

Colacium vesiculosum EHRB. の培養と形態

加藤 季 夫

東京都立大学理学部牧野標本館 (158 東京都世田谷区深沢2-1-1)

Sueo KATO: Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* EHRB. (Euglenophyceae)

Colacium vesiculosum EHRB. growing on *Cyclops* was collected from small ponds in Saitama and Chiba Prefectures and unialgal cultures of this alga were established in the laboratory. To examine the formation and morphology of attachment structures such as stalks and cushion holdfasts, two isolates were cultured in four media; soil-water, soil-water-pea, Cramer-Myers and newly devised AF-6. In addition, they were cultured together with *Cyclops* in pond water. *C. vesiculosum* LB 1315 (Culture Collection of Algae, Texas University), which was reported to lack stalks, was also cultured in the same way as mentioned above. All three isolates produced dichotomously branched stalks in AF-6 medium and brown cushion holdfasts on the exoskeletons of *Cyclops*. The field observations and the cultural studies show that the presence or absence of attachment structures can not be used as a taxonomic criterion in the genus *Colacium*.

Key Index Words: attachment structures; *Colacium vesiculosum*; culture; *Euglenophyceae*; morphology.

Colacium は細胞の前端部で *Cyclops*, *Daphnia* などの甲殻類の殻面上に着生する藻で、わが国では、神谷(1960)が愛知県岡崎市内の神社の池から *C. arbuscula* STEIN を採集し、その形態について報告している。

筆者は日本各地の池や沼から動物プランクトンを採集し、それらに着生していた *Colacium* の単離培養を行ってきた。得られた培養株のうち、*C. vesiculosum* EHRB. と同定できる2株とテキサス大学より得た *C. vesiculosum* LB 1315株 (STARR 1978) について、4種類の培地を用いた単藻培養および *Cyclops* との混合培養を行い、特に、従来 *Colacium* の分類基準として用いられてきた付着器の柄とクッション (cushion holdfast) 形成の有無とその形態について調べたので、その結果について報告する。

材 料 と 方 法

本研究で用いた *C. vesiculosum* は Table 1 に示した C-8 株、C-67 株および LB 1315 株である。C-8 株と C-67 株は、それぞれ *Cyclops* sp. に着生していた藻をビベット洗浄法 (PRINGSHEIM 1946) で単離し、無菌化したものである。また、テキサス大学

より得た LB 1315 株も同じ方法を用いて無菌化した。単離および保存用培地には淡水産鞭毛藻の培養に有効な AF-6 培地 (Table 2) を用い、培養は 20°C, 3000 lux, 12-12 時間明暗周期の照明で行った。

培養実験には Table 3 に示した AF-6 培地, soil-water 培地 (SW 培地; PRINGSHEIM 1946), soil-water-pea 培地 (SWP 培地; STARR 1964), Cramer-Myers 培地 (CM 培地; CRAMER and MYERS 1952) の4種類の培地を用いた。それぞれの培養株の一部を新しい培地に接種後、2, 4, 8, 24週間目に、細胞の形態および柄とクッションの形成に注目して観察を行った。さらに、クッション形式の有無については、時計皿に入れた濾過滅菌水 (千葉県市原市の池の水) 4 ml の中に藻などが着生していない *Cyclops* sp. 10 個体と、各培養株の数千細胞を共に入れて二者混合培養を行い、2日後に調べた。

固定には1%オスミウム酸水溶液の蒸気、核の染色には酢酸カーミン、ピレノイドの染色にはプロピオン酸カーミン (ROSOWSKI and HOSHAW 1970)、生体染色には0.1%中性赤水溶液をそれぞれ用いた。なお、柄の観察には位相差顕微鏡を用いた。

Table 1. Source of *C. vesiculosum*.

Strain No.	Collecting locality	Date	Isolator
C-8	Shinrin Park, Saitama	Oct. 21, 1976	Kato
C-67	Ichihara City, Chiba	Apr. 24, 1977	Kato
LB 1315*	England	1943	Pringsheim

*Culture Collection of Algae, University of Texas at Austin (STARR 1978).

