

# 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\*

檜 山 晃 晴

和歌山県沿岸域においては、従来から藻場の衰退現象（磯焼け）が不定周期で発生し、衰退と回復を繰り返してきた、しかし、近年は、回復することなく藻場の衰退状況が継続し、採介生産が大きく減少したままである。この現象には、外海水（黒潮流系水）の勢力変動（黒潮流路変動）が根源的に関与していると考えられ、地球規模的な環境要因が対象となる以上、原因管理的な解決は望めない。そこで、磯焼け時に人工的な藻場を造成し、環境が好転するまでの間、衰退した天然藻場の機能補完を続けるという応急策が要求されてきた。

しかしながら、これまでも、状況の良い他の海域からカジメ（成体）を移植する試験が行われたが、外海域に多いブダイ等の食害により失敗に終わった、もちろん、ブダイもまた磯根資源であり、ブダイに摂餌されたことは、餌料海藻として機能したといえる。ただ、仮に生長点までを保護することができれば、再び葉部を再生して餌料供給、繁殖して群落の拡大ができることになる。

また、移植したカジメの母藻を食害防護枠で被覆する策も試されたが、有性生殖で発生した幼体（二次世代）は食害防護枠内で残存したものの、1年経たないうちに側葉を形成することなく消失した。この顛末は、外海水の勢力分布が、ブダイ等の食害生物の侵入を許すばかりでなく、藻場の環境水そのものとして適さないことを示している。従って、外海水の勢力下でも繁茂できる優良個体を選抜し、簡便な技術で大量培養して安価な工法で造成・展開する手法の開発が望まれる。

本事業は、既存先端技術の実用化に資する技術開発を主題として、増養殖対象種であるホンダワラ類

の種苗生産に、当场が既に基礎研究段階で完成した組織培養手法の応用を試みるものである。また、磯焼け海域への培養苗の移植に関しては、民間研究機関が開発した藻場造成技術を本県地域特性に合わせて改良し、苗の食害防護策の一部には、大学等が開発した忌避物質合成技術を応用する。事業の実施にあたっては、産・学・官の自由な連携の下に行う共同研究体制を積極的に取り入れ、それぞれの先端知見および技術を集約することで、“使えるハイテクノロジー”の開発を目指す。

## 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、既に木村<sup>1)</sup>が、PESI液体培地およびASP12-NTA寒天培地を用い、アカモク、トゲモク、ヒジキの組織片から直接初期葉を形成することに成功している。しかし、実際、増養殖用資材として培養苗を供給するためには、培養手法の簡素化、効率化、量産化が求められる。そこで、実用化・量産化をみすえて、培養手法の再検討を行った。

### 材料および方法

#### 1) 組織片の切出し

天然藻場から採集したトゲモク（三輪崎）、ノギリモク（三輪崎）、ヤナギモク（加太）、ヒジキ（田辺）について、先ず藻体から根（付着器）、茎、枝をキッチンバサミを用いて切り取り、ろ過滅菌海水を入れた2ℓメジャーカップ内で洗浄した。海水のろ過には、0.22μmミリポフィルターを用いて

\* 地域先端技術共同研究開発促進事業費による。

吸引ろ過した。洗浄後、各組織部位の表面部分をメスで削ぎ落とし、1~2mm角の組織片に整形した。各組織片を50mlビーカー内に収容し、新しい滅菌海水で数回洗浄した。

## 2) 静置培養

24穴マルチウェルプレートに組織培養用ピペットで培養水2.5mlを注ぎ入れ、その中にピンセットで1個の組織片を収容した。培養水には、各藻体を採集した現場の海水を、0.22μmミリポアフィルターで吸引ろ過したものをを用いた。マルチウェルプレートを温度勾配恒温器内に収め、出芽が確認できるまで静置培養した。また、出芽しない組織については、約120日後まで経過観察した後廃棄した。

## 3) 通気培養

出芽した組織を500mlスチロールサンプル瓶に移し、人工気象器内で通気培養した。サンプル瓶1本内の収容数は、20個以内とした。培養水には、当場の流水池の海水を0.45μmミリポアフィルターで

吸引ろ過したものをを用いた(1本につき約340ml)。培養条件は20℃、3000lx(12L)であった。換水は1週間に2回行った。

## 結果および考察

表1は、培養に用いた海藻の種類、組織部位別にみた平均出芽率である。トゲモク、ノコギリモク、ヤナギモクでは、20℃、3000lx(12L)の培養条件において、根および茎の組織から26.2~86.0%の出芽がみられた。前年度の組織培養実験では、根と茎の差異を明確にするため、ある程度茎と離れた根の組織を切り出したが、今年度は茎の直下に当たる根の中央部の組織を用いた。そのため、前年度に比べると、根の組織からの出芽が目立って増えた<sup>2)</sup>。個体毎には、根からの出芽が多いもの、逆に茎からの出芽が多いもの、両方から平均的に出芽するものがあつた。枝の組織からは、前年度同様に芽がみられなかった。実用上は、藻体下部中心部の組織を用いれば3割以上の確立で出芽させることができると考えられる。ヒジキでは、根の組織のみを用いて80.0%の出芽がみられた。

