播磨灘産の大型珪藻 *Coscinodiscus wailesii* Granの生活環と生態に関する研究

Life cycle and Ecology of a Giant Diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran in Harima-Nada, eastern Seto Inland Sea of Japan

長井　敏
Satoshi　Nagai

1995

目　次

第Ⅰ章　序　　論……1
第Ⅱ章　播磨灘における *Coscinodiscus wailesii* Granの大量発生と環境……5
　第1節　栄養細胞および環境要因の経年および季節変化
　第2節　主成分分析を用いた *C. wailesii* の大量発生の環境条件の抽出
　第3節　*C. wailesii* の増殖に及ぼす生物学的要因の影響
第Ⅲ章　培養条件下における生活環の解明……32
　第1節　増大胞子の形成と細胞径の回復
　　第1項　細胞径の減少
　　第2項　簡易無菌化法によるクローン培養株の確立
　　第3項　増大胞子形成条件の解明
　　第4項　増大胞子の形態と形成過程
　　第5項　回復した細胞の大きさに影響を与える諸条件
　　第6項　培養株間における偽似増大胞子を形成する能力の差異の検討
　　第7項　細胞の大きさと生活環
　第2節　休眠細胞の形態と生理
　　第1項　休眠細胞の形成
　　第2項　休眠細胞形成条件
　　第3項　休眠細胞の形成に関わる海底泥の作用
　　第4項　人工的に形成させた休眠細胞の生理
第Ⅳ章　現場水域における生活環……104
　第1節　現場水域における大きさの回復
　第2節　現場水域における休眠細胞の生理生態
　　第1項　休眠細胞の形態と復活
　　第2項　水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞の出現動態
　　第3項　秋期大量発生と鉛直混合の関係
第Ⅴ章　総　　括……138
Summary and Conclusions……148
謝辞……152
参考文献……153

第Ⅰ章　序　　論

赤潮は、主に植物プランクトンの異常繁殖や集積等による着色現象である。我が国沿岸域では1960年代以降、富栄養化の進行とともに赤潮が頻発し、その結果、莫大な金額の漁業被害が増加している（水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1973-1994）。一方では、有毒プランクトンによる食用貝類の毒化など、赤潮のような着色が見られなくても大きな問題を引き起こす種の存在も知られている。植物プランクトンの増殖による漁業被害を類別すると、①有害プランクトンによる魚介類の斃死、②有毒プランクトンによる魚介類の毒化、③有害プランクトンによる養殖業や漁業の操業の妨害の３つに大別できる。①は、発生した赤潮プランクトンによって、天然、蓄養、あるいは養殖中の魚介類が死亡させられるものである。②は、食物連鎖を通じてプランクトンの毒が魚介類に蓄積されて、これを食べた人間が中毒する（時には死に至る）というもので、麻痺性貝毒、下痢性貝毒、記憶喪失毒、シガテラ毒等が知られている。③は、発生した植物プランクトンが増殖期あるいは死滅期に”ヌタ”と呼ばれる粘質凝集体を形成するため、窒息して魚介類が死滅する場合、粘質物が底引き網、定置網、刺網等に大量に付着したりして、操業活動を阻害する場合がある。また、植物プランクトンが増殖時に栄養塩を大量に消費するため、例えばノリ養殖に大きな影響を与えることがある。

漁業被害を与えるプランクトンの中で、大型の中心目珪藻類の１種 *Coscinodiscus wailesii* Granが播磨灘において大発生し、栄養塩が多量に消費され、灘全域で栄養塩濃度の顕著な低下現象がみられるようになった（眞鍋・近藤 1987, 1988、眞鍋ほか 1994a, b）。この栄養塩濃度の低下現象期はノリ養殖の最盛期と一致しており、このため養殖海苔の色落ち等の品質低下が生じ、多額の漁業被害が起こっている。

イギリス海峡西部海域でも、*C. wailesii* の大量発生時に本種の分泌する粘液物質が漁網に堅固に付着するため、底曳網が目詰まりし、曳網時に破れるといった漁業被害が報告されている（Boalch & Harbour 1977）。Percival et al.（1980）は、漁業被害をもたらす原因となったこの粘質物が、グルコース、マンノース、フコースおよびウロン酸残余体を含む多糖類であり、*C. wailesii* の細胞外排出物とほぼ一致することを確認している。また、Manabe & Ishio（1991）は、本種が大量発生した後、多くのデトライタスや他の植物プランクトン等を吸着しながら海底へと速やかに沈降するため、海域の高透明度現象が生じること、および *C. wailesii* の底層への大量沈降が、貧酸素化等の底質環境の悪化をもたらしていることを指摘した。このような結果から、*C. wailesii* は主に冬期、播磨灘の漁場環境や物質循環に悪影響をもたらしていると推定される。

C. wailesii は珪藻綱（Bacillariophyceae）円心目コスキノディスクス亜目コスキノディスカス科の１種である。*C. wailesii* は、カナダ太平洋岸のナナイモ（バンクーバー島）で

初めて見いだされた種で（小久保 1960）、我が国では冬期、各地に出現する大型（直径150～400μm）の浮遊珪藻である（山路 1984）。一般に、*C. wailesii* は北方性種として知られており（Takano 1954, 小久保 1960）、日本海南東部においても最低水温期に広大な範囲で春のブルームを形成することが報告されている（Nishimura 1965, 長田 1994）。しかしながら、日本海北部、オホーツク海、ベーリング海における出現の記録がないこと（Nishimura 1965）、伊豆大島付近の亜熱帯のような水域においてさえ、時々優占種となっていること（Takano 1954）、隅田川河口や相模湾でもしばしば確認されていること（高野 1990）、南カリフォルニア沖でも珍しくないこと（Cupp 1943）などから、北方性種という見方に疑問がもたれている（Nishimura 1965）。このように、本種は広範な分布を示すことから、" cosmopolitan species" と見なされる。

C. wailesii の外観的特徴は、殻頂面がやや凹入し、殻環部が比較的高い円筒形をしており、殻頂面と殻套部が鋭角をなしている。また、中心域は透明で輪郭が不規則であり、殻套部に隣接する接蓋帯片は幅広く、その次の帯片は狭くて上舌を持つなど（高野 1990）、他種とは明確に区別できる。

一般に植物プランクトンの増殖過程においては、物理的環境（水温、塩分、日射量、潮流）、化学的環境（栄養塩、増殖促進物質、ｐH、キレーター）、生物的環境（動物プランクトンによる捕食、植物プランクトン間の競合、殺藻細菌による殺滅）といった多くの要因が関与していると考えられている（Proctor 1957, Pratt 1959, 1965, 入江・浜島 1966, 飯塚・入江 1966, 森・入江 1966, Pratt 1966, 岩崎ほか 1968, 飯塚・入江 1969a, b, 岩崎・佐々田 1969, 上野 1969, 岩崎 1971, 飯塚 1972, Qasim et al. 1972, Smayda 1973, Hitchcock & Smayda 1977, Guillard & Kilham 1977, Uye 1986, 本城ほか1978, Nakahara 1978, Smayda 1980, 吉田・沼口 1982a, b, c, 岡市 1983, Yamochi 1983, 吉松ほか 1985, Honjo 1987, 池田ほか 1987, Yanagi 1989, 矢持 1989, 保坂 1990, Sakata 1990, Fukami at al. 1991, Imai et al. 1991, 1993, 1995, 田森ほか 1991, Mitsutani 1992, Nagasaki et al. 1994, 松山ほか 1995）。また、植物プランクトンがブルームを形成するまでには、いくつかの段階的過程を経ており、この間の過程を把握することはその増殖機構を理解する上で、重要な鍵となる（Steidinger 1975, 辻田 1984, 渡辺 1986, 1988, 池田・中田 1987, Paerl 1988, 今井 1990, 山口 1994）。植物プランクトンの増殖機構に関する研究が精力的に実施されてきた結果、多大な漁業被害を与える有害植物プランクトンの増殖を、事前により正確に予知することの重要性が指摘されている（吉田 1980, 小野ほか 1980, 大内・高山 1981, 大内 1982, 大内・高山 1984, 安楽 1985a, b, 伊藤・今井 1988, Honjo1994, 山口 1994, 岡山県ほか 1995）。*C. wailesii* の段階的な増殖過程と環境要因の関係を詳細に解析することは、本種の大量発生のメカニズムを理解し、その発生・増殖を予知する上で基本的かつ重要な研究課題といえよう。しかしながら、現場調査中心の研究だけでは明らかにできない部分が多く、我国においても、室内培養実験に

よる有害植物プランクトンの水温・塩分・光強度・栄養塩の増殖応答など、生理学的研究も平行して行われてきた（池田 1971, Hirayama & Numaguchi 1972, 平山ほか 1972, 沼口・平山 1972, 本城・花岡 1973, 岩崎 1973, 飯塚・中島 1975, Uchida 1976, Iwasaki 1979, 岩崎 1980, 本城 1981, 平山・川端 1982, 西村 1982, 飯塚・峰 1983, Nakamura & Watanabe 1983a, b, c, Tanaka et al. 1983, Yamochi 1983, 吉田・河口 1983, 西島・畑 1984, 渡辺・中村 1984a, 1984b, 矢持 1984a, b, Nakamura 1985a, b, 西島・畑 1986, Yamochi & Joh 1986, Nakamura et al. 1988, Ishimaru et al. 1989, 小野 1988, 山口・本城 1989, 矢持 1989a, 山口ほか 1991, Hosaka 1992, Nakamura et al. 1992, 吉松 1992, 山口 1994）。

珪藻の栄養細胞は珪酸質の堅固な皮殻で覆われ、無性的な２分裂によって増殖する。皮殻の内生的形成機構から、細胞分裂が進むにつれて蓋殻径が直線的に小さくなることが知られている（Drebes 1977, Lewis 1984）。このような細胞分裂の特徴から、珪藻類は同一種においても細胞径の範囲が非常に大きくなる。分裂速度が、細胞の径によって異なることが、*Thalassiosira nordenskioeldii*（Durbin 1977）、*Ditylum brightwellii*（Paasche 1968, 1973）などの種類で確認されている。また、珪藻類における細胞サイズと分裂速度は明瞭な負の相関関係を示すことが報告されている（Mizuno 1991）。従って、細胞サイズにより分裂速度が変化する珪藻種においては、population dynamicsを研究する上で、天然集団の細胞サイズの把握は必要不可欠な研究と考えられる（江草 1949, 小久保 1955）。

一方、近年、赤潮や貝毒の原因となる渦鞭毛藻やラフィド藻類に関しては、生活史の一時期を底生性のシストとして生存不適な時期を海底で過ごしていることが、多くの種で報告されている（例えば、Wall 1975, Dale 1983, Sako et al. 1984, 1985, 1986, 福代 1987, 今井ほか 1987, Imai & Itoh 1988, Imai et al. 1993, 吉松 1993, Kobayashi 1995）。沿岸域に出現する珪藻類の多くの種類についても、" Resting spore"（休眠胞子）や " Resting cell"（休眠細胞）と呼ばれる耐久性の" Resting stage cells"（休眠期細胞）を形成することが *Chaetoceros* 属、*Thalassiosira* 属、*Melosira* 属、*Leptocylindrus* 属および *Skeletonema* 属等において確認されている（Lund 1954, Garrison 1981, French & Hargraves 1985, French & Hargraves 1986, Sicko-Goad et al. 1986, 1989, 今井ほか 1990, 板倉ほか 1992）。これらのシストや休眠期細胞は植物プランクトンの増殖機構を考える上で、重要な意義を持つことが明らかになってきた（Wall 1971, 飯塚・入江 1972, Steidinger 1975, 福代 1982, Dale 1983, 中原 1986, 左子・石田 1986, 今井 1990）。植物プランクトンの増殖において果たすこれら底泥期細胞群の役割としては、①栄養細胞では生存不可能な環境条件の期間を耐久性を持って乗り切る（例えば、越夏、越冬）、②細胞の耐久性が増すため補食等に強く、種の分布の拡大をより容易にする、③通常、休眠期間や発芽の時期は環境条件によって制御されている、④有性生殖の結果形成されたシストの場合は遺伝子の組み替えが行われるため、種の遺伝的多様性を維持できる等が挙げられている。⑤

休眠後、発芽できない期間をほとんど持たない珪藻類の場合、短期間の環境変動にすばやく適応できる等が挙げられよう(Wall 1971, 1975, French & Hargraves 1980, Garrison 1984, 今井 1990, 板倉・今井 1991)。それゆえ、生活環を明らかにすることは、増殖機構の解明や被害防除および発生予知を行うために、緊急を要する重要研究課題であるといえる。しかしながら、これまで *C. wailesii* については、生活史的観点に立脚した研究は皆無であった。

以上のような背景から、本研究においては、*C. wailesii* の研究の中でこれまで全く不明であった生活環について、特に大きさの減少と回復過程、さらには休眠細胞の存在を証明し、その生理生態を調べて、大量発生において果たすこれら生活環の役割を解明することを目的とした。

本研究においては、第Ⅱ章でまず *C. wailesii* の栄養細胞の計数を中心とした10年間の調査結果から、大量発生と環境要因の関係を解析し、本種の大量発生と密接な関係を持つ環境要因について検討した。そして、生活環に関する研究を始めた理由・原因、その重要性について述べた。次に、第Ⅲ章において室内培養実験により、生活環、特に栄養細胞の大きさの変化について(殻径の減少、増大胞子形成、栄養的増大)、休眠細胞の形成・復活等の条件検索、生理状態について調べた。第Ⅳ章では、瀬戸内海東部海域(播磨灘)を対象水域として現場調査を行い、栄養細胞の大きさの減少・回復過程を調べた。また、水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞の経年的・季節的挙動、つまり" Population dynamics"について調べた。第Ⅴ章においては以上を総括し、播磨灘における *C. wailesii* の生活環から見た生存戦略、ならびに大量発生機構について論じた。

第Ⅱ章　播磨灘における *Coscinodiscus wailesii* Granの大量発生と環境

海況・気象条件等の環境因子の変動と植物プランクトンの大増殖の因果関係を明らかにすることは、その増殖機構を解明するための最も基本的な研究の進め方と考えられる。このため、植物プランクトンの出現期あるいは一年を通した現場調査を行い、化学的、物理的および生物的環境要因と植物プランクトンの出現動態を把握する必要がある。これまで、植物プランクトンの動態と環境要因の関係については多くの研究者によって調査・研究が実施されており、既に総説としても報告されている(例えば、Guillard & Kilham 1977, Smayda 1980, Honjo 1994)。ところで、伝統的に行われてきた有害・有毒プランクトンの現場調査は、増殖時期前・中・後の環境条件を明確にすることに重点が置かれていたため、増殖期以外における有害・有毒種の生態については不明な点が多く残されていた。しかし、近年になり、有害・有毒種の出現動態に関する年間を通じた(特に、増殖期以外の時期)調査・研究が精力的に実施されるようになってきた(中田・飯塚1987, 寺田ほか 1987, 矢持 1989, 今井 1990, 山口 1994)。

以上のような観点から、本章では現場水域における *Coscinodiscus wailesii*Gran個体群の大量発生と環境要因の関係を解明するために行った現場調査の解析結果、および、解析により新たに抽出された問題点について述べる。まず、第1節では、瀬戸内海東部に位置する播磨灘の毎月上旬に実施した調査結果に基づき、*C. wailesii* の栄養細胞および環境要因の経年および季節変化を示し、本種個体群の発生に影響を与える環境要因のスクリーニングを行った結果を述べる。第2節においては、*C. wailesii* の発生と環境要因との関係をさらに詳しく検討するため、統計的手法を用いて本種の発生にどのような条件が関わっているかを検討した。第3節では、*C. wailesii* の増殖に及ぼす生物学的要因の影響について述べる。そして、これらの解析結果から問題点を明らかにし、第Ⅲ章以降の研究を実施した意義について述べる。

第1節　栄養細胞および環境要因の経年および季節的変化

播磨灘は瀬戸内海東部に位置する、面積3426ｋｍ^2、平均水深25.6ｍの半閉鎖性浅海域である(村上 1976)。播磨灘においても、1950年代後半からの北部臨海域の工業地帯化に伴い、工業排水・生活排水等が大量に流入し、富栄養化が進行した。富栄養化の進行とともに、多大な漁業被害を伴う赤潮の発生が恒常的に起こるようになり、大きな社会問題となった。播磨灘の水質環境については、古武家・北村(1979)、森口ほか(1981)、中野ほか(1983)、近藤(1987)、鈴木ほか(1981a)、反田ほか(1983a, b, 1984, 1991)、眞

鍋（1988, 1991）および眞鍋ほか（1987, 1991, 1994a, b）により詳細に調査されており、透明度、水温、塩分、栄養塩、およびクロロフィル-a量等の情報量は比較的多いといえる。播磨灘は東部は明石海峡を経て大阪湾に、南部は鳴門海峡を経て紀伊水道に、また、西部は備讃瀬戸に通じている。播磨灘において、*C. wailesii* がいつ頃から大量発生するようになったについては定かではないが、少なくとも十年前から毎年のように大きなブルームを形成するようになっている。*C. wailesii* の発生状況に関しては、1984年から眞鍋・近藤（1986, 1987）および眞鍋ほか（1994a）により調査されており、秋期の大量発生によって、播磨灘の栄養塩濃度は著しく低下し、その影響はかなり長期間継続することが明らかになっている。そして、低水温期における本種の大量発生が原因と考えられる極度の栄養塩濃度の低下が、養殖ノリの生育に様々な悪影響を与えていることが報じられている。また、眞鍋・近藤（1987）は、*C. wailesii* 発生初期の細胞密度と明石海峡で求めた *C. wailesii* 天然個体群の倍加時間から、*C. wailesii* 細胞数予測式を導き、また *C. wailesii* の倍加時間、*C. wailesii* 1細胞当たりの栄養塩取り込み量と初期栄養塩濃度から栄養塩濃度予測式を表している。しかし、*C. wailesii* の生態に関しては不明な点が多く、その発生機構も解明されていない。一年を通じた現場調査での栄養細胞の分布並びに出現状態を調べ、環境因子との関係を把握することは、*C. wailesii* 個体群の発生機構ならびにノリ養殖に対する影響を知る上で重要な手がかりとなることが期待される。

以上の背景から、本節では、播磨灘において1984年から1995年の約11年間にかけて行われた調査結果について述べ、*C. wailesii* の大規模な発生から非発生にわたる環境条件の相違を11年にわたって比較し検討した。これらの資料をもとに、本種の個体群の発生がどのような環境要因によって影響されているのかを解析した。

調査および水質分析方法

播磨灘における調査地点をFig. 2-1に示した。調査地点は計19地点であり、1984年３月から1995年３月にかけて毎月上旬に１回、計135回調査を実施した。測定項目のうち、水中の *C. wailesii* 栄養細胞密度の計数については、1984年８月から開始した（合計128回）。採水層は表層（0.5m）、10m（沿岸部は５m）、および底層（海底上１m）の３層である。表層水は原則としてポリバケツで、10m層水は北原式採水器、底層水は眞鍋・反田（1985）により考案された採水器を用いて採水した。

本研究においては、*C. wailesii* の増殖に影響を及ぼす環境要因として、水温、塩分、無機態窒素（アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の合計量、以下DINと略す）、反応性燐酸（以下PO_4-Pと略す）、反応性珪酸（以下SiO_2-Siと略す）、全植物プランクトン細胞密度（表層のみ計数）、クロロフィル量、および日射量に注目し、*C. wailesii* 細胞密度との関係を解析した。

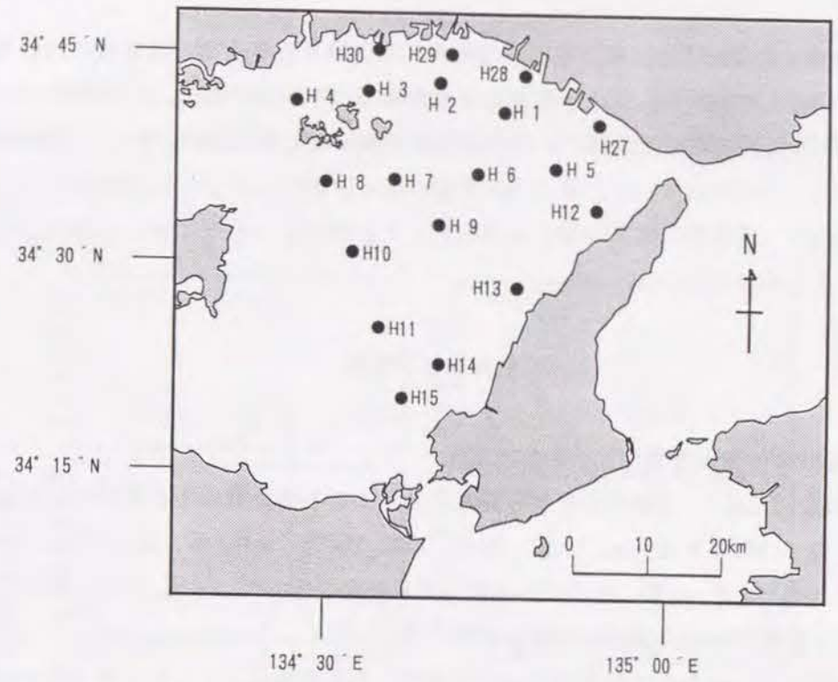


Fig. 2-1. Location of the sampling stations in Harima-Nada, Seto Inland Sea of Japan.

