

オオムギ網斑病菌とオオムギ斑葉病菌の rDNA-IGS 領域の PCR-RFLP 解析による識別

菊原賢次*・石井貴明

形態が酷似した近縁種であるオオムギ網斑病菌 *Pyrenophora teres* とオオムギ斑葉病菌 *P. graminea* を識別するため、分子遺伝学的手法で解析を行った。国内の西南暖地を中心とした地域から両種の菌株を収集し、rDNA-IGS 領域を PCR で増幅させ、増幅産物の長さを比較した。*P. teres* は約 4kbp と約 4.4kbp の 2 つのグループに、*P. graminea* は約 3.8kbp の 1 つのグループに類別された。これらの増幅産物を 6 塩基認識制限酵素 *Apa* I, *Bgl* II, *Dra* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Sac* I で処理した RFLP パターンは、rDNA-IGS 領域の増幅産物長で類別されたグループ間で同一であった。4 塩基認識制限酵素 *Alu* I で増幅産物を処理した RFLP パターンは、*P. teres* に属する 2 つのグループと *P. graminea* に属する 2 つのグループに類別された。以上のように、rDNA-IGS 領域の PCR-RFLP 解析は *P. teres* と *P. graminea* を識別する有効な手段であった。一方、国外における *P. graminea* の一部では、本研究の PCR-RFLP 解析で *P. teres* と類似するものが存在しており、これらを含めると、PCR 増幅産物を *Dra* I で処理した RFLP パターンが、両種をより明確に判別することができた。

[キーワード : オオムギ網斑病, オオムギ斑葉病, rDNA-IGS 領域, PCR-RFLP 解析]

Distinction between *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea* based on RFLP analysis of intergenic spacer region of ribosomal DNA. KIKUHARA Kenji and Takaaki ISHII (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 27: 17 - 21 (2008)

Intergenic spacer (IGS) region of the ribosomal DNA (rDNA) were amplified from each isolates of *Pyrenophora teres* and *P. graminea* with PCR. The length of the IGS-PCR products in *P. teres* were classified into two groups, ca. 4kbp or 4.4kbp, and the length of the IGS-PCR products in *P. graminea* were ca. 3.8kbp. The RFLP patterns of isolates obtained with the 6-base cutting enzymes *Apa* I, *Bgl* II, *Dra* I, *EcoR* V, *Hind* III and *Sac* I were similar within each group based on the PCR products length and different among 3 groups. The restriction patterns of IGS-PCR products from isolates of *P. teres* with the 4-base cutting enzyme *Alu* I were similar each group and the restriction patterns of IGS-PCR products from isolates of *P. graminea* were classified into two groups. Therefore, variability of the rDNA-IGS region could distinguish between *P. teres* and *P. graminea*. On the other hand, the RFLP patterns obtained these restriction enzymes were similar between isolates of *P. graminea* in another paper and the group identified by the long IGS-PCR products in *P. teres* in this investigation. In consideration of those isolates, the RFLP patterns obtained with *Dra* I could clearly distinguish between *P. teres* and *P. graminea*.

[Key words: barley net blotch, barley leaf stripe, rDNA-IGS, RFLP analysis]

緒言

Pyrenophora 属菌はイネ科植物に寄生する Drechslera 属菌の完全世代としてよく知られており、世界で十数種が知られ、日本ではオオムギ *Hordeum vulgare* L. で 3 種、コムギ *Triticum aestivum* L. とエンバク *Avena sativa* L. に各 1 種が確認されている¹⁾¹⁾。オオムギに発生する病害のうち、*Pyrenophora teres* Drechsler によるオオムギ網斑病と *P. graminea* Ito and Kuribayashi によるオオムギ斑葉病は我が国を含む温暖湿潤な地域で重要病害^{6,10,16)}である。

