

アサクサノリ同型接合糸状体の作出と無菌培養

内田 卓志・有馬 郷司

Preparation of Homozygous Free-living Filaments of *Porphyra tenera* in Axenic Culture

Takuji UCHIDA and Satoshi ARIMA

In nature, *Porphyra* conchospores are sometimes diploid, and meiosis occurs during their germination, thus the thalli that develop from them consist of genetically heterogeneous cells. To obtain genetically homogeneous conchospores for physiological and genetic studies we prepared homozygous free-living filaments of *P. tenera* in axenic culture. First, a thallus with genetically homogeneous cells was produced by culturing single cells which were isolated enzymatically from the thallus of *P. tenera*. Then, the thallus from a single cell was sterilized with a "dip & drag" technique in an agar plate containing antibiotics. The sterilized thallus was inoculated into ST₃ sterility test medium. Within 10 days of inoculation, sexual reproduction occurred resulting in the production of carpospores through self-fertilization. The free-living filaments germinated from the carpospores were homozygous and axenic. The free-living filaments were maintained at 20°C under continuous illumination. When the filaments were transferred to a 9 h light period, conchospores, which were genetically homogeneous and axenic, were formed and released 6-10 days after the transfer.

Key words: *Porphyra*, free-living filament, homozygote, axenic culture, single isolated cell

水産業上重要な海藻であるアマノリ属については、プロトプラストを用いた選抜育種やプロトプラストの融合など品種改良に関する研究が盛んに行われている。また一方ではノリの病気が養殖上問題となっており、その原因究明及び予防対策を講じるための研究が重要である。これらの研究に取り組むにあたっては、それぞれ専門の技術導入が不可欠であるが、研究材料として適した株の作出及びその室内培養実験系の確立が重要かつ基本的な課題であると考えられる。すなわち、育種に関しては、研究材料として純系株の保存が重要であるし、病気についてはその原因究明にあたって無菌培養株を用いた生理実験が有効な研究方法であると考えられる。

アマノリ属葉体の核相は半数体であるため、自家受精によって形成された糸状体は同型接合体と考えられていた。しかし、殻胞子が二倍体でしかも発芽時に還元分裂することがあり、その結果生育した葉体は遺伝的に異なる細胞から成ることが考えられる(馬・三浦 1984)。この場合自家受精の結果形成された糸状体は必ずしも同型接合体とはいえない。従って同型接合体を得るためには、鬼頭(1985)も指摘しているように、葉体のプロトプラスト等核相が確実に半数体である細胞を単離培養し、生育した葉体を自家受精させる必要がある。また、海藻の無菌化はかなり

困難な操作であるため、一度無菌化した藻体をそのまま長期間保存し、必要に応じて無菌の、しかも実験に適した生活環ステージの材料が容易に得られるような実験系を確立しておくことが望ましい。

著者らは、育種及び病理を前提としたアマノリの生理学的な研究を行っているが、本報告ではこれらの実験を行うための材料として、無菌でしかも遺伝的に均質な殻胞子を得る実験系を検討した結果について述べる。

本研究を行うにあたって御助言、御指導を戴いた南西海区水産研究所資源増殖部長月館潤一博士に深謝致します。

材料及び方法

本研究においては Fig. 1 に示す一連の操作を行うことによって無菌で同型接合の糸状体を作成した。まず、殻胞子を培養して得た葉体を酵素処理し、単離細胞を調製した。次に単離細胞を培養して遺伝的に均質な細胞から成る葉体を生育させた。さらに無菌化した葉体を自家受精させ、同型接合体を作成した。以下に各処理段階ごとに実験方法を述べる。

