

## スサビノリ発芽殻胞子の凍結冷蔵

右田清治・山口正市\*・田中修一

### Freeze-Preservation of Germinated Conchospores of *Porphyra yezoensis* in Viable State

Seiji MIGITA, Masaichi YAMAGUCHI and Shuichi TANAKA

From the previous investigations, it was demonstrated that the leafy thalli of *Porphyra* show high frost-resistance. Recently, the freeze-preservation of laver-nets growing the thalli has been put into practical use for *Porphyra* cultivation in Japan.

In this paper, we deal with the frost-resistance of germinated conchospores of *Porphyra yezoensis* in an attempt to develop a new application of *Porphyra* cultivation.

The results are summarized as follows :

1. The germinated conchospores showed higher resistivity against the freeze-preservation than the free conchospores, but they showed slightly lower resistivity than the germinated monospores.
2. In the freeze-preservation at about  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ , most of germinated conchospores survived without remarkable damage at least for two weeks. On the other hand, the survival-rate gradually decreased after 25 days storage.
3. In the room-seeding of *Porphyra*, the freeze-preservation of laver-nets, on which conchospores germinated, will be a useful method of *Porphyra* cultivation.

アマノリ葉体は強い耐凍性をもつため<sup>1-3)</sup>, ノリ養殖においては採苗後の葉体を凍結冷蔵して, 養殖期の後半に活用する冷凍網の技術が広く普及している。一般に, このような冷凍網では2, 3 cmから数 cmの葉体を入庫するが, それ以下の幼芽, 幼葉でも凍結には比較的強いものの, 長期安全に生存するとは限らずまた産業上の必要性も少ないため, 採苗初期の冷凍は行なわれていない。また, 糸状体より放出された殻胞子を短期間冷蔵して, それを採苗に利用する試験もこころみられたが<sup>4,5)</sup>, 殻胞子の耐凍性が弱く成績が不安定なため実用化されていない。

筆者らは, 1970年秋に放出殻胞子を室内で海苔網の単糸に着生, 発芽させ2, 3時間を経過した発芽殻胞子を直ちに凍結冷蔵して耐凍性を調べたが, それらは短期間であれば高い生存率を示すことが判明した。また, 同時に採苗直後の海苔網を短期冷蔵する実用化試験でも好成績を収めたので, それらの結果を報告する。

\* 太良町海苔採苗場 (佐賀県太良町)

## 材 料 お よ び 方 法

実験にはスサビノリ糸状体より放出された殻胞子を用い、またスサビノリ葉体の単胞子も比較試験に供した。

放出殻胞子は、1970年9月末から10月にかけて、ガラス容器の底に沈んだものを集めて胞子液とし、その適量を200mlの枝付きフラスコにクレモナ5号の単糸（長さ3cm）と共に入れ、5000~7000 luxの白色蛍光灯の光線で送気攪拌して培養し、2, 3時間で単糸上に着生発芽させた。その単糸は着生していない殻胞子を海水中で洗い落した後、4本づつを径1cm高さ5cmの管瓶に入れ、海水中と水を切った湿状態で空気中で密封したものの数組をつくり、それらを電気冷蔵庫の製氷室で $-10$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ まで凍結し、直ちに両温度の冷凍庫で冷蔵した。なお、その際の冷却速度は海水中凍結で約 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、湿状態の空気中凍結で $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ であった。

また、対照として同時に小ガラス板上に沈下した未発芽の殻胞子を同様に凍結冷蔵し、一方スサビノリの10~15cmの大型葉体より11月中旬に放出された単胞子もクレモナ単糸上に着生、発芽させて耐凍性を比較してみた。なお、この実験では養殖海苔網より採集した葉体のうち単胞子放出中の数個体をシャーレに入れ、暗黒下で約半日間静置して放出された単胞子を、前述の殻胞子の場合と同じ方法で単糸上に着生、発芽させた。

