的に稀にしか発生しないと考えられるオヒシバ等の野生植物のいもち病菌よりも菌株採集を容易に行うことができる利点がある。すなわち、イネいもち病菌を除けば、日本の広域から体系的に菌株の採集ができる唯一のイネ科植物いもち病菌となっている。本研究では、先ず、これらの野生植物のいもち病菌について、分類学的位置付けの検討を行った(第2章)。すなわち、本研究の最終的な目標は、これら野生植物のいもち病菌で得られた知見や研究成果をイネいもち病菌の生態解明に向けた研究に還元することにある。このため、イネいもち病菌との種の同異は極めて重要な確認事項となり、研究を始めるに当たり先ず検討する課題とした。エノコロおよびアキノ菌を含め、雑穀や野生植物のいもち病菌の分類については、これら宿主植物がイネいもち病菌の二次宿主となり得るかといった観点からこれまで研究が進められてきた(Borromeo et al. 1993; 加藤・山口 1980; Levy et al. 1993; 生井ら 1996; 八重樫 1981; Mackill 1986)。そのため、これらの分類を扱った先行研究では、雑穀や野生植物のいもち病菌はイネいもち病

菌との比較対象に過ぎず、主な研究目的となっていないため、イネいもち病菌以外の分離宿主の菌については供試菌株数が極めて少数となっている。エノコロおよびアキノ菌については、エノコロ菌で分類学的な検討が既に行われており、本菌はアワいもち病菌と近縁であり、*Setaria* pathotype に類別されることが予想されている(Nishikado 1912; Kato et al. 2000)。しかしながら、これら研究についても供試菌株数が限られており、本菌の分類学的位置付けに関する結論がエノコロ菌の母集団全体に適用できるかについては、疑問が残る。また、冒頭で述べた通り、Couch および Kohn(2002)によりイネいもち病菌で学名変更が論じられたのは最近のことであり、彼らの報告以降で、これら菌を扱った分類の研究は行われていなかった。そのため、新学名 *M. oryzae* を適用できるかについても、検討する必要性が生じていた。さらに、アキノエノコログサについてはいもち病の発生が頻繁に認められるものの、本病自体に文献上の記載が無く(岸 1998)、菌の分類についても研究例は皆無となっていた。エノコロおよびアキノ菌の生態学的諸性質については、第3章および第4章で扱った。第3章では、これらいもち病菌の菌株集団内における遺伝的多様性をDNAフィンガープリント分析によるリネージ識別を通じて検討した。また、供試菌株集団としては、日本各地から広域に採集した菌株集団、さらには、極めて限られた面積から採集された局所集団を用いて行った。また、第4章では、種子に感染したエノコロおよびアキノ菌の野外における越冬の成否について検討を行った。これら研究結果をイネいもち病菌で既に得られている知見と照らし合わせて考察を行い、*M. oryzae* の生態学的諸性質に関して野生植物(エノコログサおよびアキノエノコログサ)の菌であることにより生じる特性、裏を返せば、栽培植物(イネ)の菌であることによる特性の解明を試みた。さらに宿主が野生種および栽培種である場合の菌の進化的傾向の違いについて考察を行った。

第2章 日本において採集されたエノコロおよびアキノ菌の分類学的位置付けの 検討

2-1. 目的

本章では、エノコロおよびアキノ菌の分類学的位置付けについて検討を行った。これまで、イネ科植物から分離されたいもち病菌については、*M. grisea* およびその不完全世代名である *P. grisea* が学名として一般的に用いられてきた。本学名はメヒシバいもち病菌を基準種とするものであるが、近年、イネを始めとする幾つかのイネ科植物から分離されたいもち病菌については、メヒシバいもち病菌とは別種にすべきとの主張がなされている。すなわち、Couch および Kohn(2002)は、これらいもち病菌に完全世代名 *Magnaporthe oryzae*、および、不完全世代名 *Pyricularia oryzae* とする新学名を与えた。これら菌の分類については、この新学名は正当性が認められつつあり、特に、イネいもち病菌については近年、多くの研究者がこの新学名を採用している。エノコロおよびアキノ菌では、学名を含めた分類学的位置付けに関する研究はエノコロ菌のみについて行われてきた(Asuyama 1963; Kato et al. 2000; Tosa et al. 2004; Nishikado 1917)。Nishikado(1917)は、エノコログサおよびアワを含む6つの植物種から分離されたいもち病菌の菌株について宿主範囲および形態を比較した。その結果、エノコログサおよびアワから分離された菌株はアワに特異的な病原性を示した。そこで、これら菌を *P. setariae* とすることを提案した。一方、Asuyama(1963)は、イネ科植物から分離されたいもち病菌は一般に形態が類似していることに着目し、エノコログサを含むイネ科植物の菌は同一種として単一の学名を用いるべきであると主張した。また、先命権に従えば、これら菌の学名には、最も早くに提案された *P. grisea* が妥当であるとした。Kato(2000)らは、イネ科、タケ科(原文で

は Bambusideae)、シヨウガ科から分離されたいもち病菌計 85 菌株について、シコクビエ、アワ、キビ、イネ、メヒシバ、イタリアンライグラスおよびウィーピングラブグラス[*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees.]を判別植物種とした接種実験を行った。その結果、これら判別植物に対して特異的な病原性を示すグループが供試菌株中に見出された。そこで、これらグループを pathotype に類別することを提唱した。また、各 pathotype には各判別植物種を原宿主とするいもち病菌に加え、判別植物種に近縁の植物種のいもち病菌が含まれていた。たとえば、Kato(2000)らの研究ではエノコロ菌が 3 菌株含まれていたが、これらはアワいもち病菌とともに *Setaria* pathotype(アワ病原型)に類別された。さらに、Kato(2000)らはシコクビエいもち病菌 G10-1 菌株のゲノミックライブラリーからランダムに単離された複数のシングルコピー-DNA 配列をプローブとした RFLP(以下、scRFLP)分析を行い、RFLP データから供試菌株のデンドログラムを作成した。その結果、イネ科植物のうち、栽培種ならびにそれらの近縁野生種から分離されたいもち病菌株はデンドログラム中で単一のクラスターを形成した。そこで、このクラスターに含まれる菌株は単一のグループを形成すると考え、このグループを栽培植物寄生菌群[CC(Cultivated cereals)菌群]と命名した。また、同デンドログラムには上記の pathotype によるグルーピングと一致したクラスターが見出された。例えば、エノコロ菌は栽培植物寄生菌群のクラスター内に分岐し、アワいもち病菌とともに 1 つのサブクラスターを形成した。Tosa ら(2004)は、Kato ら(2000)の供試菌株から各 pathotype を代表できるような菌株を選び、これら菌株について Couch および Kohn (2002)により提案された新学名 *M. oryzae* の適用可否について検討を行った。Tosa ら(2004)は主にこの検討を Couch および Kohn (2002)により開発された PCR-RFLP によるいもち病菌の種の判別方法により行った。この判別法は、供試菌株のゲノムから β -tublin 遺伝子の増幅を行い、その後増幅断片を *Hpa* により切断して得られる切断断片の多型を基準として行う

ものである。本法では、*M. oryzae* の増幅産物からは *Hpa* 切断により 2 つの断片(188 および 362bp)が検出され、一方、*M. grisea* および *P. grisea* を含む、*Magnaporthe / Pyricularia* の他種の増幅産物は、*Hpa* により切断されず 1 つの断片が検出される。したがって、この PCR-RFLP 診断法は *M. oryzae* の同定に有用であることが示されていた。Tosa ら(2004)は、この判別方法を用いることにより、Kato ら(2000)により提唱された栽培植物寄生菌群が *M. oryzae* に対応することを明らかにした。さらに、栽培植物寄生菌群と *M. oryzae* との対応はリボソーム RNA 遺伝子の ITS(以下、rDNA-ITS)領域の塩基配列の比較に基づく系統解析によっても支持された。また、Tosa ら(2004)はこの研究でアワいもち病菌のみを *Setaria pathotype* の代表として供試していたが、アワいもち病菌も *M. oryzae* として類別可能であることを見出した。さらに、先の Kato ら(2000)の研究でエノコロ菌は栽培植物寄生菌群に類別されたことを考え併せると、エノコロ菌も *M. oryzae* であることが類推される。一方、これら先行研究例はエノコロ菌自体の分類に焦点を当てたものでなく、供試されたエノコロ菌は他のイネ科植物いもち病菌の分類学的位置付けを検討するための参照として付加されていたに過ぎない。そのため、これら研究における供試菌株数は多くとも 3 に留まっており、さらには、アキノ菌については分類学的研究に供試された例は皆無となっている。したがって、エノコロおよびアキノ菌の分類学的位置付けについて、断定的な結論を下すには、多数の菌株を供試した、詳細な検討が必要と考えられた。

本章では、これら菌の分類学的位置付けに明確な結論を下すことを目的として、以下の検討を行った。すなわち、日本の両菌の集団構成を代表できるよう広範囲から採集された両菌の菌株を供試し、これら菌株と他の植物から採集されたいもち病菌、特に、アワ菌との類縁関係の解析、さらには、新学名 *M. oryzae* の適用可否を検討した。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 供試菌株

供試菌株としてエノコロ菌 15 菌株、アキノ菌 13 菌株、および、イネ科植物 11 種、すなわち、イネ、アワ、キビ、シコクビエ、コムギ、エンバク(*Avena sativa* L.)、ペレニアルライグラス、トールフェスク(*Leersia oryzoides*), メヒシバ, ブッフエルグラス(*Cenchrus ciliaris*)およびササ(*Sasa* sp.)から分離されたいもち病菌 22 菌株を用いた (Table 1)。エノコロおよびアキノ菌のうち、菌株名の先頭に符号“SA05-”のある菌株は、2005 年に日本の 13 県で採集された罹病葉から、当研究室で Kusaba ら(2006)の方法に従い単孢子分離により得られたものである。また、エノコロ菌 KANSV1-4-1 および NI913 の 2 菌株は、神戸大学より分譲されたものである。また、他のイネ科植物から採集された菌については、アワいもち病菌 4 菌株(NRSI3-1-1, NNSI3-2-1, IN77-16-1-1 および IN77-20-1-1)を除く 18 菌株は、先の研究(Tosa et al. 2004)において、rDNA-ITS 領域の塩基配列に基づく系統学的解析および PCR-RFLP による種の判別法(Couch and Kohn, 2002)により学名の検討がなされ、その結果、イネ、アワ、キビ、シコクビエ、コムギ、エンバクおよびペレニアルライグラスから分離されたいもち病菌 14 菌株は、*M. oryzae* であることが報告されている(Tosa et al. 2004)。したがって、本研究では、これら 14 菌株を *M. oryzae* の基準菌株として用いた。

2-2-2. 交配能検定

エノコロおよびアキノ菌(SA05 菌株)、各 13 菌株について *M. oryzae* との交配能を調査した。これら被検定菌と、雌雄両性かつ高い捻性を示す Y93-164a-1

Table 1 *Pyricularia* isolates used in this study.

Host	Isolate	Locality	Source ^a	Year	Mating characteristics ^b			sc-RFLP PCR-			
					Tester	Perithe- cium	Asco- spore	Mating type	type	RFLP type ^c	
<i>Setaria viridis</i> (green foxtail)	SA05-6	Saga, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
	SA05-40	Hyogo, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	1	+	MATI-2	A	+	
	SA05-43	Nagasaki, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	B	+	
	SA05-56	Nagasaki, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	±	-	MATI-2	A	+	
	SA05-59	Kanagawa, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
	SA05-63	Kanagawa, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	2	+	MATI-1	A	+	
	SA05-68	Ibaraki, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
	SA05-75	Chiba, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	±	-	MATI-2	A	+	
	SA05-84	Saga, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
	SA05-134	Miyagi, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
	SA05-138	Miyagi, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	C	+	
	SA05-144	Kyoto, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	D	+	
	SA05-149	Siga, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	E	+	
	KANSVI-4-1	Kanagawa, Japan	2	1975	G10-1/Z2-1	0	-	ND	A	+	
	NI913	Chiba, Japan	2	1974	G10-1/Z2-1	1	+	MATI-1	A	+	
	<i>S. faberii</i> (giant foxtail)	SA05-3	Saga, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+
		SA05-37	Oita, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+
		SA05-51	Nagasaki, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	1	+	MATI-2	F	+
		SA05-62	Kanagawa, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+
		SA05-71	Ibaraki, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+
SA05-86		Saga, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
SA05-101		Oita, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	2	-	MATI-1	A	+	
SA05-109		Kumamoto, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
SA05-117		Ehime, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
SA05-124		Ehime, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	±	-	MATI-2	A	+	
SA05-126		Kochi, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
SA05-130		Kochi, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
SA05-148		Kyoto, Japan	1	2005	Y93-164a-1/F1-63	0	-	ND	A	+	
<i>S. italica</i> (foxtail millet)		GFS11-7-2	Gifu, Japan	2	1977	G10-1/Z2-1	3	+	MATI-2	G	+ ^d
	NRS12-2-2	Nara, Japan	2	1977	G10-1/Z2-1	3	+	MATI-2	H	+ ^d	
	NRS13-1-1	Nara, Japan	2	1977	G10-1/Z2-1	3	+	MATI-2	G	+	
	NNS13-2-1	Nagano, Japan	2	1984	G10-1/Z2-1	3	+	MATI-1	I	+	
	IN77-16-1-1	Mysore, India	2	1977	G10-1/Z2-1	2	+	MATI-1	J	+	
	IN77-20-1-1	Mysore, India	2	1977	G10-1/Z2-1	2	+	MATI-1	J	+	

Table 1. Continued.

Host	Isolate	Locality	Source ^a	Year	Mating characteristics ^b	Perithe- cium	Ascus spore	Mating type	sc-RFLP PCR-		
									Tester	type	RFLP type ^c
<i>Oryza sativa</i> (rice)	Ken53-33	Aichi, Japan	2	1953	Br48/Br116.2	1	+	+	MAT1-2	K	+ ^d
	1836-3	Niigata, Japan	2	1976	G10-1/Z2-1	±	+	+	MAT1-2	L	+ ^d
<i>Panicum miliaceum</i> (common millet)	NNPM1-2-1	Nagano, Japan	2	1983	G10-1/Z2-1	3	+	+	MAT1-2	M	+ ^d
	STPM1-3-2	Saitama, Japan	2	1981	G10-1/Z2-1	3	+	+	MAT1-2	M	+ ^d
<i>Eleusine coracana</i> (finger millet)	MZ5-1-6	Miyazaki, Japan	2	1976	Br48/Br116.2	3	+	+	MAT1-2	N	+ ^d
	Ken15-15-1	Tokyo, Japan	2	1975	Br48/Br116.2	2	+	+	MAT1-2	N	+ ^d
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	Br3	Londrina, Brazil	2	1990	Br48/Br116.2	3	+	+	MAT1-1	O	+ ^d
	Br48	Itapora, Brazil	2	1990	Br48/Br116.5	3	+	+	MAT1-1	O	+ ^d
	Br116.5	Santa Mariana, Brazil	2	1992	Br48/Br116.2	3	+	+	MAT1-2	P	+ ^d
<i>Avena sativa</i> (oats)	Br58	Itambe, Brazil	2	1990	Br48/Br116.5	3	+	+	MAT1-2	P	+ ^d
<i>Lolium perenne</i> (perennial ryegrass)	TP1	Tochigi, Japan	2	1997	Br48/Br116.5	2	+	+	MAT1-2	Q	+ ^d
	WK3-1	Yamaguchi, Japan	2	1996	Br48/Br116.5	3	+	+	MAT1-2	R	+ ^d
<i>Leersia oryzoides</i> (rice cutgrass)	N1919	Chiba, Japan	2	1974	G10-1/Z2-1	0	-	-	ND	S	+ ^d
<i>Digitaria sanguinalis</i> (crabgrass)	Dtg41	Hyogo, Japan	2	1991	G10-1/Z2-1	0	-	-	ND	T	+ ^d
<i>Cenchrus ciliaris</i> (buffelgrass)	N1981	Kumamoto, Japan	2	1975	G10-1/Z2-1	0	-	-	ND	U	+ ^d
<i>Sasa</i> sp. (bamboo grass)	INA-B-92-45	Aichi, Japan	2	1993	G10-1/Z2-1	0	-	-	ND	V	+ ^d

^a 1, present study; 2, Kobe University, Hyogo, Japan.

^b Mating characteristics determined using G10-1/Z2-1 are from Kato et al. (2000), and Br48/Br116.2 and Br116.5 are from Tosa et al. (2004). Sexuality was determined according to the nomenclature of Ito et al. (1983). Scores for productivity of perithecia: 0, not produced; ±, occasionally produced; 1, 1–10 perithecia in a petri dish; 2, 11–50 perithecia in a petri dish; 3, >50 perithecia in a petri dish. Scores of productivity of ascus and ascospore: -, not produced; +, produced. ND, mating type and sexuality could not be determined; these isolates did not produce perithecia with the respective tester isolates. UN, sexuality is unknown since no information concerning their sexuality was provided by Kato et al. (2000).

^c Presence (+) or absence (-) of *Hpa* site (Fig. 2).

^d Data from Tosa et al. (2004).

(*MATI-1*)および F1-63 (*MATI-2*) の 2 菌株の検定菌と対峙培養させた。Y93-164a-1 は、中国の雲南省においてイネから採集された菌で、*M. oryzae* に属する。一方、F1-63 は、Y93-164a-1 と、雲南省においてイネから採集された *M. oryzae* である Y93-245d-1 を交配させて得られた F1 菌株である。対峙培養は検定菌株と被検定菌株の菌叢片を、オートミール培地上に互いの菌株が 4cm 離れるように配置し、22 ℃、連続照射下で 30 日間培養した。また、被検定菌の交配能は形成した子のう殻の有無および数、ならびに、子のうおよび子のう胞子の形成の有無に基づき評価した。すなわち、上記の対峙培養後、被検定菌と検定菌の菌糸交合部を实体顕微鏡下で観察し、子のう殻数を次の 5 段階で記録した。すなわち、0(非形成)、±(非形成または形成)、1(1-10 個形成)、2(11-50 個形成)、3(> 50 個形成)で評価した。また、子のう殻を培地から解剖針を用いて、スライドグラス上に置床し、カバーグラスで押し潰し、子のう殻から滲出する子のうおよび子のう胞子の有無を光学顕微鏡下で確認し、その結果を、+(有)または、-(無)と記録した。子のう殻を形成した被検定菌株については交配型についても検討を行った。すなわち、Itoi ら(1983)の基準に従って、検定菌株 Y93-164a-1(*MATI-1*)と被検定菌株が子のう殻を形成した場合、被検定菌株の交配型を *MATI-2*、検定菌株 F1-63(*MATI-2*)と被検定菌株が子のう殻を形成した場合、被検定菌株の交配型を *MATI-1* とした。以上の交配能ならびに交配型の調査は 2 回反復して行った。

2-2-3. PCR-RFLP 分析

供試菌株からの全ゲノム DNA 抽出は、Luo ら(2005)の方法に準じて行った。全ゲノム DNA からの PCR による *β-tublin* 遺伝子の増幅は Couch および Kohn (2002)に従って行った。供試菌株から得られた増幅産物を制限酵素 *Hpa* I で切断後、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により分画した。分画後、ゲルをエ

チジウムブロマイドで染色を行い、UV 照射下で各 PCR 増幅断片の切断多型を観察した。

2-2-4. 病原性検定

供試植物として、Kato ら(2000)がイネ科植物いもち病菌を pathotype に類別する時に用いた 5 つの判別植物種を用いた。すなわちアワ(7 地方品種, 021, 036, 046, 049, 057, 06 および 066; 市販品種, イタリアンミレット R)、イネ 9 品種(新 2 号, 愛知旭, 石狩白毛, 関東 51, ツユアケ, フクニシキ, ヤシロモチ, Pi No4 およびとりで 1 号)、シコクビエ(雪印系)、キビ(アクセス番号, PM 9)およびメヒシバである。アワの 7 地方品種は、日本(021 および 036)、韓国(046)、中国(049)、台湾(057)、フィリピン(06)およびインド(066)に由来する(Fukunaga et al. 1997)。またメヒシバの種子は、佐賀大学実験圃場に自然発生していた植物から採集された。さらに、以上の 5 判別品種に加えて、ヒエ(青葉ミレット)、コムギ(シロガネコムギ)、ペレニアルライグラス(フレンド)およびイタリアンライグラス(*Lolium multiflorum* L.)(タチワセ)を供試した。供試植物を 7 個体ずつ、3 週間、シードリングケース中で育成した。孢子懸濁液の作成および供試植物への接種は、Luo ら(2002)の方法に従って行った。接種後の植物体は、26℃ に設定した恒温高湿の接種箱に 20 時間静置後、ガラス室内に移した。