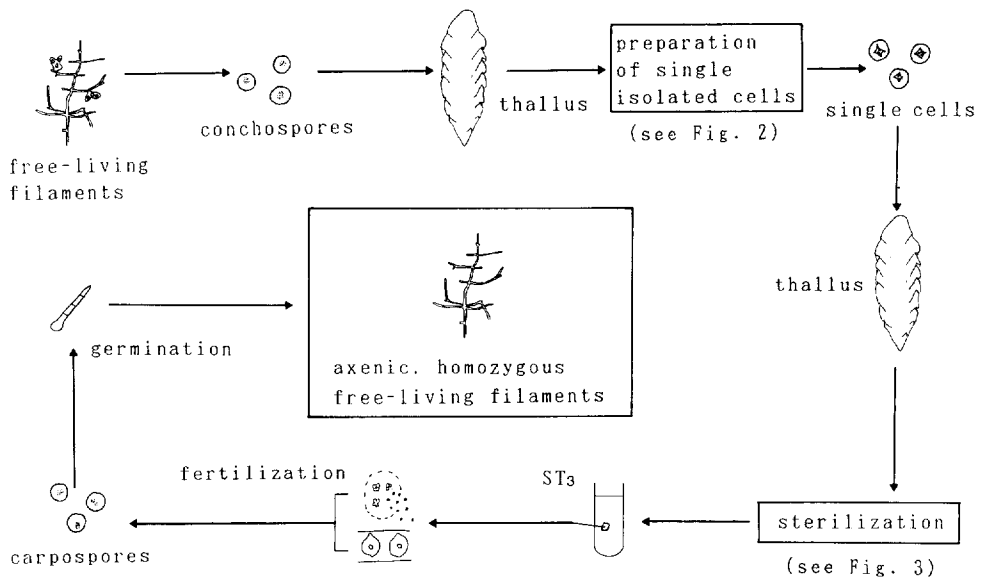


Fig. 1. Diagram of procedures for axenic culture of homozygous free-living filaments of *Porphyra tenera*.

供試材料

実験材料には山口県産で、南西海区水産研究所において継代培養しているアサクサノリ (*Porphyra tenera* KJELLMAN) のフリー糸状体を用いた。単離細胞の調製に用いた葉体は、フリー糸状体から得た殻胞子を 20°C、1 日 9 時間照明 (3,000 lx) の条件下で 40 日間培養して得たものである。培養液として PES (PROVASOLI 1966) を用い、培養器としては直径 9 cm のフラット

シャーレまたは 100 ml 容の三角コルベンを使用した。

単離細胞の調製

単離細胞の調製は Fig. 2 に示す手順で室温 20°C の条件下で行った。葉体約 40 mg をパパインを含む 5 ml の酵素液 I (Table 1) に入れて軽い振盪を加えながら 15 分間処理した。次に洗浄液を用いて葉体に付着したパパインを完全に除去した後、約 1 mm 角に細断し、アワピアセトン粉末 (Sigma 社製) 及びセルラーゼ (Onozuka R-10, ヤクルト社製) 等を含む酵素液 II (Table 1) 5 ml に懸濁した。酵素液 II による処理は 1 分間に約 20 回の往復振盪を与えながら 1 時間行った。これらの処理によって得た単離細胞は 20 μ m メッシュのナイロンガーゼを用いて分離した後洗浄し、PES 培養液中で培養した。単離細胞の培養条件は殻胞子の場合と同様である。

