

日本各地の水田土壌より分離培養した *Gonium pectorale* Müller について

楠元 守*・園田幸朗*・梶野 稔*・浜松伸典*

Gonium pectorale Müller isolated from paddy field soil collected
from various localities in Japan

Mamoru KUSUMOTO*, Sachiro SONODA*, Minoru KAJINO* and Nobumiti HAMAMATU*

KUSUMOTO, M., S. SONODA, M. KAJINO and N. HAMAMATU 1978. *Gonium pectorale* isolated from paddy field soil collected from various localities in Japan. Jap. J. Phycol. 26 : 19-26.

Many samples of surface soil were collected from 286 different paddy fields in Japan. Although a total of 311 clones of *Gonium* were isolated from dry soil samples and several species of *Gonium* were recognized, only two taxa of *Gonium pectorale* MÜLLER, namely var. *pectorale* and var. *praecox* POCKOCK, were treated in this report. The latter variety was reported for the first time in this country. As to the distribution of these two varieties in Kanagawa Prefecture, it became known that the former was widely distributed in most of the paddy fields surveyed, but the latter was restricted to only four out of the 286 paddy fields. Morphological observations through the life cycles of the two varieties were described in detail. Also, it was reported that germination of zygotes after preserving in dry soil for years or in organic solvent for a month was observed.

Mamoru Kusumoto, Sachiro Sonoda, Minoru Kajino, Nobumiti Hamamatu, Kanagawa Prefectural Education Center, 4210 Fujisawa, Fujisawa-si Kanagawa 251 Japan.

Gonium 属には、これまでヨーロッパ・北米・中米などにより7種2変種が知られているが、本邦の池・沼・水田などにも同属の藻がかなり広く分布するものと推察されている。しかし、本邦産の *Gonium* の分類や生殖、および生活史に関する詳細な報告はない。

楠元ら(1976)は本邦産の *Eudorina* 属の研究において、分類上の基準として形態的形質および生殖について検討する場合に、自然からの採集試料の観察のみによらず、同一条件下でのクローン培養 (clonal culture) による比較研究が効果的であると示した。

筆者らは、本邦各地から採集した水田土壌より分離培養した311クローンの *Gonium* について形態およ

び生殖の観察を行なって来た。本報では分布範囲の最も広い *G. pectorale* var. *pectorale* と、日本新産と思われる *G. pectorale* var. *praecox* POCKOCK について報告したい。

材料と方法

試料の採集法および培養法は、前報(楠元ら1976)と同様である。試料は、本邦各地の286箇所の水田より採集した風乾土壌を用いた。風乾土中の接合子 (zygospore) や単為胞子 (parthenospore) の発芽法は、市村(1971, 1972), STARR (1973), 楠元ら(1976)に準じた。

観察は生体が主であったが、核や仁はアセトカーミン染色法 (CAVE & POCKOCK 1951, POCKOCK 1951, HYDE & GARODOLLA 1953) により、ゼラチン様膜

本研究は文部省科研費(昭和49年度課題番号992510)による研究の一部である。

* 神奈川県立教育センター生物学教室 (251 藤沢市藤沢 4210)

は1% メチレンブルー液 (POCOCK 1955, STEIN 1958) によって染色後観察した。

結果と考察

1. 形態

G. pectorale は、通常16個の細胞からなる平板状の正方形ないしひし形の群体で、対角線を中心としてわずかに外側に湾曲している。培養条件によっては、8細胞または4細胞よりなる群体もみられる。

群体の周囲の各辺には3個ずつ計12個の細胞が配列し、その内側には4個の細胞が平板状に配列している (Figs. 1, 2, 5, 6)。これらの細胞は群体全体をおおうゼラチン様膜で包まれているが、この膜が明瞭でない群体も観察される。

細胞は2本の等長のべん毛を有し、べん毛の基粒に接して2個の収縮胞がある。眼点は細胞の前部に1個認められ、葉緑体の前縁に埋没している。葉緑体は杯状で、その中にはピレノイド (pyrenoid・澱粉核) がある (Figs. 3, 4)。

G. pectorale には、これまでに2変種が知られている (POCOCK 1955)。

(1) *G. pectorale* MÜLLER var. *pectorale* (Figs. 1 and 5)。

本変種は MÜLLER (1773) により最初に報告され (POCOCK 1955)、世界的にもよく知られており、本邦においても最も普通に観察される *Gonium* である。

