

# ホンダワラ類の組織培養による 増養殖用種苗生産技術開発\*

田中俊充・木村 創

ホンダワラ類は、沿岸域でガラモ場と呼ばれる藻場を形成し、魚介類の再生産や環境保全に重要な役割を果たしている。したがって、磯焼けによる藻場の消失は深刻な問題となっており、各地で藻場の回復が図られている。ホンダワラ類では、一般に成熟した母藻から卵を採取して種苗を生産し、これらを移植する方法が用いられているが、成熟期間が他の海藻類に比べて短いことや卵の放出が間断的であるため安定した種苗生産は難しいのが現状である。

近年、海藻学の分野ではバイオテクノロジーの技術を用いることにより卵や遊走子など正規の繁殖法を経由することなく、個体を増殖させることが可能となり、新しい育種法として期待されている。なかでも、ホンダワラ類については、1985年にMooneyとStaden<sup>1)</sup>が初めて*Sargassum heterophyllum*の外植片から初期葉の形成に成功して以降、ヒジキ<sup>2-5)</sup>、アカモク<sup>4, 5)</sup>、トゲモク<sup>4-8)</sup>、ノコギリモク<sup>6-10)</sup>、オオバモク<sup>6-10)</sup>、フタスジモク<sup>11)</sup>などで組織培養が行なわれており、人工採苗に代わる新しい技術として注目されている。

そこで、本事業ではホンダワラ類の組織培養による種苗生産技術を開発し、天然海域への移植方法について検討する。

## 1 組織培養

### 目 的

多年生ホンダワラ類のうちトゲモク<sup>4-8)</sup>、ノコギリモク<sup>6-10)</sup>やオオバモク<sup>6-10)</sup>では仮根部や茎状部の組織片から出芽した幼芽を人工気象器内で

培養することで周年を通して種苗を生産することができるようになった。

そこで、本年度は大規模に組織培養種苗を生産する手法について検討した。また、出芽した組織片を長期間保存する技術を開発するため、保存に適した培養条件について検討した。

### 材料および方法

材料はオオバモク*Sargassum coreanum*とノコギリモク*Sargassum macrocarpum*を用いた。実験には藻体の茎状部を使用し、組織片の切り出しは木村<sup>4, 5)</sup>に準じて行った。

#### 1) フラスコを用いた培養方法の検討

培養は200mlの培養液を入れた細胞培養用フラスコにノコギリモクの組織片80個を収容して行った。培養液は0.45 $\mu$ mミリポアフィルターで吸引ろ過した砂ろ過海水を使用した。培養液の交換は1回/週、2回/月、1回/月に換水する区と無換水の4試験区を設けた。培養条件は20 $^{\circ}$ C・6,000lx (12L:12D)に設定し、1ヶ月ごとに3ヶ月間出芽状況を観察した。また、対照区として24穴マルチウェルプレートを用いて無換水条件で80個の組織片を培養した。

#### 2) 通気培養における大量培養方法の検討

静置培養により出芽したオオバモクとノコギリモクの組織片を200 l アルテミア孵化水槽と500mlサンプル瓶にそれぞれ10個ずつ収容し、通気培養を行った。アルテミア孵化水槽については20 $^{\circ}$ C・1,700lx (12L:12D)に設定した恒温室で行い、培養液は砂ろ過海水を10 $\mu$ mネットでろ過した海水に市販の藻類培養液(KW21)を0.1%添加して使

\*地域先端技術共同研究開発促進事業費による

用した。通気は水槽底面の中央部にエアーストーンを設置し、組織片が常時攪拌するようにした。サンプル瓶については20℃・6,000lx (12L:12D) に設定した人工気象器で行い、培養液は砂ろ過海水を0.45 $\mu$ mミリポアフィルターで吸引ろ過した海水に市販の藻類培養液を添加して使用した。それぞれの培養液は週に2回交換し、各組織片の最大葉長を1週間ごとに1ヶ月間測定した。

### 3) 出芽した組織片の保存方法の検討

静置培養により出芽したノコギリモクの組織片を24穴マルチウェルプレートに収容し、20℃・6,000lx (12L:12D)、20℃ (24D)、5℃・6,000lx (12L:12D)、5℃ (24D) の4条件で保存した。培養液は砂ろ過海水を0.45 $\mu$ mミリポアフィルターで吸引ろ過した海水を用いた。保存した組織片は1, 3, 5, 7, 9, 12ヶ月目に各プレートから4個ずつ取り出して通気培養に移し、1週間ごとに1ヶ月間最大葉長を測定した。培養は20℃・6,000lx (12L:12D) に設定した人工気象器で行い、培養液はPESI培地<sup>12)</sup>を用い、週に2回の割合で交換して使用した。

