

## 野生スサビノリの低栄養塩耐性

福永 剛<sup>1</sup>・瀧上 哲<sup>2</sup>・岩淵 光伸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>有明海研究所・<sup>2</sup>研究部)

低栄養塩に強く色落ちしにくいという特性を持ったノリ新品種開発に用いる材料を探すため、野生スサビノリを採集して低栄養塩条件下での色調変化を調べた。採集した野生スサビノリ約300個体間で色調に大きな違いが認められ、またDNA塩基配列の解析によって、個体間には遺伝的な多様性が存在すると同時に、既存の養殖系統保存株とは遺伝的に異なることが明らかになった。低栄養条件下での培養による色調変化でも既存養殖系統保存株に比べて、色落ちしにくい個体と色落ちしやすい個体が認められた。色落ちしにくい個体は生長が悪いため、そのままでは養殖種苗として使用できないことから、低栄養塩耐性品種を開発するための元株として利用することが有効であると考えられた。

キーワード：野生スサビノリ、色落ち耐性、低栄養塩、品種改良

有明海では、2000年度に大規模な養殖ノリの色落ち被害が発生した。特に福岡県においては生産額が前年比40%に落ち込み、大きな社会問題となった。<sup>1</sup>01年度以降は生産量の大きな落ち込みは見られないものの、近年は有明海においてDINの低下傾向が認められることもあって、<sup>2</sup>低栄養塩に耐性を持つ新品種が開発が強く求められている。これまで筆者らはプロトプラスト培養系による体細胞変異の効率的な選抜法を利用して、低塩分に耐性を持つ系統の開発に成功し、品種登録を行った。<sup>3</sup>同様の方法で低栄養耐性株の開発を試みてきたが、低栄養状態で色落ちの進行が顕著に遅れる新品種開発に至っていない。一方ノリのDNA解析により、現在利用されている養殖系統保存株は遺伝的な多様性に乏しいことが分かっている。<sup>4</sup>このことから、現在の養殖種苗と異なる優れた特性を持った新品種開発には、養殖種苗と遺伝的に離れた株や系統を材料とした方が効率的ではないかと推定される。

これまで野生スサビノリは個体ごとにDNA塩基配列の違いが認められ、遺伝的多様性は高いことが分かっている。<sup>4</sup>しかし野生スサビノリの特性を個体ごとに調査した報告はなく、新たな養殖株として利用された例もない。そこで野生スサビノリの採集を行い、採集個体の遺伝的多様性と低栄養塩耐性を検討したところ、野生スサビノリは既存の養殖系統保存株に比較して遺伝的多様性が高いこと、また低栄養塩に対する抵抗性も多様であり顕著

に色落ちが遅れる個体が存在することが明らかとなったので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 野生スサビノリの採集

<sup>5</sup>05年3月に宮城県女川湾付近ならびに雄勝湾付近の海岸の7地点において野生スサビノリの採集を行った。採集した葉体は個体毎にビニール製の小袋に入れ、保冷剤を入れたクーラーボックスで持ち帰った。研究室に持ち帰った後は、一旦乾燥してビニール袋に入れ、実験に供するまで-20℃の冷凍庫に保管した。

#### 2. 野生スサビノリの色調測定とDNA解析

野生スサビノリの遺伝的な多様性を調べることに、また低栄養に強い個体を選抜する時に単胞子で増殖したクローン個体の選抜を避けることを目的として、サンプリングした野生スサビノリ299個体の色調を測定し、その中から色調が良い個体のDNAを解析した。

色調の測定は冷凍保管したサンプルを15℃の滅菌海水に戻し、色彩色差計（ミノルタ社製）を用いて行った。葉体を白タイル上に広げ葉体の中央部を測定した。色調はL\*a\*b\*測色系で表し、採集を行った地点別にL\*値の上位から3個体ずつ合計21個体を選んで、DNA解析用サンプルとした。なおノリの色調は、L\*値は低いほど、a\*値は高いほど優れているが、今回はL\*値のみを選抜

