

## エゾヤハズの四分胞子発生機構の解析 VIII. 四分胞子発生におよぼす $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ 欠如の影響

大森長朗・橋田順子

山陽学園短期大学 (703 岡山市平井1丁目14-1)

OHMORI, T. and HASHIDA, J. 1983. An analysis of tetraspore development in *Dictyopteris divaricata* VIII. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  deficiency on tetraspore development. Jap. J. Phycol. 31: 92-96.

Tetraspores of *Dictyopteris divaricata* were normally developed in Herbst's artificial sea water (ASW). In  $\text{CaCl}_2$ -free ASW, most of the spores died in 2 days. Cultured in ASW containing 0.03 g/l  $\text{CaCl}_2$  for 2 days, 40% of the germlings developed into apolar ones lacking rhizoids. At a concentration of 0.12 g/l and 0.06 g/l  $\text{CaCl}_2$ , plasmoptysis at the tip of a rhizoid and the ramification of the rhizoid were seen. In ASW containing less than 0.05 g/l KCl, spores didn't germinate and died gradually. At a concentration of 0.1 g/l KCl, 32% of germlings developed into apolar ones. As a concentration of  $\text{MgSO}_4$  in ASW became lower, the formation of erect shoot was more inhibited. In  $\text{MgSO}_4$ -free ASW, the erect shoot was formed in only 14% of the germlings. From the cultures of spores in  $\text{Mg}^{2+}$ -free and  $\text{SO}_4^{2-}$ -free ASW, it was proved that  $\text{Mg}^{2+}$  was indispensable for the formation of the erect shoot.

*Key Index Words:* apolar germlings; artificial sea water;  $\text{Ca}^{2+}$ ; *Dictyopteris divaricata*; erect shoot;  $\text{K}^+$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $\text{SO}_4^{2-}$ ; tetraspore development.

Takeo Ohmori and Junko Hashida, Sanyo Gakuen Junior College, Hirai, Okayama, 703 Japan.

エゾヤハズの四分胞子の発生過程については、INOH (1936) および西林・猪野 (1959) が詳しく報告している。濾過海水に  $\text{CaBr}_2$  または  $\text{CaI}_2$  を加えた液でエゾヤハズの四分胞子を培養すると仮根の形成が抑制され (大森・宮崎・末村 1977), KCl または KBr を加えた海水溶液中では仮根が分岐する (大森・末村 1977) など、初期発生に対する高濃度の無機イオンの影響が調べられている。

今回、エゾヤハズの四分胞子を Herbst 人工海水で培養したところ、濾過海水の場合と全く同じように発生することがわかったので、 $\text{CaCl}_2$ , KCl,  $\text{MgSO}_4$  のいずれか一つを含まない人工海水、およびそれぞれについて濃度を低くした人工海水で胞子の培養を試みた。この実験によって初期発生に対する Ca イオン、K イオン、Mg イオンの影響を調べることができたのでその結果を報告する。

### 材料と方法

本研究では1982年5月24日、6月6日および6月21日に岡山県玉野市渋川において採集されたエゾヤハズ

(*Dictyopteris divaricata*) の四分胞子を用いて実験を行なった。採集後藻体を一晩暗所に放置し、翌日濾過海水 (SW) を満たした大型シャーレ中に浸して四分胞子を放出させた。2時間以内に放出された胞子を遠沈して集め、実験を行なった。純水を用いて normal な人工海水 (ASW, Table 1) を作り、この中で胞子を培養して濾過海水の場合と比較観察した。次にこの人工海水から  $\text{CaCl}_2$  だけが 0.49, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0 g/l, KCl だけが 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.03, 0 g/l および  $\text{MgSO}_4$  だけが 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0 g/l と少なくなった人工海水を作り、胞子発生に対する影響を調べた。

さらに  $\text{MgSO}_4$ -free 人工海水で培養した場合には、直立苗 (erect shoot) の形成が抑制されたので、この効果が  $\text{Mg}^{2+}$  か  $\text{SO}_4^{2-}$  か、どちらの欠如によるものかを明らかにするために  $\text{Mg}^{2+}$ -free,  $\text{SO}_4^{2-}$ -free の人工海水 (Table 1) を作って胞子の培養を行なった。光は自然光で培養温度は  $17.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  であった。培養はすべて小型シャーレ (径 6 cm) を使用し、培養液は各シャーレに 7 ml ずつ入れた。

Table 1. Artificial sea waters (ASW).

