

ノリ保存株から分離したクローン株の素材評価

横尾一成・三根崇幸・荒巻 裕・川村嘉応

Evaluation as Material of the Clonical Line Strain Separated from Preservation Strains of Nori, *Porphyra yezoensis*

Kazunari YOKOO, Takayuki MINE, Hiroshi ARAMAKI, and Yoshio KAWAMURA

Four clonical line strains from preservation strains by using the monospore were estimated to be useful materials for breeding and gene-analysis under laboratory culuture and field culture. we evaluated them on four parameters : growth of thalli, the number of releasing monospores and sheets and grade of dried Nori. From the result of evaluations, one strain was useful as a breeding material, and four strains were useful as gene-analysis materials. Therefore, the seperation procedure of clonical line strain in the present study could contribute to obtaining not breeding materials but gene - analysis ones.

まえがき

陸上植物,特にイネにおいては,品種の純系化や特性等の整理が厳密に行われており,従来から遺伝的なホモ集団である純系株の優良品種同士を交雑した1代雑種を利用する育種法が行われている^{1,2)}。

一方,ノリ養殖では,全国のノリ養殖漁場において1,000種類あまりの養殖株が品種として実用に供されているが,そのほとんどが純系化されておらず,形態や生理的特性など厳密に整理されていない^{3,4)}。そのため,交雑についての報告^{5,6)}はあるものの,養殖現場における普及例は少ない。

また,近年,遺伝子解析技術の発展により,有用遺伝子の検索や遺伝子発現機構の解明等に寄与できるような,特性が明白で遺伝的に均一なクローン株が必要となっている^{7,8)}。

そのため,本試験では,ノリ保存株からクローン株を分離し,育種素材および遺伝子解析素材としての素材評価を行い,分離手法の有効性について検討した。

材料および方法

1. クローン株の分離

供試株は,選抜育種によって高生長株として作出され,フリー糸状体で保存されていた,スサビノリ *Porphyra yezoensis* D-14-1, D-22-1, D-46-2, D-48-2の4株である。クローン株の分離は,それぞれの株の殻胞子発芽葉体から放出させた単胞子1個体を取り,葉体に生育させ,成熟,自家受精させてフリー糸状体にし,保存培養することによって行った。培養条件は,水温18°C,塩分30PSU,光強度90 μ mol/sec/m²で12時間明期:12時間暗期であった。培養期間は,単胞子の放出が7~14日間,単胞子の成熟,自家受精が約38日間であった。なお,殻胞子発芽葉体および単胞子は,それぞれ8cmと5cmのビニロン単糸に付着させて培養した。

クローン株の名称は,D-14-1から分離したものをJ-14-1とした。同様にD-22-1からJ-22-1, D-46-1からJ-46-1, D-48-2からJ-48-2とした。

2. 素材評価

①室内評価

評価に供した株は,1.の試験により分離したクローン株4株と対照株のD-48-2である。それぞれの株から得られた殻胞子は,8cmのビニロン単糸へ付着させた。付着

密度は、試験開始時がビニロン単糸1本当たり100~300個、その後、間引き等の調整により培養12日後以降が、ビニロン単糸1本当たり約100個であった。培養は、SEALIFE (マリンテック社製) にESS₂を8cc/ℓの割合で添加した人工培養海水⁹⁾を用い、塩分30PSU、光強度90 μmol/sec/m²で12時間明期:12時間暗期から11時間明期:13時間暗期まで6日毎に15分ずつ明期を短くしていく周期のもとで30日間行った。水温は、30日間で22.5℃から18.5℃まで低下させた。葉体は、培養24日後までビニロン単糸に付着した状態で培養し、その後は、ビニロン単糸から外して浮遊させた状態で培養した。付着状態における培養は、1ℓの培養フラスコを用い、培養液の液量は800mlとした。浮遊状態における培養は、5ℓの培養フラスコを用い、培養液の液量は4ℓとした。

