

光質が異なるLED照射下でのアラメの配偶体の生長と成熟

村瀬 昇*†, 阿部真比古*, 野田幹雄*, 須田有輔*

Growth and Maturation of Gametophyte in *Eisenia bicyclis* under Different Light Quality from Light Emitting Diodes (LEDs)

Noboru Murase*†, Mahiko Abe*, Mikio Noda* and Yusuke Suda*

Abstract : We investigated the effect on growth and maturation of gametophyte in *Eisenia bicyclis* at 20°C, 12 h light- 12 h dark cycle and 50 μmol m⁻² s⁻¹ using four different light emitting diodes (LEDs) and a fluorescent light . The relative growth rates of the male and female gametophytes under blue LEDs were obtained high values, but that under red LEDs were obtained low values. The maturation of the female gametophyte was promoted under white and blue LEDs, and was inhibited under red LEDs. Thus, it were clarified that the growth and maturation of gametophyte in *Eisenia bicyclis* were promoted by using white and blue LEDs, and were inhibited by using red LEDs.

Key words : *Eisenia bicyclis*, gametophyte, Growth, LEDs, Maturation

緒 言

褐藻コンブ目のアラメ *Eisenia bicyclis* は有用水産生物の餌料や仔稚魚の育成場となる藻場構成種として、水産上重要な種である。アラメ場を含む藻場は、温暖化による海水温上昇や、植食動物の食害および浮泥の堆積などにより衰退が全国的に進んでいる^{1, 2)}。山口県の日本海沿岸ではアラメが主要な藻場構成種となっているが、一部の海域では魚やウニの食害により藻場が衰退し始めている。藻場衰退は、磯根資源の減少を招き沿岸漁業に大きな影響を及ぼす。その対策には、スポアバックなどによる母藻投入や基質を用いた種苗移植などの藻場の創生や維持・管理が知られている³⁾。基質を用いた種苗移植においてはアラメなどの藻場構成種の種苗を安定的に生産、管理する技術が必要である。

アラメと同じコンブ目に属し、養殖種であるワカメやコンブでは、配偶体の時期に室内で種苗生産が行われているため、生育には光源が必要となる。その光源には、透過性

の高いポリカーボネート素材の屋根や窓から透過させた太陽光や、人工光源では蛍光灯が使用されてきた。しかし、太陽光の光量調節では遮光ネットなどを用いた経験に基づいており、蛍光灯では発熱や漏電などの技術的課題も多く、種苗生産では簡便に再現性のある光条件を設定、維持することが困難である。

近年、消費電力が低く、寿命が長いLED (Light Emitting Diode, 発光ダイオード) が多様な分野で光源として利用されてきた。さらにこの1~2年の間に、従来の照明器具に取り付け可能な電球型や蛍光灯型のLEDも登場し、一般の照明光源として多様な産業分野での普及が加速してきている。LEDは波長特性が異なる様々な発光色が開発され、その発光スペクトルの幅は小さいという特徴を持つことから、異なる光質条件を設定しやすい。また、LEDの低発熱という特徴から近接照射ができるため、農林水産分野では植物工場の栽培光源として利用され⁴⁾、作物では赤色LEDおよび青色LED照射による生長促進や機能性成分の生成に関する研究が行われている^{5, 6)}。水産分野でも、

*水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan)

†連絡先 (Corresponding author: e-mail: murasen@fish-u.ac.jp)

二枚貝や無脊椎動物の餌料用微細藻の培養^{7,8)}, アジ類やイカ類などの集魚灯の光源としてLEDが利用され始めている⁹⁻¹¹⁾。さらに, 海藻類の増養殖および藻場造成においても, 室内での種苗生産や管理などで培養用の光源として利用が期待されている。これまでに大型海藻に対しては, 白色LED照射による緑藻アナオサ *Ulva pertusa* の不稔性変異株の生長¹²⁾, 光質が異なるLED照射による緑藻スジアオノリ *Ulva prolifera*¹³⁾ および紅藻トサカノリ *Meristotheca papulosa* の生長と光合成について報告されている¹⁴⁾。また, 異なる光質条件下でのLED照射は褐藻ワカメの配偶体の生長と成熟にも影響することが報告されている¹⁵⁾。

そこで本研究では, 種苗生産や長期保存にLED照明を活用することを目的として, 藻場構成種であるアラムの配偶体を用いて, 生長や成熟に及ぼす青色, 緑色, 赤色および白色の各LED照射の影響と効果を培養実験から明らかにした。

