

滅菌泥中におけるアカグサレ病菌卵胞子の生存

横尾一成・川村嘉応・東條元昭*

Oospore Survival of *Pythium porphyrae*, in Sterile Sediments

Kazunari YOKOO, Yoshio KAWAMURA, and Motoaki TOJO*

まえがき

アカグサレ病は全国各地のノリ養殖場で毎年発生し、製品の品質を低下させるとともに、生産量を減少させるなど多大な被害を与えている。本病は、卵菌綱-腐敗カビ目-*Pythium* 属の一種 *P. porphyrae* がノリ葉体に寄生して起きる病気である。

本菌の越冬状態から初感染に至る感染経路について詳細な研究は行われていない。ただ、養殖漁期中に葉体上に形成された卵胞子が越冬して本病の初感染原になっていることが推察されている¹⁾。一方、陸上の *Pythium* 属菌の卵胞子は、一般に泥の中で休眠することが知られている²⁻⁴⁾。

そこで本研究では、アカグサレ病菌卵胞子が泥の中でどのくらいの期間生存し、発芽することができるのかを陸上の *Pythium* 属菌の卵胞子の検出に使われる土壌希釈平板法を用いて検討した。

実験材料

供試菌株：1995年10月31日に佐賀県有明海（農区204）で採集し、佐々木・佐藤の方法⁵⁾により作成したトウモロコシ煎汁寒天培地で継代培養したものである。

供試培地：佐々木・佐藤の方法⁵⁾により作成したトウモロコシ煎汁寒天培地および煎汁液体培地と一谷・長岡の方法⁶⁾により作成した Bact-CMA 培地、捕捉培地、VP₃ 培地を用いた（表1）。全ての培地は、塩分濃度を20‰、pHを7.88に調整して供試した。

供試土壌：1997年1月30日、本センター近くの六角川河口の川岸の、表層から約10cmの土壌を1ℓポリ容器に約1kg採取した。ただちに実験室に持ち帰り、篩別（1.0mm）して瓦礫や植物根などを取り除いた土壌を高圧滅菌（121℃、20分間）し、温度16℃、暗の条件下に1ヶ月間静置した。

実験方法

1. 卵胞子懸濁液の作成方法の検討

卵胞子は、菌を接種した寒天培地を径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、これをトウモロコシ煎汁液体培地で水温18℃、照度1,000 luxで12時間明：12時間暗条件下で3ヶ月間培養して形成させた。この卵胞子形成菌糸体を無菌的に取り出し、滅菌20‰海水で2から3回洗い、エース ホモジナイザーで15,000 rpm、3分間処理し卵胞子懸濁液とした。

試験区は、藤田・銭谷の方法⁷⁾により寒天培地から作成した卵胞子懸濁液（以下、寒・卵区と略す）と、前述の方法で液体培地から作成した卵胞子懸濁液（以下、液・卵区と略す）および対照区として、寒天培地の菌糸体のみ（以下、寒・対照区と略す）と、液体培地の菌糸体のみ（以下、液・対照区と略す）を、トウモロコシ煎汁寒天培地に接種し、検鏡によって菌糸体の発芽を調べた。

2. 卵胞子形成に及ぼすコーンオイル、水温、照明、空気の影響

実験に用いた培地は、トウモロコシ煎汁液体培地を基本にしてコーンオイル（ナカライテスク株）を8,000, 4,000, 2,000, 0 ppmになるように添加した4試験区と

* 大阪府立大学 農学部 植物病理学教室

表 1 供試培地

種 類	成 分	濃 度 (/ℓ)
トウモロコシ煎汁寒天培地	Agar	38 g
Bact-CMA 培地	Cornmeal agar	38 g
捕捉培地	Agar	38 g
	Pimaricin	10 mg
	PCNB	100 mg
	Vancomycin	100 mg
VP ₃ 培地	Agar	38 g
	Sucrose	20 g
	CaCl ₂	10 mg
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10 mg
	ZnCl ₂	1 mg
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.02 mg
	MoO ₃	0.02 mg
	MnCl ₂	0.02 mg
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.02 mg
	Thiamine-HCL	100 μg
	Pimarcin	5 mg
	Penicillin	50 mg
	Vancomycin	75 mg
	PCNB	100 mg
	Rose bengal	2.5 mg

した。培養条件は、水温を 23, 18, 13, 8 °C とした 4 試験区とし、照度を 1,000 lux で 12 時間明：12 時間暗の試験区（明区）、全暗にした試験区（暗区）の 2 試験区とした。さらに、空気の影響を見るために通気性のあるシリコン栓で蓋をした好氣的条件区とゴム状パッキンで蓋をした嫌氣的条件区の 2 試験区を設定した。