葉長、葉幅の測定は、6日間隔で行った。ただし測定には、1本のビニロン単糸に付着している葉体の中から、より大型の個体10個を用いた。単胞子の放出期間と放出量の測定は、培養12日後から毎日行い、照明の点灯開始時刻の午前8時から8時間、培養容器中に投入した5cmのビニロン単糸への単胞子の付着個数を計数した。なお、葉体の付着したビニロン単糸を滅菌海水入りの試験管に入れて激しくシェイクする作業を3日間隔で行い、換水を6日間隔で行った。

②野外評価

評価に供した株は、1.の試験により分離したクローン株4株と対照株の佐賀5号、D-48-2である。それぞれの株から得た殻胞子は、養殖網(1.5×18m)に当センター敷地内にある水車式陸上採苗機を用いて付着させた。付着殻胞子数は、6株ともに網糸1cm当たり、約50個体であった。試験は、佐賀県福富町地先約2.5kmに位置する本センターの六角試験地において、10月7日から11月7日までの秋芽網期と12月13日から12月25日までの冷凍網期の2期間に分けて行った。なお、冷凍網期は、秋芽網期において10月30日まで養殖し、その後、冷凍保存した養殖網を用いた。ノリ葉体の摘み取りは、いずれの養殖期間も試験終了日に行い、ノリ乾燥機(古賀産業製)によって乾ノリ製品とした。乾ノリ製品の等級格付けは、佐賀県漁業協同組合連合会のノリ等級検査員によって実施された。

葉長、葉幅の測定は、2~3日間隔で行った。ただし測定には、網糸2cmに着生したノリ葉体のうち、葉長についてより大型の10個体を用いた。単胞子の放出期間及び放出量の測定は、2~3日間隔で行い、顕微鏡観察により網糸2cmに付着した単胞子の個体数を計数した。な

お、測定は、殻胞子発芽葉体が100細胞以上となった7日後から行い、1~2細胞の健全な幼芽を単胞子と見なした。海況は、六角試験地の横に設置している自動観測塔における水温、塩分の昼間満潮時測定値で表示した。

結 果

1. クローン株の分離

単胞子の放出は、各株の殻胞子発芽葉体から培養約2週間後に見られた。単胞子の付着数は、いずれの株も5cmのビニロン単糸に数個~十数個であった。選択した1個体の単胞子から得たフリー糸状体は、いずれの株も約6ヶ月間で湿重約0.2gになった。

2. 素材評価

①室内評価

室内培養における各々の葉長はFig.1に示すとおりである。培養18日後における平均葉長は、D-48-2が12.32mm、J-14-1が14.06mm、J-22-1が9.80mm、J-46-1が8.31mm、J-48-2が11.47mmであった。培養30日後における平均葉長は、D-48-2が96.85mm、J-14-1が98.41mm、J-22-1が42.82mm、J-46-1が21.92mm、J-48-2が75.68mmであった。培養30日後の平均葉長は、D-48-2とJ-14-1がほぼ同じ値でもっとも高い生長を示し、J-46-1がもっとも低い生長を示した。

葉幅比は、Fig.2に示すとおりである。培養30日後の葉幅比は、対照株のD-48-2が29.9と最も大きく、J-46-1が17.0と最も小さかった。

単胞子の放出期間と放出量は、すべての株においてビニロン単糸への単胞子の付着数が少なかったために株間の違いを比較できなかった。

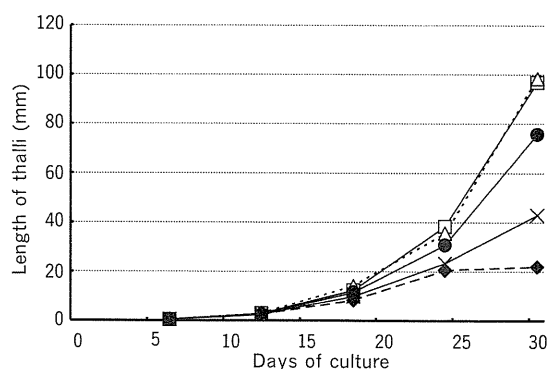


Fig. 1. Growth of Nori thalli in laboratory cultivation. □, D-48-2; △, J-14-1; ×, J-22-1; ◆, J-46-1; ●, J-48-2.