Component	Normal medium (g/l)	Ca <sup>2+</sup> -free (g/l)	K <sup>+</sup> -free (g/l)	MgSO <sub>4</sub> -free (g/l)	Mg <sup>2+</sup> -free (g/l)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -free (g/l)
NaCl	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
KCl	0.8	0.8	—	0.8	0.8	0.8
MgSO <sub>4</sub>	3.2	3.2	3.2	—	—	—
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	—	—	—	3.8	—
MgCl <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	2.6
CaCl <sub>2</sub>	0.98	—	0.98	0.98	0.98	0.98

1 ml of 4.94% NaHCO<sub>3</sub> per 100 ml of ASW is added.

Table 2. Development of tetraspores cultured for 6 days with SW and CaCl<sub>2</sub>-varied ASW.

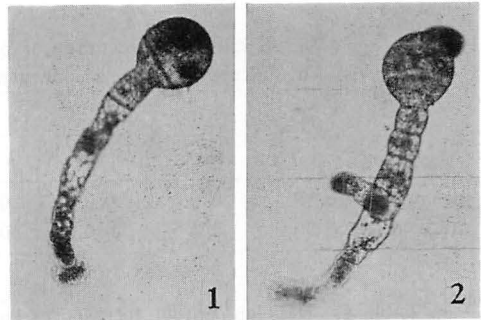
	SW	CaCl <sub>2</sub> concentration (g/l) in ASW						
		0.98	0.49	0.25	0.12	0.06	0.03	0
survival (%)	92.0	86.0	95.0	82.5	77.0	45.0	4.0	0.0
germination (%)	98.0	99.0	99.0	99.5	100.0	100.0	—	—
apolar germling (%)	0.5	0.5	1.0	2.0	0.5	2.5	40.3	—
erect shoot (%)	93.8	90.8	87.5	89.0	76.0	56.2	—	—

Apolar germling is counted after 2 days culture.

## 結 果

人工海水中での四分孢子発生：人工海水中でエゾヤハズの四分孢子を培養し、初期発生を観察した。培養後20時間ぐらいで孢子は一端から突起を出し始めた。次に第一分割壁が突起の伸出方向に対して直角の方向に形成されて孢子は2細胞に分けられた。突起は生長して仮根となる。孢子の部分が2～4細胞に分かれた後、その頂端部が隆起してくる。この頂端部の隆起は隔壁によって仕切られ、その後細胞分裂をくりかえして生長し、直立苗 (erect shoot) に発達する。以上のような人工海水中での四分孢子の発生は、その生残率、発芽率、発生様式および発生速度などすべてが濾過海水で培養した場合と同じであった (Fig. 3)。

CaCl<sub>2</sub> の四分孢子発生に対する影響：CaCl<sub>2</sub> が 0.98 (ASW), 0.49, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 および 0 g/l の人工海水で孢子を培養した。0.12～0.98 g/l では培養6日後の生残率は 77.0～95.0% であったが 0.06 g/l では培養1日後で生残率 78.5%, 培養6日後で生残率 45.0% と、孢子の生存に著しい影響を与えた。0.03 g/l では培養1日後で 56.0% が死滅し、0 g/l (Ca<sup>2+</sup>-free) では培養1日後で 67.5% が死滅し、培養2日後ではほとんどすべての孢子が死滅した。0.06～0.98 g/l では生き残っている孢子の発芽率には大きな差はみられなかったが、0.03 g/l では培養2日後の発芽率は



Figs. 1-2. Germlings of *Dictyopteris divaricata* cultured in CaCl<sub>2</sub>-deficient ASW. 1. A germling showing plasmoptysis at the tip of a rhizoid in 0.06 g/l CaCl<sub>2</sub> ASW for 3 days. 2. A germling with a ramified rhizoid in 0.12 g/l CaCl<sub>2</sub> ASW for 7 days.

