

# 養殖ノリのプロトプラストを用いた 変異株及び環境耐性株作出法の検討

草加 耕司

Selective Method of Mutants and Environmental Resistant Using  
Protoplasts from Nori *Porphyra* spp.

Koji KUSAKA

養殖ノリ *Porphyra* spp. のプロトプラストからの発芽体を選抜し、優良品種を得る育種技術の開発を目的として、プロトプラストの作出方法や培養条件を検討してきた<sup>1, 2)</sup>。その結果、市販の酵素を用いて実験レベルでのプロトプラストの作出が可能となり、また液体と寒天培地の併用によって安定した再生系が確立され、多くの再生体が得られるようになった。

今田<sup>3)</sup>及び片山<sup>4, 5)</sup>は養殖ノリの育種法として化学変異剤の施用を試み、2, 3の優良変異株を分離した。この手法はプロトプラスト由来の変異株の作出にも有効な手段と考えられる。一方、高水温や低塩分などの極限的な環境に対する耐性の獲得は、特に生理障害を主因とする病害耐性とも関連し、優良品種の特性として重要な意味を持つ。そこで、本報では養殖ノリのプロトプラストから効果的に変異株を誘発するための化学変異剤の処理方法と、高温及び低塩分に対する耐性株の選抜法について、それぞれの要因に対する感受性の側面から検討した。

## 材料と方法

**供試葉体とプロトプラストの作出法** 各試験に用いた葉体は、1991年10月に岡山市久々井地先で育苗した葉長3~5cmのナラワササビノリ *P. yezoensis* f. *narawaensis* で、育苗後-20℃で冷蔵保存していたものである。葉体は実験の度毎に解冻し、20℃、3,000 lux、10時間の明期、ASP 6の人工海水中で2~3日培養し、葉先部と基部を取り除いて、健全な葉体の部位のみを実験に供した。

プロトプラストの作出は、図1に示す前報<sup>2)</sup>と同様の方法で行った。作出操作を終了した後、Burker Turkの

血球計数板を用いてプロトプラストの作出量を算出し、濃度を調整して各試験に用いた。

**培養方法** プロトプラストの培養は、液体培地と寒天培地による2通りの方法で行った。液体での培養には、96ウェルのマイクロプレートを用い、SWM-III 改変液で $10^3$ 個/mlの濃度に調整したプロトプラスト懸濁液を1孔当たり0.1ml収容した。寒天を用いた培養は、40℃で保温しておいたSWM-III 改変液をベースにした0.8

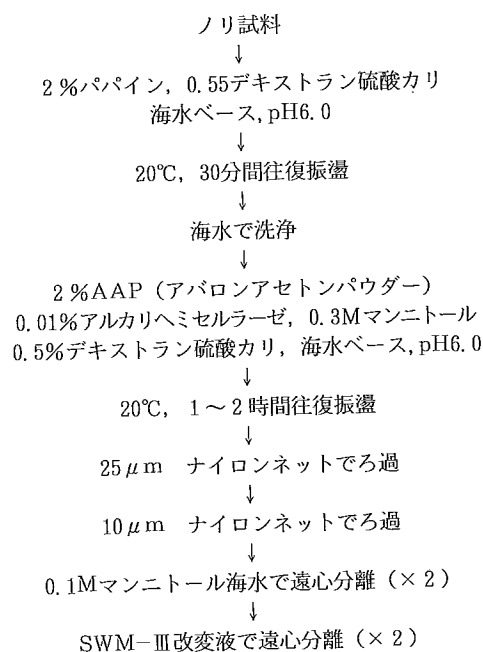


図1 プロトプラストの作出方法

%の寒天10mlに、 $5 \times 10^8$ 個/mlの濃度になるようにプロトプラストを包埋し、直径8.5cmのスチロール製シャーレに入れて行った。それぞれの培地にはバクテリアの増殖を防ぐため、岩渕らの方法<sup>9)</sup>に従い、ペニシリンGカリウム0.1mg/mlとストレプトマイシン0.25mg/mlを添加した。培養中の生残個体の計数は倒立顕微鏡150倍下で、液体培地は各試験区当たり10孔ずつを、寒天培地は20視野を無作為に検鏡した。