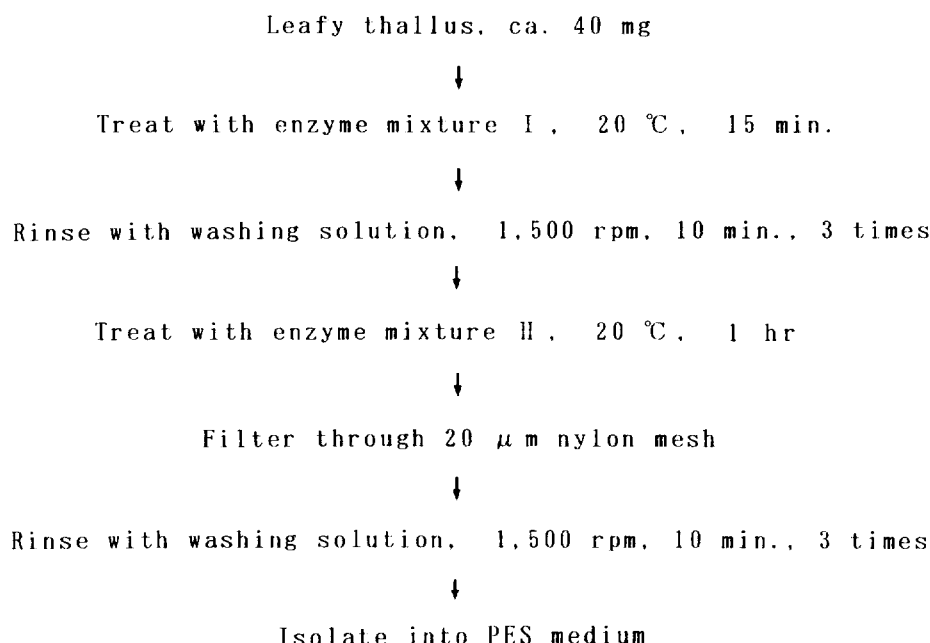


Fig. 2. Method for preparation of single cells of *Porphyra tenera*.

Table 1. Composition of enzyme solution and washing solution

Component	Enzyme solution I	Enzyme solution II	Washing solution
Papain	100 mg	—	—
AAP* ¹	—	200 mg	—
Cellulase* ²	—	100 mg	—
MES* ³ (1 M)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Dextran sulfate potassium salt	50 mg	50 mg	50 mg
Seawater	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
pH	6.0	6.0	6.0

*¹ Abalone acetone powder (Sigma)

*² Cellulase Onozuka R-10 (Yakult)

*³ 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid

Table 2. Composition of antibiotics mixture

Antibiotics	Amounts/30 ml
Penicillin G potassium salt	300,000 units
Streptomycin sulfate	120 mg
Chloramphenicol	60 mg
Polymyxin B sulfate	1,500 units
Tetracycline hydrochloride	3,000 units

葉体の無菌化

葉体の無菌化は Fig. 3 に示す手順で行った。単離細胞を約40日培養して得た葉体を約5mm角の細片にした後、抗生物質混液を含む海水中に入れて振盪した。次いで葉体細片を1片ずつ抗生物質混液を含む海水寒天プレート中で引きずり回し (dip & drag technique; IWASAKI 1965, TATEWAKI and PROVASOLI 1964, TSUKIDATE 1977), 葉体に付着した細菌を除去した。なお、抗生物質混液は Table 2 に示した組成の原液をメンブランフィルター (孔径 0.2 μm) で濾過した後、滅菌海水で10倍に希釈して使用した。

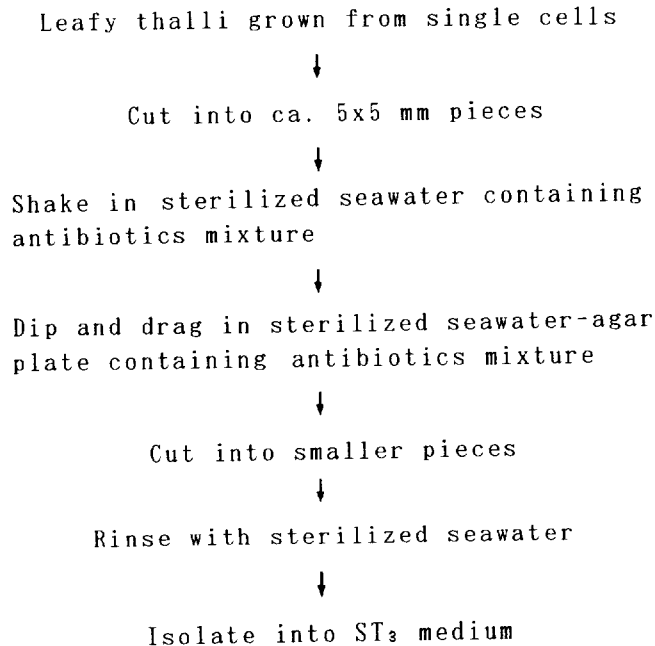


Fig. 3. Method for axenic culture of *Porphyra tenera*.