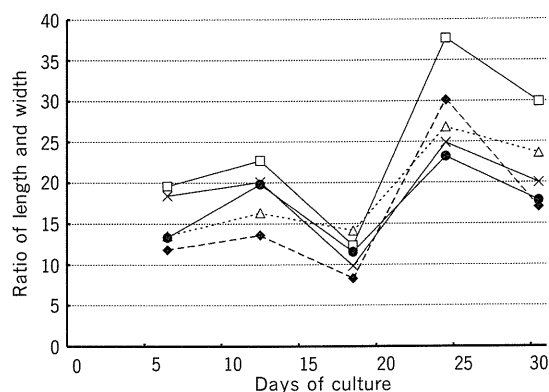


Fig. 2. Ratio of length and width at Nori thalli in laboratory cultivation.

□, D-48-2; △, J-14-1; ×, J-22-1; ◆, J-46-1;
●, J-48-2.

②野外評価

六角試験地における水温、塩分の日変化はFig. 3, 4に示すとおりである。水温は、平年値と比較すると、10月中旬までやや高く推移したが、10月下旬から低く推移した。特に10月下旬から11月の低水温は著しく、平年値の2～4℃低い値であった。塩分は、試験期間を通してほぼ平年並みであった。

秋芽網期における各株の葉長はFig. 5に示すとおりである。培養18日後の(10月24日)の平均葉長は、佐賀5号が6.36mm, D-48-2が4.43mm, J-14-1が6.52mm, J-22-1が6.12mm, J-46-1が5.89mm, J-48-2が6.08mmであった。培養30日後(11月5日)の平均葉長は、佐賀5号が106.24mm, D-48-2が121.20mm, J-14-1が91.13mm, J-22-1が104.09mm, J-46-1が90.24mm, J-48-2が64.48mmであった。培養30日後の平均葉長は、D-48-2が最も大きく、高い生長を示し、J-48-2が最も小さく、低い生長を示した。

冷凍網期における各株の葉長はFig. 6に示すとおりである。冷凍網期の開始時における平均葉長は、佐賀5号が45.48mm, D-48-2が25.42mm, J-14-1が24.98mm, J-22-1が32.09mm, J-46-1が28.94mm, J-48-2が34.64mmであった。培養13日後(12月25日)の平均葉長は、佐賀5号が160.53mm, D-48-2が233.20mm, J-14-1が133.63mm, J-22-1が148.95mm, J-46-1が149.30mm, J-48-2が96.39mmであった。

秋芽網期における各株の葉幅比はFig. 7に示すとおりである。培養の30日後の葉幅比は、D-48-2が最も大きく28.7であり、J-48-2が最も小さく16.3であった。

冷凍網期における各株の葉幅比はFig. 8に示すとおりである。培養30日後の葉幅比は、D-48-2が最も大きく

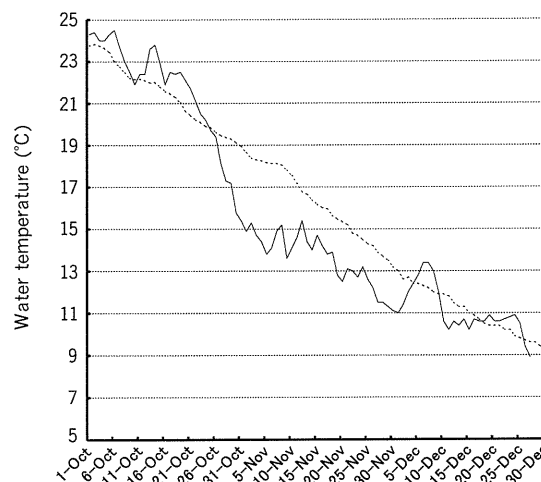


Fig. 3. Change in the water temperature on the high water during daylight in the experimental site. Solid line, 2002; Broken line, annual average value from 1973 to 2001.

