

養殖アマノリの疾病に関する研究 VI

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	加藤, 盛 渡辺, 競 佐藤, 陽一
巻/号	39巻7号
掲載ページ	p. 771-775
発行年月	1973年7月

養殖アマノリの疾病に関する研究—VI ノリ赤腐病菌の栄養生理について

加藤 盛・渡辺 競・佐藤陽一
(1973年4月7日受理)

Studies on the Diseases of Cultured *Porphyra*—VI Nutritional Behavior of the Causal Fungus of the Red Wasting Disease of Nori

Sakari KATO*, Tsuyoshi WATANABE**, and Yoichi SATO**

The present paper deals with the results of studies on the nutritional behavior of the pathogenic fungus of the red wasting disease of Nori. The fungus was isolated from diseased fronds obtained from Matsushima bay.

1) The mycelial growth of the fungus was very poor on any of the CZAPECK's, HOPKINS's and RECHARD's media containing inorganic nitrogen source.

2) Amino acids were utilized well by this fungus as their nitrogen source. Of these amino acids, acidic amino acids were the most favoured. Inorganic nitrogen compounds were generally unsuitable as nitrogen source for mycelial growth.

3) For the carbon source, starch, sucrose and xylan were utilized fairly well by this fungus. Above all, starch gave the best growth of mycelium.

4) This fungus was auxoautotrophic to tested growth factors. For growth, this fungus does not appear to need a specific growth factor.

5) The range of the optimal concentration of NaCl for mycelial growth was narrow. Mycelial growth decreased significantly with the concentration of NaCl reaching above 2 percent.

6) From these experiments, it was concluded that the composition of the synthetic liquid medium suitable for the culture of *Pythium porphyrae* is: glutamic acid, 2 g; K_2HPO_4 , 1 g; KCl, 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g; soluble starch, 20 g (or sucrose, 30 g; xylan, 10 g); dist. water, 1 liter; pH 7.0-8.0.

近年ノリ赤腐病が各地で大発生し、その被害は作柄を左右するまでに至っている。本病防除法の確立はノリ養殖上緊急焦眉のことであり、昨今各方面で赤腐病についての研究が開始されているのが現状である。今までもすでに赤腐病菌の形態や発生生態については新崎¹⁾の詳報があり、また病原菌の培養上の諸性質についても新崎ら²⁾、佐々木ら^{3,4)}の報告がみられる。しかし、培養に関する報告は主に温度条件、至適 pH、天然培地の種類などに関するものであり、病原菌の栄養要求、分泌酵素、毒性物質の生産などについての報告はない。病原菌についての研究は寄生病である本病の発生機作解明上の基本となるべき重要な問題であり、そのためにはまず組成既知の合成培地が必要である。

われわれは 1969 年以来赤腐病の発生生態や、防除を目的として実験を続けているが、本菌培養のために好適な合成培地や、本菌の栄養生理についても 2・3 の知見を得たのでここに報告する。

* 東北大学農学部 (Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan)

** 宮城県水産試験場 (Miyagi Prefectural Fisheries Experimental Station, Ishinomaki, Japan)

実験方法

使用菌株 供試赤腐病菌は宮城県松島湾ノリ養殖場において発生した赤腐病罹病葉体から分離したものである。分離した病原菌は、形態からみて高橋ら*によつて報告されている *Pythium porphyrae* n. sp. と同一種と思われる。前培養には corn meal agar 培地 (DIFCO) を用い、接種源としては 15 日間培養の菌叢周縁部から径 5 mm のディスクを切り取つて使用した。

培地組成および作製法 基本培地の組成は次の通りである。

$K_2HPO_4 \cdot 1$ g, $KCl \cdot 0.5$ g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O \cdot 0.5$ g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O \cdot 0.01$ g, 蒸留水 $\cdot 1$ l.

