

徳島大学博士論文

スジアオノリ陸上養殖のための体細胞を使う
種苗生産に適した培養条件

喜多 郁弥

徳島大学大学院 総合科学教育部 地域科学専攻

2023 年

目次

序論	1
スジアオノリについて	1
徳島県におけるスジアオノリ養殖	2
スジアオノリの陸上養殖技術とその課題	3
新たなスジアオノリの種苗生産技術	4
本論	5
第1章 藻対抽出液(SEHT)を用いたスジアオノリ種苗生産に適した培養温度, 栄養塩濃度, 塩分濃度条件の検討	5
1.1 材料および方法	5
1.1.1 前培養	5
1.1.2 細断組織片の作製	6
1.1.3 SEHTの作製	6
1.1.4 培養方法	7
1.1.4.1 培養温度	7
1.1.4.2 栄養塩濃度	7
1.1.4.3 塩分濃度	8
1.1.5 分枝形成の評価方法	8
1.2 結果	9
1.2.1 培養温度	9
1.2.2 栄養塩濃度	10
1.2.3 塩分濃度	10
1.3 考察	11
第2章 藻体抽出液を用いたスジアオノリ種苗生産に適した光量・光質条件の検討	14
2.1 材料および方法	14
2.1.1 培養方法	14
2.1.1.1 光量	14
2.1.1.2 光質	15
2.1.1.3 吸収スペクトル	16
2.1.2 分枝形成の評価方法	16
2.2 結果	16
2.2.1 光量	16
2.2.2 光質	17
2.2.3 吸収スペクトル	19
2.3 考察	19
第3章 SEHTを用いたスジアオノリの新種苗生産方法の提言	22
3.1 細断組織片の分枝形成を促進させる培養条件	22

3.2 SEHT を用いたスジアオノリ種苗生産の普及を目指して.....	22
3.2.1 高額な機器や培養設備について.....	23
3.2.2 培養技術について.....	23
3.2.3 今後の課題.....	23
要 約.....	25
謝 辞.....	29
引用文献.....	30
図.....	35

序 論

スジアオノリについて

スジアオノリ *Ulva prolifera* は、日本各地に分布しており、波静かな汽水域の潮間帯の岩上や他の海藻上に繁茂する緑藻で、緑藻植物門 Chlorophyta, 緑藻綱 Chlorophyceae, アオサ目 Ulvales, アオサ科 Ulvaceae, アオサ属 *Ulva* に属する (Fig. 1)。本種はかつて、アオノリ属 *Enteromorpha* に属しており、外形や体の断面および表面細胞の並び等からアオサ属とは別属として分類されていたが、近年の DNA 分析による分子系統解析や比較形態学的研究により、アオノリ属とアオサ属が分子系統学的にも形態学的にも明確な分類ができないことから、両属を統合してアオサ属となった経緯を持つ (Hyden *et al.* 2003; 小倉ら 2004)。

緑藻アオサ類 *Ulva spp.* の中でも特にスジアオノリは香気に優れており、美味とされ、生のスジアオノリは、天ぷらや佃煮、お吸い物などの伝統的な日本料理に、粉末状に加工したあおのり粉は、お好み焼き、ポテトチップスや羊羹などの菓子類に使用される (Ohno 1993)。本種の食品利用の歴史は古く、江戸時代では贈答品として重宝されており、江戸時代の文献「箋注倭名類聚抄 (1827 年)」において「緑色、髪毛・乱れ糸のよう」とスジアオノリと思われる記載が認められる (今田 2003)。

本種の葉長は 10~30 cm 程度、時に長いもので 1 m 以上にもなり、体は扁平で一層細胞からなる管状構造を持ち、体の太さは基部から先端まで変わらず、細長い主枝から分枝を多く形成する。本種の生活史については、配偶体と孢子体の姿がほとんど同じである同形世代交代を行い有性生殖の生活史を持つもの、そして、世代交代のない無性生殖の生活史を持つものが存在する。繁殖は、栄養細胞が生殖細胞へと分化 (= 成熟) し、遊走細胞 (2~4 本

の鞭毛を持つ生殖細胞)を放出させることにより行う(飯間 2002)。生殖細胞へと分化した部位は、栄養細胞の緑色から色調が黄色もしくは褐色に変化し、肉眼でも容易に観察することができることから、遊走細胞を採取するための指標となる。本種の天然環境における成熟は、月齢、水温、塩分に支配されているが、特に水温による影響が大きいと考えられ、20~25℃の水温帯が最も成熟しやすく、15℃以下および30℃以上では遊走細胞の放出量が低下することが知られている(團ら 1998)。人為的な成熟の誘導については、スジアオノリや緑藻アオサ *Ulva australis* などのアオサ属藻類は、細胞間に成熟阻害物質を有しており、藻体を細断することで成熟阻害物質が藻体外へ流出し、成熟が始まることが報告されている(Stratmann *et al.* 1996; Hiraoka *et al.* 1998; Dan *et al.* 2004)。これらの現象を利用し、後述に記載する人工採苗が行われている。

徳島県におけるスジアオノリ養殖

スジアオノリの主な産地は徳島県、高知県、岡山県、和歌山県、特に徳島県の吉野川、高知県の四万十川が産地として有名であり、徳島県産のスジアオノリの生産量は国内シェアの大半を占める。本種の養殖は、天然採苗または人工採苗によって種付けされた網(種網と称される)を河川の河口やその周辺に張ることで行われる。徳島県には吉野川や勝浦川、那賀川といったスジアオノリの生育に適した河口域があり、河川内で養殖が盛んに行われている。主たる生産地は吉野川であり、河口の8 km 上流から JR 高徳線の下流までが利用されている。漁場は主に種付けに使用される「天然採苗場」と種網を養殖する「養殖場」に分けられ、養殖に利用されている。吉野川では、1983年よりスジアオノリ養殖が本格的に始められた。当初、本種の養殖は天然採

苗に依存していたため、種網の品質や生産量が安定せず、養殖での収量が不安定であったが、1990年代後半に母藻細断法による人工採苗技術（團ら 1997）や種網の冷蔵保存技術（團ら 2003）が開発され、安定した生産が行われるようになった。しかし、近年は地球温暖化の影響による秋冬時の水温の上昇に伴う養殖適期の短縮や栄養塩不足による色落ち等により、養殖生産量が約2～3割に減少している（Fig. 2）。2020年以降には、栄養塩不足による色落ち等の改善のため、鉄製器具（耕耘桁）をロープに結んで、吉野川に投入し、船で引っ張ることで河床に溜まった窒素・リンなどの栄養塩を河川中に放出させる海底耕耘の取り組み（中西ら 2012）や徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究課による半透膜を用いたペットボトル栄養剤（加藤ら 2022）の活用が行われている。

スジアオノリの陸上養殖技術とその課題

スジアオノリの河川養殖では、気候変動に左右され、生産量が不安定になるだけではなく、夾雑物としてヨコエビ類が混入することにより品質低下や夾雑物の除去コストの問題も抱えている（向井ら 2004）。

そこで、近年、養殖スジアオノリの生産量の安定化と品質の向上を図るため、陸上養殖技術の研究が行われている（Hiraoka *et al.* 2004; 江端ら 2007; Hiraoka & Oka 2008; Oka *et al.* 2009）。スジアオノリがよく育つ水温は15～20℃であり（平岡ら 1999）、陸上養殖では、周年にわたって水温が低温で安定し、栄養塩に富み、その他の藻類が含まれない清浄な地下海水または海洋深層水を主に用いる（Hiraoka *et al.* 2004; 江端ら 2007; Hiraoka & Oka 2008; Oka *et al.* 2009）。本種の陸上養殖では、互いの仮根が結びつき葉上部が放射状に均一に伸びた集塊状の種苗を用いる（Fig. 3）。これを水槽内で浮遊させ

て、光を満遍なく藻体に供給することで、天候に左右されずに夾雑物の少ないスジアオノリを高密度生産することができる (Hiraoka & Oka 2008)。集塊状の種苗は、成熟した藻体より放出された遊走細胞から作製される (Hiraoka & Oka 2008)。このため、種苗生産には母藻を成熟させることが重要であったが、藻体によって成熟にかかる時間がまちまちであり (團ら 2003)、安定した種苗生産技術の開発が期待されていた。

新たなスジアオノリの種苗生産技術

遊走細胞に頼らない新たな種苗生産方法として、喜多ら (2019) は、体細胞分裂を利用した種苗生産方法を提案した。これは、スジアオノリ藻体抽出液 (Solution Extracted from Homogenized Thalli of *U. prolifera*, 以下、SEHT と呼称) を添加した海水で本種の細断組織片の培養を行い、遊走細胞への分化を抑制し、細断組織片の縁辺部より多数の分枝 (= 新芽) を形成させ種苗として使う方法である。現在行われている遊走細胞を使う従来の種苗生産方法と比較すると、喜多ら (2019) が開発した体細胞を使う方法の方が種苗数や品質を安定させやすいと考え、本研究では、SEHT を用いた種苗生産を実用化するため、体細胞の細断組織片の最適な組織培養条件を究明することとした。

本 論

第 1 章 藻対抽出液 (SEHT) を用いたスジアオノリ種苗生産に適した培養温度, 栄養塩濃度, 塩分濃度条件の検討

SEHT を用いた種苗生産技術を実用化するには, 分枝を形成した細断組織片を効率よく作製するための細断組織片の組織培養条件を検討する必要がある。そこで, 細断組織片の最適な組織培養条件として, 培養温度, 栄養塩濃度, 塩分濃度について検討を行った。

1.1 材料および方法

培養温度, 栄養塩濃度, 塩分濃度の実験で使用する細断組織片は前培養した藻体から作製した。まず, 前培養の方法, 細断組織片の作製方法, SEHT の作製方法, について説明する。

1.1.1 前培養

供試材料のスジアオノリは, 徳島県吉野川で採取し徳島県水産研究課が継代培養していた株で, 2 本鞭毛の遊走細胞を形成する無性生殖の生活史を持っている。この成熟藻体から遊走細胞を採取後, シャーレで静置培養を行った。数日後に遊走細胞が定着して発芽した後, シャーレよりスパーテルでこそぎ取り, 海苔糸状体栄養剤 (第一製網, ポルフィランコンコ) を 120℃ にて 30 分間加圧滅菌した海水 (徳島大学水圏教育研究センター地先の小鳴門海峡より汲み上げて砂ろ過した海水, 以下, 滅菌海水と呼称) に添加した培養液に移し, 高機能型人工気象室 (日本医化器械製作所, LP-1PH-NPC) 内で水温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 白色蛍光灯 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 光周期 12L12D の条件下で, 3 週間培養を行ったものを使用した。3 週間の培養後, 藻体長が 12~14 cm に育

ったスジアオノリ 2.5 g (湿重量) を, 新たな培養液 (滅菌海水に海苔糸状体栄養剤が 0.05% になるように添加) 100 ml が入った半透明の 100 ml のポリプロピレン容器に入れ, インキュベーター (PHC Inc., MIR-154-PJ) で 30°C, 白色蛍光灯 $29 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 光周期 12L12D で 2 週間保存した。

1.1.2 細断組織片の作製

上記の方法で保存した 2.5 g (湿重量) の藻体を滅菌海水 200 ml とともにブレンダー (Waring Inc., 700BUJ) に入れ, 22500 rpm, 90 秒間細断した後, 目合い 300 μm のプランクトンネット (Sefar Inc., 58GG) でろ過した。そのろ液を更に目合い 20 μm のネット (Sefar Inc., NY20-HC) でろ過し, 20 μm のネット上に捕集された細断組織片の表面の水分をペーパータオルで軽く吸い取り, 全実験で使用した。

1.1.3 SEHT の作製

SEHT の作製は喜多ら (2019) に準じて行った。湿重量 230 g のスジアオノリを細断しやすいように -60°C で凍結し, その後, 約 12 g の立方体に切り分け, この一塊を滅菌海水 200 ml とともにブレンダー (Oster Inc., Urban blender, 450W) に入れて 90 秒間 18000 rpm で細断を行った。これを 3 L ガラス製三角フラスコに移し, 液量が 2 L となるように滅菌海水を加えた。次に, フラスコの口をプラスチックパラフィンフィルムで塞ぎ, アルミ箔でフラスコ全体を覆って遮光し, $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ちながら, 振とう機 (東京理化機械, MMS-100) で 24 時間, 106 rpm で振とうを行った。振とう後, 2 L ガラスビーカーに移し, -30°C で凍結を行った。凍結後, $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で静置して自然解凍すると, 上澄み液と沈殿物の 2 層に分離するので, この上澄み液を孔径

1.2 μm のガラス繊維ろ紙 (GE healthcare, Whatman GF/C) で吸引ろ過し, 100 ml ねじ口ポリプロピレン容器に入れ, -30°C で凍結保存して, 使用時に解凍して全実験で用いた。

1.1.4 培養方法

1.1.4.1 培養温度

実験には, 直径 90 mm, 高さ 20 mm のプラスチック製滅菌シャーレを用いた。シャーレ 1 枚あたりの培養液量は 30 ml とし, 培養液の SEHT の濃度が, 喜多ら (2019) が推奨した 25% となるように滅菌海水で調整した。その後, 細断組織片を 1 シャーレ 0.05 g となるように収容し, PES 培地 (Provasoli 1968) を 0.05% の濃度になるように添加した。1 実験区につき, このシャーレ 5 枚を用意した。5, 10, 15, 20, 25°C の 5 実験区を設定し, 温度勾配恒温器 (日本医化器械製作所, TG-180WLED-5LE) により, 光源には白色 LED を用い (発光スペクトルは Fig. 4), 光量 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 光周期 12L12D として, 7 日間の培養を行った。

