

オオムギ,コムギ,エンバクに寄生するUsilago属菌酵素の電気泳動パターンの比較

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	兼平,勉 篠原,正行
発行元	日本植物病理學會
巻/号	52巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 660-668
発行年月	1986年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



オオムギ, コムギ, エンバクに寄生する *Ustilago* 属菌酵素の電気泳動パターンの比較

兼平 勉*・篠原正行*

Tsutomu KANEHIRA and Masayuki SHINOHARA: Comparison of
Electrophoretic Patterns of the Enzymes from *Ustilago* spp.
Parasitic on Barley, Wheat and Oats

Abstract

Thirty three isolates of four species of *Ustilago*, *U. hordei*, *U. nuda*, *U. tritici* and *U. avenae*, parasitic on barley, wheat and oats, respectively, were compared by polyacrylamide gel electrophoresis on seven different enzymes extracted from sporidial or mycelial cells. The enzymes examined were esterase, peroxidase, leucine aminopeptidase, acid phosphatase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. The zymograms of the isolates belonging to the same species showed almost the same patterns. The number and position of bands of esterases, leucine aminopeptidases and malate dehydrogenases were similar between *U. avenae* and *U. hordei*, and the similarities of both fungi were about 70%. On the other hand, *U. nuda* and *U. tritici* showed different electrophoretic patterns on seven enzymes and their similarities were only about 10%. From the results obtained it may be inferred that *U. avenae* and *U. hordei* are closely akin, and that the taxonomical distinction of *U. nuda* and *U. tritici* as different species each other are reasonable.

(Received March 27, 1986)

Key words: *Ustilago hordei*, *U. nuda*, *U. tritici*, *U. avenae*, electrophoresis, isozyme patterns, taxonomy.

緒 言

オオムギ, コムギに寄生する *Ustilago* 属菌のうち, *U. nuda* と *U. tritici* はともに胚感染 (embryo infection) し, 黒穂胞子の形態に差がないことから同一種とされている^{1, 8, 11)}。またオオムギ, エンバクに寄生する *U. avenae*, *U. nigra* (国内未発生), *U. hordei*, *U. koleri* は子苗感染 (seedling infection) するが黒穂胞子の形態から, それらは区別されている^{1, 8, 11)}。

著者らはこれら *Ustilago* 属菌のうち, *U. nuda*, *U. tritici*, *U. avenae*, *U. hordei* の4種を供試して7種類

の酵素の電気泳動パターンを調べ, その類縁関係を検討した。

一部の供試材料を分与下された愛知農試西岡幹弘氏, 茨城農試祝迫親志氏に感謝の意を表す。

材料および方法

供試菌 各地で採取された4種の *Ustilago* 属菌の黒穂胞子から得た計33菌株を供試した (Table 1)。

試料の調整 各供試菌株は Holliday⁹⁾ の完全培地または1 l 当り グルコース 20 g, アスパラギン 2 g, Difco-yeast extract 2 g, Difco-malt extract 2 g, プロリン 250 mg を含む液体培地で室温下, 5~7日

* 日本大学農獣医学部 College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252, Japan

Table 1. Isolates of *Ustilago avenae*, *U. hordei*, *U. nuda* and *U. tritici*

Fungi and isolates used	Location	Year collected	Mating type	Culture type ^{a)}
<i>Ustilago avenae</i>				
AZ 31	Kanagawa	1980	A	M
AZ 32	Kanagawa	1980	a	M
AZ 33	Kanagawa	1980	A	M
AZ 34	Kanagawa	1980	a	M
AQ 11	Kanagawa	1980	?	S
AQ 12	Kanagawa	1980	?	M
AQ 13	Kanagawa	1980	?	M
AQ 14	Kanagawa	1980	?	M
<i>Ustilago hordei</i>				
UH 1-11	Kanagawa	1981	?	S
UH 1-12	Kanagawa	1981	?	S
UH 1-13	Kanagawa	1981	?	S
UH 1-14	Kanagawa	1981	?	S
UH 21	Ibaraki	1984	?	S
UH 22	Ibaraki	1984	?	S
UH 23	Ibaraki	1984	?	S
UH 24	Ibaraki	1984	?	S
UH 25	Ibaraki	1984	?	S
UH 26	Ibaraki	1984	?	S
<i>Ustilago nuda</i>				
UNK 151	Tokyo	1964	A	M
UNK 152	Tokyo	1964	a	M
UNK 163	Tokyo	1964	A	M
UNK 164	Tokyo	1964	a	M
UN 21	Kanagawa	1979	?	M
UN 23	Kanagawa	1979	?	M
UN 32	Kanagawa	1981	?	M
UN 41	Kanagawa	1983	?	M
UN 43	Kanagawa	1983	?	M
<i>Ustilago tritici</i>				
UT 1d2	Aichi	1979	?	M
UT 1d4	Aichi	1979	?	M
UT 2d1	Kanagawa	1980	?	M
UT 2s4	Kanagawa	1980	?	M
UT 33	Kanagawa	1981	?	M
UT 44	Kanagawa	1981	?	M

