

愛知県内ノリ養殖漁場から分離されたスミノリ症原因菌の PCR による検出

三宅佳亮・植村宗彦・伏屋 満

Detection of the “Suminori” disease bacteria, *Flavobacterium* sp. from the *Porphyra* sp. farming fields in Aichi prefecture by polymerase chain reaction

MIYAKE Yoshiaki^{*1}, UEMURA Munehiko^{*2}, and FUSEYA Mitsuru^{*3}

Abstract : We developed the species-specific PCR primers based on the 16S rDNA sequence of the bacteria *Flavobacterium* sp. which cause “Suminori” disease of the cultivated *Porphyra* sp.(nori). The eleven isolates of the bacteria *Flavobacterium* sp. used in this study were collected from the several nori farming fields in Aichi prefecture. All samples showed same 16S rDNA sequence. So we designed 1st-PCR (SM-F1 and SM-R1) for 1st PCR, Nested-PCR1 (SM-F2 and SM-R2) and Nested-PCR2 (SM-F2 and SM-R3) for 2nd PCR based on 16S rDNA sequence of the specimens. Specificity of those primers was investigated by PCR using the DNA extracted from the nori thallus collected from the farming field. 1st-PCR and Nested-PCR2 showed high species-specificity, but Nested-PCR1 showed low species-specificity. 2nd PCR using Nested-PCR2 followed after 1st PCR using 1st-PCR showed more sensibility than each 1st PCR using 1st-PCR or Nested-PCR2.

キーワード; ノリ, スミノリ症, PCR 法

スミノリ症は養殖ノリ, *Porphyra* sp.に見られる病害の一つで, 有明海のノリ養殖漁場では 1975 年~1990 年の間にしばしば大発生が認められ, スミノリ症を発症した葉体の縁辺部には多数の細菌が附着していたとされる¹⁾。また愛知県でも 1991 年以降, 伊勢湾や三河湾のノリ養殖漁場で 12 月末から翌年 1 月にかけて発生が認められ, 伏屋ら³⁾は常滑市地先ノリ養殖漁場でスミノリ症を発症した葉体から, スミノリ症原因菌と考えられる *Flavobacterium* 属の細菌(以下スミノリ菌)を分離している。スミノリ症の葉体は, 漁場においては肉眼的に正常で顕微鏡下の観察でも特に異常は認められなくても, 淡水に触れると短時間で原形質の吐出を生ずる。これを乾ノリとした場合には, 艶のない黒い色調となり, 著しい品質低下を引き起こす。こうした漁業被害を軽減するため, 漁場におけるスミノリ菌の存在と, ノリ葉体に感

染するスミノリ菌の養殖管理による増減を明らかにし, スミノリ症の発症条件を解明することが必要とされる。このためには, 漁場海中やノリ葉体上に存在する微量なスミノリ菌を検出することが求められるが, 従来行われてきた平板培地を用いた菌分離・培養によるスミノリ菌検出法³⁾では, 検出に時間を要し, その検出限界は 10⁶ cfu.スミノリ菌/g ノリ葉体乾重量程度⁴⁾とされている。そこで, 本研究においては, スミノリ菌の 16S rDNA 遺伝子塩基配列中の特異的配列をプライマーとする PCR を用いた, 迅速で検出限界の高いスミノリ菌検出技術を検討した。

材料及び方法

供試菌株および 16S rDNA 遺伝子塩基配列の決定

供試したスミノリ菌株は, 1999~2001 年にスミノリ症

^{*1} 愛知県水産試験場漁業生産研究所 (Marine Resources Research Center, Aichi Fisheries Reserch Institute, Toyohama, Minamichita, Aichi, 470-3412, Japan)

^{*2} 財団法人愛知県水産振興基金栽培漁業部 (Aichi Sea Farming Center, Atsumi, Aichi, 441-3615, Japan)

^{*3} 愛知県農林水産部水産課 (Fisheries promotion division, Aichi prefectural government, Sannomaru, Nagoya, Aichi, 460-8501, Japan)