成熟群体は大きく、きれいな緑色をしている。群体の周囲の細胞は球形ないしやや鐘形をしているが、内側の4細胞は不整の六角形をしたものが多い。

細胞内には大きい球形のピレノイド1個と、極方向からは円形であるが側面から観察すると楕円形の核1個がある (Fig. 3)。

群体は約 $80 \times 80 \mu\text{m}$ 、細胞は長さ約 $15 \mu\text{m}$ 、幅約 $12 \mu\text{m}$ であった。

(2) *G. pectorale* var. *praecox* POCOCK (Figs. 2 and 6)。

本変種は POCOCK (1955) により北米より報告されたのが最初であるが、その後本変種の報告は稀れである。

成熟群体は比較的小さく、やや淡緑色である。群体の周囲の細胞は卵形で、密に配列しており、このため細胞の互いに隣接している部分は平面状になっている。このような隣接部分は、細胞の後部1/2程度であるため、細胞の前半部が後半部よりやや広くなっている。

内側の4細胞は極方向から観察すると六角形である。

細胞内には、1個の球形のピレノイドと球形の核がある。細胞の先端部の色のない部分は var. *pectorale* より大きい (Fig. 4)。

群体は約 $50 \times 50 \mu\text{m}$ 、細胞は長さ約 $13 \mu\text{m}$ 、幅 $11 \mu\text{m}$ であった。

2. 無性生殖

Gonium 属の無性生殖では、群体を構成するすべての細胞が各々連続的に3~4回分裂してプラケア (plaque) と呼ばれる皿状の平板を形成する。

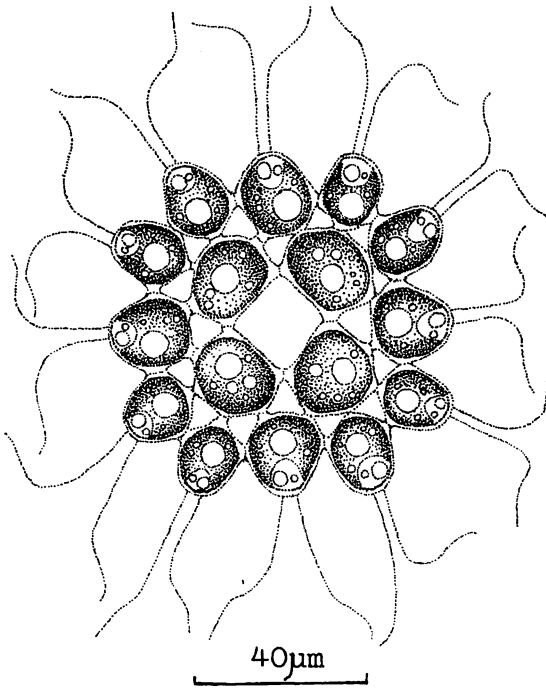
プラケア形成の過程は、まず、成熟した細胞の葉緑体に変形し、ピレノイドの確認が困難になり、やがて前端から次第に溝が発達し、縦分裂によって2細胞となる。この第一分裂が始まるとまもなく細胞はごくゆっくり回転をはじめ、2細胞期には 90° 回転して分裂面はもとの細胞の前後軸とほぼ直角の位置になる。第二分裂は、第一分裂面と直角の方向に縦分裂する。第三分裂は、第一分裂後の左右の細胞より生じたそれぞれ2個ずつの細胞が一組になり、第一分裂面を境にして少しずつ前後方向にずれながら第一分裂面と平行に分裂が進行し、分裂した細胞は湾曲した平面上に配列するようになる。

続く第四分裂によって16細胞期に達する (Fig. 7)。この段階では娘群体はべん毛の生ずる位置がプラケアの内側になるように湾曲しているが、inversion (反転) によって反対側に湾曲するとともに、各細胞は2本のべん毛を出してゆるやかに動かし始める。べん毛の動きが活発になった娘群体は、母群体のゼラチン様膜を破って泳出する。泳出した娘群体は、べん毛の派生する面を前面にし、群体の中心部を軸として回転しながら移動する。