水温の測定には主としてサーミスタ水温計を用いた。塩分は、主にAuto lab.製サリノメーターを用いて測定した。アンモニア態窒素はインドフェノール法ＥＤＴＡ変法（眞鍋1969）、亜硝酸態窒素はＧＲ変法（Strickland & Parsons 1972）、硝酸態窒素はカドミウム還元法（Strickland & Parsons 1972）、PO_4-P（Strickland & Parsons 1972）およびSiO_2-Siはモリブデン青法（Koroleff 1976）により測定した。全項目ともTechnicon社製Auto analyzerによる自動分析法（眞鍋・反田 1986）によった。クロロフィル量は、92%アセトン抽出液の660ｎｍにおける蛍光強度を日立製ＭＰＦ－３型蛍光光度計を用いて測定し、その蛍光強度からクロロフィル-aとフェオフィチンをそれぞれ分別定量する海洋観測指針（気象庁 1970）に示された方法に従って測定した。クロロフィル-aとフェオフィチン-aの固有蛍光値は、同一試料をLorenzen（1967）の方法により測定し、求めた両者の値から逆算した。*C. wailesii* は、200*ml* の試水をグラスファイバー製フィルター（ADVANTEC TOYO ＧＡ200）上に吸引ロ濾過補集された細胞を肉眼で計数し、１*l* 当りの細胞密度を算出した。全植物プランクトン（本研究ではピコプランクトンは含めいてない）は、表層水の100～1000μ*l* を未固定のまま直接光学顕微鏡下で計数し、１*ml* 当りの細胞密度を求めた。日射量については、1984年４月から1992年３月まではネオ日射計（英弘精機製、M-201型）、1992年４月以降はAANDERA社製日射計（2770型）により測定した。

これらの調査の内、1989年３月までの結果の一部は眞鍋・近藤（1987, 1988）により既に報告されており、それらのデータも含めて今回の考察に用いた。眞鍋・近藤（1988）は

C. wailesii 個体群の大増殖が播磨灘の一部の海域に限定されるものではなく、むしろほとんどの出現時に水平的に広範に分布することを報告している。また、分布の中心が播磨灘中央部にある場合（1987年10月）、兵庫県家島群島付近にある場合、あるいは播磨灘北部にある場合（1987年12月）などを一定の分布パターンがみられないことを示していることから、今回は、播磨灘の特定の調査地点のデータを解析するのではなく、19地点の平均値を解析することにした。

結果および考察

1． *C. wailesii* の発生と環境要因の経年変化

Figs. 2-2～2-10に、1984年３月から1995年３月までの播磨灘19地点平均の *C. wailesii* 栄養細胞密度（1984年８月～）、水温、塩分、DIN、PO_4-P、SiO_2-Si、植物プランクトン細胞密度、クロロフィル-a量、および日射量の経年変化を示した。水温、DIN、PO_4-P、SiO_2-Siおよび日射量については平年偏差も同時に示した。

Fig. 2-2に、*C. wailesii* の栄養細胞の平均密度の深度別変化を示した。*C. wailesii* は、主に９～４月まで出現し、その間２度のピークを示す傾向があり、秋から春にかけて出現するという明瞭な季節性をもつことが判る（Manabe & Ishio 1991）。しかし、1993年には８月上旬（夏期）にも例外的に出現が確認されている。全調査期間中、栄養細胞密度の最大値は表層で2440cells/*l*（1984年10月、Sta. H10）、中層で2020cells/*l*（1986年10月、Sta. H７）、底層では3120cells/*l*（1984年10月、Sta. H10）の範囲にあった。細胞密度は表層より底層で高いことがしばしば観察されており、底層に比較的高密度で分布するのが本種の出現時の大きな特徴といえる。細胞密度は1984～1986年にかけて高く、それ以降は極端に大きな発生のピークは認められない。出現細胞密度は、経年的に減少傾向にあることを示している。

Fig. 2-3に、水温および偏差の変化を示した。水温は調査期間中、表層で5.70℃（1984年３月、Sta. H４）～29.44℃（1994年８月、Sta. H30）、中層で5.70℃（1984年３月、Sta. H４）～28.81℃（1994年９月、Sta. H30）、底層で5.80℃（1984年３月、Sta. H２, ４, 29, 30）～28.55℃（1994年９月、Sta. H28）の範囲にあった。夏期の水温は1987、1990および1994年で平年より高めで、1988、1989、1992および1993年に低め、冬期の水温は1985と1986年で異常低温であったほかは、平年並みか高めであった。ここ数年は暖冬傾向にある。ごく近年では、1993年夏期に異常低温、1994年夏期は異常高温現象となった（辻 1994, 原田 1995）。

Fig. 2-4に、塩分の変化を示した。調査期間中、塩分は表層で4.77（1993年８月、Sta. H27）～33.65（1995年３月、Sta. H８とH15）、中層で24.05（1984年７月、Sta. H28）～33.66（1995年３月、Sta. H７）、底層で29.88（1993年11月、Sta. H28）～33.70（1985年３月、

Sta. H14）の範囲にあった。塩分は播磨灘北部沿岸域に流入する河川水に大きな影響を受けており（眞鍋 1987）５、６月の梅雨時に大きな低下を示した（1984～1986、1988、1990、1991および1993年）。特に1993年７月の極端な低下は、その後の塩分の推移にも大きな影響を与えたことが判る。

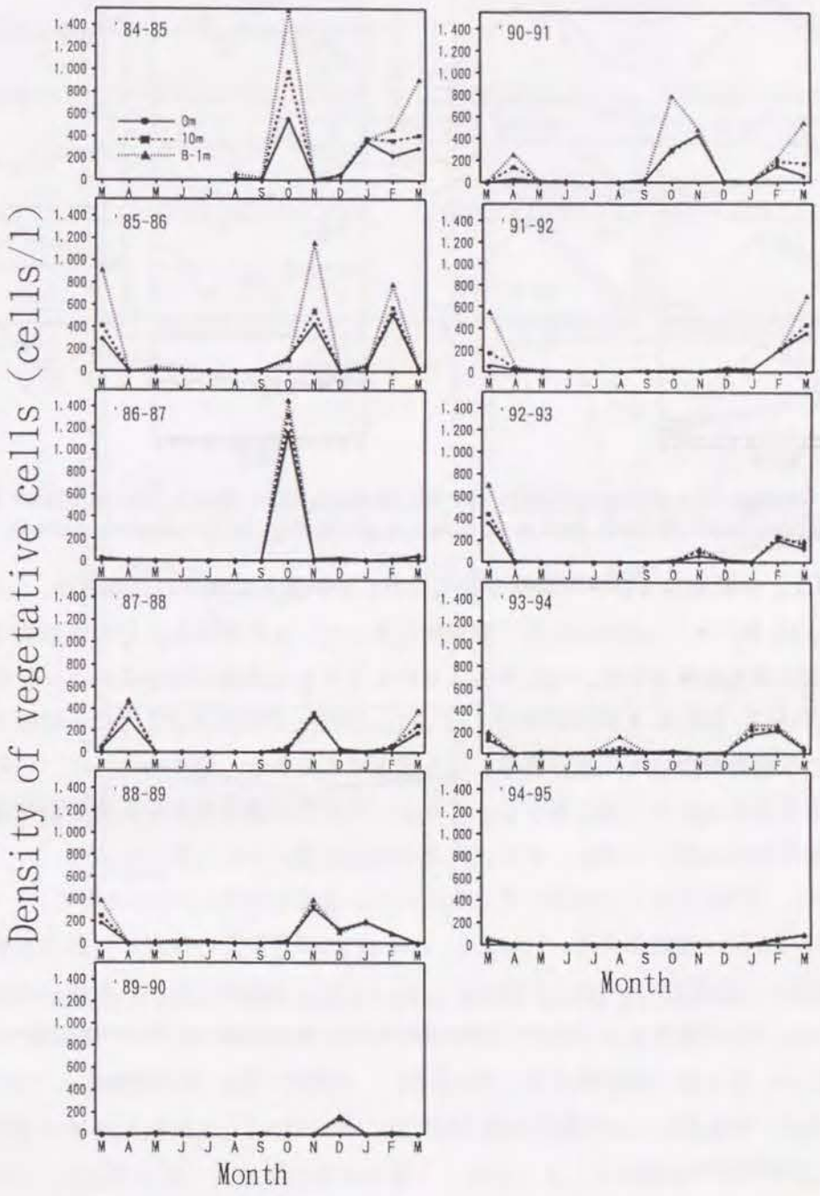


Fig. 2-2. Changes of vegetative cell density of *Coscinodiscus wailesii* Gran from August 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations.

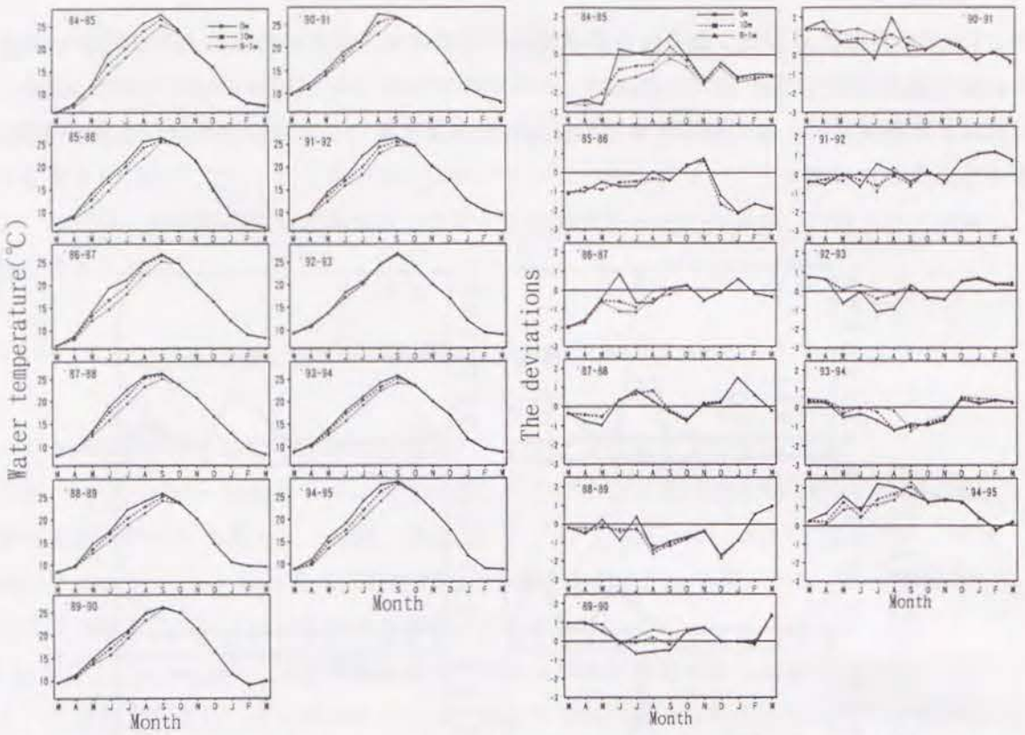


Fig. 2-3. Changes of water temperature and the deviation from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations.

Fig. 2-5に、日射量およびその偏差の変化を示した。調査期間中の日射量は、5.1（1988年1月）～23.5MJ/m^2（1994年8月）の範囲にあった。日射量はおおむね季節的な変化を示すが、他の環境要因と同様、その年によりかなり大きな変動が認められる。日射量が1984、1985、1987、1993および1994年では6月に、1987と1988年では7月に一度低下しているが、これは梅雨時期の悪天候が影響したものと考えられる。偏差をみると、1994年は3～10月まで平年を大きく上回る値となっており、この年の異常気象を反映した結果となっている。経年的に比較した場合、さほど大きな変化は認められなかった。

Fig. 2-6に、DIN濃度および偏差の変化を示した。調査期間中、DINは表層で0.1（多くの地点）～69.4μM（1990年5月、Sta. H28）、中層で0.1（多くの地点）～20.8μM（1993年12月、H28）、底層で0.1（多くの地点）～42.1μM（1993年7月）の範囲にあった。

Fig. 2-7に、PO_4-P濃度および偏差の変化を示した。調査期間中、PO_4-Pは表層で0.01(多くの地点）～1.84μM（1993年7月、Sta. H29）、中層で0.01（多くの地点）～1.82μM（1994年5月、Sta. H5）、底層で0.02（1988年7月、Sta. H5）～8.50μM（1993年7月、Sta. H28）の範囲であった。

Fig. 2-8に、SiO_2-Si濃度および偏差の変化を示した。調査期間中、SiO_2-Siは表層で0.0（1995年3月（Sta. H2, 4）, 1989年6月（Sta. H29, 30））～100.0μM（1993年8月、Sta. H28）、中層で0.0（1995年3月、Sta. H2, 29, 30）～100.0μM（1993年8月、Sta. H28）、

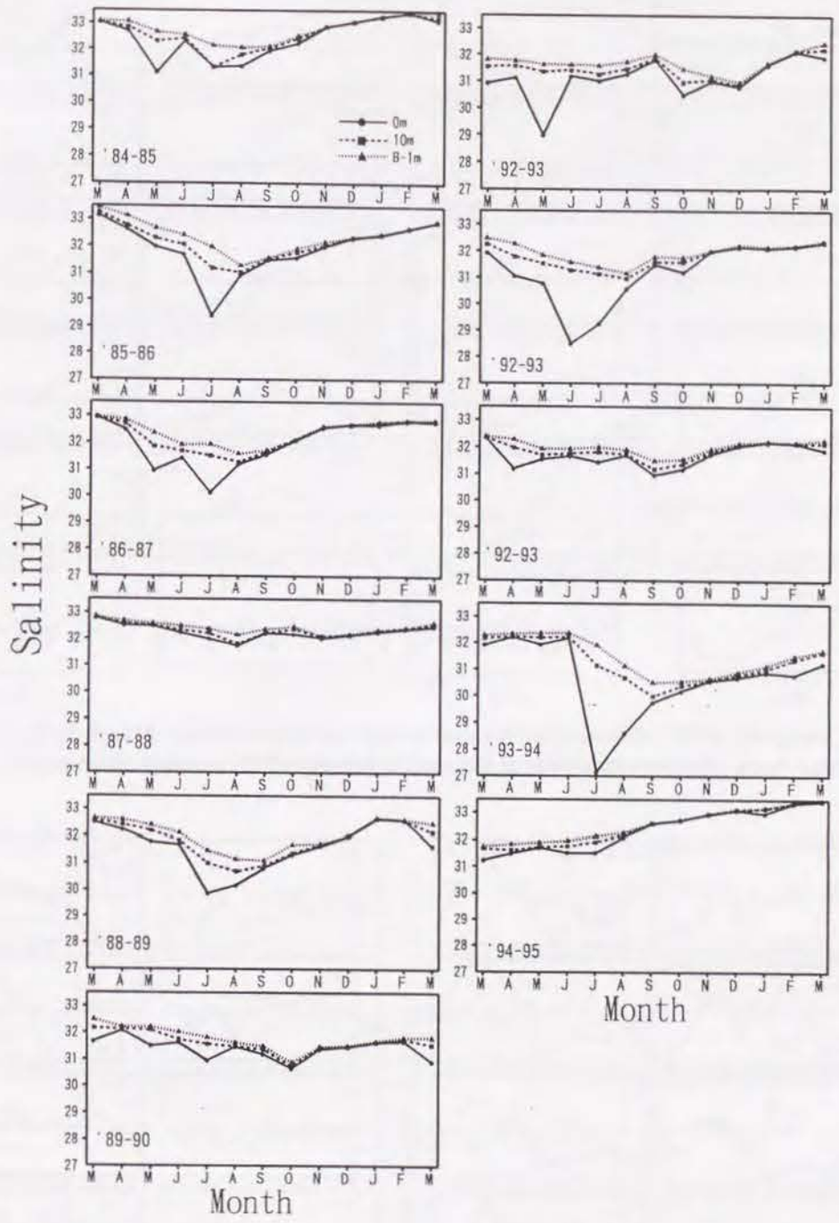


Fig. 2-4. Changes of salinity from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations.

底層で0.0（1995年3月、Sta. H29, 30）～68.5μM（1988年9月、Sta. H11）の範囲にあった。DIN、PO_4-PおよびSiO_2-Siについては、成層崩壊期に表層から底層までほぼ均一な濃度を示すが、成層形成期には底層の濃度が著しく増加した。季節変動パターンは高水温期は梅雨時期以外は主に低く、低水温期に高くなるといった傾向を示すが、年によって若干異なっていた。これは、降水に伴う河川水の大量流入による栄養塩類の供給、高水温期の海底泥からの溶出、台風などによる海水の擾乱に伴う海水の分散、あるいは均一化、植物

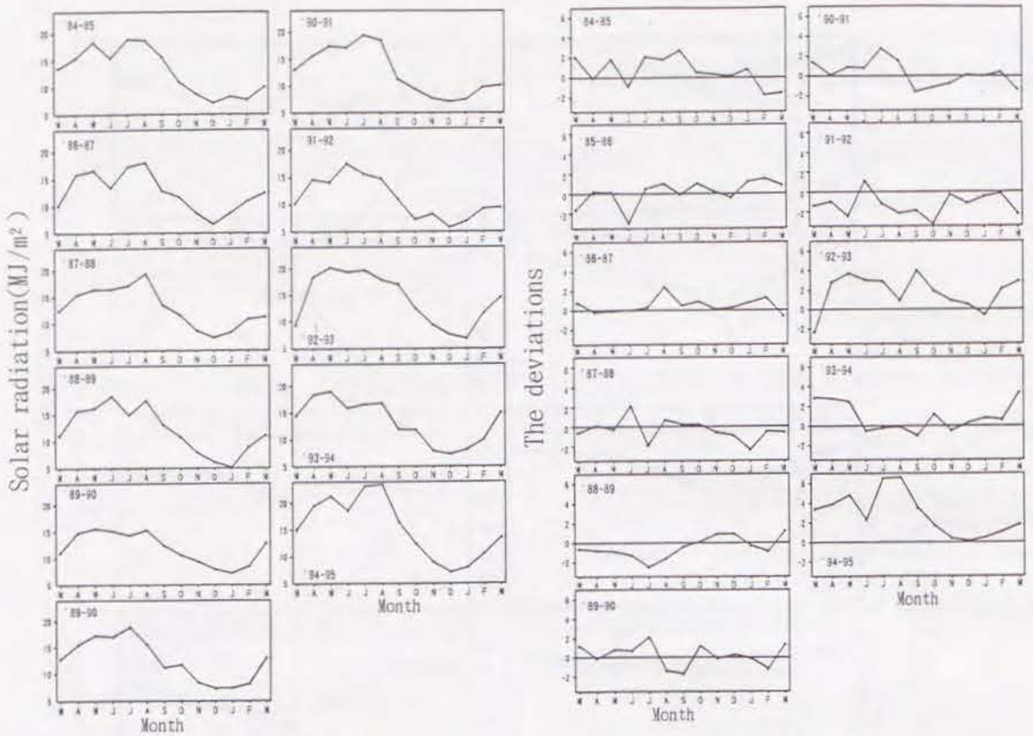


Fig. 2-5. Changes of solar radiation and the deviation from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations.

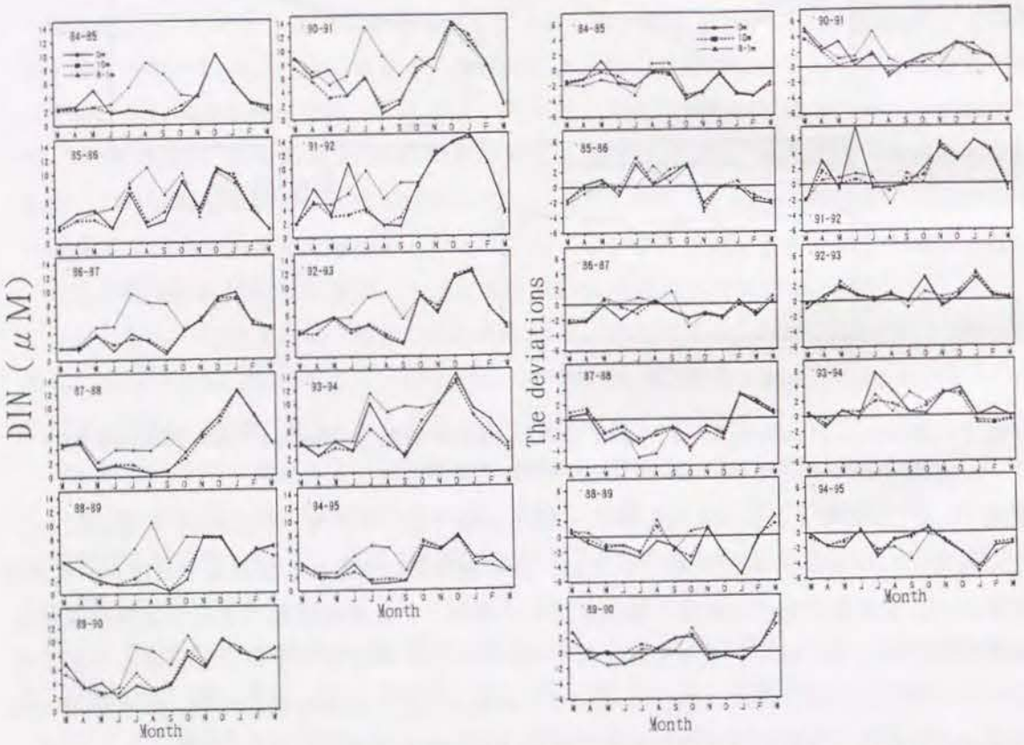


Fig. 2-6. Changes of DIN and the deviation from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations.

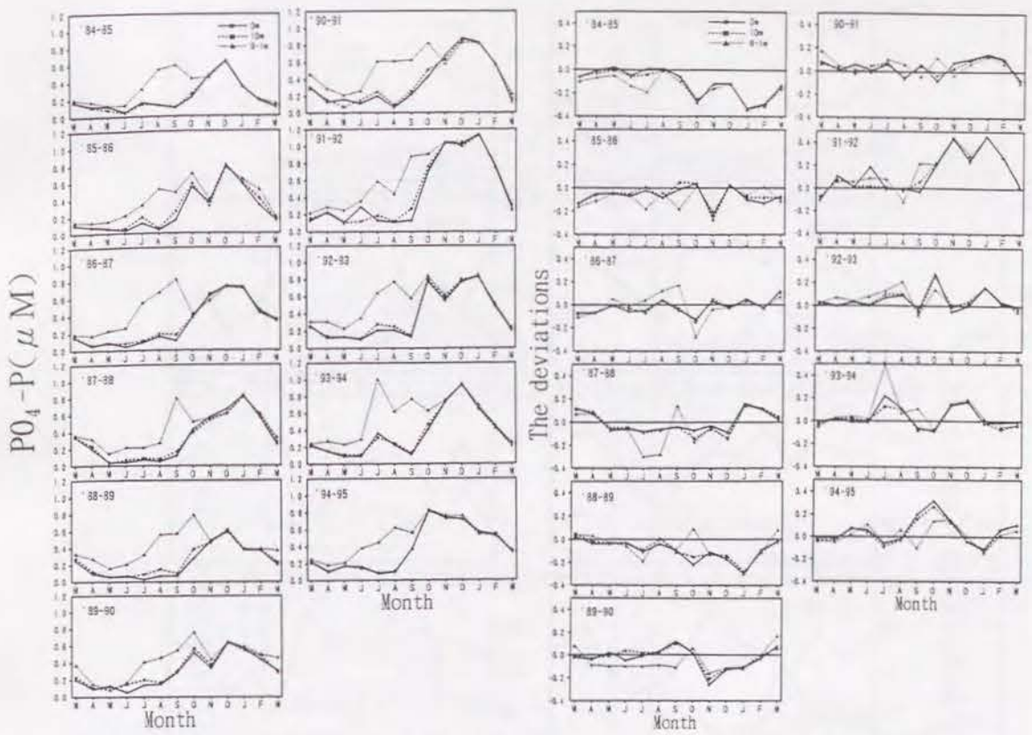


Fig. 2-7. Changes of PO_4-P and the deviation from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations

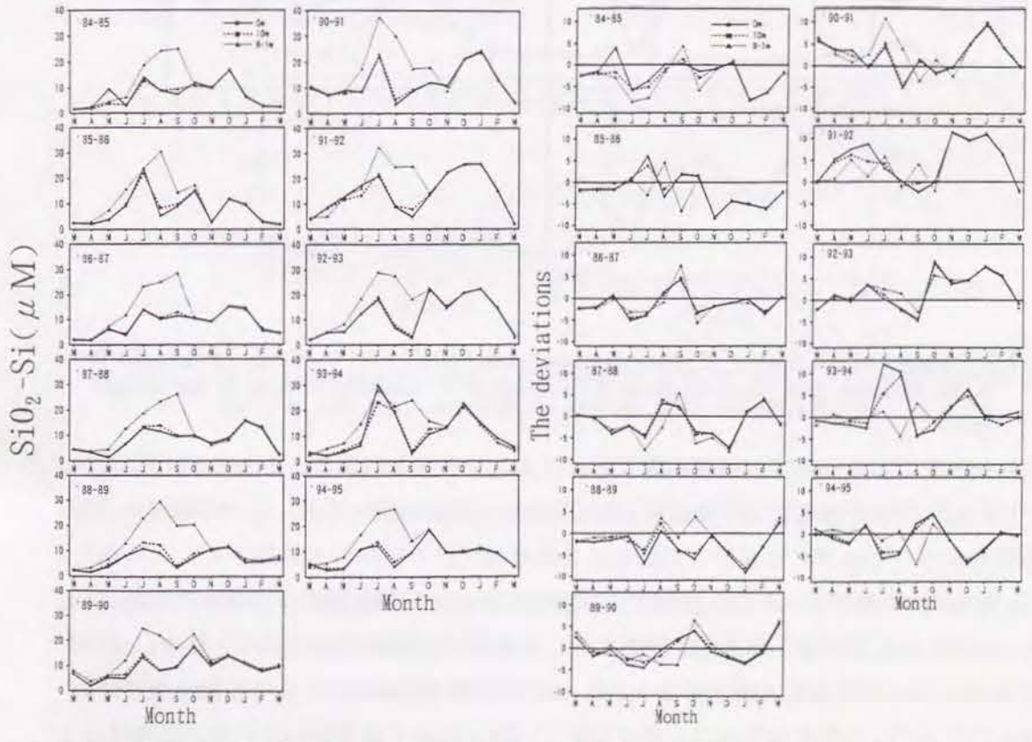


Fig. 2-8. Changes of SiO_2-Si and the deviation from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations

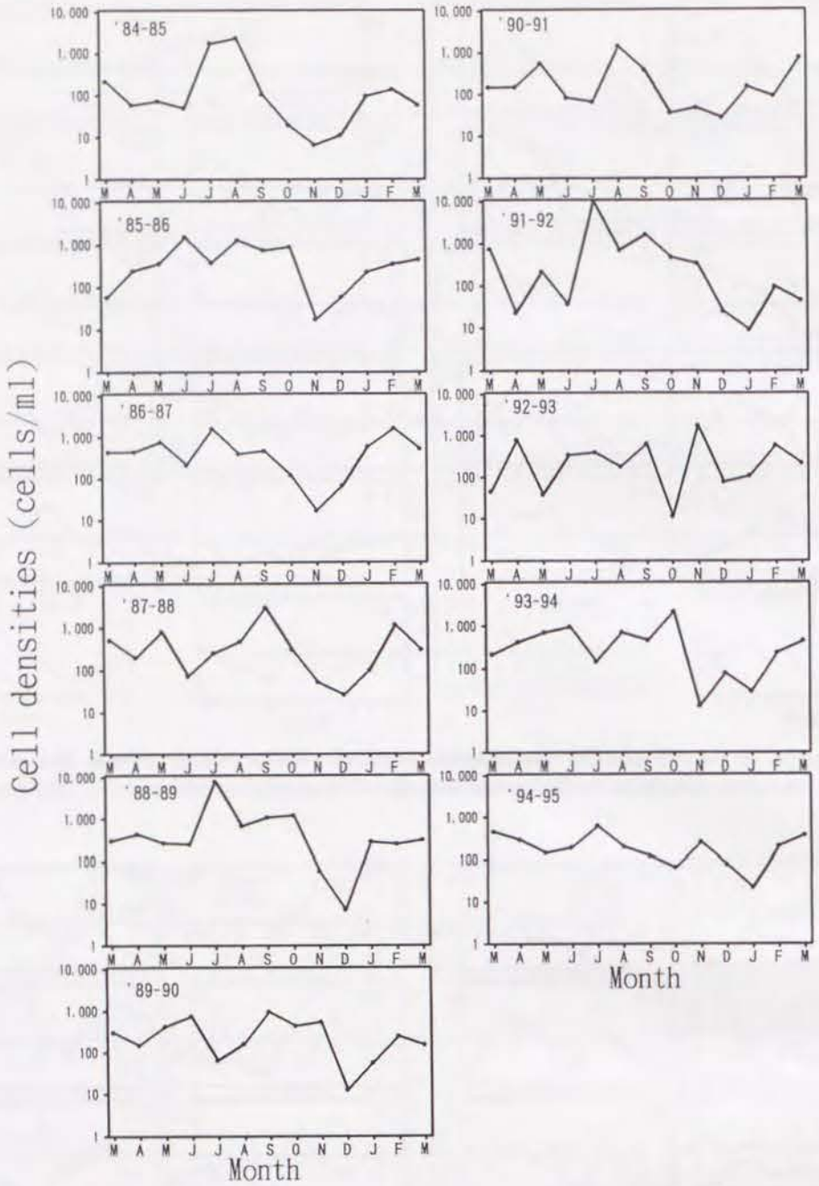


Fig. 2-9. Changes of cell density of phytoplankton from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations in the surface layer.

