

ライグラスなどグラス類いもち病菌の分子系統と病原性

月星 隆雄

農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所

[〒329-2793 那須塩原市千本松 768]

Molecular phylogeny and pathogenicity of blast fungi on grasses including *Lolium* spp. in Japan

Takao TSUKIBOSHI

National Institute of Livestock and Grassland Science,

National Agriculture and Food Research Organization

1. 目的

グラス類はイネ科全体を指す総称であり、イネ科牧草、芝草および野草を含み、その多くは家畜飼料として広く利用されている。中でもライグラス類 (*Lolium* spp.) は飼料用イネ科牧草として最も重要な草種であり、特にイタリアンライグラス (*L. multiflorum* Lam.) は生産量、品質および家畜嗜好性の高さから、2006年には栽培面積が日本全体で6万haを超え、特に中国、四国および九州など西南暖地で広く栽培されている(西見ら, 2009)。

多くのグラス類にはいもち病が発生するが、ライグラス類ではイネと同様に紡錘形から楕円形、内部灰白色、周縁部褐色、長さ2-5mm、幅1-3mm程度の病斑を葉身および葉鞘に形成する(図1)。その他、わが国でいもち病の発生が報告されているグラス類として、エンバク、ハトムギ、シコクビエ、オオムギ、キビ、アワ、コムギ、トウモロコシ、ベントグラス、スイートバーナルグラス、

ブロムグラス、ラブグラス、センチピードグラス、フェスク、ベルベットグラス、パニカム、キクユグラス、リードカナリーグラス、チモシー、セントオーガスチングラス、メヒシバ類、オヒシバ類、ナルコビエ類、サヤヌカグサ類、キビ類、スズメノヒエ類、エノコログサ類およびマコモ類がある(日本植物病理学会, 2000; 2010)。本報告ではイタリアンライグラスを初めとしてグラス類のいもち病菌を広く各地から収集し、その分子系統と病原性を明らかにすることを目的とした。



図1. イタリアンライグラスいもち病の病徴

なお、本成果の一部はすでに論文および研究成果などで発表している (Tsukiboshi et al., 2009 ; 月星ら, 2010).

2. 材料および方法

1) 病原菌の採集および分離

2002 年から 2008 年にかけて沖縄県、宮崎県、石川県、富山県、新潟県、栃木県および福島県の各県で、イタリアンライグラス、オーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.), ライムギ (*Secale cereale* L.), エンバク (*Avena sativa* L.), オオムギ (*Hordeum vulgare* L.), ギニアグラス (*Panicum maximum* Jacq.), ローズグラス (*Chloris gayana* Kunth), ネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach.) およびトウモロコシ (*Zea mays* L.) のいもち病罹病サンプルをイネ圃場と隣接しない圃場および牧草地から収集した (表 1). オーチャードグラスおよびライムギの罹病葉は、栃木県那須塩原市畜産草地研究所内の温室で栽培されていた植物体から採集した. 分離法は、病斑周縁部を切り取り、70%エタノールに 30 秒、次いで 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 2 分間浸漬した後に、滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、1.5%素寒天平板上に置いた. これを 25°C, 12 時間光周期の BLB (ブラック・ライト) 照射下に 3-5 日間保ち、形成された分生子のうちの 1 個を実体顕微鏡下でガラス針を用いて拾い、V8 ジュース寒天培地 (V8 ジュース, Campbell 社, 200ml, CaCO₃ 3g, 寒天 15g/L) 上で培養した. 培養菌株は使用するまで、V8 培地の試験管斜面培養として 22°C, 暗黒下で保存した.