解凍は室温で行ない、16日までの短期冷蔵では、試料を直ちに培養海水に移し、3, 4時間後に生死を検鏡調査した。生死の判定は生のまま観察し、発芽体では色素体の色や形の変化で、殻胞子ではさらに細胞破壊の有無でも識別したが、その結果はエリスロシン染色性による判定とよく一致した。20日以上長期冷蔵では、色素体の色が淡色になり、単糸上では色による生死の判定がやや困難な場合もあったので、1日間通気培養後エリスロシン染色によって生死を区別した。

生存率は、発芽体では各単糸上の約100個体につき生、死を計数し、単糸4本の平均値で表わし、未発芽殻胞子ではガラス板上の任意の数視野の平均値で示した。なお、発芽殻胞子、単胞子の長期冷蔵ではそれぞれ3回行なった実験例の総平均値のみを图示した。

## 結 果

**短期冷蔵** 糸状体より放出された殻胞子は、静置した状態ではほとんど着生しないが、送気して海水を攪拌すると短時間に単糸上に着生するようになる。着生した殻胞子は約2時間も培養すると、側面観で長卵形ないし棍棒状に発芽し、細胞膜も形成されてくる(Fig. 3, A)。発芽殻胞子の凍結実験では、このような状態になった発芽体を凍結冷蔵した。短期冷蔵としては、1970年9月29日、10月3日、10月11日より実験を開始し、それぞれ1~16日後に解凍して生存率を調べたが、その結果は Fig. 1 のようになった。

まず、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷蔵をみると、海水中凍結の生存率は平均値（実線）で4日後までは90%以上を示すが、その後は徐々に低下し8日後で88%、16日後で82%となっている。また、湿状態の空気中凍結の生存率（破線）は、やや前者より低い、それでも8日後までは80%以上で、16日後でも約70%の値を示した。次に、 $-10^{\circ}\text{C}$ の冷蔵でも生存率と冷蔵期間との関係は、ほぼ同じ傾向がうかがわれるが、8日までの短期間では $-20^{\circ}\text{C}$ より生存率がやや高くなっている。

以上のように、短期間の凍結冷蔵で着生後2, 3時間しか経過していない発芽殻胞子でも、その生存率はかなり高い値を示した。また、解凍後の生長が正常であるかどうかを知

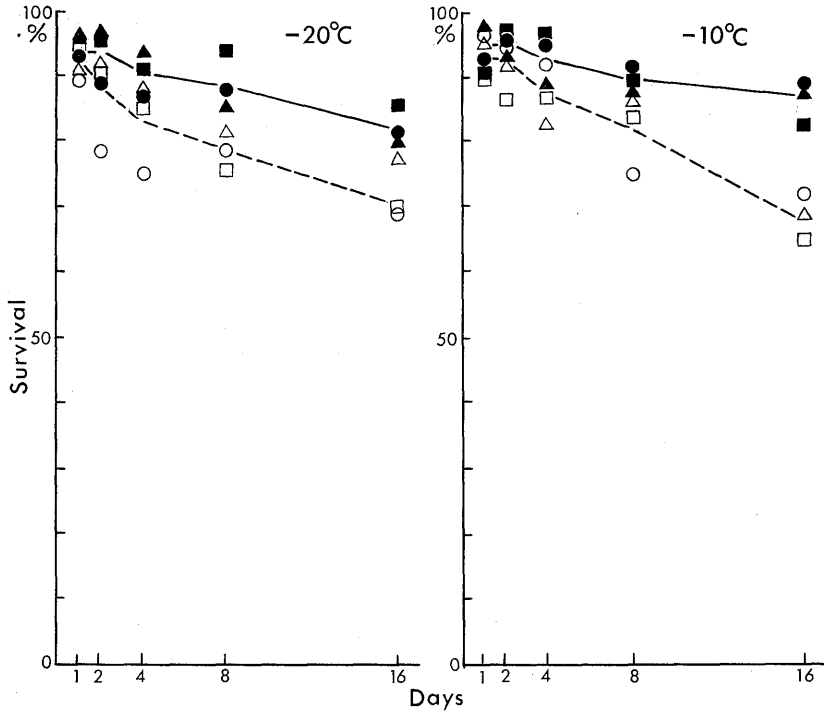


Fig. 1. Change in survival-rate of germinated conchospores, *Porphyra yezoensis*, during freeze-preservation at about  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ . Starting date of experiments ;  $\circ$   $\bullet$  Sept. 29, 1970,  $\square$   $\blacksquare$  Oct. 3, 1970,  $\triangle$   $\blacktriangle$  Oct. 11, 1970. Solid marks, solid line (average); materials were frozen in test tube containing sea water. Open marks, broken line (average); materials were frozen in test tube containing air.

