

養殖ノリの変異株とそのプロトプラスト

片山 勝介

Porphyra Mutants Induced by Chemical Mutagens and Protoplasts from the Isolated Strains

Katsusuke KATAYAMA

養殖ノリ *Porphyra* spp. の品種改良を目的として、化学変異剤を用いた変異の作出技術の開発と、その変異株の分離などを行ってきた¹⁻³⁾。現在も試験を継続しているがその結果とあわせ、それら分離株の葉体からのプロトプラストを分離し、その発芽体の変異を観察したので、その概要を報告する。

材料と方法

変異原 従来の試験¹⁻³⁾で変異誘起性の高いことが観察されたコルヒチン(COと略す)とアルキル化剤のEMS(エチルメタンスルホネート)の2種の化学変異剤を用いた。処理濃度は%で表示した。

殻胞子の浸漬処理 1984年2月から貝殻糸状体とし、同年9月以降26℃以上で培養していたナラワサビノリ *P. yezoensis* f. *narawaensis* (表中ではYNとする)を供試した。小型回転枠により、500ディールのビニロン単糸に殻胞子を付着させ、18℃で2~5時間培養した後、各濃度で浸漬処理を行った。変異剤溶液は、実験直前に培養液ASP6を用いて各濃度に調整した。対照は無処理とし、幼葉期以後対照より生長が良いか、著しい変異がみられる個体のみ、その後も培養を継続し、特性の観察を行った。培養は原則として、16℃、6 klux、9時間明期で通気、培養液は5~7日で交換した。

糸状体期の浸漬処理 用いた品種はT3-1⁴⁾(*P. yezoensis*)、ナラワKN(ナラワサビノリ、表中ではKNとする)及びユノウラアサリサ(*P. tenera*, YUとする)の3品種で、16℃、14時間明期で継代培養していたフリー糸状体を供試した。処理は、PES培地で調整した各濃度の変異剤溶液中に浸漬して行った。糸状体を27℃、2.5klux、9時間明期の条件下に移すと同時に処理を始め、15~30日間浸漬した。そして、殻胞子のう細胞の形成を確認した後にASP6に移して18℃に下げ、殻胞子を放出させた。その発芽体を培養し、変異を観察し

た。培養条件等は前項と同じである。なお、各形質の変異の表示は表1に示した記号によった。

表1 変異の特性表示記号

生長	生残	稔性
+ : 対照より良 - : 対照より悪	d : 一部死	s f : 低い
細胞形態	葉色	葉形
G : 巨大細胞	r : 赤色がかかる g : 緑色 dc : 濃い	丸 : 丸葉型 細 : 細葉型 ひだ : ひだ多し

その他：空欄は対照と変わらないことを示す
() は一部の個体の変異を示す。

分離株の特性の検定 分離株のフリー糸状体を、27℃、短日条件下で培養し、あらかじめ殻胞子のうを形成させておいたものを用いた。ASP6を容れたフラスコ中に、糸状体と、3、4cmに切ったビニロン単糸とを入れ、18℃で通気攪拌した。5~7日目の1日間で単糸に付着した殻胞子からの発芽体の諸形質について、ナラワサビノリ(YN)と比較検定した。方法はノリ品種特性調査、室内栽培試験実施要領*に準じて行った。

野外栽培試験は、フリー糸状体を各々貝殻糸状体に移植し、通常の栽培管理の後、'85年10月16日に室内採苗し、以後、前記調査の野外比較栽培試験実施要領*に準じた。

プロトプラストの分離と培養 培養した分離株の葉体中央部を1.2mm²に切りとったものを試料とした。以下、鬼頭⁵⁾の方法を参考とした。まず、10%パバイン、0.5%デキストラン硫酸カリウムの海水溶液に試料を入れ、20℃で15分間、振とうした。海水洗浄後、2% AAP (Abalone Aceton Powder, シグマ社製)を含む0.3Mマンニット、0.5%デキストラン硫酸カリウム海水溶液

* 昭和55年度種苗特性分類調査報告書(日本水産資源保護協会)