## 結果および考察

### 1) フラスコを用いた培養方法の検討

培養液の交換頻度別の出芽率を図1に示す。各試験区ともにすべての観察時に芽が見られ、30～60日の間に最も多く出芽していた。最終的な出芽率は無換水区が55.0%、1回/月換水が56.3%、2回/月換水が62.5%、1回/週換水が43.8%であり、

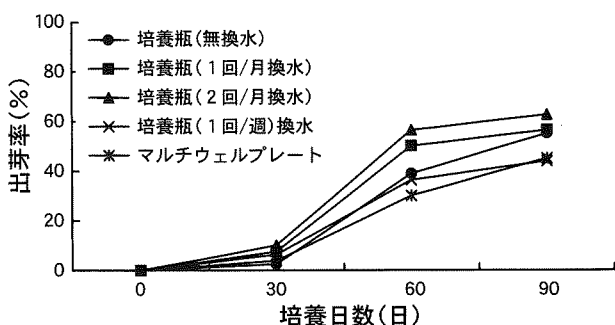


図1 培養液の交換頻度別の出芽率

最も多く出芽した区と少なかった区の間でカイ二乗法による統計処理でも有意な差は認められなかった。また、これらは従来まで行ってきたマルチウェルプレートの45.0%と比べても差は見られなかった。

これまで、静置培養では出芽せずに腐敗した組織片が他を汚染することがないように個々が独立したマルチウェルプレートを使用していたが、1枚のプレートに24個の組織片しか収容できないことから大量培養には適さなかった。一方、今回実験に使用した細胞培養用フラスコは大量の組織片を収容できるものの、コンタミにより出芽率が低下する危険があり、培養液を定期的に交換することで汚染の軽減を試みた。しかし、結果的には培養液の交換の有無に関わらず、各試験区で出芽率に大きな差は見られなかったことから、他の藻類の混入など深刻なコンタミを起こさなければ出芽に影響しないと考えられた。したがって、藻場造成などで大量の種苗が必要な場合、静置培養では大型のフラスコを用い、一度に多数の組織片を培養し、効率的に種苗を生産することが可能となった。

### 2) 通気培養における大量培養方法の検討

アルテミア孵化水槽とサンプル瓶で培養した時のオオバモクとノコギリモクの初期葉の生長を図2に示す。サンプル瓶で培養した組織片は両種とも枯死が見られず、4週間で平均葉長10mm以上に生長した。一方、アルテミア孵化水槽ではオオバモクは期間中に2個、ノコギリモクは6個が枯死し、残った組織片についても4週間で葉長3～4mmにしか生長しなかった。枯死や生長不良の原因は、水槽容量に対して入れた組織片の数が少なかったことや培養開始時の小さな組織片が水槽内で常時回転していなかったこと、水槽を設置した場所の照度が人工気象器内に比べて1/3以下であったことなどが影響したと考えられる。今後は、水槽内のエアレーションの強さや照度を調整するとともに容器に入れる組織片の数を検討して培養試験を行う必要がある。

