

組織培養によるアマモ (*Zostera marina* L.) の 無菌種苗の安定的生産法

橋爪不二夫・山本有子

要 旨

英虞湾における新規のアマモ場造成には大量の種子・種苗が必要となる。そこで、既存のアマモ場からの種子を必要とせず、無性的に大量の種苗を作出できるよう、組織培養によるアマモの増殖技術の開発が求められている。

しかし、アマモなどの海草については、これまでに無菌的な培養の報告がほとんどなく、殺菌法や培養開始材料など、基本的な培養条件から検討を始めた。その結果、発芽体形成条件や生育培地条件の解明により、安定したアマモ実生育成系を確立した。このことによって、1種子について1種苗ではあるが、高い発芽体形成率、発芽体生育個体率で大量の培養苗を安定的に生産できるようになった。今後はこれを材料として、1種苗から複数の種苗を増殖する培養法の開発を進める。

キーワード：海草、アマモ、無菌、種苗、組織培養

緒 言

近年、沿岸域の埋め立て、流入河川の水質悪化などに起因する海洋環境の悪化によりアマモ場が減少傾向にある。そのため、全国的にアマモ場を造成回復させる試みがなされている。このアマモ場を造成するためには、主として天然のアマモより採取した種子を浅海域に直接播種する方法、または採取した種子から苗を育てた後に、このアマモ種苗を浅海域に移植する方法により行なわれている。また、広範囲のアマモ場を形成するには、大量の種苗が必要となるため、アマモ種苗を人工的に増殖する技術の研究が行なわれている。

これまで、アマモの無菌的な培養についての報告は数少ない^{1, 3, 4, 5)}。これらの中には、藻体の一部組織をプロトプラスト(単細胞)化し、濃度勾配を調整した抗菌物質の存在下で培養する無菌培養法などが含まれ、カルス形成までの培養は成功している。しかし、これらの報告を含め、従来の研究では、無菌化した組織の安定した生長に至っていない。そこで、組織培養によるアマモの大量増殖を最終的な目的として、本研究ではその基礎となる、アマモの無菌種苗の安定的な生産法の開発を目的に研究を行った。

材料及び方法

(1) アマモ組織の無菌化および初期培養

最初に、海から採取したアマモ植物体の無菌培養に各種の糖類が及ぼす影響等を検討した。供試試料として、平成15年に池の浦(二見町松下)、松名瀬(松阪市)で採取したアマモ植物体を用いた。生長点を含む茎基部組織を切断して、超音波洗浄5分、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度1%)で10分表面殺菌した。初期培養条件を検討するため、試験管(8cm長)に、3% ショ糖、および0.2M 糖類を含むMS²⁾培地 10ml を入れ、茎基部組織からさらに外皮をはぎ、生長点の周辺組織を1cmの長さで摘出して1本ずつを植え込んだ。また、浸透圧調整剤としてマンニトール、グルコース、ソルビトール、フルクトースを用い、初期生育率、雑菌汚染率を測定した。培養には人工気象器を用い、培養条件は16℃恒温、弱光(1,000lux)、12時間照明とした。なお、以下の室内培養試験についても、この条件を共通の培養条件として用いた。

次に、アマモ種子からの幼植物体育成条件の検討については、供試試料として、平成15年伊勢湾(松名瀬および池の浦)、立石浦(阿児町立神)で採取したアマモ種子を用いた。これを超音波洗浄30分、70%エタノール30秒、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度2.5%)1分で表面殺菌した。40g海砂を入れオートクレーブ(121℃、20分間)し、0.22μm孔径フィルターでろ過

した20%海水75mlを加えた試験びんに種子を播種した。なお、以下の試験における液体培地は、すべて同様の方法でフィルターろ過滅菌した。

2週間後、発芽したアマモ発芽体に等量（75ml）の100%海水を追加し、幼植物体を育成した。さらに、2ヵ月後、生長したアマモ幼植物体から茎基部組織を切り出し、人工海水70ml/びん（容量200ml）に移植した。培養は(1)で述べた培養条件で行った。

