

三重大学大学院生物資源学研究科の 博士論文の要旨と修士論文の題目 2002 年 4 月～2003 年 12 月

Abstracts of Doctor Theses and Titles of Master Theses in the Faculty of Bioresources, Mie University, April 2002 to December 2003

博士（学術）学位論文 21 名

論文提出による博士学位

氏名	朴 贊善
学位記番号	生博 乙第 25 号
学位記授与の日付け	平成 14 年 7 月 17 日
学位論文題目	Biochemical features of red rot disease fungus <i>Pythium porphyrae</i> isolated from <i>Porphyra</i> cultivation farms in Korea and implication for disease prevention (韓国ノリ養殖場から分離した赤腐れ病病原菌 <i>Pythium porphyrae</i> の生化学的特性及び病気予防に関する研究)

論文審査委員

主査 教授・天野 秀臣
教授・加納 哲
教授・前川 行幸
教授・高松 進
講師・柿沼 誠

要 旨

韓国ではノリは最も重要な養殖海藻であるが、様々な病気により収量が大きく変動する。ノリ赤腐れ病は卵菌類 *Pythium* spp. によって起き、毎年ノリ養殖に大きな被害をもたらす最も深刻な病気の一つである。韓国では赤腐れ病が肉眼的に観察されていたが、その詳細な研究は全くなされていない。本研究は韓国の牙山、木浦、海南及び莞島産ササビノリから分離した赤腐れ病病原菌 *Pythium* sp. の生物学的、生化学的及び遺伝学的性質を日本の福岡、宮城及び愛知県の分離菌株と比較し、韓国産分離菌株の諸特性を把握し、究極的には韓国における赤腐れ病病原菌の検出、漁場での病原菌の出現状況の把握と定量化、抵抗性株の開発を行うことを目的とした。

韓国における代表的なノリ養殖場の莞島から分離した莞島株は分生子数が有意に日本の分離株より多かったが ($p < 0.05$)、その他の差は僅かであった。莞島分離株はほとんどの形態学的及び成長や栄養要求の生理学的性質が日本の菌株とよく類似していたので、*Pythium porphyrae* と推定された。しかし、SDS 存在下及び非存在下での水溶性タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンとアイソザイムパターンは日本の分離株と若干異なった。

韓国（牙山、木浦、莞島及び釜山）から分離した 21 株と日本（福岡、宮城及び愛知県）から分離した 17 株の間の遺伝的変異を、市販の 10 塩基のオリゴヌクレオチド 20 種類（PAP-F1～PAP-F20）を用いた RAPD-

PCR 法によって分析した。約 800bp から 5.1kbp の DNA 断片が増幅された。得られた電気泳動パターンの UPGMA 分析の結果、38 株は大きく 3 グループに分けられ、dissimilarity coefficients は 0.0010 から 0.6983 の範囲であった。即ち、各分離株間には遺伝的な変異が認められ、これらの変異は各分離株の地理的な起源と深い関係を示した。次に、赤腐れ病病原菌の PCR による検出方法の開発を行った。莞島分離株の rDNA の internal transcribed spacer 領域の塩基配列は、日本の分離株のそれと全く同一であったため、得られた塩基配列をもとにノリ赤腐れ病病原菌に特異的なプライマー PP-1 (5'-TGTGTTCTGTGCTCCTCTCG-3') 及び PP-2 (5'-CCCAAATTGGTGTTCCTCC-3') を設計した。これらプライマーを用いて、陸上植物病原菌の各種 *Pythium* 及び海水から回収した海洋微生物につき PCR を行ったところ、DNA 増幅は認められず、本プライマーの特異性が確認された。次に、PCR による検出感度を調べたところ、遊走子 1 個を検出することができた。さらに、これらプライマー PP-1 及び PP-2 を用いた PCR により市販されている乾ノリから赤腐れ病病原菌の検出が可能であることも確認した。一方、赤腐れ病早期予防策として、ノリ養殖場海水中の赤腐れ病病原菌の遊走子量を定量的に測定するため、内部標準を用いた競合 PCR 法の開発を行った。本研究で得られたプライマー (PP-1 及び PP-2) 及び内部標準 pPPISC DNA を用いた競合 PCR 法は、ノリ養殖場海水中に含まれる病原菌遊走子の検出及び定量方法として有効なものと考えられた。次に、赤腐れ病予防の根本的な方法として、抵抗性株の開発を試みた。赤腐れ病に罹病した患部ではほとんどの細胞が死滅しているが、まれに赤腐れ病病原菌に対して何らかの抵抗性を持っていると考えられる未感染細胞が

存在する。この細胞から、組織培養により抵抗性株を作出した。本株の抵抗性を評価したところ、抵抗性は一般の養殖スサビノリより高かったが、抵抗性のマルバアマノリ野生株のそれより低かった。本抵抗性は F2 でも認められ、世代交代しても抵抗性が遺伝的に安定であることが確認された。

次に、本抵抗性株の生化学的な特質を調べた。抵抗性株の全タンパク質を抽出し、2次元電気泳動を行ったところ抵抗性株特有の4個のスポットが認められた。また、ノリの硬さに関するポルフィランの含量は抵抗性株と養殖スサビノリでそれぞれ $11.9 \pm 0.5\%$ と $9.5 \pm 0.4\%$ であった。これらのポルフィランの硬さに関与する 3,6-anhydro-L-galactose と硫酸基含量は抵抗性株がそれぞれ $8.2 \pm 0.2\%$ と $7.7 \pm 0.3\%$ 、養殖スサビノリは $6.1 \pm 0.3\%$ と $10.8 \pm 0.5\%$ であった。即ち、抵抗性株は葉体の硬さに関与するポルフィラン、3,6-anhydro-L-galactose が養殖スサビノリより多く、硫酸基含量は少ないことが判明し、このことが抵抗性に深く関係していると思われた。

以上の結果より、韓国にも日本と生物学的、生化学的及び遺伝的によく類似した赤腐れ病病原菌が存在することを初めて明らかにし、両国の赤腐れ病病原菌を PCR 法で同時に検出する PCR プライマーを設計することができた。さらに病原菌を定量的に解析する競合 PCR 法を確立した。この方法を利用してノリ養殖現場における赤腐れ病病原菌遊走子の出現量をモニタリングし、赤腐れ病に対する早期対応策としての病気流行の予報の可能性が示された。また、組織培養で赤腐れ病病原菌に対する抵抗性株の開発ができたことから、本研究はノリ養殖場における病原菌検出と抵抗性株開発の両面からノリ生産の安定性に役立つと考えられる。