オオムギ網斑病は罹病種子や前作のオオムギ残渣が第一次伝染源になり、幼苗に感染する。感染葉上には多量の分生子が形成され、これにより活発に第二次伝染を繰り返し、穂に感染すると罹病種子ができる¹⁷⁾。オオムギのほとんどが不稔になり、感染葉や茎で形成された孢子斑葉病は種子伝染し、感染した個体は枯死あるいは子実

が他の個体の穂に感染すると、罹病種子ができる。両種は同じ種子伝染性病害であるが、防除法が異なり、オオムギ網斑病は種子消毒以外に出穂期の薬剤防除も必要である^{6,10)}が、オオムギ斑葉病は種子消毒が唯一の防除法である。

種子伝染性病害の防除対策は、健全種子の確保が重要である。特に、オオムギ斑葉病については主要農産物種子法により、生産種子に罹病種子の混入が許されないため、種子生産農家には特に注意すべき病害である。このため、生産現場では健全種子の確保だけでなく罹病種子における両種の識別が重要である。プロッター法を改変した菊原⁹⁾や松本¹²⁾の方法により、種子上あるいは、種子をのせた培地上に分生子を形成させ、オオムギ網斑病あるいはオオムギ斑葉病の罹病の有無を判別することは可能であるが、両種が近縁種であるため、分生子の形態では種の識別ができない。

PCR を含む分子生物学的手法は菌の遺伝的多様性を分析する手法としてよく用いられ、ribosomal DNA (rDNA) 領域は保存性が高い遺伝子と多様性が高い非遺伝子領域を

* 連絡責任者 (病害虫部)

含むため、系統・分類学によく用いられる。スペーサー領域の rDNA-ITS 領域（内部転写スペーサー領域）は種間で遺伝子の多様性があり、種の識別に用いられ^{1,3,14,18)}、リボゾーム反復ユニットを分ける IGS 領域（遺伝子間スペーサー領域）は種内で遺伝子の多様性があることから、種内の類別に用いられる^{3,7)}。

P. teres と *P. graminea* の rDNA-ITS 領域の塩基配列は 1 塩基しか違いがなく¹⁸⁾、rDNA-ITS 領域の PCR 増幅産物の制限酵素切断片長多型 (RFLP) 解析では両種は区別ができなかった⁸⁾。これまでに *P. graminea* では rDNA-IGS 領域の PCR-RFLP 解析により、複数の RFLP パターンが確認されているが^{5,15)}、*P. teres* の rDNA-IGS 領域では PCR-RFLP 解析は行われていない。そこで、国内の西南暖地を中心とした地域から両種の菌株を収集し、rDNA-IGS 領域の PCR-RFLP 解析を行い、両種の識別の可能性を検討した。

材料と方法

1 供試菌株

第 1 表に今回使用した *P. teres* と *P. graminea* の菌株を示した。これらのうち、筆者が分離した菌株は、以下の方法により分離を行った。すなわち、それぞれの病害について特徴的な病徴を示した罹病葉を各地域から採取

第 1 表 供試菌株

種 / 菌株名	宿主	分離地	分離年	分離者・分譲者
<i>Pyrenophora. teres</i>				
FUPT9901	二条オオムギ	福岡県	1999	著者
Pt amagi 2	二条オオムギ	福岡県	1998	著者
FUPT9906	二条オオムギ	熊本県	1999	著者
FUPT9908	二条オオムギ	熊本県	1999	著者
pt 1-1 ¹⁾	二条オオムギ	大分県	不明	狭間
pt 3-3 ²⁾	二条オオムギ	鳥取県	不明	長谷川
MAFF305408 ³⁾	六条オオムギ	千葉県	1976	西原
MAFF511033 ³⁾	六条オオムギ	千葉県	不明	西原
IFO6674 ⁴⁾	不明	不明	不明	Kurata
IFO7508 ⁴⁾	不明	不明	不明	西原
<i>P. graminea</i>				
FUPG9901	二条オオムギ	福岡県	1999	著者
Pg kurume 2	二条オオムギ	福岡県	1998	著者
FUPG9920	二条オオムギ	熊本県	1999	著者
FUPG9910	二条オオムギ	大分県	1999	著者
FUPG9915	二条オオムギ	宮崎県	1999	著者
FUPG9925	二条オオムギ	岡山県	1999	著者
FUPG9930	二条オオムギ	埼玉県	1999	著者
Tsukuba D ⁵⁾	二条オオムギ	千葉県	不明	旧畑作病害研究室
IFO7507 ⁴⁾	不明	不明	不明	西原