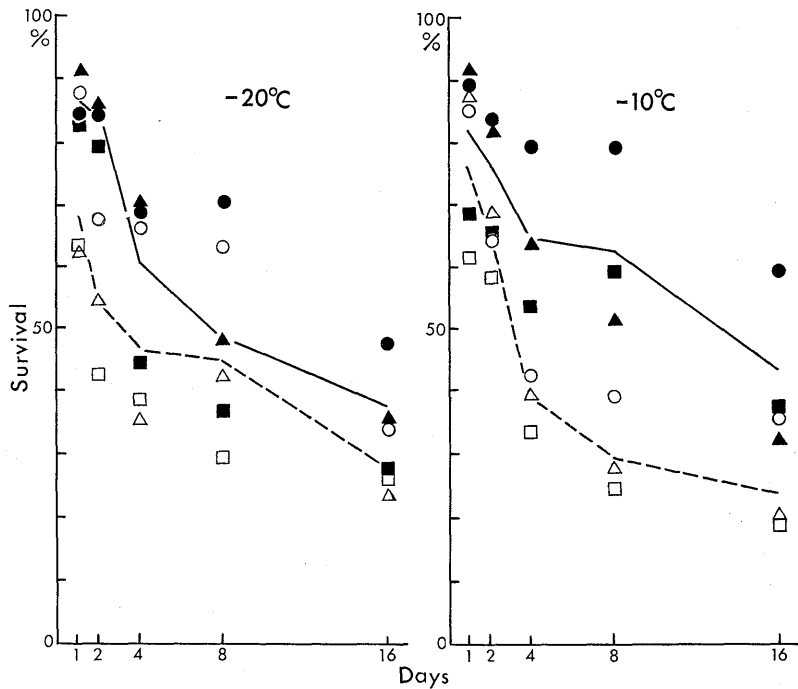


Fig. 2. Change in survival-rate of free conchospores, *Porphyra yezoensis*, during freeze-preservation at about  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ . Remarks are the same as in Fig. 1.

るため、16日間冷凍したものを送気培養したところでは、海水中や湿状態の空气中凍結のいずれでも凍結しない殻胞子の発芽体と同様な生長経過を示し、3日後には3, 4細胞に生長した (Fig. 3, C, D)。

一方、殻胞子の耐凍性は、同時に放出された未発芽の殻胞子を前実験と同様にして凍結冷蔵して調べたが、その結果は Fig. 2 のようになった。海水中凍結での生存率は、その平均値 (実線) で1日後までは80%以上を示すが、冷蔵2日以後になると急激に低下し、16日後では約40%となっている。また、湿状態の空气中凍結の生存率は、平均値 (破線) でさらに短期間のうちに低下し、16日後には30%以下になっており、各実験例による生存率の変動が大きく、その値も不安定であった。なお、 $-20^{\circ}\text{C}$ と $-10^{\circ}\text{C}$ とでは、海水中凍結でわずかに後者の生存率が高いが、湿状態の凍結でははっきりした傾向はみられなかった。

ところで、ノリ養殖における冷凍網では、葉体の含水率20~30%の半乾燥状態で密封し冷蔵しているが<sup>3)</sup>、発芽殻胞子では乾燥状態を調べて冷凍することは困難である。そこで、

