褐藻クロメの組織培養

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	木村,創 能登谷,正浩
発行元	日本水産學會
巻/号	62巻4号
掲載ページ	p. 638-641
発行年月	1996年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

Nippon Suisan Gakkaishi 62(4), 638–641 (1996)

褐藻クロメの組織培養

木村　創，能登谷正浩

(1995年9月11日受付)

Tissue Culture of *Ecklonia kurome* Okamura (Laminariales, Phaeophyta)

Hajime Kimura*1 and Masahiro Notoya*2

Tissues of *Ecklonia kurome* Okamura were cultured in four sampling times (spring, summer, autumn, winter) for the explants (blade meristematic zone and stipe) under two temperatures (20 and 25°C) and in three media (ASP_{12}–NTA, SW–II, and sterile sea water). A high rate of callus development independent of temperature was seen in tissues from the blade explant in July which was cultured in the medium of ASP_{12}–NTA. Two color types of callus, pale yellow and brown, were formed from blade and stipe tissues. The brown calluses were cultured under 20°C, 30 μM $m^{-2}s^{-1}$ and 12L: 12D in a liquid medium of ASP_{12}–NTA. Sporophyte-like plantlets differentiated from the callus within three weeks of culture.

キーワード：クロメ，組織培養

クロメは暖海域の藻場を形成する重要な多年生の大型コンブ目植物である。しかし，近年和歌山県では環境等の変化によってクロメ群落が減少しており，環境に適合するクロメの育種が必要となってきた。このため筆者らは短期間に育種を進めることのできる組織培養方法について天然藻体を用いて検討した。

これまでコンブ目植物の組織培養では，培養によって得られた幼胞子体組織を用いる方法と，天然藻体の葉状部や茎状部組織を用いる二つの方法が報告されている。[1] 前者ではカルス形成および増殖が速く，また葉状部への分化が種によっては2週間以内と極く短期間に認められることから，これまでに13種でカルスの形成や分化におよぼす温度や光量の影響について報告されている。[2-6] 後者の場合は一般にカルス形成から葉状体への分化までに6ヵ月から2年の長期間を要するため，[7-14] それらの条件を検討した報告は少ない。

カジメ属*Ecklonia*の種の天然藻体の組織を用いた培養については，ツルアラメ*E. stolonifera*,[15] *E. radiata*,[16,17] カジメ*E. cave*[12,18]の3種で報告されているが，クロメ*E. kurome*についてはまだ報告されていない。著者らはクロメの天然藻体の生育時期や培養温度，培地がカルスの形成におよぼす影響を観察した。また，ここで得られたカルスを培養して葉状体への分化を観察したので報告する。

材料および方法

材料のクロメは和歌山県白浜町江津良浜で1990年の5月1日，7月21日，9月27日，12月10日に3齢の藻体を採取した。藻体は採取後，組織摘出までの1～2日間濾過海水をかけ流しにした1トン水槽に垂下した。組織の摘出は葉状部の生長点付近（約4×4 cm）および茎状部下部（長さ約3 cm）を切り取り，試料の表面を滅菌海水でよく洗浄した後，クリーンベンチ内に移した。試料の表面をエタノールで拭いた後，滅菌したコルクボーラーで組織を打ち抜き，表面の組織を取り除いた後，厚さ2～3 mmの扇型の組織片に細断した。組織片は尖った部分を上にして1.2%寒天培地の入った9 cmシャーレ1枚につき10個の組織片を植え付けた。培養は20, 25°C，光量30 μM $m^{-2}s^{-1}$，光周期12L：12Dとし，培地にはASP_{12}–NTA，滅菌海水およびSW–Ⅱの3種を用いた。

組織片からのカルス形成率は，組織を培地に植え付け1ヵ月後に実体顕微鏡下で観察して算出した。

1990年9月1日，7月21日に採取した藻体の葉状部生長帯組織から形成されたカルス塊を，約10細胞づつ組織から切り離し，2 m*l*容マルチウエルプレートに移

*1 和歌山県水産増殖試験場 (Wakayama Prefectural Institute of Aquaculture, Motomachi, Tanabe, Wakayama 646, Japan).
*2 東京水産大学藻類学研究室 (Laboratory of Applied Phycology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

