

# 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

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者	鈴木, 文彦 藤, 晋一 古場, 文子 中島, 隆 荒井, 治喜
巻/号	78巻1号
掲載ページ	p. 10-17
発行年月	2012年2月

## 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

鈴木 文彦<sup>1\*</sup>・藤 晋一<sup>2</sup>・古場 文子<sup>3</sup>・中島 隆<sup>3</sup>・荒井 治喜<sup>4</sup>

### ABSTRACT

SUZUKI, F.<sup>1\*</sup>, FUJI, S.<sup>2</sup>, KOBAYASHI, A.<sup>3</sup>, NAKAJIMA, T.<sup>3</sup> and ARAI, M.<sup>4</sup> (2012). Analysis of genetic diversity and population structure in *Pyricularia oryzae* collected from western Japan using SSR markers. Jpn. J. Phytopathol. 78: 10–17.

We selected 12 simple sequence repeat (SSR) markers useful for differentiating Japanese isolates of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, and developed three multiplex sets, each containing four SSRs, for fluorescence detection. Genetic diversity and population structure of *P. oryzae* field isolates in western Japan were studied based on these markers. For a total of 293 isolates collected from 16 prefectures in 2001, a high level of genetic diversity was observed, with 265 different haplotypes and an average of 14.3 (range 2–36) alleles per locus. Estimates of population differentiation varied greatly among 10 prefectures, with pairwise  $F_{ST}$  ranging from 0.002 to 0.275. A Mantel test revealed significant positive correlation ( $r^2=0.224$ ,  $P=0.004$ ) between geographical distance (69–539 km) and pairwise  $F_{ST}$ , suggesting that the level of gene flow is remarkably high between neighboring prefectures, probably occurring via dispersal of spores and movement of infected rice seed. In contrast, a relatively high level of genetic differentiation was observed between prefectures located in geographically distant regions, suggesting that spore dispersal and seed movement over a relatively long distance is restricted. The SSR markers selected in this study should be useful for studying the population genetics of the rice blast fungus.

(Received May 13, 2011; Accepted October 17, 2011)

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

### 緒 言

いもち病はイネの最重要病害の1つであり、その防除のために毎年多くの殺菌剤や資材が投入されている。近年は環境問題や食の安全への関心が高まり、従来よりも効果的で減農薬に結びつく防除体系の再構築が求められている。しかし、いもち病の伝染環や発生生態に関しては、依然として未解明な部分が残されており、防除適期や防除基準の根拠となるデータが不足している。そこで、いもち病の生態研究をいっそう進展させていくために、SSR (Simple Sequence Repeat) マーカーに着目した。本マーカーの利用により、いもち病菌を個体レベルで識別してその挙動を追跡する、あるいはいも

ち病菌を集団として捉えてその変動を集団遺伝学的に解析することなどが容易になる。

近年、植物病原糸状菌の集団や生態を解析する手段として、分子マーカーが盛んに用いられている。いもち病菌においても、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), rep-PCR (repetitive element-based polymerase chain reaction), SSRなどが個体識別用のマーカーとして開発されてきた (George *et al.*, 1998; 平八重ら, 1999; Kaye *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 1991)。このうち、SSRは、ゲノム中に広く散在する短いモチーフ (1～6塩基) の繰り返し配列であり、多型性に富み遺伝的にも比較的安定、中立で共優性を示すという特徴がある。複数

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 秋田県立大学生物資源科学部バイオテクノロジーセンター (〒 010-0195 秋田県秋田市下新城野字街道端西 241-438) Biotechnology Center, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, 241-438 Kaidobata-Nishi, Nakano, Shimoshinjo, Akita City, Akita 010-0195, Japan

<sup>3</sup> 九州沖縄農業研究センター (〒 861-1192 熊本県合志市須屋 2421) NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, 2421 Suya, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan

<sup>4</sup> 中央農業総合研究センター北陸研究センター (〒 943-0193 新潟県上越市稲田 1-2-1) NARO Agricultural Research Center Hokuriku Research Center, 1-2-1 Inada, Joetsu, Niigata 940-0193, Japan

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

の座位を組み合わせることで、正確で迅速な個体識別が可能となるため、個体間の普遍的な比較を行うことができる。これらの利点を活かし、連鎖地図の作製や集団遺伝学への応用、DNA 鑑定などの遺伝マーカーとして広く用いられている。一方、SSR の難点としては、開発に時間と労力がかかること、解析に高額機械を必要とすることがあげられる。だが、いったんマーカー選抜と解析系の構築が成功すれば、その後のデータ取得は安価でかつ容易である。現在、いもち病菌においては、ゲノム情報を入手可能な状況にあることから、SSR 配列の探索とプライマーの設計までは机上で行うことができる。

