

## ウミトラノオの生活史についての顕微測光法的研究

大森長朗・植木洋子

山陽学園短期大学 (703 岡山市平井 1-14-1)

OHMORI, T. and UEKI, Y. 1981. Feulgen microspectrophotometric studies of the life history of *Sargassum thunbergii*. Jap. J. Phycol. 30: 44-46.

Liberated unfertilized eggs and cells of male conceptacle walls of *Sargassum thunbergii* were stained by the Feulgen technique, and the relative amounts of DNA per nucleus were measured by microspectrophotometric analysis. The average relative amount of DNA in nuclei of the male conceptacle walls was twice as large as that of the liberated unfertilized eggs. It is concluded that in *S. thunbergii* the liberated unfertilized eggs are haploid while the cells making up receptacle are diploid.

*Key Index Words:* DNA; Feulgen staining; life history; microspectrophotometry; nuclear phase; *Sargassum thunbergii*.

Takeo Ohmori and Yoko Ueki, Sanyo Gakuen Junior College, Hirai, Okayama, 703 Japan.

近年、培養技術の進歩により、複雑な海藻の生活環は、年毎に明らかになってきている。しかし海藻の核分裂像は非常にとらえにくく、また染色体が小さいこともあって、核相 (nuclear phase) が完全に解明された海藻の種は少ない。著者らは、染色体数とは別の方法で核相を決定する方法を模索してきたが、今回、ウミトラノオ (*Sargassum thunbergii*) を用いて、その生殖嚢壁の細胞の核と放出卵の核の相対 DNA 量を、顕微測光法を用いて測定することにより、その核相を明らかにすることができたので、その結果を報告する。

### 材料と方法

1979年6月11日と25日に、岡山県玉野市渋川海岸で採集したウミトラノオを材料に用いた。採集後、雌雄の株を区別してそれぞれ個体別に濾過海水に浸して放置した。雄の生殖器托および表面に放出直後の卵を付着している雌生殖器托を採取し、酢酸アルコール (氷酢酸 1:100% エチルアルコール 3) で30分間固定した。固定後70%アルコールで3回洗浄した。順次、高濃度のアルコールに移して脱水し、クロロホルムを通して、パラフィンに材料を埋藏した。7~8 $\mu$ の厚さの

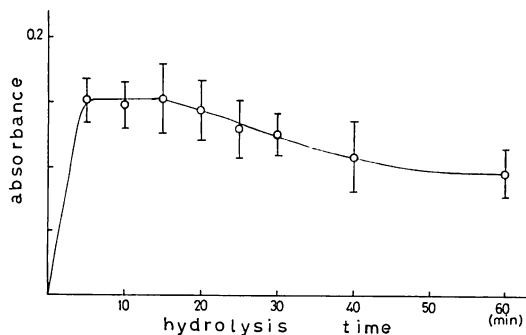


Fig. 1. The effect of hydrolysis time in 1N HCl at 60° on the absorbance of measurable dye bound by meristoderm nuclei. The points are mean  $\pm$  S. D. of absorbance.

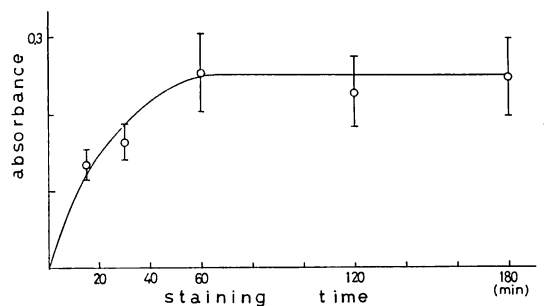


Fig. 2. The effect of staining time in Schiff's reagent on the absorbance of measurable dye bound by meristoderm nuclei. The points are mean  $\pm$  S. D. of absorbance.

