

Zygnema extenu Jao の有性生殖を誘起する要因

加藤季夫¹・大島海一²

¹ 國學院大學自然科学研究室 (150 東京都渋谷区東 4-10-28)

² 日本大学生物資源科学部 (252 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

Kato, S. and Ooshima, K. 1997: The factor for induction of sexual reproduction in *Zygnema extenu* Jao (Zygnematales, Chlorophyceae). Jpn. J. Phycol. (Sôri) 45:1-4.

Two clonal cultures of *Zygnema extenu* were established from samples collected from a paddy field in Yokohama, Kanagawa Prefecture on March 7, 1991 and were maintained at 10°C, under a light intensity of 3,000lux on a light regime of 10L:14D hours. A series of experiments was carried out to investigate key factors for induction of sexual reproduction. The formation of zygotes was observed only when the two complementary mating-type cultures were mixed together and maintained at temperatures, ranging from 20 to 30°C. However, it could not be induced by other factors, such as nitrogen depletion, high light intensity and long day length. The results obtained in the present study indicated that higher temperatures seem to be important for sexual reproduction in *Z. extenu*.

Key index words: sexual reproduction-temperature-Zygnema-Zygnematales-zygote formation

¹Laboratory of Natural Science, Kokugakuin University, 4-10-28 Higashi, Shibuya-ku, Tokyo 150, Japan

²College of Bioresource Science, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252, Japan

ホシミドロ属 *Zygnema* は緑藻綱ホシミドロ目 (Zygnematales, Chlorophyceae) の代表的な糸状藻で、接合と呼ばれる特徴的な様式の有性生殖を行うことでよく知られている。野外では接合している藻体がしばしば観察されるにもかかわらず、実験室内で培養して接合を人為的に誘起することはなかなか困難のようである。現在のところ、接合の誘起に成功しているのは *Zygnema circumcarinatum* Czurda だけである (Miller 1973, Miller and Hoshow 1974)。

今回、横浜市内の水田から採集した試料から得られた *Z. extenu* Jao のクローン培養株を用いて、接合を誘起する要因を調べる培養実験を行った。その結果、本藻の接合を誘起する要因は温度であることが判明したので、ここに報告する。

材料と方法

1991年3月7日に神奈川県横浜市緑区寺家町にある水田から、接合を始めている *Zygnema extenu* Jao の藻体を採集した。顕微鏡下で一部が接合している藻体を選び出し、そのまだ接合せず2本の糸状体のままの部分をも5細胞の長さに切断して、それらをマイクロピペットで吸い上げ AF-6 培地 (加藤 1982) に移した。そ

の結果、Z91-10a 株と Z91-10b 株のクローン培養株2株が得られた。これらは、AF-6 培地・培養温度 10°C・照度 3,000lux・10-14hr の明暗周期の条件下で、継代培養されている。

接合を誘起する要因を調べるために、Z91-10a 株と Z91-10b 株の2つのクローン培養株を用いて、次のような一連の培養実験を行った。培養用容器として、ヌンク社製のフラスコ型カルチャーチェンバーを使用した。培養を開始してから2週間、検鏡して接合の有無を確認した。

実験1: 2つの培養株の藻体を混合してから、次の5通りの培養を行った。

1-A: 継代培養と同じ培養条件での培養

1-B: 培地のみを換えて培養

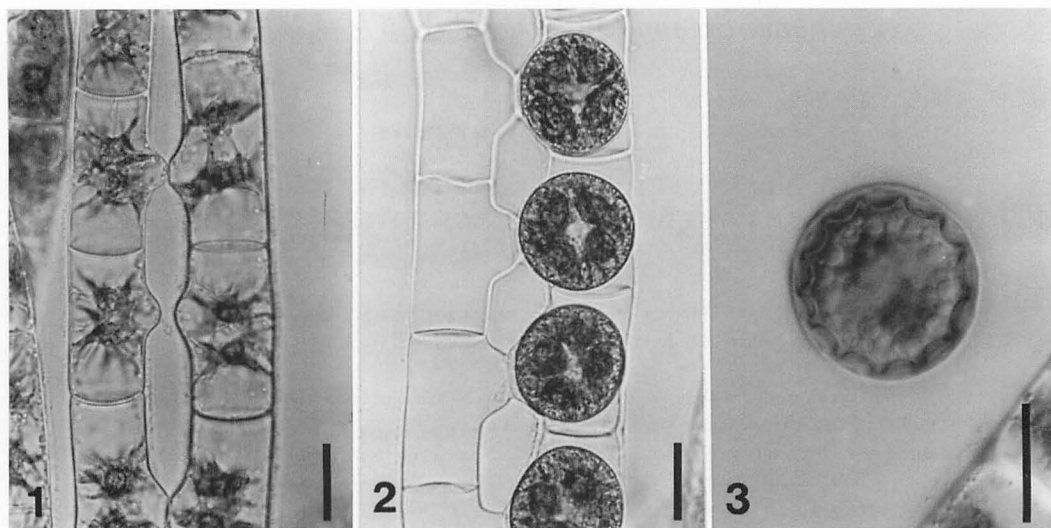
AF-6 培地を窒素源を含まない Reichart/Grote 培地 (Grote 1977) に

