

東北地方南部においてイネ科雑草にいもち病を  
起こす *Pyricularia* 属菌に関する研究

鈴木 智 貴

## 目 次

I. 緒 言	1
II. メヒシバいもち病菌の個体識別法の検討	
1. 材料および方法	8
2. 結 果	12
3. 考 察	15
III. 山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病の発生生態	
1. 庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の動態	
1-1 材料および方法	17
1-2 結 果	19
1-3 考 察	27
2. 庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の越冬	
2-1 材料および方法	29
2-2 結 果	34
2-3 考 察	50
3. メヒシバいもち病菌の長距離飛散の可能性の検討	
3-1 材料および方法	54
3-2 結 果	57
3-3 考 察	67
IV. 東北地方南部で認められたイネ科雑草いもち病について	
1. 東北地方南部に自生するイネ科植物から分離したいもち病菌の特徴	

1-1	緒言	70
1-2	材料および方法	71
1-3	結果	77
1-4	考察	81
2.	宮城県で採集したオニウシノケグサのいもち病菌の特徴	
2-1	緒言	84
2-2	材料および方法	84
2-3	結果	89
2-4	考察	94
3.	山形県庄内地方におけるネズミムギいもち病の病原菌の種類	
3-1	緒言	96
3-2	材料および方法	97
3-3	結果	101
3-4	考察	105
V.	総合考察	108
VI.	摘要	118
VII.	謝辞	121
VIII.	引用文献	123

## I. 緒 言

### 環境保全型農業と病害虫の生態研究の重要性

現在、人間活動による温室効果ガスの放出、とりわけ二酸化炭素の年間排出量は 1970 年からの 30 年間に、1970 年比で 70%増加し、世界規模で温暖化が進行している (IPCC 第 4 次評価報告書, 2007)。これに伴い、局地的な干ばつや大雨、洪水、大型台風の発達、海水面の上昇による生活域の制限、生態系への影響など様々な問題が世界各地で発生・深刻化しており、地球環境への負荷に対する危機意識が世界的に高まっている。世界の食糧生産地帯においても例外なくこの現象は引き起こされ、食糧の安定生産と供給に大きな影響を及ぼしており、今後このような傾向は加速することはあっても収束することは考えにくいと予想される。

これまで、科学技術の開発や進歩に伴う農業の機械化や近代化、大規模化等による食糧増産や安定的な供給が進められてきた中で、化学肥料や化学合成農薬等の農業資材の開発が作物生産性の向上や病害虫・雑草による減収の大幅な軽減に寄与してきた。しかしながらこれらの農業資材は安価で効果が高く、さらに利用しやすいことから農耕地に大量に投入された。その結果、化学肥料では土壌汚染といった弊害をもたらし、合成農薬においては耕地への残留や病害虫の誘導多発生、薬剤抵抗性病害虫の発生、さらには非対象生物への作用といった弊害をもたらした。これらの弊害は生態系にも悪影響を及ぼした。このような背景から化学肥料・合成農薬使用のあり方について見直され、まずヨーロッパを中心に環境への負荷を極力軽減することを目的とした環境保全型農業の取り組みが始まり、我が国においてもそのような気運が高まり、1970 年代から害虫防除における IPM 研究を契機に 1990 年代後半には環境基本法や食料・農業・農村基本法が改定されるなど、政策的にも環境保全型農業が推進されてい

る（對馬，2005）。

環境保全型農業を実践するためには，発生予察を活用し，病虫害・雑草に対する総合防除の概念を基に耕種的防除，生物的防除，化学的防除を組み合わせた防除体系を構築することが必要である。そのためには前提として対象とする病虫害の生態を把握することが最も重要であり，生態研究が十分でない環境保全型の農業技術を導入するにあたってリスクを伴うこともある。一例としてイネばか苗病を挙げる。近年，東北地方では水稻栽培の種子消毒技術に温湯浸漬法が広く用いられるようになった。本法は従来化学合成農薬で行われていた種子消毒を，60℃前後のお湯でイネ種子を処理することにより消毒ができ，農薬のように処理後の廃液が出ない環境に配慮した方法である（早坂ら，2000）が，その一方でイネばか苗病が問題となっている。イネばか苗病は種子伝染性病害の最も代表的な病害の一つで，育苗様式の変化や薬剤耐性菌の出現により突発的に発生が増加して生態学的研究が精力的に実施された（佐々木，1987；渡部，1985）ものの，効果の高い種子消毒剤の出現により1990年代にはほとんど発生が認められなくなり，種子への依存性も大きい病害であったことなどから「過去の病害」として認識されるようになっていた。温湯浸漬法の普及により再び発生が増加した本病は基本的な伝染様式は変わらないものの，以前の発生様相とは異なり大規模育苗ハウス全体で発生が認められる事例や，同じ工程で消毒された種子でも，農家単位で発生状況がかなり異なるなど種子伝染だけでは説明できない状況がうかがえる。このことは，病虫害に関する生態研究がまだまだ不十分であることを示すと同時に，環境保全型農業を実践あるいはその技術を導入するためには，これまでの化学農薬による防除をおこなっていた時代よりも病虫害の生態研究がより重要な意味を持つことを示している。

### Pyricularia 属菌によるいもち病

いもち病は主にイネ科植物に発生する病害で、とくにイネに発生するイネいもち病は食料生産にとって最も重要な病害の一つである。また、米は我が国の主食であることからさまざまな栽培技術が開発・導入され、とりわけ病害虫防除に関しても化学農薬による防除技術がほぼ確立されている。このため防除技術の研究は化学農薬の使用をより効率的に活用する環境保全型にシフトしている(早坂, 2004)。そのためには病原菌であるイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* Cavara の生態を解明することが重要である。

ところで、イネ以外のイネ科植物いもち病に、メヒシバいもち病がある。メヒシバいもち病菌は *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. であり、いもち病菌としてはじめて学名が記載され、*Pyricularia* 属菌の基準種となっている(中馬, 2013)。イネ以外のイネ科植物いもち病としては最も身近に認められるもののひとつである。イネいもち病菌との関係では多くの議論がなされており、我が国ではメヒシバいもち病菌は *P. grisea*, イネいもち病菌は *P. oryzae* で別種として扱われていたが、Rossman *et al.* (1990) が形態学的類似性と交雑親和性から同種とすべきと報告している。一方、完全世代も発見され、*Magnaporthe grisea*(Hebert) Barr とされた(Barr, 1977)。Rossman *et al.* (1990) の報告以降 10 数年にわたり、メヒシバいもち病菌とイネいもち病菌は同種 *P. grisea* として扱われるが、Couch and Kohn (2002) が、GCPSR (Taylor *et al.*, 2000) を取り入れた遺伝子解析により、イネいもち病菌がメヒシバいもち病菌と別種であり、新たに *Magnaporthe oryzae* を新設した。これは、Kato *et al.* (2000) が主張しており、Hirata *et al.* (2007) も支持する結果を得ており、現在はイネいもち病菌とは別種のメヒシバいもち病菌は *P. grisea*/*M. grisea*, イネいもち病菌は *P. oryzae*/*M. oryzae* として落ち着いている。

## いもち病の発生生態

イネいもち病菌の発生生態は、稲作の発展とともに精力的に研究が実施されている。近年の箱育苗と機械移植体系においては保菌種子の播種により発生する苗いもちが、本田に持ち込まれることで発生すると考えられている（深谷ら，2001）。その後，発病株内では抽出してくる上位葉に感染・発病を繰り返す。また周囲のイネ株にも伝染する。穂いもちは止葉を含めた最上位 2~3 葉のいもち病斑が伝染源となる（大畑，1989）。穂いもちは減収の直接の原因となるが，これ以外にも保菌種子を生成し，種子として保管され翌年の伝染源となる。このため，基本的な防除技術は種子消毒と箱施用剤による葉いもち予防防除，水面施用剤による穂いもち予防防除に体系化されている。

一方，イネ以外のイネ科植物いもち病の発生生態はほとんど明らかされていない。山形県庄内地方では，毎年メヒシバいもち病が発生するが，本病は非常に興味深い発生様相を示す。本病は毎年 7 月に入ってから発生が認められ，6 月での発生は認められない。初発の期間は短く，庄内地方一円にほぼ同時期に発生し，初発後は一斉に激発の様相を示して短期間で急激に蔓延する。新抽出葉には次々と新たな病斑が形成され常に激発状態で経過し，9 月下旬頃まで新鮮な病斑が常に認められる。一方，宿主植物であるメヒシバ (*Digitaria ciliaris*(Retz.) Koeler ; 小林ら，2005) は 5 月下旬ごろから実生苗が発生し 6 月下旬には分けつを発生させて群落を形成する。いもち病の発生には十分な主因と誘因（気象条件）が成立していると考えられるものの，6 月の発生が認められない。庄内地方は東北南部の日本海側に位置し，日本屈指のコメどころである庄内平野を中心に東は朝日山地や出羽三山，北は鳥海山を望む地方である。当地方は冬期積雪地帯であり，中山間地域では最長 4 ヶ月，積雪の少ない沿岸地域でも 2 ヶ月程度根雪状態が継続する。メヒシバは一年生植物であるゆえに，庄内地方では，翌春の植物体は地上部の形状が判別できないほどに破損・分解

される。すなわち、罹病したメヒシバ上のいもち病菌は最長で4ヶ月近く積雪下で濡れた状態にさらされる。一般に、いもち病菌は低温湿潤条件下では2ヶ月足らずで死滅すると報告されている（高崎，1978；高崎ら，1979）。当地方はいもち病菌の越冬に対し非常に過酷な条件であり，メヒシバいもち病菌の冬季の生存は困難と思われる。しかしながら，本病は毎年発生が確認されており，当地方で常に激発状態にあるメヒシバいもち病の発生生態，すなわち野外でどのように生存しているかは不明で，非常に興味深い。伝染経路に関し人為的な要因が多くを占めるイネいもち病菌と異なり，自然界におけるいもち病菌の生態を研究している事例はほとんどなく，特に冬季積雪地帯におけるいもち病菌の越冬，すなわち翌年の第一次伝染源として野外での生存の確認を試みた研究事例はごくわずかであり，十分明らかとなっていない。

#### 病原菌の個体識別

病原菌の生態学的研究では，病原菌の様々な特徴からマーカーを定めてその動態を追跡する方法がとられている。たとえば *Fusarium* 属菌などでは生態学的研究のために硝酸塩利用能欠損変異菌株（*nit* 変異菌株）が作出・利用されている（竹原・國安，1994a，1994b；竹原・國安，1995）。*Pyricularia* 属菌ではイネいもち病菌で試みられているものの，その性質が安定しないことが多く（三島ら，1995），菌学的研究に利用が限定されている（Correll *et al.*, 2000；Zhang *et al.*, 2006）。また，いもち病菌の分生胞子をマーカーにして孢子採集器を用いた飛散量の時間的な変動を解析した生態学的研究が行われていた（吉野 1997）。しかし，形態的に区別できないイネいもち病菌とメヒシバいもち病菌が同時期に混在して飛散しているため，得られた胞子を区別することは困難であり，得られた結果を過大に評価していた可能性がある。他には，イネいもち病菌の病原レースをマーカーとして伝染経路を推定した研究もあったが，



遺伝子解析技術の発展により病原菌の個体識別が可能となって再検証された結果、レースと遺伝子型には一定の関係性が見いだせないことが明らかとなり(荒井, 2004 ; 村松ら, 2003 ; 高橋・猫塚, 2009), レースを生態学的研究に利用することが困難であることが明らかにされている. そもそも, 雑草のいもち病菌の場合, レースが存在しているかはほとんど明らかになっておらず, 伝染経路を推定するツールとして用いることは不可能である. 一方近年, ゲノム解析の進歩により, いもち病菌の遺伝子型をマーカーとして個体識別する方法が開発されている. 遺伝子解析に基づく本手法は多数の検体を一度に解析できるため, いもち病菌の生態学的研究に多く利用されている (Dobinson *et al.*,1993 ; Kachroo *et al.*,1994 , 1995 ; Nakayashiki *et al.*,2001 ; Farman *et al.*,1996a,1996b). *Pot2* rep-PCR フィンガープリント法 (George *et al.*,1998 ; Suzuki *et al.*,2006) はいもち病菌ゲノムに散在しているトランスポゾン *Pot2* (Kachroo *et al.*, 1994) を標的配列として遺伝子型を決定する個体識別法で, イネいもち病菌の集団構造解析や伝染経路の解明, 薬剤耐性菌の出現解析などに用いられており, 有効な方法と考えられている (Correll *et al.*,2000 ; 生井ら,2006 ; Suzuki *et al.*,2006 ; 笹原, 2004 ; 佐々木ら, 2007 など).

## 本論文の構成

本研究では, 野外における *Pyricularia* 属菌の生態を把握し, 雑草のいもち病の伝染経路を明らかにすることを目的として, 東北地方南部に位置する山形県庄内地方の冬季積雪地帯におけるメヒシバいもち病の発生生態を中心に解析した. さらに, 山形県と宮城県に自然発生した数種イネ科雑草のいもち病について, 分離菌株の病原性, 培養中の代謝産物, 遺伝子解析を行った. 本論文では, 第Ⅱ章と第Ⅲ章において山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病とそのいもち病菌を対象とした研究を行った. メヒシバいもち病を対象とした理由は,

本病の病原菌がイネいもち病菌と明確に区別できること、感染性がメヒシバ (*Digitaria* 属) に特化しており (Tsurushima *et al.*,2005) メヒシバいもち病菌以外に野外で認められるいもち病菌がその発生生態に影響を及ぼす可能性が小さく、野外での生態を研究する材料として最良と考えたからである。第Ⅱ章では、メヒシバいもち病菌の個体識別法について検討し、第Ⅲ章では、本菌の分布実態、越冬および長距離飛散の解析により発生生態について論じた。第Ⅳ章として、東北地方南部の山形県と宮城県に認められたイネ科植物のいもち病、特に水田周辺で認められた数種のイネ科植物のいもち病と病原菌について特徴を明らかにし、発生生態とイネに対する伝染性について論じた。

## II. メヒシバいもち病菌の個体識別法の検討

いもち病菌の個体識別法としては薬剤耐性を付与した菌株や硝酸塩利用能欠損変異株などの生理的性質を利用するほか (Correll *et al.*, 2000 ; Noguchi *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006), 近年, 遺伝子解析による微生物の個体識別が簡便に行えるようになった. いもち病菌ゲノムに散在しているトランスポゾン *Pot2* (Kachroo *et al.*, 1994) は複数種のいもち病菌が多数のコピーを保有しており, これを標的配列とした個体識別法である *Pot2* rep-PCR フィンガープリント法 (George *et al.*,1998 : Suzuki *et al.*,2006) はイネいもち病菌の集団構造解析や伝染経路の解明, 薬剤耐性菌の出現解析などに用いられている (Correll *et al.*,2000 ; 生井ら,2006 ; Suzuki *et al.*,2006 ; 笹原, 2004 ; 佐々木ら, 2007 など).

本論文では, メヒシバいもち病菌の個体識別法として本法が有効であるかを確かめるために, 改良型であるシングルプライマーを用いた *Pot2* rep-PCR 法 (Suzuki *et al.*,2006) による個体識別を検討した. 本章では, 特に病理学実験の基本である, 病原菌の分離や培養, 保存, 継代接種などの過程による遺伝子型の変化の可能性について検討した.

### 1 材料および方法

#### 供試菌株の培養, 保存および孢子形成条件

供試菌株は, 2005 年に山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センター高坂農場の水田畦畔に自生しているメヒシバの葉身の病斑から, 単孢子分離法によって分離した 3 菌株 (菌株名 ; 病 7-1, 病 8-1, 病 25-1) を用いた. これらの菌株は, PSA 斜面培地 (ジャガイモ 200g, ショ糖 15g, 棒寒天 15g/1000ml)

で培養し山形大学農学部植物病理学研究室の低温室内に、10℃で保存していたものを元菌とした。

試験に用いる分生孢子の形成条件は古田・関口（1968）に準じた。供試菌株をオートミール培地（オートミール粉末 50g, ショ糖 5g, 棒寒天 20g/1000ml）に移植して暗黒条件 25℃で 14 日間培養後、表面の気中菌糸を絵筆で流水中できき取って風乾し、光照射下で 25℃, 3 日間培養して孢子を形成させた。

#### 培養中の *Pot2* 遺伝子型の安定性

分離菌株の保存、培養および孢子形成による *Pot2* 遺伝子型の安定性を解析するため、長期保存および継代培養時と分生孢子の形成は次のような条件で検討した。長期保存菌の安定性に関する解析については、継代移植をしていない元菌から 2007 年、保存 4 年目の 2009 年および 6 年目の 2011 年に後述に従って DNA を抽出して rep-PCR をおこなった。また継代培養菌の安定性については、2007 年に元菌株から新たな斜面培地に継代し、2009 年にはこの継代菌株から再度新たな培地に継代移植をおこなった。この作業を 2010 年および 2011 年にも繰り返した。

分生孢子の形成時の安定性については、上述の方法で形成させた成熟した分生孢子を供試菌株 1 菌当たり 100 孢子単孢子分離して菌株とし、それぞれの分離菌を供試した。

#### メヒシバの育苗と継代接種

継代接種に供試したメヒシバは、低温乾燥下で保存していた種子を、塩基性塩化銅・フルジオキサニル・ペフラゾエート・塩基性塩化銅水和剤（商品名：モミガード C 水和剤）200 倍で消毒し、育苗培土を充填した弁当箱に播種して発芽させ、イネ用シードリングケース（5cm×15cm×10cm）に 2 実生苗（ケー

ス当たり 2 株とした) を移植して 4~5 葉期になるまで栽培した。このメシバに、オートミール培地で形成させた分生胞子を  $10^4$  個/ml の懸濁液に調整し噴霧接種した。噴霧後、ただちに飽和湿度、 $25^{\circ}\text{C}$  の接種箱に 24 時間静置し、その後人工気象室 ( $25^{\circ}\text{C}$  16 時間、 $15^{\circ}\text{C}$  8 時間、自然光) で発病するまで栽培した。典型的な単一病斑を 2 つ選び、そこから単胞子分離によって再分離をおこない、斜面培地に移植、保存すると同時にオートミール培地に移植して再び胞子を形成させて、上述と同様に次の世代の接種をおこない、この作業を 2 回繰り返した。なお、菌株は上記 3 菌株のうち病 7-1 および病 25-1 の 2 菌株を用い、接種試験は外部からの飛び込みいもちを防止するため野外での発生が認められなくなる 10 月以降に実施した。

#### PEX 法による菌体 DNA の抽出

分離菌株の DNA 抽出は PEX 法 (Nakahara *et al.*, 1999) に準じておこなった。すなわち、はじめに再分離菌株は 1ml の PS 液体培地 (ジャガイモ 200g, ショ糖 15g/1000ml) で 3~4 日間培養後、菌糸体を回収して、余分な水分を除去してから米粒大の量を爪楊枝でかき取ってマイクロチューブに入れた。続いて、PEX 溶液 (Potassium ethyl xantogenate 100mg, 1M Tris-HCl(pH8.0) 10ml, 0.5M EDTA(pH8.0) 2ml, NaCl 4.09g/100ml; Nakahara *et al.*, 1999) を 300 $\mu\text{l}$  加えてペレットミキサーで磨砕し、 $60^{\circ}\text{C}$  で 30 分間静置した。静置後、遠心分離機で 14000rpm, 5 分間遠心分離した。得られた上清 160 $\mu\text{l}$  を新しいマイクロチューブへ移し、100%エタノールを 400 $\mu\text{l}$  加えてよく反転混合し、再度 14000rpm, 5 分間遠心分離して DNA を沈殿させた。上清を除去し、70%エタノールを 600 $\mu\text{l}$  加えて室温で 14000rpm, 1 分間遠心分離し DNA を洗浄した。その後上清を捨て、小型卓上遠心機で再度軽く遠心後、水分を完全に除去し DNA を乾燥させた。乾燥 DNA に 200 $\mu\text{l}$  の滅菌蒸留水を加えて溶解し、

鋳型 DNA を調整した.

### rep-PCR

Suzuki *et al.*(2006)の方法に従い, いもち病菌のゲノム上に散在している *Pot2* (Kachroo *et al.*, 1994) 領域間を増幅する, 逆位反復配列内に設計されたシングルプライマー *Pot2*-TIR (5'-ACAGGGGGTACGCAACGTTA-3') を用いて PCR を行った. 0.2mlPCR チューブに鋳型 DNA0.3 $\mu$ l とマスターミックス 9.7 $\mu$ l (滅菌蒸留水 6.65 $\mu$ l, 10 $\times$ Ex *Taq* Buffer 1 $\mu$ l, 2.5mM dNTPs 1.6 $\mu$ l, 10 $\mu$ M *Pot2*-TIR 0.5 $\mu$ l, TaKaRaEx *Taq* 0.1 $\mu$ l) を入れ, サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, 米国)あるいは TaKaRa PCR Thermal cycler (TaKaRa, 東京)) で増幅反応を行った. PCR の反応条件は, 最初の熱変性を 94 $^{\circ}$ C, 2分30秒, 熱変性 (94 $^{\circ}$ C, 1分), アニーリング (62 $^{\circ}$ C, 1分), 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 5分) を 35 サイクル, 最後の伸長反応を 72 $^{\circ}$ C, 5分間行った.

得られた PCR 産物は 5 $\mu$ l に対して 6 $\times$ Loading Buffer 2 $\mu$ l を加えて)調整し, 1.5%アガロースゲルで 100V, 約 90 分間電気泳動を行った. 泳動後, 0.1%エチジウムブロマイド溶液 (エチジウムブロマイド 300mg/蒸留水 300ml) で約 15 分間振とうして染色後, トランスイルミネーター (UVP TFML-26E) で紫外線を照射して特徴を観察し, ポラロイドカメラ (FUJIFILM FP-3000B) で撮影した.

## 2 結果

### PSA 培地上での長期保存，継代培養による *Pot2* 遺伝子型の安定性

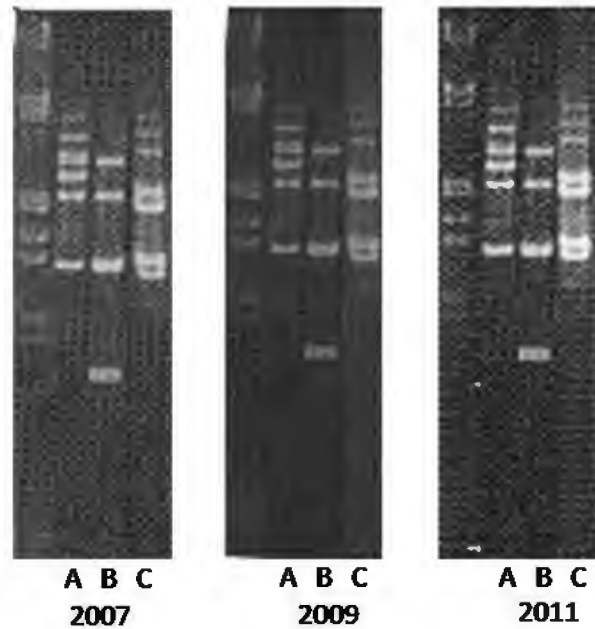
2005 年にメヒシバから分離した 3 菌株について，シングルプライマーを用いた *Pot2* rep-PCR 法によるフィンガープリントパターンを解析した．その結果，供試菌株はそれぞれ固有のパターンを示した（図 II-1）．続いてこの元菌を PSA 培地で 2011 年まで 6 年間の長期保存した菌株について，*Pot2* 遺伝子型を元菌と比較した結果，長期保存による *Pot2* 遺伝子型の変化は認められず，調査した年次すべてで元菌の遺伝子型と全て一致した（図 II-1）．また，培地上で継代培養した菌株についても元菌と遺伝子型が同一であった（データ省略）．

供試 3 菌株を用いて，オートミール培地上に常法で形成させた分生胞子についても，分離した 100 菌株は元菌と全く同一の *Pot2* 遺伝子型を示し，遺伝子型の変化は認められなかった（データ省略）．

### メヒシバへの継代接種における *Pot2* 遺伝子型の安定性

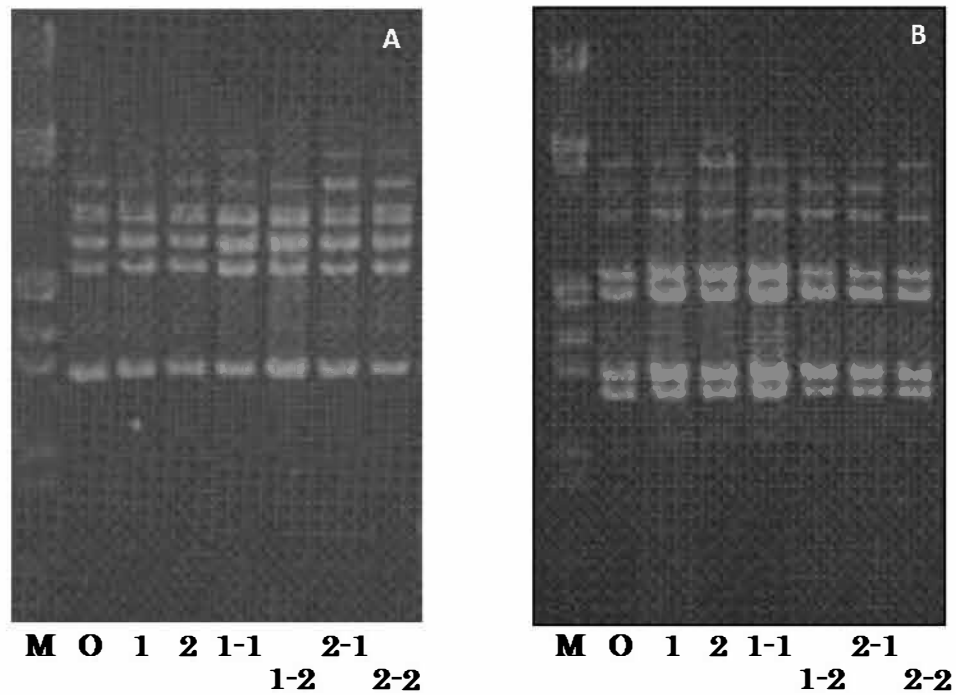
供試した 2 菌株について，接種と再分離を繰り返し，得られた再分離菌株の *Pot2* 遺伝子型を検討した結果，元菌の *Pot2* 遺伝子型と，接種後に再分離した菌株の遺伝子型は全て一致した（図 II-2）．

以上のことから，継代接種，分離，培養等の操作の過程で遺伝子型が変化する事例は全く認められず，遺伝子型は安定していた．



図II-1 長期保存後における供試菌株の *Pot2rep*-PCRフィンガープリントパターン A ; 病7-1, B ; 病8-1, C ; 病25-1を示す。元菌は2005年に分離したもので、*Pot2*遺伝子型は保存2年後の2007年、4年後の2009年および6年後の2011年にDNA抽出からおこなって、*Pot2*遺伝子型を確認した。





図Ⅱ-2 接種後の再分離菌株（継代接種）におけるフィンガープリントパターン  
 A；病7-1  
 B；病25-1  
 M；サイズマーカー，O；接種菌株（元菌株）  
 1；噴霧接種後に形成された病斑からの再分離菌株1  
 1-1，1-2；再分離菌株1の再接種により形成された病斑からの再分離菌株  
 2；噴霧接種後に形成された病斑からの再分離菌株2  
 2-1，2-2；再分離菌株2の再接種により形成された病斑からの再分離菌株