いもち病菌における SSR の開発は、最初は Brondani *et al.* (2000) が AG リピートを標的に探索を行い、24 種類のプライマーセットを報告した。その後、Kaye *et al.* (2003) は、EST や BAC ライブラリーなどの情報から探索を進め、Nitta *et al.* (1997) の連鎖地図上に 23 種類の SSR マーカーをマッピングした。一方、Li *et al.* (2007) は、繰り返し単位が 10 塩基を越えるミニサテライトマーカーを使用しても多型が検出できることを報告している。しかし、これら既報のマーカーでは、遺伝的多様性の高い来歴の供試菌株を基準に選抜していることから、日本国内の圃場から分離されたイネいもち病菌の集団への適用を試みたが、多型が全く観察されないか極端に低頻度であった (鈴木ら、未発表)。このため、SSR マーカーを生態研究等に活用していくことを目的とした場合、選抜の段階で比較的近縁の菌群を対象に再検討を行う必要があると考えられる。そこで、Suzuki *et al.* (2009) は、公開されたゲノム情報 (Dean *et al.*, 2005) を利用して、日本国内の分離菌を対象にマーカー選抜を進め、多型検出に有効な 9 マーカーを開発した。Zheng *et al.* (2008) も、同時期にゲノム情報から網羅的に 446 の SSR を探索し、そのうち 313 に多型が認められることを明らかにし、座乗染色体における位置情報とともに報告している。

本研究では、Suzuki *et al.* (2009) の 9 マーカーを基本とし、Kaye *et al.* (2003) のマーカーを含む 3 マーカーを新たに加え、合計 12 マーカーを国内分離菌の解析用に選定した。まず、操作性や解析効率を向上させるため、12 マーカーについてマルチプレックス化を実施した。次に、2001 年に西日本 (中国、四国、九州地方) で収集された分離菌を供試し、アレルやハプロタイプの検出頻度を中心として、選定した 12 マーカーの有効性を検証した。なお、供試する西日本分離菌は、2001 年に全国的に行われたレース調査時に収集されたものである (荒井・中島, 2003, 小泉ら, 2007)。さらに、本解析で得られたデータを使用し、集団遺伝学的手法に基づく解析法の適用を試みた。

## 材料および方法

**供試菌株** SSR 座の選抜試験には、レース検定用標準菌株 12 菌株 (研 54-04, 研 54-20, 新 83-34, 北 1, 長 69-150, 九 82-625A, 稲 72, 稲 168, 研 53-33, P-2b, 青 92-06-2, 岩 81-04), および圃場分離菌 12 菌株 (02-416702, 02-4110302, 02-4110301, Le2338-4, 03-440101, 03-441901, 03-442903, 03-420401, 宮崎 2-9, 03-FR16-03, 鳥取 6, 西脇 4) を供試した。選抜した SSR マーカーの有効性の検証試験には、2001 年に西日本 (中国、四国、九州地方) の 16 県から収集したいもち病菌を供試した。本コレクションは、レース分布調査を目的に全国的に収集したものであり、1 圃場から 1 菌株を基本として県単位で集められた (荒井・中島, 2003; 小泉ら, 2007)。この西日本を対象にした調査では、最終的にレース検定まで行った菌株は、徳島県を除く 16 県で 301 菌株となっている (荒井・中島, 2003)。本研究では、保存菌株の培養から開始し、死滅菌を除いた上でイネいもち病菌と確認した菌株は、最終的に 293 菌株となった。各県の供試菌株数は、Table 1 に示した。

**SSR マーカーの選抜** Kaye *et al.* (2003) の報告から、ヌルアレル頻度が低く反復モチーフが 3 塩基のタイプを中心に、

Table 1. Haplotype number and haplotypic diversity of *Pyricularia oryzae* populations from 16 prefectures in western Japan based on SSR markers and *Pot2* rep-PCR

Area and prefecture	No. of isolates	Haplotypes			
		12 SSR markers		<i>Pot2</i> rep-PCR	
		Number	Diversity	Number	Diversity
<b>Chugoku</b>					
Tottori	44	40	0.97	18	0.87
Shimane	34	33	0.97	15	0.86
Okayama	12	12	1.00	7	0.85
Hiroshima	7	7	1.00	4	0.61
Yamaguchi	7	7	1.00	5	0.76
<b>Shikoku</b>					
Kagawa	4	4	1.00	4	1.00
Ehime	12	12	1.00	5	0.53
Kochi	9	9	1.00	5	0.64
<b>Kyushu</b>					
Fukuoka	17	16	0.93	7	0.68
Saga	16	15	0.93	11	0.85
Nagasaki	31	30	0.97	17	0.88
Kumamoto	19	19	1.00	12	0.85
Oita	42	40	0.97	14	0.84
Miyazaki	6	6	1.00	5	0.78
Kagoshima	25	25	1.00	12	0.79
Okinawa	8	8	1.00	4	0.56
<b>Total</b>	<b>293</b>	<b>265</b>	<b>0.997</b>	<b>101</b>	<b>0.891</b>