表2は、根および茎の組織を合わせた平均出芽率を、培養条件別にみたものである。トゲモクでは、20℃、18℃、室温の実験区で30%以上の組織が芽を出し、それより高温区と低温区で成績が落ちた(16.7~20.0%)。同じ20℃区では、1000lx(24L)と3000lx(12L)の区画に大きな差は認められなかった。ノコギリモクでは、20℃(12L)区の出芽率

表1 組織部位別にみた平均出芽率

組織部位	平均出芽率			
	トゲモク	ノコギリモク	ヤナギモク	ヒジキ
根	41.7%	86.0%	55.3%	80.0%
茎	33.3%	69.0%	26.2%	—
枝	0.0%	0.0%	0.0%	—

培養条件：20℃、3000lx(12L)

表2 培養条件別にみた平均出芽率

培養条件	平均出芽率			
	トゲモク	ノコギリモク	ヤナギモク	ヒジキ
30℃ 1000lx 24L	20.0%	34.0%	14.0%	0.0%
25℃ 1000lx 24L	20.0%	58.0%	22.0%	0.0%
20℃ 1000lx 24L	33.3%	50.0%	30.0%	20.0%
18℃ 1000lx 24L	30.0%	45.5%	28.6%	60.0%
15℃ 1000lx 24L	16.7%	19.2%	26.9%	80.0%
20℃ 3000lx 12L	36.7%	65.0%	36.0%	80.0%
室温	30.0%	24.7%	16.0%	0.0%
6℃(10lx, 24L)→20℃(3000lx, 12L)	—	—	—	100.0%

が最大で(65.0%)、それより高温区と低温区で出芽率が低下した。また、温度の一定しない室温区では、出芽率24.7%と成績が悪かった。同じ20℃区では、3000lx(12L)区の成績が1000lx(24L)区に優った。組織培養実験に用いた4種の中では、ノコギリモクが最も容易に出芽させることができた。ヤナギモクでも、20℃(12L)区の成績が最もよく、出芽率36.0%であった。同じ20℃区では、1000lx(24L)と3000lx(12L)の区画に大きな差は認められなかった。ヒジキでは、25℃以上の高温区で出芽がみられず、低温区の成績がよかった。また、同じ20℃区で比較すると、3000lx(12L)区が1000lx(24L)区の4倍出芽した。ヒジキに関しては、光条件が無性生殖に関与している可能性が窺える。なお、ヒジキでは、6℃(101x, 24L)で148日間静置培養した後、20℃(3000lx, 12L)区に移す実験を行ったが、移設後平均16日で全て出芽した。このことから、組織を休眠保存することができると考えられる。

表3は、出芽に要した日数を示したものである。トゲモクでは、最短で30日前後、平均50日前後で芽を出した。初夏の実験に比べ秋の実験ケースの方が若干出芽が早かった。ノコギリモクでは、14~43日で出芽し始めた。平均培養日数は26~69日で、春から秋に向かうにつれて短くなった。ヤナギモクでは、23~61日で出芽し始め、平均培養日数は47~85日で、季節による差異は明確でなかった。静置培養は、通気培養に比べて管理労力を伴わず、そのため、培養日数の短縮よりも出芽率の向上が課題となる。

図1は、通気培養中の出芽組織の生長を示したものである。12月6日に通気培養を開始したトゲモクでは、15日で平均全長2.6mm、22日で3.3mm、28日で5.7mmに生長した。同じ日に通気培養を開始したノコギリモクでは、15日で平均3.7mm、22日で5.9mmに生長した。さらに、同じ日のヤナギモクでは、15日で平均2.4mm、22日で4.6mm、24日で5.4mmに生

表3 出芽に要した日数

	培養開始日	出芽に要した日数	
		最短	平均
トゲモク	99/06/02	34	52
	99/09/11	25	47
ノコギリモク	99/03/25	43	69
	99/06/01	14	60
	99/07/09	34	54
	99/09/11	25	45
	99/11/10	26	54
	99/11/16	21	26
	99/12/04	17	41
	99/12/07	25	63
ヤナギモク	99/12/08	14	42
	99/02/02	23	47
	99/04/07	49	75
	99/06/11	35	66
	99/07/09	34	47
	99/08/25	42	64
	99/10/06	61	84
	99/10/21	25	64
	99/10/28	29	57
	99/11/15	30	54
ヒジキ	99/12/08	57	85
	99/04/06	8	27

長した。12月28日に培養し始めたノコギリモクでは若干生長が遅いが、総じて30日程度でクレモナ撚糸に挟み込めるサイズ(3mm以上)を得ることができた。

表4は、平均3mmサイズの苗の生産に要した培養日数である。トゲモクでは、12月6日に通気培養を開始した1ケースでのみ測定を行ったが、通気培養日数22日、総培養日数108日で平均3mmサイズの培養苗を得ることができた。ノコギリモクでは、合計16ケースで測定を行い、最も生長の速いケースでは、通気培養後13日で平均3mmサイズを得た(総培養日数41日)。平均では、通気培養日数21日、総培養日数78日を要し、最も生長の悪いケースでは、それぞれ31日、118日を要した。ヤナギモクでは、合計23ケースで測定を行い、最も生長の速いケースにおいて、通気培養後10日で平均3mmサイズを得た(総培養日数46日)。平均では、通気培養日数21日、総培養日数99日を要し、最も生長の悪いケー

