

クロロフィル蛍光を活用した 紅藻スサビノリ葉状体の貧栄養ストレスの評価

阿部真比古^{1†}・塩田真由¹・村瀬 昇¹・鹿野陽介²

Stress investigation of *Pyropia yezoensis* thalli under low nutrient condition using chlorophyll fluorescence

Mahiko Abe^{1†}, Mayu Shiota¹, Noboru Murase¹, Yousuke Shikano²

Abstract : We investigated the changes in photosynthetic activity, L* value and chlorophyll fluorescence of *Pyropia yezoensis* thallus under low nutrient condition. Photosynthetic activities decreased when L* values of thallus were the higher values of 65. As for R-SD values extracted from chlorophyll fluorescence using graphic software, photosynthetic activities and relative values of R-SD decreased when thallus were exposed to low nutrient condition. Under low nutrient condition, it was suggested that thallus was maintained for photosynthetic activity using resources of nitrogen, phosphorus, iron and so on within cells. While, by lacking of their resources, it was thought that thallus was not able to produce photosynthetic pigment and photosynthetic activity was decreased. In the present results, chlorophyll fluorescence has a potential to become useful tool for finding the low nutrient stress of *P. yezoensis* thallus.

Key words : *Pyropia yezoensis*, chlorophyll fluorescence, Imaging-PAM, low nutrient, L* value, thallus,

緒 言

近年のノリ養殖における問題の1つとして、海域の貧栄養化によるノリの色落ちが挙げられる。色落ちとは、海水中の窒素やリン等の栄養塩が不足することにより、ノリ葉状体の生育不良や退色が起こることである。色落ちにより風味や色合いが落ちるため乾海苔とした際の商品価値が下がり、共販において落札されない場合もある¹⁾。ノリ養殖現場では、色落ちの状況を把握するために、海域の栄養塩を測定する他に、ノリ葉状体を分光測色計等で測定し、明度を示すL*値や赤～緑方向を示すa*値で色落ちの程度を判断している²⁻¹⁰⁾。また、ノリと栄養塩を競合する珪藻類や鞭毛藻類等の植物プランクトンの動向をモニタリングし、ノリ葉状体の色落ちを予測することにより被害の軽減にも取り組んでいる¹⁾。

ノリ葉状体の色落ちに対する動態については、葉状体内

の微量金属の減少、光合成色素の変化、葉緑体の縮小や液胞の膨潤、デンプン粒の増大などが報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。一方で、貧栄養により引き起こされる光合成活性等の生理的な影響についてはほとんど調べられていない。近年、様々な環境ストレスに対する耐性を評価できる手法として、パルス変調クロロフィル蛍光測定 (Pulse Amplitude Modulation : PAM法) が知られている。この手法は陸上植物を始め海産顕花植物や大型藻類、サンゴ類に共生する褐虫藻などにおいて、様々なストレスに対する光合成の機能低下の指標として用いられている¹⁶⁻²²⁾。アマノリ類では、一般的なノリ養殖に用いられているスサビノリ *Pyropia yezoensis* (Ueda) Hwang et Choiだけでなく、アサクサノリ *P. tenera* (Kjellman) Kikuchi, Miyata, Hwang et Choi, オニアマノリ *P. dentata* (Kjellman) Kikuchi et Miyata, イチマツノリ *P. seriata* (Kjellman) Kikuchi et Miyataおよびカイガラアマノリ *P. tenuipedalis* (Miura)

¹ 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

² 山口県水産研究センター内海研究部 (Inland Sea Division, Yamaguchi Prefectural Fisheries Research Center)

[†] 別刷り請求先 abemahi@fish-u.ac.jp

Kikuchi et Miyataなどを用いて、水温、光、乾燥、塩分などの環境要因が光合成活性に及ぼす影響について報告されている²³⁻²⁸⁾。PAM法は、葉状体を迅速かつ非破壊的に測定することが可能であり、海藻養殖の現場においても葉状体のストレスに対する早期診断や養殖品種の作出等への応用が期待されている²⁷⁾。

そこで、本研究では、室内培養により貧栄養が葉状体の光合成活性に与える影響をPAM法で調べるとともに、色落ち動態との関係性を調べた。また、実際にノリ養殖現場で活用されている蛍光顕微鏡を用い、クロロフィル自家蛍光から貧栄養ストレスの早期検出が可能かどうかを検討した。

材料と方法

材料には、独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所（現：国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所）から提供して頂き、水産大学校藻場生態系保全研究室で保存培養した養殖品種ナラワスサビノリU-51株を用いた。培養している糸状体を成熟させ、殻胞子を放出させた。放出させた殻胞子を培養する過程で放出された単胞子をクレモナ糸に付着させ、2~8細胞まで生長させた後、冷凍保存した。冷凍保存した単胞子は適宜解凍し、葉幅5 mm以上になるまで通気培養し、得られたノリ葉状体を実験に使用した。この培養条件は、培地にはSWM-III²⁹⁾ からS-3 vitamin, 土壌抽出物, Trisおよび肝臓抽出物を除去した1/2 SWM-III改変培地（以下、1/2 SWM-III改変培地^{30,31)}）、温度18°C、光量60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期10hL : 14hDとした。

本実験では、栄養を添加しない地先海水中でノリ葉状体を色落ちさせる実験区と栄養豊富な1/2 SWM-III改変培地中でノリ葉状体を色落ちさせない対照区を設け、いずれの培地も0.22 μm フィルター（SCGPT02RE Steritop-GP, Merck社）により濾過滅菌後に使用した。培養条件は、温度18°C、光量60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期10hL : 14hDとし、通気培養した。培養期間は14~15日間とし、実験区および対照区ともに換水を2~3日毎に行った。葉状体は、実験区および対照区ともに1L枝付き培養フラスコに10個体ずつ収容した。実験区および対照区ともに測定は2~3日毎に行い、測定項目は以下の3つとした。

1つ目は、分光測色計（CM-2600d, KONICA MINOLTA社）を用い、ノリ葉状体のL*a*b*表色系の測定を行った。

測定部位はノリ葉状体の中央部とした。

2つ目は、画像パルス変調クロロフィル蛍光測定装置 Imaging-PAM（WALZ社）を用い、ノリ葉状体の光化学系IIにおける実効量子収率（ Φ_{II} ）を測定した。実効量子収率（ Φ_{II} ）は、光化学系IIにおける光量子あたりの電子伝達量を示すものであり、ノリ葉状体の生長を抑制する暗処理をせずに測定することができる。容器に実験区および対照区のそれぞれに用いた培地を少量入れ、重ならないようにノリ葉状体を広げ、実効量子収率（ Φ_{II} ）を測定した。予備実験において実効量子収率（ Φ_{II} ）はノリ葉状体の部位によって差が生じないことから、本実験ではノリ葉状体の中央部を測定した。