Table 2. Characteristics of 12 SSR loci of *Pyricularia oryzae* assembled into three multiplex PCRs<sup>a</sup>

Multiplex set	Locus <sup>b</sup>	Repeat motif	Expected fragment length (bp)	Primer sequences and labeling <sup>c</sup>	Final concentration for PCR (nM)	Reference
A	<i>Mgms02</i> /VI/Sct.5.194/88907	(GGTA) <sub>48</sub>	348	P5: TGGTCAGTATGCAAGCTTGT P6: PET-ATAGAAGTGACTTGTGGTGGG	100	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
	<i>Mgms06</i> /II/Sct.5.184/961490	(TAC) <sub>17</sub>	229	P19: AAAGAGACGTGCCAGAAAGAC P20: VIC-AGCCATCTTATGGACTGTGGA	50	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
	<i>ms87-88</i> /I/Sct.5.195/514883	(TGC) <sub>12</sub>	203	Pyrms87: AGACTTGTACTCGGGTCTTGA Pyrms88: NED-CCAGATGTCACTCCCCTGTA	50	Kaye <i>et al.</i> (2003)
	<i>ms99-100</i> /V/Sct.5.134/182713	(TGT) <sub>21</sub>	244	P21: AACGTCTGTGCGCTGAGTGAT P22: FAM-AACATGGAAAGGGTCCGAT	50	Kaye <i>et al.</i> (2003)
B	<i>Mgms01</i> /VI/Sct.5.194/920465	(CAG) <sub>9</sub>	219	P1: NED-CGCAGCAGCCGACTATCAA P2: TAGTGGGAGTGCCAGATTGTG	50	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
	<i>Mgms04</i> /III/Sct.5.191/554969	(TGT) <sub>17</sub>	245	P9: PET-TAAACCTGTTGCTGCTGTTGC P10: AAGACAACACCAGGGAGCAAT	100	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
	<i>Mgms07</i> /I/Sct.5.196/3981935	(CAA) <sub>15</sub>	228	P23: ATCTCGGTAGCCTAGTCTTCG P24: VIC-AAGTAAGCCGGATCGTCCAA	100	This study
	<i>Mgms08</i> /VII/Sct.5.193/38604	(CAA) <sub>37</sub>	273	P27: FAM-TCAGTGTGCAACAACAACCT P28: TAAATCACAACCATGTGGGC	50	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
C	<i>Mgms09</i> /VI/Sct.5.194/2934951	(TTC) <sub>16</sub>	220	P29: CAAACAACTTACAAGCGCCA P30: PET-GAGACGGCGGGAATAAATA	50	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
	<i>Mgms13</i> /V/Sct.5.190/2318515	(TC) <sub>62</sub>	248	P49: GGAATGATCACAACGACGAA P50: VIC-TTGTCTACCGGCAAAAAGA	100	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
	<i>Mgms14</i> /V/Sct.5.134/344542	(GTAG) <sub>23</sub>	225	P51: NED-CGGTAACTGGCAACTATCGT P52: ATCGAATGTACTGGGTGTCAGT	50	Suzuki <i>et al.</i> (2009)
	<i>Mgms15</i> /IV/Sct.5.177/554587	(AG) <sub>55</sub>	213	P55: FAM-TGGGCACCAAATAGTTTCCT P56: CGATTCCATAAGTGGCTTGGGA	50	Suzuki <i>et al.</i> (2009)

<sup>a</sup>Information concerning locus, repeat motif, and expected fragment length was obtained from *Magnaporthe grisea* database.

<sup>b</sup>Locus name/Linkage group/Supercontig No./Position in supercontig.

<sup>c</sup>Primer pair of Pyrms99 and 100 for amplification of this locus (Kaye *et al.*, 2003) was substituted with the newly designed primer pair of P21 and 22 in this study.

15 マーカー (ms33-34, ms37-38, ms45-46, ms47-48, ms61-62, ms63-64, ms67-68, ms77-78, ms83-84, ms87-88, ms93-94, ms99-100, ms101-102, ms115-116, ms125-126) を解析の標的とした。多型性評価には、上述のレース検定用標準菌株 12 菌株および圃場分離菌 12 菌株を供試した。また、Suzuki *et al.* (2009) がマーカー選抜時に調査対象とした 28 の SSR 座について、これらの供試菌株を用いてアレル多型性の再評価を行った。各供試菌株を PDB 培地で培養し、UltraClean Microbial DNA isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Solana Beach, CA) を用いて抽出した DNA をテンプレートとした。PCR は 10 µl の反応液で行い、1 × Ex *Taq* buffer, 0.2 mM dNTP, 各 primer を 0.5 µM, TaKaRa Ex *Taq* (TaKaRa Bio Inc. Otsu, Japan) を 0.25 unit に調製し、テンプレート DNA を 10 ng 添加した。反応条件は、94°C 2 分 30 秒の後、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分で 30 サイクル繰り返し、72°C 5 分の反応を行った。PCR には、サーマルサイクラー i-Cycler (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA) を用いた。PCR 産物を MetaPhor agarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME) の 3% ゲルで電気泳動を行い、アレルの多型性を調査した。

