

ノリのプロトプラスト，単離細胞を利用した採苗について

青戸 泉*・川村 嘉応・北嶋 博卿

Seeding Methods Using Protoplasts and Isolated Cells of
Porphyra yezoensis f. *narawaensis*

Izumi AOTO*, Yoshio KAWAMURA and Hiroaki KITAJIMA

Abstract

The possibility of seeding methods using protoplasts and isolated cells was examined in laboratory and the field by two means, respectively. One was directly using protoplasts and isolated cells embedded in agars and calcium alginate gel as seed by Stationary culture-Gel covering method and Suspending in gel-Soaking seeding string method, another was using the monospores from the regenerated cell mass.

On the former means, in the laboratory, 79 to 100% of survival bodies on seeding strings changed to the monospores or germlings on the 21th to the 23th day from beginning of culture, and their number on the strings were enough for practical seeding. On the other hand, in the field, better results were obtained in case of 14 and 18 days' culture in the laboratory on the Suspending in gel-Soaking seeding method.

On the latter means, in the laboratory, the number of seeds on the strings did not reach the standard value, but, it would be able to raise the density of seeds by increasing regenerated bodies in a flat-bottomed flask at the beginning of culture in the laboratory. On the other hand, in the field, on the 19th day from beginning of culture, 2.1 bodies of young thalli were recognized in a field of microscope of 100 magnifications. Their maximum length reached 0.343 mm on the 25th day from beginning of culture with shrinking of length by the death of the top which was due to four hours' exposure in the day time.

はじめに

ノリ養殖では，春季に果胞子をカキ殻に穿入させたのち秋季まで培養し，養殖期になってその糸状体から放出される殻胞子を採苗し種苗としている。したがって，このカキ殻糸状体培養のため長

期間にわたり多大の労力と経費を要し，また，現実的に養殖期の環境を予測することが困難であるため，その年の養殖環境に適した種苗を供給することが難しい。

* 現佐賀県栽培漁業センター (Saga Prefectural Sea Farming Center)

ところが、ノリのプロトプラスト、単離細胞を種苗として利用できれば、糸状体培養は不要となり、養殖場の環境変動にも比較的迅速に対応でき、しかも品種選抜試験で隘路となっている長期培養の必要性が解消されるため、品種開発も進展するものと考えられる。

そこで、プロトプラスト、単離細胞を寒天、ア

ルギン酸カルシウムゲルに包埋し直接種苗として利用する方法と、プロトプラスト、単離細胞から再生した細胞塊及び細胞塊から放出される単胞子を採苗し種苗として利用する方法について、室内培養試験と野外養殖試験を行い、採苗手法の可能性について検討した。

材料及び方法

1. プロトプラスト、単離細胞の作出材料及びその前培養

材料の保存方法及びその前培養条件等は先の報文¹⁾と同様である。野外養殖試験の一部については葉長5~6cmの葉体も使用したが²⁾、採苗では多量のプロトプラスト、単離細胞を必要としたため主として2~3cmの葉体を使用した。

2. プロトプラスト、単離細胞の作出方法

細胞壁消化酵素の種類を除き、基本的なプロトプラスト、単離細胞の作出は鬼頭ら²⁾の方法に準じて行った³⁾。室内培養試験では、細胞壁消化酵素は2.0% AAP にアルカリヘミセルラーゼ0.005%を混合して処理し、野外養殖試験では0.1%のアルカリヘミセルラーゼ単独により処理した。

3. プロトプラスト、単離細胞の採苗と培養

以下に述べる採苗法の概要を Fig. 1. に示した。

1) 室内培養試験

(1) 静置-被覆法

液体培地中でプロトプラスト、単離細胞を採苗糸に直接付着させた後、寒天、低融点アガロース、アルギン酸ナトリウムゾル中にこの採苗糸を浸漬し、ゲル化させて採苗糸を被覆して培養する方法(以下静置-被覆法と略す、Stationary culture - Gel covering method) について検討した。

試験は採苗に用いるプロトプラスト、単離細胞密度を変えて行った。

実験 1

直径13cmの深型シャーレにプロトプラスト、単離細胞を $1.5 \times 10^2 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 懸濁した海水1,333 mLを入れ、12cmに切断したクレモナ20番手の糸数

本をシャーレの底に敷き、一昼夜静置して直接付着させた。プロトプラスト、単離細胞が付着した採苗糸は引上げて、1.0, 2.0, 3.0%の寒天及びアルギン酸ナトリウムゾル中にそれぞれ10秒程度浸漬した。寒天は冷却によりゲル化させ、また、アルギン酸ナトリウムは $100 \text{ m mol} \cdot \ell^{-1}$ の塩化カルシウム添加海水中に1時間浸漬してゲル化(以下、アルギン酸ゲルと略す)させた後、滅菌海水に移して余分の塩化カルシウムを除いた。

採苗したプロトプラスト、単離細胞の培養は1ℓ容の球状平底フラスコを用い、培地は改変 SW M - III、日長条件11L : 13D、照度3,500~4,000 lx、温度18°C、培地の塩分濃度28.5‰とした。培地中にはペニシリンGカリウム12万単位、ストレプトマイシン硫酸塩 $200 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ を添加した。培地は3日毎に全量交換した。また、アルギン酸ゲルを用いた採苗、培養ではゲルを維持するために、培地中に $5 \text{ m mol} \cdot \ell^{-1}$ の塩化カルシウムを加えた。

実験 2

プロトプラスト、単離細胞の密度を $8.2 \times 10^1 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ とした海水1,000mℓを深型シャーレに入れて採苗糸に付着させ、0.8, 1.0, 2.0, 3.0%の寒天及びアルギン酸ナトリウムゾル、1.0, 2.0%の低融点アガロースに浸漬し、ゲル化させ培養した。なお、採苗時の寒天は36.0°C、アガロースは28.0°Cに保った。

