

ノリのあかぐされ病耐性の評価手法の開発

岩出将英・坂口研一*

Development of the technique for evaluating the degree of resistance
to red rot disease of Nori *Pyropia* spp.

SHOUEI IWANE AND KENICHI SAKAGUCHI

キーワード：あかぐされ病，ノリ養殖，耐病性，評価手法

三重県のノリ養殖業は、伊勢湾奥部の桑名地区から湾口部の鳥羽地区までの沿岸域で広く行われている。2011年度漁期においては、生産枚数2億7,700万枚、生産金額26億4,700万円の水揚げがあり（三重県漁業協同組合連合会 2011）、伊勢湾における冬季の基幹漁業となっている。しかしながら、近年では、韓国・中国をはじめとする海外産ノリの生産量や日本に対する輸出量も増加傾向にあり（全国海苔貝類漁業協同組合連合会 2009）、三重県のノリ養殖業をとりまく環境は厳しくなっている。

ノリ (*Pyropia* spp.) の品種は、全国に1,000種程度存在すると言われているが、特性評価がなされているものや品種履歴が整理されているものは少なく、これはノリの形態が単純で環境変異も大きいため、視覚による品種の判別や分類が困難であることが要因となっている（岩淵 2003, 淵上ら 2009）。一方で、ノリの生活史の中には、ピーカー等で培養が可能なフリー糸状体という形態が存在し、フリー糸状体では保存や持ち運びが容易なため、国内から海外への優良品種の流出も危惧されている。今後、日本のノリ養殖が厳しい国際競争の中において競争力をもって存続し続けるためには、諸外国に先駆けて優良品種の開発を行い、客観的な手法による特性評価に基づいた品種登録を促進することで、知的財産権を確保していくことが重要となってくる。今まで、優良品種の開発における品種登録は、野外養殖試験の結果を主体とした評価によって行われてきたが、養殖環境の変動によって品種の特性が変化する場合があるため、野外養殖試験だけでは、安定的かつ正当な品種の特性評価を行うことは困難であった。現在、農林水産省が所管する品種登録制度においては、草花類の品種登録数が10,000品種以上あるにもかかわらず、ノリの品種登録数は、わずか9品種に留まっている（農林水産省 2008）。種苗特

性分類調査報告書（水産資源保護協会 1981）に則った従来の野外養殖試験による品種登録審査は、実際の養殖方法にそぐわない品種特性評価手法や評価項目による部分が多いため、ノリに関して品種登録が進まない理由の一つとなっている。そこで、ノリ生産県である福岡県・佐賀県・熊本県・岡山県・三重県・愛知県・千葉県の県水産研究機関と（独）水産研究総合センターが連携のもと、知的財産権を確保し、我が国のノリ養殖の優位性を維持するために、ノリの品種登録を容易に行うための技術として、室内培養試験による簡便・迅速かつ数値的にノリ品種の特性を評価できる手法を開発した（水産総合研究センター 2012）。三重県水産研究所鈴鹿水産研究室（以下、鈴鹿水産研究室）では、室内培養試験によって、ノリ品種のあかぐされ病耐性を数値化する品種特性評価手法の開発を担当した。ノリのあかぐされ病は、全国のノリ漁場において毎年のように発生し、ノリの生産量の減少やノリ製品の品質低下の原因となり、ノリ養殖を行う上で最も被害が大きい病気である（日本水産学会 1973）。養殖に使用する品種について、あかぐされ病耐性の強弱を数値により判断し、ノリ品種のあかぐされ病耐性を適切に評価できれば、あかぐされ病の蔓延しやすい漁場や時期において耐病性に優れた品種を用いることが可能となる。

以上のことから、本報では、鈴鹿水産研究室で担当し開発したノリのあかぐされ病耐性の評価手法について報告する。なお、あかぐされ病耐性の評価にあたっては、品種登録審査の際に比較対照品種として用いられているスサビノリ基準品種 U-51（以下、U-51）を基準として、U-51 との比較による相対的な耐性を明らかにすることとした。あかぐされ病に対する U-51 の耐性は、以下の結果で示すようにノリの品種の中では中程度であり、U-51 を基準品種とすることで評価対照品種のあかぐされ病耐