マルチプレックス化による SSR マーカーの検出 選定した 12 種類の SSR マーカーの検出は、増幅産物のサイズ、および増幅効率を考慮して各 4 マーカーを含む 3 セット (A, B, C) のマルチプレックス PCR として効率化した (Table 2)。SSR マーカーの PCR 増幅には ms99-100 を除き、すべて原典 (Kaye *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2009) で用いられているプライマー配列を使用した。ms99-100 については、原典 (Kaye *et al.*, 2003) のプライマー配列の 3' 側が反復モチーフ内に位置していたため、当該 SSR 座周辺配列からプライマー (P21 および P22, Table 2) を新たに設計し、これを用いた。プライマーペアの一方を 4 種類の蛍光色素 (6-FAM, VIC, NED, PET) のいずれかで標識し、反応液は、1 × PCR buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 mM dNTP Mix, Table 1 に示した 50 nM または 100 nM の

各 primer, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) 5 unit を最終濃度として, 10 ng のテンプレート DNA を加えた 10  $\mu$ l とした. テンプレート DNA には, 前述のキットで抽出した DNA の他, 簡易抽出法である PEX 法 (Nakahara *et al.*, 1999) で抽出した DNA を用いた. 反応条件は, 94°C 10 分の熱変性後に, 94°C 1 分, 55°C 1 分, 72°C 1 分で 30 サイクル繰り返し, 72°C 5 分の反応を行った. PCR には, サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いた. 反応後の増幅産物 1  $\mu$ l に 9.85  $\mu$ l の HiDi と 0.15  $\mu$ l のサイズスタンダード 500LiZ を加え, Genetic Analyzer ABI3100 (Applied Biosystems) によりキャピラリー電気泳動を行った後, GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems) でフラグメント解析を行い, アリルサイズを決定した.

西日本分離いもち病菌のジェノタイプピング 2001 年西日本分離 293 菌株を対象にして, 前項で構築したマルチプレックス PCR の解析系を適用し, 12 種類の SSR マーカーに対するアリルデータを取得した. また, *Pot2* rep-PCR 法 (Suzuki *et al.*, 2006) を用い, フィンガープリントパターンに基づく個体識別を比較のために行った. なお, テンプレート DNA の調製には, 前述の DNA 抽出キットを用いた.

データ解析 取得した 293 菌株の SSR マーカーの解析結果から, 各県集団および全集団のアリル多様度とハプロタイプ多様度 (Nei, 1987) を, GenAlEx ver. 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) および Arlequin ver. 3.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005) を用いて計算した. なお, 増幅産物を検出できなかったケース (ヌルアリル) は, ミッシングデータ (000) として処理した. マーカー間の連鎖不平衡 (LD) 解析は, Genepop (Raymond and Rousset, 1995) を用いて行い, 有意性の検定は Bonferroni の補正もあわせて行った. サンプル数が 10 以上の 10 県のデータについて, Arlequin ver. 3.1.1 を用いて県集団間のペアワイズ  $F_{ST}$  および  $Nm$  値を算出するとともに, AMOVA (analysis of molecular variance) 分析を行った. また, 各県集団の地理的位置を便宜的に県庁に定め, 空間的距離と遺伝的距離の相関解析 (Mantel test) を, GenAlEx ver. 6.1 を用いて行った. さらに, プログラム Populations 1.2.30beta (Langella, 2007) を用い, Neighbor-joining 法 (Saito and Nei, 1987) による集団系統樹を Nei *et al.* (1983) の遺伝距離 ( $D_A$ ) に基づき作成した.

## 結 果

### SSR の選抜とマルチプレックス化

Kaye *et al.* (2003) の 15 マーカーを標的に, 標準菌株 (12 菌株) と圃場分離菌 (12 菌株) を対象にして多型性を調査した結果, 全菌株では 9 マーカーで多型が観察されたが, 圃場分離菌では 4 マーカーのみで多型が観察された. そのうち 2