(2) 無菌化したアマモの持続的生長

(1)において無菌化し、初期培養したアマモ組織が1ヶ月ほどで次第に衰退・枯死するという問題を解決するため、培養開始材料（採取株、実生）の違いを比較しつつ、材料の調整法（試料の大きさ）、培地条件を比較検討した。

まず、供試試料として、平成16年に松下漁港（二見町）、松名瀬（松阪市）でアマモ植物体を採取した。アマモの茎を3～5cmあるいは5～7cmの大ききで切り出し、淡緑色になるまで外葉を剥ぎ、超音波洗浄10分、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）2分で表面殺菌した。10mlの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（三重県水産研究所より供与）、MS培地、ダイゴ人工海水SP培地（和光純薬工業株式会社、395-01343）、同IMK-SP培地（和光純薬工業株式会社、398-01333）の4種類を用いた。また、IMK-SPについては、3%ショ糖、活性炭（5mm角2個）、アンモニア態窒素を添加した効果を比較した。培養は(1)で述べた培養条件で行い、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。

次に、平成16年立神（阿児町）で採取したアマモ種子を培養開始材料とした。種子に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、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度2.5%）1分で表面殺菌した。48孔マイクロプレートにオートクレーブした300 μ l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500 μ lの20%天然海水、または20%人工海水IMK-SP培地を加えた。各実験区2枚のプレートを用い、計96個のセルに1粒ずつ種子を植え込んだ。培養は(1)で述べた培養条件で行った。播種1ヵ月後、発芽体の幼葉が展開した個体数を調査した。その後、幼葉展開個体をIMK-SP液体培地20mlに移植し、同条件で培養を継続し、播種3ヵ月後に生存数調査した。

(3) アマモ幼植物体の育苗用基盤への適応性

最初に、アマモ植物体の生育ステージ等が培養後の生長に及ぼす影響を調べた。供試試料として、平成17年4

月11日、4月26日、5月9日に松下漁港（二見町）で、同5月24日に松名瀬（松阪市）でアマモ植物体を採取した。アマモの茎基部組織を切り出し、(1)で述べた方法と同様に表面殺菌した。松名瀬で採取したアマモの組織培養にはMS基本培地を主として用い、一部にIMK-SP、天然海水を用いて比較した。二見で採取したアマモは、2層培地、または1層培地（液体培地のみ）で培養した。2層培地は10mlの0.6%アガロース固体培地に、同基本培地の20ml液体培地を重層して調整した。培養は(1)で述べた培養条件で行い、2、4、6週間後、生存率を調査した。

続いて、無菌的に育成したアマモ幼植物体を水産研究部試作の育苗用基盤に移植し、そこでの生長をみた。培養後約1ヶ月を経過したアマモ幼植物体を、以下の2通りの方法で移植・栽培し、生育を比較した。i) 家庭用水槽に、育苗用基盤ヤシの実マット（水研試作）を底に敷いた鉄製かごに海砂を充填し、アマモ幼植物体を栽植した。人工気象器内での培養は、(1)で述べた培養条件で行った。ii) 大型水槽（屋外設置流水式水槽）において、マットに等間隔で簡易に栽植できるように水稻用多孔式ポットを設置した。その後、活着、生育状況を調査した。

(4) アマモ実生の安定的生育と大量作出

実験材料を周年にわたって確保するため、アマモ実生の安定的生育条件を検討した。供試試料として、平成17年松名瀬（松阪市）で採取し、追熟させたアマモ種子（栽培漁業センターから分譲）を用いた。殺菌後、塩分濃度を5%に高めた海水中で4℃保存した。発芽体の形成は以下の通りである。発芽用培地として、20%人工海水IMK-SP、0.6%ショ糖、250mg/lカルペニシリンを用いた。培養容器は48孔マイクロプレートとし、これに800 μ l/孔で培地を注いだ。培養は(1)で述べた培養条件で行い、発芽体形成を誘導した。

