

修士論文

アマモ発芽体の室内培養における植物調節剤の検討

平成 21 年度

三重大学大学院生物資源学研究科

博士前期課程 生物圏生命科学専攻

海洋生物科学講座

藻類学研究室

中村 友紀

目次

序論	1
材料と方法	4
結果	10
考察	17
要約	21
謝辞	22
参考文献	23

序論

アマモ *Zostera marina* Linnaeus はアマモ科に属する海産種子植物で、海藻 (Algae) とは異なり海草 (Seagrass) と呼ばれている。本種は北半球の温帯域から寒帯域の沿岸に広く分布し、日本では九州から北海道までの内湾の水深 1 - 数メートルの砂泥底に生育し、アマモ場と呼ばれる大規模な群落を形成する (大森 2000)。図 1 にアマモの生活史を示した。

アマモは種子による有性繁殖と、地下茎からの分枝による栄養繁殖の 2 通りの方法で繁殖する。初夏に放出され底質中に埋没した種子は夏を経て晩秋から初冬にかけて発芽、伸長し、新生株として群落に加入する。成熟株は初春から初夏にかけて茎を形成し、春から初夏にかけて花穂を付け、開花結実する。種子放出後の成熟株は全て枯死流失する。一方、

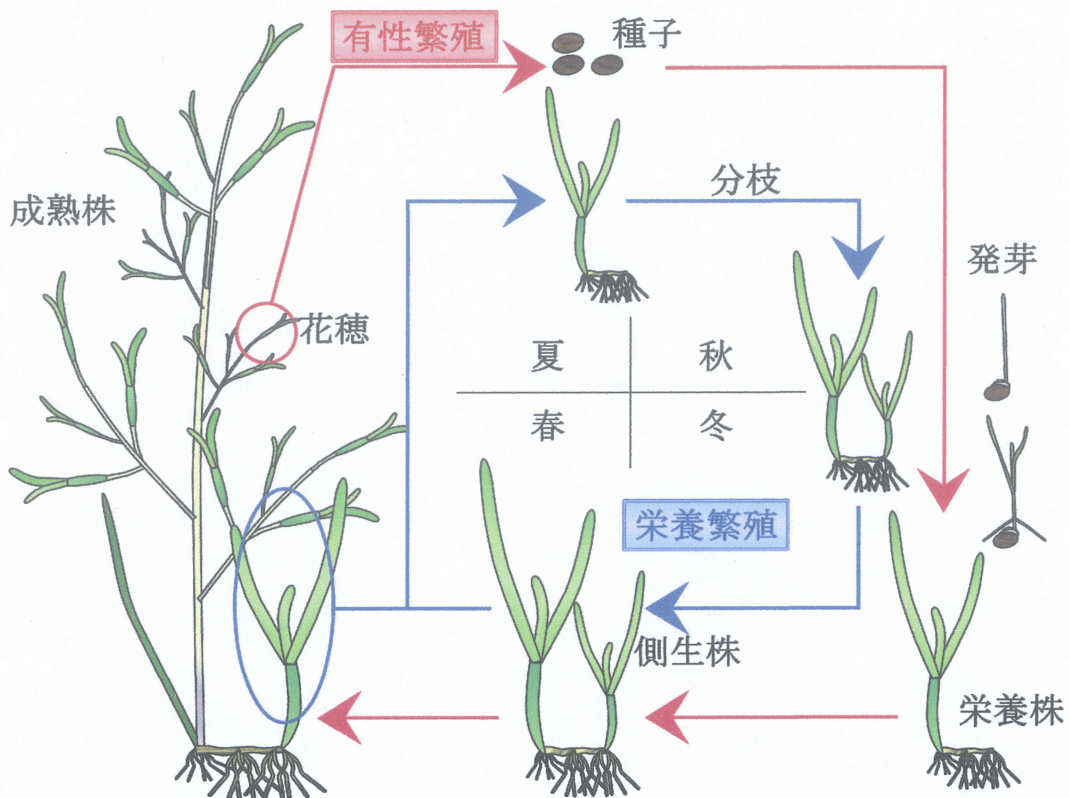


図 1 アマモの生活史

栄養株は夏に多くの葉が枯死流失し一旦衰退するが、秋には再び分枝伸長を開始し、翌年の春には成熟する。

アマモ場は沿岸域の主要な一次生産の場としてだけでなく、窒素やリンの吸収による水質浄化作用もあり、魚介類の餌場・産卵場、幼稚仔魚の生育場等の多様な役割を担う重要な存在であることが報告されている（幡手 1981）。近年、アマモ場は世界的に減少していることが報告されている（相生 2000）。日本も例外ではなく環境庁の調査によると 1978年から 1991年までの 13年間で 2,077ha のアマモ場が消失した（環境庁 1994）。特に伊勢湾では、1955年には 10,400ha 存在したアマモ場は 1994年には 585ha にまで激減し、この 40年間で実に 90%のアマモ場が失われた。三重県側では 1994年から 1999年の 5年間でさらに 70%のアマモ場が失われた（三重県 2000）。このようなアマモ場の消失の原因は主に埋め立てや護岸工事による生息地の縮小、生活廃水や工業排水の流入に伴う水質汚濁や富栄養化であると考えられている（相生 1998）。アマモ場の減少に伴い、日本各地で人工的にアマモ場を造成する試みが行われるようになってきた。

アマモ場造成には播種法と株移植法がある。播種法は種子を直接造成場所に蒔く方法で、株移植法は他のアマモ場から採取した成体もしくは陸上施設で種子から育苗したアマモを造成場所に移植する方法である。播種法および株移植法では現存する群落から多量の種子および株を採取する必要があり、群落に大きな負荷をかけることになる。またアマモが絶滅に瀕している、もしくはごく少量しか生育していない場所での造成では、他地域からの

種子や株の移入は遺伝的攪乱をもたらす可能性がある。そこで造成場所近辺にある少量の種子や親株を用いた種苗の大量増殖法開発が必要となってきた。

陸上植物では組織培養を用いた種苗の大量増殖技術が普及し、多くの農作物や花卉に利用され、特に商業的に栽培されているイチゴやランなどでは一般的な増殖方法となっている（小柴・神谷 2002）。海草についてこれまではこのような方法はほとんど試みられることはなかったが、三重県科学技術振興センター農業研究部（現 三重県農業研究所）では 2004 年度にアマモの組織培養に初めて成功し、実験室内でのアマモ種苗の生産手法の基礎を開発した（広瀬ら 2005, 2006）。室内条件下でアマモ種苗の大量生産を行うため、これまで植物生長調節剤（植物ホルモン）を用い、形態形成の調節を行う方法が試みられてきた。

