

阿知波英明・中嶋康生：マルバアマノリとカイガラアマノリの プロトプラストの電気融合法による種間雑種の作出

Hideaki Achiha and Yasuo Nakashima 1995: Interspecific hybrid of isolated protoplasts between *Porphyra suborbiculata* and *P. tenuipedalis* by electrofusion method. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 43:223-226.

Aichi Fisheries Research Institute, Toyohama, Minamichita, Chita, Aichi 470-34, Japan
〒470-34 愛知県知多郡南知多町豊浜 愛知県水産試験場漁業生産研究所

Protoplasts isolated from foliose thallus of *Porphyra suborbiculata* Kjellman and *P. tenuipedalis* Miura were fused by electrofusion method. Protoplasts and fused products were cultured on agarose medium in petri dishes. After 28 days, protoplasts as well as fused products were frozen at -75°C for 7 days in order to remove the regenerated sporelings of *P. tenuipedalis*. After thawing, these materials were transferred to the liquid medium and cultured with aeration. Round-oblong shaped foliose thalli from *P. suborbiculata* regenerating in culture was removed. In 94 days culture, some of the regenerated thalli expressed morphological features of parent plants. These thalli showed, spinulate processes in thallus edge and formed monospores as in *P. suborbiculata*, and they showed broad linear-lanceolate in shape as in *P. tenuipedalis*. In 113 days culture, the maximum size of thallus was 30cm in length and 9.5cm in width and these frond released monospores and formed spermatia. These observations suggest a possible genetic recombination between these two species.

Key Index Words: electrofusion, interspecific hybrid, *Porphyra suborbiculata*, *Porphyra tenuipedalis*, protoplasts

近年、細胞融合による育種の試みがアマノリ属の種間 (Fujita and Migita 1987, Fujita and Saito 1990, Araki and Morishita 1990, 藤田 1993, Matsumoto *et al.* 1994) やアマノリ属とウシケノリ属の属間 (藤田 1993) でなされている。今回、マルバアマノリ *Porphyra suborbiculata* Kjellman とカイガラアマノリ *P. tenuipedalis* Miura のプロトプラストを用い種間雑種を作出し、この葉体についていくつかの性質を調べたので報告する。

筆者らはアマノリ類のあかぐされ病耐性の高い新品種の作出のため、多くの種類、品種について細胞融合による検討をおこなっている。今回検討した野生種のマルバアマノリ (Fig.1 A) とカイガラアマノリ (Fig.1 B) はともに養殖に用いられるアマノリ類に比べあかぐされ病に強いことが示された (阿知波ら、未発表)。しかし、前者は大型になれず、後者は冷凍に弱い (阿知波ら、未発表) 等養殖に向かない性質を持っている。そこであかぐされ病に強く、養殖に利用できるような大型でかつ冷凍に耐えるノリの品種を作出する目的で、これら2種のプロトプラストを用い電気融合法を利用して種間雑種の作出を試みた。

融合に使用したマルバアマノリ (保存名 T41) は、愛知県知多半島の伊勢湾側の豊浜地先で採取後、単孢子により継代培養した葉令22日の葉体 (葉長約3mm)

を -75°C で冷凍保存しておいたものである。マルバアマノリは葉形が円形ないし楕円形で、色彩が茶色で葉体縁辺部に顕微鏡的な鋸歯を持っている (Fig.1 A, F)。一方、カイガラアマノリは佐賀県で種苗保存用に貝殻に穿孔させない状態で保存していた浮遊 (フリーリビング、無基質) 糸状体を分与していただき、カキ殻に移殖し、そこから直接発芽した幼体をはぎ取り通気培養で成長させた葉体を用いた。カイガラアマノリは、葉形が広線形ないし披針形であり色彩が明赤色で、葉体縁辺部に鋸歯を持たず、冷凍に弱い特徴を持っている (Fig.1 B, G)。

両葉体を2%ババイン処理後、マルバアマノリはアバロンアセトンパウダー (SIGMA社) とアルカリヘミセルラーゼ (和光純薬) で、カイガラアマノリはアルカリヘミセルラーゼのみを用いてプロトプラストを単離した。その結果、湿重量0.1g当たりマルバアマノリで 4.5×10^6 個、カイガラアマノリで 0.6×10^6 個のプロトプラストが単離された。プロトプラストの直径の平均はそれぞれ10.7, 12.3 μm であった (Fig.1 I, J)。単離したプロトプラストは、pH未調整の0.6Mのマンニトールを純水に溶かした溶液で遠心分離器を用いて3回洗浄後、プロトプラスト数が1ml当たり約 5×10^5 個になるように溶液に懸濁した。それぞれのプロトプ

