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

善林 薫^{1*}・鬼頭 英樹¹・鈴木 文彦²

ABSTRACT

ZENBAYASHI-SAWATA, K.^{1*}, KITO, H.¹ and SUZUKI, F.² (2014). Analysis of genetic differentiation in field populations of *Pyricularia oryzae* by SSR markers. J. Phytopathol. 80: 81–87.

Rice blast, caused by *Pyricularia oryzae*, is the most prevalent and widespread disease of rice in Japan. In this study, simple sequence repeat (SSR) markers were used to discriminate among three field populations of rice blast, which consisted of isolates collected from three respective plots with two cultivars during the growing seasons. In total, 302 isolates of *P. oryzae* genotypes were found with 8 SSR markers and used in population genetic analyses. Collected isolates were classified into three populations by field plot, and each population was separated into subpopulations according to the blast epidemic stage. Haplotypic diversity of the populations ranged from 0.535 to 0.904, revealing that genetic diversity in the field populations was high. All three populations were significantly differentiated according to pairwise F_{ST} and R_{ST} comparisons, but no differentiation was detected among subpopulations grouped by epidemic stages in the same plot. A migration event was detected by SSR genotyping of the isolates between neighboring plots. A phylogenetic tree based on a minimum spanning tree algorithm also suggested migration of the fungus and showed that the direction of evolution differed among populations of the same cultivar located spatially distant from adjacent plants of different cultivars. From these results, SSR markers may enable us not only to discriminate field populations of *P. oryzae* that are genetically similar, but also to evaluate genetic processes such as gene flow, genetic drift, mutation and natural selection of the populations.

(Received November 8, 2012; Accepted August 26, 2013)

Key words: genetic diversity, *Pyricularia oryzae*, population structure, SSR

緒 言

イネいもち病（病原菌 *Pyricularia oryzae* Cavara, teleomorph: *Magnaporthe oryzae*）はイネの重要病害であり、毎年、本病の被害を軽減するために多額の資材や防除薬剤が使用されている。これらの防除資材に依らない病害防除法として、長い間、外国稲を含むイネの保有するいもち病真性抵抗性遺伝子の国内品種への導入が行われてきた。しかし、それら抵抗性遺伝子の多くは品種普及後数年で無効化することが報告されており（伊藤, 1967; 田中ら, 1970; 山田ら, 1970）、近年では、レース変動に依存せず、より無効化しにくいと考えられる量的形質であるいもち病抵抗性（圃場抵抗性）の導入が精力的に行われている（坂ら, 2007, 2010; 山口ら, 2005）。抵抗性品種の罹病化機構の解析の結果、真性抵抗性

遺伝子とそれに対応するいもち病菌の非病原力遺伝子間の相互作用が明らかになってきており（Jia *et al.*, 2000）、今後も真性抵抗性遺伝子については、宿主－病原体相互作用の解析に基づいた罹病化機構の解明が進むものと期待される。しかし、圃場抵抗性遺伝子については、単離された遺伝子の数も少なく（Fukuoka *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2010）、宿主と病原菌との相互作用についての知見は未だ乏しい。

持続的な病害抵抗性遺伝子の利用方法を確認するためには、抵抗性遺伝子の機能解析だけでなく、病原性変異を含めた病原菌集団の遺伝的变化、すなわち、圃場の病原菌集団における進化の機構を明らかにしなければならない。Spitze (1993) は、集団内の特定形質の遺伝的進化を正しく評価するためには、中立的に進化するゲノム領域の遺伝的変異の程度やその速度を量的に評価したうえで、特定形質

¹ (独) 農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター（〒014-0102 秋田県大仙市四ッ屋字下古道3） NARO Tohoku Agricultural Research Center, 3 Shimofurumichi, Yotsuya, Daisen, Akita 014-0102, Japan

² (独) 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター（〒305-8666 茨城県つくば市観音台3-1-1） NARO Agricultural Research Center, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

* Corresponding author (E-mail: kaoruz@affrc.go.jp)

