

技術報告

フリー配偶体培養による 温帯性多年生コンブ目褐藻アラメの種苗生産方法

澤山周平*1*2・鬼塚年弘*1・堀 正和*1*2

Method for seedling production of the temperate perennial Laminariales species,
Eisenia bicyclis, using free-living gametophyte culture

Shuhei SAWAYAMA, Toshihiro ONITSUKA and Masakazu HORI

In recent years, the demand for macroalgae seedling production has increased worldwide due to a considerable decline of seaweed beds and increasing anticipation for advantaging “Blue Carbon” as a solution for climate change. Utilizing free-living gametophyte culture for seedling production for Laminariales kelps (e.g., *Saccharina* and *Undaria*) is an efficient and robust technology to address climate change. However, no detailed technical reports of seedling production by free-living gametophyte culture exist today for perennial species, the main component of kelp beds in temperate coastal regions of Japan (e.g., *Eisenia bicyclis* and *Ecklonia cava*). In fact, there is a technical bottleneck in their seedling production due to the difficulty in suppressing the maturity of gametophytes to synchronize fertilization. This report describes the method for free-living gametophyte culture of these species by demonstrating a case example of *E. bicyclis* seedling production, which includes applying Fe-free medium to suppress the maturity of gametophytes.

キーワード：磯焼け, 藻場造成, ブルーカーボン, 鉄
2023年12月4日受付 2024年7月30日受理

近年、国内外の沿岸岩礁域において、大型褐藻類群落の衰退に伴う藻場の著しい減少とその状態の持続、いわゆる「磯焼け」の問題が深刻化している。磯焼けの発生・持続要因は海域により多様であるが（谷口1999, 藤田2002）、日本の温帯域各地においては、短期的・中長期的な高水温の影響が強く疑われる事例が多い（河尻ら1981, Tanaka *et al.* 2012, 阿知波ら2014, 八谷ら2014, 高村ら2019, 武田2021）。また、日本沿岸の暖流域においては気候変動による海藻の南北分布の大幅な変化が予

測され（Komatsu *et al.* 2014, Takao 2015, Kumagai *et al.* 2018）、すでに南方系の海藻の進出・増加が報告されている海域もある（原口ら2006, Tanaka *et al.* 2012, 田中ら2013, 寺田ら2021）。このように在来の海藻種で構成された藻場が減少していく状況の中、海藻種苗の移植や食害生物の駆除等の様々な磯焼け対策手法が検討・考案され（水産庁2021）、実際に効果を上げた取り組みも見られる（Unno and Hasegawa 2010, 倉島ら2014）。しかしながら、これらの取り組みの効果を長期間持続させる

*1 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所環境・応用部門沿岸生態システム部
〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2丁目12-4

Coastal and Inland Fisheries Ecosystems Division, Environment and Fisheries Applied Techniques Research Department, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, National Research and Development Agency, 2-12-4, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan

E-mail: sawayama_shuhei32@fra.go.jp

*2 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産資源研究所水産資源研究センター社会・生態システム部

ことはコストや労力の問題から容易ではなく、近年の水温上昇トレンドを鑑みても今後ますます困難になるものと予想される。また、従来の水産的な観点に加えて、近年では大気中・海洋中の二酸化炭素の貯蔵を目的とした、いわゆるブルーカーボンの創出という観点からも、海藻を増やす取り組みに対する社会的需要は高まっている(堀・桑江 2017)。こうした背景から、対象となる海域や海藻の種の特性に応じた、より効率的で水温上昇等の環境変化に対しても頑健な種苗生産技術を開発することが喫緊の課題となっている。

ワカメやコンブ類等を始めとしたコンブ目褐藻類の養殖においては、フリー配偶体培養と呼ばれる先進的な種苗生産技術が開発され、現在国内外で普及が進んでいる。これら一般的な養殖対象種のフリー配偶体培養の方法は、複数の研究報告(Shan and Pang 2009, 棚田ら 2015, 二羽 2015)や技術書(大野 1987, Forbord *et al.* 2018, Bartsch 2018), マニュアル(團 2000, 和歌山県水産試験場 2022)等に記載されている。一方で、我が国温帯域における岩礁性藻場の主要構成種である多年生コンブ目褐藻類(アラメ *Eisenia bicyclis*, サガラメ *Eisenia nipponica*, カジメ *Ecklonia cava*, クロメ *Ecklonia cava* ssp. *kurome* 等)については、フリー配偶体培養を用いた種苗生産の事例は過去に散見されるものの、その具体的技術に関して詳細が記された報告はなかった。これら温帯性多年生褐藻類では、配偶体・幼孢子体の生理生態において一年生のワカメや冷水性のコンブ類とは異なる点が見られ、例えば、幼孢子体の発生・成長速度が遅い、配偶体の成熟タイミングが同期しにくい(澤山私信)、雌性配偶体の単為発生による異常孢子体形成が多く見られる(右田 1984)などの特性が挙げられる。こうした特性の影響により、既存のフリー配偶体培養手法を温帯性多年生褐藻類の種苗生産に適用した場合、配偶体の増殖や長期的な維持が難しく、種苗生産時に孢子体のサイズにばらつきが生じやすく着生密度も低くなる傾向があった(澤山私信)。すなわち、これらの種において種苗生産を成功させるためには、配偶体の培養時には成熟を厳密に抑制する一方、種苗生産時に確実に雌雄の成熟を誘導することで孢子体形成のタイミングを同期させることが鍵となると考えられた。

配偶体の成熟を抑制する手段としては、温度条件を24~25°C程度と高くする方法が知られている(谷口・秋山 1982, 太田 1988)。しかし、アラメやサガラメの雌雄性配偶体では24°C以上で成熟した報告があるほか(馬場 2010, 林田ら 1999)、カジメやクロメの地域集団間で配偶体の成熟に対する温度特性が大きく異なることが示唆されていることから(田中ら 2008)、この方法で完全に成熟を抑制することは困難と考えられる。また、低光量条件に置くことでもコンブ目の雌性配偶体の成熟がある程度抑えられるが(松井ら 1992)、この場合は配偶体の栄養成長も抑制されることから(松井ら 1992, 林田

2002)、特に拡大培養には不適と考えられる。光源として緑色LEDを用いることで配偶体の成熟を抑制できることも知られるが(村瀬ら 2014)、大規模な種苗生産の上では設備コストの問題が生じると考えられる。

一方、コンブ属 *Saccharina* やワカメ *Undaria pinnatifida*, オオウキモ *Macrocystis pyrifera* などの多様なコンブ目褐藻類において、培養液中のキレート鉄(Fe(III)-EDTA)を始めとする鉄成分の濃度が配偶体の成熟に大きく影響することが知られている(Iwai *et al.* 2015, Lewis *et al.* 2013, Matsunaga *et al.* 1998, Motomura and Sakai 1981, Stekoll *et al.* 2020, Suzuki *et al.* 1994, 植木ら 2011)。同じくコンブ目に属するアラメやカジメに関してはこれまでに同様の報告はないものの、鉄成分欠乏状態の配偶体で成熟が抑制され、栄養成長を優先的に行うようになることが経験的に分かっている(澤山私信)。そこで本報では、配偶体の拡大培養・保存培養の工程において鉄成分を含有しない培養液により成熟を抑制し、成熟の促進時には鉄成分を含む培養液に移すことで受精を同期させる手法を用いたアラメの種苗生産事例をもとに、フリー配偶体培養による種苗生産の一連の作業工程について記載することを目的とする。

フリー配偶体培養とは

ワカメやアラメ・カジメを含むコンブ目褐藻類は、孢子体(いわゆる藻体)上に生殖器官(孢子葉や子嚢斑)を形成し、そこから放出された遊走子が岩盤等の基質に着底すると、雌雄いずれかの配偶体として発生する。配偶体は基質上で細胞分裂(栄養成長)を繰り返しながら増殖し、成熟期に雌雄それぞれが形成した卵と精子が受精することで幼孢子体が芽生える。配偶体は高水温や低光量といった生育に不適な環境条件に対する耐性が高く、孢子体が枯死または成長を停止する環境でも生残・成長することができる(tom Dieck 1993, 馬場 2009, 馬場 2010)。また、配偶体は数細胞の大きさにまで細断しても死なず、各断片が再び栄養成長を繰り返すことで無性的に増殖できる。フリー配偶体培養は、コンブ目褐藻類の配偶体が有するこうした生理・生態特性を種苗生産に応用した技術である。

「フリー配偶体」という語は、Free-living gametophyte の和訳であり、基質から遊離した状態で培養される配偶体を意味する。従来のコンブやワカメ養殖における種苗生産では、春・夏季に藻体から放出させた遊走子を基質(種糸)に直接付着させ、それを孢子体が発芽する秋・冬季まで海中や水槽内で保管してから育苗・本養殖を開始するといった、海藻本来の生活史サイクルに則した方法が一般的であった(名畑 2005, 團ら 2015)。しかし、このような季節性に依存した方法では、その年の気温や水温等の環境条件によって種苗の品質や芽生えるタイミング等が大きく左右されるという問題があった。これに

