

AFLP 法によるイネいもち病菌 DNA 多型の検出

平八重一¹⁾・水久保隆之^{1)*}・宮崎 力²⁾・斎藤 彰¹⁾
西 和文¹⁾・岩野 正敬^{1)*}

(¹⁾九州農業試験場・²⁾科学技術振興事業団)

Detection of DNA polymorphism among rice blast fungus isolates by AFLP analysis.

Kazuyuki HIRAYAE¹⁾, Takayuki MIZUKUBO^{1)*}, Chikara MIYAZAKI²⁾, Akira SAITO¹⁾, Kazufumi NISHI¹⁾ and Masataka IWANO^{1)*} (¹⁾Kyushu National Agricultural Experiment Station, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192. ²⁾Nagasaki Laboratory, Japan Science and Technology Corporation, Ohmura, Nagasaki 856-0026)

To detect DNA polymorphism among isolates of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, the AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique was adopted. When each primer combination of *EcoRI*-AC/*MseI*-CA, *EcoRI*-AA/*MseI*-CA or *EcoRI*-AT/*MseI*-CA was used, every *M. grisea* isolate produced more than 30 fragments. The number was approximately 10 to 20 times higher than that for the RAPD technique using 10-nucleotide random primers. Moreover, in every primer set, 5 isolates from independent clonal lineages were distinguishable from each other by fragments showing polymorphism. On the other hand, 5 isolates including an original isolate and its pathogenic mutants produced the same number and size of amplified fragments in all 6 primer sets (the above plus *EcoRI*-AC/*MseI*-CC, *EcoRI*-AA/*MseI*-CC and *EcoRI*-AT/*MseI*-CC). These results show the higher utility and reproducibility of the AFLP technique in elucidating the ecology of rice blast fungus.

Key words: AFLP, DNA polymorphism, *Magnaporthe grisea*, rice blast

イネいもち病菌は、イネ品種の抵抗性遺伝子を侵す病原性変異系統(レース)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まだ十分に明らかでない。従って、いもち病菌の病原性変異や個々の菌株の遺伝的差異を DNA の多型として検出できれば、変異機構の解明や抵抗性品種の有効利用に繋がるものと期待される。

DNA の多型解析法としては、従来、RFLP 法および RAPD 法が広く用いられてきたが、両法にはそれぞれに特徴がある。すなわち、前者には、結果の再現性は高いものの、解析に純度の高い DNA を量的に必要とする点、検出操作が煩雑である点、特定のプローブを必要とする点で問題がある。一方後者には、検出操作は簡便であるものの結果が反応条件に左右されやすく、さらに、

検出できる増幅断片の数が少ないという欠点がある。

近年、RFLP 法と RAPD 法の長所を併せもつ新たなフィンガープリントの手法として、AFLP (増幅断片長多型) 解析法 (Vos *et al.*, 1995; 島野・矢野, 1997) が注目されている。そこでまず、AFLP 法がイネいもち病菌においても、その DNA 多型の検出に有効か否かについて検討した。

材料および方法

1. イネいもち病菌菌株

フィンガープリント解析の結果、それぞれ系統の異なることが明らかなイネいもち病菌 5 菌株 (SONE *et al.*, 1997) に加え、Kyu 9447012 株とこれに由来する病原性変異菌株 4 株の、計 10 菌株を供試した。各菌株名、レースおよび系統を Table 1 に示した。これらの菌株は、病原性およびその他の変異を避けるために、1996 年 2 月以後、ろ紙法で -30°C に保存した。

2. 菌体 DNA の抽出

菌体 DNA の抽出は、既報 (平八重ら, 1997) に従っ

*現在 農業研究センター

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

Table 1. List of *Magnaporthe grisea* isolates used in this study

Isolate	Location (Year)	Race	Clonal lineage ^{a)}
Ken54-20	Yamaguchi (1954)	003	JBLB-K33
Ken54-04	Gifu (1954)	003	JBLA-K04
Hokul	Hokkaido (1948)	007	JBLB-HK1
Ina72	Nagano (1957)	031	JBLA-INA
P-2b	Niigata (1948)	303	JBLC-P2B
Kyu9447012	Okinawa (1994)	003	— ^{b)}
95Mu-34 ^{c)}		007	—
95Mu-41 ^{c)}		013	—
95Mu-36 ^{c)}		043	—
95Mu-11 ^{c)}		403	—

a) Data from SONE *et al.* (1997).

b) Unknown.

c) Spontaneous mutant derived from Kyu9447012.