*現所属：三重県水産資源課

性評価の結果が実用的になるとともに、品種登録審査も円滑に実施することが可能となることが期待される。

材料および方法

1. 特性評価試験に使用したノリ品種

あかぐされ病耐性の品種特性評価試験は、評価対象としての19品種（有明1号、佐賀8号、アオクビ、クロスサビ、大牟田1号、オオバグリン、佐賀1号、佐賀5号、水呑、青芽、スサビ緑芽、しあわせ1号、女川スサビ、フタマタスサビノリ、野間、熊本漁連3号、湯の浦、福岡1号、ZX-1）（以下、評価品種）と基準品種であるU-51をフリー糸状体の状態で（独）水産総合研究センター西海区水産研究所から提供を受けて実施した。これらのフリー糸状体を研究室においてカキ殻に穿孔させることにより、カキ殻糸状体を作製し、その後、室内採苗を行うことでノリ葉体を得て試験を実施した。

2. 特性評価試験に使用したノリ葉体ディスクの選別

評価品種およびU-51の葉体培養は、1,000ml枝付培養フラスコを用いて、鈴鹿水産研究室がある鈴鹿市の沿岸から採取した海水の塩分を30psuに調整した1/2SWM-III改変培地（尾形 1970）により行った。培養条件として、水温18℃、光周期は明期11時間：暗期13時間、光強度は $60 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に設定した（以下、統一培養条件）。評価品種とU-51を統一培養条件下で3週間培養し、顕微鏡観察によって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、ノリ葉体中央部から生検トレパンを用いて直径1mmのノリ葉体ディスクを20枚以上打ち抜き、統一培養条件下で1日間回復培養を行った。評価試験当日にノリ葉体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ものを5枚選別した。

3. 特性評価試験に使用したあかぐされ病原菌株

感染に用いた菌株は、三重県伊勢市大淀地先のノリ養殖場においてあかぐされ病に罹病した養殖スサビノリ品種から分離し、トウモロコシ煎汁寒天に半海水を加えたCMSA培地（佐々木・佐藤 1969）へ植継ぎ保存したものを使用した。

4. あかぐされ病原菌遊走子の調整

1) あかぐされ病原菌遊走子の懸濁液作出

1,000mlの三角フラスコに抗生物質無添加の新崎B培地（Arasaki et al, 1968）を700ml入れ、その中に植継

ぎ保存していたあかぐされ病原菌培養CMSA培地を1cm角に切り取ったもの5片入れ、20℃で5日間培養した。評価試験当日に培養液を30 μm ナイロンメッシュでろ過し、メッシュ上の菌体のみを塩分15psuに調整した半海水700mlに入れ、ロータリーシェイカーを用いて120rpmで振とうしながら、菌体の洗浄を開始した。その後、1, 2, 4, 6時間後に菌体を新たな半海水700mlに移すことにより合計5回の洗浄を行った。最後の洗浄時に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、既に放出されている遊走子を取り除くため30 μm ナイロンメッシュ上で菌体を半海水により十分に洗浄した。最後に50ml遠沈管に30ml入れた半海水中に菌体を懸濁し、さらに30分間振とうを行った後、遊走子を30 μm ナイロンメッシュで分離し、遊走子原液を得た。遊走子原液1.0mlに2%グルタルアルデヒド半海水を同量加えて遊走子を固定し、トーマ血球算定盤で3回計数して遊走子濃度を算定したのちに、遊走子濃度が3,000個/mlになるように遊走子原液を半海水で希釈して半海水遊走子液を調整した。