\*現所属：九州農政局

の指標とした。

DNAの抽出は、サンプルから約1 cm角に葉体を切り出し、1.5mlチューブ内に入れてISOPLANT（日本ジーン）を用いて行った。抽出法は基本的に添付プロトコールに従ったが、精製度を高めるためにフェノールとPCIによる処理を加えた。DNA塩基配列は、核DNAのITS-1領域をダイレクトシーケンス法によって調べ、プライマーにはF-intron2（5' TTAAGAGACAGTCGGTCCCCT）とR5.8S2（5' GCTGCGTTCTTCATCGTT）を用いた。PCR反応はキアゲンHot Star Taqを使用し、95°C15分の後、94°C1分、57°C1分、72°C1分を30サイクル行った。

反応産物はキアゲンPCR Purification KITを用いて精製した。ダイレクトシーケンスはABI PRISM Big Dye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit ver1.1（Applied Biosystems）を用い、反応条件は96°C1分の後、96°C10秒、50°C5秒、60°C4分を30サイクルとした。反応産物をEDTA-Ethanol法で精製し、ABI PRISM 301ジェネティックアナライザー（Applied Biosystems）を用いて塩基配列を決定した。

### 3. 野生スサビノリの低栄養塩耐性試験

前述の色調測定結果から色調が良かった野生スサビノリ21個体と現在養殖に使用されている2個体について低栄養塩耐性を調べた。

各葉体を栄養塩無添加の人工海水（シーライフ）中で5日間培養した。培養は11枝付きフラスコを用い、温度18°C、照度8,000lx、明暗周期は10L14Dとした。葉体の色調は24時間ごとに色彩色差計（ミノルタ社製）を用いて測定した。測定方法は葉体を白色タイル上に広げ、1個体につき数ヶ所の色調を測定して平均した。色調はL\*a\*b\*表色系を用いて表し、L\*値を代表値として色調の変化を判断した。培養期間中のL\*値の変化から直線回帰式を求め、その変化率（傾き）を低栄養耐性の指標とした。すなわち傾きが小であるほど低栄養耐性が強く色落ちしにくいと評価し、傾きが大であるほど低栄養耐性が弱く色落ちしやすいとした。

この試験の結果から特に低栄養耐性が強いと判断された葉体については、自家受精を行い糸状体を分離した。

## 結 果

### 1. 野生スサビノリの色調測定とDNA解析

野生スサビノリは7地点より338個体を採集した。そのうち色彩色差計による色調の測定が可能だったのは299個体であった。色彩色差計によるL\*値の測定結果を図1に示した。L\*値の平均は55.9、最小は38.2、最大は7

7.9を示し、個体間で顕著な差が認められた。

色調の上位21個体のDNAの塩基配列は図2に示すように現在のスサビノリ養殖系統株とは異なる5ハプロタイプに区別された。データの信頼性が高い塩基配列283塩基中で欠失は18塩基、置換は44塩基認められた。なお解析した21個体中2個体については、DBJのBLAST検索の結果、スサビノリとは異なる種である可能性が高いことが判明したため、本結果からは除外した。

### 2. 野生スサビノリの低栄養塩耐性試験

低栄養塩海水で5日間培養した場合の野生スサビノリ各葉体のL\*値の変化率を図3に示した。変化率は高いもので0.34、低いもので0.013であった。現在の養殖に使用されている品種の変化率は2個体ともに約0.14であ