培養条件、ゲル化の方法は実験1と同様である。

(2) 懸濁-浸漬法

寒天及びアルギン酸ナトリウムゾルに、プロト

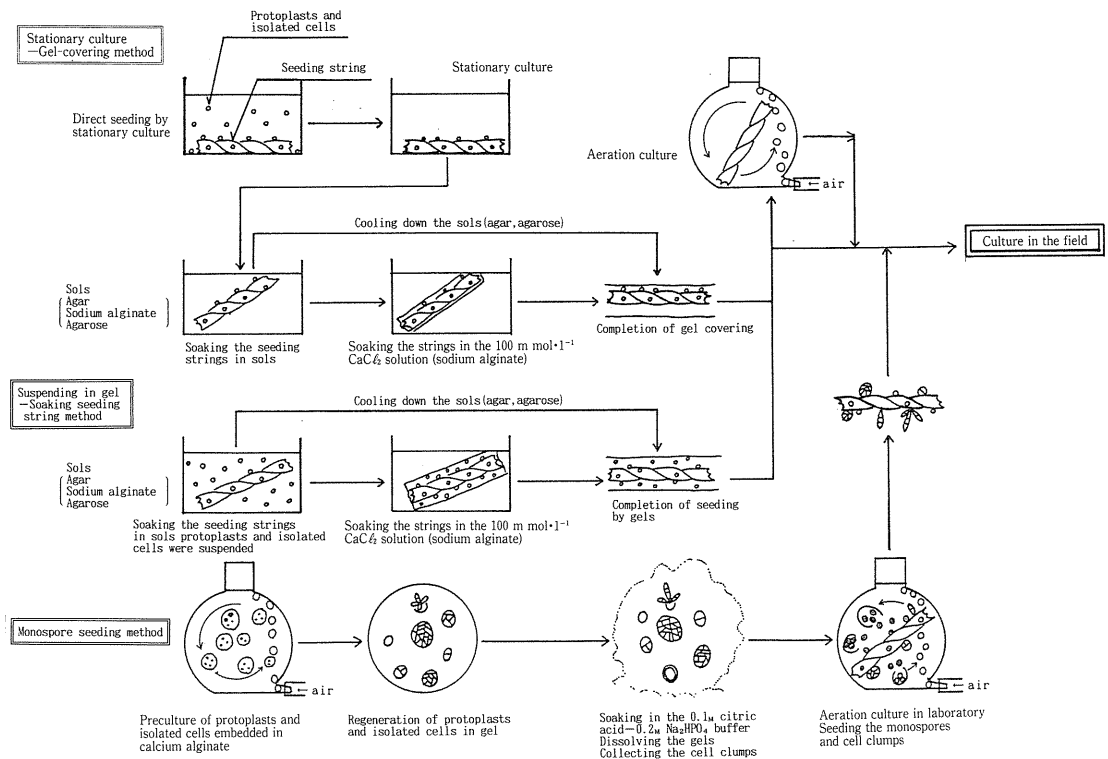


Fig. 1. ノリのプロトプラスト、単離細胞を用いた採苗手順の概略

Out line of seeding methods used the protoplasts and isolated cells of *P. yezoensis f. narawaensis*.

プラスト、単離細胞を懸濁し、この中にクレモナ採苗糸を浸漬して引き上げ、ゲル化させて採苗し、培養する方法(以下懸濁-浸漬法と略す、Suspending in gel -Soaking seeding string method)について検討した。

試験は採苗に用いるプロトプラスト、単離細胞の密度を変えて行った。

実験 1

アルギン酸ナトリウムゾル 9 ml に 2.5×10^4 cells \cdot ml $^{-1}$ のプロトプラスト、単離細胞懸濁液 1 ml を混合して 1% のゾル濃度とし、クレモナ採苗糸を 10 秒間浸漬して引上げた。培養条件、ゲル化の方法は静置-被覆法と同様である。

実験 2

寒天及びアルギン酸ナトリウムゾル 9 ml に 1×10^5 cells \cdot ml $^{-1}$ のプロトプラスト、単離細胞懸濁液 1 ml を混合し、実験 1 と同様にして採苗、培養

した。なお、寒天のゲル化は冷却によった。

実験 3

静置-被覆法及び後述する単胞子法で採苗する場合と異なり、懸濁-浸漬法で採苗する場合、プロトプラスト、単離細胞の一部はゲルの膜の中に分散しており、採苗当初は採苗糸に直接付着できず、培養の進行とともに仮根を伸ばして初めて付着すると考えられる。したがって、採苗初期にゲルが剥落すればプロトプラスト、単離細胞も剥落し、採苗が不能となる。

そこで、アルギン酸ゲルで採苗し、室内培養した場合について、培養開始後に採苗糸のゲルをキレーターで溶かして再生個体の採苗糸への直接付着状況について観察した。

プロトプラスト、単離細胞を 2.4×10^4 cells \cdot ml $^{-1}$ の密度とした懸濁液 1 ml を、アルギン酸ナトリウムゾル 9 ml に溶かして採苗後ゲル化させ、通

気培養した。このようにして採苗，培養した採苗糸の一部を10，15，19日目に切り取り，まず採苗糸上の生残個体数を計数した。引き続きこの採苗糸を McIlvaine 緩衝液 (0.1mol citric acid - 0.2mol Na₂HPO₄ buffer, pH 7.4)⁴⁾ とともにメジューム瓶中で振盪し，ゲルを除いてから糸上の付着個体数を計数した。培養条件は静置-被覆法と同様である。

(3) 単孢子法

プロトプラスト，単離細胞をアルギン酸ゲル中で一定期間培養して細胞塊まで再生させ，ゲルを溶解してこの細胞塊を回収し，採苗糸とともに液体培地中で通気培養して，細胞塊と細胞塊から放出される単孢子を採苗して培養する方法 (以下単孢子法と略す，Monospore seeding method) について検討した。

実験 1

前培養として，プロトプラスト，単離細胞はアルギン酸ゲルに包埋後，改変 SWM-III 培地中で通気培養し，8日目に McIlvaine 緩衝液 (pH 7.4) とともにメジューム瓶に入れ振盪機で振盪してゲルを溶解した。この溶液を600rpmで5分間遠心した後，上澄みをピペットで除き，0.3mol・ℓ⁻¹ マニトールを含む NaCl 滅菌海水，0.1mol・ℓ⁻¹ マニトールを含む天然滅菌海水，天然滅菌海水で順次洗浄と遠沈を繰り返し，細胞塊を洗浄して回収した。海水の塩分濃度はいずれも28.5%とした。回収した細胞塊は，0.5ℓ容の球状平底フラスコにクレモナの採苗糸と共に収容し，通気培養して単孢子と細胞塊の採苗糸への付着状況を観察した。

実験 2

プロトプラスト，単離細胞を11日間アルギン酸ゲル中で培養後ゲルを溶解し，細胞塊を回収して，手製の小形網 (Fig. 2.) とともに5ℓ容の球状平底フラスコに収容，培養して採苗を行った。

前培養及び採苗中のプロトプラスト，単離細胞の培養条件は，実験1，2ともに培地は改変 SWM-III，日長条件11L:13D，照度3,500~4,000lx，温度18°C，培地の塩分濃度28.5%とした。培地中にはペニシリンGカリウム12万単位，ストレプトマ

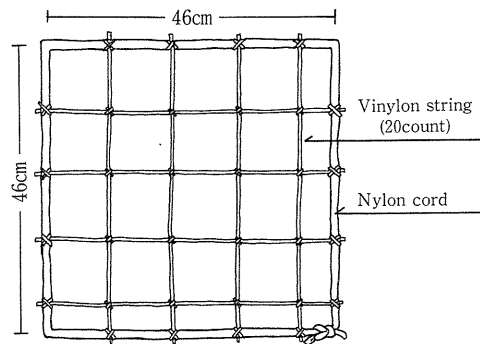


Fig. 2. 採苗，培養試験に用いた方形網
Hand made small square net for seeding and culture experiments.