計数にあたっては、十分成熟したもの（図 1 a）と未成熟のもの（図 1 b）を卵胞子とした。本編で使用されている卵胞子には、未成熟の卵胞子との区別が難しい栄養繁殖体も含めた。また、卵球が極度に顆粒化しているもの（図 1 c）、内容物が消失して中空になっているもの（図 1 d）は、発芽活性が無いと見なし卵胞子には入れなかった。卵胞子数は、培養 22, 36 日後に顕微鏡の 400 倍視野で 5 視野を計数し、その平均値で表した。

3. 発芽率に及ぼす卵胞子形成期間の影響

実験は、水温 18°C、照度 1,000 lux で 12 時間明：12 時間暗条件下で 1.5, 2.0, 3.0, 4.5 ヶ月間行い、それぞれの培養後に発芽率を測定した。

卵胞子懸濁液は実験 1 のとおり作成し、濃度は 10,000 個/ml に調整した。

発芽率の測定方法は、卵胞子懸濁液 0.5 ml（卵胞子数 5,000 個）を 5 枚のトウモロコシ煎汁寒天培地の表面にコンラージ棒で塗抹し、7 日間培養したのち、検鏡によって菌糸体の発芽を調べた。発芽率は、塗抹した全卵胞子数に対する発芽卵胞子数（%）で表した。

4. 希釈平板法に供試する選択培地及び希釈倍率の検討

卵胞子懸濁液は、実験 1 のとおり作成した。卵胞子懸濁土壌は、供試土壌 50 g に卵胞子懸濁液を卵胞子数が、50,000 個/g になるように混合した。卵胞子懸濁土壌希釈液の調整は、卵胞子懸濁土壌 5 g を滅菌三角フラスコ（100 ml 容）に入れ、0.35%素寒天を加えて 25 ml になるようにし、振とう機で振とう（121 rpm, 30 分間）したものを 5 倍希釈液（卵胞子数 10,000 個/ml）とした。これを手でよく振り混ぜ、その液層の中心部から 5 ml をピペットで取って 0.35%素寒天 45 ml を加え、50 倍希釈液（卵胞子数 1,000 個/ml）とした。さらに、同様の方法で 250 倍希釈液（卵胞子数 200 個/ml）を作成した。