3つ目は、生物顕微鏡（BX51, OLYMPUS社）、落射式蛍光システム（U-LH100HG, OLYMPUS社）および顕微鏡USBデジタルカメラ（HDCEX3, AS ONE社）を用い、クロロフィル自家蛍光画像を撮影し、画像編集ソフト Adobe Photoshop CS6（Adobe社）を用いて赤色照度（R）、緑色照度（G）および青色照度（B）を抽出・測定した。まず、生物顕微鏡、落射式蛍光システムおよび顕微鏡USBデジタルカメラを用いてノリ葉状体に波長520~550nmの広帯域IG励起（WIG励起）を照射して栄養細胞のクロロフィル自家蛍光を倍率200倍で撮影した。撮影する際には可能な限りノリ葉状体を平面になるようにスライドガラス上に広げ、カメラ画像全体の細胞が明瞭になるように撮影した。次に撮影した画像をPhotoshopに取り込み、ヒストグラムの画面を表示させた。チャンネルをレッド/グリーン/ブルーに設定し、各色照度の画像あたりの「平均」および「標準偏差」のそれぞれの値を記録した。なお、色落ちが進行するとノリ葉状体縁部に皺が増加し、撮影画像全体の焦点がぼやける場合があった。その際には、細胞同士の境目がはっきり識別できる範囲が画像の少なくとも1/3程度になるように撮影し、その範囲のみを選択し測定を行った。葉状体1個体に対して中央~上部にかけて2箇所の画像を撮影した。得られた2つの「平均」および「標準偏差」のそれぞれの平均値を算出して、葉状体1個体あたりのR、G、BおよびR、G、Bの標準偏差の値とした。

最後に、貧栄養条件下における光合成色素の組成の変化を確認するために、葉幅5 mm程度のノリ葉状体5個体を500mL枝付き培養フラスコに収容し、実験区と同様の培養条件で通気培養し、培養初日、7日目および14日目に吸収スペクトルを測定した。ノリ葉状体を1個体ずつアクリル

製ディスプレイセル (BRA759106, AS ONE社) の内側に直接貼り付け、ヘッドオンフォトマル装置 (130-6031, HITACHI社) を装着した分光光度計 (U-3000, HITACHI社) を用いて、波長400~750 nmの範囲の吸光度を測定した。

結 果

Fig. 1には、実験区における培養初日と14日目のノリ葉状体を示した。培養初日のノリ葉状体は、葉長2~4 cm程度であり、色調は黒紫色であった。培養期間中、ノリ葉状体は生長し、培養14日目には葉長3~8 cm程度に達したが、色調は薄茶色となった。

Fig. 2には、対照区および実験区における培養期間中の明度 (L^* 値) の変化を示した。培養期間中における対照区の L^* 値は、 $52.5 \pm 1.2 \sim 56.2 \pm 0.7$ (平均値 \pm 標準偏差) の範囲であった。実験区における培養初日の L^* 値は、 51.8 ± 2.2 であり、対照区とほぼ同様であった。培養2日目までは L^* 値はほとんど変化しなかったが、培養4日目から L^* 値は 56.3 ± 2.2 と上昇し始めた。その後も L^* 値は上昇し続け、培養6日目には 60.3 ± 2.2 、8日目には 63.4 ± 2.0 、10日目には 66.1 ± 2.6 、12日目には 68.1 ± 2.0 となり、培養最終日の15日目には 71.0 ± 1.8 に達した。

Fig. 3には、対照区および実験区における培養期間中の実効量子収率 (Φ_{II}) の変化を示した。培養期間中における対照区の Φ_{II} は、 $0.461 \pm 0.013 \sim 0.495 \pm 0.009$ の範囲にあった。実験区における Φ_{II} は、培養初日では $0.461 \pm$

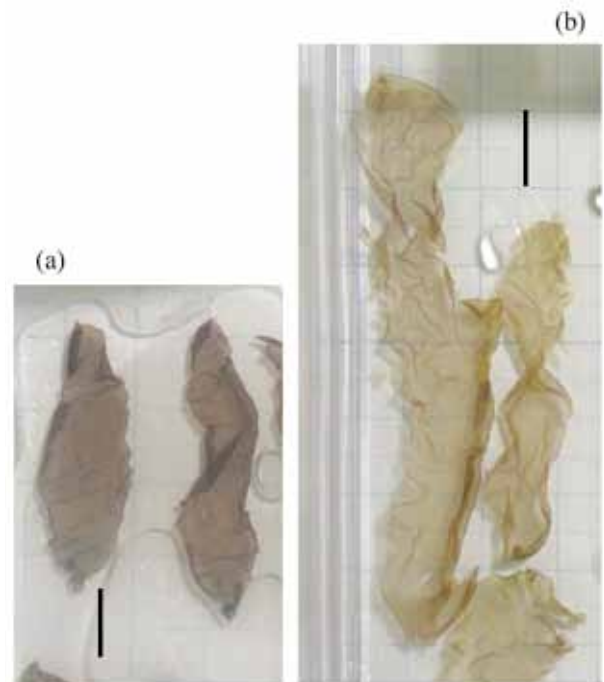


Fig. 1. Photographs show the foliose thalli in 0 (a) and 14 (b) days in culture under low nutrient condition. Bars indicate 1cm.

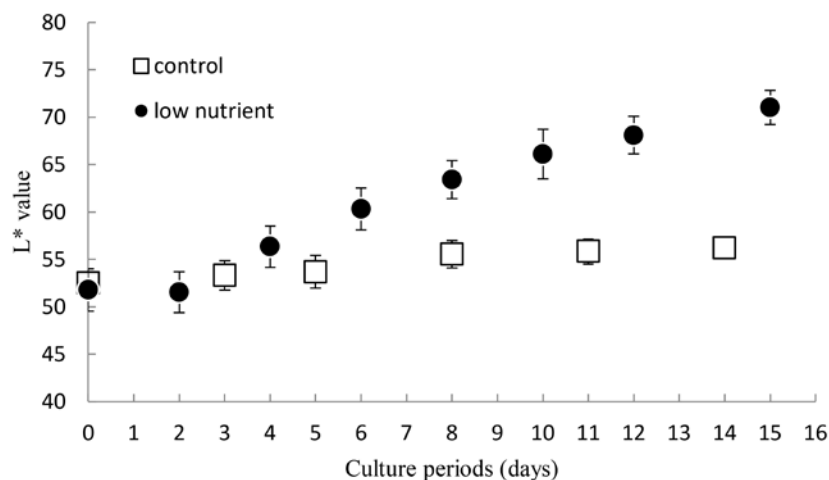


Fig. 2. Changes in L^* values under control and low nutrient conditions during culture periods. Bars indicate standard deviations.

