

# ナラワスサビノリのプロトプラスト・単離細胞 に及ぼす塩分濃度の影響

山口 忠則

Influence of Salinity on the Protoplasts and Isolated Cells from  
*Porphyra yezoensis* f. *narawaensis*

Tadanori YAMAGUCHI

## まえがき

海藻類におけるプロトプラスト・単離細胞の作出は、これまでに緑藻類ではアオサ、アオノリ及びヒトエグサ、褐藻類ではオキナワモズク、紅藻類ではササビノリなどで行われている<sup>1,2)</sup>。とくに、アマノリ類では、作出したプロトプラスト・単離細胞からノリ葉体に再生させる方法がほぼ確立され<sup>3-5)</sup>、養殖ノリの品種改良に利用できる技術として期待されている。養殖ノリにおける品種改良の目標のひとつに低塩分耐性品種の開発があり、その一環として現在、プロトプラスト・単離細胞に対する塩分濃度の影響が検討されている<sup>6,7)</sup>。しかし、これまでの研究では十分な知見が蓄積されているとはいえない。そこで筆者は、ナラワスサビノリ *Porphyra yezoensis* f. *narawaensis* のプロトプラスト・単離細胞を培養液の塩分濃度をかえて静置・通気培養し、塩分濃度が再生個体の形態形成や生長にどのような影響を与えるかを検討したので報告する。

## 材料及び方法

### 静置培養における塩分濃度の影響

供試したノリ葉体は、陸上採苗後、佐賀県六角川沖合の支柱式漁場で葉長20~30mmまで養殖し、その後-30°Cで凍結保存したナラワスサビノリ（品種名 佐賀5号）であった。実験にはこの葉体を必要な量だけ取り出し、解凍して用いた。

プロトプラスト・単離細胞の作出は、岩渕ら<sup>4)</sup>、青戸ら<sup>5)</sup>の方法に準じて行い、細胞壁分解酵素として2%AAP

を使用した。作出したプロトプラスト・単離細胞は血球計算盤を用いて計数し、約 $4 \times 10^4$ 個・ $\text{mL}^{-1}$ の懸濁液となるように調整した。

塩分濃度30%の海水を基本とした1%アガロース培地10mlに上記のプロトプラスト・単離細胞の懸濁液1mlを混合し、プラスチック滅菌シャーレ（直径9cm）に展開した。培地が固化したのち、塩分濃度を0, 5, 10, 20, 30%の5段階に調整した改変SWM-III液添加培養液（以下、補強海水）をそれぞれ10ml重層し、テープで密閉した。なお、補強海水にはバクテリアの繁殖を防止するためにペニシリンGカリウムとストレプトマイシン硫酸塩をそれぞれ0.1, 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ の濃度となるように加えた。培養条件は温度18°C、照度2000~3000lx、明暗周期11L:13Dとし、補強海水は7日ごとに交換した。

プロトプラスト・単離細胞の再生個体の生残率は、培養開始0, 7, 14, 21, 28日目に倒立顕微鏡100倍で20~50視野を計数して求めた。さらに、21日目には無作為に抽出した50個体の仮根を除く葉長、形態、発生した仮根の本数を測定した。

### 通気培養における塩分濃度の影響

供試ノリ葉体及びプロトプラスト・単離細胞の作出方法は静置培養の場合と同じとした。ただし、細胞壁分解酵素として0.05%アルカリヘミセルラーゼを使用した。

通気培養はプロトプラスト・単離細胞を含むシャーレ一枚分のアガロース片を入れて行った。補強海水の塩分濃度は18, 20, 22, 24, 26, 28, 30%の8段階とし、その他の培養条件は静置培養の場合と同じとした。

葉長の測定は、培養開始30日目に葉長の大きいものから20個体について行った。

## 結果及び考察

### 静置培養における塩分濃度の影響

塩分濃度別の生残率の変化を図1に示した。生残率は培養開始7日目では各区間の差はほとんどみられなかったが、14日目では0、5%区で急激に低下した。10、20、30%区は14日目に降ほぼ70~90%で推移しており、顕著な差はなかった。また、補強海水の塩分濃度が0%であっても培養開始21日目まで生残個体を確認した。これらの結果から、塩分濃度30%のアガロース培地を用いた場合、重層した補強海水がアガロース培地へ浸透して再生個体に影響を与えるまでにかかなりの日数が必要であることが明らかとなった。