1) 大分県農業技術センターより分譲

2) 鳥取県農業試験場より分譲

3) 生物資源機構より分譲

4) 旧発酵研究所より分譲

5) 中央農業総合研究センターより分譲

し、組織分離法により菌を分離し、V8 ジュース寒天培地 (V8 ジュース 200ml, CaCO₃ 3g, 寒天 15g / 1L) で 25℃, 12 時間 BLB ランプ照射, 12 時間暗黒を繰り返す条件で培養し、分生子を形成させ、これを単胞子分離し、菌株として保存した。通常の培養はポテトデキストロース寒天培地 (PDA; ジャガイモ 200g の煎汁, ブドウ糖 20g, 寒天 15g / 1L) を用い、長期間培養する場合には素寒天培地を用いた。

2 DNA の抽出法と PCR の条件

菌糸を採取する際は、各菌株をポテトデキストロース液体培地 (ジャガイモ 200g の煎汁, ブドウ糖 20g / 1L) で 25℃, 5 日間培養し、菌糸をガラスウールフィルタで回収した。あるいは、各菌株を PDA 培地で 25℃, 7 日間培養し、菌糸を白金耳で少量回収した。その後、この菌糸を液体窒素で凍結し、乳鉢で破碎した。全 DNA の抽出は早川⁴⁾の方法で行った。rDNA の IGS 領域を増幅するプライマーは CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') と CNS1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3') を用いた¹⁵⁾。PCR は EX Taq DNA polymerase (TaKaRa) キットの説明書に従い 50 μl で行った。サーマルサイクラー (ASTEC 製, PC707) の温度や時間等の条件は最初の熱変性 94℃, 5 分間, 熱変性 94℃, 1 分間, アニリング 59℃, 2 分間, 伸長反応 72℃, 5 分間で 35 回繰り返し、最後の伸長反応 72℃, 10 分間を行った。

3 RFLP 解析

制限酵素処理は PCR 産物 1 μl, 10 × バッファー 1 μl, 制限酵素 (Alu I, Apa I, Bgl II, Dra I, EcoR V, Hind III, Sac I (Boehringer Mannheim)) 0.5 μl, 滅菌蒸留水 7.5 μl で 37℃, 8 時間以上処理した。なお、用いた制限酵素のうち Alu I のみが 4 塩基認識制限酵素で他は 6 塩基認識制限酵素である。

制限酵素処理断片は 1xTBE バッファーで 1% または 3% のアガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロミドで染色した後検出し、解析した。IGS 領域の制限酵素地図は制限酵素 Apa I, Bgl II, Dra I, EcoR V, Hind III, Sac I の 2 回処理で作成した。