### 3. 考 察

病原菌の生態学的研究は個体識別技術を構築することが重要となる。イネいもち病菌では遺伝子解析による個体識別法が開発されて生態研究に利用されている (Chen *et al.*,1995 ; Don *et al.*,1999a ; Don *et al.*,1999b ; Kumar *et al.*,1999 ; Park *et al.*,2003 ; Park *et al.*,2008 ; George *et al.*,1998). それらの多くはいもち病菌のゲノム上に散在する反復配列をプローブとして利用されている (Dobinson *et al.*,1993 ; Kachroo *et al.*,1994, 1995 ; Nakayashiki *et al.*,2001 ; Farman *et al.*,1996a,1996b). またこれらのプローブを用いた解析はイネいもち病菌に限らず、イネ以外のイネ科植物いもち病菌の個体識別にも有効である (Kachroo *et al.*,1994 ; Kato *et al.*,2000 ; Kusaba *et al.*,1999 ; Kusaba *et al.*,2006 ; Tosa *et al.*,2004 ; Yamagashira *et al.*,2008 ; Tanaka *et al.*,2009 ; Viji *et al.*,2001 ; Farman, 2002). 本章ではメヒシバいもち病菌の発生生態を解明することを目的に、本菌の個体識別法として Suzuki *et al.* (2006) が開発した rep-PCR 法を適用し、検討した。数ある個体識別法の中で本手法を選択した理由は、短時間で多数の菌株を扱うことができかつ安価にできること、放射性同位体等を用いず PCR と電気泳動のみで解析が可能であり、簡便であるためである。本手法は George *et al.* (1998) の従来法をより菌株の識別能を高めたものであり、従来法では識別できなかったメヒシバいもち病菌も識別が可能であった (データ未発表)。さらに、分離・培養、保存あるいは継代接種によって遺伝子型が変化しないかを検討した結果、メヒシバへの接種と再分離を繰り返した継代接種試験では再分離菌の *Pot2* 遺伝子型は概して変化することが無く、安定していた。培地上での変化についても、PSA 培地を用いて長期保存と継代培養した菌株、および孢子形成用のオートミール培地を用いた孢子形成時の分生孢子すべてにおいて遺伝子型の変化は認められなかつ

た。つまり，改良型本法によって識別した本菌の遺伝子型は，基本的な実験操作に伴って変化する可能性もなく安定していると言える。よって，本法はメヒシバいもち病菌の個体識別に有効で，本菌の野外での生態研究に利用できる手法であることが明らかになった。

### Ⅲ. 山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病の発生生態

#### 1. 庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の動態

第Ⅱ章において、メヒシバいもち病菌の個体識別技術としてのシングルプライマーによる rep-PCR 法を検討し、本菌に適用できる有用な技術であることを確認した。そこで、本技術を利用して山形県庄内地方における本病菌の動態を調査した。

##### 1-1 材料および方法

###### 調査地点の設定

本試験における調査地点は、メヒシバいもち病が激発していた庄内地方の地点で、庄内地方全体を網羅するよう調査地点を設定した。すなわち庄内地方を沿岸部、平野部、中山間部の3地域に便宜的に分け、沿岸部は酒田市浜中、鶴岡市五十川、遊佐町菅里十里塚、平野部は鶴岡市田川蓮華寺、鶴岡市高坂、三川町横山、酒田市本楯、酒田市寺田、酒田市竹田、中山間部は鶴岡市黒川上の山、鶴岡市行沢、鶴岡市羽黒町荒川、鶴岡市羽黒町川代の計13地点に山形大学農学部の学内圃場（鶴岡市新形）を加えた14地点とした（図Ⅲ-1）。調査地点には調査棒を立て、毎年ほぼ同一地点で調査をおこなった。

###### 庄内地方に認められる *Pot2* 遺伝子型

庄内地方で発生するメヒシバいもち病菌の *Pot2* 遺伝子型を調査するため、上述の13地点において、1地点当たり10菌株以上を目標に罹病葉のサンプリングをおこなった。罹病葉は分生胞子を形成しているものを優先的に採集し、単胞子分離によって菌株を得た。得られた菌株は第Ⅱ章に記したDNAの抽出

および rep-PCR 法に従って遺伝子型を解析した。認められた総遺伝子型数は 2007 年から 2011 年の 5 カ年の調査からまとめた。

#### メヒシバいもち病激発株 1 株内における *Pot2* 遺伝子型

メヒシバ 1 株内の葉身に発生したいもち病の病斑からいもち病菌を分離し、*Pot2* 遺伝子型を調査した。サンプリングは 1 株内から、1 葉当たり 1 病斑が形成されている罹病葉を 2 枚、1 葉当たり 3 病斑が形成されている罹病葉を 1 枚とし、それぞれ単孢子分離して得た菌株の *Pot2* 遺伝子型を調査した。調査株数は 3 株とした。サンプリング地点は本学農学部附属やまがたフィールド科学センター高坂農場と、山形県以外の県での発生しているいもち病菌の状況も比較検討するため、宮城県（宮城大学食産業学部太白キャンパス内）と青森県（弘前大学敷地内）でもサンプリングをおこなった。

#### メヒシバいもち病菌の発生動態調査

本病の発生を発生初期（7 月上～下旬）、中期（8 月上～中旬）および後期（9 月上～中旬）の 3 時期に分け、2007 年から 2011 年に各サンプリング時期に発生している上位葉の形成直後の病斑から単孢子分離して得た菌株を供試した。サンプリングしたいもち病菌について、分離、培養、DNA 抽出、*Pot2* 遺伝子型を解析した。解析はサンプリング時期ごとに集団として扱った。

## 1-2 結 果

### 庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の *Pot2* 遺伝子型

庄内地方 13 地点に発生したメヒシバいもち病罹病より病原菌を 2007 年から 2011 年にかけて分離した菌株合計 1598 菌株を *Pot2* rep-PCR 法による *Pot2* 遺伝子型で類別した。その結果、分離菌株は合計で 161 遺伝子型に類別され、遺伝子型名はそれぞれ Sy1~Sy161 と表した。図Ⅲ-2 は遺伝子型の一部を示している。

### メヒシバいもち病激発株内に分布する *Pot2* 遺伝子型

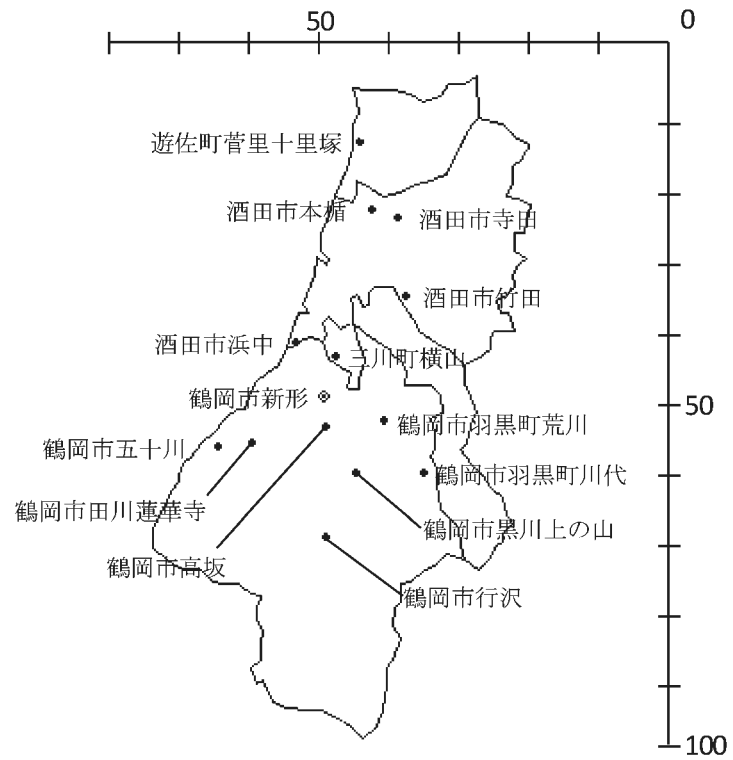
本病が激発したメヒシバを供試して株内の *Pot2* 遺伝子型を調査した。その結果、同一株内で葉身が異なると、別の *Pot2* 遺伝子型が検出される株が複数認められ、同一の遺伝子型が検出される場合は少なかった（図Ⅲ-3, 表Ⅲ-1）。また、同一罹病葉内にある異なる病斑からの分離菌でも、全て同一の遺伝子型が検出された場合と、全く異なる 3 種類の遺伝子型が検出される場合とが見られた（図Ⅲ-3）。このように、メヒシバのいもち病では、同一株内でも病斑ごとに分離したいもち病菌の遺伝子型は異なる場合が認められた。

### 庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の動態

類別した遺伝子型をもとに、いもち病菌のサンプリング時期ごとの検出数を示したのが表Ⅲ-2 である。各サンプリング時期に採集した菌株を 1 つの集団として考えると、まず、各集団では必ず複数地点で同一の遺伝子型（Sy4, Sy5, あるいは Sy21）が検出され、Sy4 の菌株は最大 10 地点で検出された。例えば、2007 年に発生初期に調査した集団では、代表的な同一の遺伝子型として Sy4 が 6 地点で検出された。検出された遺伝子型数について調査年ごとに比較すると、2007 年の発生初期には 13 地点で合計 22 遺伝子型が検出された。発生後

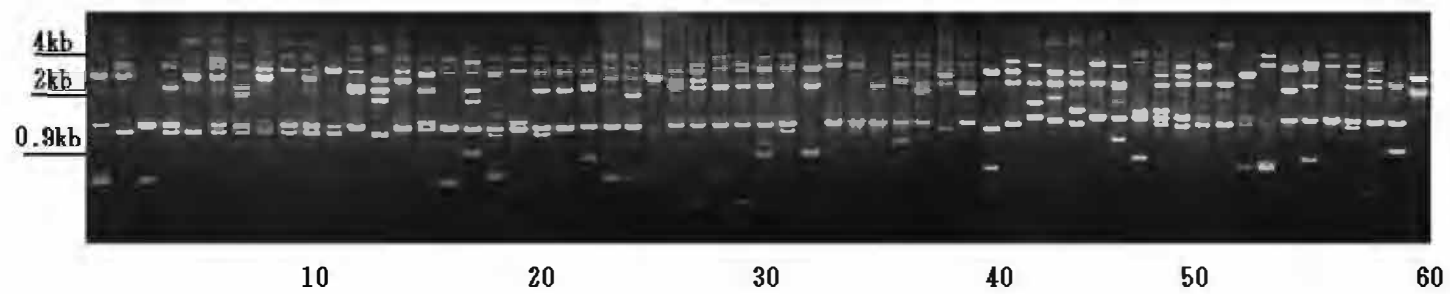
期に検出されたのは 23 遺伝子型であったが、鶴岡市五十川などのように発生初期と全く異なる遺伝子型が検出される地点や、酒田市寺田などのように全て同一の遺伝子型が検出される地点があった。発生後期の菌株集団のうち、前の集団（発生初期）と共通する遺伝子型の菌株が占める割合は 40%であった。同様に、2008 年は発生初期に比べ発生後期で検出される遺伝子型は多くなったが、前の集団と共通する遺伝子型は 10 種類と半分以下であり、その遺伝子型の菌株が集団に占める割合は 44%であった。2010 年と 2011 年はサンプリング時期を 3 つに分けて同様に比較したが、その傾向は 2007 年および 2008 年とほぼ同様であった。すなわち、発生初期から発生中期、発生後期とサンプリング時期が遅くなるにつれ、各調査地点では新規の遺伝子型が検出された。ひとつ前の集団と共通する遺伝子型の菌株が占める割合もほとんどの地点が 50%以下で、合計でも各集団で 20%を下回った。

各調査年の発生後期の集団と翌年の発生初期の集団を比較すると、共通の遺伝子型が検出された地点は 2007～2008 年で 9 地点中 4 地点、2009～2010 年は 13 地点中 6 地点、2010～2011 年は 13 地点中 3 地点であり、越冬の前後で集団の遺伝子型構成が大きく変化した。

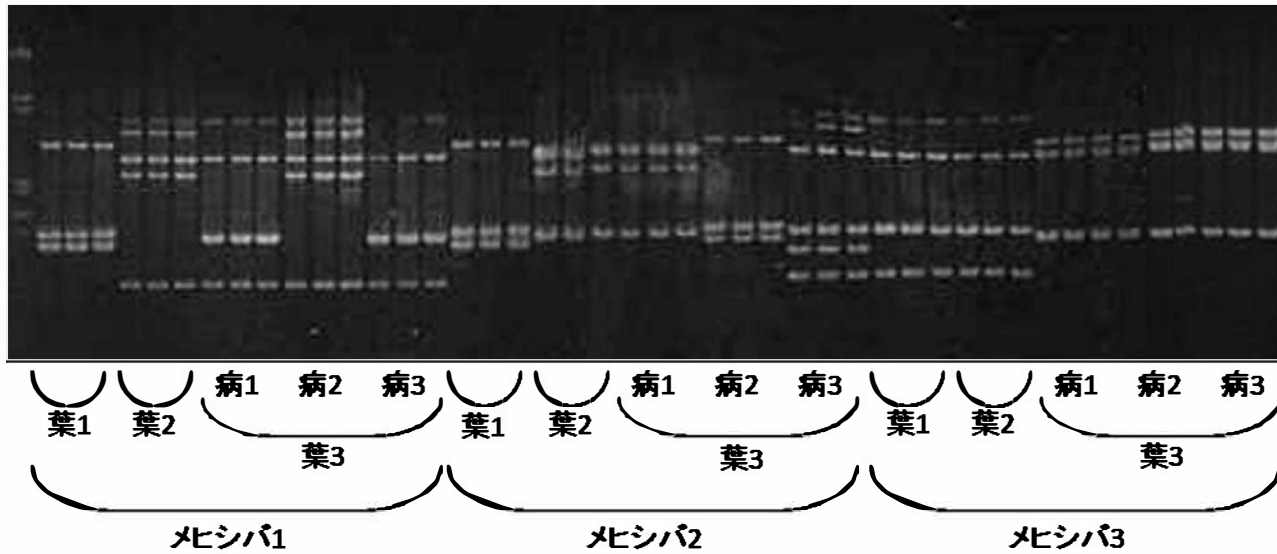


図Ⅲ-1 山形県庄内地方に設置した定点調査地点  
 注) 図中のスケールは1メモリで10kmを示す.





図Ⅲ-2 庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の*Pot2* rep-PCRフィンガープリントパターン (一部)



図Ⅲ-3 メヒシバいもち病激発株内に分布する*Pot2*遺伝子型（山形県の例）  
 1株内で単一病斑を形成した葉身（葉1と葉2）および1葉身内に3病斑を形成した葉身（葉3）から  
 いもち病菌を分離した。1病斑当たり3単孢子分離した。他県のは表Ⅲ-1にまとめた。

表Ⅲ-1 メヒシバー株内の病斑から分離したいもち病菌の*Pot2*遺伝子型の異同

株番号	メヒシバ1					メヒシバ2					メヒシバ3				
葉番号	葉1	葉2	葉3			葉1	葉2	葉3			葉1	葉2	葉3		
病斑番号	病1	病1	病1	病2	病3	病1	病1	病1	病2	病3	病1	病1	病1	病2	病3
山形県	Ya	Yb	Yc	Yb	Yc	Ya	Yd	Yd	Ya	Ye	Yf	Yf	Yg	Yg	Yg
宮城県	Ma	Ma	Mb	Mb	Ma	Mc	Md	Md	Md	Md	Ma	Me	Mf	Ma	Mf
青森県	Aa	Ab	Ac	Ad	Aa	Ae	Af	Ag	Ac	Ah	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad

注1) Y, M, Aはそれぞれ各県を, a~iは異なる遺伝子型を示す.

注2) 病斑からは3菌株単孢子分離し, 同一病斑内の系統はすべて一致していた.

表Ⅲ-2 山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の採取時期別集団のPot2遺伝子型数および集団間での共通遺伝子型検出割合

区分	調査地点名	サンプリング時期 <sup>a)</sup>										
		2007		2008		2009	2010			2011		
		発生初期	発生後期	発生初期	発生後期	発生後期	発生初期	発生中期	発生後期	発生初期	発生中期	発生後期
沿岸部	鶴岡市五十川	-/2(2) <sup>b)</sup>	0/7(11)	0/1(7)	1/2(3)	-/4(10)	1/1(5)	0/5(10)	2/6(10)	0/2(9)	0/4(10)	0/5(10)
		-	0%	0%	67%	-	100%	0%	70%	0%	0%	0%
	酒田市浜中	-/7(37)	NT	-/4(10)	2/2(13)	-/6(10)	0/2(6)	NT	-/4(8)	0/3(8)	1/4(9)	0/7(9)
平野部	遊佐町菅里十里塚	NT	-/3(7)	NT	-/3(8)	-/5(10)	1/3(10)	0/4(10)	1/5(5)	0/3(10)	1/4(11)	0/4(6)
		-	-	-	-	-	10%	0%	20%	0%	27%	0%
	鶴岡市田川蓮華寺	-/3(5)	1/5(12)	0/2(4)	1/4(5)	-/2(3)	0/2(10)	0/5(10)	0/5(10)	0/2(8)	1/4(4)	2/7(11)
中山間部	鶴岡市高坂	NT	-/1(1)	0/5(8)	1/4(5)	-/10(15)	0/4(10)	1/2(2)	2/4(10)	1/2(10)	0/5(9)	0/6(10)
		-	-	0%	20%	-	0%	50%	50%	40%	0%	0%
	三川町横山	-/3(11)	2/4(5)	1/2(11)	1/1(2)	-/11(20)	1/4(4)	1/5(10)	0/8(10)	0/3(8)	1/4(6)	1/5(9)
平野部	酒田市本楯	-/5(19)	3/6(7)	1/3(4)	2/8(12)	-/8(10)	0/4(8)	0/7(10)	0/4(10)	0/2(10)	0/5(8)	1/7(8)
		-	43%	25%	33%	-	0%	0%	0%	0%	0%	13%
	酒田市寺田	-/8(18)	3/3(8)	2/3(13)	1/3(4)	-/5(9)	1/3(5)	2/5(9)	0/5(8)	0/2(2)	1/5(10)	0/8(10)
中山間部	酒田市竹田	NT	-/6(9)	2/3(7)	1/3(3)	-/7(9)	0/1(2)	0/5(10)	3/8(11)	0/3(10)	NT	-/6(9)
		-	-	86%	33%	-	0%	0%	36%	0%	-	-
	鶴岡市黒川上の山	-/6(14)	2/2(5)	NT	-/3(4)	-/7(8)	1/1(1)	1/7(10)	1/5(7)	0/2(4)	0/6(9)	1/7(10)
平野部	鶴岡市行沢	-/5(7)	0/4(7)	0/2(6)	1/1(1)	-/3(9)	0/4(10)	1/4(10)	2/4(5)	0/1(8)	1/4(7)	2/8(10)
		-	0%	0%	100%	-	0%	20%	40%	0%	14%	20%
	鶴岡市羽黒町荒川	NT	NT	-/1(8)	1/3(5)	-/8(10)	3(10)	0/3(10)	0/4(9)	1/4(7)	1/4(8)	0/9(10)
平野部	鶴岡市羽黒町川代	-/2(8)	2/4(19)	0/5(8)	0/6(7)	-/9(16)	0/2(4)	0/7(9)	0/9(10)	2/4(10)	2/7(10)	0/6(8)
		-	63%	0%	0%	-	0%	0%	0%	40%	20%	0%
	合計	-/22(121)	13/23(91)	6/15(86)	10/23(72)	-/45(139)	8/24(85)	6/34(110)	11/46(113)	4/15(104)	9/34(102)	7/61(120)
	-	40%	22%	44%	-	16%	10%	18%	10%	20%	10%	
	検出された 代表的な遺伝子型 <sup>c)</sup>	Sy4 (6地点)	Sy5 (6地点)	Sy4 (8地点)	Sy4 (10地点)	Sy21 (9地点)	Sy21 (4地点)	Sy4 (6地点)	Sy4 (6地点)	Sy21 (7地点)	Sy4 (7地点)	Sy4 (4地点)

a) 発生初期は7月下旬まで、発生中期は8月上～中旬、発生後期は9月上旬以降にサンプリングを行った。

b) 上段は「ひとつ前の集団と共通の遺伝子型数/その集団の遺伝子型数」、カッコ内は解析した菌株数を示す。

下段は「ひとつ前の集団」と共通する遺伝子型の菌株が集団に占める割合を示す。

NTは調査未実施あるいは調査範囲内に病斑が認められなかったことを示す。

c) 同一サンプリング時期において、最も多くの地点で検出されたPot2遺伝子型を示す。

表Ⅲ-3 庄内地方における越冬前後のメヒシバ種子のいもち病保菌率

区分	採集地点	越冬前				越冬後			
		採種時期	供試種子数	保菌種子数	保菌率(%)	採種時期	供試種子数	保菌種子数	保菌率(%)
	鶴岡市新形	2007年10月	6431	4	0.06			NT	
		2008年10月	8932	8	0.09	2009年4月	10128	0	0
		2009年10月	5039	5	0.10	2010年4月	2004	0	0
		2010年10月	2657	3	0.11			NT	
沿岸部	鶴岡市五十川	2010年10月	998	0	0	2011年4月	903	0	0
	酒田市浜中	2010年10月	1032	0	0	2011年4月	854	0	0
	遊佐町菅里十里塚	2010年10月	1293	4	0.31	2011年4月	799	0	0
平野部	鶴岡市田川蓮華寺	2010年10月	1134	2	0.18	2011年4月	876	0	0
	鶴岡市高坂	2010年10月	1049	2	0.19	2011年4月	459	0	0
	三川町横山	2010年10月	1091	0	0	2011年4月	941	0	0
	酒田市本楯	2010年10月	1082	3	0.28	2011年4月	560	0	0
	酒田市寺田	2010年10月	1038	2	0.19	2011年4月	605	0	0
	酒田市竹田	2010年10月	980	2	0.20	2011年4月	985	0	0
中山間部	鶴岡市黒川上の山	2010年10月	895	0	0	2011年4月	913	0	0
	鶴岡市行沢	2010年10月	1009	1	0.10	2011年4月	768	0	0
	鶴岡市羽黒町荒川	2010年10月	938	0	0	2011年4月	670	0	0
	鶴岡市羽黒町川代	2010年10月	1123	1	0.09	2011年4月	569	0	0
平均					0.11				0
	宮城県大崎市 <sup>a)</sup>	2009年11月	4629	34	0.73	2010年4月	71029	0	0

a)比較のために太平洋側での調査を行った。

### 1-3 考察

山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の動態を検討するために*Pot2* rep-PCRフィンガープリント法による遺伝子型を調査した。その結果、2007年からの5年間で合計1598菌株を解析し、161の*Pot2*遺伝子型が分布していることが明らかとなった。また調査地に特徴的にみられる遺伝子型が年ごとに変化する一方で、庄内地方に広範囲に共通して認められる遺伝子型も存在することが明らかとなった。

検出された遺伝子型を発生時期別に分析すると、まず、調査した各発生時期には必ず地理的に離れた複数地点で検出される同一の遺伝子型が認められた。本調査の地点間の距離は5km以上であり、何らかの方法で長距離伝搬したと考えられる。高橋ら(2010)は岩手県のMBI-D耐性イネいもち病菌が県内に拡大した要因を*Pot2* rep-PCR法で解析し、耐性菌が保菌種子を介して長距離伝播したことを明らかにしている。鈴木ら(2012)も西日本のイネいもち病菌をSSRマーカーで解析し、遠距離間で同一のハプロタイプが検出されるのは保菌種子や罹病苗などの人為的な持ち込みによるものと推察している。他方、笹原(2004)は、イネいもち病の伝染が及ぶのは1回の感染好適条件でも700m程度であろうと試算している。一方、雑草であるメヒシバにおいて種子や苗の移動が遠距離に及ぶことは考えにくい。つまり、メヒシバ菌の場合は感染が繰り返されて移動した可能性を考えた方が良いのかもしれない。

その一方で、いもち病が激発したメヒシバの株内に分布するいもち病菌の遺伝子型を調査した結果では、異なる葉身の分離菌株で*Pot2*遺伝子型が異なり、1葉身の異なる病斑からも異なる遺伝子型が認められるなど、同一株内でも検出される遺伝子型が多様であった。さらに年間の動態についても多様な変化が認められ発生初期から中期、後期になるにつれてその構成が複雑となった。毎年の発生初期は他のサンプリング時期よりも少ない遺伝子型で構成されたが、

それでも多数の遺伝子型が各地で検出された。また、前年の発生後期を構成した遺伝子型は調査地点の半数以下であった。このように本菌は検出される遺伝子型の数が毎年初発時期には少なく、発生中期から後期にかけて増加し、越冬を挟んで翌年の初発に減少するという規則的な変動パターンを毎年繰り返し、基本的には集団として多様性を維持していると考えられた。集団として多様である理由としては、宿主のメヒシバとともに野外において人為的な選択が及ばないことで、集団の多様性が単一化の方向に進まないためかもしれない。また、野外では越冬という過酷な条件ではほとんどの菌が死滅して翌年の発生初期には検出される遺伝子型が少なくなり多様性が減少するが、元々の集団が非常に多様であるため翌年の初期集団としても多様性が維持されていると考えられる。また、ほとんどの定点調査地点で、発生初期に検出されていた遺伝子型が後期では検出されなくなり、新しい遺伝子型が検出されたことについては、周辺から次々に飛散してくる胞子を捕捉し発病している可能性がある。

## 2. 庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の越冬

栽培植物いもち病菌は保菌種子が重要な第一次伝染源であることが明らかにされている（加藤ら，1977：加藤，1997：Tosa *et al.*, 2007：Tanaka *et al.*, 2009）。また，雑草のいもち病菌でも，西日本においてエノコログサイもち病菌は種子伝染することが報告されている（山頭ら，2008）。

本項では，山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の越冬方法を明らかにすることを目的に試験をおこなった。すでに，八重樫・浅賀（1981）は秋田県においてメヒシバいもち病菌の種子での越冬を調査し，越冬後に保菌種子は認められないものの，越冬前には種子が保菌していることから種子での越冬を否定できないとしている。そこで第一次伝染源として想定される種子，罹病植物での本菌の越冬について検討した。さらに，イネいもち病菌は根に感染し地上部で発病することが報告されている（Sesma and Osborn, 2004）ことから，土壌での生存の可能性についても検討した。

### 2-1 材料および方法

#### 種子採集地点の設定

上述の13地点とした（図Ⅲ-1参照）。越冬前の種子の調査は，2007年から2011年の10月に山形県鶴岡市新形および鶴岡市高坂の畑の脇でメヒシバの穂から脱落する直前あるいは脱落后の土壌表面から採集した。また，越冬後の種子は2009年から2011年の4月に同一地点の土壌表面から採集した。採集した種子は護穎と内穎がそのまま付着した状態のものを供試した。各調査地点における積雪期間は，2009，2010および2011年の鶴岡市新形ではそれぞれ約2ヶ月，3ヶ月，2ヶ月半であった。また，2011年の各調査地点のそれは，沿岸部は約3ヶ月，蓮華寺，高坂，横山，本楯は約3ヶ月半，寺田，竹田および中



山間部では約 4 ヶ月であった。

#### 種子の保菌状況調査

種子のいもち病保菌状況の調査は、ブロッター法で行った、すなわち、採集した種子を素寒天培地（寒天 15g/l）に並べ、25℃蛍光灯照射下で 2 日間培養し、光学顕微鏡で種子表面での分生孢子形成の有無を調査した。孢子形成が確認できた種子はその都度回収し、滅菌水で洗浄後に湿らせた濾紙上に並べ、蛍光灯照射して発芽試験を行った。なお、日本海側地域の状況と比較するため、宮城県大崎市古川の水田脇の同一地点から越冬前の 2009 年 11 月と越冬後の 2010 年 4 月に種子を採集して同様に調査した。2009 年から 2010 年にかけての大崎市古川の調査地点では 12 月下旬から積雪があり、3 月中旬までの約 2 ヶ月間積雪が続いた状態であった。

#### 苗いもちの発生調査

前年度に鶴岡市高坂の山形大学農学部附属高坂農場のメヒシバいもち病が激発した畑地と、前述の調査地点で、翌年の融雪後に土壌表面よりメヒシバ種子を採集した。これらの種子を供試して苗いもちの発生を調査した。シードリングケースあるいは水稻育苗箱の 1/10 サイズの弁当箱に園芸培土を充填し、各地点から採集したメヒシバ種子を 500 粒播種し、底面から灌水して 25℃、暗条件下のインキュベーターで 48 時間培養して発芽させ、ガラス温室で 1～2 葉期まで栽培した。その後、育苗したメヒシバの発病を促す目的で 25℃、湿度 100% の接種箱に入れ 24 時間保持し、再びガラス温室に戻して栽培を継続した。1 週間栽培後、葉枯あるいは枯死した苗については湿室処理して、病患部における分生孢子形成の有無により苗いもちと判定した。また、宮城県大崎市で採集した越冬前の保菌種子を、同様の育苗・調査方法で苗いもちの有無を調査した。

### メヒシバの分割移植栽培による種子伝染の検討

鶴岡市新形に自然発生したメヒシバ実生苗を本病初発前の6月上旬～中旬に採取し、親株を中心から2株に分割し、それぞれを素焼き鉢に移植して養成した。6月下旬に上述の13地点に素焼き鉢ごと移植した。一方移植時に、移植した13地点からも同地点に発生していたメヒシバ実生苗1株を採取して分割し、一方の株を素焼き鉢に植え込み、鶴岡市新形に持参してきて畑地に素焼き鉢ごと移植した。こうして作成した計26株、52分割株について、それぞれの株のメヒシバ葉身に形成された病斑を初発から定期的にすべてサンプリングして得た菌株の*Pot2*遺伝子型を調査し、対応する株同士を比較した。試験は2007年、2008年、2009年の3か年おこなった。

### 保菌種子での越冬試験

本試験では、前実験で保菌状況調査試験のために採種した越冬前の種子について保菌率を調査したあと、保菌種子として用いた。すなわち、保菌率約0.3%の種子を市販のヤシ繊維製のお茶バックに入れ、土壌を充填したプランターの土壌表面に置き、各種条件で後述の越冬処理を行った。越冬処理は2010年から2011年にかけておこなった。

### 罹病組織上での越冬試験

罹病組織については葉身および穂枝の病斑を供試した。葉身については、メヒシバ種子をチウラム・ベノミル水和剤（商品名：ベンレート T 水和剤）400倍溶液に浸漬して消毒したあと播種し、約3週間育苗したメヒシバを用い、人工接種して病斑を形成させて行った。人工接種は2005年に鶴岡市高坂で発生したメヒシバ罹病葉から単孢子分離・保存していたメヒシバいもち病菌3菌株

(病 7-1, 病 8-1 および病 25-1) を用い, 常法により接種した.