Table 2. Composition of AF-6 medium

Addition	mg/liter
NaNO ₃	140
NH ₄ NO ₃	22
MgSO ₄ ·7H ₂ O	30
KH ₂ PO ₄	10
K ₂ HPO ₄	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10
CaCO ₃	10
Fe-citrate	2
Citric acid	2
Biotin	0.002
Vit. B ₁	0.01
Vit. B ₆	0.001
Vit. B ₁₂	0.001
Trace metals	5 ml
pH	6.6

1 ml of the trace metals solution contains: 0.2 mg FeCl₃·6H₂O; 0.08 mg MnCl₃·4H₂O; 0.001 mg ZnSO₄·7H₂O; 0.0004 mg CoCl₂·6H₂O; 0.0008 mg Na₂MoO₄; 1.5 mg Na₂-EDTA.

結果と考察

採集時の付着器の有無 観察に用いた *C. vesiculosum* の C-8 株は、森林公園内の小さな池のサンプルから

単離培養したものである。そのサンプル中では *Cyclops* 1 個体あたり数十細胞の *Colacium* が着生していたが、いずれの着生細胞も分類上重要な形質とされている付着器の柄とクッションを形成していなかった。一方、C-67 株を単離培養した市原市の溜池のサンプル中では、*Cyclops* 1 個体あたり数百細胞の *Colacium* が着生し、そのため肉眼でも *Cyclops* が緑色に見えた。これらの着生細胞では、褐色のクッションを形成していたものも観察されたが、柄を形成したものは発見されなかった。このように、自然採集物では付着器を形成していない場合が多く認められた。

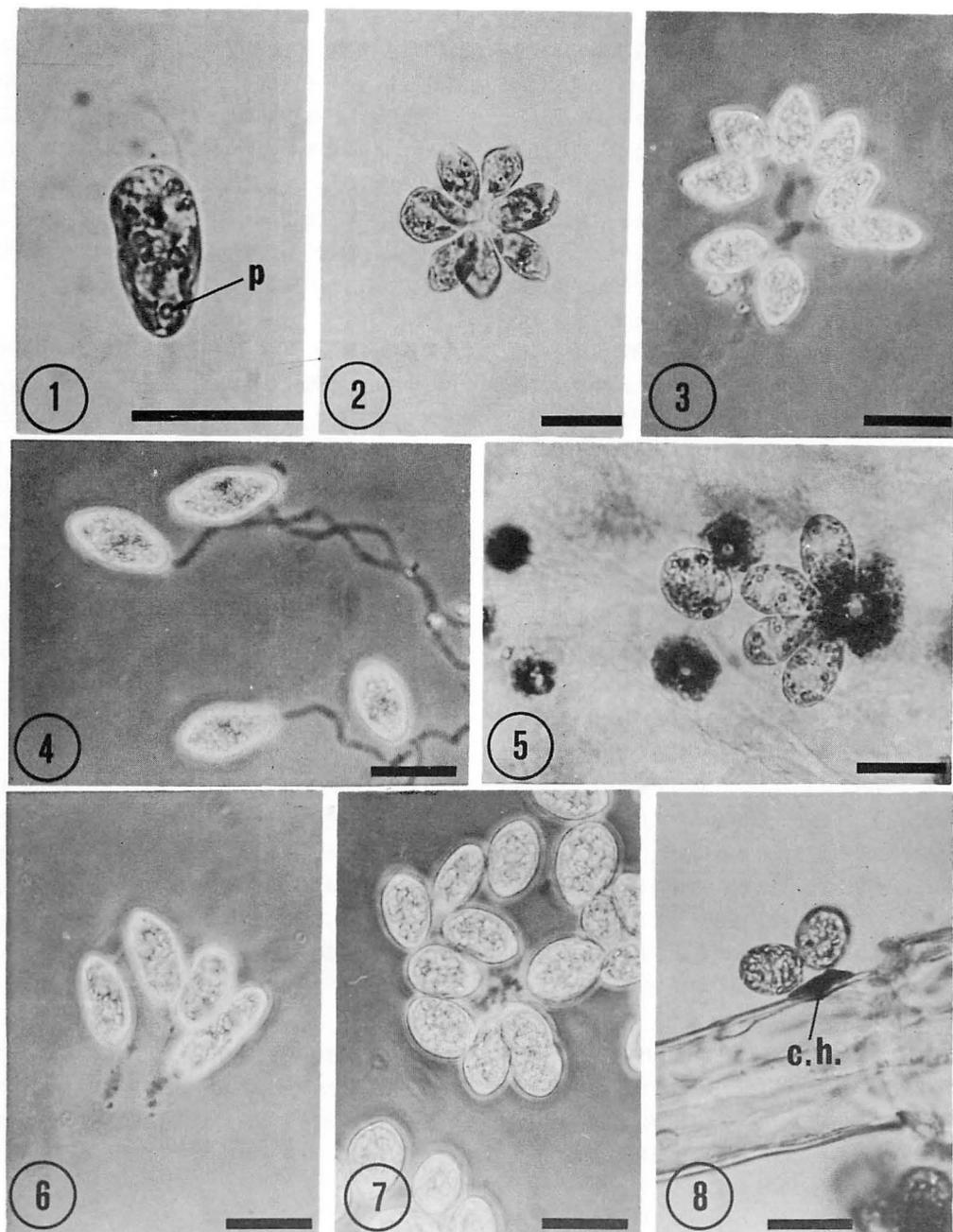
細胞の形態 C-8 と C-67 両株とも、培養中に観察された遊泳細胞は西洋ナン形、卵形あるいは紡錘形で、その大きさは長さ 19-29 μm 幅 10-12 μm、体長の約 2 倍の長さの鞭毛 (locomotory flagellum) で活発に泳ぎまわった (Fig. 1)。葉緑体は皿状で、1 細胞あたり 5-10 個、細胞の内側に向かって突出したピレノイド (inner pyrenoid) をそれぞれ 1 個持っていた。自然採集物では、細胞内に多量のパラミロン粒が蓄積されていてピレノイドは観察しにくい場合が多いが、培養中の対数増殖期のものではパラミロン粒が少なくピレノイドの観察は容易であった。眼点は 4-5 μm の長さで、貯蔵胞の上部に近接していた。核は径 6-7 μm の球状で、細胞の尾部に位置していた。粘液体は球形で小さく、散在していた。