材料と方法

材料

材料には, アラムの成熟藻体から遊走子を放出させ, それらから発芽させた配偶体を用いた。2009年10月28日に山口県下関市蓋井島西側の水深約3 mで成熟したアラム藻体を採集した。採集した藻体の側葉から子嚢斑を形成している部分を切り取り, 海水で付着生物を取り除き, 蒸留水で洗浄した後, 室内で約1時間程度乾燥させた。乾燥させた胞子葉を滅菌海水に浸漬し遊走子を放出させた。遊走子は, 容量50mlの底面に格子が記された細胞培養フラスコ (Greiner, 690170) 内に散布し, 濃度が約30~80 cells ml⁻¹になるように滅菌海水30mlを入れて調節した。

予備培養

光質別培養実験を開始する前に, 温度20℃の下, 光源に3波長形昼白色蛍光灯 (National, FL40SS・EX-N/37) を用い, 光量を50 μmol m⁻² s⁻¹, 明期12時間:暗期12時間の条件下で滅菌海水を用いて2日間静置して予備培養を行った。

光質別LED照明装置

光質別培養実験では, LED光源として砲弾型の青色LED (日亜化学工業, NSPB500S), 緑色LED (日亜化学工業, NSPG500S), 赤色LED (MagicTeck, LS501RS) および

白色LED (日亜化学工業, NSPW500CS) を用いた。対照区には予備培養と同じ3波長形昼白色蛍光灯を用いた。各光源の発光スペクトルをFig. 1に示す。発光スペクトルは, 光ファイバ (Ocean Optics, P400) を接続した分光器 (Ocean Optics, USB4000) とパソコン上のソフトウェア (Ocean Optics, Spectra suite) を用いて測定した。培養フラスコを置く5 mm厚の亚克力板を透過した光の発光ピーク波長は, 青色LEDが465 nm, 緑色LEDが523 nm, 赤色LEDが635 nm, 白色LEDが第1ピーク466 nmと第2ピーク566 nmであった。また, 蛍光灯では第1ピークが546 nmと第2ピークが611 nmおよび第3ピークが436 nmであった。発光波長範囲は青色LEDが約440~490 nm, 緑色LEDが約490~560 nm, 赤色LEDが約610~660 nm, 白色LEDが約440~720 nmおよび蛍光灯が約400~720 nmであった。

光質別培養実験

光質別培養実験では, 各光質下での光条件を光量50 μmol m⁻² s⁻¹, 明期12時間:暗期12時間, 温度20℃とした。予備培養後の遊走子から発芽して1~3細胞期の配偶体を対象に行った。光質別培養実験の開始時には, PES培地にKIを添加したPESI¹⁶⁾ を滅菌海水1000mlに対し10 ml加え, さらにGeO₂を0.5 mg加えた培養液を予備培養で用いた滅菌海水と交換した。細胞培養フラスコは, 格子が記された底面が照射されるように設置した。

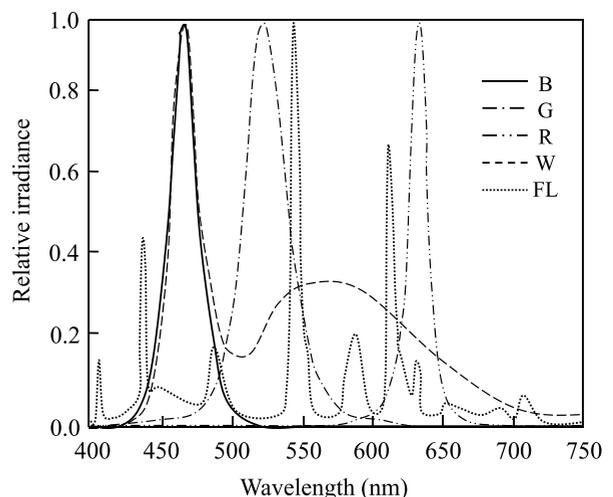


Fig. 1 Spectral distributions of four different LEDs and a fluorescent light. B, blue LEDs; G, green LEDs; R, red LEDs; W, white LEDs; FL, a fluorescent light.