このように処理した葉体細片は ST₃ (PROVASOLI *et al.* 1957) に単離し、20°C、1日9時間照明の条件下で培養し、有性生殖による糸状体形成を観察した。

無菌検査

無菌検査は ST₃ 及び STPm (IWASAKI 1965) 培養液に材料を植え付け、20°C で1~2カ月培養

後、細菌の生長の有無を確認することにより行った。

糸状体の保存培養

糸状体の保存は ASP12NTA (PROVASOLI *et al.* 1957) 及び ST₃ 培養液中で 20°C, 連続光 (照度 200~600 lx) の条件下で行った。培養器としてねじ蓋付き試験管 (18×130 mm) を用いた。

結 果

単離細胞の調製とその生長

酵素液Ⅱによる処理を開始してから15分後には数細胞からなる細胞塊がみられ、1時間後には単離細胞が多数認められた。しかし、1時間以上酵素処理を続けると死細胞が著しく増加するため酵素液Ⅱによる処理時間は1時間とした。単離細胞 (Plate I-1) は球形であることからプロトプラストあるいはこれに近い状態になっているものと考えられる。

単離細胞は PES 培養液中で活発に細胞分裂を繰り返し、約1カ月後には葉長 0.5 cm 前後となった。葉体は Plate I-2 に示す正常な形態の個体の他に、仮根が複数形成された個体や胞子嚢状になった個体が認められた。

葉体の無菌化及び無菌葉体の培養

本研究において無菌化に成功した個体は22個体中2個体であった。他の個体については無菌検査培養液中で1カ月以内に細菌の増殖が認められた。無菌処理後 ST₃ に植え付けた葉体では10日後に有性生殖による果胞子形成が確認された。果胞子は発芽して正常な形態のフリー糸状体となった (Plate I-3)。

無菌糸状体の保存及び殻胞子形成

フリー糸状体は 20°C, 連続光下で ST₃ 及び ASP12NTA 両培養液中で良好な生長を示したが、殻胞子の放出は認められなかった。殻胞子の放出は明暗周期を与えた場合にみられ、フリー糸状体を 20°C, 1日9時間照明 (照度 3,000 lx) の条件に移した場合、6~10日後に殻胞子を放出した (Plate I-4)。

糸状体は無菌化してから 20°C, 連続光下で継代培養しているが、1年以上経過しても細菌の混入は認められず、明暗周期を与えることにより比較的短期間で容易に遺伝的に均質で無菌状態の殻胞子を得ることが可能となった。

考 察

酵素を用いた海藻の単離細胞あるいはプロトプラストの調製に際しては、浸透圧調節の目的で酵素液に 0.7~1 M の濃度のマンニトールあるいはソルビトールが加えられることが多いが (内

田 1991), アマノリの場合, このような浸透圧調節は必要がないとの報告がある (切田ほか 1988)。本報告においても特に浸透圧調節をしないでアサクサノリ葉体の酵素処理を行ったが, 発芽能力を持つ単離細胞を分離することができた。この方法は単離細胞分離後の洗浄操作が容易になること, 浸透圧調節物質の培養液への持ち越しがなく, 細菌の増殖が少なくてすむことなどの利点があると考えられる。

単離細胞を得る操作は確実に半数体の体細胞を得る目的で行った。アマノリ属の葉体は生長の過程で単胞子を放出することが知られているが, 単胞子を培養して得た葉体も遺伝的に均質な細胞から成っていると考えられる。したがって単離細胞の代わりに単胞子を利用することも可能であるが, 任意の時期に得られるという意味からは単離細胞を用いる方法が優れていると考えられる。