接種植物の反応の調査は、接種後 7 日目に行い、病斑型を 5 段階、すなわち、0(病斑無し)、1(小褐点病斑)、2(直径 3mm 未満の小褐点, 時として中央部に灰色の崩壊部を有する)、3(直径 3-5mm の病斑, 中央部に灰色の崩壊部を有する)、4(5mm 以上の病斑, 中央部に灰色の崩壊部を有する)および 5(葉身が枯死)、で評価した。また、病斑型 0、1 および 2 を示す病斑を抵抗性反応、3、4 および 5 を示す病斑を罹病性反応とした。接種試験は、2006 年の 4~9 月に 2 回反復して行

った。

2-2-5. scRFLP 分析に基づくデンドログラムの作成

全ゲノム DNA の切断を、制限酵素 *EcoR* または *Hind* によって行い、その制限断片を、0.8%アガロースゲル中で電気泳動により分画した。電気泳動終了後、DNA 断片をナイロン膜に転写した。scRFLP 解析のプローブとして、Skinnerら(1993)の制限地図に使用された 14 種の RFLP マーカー、CH-131H、CH4-116H、4-22、CH2-90H、CH3-73H、4-14、4-20、CH3-33H、CH5-61H、CH4-5H、CH3-122H、CH4-131H、CH2-32H および CH5-75H を供試した。これらプローブのビオチン標識は、NEBlot Phototope Kit を用い、添付説明書に従い行った。また、これらプローブを用いてハイブリダイゼーションおよび検出を行った(Luo et al. 2005)。

検出されたハイブリダイゼーションバンドを菌株間で比較し、同一サイズのバンドを菌株間で保有(1)、非保有(0)として記録した。このデータに基づき、以下の Nei and Li(1979)の式を用いて菌株間の類縁度(F)を算出した。

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

N_x 、 N_y は菌株 x と y においてそれぞれ検出された制限断片数、 N_{xy} は、菌株間で共通なバンド数を示す。この係数から平均距離法によりクラスター分析を行い、デンドログラムを作成した。デンドログラムの作成には、NYSYSpc の UPGMA プログラムを使用した(Rohlf 1998)。

2-3. 結果

2-3-1. エノコロおよびアキノ菌の交配能

エノコロ菌 13 菌株およびアキノ菌 13 菌株(SA05 菌株)、計 26 菌株を、雌雄両性で高い捻性を示すイネ菌、Y93-164a-1(*MAT1-1*)および F1-63(*MAT1-2*)と交配させた(Table 1)。その結果、19 菌株が両検定菌株と子のう殻を形成せず、ほとんどの供試菌株が、不稔性かあるいは極めて低い捻性を示すことが明らかとなった。一方、残りの 7 菌株は、子のう殻を形成し、交配型を決定することができた。すなわち、2 菌株(エノコロ菌, SA05-63; アキノ菌, SA05-101)は、F1-63 と子のう殻を形成したため、*MAT1-1* であると判別され、5 菌株(エノコロ菌, SA05-40, -56 および-75; アキノ菌, SA05-51 および-124)は、Y93-164a-1 と子のう殻を形成したため、*MAT1-2* であると判別された。しかしながらこれら 7 菌株のうち、子のう胞子を形成した菌株は SA05-40 および-63 のみであった。エノコロ菌 2 菌株(KANSV1-4-1 および NI913)を含む他の 24 菌株の交配能および交配型は、先に Kato ら(2000)および Tosa ら(2004)により調査されている。KANSV1-4-1 および NI913 には、検定菌株としてシコクビエ菌 G10-1(*MAT1-1*)および Z2-1(*MAT1-2*)が用いられた。NI913 は、Z2-1 と子のう殻を形成したが、非常に低い捻性(子のう殻形成評価, 1)を示した。一方、KANSV1-4-1 は、検定菌株のどちらとも子のう殻を形成しなかった。

2-3-2. PCR-RFLP 分析による種識別

Couch および Kohn(2002)により提案された *β-tubulin* 遺伝子の PCR-RFLP 法により、エノコロおよびアキノ菌 28 菌株、ならびにアワイもち病菌 4 菌株(NRSI3-1-1,

NNSI3-2-1, IN77-16-1-1 および IN77-20-1-1)について種同定を行った(Table 1, Fig. 2)。残りの 18 菌株については、先に PCR-RFLP 分析により種が同定されている (Tosa et al. 2004)(Table 1)。Hpa 制限パターンの一例として、エノコロ菌およびアキノ菌各 6 菌株に加え、アワいもち病菌 GFSI1-7-2、イネいもち病菌の Ken53-33 およびメヒシバいもち病菌 Dig41 の制限パターンを Fig. 2 に示す。この内、GFSI1-7-2 および Ken53-33 は *M. oryzae* の PCR-RFLP phenotype、Dig41 は *M. oryzae* とは別種の *Magnaporthe* あるいは *Pyricularia* 属菌の PCR-RFLP phenotype の代表として、供試菌株との比較のために供試した。Fig. 2 で示すように、供試したエノコロおよびアキノ菌、ならびにアワいもち病菌はすべて GFSI1-7-2 および Ken53-33 と同じ 2 つの断片が認められ、すなわち、これら菌株は、*M. oryzae* と同じ PCR-RFLP phenotype を有することが明らかとなった。

2-3-3. 各種イネ科植物に対するエノコロおよびアキノ菌の病原性

エノコロおよびアキノ菌 28 菌株およびアワいもち病菌 4 菌株(GFSI1-7-2, NRSI2-2-2, NRSI3-1-1 および NNSI3-2-1)計 32 菌株の病原性を、アワ、イネ、シコクビエ、キビおよびメヒシバの 5 つの判別品種(Kato et al. 2000)、さらにヒエ、コムギ、ペレニアルライグラスおよびイタリアンライグラスの 4 植物種を追加して評価した。その結果、エノコロおよびアキノ菌、ならびにアワいもち病菌の宿主範囲は類似することが明らかとなった(Table 2)。すなわち、病原性反応(感染型 3, 4 あるいは 5)は、ペレニアルライグラスおよびイタリアンライグラスを除くと、アワにおいてのみ観察され、エノコロおよびアキノ菌、およびアワいもち病菌は、アワにのみ病原性を示すものと考えられた。しかしながらこれら菌株の、アワの地方品種ならびに市販品種に対する病原性は一様ではなかった。韓国地方品種(046)に対しては、全ての菌株が感染型 3~5 を示し、したが

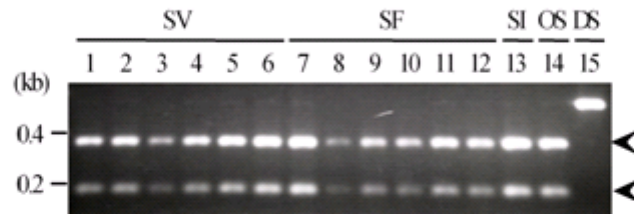


Fig. 2. PCR-RFLP diagnosis of *Pyricularia* isolates. A region of the beta-tubulin gene was amplified, digested with *Hpa*II, and separated on a 1.5% agarose gel. Arrows represent two fragments (188 and 362 bp) that are characteristic of *M. oryzae* (Couch and Kohn 2002). The abbreviations above lane numbers indicate host plants from which isolates were collected: SV, *Setaria viridis*; SF, *S. faberii*; SI, *S. italica*; OS, *Oryza sativa*; DS, *Digitaria sanguinalis*. The isolates used in this diagnosis are as follows: lane 1, SA05-6; 2, SA05-43; 3, SA05-138; 4, SA05-144; 5, SA05-149; 6, SA05-68; 7, SA05-3; 8, SA05-51; 9, SA05-62; 10, SA05-126; 11, SA05-148; 12, SA05-71; 13, GFS11-7-2; 14, Ken53-33; 15, Dig41.

Table 2. Pathogenicity of *Pyricularia* isolates from *Setaria* spp.

Plant tested ^c	Infection type ^a																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	<i>Setaria viridis</i> ^b																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	NI913					KANSV1-4-1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
<i>Setaria italica</i> (foxtail millet)	021	4	5	4	4	4	4	5	5	4	5	SA05-149	5	2-4	5	3	1-3	5	5	0-4	4	4	4	<i>Setaria faberii</i> ^b	SA05-148	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	<i>Setaria italica</i> ^b	NNSI3-2-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	NRSI3-1-1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	NRSI2-2-2	5	4	5	4	4	4	3	3	5	4	5	4	4	4	4	4	5	4	4	5	5	GFSI1-7-2	3	2	3	3	4	3	3	3	4	4	5	3	2	4	3	3	3	3	2	4	4	SA05-62	3	2-4	3	3	3	3	4	3	4	3	3	3	2-3	3	3	2-3	3	3	3	3	3	SA05-51	3	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	3	2-3	3	3	2-3	3	3	2-3	3	3	SA05-37	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0-4	0	0	0-3	0	0	0-3	0	0	SA05-3	0	1	2-3	2-3	3	3	2-3	3	2-4	2-3	2	2-3	2-3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	SA05-86	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	SA05-71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-138	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SA05-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. Continued.

Plant tested ^c	Infection type ^a																																				
	<i>Setaria viridis</i> ^b							<i>Setaria faberii</i> ^b							<i>Setaria italica</i> ^b																						
	SA05-6	SA05-40	SA05-43	SA05-56	SA05-59	SA05-63	SA05-68	SA05-75	SA05-84	SA05-134	SA05-138	SA05-144	SA05-149	KANSV1-4-1	NI913	SA05-3	SA05-37	SA05-51	SA05-62	SA05-71	SA05-86	SA05-101	SA05-109	SA05-117	SA05-124	SA05-126	SA05-130	SA05-148	GFSI1-7-2	NRSI2-2-2	NRSI3-1-1	NNSI3-2-1					
<i>Eleusine coracana</i> (finger millet)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Yukijirushi-kei	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Panicum mitiaceum</i> (common millet)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PM9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Echinochloa utilis</i> (barnyard millet)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aoba millet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Shiroganekomugi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Digitaria sanguinalis</i> (crabgrass)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lolium perenne</i> (perennial ryegrass)	2-3	2-4	0-3	0-3	2-4	0-3	0-4	0	0-3	0-3	0-3	0	0-3	0	2-3	1	0-4	0-4	3	1	0	2	0	0	0	0-4	0-3	0	0-3	2-3	1-3	0-4	0-3	0	0	0	0
Friend	4	4	0-4	0-3	0-3	4	0-4	3	2-3	3	3	0-3	0-3	4	4	1-4	4	2-4	4	0-3	3	0-3	0-3	0-4	0-3	0-3	0-3	0-4	1-4	0-3	4	4	4	4	4	4	
<i>Lolium multiflorum</i> (Italian ryegrass)	4	4	0-4	0-3	0-3	4	0-4	3	2-3	3	3	0-3	0-3	4	4	1-4	4	2-4	4	0-3	3	0-3	0-3	0-4	0-3	0-3	0-4	1-4	0-3	4	4	4	4	4	4	4	
Tachiwase	4	4	0-4	0-3	0-3	4	0-4	3	2-3	3	3	0-3	0-3	4	4	1-4	4	2-4	4	0-3	3	0-3	0-3	0-4	0-3	0-3	0-4	1-4	0-3	4	4	4	4	4	4	4	

^a 0, no visible symptoms; 1, pinpoint brown lesions; 2, small brown lesions (<3 mm in diameter), sometimes with gray centers; 3, intermediate size lesions (3–5 mm in diameter) with gray centers; 4, large lesions (>5 mm) with gray centers. 5, complete blighting of leaf blade. 0–2; avirulence reactions, 3–5, virulence reactions. An infection type with a range indicates that varied reactions (avirulent or virulent) were observed among individual plants of 14 test plants in two repeated experiments.

^b Original host.

^c 021, 036, 046, 049, 057, 06 and 066 are landraces originating from Japan (021 and 036), Korea, China, Taiwan, the Philippines and India, respectively (Fukunaga et al. 1997). The code numbers of the landraces are from Fukunaga et al. (1997). *Digitaria sanguinalis* originated from seeds collected from an indigenous plant population in an experimental field of Saga University

って、全ての菌株がこの品種に対しては、病原性を示すものと考えられた。対照的に、32 菌株のうち 25 菌株が、フィリピン地方品種(06)に対して感染型 0~2 の非病原性反応を示し、残り 7 菌株は、感染型 0-3、0-4 あるいは 1-4 といった不安定な反応を示した。このことから、エノコロおよびアキノ菌、およびアワ菌は、フィリピン地方品種(06)に対して非病原性あるいは弱病原性を示すかのどちらかであると考えられた。さらに、エノコロ菌、アキノ菌、およびアワいもち病菌の各集団内に、アワの地方品種に対して異なる病原性反応を示す菌株が存在していた。たとえば、インド地方品種(066)に対してエノコロ菌 15 菌株のうち 11 菌株は、非病原性あるいは弱病原性を示すが、残りの 4 菌株は、病原性反応を示した。また、同様のインド地方品種(066)に対する病原性の違いは、アキノ菌およびアワ菌においても観察された。ペレニアルライグラスおよびイタリアンライグラスは、人工接種により種々のイネ科植物から分離されたいもち病菌が感染できると報告されている(加藤 1983; 加藤・山口 1980; Kato et al. 2000; 生井ら 1996; 八重樫 1981)。しかしながら本研究では、ペレニアルライグラスに対して、供試菌株のうち 10 菌株が感染型 0~2、すなわち非病原性を示した。一方、残りの 22 菌株は、感染型 0-3、0-4、1-3、2-3 および 2-4 のように不安定な反応を示した。一方、イタリアンライグラスに対しては、19 菌株が不安定な反応を示し、13 菌株が感染型 3 あるいは 4 の病原性反応を示した。

2-3-4. scRFLP 分析に基づく系統学的解析

Table 1 の全菌株を、14 のシングルコピー配列をプローブとした scRFLP 分析に供試した。各プローブを用いたハイブリダイゼーションにより、0~4 のバンドが検出された。50 供試菌株のサザンプロットにおいて、プローブおよび制限酵素の組み合わせを合計すると、菌株間で多型を示すバンドが 107 検出された。

これら検出された多型バンドに基づいて、エノコロおよびアキノ菌 28 菌株は、A~F の 6 つのハプロタイプに分けられた(Table 1)。ハプロタイプ A は、エノコロおよびアキノ菌の両方の菌株集団中に認められた。B、C、D および E は、エノコロ菌において認められ、一方、F はアキノ菌において認められた。他の 11 の植物種から分離されたもち病菌 22 菌株は、G~V の 16 のハプロタイプに分けられた。これら 16 のハプロタイプのうち、G、H および K~R の 10 のハプロタイプは、先に *M. oryzae* であると同定されている 14 菌株、すなわちアワいもち病菌(G および H)、イネいもち病菌(K および L)、キビいもち病菌(M)、シコクビエいもち病菌(N)、コムギいもち病菌(O および P)、エンバクいもち病菌(P) およびペレニアルライグラスいもち病菌(Q および R)に認められた。残りのアワ菌 4 菌株(NRSI3-1-1, NNSI3-2-1, IN77-16-1-1 および IN77-20-1-1)は、G、I および J の 3 つのハプロタイプに分けられた。NRSI3-1-1 のハプロタイプは、先に Tosa ら(2004)により *M. oryzae* であると同定されたアワいもち病菌 GFSI1-7-2 と同じハプロタイプ、G であった。他の 4 つのハプロタイプ、S~V は、サヤヌカグサイもち病菌(S)、メヒシバいもち病菌(T)、ブッフエルグラスいもち病菌(U)およびササイもち病菌(V)に分布していた。Fig. 3 の RFLP 分析の結果に基づくデンドログラムにおいては、*M. oryzae* に分布する 10 のハプロタイプが 1 つのクラスターを形成した(デンドログラム中に矢印 A で示している)。このクラスターは、高いブートストラップ値(100%)で支持されており、他種の菌株とは明確に分岐していた。したがって、このクラスターを、*M. oryzae*-specific cluster (*M. oryzae* に特異的なクラスター)とした。エノコロおよびアキノ菌に分布する 6 つのハプロタイプ、ならびにアワ菌である NNSI3-2-1、IN77-16-1-1 および IN77-20-1-1 に特有な 2 つのハプロタイプ、I および J は、*M. oryzae*-specific cluster 中に分岐していた。また、*M. oryzae*-specific cluster 内のサブクラスターは、93%以下という低いブートストラップ値でしか支持されなかったが、このクラスター内で、エノコ

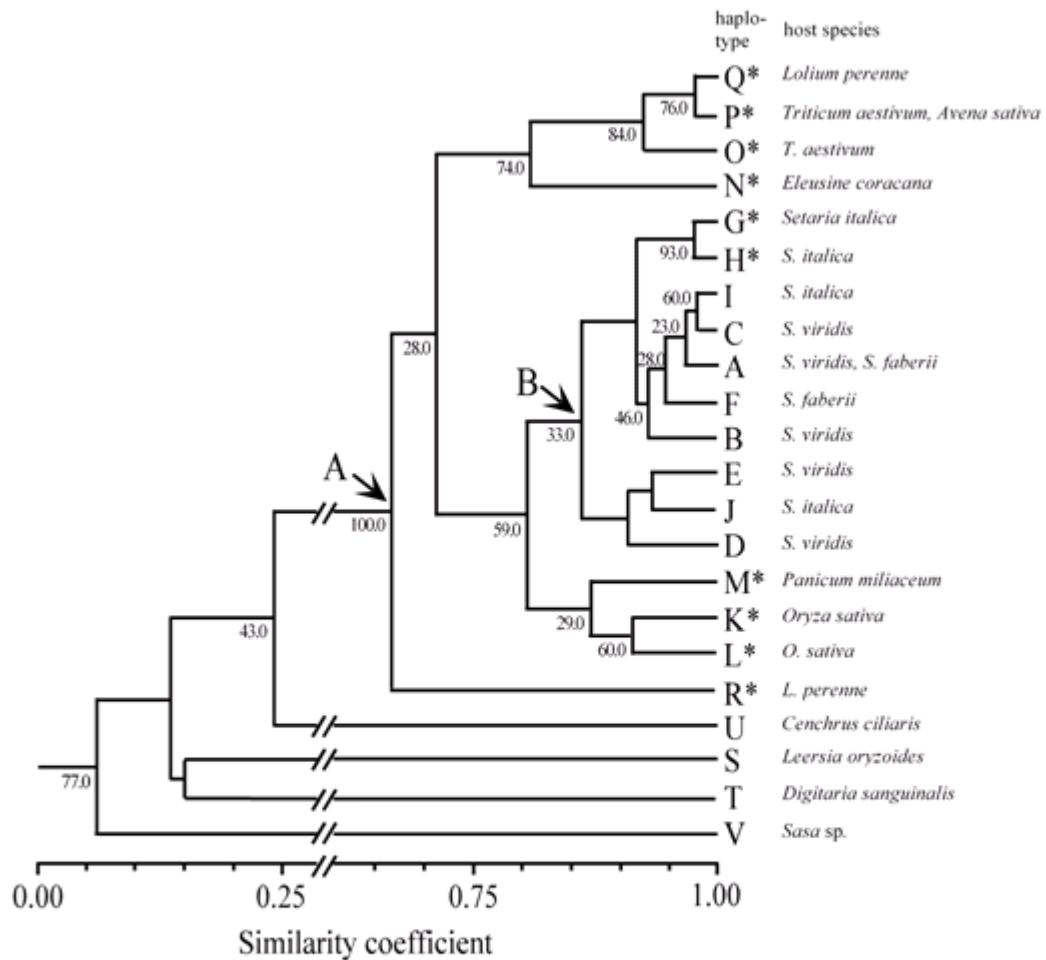


Fig. 3. UPGMA dendrogram of *Pyricularia* isolates constructed from single-copy RFLP data. Bootstrap values are indicated on the corresponding node for each cluster. Nodes that did not appear in a consensus tree generated from the bootstrap resampling are shown without the value. Isolates belonging to each RFLP haplotype (A to V) are described in Table 2-1. Stars indicate haplotypes detected from isolates that were previously identified as *Magnaporthe oryzae* (Tosa et al. 2004). Arrow A indicates a *M. oryzae* specific cluster and arrow B a *Setaria* isolates specific subcluster.