を発症した愛知県内ノリ養殖漁場の葉体および漁場海水から分離して-80 で保存した菌株のうち 本研究着手時にスミノリ症病原性を保持していた S-01 株から S-11 株の計 11 株を用いた。これら菌株を分離したサンプルと分離した時期については表 1 に示した。保存菌株は、株毎に平板培地 (MarineBroth 2216 寒天 2%含有, DIFCO 社) に塗抹して 20 4 日間培養した後、数コロニーを乳鉢と乳棒を用いて液体室素下で粉碎し、DNA 抽出キット (DNeasy, Qiagen 社) により DNA を抽出した。抽出した DNA を元に 16S rDNA の増幅⁵⁾を行い、得られた増幅産物をクローニングキット (pGEN-T Vector Systems, Promega 社) を用いてクローニング⁶⁾した。塩基配列の決定は ABI373A 型機 (Applied Biosystems 社) を使用し、蛍光ダイターミネーターキット (DYEnamic ET Terminator CycleSequencing Kit, Amersham Biosciences 社) により行った。

スミノリ菌検出用プライマーの検討

プライマーは、スミノリ菌 16S rDNA 遺伝子塩基配列と遺伝子データベースから得た類似配列を持つ *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Polaribacter*, *Flavobacterium* に属する菌の塩基配列情報を元に、 T_m 値が 55~65 , プライマーの塩基数が 18~25bp ,PCR 増幅産物の塩基数が 200~1,000bp の条件で遺伝子解析ソフト (GENETYX) を用いて設計^{7,8)}した。なお、検出限界を高めるため、1st PCR プライマーとともに、1st PCR プライマーによる増幅産物を鋳型として行う Nested-PCR のプライマーについても設計を行った。

設計されたプライマーの PCR による増幅を調べるた

め、S-01 株から DNA 抽出キットにより抽出した DNA を鋳型 DNA として PCR を行った。PCR 反応液は、鋳型 DNA が 1 μ l、 μ ATP、 μ CTP、 μ GTP および μ TTP が 200mM、forward 側および reverse 側プライマーがそれぞれ 0.4 μ M、*Taq*DNA ポリメラーゼ (Ampli*Taq* Gold, Applied Biosystems 社) が 0.625units、*Taq*DNA ポリメラーゼ添付のバッファーおよび滅菌超純水を添加して全量を 25 μ l とした。PCR は、サーマルサイクラー (GeneAmpTM PCR System 9600, Applied Biosystems 社) を用いて、プレヒート 95 , 9 分間に続いて熱変性 94 , 30 秒間、アニーリング 50 , 30 秒間、伸長反応 72 , 30 秒間を 40 サイクル繰り返した後、最終伸長反応 72 , 10 分間の反応により行った。PCR 増幅産物の確認は、1.5% アガロース電気泳動により行った。

また、PCR 反応によって想定した領域の増幅産物が得られているかを確認するため、増幅産物について制限酵素 *Rsa* による切断片長多型を調べた。

漁場サンプルを用いたプライマーの検証

設計したプライマーを用いて、漁場のノリ葉体から特異的にスミノリ菌を検出することが可能かを調べるため、2002 年に愛知県内のノリ養殖漁場で葉体を採集し、-30 下で保存した。葉体から抽出した DNA を用いて PCR を行い、増幅産物を確認した。なお、供試した葉体の採集場所、採集時期およびスミノリ症の発症の有無について表 3 に示した。増幅産物が得られた葉体については、同時に行っていた菌分離で得られた菌について、感染試験³⁾によるスミノリ症病原性の有無と各プライマーによる増幅産物の確認とその制限酵素 *Rsa* 切断片長多

表1 供試菌株を分離したサンプルの採集場所および時期

菌株	菌株を分離したサンプル	採集場所	採集時期
S-01	支柱柵 秋芽生産網の葉体	鬼崎地区	1999年12月
S-02	支柱柵 冷蔵生産網の葉体	大野地区	2001年2月
S-03	支柱柵 冷蔵生産網の葉体	鬼崎地区	2001年1月
S-04	支柱柵 冷蔵生産網の葉体	鬼崎地区	2001年1月
S-05	浮流柵 冷蔵生産網の葉体	鬼崎地区	2001年1月
S-06	支柱柵 冷蔵生産網の葉体	西尾地区	2001年1月
S-07	漁場海水	西尾地区	2001年1月
S-08	支柱柵 冷蔵生産網の葉体	味沢地区	2001年1月
S-09	浮流柵 秋芽生産網の葉体	大野地区	2001年12月
S-10	浮流柵 冷蔵生産網の葉体	鬼崎地区	2001年12月
S-11	支柱柵 冷蔵生産網の葉体	西尾地区	2001年12月