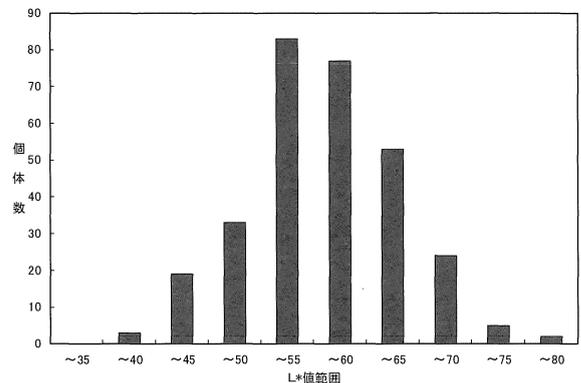


図1 野生スサビノリのL\*値測定結果

```

60
Type_1 TCACAGGTGGAATGGAAGAGAGAATCTGTTTGTGCGCTTTTTTTGGGGGATACCGAGC
Type_2 TCACAGGTGGAATGGAAGAGAGAATCTGTTTGTGCGCTTTTTTTGGGGGATACCGAGC
Type_3 GCACAGGTGGCAATGAAAGAGAGAATCTGCATGTGCGCTT---TCGGGGTAGCAAGCAGC
Type_4 GCACAGGTGGCAATGAAAGAGAGAATCTGCATGTGCGCTT---TCGGGGTAGCAAGCAGC
Type_5 GCACAGGTGGCTATGAAAGAGAGAATGTGCATGTGCGCT---TCGGGGTAGCA---GC
*      *** *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
120
Type_1 ACTGCCAT-CCATCGCCTCT-GTGACGGGCGTAATTTCCATTGAGAGGATGTGAGGGCA
Type_2 ACTGCCAT-CCATCGCCTCT-GTGACGGGCGTAATTTCCATTGAGAGGATGTGAGGGCA
Type_3 ACTCTTCTGCCATCGCCTCTTTGCGCGGGCGTAAATTCCTATTGAGAGGATGTGAGGGCA
Type_4 ACTCTTCTGCCATCGCCTCTTTGCGCGGGCGTAAATTCCTATTGAGAGGATGTGAGGGCA
Type_5 ACTCTTCTGCCATCGCCTCT-GTGCGGGGCGTAAATTCCTATTGAGAGGATGTGAGGGCA
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *
180
Type_1 CCGCAGGAAGCTTTCCACAGGAAGTGCATCCTTCTCCCTCCACGACGGCGTCTGT
Type_2 CCGCAGGAAGCTTTCCACAGGAAGTGCATCCTTCTCCCTCCACGACGGCGTCTGT
Type_3 CCACAGGAAGCTTTCCACAGGAAGTGCATCCTTCTCCCTCCACGACGGCGTCTGT
Type_4 CCACAGGAAGCTTTCCACAGGAAGTGCATCCTTCTCCCTCCACGACGGCGTCTGT
Type_5 CCACAGGAAGCTTTCCACAGGAAGTGCATCCTTCTCCCTCCACGACGGCGTCTGT
*      *      *
240
Type_1 GCATGGCAATTTATTATTTTTTGCCTACCATGGAGGATGCCACAGTGGAGCCCTTTAC
Type_2 GCATGGCAATTTATTATTTTTTGCCTACCATGGAGGATGCCACAGTGGAGCCCTTTAC
Type_3 GCTTGGCAGT-----TTTTTTTGCCTCCAGGAGGATGCCACAGTGGAGCCCTTTAC
Type_4 GCTTGGCAGT-----TTTTTTTGCCTCCAGGAGGATGCCACAGTGGAGCCCTTTAC
Type_5 GCTTGGCAGT-----TTTTTTTGCCTCCAGGAGGATGCCACAGTGGAGCCCTTTAC
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *
270
Type_1 ATACTAACATCATCCTATGCCCGCTTTTA-CTTAACC
Type_2 ATACTAACATCATCCTATGCCCGCTTTTA-CTTAACC
Type_3 ATATATACATCATCATATGCCCGCTTTTTTCTTAACC
Type_4 ACATATACATCATCATATGCCCGCTTTTTTCTTAACC
Type_5 ATATTTACATCATCATATGCCCGCTTTTTTCTTAACC
*      *      *      *      *