対し、フリー配偶体培養を用いることにより、屋内で効率的に増殖させた配偶体を長期間保存することができるため、環境条件に影響されことなく安定した種苗生産が可能となる。また、受精のタイミングを自由に操作できることから、その年の海洋環境に合わせた種苗生産の時期の調整が可能である（大野ら 2000, 團 2000, 二羽・原田 2016）。その後、フリー配偶体から養殖用種系を生産するための「塗布法」（棚田ら 2015）や「噴霧法」（二羽 2016）と呼ばれる手法の開発や大型水槽を用いた培養方法の考案（二羽 2016）などの技術向上を経て、現在ワカメ養殖では大規模種苗生産も達成されている（棚田ら 2020）。

フリー配偶体の培養方法には、1遊走子起源の配偶体を単離培養する方法（團 2000, 二羽 2015）と、複数の遊走子起源の配偶体（雌雄が混在したもの）を培養する方法（和歌山水試 2022, Forbord *et al.* 2018）の2通りがある。前者の場合、同じフリー配偶体から得られる種苗は遺伝的に同質であるため、特定の形質を持つ品種の系統保存や、それらの交配育種による有用品種の作出にも用いることができる（Bartsch 2018, 村瀬ら 2021）。また、後者では温度や光質の管理によって配偶体の成熟と受精を管理する必要があるが、雌雄が混在しているため偶発的な孢子体形成を完全に防ぐことができない。こうしたことから、本報のフリー配偶体培養試験では1遊走子起源の配偶体を単離培養する方法を採用することとした。

フリー配偶体培養はいくつかの工程に区分されるが、本報では採取した遊走子から雌性配偶体の単離を経て肉眼視可能なサイズの1遊走子由来の配偶体塊を得るまでの工程を「初期培養」、得られた配偶体塊を長期間にわたり維持するための培養工程を「保存培養」、配偶体塊を通気・遊離培養によって増殖する工程を「拡大培養」とそれぞれ呼ぶこととする。また、棚田ら（2015）に倣い、雌雄の配偶体塊を細断・混合して基質（種系）へ着生させる作業を「採苗」、種系上で葉長 5mm 程度の幼孢子体まで培養する工程を「種苗生産」とそれぞれ定義した。その後の本養殖・沖出しまでの中間育成期間を「育苗」と呼称し、カジメにおいて沖出しに適した種苗サイズとされる葉長 10cm 程度（田井野 2009）まで孢子体が成長した段階で育苗完了とした。これらの各工程全体を通したフロー図を図 1 に示した。

フリー配偶体培養のための設備と材料

本報のフリー配偶体培養試験の実施方法とともに、フリー配偶体培養に必要な設備・消耗品について説明する。初期培養から拡大培養まで、フリー配偶体培養に必要な設備・消耗品について、培養の工程ごとに主だった物を表 1 に示した。培養庫に関しては、異なる環境条件を要する複数の培養段階を同時に進める場合があるため、環境条件を個別に制御可能な複数の培養庫を使用できるこ

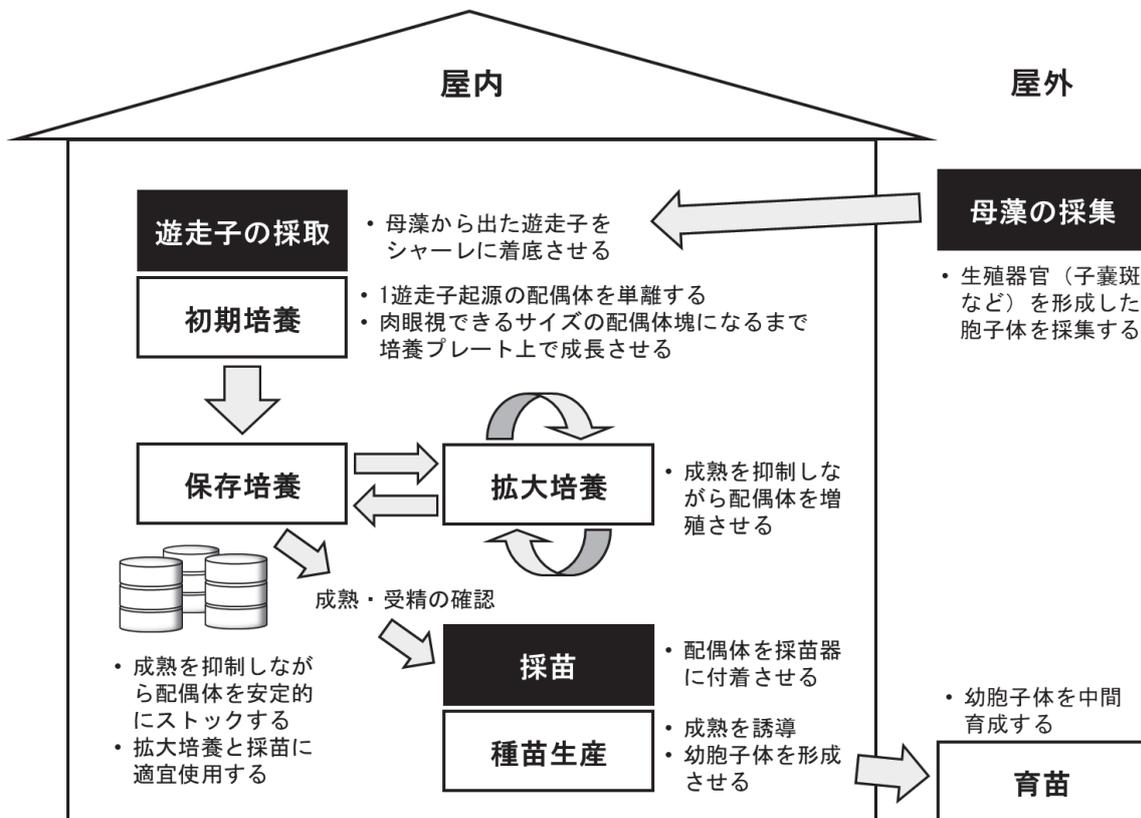


図 1. フリー配偶体培養による海藻生産の工程全体のフロー図

表 1. フリー配偶体培養の各工程に必要な主な設備・消耗品

工程	必要な設備・消耗品	必要数	用途
培養全般	培養庫（人工気象機，恒温室等）	複数（培養規模に依存）	フリー配偶体の培養スペース
	白色LED照明	複数（培養規模に依存）	培養の光源
	電源タイマー	複数（培養規模に依存）	照明の明暗周期制御
	小型吸引ポンプ	1	滅菌海水の作成
	* ボトルトップ式滅菌フィルター （孔径 0.22 μ m）		滅菌海水の作成
	ガラス製メデイウム瓶（容量 2～5L）	複数（培養規模に依存）	滅菌海水の作成，保存
	* 試薬一式	必要量	PESI培地の調製（Tatewaki 1966）
	実体・倒立顕微鏡	各 1	遊走子・配偶体の観察，単離
	高圧蒸気滅菌器	1	培養器具の滅菌
	* シリコン製チューブ（内径 4mm，外径 6mm）		配偶体の単離，拡大培養時の通気
* ガラス製パストゥールピペット		配偶体の単離，拡大培養時の通気	
遊走子採取 ～初期培養	* 滅菌培養プレート（24穴）		初期培養
	* PET製プレート用シール		初期培養時の揮発防止
保存培養 ～拡大培養	* 細胞培養フラスコ（容量 50～200mL）		保存培養容器
	* PET製シュガーボトル（容量 350mL） またはガラス製三角フラスコ （容量 300～500mL）	複数（培養規模に依存）	拡大培養容器
	エアープンプまたはブロワー	複数（培養規模に依存）	拡大培養時の通気
採苗 ～種苗生産	* ステンレス製バット網		採苗器の本体
	* クレモナ製撚糸（直径 2mm）		採苗器に巻き付ける種糸
	ハンディガスバーナー	1	種糸の毛羽除去
	ミキサー	1	配偶体の細断
	* 刷毛		塗布法（棚田ら 2015）による採苗
	水槽 または* ポリ塩化ビニル製ボトル （容量 3L）	複数（培養規模に依存）	種苗生産容器

消耗品には*を付し，必要数は割愛した。

とが望ましい。本報の実験においては，単独で気温と光量の時間制御が可能大型人工気象機（MIR-254-PJ，PHCBI社製）や小型人工気象機（LH-60LF3-DT，ヤガミ社製）の他，広いスペースを要する拡大培養や種糸生産の段階では恒温室（グロースキャビネット，小糸工業株式会社製）も用いた。本報の試験での大型人工気象機や恒温室においては，電源タイマーと白色LED（NLM10SG，日機社製）を増設または設置することにより光量の調節と明暗周期制御を行った。光量の尺度として光合成有効量子束密度PPFD[$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]を小型光量子計（MQ-200，Apogee社製）により測定した。

採苗と種苗生産に用いる採苗器の構造は二羽（2015）におけるワカメの種苗生産事例を参考にした。採苗器の本体（枠）には洗浄・高温滅菌したステンレス網（18-8角バットアミ 18枚取，シンドー社製，横 230mm×縦 170mm）を，採苗器に巻き付ける種糸の素材にはクレモナ製の直径 1.5mmの撚糸（クレモナより糸 10号，まつ