穂枝は野外で病斑が形成されたものを採集し, 赤色のミシン糸を結んで目印を付け, プランターに充填した滅菌土壌に各処理ごとに 3 本ずつ固定した.

越冬処理は 2008 年から 2009 年にかけておこなった. また葉身については 2010 年から 2011 年にかけて, *Pot2* 遺伝子型により越冬能力が異なるかを検討するために追試験をおこなった.

#### 罹病組織を保存した場合の生存期間の調査

イネなどの栽培植物と同様, 種々の条件でメヒシバを冬季に保存した場合に本菌の生存がどの程度の期間可能かを検討した. 2012 年 9 月末に水田周辺からメヒシバの本病罹病葉を多数採集し, 雑誌に挟み込んで 5 日間保存し十分乾燥させた. 乾燥させた罹病葉を, ろ紙を湿らせたシャーレ内で湿室処理して組織が湿潤した状態と, 比較区として乾燥させたままの状態を設け, 保存を開始した. 保存の際の温度は, 5°C の低温および -30°C の極低温とした. 保存後, 定期的にサンプルを取り出し, 組織分離法 (70% エタノール 30 秒, 2% アンチホルミン 2 分間) によりいもち病菌の生存状況を確認した.

#### 越冬処理の方法

越冬処理は鶴岡市新形の山形大学農学部の試験地で実施し, 処理の種類は,  
1. 風雨あるいは積雪下に晒される屋外 (野外区), 2. 屋外であるが風雨, 積雪が及ばない屋根つきの土置場 (野外乾燥区), 3. 暖房設備の無いガラス室 (屋内区) の 3 種類とした. 試験は, すべて 3 反復とした.

#### 越冬の評価方法

本病保菌種子と罹病穂枝については翌年の 4 月下旬に回収し, 前者は保菌率

を、後者は湿室処理による孢子形成の有無および常法による組織分離により生存の有無を調査した。罹病葉の越冬処理は翌年の3月下旬まで約10日間隔で定期的にサンプリングし、組織分離法によりPSA培地上でいもち病菌の菌叢が生成されたものを生存と判定した。

#### 土壌におけるメヒシバいもち病菌の検出

本試験では、土壌表面あるいは土壌中のメヒシバいもち病菌を検出するため、まず土壌からの本菌の検出が可能かどうかを検討した。すなわち、本菌分生孢子を滅菌した育苗培土1gあたり、孢子濃度が $10^6 \sim 10^0$ 個となるように孢子懸濁液を人工的に添加した。土壌からは、Kageyama *et al.* (2003) に準じてDNAを抽出・精製し、土壌抽出DNAを鋳型としてメヒシバいもち病菌のITS領域内に設計したプライマーDSP (5'-GTTACAAACTCTTGTATA-3') と ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG C-3') を用いたPCRをおこない (Tsurushima *et al.*, 2005)、本菌の検出が可能かどうかを検討した。次に、2011年に上述の13地点より採取した土壌を供試して同様の方法でいもち病菌の検出を試みた。土壌の採集時期は越冬前の10月および越冬直後の4月下旬とした。また、土壌からのDNA抽出が生物由来の遺伝子を確実に抽出できているかを確認するため、rDNA-ITSを増幅する汎用プライマーITS5 と ITS26 (Godfrey *et al.*, 2003) を用い、PCRもおこなった。

## 2-2 結 果

### メヒシバ種子の保菌状況

越冬前の10月に採集した種子の保菌率は、鶴岡市新形では2007年は0.06%、2008年は0.09%、2009年は0.10%、2010年は0.11%であった(表Ⅲ-3)。定点調査13地点における種子の保菌率は、0%~0.31%と保菌が認められない地点もあり、平均で0.1%であった。一方、翌年の融雪後に採集した種子では、2009年と2010年の鶴岡市新形および2011年の定点調査地点の全てで種子の保菌が認められなかった。庄内地方と保菌率を比較するために宮城県大崎市で採集した種子の保菌率は、越冬前の11月では0.73%であったが、越冬後は庄内地方と同様に保菌種子は認められなかった(表Ⅲ-3)。また、越冬前の種子に見出された保菌種子34粒について発芽試験を行ったが、全ての種子が発芽しなかった。

### 越冬後種子の苗いもち発生率

2011年4月中旬に、前述の庄内地方13地点から採取した越冬後の種子を播種して発生した実生苗は、生育不良や枯死苗は認められたものの苗いもちと判定される苗は認められなかった(表Ⅲ-4)。一方、宮城県大崎市で越冬前の秋に採集し、低温乾燥下で保管していた保菌率0.72%の種子を播種して苗いもちの発病を調査した結果、20,201本の苗中1苗のみ、下葉にいもち病と思われる病斑が形成され、その上に分生胞子が認められた(データ省略)。

### メヒシバ分割株の発病と分離したいもち病菌遺伝子型の関係

本病に感染していた種子が越冬して翌年の第一次伝染源になるとすれば、その実生苗は自然発病前に分割して異なる地点に移動しても同一遺伝子型のいもち病菌が認められると考えられる。この仮説のもと、鶴岡市新形に発生したメ

ヒシバ実生苗を6月中旬までに採取して分割し、分割株の一方を庄内地方各地に移植して栽培した。その結果、2007年は分割した26組の株中、両分割株とも発病したのは7株(7地点)であった(表Ⅲ-5)。これらの発病株のうち酒田市浜中と三川町横山への移植株は親株と同一の遺伝子型がそれぞれ確認された。遺伝子型は前者がSy1, 7, 9, 11, 後者はSy35であった。一方、残る5株については、移植株と分割株との間でいもち病菌の遺伝子型は全く一致しなかった。2008年は鶴岡市新形での発生がほとんど認められず、唯一両株とともに発病が認められた鶴岡市五十川との組み合わせの株では、同一の遺伝子型(Sy20)の菌株が得られた(表Ⅲ-6)。2009年は移植株と親株の両方に発病を認めたのは8地点であった。これらの中で同一遺伝子型のいもち病菌が確認されたのは鶴岡市高坂と鶴岡市上の山の2地点で、前者はSy4、後者はSy19が共通遺伝子型であったが、6地点は全く異なる遺伝子型が確認された(表Ⅲ-7)。

庄内地方13地点から採取したメヒシバを分割して鶴岡市新形に移植した場合では、2007年は3地点からの移植株が両株とも発病した。発病株の*Pot2*遺伝子型を比較した結果、酒田市竹田から採取した株で分割株と同一の遺伝子型(Sy4)が認められ、残りの2地点のものは一致しなかった(表Ⅲ-8)。2008年は3地点の組み合わせで発病が認められた。その遺伝子型は、三川町横山からの移植株で同一の遺伝子型(Sy4)が認められたが、残りの2地点は株同士で異なっていた(表Ⅲ-9)。2009年も3地点の組み合わせで発病が認められた。発病株から得られたいもち病菌は、対応するすべての株同士で同一遺伝子型(鶴岡市高坂: Sy114, 三川町横山: Sy4, 115, 鶴岡市羽黒町荒川: Sy40)が認められた(表Ⅲ-10)。

#### 保菌種子および罹病組織での越冬調査

保菌率0.3%の越冬前採集種子を人為的に越冬させた結果、野外区では4,234

粒を調査したが保菌種子を全く確認できなかった。一方、屋内区では4,034粒中2粒の保菌種子が認められ保菌率は0.05%となった(表Ⅲ-11)。また、罹病穂枝は4月下旬に回収し、湿室処理によりいもち病菌の生存を確認したが、野外乾燥区、屋内区ともに病斑上に分生胞子は形成されず、組織分離でもいもち病菌を分離できなかった。屋外区については冬期の強風により穂枝が土壌とともに喪失し、回収ができなかった(表Ⅲ-11)。

メヒシバいもち病菌を人工接種した罹病株を越冬させた結果、野外区では供試した3菌株ともに、処理10日目から分離率が低下し、41日目以降は分離できなくなった(表Ⅲ-12)。野外乾燥区では処理51日目まで分離が可能であったが、62日目には低下し、82日目以降分離できなくなった。これに対して屋内区では103日目にメヒシバ葉身が腐食しはじめ、分離率が低下したが、134日目でも分離可能であった。一方、当地方に広く分布した異なる*Pot2*遺伝子型の菌株間で越冬能力を試験したが、生残能力に差は認められなかった(表Ⅲ-13)。

#### 人工的に低温保存したいもち病菌の生存状況

罹病葉を乾燥および湿潤状態で5℃あるいは-30℃で保存し、経時的に生存状況を確認した結果、乾燥状態で5℃の場合、保存開始1ヶ月目でも組織分離によりいもち病菌が分離でき、生存が確認された。また、-30℃条件では保存1週間目で1病斑のみ分離できたが、その後は分離できなくなった。一方、湿潤条件にした場合5℃では、1週間目には分離は可能であったものの、保存中にも肉眼で確認できる状態でいもち病菌以外の糸状菌が罹病葉を覆い始め、2週間目には表面殺菌をしたにも関わらず、他の糸状菌が罹病葉全体を覆うように発育し、いもち病菌の分離が不可能となった。-30℃では保存直後からいもち病菌の分離は不可能であった(表Ⅲ-14)。

### 土壤からのメヒシバいもち病菌の検出と野外での生存調査

乾土 1g を取り, 1g 当りに  $10^6 \sim 10^0$  個となるように分生胞子を接種して土壤から DNA を抽出し, PCR により検出を試みた結果, 分生胞子  $10^1$  個以上の濃度の懸濁液を混和した土壤からバンドが確認され, 検出可能であった. そこで調査 13 地点から土壤を採取し, DNA 抽出を行い PCR により検出を試みた結果, 越冬直後の 4 月下旬に採集した土壤からはバンドは検出されなかった(データ未掲載).



表Ⅲ-3 庄内地方における越冬前後のメヒシバ種子のいもち病保菌率

区分	採集地点	越冬前				越冬後			
		採種時期	供試種子数	保菌種子数	保菌率(%)	採種時期	供試種子数	保菌種子数	保菌率(%)
	鶴岡市新形	2007年10月	6431	4	0.06			NT	
		2008年10月	8932	8	0.09	2009年4月	10128	0	0
		2009年10月	5039	5	0.10	2010年4月	2004	0	0
		2010年10月	2657	3	0.11			NT	
沿岸部	鶴岡市五十川	2010年10月	998	0	0	2011年4月	903	0	0
	酒田市浜中	2010年10月	1032	0	0	2011年4月	854	0	0
	遊佐町菅里十里塚	2010年10月	1293	4	0.31	2011年4月	799	0	0
平野部	鶴岡市田川蓮華寺	2010年10月	1134	2	0.18	2011年4月	876	0	0
	鶴岡市高坂	2010年10月	1049	2	0.19	2011年4月	459	0	0
	三川町横山	2010年10月	1091	0	0	2011年4月	941	0	0
	酒田市本楯	2010年10月	1082	3	0.28	2011年4月	560	0	0
	酒田市寺田	2010年10月	1038	2	0.19	2011年4月	605	0	0
	酒田市竹田	2010年10月	980	2	0.20	2011年4月	985	0	0
中山間部	鶴岡市黒川上の山	2010年10月	895	0	0	2011年4月	913	0	0
	鶴岡市行沢	2010年10月	1009	1	0.10	2011年4月	768	0	0
	鶴岡市羽黒町荒川	2010年10月	938	0	0	2011年4月	670	0	0
	鶴岡市羽黒町川代	2010年10月	1123	1	0.09	2011年4月	569	0	0
平均					0.11				0
	宮城県大崎市 <sup>a)</sup>	2009年11月	4629	34	0.73	2010年4月	71029	0	0

a)比較のために太平洋側での調査を行った。

表Ⅲ-4 越冬後種子を播種した場合のいもち病発病苗率

採集地点	調査苗数	発病苗数	発病苗率(%)
浜中	402	0	0
五十川	392	0	0
蓮華寺	381	0	0
高坂	465	0	0
行沢	337	0	0
上の山	386	0	0
横山	344	0	0
本楯	446	0	0
十里塚	438	0	0
寺田	412	0	0
竹田	315	0	0
川代	382	0	0
荒川	372	0	0
庄内地方全域*	8946	0	0
宮城県大崎市	2175	0	0
合計	16193	0	0

\*) 庄内地方13地点（第1図）の種子を混ぜて播種した。  
また，種子の千粒重は927mgであった。

表Ⅲ-5 鶴岡市新形の実生苗を分割して移植した株から分離した菌株の*Pot2*遺伝子型 (2007年)

移植地点名		認められた遺伝子型	
		移植株 <sup>a)</sup>	親株 <sup>b)</sup>
沿岸部	浜中	Sy1,2,3,4,5,6,7,9,10,11	Sy1,7,9,11,13,25,35,43,46,47,48,49,55
	五十川	Sy16	Sy7,11,13,21,25,33,50
	十里塚	Sy40	Sy1,7,21,25
平野部	蓮華寺	- <sup>c)</sup>	Sy7,13,25,26,35,43,45
	高坂	-	Sy1,11,13,25,35,51
	横山	Sy35	Sy5,13,21,25,26,35,43,52
	本楯	Sy35	Sy11,25,53
	寺田	-	Sy1,5,13,21,25,35,41,54
	竹田	Sy4,21	Sy7,9,11,25
中山間部	上の山	Sy5,20,21,29,56	Sy2,11,25,35
	行沢	Sy1,5,9,57	-
	荒川	-	-
	川代	-	-

a)移植株は、鶴岡市新形の実生苗を親株として分割し、各地点に移植した分割株。

b)親株は、各地域に移植した株に対応する分割株。アンダーラインは分割株で共通の遺伝子型。

c)-は株にいもち病が発生しなかったことを示す。

表Ⅲ-6 鶴岡市新形の実生苗を分割して移植した株から分離した菌株の*Pot2*遺伝子型（2008年）

移植地点名	認められた遺伝子型		
	移植株 <sup>a)</sup>	親株 <sup>b)</sup>	
沿岸部	浜中	Sy4,34	- <sup>c)</sup>
	五十川	Sy4, <u>20</u> ,21	<u>Sy20</u>
	十里塚	-	-
平野部	蓮華寺	Sy4,20	-
	高坂	Sy48	-
	横山	-	-
	本楯	-	-
	寺田	Sy1,4,27	-
	竹田	-	-
中山間部	上の山	-	-
	行沢	-	-
	荒川	Sy4	-
	川代	Sy1,20,62	-

a)移植株は、鶴岡市新形の実生苗を親株として分割し、各地点に移植した分割株。

b)親株は、各地域に移植した株に対応する分割株。アンダーラインは分割株で共通の遺伝子型。

c)-は株にいもち病が発生しなかったことを示す。

表Ⅲ-7 鶴岡市新形の実生苗を分割して移植した株から分離した菌株の*Pot2*遺伝子型 (2009年)

移植地点名	認められた遺伝子型		
	移植株 <sup>a)</sup>	親株 <sup>b)</sup>	
沿岸部	浜中	. <sup>c)</sup>	Sy4,10,14,40,106,107,108
	五十川	Sy12,19,21	Sy21,99,111
	十里塚	-	-
平野部	蓮華寺	Sy4,21,29,89	-
	高坂	Sy4,7,92,112,113	Sy4,54
	横山	Sy1,4,12,16,62,104	Sy14
	本楯	-	Sy4
	寺田	Sy35,104	Sy3,92
	竹田	-	-
中山間部	上の山	Sy19,20,21,24	Sy19,91
	行沢	Sy11,14,115	Sy1
	荒川	Sy35	Sy40
	川代	Sy11,35,82	Sy21

a)移植株は、鶴岡市新形の実生苗を親株として分割し、各地点に移植した分割株。

b)親株は、各地域に移植した株に対応する分割株。アンダーラインは分割株で共通の遺伝子型。

c)-は株にいもち病が発生しなかったことを示す。

表 III-8 移植地点の実生苗を分割して移植した株から分離した菌株の*Pot2*遺伝子型 (2007年)

地点名	認められた遺伝子型		
	移植株 <sup>a)</sup>	親株 <sup>b)</sup>	
沿岸部	浜中	Sy13,25,47	Sy4,5,9,11
	五十川	c)	-
	十里塚	-	Sy5,34,35
平野部	蓮華寺	-	-
	高坂	-	-
	横山	-	Sy25,26
	本楯	-	Sy4,5
	寺田	-	-
	竹田	Sy4,13	Sy4,11,25
中山間部	上の山	Sy13,35,47	-
	行沢	-	-
	荒川	Sy13	-
	川代	Sy11,43	Sy4,16,35

a)移植株は、移植地点から採取した実生苗を親株として分割し、鶴岡市新形に移植した分割

b)親株は、各地域に移植した株に対応する分割株。アンダーラインは分割株で共通の遺伝子型。

c)-は株にいもち病が発生しなかったことを示す。

表 III-9 移植地点の実生苗を分割して移植した株から分離した菌株の *Pot2* 遺伝子型 (2008年)

地点名		認められた遺伝子型	
		移植株 <sup>a)</sup>	親株 <sup>b)</sup>
沿岸部	浜中	- <sup>c)</sup>	Sy1,2,4
	五十川	-	-
	十里塚	-	-
平野部	蓮華寺	Sy4,75	Sy20,64
	高坂	-	Sy4,35,48
	横山	Sy <u>4</u>	Sy <u>4</u>
	本楯	-	Sy4,66
	寺田	-	-
	竹田	-	-
	中山間部	上の山	-
	行沢	-	Sy1,25,68
	荒川	-	Sy4
	川代	Sy4	Sy1,20,62

a) 移植株は，移植地点から採取した実生苗を親株として分割し，鶴岡市新形に移植した分割

b) 親株は，各地域に移植した株に対応する分割株．アンダーラインは分割株で共通の遺伝子型．

c) は株にいもち病が発生しなかったことを示す．

表 III-10 移植地点産実生苗の分割移植株から分離した菌株の *Pot2* 遺伝子型 (2009年)

地点名		認められた遺伝子型	
		移植株 <sup>a)</sup>	親株 <sup>b)</sup>
沿岸部	浜中	Sy4,21,22,29,103,109,110,111	- <sup>c)</sup>
	五十川	Sy26	-
	十里塚	-	-
平野部	蓮華寺	Sy10,35,40,55,100	-
	高坂	Sy4,25,104, <u>114</u> ,115	Sy16,92,113, <u>114</u>
	横山	Sy4,29,62, <u>115</u>	Sy4,11,12,26,52, <u>115</u>
	本楯	Sy4,8,110	-
	寺田	-	-
	竹田	Sy4,16,99,113,114	-
中山間部	上の山	Sy4,10,14,21,99	-
	行沢	Sy1,4,104,110	-
	荒川	Sy4,35, <u>40</u> ,48	Sy21, <u>40</u>
	川代	-	Sy1,21,35

a) 移植株は、移植地点から採取した実生苗を親株として分割し、鶴岡市新形に移植した分割

b) 親株は、各地域に移植した株に対応する分割株。アンダーラインは分割株で共通の遺伝子型。

c) は株にいもち病が発生しなかったことを示す。



表Ⅲ-11 越冬処理後の保菌種子および罹病穂軸での生存状況

処理区	種子			穂軸	
	調査種子数	保菌種子数	保菌率	調査本数	生存本数
野外区	4234	0	0	NT	-
野外乾燥区	4034	2	0.05	9	0
屋内区	-	-	-	9	0

NTは強風により喪失したため調査ができなかった。

表Ⅲ-12 越冬処理後のメヒシバ葉身でのいもち病菌生存状況

調査月日 (処理後日数)	供試菌株名								
	病7-1			病8-1			病25-1		
	野外区	野外乾燥区	屋内区	野外区	野外乾燥区	屋内区	野外区	野外乾燥区	屋内区
2008/11/4(0)	+++ <sup>a)</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11/14(10) <sup>b)</sup>	+	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++
11/24(20)	+	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++
12/4(30)	-	++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
12/15(41)	+	+++	+++	-	+++	+++	-	++	+++
12/25(51)	-	+++	+++	-	++	++	-	++	+++
2009/1/5(62)	NT	++	+++	-	++	+++	-	+	+++
1/15(72) <sup>c)</sup>	NT	+++	+++	NT	++	++	NT	++	+++
1/25(82)	NT	++	+++	NT	-	+++	NT	+	+++
2/4(92)	NT	-	+++	NT	-	+++	NT	-	+++
2/15(103)	NT	-	+	NT	-	+	NT	-	+
2/26(114)	NT	-	++	NT	-	+	NT	-	+++
3/7(124)	NT	-	+	NT	-	+	NT	-	++
3/17(134)	NT	-	+	NT	-	++	NT	-	+++

a) 3病斑採集し，分離できたものを+，できなかったものを-，NTは植物体の枯死・喪失のため調査不可。

b) 11月10～12日に降雪あり。

c) 1月15日以降に降雪あり．吹雪のため野外乾燥区においても被雪した。

表Ⅲ-13 遺伝子型の異なるいもち病菌のメヒシバ葉身での生存状況

調査月日	野外区					野外乾燥区					屋内区				
	Sy1 <sup>a)</sup>	Sy4	Sy21	Sy35	Sy41	Sy1	Sy4	Sy21	Sy35	Sy41	Sy1	Sy4	Sy21	Sy35	Sy41
2010/11/10	+++ <sup>b)</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11/20	+	+	++	+	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11/27	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
12/6	+	+	+	++	+	+++	++	++	++	+	+++	++	+++	+++	++
12/13	+	+	+	+	+	++	++	++	-	++	+++	++	+++	++	+++
12/22	-	+	+	+	+	++	-	+	+	+	++	++	++	++	++
12/27	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+
2011/1/6	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	++	++	++	++	++
1/14	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	++	-	+	++	++
1/23	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	++	++	+	+
1/31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	++	++	++
2/7	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
2/14	NT	-	-	NT	-	-	-	-	NT	-	+	+	+	-	+
2/22	NT	-	-	NT	-	-	-	-	NT	-	-	+	-	+	+
3/1	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-	NT	-	NT	+	+	-	NT
3/8	NT	NT	NT	NT	-	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT

a) Sy1, Sy4, Sy21は年次, 地点, 発生時期を問わず庄内地方に広く分布する遺伝子型.

Sy35, Sy41は地域に固有の遺伝子型 (対照) .

b) 表Ⅲ-4と同様.

表Ⅲ-14 保存条件といもち病菌の生存状況

罹病葉の状態 <sup>1)</sup>	保存温度	保存期間（日数） <sup>2)</sup>				
		保存直前	直後（1日）	1週間（7日）	2週間（15日）	1ヶ月（34日）
湿潤	5℃	+++	+++	+++	---	---
	-30℃	+++	---	---	---	---
乾燥	5℃	+++	+++	+++	++	+++
	-30℃	+++	++	++	---	---

- 1) 罹病葉をいったん十分に乾燥後，湿潤のものは湿室処理を行ってから保存を開始した。
- 2) 処理区当たり3病斑を供試し，分離できた場合を+，できなかった場合を-とした。

## 2-3 考 察

本項ではメヒシバいもち病の第一次伝染源を明らかにすることを目的に検討をおこなった。まず、種子が第一次伝染源になる可能性については、本病が激発した鶴岡市新形のは場から秋に採集した越冬前のメヒシバ種子の保菌率を調査した。その結果、2007年から2010年の4年間で、平均0.1%であった。この保菌率が普遍的であるかを確認するために庄内地方各地で種子を採集したが、保菌種子が確認された地点において保菌率は0.1~0.3%の範囲であった。この保菌率は、イネ種子のいもち病保菌率と比べると低く（早坂，2000；内藤ら，2002）、種子への自然感染は激発地点であるにもかかわらず低率であることが明らかとなった。保菌が認められた種子を発芽試験に供したが発芽は認められなかった。他方、野外においてメヒシバの穂いもち発生を観察した結果、メヒシバではイネのような穂首のいもちは認められなかった。稀に認められる穂枝の病斑周囲の種子が2~3粒保菌していることが確認できたことから、その種子を播種したが発芽しなかった。このことから、保菌種子は発芽能力を失っている可能性が考えられた。

一方、融雪後に採集した2009、2010および2011年の種子では、保菌種子が全く検出できなかった。保菌率0.3%の種子を人為的に越冬処理したところ、野外区では保菌種子が認められず菌が死滅したと考えられた。しかし、乾燥が維持される条件では種子の保菌が維持されていた。このことは、越冬前はわずかに保菌種子が存在していても、積雪下で経過するうちに腐敗枯死する可能性が高いことを示している。

越冬後の種子を回収、播種した結果、実生苗の発病は認められなかった。一方越冬前に採集した種子を低温乾燥下で保管し、播種した場合には1苗のみ苗いもちが認められた。このことは、保菌種子が野外において乾燥下で経過するような条件ではごく稀に種子伝染することを示している。

また、いもち病の初発前に自然発生してきたメヒシバ実生苗を2つに分割して、それぞれ離れた別の地点で育苗したところ、3年間で計78株のうち10株は分割株と移植株の間で同一の遺伝子型が認められた。この中には、例えば2009年の鶴岡市高坂の親株と鶴岡市新形に移植した株で認められた Sy114 および三川町横山の親株と鶴岡市新形の移植株で認められた Sy115 については、各地点においてのみ認められた特徴的な遺伝子型であった。このような結果は、自然条件下ではまだ感染しない6月の実生苗がすでに同一遺伝子型の菌によって感染していたことを意味すると考えられる。つまり、これらの10株は越冬後から初発前の間に菌が飛散して感染していた可能性と、それよりも前に保菌した種子が越冬できた可能性の両者があると示唆された。

種子伝染が明確に示されているシコクビエでは6月頃から苗いもちが自然発生し（大畑，1974），保菌種子を播種することにより苗いもちが発生することが報告されている（加藤ら，1977）。ホソムギ（田中，2007）やネズミムギ（杉山，1997；西見ら，2009）において苗いもちによる甚大な被害が報告されているが、これらの報告では、保存された種子を播種している。また、エノコログサ類の種子に感染したいもち病菌は佐賀県内の野外では越冬できる可能性が示されている（山頭ら，2008）。このように、保菌種子が第一次伝染源となるのは種子が保存された場合や積雪がほとんどない地域の事例である。本研究によりメヒシバでも乾燥した環境で冬季保存した種子の中には苗いもちの発病が確認されたものの、積雪下で越冬後の野外から採集した種子では発病が認められなかった。加えて、庄内地方の沿岸部、平野部、中山間部での調査結果から当地方ではメヒシバ種子での越冬は確認できなかった。これらから、庄内地方のような冬期積雪地で本菌が種子で越冬することは難しいと考えられる。ただし、実生苗の分割試験の結果や、乾燥した条件での越冬試験の結果から、種子による越冬の可能性を完全には否定できないと考えられる。