2) あかぐされ病原菌遊走子の添加量の検計

U-51のノリ葉体ディスクが5枚入った直径6cmのプラスチックシャーレを5つ準備し、そこにそれぞれあかぐされ病原菌遊走子が1,000個、5,000個、10,000個、20,000個、30,000個入った半海水を10ml加え、15分間静置することでノリ葉体ディスクへの感染を行った。その後、10mlの半海水、続いて10mlの1/2SWM-III改変培地へノリ葉体ディスクを移動させることにより洗浄し、統一培養条件下で24時間静置培養を行い、ノリ葉体ディスク上の感染箇所数について調べた。

5. 評価品種別のあかぐされ病耐性比較試験

選別した評価品種とU-51のノリ葉体ディスクをそれぞれ5枚用意し、直径6cmのプラスチックシャーレに品種ごとに別々に入れ、そこに調整した半海水遊走子液を10ml（あかぐされ病原菌遊走子の含有数は、30,000個）加え、15分間静置することでノリ葉体ディスクへの感染を行った。次に10mlの半海水、続いて10mlの1/2SWM-III改変培地へノリ葉体ディスクを移動させることにより洗浄し、統一培養条件下で24時間静置培養を行った。培養後、ノリ葉体ディスク上の感染箇所数および感染細胞数を光学顕微鏡（ $\times 400$ 倍）で計数した。あかぐされ病耐性比較試験は、3期に分けて（1期目：佐賀8号、大牟田1号、有明1号、クロスサビ、オオバグリン、アオクビ、2期目：佐賀1号、佐賀5号、水呑、青芽、スサビ緑芽、しあわせ1号、3期目：女川スサビ、野間、熊本漁連3号、湯の浦、福岡1号、ZX-1、フタマタスサ

ビノリ) 実施し, 1 評価品種につき, 合計 6 回実施した。各品種のデータの評価については, 比較試験回次ごとの U-51 における感染箇所数および感染細胞数を基準とした相対指数を用いて行った。つまり, 評価品種間における感染箇所数の比較には, 5 枚のノリ葉体ディスクの平均値から算出した評価品種のノリ葉体ディスク 1 枚あたりの平均感染箇所数を, 同様に求めた U-51 のノリ葉体ディスク 1 枚あたりの平均感染箇所数で除した「あかぐされ病相対感染箇所指数」を用いた。また, 評価品種間における感染後の 1 感染箇所あたりの平均感染細胞数の比較には, 5 枚のノリ葉体ディスクの合計感染細胞数を合計感染箇所数で除して求めた評価品種 1 感染箇所あたりの平均感染細胞数を, 同様に求めた U-51 の 1 感染箇所あたりの平均感染細胞数で除した「あかぐされ病相対感染速度指数」を用いた。評価品種間におけるあかぐされ病耐性の比較には, 評価品種のノリ葉体ディスク 1 枚あたりの平均感染細胞数を U-51 のノリ葉体ディスク 1 枚あたりの平均感染細胞数で除した「あかぐされ病相対感染指数」を用いた。1 評価品種につき 6 回の評価試験を実施したので, この 6 回の試験のデータから更に平均値と標準誤差を求め, 各評価品種のそれぞれの指数とした。

結果

1. あかぐされ病原菌遊走子の添加量の検討

U-51 のノリ葉体ディスク 1 枚あたりの感染箇所数 (平均値 ± 標準誤差) は, 感染用遊走子量が 1,000 個では 0.20 ± 0.09 箇所/disk, 5,000 個では 0.33 ± 0.11 箇所/disk, 10,000 個では 0.93 ± 0.25 箇所/disk, 20,000 個では 1.73 ± 0.26 箇所/disk, 30,000 個では 4.27 ± 0.55 箇所/disk であった。各品種のノリ葉体ディスクへの感染箇所数を比較するには, 考察で記述するように感染箇所が少なすぎる場合も多すぎる場合も難しくなるが, 遊走子を 30,000 個添加した場合の 4 箇所程度が感染箇所の比較に