発芽試験法は、1 試験区あたり 5 枚ずつのそれぞれの

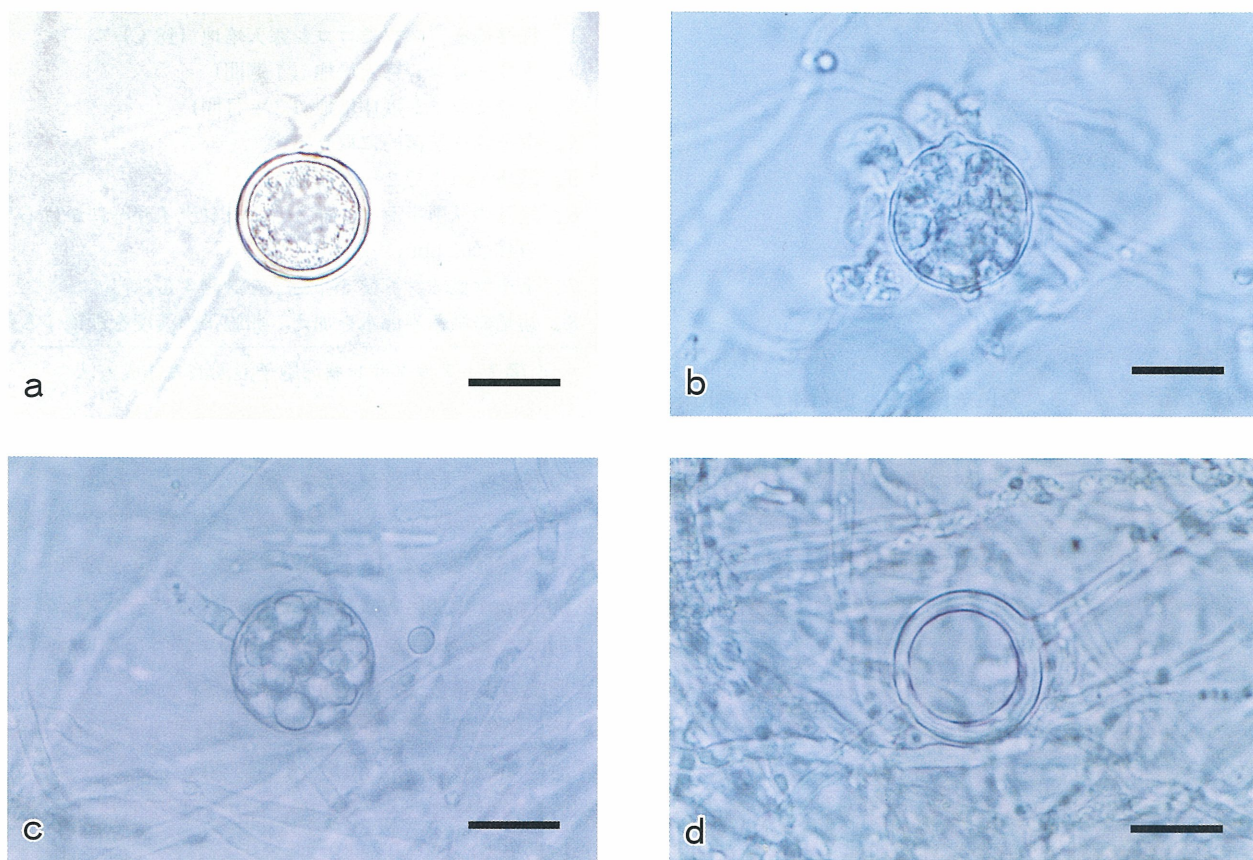


図1 アカグサレ病菌の卵孢子
a, 十分成熟したもの；b, 未成熟のもの；c, 卵球が極度に顆粒化しているもの；d, 内容物が消失して中空になっているもの。スケールバーは10 μm 。

培地の表面に卵孢子懸濁土壌希釈液 0.5 ml を滴下し、これをコンラージ棒で塗抹した。このとき、塗抹液がシャーレの内壁に付着しないように注意した。発芽卵孢子数は、検鏡によって発芽確認したものを計数した。培養は水温 18°C、照度 1,000 lux で 12 時間明：12 時間暗条件下で行った。

5. 滅菌泥中の卵孢子の発芽試験

供試土壌の含水率の調整は、供試土壌をガラスシャーレに 100 g ずつ取り、滅菌 20% 海水を加えて行い、85, 60, 30, 0% とした。卵孢子懸濁液は、実験 1 のとおり作成した。卵孢子懸濁土壌は、供試土壌 50 g に卵孢子懸濁液を卵孢子数が 40,000 個/g になるように混合した。卵孢子懸濁希釈液の調整は、実験 4 の方法で 2, 4, 8 倍希釈液を作成した。対照は、卵孢子懸濁液を静置したものとした。

発芽試験法は、2, 4, 8 倍希釈液あたりそれぞれ 1, 2, 3 枚のトウモロコシ煎汁寒天培地の表面に卵孢子懸濁土壌 0.5 ml を滴下し、これをコンラージ棒で塗抹した。このとき、塗抹液がシャーレの内壁に付着しないよ

うに注意した。発芽卵孢子数は、検鏡によって発芽確認したものを計数した。発芽率は、塗抹した全卵孢子数に対する発芽卵孢子数で表した。培養条件は室温 (14 から 29°C) と水温 18°C、照度 1,000 lux で 12 時間明：12 時間暗条件下で行った。培養期間は、2 週間、1 ヶ月間、2 ヶ月間とした。

結果及び考察

1. 卵孢子懸濁液の作成方法の検討

従来の寒天培地中に形成される卵孢子を用いて卵孢子懸濁液を作成する方法⁷⁾では、混入してくる寒天片の影響が無視できない。そのため、本実験では液体培地中に形成される卵孢子を用いて卵孢子懸濁液を作る方法を検討した。

各実験区における菌糸の伸長が確認された日数を、表 2 に示した。寒・卵区および液・卵区からの菌糸の伸長は、いずれも 5 日後に確認された。寒・対照区および液・対照区の菌糸の伸長は、いずれも 1 日後に確認された。

表2 菌糸の伸長までの日数

実験区	日 数
寒・卵区	5
液・卵区	5
寒・対照区	1
寒・対照区	1

設定した2種類の対照区の結果から、寒天、液体のいずれの培地で形成された菌糸体でも、菌糸体からの菌糸の伸長は1日後に確認することができた。また、寒・卵区の菌糸の伸長が、液・卵区の菌糸の伸長と同じく5日後に確認されていることから、液・卵区が卵胞子および栄養繁殖体だけになっていることが確かめられた。

