イネいもち病菌株 Kyu9439013 および OS99-G-7a を個体識別する DNA マーカー

平八重一^{1)*}・藤本 知子¹⁾・山口純一郎²⁾・中島 隆¹⁾・藤田 佳克^{1)**}
(¹⁾九州沖縄農業研究センター・²⁾佐賀県農業試験研究センター)

Specific DNA markers of *Pyricularia grisea* isolates, Kyu9439013 and OS99-G-7a.
Kazuyuki Hirayae^{1)*}, Tomoko Fujimoto¹⁾, Junichiro Yamaguchi²⁾, Takashi Nakajima¹⁾ and
Yoshikatsu Fujita^{1)**} (¹National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region,
Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan. ²Saga Prefectural Agriculture Research Center, Kawasoe-
cho, Saga 840-2205, Japan)

By using a primer set of pJF1 and pJR1, polymerase chain reaction (PCR) fragments, ca. 1,300 bp and ca. 2,700 bp were amplified from *Pyricularia grisea* isolates, Kyu9439013 and OS99-G-7a, respectively. The fragments were found to be unique to each isolate, suggesting that these could be used as specific DNA markers for the 2 isolates. Further investigation confirmed the specificity of the fragments: in the 480 isolates examined, some showed a fragment of ca. 800 bp, while others showed none. The specific markers of the 2 isolates were stably detected after 50 times transfer on medium and 7 times infection on rice leaves. Further, virulence of the 2 isolates was not reduced after the rice infection. Thus, since the isolates Kyu9439013 and OS99-G7a can be clearly identified by a specific DNA marker, these can be used as efficient tools to trace the rice blast pathogen in natural fields.

Key words : *Pyricularia grisea*, isolate-specific DNA marker, ecological study

緒 言

いもち病はイネの最重要病害である。いもち病菌はイネ品種の真性抵抗性遺伝子を侵す病原性変異系統（レース）や薬剤耐性菌を出現させ、たびたび甚大な被害をもたらしてきた。いもち病の発生圃場から分離される菌のレースや遺伝子型は多様であるが、これらはそこに存在した菌が変異した結果なのか、あるいは別の地域からの侵入によるものなのかについては十分に明らかでない。これまで、RFLP 法、RAPD 法、AFLP 法、*Pot2* rep-PCR 法等がいもち病菌個体群の遺伝的多様性や薬剤耐性菌出現の解明に利用されてきた (Correll et al., 2000 ; Don et al., 1999 ; George et al., 1998 ; 平八重ら,

1999 ; Javan-Nikkhah et al., 2004 ; 生井ら, 2006 ; Sone et al., 1997 ; Suzuki et al., 2006)。AFLP 法 (平八重ら, 1999), rep-PCR 法 (Suzuki et al., 2006), SSR 法 (Kaye et al., 2003) においては、いもち病菌を個体識別できる可能性も示されているが、これらの手法には、操作の利便性、再現性および確実性に問題が残されている。従って、より正確にいもち病菌の個体群動態を明らかにするためには、特定のいもち病菌株を簡便かつ確実に識別可能な DNA マーカーの開発が有効と考えられる。

本研究において、著者らは、STS 化したいもち病菌の非病原性遺伝子連鎖マーカーの有無を調査する過程で、他の菌株と異なる大きさの増幅断片を示す菌株 (Kyu9439013, OS99-G-7a) を見いだした。すなわち、増幅断片は両菌株間でも異なっており、特異的な DNA マーカーとしてそれぞれの菌株を識別できる可能性が示唆された。そこで、これら 2 菌株を九州北部地域の佐賀県相知町および熊本県菊鹿町の圃場に伝染源として導入してその伝搬を追跡することを想定し、導入予定地域の菌株を対象に DNA マーカーの特異性を調査した。また、

*, **現在 中央農業総合研究センター

*Corresponding author, hirayae@affrc.go.jp

Present address: National Agricultural Research Center, Inada, Joetsu, Niigata 943-0193, Japan

