

ノリ葉体上に形成されたアカグサレ病菌卵胞子の発芽特性

川原逸朗・横尾一成・荒巻 裕・川村嘉応・東條元昭*

Properties of Germination in *Pythium porphyrae* OosporesItsuro KAWAHARA, Kazunari YOKOO,
Hiroshi ARAMAKI, Yoshio KAWAMURA, and Motoaki TOJO*

まえがき

有明海のノリ養殖において発生するアカグサレ病は、ノリの生産に大きな影響を及ぼす病害の1つである。本病は、腐敗カビ科の1種、*Pythium porphyrae*がノリ葉体の細胞中に感染して発病する。

本病原菌がノリ養殖漁期終了後、どのような形態で越冬し、再び秋季に発病するかということについては、長い間明確にされていなかった。しかし、1998年に佐賀県有明水産振興センター¹⁾が、春から秋にかけて有明海の海底泥からアカグサレ菌を分離し、本病原菌の有性生殖器官である卵胞子が海底泥中に越冬生存している可能性を示した。

本病原菌は、寒天培地上で培養が容易にできることから、寒天培地上に形成された卵胞子（以下、培地卵胞子という）の発芽条件等は、すでに藤田²⁾や佐賀県有明水産振興センター³⁾によって報告されている。しかし、実際の漁場と同様にノリ葉体上に形成される卵胞子（以下、葉体卵胞子という）についてこれらの報告はなされていない。葉体卵胞子の発芽条件を明らかにすることは、海底泥における本菌の越冬状況やノリ葉体への初期感染機構の解明に役立ち、病害対策上重要と思われる。

そこで、本報では、実験室内で形成させた葉体卵胞子の発芽に及ぼす塩分、温度、培地の影響および温度耐性について検討したので報告する。

材料および方法

供試菌株 1998年6月25日に有明海の海底泥から分離し、下記のトウモロコシ寒天培地により18°Cで保存培養していた株（以下、G-3株という）を用いた。

供試培地 佐々木・佐藤⁴⁾のトウモロコシ培地 I を基本に

乾燥トウモロコシを冷凍トウモロコシに替えたもの（以下、トウモロコシ培地という）およびノリエキス培地を用いた。ノリエキス培地は、生の冷凍ノリ10gに塩分20%の滅菌海水を200ml加え、ガラスホモジナイザーで磨り潰した後、15,000×g、4°C、30分間の遠心分離により得られた上清を塩分20%の滅菌海水で10~30倍に希釈して用いた。各培地は特記しない限り、塩分20%、寒天1.5%、pH7.8、抗生物質（Vancomycin hydrochloride, Penicillin G potassium, Ampicillin anhydrousそれぞれ0.1mg/ml¹⁾）添加とし、培地20mlを滅菌シャーレ（内径85mm、高さ20mm）に分注して平板とした。なお、抗生物質を添加する前にトウモロコシ培地はオートクレーブで滅菌したが、ノリエキス培地は加熱を避けるためオートクレーブ滅菌を行わなかった。

葉体卵胞子懸濁液の作製 葉体卵胞子は、G-3株を水温18°C、塩分20%の海水中でノリ葉体に感染させ、菌糸が十分に葉体に広がった時点で、10°Cのインキュベータに移し、暗所で約1.5カ月間放置して葉体に形成させた。この葉体卵胞子を塩分20%の滅菌海水に入れ、ホモジナイザー（日本精機製作所製）で15,000rpm、3分間処理した。その後、40μmのプランクトンネットで濾過し、得られた濾液を塩分20%滅菌海水で遠心分離（1,230×g、15分間、4°C）・再懸濁を3回反復して卵胞子を洗浄して葉体卵胞子懸濁液を作製した。

