

## 養殖ノリプロトプラストの基質に対する付着能

谷田圭亮\*・増田恵一\*

Adhesion of Protoplasts from Cultured Susabi-nori *Porphyra yezoensis*

Keisuke TANIDA and Keiichi MASUDA

養殖ノリのプロトプラストを直接採苗のための種苗として用いる技術が確立すれば、従来のように貝殻系状体を培養しなくとも採苗が可能となる。しかし、プロトプラストは殻胞子と比較してきわめて弱い付着能しか持たず、通常の殻胞子と同様の扱いでの採苗は不可能であるため、何らかの処理が必要であると考えられる。

本試験では、プロトプラストを網糸に付着させるためにアガロースを用いることによって、有効な結果を得たので報告するとともに、今後、プロトプラストが養殖用種苗として利用できるかどうかを検討した。

### 材料と方法

本試験において試料として用いたノリ葉体は、貝殻系状体より実験室内で採苗し、約30日通気培養を行ったものである。前報<sup>1)</sup>に従い、プロトプラストを作出し、 $1.5 \times 10^5$  cells/mlのプロトプラスト懸濁液を作成した。

プロトプラストを付着させる基質は、長さ約5 cmの滅菌したノリ養殖用網糸を用いた。

#### 1) 網糸に直接付着させる方法

60mmプラスチックシャーレに網糸を入れたものに、プロトプラスト懸濁液10mlを加え、20℃で静置した。網糸は3時間後、1日後および3日後に取り出し、通気培養に移した。通気培養は、SWM-Ⅲ改変液で18℃、2000lx、L/D=12/12の条件で丸底フラスコを用いて行った(第1図)。プロトプラストの付着数および生残率は、網糸をプロトプラスト懸濁液から取り出した直後と、通気培養を行ってから1週間後に網糸に付着しているプロトプラストを、光学顕微鏡100倍の投光下で10視野計数し、その平均として求めた。

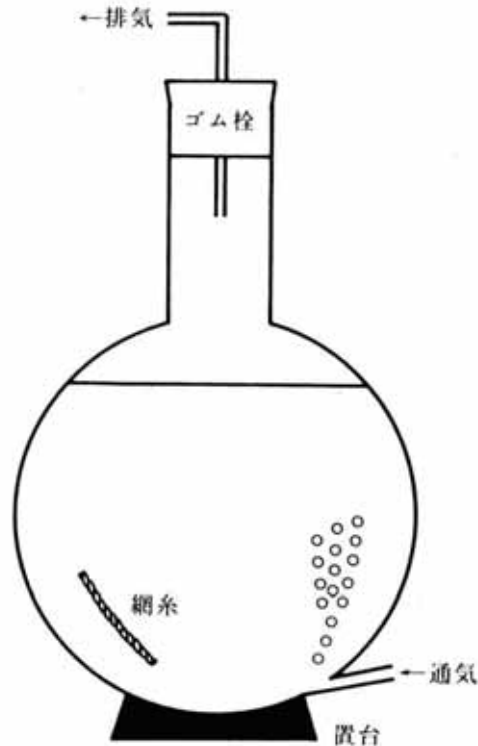
#### 2) アガロース皮膜をつくった網糸に付着させる方法

0.5%アガロース(SWM-Ⅲ改変液ベース)を40℃で保持し、そこに網糸を入れてすぐに取り出すことにより、アガロース皮膜をつくる。十分に冷めてから1)と同様に、60mmプラスチックシャーレにこの網糸を入れ、プロトプラスト懸濁液を10ml加え、20℃で静置した。網糸は3時間後、1日後、3日後に取り出し、通気培養に移した。プロトプラストの付着数および生残率は、1)と同様の方法で求めた。

\* 兵庫県立水産試験場 (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Akashi 673)

### 3) プロトプラスト懸濁液をアガロースと混和して網糸に付着させる方法

プロトプラスト懸濁液を、アガロース溶液と混和し、強制的に網糸に付着させた場合の生残率を求めた。すなわち、あらかじめSWM-Ⅲ改変液中に、0.6%、1.2%、2.0%および3.0%になるようにアガロースを調整し、40℃で保持したアガロース溶液 0.5mlとプロトプラスト懸濁液 0.5mlを混和（アガロースの最終濃度はそれぞれ0.3%、0.6%、1.0%および1.5%）したものを速やかに網糸にたらし、アガロースが固化するのを待って通気培養を行った。これらについても通気培養を行う直前と、1週間後にプロトプラストを計数し、生残率を求めた。



第1図 養殖ノリプロトプラストを付着させた網糸の通気培養装置

## 結 果

### 1) 網糸に直接付着させる方法

直接網糸に付着させたプロトプラストの生残率について、第1表に示す。

網糸をプロトプラスト懸濁液から取り出した直後では、3時間静置したものが最も多い付着数を示し、静置時間が長くなるにしたがって付着数が減少する傾向がみられた。しかし、通気培養に移して1週間後には、3時間静置したものは全てのプロトプラストが脱落した。3日間静置したものでは静置中に約65%にまで減少したにもかかわらず1週間後の生残率は最も高い傾向がみられた。プロトプラスト懸濁液中の静置時間が短いほど多くのプロトプラストが脱落または枯死する傾向がみられた。

