

いもち病菌の寄生性分化に関する研究

林, 長生

<https://doi.org/10.11501/3180639>

出版情報 : 九州大学, 2000, 博士 (農学), 論文博士
バージョン :
権利関係 :



いもち病菌の寄生性分化に関する研究

柳 義 典

2004

いもち病菌の寄生性分化に関する研究

愛知県農業総合試験場山間農業研究所

林 長生

2001

いもち病菌の寄生性分化に関する研究

I. 緒言	2
II. 各種イネ科植物から分離したいもち病菌の類縁関係	
1. いもち病菌の宿主範囲	4
2. いもち病菌の交配能	13
3. いもち病菌のアイソザイム	23
4. いもち病菌のDNA分析	
1. パルスフィールドゲル電気泳動法によるいもち病菌染色体様DNAの分離	40
2. RFLPプローブによるいもち病菌の類縁関係	48
5. 総合考察	61
III. イネいもち病菌病原性の遺伝子解析	
1. 方法論の確立	64
2. イネいもち病菌のイネ判別品種に対する非病原性の遺伝子解析	82
3. 非病原性遺伝子のマッピング	106
IV. イネいもち病菌品種特異性の分化	117
V. いもち病菌の種特異性の分化	139
VI. 総合考察	151
摘要	160
謝辞	164
引用文献	165
英文摘要	172

第1章 緒言

いもち病菌の宿主範囲は多様性に富み、寄生性が分化した多くの菌群が知られている。わが国において野外での寄生が報告または確認された植物は33属65種に及ぶ。多くはイネ科植物であるが、カンナ科、ショウガ科およびカヤツリグサ科植物が含まれる⁹⁵⁾。また海外において報告または確認された植物は15科66属118種3亜種に達する⁹⁸⁾。イネいもち病菌に感受性の植物はイネの他に76種、またイネに病原性を示すいもち病菌の自然発生は31種の植物で知られている⁹⁵⁾。これらのうちタケ・ササ類、エゾノサヤヌカグサ、オニウシノケグサ、ネズミムギ、ホソムギ、オオムギおよびハトムギなどは、イネいもち病の伝染源になり得ると考えられている。

また、いもち病菌には他の植物病原菌と同様に、宿主の品種に対する病原性を異にする系統が知られ、レース（菌型）と呼ばれている。特にイネいもち病菌レースについては、いもち病がイネの重要病害で、しばしば甚大な被害を及ぼしたことから、これまで農林省農政局植物防疫課による共同研究を含め膨大な数の研究がなされ、病斑型および病斑数についてレース類別の基準が確立された⁵⁶⁾。さらに、いもち病菌レースに対する反応に基づいた9つの品種からなる判別品種が選定された⁹³⁾。この判別品種を用いて全国のレース分布調査⁸⁹⁾および地域のレース分布調査^{53, 64, 65)}が行われた。全国調査においては、1976年は23レース、1980年は22レースが確認され、レース分布と作付品種の関係が明らかにされた。また、新品種導入・普及に伴うレースの変動²¹⁾やいもち病菌レースの消長に作用するものとして越冬力や病原力およびレース間の競合等に関係するいもち病菌の生理生態的性質が示された^{83, 94)}。また、いもち病菌レースに対する反応に基づいたイネ品種の類別⁹²⁾が行われた。

海外のいもち病抵抗性遺伝子を導入した抵抗性品種は、顕著な発病の低下をもたらしたが、広域に普及すると抵抗性品種の罹病化が問題となった¹⁾。これは抵抗性を侵す新たないもち病菌の系統（レース）が出現し、抵抗性が崩壊した結果として知られており、抵抗性利用の際の問題点とされている^{1, 91)}。この現象は、いもち病菌の遺伝的変異に起因していると考えられており、レース生成機構の解明は重要な課題となっている。

病害防除に病害抵抗性を効果的に利用するための研究では、宿主と病原の双方から解析する必要がある。しかし、これまでイネの抵抗性について遺伝解析が多くなされているのに比べ、イネいもち病菌の遺伝解析は遅れた。これはイネいもち病菌の完全世代が長らく発見されなかったことや遺伝分析を行い得る高い交配稔性を有する菌系がなかったことに大きな原因がある⁶⁸⁾。1971年に、メヒシバいもち病菌で完全世代が見いだされると、1975～76年にはシコクビエをはじめとするイネ科植物に病原性をもついもち病菌においても完全世代が見出された。これらのいもち病菌を用いた病原性の遺伝解析ではイネいもち病菌を含め宿主を異にするいもち病菌間において交配が可能であることが明らかにされた。近年になってイネに病原性をもついもち病菌においても遺伝分析に供試できる菌系が見いだされた⁵⁷⁾。こうした状況から従来より形態的に区別が付きにくいとされていたいもち病菌全体の分

類学的異同が問題として提起されるようになり、イネいもち病菌*Pyricularia oryzae* Cavaraをメヒバ
いもち病菌と同一種とし*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.する提案もなされた⁵⁹⁾。

本報では、最初にいもち病菌全体におけるイネいもち病菌の位置を明らかにするために、イネ科
植物に対する宿主範囲、中国雲南省陸稲地帯から分離された高い交配稔性をもつイネいもち病菌を用
いた各種いもち病菌の相互交配、アイソザイムのパターン、染色体DNAの分離パターン及びRFLPマーカ
ーにより各種いもち病菌系の類縁関係の推定を行った（第Ⅱ章）。次にイネ品種に対し寄生性分化した
イネいもち病菌レースの遺伝的機構を明らかにするために、イネいもち病菌の相互交配によるF₁菌系
のイネ品種に対する病原性の遺伝子分析を行った（第Ⅲ章）。さらに遺伝子対遺伝子説がイネとイネ
いもち病菌（品種特異性）に適用できるか検討し、それに基づきイネ品種の抵抗性及びいもち病菌の
非病原性の遺伝分析を行った（第Ⅳ章）。また、宿主範囲を異にするいもち病菌の寄生性分化と宿主
に対する非病原性の関係（種特異性）を明らかにするため、イネいもち病菌とシコクビエいもち病菌
及びイネいもち病菌とアワいもち病菌との交配を行い、そのF₁菌系群の宿主に対する非病原性の解析
を行った（第Ⅴ章）。

第Ⅱ章 各種イネ科植物から分離したいもち病菌の類縁関係

様々な植物からいもち病菌が分離され、各種いもち病菌の相互関係は複雑である。そこで本実験では寄生性に加え、中国雲南省陸稲地帯から分離された高い交配稔性をもつイネいもち病菌を用いた相互交配、アイソザイム及びDNAマーカーによる各種菌系の類縁関係の推定を行った。

第1節 いもち病菌の宿主範囲

宿主範囲に基づき各種いもち病菌の類縁関係を明らかにし、いもち病菌全体におけるイネいもち病菌の位置付けを行った。

材料及び方法

(1) 供試菌

国内及び国外のイネ科植物19属30種、ショウガ科植物1属2種、カヤツリグサ科植物1属1種、合計32種の植物から分離されたいもち病菌50菌系について、宿主範囲の比較を行った。各供試菌系の菌系番号、分離植物、採集年及び採集場所を表Ⅱ-1に示した。国外からの菌系は農林水産省指令番号51-横植-2503, 52-横植-481, 60-横植-425, 63-横植-2356, 04-横植-2163及び06-横植-2179により輸入を許可された。

(2) 供試植物

宿主範囲の実験に供試した植物は、表Ⅱ-2に示したイネ科植物7族16属20種である。育苗は、シードリングケース（15×5×10cm）あるいはワグネルポット（1/5000a）を用いて温室内で行った。培土として、イネ、アシカキ及びサヤヌカグザにはくみあい粒状培土K（呉羽化学）、それ以外では園芸培土（呉羽化学）を使用した。ネピアグラスは保存株からの挿し木により、マコモ、アシカキ及びエゾノサヤヌカグザは自生のものを株上げし、株分けして育苗した。他の16種の植物は播種し、表Ⅱ-2に示した通り各々の植物を10～31日間育苗した。挿し木、株分けした植物では4～5株、播種した植物では10～20個体をそれぞれ供試した。

(3) 病斑型の検定

いもち病菌はオートミール平板培地（オートミール粉末30g、グルコース5g、寒天16g、脱イオン水1,000ml）で25℃、12日間培養した。シャーレ全体に菌叢が伸びたところで気中菌糸を滅菌水で洗い落とし、分生胞子の形成を促進するためBLB蛍光灯下に置いた。ツィーン20を10,000倍になるように添加した滅菌水を分生胞子を形成した菌叢に注ぎ、絵筆で洗い落とし、胞子懸濁液を調製した。三重のガーゼで濾過後、胞子濃度を $1 \sim 1.5 \times 10^5$ 個/mlとなるように調整し、シードリングケース当り5～7mlをエアブラシ（オリンポス工業、HP101）を用い各種植物の苗に噴霧接種し、24.5℃、暗黒の接種箱に20時間静置した。接種は各菌系とも少なくとも2回以上反復した。その後、25℃、自然陽光

表Ⅱ- 1. 宿主範囲試験に供試したいもち病菌

番号	菌系名	分離植物	分離植物略称	分離年	場所
1	BRATA1-1-1	コムギ	TA	1987	Londrina, Parana, Brazil
2	PARTA1-1-1	コムギ	TA	1986	Asuncion, Paraguay
3	AT1-1-1	カモジグサ	AT	1986	日本
4	GFIT4-1	イタリアンライグラス	LM	1977	岐阜県八幡町
5	IBLM1-1-1	イタリアンライグラス	LM	1986	茨城県つくば市
6	ONLM1-3-1	イタリアンライグラス	LM	1984	沖縄県
7	NI899	メドーフェスク	FE	1974	栃木県西那須野町
8	FSECu1-1-1	シナダレスズメガヤ	ECu	1988	福島県郡山市
9	SZECu1-1-1	シナダレスズメガヤ	ECu	1988	静岡県森町
10	NI1004	エルーシネ・フロクシフォリア	EF	1975	栃木県西那須野町
11	CHNEI1-1-1	オヒシバ	EI	1991	Yunnan, China
12	IDOEI1-2-2	オヒシバ	EI	1985	Metro, Lampung, Indonesia
13	CHNEC1-1-1	シコクビエ	EC	1989	Lulian, Yunnan, China
14	KEN8-2	シコクビエ	EC	1974	東京都西ヶ原
15	UG77-17-1-1	シコクビエ	EC	1977	Kabanyolo, Uganda
16	NI1006	エルーシネ・アフリカーナ	EA	1975	栃木県西那須野町
17	FSLeO1-1-1	エゾノサヤヌカグサ	LeO	1988	福島県天栄町
18	IDOLeH1-1-1	タイワンアシカキ	LeH	1985	Metro, Lampung, Indonesia
19	IDOLeH3-1-1	タイワンアシカキ	LeH	1985	Pama, Jatan, Indonesia
20	CHNOS32-2-4	イネ	OS	1989	中国雲南省昭通地区緑荫郷
21	CHNOS37-1-1	イネ	OS	1989	中国雲南省西双版纳州景洪
22	IDOOS12-1-1	イネ	OS	1985	Badung, Bali, Indonesia
23	IBOS1-1-1	イネ	OS	1985	茨城県竜ヶ崎市
24	IBZL1-2-6	マコモ	ZL	1985	茨城県竜ヶ崎市
25	NI901	リードカナリーグラス	PA	1974	栃木県西那須野町
26	IBPB1-1-1	ヌカキビ	PB	1986	茨城県牛久市
27	SZPM1-2-2	キビ	PM	1987	静岡県静岡市
28	STPM1-1-1	キビ	PM	1982	埼玉県大滝村
29	IDOPR2-1-1	ハイキビ	PR	1985	Simalungun, North Sumatera, Indonesia
30	CBEcCG1-4-1	イヌビエ	EcCG	1985	千葉県沼南町
31	FSEcCG1-1-1	イヌビエ	EcCG	1988	福島県
32	IWEU2-1-2	ヒエ	EU	1990	岩手県軽米町
33	SZEU1-1-1	ヒエ	EU	1987	静岡県静岡市
34	PH77-201-1-1	ブラキアリア・ムティカ	BM	1977	IRRI, Los Banos, Philippines
35	IBSV5-1-1	エノコログサ	SV	1986	茨城県牛久市
36	KANSV4-2	エノコログサ	SV	1975	神奈川県鎌倉市
37	GFSI1-1-1	アワ	SI	1977	岐阜県八幡町
38	MISI1-1-4	アワ	SI	1977	三重県一志町
39	FOSG1-1-1	キンエノコロ	SG	1986	福岡県八女郡黒木町
40	NI859	ナルコビエ	EV	1972	千葉県
41	NI980	ジギタリア・スマチー	DSm	1975	熊本県西合志町
42	IBDS1-1-1	メヒシバ	DS	1985	茨城県つくば市
43	IBDS7-1-1	メヒシバ	DS	1988	茨城県牛久市
44	IDOPeP4-1-1	ネピアグラス	PeP	1985	Gianyar, Bali, Indonesia
45	NI979-2	キクユグラス	PC	1975	熊本県西合志町
46	USA1-1-1	セントオーガスチングラス	SS	1976	USA
47	IBPBa1-1-1	マダケ	PBa	1986	茨城県牛久市
48	NNZiM1-1-1	ミョウガ	ZiM	1985	長野県南信濃町
49	SZZO1-1-1	ショウガ	ZO	1988	静岡県芝川町
50	IDOCsp1-1-1	スゲ	Csp	1985	Kotabumi, Lampung, Indonesia

表Ⅱ-2. 宿主範囲試験に供試したイネ科植物

族 種	接種時の 播種後日数 ^a
オオムギ族	
オオムギ 「ハヤミオオムギ」	14
ウシノケグサ族	
イタリアンライグラス 「マンモス B」	29
ペレニアルライグラス 「フレンド」	31
メド-フェスク 「ホクリョウ」	29
メド-フェスク 「ファースト」	29
ヒゲシバ族	
シナダレスズメガヤ 「雪印系」	29
シコクビエ 「EC 3 (10-20-4)」 (ネパール, Manigaon)	18
シコクビエ 「EC 21」 祖谷在来	18
バミューダグラス 「雪印系」	29
イネ族	
アシカキ 「牛久沼系」	22
エゾノサヤヌカグサ 「上川系」	22
マコモ 「牛久沼系」	25
イネ 「愛知旭」	17
イネ 「Kencana」 (インドネシア)	17
カラスムギ族	
エンバク 「雪印改良 101」	16
キビ族	
ヌカキビ 「牛久沼系」	29
オオクサキビ 「牛久沼系」	23
キビ 「PM 11 大塔村系」	17
キビ 「PM 18 大鹿村茶系」	17
ヒエ 「EU 103 九戸系」	13
アワ 「SI 5 赤粟」	17
アワ 「SI 9 紅粟」	17
アワ 「SI 12 毛沬鱈」	17
アワ 「PAKSI 116」 (パキスタン)	17
メヒシバ 「つくば系」	23
ネピアグラス 「Giante pinda」	30
トウモロコシ族	
トウモロコシ 「Golden cross bantam」	10

a アシカキ、エゾノサヤヌカグサ、マコモ及びネピアグラスは、株分けまたは挿し木による定植後日数。

の空調温室に移して5～7日間発病させた後、各個体毎に最も罹病的な病斑型について次の6段階に分けて判定した。

病斑型0：全く病斑が認められない。

病斑型1：褐点病斑を形成し、崩壊部が認められない。

病斑型2：病斑の幅が1mm未満または二次支脈の幅を越えない。

病斑型3：病斑の幅が1.5mm未満または二次支脈の幅の1.5倍を越えない。

病斑型4：病斑の幅が2.0mm未満または二次支脈の幅の2倍を越えない。

病斑型5：病斑の幅が2.0mm以上または二次支脈の幅の2倍を越える。

最終的な病斑型の判定は供試個体数の50%以上に形成された病斑型で表した。ウシノケグサ族等の牧草や雑草の検定植物においては、遺伝的に不均一なため病斑型の反応が分離する場合がみられた。この場合は1個体でも罹病すれば病原性ありと判断し、H (Hetero) と記録した。病斑型に基づき病斑型0～2を抵抗性反応、病斑型3～5を罹病性反応とした。また、病斑型2より罹病性の病斑については、病斑部を切り取りシャーレにろ紙を敷いた温室に20時間置き、実体顕微鏡下で形成された胞子を観察した。胞子の形成程度は3段階に分けて判定した。

＋：病斑部に一見して多数の胞子を形成する。

↑：病斑部に少数の胞子を形成する。

－：病斑部に胞子の形成がみられない。

実験結果

接種結果を表Ⅱ-3に示した。アワなどいくつかの植物において病斑型2の病斑にわずかに胞子形成が認められる場合があったが、胞子の形成量の多かった病斑型3以上を病原性ありとした。各々のいもち病菌の多くは3～7種の検定植物に病原性を示した。コムギからの分離菌BRATA1-1-1 (表Ⅱ-3, 菌系番号1) は、オオムギ、イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、メドーフェスク、シナダレスズメガヤ、エンバク、オオクサキビ、トウモロコシの8種に罹病性病斑を形成し、広範囲の植物に病原性を示した。一方、シナダレスズメガヤ菌FSECu1-1-1 (菌系番号8) 及びハイキビ菌IDOPR2-1-1 (菌系番号29) は、シナダレスズメガヤ、トウモロコシの2種の植物にのみ、マコモ菌IBZL1-2-6 (菌系番号24) はマコモにのみ病原性を示した。マダケ菌、ミョウガ菌、ショウガ菌はすべての検定植物に病原性を示さなかった。各種菌系の宿主範囲は極めて多様で、ある族の宿主からの分離菌がある限定された族の植物に病原性を示すという関係は見られなかった。植物側を基準にした時、特定の菌群が病原性を示す宿主植物は、シナダレスズメガヤ、シコクビエ、アシカキ、マコモ、イネ、ヌカキビ、キビ、アワ、メヒシバ及びネピアグラスであった。一方、複数の菌群が病原性を示す宿主植物は、オオムギ、ウシノケグサ族植物、バミューダグラス、エンバク及びトウモロコシであった。従って、特定の種の植物に対する病原性を基準にする方式を採用し判別宿主とした。これらの判

表II-3. イネ科、ショウガ科及びカヤツリグサ科植物より分離したいもち病菌のイネ科植物に対する病原性

族 種	各菌系の病斑型 (菌系番号、分離植物略称) ^a																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
	TA		AT		LM		FE		ECu		EF		EI		EC		EA	LeO	LeH		OS			ZL	PA
オオムギ族																									
オオムギ 「ハヤミオオムギ」	5+	5	2-	5+	2	4-	5+	2t	3-	3+	5	5	3+	5+	2-	3-	2-	1-	1	5	5	2-	5+	0	3+
ウシノケグサ族																									
イタリアンライグラス 「マンモスB」	3-	1	0	3+	3+	4+	4+	0	0	3+	3+	0	0	4H+	0	2	5H+	0	0	5H+	5+	4+	4H+	0	5H+
ペレニアルライグラス 「フレンド」	3+	1	0	3-	0	5+	4H+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	4-	0	0	0
メド-フェスク 「ホクリョウ」	3+	2	0	5+	3+	5+	5+	0	0	1	3	3	3+	3+	3t	3+	5+	4+	3+	4+	5+	4+	4+	0	4-
メド-フェスク 「ファースト」	3+	2	3+	4+	4+	5+	5+	0	2-	3-	3	4	5+	5+	2t	5+	5+	3t	3+	5+	5+	5+	5+	0	5+
ヒゲシバ族																									
*1 シナダレスズメガヤ 「雪印系」	3+	5	1-	0	5	4t	2-	5+	3+	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	2-
*2 シコクビエ 「EC 3 Manigaon」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5+	5	5	5+	5+	4+	5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*2 シコクビエ 「EC 21 祖谷在来」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5+	5	5	5+	5+	3-	5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
バミューダグラス 「雪印系」	2	1	5+	1t	0	2-	3Ht	1-	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2-	0	0
イネ族																									
*3 アシカキ 「牛久沼系」	1	1	0	0	1-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5+	5+	1	1	1+	1	0	0
エゾノサヤヌカグサ 「上川系」	1-	1	0	1	2t	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2+	1	0	2	2	2+	1	0	2-
*4 マコモ 「牛久沼系」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-	0	0	0	0	0	0	5	0
*5 イネ 「愛知旭」	0	0	0	5+	5+	0	4+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5+	0	0	5	5	5+	5+	0	5+
*5 イネ 「Kencana」	1	1	0	5+	5+	1	5+	1-	0	0	1	1	0	0	0	0	3t	3+	5	5	5	5-	5+	0	5+
カラスムギ族																									
エンバク 「雪印改良 101」	5+	4+	1-	1-	1	1	5-	2+	3+	1	1	1	0	2t	1-	1	2-	1	2t	2-	1	1	4t	0	0
キビ族																									
*6 ヌカキビ 「牛久沼系」	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
オオクサキビ 「牛久沼系」	3+	2t	0	2+	0	0	0	0	2t	0	0	0	0	2t	0	2t	2+	0	0	2-	0	0	2-	0	2-
*7 キビ 「PM 11 大塔村系」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*7 キビ 「PM 18 大鹿村茶系」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ヒエ 「EU 103 九戸系」	2t	0	0	0	0	1	0	0	0	2-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*8 アワ 「SI 5 赤粟」	1	1	2t	0	1	0	2-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2t	0	0	0	0	0
*8 アワ 「SI 9 紅粟」	0	2-	4+	0	2-	0	2-	0	2-	0	1	0	0	0	0	0	0	2-	2t	2-	0	0	0	0	0
*8 アワ 「SI 12 毛沬」	0	2-	0	0	2t	0	2-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-	2t	2-	0	0	1	0	0
*8 アワ 「PAKSI 116」	1	2-	2t	1	2t	0	2-	1	2-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2t	1	0	2-	0	0
*9 メヒシバ 「つくば系」	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
*10 ネピアグラス 「Giant pinda」	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
トウモロコシ族																									
トウモロコシ 「Golden cross bantam」	5+	5+	3+	3+	5+	3t	4+	5+	2+	3+	5	5	5+	5+	5+	3+	4+	3+	4+	5	5	5+	5+	0	3+