うら工業社製）をそれぞれ用いた。まず撚糸表面の油脂成分を除去するため，紙管に巻かれた状態のままの撚糸を，水道水を沸騰させた鍋に入れて 20分間煮沸し，さらに 20分おきに湯を交換しながら合計 1時間煮沸した。煮沸後の撚糸は紙管ごと 60 $^{\circ}$ Cに設定した乾燥機（WF0-520，EYELA社製）に入れ，1日以上かけて完全に乾燥させた。その後，撚糸の先端をステンレス網の端に固定し，撚糸を紙管から外しながら，横向きに 63往復，およそ 29m分を巻き付けた。さらに，ハンディガスバーナー（GT-3000S，スタイル社製）を用いてステンレス網に巻き付けた撚糸の表面を軽く炙り，表面の毛羽を除去した。こうして種苗生産に使用する採苗器を計 5枚，種糸長にして 145m分作成した。

一般的な海藻の培養培地の一つである PESI（Provasoli's Enriched Seawater with Iodine，Tatewaki 1966）の原液は，配偶体の成熟を誘導するキレート鉄成分を含む。本報のアラメのフリー配偶体培養のうち，特に成熟を抑制する

必要がある保存培養と拡大培養では、鉄成分を含まない培養液を用いることとした。過去に鉄成分によるコンブ目褐藻類の配偶体の成熟への影響を調べた報告では、鉄成分を含まない培地として $ASP_{12}NTA$ 培地 (Provasoli 1963) が使用された例が多かったが (e. g. Motomura and Sakai 1981, 植木ら 2011), 本培養試験では鉄以外の含有成分の量を統一するため、鉄成分を含む通常のPESI (以降Std-PESIと呼ぶ) および鉄成分を含まない改変PESI (以降Mod-PESIと呼ぶ) をそれぞれ調製して使い分けた。Mod-PESI原液は、Std-PESI原液の調製工程 (Tatewaki 1966) においてFe Stock Solutionおよび $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (PII Metal Mix中) を加える操作を省くことにより作成した。調製したStd-PESIおよびMod-PESIの原液は冷蔵庫で保管し、適宜滅菌海水で希釈して培地として使用した。PESI培地の希釈率は滅菌海水 1Lに対して原液 20mLであるが、ワカメでの種苗生産の事例 (棚田 2015, 多田・棚田 2022) と比較すると必要な窒素濃度よりも高い可能性が考えられた。このため、液量が少なく栄養が枯渇しやすい培養プレートでの培養を除き、通常の50%, すなわち滅菌海水 1Lに対して原液 10mLの割合で希釈することとした。本報では、相模湾沿岸表層から揚水ポンプでくみ上げられた海水 (砂濾過済み) を、吸引ポンプ (CAS-1, アズワン社製) に連結したボトルトップ式滅菌フィルター (孔径 $0.22\mu m$) で濾過して得た滅菌海水をガラス製メEDIUM瓶内で保存し、培地の調製やその他作業に用いた。

フリー配偶体の作成と培養

フリー配偶体を作る (遊走子の採取と初期培養) アラムのフリー配偶体作成方法の例として、2021年に実施した遊走子の採取とその後の培養の手順について記載する。母藻として、2021年6月に千葉県富津市竹岡漁港西側の水深約3mの岩礁帯で採取した天然のアラム胞子体6個体を、神奈川県横須賀市西部の屋外水槽 (コンクリート製、縦2m、幅1.5m、深さ1.2m) で約5か月間養生したものをを用いた。養生期間中は胞子体の付着器部分を綿紐と結束バンドでレンガに固定し、茎部が垂直の姿勢となるよう水槽の底に設置した。水槽には砂濾過海水を約360L/分の流量でかけ流すとともに、遮光のため水槽上面をポリエステル製シート (寒冷紗黒・遮光率50%, 渡辺泰社製) で被覆した。夏季の水槽内の水温は最高約 $26^{\circ}C$ に達したが、10月中旬以降は $22^{\circ}C$ を下回った。水温が $20^{\circ}C$ 以下に低下した2021年11月、水槽内の胞子体1個体から、子嚢斑を形成した側葉を1枚採取した。採取直後の海水で湿った状態の側葉を、葉の部分が重なり合わないようジップ式のポリ袋に入れ、常温 (気温約 $18^{\circ}C$) ・暗所で実験室に運搬した。

採取から約3時間後、実験室に持ち帰った側葉から子嚢斑の部分のみをハサミで切り取り、子嚢斑部分の切片

を得た。切りだした切片の両面を蒸留水で軽く湿らせたペーパーワイプで優しく拭いた後、ピンセットでビーカー内の滅菌海水に入れてかき混ぜるようにして洗浄した。ペーパーワイプと滅菌海水を交換してこの洗浄作業を2度行い、切片表面の珪藻や微生物を除去した。この後、切片をタオルペーパーに乗せて30分ほど気温 $20^{\circ}C$ の屋内で陰干しした (写真1a)。

新しい滅菌海水を満たしたデイスポシャーレ (直径90mm、深さ20mm) に洗浄した切片を入れた。光刺激により遊走子の放出を促すため、実体顕微鏡のステージ上でLEDスポットライトを至近距離から当てたところ、数分後には海水中を動き回る白い粒子が大量に観察され、遊走子が放出されたことが確認された (写真1b)。遊走子の放出確認後、マイクロピペットでビーカー内の海水をごく少量 ($200\mu L$ 以内) 吸い取り、培養液 (50%Std-PESI) を7割ほど満たしたデイスポシャーレ (直径90mm、深さ20mm) に滴下した。この時、葉の組織やゴミが混入しないよう、切片の表面付近に触れずに水面近くから静かに吸い取るようにした。遊走子液を滴下

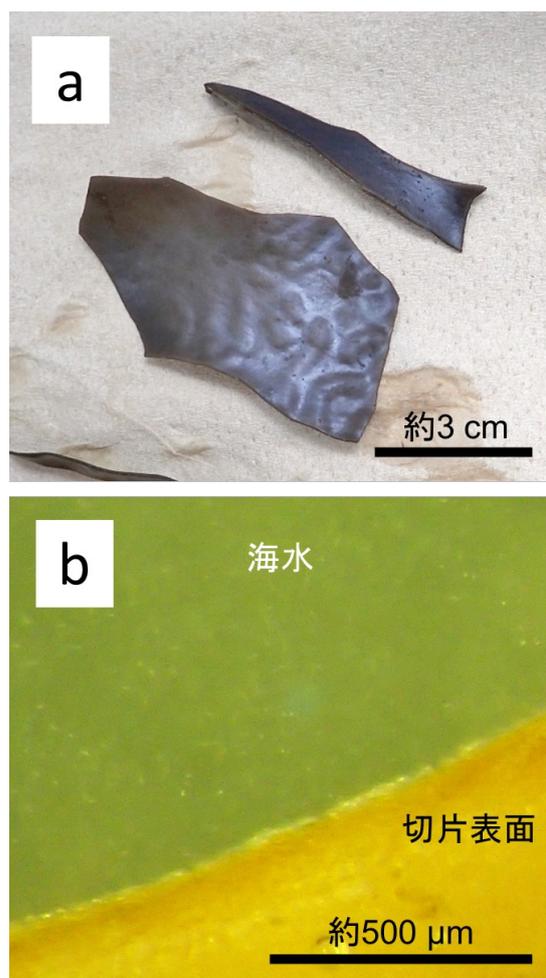


写真1. 遊走子採取時の様子

陰干し中のアラム子嚢斑の切片 (a), 実体顕微鏡で観察した遊走子放出中の切片表面 (b)。海水中に多数ある微小な白い点が放出された遊走子。

したシャーレに透明な蓋を被せ、遊走子の密度が均一になるよう水平方向に振盪した後、20°C、明暗周期12h/12h、PPFD約30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ に設定した大型人工気象機内に移して初期培養を開始した。この時シャーレに入れた遊走子の量が多すぎると、この後の雌雄の単離作業が困難になるため、滴下する液量を段階的に変えた複数のシャーレを作成しておくことが望ましい(二羽2015)。滴下する液量は使用するシャーレの大きさや液中の遊走子濃度にもよるが、本試験と同様の材料を用いた場合には10~200 μL 程度の範囲で5段階ほど作成すれば十分である。

初期培養開始後1日でシャーレ底面に着底した遊走子が発芽し、配偶体が形成された。8日が経過すると雌性配偶体は1~2細胞、雄性配偶体は6~8細胞程度に成長し、1細胞当りのサイズと全体の形態から雌雄の判別が可能となったので(写真2a)、1遊走子起源の配偶体の単離を実施した。単離作業はワカメにおける手法(團2000)を参考に行った。全長144mmのガラス製パストールピペットの先端を熱して細く引き延ばし(先端の内径およそ200 μm)、太い側に長さ約50cmのシリコン製チューブ(内径4mm、外径6mm)を連結した吸引器具を用意した。この器具のチューブ先端を口にくわえ、倒立顕微鏡でシャーレ上を観察しながら、器具の先端で1遊走子起源の配偶体をシャーレ表面から1つずつ剥離し、口で軽く吸い込むことで単離した。単離した配偶体は、Std-PESI培地を満たした滅菌培養プレート(24穴)のウェル内に1株ずつ移した。雌雄のコンタミネーションによる受精を避けるため、雌雄の配偶体はそれぞれ別の培養プレートに収容した。この培養プレート(雌雄各1枚)を20°C、明暗周期12h/12h、PPFD約20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の人工気象機内で静置培養したところ、約2ヶ月後には雌雄の配偶体はともに肉眼視可能な大きさ(直径0.5mm程度)の塊に成長した(写真2b)。通常はこのまま静置培養を続けて配偶体の栄養成長を待つが、今回は配偶体の栄養成長を促進するため、人工気象機内に設置した振盪機(SK-O180-S, DLAB scientific社製)の台上に培養プレ