マーカー (ms87-88, ms99-100) は, アリル多様度が高いことから, 国内分離菌を対象とした解析に有用であると判断した. 一方, Suzuki *et al.* (2009) の 28 の座位については, 全菌株では 15 座位で多型が観察されたが, 圃場分離菌では 9 座位のみで多型が観察された. この 9 座位は, Suzuki *et al.* (2009) が報告した 9 マーカーの座位とすべて一致した. Suzuki *et al.* (2009) の 9 マーカーに, Kaye *et al.* (2003) から選抜した 2 マーカー (ms87-88, ms99-100) を加えると 11 種類となったが, 今回は標準菌株でのみ多型が観察された座位から, 座乗する連鎖群等を考慮した上で, 1 マーカー (*Mgms07*) をマルチプレックス化のために新たに選抜した. これらの 12 種類の SSR マーカーについて, 増幅産物のサイズ, 増幅効率を考慮した上でマルチプレックス化を検討した結果, Table 2 の組み合わせ (A, B, C) に最適化できた. プライマー濃度以外はすべて同一の PCR 反応条件で増幅後, キャピラリーシーケンサー (Genetic Analyzer ABI3100) を用いて解析した結果, 蛍光シグナルの種類とピークから各マーカーのアリルを明確に識別でき, マルチプレックス化による非特異的な増幅産物等も問題とはならなかった. また, 各マーカーを単独で検出した場合とマルチプレックス PCR で検出した場合とで, アリルサイズに差異がないことを確認した. テンプレート調製法としては, 抽出キットと PEX 法のいずれでもデータ取得が可能であった.

Table 3. Number of alleles, gene diversity, and observed size range of the 12 SSR loci in 293 *Pyricularia oryzae* isolates collected in western Japan in 2001

SSR locus	No. of alleles	Gene diversity	Observed size range (bp)
<i>Mgms01</i>	3	0.060	212–219
<i>Mgms02</i>	19	0.779	225–336
<i>Mgms04</i>	9	0.695	245–279
<i>Mgms06</i>	8	0.220	228–267
<i>Mgms07</i>	2	0.014	212–215
<i>Mgms08</i>	16	0.676	197–253
<i>Mgms09</i>	6	0.351	213–234
<i>Mgms13</i>	21	0.849	162–242
<i>Mgms14</i>	13	0.654	204–289
<i>Mgms15</i>	17	0.881	129–189
<i>ms87-88</i>	36	0.738	176–332
<i>ms99-100</i>	22	0.799	213–274
Mean	14.3	0.560	

Table 4. Pairwise comparisons of gene flow ( $Nm$ ) (above diagonal) and genetic differentiations ( $F_{ST}$ ) (below diagonal) among 10 populations of *Pyricularia oryzae* from western Japan

	Tottori	Shimane	Okayama	Ehime	Fukuoka	Saga	Nagasaki	Kumamoto	Oita	Kagoshima
Tottori	—	4.032	28.240	3.281	2.792	2.261	4.973	3.385	4.185	3.785
Shimane	0.110***	—	3.480	2.611	1.965	2.081	3.803	5.002	2.784	4.274
Okayama	0.017	0.126***	—	1.933	1.618	1.320	2.925	2.302	2.412	2.934
Ehime	0.132***	0.161***	0.206***	—	2.128	1.779	6.631	33.752	11.902	16.799
Fukuoka	0.152***	0.203***	0.237***	0.190***	—	198.031	26.852	3.550	5.020	3.558
Saga	0.181***	0.194***	0.275***	0.219***	0.003	—	15.661	3.328	3.716	2.955
Nagasaki	0.091***	0.116***	0.146***	0.070	0.018	0.031	—	17.192	30.902	11.283
Kumamoto	0.129***	0.091***	0.179***	0.015	0.123***	0.131***	0.028	—	19.679	268.870
Oita	0.107***	0.152***	0.172***	0.040	0.091***	0.119***	0.016	0.025	—	10.449
Kagoshima	0.117***	0.105***	0.146***	0.029	0.123***	0.145***	0.042	0.002	0.046	—

Notes: \*\*\* Significantly different at  $P < 0.001$ .

### 西日本分離いもち病菌の SSR 解析

選定した 12 種類の SSR マーカーにより、2001 年に西日本各県から収集したいもち病菌を解析した結果、供試した 293 株は 265 のハプロタイプに類別された (Table 1). ハプロタイプに基づく菌株集団の多様度は、県別にみると 0.93 ~ 1.00 の範囲にあり全体では 0.997 となり、きわめて高い値が検出された (Table 1). 各マーカーのアレル数は、2 ~ 36 であり平均で 14.3 となり、各マーカーで検出された多様度は、0.014 ~ 0.881 の範囲にあり平均で 0.560 となった (Table 3). マーカー間の全組み合わせについて、連鎖不平衡 (LD) 解析を実施した結果、62.2% (41/66) の組み合わせで有意 ( $P < 0.05$ ) な連鎖が認められ、Bonferroni 補正後では、なお 43.9% (29/66) が有意となった。試験を通しての観察されたヌルアレルはきわめて低頻度であり、2 つのマーカー (*Mgms08*, *ms87-88*) で 2 菌株ずつ観察されるにとどまった。複数の個体が属するハプロタイプとしては 19 種類が確認され、それらを分離地点から分類すると、同一県内で観察されたハプロタイプが 6 種類、隣接する県間が 7 種類、離れた県間が 6 種類であった。離れた県間で観察された 6 種類 (19 菌株) のハプロタイプの分離地は、それぞれ (愛媛, 高知, 福岡), (岡山, 高知), (香川, 佐賀, 長崎), (鳥取, 福岡, 佐賀, 大分), (愛媛, 鹿児島), (広島, 鹿児島) の組み合わせであった。比較のために実施した *Pot2* rep-PCR 解析では、293 の供試菌株から 101 のハプロタイプが検出され、全体のハプロタイプ多様度は 0.891 であった。