た。すなわち、PDB 培地 (Difco) で培養したイネいもち病菌の菌体を、1%セルラーゼおよび0.2%ノボザムを含む0.6M KCl (pH5.5) 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, RNaseA 処理を行い, AFLP 解析のためのDNA 試料とした。

3. AFLP 解析

AFLP 断片の増幅は、PE Applied Biosystems 社の Microbial Fingerprinting Kit を用い、操作は島野・矢野 (1997) に準じた。すなわち、まず、いもち病菌 DNA 100ng に *EcoRI* と *MseI*、両制限酵素の切断部位に特異的な配列をもつ2種類のアダプターおよび T4 DNA リガーゼを加えて、22°Cで一晩反応させた。次に、これを鋳型として2段階のPCR 反応を行い、選択的に断片を増幅した。*EcoRI*-/*MseI*-プライマーの組合わせとしては、AC/CA, AA/CA, AT/CA, AC/CC, AA/CC および AT/CC の6通りのいずれかを用いた。増幅産物は、島野・矢野 (1997) に従って、DNA シーケンサーを用いて6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画した後、GeneScan ソフトウェア1.2で解析した。

4. イネいもち病菌の類別

AC/CA, AA/CA および AT/CA の3通りの組合わせで検出されたすべての AFLP 断片について、PAUP 3.1ソフトウェアにより最大節約法で解析した。

結果 および 考察

供試したイネいもち病菌10菌株では、用いた3種類のプライマーの組合わせにおいて、いずれの菌株についても30以上の増幅産物が検出された。その例を Fig. 1 に示した。

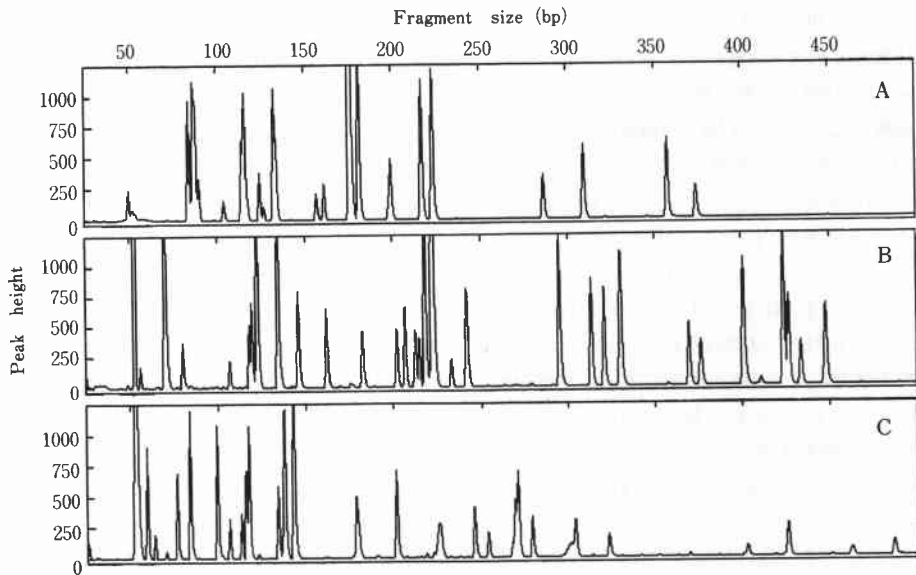


Fig. 1. Electropherograms showing PCR products generated using a different AFLP primer combination (A; *EcoRI*-AC/*MseI*-CA, B; *EcoRI*-AA/*MseI*-CA, C; *EcoRI*-AT/*MseI*-CA) for the *Magnaporthe grisea* isolate Ken54-04. A Microbial Fingerprinting Kit and GeneScan 1.2 software (PE Applied Biosystems) were used for the AFLP procedures.

