

ワカメフリー配偶体からの種苗生産

■ 昭紀

ワカメフリー配偶体からの種苗生産は、一般にコンブ目植物で行われている単種培養の手法を応用し行われている。徳島水試でも、この方法を改良して種苗生産を行いワカメ品種改良研究を行っている。しかし、ワカメフリー配偶体からの種苗生産の方法について詳しく説明したものは現在のところ発表されていない。徳島水試で行っている方法は、比較的簡便で、かつ確実性が高いと考えられるため、以下に紹介する。なお、徳島水試では種苗生産漁業者に、この方法の研修を行っており、技術習得が終わり、実用化している業者もいる。

ワカメのフリー配偶体からの種苗生産とは、目的とするワカメの遊走子から発生した配偶体を、雌雄1尾づつに分離し、増殖させ、これを機械的に細断し、糸に吸着または付着させ、糸上で受精させる。これから発生したワカメ幼葉を室内培養と天然海水中で藻体長1~2cmまで成長させる。

1. 藻体の外部形態の測定

- 1) 目的とするワカメの外部形態(葉長、葉幅、葉重など)を測定し、写真撮影を行う。場合によっては、葉厚とか皺の有無など、目的に応じて測定する。
- 2) 孢子葉は、測定後速やかにビニール袋に入れ、15~20℃の冷暗所に保存する。15℃より低温では、海水に戻した場合、遊走子の放出が悪くなる。孢子葉を海水から出して冷暗所に保存した場合、2~3日間は遊走子の放出は可能である。

2. 遊走子の採取

- 1) 遊走子を放出させる部屋の温度は15~20℃がよく、高温では遊走子の遊泳時間が短くなるためよくない。
- 2) 孢子葉を3~4cm角程度に切る。仮根に近い部分が孢子の放出が良好であるが、孢子葉表面のなるべく汚れの少ない部分を切り取る。切り取った葉片はキムタオル等で軽く汚れをふき取る。
- 3) 100mlの滅菌海水の入ったビーカーを3ヶ用意し、葉片を順に洗浄した後、50mlの滅菌海水の入った直径90mm高さ20mmのシャーレに入れる。
- 4) 葉片の入ったシャーレを実体顕微鏡ステージにのせ、シャーレ上から光を照射する。実体顕微鏡は暗視野状態に調整しておくこと、遊走子の放出を観察しやすい。光ファイバー等で照射して10分程度で、遊走子は充分放出される。
- 5) 毛細管を用意する。毛細管はヘマトクリプト管を加熱し、引き延ばしたものか、パスツールピ

ペット先端を十分に細長く引き延ばしたものをを用いる。

- 6) PESI 培地を 50ml 満たしたシャーレ(直径 90mm 高さ 20mm)を用意する。
- 7) 実体顕微鏡下で遊走子を適量吸引して、シャーレに滴下する。吸引時に、毛細管がシャーレの底とか葉片に触れないように注意する(珪藻を吸引することが多い)。滴下後、シャーレを手で十分に振とうし、遊走子密度を均一にする。
- 8) それぞれ遊走子液の吸引量を違えた 4 種類程度のシャーレを作成しておく。遊走子量が多いと配偶体の密度が高くなり、配偶体どおしが接近しすぎて単離しにくくなる。
- 9) 遊走子採取後のシャーレは、20℃、14~12 時間明期(1000~1500lux)で培養する。温度は、一定となるように人工気象器に入れたほうが配偶体の成長がよい。配偶体は、条件が悪い(温度の変動、高温、高照度)と雌雄が似た形となり、判別しづらい。
- 10) 2 週間で配偶体は雌雄判別できる大きさとなる。受精の恐れがあるため、なるべく早めに配偶体の雌雄判別を行い、単離する必要がある。
- 11) この段階で、珪藻による汚染はほとんど無いが、もし珪藻が発生したならばそのシャーレは廃棄する。廃棄できない場合は、二酸化ゲルマニウムで珪藻の増殖を押さえることができるので、珪藻に汚染されていない配偶体を単離する。