0.011であり, 対照区と同様であった。培養2日目, 4日目には Φ_{II} はそれぞれ 0.433 ± 0.014 と 0.404 ± 0.016 と培養初日に対して有意に低下した (student's *t*-test, $p < 0.05$)。培養6日目の Φ_{II} は, 0.461 ± 0.014 と回復した。培養8日目以降の Φ_{II} は徐々に低下していき, 培養12日目には 0.378 ± 0.017 , 培養15日目には 0.327 ± 0.025 まで低下した。

Fig. 4には, 対照区および実験区における栄養細胞の表面観および波長520~550 nmの広帯域IG励起 (WIG励起) でのクロロフィル自家蛍光画像を示した。培養期間中, 対照区では星状のクロロフィル自家蛍光が観察され, 画像に大きな変化は認められなかった。一方, 実験区では, 培養2日目まではほとんど観察像に変化は認められなかった。

培養4日目から葉緑体の縮小が開始し, 培養最終日まで続いた。

Fig. 5には, 対照区および実験区での培養期間中の波長520~550 nmの広帯域IG励起 (WIG励起) でのクロロフィル自家蛍光画像における赤色照度 (R) を培養初日の平均値に対する相対値の変化で示した。本研究においては, 培養期間中にWIG励起における緑色照度 (G) および青色照度 (B) も測定した。培養期間中の実験区でのR, GおよびBの値は, Rの値が最も変化し, Gの値は対照区と比較して差が小さく, Bの値はほとんど差がなかった。これらのことから, Fig. 5にはRのみの結果を示した。対照区における培養期間中のRの相対値は, 培養初日の平均値に対

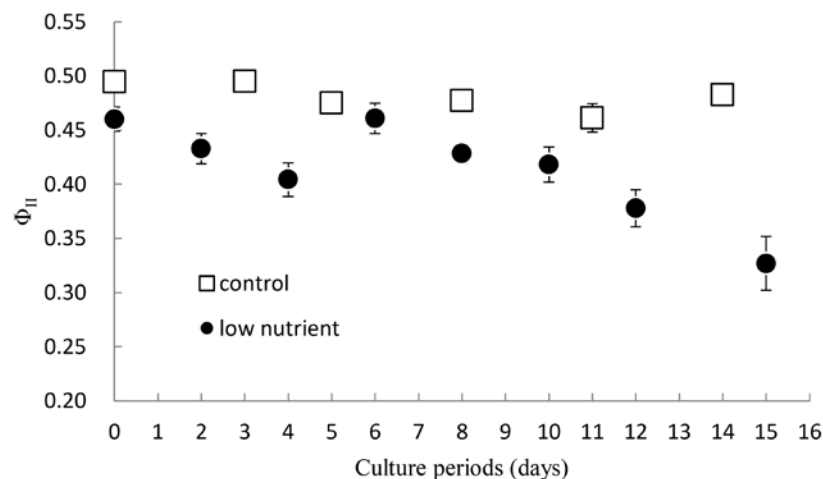


Fig. 3. Changes in Φ_{II} under control and low nutrient conditions during culture periods. Bars indicate standard deviations.

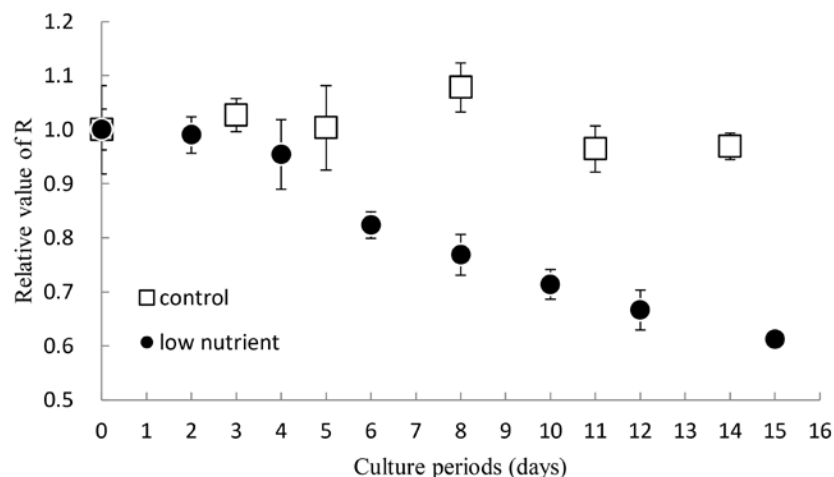


Fig. 5. Changes in relative values of R under control and low nutrient conditions during culture periods. Bars indicate standard deviations.