1.1.4.2 栄養塩濃度

実験に使用するシャーレ, 培養液の SHET の濃度, 1 シャーレあたりの細断組織片の収容量は 【1.1.4.1】 と同様であるが, シャーレの 25%SEHT に対して PES 培地が 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2% の濃度になるように添加した。また, PES 培地を加えない実験区も用意し, 全 6 実験区で 7 日間の培養を行った。なお, 実験にはグロースチャンバー (PHC Inc., MLR-352) を用い, 温度を 20°C に固定し, 光源には 3in1LED 照明ユニット (日本医化器械製作所, 3LH-64) を使い (発光スペクトルは Fig. 5), 光量 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

光周期 12L12D に設定した。

1.1.4.3 塩分濃度

実験に使用するシャーレ、培養液の SHET の濃度、1 シャーレあたりの細断組織片の収容量、使用するグロースチャンバー、培養温度、光源は【1.1.4.2】と同様であるが、SEHT の濃度が 25% で一定となるよう滅菌海水と蒸留水を用いて、各塩分濃度を調整し、ポータブルマルチ水質計（東亜ディーケーケー、MM-41DP）で塩分濃度の測定を行った。使用した滅菌海水の塩分濃度は 31.0 psu であったが、SEHT 原液の塩分濃度は 19.4 psu と低いため、滅菌海水のみで SEHT の濃度を 25% に調整した場合、塩分濃度は滅菌海水の塩分濃度よりも低い 27.9 psu となった。蒸留水のみで SEHT の濃度を 25% に調整した場合、塩分濃度は 4.8 psu となることから、本実験の条件では、塩分濃度の検討可能な範囲が 4.8~27.9 psu となった。ここでは、塩分濃度を 4.8, 7.8, 10.6, 16.0, 27.9 psu になるように滅菌海水と蒸留水で調整し、全 5 実験区で 7 日間の培養を行った。

1.1.5 分枝形成の評価方法

全実験とも、7 日間の培養後に各シャーレから組織断片 50 片を無作為に選出して倒立顕微鏡での観察を 5 回行い、喜多ら（2019）に従って、細断組織片より分枝細胞（Branch cell：分枝へと分化した細胞）が 3 本以上形成したものを「分枝を形成した細断組織片」として計数し、以下の算出式により分枝形成率を求めた：

$$\text{分枝形成率 (\%)} = 100 \times \frac{\text{分枝を形成した細断組織片の数}}{\text{観察した細断組織片の数}}$$

分枝形成率は培養温度間，栄養塩濃度間，塩分濃度間での多重比較検定 (Steel-Dwass 検定) を行い，有意差の有無を確認した。

また，喜多ら (2019) の定義により，「分枝細胞以外の細断組織片の分化」，「肥大細胞 (Swelled cell: 液胞が大きくなり，細胞全体が球形に肥大して断面積が 2 倍以上となる。細胞は濃い緑色を呈し，細胞の配列が乱れ，細胞壁が肥厚する)」，「仮根細胞 (Rhizoid cell: 仮根へと分化した細胞)」，「成熟細胞 (Matured cell, 生殖細胞へと分化した細胞)」，「胞子放出細胞 (Empty cell: 生殖細胞が放出された空の細胞。空の細胞は無色透明，もしくは白色を呈する)」，「枯死細胞 (Dead cell: 何らかの原因で死んだ細胞。細胞の萎縮や生殖細胞が放出されずに細胞内に残り残されることで，細胞が黒ずむ)」の 6 相を判定し (Fig. 6)，相別に計数を行い，それぞれの出現率を求めた。

1.2 結果

1.2.1 培養温度

分枝形成率の平均値は，培養温度が 5°C で 0%，10°C で 2.8% と低い値であったが，15°C で 28.4% と急激に上昇し，20°C で 64.0% と最大となったが，25°C では 40.0% と減少した (Fig. 7)。多重比較検定の結果，5°C と 15°C，5°C と 20°C，5°C と 25°C の分枝形成率の間にのみ有意差が認められ ($p < 0.05$)，それ以外の温度間には有意差が認められなかった ($p > 0.05$)。

細断組織片の分化過程では，分枝形成率の低い 5°C と 10°C において，胞子放出細胞と枯死細胞の割合が高く，分枝形成率上昇する 15°C と 20°C では (Fig. 7)，胞子放出細胞および枯死細胞の割合が減少した (Fig. 8)。しかし，25°C では再び胞子放出細胞および枯死細胞の割合が上昇した (Fig. 8)。また，分枝形成率が上昇する 15°C 以降では (Fig. 7)，肥大細胞の割合が減少した (Fig.

8)。仮根細胞および成熟細胞は、全5実験区において見られなかった。

1.2.2 栄養塩濃度

分枝形成率の平均値は、PES培地を加えていない場合は67.2%であった。PES培地が0.0125%のときの分枝形成率の平均値は72.0%、0.025%では65.6%、0.05%では65.6%、0.1%では70.4%、0.2%では70.8%であり、分枝形成率はPES培地の濃度によらず、ほぼ一定であった (Fig. 9)。また、多重比較検定の結果、すべての栄養塩濃度間で有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

細断組織片の分化過程では、肥大細胞、分枝細胞、仮根細胞、成熟細胞、孢子放出細胞および枯死細胞が占める割合は多少の変動はあるものの、PES培地の希釈濃度に関わらず、ほぼ一定であった (Fig. 10)。

1.2.3 塩分濃度

分枝形成率の平均値は、4.8~10.6 psu で29.2~31.6%とほぼ一定であったが、16.0 psu で38.0%、27.9 psu で54.0%と分枝形成率の上昇が見られた (Fig. 11)。また、多重比較検定の結果、すべての塩分濃度間で有意差が認められなかった ($p > 0.05$)。

細断組織片の分化過程では、孢子放出細胞と枯死細胞の割合は多少の変動こそあるものの、同程度であり、塩分濃度が上昇するにつれ、分枝形成率が上昇した (Fig. 12)。また、成熟細胞の割合もわずかに上昇した。肥大細胞および仮根細胞は、4.8~10.9 psu までは、多少の変動はあるものの、塩分濃度に関わらず、ほぼ一定であった (Fig. 12)。しかし、分枝形成率の上昇が見られる16.0 psu と27.9 psu では、肥大細胞および仮根細胞の割合が減少した (Fig. 12)。

1.3 考察

細断組織片の成熟と培養温度に関して、團ら（1998, 2008）はスジアオノリより円形に切り取った小さな藻体片（ディスク）が 20°C で最も成熟速度が速く、それよりも培養温度が高くなっても低くなっても成熟速度が低下することを報告している。一方、本研究において SEHT を添加した際の細断組織片の分枝形成率は 20°C で最大となり、成熟細胞は全 5 実験区とも見られなかった。成熟が最も促進される温度帯でありながら、SEHT が細断組織片の成熟を抑制したことで、分枝形成を誘導したためであると推察された。多重比較検定の結果、5°C と 15°C、5°C と 20°C、5°C と 25°C の分枝形成率の間には有意差が認められた ($p < 0.05$)。それ以外の培養温度間においても検定統計量は 10°C と 15°C の間が $t = 2.652$ 、10°C と 20°C の間が $t = 2.652$ 、10°C と 25°C の間が $t = 2.643$ 、15°C と 20°C の間が $t = 2.627$ 、20°C と 25°C の間が $t = 2.619$ であり、有意性の判断材料として算出した 5% 水準の $t = 2.729$ との差がほとんどなかったことから、試験回数または検体数を増やすことで有意差が認められると考える。そこで、分枝形成率が最大となる温度は 20°C と判断する。

SEHT を添加した細断組織片の分枝形成率が栄養塩濃度の上昇に関わらず、ほぼ一定であった (Fig. 9)。多重比較検定の結果、すべての栄養塩濃度間で有意差が認められなかったことから ($p > 0.05$)、本研究での 7 日間の培養期間においては、栄養塩濃度は細断組織片の分枝形成率の増減に寄与していないと考える。

細断組織片の成熟と塩分濃度に関して、スジアオノリでは塩分濃度 5.0～52.0 psu の条件で藻体ディスクの 70% 以上が培養 5 日後に成熟し、6.6 psu 以下および 59.4 psu 以上では成熟の割合が低下することを報告している (牧野ら 2003; 團ら 2008)。本研究において SEHT を添加した際の細断組織片の

分枝形成率が塩分濃度 16.0 および 27.9 psu で上昇したのは、細断組織片の成熟を促進させる塩分濃度の範囲内でありながら、SEHT が存在することにより、細断組織片の成熟を抑制し、分枝形成を誘導したためであると推察された。多重比較検定の結果、すべての塩分濃度間で有意差は認められなかったが ($p > 0.05$)、検定統計量は 4.8 psu と 27.9 psu の間が $t = 2.627$ 、7.8 psu と 27.9 psu の間が $t = 2.635$ 、10.6 psu と 27.9 psu の間が $t = 2.635$ 、16.0 psu と 27.9 psu 間が $t = 2.627$ であり、5%水準である $t = 2.729$ との差がほとんどなかったことから、温度実験のときと同様に、試験回数または検体数を増やすことで有意差が検出されると判断した。よって、分枝形成率が上昇し、最大となる塩分濃度を 27.9 psu であると判断する。

さらに、細断組織片の分枝形成および成熟との関係性について考察する。喜多ら (2019) は、SEHT を用いた種苗生産で細断組織片に使用する藻体について、使用前に静置培養し、これを「保存」と称して、保存温度と保存期間が細断組織片の分枝形成に与える影響について述べている。これによると、保存期間の長期化、あるいは保存温度の上昇に伴い、SEHT が存在しない場合には、細断組織片の成熟が強く促進されるが、SEHT の存在下では細断組織片の成熟が抑制され、分枝形成が促進される。しかし、保存を行わない藻体の細断組織片に対し SEHT を添加すると、SEHT の添加の有無にかかわらず細断組織片の縁辺部からの分枝形成が起こらず、肥大細胞および仮根細胞の形成が強く促進される (喜多ら 2019)。このことから、藻体を長期間、25 ~ 30°C で保存することで、藻体を容易に成熟へと誘導させることができる。そして、成熟が誘導された藻体の細断組織片に SEHT を添加した場合、細断組織片の分枝形成が強く促進される。しかし、保存を行わない (= 成熟へと誘導させない) 藻体の細断組織片に SEHT を添加すると細断組織片の縁辺部

から分枝形成が起こらない。そのため、細断組織片の縁辺部より分枝形成を促進させるためには、細断組織片に使用する藻体を成熟へと誘導する必要があると推察され、成熟と分枝形成の2つの現象に強い関係性が示唆された。藻体の成熟を誘導する培養条件が、細断組織片の分枝形成を促進させるうえで必要な培養条件でもあり、SEHTによって成熟の抑制を行うことで細断組織片の分枝形成が促進されると考える。

第 2 章 藻体抽出液を用いたスジアオノリ種苗生産に適した光量・光質条件

の検討

第 1 章では SEHT を用いた種苗生産技術を確立するために、分枝を形成した細断組織片を効率よく作製するための細断組織片の組織培養条件として、培養温度、栄養塩濃度、塩分濃度の検討を行った。さらに効率よく分枝を形成した細断組織片を作製するために、細断組織片の組織培養条件として、光条件（光量・光質）について検討を行った。

2.1 材料および方法

前培養の方法，細断組織片の作製方法，SEHT の作製方法については，第 1 章の 1.1.1～1.1.3 と同様の手順である。

2.1.1 培養方法

2.1.1.1 光量

実験には，直径 90 mm，高さ 20 mm のプラスチック製滅菌シャーレを用いた。シャーレ 1 枚あたりの培養液量は 30 ml とし，培養液の SEHT の濃度は，成熟せずに分枝形成率が 50%以上の細断組織片を効率よく作製が可能である 25%となるように滅菌海水で調整を行った後，細断組織片を 1 シャーレ 0.05 g となるように収容した。また，PES 培地が 0.05%になるように添加した。1 実験区につき，このシャーレ 5 枚を用意した。実験は上部から下部に向けての垂直光で行い，側面からの光が入らないようにシャーレ側面を黒のビニールテープで遮光し，光源からの高さを調整することで光量を調整した。使用した光源直近の光量は約 $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であったが，予備実験時に

光源直近で培養を行った際、シャーレ中の培養液の温度上昇が見られ、細断組織片の成熟を引き起こす可能性があったことから、培養液の温度上昇が確認されない $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を光量の上限值とした。本実験の条件では、光量を 0, 10, 25, 50, 75, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の 6 実験区に設定し、グロースチャンバー (PHC Inc., MLR-352) を用い、温度を 20°C に固定し、光源には 3in1LED 照明ユニット (日本医化器械製作所, 3LH-64) を使い (発光スペクトルは Fig. 5), 光周期 12L12D として、7 日間の培養を行った。また、予備実験より分枝を形成した細断組織片数について光量間で有意な差が見られたことから、分枝形成率の算出を行った (2.1.2 で詳述)。

2.1.1.2 光質

実験に使用するシャーレ、培養液の SHET の濃度、1 シャーレあたりの細断組織片の収容量、PES 培地の添加量、使用するグロースチャンバー、培養温度、光源は前述の 2.1.1.1 と同様であるが、光質を赤色 (ピーク波長 655 nm)、緑色 (ピーク波長 518 nm)、青色 (ピーク波長 449 nm)、白色 (ピーク波長 449 nm, 518 nm, 655 nm の混合)、対象区として 3 波長型蛍光灯の 5 実験区を設定し、実験を行った (各照射光の発光スペクトルは Fig. 13)。なお、実験は実験 I と同様に上部から下部に向けての垂直光で行い、側面からの光が入らないようにシャーレ側面を黒のビニールテープで遮光し、光源からの高さを調整することで各光源の光量を $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に調整し、光周期 12L12D として、7 日間の培養を行った。また、予備実験より分枝を形成した細断組織片数について光質間で有意な差が認められなかったことから、本実験においても、同様の結果になると考えられたため、分枝を形成した細断組織片数の計数だけでなく、細断組織片からの分枝数や分枝の長さへの影響

