

rDNA ITS 領域の多型によるいもち病菌の類別

平八重 一之・西 和文・岩野 正敬
(九州農業試験場)

Genetic characterization of *Pyricularia grisea* from various hosts by analysis of polymorphisms of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. Kazuyuki HIRAYAE, Kazufumi NISHI and Masataka IWANO (Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-11)

Using 27 strains of *Pyricularia grisea* from various hosts, the internal transcribed spacer regions (5.8S plus ITS1 and ITS2) of nuclear ribosomal DNA (rDNA) repetitive units were analyzed by the RFLP (restriction fragment length polymorphism) and/or SSCP (single strand conformation polymorphism) method. The ITS regions of 9 rice strains belonging to 8 races were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) and restricted with 9 enzymes (*Acc* II, *Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mbo* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Eco*R I and *Hind* III). There were no polymorphisms among those strains, suggesting that the rice strains in Japan are in a homogeneous genetic group. This was confirmed with a mitochondrial small rDNA and a mitochondrial large rDNA fragment. On the other hand, the *P. grisea* from various hosts showed polymorphisms within the ribosomal ITS regions by RFLP and/or SSCP using 6 restriction enzymes (*Eco*R I, *Hae* III, *Hha* I, *Mbo* I, *Msp* I and *Rsa* I). The results divided the *P. grisea* strains into 4 groups, namely rice group, crab grass group, Manchurian wild rice group and mioga group. The rice group included strains from other host plants: Italian millet, common millet, finger millet, goose grass, Japanese millet, weeping lovegrass, panicum (nukakibi), Italian ryegrass and harding grass.

Key words: *Pyricularia grisea*, nuclear ribosomal DNA, internal transcribed spacers, RFLP, SSCP

Pyricularia 属菌の多くはイネ科植物に寄生するが、その他カンナ科、カヤツリグサ科およびショウガ科の植物にも寄生することが知られている。八重樫(1987)の総説によれば、これらの各種植物に寄生する *Pyricularia* 属菌に関してこれまでに、培養菌叢の形状や性質、分生胞子の形態、病原性、相互交配による稔性からの類縁関係、菌体外酵素のアイソザイムパターンによる類別が試みられてきた。一方、近年の分子遺伝学的手法によって、相互の交配能の低さから限られた種類のいもち病菌でしか明らかにされなかった各種いもち病菌の多様性あるいは遺伝的類縁関係についても明らかにされつつある (SHULL and HAMER, 1994)。

本報告では、rDNA の両 ITS (internal transcribed spacer) 領域を含む PCR 増幅断片について DNA 多型を検討し、各種いもち病菌の分子遺伝学的類別を試みた。本試験で供試した各種いもち病菌を分譲いただいた農林

水産省農業研究センター水田病害研究室の林 長生主任研究官 (現・愛知県農業総合試験場山間農業研究所) にお礼申し上げる。

材料および方法

1. いもち病菌菌株および培地

イネいもち病菌8レース9菌株を含む、13種類の植物から分離された各種いもち病菌計27菌株を供試した。各菌株の分離源植物と菌株名を Table 1 に示した。これらの菌株は、1996年2月以後ろ紙法で-30℃に保存し、必要に応じて PDA 培地 (日本製薬) で生育させたのち、YPS (0.2%酵母エキス, 0.1%ペプトン, 1%ショ糖) 液体培地で培養を行い、DNA 抽出のための菌体試料を得た。

2. 菌体 DNA の抽出

いもち病菌の菌体を 1%セルラーゼおよび0.2%ノボ

Table I. List of *Pyricularia grisea* strains from various hosts used in this study