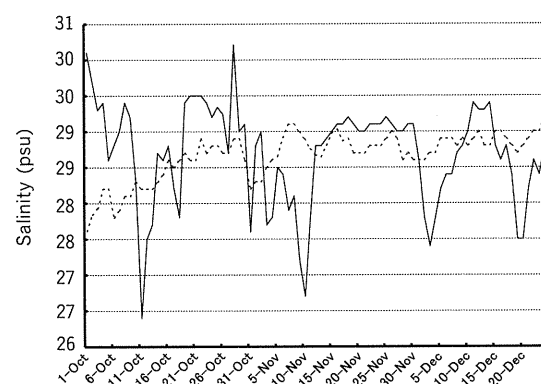


Fig. 4. Change in the salinity in on the high water during daylight in the experimental site. Solid line, 2002; Broken line, annual average value from 1973 to 2001.

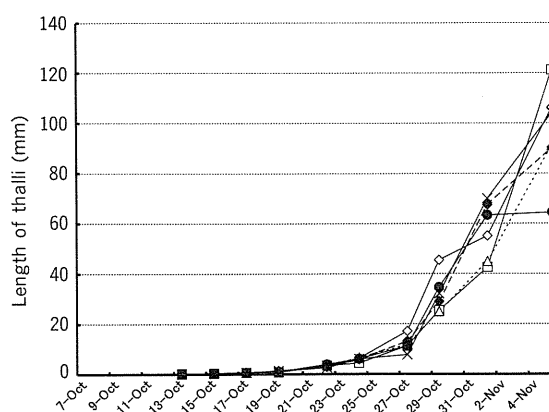


Fig. 5. Growth of Nori thalli in autumn-nets period. ◇, Saga5; □, D-48-2; △, J-14-1; ×, J-22-1; ◆, J-46-1; ●, J-48-2.

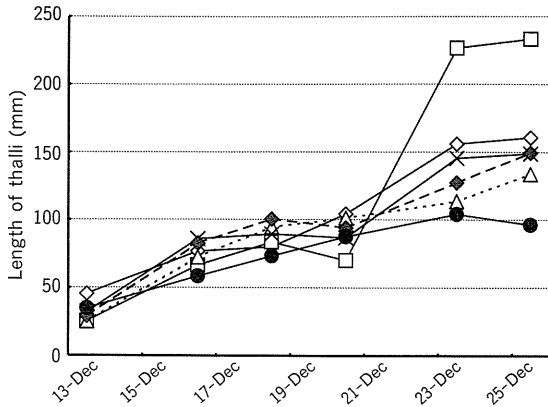


Fig. 6. Growth of Nori thalli in frozen-nets period.
 ◇, Saga5 ; □, D-48-2 ; △, J-14-1 ; ×, J-22-1 ;
 ◆, J-46-1 ; ●, J-48-2.

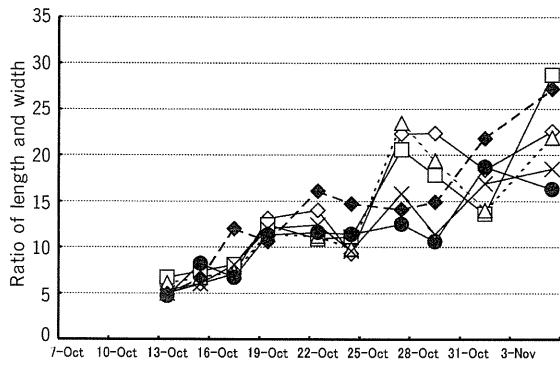


Fig. 7. Ratio of length and width at Nori thalli in autumn-nets period.
 ◇, Saga5 ; □, D-48-2 ; △, J-14-1 ; ×, J-22-1 ;
 ◆, J-46-1 ; ●, J-48-2.