```

図2 野生スサビノリのITS-1領域DNA塩基配列

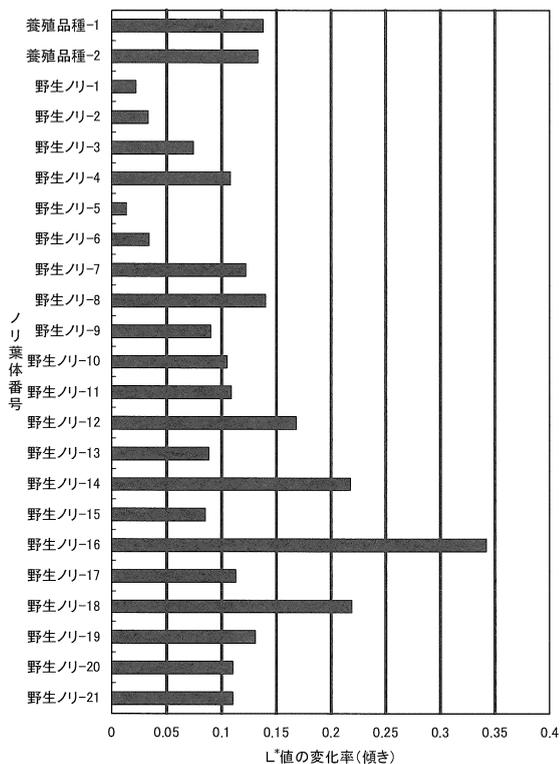


図3 野生スサビノリ各個体の低栄養条件下でのL\*値変化率

ったのに対して、野生スサビノリは個体間で顕著な違いが認められた。このうち代表的な2葉体（葉体番号：野生ノリー2と野生ノリー14）のL\*値の変化を図4に示した。葉体のL\*値は時間の経過とともに上昇し色調は低下しているのがわかる。このうち野生ノリー2では開始時のL\*値は平均57.4であったが、5日後でも61.7までにしか上昇せず、変化率は0.03となった。また野生ノリー14は実験開始時のL\*値平均は57.3であったが、5日後には80.7まで上昇し変化率は0.21となった。このように実験開始時のL\*値はほぼ同じであっても、低栄養塩条件下における色調の変化率には大きな個体差が認められた。

### 考 察

今回宮城県で採集した野生スサビノリの中から、色調の良い個体を中心に21個体の核DNA ITS-1領域の配列を解読したところ、5ハプロタイプが確認された。現在の養殖系統保存株における同領域の多様性は極めて低いに対し、野生スサビノリの個体間では多くの変異が認められたというMizukami et al<sup>4)</sup>の報告と同様の結果となった。このことは野生スサビノリは、既存養殖系統株と

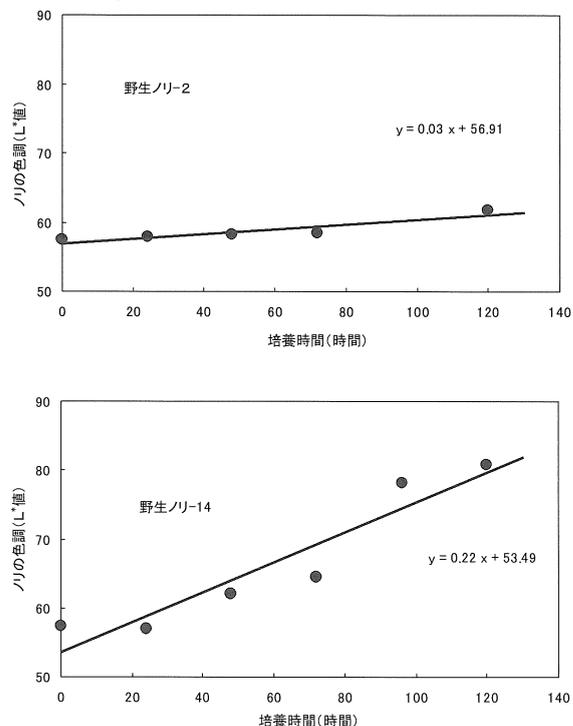


図4 野生スサビノリの低栄養条件下でのL\*値変化

遺伝的に違いがあるだけでなく、野生スサビノリ個体間の遺伝的多様性も大きいことを意味している。

野生スサビノリではDNA配列の違いだけでなく、低栄養塩条件下での培養実験でも、養殖種苗に比べて色落ちが遅い個体と、著しく速い個体とが認められ、特性にも大きな違いが認められた。