### 2) アガロース皮膜をつくった網糸に付着させる方法

アガロース皮膜をつくった網糸に付着させたプロトプラストの生残率について、第2表に示す。

アガロース皮膜をつくった網糸についても、1)と同様の結果が得られた。すなわち、プロトプラスト懸濁液中に静置する時間が長いほど、通気培養を行ってから1週間後の生残率が高い傾向がみられた。

## 谷田・増田：養殖ノリプロトプラストの付着能

また、アガロース皮膜をつくった網糸は、処理をしない網糸よりも高い生残率を示した。

しかし、1週間後では発芽を始め、2～4細胞にまで生長してはいるものの、半数以上のプロトプラストが仮根によって直接網糸に付着するのではなく、アガロース皮膜の上に乗っている状態であった。このことは、さらに継続して培養を行ううちに脱落する可能性があるものと思われる。

## 3) プロトプラスト懸濁液をアガロースと混和して網糸に付着させる方法

プロトプラスト懸濁液と混和したアガロース溶液の最終濃度別プロトプラストの生残率について、第3表に示す。

通気培養に移す直前のプロトプラスト付着数は、アガロース最終濃度 0.6%のものが最も多く、1週間後の生残率も約58%と最も高かった。アガロース濃度はこれより高くても低くても付着数、生残率ともに低下する傾向がみられた。

第1表 直接網糸に付着させたノリプロトプラストの生残

|         | 3時間静置     | 1日間静置     | 3日間静置     |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 通気培養開始時 | 5.9±1.578 | 5.0±1.549 | 3.8±1.661 |
| 培養1週間後  | —         | 0.2±0.400 | 0.6±1.020 |

注) 数値は顕微鏡100倍1視野あたりの平均個体数±標準偏差

第2表 アガロース皮膜をつくった網糸に付着させたノリプロトプラストの生残

|         | 3時間静置     | 1日間静置     | 3日間静置     |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 通気培養開始時 | 7.8±1.661 | 6.3±1.792 | 4.8±1.536 |
| 培養1週間後  | 0.3±0.458 | 1.4±1.114 | 1.8±1.327 |

注) 数値は顕微鏡100倍1視野あたりの平均個体数±標準偏差

第3表 プロトプラスト懸濁液をアガロースと混和して網糸に付着させたノリプロトプラストの生残

| アガロース濃度* | 0.3%      | 0.6%      | 1.0%      | 1.5%      |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 通気培養開始時  | 3.0±1.483 | 6.0±1.732 | 3.8±1.600 | 3.1±1.640 |
| 培養1週間後   | 0.3±0.640 | 3.5±1.565 | 1.9±1.221 | 1.3±0.900 |

\* プロトプラスト懸濁液と混和後のアガロース濃度

注) 数値は顕微鏡100倍1視野あたりの平均個体数±標準偏差

## 考 察

養殖ノリのプロトプラストは、作出直後でも網糸に対してごく弱い付着能をもっている。<sup>2, 3)</sup> また、その付着能を高める方法として、一定の静置培養期間をおく、<sup>2)</sup> プロトプラスト懸濁液にアガロース溶液を混和する、<sup>3, 4, 5)</sup> アガロース皮膜をつくった網糸にプロトプラストを付着させる等の方法が有効であることがわかった。しかし、いずれの方法でも1週間の通気培養によって多くのプロトプラストが脱落または枯死し、発芽までに要する時間も殻胞子とは比べものにならないほど長かった。

これらの現象は、そもそもプロトプラストが細胞壁をもたない細胞であることが大きな理由であると考えられる。殻胞子や単胞子では細胞壁が細胞内部を強力に保護するとともに、細胞壁に含まれる粘質多糖類がその付着に大きな役割をもっているものと考えられる。<sup>4)</sup>



また、アガロースを用いてプロトプラストを強制的に網糸に付着させた場合、発芽しても仮根が網糸に付着しない個体が多くみられ、これらは培養を続けるうちに脱落する可能性が高いものと思われる。

プロトプラストを養殖用の種苗として利用するためには、作出にかかる時間とコストを軽減すること、細胞壁を形成し、発芽を始めるまでの時間の短縮を図ること、最終的に生き残る個体数から逆算してプロトプラスト懸濁液をつくることなど、大きな問題が残されており、実際の養殖現場での利用は現在のところ不可能であると考えられる。しかし、選抜育種などの試験を行う目的で、ごく小規模での野外養殖試験のために利用することは可能であるということが示唆された。

## 要 約

養殖ノリプロトプラストの網糸に対する付着能について試験を行い、プロトプラストが養殖用種苗として利用できるかどうかを検討した。

プロトプラストは作出直後にも弱い付着能をもつが、一定期間の静置培養を行うことやアガロースを用いて強制的に付着させることによって付着能を高めることができた。現段階では選抜育種等の小規模な野外養殖試験に利用することは可能であろう。しかし、養殖用種苗として用いるためには、処理の簡素化やコストの低減を図るなどの問題が残されている。

## 文 献

- 1) 谷田圭亮, 増田恵一: プロトプラストを選抜育種に用いた養殖ノリ形質の固定化, 兵庫水試研報, 29, 17-23, 1991.
- 2) 佐賀県有明水産試験場: 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, 1988.
- 3) 福岡県有明水産試験場: 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, 平成元年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, 1990.
- 4) 佐賀県有明水産試験場: 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, 1991.
- 5) 愛知県水産試験場: 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, 1991.
- 6) 右田清治: ノリ殻胞子と単胞子の着生, 長崎大学水産学部研報, 33, 39-48, 1972.