表 1. 採集したグラス類いもち病菌

MAFF番号	分離源	菌種	採集場所	採集年月日
306640	ローズグラス	<i>Pyricularia</i> sp.	沖縄県石垣市	2002/2
306662	ギニアグラス	<i>Pyricularia</i> sp. LS-group	沖縄県八重山郡竹富町	2002/2
306671	ギニアグラス	<i>Pyricularia</i> sp. LS-group	沖縄県八重山郡竹富町	2002/2
306672	ギニアグラス	<i>Pyricularia</i> sp. LS-group	沖縄県石垣市	2002/2
511486	イタリアンライグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	石川県かほく市	2008/10/6
511487	イタリアンライグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	富山県富山市	2008/10/7
511488	イタリアンライグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	新潟県三条市	2008/10/8
511489	イタリアンライグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	福島県白河市	2008/9/24
511490	イタリアンライグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	栃木県那須塩原市	2007/9
511491	イタリアンライグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	栃木県那須塩原市	2007/9
511492	オーチャードグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	栃木県那須塩原市	2007/7
511493	オーチャードグラス	<i>Pyricularia oryzae</i>	栃木県那須塩原市	2007/7
511494	オオムギ	<i>Pyricularia oryzae</i>	宮崎県都城市	2007/10/29
511495	オオムギ	<i>Pyricularia oryzae</i>	宮崎県都城市	2007/10/29
511496	ライムギ	<i>Pyricularia oryzae</i>	栃木県那須塩原市	2008/7

2) 分子系統解析

分子系統解析には MAFF 306672, MAFF 511490~511496 (表 1), T-1 (栃木県那須塩原市産イタリアンライグラス), Corn1-3 (栃木県那須塩原市産トウモロコシ), D2-1 (宮崎県都城市産エンバク), O-19 (沖縄県浦添市産ネピアグラス) の 12 菌株 (由来) を供試した. 供試菌株を V8 ジュース寒天培地上, 25°C, 暗黒下で培養し、形成された分生子および気中菌糸をかき取り、既報の方法により DNA の抽出を行った (Tsukiboshi et al., 2005). 得られた DNA について、Bt1a およ

び Bt1b プライマー (Hirata et al., 2007) を用いて PCR 法により β -チューブリン遺伝子領域の一部を増幅し、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に近隣結合法により Clustal W プログラムを用いて系統樹を作成した。

3) 病原菌の接種

9cm シャーレ内の素寒天平板上に、滅菌したイタリアンライグラス葉 (品種: ヒタチヒカリ) を並べ、この上に供試菌株の菌培養片を 8 個程度置いた。これを BLB 照射下、25℃で 5-7 日間培養して分生子を形成させた。これに少量の滅菌水 (0.1% Tween20 添加) を加え、絵筆で分生子を掻き取った後、脱脂綿で濾過した。分生子懸濁液は最終的に約 10^5 spores/ml に調製し、接種に用いた。供試菌株は上記の MAFF 511490, 511492, 511494, 511496, 306672 および O-19 に加え、MAFF 306640 (分離源: ローズグラス), MAFF 306671 (ギニアグラス) および MAFF 305470 (イネ) を用いた。接種は、22-30℃の温室でイタリアンライグラス (品種: タチムシャ, ミナミアオバ), オーチャードグラス (フロンティア, キタミドリ), ライムギ (春一番), エンバク (早刈一番.), ギニアグラス (ナツカゼ), ローズグラス (カロイド, カタンボラ) およびイネ (コシヒカリ) を、園芸培土 (クレハ化学) を詰めた 1 万分の 1a ワグネルポットを用いて 3-4 葉期まで栽培し、これらに上記の分生子懸濁液を葉面が十分に濡れるまで噴霧し、これを暗黒下、25℃, 相対湿度 100%の恒温器に 24 時間保った後に、25℃恒温室 (光周期 12 時間) に移し、7 日後に発病調査を行った。発病評点は、0: 無病徴, 1: 褐点型病斑, 2: 中型病斑を少数, 3: 大型病斑を多数形成の 4 段階とした。