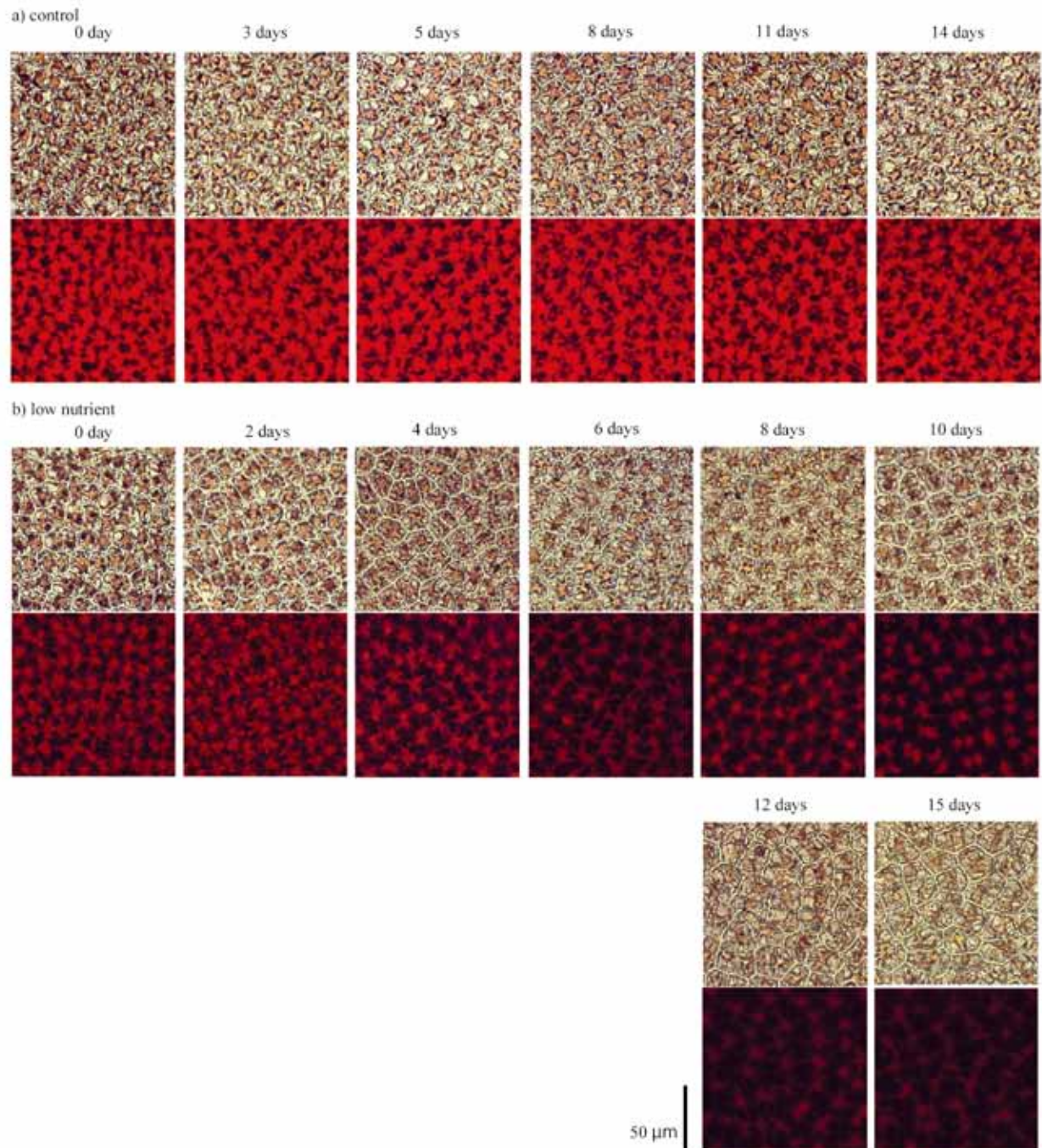


Fig. 4. Photographs show the changes in light microscopic images (upper lines) and chloroplast autofluorescence images (lower lines) under control (a) and low nutrient (b) conditions during culture periods.

して $0.96 \pm 0.04 \sim 1.08 \pm 0.05$ の範囲にあった。一方、実験区におけるRの相対値は、培養2日目は培養初日に対して 0.99 ± 0.03 とほとんど変化しなかった。その後、Rの相対値は培養4日目に 0.95 ± 0.06 、6日目に 0.82 ± 0.02 、8日目に 0.77 ± 0.04 、10日目に 0.71 ± 0.03 と徐々に低下し、培養12日目や15日目では、 0.67 ± 0.04 および 0.61 ± 0.02 にまで低

下した。

Fig. 6には、対照区および実験区での培養期間中のWIG励起でのクロロフィル自家蛍光における赤色照度 (R) の「標準偏差」(R-SD)を培養初日の平均値に対する相対値の変化で示した。この「標準偏差」はクロロフィル自家蛍光画像における赤色照度 (R) のばらつきを示すもので

ある。対照区では、培養期間中、培養初日に対するR-SDの相対値は、 $1.00 \pm 0.05 \sim 1.10 \pm 0.03$ の範囲にあった。一方、実験区では、培養2日目には、培養初日に対して 0.93 ± 0.10 とやや低下した。培養4日目には、 0.98 ± 0.09 と値が回復したものの、その後は徐々に低下し、培養15日目には 0.62 ± 0.06 となった。

Fig. 7には、対照区および実験区における明度 (L^* 値) と実効量子収率 (Φ_{II}) との関係を示した。対照区においては、培養期間中、 L^* および Φ_{II} はそれぞれ $52.5 \pm 1.2 \sim 56.2 \pm 0.7$, $0.461 \pm 0.013 \sim 0.495 \pm 0.009$ の範囲にあった。実験区における培養初日の L^* 値および Φ_{II} は、それぞれ 51.8 ± 2.2 および 0.460 ± 0.011 であった。培養2日目は、 L^*

値はほとんど変化しなかったものの、 Φ_{II} は 0.433 ± 0.014 と低下した。培養4日目から L^* 値は 56.3 ± 2.2 と上昇したが、 Φ_{II} は 0.404 ± 0.016 まで低下した。培養6日目には、 L^* 値が 60.3 ± 2.2 まで上昇したが、 Φ_{II} は 0.461 ± 0.014 まで回復した。その後も L^* 値は上昇し続け、培養15日目に 71.0 ± 1.8 に達した。 Φ_{II} は、培養8日目以降は低下し続け、培養15日目には 0.327 ± 0.025 まで低下した。

Fig. 8には、対照区および実験区における実効量子収率 (Φ_{II}) と波長520~550 nmの広帯域IG励起 (WIG励起) でのクロロフィル自家蛍光画像の赤色照度 (R) の相対値との関係を示した。対照区においては、培養期間中、 Φ_{II} およびRの相対値はそれぞれ $0.461 \pm 0.013 \sim 0.495 \pm 0.009$,

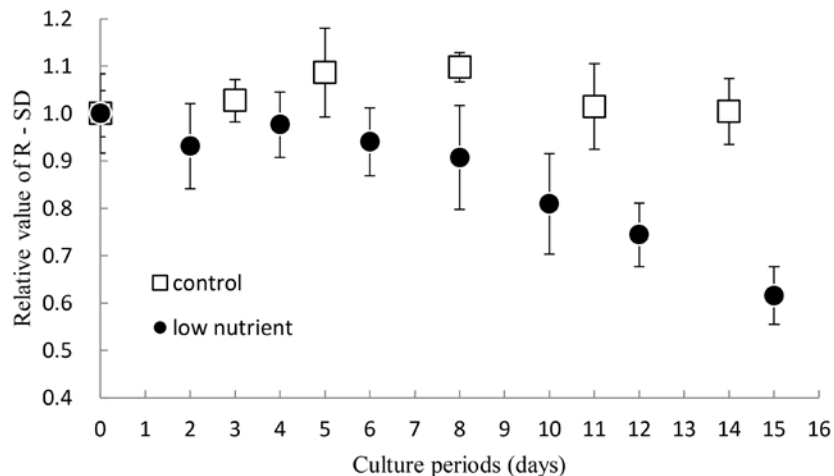


Fig. 6. Changes in relative values of R-SD under control and low nutrient conditions during culture periods. Bars indicate standard deviations.

