

伊勢湾ノリ養殖漁場から分離されたあかぐされ病菌 *Pythium* sp. の rDNA における IGS1 領域の配列

原田靖子・福田至朗・服部克也

Intergenic Spacer 1 Sequence in rDNA of the Red rot disease fungi, *Pythium* sp., from *Porphyra* farming fields in Ise Bay

HARADA Yasuko^{*1}, FUKUTA Shiro^{*2}, and HATTORI Katsuya^{*1}

キーワード; 養殖ノリ, あかぐされ病, *Pythium* sp., rDNA, IGS1 領域, 配列

愛知県のノリ養殖漁場では、毎年養殖ノリのあかぐされ病が秋芽網生産期頃から発生し、秋芽網から冷蔵網への切り替え時期には深刻な被害を及ぼしている。あかぐされ病は卵菌綱に属する腐敗カビの一種 *Pythium* sp. がノリ葉体に寄生することにより発症する。^{1,2)} 主な感染は、*Pythium* sp. の遊走子がノリ葉体に付着することから起こるため、病害蔓延及び病害防除の指標として、漁場海水中の遊走子を間接蛍光抗体法³⁾やPCR法⁴⁾で検出することが試みられている。特に、DNAを増幅するPCR法は菌量が微量でも検出できることから病原菌の検出感度が高いため、病害防除への活用が期待され、rDNAのITS領域の配列を元にしたプライマー、⁴⁾RAPDにより増幅された配列を元にしたプライマー⁵⁾などが設計されている。近年、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法⁶⁾が開発され、温度を一定に維持できるインキュベーターがあればDNAの増幅が可能となった。この手法は簡便、迅速及び精確にDNAを増幅できるため現場への普及性が高く、トマトではトマト黄化葉巻病 (TYLCV) のLAMP法ウイルス検出キットが開発され、⁷⁾生産現場で病害防除に活用されている。*Pythium* sp.についても、LAMP法による遊走子検出手法を開発し、キット化することができれば、現場で病害防除などに活用できると期待される。LAMP法において*Pythium* sp.を特異的に検出するためには、新たなプライマーの設計が必要⁶⁾であり、既に配列が明らかとなっている*Pythium* sp.のITS領域⁴⁾に加え、新たな領域について配列を決定することが求め

られる。このため本報告においては、種特異性が高いとされるrDNAのIGS (Intergenic Spacer) 領域⁸⁾の配列を決定した。

DNAは、愛知県水産試験場で保存している*Pythium* sp. 菌株 AP-1 (伊勢湾野間漁場の病葉から1991年に採取)、AP-2 (伊勢湾豊浜漁場の病葉から2003年に採取) 及び AP-3 (伊勢湾小鈴谷漁場の病葉から2004年に採取) より、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社) を用いて抽出した。このDNAについてrDNAの28S末端部から5S上流部までを増幅するプライマー⁹⁾を用いてPCRを行い、プライマーはFig.1に示した。得られた増幅産物をpGEM-T Easy Vector (Promega社) でサブクローニングした後、DTCS Quick Start Sequencing Kit 及びCEQ8000 (Beckman Coulter社) により配列を決定した。AP-1、AP-2及びAP-3に認められた配列は同一であり、決定した配列についてはFig.1に示した。DDBJにおいて*Pythium* 属のIGS領域の配列情報を検索したところ、登録されている情報として*Pythium insidiosum* のIGS1の配列 (accession number AY484596) のみであった。今後は、本報で決定された*Pythium* sp.のIGS1の配列を元にプライマーを設計し、漁場海水などでLAMP法による増幅を行って*Pythium* sp.を特異的に検出できるプライマーを選択していく。

謝 辞

本報告においては、DNA配列の読み取りに際して愛知県農業総合試験場環境基盤研究部生物工学グループ各

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

^{*2} 愛知県農業総合試験場 (Aichi-ken Agricultural Research Center, Yazako, Nagakute, Aichi 480-1193, Japan)