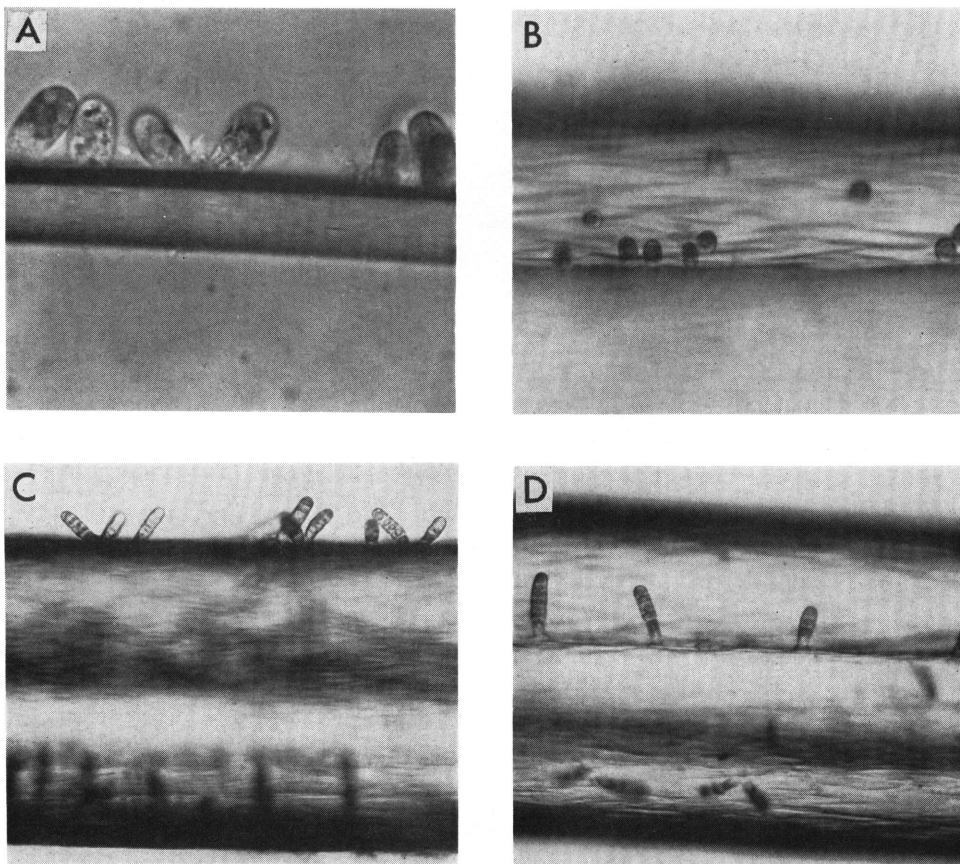


Fig. 3. Survival of germinated conchospores of *Porphyra yezoensis*, after freeze-preservation and their development.

A, 2 hours old germling of conchospores before freeze-preservation. B, survived germlings after 16 days freeze-preservation in sea water. C, development of the germlings, cultured for 3 days after 16 days freeze-preservation in sea water. D, development of germling, cultured for 3 days after 16 days freeze-preservation in air. A,  $\times 380$ , B-D,  $\times 120$ .

単糸を10分ないし30分間陰干して冷凍してみたが、生存率はいずれも湿状態での凍結よりはるかに低い値であった。

**長期冷蔵** 前項の実験では、同一条件で着生させた発芽殻胞子の単糸に限られていたため、16日間の短期冷蔵の結果しか得られず、しかもその間の生存率が比較的高い値を示したので、実験途中の10月中旬から20日間以上のやや長期の冷蔵試験を実施した。その結果は Fig. 4, A に示すように、発芽殻胞子の生存率は冷蔵20日後で約70%かそれ以上の高い値であるが、25日を過ぎると急に凍死するものが増え、40日後には40%以下に低下した。海水中凍結と湿状態の空气中凍結とを比べると、前者の生存率がかなり高く、また-10, -20°Cの冷蔵では-10°Cで凍死がやや多く、とくに30日以上冷蔵でその差が顕著であった。