ラスト懸濁液を1:1に混合し、その混合液にCaCl₂を1mMの濃度になるよう添加しプロトプラスト混合懸濁液とした。次に、細胞電気融合装置 (SSH-10型, 島津製作所) を用い、プロトプラストの混合懸濁液約400 μ lをFTC-02型の融合チャンバーの電極間溝に滴下し、15分間の静置後、交流1MHz, 35V, 10sに続いて直流250V, 25 μ sの印加で融合操作をおこない、30分間静置した。その後プロトプラスト融合細胞懸濁液を試験管内に移し換え、砕いた氷の中に1時間おいた。なお、今回の試験では、異種間融合率等は測定していない。氷冷後、プロトプラスト融合細胞懸濁液を、約40°Cに保温した1%アガロース (FMC社, 商品名SEA PLAQUE) 培地にプロトプラスト数に換算して約4.5 \times 10⁴個/mlになるよう懸濁した。この懸濁液1mlを、あらかじめ、1%アガロース (FMC社, 商品名SEA KEN) 培地3.5mlを用いて滅菌プラスチックペトリ皿 (90mm \times 20mm) 中に作成しておいたアガロース平板培地上に流し込み2層とした。冷却固形した後、アガロース2層平板培地上に液体培地15mlを重層した。培地はSWM IIIの組成 (尾形1970) から肝臓抽出物と土壌抽出物を除いて作成した改変培地を用いた。培養は、16°C, 白色蛍光灯照明4000~5000lux, 11hL:13hDの条件で静置培養した。なお、すべての培地には、抗生物質混液 (Poine-Fuller and Gibor 1984) を200ml当たり1ml添加した。また、液体培地は7日ごとに新しい培養液に交

換した。

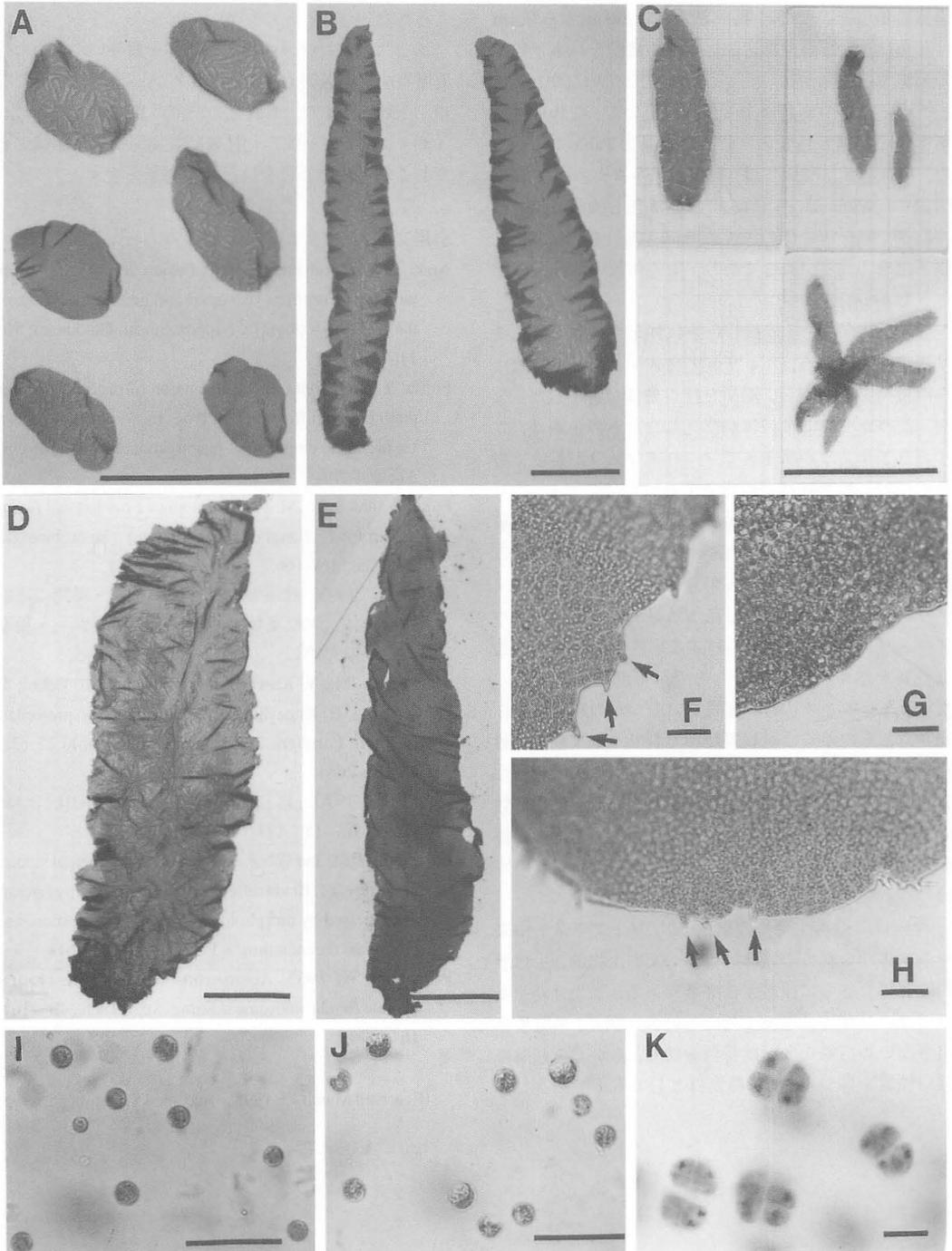
カイガラアマノリは冷凍に弱く、葉長数百 μ mから数cmの葉体は-75°Cで6日間の冷凍で死亡するので (阿知波ら, 未発表), 培養28日後に両種のプロトプラストと融合体を混合培養したアガロース培地をペトリ皿ごと-75°Cで7日間冷凍し、カイガラアマノリ葉体を死滅させた。なお、培養28日後のマルバアマノリとカイガラアマノリのプロトプラストからの再生体の最大葉長はそれぞれ約0.4mm, 約0.9mmであった。解凍後アガロース培地を適当に細断し、21容の枝付き平底フラスコで通気培養をおこない、適宜マルバアマノリと判断される円形から楕円形の葉体を取り除いた。なお、カイガラアマノリのみプロトプラストを培養したペトリ皿について、同様な冷凍処理をおこない通気培養に移行したが、再生葉体の成長はみられなかった。

