

トウモロコシ南方さび病菌の遺伝的変異の検討

平八重一之¹⁾・川瀬 章夫¹⁾・梅田 陽子²⁾
中谷 大樹²⁾・山口 武夫²⁾・西 和文¹⁾
(¹⁾九州農業試験場・²⁾九州東海大学農学部)

Genetic variation of southern rust fungus of corn in Japan. Kazuyuki HIRAYAE¹⁾, Akio KAWASE^{1)*}, Yoko UMEDA²⁾, Daiki NAKATANI²⁾, Takeo YAMAGUCHI²⁾ and Kazufumi NISHI¹⁾ (¹⁾ Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192. ²⁾ Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University, Choyo, Kumamoto 869-1404)

To investigate the genetic variation among Japanese isolates of the southern rust pathogen of corn, *Puccinia polysora* UNDERWOOD, the RFLP of the 5.8S rDNA plus ITS1 and ITS2 regions was analysed. The ITS regions of 14 *P. polysora* isolates and a *P. sorghi* isolate were successfully amplified with whole DNAs extracted from infected leaves. When the ITS regions of the *P. polysora* isolates were restricted with *Hae* III, *Mbo* I, *Nla* III or *Taq* I, two RFLP patterns were detected. Results suggest there were at least two genetic groups in Japanese *P. polysora*. Each group consisted of isolates from different locations and dates of collected. *P. polysora* could easily be distinguished from *P. sorghi* by the RFLP patterns of the ITS regions.

Key words: corn, internal transcribed spacers, nuclear ribosomal DNA, *Puccinia polysora*, RFLP, southern rust

Puccinia polysora UNDERWOOD によって引き起こされるトウモロコシ南方さび病は、特に畜産業の盛んな九州地域では、晩期栽培の飼料用トウモロコシにおける重要病害の一つである。本病の発生は、これまでに、九州・沖縄および四国の各県のほか、山口県および近畿地方の兵庫県でも確認されている(西ら, 1977)。さらに、本病の発生消長についても明らかにされつつあり、病原菌の海外飛来説を裏付ける研究結果が得られている(西ら, 1988)。

南方さび病菌にレースが存在することについては、アフリカ、アメリカおよび台湾で報告されている(ROBERT, 1962; RYLAND and STOREY, 1955; STOREY and HOWLAND, 1957; ULLSTRUP, 1965; YEH, 1986)。一方、我が国で発生している本病原菌に遺伝的変異が存在するかどうかについては、明らかにされていない。

そこで本報告では、rDNA の両 ITS (internal transcribed spacer) 領域を含む PCR 増幅断片について

DNA 多型を調査し、本邦で発生が認められたほぼ全域から集めた本病原菌の遺伝的変異について検討した。

材料および方法

1. さび病菌類菌株および罹病トウモロコシ葉の調製
南方さび病菌については、本病原菌の発生が確認されたほぼ全地域から採集した計14菌株を供試した。また、トウモロコシさび病菌1菌株をあわせて用いた。各菌株の採集地および採集年を Table 1 に示した。これらの菌株について、トウモロコシ葉で継代中の夏胞子、あるいは液体窒素に浸漬保存してある夏胞子を播種後約4週間のトウモロコシ(品種:TX128)子苗に接種した。これを25℃で約1週間生育させて夏胞子堆が出現する直前の罹病葉を採集し、-20℃で凍結したものを各菌株からのDNA抽出のための試料とした。

2. 罹病トウモロコシ葉からの全DNAの抽出
抽出用バッファー(2% CTAB, 0.1M Tris・HCl (pH 8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP, 20mM EDTA)に液体窒素下で粉碎したトウモロコシ罹病葉を懸濁し、55℃で15分間保温した後クロロホルムで抽出した。その

*現在 種苗管理センター沖繩農場

*Present address: Okinawa Station, National Center for Seeds and Seedlings, Higashi, Okinawa 905-1202

水相について、10分の1容の10% CTAB/0.7M NaClを加えて十分に混合し、65°Cで15分間静置し、その後クロホルムで抽出する操作を数回繰り返した。さらに、RNase 処理、フェノール抽出を行い、イソプロパノールによって沈殿させた DNA は、最終的に TE バッファー (pH 8.0) に溶解して、PCR 増幅のための鋳型 DNA とした。