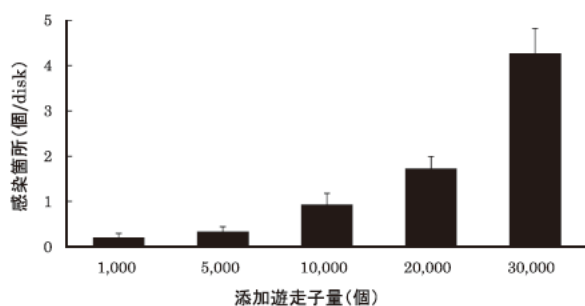


図1 あかぐされ病原菌遊走子の添加量による感染箇所数の変化 (平均値 ± 標準誤差)

は適当であり, あかぐされ病への耐性の評価にあたっては, プラスチックシャーレ 1 枚あたり遊走子を 30,000 個添加して行った (図 1)。

2. 評価品種間における感染箇所数の比較

19 品種のうち 7 品種 (湯の浦, 野間, 福岡 1 号, ZX-1, 女川スサビ, クロスサビ, 有明 1 号) は, あかぐされ病相対感染箇所指数が 1 より小さく, U-51 よりあかぐされ病感染箇所数は少なかった (図 2)。特に, 「湯の浦」は, あかぐされ病相対感染箇所指数が 0.80 ± 0.06 と最も小さかった。一方, スサビ緑芽, 水呑, 青芽, 佐賀 5 号, しあわせ 1 号の 5 品種は感染箇所指数が 4.0 以上と大きかった。

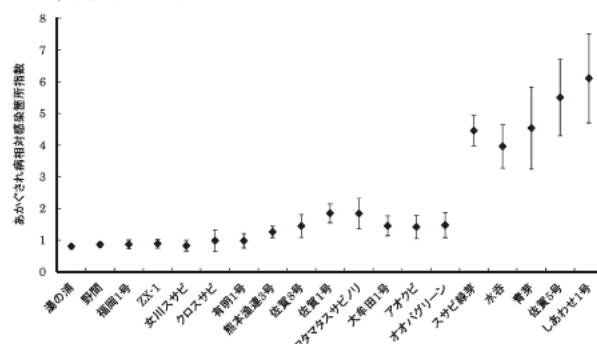


図2 評価品種のあかぐされ病相対感染箇所指数 (平均値 ± 標準誤差)

3. 評価品種間における感染速度の比較

19 品種のうち 7 品種 (湯の浦, 野間, 福岡 1 号, ZX-1, 佐賀 1 号, スサビ緑芽, しあわせ 1 号) は, あかぐされ病相対感染速度指数が 1 より小さく, U-51 より 1 感染箇所あたりの平均感染細胞数は少なかった (図 3)。特に, 「湯の浦」はあかぐされ病相対感染速度指数が 0.66 ± 0.06 と最も小さかった。一方, 「オオバグリーン」は指数が 1.84 ± 0.24 と最も大きかった。

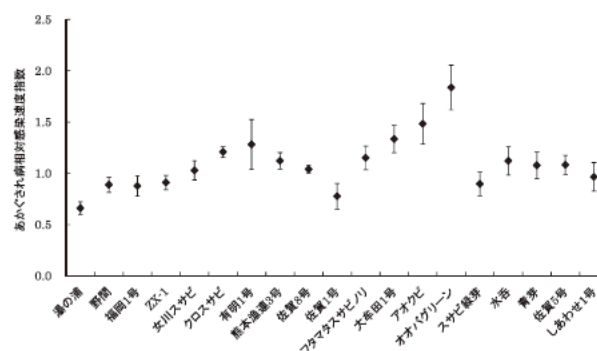


図3 評価品種のあかぐされ病相対感染速度指数 (平均値 ± 標準誤差)

4. 評価品種間におけるあかぐされ病耐性の比較

19品種のうち5品種（湯の浦、野間、福岡1号、ZX-1、女川ササビ）は、あかぐされ病相対感染指数が1より小さく、U-51より1枚あたりの平均感染細胞数は少なかった（図4）。特に、「湯の浦」はあかぐされ病相対感染指数が 0.52 ± 0.08 と最も小さく、あかぐされ病原菌に対する耐性が最も強いと考えられた。一方、「しあわせ1号」は指数が、 6.82 ± 2.36 と最も大きかった。