4週間後に、雑菌汚染せず、形成された発芽体を用い、これを生長させるのに適した移植培地を検討した。塩分濃度が、1.0%～4.0%（0.5%刻みで7水準）となるよう人工海水SPを希釈、または塩化ナトリウム（NaCl）を追加した。ビタミン類（1倍濃度IMK）、0.5%ショ糖、250mg/lカルペニシリンは全区共通に添加した。試験管（直径25mm×11.5cm）に、培地を20ml/本入れた。培養は(1)で述べた培養条件で行った。発芽体を移植して2、4週間後に、雑菌汚染個体を除外した全移植個体に対する生長個体の割合を調査した。

さらに、ここでの培養条件を応用させて、アマモ組織培養苗を大量に作出する方法を試みた。平成18年鶴方浜、立神（志摩市）で採取し、追熟させたアマモ種子を

用い、殺菌後、0.1%シヨ糖、250mg/l カルベニシリン添加20%人工海水IMK-SP培地で発芽させた。2週間後、発芽体を0.5%シヨ糖、250mg/lカルベニシリン添加75%人工海水+1倍濃度IMK培地に移植した。培養は(1)で述べた培養条件で行った。

結 果

(1) アマモ組織の無菌化および初期培養

海から採取した植物体の場合、今回検討した表面殺菌条件でほぼ雑菌の発生は抑制できた(表1)。浸透圧調節剤としてはソルビトールが不適である以外大きな差はみられなかった(表1)。培養開始後3週間すると、1~2cmの鮮やかな緑色の茎組織に生長した(図1)。しか

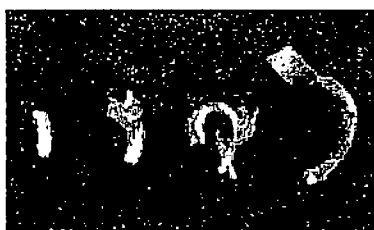


図1 培地中で生長したアマモの茎組織

し、一部に生き残った茎組織を継代培養すると5cmほどにまで伸長したが、持続的に生長させることはできなかった。

一方、表面殺菌後播種したアマモ幼植物体の茎基部組織を培養したところ、一部(約2%)に再生した植物体が得られた(図2)。



図2 培地中で再生したアマモの幼植物体

(2) 無菌化したアマモの持続的生長

平成16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時間の間に、できるだけ緑色が残っている個体を選抜して採取した(表2)。採取地、材料調整法を比較すると、茎基部組織を長く(5~7cm)に調整して植えつけたほうが生長良好であった(表2, 図3)。しかし、前年に行った予備的試験で約1cmに調整した

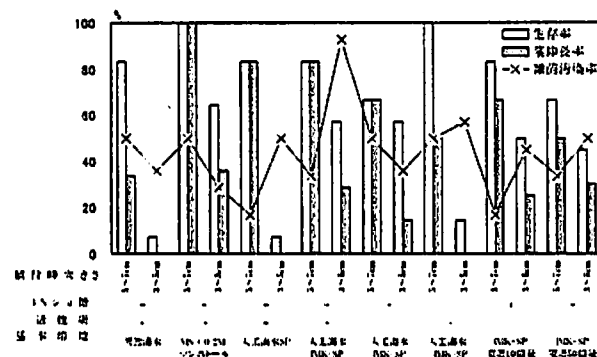


図3 各種培地条件でのアマモの初期培養

時(データ未記載)に比べ数倍の長さにしたため、3~5cmに調整した茎でも雑菌汚染が20~80%の個体にみられた(図3)。基本培地4種類、3%シヨ糖の有無、活性炭添加、蜜露源の補強の効果、影響については判然としなかった(図3)。