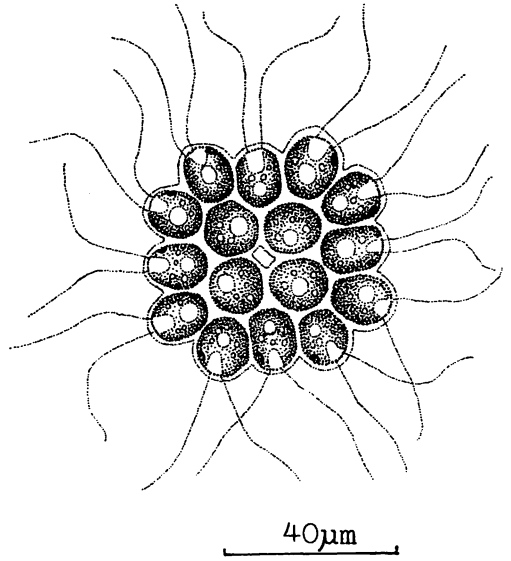
照度 4000 lux 、連続照射、温度 27°C 、二相培地 (soil-water bi-phasic medium) (PRINGSHEIM 1964) で *G. pectorale* var. *pectorale* の泳出直後の娘群体を培養したところ、群体が成長して細胞分裂が始まるまでに20時間を要し、さらに娘群体形成・泳出までに2時間を要した。すなわち、上記の条件では *G. pectorale* var. *pectorale* の無性生殖のサイクルは22時間であった。SAITO & ICHIMURA (1975) は合成培地を用いて *G. multicoecum* の無性生殖のサイクルを調べ、 36°C では8時間であるとし、これから成長定数Kは12であるとした。そして、*G. multicoecum* は藻類のなかでも最も成長の速いものの一つであろうとしている。

無性生殖における *G. pectorale* var. *pectorale* と

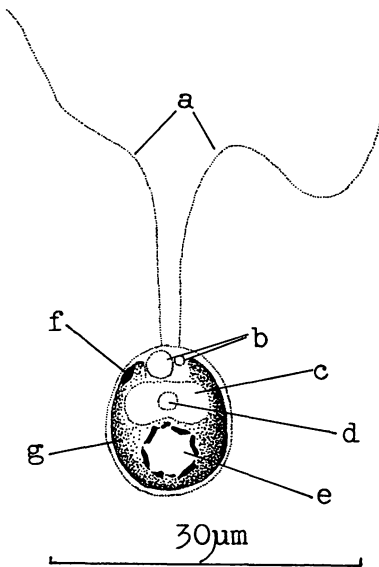
1



2



3



4

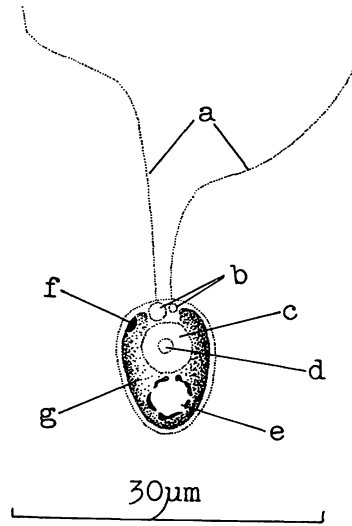


Fig. 1. Vegetative colonies of *Gonium pectorale* var. *pectorale*.

Fig. 2. Vegetative colonies of *Gonium pectorale* var. *praecox*.

Fig. 3. Cell of *Gonium pectorale* var. *pectorale* a. flagella b. contractile vacuole c. nucleus d. nucleolus e. pyrenoid f. eyespot g. chloroplast.

Fig. 4. Cell of *Gonium pectorale* var. *praecox* a. flagella b. contractile vacuole c. nucleus d. nucleolus e. pyrenoid f. eyespot g. chloroplast.

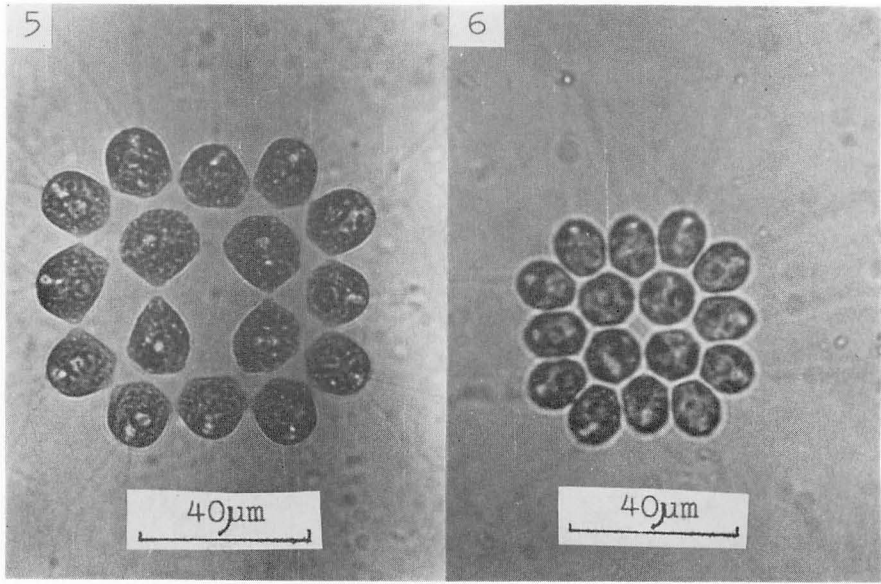


Fig. 5. Vegetative colonies of *Gonium pectorale* var. *pectorale*.
 Fig. 6. Vegetative colonies of *Gonium pectorale* var. *praecox*.