(pH6.0)に移し、20℃で3時間振とうし、細胞壁を分解した。遊離したプロトプラストを30~60 μmのナイロンフィルターでろ過し、ろ液を1.000r.p.m.で3~5分間遠心分離。上澄み液を除去後、滅菌海水を加え、遠心分離を行った。この操作を4回繰り返す、プロトプラストを洗浄した。以後、シャーレ又は平底フラスコなどにより、前述の殻胞子の場合に準じて培養した。

結果と考察

殻胞子処理による変異 '82年以来、殻胞子の変異剤溶液浸漬処理によって、多くの変異が誘起され、なかには実用形質、例えば幼芽期の高生長性、低稔性なども観察されたが、更に多くの変異を作出するため、コルヒチンによる浸漬処理を行った。

コルヒチンのように染色体に作用して、変異を誘起する場合、減数分裂に際して変異剤を接触させることが有効である。アマノリ類の減数分裂は従来、殻胞子形成時に行われるとされていたが、まれに未分裂のまま放出されることもある⁶⁾といわれていた。しかし、最近、殻胞子の着生後第1回目の細胞分裂時に減数分裂が行われるという観察結果が報告されている⁷⁾。そこで、殻胞子の付着後の時間を変えて処理を試み、その変異を観察した。結果を表2に示した。

コルヒチンの0.5%で3回、0.2%で2回行った。採苗2時間と5時間後から処理を開始し、各々4時間と20時間、浸漬した区を設けた。採苗2時間のものでは一部枯

死したり、生長のやや悪い区が多く、処理剤による薬害と思われる影響がみられた。その他、ひだの著しい個体、丸葉型や赤色変異など数多くの変異個体も得られた。その中で、採苗2時間後に0.5%20時間浸漬区のものに初期生長も良好で、葉色の濃い黒紫色の数個体がみられ、そのうち、葉齢85日で葉長30 cm以上になっても生殖細胞の形成が認められないもの1個体を得た。長日条件に移した後、僅かに形成された果胞子を分離した。

採苗後5時間経過したものでは、細胞壁の形成も充分進み、0.5%溶液20時間浸漬でも枯死個体はほとんどみられなかった。この区では細葉型や低稔性個体の発現も多くみられ、成葉期に至るまで数多くの培養を行ったが、葉体の厚いもの、ちぢみを生ずるものなども多く、有用個体は少なかった。その内、0.5%20時間浸漬区で高生長を示す褐紫色の濃い個体が得られ、培養を続けたところ、葉齢90日で葉長35 cmになり、僅かに生殖細胞が形成されたので分離した。以上、ナラワササビノリを用いた殻胞子浸漬処理によって得られた変異個体のうちから2個体を分離した。

殻胞子のう細胞形成期処理による変異 3品種を用い、COの0.01%とEMSの0.005%とで約1ヵ月間長時間浸漬し、殻胞子のう細胞の形成を確認後、通常培地に移すと同時に18℃に下げ、殻胞子放出を促進した。それらを培養し、変異を観察した結果を表3に示した。CO、EMSの両処理区とも直径30 μm以上の巨大細胞からなる発芽体が多くみられたほか、赤や緑の色彩変異、あら

表2 殻胞子処理による変異

変異剤	濃度 (%)	処 理 方 法*1			
		1	2	3	4
CO	0.5	-(r)(ひだ)	-(r)(dc)*2	(sf)	(+dc, sf)*3
		(r)(G)	-(丸)(ひだ)	(r)(G)	(r)(sf)(細)
		-(d)(r)	-(丸)(r)	(細)(G)	(dc)(sf)
	0.2	-(g)	-d	(r)(G)	(G)

*1, 1:採苗2時間後から4時間浸漬, 2:同左20時間浸漬
3:採苗5時間後から4時間浸漬, 4:同左20時間浸漬
*2, YC5004, *3, YC5007を分離

表3 3品種の殻胞子のう細胞形成期処理による変異

変異剤	濃度 (%)	T3-1	KN	YU
CO	0.01	(r, sf)*1(+sf)*2	(r)(G)	(+)(G)(丸)
EMS	0.005	(+)(sf)(G)	(r)(G)(丸)	(g)(G)