3. 雌雄配偶体の単離

- 1) 倒立顕微鏡のステージに配偶体を培養しているシャーレをのせ、単離に適した配偶体をさがす。配偶体どおしが十分に離れており、雌雄がはっきりしているものを単離する。パスツールピペットにチュウブを付け、配偶体をシャーレから分離し、吸引する。吸引した配偶体は、PESI 培地を満たした 48 穴マイクロプレートに 1 尾づつ入れる。
- 2) 配偶体は、雌配偶体を雄配偶体より 1.5 倍程度多く採取する。
- 3) 1 ヶ月間、20℃、14~12 時間明期(1500~2000lux)で培養する。

4. 配偶体の保存及び拡大培養

- 1) マイクロプレートで培養後の配偶体を取り出す。通常、配偶体は肉眼視できる大きさとなっているので、眼科用ピンセットでマイクロプレートからつまみ上げて取り出す。十分な大きさに育っていない場合は、倒立顕微鏡下でパスツールピペットを使い吸引してもよい。
- 2) 保存する場合は、ねじ口試験管に入れて 20℃、14 時間明期(1000~1500lux)で保存する。徳島水試では、1 株につき雌配偶体 3 尾、雄配偶体 2 尾を保存している。保存後の培地の交換は、2 ヶ月に 1 回 PESI 培地を交換している。
- 3) 種苗生産に用いるために拡大培養する場合は、PESI 培地を満たした直径 30mm の試験管に入れ通気培養する。20℃、14~12 時間明期(1500~2000lux)で培養する。培地の交換は、2 週間に 1 回行う。配偶体が大きく増殖してきたら、容器をフラスコに変え、通気培養を継続する。

5. フリー配偶体の細断及び基質への付着

- 1) フリー配偶体を細断し、糸に吸着させてから、約 1 ヶ月で 2~5mm の藻体になり、鳴門海域では天然海水中での仮沖だし(中間育成)を開始するサイズとなる。仮沖だしは、海水温が 22~23

以下にならないとワカメにとって危険であるため、フリー配偶体の細断は、その海水温になる頃から逆算して1ヶ月前に行う。通常のワカメ種苗生産は、屋外のタンク内でワカメ配偶体の付いた採苗枠を培養しており、水温、光量は変動し易く、計画的種苗生産が行い難い。しかし、この方法であるならば、鳴門ワカメは、ほぼ1ヶ月で2~5mmサイズになることが分かっているため、生産計画が立てやすい。

- 2) フリー配偶体を細断する 2 週間前に、配偶体の成熟促進を行う。15 , 10 時間明期(1000~1500lux)の低温、短日処理を行う。
- 3) 徳島水試では直径 2mm のクレモナ糸 120cm に配偶体を付けて種苗生産を行っている。図 1 に示したように、ビニール被覆した針金を使い糸を巻き付ける枠を作成する。これは、糸を巻き付けて 1L のビーカーに入る大きさであり、枠から長く上方へ伸びた取っ手により枠全体をビーカーから取り出すことができる構造となっている。