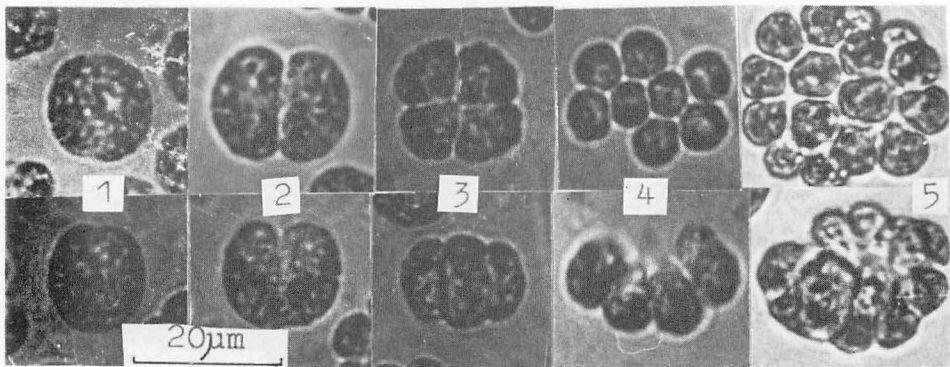


Fig. 7. Plakea formation of *Gonium pectorale*. The upper is frontal view. The lower is lateral view. 1: Before cell division, 2: 2-celled stage, 3: 4-celled stage, 4: 8-celled stage, 5: 16-celled stage.

G. pectorale var. *praecox* との大きな相違は、前者が 70~80 µm の大きな群体に成長した後娘群体形成が始まるのに対し、後者は 35~40 µm の大きさの群体で娘群体の形成が始まることである。変種名 *praecox* も、このことに由来している (POCOCK 1955)。

また、第一分裂直前の変化が、*G. pectorale* var. *praecox* では大きく、核や葉緑体の移動が容易に観察される。

3. 有性生殖

接合子の形成: 分離した各クローン (clone) は、同一クローン内での有性生殖は観察されなかった。

STEIN (1965a) は *G. pectorale* の 33 の有性生殖を行なう集団 (sexual population) 間での性的適合性を pH, 温度などの条件をかえて調べた。また、接合子形成の条件として温度 (STEIN 1966) や培地中のビタミン・アミノ酸およびその他の有機物 (STEIN 1965b) が影響を与えることを報告している。

筆者らは15クローンを任意に選び、二相培地を用いて調べた結果、性的に適合する組み合わせと接合子形成の条件をみいだすことができた。

Gonium 属の有性生殖では、群体内のすべての細胞が配偶子を形成する。受精は同形同大の配偶子間で起

る同形接合 (isogamy) である。

相補的な二つの成熟したクローンを混合すると、数分後には群体を構成していた細胞は群体から泳出して単細胞の配偶子となる。配偶子はべん毛の先端を器物に付着させて一箇所に数個～数十個集まり、クランプ (clump・接合塊) を形成する (Fig. 8)。このとき各配偶子の葉緑体は後部へ移動し、前端部は透明になる。

配偶子は、クランプ形成の後2細胞ずつ対になり、べん毛の先端から次第に接着し、間もなく透明になった細胞の前端部を互いに伸ばして接合を開始する (Fig. 9a)。はじめに透明部分が、続いて葉緑体が、一方の配偶子から他方の配偶子へ移動する。接合前に卵形であった配偶子は、接合完了と同時に球形に変わ

る (Fig. 9b~9d)。接合を開始してから球形になるまで僅か3~4分であった。

球形になった接合子は両極を結ぶ面で区分された葉緑体を持ち、4本のべん毛でしばらく遊泳する。この動接合子 (planozygote) は、その後器物に付着して運動を停止する。べん毛は4~5時間後には消失し、厚膜を形成して休眠する。接合子は初期には緑色であるが、次第に橙黄色に変化して外見上の変化は停止する (Fig. 10)。

白色蛍光灯による照度 6,000 lux・14時間照明、温度27°Cの恒温条件下で、二相培地を用い1週間培養した性的に適合する二つのクローンを試験管内で混合培養すると、12時間後に試験管上部の水面付近に多数の