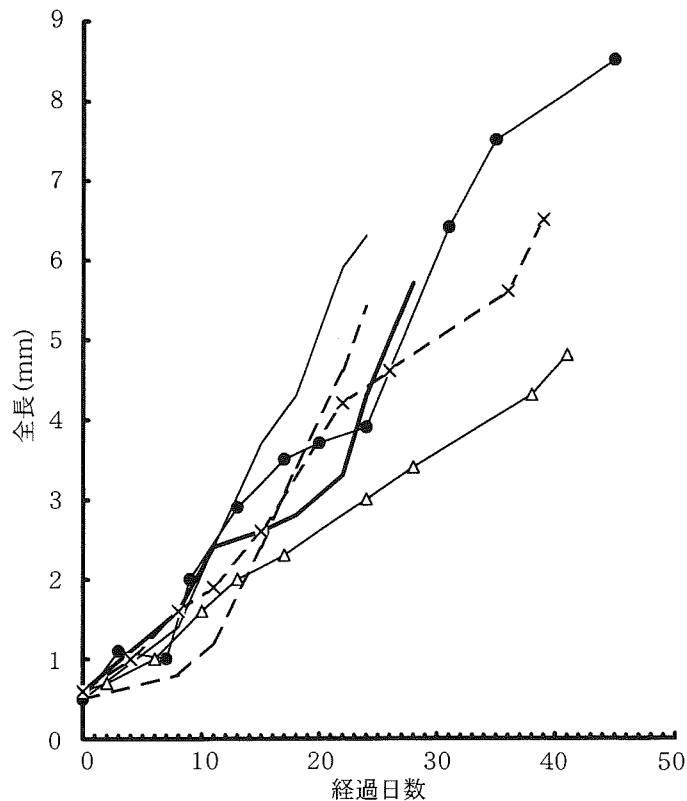


図1 通気培養中の平均全長の変化

- トゲモク (12/6)
- ノコギリモク (12/21)
- △—— ノコギリモク (12/28)
- ×—— ヤナギモク (12/30)
- ノコギリモク (12/6)
- △—— ノコギリモク (12/28)
- ×—— ヤナギモク (12/30)

表4 平均3mmサイズの苗の生産に要した培養日数

種類	通気培養日数			総培養日数		
	平均	最小	最大	平均	最小	最大
トゲモク	22	22	22	108	108	108
ノコギリモク	21	13	31	78	41	118
ヤナギモク	21	10	27	99	46	152

スでは、それぞれ27日、152日を要した。換水時の紛失を除くと、大半の組織を苗にまで生産することができ、歩留まりについては技術開発を要しないといえる。ただし、通気培養では換水等の管理労力と大きな収容スペースを要し、培養日数の短縮が課題となる。

## 2 人工藻場造成

### 目的

ホンダワラ類の培養苗を実際に磯焼け海域に移植

し、資材と造成手法の評価を行う。

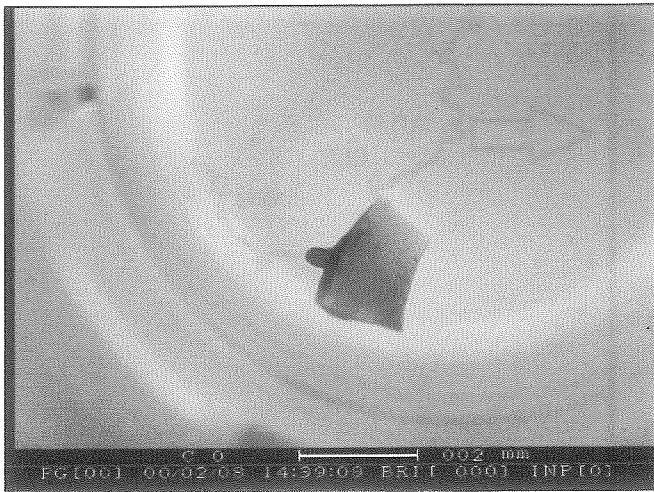
### 材料および方法

ホンダワラ類の培養苗をクレモナ燃糸（20番手、36本合、左三ツ燃）に挟み込み、それを前年度事業で開発した食害防止型基質<sup>2)</sup>の中央の穴に縛り付け移植ブロックとした。この移植ブロックを、前年度工区に用いたアワビ礁上面の鉄格子に被覆番線等で固定した（図3）。また、そのアワビ礁周辺にある巨礫上に、水中セメントとボルトで移植ブロック88個を固定した。

### 結果および考察

表5は、平成10年度と11年度の人工藻場造成手法を比較し、それぞれの資材・工法に関する評価を示したものである。図4は、工区の水中写真である。前年度に用いた食害防護枠による手法では、十分な