アマモ種子からの幼植物体育成について、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。雑菌が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、発芽して葉を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3)。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かったため、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3)。本試験で余剰分となった種子を予備試験的に9cm深底シャーレ(海砂+20%天然海水)で培養したが、こちらのほうが多孔ブ

表1 各種浸透圧調節剤がアマモの初期培養に及ぼす影響

浸透圧調節剤	供試数	初期生育数	(%)	雑菌汚染数	(%)
Mannitol	179	100	(55.9)	11	(6.1)
Glucose	40	25	(60.0)	0	(0)
Sorbitol	40	9	(22.5)	4	(10.0)
Fructose	40	23	(57.5)	2	(5.0)
Sucrose	40	19	(47.5)	1	(2.5)

表2 採取したアマモ植物体の数と材料の生育ステージ

採取地	採取数	植付け時の調整, 大きさ
二見	160	殺菌時よりさらに2~3枚外葉剥ぎ, 3~5cmに調整
松阪	55	殺菌時のまま, 5~7cmで植付け

表3 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

1ヵ月後に葉展開数, 3ヵ月後に生存数調査。

表4 採取したアマモ植物体の数と材料調整

採取地	採取日	採取数	藻場での生育ステージ 初期株割合	採取したアマモの生育ステージ
松下漁港(二見町)	4/11	230	やや少ない	初期(小型), 中期(中型)に大別
	4/26	500	少ない	
	5/9	250	極少ない	初期(小型)のみ
松名瀬(松阪市)	5/24	300	多い	

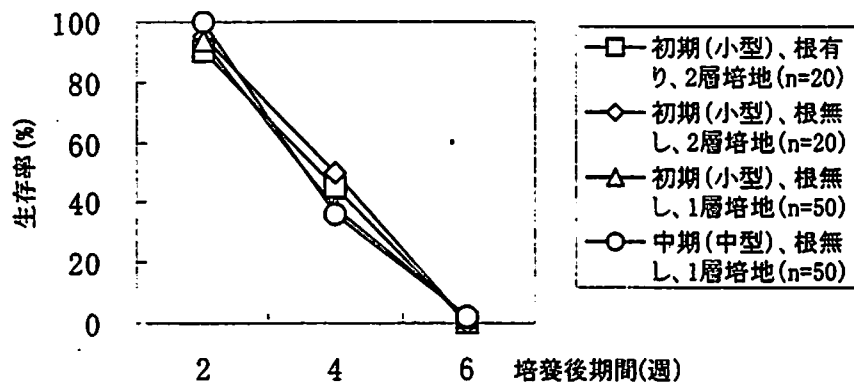


図4 平成17年4月11日二見で採取したアマモの培養後生存率

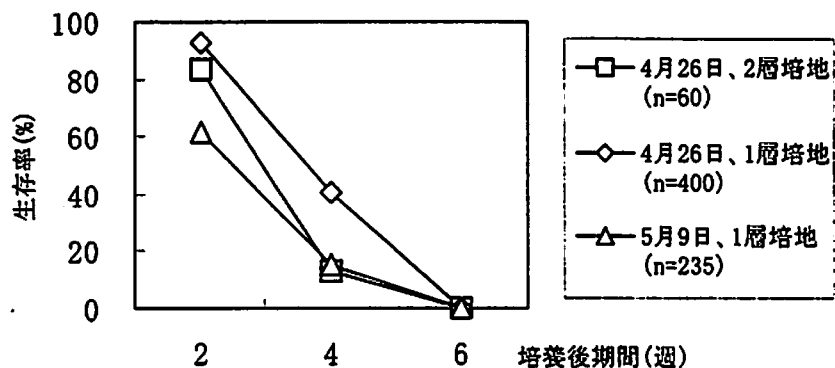


図5 平成17年4月26日, 5月9日二見で採取したアマモの培養後生存率

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。

(3) アマモ幼植物体の育苗用基盤への適応性

平成17年度は4月から採取を始めたが, 二見地区では4月にすでに生育ステージ中期の植物体が多かった。松

名瀬地区では従来の群落の北側に新たな群落が形成されており, 5月下旬でも生育ステージ初期の個体が多かった(表4)。生育ステージ中期の個体が多い二見地区の植物体を材料とすると, 培養後4週間で生存率は50%, 6週間後にはほぼ0%となった(図4, 図5)。一方, 生育ス