型を調べた。なお、葉体からの DNA 抽出、感染試験、PCR 等については、以下により行った。

湿重量数 mg の葉体を 9ml の滅菌ろ過海水とともにステンレス製ホモジナイザーで 10,000rpm、30 秒間ホモジナイズした後、オープニング 20 μ m の滅菌ガーゼでろ過したろ液をポアサイズ 0.4 μ m のポリカーボネイト製フィルター（東洋濾紙株式会社）で吸引して細菌をフィルター上に集めた。このフィルターを TE50 μ l とともにマイクロチューブに入れ、90 20分間の熱処理後、12,000rpm で5分間の遠心により得られた上澄を鋳型 DNA とした。なお、ポジティブコントロールには DNA 抽出キットで抽出した S-01 株 DNA を用いた。PCR については前項に示した方法により行った。PCR 増幅産物が得られた葉体については、前述したろ液を平板培地に塗抹してコロニーを採取し、伏屋らの方法³⁾により感染試験を行った。また、感染試験に用いたコロニーの一部を TE20 μ l 中に懸濁し、この懸濁液を鋳型 DNA として、前項に示した方法により PCR を行った。得られた PCR 増幅産物については、制限酵素 *Rsa* による切断片長多型により、スミノリ菌であるかを判定した。

プライマーの検出限界の検討

設計された各プライマーについて単独で PCR を行った場合と、1st PCR プライマーで PCR を行った後 Nested-PCR プライマーにより Nested-PCR を行った場合とのスミノリ菌検出限界を比較した。鋳型 DNA には、DNA 抽出キットにより抽出した S-01 株 DNA および 2004 年 1 月に鬼崎地区漁場で採集し-30 で保存したスミノリ症葉体から前項に示した方法により抽出した DNA を用いた。これらの DNA を TE により 10 倍希釈を繰り返して、段階希釈した鋳型 DNA 希釈系列を各々作成した。これを前項の方法により PCR を行って、増幅産物が生成される希釈段階を比較した。

結果及び考察

16S rDNA 遺伝子塩基配列の決定

供試菌 S-01 株の 16S rDNA 遺伝子塩基配列を図 1 に示した。供試菌 11 株の 16S rDNA 遺伝子塩基配列は全て同一であったことから、愛知県内のノリ漁場で採集されたスミノリ菌は同じ種であると考えられ、愛知県内ノリ漁場においては単一のプライマーによりスミノリ菌の検出



図1 スミノリ菌 (S-01株) の16S rDNA塩基配列および設計したプライマーの塩基配列上の位置

は可能と考えられた。

スミノリ菌検出用プライマーの検討

遺伝子解析ソフトにより設計された 1st PCR プライマーおよび Nested-PCR のプライマーについては、その組み合わせを 1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 として、各々プライマーの方向毎の塩基配列および想定

される増幅産物の塩基数を表 2 に示した。設計された各プライマーの 16S rDNA 遺伝子配列上の位置は図 1 に示した。1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 により得られた PCR 増幅産物と、制限酵素 *Rsa* による増幅産物切断片長多型を図 2 に示した。設計されたプライマーは、いずれも想定された塩基数の増幅産物を生成し、制限酵素 *Rsa* による切断片の塩基数もスミノリ菌

