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^{*1}

藤 田 雄 二

(1977 年 7 月 9 日受理)

Studies on Pathogenic *Pythium* of Laver Red Rot in Ariake Sea Farm—V

Germination of *Pythium porphyrae* Oospores

Yuji FUJITA^{*2}

When oospores of *P. porphyrae* S2 obtained from the culture of corn meal agar were incubated in 50% sea water or on semi-solid nutrient medium, the germination of oospores took place by producing zoospores in a vesicle formed by migration of protoplasmic contents of the oospore through a germ-tube. The percentage of germination was higher on nutrient medium such as glucose-nitrate agar, FULLER *et al.*'s agar or corn meal agar than on sea water agar. The optimal range for germination of oospores was 15-22°C in temperature and 20-60% sea water concentration, and even under such optimal conditions the percentage of germination was less than 20%. Generally, most of thick-walled oospores did not germinate. Since the symptom of red rot appeared on the frond of *Porphyra yezoensis* in the infection test using oospores as inocula, the zoospores produced by germination of oospores may function as the unit of primary infection.

先に、著者ら¹⁾は有明海産のりあかぐされ病原菌 *Pythium* の有性生殖器官形成の環境および栄養条件について検討した。本病原菌の卵胞子は、新崎²⁾の葉体寄生菌による研究から、本菌の越冬および本病の秋期発病に関与すると考えられている。しかし卵胞子がどのような様式で、またどのような環境条件下で発芽するかなどについてはまだ十分に研究されていない。卵胞子の発芽様式や発芽条件を明らかにすることは、漁場における本菌の生態あるいは本病の秋期発病の機序を解明するのに役立ち、病害対策を講ずる上から重要であると考えられる。

本報では有明海産病原菌株の卵胞子の発芽過程を観察し、併せて発芽に対する温度、海水濃度などの影響を調べた結果について述べる。

実験材料および方法

供試菌株 先に分離・同定した *Pythium porphyrae* S2 株^{3,4)}を供試した。ただし本菌株はのり葉体に再感染させることによって卵胞子の形成数が前報¹⁾の結果よりも増加したので、本研究では感染・再分離した菌株を供試した。菌株の保存方法・条件は前報³⁾の通り。

供試培地 グルコース・硝酸塩培地、FULLER⁵⁾の海産藻菌用 (F) 培地およびコーンミール 50% 海水 (CMSA) 培地⁶⁾を供試した。グルコース・硝酸塩培地の組成はグルコース 0.5%, 硝酸カリウム 0.2%, 酵母エキス 0.01%, トリス 0.1%, リン酸水素カリウム 8 mg/100 ml とした。各培地は特記しない限り海水 50%, 寒天 0.8%, 抗生物質 (ペニシリン G カリウム 2 万 IU, ストレプトマイシン硫酸塩 5 mg/100 ml) 添加, pH 7.5 とし、培地 15 ml をペトリ皿 (内径 85 mm) に平板とした。また F 培地および CMSA 培地も特記しない限りトリス 0.1% を添加した。

卵胞子およびその懸濁液の調製 卵胞子は CMSA 平板培地 (寒天 1.2%, トリス無添加) で 20°C, 暗所で 2 カ月間培養したコロニーから得た。寒天平板のまま 4 カ月間 -20°C で凍結保存して菌糸を殺し (未発表), 解凍後、軽く押しつぶしてそのまま供試するか、あるいは卵胞子懸濁液を調製した。なお、凍結処理などによって卵胞子の発芽率が低下するようなことは特に認められなかった。卵胞子懸濁液の調製法は次の通り、コロニーの寒天片を滅菌 50% 海水の中に入れガラスホモジナイザ

^{*1} 本研究の一部は昭和 50 年度文部省科学研究費によった。

^{*2} 長崎大学水産学部 (Faculty of Fisheries, The University of Nagasaki, Bunkyo-machi, Nagasaki 852).