1-C: 培養温度のみを換えて培養: 10°C から 25°C に

1-D: 照度のみを換えて培養: 3,000lux から 8,000lux に

1-E: 明暗周期のみを逆転させて培養: 10-14hr を 14-10hr に

実験2: 2つの培養株の藻体を混合せず別々に、10°C



Figs. 1-3. Conjugation of *Z. extenuis* strains cultured in AF-6 medium at 25°C.

1. Papillae formed at each gametangium, in 3-day-old culture.
 2. Young zygotes formed in female gametangia, in 7-day-old culture.
 3. A mature zygote showing pits at the median wall, in 4-week-old culture.
- Scale bars = 20µm.

の培養温度だけを25°Cに換え、その他は継代培養と同一条件下で培養した。

実験3:2つの培養株の藻体を混合してから、培養温度を15°C・20°C・25°C・30°C・35°Cの5段階に換え、その他は継代培養と同一条件下で培養した。

実験4:2つの培養株の藻体を混合せず別々に、培養温度だけを25°Cに換え、その他は継代培養と同一条件下で培養し、それぞれ2週間毎に新しい培地へ移植を繰り返した。12週間後にそれらの藻体を混合して、さらに同じ温度25°Cで培養を続けた。

なお、観察には倒立型光学顕微鏡(オリンパス社製IMT2型)を用いた。

結果

実験1:結果はTable 1にまとめて示されている。継代培養と同じ条件下で培養した1-Aでは、2週間後も接合は起こらなかった。アオミドロの接合実験に用いられる窒素源を含まないReichert/Grote培地で培養した1-Bでも、接合は起こらなかった。また、照度を約3倍の8,000luxに上げた1-Dと明暗周期を逆転させた1-Eでも、接合は起こらなかった。

接合が確認できたのは、培養温度を25°Cに上げ培養した1-Cのみであった。培養を開始してから3日後に、近接する雌雄両配偶子嚢に乳頭状の突起が形成され始

Table 1. Zygote formation of *Z. extenuis* under different culture conditions.

No.	Medium	Temperature	Light intensity	Photoperiod	Zygote*
1-A	AF-6	10°C	3,000lux	10-14hr	-
1-B	Reichert/Grote	10	3,000	10-14	-
1-C	AF-6	25	3,000	10-14	+
1-D	AF-6	10	8,000	10-14	-
1-E	AF-6	10	3,000	14-10	-

* After two weeks, + : present, - : absent

Table 2. Zygote formation of *Z. extenu* at different temperatures.

Temperature °C	15	20	25	30	35
Zygote*	-	+	+	+	d

* After two weeks, + : present, - : absent, d : dead

めた(Fig. 1)。5～7日後には完成した接合管を通して、雄性配偶子が雌性配偶子嚢に移動し、雌雄両配偶子が融合・合体して接合子が形成された(Fig. 2)。その後、接合子は次第に成熟して、4週間後にはその中層膜は黄褐色になり表面には小孔が形成されていた(Fig. 3)。

実験2：培養温度を25℃に上げても、2つの培養株の藻体を混合せず別々に培養した場合には、2週間後でも接合は起こらなかった。

実験3：結果はTable 2に示されている。5段階の培養温度を設定したこの実験では、培養温度15℃の場合には2週間後も接合が起こらなかったが、20℃・25℃及び30℃の場合には接合が観察された。また、最も高温の35℃の場合には接合は起こらず、培養を開始して2～3日後に藻体は全て死滅してしまった。

実験4：培養温度25℃で12週間別々に培養し、移植を繰り返し新鮮な状態を維持した2つの培養株の藻体を混合して、その培養温度を変えず25℃のまま培養を続けた場合も、接合が起こった。

以上の一連の培養実験(実験1～4)の結果から、*Z. extenu*の接合を誘起する環境要因の一つが温度であることが判明した。

考察

藻類の有性生殖を誘起する環境要因としては、栄養塩類・光・温度・明暗周期などが考えられるが、多くの藻類で栄養塩類、特に窒素源の欠乏が誘因となることが報告されている(長谷他 1972, Brawley and Johnson 1992)。ホシミドロ目のアオミドロ属 *Spirogyra* では30種以上で、藻体を窒素源が不足あるいは欠乏する培地に移す方法を用いて接合を誘起することに成功している(Grote 1977, Yamashita and Sasaki 1979, Simons et al. 1984)。