表2 設計した各プライマーの塩基配列とPCRにより生成される増幅産物の想定塩基数

組み合わせNo.	方向性	プライマー	塩基配列	PCR増幅産物
1st-PCR	forward	SM-F1	5'-CAGAGGTGCTTGCATTTGC-3'	774bp
	reverse	SM-R1	5'-GTCACTGAACAAATGCCCAACAAC-3'	
Nested-PCR1	forward	SM-F2	5'-GGTGCTTGCATTTGCTGACG-3'	524bp
	reverse	SM-R2	5'-CACCTCTGACTTAATTAACCTC-3'	
Nested-PCR2	forward	SM-F2	5'-GGTGCTTGCATTTGCTGACG-3'	399bp
	reverse	SM-R3	5'-CAAGCTGGTATACATACCAGTG-3'	

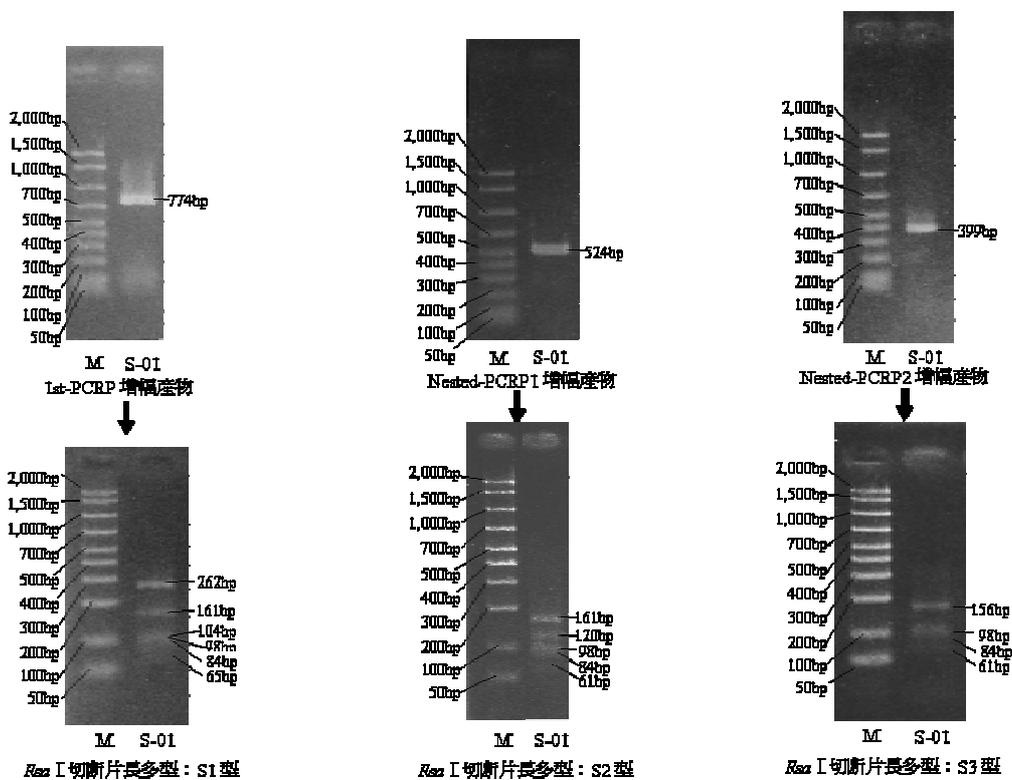


図 2 1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 により得られたスミノリ菌 PCR 増幅産物と制限酵素 *Rsa* による切断片長多型 (Mはサイズマーカー)

16S rDNA 遺伝子塩基配列の制限酵素切断部位から求めた塩基数と一致していた。これらにより、1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 は、各々スミノリ菌 16S rDNA 遺伝子塩基配列の想定された部位を増幅していると判断され、1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 によってスミノリ菌を検出することは可能と考えられた。なお、1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 によって得られた増幅産物の制限酵素 *Rsa* による切断片長多型を、それぞれ S1 型、S2 型および S3 型とした。

漁場サンプルを用いたプライマーの検証

1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 を用いた各葉体における PCR 反応の増幅結果を表 4 に示した。

表3 供試葉体のスミノリ症発症の有無、採集場所および採集時期

葉体No.	スミノリ症	採集場所	採集時期
No.1	-	西尾地区 支柱柵 育苗網	2002年11月
No.2	-	豊浜地区 支柱柵 秋芽生産網	2002年11月
No.3	+	鬼崎地区 支柱柵 冷蔵生産網	2002年12月