3. 結果

1) 分離菌株と分子系統解析

2002 年から 2009 年にかけて、グラス類いもち病菌の採集を行った結果、ローズグラスから 1 菌株、ギニアグラスから 3 菌株、イタリアンライグラスから 6 菌株、オーチャードグラスから 2 菌株、オオムギから 2 菌株、ライムギから 1 菌株の計 15 菌株の MAFF 登録株を得た (表 1)。このうち 8 菌株とイタリアンライグラス、トウモロコシ、エンバクおよびネピアグラスから分離した 4 菌株について、 β -チューブリン遺伝子領域の塩基配列に基づく分子系統解析を行った結果、イタリアンライグラス、オーチャードグラス、オオムギおよびライムギからの菌株は、DDBJ accession 上のペレニアルライグラス、シコクビエ、イネおよびコムギ菌と共に、すべて既報の *Pyricularia oryzae* 栽培植物寄生菌群に類別された (図 2)。これに対し、ギニアグラスからの菌株は *Pyricularia* sp. LS (*Leersia-Setaria*) 群に、ネピアグラスからの菌株は *Pyricularia* sp. CE (*Cenchrus echinatus*) 群に類別された。また、トウモロコシおよびエンバクからの菌株は *Pyricularia grisea* と同一のグループとなった。

2) 病原性

接種試験の結果、イタリアンライグラス菌、オーチャードグラス菌、ライムギ菌およびオオムギ

菌は概ね同様の寄生性を示し、いずれの菌株もイタリアンライグラスに強い病原性を、オーチャードグラス、ライムギおよびエンバクに弱い病原性を示し、イネおよびギニアグラスにはほとんど病原性を示さなかった（表 2）。これに対して、エンバク菌はイタリアンライグラス、オーチャードグラス、ライムギ、エンバクおよびギニアグラスにごく弱い病原性を示し、イネには病原性を示さなかった。また、ネピアグラス菌はイタリアンライグラス、オーチャードグラスおよびライムギにごく弱い病原性を示し、イネおよびギニアグラスには病原性を示さなかった。ギニアグラス、ローズグラスおよびイネに接種した結果、ギニアグラス菌はギニアグラスにのみ、イネ菌はイネにのみ病原性を示し、ローズグラス菌はいずれの植物にも病原性を示さなかった。