プランクトンによる消費等が関連し合うことによって生じる現象と捉えられる。経年的には、DINおよびPO_4-P濃度は若干増加傾向に、SiO_2-Siは増加傾向にあった（眞鍋ほか 1994 b）。

Fig. 2-9に、植物プランクトン細胞密度の変化を示した。調査期間中の最高密度は、58340cells/ml（1991年７月、Sta. H2）であった。細胞密度は高水温期に高く、夏期には2000cells/ml（19地点平均）を超えることがこれまで頻繁に観察されている。播磨灘における植物プランクトンの出現状況は、中村ほか（1989）により調査されている。これによる

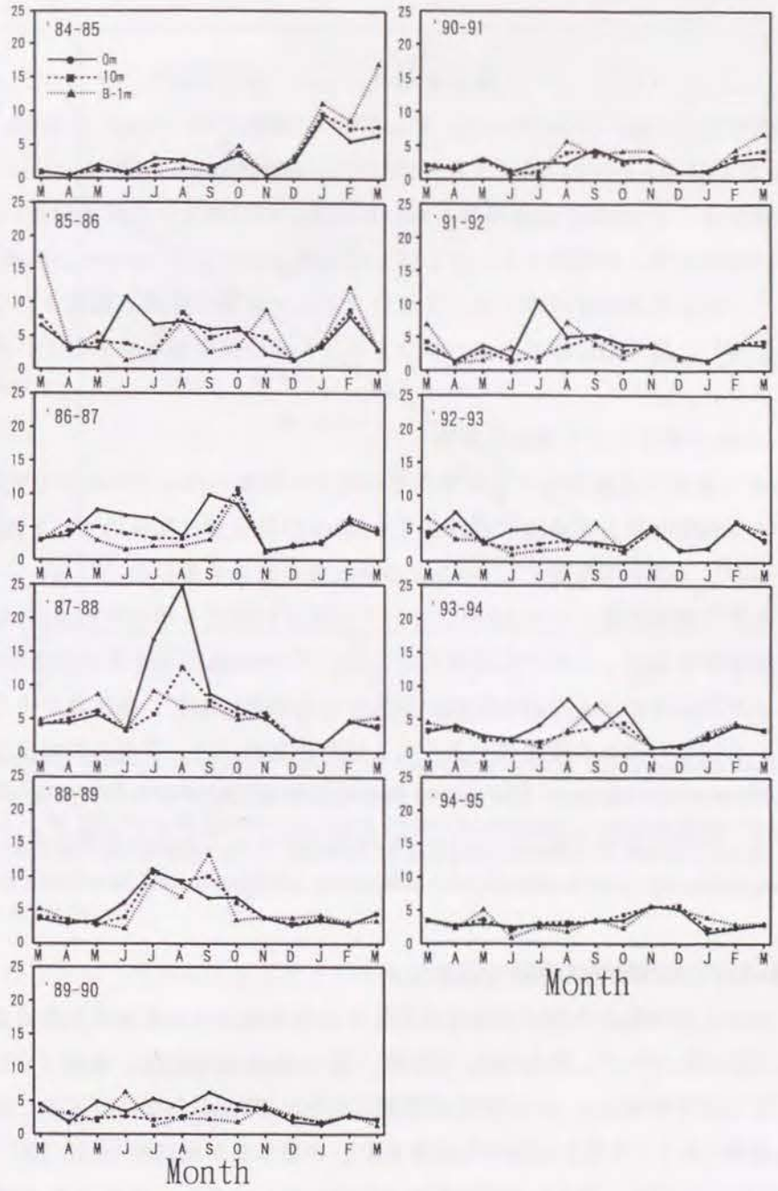


Fig. 2-10. Changes of chlorophyll-a from March 1984 to March 1995 in Harima-Nada. Monthly data were shown as the average of 19 sampling stations.

と、調査期間中に出現した植物プランクトンは７綱15目34科127種であり、珪藻が76種（59%）と最も多く、次いで渦鞭毛藻が38種（30%）であった。眞鍋（1988）は、植物プランクトンによって吸収・有機化された無機栄養塩類濃度の百分率（吸収率）を播磨灘の表層水において試算し、播磨灘中央部から北部海域にかけてはSiO_2-Siの40～70%、DINの50～80%、PO_4-Pの70～90%が植物プランクトンにより有機化されていることを明らかにした。植物プランクトン細胞密度の経年的変化は、横ばいか減少傾向にあるといえよう（眞鍋ほか 1994b）。

Fig. 2-10に、クロロフィル－ａ量の変化を示した。調査期間中、クロロフィル-ａ量の最大値は表層で85.1μg/l（1986年９月、Sta. H28）、中層で39.1μg/l（1994年10月、Sta. H10）、底層で38.9μg/l（1985年３月、Sta. H29）の範囲にあった。クロロフィル-ａ量の著しい増加は、*C. wailesii* の出現時（1984年10月、1985年１～３月と11月、1986年２月と10月、1991年３月、1992年３月）にしばしば観察された。*C. wailesii* と同様に小型植物プランクトンによる赤潮形成時にも、クロロフィル－ａ量の増加が観察されている（例えば1991年７月）。経年的にみるとクロロフィル－ａ量は減少傾向を示しているといえよう。

２．*C. wailesii* の発生とノリ養殖の関係

C. wailesii の発生が兵庫県のノリ養殖にどの程度の影響を与えているかを把握するため、兵庫県のノリ共販枚数と播磨灘における *C. wailesii* の発生量の関係について検討した。

Fig. 2-11に、ノリ共販枚数と *C. wailesii* の発生量の関係を示した。なお、ノリは12月～翌年４月までの積算枚数、*C. wailesii* については各月19地点３層の平均値の10月～翌年４月までの積算値を求め、それぞれ年毎に示した。*C. wailesii* の発生量が大きかった1984～1986年および1990年ではノリ共販枚数が少なかったのに対して、発生量が少なかった年（例えば、1994年）には共販枚数が多くなる傾向が認められ、両者の間には$Y=-292.7X+1.7\times10^9$（$r=-0.87$, $n=11$）という強い負の相関関係が得られた。従って、兵庫県のノリ養殖は、共販枚数から見て、*C. wailesii* の発生によって大きな影響を受けていたことが判明した。

３．*C. wailesii* と環境要因の平均的季節変化

Fig. 2-12に、1984年８月から1995年３月までの播磨灘19地点各層平均の月別の水温、塩分、σ_t、ＤＩＮ、PO_4-P、SiO_2-Si、日射量、*C. wailesii* 細胞密度、植物プランクトン細胞密度、およびクロロフィル-ａ量な季節変化をそれぞれ示した。

水温は表層で8.6（３月）～26.7℃（９月）、中層で8.5（３月）～26.2℃（９月）、底層で8.6（３月）～25.4℃（９月）の範囲で推移した。４月から９月まで上昇が続き、各層とも９月を境にして３月まで下降した。水温の鉛直差がみられる４～９月までを成層形成期、鉛直差がみられない10～３月までを成層崩壊期とみなすことができる。

塩分は、表層で30.27（７月）～32.38（２月）、中層で31.38（８月）～32.47（３月）、底層で31.65（８月）～32.59（３月）の範囲で推移した。４月から７月にかけて、特に表層で急激な低下を示し、表層と底層の塩分差は７月に最大となった。この低下は梅雨時期の降水に伴う北部沿岸域からの河川水の大量流入によるものである。塩分は７月を境にして２月まで上昇を続け、表層から底層まで均一となるのは11～２月であった。

密度（σ_t）は、表層で1020.1（９月）～1025.5（２月）、中層で1020.4（９月）～1025.2（３月）、底層で1020.7（９月）～1025.3（３月）の範囲で推移した。高水温期に低く

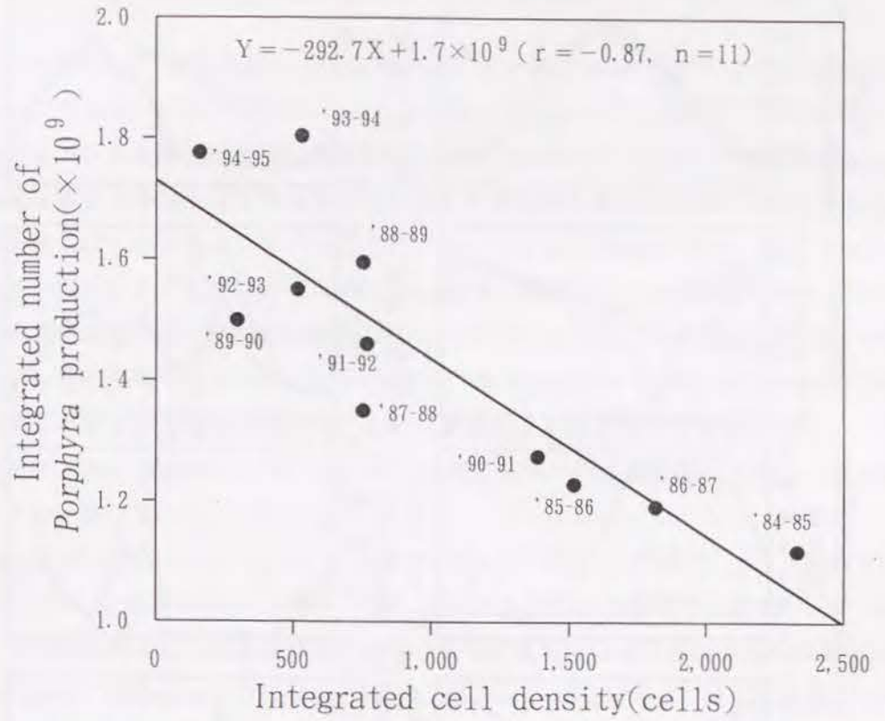


Fig. 2-11. Relationship between integrated density of vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran and integrated number of Nori(*Porphyra*) production. Integrated cell density was calculated from the data of October to April. Monthly data of *C. wailesii* were obtained from the average cell density of 3 layer of 19 sampling stations in Harima-Nada. Integrated number of Nori (*Porphyra*) production was estimated from December to April in Hyogo prefecture.

低水温期に高くなるという明瞭な季節変化を示した。表層と底層の密度差は７月に最大1.9となったが、鉛直混合期にあたる10～３月には差はほとんど認められなかった。

日射量は、7.4（12月）～16.9MJ/m^2（５月）の範囲で推移した。４～８月の間は17MJ/m^2前後の高い値で推移したが、この間、大きな差はみられない。８月を堺にして12月まで急激に減少し、１月には上昇を始めるという明瞭な季節変化を示した。

DIN濃度は表層で1.7（９月）～10.8μM（12月）、中層で2.2（９月）～10.5μM（12月）、底層で3.9（５月）～10.4μM（12月）、PO_4-P濃度は表層で0.10（５、６月）～0.77μM（12月）、中層で0.09（５月）～0.76μM（12月）、底層で0.19（５月）～0.76μM（12月）の範囲で推移した。DINおよびPO_4-P濃度は表層、中層では４～９月の高水温期に低い値を示している。栄養塩濃度の低さは、陸水から栄養塩が供給されても植物プランクトンによって急速に消費されるためと理解されている（眞鍋 1988）。９月を境にして12月まで上昇を示し、１月以降は逆に低下した。底層では高水温期に表・中層に比べ、著しく濃度が上昇した。これは成層の形成に伴う海底泥からの盛んな溶出が原因と考えられる。一方、11～３月までは表層から底層まで均一な濃度を示すが、これは循環期における海水の鉛直的な混合による結果と理解できる。

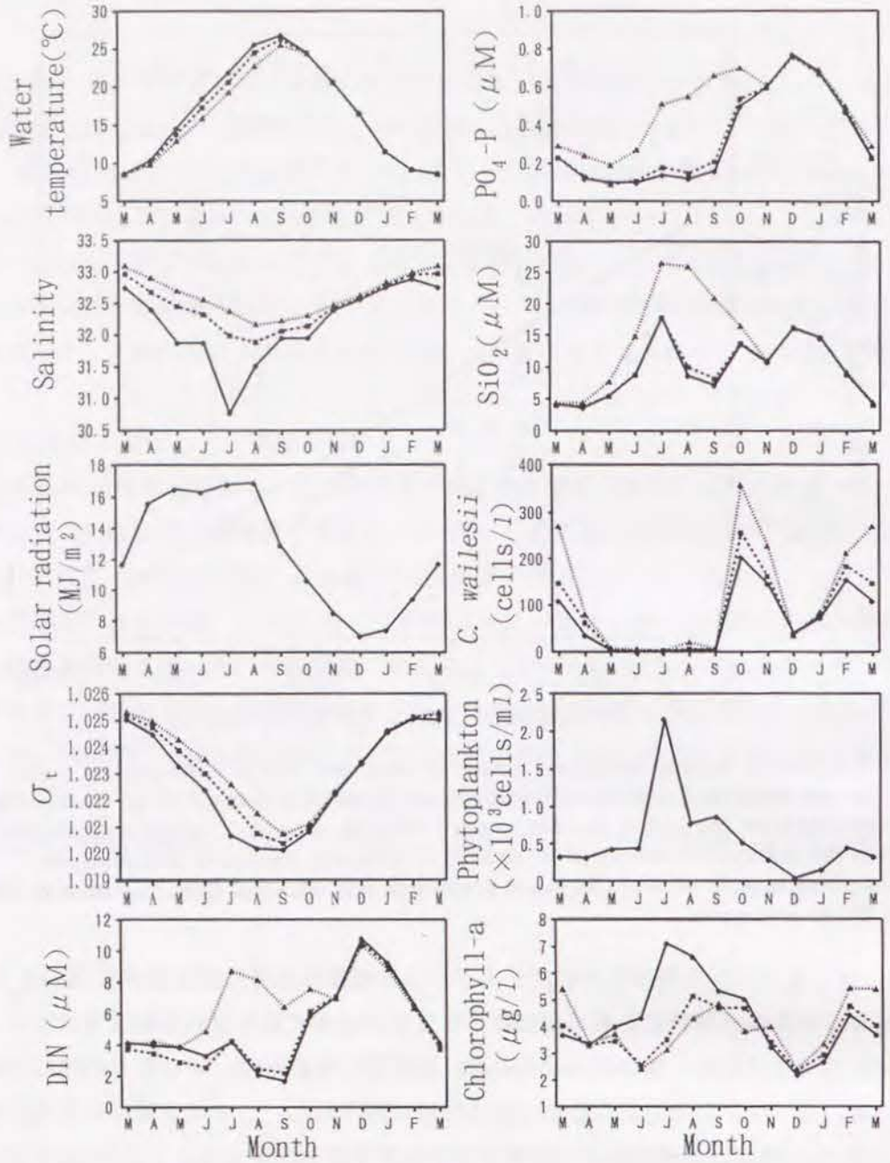


Fig. 2-12. Seasonal changes of water temperature, salinity, solar radiation, σ_{15}, DIN, PO_4-P, SiO_2-Si, *Coscinodiscus wailesii* Gran, phytoplankton, and chlorophyll-a on average of 19 sampling stations in Harima-Nada.

SiO_2-Si濃度は、表層で3.60（４月）～16.26μM（12月）、中層で3.78（４月）～16.18μM（12月）、底層で4.33（３月）～16.10μM（12月）の範囲で推移した。５月から７月にかけて急激な上昇を示した。これは、SiO_2-Siが陸水に大量に含まれており、梅雨時期の降水に伴う河川水の大量流入による供給と、海底泥からの溶出が原因と考えられる。８、９月の濃度低下は、SiO_2-Siを必須栄養素とする珪藻類の活発な増殖による消費が主たる原因と推測される。循環期に入り10月には一旦、濃度は上昇したが、11月には低下し12月に再び上昇しており、12月を境にして濃度は低下した。このようにSiO_2-Siは、DINおよびPO_4-Pとは少し異なった変動を示した。DINおよびPO_4-P濃度が10～12月にかけて直線的に急上昇するのに対して、SiO_2-Si濃度は11月に一度低下するが、この原因は不明である。

植物プランクトン細胞密度は、42（12月）～2166cells/ml（７月）の範囲で推移した。高水温期に高く、特に７月に最大値を示した。９月を堺に低下し、12月に最小となる。２月に一度高くなるが３月には再び低下する。10～４月までの変動パターンは *C. wailesii* のそれとよく似ている。眞鍋ほか（1994b）によると、播磨灘における植物プランクトンの平均細胞密度（表層）は、北部沿岸海域では3×10^3cells/ml、家島群島以北では4×10^2cells/ml、灘中央部では$4\sim8\times10^2$cells/ml、灘南西部では4×10^2cells/ml以下の値を平均的に示すこと、灘全体を平均すると、珪藻類の占める割合は80%を上回り、播磨灘はほぼ周年、特に *Skeletonema* 属、*Chaetoceros* 属に代表される珪藻類が卓越している海域であることを報じている。

C. wailesii は、表層で1.2（７月）～203.9cells/l（10月）、中層で1.6（６月）～257.1cells/l(10月）、底層で3.4（７月）～357.5cells/l(10月）の範囲で推移した。*C. wailesii* は、９～10月にかけての循環期初期に活発に増殖を始め、10～11月にかけて大量発生に至ることが判る。栄養塩濃度の急激な上昇と *C. wailesii* の増殖の開始とはよく一致しており、*C. wailesii* は循環期に底層から豊富に供給される栄養塩を利用して大増殖していると理解できる。その後、一旦、11と12月にかけて減少するが１と２月に再び増殖をみせ、３～５月にかけて衰退していくのが、播磨灘における *C. wailesii* の平均的な季節変動パターンである。しかしながら、５～８月ににかけても *C. wailesii* の出現が確認されることがあり、*C. wailesii* の栄養細胞は周年、播磨灘の水中に存在しているといえる（第Ⅳ章参照）。

クロロフィル-a量は、表層で2.2（12月）～7.1μg /l（７月）、中層で2.4（12月）～5.2μg /l（８月）、底層で2.4（５月）～5.4μg /l（２月）の範囲で変動を示した。年によって異なるが、おおむね７～９月は植物プランクトン、10と11月は *C. wailesii*、２～４月は *C. wailesii* と他の植物プランクトンの両者の増殖に伴ってクロロフィル量が増加した。眞鍋（1987）は、播磨灘における濁度とクロロフィルの間に高い正の相関（相関係数＝0.97）が認められることから、当海域の濁りのほとんどはプランクトンに起因すると報告している。さらに眞鍋（1988）は、播磨灘の表層水の栄養塩濃度とクロロフィル量の間には負の相関関係があるのを明らかにし、得られた回帰式から植物プランクトンにより有機化された無機栄養塩濃度を逆算した。次いでその値を水中の無機栄養塩濃度に加算し、植物プランクトン出現初期の栄養塩濃度を推定した。この値と塩分との間に高い負の相関関係がみられたことから、播磨灘表層水における栄養塩類の起源は主として灘北部沿岸に流入する陸水にあると推察した。

4．*C.wailesii* の増殖に及ぼす環境要因

温帯域においては、植物プランクトンの出現には明瞭な季節変化が見られ、その種組成

の季節遷移にも一定のパターンが認められることが知られている（Ignatiades & Smayda 1970）。すなわち、春先には珪藻類のブルームが起こり、それに続いて晩春から初秋にかけては渦鞭毛藻やラフィド藻類が卓越するが、それ以降は再び珪藻類が優先する（Durbin et al. 1975, Nakahara 1978）。このような季節性をもたらす環境要因としては、光（Hitchcock & Smayda 1977）、水温（Pratt 1959, Smayda 1973）、塩分（Qasim et al. 1972）等の要因のみならず、多数の要因が挙げられており（Smayda 1973、Smayda 1980）、植物プランクトン種の遷移は、極めて複雑な生態現象であると考えられる（Guillard & Kilham 1977）。山口・本城（1989）および山口（1994）は培養条件下において、渦鞭毛藻類の *Gymnodinium nagasakiense*、ラフィド藻類の *Chattonella antiqua*、珪藻類の *S. costatum* 等の増殖に及ぼす温度および塩分の影響を２因子要因計画実験により詳細に調べた結果、いずれの種類の増殖応答においても水温と塩分が相互に関連し大きな影響を及ぼしており、これらの効果が種により異なることを明らかにした。また、現場水域における植物プランクトンの発生、増殖および水平的な分布に密接に関与していると述べている。Tomas（1978）やNorris & Chew（1975）もこれらの環境要因が植物プランクトンに対して相乗的あるいは干渉的に作用することを報告している。

水温と塩分の関係についてみると、これまで *C. wailesii* の出現が確認された最低水温は、6.0℃（1986年３月、St.H29の底上１m、*C. wailesii* ：55cells/*l*）であり、最高水温は、29.1℃（1984年９月、St.H30の表層、*C. wailesii* ：５cells/*l*）であった。塩分については最低が20.11（1994年２月、St.H28の表層、*C. wailesii* ：75cells/*l*）、最高が33.70（1985年３月、St.H14の底上１m、*C. wailesii* ：1250cells/*l*）であった。培養条件下でも *C. wailesii* は、温度６～28℃、塩分15～35の範囲で増殖可能であり（眞鍋・近藤（1988）および第Ⅲ章第２項参照）、本種は広水温・広塩分適応性種であると判断できる。この温度および塩分に対する本種の増殖特性と、５～９月に大きな増殖を示さない現象とを考えあわせると、水温・塩分それ自体が本種の大量発生に直接関与する要因ではないと考えられる。*C. wailesii* 栄養細胞の経年変化（Fig.2-2）と水温および偏差の経年変化（Fig.2-3）から、本種の大量発生期は水温成層崩壊期（鉛直混合期）と一致していることが判る。しかしながら、成層崩壊期に常に大量発生しているわけではなく、ほとんど増殖がみられない年もある。塩分（Fig.2-4）の経年変化をみると、*C. wailesii* の大量発生と明瞭な対応関係は認められなかった。

栄養塩濃度との関係についてみると、DIN（Fig.2-6）は、梅雨時期と鉛直混合期に濃度の著しい上昇を示しているが、PO_4-P（Fig.2-7）は鉛直混合期に濃度が著しく上昇するが、梅雨時期にはDINほど濃度上昇を示していない。一方、SiO_2-Si（Fig.2-8）は、DINやPO_4-Pとは異なり、明瞭な季節変化を示さなかった。*C. wailesii* は、基本的には９と10月の鉛直混合期に豊富に供給される栄養塩を利用して大増殖していると考えられる。偏差をみると、いずれの栄養塩も１～３月の *C. wailesii* の大量発生時（1984、1985、1986、1992年）