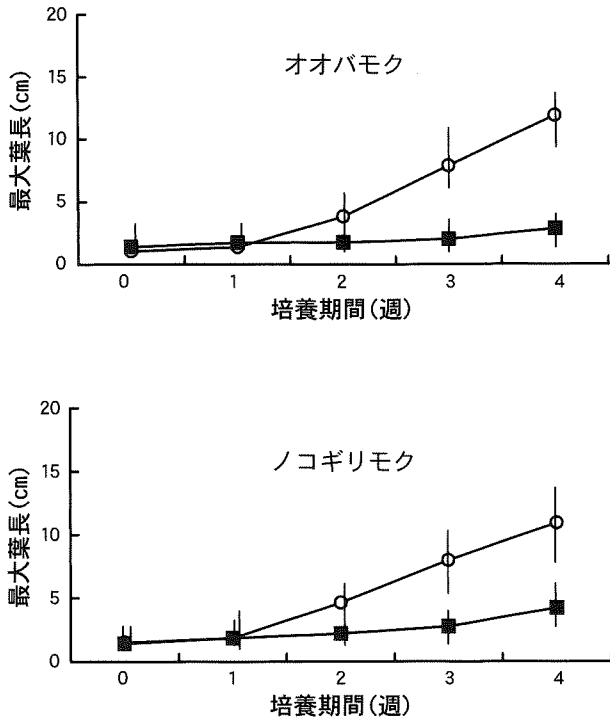


図2 オオバモクとノコギリモクの初期葉の生長  
 ■ 200 l アルテミアふ化水槽, ○ 500 ml サンプル瓶

### 3) 出芽した組織片の保存方法の検討

保存条件別の組織片の生存率を表1に示す。保存した組織片は期間が長くなるにつれて色素が抜け落ちて透明になるものが見られるようになり、通気培養に移しても生長しなかったことから枯死したと判断した。このような組織片は5ヶ月以上保存したもので多く見られるようになり、20℃・6,000lx (12L:12D) と5℃・6,000lx (12L:12D) で保存した組織片は9ヶ月目以降すべて枯死していた。一方、

20℃ (24D) と5℃ (24D) では枯死する組織片が少なく、20℃ (24D) の条件では12ヶ月が経過しても50%が生存していた。

保存した組織片の通気培養における生長を図3に示す。1ヶ月間保存した組織片は、通気培養に移した後も良好な生長を示し、4週間で葉長6~8mmになった。しかし、3ヶ月以上保存した組織片は通気培養に移した後の生長差が大きくなり、5℃・6,000lx (12L:12D) では3ヶ月目以降、5℃ (24D) では12ヶ月目に初期葉の生長が著しく鈍くなった。一方、20℃ (24D) で保存した組織片は12ヶ月間保存した組織片でも通気培養で葉長約7mmになり、期間を通して安定した生長が見られた。

以上の結果より、組織培養した種苗の保存には20℃ (24D) の条件が最も適していることが明らかとなった。吉田ら<sup>13)</sup> は同じホンダワラ類のアカモク幼胚を低温・暗条件下に置くことで1年以上保存できることを報告しているが、組織培養した種苗についても暗条件下に置くことで生存日数の延長が図られ、その後の通気培養でも良好な生長が見られた。昨年度の試験により、組織培養での出芽率は海藻の採取時期によって大きく異なることが分かっており<sup>9)</sup>、今後は出芽しやすい時期に組織片を切り出して、出芽した種苗を保存し、使用前に通気培養に移すことで移植用の種苗を必要な時期に作成することが可能となった。

表1 保存条件別の組織片の生存率

保存条件	1ヶ月保存	3ヵ月保存	5ヵ月保存	7ヵ月保存	9ヵ月保存	12ヶ月保存
20℃(12L:12D)	100	100	50.0	50.0	0	0
20℃(24D)	100	100	100	100	100	50.0
5℃(12L:12D)	100	75.0	25.0	25.0	0	0
5℃(24D)	100	100	75.0	50.0	75.0	25.0

