

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

ホンダワラ類は「ガラモ場」と呼ばれる群落を形成し、魚介類の産卵場、仔稚魚の隠れ場、他の藻類の附着基質として重要な生態的機能を果たしている。そのため、近年、問題となっている「磯焼け現象」によるガラモ場の衰退は、漁業資源にも大きな影響を及ぼすことが予想される。しかし、ホンダワラ類の多くは成熟期間が季節的に短期間に限られる、放出される生殖細胞の数が少ない、卵や幼胚の時期に珪藻類に覆われて健全な種苗が育ちにくいなどの理由により人工採苗は容易ではない。

近年、海藻学の分野では、バイオテクノロジーの技法を用いることにより、正規の繁殖法（孢子、配偶子による繁殖、栄養繁殖など）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。ホンダワラ類についても植物の外植片（組織片）を培養することにより、1985年にMooneyとStadenが初めて*Sargassum heterophyllum*で初期葉の形成に成功して¹⁾以降、いくつかの種で組織培養が行なわれている²⁻⁸⁾。特に、そのほとんどがカルス細胞（不定形の組織塊）などを経ずに直接初期葉に分化するため、組織培養が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を行なう。

1. 組織培養実験

目 的

ホンダワラ類の組織培養については、木村^{4,8)}や

樫山⁵⁻⁷⁾により藻体の仮根や茎の組織を使用し、培養条件を15~25℃、3000~5000lx (12L : 12D) に設定することで高い出芽率が得られている。そこで本年度は培養液の種類（沿岸水、外洋水、栄養塩添加海水）および植物ホルモン添加により、出芽率の向上や培養日数の短縮を試みるとともに、また月別の出芽率について調べた。

材料および方法

実験にはオオバモク*Sargassum coreanum*とノコギリモク*Sargassum macrocarpum*を用いた。これは両種が多年藻であり、年間を通して実験に使用することができる。県内に大きな群落を形成している場所があり比較的容易に材料を入手できることによる。また、実験には昨年度の結果で、高い出芽率が得られる傾向がみられた幼体から若体を使用した。

1) 月別出芽率の比較

2001年7月より12月まで約2ヶ月に1回、天然海域より8本の材料海藻を採取し実験に供した。採取した海藻は1~3日間当場の屋外コンクリート水槽において流水で管理し、他の藻類や動物を除去した後、仮根に近い茎の部位より1藻体当たり12個の組織片を切り出した。組織片の切り出し方法は木村^{4,8)}に準じた。すなわち、使用部位を比較的大きめに藻体から切り出し、ごみや夾雑物などをよく拭き取った後、表面を70%エタノールで拭き、直ちに組織表面のエタノールをガスバーナーで除去した。その後、エタノールやガスバーナーにより枯死した部分を切り除き、中心の髄組織を1~2mm角で切り出した。組織片は滅菌海水でよく洗浄した後、2.5mlずつ培

*地域先端技術共同研究開発促進事業費による。

養液（当場の砂ろ過海水を0.45 μ mミリポアフィルターで吸引ろ過したもの）を入れた24穴マルチウェルプレートに1個ずつ収容した。培養は20 $^{\circ}$ C, 6000lx (12L:12D) に設定した人工気象器内で行い、週に2回の割合で3ヶ月間出芽状況を観察した。

2) 培養液別の出芽比較

培養液は沿岸水（当場の砂ろ過海水を0.22 μ mミリポアフィルターで吸引ろ過したもの）、外洋水（潮岬沖の黒潮内で採取した海水を0.22 μ mミリポアフィルターで吸引ろ過したもの）、沿岸水PESI液体培地（沿岸水に栄養塩を添加したもの）および外洋水PESI液体培地（外洋水に栄養塩を添加したもの）とし、24穴マルチウェルプレートに2.5mlずつ入れた。その後、実験1)と同様の方法により8本の藻体から計96個の組織片を切り出し、ランダムに各プレートに1個ずつ収容し静置培養を行い、各試験区24個の組織片で出芽率を比較した。実験は7月と9月採取の藻体を用いて2回行なった。培養条件および出芽状況の観察は実験1)に従った。

3) 植物ホルモン添加による出芽向上

実験1)と同様の方法により8本の藻体から計96個の組織片を切り出し、2.5mlずつ培養液(当場の砂ろ過海水を0.22 μ mミリポアフィルターで吸引ろ過したもの)を入れた24穴マルチウェルプレートにランダムに1個ずつ収容した。その後、伸長生長を誘導するオーキシンの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（以下2,4-D）を0,0.1,1.0,10.0mg/l, 細胞分裂を誘導するサイトカイニンの6-ベシジルアミノプリン（以