しかし、アマモの増殖に適した室内培養条件は不明な点が多い。室内条件下でアマモの枝分かれによる増殖を促進するためには光、温度などの環境を至適化することが必要であり、さらに植物生長調節剤の使用が有効であると考えられる。そこで本研究では、アマモの分枝生長に適した室内培養条件を明らかにするため、培地、培養温度および植物生長調節剤の使用について検討した。

材料と方法

【材料の採集】

本研究で使用したアマモの種子は、三重県志摩市阿児町の鵜方浜および立神浦に生息するアマモの成熟株から得た。2008年6月および2009年6月にアマモ成熟株を採集し、ネットに入れ、陸上の屋外水槽内に吊るして海水中で約1ヶ月間追熟させ、種子を放出させた。回収した種子は選別後、滅菌海水の入った容器に入れ、実験に用いるまで0°Cで保存した。

【種子の表面殺菌と播種】

種子を10分間超音波洗浄したのち、約0.25%の次亜塩素酸ナトリウムで10分間表面殺菌を行った。その後、滅菌蒸留水で3回洗浄した。培養液には20%に薄めた人工海水（ダイゴ、人工海水SP+IMK培地、日本製薬）に0.1%ショ糖（w/v）、 250mgL^{-1} のカルベニシリンナトリウムを添加して、フィルター（ $0.22\mu\text{m}$ 、SCGPU01RE、MILLIPORE）ろ過したものをを用いた。表面殺菌処理後の種子は、発芽を促進させるために種皮にメスで縦方向に切れ目を入れたのち、培養液を入れた48穴培養プレートに一個ずつ播種した。用いた人工海水組成および栄養塩補強のためのIMK培地の組成を表1に示した。IMK培地とは微細藻類の分離や大量増殖などに利用されるビタミン類、微量金属などの混合培地であり、藻類や海産種子植物の生長に必須の成分が含まれている。

【予備培養】

培養プレートに播種した種子は人工気象器内で約 3 週間培養を行って発芽させた。培養条件は、温度は 16°C，光強度は $100\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光周期は 12L:12D とした。その後，50% に薄めた天然海水に IMK 培地，0.5% ショ糖 (w/v)， 250mgL^{-1} のカルベニシリンナトリウムを加えた 20mL の培養液を入れた 40mL の培養試験管に発芽体を移し，上記の条件ですらに 3 週間程度培養した。

表 1 ダイゴ人工海水 SP と IMK の組成 (1000mL 中)

人工海水SP (mgL^{-1})		IMK (mgL^{-1})	
NaCl	20,747	NaNO ₃	200
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,474	Na ₂ HPO ₄	1.4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,326	K ₂ HPO ₄	5
Na ₂ SO ₄	3,505	NH ₄ Cl	2.68
KCl	597	FeEDTA	5.2
NaHCO ₃	171	MnEDTA	0.332
KBr	85	Na ₂ EDTA	37.2
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	34	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18
SrCl ₂	12	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.023
NaF	3	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.014
LiCl	1	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0073
KI	0.07	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0002	H ₂ SeO ₃	0.0017
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.008	ThiaminHCl	0.2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.005	Biotin	0.0015
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.0002	Vitamin B ₁₂	0.0015
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.002		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0008		

【培地の海水濃度と IMK 濃度の至適化】

長期間の培養において、培地の交換をすることなく同じ培地で培養を続けると、栄養不足などにより葉の退色や枯死といった草体の衰弱が起こる。しかし、培養株の雑菌汚染の確率を低くするためには培地交換を頻繁に行うことができない。そのため、長期間植物体が健康な状態で生育できる培地に改良する必要がある。アマモの培養に使用している培地は海水に IMK 培地、ショ糖、抗生物質を加えたものであるが、培養中の栄養不足を防ぐためには培地中の海水と IMK 培地の濃度を長期培養に至適化することが必要であると考えた。本実験では、培地をアマモの長期培養により適したものとするため、培地の海水濃度と IMK 濃度をさまざまに変化させて生長への影響を調べた。

培地は液層（上層）と固層（下層）からなる 2 層培地を使用した。上層の液体培地について海水濃度を 50%と 100%、IMK 濃度を通常の使用量を 1 倍として 1 倍、1.5 倍、2 倍、3 倍と設定し、海水濃度と IMK 濃度の組合せ計 8 試験区を作成した。液体培地にはその他に 0.5%ショ糖（w/v）と 250mgL^{-1} のカルベニシリンナトリウムを加えた。下層には 50%に薄めた天然海水に 1 倍 IMK、0.5%ショ糖（w/v）、0.5%活性炭（w/v）を加えて 0.5%アガロースで固めた寒天培地をすべての試験区で共通に使用した。

6 週間の予備培養後の植物体を各培地に移し、2 ヶ月間培養を行った。培養条件は温度 16°C 、光強度 $60\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光周期は 12L:12D とした。

【種子の発芽温度と生長】

アマモの生長に影響を与える要因として種子の発芽温度が考えられており、屋外水槽でのアマモの生育実験において、20°Cで発芽した植物体は栄養株となり分枝生長によって増殖しやすいことが観察された (Morita *et al.* 2010)。そこで発芽温度が植物体のその後の生長に及ぼす影響を調べるため、異なる温度で種子を発芽させて培養を行った。

播種した種子を 16, 18, 20, 22°C の 4 条件で 3 週間培養し、発芽させた。その後、予備培養を経た植物体を 2 層培地に移し、すべて 14°C で 2 - 4 ヶ月間培養した。

【培地への矮化剤の添加】

矮化剤は一般に植物の伸長生長を抑制し、形態形成を促進する作用をもつ植物生長調節剤である。イセイモでは矮化剤アンシミドール 10mgL⁻¹ を添加した液体培地中での回転培養によって多芽体の芽が大幅に増え、植物体の大量増殖に成功している (平野ら 2000)。そこで、これをアマモに応用してアンシミドールによって分枝生長を促進しようと試みた。

予備培養後、全長約 6 - 10cm に生長させた植物体を 0, 1, 3, 5mgL⁻¹ のアンシミドール (Ancymidol [1-Cyclopropyl-1-(4'-methoxyphenyl)-1-(5'-pyrimidine)methanol], 和光純薬工業) を添加した 2 層培地に移した。培地の上層 (液層) は天然海水に 0.5% ショ糖 (w/v), 1 倍 IMK, 250mgL⁻¹ カルベニシリンナトリウムを加えた液体培地, 下層 (固層) は天然海水に液層と同濃度のショ糖と IMK, および 0.5% 活性炭を加えて 0.5% アガロースで固めた

