

閉鎖性海域の環境創生プロジェクト研究 細胞培養によるアマモの大量増殖技術および造成技術の開発

広瀬和久・橋爪不二夫*・山本有子*・奥村宏征

目的

英虞湾の環境悪化を防止・改善するため、水質浄化機能を有し、魚介類産卵場および幼稚魚の生育場として浅海域の環境に対して重要な役割を果たすアマモ場を造成する技術を確立する。

また現在、アマモ場造成には海域での種子採取が不可欠であるが、造成の一方で別の海域から種子を採取するという矛盾を内包している。そこで、これまではほとんど行われていない細胞培養を利用したアマモの大量増殖方法を検討することにより、新しいアマモ場造成技術の確立を目指す。

方法

1 アマモ場造成技術

1) アマモ種子の採取・追熟・選別・保存

平成16年6月3日(大潮時)に、二見町松下池の浦でアマモの花穂を採取した後、海水槽(容量約2t)に入れ、曝気しながら月末まで種子の追熟処理を行った。6月29日に海水槽底部に沈下している完熟種子を集め、混在している貝殻、小石等を取り除いた後、飽和食塩を用いて比較的重い種子を選抜した。

遮光フィルムを外部一面に貼り、海水で満たしたポリエチレン製容器(容量約30%)に選抜したアマモ種子を入れ、曝気しながら冷蔵庫内(約5℃)に置き、容器内の海水を2~4週間隔で交換しながら種子を保存した。

2) アマモの育苗

平成16年11月29日、育苗用基盤のマリンバスケットにアマモ種子を1基当たり180粒ずつ播種した後、海水槽内(約2t)に置き、流水条件で育苗した。播種後約2ヶ月の平成17年1月27日、マリンバスケットで育苗したアマモ苗を英虞湾内の志摩市立神立石浦地先の海底(水深2~3m)に鉄製の細い杭で固定した。

2 アマモ大量増殖技術

1) 海から採取したアマモ植物体の培養

平成16年5月6、7日の干潮時に、松下漁港(二見町)、松名瀬(松阪市)で採取したアマモの茎を5~7cmの大きさに切り出し、淡緑色になるまで外葉を剥ぎ、超音波洗浄10分、5倍希釈した台所用洗浄剤2分で表面殺菌し、滅菌海水で数回すすいだ。その後、10mL 0.8%固体培地に生長点を含む茎基部組織を植え込み、10mLの同組成の液体培地を注いだ。基本培地として、天然海水、MS培地、人工海水SP培地、同IMK-SP培地の4種類を比較した。また、IMK-SP培地を基本として、3%ショ糖、活性炭(5mm角のを2個)、アンモニア態窒素の補強の効果を比較した。

種子の培養は15℃恒温の人工気象器で培養し、1ヶ月後に生存個体数、茎伸長個体数、雑菌汚染個体数を計測した。

2) アマモ種子からの幼苗育成と細胞培養

6月14日立神(阿児町)で採取したアマモ種子から混じっている小さな貝や石、腐敗した種子を取り除き、超音波洗浄10分、70%エタノール30秒、2倍希釈台所用洗剤(有効塩素濃度2.5%)1分で表面殺菌した。

その後、48穴マイクロプレートにオートクレーブした300μLの海砂、または固体培地(0.4%アガロース)を入れ、フィルターろ過した500μLの20%天然海水、または20%人工海水IMK-SP培地を加えた。これに1粒ずつ各区96粒の種子を植え込んだ。

培養条件は16℃恒温、弱光(1000lux)14時間照明の人工気象器内に置いた。

結果

1 アマモ場造成技術

1) アマモ種子の処理

二見町松下池の浦で採取し、追熟、選抜したアマモ種子は約87,000粒となり、試験用として冷蔵庫内で保存した。

2) アマモの育苗

本年度は15年度に試作した5種類の基盤うち、発芽率及び生育率が比較的高く、またアマモの現地移植後も成長を妨げず自然分解する素材のヤシシートとコットンシートを用いて製作した「マリンバスケット」で育苗試験を行った。マリンバスケットは、縦横30cm、高さ5cmの鉄製の金網籠であり、内側に2～3ヶ月で分解するコットンシートと1～2年で分解するヤシシートを敷いた。コットンシートは砂や種が漏れないための、また内側のヤシシートは発芽・生育したアマモの根が支持体として利用するためのものである。

マリンバスケットにアマモ種子を180粒ずつ播種し育苗した結果、現地移植直前の2ヶ月後のアマモの生育率は約18%であった。なお金網籠の鉄表面を亜鉛メッキしたマリンバスケットも同時に試験したが、生育率は約15%とやや低く、また苗の生長率もやや低かった。この結果、マリンバスケット酸化防止のための金網表面のメッキは、必要のないことが分かった。(表3)