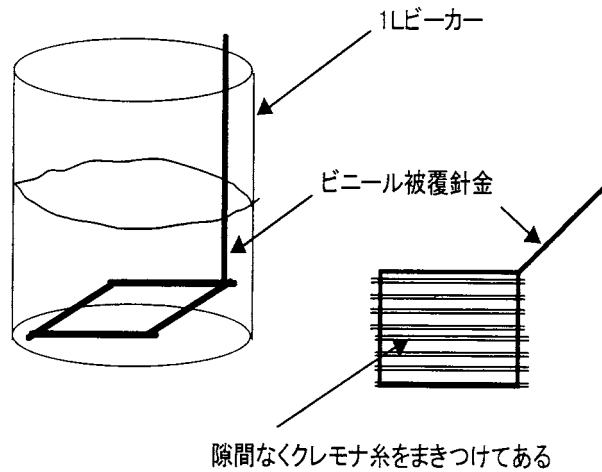


図 1 ワカメ培養容器

- 4) クレモナ糸は、約 30 分間煮沸し、あく抜きを行い、乾燥する。これを、枠に隙間無く巻き付ける。
- 5) 使用するフリー配偶体は雌雄 1ml ずつあれば充分である。雌雄配偶体を混合して、100ml PESI 培地を満したミキサーに入れ、4~5 細胞になるまで細断する。ホモジナイザーを使っても可能であるが、ミキサーの方が、その後の芽胞体までの成長が速い。
- 6) 1L のビーカーに糸を巻き付けた枠を入れ、PESI 培地 500ml を満たす。細断後の配偶体懸濁液を糸の上に均一になるようにまく、この状態で、配偶体は糸の上に乗っているだけであるが、雌配偶体は受精後、糸上に仮根を伸ばし、固着するようになる。
- 7) 1 ヶ月間の培養条件は、表 1 のとおりである。1 週間後から、通気を開始し、同時に照度を上げ、日長を長くして行く。1 週間ごとに培地を交換するが、1 日前に新しいビーカーに 500ml の培地を入れ、同じ場所に置き、温度を合わせておく。最初の培地交換時に、取っ手を持って枠を培地中で振とうし、糸上の余分な配偶体を落とし、新しい培地の入ったビーカーへ移す。

5. 仮沖だし

- 1) 1ヶ月間培養し、2~5mm になった種苗をこのまま養殖用ロープに挟み込んで、本養殖を行うこともできるが、芽数が多くなりすぎるなど後の養殖上の問題があるため、仮沖出しを行い、1cm 程度の藻体まで成長させる。
- 3) 枠の裏側になった糸は、幼葉が付いておらず、当然、糸は真っ白である。裏側の部分で糸を切り、数十本のワカメ種糸を作る(図 2)。
- 4) 種糸の幼葉の付いてない片方の糸を適当な枠に結び、この枠を養殖ロープに付ける。仮養殖の水深は 20~50cm になるように、プイと錘で調整する。
- 5) 水温にもよるが、20~30 日で葉長 1cm のワカメ種苗ができる。

表 1 ワカメ配偶体及び芽胞体培養条件

培養条件	第1週	第2週	第3週	第4週	第5週以降
日長(明期/暗期時間)	11/13	11/13	12/12	12/12	12/12
照度(lux)	2000	2500	3000	3500	4000
温度(°C)	20	20	20	20	20
通気	無通気	微通気	通気	強通気	強通気
培地交換(PESI)	有り	有り	有り	有り	有り
備考	受精期	芽胞体期	幼葉期		仮沖出し

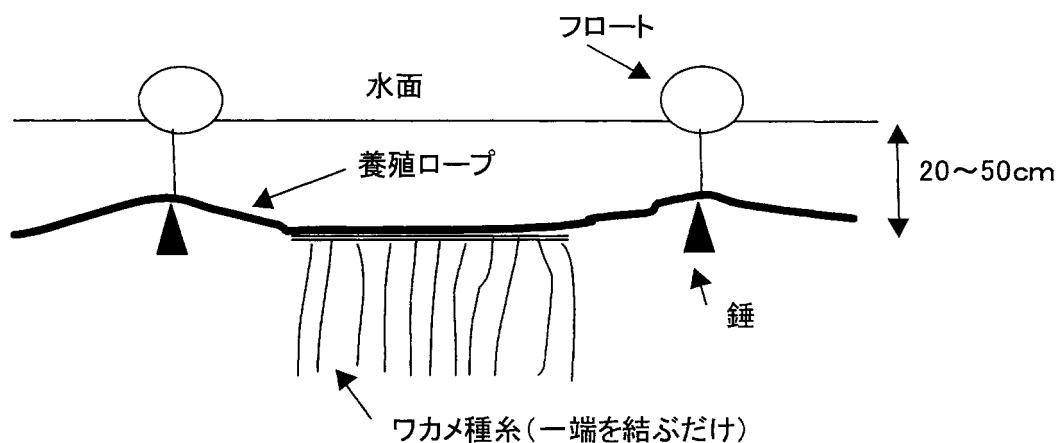


図 2 仮沖出し法