一方、基物に着生した細胞はその鞭毛を失なってお

Table 3. The formation of stalks and brown cushion holdfasts of *C. vesiculosum* in four media and in mixed culture with *Cyclops* sp.

Strain No.	AF-6		Soil-water		Soil-water-pea		Cramer-Myers		On exoskeleton of <i>Cyclops</i> sp.
	c. h	s	c. h	s	c. h	s	c. h	s	c. h
C-8	-	+	-	+	-	+	-	+	+
C-67	-	+	r	+	r	+	-	r	+
LB 1315	-	+	-	-	-	-	-	-	r

c. h: cushion holdfasts; s: stalks; +: formed; -: not formed; r: rare.



Figs. 1-5. Cells and attachment structures of *Colacium vesiculosum* strain C-8. Scale = 20 μ m in Figs. 1-5. 1. Free swimming cell showing inner pyrenoids (p), 2-week-old culture in AF-6; 2. 8-celled colony without stalks and cushion holdfasts, 2-week-old culture in AF-6; 3. 8-celled colony with dichotomously branched short stalk, 4-week-old culture in AF-6; 4. A colony with dichotomously branched long stalks, 4-week-old culture in AF-6; 5. 4-celled colony with a brown cushion holdfast on *Cyclops*, 2-day old culture in sterilized pond water.

Figs. 6-8. Cells and attachment structures of *Colacium vesiculosum* strain LB 1315. Scale = 20 μ m in Figs. 6-8. 6. 4-celled colony with short stalks, 4-week-old culture in AF-6; 7. Colonies with short stalks, 4-week-old culture in AF-6; 8. Cells with a brown cushion holdfast (c. h.) on *Cyclops*, 2-day-old culture in sterilized pond water.

り、尾部の先端部はふつう丸くなっていた。その大きさは遊泳細胞とほぼ等しく、葉緑体の数は6-15個であった。以上の観察結果は LEMMERMANN (1913), JOHNSON (1934), ROSOWSKI and KUGRENS (1973) による欧米産のものについての報告とほぼ一致した。