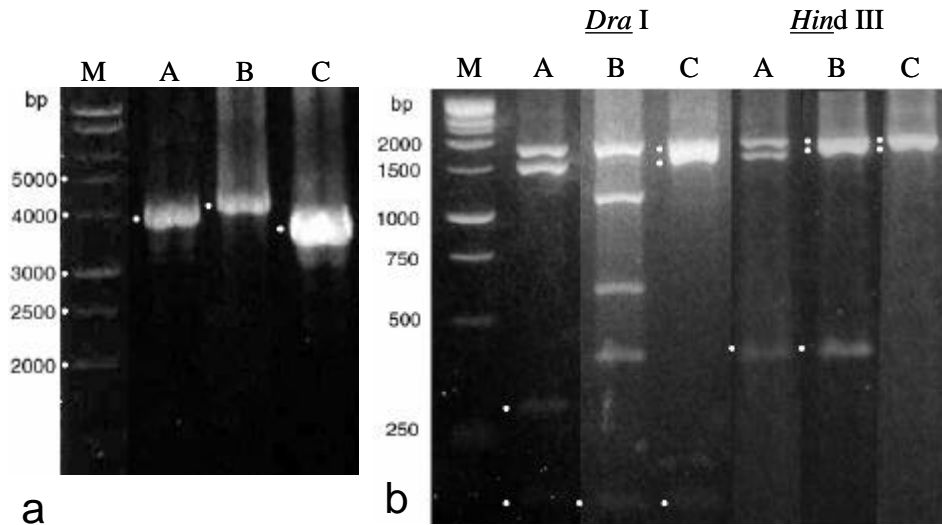
結果

プライマー CNL12 と CNS1 を用いて PCR を行い、IGS 領域を示す DNA 断片がすべての菌株で増幅された (第 1 図 a)。*P. teres* 菌株の増幅産物長は約 4kbp (グループ A (第 1 図 a の A)) と 4.4kbp (グループ B (第 1 図 a の B)) の 2 つのグループに、*P. graminea* 菌株の増幅産物長は全て約 3.8kbp (グループ C (第 1 図 a の C)) のグループに類別された。

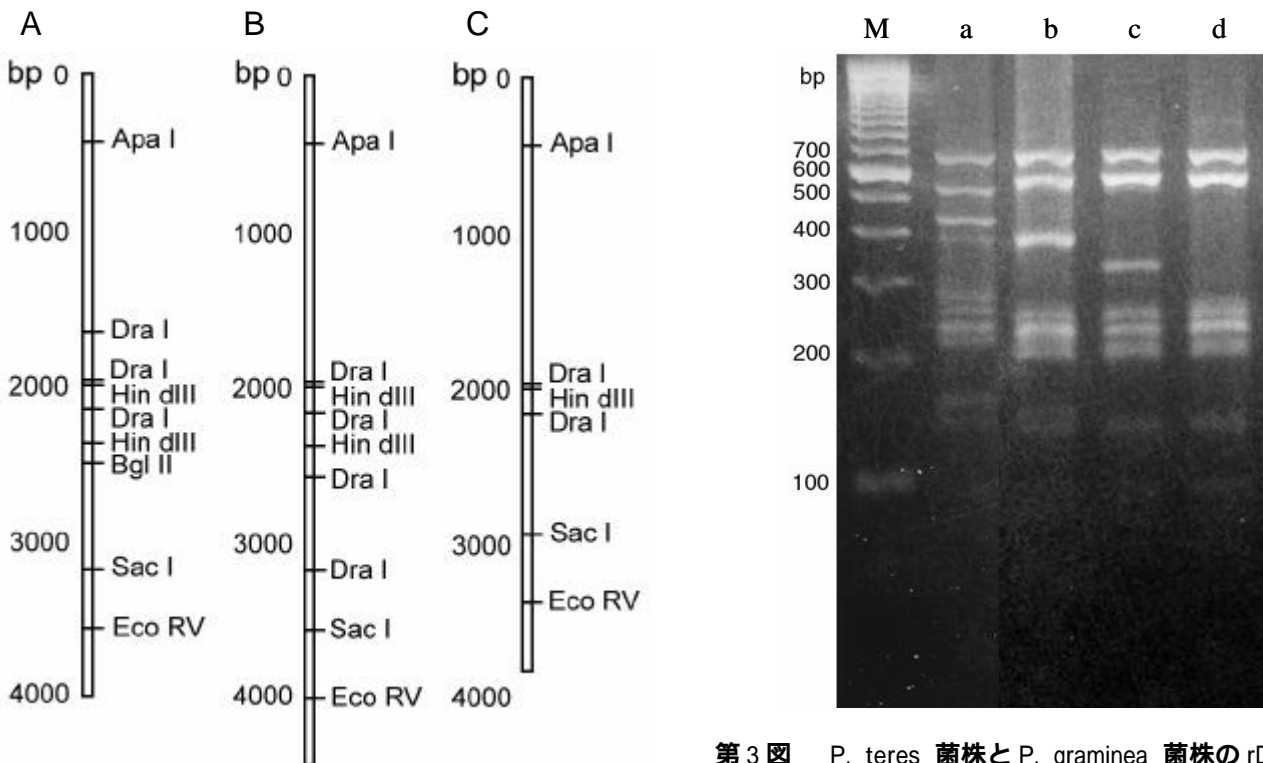
6 塩基認識制限酵素 Apa I, Bgl II, Dra I, EcoR V, Hind III, Sac I で PCR-RFLP 解析を行った。その結果、増幅産物長で類別されるグループ (グループ A, B, C) 内は同じパターンを示した。グループ間の比較では、Dra I 処理による RFLP パターンはグループごとに異なった (第 1 図 b)。Hind III 処理による RFLP パターンは *P. teres* のグループ A と B で類似し、*P. graminea* のグループ C