単位は%で示す

## 2 人工藻場造成

### 目 的

昨年度の試験により、磯焼け海域に移植したノコ

ギリモク種苗が天然の藻体と同じ形状に生長し、1年ほどで生殖器床を形成することが明らかになった<sup>10)</sup>。

そこで、本年度も組織培養した種苗を磯焼け海域に展開し、人工藻場の造成を試みた。また、組織培

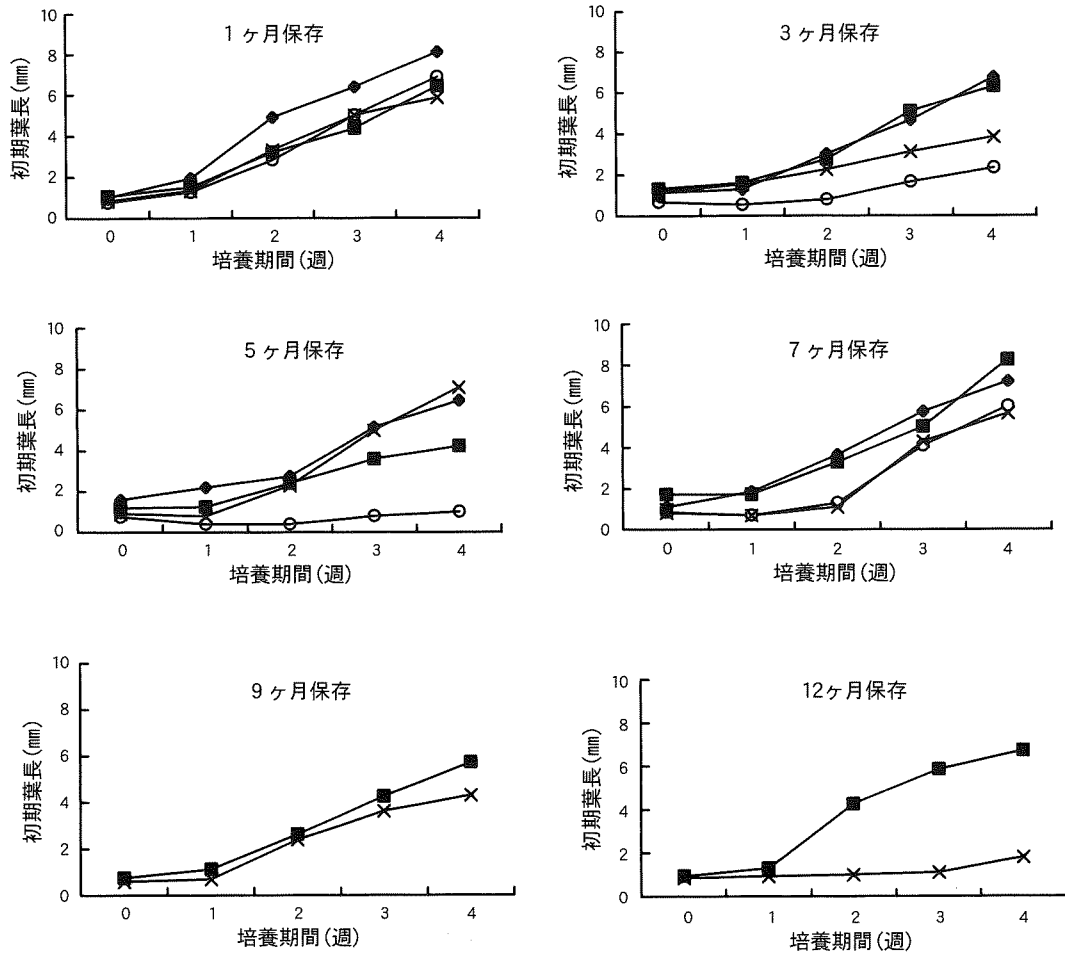


図3 保存した組織片の通気培養における生長

◆ 20°C・6,000 lx (12L:12D), ■ 20°C (24D)  
 ○ 5°C・6,000 lx (12L:12D), × 5°C (24D)

養藻体の再生産能力を調べるため、成熟した藻体から卵を採取し、その発生を観察するとともに天然藻体から得られた卵と比較した。

### 材料および方法

組織培養において出芽したノコギリモクの組織片を通気培養に移し、1ヶ月間培養した。その後、葉数が4～5枚になるよう解剖用メスで組織片から切り離して実験用の種苗とした。

#### 1) 人工藻場造成試験

組織培養した種苗をクレモナロープの間に挟み込み、これを海藻移植プレート (3cm×16cm) に2本ずつ結束バンドで固定した。作成したプレートは屋

内水槽で流水培養した後、磯焼け海域に設置した5基の藻礁に水中ポンドや結束バンドで固定した。試験は日高町比井崎地先海域 (図4) の磯焼け海域で実施した。

#### 2) 再生産試験

2001年8月から2002年2月に屋外巡流水槽に移したノコギリモク種苗のうち、2002年12月までに雌雄それぞれ4本の藻体が生殖器床を形成した。その後、2002年12月26日と2003年1月14日に雌の生殖器床から放卵が見られ、多量の受精卵が採取できた。そこで、得られた卵を滅菌海水で洗浄した後、20°C・6,000lx (12L:12D) に設定した人工気象器で1ヶ月間培養した。培養はPESI培地を使用し、