次に、罹病植物体を人為的に越冬させていもち病菌が生存できるかを検討した。その結果、穂枝、葉身ともにいもち病菌の越冬は確認できなかった。特に葉身では野外区では処理後 10 日目から分離率が低下し 1 ヶ月で分離ができなくなった。これは罹病植物体が降雪にあった時期と一致することから、降雪により植物体が濡れ状態になったことに加え低温状態が病原菌の活性を急速に低下させ、死滅に至ったと考えられる。また、ほとんど降雪にさらされない屋根のある場所で越冬させても、2 ヶ月～3 ヶ月で分離ができなくなった。このことは、メヒシバいもち病菌もイネいもち病菌と同様に降雪地で罹病植物体での越冬が不可能であることを示しており、菌株による越冬能力の差異も認められなかった。実験室でより明確な条件設定の下で確認した結果、乾燥状態で 5℃ の場合はいもち病菌の生存が確認できたが、湿潤状態では速やかにその他の糸状菌が罹病組織を蔓延し、いもち病菌の分離が不可能となった。さらにより低い温度では乾燥状態でも短期間のうちに分離が不可能となった。これらのことは、メヒシバいもち病菌もイネいもち病菌と同様に降雪地では罹病植物体での越冬は不可能であることを示している。土壌における本菌の生存を調査した結果、降雪前の 10 月および融雪後の 4 月に採集した土壌からの検出はできなかった。本菌を人工的に土壌に接種した場合、乾土 1g あたり 10 個の分生胞子が存在するレベルまで検出可能であったことから、庄内地方では少なくとも越冬後の土壌中に存在するいもち病菌は分生胞子 10 個/乾土 1g 未満であることが明らかとなった。

以上の結果から、庄内地方におけるメヒシバいもち病菌の第一次伝染源として、罹病組織や土壌、種子での明確な生存が確認できなかった。種子伝染については、分割試験などの結果から種子が第一次伝染源となり得る可能性も残されるものの、当地方における本病の発生様相から種子を第一次伝染源の主要なものとするにはその保菌率が予想以上に少ない。越冬以外の伝染経路が存在し

ていることも考慮する必要があると思われる。



### 3. メヒシバいもち病菌の長距離飛散の可能性

前項までに、庄内地方に分布するメヒシバいもち病菌は非常に多様な集団であること、本菌の越冬は罹病組織ではほとんどないが、種子の可能性は残されていることを論じた。一方、複数の地点で同一の遺伝子型が同時期に検出されることが明らかになり、周辺からの胞子の飛散により発病している可能性も考えられた。

本項では冬期積雪地帯である庄内地方におけるメヒシバいもち病の初発前の発病要因を検討し、初発の原因となるいもち病菌が周辺地域にも存在し、胞子の飛散よるものと想定し、初発時期の庄内地方周辺地域分布しているいもち病菌の遺伝子型を調査した。

#### 3-1 材料および方法

##### 罹病株の設置による初発生期以前の野外感染・発病試験

庄内地方で7月以前に本病が発生しない他の理由として、野外の気象条件が発病に十分でない可能性がある。そこで、種子消毒したメヒシバの種子を播種して育苗し、研究室内で保存していた菌株を人工的に接種して作製した罹病株を野外の実生メヒシバ群落内に移植し、周辺の健全メヒシバに伝染するか否かを検討した。罹病株は、2本植え1株としてシードリングケースに8株移植し、5～6葉期まで育苗したメヒシバに、前述の幼苗の感受性試験と同様のメヒシバいもち病菌株の胞子懸濁液を噴霧接種して作成した。作成した罹病株を本研究室の実験圃場で発生したメヒシバ群落に、6月上、中、下旬にそれぞれシードリングケースから取り出して直接移植し、周辺の健全メヒシバへの発病を観察した。

### 初発時期の孢子飛散量の推定といもち病感染に寄与する湿潤時間の検討

野外での初発にいもち病菌孢子の飛散が関与する場合、どの程度の孢子飛散によって病斑が形成されるのかを推定するため、人為的に孢子濃度を調整した懸濁液を噴霧接種により検討した。またいもち病菌の感染には一定時間以上の湿潤が必要であるため、野外において主因が存在している場合に温度一定の下でどの程度の湿潤時間で感染が成立するかを検討した。上述のように種子消毒し、シードリングケース当たり 6 株移植し 5~6 葉期まで栽培したメヒシバに、病 7-1, 病 8-1 および病 25-1 を供試菌株として、それぞれ孢子濃度を  $1 \times 10^4$  個/ml に調整した懸濁液を、10 倍, 100 倍, 1000 倍 ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  個/ml) に希釈して孢子濃度を確認し、それぞれ接種した。ただちに飽和湿度、 $25^\circ\text{C}$  の接種箱に入れ 24 時間保持し、その後人工気象室で発病するまで栽培した。発病後病斑数を計数した。

感染が成立する湿潤時間の検討は、同様に栽培したメヒシバに  $1 \times 10^4$  個/ml の孢子濃度で噴霧接種し、 $25^\circ\text{C}$ 、飽和湿度の接種箱に入れた後、3 時間、6 時間、9 時間、12 時間および 24 時間毎に接種箱から出して、人工気象室で発病するまで栽培し、病斑数を計数した。

病斑数は以下に示した指数で評価した。

- 0 . . . . 病斑の形成が認められない
- 1 . . . . 株当たりの病斑数が 1~5 個
- 2 . . . . 株当たりの病斑数が 6~10 個
- 3 . . . . 株当たりの病斑数が 11~20 個
- 4 . . . . 株当たりの病斑数が 21 個以上
- 5 . . . . 病斑同士が融合し計数不能あるいは半数以上の葉が枯死

### 初発生に関わるいもち病菌の孢子飛散時期

庄内地方における野外での本病初発生に関与するいもち病菌の孢子飛散時期を明らかにするため、メヒシバをトラップとして用いた暴露試験を行った。前述と同様に播種したメヒシバをガラス室内で5葉期まで育苗し、上述の13地点（図Ⅲ-1）に6月上旬から7日ごとに設置した。トラップ苗を3日間設置後に回収し、ただちに接種箱（25℃、湿度100%）に24時間静置してからガラス室に移した。葉身に病斑が形成された場合、そのトラップ苗の設置期間を孢子の飛散時期とした。同時にトラップ苗にマーク棒を立て、そこを中心に直径1mの範囲内に自然発生したメヒシバの葉身に病斑が形成されるのを観察し、形成された場合はその地点の初発日とした。同時にトラップ苗と野外の実生苗の罹病葉を採集してその後の試験に用いた。なお、トラップ苗と自然発生したメヒシバに形成された罹病葉は10枚を目標に採集し、1病斑当たり1単孢子分離して得た菌株の*Pot2*遺伝子型を比較した。試験は2010年と2011年に実施した。

### 庄内地方周辺地域と周辺県のメヒシバいもち病菌初発生期の*Pot2*遺伝子型

庄内地方のメヒシバいもち病の初発生期に合わせて国道7号、113号、287号、347号、13号、108号に沿って約15kmごとに庄内地方を取り囲む地域、すなわち新潟県下越地方、山形県置賜地方、山形県村山地方、山形県最上地方、秋田県由利地方の各地点（図Ⅲ-5）で道路沿いに自生する実生メヒシバを観察して本病罹病葉を採集し、単孢子分離して*Pot2*遺伝子型を調べた。一方、山形県外の地方については、青森、岩手、宮城、福島、茨城、群馬、長野、新潟等に在住する知人に、メヒシバの葉身に発生した病斑の採集、送付を7月に依頼し、送付された葉身上の病斑から1病斑当たり1胞子を単孢子分離して得た菌株を解析に用いた。試験は2010年、2011年の2年間行った。

### 3-2 結 果

#### 初発生期以前の野外におけるメヒシバの感染・発病

人工接種により作成した本病罹病株を、野外での本病初発生期以前の6月に時期を違えてメヒシバ群落に移植した結果、6月上旬の6月8日に移植したSy162菌株の場合では、周辺メヒシバへの発病は認められなかった。しかし、6月中旬および下旬の6月15日、6月22日に設置したSy163およびSy164菌株の場合は、それぞれ6月27日と6月30日に周辺メヒシバに発病が確認された。形成されたこれらの病斑からいもち病菌を単孢子分離し、接種した菌株と遺伝子型を比較した結果、両者の病斑からのいもち病菌の*Pot2*遺伝子型は同一であったことから、接種菌株の感染によるものと確認された(表III-15)。なお、その後も引き続き発病調査を継続した結果、試験地における健全メヒシバの初発日は7月18日で、罹病葉からは移植したメヒシバの接種菌株と異なる遺伝子型の菌が確認された。

#### 初発時期の孢子飛散濃度の推定と感染成立に必要な湿潤時間

異なる孢子濃度の懸濁液をメヒシバに噴霧接種した結果、メヒシバの発病は最低濃度とした $1 \times 10^1$ 個/mlでも病斑が形成され、その発病程度は0.7~1.5(病斑数で10個以内)であった(表III-16)。 $1 \times 10^2$ 個/mlは $1 \times 10^1$ 個/mlと同程度で、 $1 \times 10^3$ 個/ml以降は濃度が高いほど発病程度が高くなった。

感染成立に必要な湿潤時間は、菌株によって3~6時間でも病斑が形成されたが、多くは9時間以降であった(表III-17)。

#### 庄内地方における初発時期と初発生に関わるいもち病菌

庄内地方各地に設置したトラップ苗にいもち病菌が補足されたのは、2010年は1地点で6月28日~7月1日、その他の地点は7月2~5日であった。2011

年では3地点で7月6～9日,6地点で7月9～13日,3地点で7月10～14日,1地点で7月15～18日に設置したトラップで発病が認められた。一方,トラップの設置地点において病斑を確認した自然発生日は,両年ともトラップ苗がいもち病菌胞子を補足した期間の最終日であった(表Ⅲ-18)。次に,自然発生メヒシバの初発罹病葉から分離した菌株とトラップ苗から分離したいもち病菌の *Pot2* 遺伝子型を比較した結果,同一地点の実生メヒシバとトラップメヒシバの両者に同一の遺伝子型の菌株が必ず含まれ,この傾向は2年間で共通した(表Ⅲ-19)。地点間では異なった遺伝子型が分布する例がほとんどであった。

#### 庄内地方周辺地域のいもち病初発期の分離菌の遺伝子型

庄内地方を取り囲むように位置する地域の,メヒシバいもち病の初発期に分布した遺伝子型を調査した結果,庄内地方の周辺の各地点から採集されたいもち病菌の *Pot2* 遺伝子型には,同年に庄内地方の各地点における初発時に採集されたいもち病菌と同一の遺伝子型の菌が一部確認された。さらに,同年の庄内地方の発生中期,発生後期に分布したいもち病菌の遺伝子型も認められた(表Ⅲ-20)。

#### 山形県周辺県のいもち病菌初発期の分離菌の遺伝子型

山形県の周辺県の本病初発期に検出されたメヒシバいもち病菌の遺伝子型は,その県独自の遺伝子型の菌が分離される例も多かったが,庄内地方で同年の初発期に分離されたものと同じの遺伝子型の菌が検出された例も数多く認められた(表Ⅲ-21)。



図Ⅲ-4 サンプリングを行った庄内地方周辺地域  
山形県庄内地方を灰色で示した。

表Ⅲ-15 罹病株設置による周辺株での発病月日

供試菌株（遺伝子型）	罹病株の設置月日	周辺株の発病確認月日
Sy162	6月8日	-
Sy163	6月15日	6月27日
Sy164	6月22日	6月30日

試験圃場での初発確認日は7月18日であり、供試菌株とは異なる遺伝子型のいもち病菌が分離された。

表Ⅲ-16 接種濃度の違いによるメヒシバいもち  
病の発病程度

接種菌株	孢子濃度			
	10 <sup>1</sup> 個/ml	10 <sup>2</sup> 個/ml	10 <sup>3</sup> 個/ml	10 <sup>4</sup> 個/ml
病7-1	1.5(0.3)	1.0(0.4)	2.7(0.6)	4.0(0)
病8-1	0.7(0.2)	0.5(0.2)	1.3(0.4)	4.0(0)
病25-1	1.2(0.3)	1.5(0.2)	2.5(0.5)	4.0(0)

注1) 数字は6株の発病指数の平均値. カッコ内は標準誤差.

注2) 25℃, 飽和湿度で24時間保持した.

注3) 発病指数は以下のとおり.

0: 病斑の形成が認められない.

1: 株当たり病斑数が1~5個. 2: 同6~10個.

3: 同11~20個. 4: 同21個以上.

5: 病斑同士が融合し, 計数不能あるいは半数以上の葉が枯死.



表Ⅲ-17 湿潤時間の違いによるメヒシバいもち病の発病程度

接種菌株	湿潤時間					
	0hr	3hr	6hr	9hr	12hr	24hr
病7-1	0.0(0)	0.0(0)	0.7(0.3)	4.8(0.2)	5.0(0)	5.0(0)
病8-1	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	5.0(0)	5.0(0)	5.0(0)
病25-1	0.0(0)	0.2(0.2)	0.2(0.2)	3.5(0.2)	4.8(0.2)	4.2(0.2)

注1) 数字は6株の発病指数の平均値. カッコ内は標準誤差.

注2) 接種源の孢子濃度は $1 \times 10^5$ 個/mlに調整.

注3) 発病指数は第3表と同様.

表Ⅲ-18 庄内地方各地におけるメヒシバいもち病の初発生とトラップ苗上での初発月日

地点名	2010年の発病月日		2011年の発病月日	
	トラップ苗	自然発生	トラップ苗	自然発生
浜中	7/2～7/5	7/5	7/6～7/9	7/13
五十川	7/2～7/5	7/5	7/9～7/13	7/13
蓮華寺	7/2～7/5	7/5	7/6～7/9	7/13
高坂	6/28～7/1	7/1	7/6～7/9	7/13
行沢	7/2～7/5	7/5	7/10～7/14	7/14
上の山	7/2～7/5	7/5	7/10～7/14	7/14
横山	7/2～7/5	7/5	7/9～7/13	7/13
本楯	7/2～7/5	7/8	7/9～7/13	7/13
十里塚	7/2～7/5	7/5	7/9～7/13	7/13
寺田	7/2～7/5	7/5	7/9～7/13	7/13
竹田	7/2～7/5	7/5	7/9～7/13	7/13
荒川	7/2～7/5	7/5	7/15～7/18	7/14
川代	7/2～7/5	7/5	7/10～7/14	7/14

注) トラップ苗は回収後、接種箱に24時間静置し、その後の発病を確認。

表Ⅲ-19 自然発病メヒシバとトラップ苗上の初発生いもち病菌の系統

地点名	2010年		2011年	
	トラップ苗	自然発生メヒシバ	トラップ苗	自然発生メヒシバ
浜中	<u>110</u> (3), <u>140</u> (7)	110(2),140(4)	<u>4</u> (4), <u>21</u> (5)	4(3),21(4),31
五十川	<u>21</u> (3), <u>29</u> (6)	21(5)	<u>4</u> , <u>38</u> (2)	5(5),38(4)
蓮華寺	<u>16</u> (8)	16(9),28	<u>21</u> (10)	21,67
高坂	<u>23</u> (4), <u>143</u> (6)	23,141,142(3),143(5)	<u>21</u> (6), <u>45</u> (4)	21(6),45(4)
行沢	<u>19</u> (4)	19(7),28,45,29	<u>115</u> (4)	115(8)
上の山	4(3), <u>21</u> (4)	21	4(6), <u>35</u> (4)	5(2),35(2)
横山	<u>21</u> (2), <u>149</u> (2)	9,21,121,149	<u>4</u> (7), <u>95</u> (3)	4(4),26(3),95
本楯	<u>86</u> , <u>144</u> (4)	86(5),110,144,145	21(2), <u>45</u> (8)	4(4),45(6)
十里塚	<u>9</u> (3), <u>108</u> (2)	4,9,108(8)	<u>16</u> (7), <u>21</u> (3)	16(4),21(5),130
寺田	<u>1</u> , <u>4</u> (3)	1(3),4,11	<u>1</u> (3), <u>16</u> (2)	1,16
竹田	<u>86</u>	86	<u>4</u> (7),41	4(4),16,21(4)
荒川	<u>21</u> (2)	21,29,37	<u>4</u> (5), <u>35</u>	4(2),11,21(3),35
川代	<u>4</u> (4)	4(3),66	<u>1</u> (3), <u>4</u> (5), <u>21</u> (2)	1(4),4(3),21,28(2)

注1) ( ) 内は分離された菌株数.

注2) 下線は自然発生苗に発生した系統と同一の遺伝子型.

表Ⅲ-20 庄内地方周辺地域のメヒシバいもち病初発時期に採集されたいもち病菌の遺伝子型

採集地点	2010				2011				
	検出された 遺伝子型数	庄内地方の各時期と共通の遺伝子型数			検出された 遺伝子型数	庄内地方の各時期と共通の遺伝子型数			
		発生初期	発生中期	発生後期		発生初期	発生中期	発生後期	
新潟県	村上市塩野町	4	1	0	0	5	2	0	0
	北中前	4	1	2	0	5	2	0	0
	岩船町	2	1	0	0	3	0	0	1
	平林	5	2	1	0	4	3	0	0
山形県	鶴岡市鼠ヶ関	5	3	0	0	5	1	0	2
	小国町手ノ子	4	2	0	1	4	0	0	0
	白鷹町	5	1	1	1	3	1	1	0
	朝日町上郷	3	0	0	1	3	1	1	0
	和合平	1	1	0	0	3	2	0	1
	松原	3	1	0	0	3	1	0	0
	大江町海味	6	0	1	2	2	1	0	0
	鮭川村川口	1	1	0	0	3	0	2	0
金山町上台	3	1	0	0	3	2	0	0	
秋田県	由利本荘市矢島町	1	0	0	0	4	2	1	0
	にかほ市	2	0	0	1	1	0	0	0
	合計	33	7	4	4	31	6	4	3

表Ⅲ-21 山形県以外で検出されたのメヒシバいもち病菌遺伝子型

採集県	2010			2011		
	調査菌株数	検出された 遺伝子型数	庄内地方と共通 の遺伝子型数	調査菌株数	検出された 遺伝子型数	庄内地方と共通 の遺伝子型数
青森県	11	3	2	7	3	0
岩手県	29	12	2	19	6	3
秋田県	-	-	-	10	3	1
宮城県	33	13	5	9	3	2
福島県	19	11	3	10	4	2
茨城県	16	11	3	-	-	-
群馬県	3	3	3	6	3	2
長野県	9	5	1	10	4	1
新潟県	7	6	4	-	-	-

### 3-3 考 察

本項では、庄内地方での初発伝染源が種子以外にどこに存在しているのかを明らかにするため、まず、7月以前に本病の発生がほとんど認められない要因についてを検討した。病害の発生には主因、素因、誘因が揃うことが条件である。素因であるメヒシバは5月下旬から発生し始める。病害に対する感受性は宿主植物の生育ステージにより異なり、例えばイネでは葉齢が若いほどイネいもち病に対する感受性が高まることが知られている（鈴木・藤田，1985）。本病が7月以前に発生しない理由としてメヒシバの幼苗が本病に対し抵抗的である可能性が考えられるが、本病が全般的に発生している時期（8月）のメヒシバ幼苗は普通に激発していることが認められ、幼苗が抵抗的であることは考えにくい。このことから、庄内地方では7月までに誘因である感染に好適な気象条件が成立していない可能性が考えられた。これを検証するため幼苗トラップを野外に暴露することで、6月にいもち病菌が存在するかを検討した。その結果、メヒシバいもち病菌の孢子飛散は庄内地方全域でほぼ一致し、早い年でも6月下旬～7月上旬であった。それ以前の飛散孢子はトラップに捕捉されなかった。これは、6月中旬以前にはいもち病菌がメヒシバに感染し、発病させるだけの孢子濃度で飛散していないことを示唆している。発病に必要な条件を孢子濃度と葉面結露時間から検討した結果、必要な孢子濃度は今回の結果では10個/mlであり、イネいもち病の感染に可能な孢子濃度（吉野，1975）よりも低い濃度であった。葉面結露時間は少なくとも3～6時間必要であり、葉面の結露時間（加藤，1987）についてはイネいもち病と同程度であった。このことから、メヒシバはイネよりも感染しやすいものと考えられた。孢子濃度がより低い濃度でも感染可能な理由としては、葉が柔らかいことやメヒシバいもち病菌の感染に寄与しているピリカラシンHの産生（Tsurushima *et al.*,2005）と関係していると思われる。またメヒシバは葉が地面と平行に近い状態で抽出しており、結露や降雨後の葉

上の水滴がイネよりも長時間維持される可能性もある。次に、人工的に作成した本病罹病株を6月中に野外の実生メヒシバ群落に移植して周辺のメヒシバに本病が感染・発病するかを検討した。その結果、6月初旬の移植では本病が発生しなかったが、6月中旬以降の移植では健全メヒシバに本病が感染・発病し、再分離菌は接種菌と同一の遺伝子型であることを確認した。以上のことから、庄内地方では6月中旬には病斑上に分生胞子を形成し、周辺のメヒシバへ感染する十分な気象条件が成立していると考えられ、6月に発生が認められない理由は感染に可能な密度で主因が存在しない、すなわち感染可能な濃度の胞子の飛散が認められないためと考えられた。そして、初発に寄与する胞子飛散は庄内地方で一斉に起こると考えられた。

前項の発生動態調査から、庄内地方の本病菌は初発生から多様な集団で構成されていた。このことから、イネいもち病のように同一株の下位葉から上位葉へ順次移行し、穂いもちに至るとされている一般的な伝染過程（大畑，1989）に加え、メヒシバいもち病では越冬地点以外から飛散してくる分生胞子が初発生に寄与している可能性が考えられた。そこで、調査範囲を庄内地方から比較的近隣の地域に拡大し、初発生の時期に合わせて罹病メヒシバを採集し分離菌株の遺伝子型を解析した。その結果採集された菌株の遺伝子型には同年の庄内地方の初発生の集団に存在した遺伝子型の他、発生中期や発生後期に分布した遺伝子型が共通して検出された。さらに山形県を取り囲むように東北太平洋側、関東などを中心とした地域の本病初発生期の分布菌を集めて検討した結果、多くが各県ごとに特徴的な遺伝子型が検出されたが、庄内地方で採集されたものと同じ遺伝子型も検出された地点がいくつか認められた。

以上の結果を総合的に判断すると、庄内地方のメヒシバに発生するいもち病は、種子越冬による初発もごくわずかに存在するが、それだけではなく発生地点以外から胞子が飛散することによっても起こりうると考えられた。この場合、

初発が庄内地方で一斉に起こることを考慮すると胞子が一斉に飛散すると考えられる。その胞子濃度がイネいもち病菌よりも低い濃度でも感染可能であることから、より遠方から飛散してきた胞子でも感染・発病する可能性がある。その後の伝染発病も同一株の下位葉の病斑に形成された胞子による感染だけではなく、外部から飛散する胞子に感染して発生していることが推測される。そして、冬季には積雪下にさらされて多くが越冬できずに死滅するため、翌年にはまた、越冬個体の他に外部から飛び込むいもち病菌により発生が起こるというパターンを繰り返しているため、初発から発生盛期にかけて検出される遺伝子型が多様性に富むと考えられた。



## IV 東北地方南部で認められたイネ科雑草いもち病について

### 1. 東北地方南部に自生するイネ科植物から分離したいもち病菌の特徴

#### 1-1 緒言

イネいもち病菌を人工接種するとイネ科植物の 39 属 77 種に感染可能だが、いもち病の自然発生したイネ科植物から分離したいもち病菌がイネに病原性を示すものはイネを除き 31 種であると報告されている（八重樫，1987）。イネ以外のイネ科植物いもち病の発生事例から八重樫（1987）は、イネいもち病の伝染源となりうる植物としてタケ・ササ類，エゾノサヤヌカグサ，ネズミムギ，ホソムギ，オオムギ，クサヨシ，オニウシノケグサ，ハトムギなどを挙げている。

いもち病菌の学名について Kato *et al.* (2000) は、病原性，RFLP による DNA 解析，交配稔性から栽培植物のいもち病菌をメヒシバいもち病菌と別種とし，*Pyricularia oryzae* とすることを主張した。その後，Couch and Kohn (2002) は GCPSR (Taylor *et al.*, 2000) の種識別法によりイネいもち病菌を含む栽培植物のいもち病菌を *Magnaporthe grisea* (不完全世代 *P. grisea*) から分離し，新たに *M. oryzae* (不完全世代 *P. oryzae*) とすることを提案した。Hirata *et al.* (2007) もこれを支持する結果を得ている。一方，国内では栽培植物以外のイネ科植物いもち病が多数報告されているが（八重樫，1987），発生が稀でその特徴はほとんど検討されていないことからその病原菌の多くは *Pyricularia sp.* とされており，エノコログサ類 (Yamagashira *et al.*, 2008) を除き栽培植物いもち病菌との遺伝的類縁関係が検討されていない。そこで，宮城県および山形県で採集したイネ科植物いもち病菌について，病原性，毒素生産性および遺伝子解析によって類縁関係を検討し，イネいもち病の伝染源となり得るかを検討した。

## 1-2 材料および方法

### 供試菌株

分離したイネ科植物はネズミムギ (*Lolium multiflorum* Lam.), ナルコビエ (*Erichloa villosa* Kunth), コブナグサ (*Arthraxon hispidus* Makino), ヌカキビ (*Panicum biscalatum* Thunb.), エノコログサ (*Setaria viridis* Beauv.), チカラシバ (*Pennisetum alopecuroides* Spreng.), マコモ (*Zizania latifolia* Turcz.) であり, 比較としてイネ (*Oryza sativa* L.: 品種: はえぬき), メヒシバ (*Digitaria ciliaris* Koeler) からの分離菌株を供試した. 我が国ではこれらのうち, ナルコビエ (西門, 1926), ヌカキビ (中山・西原, 1975), マコモ (後藤ら, 1954) はいもち病の発生報告があり, コブナグサ, チカラシバは未報告である. これらは 2006 年から 2008 年に, 葉身に認められたいもち病斑を採集し, 湿室処理により病斑上に分生胞子を形成させ, 釣菌法により単孢子分離した. 以下, 菌株名を「ネズミムギ分離菌」のように「分離宿主名+分離菌」とした.

### 分生胞子のサイズ計測

供試菌株をオートミール培地 (オートミール粉末 50g, ショ糖 5g/l) に移植し, 14 日間培養後, 培地表面の気中菌糸を絵筆でかきとって蛍光灯照射下, 25℃で培養して形成された分生胞子を 1 菌株あたり 50 個計測した.