口およびアキノ菌のハプロタイプ A~F、およびアワ菌のハプロタイプ G~J は単一のサブクラスター(デンドログラム中に矢印 B で示している)を形成した。

2-4. 考察

本章の目的は、エノコロおよびアキノ菌の分類学的位置付けを行い、近縁の栽培植物であるアワのいもち病菌との関係を明らかにすることにある。先にエノコロ菌についての分類研究がなされているが、これら研究で供試されたエノコロ菌の菌株数は極めて少なく、また、知る限りにおいて、アキノ菌の分類に関する研究例は皆無となっている。本章では、これら菌の分類について、より正確かつ決定的な情報を得るために、日本の広範な地域から分離されたエノコロ菌 15 菌株およびアキノ菌 13 菌株を用いた。エノコロ菌は 9 県から採集されたものであり、東北、関東、近畿および九州にわたる。一方、アキノ菌も 9 県から採集されたもので、関東、近畿、四国および九州にわたる。したがって、これら菌株は、日本のエノコロおよびアキノ菌の集団の代表となり得ると考えた。供試したエノコロおよびアキノ菌のほとんどが *M. oryzae* 検定菌株と不稔性あるいは極めて低い稔性を示したが、 β -*tublin* 遺伝子の PCR-RFLP 分析により *M. oryzae* であることが明らかとなった。また、両菌が、ペレニアルライグラスおよびイタリアンライグラスを除き、アワのみに病原性を示すことから、両菌は Kato ら(2000)により提唱された *Setaria* pathotype に所属するものと考えられた。また、これら分類学的性質は、scRFLP 分析により得られたデンドログラムによりさらに強く支持された。すなわち、エノコロおよびアキノ菌は、デンドログラムにおいて、*M. oryzae* specific cluster に包含され、さらに、そのクラスター内において、アワ菌とともにサブクラスターを形成した。これらの結果から、エノコロ菌は、アキノ菌も同様に、*M. oryzae* の *Setaria* pathotype に属すると考えら

れた。しかしながらここで、1つの疑問が生じる。すなわち、自然界でエノコログサおよびアキノエノコログサからアワへと、いもち病菌の移行が生じているのか、ということである。加藤(1983)は、先に、アワおよびエノコログサのいもち病菌にアワに対する生理的なレースが存在することを報告している。本研究では、アワいもち病菌およびエノコロ菌に加えて、アキノ菌においてもアワの地方品種ならびに市販品種に対してもレースが存在することを見出した。エノコロおよびアキノ菌の両方にレースが存在することから、これら菌株は、アワに密接した生活環を送っていることが示唆された。したがって、両菌はアワへの移行が可能であるかもしれない。さらに、RFLP デンドログラムにおいては、エノコロおよびアキノ菌とアワいもち病菌が遺伝的に近縁であることが認められた。エノコロおよびアキノ菌とアワいもち病菌との間に共通するハプロタイプは認められなかったが、これはおそらく、各菌の採集年または採集地の違いによるものと考えられた。すなわち、エノコロおよびアキノ菌のほとんどは、2005年に日本各地で採集されたものであるのに対して、アワ菌は、1984年以前に日本およびインドで採集されたものである。エノコロおよびアキノ菌とアワいもち病菌の同一 pathotype 内における遺伝的分化は今後さらに検討が必要となるが、エノコロ菌 15 菌株中 11 菌株およびアキノ菌 13 菌株中 12 菌株が共通のハプロタイプ、A に所属することが明らかとなった。したがって、両菌はエノコログサおよびアキノエノコログサの両方に病原性を有し、自然界では両宿主における菌の集団の分化は生じていないことが推定された。

本研究では、2つの *Lolium* 属植物、すなわちペレニアルライグラスならびにイタリアンライグラスを接種実験に供試したが、これら *Lolium* 属植物に対しては、他のイネ科植物から分離されたいもち病菌でもその多くが人工接種により感染することができるとされている(加藤 1983; 加藤・山口 1980; Kato et al. 2000; 生井ら 1996; 八重樫 1981)。しかしながら、近年、Tosaら(2004)は、これ

らイネ科植物いもち病菌が両植物に親和性となるのは、高温条件下でのみであることを明らかにした。彼らは、低温(20)下で接種実験を行い、*Lolium* 属植物から分離された菌株を除き、供試した全てのイネ科植物いもち病菌が、*Lolium* 属植物に感染することができないことを見出した。本章で行った接種実験は、比較的な温暖な季節(2006年4~9月)に温室で行われたが、エノコロおよびアキノ菌、ならびにアワいもち病菌計32菌株のうち、ほとんどがペレニアルライグラスに対して非病原性あるいは弱病原性を示し、32菌株中19菌株がイタリアンライグラスに対して弱病原性を示した。このような結果は、エノコロおよびアキノ菌、さらにアワいもち病菌も同様に *Lolium* 属植物の潜在的な病原菌ではないことを示唆していると考えられた。

本研究により、(1)エノコログサおよびアキノエノコログサから分離されたいもち病菌は、*M. oryzae* であること、(2)エノコロおよびアキノ菌は互いに近縁で、さらには、アワいもち病菌とも近縁であり、*Setaria* pathotype に所属すること、の2点が明らかとなった。(2)については、エノコロおよびアキノ菌の宿主植物およびアワが系統学的に近縁であることが反映していると推察される。これまで、エノコログサ、アキノエノコログサおよびアワ以外の *Setaria* 属植物からもいもち病菌が分離されているが、これら菌株とその宿主種間の系統学的・分類学的な比較を行うことは非常に興味深いことと考えられる。Kato ら(2000)は、*Setaria tomentosa* (Roxb.) Kunth より分離された3菌株および *Setaria geniculata* P. Beauv. より分離された1菌株を含む、各種イネ科植物いもち病菌の RFLP デンドログラムを作成した。*S. tomentosa* より分離された3菌株のうち1菌株、および *S. geniculata* より分離された菌株は1つのクラスターに属するものの、それは CC グループとは離れて分岐していた。また、*S. tomentosa* の残りの菌株は、CC グループに属するものの、アワ菌系の菌株とは異なるクラスターを形成した。*S. tomentosa* の系統分類学的知見は得られていないものの、*S. geniculata* について

はアワと明確に異なる系統分化により成立した種であることが報告されている (Doust and Kellogg 2002)。Doust and Kellogg(2002)は、*Setaria* 属の 9 植物種を含むイネ科植物の分子系統樹を作成したが、その *Setaria* 属植物は、アワを含むグループおよび *S. geniculata* を含むグループの 2 つに識別されることを明らかにした。したがって、アワと遠縁の *Setaria* 属植物の菌からは、*Setaria* pathotype に属する菌株とは系統的に隔った菌も見出される可能性も考えられる。さらには、これら菌は *M. oryzae* とは別種となる可能性もあるように考えられる。

第3章 日本において採集されたエノコロおよびアキノ菌の DNA フィンガープリント分析に基づく集団解析

3-1. 目的

イネ科植物いもち病菌の遺伝的多様性および集団構造に関する研究は、宿主の経済的重要性から、*Oryza pathotype*、すなわちイネいもち病菌を中心に研究が行われてきた。すなわち、このような集団遺伝学的知見は、本菌に対する抵抗性品種の育種に不可欠なためである。また、その手段として、トランスポゾン因子由来の散在性反復 DNA 配列を用いた DNA フィンガープリント分析が広く用いられており、幾つかのイネ栽培地域および国において本菌の集団解析に応用されてきた(Chen et al. 1995; Don et al. 1999a, b; Kumar et al. 1999; Levy et al. 1993; Xia et al. 1993; Park et al. 2003, 2008; Roumen et al. 1997; Zeigler et al. 1995)。つまり、供試菌株集団から検出された DNA フィンガープリントパターンについて、パターン間で同一サイズのハイブリダイゼーションバンドの共有率から遺伝的類縁度を算出し、平均距離法に基づきデンドログラムを作成する手法である。通常、これら研究において作成されたデンドログラムには、高いブートストラップ値で支持される幾つかのクラスターが認められてきた。多くの場合、これらクラスター間では類縁度が 70%以下となる一方、同一クラスター内の菌株間では、80%以上の高い類縁度が認められる。このようなクラスターは本菌のリネージと考えられている(Kumar et al. 1999)。すなわち、イネいもち病菌は野外で無性的に増殖するため、本菌の集団は遺伝的に異なる祖先菌株からクローナルに派生した幾つかのリネージにより構成されることが予想される。したがって、上述のクラスター間の類縁度は祖先菌株間の遺伝的差異を反映し、クラスター内の類縁度はクローナルな増殖過程において蓄積した突然変異量を反映

すると考えられる。また、Kumar ら(1999)はヒマラヤ山脈の麓の地域から採集したイネいもち病菌について、本菌のゲノミックライブラリーより単離したシングルコピー配列をプローブとしたRFLP分析(sc-RFLP)およびDNAフィンガープリント分析を行った。その結果、同菌株集団にDNAフィンガープリント分析で類縁度70%付近に高いブートストラップ値で支持されるクラスターが認められること、さらに、これらクラスターによる菌株のグルーピングはsc-RFLP分析によるグルーピングと一致することを見出した。したがって、このようなDNAフィンガープリント分析に基づくクラスターは菌株間の遺伝的分化を反映しており、本菌のリネージとして識別可能なことを報告している。イネいもち病菌の場合、これまで解析された地域および国の菌株集団は、特殊な例外を除き、1~10と比較的限られた数のリネージで構成されている。このような比較的単純なリネージ構成は、宿主が栽培植物であることにより起因すると考えられる。たとえば、日本のイネいもち病菌の集団では1960年代から現在に至る間、リネージの減少が生じたとされており、この減少は抵抗性品種の導入による菌株集団へのボトルネック効果がもたらしたものと考えられている(Don et al. 1999; Sone et al. 1997)。このように、イネいもち病菌の集団構造に関しては多くの知見が得られているが、他の pathotype に属するいもち病菌の集団構造に関する知見は極めて少ない。また第1章で述べたように、pathotype は一般に Kato ら(2000)による原宿主種の他に、近縁野生植物のいもち病菌も含んでいるが、そのいもち病菌の集団構造に関する報告はいまだ皆無となっている。そこで、本研究では、MGR586 および MAGGY を用いた DNA フィンガープリント分析(以下、それぞれ MGR586-および MAGGY-DNA フィンガープリント分析)により、日本で採集されたエノコロおよびアキノ菌の集団構造について解析を行った。MGR586 は DNA 型のトランスポゾンであり(Hamer et al. 1989)、イネいもち病菌の DNA フィンガープリント分析では本配列が最も頻繁に利用されている。MGR586 は

イネいもち病菌以外のイネ科植物いもち病菌においても広く分布し、中程度から高度に反復して存在することが報告されている(Eto et al. 2001)。また、DNA フィンガープリント分析に用いられるプローブとして、レトロ型トランスポゾン因子である MAGGY(Leong et al. 1994; Farman et al. 1996a)もよく知られている。また、本配列は、イネいもち病菌、アワいもち病菌およびエノコロ菌に分布することが報告されており(Tosa et al. 1995; Kusaba et al. 1999; Eto et al. 2001)、イネいもち菌においては、MGR586 または MAGGY を用いた DNA フィンガープリント分析によって識別されたりネーミングが、互いに一致することが明らかとなっている(Don et al. 1999a)。

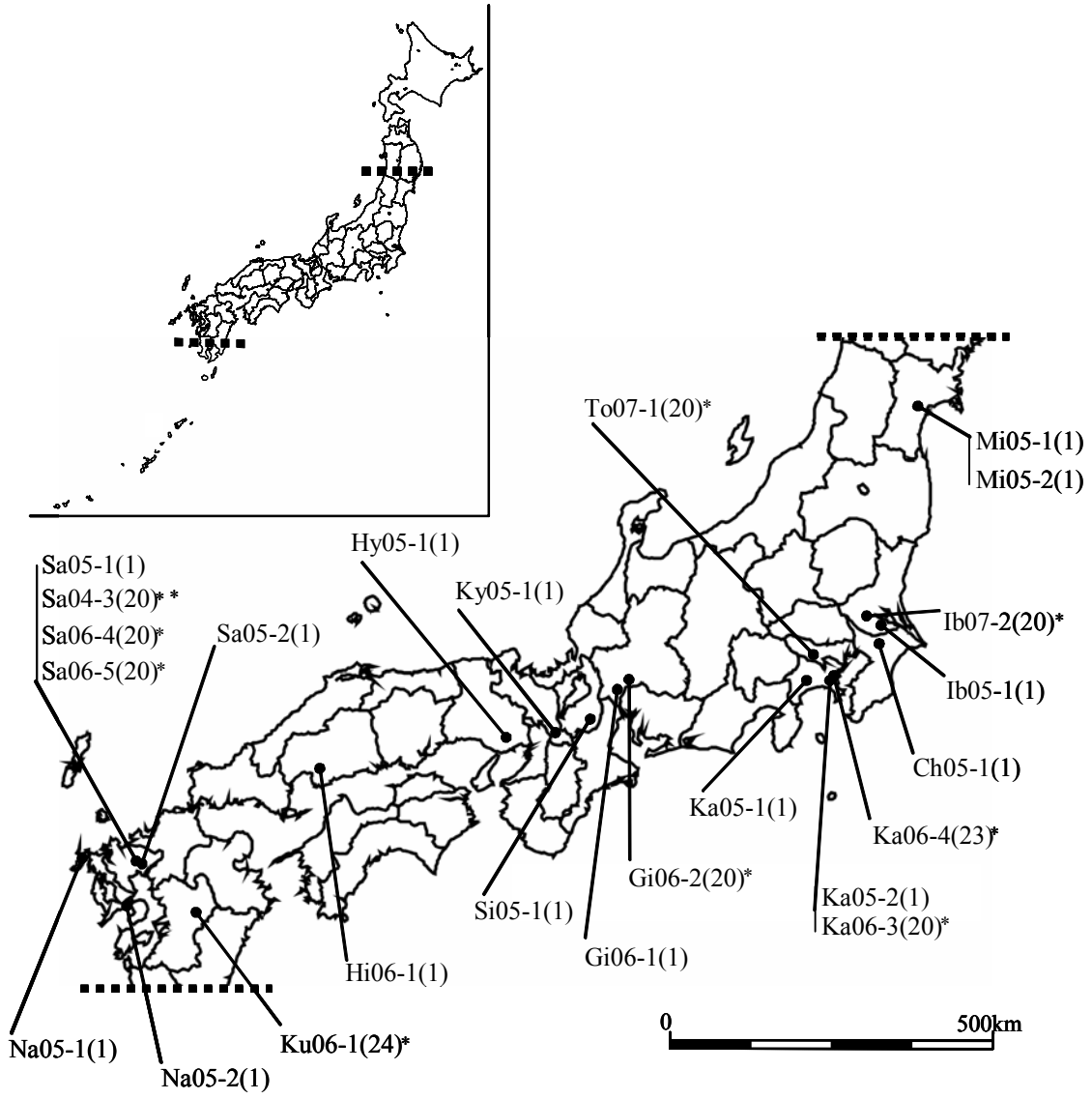
3-2. 材料および方法

3-2-1. 供試菌株

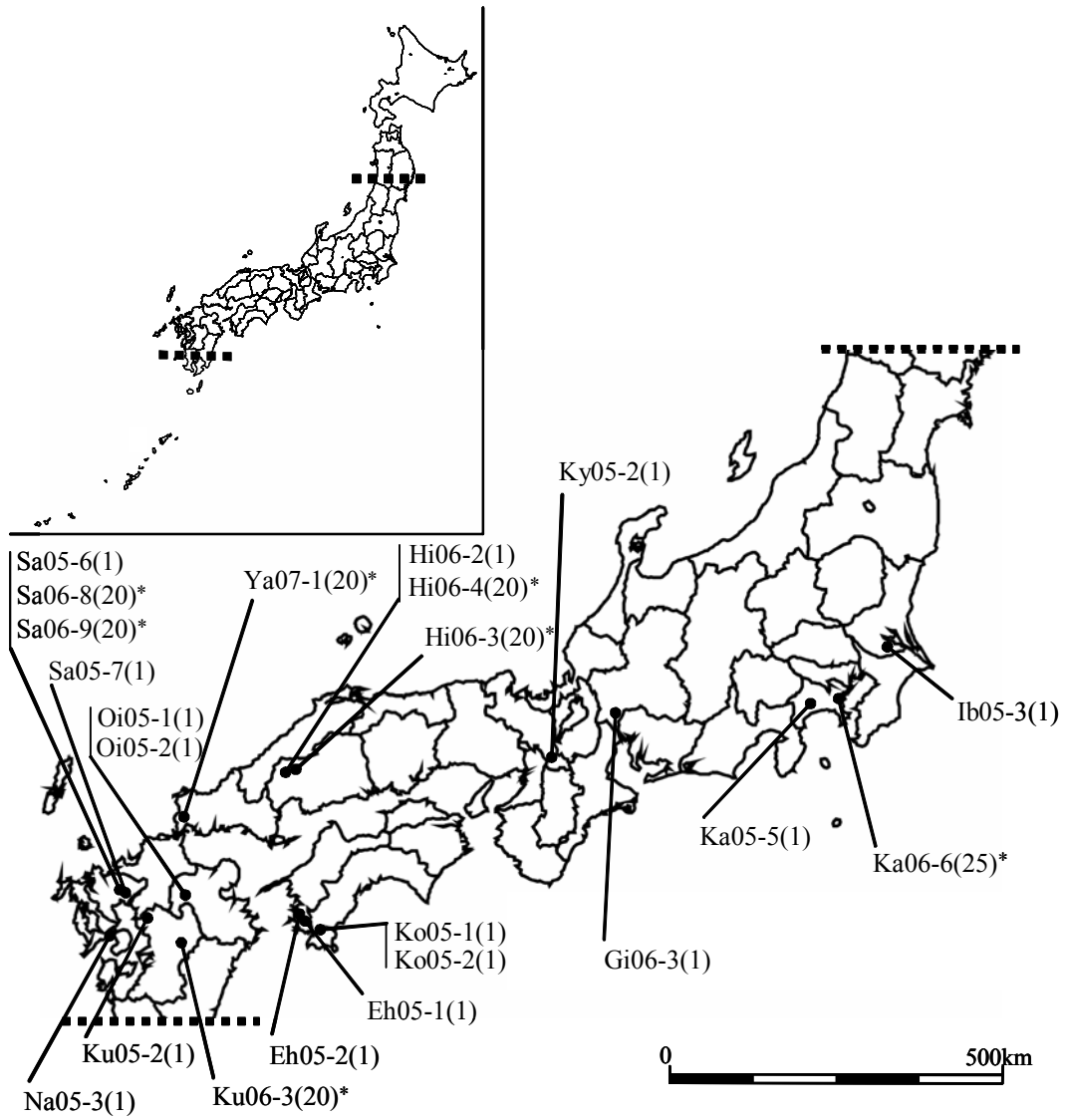
本研究では、エノコロ菌 202 菌株およびアキノ菌 160 菌株を供試した (Fig. 4)。以下、本章では、供試菌株および菌株集団の採集地点は次の略号で示す：都府県の略名(e.g., Sa)、採集年(e.g., 04)、および、同一県内で異なる地理的由来を示す枝番号(e.g., -1)。都府県の略称名、Na、Sa、Ku、Oi、Ya、Hi、Eh、Ko、Hy、Ky、Si、Gi、Ka、To、Ch、Ib および Mi は、それぞれ長崎、佐賀、熊本、大分、山口、広島、愛媛、高知、兵庫、京都、滋賀、岐阜、神奈川、東京、千葉、茨城および宮城に対応する。日本全国におけるエノコロ菌の集団構造を検討するために、11 都府県の 15 地点(Na05-1, Na05-2, Sa05-1, Sa05-2, Hi06-1, Hy05-1, Ky05-1, Si05-1, Gi06-1, Ka05-1, Ka05-2, Ch05-1, Ib05-1, Mi05-1 および Mi05-2)でそれぞれ 1 菌株ずつ採集されたいもち病菌計 15 菌株を用いた(Fig. 4A)。2006 年に Hi06-1 および Gi06-1 で採集された 2 菌株を除く全供試菌株が、前章で分類学

Fig. 4. Locations of collection sites of *Maganaporthe oryzae* isolates from green foxtail (A) and giant foxtail (B) in Japan. Sites located within 5 km in distance are plotted by a single dot. Names of the collection sites are designated as abbreviated names of prefectures where the collection sites are located, years of collection, and identification numbers within the prefectures. The abbreviated names, Na, Sa, Ku, Oi, Ya, Hi, Eh, Ko, Hy, Ky, Si, Gi, Ka, Ch, Ib, Mi and To correspond to Nagasaki, Saga, Kumamoto, Oita, Yamaguchi, Hiroshima, Ehime, Kochi, Hyogo, Kyoto, Siga, Gifu, Kanagawa, Chiba, Ibaraki, Miyagi Prefectures and the Metropolis of Tokyo, respectively. Numbers of isolates collected from each site are indicated in parentheses. The symbols,* and **, represent areas of sites, 1 m² and 50 m², respectively. The areas are shown for the sites where more than one isolate was collected.