生長測定

生長測定は、培養開始から28日目まで2日間隔で行った。各光質下で雌雄が識別できる配偶体を倒立顕微鏡（OLYMPUS, IX71）とデジタルカメラ（OLYMPUS, DP70）を用いて追跡観察した。追跡観察は、細胞培養フラスコの各格子上の配偶体の位置を用紙に記録して、雌雄の配偶体を10個体ずつ識別した。生長については、撮影した写真をパーソナルコンピュータ上に取り込み、画像解析ソフト（LIA for Win32）により配偶体の面積を求めた。

培養14日目の測定値から次式より相対生長率を求めた。

$$\text{相対生長率 (\% day}^{-1}\text{)} = \{ \ln(\text{培養14日目の値}) - \ln(\text{培養開始日の値}) \} / \text{培養日数} \times 100$$

成熟観察

成熟の観察は、アラメの雌性配偶体を対象に行った。雌性配偶体に卵が形成された時点で、成熟とみなした。雌性配偶体は、各光質下で47~100個体を選び、培養開始から48日目まで2日間隔で観察した。

統計処理

各光質間の相対生長率については、データ解析ソフト（カイエンス, KyPlot 5.0）を用いて、一元配置分散分析（one-way ANOVA）を行った後に、Tukey-Kramer法により多重比較検定した。

吸収スペクトル

アラメの遊走子をディスポーサルの滅菌シャーレ（ニプロ, 34-153）に散布し、蛍光灯下で温度20℃、光量 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明期12時間：暗期12時間の条件で培養した。培養液には、光質別培養実験と同じものを用い、約3ヶ月培養した。この間週に1回程度水換えを行った。培養した配偶体をカミソリの刃で5~6細胞の大きさに細断し、滅菌海水を加えて懸濁液を作成した。次に、この懸濁液をセルに入れ、滅菌海水を満たしたセルを対照区として、吸収スペクトルを測定した。吸収スペクトルは、ヘッドオンフォトマル装置（日立, 130-6031）が付属した分光光度計（日立, U-3000）を用いて、400~750 nmの波長範囲の吸光度を測定した。

結 果

アラメ配偶体の生長

アラメ雄性配偶体の各照射下での培養14日目の相対生長率をFig. 2に示す。相対生長率は、蛍光灯下で $39.3 \pm 2.2 \%$ day^{-1} （平均値 \pm 標準偏差、以下同様に表す）と高い値を示し、次いで白色および青色LED照射下でそれぞれ $36.3 \pm 2.4 \%$ day^{-1} と $36.1 \pm 5.5 \%$ day^{-1} 、緑色LED照射下で $34.2 \pm 4.5 \%$ day^{-1} であった。赤色LED照射下では $24.9 \pm 1.7 \%$ day^{-1} と低い値を示した。相対生長率は、蛍光灯下と緑色LED照射下および赤色照射下との間、青色および白色LEDと赤色LED照射下との間、緑色LED照射下と赤色LED照射下との間でそれぞれ有意な差が認められた（ $P < 0.05$, $n = 10$ ）。

アラメ雌性配偶体の各照射下での培養14日目の相対生長率をFig. 3に示す。相対生長率は、蛍光灯下で $41.5 \pm 3.1 \%$ day^{-1} と高い値を示した。次いで青色LED照射下で $38.1 \pm 5.3 \%$ day^{-1} 、白色および緑色LED照射でそれぞれ $36.3 \pm 2.2 \%$ day^{-1} および $34.4 \pm 2.1 \%$ day^{-1} であった。赤色照射下では $25.7 \pm 6.4 \%$ day^{-1} と低い値を示した。相対生長率は、蛍光灯下と白色、緑色および赤色LED照射下との間、青色LED照射下と赤色LED照射下との間でそれぞれ有意な差が認められた（ $P < 0.05$, $n = 10$ ）。

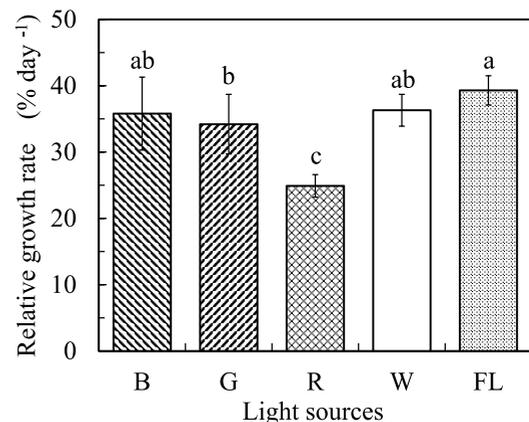


Fig. 2 Relative growth rates of male gametophytes in *Eisenia bicyclis* of 14th days in culture using four different LEDs and a fluorescent light. Each value is the mean of ten samples (mean \pm S.D.). Different letters on bars represent significantly different among light sources by Tukey-Kramer's multiple comparison test ($P < 0.05$). B, blue LEDs; G, green LEDs; R, red LEDs; W, white LEDs; FL, a fluorescent light.