### 病原性試験

Yamada *et al.* (1976) のレース判別 9 品種に Kiyosawa (1981) の 3 品種を加えたイネ 12 品種を供試した. 砂壤土を充填したシードリングケース (15×5×10cm) に, チウラム・ベノミル水和剤の 400 倍液で 24 時間消毒した種子を播種・育苗し, 約 2 週間後の苗を用いた. 上述の方法で形成させた分生胞子を

10<sup>5</sup> 個/ml に調整して噴霧接種した。メヒシバはイネと同様に種子消毒して育苗したものに分離菌株を噴霧接種した。

各菌株の分離宿主に対する病原性については、ネズミムギ（市販のイタリアンライグラス品種，ワセアオバを用いた），エノコログサおよびナルコビエはイネと同様に種子消毒してから，砂壤土あるいは市販培土を充填したシードリングケース（15×5×10cm）に 3～6 粒播種して育苗した。栽培期間は 2～3 週間とした。また，チカラシバ，ヌカキビおよびコブナグサは野外から掘り取った株の地上部を一度切除して新たに発生した分げつを切り出し，再度移植したものを 2～3 週間養成して用いた。各分離株を上述と同じく 10<sup>5</sup> 個/ml に調整して噴霧接種した。

各植物は接種後，25℃，飽和湿度の接種箱内に 24 時間静置し，その後温室内に移動して 2 週間栽培し，発病の有無を確認した。

#### 毒素生産性の調査

Nukina（1999）の方法に準じていもち病菌の毒素成分を調査した。供試菌株の培養は 500ml 容振とうフラスコに醤油－砂糖培地（醤油 50ml，砂糖 50g，消泡剤少々／水 1l）を 100ml 分注し，供試菌株を移植し，約 120 ストロークで 10 日間振とう培養した。

2 号濾紙を装着したポリサルホンホルダーで培養液を吸引濾過し，ろ液を 300ml 容分液ロートへ移して酢酸エチルを約 90ml 加えてよく攪拌して抽出した。酢酸エチル層に飽和食塩水を約等量加え攪拌して脱水し，再び，酢酸エチル層を 200ml 容三角フラスコへ移し，硫酸マグネシウムを薬匙一杯加えて完全に脱水した。これを 300ml 容ナス型フラスコへ移し，ロータリーエバポレーターを用いて毒素を濃縮しサンプル瓶に乾固，保存した。濃縮したサンプルを少量の酢酸エチルで溶解し，シリカ薄層（No.5554 Silica gel 60F<sub>254</sub>；MERCK 社

製) にキャピラリーを用いて塗布し、メタノール:クロロホルム=10:1 で展開した。展開後、254nm および 365nm の紫外線を照射してスポットを検討し、その後バニリン硫酸を噴霧して 120°C で焼き、発色させて特徴を観察した。

### 遺伝子解析

遺伝的類縁関係を明らかにするため、供試菌株の DNA を抽出し、 $\beta$ -チューブリン遺伝子の PCR-RFLP (Couch and Kohn, 2002) および rDNA-ITS 領域の塩基配列を解析した。また、採集地点にはメヒシバいもち病が発生していたことから、*Digitaria* 属に感染するいもち病菌に特異的なプライマーを用いた PCR (Tsurushima *et al.*, 2005) も解析に加えた。

上述の通り供試菌株から DNA を抽出後、 $\beta$ -チューブリン遺伝子の PCR は、 $\beta$ -チューブリン遺伝子を増幅するプライマー Bt1a (5'-TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3') と Bt1b (5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3') を用いて増幅反応を行った。0.2mlPCR チューブに鋳型 DNA 1  $\mu$ l とマスターミックス 24  $\mu$ l (滅菌蒸留水 18.8  $\mu$ l, 10  $\times$  EX *Taq* Buffer 2.5  $\mu$ l, 2.5mM dNTPs 2  $\mu$ l, 20  $\mu$  M Bt1a プライマー 0.25  $\mu$ l, 20  $\mu$  M Bt1b プライマー 0.25  $\mu$ l, TaKaRa Ex *Taq* 0.2  $\mu$ l) を入れ、サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2700 あるいは TaKaRa PCR Thermal cycler) で増幅反応を行った。PCR の反応条件は、最初の熱変性を 95°C, 8 分, 熱変性 (95°C, 30 秒), アニーリング (55°C, 20 秒), 伸長反応 (72°C, 1 分) を 30 サイクル, 最後の伸長反応を 72°C, 5 分間行った。

$\beta$ -チューブリン遺伝子産物は制限酵素 *Hpa*II で消化し、RFLP 解析を行った。PCR 産物 5  $\mu$ l に制限酵素 (*Hpa*II (5U/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$ L バッファー 1  $\mu$ l, 滅菌蒸留水 3.5  $\mu$ l) を加え、37°C で 24 時間処理した。制限酵素処理後、3% アガロースで電気泳動を行い、PCR 産物を確認した。

*Digitaria* 属に感染するいもち病菌に特異的なプライマーを用いた PCR は、メヒシバいもち病菌の ITS 領域内に設計したプライマー DSP (5'-GTTACAAACTCTTGTATA-3') とユニバーサルプライマーである ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いて増幅反応を行った (Tsurushima *et al.*, 2005). 0.2mlPCR チューブに鋳型 DNA 0.5  $\mu$ l とマスターミックス 12  $\mu$ l (滅菌蒸留水 7.875  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup>free) 1.25  $\mu$ l, 2.5mM dNTPs 1  $\mu$ l, 20  $\mu$ M DSP プライマー 0.5  $\mu$ l, 20  $\mu$ M ITS4 プライマー 0.5  $\mu$ l, 25mM MgCl 溶液 0.75  $\mu$ l, TaKaRa *Taq*(2.5U/ $\mu$ l) 0.125  $\mu$ l) を入れ、サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2700 あるいは TaKaRa PCR Thermal cycler) で増幅反応を行った. PCR の反応条件は, 最初の熱変性を 94 $^{\circ}$ C, 2 分 30 秒, 熱変性 (94 $^{\circ}$ C, 1 分), アニーリング (62 $^{\circ}$ C, 1 分), 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 5 分) を 35 サイクル, 最後の伸長反応を 72 $^{\circ}$ C, 5 分間行った.

得られた PCR 産物を 2%のアガロースゲルで電気泳動を行い, 0.1%エチジウムブロマイド溶液 (エチジウムブロマイド 300mg/蒸留水 300ml) で約 15 分間振とうして染色後, トランスイルミネーター (UVP TFML-26E) で確認した.

#### rDNA-ITS 領域のシーケンス解析

供試菌株の系統関係を明らかにするため, rDNA-ITS 領域のシーケンスをおこなった. 本領域を増幅するためユニバーサルプライマーである ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') および ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA CAAGG-3') (White *et al.*, 1990) を用いて増幅反応を行った. 2%アガロースで電気泳動により増幅産物を確認後, PCR 産物に ExoSAP (Affymetrix, USA) 20 倍希釈液を PCR 産物の 1/5 容量加えて 37 $^{\circ}$ C, 30 分反応させ, その後 80 $^{\circ}$ C で 20 分処理した.

### シーケンス反応

精製した PCR 産物を BigDye Terminator ver.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 用い、それぞれのプライマー (ITS4, ITS5) で独立にシーケンス反応を行った。PCR 産物 3~5  $\mu$ l とマスターミックス 17  $\mu$ l (滅菌蒸留水 8.75  $\mu$ l, 20  $\mu$ M プライマー 0.25  $\mu$ l, Ready mix 2.0  $\mu$ l, 5 $\times$ Sequence buffer 6  $\mu$ l) を混合し、最初の熱変性を 96 $^{\circ}$ C, 1分, 96 $^{\circ}$ C, 10秒, 50 $^{\circ}$ C, 5秒, 60 $^{\circ}$ C, 4分のサイクルを 25 サイクル行った。

### プライマーの除去

反応後の PCR 産物を 1.5ml チューブに移し、3M 酢酸ナトリウム 2  $\mu$ l と冷 100%エタノール 22  $\mu$ l を加え反転混合し、-30 $^{\circ}$ C で 15 分間静置した。15000rpm, 4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心分離後、上清を除去して 70%エタノール 150  $\mu$ l を加え、再び 15000rpm, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離した。エタノールをデカントで捨て、乾燥させてシーケンサー用のサンプルとした。

### シーケンス解析

Applied Biosystems Model 373A DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を用いて、サンプルのシーケンスを行った。ゲル板を水酸化カリウム溶液、水道水、専用洗剤、水道水の順に洗浄後、超純水でリンスした。ポリアクリルアミドゲル (尿素 18g, 10 $\times$ TBE バッファー 5ml, 40%ポリアクリルアミド 5ml/50ml) をミリポアフィルターに通した後 10 分間吸引器で脱気し、10%過硫酸アンモニウム溶液 250ml を加えて変性させた。TEMED (N,N',N',N'-Tetramethylethylenediamine) 25  $\mu$ l を加えて静かに混合し、ゲル板に気泡が入らないように速やかに流し込んでゲルを固化させた。ホルムアミドと blue loading dye を 1 : 5 で混合したサンプル溶解液 4  $\mu$ l とサンプルを混

合し、95°Cで2分間処理して1本鎖DNAとし、氷中で速やかに冷却した。その後、373A DNA シークエンサーのマニュアルに従いサンプルを電気泳動した。

#### 配列のアライメントと系統樹の作成

シーケンスにより得られた配列は、コンピュータ上で ChromasPro (フリーソフトウェア) を用いて配列を校正、決定した。DDBJ から取得した *Pyricularia* 属菌の塩基配列とともに ClastalX でアライメント後、PAUP4.0β10 で最大節約法により系統樹を作成し、各枝の信頼性をブートストラップ解析 (1000 回反復) によって評価した。

## 1-3 結果

### 分生胞子のサイズ

ショ糖 5%加用オートミール培地で形成させた分生胞子を計測した結果、分離菌株の形態は典型的ないもち病菌の分生胞子であり、サイズもほぼ同等であった。一方マコモ分離菌のサイズは幅が広がった（表IV-1）。

### 病原性検定

病原性を調査した結果、イネ分離菌以外の分離菌株は全てのレース判別品種に対し罹病性病斑を形成しなかった。メヒシバはイネと同様に種子消毒して育苗したものに分離菌株を噴霧接種した。その結果、メヒシバ分離菌とチカラシバ分離菌が罹病性病斑を形成し、それ以外の分離菌株は病斑を形成しなかった。これらのイネおよびメヒシバに対する病原性は山中（1987）と一致した。

ネズミムギ、エノコログサ、ナルコビエおよびコブナグサ分離菌はそれぞれの宿主に対するいもち病斑を形成した。一方、ヌカキビ分離菌は葉身にいもち病斑が形成されず、節や枝梗のみが罹病し、病斑上には分生胞子の形成が確認できた。チカラシバ分離菌はチカラシバに対するいもち病斑を形成しなかった（表IV-1）。

### 毒素生産性

培養ろ液中に生産された二次代謝産物を TLC 法により調査した結果、イネ、ネズミムギ、エノコログサ、ナルコビエおよびヌカキビ分離菌はピリカラシン H を生産しなかった。一方、メヒシバ、チカラシバ、コブナグサおよびマコモ分離菌はピリカラシン H と同様の位置にスポットが確認できた（表IV-1）。

### 遺伝子解析

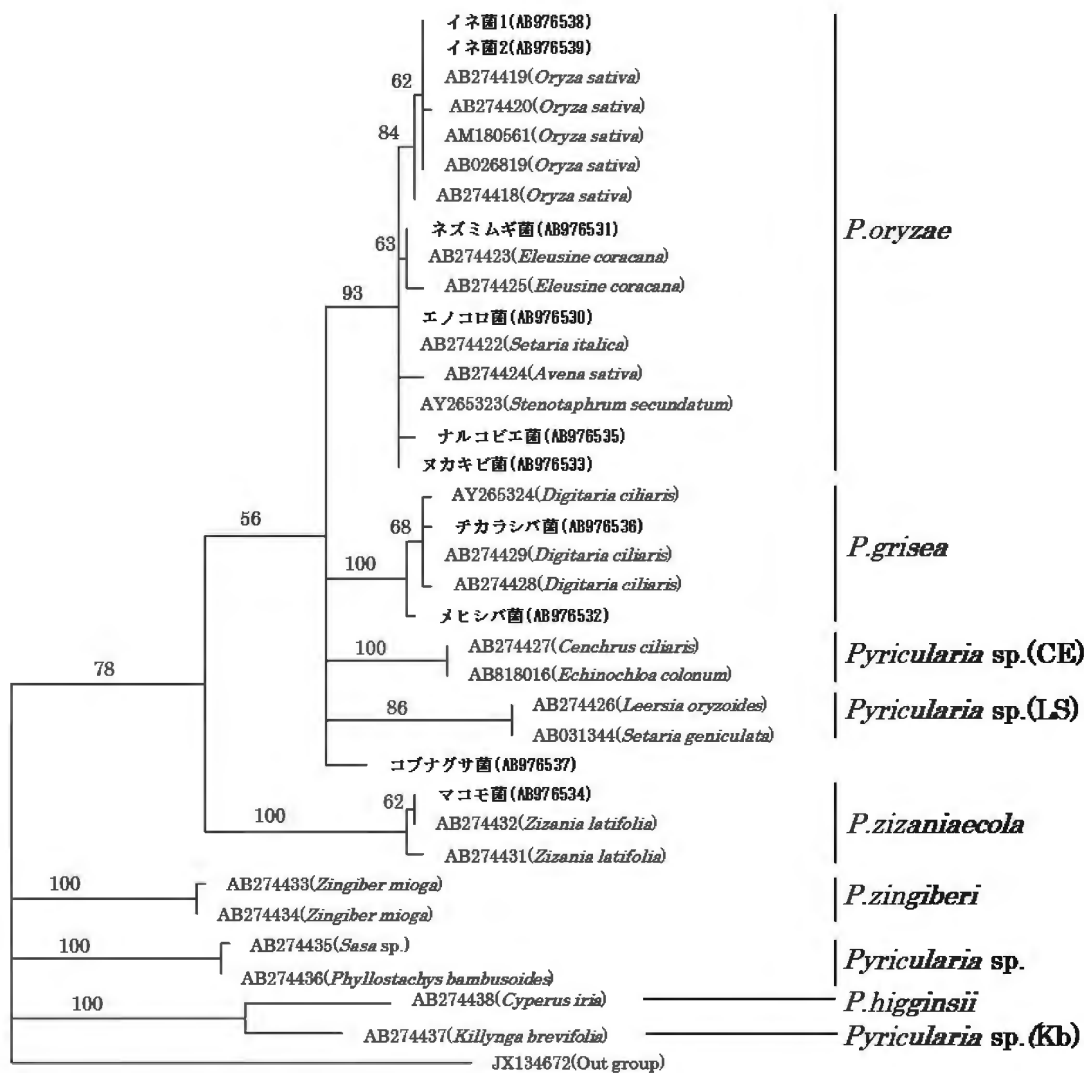
$\beta$ -チューブリン遺伝子の PCR-RFLP 解析ではイネ、ネズミムギ、エノコロ



グサ, ナルコビエおよびヌカキビ分離菌で PCR 産物が制限酵素 *Hpa*II で切断された *P. oryzae* の特徴と一致した. 一方, コブナグサ, チカラシバ, メヒシバおよびマコモ分離菌の PCR 産物は切断されなかった.

rDNA-ITS 領域の塩基配列を解析した結果, ネズミムギ, エノコログサ, ナルコビエおよびヌカキビ分離菌は既知の *P. oryzae* と同一の分類群に類別された (図IV-1). 一方, チカラシバ分離菌はメヒシバ分離菌とともに既知の *P. grisea* と同一の分類群に類別され, マコモ分離菌, コブナグサ分離菌はそれぞれ単一の分類群となった (図IV-1).

*Digitaria* 属植物に感染するいもち病菌特異的プライマーによる PCR ではチカラシバ分離菌, コブナグサ分離菌でバンドが検出されたが, その他の分離菌株では検出されなかった (表IV-1).



図IV-1 rDNA-ITS領域の塩基配列に基づいた数種イネ科植物いもち病菌の系統樹  
 供試菌株名は「分離宿主+菌」で、取得した新規のAccession No.を菌株名の後に示した。  
 Accession No.後の ( ) は分離宿主の学名を示す。系統樹はClustalXでアライメント後、  
 PAUP4.0B10で最大節約法により作成した。図中の数字は枝のブートストラップ値(1000  
 回反復)を示す。*Pyricularia*属の種名はHirata *et al.*(2007)に準じ、外群は*Magnaporthe  
 salvinii*(JX134672)を用いた。

表1 数種のイネ科植物から分離したもち病菌の特徴

供試菌株 <sup>a)</sup>	採集地	孢子サイズ <sup>b)</sup>			病原性 <sup>c)</sup>			毒素生産性 <sup>d)</sup>	遺伝子解析 <sup>e)</sup>	
		長さ×幅(μm)	平均(μm)	長さ/幅	イネ	メヒシバ	分離宿主	PH	RFLP	DS
ネズミムギ菌1	酒田市	17.5-32.5×7.5-11.3	26.4×9.3	2.8	R	R	S	-	+	-
ネズミムギ菌2	酒田市	NT <sup>f)</sup>			R	R	S	-	+	-
エノコログサ菌1	酒田市	20.0-30.0×8.8-12.5	25.3×10.7	2.4	R	R	S	-	+	-
エノコログサ菌2	酒田市	NT			R	R	S	-	+	-
コブナグサ菌1	仙台市	20.0-32.5×6.3-10.0	28.1×7.8	3.6	R	R	S	+	-	+
コブナグサ菌2	仙台市	NT			R	R	S	+	-	+
ナルコビエ菌1	仙台市	20.0-30.0×7.5-10.0	26.5×9.4	2.8	R	R	S	-	+	-
ナルコビエ菌2	仙台市	NT			R	R	S	-	+	-
ヌカキビ菌1	遊佐町	NT			R	R	R(S)	-	+	-
ヌカキビ菌2	遊佐町				R	R	R(S)	-	+	-
チカラシバ菌1	遊佐町	NT			R	S	R	+	-	+
チカラシバ菌2	遊佐町				R	S	R	+	-	+
マコモ菌1	鶴岡市	22.5-35.0×10.0-18.8	29.4×14.4	2.0	R	R	NT	+	-	-
マコモ菌2	鶴岡市	NT			R	R	NT	+	-	-
イネ菌1	鶴岡市	16.8-25.7×6.9-10.9	20.8×9.2	2.3	S (レース037.0)	R	S	-	+	-
イネ菌2	鶴岡市	NT			S (レース107.0)	R	S	-	+	-
メヒシバ菌1	鶴岡市	20.0-30.0×6.3-10.0	25.0×8.6	2.9	R	S	S	+	-	+
メヒシバ菌2	鶴岡市	NT			R	S	S	+	-	+

a)供試菌株名は「分離宿主+菌」のように表記した。

b)ショ糖5g添加オートミール培地で形成させた孢子を50個計測した。

c)感受性をS, 抵抗性をRとした。イネはYamada *et al.* (1976), Kiyosawa *et al.* (1981)の計12品種を用いた。ヌカキビ菌は葉身に病斑が認められず節や枝梗のみのため、R(S)とした。

d)PH:ピリカラシンHと同じRf値にスポットが認められた場合を+, 認められなかった場合を-とした。

e)RFLP:β-チューブリン遺伝子のPCR-RFLP. *Hpa* IIにより切断された場合を+, されなかった場合を-とした。

DS: *Digitaria* 属植物いもち病菌特異的プライマーによるPCR. 検出された場合を+, されなかった場合を-とした。

f)NTは調査未実施であることを示す。

#### 1-4 考察

いもち病はイネ以外のイネ科植物に発生することが知られている。しかしながら、イネ以外のイネ科植物から分離したいもち病菌は必ずしも分離宿主に対する病原性を持つわけではなく、イネいもち病菌やメヒシバいもち病菌などの感染により引き起こされている事例も認められる（本蔵ら，1983；生井ら，1996；Kusaba *et al.*，1997 など）。一方、いもち病菌は作物の種類により宿主範囲が限定され、作物特異的な病原性を有する栽培作物寄生菌群として分類されている（Kato *et al.*，2000；Hirata *et al.*，2007）。これらの菌群は宿主の近縁種である野外のイネ科植物にも病原性が認められ、作物と雑草間でいもち病菌が行き来している可能性が考えられる。このことから本章では野外の数種のイネ科雑草から分離したいもち病菌について、病原性、毒素生産性、遺伝子解析により分類学的位置を推定することでイネ科雑草いもち病菌がイネいもち病の伝染源となり得るかを検討した。

以上の結果から今回供試したネズミムギ、エノコログサ、ヌカキビおよびナルコビエ分離菌は栽培植物寄生菌群である *P. oryzae*（Hirata *et al.*，2007）と考えられた。ネズミムギ分離菌とエノコログサ分離菌は、それぞれ Kusaba *et al.*（2006）と Yamagashira *et al.*（2008）の報告と一致したが、ヌカキビ、ナルコビエの両分離菌はこれまで *Pyricularia* sp.とされており、これらのいもち病の病原として *P. oryzae*を新たに追加したい。そして、今回供試したイネ以外のイネ科植物分離菌はレース判別イネ品種に病原性が認められなかった。今後より多くの菌株を用いて検討する必要があるが、イネいもち病の伝染源となる可能性は小さいと考えられた。ヌカキビ分離菌はピリカラシン H と同位置にスポットが認められず、これを生産するキビいもち病菌（Nukina, 1999）と今回の分離菌は異なると考えられるが、一方で Hirata *et al.*（2007）はキビいもち病菌とヌカキビ分離菌が系統学的に近縁であるとしている。病原性検定で

はヌカキビに接種しても葉身に病斑を形成せず、節および枝梗のみの発病であった。野生イネ科植物のレースの分化についてはエノコログサのいもち病菌で報告されており（加藤，1983；Yamagashira *et al.*, 2008），病原性が分化している可能性も考えられる。あるいは Hirata *et al.*（2007）の供試した菌株とは異なる，既報の病原型の日和見感染の可能性もある。いずれにしてもヌカキビ分離菌の病原性については今後より多くの菌株を採集して検討する必要がある。

コブナグサ分離菌，チカラシバ分離菌については代謝産物がピリカラシン H と同位置にスポットが認められ，かつ *Digitaria* 属植物に感染するいもち病菌特異的プライマーによる PCR でもバンドが検出された。このうち，コブナグサ分離菌は Nukina（1999）の代謝産物による分類基準に従うとサイトカラシン型であり，ピリカラシン H と官能基が一つ異なるサイトカラシン H を生産するが，本手法では両代謝産物の区別はつかない。ピリカラシン H の生産性と *Digitaria* 属植物に対する病原性は一致することが報告されており（Tsurushima *et al.*, 2005），本プライマーによりバンドが検出されたにも関わらずコブナグサ分離菌がメヒシバへの病原性が認められなかったことは本代謝産物がピリカラシン H ではない可能性を示唆している。コブナグサ分離菌は系統樹上では *P. grisea* と異なる位置に類別される一方で，*Pyricularia* sp.(CE) や *Pyricularia* sp.(LS)（Hirata *et al.*, 2007）とも明確に異なることから，新種の可能性もあり，多くの菌株を採集してさらに検討する必要がある。チカラシバ分離菌はメヒシバに病原性を示したがチカラシバには示さなかった。rDNA-ITS 領域の塩基配列から得た系統樹では，メヒシバ分離菌と同一の分類群に類別されたことから，今回チカラシバから分離された菌株は *P. grisea* と考えられ，日 and 見感染により発病した可能性が高い。

マコモ分離菌はピリカラシン H と同位置にスポットが認められ，既報

(Nukina, 1999) と一致した。しかし、メヒシバには病原性が認められなかった点は Tsurushima *et al.* (2005) が報告している毒素生産性と病原性との関係と一致しなかった。メヒシバいもち病菌は孢子発芽時にピリカラシン H を分泌しメヒシバへの侵入を成立させること (Tsurushima *et al.*, 2005) が明らかにされており、マコモ菌がメヒシバに病原性が無いのは孢子発芽時に本毒素を生産しない可能性が考えられる。分生孢子の特徴は既報 (Hashioka, 1973) と一致し、系統樹上の位置からも *P.zizaniaecola* であると考えられた。

野生イネ科植物に寄生しているいもち病菌が栽培植物のいもち病にどの程度寄与しているかは明らかではない。しかし、我が国の重要な作物であるイネに病原性を示さないものの、栽培植物が多様化している今日、雑草いもち病菌が重要な病原菌として発達する可能性が常に存在していると考えられる。例えば、ネズミムギ分離菌は今後、水田転作に広く用いられているイタリアンライグラスの重要な病原菌になるかもしれない。著者は今回供試した分離菌株以外に、宮城県の水田周辺でオニウシノケグサ (鈴木ら, 2013), ハルガヤ (*Anthoxanthum adoratum* L.), シナダレスズメガヤ (*Eragrostis curvula* Nees) にもいもち病を確認している。これらのいもち病菌がどのように自然界で発生を繰り返しているのか、イネ科の作物やその他の野生イネ科植物に対する寄生性などは非常に重要なことであり、今後、Kato *et al.* (2000) のいもち病菌の病原型を検討し栽培植物に対する病原菌としての潜在的リスクを明らかにする必要がある。

## 2. 宮城県で採集したオニウシノケグサのいもち病菌の特徴

### 2-1 緒言

オニウシノケグサ（英名；tall fescue, 学名；*Festuca arundinacea* Schreb）はヨーロッパ原産の多年生イネ科植物であり，日本へは明治初年に牧草としてアメリカから導入された（清水ら，2005）．土壌の乾湿や耐寒性，耐暑性に優れていることから，牧草の他に道路の路肩や法面，ゴルフ場や公共施設等の芝草としても広く利用されている．一方で，本植物は生態系や在来種に及ぼす影響が顕著であることから特定外来植物に指定し，侵入・蔓延を防止するための有効な対策を強化することが必要であるとも指摘されている（村中ら，2005）．

牧草や芝草は，家畜による摂食や踏圧，刈り取りなどの攪乱に強く，また利用面積が広いため利用地点も多く最も広範に野生化している作物である（山下，2002）．宮城県ではオニウシノケグサが水田周辺の畦畔などで雑草として野生化しているのがしばしば観察される．著者らは *Pyricularia* 属菌の野外における生態的研究を進める過程で，宮城県中部～北部地域の複数の水田周辺にオニウシノケグサのいもち病を認めた（鈴木ら，2011）．オニウシノケグサのいもち病を対象とした報告は少ないことから（成田ら，1954；Tredway *et al.*, 2005），その病徴と発生状況とともに，病原菌を分離し，病原性および毒素生産性の特徴や遺伝子解析を試みた．

### 2-2 材料および方法

#### 供試菌株

宮城県中北部の水田周辺に自生しているオニウシノケグサの葉身に発生した病斑から，単孢子分離によりいもち病菌を分離した．1病斑から1単孢子分離とし，2008年と2009年採集したものを試験に供した．またイネに対する病原

性および遺伝子解析は 2011 年に同様の方法で分離した菌株を加えて、試験を実施した。

### 分生胞子のサイズ計測

2008 年の登米市および 2009 年に登米市と古川市から分離した計 4 菌株を用いた。オートミール培地（オートミール粉末 50g, ショ糖 5g/l）に移植し、14 日間培養後、培地表面の気中菌糸を絵筆でかきとって蛍光灯照射下、25℃で培養して形成された分生胞子を 1 菌株あたり 50 個計測した。

### 病原性試験

ネズミムギ（イタリアンライグラス品種；タチマサリ）とオニウシノケグサ（トールフェスク品種；ホクリョウ）、メヒシバおよびイネを用いた。イネは Yamada *et al.* (1976) の提案するいもち病菌レース判別品種（真正抵抗性遺伝子）である新 2 号 (*Pik-s*), 愛知旭 (*Pia*), 石狩白毛 (*Pii*), 関東 51 号 (*Pik*), ツユアケ (*Pik-m*), フクニシキ (*Piz*), ヤシロモチ (*Pita*), Pi-No.4 (*Pita-2*), とりで 1 号 (*Piz-t*) に Kiyosawa (1981) の K60 (*Pik-p*), BL1 (*Pib*), K59 (*Pit*) の 3 品種を加えた 12 品種で検討した。各品種の種子を 10℃で 48 時間吸水処理した後、チウラム・ベノミル水和剤 400 倍希釈液で 10℃, 24 時間種子消毒した。種子を洗浄後、脱塩水を入れ 25℃, 明条件下で 48 時間催芽処理を行った。催芽種子は、砂壤土を充填したシードリングケース (15×5×10cm) に、1 品種 3 粒ずつ 9 品種を播種し、ガラス室内で 4~5 葉期まで育苗した。肥培管理は元肥として 1 シードリングケースあたり複合肥料 2g (片倉チッカリン; N:P:K=10:12:10) を施用し、接種 1 週間前には追肥として硫酸アンモニウムを 1 シードリングケースあたり 1g 施用した。ネズミムギ、オニウシノケグサは、種子を消毒、催芽し、砂壤土を充填したシードリングケース (15



×5×10cm) に 6 粒播種した。栽培期間は 2~3 週間とし、肥培管理は複合肥料をイネの半量である 1g 施用し、追肥は行わなかった。

### 毒素生産性

Nukina (1999) の方法に準じていもち病菌の毒素成分を調査した。供試菌株の培養は 500ml 容振とうフラスコに醤油-砂糖培地(醤油 50ml, 砂糖 50g, 消泡剤少々/水 1l) を 100ml 分注し、供試菌株を移植し、約 120 ストロークで 10 日間振とう培養した。

培養液は 2 号濾紙を装着したポリサルホンホルダーで吸引濾過し、ろ液を 300ml 容分液ロートへ移して酢酸エチルを約 90ml 加えてよく攪拌して抽出した。酢酸エチル層に飽和食塩水を約等量加え攪拌して脱水し、再び、酢酸エチル層を 200ml 容三角フラスコへ移し、硫酸マグネシウムを薬匙一杯加えて完全に脱水した。これを 300ml 容ナス型フラスコへ移し、ロータリーエバポレーターを用いて毒素を濃縮しサンプル瓶に乾固、保存した。濃縮したサンプルを少量の酢酸エチルで溶解し、シリカ薄層 (No.5554 Silica gel 60F<sub>254</sub>; MERCK 社製) にキャピラリーを用いて塗布し、メタノール:クロロホルム=10:1 で展開した。展開後、254nm および 365nm の紫外線を照射してスポットを検討し、その後バニリン硫酸を噴霧して 120℃で焼き、発色させて特徴を観察した。

### 遺伝子解析

遺伝子解析はメヒシバいもち病菌特異的プライマーを用いた遺伝子解析およびβ-チューブリン遺伝子の PCR-RFLP 解析を行った。メヒシバいもち病菌の ITS 領域内に設計したプライマー-DSP (5'-GTTACAAACTCTTGTATA-3') とユニバーサルプライマーである ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いて増幅反応を行った (Tsurushima *et al.*, 2005)。0.2mlPCR チューブ

に鋳型 DNA $0.5\ \mu\text{l}$  とマスターミックス  $12\ \mu\text{l}$  (滅菌蒸留水  $7.875\ \mu\text{l}$ ,  $10\times$ PCR Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ free)  $1.25\ \mu\text{l}$ ,  $2.5\text{mM}$  dNTPs  $1\ \mu\text{l}$ ,  $20\ \mu\text{M}$  DSP プライマー $0.5\ \mu\text{l}$ ,  $20\ \mu\text{M}$  ITS4 プライマー $0.5\ \mu\text{l}$ ,  $25\text{mM}$  MgCl 溶液  $0.75\ \mu\text{l}$ , TaKaRa *Taq*( $2.5\text{U}/\mu\text{l}$ )  $0.125\ \mu\text{l}$ ) を入れ, サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2700 あるいは TaKaRa PCR Thermal cycler) で増幅反応を行った. PCR の反応条件は, 最初の熱変性を  $94^\circ\text{C}$ , 2分30秒, 熱変性 ( $94^\circ\text{C}$ , 1分), アニーリング ( $62^\circ\text{C}$ , 1分), 伸長反応 ( $72^\circ\text{C}$ , 5分) を 35 サイクル, 最後の伸長反応を  $72^\circ\text{C}$ , 5分間行った.