**Present address: National Agricultural Research Center, Kannondai, Tsukuba 305-8666, Japan

両菌株を識別する DNA マーカーと病原力の安定性について検討した。

材 料 お よ び 方 法

1. 供試菌株

佐賀県相知町とその周辺地域、および熊本県菊鹿町の水田から採集した計460株、および研究室保存の様々な由来とレースを含む計23株を供試した (Table 1)。すべての菌株はろ紙法で -30°C に保存し、必要に応じて PDA 培地で生育させたのち PDB 培地 (ともに Difco) で培養を行い、DNA 抽出のための菌体試料を得た。また、佐賀県および熊本県分離株については、各グループから5菌株以上を供試し、Yamada et al. (1976) の9品種に清沢 (1979) の3品種「K60」, 「BL 1」, 「K59」を加えた12判別品種によりレース検定を行った。

2. 菌体 DNA の抽出

菌体 DNA の抽出は、既報 (平八重ら, 1999) に従った。また、簡易抽出は、5ml の PDB 培地で $25^{\circ}\text{C} \cdot 3$ 日間静置培養して得られた少量の菌体を $50\mu\text{l}$ のセルラーゼ液 (1%セルラーゼ (Sigma), 50mM トリス-塩酸, pH7.4, 10mM エチレンジアミン四酢酸) に懸濁して $37^{\circ}\text{C} \cdot 90$ 分保ち、その後 $450\mu\text{l}$ の20mM トリス-塩酸, pH 8 を混合後 $6,000\text{rpm} \cdot 5$ 分間の微量遠心分離で得られた上清を鋳型 DNA 溶液とした。

3. STS マーカーの検出

佐賀県および熊本県分離菌株、研究室保存菌株の計483株 (Table 1) を供試し、STS マーカーの検出を行った。プライマーには、pJF 1 (5' TGGTCGCAGAGCCTTGATGGG 3') および pJR 1 (5' TGGTCGCAGATAGGTTAGAAT 3') のセットを用いた。PCR 反応液は、鋳型 DNA 20ng または簡易抽出 DNA 溶液 $5\mu\text{l}$, プライマー $0.125\mu\text{M}$, dNTP 0.2mM , 2mM Mg^{2+} , Ex Taq (TaKaRa) 0.5units を含む $20\mu\text{l}$ とした。温度条件は、 $94^{\circ}\text{C} \cdot 3$ 分の予備変性のうち、 $94^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分の変性、 $62^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分のアニーリング、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 2$ 分の伸長反応を25サイクル行い、最後に $72^{\circ}\text{C} \cdot 5$ 分の反応を加えた。

4. DNA マーカーおよび病原力安定性の検討

Kyu9439013株、OS99-G-7a株に特異的な DNA マーカーの安定性については、PDA 培地で1週間ごとに50回まで継代培養した場合、および、6葉期の「ヒノヒカリ」を用いて、葉身上で形成させた胞子を健全なイネに接種する操作を7回繰り返した場合のそれぞれについて、pJF 1 と pJR 1 の組合せによる増幅断片を検出した。なお、イネ継代株は、7回目の病斑から単胞子分離した50

菌株を供試した。

両菌株の病原力の安定性については、上述のそれぞれ5株のイネ継代株を供試し、胞子形成能、病斑形成能を継代前の元株と比較した。胞子形成については、常法によりオートミール培地で形成させた胞子数を計数した。病斑形成については、6葉期の「ヒノヒカリ」に同量の胞子懸濁液 (10×10^3 個/ml) を噴霧接種した場合の病斑数、病斑の大きさを観察した。接種試験は室内で行った。