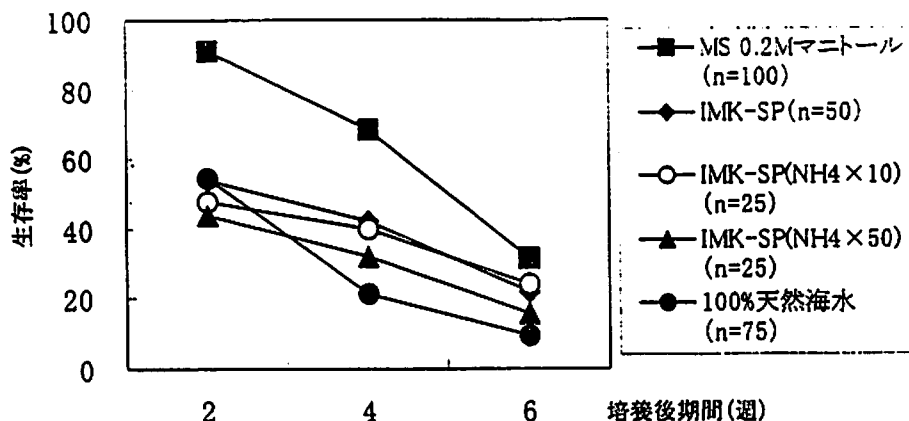


図6 平成17年5月24日松名瀬で採取したアマモの培養後生存率

テージ初期の個体が多い松名瀬地区の場合は、生存率が比較的高く推移した(図6)。培養を行う培地の比較ではMS, IMK-SP, 天然海水の順に生存率が高かった(図6)。

育苗用基盤への適応性については、大型流水式水槽でのアマモ苗は栽植後1週間ほどから衰弱し始め、3週間ですべて枯死した(図7)。水稲用の多孔ポットを用いると移植作業の労力は軽減できたが、アマモ苗の根を廻反させるため、活着には不都合であることが分かった。温度を制御した人工気象器内の水槽ではアマモ苗は3か月以上生存したが、地下茎を広げて繁殖する個体はなかった(図8)。頻繁な海水交換や通気による生育の改善はみられなかった。

(4) アマモ実生の安定的生育と大量作出

平成17年度産の種子を材料として、アマモ実生の安定的生育条件を検討したところ、天然海水と同じ3%、あるいはそれ以上の塩分濃度で、アマモ発芽体の生長個体の割合は、4週間後で0~7.5%と極めて低かった(図9)。一方、1.0~2.0%の低い塩分濃度で発芽体の生長が良好で、80%以上の個体が生長した。特に、1.5%の場合、95%以上と極めて高い値を示した(図9)。低い塩分濃度区で培養した発芽体は、葉の色が鮮やかな緑色で、発根も良好であった(図10)。