マイクローム切片は、キシレンでパラフィンを溶除した後、順次低濃度のアルコールに移していく。流水で30分間洗った後、60°Cに保温した1N HClに15分間浸して加水分解を行う。純水で軽く洗ってから室温でSchiffの試薬に90分間浸した。0.05 M 亜硫酸水素ナトリウムで2分ずつ3回洗った後、流水で10分間洗い発色させた。アルコールで脱水した後、ビオライト(Bioleit)で封入した。相対DNA量は、オリンパス定量顕微鏡BHQを用い、560 nmの波長の光を照射して測定した。相対DNA量は、照射する光のスポットの面積とその吸光度の積で表わされる。放出卵の核の測定に用いたスポットの径は6 $\mu$ で、生殖巣壁の核の場合は5 $\mu$ であった。

## 結 果

まず、ウミトラノオの核をフェイルゲン染色するための最適加水分解時間を決定する必要から、60°Cの1N HClに5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60分間浸す8通りの加水分解を行った。このときのSchiff試薬による染色時間は90分間である。生殖器托の形成表皮(meristoderm)の核の吸光度を、それぞれの場合につき20個の核で測定した。その結果、5~15分という短時間の加水分解が最適であった(Fig. 1)。20分以上加水分解したものでは、加水分解の時間が長くなるほど染色は弱くなり、吸光度は低下した。

続いて、最適染色時間を決定するために、1N HCl, 60°Cで15分間の加水分解を行った後、Schiffの試薬に浸す時間を、15, 30, 60, 120, 180分間の5通り行って比較してみた。それぞれ20個の形成表皮の核についてその吸光度を測定したところ、60分間の染色で吸光度は最大となり、それ以上染色時間をのばしても効果はみられなかった(Fig. 2)。

ウミトラノオの未受精の放出卵の核を、1N HCl, 60°Cで15分間加水分解し、Schiffの試薬に90分間浸して染色し、50個の核について核当りのDNA量を測定した。DNA量は0.3~0.8を示し、17個の核が0.5, 14個の核が0.6を示し、その平均値は0.54であった(Fig. 3a)。

一方、ウミトラノオの若い雄の生殖巣壁の細胞の50個の核について核当りのDNA量を測定したところ、DNA量は0.8~1.4を示した。20個の核が1.0の値を示し、13個の核が1.1を示した。その平均値は1.05であった(Fig. 3b)。これは未受精の放出卵の核DNA量の2倍に相当する。

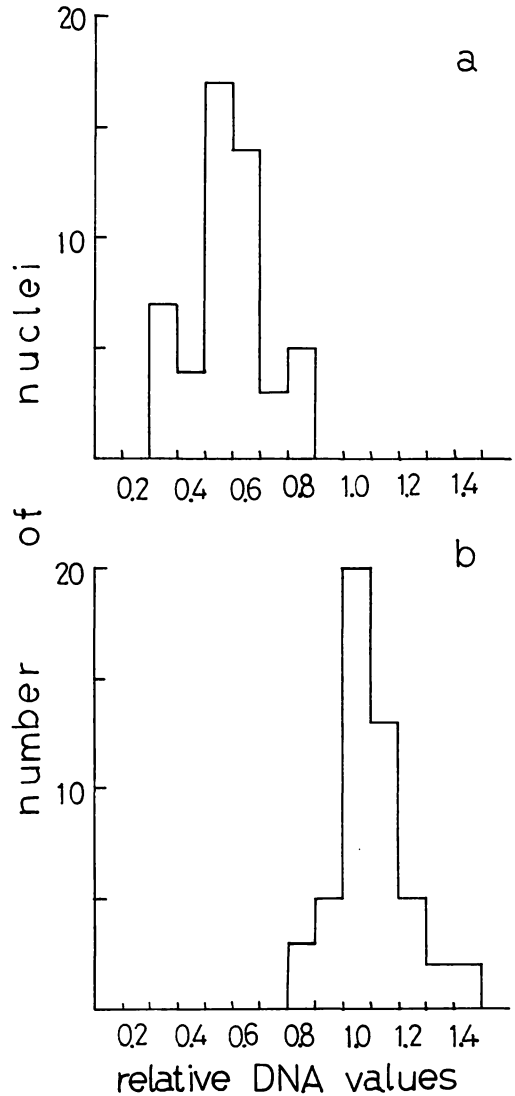


Fig. 3. Frequency distribution of relative DNA values of nuclei of unfertilized eggs (a) and male conceptacle walls (b) in *Sargassum thunbergii*. Unfertilized eggs: 50 nuclei, mean = 0.54 units. Conceptacle walls: 50 nuclei, mean = 1.05 units.