5. 特異性決定領域の検討

STS マーカー (J18) の両端の塩基配列をもとに、3種類のフォワードプライマーと2種類のリバースプライマーを設計した (Fig. 2)。それぞれに特異的な増幅断片が認められた Kyu9439013株および OS99-G-7a 株について、pJF 1 と pJR 2 (5' GAGCCACAAAAAGATG TTTCT 3'), pJF 2 (5' AGTTGCCTTAGGCATA GTGT 3') と pJR 1, pJF 2 と pJR 2, および pJF 3 (5' AGAAACATCTTTTGTGGCTC 3') と pJR 1 の各組合せによる増幅断片を検出した。対照として OS98-P-01, OS98-P-05, OS98-P-06, OS98-P-08 の4菌株を供試し、PCR は上述の条件で行った。

結 果

1. STS マーカーの検出

約480の菌株を供試して STS マーカーの検出を行った結果、pJF 1 と pJR 1 のプライマーセットによる PCR では、Kyu9439013株のみで約1,300bp の増幅断片が検出され (Table 1, Fig. 1), OS99-G-7a 株のみで約2,700bp の増幅断片が検出された (Table 1)。一方、その他の菌株では、約800bp の断片が検出されるか、断片の増幅が認められなかった。佐賀県および熊本県の圃場分離株では1菌株を除き約800bp の断片が検出されたのに対し、過去に分離され長年利用されてきた保存菌株では、断片の増幅が認められないものが多く存在した (Table 1)。多数菌株の調査では、鋳型 DNA のセルラーゼ処理による簡易抽出が有効であった。また、レース検定に供試した佐賀県および熊本県分離株は、すべてレース007.0であった。

2. Kyu9439013株および OS99-G-7a 株における特異的 DNA マーカーの安定性

Kyu9439013株および OS99-G-7a 株を PDA 培地で1週間ごとに50回まで継代培養したのちにも、pJF 1 と pJR 1 のプライマーセットによる PCR でそれぞれ約1,300bp と約2,700bp の増幅断片が検出された。また、イネの葉身を用いて接種と胞子形成を7回繰り返した場

Table 1. Properties of the *Pyricularia grisea* isolates used in this study

Isolate	Basis of geographical origin (Year)	Race ^{a)}	Fragment size (bp) ^{b)}
Field isolates (total 460)			
OS98- L -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12	Ouchi T. Saga (1998)	007. 0	850
OS98- P -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12	Ouchi T. Saga (1998)	007. 0	850
YM98- L -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12	Yamato T. Saga (1998)	007. 0	850
YM98-01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32	Yamato T. Saga (1998)	007. 0	850
FSO98-01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32	Fuji T. Saga (1998)	007. 0	850
FSK98-01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -41, -42, -43, -44, -45, -46, -47, -48, -49, -50, -51, -52, -61, -62, -63, -64, -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72	Fuji T. Saga (1998)	007. 0	850
MK98-01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -41, -42, -43, -44, -45, -46, -47, -48, -49, -50, -51, -52, -61, -62, -63, -64, -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -81, -82, -83, -84, -85, -86, -87, -88, -89, -90, -91, -92, -101, -102, -103, -104, -105, -106, -107, -108, -109, -110, -111, -112	Mitsuse V. Saga (1998)	007. 0	850
OS99- L -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11	Ouchi T. Saga (1999)	007. 0	850
OS99- P -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12	Ouchi T. Saga (1999)	007. 0	850
OS99- G -2a, -3a, -5a, -6a, -8a, -9a, -10a, -11a, -12a	Ouchi T. Saga (1999)	007. 0	850
OS99- G -4a	Ouchi T. Saga (1999)	007. 0	No fragment
OS99- G -7a	Ouchi T. Saga (1999)	007. 0	2, 700
OS99- L -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12	Ouchi T. Saga (1999)	007. 0	850
OS99- P -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18	Ouchi T. Saga (1999)	007. 0	850
YM99- S -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10a, -11a, -12a	Yamato T. Saga (1999)	007. 0	850
YM99- L -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12	Yamato T. Saga (1999)	007. 0	850
YM99- P -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17	Yamato T. Saga (1999)	007. 0	850
OS2K - SG -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12	Ouchi T. Saga (2000)	007. 0	850
OS2K - S -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23	Ouchi T. Saga (2000)	007. 0	850
OS2K - P -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20	Ouchi T. Saga (2000)	007. 0	850
KKK2K - P -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20	Kikuka T. Kumamoto (2000)	007. 0	850