とは異なった(第1図b)。Bgl II 処理では、*P. teres* のグループ A は切断されたが、グループ B と *P. graminea* のグループ C は切断されなかった(データ省略)。Apa I 処理による RFLP パターンは全ての菌株グループで類似

し、Eco RV と Sac I も同様であった(データ省略)。6塩基認識制限酵素により IGS 領域の制限酵素地図を増幅産物長で類別されるグループごとに作成した(第2図、第2表)。さらに、4塩基認識制限酵素 Alu I 処理による



第1図 *P. teres* 菌株と *P. graminea* 菌株の rDNA-IGS 領域の PCR 産物のアガロースゲル電気泳動
 a) PCR 産物 b) 制限酵素処理 (Dra I , Hind III) M, 1kb DNA マーカー; A, *P.teres*: FUPT9901; B, *P.teres*: MAFF511033; C, *P. graminea*: FUPG9901 , 図内の「・」はバンドの位置を示す。



第2図 rDNA-IGS 領域の制限酵素地図
 A) , B) *P. teres* , C) *P. graminea*

第3図 *P. teres* 菌株と *P. graminea* 菌株の rDNA-IGS 領域の PCR 産物の制限酵素(Alu I)断片の アガロースゲル電気泳動

M, 1kb DNA マーカー; a, *P.teres*: FUPT9901; b, *P.teres*: MAFF511033; c, *P. graminea*: FUPG9901; d, *P. graminea*: Pgkurume2

PCR-RFLP 解析を行った。その結果、RFLP パターンは *P. teres* のグループ A, B および *P. graminea* のグループ内で 2 つのグループに類別された (第 3 図, 第 2 表)。

増幅産物長や *Apa* I, *EcoR* V, *Sac* I 処理による RFLP パターンは処理産物の分子量が近いと類似し、アガロースゲル電気泳動では両種間の区別が困難であった。一方、*Dra* I, *Hind* III, *Alu* I 処理の RFLP パターンは両種でバンド数が異なり、明確に区別ができた。

第 2 表 *Pyrenophora* 属菌株の rDNA-IGS 領域の PCR-RFLP パターン

種 / 菌株名	rDNA-IGS領域のPCR-RFLPパターン	
	長さ6種類の6塩基認識制限酵素 ¹⁾	4塩基認識制限酵素 <i>Alu</i> I
<i>Pyrenophora. teres</i>		
FUPT9901	A ²⁾	a
Pt amagi 2	A	a
FUPT9906	A	a
FUPT9908	A	a
pt 1-1	A	a
pt 3-3	A	a
MAFF305408	B	b
MAFF511033	B	b
IFO6674	A	a
IFO7508	B	b
<i>P. graminea</i>		
FUPG9901	C	c
Pg kurume 2	C	d
FUPG9920	C	c
FUPG9910	C	c
FUPG9915	C	c
FUPG9925	C	d
FUPG9930	C	d
Tsukuba D	C	d
IFO7507	C	c