寒天培地を使用した。上層の液体培地にアンシミドールを各濃度で添加した。2層培地に移した後、2ヶ月間培養を行った。

【培地へのベンジルアデニンの添加】

サイトカイニンには一般に茎の老化防止、腋芽の形成促進、着果促進、多芽体の誘導促進などの作用があり、レタス、タバコの発芽促進、ブドウ、メロン、トマトの着果促進にも利用されている。天然に存在するのはカイネチンとゼアチンだけであるが、類似構造物質のベンジルアデニン (BA) などのサイトカイニン類が広く用いられている (大澤 1994)。本実験では、アマモの分枝生長を促進することを目的として、ベンジルアデニンを添加した培地での培養を行った。

播種後3週間の約3 - 4cmに生長させた発芽体を、予備培養を経ずに2層培地に移植した。培地の上層は50%に薄めた天然海水に1倍IMK、0.5%ショ糖、250mgL⁻¹カルベニシリンナトリウムを加えた液体培地にベンジルアデニン (6-Benzyladenine, 和光純薬工業) を0, 1, 3, 5, 10mgL⁻¹の濃度で加えた。下層は天然海水に1倍IMK、0.5%ショ糖、0.5%活性炭を加えて0.5%アガロースで固めた寒天培地を共通で使用した。

【植物体の測定】

培養中および培養後の植物体について葉の長さ、地上部の長さ、地下茎の長さ、節数、

根の長さとおよび本数を測定した。葉、地下茎、および根の長さは、図 2 で示したようにデジタルカメラで撮影した画像データをパソコンに取り込み、面積測定ソフト (Lia 32 for Windows 95) を用いて求めた。培養中には、雑菌汚染を防ぐために培養試験管に入ったままの状態を撮影し、第 1 - 3 葉の長さを測定した。培養終了後の測定では、方眼紙を敷いたバットに草体を広げてその上から透明のアクリル板をかぶせて撮影し、葉長と地下茎の長さおよび根の長さを測定した。

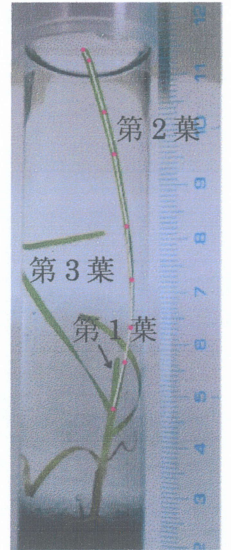


図 2 培養中の植物体の測定

【統計処理】

各実験で測定した葉長と根長、根数、及び地下茎長と節数について、一元配置分散分析、Fisher の最小有意法で評価した。培地の海水および IMK 濃度についての実験の測定結果は 2 要因の分散分析、Fisher の最小有意法でも評価を行った。

結果

【海水濃度・IMK濃度】

各培地へ移植してから2ヶ月後の植物体の葉の長さを図3に示した。葉の長さは最も若い葉から順に第1葉、第2葉、第3葉としてそれぞれ長さを測定した。50%海水と100%海水における葉の生長を比べると、全体的にみて100%海水でいずれの葉も長く生長していた。IMK濃度別にみると、各濃度において50%および100%海水でそれぞれの葉位（第1-3葉）について有意な差は見られなかった。第1葉は第2、3葉に比べて短く、50%海水区では3.1-4.2cm、100%海水区では5.5-6.8cmであった。第2、3葉の長さは、50%海水区では8.3-9.7cm、100%海水区では11.7-13.9cmであった。第1、2、3葉ともIMK濃度に関係なく50%海水区に比べ、100%海水区では有意 ($p<0.01$) に長かった。

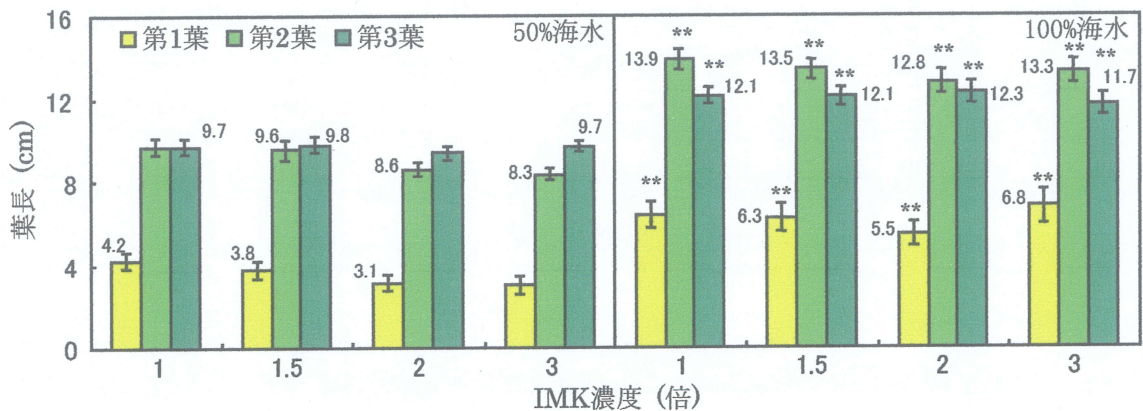


図3 海水・IMK濃度と葉の長さ (±SE; **, $p<0.01$)

根の長さと本数を図4に示した。約30個体についてそれぞれ最も長い根の長さ（最長根長）を測定して比較した。最長根長は50%海水区においてIMK濃度が1倍のとき3.3cm、

1.5 倍のとき 3.2cm となり、100%海水区における IMK 濃度 1 倍の 2.4cm、濃度 1.5 倍の 2.3cm に比べてそれぞれ有意に長くなった ($p<0.01$)。根の本数は 50%海水区と 100%海水区で、IMK 濃度それぞれについてほとんど差はみられず、IMK 濃度 1.5 倍においてのみ 100%海水で、やや少なかった。IMK 濃度が 1.5 倍のとき 50%海水培地で平均 8.3 ± 0.3 本となり、100%海水培地の 7.1 ± 0.3 本に対して有意に多くなった ($p<0.05$)。

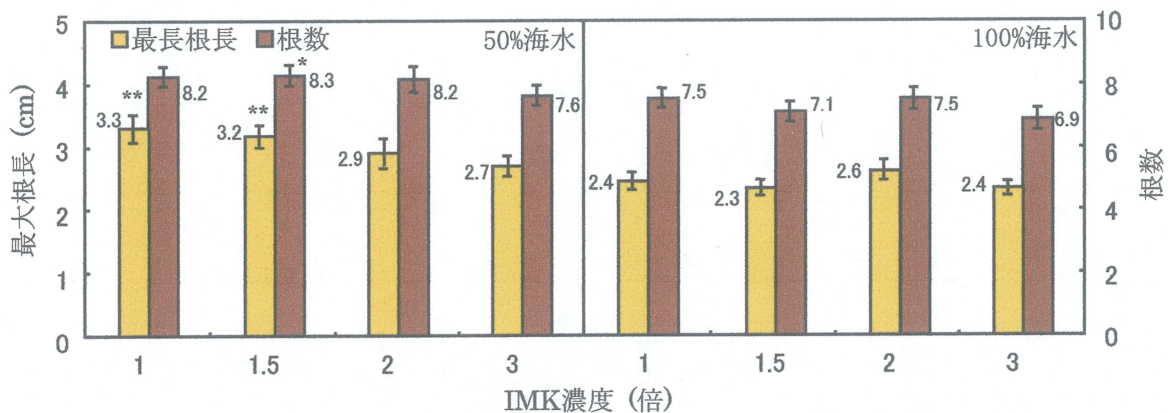


図4 海水・IMK濃度と根の生長 (\pm SE; **, $p<0.01$; *, $p<0.05$)