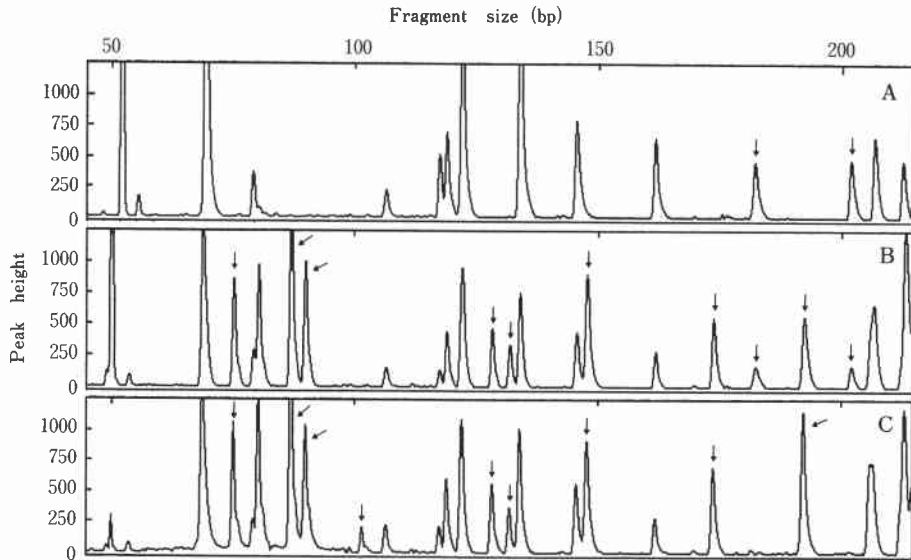


Fig. 2. AFLP markers detected among the isolates Ken54-04 (A), Hoku1 (B) and P-2b (C) using a primer combination of *EcoRI*-AA/*MseI*-CA. The markers are indicated by arrows.

系統 (clonal lineage) の異なる研54-04, 研54-20, 北1, 稲72および P-2b の5菌株間では, 複数の多型を示す断片すなわち AFLP マーカーが認められた。その例を Fig. 2 に示した。各プライマーの組み合わせでは, *EcoRI*-AC/*MseI*-CA により11, *EcoRI*-AA/*MseI*-CA で21, さらに *EcoRI*-AT/*MseI*-CA で20の AFLP マーカーが検出された。以上のマーカーの有無について, 5菌株は互いに異なるパターンを示した (Table 2)。

一方, Kyu9447012株とこれに由来する病原性変異菌株4株の5菌株では, まったく同一の増幅産物が得られ, レースすなわち病原性の変異との連鎖を示唆する AFLP マーカーは検出されなかった。また, これらの病原性が異なる菌株間では, 上記の3種類のプライマーの組み合わせの他 *EcoRI*-AC/*MseI*-CC, および *EcoRI*-AA/*MseI*-CC および *EcoRI*-AT/*MseI*-CC の組み合わせにおいても, 多型を示す断片は認められなかった。このことは, 病原性の変異に伴う DNA の変化が, ごく狭い領域で起きていることの結果と推察された。なお, Kyu9447012株他増幅産物は, 先の52のマーカーの検出パターンを見た場合, 系統の異なる各菌株とは異なるパターンを示した (Table 2)。

AFLP を示さないその他の増幅断片は, 菌株間で良く一致したピークとして検出され (Fig. 1, Fig. 2), 本法の再現性の高さが再確認された。10塩基のプライマーを用いた RAPD 法をいもち病菌に適用した場合に

は, 通常数本の断片しか検出されない。これに対し本法は, その10~20倍の増幅産物を検出できるため, DNA 変異の検出に極めて有効な手法であると考えられた。

本試験結果 (Table 2) から, 供試したイネいもち病菌10菌株は Fig. 3 の通りに類別された。すなわち, 反復配列を用いたフィンガープリント解析により異なる系統 (clonal lineage) に分類された5菌株は, AFLP 法によっても相互に識別された。現在本邦に分布する90%のイネいもち病菌株は, JBLA-K04 あるいは JL1 と呼ばれる系統に属し, 残りの10%が JBLB-K33 あるいは JL2 と呼ばれる系統に属している (SONE *et al.*, 1997; DONら, 1998)。本試験の結果においても, これらの2つの系統に属する各菌株は, 明確に類別された。ただし, 研54-20, 北1 および P-2b の3菌株では, 北1が, 同じ JBLB に属する研54-20よりも JBLC の P-2b により近い可能性が示された。