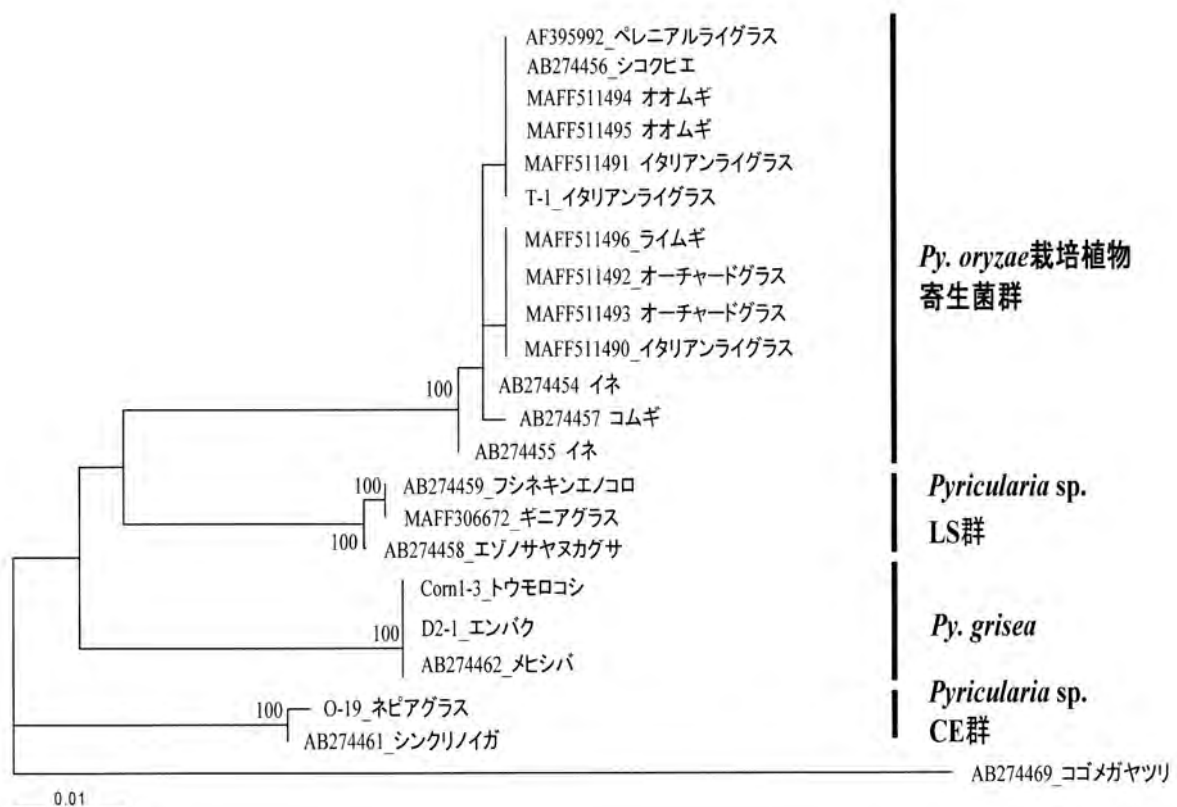


図 2. β -チューブリン遺伝子領域の塩基配列に基づくグラス類いもち病菌の分子系統樹

近隣結合法により作成した。OTU 名として農業生物資源ジーンバンクの MAFF 登録番号あるいは DDBJ accession 番号および分離源宿主を示した。分岐点の数字はブートストラップ確率（70%以上）、最下線は遺伝距離を表す。

4. 考察

イネを除くグラス類のいもち病については、ライグラスについて比較的古くから研究されており、わが国ではイタリアンライグラスにイネいもち病菌を接種すれば、あるいは発病好適環境条件下では感染するという報告があった（成田ら，1956）。自然条件下での発生は 1970 年静岡県で初めて報告されたが（牧野・久永，1972），この事例はイネいもち病菌を接種して激しく発病した水田イネに隣接するイタリアンライグラスのもので、病原としてイネいもち病菌（N2 型）が分離されてい

表2. グラス類いもち病菌の病原性

接種源	被接種植物 (品種)									
MAFF番号, 菌株番号 (分離源)	イタリアンライグラス (タチムシヤ)	イタリアンライグラス (ミナミアオバ)	オーチャードグラス (フロレンティア)	オーチャードグラス (ギタミドリ)	ライムギ (春一番)	エンバク (早刈一番)	イネ (コシヒカリ)	ギニアグラス (ナシカゼ)	ローズグラス (カローイ)	ローズグラス (カタンボラ)
MAFF 511491 (イタリアンライグラス)	2.8*	3.0	1.6	1.4	1.4	1.6	0.0	0.0	—	—
MAFF 511492 (オーチャードグラス)	2.8	2.8	1.6	2.2	1.2	2.2	0.0	0.0	—	—
MAFF 511496 (ライムギ)	2.8	3.0	1.2	1.4	2.4	1.2	0.0	0.2	—	—
MAFF 511494 (オオムギ)	1.6	2.6	1.2	1.2	1.4	1.0	0.0	0.0	—	—
D2-1 (エンバク)	0.4	0.2	0.4	0.4	0.2	0.4	0.0	0.7	—	—
MAFF 306671 (ギニアグラス)	—	—	—	—	—	—	0.0	2.8	0.1	0.1
MAFF 306672 (ギニアグラス)	—	—	—	—	—	—	0.0	2.6	0.1	0.1
MAFF 306640 (ローズグラス)	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0
O-19 (ネピアグラス)	—	0.8	0.6	—	0.2	—	0.0	0.0	—	—
MAFF 305470 (イネ)	—	—	—	—	—	—	2.0	0.0	0.0	0.0

* 発病評点: 0, 無病徴; 1, 褐点型病斑; 2, 中型病斑を少数; 3, 大型病斑を多数形成; —, 未試験.

る。しかし、1977年宮崎で発生した事例は、水田から離れた畑作地帯のイタリアンライグラスであり、病原菌もイネには全く病原性を示さなかった（岡田・後藤，1979）。このためライグラスにはイネいもち病菌とライグラスにのみ病原性を示す菌系統が発生していると考えられている。本報告



図3. オーチャードグラスいもち病の病徴

で採集分離したイタリアンライグラス由来の菌株はイタリアンライグラスに強い病原性を示し、イネには示さなかったことから後者であると推定できる。これは1999年に主に山口県および宮崎県のイタリアンライグラスから収集された89菌株がすべてイタリアンライグラスに強い病原性を示し、イネには示さなかったとした報告とも一致する（Kusaba et al., 2006；西見ら，2009）。また、今回の採集調査の結果、石川県かほく市、富山県富山市、新潟県三条市および福島県白河市など