をコードする遺伝子領域におけるそれらと比較することが重要であると述べている。いもち病菌においては、高橋ら(2008)が圃場における病原性変異いもち病菌の出現頻度を明らかにしているが、中立的に進化する遺伝的指標を用いた圃場分離集団における集団遺伝学的な構造解析はほとんど行われておらず、いもち病菌集団の多様性や進化速度を理解するための基本情報が不足している。

一方、近年、病原菌個体を高精度で識別できる分子マーカーの開発が進められ、これを利用して圃場の病原菌集団の構造解析を行い、得られた知見を抵抗性品種に対する病原菌の適応程度の予測に用いる研究が急速に発展している(McDonald *et al.*, 1996; Zhan *et al.*, 2002)。イネいもち病菌では、鈴木らが、日本産いもち病菌の識別が可能な *Pot2* rep-PCRやSSR(Simple Sequence Repeat)を開発している(Suzuki *et al.*, 2010; 鈴木ら, 2012)。特に、SSRについては、西日本16県のいもち病菌集団の遺伝的多様性や遺伝的距離の解析から、本邦いもち病菌の集団遺伝学的研究に有効であることが報告されている(鈴木ら, 2012)。

いもち病の発生と伝搬には、種子伝染と栽培期間中の胞子飛散による空気伝染が大きく影響することから、種籾の由来が同じ(もしくは近い)圃場や、品種が異なっているも隣接する圃場間で生じるいもち病菌の個体群はより近縁であることが予想される。そこで本研究では、種籾の生産地域が同じ同一品種の栽培圃場間や、隣接した異品種栽培圃場間から採集された菌株からなるいもち病菌集団において、現時点でもっとも個体識別能が高いと考えられるSSRマーカーが、集団の構造解析に利用可能かを検証することを主目的として、2地点3圃場のいもち病菌集団について、1)同一圃場内における、作期を通した本菌集団構造や多様度的変化 2)近接する2圃場における菌の移出入の検出 3)3圃場のいもち病菌集団の遺伝的距離、について解析した。

材料および方法

試験圃場および耕種概要 試験は2009年に行った。圃場に発生したいもち病菌を経時的に採集する圃場として、東北農業研究センター大仙研究拠点(秋田県大仙市)内のYA圃場(10a)および、YA圃場から直線距離で約1km離れ、間に国道、線路および住宅地が存在する農家圃場TA(70a)を設定した(Fig. 1)。両圃場ともにJAおぼこから購入した種子消毒(ヘルシードスターナ吹付け)済み「あきたこまち」種子を育苗した苗を移植した。購入した種子は同一採種組合産であるが、採種農家は異なっていた。育苗期および移植後の追肥、除草剤および殺虫剤による防除は、秋田県仙北地域の農家慣行に準じて行った。いもち病防除は、YA圃

Fig. 1. Location of sampling plots in Akita Prefecture in Japan. YA and YH are located in Tohoku Agricultural Research Center (TARC); TA is a farmer's field ~1 km east of TARC.

場は6月19日にプロベナゾール粒剤(有効成分:プロベナゾール8.0%)を3kg/10a,7月21日にピロキロン粒剤(同:ピロキロン5.0%)を3kg/10a散布した。TA圃場は緑化期(4月下旬)にカルプロパミド箱粒剤(同:カルプロパミド4.0%)を10g/箱,移植時(5月下旬)にプロベナゾール・フィプロニル箱粒剤(同:プロベナゾール24.0%,フィプロニル0.6%)を50g/箱処理し、穂いもち防除は無人ヘリを用いた共同防除によって7月下旬にフサライドフロアブル(同:フサライド20.0%)を散布した。また、所内圃場で早期にいもち病が発生した圃場からも葉いもち病斑および穂いもち罹病部位の採集を行った。この圃場(YH:10a)はYAと約30mの距離に位置し、多数の品種が栽培されていた。葉および穂いもちは、いもち病防除が実施されていなかった品種「ひとめぼれ」栽培区から採集した。それぞれから分離した菌株は、圃場別集団としてYA, YHおよびTAと表記した。