^a いもち病菌菌系の番号及び分離植物の略称は表II-1に示した。病斑型及び胞子形成程度は本文に示した。

枠は罹病性反応を示した判別植物 (*1~*10) と各種いもち病菌群との組み合わせを示す。

表II-3. (続き) イネ科、ショウガ科及びカヤツリグサ科植物より分離したいもち病菌のイネ科植物に対する病原性

族 種	各菌系の病斑型 (菌系番号、分離植物略称) ^a																								
	26 PB	27 PM	28 PM	29 PR	30 EcCG	31 EcCG	32 EU	33 EU	34 BM	35 SV	36 SV	37 SI	38 SI	39 SG	40 EV	41 DSm	42 DS	43 DS	44 PeP	45 PC	46 SS	47 PBa	48 ZiM	49 ZO	50 Csp
オオムギ族																									
オオムギ 「ハヤミオオムギ」	5	4	3t	1	2+	1	5	5+	3+	2-	4+	2t	2-	2+	5+	3-	1	3+	0	2+	2-	0	0	0	2-
ウシノケグサ族																									
イタリアンライグラス 「マンモスB」	0	0	4H-	0	4+	5H+	4	5+	4+	0	3H+	0	5H+	3H+	5+	5+	0	5H+	5H+	5H+	5+	0	0	0	5+
ペレニアルライグラス 「フレンド」	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	0	4+	0	0	0	0	4t	0	3+	5H+	0	0	0	0	0	5+
メド-フェスク 「ホクリョウ」	5	0	3t	2-	4+	5+	4+	5+	4H+	5H+	5H+	0	3+	4+	4+	4t	0	5+	3t	5H+	4+	0	0	0	5+
メド-フェスク 「ファースト」	5	5H-	5+	2Ht	3+	5+	4+	4+	4+	5H+	5H+	3+	4+	4+	4+	5+	5H+	5+	5+	5+	5H+	0	0	0	5+
ヒゲシバ族																									
*1 シナダレスズメガヤ 「雪印系」	1	0	1-	3t	5+	0	3+	3+	0	0	0	0	0	3+	0	3Ht	0	0	0	1	0	0	0	0	0
*2 シコクビエ 「EC 3 Manigaon」	0	0	0	0	0	0	0	0	5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*2 シコクビエ 「EC 21 祖谷在来」	0	0	0	0	0	0	0	0	5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
バミューダグラス 「雪印系」	0	0	1-	0	0	5H+	1	0	0	3H+	0	0	3Ht	4H+	0	0	0	0	0	4H+	0	0	0	0	0
イネ族																									
*3 アシカキ 「牛久沼系」	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
エゾノサヤヌカグサ 「上川系」	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2t
*4 マコモ 「牛久沼系」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3-	0	0	0	0	0
*5 イネ 「愛知旭」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5+
*5 イネ 「Kencana」	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5+
カラスムギ族																									
エンバク 「雪印改良 101」	5	0	0	0	2+	0	4+	3+	3+	1	5+	3+	5+	0	5+	0	0	0	4t	1	3+	0	0	0	1
キビ族																									
*6 ヌカキビ 「牛久沼系」	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
オオクサキビ 「牛久沼系」	0	0	0	2t	2-	0	2t	2-	0	0	0	0	0	0	2t	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*7 キビ 「PM 11 大塔村系」	0	5t	5+	2-	0	5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*7 キビ 「PM 18 大鹿村茶系」	0	5t	5+	0	0	5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ヒエ 「EU 103 九戸系」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*8 アワ 「SI 5 赤粟」	0	0	0	0	1	1	0	2-	0	0	3t	5+	5+	2-	0	0	0	0	0	2-	0	0	0	0	0
*8 アワ 「SI 9 紅粟」	0	0	0	0	0	0	0	2-	0	0	0	5+	5+	5+	0	0	0	2-	0	5+	0	0	0	0	0
*8 アワ 「SI 12 毛沬」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-	2-	0	0	0	2-	0	2t	0	0	0	2-	0
*8 アワ 「PAKSI 116」	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2-	5+	5+	2-	2-	0	2-	0	3t	0	2-	0	0	0	0	0
*9 メヒシバ 「つくば系」	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5-	5+	5+	0	0	0	0	0	0	0
*10 ネピアグラス 「Giant pinda」	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2-	0	0	0	0	4+	1	2-	0	0	0	0
トウモロコシ族																									
トウモロコシ 「Golden cross bantam」	5	3	4+	3-	3+	5+	5	5+	4+	4+	4+	3+	2-	3+	4+	3-	5+	5+	5+	3+	5+	0	0	0	3+

a いもち病菌菌系の番号及び分離植物の略称は表II-1に示した。病斑型及び孢子形成程度は本文に示した。

枠は罹病性反応を示した判別植物 (*1~*10) と各種いもち病菌群との組み合わせを示す。

別宿主のうち二つ以上を同時に侵した菌系は、シナダレスズメガヤ及びシコクビエに病原性を示したUG77-17-1-1（シコクビエ菌，菌系番号15），アシカキ及びイネ品種「Kencana」に病原性を示したIDOLeH3-1-1（台湾アシカキ菌，菌系番号19）など希であった。供試した50菌系は，10種の判別宿主に対する病原性を基準にして，シナダレスズメガヤ菌群（9菌系），シコクビエ菌群（8菌系），アシカキ菌群（2菌系），マコモ菌群（1菌系），イネ菌群（10菌系），ヌカキビ菌群（1菌系），キビ菌群（3菌系），アワ菌群（7菌系），メヒシバ菌群（3菌系），ネピアグラス菌群（1菌系）及び何れの判別宿主にも病原性を示さないその他の菌群（5菌系）の11の反応型に群別された（表Ⅱ-4）。

イネに病原性を示したイネ菌群に属する菌系にはイネ以外にイタリアンライグラス，トールフェスク，サヤヌカグサ，リードカナリーグラス及びカヤツリグサ科植物からの分離菌が含まれていた。アワ菌群には，アワイもち病菌の他にカモジグサ，エノコログサ，キンエノコロ及びキクユグラスからの分離菌が含まれていた。また，アワイもち病菌にはアワ品種「SI5」，「SI9」及び「PAKSI116」に対して病原性を示す菌系及び示さない菌系があり，また，アワ品種「SI12」はいずれのアワ菌群菌に対しても抵抗性を示しアワ菌にレース分化がみられた。台湾アシカキ菌群，マコモ菌群，ヌカキビ菌群及びネピアグラス菌群はそれぞれ判別宿主台湾アシカキ，マコモ，ヌカキビから分離した菌系が含まれた。その他の菌群に含まれた5菌系のうち2菌系，NI859（ナルコビエ菌）及びUSA1-1-1（セントオーガスチングラス菌）は，複数の菌群が病原性を示す宿主であるウシノケグサ族植物にのみ病原性を示した。タケ，ミョウガ及びショウガから分離された残りの3菌系，IBPBa1-1-1，NNZiM1-1-1及びSZZO1-1-1は，すべての供試植物に病原性を示さなかった。イタリアンライグラスより分離された3菌系は，2菌系がイネ菌群に，1菌系がシナダレスズメガヤ菌群に分けられた。また，イヌビエより分離された2菌系は，シナダレスズメガヤ菌群とキビ菌群に分けられた。イネ及びシコクビエ菌群のなかには，一部シナダレスズメガヤに病原性を示す菌系が含まれていた。ウシノケグサ族の検定植物には，遺伝的に不均一なため抵抗性と罹病性の反応が個体毎に分離する場合がみられた。

考察

32種の植物から分離されたいもち病の多くは複数の検定植物に病原性を示した。いもち病菌の宿主植物には多くの菌系が共通に病原性を示す植物種と限られた菌系が病原性を示す植物種がみられた。特定の植物種を判別宿主とすることによりシナダレスズメガヤ菌群，シコクビエ菌群，アシカキ菌群，マコモ菌群，イネ菌群，ヌカキビ菌群，キビ菌群，アワ菌群，メヒシバ菌群，ネピアグラス菌群及びその他の菌群の11菌群に類別された。その他の菌群は，多くの菌系が共通に病原性を示すウシノケグサ族植物に対する病原性の有無により，さらに2つに分けることが可能である。ブラジル及びパラグアイのコムギから分離されたいもち病菌は，シナダレスズメガヤ菌群に分類された。加藤（1980）²⁵⁾は，特定の種の植物に対する病原性の有無を分別基準としてシナダレスズメガヤ，メヒシバ，アワ，シコクビエ，イネ，マコモ，ショウガ，不詳の8菌群に類別した。八重樫（1981）⁸⁸⁾は，寄主範囲の

表II-4. 判別植物に対する反応によるいもち病菌の類別

反応型	ウシノケグサ族	判 別 植 物										該当菌系	
		シナダレ	スズメガヤ	シコクビエ	アシカキ	マコモ	イネ	ヌカキビ	キビ	アワ	メヒシバ		ネピア
A	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	シナダレスズメガヤいもち病菌 コムギいもち病菌 イタリアンライグラスいもち病菌 ハイキビ菌 イヌビエ菌 ヒエ菌
B	S	R(S)	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	シコクビエいもち病菌 エルシーネフクロシフォリア菌 オヒシバいもち病菌 エルシーネアフリカーナいもち病菌 ブラキアリアムチカ菌
C	S	R	R	S	R	R(S)	R	R	R	R	R	R	タイワンアシカキいもち病菌
D	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	マコモいもち病菌
E	S	R(S)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	イネいもち病菌 イタリアンライグラスいもち病菌 メドーフェスクいもち病菌 サヤヌカグサ菌 リードカナリーグラスいもち病菌 スゲ菌
F	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	ヌカキビいもち病菌
G	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	キビいもち病菌 イヌビエ菌
H	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	アワいもち病菌 カモジグサ菌 エノコログサ菌 キンエノコロ菌 キクユグラス菌
I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	メヒシバいもち病菌 ジギタリアスマチ-菌
J	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	ネピアグラスいもち病菌
K	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(ウシノケグサ族病菌) ナルコビエ菌 セントオーガスチンいもち病菌
L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	(その他) マダケ菌 ミョウガ菌 ショウガ菌

R: 抵抗性反応 (病斑型0-2), S: 罹病性反応 (病斑型3-5).
R(S): 各菌群のほとんどの菌系が抵抗性反応だが, 一部の菌系または品種の組み合わせでは罹病性反応を示す。

わずかな違いをもって菌系を分類することは、實際上無意味と考え、寄主範囲を分類基準とする場合には、宿主植物の2つ以上を同時に侵害し得る菌系がない判別寄主の選択が重要課題となるとし判別寄主としてメヒシバ、イネ、シコクビエ、ミョウガを選定し、その他を入れて5群に類別した。本試験ではその他の菌群に分類されたショウガ菌及びミョウガ菌はショウガ科植物の中でもショウガ属のみに寄生性をもつ寄主範囲の狭いもち病菌であることが示されており³⁸⁾、ミョウガ菌群として分類することができると思われる。わが国でいもち病菌として命名された8種の*Pyricularia*属種のなかでアシカキいもち病菌 (*P. Leersiae* (Sawada) Ito)、マコモいもち病菌 (*P. zizaniae* Hara, *P. zizaniaecola* Hashioka)、キビいもち病菌 (*P. panici-milliacei* Hara)、アワいもち病菌 (*P. setariae* Nishikado)、ミョウガ・ショウガいもち病菌 (*P. zingiberi* Nishikado) は本試験で分類された菌群に対応していると思われる。一方、複数の菌群が病原性を示す宿主植物は、オオムギ、ウシノケグサ族植物、バミューダグラス、エンバク及びトウモロコシであった。トウモロコシは50菌系中44菌系に対し罹病性であった。ハトムギに対してイネいもち病菌とシコクビエいもち病菌が病原性を示すことが報告されている¹²⁾。トウモロコシとハトムギはトウモロコシ族に含まれ、いもち病菌に対する抵抗性に同じ遺伝背景を有しているのかもしれない。イネいもち病菌は、特定の種を宿主とする他の菌群と同様に、共通の宿主に病原性を示すと同時に、イネに対して特異的に病原性を獲得した菌群といえる。これは、いもち病菌が寄生性を分化させた結果と推定され、いもち病菌は各種植物に対する寄生性を進化させた菌群の集まりといえる。たとえば*Pyricularia grisea*の基準種であるメヒシバいもち病菌とイネいもち病菌とを比較すると、両者とも共通の宿主(ウシノケグサ族、トウモロコシなど)を侵し、イネいもち病菌はイネをメヒシバいもち病菌はメヒシバを特異的に侵す。このことから各いもち病菌は共通の祖先から分化した菌群とすることがいえる。また、少ない事例ではあるが、水田畦畔雑草であるタイワンアシカキやエゾノサヤヌカグサなどから分離した菌系がイネに病原性をもつ場合がみられた。イネ品種に病原性を示すいもち病菌が分離された水田畦畔雑草としては、*Leersia hexandra* (タイワンアシカキ)^{44, 101)}、*Echinochloa colona*⁴⁴⁾、*Rottboellia exaltata*⁴⁴⁾などが報告されている。また、1985年以降、ブラジルのコムギにいもち病を引き起こした病原の一部は、イネいもち病菌であったと報告されている⁷⁵⁾。以上のことからイネいもち病菌に共通の宿主が畦畔雑草または近接した栽培植物にあり、低い確率でイネとある範囲のイネ科植物の間でいもち病菌の行き来している可能性があるかと推察される。

第2節 いもち病菌の交配能

各種いもち病菌及び同種いもち病菌相互を対峙培養し、子のう殻の形成程度に基づいて各種いもち病菌の類縁関係を明らかにした。また、イネいもち病菌とその他のいもち病菌との有性器官形成程度からイネいもち病菌のいもち病菌全体の中での位置付けを行いイネいもち病菌の来歴を考察した。

材料および方法

(1) 供試菌

表Ⅱ-5に示した各種植物から分離したいもち病菌64株を供試した。10属14種の植物から分離された54菌系は高い交配稔性を有するシコクビエいもち病菌相互の交配後代菌系（57-R-33, 57-R-28, それぞれ交配型*Mat1-1*, *Mat1-2*, 両者とも雌雄性菌）による交配型検定により交配型が明らかになっている。同じ分離植物から2菌系以上を供試した分離菌のなかで、メヒシバ菌, ヒエ菌, シコクビエ菌, オヒシバ菌, シナダレスズメガヤ菌, イネ菌, アワ菌には, 交配型*Mat1-1*, *Mat1-2*の両方がみられたが, キビ菌, エノコログサ菌, コムギ菌では*Mat1-2*のみであった。残りの5属6種の植物から分離された12菌系はシコクビエいもち病菌との交配で有性世代を形成しないため交配型が不明である。

(2) 交配

交配は分離植物の異なる菌系について交配型の異なるすべての組み合わせで行った。交配型が不明の菌系については, 交配型*Mat1-1*菌系, *Mat1-2*菌系の双方と交配させた。オートミール培地（オートミール3%, グルコース0.5%, 寒天1.6%）上に各菌系を2点ずつ4カ所に植え対峙培養した。25°C, 暗黒下で5日間培養し両菌の菌糸が接近したらプラスチック袋に入れて21°Cで蛍光灯下（18W）においた。3~4週間後に子のう殻形成数および子のう殻を潰して子のう胞子の成熟度を調査した。子のう殻形成程度は以下の基準によった。

++++	: 4 辺ある菌系間の菌糸の出会い部の 4 辺に子のう殻を形成
+++	: 3 辺に子のう殻を形成
++	: 2 辺に子のう殻を形成
+	: 1 辺に子のう殻を形成
t	: わずかに部分的に子のう殻を形成
-	: 全く子のう殻を形成しない

子のう胞子の成熟度は、以下の基準によった。

+++	: 1子のうに8個の成熟した子のう胞子がある
++	: 1子のうに8個未満の成熟した子のう胞子がある
+	: 子のう殻中に未熟な子のう胞子または子のうのみ形成する
±	: 子のう殻のみ形成

表Ⅱ-5. 各種いもち病菌間の交配能力の検定に供試した菌系

菌系名	分離植物 (和名 学名 略称)	分離年	交配型 ^a	採集地
FODS1-1-5	メシバ <i>Digitaria sanguinalis</i> (DS)	1985	Mat1-2	福岡県黒木町
IN77-34-1-1	" "	1977	Mat1-1	Univ. Mysore, India
KENM1-3	" "	1972	Mat1-1	東京都西ヶ原
NNDS6-2-1	" "	1985	Mat1-2	長野県上村
NNDS7-2-3	" "	1985	Mat1-2	長野県南信濃村
UG77-4-1-1	" <i>Digitaria scalarum</i> (DSc)	1977	Mat1-2	Kabanyolo, Uganda
CBEcCG1-4-1	イヌビエ <i>Echinochloa crus-galli</i> (EcCG)	1985	Mat1-2	千葉県沼南町
IWEU2-1-2	ヒエ <i>Echinochloa utilis</i> (EU)	1990	Mat1-1	岩手県軽米町
SZEU1-1-1	" "	1987	Mat1-2	静岡県静岡市
NI886	" <i>Eleusine africana</i> (EA)	1973	Mat1-2	栃木県西那須野町
IN77-13-1-3	シコクビエ <i>Eleusine coracana</i> (EC)	1977	Mat1-2	Raganathittu, India
NP10-17-4-1-3	" "	1975	Mat1-1	Syabru, Nepal
UG77-17-1-1	" "	1977	Mat1-1	Kabanyolo, Uganda
Z2-1	" "	1979	Mat1-2	香川県
IDOEI1-2-2	オヒシバ <i>Eleusine indica</i> (EI)	1985	Mat1-2	Metro, Lampung, Indonesia
IN77-35-1-2	" "	1977	Mat1-2	Univ. Mysore, India
IN77-36-1-1	" "	1977	Mat1-2	Chammdi Hill, India
IN77-48-1-1	" "	1977	Mat1-1	Univ. Mysore, India
NI1005	" "	1975	Mat1-2	栃木県西那須野町
UG77-07-1-1	" "	1977	Mat1-1	Serere, Uganda
IBECu 2-2-1	シタリス' ヲガヤ <i>Eragrostis curvula</i> (ECu)	1988	Mat1-2	茨城県山方町
KENWL-1	" "	1974	Mat1-1	栃木県黒磯市
KENWL-2	" "	1974	Mat1-2	栃木県黒磯市
NI859	ナルコビエ <i>Eriochloa villosa</i> (EV)	1972	Mat1-2	千葉県
IDOLeH1-1-1	タイワンシガキ <i>Leersia hexandra</i> (LeH)	1985	-	Metro, Lampung, Sumatera, Indonesia
IDOLeH4-1-2	" "	1985	-	Pama Jatan, Kalimantan, Indonesia
CHNOS32-3-4	イネ <i>Oryza sativa</i> (OS)	1990	Mat1-2	中国雲南省昭通地区緑荫郷
CHNOS37-1-3	" "	1989	Mat1-1	中国雲南省西双版纳州景洪
2145-R-11	(イネ) (<i>Oryza sativa</i>)	1990	Mat1-2	F菌系 (CHNOS37-1-1/CHNOS12-2-1)
3472-R-12	" "	1991	Mat1-1	F菌系 (CHNOS37-1-3/2145-R-57-1)
IBPB1-1-1	ヌカキビ <i>Panicum bisulcatum</i> (PB)	1986	-	茨城県牛久市
IBPB1-4-1	" "	1988	-	茨城県牛久市
NNPM2-6-1	キビ <i>Panicum miliaceum</i> (PM)	1985	Mat1-2	長野県南信濃村
NNPM3-2-1	" "	1985	Mat1-2	長野県南信濃村
NRPM1-3	" "	1977	Mat1-2	奈良県大塔村
STPM 1-2-1	" "	1982	Mat1-2	埼玉県滝村
SZPM 1-2-2	" "	1987	Mat1-2	静岡県静岡市
SZPM 1-3-1	" "	1987	Mat1-2	静岡県静岡市
IDOPeP3-2-4	ネピアグラス <i>Pennisetum purpureum</i> (PeP)	1985	-	Denpasar, Bali, Indonesia
IDOPeP4-1-3	" "	1985	-	Gianyar, Bali, Indonesia
GFSI1-1-1	アワ <i>Setaria italica</i> (SI)	1977	Mat1-1	岐阜県八幡町
GFSI1-14-1	" "	1977	Mat1-1	岐阜県八幡町
IN77-16-1-1	" "	1977	Mat1-1	Mysore, India
MZSI1-1-1	" "	1976	Mat1-2	宮崎県都城市
NNSI1-1-1	" "	1985	Mat1-2	長野県南信濃村
NNSI3-1-2	" "	1985	Mat1-1	長野県上村
NRSI1-1-1	" "	1977	Mat1-2	奈良県大塔村
NRSI2-3-1	" "	1977	Mat1-2	奈良県西吉野村
NRSI3-1-1	" "	1977	Mat1-2	奈良県西吉野村
NRSI5-1-1	" "	1977	Mat1-1	奈良県天川村
STSI2-2-1	" "	1982	Mat1-1	埼玉県荒川村
STSI3-1-5	" "	1982	Mat1-1	埼玉県荒川村
YNSI1-7	" "	1983	Mat1-1	山梨県小菅村
YNSI2-1-1	" "	1983	Mat1-2	山梨県小菅村
KANSV4-2	エノコログサ <i>Setaria viridis</i> var. <i>minor</i> (SV)	1975	Mat1-2	神奈川県鎌倉市
NI1078	" "	1976	Mat1-2	熊本県西合志町
SASV1-2-2	" "	1985	Mat1-2	佐賀県神埼町
STSV1-2-2	" "	1985	Mat1-2	埼玉県鴻巣市
BRATA1-1-1	コムギ <i>Triticum aestivum</i> (TA)	1987	Mat1-1	Londrina, Parana, Brazil
PARTA1-1-1	" "	1986	Mat1-1	Asuncion, Paraguay
NNZiM4-1-1	ミョウガ <i>Zingiber mioga</i> (ZiM)	1985	-	長野県南信濃村
YNZiM1-1-1	" "	1983	-	山梨県小菅村
SZZO1-1-1	ショウガ <i>Zingiber officinale</i> (ZO)	1988	-	静岡県芝川町
IBZL1-2-2	マコモ <i>Zizania latifolia</i> (ZL)	1985	-	茨城県竜ヶ崎

a - 交配型不明。

実験結果

13族20種の植物から分離された64菌株を相互交配し、その稔性を調査した。

(1) シコクビエいもち病菌と各種いもち病菌の交配による有性世代形成能

シコクビエいもち病菌4菌系（交配型*Mat1-1*：NP10-17-4-1-3およびUG77-17-1-1，交配型*Mat1-2*：IN77-13-1-3およびZ2-1）と各種いもち病菌の交配により有性世代形成能を比較した。結果を表Ⅱ-6に示した。