【種子の発芽温度】

2層培地に移植して2ヵ月後の葉の長さを図5、地下茎の長さとし節の数を図6、最大根長と根の本数を図7に示した。発芽温度別の葉の長さ(図5)をみると、第1葉が4.5-6.7cmと短く、それぞれの発芽温度で有意な

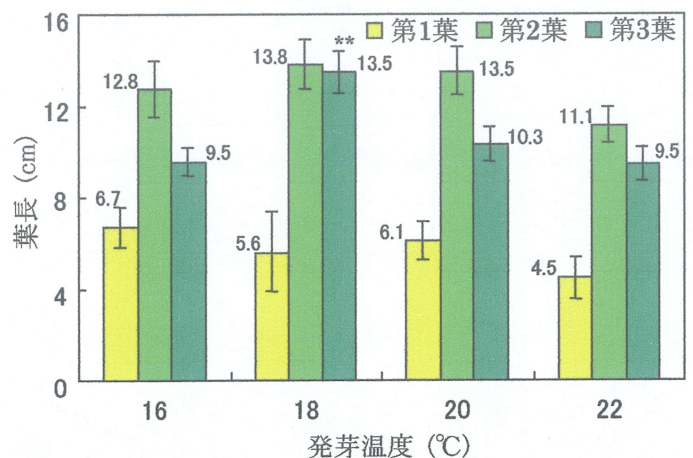


図5 発芽温度と葉の長さ(2層培地移植後2ヶ月; \pm SE; **, $p<0.01$)

差は見られなかった。第2葉は第1, 3葉に比べて長く, 11.1 - 13.8cmであったが, 発芽温度別で有意な差は見られなかった。第3葉は 9.5 - 13.5cm であり, 発芽温度 18℃区でのみ有意に長かった ($p<0.01$)。

地下茎の長さや節の数について (図6) は,

地下茎長は 6.6 - 7.8mm, 節数は 2.5 - 3.1

でどちらも発芽温度の違いによる差は見

られなかった。最長根長について発芽温度

による差はみられず, 3.5 - 5.2cm であっ

た。根の本数については, 22℃で発芽した

ものでは平均 4.6本であり, 他の発芽温度

の 6.3 - 6.5 本に対して有意に少なかった

($p<0.05$)。

2層培地に移植してから3ヵ月後の葉の長

さを図8, 地下茎の長さや節の数を図9, 最

長根長と根の本数を図10に示した。葉の長

さについて, 第1葉は 3.9 - 7.5cm であり,

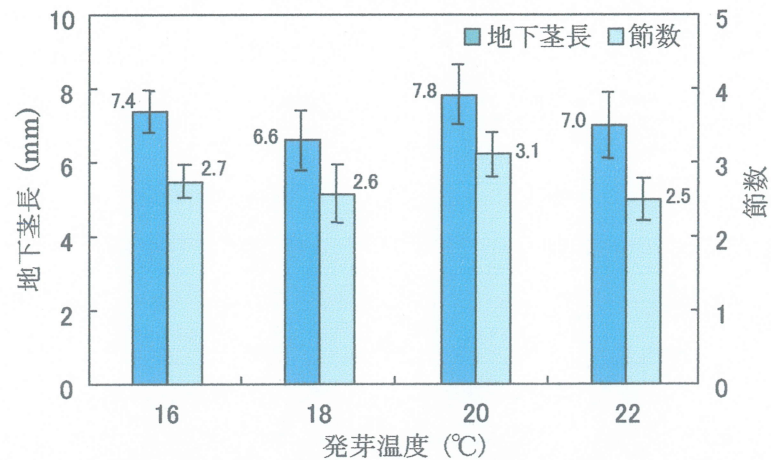


図6 発芽温度と地下茎の生長 (2層培地移植後2ヶ月; \pm SE)

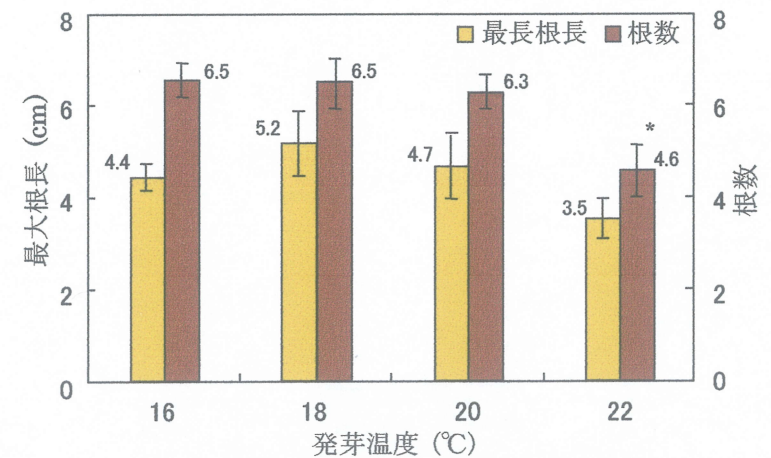


図7 発芽温度と根の生長 (2層培地移植後2ヶ月; \pm SE; *, $p<0.05$)

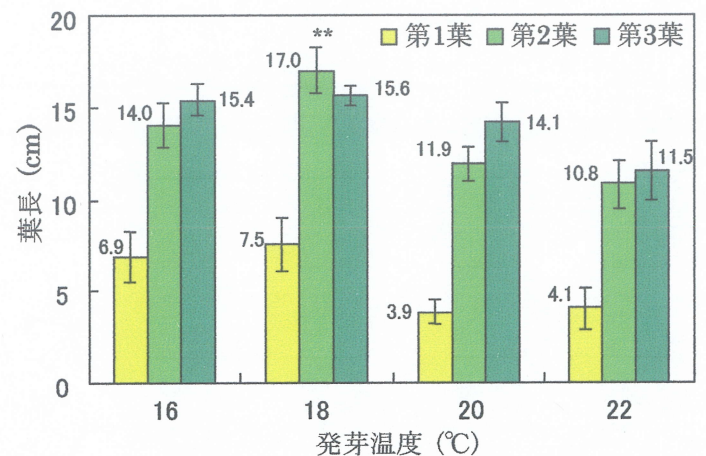


図8 発芽温度と葉の長さ (2層培地移植後3ヶ月; \pm SE; **, $p<0.01$)