いもち病の発生といもち病菌採集 本研究では、小林(1984)が報告している定義に準じ、伝染第1および第2世代病斑を葉いもち発生初期の病斑、第3世代以降を葉いもち発生盛期の病斑とし、穂首、枝梗および籾のいもちを穂いもちとしてこれらを採集した。発生時期別の分集団を表す場合は、葉いもち発生初期をE、盛期をL、穂いもちをPとして、圃場名と組み合わせ「YA-E」のように表記した。菌株採集方法は、発病株数が少ない発生初期とそれ以降で異なる方法を用いた。すなわち、発生初期は、YAについては圃場内を5m×5mの36ブロックに分け、1ブロックおきに全株を調査し、ブロック内で1回の採集につき10病斑を超えないよう無作為に採集した。TAについては、1ブロックを10m×20mとして、YAと同様に採集した。圃場全体に発病が広がった発生盛期以降および穂いもちについては、YAは縦横3.6mおき、TAは同10mおきに中心株周辺から1病斑を採集した。YH圃場については、葉いもちは早期に発生が認められた第一世代病斑4菌株のみを採集し、穂いもちは区内から任意に罹病穂を採集して脱穀したのち、無作為に選んだ罹病籾から分離した。菌株は、1病斑あるいは1罹病穂(籾)から、単胞子分離により1採集地点あたり1

菌株を分離し、YA, YH および TA からそれぞれ 160, 62, 80 の計 302 菌株を得た.

DNA 抽出および SSR マーカーの検出 各菌株は PDA 培地で培養後、菌糸を掻き取り DNeasy Plant mini kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した. DNA は濃度を 10 ~ 20 ng/μl に調整し、マルチプレックスマーカー化した SSR を用いた解析を行っている秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに委託して、鈴木ら (2012) が報告している 12 座の SSR マーカーの PCR 産物サイズをシーケンスにより確定した. 得られた各 SSR マーカーの PCR 産物サイズデータについては、末端に付加された 1 塩基の有無によるサイズのずれを補正後、最終的な SSR マーカーのアリルサイズとしてデータ解析に用いた.

データ解析 SSR マーカーのアリルサイズを組み合わせたものを、各菌株のハプロタイプとし、全 302 菌株について、分集団および全集団のハプロタイプ数、ハプロタイプ多様度 (Diversity) (Nei, 1987) を GenAlEx ver. 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) により計算した. また、Arlequin ver. 3.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005) を用いて、集団および分集団間のアリの出現頻度に基づく集団分化指数 F_{ST} およびアリルサイズに基づいた遺伝子分化係数 R_{ST} (Slatkin, 1995) を算出し、集団間のペアワイズ F_{ST} および R_{ST} を計算して集団分化を検定した. また Minimum spanning network 法を用いてハプロタイプ系統樹を作成し、TreeView (ver. 0.4) を使用して系統樹を描画した.

結 果

いもち病の発病および解析集団個体数

試験圃場で最も早く葉いもちが発生したのは YH 圃場で、6 月 29 日に「ひとめぼれ」で特定の株に第一世代の病斑が出現し、その後無防除区を中心に発病が進んで葉および穂いもちともに多発生となった. YA 圃場では、7 月 9 日に全株調査で 4 株に第一世代病斑がみられ、その後病勢は進展して穂いもちでは中発生程度となった. TA 圃場でも第一世代病斑の出現日は 7 月 9 日と推定され、葉および穂いもちの発病程度は小発生であった. 菌株は、1 病斑あるいは 1 罹病穂 (籾) から単胞子分離により確立し、YA, YH および TA からそれぞれ 160, 62 および 80 の計 302 菌株を得た. これら圃場別の集団および、菌株の世代により各集団を 3 つに分けた分集団を構成する個体 (菌株) 数を Table 1 に示した.