なお、実験に供した葉体卵胞子は、発芽後、トウモロコシ培地で培養したものをノリ葉体に感染させ、アカグサレ病が発病することを確認した。

1. 各種条件下における発芽試験

葉体卵胞子懸濁液は、トーマ・ツァイス血球計算盤により、葉体卵胞子が2,000個/mlになるように20%滅菌海水で調整したものをを用いた。この葉体卵胞子懸濁液0.1mlを各試験区ごとに3枚の培地にコンラージ棒で塗抹し、7日間培養したのち、発芽した葉体卵胞子数を顕微鏡で計

*大阪府立大学農学部植物病理学研究室

数した。発芽率は、塗抹した全葉体卵胞子数に対する百分率で示し、3枚の培地の百分率の平均値とした。

1) 発芽に及ぼす塩分濃度の影響

塩分0, 10, 15, 20および30%のトウモロコシ培地を用い、各塩分濃度の海水に懸濁調整した葉体卵胞子を上記の方法で塗抹後、18℃で培養して発芽率を求めた。

2) 発芽に及ぼす温度の影響

トウモロコシ培地を用い、上記の方法で葉体卵胞子懸濁液を塗抹後、15, 18, 21, 24, 27および30℃で培養して発芽率を求めた。

3) 発芽に及ぼす培地の影響

ノリエキス10倍希釈培地、20倍希釈培地、30倍希釈培地および対照としてトウモロコシ培地を用い、-20℃で冷凍保存していた葉体卵胞子懸濁液を上記の方法で塗抹後、18℃で培養して発芽率を求めた。

2. 葉体卵胞子の温度耐性試験

1) 短期培養による温度耐性

葉体卵胞子懸濁液を18, 24, 30および36℃のインキュベーター内に24時間静置した後に、上記の方法でトウモロコシ培地へ塗抹し、18℃で培養して発芽率を求めた。

2) 長期培養による温度耐性

葉体卵胞子を20%滅菌海水に懸濁したもの(海水区)と干潟泥とともに20%滅菌海水に懸濁したもの(泥区)とを屋外条件下で静置し、定期的に発芽率を求めた。海水区は、葉体卵胞子40,000個を50ml容のポリプロピレンチューブに入れ、20%滅菌海水を加えて全量を20mlとし、懸濁密度を2,000個/mlに調整した。泥区は、同じ容器に60℃のウォーターバスで1時間処理後、1ヶ月間15℃の冷暗所で放置した有明海の干潟泥5gと葉体卵胞子40,000個および20%滅菌海水を加えて全量を20mlとした。いずれの区も、これらの容器を3本ずつ作製し、屋外の日陰に設置した水槽に浮かべて約1年間静置した。その間、定期的に各容器内の試料を0.5ml取り出し、20%滅菌海水0.5mlを加えて2倍に希釈した後、1本の容器に対して3枚の平板培地にそれぞれ0.1mlずつ、合計9枚のトウモロコシ培地に塗抹した。発芽は、18℃で7日間培養した後、顕微鏡で確認した。泥区については、顕微鏡で発芽を確認する前に培地表面の泥を20%滅菌海水で洗い流した。発芽率は、9枚の百分率の平均値とした。

なお、容器を浮かべた水槽の水温を水銀棒状温度計を用いて午後2時前後に測定した。

結 果

1. 各種条件下における発芽試験

1) 発芽に及ぼす塩分濃度の影響

各塩分濃度での発芽率は、表1に示したとおりである。塩分0~30%の範囲における発芽率は、塩分10~20%で高く、いずれも10%程度であった。

2) 発芽に及ぼす温度の影響

各温度での発芽率は、表2に示したとおりである。15~30℃の範囲における発芽率は、24℃で17.7%と最も高く、次いで21℃の13.3%であり、30℃ではわずか0.2%とほとんど発芽しなかった。

3) 発芽に及ぼす培地の影響

各培地での発芽率は、表3に示したとおりである。ノリエキス10倍希釈培地が最も発芽率が高く26.4%、次いで20倍希釈培地の24.8%、トウモロコシ培地19.6%、30倍希釈培地の16.8%となった。