英虞湾内の現地海域に移植(1月27日)したマリンバスケットは、2ヶ月後の3月の潜水観察調査の結果、生育株数はやや減少したが生育していることが確認できた。

2 アマモ大量増殖技術

1) 海から採取したアマモ植物体の培養

本年度は海でのアマモの生育が不良で、平成16年5月の時点で大部分の株が枯死していた。そのため、最大干潮時の約1時間間に、できるだけ緑色が残っている個体を選抜して採取した。採取地、材料調整法を比較すると、茎基部組織を大き目(5～7cm)に調整して植えつけたほうが生長良好であった(表1)。

しかし、前年(約1cm)に比べ数倍の大きさに植えつけたため、3～5cm調整の茎でも雑菌汚染が多くみられた。基本培地4種類、3%ショ糖の有無、活性炭添加、窒素源の補強の効果、影響については判然としなかった。

2) アマモ種子からの幼苗育成と細胞培養

海砂を支持体とした場合、種子の植え付け状態が確

認できないことやピンセットの先に付着した砂が散乱するなど作業が極めて困難であった。アガロース固体培地ではこのような問題が解消され、移植が容易であった。雑菌発生する種子も若干見られたが、1粒ごとに区切られたマルチプレートを用いたことで汚染の拡大は最小限に抑えられた。アガロース固体培地を支持体とした場合、発芽して葉の展開する個体の割合が海砂を用いた場合よりも高かった(表2)。

これは、元来アマモの発芽には海砂の摩擦による種子の殻の開裂が必要とされていたが、今回用いた種子は追熟期間が長いため、殻が容易に開裂したためと推察される。すなわち、成熟した種子を用いることで、海砂を使わなくても高い発芽率を得ることができた。アマモの発芽体は弱く、継代移植のストレスだけで枯死することがあるが、同一培地で維持した場合でも3ヶ月以内に大部分が枯死した(表2)。

今回、試験に余った種子は9cm深底シャーレで海砂+20%天然海水で培養したが、こちらのほうが多穴プレートで培養した場合よりも葉の伸長程度が大きかった。

考 察

1) 海から採取したアマモ植物体の培養

アマモ種子からアマモ苗を育苗する技術はほぼ確立できたため、今後は細胞培養により作出される苗に最も適した基盤にマリンバスケットを改良する必要があると考えられる。さらに、マリンバスケットで育苗したアマモ苗を現地に移植する基礎的な技術は開発できたが、今後は細胞培養苗に適した技術として改良する必要があると考えられる。

2) アマモ種子からの幼苗育成と細胞培養

海から材料を採取する場合、今後はより生育状態の良い植物体を選別するとともに、適正な大きさに材料調整することが必要である。種子からの実生形成については、雑菌汚染回避のため一旦多穴プレートで発芽させた後、すみやかに容積の大きい培養容器に移植するのが発芽体の生長促進に有効と考えられる。

表1 採取したアマモ植物体の数と材料調整

| 採取地 | 採取数 | 植え付け時の調整, 大きさ |
|-------|-----|-----------------------------|
| 二見町松下 | 160 | 殺菌時よりさらに2~3枚概要を剥ぎ, 3~5cmに調整 |
| 松阪松名瀬 | 55 | 殺菌時のまま, 5~7cmで植付け |

表2 培地支持体・基本培地とアマモ種子の発芽率

| 培地支持体 | 基本培地 | 種子数 | 葉展開数 | 展開率 (%) | 3ヶ月以上生存数 | 生存率 (%) |
|-----------|---------------|-----|------|---------|----------|---------|
| 海砂 | 20%天然海水 | 96 | 44 | 45.8 | 1 | 1.0 |
| | 20%人工海水IMK-SP | 96 | 44 | 45.8 | 0 | 0.0 |
| 0.4%アガロース | 20%天然海水 | 96 | 66 | 68.8 | 3 | 3.1 |
| | 20%人工海水IMK-SP | 96 | 59 | 61.5 | 1 | 1.0 |

※ 平成16年9月15日播種、1ヵ月後に葉展開数調査、3ヶ月後に生存数調査

表3 現地移植前（播種2ヵ月後）のアマモ苗の生育

| 試験区 | 生存率 (%) | 葉数 | 葉長 (cm) | 根数 | 根長 (cm) |
|---------------|---------|-----|---------|-----|---------|
| 鉄製マリンバスケット | 17.7 | 2.0 | 10.1 | 3.0 | 4.0 |
| 亜鉛メッキマリンバスケット | 14.6 | 2.1 | 9.8 | 2.5 | 3.3 |