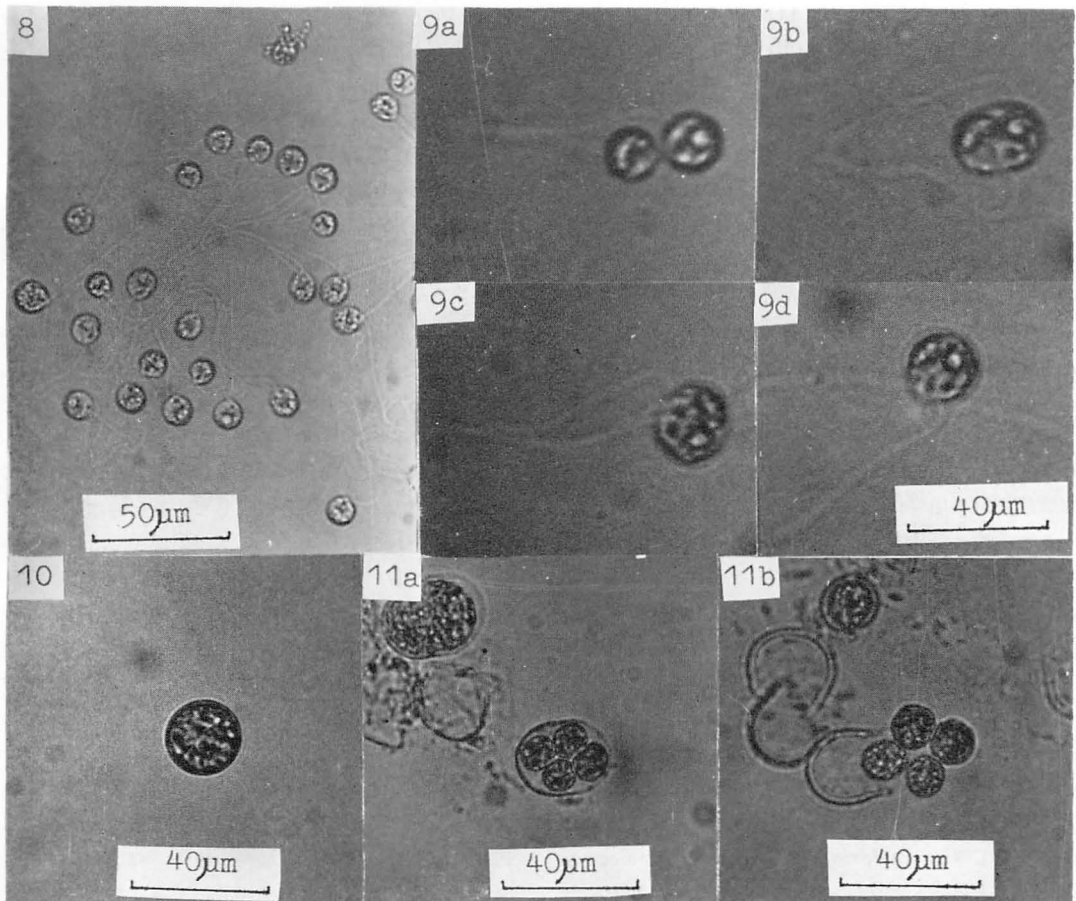


Fig. 8. Clumping cells which have escaped from the colony

Fig. 9. Stages in syngamy a. b. Fusing gametes; c. d. Planozygote with 2 chloroplasts, 2 pyrenoids, 2 eyespots and 4 flagella.

Fig. 10. Zygospore

Fig. 11. Zygote germination, a. 4-celled germ colony in zygote b. 4-celled germ colony emerging from zygospore wall.

接合子が付着し、緑色の環が観察される。この環は4~5日後には橙黄色に変化する。混合後 1000 lux・14時間照明下におくと、緑色環は形成されても橙黄色にはならない。STEIN (1958) も接合子形成後24時間以後暗黒下に置くと緑色のままであることを観察している。これらのことから、接合子の成熟には光が関与しているものと考えられる。大部分の接合子は水面近くに付着するが、試験管底にも相当数の接合子が確認された。

G. pectorale var. *pectorale* と *G. pectorale* var. *praecox* の組み合わせでは、接合子は観察されなかった。このことは、両変種は性的に互に独立した生物であるという証拠の一つとなろう。

接合子の発芽と保存: 筆者らは、10日間風乾した接合子を、照度 4,000 lux・14時間照明、温度 28°C の恒温条件下で土壌抽出液を用いて再培養した結果、多くの接合子の発芽を観察した。