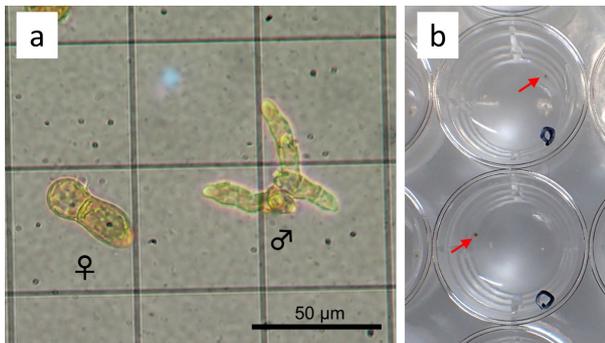


写真2. 初期培養中のアラメ雌雄性配偶体雌雄の判別が可能になった配偶体(a)、培養プレートのウェル内で成長した雄の配偶体塊(b)。

トを載せ、60rpmで水平振盪しながら培養を続けた。その結果、さらに約2ヶ月後に配偶体塊は直径2mm程度に成長した。

フリー配偶体を保存する、増やす(保存培養と拡大培養)

2022年3月、上述の配偶体塊を培養プレートのウェルから滅菌済ピンセットで取り出し、50%Mod-PESI培養液を満たした細胞培養フラスコ(ポリスチレン製、スクリューキャップ式、容量約70mL)に移し、培養庫内に静置して保存培養を開始した(20°C、明暗周期12h/12h、PPFD約5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。保存培養は配偶体を長期的に維持することが目的のため、配偶体の増殖や成熟を抑制し、栄養要求量を低下させるために低い光量で培養するのが適切である。光量の調節は、照明から距離を離す他、必要に応じて白いペーパータオルを被せることで行った。以降、保存株を長期的に維持する場合、細胞培養フラスコ内の培養液はおよそ半年に一回の頻度で交換することが望ましい。

ここから、細胞培養フラスコ内で保存培養中の雌雄の配偶体を用いて、フリー配偶体の拡大培養を行った。2022年6月、初期~保存培養において状態の良好だった株(成熟の進行や配偶体の色抜けなどが無いもの)を選び、ピンセットを用いて配偶体塊の一部を少量(直径1mm程度)取り出した。これをシャーレ上で数片に分割した後、50%Mod-PESIを満たした拡大培養容器に収容し、通気培養を開始した。拡大培養容器として、穴開きシリコン栓をかぶせたガラス製三角フラスコ(容量300mLまたは500mL)およびPET製シュガーボトル(容量350mL、家庭用塩素系漂白剤により簡易的な殺菌処理済み)を用いた(写真3a)。後者のボトルは上部からパストールピペットが挿入でき、縦長で通気時に培養液全体がよく攪拌される形状から採用した。空気の供給には小型のエアーポンプ(テトラCA-60、スペクトラムブランドジャパン社製)またはブローワー(AP-40P、安永エアポンプ社製)を用いた。これらの機器からシリコンまたは塩化ビニル製チューブ(内径4mm、外径6mm)を伸ばし、先端に全長230mmのガラス製パストールピペットを繋いだものを拡大培養容器に挿入し、配偶体塊が常にゆっくりと容器内で動き続ける程度の流量になるようチューブの途中に取り付けたバルブで調節しながら通気した。拡大培養容器は恒温室の棚または小型恒温室内に設置し、それぞれ20°C、明暗周期12h/12h、PPFD約20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の条件で培養を開始した。拡大培養中、培養液の蒸発により液量が減少していた際には開始時の水面の高さまで蒸留水を加えて希釈した。培養液は3~4週に1回の頻度で容器とともに全量を交換した。拡大培養容器中の配偶体塊のうち直径2mmを超える大きなものについては、培養液交換時にピンセットで数片に分割するとともに、適宜容器の数を増やして過密にならないよう拡大培養を続けた。また、成長・増殖した配偶体

塊の一部を細胞培養フラスコに移し、随時保存培養株のストックを増やしていった。拡大培養容器内の側面や底面に配偶体塊が付着していた場合には、容器ごと超音波洗浄機に入れて5～10分間洗浄するか、セルスクレーパーで直接擦り落とすことにより配偶体塊を遊離させた。拡大培養中に雌雄性配偶体の成熟や胞子体の形成などは見られず、配偶体の栄養成長が順調に進行した(写真3b)。拡大培養開始から約2ヶ月後には直径約2mmの配偶体塊の保存培養株が雌雄それぞれ50個以上得られた。保存培養中の配偶体においても、雌雄ともに生殖器官の形成は見られなかった。

なお、鉄成分を含有することが記載されている市販の海藻培養用の培養液を用いて行った拡大培養の予備試験(培養液以外の条件は上記の拡大培養本試験と同様)においては、開始直後から配偶体の成熟が進行し、胞子体形成も多く見られ(写真3c)、結果として配偶体が増殖しにくくなった。

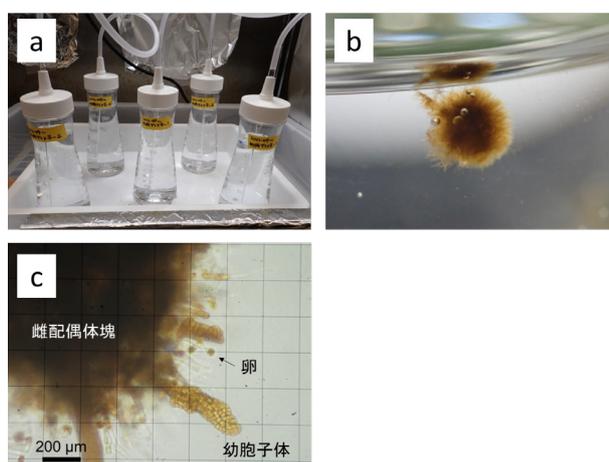


写真3. アラメのフリー配偶体拡大培養の様子

シュガーボトルを用いた拡大培養の様子(a)、拡大培養により直径2mm程度に成長した雌性配偶体塊(b)、拡大培養予備試験において卵・胞子体形成が見られた雌性配偶体塊(c)。

フリー配偶体からの種苗生産

成熟・受精の確認試験 採苗に先立って、雌雄性配偶体の成熟と受精の確認試験を行った。雌雄の配偶体保存培養株のうち特に状態が良好な株を1個ずつ選抜し、直径2mm程度の配偶体塊2個ずつ(成熟と受精が確認できれば良いため、この程度の少量で良い)を取り出した。鉄成分の添加と光量の上昇、温度の低下によって成熟誘導を行うため、それぞれの配偶体塊を50%Std-PESIを満たした新たな細胞培養フラスコ内に移し、15°C、PPFD約 $30\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (明暗周期12h/12h)に設定した人工気象機内に設置した。なお、ワカメのフリー配偶体による種苗生産では成熟誘導のため明暗周期を短日条件とすることがあるが(團2000, 棚田ら2015)、カジメやアラメの

配偶体では中日・長日条件でも高い割合で成熟することが知られることから(太田1988, 松井ら1992, 田中ら2008, 馬場2010, 村瀬ら2014)、短日条件は用いなかった。成熟誘導開始から7日後には雌雄ともに成熟が進行していた。雌では配偶体の先端部が太く膨らみ、これらは造卵器と考えられ、一部ですでに卵の形成も見られた(写真4a)。一方、雄では細長く伸びた配偶体上に細かい枝分かれが密集した節が多数形成され、これらは造精器と判断された(写真4b)。

続いて受精能の確認のため、雌雄の配偶体塊を約100mLの50%Std-PESIとともに家庭用ミキサー(IFM-C20G, イワタニ社製)に入れ細断・混合し、5細胞程度の長さの断片に細断された配偶体を含む溶液を得た。これを2mL程度ピペットで吸い取り、50%Std-PESIを満たしたデイスチャーレ(直径90mm, 深さ20mm)に移した。チャーレ裏面中央には2cm四方の透明方眼紙(目盛1mm)を貼り付けた。このチャーレ内の配偶体断片について、5～8日間隔で経過観察を行いながら、上記と同条件で約3週間にわたり培養を続けた。培養液は細断から17日後(成熟誘導開始から24日経過後)に一度交換した。方眼の2×2目盛(4mm²)を1区画として、