しかし、ホシミドロ属では、Godward培地で培養した藻体を1/10に稀釈したGodward培地に移す方法で、接合を誘起することに成功した *Zygnema circum-*

carinatum Czurda 1種の報告があるだけである(Miller 1973)。古くは Pessoney (1968)が、窒素源を欠乏させてホシミドロの接合を誘起することは、アオミドロの場合と比べて成功しにくいと記述している。そして、Simons et al.(1984)は、アオミドロの場合と同じ方法で窒素源を欠乏させホシミドロの接合を試みたが、接合を誘起することはできなかったと報告している。今までの研究から、ホシミドロの接合誘起には、栄養塩類以外の環境要因が大きく関与している考えられている。

実験に用いた *Z. extenu* を採集した水田では、毎年10月下旬から11月上旬になると本藻が出現する。冬季の水温が低い時期には、本藻は緑色の塊状で生育しており、接合している藻体は見られない。2月下旬から3月初旬になると接合が始まり、4月上旬から成熟した黄褐色の接合子が見られるようになる。5月上旬には田植えの準備のために、水田は掘り返されてしまうことになる。

1991年の場合、2月12日の日中で水田の最高温度は16℃であり、本藻の接合はまだ起こっていなかったが、3月7日の日中にはその最高温度は24℃まで上昇しており、この時点で既に接合が起こっていた。4月12日と24日には成熟した黄褐色の接合子が多数観察されたが、5月7日には水田は掘り返されてしまった。このように野外では、本藻は水温が高くなる時期に接合を始め、水田が掘り起こされるまでの1～2ヶ月の間に接合子の成熟を完了させている。これらの野外観察の結果から、本藻の接合誘因としては栄養塩類、特に窒素源の変化よりも温度が関係していると推測していた。

今回、Z91-10a株とZ91-10b株の2つのクローン培養株を用いた一連の培養実験で、培養温度が20～30℃の場合のみ接合が起こったことから、それを誘起する環境要因は推測通り窒素源の欠乏よりも温度が強く関係していることが判明した。さらに、実験4の結果

をも考慮すると、温度の変化つまり温度が上昇することではなく、一定の温度(20~30℃)になることによって接合が誘起されると考えられる。また、2つのクローン培養株を混合しない限り、培養温度が25℃でも接合は起こらないことから、本藻はホモ接合は行わずヘテロ接合のみと思われる。

謝辞

本研究を進める上で、様々なご助言をいただいた元日本大学農獣医学部(現生物資源科学部)教授の山岸高旺博士、日本赤十字大学の千原光雄教授及び山形大学の原慶明教授にお礼を申し上げます。

文献

- Brawley, S. H. and Johnson, L. 1992. Gametogenesis, gametes and zygotes : an ecological perspective on sexual reproduction in the algae. *Br. Phycol. J.* 27 : 233-252.
- Grote, M. 1977. Über die Auslösung der generativen Fortpflanzung unter kontrollierten Bedingungen bei der Grünalge *Spirogyra majuscula*. *Z. Pflanzenphysiol.* 83 : 95-107.
- 長谷柴二・三原佐代子・市村輝宜 1972. 藻類の生活環境. p. 68-98. 古谷雅樹・宮地重遠・玖村敦彦(編)生活環境の制御. 植物生理学講座 4. 朝倉書店.
- 加藤季夫 1982. *Colacium vesiculosum* Ehr. の培養と形態. 藻類 30 : 63-67.
- Miller, R. D. 1973. A developmental and physiological comparison of two mating strains of *Zygnema circumcarinatum* Czurda. PhD dissertation, University of Arizona, Tucson, Arizona.
- Miller, R. D. and R. W. Hoshow 1974. Cell width as a taxonomic character with special reference to *Zygnema circumcarinatum* Czurda. *Br.phycol.J.* 9 : 145-148.
- Pessoney, G. F. 1968. Field and laboratory investigation of zygnetacean algae. PhD dissertation, University of Texas, Austin.
- Simons, J., Van Beem, A. P. and De Vries, P. J. R. 1984. Induction of conjugation and spore formation in species of *Spirogyra* (Chlorophyceae, Zygnematales). *Acta Bot. Neerl.* 3 : 323-334.
- Yamashita, T. and Sasaki, K. 1979. Conditions for induction of the mating process and changes in contents of carbohydrates and nitrogen compounds during the mating process of *Spirogyra*. *Journ. Fac. Sci., Hokkaido Univ. Ser. V* 11 : 279-287.

(Received Feb. 13 1995, Accepted Dec. 9 1996)