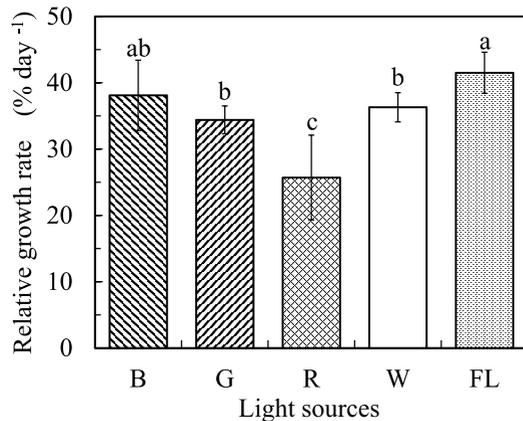


Fig. 3 Relative growth rates of female gametophytes in *Eisenia bicyclis* of 14th days in culture using four different LEDs and a fluorescent light. Each value is the mean of ten samples (mean \pm S.D.). Different letters on bars represent significantly different among light sources by Tukey-Kramer's multiple comparison test ($P < 0.05$). B, blue LEDs; G, green LEDs; R, red LEDs; W, white LEDs; FL, a fluorescent light.

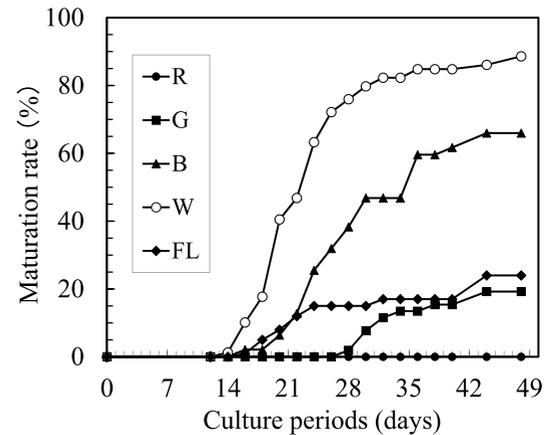


Fig. 4 Changes in maturation rates of female gametophytes in *Eisenia bicyclis* using four different LEDs and a fluorescent light. B, blue LEDs; G, green LEDs; R, red LEDs; W, white LEDs; FL, a fluorescent light.

アラメ雌性配偶体の成熟

アラメ雌性配偶体の48日間の成熟率の変化をFig. 4に示す。アラメ雌性配偶体の成熟は、培養14日目に白色LED照射下で最初に認められた。培養16日目には青色LED照射下および蛍光灯下で、培養28日目には緑色LED照射下でも成熟が認められた。白色LED照射下では培養18日目から20日目にかけて、青色LED照射下では培養24日目から36日目にかけて、成熟率が高くなった。蛍光灯下の成熟率は培養24日目以降ほぼ一定であった。培養48日目の成熟率は、白色LED照射下で88.6%と最も高く、次いで青色LED照射下が66.0%、蛍光灯下が25.0%、緑色LED照射下が19.2%の順であった。赤色LED照射下では成熟が全く認められなかった。

吸収スペクトル

蛍光灯下で約3ヶ月培養したアラメ配偶体の吸収スペクトルをFig. 5に示す。相対吸光度は、波長約450 nm付近で吸収ピークを示し、波長450 ~ 570 nmにかけて減少し、波長570 ~ 650 nmの範囲で低い値を示した。波長約650 nmからは再び高い値を示し、波長約675 nmで吸収ピークを示し、それ以上の波長範囲で吸光度が低下した。

考 察

本研究では、光質が異なるLED照射によるアラメの配

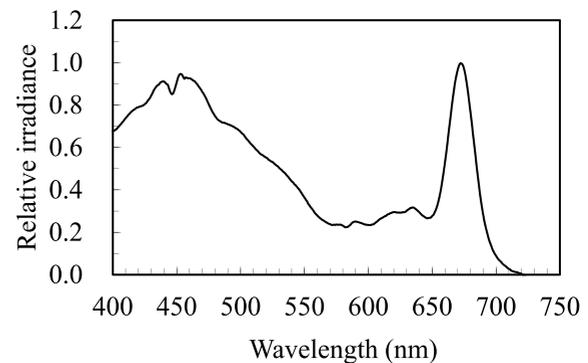


Fig. 5 Relative absorption spectrum normalized at 680 nm of living gametophyte in *Eisenia bicyclis* cultured for about 3 months using a fluorescent light. Each data shows the mean of three samples.

