

氏名(本籍)	なかむらひとし 中村 仁 (宮城県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第1,805号
学位授与年月日	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	リボソーム DNA ITS 領域を用いたヤナギ類さび病菌の種の評価に関する研究
主査	筑波大学併任教授 農学博士 金子 繁 (森林総合研究所)
副査	筑波大学教授 農学博士 柿 篤 真
副査	筑波大学助教授 農学博士 山 岡 裕 一
副査	筑波大学助教授 理学博士 徳 増 征 二
副査	東京大学教授 理学博士 杉 山 純 多

論文の内容の要旨

バイオマス資源としての価値が高まりつつあるヤナギ類さび病の病原菌(さび菌目-Melampyrea 属)の種の分類は、主に夏孢子および冬孢子の形態的特徴と宿主に対する寄生性に基づいて行われている。しかし、種間における形態的な差異は小さいため同定は困難な場合が多い。本研究では、日本産のヤナギ類さび病菌10種について、従来の形態的形質に基づくリボソーム DNA (rDNA) の ITS 領域を用いて識別できるかどうかを明らかにするとともに、それぞれの種の分類学的な妥当性について評価し、簡便で信頼のできる種の同定法の開発を試みることを目的とした。

(1)rDNA ITS 領域を用いたヤナギ類さび病菌の種の識別および評価

野外より収集したヤナギ類さび病菌10種54系統、未同定菌10系統、および人工培養菌株6種8系統を DNA 解析に供試した。各系統の孢子堆を含む葉片あるいは培養菌体から抽出した全 DNA を用いて、菌の5.8 rDNA を含む ITS 領域を PCR 増幅した。増幅産物の大きさは、約880 bp, 約860 bp あるいは約840 bp のいずれかであった。これらを Alu I, Dra I, EcoRI, Ssp I および TaqI の5種の制限酵素を用いて RFLP 分析し、制限酵素地図を作成した。その結果、供試した72系統は14の RFLP タイプに類別された。RFLP タイプは、各系統内の菌株間において一定であり、また孢子世代による差異も認められなかった。*M. capraearum*, *M. epiphylla*, *M. kamikotica*, *M. larici-urbaniana*, *M. microsora*, *M. yeaoensis* の各系統は、それぞれ種特異的な RFLP タイプを示した。一方、*M. chelidonii-pierotii* と *M. coleosporioides* は同一タイプを示し、識別できなかった。また、*M. epitea* には系統により異なる4つのタイプが認められ、このうちの1タイプは *M. humilis* と同一であった。

M. kamikotica を除く9種41系統において、RFLP 分析よりも検出感度が高いと考えられた SSCP 分析を用いて、ITS 領域の塩基配列の差異について調べたが、前法で識別できなかった種は、同様に識別はできなかった。さらに *M. capraearum*, *M. epiphylla* および *M. humilis* の ITS 領域の塩基配列を決定した結果、RFLP 分析および SSCP 分析の結果が裏付けされた。

以上のことから、RFLP タイプは系統内で安定しており、また6種については種特異的であることが明らかとなった。また、同一の RFLP タイプを示すものは遺伝的に極めて近縁な関係にあると考えられた。

(2) *Melampsora chelidonii-pierotii* と *M. coleosporioides*, ならびに *M. epitea* と *M. humilis* の形態および寄生性の比較

同一の RFLP タイプを示した *M. chelidonii-pierotii* と *M. coleosporioides* について、形態および各胞子世代の接種試験に基づく寄生性を比較した結果、両種間では、冬胞子の大きさに若干の差異が認められる以外は、他の形態的特徴および寄生性は非常に類似していた。さらに、4つの RFLP タイプが存在した *M. epitea* と、*M. epitea* の 1 菌群と同一タイプを示した *M. humilis* について、同様に比較を行った。その結果、*M. epitea* のそれぞれの RFLP タイプを示した菌群は、夏胞子の形態あるいは夏胞子世代の寄生性が明らかに異なっていた。また、同一のタイプを示した *M. epitea* の 1 菌群と *M. humilis* 間では、冬胞子の長さに若干の差異があったが、その他の形態的特徴および夏胞子世代の寄生性は非常に類似していた。

以上の結果より、RFLP タイプと多くの形態的特徴および寄生性の間には相関性が認められ、ヤナギ類さび病菌の rDNA ITS 領域の RFLP タイプは、種を識別するための有効な指標となることが明らかになった。また、従来さび菌の分類上重視されてきた冬胞子の形態は、ヤナギ類さび病菌では分類上重視できないことが示唆された。同一の RFLP タイプを示した *M. chelidonii-pierotii* と *M. coleosporioides*, ならびに *M. epitea* の 1 菌群と *M. humilis* はそれぞれ同種である可能性があるため、今後分類学的な再検討が必要であると考えられた。また、RFLP タイプの異なる *M. epitea* の 3 菌群については、それぞれが別種である可能性が高く、分類学的検討が必要になった。

審査の結果の要旨

本研究は、種の同定が困難なヤナギ類のさび病菌について、菌のリボソーム DNA の ITS 領域の解析を行い、従来の分類による種の妥当性を評価するとともに、簡便で信頼できる同定法の開発を試みた。種々の手法を試みながら、培養が極めて難しいこの菌群に適した手法を見いだし、日本産の10種について、豊富な資料を用いて解析するとともに、さらに問題となる種については、従来の方法による形態観察、接種試験による結果とも比較し、この手法がヤナギ類のさび病菌の種の同定にとって信頼できるものであることを明らかにしたことは大きな成果である。

特に、ITS 領域の解析において、他の菌類では比較的多く用いられている PCR-RFLP 法のみならず、菌類で用いられた例がまだ少ない PCR-SSCP 法を試みるとともに、それらの結果を塩基配列の解析結果と比較するとともに、豊富な材料を用いた詳細な接種試験を進め、DNA 解析結果が生理的性質として重要な寄生性とも相関していることを明らかにして、同定手法としての信頼性を明確にしていることは重要であると思われる。本手法で識別できなかった種については、従来、この菌群の分類で重視されてきた分類基準形質だけではなく、他の形質についても詳細に比較するとともに、寄生性に関しての接種試験結果も取り入れ、その結果として、従来、種の分類上重視されてきた冬胞子世代のいくつかの形質が、それほど重視できないことを明らかにしていることは、ヤナギ類さび病菌を含めた *Melampsora* 属菌全体の今後の分類にも大きな影響を与える可能性がある。今後の課題としては、DNA の他の領域についての解析、さらに、この研究では比較をしていない種についても解析を行い、それらに基づいて分類学的な整理を行うことが必要であろう。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。