培養94日後に、最大で葉長6cm, 葉幅1.6cmの広線形ないし披針形で深緑色の、縁辺部に顕微鏡的な鋸歯のみられる個体が多数認められた (Fig.1 C, H)。これらの葉体の培養を続けたところ、単胞子を放出しながら成長を続け、培養113日後には最大で葉長30cm, 葉幅9.5cmの広線形ないし披針形の葉体に成長し (Fig.1 D, E), 雄性斑および果胞子が形成された。一方、この培養葉体から放出された単胞子由来の葉長数百 μ mから数cmの葉体を、培養94日後と培養104日後に-75°Cでそれぞれ6日間および15日間冷凍し、解凍後数日間

Table 1. Characteristics of interspecific hybrid between *P. suborbiculata* and *P. tenuipedalis* and its parents

Characters	<i>P. suborbiculata</i>	<i>P. tenuipedalis</i>	Interspecific hybrid
Thallus shape	round-oblong	broad linear-lanceolate	broad linear-lanceolate
Thallus color	brown	light reddish	dark green
Chromosome number of thallus	3	3	?
			(spermatangial cells n=3)
Microscopic serration	present	lacking	present
Formation of monospores	many	none	many
Resistance to refrigeration (at -75°C for 6 days)	resistant	less resistant	intermediate (Adult thallus) resistant (Sporelings)

Fig.1 Interspecific hybrid between *P. suborbiculata* and *P. tenuipedalis*. (A, B) Morphology of matured thalli form *P. suborbiculata* (A) and *P. tenuipedalis* (B). Scale bars = 5cm. (C, D, and E) Morphology of juvenile thallus and matured thalli of interspecific hybrid after 94 (C), 113 (D), and 116 (E) days culture. Scale bars = 5cm. (F, G, and H) The margin of a foliose thallus of *P. suborbiculata* (F), *P. tenuipedalis* (G), and interspecific hybrid (H) on enlarged scale. Arrows indicate microscopical spinulate processes. Scale bars = 50 μ m. (I, J) Isolated protoplasts from a foliose thallus of *P. suborbiculata* (I) and *P. tenuipedalis* (J). Scale bars = 50 μ m. (K) Three chromosomes of spermatia of interspecific hybrid. Scale bar = 10 μ m. 図1. マルバアマノリとカイガラアマノリ, およびその種間雑種. (A, B) マルバアマノリ (A) とカイ