KKF2K - SC -01, -02, -03, -04, -05, -06, -21, -22, -23, -24, -25, -51, -52, -53, -54, -55	Kikuka T. Kumamoto (2000)	007. 0	850
OS01- SG -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25	Ouchi T. Saga (2001)	007. 0	850
KKF01- SGH -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21	Kikuka T. Kumamoto (2001)	007. 0	850
KKF01- SGM -01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08, -09, -10, -11, -12, -13, -14	Kikuka T. Kumamoto (2001)	007. 0	850
Reference isolates (total 23)			
Mu -95	Mutant from Kyu91-01 (Ooita, 1991) (1993)	001. 2	850
Ken54-04	Gifu (1954)	003. 0	850
Ken54-20	Yamaguchi (1954)	003. 0	No fragment
95Mu -29	Mutant from Kyu9447012 (Okinawa, 1994) (1995)	003. 2	850
Shin83-34	Niigata (1983)	005. 0	850
Ina86-137	Aichi (1986)	007. 0	No fragment
Hoku1	Hokkaido (1948)	007. 0	No fragment
Ina72	Nagano (1957)	031. 1	850
NAO -02	Niigata (unknown)	033. 1	No fragment
TH68-140	Aichi (1968)	035. 1	850
2145- R -57	Cross progeny (1990)	037. 1	No fragment
Kyu9439013	Kochi (1994)	047. 0	1, 350
TH77-1	Akita (1977)	047. 0	No fragment
TH69-8	Fukushima (1969)	071. 1	850
Sasamori121	Yamagata (1990)	077. 1	850
Ina168	Aichi (1958)	101. 0	850
CHNOS60-2-3	China (1993)	102. 0	850
Ken53-33	Aichi (1953)	137. 1	No fragment
Ina93-3	Yamaguchi (1993)	301. 0	850
P -2b	Niigata (1948)	303. 1	850
Ao92-06-2	Aomori (1992)	337. 1	850
IW81-04	Akita (1981)	437. 1	No fragment
Ai74-134	Aichi (1974)	477. 1	No fragment

a) Race for each field group was determined on the basis of some isolates.

b) PCR amplification was performed with a primer set of pJF1/pJR1 for all the isolates. Total 483 isolates were used.

Table 2. Estimated size (bp) of each fragment amplified using a different primer combination

Primer combination	Isolate of <i>P. grisea</i>		
	Kyu9439013	OS99- G -7a	OS98- P -01 ^{a)}
pJF1/pJR1	1, 300	2, 700	800
pJF1/pJR2	650	2, 500	650
pJF2/pJR1	1, 100	2, 500	600
pJF2/pJR2	450	2, 300	450
pJF3/pJR1	650	160	160

a) For the other isolates such as OS98- P -05, OS98- P -06, and OS98- P -08, the fragments amplified with each primer set were of the same size as shown for OS98- P -01.

合にも、培地上の継代培養と同様に両菌株で増幅断片に変化はなかった。

3. Kyu9439013株および OS99- G -7 a 株の病原性の安定性

イネで7回継代培養した5分離株平均の胞子形成数は、シャーレあたりで Kyu9439013株が 5.8×10^4 、OS99- G -7 a 株が 1.0×10^5 と計数され、継代前のそれぞれ 6.0×10^4 、 1.0×10^5 と差がなかった。また、「ヒノヒカ

Fig. 1. A unique fragment obtained from the isolate Kyu9439013 by PCR amplification by using a primer set of pJF1 and pJR1. The size of the fragment (arrow) was estimated to be ca. 1,300 bp. M, PCR markers (50-2,000 bp); 1, isolate CHNOS60 - 2 - 3; 2, 2145 - R - 57; 3, Mu-95; 4, Ken54 - 04; 5, Ken54 - 20; 6, 95Mu - 29; 7, Shin83 - 34; 8, Ina86 - 137; 9, Hoku1; 10, Ina72; 11, TH68 - 140; 12, Kyu9439013; 13, TH69 - 8; 14, Sasamori121; 15, Ina168; 16, Ken53 - 33; 17, Ina93-3; 18, P-2b; 19, Ao92 - 06; 20, IW81-04; 21, Ai74-134; 22, TH77 - 1; 23, NAO-02. The primer sequences were as follows: pJF1, 5' - TGGTCGCAGAGCCTTGATG - 3'; pJR1, 5' - TGGTCGCAGATAGGTTAGAA T - 3'.