Strain	Host	Location (Year)	Abbr. (Race)
Ken54-20	rice	Yamaguchi (1954)	R1 (003)
Ken54-04	rice	Gifu (1954)	R2 (003)
Hokul	rice	Hokkaido (1948)	R3 (007)
Ina72	rice	Nagano (1957)	R4 (031)
Ina168	rice	Aichi (1958)	R5 (101)
Ken53-33	rice	Aichi (1953)	R6 (137)
P-2b	rice	Niigata (1948)	R7 (303)
Ao92-06	rice	Aomori (1992)	R8 (337)
IW81-04	rice	Akita (1981)	R9 (437)
SZSI1-1-1	Italian millet	Shizuoka (1987)	AW1
NNSI1-1-1	Italian millet	Nagano (— ^{a)})	AW2
NNPM1-1-1	common millet	Nagano (—)	KB1
YNPM2-1-1	common millet	Yamanashi (—)	KB2
Z2-1	finger millet	— (—)	SB1
Ken82-11	goose grass	— (1982)	OS1
NNDS7-2-3	crab grass	Nagano (1985)	MS1
IBDS1-1-1	crab grass	Ibaraki (1985)	MS2
SZEU1-1-1	Japanese millet	Shizuoka (1987)	HE1
IWEU2-1-2	Japanese millet	Iwate (1990)	HE2
IBECu1-1-1	weeping lovegrass	Ibaraki (1986)	WL1
NI864	mioga	— (—)	MG1
NNZiM1-1-1	mioga	Nagano (1985)	MG2
IBZL1-1-1	Manchurian wild rice	Ibaraki (1985)	MM1
IBPB1-1-1	panicum (nukakibi)	Ibaraki (1986)	NK1
Miyazaki	Italian ryegrass	Miyazaki (1993)	IR1
Yamaguchi	Italian ryegrass	Yamaguchi (1993)	IR2
K78-4	harding grass	— (—)	HG1

a) Unknown.

ザイムを含む0.6M KCl (pH 5.5) に懸濁した。遠心分離によって回収したプロトプラスト化細胞を抽出用バッファー (50mM トリス-塩酸, pH8, 50mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール) に再懸濁し、65°C で1時間保って DNA の抽出を行った。さらにフェノール抽出, RNAaseA 処理を行い, PCR 増幅のための鋳型 DNA とした。

3. rDNA 断片の PCR 増幅

各種 rDNA 断片の増幅は WHITE *et al.* (1990) に従った。すなわち, 核の rDNA では ITS1 と ITS4 のプライマーセットを用いて, 5.8S rDNA とその両側の ITS 領域を含む約550bpの断片を増幅した。イネから分離されたいもち病菌9菌株については, プライマー MS1 と MS2 により約600bpのミトコンドリアスモール rDNA 断片を, また ML3 と ML4 のプライマーセットにより約850bpのミトコンドリアラージ rDNA 断片を増幅した。

PCR 反応は, rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて行った。まず, 94°C・3分で DNA の予備変性を行

行った後, 94°C・1分の変性, 55°C・1分のプライマーのアニーリング, 72°C・2分の DNA の伸長反応を30サイクル行い, 最後に72°C・5分の伸長反応を加えた。

4. RFLP および SSCP の検出

制限酵素として *Acc* II, *Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mbo* I, *Msp* I, *Rsa* I の4塩基認識酵素7種類の他, *Eco* RI, *Hind* III を用いた。RFLP は PCR 増幅断片を各種制限酵素で切断した後, 主として, 2.5% NuSieve GTG アガロース (FMC) ゲル電気泳動を行い, エチジウムブロマイド染色により検出した。SSCP (single strand conformation polymorphism) 法は福岡 (1995) に従い, 10°Cの下で6%ポリアクリルアミドゲル (厚さ, 1mm) 電気泳動を行った。バンドの検出に用いた銀染色の方法を Fig. 1 に示した。

結果および考察

1. イネいもち病菌菌株間の RFLP

供試したイネいもち病菌の各レース菌株間では, PCR 増幅した3種類の rDNA 断片と用いた9種類の制

限酵素との組合せにおいて、まったく多型が検出されなかった (Table 2)。すなわち、イネいもち病菌は、遺伝的に極めて均一な集団であることが明らかとなった。日本における様々なレースの存在は、既存のレースが、主として突然変異を起こした結果であると考えられている (山田, 1987)。したがって、レース変異等の病原性変異を識別するためには、病原性変異に関わる遺伝子断片の