原則として培養温度は20°C、光条件は10時間明期で、培養開始後7日目までは1,000lux、それ以降は3,000luxとした。

**変異誘発試験** 試験に用いた化学変異剤は、今田<sup>9)</sup>、片山<sup>10)</sup>によって養殖ノリに対する有効性が報告されているアルカロイド類のコルヒチンとアルキル化剤のEMS(エチルメタンサルホネート)である。

1) 短期処理 各濃度に調整したコルヒチンとEMS溶液中に、作出直後のプロトプラストを24時間浸漬したあと遠心分離によって水洗し、液体培地中で培養した。コルヒチン溶液の濃度は0, 1, 3, 5, 7g/l, EMSは0, 0.05, 0.1, 0.5, 1ml/lのそれぞれ5区を設定した。

2) 長期処理 コルヒチンとEMSを添加し、各濃度に調整した寒天培地中でプロトプラストを培養した。培地の薬剤濃度は、コルヒチンが0, 0.5, 1, 3g/lの4区とし、EMSは0, 0.01, 0.05, 0.1ml/lと0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7ml/lの2度の試験を行った。

**環境耐性試験** 環境耐性は高温と低塩分を対象とした。高温における耐性試験は、恒温室内を20, 24, 27, 30°Cに設定して行った。低塩分における耐性試験の培地は、SWM-Ⅲ改変液と蒸留水を混合して作製し、全海水、2/3海水、1/2海水、1/3海水の4区を設定した。両試験とも培養は液体と寒天の2通りの方法で行い、各試験区でのプロトプラストの生残と、成長の指標として細胞数を調べた。

### 結果と考察

**コルヒチン処理** コルヒチン溶液への24時間浸漬後のプロトプラストの生残率を図2に示した。生残率は浸漬を終えた直後の対照区の生残個体数を100%として換算した。浸漬した直後の生残率は、1g/l区が90.9%、3g/l区が72.4%、5g/l区が45.3%、7g/l区が14.9%となり、コルヒチン濃度が高まるに従って低下した。プロトプラストに及ぼす浸漬後のコルヒチンの影響を知るため、4日後の生残を調べた。しかし、浸漬した直後と4日後の生残率の

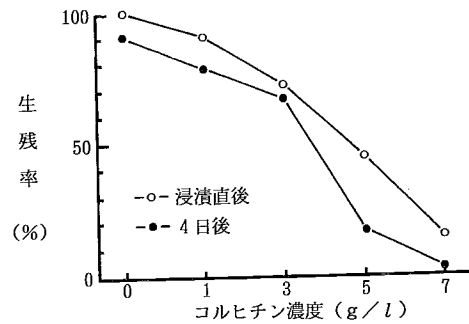


図2 24時間コルヒチン浸漬後の生残率

差は、5g/l区で27.9%と対照区の9.1%より大きかったが、その他の区は対照区とほぼ同等の差であり、濃度が高まるにつれて減耗が激しくなる傾向はみられなかった。従って、コルヒチンへの浸漬は、その後のプロトプラストの生残には影響しないものと考えられた。

突然変異の頻度は、変異原の処理強度に対して指数関数的に増大するが、濃度が高すぎるとかえって低下する<sup>7)</sup>。また、陸上植物や微生物を材料とした場合の変異剤は、一般にそれぞれの生物の50%致死濃度よりやや低い濃度で使用される<sup>8, 9)</sup>。そこで、生残率50%を目安として適正な処理濃度を検討すると、コルヒチンへの24時間浸漬では3~5g/lが適当と考えられた。

コルヒチンを寒天培地に添加した培養での濃度別の生残率の推移を図3に示した。0.5, 1g/lの生残率は対照区と同様に推移したが、3g/l区は培養初期の減耗が激しく、7日後には生残率が11.4%にまで低下した。各濃度とも7日目以降の減耗はみられず、生残率は横ばいとなった。培養開始16日後における生残個体の細胞数を図4に示した。0.5/l区ではコルヒチンの影響がみられ