Fig. 2. Schematic representation of 5 PCR primers designed on the J18 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. The solid line toward the terminal regions represents a known sequence, while the dashed line in the middle represents an unknown region. Arrows indicate the approximate position and direction of primers. To investigate the specificity for the 2 isolates, Kyu9439013 and OS99-G-7a, PCR amplifications within the J18 RAPD marker were performed with 5 primer sets: pJF1/pJR1, pJF1/pJR2, pJF2/pJR1, pJF2/pJR2, and pJF3/pJR1. The primer sequences of pJF1 and pJR1 are provided in the legend of Fig. 1. The other primer sequences were as follows: pJF2, 5' - AGTTGCC TTAGGGCATAGTGT - 3'; pJF3, 5' - AGAAA CATCTTTTGTGGCTC - 3'; and pJR2, 5' - GAGC CACAAAAAGATGTTTCT - 3'. All the sequences have also been described in the text.

り」に同量の胞子懸濁液を接種した場合、いずれの分離株の病斑数、病斑の大きさについても継代前の元株との違いは認められなかった。

4. 特異性決定領域の検討

Kyu9439013株および OS99-G-7 a 株について、マーカー両端塩基配列をもとに設計したプライマー (Fig. 2) を組合せて PCR を行った結果、それぞれのマーカーの特異性を決定する領域が明らかとなった。

Fig. 3. Amplified fragments by using each primer set: 1, pJF1/pJR1; 2, pJF1/pJR2; 3, pJF2/pJR1; 4, pJF2/pJR2; and 5, pJF3/pJR1. The estimated size of each fragment is summarized in Table 2. M1, Perfect DNA markers (0.5 - 12 kb); M2, PCR markers (50 - 2,000 bp); K, Kyu9439013; G, OS99 - G - 7a; P, OS98 - P - 01. For OS98 - P - 05, OS98 - P - 06, and OS98 - P - 08, the fragments amplified with each primer set were of the same size as that of the fragments obtained for OS98-P-01. See Fig. 1 and Fig. 2 for primer sequences.

Kyu9439013株では、pJF 2 と pJR1, pJF 3 と pJR 1 の各組合せによるそれぞれ1, 100bp, 650bp の断片が他の供試5菌株と異なっており、pJF 1 と pJR2, pJF 2 と pJR 2 の組合せで検出される650bp, 450bp の断片は OS99-G-7 a 株を除く OS98-P-01, OS98-P-05, OS98-P-06 および OS98-P-08 の4菌株でも検出された (Table 2, Fig. 3)。

OS99-G-7 a 株では、pJF 1 と pJR2, pJF 2 と pJR1, pJF 2 と pJR 2 の各組合せによるそれぞれ2, 500bp, 2, 500bp, 2, 300bp の断片が他の菌株と異なっており、pJF 3 と pJR 1 の組合せで検出される160bp の断片は Kyu9439013株を除く他の供試4菌株でも検出された (Table 2, Fig. 3)。

考 察

Kyu9439013株および OS99-G-7 a 株をそれぞれに識別する DNA マーカーを明らかにした。これらは、交配系を利用した非病原性遺伝子連鎖地図の RAPD マーカーに由来しており、それぞれの内部に大きさの異なる断片が挿入されていることが示された。すなわち、プライマーの組合せによる PCR の結果から、Kyu9439013株では pJF 3 (pJR 2) と pJR 1 の間に約500bp の断片、OS99-G-7 a 株では pJF 2 と pJR 2 (pJF 3) の間に約1, 850bp の断片の挿入が考えられた。それぞれの挿入断片については現在解析中である。