表4 No.1～3の葉体から抽出されたDNAの1st-PCR、Nested-PCR1およびNested-PCR2によるPCR増幅産物の生成

葉体No.	1st-PCR	Nested-PCR1	Nested-PCR2
No.1	-	+	-
No.2	-	+	-
No.3	+	+	+

表5 No.1葉体から得られた菌コロニーのスミノリ症病原性、1st-PCR、Nested-PCR1およびNested-PCR2によるPCR増幅産物とその制限酵素*Rsa*切断片長多型

コロニーNo.	スミノリ症病原性	1st-PCR		Nested-PCR1		Nested-PCR2	
		増幅産物	切断片長多型	増幅産物	切断片長多型	増幅産物	切断片長多型
1-01	-	-		約500bp	***	-	
1-02	-	-		約500bp	***	-	
1-03	-	-		約500bp	***	-	
1-04	-	-		約500bp	***	-	
1-05	-	-		約500bp	***	-	
1-06	-	-		約500bp	***	-	
1-07	-	-		約500bp	***	-	
1-08	-	-		-		-	
1-09	-	-		約500bp	***	-	
1-10	-	-		約500bp	***	-	
1-11	-	-		約500bp	***	-	
1-12	-	-		約500bp	***	-	
1-13	-	-		約500bp	***	-	
1-14	-	-		-		-	
1-15	-	-		約500bp	***	-	
1-16	-	-		約500bp	***	-	
1-17	-	-		約500bp	***	-	
1-18	-	-		-		-	
1-19	-	-		約500bp	***	-	
1-20	-	-		-		-	
1-21	-	-		-		-	
1-22	-	-		-		-	
1-23	-	-		-		-	
1-24	-	-		-		-	
1-25	-	-		-		-	
1-26	-	-		-		-	
1-27	-	-		-		-	
1-28	-	-		-		-	

(***)スミノリ菌16S rDNAの増幅産物制限酵素*Rsa*切断片長多型と異なる多型

表6 No.2葉体から得られた菌コロニーのスマリリ症病原性, 1st-PCR, Nested-PCR1およびNested-PCR2によるPCR増幅産物とその制限酵素*Rsa* 切断片長多型

コロニーNo.	スマリリ症病原性	1st-PCR		Nested-PCR1		Nested-PCR2	
		増幅産物	切断片長多型	増幅産物	切断片長多型	増幅産物	切断片長多型
2-01	-	-		約500bp	***	-	
2-02	-	-		約500bp	***	-	
2-03	-	-		約500bp	***	-	
2-04	-	-		-		-	
2-05	-	-		約500bp	***	-	
2-06	-	-		約500bp	***	-	
2-07	-	-		約500bp	***	-	
2-08	-	-		-		-	
2-09	-	-		約500bp	***	-	
2-10	-	-		-		-	
2-11	-	-		-		-	
2-12	-	-		約500bp	***	-	
2-13	-	-		-		-	
2-14	-	-		約500bp	***	-	
2-15	-	-		-		-	
2-16	-	-		-		-	
2-17	-	-		-		-	
2-18	-	-		約500bp	***	-	
2-19	-	-		約500bp	***	-	
2-20	-	-		約500bp	***	-	
2-21	-	-		約500bp	***	-	
2-22	-	-		約500bp	***	-	

(***)スマリリ菌16S rDNAの増幅産物制限酵素*Rsa* 切断片長多型と異なる多型

表7 No.3葉体から得られた菌コロニーのスマリリ症病原性, 1st-PCR, Nested-PCR1およびNested-PCR2によるPCR増幅産物とその制限酵素*Rsa* 切断片長多型

コロニーNo.	スマリリ症病原性	1st-PCR		Nested-PCR1		Nested-PCR2	
		増幅産物	切断片長多型	増幅産物	切断片長多型	増幅産物	切断片長多型
3-01	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-02	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-03	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-04	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-05	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-06	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-07	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-08	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-09	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-10	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-11	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-12	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-13	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-14	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-15	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-16	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-17	+	774bp	S1型	524bp	S2型	399bp	S3型
3-18	-	-		-		-	