64.7% と低くなった。そしてこの時、発芽している孢子の 40.3% は仮根を形成しない apolar な発芽体であった。0.25～0.98 g/l では濾過海水中の場合と同じように erect shoot が形成された。培養6日後の erect shoot の形成率は 0.12 g/l では 76.0%, 0.06 g/l では 56.2% と、CaCl<sub>2</sub> が極端に少なくなると低くなっていった (Table 2)。

0.12, 0.06 g/l では仮根の先端から原形質を吐出しているのが観察された (Fig. 1)。原形質吐出を起こしているものの割合は培養6日後で 0.12 g/l では 39.0

%, 0.06 g/l では 64.0% であった (Table 3)。原形質吐出を起こした場合、その後吐出を起こした細胞は死滅するようになる。また、吐出はみられないが、仮根の先端が黒っぽくなっているものも観察された。仮根の分岐は濾過海水で培養した場合でも培養 6 日後に 3.5% ほどみられるが、CaCl<sub>2</sub> 0.12, 0.06 g/l では 22.5%, 21.5% となり、CaCl<sub>2</sub> が極端に少なくなると仮根が分岐してくるものが多くなった (Table 3)。この場合、仮根の先端部で原形質吐出を起こした後に、分岐してくる発芽体が多かったので、吐出のために壊死してしまった仮根の代償として、仮根分岐が起こったものと思われる (Fig. 2)。

KCl の四分孢子発生に対する影響: KCl が 0.8 (ASW), 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.03 および 0 g/l の人工海水で孢子を培養した。0.05 g/l 以下では時間の経過とともに死滅する孢子が増えていった。培養 1, 3, 7 日後の生残率は 0.05 g/l では 92.5%, 63.0%, 23.5%, 0.03 g/l では 88.5%, 47.5%, 16.0%, 0 g/l (K<sup>+</sup>-free) では 84.0%, 35.0%, 6.0% となり、外液の K<sup>+</sup> の希薄さが徐々に四分孢子の生存に影響してくることが明

らかになった。0.2 g/l 以上では孢子の発芽に大きな影響はみられなかったが、0.1 g/l では培養 7 日後の発芽率は 50.8% と低くなり、仮根を形成しない apolar な発芽体が 32.0% と多くなった (Table 4)。erect shoot の形成率は 0.2 g/l でやや低くなり、0.1 g/l では erect shoot を形成したものは皆無であった。0.05 g/l 以下になると発芽が著しく抑制され、分割壁形成や仮根の伸長も観察されなかった。

MgSO<sub>4</sub> の四分孢子発生に対する影響: MgSO<sub>4</sub> が 3.2 (ASW), 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 および 0 g/l の人工海水で孢子を培養した。0 g/l (MgSO<sub>4</sub>-free) の培養でも培養 6 日後の生残率は 77.0%, 発芽率は 94.0% であり、濾過海水中で培養したものとあまりかわらなかった。erect shoot の形成率は MgSO<sub>4</sub> の濃度が低くなるにつれて下がり、MgSO<sub>4</sub>-free では erect shoot を形成したものは極めて少なく 14.0% となった (Table 5, Fig. 4)。この erect shoot 形成の抑制が Mg<sup>2+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> のどちらのイオンの不足によるものかを調べるために Mg<sup>2+</sup>-free, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-free の人工海水 (Table 1) を作り、孢子を培養した。濾過海水, normal

Table 3. Percentage of plasmoptysis and ramification of rhizoids in culture at various concentrations of CaCl<sub>2</sub> for 6 days.

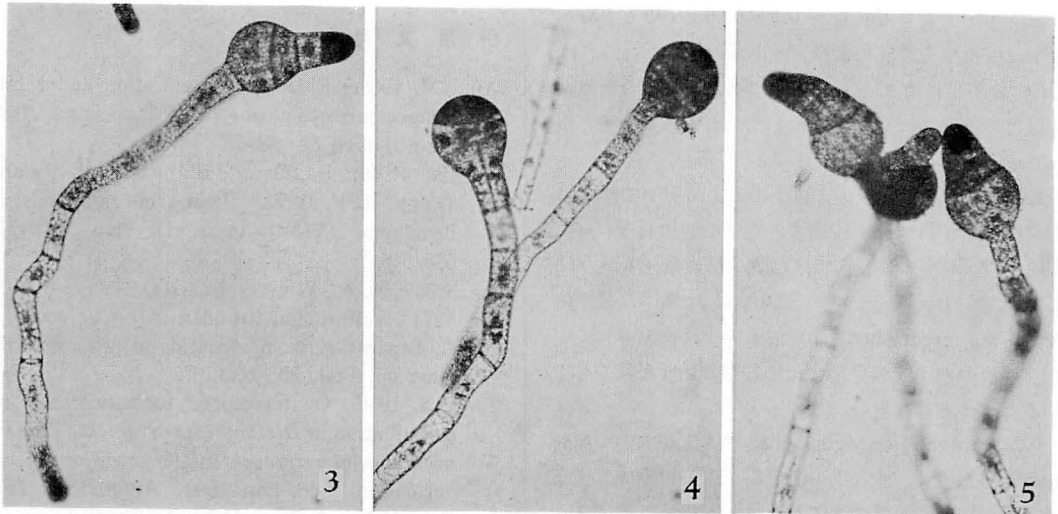
	SW	CaCl <sub>2</sub> concentration (g/l) in ASW						
		0.98	0.49	0.25	0.12	0.06	0.03	0
plasmoptysis (%)	0.0	0.0	0.0	6.0	39.0	64.0	—	—
ramification (%)	3.5	0.6	0.5	2.5	22.5	21.5	—	—

Table 4. Development of tetraspores cultured for 7 days with SW and KCl-varied ASW.