偶体の生長と成熟に与える影響について精査した。

アラメの雄性および雌性配偶体の生長は、青色LED照射下ではほぼ同等に良好で、赤色LED照射下では低調であることが明らかとなった。アラメの雄性配偶体の生長について光質が異なるカラー蛍光灯を用いた培養実験では、青色、白色および緑色光下で生長が良好で、赤色光下で生長が劣っていたと報告され¹⁷⁾、本研究の結果でもほぼ同様の傾向を示した。

アラメ配偶体の吸収スペクトルから (Fig. 5), 吸光度が比較的高い波長範囲の400~500 nmには、青色、白色LED照射および蛍光灯による発光波長範囲が含まれる (Fig. 1)。その波長範囲に照射された光は、藻体に含まれるクロロフィル a および c によって効率よく吸収され、配偶体の光合成活性が高まり、生長が良好になったと考え

られる。一方、赤色LED照射では、発光スペクトルの範囲（波長610～650 nm, Fig. 1）がアラメ配偶体の吸光度の低い波長範囲（Fig. 5）にあるため、その範囲の光エネルギーを十分に光合成に利用することができず、生長が抑制されたと考えられる。青色LED照射下に次いで緑色LED照射下の生長が比較的良好であったのは、緑色LED照射による発光波長範囲（約490～560 nm, Fig. 1）が褐藻特有のカロテノイド系光合成色素であるフコキサンチンの波長540 nm付近の吸収帯（Fig. 5）と一致し、光合成に利用でき、生長したためと考えられる。このように、光源の発光波長範囲と吸収スペクトルとの関係から光質による生長の違いについて推察することができた。しかし、藻体の吸収スペクトルは光合成の作用スペクトルと必ずしも一致しないため¹⁸⁾、今後、作用スペクトルに関して解析を進めるとともに、光合成色素の定量分析などを精査する必要がある。

本研究でのアラメの雌性配偶体の成熟は、白色および青色LED照射下で良好であり、赤色LED照射下では全く認められなかった。青色光によるコンブ目の雌性配偶体の成熟の促進については、LED照射ではワカメ¹⁵⁾で報告され、蛍光灯ではアラメ¹⁷⁾と*Laminaria saccharina*¹⁹⁾で知られており、本研究でも同様の結果が得られた。また、本研究では白色LED照射下でのアラメ配偶体の成熟率が高かった。これは、本研究で用いた白色LEDが青色を発する発光ダイオードの表面に蛍光塗料を塗布して製造されており、波長約440～490 nmの青色域の青色LEDの発光波長範囲と一致する（Fig. 1）ためと考えられた。

一方、赤色光では、LEDを用いた本研究のアラメおよびワカメ¹⁵⁾とも雌性配偶体には卵の形成が全く認められなかったが、蛍光灯を用いたアラメ¹⁷⁾と*Laminaria saccharina*¹⁹⁾の雌性配偶体ではわずかに卵形成が認められている。*Laminaria saccharina*¹⁹⁾の雌性配偶体では、卵形成に関する作用スペクトルが調べられ、波長400～480 nmで高く誘導されるが、波長520 nm以上では誘導されなかったことが報告されている。赤色蛍光灯の発光波長範囲は広く、青色域（波長440～490 nm）を含むためにコンブ目の雌性配偶体の卵形成をわずかながらでも誘導するが、それに対して赤色LED照射下では発光波長範囲（波長610～650 nm）が狭く、青色域を含まないため卵形成が認められなかったと推察される。