### 集団解析

10 県のデータ間でペアワイズ  $F_{ST}$  を算出した結果、0.002 から 0.275 (平均: 0.112 ± 0.010) となり、集団間の組み合わせによって比較的大きなばらつきのあることが明らかになった (Table 4). 地域ごとに分けてみた場合、九州 6 県では 0.002 ~ 0.131 (平均: 0.063 ± 0.014), 中国 3 県では 0.017 ~

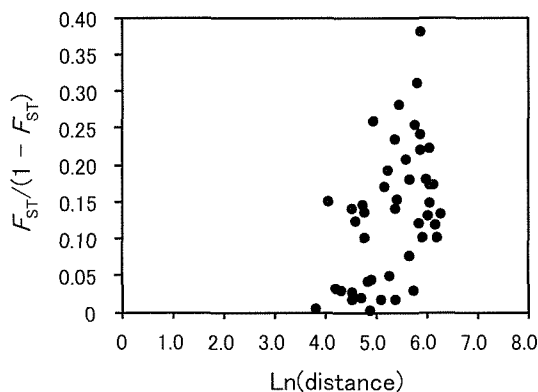


Fig. 1. Relationship between pairwise geographical distance and genetic differentiation as measured by  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  among 10 prefectural populations of *Pyricularia oryzae*. The significance of this relationship was evaluated using the Mantel test with 9,999 permutations ( $r^2=0.224$ ,  $P=0.004$ ).

0.126 (平均: 0.084 ± 0.034) と遺伝的距離は比較的小さくまとまった。一方、中国と九州の組み合わせでは、0.091 ~ 0.275 (平均: 0.155 ± 0.012) と遺伝的距離は大きくなった。四国については愛媛のみのデータであるが、九州 4 県 (長崎, 大分, 熊本, 鹿児島) との間で遺伝的距離が小さく、有意差も認められなかった。世代あたりの移住個体数 ( $Nm$ ) は、1.320 ~ 268.870 となり、隣接する県間など近距離の集団間で比較的大きな値となった (Table 4). 次に各集団の位置として便宜的に県庁の位置を割り当て、 $F_{ST}$  と地理的距離との相関を Mantel test で解析した結果、両者の相関は  $r^2=0.224$  ( $P=0.004$ ) となった (Fig. 1). あまり高い相関ではないが、地理的距離により集団分化が生じ、距離が離れるほど遺伝子流動が制限される傾向が認められた。

Neighbor-joining 法による集団系統樹を作成した結果、中国地方の 3 県 (鳥取, 島根, 岡山), 九州の 3 県 (福岡, 佐賀, 長崎), 四国と九州の 4 県 (愛媛, 熊本, 大分, 鹿児島)

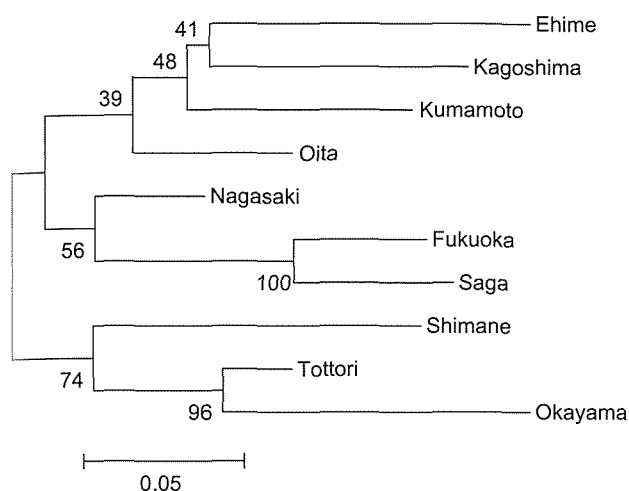


Fig. 2. Neighbor-joining tree of 10 *Pyricularia oryzae* populations using Nei's distance based on 12 SSR loci. The root was assumed to be at the midpoint of the tree. Numbers on the nodes indicate the percentage bootstrap values generated from 1,000 replications.