がないか着目し，計測を行った（2.1.2 で詳述）。

2.1.1.3 吸収スペクトル

藻体の吸収スペクトルの測定には，前述の前培養により培養した藻体長が 12～14 cm，幅 2 mm 程度に育った藻体を用いた。藻体を 2 cm 程度の長さに切り取り，切り取った藻体を石英セル内側の透過面への接着のため滅菌海水で湿らせた後，ミクロスパーテルのヘラ部分に軽く載せ，石英セル内側の透過面片側にヘラ部分に載った藻体を軽く押し当てながら，ミクロスパーテルを用い隙間なく重ならないように貼り付け，紫外可視分光光度計（島津製作所，UV-1900）を用いて吸光度を測定した。

2.1.2 分枝形成の評価方法

分枝形成率の算出方法については，第 1 章の 1.1.5 と同様である。

光質の違いが与える細断組織片からの分枝数と分枝の長さへの影響については，各シャーレより，分枝を形成した細断組織片を無作為に 20 片選出して倒立顕微鏡での観察を 1 回行い，細断組織片からの分枝数を計測後，計測した分枝のうち一番長いものを測定した。

分枝形成率，細断組織片からの分枝数および分枝の長さについては，光量間，光質間での多重比較検定（Tukey-Kramer 検定）を行い，有意差の有無を確認した。

2.2 結果

2.2.1 光量

分枝形成率の平均値は，光量が $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0%， $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.4%

と低い値であったが、 $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 14.4%と急激に上昇し、 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 60.4%となり、それ以降も $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 62.4%、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 70.0%と上昇した (Fig. 14)。多重比較検定の結果、 $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 50, 75, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 50, 75, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 50, 75, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量間において有意差が認められ ($p < 0.05$)、それ以外の光量間には有意差が認められなかった ($p > 0.05$)。

細断組織片の分化過程について、枯死細胞が $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 100%だったが、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では枯死細胞の割合が減少し、 $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では枯死細胞が観察されず、孢子放出細胞の割合が上昇した (Fig. 15)。 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から肥大細胞が認められたが、 $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では肥大細胞の割合が減少し、分枝形成率が上昇した (Fig. 15)。仮根細胞は $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のみ認められたが、その割合は 0.4%と低く、成熟細胞は全 6 実験区において認められなかった。

2.2.2 光質

分枝形成率の平均値は、3 波長型蛍光灯で 30.4%、白色 LED で 21.6%、赤色 LED で 27.6%、緑色 LED で 10.0%、青色 LED で 26.8%であった (Fig. 16)。また、各実験区の 5 シャーレの分枝形成率は、多重比較検定の結果、緑色 LED については、すべての光質間に有意差が認められたが ($p < 0.05$)、それ以外の光質間では認められなかった ($p > 0.05$)。

細断組織片の分化過程では、肥大細胞、分枝細胞、成熟細胞、孢子放出細胞および枯死細胞が 5 実験区すべてで認められたが、仮根細胞は形成されなかった (Fig. 17)。肥大細胞の割合は、3 波長型蛍光灯で 2.8%、白色 LED で 6.4%、赤色 LED で 3.2%、青色 LED で 6.8%であったが、緑色 LED では、他

の光質と比較して、肥大細胞の割合が 30.4%と高かった (Fig. 17)。成熟細胞の割合は、3 波長型蛍光灯で 16.4%、白色 LED で 10.0%、赤色 LED で 8.0%、青色 LED で 8.8%であったが、緑色 LED では、他の光質と比較して、成熟細胞の割合が 2.0%と低かった (Fig. 17)。孢子放出細胞の割合は、3 波長型蛍光灯で 14.0%、白色 LED で 12.4%、赤色 LED で 14.8%、青色 LED で 7.2%であったが、緑色 LED では、他の光質と比較して、孢子放出細胞の割合が 2.0%と低かった (Fig. 17)。枯死細胞の割合は、3 波長型蛍光灯で 36.4%、白色 LED で 49.6%、赤色 LED で 46.4%、青色 LED で 50.4%であったが、緑色 LED では、枯死細胞の割合が 55.6%とやや高かった (Fig. 17)。

細断組織片から分枝数の平均値は、3 波長型蛍光灯で 15.3 本、白色 LED で 14.4 本、赤色 LED で 11.8 本、緑色 LED で 8.0 本、青色 LED で 15.1 本であった (Fig. 18)。多重比較検定の結果、3 波長型蛍光灯と緑色 LED、白色 LED と緑色 LED、青色 LED と緑色 LED の間には有意差が認められたが ($p < 0.05$)、それ以外の光質間では認められなかった ($p > 0.05$)。

細断組織片の最長の分枝の長さの平均値±標準偏差は、3 波長型蛍光灯で $137.8 \pm 43.6 \mu\text{m}$ 、白色 LED で $113.7 \pm 44.8 \mu\text{m}$ 、赤色 LED で $109.2 \pm 36.7 \mu\text{m}$ 、緑色 LED で $32.1 \pm 12.1 \mu\text{m}$ 、青色 LED で $181.3 \pm 59.7 \mu\text{m}$ であった (Fig. 19)。多重比較検定の結果、3 波長型蛍光灯と白色 LED、3 波長型蛍光灯と赤色 LED、白色 LED と赤色 LED の光質間においては有意差は認められず ($p > 0.05$)、それ以外の光質間では有意差が認められた ($p < 0.05$)。また、青色 LED および緑色 LED については、全ての光質間で有意差が認められ ($p < 0.05$)、青色 LED での分枝の生長が良好であった。

2.2.3 吸収スペクトル

本実験で使用した藻体の吸収スペクトルを Fig. 20 に示す。藻体の相対吸光度は、波長 400~500 nm と波長 630~690 nm の範囲に高い吸収帯が認められ、波長 520~580 nm で低い値を示した。

2.3 考察

細断組織片の成熟と光量に関して、團 (2008) は、スジアオノリより円形に切り取った小さな藻体片 (ディスク) を $16 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の条件下で培養すると、培養 5 日後に成熟となる割合が 100% となり、 $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下では、成熟となる割合が 0% であったと報告している。また、光量が $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では、短期間で成熟へ至り、培養 3 日後に成熟となる割合が 100% となることも報告している。著者は、SEHT を用いた種苗生産において、細断組織片の縁辺部より分枝の形成を促進させるためには、細断組織片に使用する藻体を成熟へと誘導する必要があると推察している。本実験において、本来は成熟が短期間で促進される光量域である $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上での分枝形成率が高くなったのは、第 1 章の温度実験の結果と同様であり、SEHT が細断組織片の成熟を抑制することで、分枝形成を誘導したためであろう。また、多重比較検定の結果から、SEHT を用いた種苗生産では、分枝形成率が 60% 以上となる $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上で組織培養を行うことで、スジアオノリ陸上養殖のための安定した種苗の大量生産に繋がると考える。

スジアオノリの生長と光質に関して、高田ら (2011) は、本種の相対生長率が蛍光灯、青色および赤色 LED 照射下で高く、次いで白色 LED 照射下の順で、緑色 LED 照射下で低調であったことを報告している。本実験での分枝形成率の平均値は、3 波長型蛍光灯、赤色および青色 LED で同程度、白色 LED 照射下の

順で高く、緑色 LED 照射下で低くなり (Fig. 16)、高田ら (2011) が報告する相対生長率と概ね同様の傾向が認められた。高田ら (2011) が報告する本種の相対生長率が低調となる緑色 LED 照射下について、本実験では緑色 LED 照射下での分枝形成率が低いことに加え (Fig. 16)、細断組織片からの分枝数が少なく (Fig. 18)、分枝も短いものが多いことから (Fig. 19)、緑色 LED は、細断組織片の分枝の形成および生長を抑制させる光質条件であることが示唆された。著者は、SEHT を用いた種苗生産において、細断組織片の縁辺部より分枝の形成を促進させるためには、細断組織片に使用する藻体を成熟へと誘導する必要があると考えている。本実験の緑色 LED 照射下での細断組織片の分化過程を見ると、成熟細胞の割合が 2.0% と他の光質と比較して低かったことから (Fig. 17)、緑色 LED 照射下では、細断組織片の成熟が抑制され、分枝形成を誘導しにくいと推察している。緑色 LED は、本種の細断組織片の分枝の形成および生長を抑制する一方で、成熟も抑制することから、本種の種苗の長期保存または組織片の維持培養などの光源として適していると考ええる。

本実験で使用したスジアオノリの生葉の吸収スペクトル (Fig. 20) は、高田ら (2011) が報告するスジアオノリの生葉の吸収スペクトルと概ね同様であり、高い吸収帯を示した波長範囲 400~500 nm は、使用した青色 LED 光源の波長範囲 (Fig. 5 : 400~510 nm) とほぼ一致し、波長範囲 630~690 nm の高い吸収帯は、赤色 LED 光源の波長範囲 (Fig. 5 : 600~700 nm) とほぼ一致していた。赤色 LED と青色 LED 照射下での細断組織片の分枝形成率と分枝数に有意差こそ認められなかったものの、分枝の長さにおいては、有意差が認められ、青色 LED において分枝の生長が良好であった (Fig. 16)。Le *et al.* (2018) は、緑藻のアオサにおいて、白色蛍光灯および青色 LED 照射下で葉の日間生長率が良好であったことを報告している。また、高田ら (2011) は、総光合成速度が青色

LED 照射下で高く，白色および赤色 LED 照射下で同程度，緑色 LED 照射下で低かったことを報告している。青色 LED 照射下で分枝の生長が良好であった理由として，本実験で使用したスジアオノリの生葉の吸収スペクトル（Fig. 20）において，高い吸収帯を示した青色域の波長範囲（400～500 nm）が，同じく高い吸収帯を示した赤色域の波長範囲（630～690 nm）よりも広く，青色 LED 光源の波長範囲（Fig. 5：400～510 nm）が満遍なく吸収されことにより，総光合成速度が高くなり，分枝の生長が促進され，分枝の長さが良好であったと考えられる。今後，分枝の生長が促進される青色 LED を光源として組織培養を行うことで，スジアオノリ陸上養殖のための安定した種苗の大量生産に繋がると考える。

第 3 章 SEHT を用いたスジアオノリの新種苗生産方法の提言

現在行われている遊走細胞を使う従来の種苗生産方法では、藻体によって成熟にかかる時間がまちまちであり（團ら 2003）、種苗生産が不安定であった。そこで、遊走細胞に頼らない新たな種苗生産方法として、喜多ら（2019）は SEHT を用いた種苗生産方法を提案した。従来の種苗生産方法と比較すると、喜多ら（2019）が開発した体細胞を使う方法の方が種苗数や品質を安定させやすいと考え、本研究では、SEHT を用いた種苗生産を実用化するため、体細胞の細断組織片の最適な組織培養条件を究明することとした。

3.1 細断組織片の分枝形成を促進させる培養条件

本研究の結果から、SEHT を用いた種苗生産では、培養温度 20℃、栄養塩を添加せず、塩分濃度 27.9 psu、光量 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上、青色 LED を用いて組織培養を行うことで、細断組織片の分枝形成を効果的に促進できる。

3.2 SEHT を用いたスジアオノリ種苗生産の普及を目指して

SEHT を用いたスジアオノリ種苗生産を養殖現場での実用に向けて普及するにあたり問題となるのが、まず、母藻や種苗の培養のための培養庫（インキュベーターなど）や滅菌海水を精製するための高圧蒸気滅菌装置、顕微鏡といった高額な機器や培養設備が必要な点である。次に、種苗生産に用いる藻体の単藻化や種苗の組織培養、SEHT の作製といった培養技術が必要な点である。そこで、SEHT を用いたスジアオノリ種苗生産方法の養殖現場への普及に向けた課題解決のアクションプランを次のように提案する。

3.2.1 高額な機器や培養設備について

培養庫や高圧蒸気滅菌装置，倒立顕微鏡といった高額な精密機器や培養設備の取得や維持は，個人事業主では困難であり，公的機関によるサポートや事業団体等による種苗センターなどで用意し，安定した種苗供給体制を作り，普及を維持する必要があると考える。

3.2.2 培養技術について

種苗生産に用いる藻体の単藻化や種苗の組織培養，SEHTの作製といった培養技術では，細かな操作技術を伴うため，SEHTを用いた種苗生産技術の習熟者を確実に確保すべく，技術研修を行い，技術の継承を確実に行う。

3.2.3 今後の課題

SEHTを使う種苗生産方法は，SEHTの作製が藻体を細断してから抽出するまでに2~3日要することや細断組織片に使う藻体の前培養に1ヶ月以上の期間を要するなど養殖現場での実用に向けては種苗生産の迅速化の面で未だ課題が多い。また，SEHTを用いた種苗生産方法は，個人事業主での実施が難しいことから，それが可能なように技術開発を進める。

Liu *et al.* (2022) は，本種の体細胞分裂による新芽の形成について，培地を交換せずに1~2ヶ月間培養した藻体を新たな培地へ移すと2~4日以内で葉状部のほぼすべての栄養細胞より新芽が形成されることを報告しているが，SEHTを用いた種苗生産方法では，細断組織片の栄養細胞すべてが新芽へと分化するのではなく，細断組織片の細断面からのみ新芽が形成される特徴を持つ。しかし，SEHTを添加することで，なぜ，細断組織片の縁辺部より分枝の形成を誘導することができるのか，この縁辺部からの分枝形成のメカニズムについては未解明なところが多い。藻体表面の共生細菌が