a) S:sporidial type, M:mycelial type.

間, 120 st.p.m. で振とう培養した。培養後, 4 C, 3,000 r.p.m., 20分間の遠心分離によって集菌し, さらに菌体は 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) で 4 C, 3,000 r.p.m. の遠沈洗浄を 3 回くり返した。その後, 菌体は -20 C で凍結保存した。菌体は低温下で

融解し, 5 C に冷却した Vibrogen Cell Mill Vi4 セルホモジナイザー (Edmund Bohler, Tübingen) で 0.5~0.6 mm のガラスビーズとともに 20~30分間振とうして破碎した。さらに破碎した菌体懸濁液を 4 C, 25,000×g, 60分間, 遠心分離し, その上清を同量の

40%シロ糖と混合して泳動用試料とした。この試料は電気泳動時まで-20℃で凍結保存したが、少なくとも1年間は泳動パターンに変化は認められなかった。

電気泳動 電気泳動は垂直式のスラブディスク電気泳動装置(アトー社製)で行った。ポリアクリルアミドゲルは Davis⁶⁾の方法によって調整し、3%濃縮ゲル、7.5%分離ゲル(pH 8.3)を使用した。泳動はゲルプレート(13 cm×14 cm×厚さ 2 mm 又は 1 mm)当たり10または 20 mA の定電流で5~6時間行った。

酵素の染色 エステラーゼの染色は Berry & Frank²⁾の方法を一部改変して行った。すなわち、7% α -naphthyl acetate のアセトン溶液 2 ml, fast blue RR salt 50 mg, 0.5 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4) 2ml, 蒸留水 96 ml の混合液に、ゲルを37℃で10~15分間浸漬した。

ペルオキシダーゼの染色は 山本・桃谷²³⁾の方法を一部改変して行った。すなわち、o-dianisidine 100 mg を氷酢酸 0.84 ml に溶解し、蒸留水 90 ml, 0.5 M 酢酸緩衝液(pH 5.0) 10ml を加え染色液とし、ゲルを室温で10分間浸漬したのち、30% H_2O_2 0.2 ml を加えて染色した。

酸性ホスファターゼの染色は 萩田・中村²⁰⁾の方法で行った。

ロイシンアミノペプチダーゼの染色は Burstone & Folk³⁾の方法で行った。

リンゴ酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素の染色は Berry & Frank²⁾の方法で行った。

各酵素のバンドの位置はブロムフェノールブルーの移動距離を100とした時の各バンドの相対移動度(Rm)で表した。各菌株間または種間の類似度(similarity)は Yamazaki ら²⁵⁾の方法で算出した。

結 果

エステラーゼの電気泳動パターンは *U. avenae* (カッコ内は Rm 値を示す、以下同じ、22, 28, 58, 62) と *U. nuda* (22, 25, 58, 68) の全ての菌株で差はなく、4本のバンドが認められた。*U. hordei* (22, 28, 56, 62) と *U. tritici* (30, 46, 58, 62) では種内の菌株間のバンド数に多少の差が認められたが、それぞれの種に固有の共通バンドが認められた。*U. avenae* と *U. hordei* 間では Rm 62 のバンドの濃淡に差を認めたが、4本のバンドの Rm 値には差はなかった(Table 2)。