ノコギリモク



ヤナギモク

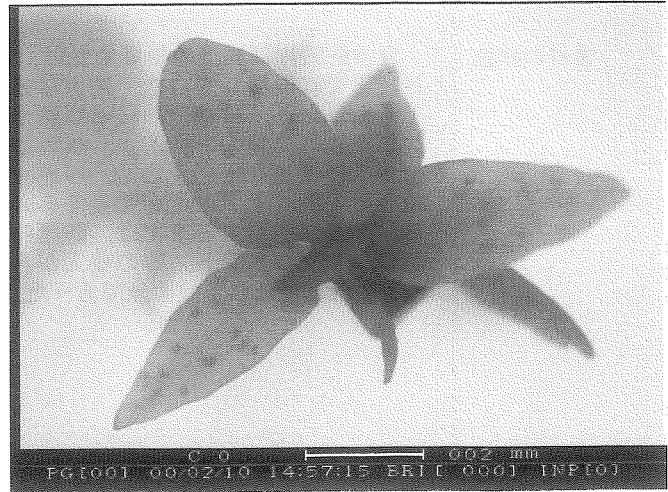
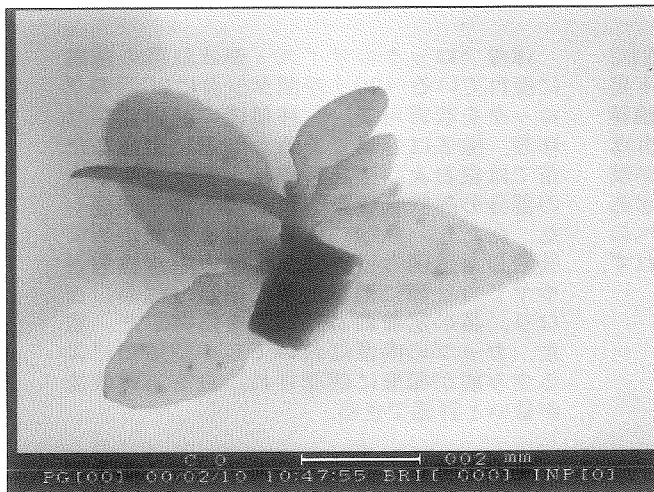
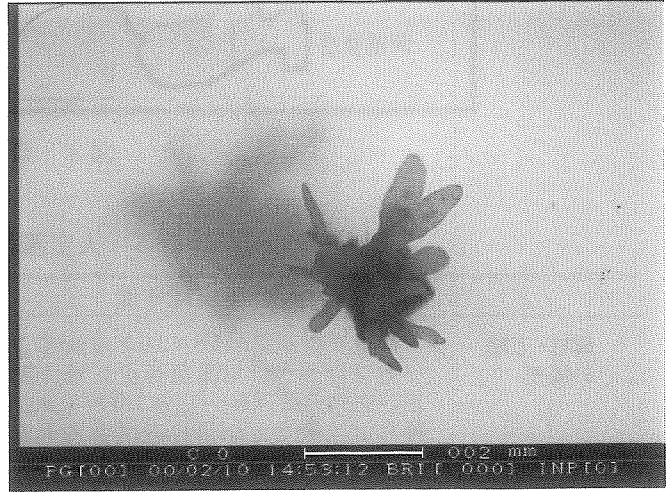
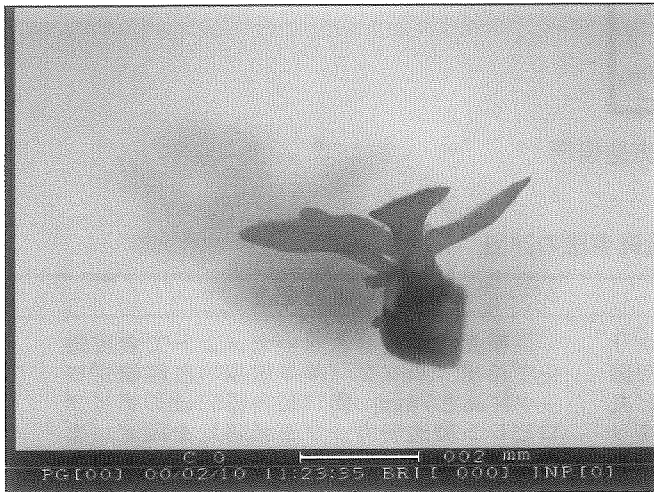
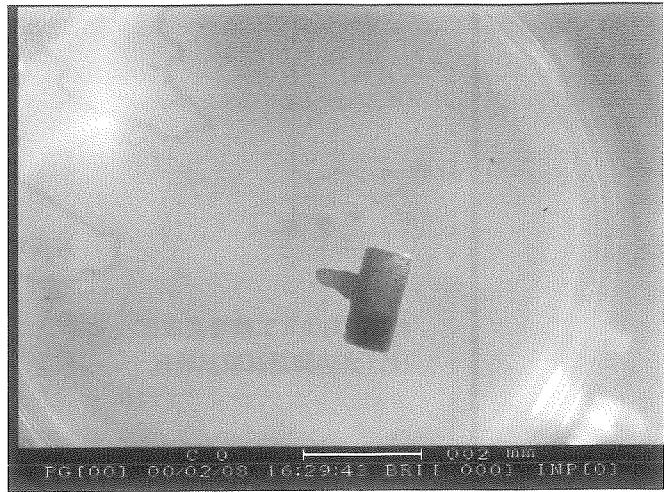