3. rDNA ITS 領域断片の PCR 増幅

rDNA ITS 領域断片の増幅は WHITE *et al.* (1990) に従った。すなわち、ITS 1 と ITS 4 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 の検出

RFLP は、Table 2 に示した9種類の4塩基認識制限酵素を用いて PCR 増幅断片を切断した後、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。

結果および考察

1. さび病菌類 rDNA 断片の増幅

健全および罹病トウモロコシ葉から抽出した全 DNA を鋳型とし、WHITE らの ITS 1 と ITS 4 のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った結果、健全葉由来の DNA では断片の増幅は認められなかった。一方、罹病葉由来の鋳型 DNA においては、いずれも DNA 断片の増幅が確認された (Fig. 1)。すなわち、本法により、絶対寄生菌類であるトウモロコシ南方さび病菌やさび病菌を検出可能であることが明らかとなった。

増幅断片の大きさは、南方さび病菌のものが約 750bp、さび病菌のものが約 720bp と計算された。今回供試のさび病菌は1菌株であるが、過去に誤って同定されたことのある両菌を明確に識別できる可能性が示唆された。

2. 南方さび病菌の rDNA ITS 領域断片の DNA 多型

本病の発生が確認されている本邦のほぼ全地域から、3年間に渡って採集した計14菌株について、rDNA ITS 領域を指標とした遺伝的多様性を調べた。各種制限酵素処理による泳動パターンの例を Fig. 1 に、結果のまと

Table 1. List of *Puccinia* isolates used in the study

Fungus	Isolate	Location	Date of collection
<i>Puccinia polysora</i>	Ku-9401	Yabe, Kumamoto	1994.10
	Ku-9402	Koshi, Kumamoto	1994.10
	Ku-9501	Ashikita, Kumamoto	1995.9
	Ku-9504	Reihoku, Kumamoto	1995.9
	Ku-9601	Koshi, Kumamoto	1996.7
	Ku-9604	Takamori, Kumamoto	1996.7
	Ku-9607	Ueki, Kumamoto	1996.9
	Ku-9611	Yabe, Kumamoto	1996.9
	Ku-9616	Minamata, Kumamoto	1996.9
	Mi-9604	Nishimera, Miyazaki	1996.10
	Na-9601	Azuma, Nagasaki	1996.11
	Sh-9602	Yoshino, Tokushima	1996.9
	Sh-9603	Kuma, Ehime	1996.9
	Hy-9601	Nantan, Hyogo	1996.9
<i>P. sorghi</i>	Ps-9601	In-nai, Oita	1996.11

Table 2. Summary of pattern types produced by the restriction enzyme digestion of the PCR-amplified nuclear rDNA ITS regions of *Puccinia* isolates

Isolate	Pattern type									
	— ^{a)}	Acc II	Alu I	Msp I	Rsa I	TspEI	Hae III	Mbo I	Nla III	Taq I
Ku-9401, Ku-9501 Ku-9504, Ku-9604 Ku-9611, Ku-9616 Mi-9604, Na-9601 Hy-9601	N1	Ac1	Al1	Ms1	Rs1	Ts1	Ha1	Mb1	NI1	Ta1
Ku-9402, Ku-9601 Ku-9607, Sh-9602 Sh-9603	N1	Ac1	Al1	Ms1	Rs1	Ts1	Ha2	Mb2	NI2	Ta2
Ps-9601	N2	Ac2	Al2	Ms2	Rs2	Ts2	Ha3	Mb3	NI3	Ta3

a) No enzyme.