これまでライグラスいもち病の発生報告がなかった地域からも本菌が採集された。1970年代には本病の発生は宮崎、高知、岐阜、静岡および栃木県に限られており（農林水産技術会議事務局，1981），発生地域が北上してきた可能性がある。接種試験ではイタリアンライグラス、オーチャードグラス、ライムギおよびオオムギからの菌がほぼ同様の宿主範囲を示したことから、これらは同一の菌系であると考えられる。特にオーチャードグラスとライムギの菌は温室内という特殊環境下で発生したものであり（図3），ライグラス等の菌がこれらの植物に感染したものと考えられる。オーチャードグラスとライムギのいもち病についてはわが国での発生報告はないが、圃場での発生状況を今後観察していく必要がある。

B-チューブリン遺伝子領域に基づく分子系統解析の結果，イタリアンライグラス，オーチャードグラス，オオムギおよびライムギからの菌株は，既報のペレニアルライグラス，シコクビエ，イネおよびコムギ菌と共に，すべて *Py. oryzae* 栽培植物寄生菌群（CC-group: C3 crop isolate group）に類別された。これは Tosa et al. (2004)がわが国で採集したペレニアルライグラス由来の菌株を，イネ菌，コムギ菌およびシコクビエ菌などと共にこのグループに類別したことに一致する。このグループは，Couch and Kohn (2002)が *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr から分割した *Magnaporthe oryzae* B. Couch（有性世代）（=無性世代 *Py. oryzae* Cavara）と一致する。*M. grisea*（= *Py. grisea* (Cooke) Sacc.）は，メヒシバ寄生菌群として残されたが，今回採集したエンバク菌およびトウモロコシ菌も本種に類別された。エンバク菌は接種試験の結果，分離源であるエンバクに対してもごく弱い病原性しか示さず，エンバク上に偶発的に着生したメヒシバいもち病菌が分離されたと推測される。トウモロコシ菌については，接種試験は行っていないが，メヒシバ菌がトウモロコシに病原性を示すとされていることから（西原，1987），本菌株もメヒシバいもち病菌であると推測される。

一方，ギニアグラス菌およびネピアグラス菌は，Hirata et al. (2007)が提唱した *Pyricularia* sp. LS 群および CE 群にそれぞれ分類された。接種試験の結果，ギニアグラス菌のギニアグラスへの病原性は明瞭であったが，同じ LS 群に属するエゾノサヤヌカグサおよびフシネキンエノコロに対する本菌の病原性は現状では不明である。この結果，ギニアグラスいもち病の病原を既知の菌種とは異なる *Pyricularia* sp. LS-group と同定して（Tsukiboshi et al., 2009），日本植物病名目録に登録した。ネピアグラス菌については，分離源であるネピアグラスおよび同じグループに属するシンクリノイガへの病原性は不明であり，今後の検討を要する。また，ローズグラス菌は接種試験の結果，分離源であるローズグラスに病原性を示さず，異なる植物への寄生菌がローズグラス上に偶発的に着生して分離された可能性がある。分類群はまだ不明であるが，rDNA-ITS 領域の解析の結果では *Py. grisea* と近縁だが，別種であると推定される（データ未公表）。以上のように，いもち病菌，特に暖地型のグラス類から分離される菌の多くは，既存の菌種とは別種である可能性がある。今後はこれらの菌を新種として記載発表する予定である。

5. 謝辞

病原菌の採集を行うに当たり多大なご協力を賜った石川県畜産総合センター，富山県農林水産総

合技術センター畜産研究所，新潟県農業総合研究所畜産研究センター，独立行政法人家畜改良センター福島本所，沖縄県八重山農林水産振興センター八重山家畜保健衛生所，雪印種苗株式会社宮崎研究農場および農研機構畜産草地研究所那須研究拠点の牧草・飼料作物担当者各位に厚く御礼申し上げます。