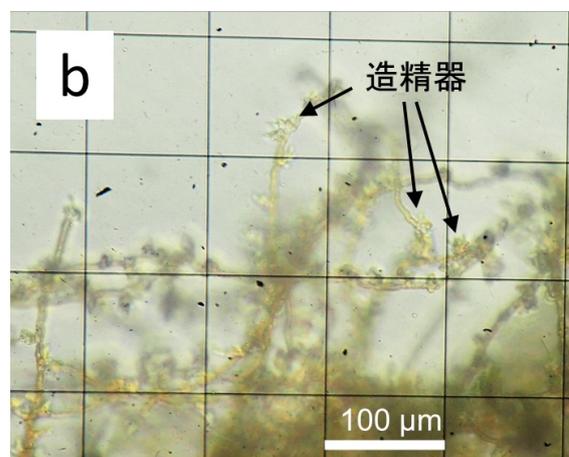
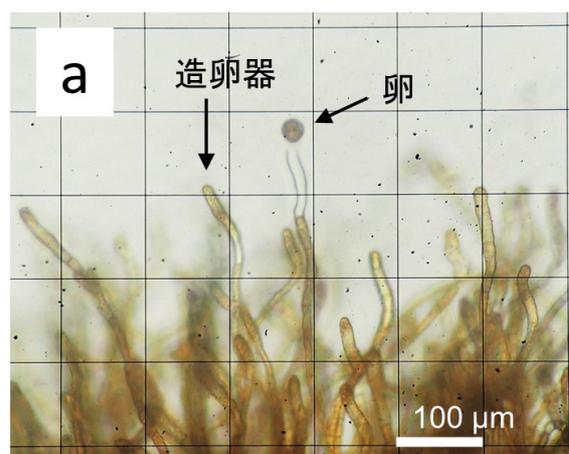


写真4. 成熟確認試験において生殖器官を形成したアラメ雌雄性配偶体(2022年7月)

造卵器および卵を形成した雌性配偶体(a)、造精器を形成した雄性配偶体(b)。

毎回の観察時に10区画ずつを無作為に選定し、区画内の配偶体断片数、卵と幼胞子体の数および幼胞子体サイズのデータを取得した。選定した全ての区画において、雌雄の配偶体はそれぞれ1断片以上存在していた。芽胞体については幼胞子体に含めた。計数した全ての雌の配偶体断片のうち卵または幼胞子体の形成が見られたものの割合を雌の成熟率とした。雄については、確認に要する時間の制限から、10区画のうち造精器形成済みの雄性配偶体が存在した区画の割合を雄の成熟率とした。卵と胞子体の形成数の尺度として、10区画内で観察された卵および幼胞子体の断片数を雌性配偶体断片数で除し、雌性配偶体1断片当りの平均形成数を算出した。幼胞子体のサイズ計測には接眼レンズ内のスケールを用いた。雄の成熟率は、成熟誘導開始から12日後には100%に達した(図2a)。雌の成熟率は期間中少しずつ上昇し、成熟誘導開始から32日後にはほぼ100%となった(図2a)。雌の成熟率の上昇とともに卵および幼胞子体も数を増やし、最終的には雌性配偶体1断片当りの卵・幼胞子体の形成数が平均3.3個となった(図2b)。この時の幼胞子体の葉長は最大1,800 μm 、平均398.9 μm

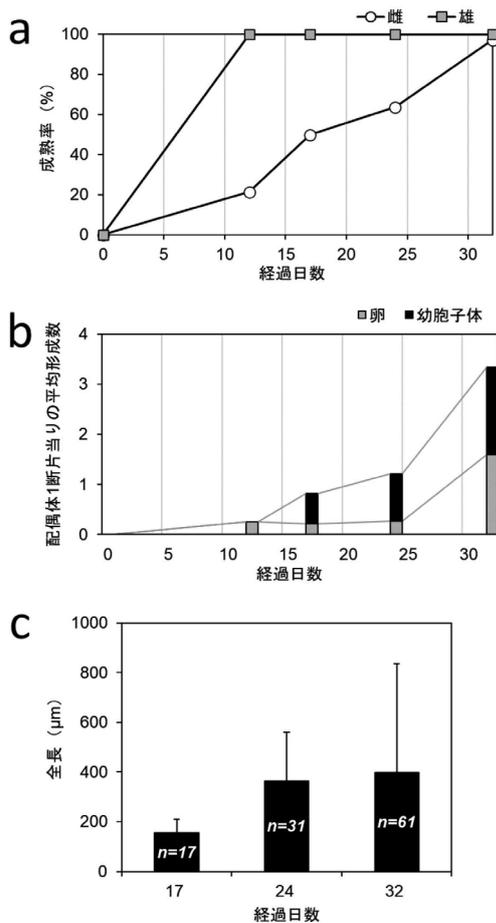


図2. アラメフリー配偶体の成熟・受精確認試験の結果

雌および雄の配偶体成熟率の推移 (a)、雌性配偶体における卵および胞子体の形成率の推移 (b)、幼胞子体の全長の推移 (c)。経過日数は成熟誘導開始時を0日として起算。全長のエラーバーは標準偏差を示す。

(SD437.1)であった(図2c)。一方、成熟誘導開始から32日後の雄性配偶体では精子の放出を終了したと見られる透明になった造精器が多く観察された。

採苗と種苗生産 2022年9月、上述の試験で順調な成熟・受精が確認された雌雄の保存株を用いて、培養条件の変更(鉄成分の添加、光量の上昇および温度の低下)による採苗に向けた成熟の誘導を開始した。これらの株の細胞培養フラスコ内の培養液を50%Std-PESIに交換し、15°C、明暗周期12h/12h、PPFDを約40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ に設定した人工気象機内に移したところ、9日後には雌雄ともに順調に成熟が進行していた。成熟が確認できたため、棚田ら(2015)の塗布法を参考に、下記手順にて採苗を実施した。採苗に用いる配偶体塊の量の目安として、雌は採苗器1個(種糸約30m)につき直径3mm程度であれば2~3個程度とし、雄はそれと同量から半分程度の体積でよい。本試験では、雌の配偶体塊(直径約3mm、計13個)と雄の配偶体塊(直径約4mm、計3個)を用い、約100mLの50%Std-PESIとともに上述のミキサーに入れ細断・混合した。配偶体塊が5細胞程度の断片に細断されたことを確認した後、50%Std-PESIで希釈し、約200mLの配偶体液を得た。採苗器をステンレス製のバットに乗せ、熱湯殺菌した刷毛を用いて採苗器両面の糸に配偶体液を塗り込んだ。種糸上の配偶体の密度が均一になるよう、計5枚の採苗器に同じ方法で配偶体液を塗布した。塗布後、50%Std-PESIを満たした透明アクリル製の薄型水槽(内寸横250mm、縦200mm、奥行40mm、HOGA社製)5基の中に、配偶体を付着させた採苗器を1枚ずつ横向きに立てかけて収容した。この水槽を15°C、明暗周期12h/12h、PPFD約50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (水槽の中心部分で計測)に設定した恒温槽の棚上に並び、拡大培養と同様の機材・方法により通気培養した(写真5a)。培養中はおよそ2週間に一度の頻度で培養液を全量交換した。通気量は、配偶体の脱落を防ぐために開始直後はやや弱め(拡大培養と同程度)とし、その後水槽全体に水流が生じる程度に強めた。これと並行し、50%Std-PESIを満たしたディスプレイ(直径90mm、深さ20mm)に配偶体液を少量添加したものを水槽と同じ培養条件(ただし通気は無し)に置き、経過観察を行った。なお、種苗生産中に採苗器を収容する培養容器として、ポリ塩化ビニル製ボトルを用いた手法や(棚田ら2015)、大型の水槽に複数の採苗器を収容する方法(二羽2016)も提案されているが、今回は観察の簡便さと光環境・水流環境の統一性を重視し、上記の薄型水槽を用いることとした。

採苗から11日後(成熟誘導開始から21日後)、観察用シャーレ上を倒立顕微鏡で観察したところ、芽胞体および幼胞子体の形成が確認された。この時、水槽内の種糸表面は全体的に白く、幼胞子体のような粒子は肉眼で観察できなかった。採苗から25日後(成熟誘導開始か



写真 5. 恒温室での種苗生産の様子とアラム種苗の状態
 アクリル水槽を用いた種苗生産の様子 (a)、成熟誘導開始から 35 日後の種糸の拡大 (b)、50 日後の種糸の拡大 (c) および採苗器全体 (d)、71 日後の種糸の拡大 (e) および採苗器全体 (f)。d, f の採苗器右端は通気の泡が直接当たっていたため着生が疎らとなっている。

ら 35 日後)、種糸の表面に微小な幼胞子体が多数形成されているのが肉眼で観察された (写真 5b)。さらに 15 日後 (成熟誘導開始から 50 日後) の 10 月 26 日には胞子体の多くは葉長 3~4mm 程度まで成長した (写真 5c)。肉眼視可能な胞子体の着生密度は種糸 5cm 当り 20 株程度となり、通気の泡が直接当たっていた部分を除いて、採苗器のほぼ全体に満遍なく着生が見られた (写真 5d)。このように、成熟を誘導したフリー配偶体を屋内で培養することにより、胞子体が高い密度で着生したアラム種苗を 145m 分生産することができた。この時点で、すでに種苗は育苗開始に適した状態と考えられたが、育苗現場 (神奈川県横須賀市西部の屋外水槽) の水温が 22°C 以上とまだ高かったことから、ある程度水温が低下するまで屋内での培養を続けることにした。成熟誘導開始から 63 日後には胞子体の葉長は最大 8mm 程度まで成長したが、やや葉状部の色が薄くなり始め、71 日後にはさらに色抜けが進行するとともに脱落した葉状部も多数見られた (写真 5e)。育苗開始時の急激な経験水温の変化によるショックを避けるため、11 月 14 日~15 日に恒温庫の設定温度を 15°C から半日に 0.5°C ずつ上昇し、17°C とした。