培地に移された接合子は吸水とともに肥大し、早いものは4~5時間で緑色となり、分裂を開始する。分裂は連続して2回起り、4細胞となる (Fig. 11a)。Gonium の生活史では、接合子の発芽時に減数分裂が起ると考えられていることから、これら4細胞はそれぞれ生殖原細胞 (gonium・gone) とよばれる。

4細胞よりなるこの発芽群体 (germ colony) はべん毛を有し、接合子の殻を破って泳出する (Fig. 11a)。泳出直後の群体の大きさは 20~25 μm であった。接合子より泳出したばかりの発芽群体を引続き同条件で培養すると、約20時間で細胞分裂が始まり、24時間後には16細胞の娘群体が4群体得られた。

これらの4群体を各々クローン培養した後に加・-の明らかなクローンとの検定交雑の結果、2クローンが+、残りの2クローンは-と判明した。同様な実験を接合子より発芽したばかりの群体10組について行なった結果、すべて+・-の比は1:1で生ずることがわかった。この結果は、STEIN (1958) が土壌抽出物を含む BEIJERINCK の寒天培地 (Beijerinck's soil-extract agar) を用いて行なった結果と一致する。

接合子の保存について楠元ら (1976) は、二相培地で培養して得た *Eudorina elegans* var. *synoica* の接合子を土とともにシャーレに移して徐々に風乾したものを室温で貯蔵し、1年後に水を加えて発芽条件下に置いたところ多くの接合子が発芽したことを報告している。本研究では、*G. pectorale* var. *pectorale* の接合子について上記と同じ方法で実験を行ない、同様の結果を得た。

岩波 (1971), IWANAMI (1972a, 1972b, 1973), 岩波・秋沢 (1974) は、花粉や種子およびアルテミア (*Artemia salina*) の卵などの長期保存が、有機溶媒中で可能であるとした。

筆者らは、*G. pectorale* var. *pectorale* の接合子を前期の方法で風乾して、乾燥後1箇月経過したものを試料とし、メチルアルコール、エチルアルコール、エチルエーテル、ベンジンそれぞれ 30 ml 中に、試料 10 g を入れて室内に保存した。1箇月後、溶媒を完全に除去し、再培養した結果、メチルアルコールの中に貯蔵したものは発芽しなかったが、その他の溶媒中に貯蔵したものは発芽した。なかでもベンジン中に貯蔵したものは多数の発芽群体が観察された。

試料を貯蔵するのに用いた溶媒の種類によって発芽に差が生じたのは、溶媒の性質のほか、貯蔵前の水分の除去および貯蔵後の溶媒の除去と関係があるものと考えられる。

4. 生活史

G. pectorale の生活史を要約すると、2変種ともに Fig. 12 の生活環で示される。

群体は、成長に好適な生活環境下では1→2→3→1の無性生殖サイクルで増殖する。成熟した群体が性的に適合する相手と混在する場合は、群体から配偶子が泳出して相補的な相手の配偶子と接合する4→5→6→7で接合子を形成して休眠する。接合子を形成しないクローンを二相培地の土とともに徐々に乾燥させ、乾燥土を2箇月貯蔵後、これを再培養すると再び *Gonium* が発芽することから、群体が減水などの不良環境に遭遇すると、群体を構成している細胞は厚膜を形成する4→10で単為胞子となり、乾燥等に耐えるものと考えられる。

接合子や単為胞子が再び生活に好適な環境におかれると、接合子は7→8→9→1の順に発芽・成長し、単為胞子は10→11→3→1の順で発芽・成長して増殖する。

5. 分布

Gonium の分布を調べるために、楠元ら (1976) と同様に各種の条件を考慮して神奈川県内の99地点の水田から試料を採集した。培養の結果、84地点から *Gonium* が発生し、発生率は 85% であった。この結果から、工場・生活污水等による汚染の少ないほとんどの水田に *Gonium* が分布しているものと考えられる。また、乾燥法は、*Gonium* の採集法としても分布調査の手段としても有効な手段と考えられる。