この培地に種々の窒素源や炭素源を加え、pH を 7.0 に調整し、菌を接種その生育程度を比較検討した。

供試窒素源は次の 22 種である。各窒素源は $NaNO_3$ 2 g 中の窒素量を基準とし、これと等量になるようそれぞれ培地に添加した。炭素源は蔗糖を用いた。 $NaNO_3$, KNO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, DL-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-アルギニン, DL-リジン, L-ヒスチジン, L-アラニン, β -アラニン, DL-バリン, DL-ノルバリン, DL-ロイシン, DL-イソロイシン, DL-セリン, L-トリプトファン, DL-スレオニン, L-プロリン, L-シスチン, DL-メチオニン, L-グルタミン, L-アスパラギン。

炭素源としては、キシロース、グルコース、蔗糖 (各 30 g/l)、澱粉 (20 g/l)、キシラン (10 g/l) の 5 種を使用した。この場合の窒素源はグルタミン酸である。

各培養液は 50 ml ずつ 200 ml 容三角コルベンに分注し、 $120^\circ C$ で 15 分間滅菌した。培養は $20^\circ C$ で 15 日間行なつた。培養後、菌体と培養液を汙別し、汙液について pH を測定、菌体は蒸留水で十分洗滌後、 $110^\circ C$ で恒量となるまで乾燥し、この乾燥菌体重をもつて期間中の菌の生育量とした。以下に示す菌体重はすべて 3 コルベンからの平均値である。

結 果

合成培地における菌の生育 一般糸状菌の培養によく用いられ、かつ簡単な組成の合成培地として、CZAPECK, HOPKINS, RECHARD 氏⁹⁾液体培地を選定、各培地における赤腐病菌の生育について検討した。結果は Table 1 に示す通り、各培地で生育は不良であり、15 日間の培養でわずかに菌体重として 25 mg 程度の生育を示したに過ぎなかつた。この結果から使用した 3 種の培地では、本菌の生育に必須の栄養源または生育因子が不足していることが推定された。

Table 1. The growth of fungus in various synthetic media.

Medium	CZAPEK'S medium	HOPKINS'S medium	RECHARD'S medium
Dry weight of mycelium	25.0 mg	19.3 mg	18.4 mg
Final pH	7.2	7.1	7.0

Initial pH : 7.0.

Each dry weight in the Table is the average of 3 cultures.

Cultures incubated 15 days at $20^\circ C$.

窒素源の影響 22 種の窒素源を使用し、菌の生育について比較検討した。結果は Table 2 に示す通り、菌糸の生育はグルタミン酸、アスパラギン酸など酸性アミノ酸添加培地で最も良く、次いでグルタミン、アラニン、プロリン、シスチンなどの添加区が良好であつた。他のアミノ酸や無機態窒素源の添加区では各区間に大差なく、すべて生育は不良であつた。特に $(NH_4)_2SO_4$ 添加区では菌はほとんど生育せず、アンモニア態窒素は本菌の生育には不適と考えられる。

培地 pH の変動 液体培地で本菌を培養した場合、生育に伴つて培地 pH が変動する。変動程度は生育

* 高橋実他, 昭和 45 年度日本水産学会大会講演

Table 2. Comparison of various sources of nitrogen for growth of fungus.

Nitrogen source	Dry weight of mycelium (mg)	Final pH
Aspartic acid	82.7	8.1
Glutamic acid	83.3	8.1
Asparagine	11.0	7.3
Glutamine	43.3	7.2
Arginine	15.6	7.4
Lysine	26.5	7.1
Histidine	10.3	7.3
Alanine	46.9	7.4
β -Alanine	5.4	7.3
Valine	19.4	7.4
Norvaline	7.2	7.1
Leucine	8.6	7.3
Isoleucine	9.3	7.3
Serine	16.5	7.2
Threonine	16.2	7.3
Tryptophane	1.4	7.2
Proline	40.7	7.4
Cystine	46.2	7.8
Methionine	15.1	7.3
NaNO_3	25.0	7.2
KNO_3	23.8	7.2
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	8.0	7.0

Initial pH : 7.0.