イシン硫酸塩200mg・ℓ⁻¹を添加した。前培養中は3日毎に培地を全量交換した。また，採苗中は第一回目の培地交換を14日目に行い，以後3日毎に全量を交換した。

2) 野外養殖試験

(1) 懸濁-浸漬法

2.4×10⁵ cells・ml⁻¹に調節したプロトプラスト，単離細胞懸濁液5mlと，アルギン酸ナトリウム45mlを50ml容のビン中で混合して1.0%とした。この中にクレモナ20番手の糸3mを10秒間浸漬し，引上げてゲル化させた。プロトプラスト，単離細胞を採苗した網のうち，3日間あるいは14日間室内培養したものについては，1991年1月14日に，7日間あるいは18日間のものについては1月18日に六角川沖の本水試験地に各々張り出した。張り出し後は，幅1.5m，長さ18mのノリ養殖網に結び付けて固定し，日中4時間の干出を与えながら養殖した。

室内培養は5ℓの球状平底フラスコを用い，培養条件は静置-被覆法及び懸濁-浸漬法による室内培養試験と同様である。

(2) 単孢子法

プロトプラスト，単離細胞をアルギン酸ゲルビーズに包埋して9日間室内培養した後，先述の方法で細胞塊を回収し，手製の採苗網とともに5ℓ容の球状平底フラスコに収容し，さらに6日間室内で培養してから，1991年1月14日に試験地に

張り出して養殖した。採苗糸の室内培養条件は単孢子法による室内培養試験と同様である。また、懸濁一浸漬法による野外養殖試験と同様、養殖開始当初から日中4時間の干出を与えた。なお、野外養殖試験地周辺には漁業者のノリ網が多数設置されており、単孢子を放出している。したがって、単孢子法で採苗された個体とこれらの単孢子を区別するため、採苗していないクレモナ20番手の糸を同時に張り、幼芽の付着、生長状況を比較した。

4. 採苗糸上でのプロトプラスト、単離細胞及び単孢子、細胞塊の付着状況及び再生、生長の観察

静置一被覆法、懸濁一浸漬法採苗による室内培

養試験では、数日おきに同一の採苗糸を取り出して、また、単孢子法については一回目の実験では11.2cmに切り取った同一の採苗糸について、2回目については採苗糸の一部をそのつど新たに網から切り取り、観察を行った。

野外養殖試験については、いずれの採苗法でも3～4日毎に採苗糸および網の一部を切り取って試験場に持ち帰り観察した。

観察は、生物顕微鏡、実体顕微鏡を使用した。また、葉体の測定は大きさにより適直接眼マイクロメーター、定規を使用した。

結果及び考察

1. 室内培養試験

1) 静置一被覆法

実験1

採苗糸上でのプロトプラスト、単離細胞の再生個体数の変化と培養18日目の幼芽数を Fig. 3. に示した。

寒天及びアルギン酸ゲルの皮膜がやや不透明になるため、再生個体が小さいうちは一部で見落としがあり、このため培養が進むにつれて再生個体数が増加する実験区があった。しかし、最も再生個体数の少ない寒天3.0%区でも培養12日目には顕微鏡の100倍1視野(径約1.8mm)当りの採苗糸上に8.5個体、18日目の幼芽数は9.6個体となっており、いずれの濃度でも採苗糸上でプロトプラスト、単離細胞が生き残って生長を続け、単孢子化により幼芽を形成していることが確認された。

実験2

プロトプラスト、単離細胞の採苗糸上での再生形態の変化を Fig. 4. に、また葉体の生長を Fig. 5. に示した。

プロトプラスト、単離細胞は培養に伴って細胞塊から単孢子化を経て葉体、または直接幼芽化して葉体へと再生する傾向を示し、培養21～23日目には生残個体の79.0～100.0%が単孢子化ないし

幼芽化して生長し、葉体となるのが観察された(Plate 1. A. B.)。

カキ殻糸状体を用いた漁業者による実際の採苗では、顕微鏡の100倍1視野当り数個の殻胞子の付着が適当とされており、静置一被覆法での採苗でも十分な芽数を得ることができた。したがって、室内培養では、この方法によりプロトプラスト、単離細胞を直接採苗し、培養することが可能と考えられた。

低融点アガロースを用いた採苗法については、岩淵ら⁵⁾が報告している。低融点アガロースは採苗の際に寒天より低温に保て、プロトプラスト、単離細胞に対する温度障害を軽減できる利点があるが⁶⁾、寒天と同一濃度ではゲル強度が低下し、早期に採苗糸上から剥落することが懸念された。しかし、試験中の観察では、ゲルの膜は長期にわたって安定しており、寒天、アルギン酸ゲルを用いた場合と差はなかった。

静置一被覆法の問題点として、採苗糸に付着するプロトプラスト、単離細胞の密度が不均一になりやすく、実験1では再生個体の密度が高く、途中で再生形態の追跡が困難となった。このため、実験2では密度を半分以下に押えたが、逆に再生個体の密度が薄くなりすぎた。これは、液体培地

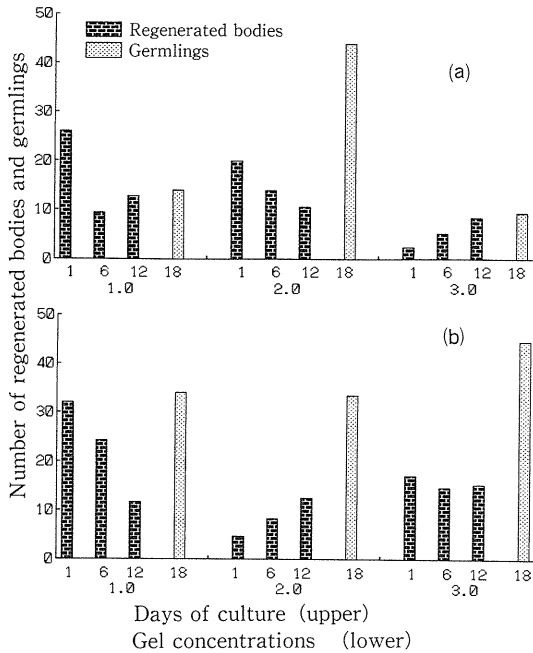


Fig. 3. 採苗糸上での生長個体数の変化と培養18日目の幼芽数（静置一被覆法，室内培養）

Changes of number of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells during the culture period (12days) and number of germlings at 18th day from beginning of culture on seeding strings.