*1, YTC112R, *2, YTC109を分離

ゆる方向に根様糸を有するもの、葉状突起をもつ立体的膨らみを呈するものなどの奇形がみられた。それらの中にあって、T3-1の変異個体で幼芽期から高生長を示す1個体がコルヒチンの0.01%区にみられ、以後も生長速度が速く、約30日で葉長12.2mm、葉幅1.1mmに伸長した。葉齢70日で50cmに生長したので、以後は幅2cm程度の葉片に切断し、培養を続けたが全く生殖細胞の形成は認められなかった。110日目に湿重当たりの葉面積により全体の面積を計算したところ、17.046m²と超大型に生長していた。この時点でも生殖細胞が全く形成されないで、一部の葉片を14時間明期の長日条件下に移し、培養したところ、約20日後に極く僅少の雌、雄各細胞が認められたので、果胞子を分離した(YTC109)。葉色は褐色を呈する濃い色で、ひだの比較的少ない個体であり、成葉期になっても著しい高生長を示した。

このほかT3-1のCO浸漬による同じ処理区中に、前述の個体よりは生長性では僅かに劣るが、稔性が低く、赤褐色を呈する色彩変異のある個体も得られたので分離した(YTC112R)。

分離株の培養による検定 前年³⁾分離したのは表4に

表4 分離株の履歴

分離株	原種	変異剤処理時期と濃度(%)	主な特性
YE251	YN	殻胞子, EMS0.025	葉色濃い
YE504H	"	" EMS0.05	高生長, 高温耐性
YE505H	"	" "	" "
YTE52	T3-1	殻胞子のう細胞形成期, EM0.005	高生長, 低稔性
YTC103	"	" CO0.01	" "
AUE55	YU	" EMS0.005	" "

表5 分離株の培養特性

形質		YE251	YE505H	YTE52	YTC103	AUE55	対照(YN)
葉形	幼葉期	線形	線形	線形	線形	線形	線形
	成葉期	"	線状倒披針形	広線形	"	"	"
葉色		褐紫	褐紫	紫褐	紫褐(濃)	紫褐(濃)	紫褐
栄養繁殖性	繁殖期	18日~	16日~	18日~	20日~	12日~	17日~
	単胞子発芽体量	少	少	少	少	中	少
生長性		幼芽・幼葉期	良	良	良	良	良
稔性	成熟期	晩熟	(晩熟)	晩熟	晩熟	晩熟	晩熟
	生殖細胞形成量	小	中	小	小	小	小
最大葉長*1		61cm	40cm<	30cm	50cm<	50cm<	42cm
高温耐性*2		-	-	-	-	-	-
その他		個体により稔性に著しい差あり			葉色一番濃い		

()は一部の個体にみられる特性

*1 最大葉長を確認できなかった場合、<記号でそれ以上であることを示す。

*2 対照と差がない場合を一記号で示す。

示した6株である。すべてフリー系状体として常法で培養した後、27℃、9時間明期の短日条件に移し、40日間培養を続け、殻胞子のうを形成させた。しかし、YE504Hのみは培養中に糸状体が赤変、次いで白化して細菌類の繁殖があり、別の容器のものも不調で殻胞子のうの形成はほとんどみられなかった。したがって、他の5種について、殻胞子をビニロン糸に付着させ、20℃で培養、表5に示した各形質について特性を調べた。なお、20日以降は培養水温を18℃とした。また、高温耐性は付着後24時間の発芽体を28℃で3日間培養し、その生存率と細胞数とを対照と比較して判定した。

幼葉期の葉形はすべて線形であるが、基部や先端部の形では多少異なるものもみられた。葉長1cm程度以上になると違いがみられるようになり、YE505Hで線状倒披針形、YTE52でやや幅広の広線形となった。これらと同一の原種からの株であるYE251やYTC103と異なることから、原種由来の葉形ではなく、変異によるものであった。葉色では褐色の少し強い紫褐とやや青味の強い褐紫とに分かれたが、そのうちYTC103とAUE55とで少し黒味がかった濃いものであった。栄養繁殖性の