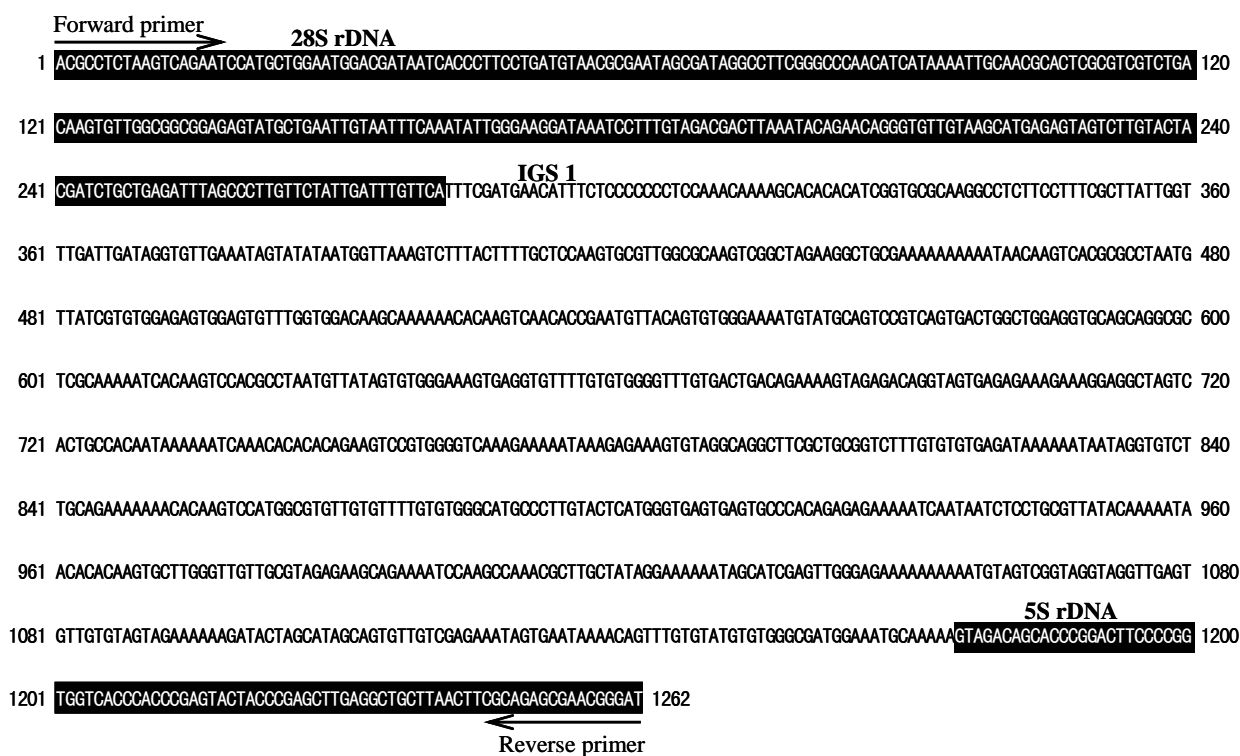


Fig. 1 DNA sequence of the intergenic spacer 1 (IGS1) of the red rot disease fungi *Pythium* sp. collected in Aichi prefecture. The IGS1 regions of three strains were completely conserved. Shaded boxes represent nucleotide sequences of 28S and 5S rDNA regions. Arrows indicate the positions and direction of polymerase chain reaction primers. The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases with the accession number AB254193.

位に機器使用の御配慮及び技術的な御指導を賜った。ここに謝意を表する。

文 献

- 1) 新崎盛敏 (1947) アサクサノリの腐敗病に関する研究. 日水試, 13, 74-90.
- 2) Takahashi M., Ichitani T. and Sasaki M. (1977) *Pythium porphyrae* Takahashi et Sasaki, sp. nov. causing red rot of marine red algae *Porphyra* spp.. Trans. Mycol. Soc. Jpn., 18, 279-285.
- 3) Amano. H., Sakaguchi K., Maegawa M. and Noda H. (1996) The use of a monoclonal antibody for the detection of fungal parasite, *Pythium* sp., the causative organism of red rot disease, in seawater from *Porphyra* cultivation farms. Fish. Sci., 62, 556-560.
- 4) Park C. S., Kakinuma M. and Amano H. (2001) Detection of the red rot disease fungi *Pythium* sp. by polymerase chain reaction. Fish. Sci., 67, 197-199.
- 5) 横尾一成・川村嘉応・川原逸朗・東條元昭・水上 謙 (2000) PCR 法によるアカグサレ病菌卵胞子の滅菌泥からの検出, 水産増殖, 48, 679-680.
- 6) Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yoneyama T., Watanabe K., Amino N. and Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acid Res., 28(12), 1-6.
- 7) Fukuta S., Kato S., Yoshida K., Mizukami Y., Ishida A., Ueda J., Kanbe M. and Ishimoto Y. (2003) Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. J. Virol. Methods, 112, 35-40.
- 8) 杉田 隆・西川朱寶 (2004) DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. Jap. J. Med. Mycol., 45, 55-58.
- 9) Belkhiri A., Buchko J. and Klassen G. R. (1992) The 5S ribosomal RNA gene in *Pythium* species: two different genomic locations. Mol. Biol. Evol., 9(6), 1089-1102.