紅藻類は生活環の中で運動性を持つステージが全くないため, 海藻類の中でも無菌化が困難であり, 抗生物質を含む海水で胞子を洗浄する方法 (TATEWAKI *et al.* 1989) や藻体を抗生物質を含む寒天プレート中で藻体を引きずり回し, 付着した細菌を除く方法 (TATEWAKI and PROVASOLI 1964, IWASAKI 1965, TSUKIDATE 1977) が用いられている。本研究においても抗生物質を含む海水で藻体を振盪し, 次に抗生物質を含む海水寒天プレート中で藻体を引きずり回すことにより, 無菌葉体を得ることができた。無菌化率は22個体中2個体と10%に満たなかったが, IWASAKI (1965) 及び TSUKIDATE (1977) も基本的には同様の方法でアマノリ葉体の無菌化に成功しており, アマノリの無菌個体を得るには現在のところこの方法が確実と考えられる。

アマノリ葉体の生長及び成熟は日長条件によって影響を受け, 長日条件では生長が抑制され, 糸状体の形成が促進されることが知られている (IWASAKI 1961)。本研究においては無菌処理した葉体を ST₃ 培養液中で培養することにより有性生殖が促進され, 17日後には糸状体の生長がみられた。この場合は葉体の培養はすべて短日条件で行っていることから, 日長条件以外にも培養液成分の変化等有性生殖を誘起する要因が存在することが示唆される。糸状体は 20°C, 連続光下で培養した場合, 生長は良好であったが, 殻胞子の放出はみられなかった。この結果はこれまでに報告されている実験結果と一致する (IWASAKI 1961, 安部 1986)。また, 20°C, 連続光下で培養した糸状体に明暗周期を与えた場合糸状体は速やかに殻胞子を放出した。このような糸状体の性質を利用すると必要な時にステージの揃った殻胞子を得ることが可能で, 殻胞子を材料とした研究に好都合と考えられる。

以上のように同型接合の糸状体を無菌で保存培養し, 遺伝的に均質な殻胞子を得る実験系を確立することができた。しかし, TSUKIDATE (1977) は無菌静置培養では正常な形態の葉体は形成されず, 振盪培養をおこなうことにより正常葉体が得られることを報告している。しかし振盪培養を行った場合でも無菌状態では生長が遅いことから, 今後本研究で得た実験系を用いて細菌がアマノリの生長に及ぼす影響を検討し, 無菌葉体の最適培養条件を見出す必要がある。

摘 要

1. アサクサノリの育種及び生理の研究を行うための実験材料として無菌で同型接合のフリー糸状体を作成した。
2. 同型接合体は葉体を酵素処理することによって得た単離細胞を培養し、生育した葉体を自家受精させることにより作成した。
3. 無菌のフリー糸状体は抗生物質で処理した葉体細片に有性生殖を行わせることにより得た。
4. 無菌・同型接合のフリー糸状体は 20°C、連続光照射のもとで良好な生長を示したが、殻胞子の放出はみられなかった。
5. 殻胞子の放出はフリー糸状体に明暗周期を与えた場合にみられた。放出された殻胞子は無菌で遺伝的に均質と考えられる。

文 献

- 安部 昇, 1986: ノリの種苗生産及び育苗管理に関する研究. 福岡県有明水産試験場臨時研究報告, 1-78.
- IWASAKI, H., 1961: The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull.*, **121**, 173-187.
- IWASAKI, H., 1965: Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera* I. The influence of different B₁₂ analogues, plant hormones, purines and pyrimidines on the growth of conchocelis. *Plant & Cell Physiol.*, **6**, 325-336.
- 切田正憲・佐々木和之・岩淵光伸, 1988: 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 (I). 福岡有明水試研報, 昭和61年度, 9-26.
- 鬼頭 鈞, 1985: ノリのプロトプラストの作出と個体の再生. 農林水産技術研究ジャーナル, **8**, 20-24.
- 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.
- PROVASOLI, L., J. J. A. McLAUGHLIN and M. R. DROOP, 1957: The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, **25**, 392-428.
- PROVASOLI, L., 1966: Media and prospects for the cultivation of marine algae. In "Culture and collections of algae" (ed. by WATANABE, A. and A. HATTORI), *Jap. Soc. Plant Physiol.*, Tokyo, 63-75.
- TATEWAKI, M. and L. PROVASOLI, 1964: Vitamin requirements of three species of *Antithamnion*. *Botanica Marina*, **6**, 193-203.
- TATEWAKI, M., X. WANG and I. WAKANA, 1989: A simple method of red seaweed axenic culture by spore-washing. *Jpn. J. Phycol.*, **37**, 150-152.
- TSUKIDATE, J., 1977: Microbiological studies of *Porphyra* plants-VI. An investigation of bacteria-free culture of *Porphyra* with a shaking culture apparatus. *Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab.*, **10**, 113-121.
- 内田卓志, 1991: 第9章 藻類. 「農林水産研究文献解題 17植物バイオテクノロジー編」農林水産技術会議事務局編, (財)農林統計協会, 東京, 624-639.