交配型*Mat1-1*のシコクビエいもち病菌，2菌系のうちUG77-17-1-1はNP10-17-4-3に比較して多くの各種いもち病菌と有性世代を形成し，シナダレスズメガヤ菌，オヒシバ菌，エルシーネ・アフリカーナ菌，イネ菌，イヌビエ菌，アワ菌，ナルコビエ菌との交配では成熟した子のう胞子を生成した。また*Mat1-2*のシコクビエいもち病菌は，コムギ菌，シナダレスズメガヤ菌，オヒシバ菌，イネ菌，ヒエ菌，アワ菌との交配により子のう胞子を形成した。キビ菌およびエノコログサ菌は，わずかに子のう殻を形成したが，子のう及び子のう胞子は形成されなかった。メヒシバ菌はいずれのシコクビエ菌とも子のう殻を形成しなかった。

(2) イネいもち病菌と各種いもち病菌の交配による有性世代形成能

交配稔性が高い中国雲南省産イネいもち病菌，交配型*Mat1-1*のCHNOS37-1-3，交配型*Mat1-2*のCHNOS32-3-4，及び中国雲南省産イネいもち病菌相互交配によるF₁菌系，交配型*Mat1-1*の3472-R-12，交配型*Mat1-2*の2145-R-11を分離植物が異なるいもち病菌と交配した。交配型*Mat1-1*のイネいもち病菌はシナダレスズメガヤ菌，オヒシバ菌，シコクビエ菌，エルシーネ・アフリカーナ菌，イネ菌，キビ菌，イヌビエ菌，エノコログサ菌，アワ菌，ナルコビエ菌との交配により，また*Mat1-2*のイネいもち病菌は，コムギ菌，シナダレスズメガヤ菌，オヒシバ菌，シコクビエ菌，ヒエ菌，アワ菌との交配により子のう胞子を形成した。イネ菌とメヒシバ菌との交配では，交配型*Mat1-2*のメヒシバ菌3菌系のうち2菌系は，菌叢の境界4辺に子のう殻を形成したが，子のう，子のう胞子は形成されなかった。交配型*Mat1-1*のメヒシバ菌では，わずかに子のう殻が形成されたが，交配型*Mat1-2*と同様子のう胞子は形成されなかった（表Ⅱ-7）。

(3) アワ菌×各種いもち病菌の交配

本邦産及びインド産アワいもち病菌4菌系，交配型*Mat1-1*のIN77-16-1-1及びNRSI5-1，交配型*Mat1-2*のMZSI1-1-1及びNRSI3-1-1と各種いもち病菌の交配により有性世代形成能を比較した。その結果，交配型*Mat1-1*のアワいもち病菌はシコクビエ菌，エルシーネアフリカーナ菌，イネ菌との交配により，また交配型*Mat1-2*のアワいもち病菌は，オヒシバ菌，シコクビエ菌，イネ菌との交配により成熟した子のう胞子を形成した。アワ菌には，両交配型がみられたが，相互では交配できなかった（表Ⅱ-8）。

(4) キビ菌×各種いもち病菌の交配

表Ⅱ-6. シコクビエいもち病菌と各種いもち病菌の交配稔性

Mat1-2 菌系	分離宿主 (略称)	シコクビエいもち病菌(Mat1-1)			
		NP10-17-4-1-3		UG77-17-1-1	
		子のう殻	子のう胞子	子のう殻	子のう胞子
IBECu2-2-1	ECu	-	-	t	+++
KENWL-2	ECu	-	-	++++	+++
IDOEI1-2-2	EI	-	-	t	+++
IN77-35-1-2	EI	-	-	t	+++
IN77-36-1-1	EI	-	-	t	+++
NI1005	EI	-	-	+++	+++
NI886	EA	-	-	t	+++
* IDOLeH1-1-1	LeH	-	-	-	-
CHNOS32-3-4	OS	-	-	t	++
2145-R-11	OS	-	-	++	+++
* IBZL1-2-2	ZL	-	-	-	-
* IBPB1-1-1	PB	-	-	-	-
NRPM1-3	PM	-	-	-	-
NNPM2-6-1	PM	-	-	t	±
NNPM3-2-1	PM	-	-	t	±
STPM1-2-1	PM	-	-	t	±
SZPM1-2-2	PM	-	-	t	±
SZPM1-3-1	PM	-	-	+	±
CBECG1-4-1	EcCG	-	-	t	+++
SZEU1-1-1	EU	-	-	-	-
KANSV4-2	SV	-	-	-	-
NI1078	SV	-	-	t	±
SASV1-2-2	SV	-	-	-	-
STSV1-2-2	SV	-	-	-	-
MZSI1-1-1	SI	-	-	t	+++
NRSI1-1-1	SI	-	-	t	++
NRSI2-3-1	SI	-	-	t	±
NRSI3-1-1	SI	-	-	+	+++
YNSI2-1-1	SI	-	-	-	-
NNSI1-1-1	SI	-	-	-	-
NI859	EV	++++	++	++	+++
FODS1-1-5	DS	-	-	-	-
NNDS6-2-1	DS	-	-	-	-
NNDS7-2-3	DS	-	-	-	-
UG77-4-1-1	DSc	-	-	-	-
* IDOPeP3-2-4	PeP	-	-	-	-
* YNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* SZZO1-1-1	ZO	-	-	-	-

Mat1-1 菌系	分離宿主	シコクビエいもち病菌(Mat1-2)			
		IN77-13-1-3		Z2-1	
		子のう殻	子のう胞子	子のう殻	子のう胞子
BRATA1-1-1	TA	+	+++	-	-
PARTA1-1-1	TA	++	+++	++++	+++
KENWL-1	ECu	+	+++	++++	+++
IN77-48-1-1	EI	+	++	++	±
UG77-7-1-1	EI	t	+++	++++	+++
* IDOLeH1-1-1	LeH	-	-	-	-
CHNOS37-1-3	OS	++++	+++	++++	+++
3472-R-12	OS	++++	+++	-	-
* IBZL1-2-2	ZL	-	-	-	-
IBPB1-1-1	PB	-	-	-	-
IWEU2-1-2	EU	-	-	t	++
GFSI1-1-1	SI	-	-	-	-
GFSI1-14-1	SI	-	-	-	-
IN77-16-1-1	SI	t	+++	++	++
NNSI3-1-2	SI	t	++	-	-
NRSI5-1-1	SI	-	-	t	+
STSI2-2-1	SI	-	-	-	-
STSI3-1-5	SI	t	+++	-	-
YNSI1-7	SI	-	-	-	-
IN77-34-1-1	DS	-	-	-	-
KENM1-3	DS	-	-	-	-
* IDOPeP3-2-4	PeP	-	-	-	-
* YNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* SZZO1-1-1	ZO	-	-	-	-

*を付した菌系は交配型不明。

表II-7. イネいもち病菌と各種いもち病菌の交配稔性

<i>Mat1-2</i>		イネいもち病菌(<i>Mat1-1</i>)			
菌系	分離宿主	CHNOS37-1-3		3472-R-12	
		子のう殻	子のう胞子	子のう殻	子のう胞子
IBECu2-2-1	ECu	++++	+++	++++	+++
KENWL-2	ECu	++++	+++	++++	+++
IDOE11-2-2	EI	++++	+++	++++	+++
IN77-35-1-2	EI	++++	+++	++++	+++
IN77-36-1-1	EI	++++	+++	++++	+++
NI1005	EI	++++	+++	++++	+++
IN77-13-1-3	EC	++++	+++	++++	+++
Z2-1	EC	++++	+++	-	-
NI886	EA	++++	+++	++++	+++
* IDOLeH1-1-1	LeH	-	-	-	-
* IDOLeH4-1-2	LeH	-	-	-	-
CHNOS32-3-4	OS	++++	+++	++++	+++
2145-R-11	OS	++++	+++	++++	+++
* IBZL1-2-2	ZL	-	-	-	-
* IBPB1-1-1	PB	-	-	-	-
* IBPB1-4-1	PB	-	-	-	-
NNPM2-6-1	PM	++++	++	++++	++
NNPM3-2-1	PM	+	±	++++	±
NRPM1-3	PM	t	±	++++	++
STPM1-2-1	PM	++++	++	++++	±
SZPM1-2-2	PM	++++	++	++++	++
SZPM1-3-1	PM	++++	±	++++	±
CBECG1-4-1	EcCG	++++	+++	++	±
SZEU1-1-1	EU	-	-	-	-
KANSV	SV	t	±	-	-
NI1078	SV	++++	+++	++++	++
SASV1-2-2	SV	-	-	++++	+++
STSV1-2-2	SV	-	-	+	±
NRS11-1-1	SI	++++	+++	++++	+++
NRS12-3-1	SI	-	-	-	-
NRS13-1-1	SI	++++	+++	++++	++
YNSI2-1-1	SI	t	+++	t	+++
NI859	EV	++++	+++	++++	+++
FODS1-1-5	DS	t	±	t	±
NNDS6-2-1	DS	++++	±	++	±
NNDS7-2-3	DS	+++	±	++++	±
UG77-4-1-1	DSc	-	-	-	-
* IDOPeP3-2-4	PeP	-	-	-	-
* IDOPeP4-1-3	PeP	-	-	-	-
* NNZiM4-1-1	ZiM	-	-	-	-
* YNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* SZZO1-1-1	ZO	-	-	-	-

<i>Mat1-1</i>		イネいもち病菌(<i>Mat1-2</i>)			
菌系	分離宿主	CHNOS32-3-4		2145-R-11	
		子のう殻	子のう胞子	子のう殻	子のう胞子
BRATA1-1-1	TA	-	-	++++	+++
PARTA1-1-1	TA	++++	+++	++++	+++
KENWL-1	ECu	-	-	+	+++
IN77-48-1-1	EI	-	-	++	++
UG77-7-1-1	EI	++++	+++	++++	+++
NP10-17-4-1-3	EC	-	-	-	-
UG77-17-1-1	EC	t	++	++	+++
* IDOLeH1-1-1	LeH	-	-	-	-
* IDOLeH4-1-2	LeH	-	-	-	-
IWEU2-1-2	EU	-	-	++	+++
* IBZL1-2-2	ZL	-	-	-	-
* IBPB1-1-1	PB	-	-	-	-
* IBPB1-4-1	PB	-	-	-	-
GFSI1-1-1	SI	-	-	-	-
GFSI1-14-1	SI	-	-	-	-
IN77-16-1-1	SI	-	-	t	++
NNSI3-1-2	SI	-	-	-	-
NRSI5-1-1	SI	-	-	++	+++
STSI2-2-1	SI	-	-	-	-
STSI3-1-5	SI	-	-	-	-
YNSI1-7	SI	-	-	-	-
IN77-34-1-1	DS	-	-	-	-
KENM1-3	DS	-	-	t	±
* IDOPeP3-2-4	PeP	-	-	-	-
* IDOPeP4-1-3	PeP	-	-	-	-
* NNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* YNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* SZZO1-1-1	ZO	-	-	-	-

*を付した菌系は交配型不明。

表Ⅱ-8. アワいもち病菌と各種いもち病菌の交配検性

<i>Mat1-2</i>		アワいもち病菌(<i>Mat1-1</i>)			
菌系	分離宿主 (略称)	IN77-16-1-1		NRSI5-1	
		子のう殻	子のう胞子	子のう殻	子のう胞子
IBECu2-2-1	ECu	-	-	-	-
KENWL-2	ECu	-	-	-	-
IN77-35-1-2	EI	-	-	-	-
IN77-36-1-1	EI	-	-	-	-
IDOE11-2-2	EI	-	-	-	-
NI1005	EI	-	-	-	-
IN77-13-1-3	EC	t	+++	-	-
Z2-1	EC	++	++	t	+
NI886	EA	-	-	t	+++
* IDOLeH1-1-1	LeH	-	-	-	-
CHNOS32-3-4	OS	-	-	-	-
2145-R-11	OS	t	++	++	+++
* IBZL1-2-2	ZL	-	-	-	-
* IBPB1-1-1	PB	-	-	-	-
NRPM1-3	PM	-	-	-	-
SZPM1-2-2	PM	-	-	-	-
CBEcCG1-4-1	EcCG	-	-	-	-
SZEU1-1-1	EU	-	-	-	-
KANSV4-2	SV	-	-	-	-
NI1078	SV	-	-	-	-
SASV1-2-2	SV	-	-	-	-
STSV1-2-2	SV	-	-	-	-
NRSI1-1-1	SI	-	-	-	-
NRSI2-3-1	SI	-	-	-	-
NRSI3-1-1	SI	-	-	-	-
YNSI2-1-1	SI	-	-	-	-
NI859	EV	-	-	-	-
NNDS6-2-1	DS	-	-	-	-
NNDS7-2-3	DS	-	-	-	-
FODS1-1-5	DS	-	-	-	-
UG77-4-1-1	DSc	-	-	-	-
* IDOPeP3-2-4	PeP	-	-	-	-
* YNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* SZZO1-1-1	ZO	-	-	-	-

<i>Mat1-1</i>		アワいもち病菌(<i>Mat1-2</i>)			
菌系	分離宿主 (略称)	MZSI1-1-1		NRSI3-1-1	
		子のう殻	子のう胞子	子のう殻	子のう胞子
BRATA1-1-1	TA	-	-	-	-
PARTA1-1-1	TA	-	-	-	-
KENWL-1	ECu	-	-	-	-
IN77-48-1-1	EI	t	±	++	±
UG77-7-1-1	EI	-	-	+++	++
NP10-17-4-1-3	EC	-	-	-	-
UG77-17-1-1	EC	t	+++	+	+++
* IDOLeH1-1-1	LeH	-	-	-	-
CHNOS37-1-3	OS	-	-	++++	+++
3472-R-12	OS	-	-	++++	++
* IBZL1-2-2	ZL	-	-	-	-
* IBPB1-1-1	PB	-	-	-	-
IWEU2-1-2	EU	-	-	-	-
GFSI1-1-1	SI	-	-	-	-
GFSI1-14-1	SI	-	-	-	-
IN77-16-1-1	SI	-	-	-	-
NNSI3-1-2	SI	-	-	-	-
NRSI5-1-1	SI	-	-	-	-
STSI2-2-1	SI	-	-	-	-
STSI3-1-5	SI	-	-	-	-
YNSI1-7	SI	-	-	-	-
IN77-34-1-1	DS	-	-	-	-
KENM1-3	DS	-	-	-	-
* IDOPeP3-2-4	PeP	-	-	-	-
* YNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* SZZO1-1-1	ZO	-	-	-	-

*を付した菌系は交配型不明。
空欄は試験未実施。

キビ菌には交配型*Mat1-1*菌系が分離されず、交配型*Mat1-2*菌系、NRPM1-3及びSZPM1-2-2を各種いもち病菌と交配させ有性世代形成能を比較した。その結果、オヒシバ菌、イネ菌との交配で子のう胞子を形成したが、8個の子のう胞子がすべて成熟した子のうはみられなかった。シコクビエ菌及びコムギ菌との交配では、子のう殻の形成はみられたが、子のう及び子のう胞子は形成されなかった（表Ⅱ-9）。

（5）その他のいもち病菌系の組合せによる交配

オヒシバ菌、エルーシネ・アフリカーナ菌、コムギ菌、シナダレスズメガヤ菌は、シコクビエ菌またはイネ菌が子のう殻及び子のう胞子を形成した各種いもち病菌との交配において、子のう胞子を形成した。また、シナダレスズメガヤ菌、オヒシバ菌はそれぞれ同士の交配により子のう胞子を形成した。ヒエ菌は、交配型*Mat1-1*及び*Mat1-2*のそれぞれ1菌系のみを供試したが、シコクビエ菌及びイネ菌との交配により子のう胞子を形成した。しかし、ヒエ菌相互の交配では子のう殻を形成しなかった。メヒシバ菌は、イネ菌及びシコクビエ菌との交配により子のう殻を形成したが、子のうの形成はなかった。また、メヒシバ菌相互では子のう殻を形成しなかった。台湾アシカキ菌、マコモ菌、ヌカキビ菌、ネピアグラス菌、ミョウガ菌、ショウガ菌はいずれのいもち病菌とも子のう殻を形成しなかった（表Ⅱ-10）。

考察

主として本邦、東南アジアにおいて分離されたイネいもち病菌には、*Mat1-1*及び*Mat1-2*の両交配型が報告されている^{73, 81, 86, 88}。これらの報告では、イネいもち病菌と他のイネ科植物より分離されたいもち病菌系を相互交配した場合の稔性程度は低く、雌性機能を持つ*Eleusine*属植物からの菌系と交配した場合のみ、子のう殻を形成している。シコクビエいもち病菌において異なる交配型の菌系間交配で有性世代が形成されない理由は雌性機能消失と考えられている^{18, 19}。イネいもち病菌における低い交配稔性もこのためと推察される。本研究でイネいもち病菌として供試した中国産イネいもち病菌は、雌性機能をもちオヒシバやシコクビエなど*Eleusine*属植物からの分離菌系と同様、ウィーピングラブグラス菌、オヒシバ菌、シコクビエ菌、エルーシネ・アフリカーナ菌、キビ菌、イヌビエ菌、エノコログサ菌、アワ菌、ナルコビエ菌、コムギ菌、ヒエ菌の広範囲の宿主からの分離菌系との交配で、子のう殻及び成熟した子のう胞子を形成した。アワ菌、キビ菌、シナダレスズメガヤ菌はシコクビエ菌、オヒシバ菌及びイネ菌との交配で子のう殻及び子のう胞子を形成したが、それ以外の菌系とは交配稔性がみられなかった。メヒシバ菌は相互の交配ではまったく子のう殻を形成しなかったが、イネ菌及びオヒシバ菌との交配では子のう、子のう胞子のない子のう殻を形成する場合がみられた。台湾アシカキ菌、マコモ菌、ヌカキビ菌、ネピアグラス菌、ミョウガ菌およびショウガ菌は、いずれの菌系との交配において全く子のう殻を形成せず交配稔性を欠いていた。八重樫⁸⁸は、同様に*Pyricularia*属菌を培地上で交配させ、その稔性からA群：多くの*Pyricularia*属菌との間で交配可能で、

表Ⅱ-9. キビいもち病菌と各種いもち病菌の交配稔性

<i>Mat1-1</i>		キビいもち病菌(<i>Mat1-2</i>)			
菌系	分離宿主 (略称)	NRPM1-3		SZPM1-2-2	
		子のう殻	子のう胞子	子のう殻	子のう胞子
BRATA1-1-1	TA	-	-	-	-
PARTA1-1-1	TA	t	±	-	-
KENWL-1	ECu	-	-	-	-
IN77-48-1-1	EI	-	-	-	-
UG77-7-1-1	EI	t	±	++++	++
NP10-17-4-1-3	EC	-	-	-	-
UG77-17-1-1	EC	-	-	t	±
* IDOLeH1-1-1	LeH	-	-	-	-
CHNOS37-1-3	OS	t	±	++++	++
3472-R-12	OS	++++	++	++++	++
* IBZL1-2-2	ZL	-	-	-	-
IBPB1-1-1	PB	-	-	-	-
IWEU2-1-2	EU	-	-	-	-
GFSI1-1-1	SI	-	-	-	-
GFSI1-14-1	SI	-	-	-	-
IN77-16-1-1	SI	-	-	-	-
NNSI3-1-2	SI	-	-	-	-
NRSI5-1-1	SI	-	-	-	-
STSI2-2-1	SI	-	-	-	-
STSI3-1-5	SI	-	-	-	-
YNSI1-7	SI	-	-	-	-
IN77-34-1-1	DS	-	-	-	-
KENM1-3	DS	-	-	-	-
* IDOPeP3-2-4	PeP	-	-	-	-
* YNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* NNZiM1-1-1	ZiM	-	-	-	-
* SZZO1-1-1	ZO	-	-	-	-