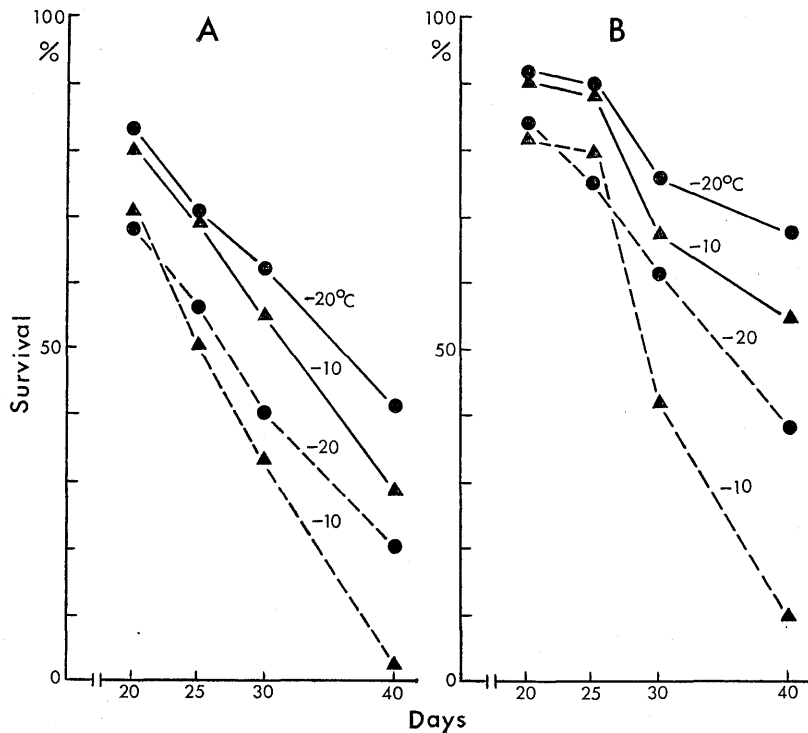


Fig. 4. Change in survival-rate of germinated conchospores (A) and germinated monospores (B), *Porphyra yezoensis*, during freeze-preservation at about -10°C and -20°C.

Solid line; materials were frozen in test tube containing sea water.

Broken line; materials were frozen in test tube containing air.

この発芽殻胞子の長期冷蔵でも、解冻後の単糸上の発芽体を数日間送気培養してみたが、大部分の発芽殻胞子は正常に生長したのに、30, 40日冷蔵したもののうち生きてはいるが単細胞のままに生長不良のものがまれに観察された。

一方、葉体より放出される単胞子についても、室内でクレモナ単糸上に着生させ2, 3時間経過した発芽体を、殻胞子の場合と同じ方法で、11月中旬から凍結冷蔵してその耐凍性を調べた。その結果は3回行った実験の平均値で Fig. 4, B のようになり、発芽単

胞子の生存率は海水中、湿状態の空气中凍結でも、また $-10$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷蔵でも、25日後までは80%以上の値であるが、冷蔵30日以後になると急に凍死が多くなっている。しかし、発芽単胞子の生存率は発芽殻胞子のそれよりかなり高く、耐凍性の強弱の差がはっきりうかがわれる。なお、冷蔵温度では $-20^{\circ}\text{C}$ が $-10^{\circ}\text{C}$ より生存が多く、海水中凍結が湿状態の凍結より凍死が少ないことは、長期冷蔵の発芽殻胞子の場合とよく一致している。

**企業化試験** 以上の研究室での実験と同時に、佐賀県太良町大浦漁協のノリ業者の協力を得て企業化試験を実施した。採苗は9月25日から9月28日にかけて、太良町海苔採苗場の回転式採苗装置を使用してクレモナ5号海苔網に種付を行ない、それらの網は採苗当日の午後に水切りして $-20\sim-23^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫で凍結冷蔵し、10月1日から10月5日にかけて重ね張りで沖出しをして、さらに11月5日頃から展開養殖を行ない、その間の芽の増減、生育、生産量を調査した。