図2 培養組織の形状

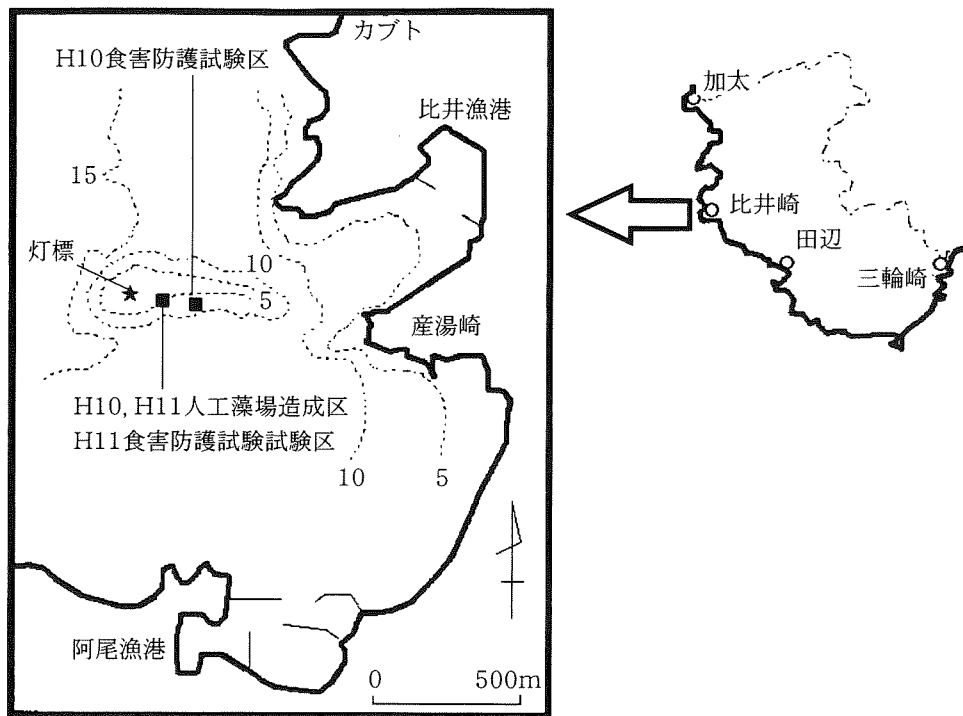


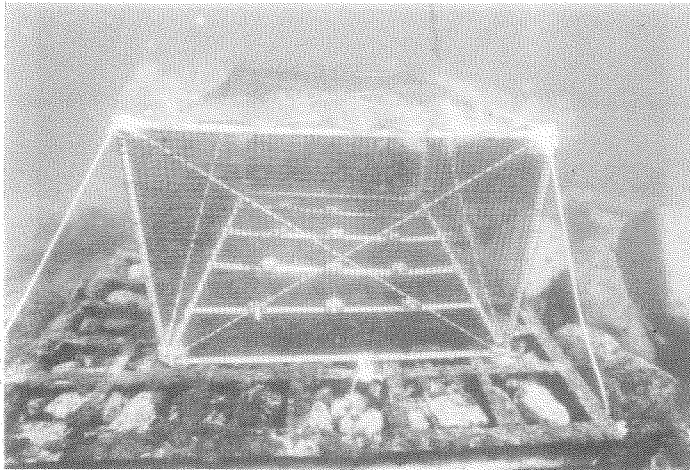
図3 事業実施場所

表5 人工藻場造成手法の評価

	平成10年度	平成11年度
資材・工法の概要	移植ブロック（10×10×2cmのコンクリートブロックに培養苗をクレモナ燃糸で固定）を食害防護枠（2×1.5×1m、塩ビ丸棒および最大5cm目合のプラスチックネット製）にボルト付けし、その食害防護枠をアワビ礁上面の鉄格子に被覆番線等を用いて固定。	巨礫面にボルトと水中セメントで食害防止型移植ブロック（前年度用いた移植ブロックに高さ74mm、開口部内径51mmのポリプロピレン製透明カップを装着）を固定。また、アワビ礁上面の鉄格子に被覆番線等で直接固定した。
資材の評価	食害防護枠は波浪の影響を受け、設置62日後までに崩壊していた。完全な強度不足と考えられた。移植後の経過観察や移植替えが難しい。施設の構造上、餌料海藻群落としての機能を果たすには、移植藻体が繁殖して近隣に第二世代が発生する必要がある。施設が崩壊するまでは、防護枠内への魚類、マクロベントス等の侵入がみられず、食害防護機能としては十分であった。	移植ブロックのサイズ・形状は苗の運搬に優れている（20ℓ密閉タンクに26個のブロックを収容可能）。移植後の経過観察や移設、撤去は容易である。順調に生長した苗では根および茎を形成し、生長点より上の部分のみ被食され餌料海藻として機能した。ただし、魚類による食害を対象として装着した透明カップは、小型の肉食性巻貝やヤドカリ類に適した棲息場所（窪み）となり、苗の定着および採光を障害した。また、カップの内部においても小型魚類による食み痕が頻繁に確認され、食害防護機能が低いと評価できる。
工法の評価	施設の設置に4名以上の潜水作業員が必要で、工区への運搬に小型船の曳航を要した。藻場造成には、食害防護枠の組み立てに1日、移植ブロックのボルト付けおよびアワビ礁への設置に1日、延べ2日を要した。工事の規模に比べて移植数量が少なく、また、設置場所が人工構造物上に制限されることから実用的でない。	潜水作業員1名でも造成が可能。経過観察、移植替え、撤去が容易。ただし、硬い巨礫面でボルト軸の埋設に時間がかかりすぎた。100本程度の藻場造成には、ボルト軸の埋設に1日、移植ブロックの固定に0.5日、延べ1.5日を要した。1人・0.5日で200本程度の移植が完結できる手法の開発が課題。