*を付した菌系は交配型不明。

表Ⅱ-10. 各種いもち病菌相互の交配稔性

		Mat1-1 菌系													
Mat1-2 菌系		TA (2)	ECu (1)	EI (2)	EC (2)	LeH (1)	OS (2)	ZL (1)	PB (1)	EU (1)	SI (8)	DS (2)	PeP (1)	ZiM (2)	ZO (1)
ECu	(2)	+	+++*	+++*	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
EI	(4)	+++	+++*	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
EC	(2)	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	-	+++*	+++	-	-	-	-
EA	(1)	+++*	-	+++*	+++*	-	+++	-	-	-	+++*	-	-	-	-
LeH	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OS	(2)	+++	+++*	+++	+++	-	+++	-	-	+++*	+++*	±*	-	-	-
ZL	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PB	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM	(6)	±*	-	+++*	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
EcCG	(1)	-	-	+++*	+++*	-	+++*	-	-	-	-	-	-	-	-
EU	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SV	(4)	+++*	-	+++*	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
SI	(6)	-	-	++*	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
EV	(1)	-	-	-	+++*	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
DS	(3)	-	-	±*	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
DSc	(1)	nt	nt	nt	-	nt	-	nt	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt
PeP	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZiM	(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZO	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : 1 子のうに8個の成熟した子のう胞子がある, ++ : 1 子のうに8個未満の成熟した子のう胞子がある, + : 子のうのみ形成, ± : 子のう殻のみ形成, - : 子のう殻を形成しない, nt : 試験せず。

分離宿主名のアンダーラインは交配型不明の菌系を供試したことを示す。

() は分離宿主毎の供試菌系数。* : 1 例のみ観察。

特に*Eleusine* 属植物のいもち病菌の間では極めて稔性が高い、B群：メヒシバいもち病菌相互の交配のみで稔性が高いメヒシバいもち病菌、C群：稔性は低く、*Eleusine* 属植物のいもち病菌とのみ子のう殻を生成、およびD群：全く稔性を示さないの4群に類別した。本試験と比較すると、八重櫛のC群に含まれるイネいもち病菌は*Eleusine* 属植物のいもち病菌と同様の稔性を示したためA群に位置づけられた。B群のメヒシバいもち病菌については、本試験ではメヒシバいもち病菌相互の交配稔性を確認できなかったが、イネ菌及びオヒシバ菌との交配では子う、子う胞子のない子う殻を形成する場合がみられた。また、全く交配稔性を示さないD群は、本試験と共通したいもち病菌が含まれている。

交配稔性の程度はいもち病菌が分化した過程を表しているとも言える。菌系を相互交配した場合の稔性程度から類縁関係を推定すると、イネ菌はシコクビエ菌、アワ菌、キビ菌等と近縁、子う及び子う胞子を形成しないメヒシバ菌、全く子う殻を形成しないタイワンアシカキ菌、マコモ菌等の菌群とは遠縁といえる。Rossmanは、イネいもち病菌*Pyricularia oryzae* Cavaraを含むいもち病菌に統一された学名*Pyricularia grisea* (完全世代名*Magnaporthe grisea*) を与えているが、イネ以外から分離されたいもち病菌*Pyricularia grisea*とイネいもち病菌が有性世代を形成することをその根拠のひとつに挙げている⁵⁹⁾。相互の交配稔性が確認された菌群を同一種とみなすのは妥当と考えられる。従って、本研究において供試した各種いもち病菌に関しては、タイワンアシカキ菌、マコモ菌、ヌカキビ菌、ネピアグラス菌、ミョウガ菌およびショウガ菌を除きたいもち病菌は、程度の多少はみられたがいずれも交配稔性を示し、同一種に含まれると考えられる。しかしながら、メヒシバ菌は、イネまたはオヒシバいもち病菌との交配において菌叢の接合部に直線状に子う及び子う胞子がない子う殻を形成した。この場合、交配稔性があるとするかどうかは供試菌系を増やすなどさらに検討が必要と考えられる。

ごま葉枯病菌の交配型遺伝子座の研究から、交配稔性がないため交配型が不明の菌系においても交配型遺伝子をもつことが明らかにされている⁶¹⁾。有性世代器官の形成は、交配型遺伝子、子う殻形成に係わる遺伝子をはじめとする有性世代の一連の形態形成の結果であることからすると、イネいもち病菌との交配稔性を欠いている菌群が系統的に遠縁であると断定することはできないといえる。日本をはじめ世界に広く分布する交配稔性のないまたは交配稔性が低下した多くのイネいもち病菌の存在がそのことを示している。中国雲南省などからの一部のイネいもち病菌が高い交配稔性を保持していたことから、多くのイネいもち病菌は、伝播の過程で有性世代形成に必要な一連の遺伝子群の一部の機能を失ったと推察される。このことは、いもち病菌の分類には交配稔性以外の特性も含めて検討する必要があることを示していると考えられる。

第3節 いもち病菌のアイソザイム

マコモいもち病菌など一部を除き各種植物より分離したいもち病菌を胞子の形態から区別することは困難である。アイソザイムの変異性に関する分析は遺伝子組成の相同性を解明し、類縁関係を推定する上で非常に有効な手段であることが多くの動植物を用いた研究により明らかにされている^{45, 58)}。そこでアイソザイムによる各種いもち病菌の類縁関係を検討し、イネいもち病菌のいもち病菌の中での位置付けについて考察した。

材料および方法

(1) 供試菌株

イネ、メヒシバ、シコクビエなど18の植物種より分離したいもち病菌58菌系を供試した(表Ⅱ-11)。

(2) アイソザイムの抽出

Matsuyama and Kozakaの方法によった⁴⁹⁾。いもち病菌を酵母エキス合成液体培地(0.5%酵母エキス, 0.05% KH_2PO_4 , 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% MgSO_4 , 微量の CaCl_2 , 2%グルコース)80mlで, 28℃, 9日間振盪培養した。培養液を濾過し, -20℃の2容冷アセトンを加え, 30分間, -10℃に静置後, 5℃で4,000×g, 10分間遠心分離した。得られた沈殿物から残ったアセトンを除去し, 12.5%グルコースを含む1/60Mのリン酸緩衝液0.5mlに溶かし抽出液とした。

(3) 電気泳動法

いもち病菌菌体外アイソザイムは、薄層ゲル等電点焦点法により分別した。7%ポリアクリルアミド, 13.3%グリセリン, 0.2%メチレンビスアクリルアミド(BIS), 2.7%アンフォライン(両性担体, pH3.5~10およびpH4~6, LKB社製), 0.015%過硫酸アンモニウムおよび0.013%テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を含むゲルを作製した。ゲルの大きさは、長さ8.5cm, 厚さ0.5mmとし、ゲル上陰極寄りにサンプルアプリーケーターを置き、そのスロットに抽出液10~20 μl を注入した。電極液としては、アンフォラインpH3.5~10の場合、陰極側に1Mリン酸液、陽極側に1M水酸化ナトリウム液を、pH4~6の場合は、陰極側に0.1M β -アラニン、陽極側に0.5Mリン酸+0.1Mグルタミン酸液を用い、それらを電極濾紙に浸しゲル上に置き電極と連結した。5℃の恒温下、5W定電力で30分、次に10Wとし1400Vに達したところで1400V定電圧で累計3~4時間通電しアイソザイムを分離した。

(4) 染色法

電気泳動によってゲル上に分離されたアイソザイムの染色に用いた方法は次の通りである。

1) パーオキシダーゼ

ベンジジン0.2g, 氷酢酸0.5mlに脱イオン水100ml加え加熱溶解し、冷却後冷蔵保存した。使用前に30%過酸化水素0.2mlを添加した。この反応液に2%酢酸に10分間前浸漬した泳動後のゲルを浸漬し、アルミ箔で遮光し30℃で30分間発色させた。パーオキシダーゼは青色のバンドとして染色された。

表II-11. アイソザイム分析に供試したいもち病菌

番号	菌株名	分離植物	分離植物略称	分離年	場所
1	PARTA1-1-1	コムギ	TA	1986	Asuncion, Paraguay
2	GFIT1-1	イタリアンライグラス	LM	1977	岐阜県八幡町
3	ONLM1-1-1	イタリアンライグラス	LM	1984	沖縄県
4	IBECu1-1-2	シナダレスズメガヤ	ECu	1986	茨城県つくば市
5	KENWL-1	シナダレスズメガヤ	ECu	1974	栃木県西那須野町
6	IDOEI1-1-1	オヒシバ	EI	1985	Metro, Lampung, Indonesia
7	IN77-48-1-1	オヒシバ	EI	1977	Univ. Mysore, India
8	NI915	オヒシバ	EI	1974	千葉県
9	NI1005	オヒシバ	EI	1975	栃木県西那須野町
10	G10-1	シコクビエ	EC	1979	栃木県
11	GFEC1-1-2	シコクビエ	EC	1977	岐阜県八幡町
12	IN77-25-1-1	シコクビエ	EC	1977	Mysore(F.F.23), India
13	KEN8-2	シコクビエ	EC	1976	東京都西ヶ原
14	MZ4-1-3	シコクビエ	EC	1976	宮崎県都城市
15	Z2-1	シコクビエ	EC	1979	香川県
16	1601-3	イネ	OS	1976	長野県北安曇郡松川町
17	1813-2	イネ	OS	1976	新潟県柏崎市
18	CD169	イネ	OS	1973	Ivory Coast
19	CD171	イネ	OS	1973	Ivory Coast
20	F67-57	イネ	OS	1967	
21	稲168	イネ	OS		愛知県稲武町
22	研53-33	イネ	OS	1953	愛知県稲武町
23	長68-138	イネ	OS	1968	長野県
24	長77-201	イネ	OS	1977	長野県
25	PO2-7401	イネ	OS	1973	Lampegan, Sukabumi, Indonesia
26	PO4-7501	イネ	OS	1975	Tulungagung, East Jawa, Indonesia
27	PO12-7301	イネ	OS	1973	Tamanbogo, Lampung, Indonesia
28	PH79-1-2-4	イネ	OS	1979	中国広州
29	TH69-8	イネ	OS	1969	福島県
30	CHIZL-1	マコモ	ZL	1974	千葉県成田市
31	IBZL1-1-1	マコモ	ZL	1985	茨城県竜ヶ崎市
32	NI901	リードカナリーグラス	PA	1974	栃木県西那須野町
33	IBPB1-1-1	ヌカキビ	PB	1986	茨城県牛久市
34	NI885	ヌカキビ	PB	1973	栃木県西那須野町
35	NI922	ヌカキビ	PB	1974	栃木県西那須野町
36	NNPM1-1-1	キビ	PM	1985	長野県南信濃村
37	STPM2-1-1	キビ	PM	1982	埼玉県大滝村
38	YNPM2-1-1	キビ	PM	1983	山梨県小菅村
39	CBEcCG1-2-1	イヌビエ	EcCG	1985	千葉県沼南町
40	IN77-16-1-1	アワ	SI	1977	Mysore(F.F.8), India
41	IN77-20-1-1	アワ	SI	1977	Mysore(F.F.22), India
42	NNSI1-1-1	アワ	SI	1986	長野県南信濃村
43	NI859	ナルコビエ	EV	1972	千葉県
44	NI980-3	ジギタリアスマチー	DSm	1975	熊本県
45	IBDS1-1-1	メヒシバ	DS	1985	茨城県つくば市
46	NI907	メヒシバ	DS	1974	栃木県西那須野町
47	NI982	メヒシバ	DS	1975	熊本県西合志町
48	SIM1-2	メヒシバ	DS	1972	埼玉県鴻巣市
49	TOCHM1	メヒシバ	DS	1972	栃木県西那須野町
50	IDOPeP2-1-1	ネピアグラス	PeP	1985	Gianyar, Bali, Indonesia
51	IDOPeP3-1-1	ネピアグラス	PeP	1985	Denpasar, Bali, Indonesia
52	IBPBa1-1-1	マダケ	PBa	1986	茨城県牛久市
53	IN77-14-1-1	タケ(<i>Bambusa arundinacea</i>)	BA	1977	Bird Sanctuary, Ranganathittu, India
54	KAGZM1-1	ミョウガ	ZiM	1978	香川県善通寺市
55	YNZiM1-1-1	ミョウガ	ZiM	1985	山梨県小菅村

2) 非特異的エステラーゼ

Matsuyama et al.⁴⁹⁾の方法によった。すなわち、ファーストバイオレットB塩100mgを1/60Mリン酸緩衝液100mlに加熱して溶解させ、アセトンに溶解した1% α -ナフチル酢酸 5 mlを添加した。この反応液に泳動後のゲルを浸漬し、37℃で1時間発色させた。非特異的エステラーゼは褐色のバンドとして検出された。

3) アルカリフォスファターゼ

0.01M トリス・塩酸緩衝液 pH8.5, 100mlに1-ナフチルリン酸ナトリウムを75mg, ファーストブルーRR塩を50mg, PVPを500mg加え、これに塩化ナトリウム, 塩化マグネシウムをそれぞれ0.3M, 5mMとなるように添加した反応液にゲルを浸漬し、アルミ箔で遮光して30℃で約2時間放置した。アルカリフォスファターゼは褐色のバンドとして染色された。

4) 酸性フォスファターゼ

0.5M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0 10ml, 0.1M 1-ナフチルリン酸ナトリウム 1ml, ファーストガーネットGBC塩50mgに脱イオン水を加えて100mlとした反応液にゲルを浸漬し、アルミ箔で遮光して30℃で約1時間放置した。酸性フォスファターゼは濃い褐色のバンドとして染色された。

5) ロイシンアミノペプチダーゼ

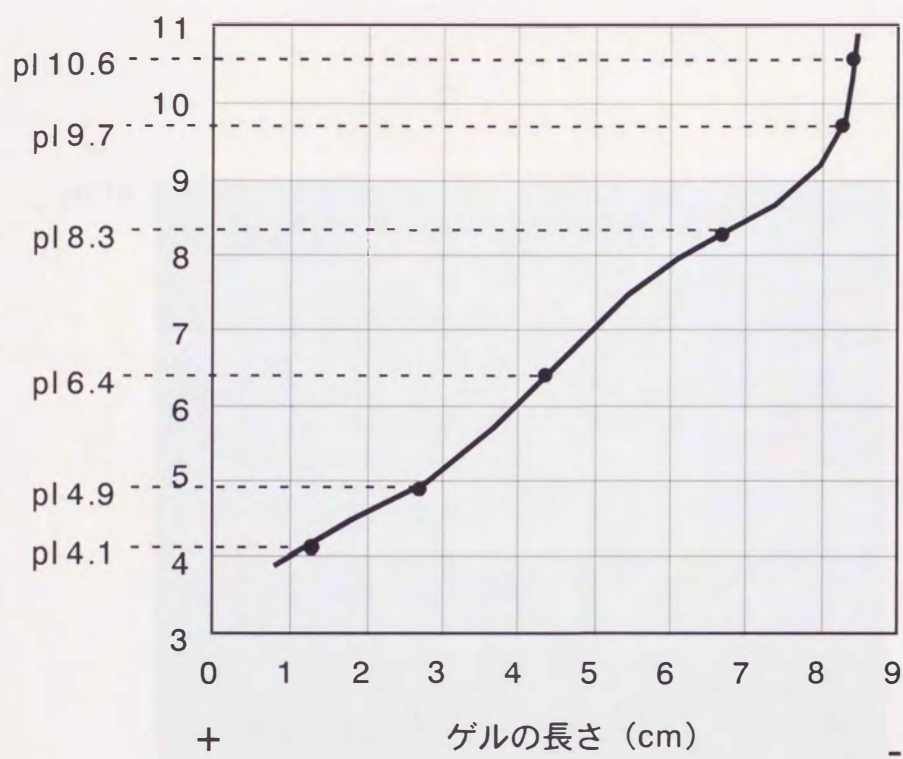
0.3mMのL-ロイシル-2-ナフチルアミドを含む0.05M酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0, 100mlにファーストブラックK塩20mgを加えた反応液にゲルを浸した。30℃で約4時間放置した。ロイシンアミノペプチダーゼは紫色のバンドとして染色された。

アイソザムの等電点 (pI) の測定のためpIマーカー有色タンパク質をいもち病菌試料と同時に泳動し、アイソザイムバンドのpIを調べた(図II-1)。pIマーカー有色タンパク質はオリエンタル酵母工業社製のものをを用いた。

実験結果

1) パーオキシダーゼ

各種いもち病菌の菌体外パーオキシダーゼアイソザイムを分析した結果、陰極側に5, 陽極側に13種類のバンドを検出することができた(図II-2, 3)。これらのバンドを陰極側から陽極側に向って、C1~C5, A1~A13と呼ぶことにした。安定した主要バンドC1, C2, A3, A11, A12を分類の基準とした。A3, A11, A12を示す型(I型)が最も多く、イネ菌, シコクビエ菌, オヒシバ菌, アワ菌, キビ菌, コムギ菌, シナダレスズメガヤ菌, リードカナリーグラス菌及びネピアグラス菌が含まれた。ヌカキビ菌はA11およびA12(II型), メヒシバ菌及びジギタリア・スマチー菌はA3のみを示した(III型)。またタケ菌及びミョウガ菌では陰極側の異なる位置に各々C1, C2のバンドが認められた(IV型, V型)。マコモ菌では、少数の弱いバンドが認められたが主要なバンドは検出されなかった(VI型)。インド産タケ菌はイネ菌やシコクビエ菌と同じI型に分かれた。



図Ⅱ-1. pI有色タンパク質によって明らかにされた泳動後のゲルにおけるpH勾配

各pIのタンパク質はウマチトクロームCとアセチルチトクロームCからなる。

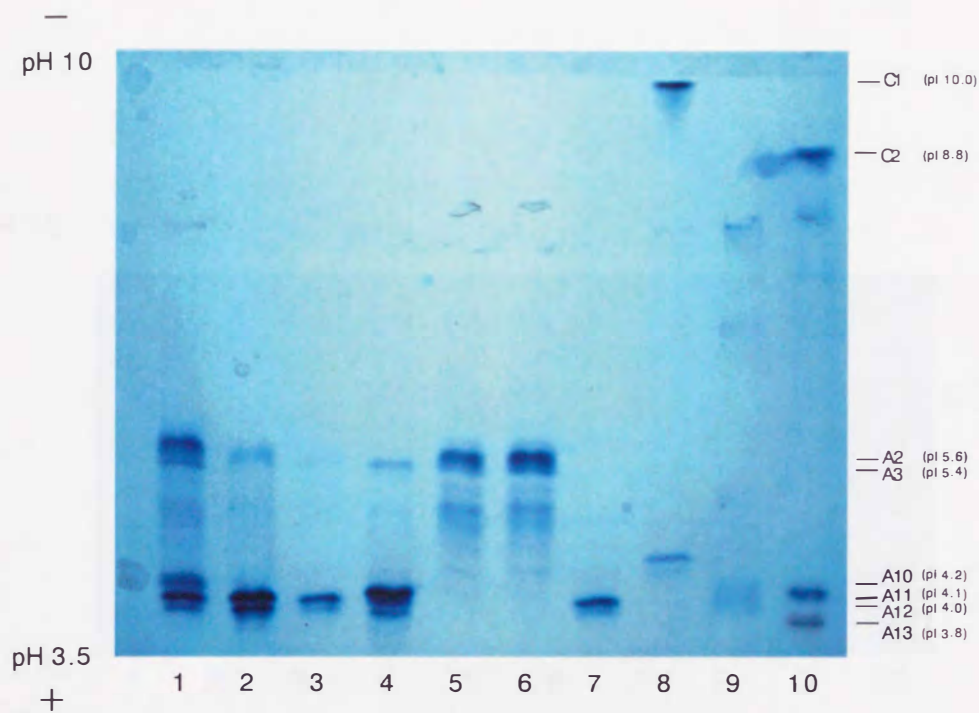


図 II -2. いもち病菌パーオキシダーゼアイソザイムの分離
パターン

1 : PO12-7301 (イネ菌), 2 : PARTA1-1-1 (コムギ菌), 3 : KENWL-1 (シナダ
レスズメガヤ菌), 4 : IDOPeP3-1-1 (ネビアグラス菌), 5 : NI907 (メヒシバ菌),
6 : NI980-3 (ジギタリアスマチー菌), 7 : IBPB1-1-1 (ヌカキビ菌), 8 : IBPBa1-
1-1 (タケ菌), 9 : CHIZL-1 (マコモ菌), 10 : YNZiM1-1-1 (ミョウガ菌)

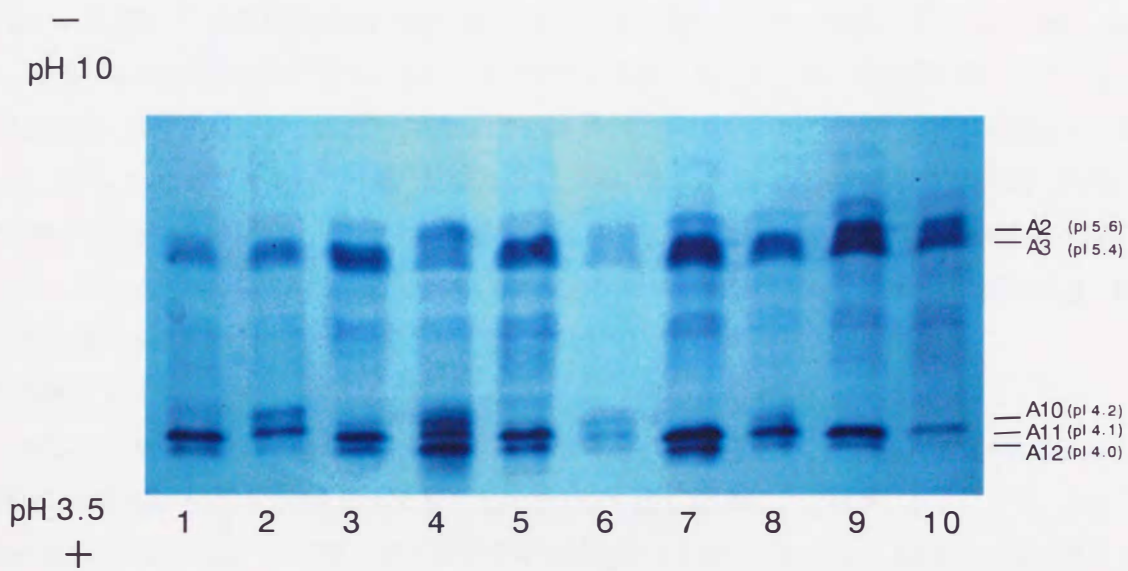


図 II -3. いもち病菌パーオキシダーゼアイソザイムの分離パターン

1 : F67-57 (イネ菌), 2 : TH69-8 (イネ菌), 3 : G10-1 (シコクビエ菌), 4 : MZ4-1-3 (シコクビエ菌), 5 : NI915 (オヒシバ菌), 6 : NI1005 (オヒシバ菌), 7 : NNPM1-1-1 (キビ菌), 8 : STPM2-1-1 (キビ菌), 9 : IN77-16-1-1 (アワ菌), 10 : IN77-20-1-1 (アワ菌)