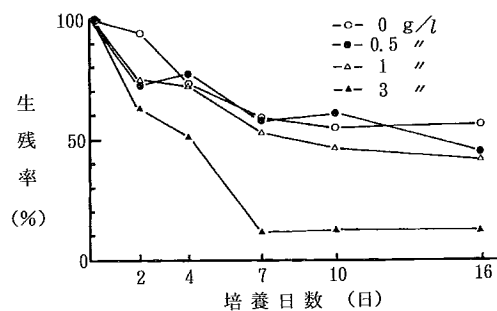


図3 寒天培地におけるコルヒチン濃度別の生残率の推移

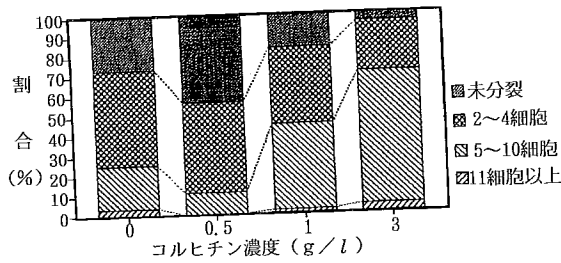


図4 コルヒチン濃度別の細胞数

ず対照区よりむしろ早い成長を示したが、濃度が上がるに従って成長が劣る傾向がみられ、その影響が顕著となった。特に、3g/l区では細胞分裂がかなり阻害されていた。これらのことから、コルヒチンへの長期浸漬の場合、1~3g/lの濃度で7日間程度の浸漬が適当と考えられた。

**EMS処理** EMS溶液への24時間浸漬後のプロトプラストの生存率を図5に示した。生存率は24時間浸漬を終えた直後の対照区の生存個体を100%とした。浸漬直後の生存率は、0.05ml/l区が62.0%，0.1mlが79.3%，0.5mlが38.2%，1mlが7.7%で、0.05ml/l区を除いては濃度が高まるに従って低下した。浸漬した直後と5日後の生存率の差は、全ての区で対照区の24.7%より低く、EMSへの浸漬によるその後の毒性はみられなかった。このことは、EMS溶液が遠心分離による水洗で十分除去されることを示している。50%の生存率を目安にすると、EMSの24時間浸漬では、0.1~0.5ml/lの濃度が適当と考えられた。

EMSを寒天培地に添加した培養での濃度別の生存率の推移を図6に示した。生存率は0.01~0.1ml/lの範囲では対照区と同様の推移をした。このため0.1~0.7ml/lの濃度で追試験した。0.1ml/l区では対照区よりやや低い生存率で推移したが、0.3ml以上の濃度では急激に低下し、6日目までに生存率が0となった。培養開始16日後の生存個体の細胞数を図7に示した。11細胞以上の割合をみると、0.1ml/l区でやや少なく成長の遅れがみられるが、全般的には対照区と大差なく、0.1mlまでの濃度ではほとんど影響を受けなかった。これらのことから、EMSの長期浸漬は0.1~0.3ml/lで7日間程度が適当と考えられた。

