

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・岩出将英

目的

黒ノリの赤ぐされ病は毎年のように発生し、黒ノリ養殖を行う上で最も被害が大きい病気である。深刻な年には摘採不能になる漁場がでる場合もある。黒ノリには多くの品種があり、赤ぐされ病に対する耐性に違いがあることが確認されていることから、適切に使用する品種を選択することによって、赤ぐされ病の被害を軽減することが期待できる。そこで、黒ノリの赤ぐされ病耐性の強弱を数値により判断し、各品種の赤ぐされ病耐性を適切に評価するための技術開発を実施する。これにより、各品種の赤ぐされ病に対する耐病性を簡便に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。

方法

(1) 使用する葉体ディスクの選別

統一的培養条件下で3週間培養したU-51、アオクビ、有明1号、オオバグリーン、大傘田1号、クロスサビ、佐賀8号の葉体を顕微鏡観察し、死細胞や成熟誘導している細胞が無いことを確認したあと、葉体中央部から直径1mmに打ち抜いたディスクを得、1日間回復培養を行った。翌日培養しておいたディスクをスライドグラス上で検鏡し、死細胞や成熟誘導している細胞が無いディスクを5枚選別した。

(2) あかぐされ病原菌遊走子の調整

1000mlの三角フラスコに新崎B(抗生物質無添加)を700ml入れ、その中にコーンミール寒天培地上で生長させたあかぐされ病原菌1cm角を5片入れ20℃で5日間培養した。培養液を30μmナイロンメッシュでろ過し、菌体のみを半海水700mlに入れ、ロータリーシェイカーを用いて120rpmで振とうした。1回目と2回目の洗浄は新たなろ過半海水700mlに1時間に1回移すことにより洗浄した。3回目以降は2時間に1回の洗浄を2回繰り返し、検鏡により多量の遊走子を放出し始めていることを確認した後、30μmナイロンメッシュ上で既に放出されている遊走子を取り除くため十分洗浄を行った後、50mlの遠沈管内で30mlの半海水中に菌体を懸濁し、振とうを行った。30分後遊走子を30μmナイロンメッシュで分離し、遊走子液0.5mlに2%グルタルアルデヒド半海水を同量加えて固定した遊走子をトーマ血球算定盤で3回計測した。計測した遊走子濃度から、遊走子濃度が3,00

0個/mlになるように100mlの半海水遊走子液を調整した。

(3) 品種別のあかぐされ病耐性比較試験

直径6cmのシャーレに選別した各品種の葉体ディスクを5枚ずつ入れ、調整した遊走子液を10ml加え、15分間静置で感染させた。それぞれ、直径6cmのシャーレに入れた10mlの半海水、続いて10mlの1/2SWM-III添加海水へ移動させることにより洗浄し、18℃で24時間静置培養を行った。

培養後U-51、アオクビ、有明1号、オオバグリーン、大傘田1号、クロスサビ、佐賀8号の葉体ディスクを光学顕微鏡(×400倍)で感染箇所数および感染細胞数を計数した。本実験は6回繰り返し実施した。品種間におけるあかぐされ病原菌の相対感染箇所指数、1感染箇所あたりの相対感染速度指数、あかぐされ病相対感染指数をANOVAおよびPost-hoc test (Tukey-Kramer)を行い、あかぐされ病感染について品種間で差があるか統計的に検討した。

結果および考察

実験に使用する葉体をディスクに打ち抜く前とディスクを1日間回復培養した後の2回検鏡し、問題のないディスクを選別して感染実験を実施した結果、あかぐされ病による死細胞以外はほとんど認められず、感染細胞数をより正確に計数することができた。

品種間のあかぐされ病原菌への感染箇所数の比較には基準品種であるU51の1枚あたりの平均感染箇所数と評価品種1枚あたりの平均感染箇所数を比較したあかぐされ病感染箇所指数を用いた。各品種のあかぐされ病感染箇所指数の平均値と標準誤差は有明1号で 0.98 ± 0.33 、佐賀8号は 1.45 ± 0.52 、アオクビは 1.42 ± 0.51 、クロスサビは 0.95 ± 0.53 、大傘田1号は 1.51 ± 0.48 、オオバグリーンは 1.62 ± 0.58 であった。しかし、これらの品種間で有意な差は認められなかった(ANOVA, Tukey-Kramer検定, $P > 0.05$)。