2) 非特異的エステラーゼ

各種いもち病菌の菌体外非特異的エステラーゼアイソザイムを分析した結果、陰極側に10、陽極側に11種類のバンドを検出することができた(図Ⅱ-4, 5)。これらのバンドを陰極側から陽極側に向って、C1~C10, A1~A11と呼ぶことにした。主要バンドのうちC6, A1, A8及びA11の有無により各いもち病菌を分別した。ネピアグラス菌はC6, A1およびA8 (I型)、タケ菌はC6およびA1 (II型)、ミョウガ菌はA8をもち (III型)、コムギ菌はA1およびA8 (IV型)、マコモ菌はいずれのバンドもなかった。それ以外の菌系については特定のバンドの有無により分別することができなかった。

3) アルカリフォスファターゼ

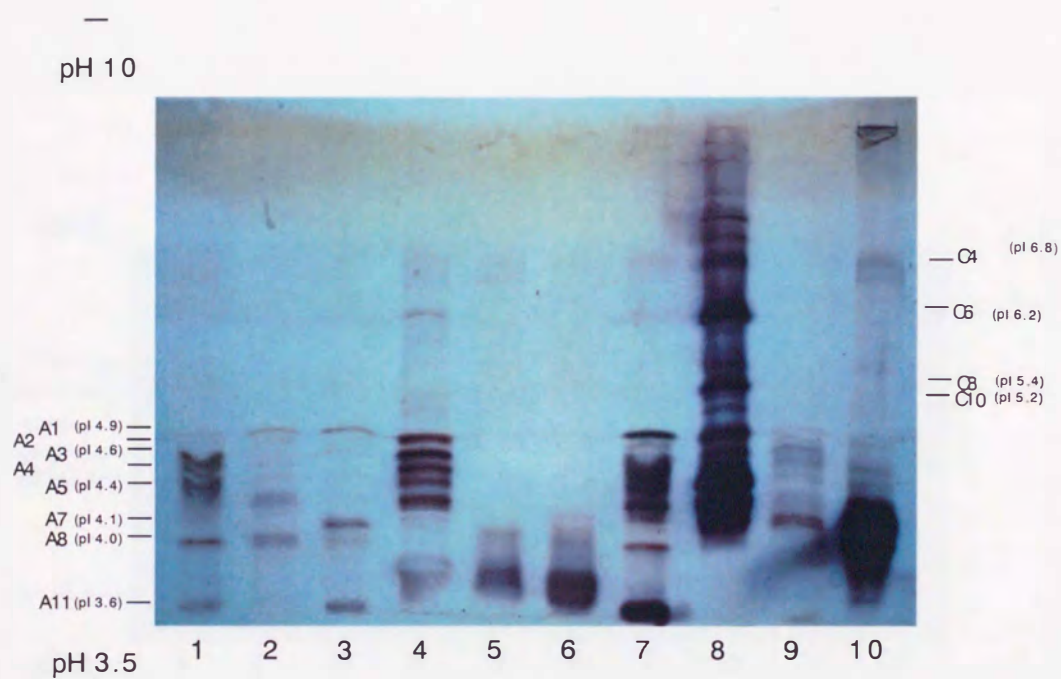
各種いもち病菌の菌体外アルカリフォスファターゼアイソザイムを分析した結果、陰極側に1、陽極側に19種類のバンドを検出することができた(図Ⅱ-6, 7)。このうち、A6及びA10の2本のバンドはミョウガ菌、マコモ菌以外の各菌系のザイモグラムで認められた。主要なバンドA1, A2, A4, A7, A8及びA10の出現状況に着目すると、おのおのの菌系はI, II, III, IV及びV型のアイソザイムパターンに大別することができた。I型にはすべてのバンドがあるネピアグラス菌、II型には、A2, A7, A8及びA10があるメヒシバ菌、III型にはA2, A4, A7, A8及びA10があるコムギ菌、IV型にはA7, A8, A10があるイネ菌、ヌカキビ菌、キビ菌及びアワ菌が含まれた。V型は、A10のみがみられ、イタリアンライグラス菌、シコクビエ菌及びオヒシバ菌が含まれた。シナダレスズメガヤ菌は、IV型とV型に属する菌系がみられた。

4) 酸性フォスファターゼ

各種いもち病菌の菌体外酸性フォスファターゼアイソザイムを分析した結果、陰極側に5種類以上、陽極側に10種類以上のバンドを検出することができた(図Ⅱ-8, 9)。主要なバンドにより、A3, A4, A5, A7をもつイネ菌、キビ菌、アワ菌及びヌカキビ菌 (I型)、A1, A5, A7をもつシナダレスズメガヤ菌、シコクビエ菌、オヒシバ菌、イタリアンライグラス菌およびコムギ菌 (II型)に分けることができた。ネピアグラス菌、メヒシバ菌、ナルコビエ菌、タケ菌では、薄いバンドが多かったが陰極側及び陽極側に多数のバンドが認められた。マコモ菌ではバンドがみられなかった。

5) ロイシンアミノペプチダーゼ

各種いもち病菌の菌体外ロイシンアミノペプチダーゼアイソザイムを分析した結果、陽極側に7種類のバンドを検出することができ、A1~A7とした(図Ⅱ-10, 11)。A1, A3, A7の有無に違いがみられた。メヒシバ菌及びジギタリア・スマチー菌ではA1及びA3のバンドを欠き、A7のバンドが特異的に認められ他の菌系と区別できた (I型)。イネ菌およびネピアグラス菌ではA3 (II型)、ヌカキビ菌、コムギ菌およびシナダレスズメガヤ菌ではA1およびA3 (III型)、ミョウガ菌ではA1 (IV型)がみられた。シコクビエ菌、オヒシバ菌、キビ菌およびアワ菌では出現するバンドに菌系間差がみられた。タケ菌およびマコモ菌からはバンドが検出されなかった。



+ 図 II-4. いもち病菌非特異的エステラーゼアイソザイムの
 分離パターン

1 : PO12-7301 (イネ菌), 2 : PARTA1-1-1 (コムギ菌), 3 : KENWL-1 (シナダ
 レスズメガヤ菌), 4 : IDOPeP3-1-1 (ネビアグラス菌), 5 : NI907 (メヒシバ菌),
 6 : NI980-3 (ジギタリアスマチー菌), 7 : IBPB1-1-1 (ヌカキビ菌), 8 : IBPBa1-
 1-1 (タケ菌), 9 : CHIZL-1 (マコモ菌), 10 : YNZIM1-1-1 (ミヨウガ菌)

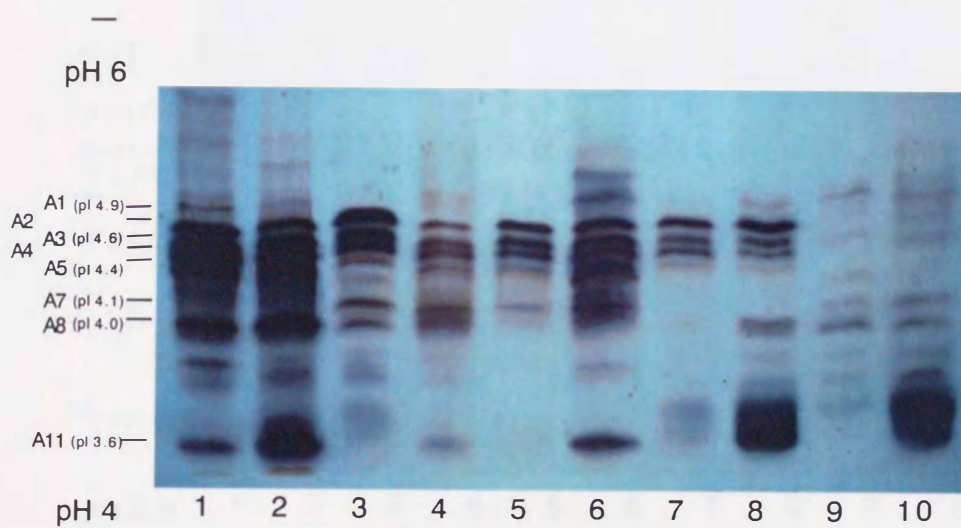
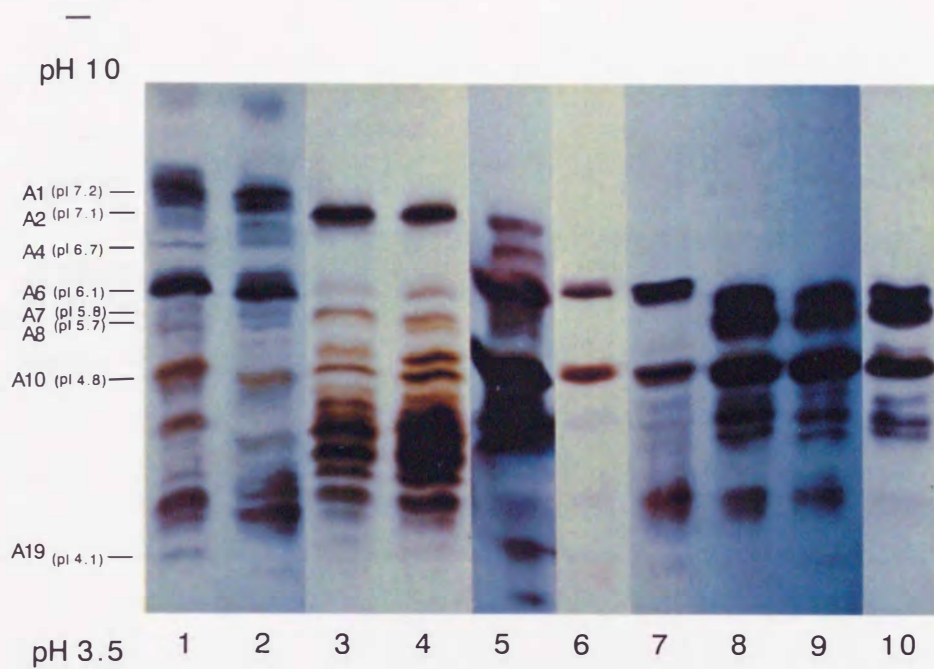


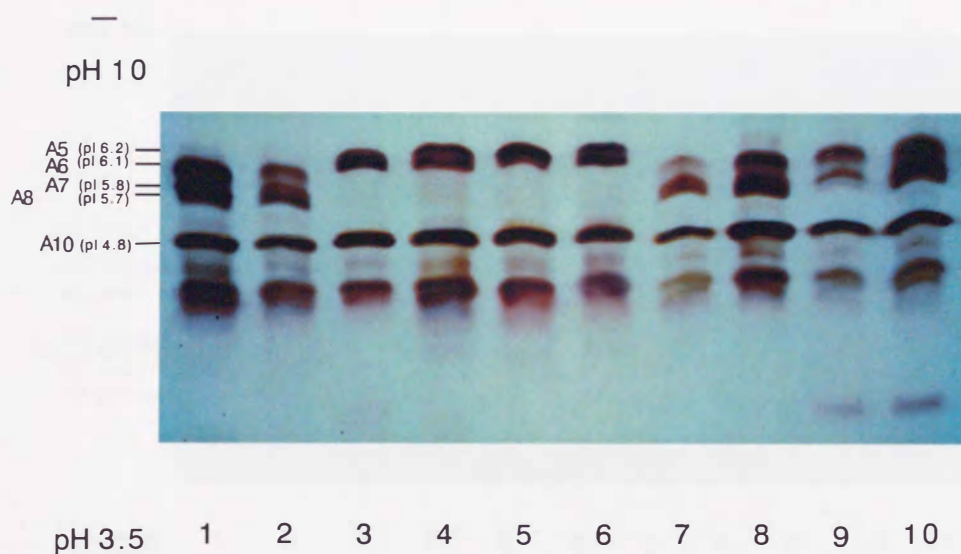
図 II -5. いもち病菌非特異的エステラーゼアイソザイムの分離パターン

1 : F67-57 (イネ菌), 2 : TH69-8 (イネ菌), 3 : G10-1 (シコクビエ菌), 4 : MZ4-1-3 (シコクビエ菌), 5 : NI915 (オヒシバ菌), 6 : NI1005 (オヒシバ菌), 7 : NNPM1-1-1 (キビ菌), 8 : STPM2-1-1 (キビ菌), 9 : IN77-16-1-1 (アワ菌), 10 : IN77-20-1-1 (アワ菌)



十 図 II-6. いもち病菌アルカリフォスファターゼアイソザイムの分離パターン

1 : IDOPeP3-1-1 (ネビアグラス菌), 2 : IDOPeP2-1-1 (ネビアグラス菌), 3 : NI907 (メヒシバ菌), 4 : TOCHM1 (メヒシバ菌), 5 : PARTA1-1-1 (コムギ菌), 6 : KENWL-1 (シナダレスズメガヤ菌), 7 : ONLM1-1-1 (イタリアンライグラス菌), 8 : 長68-138 (イネ菌), 9 : NI885 (ヌカキビ菌), 10 : NI922 (ヌカキビ菌)



+

図II-7. いもち病菌アルカリフォスファターゼアイソザイムの分離パターン

1 : F67-57 (イネ菌), 2 : TH69-8 (イネ菌), 3 : Z2-1 (シコクビエ菌), 4 : G10-1 (シコクビエ菌), 5 : NI1005 (オヒシバ菌), 6 : IN77-48-1-1 (オヒシバ菌), 7 : NNPM1-1-1 (キビ菌), 8 : STPM2-1-1 (キビ菌), 9 : IN77-16-1-1 (アワ菌), 10 : IN77-20-1-1 (アワ菌)

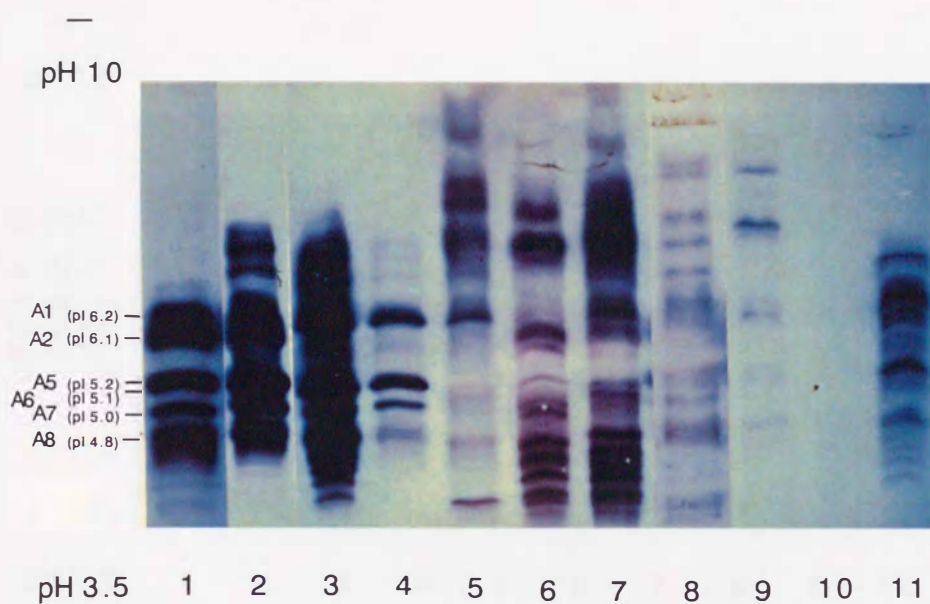


図 II-8. いもち病菌酸性フォスファターゼアイソザイムの分離パターン

1 : PH79-1-2-4 (イネ菌), 2 : IBPB1-1-1 (ヌカキビ菌), 3 : PARTA1-1-1 (コムギ菌), 4 : KENWL-1 (シナダレスズメガヤ菌), 5 : IDOPeP3-1-1 (ネピアグラス菌), 6 : NI907 (メヒシバ菌), 7 : NI980-3 (ジギタリアスマチー菌), 8 : NI859 (ナルコビエ菌), 9 : IBPBa1-1-1 (タケ菌), 10 : CHIZL-1 (マコモ菌), 11 : YNZIM1-1-1 (ミョウガ菌)

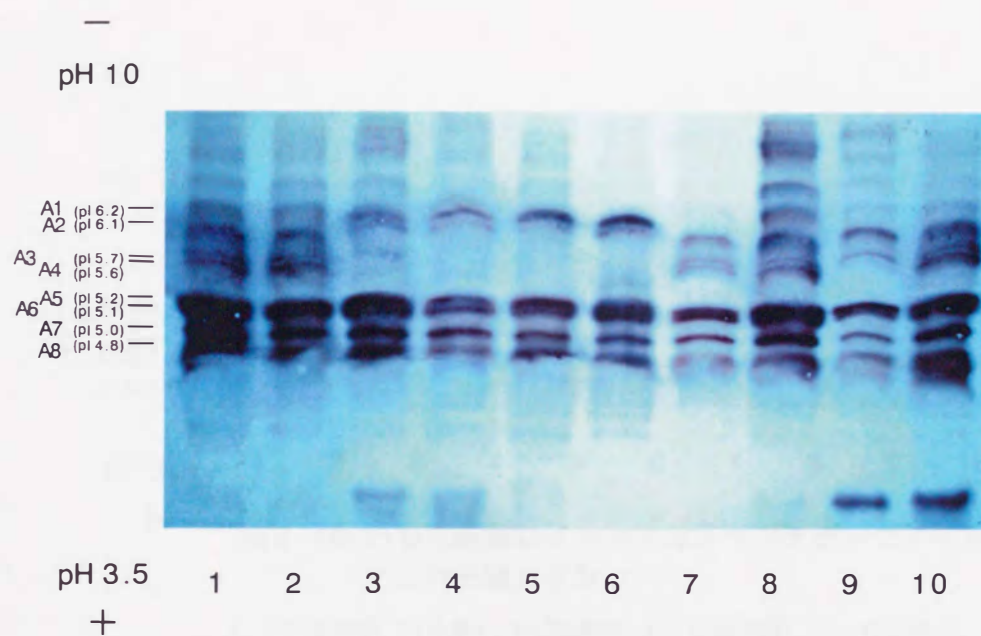


図 II -9. いもち病菌酸性フォスファターゼアイソザイムの
分離パターン

1 : F67-57 (イネ菌), 2 : TH69-8 (イネ菌), 3 : Z2-1 (シコクビエ菌),
4 : G10-1 (シコクビエ菌), 5 : NI1005 (オヒシバ菌), 6 : IN77-48-1-
1 (オヒシバ菌), 7 : NNPM1-1-1 (キビ菌), 8 : STPM2-1-1 (キビ菌),
9 : IN77-16-1-1 (アワ菌), 10 : IN77-20-1-1 (アワ菌)

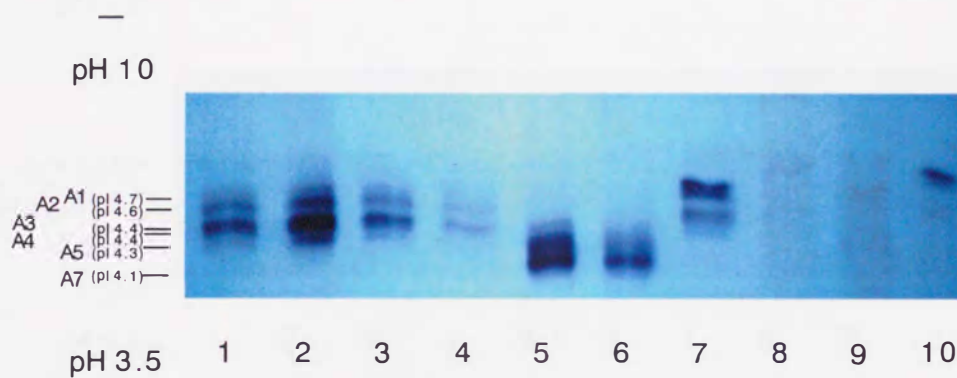


図 II -10. いもち病菌ロイシンアミノペプチダーゼアイソザイムの分離パタン

1 : PO12-7301 (イネ菌), 2 : PARTA1-1-1 (コムギ菌), 3 : KENWL-1 (シナダレスズメガヤ菌), 4 : IDOPeP3-1-1 (ネピアグラス菌), 5 : NI907 (メヒシバ菌), 6 : NI980-3 (ジギタリアスマチー菌), 7 : IBPB1-1-1 (ヌカキビ菌), 8 : IBPBa1-1-1 (タケ菌), 9 : CHIZL-1 (マコモ菌), 10 : YNZiM1-1-1 (ミョウガ菌)