次に、平成18年度産の種子を材料とし、上記の適正化条件下で培養を行ったところ、発芽体形成率は約50%、移植後生長した個体も約97%と極めて高く、多数のアマ

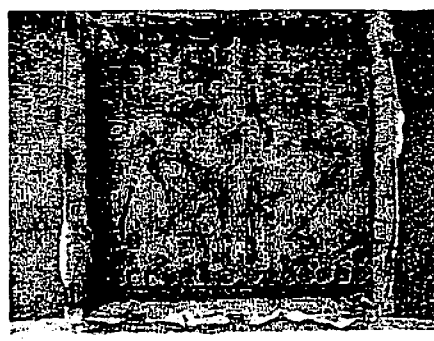
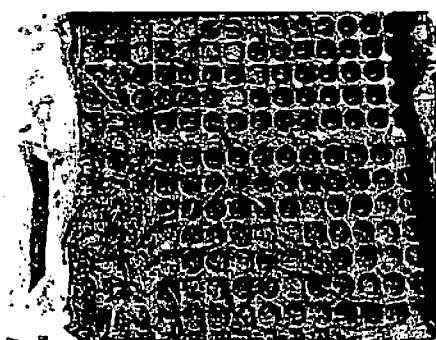


図7 流水式水槽(温度制御無し、海水循環)におけるアマモの育成
移植直後(左)と移植3週間後(右)

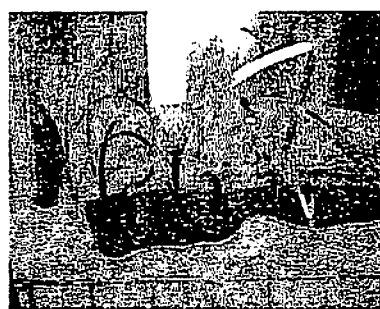


図8 人工気象器(16℃、海水循環なし)におけるアマモの育成
移植直後(左)と移植3ヶ月後(右)

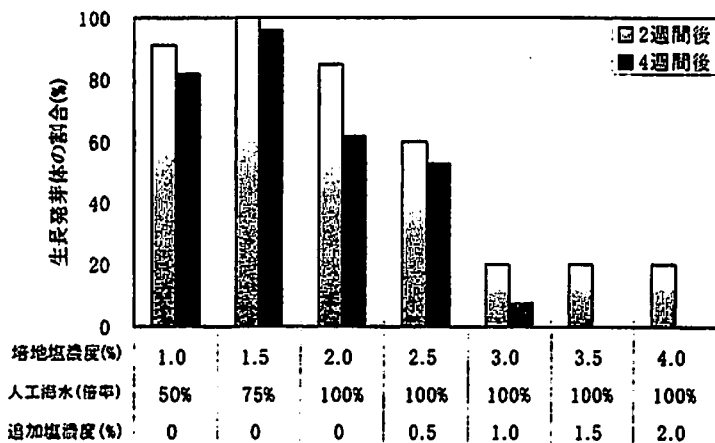


図9 アマモ発芽体生育に及ぼす培地塩分濃度の影響



図10 低塩分濃度培地で生長させたアマモ培養植物体（播種6週間後）

表5 アマモの発芽体形成と培養苗の多量生産

播種数	発芽形成体			培養苗の育成			
	非雑菌汚染数 (a)	発芽体形成数 (b)	発芽体形成率 (b/a,%)	移植数	非雑菌汚染数 (d)	生長個体数 (e)	f生長個体率 (e/d,%)
3,456	3,188	1,589	49.8	614	576	558	96.9

モ培養苗を安定的に生産できた（表5）。

考 察

これまでの数少ないアマモの組織培養についての報告では、前提となる無菌化の段階から困難とされ、無菌培養できたとしてもアマモ組織が生長することなく枯死するため、植物体の再生まで至ったという例は無かった。そこで、本研究では最初に、アマモ組織の無菌化について検討したが、海から採取した植物体では、完全に殺菌するのは困難であると思われた。しかし、少なくとも今回の表面殺菌により、アマモ組織の生長に悪影響を及ぼさない程度に雑菌濃度を低減できたと考えられる。ただし、本研究で、初期培養用の培地として、MS培地よりも海水を基本とする培地でアマモの生長が優れていることが明らかとなったものの、1ヶ月ほどで枯死するため、持続的成長に十分ではなかった。