A



B



的位置付けの検討がなされているものである。すなわち、Na05-1、Na05-2、Sa05-1、Sa05-2、Hy05-1、Ky05-1、Si05-1、Ka05-1、Ka05-2、Ch05-1、Ib05-1、Mi05-1 および Mi05-2 で採集された菌株は、それぞれ、SA05-43、-56、-6、-84、-40、-144、-149、-59、-63、-75、-68、-134 および-138 である。採集地間の距離は、最短で Mi05-1 ~ Mi05-2 間の約 300m、最長で Na05-1 ~ Mi05-1(または Mi05-2)間の約 1160km である。また、本菌の日本各地における局所的な集団構造を検討するために、6 都県の 9 地点(Sa04-3, Sa06-4, Sa06-5, Ku06-1, Gi06-2, Ka06-3, Ka06-4, To07-1 および Ib07-2)で採集されたいもち病菌、それぞれ 20 ~ 24 菌株を用いた (Fig. 4A)。各採集地の面積は、 $5 \times 10 \text{ m}^2$ (Sa04-3)または、 $1 \times 1 \text{ m}^2$ (Sa04-3 以外の 8 採集地)であった。また、各地点において 20 ~ 24 罹病葉(1 個体につき 1 罹病葉)を任意に採集し、それら罹病葉から 20 ~ 24 菌株(1 罹病葉につき 1 菌株)を分離し、各菌株集団を日本各地における局所集団とした。また、アキノ菌も同様に、日本全国および局所における菌株集団構造について検討を行った。日本全国の集団構造の検討は、11 府県の 15 採集地(Na05-3, Sa05-6, Sa05-7, Ku05-2, Oi05-1, Oi05-2, Hi06-2, Eh05-1, Eh05-2, Ko05-1, Ko05-2, Hi06-2, Ky05-2, Gi06-3, Ka05-5 および Ib05-3)でそれぞれ 1 菌株ずつ採集されたいもち病菌(計 15 菌株)を用いた。これら供試菌株についても、2006 年に Hi06-2 および Gi06-3 で採集された菌株を除き、前章で分類学的位置付けがなされた。すなわち、Na05-3、Sa05-6、Sa05-7、Ku05-2、Oi05-1、Oi05-2、Eh05-1、Eh05-2、Ko05-1、Ko05-2、Ky05-2、Ka05-5 および Ib05-3 で採集された菌株は、前章の、SA05-51、-3、-86、-109、-37、-101、-117、-124、-126、-130、-148、-62 および-71 である。採集地間の距離は、最短で Ko05-1 ~ Ko05-2 間の約 2km、最長で Na05-3 ~ Ib05-3 間の約 990km である。また、日本各地における局所的な集団構造を検討するために、5 県 7 地点(Sa06-8, Sa06-9, Ku06-3, Ya07-1, Hi06-3, Hi06-4 および Ka06-6)で採集されたいもち病菌、それぞれ 20 または 25 菌株を用いた。各採集地面積は $1 \times 1 \text{ m}^2$ で、そこからエノ

コロナ菌と同じ方法で 20 または 25 菌株ずつ採集し、それら菌株集団を日本各地における局所集団とした。

3-2-2. DNA フィンガープリント分析

各供試菌株のゲノム DNA を、MGR586-DNA フィンガープリント分析では *EcoR*、MAGGY-DNA フィンガープリント分析では *BamH* によって制限切断を行った。その制限 DNA 断片を 0.8%アガロースゲルで分画後、ナイロンメンブランへの転写を行った。プローブとして、MGR586-DNA フィンガープリント分析では、MGR586 トランスポゾン配列のほぼ全長を含むプラスミドクローン pMGR-T1(Farman et al. 1996b)を用いた。また、MAGGY-DNA フィンガープリント分析では、MAGGY のクローン pMGY23 の *Sal* -*BamH* 断片(SB)を含む pMGY-SB をプローブとして用いた(Tosa et al. 1995)。ハイブリダイゼーションおよび検出後、クラスター分析を前章の材料および方法と同様にして行った。

3-2-3. 交配能検定

2006 年に Hi06-1 および Gi06-1 で採集されたエノコロナ菌 2 菌株、ならびに Hi06-2 および Gi06-3 で採集されたアキノ菌 2 菌株の交配能について、「第 2 章 2-2. 材料および方法」で述べた Y93-164a-1(*MAT1-1*)および F1-63(*MAT1-2*)を検定菌株として用いて調査した。調査方法は前述(第 2 章 2-2. 材料および方法)の通りである。

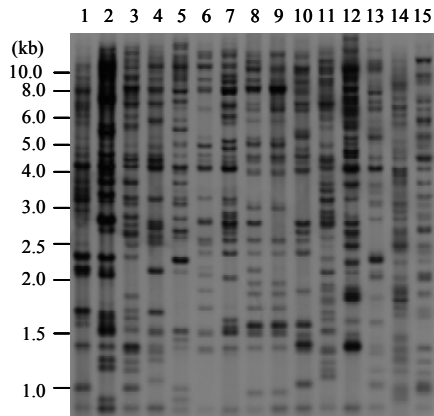
3-3. 結果

3-3-1. DNA フィンガープリント分析に基づくエノコロおよびアキノ菌の集団構造

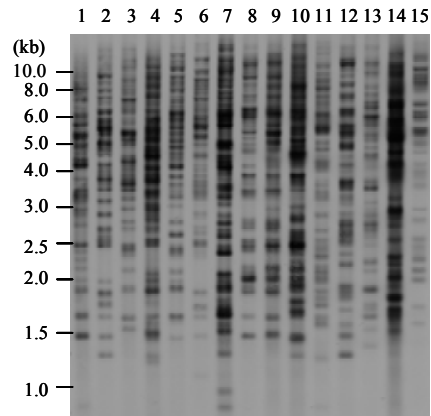
日本全国におけるエノコログサイもち病菌の集団構造を調査するために、2005～2006年に日本の11都府県15採集地で採集されたもち病菌15菌株を、MGR586-DNA フィンガープリント分析に供試した(Fig. 5A)。その結果、各DNA フィンガープリントパターンにおいて、1～10kbの間に約30のバンドが検出された(Fig. 5A)。また、菌株間の類縁度をDNA フィンガープリントパターン中の同一サイズバンドの共有率に基づき算出した。類縁度を算出した菌株の全組み合わせ(pairwise combination)は105であったが、類縁度100%を示す菌株の組み合わせは無く(類縁度18 - 93%, 平均39%)、比較的高い類縁度を示した pairwise combination はKa05-1とIb05-1、ならびにHy05-1とNa05-1において採集された菌株のみ(93%および75%)となった(Fig. 5C)。算出された類縁度に基づき、UPGMA デンドログラムを作成したところ、上述のKa05-1とIb05-1、ならびにHy05-1とNa05-1に由来する菌株を除き、類縁度65%以上においてグループを形成する菌株は無かった(Fig. 5E)。また、MAGGY-DNA フィンガープリント分析では、各菌株のDNA フィンガープリントパターンから、1～10kbの間に約45のハイブリダイゼーションバンドが認められた(Fig. 5B)。MGR586-DNA フィンガープリントパターンと同様に、105の組み合わせ中100%の類縁度を示す組み合わせは認められなかった(類縁度18 - 93%, 平均39%)(Fig. 5D)。さらに、同様に、Ka05-1とIb05-1、ならびにHy05-1とNa05-1に由来する菌株間には高い類縁度(83%および75%)を示した(Fig. 5F)。また、類縁度に基づき作成したUPGMA デンドログラムでも、Fig. 5Eのデンドログラムと同様に、68%以上でクラスターを形成する菌株は、上記2組み合わせ以外は認められなかった。MGR586およびMAGGYの両デンドログラムにおいて、菌株間の類縁関係は採集地間の距

Fig. 5. DNA fingerprint analysis of *Maganaporthe oryzae* isolates from green foxtail (A-F) and giant foxtail (G-K) at macro-geographic scale in Japan. 15 isolates from green foxtail were collected from 15 sites in 11 prefectures, Na05-1 and -2 in Nagasaki, Sa05-1 and -2 in Saga, Hi06-1 in Hiroshima, Hy05-1 in Hyogo, Si05-1 in Siga, Ky05-1 in Kyoto, Gi06-1 in Gifu, Ka05-1 and -2 in Kanagawa, Ch05-1 in Chiba, Ib05-1 in Ibaraki and Mi05-1 and -2 in Miyagi Prefecture (Fig. 3-1A), 15 isolates from giant foxtail were collected from from 15 sites in 11 prefectures, Na05-3 in Nagasaki, Sa05-6 and -7 in Saga, Ku05-2 in Kumamoto, Oi05-1 and -2 in Oita, Hi06-2 in Hiroshima, Eh05-1 and -2 in Ehime, Ko05-1 and -2 in Kochi, Ky05-2 in Kyoto, Gi06-3 in Gifu, Ka05-5 in Kanagawa and Ib05-3 in Ibaraki Prefecture (Fig. 3-1B). **A, B, G, H** DNA fingerprint profiles of the 15 isolates were generated by using pMGR-T1 (A, G) and pMGY-SB (B, H) as hybridization probes for MGR586 and MAGGY, respectively. Molecular sizes are shown on the left. **C, D, I, J** Histograms showing similarities between DNA fingerprint profiles in all 105 possible pair-wise combinations of the 15 isolates. The similarities in C and D were calculated from the DNA fingerprint profiles shown in A and B, respectively, by using the formula of Nei and Li (1979). **E, F, K, L** UPGMA dendrograms were constructed from the DNA-fingerprint similarity data shown in C (E), D (F), I (K), J (L), respectively. The sites where isolates were collected are indicated as taxon labels. Numbers in parentheses with the taxon labels are corresponding to lane numbers of DNA fingerprint profiles shown in A, B, a and b, respectively. Numbers at nodes represent bootstrap support from 1000 iterations.

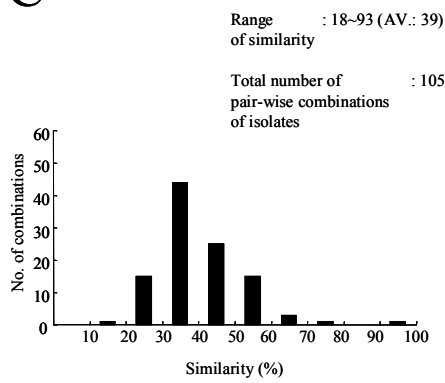
A



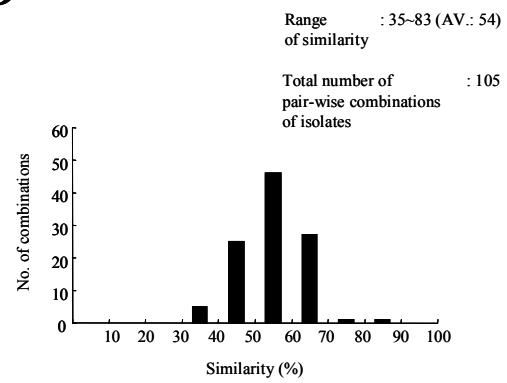
B



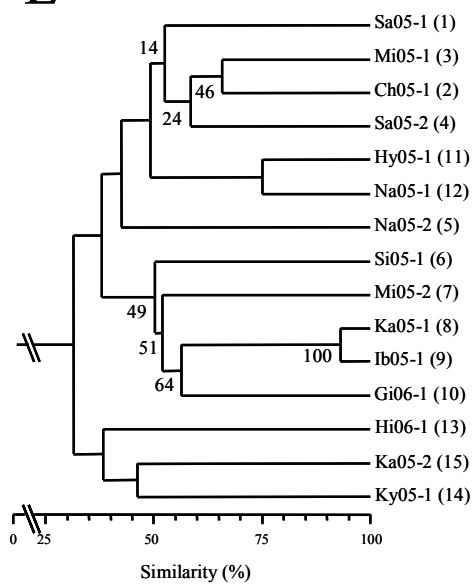
C



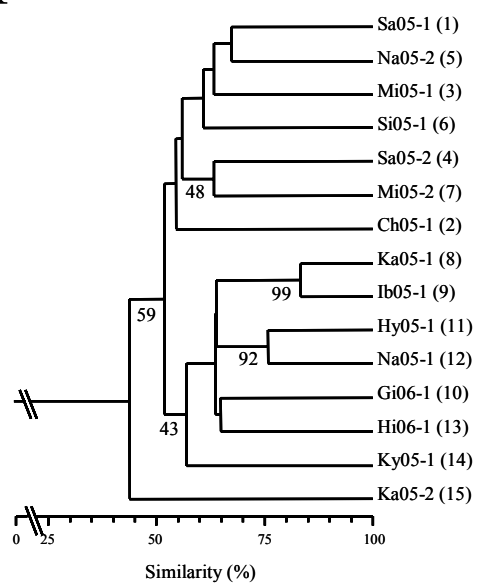
D

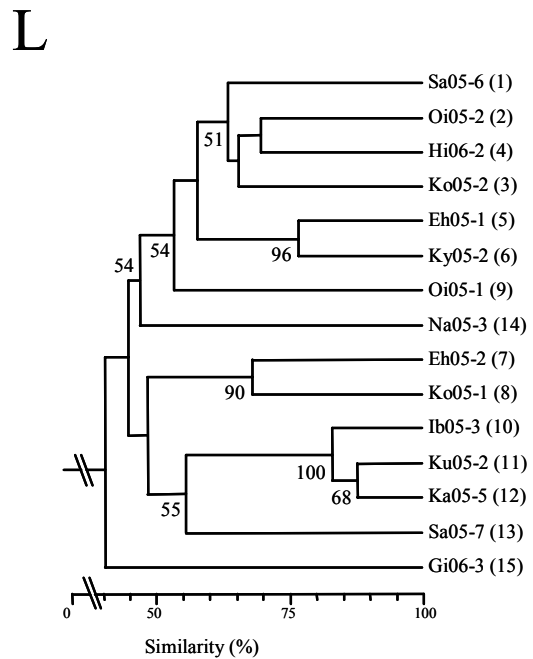
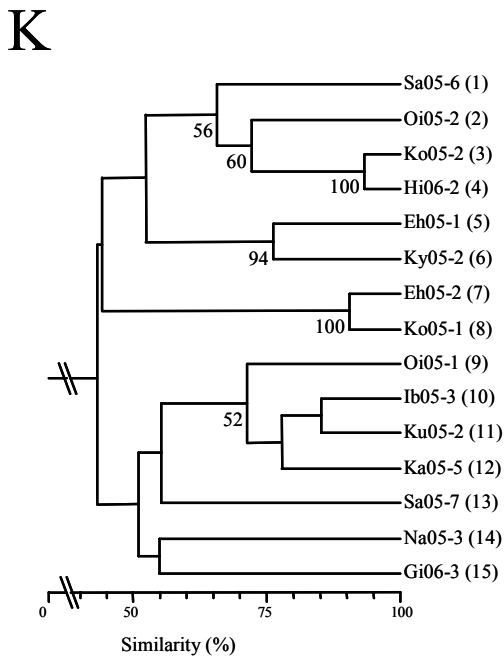
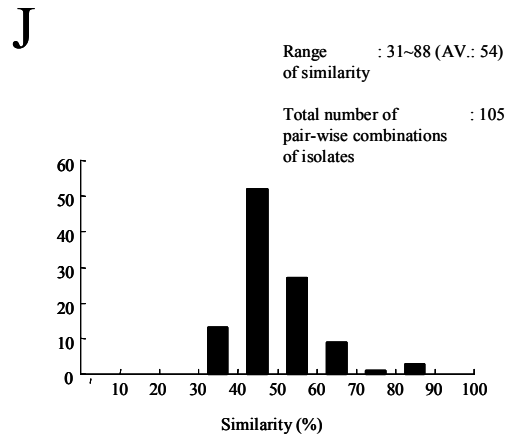
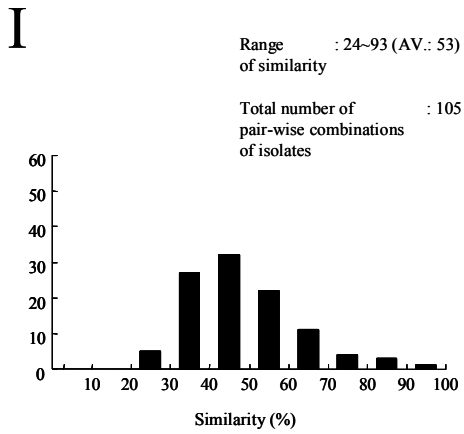
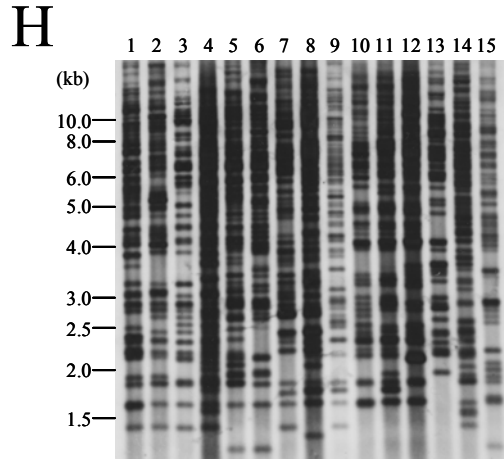
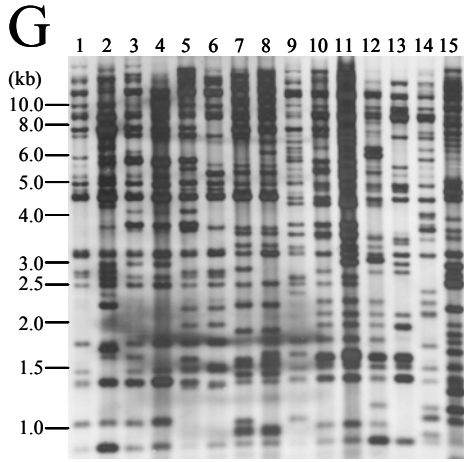


E



F





離と相関が認められなかった。供試菌株には佐賀県(Sa05-1 および-2)、長崎県(Na05-1 および-2)および宮城県(Mi05-1 および 2)で採集された菌株が含まれているが、両デンドログラムで同じ県内で採集された菌株どうしが単一のクラスターを形成することは無かった。例えば、15 採集地の中で、Mi05-1 ~ Mi05-2 間の距離が最短であったが、それら採集地の菌株は MGR586 のデンドログラム中では、Mi05-1 の菌株は、Ch05-1(千葉県)の菌株とクラスターを形成し、Mi05-2 の菌株は、Na05-2(長崎県)の菌株とクラスターを形成した。また、局所におけるエノコロ菌の集団構成を解析するため、日本の 6 県 9 採集地から、それぞれ 20 ~ 24 菌株ずつ採集した菌株集団について MGR586-DNA フィンガープリント分析を行った(Table 3)。Sa04-9 の面積は $5 \times 10 \text{ m}^2$ で、残り 8 採集地の面積は、それぞれ約 $1 \times 1 \text{ m}^2$ であった。1 例として、Sa04-1 で採集されたいもち病菌 20 菌株の DNA フィンガープリントパターンを Fig. 6A に示している。Fig. 6A で示すように、同一の DNA フィンガープリントパターンを示す菌株が、各菌株集団内で認められたが、そのような菌株は、1 菌株から無性的に増殖したものと考えられた。このような菌株は同一のハプロタイプとし、異なる DNA フィンガープリントパターンを示す菌株を異なるハプロタイプとして類別すると、各集団内で検出されたハプロタイプ数は、2 ~ 11 であった。また、Sa04-3 の菌株集団を除き、各菌株集団内のハプロタイプ間の類縁度は 62% 以下であった(Fig. 6B)。Sa04-1 の菌株集団においては、11 ハプロタイプが検出されたが、Fig. 6B で示すように、その 11 ハプロタイプは、70% の類縁度において 5 つの枝および 3 のクラスターに分かれていた。

エノコロ菌と同様に、日本の広域から採集されたアキノ菌菌株集団(11 府県 15 採集地)についても、MGR586 および MAGGY-DNA フィンガープリント分析を行った(Fig. 5G-L)。MGR586-DNA フィンガープリント分析では各フィンガープリントパターンから 1 ~ 10kb の間に約 30 のバンドが検出され、これらバンド

Table 3. MGR586-DNA fingerprint variation in microgeographic populations of *Magnaporthe oryzae* isolates from green foxtail.

Collection site ^a	No. of isolates	No. of haplotypes ^b	Similarity ^c (%)	No. of putative lineages ^d	
				70%	50%
Sa04-3	20	11 (55)	31-88(51)	8	4
Sa06-4	20	2 (1)	26	2	2
Sa06-5	20	3 (3)	48-62(54)	3	2
Ku06-1	24	2 (1)	34	2	2
Gi06-2	20	2 (1)	25	2	2
Ka06-3	20	2 (1)	33	2	2
Ka06-4	23	2 (1)	56	2	1
To07-1	20	3 (3)	20-60(38)	3	2
Ib07-2	20	2 (1)	20	2	2

^aSa-3 was 50m² in area, and other sites were 1m² in area.

^bNumbers of all possible pairwise combinations of haplotypes in each population are shown in parentheses.

^cRange of similarities between DNA fingerprint profiles in all possible pairwise combinations of haplotypes in each population were calculated by using the formula proposed by Nei and Li(1979): averages of the similarities are shown in parentheses.

^dPutative lineages were arbitrarily established as isolates with greater than 70% and 50% similarity in each population, respectively.