AFLP 法は, イネいもち病菌においても, 特定のプローブや塩基配列の情報が無くとも多くの増幅断片について比較・検討できることから, いもち病菌の DNA 多型の検出に極めて有効な手法と考えられる。いもち病菌を AFLP マーカーで類別して追跡可能となれば, いもち病の発生生態やいもち病菌の変異性における多くの知見が得られるものと期待される。また, 本法では, 制限酵素の種類および選択的断片の増幅に用いるプライマーの設計と組み合わせを変えることによって, 理論的には無

Table. 2 Detection of AFLP markers from *Magnaporthe grisea* isolates^{a)}

Primer set	AFLP marker	isolate					
		Ken54-20	Ken54-04	Hokul	Ina72	P-2b	Kyu9447012 etc ^{b)}
	01		+		+		+
	02	+		+		+	
	03			+		+	
	04			+		+	
<i>EcoRI</i> -AC	05			+		+	
+	06			+		+	
<i>MseI</i> -CA	07			+			
	08					+	
	09					+	
	10	+	+		+	+	+
	11	+	+	+	+		+
	12	+		+		+	
	13	+					
	14	+					
	15	+	+	+		+	+
	16	+	+	+		+	+
	17			+		+	+
	18	+		+		+	
	19			+		+	
	20			+		+	
<i>EcoRI</i> -AA	21			+		+	
+	22			+	+	+	
<i>MseI</i> -CA	23					+	
	24			+		+	
	25			+		+	
	26			+		+	
	27	+			+		+
	28	+	+	+	+		
	29	+	+	+	+		+
	30	+	+	+	+		
	31	+	+	+	+		+
	32	+	+	+	+		
	33		+		+		
	34	+		+		+	+
	35		+		+		+
	36			+		+	
	37			+		+	
	38			+		+	
	39			+		+	
	40			+		+	
<i>EcoRI</i> -AT	41			+		+	
+	42			+		+	
<i>MseI</i> -CA	43			+		+	
	44			+		+	
	45	+	+	+		+	
	46			+		+	+
	47	+		+		+	
	48			+		+	+
	49					+	
	50					+	+
	51					+	
	52			+		+	

a) In all AFLP procedures and analysis, a Microbial Fingerprinting Kit and GeneScan 1.2 software (PE Applied Biosystems) were used according to the instruction of the manufacturer.

b) The others were 95Mu-34, 95Mu-41, 95Mu-36 and 95Mu-11.

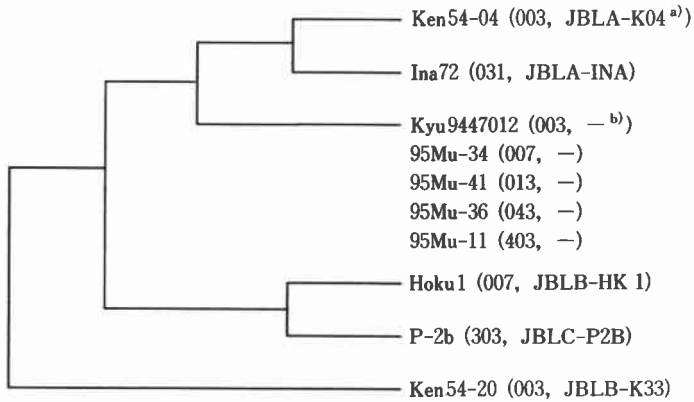


Fig. 3 Grouping of *Magnaporthe grisea* isolates based on the AFLPs detected using 3 primer combinations, *EcoRI*-AC/*MseI*-CA, *EcoRI*-AA/*MseI*-CA and *EcoRI*-AT/*MseI*-CA.

a) Clonal lineage data are from SONE *et al.* (1997).

b) Unknown.

限の断片の解析が可能である。従って、病原性の変異を、特異的な断片として検出することも不可能ではない。

引用文献

1) DON, L.D.・草場基章・土佐幸雄・中屋敷均・真山滋志 (1998) 日植病報 64:351. (講要) 2) 平八重一之・西和文・岩野正敬 (1997) 九病虫研会報 43:8-11. 3) 島野公利, 矢野昌裕 (1997) 新版植物のPCR実験プロトコール (島本

功・佐々木卓治 監修) 秀潤社: pp.182-188. 4) SONE, T., ABE, T., YOSHIDA, N., SUTO, M. and TOMITA, F. (1997) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63: 155-163. 5) VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T. van de, HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZEBEAU, M. (1995) Nucl. Acids Res. 23: 4407-4414.

(1999年4月30日 受領)