SSR マーカーの対立遺伝子座数と分集団の遺伝的多様性

全 302 菌株における 12 座の SSR マーカーのアリル数は、最も少ない Mgms07 で 1, 最も多い ms87-88 で 27 個であった (Table 2). 検出されたアリルサイズ範囲が、鈴木ら (2012) が報告している期待値 (Expected size) と異なるものもあったが、これは期待値がギアナ産いもち病菌株 Guy11 に由来する菌株 70-15 の塩基配列に基づいており、日本の圃場分離菌とは遺伝的背景が大きく異なることが原因と考えられる. アリル数が中程度であった Mgms01, 02, 04, 06, 08, 09, 14 および Ms99-100 の 8 マーカーをマーカーセット A,

Table 1. Haplotype number and diversity of *Pyricularia oryzae* populations in Akita Prefecture based on different sets of SSR markers

Sample location (Rice cultivar)	Subpopulation	Source	Sampling time	No. of isolates	Haplotype			
					Marker set ^{a)} A+B		Marker set A	
					Number	Diversity ^{b)}	Number	Diversity
YA (Akitakomachi)	YA-E	Leaf	Early	70	31	0.911	22	0.871
	YA-L	Leaf	Late	66	38 (11) ^{c)}	0.915	18 (12)	0.844
	YA-P	Panicle		24	15 (10)	0.910	8 (7)	0.799
	total			160	65	0.946	27	0.863
YH (Hitomebore)	YH-E	Leaf	Early	4	2	0.500	1	0.000
	YH-P	Panicle		58	47	0.976	23	0.904
	total			62	47	0.973	23	0.904
TA (Akitakomachi)	TA-E	Leaf	Early	35	17	0.890	15	0.816
	TA-L	Leaf	Late	21	16 (4)	0.902	7 (4)	0.535
	TA-P	Panicle		24	16 (4)	0.906	10 (4)	0.764
	total			80	41	0.946	24	0.755

a) The components of the marker set are shown in Table 2.

b) Diversity = $1 - \sum (p_i)^2$, where p_i is the frequency of the i th haplotype for the population and $\sum (p_i)^2$ is the sum of the squared frequency of the haplotype in the population.

c) Number in parentheses indicates the number of haplotypes common to the two subpopulations. For example, isolates in subpopulation YA-L are classified into 38 haplotypes by marker set A+B, and 11 of these haplotypes are common to YA-E.

Table 2. Number of alleles and size of the 12 SSR loci detected in *Pyricularia oryzae* isolates

Marker set ^{a)}	SSR locus	No. of alleles	Expected size (bp) ^{b)}	Observed size range (bp)
A	<i>Mgms01</i>	2	245	216–219
	<i>Mgms02</i>	10	348	249–328
	<i>Mgms04</i>	3	245	254–266
	<i>Mgms06</i>	3	229	243–256
	<i>Mgms08</i>	9	273	217–247
	<i>Mgms09</i>	6	220	213–228
	<i>Mgms14</i>	8	225	236–284
	<i>ms99–100</i>	10	244	235–278
B	<i>Mgms13</i>	17	248	179–241
	<i>Mgms15</i>	16	213	129–179
	<i>ms87–88</i>	27	203	158–295
	<i>Mgms07</i>	1	228	212

a) Marker set A: *Mgms01*, *Mgms02*, *Mgms04*, *Mgms06*, *Mgms08*, *Mgms09*, *Mgms14*, and *ms99–100*; marker set B: *Mgms13*, *Mgms15*, *ms87–88*, and *Mgms07*.

b) SSR loci and their expected size were obtained from Suzuki *et al.* (2012).