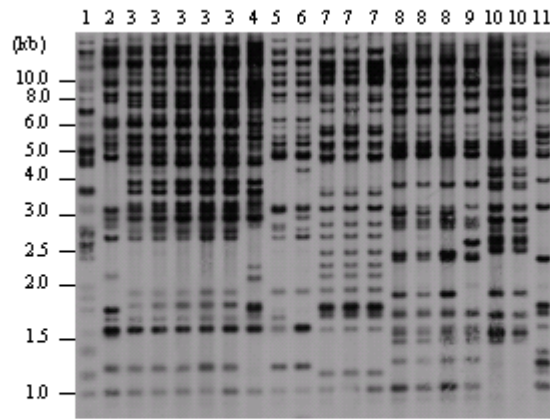
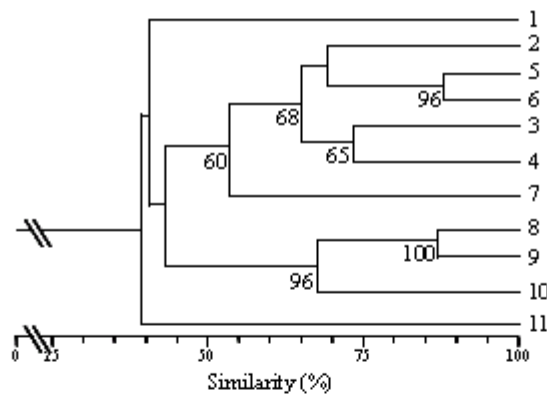
A**B**

Fig. 6. DNA fingerprinting profiles and a dendrogram of *Maganaporthe oryzae* isolates. **A** MGR586-DNA fingerprinting profiles of 20 *M. oryzae* isolates from green foxtail in Sa04-3 in Saga Prefecture. The DNA-fingerprint profiles were generated by using pMGR-T1 as a hybridization probe. Lane design, 1 to 11, shows haplotypes detected in the DNA-fingerprint profiles. Molecular sizes are shown on the left. **B** A UPGMA dendrogram constructed from DNA-fingerprint similarities among the 11 haplotypes in the DNA-fingerprint profiles. Numbers at nodes represent bootstrap support from 1000 iterations. Taxon labels are corresponding to numbers of haplotypes indicated above the lanes in Fig. 6A.

について菌株間で類縁度を算出した(Fig. 5G)。エノコロ菌と同様に供試菌株数は15であるため、pairwise combination は105となるが、このうち10の組み合わせで類縁度70%以上と比較的高い類縁度が認められたが、それ以外の組み合わせは68%以下となり、100%の類縁度を示す組み合わせは認められなかった(類縁度24-93, 平均53%)(Fig. 5I)。また、算出された類縁度に基づき作成されたUPGMA デンドログラムでは、類縁度75%以上と比較的高い類縁度で4つのクラスターが認められた(Fig. 5K)。すなわち、それぞれKo05-2およびHi06-2、Eh05-1およびKy05-2、Eh05-2およびKo05-1、Ib05-3、Ku05-2およびKa05-5の採集菌株で構成されるクラスターである。このうち、Ko05-2およびHi06-2、Eh05-1およびKy05-2、Eh05-2およびKo05-1の3つのクラスターは高いブートストラップ値(94~100%)で支持されていた。一方、これら以外で観察されたクラスターは全て75%以下で分岐していた。MAGGY-DNA フィンガープリント分析では各フィンガープリントパターンから1~10kbの間に約45のバンドが検出された(Fig. 5H)。これらバンドから算出した菌株間の類縁度は105の pairwise combination 中、31~88%(平均54%)であり、100%の類縁度を示す組み合わせは認められなかった(Fig. 5J)。MGR586では作成したデンドログラムに75%以上の類縁度で4つのクラスターが認められたが、MAGGYのデンドログラムでは、75%以上の類縁度で観察されるクラスターは2つに留まった(Fig. 5L)。他のクラスターは全て69%以下の類縁度で分岐していた。MGR586とMAGGYのデンドログラムを比較した場合、MGR586のデンドログラムで75%以上の類縁度で観察された4つのクラスターのうち、Eh05-1およびKy05-2、Eh05-2およびKo05-1、Ib05-3、Ku05-2およびKa05-5の採集菌株でそれぞれ構成される3つのクラスターがMAGGYのデンドログラムでも支持されていた。エノコロ菌ではMGR586およびMAGGYのどちらのデンドログラムについても、菌株の地理的由来に関連したクラスターは認められなかったが、アキノ菌についても同様の結果とな

った。すなわち、本解析では同一県内から採集されたものとして、佐賀県(Sa05-6 および-7)、大分県(Oi05-1 および-2)および愛媛県(Eh05-1 および-2)の菌株が含まれるが、MGR586 および MAGGY のどちらにおいてもデンドログラム中でこれら同一県から採集された菌株のペアが単一のクラスターを形成することはなかった。エノコロ菌と同様に、5 県 7 採集地において、局所、すなわち 1×1 m²の範囲から採集された菌株集団について検討を行った(Table 4)。その結果、各菌株集団において、2~5 のハプロタイプが認められた。また、ハプロタイプ間の類縁度は 98%以下と、エノコロ菌の場合よりも高い値を示したものの、Hi06-4 の菌株集団を除き、類縁度が 70%以下となるハプロタイプの組み合わせがいずれの集団にも認められた。

3-3-2. エノコロおよびアキノ菌の交配能

2006 年に Hi06-1 および Gi06-1 で採集されたエノコロ菌 2 菌株、ならびに Hi06-2 および Gi06-3 で採集されたアキノ菌 2 菌株を、交配能検定に供試した。その結果、検定菌株 Y93-164a-1(*MAT1-1*)および F1-63(*MAT1-2*)と子のう殻を形成するものは認められなかった。したがって、エノコロおよびアキノ菌の交配能は、前章と同様に極めて低いことが示唆された。

3-4. 考察

これまで調査された地域および国のイネいもち病菌集団では、DNA フィンガープリント分析に基づく UPGMA デンドログラム中に、リネージが明確なクラスターとして識別されてきた。すなわち、デンドログラム中、菌株間のグルーピングを示すクラスターは類縁度を示す軸に添って不連続に生じる。すなわち、

Table 4. MGR586-DNA fingerprint variation in microgeographic populations of *Magnaporthe oryzae* isolates from giant foxtail.

Collection site ^a	No. of isolates	No. of haplotypes ^b	Similarity ^c (%)	No. of putative lineages ^d	
				70%	50%
Sa06-8	20	6(15)	7-78(26)	5	5
Sa06-9	20	4(6)	46-89(65)	2	2
Ku06-3	20	5(10)	42-77(61)	2	1
Ya07-1	20	5(10)	37-96(55)	4	2
Hi06-3	20	3 (3)	44-98(62)	2	2
Hi06-4	20	3 (3)	96-98(97)	1	1
Ka06-6	25	2 (1)	58	2	1

^aAll sites were 1m² in area.

^bNumbers of all possible pairwise combinations of haplotypes in each population are shown in parentheses.

^cRange of similarities between DNA fingerprint profiles in all possible pairwise combinations of haplotypes in each population were calculated by using the formula proposed by Nei and Li(1979): averages of the similarities are shown in parentheses.

^dPutative lineages were arbitrarily established as isolates with greater than 70% and 50% similarity in each population, respectively.

リネージであると考えられる高いブートストラップ値で支持されるクラスターは、デンドログラム中で高い類縁度(80%)で形成され、これらクラスター間の結びつきを示すスーパークラスターは、通常 70%以下の類縁度で最初に形成される。したがって、リネージに対応するクラスターから次のスーパークラスターまでは、いわばクラスターの空白域とも呼べるインターバルが現われる。一方、エノコロ菌集団のデンドログラムにおいては、クラスターの形成が類縁度に対して連続的に観察され、イネいもち病菌集団でみられるような明確なリネージ構造が認められなかった。しかし、イネいもち病菌集団においても、例外的に、明確なリネージ構造が認められない菌株集団も報告されている。Park ら(2003)は、1981～2000年にかけて採集された韓国産イネいもち病菌 328 菌株のリネージ構成を、MGR586 および MAGGY-DNA フィンガープリント分析により調査した。その結果、70～85%と幅広い類縁度でデンドログラム中に 13 のクラスターが連続的に形成された。また、これらクラスターは菌株の採集年と一致するものの、高いブートストラップ値で支持されるものが無かった。したがって、Park ら(2003)は、韓国のイネいもち病菌集団についてはこれらクラスターを含む単一のスーパークラスターがリネージに対応すると考えられた。すなわち、韓国産イネいもち病菌の集団は単一のリネージで構成されると推論された。本研究の日本全国から採集されたエノコロ菌のデンドログラムでも、クラスターは類縁度を示す軸に添って連続に生じ、クラスターの空白域と呼べるようなインターバルは認められなかった。しかしながら、同デンドログラムでは高い類縁度でのクラスターの形成はほとんど認められなかった。このことから、韓国産のイネいもち病菌集団とは異なり、検出されたハプロタイプのほとんどは異なるリネージに属すると考えられた。同デンドログラムで、2つの菌株組み合わせ(Ka05-1 と Ib05-1, および Hy05-1 と Na05-1 から分離されたいもち病菌)が、それぞれ 1つのクラスターを形成し、残りの 11 菌株は、それぞれ単独でクラスター

を形成した。これらの状況から推定すると、供試した 15 のエノコロ菌株は 13 のリネージに分けられると考えられる。これまで報告されているイネいもち病菌集団のリネージ数は、ヒマラヤ山脈山麓で採集された菌株集団を例外とすると、1~10 に収束している。したがって、エノコロ菌のリネージは、イネいもち病菌集団のものよりも数が多いと言える。また、このことは供試したエノコロ菌株は 15 と少数であることも考慮すると、一段と明確となる。なお、ヒマラヤ山脈山麓で採集された菌株集団には 56 と多数のリネージが認められているが、本集団の菌株は野外で交配していることが想定されており、かつ、同地域はイネの起源地とされ、これら要因により例外的なりネージ構成の複雑さが観察されると考えられている(Kumar et al. 1999)。全国から採集したアキノ菌については MGR586-DNA フィンガープリント分析に基づくデンドログラム中で 76%と比較的高い類縁度で4つのクラスター(Ko05-2 および Hi06-2, Eh05-1 および Ky05-2, Eh05-2 および Ko05-1, Ib05-3, Ku05-2 および Ka05-5 の採集菌株をそれぞれ含む)が認められ。これらのうち Ib05-3、Ku05-2 および Ka05-5 のクラスターを除く3つは高いブートストラップ値で支持されていた。また、Eh05-1 および Ky05-2 と Eh05-2 および Ko05-1 をそれぞれ含むクラスター、さらには Ib05-3、Ku05-2 および Ka05-5 のクラスターも MAGGY のデンドログラム中でグルーピングが支持されていた。そこで、これらを4つのクラスターをリネージと仮定し、これらクラスターに含まれない菌株をそれぞれ別のリネージにすると、供試菌株は 10 のリネージに分けられる。また、アキノ菌についても、両デンドログラム中で各クラスターは類縁度の軸に沿って連続的に形成される傾向を示している。これらのことはアキノ菌についても、集団構造が複雑であり、多数のリネージが含まれることを支持するものと考えられた。また、全国から採集したエノコロおよびアキノ菌の両菌株集団のデンドログラムで、同じ県に由来する菌株が単一のクラスターを形成する傾向は認められなかった。このことから、これら菌

は同一県内といった限られた場所においても、集団のリネージ構成が複雑であることが予想された。本研究では、 $5 \times 10 \text{ m}^2$ あるいは $1 \times 1 \text{ m}^2$ といった局所から両菌菌株を採集し、DNA フィンガープリント分析に供試したが、エノコロおよびアキノ菌のいずれの集団についても、リネージ構成は複雑と考えられた。イネいもち病菌の研究例で通常、異なるリネージ間に認められる類縁度 70%を基準に各集団で検出されたハプロタイプをリネージに分けると、アキノ菌の 1 集団を除き、Table 3 および 4 に示す通り各集団は 2~8 の異なるリネージを含むことになる。さらに低い 50%でリネージ類別を行っても、エノコロ菌では 8、アキノ菌では 4 の集団で異なるリネージに識別されるハプロタイプが存在する。

栽培植物の病原体の場合、新抵抗性品種の導入、農薬散布などによる人工的な選択圧が、病原菌の動態に非常に大きな影響を及ぼすと考えられる。このような淘汰圧は病原菌の集団にボトルネック効果を生み出し、集団の遺伝的多様度を減少させるのかもしれない。日本のイネいもち病菌集団では、過去に本菌の大量絶滅が生じ、現在の集団に分布するリネージが減少したと考えられている。Don ら(1999a)は DNA フィンガープリント分析により、1972~1993 年の間に採集された日本産イネいもち病菌集団は 2 つのリネージで構成されることを明らかにした。また、これらリネージは 1960 年より前に採集されたいもち病菌で検出された 5 つのリネージのうち 2 つに相当していた。したがって、1960 年以前に存在していた 3 つのリネージは、絶滅したものと考えられた。日本では、1960 年初期に、いもち病耐性品種が商業用として幅広く導入されたが、その品種に病原性を示すいもち病菌集団が出現し、数年間のうちに抵抗性の崩壊が生じた。Sone ら(1997)は、リネージ構成の単純化は、その抵抗性の崩壊に付随するものと提案している。すなわち、抵抗性品種の導入が、イネいもち病菌集団のリネージの絶滅を招き、その後、抵抗性品種に感染可能であった少数の生き残った個体から現在のイネいもち病菌集団は派生したと考えた。本研究で結

論付けられた日本におけるエノコロおよびアキノ菌集団のリネージ構成の複雑さは、人工的な選択を受けていないことに起因するのかもしれない。すなわち、これら集団は、日本のイネいもち病菌で想定されているボトルネックを通過しておらず、結果として、祖先菌株集団の多様なリネージ構成が、現代の菌株集団においても保持されているのかもしれない。

また一方で、DNA フィンガープリントパターンにおいて識別されたハプロタイプやリネージは、無性生殖中の変異、または有性・擬有性生殖による組換えにより、急速に生じたと推察することもできる(Wu and Magill 1995; Kumar et al. 1999; Zeigler et al. 1997)。特に、局所集団においてハプロタイプの変異が見つかったことは、このことを支持するようにも見受けられる。しかしながら、我々は前章において、日本広域から分離されたエノコロおよびアキノ菌各 13 菌株について交配能を調査し、捻性が低いことを明らかにした。また、本研究では新たに、局所(Sa04-3)から分離されたいもち病菌集団 20 菌株について、その交配能を調査したが、検定菌株 Y93-164a-1(*MAT1-1*)および F1-63(*MAT1-2*)と子のう殻を形成するものは認められなかった。したがって、エノコロおよびアキノ菌集団における DNA フィンガープリントパターンの変異に有性生殖はほとんど寄与しないものと推測される。これまで、イネいもち病菌について、無性生殖中および擬有性生殖の過程における DNA フィンガープリントパターンの変異について調査が行われてきた(Wu and Magill 1995)。その結果、変異が認められとしても、親菌株のハプロタイプとの差異はわずかであり、新しいリネージを生じるような変異は観察されていない。したがって、本研究で供試菌株に認められた様々な DNA フィンガープリントパターンが体細胞分裂中の変異または擬有性生殖による組換えにより生じているかについては更なる調査が必要であるが、その可能性は低いものと考えられる。

前章において、エノコロおよびアキノ菌が、アワの地方品種および市販品種

に対して様々な病原性反応を示すことを見出され、両菌集団にアワに対するレースが存在すると考えられた。エノコログサおよびアキノエノコログサ集団が保有する病原菌に対する抵抗性遺伝子が、レース分化や菌株集団中に高い遺伝的多様度をもたらしているのかもしれない。今後、エノコロおよびアキノ菌の、エノコログサおよびアキノエノコログサに対する病原性反応について調査を行い、レース分化やいもち病抵抗性について検討する必要がある。

第4章 エノコログサ及びアキノエノコログサの種子に感染したいもち病菌の野外における越冬

4-1. 目的

イネいもち病菌の防除および抵抗性品種の育成には、本病原菌の生態学的特性の把握が不可欠である。特に、イネいもち病菌の伝染環についてはこれまで数多くの検討が行われており、その結果、イネいもち病菌の主な一次伝染源は保菌種子であることが明らかとなっている。すなわち、保菌種子が屋内の乾燥条件下において越冬可能であり、その種子表面に付着した胞子は約1年生存可能であることが報告されている(栗林 1928)。また、本菌は、被害わらにおいても越冬可能であり屋内の乾燥条件であれば胞子は約1年、菌糸は約4年生存できることが報告されているが(栗林 1928)、近年わらを農業資材として利用する機会が少なくなり、伝染源として無視できる対象となっている。したがって、保菌種子の消毒が、本病の最も有効な防除手段として徹底されてきた。また、1970年代からの機械移植の普及により、育苗法が水苗から育苗箱を利用したものへと変化し、いもち病の早期多発が確認されるようになった。このことから、保菌種子の一次伝染源としての役割が改めて議論されるようになった。つまり、育苗箱中で菌が苗に感染し、さらにその苗が本田に持ち込まれるため、本田移植後に感染するよりも早期に多発するようになったことが予想された。このため、育苗箱中の伝染源として保菌種子の役割が重要視され、育苗期間中における様々な条件での保菌種子中の菌の生存について検討されている。例えば、種子感染したいもち病菌は、湛水条件下ではほぼ死滅するが、無湛水下においては生存可能であり、苗いもちを引き起こすことが明らかとなっている(鈴木・藤田 1977, Lamey 1970)。また、種子での本病原菌の生存率には播種後の覆土が関係し

ており、覆土が浅いあるいは非覆土であるときに苗いもちが発生しやすいことが報告されている(Manandhar et al. 1998, 鈴木・藤田 1977, Lamey 1970)。このようにイネいもち病菌については保菌種子に関する知見の集積が既にある一方で、種子感染したいもち病菌の野外における越冬について検討された例が極めて少ない。これは、種子が収穫物であるため屋内での保存がこれら先行研究の前提になっていたためである。また、前述の栗林(1928)の研究が契機となり、野外における保菌種子中の菌の越冬については不可能とする見解が一般的になっている。つまり、野外では降雨により多湿となる期間が必ずあるからである。しかしながら、野生植物のいもち病菌については、植物体が冬場に屋内で保管される状況にないため、必ず野外で越冬していると推論される。そこで本章では、エノコロおよびアキノ菌について、野外における越冬の可能性を検討した。また、越冬源として、イネいもち病菌の研究例を参考に保菌種子に焦点を当てた。また、越冬の成否については、種子感染した菌を DNA フィンガープリント分析によって追跡することにより行った。すなわち、種子から得られた菌と同様の DNA フィンガープリントパターンを有する菌株が、冬場野外に放置した種子から出芽した植物個体にも発生するかを調査した。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 供試種子の増殖および菌株の接種

供試したエノコログサおよびアキノエノコログサ種子はともに 2004 年に佐賀県(エノコログサ)および秋田県(アキノエノコログサ)にそれぞれ自生していた植物体 1 個体の種子に由来するものである。これら自生植物体の種子を 2005 年にイネ育苗用培土上に播種し、出穂するまで育成した後、穂から採種を行った。

このようにして増殖した種子を 2006 年 5 月 23 日～6 月 16 日にイネ育苗用培土上に播種し、ガラス室内にてエノコログサで 3～7 葉期、アキノエノコログサで 1～6 葉期の幼苗になるまで育成した。これら幼苗に、「第 2 章 2-2. 材料および方法」に述べた方法に準じて、先に佐賀大学農学部植物病制御学研究室にて保存されたアキノ菌 SA04-110 を接種した。なお、エノコログサについては菌株を接種する前に、いもち病菌の自然感染が認められたため、1000 倍希釈したベンレート(デュポン)を 2 度噴霧散布した。また、噴霧散布 3 日後に植物体を散水により洗浄し、菌株の接種に用いた。接種した幼苗はガラス室で育成し、接種から 5 日間後の 6 月 30 日にクロロピクリンで予め土壤消毒した佐賀大学農学部実験圃場内の 1 区画(約 6.5 m²)に移植し、この区画を採種圃場とした。移植はエノコログサおよびアキノエノコログサのそれぞれ苗 36 株を採種圃場内にランダムに配置することにより行った。このように移植した植物体からの採種は移植約 1 ヶ月後の 8 月 1 日から開始し、9 月末まで行った。

4-2-2. 越冬調査地点における播種および植物体の育成

2006 年に採種圃場で増殖したエノコログサおよびアキノエノコログサの種子は、同年 10 月に三瀬および久保泉の 2 地点に播種した。両植物の種子はそれぞれの地点において約 1m² の区画に 15000 粒(エノコログサ)および 1 m²あたり 10000 粒(アキノエノコログサ)となるように土壤表面に種子を散播した。また、2006 年に採種を行った佐賀大学農学部実験圃場では、採種後に穂に残った種子を自然落下させて播種の代わりとした。これら地点では、播種後、散水や施肥等は一切行わず、自然状態のまま種子を放置して、翌 2007 年に両植物種の成植物体を自生させた。

4-2-3. 供試菌株の分離

実験に供試した菌株集団の名称は菌株の分離植物組織の採集地点を示す H[佐賀大学実験圃場(佐賀市本庄)] M(三瀬)あるいは L(久保泉)、分離した植物組織を示す S(種子)あるいは L(葉)、分離した宿主種を示す E(エノコログサ)あるいは A(アキノエノコログサ)と植物組織の採集年(06 あるいは 07)を付して示している。菌株の分離は、2006 年に採種圃場で育成した植物体の罹病葉(菌株集団名 HLE06 および HLA06)、同年の増殖種子(HSE06 および HSA06)、および増殖種子を播種後、翌 2007 年に各地点で自生した植物体の罹病葉(HLE07, HLA07, MLE07, MLA07 および KLE07)から行った。このようにして得られた各菌株集団に含まれる菌株数は Table 5 および 6 に示す通りである。罹病葉および種子からの分離は Kusaba ら(2006)の方法に従い、単孢子分離により行い、1 罹病葉あるいは 1 種子当たり 1 菌株の供試菌株を得た。罹病葉の採集は、2006 年は採種圃場で同年 8 月 2 日に、翌 2007 年はそれぞれ、7 月 22 日(佐賀大学実験圃場)、7 月 23 日(久保泉)、7 月 24 日(三瀬)に行った。また、採種は上記の通り 2006 年 8 月 1 日~9 月 30 日まで行い、種子からの菌株の分離は、原則としていもち病菌保菌種子率の調査に附随して行った。保菌種子率の調査はディープフリーズプロッター法(Manandhar et al. 1998)により行った。すなわち、採種後、エノコログサおよびアキノエノコログサの種子をプラスチックシャーレ内の水で湿らせたペーパータオル上に 25 粒ずつ置床した。いもち病菌の伸長を促すために、各シャーレを -25℃ で 6 時間凍結して種子細胞を不活化し、その後、22℃、12 時間近紫外線光下にて 5 日間培養した。培養後、顕微鏡下で種子上のいもち病菌の孢子形成の有無を観察し、種子 1000 粒当たりの保菌種子数を調べた。また、孢子形成が認められた種子については単孢子分離に供試した。アキノエノコログサの種子からは以下の方法によっても菌株の分離を行った。すなわち、アキノエノコ

Table 5. Haplotype distribution in populations of *Magnaporthe oryzae* isolates from green foxtail.