産出する物質 *Thallusin* が藻類の形態形成に関わる報告があり (Matsuo *et al.* 2005; Wichard 2015), SEHT に含まれる分枝形成を誘導する物質がバクテリアによる産出物である可能性が疑われる。また, 陸上植物においては, 植物が傷害ストレスを受けると, 傷口付近の細胞をリプログラムすることで, 新たな器官や組織を再生することが知られており (岩瀬ら 2015), 傷口付近ではカルスの形成が確認される。このカルスは, 多分化能を有しており, オーキシンやサイトカイニンといった植物ホルモンの濃度バランスを変化させることで, カルスから根や茎葉を再分化させることができる。このことから, 細断組織片の成熟を抑制し, 分枝形成を誘導する SEHT とは, オーキシンやサイトカイニンといった植物ホルモンの作用に類似した物質の可能性が疑われる。そこで著者は, スジアオノリ細断組織片に比較的, 入手が容易で安価な 6 種の植物ホルモン, インドール酢酸 (IAA), 6-ベンジルアミノプリン (6-BA), ジベレリン A3 (GA), カイネチン (KI), 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D), ナフタレン酢酸 (NAA) を添加したところ, KI において SEHT と同様に細断組織片の縁辺部から分枝の形成が確認された(未発表)。このことから, SEHT を作製せず, 安価な植物ホルモンを用いての種苗生産方法の可能性が示唆され, 種苗生産のコストダウンと迅速化に繋がると考えた。しかし, KI は海水に難溶で調整に時間を要することに加え, 細断組織片の縁辺部からの分枝の形成は, まちまちであり, SEHT と比較して種苗生産にやや不安定さが目立つ。そこで, 今後は SEHT を用いた種苗生産方法の普及を目指す技術開発を行う一方で植物ホルモンを活用した技術開発なども検討していき, 種苗生産のコストダウンと迅速化を図ることにより, 民間で種苗販売ができると考える。

要 約

序論

スジアオノリ *Ulva prolifera* は、日本各地に分布しており、波静かな汽水域の潮間帯の岩上や他の海藻上に繁茂する緑藻である。緑藻アオサ類 *Ulva* spp.の中でも特にスジアオノリは香気に優れており、美味とされる有用海藻である。

徳島県におけるスジアオノリ養殖

スジアオノリの主な産地は徳島県、高知県、岡山県、和歌山県、特に徳島県の吉野川、高知県の四万十川が産地として有名であり、徳島県産のスジアオノリの生産量は国内シェアの大半を占める。しかし、近年は地球温暖化の影響による秋冬時の水温の上昇に伴う養殖適期の短縮や栄養塩不足による色落ち等により、生産量が約 2~3 割に減少している。これらを改善するため、2020 年以降には、海底耕耘や栄養剤の開発が行われている。

スジアオノリの陸上養殖技術とその課題

近年、養殖スジアオノリの生産量の安定化と品質の向上を図るため、陸上養殖技術の研究が行われている。本種の陸上養殖では、互いの仮根が結びつき、葉上部が放射状に均一に伸びた集塊状の種苗を用いる。これにより河川養殖のように平面的な養殖を行うのではなく、水槽内で藻体を浮遊させながら、光を満遍なく藻体に供給する立体的な養殖が可能となり、天候に左右されずに夾雑物の少ないスジアオノリを高密度生産することができる。しかし、この集塊状の種苗は、成熟した藻体より放出された遊走細胞から作製されるため、藻体によって成熟にかかる時間がまちまちであり、種苗生産が不安定

であった。

新たなスジアオノリの陸上養殖技術

遊走細胞由来の種苗生産の課題を解決するため、体細胞分裂を利用する新たな種苗生産方法として、スジアオノリ藻体抽出液（Solution Extracted from Homogenized Thalli of *U. prolifera*, 以下、SEHT と呼称）を添加した海水で本種の細断組織片の培養を行い、遊走細胞への分化を抑制し、細断組織片の縁辺部より多数の分枝（＝新芽）を形成させる栄養繁殖を利用した種苗生産方法が考案された。本研究では SEHT を用いた種苗生産技術を確立するため、細断組織片の最適な組織培養条件を検討することとした。

第 1 章 藻対抽出液を用いたスジアオノリ種苗生産に適した培養温度，栄養塩濃度，塩分濃度条件の検討

SEHT を用いた種苗生産技術を確立していくためにも、分枝を形成した細断組織片を効率よく作製するための細断組織片の組織培養条件を検討する必要がある。そこで、細断組織片の最適な組織培養条件として、培養温度，栄養塩濃度，塩分濃度について検討を行った。以下，結果を示す。

【培養温度】

分枝形成率の平均値は，培養温度が 5℃で 0%，10℃で 2.8%と低い値であったが，15℃で 28.4%と急激に上昇し，20℃で 64.0%と最大となった。

【栄養塩濃度】

分枝枝形成率の平均値は，PES 培地を加えていない場合，67.2%であった。PES 培地が 0.0125%での分枝形成率の平均値は 72.0%，0.025%で 65.6%，0.05%で 65.6%，0.1%で 70.4%，0.2%で 70.8%であり，分枝形成率は PES 培

地の濃度によらず、ほぼ一定であった。

【塩分濃度】

分枝形成率の平均値は、4.8～10.6 psu で 29.2～31.6%とほぼ一定であったが、16.0 psu で 38.0%，27.9 psu で 54.0%と分枝形成率の上昇が見られた。

第 2 章 藻体抽出液を用いたスジアオノリ種苗生産に適した光量・光質条件の検討

第 1 章では SEHT を用いた種苗生産技術を確立するために、分枝を形成した細断組織片を効率よく作製するための細断組織片の組織培養条件として、培養温度、栄養塩濃度、塩分濃度の検討を行った。さらに効率よく分枝を形成した細断組織片を作製するために、細断組織片の組織培養条件として、光条件（光量・光質）について検討を行った。以下、その結果を示す。

【光量】

分枝形成率の平均値は、光量が $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0%， $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.4%と低い値であったが、 $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 14.4%と急激に上昇し、 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 60.4%となり、それ以降も $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 62.4%， $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 70.0%と上昇した。

【光質】

分枝形成率の平均値は、3 波長型蛍光灯で 30.4%，白色 LED で 21.6%，赤色 LED で 27.6%，緑色 LED で 10.0%，青色 LED で 26.8%であった。

細断組織片から分枝数の平均値は、3 波長型蛍光灯で 15.3 本，白色 LED で 14.4 本，赤色 LED で 11.8 本，緑色 LED で 8.0 本，青色 LED で 15.1 本であった。

細断組織片の最長の分枝の長さの平均値±標準偏差は、3 波長型蛍光灯で

137.8±43.6 μm, 白色 LED で 113.7±44.8 μm, 赤色 LED で 109.2±36.7 μm, 緑色 LED で 32.1±12.1 μm, 青色 LED で 181.3±59.7 μm であり, 青色 LED で生長が良好であった。

第 3 章 SEHT を用いたスジアオノリの新種苗生産方法の提言

本研究の結果から, SEHT を用いた種苗生産では, 培養温度 20°C, 栄養塩を添加せず, 塩分濃度 27.9 psu, 光量 50 μmol m⁻² s⁻¹ 以上, 青色 LED を用いて組織培養を行うことで, 細断組織片の分枝形成を促進でき, スジアオノリ陸上養殖のための安定した種苗の大量生産へ繋がると考えられた。今後, SEHT を用いたスジアオノリ種苗生産を養殖現場での実用に向けて普及する方法について提案した。

謝 辞

本研究を遂行し学位論文を取りまとめるにあたり，終始暖かく励ましてくださるとともに懇切丁寧なご指導を賜った徳島大学大学院社会産業理工学研究部の浜野龍夫教授に心よりお礼を申し上げます。また，同大学院同研究部の松尾義則教授のご指導に心から感謝する。徳島大学大学院社会産業理工学研究部の真壁和裕教授，三浦哉教授には，本論文のとりまとめに際して，有益なご指導をいただいた。徳島大学産業院の團昭紀客員教授，徳島大学大学院社会産業理工学研究部の岡直宏准教授には，投稿論文作成や日々の研究を進めるにあたり，藻類研究の基礎から懇切丁寧なご指導を賜った。心よりお礼申し上げます。

徳島大学生物資源産業学部附属水圏教育研究センター職員の加藤美砂子氏，米澤孝康氏には，試料の提供，機器類の使用等など，本研究の根幹の部分で多くの援助をいただいた。心よりお礼申し上げます。

また，実験試料のご提供や資料収集，さらに機器類の使用等について便宜を図っていただいた徳島県農林水産総合技術支援センター水産研究課の皆さまに，深謝する。

最後に，本研究の実施と発表の機会を与えて下さった株式会社環境防災社長の藤好一男博士，社員の皆さまには研究を遂行するうえで多くの援助をいただきました。心よりお礼申し上げます。

引用文献

團昭紀. スジアオノリの生理生態学的研究とその養殖技術への応用. 徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究所研究報告 2008; **6**: 1-78.

團 昭紀, 平岡雅規, 大野正夫. スジアオノリの成熟促進に及ぼす細断片のサイズ, 温度の関係. 水産増殖 1998; **46**: 503-508.

團昭紀, 平岡雅規, 大野正夫, 能登谷正浩. 成長の異なるスジアオノリ藻体での孢子形成阻害活性の決定. 水産増殖 2003; **51**: 229-230.

Dan A, Hiraoka M, Ohno M, Notoya M. Activity of sporulation inhibitor in the green alga, *Enteromorpha prolifera*. Jpn. J. Phycol. 2004; **52**: 79-82.

團 昭紀, 広沢 晃, 牧野賢治, 大野正夫, 能登谷正浩. 緑藻スジアオノリの冷蔵保存. 水産増殖 2003; **51**: 7-14.

團 昭紀, 大野正夫, 松岡正義. スジアオノリの母藻細断法による人工採苗. 水産増殖 1997; **45**: 5-8.

江端弘樹, 佐藤義夫, 畠田智, 四ツ倉典滋, 平岡雅規. 地下海水を用いた緑藻スジアオノリ陸上養殖の可能性. 水産増殖 2007; **55**: 103-108.

Hayden Hillary S., Blomster Jaanika, Maggs Christine A., Silva Paul C., Stanhope

Michael J., Waaland J. Robert. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. Eur. J. Phycol. 2003; **38**: 277-294.

平岡雅規，團昭紀，萩平将，大野正夫. 異なる温度条件下におけるスジアオノリのクローン藻体の成長と成熟. 日本水産学会誌 1999; **65**: 302-303.

Hiraoka M, Enomoto S. The induction reproductive cell formation of *Ulva pertusa* Kjellman (Ulvales, Ulvophyceae). Phycol. Res. 1998; **46**: 199-203.

Hiraoka M, Oka N. Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new “germling cluster” method. J. Appl. Phycol. 2008; **20**: 97-102.

Hiraoka M, Ohno M, Dan A, Oka N. Utilization of deep seawater for the mariculture of seaweeds in Japan. Jpn. J. Phycol. 2004; **52**: 215-219.

飯間雅文. 総説：アオノリ類の生物学（その3）生活史. 海苔と海藻 2002; **64**: 18-21.

今田節子. 海藻の食文化 成山堂書店，東京. 2003; 141-149.

岩瀬哲，池内桃子，杉本慶子. カルス形成の分枝メカニズム～アクセル因子とブレーキ因子～. BSJ-Review. 2015; **6**: 2-22.

加藤慎治，朝田健斗，池脇義弘，吉田和貴，岡直宏，團昭紀，濱野龍夫. ペ

ットボトルと半透膜を用いた安価で簡便な藻類養殖用施肥具の開発. *Algal Resources* 2022; **15**: 33-42.

喜多郁弥, 團昭紀, 浜野龍夫, 齋藤稔, 岡直宏. 藻体抽出液を細断細胞に添加するスジアオノリ種苗生産方法. *Algal Resources* 2019; **12**: 11-20.

Le Bao, Shin Jong-Am, Kang Man-Gu, Sun Sangmi, Yang Seung-Hwan, Chung Gyuhwa. Enhanced growth rate and ulvan yield of *Ulva pertusa* using light-emitting diodes (LEDs). *Aquaculture International* 2018; **26**: 937-946.

Liu Qianchun, Wu Chunhui, Xie Weifeng, Zhao Jin, Jiang Peng. Validation of mating type-related markers in *Ulva prolifera* (Ulvophyceae, Chlorophyta) and their detection during various reproductive modes. *Algal Research* 2022; **62**.

牧野賢治, 團昭紀, 廣澤晃. 異なる塩分濃度条件におけるスジアオノリの初期生長. 徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究所研究報告 2003; **2**: 45-46.

向井哲也, 岩本壮平. 穴道湖・中海水産振興対策検討調査事業－アオノリ養殖試験－. 平成14年度島根県内水面水産試験場事業報告, 島根県. 2004; 55-70.

Matsuo Y, Imagawa H, Nishizawa M, Shizuri Y. Isolation of algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. *Science* 2005; **307**: 1598.

中西敬, 高瀬博文, 中谷明泰, 今井一郎. 貧栄養状態での栄養塩供給手法としての海底耕耘の効果に関する調査研究. 土木学会論文集 B3 (海洋開発) 2012; **68**: 1115-1120.

Ohno M. Cultivation of the green alga, *Monostroma* and *Enteromorpha* 'Aonori'. In: Ohno M, Critchley AT (eds). *Seaweed Cultivation and Marine Ranching*. JICA, Yokosuka, 1993; 7-16.

小倉郁史, 山上薫, 富田健次, 畷田智. アオノリ属の識別. 関税中央分析所報 2004; **44**: 7-11.