H10年度



H11年度

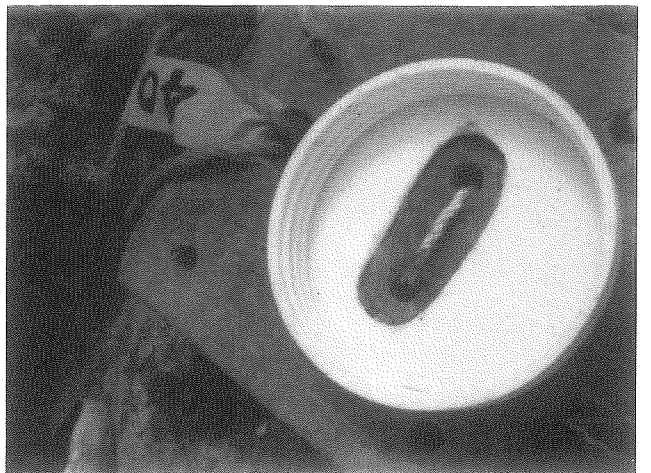
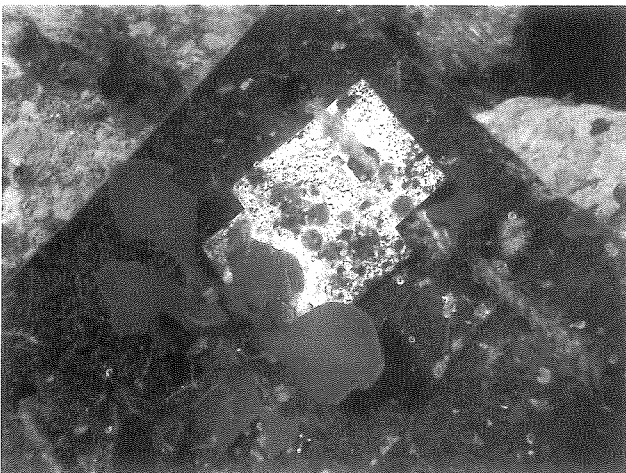
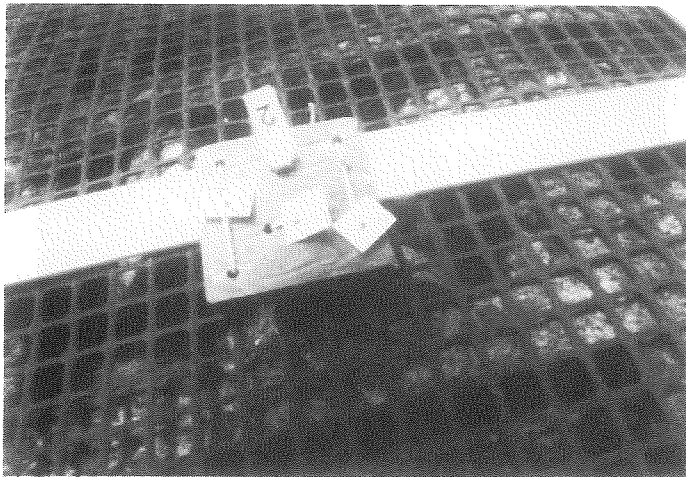