Kyu9439013株および OS99-G-7 a 株の個体識別マ-

カーは、一般のPCR法のみで検出できる。MGR586 (*Pot3*) RFLP法、AFLP法、*Pot2* rep-PCR法等の煩雑性や不安定性の問題はない。また、他の菌株が混在する場合にも個体識別マーカーにより対象菌株を確認できることから、検定菌株の単孢子分離を必要としない。

本研究により明らかとなった両菌株の個体識別マーカーは、培地による継代培養やイネ葉身への継代接種を繰り返したのちにも安定に検出された。また、Kyu9439013株およびOS99-G-7 a株のイネ継代株は、継代前の元株と同等の孢子形成能力や病斑形成能力を有していた。以上のガラス室内試験の結果から、両菌株を圃場に導入した場合にもイネの生育期間を通していもち病菌の伝搬を追跡可能と考えられた。

Kyu9439013株のレースは047.0であり、OS99-G-7 a株は007.0である。近年九州地域で分離されるいもち病菌のレースは95%以上が007.0であるため、Kyu9439013株を圃場における追跡の対象菌株として選定した場合には、いもち病真性抵抗性遺伝子として*Pit*をもつ「ハナエチゼン」等の品種を利用することにより、選定菌株の分離が容易になると考えられる。また、九州地域の主要な在来レース007.0であるOS99-G-7 a株を対象菌株とした場合には、レースの違いによる増殖力の影響を考慮しなくてもよい利点がある。

今後は、まずKyu9439013株およびOS99-G-7 a株を佐賀県、熊本県の圃場に導入して個体識別マーカーによる追跡を行い、レース変動や圃場における越冬の可能性を明らかにする予定である。さらに、個体識別マーカーの利用は、野外における侵害レースの出現とその頻度の推定にも有効と考えている。現在までに、新潟県など佐賀県、熊本県以外の地域で分離された500以上の菌株についても、Kyu9439013株およびOS99-G-7 a株の個体識別マーカーの特異性を確認している。本邦の広い地域で、個体識別マーカーをもつ両菌株の利用が可能と考えられる。

引用文献

- Correll, J. C., T. L. Harp, J. C. Guerber, R. S. Zeigler, B. Liu, R. D. Cartwright and F. N. Lee (2000) Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology* 90: 1396-1404.
- Don, L. D., M. Kusaba, A. S. Urashima, Y. Tosa, H. Nakayashiki and S. Mayama (1999) Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 65: 15-24.
- George, M. L. C., R. J. Nelson, R. S. Zeigler and H. Leung (1998) Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequence. *Phytopathology* 88: 223-229.
- 平八重一之・水久保隆之・宮崎力・斉藤彰・西和文・岩野正敬 (1999) AFLP法によるイネいもち病菌DNA多型の検出. 九病虫研会報45: 12-16.
- Kaye, C., J. Milazzo, S. Rozenfeld, M-H Lebrun and D. Tharreau (2003) The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology* 40: 207-214.
- 清沢茂久 (1979) 作物の病害抵抗性育種とその基礎研究 (18). 農及園54: 1427-1432.
- Javan-Nikkhah, M., B. A. McDonald, S. Banke and G. A. Hedjaroude (2004) Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 909-919.
- 生井恒雄・上林千裕・芦澤武人 (2006) いもち病罹病イネ株内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.
- Sone, T., T. Abe, N. Yoshida, M. Suto and F. Tomita (1997) DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping of Japanese isolates of rice blast fungus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 63: 155-163.
- Suzuki, F., M. Arai and J. Yamaguchi (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.
- Yamada, M., S. Kiyosawa, T. Yamaguchi, T. Hirano, T. Kobayashi, K. Kushibuchi and S. Watanabe (1976) Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 42: 216-219.

(2008年4月30日受領; 7月31日受理)