Oka N, Sumida T, Hiraoka M, Ohno M. Effect of Fe (II) for tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater. *Algal Resources* 2009; **1**: 63-66.

Provasoli L. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A, Hattori A (eds). *Cultures and Collections of Algae*. Proceedings of the US-Japan Conference, Hakone, September 1996. *Jpn. Soc. Plant Physiol.* 1968; 63-75.

Stratmann J, Paputsoglu G, Oertel W. Differentiation of *Ulva mutabilis* (CHLOROPHYTA) gametangia and gamete release are controlled by extracellular inhibitors. *J. Phycol.* 1996; **32**: 1009-1021.

高田順司, 村瀬昇, 阿部真比古, 野田幹雄, 須田有輔. 光質が異なる LED 照射下での緑藻スジアオノリの生長と光合成. 水産増殖 2011; **59**: 101-107.

Wichard T. Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta). *Front. Plant. Sci.* 2015; **6**: 1-16.



Fig. 1. Dried “Suji-aonori”, *Ulva prolifera*.

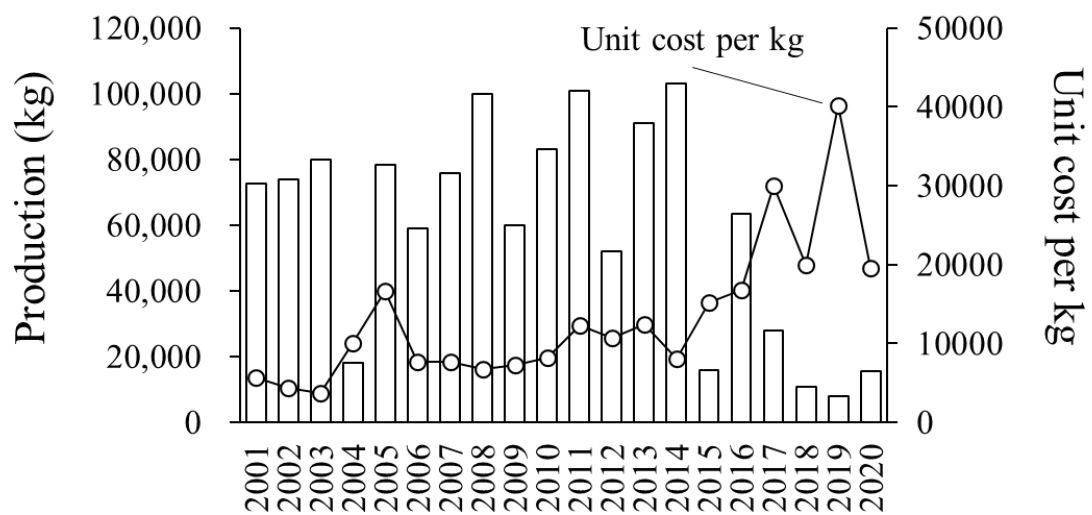


Fig. 2. Changes of *Ulva prolifera* production and unit cost per kg in the Yoshino River. Date from Division of Fisheries Research, Tokushima Pref. (1999~2020).

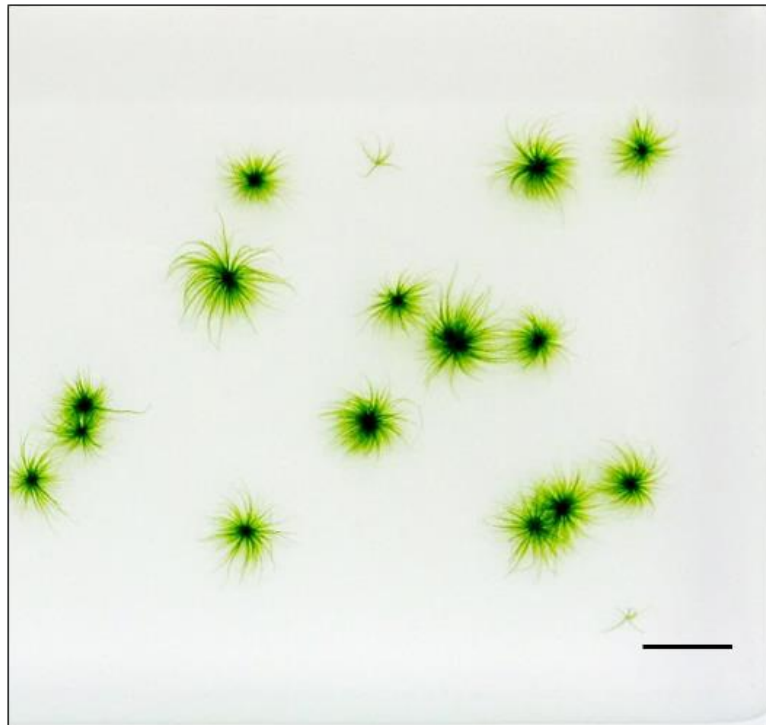


Fig. 3. *Ulva prolifera* seeds for land-based tank culture.

Scale bar = 1 cm.

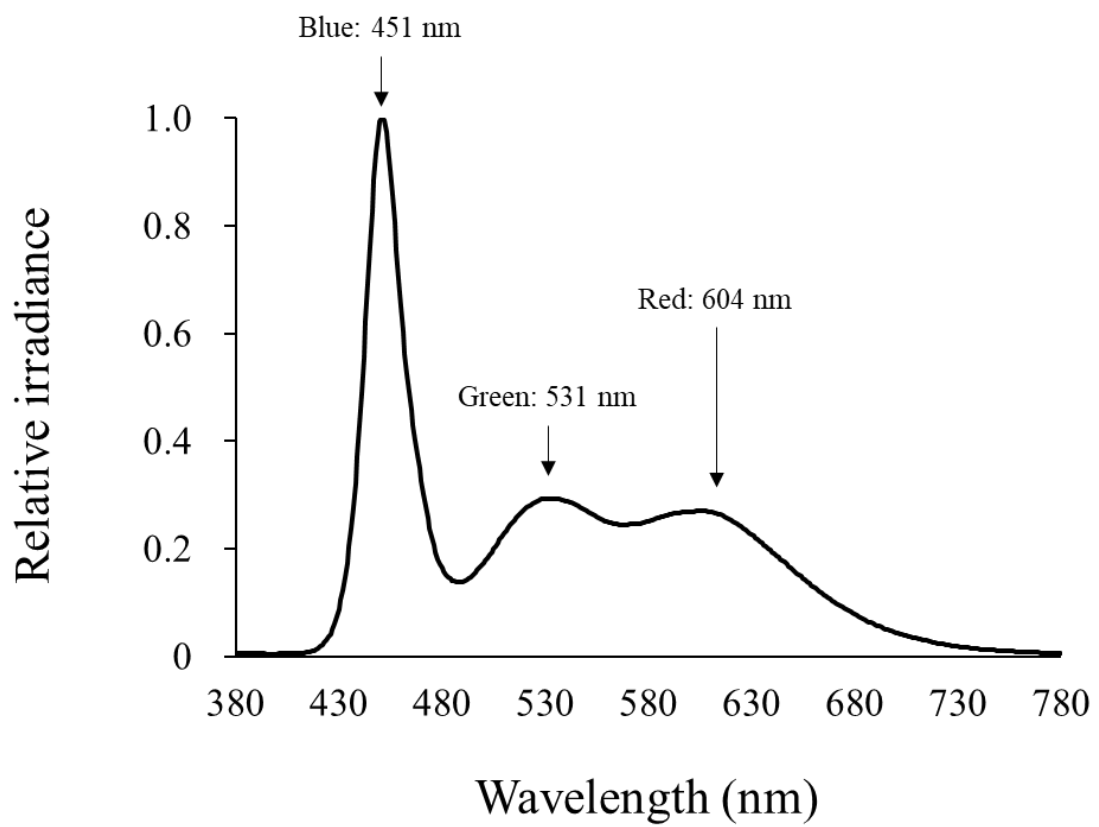


Fig. 4. Relative irradiance of wavelength for red, green and blue LED lights used.

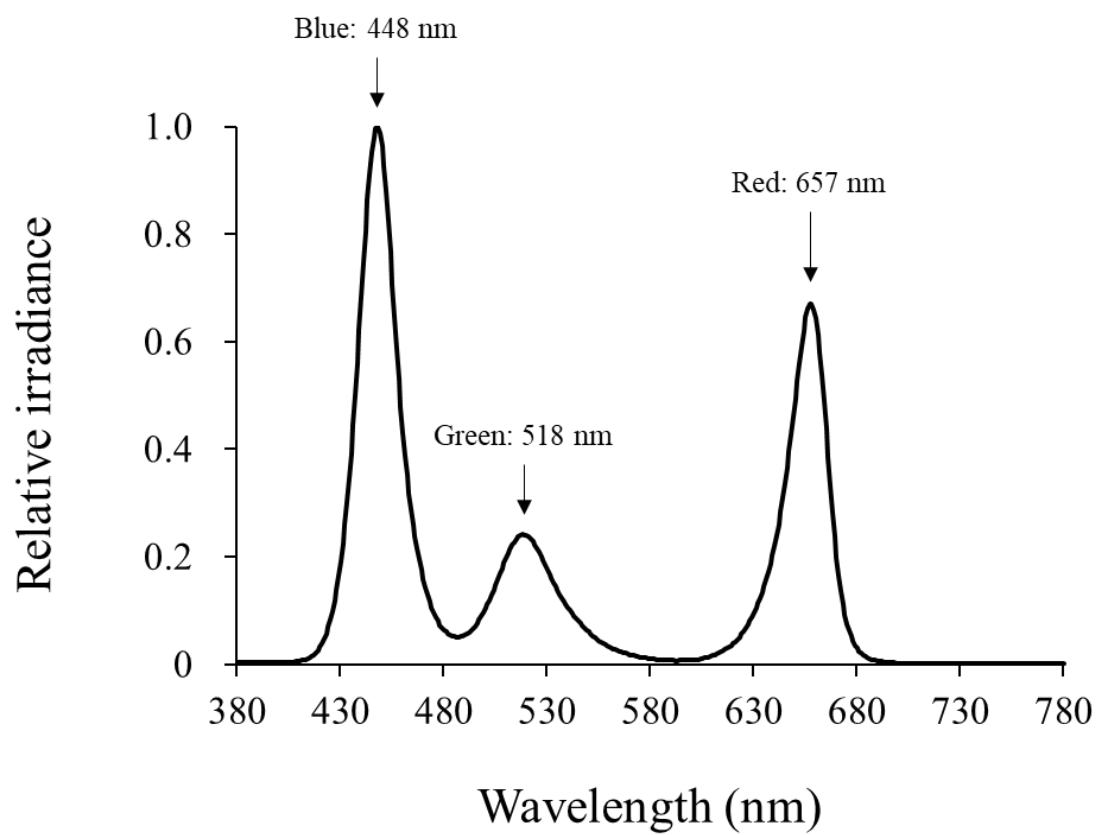


Fig. 5. Relative irradiance of wavelength for red, green and blue LED lights used.

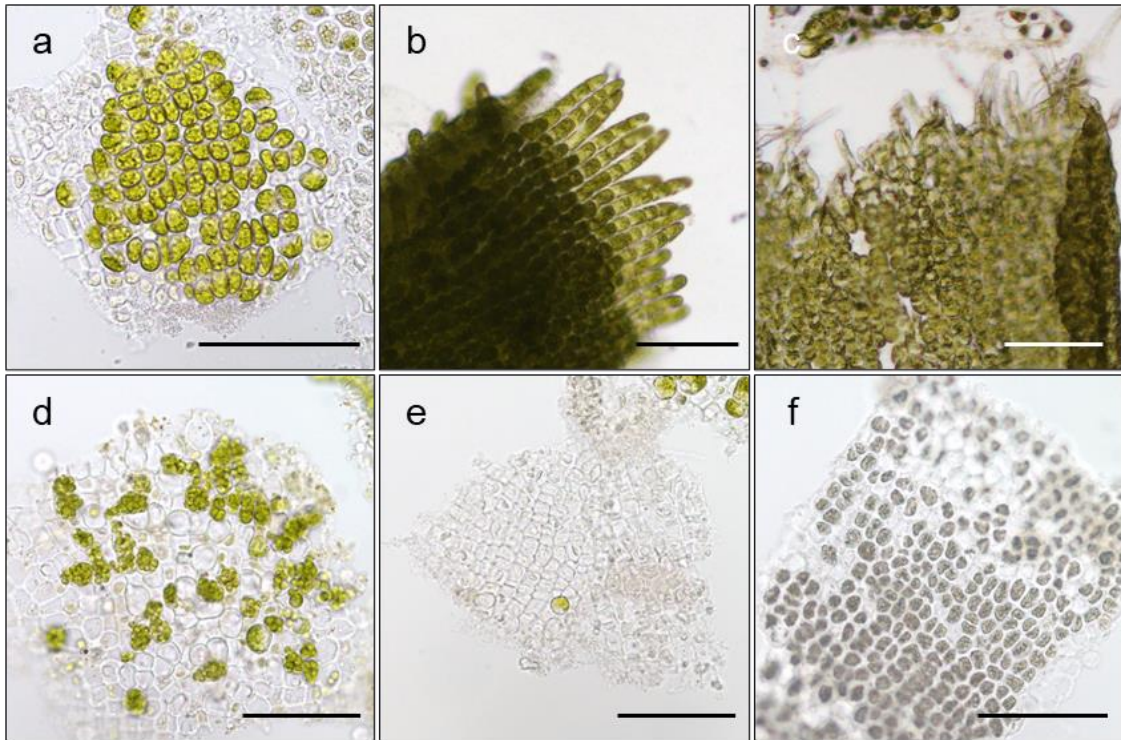


Fig. 6. Differentiated cells. a: swelled cells, b: branch cells, c: rhizoids cells, d: matured cell, e: empty cells, f: dead cells. In swelled cells, vacuole becomes larger, resulting in spherical shape and twice the cross-sectional area compared to the vegetative cells. Features of the swelled cell include; a dark green color, thickened cell walls, and unorganized cell arrangement. Scale bars = 100 μ m.