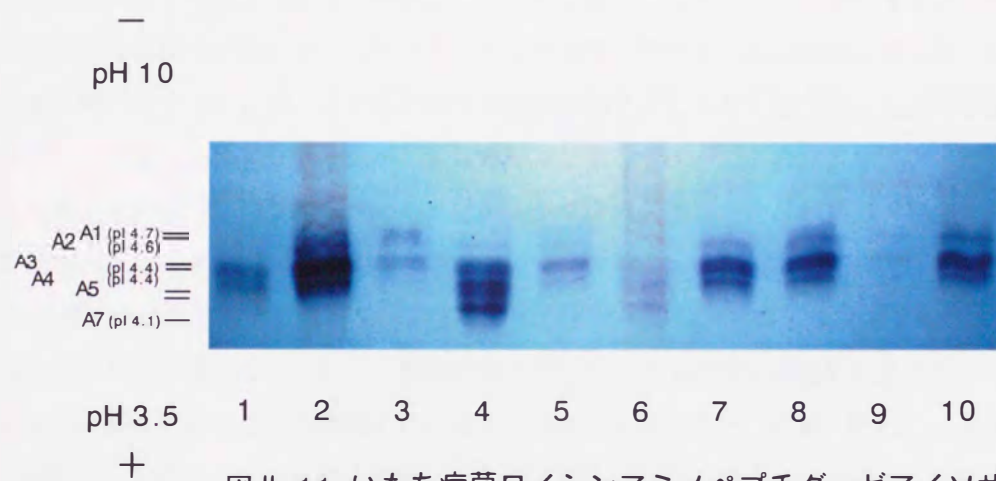


図 II -11. いもち病菌ロイシンアミノペプチダーゼアイソザイムの分離パタン

1 : 長77-201 (イネ菌), 2 : TH69-8 (イネ菌), 3 : FEC1-1-2 (シコクビエ菌), 4 : G10-1 (シコクビエ菌), 5 : NI1005 (オヒシバ菌), 6 : NI915 (オヒシバ菌), 7 : NNPM1-1-1 (キビ菌), 8 : STPM2-1-1 (キビ菌), 9 : IN77-16-1-1 (アワ菌), 10 : IN77-20-1-1 (アワ菌)

考察

本研究で分析された5種類の酵素は、いずれも各種植物より分離したいもち病菌間のある範囲において差異が認められた(表Ⅱ-12)。しかし、菌群内の変異は他の糸状菌の報告⁵²⁾と同様少なかった。イネ菌のパーオキシダーゼの主要バンドは、シコクビエ菌、オヒシバ菌、キビ菌及びアワ菌に共通し、互いを判別できなかった。Matsuyama et al.⁴⁸⁾は、イネ科植物及びミョウガより分離したいもち病菌の菌体外酵素をポリアクリルアミドスラブゲルにより分離し、パーオキシダーゼ及び非特異的エステラーゼの活性染色を行った。パーオキシダーゼのバンドパターンにより、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型の4つの型に分け、イネ菌、シコクビエ菌、オヒシバ菌、イタリアンライグラス菌、シナダレスズメガヤ菌及びエノコログサ菌はⅢ群に、キビ菌およびヌカキビ菌はⅠ群に分けた。本試験の結果ではⅢ群とⅠ群はヌカキビ菌以外は同じ群に分類された。Matsuyama et al.によりⅡ群に分類されたメヒシバ菌とマコモ菌は、本試験では異なるアイソザイムパターンを示した。このようにパーオキシダーゼのアイソザイムパターンでは比較的近縁と考えられる各いもち病菌を判別することが困難であった。しかし、検出する酵素を増やすことにより、イネ菌と他の菌群を判別することが可能であった。非特異的エステラーゼによりコムギ菌、ネピアグラス菌が、アルカリフォスファターゼ、酸性フォスファターゼによりシコクビエ菌、オヒシバ菌、コムギ菌、イタリアンライグラス菌、シナダレスズメガヤ菌がイネ菌から判別可能であった(表Ⅱ-12)。

インド産タケより分離された菌系IN77-14-1-1のパーオキシダーゼのアイソザイムパターンはシコクビエ菌と同じⅠ型に属した。しかし、本菌系は元々シコクビエ圃場に隣接したタケから分離され、シコクビエに病原性があることが確認されているシコクビエ菌であり(加藤, 私信), 本菌のアイソザイムの結果からもそのことが確認された。タケ菌、マコモ菌およびミョウガ菌は、別種として、それぞれ、*Pyricularia apiculata* Matsushima, *P. zizaniaecola* Hashioka, *P. zingiberi* Nishikado⁵⁴⁾と命名されている。これらの菌群は供試したすべて菌系のザイモグラムのパターンで大きく違っていた。このためタケいもち病菌、マコモいもち病菌およびミョウがいもち病菌を別種として扱うことは妥当であると判断された。

メヒシバ菌は*Pyricularia grisea*の基準種であるが、非特異的エステラーゼ以外はいずれの酵素のザイモグラムも他のいもち病菌と異なっていた。アワ菌とキビ菌は、いずれの酵素のザイモグラムにおいてもイネ菌と分別できなかった。以上のことから、イネ菌はメヒシバ菌とは離れ、キビ菌、アワ菌に近縁であるといえる。

表Ⅱ-12. アイソザイムによるイネいもち病菌と他のいもち病菌との判別

いもち病菌	アイソザイム				
	Px	Est	Alp	Acp	Lap
キビ菌	N	N	N	N	N
アワ菌	N	N	N	N	N
ヌカキビ菌	D	N	N	N	N
リードカナリーグラス菌	N				
シコクビエ菌	N	N	D	D	N
オヒシバ菌	N	N	D	D	N
シナダレスズメガヤ菌	N	N	D	D	D
コムギ菌	N	D	D	D	N
イタリアンライグラス菌	N	N	D	D	
イヌビエ菌	N	N			D
ナルコビエ菌		N		D	D
ネピアグラス菌	N	D	D	D	N
メヒシバ菌	D	N	D	D	D
ジギタリア・スマチー菌	D	D		D	D
タケ菌	D	D			
マコモ菌	D	D	D	D	D
ミョウガ菌	D	D	D	D	D

Px : パーオキシダーゼ、Est : 非特異的エステラーゼ、Alp : アルカリフォスファターゼ、
Acp : 酸性フォスファターゼ、Lap : ロイシンアミノペプチダーゼ
D : 判別可能、N : 判別不可能、空欄 : 試験せず。

第4節 いもち病菌のDNA分析

多様に寄生性分化したいもち病菌をDNAレベルで調査し、いもち病菌の分別及び寄生性分化について考察した。

第1項 パルスフィールドゲル電気泳動法によるいもち病菌染色体様DNAの分離

パルスフィールドゲル電気泳動法 (P F G E: Pulsed Field Gel Electrophoresis) は、従来のアガロース電気泳動では分離不可能であった長い直鎖状DNA断片を分離、解析する目的で、1982年Schwartz et al.により開発された技術で、電場の向きを交互に変えることで従来の方法に比べて100倍以上の長さの巨大DNAを分子量によって分離することができる⁶⁰⁾。一般に植物病原糸状菌をはじめとする菌類の染色体の多くは、観察するには極めて微小であり、通常用いられる分染法技術では十分な解析ができないことが多い。P F G E法を用いれば、染色体をアガロースゲルにバンドの形でとらえることができ、細胞学的観察と相補い、菌類の染色体とゲノム構造の理解がより一層進むものと期待できる。本項ではいもち病菌のゲノムサイズを明らかにするとともに、分離植物の異なるいもち病菌の染色体レベルの多型について解析した。

材料および方法

(1) 供試菌

表Ⅱ-13に示した8種のイネ科植物より分離したいもち病菌44菌系を供試した。イネいもち病菌にはレースが異なる菌系を含む。DNA分子マーカーとして酵母菌*Saccharomyces cerevisiae* YNN295系統及び*Schizosaccharomyces pombe* 972h-系統を用いた。

(2) 染色体DNAの調製

巨大DNA分子は溶液状態で操作すると切断され易いため、調製は細胞をアガロースゲル中に固めて、アガロース片の状態で行った。CM培地 (0.6%酵母エキス, 0.6%カザミノ酸水解物, 1%蔗糖)⁷⁶⁾を用い28°Cで静置培養した菌糸を1, 2回破碎し新しい培地に移し、さらに培養しメラニン化する前の若い菌糸細胞を集め、滅菌蒸留水で洗浄した。酵素液 (1% Driselase, 5mg/ml Novozyme 234, 10unit/mg Chitinase T1, 0.7M Sorbitol, pH5.2) に懸濁し、28°Cでゆっくり1-2時間振盪処理した。キムワイプで濾過後、蔗糖2層法によりプロトプラストを集め、0.7M Sorbitol, 10mg CaCl₂で洗浄した。プロトプラストを5x10⁸個/mlとなるように1%低融点アガロース (InCert agarose FML, 0.7M Sorbitol, 0.125M EDTA, pH 7.5, 50°C) と等量混合し、サンプル容器に注入し、4°Cでゲル化した。包埋したアガロース片を細胞溶解および除タンパク処理液 (0.01M Tris:pH 7.5, 0.5M EDTA:pH 8.0, 1% Lauroyl sarcosine, 1mg/ml Proteinase K) に浸し50°Cで24時間ゆっくり振盪した。処理液を交換して、さらに24時間処理し、ついで0.05M EDTA, pH 8.0で数回洗浄し、処理液を除去した。DNAアガロース片は4°Cで保存した。

表Ⅱ-13. パルスフィールドゲル電気泳動分析に供試したいもち病菌

菌株名	レース	分離植物	分離植物略称	分離年	場所
0423-1	007	イネ	OS	1976	宮城県角田市花島
2012-1	007	"	"	1976	石川県珠州市延武町
3607-4	003	"	"	1976	徳島県美馬郡美馬町天神
CD171		"	"	1973	Ivory Coast
CHNOS5-1-5	006.4	"	"	1989	中国雲南省曲靖地区曲靖
CHNOS11-1-1	106.4	"	"	1989	中国雲南省保山地区騰冲
CHNOS12-2-1	037.4	"	"	1989	中国雲南省怒江州六庫
CHNOS23-1-2	117.5	"	"	1989	中国雲南省玉溪地区通海
CHNOS29-1-2	126.0	"	"	1989	中国雲南省文山州硯山
CHNOS32-2-4	017.5	"	"	1989	中国雲南省昭通地区緑蔭郷
CHNOS37-1-2	126.0	"	"	1989	中国雲南省西双版纳州景洪
CHNOS37-1-3	126.0	"	"	1989	中国雲南省西双版纳州景洪
IBOS 1-1-1	003	"	"	1985	茨城県龍が崎市稲荷川
IBOS 7-1-1	007	"	"	1988	茨城県高萩市大能
IN77-51-1-3		"	"	1977	Mysore, India
IS69		"	"	1978	Indonesia
TH81-2-3	137.3	"	"		
KO80-12	177.1	"	"	1980	広島県芸北町
研54-04	003	"	"	1954	岐阜農試圃場
CHNEC 1-1-1		シコクビエ	EC	1989	中国雲南省陸良県陸良
G10-1		"	"	1979	栃木県
GFEC1-1-2		"	"	1977	岐阜県八幡町
KEN8-2		"	"	1976	東京都西ヶ原
MZ4-1-4		"	"	1976	宮崎県都城市
UG77-17-1-1		"	"	1977	Kabanyolo, Uganda
Z2-1		"	"	1979	香川県
FSECu 1-1-1		シナダレスズメガヤ	ECu	1988	福島県郡山市福島農試
KENWL-2		"	"	1974	栃木県西那須野町
SZECu 1-1-1		"	"	1988	静岡県森町
IBDS7-1-1		メヒシバ	DS	1988	茨城県牛久市城中
IN77-34-1-1		"	"	1977	Univ. Mysore, India
NI907		"	"	1974	栃木県西那須野町
OM 1		"	"	1974	岡山県
CBECG1-4-1		イヌビエ	EcCG	1985	千葉県沼南町
IBECG 1-1-1		"	"	1986	茨城県つくば市農環研圃場
NNPM1-1-1		キビ	PM	1985	長野県南信濃村
NRPM1-1		"	"	1977	奈良県大塔村
STPM2-1-1		"	"	1982	埼玉県大滝村
YNPM2-1-1		"	"	1983	山梨県小菅村
IN77-16-1-1		アワ	SI	1977	Mysore(F.F.8), India
MISI1-1-4		"	"	1977	三重県一志町
SZSI1-1-1		"	"	1987	静岡市田代
IBSV2-1-1		エノコログサ	SV	1985	茨城県牛久市上柏田
IBSV5-1-1		"	"	1986	茨城県牛久市柏田

(3) パルスフィールドゲル電気泳動

染色体DNAの分離はパルスフィールドゲル電気泳動装置（バイオラッド社製，CHEF-DR II）を用い，次のような泳動条件を採用した。分離ゲル濃度：0.5XTBEで溶解した0.5%アガロース（BRL Ultra-Pure DNA Agarose, Chromosome Grade）ゲルウエルに1mm幅に切ったサンプルプラグを挿入し，0.5%低融点アガロース（InCert, 0.125M EDTA, pH7.5）で包埋した。0.5XTBE（45mM Tris, 45 mM Boric acid, 1.25 mM EDTA, pH 8.3）泳動バッファーを注ぎ，0°Cに設定した冷却装置に管を投入し管の中に泳動バッファーを循環させた。泳動槽の泳動バッファーの温度は10°Cに保った。24時間毎に新しい泳動バッファーに交換し，40V，パルス間隔3,600秒で，160時間泳動した。泳動後0.5 μ g/mlのエチジウム・ブロマイド溶液に約30分間浸して染色し，蒸留水で1～3時間脱色した。

実験結果

(1) いもち病菌染色体DNAの分離

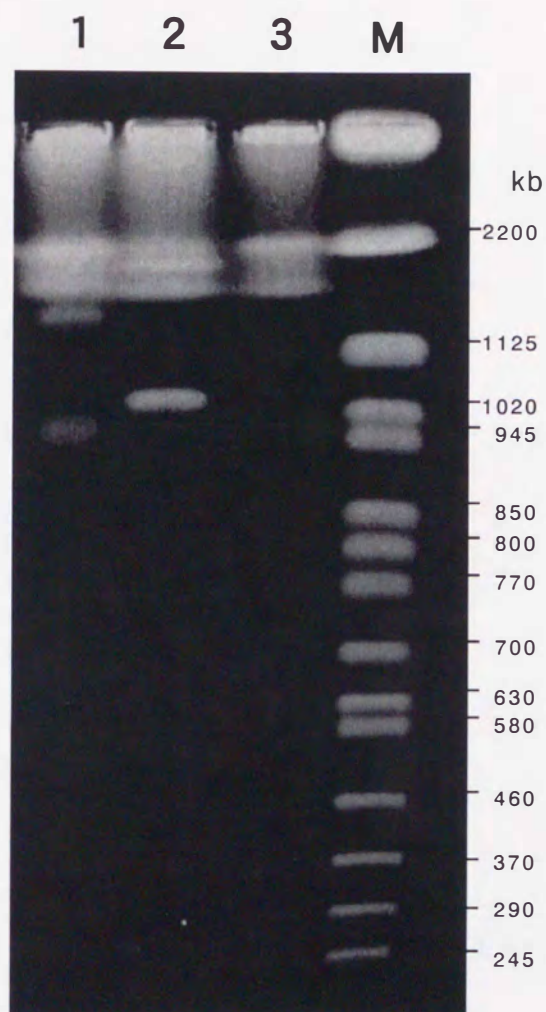
いもち病菌染色体DNAの分離条件を決定するためイネいもち病菌菌系IBOS 1-1-1およびシナダレスズメガヤいもち病菌菌系SZECu1-1-1を供試した。酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*の染色体DNAを明瞭に分離する電圧100V，パルス間隔60秒で18時間さらにパルス間隔90秒で9時間の条件では，高分子側のいもち病菌の染色体DNAは分離しなかった（図Ⅱ-12）。パルス間隔をさらに長くし，パルス間隔3600秒，電圧40V，泳動時間160時間の条件において，いもち病菌の染色体は6～7本のバンドとして分離でき，*Schizosaccharomyces pombe*の染色体（3.5, 4.6, 5.7Mb）をサイズマーカーとして各染色体のおおよそのサイズを決定した。イネいもち病菌菌系IBOS 1-1-1（レース003）は，1.5, 3.9, 4.6, 6, 8および10Mb以上の6本のバンド，シナダレスズメガヤいもち病菌菌系SZECu1-1-1では，1.05, 2, 3.9, 4.8, 5.5, 6.5および10Mb以上の7本のバンドに分離した（図Ⅱ-13，表Ⅱ-14）。

(2) 各種いもち病菌の染色体様DNAの比較

供試したメヒシバ菌，シコクビエ菌，シナダレスズメガヤ菌，イヌビエ菌，イネ菌，キビ菌，アワ菌，エノコログサ菌ではいずれも3～7本のバンドが分離された（表Ⅱ-15）。シコクビエ菌では6菌系すべてにおいて3.5Mb以下のバンドがみられなかった。それ以外のいもち病菌においては，一部の菌系において3.5Mb以下のバンドがみられなかったが，ほとんどの菌系においてゲルの基部（5.7Mb以上），中央部（3.5～5.7Mb），先端部（3.5Mb以下）にバンドがみられた。しかし，中央部のバンドの位置は各菌群さらに菌系により異なり，まったく同じバンドパターンを示すことはなかった（図Ⅱ-14）。

(3) イネいもち病菌の染色体様DNAの比較

イネいもち病菌についてはレース003を3菌系，レース007を3菌系供試した。レース003菌系では5～6本のバンドが分離した。8Mb，6Mb，2Mb付近のバンドは003菌系にほぼ共通していたが，4Mb付近のバンドは菌系により異なっていた。レース007の3菌系においても2～6Mb付近のバンドに多型が



図Ⅱ－12. パルスフィールドゲル電気泳動法によるいもち病菌染色体DNAの分離

1 : イネいもち病菌 IS69、2 : シナダレスズメガヤいもち病菌 SZECu1-1-1、3 : イネいもち病菌 IBOS1-1-1、M : *Saccharomyces cerevisiae* strain YNN295。1.0%アガロースゲル、0.5×TBE、100V、パルス間隔60秒で18時間、さらにパルス間隔90秒で9時間泳動した。

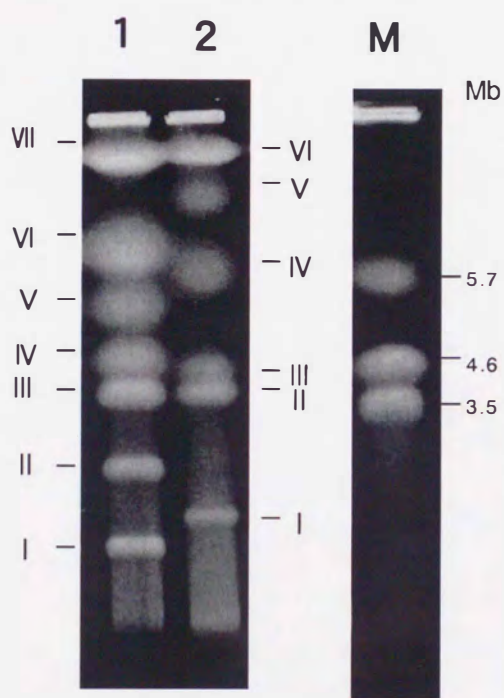


図 II - 13. パルスフィールドゲル電気泳動法によるいもち
病菌染色体DNAの分離

1 : シナダレスズメガヤいもち病菌 SZECu1-1-1、2 : イネいもち
病菌 IBOS1-1-1、M : Schizosaccharomyces pombe strain
972h-。0.5%アガロースゲル、0.5×TBE、40Vでパルス間隔
3600秒で160時間泳動した。

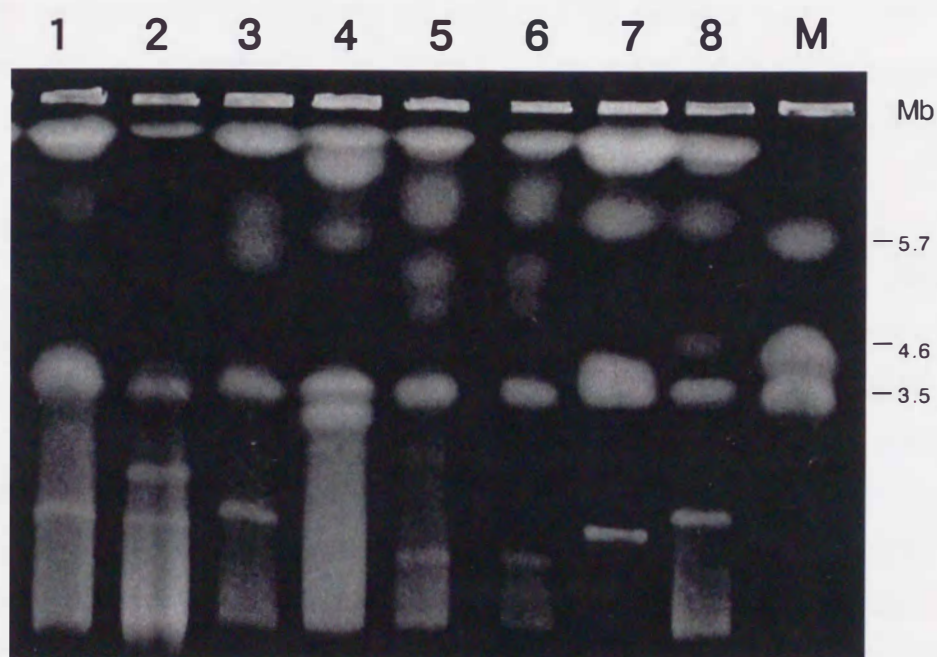
表Ⅱ-14. イネいもち病菌菌系IBOS1-1-1及びシナダレスズメガ
やいもち病菌菌系SZECu1-1-1のパルスフィールドゲル電気
泳動核型