Protoplasts and isolated cells were seeded by Stationary cultivation-Gel covering method and cultured in laboratory.

- (a). Seeding by agars of 1.0-3.0% concentrations
- (b). Seeding by calcium alginate gels of 1.0-3.0% concentrations

中ではプロトプラスト，単離細胞の生残率が不安定であること，培地の対流や動きによりプロトプラスト，単離細胞が均一に分布しないことなどによると推定される。

採苗糸上で葉体に再生した個体の生長は，寒天濃度0.8，1.0，2.0，3.0%では，培養31日目にそれぞれ23.2，31.8，35.0，19.3mm，アルギン酸ゲル0.8，1.0，2.0，3.0%では26.4，24.8，12.8，20.0mm，1.0，2.0%のアガロースによる静置一被覆法では41.0，25.3mmとなり，ゲル強度が低く，

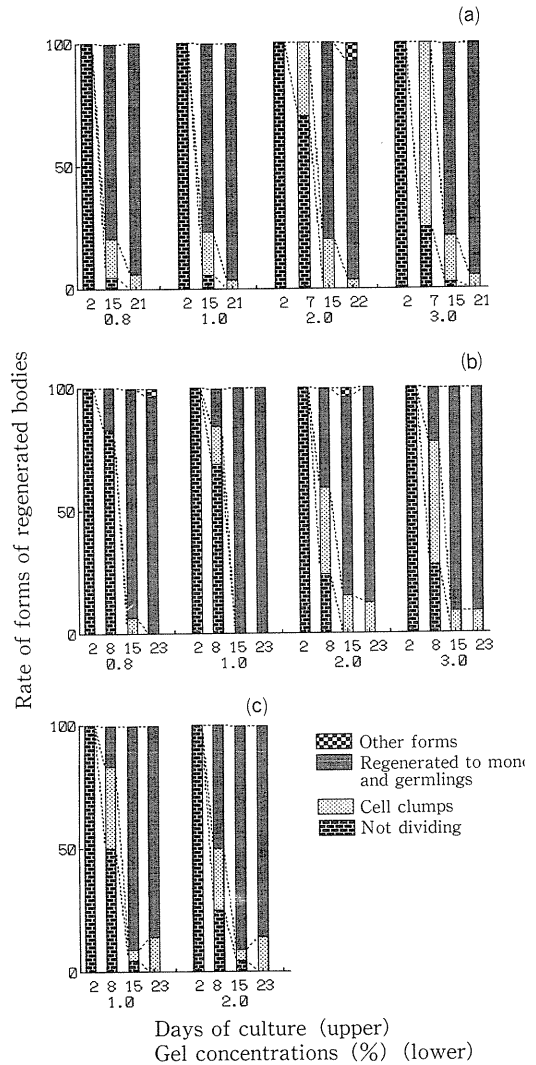


Fig. 4. 採苗糸上での生長個体の形態の変化（静置一被覆法，室内培養）

Changes of forms of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells on seeding strings.

Protoplasts and isolated cells were seeded by Stationary culture-Gel covering method and cultured in laboratory.

- (a). Seeding by agars of 0.8-3.0% concentrations
- (b). Seeding by calcium alginate gels of 0.8-3.0% concentrations
- (c). Seeding by agarose of 1.0 and 2.0% concentration

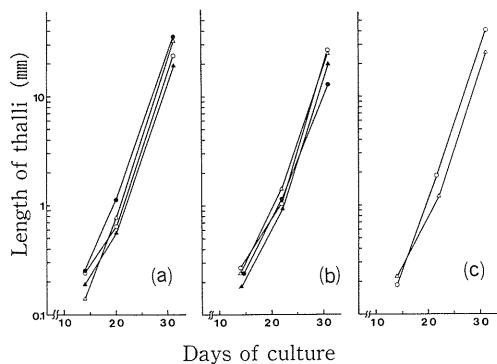


Fig. 5. 採苗糸上で葉体となった個体の生長（静置一被覆法，室内培養）

Growth of thalli regenerated from protoplasts and isolated cells cultured in laboratory on seeding strings.

Protoplasts and isolated cells were seeded by Stationary cultivation-Gel covering method.

- (a). Seeding by agars of 0.8-1.0% concentrations
- (b). Seeding by calcium alginate gels of 0.8-1.0% concentrations
- (c). Seeding by agaroses of 1.0 and 2.0% concentrations

より柔らかいもの、採苗糸を被覆した膜のより薄いもので葉体の生長が早い傾向を示した。

2) 懸濁一浸漬法

実験 1

採苗糸上での再生個体数の変化と培養18日目の幼芽数を Fig. 6. に示した。

懸濁一浸漬法ではプロトプラスト，単離細胞は採苗糸上に付着したゲル中に分散しているため，静置一被覆法に比較して再生初期は個体の確認が困難であり，個体の生長にともない見落とした個体が明らかになった。このため Fig. 6. に示したような採苗糸上での再生個体の増加が起き，培養開始後12日目には顕微鏡の100倍1視野当り27.1個体が確認された。また，培養18日目の幼芽数は20.1個となっていた。しかし，このことからアルギン

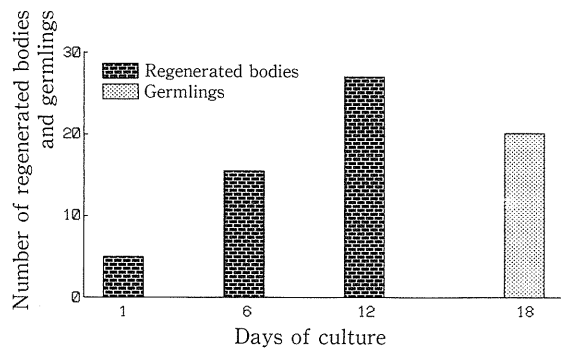


Fig. 6. 採苗糸上での生長個体数の変化と培養18日目の幼芽数（懸濁一浸漬法，室内培養）

Changes of number of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells during the culture period (12days) and number of germlings at 18th day from beginning of culture on seeding strings.

Protoplasts and isolated cells were seeded by Suspending in gel-Soaking seeding strings method used calcium alginate gel of 1.0% concentration and cultured in laboratory.