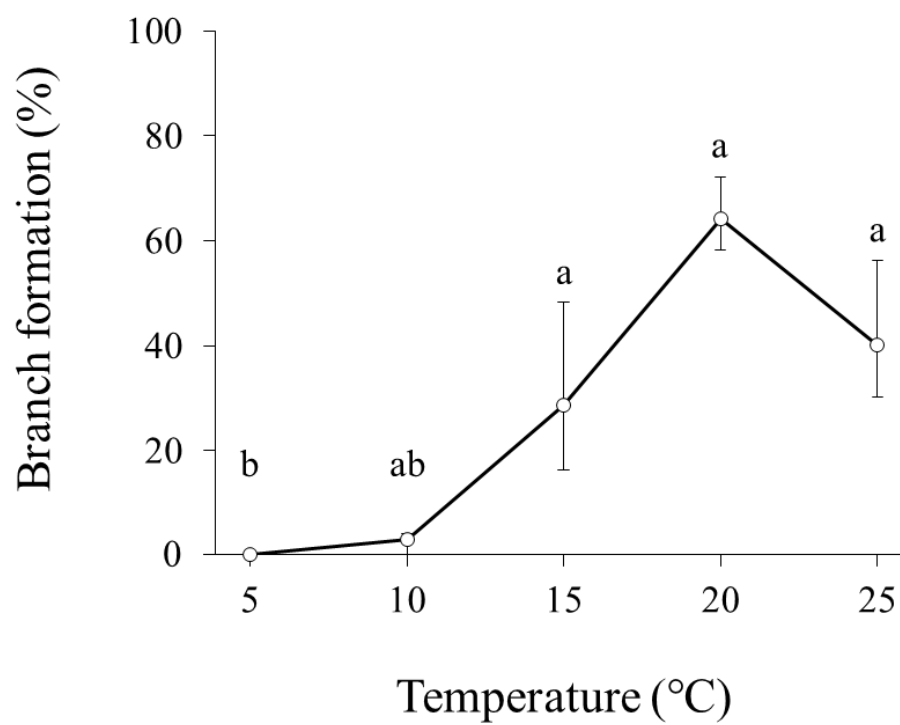


Fig. 7. Comparison of branch formation of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different conditions of temperature. Bars show the standard deviation. Letters above the bars indicate significant differences at $p < 0.05$.

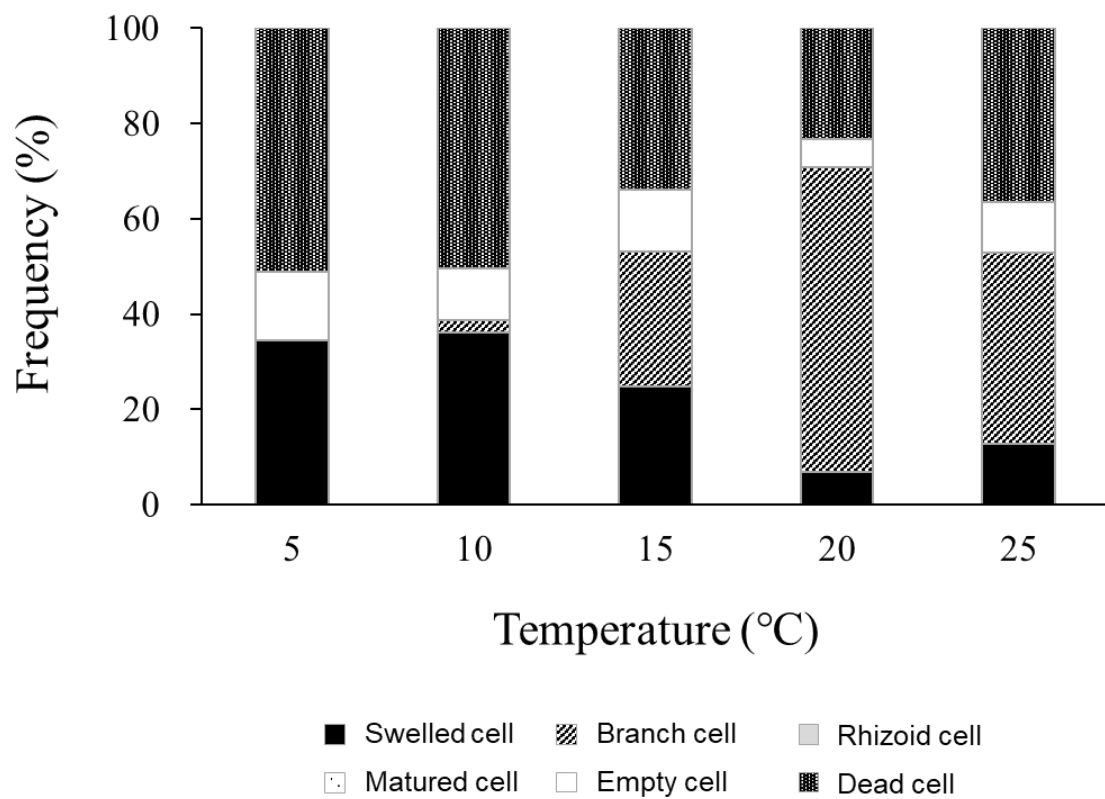


Fig. 8. The frequency of swelled, branch, rhizoid, mature, empty and dead cells of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different conditions of temperature.

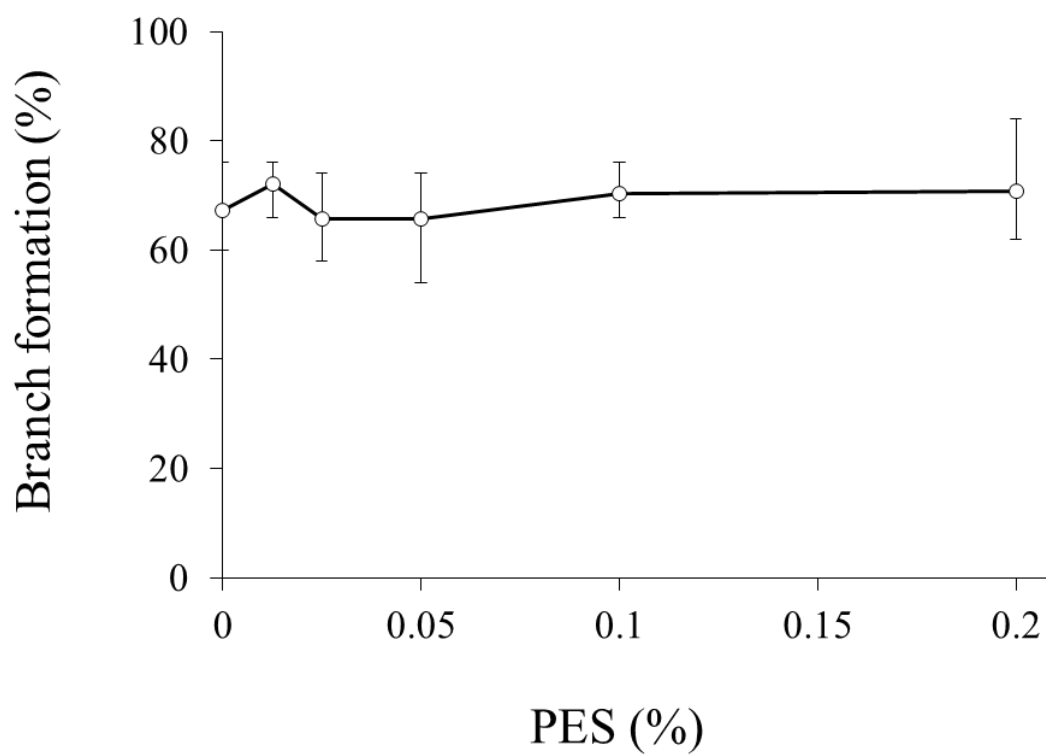


Fig. 9. Comparison of branch formation of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different conditions of PES. Bars show the standard deviation.

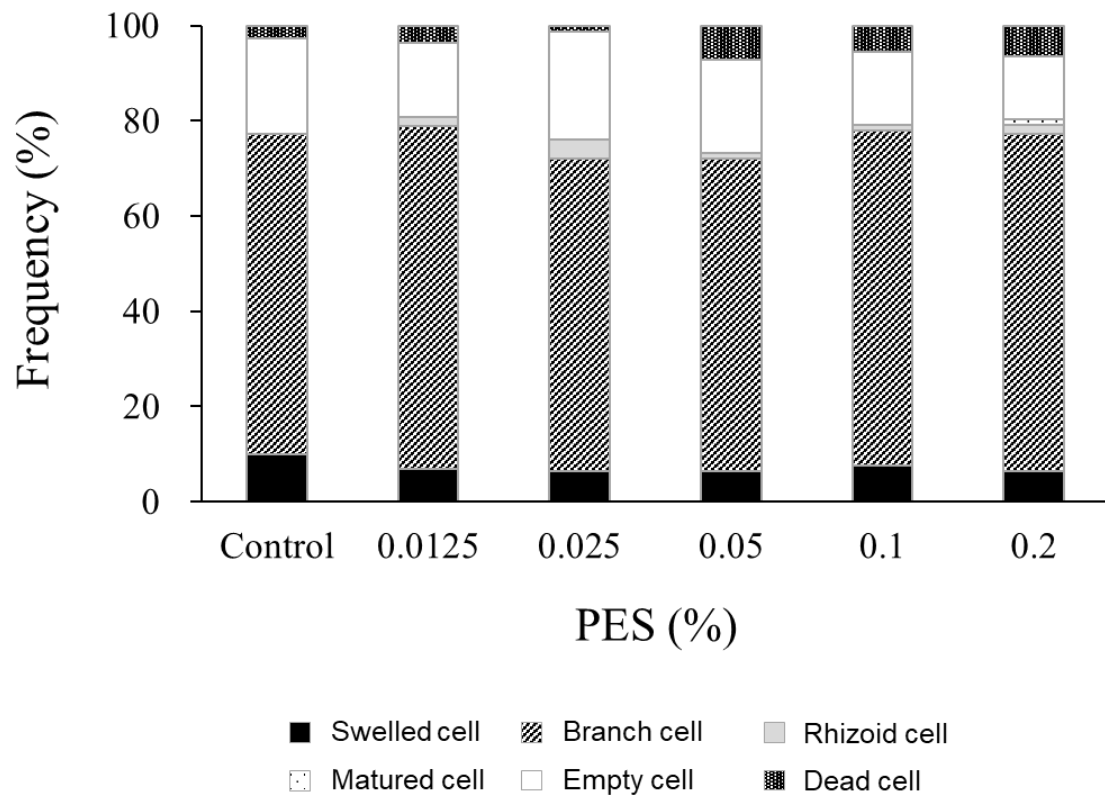


Fig. 10. The frequency of swelled, branch, rhizoid, mature, empty and dead cells of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different conditions of PES.

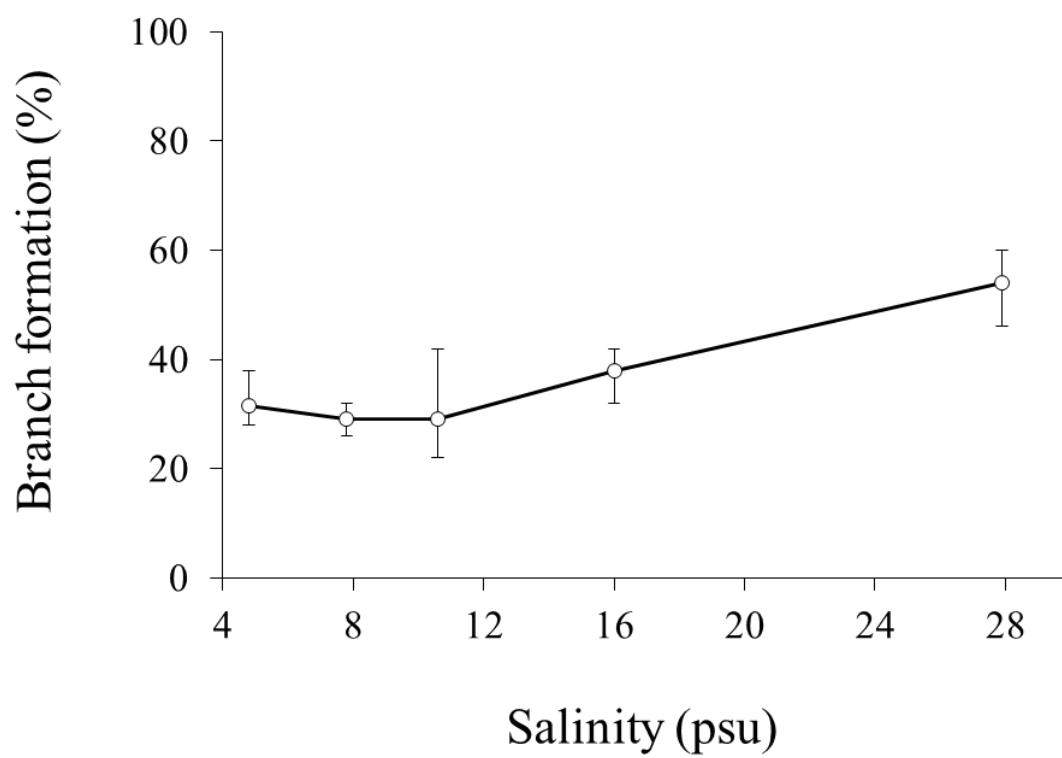


Fig. 11. Comparison of branch formation of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different conditions of salinity. Bars show the standard deviation.