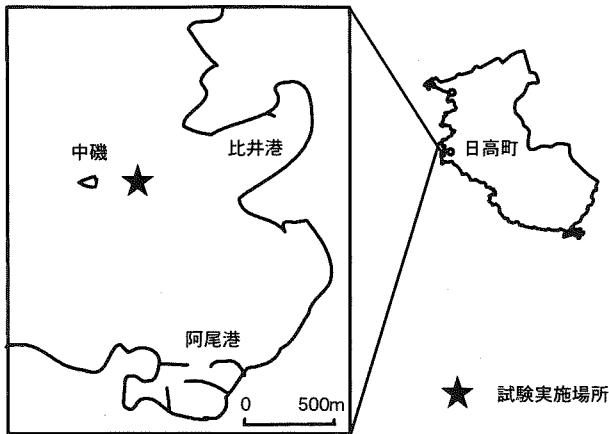


図4 試験実施場所

週に1回培地を交換した。培養期間中は5日ごとに卵の発生状況を観察し、5本の初期葉長と仮根長を測定した。また、天然藻体の卵と発生を比較するために、天然海域で成熟した母藻からも同様に卵を採取して培養し、初期葉と仮根の発生を調べた。

### 結果および考察

#### 1) 人工藻場造成試験

本年度の試験は組織培養したノコギリモクの幼体1000本を500枚の海藻プレートに活着させ、天然海域に移植する計画であった。しかし、大部分の種苗は陸上水槽での培養中に枯死し、残った種苗についてもプレートに活着しなかった。枯死の原因については、夏場に水槽内の水温が高くなったこと、附着珪藻がプレートや種苗の表面を覆ったこと、また、珪藻の発生を抑制するため途中から水槽全体を遮光幕で覆ったことなどが考えられる。

組織培養種苗の藻礁への設置状況を写真1に示す。生き残った種苗については2003年11月11日に天然海域に移植し、5基の藻礁に合計278本（プレート139枚）を貼りつけた。しかし、移植後1ヶ月（12月17日）の調査では種苗が大幅に減少しており、全体の残存率は15.1%（139枚中21枚）になった。これは種苗がプレートに活着する前に移植したため、波浪により流出したことが大きな原因と考えられる。また、1ヶ月後の調査時に藻礁周辺で藻食性魚類で

あるニザダイの群れが盛んに藻礁を突つく姿が観察された。ノコギリモクは藻食性魚類の食害に遭いにくいことが知られているが<sup>14)</sup>、桐山ら<sup>15)</sup>は他の海藻が繁茂しない食圧が強い海域では摂食選択性の低い海藻であっても食害被害を受けることを報告している。このことから、藻食性魚類による摂餌も今回の種苗の減耗要因と考えられ、種苗を磯焼け海域に移植する場合には食害防除手法を講じる必要があると思われた。

#### 2) 再生産試験

組織培養藻体から得られた卵の発生状況を写真2に示す。組織培養藻体から得られた卵の平均サイズは長径266.7 $\mu$ m、短径184.4 $\mu$ mであり、天然藻体から採集した卵の長径235 $\mu$ m、短径163.8 $\mu$ mに比べて若干大きかった。組織培養藻体から採取した卵は培養3日目には仮根を形成し、ガラスシャーレの底に活着した。その後、培養10日目には初期葉が分化しはじめ、培養20日目には2葉、30日目には3葉になり、天然のノコギリモク幼体と同じ形状になった。

組織培養藻体と天然藻体から得られた卵の発生の比較を図5に示す。初期葉長と仮根長の発生は両者間で全く差が見られず、培養開始から1ヶ月で初期葉長約10mm、仮根長約5mmになった。

これらの結果は組織培養した藻体であっても天然藻体と全く変わらない再生産能力をもつことを示している。したがって、組織培養した藻体を用いて藻場造成を行なう場合であっても、それらの藻体による再生産を利用した藻場の拡大を図ることは十分に