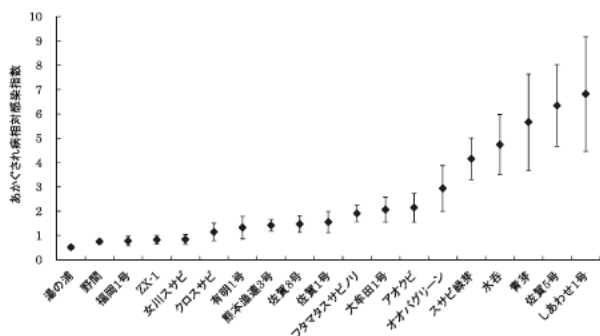


図4 評価品種のあかぐされ病相対感染指数(平均値±標準誤差)

考察

室内培養で得られるあかぐされ病原菌遊走子は、菌糸上に形成された球嚢から放出された直後は高い運動性を持つが、間もなく停止し、球形に変形した後、発芽して菌糸として生長を始める（図5）。あかぐされ病原菌についての菌の取り扱い方法や遊走子の形成・放出・感染などについては、数多くの報告がなされている（佐々木ら 1972, 加藤ら 1973, 桜井ら 1974, 藤田 1978）。例えば、藤田（1978）は、ノリ葉体の培養培地にあかぐされ病卵胞子を接種することによって、ノリ葉体にあか

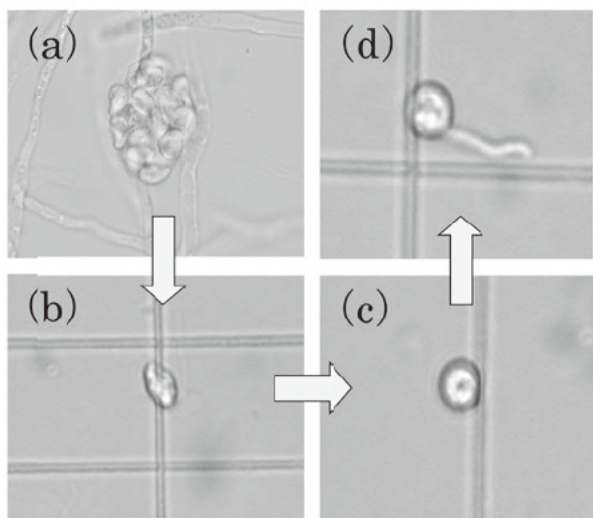


図5 時間経過に伴う遊走子の形態変化。(a) 球嚢, (b) 球嚢から放出された遊走子, (c) 運動が停止し、球形に変形した遊走子, (d) 発芽した遊走子

ぐされ病の感染による死細胞が観察されるのに4日間かかり、視覚的にノリ葉体上に病斑を確認できるまでに10日間必要であったと報告している。また、新崎B寒天培地上で生育させた菌糸体を寒天培地ごと細かく砕いて一定期間、海水等に浸漬させたのち別の培地へ浸漬することで遊走子を得る方法（押しつぶし浸漬処理）により、比較的短時間に遊走子を得ることができたという報告もある（桜井ら 1974）。この方法では、まず海水等への浸漬に8日必要とされており、別培地へ浸漬してから遊走子の放出に要した時間は早いもので8時間、放出された遊走子数については、少量と報告されている。しかしながら、ノリ葉体に感染させるために必要な遊走子量やその状態について吟味されている報告は乏しい。特性評価試験に用いるあかぐされ病原菌遊走子については、①感染時に十分な運動速度を維持していること②半海水遊走子液の濃度調整での測定誤差を少なくするため、多量の遊走子が得られること③遊走子の固定時に破壊や変形等をもたらさないこと④短期間で確実に遊走子を得ることが可能であることが必要条件となる。本研究で用いた感染用遊走子の採取方法として、富栄養半海水培地から直接、貧栄養半海水培地へ菌体を移行させ洗浄を繰り返す、最終的に少量の半海水中で放出を促す方法により、7時間程度で活性の高い遊走子を1mlあたり 10^7 個程度、安定的に得ることができた。あかぐされ病耐性の品種特性評価手法の確立においては、室内培養試験によって簡便・迅速にノリ品種の特性を評価できる手法の開発を目的としており、本研究で用いたあかぐされ病原菌遊走子の懸濁液作出法は、7時間程度で運動性のある遊走子を多量に得ることができ、評価試験に用いるあかぐされ病原菌の遊走子を確保する有効な手段と言える。