38.4であり、J-48-2が最も小さく22.2であった。

秋芽網期における単胞子の網糸への付着数はFig.9に示すとおりである。単胞子の付着は、すべての株で培養11日後（10月17日）から確認された。対照株の2株は、培養30日後（11月5日）に単胞子の付着が確認されなくなったが、クローン株の4株は、試験終了まで単胞子の付着が確認された。従って、単胞子の放出期間は、対照株の2株が18日間、クローン株の4株は、22日間以上と推定した。測定した10回の網糸2cmにおける付着単胞子数の累計は、対照株の2株とJ-22-1が350~500個で、J-14-1、J-46-1、J-48-2が800~1200個であった。従って、単胞子の放出量は、J-14-1、J-46-1、J-48-2が対照株の

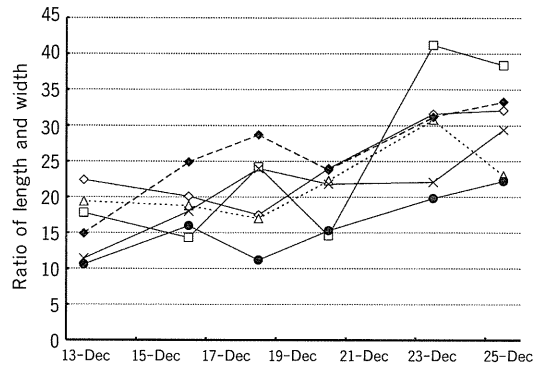


Fig. 8. Ratio of length and width at Nori thalli in frozen-nets period.
 ◇, Saga5 ; □, D-48-2 ; △, J-14-1 ; ×, J-22-1 ;
 ◆, J-46-1 ; ●, J-48-2.

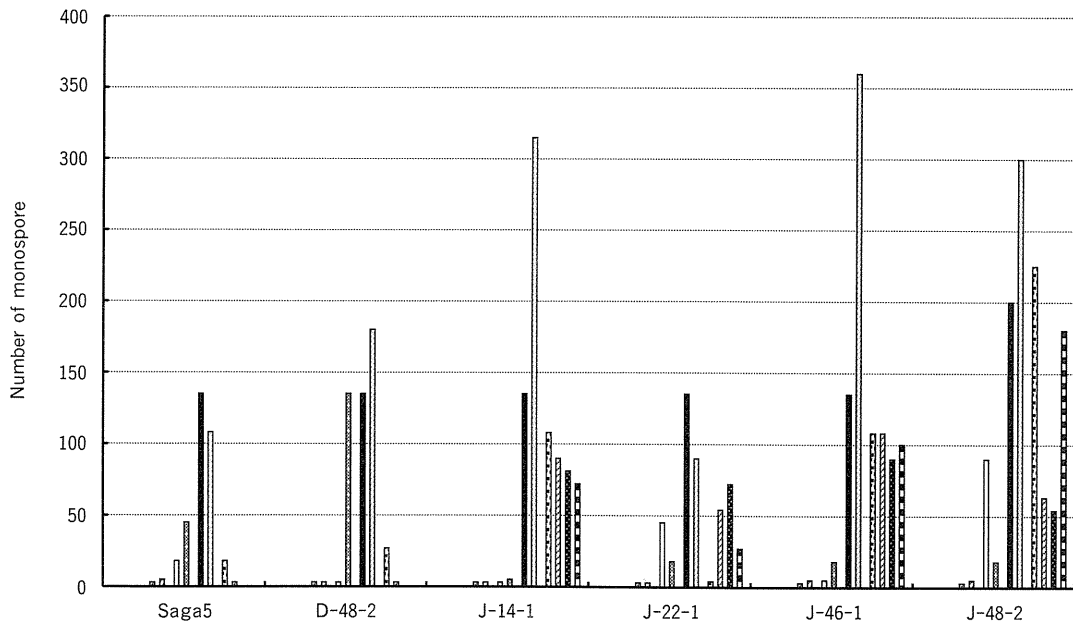


Fig. 9. Number of monospore adhering to 2cm of synthetic fibre.
 ▨, 17-Oct ; ▩, 19-Oct ; □, 22-Oct ; ▤, 24-Oct ; ▥, 27-Oct ;
 ▦, 29-Oct ; ▧, 1-Nov ; ▨, 3-Nov ; ▩, 5-Nov ; ▪, 7-Nov.