Year	Population ^a	No. of total isolates	No. of isolates grouped into each haplotype ^b									
			E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	E-8	E-9	
2006	HLE06	25	22	-	-	1	-	-	-	2	-	-
	HSE06	24	21	1	-	-	-	-	-	2	-	-
2007	HLE07	24	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MLE07	25	-	-	2	-	14	5	-	4	-	-
	KLE07	24	-	-	-	-	24	-	-	-	-	-

^a HLE06, HLE07, MLE07 and KLE07 were obtained from blast lesions on infected leaves, and HSE06 was collected from infected seeds of green foxtails .

^b “-” indicates no isolate found in a haplotype.

Table 6. Haplotype distribution in populations of *Magnaporthe oryzae* isolates from giant foxtail.

Collection year	Population ^a	No. of total isolates	No. of isolates grouped into each haplotype ^b													
			A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	A-11	A-12		
2006	HLA06	25	21	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	1
	HSA06	20	14	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3	1	-
2007	HLA07	20	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	MLA07	20	-	-	13	4	4	-	1	2	-	-	-	-	-	-

^a HLA06, HLA07 and MLA07 were obtained from blast lesions on infected leaves, and HSA06 was collected from infected seeds of giant foxtails .

^b “-” indicates no isolate found in a haplotype.

ログサの種子を70%エタノール(5秒)および3%アンチホルミン(2分)に浸漬して表面殺菌し、滅菌蒸留水で3回洗浄した。その後、種子を、乾熱滅菌した2枚のスライドガラスに挟み、指圧により破碎した。破碎種子をストレプトマイシン添加素寒天培地に移植し、22℃、12時間近紫外線光下にて6日間培養後、種子組織上から単孢子分離により菌株を得た。

4-2-4. DNAフィンガープリント分析

供試菌株のDNAフィンガープリント分析はMGR586をプローブとして行った。また、得られたDNAフィンガープリントパターン間で同一サイズのハイブリダイゼーションバンドの共有率を基に遺伝的類縁度を算出し、クラスター分析を行った。これらのDNAフィンガープリント分析ならびクラスター分析は前述した通りの方法で行った(第2章 2-2. 材料および方法)。

4-3. 結果

4-3-1. 2006年の育苗期間、採種圃場におけるいもち病の発生、ならびに、増殖種子中の保菌種子率

2005年に増殖した種子から育成したエノコログサの苗には、いもち病菌の接種前に既にいもち病斑の形成が認められた。そこで、ベンレート(デュポン)により植物体の消毒を行った後に、供試菌株の接種に用いた。一方、アキノエノコログサについては、接種前の育苗期間にはいもち病の自然発生が認められなかった。アキノエノコログサについては、接種後5日間で初めていもち病斑の形成が認められたため、このような病斑が形成された苗を選んで、採種圃場に移

植した。一方、エノコログサについては、接種後に新規な病斑形成が認められなかった。このため接種前の育苗期間に発病が認められなかった健全苗を選び、採種圃場に移植した。移植したエノコログサには、移植 10 日後に初めていもち病斑の形成が認められ、植物体の分けつ・生長に伴い、採種および罹病葉の採集を開始した 8 月初旬までにはほとんど全ての株で病斑形成が認められるようになった。また、アキノエノコログサでは移植後に植物体の分けつ・生長に伴い、接種により形成された病斑に加えて新規な病斑形成が認められ、採種および罹病葉の採集を開始した 8 月初旬までには接種時には展開していなかった葉にも病斑形成が認められた。また、これら植物体から得られた種子におけるいもち病菌の保菌率をディープフリーズプロッター法(Manandhar et al. 1998)により調査した。その結果、エノコログサで 4%(1000 粒中 40 粒)、アキノエノコログサで 0.4%となった(1000 粒中 4 粒)。

4-3-2. 播種地点における 2007 年のいもち病菌の発生

2006 年に増殖した種子を播種した三瀬および久保泉の 2 地点、および、2006 年に採種を行った佐賀大学農学部実験圃の全地点で 2007 年の 7 月にはエノコログサおよびアキノエノコログサの成植物体が生育し、群落を形成していた。また、罹病葉の採集を行った 2007 年の時点で、久保泉のアキノエノコログサを除く、全群落でいもち病の発病が認められた。

4-3-3. 2006 年の保菌種子および 2007 年の罹病葉から分離したいもち病菌におけるハプロタイプの分布

2006 年に採種圃場で育成した植物体の罹病葉(HLE06 および HLA06)、同年の

増殖種子(HSE06 および HSA06)、増殖種子を播種後、翌 2007 年に各地点で自生した植物体の罹病葉(HLE07, HLA07, MLE07, MLA07 および KLE07)から分離された各菌株集団について、MGR586 をプローブとした DNA フィンガープリント分析を行った。検出された DNA フィンガープリントパターンはエノコロおよびアキノ菌の集団に分けて比較を行い、パターン間でハイブリダイゼーションバンドが 1 本でも異なるものをハプロタイプとして類別した(Table 5 および 6)。その結果、5 つのエノコロ菌集団(HLE06, HSE06, HLE07, MLE07 および KLE07)においては、供試した全 122 菌株から 8 つのハプロタイプ、4 つのアキノ菌集団(HLA06, HSA06, HLE07 および MLA07)においては、全供試菌株 85 から 12 のハプロタイプが認められた。これらハプロタイプはエノコロ菌のものを E-1 ~ -8、アキノ菌集団のものを A-1 ~ -12 と命名した(Table 5 および 6)。2006 年の罹病葉および保菌種子から分離されたエノコロ菌の菌株集団 HLE06 および HSE06 では、-1、-2、-4 および -7 が分布していた。また、これらハプロタイプのフィンガープリントパターンは、植物体を採種圃場に移植前に接種した SA04-110 のパターンとは明らかに異なっていた(データ未掲載)。すなわち、接種菌は供試したエノコログサの苗に感染ができなかったと考えられた。2006 年のエノコロ菌集団では両集団ともに E-1 が優占的に分布していた。すなわち、HLE06 の 25 菌株中 22 菌株、HSE06 の 24 菌株中 21 菌株が E-1 に所属していた。他の E-2、E-4 および E-7 のハプロタイプは全てマイナーな分布を示した。なお、E-1 を除き、2006 年の罹病葉および種子分離菌株の両集団で共通に分布していたハプロタイプは E-7 のみとなり、他は各集団に特異的分布を示した。2006 年に採集されたエノコロ菌の集団と 2007 年に各地点で採種された集団との間で分布するハプロタイプの比較を行った。その結果、E-1 は、採種圃場の跡地である佐賀大学実験圃場から得られた HLE07 で優占的に分布し、同集団内の全供試菌株がこのハプロタイプを有していた。一方、三瀬および久保泉からの分離集団(MLE07 および

KLE07)については、E-1 とは異なるハプロタイプが分布していた。これら両集団で認められた全ハプロタイプは2006年の集団には分布していないものであり、それぞれ、MLE07にはE-3、-5、-6および-8、KLE07にはE-6のみが優占的に分布していた。

2006年の罹病葉および保菌種子から分離されたアキノ菌集団 HLA06 および HSA06 では、ハプロタイプ A-1 がそれぞれの集団で優占的に分布していた。すなわち、HLA06の25菌株中21菌株、HSA06の20菌株中14菌株、および HLA07の20菌株中19菌株が、A-1に所属していた。また、A-1は接種した SA04-110のDNAフィンガープリントパターンと同一であった(データ未掲載)。したがって、アキノエノコログサでは移植前に接種した菌株が、その後の採種圃場で優占化し、さらに種子へと感染したと考えられた。また、HLA06およびHSA06ではA-1に加えて、A-5、-8、-9、-10、-11および-12が分布していたが、これらは最多でも3菌株に認められるハプロタイプであり、両集団でマイナーな分布を示した。また、2006年に採集された集団と2007年の集団との比較では、採種圃場跡地の佐賀大学実験圃場の集団 HLE07でA-1の優占的分布が認められた。また、HLE07ではA-10も1菌株のみが有するマイナーなハプロタイプとして検出されたが、このハプロタイプは上記の通り、2006年のHSA06集団にも分布し、同集団中で3菌株のみ保有していた。また、MLA07の集団ではA-3が優占的分布を示したが、A-3を含め、同集団に分布していた全てのハプロタイプ(A-4、-6および-7)はMLA07に特異的に分布していた。

4-3-4. ハプロタイプ間の類縁関係

エノコロおよびアキノ菌のそれぞれの集団で検出されたハプロタイプについて、ハプロタイプ間のDNAフィンガープリントパターンの比較から遺伝的類縁

度を算出した(Table 7 および 8)。エノコロ菌の全菌株集団からは E-1 ~ -8 のハプロタイプが検出されたが、これらハプロタイプの全 28 組み合わせでは、E-1 ~ -6 のハプロタイプの 15 組み合わせに 84%以上と高い類縁度が観察された(Table 7)。一方、これら以外のハプロタイプの組み合わせについては最高でも 72%の類縁度となった。また、算出した遺伝的類縁度から作出したデンドログラム中で、E-1 ~ -6 の 6 つのハプロタイプは 87%と高い類縁度で単一のクラスターを形成した(Fig. 7A)。また、このクラスターは 100%のブートストラップ値で支持されていた。一方、E-8 と-7 は E-1 ~ -8 のクラスターとは別に分岐し、E-7 と-8 間も類縁度は低く、62%に留まった。アキノ菌の全菌株集団からは A-1 ~ -12 のハプロタイプが検出されたが、これらハプロタイプの全組み合わせ(66 組み合わせ)では、A-1 ~ -3 のハプロタイプの 3 組み合わせ(3 組み合わせ)および A-10、-11 および-12 の 3 組み合わせにそれぞれ、93%および 83%以上と高い類縁度が観察された(Table 8)。これら以外についても、A-8 と-9 間(80%)および A-8 と-1、-2、-3 の間(74 ~ 79%)に比較的高い類縁度が観察されたが、これらを除く残りの 56 組み合わせについては最高でも 72%の類縁度となった。また、算出した遺伝的類縁度から作出したデンドログラム中では、A-1 ~ -3 および A-10 ~ -12 のハプロタイプが高いブートストラップ値で支持される単一のクラスターをそれぞれ別に形成した(Fig. 7B)。一方、その他のクラスターは全て 65%以下と低いブートストラップ値で支持されていた。

4.4. 考察

2006 および 2007 年の分離菌株集団におけるハプロタイプの分布から、エノコロ菌およびアキノ菌ともに、2006 年の罹病葉分離菌株集団で優占化していたハプロタイプ E-1(エノコロ菌)および A-1(アキノ菌)は、同年の種子分離菌株の集団で

Table 7. Percent similarities of MGR586-DNA fingerprint profiles among haplotypes of *Magnaporthe oryzae* isolates from green foxtail.

Haplotype	Similarity ^a (%)							
	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	E-8
E-1								
E-2	97							
E-3	95	93						
E-4	90	88	91					
E-5	86	84	87	86				
E-6	88	85	88	88	88			
E-7	66	68	63	66	63	62		
E-8	68	65	65	72	69	71	62	

^a Percent Similarities of MGR586 DNA fingerprint profiles were calculated by using the formula proposed by Nei and Li(1979).

Table 8. Percent similarity of MGR586-DNA fingerprint profiles among haplotypes of *Magnaporthe oryzae* isolates from giant foxtail.

Haplotype	Similarity ^a (%)											
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	A-11	A-12
A-1												
A-2	97											
A-3	95	93										
A-4	62	61	61									
A-5	62	60	60	52								
A-6	66	65	65	56	68							
A-7	63	61	61	65	75	75						
A-8	79	77	74	65	57	57	58					
A-9	54	53	52	56	59	51	65	80				
A-10	66	65	65	68	63	68	65	61	51			
A-11	66	65	65	72	63	63	70	61	51	90		
A-12	63	62	61	65	60	65	61	58	47	88	83	

^a Percent Similarities of MGR586 DNA fingerprint profiles were calculated by using the formula proposed by Nei and Li(1979).

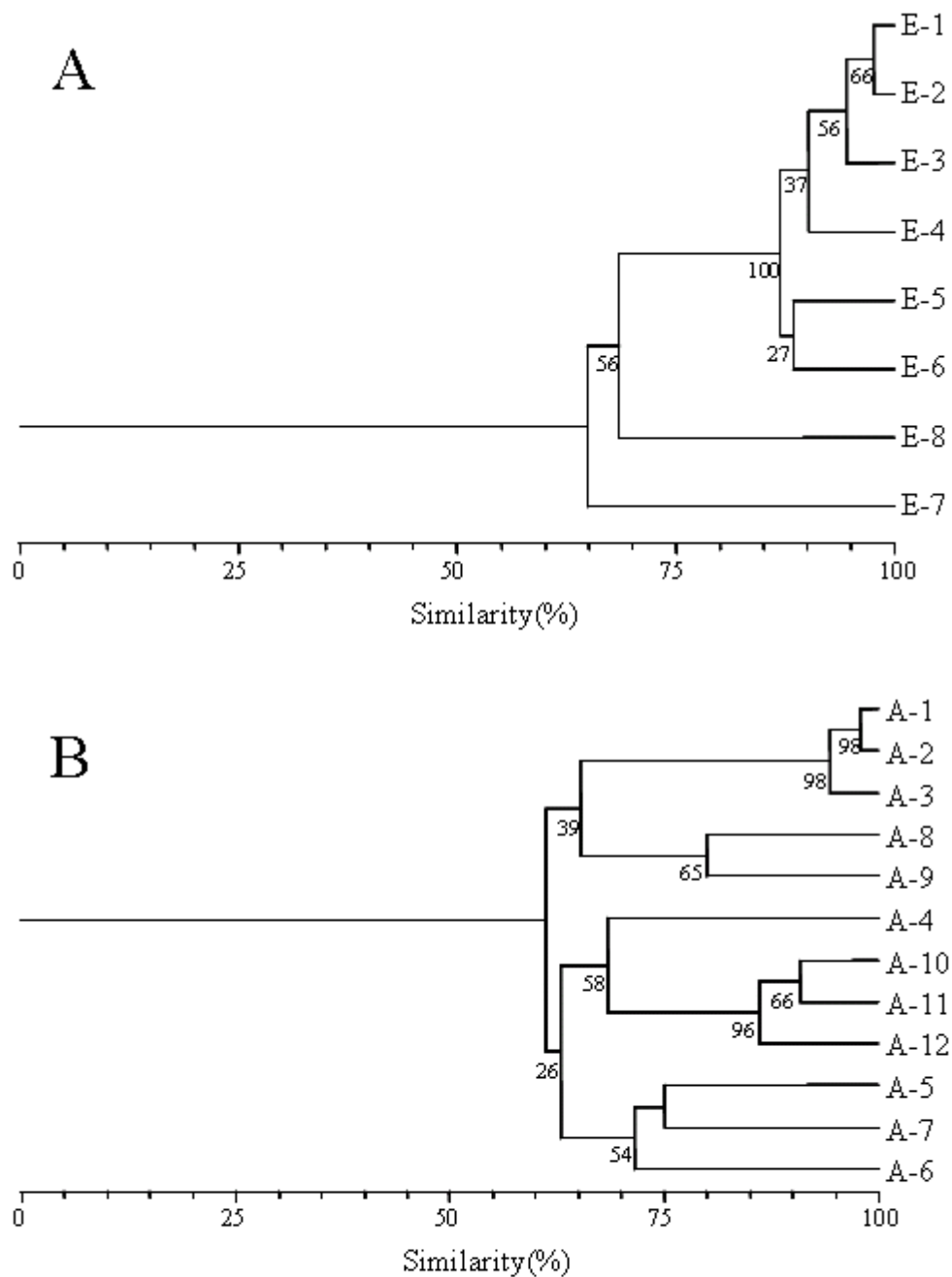


Fig 7. UPGMA dendrograms of *Magnaporthe oryzae* isolates from green foxtail (A) and giant foxtail (B) constructed from MGR586 DNA fingerprint similarity data. The haplotypes which isolates are belonging are indicated as taxon labels. Numbers at nodes represent bootstrap support from 1000 iterations.