下BAP）を0,0.01,0.1,1.0mg/lになるよう培養液に添加し、それぞれを組み合わせた計16通り（各試験区6個の組織片）で静置培養を行い出芽率を比較した。実験は7月と9月採取の藻体を用いて2回行なった。培養条件および出芽状況の観察は実験1)に従った。

4) 培養液別の生長比較

培養液は実験2)と同じ4種類を用い、500mlスチロールサンプル瓶にそれぞれ250mlずつ入れた。その後、静置培養においてほぼ同時期に出芽した組織片を各サンプル瓶に3個ずつ収容し、20 $^{\circ}$ C, 6000lx (12L:12D) に設定した人工気象器内で1ヶ月間通気培養を行った。換水は週に2回行い、1週間ごとに各組織片の最大初期葉長を測定した。

結果および考察

1) 月別出芽率の比較

材料海藻採取時の水温と日照時間を表1に示す。7月が長日条件(約14時間日長)、9月がほぼ半日条件(約12時間日長)、11~12月が短日条件(約10時間日長)であり、いずれの時期も日長時間は減少期であった。また、水温については7月が昇温期、9月以降は降温期であった。

月別の出芽率を表2に示す。全体を通した出芽率はオオバモク5.2~28.1%、ノコギリモク20.8~52.1%であり、ノコギリモクの方が出芽率は高かった。しかし、同時期に採取した藻体でも、出芽率は0~100%と母藻による差が大きかった。出芽率は

表1 材料海藻採取時の水温と日照時間

藻体	採取月日	水温($^{\circ}$ C)	日照時間
オオバモク	7.16	23.1 \uparrow	14時間13分
	9.18	26.2 \downarrow	12時間16分
	12.6	17.5 \downarrow	9時間58分
ノコギリモク	7.18	24.1 \uparrow	14時間11分
	9.30	25.0 \downarrow	11時間53分
	11.6	23.3 \downarrow	10時間39分

\uparrow は上昇または増加期, \downarrow は下降または減少期

表2 月別の出芽率の比較

No.	オオバモク			ノコギリモク		
	7月	9月	12月	7月	9月	11月
1	0(0)*	2(16.7)	3(25.0)	2(16.7)	12(100)	4(33.3)
2	0(0)	1(8.3)	5(41.7)	2(16.7)	3(25.0)	2(16.7)
3	0(0)	1(8.3)	2(16.7)	2(16.7)	8(66.6)	5(41.7)
4	0(0)	3(25.0)	1(8.3)	4(33.3)	6(50.0)	4(33.3)
5	0(0)	3(25.0)	6(50.0)	2(16.7)	10(83.3)	5(41.7)
6	0(0)	0(0)	6(50.0)	2(16.7)	0(0)	10(83.3)
7	4(33.3)	3(25.0)	1(8.3)	3(25.0)	5(41.7)	3(25.0)
8	1(8.3)	1(8.3)	3(25.0)	3(25.0)	6(50.0)	10(83.3)
全体	5(5.2)	14(14.6)	27(28.1)	20(20.8)	50(52.1)	43(44.8)

*出芽数, ()内は出芽率(%)

表3 月別の出芽日数の比較

培養日数	オオバモク			ノコギリモク		
	7月	9月	12月	7月	9月	11月
0~15	0*	0	0	0	4	0
16~30	1	8	6	7	7	15
31~45	3	2	9	6	15	15
46~60	1	0	2	6	17	5
61~75	0	0	7	1	6	3
76~90	0	4	3	0	1	5

*出芽数

両種ともに7月に採取した藻体では低く、秋以降では高まる傾向が見られた。カジメやクロメを用いた組織培養では、海藻の採取時期によってカルス細胞の形成率が異なることが知られている^{9,10)}。ホンダワラ類についても生長や成熟が水温や日長時間などの環境要因と密接に関係していることが報告されており¹¹⁾、カジメやクロメと同様に季節によって出芽率が異なることが予想される。秋以降に採取した藻体で出芽率が高まった要因としては、ノコギリモクの幼体が水温低下期に伸長することが知られており¹²⁾、両種ともに組織の出芽能力が高まっていた可能性が考えられる。

月別の出芽日数を表3に示す。出芽はオオバモクで実験開始後19日目、ノコギリモクで10日目から確認され、16~60日目に最も多かった。しかし、出芽に要した日数に採取時期による大きな違いは見られなかった。また、両種ともに60日目以降も出

芽が見られたが、終了時においても出芽しなかった組織片はほとんどが褐変しており、培養を続けたとしても出芽しないと思われた。このことから、静置培養の期間としては3ヶ月程度が適していると考えられる。