従来の方法では、 -20°C に一晩置くことで菌糸体を殺していた^{7,8)}が、今回の実験によりホモジナイザーで3分間、細切することで短時間で菌糸体を殺すことができた。また、顕微鏡での観察により、エース ホモジナイザーによって細切された菌糸体は、透明で細いことから、胞子体から発芽した菌糸体との区別が容易にできた。

以上、液体培地中で形成された卵胞子をホモジナイザーで細切する方法は、不純物混入の恐れが少なく、処理に要する時間を短縮することができた。従って、以後の実験に供するアカグサレ病菌卵胞子の懸濁液の作成方法は、図2のように行うこととした。

2. 卵胞子形成に及ぼすコーンオイル、水温、照明、空気の影響

寒天培地上におけるアカグサレ病菌卵胞子の形成については詳細な研究が行われている¹⁾が、液体培地中の卵胞子形成についての知見は少ない。そこで、本実験はトウモロコシ煎汁液体培地を用いて、アカグサレ病菌卵胞子の形成条件について検討した。

卵胞子形成の結果を表3に示した。卵胞子形成に対するコーンオイルの影響を見ると、どの試験区も濃度による差は見られなかった。水温の影響を見ると、 23°C 区、 18°C 区および 13°C の明区で良い結果が得られたが、その他の区では卵胞子の形成はほとんど見られなかった。照度条件の違いを見ると、 23°C 区、 8°C 区では明区と暗区の差はほとんど見られないが、 18°C 区、 13°C 区では、明区の方が良い結果が得られた。空気の影響を好氣的、嫌氣的培養で見ると、水温 23°C と 8°C 区では卵胞子の形成数について明らかな差は見られなかったが、水温 18°C 区と水温 13°C ・明・22日後区で好氣的培養の方が若干形成数が多く、水温 13°C ・暗・36日後区で嫌氣的培

1. 保存培養 トウモロコシ寒天培地 (18°C)
2. トウモロコシ寒天培地 (1週間)
3. トウモロコシ液体培地 (3ヶ月間)
4. 菌糸体を無菌的に取り出す。
5. 滅菌半海水で2～3回洗う。
6. 適量の滅菌半海水を加え、ホモジナイザーにかける (15,000 ppm 3分)。
7. トーマ血球計算盤で卵胞子を計測する。
8. 適量の滅菌半海水を加え、卵胞子の濃度を調節する。

図2 アカグサレ菌卵胞子混濁液の作成方法

養の方が若干形成数が多かった。

卵胞子の形成は、水温 23°C 区、 18°C 区、 13°C の明区の各実験区とくに 18°C 区のコーンオイル無添加区、2,000 ppm 添加区および 13°C の明区のコーンオイル無添加区で多い傾向が見られた。藤田・銭谷は有性生殖器官形成の環境を、寒天培地上において検討しており¹⁾、本実験と条件設定の上で異なるが、卵胞子の形成条件は海水濃度40から60%、温度15から 20°C の範囲が適していると報告している。本実験でも温度は 23°C と 18°C で良い結果を得ており、藤田・銭谷¹⁾とほぼ一致するようである。しかし、コーンオイルの添加量については、藤田・銭谷¹⁾のように明らかな差は見られなかった。これは、本実験に用いた培地が液体培地であったことから、添加したコーンオイルが培地の表層に浮いてしまったために菌体が摂取できなかったことが考えられた。今後コーンオイルの影響については、培養を平たいシャーレを用いて行うか、振とうさせながら行うといった方法を取る必要があると考えられた。

以上のことから、卵胞子を得るためのアカグサレ菌の培養条件は、水温 18°C 、照度1,000 luxで12時間明：12時間暗で良い結果が得られると考えられた。

3. 発芽率に及ぼす卵胞子形成期間の影響

卵胞子の形成期間による発芽率の違いを検討した。卵胞子の形成期間毎の発芽率を表4に示した。卵胞子の発芽率は、1.5ヶ月後には2.1から2.4%と高かったが、4.5ヶ月後には0.06から0.1%となり、培養期間が長くなるにつれて低下した。

培養期間が長くなるにつれて発芽率の低下が見られたが、これは、卵胞子の成熟が進み、深い休眠状態へ入ったために発芽しにくくなったことが考えられた。また、培養が進むにつれて卵球が顆粒化したものや、中空になったものが多く見られたことから、卵胞子の活性が低下していることも考えられた。