$\beta$ -チューブリン遺伝子の PCR は,  $\beta$ -チューブリン遺伝子を増幅するプライマー Bt1a (5'-TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3') と Bt1b (5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3') を用いて増幅反応を行った.  $0.2\text{ml}$ PCR チューブに鋳型 DNA $1\ \mu\text{l}$  とマスターミックス  $24\ \mu\text{l}$  (滅菌蒸留水  $18.8\ \mu\text{l}$ ,  $10\times$ EX *Taq* Buffer  $2.5\ \mu\text{l}$ ,  $2.5\text{mM}$  dNTPs  $2\ \mu\text{l}$ ,  $20\ \mu\text{M}$  Bt1a プライマー $0.25\ \mu\text{l}$ ,  $20\ \mu\text{M}$  Bt1b プライマー $0.25\ \mu\text{l}$ , TaKaRa Ex *Taq*  $0.2\ \mu\text{l}$ ) を入れ, サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2700 あるいは TaKaRa PCR Thermal cycler) で増幅反応を行った. PCR の反応条件は, 最初の熱変性を  $95^\circ\text{C}$ , 8分, 熱変性 ( $95^\circ\text{C}$ , 30秒), アニーリング ( $55^\circ\text{C}$ , 20秒), 伸長反応 ( $72^\circ\text{C}$ , 1分) を 30 サイクル, 最後の伸長反応を  $72^\circ\text{C}$ , 5分間行った.

#### 増幅産物の確認

得られた PCR 産物を, パラフィルム上で ( $6\times$ Loading Buffer  $2\ \mu\text{l}$ , PCR 産物  $5\ \mu\text{l}$ ) 調整し, 電気泳動を行った. 泳動後,  $0.1\%$ エチジウムブロマイド溶液 (エチジウムブロマイド  $300\text{mg}/$ 蒸留水  $300\text{ml}$ ) で約 15 分間振とうして染色後, トランスイルミネーター (UVP TFML-26E) で紫外線を照射してバンドパターンの特徴を観察し, ポラロイドカメラ (FUJIFILM FP-3000B) で撮影

した.

### RFLP 解析

$\beta$ -チューブリン遺伝子産物は制限酵素 *Hpa*II で消化し, RFLP 解析を行った. PCR 産物  $5\ \mu\text{l}$  に制限酵素 (*Hpa*II ( $5\text{U}/\mu\text{l}$ )  $0.5\ \mu\text{l}$ ,  $10\times\text{L}$  バッファー  $1\ \mu\text{l}$ , 滅菌蒸留水  $3.5\ \mu\text{l}$ ) を加え,  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間処理した. 制限酵素処理後, 3%アガロースで電気泳動を行い, PCR 産物を確認した.

## 2-3 結 果

### 自然病徴と接種病徴

著者（鈴木）が宮城県でオニウシノケグサイもち病を初めて確認したのは2008年で、その後毎年発生を認めている。本病は、葉身に典型的な崩壊部、褐変部、中毒部を持つ紡錘形から長楕円形の大型病斑を形成する（図IV-2A）。オニウシノケグサ（トールフェスク）を用いて病原性を検討した結果、原病徴が再現された。接種により発病したオニウシノケグサ（トールフェスク）の一部を野外で管理し、その後の発病経過を観察した結果、新抽出葉に二次伝染が認められ、また罹病株の地際部の葉鞘にも病斑が形成され、分生胞子も観察された（図IV-2D）。宮城県南部については詳細な調査をしていないことから発生状況は不明であるが、県中部以北では9月には比較的普通に認められ、約10～20kmの地理的に離れた計13地点で発生を確認できた。毎年発病を確認している大崎市古川の1地点において発生時期を調査したところ、6月中は発生が認められず、早くとも7月下旬、遅い年では8月中旬頃から発生し始めることが分かった。

### 分生胞子の形態

オニウシノケグサ分離菌を4菌株供試し、分生胞子のサイズを計測した結果、形態は無色から淡褐色、倒洋梨型、3細胞2隔壁、分離痕を有する典型的ないもち病菌の分生胞子であり、長さ15.9-34.1×幅6.8-11.4 $\mu$ m、平均26.2×8.7 $\mu$ mであり、イネいもち病菌（以下、イネ菌）やメヒシバいもち病菌（以下、メヒシバ菌）と数字的にはほぼ同様であったが（山中，1987）、それら菌の胞子よりも細長い傾向に見受けられた（図IV-2B，表IV-2）。

### 病原性試験

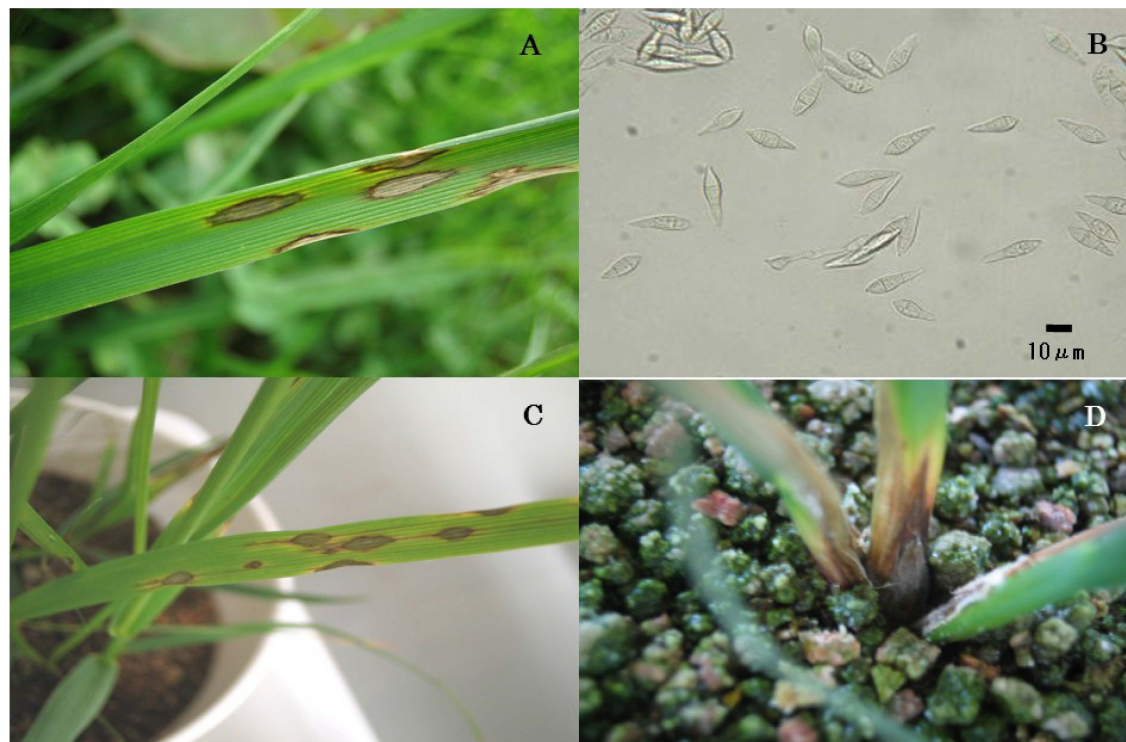
噴霧接種によりイネおよび数種のイネ科植物に対する病原性を検討した結果、供試したすべての菌株がイネ科植物のうちオニウシノケグサ（トールフェスク品種；ホクリョウ）およびネズミムギ（イタリアンライグラス品種：ワセアオバ）の葉身に典型的な罹病性病斑を形成した（表IV-2, 図IV-2C）。イネ（品種：ひとめぼれ）、メヒシバは発病しなかった。イネについてはさらに2011年の分離菌を追加した計30菌株を用いて、レース判別用12品種で検討した結果、供試した全ての菌株とも、いずれのいもち病菌レース判別品種に対しても病原性を示さなかった。逆に、イネ菌とメヒシバ菌をオニウシノケグサに接種した結果、イネ菌は病原性を示さなかったが、メヒシバ菌は菌株により発病するものと発病しないものが見られ反応が異なった。

### 毒素生産性

Nukina（1999）の方法に準じて分離菌株について毒素産物の生産性を検討した結果、オニウシノケグサ分離菌はNukina（1999）の代謝産物による分類型に従うとジヒドロピリキュロール型であり、メヒシバ菌の特徴的な毒素であるピリカラシンHは生産しなかった（表IV-2）。

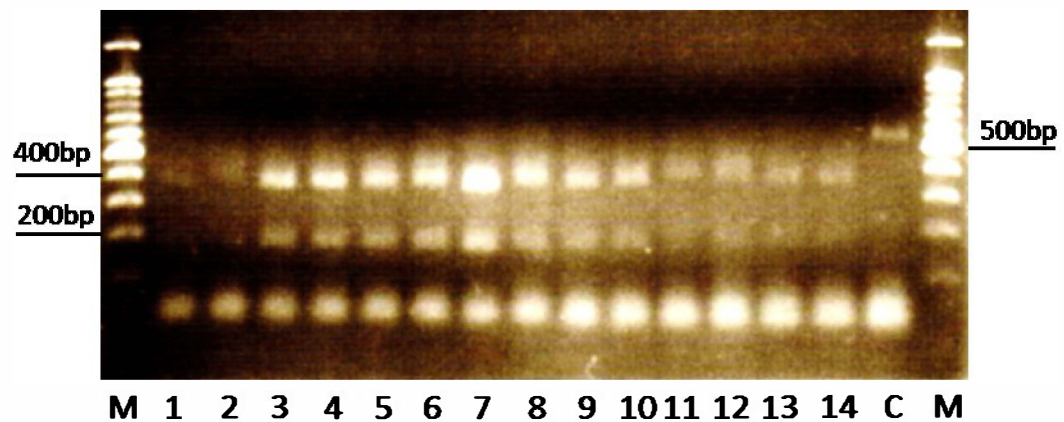
### 遺伝子解析

分離菌株の分類学的位置付けを推定するため、PCR-RFLPとメヒシバ菌を特異的に検出するプライマーを用いたPCR解析をおこなった。その結果、供試した全ての菌株においてメヒシバ病菌特異的プライマーでは増幅産物は得られず、また、 $\beta$ -チューブリン遺伝子がHpaIIにより消化・切断された（表IV-2, 図IV-3）。



図IV-1 宮城県で採集した*Pyricularia*属菌のオニウシノケグサ上での病徴と分生胞子の形態

Aは自然感染での病徴。中央に白色の崩壊部を有する典型的な病徴を示す。Bはオートミール培地で形成させた分生胞子。Cは人工接種7日後の病徴を示す。Dは人工接種後に、接種株の地際部に認められた病徴を示す。



図IV-2 オニウシノケグサから採集した*Pyricularia*属菌のPCR-RFLPパターン  
**M**は100-bp ladder markerを示す. Lane 番号は表IV-2のNo.に対応した菌株を示している. 各菌株の特徴は表IV-2に示した. **C**はメヒシバいもち病菌を用いた.

表IV-2 宮城県のオニウシノケグサから分離した*Pyricularia*属菌の特徴

No.	菌株名	採集地点	病原性 <sup>a)</sup>				毒素生産性 <sup>d)</sup>		遺伝子解析	
			イネ <sup>b)</sup>	メヒシバ	イタライ	フェスク	PH	DP	RFLP <sup>d)</sup>	DS <sup>e)</sup>
1	08'9.22東二屋オニウシ1	登米市豊里	-	-	+	+	-	+	+	-
2	08'9.22東二屋オニウシ2	登米市豊里	-	-	+	+	-	+	+	-
3	08'9.22東二屋オニウシ3	登米市豊里	-	-	+	+	-	+	+	-
4	09'9.16深谷オニウシ1	大崎市鹿島台	-	-	+	+	-	+	+	-
5	09'9.16深谷オニウシ2	大崎市鹿島台	-	-	+	+	-	+	+	-
6	09'9.16深谷オニウシ3	大崎市鹿島台	-	-	+	+	-	+	+	-
7	09'9.16深谷オニウシ4	大崎市鹿島台	-	-	+	+	-	+	+	-
8	09'9.16森オニウシ1	登米市迫町	-	-	+	+	-	+	+	-
9	09'9.16森オニウシ2	登米市迫町	-	-	+	+	-	+	+	-
10	09'9.16森オニウシ3	登米市迫町	-	-	+	+	-	+	+	-
11	09'8.19古川オニウシ1	大崎市古川	-	-	+	+	-	+	+	-
12	09'8.19古川オニウシ2	大崎市古川	-	-	+	+	-	+	+	-
13	09'8.19古川オニウシ3	大崎市古川	-	-	+	+	-	+	+	-
14	09'8.19古川オニウシ4	大崎市古川	-	-	+	+	-	+	+	-
15	09'8.19古川オニウシ5	大崎市古川	-	-	+	+	-	+	+	-
	SU772(イネいもち病菌)	鶴岡市朝日村砂川	+(037.0)	-	NT	-	-	+	+	-
	メヒシバいもち病菌1	大崎市古川	-	+	+	+	+	+	-	+
	メヒシバいもち病菌2	大崎市古川	-	+	+	-	+	+	-	+

a) + : 親和性, - : 非親和性

b) 病原性検定はYamada *et al.* (1976), Kiyosawa(1981)のレース判別品種に「ひとめぼれ」を加えた.

c) Nukina(1999)に従った. DP: Dihydropyriculol, PH: pyrichalashin H

d) Couch and Kohn(2002)に従った. +: 切断, -: 切断せず

e) Tsurushima *et al.* (2005)に従った. +: 増幅, -: 増幅せず

f) メヒシバからの分離菌株とイネからの分離菌株を比較のために用いた. SU772は山形県庄内地方で採集したものをを用いた.



## 2-4 考 察

宮城県で発生を認めたオニウシノケグサのいもち病は、そこから分離したすべての供試菌とも、分離宿主であるオニウシノケグサ（トールフェスク品種）に加えネズミムギ（イタリアンライグラス品種）に対し病原性を有した。しかし、イネ、メヒシバには病原性を認めなかった。加えて毒素生産性はピリカラシン H を生産せず、メヒシバいもち病菌を検出するプライマーおよび $\beta$ -チューブリン遺伝子の PCR-RFLP 解析の結果も総合すると、宮城県において発生しているオニウシノケグサのいもち病の病原菌は、*P. oryzae* (Hirata *et al.*, 2007) と推定され、さらにレース判別品種を用いた病原性の検定から、すべてのイネ品種に病原性は認められなかったことから、イネ菌とは異なる菌系と考えられた。オニウシノケグサのいもち病菌に関しては、イネに病原性を示すもの（成田ら, 1954；山中・西原, 1977；荒井・鈴木, 2007）と病原性を示さないもの（荒井, 2009）があることが知られ、また、本病はイネいもち病菌の感染によるもの（Kusaba *et al.*, 1998；荒井・鈴木, 2007）や、オニウシノケグサに病原性を示す他のイネ科植物のいもち病菌（山中・西原, 1977；加藤・山口, 1980）に起因することなどが報告されている。一方、著者らの結果では分離菌がネズミムギにも病原性を示したが、Tosa *et al.* (2004) はホソムギ分離菌が宿主特異的ではあるが同じくネズミムギに病原性があり、また杉山 (1997) は、ネズミムギ分離菌が複数のイネ科植物に病原性を示すことを明らかにしている。これらのことから、オニウシノケグサは数種のいもち病菌が感染できるユニバーサルな宿主である一方で、本草種上のいもち病菌にはイネいもち病菌とは異なり、*Fesutuca* 属や *Lolium* 属などを含むより宿主範囲の広いものがある可能性が示された。

オニウシノケグサのいもち病菌の野外における生活環は、他の多くのイネ科雑草のいもち病菌同様ほとんど明らかになっていない。本草の出穂は通常年 1

回で、宮城県では出穂時期が5月下旬から6月頃であり、葉いもちが発生する7月下旬～8月中旬よりも早い。成熟後、種子は地表に落下あるいは立毛の状態に維持されることもあるが、斑点米カメムシ類対策で7月下旬までに畦畔の草刈りが励行されることから、水田周辺で種子が本病原菌を保菌する場面は稀である。このことから、本病の伝染経路を検討する際には種子以外の伝染経路として、例えばネズミムギなどの共通宿主を介した伝染経路や冬期の株元の病斑上で越冬する可能性なども視野に入れる必要があると考えられる。

### 3. 山形県庄内地方におけるネズミムギいもち病の病原菌の種類

#### 3-1 緒言

ネズミムギ(英名: Annual ryegrass あるいは Italian ryegrass, 学名: *Lolium multiflorum* Lam.) は地中海地方原産のイネ科牧草で, 初期生育が旺盛なことから主に採草に利用され, 耐湿性が強いいため水田裏作や排水不良な転換畑の栽培にも適している(清水ら, 2005). 日本では明治初年の導入から畜産の発展とともに広く栽培され, 現在は北海道から沖縄まで広く栽培される最も重要な牧草の1つである(清水ら, 2005). 本種は飼料としての利用のほか, 道路法面の緑化などアメニティー用にも広く利用されている. さらに水田畦畔にも普通に認められ, 第二次世界大戦後の本格的な栽培後に各地で急激に野性化したものと考えられる(山下, 2002). 一方, 本種は雑草としても問題となっており, 関東東山地域では麦類の栽培で圃場へ侵入し被害を及ぼしている(浅井・興語, 2005).

日本におけるネズミムギのいもち病は1970年代に報告があり, イネに対する分離菌株の病原性は寄生性が認められた場合や認められなかった場合など, 必ずしも一様ではない(牧野・久永, 1972; 岡田・後藤, 1979). 杉山(1997)はネズミムギ分離菌株を多くのイネ科植物へ接種し, 50種に病原性を認めている. 西見ら(2009)はイネ科植物への接種試験から19属29種への病原性を確認している. Kusaba *et al.* (2006)はネズミムギ分離菌株が *Pyricularia oryzae* であり, シコクビエいもち病菌に近縁であるが本草種に病原性が特化している菌系であったと報告している. 一方, ネズミムギ以外のイネ科植物から分離したいもち病菌を本草種に接種すると, 比較的多くのイネ科植物のいもち病菌で発病することも知られている(荒井・鈴木, 2007; 加藤, 1983; 成田ら, 1954; 生井ら, 1996). 我が国で発生が報告されたホソムギ(英名: Perennial ryegrass,

学名 : *Lolium perenne* L) のいもち病菌は病原性が *Lolium* 属植物に特異的で、ネズミムギにも感染する (Tosa *et al.*, 2004). 著者らも宮城県で採集したオニウシノケグサのいもち病原菌がネズミムギに病原性があることを確認している (鈴木ら, 2013).

このように、ネズミムギにいもち病斑を形成するいもち病菌は複数の菌種が関わっていると考えられ、イネいもち病菌も本草種に感染が可能なことから、水稲栽培におけるいもち病の伝染源となる可能性がある。

山形県庄内地方 (鶴岡市) に所在を置く山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センター (以下, 附属農場) では、水田畦畔のネズミムギには例年、イネの出穂前である 7 月からいもち病の発生が認められている。水田周辺で野草化した本種を対象としたいもち病については報告がないことから、本研究では山形県庄内地方で認められたネズミムギのいもち病病斑から病原菌を分離して調査した。病原性については、イネとの関係を明確にするためにイネと、水田周辺に認められる数種のイネ科植物について検討した。分離菌株の特徴については、水田周辺にメヒシバいもち病が普通に認められることからメヒシバいもち病菌との関係を明確にするため、代謝産物による類別 (Nukina, 1999) と *Digitaria* 属植物分離いもち病菌に特異的なプライマーを用いた手法

(Tsurushima *et al.*, 2005) で検討した。分離菌株の種については PCR-RFLP 法 (Couch and Kohn, 2002) により推定することで、当地方で発生しているネズミムギのいもち病の原因菌を明らかにした。

### 3-2 材料および方法

#### 供試菌株

2005, 2006, 2008 年に附属農場の水田畦畔に自生していたネズミムギの葉いもち病斑から 1 病斑当たり 1 菌株のいもち病菌を単孢子分離後、PSA 斜面培地

(ジャガイモ 200g, ショ糖 15g, 棒寒天 15g/ 000ml) で培養して研究室の 10°C 低温庫で保存していた菌株を供試した。2008 年には酒田市京屋の水田脇に自生していたネズミムギにも葉いもちを確認したことから、この病斑からもいもち病菌を単孢子分離して供試菌株とし、合計 27 菌株を本研究に供試した。

病原性検定の際の接種源は、古田・関口 (1967) に準じショ糖を 5g/l に減じたオートミール培地で分生胞子を形成させたものを、 $10^5$  個/ ml の濃度に調整して用いた。

### 病原性検定

ネズミムギ (品種「タチマサリ」) とオニウシノケグサ (英名: Tall fescue, 学名: *Festuca arundinacea*, 品種「ホクリョウ」), メヒシバ (*Digitaria ciliaris*, 本研究室実験圃場で採種した) およびイネ (*Oryza sativa*) を用いた。イネは Yamada *et al.* (1976) が提案しているいもち病菌レース判別品種 (真性抵抗性遺伝子) である「新 2 号」(*Pik-s*), 「愛知旭」(*Pia*), 「石狩白毛」(*Pii*), 「関東 51 号」(*Pik*), 「ツユアケ」(*Pik-m*), 「フクニシキ」(*Piz*), 「ヤシロモチ」(*Pita*), 「PiNo.4」(*Pita-2*) および「とりで 1 号」(*Piz-t*) を用いた。各品種の種子を 10°C で 48 時間吸水処理後、チウラム・ベノミル水和剤 400 倍液で 24 時間種子消毒した。消毒後、25°C, 明条件で 48 時間催芽し、砂壤土を充填したシードリングケース (15×5×10cm) に 1 品種 3 粒ずつ 9 品種を播種し、ガラス室内で 4~5 葉期まで育苗した。施肥は元肥として 1 シードリングケースあたり複合肥料 2g (N : P : K=10 : 12 : 10) を施用し、接種 1 週間前に追肥として硫安を 1 シードリングケースあたり 1g 施用した。メヒシバ, ネズミムギおよびオニウシノケグサは、上述のとおり種子消毒後に催芽処理し、シードリングケース に 6 粒播種した。施肥は複合肥料 1g 施用し、追肥は行わなかった。育苗期間は 2~3 週間とした。接種はいずれの植物に対しても常法による噴霧接種でおこなった。

接種後、25℃、飽和湿度下に 24 時間静置し、その後ガラス室に移して 2 週間後に発病状況を調査した。

### 毒素生産性の検討

Nukina (1999) に準じていもち病菌が生産する培養時の代謝産物を調査した。供試菌株を醤油砂糖培地（醤油 50ml, 砂糖 50g, 消泡剤少々／水道水 1l）に移植し、約 120 ストロークで 10 日間振とう培養した。培養液を吸引濾過し、酢酸エチルで代謝産物を抽出した。ロータリーエバポレーターを用いて毒素を濃縮後、シリカ薄層（No.5554 Silica gel 60F<sub>254</sub> ; MERCK 社製）にキャピラリーを用いて塗布し、メタノール:クロロホルム=10:1 で展開した。展開後、バニリン硫酸を噴霧して 120℃で焼き、発色させて検出した。代謝産物の指標としてメヒシバいもち病菌を同様に培養・抽出し、本菌が特徴的に生産するピリカラシン H を指標とした。

### 遺伝子解析

PEX 溶液により供試菌株の DNA を粗抽出し (Nakahara *et al.*, 1999), *Digitaria* 属植物分離いもち病菌特異的プライマーを用いた PCR およびβ-チューブリン遺伝子の PCR-RFLP に供試した。前者はメヒシバいもち病菌の ITS 領域内に設計したプライマー-DSP (5'-GTTACAAACTCTTGTATA-3') とユニバーサルプライマー-ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いて増幅した (Tsurushima *et al.*, 2005)。後者は、Bt1a (5'-TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3') と Bt1b (5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3') をβ-チューブリン遺伝子を増幅した (White *et al.*, 1990)。

得られた PCR 産物を、2%のアガロースゲルで電気泳動後、0.1%エチジウム

ブロマイド溶液で染色して確認した。その後、 $\beta$ -チューブリン遺伝子産物については制限酵素 *Hpa*II (37°C, 24 時間) で切断し、電気泳動で確認した (Couch and Kohn, 2002)。

### 3-3 結 果

#### イネ科植物に対する病原性

分離菌株のイネ科植物に対する病原性を解析した結果を表IV-3 に示した。レース判別用のイネ 9 品種に噴霧接種した結果、すべての菌株がイネに病原性を示さなかった。メヒシバに対しては 25 菌株で罹病性病斑を形成したが、2005 年の附属農場から採集した 05'a-1-1, 05'a-2-1 の 2 菌株は病原性が認められなかった。一方、ネズミムギに噴霧接種した結果、未検討の 1 菌株を除くと 26 菌株中 25 菌株で罹病性病斑を形成した。メヒシバに病斑を形成した菌株は、ネズミムギに形成された病斑の特徴として中央部が白く周囲が褐変する楕円形の病斑を多く形成したのに対し (図IV-1A)、メヒシバに病斑を形成しなかった 2 菌株は、中毒部をともなう紡錘形の大型病斑が多く認められた (図IV-1B)。オニウシノケグサに対しては菌株により反応が異なったが、メヒシバに対し非病原性の 2 菌株はネズミムギと同様に明瞭な紡錘形の罹病性病斑を形成した。

#### 毒素生産性

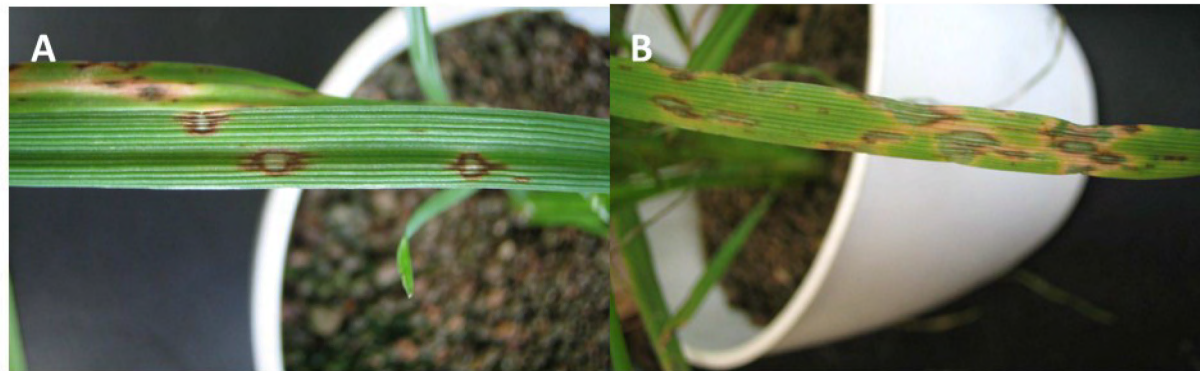
毒素生産性を TLC 法により検討した結果、05'a-1-1, 05'a-2-1 の 2 菌株を除き、メヒシバいもち病菌の特徴的な代謝産物であるピリカラシン H と同位置にスポットが認められた (表IV-3)。

#### 遺伝子解析

*Digitaria* 植物分離いもち病菌に特異的なプライマーを用いて PCR をおこなった結果、附属農場から採集した 2 菌株を除き、25 菌株で増幅産物が得られた。 $\beta$ -チューブリン遺伝子の PCR-RFLP では、附属農場産の 2 菌株は増幅産物が制限酵素で切断され、*P. oryzae* の特徴を示した。この 2 菌株はメヒシバいもち病菌特異的プライマーで増幅産物が確認されないこと、ピリカラシン H と同位



置にスポットが認められなかったことおよびメヒシバに対し病斑を形成しない  
点で特徴が一致した (表IV-3).