種子の発芽温度による有意な差は見られなかった。第2葉の長さは発芽温度 18°C で 17.0cm と最も長く、20°C の 11.9cm、22°C の 10.8cm に対して有意に長かった ($p<0.05$)。地下茎の長さ

と節の数 (図 9) については、地下茎長は 11.0 - 12.2mm で、

発芽温度による差は見られなかった。節の

数については、発芽温度 20°C で 4.9 とやや

少なく、それ以外の温度では 5.4 - 5.6 で差

は見られなかった。最長根長と根数 (図

10) については、発芽温度 16, 18°C で

4.7cm と長く、22°C では 3.7cm と有意に短

かった ($p<0.05$)。根数については各発芽

温度について 12.2 - 13.6 本の範囲にあり、差は見られなかった。なお、3ヶ月間の培養実

験後、16°C で発芽させた 23 個体のうち、2 個体が生殖株となり、花穂を形成した。

繰り返し実験として同様の条件で 2 層培地に移植して 4 ヶ月の培養を試みた。4 ヶ月の培養においても、全体的には 3 ヶ月の培養実験とほぼ同様の結果を得ることができた。繰り返

し実験の 4 ヶ月後には、発芽温度 16°C の 10 個体のうち 6 個体、18°C の 9 個体のうち 3

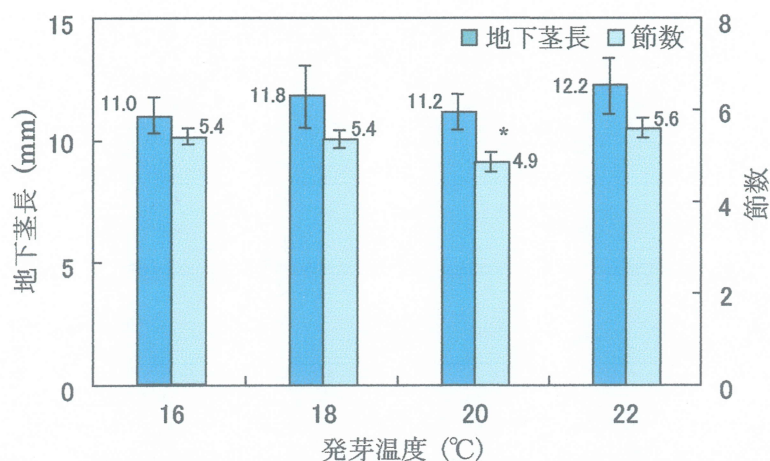


図9 発芽温度と地下茎の生長 (2層培地移植後3ヶ月; \pm SE; *, $p<0.05$)

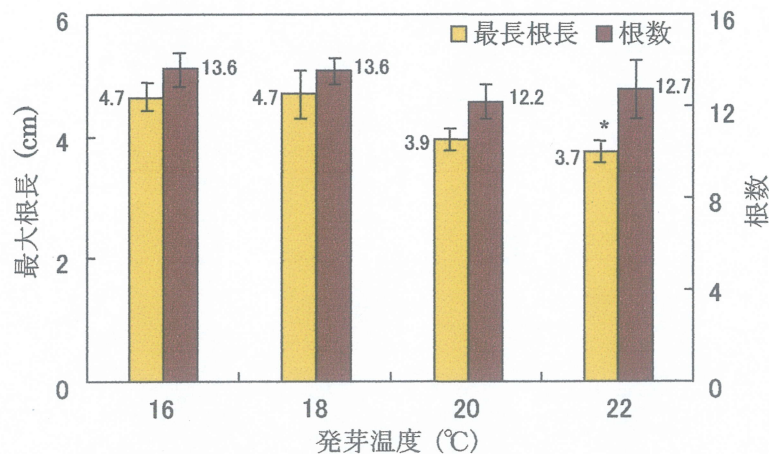


図10 発芽温度と根の生長 (2層培地移植後3ヶ月; \pm SE; *, $p<0.05$)

個体，20℃の11個体のうち5個体，22℃の11個体のうち6個体が生殖株となった。生殖株のうち発芽温度16℃で3個体，18℃で1個体，20℃で5個体，22℃で3個体が花穂を形成した。20℃，22℃といった比較的高い温度で発芽させた草体は，正常に葉が伸長しないものが他の温度よりも多く生じ，22℃のものでは枯死や草体の衰弱が多く見られた。

【矮化剤アンシミドール】

矮化剤のアンシミドールを0 - 5mgL⁻¹の濃度で添加した培地で2ヶ月間培養した草体の葉の長さを図11に示した。アンシミドールの濃度が高くなるにつれ，葉の生長は抑制された。第1葉は対照区（濃度

0mgL⁻¹）の7.9cmに比べ，1mgL⁻¹では6.9cmと差は見られなかったが，3, 5mgL⁻¹で5.6cm，5.1cmと有意に短かった（*p*<0.01）。第2葉は対照区の14.8cmに対して，1, 3mgL⁻¹では13.2cm，11.7cmと差は見られなかったが，5mgL⁻¹で11.0cm

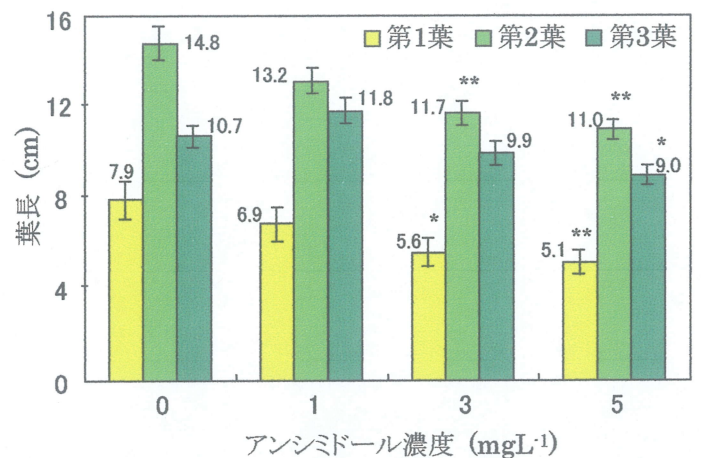


図11 アンシミドール濃度と葉の長さ (±SE; **, *p*<0.01; *, *p*<0.05)