Wash gel briefly in deionized water
 |
 Place gel in 10 % ethanol for 5 min with gentle agitation, repeat twice
 |
 Place gel in 10 mM silver nitrate solution for 20-30 min with gentle agitation
 |
 Briefly wash gel in deionized water to remove silver nitrate from gel surface, repeat twice
 |
 Soak gel in developer solution (375 mM sodium hydroxide, 2.3 mM sodium tetrahydroborate, 0.4 % formaldehyde) with gentle agitation
 |
 When the DNA bands reach the desired intensity, stop development by placing the gel in 5 % acetic acid

Fig. 1. Procedure for silver staining of DNA.

Table 2. RFLP of the PCR-amplified rDNA segments among *Pyricularia grisea* rice strains

rDNA	Restriction enzyme	Polymorphism
ITS1-4	<i>EcoR</i> I, <i>Acc</i> II, <i>Alu</i> I, <i>Hae</i> III <i>Hha</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Msp</i> I, <i>Rsa</i> I	Not detected
MS1-2	<i>Acc</i> II, <i>Alu</i> I, <i>Hae</i> III, <i>Hha</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Msp</i> I, <i>Rsa</i> I	Not detected
ML3-4	<i>Hind</i> III, <i>Acc</i> II, <i>Alu</i> I, <i>Hae</i> III, <i>Mbo</i> I, <i>Msp</i> I, <i>Rsa</i> I	Not detected

Nine strains from rice were investigated (see Table 1).

同定が不可欠であると考えられる。さらに、その解析によって病原性変異の機構を明らかにすることにより、いもち病抵抗性品種の育種や稲作の現場で強く望まれているイネ体を用いないレース判別技術の開発に結び付くと考えられる。

2. 各種いもち病菌の rDNA ITS 領域断片の DNA 多型

各種植物由来のいもち病菌について、rDNA ITS 領域断片の RFLP および SSCP の検出を試みた。

ミョウガ由来の 2 菌株 (MG1, MG2) では、増幅される rITS 領域断片のサイズがそのほかの菌株のものより小さいことが明らかとなった。さらに、制限酵素で切断しない同断片の SSCP により、メヒシバ由来の 2 菌株 (MS1, MS2) でも他のものと異なることが示された。各種制限酵素で切断した断片の RFLP, SSCP について検討した場合、イネ、アワ、キビ、シコクビエ、オヒシバ、ヒエ、ウィーピングラブグラス、ヌカキビ、イタリアンライグラスおよびハーディンググラス分離菌は同一のバンドパターンを示した。また、メヒシバ分離菌、マコモ分離菌およびミョウガ分離菌は、それぞれ互いに異なるパターンを示した (Table 3)。なお、各菌株間に認められた多型のパターンは RFLP, SSCP の両方法で同様であったが、RFLP 法によっては多型の判定が困難な場合でも、SSCP 法によって明確に多型を検出できる例があった (Fig. 2)。

3. 各種いもち病菌の類別

本試験で検討したいもち病菌 20 菌株は、rDNA ITS 領域断片の多型から、分離源植物の種類によってイネ・オヒシバなどのグループ、マコモ、メヒシバ、ミョウガの各グループの、4 つのグループに類別された (Fig. 3)。

各種いもち病菌の類別については、これまでに、アイソザイムパターンおよび相互交配による稔性から、それ

Table 3. Summary of pattern types produced by the restriction enzymes used for RFLP and SSCP of the PCR-amplified nuclear rDNA ITS regions of *Pyricularia grisea* from various hosts

Strain	Pattern type						
	— ^{a)}	<i>EcoR</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I
R1, AW1, etc. ^{b)}	N1	E1	Ha1	Hh1	Mb1	Ms1	R1
MS1, MS2	N2	E2	Ha2	Hh2	Mb2	Ms2	R2
MM1	N1	E3	Ha3	Hh3	Mb3	Ms3	R3
MG1, MG2	N3	E4	Ha4	Hh4	Mb4	Ms4	R4

a): No enzyme.

b): R6, AW2, KB1, KB2, SB1, OS1, HE1, HE2, WL1, NK1, IR1, IR2 and HG1. See Table 1 for abbreviations of strains.

