

# ナラワスサビノリのプロトプラスト・ 単離細胞に及ぼす紫外線の影響

山口忠則

Influence of Ultraviolet Rays on Protoplasts and Isolated Cells  
from *Porphyra yezoensis* f. *narawaensis*

Tadanori YAMAGUCHI

## まえがき

アマノリ葉体からプロトプラスト・単離細胞を作出し、再生させる技術は確立されており<sup>1-3)</sup>、今後は育種への応用が期待されている。プロトプラスト・単離細胞の利用は、育種試験において優良な個体を選抜する際、葉体を扱うより効率が良いと思われる。さらに、紫外線やX線、化学変異源などで変異処理を施す対象としても適しており<sup>4,5)</sup>、農作物ではすでに多くの変異体が作出されている<sup>6)</sup>。しかし、アマノリの変異処理に関しては、葉体や殻胞子に対する影響がいくらか報告されている<sup>7-9)</sup>ものの、プロトプラスト・単離細胞に対する影響についての報告はまだ少ない<sup>10,11)</sup>。

筆者は、ナラワスサビノリ *Porphyra yezoensis* f. *narawaensis* のプロトプラスト・単離細胞に紫外線を照射し、再生個体の生残率が半減する紫外線量を検討したので報告する。

## 材料及び方法

供試したアマノリ葉体は、陸上採苗後、佐賀県六角川沖合の支柱式漁場で葉長20~30mmまで養殖したのち、-30℃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>2)</sup>、青戸ら<sup>3)</sup>の方法に準じた。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  $4 \times 10^4$  cells $\cdot$ ml<sup>-1</sup>の懸濁液となるように調整した。塩分約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。

プロトプラスト・単離細胞への紫外線の照射には、クリーンベンチ備付けの殺菌ランプ（東芝GL15）を用い、紫外線の強度は紫外線強度計（SPECTRONICS社製、DRC-100H）で測定した。上記のシャーレの培地が固化したのち、0.2mW $\cdot$ cm<sup>-2</sup>の紫外線を0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8分間それぞれ2枚に照射した。また、0.4mW $\cdot$ cm<sup>-2</sup>の紫外線を0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4分間それぞれ2枚に照射した。

紫外線を照射したシャーレは、塩分約30の改変SWM-III液添加培養液（以下、補強海水）10mlを重層し、テープで密封した。なお、補強海水には細菌類の繁殖を防ぐため、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, 0.25mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup>となるように加えた。培養温度は18℃とし、初期の24時間のみ、白色蛍光を用いて照度約1,500lxの可視光を当てる区（以下、可視光区）と、アルミホイルで包み遮光する区（以下、遮光区）とに分けた。その後はどちらも、照度2,000~3,000lx、明暗周期11L:13Dの条件で培養し、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28日後に倒立顕微鏡100倍で20~50視野を計測して求めた。

## 結果及び考察

紫外線強度0.2mW $\cdot$ cm<sup>-2</sup>の場合の、培養開始28日後の再生個体の生残率について、未照射を100%として図1に示した。生残率は、可視光区に一部例外もみられたが、全体的としては可視光区、遮光区ともに、照射時間が長

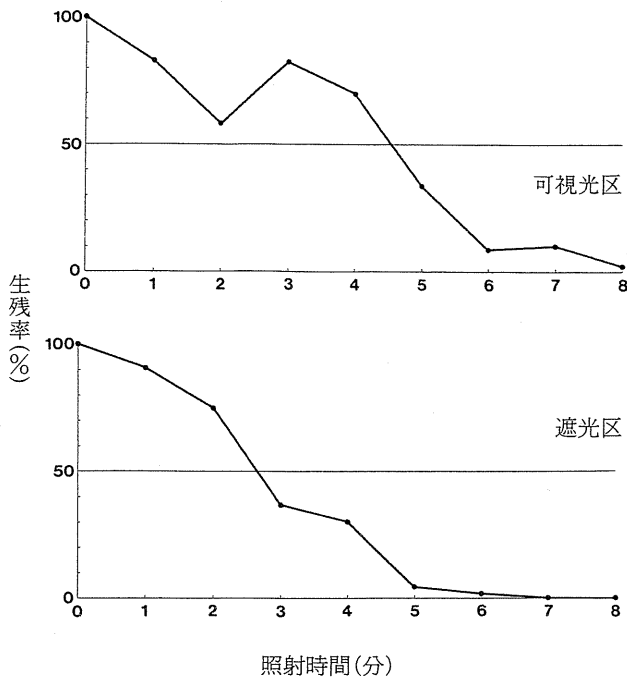


図1 0.2 mW·cm<sup>-2</sup>の紫外線が生残率に及ぼす影響

くなるほど低かった。

可視光区における再生個体の生残率は、4分照射で70.0%、5分照射で33.8%となった。したがって、生残率が半減する条件は、0.2mW·cm<sup>-2</sup>の紫外線を4～5分照射したとき、つまり、4,800～6,000erg·mm<sup>-2</sup>の線量を照射したときであると考えられた。

一方、遮光区における再生個体の生残率は、2分照射で74.9%、3分照射で36.9%となった。したがって、生残率が半減する条件は、0.2mW·cm<sup>-2</sup>の紫外線を2～3分照射したとき、つまり、2,400～3,600erg·mm<sup>-2</sup>の線量を照射したときであると考えられた。

以上のことから、再生個体の生残率を半減させる紫外線量は、可視光区が遮光区より1,200～2,400erg·mm<sup>-2</sup>多く必要であることが明らかになった。