**高温** 液体培地における温度別の生存率の推移を図8に示した。27℃区では直線的に生存率は低下し、11日後には17.2%にまで低下した。30℃区では2日後に0.02%

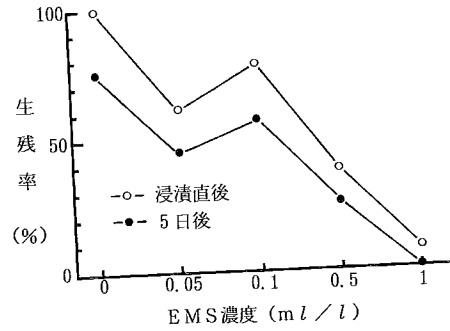


図5 24時間EMS浸漬後の生存率

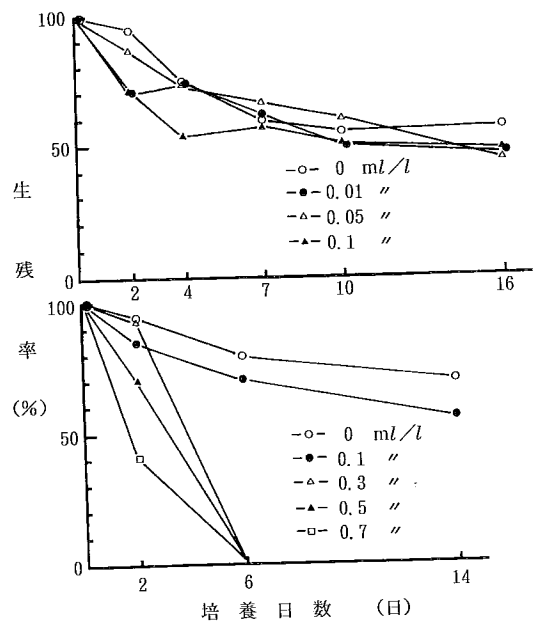


図6 寒天培地におけるEMS濃度別の生存率の推移

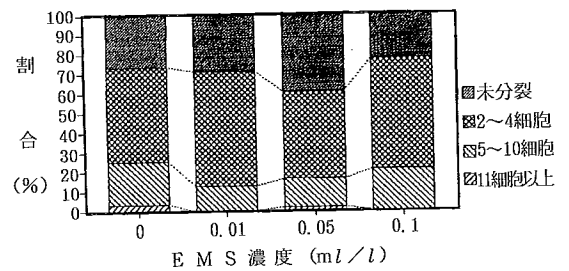


図7 EMS濃度別の細胞数

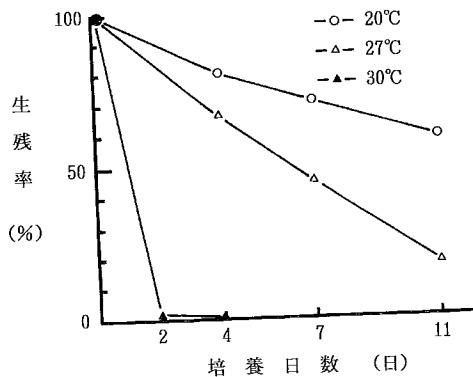


図8 液体培地における温度別の生残率の推移

になり4日後には0となった。

寒天培地における水温別の生残率の推移を図9に示した。24℃区では対照区よりやや低い値で同様の推移をした。27℃区では2日までに激しい減耗がみられたが、4日以降は数%程度の生残を示した。30℃区では2日までに全個体が死滅した。培養開始16日後の生残個体の細胞数を図10に示した。24℃区では正常な発芽はしているものの、対照区に比べて成長はかなり劣っていた。一方、27℃区では4日目頃から、液胞が増大し空胞化して、未分裂のままの生残する個体が多くみられ、発芽した個体もほとんどがカルス様の異常な細胞分裂をした。

山内<sup>10)</sup>はオオバアサクサノリ *P. tenera* f. *tamatsuensis* を材料とした培養実験で、ノリ幼芽は30℃ではほとんど細胞分裂せず、25℃では異常芽の出現が顕著となり成長は非常に劣るとしている。プロトプラストの培養結果もこの報告とほぼ一致しており、今回の方法では30℃の培地から、選抜することは不可能と考えられた。27~30℃の条件で効果的に選抜するには、20℃の培地で発芽した幼芽を材料としたり、明期のを高温にするなどして、生残率の低下を抑える方法を検討する必要がある。24~27℃では4~7日の培養の後、成長異常が起きないうちに20℃の培地に移せば正常個体が得られるものと考えられる。

低塩分 各区の塩分は全海水区が31.20, 2/3海水区が21.03, 1/2海水区が16.15, 1/3海水区が10.68であった。液体培地における塩分濃度別の生残率の推移を図11に示した。生残率は培養開始時の全海水区を100%とした。2/3と1/2海水区は同様の値で低下し、11日にはそれぞれ29.0, 25.6%となった。1/3海水区では