Carbon source: Sourcrose.

Cultures incubated 5 days at 20°C.

Each dry weight in the Table is the average of 3 cultures.

Table 3. Comparison of various carbon sources for growth of fungus.

Carbon source	dry weight of mycelium (mg)	Final pH
Xylose	38.0	7.0
Glucose	47.0	7.0
Sucrose	77.0	8.2
Xylan	57.0	7.6
Starch	126.0	7.8
Xylan + Sucrose	105.0	7.2

Initial pH : 7.0. Nitrogen source : Glutamic acid.

Each dry weight in the Table is the average of 3 cultures.

Cultures incubated 15 days at 20°C.

旺盛な酸性アミノ酸添加区で1.0前後である。他区ではすべてそれ以下であり、変動幅は極めて小さい。しかし、変動方向は例外なくアルカリ側に向っているのが特長的である (Table 2)。

炭素源の影響 本実験には単糖類としてキシロース、グルコース、複糖類として蔗糖、多糖類の澱粉、キシランの5種の糖類を用いた。結果はTable 3に示す通り、菌の生育を最も助長した区は澱粉添加区であり、次いで、キシラン、蔗糖2種の混合添加区であつた。以下、蔗糖、キシラン、グルコース、キシロースと生育量は順次低下した。以上の結果から赤腐病菌の炭素源としては多糖類、特に澱粉が最も好適と思われる。

NaCl 濃度の影響 今まで報告されている赤腐病菌の培地^{2,3,4)}は、すべて海水を使用したものである。海水中に生息する本菌の培養には、NaCl を含む培地が好適と考えるのは常識ではあるが、この点をさらに確かめるために実験を行なった。NaCl 濃度を 5 段階に調整、菌の生育について検討した結果が Table 4 である。菌糸の生育は 2% 以上の NaCl を含む場合に著しく阻害されたが、1% 程度では無添加の場合と同様の生育を示し、ほとんど影響はみられなかつた。

Table 4. The effect of concentration of NaCl on mycelial growth.

Concentration of NaCl (%)	Dry weight of mycelium (mg)	Final pH
0	98.0	9.3
1	60.0	8.9
2	10.9	8.3
3	6.3	8.1
4	6.4	8.0
5	7.0	7.9

Initial pH : 8.0. Nitrogen source: Glutamic acid. Carbon source: Sucrose.
Each dry weight in the Table is average of 3 cultures.
Cultures incubated 15 days at 20°C.

Table 5. The effect of growth factor on growth of fungus.

Growth factor	Dry weight of mycelium (mg)	Final pH
B ₁	88.9	8.1
B ₂	91.4	8.1
B ₆	81.3	7.9
P	90.0	7.6
N	84.3	8.1
Bi	91.2	7.9
B ₁ + Bi	101.1	8.4
B ₁ + Bi + B ₂	100.0	8.1
B ₁ + Bi + B ₆	92.3	8.1
B ₁ + Bi + N	91.0	8.1
B ₁ + Bi + P	89.6	8.3
check	98.2	7.4

Initial pH : 7.0. Nitrogen source: Glutamic acid. Carbon source: Sucrose.
Each dry weight in the Table is the average of 3 cultures.
Cultures incubated 15 days at 20°C.
Check is growth factor free medium treated with active carbon.
Abbreviation; B₁ : Thiamine, B₂ : Riboflavin, B₆ : Pyridoxine,
N : Nicotinic acid, P : Pantothenic acid, Bi : Biotin.