ーで磨砕したものを遠心分離 (3,000 rpm, 15 分)・再懸濁を3回反復した後、卵胞子が 1.2×10^4 個/ml になるように滅菌 50% 海水中に再び懸濁させた。卵胞子懸濁液中には寒天も含まれるが、実験上特に支障はなかった。卵胞子の計数にはトーマ・ツイス血球計算盤を用いた。

卵胞子発芽の観察 コロニーの一部を寒天片として切り取り押しつぶした後、ペトリ皿中の滅菌 50% 海水中に浸漬したもの、あるいはスライドガラス上の CMSA 培地または F 培地 (いずれも寒天 0.2%) に懸濁させスライド培養したものを逐次検鏡した。培養はすべて 20°C 、暗所で行った。

卵胞子の発芽試験法 卵胞子懸濁液 0.1 ml を各試験培地の表面にコンラージ棒で塗付し、14 日間培養した。発芽卵胞子数を計数し、塗付した全卵胞子数に対する百分率を求めた。出現したコロニー数をもつて発芽卵胞子数と見なしたが、一部では検鏡も同時に行った。培養は特記しない限り 20°C 、暗所で行い、また各試験は3回反復した。

(1) 発芽に対する培地組成の影響 グルコース・硝酸塩培地、F 培地および CMSA 培地と栄養塩無添加の 50% 海水寒天 (寒天、トリス、抗生物質を供試培地と同様に添加、pH 7.5) について発芽率を比較した。またグルコース・硝酸塩培地 100 ml にのりエキス 5 ml を添加し、発芽に対するのりエキスの効果も試験した。のりエキスは市販乾燥のりから TAKAGI & KURIYAMA⁷⁾の方法によつて調製した。

(2) 発芽に対する温度、海水濃度の影響 試験には F 培地を用いた。温度の影響は $12\sim 25^\circ\text{C}$ の範囲で試験した。海水濃度試験では海水を淡水で希釈して海水濃度

を 0~100% の範囲で変更した。

卵胞子の接種によるのり葉体の発病試験 漁場で採取した無病のり *Porphyra yezoensis* 葉体を滅菌海水で反復洗浄して供試した。ペトリ皿 (内径 85 mm) 中に滅菌海水 20 ml、長さ約 10 cm の試験葉体 2 枚および約 1 cm^2 のコロニーの寒天片 2 枚を入れ、4 日間静置培養した。その後試験葉体を 300 ml 容の枝付フラスコ中の SCHREIBER の培地 (硝酸ナトリウム 0.1 g, リン酸二水素ナトリウム 20 mg を海水 1 l に溶解) に入れ、6 日間送気培養した。培養はすべて 18°C 、自然光下 (室内) で行つた。発病の有無の判定法は前報³⁾の通り。

実験結果

卵胞子の発芽過程 卵胞子の発芽過程を観察した結果を Figs. 1~5 に示す。50% 海水中に浸漬あるいは CMSA 培地、F 培地に接種した卵胞子は、約 10~15 時間後まではその内部構造に顕著な変化はほとんど認められなかつた。15~48 時間後には内部構造に変化を生じ、発芽するものが認められた。卵胞子の内部では油滴状体 refringent body が小さくなるとともに顆粒状を呈するようになり、卵胞子膜は薄く不明瞭になつた (Fig. 1. a~c)。また油滴状体が小さくなるに従つて部分的な液胞化も認められた。このような変化が徐々に進行した後、卵胞子の一部に突出部を生じ、この突出部から発芽管が伸長し、卵胞子は球形からやや不正形になつた (Fig. 1. d~g, Fig. 2. a~c)。発芽管は径 $2.5\sim 6.1\text{ }\mu\text{m}$ 、通常 1 本で 2 本以上であることはほとんど認められなかつた。発芽管が $20\sim 300\text{ }\mu\text{m}$ に伸長した後、卵胞子の内容物は発芽管の先端部に急速に移動して頂囊を生じ (Fig. 2. d)、頂囊は成熟すると直ちに内部で分裂が開

Fig. 1. Stages of the germination of mature oospore. a; initial, b~g; 30, 48, 56, 57, 57.5 and 58 hr-incubation respectively. $\times 1,100$

Oospore of *P. porphyrae* S2 in Figs. 1~5 were incubated at 20°C with 0.2% agar medium of FULLER *et al.*³⁾ (see Table 1) by slide culture method.

Fig. 2. Oospore extending germ-tube (a~c) and forming a vesicle at tip of a germ-tube (d). a~d; 30, 30.5, 32 and 45 hr-incubation respectively. a~c; $\times 1,000$, d; $\times 500$
Figs. 3 and 4. Differentiated zoospores in a vesicle formed at tip of a germ-tube. Fig. 3; $\times 500$, Fig. 4; $\times 650$
Fig. 5. Zoospores produced from germinating oospore. $\times 600$

始され遊走子を形成した (Figs. 3, 4)。遊走子はしばらくの間頂囊内で動いているが、動き始めてから約 50~80 分後には頂囊外に遊離した。数時間運動した後、遊走子は静止して球状となり、これは発芽して菌糸を出した。遊走子は腎臓形 $4.0 \sim 7.6 \times 7.2 \sim 12.0 \mu\text{m}$ (Fig. 5), ほぼ等長の 2 本の鞭毛を側生しており、一つの頂囊で形成される遊走子数は 8~18 個であつた。頂囊が形成される場合に卵胞子の内容物はほとんどすべてが発芽管の先端部に移動したが、その一部が卵胞子の内部に残留したまま遊走子を形成することまれに観察された。