付着器の形成 C-8株とC-67株の遊泳細胞をAF-6培地に接種すると、2週間目には鞭毛を失ない、その前端部で液面近くの試験管壁に着生した細胞が多数観察された。これらの細胞は付着器の柄とクッションのいずれも形成しておらず、透明な粘液物質で互いに結びついていた (Fig. 2)。4週間目には、試験管壁に柄および透明なクッション状の構造物を形成した細胞が見られた。4種類の培地を用いて、柄とクッションの形成を調べた結果が Table 3 に示してある。C-8とC-67の両株ともAF-6以外の培地でも柄を形成した。しかし、C-67株はCM培地を用いた場合、5回の実験のうち1回だけ柄を形成したのみであった。

C-67株はSW培地、SWP培地中で褐色のクッションを形成したが、C-8株ではいずれの培地でもその形成は確認されなかった。ROSOWSKI and KUGRENS (1973) は *C. vesiculosum* の4株をSW培地とSWP培地で培養したところ、4株とも褐色のクッションを形成したと報告しているが、今回の実験ではそれと異なる結果が得られた。この相違は主に用いた土壌の質の起因すると思われる。C-8株に褐色のクッション形成を起こさせるため、二者混合培養を行い、遊泳細胞を *Cyclops* の殻面に着生させた。2日後、褐色のクッションが *Cyclops* の殻面に形成されているのが観察された。C-67株についても同様な実験を行ったところ、C-8株と同じ結果が得られた。

テキサス大学の *C. vesiculosum* LB 1315株では柄の形成は観察されず、クッションの形成も稀であったと ROSOWSKI and KUGRENS (1973) は報告している。今回の培養実験では、用いた4種類の培地のうちAF-6培地でのみ柄の形成が認められた。またクッションは二者混合培養を行った時のみ、*Cyclops* の殻面上に形成された。

Colacium では、付着器の柄とクッションの有無が種レベルでの重要な分類基準とされてきた (HUBER-PESTALOZZI 1955)。しかし、ROSOWSKI and KUGRENS (1973) はそれらが環境条件によって影響されやすく、分類基準として適切であるか否かについては今後の研究に待たなければならぬと述べている。

今回の培養実験では、柄を形成しないとされていた

LB 1315株、採集時に柄とクッションを形成していなかったC-8株、柄を形成していなかったC-67株の3株とも、AF-6培地および *Cyclops* との混合培養の場合その殻面に細胞端から付着器を形成した。このことは、付着器を形成しない点に基づいて記載された *Colacium* でも、ある適切な条件下では、それら付着器を形成する可能性が大きいことを示している。したがって、付着器の有無を分類基準に用いることは適切でないと考えられる。

付着器の形態 C-8株、C-67株およびLB 1315株がAF-6培地中で形成した柄は、長さ数 μm から10数 μm と短く、二叉状に分岐し、それぞれの柄の先端には卵形あるいは長円形の細胞が倒生していた (Figs. 3, 6, 7)。この観察結果は STEIN (1878), LEMMERMANN (1913), SKUJA (1948), GREEN (1953), ROSOWSKI and KUGRENS (1973) らの報告とよく一致した。また、これら *C. vesiculosum* 3株の形態は、*C. mucronatum* BOURR. and CHAD. や *C. libellae* ROSOW. and WILL. の柄の形態 (ROSOWSKI and WILLEY 1975, 加藤未発表) とは明らかに異なっていた。稀に、C-8株とC-67株では、ROSOWSKI and KUGRENS (1973) も報告している100 μm 以上の長い柄をもつ細胞からなるコロニーが、試験管の底部に形成された (Fig. 4)。

Cyclops との混合培養でC-8株、C-67株およびLB 1315株が形成したクッションは、ふつう円盤状であり、水酸化鉄等を沈着して褐色を呈していた (Figs. 5, 8)。このクッションに関しては、柄と異なり、他の種との間に明瞭な相違点をみいだすことはできなかった。

終りに、日頃から御指導いただいている都立大学加崎英男名誉教授、ならびに培養に関して助言して下さった三浦宏一郎博士、筑波大学管平高原実験センター徳増征二博士、日本大学農獣医学部大島海一博士に深く感謝する。

引用文献

- CRAMER, M. and MYERS, J. 1952. Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. Arch. Mikrobiol. 17: 384-402.
 GREEN, J. 1953. A swarm of *Colacium*. J. Quakett Mic. Cl. 3: 510-511.
 HUBER-PESTALOZZI, G. 1955. Das Phytoplankton des Süßwassers. 4: Euglenophyceen. In A. THIENEMANN (ed.), Die Binnengewässer.