## 考 察

細胞の核をフェイルゲン染色し、その吸光度を測定することにより核当りの相対DNA量を知るという実験方法の妥当性については、以前から議論がある(江上・柴谷 1953 p. 165)。近年ようやく藻類の細胞の核についても、この方法によって相対DNA量を測定

し、これから核相を知る研究報告が見られるようになった。1972年に HURDELBRINK and SCHWANTES が紅藻 カワモヅク属 (*Batrachospermum*) の生活史の研究に、顕微分光測光法が有用であることを示したのに続いて、1975年には KOOP がこの方法を緑藻カサノリ属の1種 *Acetabularia mediterranea* に用いて、仮根の中に存在する一次核 (primary nucleus) の分裂が減数分裂であることを明らかにした。その後、LEE and KEMP (1975) が緑藻 *Eudorina elegans* で、HOPKINS and MCBRIDE (1976) が緑藻 *Coleochaete scutata* で、HOPKINS (1977) が緑藻 *Fritschiella tuberosa* で、さらに COLEMAN (1979) が緑藻類の *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pandorina morum* および *Volvox carteri* f. *nagariensis* で、それぞれの核 DNA 量を知ることによって、それらの生活史を明らかにする研究を行っている。また BREEMAN (1979) は紅藻 *Acrosymphyton purpuriferum* で、四分孢子体の核の平均 DNA 量は、配偶体の核の2倍になっていることを報告している。今回、著者らの行った実験から、褐藻類のウミトラノオでは、その雄生殖窠壁の細胞核に含まれる DNA 量は、未受精の放出卵の核に含まれる DNA 量の2倍であることが明らかになった。従ってウミトラノオの生殖器托の核相は  $2n$ 、未受精卵の核相は  $n$  と考えられる。

OGAWA (1971) は、ウミトラノオの造精子器の中で行われる最初2回の核分裂が減数分裂であって、その結果つくられてくる精子の染色体数は半数 ( $n$ ) であり、幼胚の染色体数は全数 ( $2n$ ) になっていることを確認している。この事実は、本研究の結果から考えられる核相の交代とよく一致している。

海藻の染色体を観察し、それを正確に数え上げることによってその核相を明らかにすることは、大変な労力を必要とする。しかし、今回の報告のように、フェルゲン染色した核を顕微分光測光することによって、

その相対 DNA 量を知るとは比較的容易である。今後は染色体数からではなく、相対 DNA 量から核相を推しはかり、藻類の生活史を解き明かす研究が進展してくるであろう。

#### 引用文献

- BREEMAN, A. M. 1979. The caryological phases in the life history of *Acrosymphyton purpuriferum* (J. Ag.) SJÖST. (Rhodophyceae, Cryptonemiales). *Phycologia* 18: 146-148.
- COLEMAN, A. W. 1979. Feulgen microspectrophotometric studies of *Pandorina morum* and other Volvocales (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 15: 216-220.
- 江上不二夫・柴谷篤弘 1953. 核酸. 共立出版, 東京.
- HOPKINS, A. W. 1977. Feulgen microspectrophotometric investigation of the life history of *Fritschiella tuberosa* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 13: 321-323.
- HOPKINS, A. W. and MCBRIDE, G. E. 1976. The life history of *Coleochaete scutata* (Chlorophyceae) studied by a Feulgen microspectrophotometric analysis of the DNA cycle. *J. Phycol.* 12: 29-35.
- HURDELBRINK, L. and SCHWANTES, H. O. 1972. Sur le cycle de développement de *Batrachospermum*. *Soc. bot. France, Mém. No.* 269-274.
- KOOP, H. U. 1975. Über den Ort der Meiose bei *Acetabularia mediterranea*. *Protoplasma* 85: 109-114.
- LEE, K. A. and KEMP, C. L. 1975. Microspectrophotometric analysis of DNA replication in *Eudorina elegans* (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia* 14: 247-252.
- OGAWA, H. 1971. Cytological observations of *Sargassum thunbergii* (MERT.) O. KUNTZE. *Rec. Oceanogr. Works in Japan* 11: 15-25.