単胞子放出は AUE55 で少し早く12日目から観察されたが、対照を含め16~18日目からが多く、 YTC103 のみ少し遅れた。量的にも AUE55 で多く、他は少なかった。幼芽、幼葉期の生長では、多少の違いはあるもののほとんど変らなかつた。なお、いわゆる、とびの個体の葉長ではかなりの差がみられ、特に、 YTC103 の数個体は16日目に4 mmを越し、30日では15mmの個体もあった。稔性では晩熟で生殖細胞形成量も(1)にランクされるものが多いが、 YE505 Hのみは、30日の培養で形成量が20%を越す個体も多く認められた。最大葉長については、培養途中で、葉体を2 cm幅程度に縦に切断して、葉片にして培養を続けたため、最終的に確認できない場合があった。稔性の低い品種の室内培養でフラスコを用いる場合には、1、2個体しか培養できないこともあって、最大葉長を確定するのは非常に困難であった。高温耐性については、すべて生残率等で対照と大きな違いはなく、 YE505 Hを含め耐性は認められなかつた。前年³⁾同様、処理当代にみられた耐性付与は次代には受け継げないことと判断せざるを得ない。

以上から、稔性の低い個体が多くみられた YE505 Hを除く4株では、同じような特性を示した。しかし、葉形が線形で、葉色の濃い YTC103 と AUE55 の2株については、更に今後、養殖試験を行う予定である。

養殖試験による検定 前報³⁾の室内培養試験の結果、優良と認められた YC5001 と AE42 の2株の養殖試験を行った。'85年10月19日育苗開始し、秋芽は11月12日、冷凍網は12月23日それぞれ養殖を始めた。調査した養殖特性を一括して表6に示した。

まず、幼芽、幼葉期の葉形は両者とも線形であったが、葉長3 cm以上になると違いが現れ、 AE42は基部の細かい線状倒披針形となり、以後も同じ葉形であった。一方、 YC5001の成葉期はややひだの多い葉長幅比が8~15の線形で、基部は鈍角を呈し、前者と異なった。

幼芽、幼葉期の生長は AE42の方が僅かに良かったが25日以降、成葉期になると差は認め難かった。葉長は冷凍網の'86年3月7日採取の最大葉長を測ったものであるが、基部や先端部の切れた個体も入っており、示した数値以上となる。栄養繁殖性は、 YC5001で採苗14日後から二次芽の着生がみられ、11月10日前後には多数確認できたが AE42では採苗21日後に単胞子放出個体が僅かにみられたものの、二次芽の着生は以後もほとんど認められなかつた。また、稔性では YC5001の冷凍網期の'85年2月6日に生殖細胞の形成がみられたが、 AE42では3月7日になっても観察されず、以後急激な色落ち

表6 分離株の養殖特性

形質		YC5001	AE42
葉形	幼葉成葉	形線 "	線形 線状倒披針形
	葉長 (cm)	72<	65<
	葉色	紫褐(5 P2/1)	紫褐
葉の厚さ (μm)		31.5	29.7
稔性	成熟期	72日~	93日<
	生殖細胞形成面積率	(小)	極小
栄養繁殖性	繁殖期	14日~	21日~
	単胞子発芽体量	中(約10)	小(0に近し)
生長性 (20日目)		12.1×1.3mm	15.2×1.4mm
流失抵抗性		強	中
耐病性	しろぐされ症	やや強	中
収量性	秋芽網	81.0 kg	68.5 kg

があつて、確認できなかったが、著しく稔性が低いことが判明した。

流失抵抗性は YC5001の基部の太いこともあって“ひき”が強く、強風波浪に対してもほとんど流失は観察されなかつた。また、試験中の10月下旬から11月中旬にかけては温暖な天候が続き、近隣の養殖場でしろぐされ症が発生、11月20日過ぎに試験網でも罹病が確認された。以後、11月末にかけて、 AE42では網全体で葉体が白変、先端部から流失したが、 YC5001では症状が軽く、極く一部の長く伸びた葉体で赤褐色、次いで白変する症状が認められた程度で済み、両者の違いが大きく、後者のしろぐされ症に対する抵抗性がうかがえた。