培養開始21日目に各区の任意の50個体について調べた葉長、形態、仮根数を図2に示した。各区の平均葉長は0%区で50.8 $\mu$ m、5%区で69.2 $\mu$ m、10%区で73.0 $\mu$ m、20%区で109.6 $\mu$ m、30%区で108.0 $\mu$ mであり、補強海水の塩分濃度が低くなるほど葉長は小さくなる傾向があった。

形態については、青戸らが行ったプロトプラスト形態変化の観察結果<sup>5)</sup>を参考にして、細胞が多層化したカルス状の個体(カルス様体)、単層だが不定形の葉状体(不定形葉状体)、殻胞子や単胞子が発芽したような葉状体(正常形葉体)、単胞子化した個体(単胞子化個体)、それ以外の形態の個体(その他の個体)の5種類に分類して示した。20、30%区では正常形葉体または単胞子化個体が観察されたが、0、5、10%区ではそれらの再生個体はまったく観察されず、再生個体のほとんどはカルス様体であった。補強海水の塩分濃度が低くなるほど、正常な葉体への形態形成は阻害されると考えられる。さらに、仮根数は塩分濃度が低くなるほど少なくなる傾向があっ

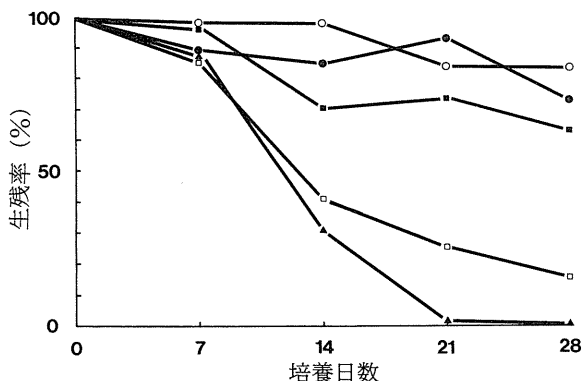


図1 静置培養における塩分濃度別の生残率の変化  
 -▲- : 0%, -□- : 5%, -■- : 10%,  
 -○- : 20%, -●- : 30%

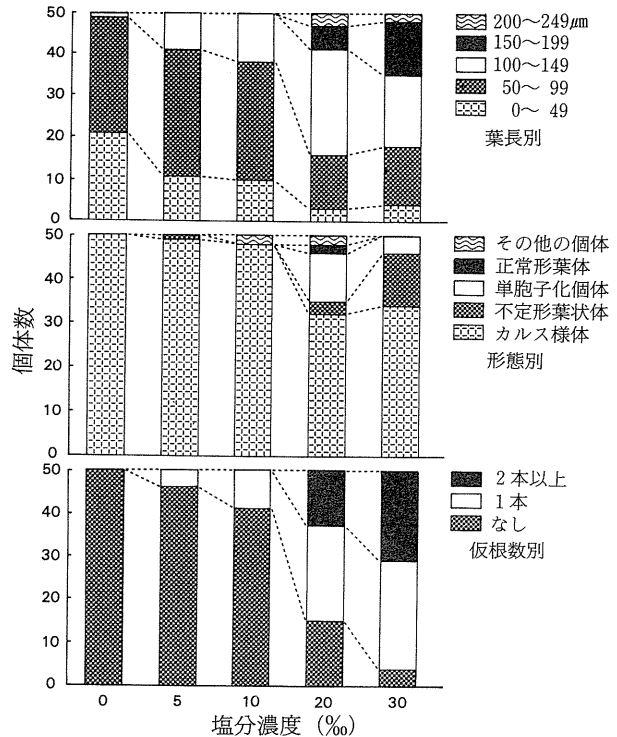


図2 静置培養における塩分濃度の影響

た。この傾向は、岩淵ら<sup>8)</sup>が生長のよい個体ほど仮根数は多くなると報告しているように、低塩分培養液によって形態形成と生長が阻害されて起こった現象であると思われる。