も、さらには翌 2007 の採種圃場跡地の罹病葉分離集団においても、優占化していることが明かとなった。また、A-1 については、採種圃場に移植前に接種した菌株のハプロタイプと同一であった。これらのことより、少なくとも、採種圃場跡地においてはエノコロおよびアキノ菌ともに前年に発生していた菌株(すなわち、E-1 あるいは A-1 のハプロタイプを有する菌株)が越冬し、翌 2007 年にも発生したものと考えられた。一方、採種圃場跡地以外の地点については、エノコロおよびアキノ菌ともに、2006 年度に検出されたハプロタイプが分布することはほとんど無く、例外的に HSA06 と HLA07 の間で、それぞれの集団でマイナーなハプロタイプであった A-10 が共通して分布していた。また、全集団のマイナーなハプロタイプの大多数は各集団に特異的な分布を示すものであった。そこで、各ハプロタイプ間の DNA フィンガープリントパターンの比較から遺伝的類縁度を算出し、さらに平均距離法によりデンドログラムを作出した。第 3 章で既に述べたが、イネいもち病菌では、DNA フィンガープリントデータにより作成されたデンドログラム中で、高い類縁度(通常は 80%以上)で形成され、かつ、高いブートストラップ値(統計的には 95%以上)で支持されるクラスターはリネージとみなすことができる。この基準に従えば、エノコロ菌の E-1 ~ -6 のハプロタイプは同一リネージとして識別される。また、E-7 および -8 は互いに、さらには、E-1 ~ -6 と異なるリネージとして識別される。また、E-1 が 2006 年の罹病葉および保菌種子分離菌株集団(HLE06 および HSE06)内で優占化していたことを考慮すれば、2006 年の HLE06 で検出された E-4、さらには、HSE06 で検出された E-2 も E-1 のクローナルな増殖中により生み出された変異型のハプロタイプであると考えられる。同様に、2007 年の MLE07 および KLE07 で検出された E-3、-5 および -6 も E-1 由来のハプロタイプであると考えられる。すなわち、MLE07 および KLE07 についても、E-1 由来の菌株が分布していたと推定され、このことは三瀬・久保泉の両地点でも、2006 年度産の保菌種子中の菌が越冬し

た可能性を支持するものと考えた。そして、MLE07 の E-8 は 2006 年の分離菌株とは異なるリネージに属することから、2007 年に播種した種子からの生育個体に三瀬にて新規に感染した菌株に由来するハプロタイプと考えられた。なお、E-7 の菌株については、2006 年の罹病葉および種子にも感染可能であったと考えられるが、2007 年の菌株集団中では検出されていない。これは本ハプロタイプに属する菌株が 2006 年分離の菌株集団中でマイナーな系統であったことに起因するのかもしれない。また、アキノ菌については、A-2 および-3 が接種菌株と同一リネージであり、その他のハプロタイプの菌株は接種菌とは異なるリネージに属すると考えられる。すなわち、MLA07 についても接種菌株由来の菌株が分布したと推定され、三瀬についても保菌種子中の菌株が越冬していた可能性が支持された。また、アキノ菌についても、2006 年の分離菌株集団に認められたマイナーな分布を示すハプロタイプのほとんどが 2007 年の集団で検出されていない。このことは、これら 2 地点において、エノコログサおよびアキノエノコログサの種子で本菌は越冬可能であるものの、その成功率は極めて低いことを示しているのかも知れない。すなわち、越冬可能なものが少数なため、前年度の菌株でマイナーなハプロタイプを有するものが次年度の生存者に含まれる確率が低くなったのかもしれない。一方、エノコロおよびアキノ菌ともに採種圃場跡地では 2006 年度に優占分布したハプロタイプが次年度も優占的に分布したのに対し、三瀬と久保泉ではその優占ハプロタイプの変異型と考えられるもののみがみとめられている。このことは、たとえ同県内においても地理的要因のわずかな相異が本菌の越冬率に影響した可能性も示唆される。つまり、優占ハプロタイプの菌株から突然変異により出現した菌株が、三瀬と久保泉では適応し越冬できたのかも知れない。三瀬と久保泉で優占化したハプロタイプとそのオリジナルのハプロタイプ(エノコロ菌では E-1, アキノ菌では A-1)との DNA フィンガープリントパターンの差異はこのような環境に対応する遺伝子に連鎖

したバンドの違いにより生じたのかも知れない。

2006年に、種子増殖用のエノコログサおよびアキノエノコログサに同一の菌株 SA05-110 の接種を行ったが、エノコログサでは採種圃場移植後の罹病葉および種子からは接種菌とは全く異なる DNA フィンガープリントパターンを示す菌株のみが分離された。このため、接種菌は感染できなかったと考えられる。第3章ではエノコロおよびアキノ菌の、両宿主植物に対するレース分化の可能性について触れたが、接種菌は供試したエノコログサに対して非病原性レースであった可能性が考えられる。一方、アキノ菌では初期に感染した接種菌株が、採種圃場においても二次感染し、採種圃場に移植後に新規に感染した菌株を押さえて優占化したと考えられる。採種圃場の罹病葉あるいは種子分離菌株中の A-1 とは異なるリネージとなったハプロタイプの菌株はこのように新規に感染したものと推測される。もし、エノコログサについても初期に感染した菌株が後に感染した菌株よりも優占化するのであれば、E-1 は育苗中に自然感染した菌株に由来するのかも知れない。本研究では自然感染が認められた後、直ぐにベノミル散布による防除を行ったが、自然感染していた菌の除去には至らなかった可能性も考えられる。

保菌種子の検定方法として、プロッター法、ディープフリーズプロッター法およびアガープレート法などが用いられているが、これらは、種子上にいもち病菌胞子を形成させ、その胞子の有無により保菌率を検討するものである。いづれの方法も種子の検定に有用であるが、ディープフリーズプロッター法によるいもち病菌の検出精度が最も良好であると報告されているため(Pande et al. 1994)、本法を保菌種子の検出に採用した。その結果、エノコログサ種子においては 4%、アキノエノコログサ種子においては 0.4% となり、エノコログサとアキノエノコログサ種子の保菌率に差が認められた。久保泉においては、アキノエノコログサの植物体の発生は認められたものの、いもち病病斑の形成は認め

られなかったのだが、これは、アキノエノコログサ種子の保菌率の低さに起因する可能性も考えられる。また、両植物種における保菌率の差は、両植物種が形成する不稔種子の割合に差異によるためかもしれない。先の研究で、イネの稔実種子よりもよりも不稔種子においてのほうがイネいもち病菌の感染率が高いことが報告されている(鈴木 1929, Manandhar et al. 1998)。Manandhar ら(1998)はネパールの 3 地方において、それぞれ異なる品種から種子を採集し、採集種子を稔実種子および不稔種子に選別後、それぞれの保菌率をプロッター法により調査を行った。その結果、各地域における保菌率はオッズ比検定により、稔実種子が 1.00 に対して、不稔種子は 0.44 ~ 0.65 となり、不稔種子のほうがいもち病菌感染率が高いことを明らかにした。本研究では種子の選別は行わず、稔実および不稔種子の割合は検討していないが、エノコログサおよびアキノエノコログサ間での不稔種子の形成率の差異が、種子の保菌率に影響を与えたのかもしれない。

イネいもち病菌の伝染環については、種子伝染以外にも以下の伝染経路が考えられている。たとえば、イネいもち病菌が、土壌伝染性糸状菌で認められる菌足(hyphopodia)を形成することによって根部感染し、さらに地上部に移行して葉いもちを引き起こす可能性も報告されている(Sesma and Osbourn 2004)。また、本菌が潜在感染した植物体の根部が、翌年の伝染源となっている可能性も示唆されている(Valent 2004)。さらに、イネいもち病菌の枯死植物体上での腐生的増殖が観察されており(小野・鈴木 1963)、その枯死植物体が越冬源としての役割を果たしているのかもしれない。エノコロおよびアキノ菌も、イネいもち病菌と同様に種子伝染以外の経路が存在する可能性も考えられる。一方、イネと、エノコログサおよびアキノエノコログサの生育条件・環境の違いが本菌の越冬様式に相違をもたらす可能性も考えられる。イネの場合は、室内で保存された種子を畑状態の床土に播種し、高湿条件下で発芽・育成させた後、水田に移植

し育成するという高生産率のシステムが完成されており、ほぼ完全に人間の管理下に置かれている。一方、エノコログサおよびアキノエノコログサは、除草などの人間による攪乱はあるものの、通年人間がその生育に関与することはほとんどない。したがって、イネのような栽培方法が単純化・システム化された植物のいもち病菌と比較すると、エノコロおよびアキノ菌は多様な手段によって越冬している可能性が高い。またこのことが、前章で述べたエノコロおよびアキノ菌の集団構造の複雑さに寄与しているのかもしれない。

第5章 総合考察

本研究では、野生植物を宿主とするいもち病菌、エノコロおよびアキノ菌について生態学的諸性質を調査し、得られた結果を既報のイネいもち病菌の知見と比較し、宿主が野生植物および栽培植物であることの違いに起因する生態特性の差異について検討を行った。先ず、第2章ではエノコロおよびアキノ菌の分類学的位置付けに関する検討を行った。先行研究では、エノコロ菌については学名等の分類学的検討がなされているものの、これら研究例で供試された菌株は最多でも3に留まっている。エノコロ菌に加えアキノ菌についてもその分類学的位置付けについて決定的な情報を得るには、これら菌の集団全体を網羅できる菌株を供試して研究を行う必要があった。そのため、供試菌株としては両菌とも日本各地の広域から採集された菌株をそれぞれ15(エノコロ菌)および13(アキノ菌)と多数用いた。 *-tublin* 遺伝子のPCR-RFLP分析ならびにscRFLPデータに基づくクラスター解析により、エノコロおよびアキノ菌はともに、イネいもち病菌およびアワいもち病菌と同じ *M. oryzae* に属することが明らかとなった。また、両菌がアワにのみ病原性を示したこと、さらに、scRFLPデータから作成されたデンドログラム上においてアワ菌と同一のグループにまとめられたことから、両菌がアワいもち病菌と同じ *Setaria* pathotype であることが明らかとなった。第3章では、日本広域から採集されたエノコロおよびアキノ菌の菌株集団について、DNAフィンガープリント分析によりリネージ構成の検討を行った。イネいもち病菌では、これまで幾つかの地域や国で採集された菌株集団についてリネージ構成が検討されている。その結果、これら集団は通常比較的少数のリネージが分布する単純な集団構成を示すことが明かとなっている(Chen et al. 1995 ; Don et al. 1999a, b; Levy et al. 1993 ; Park et al. 2003, 2008 ; Roumen et al. 1997 ; Zeigler et al. 1995)。一方、エノコロおよびアキノ菌の集団中には多数のリネージが存在し、

集団構成が遺伝的に複雑であることが示唆された。また、このような複雑性は1m²あるいは50m²といった局所から採集された集団についても認められ、両菌どちらについても、供試した菌株集団のほとんどにはリネージと考えられるグループが2つ以上見出された。第4章では、エノコログサおよびアキノエノコログサの種子に感染したイネいもち病菌の野外における越冬を調査した。このような野外における越冬の成否はイネいもち病菌では検討例が少なく、かつ、一般的にはイネいもち病菌の野外での越冬は不可能とされている。本研究では採種した種子に含まれる保菌種子から菌株を分離し、これら分離菌株をDNAフィンガープリント分析により追跡した。すなわち、種子を野外で放置し翌年生育した植物個体に保菌種子と同様の菌株が感染しているかを検討した。その結果、エノコログサおよびアキノエノコログサの両方で、保菌種子から分離されたイネいもち病菌と同一あるいは極めて類似したDNAフィンガープリントパターンを有する菌株が翌年の罹病葉からも分離された。したがって、エノコロおよびアキノ菌が保菌種子中で野外において越冬したと考えられた。

本研究ではイネいもち病菌と生態特性を比較するためにエノコロおよびアキノ菌を選んだが、この理由として、特に第3章の研究を行うに当たり、イネいもち病菌と同等の地理的な規模で菌株集団が採集できることにある。野生植物のイネいもち病菌の発生頻度について検討例はないものの、これら菌は他の野生植物の菌(例えばオヒシバいもち病菌)と比較して、経験的にはあるが発生頻度が高いことが分っており、日本全体といった地理的範囲から菌株の採集を行うことが可能である。しかしながら、これら菌がイネいもち病菌と別種であれば、仮に生態特性に差異が認められたとしても、宿主が野生および栽培植物である違いを反映するものか、種の違いを反映するのかが明確でなくなる。メヒシバいもち病菌も経験的に発生頻度が高いことが分っており、全国的な菌株の採集も可能であるが、この点を鑑みて研究対象としなかった。すなわち、メヒシバいも

ち病菌はイネいもち病菌と別種の*M. grisea*であるためである(Couch and Kohn 2002)。また、これまでの研究から、アワ菌とイネ菌は*M. oryzae*の種内でも特に近縁であることが明らかとなっている(Kato et al. 2000; Tosa et al. 1995; Kusaba et al. 1999; Eto et al. 2001; Couch et al. 2005)。種々のイネ科植物から分離されたいもち病菌をrDNAのITS領域の塩基配列データから系統樹を作成すると、イネ、アワおよび*Panicum bisulcatum*から分離されたいもち病菌が、*M. oryzae*のクラスターの中でさらに単一のサブクラスターを形成することが明らかとなっている(Kusaba et al. 1999)。また、レトロトランスポゾン由来の散在性反復配列MAGGYの分布から、本配列は*M. oryzae*中、イネ、アワおよび*P. bisulcatum*から分離されたいもち病菌のみに分布することが明らかとなり、これらいもち病菌が遺伝的に近縁であることが示唆されていた(Kusaba et al. 1999; Tosa et al. 1995; Eto et al. 2001)。また、近年、Couchら(2005)は、イネ、アワ、エノコログサ、サヤヌカグサ(*Leersia hexandra*)およびハイキビ(*P. repens*)などのいもち病菌について、複数の遺伝子の塩基置換に基づく系統学的解析より、イネ、アワ、エノコログサ、サヤヌカグサおよびハイキビのいもち病菌が同一のクラスターを形成することを示した。また、これらクラスターに属する菌株の祖先菌株はアワいもち病菌であること、すなわち、アワいもち病菌がイネへと宿主移行(host shift)し、続いてサヤヌカグサおよびハイキビへと移行したと報告した。

このようにイネいもち病菌と同一種であり、かつ、イネいもち病菌に極めて近縁なアワいもち病菌と同一pathotypeに類別されるエノコロおよびアキノ菌は生態学的研究を行うに当たりイネいもち病菌の有効なモデルシステムとなり得る。つまり、これら菌を用いてイネいもち病菌では実施不可能な実験系を構築することも可能になると考えられる。たとえば、第4章で行った越冬に関する研究もイネいもち病菌では実施が難しくなる。このような研究では本研究のように菌株をDNAフィンガープリント分析等で識別し、それを年次にまたがり追跡

調査することが必須となる。しかしながら、日本にはJL1および2の2つのリネージが存在するが、現在の日本で発生しているイネいもち病菌はほとんどが同一リネージ(JL1)に所属する菌株となっており、菌株が遺伝的に極めて類似している(Tosa et al. 2004)。つまり、例えば、前年度と同じDNAフィンガープリントパターン有する菌株が翌年に観察されても、それが越冬したものか、翌年新規に感染した菌株かが判然としなくなる。また、稀なりネージ(JL2)や遺伝的に大きく異なる菌株(例えば外国産の菌株)を人工接種しこれを追跡する手段も考えられるが、実験を実施する地域に外部から菌株を持ち込むことになり、倫理的な問題を生じる。この点において、エノコロおよびアキノ菌は第3章で論じたように、多数のリネージが存在し、菌株間の識別が容易に行える。また、栽培面積が極めて限られているアワにのみ病原性を有することから考えると、人工接種等で新規に菌株を導入しても倫理上の問題は回避できると考えられる。イネいもち病菌では、近年、防除の切り札として異なる抵抗性遺伝子をセットでもったマルチラインの栽培が提案されており(Nakajima et al. 1996a,b; 芦澤 2007; 石崎ら 2005)、実際に新潟県では生産圃場で利用されている。その一方で、マルチラインは全抵抗性遺伝子を回避するスーパーレースを生み出す危険性が指摘されている。第2章の結果から、エノコロおよびアキノ菌はアワに対してはレース分化が生じていることが予想された。もし、これら菌がエノコログサあるいはアキノエノコログサに対してもレース分化が生じているのであれば、スーパーレースの出現に関する検討などイネいもち病菌ではイネ栽培に支障が出る検討も実施可能となると思われる。第3章で述べた、エノコロおよびアキノ菌のリネージの多様性は宿主集団の抵抗性遺伝子型の多様性を反映しているとも考えられる。すなわち、宿主植物が除草を除き、ほぼ人為的な選択を受けていないことから、抵抗性遺伝子を含めた多数の遺伝子座が集団中で多型を維持している可能性が高い。このような状況であれば、宿主集団はいわば自然に形成された

マルチラインのようなものであり、そこに分布するいもち病菌のレースやその動態についての研究はスーパーレース出現の可能性を検討する新たな方法論となり得る。

アワは栽培状況が主要穀物として経済的価値の高いイネと野生植物であるエノコログサおよびアキノエノコログサの中間にあり、そのいもち病菌の生態、特に集団のリネージ構成については興味もたれる。エノコログサは、アワの祖先種であり、また、アキノエノコログサは、エノコログサと、未知の*Setaria* 属植物との交雑種であると考えられている。また、アワおよびエノコログサの種名については、アワの作物としての重要性より、アワを*Setaria italica* subsp. *italica*、エノコログサを*S. italica* subsp. *viridis*とされる場合もあれば、エノコログサがアワの祖先種であると考えられることから、エノコログサを*S. viridis* subsp. *viridis*、アワを*S. viridis* subsp. *italica*とする場合もある (Dekker 2003)。このように学名には混乱があるものの、両植物を同一種の異なる亜種とする見解が一般的になっている。エノコログサ、アキノエノコログサそしてアワは基本的に自殖性であるが、稀に種内および種間交雑が生じ、その結果生じた雑種が正常な捻性を示すことが明らかとなっている(Dekker 2003)。さらに、ユーラシアにおいて採集されたエノコログサとアワは、AFLP分析ならびにクラスター分析により各集団が単独でクラスターを形成せず、両植物種間で遺伝的交流が頻繁に生じていることが示唆されている(Le Thierry d'Ennequin et al. 2000)。また、アワ栽培地域において、アワに似た大型の穂を持つエノコログサが、アワ畑の中で擬態雑草として独自の適応を遂げていることが報告されている (佐々木・松山 1988)。Katoら(2000)は*M. oryzae*の寄生性分化、つまり、pathotypeの成立について以下のような仮説を提唱した。*M. oryzae*は西アフリカで栽培化されたシコクビエいもち病菌を祖先とし、シコクビエの栽培がアジアに伝播するに従って東方に分布域を拡大し、雑穀の一大起源地とされるインド亜大陸に到達したと考えられる。

そして、シコクビエがインド亜大陸で半栽培化された他の雑穀と混雑栽培される過程で、シコクビエのいもち病菌もアワ等の雑穀に寄生性分化したと考えた。その後、これら雑穀栽培がイネの起源地とされる中国の雲南地方に伝播する過程で、これら雑穀の菌からイネいもち病菌が成立したと考えた。また、この仮説は、アワいもち病菌をイネいもち病菌の直接の祖先とする Couchら(2005)の系統解析によっても支持されている。もし、この仮説が正しいのであれば、エノコロおよびアキノ菌はアワいもち病菌を祖先として成立したと予想される。つまり、これらの野生植物の菌はエノコログサから栽培植物として成立したアワに最初は感染していたのものであり、その後アワの起源地あるいはアワの伝播過程において、エノコログサあるいはアキノエノコログサへと宿主範囲を拡張したのかもしれない。上述のように少なくとも、エノコログサとアワについては遺伝的に明確な分化は無いものと予想される。このような状況はアワからエノコログサへの伝染を容易にしたと考えられる。さらに、本研究の結果からエノコロおよびアキノ菌はアワに対して病原性を示すことが明かとなった。各菌の宿主範囲についてはさらなる検討が必要であるが、現在の生態系においても、アワ、エノコログサおよびアキノエノコログサ間でいもち病菌は移行を繰り返しているのかもしれない。アワは雑穀であり、日本では栽培される地域が限られていることからいもち病菌の採集も困難となる。そのため、本研究ではアワいもち病菌は第2章の分類学的検討において少数菌株のみ供試するに留まった。しかしながら、アジアの諸外国、特にインドではアワの栽培が現在においても盛んに行われており、そのいもち病菌も問題となっている (Karthikeyan and Gnanamanickam 2008a, b)。本研究のさらなる展開には、このような地域からのアワいもち病菌の採集、そして、同地におけるエノコロおよびアキノ菌集団とのリネージ構成の比較が必要になるであろう。

本研究の結果から、エノコログサおよびアキノエノコログサに種子感染したい

もち病菌が野外で越冬することが強く示唆された。エノコログサおよびアキノエノコログサの種子は、同一植物体由来であっても休眠の程度が異なり、それら種子の発芽が斉一でない。また、種子は休眠性により、土壤中において数十年間発芽力を失わないと報告されている(Dekker 2003)。このため、農耕地などの両植物種の生育地では、それらの種子が次々と土壤中に蓄積され、埋土種子集団(soil seed bank)を形成する(根本 2006; Dekker 2003)。この埋土種子集団の形成によって、種子は空間的および時間的に散布されることになり、その結果、エノコログサおよびアキノエノコログサが、今日世界的な分布に成功したものと考えられている(Dekker 2003)。また、これら植物の種子に感染するいもち病菌も、以上のような野生植物の生存戦略をうまく利用している可能性も考えられる。すなわち、あるいもち病菌が感染した種子が土壤中に蓄積され、それらが不斉一的に発芽し生育することによって、感染したいもち病菌も空間的・時間的に分布域を拡大することが可能になると考えられる。先の研究で、2カ年にわたり同一圃場で採集されたエノコロおよびアキノ菌の集団構造についてMGR586 DNAフィンガープリント分析により検討した結果、両年に認められるハプロタイプのほか、各年に特異的なハプロタイプが検出された(山頭 2006)。これは、両菌が感染した種子の発芽の不斉一性によるものかもしれない。また、局所において採集されたエノコロおよびアキノ菌集団が、複雑なリネージ構成を示すことが明らかとなったが、このことは、さまざまな菌株に感染した種子が土壤中に蓄えられていたことによるものかもしれない。この仮説を検証するには、種子感染したいもち病菌の土壤中における寿命の長さを検討することが必要となるであろう。また、日本広域で採集されたエノコロおよびアキノ菌についてクラスター分析を行った結果、菌株の地理的由来に関連するクラスターが認められなかった。これは、エノコログサおよびアキノエノコログサ種子がいもち病菌の運搬媒体となって各地へ拡散している結果によるものかもしれない。し

かし、イネなどの栽培植物の種子は人間により各地へ拡散していることは自明の理であるが、エノコログサおよびアキノエノコログサは、野生植物であり、分布域の拡大様式が明らかとなっていない。そのため、両植物のいもち病菌についても長距離伝播のメカニズムを今後解明する必要がある。