酸ゲルを用いた懸濁一浸漬法でも，採苗したプロトプラスト，単離細胞の生残，再生と単胞子化が進行しているのが明らかである。

実験 2

1.0%の寒天及びアルギン酸ゲルを用いた場合の採苗糸上でのプロトプラスト，単離細胞の再生形態の変化を Fig. 7. に，葉体の生長を Fig. 8. に示した。

懸濁一浸漬法による採苗，培養でも，静置一被覆法と同様細胞塊から単胞子化する個体及び直接幼芽化する個体の比率が著しく高く，培養開始後23日目にはそれぞれ100，92.0%となった。

葉体に再生した個体の生長は，1.0%寒天とアルギン酸ゲルで培養開始後31日目にはそれぞれ27.5，30.2mmとなり（Plate 1. C.），低融点アガロースに

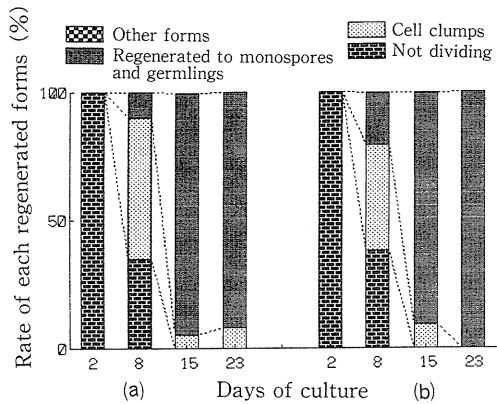


Fig. 7. 採苗糸上での生長個体の形態の変化 (懸濁一浸漬法, 室内培養)

Changes of forms of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells on seeding strings.

Protoplasts and isolated cells were seeded by Suspending in gel-Soaking seeding string method and cultured in laboratory.

- (a). Seeding by calcium alginate gel of 1.0% concentration
- (b). Seeding by agar of 1.0% concentration

は及ばないものの、寒天及びアルギン酸ゲルを用いた静置一被覆法とほぼ同様の生長速度を示した。

実験 3

室内培養日数とプロトプラスト, 単離細胞からの再生個体の採苗糸への直接付着率の関係を図. 9. に示した。

付着率は10, 15, 19日目にそれぞれ27.0, 40.6, 73.4%となり, 採苗個体が直接付着するのにやや時間を要した。しかし, 室内培養の場合, 寒天, アルギン酸ゲルいずれも安定して長期間糸上に残っており問題はないようであった。

以上のことより, 寒天及びアルギン酸ゲルを用いた懸濁一浸漬法によってプロトプラスト, 単離細胞を採苗し, 室内培養することは十分可能と考えられる。

アルギン酸ゲルを溶解するキレーターとして燐酸緩衝液の利用の検討も行った。しかし, 高濃度ではゲルの溶解が速やかに行えるが, 細胞塊はほ

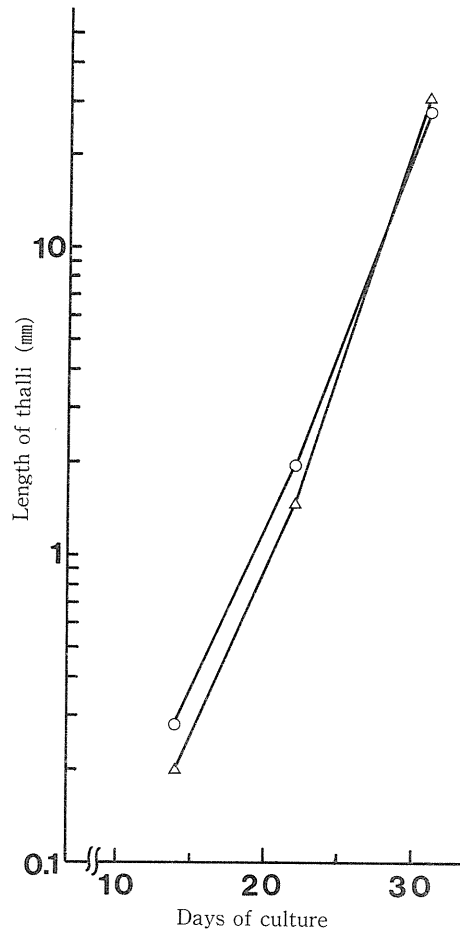


Fig. 8. 葉体となった個体の生長 (懸濁一浸漬法)

Growth of thalli regenerated from protoplasts and isolated cells cultured in laboratory on seeding strings.

Protoplasts and isolated cells were seeded by Suspending in gel-Soaking seeding string method.

- △: Seeding by calcium alginate gel of 1.0% concentration
- : Seeding by agar of 1.0% concentration

とんど死滅し, 障害が著しくて利用できなかった。また, 低濃度でも障害が見られ, かつゲルの溶解に長時間を要し, この場合も利用できなかった。

3) 単胞子法

採苗糸上での細胞塊数, 単胞子数, 幼芽数, 単胞子化個体数 (単胞子化しつつある個体の数) を

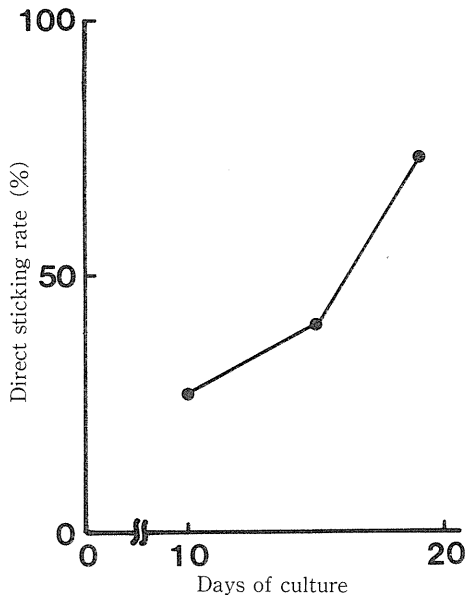


Fig. 9. プロトプラスト, 単離細胞からの生長個体の採苗糸への直接付着状況

Changes of direct sticking rate of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells to seeding strings.

Protoplast and isolated cells were seeded by Suspending in gels-Soaking seeding string method used calcium alginate of 1.0% concentration and cultured in laboratory.

Fig. 10. に示した.

採苗糸上での付着個体の形態を見ると, 培養日数の経過と共に幼芽数, 単胞子化個体数の増加が見られ, 細胞塊をゲル中から回収して液体培地中で通気培養しても単胞子化が進行しているものと思われる.