屋外水槽での育苗 育苗水槽内の水温が約 20°C となった 11 月 29 日、採苗器 1 個分 (写真 5c-e で示したもの) の種糸を、育苗枠に間隔を空けて横方向に巻き直し、屋

外水槽に係留して育苗試験を開始した。育苗枠として PE コーティングされた鉄製の網状パネル (ワイヤーネット横 62cm × 縦 29.5cm, ダイソー社製) を用いた。育苗水槽には半円柱状 FRP 製水槽 (容積約 280L, 藤山化成製) を用い、約 4L/分の流量で砂濾過海水をかけ流すとともに、水槽底面からのエアレーションで水流を循環させた。水槽上面にはポリエチレン製シート (ダイオクールホワイト遮光率約 65%, イノベックス社製) を二重に被せて遮光した。水槽内には水温データロガー (Tidbit-V2, HOBO 社製) を設置し、10 分間隔で水温を測定・記録した。育苗開始時には、葉状部の脱落により幼胞子体の密度は大幅に低下しており、開始から 1 か月以上が経過した翌年 1 月前半まではその状態が続いた (写真 6a)。しかし、1 月後半以降、幼胞子体の密度とサイズが急激に大きくなり (写真 6b)、育苗開始から 3 ヶ月弱が経過した 2 月 20 日には胞子体で種糸の大部分が覆われた (写真 6c)。2 月 20 日時点での胞子体の葉長は、ばらつきが大きいものの、多くは 5~15cm の範囲であり、おおよそ冲出しに適当なサイズと考えられた (田井野 2009)。この時の胞子体の着生密度は種糸 5cm 当り平均 3 株ほど

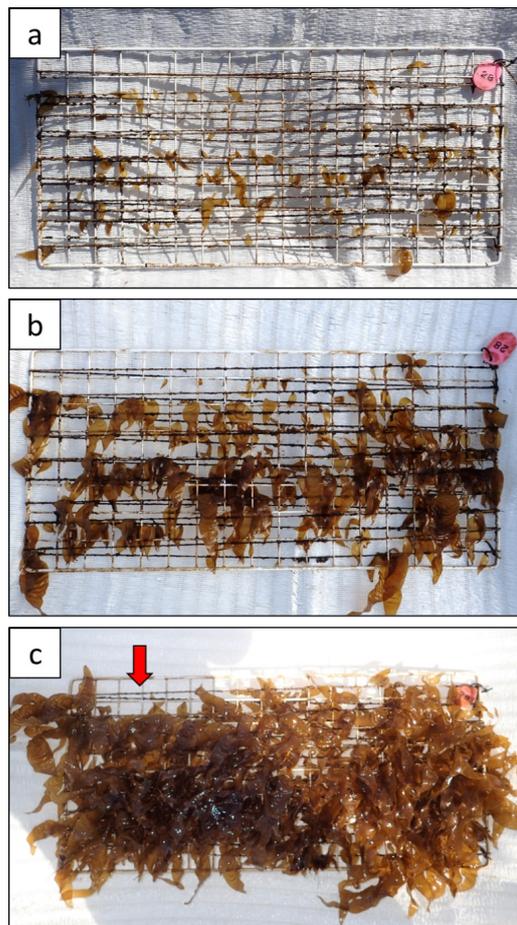


写真 6. 育苗期間におけるアラム種苗の状態
 育苗開始から 37 日後 (a, 2023 年 1 月 5 日)、58 日後 (b, 同年 1 月 26 日) および 83 日後 (c, 同年 2 月 20 日) の育苗枠。c の赤矢印は胞子体の着生が少ない部分を示す。

だったが、胞子体がほとんど生えていない部分も存在し（写真 6c）、歩留まり（種糸全体のうち葉長 10cm 前後の胞子体が密に着生し、沖出し種苗として使用できると考えられる部分の割合）はおよそ 7 割程度と見積もられた。育苗期間中の日平均水温の推移を見ると（図 3）、育苗開始時に約 20°C あった日平均水温は、12 月に入って低下を続け、同月末には 14°C を下回ったが、翌年 1 月の前半に再び約 16°C まで上昇した。その後、1 月後半から 2 月 20 日までの期間の水温は、変動しながらもおよそ 15°C を下回っており、この期間に低水温が持続したことで急激な胞子体の密度の上昇と成長が生じたと推測された。

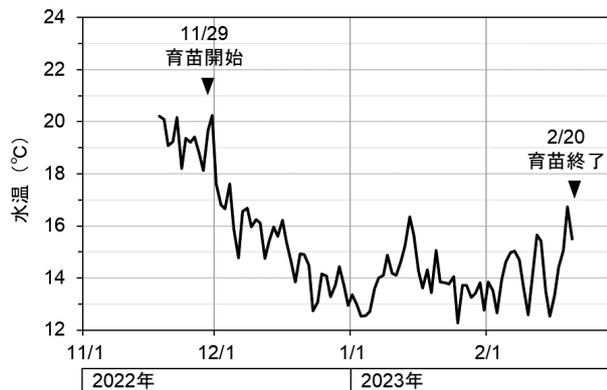


図 3. 育苗期間中の屋外水槽内の日平均水温の推移

まとめ：アラメ種苗生産の事例から

本報ではフリー配偶体培養技術を用いたアラメの種苗生産の事例を紹介しながら、一連の培養工程の具体的方法について解説した。今回示した拡大培養の結果では、開始から約 2 ヶ月という短期間で種苗生産をする上で十分な量の配偶体を得ることができた。配偶体が生殖器官を形成すると栄養成長が抑制されるため（太田 1988）、拡大培養時に鉄成分を含有しない培養液を用いて成熟を抑えたことにより、配偶体の効率的な栄養成長を促すことができたものと考えられる。同様に、保存培養においても鉄成分欠乏状態に置くことにより配偶体の成熟を抑えることができた。これまで配偶体の成熟を抑制する上で一般的だった温度管理による方法では、特に大規模生産では多少の温度の上下動が避けられないことに加え、海藻の産地によって成熟に対する温度特性が異なる可能性もあることから（田中ら 2008）、長期間にわたり完全に成熟を防ぐことは困難と考えられる。本報告では比較的短い期間の保存培養を経た種苗生産において鉄成分を含まない培養液を用いた成熟抑制が有効であることを示したが、試行段階では同様の手法で保存した配偶体を用いて 1 年後も問題なく種苗生産できていることから、より長期間保存できる可能性もある。本手法により長期間に渡るフリー配偶体の保存が可能となれば、安定的な種

苗生産を達成する上で簡便かつ有効な手段となるため、今後検証を行う必要がある。

また、拡大培養・保存培養の工程で鉄欠乏状態に置いて成熟を抑えていた配偶体であっても、培養条件を変えて成熟を誘導することで直ちに種苗生産に使用可能であることが確認された。成熟確認試験において、雌雄の成熟の進行過程は過去の報告値と比較しても順調であり（馬場 2010, 村瀬ら 2014）、最終的にはいずれの成熟率もほぼ 100% に達した。また、雌性配偶体 1 断片当りの卵および幼胞子体の平均形成数も 3.3 と高く、フリー配偶体として拡大・保存培養を経たものでありながら極めて良好な成熟と受精が達成された。この要因として、鉄成分の欠乏により成熟が抑制されていた配偶体に対して、低温・高光量という一般的な成熟誘導時の培養条件に加えて鉄成分の添加を同時に行ったことが効果的な成熟トリガーとなり、その後の高い成熟率と卵形成率に繋がった可能性がある。また、成熟誘導開始から 32 日が経過した時点で新たな卵や初期の幼胞子体の形成は続いていた一方で、雄性配偶体ではすでに精子の放出を終了した造精器が多く見られたことから、アラメでは成熟開始から 1 ヶ月程度の期間内の受精の成功の可否が最終的な種苗の胞子体密度に大きく影響するものと考えられた。今回の種苗生産において、初めて肉眼で幼胞子体を確認された日および葉長 3~4mm 程度のアラメ種苗が見られた日は成熟誘導開始から数えてそれぞれ 35 日後と 50 日後であり、ワカメの種苗生産における報告（棚田ら 2015, 二羽 2016）と比較するとやや長い時間を要した。多年生のアラメやカジメの幼胞子体の成長速度は一年生のワカメと比較すると遅い傾向にあり（Endo *et al.* 2017, Gao *et al.* 2013, Gao *et al.* 2016）、種苗生産に要した時間にもこの成長速度の差が影響したものと考えられる。なお、今回は 50%Std-PESI を用いて種苗生産に成功したが、最適な培地濃度については今後さらなる検証が望まれる。