	SW	KCl concentration (g/l) in ASW						
		0.8	0.4	0.2	0.1	0.05	0.03	0
survival (%)	68.0	68.0	67.5	59.0	54.0	23.5	16.0	6.0
germination (%)	95.5	92.0	91.5	91.0	50.8	6.0	—	—
apolar germling (%)	0.5	1.1	1.1	3.8	32.0	—	—	—
erect shoot (%)	43.5	43.5	36.5	27.5	0.0	—	—	—

Table 5. Development of tetraspores cultured for 6 days with SW and MgSO<sub>4</sub>-varied ASW.

	SW	MgSO <sub>4</sub> concentration (g/l) in ASW					
		3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0
survival (%)	96.0	94.0	61.6	90.0	87.5	80.0	77.0
germination (%)	100.0	100.0	95.7	99.0	98.5	95.5	94.0
apolar germling (%)	0.0	1.8	2.2	1.5	1.5	2.1	1.6
erect shoot (%)	95.5	90.5	73.9	83.0	61.0	42.0	14.0



Figs. 3-5. Germlings of *Dictyopteris divaricata* cultured for 7 days. 3. A germling in normal ASW. 4. Germlings without erect shoot in  $\text{MgSO}_4$ -free ASW. 5. Germlings with erect shoot in  $\text{SO}_4^{2-}$ -free ASW.

Table 6. Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  on erect shoot formation in culture for 6 days with SW and ASW.

	SW	ASW	$\text{MgSO}_4$ -free ASW	$\text{Mg}^{2+}$ -free ASW	$\text{SO}_4^{2-}$ -free ASW
erect shoot (%)	78.5	78.5	0.5	3.5	82.0

な人工海水,  $\text{MgSO}_4$ -free 人工海水,  $\text{Mg}^{2+}$ -free 人工海水および  $\text{SO}_4^{2-}$ -free 人工海水でそれぞれ6日間培養した後で胞子を観察すると, 生残率, 発芽率, 仮根の形成および伸長には差はみられなかったが, erect shoot の形成に大きな差がみられた。erect shoot の形成率は  $\text{SO}_4^{2-}$ -free 人工海水では82.0%と, 濾過海水や normal な人工海水の場合と同じであったが (Fig. 5),  $\text{Mg}^{2+}$ -free 人工海水では3.5%となり erect shoot を形成したものは非常に少なくなった (Table 6)。このことから erect shoot の形成には  $\text{Mg}^{2+}$  が必要であることがわかった。

## 考 察

海藻の初期発生には無機イオンが大きな役割を演じていると考えられている。ALLEN, JACOBSEN, JOAQUIN and JAFFE (1972) は *Pelvetia* 卵の細胞内イオン濃度を受精後24時間にわたって測定した結果,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  は変化しなかったが  $\text{K}^+$  は  $\text{Cl}^-$  とともに約2倍に増加することを報告している。 $\text{K}^+$  および  $\text{Cl}^-$  の増加は発生のために必要な酵素を活性化したり, 細胞内浸透圧を増加させるのに役立っているだろうと

述べている。*Fucus* および *Pelvetia* 卵の極性軸の決定と無機イオンとの関係は ROBINSON and JAFFE (1975) および NUCCITELLI and JAFFE (1976) によって報告されており,  $\text{Ca}^{2+}$  が極性軸の決定に深くかかわっていることが指摘されている。