には大きく濃度が低下した。この濃度低下は特にSiO_2-Siで著しかった。一方、１～３月に *C. wailesii* の大きな発生がみられなかった1990年では、1985や1986年のような栄養塩濃度の低下は認められなかった。また、10と11月の発生時は鉛直混合の盛んな時期であり、さらに台風に伴う降水などで栄養塩が供給されるため、本種が大量に発生してもこの時期の栄養塩は極端な濃度低下を示さないものと推察される。これに対して１～３月は降水量も少なく（宮原・長井 1995）、栄養塩の供給量が少ないため、*C. wailesii* の大量発生により極度な栄養塩の濃度低下が起こり、その後の栄養塩環境に大きな影響を与えているようである（眞鍋ほか 1994a, b）。しかしながら、本種の大量発生と栄養塩濃度の偏差との間には必ずしも明瞭な対応関係が認めらるわけではない（混合期の開始後の栄養塩が豊富にある時期に大量発生していない年が近年認められる）。また、いずれの栄養塩も経年的にみて単純に減少傾向にあるとはいえず（むしろ増加傾向）、本種が近年減少傾向にあることの説明にはなりえない。

本種が夏期に出現しない大きな原因の一つとして、栄養塩濃度の低いことが挙げられるが、このことは栄養塩濃度が高ければ必ず大量発生しなければならないということにはならない。一般に、栄養塩は植物プランクトンの増殖を律速する要因として非常に重要であり、このことは本種にも当然当てはまるはずである。しかし以上述べてきたように、本種の増殖を律速する要因は単純に栄養塩だけではないと考えられる。

C. wailesii と他の植物プランクトンの増殖との関係についてみると、他の植物プランクトンは主に７、８月の高水温期に細胞密度が高くなる（Figs.2-9、2-12）一方、２、３月にもしばしば春のブルームを形成した。２と３月において、*C. wailesii* が増殖せず小型植物プランクトンが増殖した年のクロロフィル－ａ量（Fig.2-10）の少なさから判断して、他の植物プランクトンが *C. wailesii* と競合関係にあるとはいい難い。また、両者の出現のピークの差異は、両者が競合関係にある結果というより、むしろ何等かの生理特性の差による可能性を示唆している。よって、他の植物プランクトンの発生は、特に本種の増殖には大きな影響を及ぼしていないと推察される。

ナラガンセット湾における *Skeletonema costatum* の冬～春期における大発生は、"winter-spring bloom" として、Pratt（1959, 1965）、Martin（1965）、Smayda（1973）、およびHitchcock & Smayda（1977）によって詳細に研究されている。このブルームに関与する環境要因として、水温、光、栄養塩、動物プランクトンによる補食圧などが挙げられているが、Hitchcock & Smayda（1977）は中でも日射量が重要な環境要因であることを示した。

しかし日射量（Fig.2-5）は、明瞭な年変動を示した。その偏差と *C. wailesii* の発生量には明瞭な対応関係が認められず、この結果は、日射量によって大量発生と非発生の相違を単純に説明できないことを示している。季節的な変化を見ると、鉛直混合の始まりとともに、*C. wailesii* の細胞密度は上昇するが、栄養塩が最も豊富にある時期（12、１月）に一度大きく低下している。この現象は、他の植物プランクトン細胞密度とクロロフィル－

a量でも生じている。12と1月は1年の内で日射量の最も少ない時期と一致しており、日射量がこの時期の本種の増殖制限因子になっていると考えられる。そして、2～4月に*C. wailesii*の細胞密度は再び増加する。これはいわゆる"Spring bloom"に相当するものである。この時期は一年の内で水温が最低となる時期でもあるので、本種の密度増加は日射量の増大によると推察される。

1993年8月、1984,1990年10月、1985年11月と1984,1985年2月および1985,1988,1991,1992年3月4月における*C. wailesii*の細胞密度は底層で最も高い値を示している。層でない場合もある（例えば、1985年1月、1986年10月）。このような現象は、瀬戸内海において他の植物プランクトンでは観察されない特異な現象であり、本種の沈降速度が大きいことに起因すると推察される。*C. wailesii*の沈降速度は、5～30m／day（Eppley et al. 1967）、0.25～3.0m／day（Bienfang 1982）、6m/hour（Manabe & Ishio 1991）と見積られている。珪藻類において1細胞の平均的な沈降速度は1m／dayよりも小さい種が多く（Smayda 1971、Bienfang 1980、Riebesell 1989）、また、沈降速度は種特異的で、細胞の大きさや細胞自身の生理状態によって大きく異なることが知られている（Smayda & Boleyn 1965, 1966a,b, Eppley 1977, Bienfang et al. 1982, 1983, Culver & Smith 1989, Passow 1991, Waite et al. 1992）。一方、珪藻類の細胞凝集塊（Diatom aggregates）の沈降速度は著しく大きく、200m／dayにもなることが報告されており（Smetacek 1985, KrancK & Milligan 1988, Alldredge & Gotschalk 1989）、Manabe & Ishio（1991）が得た*C. wailesii*の大きな沈降速度は凝集した細胞についての結果と推察される。いずれにせよ、*C. wailesii*は大きな沈降速度をもつため、表層付近で増殖しても速やかな沈降を余儀なくされるため、底層で細胞密度が高くなると考えられる。播磨灘において、2月～3月にかけて*C. wailesii*の細胞密度は表・中層で停滞もしくは減少し、底層では逆に増加している年がある（Figs.2-3, 2-12；1985年および1991年）。この間、栄養塩濃度は急激な低下を示している（Figs.2-6～2-8, Fig.2-12）。このような現象は、表層を中心とした*C. wailesii*のブルームが栄養塩の枯渇に伴って衰退し、細胞が速やかに底層へ沈降するためと理解されている（Manabe & Ishio 1991）。この考察は、対数増殖期にある細胞に比べて、対数増殖期を過ぎて老化した細胞の沈降速度の方が高くなるという、Smayda & Boleyn（1965, 1966a,b）、Eppley et al.（1967）、Bienfang（1982）の結果からも支持される。

Fig.2-13に、播磨灘における*C. wailesii*の増殖と鉛直安定度の関係について調べた結果を示した。使用したデータは、播磨灘の19地点（Fig.2-1）において、1984年1月から1995年3月にかけて毎月上旬に実施した計128回の調査の全地点の平均値である。鉛直安定度は（底層と表層の密度差）$\times 10^3$／水深（m）により求めた。鉛直安定度は表層と底層の密度差が大きいほど大きい値をとる。*C. wailesii*の細胞密度は、鉛直安定度が20以下から大きな値を示しており、両者の関係は、本種の大規模な増殖には海水の鉛直混合が必要であることを示している。しかし、鉛直安定度が小さい時でも、*C. wailesii*の細胞密度が低い

場合も多く、鉛直安定度のみで本種の消長を説明することはできないと考えられる。筆者らの観察によると、室内において*C. wailesii*を静置培養した場合、*C. wailesii*は培養容器の底に沈んだまま増殖し、通常浮上は確認されていない。しかし、培養条件下において試験管内で培養液の対流が生じるような場合には、試験管内での*C. wailesii*の浮上が観察される。このような現象から、*C. wailesii*の天然における出現の季節性を考察すると、高水温期の場合、仮に例え、表層付近に最初存在していたとしても、栄養塩が枯渇しており（Figs.2-6～2.8, Fig.2-12）、増殖は望めない。増殖できたとしても沈降速度の大きさから、すぐ底層へ到達してしまう。底層では光強度不足のため増殖することは困難と予想される（第Ⅳ章後述）。また、海水密度（Fig.2-12）の季節変化をみても、6～8月は鉛直的な密度差が大きく、強い成層が形成されていることから、増殖可能な光強度のある水深にまで再浮上することは困難であろう。よって、水温躍層の形成期には大きなブルームを形成することはできないと考えられる。一方、鉛直混合期には、増殖可能な光強度のある水深での滞在がある程度可能になると思われ、この時期には栄養塩が豊富に供給されることから大きなブルームを形成することができる。つまり、沈降速度（比重）の大きい*C.*

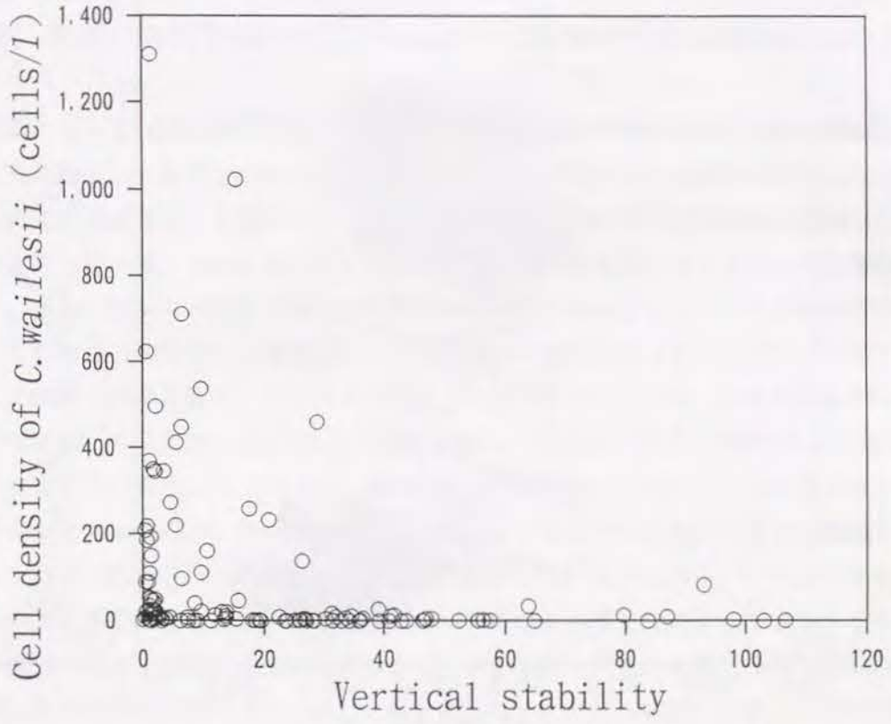


Fig. 2-13. Relationship between vertical stability and density of vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran in Harima-Nada. Vertical stabilities were treated as the average of 19 sampling stations. The cell densities of *C. wailesii* were treated as 3 layer average of 19 sampling stations. Total of 128 Data from August 1984 to March 1995 were plotted.

wailesii は海水の鉛直的な混合が盛んな循環期にしか大きなブルームを形成できないことになる。この説は、*C. wailesii* 細胞密度と水温、塩分、海水密度、栄養塩等の平均的な季節変動パターンと矛盾しない。さらにこの説は、栄養塩濃度の高い海域では低い海域に比べて、より大型の植物プランクトンの分裂速度が大きくなる傾向があり、湧昇域、とりわけ入り江や湖のような狭くて鉛直混合が起こりやすい水域では、より大型の植物プランクトンが卓越できることを実験的に示したParsons & Takahashi（1973）の報告からも支持される。

C. wailesii の増殖と水温、塩分の関係をさらに詳しく検討するため、Fig. 2-14に水温、塩分および *C. wailesii* 細胞密度の関係を示した。これまで28.0以下の塩分で *C. wailesii* の出現が確認されたのはわずかに７例であり、細胞密度も75cells/*l* 以下と小さかったことから、３者の関係をより判り安くするために、塩分の範囲は28.0～35.0に設定した。プロットしたデータは1984年８月～1995年３月までの3513（７例を除く）である。本種の発生は水温・塩分がそれぞれ19～25℃、30.5～32.5の範囲と７～11℃、31.5～33.5の範囲に集中している。前者は９～11月の水温・塩分と一致し、後者は１～４月の水温・塩分と一致

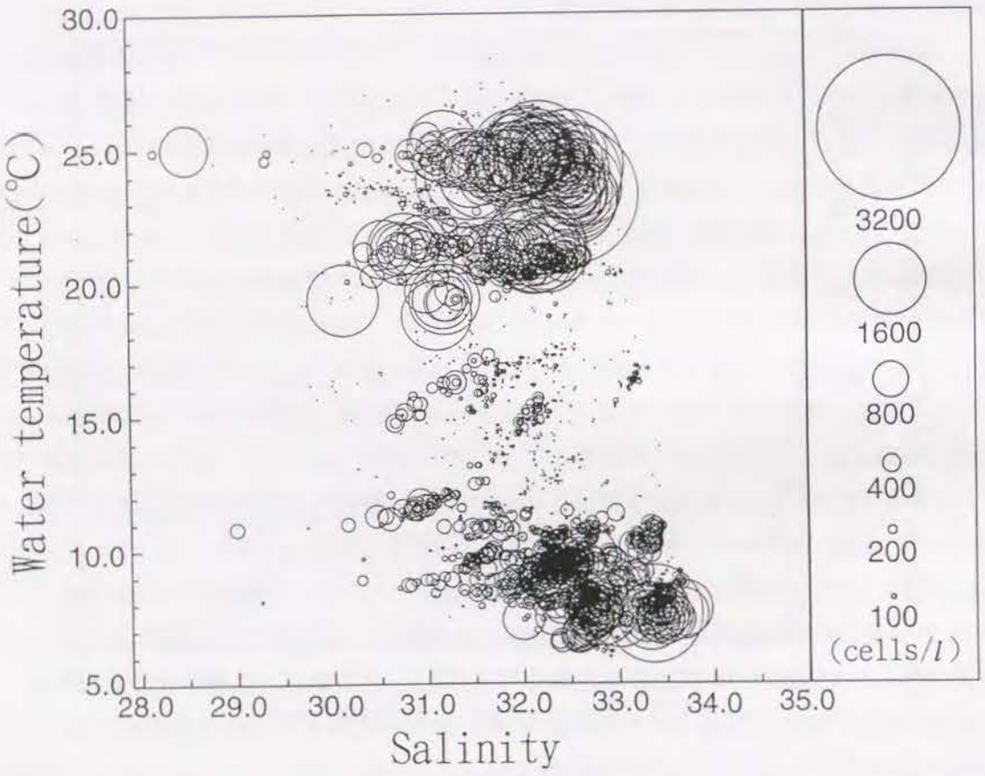


Fig. 2-14. Numerical abundance of *Coscinodiscus wailesii* Gran to water temperature and salinity in Harima-Nada from August 1984 to March 1995 (n=3513, 7 data that salinity was lower than 28 were excluded) .

する（Figs. 2-2, 3, Fig. 2-12）。本図は水温12～18℃の範囲が１年の内で栄養塩濃度の最も高くなる時期（12、１月）であるにもかかわらず、例外なく *C. wailesii* は大量発生していない。この時期は日射量が最も減少する時期と一致しており、日射量の不足が本種の強烈な増殖制限因子となっていることを示すものである。また本種は、この図からも明瞭な秋期と春期の二峰性的出現特性を持つ種であるといえよう。

日本海南東部海域でも、広大な範囲での *C. wailesii* のブルーミングが報告されているが（Nishimura 1965, 長田 1994）、日本海では秋季のブルームは観察されず、年に一度春期にのみブルームを形成することが知られている。東部瀬戸内海では、秋期の鉛直混合が９月下旬頃起こるのに対して、日本海では10月下旬頃、あるいはそれ以降に起こる（磯田 1989）。日本海の栄養塩濃度は一年の内で秋期に最低、冬期に最高になり、成層の形成・崩壊現象と対応した変動を示すことが報告されている（今井ほか 1990）。このため、秋期のブルーミングは不可能となる。一方、成層が完全に崩壊し、栄養塩濃度が上昇する冬期には、日射量が最低となるため、日本海では春にしかブルームを形成することができないと推論できる。

第２節　主成分分析を用いた *C. wailesii* の大量発生年の環境条件の抽出

瀬戸内海においては富栄養化の進行に伴い、多大な漁業被害を伴う有害赤潮が頻発し、大きな社会問題として取り上げられる様になった。それ以来、多くの研究機関により赤潮に関する研究が開始され、赤潮プランクトン調査や赤潮発生海域の環境調査が実施されてきた。研究努力の結果、赤潮発生に関する水温、塩分、栄養塩等の莫大なデータが蓄積されている。しかしながら、赤潮現象は多くの要因が複雑に絡み合っているため解析が困難である。このため、統計的な数値解析の一手法として主成分分析（以下、ＰＣＡと称す）が用いられている。沿岸水質データの解析にＰＣＡを用いた例としては、広島湾における赤潮発生予知において（大内・高山 1981、大内 1982、大内ほか 1983、大内・高山 1984）、東京湾の水質解析（鈴木ほか 1981b）、播磨灘における海面のクロロフィル分布パターンの解析（反田・眞鍋 1991）、台湾南部熱帯沿岸域における原子力発電所の温排水が植物プランクトン群集に影響を与える諸要因の解析例（Chen 1992）などがある。これらの解析は、いずれも各水質測定項目を変数とみなし、互いに関連のある多項目によって表される水質像を、少数個の新たな変数によって解釈しようとするものである。本節では *C. wailesii* の発生に関与するの環境要因をさらに詳しく検討するため、ＰＣＡを用いて約11年間の調査結果を解析し、それらの年の環境条件の差異を比較することによって、*C. wailesii* 大量発生をもたらす要因を調べた。

調査方法

主成分分析に使用したデータは、播磨灘の19地点（Fig. 2-1）において、1984年１月から1995年３月にかけて毎月上旬に実施した計135回の調査の全地点の平均値である。日射量は兵庫県立水産試験場の定置観測結果である。主成分分析の方法は、田中ほか（1984）に準じた。今回使用した変数は、各地点における表層の情報の、水温、塩分、DIN、PO_4-P、SiO_2-Si、および日射量である。これら６項目において主成分分析を実施し、主成分の寄与率、固有値、固有ベクトル、因子負荷量等を求めた。そして、得られた主成分と *C. wailesii* の細胞密度の変動とを比較した（使用したデータは1984年８月から1995年３月）。

結果および考察

Table 2-1に、ＰＣＡより得られた結果を示した。第１主成分、第２主成分、および第３主成分の寄与率はそれぞれ49.0%、29.9%、および12.1%であり、第３主成分までの累積寄与率は91.0%となった。第３主成分まで採用することにより９%の情報損失で６変数を３個のスコアに要約できた。第１主成分の固有ベクトルは主に栄養塩、次いで日射量で大きく、因子負荷量はDIN、PO_4-Pおよび日射量でそれぞれ0.932、0.961、-0.793であった。第２主成分の固有ベクトルは主に塩分および水温で高く、因子負荷量はそれぞれ0.862、-0.737であった。第３主成分の固有ベクトルは水温で高い値を示したが、第３主成分の固有値は0.673と１以下であり、平均以上の情報を持たないと考えられる。第１主成分の栄養塩の固有ベクトルの符号はプラスであり、日射量は逆にマイナスであった。第１主成分

Table 2-1. Summary of principal component analysis for data from Junuary 1984 to March 1995. The principal component analysis was made by calculating of 135 investigations data averaged 19 sampling stations of Harima-Nada in the surface layer.

	Principal component			Factor loading		
	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3
Water temperature	-0.105	-0.550	0.762	-0.181	-0.737	0.642
Salinity	0.042	0.642	0.440	0.072	0.862	0.371
DIN	0.543	-0.077	-0.303	0.932	-0.103	-0.255
PO_4-P	0.560	0.036	0.187	0.961	0.048	0.158
SiO_2-Si	0.405	-0.457	-0.055	0.695	-0.611	-0.046
Solar radiation*	-0.462	-0.263	-0.310	-0.793	-0.353	-0.262
Eigen value	2.942	1.794	0.710			
Accumlated propotion(%)	49.0	78.9	91.0			

*:The data were used the results of stationary observation in Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.

の値は栄養塩濃度と日射量で符号が逆であり、栄養塩濃度が高く日射量が小さければ主成分は大きい値を、逆の場合は小さい値をとった。第２主成分は水温と塩分で符号が逆であり、塩分が高く水温が低ければ主成分は大きい値を示し、逆の場合は小さい値を示した。第１主成分が主に栄養塩、第２主成分が塩分、第３主成分が水温の変動を示す成分であるというＰＣＡの結果は広島湾における赤潮の発生予知に関する大内・高山（1981）よるＰＣＡのそれと比較的よく一致しているといえよう。

一方、Figs. 2-12と2-14から、*C. wailesii* の12と１月の増殖において日射量の低下が強力な増殖制限因子となっていることは明らかである。また、２～４月において第２主成分のスコアが高い年には細胞密度が高くなる傾向にあった。

Fig. 2-15に、月ごとにＰＣＡによって得られた第１および第２主成分のスコアと *C. wailesii* の細胞密度の関係を示した。おおむね調査月ごとにそれぞれグループを形成している傾向が伺える。また、小さい *C. wailesii* 細胞密度を示す４～９月、逆に大きな細胞密

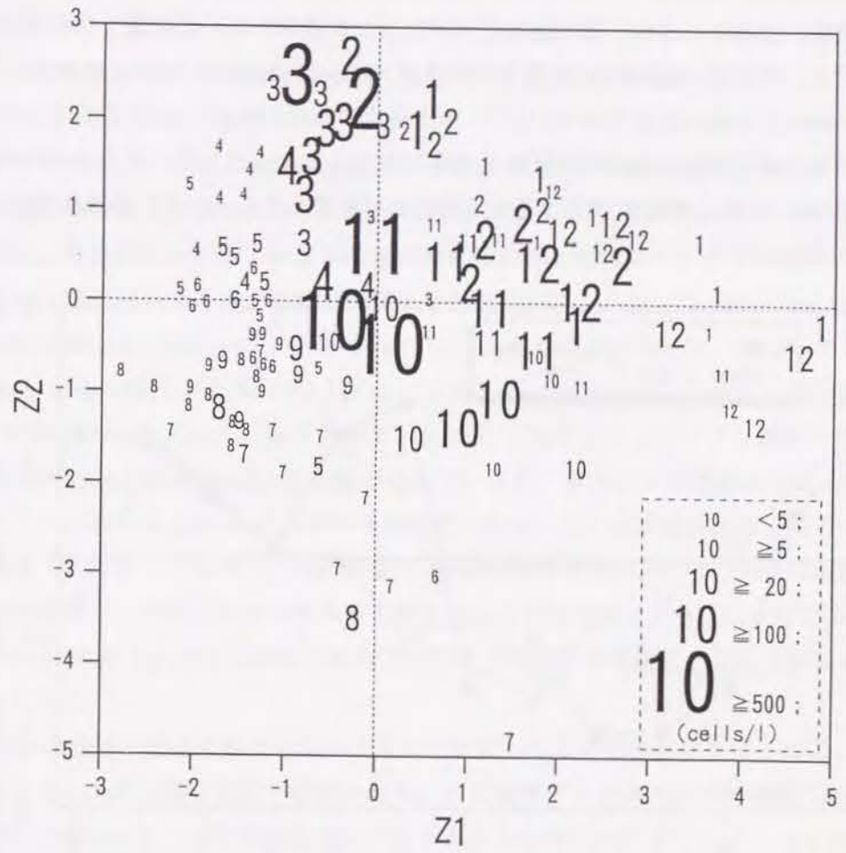


Fig.2-15. Plots of principal components PC1(Z1) and PC2(Z2). Numbers correspond to the sampled months and cell densities of vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran were shown as the size differences of each numbers. Total of 128 Data from August 1984 to March 1995 were plotted.