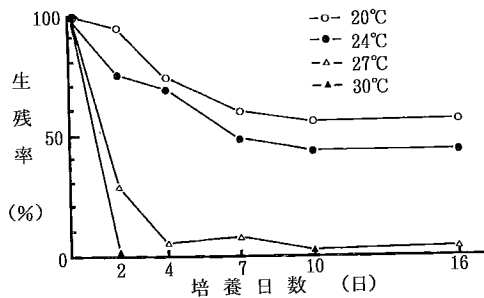


図9 寒天培地における温度別の生残率の推移

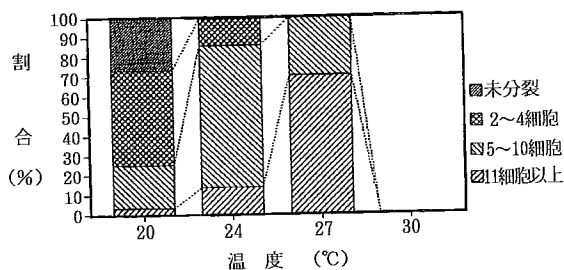


図10 温度別の細胞数

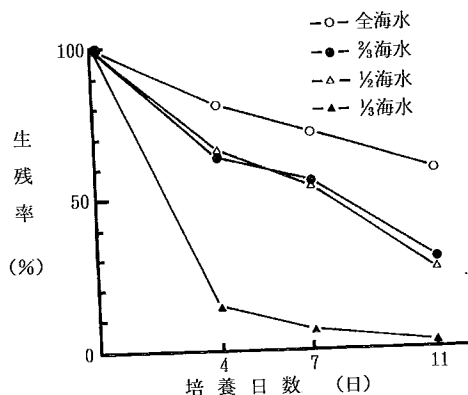


図11 液体培地における塩分濃度別の生残率の推移

は4日までの減耗が激しく、11日後には0.7%となった。

寒天培地における塩分濃度別の生残率の推移を図12に示した。対照区を除く全ての区で、寒天培地に包埋した直後の減耗がみられ、特に1/3海水区では生残率が16.6%に低下するなど、塩分の低下に従い減耗が激しい傾向にあった。しかし、それ以降は全区とも一定の減少傾向を示した。培養開始14日後の生残個体の細胞数を図13に示した。塩分が下がるに従い成長は遅れ、1/3海

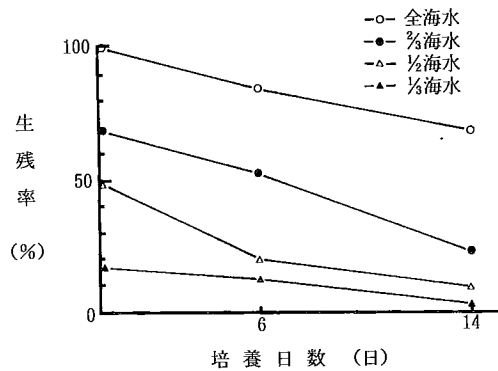


図12 寒天培地における塩分濃度別の生残率の推移

水区では2日後から液胞が増大し原形質が収縮する症状がみられ始めて、生残したプロトプラストも結局は100%未分裂のままであった。

山内<sup>11)</sup>はノリ幼芽に及ぼす塩分の影響について、ノリ幼芽は20~25以下の低塩分に長期間さらされると種々の異常形態を示すとしているが、塩分7前後でも枯死することなく僅かながら成長すると報告している。この報告と今回の結果を比較しても、細胞壁を除去されたプロトプラストは浸透圧の変化に対応できないため、殻胞子から発芽した幼芽に比べ、低塩分には極めて弱いと言える。さらに、本試験では作出時の細胞壁の除去が不完全であったプロトプラストが生残したという疑問がもたれる。これらのことを考慮すると、プロトプラストが細胞壁の再生を終える4~7日まで普通海水で培養し、その後、低塩分培地に移植する方法が効果的であり、この方法でさらに低塩分での選抜も可能ではないかと考えられる。