実験1の採苗では226個体, 実験2回目の採苗では17,420個体を回収, 使用して採苗した(Plate 1. D.). 実験1の採苗では, プロトプラスト, 単離細胞の培養開始後26日目, 採苗後19日目で採苗糸100mm当り34.8個体, 実験2の採苗ではプロトプラスト, 単離細胞の培養開始後28日目, 採苗後18日目で44個体と実際の漁業者の採苗基準より低い値であった。ただ, 採苗時の細胞塊密度を高めること

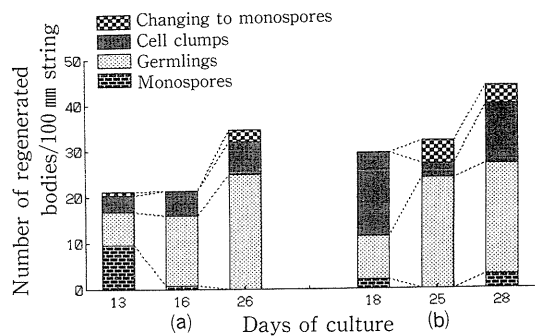


Fig. 10. 採苗糸上での生長個体数と形態の変化(単胞子法採苗, 室内培養)

Changes of number and forms of regenerated bodies from monospores and cell clumps on seeding string.

Monospores and cell clumps were seeded by Monospore seeding method and cultured in laboratory.

(a). Seeding used 277 regenerated bodies from protoplasts and isolated cells

(b). Seeding used 17,420 regenerated bodies

により採苗個体数が増加したことから, 採苗時の細胞塊量の密度を高めることにより, 採苗糸上での採苗個体密度の向上と採苗規模の拡大が可能と考える。

採苗個体のうち, 葉体の生長を Fig. 11. に示した。実験1では, プロトプラスト, 単離細胞の培養開始後44日目, 採苗後37日目で50mmに達した。実験2の採苗では, 培養開始後44日目, 採苗後34日目で20.9mmに達した。なお, 実験2の採苗で生長がやや劣り, また, プロトプラスト, 単離細胞培養開始後41日目から44日目の生長の鈍化は, 採苗糸を採苗に用いた同一のフラスコで培養し続けたため, 器壁に付着した個体が生長し, 過密となったためと思われる。

静置-被覆法, 懸濁-浸漬法に比較すると, 葉体の生長は一回目の採苗で約10日程度の遅れとなっているが, これは細胞塊を回収し, 採苗された単胞子が発生し始めるまでの操作上の遅れである。

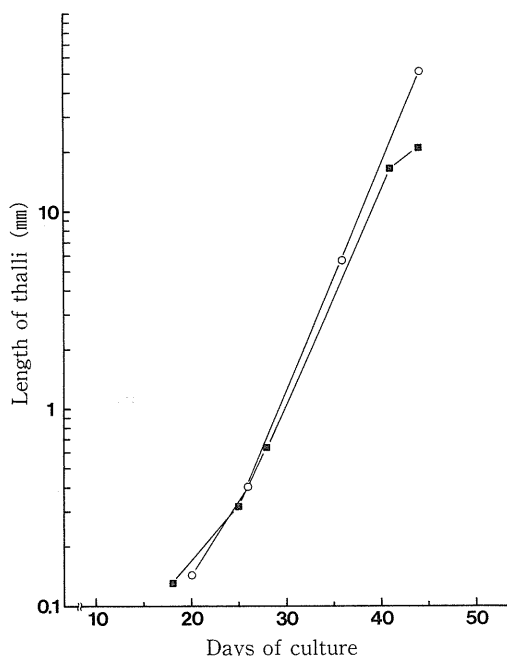


Fig. 11. 採苗糸上で葉体となった個体の生長（単孢子法，室内培養）

Growth of thalli regenerated from monospores and cell clumps on seeding strings.

Monospores and cell masses were seeded by monospore seeding method and cultured in the laboratory.

○ : Seeding used 277 regenerated bodies from protoplasts and isolated cells

■ : Seeding used 17,420 regenerated bodies

2. 野外養殖試験

1) 懸濁-浸漬法

採苗糸及び採苗網上での個体数（生残個体数）と幼芽数の増減を Fig. 12. に示した。また，単孢子化を経て葉体となった個体の生長と養殖試験地の水温変動を Fig. 13. に示した。付着個体の観察は，そのつど採苗糸を切り取って行ったため，採苗糸上の個体数，幼芽数の変動には，サンプルの違いによる変動を含んでいる。

3日間室内培養し，4日目に野外養殖に移した場合には，採苗後15日目，野外養殖12日目に61mmの採苗糸上に細胞塊が1個確認されただけで，生

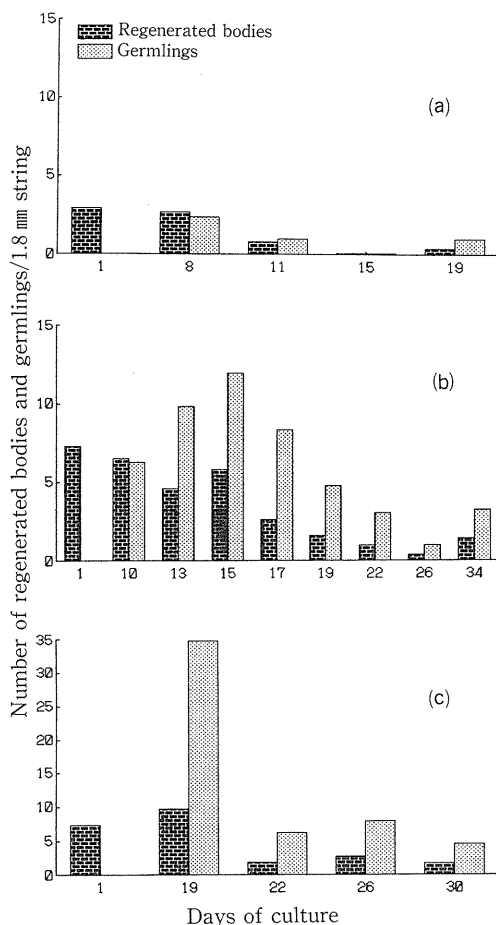


Fig. 12. 採苗糸上での生長個体数と幼芽数（懸濁-浸漬法，野外養殖）

Changes of number of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells seeded by Suspending in gels-Soaking seeding string method and number of germlings on seeding strings.

Seeded protoplasts and isolated cells were cultured in the field after culture in laboratory for 7, 14 and 18 days.