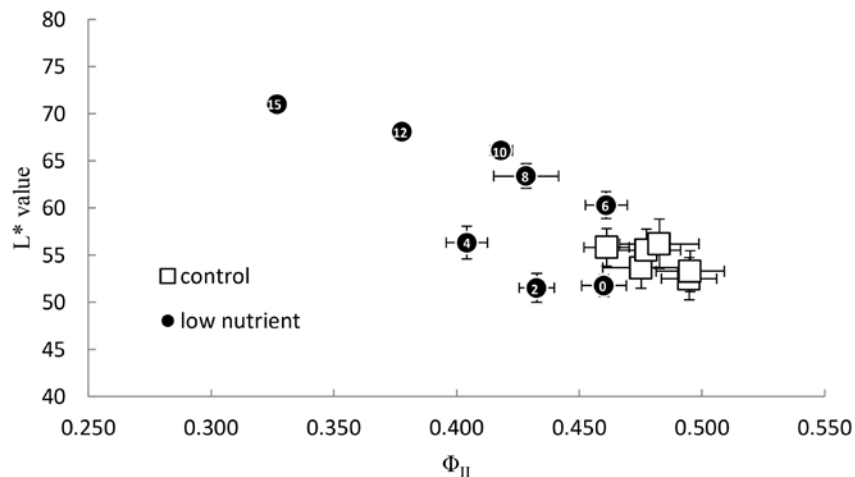


Fig. 7. Relationships between Φ_{II} and L^* values under control and low nutrient conditions. Numbers in black circles indicate each measuring day. Bars indicate standard deviations.

0.96 ± 0.04~1.09 ± 0.05の範囲にあった。実験区においては、培養初日の Φ_{II} は0.460 ± 0.014と実験区と同様の値であった。培養2日目は、Rの相対値はほとんど変化しなかったものの、 Φ_{II} が0.433 ± 0.014と低下した。培養4日目には、 Φ_{II} が0.404 ± 0.016まで低下し、Rの相対値も0.95 ± 0.06とやや低下した。培養6日目には、Rの相対値が0.82 ± 0.02まで低下したが、 Φ_{II} は0.461 ± 0.014まで回復した。その後は、 Φ_{II} の低下に伴って、Rの相対値は低下し続け、培養15日目に0.61 ± 0.02となった。

Fig. 9には、対照区および実験区における明度 (L^* 値) と波長520~550 nmの広帯域IG励起 (WIG励起) でのクロロフィル自家蛍光画像の赤色照度 (R) の相対値との関係

を示した。 L^* 値が52.5 ± 1.2~56.2 ± 0.7の範囲にある時は、Rの相対値は0.95 ± 0.06~1.08 ± 0.05の範囲であった。 L^* 値が60.3 ± 2.2を上回ると、Rの相対値は0.82 ± 0.02まで低下し、培養15日目は0.61 ± 0.02まで低下した。

Fig. 10には、対照区および実験区における実効量子収率 (Φ_{II}) と波長520~550 nmの広帯域IG励起 (WIG励起) でのクロロフィル自家蛍光画像の赤色照度 (R) の「標準偏差」(R-SD) の相対値との関係を示した。対照区においては、 Φ_{II} が0.461 ± 0.013~0.495 ± 0.009の範囲にある時、R-SDの相対値は1.00 ± 0.04~1.10 ± 0.03の範囲であった。実験区においては、培養初日の Φ_{II} は0.460 ± 0.011と対照区と同様であった。培養2日目に Φ_{II} が0.433 ±

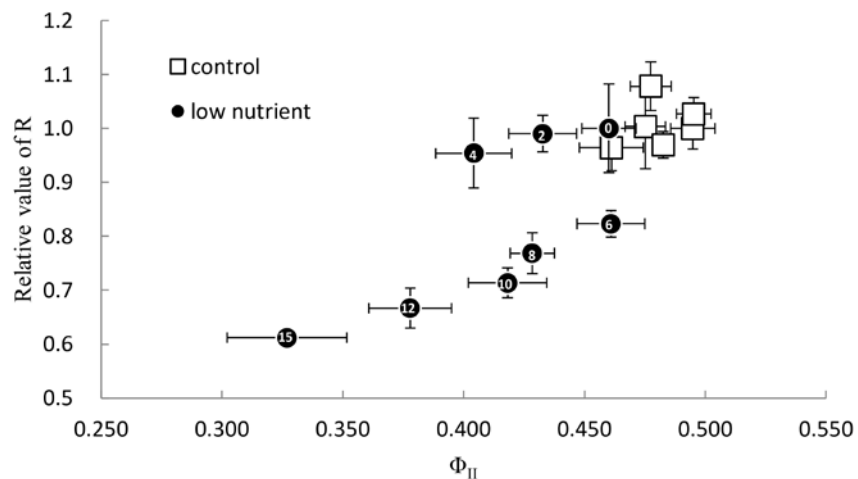


Fig. 8. Relationships between Φ_{II} and relative values of R under control and low nutrient conditions. Numbers in black circles indicate each measuring day. Bars indicate standard deviations.

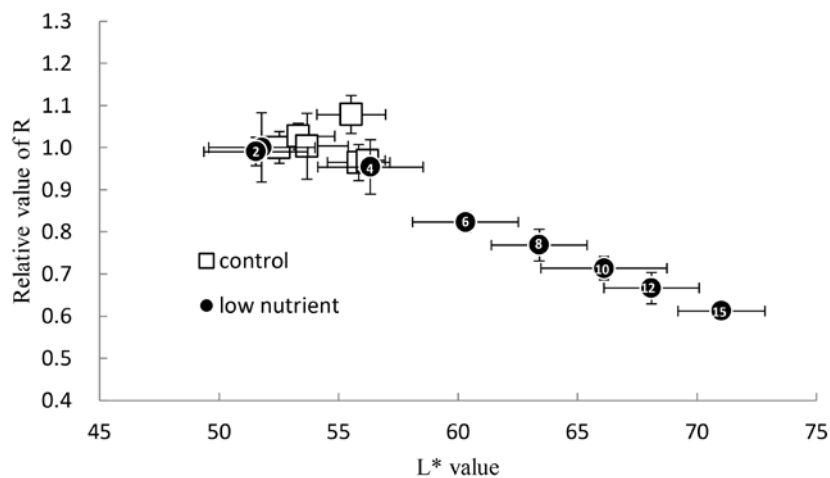


Fig. 9. Relationships between L^* values and relative values of R under control and low nutrient conditions. Numbers in black circles indicate each measuring day. Bars indicate standard deviations.