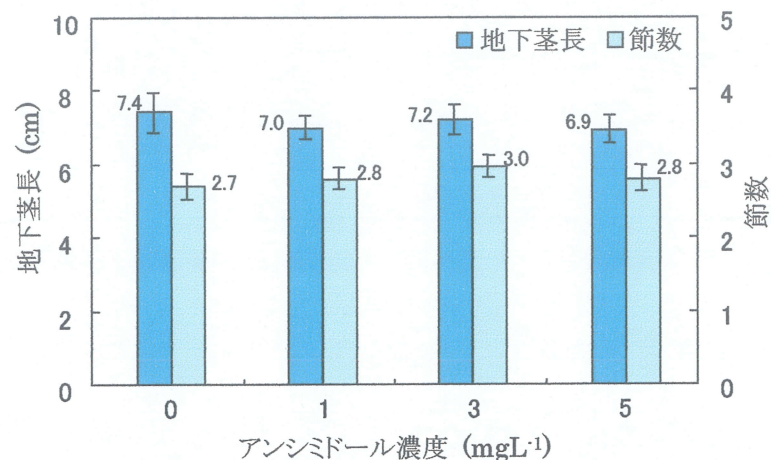


図12 アンシミドール濃度と地下茎の生長 (±SE)

と有意に短かった ($p<0.01$)。第3葉は対照区の 10.7cm に対し, 1, 3mgL⁻¹ では 11.8cm, 9.9cm と差は見られなかったが, 5mgL⁻¹ で 9.0cm と有意に短かった ($p<0.05$)。地下茎の長さや節の数を図 12 に示した。地下茎長と節数のどちらについても培地のアンシミドール濃度の違いに

よる差は見られず, 地下茎長は 6.9 - 7.4mm, 節数 2.7 - 3.0 であった。最長根長と根の本数を図 13 に示した。最長根長は対照区の 3.8cm 比べ, 1mgL⁻¹ で 4.7cm となり, 有意に長くなった ($p<0.01$)。根数については対照区の 6.6 本に比べ, 3mgL⁻¹ で 7.5 本とやや増加した。

【ベンジルアデニン】

ベンジルアデニンを添加した培地で 2 ヶ月間培養した草体の葉の長さを図 14 に示した。対照区に比べ, ベンジルアデニンを添加した培地では第1葉については影響は見られなかったが, 第2, 3葉については対照の 10.0cm 比べ

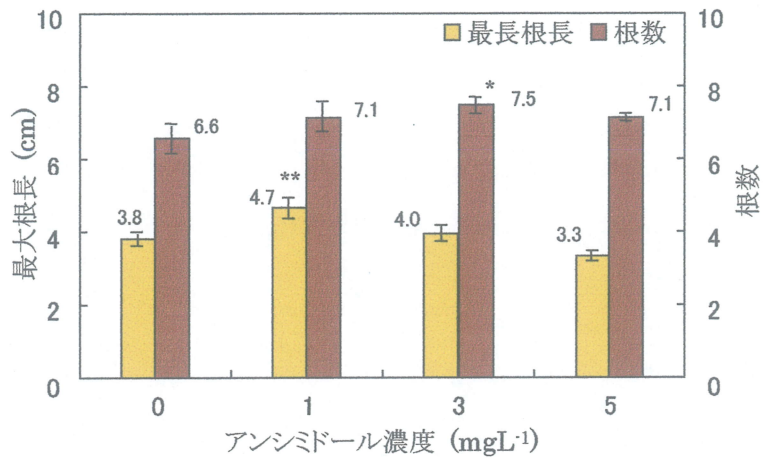


図 13 アンシミドール濃度と根の生長 (±SE; **, $p<0.01$; *, $p<0.05$)

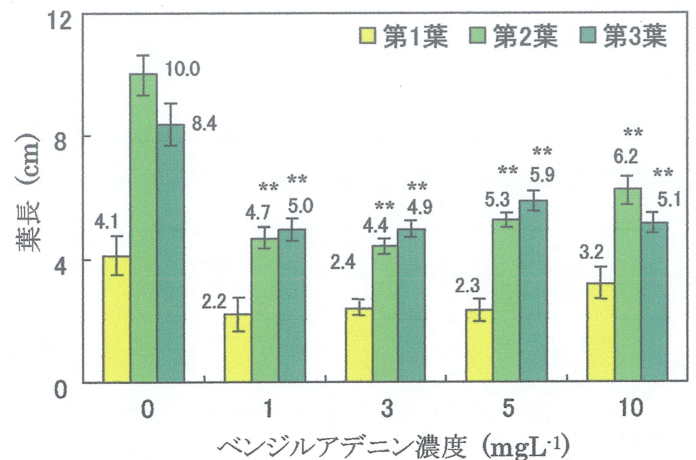


図 14 ベンジルアデニン濃度と葉の長さ (±SE; **, $p<0.01$)

てそれぞれ 4.4 - 6.2cm, 4.9 - 5.9cm と明らかに葉の伸長抑制効果が見られ ($p<0.01$), 1mgL^{-1} の低濃度でその効果は顕著であった。地下茎の長さ と節数を図 15 に示した。地下茎長は対照区の 5.8mm に

対し, $1, 10\text{mgL}^{-1}$ では差が見られなかつ

たが, $3, 5\text{mgL}^{-1}$ で 8.4mm, 8.0mm と

有意に長く ($p<0.01$), 地下茎の伸長促進

効果が見られた。節数は対照区の 3.0 に

比べ, $1-5\text{mgL}^{-1}$ では 2.6 - 3.0 と差は見ら

れなかったが, 10mgL^{-1} で 2.0 と有意に

減少した ($p<0.01$)。最長根長と根数を図

16 に示した。最長根長は対照区の 5.8cm

に比べ, 1mgL^{-1} では 4.6cm と差は見られなかつたが, $3-10\text{mgL}^{-1}$ で 1.5 - 3.5cm と有意に

短く ($p<0.01$), 根の伸長抑制効果が見られた。根数は対照区の 6.0 に対して, $3, 5\text{mgL}^{-1}$

では 6.1 本, 5.9 本と差は見られなかつたが, $1, 10\text{mgL}^{-1}$ で 4.4 本, 4.4 本と有意に少なかつ

た ($p<0.05$)。

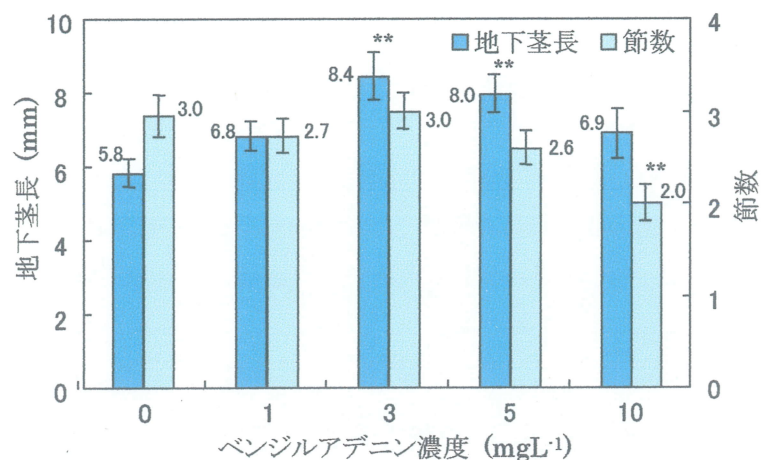


図 15 ベンジルアデニン濃度と地下茎の生長 ($\pm\text{SE}$; **, $p<0.01$)