6. 参考文献

- 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.
- Hirata, K., Kusaba, M., Chuma, I., Osue, J., Nakayashiki, H., Mayama, S. and Tosa, Y. (2007). Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. *Mycol. Res.* 111: 799-808.
- Kusaba, M., Hirata, K., Sumida, Y., Yamagashira, A., Konagai-Urata, H. and Yaegashi, H. (2006). Molecular genetic characterization and host specificity of *Pyricularia* isolates from annual ryegrass in Japan. *Plant Pathol. J.* 5: 72-79.
- 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. 関西病虫研会報 14: 96-97.
- 成田武四・岩田 勉・山貫重夫(1956). イモチ病菌 *Pyricularia oryzae* Cav.の寄主範囲に関する調査研究 1. 北海道立農試報告 7: 1-33.
- 日本植物病理学会編(2000). 日本植物病名目録. 857pp., 日本植物防疫協会, 東京.
- 日本植物病理学会編(2010). 日本植物病名目録追録. (<http://www.ppsj.org/mokuroku.html>)
- 西原夏樹(1987). 原色飼料作物の病害. 103p. 雪印種苗株式会社, 札幌.
- 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.
- 農林水産技術会議事務局編(1981). 農林水産研究文献解題No.8. 牧草病害編, 農林統計協会, 東京. (http://rms1.agsearch.agropedia.affrc.go.jp/contents/kaidai/bokusoureigai/8_m.html)
- 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. 九州農業研究 41: 72.
- 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.
- Tsukiboshi, T., Chung, W. H. and Yoshida, S. (2005). *Cochliobolus heveicola* sp. nov. (*Bipolaris heveae*) causes brown stripe of bermudagrass and Zoysia grass. *Mycoscience* 46: 17-21.
- Tsukiboshi, T., Okabe, I. and Sugawara, K. (2009). First report of blast of guinea grass caused

by *Pyricularia* sp. LS-Group in Japan. Plant Dis. 93: 1350.

月星隆雄・岡部郁子・菅原幸哉 (2010). ライグラスいもち病の発病温度特性と薬剤種子粉衣による防除. 平成 21 年度畜産草地研究成果情報.

(<http://nilgs.naro.affrc.go.jp/SEIKA/2009/nilgs/ch09014.html>)

Summary

Blast fungi, *Pyricularia* spp. were collected from grasses including Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*), orchard grass (*Dactylis glomerata*), rye (*Secale cereale*), barley (*Hordeum vulgare*), oat (*Avena sativa*), guinea grass (*Panicum maximum*), rhodes grass (*Chloris gayana*), napier grass (*Pennisetum purpureum*) and corn (*Zea mays*) and analyzed for their molecular phylogeny and pathogenicity. From 2002 to 2008, 19 isolates of *Pyricularia* spp. were obtained from the diseased samples collected in seven prefectures in Japan. The isolates from C3 crop grasses including Italian ryegrass, orchard grass, rye and barley were grouped into *Py. oryzae* CC-group (C3 crop isolate group) proposed by Tosa *et al.* (2004) in results of the molecular phylogenetic analysis based on the DNA sequences of the β -tubulin gene. They were strongly pathogenic to Italian ryegrass and weakly pathogenic to orchard grass, rye and oat in regardless of their original hosts. The isolates from guinea grass were classified as *Pyricularia* sp. LS-group proposed by Hirata *et al.* (2007) and strongly pathogenic only to guinea grass. The isolates from oat and corn were classified as *Py. grisea* based on their phylogenies. The isolate from napier grass was classified as *Pyricularia* sp. CE-group proposed by Hirata *et al.* (2007). In this study, 15 isolates of *Pyricularia* spp. from grasses were registered in the NIAS Genebank (MAFF).

微生物遺伝資源の調査プロフィール



Beauveria bassiana MAFF 635036 株に感染して死亡したクリシギゾウムシ成虫 (井原)



ライグラスいもち病の病徴
(栃木県那須塩原市) (月星)



モモ樹に発生した材質腐朽菌 3 種の子実体 (1, カワラタケ; 2, アラゲカワラタケ; 3, スエヒロタケ) (中村)



キクピシウム立枯病の病徴
(茨城県東海村) (月星)



ダイズシストセンチュウが寄生したダイズ根 (相場)



納豆菌ファージ MAFF 270115
(永井)