図IV-3 ネズミムギから分離した*Pyricularia*属菌の人工接種による病徴  
Aは菌株06'1-1-1, Bは05'a-2-1の噴霧接種により形成された病徴を示す. 接種は $10^5$ 個/mlの  
孢子濃度で行い, 接種後はガラス室にて栽培した.

表IV-3 山形県庄内地方のネズミムギから採集した*Pyricularia*属菌の特徴

採集年/地点	菌株名	病原性 <sup>b)</sup>				毒素生産性 <sup>d)</sup>	遺伝子解析	
		イネ <sup>e)</sup>	メヒシバ	ネズミムギ	オニウシノケグサ	PH	DS <sup>e)</sup>	RFLP <sup>f)</sup>
2005/	05' 3×4 1-1	-	+	+	-	+	+	-
鶴岡市高坂 <sup>a)</sup>	05' 4 1-1	-	+	+	±	+	+	-
	05' 4 2-1	-	+	+	NT	+	+	-
	05' 8 1-1	-	+	+	±	+	+	-
	05' 9 1-1	-	+	+	±	+	+	-
	05' 9 2-1	-	+	+	±	+	+	-
	05' 9 3-1	-	+	+	-	+	+	-
	05' a 1-1	-	-	+	+	-	-	+
	05' a 2-1	-	-	+	+	-	-	+
2006/	06' 1 1-1	-	+	+	-	+	+	-
鶴岡市高坂	06' 3 1-1	-	+	+	±	+	+	-
	06' 教3 1-1	-	+	+	NT	+	+	-
	06' 4×5 1-1	-	+	+	-	+	+	-
	06' 6 1-1	-	+	+	-	+	+	-
	06' 7 1-1	-	+	+	-	+	+	-
	06' 22 1-1	-	+	+	NT	+	+	-
	06' 22×23 1-1	-	+	+	±	+	+	-
	06' 23 1-1	-	+	+	NT	+	+	-
	06' 24 1-1	-	+	+	+	+	+	-
	06' 25 1-1	-	+	+	±	+	+	-
06' 25×26 1-1	-	+	+	+	+	+	-	
2008/	08' 農場イタライ 2	-	+	+	-	+	+	-
鶴岡市高坂	08' 農場イタライ 4	-	+	+	±	+	+	-
2008/	08' 京屋イタライ 2	-	+	-	-	+	+	-
酒田市京屋	08' 京屋イタライ 5	-	+	NT	+	+	+	-
	08' 京屋イタライ 6	-	+	+	+	+	+	-
	08' 京屋イタライ 7	-	+	+	+	+	+	-

a)山形大学農学部附属フィールド科学センターの水田周辺で採集した。

b)Yamada *et al.* (1976)の提唱するレース判別9品種を用いた。

c)+ : 親和性, - : 非親和性, ± : 白斑を形成したが分生胞子を形成しなかった。

d)PH ; ピリカラシンH(Nukina,1999). + : 生産, - : 生産せず。

e)Tsurushima *et al.* (2005)に従った. + : 増幅, - : 増幅せず

f)Couch and Kohn(2002)に従った. + : 切断, - : 切断せず

### 3-4 考 察

現在、イネ科植物にいもち病を引き起こす病原菌は *P. oryzae* (完全世代名 *Magnaporthe oryzae*) と *P. grisea* (完全世代名 *M. grisea*) の 2 種に大別される (Couch and Kohn, 2002 ; Hirata *et al.*, 2007). *P. oryzae* はさらに分離宿主に対する寄生性の特徴から *Oryza*, *Setaria*, *Panicum*, *Elusine*, *Triticum* の各属 (Kato *et al.*, 2000) に加え *Lolium* 属 (Tosa *et al.*, 2004) の病原型が明らかにされている. ネズミムギのいもち病菌の菌種については Kusaba *et al.* (2006) の詳細な報告があるが、野草化した本種上のいもち病菌については未検討であった.

今回供試した庄内地方のネズミムギから分離したいもち病菌 27 菌株は、イネに対し病原性は認められなかったが、ネズミムギに対し未検討の 1 菌株と病原性のなかった 1 菌株を除き全て病原性が認められた. メヒシバに対しては 2 菌株を除きメヒシバに罹病性病斑を形成した. メヒシバに病斑を形成した 25 菌株については、TLC 法によりメヒシバいもち病菌の生産するピリカラシン H と同位置にスポットが確認され、かつ *Digitaria* 属植物分離いもち病菌特異的プライマーにより増幅産物が得られた. また、 $\beta$  チューブリン遺伝子の PCR 産物は *Hpa*II で切断されなかった. これらの特徴から 25 菌株はメヒシバいもち病菌 *P. grisea* であると考えられた. 今回、ネズミムギ分離菌株の中でネズミムギに病斑を形成しない 1 菌株が確認されたが、今回の試験では接種を 1 回しか行っていないため、反復試験を実施し、再確認が必要と考えられる. *P. grisea* はメヒシバを主な宿主としているが、ネズミムギの栽培品種には比較的感染しやすいが、非親和性の品種もある (杉山, 1997). また、*P. grisea* はいくつかの報告に供試されているものの (加藤・山口, 1980, Tred way *et al.*, 2005, Tosa *et al.*, 2004), 宿主範囲は十分検討されていない. これらのことから、*P. grisea* についてはより多くの菌株を供試し、ネズミムギ品種やイネ科植物に対する病原性の

詳細な検討が必要である。一方、メヒシバに病斑を形成しなかった残りの 2 菌株 05'a-1-1, 05'a-2-1 は、ネズミムギに対する病徴が、中毒部を含む大型の紡錘形病斑を形成し他の菌株と明らかに異なった (Fig.1)。そしてこの 2 菌株はピリカラシン H と同位置にスポットはみられず、*Digitaria* 属植物分離いもち病菌特異的プライマーでの増幅が認められなかった。さらに  $\beta$ -チューブリン遺伝子の PCR-RFLP で増幅産物が制限酵素によって切断された。これらの結果からこの 2 菌株は *P. oryzae* で、イネいもち病菌とは異なる系統であると考えられた。

以上から、山形県庄内地方において水田周辺のネズミムギに発生していたいもち病は、通常メヒシバいもち病菌 *P. grisea* の感染により引き起こされていることが明らかになった。これは、当地方のメヒシバいもち病が毎年 7 月上旬より発生し、ネズミムギではやや遅れて発生することから、メヒシバからネズミムギに伝染しているものと考えられる。著者らは庄内地方におけるメヒシバいもち病の発生生態について調査し、メヒシバ種子の保菌率が低く、越冬後の翌春に回収したものでは全く認められなかったことから *P. grisea* の種子での越冬の可能性は小さいとしている (鈴木ら, 2014)。今回の結果から庄内地方では本菌がネズミムギに感染することを明らかにしたが、本草種は枯れずに越冬するため、*P. grisea* の越冬場所となりうるかもしれない。著者らはまた、酒田市京屋で 2007 年にもネズミムギのいもち病を確認しており、その分離菌株もイネいもち病菌とは異なる *P. oryzae* であった (IV-1 参照)。このことからネズミムギにはイネいもち病菌とは別菌系の *P. oryzae* が存在しており、本病の発生に低密度ながら関与していると考えられた。さらに当地点ではネズミムギの穂いもちも確認され、その分離菌株も *P. oryzae* であった (鈴木, 未発表)。栽培作物のいもち病菌は種子が重要な第一次伝染源とされており (深谷ら, 2002; Tanaka *et al.*, 2009; Tosa *et al.*, 2007)、庄内地方のような冬期積雪地帯においてもネズミムギ種子上で越冬しているかが今後注目すべき点と考えられる。一方、

附属農場では穂いもちの確認できなかったことから、発生種として優占しているメヒシバいもち病菌はネズミムギの穂への感染性が小さいのかもしれない。

宮城県でも水田周辺にネズミムギが野生化しているが、発生しているいもち病は周辺にメヒシバいもち病が多発しているにも関わらず、*P. oryzae*が分離される場合が多い（鈴木，未発表）。ホソムギのいもち病菌に関して Tosa *et al.*（2004）は、20℃の低温条件で接種した場合にホソムギに特異的に感染し、それ以外のいもち病菌は感染できないことを報告している。今回、庄内地方でネズミムギに感染するいもち病菌は複数種が関与していたが、これらのいもち病菌のうちどちらがネズミムギ上で優占種となり得るかは発生地点の *P. grisea* の菌密度だけでなく、気象条件や野生化したネズミムギの系統に左右されるのかもしれない。このため、野外の本草種上のいもち病菌集団を解析する際にはこれらの要因も合わせて解析する必要がある。

## V. 総合考察

我が国の主食であるコメ生産は、第2次世界大戦後の食糧難を早期に解消するため、栽培技術の機械化や化学肥料・合成農薬の多投入により生産性が劇的に改善されてきた。その結果、1970年代までに国内自給を達成することができたが、やはり上述のような化学物質の多投入による弊害が少なからず起こったことも事実である。化学農薬に限定して言えば、近年の薬剤はこれらの弊害を極力抑えるように、環境への残留性が小さく微生物により速やかに分解・代謝され、また対象とする病虫害以外への影響が小さく、人畜に対しても毒劇物取締法上普通物に該当する成分がほとんどを占めるようになり、かなり改善されている。しかしながら、このような農薬開発の方向性とは対照的に、未だにレイチェル・カーソンの「沈黙の春」に代表されるような、農薬に対する負の印象が依然として消費者に持たれている。

作物病害の防除技術の確立には対象となる病原の生態を把握する必要がある。多くの病害防除技術が発生生態に基づいて構築されている（門田，1996；佐々木，1987；小泉ら，1993；藤田，1990；西ら，1999）。イネいもち病についても発生生態が詳細に検討されており、特に伝染環については古くから研究が行われてきた（栗林，1928；清沢・矢沢，1976；高崎ら，1979）。その結果、現在の稲作においては保菌種子が重要な伝染源であり、育苗による発病苗の持ち込みが本田の発生の原因とされている。そのため、本病の防除は種子消毒が重要な防除技術となっており高い防除効果を示す薬剤が普及している。しかしながら、徹底した防除を実施しているにもかかわらず、本病は毎年発生し、いまだ根絶には至っていない。

本論文は第一にメヒシバいもち病の発生生態を明らかにすることを目的としている。その理由は、イネいもち病が未だに根絶できない理由として保菌種子

以外の伝染源が自然界に存在しており、本田での発病に關与している可能性を考えているためである。しかし、水稻栽培といもち病の発生には人為的な要因が多くを占めているため、自然界における伝染源の探索が容易ではない。一方、雑草のメヒシバは人為的な介入がほとんど認められないため、メヒシバいもち病の発生生態研究は、イネいもち病の野外の伝染源（伝染経路）を解明するための一助になると考えた。そのため、イネいもち病の発生生態と対比させながら論じることとした。第二に、水田周辺には様々なイネ科植物が存在し、そこにいもち病が発生している。これらのいもち病がイネの伝染源となり得るのかを軸として、明確な学名が記載されていないイネ科植物いもち病の知見を論じることとした。

メヒシバいもち病の発生生態を検討するにあたり、病原菌の動態を追跡するため *Pot2* rep-PCR フィンガープリント法 (Suzuki *et al.*,2006) により遺伝子型を決定した。5年間にわたる調査の結果、庄内地方で分離し解析した 1591 の菌株は 161 の遺伝子型に類別された。本法により決定された遺伝子型は菌の長期保存、継代培養あるいは培地上での孢子形成など実験操作による変化は一切なく安定していることを確認している。よって本菌は元々多様な集団を構成していると考えられた。本手法はもともと、イネいもち病菌の MBI-D 耐性菌が発生した際に、耐性菌の発生起源を明らかにするために改良された技術である (Suzuki *et al.*,2007,2010)。これまでイネ以外のイネ科植物いもち病、特に雑草いもち病に関してはレトロトランスポゾンの MGR586 をプローブとした DNA フィンガープリント法が用いられている (Yamagashira *et al.*, 2008a, 2008b)。本結果から、イネいもち病菌だけでなくメヒシバいもち病菌でも有効であることを明らかにした。他方、近年はマイクロサテライトマーカーを利用したより識別能力の高い個体識別法が開発・利用されている (Suzuki *et al.*,2009 ; 鈴木ら, 2012 ; 善林ら, 2014)。このような新たな手法が今後メヒシ



バいもち病菌など野生イネ科植物いもち病菌の生態研究にも利用されることで、イネいもち病菌も含めた自然界における *Pyricularia* 属菌の生態をより詳細に解明できると考えられる。

本菌の分布の特徴として調査した各発生時期には必ず地理的に離れた複数地点で検出される同一の遺伝子型が認められた。イネいもち病菌の場合、地理的に離れた地点で同一の遺伝子型が認められる場合は、保菌種子あるいは人為的な罹病苗の持ち込みによるとされている（高橋ら，2010；鈴木ら，2012）。しかしメヒシバでの種子や苗の移動が農耕地において遠距離に及ぶことは考えにくいことから、分生胞子の飛散による遠距離感染を可能性として考える必要がある。イネいもち病では1回の感染好適条件により少なくとも700m~1km 胞子が飛散し感染することが明らかにされている（笹原，2004）。今回設定した調査地点は少なくとも5km 以上離して設定している。その複数地点で同一時期に同一の遺伝子型が検出されていることから、我々が想像している以上の距離を飛散しているのかもしれない。あるいは、メヒシバの「感染しやすい特徴」がこの状況をもたらしているのかもしれない。すなわち、メヒシバは葉が地面と平行に近い状態で抽出しており、降雨後の葉上の水滴がイネよりも長時間維持されているのが観察される。そのため、常に感染発病を繰り返している可能性が考えられる。また、できるだけ遠くのメヒシバまで到達し感染・発病するためには、空気中に飛散している胞子濃度が低い状態でも感染できる特徴が必要である。胞子濃度とメヒシバの感染の関係を解析した結果、イネいもち病の場合の10分の1の胞子濃度でも感染が可能であることが明らかとなった。またメヒシバへの感染に寄与しているピリカラシンHの産生（Tsurushima *et al.*,2005）も重要である。これらのことから、イネいもち病と比較してもより遠方から飛散してきた胞子に感染・発病すると考えられる。

長距離飛散の可能性については、庄内地方における初発時期の確認と発病条

件の検討および周辺地域におけるメヒシバいもち病菌の遺伝子型構成を検討した。人工的に作成した発病株を初発以前の 6 月に野外のメヒシバ群落内に設置した結果、6 月中旬以降では周辺のメヒシバに感染・発病した。一方、野外における発生がどのような条件で起こるのかを検討したところ、植物体の湿潤時間は少なくとも 9 時間で成立し、飛散する孢子濃度は 10 個/ml の低濃度でも病斑の形成が可能であることが明らかとなった。このことから、庄内地方では誘因が 6 月にはすでに成立しており、本病が 6 月に発生しないのは主因であるいもち病菌が存在しないためであると考えられた。この仮説を証明するため、初発生に関与するいもち病菌がどの時期に飛散しているかをメヒシバのトラップ苗で補足することを検討した。その結果、庄内地方を網羅的に設定した調査地点の多くで孢子を捕捉した月日が毎年ほぼ一致し、6 月 28 日頃であった。このことは、庄内地方では地域に関係なく初発が一斉に起こることを示している。調査範囲を庄内地方周辺地域に広げ、庄内地方での初発時期とほぼ同時期に周辺県および東日本の広い地域で本菌を採集して遺伝子型を解析した結果、山形県最上地方、同村山地方や秋田県南部、新潟県北部の庄内地方周辺地域では、庄内地方で検出される遺伝子型が広く分布していることが明らかになった。検出される遺伝子型は庄内の発生初期のものに限らず、発生中期および発生後期に検出された遺伝子型も分布していた。東日本でも同様に、多くはその県固有の遺伝子型が検出される場合が多いものの、やはり庄内地方の発生初期に分布する遺伝子型が検出されている。上述のようにイネの場合は保菌あるいは罹病植物組織の人為的な移動により距離の離れた異なる地域間で同一の系統が検出される場合があるが、メヒシバにそのような移動は考えられない。このことから、メヒシバいもち病菌は庄内地方にとどまっている訳ではなく、庄内地方周辺地域、さらにはより広い地域にまで菌の移動が及んでいる可能性が考えられ、移動の方法としては空中孢子の広域飛散が推測される。

また、1年間に検出される遺伝子型が発生初期から後期にかけて複雑多様な構成であったが、これはイネいもち病の場合（生井・堤，2008）と異なり各地点とも初発時の遺伝子型の数は比較的多いことが特徴的であった。また、前年の発生後期を構成した遺伝子型が翌年の初発時期に検出される割合は小さく、調査地点の半数以下であった。また一方では、本病が激発した1株内で検出される遺伝子型が複数で構成されるなど本菌は集団として多様であることが考えられた。その理由として、メヒシバいもち病菌はもともと遺伝的に多様な集団で構成されている可能性が考えられる。越冬という過酷な条件を経過し、調査地点ではほとんどのいもち病菌が越冬できずに死滅すると考えられ、その瓶首効果により検出される遺伝子型が少なくなるが、元々非常に多様な集団であることから初期集団としても多様性が維持されていると考えられる。また、ほとんどの定点調査地点で、発生初期に検出されていた遺伝子型が後期では検出されなくなり、新しい遺伝子型が検出されたことについては、上述のようにメヒシバが感染しやすい状態が継続することによって周辺から飛散してくる胞子を捕捉し発病していることを示している。

次に第一次伝染源を検討した。その結果、越冬前の秋季に野外から回収した種子は0.1～0.3%で保菌している例が認められたが、同一地点の翌年に回収した種子の保菌は全く認められなかった。その種子を播種して苗いもちの発生を検討したが皆無であった。以上から、種子で越冬している状況証拠は認められなかった。しかし、メヒシバの分割移動試験によって低率であるが種子伝染の可能性も間接的に認められた。種子伝染が明確に示されているのはシコクビエ（大畑，1974；加藤ら，1977）、ホソムギ（田中，2007）やネズミムギ（杉山，1997；西見ら，2009）であるが、これらの作物では苗いもちによる被害が報告されている。このように、保菌種子の播種と苗いもちの発生は密接に関係しており、苗いもちの認められないメヒシバいもち病は保菌種子が主要な伝染源ではない

可能性が高い。罹病組織や保菌種子を野外の条件で越冬させても生残した例はなかった。さらに、越冬前後の土壌でも本菌は検出限界以下であった。これはイネいもち病菌の報告（高崎，1978；高崎ら，1979；三浦ら，1975；生井・堤，2008）と同一であり，乾燥状態が維持されない限り生存できないことが明らかとなった。以上の結果より，種子で越冬することも可能と考えられたメヒシバいもち病菌は，庄内地方のような2~4ヶ月積雪が続く地方での越冬は一般的に困難と考えられた。他方で，ネズミムギについては今回メヒシバいもち病菌によるいもち病の発生が認められた。これは複数年にわたり確認されているので，菌の日和見感染ではないと考えられる。ネズミムギは生植物で越冬することから，状況によってはメヒシバいもち病菌はネズミムギ上で越冬が可能なのかもしれない。

以上の得られた結果を総合的に判断し，山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病の発生生態は以下のように推測し図V-1に示した。メヒシバいもち病菌は宿主であるメヒシバとともに長年にわたり人為的な淘汰を受けることなく存在し，集団として非常に多様な集団で存在している。庄内地方は冬期積雪地帯であることから，基本的にはメヒシバいもち病菌の越冬は困難であり，越冬時の瓶首効果で集団が単純化される。越冬個体は種子あるいはネズミムギなど宿主となり得てかつ越冬する植物体上でわずかに存在し，6月下旬に一斉に分生孢子が飛散することで感染し，7月上旬に庄内地方全域が一斉に初発を迎える。そのため，地域で特徴的な遺伝的集団の中に他地域の個体が移入することで共通の遺伝子型が広域に検出されると考えられる。その後，メヒシバの場合はイネなどに比べて比較的容易に感染発病が繰り返される。このとき，下位葉から上位葉への一般的な伝染に加え，初発時と同様に孢子の飛散による菌の移入がごく近場あるいは比較的遠方からも起こりながら，9月下旬まで遺伝的に多様な集団が形成される。そして，再び冬を迎え，越冬による瓶首効果によって春には

再び集団が単純化することが毎年繰り返されると推察される。分生胞子の飛散は庄内地方の内部にとどまらず、時として庄内地方の周辺地域からも及ぶことがあり、集団の多様性を維持する役割を一部担っていると考えられる。そして、胞子は全般的に発生している時期に限らず飛散しており、庄内地方で感染する時期である 6 月下旬には感染できる濃度での飛散が起こり当地方の初発に影響を与えると推測される。

このようないもち病菌胞子の長距離飛散による伝染は新しい仮説であり、これまで考えられてこなかった。イネいもち病菌では、一般に下位葉に発生した病斑からの胞子が上位葉へと順次感染する過程が考えられており(大畑, 1989), 善林ら(2014)も 1km 離れた 2 圃場におけるいもち病菌集団が互いのほ場間での交流はなく、ほ場内のみで伝染を繰り返す集団で構成されていたことを報告している。これは、イネいもち病菌の胞子の飛散距離がさほど長いわけではなく、少なくとも 1km は飛散しないこと示唆している。しかし、実際の水田におけるいもち病菌の動態はかなり複雑であり(生井・平田, 2008; 生井ら, 2006; 生井・大友 2008), 発生している水田以外からの胞子の飛び込みによる発病も示唆されている。これは、主要な伝染源は異なるものの、イネいもち病の伝染過程がメヒシバいもち病の伝染過程に類似していることを示しているのではないだろうか。すなわち、イネいもち病では種子が主要な伝染源であるため、種子が採種圃場から供給され、さらに種子消毒による人為的淘汰が働くことでいもち病菌集団が単純化されるが、比較的広範囲から胞子が飛散して発病することでイネの生育ステージが進むにつれて水田内のいもち病菌集団を複雑にしていると考えられる。胞子飛散により遠方まで到達して感染・発病する現象は、7 月が天候不順で経過するようないもち病多発年でより助長されるかもしれない。野外での伝染源は、ビニール袋で被覆されて越冬した保菌籾殻であったり(生井・堤, 2008), 野菜類の敷き資材として用いられる稲わらであった

り（武田，1996；深谷ら，2001），畜産農家で使用する乾燥状態の敷き藁用の稲わら等が考えられる．あるいはイネいもち病菌が感染できるイネ以外の植物の可能性も残されているが，今回の研究の結果ではこの可能性は小さいと考えられる．このため，近年我が国で推進されている環境保全型の水稲栽培をより効率的に実践していくためには，その地域の農業生産の特色や水田周辺の植生などを考慮した上で，広範な地域を対象とした総合的ないもち病対策を講じる必要がある．

最後に，水田周辺の雑草病害の生態を研究する農学的意義について考察したい．まず，イネいもち病と雑草いもち病との関係についてである．本研究ではイネ以外のイネ科植物いもち病についてイネに対する病原性や病原菌の分類学的検討を加えたが，これらはメヒシバいもち病も含め，現在，水稲栽培との関係はあまり重要視されていないと感じることが多い．雑草いもち病菌に関していえば，分類学的位置付けや宿主範囲については十分検討されているが，水田におけるイネいもち病の防除体系にこれらの情報が考慮されているかといえば必ずしもそうではない．オニウシノケグサやネズミムギの今回の検討では，イネに対しての病原性は見出せなかった．しかしながら一方で，イネ以外からイネいもち病菌が分離された事例（成田ら，1956；Kusaba *et al.*, 1998；生井ら，1996）や，いもち病多発年にはネズミムギにイネいもち病菌が感染した事例（脇本，私信）などもあることから，場合によってはこれらのイネ科植物との間でいもち病菌の行き来が考えられる．特に多発年ではイネ科雑草のいもち病が草種に関わらず発生していることもあり，仮に水田周辺の雑草にイネいもち病菌が感染・発病していれば，水稲ほ場で薬剤散布等による防除を実施しても，水田周辺に新鮮な伝染源が残っていることになる．また，作物のいもち病が突如として発生し，大きな被害を及ぼした事例もあり，例として加藤（1997）はブラジルのコムギいもち病を報告している．イネいもち病についても，韓国にお

ける「統一」系イネ品種の抵抗性が突如として崩壊し、大発生したことがある（山田ら，1978）．もしかすると栽培ほ場周辺のイネ科雑草に発生したいもち病菌が何らかの方法でこれらの作物に病原性を獲得し，多発を招いたのかもしれない．いもち病菌は農地生態系の中で，作物との 2 者間の関係のみにとどまらず，ほ場周辺の雑草との寄生（共生）関係を合わせた生態系を考えねばならない．特にそれらの雑草上でイネいもち病菌やイネ以外のいもち病菌が交雑することで病原性を獲得し，これまで侵害できなかった作物や抵抗性品種を侵害できる系統あるいは新レースが出現し，作物生産に重大な被害を発生させる可能性を常に頭に置いておく必要がある．その雑草はオニウシノケグサやネズミムギなど，農地生態系ではありふれたイネ科植物でありかつ種々のいもち病菌に感受性が高い植物かもしれない．環境保全型水稲栽培をより効率的に推進するためには，イネ - イネいもち病菌の 2 者間の関係を解明するだけでなく，水田周辺のイネ科植物やそこに発生するいもち病を含めた多者間の関係を整理することが今後必要となってくるかもしれない．これらを明らかにすることによって，真の環境保全型水稲栽培につながると考えている．



図VI-1 山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病の発生生態 (推定)  
 庄内地方は冬季積雪地帯であることから、基本的にはメヒシバいもち病菌の越冬は困難であり、6月下旬に一斉に分生孢子が飛散することで感染する。この感染により7月上旬に発病が起こる。この初発は庄内地方で一斉に迎える。下位葉から上位葉への一般的な伝染に加え、初発時と同様に孢子の飛散による菌の移入がごく近場あるいは比較的遠方からも起こる。



## VII. 摘 要

*Pyricularia* 属菌によって引き起こされるいもち病は主にイネ科植物に発生する病害で、農業上重要なイネいもち病の発生生態については多くの研究報告がある。しかし、栽培植物上での本病の発生生態は人為的な要因が絡むため複雑であり、未解明の経路が存在すると考えられる。一方、メヒシバなどイネ科雑草のいもち病は人為的な要因がほとんど影響しないことから、野外におけるいもち病全般の発生生態を解明する上で最良の研究対象となり得る。本研究では、冬期積雪地帯におけるいもち病の発生生態を明らかにすることを目的として、山形県庄内地方のメヒシバいもち病を中心に解析を行なった。さらに、山形県と宮城県に自然発生した数種雑草のいもち病について、分離菌株の病原性、培養中の代謝産物、遺伝子解析からその特徴を明らかにした。