ロイシンアミノペプチダーゼには0~2本のバンドが認められた。*U. avenae* (16, 30) と *U. nuda* (18, 30) の全ての菌株ではそれぞれ種固有の泳動パターンが認められた。*U. hordei* (16, 30) の一部の菌株では検出されないバンドがあったが、Rm 30 のバンドは全ての菌株に共通して認められた。*U. avenae* と *U. hordei* で認められた2本のバンドの Rm 値に差はなかった。*U. tritici* の供試した全ての菌株ではロイシンアミノペプチダーゼの活性を示すバンドは検出されなかった(Table 2, Fig. 1)。

ペルオキシダーゼは *U. avenae* (22, 30), *U. nuda* (22, 26) および *U. tritici* (23, 28) でそれぞれ2本のバンドが認められ、*U. hordei* (21) では1本のバンドが認められた。*U. hordei* 以外の3種の *Ustilago* 属菌では菌株によって検出されないバンドがあったが、それらにはほぼ種固有性が認められた(Table 2, Fig. 1)。

酸性ホスファターゼでは *U. hordei* (8, 18, 30) で3本、*U. avenae* (8, 23) で2本、*U. nuda* (23) と *U. tritici* (30) で1本のバンドが認められた。*U. avenae* と *U. hordei* 間で Rm 8 のバンドが、また *U. avenae* と *U. nuda* 間で Rm 23 のバンドがそれぞれ共通していた(Table 3, Fig. 1)。

リンゴ酸脱水素酵素は *U. avenae* (10, 20, 22, 25) と *U. hordei* (10, 20, 22, 25) で差はなく、それぞれ4本のバンドが認められた。*U. nuda* (16, 20) では2本のバンドが認められ、Rm 20 のバンドは *U. avenae* と *U. hordei* に共通していた。*U. tritici* (25, 30, 35) では3本のバンドが認められ、Rm 25 のバンドは *U. avenae* と *U. hordei* に共通していた(Table 3, Fig. 2)。

グルタミン酸脱水素酵素のバンドは4種の *Ustilago* 属菌の全ての菌株で検出されなかった。

グルコース-6-リン酸脱水素酵素は *U. avenae* (33) で1本、*U. hordei* (20, 33) で2本のバンドが認められ、Rm 33 のバンドは両菌に共通していた。*U. nuda* と *U. tritici* でグルコース-6-リン酸脱水素酵素のバンドは全ての菌株で検出されなかった(Table 3, Fig. 2)。

つぎに、4種の *Ustilago* 属菌の各種酵素の電気泳動パターンから共通バンドの有無によって類似度を算出した。種内の菌株間では4種とも81%以上の類似度を示し、種の固有性が明らかとなった。*U. avenae* と *U. hordei* の種間では類似度が高く、70%以上の類似度を示した。*U. avenae* と *U. nuda* の間では約23%、

Table 2. Comparison of electrophoretic Rm values of esterase (ES), leucine aminopeptidase (LAP) and peroxidase (PO) from the isolates of *Ustilago avenae*, *U. hordei*, *U. nuda* and *U. tritici*

Fungi and isolates	ES				LAP		PO	
<i>Ustilago avenae</i>	22	28	58	62	16	30	22	30
AZ 31	+	+	+	+	+	+	+	+
AZ 32	+	+	+	+	+	+	+	+
AZ 33	+	+	+	+	+	+	+	+
AZ 34	+	+	+	+	+	+	+	-
AQ 11	+	+	+	+	+	+	+	+
AQ 12	+	+	+	+	+	+	+	-
AQ 13	+	+	+	+	+	+	+	+
AQ 14	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Ustilago hordei</i>	22	28	58	62	16	30	21	
UH 1-11	+	+	+	+	+	+	+	
UH 1-12	+	+	+	+	+	+	+	
UH 1-13	+	+	+	+	+	+	+	
UH 1-14	+	+	-	+	+	+	+	
UH 21	+	+	+	+	+	+	+	
UH 22	+	+	+	+	+	+	+	
UH 23	+	+	-	+	-	+	-	
UH 24	+	+	+	+	-	+	-	
UH 25	+	+	-	+	+	+	-	
UH 26	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Ustilago nuda</i>	22	25	58	62	18	30	22	26
UNK 151	+	+	+	+	+	+	+	+
UNK 152	+	+	+	+	+	+	+	+
UNK 163	+	+	+	+	+	+	+	+
UNK 164	+	+	+	+	+	+	+	+
UNK 21	+	+	+	+	+	+	+	+
UN 23	+	+	+	+	+	+	+	+
UN 32	+	+	+	+	+	+	+	+
UN 41	+	+	+	+	+	+	+	+
UN 43	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ustilago tritici</i>	30	46	58	62			23	28
UT 1d2	+	+	+	+	-		+	+
UT 1d4	+	+	+	+	-		+	-
UT 2d1	+	+	+	+	-		+	-
UT 2s4	-	+	-	+	-		-	-
UT 33	-	-	+	+	-		-	+
UT 44	-	-	+	+	-		+	+

+ : the band present, - : the band absent.