#### あとがき

今回の変異誘発試験は、薬剤に対するプロトプラストの感受性のみを考慮して処理法を検討したが、変異率を高める観点からの検討も必要である。そのためには、陸上植物等と比べ可視的形質の少ない養殖ノリの変異を識別し、評価する方法も併せて検討する必要がある。また、環境耐性株については、変異処理と耐性培地を併用することにより、その出現率が高まる可能性も考えられ、耐性が固定化される形質か否かの検定等も含め、今後検討すべき課題である。

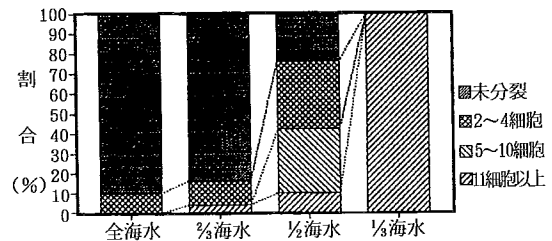


図13 塩分濃度別の細胞数

#### 要約

1. 養殖ノリのプロトプラストの発芽体から効果的に変異株を誘発するための化学変異剤の処理方法と、高温及び低塩分に対する耐性株の選抜法について検討した。
2. 24時間の短期浸漬の場合、コルヒチンは3~5 g/l, エチルメタンスルホネートは0.1~0.5 ml/lの濃度が、また培地に添加した長期的な浸漬の場合は、それぞれ1~3 g/l, 0.1~0.3 ml/lが適当と考えられた。
3. 高温培養では24℃で成長がやや劣るものの生残は対照と変わらず、27℃では僅かながら生残し成長する個体のみがみられたが、ほとんどがカルス様の異常な細胞分裂をした。一方、30℃では2日以内にほぼ全個体が死滅し、さらに減耗を抑える培養法の検討が必要と考えられた。
4. プロトプラストは低塩分に極めて弱く、低塩分培地に移した直後に死滅する例が多くみられた。したがって、プロトプラストが細胞壁を再生した後、低塩分に移植すれば効果的に選抜できると考えられた。

#### 文献

- 1) 草加耕司, 1989: アマノリ類のプロトプラスト作出条件, 岡山水試報4, 186-188
- 2) 草加耕司, 1990: アマノリ類プロトプラストの培養条件, 岡山水試報5, 112-116
- 3) 今田 克, 1976: アマノリ属 (*Porphyra* sp.) の変異株造成の試み, 水産育種研究会誌, 1, 35-37
- 4) 片山勝介, 1983: 養殖ノリの変異株に関する研究-I, 化学変異剤の施用について, 岡山水試事報, 昭和57年度, 51-56
- 5) 片山勝介, 1984: 養殖ノリの変異株に関する研究-II, 二, 三の化学物質による変異, 同誌, 昭和58年度, 43-49
- 6) 岩淵光伸・福永 剛・上妻智行, 1989: ノリのプロトプラスト, 単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗

- 化技術開発研究, 昭和63年度地域バイオテクノロジー開発促進事業報告書, pp17, 福岡県有明水産試験場
- 7) 常脇恒一郎ほか, 1982: 変異の作出, 植物遺伝学実験法, 199-232, 共立出版, 東京
- 8) 田島弥太郎・吉田俊秀・賀田恒夫, 1973: 化学物質の突然変異性検出法, pp188, 講談社
- 9) 渡辺好郎・山口彦之, 1983: 突然変異育種, pp343, 養賢堂, 東京
- 10) 山内幸児, 1974: ノリ幼芽の成長に及ぼす温度の影響-I, 温度条件とノリ芽の初期生長および形態について, 日水誌, 40, 439-446
- 11) 山内幸児, 1972: ノリ幼芽の成長に及ぼす塩分濃度の影響, 日水誌, 39, 489-496