0.03 g/l  $\text{CaCl}_2$  の人工海水中では, エゾヤハズスの四分胞子は24時間以内に半数以上死滅してしまう。この培養液では  $\text{Cl}^-$  は多量に存在するが,  $\text{Ca}^{2+}$  のみが著しく少なくなっているため, 胞子の生存には  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることが明らかになった。これは  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞壁の構築, 細胞膜の保持や透過性, 原形質コロイドの水和性に影響するなど多くの重要な役割を持っているためであると思われる。培養2日後の0.03 g/l  $\text{CaCl}_2$  の人工海水では, 生存し発芽している胞子のうち40.3%が仮根を形成しない apolar な発芽体であった。0.06 g/l  $\text{CaCl}_2$  では直立苗 (erect shoot) も培養6日後に56.2%のものが形成しただけであり, 仮根形成や erect shoot の形成にもある濃度以上の  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることがわかった。ジベレリンおよびカイネチンを含む海水で *Fucus* 卵を培養すると, その仮根に原形質吐出がみられることを ABE (1969) が報告して

いる。本研究でも  $\text{CaCl}_2$  が 0.12, 0.06 g/l の人工海水中では仮根の先端部で原形質吐出がみられた。これは  $\text{Ca}^{2+}$  の不足により、生長しつつある仮根端の細胞膜の保持や透過性に異常をきたしたためであると考えられる。

KCl の濃度が 0.05 g/l 以下の人工海水中では、培養日数が増すにつれて死滅する胞子が増加していった。0.1 g/l KCl の人工海水では培養 7 日後発芽率が 50.8 % と低く、しかもその中の 32.0 % が apolar な発芽体であった。erect shoot の形成も完全に抑制されていた。外液中の  $\text{K}^+$  が少ないため細胞の活性が低下しているためかもしれない。

0.2 g/l  $\text{MgSO}_4$  や  $\text{MgSO}_4$ -free の人工海水中で培養を行なった場合、生残率、発芽率、仮根の形成、細胞分裂などは全く正常であるが erect shoot は形成されなかった。*Fucus* 卵を  $\text{SO}_4^{2-}$ -free 人工海水で培養すると、仮根形成率が 10% に下がること (CRAYTON, WILSON and QUATRANO 1974) が報告されているが、本研究では  $\text{SO}_4^{2-}$ -free 人工海水におけるエゾヤハズの四分胞子の初期発生には異常はみられず、erect shoot も濾過海水中的のものと全く同じように形成された。しかし、 $\text{MgSO}_4$  の代わりに  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を用いた  $\text{Mg}^{2+}$ -free の人工海水中では、 $\text{MgSO}_4$ -free の場合と同じように erect shoot は形成されなかった。それゆえ、erect shoot の形成には  $\text{Mg}^{2+}$  が必要であることが明白である。この場合、 $\text{Mg}^{2+}$  の欠如により光合成に支障をきたし、その結果 erect shoot が形成されなかったのか、あるいは erect shoot の形態分化に直接  $\text{Mg}^{2+}$  がかかわっているのかは今後の研究により明らかにしてゆきたい。

## 引用文献

- ABE, M. 1969. Rhizoid differentiation under low temperature condition in *Fucus* eggs. Bot. Mag. Tokyo 82: 53-55.
- ALLEN, R. D., JACOBSEN, L., JOAQUIN, J. and JAFFE, L. F. 1972. Ionic concentrations in developing *Pelvetia* eggs. Develop. Biol. 27: 538-545.
- CRAYTON, M. A., WILSON, E. and QUATRANO, R. S. 1974. Sulfation of fucoidan in *Fucus* embryos II. Separation from initiation of polar growth. Develop. Biol. 39: 164-167.
- INOH, S. 1936. On tetraspore formation and its germination in *Dictyopteris divaricata* OKAM., with special reference to the mode of rhizoid formation. Sci. Pap. Inst. Algal. Res., Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ. 1: 213-219.
- 西林長朗・猪野俊平 1959. アミジグサ科植物の生活史について I. アミジグサ, エゾヤハズ, オキナウチワの四分胞子発生。植物学雑誌 72: 261-268.
- NUCCITELLI, R. and JAFFE, L. F. 1976. The ionic components of the current pulses generated by developing furoid eggs. Develop. Biol. 49: 518-531.
- 大森長朗・宮崎志津子・末村枝利子 1977. エゾヤハズの四分胞子発生機構の解析 II.  $\text{CaBr}_2$ ,  $\text{CaI}_2$  による仮根形成の抑制。藻類 25: 49-53.
- 大森長朗・末村枝利子 1977. エゾヤハズの四分胞子発生機構の解析 III. KCl, KBr による仮根の分岐。山陽学園短期大学研究論集 8: 47-50.
- ROBINSON, K. R. and JAFFE, L. F. 1975. Polarizing furoid eggs drive a calcium current through themselves. Science 187: 70-72.