Table 3. Comparison of electrophoretic Rm values of acid phosphatase (ACP), malate dehydrogenase (MDH), glutamate dehydrogenase (GLDH) and glucose -6-phosphate dehydrogenase (G 6 PDH) from the isolates of *Ustilago avenae*, *U. hordei*, *U. nuda* and *U. tritici*

Fungi and isolates	ACP	MDH	GLDH	G6PDH
<i>Ustilago avenae</i>	8 23	10 20 22 25		33
AZ 31	+	+	—	+
AZ 32	+	+	—	+
AZ 33	+	+	—	+
AZ 34	+	+	—	+
AQ 11	+	+	—	+
AQ 12	+	+	—	+
AQ 13	+	+	—	+
AQ 14	+	+	—	+
<i>Ustilago hordei</i>	8 18 30	10 20 22 25		20 33
UH 1-11	+	+	—	+
UH 1-12	+	+	—	+
UH 1-13	+	+	—	+
UH 1-14	+	+	—	+
UH 21	+	+	—	+
UH 22	+	+	—	+
UH 23	+	+	—	+
UH 24	+	+	—	+
UH 25	+	+	—	+
UH 26	+	+	—	+
<i>Ustilago nuda</i>	23	16 20		
UNK 151	+	+	—	—
UNK 152	+	+	—	—
UNK 163	+	+	—	—
UNK 164	+	+	—	—
UN 21	+	+	—	—
UN 23	+	+	—	—
UN 32	—	—	—	—
UN 41	+	+	—	—
UN 43	+	+	—	—
<i>Ustilago tritici</i>	30	25 30 35		
UT 1d2	+	+	—	—
UT 1d4	+	+	—	—
UT 2d1	+	+	—	—
UT 2s4	+	+	—	—
UT 33	+	+	—	—
UT 44	+	+	—	—

+ : the band present, — : the band absent.