表 3 卵胞子形成に及ぼす各種条件の影響

培養条件		コーンオイル 濃度 (ppm)	好氣的培養		嫌氣的培養	
水温	光条件		22 日後	(36 日後)	22 日後	(36 日後)
23°C	明	8000	+	(++)	+	(-)
		4000	++	(++)	++	(-)
		2000	+	(+)	+	(++)
		0	++	(+)	+	(+)
	暗	8000	+	(+)	++	(+)
		4000	++	(-)	+	(+)
		2000	+	(-)	+	(-)
		0	+	(-)	+	(-)
18°C	明	8000	++	(+)	+	(++)
		4000	++	(++)	++	(++)
		2000	+++	(++)	++	(+)
		0	++	(+++)	+	(++)
	暗	8000	+	(-)	+	(-)
		4000	+	(+)	+	(+)
		2000	+	(+)	+	(+)
		0	+	(-)	+	(-)
13°C	明	8000	++	(+)	+	(++)
		4000	+	(+)	-	(++)
		2000	+	(++)	+	(++)
		0	+++	(++)	-	(++)
	暗	8000	-	(-)	-	(+)
		4000	-	(-)	-	(+)
		2000	-	(-)	-	(+)
		0	-	(-)	-	(+)
8 °C	明	8000	-	(+)	-	(-)
		4000	-	(-)	-	(+)
		2000	-	(-)	-	(-)
		0	-	(-)	-	(-)
	暗	8000	-	(-)	-	(+)
		4000	-	(-)	-	(-)
		2000	-	(-)	-	(-)
		0	-	(-)	-	(-)

左の値は 22 日後，右の括弧書きの値は 36 日後の計算結果である。

—, 0 個；+, 1～5 個；++, 6～10 個；+++, 11～15 個。

以上のことから，卵胞子を得るためのアカグサレ病菌の培養期間は 3 ヶ月間が良いと考えられた。

4. 希釈平板法に供試する選択培地および希釈倍率の検討

希釈平板法に供試する選択培地および希釈倍率を検討した。各供試培地による卵胞子の発芽試験の結果を表 5 に示した。卵胞子の発芽は，VP₃ 培地，捕捉培地，Bact

-CMA 培地ではいずれも確認することができなかった。トウモロコシ煎汁寒天培地での発芽は，5 倍希釈液，250 倍希釈液で確認された。発芽した卵胞子の個数は，5 倍希釈液で 6 個，250 倍希釈液で 1 個であった。

VP₃ 培地，捕捉培地で卵胞子の発芽が確認できなかったことについては，培地成分として用いている抗生物質の影響が考えられる。抗生物質のアカグサレ病菌に与え

表4 培養期間毎のアカグサレ病菌卵胞子の発芽率 (%)

培養期間 (月)	18℃ 発芽率 (%)
1.5	2.1 ~2.4
2.0	0.6 ~1.5
3.0	0.1 ~0.9
4.5	0.06~0.1

る影響については、川村ら⁹⁾によって菌糸体の伸長については明らかにしたものの、卵胞子の発芽についてはまだ明らかにしていない。このため、抗生物質が卵胞子の発芽に与える影響について検討する必要があると考えられた。Bact-CMA 培地で卵胞子の発芽が確認できなかったことは、天然培地であるトウモロコシ煎汁寒天培地との何らかの成分の違いによるものと考えられた。Bact-CMA 培地とトウモロコシ煎汁寒天培地の成分の違いについては、川村によるアカグサレ病菌の培地比較実験 (川村：未発表) によって、Bact-CMA 培地よりト

ウモロコシ煎汁寒天培地の方が、菌糸の成長が良いという結果が得られている。これが卵胞子の発芽にも関与していることが示唆された。

以上の結果から、アカグサレ病菌卵胞子の検出には、トウモロコシ煎汁寒天培地を使用し、希釈倍率は5倍前後が良いと考えられた。

5. 滅菌泥中の卵胞子の発芽試験

それぞれの実験条件での卵胞子の発芽率を表6に示した。泥に混ぜた直後の卵胞子の発芽率は、含水率85%の泥で0.01から0.12%, 含水率65%の泥で0.04から0.08%で、それ以下の含水率の泥では、発芽を確認することはできなかった。また、対照区の卵胞子の発芽率は、1.0%であった。

泥に混ぜて2週間後の卵胞子の発芽率は、含水率85%の泥で水温18℃条件下で0.01から0.16%, 水温25から29℃ (室温) 条件下で0から0.04%, 含水率65%の泥で水温18℃条件下で0から0.2%, 水温25から29℃ (室温) 条件下で0%であった。それ以下の含水率の泥