ガラアマノリ (B) の成葉の形態。スケールは5cm。 (C, D, E) マルバアマノリとカイガラアマノリの種間雑種の形態。培養94日後の未成熟葉体 (C) および培養113日後 (D)、および116日後 (E) の成熟葉体。スケールは5cm。 (F, G, H) マルバアマノリ (F) とカイガラアマノリ (G)、およびその種間雑種 (H) の葉体縁辺部の顕微鏡写真。矢印は鋸歯を示す。スケールは50 μ m。 (I, J) マルバアマノリ (I) とカイガラアマノリ (J) のプロトプラスト。スケールは50 μ m。 (K) マルバアマノリとカイガラアマノリの種間雑種の雄性斑部の染色体数。スケールは10 μ m。

通気培養した。その結果、葉長が約200 μm から数cmの葉体は、先端部や縁辺部等一部の細胞を除き、多くの細胞で内容物が抜け白くなり死亡していたが、葉長約200 μm 以下の幼芽は全て生存していた。これら融合再生体と両親の性質を比較した結果をTable 1に示した。染色体数については、酢酸：アルコールが1:3で固定し、Wittmann法(1965)で核染色し検鏡した。その結果、融合再生体の雄性成熟部(Fig.1 K)および単孢子由来の幼芽は $n=3$ であり、染色体数の倍加は確認できなかった。

また、果胞子から成長した糸状体をカキ殻に穿孔させ培養したところ、カイガラアマノリと同じく貝殻から直接発芽しながら、鋸歯を持つ葉体が再生した。なお、このカキ殻に糸状体が穿孔したときの色調は、カイガラアマノリが明赤色でマルバアマノリが茶色であるのに対し種間雑種は暗赤色であった。

以上のことから、広線形ないし披針形で深緑色の融合再生葉体は染色体数の倍加は確認されなかったが、葉形および糸状体期を経ての発芽状況がカイガラアマノリに、顕微鏡的鋸歯の存在と単孢子の放出がマルバアマノリに類似し、冷凍に対する耐性が両親の中間的な性質を示す特徴を示したので、種間雑種と判断した。今までアマノリ属の種間でいくつかの融合体が作出され、その多くは細胞質雑種と判断されている(藤田1993)。今回作出された雑種は、外形等が両親の性質を兼ね備えた種間雑種であった。しかし、染色体数の倍加が確認されていない等細胞質雑種であるのか体細胞雑種であるのかの判断はできない。これについては今後試験する必要があると思われた。

今後はこの再生葉体の単孢子、プロトプラスト由来や糸状体期を経ての葉体等について、生物的、生化学的性質等をさらに検討する必要がある。また、カイガラアマノリ葉体は冷凍で死亡し乾燥に弱く、単孢子を出さない等特殊な生理的特徴を持ち、あかぐされ病に強い性質を持つので、育種素材として有用であると考

えられた。

カイガラアマノリの浮遊糸状体を贈与いただいた佐賀県有明水産振興センターの川村嘉応博士に厚くお礼申し上げる。また、本研究の一部は農林水産省地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業補助金でおこなわれたことを付記し、謝意を表す。

引用文献

- Araki, T. and Morishita, T. 1990. Fusion of protoplasts from wild type *Porphyra yezoensis* and green type *P. tenera* thalli (Rhodophyta). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1161.
- Fujita, Y. and Migita, S. 1987. Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda and development of fusion products. *Jpn J. Phycol.*, 35: 201-208.
- Fujita, Y. and Saito, M. 1990. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204/205: 161-166.
- 藤田雄二 1993. 緑藻および紅藻の種間・属間の細胞融合藻体. 大型藻類のバイオテクノロジー—更なる発展のために—. 海洋, 281: 690-695.
- Matsumoto, M., Y. Kawashima, H. Tokuda, E. Fukui, T. Aoyama, H. Kageyama. 1991. Intrageneric protoplast fusion in *Porphyra*. *J. Phycol.*, Supplement to 27 (3): 48 (No.268).
- 尾形英二 1970. 新しい海藻培養液 SWM-III について. 藻類, 18: 171-173.
- Polne-Fuller, M. and Gibor, A. 1984. Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *J. Phycol.*, 20: 609-616.
- Wittmann, W. 1965. Aceto-iron-haematoxylin-chroral hydrate for chromosome staining. *Stain Tech.*, 40: 161-164.

(Received March 15, 1995; Accepted September 5, 1995)