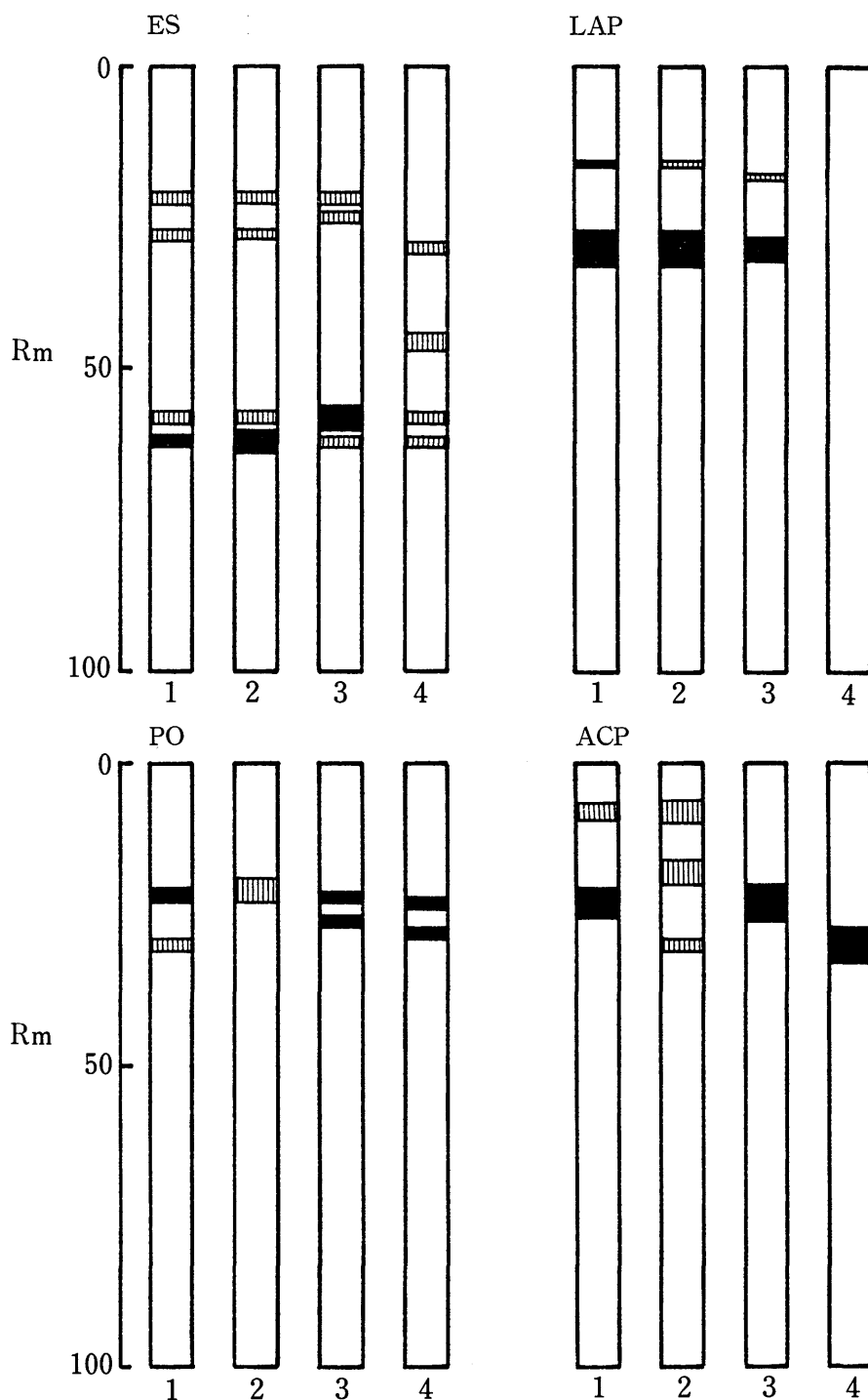


Fig. 1. Diagrammatic representation of electrophoretic patterns for esterase(ES), leucine aminopeptidase(LAP), peroxidase(PO), and acid phosphatase(ACP) of *Ustilago avenae*(1), *U. hordei*(2), *U. nuda*(3) and *U. tritici*(4).

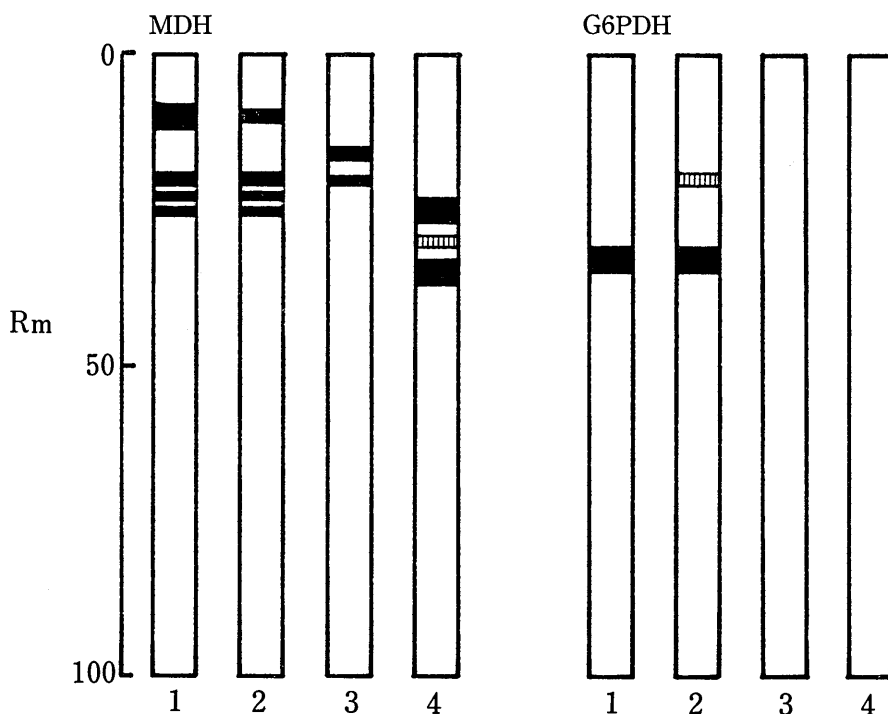


Fig. 2. Diagrammatic representation of electrophoretic patterns for malate dehydrogenase(MDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) of *Ustilago avenae*(1), *U. hordei*(2), *U. nuda*(3) and *U. tritici*(4).