2株とJ-22-1の2倍以上であると推定した。以上の結果から、栄養繁殖性は、J-14-1, J-46-1, J-48-2が、対照株よりも高く、J-22-1は、対照株と同程度であると考えられた。

秋芽網期における乾ノリの生産枚数および乾ノリの等級は、Table 1に示すとおりである。乾ノリの重量は、すべての株について100枚当たり310g前後とほぼ同じ値であった。乾ノリの生産枚数は、佐賀5号が332枚で最も多くJ-46-1が256枚で最も少なかった。乾ノリ製品の等級は、佐賀5号が○1等で最も高く、J-48-2が○3等で最も低かった。

冷凍網期における乾ノリの生産枚数および乾ノリの等級は、Table 2.に示すとおりである。乾ノリの生産枚数は、佐賀5号が388枚で最も多く、J-46-1が216枚で最も少なかった。乾ノリ製品の等級は、J-46-1がクモリ1等で最も高く、J-48-2が別等級の5等で最も低かった。

各々のクローン株を対照株と比較して評価するとJ

Table 1. Number of sheets and grade of dried Nori which were produced harvest in autumn-nets period.

Strain	Sheets	Grade*
Saga5	332	maru1
D-48-2	280	maru2
J-14-1	264	maru2
J-22-1	308	maru2
J-46-1	220	maru2
J-48-2	256	maru3

* ; A grade is the standard of federation of fisheries co-operative associations of Saga.

Table 2. Number of sheets and grade of dried Nori which were produced after harvest in frozen-nets period.

Strain	Sheets	Grade*
Saga5	388	betu3
D-48-2	330	betu3
J-14-1	304	kuro3
J-22-1	384	betu4
J-46-1	216	kumori1
J-48-2	260	betu5

* ; A grade is the standard of federation of fisheries co-operative associations of Saga.

-14-1は、幅の広い葉形で栄養繁殖性が高いが、生長性が低く収量が少ない。そのため、養殖品種としての価値は低い。J-22-1は、幅広の葉形で生長性がやや低い、収量が多い。そのため、養殖品種としての価値は高い。J-46-1は、やや幅細の葉形で栄養繁殖性ならびに品質は高いが生長性が低く、収量が少ない。そのため、養殖品種としての価値は低い。J-48-2は、幅広の葉形で栄養繁殖性が高いが、生長性ならびに品質が低く、収量が少ない。そのため、養殖品種としての価値は低い。

考 察

純系とは、すべての遺伝子についてホモな系統のことを示す。しかし、実際は、着目する形質に関与する遺伝子について純系であり、他は著しい変異を伴わなければよいとすることが多い。一方、クローンとは、無性的な生殖によって生じた遺伝子型を同じくする生物集団のことを示す。従って、一個の細胞起源のコピーであるような均一の生物的集団はクローンと称される¹⁰⁾。

能登谷¹¹⁾、飯塚ら⁸⁾は、プロトプラスト再生葉状体および単孢子1個から分離培養した葉状体について純系という表現を用いている。また、青戸ら¹²⁾、谷田ら¹³⁾は、プロトプラストから得た株についてクローンという表現を用いている。本実験で分離した株は、1個の単孢子から分離した遺伝子型を同じくする生物集団である。また、自家受精によって生じたフリー糸状体は、すべての遺伝子についてホモである。従って、分離株は、純系とクローンのいずれの定義にも含まれる。そのため、これまでは、能登谷¹⁰⁾の表現に従い分離株を純系株としていた。しかし、純系は、異なる意味で用いられる場合があることから、本研究で分離した株は、青戸ら¹²⁾の表現したクローンをういクローン株とする方が妥当であると考えられた。従って、本手法で分離した株は、純系株ではなくクローン株としてもよいと考えられた。

各々のクローン株の評価結果から、クローン株は総じて対照株よりも栄養繁殖性が高く、生長性が低いと考えられた。スサビノリの栄養繁殖性について、片山ら¹⁴⁾、草加ら¹⁵⁾の報告によると単孢子の放出期間は、培養12~23日後から培養18~35日後までの6~21日間で、本研究の対照株の結果とほぼ一致しており、放出期間が22日間以上と推定されたクローン株の栄養繁殖性に関する特異性が伺えた。また、クローン株の低い生長性は、単孢子の放出による葉体先端部の崩壊が影響していると推測された。従って、クローン株の特徴は、高い栄養繁殖性であ