1st-PCR および Nested-PCR2 については、スミノリ症の症状を呈していた No.3 葉体のみ増幅産物が生成されたが、Nested-PCR1 については、症状を呈していなかった No.1 葉体および No.2 葉体からも増幅産物が得られた。このため、No.1 葉体ろ液から 28 株、No.2 葉体ろ液から 22 株、および No.3 葉体ろ液から 18 株の合計 68 株のコロニーを採取した。各コロニーについて感染試験によるスミノリ症病原性の有無と 1st-PCR、Nested-PCR1 および Nested-PCR2 を用いた各々 PCR 増幅産物の生成および増幅産物の切断片長多型を、No.1 葉体から得られたコロニーについては表 5、No.2 葉体から得られたコロニーについては表 6 および No.3 葉体から得られたコロニーについては表 7 に示した。1st-PCR および Nested-PCR2 については No.3 葉体に認められたスミノリ症病原性を有するコロニーのみ増幅産物が生成され、その切断片長多型はそれぞれスミノリ菌の切断片長多型と一致していた。Nested-PCR1 を用いた場合には、スミノリ症病原性を有しない No.1 葉体から得られた 16 コロニーと No.2 葉体から得られた 14 コロニーについてもスミノリ菌の増幅産物とほぼ同サイズの増幅産物が生成されたが、増幅産物の制限酵素 *Rsa* の切断片長多型は、全て S2 型と異なっており、スミノリ菌とは遺伝子配列が異なる菌の増幅産物と考えられた。Nested-PCR1 についてはスミノリ菌以外の菌に対して増幅産物を生成すると考えられたことから、スミノリ菌に対する特異性は低いものと判断した。また、1st-PCR および Nested-PCR2 については Nested-PCR1 により増幅産物を生成したスミノリ菌以外の菌についても反応することはなく、スミノリ菌に対する特異性は高いと判断した。以上のことから、1st-PCR

および Nested-PCR2 を用いた PCR により漁場サンプルからスミノリ菌を特異的に検出できると考えられた。

プライマーの検出限界の検討

S-01 株 DNA およびスミノリ症葉体抽出 DNA の希釈系列を用いた 1st-PCR および Nested-PCR2 各々の単独での PCR と、1st-PCR による PCR の後に Nested-PCR2 による PCR の増幅産物生成結果を表 8 に示した。1st-PCR による検出限界は、Nested-PCR2 による検出限界に比べ、スミノリ菌抽出の希釈鑄型 DNA では 10 倍、スミノリ症の葉体抽出の希釈鑄型 DNA では 10² 倍高かった。1st-PCR による PCR の後に Nested-PCR2 による PCR を行った場合の検出限界は、1st-PCR に比べスミノリ菌抽出の希釈鑄型 DNA では 10 倍高く、スミノリ症の葉体抽出の希釈鑄型 DNA では同等であった。Nested-PCR2 についてはスミノリ菌に対する特異性は高いものの、PCR の増幅効率が 1st-PCR に比べて劣っていることから、1st-PCR による PCR の後に Nested-PCR2 による PCR を行っても検出限界が大幅に向上することはなかった。しかしながら、Nested-PCR を行うことで検出限界が 10 倍高まることが認められたことから、1st-PCR による 1st PCR の後に Nested-PCR2 による Nested-PCR を行う方法が最も感度が高いと考えられた。

また、本手法の検出限界のスミノリ菌量を見積もるために、 5.1×10^5 cfu. から 5.1×10^0 cfu. までの 6 段階の菌量に調整したスミノリ菌を 5cm² にカットしたノリ葉体（乾重量 2.25mg）に添加し、前述の方法により DNA を抽出した。これを本手法により PCR したところ、 $5.1 \times$

表8 S-01株DNAおよびスミノリ症葉体抽出DNAの希釈系列を用いた1st-PCRおよびNested-PCR2 各々の単独でのPCRと1st-PCRによるPCRの後にNested-PCR2によるPCRの増幅産物生成結果