発芽管の先端に生じた頂囊での遊走子の形成状況および遊走子の形態、形成数などは本菌の胞子嚢による遊走子の場合³⁾とよく類似した。なお、新崎²⁾はのり葉体寄生菌による卵胞子の発芽を観察し、卵胞子の内容が 4~

6 個の遊走子に分割して外膜の崩壊によつてこれを放出すると述べている。

個々の卵胞子が発芽するまでに要する時間は必ずしも一定でなく、培養条件などによつても相違するようであつたが、一般に卵胞子膜が厚いものは発芽しないか、発芽するまで長時間を要するようであつた。同様のことがのり葉体寄生菌²⁾や陸生菌 *P. ultimum*^{8,9)}などの卵胞子でも知られており、*P. ultimum* では卵胞子を土壤エキスなどで予備培養すると厚膜で休眠状のものが徐々に薄膜のものに変化し、約 6 週間の予備培養後には高い発芽率 (>90%) を示すことが明らかにされている^{8,9)}。

発芽に対する培地組成、温度および海水濃度の影響
 予め、F 培地によつて発芽率の経日変化を調べた結果、2 日後で 5.8%, 8 日後で 13.1%, 14 日後で 16.2%

Table 1. Comparison of test media for germination of *P. porphyrae* S2 oospores

Agar media	Germination (%)
1. Glucose-nitrate	19.8
2. 1+laver extract* 5 ml/100 ml	10.2
3. FULLER <i>et al.</i>	16.2
4. Corn meal (CMSA)	14.2
5. Sea water	6.5

Incubation; 14 days at 20°C. All test media contained 0.8% agar, 50% sea water, 0.1% tvis (hydroxymethyl) aminomethane, and penicillin G potassium 20,000 IU and streptomycin sulfate 5 mg per 100 ml, and pH was adjusted to 7.5, unless otherwise stated.

Germination (%) in Tables 1~3; 1,200 oospores per plate were tested. Values are averages of three trials.

* prepared by the method of TAKAGI & KURIYAMA⁷⁾ from commercial "Nori".

Table 2. Effect of temperature on germination of *P. porphyrae* S2 oospores

Temp. °C	Germination (%)
12	4.8
15	13.0
18	13.9
20	16.2
22	10.5
25	5.7

Incubation; 14 days with agar medium of FULLER *et al.*

Table 3. Effect of sea water concentration on germination of *P. porphyrae* S2 oospores

Sea water, %	Germination (%)
0	3.5
20	18.0
40	19.8
50	16.2
60	12.8
80	3.5
100	0.8

Incubation; 14 days at 20°C with agar medium of FULLER *et al.*

であった。各培地での発芽率を比較した結果を Table 1 に示す。いずれの培地でも発芽率は 20% 以下であった。グルコース・硝酸塩培地では発芽率が最も高く、次いで F 培地、CMSA 培地であつて、50% 海水寒天では最も低かつた。グルコース・硝酸塩培地にのりエキスを添加した試験では、発芽率はむしろ減少した。なお、のりエキスの添加量を変更した場合も、特に相違しなかつ

た。発芽に対する温度や海水濃度の影響を調べた結果をそれぞれ Tables 2, 3 に示す。発芽は 12~25°C の範囲で認められ、発芽率は 15~22°C で高く、20°C で最も高かつた。また海水濃度を変えた場合には、発芽率は海水濃度 20~60% で高く、40% 海水で最も高かつた。

卵胞子の接種によるのり葉体の発病 接種してから 4 日後には、試験葉体に 1~数個にわたる死細胞が認められ、10 日後には径 5~8 mm の病斑を生じた。病斑部では菌糸が葉体細胞を貫通し、病斑の外縁部には赤色輪の形成が観察された。この実験的病症は漁場における本病症とよく類似した。

考 察

有明海産あかぐされ病原菌 *P. porphyrae* S2 株の卵胞子は発芽管の先端に生じた頂囊で遊走子を形成して発芽することが確認され、先の有・無生殖器官形成試験³⁾と合せると、有明海産菌株の全生活環はほぼ明らかになったものと考えられる。従来あかぐされ病原菌の生活環のうち卵胞子の発芽以後の状態については分離菌株による報告がなく、その発芽様式はまだ明らかにされていなかった。