表5 アカグサレ病菌卵胞子の発芽試験

希釈倍率 (卵胞子濃度)	VP ₃ 培地	捕捉培地	Bact-CMA 培地	トウモロコシ煎汁寒天培地
5 倍 (10,000 個/ml)	—	—	—	+(6 個)
50 倍 (1,000 個/ml)	—	—	—	—
250 倍 (200 個/ml)	—	—	—	+(1 個)

—, アカグサレ病菌卵胞子の発芽が確認できなかったもの。

+, アカグサレ病菌卵胞子の発芽が確認できたもので、括弧内の数字は発芽卵胞子の個数を示す。

表6 各実験条件でのアカグサレ菌卵胞子の発芽率

含水率 (%)	混合した 直後	2 週間後		1 ヶ月後		2 ヶ月後	
		18℃	室温 (25~29℃)	18℃	室温 (20~27℃)	18℃	室温 (14~24℃)
85	0.01 ~0.12%	0.01 ~0.16%	0 ~0.04%	0 %	0 %	0 %	0 %
60	0.04 ~0.08	0 ~0.2	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
対照	1.0	0.27	0.12	0.22	0.02	0.32	1.0

での卵胞子の発芽率は、0%であった。また、対照区の卵胞子の発芽率は水温 18°C 条件下で 0.27%、水温 25 から 29°C（室温）条件下で 0.12%であった。

泥に混ぜて 1 ヶ月後、2 ヶ月後の卵胞子の発芽率は、どの条件下でも 0%で、卵胞子の発芽を確認することができなかった。また、対照区の卵胞子の発芽は、いずれの条件でも確認された。

以上、アカグサレ病菌卵胞子は、単独で泥中に 2 週間生存し、発芽できることが確認された。

含水率 30%以下の泥で卵胞子の発芽が確認できなかったが、これは浸透圧の差で卵胞子内の水分がなくなったためと思われる。このことからアカグサレ病菌の卵胞子は陸上の *Pythium* 属菌の卵胞子²⁻⁴⁾と異なり、乾燥に対する耐性が低いと考えられた。

温度条件での発芽率を見ると、18°C 条件下の発芽率の方が室温 (25 から 29°C) 条件下の発芽率の方より良い結果が得られている。これは藤田ら¹⁾の結果と一致する。

滅菌泥に混合した卵胞子の発芽率は、対照区の発芽率と比べると明らかに低い数値となった。この点については、本実験で供試した土壌が高圧滅菌泥であるために、泥の成分が変化したことなども考えられるので、滅菌の方法についても検討する必要があると考えられた。

今回の実験では、*Pythium* 属菌の検出によく利用される土壌希釈平板法を用いて行った。この方法での卵胞子の検出感度は、40,000 個/g の泥 1 g から 5~21 個であった。今後、もう少し検出感度の高い方法を検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) 藤田雄二・銭谷武平 1977：有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌に関する研究-Ⅲ. 有性生殖器官形成の環境および栄養条件. 日水誌, 43 (8), 921-927.
- 2) 高橋 実 1970：*Pythium* 菌の見分け方. 植物防疫, 24 (8), 339-346.
- 3) 一谷多喜郎 1992：真菌の分離と分類・同定 *Pythium* 属. 防菌防黴, 20 (2), 107-116.
- 4) 一谷多喜郎 1984：新版土壌病害の手引 *Pythium* 菌. 日植防, 130-132.
- 5) 佐々木実・佐藤重勝 1969：ノリ赤腐病菌の培地組成と培養温度について. 東北水研研報, 29, 125-132.
- 6) 一谷多喜郎・長岡秀樹 1991：麦類褐色雪腐病菌卵胞子の各種選択分離培地上における発芽差異. 関西病虫研報, 33, 69-70.
- 7) 藤田雄二・銭谷武平 1978：有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌に関する研究-V. *Pythium porphyrae* の卵胞子発芽. 日水誌, 44 (1), 15-19.
- 8) 藤田雄二・右田清治 1980：あかぐされ病罹病のり葉体の乾燥および冷凍保存による病原菌 *Pythium porphyrae* の死滅について. 長大研報, 49, 11-16.
- 9) 佐賀県有明水産振興センター 1997：バイテクを利用したノリ病害発生予測技術の開発に関する研究. 平成 8 年度バイテク利用養殖システム高度化事業報告書, 1-8.