### 通気培養における塩分濃度の影響

培養開始30日目に測定した20個体の葉長とその平均を図3に示した。再生個体の平均葉長は30%区が最も大きく5.9mmであり、補強海水の塩分濃度が低くなるほど小さくなる傾向があった。よって、塩分濃度30%以下の補強海水で通気培養した場合、再生個体の生長に適した塩分濃度は30%であることが明らかとなった。また、塩分濃度20%以上の区では、生長してアガロース培地から外れ、補強海水中でさらに生長する個体が存在したが、18%区の個体は全てアガロース培地中にあり、最大の個体でも0.25mmであった。このことから塩分濃度18%以下の補強海水を使用した場合は、プロトプラスト・単離細胞から葉状体への形態形成は困難であろうと思われる。

## 要 約

1. 補強海水の塩分濃度がナラワスサビノリのプロトプラスト・単離細胞に与える影響を、静置培養と通気培養で検討した。
2. プロトプラスト・単離細胞を静置培養したところ、

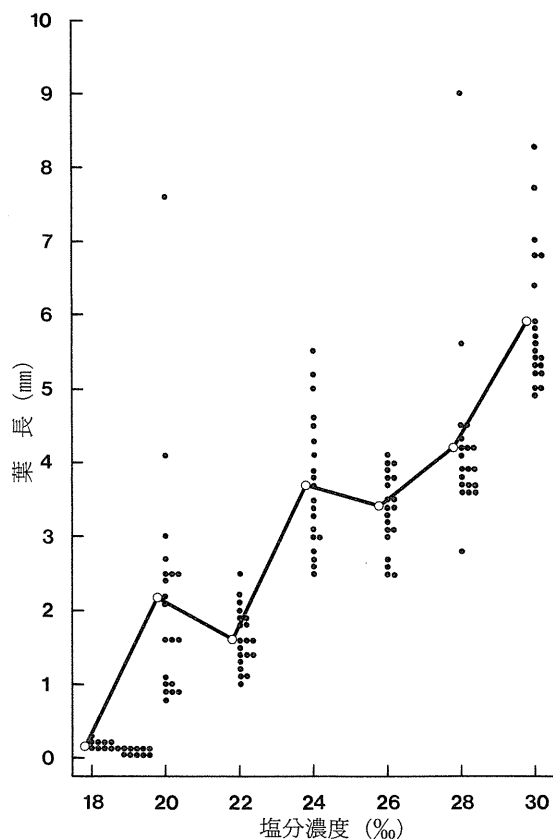


図3 通気培養における塩分濃度別の葉長  
 ●：各区の大きいものから20個体の葉長、  
 ○：20個体の平均葉長

補強海水の塩分濃度が低くなるほど、再生個体の葉長は小さくなり、正常な葉体への形態形成は阻害され、仮根数は少なくなる傾向があった。

3. 静置培養は、補強海水がアガロース培地に浸透して再生個体へ影響を与えるまでにかかりの日数を要することが明らかとなった。

4. プロトプラスト・単離細胞を30‰以下の補強海水で通気培養したところ、再生個体は30‰で最も良い生長

を示し、18‰以下では正常な葉体へ生長しないことが明らかとなった。

## 文 献

- 1) 嵯峨直恒・A. Gibor 1986：藻類の無菌培養。植物バイオテクノロジー，現代化学増刊5，55-71。東京化学同人，東京。
- 2) T. Uchida and S. Arima 1992：Regeneration of protoplasts isolated from the sporophyte of *Cladosiphon okamuranus* Tokida (Chordariaceae, Phaeophyta). *Jpn. J. Phycol.*, 40, 261-266.
- 3) 愛知県水産試験場 1991：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。平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，41-54。
- 4) 福岡県有明水産試験場 1991：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。平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，15-23。
- 5) 佐賀県有明水産試験場 1991：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。平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，24-33。
- 6) 愛知県水産試験場 1993：ノリのプロトプラストを利用した育種技術による新品種開発研究。平成4年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書，1-29。
- 7) 福岡県水産海洋技術センター有明海研究所 1993：ノリのプロトプラスト種苗の利用による地域に適合した新品種の開発。平成4年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書，1-15。
- 8) 福岡県有明水産試験場 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研究開発促進事業報告書，1-17。