2) 培養液別の出芽比較

培養液別の出芽率、出芽日数を表4,5に示す。出芽率は両実験を通して高い試験区はなく、海水の種類や栄養塩添加による効果は見られなかった。また、出芽に要した日数についても栄養塩添加区で出芽が早まるような傾向は見られず、出芽には栄養塩の添加をほとんど必要としないことが推測された。従って、静置培養に用いる培養液としては、採取や調合に手間がかかる外洋水や栄養塩添加培地よりも容易に作成できる沿岸水が適していると考えられる。

3) 植物ホルモン添加による出芽向上

植物ホルモン添加区別の出芽率を表6に示す。出

表4 培養液別の出芽率

藻体	採取月	沿岸水	沿岸水PESI	外洋水	外洋水PESI
オオバモク	7	10(41.7)*	5(20.8)	9(37.5)	7(29.2)
	9	5(20.8)	5(20.8)	9(37.5)	8(33.3)
ノコギリモク	7	12(50.0)	10(41.7)	8(33.3)	8(33.3)
	9	17(70.8)	20(83.3)	19(79.2)	14(58.3)

*出芽数, ()内は出芽率(%)

表5 培養液別の出芽日数

藻体	培養日数	沿	沿P	外	外P				
オオバモク	0~15	1*	0	0	2	2	1	3	1
	16~30	1	3	0	1	1	3	2	4
	31~45	4	1	1	1	4	2	0	3
	46~60	2	0	1	0	2	2	0	0
	61~75	2	1	0	0	0	1	2	0
	76~90	0	0	3	0	0	0	0	0
ノコギリモク	0~15	0	4	0	3	0	6	1	5
	16~30	2	5	3	13	1	5	4	8
	31~45	4	1	5	3	6	5	2	1
	46~60	3	5	2	0	1	1	0	0
	61~75	2	1	0	1	0	2	1	0
	76~90	1	0	0	0	0	0	0	0

沿：沿岸水，沿P：沿岸水PESI，外：外洋水，外P：外洋水PESIを示す

*出芽した組織片の数，左は7月採取，右は9月採取

表6 植物ホルモン添加区別の出芽率

藻体	BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)							
		0	0.1	1	10				
オオバモク	0	0	1(16.7)	0	0	0	2(33.3)	0	5(83.3)
	0.01	1(16.7)*	1(16.7)	0	4(66.7)	1(16.7)	3(50.0)	0	4(66.7)
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ノコギリモク	0	1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)	2(33.3)	1(16.7)	2(33.3)	1(16.7)	4(66.7)
	0.01	0	3(50.0)	1(16.7)	1(16.7)	1(16.7)	3(50.0)	2(33.3)	3(50.0)
	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0

*出芽数, ()内は出芽率(%)，左は7月採取，右は9月採取

芽率はいずれの試験でも植物ホルモン添加区で最も高かった。特に9月採取藻体では、両種とも2,4-Dを高濃度に添加した試験区で出芽率が高まる傾向が見られ、これらの植物ホルモンによる効果が期待できる結果となった。しかし、今回の実験では各試験区

の供試数が少なかったため植物ホルモンが有効であると断定することはできず、今後は高い出芽率が得られた植物ホルモン添加区について試験を行なう必要がある。

4) 培養液別の生長比較

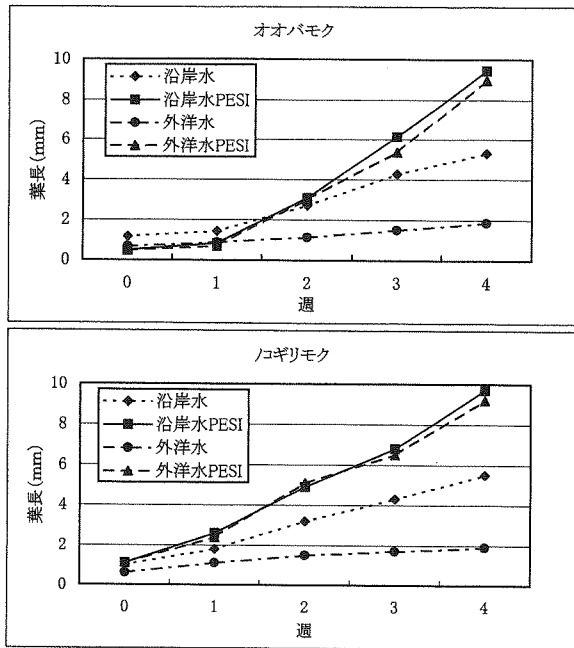


図1 培養液別の平均最大葉長の変化

培養液別の平均最大葉長の変化を図1に示す。両種ともに沿岸水PESI液体培地を用いた試験区で最も生長が速く、培養開始後1ヶ月で葉長が約10mmに達した。また、外洋水PESI液体培地を用いた試験区でも、沿岸水PESI液体培地と比べてほとんど差は見られなかった。しかし、沿岸水と外洋水を用いた試験区では、生長は実験開始後1~2週目で生長差が現れはじめ、外洋水、沿岸水の順で悪かった。両種ともに最大葉長の生長と栄養塩の多い培養液の順が一致しており、通気培養においては培養液に栄養塩を添加した方が生長が早まることが明らかとなった。