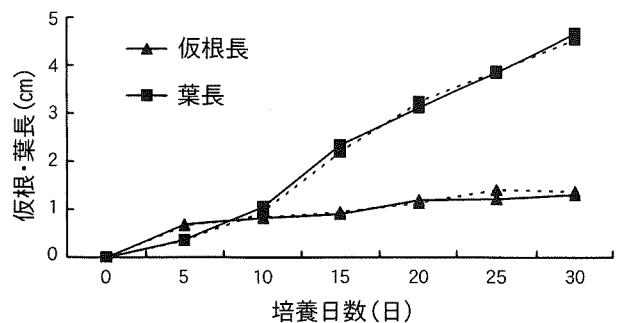
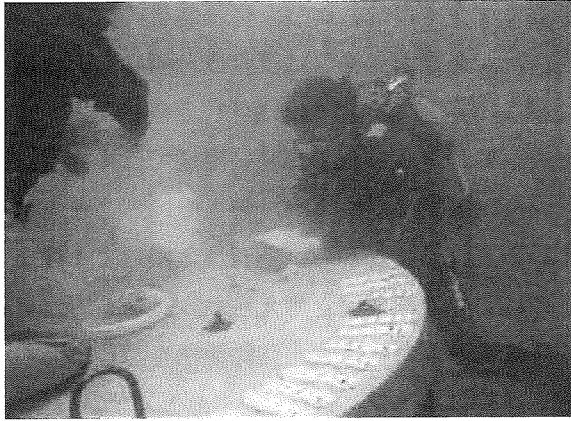
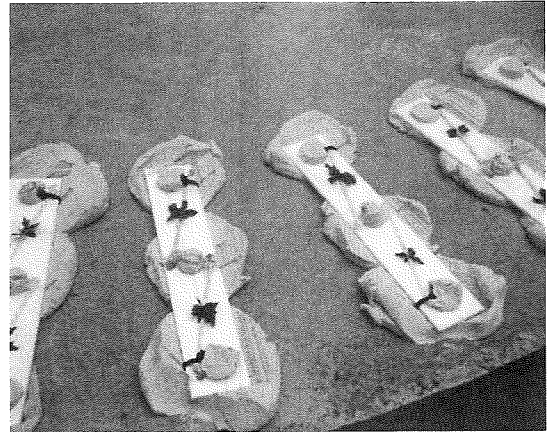


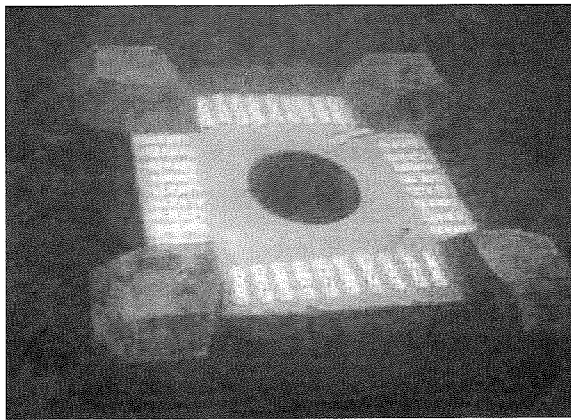
図5 組織培養と天然のノコギリモクの卵発生  
実線 天然藻体の卵、点線 組織培養藻体の卵