紫外線強度0.4mW·cm<sup>-2</sup>の場合の、培養開始28日後の再生個体の生残率について、未照射を100%として図2に示した。生残率は、可視光区、遮光区ともに、照射時間が長くなるほど直線的に低くなった。可視光区における再生個体の生残率は、1.5分照射で43.9%となった。このことから、生残率が半減する条件は、0.4mW·cm<sup>-2</sup>の紫外線を約1.5分照射したとき、つまり、約3,600erg·mm<sup>-2</sup>の線量を照射したときであると考えられた。

また、遮光区における再生個体の生残率は、1.5分照射で54.2%となった。このことから、生残率が半減する条

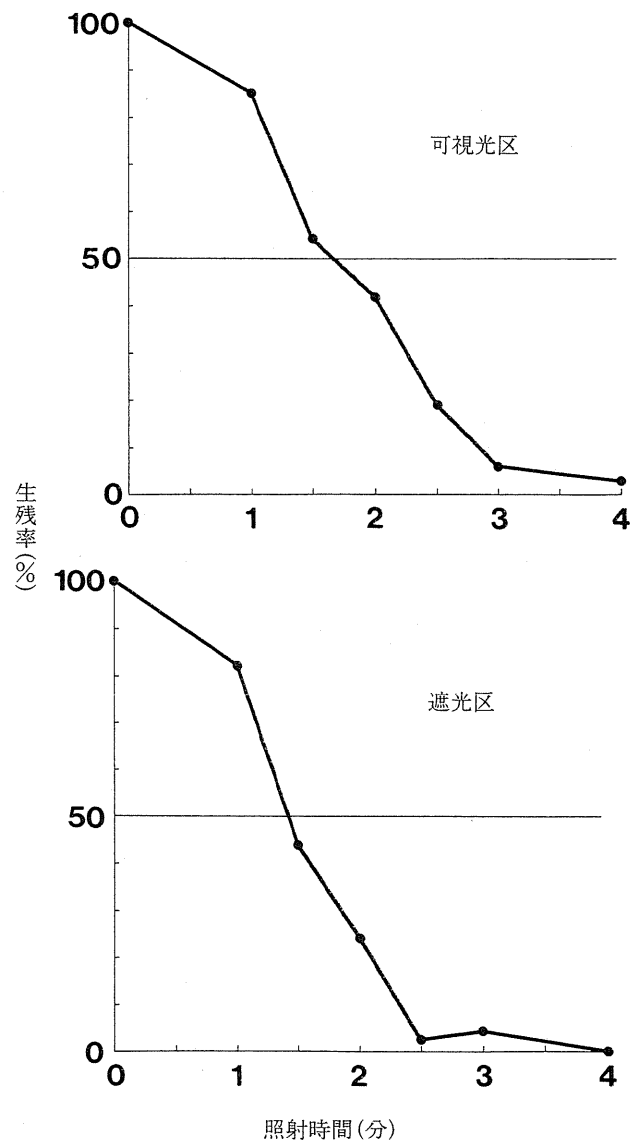


図2 0.4mW·cm<sup>-2</sup>の紫外線が生残率に及ぼす影響

件は、0.4mW·cm<sup>-2</sup>の紫外線を約1.5分照射したとき、つまり、約3,600erg·mm<sup>-2</sup>の線量を照射したときであると考えられた。

再生個体の生残率が半減する線量は、どちらの区も約3,600erg·mm<sup>-2</sup>であったが、1.5、2、2.5分照射の生残率を個別にみると、いずれも可視光区が高かった。

本実験において同じ条件の紫外線を照射した場合、生残率は可視光区が遮光区より高い傾向を示した。一方、紫外線を照射せずに培養を始めた場合、初期の5日間遮光しても、生残率への影響は特に見られないという報告<sup>12)</sup>がある。このことから、本実験でみられた生残率の差には、遮光だけではなく、紫外線の照射も影響しているのではないかとと思われる。また、多くの生物において

は、紫外線の障害を受けた細胞が、可視光によって回復するという光回復の現象が認められている<sup>13)</sup>。

したがって、本実験において可視光区の生残率が高かった原因は、遮光区であれば紫外線障害で死滅してしまうプロトプラスト・単離細胞が、蛍光灯の可視光によって回復した結果ではないかと思われる。しかし、アマノリの光回復の確認には、今後さらに検討が必要であろう。

## 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 鶴飼保雄・藤巻 宏 1984：植物改良の原理 [上]，140-155，培風館，東京.
- 5) 西 荒介 1985：植物培養細胞の変異と選抜，1-56，講談社，東京.
- 6) 渡辺好雄・山口彦之 1983：突然変異育種，9-39，養賢堂，東京.
- 7) 片山勝介 1983：養殖ノリの変異種に関する研究-I 化学変異剤の施用について，昭和57年度岡山県水産試験場事業報告書，51-56.
- 8) 片山勝介 1984：養殖ノリの変異種に関する研究-II 二，三の化学物質による変異，昭和58年度岡山県水産試験場事業報告書，43-49.
- 9) 片山勝介 1985：化学変異剤による養殖ノリの変異とその分離株の特性，昭和59年度岡山県水産試験場事業報告書，71-76.
- 10) 愛知県水産試験場 1992：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試験，平成3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，24-26.
- 11) 福岡県有明水産試験場 1992：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3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，17-18.
- 12) 福岡県有明水産試験場 1990：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，14-15.
- 13) 野津敬一 1975：紫外線の生物作用，55-66，共立出版，東京.