0.014まで低下すると、R-SDの相対値も 0.93 ± 0.09 まで低下した。培養4日目には、 Φ_{II} は 0.404 ± 0.016 まで低下したが、R-SDの相対値は 0.98 ± 0.07 と回復した。培養6日目に Φ_{II} が 0.461 ± 0.014 まで回復すると、R-SDの相対値は 0.94 ± 0.07 と低下し、その後は Φ_{II} の低下とともに、R-SDの相対値も低下した。

Fig. 11には、対照区および実験区における L^* 値（明度）と波長520~550 nmの広帯域IG励起（WIG励起）でのクロロフィル自家蛍光画像の赤色照度（R）の「標準偏差」（R-SD）の相対値との関係を示した。対照区において、 L^* 値が $52.5 \pm 1.2 \sim 56.2 \pm 0.7$ の範囲にある時は、R-SDの相対値は $1.00 \pm 0.04 \sim 1.10 \pm 0.03$ の範囲であった。実験区

においては、培養初日の L^* 値は 51.8 ± 2.2 と対照区と同様であった。培養2日目では L^* 値が 51.5 ± 2.2 とほとんど変化しなかったが、R-SDの相対値は 0.93 ± 0.09 とやや低下した。培養4日目には、 L^* 値は 56.3 ± 2.2 と増加したが、R-SDの相対値は 0.98 ± 0.07 と回復した。その後は L^* が増加するに伴い、R-SDの相対値も低下した。

Fig. 12には、貧栄養条件下におけるノリ葉状体の培養初日、7日目および14日目の生体吸収スペクトルを示した。各吸収スペクトルは初日の波長439 nmに対する相対値で表し、4つの吸収極大波長は、それぞれクロロフィルa（679 nm）、フィコシアニン（620 nm）、フィコエリスリン（496, 566 nm）由来の吸収帯である。貧栄養条件下で

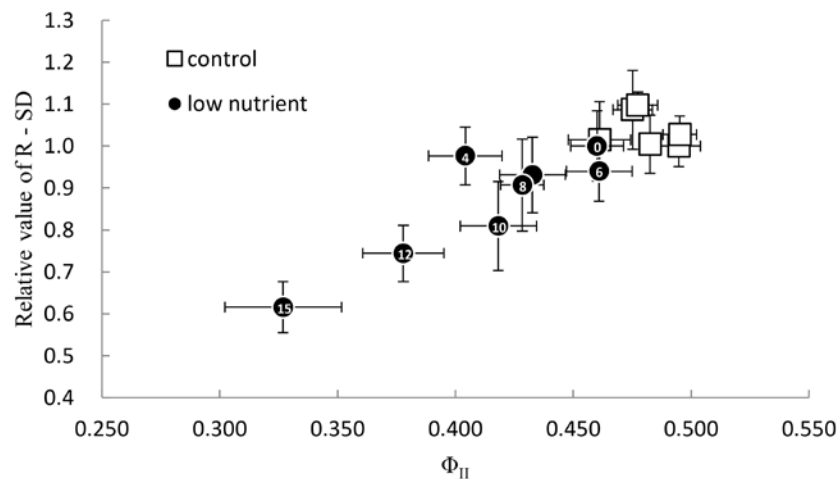


Fig. 10. Relationships between Φ_{II} and relative values of R-SD under control and low nutrient conditions. Numbers in black circles indicate each measuring day. Bars indicate standard deviations.

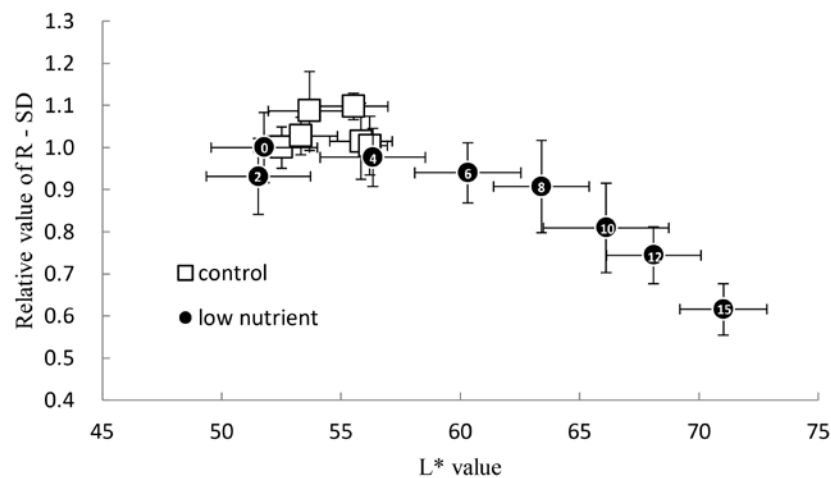


Fig. 11. Relationships between L^* values and relative values of R-SD under control and low nutrient conditions. Numbers in black circles indicate each measuring day. Bars indicate standard deviations.

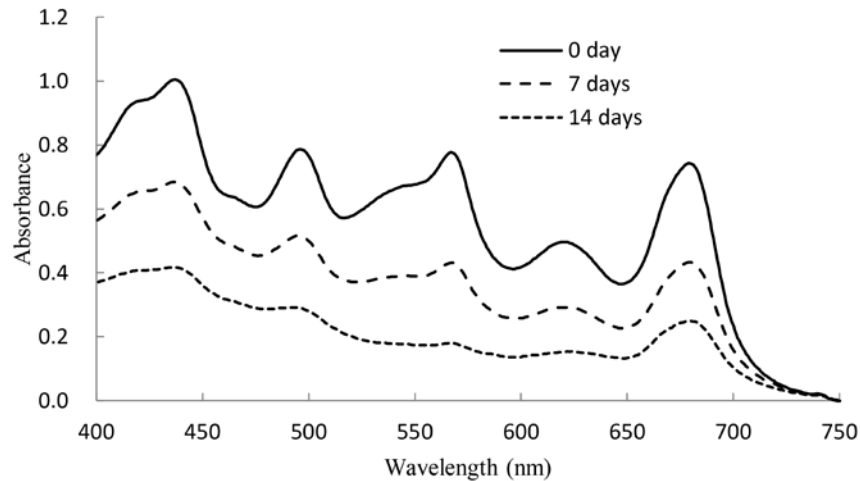


Fig. 12. Changes of the absorption spectra of foliose thalli in 0, 7 and 14 days in culture under low nutrient condition. All lines indicate the relative values to the value of 439 nm in 0 day in culture.

は、培養日数が経過するほどスペクトル全体の吸光度が低下した。クロロフィルa (679 nm) については、培養初日と比較して培養7日目に41.7%、培養14日目に66.5%低下した。フィコシアニン (620 nm) とフィコエリスリン (566 nm) については、培養初日と比較して培養7日目でそれぞれ41.1%と44.5%、培養14日目でそれぞれ69.3%と76.7%であり、フィコエリスリンの吸収帯で低下した。

考 察

本研究では、ノリ葉状体の貧栄養ストレスを評価するために、室内培養により明度 (L^* 値) および実効量子収率 (Φ_{II}) との関係調べた。また、試験研究機関の多くが保持している蛍光顕微鏡を活用し、ノリ葉状体の貧栄養ストレスを早期に検出できるかを検討した。