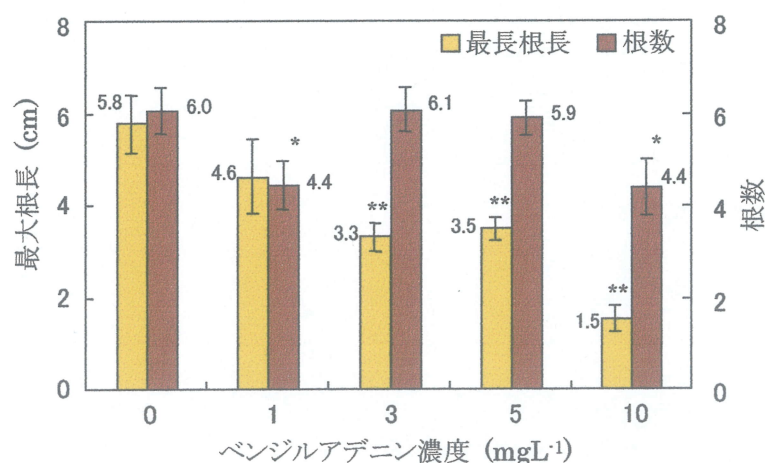


図 16 ベンジルアデニン濃度と根の生長 ($\pm\text{SE}$; **, $p<0.01$; *, $p<0.05$)

考察

これまで室内で、アマモもしくはその組織を長期間培養した例は少ない。後藤ら (1996) は、アマモ組織培養の基礎的條件の解明を目的として、材料の無菌化方法の開発、植物ホルモンの効果の検討、培地の浸透圧と初期生育の関連性の検討などを行った。その結果、材料の無菌法および生長に及ぼす浸透圧の影響が明らかにされたが、草体組織からのカルス誘導には至らなかった。愛媛県水産試験場では、アマモ茎頂からのカルス誘導が試みられ、培地へオーキシンを添加した 90 - 180 日の培養によってカルスの形成に成功した (喜安・平田 2001)。三重県科学技術振興センター農業研究部 (現 三重県農業研究所) ではアマモの生長点を含む組織からの植物体の再生に初めて成功し、実験室内でのアマモ種苗の生産手法を開発した (広瀬ら 2005, 2006)。本研究では種子の発芽から、実生を経て、成熟に至るまでの 4 - 5 ヶ月間を室内培養環境下で生育させることができた。

培地の海水濃度と IMK 濃度についての実験では、海水 100%では葉の生長が、海水 50%では根の生長がより大きくなった。海水 100%の培地はアマモの葉の生長に適し、海水 50%の培地は根の生長に適した培地であると考えられた。50%海水と 100%海水の培地で生育したアマモ草体の状態について、葉の退色や枯死などについて違いはみられず、アマモは正常な状態で生育した。培地に添加した IMK の濃度を 1, 1.5, 2, 3 倍とした場合、葉と根のどちらについても生長に差は見られなかった。したがって、IMK 濃度を 1 倍程度とし、2 ヶ月に 1 回の液体培地交換を行うことにより長期培養は十分可能である。アマモは海域に

において、栄養塩濃度の比較的高い内湾域に生育しており、本実験においても3倍濃度のIMKを添加した栄養塩濃度の著しく高い培地であっても生長に悪影響は見られず、正常に生育した。

屋外水槽での生育実験において、20°Cで発芽したアマモは栄養株になり分枝生長によって株が増殖しやすいことが観察されている (Morita *et al.* 2010)。16, 18, 20, 22°Cで発芽させ、その後同じ温度で培養した草体についての測定結果から、発芽温度によって生長にそれほど差は見られず、明瞭な傾向はなかった。18°Cで発芽させた草体は、他の温度で発芽させたものに比べて葉がやや長くなった。20°C, 22°Cといった比較的高い温度で発芽させた草体は、正常に葉が伸長しないものが他の発芽温度よりも多く生じ、22°Cでは枯死や草体の衰弱も多く見られた。アマモが正常に生育できる発芽温度は16°C, 18°Cであった。室内培養下でアマモの分枝生長を促進するためには、さらに培養環境の改善が必要であると考えられた。2層培地に移植してから3, 4ヶ月後には、一部の株が生殖株となり花穂を形成し、本研究で初めて試験管内でアマモを成熟させることができた。室内培養によってアマモを成熟させ、安定的に種子を生産できるようになれば、その種子によるアマモ場造成を行うことが可能となる。

海草に対する植物ホルモン（植物生長調節剤）の効果について明らかにされていることはまだ少ないが、これまでにいくつかの海草種について植物生長調節剤を使用した培養実験、増殖実験が行われている。*Ruppia maritima* Loisel では生長点を含む地下茎組織の培養に

においてオーキシンによって根の生長が抑制され、サイトカイニンによって地下茎の枝分かれが促進され、また地下茎とシュートの生物量が3-4倍に増加したことが報告されている (Koch and Durako 1991)。*Posidonia oceanica* (L.) Delile では室内で発芽させた実生について、オーキシンを添加した培地での培養によって根の形成と伸長が促進され、*Phyllospadix torreyi* S. Watson の実生でもオーキシンによる根の生長促進効果が確認されている (Balestri and Bertini 2003, Reed *et al.* 1998)。*Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson ではサイトカイニンの一種 thidiazuron を添加した培地で頂端分裂組織から新しい葉あるいは葉再生カルスが形成され、また生長点を含む地下茎組織の培養においてジベレリン酸によって葉の形成と伸長が明らかに促進された (Garcia-Jimenez *et al.* 2006)。

アンシミドールは陸上植物でよく用いられ、実用化技術も確立されている。例えばイセイモでは、アンシミドールを 10mgL^{-1} の濃度で添加した液体培地を用いた回転培養によって60日間の培養で多芽体が100近い芽を形成した (平野ら 2000)。またアスパラガスの培養において培地へのアンシミドール添加によって多芽体が形成されたことが報告されている (松原ら 1991)。本実験では、矮化剤アンシミドールを添加した培地でアマモの培養を行った。アンシミドールの添加した培地で培養したアマモは、葉と根の伸長が抑制された。しかし、地下茎の生長については矮化剤の効果は確認されなかった。アンシミドールによるアマモの形態形成への促進効果は見られなかったことから、他の植物生長調節剤の検討が必要であると考えられる。