エノコロおよびアキノ菌が野外での越冬が可能であれば、分類学的に近縁なイネいもち病菌についても野外での越冬は可能であると予想される。従来の見解の通りイネいもち病菌の野外での越冬が不可能であるとすれば、これは水田で行うイネ栽培の特徴である可能性もある。すなわち、収穫後、自然落下した保菌種子のいもち病菌は翌年の苗移植前の水田の灌水により死滅するのかもしれない。一方、野生植物のいもち病菌とイネいもち病菌の間で越冬能に遺伝的差異がある可能性も考えられる。つまり、種子保存の必要性からイネいもち病菌は乾燥条件下である室内で冬場確実に越冬できる。このような状況が、イネが栽培化された当時から現在まで続いたため、イネいもち病菌では越冬能を低下させる変異が生じたのかも知れない。本研究が契機となり、イネいもち病菌についても野外での越冬に関して研究が進められることが期待される。また、その成果は本菌の防除といった実用面のみでなく、越冬能に關与する遺伝子の解明といった新規研究分野の展開を生み出す潜在的可能性も秘めている。今後の研究の発展が期待される。

引用文献

- Asuyama H (1963) Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Piricularia oryzae*. In: Ou SH (ed) The rice blast disease. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, pp9-22
- 芦澤 武人(2007) マルチラインにおけるイネいもち病の発生抑制機構とシミュレーションモデルによる解析. 東北農研研報 108: 1-46
- Barr ME (1977) *Magnaporthe*, *Telimebella*, and *Hyponectria* (Physosporiaceae). Mycologia 69: 952-966
- Borromeo ES, Nelson RJ, Bonman JM, Leung H (1993) Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed hosts. Phytopathology 83: 393-399
- Brondani C, Brondani RPV, Garrido LR, Ferreira ME (2000) Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. Genet Mol Biol 23: 753-762
- Chen D, Zeigler RS, Leung H, Nelson RJ (1995) Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. Phytopathology 85: 1011-1020
- Couch BC, Fudal I, Lebrun MH, Tharreau D, Valent B, van Kim P, Notteghem JL, Kohn LM (2005) Origin of host-specific population of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weed of rice. Genetics 170: 613-630
- Couch BC, Kohn LM (2002) A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. Mycologia 94:683-693
- Correll JC, Harp TL, Guerber JC, Zeigler RS, Liu B, Cartwright RD, Lee FN (2000) Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent

- genetic and molecular markers. *Phytopathology* 90: 1396-1404
- Dekker J (2003) Evolutionary biology of the foxtail (*Setaria*) species-group. In: Inderjit (ed) *Weed Biology and Management*. Kluwer, The Netherlands, pp 65-114
- Dobinson KF, Harris RE, Hamer JE (1993) *Grasshopper*, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *MPMI* 6: 114-126
- Don LD, Kusaba M, Urashima AS, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S (1999a) Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 65:15-24
- Don LD, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S (1999b) Population structure of the rice blast pathogen in Vietnam. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 65: 475-479
- Doust AN, Kellogg EA (2002) Inflorescence diversification in the panicoid “bristle grass” clade (Paniceae, Poaceae): Evidence from molecular phylogenies and developmental morphology. *Am J Bot* 89:1203-1222
- Eto Y, Ikeda K, Chuma I, Kataoka T, Kuroda S, Kikuchi N, Don LD, Kusaba M, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2001) Comparative analyses of the distribution of various transposable elements in *Pyricularia* and their activity during and after the sexual cycle. *Mol Gen Genet* 264:565-577
- Farman ML, Tosa Y, Nitta N, Leong SA (1996a) MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Gen Genet* 251:665-674
- Farman ML, Taura S, Leong SA (1996b) The *Magnaporthe grisea* DNA fingerprinting probe MGR586 contains the 3' end of an inverted repeat transposon. *Mol Gen Genet* 251:675-681
- Fukunaga K, Domon E, Kawase M (1997) Ribosomal DNA variation in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv., and a survey of variation from Europe and Asia. *Theor Appl Genet* 95:751-756

- George MLC, Nelson RJ, Zeigler RS, Leung H (1997) Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and Endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 88: 223-229
- Hamer JE, Farrall L, Orbach MJ, Valent B, Chumley FG (1989) Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9981-9985
- Hirata K, Kusaba M, Chuma I, Osue J, Nakayashiki H, Mayama S, Tosa Y (2007) Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. *Mycol Res* 111: 799-808
- 石崎 和彦, 松井 崇晃, 原澤 良栄 (2005) 新潟県におけるコシヒカリのいもち病真性抵抗性マルチラインの実用化. *日作紀* 74: 438-443
- Itoi S, Mishima T, Arase S, Nozu M (1983) Mating behavior of Japanese isolates of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 73:155-158
- Kachroo P, Leong SA, Chattoo BB (1994) Pot2, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Gen Genet* 245: 339-348
- Kachroo P, Leong SA, Chattoo BB (1995) Mg-SINE: A short interspersed nuclear element from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11125-11129
- Karthikeyan V, Gnanamanickam SS (2008a) Biological control of *Setaria* blast (*Magnaporthe grisea*) with bacterial strains. *Crop Protection* 27: 263-267
- Karthikeyan V, Gnanamanickam SS (2008b) Determining the fertility status of *Setaria* infecting *Magnaporthe grisea* isolates with standard testers and identification of tolerant cultivar of *Straria italica*. *Mycopathologia* 166: 227-233
- 加藤 肇 (1983) イネ科植物より分離したいもち病菌のアワ, カラスムギ, オオアワガエリ, ネズミムギ, ホソムギに対する病原性. *関東病虫研報* 30: 22-23

- 加藤 肇, 山口 富夫 (1980) イネ科, ショウガ科植物より分離したいもち病菌の
宿主範囲. 関東病虫研報 27: 14-15
- Kato H, Yamamoto M, Yamaguchi-Ozaki T, Kadouchi H, Iwamoto Y, Nakayashiki H,
Tosa Y, Mayama S, Mori N (2000) Pathogenicity, mating ability and DNA
restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from
Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. J Gen Plant Pathol 66:30-47
- 岸 國平 (1998) 日本植物病害大辞典, 全国農村教育協会, 日本, pp. 1207.
- 佐々木 高明, 松山 利夫 (1988) 畑作文化の誕生: 縄文農耕論へのアプローチ,
日本放送出版協会, 日本, pp.165-187.
- Kumar J, Nelson RJ, Zeigler RS (1999) Population structure and dynamics of
Magnaporthe grisea in the Indian Himalayas. Genetics 152: 971-984
- 栗林 数衛 (1928) 稲熱病の越冬及第一次発病の原因と其防除に関する研究. 日
植病報 2: 99-117
- Kusaba M, Eto Y, Don LD, Nishimoto N, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S (1999)
Genetic diversity in *Pyricularia* isolates from various hosts revealed by
polymorphisms of nuclear ribosomal DNA and the distribution of the MAGGY
retrotransposon. Ann Phytopathol Soc Jpn 65:588-596
- Kusaba M, Hirata K, Sumida, Y, Yamagashira A, Konagai-Urata H, Yaegashi H (2006)
Molecule genetic characterization and host specificity of *Pyricularia* isolates from
annual ryegrass in Japan. Plant Pathol J 5:72-79
- Lamey HA (1970) *Pyricularia oryzae* on rice seed in the United States. Plant Dis Rep
54: 931-934
- Leong SA, Farman ML, Smith J, Budde A, Tosa T, Nitta N (1994) Molecular genetic
approach to the study of cultivar specificity in the rice blast fungus. In: Zeigler RS,
Leong SA, Tang PS (eds) Rice blast disease. CABI International, Wallingford, pp.

87-110

- Le Thierry d'Ennequin M, Panaud O, Toupance B, Sarr A (2000) Assessment of genetic relationship between *Sataria italica* and its wild relative *S. viridis* using AFLP markers. *Theor Appl Genet* 100: 1061-1066
- Levy M, Correa-Victoria FJ, Zeigler RS, Xu S, Hamer JE (1993) Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83:1427-1433
- Levy M, Romao J, Marchetti MA, Hamer JE (1991) DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell* 3: 95-102
- Luo CX, Hanamura H, Sezaki H, Kusaba M, Yaegashi H (2002) Relationship between avirulence genes of the same family in rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *J Gen Plant Pathol* 68:300-306
- Luo CX, Yin LF, Koyanagi S, Farman ML, Kusaba M, Yaegashi H (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
- Mackill AO (1986) New hosts of *Pyricularia oryzae*. *Plant Dis* 70: 125-127
- Manandhar HK, Jorgensen HJL, Smedegaard-Petersen V, Mathur SB (1998) Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. *Plant Dis* 82: 1093-1099
- Nakajima T, Sonoda R, Yaegashi H (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
- Nakajima T, Sonoda R, Yaegashi H, Saito H (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
- Nakayashiki H, Matsuo H, Chuma I, Ikeda K, Betsuyaku S, Kusaba M, Tosa Y, Mayama S (2001) Pyret, a Ty3/Gypsy retrotransposon in *Magnaporthe grisea* contains an extra domain between the nucleocapsid and protease domains. *Nucleic Acids Res* 29: 4106-4113
- 生井 恒夫, 貫名 学, 三枝 正彦, 富樫 二郎 (1996) ワイルドライス(アメリカマコモ)に発生したいもち病. *日植病報* 62: 247-253
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269-5273
- 根本 正之 (2006) 雑草生態学, 朝倉書店, 東京, pp. 49-54
- Nishikado Y (1917) Studies on the rice blast fungus, (I). *Ber Ohara Inst Landwirtsch Forsch* 1:171-218
- 小野 小三郎, 鈴木 穂積 (1963) 水田におけるいもち菌の腐生増殖に関する研究. *北陸農業試験場報告* 4: 1-16
- Pande S, Mukuru SZ, Odhiambo RO, Karunakar RI (1994) Seedborne infection of *Eleusine coracana* by *Bipolaris nodulosa* and *Pyricularia grisea* in Uganda and Kenya. *Plant Dis* 78: 60-63
- Park SY, Milgroom MG, Han SS, Kang S, Lee YH (2003) Diversity of pathotypes and DNA fingerprint haplotypes in populations of *Magnaporthe grisea* in Korea over two decades. *Phytopathology* 93: 1378-1385
- Park SY, Milgroom MG, Han SS, Kang S, Lee YH (2008) Genetic differentiation of *Magnaporthe oryzae* populations from scouting plots and commercial rice fields in Korea. *Phytopathology* 98: 436-442
- Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc., version 2.0. Numerical taxonomy and multivariate

- analysis system. Exeter Publishing, New York
- Rossman AY, Howard RJ, Valent B (1990) *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia* 82:509-512
- Roumen E, Levy M, Notteghem JL (1997) Characterisation of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. *Eur J Plant Pathol* 103: 363-371
- 佐々木高明, 松山利夫 (1988) 畑作文化の誕生：縄文農耕論へのアプローチ, 日本放送出版協会, 東京, pp165-187
- Sesma A and Osbourn AE (2004) The rice leaf pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431: 582-586
- Skinner DZ, Budde AD, Farman ML, Smith JR, Leung H, Leong SA (1993) Genome organization of *Magnaporthe grisea*: genetic map, electrophoretic karyotype, and occurrence of repeated DNAs. *Theor Appl Genet* 87:545-557
- Sone T, Abe T, Yoshida N, Suto M, Tomita F (1997) DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping of Japanese isolates of rice blast fungus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 63: 155-163
- Suzuki F, Arai M, Yamaguchi J (2006) DNA fingerprinting of *Pyricularia grisea* by rep-PCR using a single primer based on the terminal inverted repeat from either of the transposable elements *Pot2* and MGR586. *J Gen Plant Pathol* 72: 314-317
- Suzuki F, Arai M, Yamaguchi J (2007) Genetic analysis of *Pyricularia grisea* population by rep-PCR during development of resistance to scytalone dehydratase inhibitors of melanin biosynthesis. *Plant Dis* 91: 176-184
- 鈴木 橋雄 (1929) 稲の疾病に於ける花器接種類似現象に就きて. *日植病報* 3: 1-14
- 鈴木 穂積, 藤田 佳克 (1977) いもち病種子伝染と苗いもち 北東農試研報 55:

241-244

- Tosa Y, Hirata K, Tamba H, Nakagawa S, Chuma I, Isobe C, Osue J, Urashima AS, Don LD, Kusaba M, Nakayashiki H, Tanaka A, Tani T, Mori N, Mayama S (2004) Genetic constitution and pathogenicity of *Lolium* isolates of *Magnaporthe oryzae* in comparison with host species-specific pathotypes of the blast fungus. *Phytopathology* 94:454-462
- Tosa Y, Nakayashiki H, Hyodo H, Mayama S, Kato H, Leong SA (1995) Distribution of retrotransposon MAGGY in *Pyricularia* species. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 61: 549-554
- Valent B (2004) Underground life for rice foe. *Nature* 431: 516-517
- Wu BC, Magill CW (1995) Spontaneous mutations at fingerprint loci in clonal lineages of the rice blast fungus. *Exp Mycol* 19: 86-90
- Xia JQ, Correll JC, Lee FN, Ross WJ, Rhoads DD (2000) Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selection. *Plant Dis* 84; 877-884
- Xia JQ, Correll JC, Lee FN, Ross WJ, Marchetti MA, Rhoads DD (1993) DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology* 83: 1029-1035
- 八重樫 博志 (1981) いもち病菌の完全世代に関する研究. 東北農試研報 63: 49-125
- 山頭 亜紀子 (2006) 同所から採集したエノコログサおよびアキノエノコログサ いもち病菌の菌株構成に関する検討. 平成 17 年度修士論文, 佐賀大学大学院
- Zeigler RS, Cuoc LX, Scott RP, Bernardo MA, Chen DH, Valent B, Nelson RJ (1995) The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the

Philippines. *Phytopathology* 85: 443-451

Zeigler RS, Scott RP, Leung H, Bordeos AA, Kumar J, Nelson RJ (1997) Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology* 87:284-294

謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始直接御教示および御鞭撻を賜りました佐賀大学農学部植物病制御学研究室 草場基章准教授に心より感謝の意を表します。また、御指導および御高配を賜りました植物ウイルス病制御学研究室 大島一里教授に厚く御礼の意を表します。博士論文の審査において、宮崎大学農学部 上運天博教授、鹿児島大学農学部 岩井久教授、ならびに琉球大学農学部 諸見里善一教授に副査として多大なる御助言を賜りました。また、元佐賀大学農学部 八重樫博志教授には研究を進めるに当たり有益な御助言を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

神戸大学大学院自然科学研究科 土佐幸雄教授には、本研究の分類学的研究および集団解析において、菌株、DNA フィンガープリント分析でプローブとして用いた pMGR-T1 および pMGY23 ならびに多大なる御助言を賜りました。接種実験を行うに当たり、農業生物資源研究所 河瀬真琴博士には、多くのアワ地方品種の種子を御分譲頂きました。また、佐賀県農業試験場 稲田稔氏には、懇篤にもコムギ種子を御分譲頂きました。交配実験を行うに当たり、中央農業総合研究センター 藤田佳克博士には、貴重な菌株を御分譲頂きました。また、エノコログサのいもち病菌の生態学的研究の先達者である、株式会社バイオマトリックス研究所 平田健治博士には、菌株および懇切なる御助言を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるに当たり、佐賀大学農学部植物病制御学研究室の諸氏には有益な御指導御協力を賜りました。羅朝喜博士ならびに尹良芬氏には、実験技術等について懇切なる御指導を賜りました。また、三坂将和氏、祝千尋氏、梅野美穂氏ならびに諸石雅彦氏には、本研究を行うに当たり共同研究者として直接多大なる御助力を頂きました。ここに心より厚く御礼申し上げます。また、

佐賀大学農学部植物病制御学研究室および植物ウイルス病制御学研究室の学生
諸氏にも貴重なご助言等を頂きました。ここに感謝申し上げます。

要旨

野生 *Setaria* 属植物のいもち病菌である、エノコログサとアキノエノコログサイもち病菌(以下、エノコロおよびアキノ菌)の日本産菌株について、分類学的位置付け、集団構造および種子感染による越冬の成否を検討した。また、得られた結果を既報のイネいもち病菌のものと比較し、生態特性の差異を検討した。

日本各地で採集されたエノコロおよびアキノ菌計 28 菌株について分類学的位置付けを DNA 解析および病原性検定に基づき検討した。 *-tublin* 遺伝子の PCR-RFLP 分析により、全供試菌株から *Magnaporthe oryzae* の同定基準とされる切断断片パターンが検出された。また、種々のイネ科植物に対する病原性検定では、両菌はアワいもち病菌と同じくアワにのみ病原性を示した。さらに、各種シングルコピー DNA 配列をプローブとした RFLP データから構築された dendrogram 上で、エノコロおよびアキノ菌とアワいもち病菌は単一のサブクラスターを *M. oryzae* 特異的クラスター中に形成した。これらより、両菌はイネいもち病菌と同種 *M. oryzae* の *Setaria* pathotype に属すると考えられた。

日本の広域から採集されたエノコロおよびアキノ菌各 15 菌株を散在性反復配列 MGR586 および MAGGY をプローブとした DNA フィンガープリント分析に供試した。DNA フィンガープリントパターンの類縁度が 70% 以下となる菌株の組み合わせを異なるリネージとしたところ、少なくともエノコロ菌では 13、アキノ菌では 8 つのリネージが見出された。先に報告された世界各地のイネいもち病菌集団におけるリネージ数は 2~10 であり、両菌集団のリネージ構成はイネいもち病菌と比較して複雑であることが示唆された。また、1 m²または 50 m² 区画から採集された 16 の菌株集団を MGR586-DNA フィンガープリント分析に供試し、両菌の局所集団のリネージ構造を検討した。上記と同様の基準でリネージを識別したところ、ほぼ全集団に 2 つ以上のリネージが認められた。よっ

て、両菌集団のリネージ構成は局所においても複雑であると考えられた。

2006年9月に、佐賀大学実験圃場で育成したエノコログサおよびアキノエノコログサから種子を採集し、同年10月に佐賀県内3地点の露地に播種した。また、2007年7月に播種した種子に由来する植物体からいもち罹病葉を各地点で採集した。そして、2006年の採集種子に含まれていた保菌種子および2007年の罹病葉からいもち病菌株を分離し、MGR586-DNAフィンガープリント分析に供試した。その結果、保菌種子および罹病葉からの分離菌株のほとんどが同一あるいはDNAフィンガープリントパターンが極めて類似したハプロタイプに属していた。したがって、イネいもち病菌では不可能とされてきた野外における越冬が、エノコロおよびアキノ菌では可能であることが示唆された。

Abstract

Pyricularia isolates from wild foxtails in Japan, green foxtail (*Setaria viridis*) and giant foxtail (*S. faberii*), were examined on their taxonomic status, population structures and winter survival.

A total of 28 *Pyricularia* isolates from the wild foxtails was collected from various locations in Japan and taxonomically characterized by DNA analyses and pathogenicity assays. A diagnostic polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) phenotype of *M. oryzae* was detected in the *beta-tubulin* genomic region in all the wild foxtail isolates used. Host ranges of the wild foxtail isolates inferred from the pathogenicity assays were similar to those of isolates from foxtail millet (*S. italica*). The 28 wild foxtail isolates formed a subcluster with foxtail millet isolates within specific cluster in the dendrogram constructed from RFLP analysis using single-copy sequences as probes. These results indicated that *Pyricularia* isolates from the wild foxtails could be classified into the *Setaria* pathotype of *M. oryzae*.

As representatives of macrogeographic population, 15 isolates from green foxtail and 15 isolates from giant foxtail were collected from various locations in Japan and subjected to DNA fingerprint analyses with the transposable elements MGR586 and MAGGY as probes. If lineages are arbitrarily established based on greater than 70% DNA fingerprint similarities in isolates, at least 13 and 8 lineages were detected in the green foxtail and the giant foxtail pathogen population, respectively. The numbers of the putative lineages in the wild foxtail pathogen populations were higher than those reported in the rice blast pathogen populations from several countries or regions, in which isolates were sorted into 2 to 10 lineages. MGR586-DNA fingerprint variations of the wild foxtail pathogens were also examined in 16 microgeographic populations

collected from a 1 m² or 50 m² area. If lineages were arbitrarily established based on the above criterion, almost of the 16 populations contained more than two lineages. These results suggested that *M. oryzae* isolates from the green foxtail and giant foxtail in Japan possessed a complex lineage structure, even at the microgeographic scales.

Seeds including those infected with *M. oryzae* were collected from both of the wild foxtails growing at the experimental field in Saga University in Saga prefecture on August to September, 2006. These seeds were sown on soil surface at three fields in Saga prefecture on October, 2006. On July, 2007, leaves with blast lesion were collected from plants generated from the seeds at these fields. *M. oryzae* isolates were collected from the infected seeds and the infected leaves and subjected to MGR586-DNA fingerprint analyses. For each of the wild foxtails, the majority of the isolates from the infected seeds and the infected leaves could be sorted into an identical haplotype or lineage based on the DNA fingerprint analyses. These results suggest that the wild foxtail pathogens can survive during the winter season in natural condition where rice blast pathogen is supposed to be extinguished.