PCRに使用したプライマー	S-01株DNA(23.3 μg / ml)の希釈段階						
	$\times 10^{-1}$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-5}$	$\times 10^{-6}$	$\times 10^{-7}$
1st-PCR	+	+	+	+	+	-	-
Nested-PCR2	+	+	+	+	-	-	-
1st-PCR Nested-PCR2	+	+	+	+	+	+	-

PCRに使用したプライマー	スミノリ症葉体抽出DNAの希釈段階				
	$\times 10^{-1}$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-5}$
1st-PCR	+	+	+	-	-
Nested-PCR2	+	-	-	-	-
1st-PCR Nested-PCR2	+	+	+	-	-

(注) + : 増幅産物生成, - : 増幅産物生成されず

10² cfu.の菌量レベルまで検出することができた。これにより、1st-PCRによる1st PCRの後にNested-PCR2によるNested-PCRを行う本手法の検出限界のスミノリ菌量は、2.3 × 10⁵ cfu.スミノリ菌/g 葉体乾燥重量と見積もられた。本研究では本手法と平板培養法との検出限界を比較する試験は行わなかったが、10⁶ cfu.スミノリ菌/g 葉体乾燥重量定量とされる平板培養法の検出限界⁴⁾に比べて本手法は約10倍検出限界が高かった。なお、検出限界をさらに高めるためには、Nested-PCRプライマーとなるNested-PCR2の増幅効率が低いことから、より増幅効率の高いNested-PCRプライマーを設計することが必要とされる。また、効率的に漁場のノリ葉体からスミノリ菌DNAを抽出する方法についても検討が必要と考えられた。

要 約

愛知県内ノリ養殖漁場から採集されたスミノリ菌の16S rDNA塩基配列を元にPCRによりスミノリ菌を検出するプライマーの設計を行った。愛知県内ノリ養殖漁場から得られたスミノリ菌の16S rDNA塩基配列は同一であり、プライマーとして1st-PCR (SM-F1, SM-R1)、Nested-PCR1 (SM-F2, SM-R2) および Nested-PCR2 (SM-F2, SM-R3) を設計した。漁場のノリ葉体をサンプルとしてプライマーのスミノリ菌特異性を調べたところ、1st-PCR および Nested-PCR2 の特異性は高かったが、Nested-PCR1 は特異性が低かった。1st-PCRによる1st PCRの後にNested-PCR2によるNested-PCRを行った場合、その検出限界はそれぞれのプライマー単独でPCRを行った場合よりもやや高まった。

謝 辞

本研究は農林水産技術会議先端技術等地域実用化研究

推進事業により実施した。なお、本研究を行うにあたり、シーケンス作業、プライマー設計などに関して、様々なご指導、ご助言いただきました。愛知県農業総合試験場環境基盤研究部生物学グループの福田至朗氏に深謝いたします。また、機材の使用に関してご配慮いただいた同グループ研究員の方々に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 川村嘉応 (1992) スミノリ症、のり病症名の統一について。水産庁, 27-37.
- 2) 川村嘉応 (1994) 養殖ノリのスミノリ病に関する研究。佐賀有明水振セ研報, 16, 29-98.
- 3) 伏屋 満・二ノ方 圭介・植村 宗彦・盛田 信 (2001) 室内培養における結合型塩素および *Flavobacterium* sp.による養殖スミノリ症の発症。愛知県水産試験場研究報告, 8, 15-20.
- 4) 伏屋 満・服部克也・植村宗彦 (2002) スミノリ症等発生機構解明試験。平成13年度愛知県水産試験場務報告, 9-10.
- 5) 平石 明 (1995) PCRを利用した16S rDNA遺伝子の解析と系統研究-1 16S rDNAの増幅と制限酵素断片解析。Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology, 10(1), 31-42.
- 6) 渡辺 格 (1989) 植物バイオテクノロジー実験マニュアル クローニングとシーケンス。農村文化社, 東京, pp314.
- 7) バイオ実験イラストレイテッド本当にふえるPCR (1998) 中山広樹著 細胞工学別冊, 秀潤社, 東京, 22-26.
- 8) PCR法最前線 - 基礎技術から応用まで (1996) 蛋白質核酸酵素臨時増刊号, 共立出版株式会社, 東京, 41(5), 437-445