それ以外をマーカーセット B とし、12 座すべての SSR マーカー (A + B) を用いてハプロタイプによる菌株の識別を行った。その結果、もっとも遺伝的多様度の高い YH-P では 58 菌株が 47 種類のハプロタイプに類別されたのをはじめ、各分集団内の菌株は非常に多くのハプロタイプに類別された (Table 1)。また、YA および TA において、分集団 L で同 E と、分集団 P で同 L との間で共通して検出されたハプロタイプは、YA-L で 38 種類中 11 種類、YA-P で 15 種類中 10 種類、TA-L および TA-P で 16 種類中 4 種類であった (Table 1)。また、同一圃場内の菌株について、アレルサイズの変化を調査したところ、Table 3 に例を示したアレル数の多い 3 種のマーカーにおいて、SSR の反復数が 1 個増減して新たな

アレルが生じたことにより、異なるハプロタイプとなる菌株が観察された。このことから、アレル数の多いマーカーは、一作期内の菌増殖の過程で変異している可能性があると考えられた。また、*Mgms07* はアレル数が 1 で、多型が検出されなかった。そこで、マーカーセット A のみを用いてハプロタイプ分類を行ったところ、YA, YH および TA はそれぞれ 27, 23 および 24 種類のハプロタイプに類別され、集団および分集団の遺伝子多様度は YH-E を除き 0.535 ~ 0.904 の範囲の値を示した (Table 1)。これらの値から、宿主品種 (伝染源となる罹病種子) や圃場の違いによるいもち病菌集団の差異を識別するのに十分な多様性は確保されていると判断し、以後、集団および分集団の構造解析にはこの 8 マーカーを用いた。

品種および圃場におけるいもち病菌集団の遺伝構造解析

YA, YH および TA のいもち病菌集団について、ペアワイズ F_{ST} を算出した結果、いずれの組み合わせにおいてもペア集団間で有意な遺伝的分化が認められ、この 3 集団は遺伝的に異なる集団であることが明らかとなった (Table 4)。一方、実際のアレルサイズを用いて解析した分化程度 (R_{ST}) は、YA と TA においては有意水準 1%, YA と YH および YH と TA の組み合わせでは有意水準 5% で遺伝的分化を支持する結果となった (Table 4)。

Table 4. Matrix of exact tests of genetic pairwise differentiation among three collection sites using F_{ST} (below diagonal) and R_{ST} (above diagonal)

Site	YA	YH	TA
YA	—	0.018*	0.125**
YH	0.059**	—	0.033*
TA	0.283**	0.198**	—

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ after Bonferroni corrections. Data were analyzed using Arlequin ver. 3.1.

Table 3. Example of observed PCR product size (bp) for the SSR loci in rice blast isolates collected in the field

Locus ^{a)}	<i>Mgms</i> 01	<i>Mgms</i> 02	<i>Mgms</i> 04	<i>Mgms</i> 06	<i>Mgms</i> 07	<i>Mgms</i> 09	<i>Mgms</i> 14	<i>ms</i> 99–100	<i>Mgms</i> 08	<i>Mgms</i> 15	<i>Mgms</i> 13	<i>ms</i> 87–88
Repeat motif	CAG	GGTA	TGT	TAC	CAA	TTC	GTAG	CAA	CAA	AG	TC	TGC
Isolate												
YA-E-02	216	277	257	244	212	217	260	262	235	173	<u>209^{b)}</u>	159
YA-L-63	216	277	257	244	212	217	260	262	235	173	<u>211</u>	159
YA-L-90	216	277	254	244	212	217	264	259	229	<u>165</u>	211	215
YA-P-164	216	277	254	244	212	217	264	259	229	<u>163</u>	211	215

a) Loci and repeat motifs were obtained from Suzuki *et al.* (2012). Repeat motif of *ms99–100* was modified based on the current genome sequence of isolate 70–15 in *Magnaporthe grisea* Database. (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/magnaporthe_grisea/MultiHome.html, accessed July 2013).

b) Numbers in the table are the observed PCR product size (bp) of the SSR loci in the isolates; underlines indicate that different sizes were observed probably due to the change of repeat units among the isolates.