度を示す10～３月で、大きな２つのグループが形成されている。第１主成分（栄養塩環境および日射量を説明する成分）の値は４～９月では負の符号側、10～３月では０付近から正の符号側に区分されており、ＰＣＡの結果は４～９月に *C. wailesii* が大量発生しない原因が、主に栄養塩濃度の低さと光の強さにあることを指摘した。しかし、第１主成分の値が大きければ大きいほど *C. wailesii* 細胞密度が高くなると言うわけでもなく、３以上で100cells/*l* を超える月はなく、また500cells/*l* 以上を示した月の第１主成分の値はいずれも０付近に位置している。11～１月の第１主成分のほとんどの値は正の符号側にあるが *C. wailesii* 細胞密度の小さい年が多い。このことは栄養塩濃度が１年の内で最も高くなる時期と日射量が最も少なくなる時期が重なっていることに原因がある。また、これらの月の第２主成分の値は０から大きく離れていない（水温・塩分は増殖の制限・促進因子となっていない）。従って、ＰＣＡの結果は、11～１月の *C. wailesii* 細胞密度の低さが日射量の不足に起因していることを明確に示している。このことは、Figs. 2-2, 2-12, 2-14によって強く支持される。日射量が *C. wailesii* の増殖に大きな影響を与えている環境因子の１つである可能性が示唆されるが、他の植物プランクトンの赤潮形成と日射量・日照時間の関係についても、例えば *Chattonella*（今井 1990）、*G. nagasakiense*（飯塚 1989、山本ほか 1989）、*S. costatum*（Hitchcock & Smayda 1977）など多くの報告がある。山口（1994）は、培養実験の結果、弱光は *Chattonella* の増殖に不適であり、これに対して、*G. nagasakiense* は10 μmol・m^{-2}・s^{-1}の低光強度条件下でも十分増殖が可能であることから、現場海域における

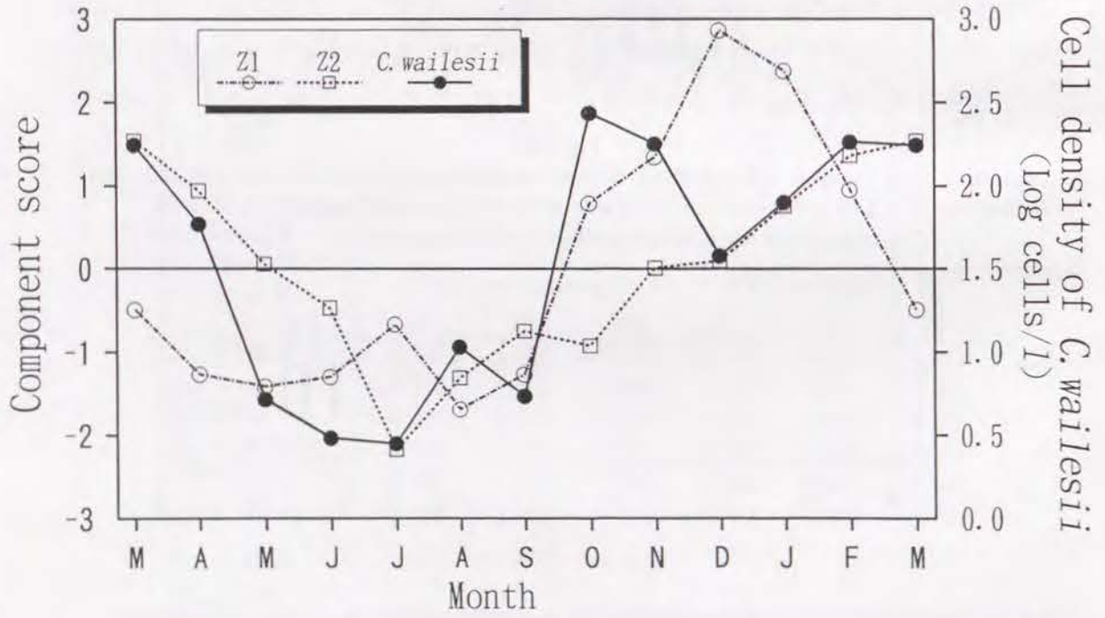


Fig.2-16. Seasonal changes of PC1, PC2, and *Coscinodiscus wailesii* Gran. The densities of vegetative cells of *C. wailesii* were treated as 3 layer average of 19 sampling stations in Harima Nada.

卓越種の交替過程に、光強度に対する増殖応答の差が大きく影響することを指摘している。

Fig. 2-16に、各調査毎の第１および第２主成分のスコアーを月別に平均したもの、および播磨灘19地点３層平均の *C. wailesii* 栄養細胞密度の季節変化を示した。Fig. 2-12から、第１主成分スコアは栄養塩濃度の季節変動パターンと、第２主成分スコアは塩分のそれとよく一致していることが判る。この傾向は、Table 2-1に示した第１および第２主成分の固有ベクトルの値からも明らかである。これら両主成分の季節変動パターンは *C. wailesii* のそれと比較的よく対応している。Fig. 2-16の結果は、自然条件下における植物プランクトン個体群の増殖速度が種々の環境要因の影響を総合的に反映した結果であるとする山口（1994）の説をうまく表現した結果と考えられ、*C. wailesii* が播磨灘の化学的・物理的環境条件に適応している結果と捉えることができよう。環境因子間の相互作用は、水温と塩分以外にも、光条件（Jitts et al. 1964, Smayda 1969）や栄養塩（Rhee & Gotham 1981）の間にも存在することが報告されている。

第３節　*C. wailesii* の増殖に及ぼす生物学的要因の影響

植物プランクトンの消滅、種の遷移過程には物理・化学的な環境要因だけではなく、生物学的な要因も重要な要因である（Smayda 1980、池田・中田 1987）。生物学的要因の一つとしては、動物プランクトンによる捕食が考えられる。植物プランクトンの捕食者としては、繊毛虫類、底生濾過捕食動物、幼稚仔魚や、多くのカイアシ類（幼生から成体まで）が含まれる（Smayda 1980）。これらのうち *C. wailesii* を捕食するカイアシ類としては、*Rhincalanus nasutus*（Mullin & Brooks 1967）、*Calanus helgolandicus*, *Temora longicornis*（Roy et al. 1989）が知られている。瀬戸内海で *C.wailesii* を捕食できるカイアシ類は、*Calanus sinicus* と *Centropages abdominantes* の２種とされているが、両者の現場密度から考えて、これらのカイアシ類が *C. wailesii* の発生や消滅過程に関与している可能性はほとんどないと考えられる（上　真一　私信）。播磨灘産 *C. wailesii* は蓋殻径が180～500 μmの範囲であり（第Ⅳ章参照）、大型であるため本種を捕食できる動物プランクトンは少ないと考えられ、*C. wailesii* の季節的消長に対して動物プランクトンによる捕食圧が及ぼす影響は少ないと判断される。

C. wailesii の発生・消滅に影響を及ぼす可能性のある第２の生物学的要因として、他の植物プランクトンとの競合関係が挙げられる。ある植物プランクトンの増殖時に細胞から排出される物質により、別の特定の植物プランクトンの増殖が阻害されるといった現象が、赤潮形成時や培養条件下で観察されており（Proctor 1957、Pratt 1966、Pincemin 1969、Kroes 1972）、これらの現象が現場水域の種類組成の変化に影響を与えていることが報告

されている（Murphy et al. 1976, 本城ほか 1978）。*C. wailesii* についても同様に、ブルームの規模と継続期間は他の植物プランクトンとの競合によって変化することは十分考えられる。しかしながら、Fig.2-12から、*C. wailesii* の大量発生期と他の植物プランクトンの発生時期とは１～３月を除いて大きなずれがあり、少なくとも10～11月の *C. wailesii* の大量発生時については競合種の関与はほとんど考慮しなくてもよいと考えられた。

Gallagher（1980, 1982）は、ナラガンセット湾における *S. costatum* の出現動態において、夏期群と冬期群は別のグループであることを遺伝学的に証明している。冬期の株は２℃でも継代培養が可能であるが、夏期の株は５℃以下でそれができないことから、低水温耐性の差が天然における両群の出現を分けていると考察している。*C. wailesii* にも秋期群と春期群が仮に存在するとすれば、11～12月の細胞密度の低下は両群の交替期と捉えることもできよう。しかし、秋期群と春期群が異なる系群かどうかを明確にするためには、アイソザイムやモノクローナル抗体などの生化学的方法やＤＮＡ等の遺伝子レベルでの解析が必要となろう。

以上の結果から、*C. wailesii* の発生・消滅には、水温、塩分、栄養塩および日射量といった物理・化学的環境要因が主に関与しており、これらの直接的作用というより、相乗的な作用の結果、出現の季節性をもたらすことが強く示唆された。これらに加え *C. wailesii* の沈降速度の大きさ等の本種の生物学的特徴が、播磨灘において代表とされる *S. costatum* 等の珪藻類とは異なった季節的出現特性を示す原因であることが推察された。しかしながら、今回の解析結果からは *C. wailesii* 個体群の大量発生と非発生との環境条件の差異を検出することが出来なかった。さらに、①毎年の鉛直混合期の環境条件の差異はそれ程大きくないにも拘わらず、秋期のブルームの規模が年により大きく異なるのは何故か？、夏期は栄養細胞のまま生存しているのか？、②12～１月に *C. wailesii* は一旦衰退するが、底層の細胞密度がさほど高くなるわけでもなく、*C. wailesii* 栄養細胞はどこへ行くのか？、③1986年10月には大きな増殖を示したが、急激に衰退してしまった。何故このようなことが起こるのか？、④細胞密度が経年的にみて減少してきたが、何が原因しているのか？、といったことが未解明である。これらには環境特性の変化だけでなく、*C. wailesii* の生理学的ならびに生活環の特性も関与している可能性が考えられた。夏期に、低密度ながら栄養細胞がみられるが、それらが秋の”population”として発達するのか、あるいは休眠胞子や休眠細胞として夏期を過ごし、それが秋の”population”の種となるのかについても解明すべき問題として残されている。第Ｉ章でも述べたように、珪藻類は被殻の特徴的な構造により分裂する毎に殻径が減少し、同一種においても細胞径の範囲は非常に大きくなる。こういった細胞構造の特徴により、細胞の大きさによって分裂速度の変化する種類がいることや、珪藻類の天然個体群における殻径組成の変化が、細胞サイズにより分裂速度が異なるという性質によることが原因しているといったことが報告されている。一方、*Chattonella* 属や *Alexandrium* 属など多くの渦鞭毛藻、珪藻類等において、栄養細胞としての出現

特性（季節性）がシストや休眠期細胞を中心とする生活環と密接な関係を持つことが報告されている（Garrison 1981, 福代 1982, 今井 1990, 板倉・今井 1991）。それゆえ *C. wailesii* の生活環ならびに生活感に関わる生理学的特性を詳しく研究することにより、本種の天然個体群の動態についてもより深い理解を得ることができると確信した。また、本種の大発生を予察する上においても、生活環の解明は必要不可欠な研究課題であることから、現場調査と平行して生活環に関する研究を実施した。培養条件下における生活環に関する研究の成果は第Ⅲ章に、現場水域における結果は第Ⅳ章に示した。

第Ⅲ章　培養条件下における生活環の解明

植物プランクトンの増殖機構を解明するための研究法には、大きく分けて二つの取り組み方がある。その一つは、海況・気象条件などの環境因子の変動と植物プランクトン個体群の発生との因果関係を明らかにしようよする環境面からの調査・研究であり、もう一方は、植物プランクトンの増殖生理や生態の解明といった生物学的方面からのアプローチである（岩崎 1973, 山口1994）。植物プランクトンの増殖現象は様々な環境因子が複雑に絡み合って起こると考えられるので、環境面からの研究のみでは不十分であり、生物学的な面も含めた両側からの研究が有機的に連携される必要がある。前章（第Ⅱ章）においては、現場調査に基づき *C. wailesii* 個体群の発生に関与する環境要因を明らかにするために、大量発生と非発生の環境条件の差異の検出を試みた。その結果、*C. wailesii* 個体群の増殖・消滅には、水温、塩分、栄養塩および日射量といった物理・化学的環境因子が主に関与していること、加えて *C. wailesii* の沈降速度の大きさ等の生物学的特徴から、これらの直接的作用というより、相乗作用の結果、出現の季節性が生じることが強く示唆された。しかしながら、*C. wailesii* の大量発生と非発生の環境条件の差異を検出することは出来なかった。このような現場調査は、前者の環境面からの取り組みと位置付けられよう。

生理学的な裏付けがなされなければ、現場海域において植物プランクトンの増殖と環境要因との相関関係が見かけ上得られたとしても、単なる現象の記載に終わってしまうであろうし、誤った解釈をする可能性もある。従って、現場調査から得られた環境要因と *C. wailesii* の相互作用に対して直接的な証拠を得るために、実験的な解析が必要となる。また、これまで多くの種類の生物において、その個体群の増殖・消滅過程や種間の遷移現象を明らかにする上で、個々の生物種における生活環の解明は非常に重要な研究テーマとして認識され、古くから多くの研究者により手がけられてきた。さらに多くの生物群においては、有性生殖の方法や配偶子や、接合子の形態学的特徴の相違、生活環のタイプ等が分類の基準となっていたり、また種の分化・進化過程の解明において、有効な情報源となっている。従って、生活環の中の各ステージにおける生理学的特徴や、生活環の果たす生態学的役割を明らかにすることは、前章で解析した *C. wailesii* の大量発生と環境要因の関係に関する理解をより深めるため、さらには有害プランクトン増殖機構の解明や被害防除および発生予知を行うためにも、緊急を要する重要研究課題と考えられる。しかしながら、これまで *C. wailesii* については、生活史的観点に立脚した研究は皆無であった。

以上のような観点から、本章では *C. wailesii* の無菌培養を確立し、室内培養において生活環を明らかにすることにより、生活環の面から増殖に関わる条件を解明することを目的とした。まず、第１節で栄養細胞の分裂に伴う細胞径の減少過程、細胞径と分裂速度の関係、細胞の形態の変化等について調べた。次に増大胞子の形成条件を、光（光強度および明暗周期）・水温・塩分・栄養・培養日数を種々組み合わせることによって検討した。そして、形成された増大胞子の形成過程・微細構造、増大胞子の大きさを変える条件等についても調べた。最後に大きさと生活環の関係、生活環の生態学的役割について論じた。第２節では、まず休眠期細胞の形成条件を光（光強度および明暗周期）・栄養塩等の組み合わせによって検索した。形成された休眠期細胞の形態、復活過程について調べた。人工的に形成された休眠期細胞の形成条件、および暗黒条件下における生存期間等の生理について詳しく検討した。最後に、他の珪藻類および他の分類群に属する植物プランクトンの耐久細胞との形成条件、休眠期間および発芽条件の差異などから、本種の休眠期細胞と他の植物プランクトンの休眠機構や" survival strategy"（生存戦略）の違いについて論じた。

第１節　増大胞子の形成と細胞径の回復

第１項　細胞径の減少

一般に、珪藻類は珪酸質の堅固な皮殻で覆われ、栄養細胞は無性的な２分裂により増殖する。そして、被殻の内生的形成機構から、蓋殻径が分裂回数と直線的関係をもって減少することが知られている。この関係は " MacDonald & Pfitzer's Rule" と呼ばれ（Round 1972, Drebes 1977, Lewis 1984）、主に中心目珪藻類で是認されている。中心目珪藻類の栄養細胞のこのような特徴から、同一種においても細胞径の範囲は非常に大きいものとなる。また、栄養細胞が極度に小型化すると、生理活動が低下し死滅すると云われており（Geitler 1932, 小久保 1955, 上野 1991）、このため、珪藻類は減少した大きさを回復しなければならない。一方、同一種内において、細胞のサイズによって分裂速度が異なること（例えば、Durbin 1977）は、サイズが栄養塩類の取り込み速度とも密接に関わっていることを示唆している。従って、天然個体群の動態を解明するためには、種内における分裂速度と細胞サイズの関係を正確に把握しておく必要がある。本項では、継代培養により、*C. wailesii* の栄養細胞の大きさおよび形態の変化、細胞径と分裂速度の関係等について検討した。

材料および方法

１．栄養細胞の大きさの減少

栄養細胞の大きさの変化量を調べる実験に用いた *C. wailesii* は、それぞれ1986年３月と1990年９月に播磨灘より採集し、ミクロピペット洗浄法で無菌化したクローン培養株であ

る。本種の培養液の組成は、Provasoli et al.（1957）のASPⅡおよび矢持（1984）に準じたもので、組成をTable 3-1に示した。培養液を作成後、オートクレーブにて121℃、15分間の加圧滅菌を施した。以下、このオートクレーブ終了後の培養液をＭＰ１液と名付けた。培養株の維持は、Vidrex製200*ml*容三角フラスコにＭＰ１液100*ml*を入れ、温度10℃、光強度35μmol$\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$、明暗周期12hL/12hDの条件下で行い、植え継ぎは約１ヶ月毎に行った。そして、栄養細胞の大きさが細胞分裂により、どの程度減少するのか知るため、上述した維持培養株の約１ヶ月毎の植え継ぎ時に、１クローン株につき200細胞以上の蓋殻径を測定した。実験には、開始時の蓋殻径約250μmのクローン３株と、約100μmのクローン２株を用いた。

Table. 3-1. Composition of the basal culture medium (MP1).

Constituent	Concentration
$NaNO_3$	20.00 mg
K_2HPO_4	1.70 mg
$NaHCO_3$	108.00 mg
$Na_2SiO_3\cdot 9H_2O$	281.00 mg
Tris	1000 mg
Metal mixture[1]	1 *ml*
Vitamin mixture[2]	10 mg
Filtered sea water	1000 *ml*

[1] Metal mixture （Modified P 1 soln.）

$EDTA\cdot 2Na\cdot 2H_2O$	3.00 g
$FeCl_2\cdot 6H_2O$	0.39 g
$MnCl_2\cdot 4H_2O$	0.43 g
$ZnCl_2\cdot 7H_2O$	0.060 g
$CoCl_2\cdot 6H_2O$	0.012 g
$CuSO_4\cdot 5H_2O$	0.005 g
H_3BO_3	3.40 g
$Na_2MoO_4\cdot 2H_2O$	0.13 g
Distilled water	1000 *ml*

[2] Vitamin mixture （Modified S 3）

Thiamine·HCl	50 mg
Nicotinic acid	10 mg
Ca-panthenate	10 mg
p-Aminobenzoic acid	1.0 mg
Biotin	0.10 mg
i-Inositol	500 mg
Thymine	300 mg
Folic acid	0.20 mg
Cyanocobalamin	0.02 mg
Distilled water	1000 *ml*

２．栄養細胞の細胞径と分裂速度、被殻の厚み、体積および表面積の関係

実験には1992年11月～1995年４月の間に播磨灘から分離したクローン無菌培養６株を用

いた。まず、500*ml*容培養瓶（Vidrex製）に300*ml*のMP1液を入れたものを計６個準備した。これに細胞径100～110μm，150～160μm，200～210μm，250～260μm，300～310μmおよび380～390μmの培養株を５～10細胞ずつ、それぞれフラスコに接種し、温度22.5℃、白色蛍光灯による光強度70μmol$\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$、明暗周期16hL/8hDの条件下で10日間（後期対数増殖期まで）培養した。培養４日目から毎日一定時間によく攪拌した後、各フラスコの培養液を２～10*ml*ずつ抜き取り、光学顕微鏡下で*C. wailesii*細胞数を計数した。１*ml*当たりの細胞密度として片対数グラフにプロットし、その直線部分（対数増殖期）について、最小自乗法（Guillard 1979，山口 1994）により分裂速度（μ：divisions$\cdot day^{-1}$）を計算した。一方、各培養株の被殻の厚みを調べるため、実験前にフラスコに接種した全細胞の被殻の直径を光学顕微鏡下で測定し、各培養株毎に平均径を算出した。培養終了後、フラスコ毎に*C. wailesii*の殻径を150ずつ光学顕微鏡を用いて測定し、各株毎の平均細胞径を求め、実験開始時の殻径、実験終了後の殻径およびその間の分裂回数から分裂毎に減少した殻径（被殻の厚み）を算出した。また、細胞のサイズと細胞の体積および表面積の関係を知るため、各培養株毎に20細胞ずつ殻高（valve height）も光学顕微鏡下で測定した。殻高は細胞周期によって大きく異なるので、細胞版が形成された直後の細胞の殻高を測定した。細胞の体積および表面積は*C. wailesii*を正円筒形とみなし、体積（Ｖ）および表面積（Ｓ）をそれぞれ、$V=\pi r^2 h$、$S=2\pi r^2+2\pi r h$（ｒ：半径，ｈ：殻高，π：円周率＝3.1415）として計算した。

結果および考察

１．栄養細胞の大きさの減少

Fig. 3-1に、継代培養における*C. wailesii*５株の栄養細胞の平均蓋殻径の経時変化を示した。今回実験に用いた５株全てにおいて、培養期間中に細胞の大きさに減少が認められた。蓋殻径が約250μmの培養株は、３株ともほぼ同様な減少傾向を示し、上記の培養方法では１ヶ月で7.4μm（３株平均）減少した。平均殻径が約100μmの２培養株は、１ヶ月で約5.6μm（２株平均）減少し、250μmの培養株に比べてその変化量は小さかった。

Fig. 3-2（Ａ～Ｇ）に、培養条件下において観察された栄養細胞を示した。培養中の栄養細胞は小型化するにつれ、異常分裂した細胞が多く観察された（Ｂ，Ｃ）。また、大きさが70μm前後にまで減少した時、貫殻軸方向に伸張したまま分裂しない細胞（Ｄ）や、細胞内容物が殻から脱出した細胞（Ｅ～Ｇ）などが高頻度で観察されるようになった。そして、これらの細胞はそれ以上分裂することなく２株とも死滅した。栄養細胞がある一定の大きさまで小さくなると、それ以上細胞分裂ができずに死滅してしまう現象は、*Coscinodiscus*属でも報告されており（Werner 1971c）、中心目珪藻類では一般的な現象のようである（Round et al. 1990）。上述のように*C. wailesii*を継代培養すると、小型化するに従

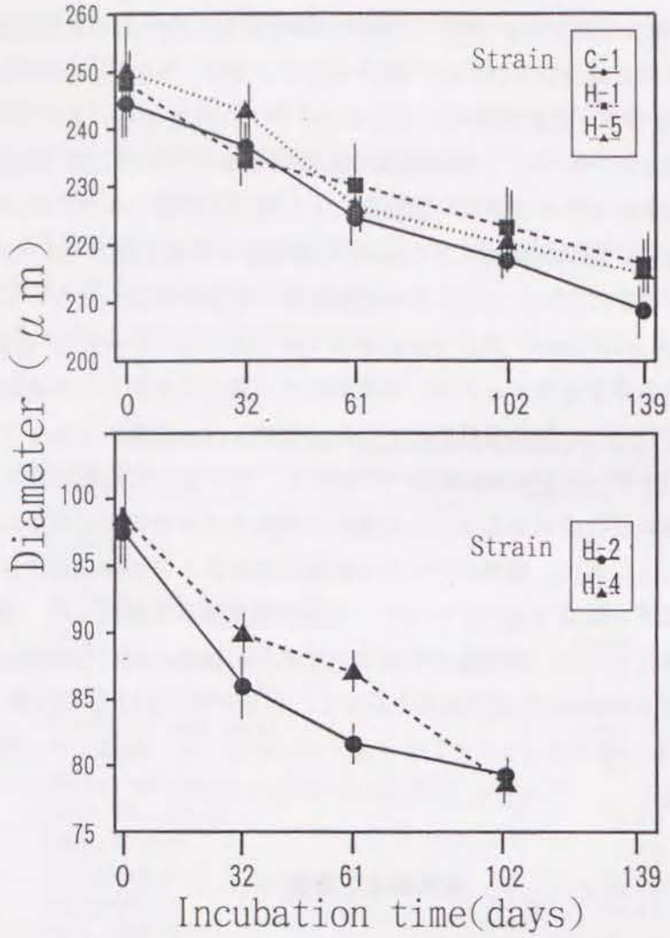


Fig. 3-1. Sequential changes of mean cell sizes (valve diameter) of *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture.