ノリ葉状体の L^* 値は、貧栄養条件下において培養4日目以降に上昇し始めた (Fig. 2)。白石⁵⁾ の報告では、 $L^*=60$ を色落ちの初期兆候、 $L^*=63$ を肉眼でも十分に確認できる色落ち、 $L^*=74$ を重度の色落ちとしている。培養4日目および6日目の L^* 値はそれぞれ53.4~61.3および57.0~63.8であり、色落ちとされない個体から色落ちを肉眼で確認できる個体までが含まれていた。一方、貧栄養条件下におけるノリ葉状体の Φ_{II} の変動は L^* 値のそれとは異なった (Fig. 3)。培養2日目と4日目の Φ_{II} は、 0.433 ± 0.014 、 0.404 ± 0.016 と低下し、培養6日目の Φ_{II} は、 0.461 ± 0.014 まで回復した。さらに、培養8日目になると全ての葉状体の L^* 値が60を超えたものの、 Φ_{II} は 0.428 ± 0.009 と緩やかな低下に

留まった。全てのノリ葉状体の L^* 値が65を超える培養12日目以降、 Φ_{II} は 0.378 ± 0.017 および 0.327 ± 0.025 と低下した。これらのことから、貧栄養状態に曝されたノリ葉状体は、 L^* 値では色落ちとされない状況 (培養2日目) においても Φ_{II} の低下が認められ、実効量子収率 (Φ_{II}) は早期に貧栄養ストレスを検出できる可能性が示唆された。また、貧栄養状態が1週間以上継続し、ノリ葉状体の L^* 値が65を超えると、全ての個体の Φ_{II} が0.400を下回り、光合成活性が低下することが明らかとなった。

本研究では、実験区において葉緑体の縮小、液胞の膨潤および細胞間隙の拡大が観察された (Fig. 4)。これらの結果は岩本¹²⁾ や植木¹⁵⁾ の報告と同様であった。栄養欠乏状態では、フィコピリタンパク質が窒素源のプールとして機能していることが示唆されている¹⁵⁾。植木¹⁵⁾ を参考に、Fig. 7の生体吸収スペクトルの吸光度から培養初日、7日目および14日目のフィコエリスリン (A_{566}) とクロロフィルa (A_{679}) の吸光度比 (A_{566}/A_{679}) を算出したところ、それぞれ1.04、0.99および0.72となった。つまり、培養7日目までは色素が一樣に消失したが、培養14日目にはクロロフィルaよりもフィコピリンの消失が進行したと考えられる。本研究の実験区では、滅菌した地先海水に窒素やリンだけでなく鉄などの微量金属類も添加していない。実験区において培養2日目や4日目で確認された実効量子収率 (Φ_{II}) の低下は、使用した地先海水ではノリ葉状体の生長において必要な栄養分が十分に含まれておらず、低栄養環境下における生理ストレスを示していると考えられる。また、培養6日目に認められた Φ_{II} の回復は、

細胞内の栄養源の分解・再利用にシフトしたことを意味するかもしれない。そのため、培養後半になってくると培地中の栄養塩が不足するとともに、培地中の鉄不足によりクロロフィルaやフィコビル色素の合成が抑制され³²⁾、細胞内の栄養源プールが維持できなくなり、光合成活性が低下していったと考えられた。本研究では、培養に使用した地先海水および培地に関して栄養塩を測定していないため、今後は培養期間中の栄養塩の変化を測定する必要がある。

ノリ養殖現場において、ノリ葉状体の色落ちを早期に検出し、適正に対応することは重要である。しかし、現状では、植物プランクトンと栄養塩の動向をモニタリングしてノリ葉状体の色落ちを予測する以外ない¹⁾。上記したようにノリ葉状体の実効量子収率 (Φ_{II}) などの光合成活性を指標とすることで、貧栄養ストレスを早期に検出できる可能性がある。しかし、本研究で使用した画像クロロフィル蛍光測定器は非常に高額であり、新たに導入することは非常に困難と思われる。そこで、試験研究機関の多くが保持している蛍光顕微鏡を活用し、ノリ葉状体の貧栄養ストレスの早期検出について検討した (Fig. 5~11)。波長520~550 nmの広帯域IG励起 (WIG励起) でのクロロフィル自家蛍光画像における赤色照度 (R) の値は、細胞内の葉緑体の縮小と液胞の膨潤に伴って低下していくため、 L^* 値と同様に变化した。一方、ノリ葉状体の貧栄養ストレスを早期に検出するためには、実効量子収率 (Φ_{II}) の値だけでなく、クロロフィル自家蛍光画像の標準偏差 (R-SD) などのばらつきを評価する必要があると思われる (Fig. 6, 10, 11)。対照区におけるR-SDの相対値は、 $1.00 \pm 0.04 \sim 1.10 \pm 0.03$ の範囲であった。実験区のR-SDの相対値は、培養初日に対して統計的に有意差は認められなかったものの (student's *t*-test, $p < 0.05$)、培養2日目や4日目に 0.93 ± 0.09 や 0.98 ± 0.07 と培養初日より低い値を示した。また、貧栄養状態が継続するとR-SDの相対値は低下した。R-SDの相対値の低下は、クロロフィル自家蛍光画像において赤色照度が均一化することを意味する。赤色照度が示す多くの部分は葉緑体であることから、貧栄養状態によって葉緑体を含む細胞内の配置や代謝などが変化した結果、蛍光も変化した可能性が考えられる。今後もサンプル数を増やし、R-SDの有効性を検討していく必要がある。クロロフィル自家蛍光は、ノリ葉状体の個体群の違い、蛍光顕微鏡の機種や光源の劣化、レンズの画角などにより蛍光強度が変化する。そのため、各研究機関において

L^* 値、RおよびR-SDの基準値を作成していく必要があるものの、蛍光顕微鏡はノリ葉状体の貧栄養ストレスの早期検出に利用できる可能性がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、愛知県水産試験場 村内嘉樹氏、大分県農林水産研究指導センター 菅沼倫美氏、岡山県農林水産総合センター水産研究所 弘與正憲氏、香川県水産試験場 松岡聡氏、熊本県水産研究センター 阿部慎一郎氏、佐賀県有明水産振興センター 三根崇幸氏、兵庫県農林水産技術総合センター水産技術センター 二羽恭介氏、兵庫県漁業協同組合連合会のり研究所 川崎周作氏、三重県水産研究所鈴鹿水産研究室 山田大貴氏、宮城県水産技術総合センター 菊田拓実氏の皆様にご協力頂きました。ここに記して感謝申し上げます。