ると考えられた。

育種素材および遺伝子解析素材としての適性は、次のように評価した。育種素材は、養殖に関して優良な形質を有していることが必要となる。従って、分離したクローン株は、養殖品種として価値が高いと評価したJ-22-1の1株だけが育種素材として用いることができると考えられた。次に、遺伝子解析素材は、遺伝的に均一であるクローン株で特性が明らかであることが必要とされる。本試験で分離した4株は、すべてクローンである。さらに、分離した4株のクローン株は、室内培養および野外養殖によって、それぞれの特性を明らかにしたため、遺伝子解析素材として用いることができると考えられた。

本試験では、育種素材となるクローン株を効率的に得るために、優良形質を有する選抜株からの分離を行った。しかし、分離したクローン株J-48-2は、特性評価の結果、元株である選抜株D-48-2と異なる特性を有していると考えられ、元株の優良形質である高生長性を有していないことが明らかとなった。本試験において、元株から得られた単胞子の数は、数個から十数個と少なかった。よって、本試験の培養条件は、必ずしも単胞子の放出条件として適当ではなかったと考えられる。そのため、放出された単胞子は、遺伝的に多様性の高い元株の中の、より栄養繁殖性の高い、いわゆる単胞子を出しやすい性質を持つ個体であった可能性が高いと考えられた。また、他のクローン株3株についても栄養繁殖性が高かったことから、J-48-2と同様に元株の優良形質を有していない可能性があると考えられる。これらのことから、本手法は、育種素材となる優良特性を有するクローン株の効率的な作出には、有効ではなかったと考えられた。

遺伝子解析素材の作出に関しては、本手法は有効であると考えられた。しかし、多くの遺伝子を解析するためには、様々な系統のクローン株を収集していく必要がある。

文 献

- 1) 藤巻宏・鶴飼保雄 (1985) : 遺伝と育種 2 改造される植物, pp.169, 培風館, 東京.
- 2) 蓬原雄三 (1990) : イネの育種学. pp.144, 東京大学出版会, 東京.
- 3) 川村嘉応・鷲尾真佐人 (2000) : 養殖現場における選抜育種. 海苔の生物学(能登谷正浩編), 105-112. 成山堂書店, 東京.
- 4) 鬼頭鈞 (2000) : 21世紀における海藻の研究と利用. 藻類, 48(3), 257-259.
- 5) A.Miura, J-A.Shin (1989) : Crossbreeding in Cultivars of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta)-Preliminary Report. *Korean J. Phycol.*, 4(2), 207-211.
- 6) 三浦昭雄・符鵬飛・申宗岩 (1992) : 紅藻ササノリとアサノリの色素変異体による種間交雑実験. *J. Tokyo Univ. of Fish.*, 79(1), 103-129.
- 7) 岡内正典・水上謙 (1995) : 遺伝子研究の現状と応用への展望. 月刊海洋, 27(11), 683-692.
- 8) 飯塚治・北出幸広・嵯峨直恒 (2002) : 海モデル植物 海苔とゲノミクス. 海洋と生物, 24(1), 34-38.
- 9) Y. Kitade, S. Yamazaki, and N. Saga (1996) : A method for extraction of high molecular weight DNA from the macroalga *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 32, 496-498.
- 10) 八杉龍一・小関治男・古谷雅樹・日高敏隆 (1996) : 生物学辞典, 第4版, pp.2027, 岩波書店, 東京.
- 11) 能登谷正浩 (2000) : 養殖現場における組織培養による育種と種苗生産. 海苔の生物学(能登谷正浩編), 98-104. 成山堂書店. 東京.
- 12) 青戸泉・川村嘉応・北嶋博脚 (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. 佐賀県有明水産試験場, 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, 1-33.
- 13) 谷田圭亮・増田恵一 (1991) : 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. 兵庫水試報, 29, 17-23.
- 14) 片山勝介 (1982) : 養殖ノリの選抜分離種の特性について. 岡山水試事報, 130-134.
- 15) 草加耕司・池田善平・片山勝介 (1988) : 養殖ノリ変異種の特性について. 岡山水試報, (3), 71-74.