(a). Cultured in laboratory for 7days

(b). for 14days (c). for 18days

残数は著しく少なかった。

7日間室内培養したものでは，採苗後19日目，野外養殖12日目には，個体数は顕微鏡の100倍1視野（1.8mm）当り0.4個体であったが，単孢子化の

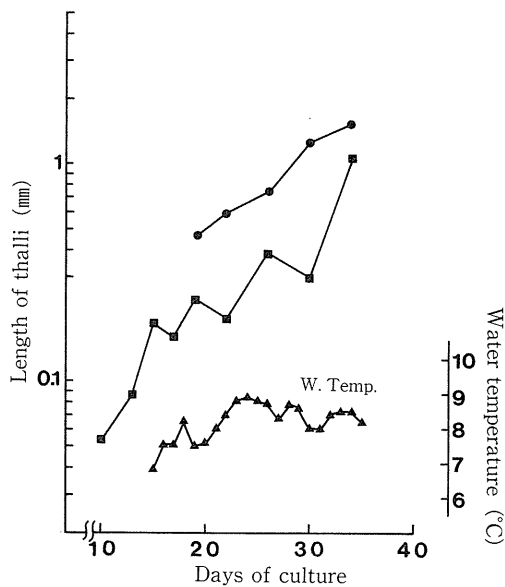


Fig. 13. 葉体の生長と養殖場の水温変化（懸濁一浸漬法，野外養殖）

Growth of thalli regenerated from protoplasts and isolated cells, and changes of water temperature in the field.

They were seeded by Suspending in gel-Soaking seeding string method and cultured in the field.

■ : Cultured in laboratory for 14days

● : for 18days

進行にともない1視野当りの平均幼芽数は0.98と became.

14日間室内培養したものは，採苗後30日目，野外養殖16日目で個体数は1視野当り1.1個体，幼芽数は4.1個体となった。

18日間室内培養したものは，採苗後30日目，野外養殖12日目は1視野当り個体数は1.8個体，幼芽数は4.6個体となった。

以上の結果から，本法で採苗し野外養殖する場合，室内培養期間を長くすれば採苗率を向上させることができると考えられが，7日間程度では短か過ぎるようである。採苗時のプロトプラスト，単離細胞密度を高め，2～3週間室内培養すれば，採苗効果は向上するものと考えられる。

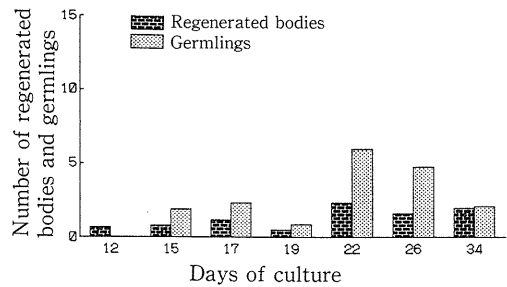


Fig. 14. 採苗糸上での生長個体数と幼芽数（単胞子法採苗，野外養殖）

Changes of number of regenerated bodies from monospores and cell clumps.

They were seeded by Monospore seeding method and number of germlings on seeding strings.

採苗個体の生長は，室内培養14日間では採苗後34日目で平均1.06mm，18日間では1.52mmとなった。

ノリ養殖では，通常採苗直後の網は短時間の干出にとどめ，ノリの生長につれて徐々に干出時間を長くし，干出による芽傷みを防止している。今回養殖試験を開始した時点では，六角川河口の試験地周辺でノリの病害の一つであるスミノリ症が蔓延しており，無干出条件で室内培養していた採苗網を馴致無しに日中4時間の干出条件での養殖に移した。また，水温は年間で最も低い時期に当たっていた。このため，幼芽先端部の枯死が一部で見られ，生長も著しく鈍く，培養水温が高く，無干出条件の室内培養期間が長いほど採苗効率，生長速度が優れているという結果となったが，比較的過酷な条件下でもこの方法により採苗して野外養殖ができることが示された（Plate 1. E. F.）。

2) 単胞子法

単胞子法で採苗し，野外養殖した場合の付着個体数と幼芽数の変化を Fig. 14.，葉体の生長を Fig. 15. に示した。

プロトプラスト，単離細胞の採苗後26日目，野外養殖開始後11日目には，付着個体数は顕微鏡の100倍1視野当り1.6個体，幼芽数は4.7個体，野外養殖19日目には付着個体数は1.95個体，幼芽数は2.1個体となった。葉体の生長を見ると，プロトプ

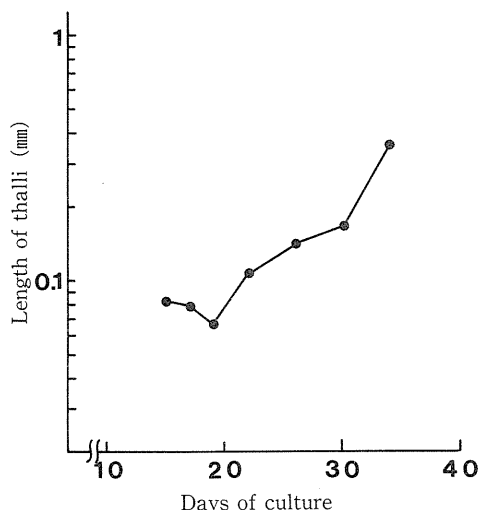


Fig. 15. 単孢子法採苗により野外養殖した場合の葉体の生長

Growth of thalli regenerated from monospores and cell clumps seeded by Monospore seeding method and cultured in the field.

ラスト、単離細胞の培養開始後34日目、野外養殖開始後25日目には0.343mmとなったが、野外養殖開始後数日間は生長の低下が見られた (Plate 1. G.).

先に懸濁-浸漬法の項で述べたように、漁場の環境が著しく不良であったことから、干出に対す

る馴致無しに日中4時間の干出を与えた場合、懸濁-浸漬法に比較して本法で採苗した幼芽は干出の影響を受けやすく、採苗網の張り出し後数日間は葉体の先端部が枯死する個体が多く見られ、生長の遅れの原因となったと思われる。

3. 静置-被覆法、懸濁-浸漬法及び単孢子法で採苗、養殖する際の注意点と問題点

懸濁-浸漬法で用いたアルギン酸ゲルの皮膜は極く薄いものであったが、単孢子法による採苗に比較して野外養殖での干出による芽傷みの程度が軽微で、幼芽の保護に一定の効果があるものと思われる。また、単孢子法の場合、干出により障害は受けていたが、細胞塊、幼芽とも生残しており、干出に対する馴致を適切に行えば十分採苗法として利用できるものと思われる。

懸濁-浸漬法及び静置-被覆法の難点として、アルギン酸ゲル及び寒天ゲルは膜がもろく、採苗規模を大きくする際の障害になるものと考えられ、これらに代わる適切な膜の開発が必要であろう。これに対して、単孢子法では干出に注意すれば比較的採苗網の取扱が簡便なので、大規模化する事により採苗法として有効であると考えられる。