Table 5. Pairwise comparison of genetic differentiation (F_{ST}) among eight subpopulations of *Pyricularia oryzae*

Subpopulation	YA-E	YA-L	YA-P	YH-E	YH-P	TA-E	TA-L
YA-E							
YA-L	0.007						
YA-P	0.016	-0.004					
YH-E	0.220*	0.156*	0.178*				
YH-P	0.040**	0.059**	0.054**	0.303**			
TA-E	0.110**	0.140**	0.162**	0.385**	0.106**		
TA-L	0.208**	0.252**	0.298**	0.575**	0.227**	0.042	
TA-P	0.126**	0.155**	0.183**	0.422**	0.119**	-0.006	0.026

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ after Bonferroni corrections. Data were analyzed using Arlequin ver. 3.1.

次に、分集団についてペアワイズ F_{ST} を求めたところ、YA と TA では、同一圃場内の分集団間で有意な遺伝的分化は認められなかった。YH については YH-E と YH-P 間で F_{ST} が 0.303 と比較的大きい値を示したが、これは YH-E が早期発生 の 4 病斑のみであり、サンプリング数の不足によるハプロタイプの偏りが影響した可能性が考えられた。一方、異なる圃場間においては、いずれの組み合わせにおいても遺伝的分化が検出された (Table 5)。

系統樹による遺伝的類縁関係の解析

ハプロタイプペアについてアリの異なるマーカー数をハプロタイプ間距離として用い、minimum spanning tree (最小木) アルゴリズムによりネットワーク系統樹を作成した (Fig. 2)。その結果、3 集団に共通するハプロタイプは系統樹の中心に近いところに位置していた。2 集団に共通するハプロタイプについては、YA と TA で共通するハプロタイプ、すなわち同一品種から得た菌株のハプロタイプは概ね図の右側に、YA と YH すなわち品種は異なるが近接した圃場か

ら得た菌株のハプロタイプは左側に配置される結果となった。TA と YH 間のみに共通するハプロタイプはなかった。また、Fig. 2 で検出されたハプロタイプ I-1 は、YH-E の 4 菌株が属するハプロタイプであり、YA と YH 集団において検出頻度の高いハプロタイプであった。

考 察

今回、自然発生条件下で増殖したイネいもち病菌の集団の識別に、鈴木ら (2012) の開発した SSR マーカーが利用できるかを検討した。一般的に、SSR の突然変異頻度は遺伝子のコード領域と比較して高いと言われている (Thuillet *et al.*, 2001)。また、いもち病菌の圃場における増殖は指数関数的であり、一作物期で個体数が急激に増加するとされる (小林, 1984)。これらの知見から、圃場分離菌株は多様なハプロタイプに類別されることが予想されたが、本研究の結果、アリル多様度の高いマーカーを用いて菌株のハプロタイプを類別すると、一作物期で菌の世代が進むにつれ

Fig. 2. Minimum spanning tree of three *Pyricularia oryzae* populations. Haplotypes represented by red, blue and green circles were collected from YA, TA and YH field, respectively. Circle size corresponds to proportion of haplotype frequency.

て新たなハプロタイプが検出され、世代間で共通するハプロタイプ割合はそれほど高くなかった (Table 1). また、アレル多様度の高いマーカーにおいては、一作期内でもいもち病菌が増殖する過程で変異している可能性が考えられた (Table 3). これらの結果から、Guichoux *et al.* (2011) が述べているように、SSR マーカーを用いることは、短期間での集団の変化を捉えることができる半面、菌株の親子解析や長期的な進化の解析では、誤った判断をする可能性がある。したがって、解析目的に適したマーカーを選択するためには、突然変異頻度の推定を含めたマーカー情報をさらに充実させる必要があると考えられる。