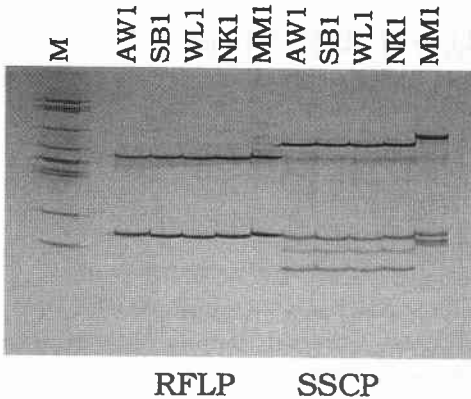


Fig. 2. An example of the RFLP and SSCP profiles among *Pyricularia grisea* from several hosts. The PCR-amplified nuclear rDNA ITS regions were digested with Hae III. M: DNA size marker of ϕ X174 digested with Hinc II. See Table 1 for abbreviations of strains.

ぞれ5群および4群に類別され、また、その寄生性からイネ科植物のいもち病菌は6群に類別されている(八重樫, 1987)。これらの類別のうち、マコモ分離菌、メヒシバ分離菌およびミョウガ分離菌とその他の菌群とは、今回の結果でもそれぞれを明確に類別できた。しかしながら、本試験のイネのグループには、寄生性から明確に区別できるとされているシコクビエ、アワ、キビなどからの分離菌が含まれていた。

rDNA, mtDNA, シングルコピー DNA をそれぞれプローブとした RFLP 解析によって、世界の様々な地域に由来する各種植物のいもち病菌は、それぞれ6, 8および8の RFLP グループに類別されている (SHULL and HAMER, 1994)。本試験では、限られた数と種類の、しかも本邦で分離された菌株のみを試験に供試し、ITS領域を含む rDNA 断片内部の多型について検討した。このため、rDNA 断片をプローブとした場合に検出された6種類の RFLP パターン (SHULL and HAMER, 1994) に対応するものうち、4種類のパターンのみが

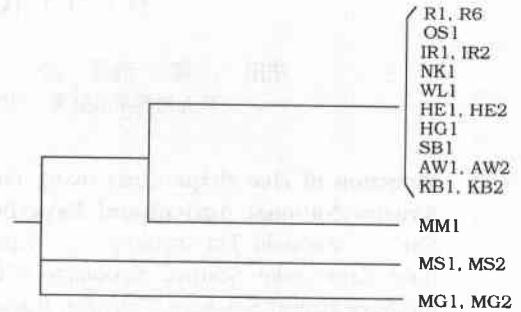


Fig. 3. Grouping of *Pyricularia grisea* strains from various hosts based on the polymorphisms of nuclear rDNA ITS regions. See Table 1 for abbreviations of strains.

検出されたものと考えられる。

イネ、オヒシバ菌のグループの細分化や各種いもち病菌の詳細な類縁関係を知るために、現在、rDNA IGS (intergenic spacer) 領域の RFLP について検討中である。

引用文献

- 1) 福岡修一 (1995) 植物の PCR 実験プロトコル (島本功・佐々木卓治 監修) 秀潤社: pp. 141-146.
- 2) SHULL, V. and HAMER, J. E. (1994) Rice Blast Disease (ZEIGLER, R. S., LEONG, S. A. and TENG, P. S. eds.) CAB International, U.K., pp. 65-86.
- 3) WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (INNIS, M. A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J. J. and WHITE, T. J. eds.) Academic Press, U.S.A., pp. 315-322.
- 4) 八重樫博志 (1987) 稲いもち病 (山中 達・山口富夫 編著) 養賢堂: pp. 22-49.
- 5) 山田昌雄 (1987) 稲いもち病 (山中 達・山口富夫 編著) 養賢堂: pp. 189-216.

(1997年4月30日 受領)