

将来を見据えた試験研究推進事業(準備事業)

ノリ養殖の安定生産を脅かす壺状菌の早期定量検出と現場への応用

太田 洋志・三根 崇幸

壺状菌病は、壺状菌がノリに寄生することで発病し、養殖ノリの生長阻害や製品の品質低下等の被害を引き起こす。壺状菌の感染後の増殖は水温が高いほど速いため、地球温暖化等に伴いノリ養殖環境の水温が上昇傾向にある中で、今後本病の被害が増大することが危惧される。こうした中、本病の被害対策として、壺状菌の早期発見が求められており、これまでに海水中を漂う壺状菌遊走子を検出するPCR法が開発されてきた。しかし、泥等の土壌成分がDNAを吸着することや土壌成分に含まれる腐植酸がPCR反応の阻害要因となるため、有明海のような泥等の懸濁粒子を多く含む海水では、検出が不十分となるケースが確認されている。そこで、有明海の海水から壺状菌遊走子のDNAを効率的に検出するため、土壌成分等の影響を受けにくいDNA抽出方法を検討した。

方法

試験には、2020年3月にノリ養殖漁場から採取した壺状菌株を用いた。壺状菌遊走子は、3日間通気培養した菌株罹病ノリ葉体10枚を滅菌海水20mlが入った50ml三角フラスコに収容し、4時間程度振盪することにより得た。2020年6月に六角川河口で採取しオートクレーブ滅菌した底泥を濾過海水に懸濁して、懸濁粒子濃度をO.D.が0.01, 0.04, 0.07および0.10になるように調整した海水500mlに、壺状菌遊走子を 10^1 , 10^2 , 10^3 細胞ずつ接種した。なお、懸濁粒子濃度は、分光光度計を用いて、400nmの最大吸光波長で測定した吸光値(=O.D.)で表示した数値である。上記の4段階の懸濁粒子濃度と3段階の遊走子量を組み合わせた計12パターンの海水を孔径 $0.8\mu\text{m}$ のポリカーボネート製メンブレンフィルター(ADVANTEC社製)で吸引濾過して遊走子を集菌し、DNA抽出に用いた。集菌したメンブレン

フィルターからのDNA抽出は、ヌクレアーゼフリーウオーター(タカラバイオ社製)100 μl を加えた後に90 $^{\circ}\text{C}$ で20分間熱処理する方法(以下、熱処理法)とDNeasy PowerSoil kit(Qiagen社製)を用いてキットに添付されたプロトコールに従い10mM Tris-HCl 100 μl に溶出する方法(以下、PowerSoil kit法)を用いた。得られたDNA抽出液はPCRに供し、標的遺伝子の増幅産物の有無を調べることで、壺状菌遊走子の検出を行った。PCRには、PCR酵素としてHotStarTaq Plus DNA polymerase(Qiagen社製)を用い、プライマーとして本県と甲南大学が共同で特許(特許第5374684号)を取得している1105Fおよび1200Rを用いた。増幅反応は、サーマルサイクラー(バイオメトラ社製)を用い、95 $^{\circ}\text{C}$ 5分間を1サイクル、94 $^{\circ}\text{C}$ で30秒間、50 $^{\circ}\text{C}$ で30秒間、72 $^{\circ}\text{C}$ で1分間を40サイクル、72 $^{\circ}\text{C}$ で10分間を1サイクル行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動で確認した。

結果

熱処理法およびPowerSoil kit法により得たDNA抽出液からのPCRによる遊走子の検出結果をそれぞれ表1および表2に示した。熱処理法では、いずれの懸濁粒子濃度においても、遊走子が 10^3 細胞以下では検出されず、 10^4 細胞以上の遊走子でも検出結果が不安定であった。一方で、PowerSoil kit法では、試験を実施した懸濁粒子の濃度に関わらず、遊走子が 10^1 細胞以上で検出された。このことから、PowerSoil kit法は、熱処理法よりも土壌成分の影響を受けずに壺状菌遊走子DNA抽出液を得ることができる有効な手法であることが明らかとなった。

表1 熱処理法により得たDNA抽出液からのPCRによる遊走子の検出結果(検出：○，非検出：×)

O.D.	遊走子量(細胞)				
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
0.01	×	×	×	×	○
0.04	×	×	×	○	×
0.07	×	×	×	○	○
0.10	×	×	×	×	○

表2 PowerSoil Kit法により得たDNA抽出液からのPCRによる遊走子の検出結果(検出：○，非検出：×)

O.D.	遊走子量(細胞)				
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
0.01	○	○	○	○	○
0.04	○	○	○	○	○
0.07	○	○	○	○	○
0.10	○	○	○	○	○