生育因子の影響 植物病原菌のうちには生育のために特殊な生育因子を必要とするものが多い。本菌についてその必要の有無を検討した。生育因子として使用したのは、サイアミン、リボフラビン、ピリドキシン、ピオチン、ニコチン酸、パントテン酸の 6 種のビタミン類である。結果は Table 5 に示す通り、いずれのビタミンの単独または混合添加でも生育促進の効果は認められなかつた。赤腐病菌は必要とする生育因子を体内で十分合成し得るものと思われる。

考 察

ノリ赤腐病菌培養のための培地で、今まで報告されているものの多くは組成不明の天然固形培地である。本菌の栄養生理または代謝生理を詳細に検討し、さらに本病の host-parasite interaction を十分解明するためには、生育に好適な完全合成培地の作製がその基礎となる。この目的のために窒素源、炭素源、生育因子、NaCl 濃度など種々の面から検討した結果、最も好適な培地として次の組成のものが見出された。

グルタミン酸 2g, K_2HPO_4 1g, KCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g 以下, 澱粉 20g (または蔗糖 30g, キンラン 10g 混合), 蒸留水 1l, pH 7.0-8.0。

この培地は菌の栄養生理や代謝産物の検討には十分その目的を達するが、長期間にわたる stock culture 用の培地としては天然培地に劣る点が見られた。

本実験の諸結果を通して、赤腐病菌の栄養生理上の大きな特質としてみられるのは窒素源の利用である。本菌は有機態窒素、特に酸性アミノ酸、アミド、アラニンなどをよく利用して生育するが、無機態窒素はほとんど利用し得ず、生育は極めて不良であつた。重要なことはこの生理上の特性と寄主であるノリの栄養状態との関係である。本病は生育良好のノリに多発し、また生育良好なノリの細胞内では菌糸の伸長も極めて速やかである。一方、生育良好のノリ組織では例外なしに本菌の好個の栄養源である酸性アミノ酸やアミドが蓄積しており⁶⁾、かつ代謝活性も高揚しており、本菌生育上の好条件が十分備わっている。このことは本病の寄生関係を栄養面から解明する上に有力な手掛りを提供するものであろう。

また、本菌はキンランを含む培地では、適応的にキンランナーゼを分泌する⁷⁾が、キンランはノリ組織表層の膜構造の主体をなすものであり⁸⁾、赤腐病菌の寄主体侵入機作を考える上で、このキンランナーゼの生成は重要である。

要 約

ノリ赤腐病菌の栄養要求および本菌の生育に適する完全合成培地について検討した。

赤腐病菌は無機塩類と糖からなる CZAPEK, HOPKINS, RECHARD 氏各培地では生育は極めて不良である。本菌培養のための窒素源としては酸性アミノ酸が最も好適であり、無機態の窒素源では生育は極めて不良である。特にアンモニヤ態窒素では菌の生育はほとんど起らない。炭素源としては澱粉が最も生育を促進し、次いで蔗糖とキンラン2者添加区が良好であつた。単糖類は好適ではない。

本菌はまた生育のために特別の生育因子を必要とせず、培地食塩濃度では2%以上の場合、生育抑制の傾向がみられた。

以上の諸結果から、赤腐病菌の栄養生理や代謝産物検討のための完全合成培地としては、栄養源としてグルタミン酸、炭素源として澱粉または蔗糖・キンランを含む液体培地が好適と思われた。

本研究の一部は昭和44, 45年度、水産庁指定調査研究総合助成事業費によつた。ここに記して謝意を表す。

文 献

- 1) 新崎盛敏: 農電研報, 3, 87-93 (1962).
- 2) S. ARASAKI, K. AKINO and T. TOMIYAMA: *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.*, 12, 203-206 (1968).
- 3) 佐々木 実・佐藤重勝: 東北水研研報, 29, 125-132 (1969).
- 4) 佐々木 実・桜井保雄: 東北水研研報, 32, 83-87 (1972).
- 5) 明日山秀文・向 秀夫・鈴木直治編: 植物病理実験法, 日本植物防疫協会, 1962, pp. 761-766.
- 6) 渡辺 競・加藤 盛: 本誌, 36, 921-925 (1970).
- 7) 宮城水試: 昭和44年度指定調査研究総合助成事業報告, 13-16 (1970).
- 8) 宮城水試: 昭和45年度指定調査研究総合助成事業報告, 5-8 (1971).