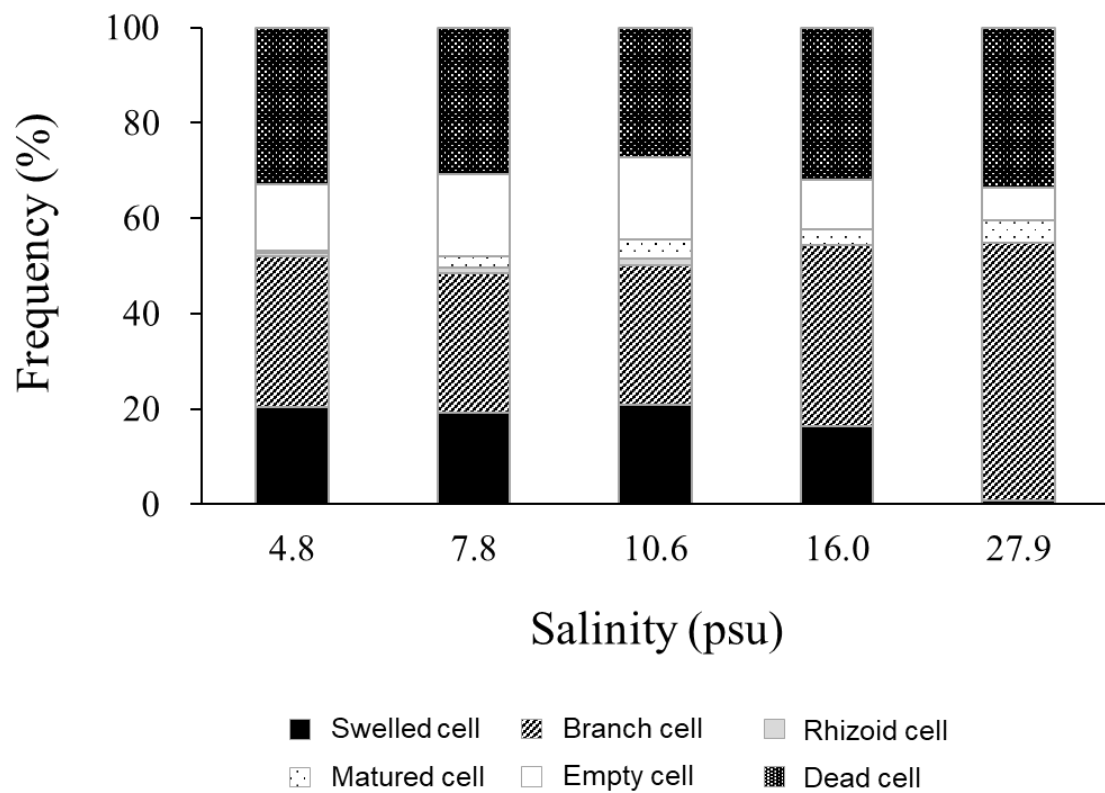


Fig. 12. The frequency of swelled, branch, rhizoid, mature, empty and dead cells of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different conditions of salinity.

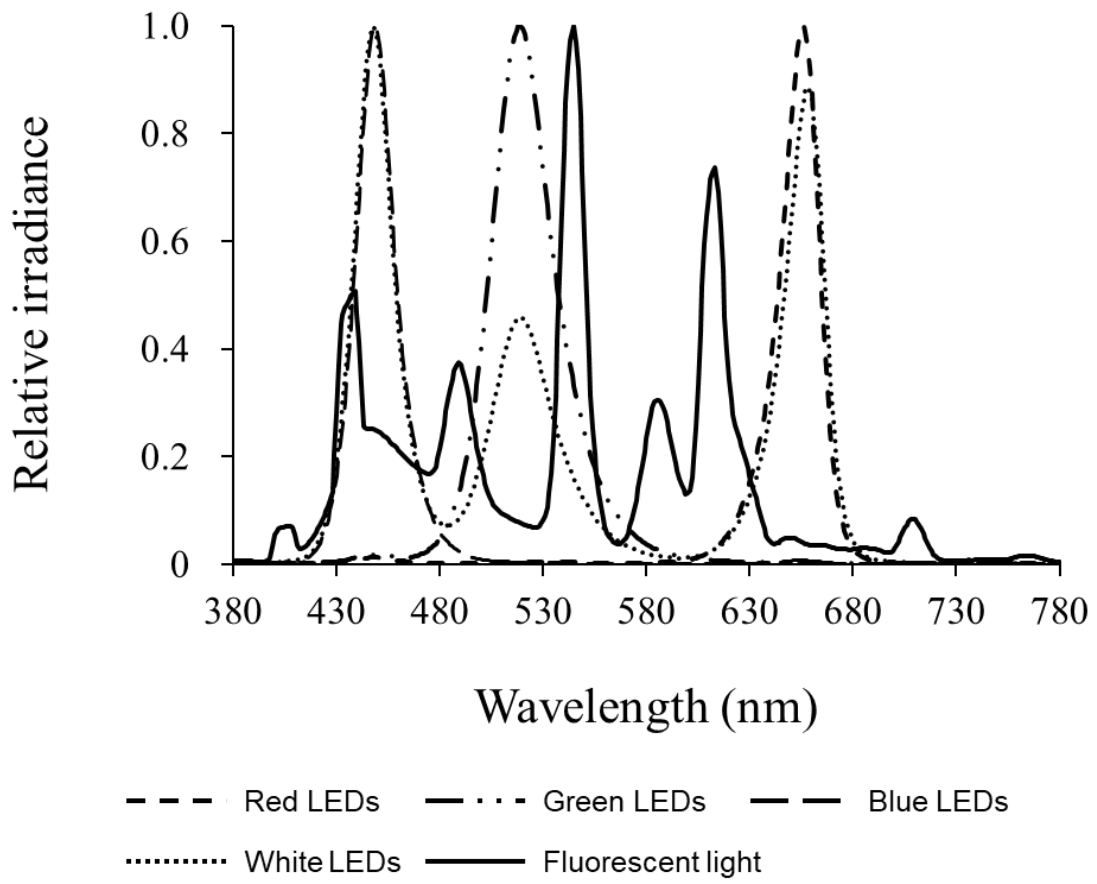


Fig. 13. Relative irradiance of wavelength for red, green and blue LED lights used.

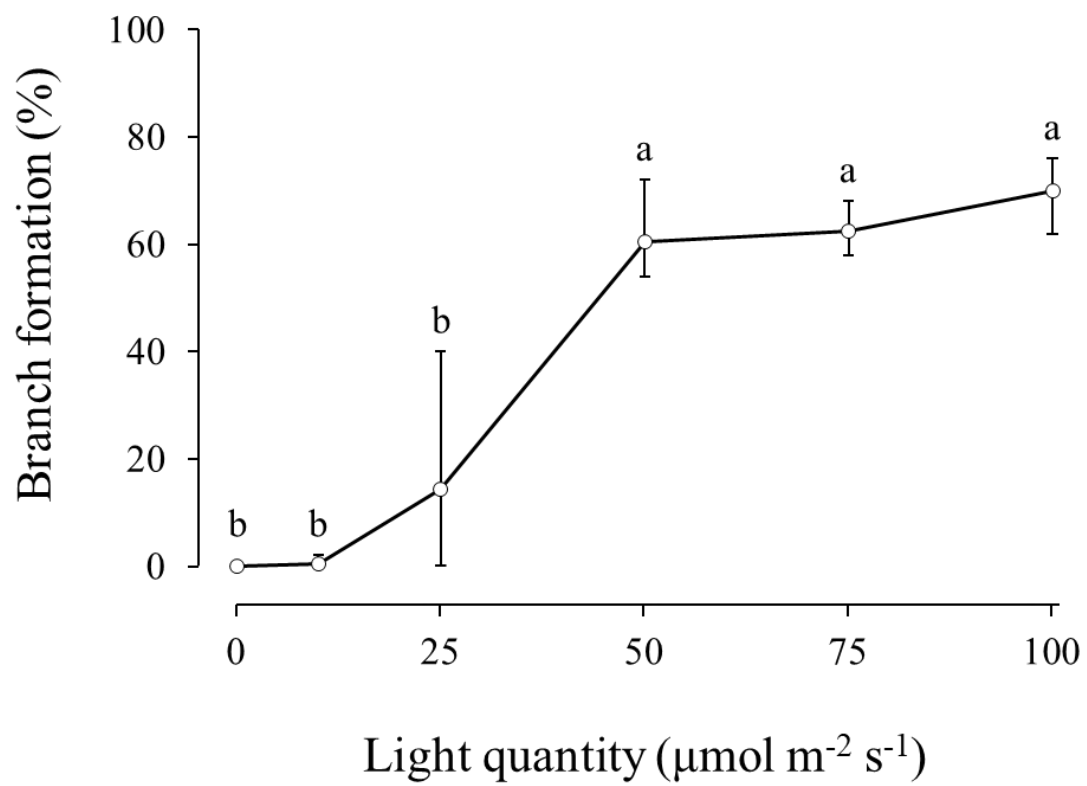


Fig. 14. Comparison of branch formation of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different light quantity conditions. Bars show the standard deviation. Letters above the bars indicate significant differences at $p < 0.05$.

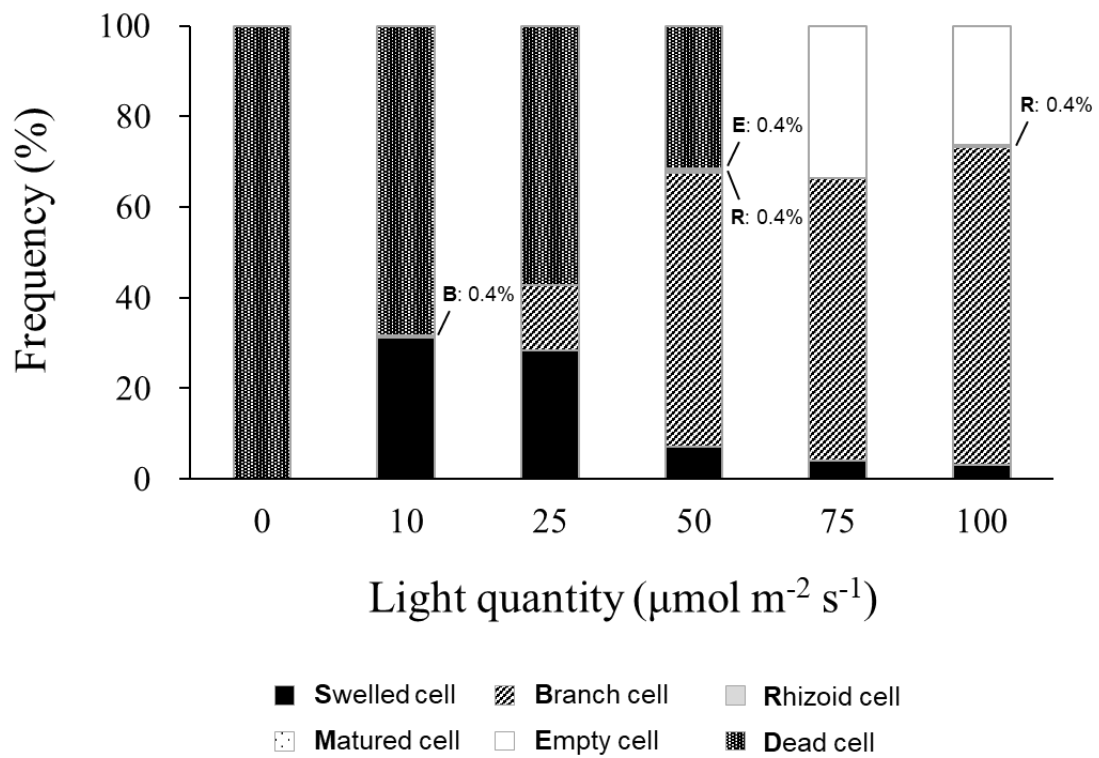


Fig. 15. The frequency of swelled, branch, rhizoid, matured, empty and dead cells of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different light quantity conditions.