1) 6 種類の制限酵素は、*Apa* I, *Bgl* I, *EcoR* V, *Dra* I, *Hind* III, *Sac* I である

2) 同じアルファベットは同じ多型を示し、第 2 図および第 3 図でのアルファベットの多型を示す。

考 察

Jawhar ら⁵⁾はシリアの *P. graminea* の菌株で rDNA-IGS 領域の RFLP 解析を行った結果、多くの RFLP パターンが見られ、遺伝的変異が大きいことを確認した。その要因として、突然変異、他の地域からの移入および交雑による組換えの可能性を指摘している。Pecchia ら¹⁵⁾はイタリア、オーストラリア、チュニジアから分離された *P. graminea* の菌株で本研究と同様の rDNA-IGS 領域の RFLP 解析を行い、菌株ごとに異なる多数のパターンを確認している。このように、オオムギ起源地の近隣諸国においては、*P. graminea* の遺伝的変異が大きいことが報告されている。一方、本試験で供試した日本産の *P. graminea* 9 菌株は、rDNA-IGS 領域の RFLP 解析の結果、2 つのグルー

プに類別され、比較的変異が少なかった。また、その中には Pecchia ら¹⁵⁾が報告した RFLP パターンと一致するものが含まれていた。日本は、自然状態で病原菌や種子の海外からの移入が少なく、今回供試した菌株の宿主の大半を占める二条オオムギの栽培的歴史も浅いため、*P. graminea* の遺伝的変異も少ないと考えられる。このため、国内の西南暖地における *P. graminea* は限られた遺伝的変異で構成されていると推察される。*P. teres* 10 菌株の rDNA-IGS 領域の PCR-RFLP 解析により、*P. graminea* と同様に 2 つのグループに類別され、*P. teres* も比較的遺伝的変異が少ないと考えられる。国内の西南暖地の両種の遺伝的変異は少なく、本報告の供試菌株を両種に類別できれば、両種を識別する指標として十分と考えられる。しかしながら、近年の物流状況から、今後、本病の海外からの移入が全くないとは考えられないため、両種の識別には、より多くの菌株を類別できる指標が望ましいと考えられる。

Pecchia ら¹⁵⁾は *P. graminea* 6 菌株を rDNA-IGS 領域の PCR 増幅産物長で約 3820bp と約 4380bp の 2 つのグループに類別し、本研究と同様な制限酵素で PCR-RFLP 解析を行った。その結果、増幅産物長が約 3820bp のグループは本研究結果における *P. graminea* のグループと増幅産物長および PCR-RFLP 解析の結果が一致した。一方、増幅産物長が約 4380bp のグループは本研究における *P. teres* のグループ B と増幅産物長ではほぼ一致し、RFLP パターンでも類似していた。西南暖地の菌株を用いた本研究結果では、両種の識別は増幅産物長の比較や *Dra* I, *Hind* III あるいは *Alu* I 処理による PCR-RFLP 解析で可能であった。しかし、本研究で用いた *P. teres* の一部の菌株では、増幅産物長あるいは *Hind* III や *Alu* I 処理による RFLP パターンが Pecchia ら¹⁵⁾が報告した *P. graminea* の解析結果と類似したことから、*P. teres* と *P. graminea* の区別が困難になることも推察される。このため、*Dra* I 処理による PCR-RFLP 解析が明確に両種を識別できると考えられた。

P. teres と *P. graminea* の識別は健全種子生産のため西欧諸国でも重要視され、rDNA-ITS 領域の 1 塩基の違いを区別できる蛍光物質を利用した Scorpion プライマーによるリアルタイム PCR 法により、両種の識別が可能である^{1,2)}。しかし、この方法では高額なリアルタイム PCR 装置が必要である。一方、本研究結果による識別は従来からよく利用されている PCR-RFLP 法であるため、通常の PCR 装置での識別が可能である。従って、本報告は健全種子を確保するために各県農業試験場や病害虫防除所などの生産現場において利用できる方法として重要な知見である。