種苗生産の工程の後、育苗開始までの期間において幼胞子体の色抜け・葉状部の脱落が生じた。これは、育苗の開始を待つ間に小型の水槽内での培養を長期間続けたことによって生じた生理障害と推察された。これに関して、二羽（2016）のように水量の多い大型水槽を用いて種苗生産を行うことでリスクを低減させることができるかもしれないが、その場合には光や水流の採苗器への当たり方にムラが生じないように注意する必要がある。その後、種糸上の胞子体の着生密度は、育苗を経てやや回復した。これは、脱落を免れた微視的サイズの幼胞子体が、育苗期間中に肉眼視可能なサイズに成長したためと考えられた。しかし、これらの微小な幼胞子体が沖出しに適したサイズと密度に達するまでには 2 ヶ月以上の時間を要した。また、部分的に胞子体の着生が少ない箇所も見られ、種苗全体の歩留まりは 7 割程度となった。これらのことから、胞子体の着生密度を全体的に高い状態に保

ちつつ早期の海域への移植を実現するため、幼孢子体が葉長 5mm 程度に成長した段階で速やかに育苗の工程に移ることが望ましいと考えられた。フリー配偶体培養による種苗生産は、開始時期の調整ができるうえ 1 シーズンに複数回の生産を行えるため、従来の種苗生産手法と比べて環境変化に対して頑健と言える。しかしながら、種苗生産後に屋外で育苗を開始する時期に関しては、依然として海域や水槽の設置場所の環境に大きく左右されることになる。黒潮流域の冬季の水温は深層からの栄養塩供給とも密接な関係が見られ (Aoki *et al.* 2022)、育苗の開始が早すぎた場合には、高水温による直接の生理的影響だけでなく栄養塩不足による色抜け・枯死等も懸念される。今回の育苗における孢子体の成長を見ても、水温が高い期間は停滞しており、水温が継続的に 15°C を下回るようになった 1 月後半以降に急激に成長していた。1 月前半に観測された水温の上昇は、大蛇行中の黒潮からの暖水波及の影響と考えられた (静岡県水産・海洋技術研究所 2023)。したがって、温暖化や黒潮大蛇行の影響で冬季水温が高い年が増加している昨今の我が国温帯域では、育苗に適した時期の遅れや短期化により、種苗の品質低下や沖出し時期の遅延等のリスクが高まっていると考えられる。今後はより高い品質・歩留まりの種苗をより早い時期に沖出しに供給できるようにするため、屋内での一次育苗の導入や、外海よりも低水温となる内湾域の育苗場としての利用など、育苗方法の検討を進める必要がある。

これまでの海藻のフリー配偶体培養技術の利用は、主に食用海藻の養殖での種苗生産に限られてきた。しかし、近年では深刻化する磯焼けの問題に加え、ブルーカーボンの創出や化石燃料の代替資源としての利用可能性などから、非食用海藻についても大規模な種苗生産・養殖の需要が急速に高まっている。実際に、欧州においては食用以外の利用も視野に入れたカラフトコンブ *Saccharina latissima* の大規模沖合養殖の取り組みが進められている (Buck and Grote 2018)。一方で我が国温帯域においては、天然のブルーカーボンとしての藻場が大きく減少しているにも関わらず、欧州のような大規模な取り組みはほとんど進んでいないのが現状である。ここで、本報で示した培養手法はこうした大規模な養殖生産の上での重要な足掛かりとなりうる。さらに、温帯性多年生コンブ目褐藻類の種苗生産技術は、コンブ類の大規模沖合養殖とは異なり、沿岸域で深刻化する磯焼け対策や磯根資源の回復に向けた藻場造成に繋がるポテンシャルを有する点でも重要である。対象種や実施海域により配偶体の成熟条件等が多少異なる可能性については注意を要するものの、本報と同様の工程で神奈川県産カジメの種苗生産が可能であることも確認しており、その他の温帯性多年生コンブ目褐藻類 (サガラメ、クロメ等) においても適用可能と考えられる。本技術が今後、広範な海域・対象種に応じた藻場造成の取り組みや、気候変動の緩和策とし

ての大規模養殖等の進展に寄与することを期待する。

謝 辞

本研究は農林水産技術会議委託プロジェクト研究「ブルーカーボンの評価手法及び効率的藻場形成・拡大技術の開発 (JPJ008722)」(令和 2~6 年度) のもとで行われた。本研究を行うにあたり、神奈川県水産技術センターの木下淳司氏、蓑宮 敦氏、春山出穂氏、加藤充宏氏ならびに相川英明氏、徳島県立農林水産総合技術支援センターの棚田教生氏、吉見圭一郎氏ならびに多田篤司氏、水産研究・教育機構水産大学の阿部真比古氏らには海藻の培養と育苗の技術に関して数々のご助言とご指導をいただきました。また、天羽漁業協同組合代表理事組合長の磯貝秀樹氏ならびに千葉県水産総合研究センター東京湾漁業研究所の石井光廣氏には、アラメ親株の採取時にご協力をいただきました。水産研究・教育機構水産技術研究所の宇野露美氏には、アラメの採苗等の作業でご協力をいただきました。ここに深く御礼申し上げます。

文 献

- 阿知波英明・落合真哉・芝 修一 (2014) 愛知県沿岸におけるサガラメ・カジメ分布面積の変動と衰退要因. 愛知県水産試験場研究報告, 19, 38 - 43.
- Aoki K, Shimizu Y, Yamamoto T, Yokouchi K, Kishi K, Akada H, Kurogi H (2022) Estimation of inward nutrient flux from offshore into semi-enclosed sea (Tokyo Bay, Japan) based on in-situ data. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 274, 107930.
- 馬場将輔 (2009) クロメの配偶体と幼孢子体の生育に及ぼす温度、光量、塩分の影響. *Algal Resources*, 2, 11 - 19.
- 馬場将輔 (2010) 室内培養によるアラメ配偶体と幼孢子体の生育に及ぼす温度と光量の影響. 海洋生物環境研究所研究報告, 13, 75 - 82.
- Bartsch I (2018) Chapter 3: Derivation of clonal stock cultures and hybridization of kelps. in "Protocols for Macroalgae Research" (ed. by Charrier B, Wichard T, Reddy CRK), CRC Press, Boca Raton, pp.61 - 78.
- Buck B, Grote B (2018) Chapter 1: Seaweed in high-energy environments. Protocol to move *Saccharina* cultivation offshore. in "Protocols for macroalgae research" (ed. by Charrier B, Wichard T, Reddy CRK), CRC Press, Boca Raton, pp.3 - 36.
- 團 昭紀 (2000) 新しいワカメの種苗生産マニュアルーフリー配偶体を使った種苗生産ー. 徳島県水産試験場, 徳島. pp.1 - 31.
- 團 昭紀・大野正夫・松岡正義 (2015) 徳島県のワカメとコンブ資源の開発研究の変遷 (総説). 徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究課研究報告, 10, 25 - 48.