した。これらを温度20℃，光量30 μM $m^{-2}s^{-1}$，光周期12L：12Dの条件下でASP_{12}-NTA液体培地を用いて3ヵ月間培養し，その間週1回の割で生育状況を実体顕微鏡で観察した。なお，培養期間中培地の交換は行わなかった。

結　果

組織を培地に植え付けて2週間後，ASP_{12}-NTA培地では，藻体の採集時期および葉状部，茎部または培養温度にかかわらずほとんどの組織片で摘出組織上部の髄組織からカルス細胞の発出が肉眼でも観察できるほどに増殖した（Fig. 1A）。形成されたカルス細胞には直径25～35 μmの球形で茶褐色のもの（Fig. 1A, B）と幅約25 μm長さ30～60 μmの透明または淡黄色の糸状の細胞（Fig. 1C, D）の2タイプがあった。これらの2タイプのカルスは培地，培養温度，試料にかかわらず認められたが，後者のカルスが約80%の組織片から形成された。

Table 1に材料や培養条件，培地がカルスの形成におよぼす影響を示した。

ASP_{12}-NTA培地ではいずれの試料や培養温度下でもよくカルスが形成されたが，とくに7月に得られた藻体が葉状部，茎状部のいずれの試料とも高いカルス形成率を示した。ついで5月または12月の藻体となり，9月の藻体では最も低い値となった。この傾向は栄養塩無添加の滅菌海水のみでもほぼ同様であった。SW-Ⅱ培地では，いずれの試料，温度下ともカルス形成率は低かった。

Table 1. Rate of callus decelopment (%) in different explants, sampling times, temperature and media of *Ecklinia kurome* Okamura (n=20 sections for each condition)

Explant	Sampling time	Temperature	Medium		
			ASP_{12}-NTA	Sea water	SW-II
Blade	May 1	20℃	+	+	−
		25℃	++	+	+
	July 21	20℃	+++	++	+
		25℃	+++	++	+
	Sep. 27	20℃	+	−	−
		25℃	+	+	−
	Dec. 10	20℃	++	−	−
		25℃	++	+	−
Stipe	May 1	20℃	+	−	−
		25℃	+	−	−
	July 21	20℃	++	+	−
		25℃	++	+	−
	Sep. 27	20℃	+	+	−
		25℃	−	++	−
	Dec. 10	20℃	+	+	−
		25℃	+	−	−

−, 0%; +, 1-30%; ++, 31-60%; +++, 61-100%.

カルス形成率におよぼす培養温度の影響は，いずれの試料，培地とも，20℃および25℃下ではほとんど差異は認められなかった。

最も旺盛に増殖がみられた茶褐色のカルスをASP_{12}-NTA液体培地に移植して培養したところ，培養5日後には，カルス塊の表層の細胞は35～40 μmの半球状となり，色素体の数や大きさが次第に増加して更に濃い褐色となった。2週間後にはカルス塊の所々から球形の細胞が数珠状に連なる細胞枝の伸長が認められた（Fig. 1E）。培養3週間後，この枝状の細胞列の伸長方向と平行に細胞壁が形成され幼胞子体様の1層細胞からなる藻体となった（Fig. 1F）。その後3ヵ月間培養を継続して観察したが，この藻体はほとんど生長せず仮根の形成も認められなかった。

考　察

組織培養の材料に天然藻体を用いた場合，用いる藻体の生理状態がカルスの形成や増殖に影響することが報告されている。[17] 和歌山県沿岸のクロメの生育サイクルは，3～5月が生長期に当たり，葉状部の伸長が旺盛である。6～7月は生長が次第に止まり葉状部の厚みが増す充実期となり，8～10月には2齢以上のほとんどの藻体が成熟して子嚢斑を形成し，その後は葉状部の上部から次第に流失が多くなる。