2. 葉体卵胞子の温度耐性試験

1) 短期培養による温度耐性

各温度で葉体卵胞子懸濁液を24時間静置後、18℃で培養したときの発芽率は、表4に示したとおりである。葉体卵胞子は、24および30℃の温度で24時間静置すると発芽

表1 アカグサレ病菌葉体卵胞子の発芽に及ぼす塩分濃度の影響

塩分濃度 (%)	発芽率 (%)
0	2.8
10	10.8
15	10.0
20	10.8
30	3.8

表2 アカグサレ病菌葉体卵胞子の発芽に及ぼす温度の影響

温度 (℃)	発芽率 (%)
15	6.3
18	8.7
21	13.3
24	17.7
27	11.5
30	0.2

表3 アカグサレ病菌葉体卵胞子の各種培地における発芽率

培地	発芽率 (%)
ノリエキス 10 倍希釈培地	26.4
ノリエキス 20 倍希釈培地	24.8
ノリエキス 30 倍希釈培地	16.8
トウモロコシ培地	19.6

率が上昇する傾向が認められ、30℃では48.2%と最も高く、その値は18℃の13.0%に比べ、4倍近くも上昇した。一方、36℃での発芽率は、8.6%と18℃よりも低下した。

2) 長期培養による温度耐性

海水区と泥区の葉体卵胞子を屋外に約1年間静置したときの発芽率の変化と、その時の培養水温の変化は、図1に

表4 アカグサレ病菌葉体卵胞子の温度耐性

温度 (℃)	発芽率 (%)
18	13.0
24	17.1
30	48.2
36	8.6

示したとおりである。葉体卵胞子の発芽率は、初め11.2%であったが、海水区では日数経過とともに次第に高まり、8月1日(20日目)に最高40.3%を示した。しかし、その後、10月20日(100日目)までに約2%まで低下し、翌年の7月26日(380日目)には0%となった。一方、泥区の発芽率は20日目に最高65.3%を示した後、次第に低下していった。しかしながら、海水区に比べ発芽率は高い値を示し、低水温期に入った11月以降も20%台を維持した後、水温が上昇した380日目に6.1%となった。

水温は、試験開始後次第に上昇し、8月12日(31日目)に最高の29.4℃となった後、増減を繰り返しながら徐々に低下した。2月1日(204日目)に最低の6.7℃を記録し

た後は再び上昇し、7月26日(380日目)の最終測定日は28.6℃であった。

考 察

本実験の結果、葉体卵胞子発芽の至適塩分濃度は、塩分10~20%、至適温度は24℃前後であった。発芽に及ぼす塩分濃度および温度の影響については、培地卵胞子で藤田²⁾が検討している。その報告によると、塩分については、海水の濃度別に検討されており、20~60%の海水濃度で高く、40%で最も高いと報告されている。用いた海水の塩分濃度が明記されていないため、各海水濃度の塩分が不明であるが、一般的な海水の塩分濃度35‰に換算して比較すると至適範囲は7~21‰であり、培地卵胞子と葉体卵胞子の至適塩分濃度は、ほぼ一致した。また、温度については、20℃で16.2%と最も高く、次いで18℃の13.9%とされている²⁾。本研究では、24℃で17.7%を示していることから発芽の至適温度は、葉体卵胞子の方がやや高い傾向がみられた。この原因については、培地卵胞子と葉体卵胞子の性質の違いによることも考えられるが、発芽試験に用いた培地の種類の違い(藤田は、FULLER *et al.*の培地使用)による可能性もあり、今後検討する必要がある。いずれにしても、藤田が培地卵胞子で報告しているように、葉体卵胞子においても、発芽率が高い温度や塩分濃度は、本疾病が初認される漁期と漁場の条件と