### 1 山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病の発生生態

病原菌の発生生態の研究にはその病原菌を識別するマーカーが必要であることから、はじめにメヒシバいもち病菌 (*P. grisea*) の個体識別法を検討した。その結果、シングルプライマーを用いた *Pot2* rep-PCR 法が本菌の個体識別に安定して利用できることを明らかにした。本法により、庄内地方における本菌の動態について、発生時期を 3 つに分けて、定点調査地点で採集した菌株の遺伝子型を 5 年間で 1,598 菌株解析した。その結果、161 種類の遺伝子型が存在し、本菌が多様な集団で構成されていることを明らかにした。その分布は調査地点に特徴的な遺伝子型がある一方で、広範囲の地点に共通する遺伝子型も認められた。また、発生初期の遺伝子型構成は、前年の発生後期に検出された遺伝子型が越冬後に認められなくなる地点が半数以上となり、越冬による瓶首効果が働いていると考えられた。

次に、庄内地方でのメヒシバいもち病菌の越冬について検討した。越冬前の秋季にメヒシバ種子を複数の地点から採集して保菌率を調査した結果、0.06～0.31%で平均 0.11%であった。しかし、融雪後の翌年 4 月に同一地点から種子を採集して保菌率を調査したところ、保菌種子は全く認められなかった。保菌種子および罹病植物体を人為的に越冬させて生存を調査した結果、積雪の及ばない乾燥した条件の場合は種子、罹病葉身でわずかに越冬できたが、積雪の及ぶ条件下では確認できなかつた。融雪後の 4 月に種子採集地点から採取した土壌でも確認できなかつた。このことから、庄内地方での越冬の可能性は小さいと考えられた。

越冬の割合が小さいにも関わらず、庄内地方では一斉に初発が認められることから、次に孢子飛散による長距離伝染の可能性を検討した。メヒシバの本菌に対する感受性を評価するため、感染可能な孢子濃度と接種時の湿潤継続時間を調査した結果、孢子濃度は 10 個/ml、湿潤時間は 3～6 時間あれば感染でき、感受性が高いことを明らかにした。メヒシバの健全実生苗を庄内地方の各地に設置し初発時期を確認したところ、野外メヒシバ上の本病初発とほぼ同日の 7 月上旬に、設置地点を問わず一斉に初発が確認された。発生初期に当地方の周辺に位置する山形県内および周辺県の本菌の遺伝子型を調査した結果、同一の遺伝子型が山形県内にも広く分布し、周辺県でも存在していることが明らかになった。

以上の結果から、庄内地方におけるメヒシバいもち病は、当地方内外から常に飛散し、感染・発病を繰り返しているものと結論づけた。

## 2 東北地方南部に発生した数種雑草いもち病について

宮城、山形両県に自生するイネ科雑草（ネズミムギ、ナルコビエ、ヌカキビ、エノコログサ、コブナグサ、チカラシバおよびマコモ）の各いもち病から分離

したいもち病菌の特徴を検討した。イネに対する病原性をレース判別品種を用いて検討した結果、各分離菌株はすべて病原性を示さなかった。PCR-RFLP と培養時の毒素生産性の調査結果から、ネズミムギ、ナルコビエ、ヌカキビ、エノコログサ分離菌株は *P. oryzae*、コブナグサ分離菌株は新規 *Pyricularia* 属菌、チカラシバ分離菌株は既知の *P. grisea* (メヒシバいもち病菌による)、マコモの分離菌株は *P. zizaniaecola* であることを明らかにした。

宮城県中北部地域の水田周辺で雑草化したオニウシノケグサから分離したいもち病菌の特徴を検討した。その結果、イネレース判別品種およびメヒシバには病斑を形成せず、オニウシノケグサには罹病性病斑を形成した。PCR-RFLP と毒素生産性の調査結果から、本いもち病菌はイネいもち病菌とは病原型の異なる *P. oryzae* であることを明らかにした。

山形県庄内地方の水田周辺で雑草化したネズミムギから分離したいもち病菌の特徴を検討した。分離菌株のイネ科植物への病原性については、イネのレース判別品種には病斑を形成しなかった。一方、メヒシバ、ネズミムギにはほとんどの菌株が罹病性病斑を形成したが、病徴は菌株により異なるものがみられた。遺伝子解析と毒素生産性の調査結果から、多くはメヒシバいもち病菌 *P. grisea* で、一部イネいもち病菌とは病原型の異なる *P. oryzae* も存在することが明らかとなった。

以上の結果から、水田周辺では複数のイネ科雑草にいもち病が発生しているが、イネいもち病の伝染源や伝染経路に関与はしておらず、これらの草種上のいもち病菌がイネへ伝染する可能性は小さいと考えられた。

## VIII. 謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文のとりまとめにあたり、多くの方々にご支援をいただいた。ここに記して御礼申し上げます。

本論文をとりまとめるにあたり、山形大学農学部准教授の長谷 修博士には、投稿論文のご校閲の労を賜るとともに、本論文の構成について懇切なるご指導とご校閲を賜った。同じく、山形大学農学部准教授の小林 隆博士には、投稿論文のご校閲の労を賜った。弘前大学農学生命科学部教授の佐野輝男博士、岩手大学農学部教授の吉川信幸博士ならびに帯広畜産大学地域環境学研究部門教授の小池正徳教授には懇切なるご指導と本論文のご校閲を賜った。

山形大学名誉教授生井恒雄博士（故人、2013年7月27日逝去）には学生時代から多くのご指導と励ましを賜った。本研究においては、岩手大学大学院連合農学研究科に在籍していた期間に主指導教員としてご指導頂き、また時には厳しい激励も頂いた。私が在籍途中で宮城県庁に入庁した際も、社会人学生としての道を示していただき、テーマも在学生に引き継ぎ共同で研究を進めさせて頂いた。退官を前に本論文の学位申請ができなかった際も、「すべて頼んでおいたから、心配しないであせらず書き上げなさい」と、退官後も大きく暖かい心で私を見守っていただいた。ご冥福を心からお祈り申し上げます。

山形大学農学部植物病理学研究室の学生の皆様には、在学中に実験や調査を手伝っていただいた。とりわけ大竹裕規氏（現、福島県職員）には、学部、修士課程のテーマとして本論文の構成に大きく関わるデータを取得していただいた。

宮城県古川農業試験場の皆様には、多くの激励をいただいた。とりわけ、元宮城県古川農業試験場長の城所隆博士には、社会人博士課程への移行について

の職場での手続きや、職務と研究を両立できるよう職場環境に配慮していただいた。作物保護部長土屋 稔氏，前部長涌井 茂氏，虫害制御班長加進丈二氏，虫害制御班小野 亨氏（現，宮城県農業・園芸総合研究所），大槻恵太氏（現，宮城県北部地方振興事務所），相花絵里氏，大江高穂氏ならびに病害制御班長宮野法近博士，前班長辻 英明氏（現，宮城県農業・園芸総合研究所），病害制御班大場淳司博士（現，宮城県農業・園芸総合研究所），笹原教子氏（現，宮城県病害虫防除所），佐藤直紀氏（現，宮城県東部地方振興事務所）には多くのご助言とご指導を賜り，また職務と研究の両立に対し時間を割いて相談に乗っていただいた。

元宮城県農業短期大学教授木村俊夫氏（現，宮城県植物防疫協会），前宮城大学教授本藏良三博士（現，株式会社渡邊採種場）は，私が農業短期大学在学中からお世話になった方々であり，多くのご助言とご指導を賜った。

山形大学農学部生物資源学科教授の貫名 学博士には，いもち病菌の培養中の代謝産物の解析において，実験機材を提供して頂くとともに，解析手法や生物有機化学実験全般についてご指導を賜った。

秋田県立大学生物資源科学部准教授の藤 晋一博士には，いもち病菌の塩基配列の解析について，大学に伺って実験機材を提供して頂くとともに，解析手法や遺伝子実験全般についてご指導を賜った。

両親には学費の面で援助を賜った。宮城県入庁後の在学についても理解をして頂き，6年間の学費を全て負担してくれた。

最後に，山形大学在学中から多くの時間をともに歩んでくれた妻の鈴木沙希に感謝したい。休日にも論文作成に時間を割く私を快く送り出してくれ，子供がまだ小さいにも関わらず多くの負担をかけた。また，学位取得に挫折しそうな時も嫌な顔をせず相談に乗ってくれ，励ましてくれた。

## IX. 引用文献

- 浅井元朗・興語靖洋（2005）．関東・東山地域の麦作圃場におけるカラスムギ、ネズミムギの発生実態とその背景．雑草研究 50(2) : 73-81.
- 荒井治喜（2004）．MBI-D 剤耐性イネいもち病菌の発生経過と防除対策．植物防疫 58:20-23.
- 荒井治善（2009）．飼料用イネ栽培で問題となる病害と防除対策．植物防疫 63:542-546.
- 荒井治喜・鈴木文彦（2007）．イネ栽培圃場に設置したイネ科牧草類から分離したいもち病菌の病原性．日植病報 73:188（講要）．
- 荒井治善・鈴木文彦・古場文子（2009）．2003年の九州地域における MBI-D 耐性イネいもち病菌の発生実態．九州病虫研報 55:7-12.
- Barr, M.E. (1977) . *Magnaporthe*, *Telimebella* and *Hyponectria* (Physosporiaceae). Mycologia 69:952-966.
- Chen, D., Zeigler, R.S., Leung, H. and Nelson, R.J. (1995) . Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. Phytopathology 85:1011-1020.
- 中馬いずみ（2013）．国際植物命名規約改定に伴ういもち病菌属名に関する議論の現状.第13回植物病原菌類談話会講演要旨集. pp26-29.
- Correll, J.C., Harp, T.L., Guerber, J.C., Zeigler, R.S., Liu, B., Cartwright, R. D. and Lee, F.N. (2000) . Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States Using Independent Genetic and Molecular Markers. Phytopathology 90:1396-1404.
- Couch, B.C. and Kohn, L. M. (2002) . A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species,

- Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. Mycologia 94:683-693.
- Dobinson, K.F., Harris, R.E. and Hamer, J.E. (1993) . Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. MPMI 6:114-126.
- Don, L.D., Kusaba, M., Urashima, A.S., Tosa, Y. Nakayashiki, H. and Mayama, S. (1999a) . Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65:15-24.
- Don, L.D., Tosa, Y. Nakayashiki, H. and Mayama, S. (1999b) . Population structure of the rice blast pathogen in Vietnam. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65:475-479.
- Farman, M.L., Taura, S. and Leong, S.A. (1996b) . The *Magnaporthe grisea* DNA fingerprinting probe MGR586 contains the 3' end of an inverted repeat transposon. Mol. Gen. Genet. 251:675-681.
- Farman, M.L., Tosa, Y., Nitta, N. and Leong, S.A. (1996a) . MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Mol. Gen. Genet. 251:665-674.
- Farman, M.L. (2002) . *Pyricularia grisea* isolates causing gray leaf spot on perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in the United States: relationship to *P. grisea* isolates from other host plants. Phytopathology 92:245-254.
- 深谷富夫・保坂 学・飯富暁康・若畑昌邦・小田島誠悟・柴田 智・沓沢朋広・米沢 悟・庄内玲子 (2001) . 秋田県における箱苗のいもち病の発生とその原因. 北日本病虫研報 52:11-13.
- 藤田佳克 (1990) . ダイズ紫斑病の生態と防除に関する研究. 東北農試研報

81:51-109.

古田 力・関口義兼 (1967) . いもち病菌の胞子形成法. 植物防疫 21 : 160-162.

George, M.L.C., Nelson, R.J., Zeigler, R.S. and Leung, H. (1998) . Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 88:223-229.

後藤和夫・中山達・小林茂子 (1954) . マコモのいもち病. 日植病報 18:160 (講要) .

Hashioka, Y. (1973) . Notes of *Pyricularia* II. Four species and one variety parasitic to Cyperaceae, Gramineae and Commelinaceae. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 14:256-265.

早坂 剛 (2000) . イネ種子の玄米に寄生しているいもち病菌に対する種子消毒剤の効果. 北日本病虫研報 51:9-11.

早坂 剛 (2004) . 水稻病害の環境保全型防除技術に関する研究. 山形県農事特別研究報告 26:1-48.

Hirata, K., Kusaba, M., Chuma, I., Osue, J., Nakayashiki, H., Mayama, S. and Tosa, Y. (2007) . Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. *Mycological Research* 111:799-808.

IPCC 第四次報告書 ( 2007 ) . 気象庁ホームページ  
ジ.[http://www.env.go.jp/earth/ipcc/4th/syr\\_spm.pdf](http://www.env.go.jp/earth/ipcc/4th/syr_spm.pdf)

Kachroo, P., Leong, S.A. and Chattoo, B.B. (1994) . *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.* 245:339-348.

Kachroo, P., Leong, S.A. and Chattoo, B.B. (1995) . Mg-SINE: A short interspersed nuclear element from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11125-11129.



- 門田育生 (1996) . イネ褐条病の病原と発生生態に関する研究. 北陸農試研報 38:113-171.
- Kageyama, K., Komatsu, T. and Suga, H. (2003) . Refind PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. J. Gen. Plant Pathol.69:153-160.
- 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 (1987) . 疫学. 稲いもち病. pp124-128, 養賢堂, 東京.
- 加藤 肇 (1997) . ミレットとコムギのいもち病. いもち病—研究と防除—. pp148-152, 日本バイエルアグロケム株式会社, 東京.
- 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.
- 加藤 肇・山口富夫・西原夏樹 (1977) . シコクビエいもち病菌の種子伝染と病原性ならびにシコクビエのいもち病感受性. 日植病報 43:392-401.
- Kato, H., Yamamoto, M., Yamaguchi-Ozaki, T., Kadouchi, H., Iwamoto, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. and 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.
- Kiyosawa, S. (1981) . Gene analysis for blast resistance. Oryza 18:196-203.
- 清沢茂久・矢沢駿一 (1976) . 神奈川県におけるいもち病菌の越冬に関する一研究. 農業および園芸 51:571-572.
- Kumar, J., Nelson, R.J. and Zeigler, R.S. (1999) . Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas Genetics

152:971-984.

栗林数衛 (1928) . 稲熱病の越年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, L.D., Nishimoto, N., Tosa, Y., Nakayashiki, H. and 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., Don, L. D., Urashima, A.S., Eto, Y., Tosa, Y., Nakayashiki, H., Yamamoto, M. and Mayama, S. (1998) . Natural Infection of Wild Grass Species with Rice Blast Fungus Suggested by DNA Fingerprinting. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64:125-128.

Kusaba, M., Hirata, K., Sumida, Y., Yamagashira, A., Konagai-Urata, H. and Yaegashi, H. (2006) . Molecule Genetic Characterization and Host Specificity of *Pyricularia* Isolates from Annual Ryegrass in Japan. Plant Pathology Journal 5:72-79.

小林括平・佐々木直子・富田麗子・宗村郁子 (2007) . イネいもち病菌 MBI-D 剤耐性菌遺伝子検査を効率化する新規プライマー. 北日本病虫研報 58:16-19.

小林浩幸・露崎 浩・高柳 繁 (2005) . 雑草モノグラフ. 4. メヒシバ (*Digitaria ciliaris*(Retz.)Koeler) . 雑草研究 50:316-326.

小泉信三・加藤 肇・吉野嶺一 (1993) . 麦類赤かび病の病原学的・疫学的研究. 農研セ研報 23:1-104.

牧野秋雄・久永 勝 (1972) . イタリアンライグラスいもち病の静岡県における発生. 関西病虫研報 14:96-97.

- 三島利夫・縄野正衡・林 長生・内藤秀樹（1995）．イネいもち病菌*nit*変異株の継代培養およびイネ体を通じた場合の安定性．日植病報 61:223（講要）．
- 三浦春夫・東海林久雄・木村和夫（1975）．わら施用田におけるいもち病，紋枯病の初期発生について（第2報）．北日本病虫研報 26:36.
- 村松佳央里・藤 晋一・古屋廣光・内藤秀樹（2003）．2000年および2002年に秋田県に分布したイネいもち病菌の個体群構造．北日本病虫研報 54:18-22
- 村中孝司・石井潤・宮脇成生・鷲谷いづみ（2005）．特定外来生物に指定すべき外来植物種とその優先度に関する保全生態学的視点からの検討．保全生態学研究 10:19-33.
- 内藤秀樹・根本文宏・山下 亨・勝部和則・芦澤武人・丸山清明・有賀 武・林 長生・宮坂 篤・園田亮一・藤 晋一・古屋廣光（2002）．水稻無病化種子「玄米種子」による種子伝染性病害の防除効果．日植病報 68:28-35.
- Nakahara, K, Hataya, T, Uyeda, I（1999）．A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridization and RT-PCR. Journal of Virological Methods 77:47-58.
- Nakayashiki, H., Matsuo, H., Chuma, I., Ikeda, K., Betsuyaku, S., Kusaba, M., Tosa, Y. and 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.
- 生井恒雄・藤田与一・柳沢広宣（2003）．圃場におけるイネいもち病菌の遺伝的系統の季節的变化．日植病報 69:267（講要）．

- 生井恒雄・平田一樹（2008）．山形県庄内地方の水田におけるイネいもち病菌 *Pot2* 遺伝子型とレースの季節的遷移. 日植病報 73:188（講要）．
- 生井恒雄・上林千裕・芦澤武人（2006）．いもち病罹病イネ株におけるいもち病菌の *Pot2* 遺伝子型およびレースの垂直分布. 日植病報 72:101-108.
- 生井恒雄・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.
- 生井恒雄・大友宏輔（2008）．1 穂内のいもち病罹病全イネ籾から分離された *Pyricularia grisea* の *Pot2* 遺伝子型. 日植病報 74:340-342.
- 生井恒雄・堤佳奈子（2008）．野外におけるイネいもち病の第一次伝染源に関する研究. 1．ビニール袋に被覆され積雪下で越冬した籾殻におけるイネいもち病菌の生存と第一次伝染源としての役割. 山形大学紀要（農学） 15:155-164.
- 西 和文・佐藤文子・唐澤哲二（1999）．ダイズ黒根腐病の発生生態と防除. 農研セ研報 30:11-109.
- 西門義一（1926）．稻熱病に関する研究. 病菌害蟲彙報 15:26-48.
- 成田武四・岩田 勉・山貫重夫（1954）．イモチ病菌, *Pyricularia Oryzae* Cav. の寄主範囲に関する調査研究, 第1報. 北海道立農業試験場報告 7:1-33.
- 西見勝臣・角田佳則・水野和彦・藤原 健（2009）．イタリアンライグラスいもち病の発生状況と対策. 植物防疫 63:569-573.
- Noguchi, M.T., Yasuda, N. and Fujita, Y. (2006) . Evidence of Genetic Exchange by Parasexual Recombination and Genetic Analysis of Pathogenicity and Mating Type of Parasexual Recombinants in Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. Phytopathology 96:746-750.
- Nukina, M. (1999) . The Blast Disease Fungi and Their Metabolic Products. J. Pesticide Sci. 24:293-298.

- 岡田 大・後藤重喜 (1979) . イタリアンライグラスいもち病の宮崎県における発生. 日植病報 45:92 (講要) .
- 大畑貫一 (1974) . シコクビエいもち病. 四国植物防疫研究 9:61-63.
- 大畑貫一 (1989) . 稲の病害－診断・生態・防除－. pp295-356, 全国農村教育協会, 東京.
- Park, S.Y., Milgroom, M.G., Han, S.S., Kang, S. and Lee, Y.H. (2003) . Diversity of pathotypes and DNA fingerprint haplotypes in populations of *Magnaporthe grisea* in Korea over two decades. *Phytopathology* 93:1378-1385.
- Park, S. Y., Milgroom, M. G., Han, S. S., Kang, S. and Lee, Y. H. (2008) . Genetic differentiation of *Magnaporthe oryzae* populations from scouting plots and commercial rice fields in Korea. *Phytopathology* 98:436-442.
- Rossmann, A.Y., Howard, R.J. and Valent, B. (1990) . *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia* 82:509-512.
- 佐々木次雄 (1987) . イネばか苗病の発生生態と防除に関する研究. 東北農試研報 74:1-47.
- 佐々木直子・荒井治善・鈴木文彦 (2006) . 岩手県における MBI-D 耐性イネいもち病菌の rep-PCR 法によるフィンガープリント解析とそれらのレース. 北日本病虫研報 57:10-13.
- 笹原剛志 (2004) . イネいもち病の DNA マーカーを用いた伝染源の解明. 植物防疫 58:511-514.
- Sesma, A. and Osbourn, A. E. (2004) . The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431:582-586.

- 清水矩宏・宮崎 茂・森田弘彦・廣田伸七(2005). 牧草・毒草・雑草図鑑. pp64-65.  
全国農村教育協会. 東京.
- 杉山正樹 (1997) . イタリアンライグラスのいもち病. いもち病－研究と防除  
－.pp156-162, 日本バイエルアグロケム株式会社, 東京.
- 鈴木文彦・荒井治喜・中島 隆 (2007) . イネいもち病菌の根部感染による苗  
いもちおよび潜在感染株の発生. 日植病報 73:187 (講要) .
- Suzuki, F., Arai, M. and 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. and 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.
- Suzuki, F., Yamaguchi, J., Koba, T., Nakajima, T. and Arai, T. (2010) .  
Changes in fungicide resistance frequency and population structure of  
*Pyricularia oryzae* after discontinuance of MBI-D fungicides. Plant  
Dis. 94:329-334.
- 鈴木文彦・藤 晋一・古場文子・中島 隆・荒井治喜 (2012) . SSRマーカーに  
よる西日本から分離されたイネいもち病菌の多様性と集団解析. 日植病  
報 78:10-17.
- Suzuki, F., Suga, H., Tomimura, K., Fuji, S., Arai, M., Koba, A. and  
Nakajima, T. (2009) . Development of simple sequence repeat markers  
for Japanese isolates of *Magnaporthe grisea*. Mol. Ecol. Resour. 9:  
588–590.

- 鈴木智貴・大竹裕規・生井恒雄（2011）．オニウシノケグサから分離したいもち病菌のイネ科植物に対する病原性と菌種の推定．日植病報 77:48（講要）．
- 鈴木智貴・大竹裕規・長谷 修・生井恒雄（2013）．宮城県で採集したオニウシノケグサのいもち病菌の特徴．日植病報 79：275-278.
- 鈴木智貴・大竹裕規・長谷 修・生井恒雄（2014）．山形県庄内地方におけるメヒシバいもち病の発生生態．日植病報 80：88-97.
- 鈴木智貴・脇本寛美・長谷 修・生井恒雄・小林 隆（2015）．東北地方南部に自生するイネ科植物から分離したいもち病菌の特徴．日植病報 81（印刷中）．
- 高橋直子・猫塚修一（2009）．粃殻を伝染源としたMBI-D剤耐性イネいもち病菌の育苗期感染．北日本病虫研報 60:8-11.
- 高崎登美雄・横山佐太正・藤吉 臨（1978）．ほ場に散在する被害稲わらでのいもち病菌の生存．九州病虫研報 24:17-18.
- 高崎登美雄・横山佐太正・藤吉 臨（1979）．被害稲わら上でのいもち病菌の死滅要因．九州病虫研報 25:6-7.
- 武田真一（1996）．育苗期のイネ葉いもちの伝染源に関する 2, 3 の知見．北日本病虫研報 47:11-14.
- 竹原利明・國安克人（1994a）．*nit*変異菌株を用いたフザリウム病の発生生態の解明Ⅰ．*Fusarium oxysporum*の各分化型の*nit*変異菌株の作成．日植病報 60:699-704.
- 竹原利明・國安克人（1994b）．*nit*変異菌株を用いたフザリウム病の発生生態の解明Ⅱ．*Fusarium oxysporum*の*nit*変異菌株の選択分離培地を用いた分離．日植病報 60:705-710.
- Takehara, T. and Kuniyasu, K.（1995）．Use of nitrate nonutilizing mutants

in ecological studies of Fusarium diseases III . Growth, benomyl sensitivity, pathogenicity, and stability of *nit* mutants of *Fusarium oxysporum* compared to wild-type strains. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61:541-548.

田中明美 (2007) . いもち病. 植物防疫 61:130-133.

Tanaka, M., Nakayashiki, H. and Tosa, Y. (2009) . Population structure of *Eleusine* isolates of *Pyricularia oryzae* and its evolutionary implications. J. Gen. Plant Pathol.75:173-180.

Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. and Fisher, M.C. (2000) . Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet. Biol. 31:21-32.

Tosa, Y., Uddin, W., Viji, G. and Kang, S. (2007) . Comparative Genetic Analysis of *Magnaporthe oryzae* Isolates Causing Gray Leaf Spot of Perennial Ryegrass Turf in the United States and Japan. Plant Dis. 91:517-524.

Tosa, Y., Hirata, K., Tamba, H., Nakagawa, S., Chuma, I., Isobe, C., Osue, J., Urashima, A. S., Don, L. D., Kusaba, M., Nakayashiki, H., Tanaka, A., Tani, T., Mori, N. and 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.

Tredway, L. P., Stevenson, K. L. and Burpee, L. L. (2005) . Genetic structure of *Magnaporthe grisea* populations associated with St. Augustinegrass and tall fescue in Georgia. Phytopathology 95:463-471.

Tsurushima, T., Don, L. D., Kawashima, K., Murakami, J., Nakayashiki, H.,



- Tosa, Y. and Mayama, S. (2005) . Pyrichalasin H production and pathogenicity of *Digitaria*-specific isolates of *Pyricularia grisea*. Mol. Plant Pathol. 6:605-613.
- 對馬誠也 (2005) . 病害防除におけるIPMの展望と課題 : アブラナ科野菜根こぶ病防除を事例として. 関東東山病虫研報 52:1-8.
- Viji, G., Wu, B., Kang, S. and Uddin, W. (2001) . *Pyricularia grisea* causing gray leaf spot of perennial ryegrass turf: population structure and host specificity. Plant Dis. 85:817-826.
- 渡部 茂 (1985) . イネ馬鹿苗病の発生生態並びにその防除技術の改善に関する研究. 岩手県農業試験場研究報告 25:1-73.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) . Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols. (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. and White T. J., eds.) . pp315-322, Academic Press, San Diego.
- 八重樫博志 (1987) . 稲いもち病 (山中達・山口富夫編) . pp33-37, 養賢堂, 東京.
- 山田昌雄・李 銀鐘 (1978) . 韓国における統一系イネ品種のいもち病罹病化. 植物防疫 32:238-242.
- Yamada, M., Kiyosawa, S., Yamaguchi, T., Hirano, T., Kobayashi, T., Kushibuchi, K. and Watanabe, S. (1976) . Proposal of a New Method for Differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 42:216-219.
- Yamagashira, A., Iwai, C., Moroishi, M., Misaka, M., Hirata, K., Fujita, Y., Tosa, Y. and Kusaba, M. (2008a) . Taxonomic characterization of *Pyricularia* isolates from green foxtail and giant foxtail, wild foxtails

in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 74:230-241.

Yamagashira, A., Iwai, C., Moroishi, M., Misaka, M., Kusaba, M., Fujita, Y. and Hirata, K. (2008b) . Population structure of *Magnaporthe oryzae* isolates from green foxtail in Japan examined by DNA fingerprint analysis. Mycoscience 49:351-358.

山頭亜紀子・梅野美穂・善林 薫・諸石雅彦・田中欽二・草場基章 (2008) .エノコログサ種子に感染したいもち病菌の野外における越冬について. 日植病報 74:209 (講要) .

山口富夫 (1980) . イネいもち病と抵抗性育種. pp150-153, 博友社, 東京.

山中 達 (1987) . 稲いもち病 (山中達・山口富夫編) . pp37-47, 養賢堂, 東京.

山中 達・西原夏樹 (1973) . ヌカキビとウィピングラブグラスのいもち病. 日植病報 42:74 (講要) .

山中 達・西原夏樹 (1977) . 各種イネ科植物から分離されたいもち病菌の病原性の比較. 日植病報 43:313-314 (講要) .

山中 達・山口富夫 (1987) . 稲いもち病. p44, 養賢堂, 東京.

山下雅幸 (2002) . 外来牧草の野生化. Grassland Science 48(2):161-167.

吉野嶺一 (1975) . イネいもち病菌の侵入に関する予察的研究 IV 接種孢子濃度が侵入率に及ぼす影響. 北陸病虫研報 23:16-20.

吉野嶺一 (1997) . いもち病の発生予察. いもち病—研究と防除— . pp70-74, 日本バイエルアグロケム株式会社, 東京.

善林 薫・鬼頭英樹・鈴木文彦 (2014) . SSRマーカーによるいもち病菌圃場分離集団の遺伝的分化の解析. 日植病報 80:81-87.

Zhang, C.Q. and Zhou, M.G. (2006) . Recovery and characterization of asexual recombinants of *Magnaporthe grisea*. Phytoparasitica

34:54-62.