い異常分裂する細胞が多く観察された（Fig. 3-2, B, C）。このような現象は、Hostettor & Rutherford（1976）により *Pinnularia brebissonii* でも報告されており、多くの中心目珪藻類で生じている現象と考えられる。継代培養していた *C. wailesii* 2株が平均径約70μmの大きさまで減少した時に死滅したことから、播磨灘産 *C. wailesii* の最小径は70μm前後であると推察された。

2．細胞径と分裂速度、被殻の厚み、体積および表面積の関係

Table 3-2に、*C. wailesii* の細胞径と分裂速度の関係を示した。分裂速度（μ）は、1.2～1.9divisions･day^{-1}の範囲にあり、100μmの株で最も小さい値を示し、300μmの株で最も高い値を示した。250μmの株と380μmの株（後者は250μmの株から栄養的増大（第2項で述べる）によって大きさを回復した直後の初生細胞から得た培養株）の分裂速度について比較すると、380μmの方が若干小さくなった。

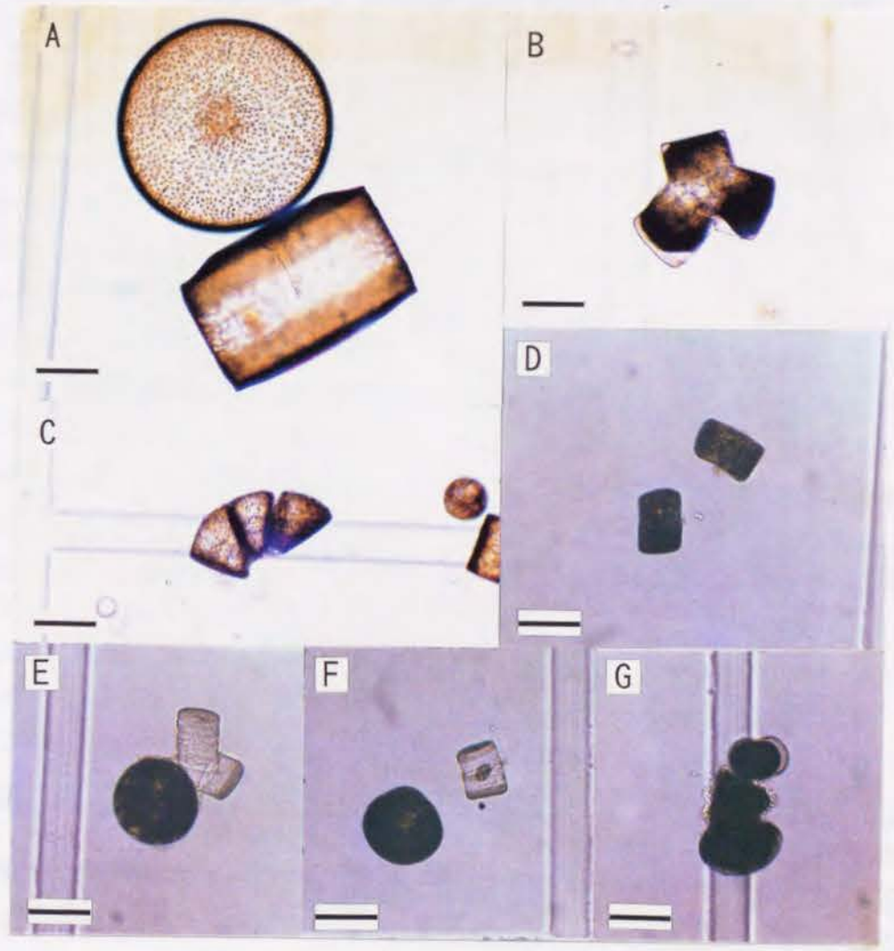


Fig. 3-2. Light microphotographs of vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran.
A, Normal vegetative cells; B ～ C : Abnormal cell division of small size cells; B, Dividing cell toward three directions; C, A dividing cell unstraight; D ～ F, Small cells in culture; D, Elongated small cells unable to divide; E ～ G, Extrication of protoplasts from their frustules. (Scale bars, 100 μ m)

植物プランクトン（珪藻類を含む）の細胞サイズと分裂速度の関係については、そのほとんどの研究は種間に関するものであり、一般に小型細胞は大きい表面積：体積比を持つため、大型種よりも栄養の吸収面に優り、分裂速度が大きいといわれている（Williams 1965, Werner 1970, Taguchi 1976, Banse 1976, Durbin 1977, Guillard & Kilham 1977, Chan 1978, Malone 1980, Mizuno 1991）。しかしながら、珪藻類の同一種内における細胞のサイズと分裂速度の関係は、種特異的である。例えば、*Thalassiosira nordenskioeldii* では分裂速度と細胞径の間には高い負の相関関係がある（Durbin 1977）。逆に、Costello & Chisholm（1981）および上野（1991）は、*Thalassiosira weissflogii*、*Skeletonema costatum* で、細胞サイズと分裂速度の間にそれぞれ正の相関が見られたと報告している。Paasche（197

Table 3-2. Division rates of various size clones of *Coscinodiscus wailesii* Gran under the conditions of a temperature of 22.5 ℃, with irradiance of 65 μ mol·m^{-2}·s^{-1}, on a 16h light and 8h dark photo-cycle in culture.

Valve diameter (μm)	Growth rate (μ : divisions•day^{-1})
100	1.201
150	1.723
200	1.497
250[A]	1.431
300	1.908
380[B]	1.319

B:a vegetative cell enlargement(see chapterⅢ)
strain formed from A(parent cell)

Table 3-3. Decreasing process of valve diameter during successive cell division in ideal centric diatom that obey "MacDonald & Pfitzer's rule".

Number of cell division	Number of each diameter											N	Average (μm)
	I	I-2W	I-2×2W	I-2×3W	I-2×4W	I-2×5W	I-2×6W	I-2×7W	I-2×8W	I-2×9W	I-2×10W		
0	1											1	500.0
1	1	1										2	498.5
2	1	2	1									4	497.0
3	1	3	3	1								8	495.5
4	1	4	6	4	1							16	494.0
5	1	5	10	10	5	1						32	492.5
6	1	6	15	20	15	6	1					64	491.0
7	1	7	21	35	35	21	7	1				128	489.5
8	1	8	28	56	70	56	28	8	1			256	488.0
9	1	9	36	84	126	126	84	36	9	1		512	486.5
10	1	10	45	120	210	256	210	120	45	10	1	1028	485.0

I:initial diameter(500.0μm), W:width of girdle(1.5μm)

3）は、*Ditylum brightwellii* や *Licmophora hyalina* では、ある大きさ（10～20μm）の間は殻径と分裂速度は正の関係を示すが、殻径がそれより大きくなると、逆に両者は負の直線関係を示すことを報じている。一方、Werner（1970, 1971）は、*Coscinodiscus asteromphalus*

の増殖速度は細胞のサイズによってほとんど変化しないことを示した。以上のような研究例から *C. wailesii* の細胞サイズと分裂速度の関係について考察するならば、殻径150～380μmまでの６つの異なる培養株を用いて細胞サイズと分裂速度の関係を調べたが、この内、殻径300μmの株の分裂速度が他より著しく高かった他は、特定の傾向は認められなかった。Gallagher（1980）は米国ナラガンセット湾から分離した *Skeletonema costatum* の多くの培養株について分裂速度を測定した結果、株間の差が大きかった結果から、単一クローン株の結果のみで個体群の分裂速度を論ずることに疑問を投げかけている。今後は、同一培養株から無性的増大胞子形成（遺伝的に全く変化しないと考えられている：後述）によって確立されたサブクローンを用いて、両者の関係を究明する必要があろう。

Table 3-3に、珪藻類の細胞分裂に伴って出現する細胞のサイズと、その細胞数や分裂毎の平均細胞径の関係（分裂様式）について示した。ｎ回分裂した後の細胞数の合計は2^n（細胞）と表すことができる。"MacDonald & Pfitzer's Rule"に従って分裂を繰り返す場合、回数が重なるにつれて、より小型でしかも大きさの異なった種々の娘細胞が現れる。細胞分裂と細胞形の関係は理論的には細胞経の減少により分裂速度に変化が生じなければ、以下のように考えられよう。すなわち、ｎ回分裂後の集団がもう１回分裂すると、それぞれの細胞は元の殻径のままの細胞と、それよりも２×被殻の厚さ（W）分小さい殻径をもつ細胞に分かれる。全体としては元の殻径をもった細胞群とそれぞれが２Wだけ小さい細胞群との集合体になる。元の殻径をもった細胞群およびそれぞれが２Wだけ小さい細胞群の平均細胞径をI_n, I_{n+1}とすると、$I_{n+1}=I_n-2W$ であり、全体の平均細胞径は（I_n+I_{n+1}）／２＝｛$I_n+(I_n-2W)$｝／２＝I_n-Wとなる。つまり、平均細胞径は１回分裂する毎にWずつ減少していくことになる。当然、細胞サイズのばらつき（標準偏差）も大きくなっていく。Table 3-3において、初期殻径（Ｉ）を500μmとし、10回分裂後の平均細胞が485μmであった場合、最初の集団の平均細胞径をI_0、ｋ回分裂後の平均細胞径をI_kとすると、$I_k=I_0-kW$となり、$W=(I_0-I_k)/k$の式で被殻の厚さ（W）、W＝1.5μmを導き出すことができる。それゆえ培養条件下において、実験開始時の平均細胞径、実験終了時の平均細胞径、およびその間の分裂回数を測定すれば、容易に被殻の厚さ（１回の分裂によって減少する殻径）を求めることが可能である。

C. wailesii の殻径（Ｉ）と被殻の厚さ（W）の関係をTable 3-2に示した実験結果より求め、Fig. 3-3に示した。今回実験に用いた培養株の被殻の厚さは0.96～1.28μmの範囲にあり、両者の間には$W=0.00097I+0.929$（$r=0.90$, $n=6$）の正の直線関係が認められた。この結果は、大型の細胞ほど被殻が厚く、小型化するに従い薄くなっていくことを示している。上野（1991）は、培養条件下において *Skeletonema costatum* の細胞分裂に伴う殻径の減少を調べた結果、12μm以上の大型細胞では0.126μm•division^{-1}、８μm以下の小型細胞では0.070μm•division^{-1}であり、小型化するに従い減少量が小さくなることを示した。この傾向は、*C. wailesii* で得られた結果と一致している。

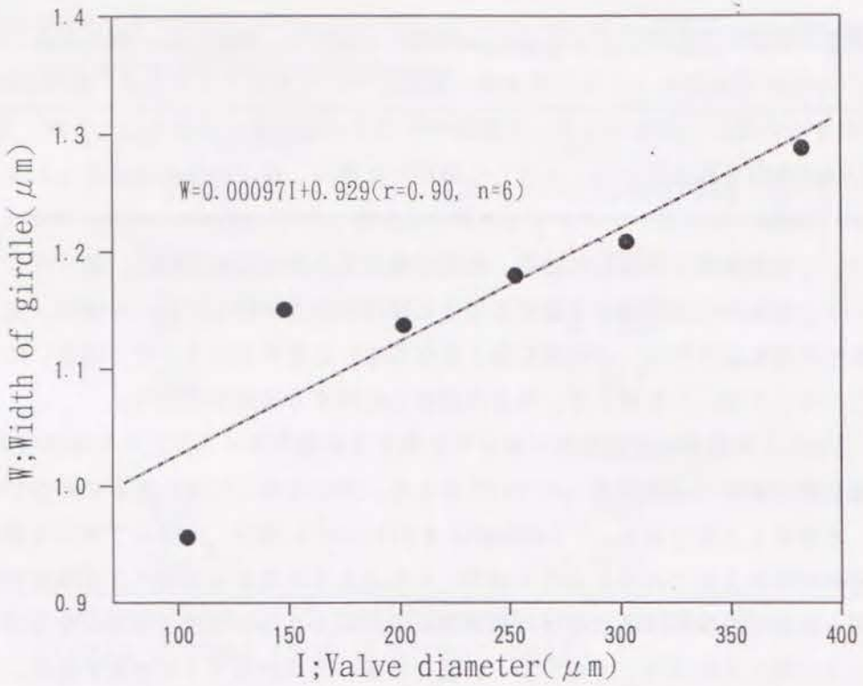


Fig. 3-3. Relationship between valve diameter and width of girdle in vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran.

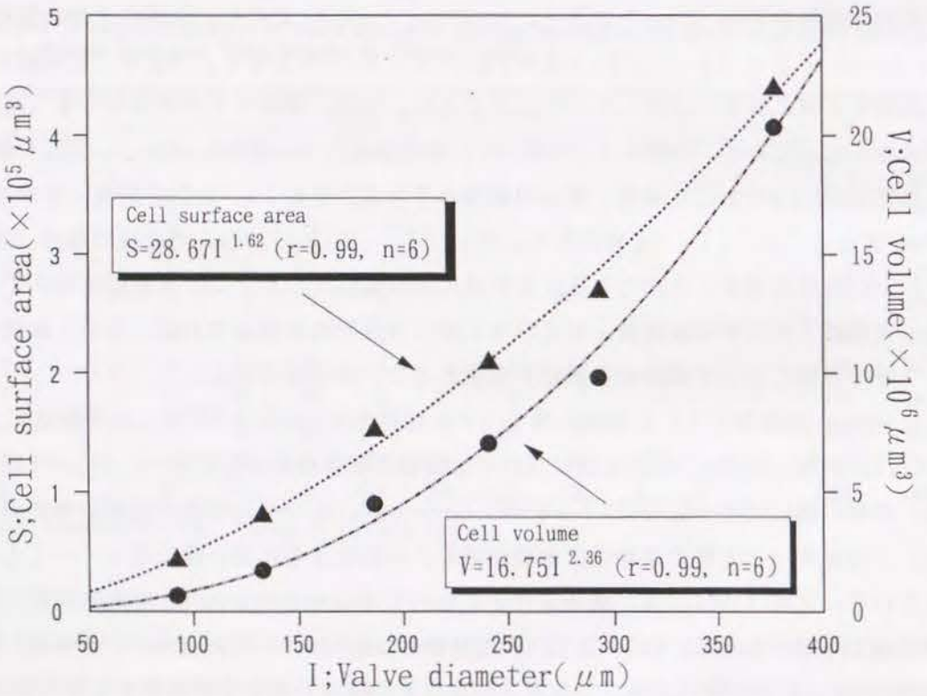


Fig. 3-4. Relationship between valve diameter and cell size in vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran. (▲ , cell surface area; ● , cell volume)

Fig. 3-4に、*C. wailesii* の殻径と表面積および体積の関係を示した。殻径（I）と表面積（S）および殻径（I）と体積（V）の間には、いずれも高い正のべき乗回帰の関係があった。今回実験に用いた *C. wailesii* の場合、表面積および体積は、それぞれ4.3×10^{4}～$4.4\times10^{5}\,\mu m^{2}$、$6.7\times10^{5}$～$2.0\times10^{7}\,\mu m^{3}$の範囲にあった。殻径（I）と表面積（S）、ならびに体積（V）の間の関係は、それぞれ、$S=28.67\,I^{1.62}$（$r=0.99$, $n=6$）、$V=16.75\,I^{2.36}$（$r=0.99$, $n=6$）の式で表すことができた。

Fig. 3-5に、*C. wailesii* の殻径（I）と表面積／体積（S／V）の関係を示した。今回の実験において、S／Vは2.2×10^{-2}～6.3×10^{-2}の範囲にあり、小型の細胞ほど大きな値を示した。両者の間には、$S/V=1.64\,I^{-0.73}$（$r=0.99$, $n=6$）の負のべき乗回帰の関係のあることが判った。この結果は、培養細胞が大型になるほど殻径に対して殻高が小さくなることを示している。またこの値は、Taguchi（1976）が *Coscinodiscus centralis* において示した5.6～9.7×10^{-2}に比べ、若干小さい。これは *C. centralis* に比べ、*C. wailesii* の方が、殻径に対する殻高が大きいことを示すものである。

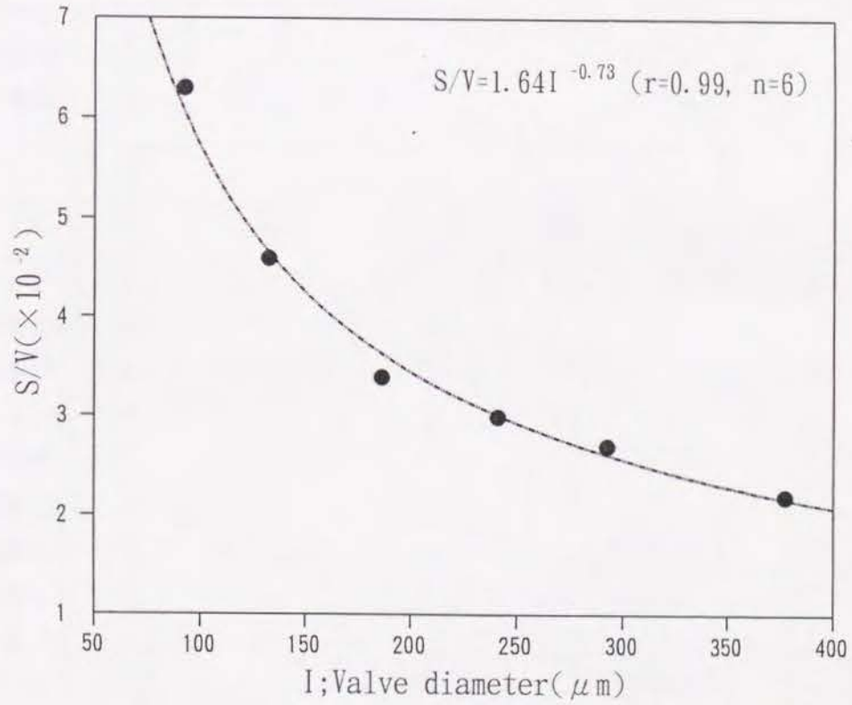


Fig. 3-5. Relationship between valve diameter and S/V (cell surface area/cell volume) in vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran.

Fig. 3-6に、播磨灘から採集された天然の *C. wailesii* の光学顕微鏡写真を示した。現場水域において採集された分裂直前の栄養細胞の環帯面（Girdle view)は、ほぼ正方形である(A，B）。Aには、培養条件下で殻高を測定したものとほぼ同一のステージにある栄養細胞を示した（細胞版が形成されている）。栄養細胞Bの殻径および殻高は437.5，415.0

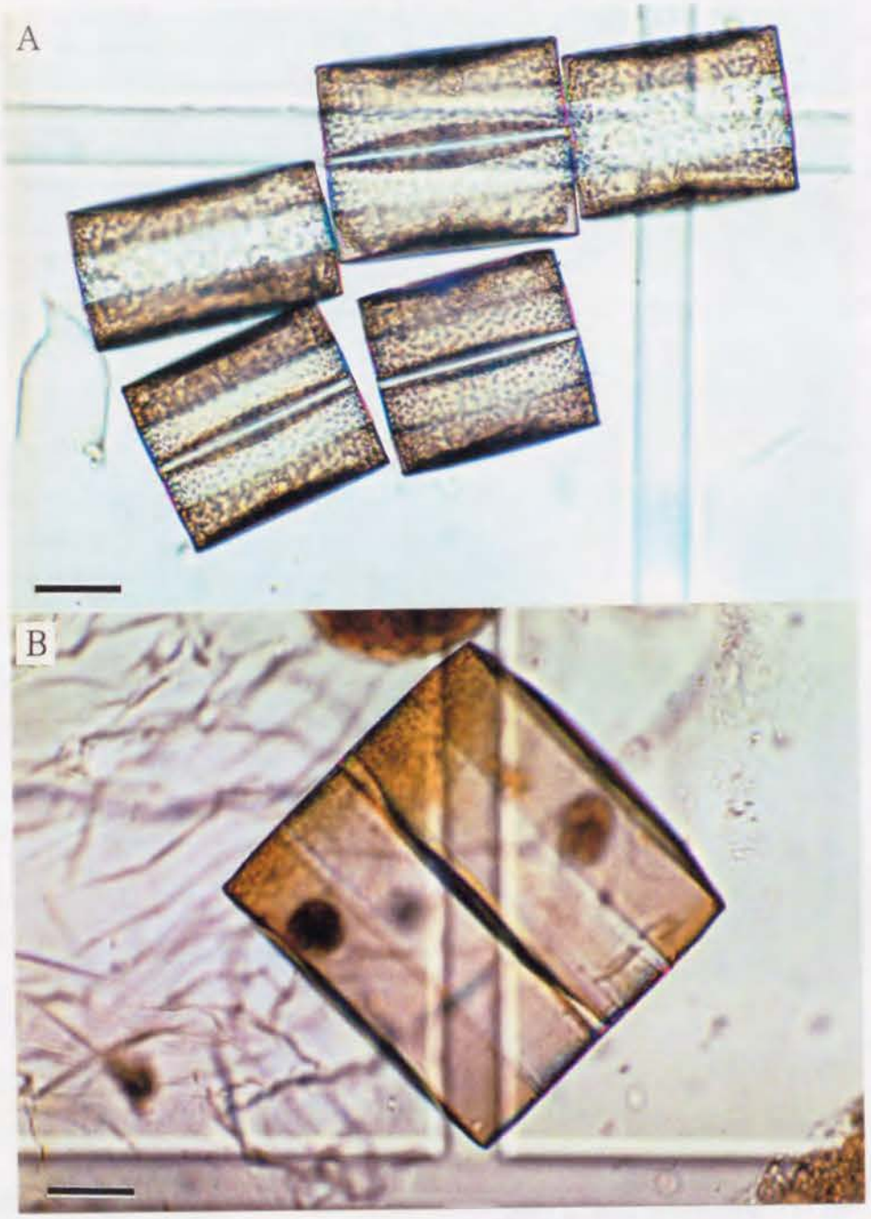


Fig. 3-6. Light microphotographs of vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran. A, Vegetative cells collected by vertical towing of a plankton net in Harima-Nada; B, A typical square cell (girdle view). (Scale bars A, 250 μ m; B, 100 μ m)

μmであり、細胞の表面積、体積およびS/V比はそれぞれ$8.7\times10^{5}\,\mu m^{2}$、$6.2\times10^{7}\,\mu m^{3}$および$1.4\times10^{-2}$であった。培養株において得られた表面積および体積を求める式に、殻径437.5μmを代入して得られた表面積および体積は、それぞれ$5.4\times10^{5}\,\mu m^{2}$、$2.9\times10^{7}\,\mu m^{3}$であり、現場水域で採集された栄養細胞に比べ、表面積および体積でそれぞれ0.46、0.63倍と小さい値になった。今回測定した天然の *C. wailesii* 栄養細胞の数が少なかったにしろ、室内培養条件下で *C. wailesii* を培養すると現場水域で見られる栄養細胞に比べ、大型細胞ほど殻径に対する殻高の比の小さくなることが示唆された。この原因については不明であった。

第２項　簡易無菌化法によるクローン培養株の確立

培養条件下において、植物プランクトンの生理・生態学的研究を行う上で、無菌クローン株の確立は、最も基本的かつ重要なテクニックである。しかし、従来から用いられてきたマイクロピペット洗浄法（Pringsheim 1946, Droop 1954, 岩崎 1967）は、極めて多くの労力とテクニックを必要とするため（左子ほか 1992）、簡易な植物プランクトンの無菌化法の考案が望まれてきた。本項では、*C. wailesii* の比較的迅速かつ簡易な大量無菌クローン株の作成方法を考案したので述べる。

材料および方法

Fig. 3-7に、大量無菌クローン培養株を確立する目的で考案した簡易無菌クローン株の作成方法の概略を示した。方法は、①ディスポーザブルシャーレ（90×20mm：ニッスイ製）20枚を10枚ずつ横２列に並べ、各シャーレに濾過滅菌海水を50～60*ml*ずつ入れた。このうち１，４，７，および10枚目にはＡＭ９原液（Provasoli et al. 1959）を濾過滅菌海水に対してそれぞれ20倍希釈になるよう、17枚目には５倍希釈になるよう添加した。②ナイロン製篩（目合 100μm）に採集した *C. wailesii* を約50細胞収容し、１番から順に *C. wailesii* を洗浄した。各シャーレでの洗浄時間は10～30秒で、細胞が壊れない程度の適当な激しさで洗浄した。17枚目では約60秒間浸漬した。③20枚目まで洗浄後、倒立顕微鏡下、*C. wailesii* を１細胞ずつマイクロピペット（100μ*l*容）により、１穴当たり濾過滅菌海水7.5*ml*を入れた６穴プレート（Falcon製）に少数ずつ接種し、極微量の海水とともに次の穴（２～３穴）へ移すことにより、さらに洗浄した。そして、ＭＰ１液を1.3*ml*ずつ入れた48穴プレートに１細胞ずつ接種し、温度20℃、光強度45$\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$、明暗周期８hL／16hDの条件下で培養した。④１週間後、無菌化の判定は、*C. wailesii* を接種した培養液の一部をＳＴ10^{-1}(Ishida et al. 1980）液体培地に添加することにより、その白濁の有無を基準に

行った。また、光学顕微鏡下で全検体について、光学顕微鏡下で無菌と判定された内の3～5検体を、アクリジン・オレンジ染色（飯田ほか 1989）後に蛍光顕微鏡下で細菌の存在の有無を確認した。

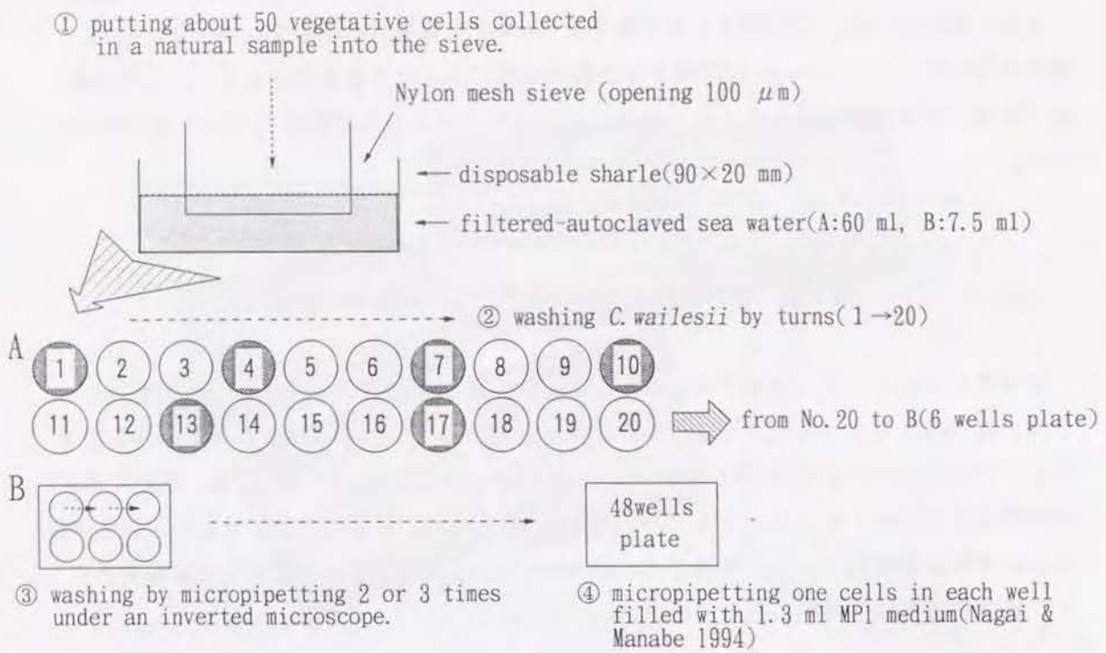


Fig. 3-7. Procedure of the method for establishing axenic clonal cultures of *Coscinodiscus wailesii* Gran. Sharle numbers 1, 4, 7, 10, and 13, diluted to 20 times solutions of AM9 (Provasoli et al. 1959) antibiotic medium; Sharle number 20, diluted to 5 times solution of the medium.