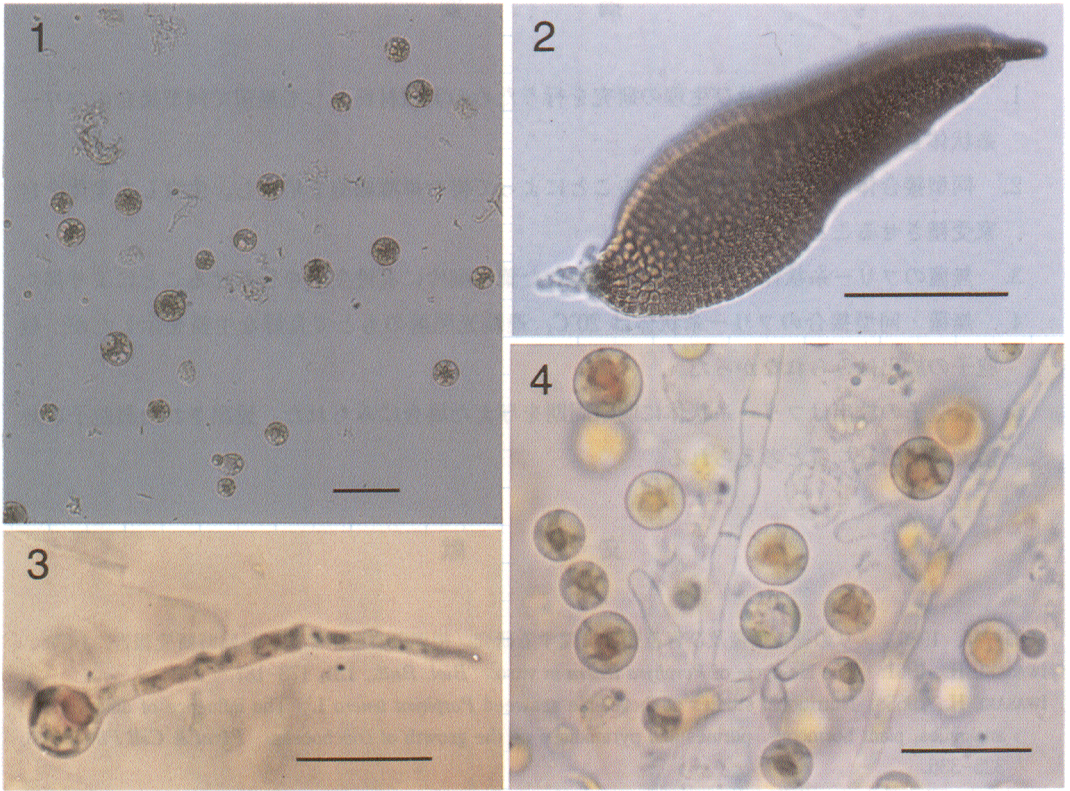


Plate I. Various stages of *Porphyra tenera* in culture.

- I-1.; Single cells isolated from a leafy thallus of *Porphyra tenera*. Scale bar = 20 μm
- I-2.; Leafy thallus grown from a single cell. Scale bar = 100 μm
- I-3.; Axenic, homozygous free-living filament. Scale bar = 20 μm
- I-4.; Conchospores released from axenic, homozygous free-living filaments. Scale bar = 20 μm