2.人工藻場造成試験

目 的

組織培養により得られたホンダワラ類の種苗を天然海域に移植すると、仮根や茎（種類によっては主枝や気胞）が形成され、天然藻体と同じ形状にまで生長することが分かっている⁵⁻⁸⁾。しかし、沖出し後の残存率の低さや沖出し時期により残存率が異なることなど問題点も多い。

ることなど問題点も多い。

そこで、本年度は年間を通して組織培養種苗を天然海域に沖出しし、その後の消長を調べるとともに、効率的な移植方法について検討した。

材料および方法

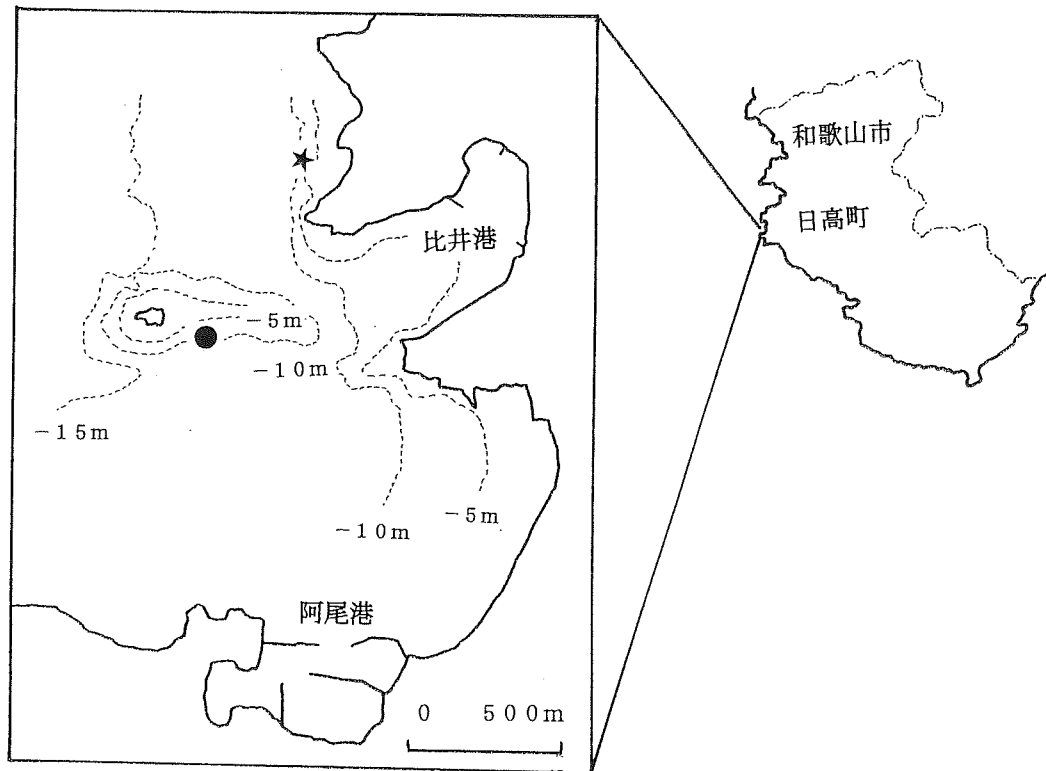
組織培養実験において出芽したオオバモクとノギリモクの組織片を通気培養に移し、葉長が約1cmになるまで培養した。その後、葉数が4~5枚になるよう解剖用メスで組織片から切断し移植用の種苗とした。

1) 移植時期の検討

試験は日高町比井崎地先海域（図2）の「中磯」（磯焼け海域）と「犬戻」（非磯焼け海域）および対照区として場内の屋外水槽で実施した。2001年8月より12月まで約2ヶ月に1回、組織培養した種苗を比井崎地先および屋外水槽にそれぞれ5本ずつ移植した。移植方法は種苗をクレモナ撚糸に挟み込み、これを移植床（目合3cmのトリカルネット）にステンレス針金で固定した（写真1）。これを天然海域では海底に打ち込んだ移植台（鉄筋製）に、また屋外水槽ではショッピングバスケットに結束バンド（ナイロン製）で固定して垂下飼育した。なお、天然海域については大型藻食動物による食害を防止するため、漁網（テグス網14号8節）を被せた（写真2）。その後、屋外水槽は約10日、天然海域はほぼ1ヵ月おきに経過を観察し、最大葉長と葉数を計測した。