そこで本研究では、アレルサイズ多型が中程度のマーカー 8 個を選択し、それらを組み合わせて圃場別の集団および分集団のハプロタイプ多様度を解析した。その結果、いもち病菌集団は、発生の初期から高い遺伝的多様性を持っており、世代が経過しても多様度の顕著な増減は検出されなかった。分集団間でのハプロタイプの変化をみると、時間的に近い 2 つの分集団間、あるいはどの分集団間でも検出されるハプロタイプがある一方、特に TA 圃場では 1 つの分集団でのみ検出されるハプロタイプも多かったことから、いもち病菌集団では、世代の経過時に多様なハプロタイプの出現および消失が起こっており、全体として一定の多様度が保たれていると考えられた。また、ハプロタイプデータを用いてペアワイズ F_{ST} および R_{ST} を解析した結果、YA と TA 集団は遺伝的に異なる集団であると判定されたことから、選択した 8 マーカーを用いることで、同一品種だが種籾の由来および栽培農家が異なり、かつ互いの圃場への菌の移出入がほとんどないと考えられる程度に距離がある 2 圃場間のいもち病菌集団を識別できることが明らかとなった (Table 4, 5). また、栽培品種が異なり近接した YA と YH 圃場間においても同菌集団の遺伝的差異が検出されたが、両集団間において R_{ST} の値が低かったのは、互いのハプロタイプのアレルサイズが似通っていたためと考えられた (Table 4). この結果から、YH と YA 集団間では、相互に菌の移出入があることが示唆された。YH-E と YA の各分集団間において有意性が劣ったのは、YH-E の個体数が少なかったためであると推察された (Table 5). また、今回検出された全 57 ハプロタイプのうち 35 ハプロタイプのレースを調査した結果、レース 007.0 が 34、レース 037.1 が 1 ハプロタイプとなり、本集団のレースをハプロタイプにより識別することは困難であると考えられた。

Minimum spanning tree による系統樹では、YA 集団を基準として見た場合、YH と TA 集団は異なる方向に分化している傾向が認められた (Fig. 2). また、YH-E の 4 個体のハ

プロタイプである I-1 が YH および YA 集団全体で検出頻度の高いハプロタイプであった (Fig. 2) ことから、YH 圃場で早期に発生した菌が YA 圃場に移入し、両圃場内で増殖したことが強く示唆された。

以上のことから、いもち病菌の SSR マーカーを用いることで、同一品種上など、これまで識別が困難であったいもち病菌集団を識別できることが明らかとなった。また、近接する圃場における集団間の菌の移入を検出することができた。さらに、標準的な栽培管理を行った場合の感受性品種上の菌集団の遺伝的多様性程度やその変化を、集団遺伝学的指標により示したことにより、栽培条件や品種抵抗性を変化させた時の菌集団の変化を定量的に解析するための基礎データを得ることができた。

今後は、これら SSR マーカーをいもち病菌集団構造解析に用いることで、種子更新の前後における圃場分離菌集団の変化、すなわち遺伝的浮動の大きさの推定や、抵抗性品種栽培時における非病原力遺伝子など重要形質に関わる遺伝子の集団内で優占化の速度など、特定の栽培管理がいもち病菌集団の変化に及ぼす影響の定量的解析が可能になると期待される。

摘 要

近年開発されたイネいもち病菌の 12 座の SSR マーカーについて、圃場分離集団に対する識別能を明らかにすることを目的とし、「あきたこまち」が栽培されている圃場 YA、YA と距離 1 km の「あきたこまち」栽培圃場 TA、YA と距離 30 m の「ひとめぼれ」栽培圃場 YH から菌の世代別に採集したいもち病菌の集団構造を SSR マーカーにより解析した。12 マーカーのうち 1 マーカーは多型がなく、3 マーカーは世代経過時に変異する可能性が示唆されたため、中程度のアレル数を示す 8 マーカーを集団構造解析に用いた。供試した 3 圃場のいもち病菌集団および世代別分集団のハプロタイプ多様度は 0.535 ~ 0.904 であり、「ひとめぼれ」発生初期集団を除き比較的高い値を示した。圃場別の 3 集団および世代別の 8 分集団におけるペアワイズ F_{ST} および R_{ST} を算出した結果、同一圃場の分集団間では遺伝的分化は検出されなかったが、圃場別の集団はそれぞれ遺伝的に異なることが明らかとなり、8 マーカーを用いることで、種子由来を異にする同一品種上や、近接する圃場の異品種上のいもち病菌集団を識別できることが明らかとなった。また、早期に発生した菌の近接圃場への移入の検出にも SSR マーカーが有効であった。さらに、同一品種間と隣接異品種間を比較した場合、SSR ハプロタイプに基づき作成した系統樹から、それらの遺伝的分化の方向が異なることが明らか