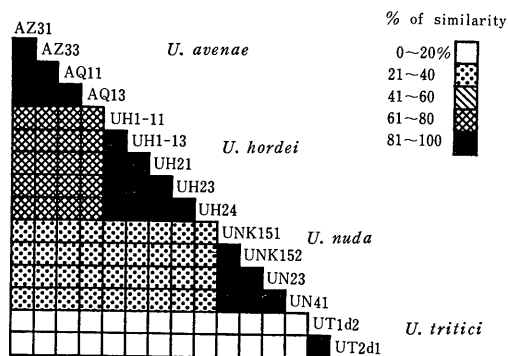


Fig. 3. The similarity matrix based on the electrophoretic patterns of seven enzymes from *Ustilago avenae*, *U. hordei*, *U. nuda* and *U. tritici*.

また *U. hordei* と *U. nuda* 間では約35%の類似度が認められた。一方, *U. avenae* と *U. tritici* の間では類似度は約14%, *U. hordei* と *U. tritici* の間では約18%であったが, *U. nuda* と *U. tritici* の間では約10%で, 他の種間に比べて著しく低い値を示した (Fig. 3)

考 察

酵素の電気泳動パターンは多くの微生物の分類, 同定に利用され, 多数の報告がある^{2-4, 12-16, 22, 24, 25})。黒穂病菌では Blank & Dekker³⁾ が11種の *Ustilago* 属菌の RNase について報告している。Bradford ら⁴⁾ は14種の *Ustilago* 属菌を調べエステラーゼ, ホスファターゼの電気泳動パターンでは, 種を特徴づけることはできないとしている。しかし, 兼平・篠原¹²⁾ はヒエに寄生する *U. crus-galli* と *U. sphaerogena* では可溶性タンパク質と11種の酵素の電気泳動パターンに差があることを報告している。

ここではオオムギ, コムギ, エンバクに寄生する *Ustilago* 属菌4種を供試し, 7種類の菌体内酵素の電気泳動パターンを比較した。その結果, 供試した *U. avenae*, *U. hordei*, *U. nuda*, *U. tritici* ではそれぞれの種内の一部の菌株で検出されないバンドがあったが, ほとんどの菌株で種固有の泳動パターンを示した。さらに種内における類似度は81%以上を示した。

オオムギ, コムギ, エンバクに寄生する *Ustilago*

属菌として *U. nuda*, *U. tritici*, *U. hordei*, *U. nigra* (国内未発生), *U. avenae*, *U. kolleri* の6種が知られ, それらの分類については古くから多くの見解が示されている。Fischer⁸⁾, Ainsworth & Sampson¹⁾, 柿島¹¹⁾ はオオムギ, コムギに寄生し, 胚感染する *U. nuda* と *U. tritici* を *U. nuda* 1種にとりまとめている。また, 子苗感染し, オオムギとエンバクに寄生する4種の *Ustilago* 属菌を黒穂胞子の突起の有無などから, *U. avenae* と *U. hordei* 2種にとりまとめている。一方, Huang & Nielsen¹⁰⁾ は *U. avenae*, *U. nigra*, *U. hordei*, *U. kolleri* の半数体分離株の交雑と黒穂胞子の形態について検討し, これら4種の *Ustilago* 属菌は交雑が可能であり, 黒穂胞子の形態は2対の対立遺伝子によって支配されることを明らかにした。また, これら4種を同一種とし, 黒穂胞子に突起がある *U. avenae* と *U. nigra* を *U. segetum* var. *avenae*, また, 黒穂胞子が平滑な *U. hordei* と *U. kolleri* を *U. segetum* var. *hordei* としている。本研究では *U. nigra* と *U. kolleri* を供試していないが, *U. avenae* と *U. hordei* 間では共通バンドが多く, 類似度が約70%であるので, それらは高い近縁関係にあるものと考えられる。