文 献

- 1) 川村嘉広：新海苔ブック 技術編2. 海苔産業情報センター, 福岡 (2017)
- 2) 小谷正幸：ノリ葉体の色落ちの数値化, 福岡水海技セ研報, 10, 49-50 (2000)
- 3) 坂口研一, 落合昇, Park CS, 柿沼誠, 天野秀臣：色落ちノリの色調評価と硫酸アンモニウム添加海水への浸漬による色調回復, 日水誌, 69, 399-404 (2003)
- 4) 川口 修, 高辻英之：広島県東部海域における溶存態無機窒素動態とノリの色落ちへの影響, 日水誌, 76, 849-854 (2010)
- 5) 白石日出人：ノリ葉体の色調変化に関する研究, 福岡水海技セ研報, 20, 131-134 (2010)
- 6) 三好順也, 高橋暁, 三島康史：備讃瀬戸における栄養塩動態とノリ養殖被害との関係, 陸水学雑誌, 73, 199-206 (2012)
- 7) 高木秀蔵, 清水泰子, 草加耕司, 藤沢節茂, 藤原宗弘, 渡邊康憲, 藤原建紀：河川から間欠的に供給される栄養塩によるノリ色調の回復, 日水誌, 78, 246-255 (2012)
- 8) 高木秀蔵, 難波洋平, 藤沢節茂, 渡辺康憲, 藤原建紀：備讃瀬戸に流入する河川水の広がりノリ漁場への栄養塩供給, 水産海洋研究, 76, 197-204 (2012)
- 9) 小池美紀, 淵上 哲：溶存態無機リン欠乏がササビノ

- り (*Pyropia yezoensis*) に及ぼす影響, 福岡水海技七研報, 23, 33-41 (2013)
- 10) 村山史康, 清水泰子, 高木秀蔵: 岡山県ノリ漁場における栄養塩濃度とノリの色調および乾海苔単価との関係, 日水誌, 81, 107-114 (2015)
 - 11) 岩本康三, 有賀祐勝, 里見雅子, 海貝征三: 色落ちしたノリの色調回復経過の化学的追及, 海苔増殖振興会会報II, 海苔増殖振興会, 東京, pp. 1-4 (1972)
 - 12) 岩本康三, 有賀祐勝, 里見雅子, 竹野 登, 森下涼子, 原慶明: ノリ葉体の栄養要求と病害, 海苔増殖振興会会報II, 海苔増殖振興会, 東京, pp. 22-40 (1972)
 - 13) 飯盛哲生, 磯部敏幸: 有明海における海苔の色落ち現象と海水中金属元素の影響, 分析化学, 55, 999-1002 (2006)
 - 14) 張 経華, 佐藤友規, 丸山亮馬, 高尾雄二, 畝中佑, 藤田雄二, 山崎素直: 有明海のノリの色落ちと微量元素欠乏一特に鉄欠乏について, 日本海水学雑誌, 63, 158-166 (2009)
 - 15) 植木知佳, 村上明男, 加藤敏朗, 嵯峨直恆, 本村泰三: 紅藻スサビノリの光合成色素と葉緑体微細構造における栄養欠乏応答, 日水誌, 76, 375-382 (2010)
 - 16) 佐藤達雄, 吉田 誠, 大矢武志: パルス振幅変調(PAM)クロロフィル蛍光測定法による野菜の高温ストレス耐性の検定, 園学雑, 71, 101-106 (2002)
 - 17) 藤野素子, 遠藤良輔, 大政謙次: キュウリ葉における水ストレスの非破壊計測に関する研究一分光反射率, 気孔コンダクタンス, PSII Yieldおよび形状の変化の比較一, 農業情報研究, 11, 161-170 (2002)
 - 18) 齊藤 宏, 岸野元彰, 石丸 隆, 灘岡和夫, 工藤 栄: 可視, 近赤外画像によるサンゴの健康度モニタリング手法の開発, 日本サンゴ礁学会誌, 10, 47-57 (2008)
 - 19) 園池公毅: クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定, 低温科学, 67, 507-524 (2009)
 - 20) 河野敬史, Gregory N. Nishihara, 寺田竜太: 日本産アマモ *Zostera marina* の分布南限群落における季節的消長と光合成特性, 日水誌, 78, 692-704 (2012)
 - 21) 土屋勇太郎, Gregory N. Nishihara, 寺田竜太: 酸素電極法とパルス変調クロロフィル蛍光法を用いた鹿児島産ホンダワラ属(ヒバマタ目)藻類5種, マメタワラ, ヤツマタモク, ヒジキ, コブクロモク, キレバモクの光合成・温度特性, 日水誌, 78, 189-197 (2012)
 - 22) Lideman, Nishihara GN, Noro T, Terada R: Effect of temperature and light on the photosynthesis as measured by chlorophyll fluorescence of cultured *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus* sp. (Sumba strain) from Indonesia. *J Appl Phycol* 25, 399-406 (2012)
 - 23) Zhang T, Shen Z, Xu P, Zhn J, Lu Q, Shen Y, Wang Y, Yao C, Li J, Wang Y, Jiang H: Analysis of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence characteristics of different strains of *Porphyra yezoensis*. *J Appl Phycol* 25, 881-886 (2012)
 - 24) Zhang T, Li J, Ma F, Lu Q, Shen Z, Zhn J: Study of photosynthetic characteristics of the *Pyropia yezoensis* thallus during the cultivation process. *J Appl Phycol*, 26, 859-865 (2013)
 - 25) 渡邊裕基, Gregory N. Nishihara, 寺田竜太: 熊本県産天然アサクサノリ配偶体の光合成に対する光と温度の影響, 藻類, 61, 141-148 (2013)
 - 26) Watanabe Y, Nishihara GN, Tokunaga S, Terada R: Effect of irradiance and temperature on the photosynthesis of cultivated red alga, *Pyropia tenera* (= *Porphyra tenera*), at the southern limit of distribution in Japan. *Phycol Res*, 62, 187-196 (2014)
 - 27) 渡邊裕基, Gregory N. Nishihara, 寺田竜太: 九州に生育するオニアマノリとイチマツノリ配偶体の光合成に対する光と温度の影響, 藻類, 64, 131-138 (2016)
 - 28) 中山冬麻, 阿部真比古, 村瀬昇, 鹿野陽介: 紅藻カイガラアマノリおよびスサビノリ葉状体の生長に及ぼす塩分の影響. 水産増殖, 65, 321-330 (2017)
 - 29) 尾形英二: 新しい海藻培養液SWM-IIIについて, 藻類, 18, 171-173 (1970)
 - 30) Fujiyoshi E, Kikuchi N: Growth of excised containing elongated denticles from the lower marginal parts of *Porphyra tanegashimensis* and *P. haitanensis* gametophytes. *Bull Fish Res Agen*, 16, 9-13 (2006),
 - 31) 藤吉栄次, 小林正裕, 玉城泉也: 培養条件について. アマノリ類養殖品種の特性(藤吉栄次・玉城泉也・小林正裕・有瀧真人編), 独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所, 長崎, pp. 24-28 (2014)
 - 32) Lobban SC, Harrison PJ: Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, New York. (1994)