辞 察

本研究実施に当たり、分離菌株を分譲して下さった大分県農林水産研究センター 挟間 渉氏、島根県農業技術センター 長谷川 優氏、中央農業総合研究センター 旧畑作病害研究室に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Bates, J. A. Taylor, E. J. A. (2001) Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Molecular Plant Pathology* 2(5):275-280
- 2) Bates, J. A. Taylor, E, J, A. Kenyon, D, M. Thomas, J, E. (2001) The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology* 2(1):49-57
- 3) Fujinaga, M. Ogiso, H. Shinohara, H. Tsushima, S. Nishimura, N. Togawa, M. Saito, H. Nozue, M. (2005) Phylogenetic relationships between the lettuce root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1, 2, and 3 based on the sequence of the intergenic spacer region of its ribosomal DNA. *J. Gen. Plant Pathology* 71:402-407.
- 4) 早川孝彦(1997). 新版 植物のPCR実験プロトコール細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 7 (島本功・佐々木卓治 監修) pp.49-51, 秀潤社, 東京
- 5) Jawhar, M. Arabi, M, I, E. (2006) Genetic variability among *Pyrenophora graminea* isolates. *Australasian Plant Pathology* 35:279-281
- 6) Jordan, V. W. L. (1981) A etiology of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres* and some effects on yield. *Plant Pathology* 30: 77-87.
- 7) Kawabe, M. Kobayashi, Y. Okada, G. Yamaguchi, I. Teraoka, T. Arie, T. (2005) Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT 1, and pg1, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *J. Gen. Plant. Pathology* 71:263-272.
- 8) 菊原賢次・石井貴明・中村利宣(2001) rDNA-ITS領域とrDNA-IGS領域のPCR-RFLP解析によるオオムギ網斑病とオオムギ斑葉病の識別. *日本植物病理学会報* 67(2):136
- 9) 菊原賢次・中村利宣 (2002) オオムギ網斑病による穂の褐変と感染子実の検出法. *九州病害虫研究会報* 48:5-9.
- 10) 菊原賢次・中村利宣 (2002) オオムギ網斑病に対する薬剤散布が収量と子実の感染に及ぼす影響. *九州病害虫研究会報* 48:10-13
- 11) 津田盛也 (1992) 植物病原菌類図説 (小林享夫・勝本謙・我孫子和雄・阿部恭久・柿島真.) pp.234-235, 全国農村教育協会, 東京
- 12) 松本幸子(1997)オオムギ斑葉病保菌種子の簡易検定法. *九州農業研究* 59:68
- 13) Moriwaki, J. Tsukiboshi, T. and Sato, T. (2002). Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *J. Gen. Plant. Pathology* 68:307-320.
- 14) Olivier, C. Berbee, M. L. Shoemaker, R. A. Loria, R. (2000) Molecular phylogenetic support from ribosomal DNA sequences for origin of *Helminthosporium* from *Leptosphaeria*-like loculoascomycete ancestors. *Mycologia* 92(4):736-746
- 15) Pecchia, S. Mercatelli, E. Vannacci, G. (1998). PCR amplification and characterization of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA in *Pyrenophora graminea*. *FEMS Microbiology Letters* 166:21-27.
- 16) Porta-Pugala, A. Delogu, G. Vannacci, G. (1986). *Pyrenophora graminea* on Winter Barley Seed: Effect on Disease Incidence and Yield Losses. *J. Phytopathology* 117:26-33.
- 17) Shipton, W, A. Khan, T, N. Boyd, W, J, R. (1973). Net blotch of barley. *Review of Plant Pathology*. 52(5):269-290
- 18) Stevens, E. A. Blakemore, E. J. A. Reeves, J. C. (1998). Relationships amongst barley and oat infecting isolates of *Pyrenophora* spp. based on sequences of the internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. *Molecular Plant Pathology On-Line*. <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1111stevens>
- 19) White, T. J. Bruns, T. Lee, S. Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. (Innis, M. A. Gelfand, D. H. Sninsky, J. J. White, T. J. eds.). pp. 315-322, Academic press inc., NewYork.