Stuttgart.

JOHNSON, D. F. 1934. Morphology and life history of *Colacium vesiculosum* Ehr. Arch. Protistenk. 83: 241-263.

神谷 平 1960. 淡水産コペポダに着生する一藻類. 藻類 8: 12-14.

LEMMERMANN, E. 1913. Eugleninae. In A. PASCHE (ed.), Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Heft 2. Flagellata. Gustav Fisher, Jena.

PRINGSHEIM, E. G. 1946. Pure Cultures of Algae. Cambridge Univ. Press, London.

ROSOWSKI, J. R. and HOSHAU, R. W. 1970. Staining algal pyrenoids with carmine after fixation in an acidified hypochlorite solution. Stain Tech. 45: 293-298.

ROSOWSKI, J. R. and KUGRENS, P. 1973. Observation on the euglenoid *Colacium* with special

reference to the formation and morphology of attachment material. J. Phycol. 9: 370-383.

ROSOWSKI, J. R. and WILLEY, R. L. 1975. *Colacium libellae* sp. nov. (Euglenophyceae), a photosynthetic inhabitant of the larval damselfly rectum. J. Phycol. 11: 310-315.

SKUJA, H. 1948. Taxonomie des Phytoplanktons einiger Seen in Uppland, Schweden. Symb. Bot. Upsal. 9(3): 1-399.

STARR, R. C. 1964. The culture collection of algae at Indiana University. Am. J. Bot. 51: 1013-1044.

STARR, R. C. 1978. The culture collection of algae at University of Texas at Austin. J. Phycol. 14: suppl., 47-100.

STEIN, F. R. 1878. Der Organismus der Infusiothiere III. Der Organismus der Flagellaten 1. Wilhelm Engelmann, Leipzig.

新刊紹介

Farr, E. R., Leussink, J. A. and Stafleu, F. A. (eds.): **Index Nominum Genericorum (Plantarum)**, Regnum Vegetabile Vols 100-102. xxvi+1896 pp. (in 3 vols). Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht. 1979. (価格約 94,000円).

植物の属名をすべて収録する計画が立案され、実行が開始されたのは、1954年バリーで開催された国際植物学会議の際の決定によっている。このような仕事は少数の人によってできるものではなく、各専門分野にわたる多数の研究者の協力によらなければ不可能なことである。この事業に世界各国の110人以上の研究者が参加し、日本からは山田幸男先生も加わって、25年にわたる努力の末に *Index Nominum Genericorum (Plantarum)*, 略して ING の出版が完成した。最初はカード形式で発行が開始され、1,000枚を1組として1955年から1971年までに35セットが出版された。カード形式による発行はここまでで中断した。そして利用に便利にするために本の形式をとることとなり、1975年までに発表された植物の属名を網羅して、約1,900ページを3巻に分けて出版が完了した。本書には細菌を除くすべての現生および化石植物の属名約63,500を収録してあり、それぞれの属名について著者、発表された出版物、発表の日付を示し、タイプ種に関すること等の事項を加えてある。

このような完備した目録ができたことにより、属名の綴字や引用等を安定させることに役立ち、また今後無用のホモニムを作ったりする混乱を防ぐ意味でも、その有用性は極めて大きいものである。

この目録の藻類に関する部分を通覧してみると、科への配置には色々不備のあることもわかる。綴字上の問題点について、紅藻・褐藻・緑藻で、現在ふつうに使われている綴りと違うものがある。今後はこの目録で正しいとして採用されたものを使って行くべきであると考えられるので、気付いたものを以下に列記する。

慣用の綴り	目録の正しい綴り
<i>Audouinella</i>	<i>Auduinella</i>
<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlamidomonas</i> ただし科名 Chlamydomonadaceae
<i>Cymathere</i>	<i>Cymathaere</i>
<i>Griffithsia</i>	<i>Griffitsia</i>
<i>Hildenbrandia</i>	<i>Hildbrandtia</i> ただし科名 Hildenbrandiaceae
<i>Lithothamnion</i>	<i>Lithothamnium</i>
<i>Monospora</i>	<i>Monosporus</i>
<i>Nemastoma</i>	<i>Nemostoma</i>
<i>Peyssonnelia</i>	<i>Peyssonnelia</i>

(北大理植 吉田忠生)