本培養結果で，7月に採取された葉状部生長帯組織が最もカルス形成率が高かった。いままで採取時期によるカルス形成率を比較した報告はなく，クロメのカルス形成率は藻体の生育状態に影響され，組織が最も充実する時期の組織がカルスの発生および増殖に適しているものと推察された。

カルス形成率と培養温度の関係については，本研究の培養では20, 25℃の2条件下で行われ，いずれもほぼ同様の形成率であった。しかし，これまでの報告に比べるとやや高い温度であったが，十分にカルス形成がなされることがわかった。

培地として用いた滅菌海水やSW-Ⅱ培地に比べASP_{12}-NTA培地ではかなりよくカルス形成が認められ，ツルアラメ[14]と同様に人工培地の方が試験に用いた栄養添加培地より高い形成率であった。

組織片から形成されるカルスの色彩には無色と褐色のものが認められ，前者は暗黒下でも増殖し，培地に有機炭素やビタミン類の添加によって増殖が促進されるが，

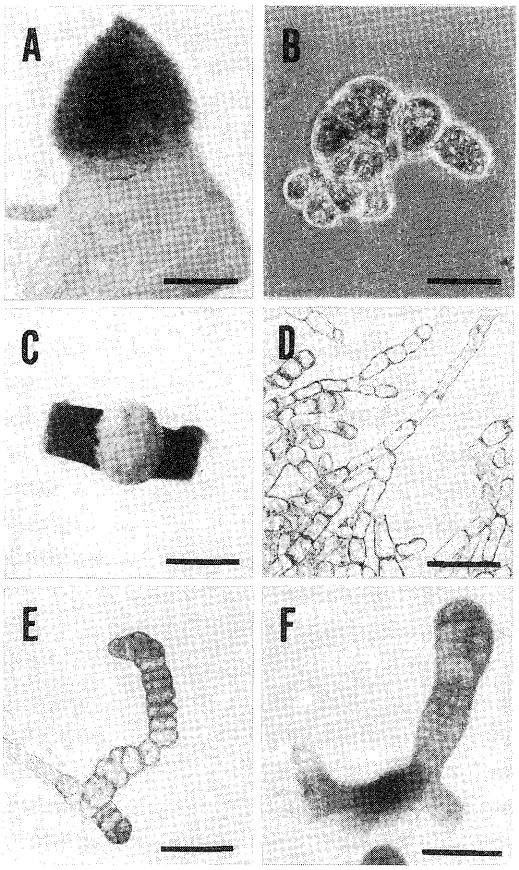

Fig. 1. Tissue culture from the blade of *Ecklonia kurome* Okamura.

A, Brown callus development in the blade explant tissue. B, Separated round brown callus cells. C, Pale yellow callus development in the blade explant. D, Separated filamentous pale yellow callus cells. E, Differentiated sporophyte-like plantlets from the brown callus cells. F, Further growing sporophyte-like plantlets. Scale bar; 1 mm in A; 50 μm in B; 2 mm in C; 100 μm in D–F.

後者ではこれらの影響はほとんど認められず，光の量や質が増殖に大きく影響することが *Ecklonia radiata* で報告されている。[16] 本研究のクロメでも色素体をほとんど含まない淡黄色のものと色素体が多い褐色のカルスが認められた。また，この褐色のカルスから3週間以内の極く短期間に胞子体様の細胞が得られた。このことは一般に髄組織からのカルスまたは低温，低光量下で増殖したカルスでは淡黄色または無色となり，高温，高光量下ではカルス細胞内の色素体が増加し，短期間に胞子体へ分化することが知られており，[1-7,12-14] カルス細胞の分化には細胞内の色素体の量が大きく関与していることが推察されていることに一致する。

これまで天然藻体の組織から配偶体を経ることなしに直接胞子体を分化させた報告はマコンブ，[9,10] ワカメ，[9,10,14] アラメ，[13] カジメ，[12] で知られている。いずれも4ヵ月から2年間の長期間の培養期間を要している。しかし，幼胞子体組織を用いた培養では，高温，高光量下ほど数週間以内の短期間に幼胞子体への分化が認められている。[3-7] したがって本研究でも比較的高い温度下で培養したため，短期間に胞子体を分化したものと推察された。