特性評価試験に用いるあかぐされ病原菌遊走子の添加量の検討では、評価品種別の耐病性を正確に評価するために、次の2点について留意しなければならない。つまり、①ノリ葉体ディスクの単位面積あたりの感染箇所が少ないと評価品種間の耐病性評価に関するデータが少なくなり信頼性が低下する。②ノリ葉体ディスクの単位面積あたりの感染箇所が多すぎると感染箇所同士の融合が起こる可能性が高くなり、正確な評価ができなくなる。以上のことを考慮し、感染させるノリ葉体に対する適切な遊走子の添加濃度について検討を行った結果、30,000個投入した場合が、 4.27 ± 0.55 (箇所/disk) となり、一番適当であることが分かった。

評価品種間における「あかぐされ病相対感染箇所指数」の平均値は0.80～6.11と品種間に7倍以上の差があったのに対して、「あかぐされ病相対感染速度指数」の平

均値は0.66～1.84となり、評価品種間の差は小さかった。あかぐされ病は、遊走子を形成することによってノリ葉体へ感染し、細胞内へ侵入後、細胞内容物を栄養として摂取しながら菌糸をノリ細胞間隙・細胞壁を貫通して平面的に感染範囲を広げる（日本水産学会 1973）。「あかぐされ病相対感染速度指数」に比べ、「あかぐされ病相対感染箇所指数」について評価品種間で大きな差があったことから、ノリ品種のあかぐされ病に対する耐病性の差異は、遊走子がノリ葉体に付着してから細胞壁を貫通して細胞内へ侵入する感染初期においてノリ品種間に差があることが要因になっていると示唆された。

ノリ漁場における本病のノリ葉体に対する感染や蔓延は、ノリ葉体への感染箇所とノリ葉体内での感染速度が重要な要素となる。そのため、あかぐされ病耐性の品種特性評価手法として、感染箇所と感染速度の要素を兼ね備えた「あかぐされ病相対感染指数」が有効と考えられる。「あかぐされ病相対感染指数」の評価品種間における指数の平均値は0.52～6.82であり、評価品種間では、13倍以上の差がみられた。あかぐされ病相対感染指数が1より小さい品種では、U-51よりあかぐされ病への耐性があり、1より大きい品種は、U-51と同程度もしくは弱いと考えられる。本研究で供試された19品種については、U-51よりあかぐされ病耐性が強いと考えられる品種が5品種で、あかぐされ病の蔓延しやすい漁場ではこれらの品種を用いてノリ養殖を行うことで、ノリ生産の安定化に結び付くことが期待できる。

本報では、あかぐされ病耐性の品種特性評価手法について開発し、評価品種19品種について、それぞれU-51に対して相対的な耐病性について数値化することができた。本手法は、品種間の耐病性の比較を行う有効な手法であり、今回評価した19品種以外でも評価を進め、あかぐされ病への耐性が大きい品種を更に探索することが求められる。また、本手法は、あかぐされ病への耐性の強さを目標とした育種を行う場合の有効なツールになるものである。ただし、あかぐされ病原菌については、生育環境要因、栄養要求性や生殖器官形成等において有明海で分離された菌株と東北産病原菌株では菌学的性状による差異が認められおり（藤田ら 1977）、また、同一海域で分離された菌株群においても菌糸の生長や有性生殖器官形成等の形態に相違があったとの報告もある（佐々木ら 1972）。このことから、本手法によってノリ品種のあかぐされ病への耐性を評価する場合は、その品種を養殖する漁場で分離されたあかぐされ病原菌を用いることが望ましいと考える。また、特性評価試験回次での数値のばらつきをより小さくし、正確に品種のあかぐ