結果および考察

Table 3-4に簡易無菌化法（Fig. 3-7）による *C. wailesii* の無菌化率（無菌化された細胞数÷無菌化に用いた全細胞数×100(%)）を示した。実験1～4の結果は、*C. wailesii* を含む海水を採集後、ＭＰ１液をわずかに添加し２～３日放置した後に無菌化を実施した場合、実験５～13の結果は、採集後すぐに無菌化を実施した場合である。採集後２～３日放置した後に無菌化を実施した場合、採集後すぐに無菌化を実施した場合に比べて無菌化率は極端に低下した。ＭＰ１液中で *C. wailesii* を培養した場合、細菌が混じっていると細菌の増殖により白濁することがしばしば観察される。従って、無菌化率の低下原因は、ＭＰ１液の添加および２～３日の放置により、海水中の細菌数が増加し、篩による洗浄や抗生物質溶液での浸漬でも *C. wailesii* 細胞表面に付着した細菌群を除去することがより困難になるためと考えられる。一方、実験５では、６穴プレートによるピペット洗浄を実施しなかったが、98細胞中の96細胞（98%）を無菌にできたこと、無菌化処理が３時間以内に終了したことから、本簡易法により比較的迅速で、かつ疲労しない大量の *C. wailesii* 無菌クローン株の確立が可能であることが判明した。しかし、本法は、篩による洗浄操作をするため、細胞が壊れやすい無殻渦鞭毛藻やラフィド藻に対しては不向きであろう。最近になり、Imai & Yamaguchi（1994）は、渦鞭毛藻およびラフィド藻類の走光性および浮上性を利用した簡易な無菌化法を考案している。今後、彼らの考案した方法を組み合わせることなどにより、多くの植物プランクトンの簡易な無菌化が可能になると考えられる。

Table 3-4. Rates of the established axenic clonal cultures of *Coscinodiscus wailesii* Gran by the method shown in Fig.3-7. Experiment numbers 1 ～ 4, the cells were tried to establish axenic clonal cultures after 2 or 3 days incubation in the MP1 medium under an adequate condition from collected natural samples; Experiment numbers 5 ～ 13, the cells were tried to establish axenic clonal cultures from collected natural samples immediately.

Number of experiment	Number of picked up cells	Number of axenic clones	Rate of axenic clones (%)
1	22	5	23
2	25	7	28
3	18	8	44
4	30	10	33
5*	98	96	97
6	24	19	79
7	44	40	91
8	24	21	88
9	11	8	73
10	47	41	87
11	42	41	98
12	12	8	67
13	47	43	91
Total	444	347	78

*: In experiment 5, washing of the 98 cells were not done by micropipetting using B(6 wells plate) shown in Fig. 3-7.

第３項　増大胞子形成条件の解明

珪藻類における大きさの回復は、増大胞子の形成を通じて行われることは古くから知られている（例えば、Schütt 1893, Gross 1937）。増大胞子形成は有性生殖と無性生殖を経て生じる場合が報告されている(例えば、Geitler 1932, Stosch 1950, Gallagher 1983)。珪藻の有性生殖に関しては、羽状目の珪藻では古くから研究されており（Geitler1932）、一部を除き、ほとんどが不動胞子による同形配偶（isogamy）であることが明らかにされて

いる。中心目においては長い間不明で、増大胞子は無性的に形成されると考えられていた（Drebes 1977）。珪藻の有性生殖の方法は、細かく分けると非常に複雑であるが、大別して二通りある。中心目では異形配偶（anisogamy）による卵子生殖（oogamy）であり、中心目の有性生殖が卵子生殖であることは、Stosch（1950）によって、*Melosira varians* で初めて発見されて以来、多くの種類で報告されてきた。いずれの場合も、有性生殖を通じて、増大胞子が形成され、それが初生細胞と呼ばれる被殻を持つ大きな細胞となる。それゆえ珪藻の有性生殖は、遺伝子の交換といった一般的な遺伝学的意義のほかに、細胞の大きさの回復という重要な意味も持つことになる（出井・千原 1991）。これら増大胞子の形成は特殊な環境条件下でしか起こらず、これまで多くの研究者により、増大胞子形成を誘起する条件が検討されてきた。大きさの回復に関係する生活環を解明するためには、まず、*C. wailesii* が増大胞子を形成する条件を検討する必要がある。珪藻類の天然個体群における大きさの回復は、細胞サイズが小さくなりすぎると死滅せざるを得ない珪藻類の宿命から考えると、非常に重要であることは十分予想される。このため培養条件下における増大胞子形成の条件解明は、天然個体群の大きさの回復過程を把握する上で必要不可欠であると考えられる。そこで本項においては、栄養細胞の有性化ならびに無性生殖的に生じる増大胞子形成条件の検討を行った。

これまで多くの研究者により明らかにされた、珪藻類の増大胞子形成を誘起する培養条

Table 3-5. Conditions inducing cell size restoration (sexual reproduction or vegetative cell enlargement) of diatoms reported by different researchers.

Species	Temperature (℃)	Light intensity	Light/dark photo cycle	Nutrients	Salinity	Sourse
Bacteriastrum hyalinum				+		Drebes(1967)
Chaetoceros constrictus	+					Drebes(1977)
C. curvisetum			+			Furnas(1985)
C. decipens	+					Drebes(1977)
C. diadema	+					French & Hargraves(1985)
Cocconeis scutellum			+	+		Mizuno & Okuda(1985)
Corethron criophilum		+				Crawford(1995)
Coscinodiscus concinnus	+	+	+			Holmes(1966)
C. asteromphalus	+	+		+		Werner(1971c)
Cyclotella meneghiniana					+	Shultz & Trainor(1968, 1970)
C. cryptica					+	Shultz & Trainor(1968, 1970)
Ditylum brightwellii				+		Gross(1937)
D. brightwellii				+		Gross(1939a)
D. brightwellii				+		Steele(1965)
Leptocylindrus danicus	+			+		French & Hargraves(1985)
Melosira nummuloides		+		+		Bruckmayer-Berkenbusch(1954)
M. moniliformis	+	+				Migita(1967a)
M. moniliformis					+	Idei & Chihara(1992)
M. sp.	+					Mizuno(1977)
Skeletonema costatum	+	+				Migita(1967b)
S. costatum				+		Davis et al.(1973)
S. costatum				+		Gallagher(1983)
Stephanopyxis palmeriana		+	+			Steele(1965)
S. palmeriana	+	+	+			Drebes(1966)
S. turris	+	+	+			Drebes(1964)
S. turris		+				Stosch & Drebes(1964)
Thlassiosira eccentrica		+				Schmid(1984)
T. weissflogii			+			Vaulot et al.(1986)
T. weissflogii			+			Vaulot & Chisholm(1987)
T. weissflogii		+	+			Armbrust et al.(1990)

+ : effective for inducing sexual reproduction or vegetative cell enlargement

件をまとめ、Table 3-5に示した。*Stephanopyxis* 属のいくつかの種では、有性生殖を誘起させるために、低温，弱光条件での培養を、高温，強光条件に移すことが有効であると報告されている（Drebes 1964, Stosch & Drebes 1964, Drebes 1966）。また、Holmes(1966)は、*Coscinodiscus concinnus* で64組にわたって、明暗周期、温度および光量の組合せ実験を行い、有性生殖が生じる条件を調べた。一方、Davis et al.(1973)やGallagher(1983)は、*Skeletonema costatum* の栄養細胞を栄養の欠乏状態から新しい通常の培養液に接種することで、増大胞子形成を誘起できることを報告した。今回は、Drebes（1964）、Holmes（1966）、およびGallagher（1983）の方法を参考にし、本種の増大胞子形成を誘起する培養条件について検討を加えた。

材料および方法

1．増大胞子形成条件の検討

実験Ⅰとして、培養実験は光強度、明暗周期、温度、および培養日数を種々組み合わせ、計54通りの条件で実施し、その組み合わせ条件をTable 3-6に示した。培養にはPyrex製50 *ml* 容三角フラスコを用い、これにＭＰ１液35*ml* を分注し、50±10細胞の *C. wailesii*（殻径150～300 μm）を接種して培養実験を開始した。増大胞子形成の有無の確認は、培養実験終了後、光学顕微鏡観察により行った。（増大胞子＋初生細胞）÷（全細胞）×100＝増大胞子形成率（%）を求め、それぞれの実験条件について増大胞子形成の程度を評価した。なお、実験区30以降の実験については、暗黒条件で培養する直前の増殖ステージが後期対数増殖期になるよう、各実験区毎に *C. wailesii* 接種細胞数を調節した。

次に、増大胞子形成における栄養塩および光の影響をさらに詳細にみるため、20℃の温度条件下、明暗周期を８hL/16hDおよび16hL/８hDの２段階、それぞれ光強度を25～110 μ mol$\cdot$m$^{-2}\cdot$s^{-1}の５段階設け（実験は各条件毎にフラスコ７本ずつ実施した）、30日間培養した後（栄養塩が枯渇した状態）、各フラスコ内の *C. wailesii* 栄養細胞を約100細胞（0.5*ml*）を新しいＭＰ１液（40*ml*）の入った各フラスコに添加した。引き続いて同一条件下で培養を行い、10日後に増大胞子形成率（上述の式）を調べた。

実験Ⅱとして、Table 3-6に示した実験条件の内、増大胞子の形成が比較的高頻度であった条件を基本形として、さらにより高頻度に増大胞子の形成が生じる条件を検討した。その実験条件をTable 3-7に示した。実験結果の比較方法は、Table 3-6で行ったものと同じである。ここでは特に培養温度と暗黒条件下での培養日数に変化を与えた。温度15°、25℃で行った実験については、それぞれの温度で３週間の温度馴致を事前に行った。また暗黒条件下で培養する直前には、増殖ステージが後期対数増殖期になるよう、各実験条件毎に *C. wailesii* 接種細胞数を調節した。

実験Ⅲとして、増大胞子形成に及ぼす塩分の影響を調べるため、Table 3-7に示した実験

区77を培養の基本形とし、塩分を15、20、25、30、および35の５段階設定した。実験は、各塩分における３週間の事前馴致の後実施し、実験終了後に実験区毎の増大胞子形成率を求めた。

なお、本項において実施した増大胞子形成実験には、無菌培養 LA2株、およびそのサブクローン株（LA2株から無性的増大胞子の形成により生じた株）を用いた。

結果および考察

C. wailesii における増大胞子形成条件を検討した結果をTable 3-6に示した。増大胞子の形成は、実験区１～14では認められなかった。この結果から、本種の増大胞子形成には、10℃から20℃への昇温が有効であることが判明した。光条件の影響についてみると、実験区15と16の結果から、光強度70 μmol・m^{-2}・s^{-1}（Condition Ⅰ）→ dark（Condition Ⅱ）→ 70 μmol・m^{-2}・s^{-1}（Condition Ⅲ）と変化させると、10℃でもわずかながら増大胞子を形成することが判った。この結果と実験区28～54の結果から、本種の増大胞子形成には、強光から暗黒、暗黒から強光条件への移行という劇的な光強度の変化が効果的であることが判明した。一方、実験区28と29のように暗黒条件に移行する前の培養期間が長すぎると、増大胞子形成率は著しく低下した。この結果は、栄養塩が枯渇した状態では増大胞子形成が起こらないことを示している。従って、増大胞子の形成にはある程度の栄養塩濃度が必要であることが明らかとなった。また、実験区30～42と実験区43～54の結果から、暗黒条件に移行する前の温度20℃での培養期間が長いほど（Condition Ⅱ）、増大胞子形成率の平均値は高くなる傾向にあった。最大値は実験区32および35で、85.0％の値が得られた。

Fig. 3-8に、最大値が得られた時（実験区32）の初生細胞および母細胞（栄養細胞）の光学顕微鏡写真を示した。ほとんどの母細胞が大きさを回復した。しかしながら、最高の形成率が得られた実験区でも、フラスコ間の形成率のばらつきは比較的大きかった。実験区28および29の結果において、本種の栄養的増大には十分な栄養塩が必要であったことから考えて、他の多くの実験区（例えば、実験区31, 32, 35, 36など）において同一条件下での形成率がばらついた原因の一つとして、増大胞子形成が起こり始める時点でのフラスコ毎の栄養塩の濃度差、すなわち、実験を始めた時点での細胞の接種量が若干異なったことにより、フラスコ内で増殖した細胞数が異なり、栄養塩濃度が変化したという可能性が考えられる。

Table 3-8に、増大胞子形成に及ぼす栄養塩および光（光強度および明暗周期）の影響について検討した結果を示した。増大胞子形成率は平均で5.6～10.1％の範囲にあり、今回設定した光条件下では光強度や明暗周期による大きな差異は認められなかった。*C. wailesii* は、栄養塩の枯渇した培養液中から新しい培養液に接種することによって、形成率は高くはないが、増大胞子を形成することが判った。

Table 3-6. Effects of temperature, irradiance and light and dark photo cycle on sexual reproduction or vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture.

Condition group	I					II					III					IV					Auxospore formations				
Experiment Number	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*	Average (%)	Standard deviation	Minimum (%)	Maximum (%)	Number
1	7~9	10	12/12	35	7	10	12/12	70									0.0	0.0	0.0	0.0	10
2	7~9	10	12/12	35	7	10	12/12	100									0.0	0.0	0.0	0.0	10
3	7~9	10	12/12	70	7	10	12/12	35									0.0	0.0	0.0	0.0	10
4	7~9	10	12/12	35	7	10	8/16	35									0.0	0.0	0.0	0.0	10
5	7~9	10	12/12	70	7	10	8/16	70									0.0	0.0	0.0	0.0	10
6	7~9	10	12/12	35	7	10	8/16	70									0.0	0.0	0.0	0.0	10
7	7~9	10	12/12	70	7	10	8/16	35									0.0	0.0	0.0	0.0	10
8	5~7	20	8/16	25	7	20	8/16	90									0.0	0.0	0.0	0.0	7
9	5~7	20	8/16	90	7	20	8/16	25									0.0	0.0	0.0	0.0	7
10	5~7	20	16/8	25	7	20	16/8	90									0.0	0.0	0.0	0.0	7
11	5~7	20	16/8	90	7	20	16/8	25									0.0	0.0	0.0	0.0	7
12	5~7	20	8/16	45	7	20	16/8	45									0.0	0.0	0.0	0.0	7
13	5~7	20	16/8	45	7	20	8/16	45									0.0	0.0	0.0	0.0	7
14	7~9	10	12/12	70	3	10							7	10	8/16	35	0.0	0.0	0.0	0.0	10
15	7~9	10	12/12	70	3	10							7	10	8/16	70	0.0	0.0	0.0	0.0	7
16	7~9	10	8/16	25	7	20	8/16	25									2.4	3.2	0.0	8.8	7
17	7~9	10	8/16	45	7	20	8/16	45									3.2	2.6	0.0	4.8	7
18	7~9	10	8/16	70	7	20	8/16	70									2.4	3.2	0.0	8.7	7
19	7~9	10	8/16	90	7	20	8/16	90									3.0	2.5	0.0	7.9	7
20	7~9	10	8/16	110	7	20	8/16	110									1.8	2.8	0.0	5.4	7
21	7~9	10	12/12	35	7	20	12/12	35									0.9	0.8	0.0	2.3	7
22	7~9	10	12/12	70	7	20	12/12	70									0.7	1.1	0.0	3.2	7
23	7~9	10	16/8	25	7	20	16/8	25									2.2	3.5	0.0	8.0	7
24	7~9	10	16/8	45	7	20	16/8	45									1.5	2.1	0.0	5.4	7
25	7~9	10	16/8	70	7	20	16/8	70									3.6	3.4	0.0	8.1	7
26	7~9	10	16/8	90	7	20	16/8	90									3.2	2.6	0.0	6.7	7
27	7~9	10	16/8	110	7	20	16/8	110									1.1	1.2	0.0	3.5	7
28	7~9	10	12/12	35	15	20	8/16	45									7.2	8.1	0.5	20.0	3
29	7~9	10	12/12	35	30	20	8/16	45									16.7	12.5	2.0	32.0	3
30	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	45									8.8	11.4	0.5	25.0	3
31	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	90									4.2	6.1	0.0	18.1	7
32	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	90									6.9	11.2	0.0	34.0	7
33	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	120									25.0	19.3	5.0	63.7	9
34	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	45									28.6	17.6	5.0	74.0	17
35	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	90									32.2	19.3	5.0	63.7	9
36	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	120									25.0	8.1	0.0	25.0	13
37	7~9	10	12/12	35	3	20	16/8	20									7.2	8.1	0.5	20.0	3
38	7~9	10	12/12	35	3	20	16/8	65									16.7	12.5	2.0	32.0	3
39	7~9	10	12/12	35	3	20	16/8	120									8.8	11.4	0.5	25.0	3
40	7~9	10	12/12	35	3	20	16/8	70									4.2	6.1	0.0	18.1	7
41	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	35									6.9	11.2	0.0	34.0	7
42	7~9	10	12/12	35	3	20	8/16	25~35									32.2	19.3	5.0	63.7	9
43	2~4	10	12/12	35	7~9	20	8/16	25~35									28.6	17.6	5.0	74.0	17
44	2~4	10	12/12	35	7~9	20	8/16	65									32.2	19.3	5.0	63.7	9
45	2~4	10	12/12	35	7~9	20	8/16	100									40.7	11.5	21.0	62.1	11
46	2~4	10	12/12	35	7~9	20	8/16	45									28.5	14.0	9.0	49.0	6
47	2~4	10	12/12	35	7~9	20	8/16	65									27.8	18.4	5.0	62.0	6
48	2~4	10	12/12	35	7~9	20	8/16	120									24.5	17.3	5.0	50.0	4
49	2~4	10	12/12	35	7~9	20	16/8	25									21.0	11.0	10.0	32.0	2
50	2~4	10	12/12	35	7~9	20	16/8	65									30.9	27.2	3.7	58.0	2
51	2~4	10	12/12	35	7~9	20	16/8	120									6.5	3.6	2.9	10.0	2
52	2~4	10	12/12	35	7~9	20	24/0	25~35									42.6	11.0	31.2	60.3	5
53	2~4	10	12/12	35	7~9	20	24/0	65									38.2	10.9	24.0	65.5	11
54	2~4	10	12/12	35	7~9	20	24/0	100									35.5	14.8	16.0	70.1	11

*：μmol・m^{-2}・s^{-1}

なお、以上の実験において、増大胞子の形成と明暗周期の関係については明瞭な関係は認められなかった。

Fig. 3-9に、Table 3-7に示した条件で増大胞子の形成実験を行った結果を示した。25℃以外の温度条件下では暗黒条件下での培養日数の違いにより、増大胞子形成率は大きく異

Table 3-7. Conditions of inducing sexual reproduction or vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus* wailesii Gran in culture.

Condition group			I				II				III				IV	
Experiment number	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*	Incubation time (days)	Temperature (℃)	Light/dark photo cycle	Irradiance*
55	7~9	10	12/12	45	2	10		0	7	10	12/12	45				
56	7~9	10	12/12	45	4	10		0	7	10	12/12	45				
57	7~9	10	12/12	45	7	10		0	7	10	12/12	45				
58	7~9	10	12/12	45	11	10		0	7	10	12/12	45				
59	7~9	10	12/12	45	14	10		0	7	10	12/12	45				
60	7~9	15	12/12	45	2	15		0	7	15	12/12	45				
61	7~9	15	12/12	45	4	15		0	7	15	12/12	45				
62	7~9	15	12/12	45	7	15		0	7	15	12/12	45				
63	7~9	15	12/12	45	11	15		0	7	15	12/12	45				
64	7~9	15	12/12	45	14	15		0	7	15	12/12	45				
65	7~9	10	12/12	45	2	20	12/12	45	2	20		0	7	20	12/12	45
66	7~9	10	12/12	45	2	20	12/12	45	4	20		0	7	20	12/12	45
67	7~9	10	12/12	45	2	20	12/12	45	7	20		0	7	20	12/12	45
68	7~9	10	12/12	45	2	20	12/12	45	11	20		0	7	20	12/12	45
69	7~9	10	12/12	45	2	20	12/12	45	14	20		0	7	20	12/12	45
70	2~3	10	12/12	45	8	20	12/12	45	2	20		0	7	20	12/12	45
71	2~3	10	12/12	45	8	20	12/12	45	4	20		0	7	20	12/12	45
72	2~3	10	12/12	45	8	20	12/12	45	7	20		0	7	20	12/12	45
73	2~3	10	12/12	45	8	20	12/12	45	11	20		0	7	20	12/12	45
74	2~3	10	12/12	45	8	20	12/12	45	14	20		0	7	20	12/12	45
75	2~3	10	12/12	45	9	20	12/12	45	2	20		0	7	20	12/12	45
76	2~3	10	12/12	45	9	20	12/12	45	4	20		0	7	20	12/12	45
77	2~3	10	12/12	45	9	20	12/12	45	7	20		0	7	20	12/12	45
78	2~3	10	12/12	45	9	20	12/12	45	11	20		0	7	20	12/12	45
79	2~3	10	12/12	45	9	20	12/12	45	14	20		0	7	20	12/12	45
80	7~9	25	12/12	45	2	25		0	7	25	12/12	45				
81	7~9	25	12/12	45	4	25		0	7	25	12/12	45				
82	7~9	25	12/12	45	7	25		0	7	25	12/12	45				
83	7~9	25	12/12	45	11	25		0	7	25	12/12	45				
84	7~9	25	12/12	45	14	25		0	7	25	12/12	45				

* : $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$



Fig. 3-8. Cell size restoration through auxospore formation or vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* Gran under the condition of test 35(Table 3-6). 85% of parent cells turned into initial cells in the experiment. Left arrow shows a parent cell and upper right arrow shows a initial cell. (Scale bar, 250 μ m)

Table 3-8. Effect of nutrients on auxospore formation or vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* Gran. Cultures were incubated for 30 days until cells grew old at 20 ℃ under the light conditions described below and reinoculated into the new medium. Observation was made after 10 days incubation in each condition from when the cultures were reinoculated into the medium.

irradiance**	Sample Number	Average (%)		Standard deviation (%)		Minimum (%)		Maximum (%)	
		8hL/16hD*	16hL/8hD*	8hL/16hD	16hL/8hD	8hL/16hD	16hL/8hD	8hL/16hD	16hL/8hD
25	7	9.4	5.6	4.9	3.5	1.9	0.0	17.0	8.8
45	7	8.4	6.5	5.6	4.0	2.0	2.6	18.5	14.6
70	7	10.1	5.8	5.4	4.5	1.6	0.0	17.0	11.7
90	7	7.2	7.1	5.2	4.5	1.7	0.0	16.4	15.7
110	7	5.6	5.6	3.4	3.1	1.2	1.5	11.3	10.0

*:Light and dark photo cycle, **: $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

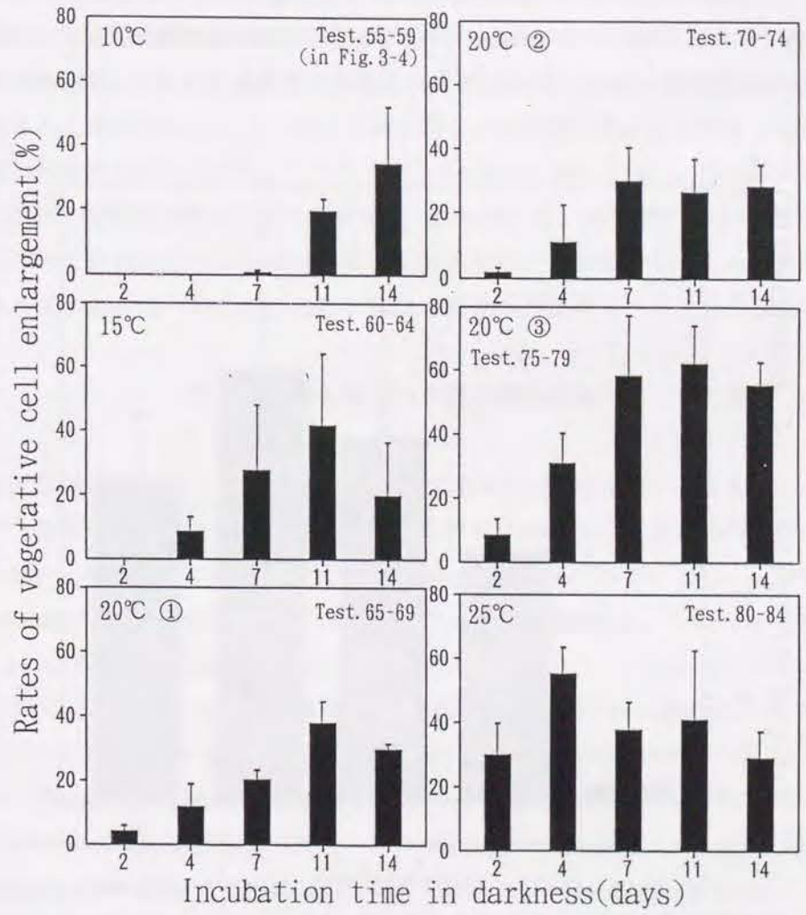


Fig. 3-9. Effects of temperature and incubation days in darkness on auxospore formation or vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture under the conditions shown in Table 3-7.