2) 移植方法の検討

通気培養で葉長が1~2cmに生長した種苗を組織片から解剖用メスで切り離し、屋外水槽で約1ヶ月間馴致した。その後種苗をコンクリートブロック（10cm×10cm）上に3~4個（計30個）ずつ静置し、微流水により3ヶ月間飼育した。飼育水には砂ろ過海水を用い、水温は自然水温によった。実験は水温が室内培養条件である20℃とほぼ一致するようになった2001年11月27日に行い、基質への着生の確認は約15日ごとに行った。



● 中磯 ★ 犬戻

図2 試験実施場所

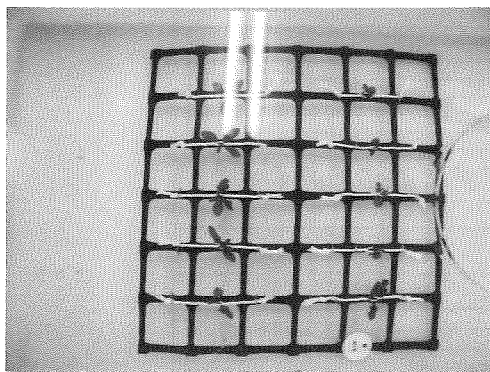


写真1 トリカルネットを用いた移植床

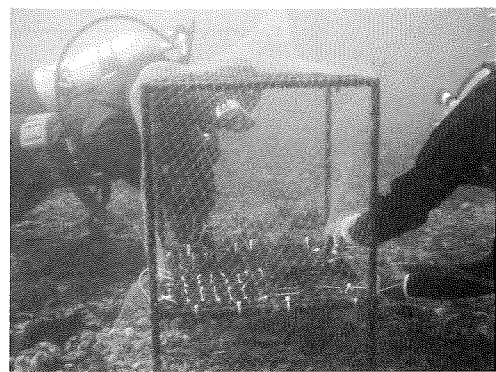


写真2 天然海域への移植状況

結果および考察

1) 移植時期の検討

8月から12月に各海域へ移植した種苗の最大葉長の変化を図3～5に示す。8月に移植した種苗は両種ともに沖出し直後から順調な生長が見られ、生長平均値（1ヵ月当たりの生長平均値）はオオバモ

ク2.6cm/月、ノコギリモク1.4cm/月であった。しかし、12月以降は生長がいくぶん鈍り、生長平均値はオオバモク1.2cm/月、ノコギリモク0.4cm/月となった。「犬戻」に移植した種苗は9月の調査時にすべて消失していたが、これは同時期に屋外水槽と「中磯」に移植した種苗が順調に生長していたこと、移植後に台風などによる荒天がなかったことから小型