出現した種の殆んどは *G. pectorale* var. *pectorale*

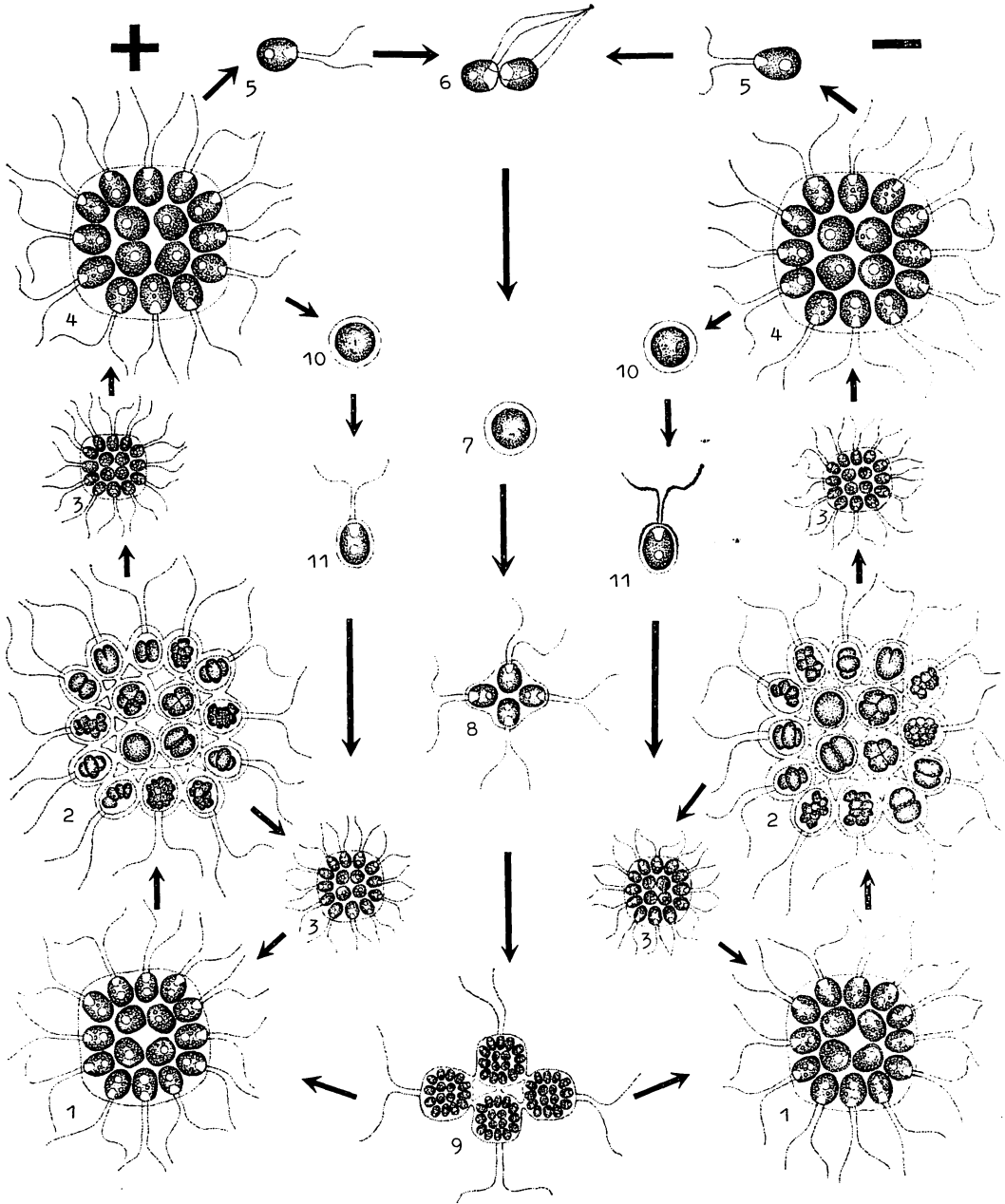


Fig. 12. Diagrammatic representation of the life cycle of *Gonium pectrale* 1. Vegetative colonies; 2. Daughter colonies formation; 3. The daughter colonies released from parental colony; 4. Sexually matured colony; 5. The gametes released from colony; 6. Conjugation of gametes; 7. Zygospore after wall formation; 8. Germ colony; 9. Germ colony which has formed daughter colony; 10. Parthenospore; 11. Biflagellate unicell.

であったが、横須賀市津久井、横浜市大瀬、厚木市日向、津久井郡城山町からは *G. pectorale* var. *praecox* が採集された。

本研究を進めるにあたり、懇切なご指導と文献の提供および校閲を賜った東京大学応用微生物研究所市村輝宜博士、および、文献の提供とご指導を賜った横浜国立大学教授齋藤実博士および日本大学教授山岸高旺博士に感謝の意を表す。