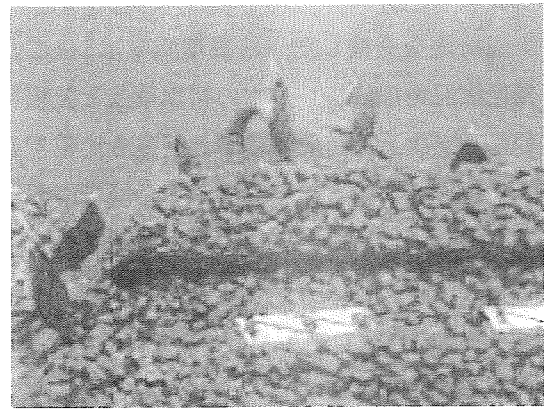
海藻プレートの移植



貼り付け直後の海藻プレート

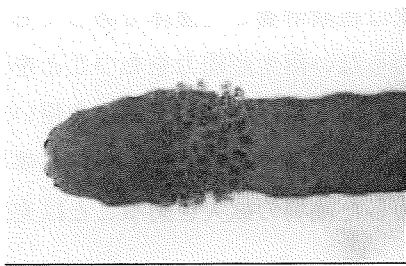


海藻プレートを貼り付けた藻礁

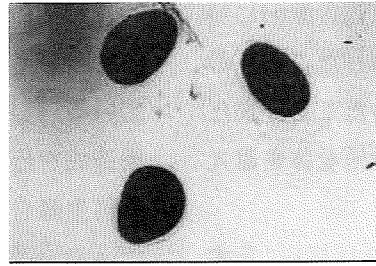


藻礁に集まるニザダイの群れ

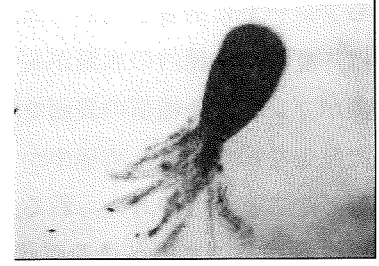
写真1 組織培養種苗（ノコギリモク）の藻礁への設置状況



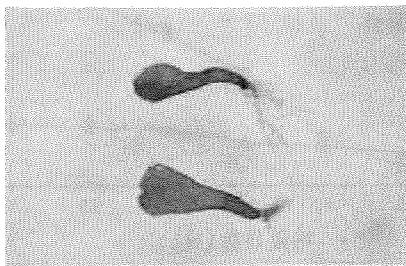
放卵した生殖器床



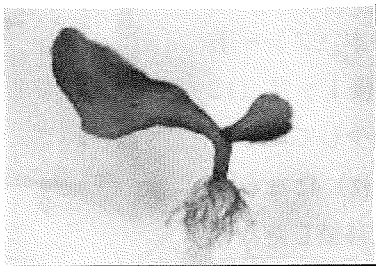
受精卵



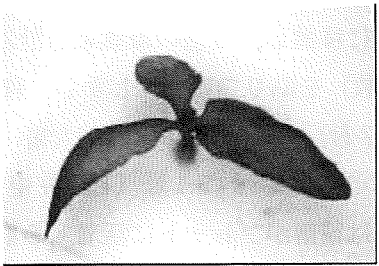
培養3日目



培養10日目



培養20日目



培養30日目

写真2 組織培養藻体（ノコギリモク）から得られた卵の発生状況

可能である。昨年度の試験により組織培養で生産した藻体は天然藻体に比べて生長が早いことが分かっており、短期間で成熟して再生産を行なう組織培養藻体は藻場造成に有効である。

## 文 献

- 1) Pauline A・Mooney・J.van Saden (1985): In vitro plantlet formation and multiple shoot induction in *Sargassum heterophyllum*. *S-Afr. Tydskr. Plantk.*, 51(1), 41-44.
- 2) Eun Kyoung Hwang・Chang Hoon Kim・Chul Hyun Sohn (1994): Callus-like Formation and Differentiation in *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura. *The Korean Journal of Phycology.*, 9(1), 77-88.
- 3) 諸見里聡 (2000) : ヒジキの組織培養による種苗生産技術開発. 平成12年度沖縄県水産試験場事業報告書, 137-138.
- 4) 木村 創(1996): ホンダワラ類2種とヒジキの組織培養. 平成7年度和歌山県水産増殖試験場事業報告, 22-27.
- 5) 木村 創・能登谷正浩(1997): 有用海藻のバイオテクノロジー. 水産学シリーズ, 113, 21-31.
- 6) 樫山晃晴(1999): ホンダワラ類の組織培養による増養殖用種苗生産技術開発. 平成10年度和歌山県農林水産総合技術センター水産増殖試験場報告, 31, 52-70.
- 7) 樫山晃晴(2001): ホンダワラ類の組織培養による増養殖用種苗生産技術開発. 平成11年度和歌山県農林水産総合技術センター水産増殖試験場報告, 32, 52-70.
- 8) 樫山晃晴(2002): ホンダワラ類の組織培養による増養殖用種苗生産技術開発. 平成12年度和歌山県農林水産総合技術センター水産増殖試験場報告, 33, 53-78.
- 9) 田中俊充 (2003) : ホンダワラ類の組織培養による増養殖用種苗生産技術開発. 平成13年度和

歌山県農林水産総合技術センター水産増殖試験場報告, 34, 38-48.

- 10) 田中俊充・木村創 (2004) : ホンダワラ類の組織培養による増養殖用種苗生産技術開発. 平成14年度和歌山県農林水産総合技術センター水産試験場増養殖研究所報告, 35, 63-72.
- 11) 藤井義一・桐原慎二(1996): 褐藻フタスジモクの組織培養. 日本海ブロック試験研究収録, 33, 57-61.
- 12) Terawaki M(1966): Formation of a crustaceous sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. *Phycologia*, 6, 62-66.
- 13) 吉田吾郎・吉川浩二・内村真之・寺脇利信(2001): 一年生ホンダワラ類アカモク冷蔵種苗の成長と成熟. *Jpn.J.Phycol(Sorui)*, 49, 177-184.
- 14) 桐山隆哉・藤井明彦・吉村 拓・清本節夫・四井敏雄 (1999) : 長崎県下で1998年秋に発生したアラメ類の葉状部欠損現象. 水産増殖, 47 (3) , 319-323.
- 15) 桐山隆哉・大橋智志・藤井明彦・吉村 拓 (2003) : 藻場に対する食害実態調査. 平成14年度長崎県総合水産試験場事業報告, 95-102.