

室内培養実験による赤ぐされ病評価手法の開発

坂口研一

目的

室内培養実験によるアマノリ類の赤ぐされ病耐性評価手法の開発を行うことにより、品種間の赤ぐされ病耐性の強弱を数値により判断できる方法を確立する。これにより、品種間の赤ぐされ病に対する耐病性を把握できることになり、赤ぐされ病の蔓延しやすい漁場や時期には耐病性に優れた品種を用いることが可能となる。この技術を開発することにより良質の黒のりを安定生産できるようにする。

方法

1. 感染用遊走子の採取方法の検討

赤ぐされ病病原菌の遊走子は球嚢から放出された後、時間の経過とともに運動速度の低下・停止・球型に変形・発芽管の伸長といった運動量および形態の変化がおこり、それぞれの過程で遊走子の感染力が異なると考えられる（図1）。感染用遊走子は①十分な運動速度を維持していること。②計数誤差を小さくするため、多量の遊走子が得られること。③得られた遊走子の形状が確認できるように、計数時の固定により遊走子に破壊や変形等をもたらさないこと。④遊走子を得られるまでの日数が短期間で確実に遊走子を得ることができること。以上の条件を満たしている必要がある。そこでこれらの条件を満たした感染用の遊走子を得るために、新たな遊走子採取方法を検討した。

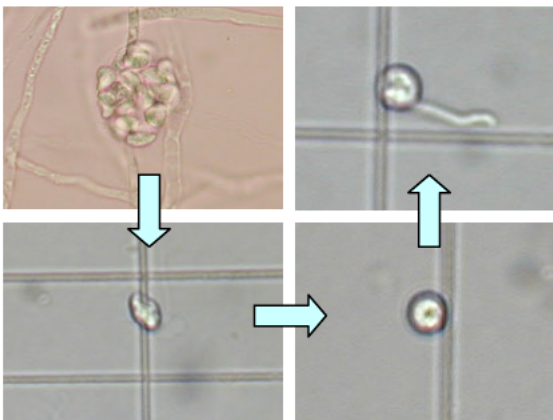


図1. 時間の経過による遊走子の変化

2. エアレーション強度の検討

U-51の葉体中央部から直径5 mmに打ち抜いたディス

クを得、ディスクが水中で平面を保つ健全なものを選別し、1日間回復培養を行った。1/2SWM-IIIを添加した海水1Lに葉体のディスクを5枚ずつ入れた培養フラスコを3個用意し、それぞれのエアレーションの気泡を180個/min.、210個/min.、240個/min. に調整し、遊走子を各500,000個投入した。48時間後の感染箇所数および1感染箇所あたりの死細胞数を計数した。

3. 感染用遊走子添加量の検討

感染試験は1/2SWM-III添加海水10 mlを満たし、その中に直径5 mmのディスクを5枚ずつ入れた直径6 cmのシャーレを3個用意し、それぞれに遊走子を100個、1,000個、10,000個投入した。シャーレの中で遊走子が均等になるようにガラス棒でゆっくり攪拌し、静置で感染させた。48時間後の感染箇所数、1感染箇所あたりの感染細胞数を計測した。

4. アマノリ類品種間の赤ぐされ耐病性試験

感染試験は1/2SWM-III添加海水10 mlを満たし、その中に直径5 mmのディスクを5枚ずつ入れた直径6 cmのシャーレに遊走子を10,000個投入し感染させた。48時間後の感染箇所数、1感染箇所あたりの感染細胞数を計測した。試験にはU-51、あさぐも、スサビ緑芽、オオバグリーンの4品種を用いた。

結果および考察

1. 感染用遊走子の採取方法の検討

新崎B（抗生物質無し）の中にコーンミール寒天培地上で生長させた赤ぐされ病原菌を入れ、20℃で5日間培養した。培養した菌体を半海水に入れ、ロータリーシェイカーを用いて120 rpmで振とうした。新たな半海水に2時間に1回移すことで洗浄した。この洗浄を5回繰り返した。多量の遊走子を放出し始めた菌体を5 mlの半海水中で菌体を懸濁した。30分後遊走子を20 μm ナイロンメッシュで分離し、遊走子液0.5 mlに2%グルタルアルデヒド半海水を同量加えて固定した。その遊走子をトーマ血球算定盤で3回計測した。以上の方法により、感染試験に必要な条件を満たした遊走子を10⁷個程度得ることができた。

2. エアレーション強度の検討

エアレーションの気泡 180 個 / min. のフラスコでは感染箇所数は平均 37 ± 12.8 カ所/枚、5 枚のディスクの 1 感染箇所あたりの平均死細胞数は 41.8 ± 37.8 cells であった。エアレーションの気泡 210 個 / min. および 240 個 / min. 試験区では 48 時間後では感染が認められなかった。このことから、エアレーションの気泡の数の違いによる感染への影響が非常に大きいことがわかった (図 2)。このことは、枝付フラスコの形状の違いによる気泡の大きさや海水の動きの違いも感染に影響する可能性が示唆された。また、エアレーションの気泡 180 個 / min. の 1 感染箇所あたりの平均死細胞数に大きなばらつきがある原因はエアレーションによる海水の動きが遊走子の葉体へのとりつき時間や遊走子の活力低下が影響している可能性が考えられた。