その結果は、この試験の場合同時に採苗した対照網の設定ができず、また当業者へ依頼した試験であったため正確なデータは得られなかったが、養殖の概略は次のようになった。沖出し一週間後の芽の減少は普通の室内採苗網に比べて大差なく、8~9日後には芽付きが肉眼で確認できるようになった。ただ、水切り後30分以上を経過した網で芽数の減耗が多少みられた。芽の生長は、10月1日張込みのもので10日頃までは順調に生育したが、10月12日からの大量降雨により一時芽イタミ症をおこしたが、枯死するには至らず徐々に回復し、その後は順調な生育を続けた。なお、降雨による淡水の障害は、有明海全域にみられた現象で、太良地区の一般の室内、野外採苗網でも同程度の被害を受けた。試験網による生産は、赤ぐされ、壺状菌病による一斉撤去(組合自主規制)の12月20日までに3~4回摘採ができ、その間の生産枚数は平均約2,000枚(最高2,800、最低1,200枚)で、同地区の一般養殖網と全く差のない生産をあげた。

## 考 察

アマノリ葉体の凍結冷蔵において、冷蔵の適温が $-20^{\circ}\text{C}$ 前後であること、また凍結前処理として含水率20~30%の半乾燥が効果的であることなどが明らかにされていて<sup>1,3)</sup>、適当な条件で凍結した葉体細胞は6カ月の冷蔵で70%以上の高い生存率がみられる<sup>2)</sup>。一方、アマノリの糸状体は葉体より耐凍性がかなり弱く、その枝は数日間の冷蔵で生存率70%以下に低下するといわれている<sup>6)</sup>。この実験で、発芽殻胞子の耐凍性は、着生後2、3時間ものを凍結したのかかわらず、20日間の冷蔵で70%以上の生存率といった高い値を示している。この生存率は、同時に試験した未発芽殻胞子の16日間冷蔵で50%以下の値と比較してもかなり高くなっており、殻胞子は発芽するとその耐凍性が急に増大するものと考えられる。

凍結冷蔵条件と耐凍性の関係をみると、まず温度については16日までの短期間で $-10^{\circ}\text{C}$ が $-20^{\circ}\text{C}$ より生存率がやや高く、20日以上長期になると逆の結果になっている。これは短期冷蔵では凍結時の障害が低温ほど悪影響を及ぼし、また長期になると $-10^{\circ}\text{C}$ 程度の温度ではなお酵素の活性による変質がおこるためと考えられる。また、海水中凍結と湿状態の空气中凍結とを比較すると、常に海水中凍結の生存率が高くなっている。この理由として空气中凍結では冷却速度がやや過大であったことがあげられるが、1日後の生存率には大差がなく冷蔵期間が長くなるほど差が大きくなっているため、空气中凍結では密封した

ものの単糸の質量に対し管瓶の容積が大きいため、凍結乾燥状態になり乾燥に弱い発芽体が障害を受けたとするのが妥当のように思う。

冷蔵期間と生存率との関係では、発芽殻胞子は16, 20日間の冷蔵で約70%の高い生存率を示したのに、25日後から急に凍死が多くなっており、約20日間が一応安全に冷蔵できる期間であると考えられる。なお、解凍後の培養で20日前後の冷蔵の発芽体は正常に生長するが、30, 40日後のものでまれに生長不良の芽がみられたのは、長期冷蔵における凍死以外の障害として考慮しなければならない。

この研究では、スサビノリの大型葉体より得た発芽単胞子についても比較実験を行なったが、その耐凍性は発芽殻胞子より強くなっており、これは一般培養で単胞子が殻胞子より発生時の生長が速いことと考え合せて、内在する活力が両者で違うことを意味するものと思われる。このようなノリの生育過程による耐凍性の相違について、すでに右田<sup>6)</sup>は葉体と糸状体の両世代で差があることを明らかにし、また糸状体では枝と殻胞子囊で、葉体では生育段階で幾らかづつ違うことを示唆している。ここで、さらに本研究の結果を加えて、ノリの両世代の各細胞の耐凍性を比較すると……果胞子<糸状体の枝<殻胞子<殻胞子囊<単胞子<発芽殻胞子<発芽単胞子<幼芽<幼葉<成体(栄養細胞)……という序列が考えられる。このうち単胞子までは凍結に弱く、また強弱の順序にも明確な差はないが、発芽殻胞子から幼芽に至る間に急に耐凍性が増大し、さらに幼葉、成体では強い抵抗性を示すようである。