がそれぞれクラスターを形成した (Fig. 2)。そこで、これらの3つのクラスターで供試菌株をグルーピングして AMOVA 分析を試みたが、観察された分散のほとんどは各集団内に存在し (85.9%)、グループ内の集団間で 4.9%、グループ間で 9.2% となり、集団分化の程度は小さかった。グルーピングを3つの地方 (中国, 四国, 九州) に変更した場合でも、各地方内の集団間で 6.4%、地方間で 6.4% と同様の結果であった。

### 考 察

選定した 12 種類の SSR マーカーは、マルチプレックス化を行った結果、作業効率を大幅に向上できた。これまで広く利用されてきた *Pot2* rep-PCR や RFLP は、バンドパターンの違いから多型を検出する手法であるため、異なる研究者の行った結果を比較することが困難であった。一方、SSR マーカーは、キャピラリーシーケンサーを用いればアリルサイズを正確に算出できるため、今後は異なる研究室で取られたデータの比較や共有が可能になるものと期待する。本研究の解析集団においては、すべてのマーカーで多型が検出され、それらを組み合わせて類別したハプロタイプの多様度で 0.997 という高い個体識別能を発揮した。各県で検出された多様性指数は近似しており、国内のいもち病菌の集団解析に広く適用できることが示された。比較のために実施した *Pot2* rep-PCR 解析では、集団全体の多様度は 0.891 であった。*Pot2* rep-PCR を用いた試験として九州集団の解析事例があるが、この中で観察された値は 0.88 であったことから (Suzuki *et al.*, 2007, 2010), *Pot2* rep-PCR の解析能としては、0.9 付近が上

限かもしれない。これらの結果は、*Pot2* rep-PCR など従来法の個体識別能には限界があること、精度の高い試験を行うためには SSR を導入する必要があることを示している。

マーカー間の LD 解析においては、高頻度で連鎖不平衡を検出したが、これはいもち病菌の繁殖様式が、交雑のない無性生殖に依存し、クローン的な増殖によるためと考えられる。一般に連鎖不平衡が大きい場合、マーカー数を増やしても個体識別能を向上させることは難しくなるが、12 マーカーから得られた情報は、集団解析に十分なレベルに達していた。観察されたアリル数とその多様度については、それぞれ 2 ~ 36, 0.014 ~ 0.881 とマーカーによって大きく異なっていた。Botstein *et al.* (1980) の基準によれば、12 マーカーのうち多様度が 0.5 以上の 8 マーカーは情報性が高く、0.25 以下の 3 マーカーは低いと判断される。ただし、この評価は、集団を構成する菌株の遺伝的類縁性によって大きく変わるため、普遍的ではないだろう。今回の試験で多型性が低かったマーカーであっても、解析対象の集団構成によっては有益なマーカーになる可能性があり、たとえば、イネいもち病菌と他種植物のいもち病菌を識別する場合などには効力を発揮するものと思われる。また、本研究に用いた西日本分離菌のレース判別結果では、007 が 79% を占めており (荒井・中島, 2003), SSR に基づくハプロタイプとレースとの関連性を解析することはできなかった。

10 県の集団間で算出したペアワイズ  $F_{ST}$  より集団分化の可能性が示され、Mantel test の結果と合わせると、集団間の遺伝的分化程度は地理的距離に比例して高くなる傾向が認められた。これは、近距離では孢子飛散による移出入や種子移動などが活発に行われ、遺伝子流動が大きなことを反映していると思われる。遠距離の県間で遺伝的距離が比較的大きくなった理由として、いもち病菌の伝染環が種子伝染に大きく依存していること、種子の生産と流通が原則的に県単位で行われていること、などが強く影響しているかもしれない。一方で、遠距離の県間でも同一のハプロタイプが観察されたこと、すべてのマーカーにおいて 10 集団に共通するアリルが観察されたことなどから、遺伝的交流が広域的に維持されていることも推定される。また、愛媛県と海を隔てた九州 4 県間で遺伝的距離が小さかったことは、地理的隔離より人為的な影響が大きく作用した結果かもしれない。いもち病菌の分生孢子の遠距離飛散については、1 回の好適条件で 600 ~ 700 m 程度と試算されており (笹原, 2004), 年あたり 4 ~ 5 世代の増殖を経た場合でも数 km の移動にとどまるだろう。したがって、遠距離間で観察された同一ハプロタイプは、保菌種子や罹病苗などの人為的な持ちこみによる可能性が高い。AMOVA 分析では、グループ間で観察される分散値は、

最大となったグループ間組み合わせでも9%程度であり、明確な集団分化を示す結果とはならなかった。国内のいもち病菌集団における集団分化の有無は、品種や栽培管理等も十分に考慮してサンプリングを行った上で、あらためて判断する必要があるだろう。