以上の培養結果は海中林造成種苗生産技術として期待される。

文　献

1) 能登谷正浩：大型海藻類の組織培養—褐藻コンブ目植物—．月刊海洋，**22**, 728–736 (1990).
2) 能登谷正浩：褐藻コンブ目植物の組織培養—現状と展望—．月刊海洋，**25**, 704–711 (1993).
3) M. Notoya and Y. Aruga: Tissue culture of parthengenetic and normal young sporophytes of *Ecklinia cave* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta). *Japan. J. Phycol*, **40**, 53–55 (1992).
4) M. Notoya and Y. Aruga: Tissue culture from the explant of stipe of *Ecklinia cave* Kjellman (Phaeophyta, Laminariales); in "Current Topics in Marine Biotechnology" (ed. by S. Miyachi, I. Karube, and Y. Isida), Fuji Technology Press, Tokyo, 1989, pp. 219–222.
5) M. Notoya, M. Nagashima, and Y. Aruga: Influence of light intensity and temperature on callus development in young sporophytes of four species of Laminariales (Phaeophyta). *Korean J. Phycol.*, **7**, 101–107 (1992).
6) M. Notoya, M. Nagashima, and Y. Aruga: Tissue culture and the developmental condition of callus from young sporophytes of *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell (Laminariales, Phaeophyta). *Japan. J. Phycol*, **40**, 349–352, (1992).
7) M. Notoya, M. Nagashima, and Y. Aruga: Influence of light intensity and temperature on the callus development in young sporophytes of three species of Laminariales (Phaeophyta). *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 15–18 (1994).
8) L. Fries: Axenic tissue culture from the sporophytes of *Laminaria digitata* and *Laminaria hyperborea* (Pheophyta). *J. Phycol.*, **16**, 475–477 (1980).
9) Z. Y. Fan, Z. Yan, and Z. Wang: Some preliminary obervations on tissue culture in *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Kexue Tongbao*, **28**, 247–247 (1983).
10) Z. Yan: Studies on tissue culture of *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. Hydrobiologia, **116/117**, 314–316 (1984).
11) T. Lee: Aposporous gametophyte formation in stipe explants from *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *Bot. Mar.*, **28**, 179–185 (1985).
12) M. Notoya and Y. Aruga: Tissue culture from the explant of *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyta), *Japan. J. Phycol.*, **37**, 302–304 (1989).
13) M. Notoya and Y. Aruga: Tissue culture from the explant of stipe of *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell (Laminariales, Pheophyta). *Japan. J. Phycol.*, **38**, 387–390 (1990).

14) M. Notoya and Y. Aruga: Tissue culture of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta). *Japan. J. Phycol.*, **40**, 393–395 (1992).
15) M. Notoya: Tissue culture from the explant pf *Ecklonia stolonifera* Okamura (Phaeophyta, Laminariales). *Japan. J. Phycol.*, **36**, 175–177 (1988).
16) H. J. Lawlor, J. A. McComb, and M. A. Borowizka: The development of filamentous and callus-like growth in axenic tissue cultures of *Ecklonia radiata* (Phaeophyta), in "Algal Biotechnology" (ed. by Stadler, T., Mollion, J., Verdis, M. C., Karamanos, Y., Horvan, H., and D. Christiaen), Elsevier Applied Sience, London, 1988, pp. 139–150.
17) H. J. Lawlor, J. A. McComb, and M. A. Borowizka: Tissue cultures of *Ecklonia radiata* (Phaeophyta, Laminariales): effect on growth oh light, organic carbon source and vitamins. *J. Applied Phycol.*, **1**, 105–112 (1989).
18) Y. Kawashima and H. Tokuda: Callus formation in *Ecklonia cava* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta). *Hydrobiologia*, **204/205**, 375–380.