ITS-1を始めとして種々の領域におけるノリのDNA解析が進むにつれ、現在養殖されている株は極めて遺伝的な多様性に乏しいことが明らかとなっている。<sup>4)</sup>これは、野生スサビノリを養殖に使用していた時代に生長が良い個体を選抜固定してナラワスサビノリと命名され、これを元株として多くの品種が派生したためであると推察される。<sup>5)</sup>このことは既存の養殖系統を材料に品種改良を行っても、得られる特性にも自ずと限界があり、画期的な優良品種が開発される可能性は低いだろうことを示唆している。特に'60年代後半から選抜を繰り返すことによって現在の養殖種苗が獲得した高生長性という特性は、ノリが代謝によって得たエネルギーの多くを細胞分裂に費やすことによって獲得したものであると推察される。色落ちしにくいという特性は、そのエネルギーを色素タンパク質の合成にも利用することが必要で、現在の養殖種苗からそのような特性を持つ新品種を開発するこ

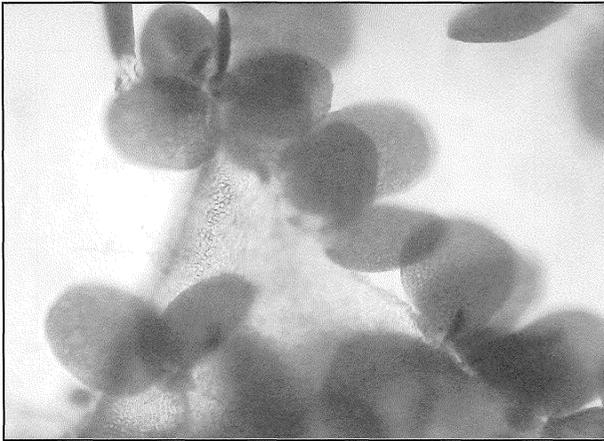


図5 低栄養条件下で色落ちが遅れた野生スサビノリ個体の2次芽

とは難しいのではないかと考えられる。

野生スサビノリの低栄養塩条件下における培養試験で非常に色落ちしにくい個体が見つかったが、この個体の単胞子から育てた2次芽は図5のように丸葉となり生長が著しく悪かった。このため野生スサビノリもそのままでは養殖に利用することは出来ず、ある程度の生長性を示すまで選抜育種を行わなければならない。また、色落ち耐性と生長性以外にも、味や品質、耐病性など養殖種苗として備えなければならない特性も多い。品種改良には多くの時間を要することから、今後はプロトプラスト培養系を利用した品種改良の時間短縮が必要である。また、養殖系統株と野生スサビノリとの交雑も時間短縮に有効であると考えられる。特に交雑の技術的な問題点で

ある交雑確認は、塩基配列が異なる野生スサビノリを材料とすることでDNA解析による確認が可能になると考えられることから、今後の品種改良の重要な手法になりうると思われる。

## 文 献

- 1) 熊谷香・内藤剛：有明海福岡県地先への栄養塩供給量の動向。福岡県水産海洋技術センター報告，第17号，73-80 (2007)。
- 2) 福永剛・岩淵光伸：低塩分条件下で選抜したアマノリ系統の特性。福岡県水産海洋技術センター報告，第14号，45-49 (2004)。
- 3) K. NIWA and Y. ARUGA : Identification of currently cultivated *Porphyra* species by PCR-RFLP analysis. *fish. sci.*, 72, 143-148 (2006)。
- 4) Y. Mizukami, H. Kito, Y. Kaminishi, N. Murase and M. Kanimoto : Nucleotide sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacer regions of cultivated (cultivars) and field-collected thalli of *Porphyra yezoensis*. *fish. sci.*, 65, 788-789 (1999)。
- 5) K. Niwa, N. Kikuchi, M. Iwabuchi and Y. Aruga : Morphological and AFLP variation of *Porphyra yezoensis* Ueda form. *narawaensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta). *Phycol. Res.*, 52, 180-190 (2004)。