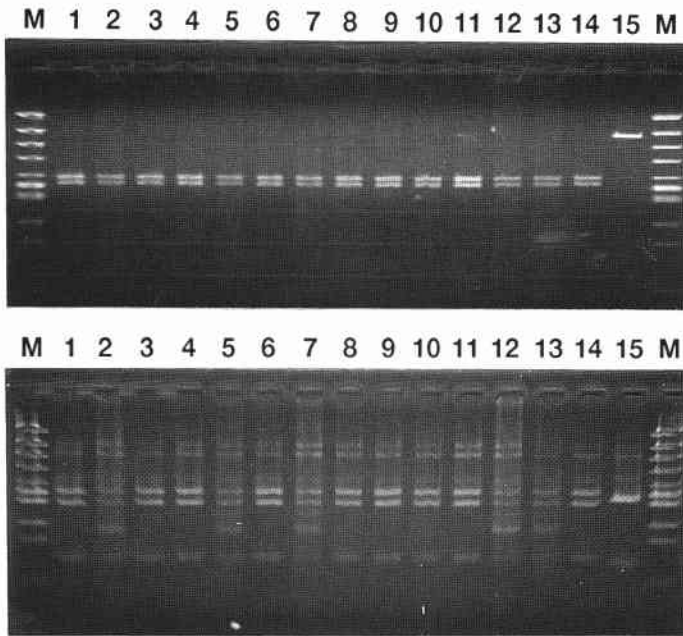


Fig. 1. Examples of the RFLP profiles among *Puccinia* isolates. The PCR-amplified nuclear rDNA ITS regions were digested with *Rsa* I (upper) and *Nla* III (lower). M: DNA size marker of ϕ X174 DNA digested with *Hinc* II, 1: Ku-9401, 2: Ku-9402, 3: Ku-9501, 4: Ku-9504, 5: Ku-9601, 6: Ku-9604, 7: Ku-9607, 8: Ku-9611, 9: Ku-9616, 10: Mi-9604, 11: Na-9601, 12: Sh-9602, 13: Sh-9603, 14: Hy-9601, 15: Ps-9601.

めを Table 2 に示した。表上段の Ku-9401 株およびその他の 8 菌株では、用いた 9 種類の制限酵素による ITS 領域断片の RFLP パターンは同一であった。また、表中段の Ku-9402 株他の 5 菌株は、*Acc* II, *Alu* I, *Msp* I, *Rsa* I および *TspE* I の 5 種類の制限酵素では上段の 9 菌株と同一の RFLP パターンを示したが、*Hae* III, *Mbo* I, *Nla* III および *Taq* I による RFLP パターンは上段の菌株のものとなっていた。すなわち、供試した南方さび病菌 14 菌株は、遺伝的に異なる少なくとも 2 つのグループに類別されることが明らかとなった。Table 1 に示したように、それぞれのグループに含まれる菌株の由来は多様であり、各グループと採集地あるいは採集年との相互関係は認められなかった。

一方、さび病菌では、各種制限酵素による切断パターンが南方さび病菌のパターンと異なっていた。このことから、rDNA ITS 領域の PCR-RFLP によって両さび病菌を識別できる可能性が強く示唆された。今後、他のさび病菌株も含めて検討する必要がある。

トウモロコシ南方さび病菌ではレースの存在が知られており、台湾では 13 のレースが報告されている (Yeh ら、

1986)。本邦のトウモロコシ南方さび病菌について、これまでレースの存在は報告されていない。本試験で類別された南方さび病菌の 2 つのグループと、レースとの関連については明らかでない。現在、第一次伝染源の海外飛来説を裏付けるデータが蓄積されつつあり (西ら, 1998)、台湾、中国大陸をはじめとする東アジア各地の菌株との比較・検討が今後の課題と考えられる。

引用文献

- 1) 西 和文・川瀬章夫・並木史郎・佐藤豊三・笹谷孝英・篠崎 毅・奈尾雅浩・森貞雅博 (1997) 九病虫研究会報 43: 16-18.
- 2) 西 和文・川瀬章夫・並木史郎・平八重一之 (1998) 九病虫研究会報 44: 9-11.
- 3) ROBERT, A.L. (1962) *Phytopathology* 52: 1010-1012.
- 4) RYLAND, A.K. and STOREY, H.H. (1955) *Nature* 176: 655-656.
- 5) STOREY, H.H. and HOWLAND, A.K. (1957) *Heredity* 11: 289-301.
- 6) ULLSTRUP, A.J. (1965) *Phytopathology* 55: 425-427.
- 7) 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.
- 8) YEH, C.C. (1986) *J. Agri. Res. China* 35: 81-93.

(1998年5月1日 受領)