胚感染する *U. nuda* と *U. tritici* は黒穂胞子の形態に差は認められないが, Popp²¹⁾, Nielsen¹⁷⁻¹⁹⁾ によると黒穂胞子の発芽様式, 黒穂胞子層表面の薄膜の有無, さらには半数体分離菌株の性質に差が認められて

いる。また, Dutercq⁷⁾ および Kim ら¹³⁾ によると, 両菌の黒穂胞子の可溶性タンパク質または可溶性ポリペプチドの電気泳動パターンには差があるとしている。本研究の結果から, *U. nuda* と *U. tritici*の間では共通バンドが少なく, 類似度は約10%と低いため, 両菌は7種類の酵素の電気泳動パターンによって区別できるものと考えられる。

摘 要

オオムギ, コムギおよびエンバクに寄生する4種の *Ustilago* 属菌を供試し, 7種類の酵素, エステラーゼ, ペルオキシダーゼ, ロイシンアミノペプチダーゼ, 酸性ホスファターゼ, リンゴ酸脱水素酵素, グルタミン酸脱水素酵素 および グルコース-6-リン酸脱水素酵素の電気泳動パターンを比較した。その結果, *U. nuda*, *U. tritici*, *U. hordei*, *U. avenae* の分離菌株はそれぞれ種内ではほぼ同一の電気泳動パターンを示した。また, *U. avenae* と *U. hordei* 間ではエステラーゼ, ロイシンアミノペプチダーゼおよびリンゴ酸脱水素酵素の電気泳動パターンに差はなく, その類似度は約70%であった。*U. nuda* と *U. tritici*の間では電気泳動パターンに差が認められ, その類似度は約10%であった。以上のことから *U. nuda* と *U. tritici* は分類上区別するのが妥当であると考えられる。

引 用 文 献

1. Ainsworth, G. C. and Sampson, K. (1950). The British Smut Fungi (Ustilaginales). C. M. I. Kew, pp. 137.
2. Berry, J. A. and Frank, R. G. (1973). Am. J. Bot. 60 : 976-986.
3. Blank, A. and Decker, C. A. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 : 4914-4917.
4. Bradford, L. S., Jones, R. J. and Gerber, E. D. (1975). Bot. Gaz. 136 : 109-115.
5. Burstone, M. S. and Folk, J. E. (1956). J. Histochem. Cytochem. 4 : 217-226.
6. Davis, B. J. (1964). Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 : 404-427.
7. Dutercq, A. (1972). Parasitica 28 : 25-32.
8. Fischer, G. W. (1953). Manual of the North American Smut Fungi. Ronald Press, N. Y., pp. 343.
9. Holliday, R. (1965). Genet. Res. (Camb.) 6 : 104-120.
10. Huang, H. -Q. and Nielsen, J. (1984). Can. J. Bot. 62 : 603-608.
11. 柿島 真 (1982). 筑波大農林研. 1 : 1-124.
12. 兼平 勉・篠原正行 (1984). 日植病報. 50 : 406 (講要).
13. Kim, W. K., Rohringer, R. and Nielsen, J. (1985). Can. J. Bot. 62 : 1432-1437.
14. Matsuyama, N. and Kozaka, T. (1971). Ann. Phytopath. Soc. Japan 37 : 259-265.
15. Matsuyama, N. and Wakimoto, S. (1977). Ibid. 43 : 462-470.
16. Matsuyama, N., Moromizato, Z., Ogoshi, A. and Wakimoto, S. (1978). Ibid. 44 : 652-658.
17. Nielsen, J. (1968). Can. J. Bot. 46 : 1193-1200.
18. Nielsen, J. (1972). Ibid. 50 : 1775-1781.
19. Nielsen, J. (1978). Ibid. 56 : 2712-2716.

20. 荻田善一・中村正二郎 (1967). 電気泳動実験法 (電気泳動学会編), 文光堂, 東京, p. 241-274.
21. Popp, W. (1955). *Phytopathology* 45 : 585-590.
22. 斉藤道彦・一戸正勝・鶴田 理 (1980). *日菌報* 21 : 229-235.
23. 山本多聞・桃谷好英 (1971). *植物の化学調節* 6 : 187-189.
24. Yamazaki, M. and Komagata, K. (1981). *Internatl. J. Syst. Bacteriol.* 31 : 361-381.
25. Yamazaki, M., Goto, S. and Komagata, K. (1985). *Trans. mycol. Soc. Japan* 26 : 13-22.