- Endo H, Suehiro K, Gao X, Agatsuma Y (2017) Interactive effects of elevated summer temperature, nutrient availability, and irradiance on growth and chemical compositions of juvenile kelp, *Eisenia bicyclis*. *Phycol. Res.*, **65**, 118 - 126.
- Forbord S, Steinhovden KB, Rød KK, Handå A, Skjermo J (2018) Chapter 2: Cultivation protocol for *Saccharina latissima*. in "Protocols for macroalgae research" (ed. by Charrier B, Wichard T, Reddy CRK), CRC Press, Boca Raton, pp.37 - 60.
- 藤田大介 (2002) 磯焼け. 「21世紀初頭の藻学の現況」(堀 輝三・大野正夫・堀口健雄編), 日本藻類学会, 山形, pp.102 - 105.
- Gao X, Endo H, Taniguchi K, Agatsuma Y (2013) Combined effects of seawater temperature and nutrient condition on growth and survival of juvenile sporophytes of the kelp *Undaria pinnatifida* (Laminariales; Phaeophyta) cultivated in northern Honshu, Japan. *J. Appl. Phycol.*, **25**, 269 - 275.
- Gao X, Endo H, Nagaki M, Agatsuma, Y. (2016) Growth and survival of juvenile sporophytes of the kelp *Ecklonia cava* in response to different nitrogen and temperature regimes. *Fish. Sci.*, **82**, 623 - 629.
- 原口展子・山田ちはる・井本善次・大野正夫・平岡雅規 (2006) 高知県萩崎地先におけるホンダワラ群落の構成種. *Bull. Mar. Sci. Fish., Kochi Univ.*, **24**, 1 - 9.
- 林田文郎 (2002) 海中林構成種サガラメの配偶体と芽胞体の生長に及ぼす光量の影響. 東海大学紀要海洋学部, **53**, 125 - 134.
- 林田文郎・平光一洋・村上宗孝 (1999) 海中林構成種サガラメの配偶体と芽胞体の生長に及ぼす水温の影響. 東海大学紀要海洋学部, **47**, 125 - 132.
- 堀 正和・桑江朝比呂 (2017) ブルーカーボン-浅海におけるCO₂隔離・貯留とその活用-. 地人書館, 254p.
- Iwai H, Fukushima M, Motomura T, Kato T, Kosugi C (2015) Effect of iron complexes with seawater extractable organic matter on oogenesis in gametophytes of a brown macroalga (*Saccharina japonica*). *J. Appl. Phycol.*, **27**, 1583 - 1591.
- 河尻正博・佐々木正・影山佳之 (1981) 下田市田牛地先における磯焼け現象とアワビ資源の変動. 静岡県水産試験場研究報告, **15**, 19 - 30.
- Komatsu T, Fukuda M, Mikami A, Mizuno S, Kantachumpoo A, Tanoue H, Kawamiya M (2014) Possible change in distribution of seaweed, *Sargassum horneri*, in northeast Asia under A2 scenario of global warming and consequent effect on some fish. *Mar. Pollut. Bull.*, **85**, 317 - 324.
- Kumagai NH, García MJ, Yamano H, Takao S, Fujii M, Yamanaka Y (2018) Ocean currents and herbivory drive macroalgae-to-coral community shift under climate warming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, 8990 - 8995.
- 倉島 彰・石川達也・竹内大介・岩尾豊紀・前川行幸 (2014) 三重県早田浦の磯焼け海域におけるガンガゼ除去の影響. 日本水産学会誌, **80**, 561 - 571.
- Lewis RJ, Green MK, Afzal ME (2013) Effects of chelated iron on oogenesis and vegetative growth of kelp gametophytes (Phaeophyceae). *Phycol. Res.*, **61**, 46 - 51.
- 松井敏夫・大貝政治・大島芳明・古原和明 (1992) コンブ目植物数種の配偶体の成長・成熟および胞子体 (幼葉) の成長に及ぼす光質・光量の影響. 日本水産学会誌, **58**, 1257 - 1265.
- Matsunaga K, Nigi G, Suzuki Y, Yasui H, Dezin G (1998) Effect of Fulvic Acid-Fe Derived from the Forest on the Growth of *Laminaria religiosa* Miyabe and *Undaria pinnatifida* Suringan. *Bull. Soc. Sea Water Sci. Jpn.*, **52**, 315 - 318.
- 右田清治 (1984) アラメ・カジメ類の属間・種間交雑. 長崎大学水産学部研究報告, **56**, 15 - 20.
- Motomura T, Sakai Y (1981) Effect of chelated iron in culture media on oogenesis in *Laminaria angustata*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1535 - 1540.
- 村瀬 昇・阿部真比古・野田幹雄・須田有輔 (2014) 光質が異なるLED照射下でのアラメの配偶体の生長と成熟. 水産大学校研究報告, **62**, 147 - 152.
- 村瀬 昇・棚田教生・多田篤司・鳥袋寛盛・吉田吾郎・阿部真比古・野田幹雄 (2021) 徳島県鳴門産ワカメ養殖品種と椿町産暖海性天然ワカメの交雑種苗の高温下での生長特性. 水産大学校研究報告, **69**, 81 - 88.
- 名畑進一 (2005) コンブ・ワカメ. 「水産増養殖システム 3. 貝類・甲殻類・ウニ類・藻類」(森勝義編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.35 - 55.
- 二羽恭介 (2015) 兵庫県明石海峡周辺のノリ漁場における二毛作に向けたワカメ養殖試験. 藻類, **63**, 90 - 97.
- 二羽恭介 (2016) 大型水槽によるフリー配偶体を使ったワカメの種苗生産. 水産増殖, **64**, 173 - 182.
- 二羽恭介・原田和弘 (2016) 室内培養のフリー配偶体を用いた瀬戸内海におけるワカメの促成栽培試験. 藻類, **64**, 10 - 18.
- 大野正夫 (1987) コンブ類・ワカメ類. 「海藻資源養殖学」(大野正夫編), 緑書房, 東京, pp.116 - 144.
- 大野正夫・團 昭紀・平岡雅規・鍋島 浩 (2000) 海洋深層水と表層海水を用いたオフシーズンのワカメの屋内タンク培養. 日本水産学会誌, **66**, 737 - 738.
- 太田雅隆 (1988) アラメ・カジメの配偶体の生長と成熟ならびに幼胞子体の生長に及ぼす水温の影響. 海生研報告, **88202**, 1 - 29.
- Provasoli L (1963) Growing marine seaweeds. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **4**, 9 - 17.
- Shan TF, Pang SJ (2009) Assessing genetic identity of sporophytic offspring of the brown alga *Undaria pinnatifida* derived from mono-crossing of gametophyte clones by use of amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Phycol. Res.*, **57**, 36 - 44.
- 静岡県水産・海洋技術研究所 (2023) 2023年01月度関東・東海海況速報. https://fish-exp.pref.shizuoka.jp/01ocean/kouseido_202301.html, 2023年11月13日.
- Stekoll MS, Peebles TN, Raymond AE (2021) Mariculture research of *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima* in Southeast Alaska. *J. World Aquac. Soc.*, **52**, 1031 - 1046.
- 水産庁 (2021) 第3版磯焼け対策ガイドライン. 水産庁, 東京, 247p.

- Suzuki Y, Kuma K, Matsunaga K (1994) Effect of iron on oogonium formation, growth rate and pigment synthesis of *Laminaria japonica* (Phaeophyta). *Fish. Sci.*, **60**, 373 - 378.
- 多田篤司・棚田教生 (2022) 阿南市福村地区におけるフリー配偶体と塗布法を用いたワカメの屋内種苗生産 (短報). 徳島県立農林水産総合技術支援センター水産課研究報告, **14**, 35 - 38.
- 田井野清也 (2009) カジメ・クロメの藻場造成-高知県沿岸-. 「カジメ属の生態学と藻場造成」(能登谷正浩編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.72 - 92.
- 高村正造・有馬史織・西村竜雄・相澤 康 (2019) 小田原沿岸海域における藻場景観被度の経年変化と減少要因. 神奈川県水産技術センター研究報告, **10**, 35 - 41.
- Takao S, Kumagai NH, Yamano H, Fujii M, Yamanaka Y (2015) Projecting the impacts of rising seawater temperatures on the distribution of seaweeds around Japan under multiple climate change scenarios. *Ecol. Evol.*, **5**, 213 - 223.
- 武田淳悟 (2021) 南房総市富浦地先における磯焼け持続要因の推定. 千葉県水産総合研究センター研究報告, **14**, 7 - 15.
- 棚田教生・團 昭紀・日下啓作・岡 直宏・浜野龍夫 (2015) 1遊走子起源のフリー配偶体を用いたワカメの大規模種苗生産法および養殖への実用化の実証. *Algal Resources*, **8**, 23 - 36.
- 棚田教生・多田篤司・中西達也・團 昭紀・吉田吾郎 (2020) フリー配偶体と塗布法を用いたワカメの種苗生産法の生産現場における実用化. *Algal Resources*, **13**, 111 - 115.
- Tanaka K, Taino S, Haraguchi H, Prendergast G, Hiraoka M (2012) Warming off southwestern Japan linked to distributional shifts of subtidal canopy - forming seaweeds. *Ecol. Evol.*, **2**, 2854 - 2865.
- 田中敏博・吉満 敏・今吉雄二・石賀好恵・寺田竜太 (2013) 鹿児島湾における藻場の分布と特性. 日本水産学会誌, **79**, 20 - 30.
- 田中俊充・四ツ倉典滋・木村 創・能登谷正浩 (2008) 和歌山県沿岸に生育するカジメ・クロメ配偶体の生長と成熟および胞子体の初期生長に及ぼす水温の影響. 水産増殖, **56**, 343 - 349.
- 谷口和也 (1999) 磯焼けの機構と藻場修復. 恒星社厚生閣, 東京, 120p.
- 谷口和也・秋山和夫 (1982) アラメ配偶体の生長及び成熟に対する水温と光条件. 東北区水産研究所研究報告, **45**, 55 - 59.
- Tatewaki M (1966) Formation of a crustacean sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. *Phycologia*, **6**, 62 - 66.
- 寺田竜太・進藤 蒼・田中美和・江崎 聡 (2021) 鹿児島県長島における藻場の長期変化, 特に東シナ海に面した沿岸からの藻場の消失. 日本水産学会誌, **87**, 631 - 641.
- tom Dieck I (1993) Temperature tolerance and survival in darkness of kelp gametophytes (Laminariales, Phaeophyta): ecological and biogeographical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **100**, 253 - 253.
- 植木知佳・加藤敏朗・堤 直人・中川雅夫・住吉恵子・本村泰三 (2011) コンブ目植物の配偶体成熟に及ぼす鉄の影響. 日本水産工学会学術講演会講演論文集, **23**, 173 - 176.
- Unno Y, Hasegawa M (2010) Restoration of *Ecklonia cava* forest on Hainan coast, Shizuoka Prefecture. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **32**, 119 - 124.
- 和歌山県水産試験場 (2022) ヒロメ養殖の手引き. https://www.pref.wakayama.lg.jp/prefg/071001/sub3_9_d/fil/hirome.pdf, 2023年 11月 13日.
- 八谷光介・桐山隆哉・清本節夫・種子田雄・吉村拓 (2014) 2013年に発生した長崎県壱岐市郷ノ浦町地先におけるアラメ・カジメ場の衰退過程について-夏季の高水温による発生と秋季の食害による拡大. *Algal Resources*, **7**, 79 - 94.