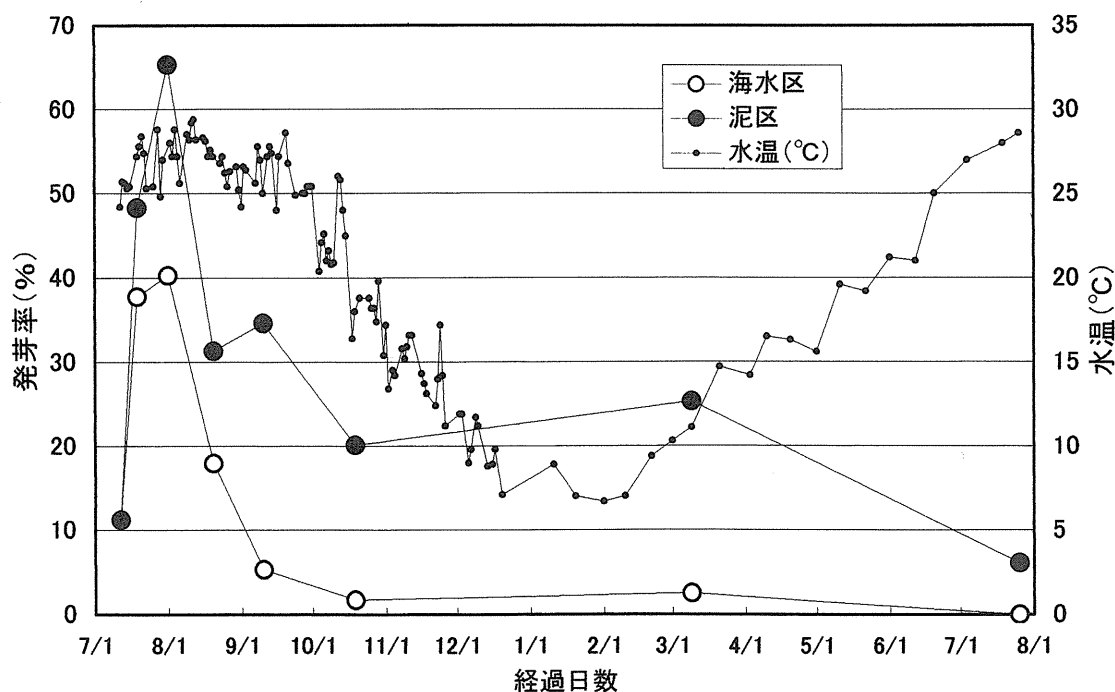


図1 アカグサレ病菌葉体卵胞子の発芽

合致すると考えられる。

冷凍生ノリから抽出したノリエキスを添加した培地で葉体卵胞子の発芽を検討した結果、この培地でも葉体卵胞子が発芽することが確認された。さらにノリエキスの濃度が高い培地ほど発芽率が高い傾向が認められた。このことは、葉体卵胞子の発芽にノリの成分が関与していることを示しており、ノリ漁期の始まりとともにノリ漁場の海底に供給される落ちノリが海底泥中に越冬生存している葉体卵胞子の発芽を誘発している可能性を示唆している。

また、葉体卵胞子は、36°Cに24時間さらされると発芽率が低下するが、18~30°Cの温度範囲で24時間程度の時間内であれば、逆に発芽率が上昇することが明らかとなった。特に、30°Cでは、この温度で7日間培養するとほとんど発芽しないが、24時間葉体卵胞子を放置したのち、適正な温度に移して培養すると発芽率が高まるという興味深い結果が得られた。

陸上の*Pythium*属菌*P. ulutimum*では、土壌エキスなどで卵胞子を約6週間予備培養することで卵胞子膜が休眠状態の厚膜から薄膜へ変化し、発芽率が90%以上に高まることが報告されている^{5,6)}。今回の実験では、葉体卵胞子膜の状態を観察できなかったが、アカグサレ病菌においても、一般的に卵胞子膜が薄いものが発芽しやすいことが知られており^{2,7)}、葉体卵胞子でみられた温度刺激による発芽率の上昇は、*P. ulutimum*と同様に厚膜から薄膜への変化が条件によっては短期間で起きることの示唆を与えた。