染色体番号	推定サイズ (Mb)	
	IBOS1-1-1	SZECu1-1-1
I	1.5	1.05
II	3.9	2
III	4.6	3.9
IV	6	4.8
V	8	5.5
VI	>10	6.5
VII		>10
全体の推定サイズ	>34	>33.75

表Ⅱ-15 各種いもち病菌の染色体DNAのバンド数と大きさの分布

染色体DNAの 泳動位置と大きさ	各種いもち病菌と供試菌系統 ^a						
	OS	SI	PM	EcCG	EC	ECu	DS
	19	3	4	2	7	3	4
基部 >5.7 Mb	+	+	+	+	+	+	+
中央部 3.5~5.7 Mb	+	+	+	+	+	+	+
先端部 <3.5Mb	±	±	+	±	-	±	+
染色体DNA数	3-7	4-5	5-6	4-6	3-6	4-7	5-6

a OS : イネ菌、SI : アワ菌、PM : キビ菌、EcCG : イヌビエ菌、EC : シコ
クビエ菌、ECu : シナダレスズメガヤ菌、DS : メヒシバ菌
+ ; 常にみとめられる、± ; 菌系によりみとめられる、- ; みとめられない



図II-14. パルスフィールドゲル電気泳動法によるイネ菌、キビ菌、イヌビエ菌、メヒシバ菌各種いもち病菌染色体DNAの分離

1~3, 8 : イネいもち病菌 (0423-1 レース007、2012-1 レース007、IBOS7-1-1 レース007、IBOS1-1-1 レース003)、4 : キビいもち病菌 (NRPM1-1)、5-6 : イヌビエいもち病菌 (CBECG1-4-1)、7 : メヒシバいもち病菌 (IN77-34-1-1)、M : *Schizosaccharomyces pombe* strain 972h-。0.5%アガロースゲル、0.5×TBE、40Vでパルス間隔3600秒で160時間泳動した。

みられた (図 II-14)。

考察

イネいもち病菌及びシナダレスズメガヤ菌から調製した染色体DNAは、パルスフィールドゲル電気泳動により850kbから10Mb以上の6～7個のDNA分子に分離した。核学的研究からいもち病菌の染色体数は $n=6$ または7とされており⁹⁹PFGEにより分離したバンドの数と一致した。

*Schizosaccharomyces pombe*の染色体DNAをマーカーとして推定するといもち病菌のゲノムサイズは、いずれの菌株も34Mbとなった。

同一宿主植物からのいもち病菌菌系間及びイネいもち病菌同一レース菌系間に共通した特有のバンドはみられず、菌系間に染色体DNA多型がみられた。このことからPFGEの核型で分離植物の異なるいもち病菌またはレースを類別することは困難であると考えられた。Kinscherf and Leong (1988)²⁷⁾は多数の*Ustilago maydis*菌株を供試して染色体をPFGEで分離した。菌株間で染色体の数は非常に似ていたが、全く同じ分離パタンの核型をもつ系統は得られなかった。さらに、*Septoria tritici*では小麦畑の一区画 (40m x 40m) から分離した菌株間においても多型が認められている⁵¹⁾。

本研究では、他の糸状菌同様のいもち病菌染色体DNAのサイズが変異に富んでいることが明らかになった。この原因として菌類で最初に染色体多型が観察された酵母菌では、DNAの欠失、増幅、転座などが多型をもたらす原因であると考えられている。*U. hordei*⁵⁰⁾や*S. tritici*⁵¹⁾では、相同染色体の大きさが、それぞれ100Kb、20%程度異なることが検出されている。また、*U. maydis*では転座による染色体の突然変異が知られている²⁷⁾。*Candida albicans*では、DNAの転座はゲノムに散在する反復配列中のDNA配列間の組換えにより起こるとされている。この反復配列は、PFGEの結果では菌株を問わず同じ大きさであった第5染色体にだけみられない。このことから、多型が生じる原因として、この反復配列による組換えが推定されている⁷⁰⁾。この他、多型の原因として生存上必須でないB染色体の関与も示唆されている。減数分裂では、常染色体 (A染色体) との対合はないが、B染色体どうしの対合はみられる。B染色体は、分裂時に不均等分配を示しやすく多型を生じやすいと考えられている。染色体DNAの多型、特に染色体の長さの違いは減数分裂の際に染色体の対合に影響を及ぼさないことが、*S. cerevisiae*で確認されている。本研究においても染色体長多型を示すいもち病菌を交配して得た後代が正常に生育し、病原性もあることを確認している。病原菌の自然集団の核型は、大いに変異に富んでいることが想像される。

種内変異の問題が大きいため、PFGEの手法を菌類の分類に応用した研究例はナタネ根朽病菌 (*Leptosphaeria maculans*) の強病原性型と弱病原性型⁶⁹⁾などまだ少ない。分類基準が少ない菌種では、有効な分類手段としてまたは付加的に使用できるがいもち病菌においては適当でないと考えられる。

第2項 RFLPマーカーによるいもち病菌の類別

イネ科植物に寄生する*Pyricularia*属菌には、宿主範囲が異なる多様な分化型が存在する。寄生性の

分化を系統的に調べる目的で、RFLPを利用し類縁性を解析した。

材料及び方法

(1) 供試菌株

供試したいもち病菌菌系の分離植物、採集地および採集年を表Ⅱ-16に示した。イネ、アワ、キビ、シコクビエ及びメヒシバから分離したいもち病菌について、各々3菌系を供試した。アワからの分離菌はインド産の1菌系を含む。長野県産のアワから分離した1菌系、および奈良県産のシコクビエから分離した1菌系は、それぞれの分離植物に対する病原性を確認したところ病原性がなく、ともにキビに病原性を示したため結果の解析ではキビいもち病菌として扱った。また、牧草のシナダレスズメガヤ、雑穀のヒエ、南米パラグアイのコムギ、インドネシアの畦畔雑草のタイワンアシカキ、同じく牧草のネピアグラス、国内の畦畔雑草のヌカキビおよびマコモ、さらにミョウガおよびタケからの分離菌、合わせて14の宿主植物から24菌系を供試した。実験結果ではいもち病菌系を表Ⅱ-16に記載した番号で示した。

(2) DNAプローブの作製とサザンハイブリダイゼーション

イネいもち病菌菌系CHNOS37-1-1の菌系からCTAB法により核DNAを抽出し、制限酵素*Bam*HⅠまたは*Pst*Ⅰで消化後、アガロースゲル電気泳動により分画した0.5~4.0kbのDNA断片をプラスミドBluescriptⅡISK⁺に導入し、大腸菌*Escherichia coli* NM522を形質転換してライブラリーを作成した。その中からランダムに200クローンを選び、イネいもち病菌から単離したDNAと予備的にハイブリダイズし、単一コピー数と考えられる32クロンの挿入DNA断片をDNAプローブとして用いた。

各種の宿主植物より分離したいもち病菌をCM培地で静置培養し、CTAB法により核DNAを抽出した。抽出したDNAは6種類の制限酵素(*Bam*HⅠ, *Eco*RⅠ, *Hind*Ⅲ, *Pst*Ⅰ, *Sal*Ⅰ及び*Xba*Ⅰ)で各々消化し、レーン当り2~3 μ gを0.6%アガロースゲルに電気泳動した。ゲルを0.25M塩酸液で脱プリン、1.5M塩化ナトリウムを含む0.5M水酸化ナトリウムでアルカリ変性し、中和後キャピラリー法によりナイロンメンブラン(アマシャム製, Hybond N)に転写した。ハイブリダイゼーションは、42℃で一晩行い、42℃下0.1%SDSを含む0.5×SSC及び0.1×SSCで洗浄後、化学発光標識(アマシャム製, ECLキット)によりバンドとして検出した(図Ⅱ-15)。

(3) 系統樹

バンドを遺伝子座とみなし、バンドがある場合を1、ない場合を0として、そのベクトルの総和を計算した。距離行列の計算法は図Ⅱ-16に示した。菌系Aと菌系Bでは同じバンドパターンであるので0、菌系Aと菌系Cでは1となる。系統樹は、SAS(r) proprietary software release 6.04により群平均法(UPGMA)でクラスター分析し作成した。

実験結果

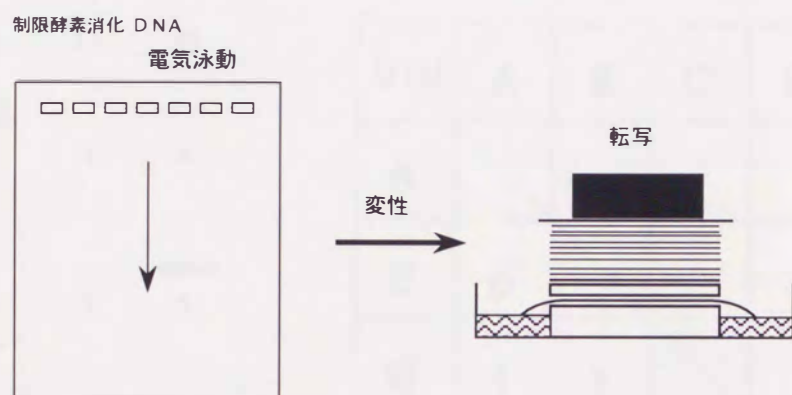
表Ⅱ-16. RFLPプローブによるいもち病菌の類別に供試したいもち病菌

番号	菌株名	分離植物	レース	分離年	場 所
1	研54-20	イネ	003	1954	山口県大内町山口農試
2	北1	"	007	1948	北海道札幌市道立農試
3	愛79-142	"	037.3	1979	愛知県稲武町山間技術実験農場
4	SZSI1-1-1	アワ		1987	静岡市田代
5	NNSI1-1-1 ^a	"		1986	長野県南信濃村八重河内
6	IN77-16-1-1	"		1977	Mysore(F.F.8), India
7	NNPM1-1-1	キビ		1985	長野県南信濃村
8	YNPM2-1-1	"		1983	山梨県小菅村
9	STPM1-1-1	"		1982	埼玉県大滝村
10	Z2-1	シコクビエ		1979	香川県
11	SZEC1-1-1	"		1987	静岡市田代
12	NREC1-2-1 ^b	"		1987	奈良県大塔村篠原
13	NNDS7-2-3	メヒシバ		1985	長野県南信濃村
14	IBDS1-1-1	"		1985	茨城県つくば市農業生物資源研究所
15	NI982	"		1975	熊本県西合志町
16	KENWL-1	シナダレスズメガヤ		1974	栃木県西那須野町
17	SZEU1-1-1	ヒエ		1987	静岡市田代
18	PARTA1-1-1	コムギ		1986	Asuncion, Paraguay
19	IDOLeH1-1-1	タイワンアシカキ		1985	Metro, Lampung, Indonesia
20	IBPB1-1-1	ヌカキビ		1986	茨城県牛久市
21	IDOPeP4-1-3	ネピアグラス		1985	Gianyar, Bali, Indonesia
22	NI864	ミョウガ		1972	栃木県西那須野町
23	CHIZL-1	マコモ		1974	千葉県成田市
24	IBPBa1-1-1	マダケ		1986	茨城県牛久市城中

a アワに病原性なく、キビに病原性あり。

b シコクビエに病原性なく、キビに病原性あり。

フィルター作製



プローブ作製

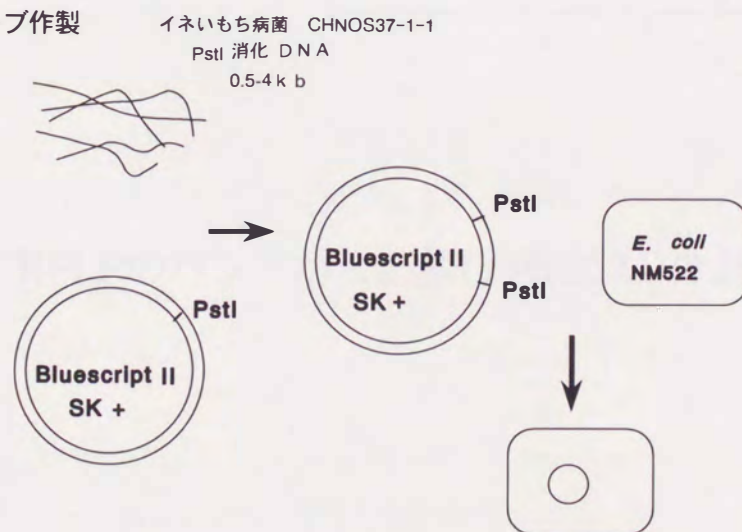


図 II-15. フィルターとプローブの作成

A	B	C	D
1	1	0	0
0	0	0	1
1	1	1	0

OTU	A	B	C	D
A				
B	0			
C	1	1		
D	3	3	2	

図Ⅱ-16. RFLPのバンドから距離行列(OTU)の計算法

33のプローブ・制限酵素の組合せのうち、メヒシバ菌は32、ネピアグラス菌は17、シコクビエ菌は7組合せで他のいもち病菌と異なるハイブリダイゼーションバンドがみられ多型が認められた。また、マコモ菌はすべての、タケ菌は20、ミョウガ菌は16、ネピアグラス菌は9組合せでハイブリダイゼーションバンドが検出されなかった。

いくつかのプローブでは、いもち病菌を分離植物の違いにより識別できた。制限酵素*Bam*HIで消化したいもち病菌ゲノムDNAをプローブ32でハイブリダイゼーションしたところ、メヒシバ菌、ネピアグラス菌、ミョウガ菌、タケ菌に多型を検出した。マコモ菌DNAはプローブに結合しなかった。イネ菌、アワ菌、キビ菌、シコクビエ菌、ヒエ菌、コムギ菌、台湾アシカキ菌及びヌカキビ菌は同じ位置にバンドがみられた（図Ⅱ-17）。

*Sal*I消化したゲノムDNAをプローブ85でハイブリダイゼーションしたところ、シコクビエ菌、シナダレスズメガヤ菌、コムギ菌で同一バンドパターンを検出した。また、イネ菌、アワ菌、キビ菌、ヒエ菌、台湾アシカキ菌及びヌカキビ菌は同じ位置にバンドがみられた。メヒシバ菌、ネピアグラス菌、ミョウガ菌、マコモ菌およびタケ菌ではバンドが検出されなかった（図Ⅱ-18）。

プローブ54では、ゲノムDNAを*Eco*RI消化したとき、キビ菌およびネピアグラス菌に特異的なバンドが検出された。また、イネ菌、アワ菌、ヒエ菌、シコクビエ菌、シナダレスズメガヤ菌、コムギ菌、ヒエ菌、台湾アシカキ菌及びヌカキビ菌は同じ位置にバンドがみられた。メヒシバ菌、ミョウガ菌、マコモ菌およびタケ菌ではバンドが検出されなかった（図Ⅱ-19）。

プローブ58では、ゲノムDNAを*Sal*I消化した場合イネ菌に特異的に結合し、9～10数本の多数のバンドを検出した。アワ菌の一部、ヌカキビ菌およびネピアグラス菌ではイネ菌と同程度の濃さで1～2本の少ないバンドが検出された。また、アワ菌、キビ菌、メヒシバ菌、ヒエ菌、コムギ菌、台湾アシカキ菌およびミョウガ菌に対しては、1～2本の薄いバンドが検出された（図Ⅱ-20）。

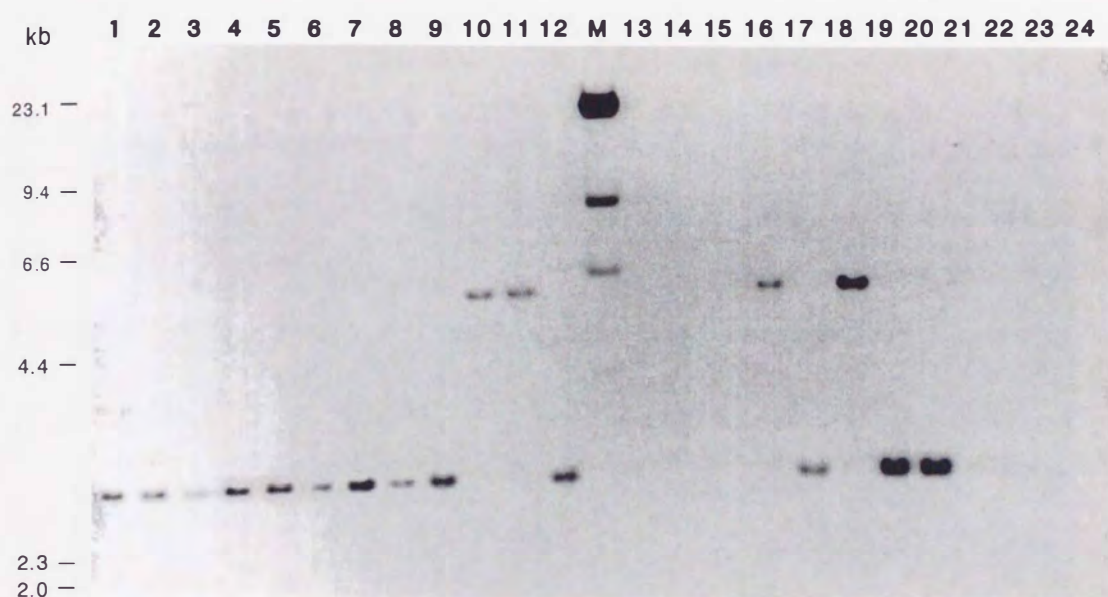
プローブ186では、ゲノムDNAを*Bam*HI消化した場合イネいもち病菌菌系愛79-142に対して他の2菌系と異なるバンドを検出し、イネ菌菌系間に多型がみられた。また、このプローブでは、アワ菌およびキビ菌に対しても菌系間に多型がみとめられた。シナダレスズメガヤ菌、ヒエ菌、コムギ菌およびヌカキビ菌は、同じバンドパターンを示したが、台湾アシカキ菌は、まったく異なるバンドパターンを示した（図Ⅱ-21）。

プローブと各制限酵素で消化したDNAのハイブリダイゼーション35組合せのうち、27組合せで供試したイネ菌3菌系に多型がみられず、8組合せにおいてイネ菌に多型がみられた。イネ菌に多型を示したプローブのうち2個は反復配列で多数のバンドを形成した。この反復配列を除いた単一コピーと考えられるプローブと制限酵素プロット33組合せのハイブリダイゼーションの結果について、群平均法（UPGMA）によるクラスター分析を行った（図Ⅱ-22）。その結果、供試菌系はイネ/アワ菌群、キビ菌群、台湾アシカキ菌群、シコクビエ菌群、シナダレスズメガヤ菌群、メヒシバ菌群、ミョウガ菌群、マコモ菌群、タケ菌群及びネピアグラス菌群の10菌群に分かれた。イネ/アワ菌群は



図II-17. プローブ32による各種いもち病菌のサザンハイブリダイゼーション分析

1~3: イネ菌、4、6: アワ菌、5、7~9、12: キビ菌、10、11: シコクビエ菌、13~15: メヒシバ菌、16: シナダレスズメガヤ菌、17: ヒエ菌、18: コムギ菌、19: タイワンアシカキ菌、20: ヌカキビ菌、21: ネピアグラス菌、22: ミョウガ菌、23: マコモ菌、24: マダケ菌。供試菌の詳細は表II-16に示した。MはDNAマーカー。



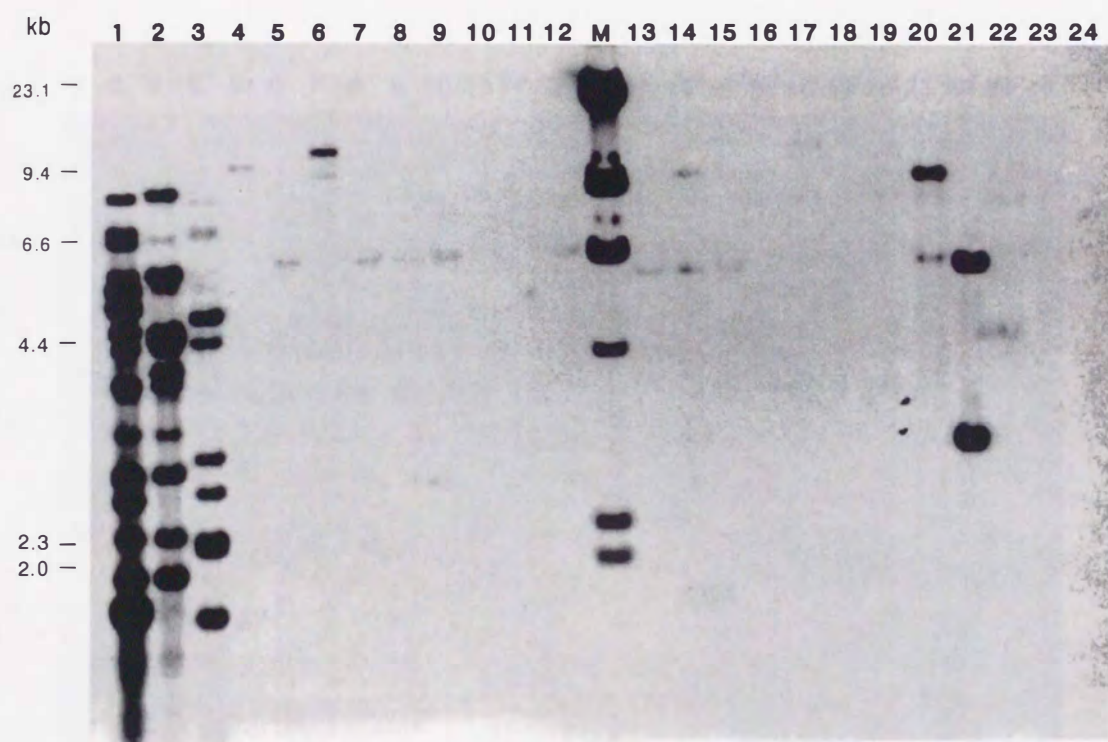
図II-18. プローブ85による各種いもち病菌のサザンハイブリダイゼーション分析