され病耐性の評価を行うためには、使用するノリ葉体の栄養状態が常に良い状態であり、成長段階を一定にすること、あかぐされ病原菌については経代回数の制限やシャーレ内の保存・培養条件を一定にするなど、ノリ葉体とあかぐされ病原菌の両者が健全な状態で特性評価試験を行う必要があると考えられる。

要 約

1. 室内培養試験によるノリアカぐされ病原菌遊走子の懸濁液作出および遊走子添加量の検討により、あかぐされ病耐性の評価手法を開発した。
2. あかぐされ病耐性の品種特性評価には、評価品種1枚あたりの平均感染細胞数をU-51の1枚あたりの平均感染細胞数で除した「あかぐされ病相対感染指数」を用いることにより、評価品種間におけるあかぐされ病耐性について数値化することができた。
3. 評価品種の湯の浦、野間、福岡1号、ZX-1、女川サビでは、あかぐされ病相対感染指数が1より小さく、U-51より1枚あたりの平均感染細胞数は少なかったため、この5品種については、U-51よりあかぐされ病耐性が強いことが示唆された。
4. 本手法を用いることで、品種間のあかぐされ病に対する相対的な耐病性を把握することができ、あかぐされ病が蔓延しやすい漁場や時期において、耐病性に優れた品種を選択的に使用することが可能となり、良質のノリを安定生産できる一助となることが期待される。

文 献

- 三重県漁業協同組合連合会（2011）：三重県黒ノリ共販結果。三重県漁業協同組合連合会，三重。
- 全国海苔貝類漁業協同組合連合会（2009）：ノリ業界の現状。全国海苔貝類漁業協同組合連合会，東京，3-11。
- 社団法人日本水産資源保護協会（1981）：昭和55年度種苗特性分類調査報告書（あさくさのり、すさびのりの栽培試験法）。社団法人日本水産資源保護協会，東京。
- 岩淵光伸（2003）：AFLP法によるノリ養殖品種の識別。福岡水技セ研報，13，21-25。
- 淵上哲・岩淵光伸（2009）：室内培養葉体から抽出したDNAを用いたアマノリ類の品種識別。福岡水技セ研報，19，115-119。
- 農林水産省（2008）：品種登録年報。農林水産省，20，37-39。
- 水産総合研究センター（2012）：漁場環境・水産資源持

続的利用型技術開発事業のうち「水産物の原産地判別手法等の技術開発委託事業」（室内培養試験による評価法の開発）総括報告書。

- 日本水産学会（1973）：水産学シリーズ 2. のりの病気。恒星社厚生閣, 7-11, 59-69.
- 尾形英二（1970）：新しい海藻培養液 SWM-Ⅲについて。藻類. 18 (3), 171-173.
- 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。東北水研研究報告. 29, 125-132.
- Arasaki, S., Akino, K., and Tomiyama, T. (1968) : A Comparison of some physiological aspects in marine Pythium on the host and on the artificial medium. *Bull. Misaki Marine Biol. Inst. Kyoto Univ.*. 12, 203-206.
- 佐々木実・桜井保雄（1972）：各地のノリあかぐされ病原菌の生長比較。東北水研研究報告. 32, 83-87.
- 加藤盛・渡辺競・佐藤陽一（1973）：養殖アマノリの疾病に関する研究－Ⅶ各地に発生する赤腐病病原菌の栄養生理と病原性について。日水誌. 39 (8), 859-865.
- 桜井保雄・秋山和夫・佐藤重勝（1974）：ノリあかぐされ病原菌の遊走子の形成・放出について。東北水研研究報告. 33, 119-127.
- 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。日水誌. 44(1), 15-19.
- 藤田雄二・銭谷武平（1977）：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－Ⅱ。日水誌. 43 (1), 89-95.
- 佐々木実・桜井保雄（1972）：各地のノリあかぐされ病原菌の生長比較。東北水研研究報告. 32, 83-87.