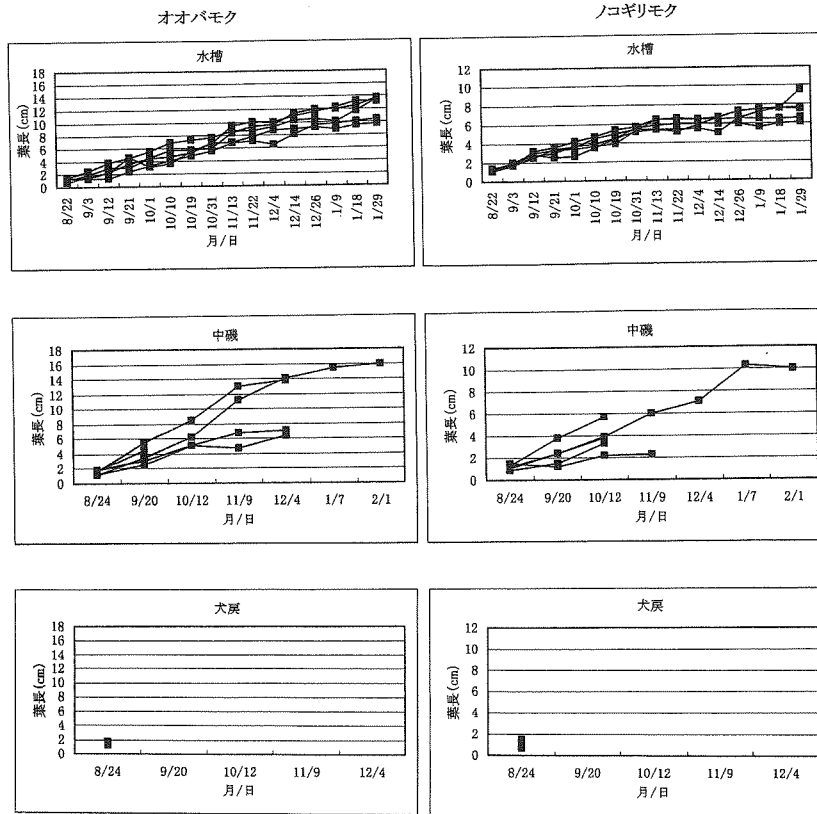


図3 8月移植種苗の最大葉長の変化

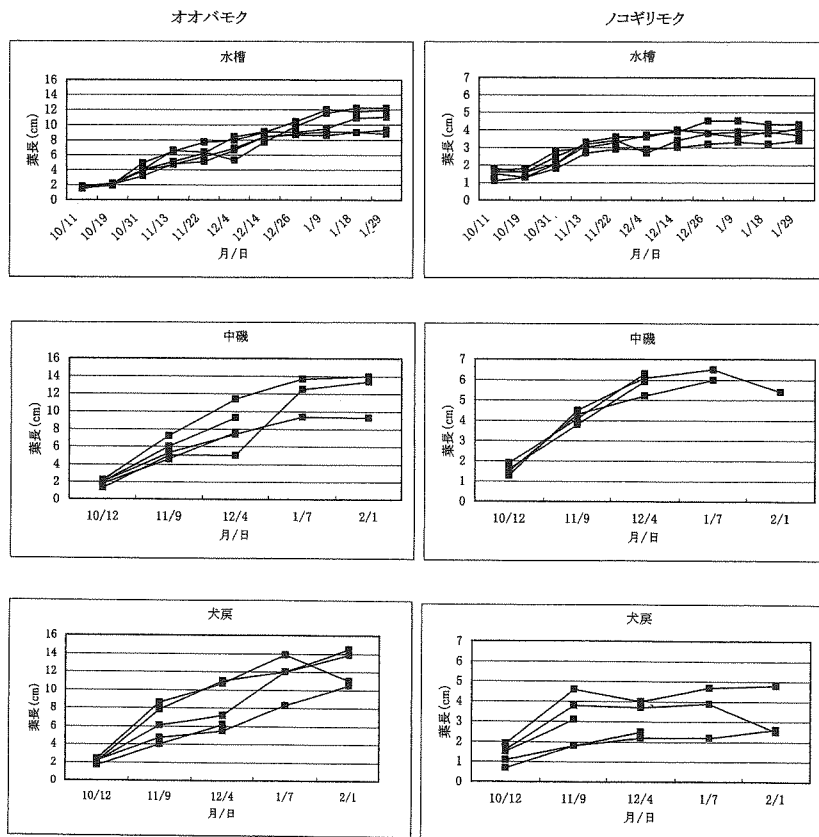


図4 10月移植種苗の最大葉長の変化

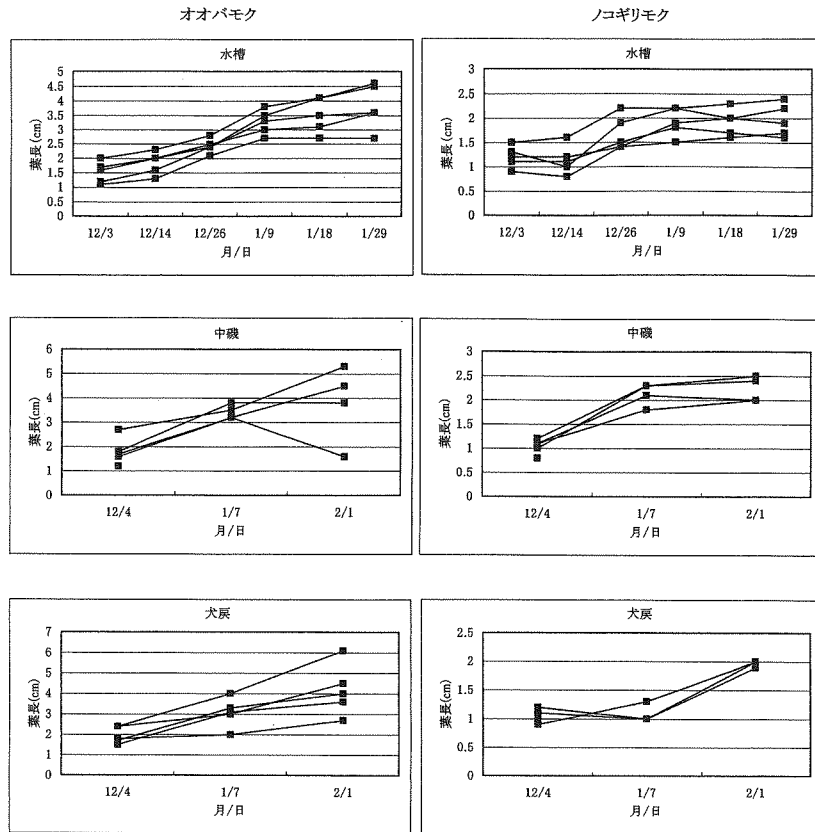


図5 12月移植種苗の最大葉長の変化

藻食動物による食害にあったと考えられる。また、天然海域では秋以降に消失する種苗が多く見られたが、これは季節風の影響で海が荒れた日が多かったため波浪により流失したものと考えられる。10月に移植した種苗も同様に冲出し当初は順調に生長したが、12月以降は鈍くなる傾向が見られた。一方、12月に移植した種苗は直後から生長が鈍く、生長平均値はオオバモク1.1cm/月、ノコギリモク0.5cm/月であった。仮根の形成は3ヶ所とも冲出し後2ヶ月目以降に確認され、そのような種苗は両種ともに残存率がよく、2月の調査時でもオオバモク90.9%（11個体中10個）、ノコギリモク100%（9個体中9個）が残っていた。また、茎や主枝の形成は両種ともに冲出し後3ヶ月目以降に多く確認され、屋外水槽と天然海域による差は見られなかった。従って、組織培養した種苗を冲出しする場合、冲出し時期としては冬よりも生長のよい夏が適しており、更に仮根の早い形成が冲出し後の残存率の向上につながるこ

が明らかとなった。

次に、各海域へ移植した種苗の平均最大葉長の変化を図6に、平均葉数の変化を図7に示す。初期葉の生長は両種とも、「中磯」が屋外水槽をいずれの時期においても上回っていた。しかし、平均葉数は屋外水槽が増加する傾向にあり、初期葉の生長とは逆の結果となった。一方、「大磯」では葉長、葉数ともに他の2海域を上回る種苗と下回る種苗に分かれた。これは「大磯」が藻類の生育環境としては適しているものの、他の藻類や食害生物などの阻害要因が多いため生育に差が出たものと考えられる。以上のことより、天然海域では藻体の生長は早いですが、阻害要因が多いため新しい葉が形成されにくいことが推測された。従って、組織培養した種苗を天然海域へ冲出しする場合には、冲出し前に屋外水槽で一定期間管理し、仮根の形成や葉数を増やすなどの中間育成を行なうことが有効であると思われる。