品種間の感染後24時間培養後の1感染箇所あたりの平均細胞数の比較には基準品種であるU51の1感染箇所あたりの平均細胞数と評価品種の1感染箇所あたりの平均感染箇所数を比較したあかぐされ病相対感染速度指数を用いた。各品種の相対感染速度指数の平均値と標準誤差は有明1号で 1.28 ± 0.34 、佐賀8号は 1.04 ± 0.05 、ア

オクビは 1.48 ± 0.48 , クロスサビは 1.21 ± 0.08 , 大牟田1号は 1.35 ± 0.21 , オオバグリーンは 1.94 ± 0.31 であった。この中で佐賀8号とオオバグリーンの間に有意な差が認められた (ANOVA, Tukey-Kramer 検定, $P > 0.05$)。

品種間の耐病性評価の数値化には基準品種である U51 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を比較したあかぐされ病相対感染指数を用いた。各品種のあかぐされ相対感染指数の平均値と標準誤差は有明1号で 1.32 ± 0.46 , 佐賀8号は 1.47 ± 0.35 , アオクビは 2.15 ± 0.59 , クロスサビは 1.10 ± 0.43 , 大牟田1号は 2.19 ± 0.61 , オオバグリーンは 3.37 ± 1.07 であった。しかし、これらの品種間で有意な差は認められなかった (ANOVA, Tukey-Kramer 検定, $P > 0.05$)。細胞レベルで健全性が高い葉体ディスクの選別および活性が強いと思われるあかぐされ病原菌の遊走子の調整をおこなって試験を行った。さらに当初予定していた試験回数の3回を6回に増やして実施したにもかかわらず、各試験回次において同一品種内のあかぐされ病相対感染指数の振れ幅が大きく、有意差のあるデータを得ることができなかった。今後、最も数値のばらつきが少ない感染速度指数を用いて評価することを検討する必要がある。

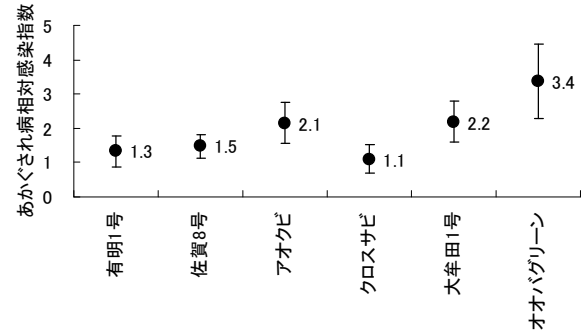


図3. 品種間におけるあかぐされ病相対感染指数
グラフ上のバーは標準誤差

関連報文

平成21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

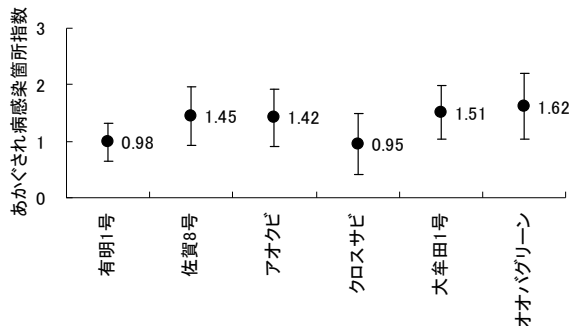


図1. 品種間におけるあかぐされ病相対感染箇所指数
グラフ上のバーは標準誤差

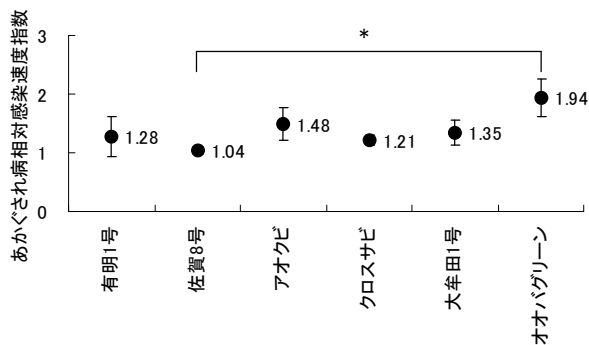


図2. 品種間におけるあかぐされ相対感染速度指数
グラフ上のバーは標準誤差

* : 有意水準5%で有意差あり