以上のように、両株の生長性、収量性、稔性等では優良な特性が確認できたが、 AE42では栄養繁殖性が低いことが難点と考えられた。特に YC5001のしろぐされ症に対する抵抗性の認められたことは貴重な形質として、更に、その特性を十分に把握検討する必要がある。

分離株からのプロトプラストの培養 変異剤を作用させて得られる変異には種々のものがあるが、それら変異個体は多くの個々の細胞レベルの変異を包含した集団としても、細胞個々の持つ数多くの特性がそのまま個体にあらわれるとは考えられない。そこで、変異個体のプロトプラストを作れば、種々の別の変異が発現することが予想される。

そこで、前述の分離株等の葉体を用い、プロトプラストを分離し、それからの発芽体の培養を試みた。

まず、殻胞子の CO_{0.5}%処理で得られたすべて巨大細胞からなる発芽体を試料とした。葉長5.1mm、葉幅0.7mmのしわ状に変形した個体で、細胞の最大径は52 μm

にも達するが、生長は悪く、採苗後35日を経過したものである。AAPを用いて細胞壁の除去を行ったが、正常な個体にくらべて、プロトプラストへの遊離が非常に少なかった。80 μm のナイロンフィルターにより得られたプロトプラストから、最終的には数十個体が発芽した。それらは、細胞の大きさも種々で、径50 μm の個体から正常な大きさのものまでみられたが、大半は20 μm 以上のものであった。また、葉形も細葉～丸葉型、ひだの多寡、葉色もいろいろであった。しかし、生長は、元の個体と同様著しく劣る個体が大半を占めた。

次に、殻胞子のう細胞形成期のコルヒチン処理で得られた非常に稔性の低い、高生長個体のプロトプラストを培養した。この場合は前の変異個体の場合と異なり、種々の変異はみられず、葉形では多少違った形態を示すものの葉色は一色で、生長でも個体差は比較的小さかった。

この他、別の変異剤処理で得られた数個体について、プロトプラストを作出し、培養したところ、個体により発現する形質は種々であった。すなわち、個体にみられない多くの変異が、そのプロトプラスト由来の発芽体には観察されること、元の個体によって多くの変異が出る場合とそうでない場合とがあることなどが判明した。この方法が、より優良な形質を有する個体を分離する手段として使えることが示唆された。

要 約

1 養殖ノリの品種改良を目的として、化学変異剤のコルヒチンとEMSへの浸漬処理によって得られた変異個体4株を分離した。

2 それらは葉色の濃いもの、初期生長の旺盛なもの、

低稔性のものなどであるが、うち1つは、葉齢110日、葉面積17 m^2 以上になっても生殖細胞を形成しない個体で成葉期になっても非常に高い生長性を示した。

3 前年、分離したもののうち5株を培養し、諸形質について特性を調べた。一部の形質で有用性が確認され、そのうち2株は更に養殖試験を行う予定である。

4 前々年の分離株のうち、2株の養殖試験を行い、ナラワサビノリの変異株で、稔性が低く、高生長であるほか、しろぐされ症に対し難罹病性であることが観察された。

5 変異個体のプロトプラストを分離し、培養を試みたところ、個体ではみられない別の変異が発現することが多く、品種改良の手法として使えそうであることがわかった。

文 献

- 1) 片山勝介, 1983: 養殖ノリの変異種に関する研究-I, 化学変異剤の施用について, 昭和57年度岡山水試報, 51-56
- 2) ———, 1984: ——— - II, 二, 三の化学物質による変異, 昭和58年度同誌, 43-49
- 3) ———, 1985: 化学変異剤による養殖ノリの変異とその分離株の特性, 昭和59年度同誌, 71-75
- 4) ———, 1982: 養殖ノリの選抜分離種特性について, 昭和56年度同誌, 130-134
- 5) 鬼頭 鈞, 1985: ノリのプロトプラストの作出と個体の再生, 研究ジャーナル8(9), 20-24
- 6) 右田清治, 1974: ノリ糸状体の殻胞子と放出に関する2, 3の観察, 長崎大学水産学部研究報告, 38, 77-85
- 7) 馬家海・三浦昭雄, 1984: スサビノリ殻胞子とその発芽体における核分裂の観察, 藻類, 32, 373-378