陸生 *Pythium* 菌のうち *P. debaryanum* など¹⁰⁻¹³⁾数種類の卵胞子では遊走子を形成する発芽と発芽して直接菌糸体に生長する発芽とが知られている。*P. porphyrae* S2 株でも遊走子を形成する発芽とは別に卵胞子が発芽して直接菌糸体に生長する発芽もしばしば観察された。陸生 *Pythium* 菌では、発芽卵胞子が遊走を形成するかどうかは栄養の多寡^{12,13)}や灌水状況¹³⁾、また培養温度¹⁰⁻¹²⁾などの外周条件に支配されるといわれ、個々の卵胞子の成熟度などの相違によるものではないようである。

のり葉体の発病試験において、感染源が遊走子のみであるかどうかは確認していないが、卵胞子の発芽によって形成された遊走子が主な感染源になったと考えられる。陸生 *Pythium* 菌では発芽後に生長した菌糸が直接あるいは付着器の形成によって宿主植物に穿入することが知られているが、本病原菌ののり葉体への感染・伝染は主に遊走子によるといわれている^{2,14)}。漁場における秋期の発病には越冬した卵胞子の発芽による遊走子が直接関与すると考えられる。新崎²⁾は葉体寄生菌による研究によつてほぼ同様のことを指摘している。

卵胞子が発芽して直接菌糸体に生長する発芽は漁場における本菌の生活環や本病の発病において重要であるとは思われない。栄養要求^{15,16)}やのり葉体での生育状況²⁾などから、本病原菌が漁場の底質中などで腐生的に生育し、胞子嚢を生じ遊走子を形成するとは考え難い。な

お、葉体寄生菌では、卵胞子が発芽して直接菌糸体に生長する発芽は認められていないようである²⁾。

有明海漁場では、本病の発病は水温が約 15~20°C である 10 月下旬ないしは 11 月上~中旬に認められ、また河口域に広がる漁場で他の漁場よりも早く認められることが多い¹⁷⁾。今回の発芽率の試験結果から判断すると、本病が発病する漁期ならびに漁場の条件は卵胞子の発芽率が高い温度や海水塩分濃度に合致するようである。なお、卵胞子の発芽に対する pH の影響も無視できないと思われるが、漁場海水 pH は他の要因ほど著しく変動しないことから今回は特に重視しなかつた。

漁場における本病の秋期発病には卵胞子の発芽が密接に関与すると推察され、また発病時期は伝染・蔓延の場合と同様にのりの養殖方法、のり葉体の生長度や潮汐・潮流などの条件によつても相違すると思われる。

終りに、御懇切な指導を賜わつた九州大学農学部豊水正道教授、北御門学助教授ならびに長崎大学水産部銭谷武平教授、右田清治教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 藤田雄二・銭谷武平：日水誌，43，921-927 (1977).
- 2) 新崎盛敏：農電研報，3，87-93 (1962).
- 3) 藤田雄二・銭谷武平：日水誌，42，1183-1188 (1976).
- 4) 藤田雄二・銭谷武平：日水誌，43，1313-1318 (1977).
- 5) M. S. FULLER, B. E. FOWLES and D. J. McLAUGHLIN: *Mycologia*, 56, 745-756 (1964).
- 6) 佐々木 実・佐藤重勝：東北水研報，29，125-132 (1969).
- 7) M. TAKAGI and M. KURIYAMA: *Bull. Fac. Hokkaido Univ.*, 10, 72-76 (1959).
- 8) W. A. AYERS and R. D. LUMSDEN: *Phytopathology*, 65, 1094-1100 (1975).
- 9) R. D. LUMSDEN and W. A. AYERS: *Phytopathology*, 65, 1101-1107 (1975).
- 10) C. DRECHSLER: *Plant Dis. Repr.*, 30, 226-227 (1946).
- 11) C. DRECHSLER: *Bull. Torrey Bot. Club*, 79, 431-450 (1952).
- 12) C. DRECHSLER: *Sydowia. Annal. Mycol. Ser. II*, IX, 451-463 (1955).
- 13) M. E. STANGHELLINI and T. J. BURR: *Phytopathology*, 63, 1493-1496 (1973).
- 14) 新崎盛敏：日水誌，13，74-90 (1947).
- 15) 加藤 盛・渡辺 競・佐藤陽一：日水誌，39，771-775 (1973).
- 16) 藤田雄二・銭谷武平：日水誌，43，89-95 (1977).
- 17) 佐賀養試：佐賀養試報，5，1-54 (1973).