現在の日本のイネいもち病菌の集団は、RFLP解析などによると、ほぼ単一の clonal lineage に属することが示唆されており (Don *et al.*, 1999)、遺伝的には均質な集団であるとみられている。Pot2 rep-PCR のフィンガープリントパターンからも、供試した2001年の西日本分離菌株のほぼすべてが同一の lineage に属しているものと推定される (データ不掲載)。一方、今回のSSR解析では、集団間で比較的大きな遺伝的距離を検出したが、これは選抜の過程で多型性の高い座位のみを集積した効果と考えられる。以上より、SSRマーカーを用いることにより、遺伝的に近縁な集団においても集団解析に十分な情報が得られることが示された。今後は選抜したSSRマーカーに基づき、同一圃場内、あるいは隣接する圃場間などでの動態解析を実施し、いもち病菌の生態解明を進めていきたい。

### 摘 要

日本産のイネいもち病菌を標的に選抜した12種類のSSRマーカーについて、4マーカーずつ3セットのマルチプレックスPCRを開発した。2001年に西日本の16県から採集されたいもち病菌について、12種類のSSRマーカーを用いて遺伝的多様性と集団構造を解析した。供試した293菌株からは、265のハプロタイプが検出され、マーカーあたりのアレル数は2から36 (平均14.3) となり、きわめて高い遺伝的多様性が観察された。次に、10県におけるペアワイズ $F_{ST}$ を算出した結果、0.002から0.275の範囲の値を示し、集団分化のレベルが県間で大きく異なることが明らかになった。Mantel testを実施した結果、遺伝的距離と地理的距離(69~539 km)との間に有意な相関が認められた ( $r^2=0.224$ ,  $P=0.004$ )。これらの結果から、隣接する県間では活発な孢子飛散や種子の移動などによって遺伝子流動が大きい一方で、離れた県間では、それらが制限されていることが推察された。以上より、選抜したSSRマーカーは、いもち病菌の集団遺伝学的研究に有用であることが示された。

### 引用文献

荒井治喜・中島 隆 (2003). 2001年に中四国および九州沖縄地域に分布したイネいもち病菌のレース. 九病虫研会報 49: 1-4.  
Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucl. Acids Res. 27: 573-580.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.  
Brondani, C., Brondani, R. P. V., Garrido, L. R. and Ferreira, M. E. (2000). Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. Genet. Mol. Biol. 23: 753-762.  
Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., *et al.* (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434: 980-986.  
Don, L. D., Kusaba, M., Urashima, A. S., Tosa, Y., Nakayashiki, H. and Mayama, S. (1999). Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 65: 15-24.  
Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinfo. Online 1: 47-50.  
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.  
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., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M. H. and Tharreau, D. (2003). The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. Fung. Genet. Biol. 40: 207-214.  
小泉信三・岩野正敬・善林 薫・フェデラ ベーニャ・園田亮一・中島敏彦・荒井治喜・中島 隆・宮坂 篤・芦澤武人・安田伸子・野口 (辻本) 雅子 (2007). 2001年に日本に分布したいもち病菌レース. 中央農研研究資料 7: 1-63.  
Langella, O. (2007). Populations 1.2.30: Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>  
Levy, M., Romao, J., Marchetti, M. A. and Hamer, J. E. (1991). DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. Plant Cell 3: 95-102.  
Li, C. Y., Li, J. B., Liu, L., Yang, J., Su, Y., Wang, Y. Y., Xie, Y., Ye, M. and Zhu, Y. Y. (2007). Development of minisatellite markers in phytopathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. Mol. Ecol. Notes 7: 978-980.  
Nakahara, K., Hataya, T. and Uyeda, I. (1999). A simple rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroid by hybridization and RT-PCR. J. Virol. Methods 77: 47-58.  
Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.  
Nei, M., Tajima, F. and Tateno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. J. Mol. Evol. 19: 153-170.  
Nitta, N., Farman, M. L. and Leong, S. A. (1997). Genome organization of *Magnaporthe grisea*: integration of genetic maps, clustering of transposable elements and identification of genome duplications and rearrangements. Theor. Appl. Genet. 90: 43-48.



- Peakall, R. and Smouse P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288–295.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248–249.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- 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.
- 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., 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.
- Suzuki, F., Yamaguchi, J., Koba, A., Nakajima, T. and Arai, M. (2010). Changes in fungicide resistance frequency and population structure of *Pyricularia oryzae* after discontinuance of MBI-D fungicides. *Plant Dis.* 94: 329–334.
- Zheng, Y., Zhang, G., Lin, F., Wang, Z., Jin, G., Yang, L., Wang, Y., Chen, X., Xu, Z., Zhao, X., Wang, H., Lu, J., Lu, G. and Wu, W. (2008). Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Fung. Genet. Biol.* 45: 1340–1347.