以上の3法とも、採苗には多量のプロトプラスト、単離細胞が必要であり、ノリの細胞壁を除くためのより効率的で安価な酵素の探索が必要である。

要 約

1. 静置-被覆法と懸濁-浸漬法の2法により、プロトプラスト、単離細胞を直接種苗として採苗し、室内で通気培養した。
2. 静置-被覆法、懸濁-浸漬法いずれのゲル濃度の場合も、培養開始後21~23日目には採苗糸上の生残個体の79.0~100.0%が単孢子化ないし幼芽化し、また、漁業者の養殖における採苗基準とされている、顕微鏡の100倍一視野(径1.8mm)当りの採苗糸上の個体数も十分な量であった。
3. 採苗糸上で葉体に再生した個体の生長はゲルの濃度が低く、膜の薄いもので早い傾向を示した。

4. アルギン酸カルシウムゲルを用いて、懸濁-浸漬法により採苗した採苗糸のゲルを一定期間の培養後溶解し、直接採苗糸に付着し再生している個体の比率を調べた。直接付着率は培養開始後10日目には27.0%、15日目で40.6%、19日目で73.4%となった。
5. プロトプラスト・単離細胞の密度を変えて単孢子法による採苗を行い、室内で通気培養した。採苗個体数は養殖基準より低い値であったが、採苗時にフラスコに収容する個体数を増加することで、採苗密度を高くすることができると考えられ

た。採苗糸上での葉体の生長は低密度の場合、採苗後37日目で50mm、高密度の場合、34日目で20.9mmに達した。

6. 懸濁-浸漬法による野外養殖試験では、室内培養14日間と18日間の場合に良好な結果が得られた。幼芽数は室内培養14日間の場合、顕微鏡の100倍1視野当り採苗後30日目、野外養殖開始後16日目で4.1個体、18日間の場合、採苗後30日目、野外養殖12日目で4.6個体となった。

7. 採苗糸上での葉体の生長は、室内培養14日間では採苗後34日目で平均1.06mm、18日間では1.52

mmとなった。

8. 単胞子法で採苗し、野外養殖した場合、養殖開始後19日目で顕微鏡の100倍1視野当り2.1個体の幼芽が観察された。

9. 養殖試験地の環境が厳しく、室内培養から野外養殖に移す際に、干出に対する馴致無しで日中4時間の干出を与えながら培養したため、先端部の枯死による幼芽の葉長の収縮が見られたが、再生葉体は、野外養殖開始後25日目には0.343mmに達した。

謝 辞

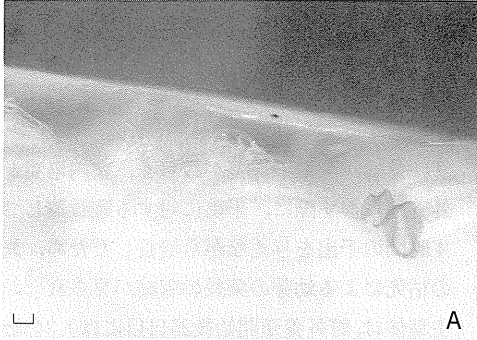
この研究を行うにあたり、懇切なご助言を頂いた水産大学校教授鬼頭鈞博士に心から御礼申し上げます。

ける。

文 献

- 1) 青戸泉・馬場浴文・北嶋博卿 1992:ゲル包埋によるノリのプロトプラスト、単離細胞の通気培養と再生。本誌, 57-64.
- 2) 鬼頭 鈞 1985:ノリのプロトプラストの作出と個体の再生。研究ジャーナル, 8(9), 20-24.
- 3) 佐賀県有明水産試験場 1987:ノリのプロトプラスト、単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。昭和61年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, 1-18.
- 4) 西沢一俊・千原光雄 1979:藻類研究法。524, 共

- 立出版株式会社, 東京。
- 5) 福岡県有明水産試験場 1990:ノリのプロトプラスト、単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。平成元年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, 1-19.
 - 6) 佐賀県有明水産試験場 1991:ノリのプロトプラスト、単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, 1-23.



A



B



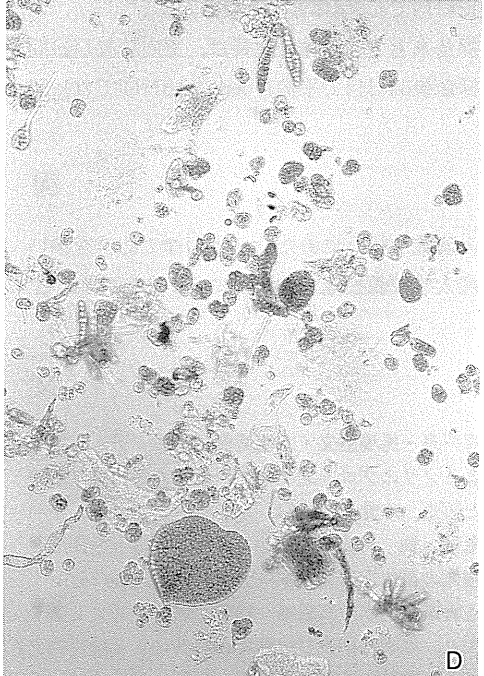
E



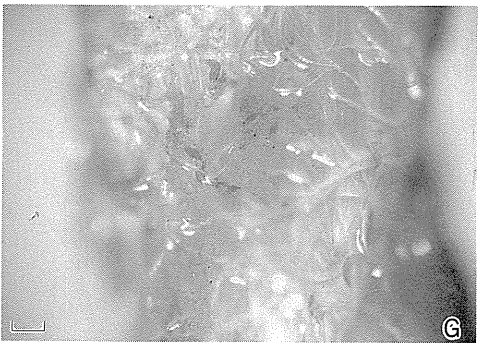
F



C



D



G

└┘ : 200 μ m

Plate 1.

- A : Growth of thallus on seeding string. By Stationary cultivation-Gel covering method used calcium alginate gel of 3.0% concentration. Cultured in laboratory for 23days.
- B : Same as A
- C : By Suspending in gel-Soaking seeding string method used calcium alginate of 1.0% concentration. Cultured in laboratory for 31days.
- D : Regenerated bodies collected for Monospore seeding method. Cultured in laboratory for 9days.
- E, F : Culture in the field seeded by Suspending in gel-Soaking seeding string method used calcium alginate gel of 1.0% concentration.
E, Culture in laboratory for 14days, in the field for 12days.
F, Culture in laboratory for 18days, in the field for 16days.
- G : Culture in the field seeded by monospore seeding method, in the field for 12days.