となった。以上の結果から、本 SSR マーカーは従来識別が困難であった同一品種間および近接圃場間のいもち病菌集団の識別に有効であるだけでなく、いもち病菌の移出入率や遺伝的浮動の大きさの推定等、進化的指標の評価にも適用できることが示された。

引用文献

- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47–50.
- Fukuoka, S., Saka, N., Koga, H., Ono, K., Shimizu, T., Ebana, K., Hayashi, N., Takahashi, A., Hirochika, H., Okuno, K. and Yano, M. (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in Rice. *Science* 325: 998–1001.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revaudel, E., Salin, F. and Petit, R.J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 591–611.
- Hayashi, N., Inoue, H., Kato, T., Funao, T., Shiota, M., Shimizu, T., Kanamori, H., Yamane, H., Hayano-Saito, Y., Matsumoto, T., Yano, M. and Takatsuji, H. (2010). Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *The Plant J.* 63: 498–510.
- 伊藤隆二 (1967). いもち病抵抗性品種の罹病化とその育種的対策. *育種学最近の進歩* 8: 61–66.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B. (2000). Direct interection of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19: 4004–4014.
- 小林次郎 (1984). 発生初期における葉いもちの疫学的研究. *秋田農試研報* 26: 1–84.
- McDonald, B.A., Mundt, C.C. and Chen, R-S. (1996). The role of selection on the genetic structure of pathogen populations: Evidence from field experiments with *Mycosphaerella graminicola* on wheat. *Euphytica* 92: 73–80.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*, p. 177, Columbia University Press, New York.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Note* 6: 288–295.
- 坂 紀邦・寺島竹彦・工藤 悟・加藤恭宏・杉浦和彦・遠藤征馬・城田雅毅・井上正勝・大竹敏也 (2007). いもち病高度圃場抵抗性を有する水稻新品種「みねはるか」。愛知農試研報 39: 95–109.
- 坂 紀邦・福岡修一・寺島竹彦・工藤 悟・安東郁男・杉浦和彦・佐藤宏之・前田英郎・遠藤征馬・加藤博美・井上正勝 (2010). いもち病高度圃場抵抗性と極良食味特性を併せ持つ水稻新品種「中部 125 号」の育成. *愛知農試研報* 42: 171–183.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- Spitze, K. (1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: Quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135: 367–374.
- 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.
- 高橋真実・芦澤武人・平八重一之・森脇丈治 (2008). 水田圃場におけるイネいもち病菌の病原性突然変異頻度の推定. *北陸病虫研報* 57: 11–17.
- 田中恒一・三浦春夫・平山成一・菊地市郎 (1970). 新庄市におけるシモキタのいもち病多発生について. *北日本病虫研報* 21: 55.
- Thuillet, A.C., Bru, D., David, J., Roumet, P., Santoni, S., Sourdille, P. and Bataillon, T. (2001). Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. spp durum desf. *Mol. Biol. Evol.* 19: 122–125.
- 山田信介・松本利雄・堀 呈治・草野 登・橋本 晃 (1970). 福島県におけるフクニシキの穂いもち多発生について. *北日本病虫研報* 21: 54.
- 山口誠之・横上晴郁・片岡知守・中込弘二・滝田 正・東 正昭・加藤 浩・田村泰章・小綿寿志・小山田善三・春原嘉弘 (2005). いもち病に強い良食味水稻品種「ちゅらひかり」の育成. *東北農研研報* 104: 1–16.
- Zhan, J., Mundt, C.C., Hoffer, M.E. and McDonald, B.A. (2002). Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in a plant pathosystem. *J. Evol. Biol.* 15: 634–647.