引用文献

- CAVE, M. S. & M. A. POCKOCK 1951. The acetocarmine technique applied to the colonial Volvocales. *Stain. Tech.* 26: 173-174.
- HYDE, B. B. & C. A. GARODOLLA 1953. A mordanting fixation for intense staining of small chromosomes. *Stain Tech.* 28: 305-308.
- 市村輝宜 1971. 微細藻類の培養に関するあれこれ(1). *遺伝* 25: 69-75.
- 1972. 同上(2). *遺伝* 26: 73-77.
- 岩波洋造 1971. 花粉を有機溶媒に入れる. *花粉誌* 8: 39-43.
- IWANAMI, Y. 1972a. Viability of pollen grains in organic solvent. *Botanique* 4: 61-68.
- 1972b. Retaining the viability of *Camellia japonica* pollen in various organic solvents. *Plant & Cell Physiol.* 13: 1139-1141.
- 1973. Retaining the viability of resting egg of brine shrimp (*Artemia salina*) in organic solvent. *Exp. Cell. Res.* 78: 470-471.
- 岩波洋造・秋沢一位 1974. 種子の有機溶媒中貯蔵の研究. 1. 有機溶媒中貯蔵法の基礎的研究. *Japan J. Breed.* 24: 59-64.
- 楠元 守・園田幸朗・夏目正己・小沢 肇 1976. 神奈川県における *Eudorina* (ボルボックス科 緑藻類) の分類と分布について. *藻類* 24: 149-164.
- POCKOCK, M. A. 1951. Karyological studies in the Volvocaceae. *Am. Journ. Bot.* 38: 800-811.
- 1955. Studies in North American Volvocales. 1. The genus *Gonium*. *Madrono* 13: 49-64.
- PRINGSHEIM, E. G. 1964. Pure cultures of algae. Cambridge Univ. Press. London.
- SAITO, S. & T. ICHIMURA 1975. Observation of colonial multiplication in a rapidly growing alga. *Gonium multicoecum* POCKOCK (Volvocaceae) *Bot. Mag. Tokyo* 88: 245-247.
- STARR, R. C. 1973. Special methods-dry soil samples. In J.R. Stein [ed.] *Handbook of phycollogical methods*. Cambridge Univ. Press. London.
- STEIN, J. R. 1958. A morphologic and genetic study of *Gonium pectorale*. *Am. Journ. Bot.* 45: 664-672.
- 1965a. Sexual population of *Gonium pectorale* (Volvocales) *Am. Journ. Bot.* 52: 379-388.
- 1965b. Growth and mating of *Gonium pectorale* (Volvocales) in diffined media. *J. Phycol.* 2: 23-28.
- 1966. Effect of temperature on sexual population of *Gonium pectorale* (Volvocales). *Am. Journ. Bot.* 53: 941-944.

津村孝平：珪藻用の高屈折率封入剤 Kohei TSUMURA: A new mounting medium for diatoms.

珪藻の被殻の永存プレパラート用の高屈折率ミヂウムは既に10種以上もの考案や販売品があるが、それらを使ってみると、いろいろの得失があって、一概にどれが最良とも言えない。ここに紹介するのは数年前にアメリカで公表された(CZARNECKI D. B. and H. D. WILLIAMS 1972. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 91: 73)もので、極めて簡単に作ることができる。

それは Polystyrene を Toluene へ濃く溶解した粘調な液へ沃化メチレンを多量に混合するだけで作れる。具体的作りかたは発泡スチロールをナイフで細かく刻ざんだもの約 16g を 50ml のトルエンに溶かし、透明になったものへ沃化メチレン 200g を完全に混合するだけでよい。使いかたはスライドグラスかカバーガラスの上で乾燥させた珪藻の被殻(もち論、酸処理・水洗ずみの)に少量のトルエンを滴下して被殻内の空気を除去してから、このミヂウムを滴下して

一般の方法と同じように永存プレパラートに作ればよい。このミヂウムは室温で一昼夜ぐらいで一応乾固するから加温して乾固させてはいけない。

沃化メチレンは屈折率 1.742 の液体で大気中に放置すれば全部蒸発してしまう性質のものであるから、これが透明に混合する上記の物質の屈折率が高くなることは当然であるが、トルエンが蒸発してミヂウムが乾固した後、沃化メチレンがどういう状態でプレパラートの中に残っているのか、あるいはプレパラートを長期間保存中に沃化メチレンを徐々に放出して屈折率が低下して来るかは現在のところ未だわかっていない。私が試用した経験によると、このミヂウムは乾固すると体積の減少がかなり著しいから、十分に濃い液を幾分多い目を使ってプレパラートを作らぬと乾固するときにプレパラート内に空気を引込むことが多い。

神奈川県立外語短大 (235 横浜市磯子区岡村町 4-15-1) Coll. of Foreign Studies Yokohama, Okamura-cho 800, Isogo-ku, Yokohama 235 Japan.

Jap. J. Phycol. 26(1): 26. 1978