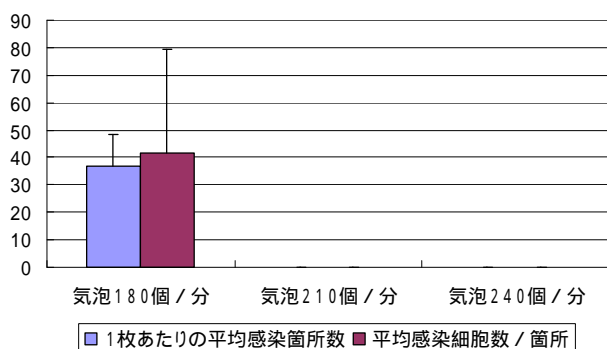


図 2. エアレーション強度による感染への影響

3. 感染用遊走子添加量の検討

感染箇所数は遊走子 100 個投入試験区では 0.34 ± 0.16 カ所/disk、1,000 個投入試験区では 5.2 ± 1.2 カ所/disk、10,000 個投入試験区では 49.0 ± 10.8 カ所 / disk であった。1 感染箇所あたりの感染細胞数は 100 個投入試験区では 48.6 ± 35.7 cells、1,000 個投入試験区では 63.8 ± 36.0 cells、10,000 個投入試験区では 51.8 ± 32.1 cells であった。

今回の試験より、1/2SWM- 添加海水 10 ml を満たした直径 6 cm のシャーレにディスクを 5 枚、遊走子を 10,000 個投入し、48 時間後に計測する条件が適当であると考えられた。

4. アマノリ類品種間の赤ぐされ耐病性試験

1 枚あたりの平均感染箇所数は U-51 で 44.4 ± 15.2 カ所 / disk、あさぐもは 32.2 ± 14.7 カ所 / disk、スサビ緑芽は 60.2 ± 11.0 カ所 / disk、オオバグリーンは 51.2 ± 10.7 カ所 / disk であった。U-51 の感染箇所数を 1 としたとき、あさぐもは 0.73、スサビ緑芽は 1.36、オオバグリーンは 1.15 であった。1 感染箇所あたりの平均感染細胞数は U-51 で 43.9 ± 28.3 cells、あさぐもは 20.1 ± 12.5 cells、スサビ緑芽は 38.4 ± 26.1 cells、オオバグリーンは 99.9 ± 64.0 cells であった。U-51 の 1 感染箇所あたりの平均感染細胞数を 1 としたとき、あさぐもは 0.46、スサビ緑芽は 0.87、オオバグリーンは 2.28 であった。1 枚あたりの平均感染細胞数は U-51 で 1949.8 ± 586.3 cells、あさぐもは 646.8 ± 273.7 cells、スサビ緑芽は 2312.0 ± 547.3 cells、オオバグリーンは 5116.2 ± 683.5 cells であった (図 3)。U-51 の 1 枚あたりの平均感染細胞数を 1 としたとき、あさぐもは 0.33、スサビ緑芽は 1.19、オオバグリーンは 2.62 であった。この数値は品種間で十分差があること。赤ぐされ病の病状の程度は葉体単位面積あたりの感染細胞数によることから、品種間の耐病性評価の数値化には基準品種である U-51 の 1 枚あたりの平均感染細胞数と評価品種 1 枚あたりの平均感染細胞数の比較したものを使用することとした。式で表すと、「評価品種の赤ぐされ耐性値 = 評価品種 1 枚あたりの平均感染細胞数 / U-51 の 1 枚あたりの平均感染細胞数」となり、本年度の暫定的な評価法と計算法から算出した赤ぐされ病耐性値は強い順にあさぐも (0.33)、U-51 (1.00)、スサビ緑芽 (1.19)、オオバグリーン (2.62) となった。

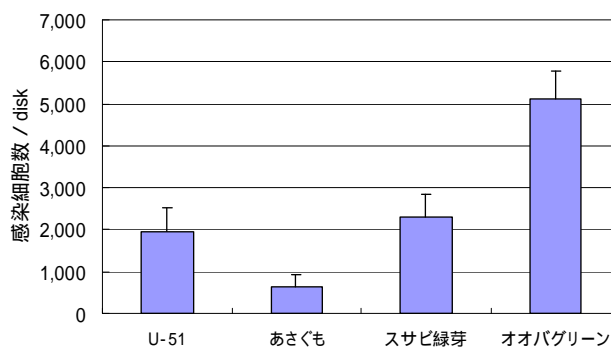


図 3. Disk 1 枚あたりの品種別感染細胞数

関連報文

平成 19 年度漁場環境・水産資源持続的利用型技術開発事業報告書 80-83