図4 人工藻場造成区の水中写真

No. 39



No. 41

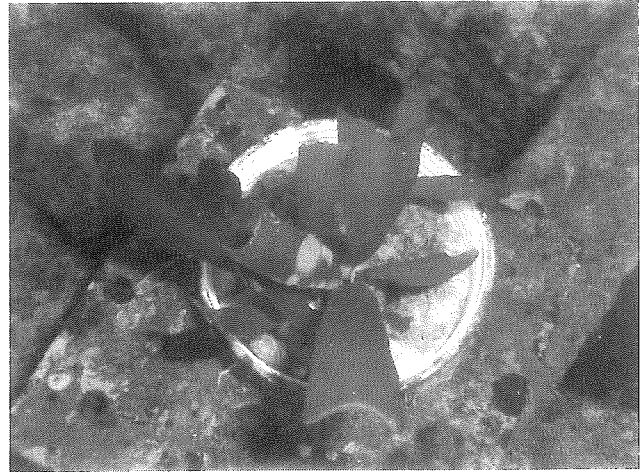
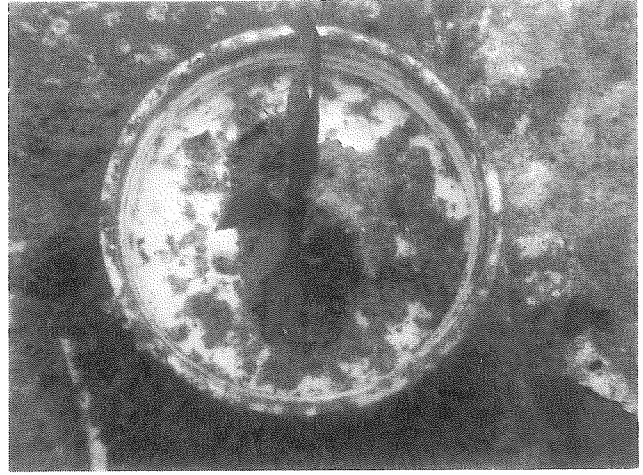
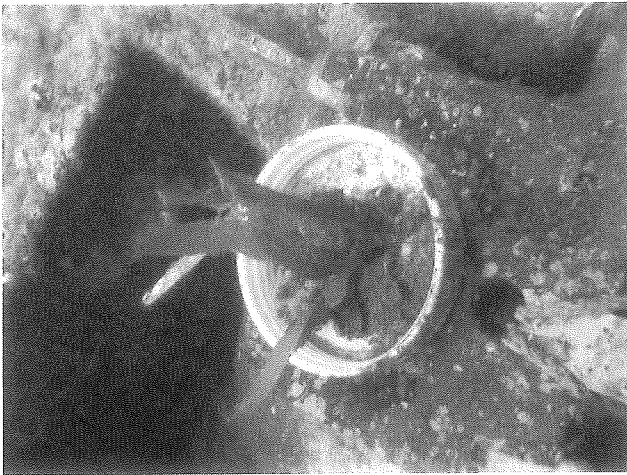


図5 移植後のヤナギモク培養苗  
(上段48日後, 中段128日後, 下段239日後)



食害防護機能を果たしたが、強度と実用性に欠けた。今年度用いた食害防止型の移植ブロックは、移設、撤去、経過観察の点で優れた利便性を示したが、移植前の工区の整備（ボルト軸の埋設）に時間と労力を費やし、レイシガイやヒメヨウラクガイ等の小型巻貝に基質が占領された。また、基質に取り付けた培養苗は、食害防止用のカップ内で生長し、根および茎を形成して天然の幼体とほぼ同じ形にまでなった。しかし、カップの外に出た葉は、絶えず魚類による食害を受けており、主枝および気胞、生殖器官ができる可能性は低いとみられる（図5）。これらの結果を踏まえると、先ず、工法としては、移植ブロックを既存の重量物（礁や巨礫など）に固定する発想を捨てる必要がある。現場の転石等を集めて重量物として利用し、小型の施設を海底上に置く手法が簡便である。また、食害対策としては、平成10年度の食害防護枠をショッピング・バスケット程度にスケールダウンし、主枝の上部を餌料として提供する形のが望まれる。

### 3 食害防護試験

#### 目 的

これまで、藻場造成の直接的な阻害要因として食害が重用視されてきた。そこで、本試験では、造成藻場に防護水準（対象生物）の異なる数種の食害対策を施すことで、食害の規模、種類を求めようとした。

#### 材料および方法

国立和歌山工業高等専門学校に依頼し、忌避行動を誘発する生理活性物質としてオレイン酸ベンジルエステルおよびリノール酸ベンジルエステルを化学合成した。各々20%および5%濃度のものを調整した後、塗料（大日本塗料製、サンデーペイント）に混ぜて食害防止型基質のコンクリート部分に塗布した。基質に培養苗1本をクレモナ燃糸で装着し、平成10年度人工藻場造成区跡地であるアワビ礁上に被覆番線を用いて固定した（各実験区20本、合計80本）。また、対象実験として、塗料のみをペイントしたもの20本、何も塗布しないもの12本を同様に移植した。

さらに、平成10年度食害防護試験区および平成11年度人工藻場造成区の経過観察結果を参照し、食害の種類および規模の考察を試みた。

#### 結果および考察

表6は、忌避物質による食害防護試験結果を示したものである。1月29日に設置された各試験区のホンダワラ類培養苗は、20日後の2月18日まで全て残存した。その後3月23日（54日後）までに、オレイン酸ベンジルエステル20%区および塗料区で1本が消失していた。また、リノール酸ベンジルエステル5%区では、4本が消失していた。その他の忌避物質区および対象区では、全ての苗が残存していた。全ての試験区において、小型巻貝類および

表6 忌避物質による食害防護試験結果

区 画	2000/1/29	2000/2/18		2000/3/23	
	移植本数	残存本数	ベントス侵入個体数	残存本数	ベントス侵入個体数
オレイン酸ベンジルエステル20%	20	20	4	19	15
オレイン酸ベンジルエステル5%	20	20	3	20	22
リノール酸ベンジルエステル20%	20	20	3	20	18
リノール酸ベンジルエステル5%	20	20	12	16	10
塗料のみ	20	20	7	19	7
対象区	12	12	0	12	22