コンブ目の配偶体における成熟の促進あるいは抑制については、培養液中のキレート化鉄²⁰⁾やジベレリンとステ

ジオサイドのような植物生長調節剤²¹⁾の影響を受けることが知られているが、培養中の光質条件も配偶体の成熟と生長の促進もしくは制御に影響を与えることが明らかになった。本研究で明らかにできた青色または赤色LED照射光を利用したコンブ目の配偶体株の成熟促進あるいは抑制に関する知見は、藻場造成、増養殖のための種苗生産あるいは優良株の長期保存において効果的な手法として期待できる。

文 献

- 1) 秋本 泰, 松村知明: 日本沿岸の海藻分布資料と藻場面積の変化. 藤田大介, 村瀬 昇, 桑原久実 (編著), 藻場を見守り育てる知恵と技術. 成山堂書店, 東京, 17-24 (2010)
- 2) 藤田大介, 桑原久実, 綿貫 啓, 青田 徹, 横山 純: 非食害型の藻場衰退要因. 藤田大介, 村瀬 昇, 桑原久実 (編著), 藻場を見守り育てる知恵と技術. 成山堂書店, 東京, 24-29 (2010)
- 3) 水産庁: 磯焼け対策ガイドライン. 水産庁, 東京 (2007)
- 4) 渡邊博之: 人工光完全制御型植物工場の現状と将来性. 農林水産技術研究ジャーナル, 29, 39-43 (2006)
- 5) 近藤謙介, 中田 昇, 西原英治: 異なる光質条件下で栽培したコマツナの生育と品質に及ぼす紅色非硫黄細菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 施用の影響. 生物環境調節, 42, 247-253 (2004)
- 6) 庄子和博, 後藤英司, 橋田慎之介, 後藤文之, 吉原利一: 赤色光と青色光がレッドリーフレタスのアントシアニン蓄積と生合成遺伝子の発現に及ぼす影響. 植物環境工学, 22, 107-113 (2010)
- 7) 上野淳一: 発光ダイオード (LED) を用いた微細藻類の培養. アクアネット, 6, 48-52 (2003)
- 8) 石川 卓, 磯和 潔: 白色発光ダイオード (LED) を用いた餌料用微細藻類の培養. 水産技術, 4, 51-55 (2012)
- 9) 川村軍蔵: 水産分野におけるLEDの応用. 農業電化協会 (編), 時代を先取りする先端技術-LEDの農林水産分野への応用. 農業電化協会, 東京, 51-62 (2006).
- 10) 本多二郎, 稲田博史: 高出力LED水中集魚灯の開発. 農業電化協会 (編), 時代を先取りする先端技術

- LEDの農林水産分野への応用. 農業電化協会, 東京, 89-99 (2006)
- 11) 岡本研正: 漁業におけるLEDの利用と展望. 農林水産技術研究ジャーナル, **32**, 32-37 (2009)
 - 12) 村瀬 昇, 銭 志亮, 水口昭弘, 水口千津雄: 白色LED照射によるアマモ, ウミヒルモおよび不稔性アナオサの生長. 海苔と海藻, **74**, 19-33 (2008)
 - 13) 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, **59**, 101-107 (2011)
 - 14) 村瀬 昇, 高田順司, 阿部真比古, 野田幹雄, 須田有輔: 光質が異なるLED照射下での紅藻トサカノリの生長と光合成. Algal Resources, **5**, 61-69 (2012)
 - 15) 團 昭紀: 発光ダイオードを使った藻類の培養. 徳島県立農林水産総合技術センター水産研究所事業報告書平成15年度, 77-78 (2005)
 - 16) Tatewaki M.: Formation of a crustaceous sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. *Phycologia*, **6**, 62-66 (1966)
 - 17) 松井敏夫, 大貝政治, 大島芳明, 古原和明: コンブ目植物数種の配偶体の成長・成熟および孢子体(幼葉)の成長に及ぼす光質・光量の影響. 日水誌, **58**, 1257-1265 (1992)
 - 18) Lüning K., Dring M. J.: Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli. *Marine Biology*, **87**, 119-129 (1985)
 - 19) Lüning K., Dring M. J.: Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* grown in blue and red light. *Marine Biology*, **29**, 195-200 (1975)
 - 20) Motomura T., Sakai Y.: Effect of chelated Iron in culture media on oogenesis in *Laminaria angustata*. *Bull Japan Soc Sci Fish*, **47**, 1535-1540 (1981)
 - 21) 倉島 彰, 山本清春: ジベレリンとステビオサイドによるコンブ目3種配偶体の成熟と生長の制御. 藻類, **60**, 9-14 (2012)