陸上植物の大量増殖技術によく用いられる植物生長調節剤にサイトカイニンのベンジルアデニンがある。海草にベンジルアデニンを使用した例として *R. maritima* の組織培養に用いられ、シュートおよび地下茎の生物量、分枝、節形成、地下茎長が 3 - 4 倍増加した (Koch and Durako 1991)。また *Halophila decipiens* Ostenfeld の培養においてベンジルアデニンによってシュート形成および分枝が促進され、その効果が確認されている (Bird *et al* 1998)。ベンジルアデニンを添加した培地での培養によってアマモの地下茎の伸長が促進され、Koch and Durako (1991) が報告したベンジルアデニンの *R. maritima* における地下茎の生長促進と同じような効果が見られたが、本実験ではアマモの葉の伸長がベンジルアデニンによって抑制され、葉の生長については *R. maritima* とは反対の効果が見られた。

陸上植物ではサイトカイニン含量の低下によって根の生長が促進され、地上部の生長が抑制されることが報告されており (小柴・神谷 2002)、本実験におけるアマモの葉の生長は陸上植物とは反対の傾向を示した。サイトカイニンによる生長の促進や抑制作用は植物体の部位や生育段階によって異なることが考えられる。本研究では植物生長調節剤を 2 層培地の上層 (液層) にのみ添加したが、上層と下層の両方、あるいは下層のみへ添加した培地での培養により、さらに生長への影響を調べる必要があると考えられた。また、矮化剤とサイトカイニンをそれぞれ単独で培地に加えてアマモの培養を行ったが、陸上植物における大量増殖技術では、いくつかの植物生長調節物質が併用されている場合が多く、アマモについても異なる種類の植物生長調節剤の併用についての検討が必要であると考えられた。

要約

アマモはアマモ場と呼ばれる大規模な群落を形成し、沿岸域の主要な一次生産の場となり、また栄養塩を吸収する作用など、沿岸環境で重要な役割を果たしている。近年はアマモ場が減少しており、各地で造成が行われている。アマモが絶滅に瀕している海域のアマモ場造成においては、少量の種子や親株を用いた室内での大量種苗生産技術の確立が求められている。本研究では、アマモの増殖に適した室内培養条件を明らかにすることを目的として、培地、培養温度、植物生長調節剤の使用などについて検討した。海水 100%の培地は葉の生長、50%の培地は根の生長に適しており、培地の IMK 濃度は植物体の生長に大きな影響はないと考えられた。発芽温度によってその後の草体の生長に違いは見られなかった。2層培地での3-4ヶ月の培養後、一部の培養株は生殖株となり花穂を形成した。わい化剤アンシミドールによって葉の生長が抑制されたが、形態形成の促進効果はみられなかった。ベンジルアデニンによって葉および根の生長が抑制され、地下茎の伸長が促進された。今後は、培養環境の改善、使用する植物生長調節剤の検討などが必要であると考えられた。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大な御指導と御協力を頂きました三重県農業研究所の橋爪不二夫博士、および経営・植物工学研究課の皆様に深く感謝致します。また、日頃から数々のご指導とご教示を賜りました前川行幸教授、倉島彰助教、研究員 森田晃央博士、岩尾豊紀、各諸氏および三重大学藻類学研究室の皆様に深く感謝致します。

参考文献

相生啓子 1998. 日本の海草—植物版レッドリストより—. 海洋と生物 114 : 7-12.

相生啓子 2000. アマモ場研究の夜明け. 海洋と生物 131 : 516-523.

Balestri, E., Bertini, S. 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aquat. Bot.* 76: 291-297.

Bird, K. T., Johnson, J. R., Jewett-Smith, J. 1998. In vitro culture of the seagrass *Halophila decipiens*. *Aquat. Bot.* 60: 377-387.

Garcia-Jimenez, P., Navarro, E. P., Santana, C. H., Luque, A., Robaina, R. R. 2006. Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth in vitro of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquat. Bot.* 84: 79-84.

後藤文之・吉原利一・川端豊喜・島谷邦枝 1996. アマモ組織培養の基礎的研究. 電力中央研究所研究報告. 研究報告・調査報告. U : 1-22.

幡手格一 1981. 6, アマモ場. P93-115. 藻場・海中林. 日本水産学会編. 恒星社厚生閣, 東京.

平野三男・森利樹・戸谷孝・河野満 2000. 組織培養によるイセイモの種苗増殖に関する研究 第3報 イセイモ多芽体の培養・順化条件と再分化植物. 三重県農業技術センター研究報告 27 : 53-57.

- 広瀬和久・橋爪不二夫・山本有子・奥村宏征 2005. 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. 閉鎖性海域の環境創生プロジェクト研究事業. 平成 15 年度三重県科学技術振興センター水産研究部事業報告書 65-66.
- 広瀬和久・橋爪不二夫・山本有子・奥村宏征 2006. 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. 閉鎖性海域の環境創生プロジェクト研究事業. 平成 16 年度三重県科学技術振興センター水産研究部事業報告書 85-87.
- 環境庁 1994. 第 4 回自然環境保全基礎調査, 海域生物環境調査報告書(干潟・藻場・サンゴ礁)第 2 巻, 藻場. 環境庁自然保護局・(財)海中公園センター, 400p.
- 喜安宏能・平田伸治 2001. アマモ (*Zostera marina*) 茎頂からのカルス誘導. 愛媛県水産試験場研究報告 9 : 13-16.
- Koch, E. W., Durako, M. J. 1991. In vitro studies of the submerged angiosperm *Ruppia maritima*: auxin and cytokinin effects on plant growth and development. Mar. Biol. 110: 1-6.
- 小柴恭一・神谷勇治 2002. 新しい植物ホルモンの科学. P37-53. 講談社サイエンティフィック編. 講談社, 東京.
- 松原幸子・榊田正治・村上賢治・高橋和久・石倉聡 1991. アスパラガス側芽培養でのアンシミドールによる発根及び多芽体形成. 岡山大学農学部学術報告 77 : 9-15.
- 三重県 2000. 平成 12 年度伊勢湾地区藻場造成事業調査委託業務報告書 130p.

Morita, T., Kakinuma, M., Mizumo, G., Okumura, I., Kokubu, H., Kurashima, A.,

Maegawa, M. 2010. Morphological characteristics of annual *Zostera marina*

shoots at various germination temperatures. *Aquat. Bot.* 92: 49-54.

大森雄治 2000. 日本の海草—分布と形態—. *海洋と生物* 131 : 524-532.

大澤勝次 1994. 図集・植物バイテクの基礎知識. P66. 農山漁村文化協会, 東京.

Reed, D. C., Holbrook, S. J., Solomon, E., Anghera, M. 1998. Studies on germination and

root development in the surfgrass *Phyllospadix torreyi*: implications for habitat

restoration. *Aquat. Bot.* 62: 71-80.