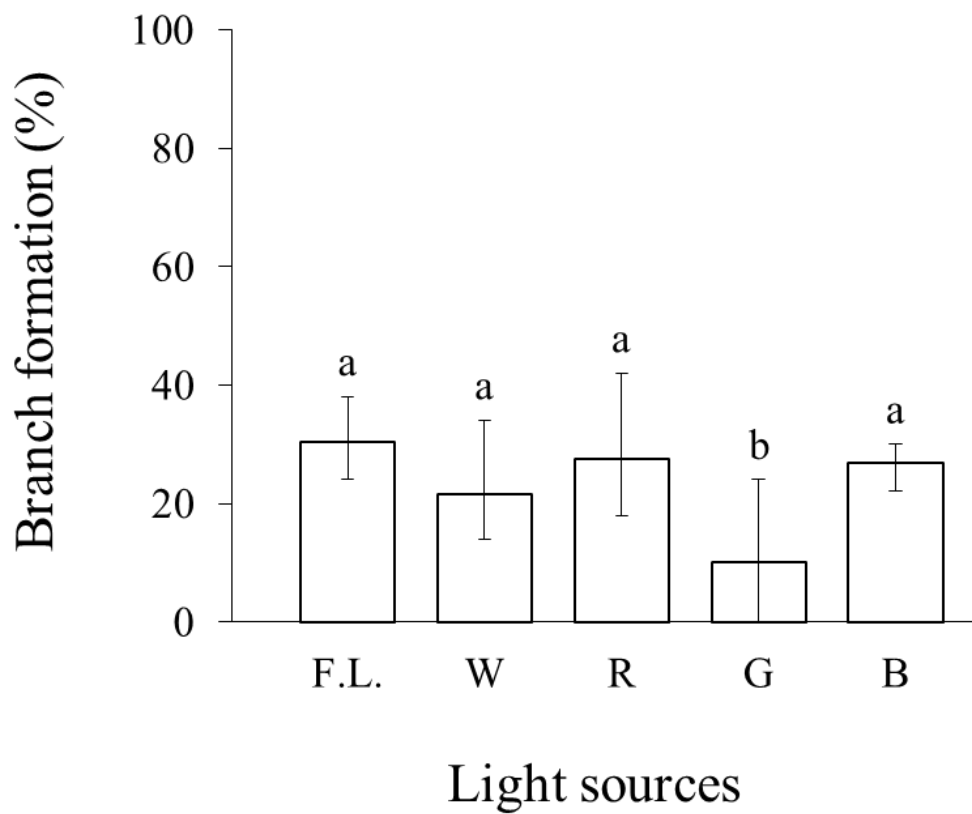


Fig. 16. Comparison of branch formation of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different light source conditions. F.L.: fluorescent light, W: white LEDs, R: red LEDs, G: green LEDs, B: blue LEDs. Bars show the standard deviation. Letters above the bars indicate significant differences at $p < 0.05$.

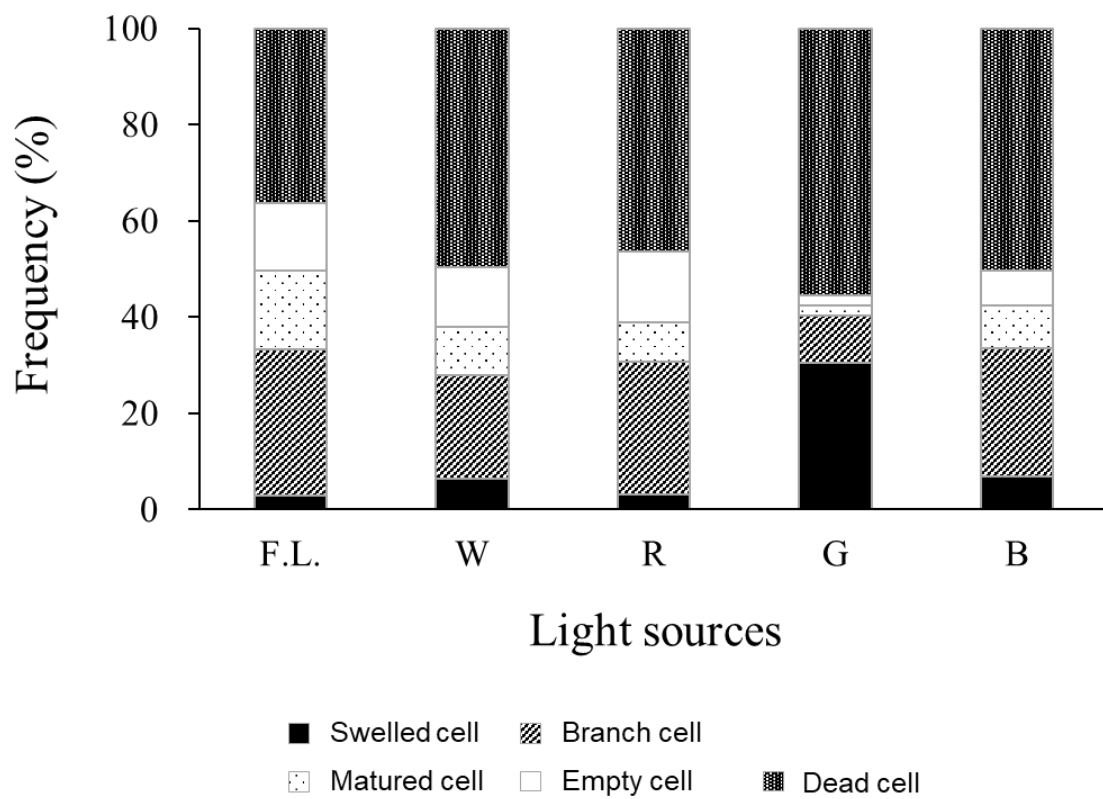


Fig. 17. The frequency of swelled, branch, rhizoid, matured, empty and dead cells of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different light source conditions. F.L.: fluorescent light, W: white LEDs, R: red LEDs, G: green LEDs, B: blue LEDs.

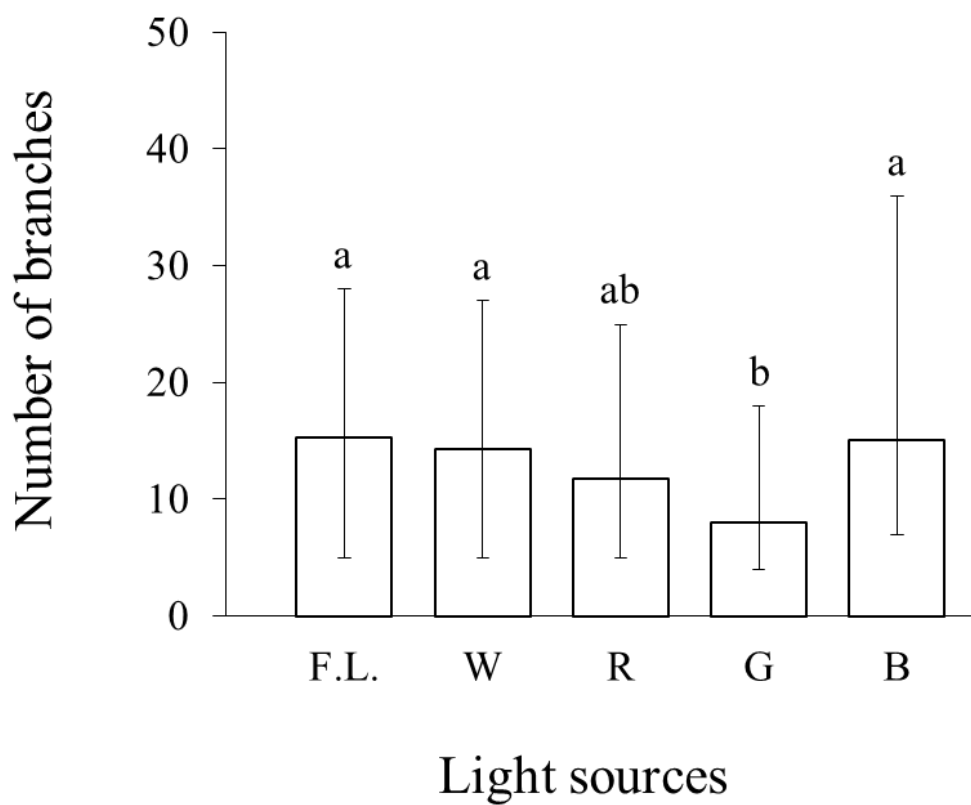


Fig. 18. Comparison of number of branches of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different light source conditions. F.L.: fluorescent light, W: white LEDs, R: red LEDs, G: green LEDs, B: blue LEDs. Bars show the standard deviation. Letters above the bars indicate significant differences at $p < 0.05$.

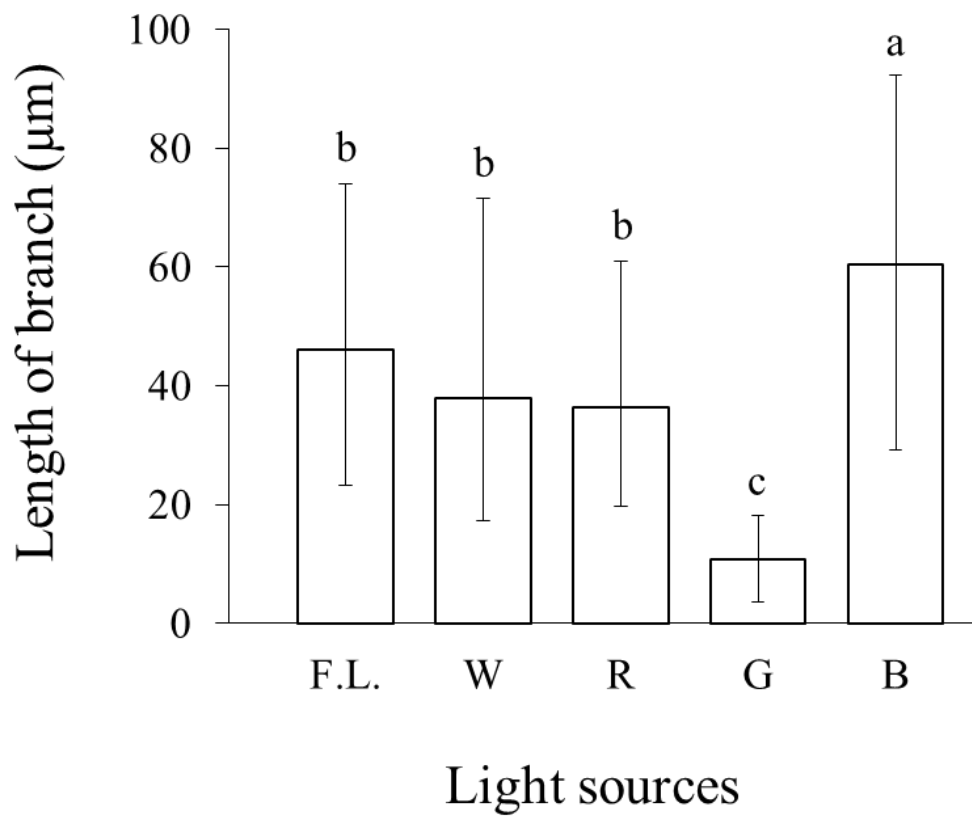


Fig. 19. Comparison of length of branches of *Ulva prolifera* subfragments cultured in different light source conditions. F.L.: fluorescent light, W: white LEDs, R: red LEDs, G: green LEDs, B: blue LEDs. Bars show the standard deviation. Letters above the bars indicate significant differences at $p < 0.05$.

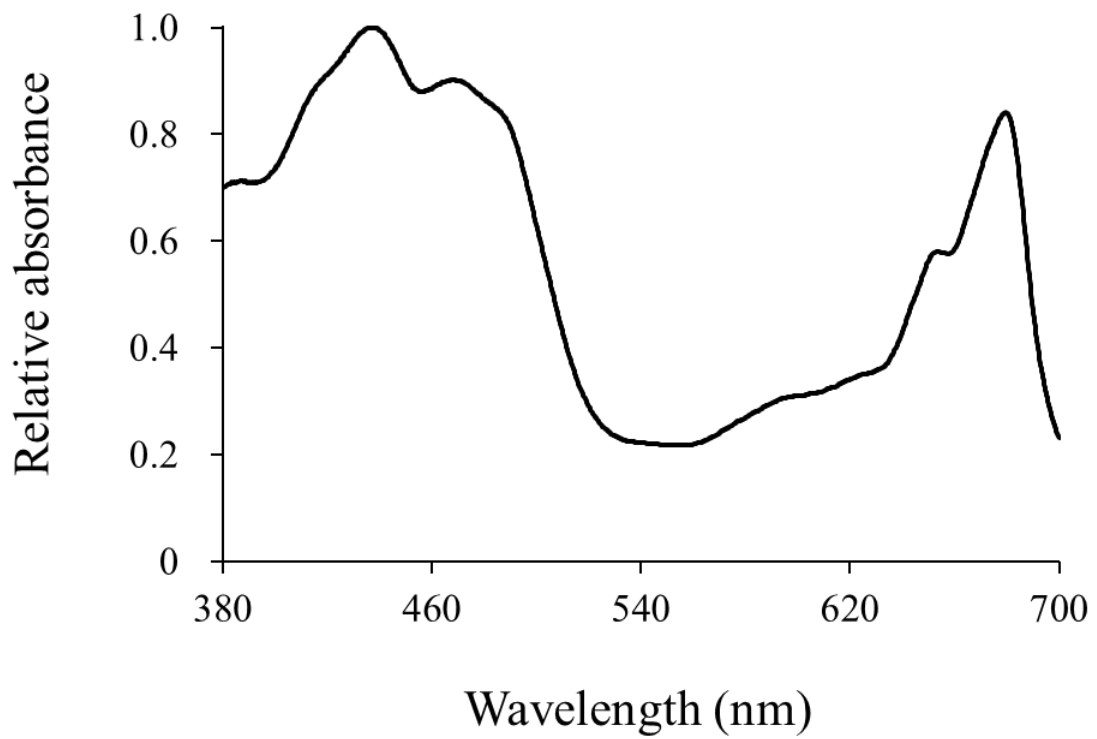


Fig. 20. Relative absorbance of wavelength for living thalli of *Ulva prolifera*.

参考文献

主論文

喜多郁弥, 岡本裕太, 團 昭紀, 浜野龍夫, 岡 直宏. 藻体抽出液を用いたスジアオノリ種苗生産における組織培養条件の検討. *Algal Resources* 2022; **15**: 1-7.

喜多郁弥, 米澤孝康, 岡本裕太, 團 昭紀, 浜野龍夫, 岡 直宏. 藻体抽出液を用いたスジアオノリ種苗生産に適した光量・光質条件の検討. *Algal Resources* 公刊予定 (印刷中)

副論文

喜多郁弥, 團 昭紀, 浜野龍夫, 齋藤 稔, 岡 直宏. 藻体抽出液を細断細胞に添加するスジアオノリ種苗生産方法. *Algal Resources* 2019; **12**: 11-20.