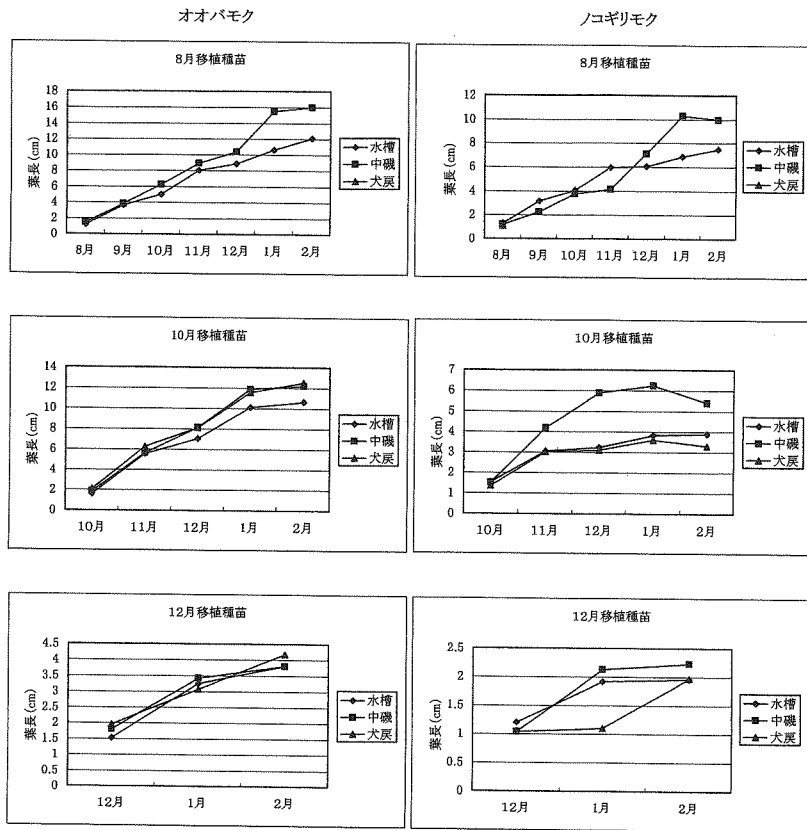


図6 移植後の平均最大葉長の変化

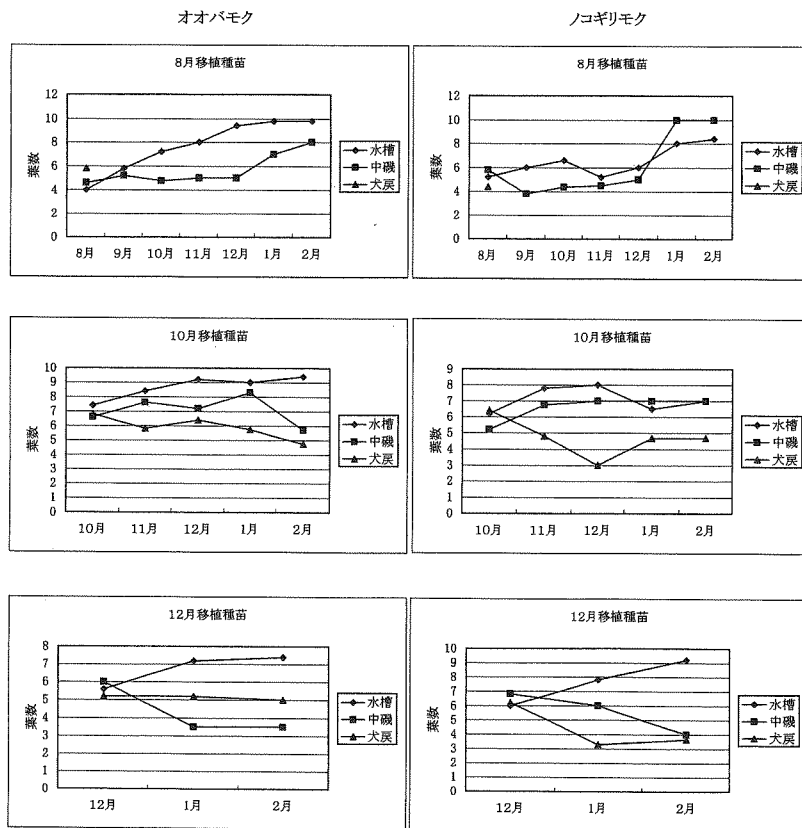


図7 移植後の平均葉数の変化

2) 移植方法の検討

組織培養種苗の着生状況を表7に示す。両種ともに実験終了時まで枯死や流出した種苗は見られず、着生率はオオバモク63.3% (30個体中19個)、ノコギリモク36.7% (30個体中11個)であった。基質への着生は最初の確認時から認められ、大部分が1ヶ月程度で着生したが、2ヶ月目以降では両種ともにほとんど見られなかった。基質への着生が見られた種苗は仮根が形成されており、しっかりと基質に付着していた(写真3)。現在のクレモナ撚糸に種苗を挟み込む移植方法の場合、仮根が形成されない藻体はいずれ糸が切れた時に流失してしまう。本手法により屋外水槽で2ヶ月程管理し、基質に着生した種苗を移植する方が残存率の向上につながるものと思われる。また、天然海域におけるノコギリモクの幼体は、生育当初伸長より付着器を発達させることが知られており¹²⁾、仮根形成後に沖出しする方が、その後の生長も早まる可能性がある。



オオバモク



ノコギリモク

写真3 基質へ着生した組織培養種苗(実験終了時)

表7 組織培養種苗の着生状況

経過日数	オオバモク	ノコギリモク
0	0/30(0)*	0/30(0)
16	4/30(13.3)	7/30(23.3)
30	11/30(36.7)	9/30(30.0)
45	11/30(36.7)	10/30(33.3)
62	16/30(53.3)	11/30(36.7)
73	19/30(63.3)	11/30(36.7)
90	19/30(63.3)	11/30(36.7)

*着生数, ()内は着生率(%)

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) 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.
- 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) 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.

6) 樫山晃晴(2000): 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年度地域先端技術共同研究開発促進事業報告書.

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12年度先端技術等地域実用化研究促進事業西海ブロック報告会資料.

8) 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.

9) Y.Kawashima・H.Tokuda (1990):
Callus formation in *Ecklonia cava* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta) *Hydrobiologia*, 204/205, 375-380.

10) 木村 創・能登谷正浩(1996): 褐藻クロメの組織培養. 日本水産学会誌, 62 (4), 638-641.

11) 吉田吾郎(2000): 生活史と環境要因. 日本水産学会誌, 66 (4), 746-747.

12) 村瀬 昇(2001): 褐藻ノコギリモク *Sargassum macrocarpum* C. Agardhの生態学的研究. 水産大 学校研究報告, 49 (4), 201.