1～3：イネ菌、4、6：アワ菌、5、7～9、12：キビ菌、10、11：シコクビエ菌、13～15：メヒシバ菌、16：シナダレスズメガヤ菌、17：ヒエ菌、18：コムギ菌、19：台湾アシカキ菌、20：ヌカキビ菌、21：ネピアグラス菌、22：ミョウガ菌、23：マコモ菌、24：マダケ菌。供試菌の詳細は表II-16に示した。MはDNAマーカー。



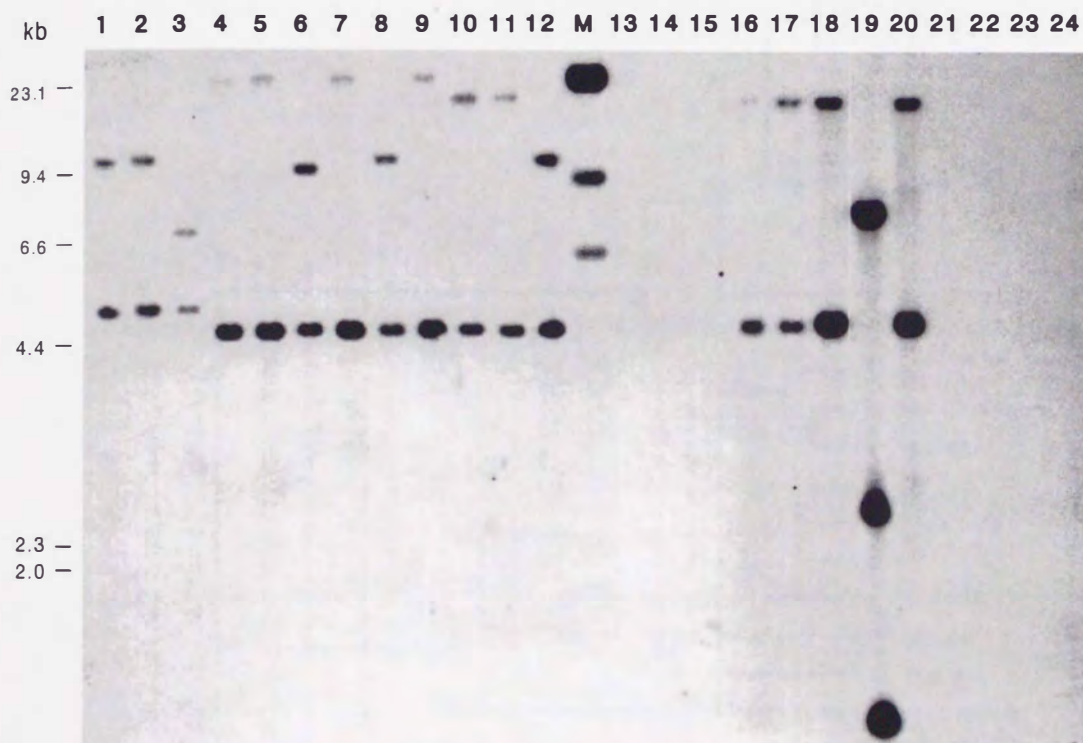
図Ⅱ-19. プローブ54による各種いもち病菌のサザンハイブリダイゼーション分析

1～3：イネ菌、4、6：アワ菌、5、7～9、12：キビ菌、10、11：シコクビエ菌、13～15：メヒシバ菌、16：シナダレスズメガヤ菌、17：ヒエ菌、18：コムギ菌、19：台湾アシカキ菌、20：ヌカキビ菌、21：ネピアグラス菌、22：ミョウガ菌、23：マコモ菌、24：マダケ菌。供試菌の詳細は表Ⅱ-16に示した。MはDNAマーカー。



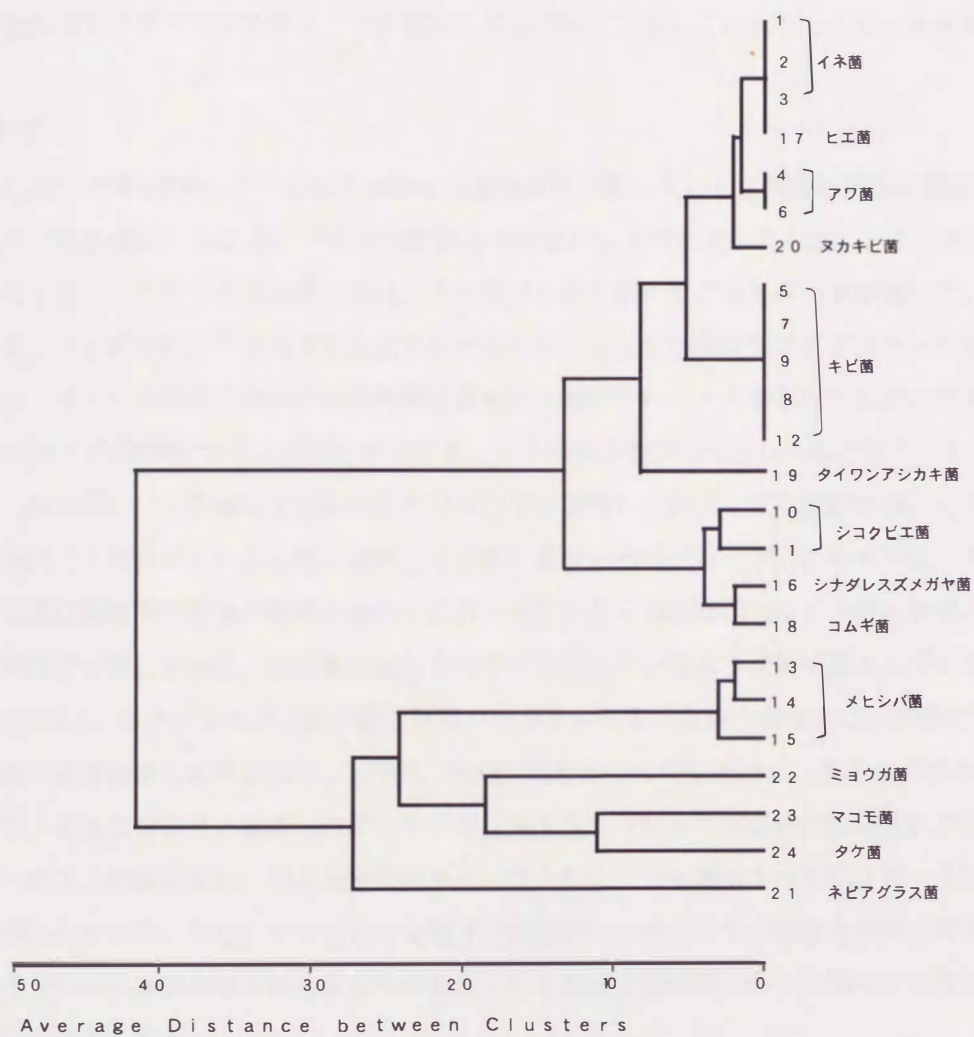
図Ⅱ-20. プローブ58による各種いもち病菌のサザンハイブリダイゼーション分析

1~3:イネ菌、4、6:アワ菌、5、7~9、12:キビ菌、10、11:シコクビエ菌、13~15:メヒシバ菌、16:シナダレスズメガヤ菌、17:ヒエ菌、18:コムギ菌、19:台湾アシカキ菌、20:ヌカキビ菌、21:ネピアグラス菌、22:ミョウガ菌、23:マコモ菌、24:マダケ菌。供試菌の詳細は表Ⅱ-16に示した。MはDNAマーカー。



図II-21. プローブ186による各種いもち病菌のサザンハイブリダイゼーション分析

1～3：イネ菌、4、6：アワ菌、5、7～9、12：キビ菌、10、11：シコクビエ菌、13～15：メヒシバ菌、16：シナダレスズメガヤ菌、17：ヒエ菌、18：コムギ菌、19：タイワンアシカキ菌、20：ヌカキビ菌、21：ネピアグラス菌、22：ミョウガ菌、23：マコモ菌、24：マダケ菌。供試菌の詳細は表II-16に示した。MはDNAマーカー。



図Ⅱ-22. イネ菌に多型を示さない27のRFLPマーカーにより作成したもち病菌の系統樹

供試菌番号は表Ⅱ-16を参照。

イネ菌、ヒエ菌、アワ菌及びヌカキビ菌を含んでいた。特にヒエ菌はイネ菌3菌系に多型を示さなかった27組合せのハイブリダイゼーションのすべてにおいて、イネ菌と全く同じバンドパターンを示した。次にキビ菌群がイネ菌に近縁であった。キビ菌群の5菌系は同じバンドパターンを示した。タイワンアシカキビ菌群はイネ菌とは少し離れた所に位置した。シコクビエ菌群、シナダレスズメガヤ菌群は近くに位置しコムギ菌はシナダレスズメガヤ菌群に属した。メヒシバ菌群、ミョウガ菌群、マコモ菌群、タケ菌群及びネピアグラス菌群は、イネ菌からコムギ菌とは離れて別のクラスターを形成した。

考察

単一コピーのRFLPマーカーにより14の宿主植物から分離したいもち病菌24菌系の類縁関係を明らかにした(図Ⅱ-22)。ヒエ菌、アワ菌及びヌカキビ菌がイネ菌にもっとも近く、キビ菌が続いた。シコクビエ菌、シナダレスズメガヤ菌は、イネ菌からやや離れてクラスターを形成した。メヒシバ菌はイネ菌、コムギ菌などで形成された大きなクラスターとは異なる位置にクラスターを形成した。このことは、メヒシバ菌は、他のいもち病菌と遺伝的に離れていることを示している。イネ菌に多型を示したプローブ6個を併せて系統樹を作成するとイネ菌菌系受79-142はヒエ菌と同じクラスターを形成した(図省略)。イネ菌に多型を示したプローブを除外して作成した系統樹では、ヒエ菌はイネ菌すべてと同じクラスターに入った。また、イネ菌に多型を示すプローブによりアワ菌、キビ菌及びシコクビエ菌に菌系間の変異が認められた。これらのことから系統分類ではイネ菌に多型を示さないマーカーの使用が有効であった。1985年以来いもち病が多発しているパラグアイ産コムギからの分離菌PARTA1-1-1は、シナダレスズメガヤ菌と同じクラスターを形成した。南米のコムギの中にはイネに病原性のある菌系も報告されている¹⁵⁾が、今回供試したコムギ菌菌系は、第1節の宿主範囲の結果において、イネに病原性が認められず、シナダレスズメガヤいもち病菌群に類別されており、RFLPマーカーによる試験結果は、宿主範囲の結果と一致した。マコモ菌はすべてのプローブに対してバンドを形成しなかった。また、マコモ菌分生孢子は形態的にも他のいもち病菌と区別が可能である⁷⁾ことからイネいもち病菌をはじめとするその他のいもち病菌と遺伝的にかなり離れており別種とすることは妥当と考えられる。

Borromeo et al.³⁾はイネと畦畔雑草から分離したいもち病菌の類縁関係をミトコンドリアDNAの制限酵素消化分析、リボゾームDNA、単一コピーDNA及び反復配列DNAによるプロット分析を行った。ミトコンドリアDNAの制限酵素消化分析、リボゾームDNAによるプロット分析では区別できなかった菌系も単一コピーDNAによるクラスター分析により類別され、単一コピーDNAマーカーの系統分類への利用の有用性を示した。一方、反復配列プローブ58のハイブリダイゼーションのバンドパターンから系統樹を作成したところ、イネ菌とアワ菌の各菌系が別のクラスターに、またシコクビエ菌とミョウガ菌が同じクラスターに入るなど、系統進化を探る目的には適合しなかった(図省略)。同じようなことがKimにより報告されている²⁶⁾。Kimはイネと他の植物からの分離したいもち病菌の系統分類

にMGRと似た反復配列pMJ6を用いたが、メヒシバ菌はイネ菌とアワ菌及びキビ菌の間に位置した。

第5節 第Ⅱ章の総合考察

本章では、多数の植物より分離されたいもち病菌菌系について宿主範囲、相互交配による稔性、5種のアイソザイム分析、パルスフィールドゲル電気泳動法による核型及びRFLPマーカーによる多型分析によりいもち病菌の類別を図った。いもち病菌の宿主植物は多くの菌系が共通に病原性を示す植物種と限られた菌系が病原性を示す植物種がみられた。特定の植物種を判別宿主とすることにより宿主範囲によってシナダレスズメガヤ菌群、シコクビエ菌群、アシカキ菌群、マコモ菌群、イネ菌群、ヌカキビ菌群、キビ菌群、アワ菌群、メヒシバ菌群、ネピアグラス菌群、共通の宿主であるウシノケグサ族菌群及びその他の菌群の12菌群に類別された。イネいもち病菌は、特定の種を宿主とする他の菌群と同様に、共通の宿主に病原性を示すと同時に、イネに対して特異的に病原性を獲得した菌群といえる。相互交配による稔性は、稔性の高いイネ菌およびシコクビエ菌を検定菌系に用いることにより広範囲の宿主からの菌系の交配稔性が明らかとなった。RFLPマーカーによる系統分類では、14種から分離した24菌系は10菌群に分けることができた。ヒエ菌、アワ菌及びヌカキビ菌がイネ菌にもっとも近く、キビ菌が次に近縁であった。シコクビエ菌、シナダレスズメガヤ菌は、イネ菌からやや離れてクラスターを形成した。メヒシバ菌はイネ菌、キビ菌、コムギ菌等多くの菌群により構成された大きなクラスターとは異なる位置にクラスターを形成し、遺伝的に離れていた。アイソザイム分析では、パーオキシダーゼはイネ菌、リードカナリーグラス菌、アワ菌、キビ菌、シコクビエ菌、オヒシバ菌、シナダレスズメガヤ菌、コムギ菌、ネピアグラス菌を区別できないが、アルカリホスファターゼ、酸性フォスファターゼでは、シコクビエ菌、オヒシバ菌、コムギ菌、イタリアンライグラス菌、ウィーピングラブグラス菌をイネ菌から区別できた。しかし、いずれの酵素のアイソザイムでも、イネ菌、アワ菌及びキビ菌の区別は困難であった。

図Ⅱ-23にRFLPマーカーの多型分析に基づいた系統樹、宿主範囲で類別された菌群を配置し、イネ菌またはシコクビエ菌との交配稔性及び5種のアイソザイムの結果を比較し、各種菌系の類縁関係の推定を行った。RFLPによる10群と宿主範囲による12群は、RFLP解析を行わなかったウシノケグサ族菌系を除き、ほぼ対応関係にあった。イネ菌またはシコクビエ菌との交配稔性は、一部の菌群で例外があるものの宿主範囲により類別されたイネ菌群からウシノケグサ菌群までにみられ、メヒシバ菌群からネピアグラス菌群まではみられなかった。このことから交配稔性は、RFLPマーカーに基づいた系統樹のイネ菌からシナダレスズメガヤ菌及びコムギ菌までの大きなクラスターに保持され、一方の大きなクラスターには保持されていないことがわかる。ただ、前者のクラスターには、シコクビエ菌よりイネ菌に近縁とされたヌカキビ菌や台湾アシカキ菌があるが、これらの菌系はイネ菌またはシコクビエ菌との交配稔性を全く失っていた。この原因としては、供試菌系数が少ないことによるか、子のう殻形成に関する遺伝子の一部の機能を失ったと想定される。有性世代器官は、交配型遺伝

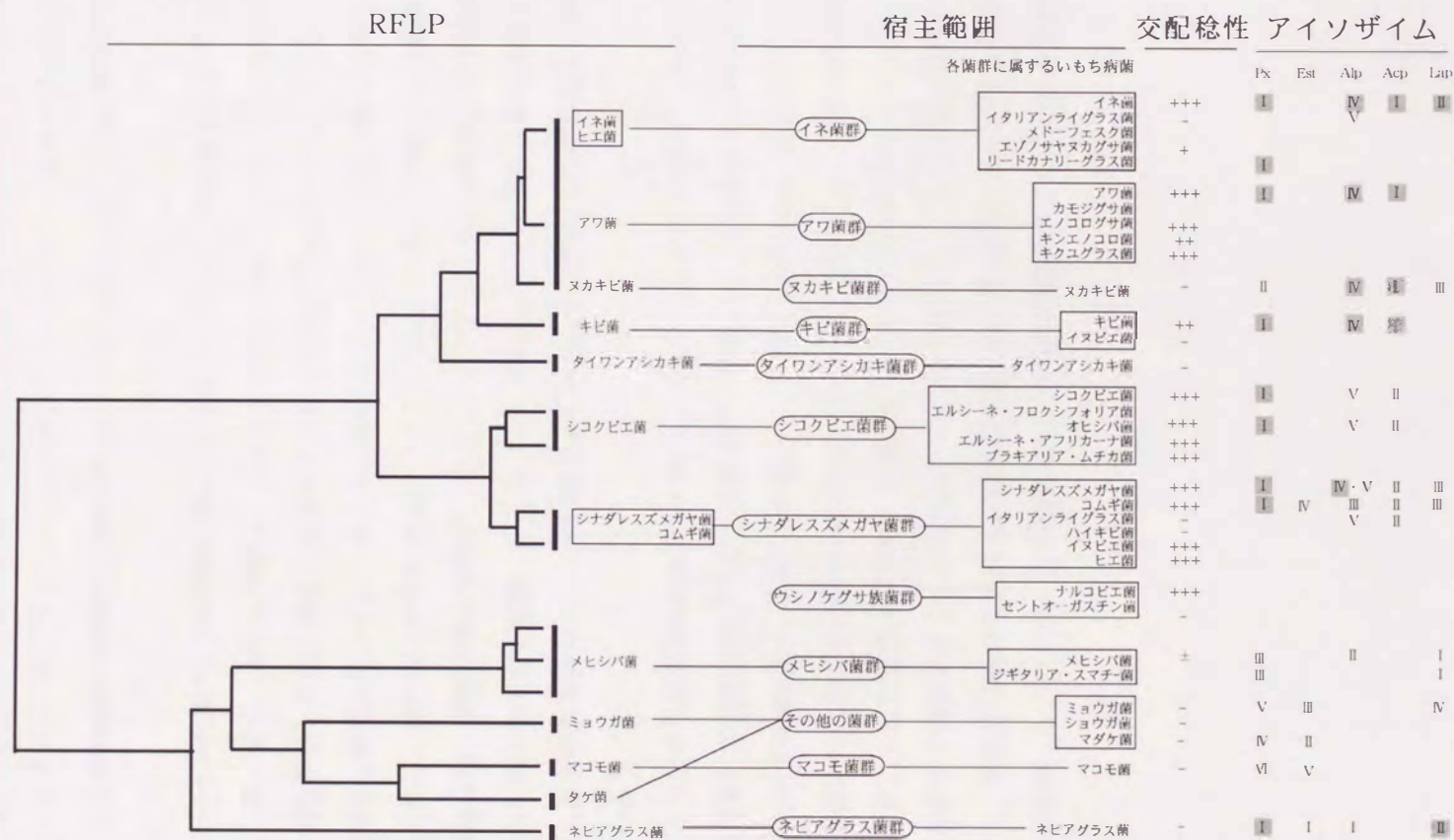


図 II-23. 各種いもち病菌の系統分化と寄生性分化との関係

交配能力はイネ菌又はシコクビエ菌との交配結果。交配能力程度は本文参照。

■ はイネ菌と同じアイソザイムパターンであることを示す。

子の子のう殻形成の開始とする一連の遺伝子の発現による形態形成の産物あるとすると、イネいもち病菌との交配稔性を欠いている菌群が系統的に遠縁であると断定することはできないといえる。5種のアイソザイムのなかで、主要バンドによる判別が可能であったパーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ及び酸性フォスファターゼのアイソザイムパターンはイネ菌からキビ菌までほとんど同じであり、アイソザイムによる判別は宿主範囲及びRFLPマーカーによる系統分類との対応関係が認められる。

メヒシバ菌はRFLPマーカーに基づいた系統樹では、イネ菌やシコクビエ菌が属するクラスターとは別のクラスターに属した。また、メヒシバ菌はイネ菌及びオヒシバ菌との交配において体部が未発達の頸部のみの子のう殻を形成したが、子のう及び子のう胞子は形成されなかった。さらに、アイソザイムのパターンも他の菌群と異なっていた。これらの結果はメヒシバ菌とイネ菌の関係はやや遠いことを示していると考えられる。タケ菌、マコモ菌及びミョウガ菌は、すべての判別宿主に病原性がなく、またRFLPによる系統分類、交配稔性及び供試したすべてのザイモグラムの結果が他の菌群と大きく異なっていた。このためタケいもち病菌、マコモいもち病菌およびミョウがいもち病菌を別種として扱うことは妥当であると判断される。マコモ菌分生胞子は形態的に他のいもち病菌と区別が可能であることが知られている⁷⁾。

Rossman et al.⁵⁹⁾は、イネいもち病菌*Pyricularia oryzae* Cavaraはイネ以外から分離されたいもち病菌*Pyricularia grisea*との有性世代形成能力及び形態から両者を同じ種とし、イネいもち病菌に完全世代名として*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, 不完全世代名として*Pyricularia grisea* Sacc. を与えた。また、国際植物命名コード(ICBN)に基づき*Pyricularia grisea*を統一した種名とした。本研究の結果からイネいもち病菌をシコクビエいもち病菌と同じ種にすることは、妥当であると考えられる。しかし、メヒシバ菌はイネいもち菌またはシコクビエいもち菌との交配において、子のう胞子が形成されたとする報告がほとんどない。本研究においてもメヒシバ菌に交配稔性を認めていない。従ってメヒシバいもち病菌はイネいもち病菌、シコクビエいもち病菌などと生殖的隔離が成立していると思われる。