海水に懸濁し、屋外に静置した葉体卵胞子の発芽率は、試験開始前の11.2%から20日目に40.3%まで上昇した。これは、室内実験の温度耐性試験でみられた発芽率の上昇と同様に、葉体卵胞子が屋外に静置されている間に、適度な温度刺激を受けたためと考えられる。一方、20日目以降は次第に発芽率が低下していった。葉体卵胞子の入った容器を浮かべた水温の変化をみると試験開始から31日目に最高水温29.4°Cを記録しているように20日目以降も温度の高い状態が続いた。このため、葉体卵胞子を入れた容器内は、長時間高温にさらされていたものと思われる。室内試験では、36°Cに24時間さらされると葉体卵胞子の発芽率がほとんど認められなくなることから、屋外試験でみられた発芽率の低下も、高温の影響ではないかと考えられる。新崎⁷⁾はアカグサレ病菌の葉体卵胞子が夏の高温時に膜が厚くなり、生残、発芽率ともに低下すると報告している。

泥中に混入し、屋外に静置した葉体卵胞子の発芽率は、海水区と同様の変化を示したが、20日目の最高65.3%を

はじめ、常に海水区よりも高い値を示した。さらに、海水区が約1年間静置すると発芽しなくなったのに対し、泥区は380日目に6.1%の発芽を確認することができた。これに対し、横尾ら⁸⁾は本報と同様に泥中に混入した培地卵胞子の発芽率を経時的に求めた結果、発芽率が確認できたのは混入から2週間後までであり、それ以降は確認されなかったと報告している。このときの発芽率低下の原因は、明らかではないが、卵胞子の生存と関係しているとすれば、葉体卵胞子の状態で泥中にある方が、葉体卵胞子だけで海水中に懸濁しているものや泥中にある培地卵胞子よりも耐性が高いと考えられる。

以上のように、本実験によりアカグサレ病菌葉体卵胞子の適性発芽条件が、本病原菌の初期感染時期である10~11月の漁場水温や発病初認の頻度が高い河口漁場の塩分濃度とほぼ一致すること、ノリの成分が葉体卵胞子の発芽に関与していること、葉体卵胞子は適度な温度刺激を受けると発芽率が高まること、さらに、葉体に形成させた卵胞子が泥の中で越冬生存し、ノリ漁期の始まる秋に高率で発芽できることが明らかとなった。これらの結果は、天然漁場の海底泥中にアカグサレ病菌の卵胞子が越冬生存して分離されたとする佐賀県有明水産振興センター¹⁾の推察を支持するものであり、本病原菌の初期感染に越冬した卵胞子が密接に関与していることを示していると考えられる。したがって、今後は、アカグサレ病の防除対策を講ずる上で重要となる有明海の海底泥における本菌卵胞子の水平・垂直分布を調査するとともに、葉体卵胞子の詳細な越冬条件やノリ葉体への初期感染機構について検討する必要がある。

文 献

- 1) 佐賀県有明水産振興センター 1998: ノリ養殖における生産阻害因子の発生動態とその制御技術の開発. 平成10年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 5-10.
- 2) 藤田雄二 1978: 有明海のり漁場から分離したあかぐされ病原菌*Pythium*に関する研究-V. *Pythium porphyrae*の卵胞子発芽. 日水誌, 44(1), 15-19.
- 3) 佐賀県有明水産振興センター 1996: ノリ養殖における生産阻害因子の発生動態とその制御技術の開発. 平成8年度地域重要新技術開発促進事業報告書, 5-8.
- 4) 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. 東北水研報, (29), 125-132.
- 5) W.A. Ayers and R.D. Lumsden 1975: Factors affecting production and germination of oospores of three *Pythium* species. *Phytopathology*, 65, 1094-1100.

- 6) R.D.Lumsden and W.A.Ayers 1975: Influence of soil environment on the germinability of constitutively dormant oospores of *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 65, 1101-1107.
- 7) 新崎盛敏 1962: アサクサノリの人工養殖に関する研究 III. ノリ赤腐れ病について. 農電研報, (3), 87-93.
- 8) 横尾一成・川村嘉応・東條元昭 1999: 滅菌泥中におけるアカグサレ病菌卵胞子の生存. 佐有水研報, (18), 1-7.