ところで、発芽直後の殻胞子が短期間の冷蔵に堪えるとなると、当然室内採苗の海苔網の凍結冷蔵が可能になり、本研究もその企業化の基礎知識を得ることを目的としてきた。現在、室内採苗は瀬戸内海や九州沿岸の各地でその技術が定着している。しかし、その採苗期間は気温や海水温に支配され、普通九州では9月20日過ぎから操業できるが、なお漁場水温が高く沖出しができなかったり、また早張りを禁止する漁場行使の自主規制もあって、一般に9月中の採苗は制限されている。一方、操業終了時は野外採苗の張込が終る10月10日前後であり、その後は収量の減少をきたすので行なわれない。このように、ノリの室内採苗はかなりの設備投資を要しながら、その操業日数は約10日間というきわめて短い期間である。そこで、室温が下がり室内採苗が可能になる9月下旬から、海水温が沖出しできる温度になるまでか或いは自主規制の採苗開始日まで、約1週間から10日間の短期冷蔵を行なうことは、室内採苗の能率を高めるのに役立つと考える。その技術的なことに関連しては、葉体の冷凍網では凍結前処理として半乾燥にして密封しているが、採苗直後の発芽殻胞子は乾燥に弱いこと、冷蔵中にさらに凍結乾燥状態になることなどを考えると、半乾燥にするのはかえって危険であり、滴下する水分を切った程度で冷凍袋に封入する方が望ましい。また、採苗を開始して入庫できる状態になるまでの時間は、この実験では2, 3時間であったが、当業者のものでは条件により差があるので、発芽状況を検鏡して判断するか、午後まで海中に入れた後で入庫すれば安全といえよう。冷蔵温度は短期間の場合には-10℃が-20℃よりやや生存が多いが、両者の差は少ないので一般冷凍網でとられている-20℃前後の温度でも一向にさしつかえはなく、また冷蔵期間は前述した実用上の必要期間である10日以内を一応の目安と考えればよいと思う。

## 摘 要

スサビノリの殻胞子を海苔網の単糸に着生させ、2, 3時間後の発芽殻胞子を  $-10, -20^{\circ}\text{C}$  で凍結冷蔵し、解凍後の生存率を調べた。

1. 発芽殻胞子は海水中凍結、湿状態の空气中凍結で未発芽の殻胞子より強い耐凍性をもつ。また、発芽単胞子は発芽殻胞子よりさらに強い抵抗性を示した。
2. 発芽殻胞子は冷蔵 20日間までは大部分が生き残ったが、25日以上になると徐々に凍死が多くなる。
3. 室内採苗網を直ちに凍結冷蔵し、4~10日後に出庫して養殖したところ、正常な生産をあげた。この方法は採苗期間を長くし、室内採苗の能率を増大するのに役立つと思う。

終りに、本研究を行なうにあたり、種々ご協力いただいた佐賀県太良町および同町大浦漁協の方々に厚く御礼申し上げる。

## 文 献

- 1) 右田清治：アマノリ葉体の生体凍結保存-I, 本誌, 17, 44~54 (1964)
- 2) 右田清治：アマノリ葉体の生体凍結保存-II, 本誌, 21, 131~138 (1966)
- 3) 倉掛武雄：海苔網冷蔵の手引, 全海苔連, 東京 (1966)
- 4) 片山勝介・本田信夫・石田公行：低温貯蔵単胞子によるノリの採苗について, 岡山水試事業報告 (1966)
- 5) 本田信夫・杉山英之・片山勝介：ノリ単胞子の冷凍貯蔵について, 岡山水試事業報告 (1967)
- 6) 右田清治：凍結アサクサノリ糸状体の生存と殻胞子放出, 本誌, 22, 33~43 (1967)