そこで、持続的成長に好適な培地条件等について検討した。海から材料を採取する場合、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った。種子からの発芽体形成については、雑菌汚染回避のため、一旦多孔プレートで発芽させることが有効である。しかし、予備的試験の結果から、容量の小さいマイクロプレートのセルで培養を継続するより、すみやかに容積の大きい培養容器に移植するほうが発芽体の生長を促進させるのに有効と考えられる。

自生地でアマモ苗を採取する場合、年度ごとに生長の良否や早晚があり、一定の品質の材料を確保することは

困難である。しかし、今回の結果から、出来る限り生育ステージ初期の個体を厳選して採取することが必要と考えられる。

無菌培養を経て得られたアマモ幼植物体を育苗用基盤へ移植したが、アマモの屋外培養を開始した時期が5月下旬になったため、海水温上昇期と重なり、活着はみられなかった。しかし、人工気象器内の低温下で栽培すれば活着することから、適切な時期に移植すれば定着するものと考えられる。すなわち、試験管外に出す時期を任意に調整できる実生の培養・育成が必須である。

さらに、アマモ採取株からの培養は制約が多い上に、持続的な生長が難しいことが明らかとなった。そこで、種子からの発芽体形成とその後の生長を向上させ、アマモ幼植物体を安定的に大量に生産する方法を検討した。その結果、アマモ発芽体の生長には、移植する培地の塩分濃度が大きく影響することが明らかになった。すなわち、天然海水の半分程度の塩分濃度が、その後の生長に好適であった。

本研究で開発した無菌培養系によって、大量のアマモ組織培養苗を安定的に生産できた。さらに、アマモの培養開始時期を調整することで、高い活着率が期待できる海水温下降期（10月末～11月初旬）に順化を開始する培養系を確立できた。

謝 辞

本研究の実施に当たって、丁寧な指導、助言、ご協力を賜りました三重大学大学院生物資源学研究所の前川行

幸教授、三重県水産研究所の山形陽一氏（元地域若菜研究課長）、西村昭史研究管理監、国分秀樹氏、奥村宏征氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 喜安宏能 (1999): アマモ人工種苗生産技術開発試験。平成11年度愛媛県中予水産試験場事業報告, 127-128.
- 2) Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- 3) 鈴川健二 (2001): アマモ人工種苗生産技術開発試験。平成13年度愛媛県中予水産試験場事業報告, 143-146.
- 4) 鈴川健二 (2002): アマモ人工種苗生産技術開発試験。平成14年度愛媛県中予水産試験場事業報告, 157-162.
- 5) 鈴川健二 (2003): アマモ人工種苗実用化試験 (組織培養によるアマモ人工種苗生産技術開発)。平成15年度愛媛県中予水産試験場事業報告, 139-140.
- 6) 鈴川健二 (2004): 複合深場造成実証試験, II アマモ人工種苗実用化試験。平成16年度愛媛県中予水産試験場事業報告, 113-114.

Method for Stable Production of Sterile Seedlings of Eelgrass (*Zostera marina* L.) by Tissue Culture

Fujio HASHIZUME and Yuko YAMAMOTO

Abstract

Numerous seeds and seedlings of eelgrass should be required to build a new eelgrass bed on Ago bay. In order to produce a lot of seedlings without using seeds gathered from an existing eelgrass bed, it is expected to develop a proliferation method of eelgrass by tissue culture.

On seagrass including an eelgrass, however, few study of sterile culture has been reported, and then we began to examine basal culture conditions, such as a method for pasteurization of the eelgrass and the starting material for culture. As the results, we successfully established a stable growth system of eelgrass seedling, due to the elucidation of the conditions for a germinating-body formation and for growth medium. Accordingly, a large number of the cultivating plantlets could be stably produced at both high rates of the germinating body-formation and of the growing plantlet from the germinating body, while only single seedling was acquired from a single seed. By using these sterile eelgrass seedlings as the materials, we will exploit a method to proliferate multi-seedlings from a single seedling.

Key words : seagrass, eelgrass, sterile, seedling, tissue culture