表7 食害防護対策の概要

試験区	方法〈侵入可能な植食性動物〉	試験結果と評価
平成10年度		
①5 cm防護区	クロメ造成藻場を食害防護柵(2×1×1 m, 全面5 cm目合)で被覆。〈小型魚類, 小型貝類, 小型ウニ類〉	裸区以外では食害が見られなかった。裸区のクロメには魚類による食み跡が確認された。5 cm目合を通れない魚類として、ブダイ・アイゴ等が考えられる。
②2 cm防護区	クロメ造成藻場を食害防護柵(2×1×1 m, 全面2 cm目合)で被覆。〈小型貝類〉	
③複合区	2 cm防護区の天面のみを5 cm目合にし, その4辺に匍匐性動物の侵入を防ぐキンランを装着。〈小型魚類〉	
④裸区	対象実験区。〈全て〉	
平成11年度		
①透明カップ	移植ブロックに透明カップ(高さ74mm, 開口部内径51mm)を装着。〈小型魚類, 小型貝類, 小型ウニ類〉	裸区は全て消失。カップ内で生長した苗はカップ丈で鋭い食痕。また, カップ内部にも食み跡がみられた。ブダイやアイゴに加え, 小型のベラ類やバリコ(アイゴの稚魚)による食害も考えられる。
②忌避物資	①のコンクリート部分に忌避物質を塗布。〈小型魚類〉	
③裸区	対象実験区。〈全て〉	

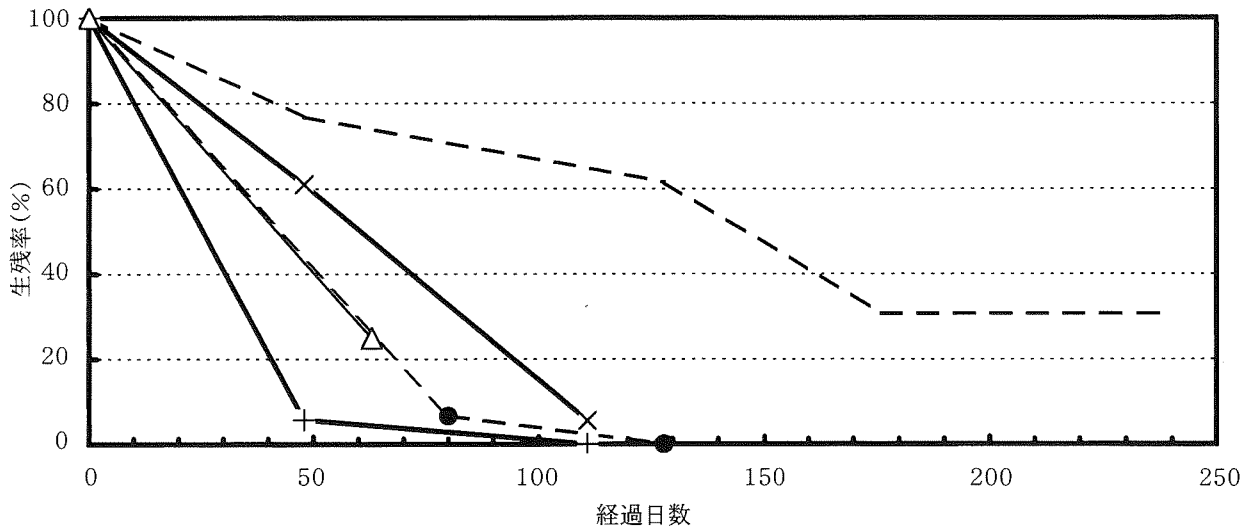


図6 透明カップで保護した苗の生残

- △--- ヤナギモク (4/21)
- ヤナギモク (6/8)
- ×--- トゲモク (8/27)
- +--- トゲモク (8/27; 裸区)
- △--- ノコギリモク (10/14)

ヤドカリ類の侵入がみられた。侵入した小型巻貝類は、肉食性のアキガイ科の種で、直接苗を摂餌したとは考え難い。侵入したベントスは、食害防護カップを適当な棲息場所として利用しているものと考えられる。食害以外の苗の消失原因として、根が形成されずクレモナ燃糸に挟み込まれただけの苗が、これらのベントスの匍匐移動により脱落してしまうことが揚げられる。化学物質の忌避効果については、苗の根が形成された後の観察結果をもとに判断していきたい。

表7に、平成10年度および11年度の食害防護試験の概要を示す。前年度試験区では、裸区の海藻のみが消失した。また、魚類とみられる鋭い食み痕が確認され、5 cm防護で足る魚類食害が注目された。一方、今年度の試験区では、食害防止用透明カップ（開口部内径51mm）の内部でも鋭い食み痕がみられ、比較的小型の魚類による食害が浮上した。ベントスでは、カップ内に肉食性のレイシガイが目立って侵入していたが、苗に対する影響は不明である。ただ、カップ内のスペースを占領し、採光を妨げることは事実である。カップの形状が棲みかとして適しているためと考えられ、食害防護資材としては、根本的に別の発想が求められる。ウニ類では、ガンガゼの稚ウニがカップ内で1件みられたのみであった。

図6は、透明カップで防護した苗の生残を示したものである。4月の移植では比較的緩やかに消失したのに対し、6月と10月の移植区では急激に消失した。8月27日に移植したトゲモクでは、10月14日（48日後）に61%残っていたが、12月16日（111日後）には6%にまで減少していた（裸区では48日後に6%まで減少していた）。このことから、初夏および秋期に小型魚類による食害圧が強まることが窺える。

## 文 献

- 1) 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報告, 28, 22-27.
- 2) 檜山晃晴, 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.