なった。すなわち、10℃では暗黒条件下での培養日数が14日、15℃では11日、20℃では7～11日、25℃では4日で最も高く、培養温度が高くなるほど暗黒化で必要な日数が短くなる傾向が認められた。よって、本種の増大胞子形成には暗黒条件下における培養日数が非常に重要な意味を持つことが明らかとなった。また、実験区65～79（Table 3-7）において、10℃から20℃に昇温した後、暗黒条件下に移行するまでの培養日数が2および6日間に比べて9日間の方が増大胞子形成率は高くなった。この結果は、実験区30～42と実験区43～54の結果（Table 3-6）において、暗黒条件に移行する前の20℃での培養期間が長いほど（中期から後期対数増殖期に達するまでの間）、増大胞子形成率が高くなる傾向にあったことと一致しており、このことは10℃から20℃への昇温効果があるというより、むしろ増大胞子形成に適した温度のあることを示唆していると考えられる。

Fig. 3-10に、実験区44を培養の基本形として、増大胞子形成に及ぼす塩分の効果について調べた結果を示した。設定したすべての塩分条件下で増大胞子の形成を観察することができた。しかし、塩分15では増大胞子形成率が1.6%と、塩分20以上に比べて著しく低かった。塩分30では増大胞子形成率が40%を上回っており、本種の増大胞子形成における最適塩分は30前後にあると考えられ、塩分も増大胞子形成に影響を与えることが示唆された。

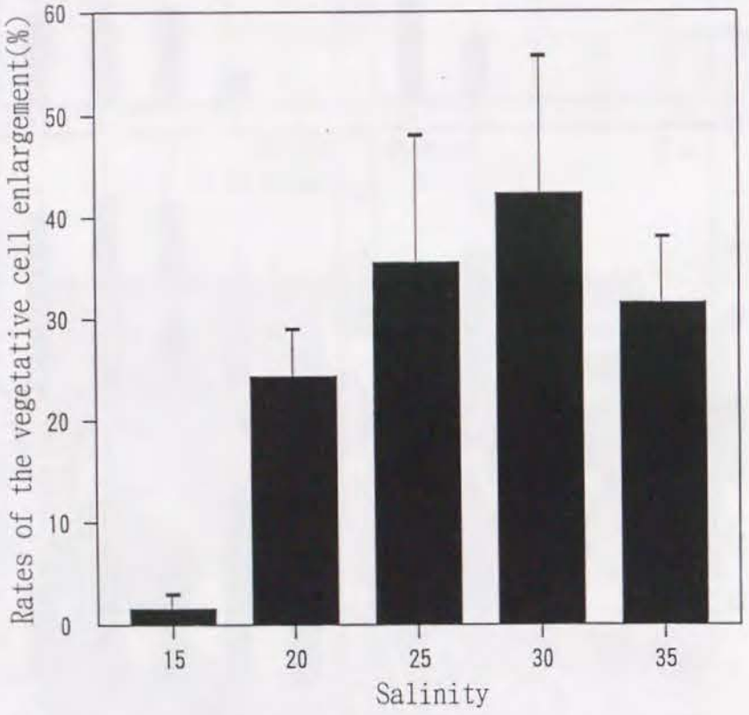


Fig. 3-10. Effect of salinity on auxospore formation or vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* Gran under the conditions of the test 44 (Table 3-6).

以上得られた結果から、光・温度・栄養塩濃度、塩分およびそれらの変化と培養日数を組み合わせることによって、多くの組み合わせ培養条件下で *C. wailesii* の増大胞子形成を誘起できることが判明した。中でも、本種の増大胞子形成における最適な条件は、塩分30前後、温度20℃の条件下で栄養細胞を後期対数増殖期まで培養した後、暗黒条件下で7～11日培養し、光強度20 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 以上（明暗周期は影響しない）の光条件下で培養することであった。しかしながら、10～25℃の広い温度条件下では暗黒条件下での培養期間をTable 3-7に示したように調節すると、増大胞子形成を高頻度で誘起できることが判った。

Table 3-6～3-8およびFigs. 3-9, 10に示した全実験区のサンプルを光学顕微鏡下で観察した結果、実験区42（Table 3-6）でのみ造精細胞および造卵細胞と思われる細胞をわずかながら観察することができた。実験区42以外の条件下では、増大胞子形成は観察されたが、造精細胞および造卵細胞と思われる細胞は全く観察されなかったことから、ほとんどの実験区で観察された球形細胞は無性的に形成された増大胞子である可能性が大きい。

これまで多くの種類で、有性生殖による増大胞子形成を誘起する方法が検討されてきたが（Table 3-5）、これまで明らかとなった *Stephnopyxis* 属（Stosch 1965）、*Skeletonema costatum*（Gallagher 1983）、および *C. wailesii*（本研究）において、無性的な増大胞子形成が誘起される条件から考えて、有性生殖を通じた増大胞子形成を誘起する培養条件との間に、特別な差異は見い出せない。ごく最近、Nagai et al.（1994）は海底泥中から *C. wailesii* の精子形成を高頻度に促進する細菌（*Alcaligenes* 属）を分離した。今後、このような細菌を用いた研究により、中心目珪藻における性の分化過程、少なくとも精子形成に関するメカニズムの一端が明らかになり、有性と無性の差が明らかにできると期待される。

第4項　増大胞子の形態と形成過程

中心目珪藻類の造精細胞（spermatogonia）、造卵細胞（oogonia）、接合子（zygote）の形成という有性生殖（卵子生殖）を通じた増大胞子形成過程の形態変化の観察に関しては、*Bacteriastrum hyalinum*(Drebes 1967)、*Bellerochea malleus*(Stosch 1965)、*Biddulphia rhombus*、*Biddulphia granulata*(Stosch 1956)、*Chaetoceros didymum*、*Chaetoceros eibenii*(Stosch et al. 1973)、*Coscinodiscus asteromphalus*(Werner 1971c)、*Coscinodiscus biconicus*(Hofker 1928)、*Coscinodiscus consinus*(Holmes 1967)、*Melosira moniliformis*（Stosch 1958, 右田 1967a）、*Melosira monilifornis* var. *octogona*（Idei & Chihara 1992）、*Melosira nummuloides*（Crawford 1974）、*Melosira varians*（Stosch 1951a)、*Melosira* sp.（Mizuno 1977）、*Skeletonema costatum*(右田 1967b)、*Stephanodiscus niagarae*（Edlund & Stoermer 1991）、*Stephanopyxis turris*（Stosch & Drebes 1964）、*Stephanopyxis palmeriana*（Drebes 1966）などで報告されている。

一方、無性的増大胞子の形成は”vegetative cell enlargement”（栄養的増大）と呼ば

れており、*Ditylim brightwellii*(Gross 1937, 1939a, b, Stosch 1965)、*Bellerochea malleus*、*Streptotheca thamensis*、*Biddulphia sinensis*(Stosch 1965)、*Skeletonema costatum*（Gallagher 1983）および*Leptocylindrus danicus*（French & Hargraves 1985）などで報告されている。接合子の形成によらないで細胞の大きさが飛躍的に増す現象を栄養的増大といい、この場合には遺伝因子組成には全く変化を起こさず、株が維持される（高野 1967）。なお現在のところRound et al.(1990)が、配偶子の接合や受精の結果として生ずる接合子（zygote)、つまり有性生殖の結果生じた球形細胞だけを、" auxospore"（増大胞子）とみなすと定義している。また、栄養的増大で生じた球形細胞は、" pseudo-auxospore"（偽似増大胞子）と呼んで、真正の増大胞子とは区別して考えるようになった（高野 1967）。今後は、以上の定義に準じて明らかに無性的に形された場合には偽似増大胞子の用語を用いることにする。

特殊な有性生殖として知られるオートガミー（autogamy）を通じての増大胞子形成が、中心目では、*Cyclotella meneghiniana* や *Melosira nummuloides* で報告されている（Round et al. 1990）。一方、単為発生（parthenogenesis）に関しては、*Melosira moniliformis* var. *octogona* や *Actinoptychusundulatus* で知られている（Bröer, Behre and stosch in Drebes 1977）。今回多くの実験区（Tables 3-6～3-8およびFigs. 3-8～3-10）において栄養的増大を観察したが、厳密にいえば有性生殖に属するオートガミーや単為発生といった方法で増大胞子を形成していた可能性（この場合、栄養的増大ではなくなってしまう）が考えられた。オートガミーは、細胞質分裂が起こらないで同一の細胞内で分裂した核同士が、核融合した後に増大胞子になる方法である。単為発生は、卵細胞が減数分裂の過程で放出した極体と融合して増大胞子に変化する生殖方法である。従って、これら両生殖方法はいずれも増大胞子になる前に、必ず同一細胞内に２核の時期が存在するはずである。もし正真正銘の栄養的増大であれば、偽似増大胞子が膨張する前に２核となることは決してないと予測される。以上のことを確認するため、Yamaguchi（1992）およびYamaguchi & Imai（1994）の方法を参考にして、4'-6-diamino-2-phenylindole（ＤＡＰＩ）を用いた核染色を実施した。

また、増大胞子形成時に、珪酸質の鱗片（scale）が造大胞子の細胞膜と粘液質の間に多数形成されることが、*Melosira varians*、*M. nummuloides*、*M. moniliformis*（Crawford 1974）、*M. moniliformis* var. *octogona*（Stosch 1982）などで報告されている。珪藻類においては有性生殖の方法に加えて、鱗片等の接合子の形態的特徴は、非常に変化に富んでおり、これらは非常に重要な分類形質として用いられ、珪藻類の進化や系統発生との関係がが論じられてきた（Geitler 1932, 1957, 1973, Drebes 1977, Round et al. 1990, Mann 1993）。前項では、本種の栄養的増大が高頻度に起こる培養条件を明らかにした。本項では、その条件下で実験を行い、偽似増大胞子形成過程およびその形態変化について詳細に観察した結果を述べる。

材料および方法

核染色のために、実験区44（Table 3-6）を基本培養条件として、偽似増大胞子の形成を試み、暗黒条件下（ConditionⅢ）から光条件下（ConditionⅣ）に移行した直後から開始して２～３時間間隔でサンプリングを行い、毎回200以上の細胞をグルタールアルデヒドで最終濃度１％になるよう固定した。次に、これら固定試料を99％メタノールで置換し、常温暗黒条件下で24時間以上保存した。そして、ＤＡＰＩ（和光純薬製）を含むトリスバッファー（ＤＡＰＩ最終濃度 5 μg/ml）でメタノールを置換した。ＤＡＰＩ染色後、落射型倒立顕微鏡（オリンパス）のU励起光下で核を観察した。核の観察は、２～３時間間隔で固定された各サンプル毎に200細胞以上実施した。また、光条件下（ConditionⅣ）に移行した直後に固定された栄養細胞（Fig. 3-11, Ａ）および偽似増大胞子形成の開始を示す細胞（Fig. 3-11, Ｂ）のＤＡＰＩ染色された核の直径をそれぞれ150細胞以上ずつ測定した。

Table 3-7に示した実験区77を基本培養条件とし、栄養的増大を通じた大きさの回復過程の偽似増大胞子形成の開始から初生細胞の形成に至るまでの過程を、同一細胞について連続的に観察した。偽似増大胞子および初生細胞の形態を光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡（Scanning electron microscope；日立 ES-2030, 以下、ＳＥＭと称す）、および透過型電子顕微鏡（Transmission electron microscope；日本電子 JEM-1010, 以下、ＴＥＭと称す）を用いて詳細に観察し、栄養細胞の蓋殻構造と比較することにより、新生被殻の形成過程を調べた。可能な限り偽似増大胞子や初生被殻の表面構造を壊さないようにするため、前処理としての強酸による洗浄を行わなかった。偽似増大胞子を含む培養を、50％グルターールアルデヒドで最終濃度が１％となるよう固定した後、培養液を50、70、90、および99％エタノールで各15分ずつ段階的に脱水処理した。そして、エタノール溶液中の偽似増大胞子を、マイクロピペットでロ紙上に乗せ自然乾燥させたものを観察に供した。

また、偽似増大胞子膜中に含まれる珪酸の存在を確認するため、栄養的増大過程で形成された増大胞子をガラス繊維ロ紙（Whatman GF/C）上に捕集した後、高温炉において450℃で４時間焼却処理した（完全に有機物を除去するため）。また、有性生殖についても光学顕微鏡下で造精細胞や造卵細胞と思われる細胞の観察を行った。

結果および考察

１．栄養的増大による偽似増大胞子形成過程

Fig. 3-11（Ａ～Ｊ）に、栄養的増大過程におけるＤＡＰＩ染色の蛍光顕微鏡写真を示した。各細胞はＤＡＰＩ染色後、蛍光顕微鏡下で観察しているが連続写真ではない。栄養的増大は、有性生殖における造卵細胞の成熟のように細胞が貫殻軸方向に長く伸張する（Drebes 1977）ことなく、細胞の膨張が始まった（Ａ, Ｂ）。増大胞子の膨張が開始する前

に、栄養細胞内では原形質の凝縮が観察され、原形質の端部が被殻から分離した（B～D）。さらに細胞が膨張すると母細胞の被殻が外れ（E）ほぼ完全な球形になった（F）。半球形になり（G）、最初の初生被殻の形成が進行する間に、核分裂が起こった（H）。分裂した小核は大核から離れ（I，J）やがて消失した。この核分裂は" metagamic mitoses"と呼ばれ、この分裂に伴い初生被殻が形成されることが知られている（Drebes 1977）。ConditionⅣ（Table 3-6）に移行後、2～3時間間隔でＤＡＰＩ染色した細胞（各200以上）

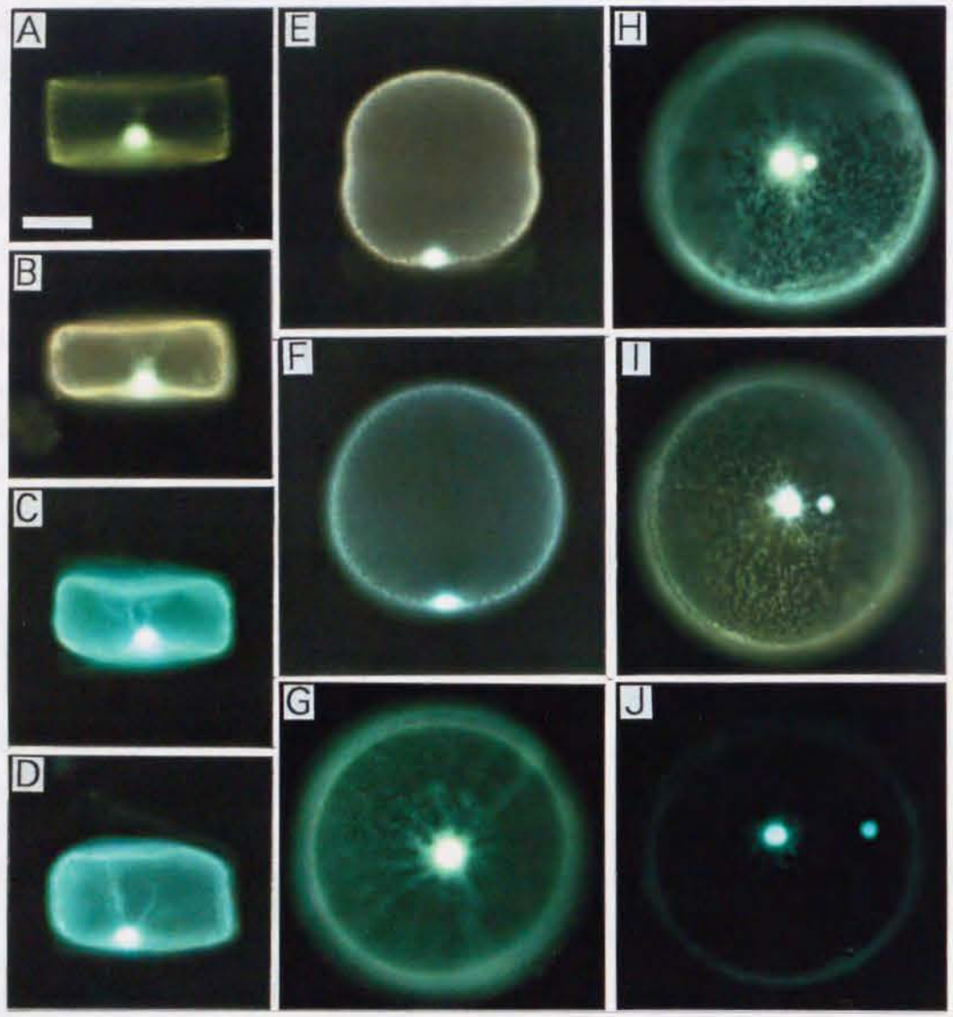


Fig. 3-11. Epifluorescence microphotographs of vegetative cell enlargement process in *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture under the conditions of the test 44(Table 3-6). Blue white fluorescences of Nucleus are visible. Cells were fixed with glutaraldehyde and stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole(DAPI).
A, A cell transfered to a light condition (Condition Ⅳ) from in darkness (Condition Ⅲ). The cell is a normal vegetative cell in the morphology; B, Initiation of vegetative cell enlargement showing condensation of protoplast; C, Start of expansion; D ～ E, cells on their way to expansion; F, Perhaps fully expanded cell; G ～ J, Progress of the metagamic mitoses and first initial valve formation; G, start of metagamic mitoses; H, Dividing nucleus; I, Divided nucleus; J, Degeneration of smaller nucleus (Scale bar, 100 μ m)

を観察した結果、観察を開始後（Aのステージ）から" metagamic mitoses"が起こるまで（H）の間に、2核になった細胞は観察されなかった。

Fig. 3-12に、光条件下（ConditionⅣ：Table 3-6）に移行した直後に固定された栄養細胞（Fig. 3-11, Aに代表される）および増大胞子形成の開始を示す細胞（Fig. 3-11, Bに代表される）の核の直径の測定結果を示した。AおよびBに代表される細胞はそれぞれ、平均直径±標準偏差が21.0±2.0、23.2±3.1μmであった。Mann-WhitneyのU検定（有意水準 0.05）の結果、両者の殻径分布に差があるとは言えなかった。仮に、Fig. 3-11に示した増大胞子形成がオートガミーや単為発生の結果であるなら、細胞の膨張が開始される前に、つまりAとBの間に核分裂が起こるはずである。また、膨張の途中に核分裂するならば、Bの核はAに比べて著しく大きくなるはずである。2核の細胞を確認できなかったこと、ならびに、AとBに代表される細胞の核の直径にほとんど差がなかったことから、本種の細胞サイズの回復は正真正銘の栄養的増大によるといえる。

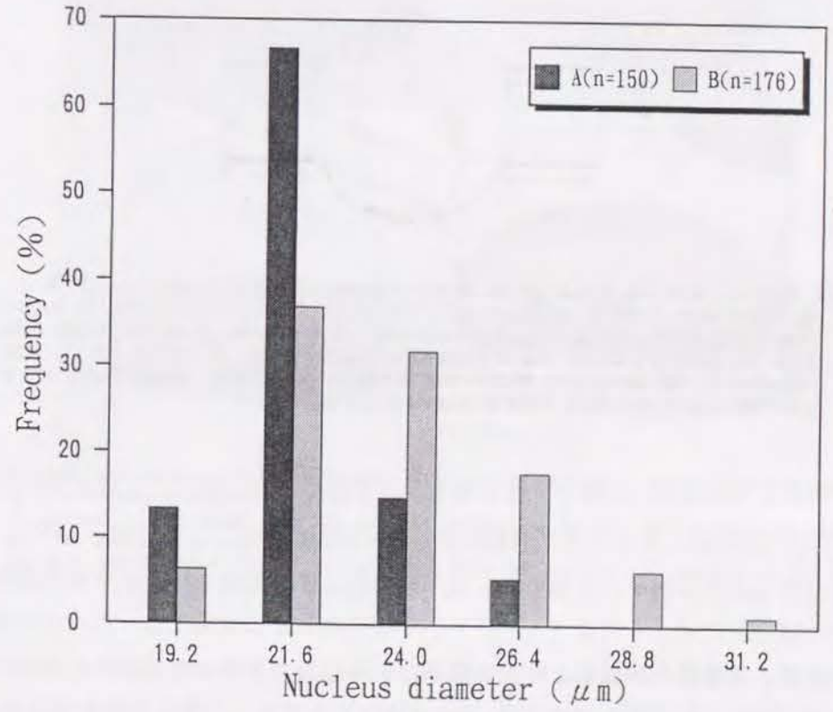


Fig. 3-12. Frequency distributions of the nucleus diameters on the way of vegetative cell enlargement process in *Coscinodiscus wailesii* Gran. Both columns of A and B are correspond to the stages A and B shown in Fig. 3-11.

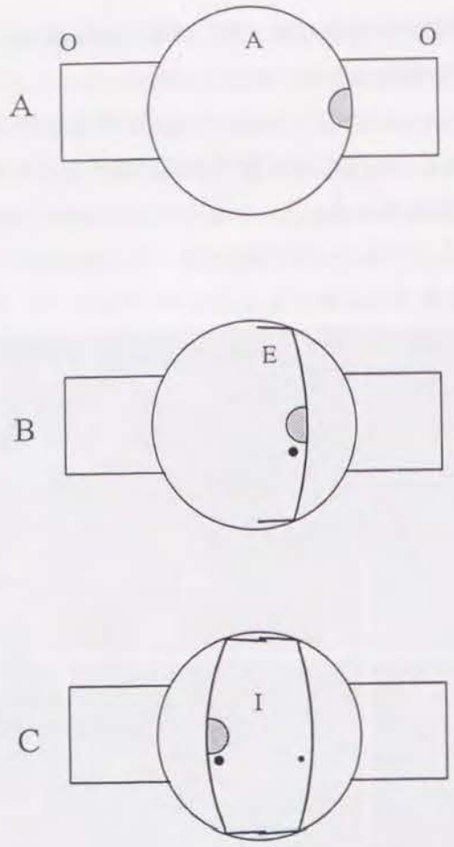


Fig. 3-13. Formation of the initial cell in centric diatoms reviewed in Drebes (1977).
A, Intercalary formed auxospore (A) containing the diploid nucleus; O, oogonial thecae; B, Inside the auxospore membrane the epithecae (E) of the initial cells formed by a metagamic mitosis, one of both nuclei degenerates; C, Initial cell (I), still surrounded by the auxospore membrane. Beside a functional nucleus there are two pycnotic nuclei resulting from two metagamic mitoses.

Fig. 3-13に、*Coscinodiscus* 属の有性生殖を通じての増大胞子形成における" metagamic mitoses" と初生被殻の通常の形成過程を示した（Drebes 1977）。Drebes（1977）によると、増大胞子の中では核分裂が２度行われ、各々の分裂に伴って新しい上下両被殻が形成される。最初の核分裂が起こった後（A，B）、２核の内の片方は退化し一方だけが残るという。この結果、細胞質分裂は起こらず上殻（epitheca）が形成される。次に核は反対側に移動した後（C）、核分裂を経て下殻（hypotheca）を形成し、初生被殻が完成して初生細胞となる（C）と述べている。

Fig. 3-14に、栄養的増大の過程で上殻のみが形成された細胞や、ほぼ初生細胞となった細胞の光学顕微鏡写真を示した。*C. wailesii* の栄養的増大過程での初生被殻の形成過程は、上で述べたDrebes（1977）の報告とは若干異なった。Drebes（1977）は、新しい下殻を形成するために核が上殻側から反対側に移動した後、核分裂をすると述べている。これまで

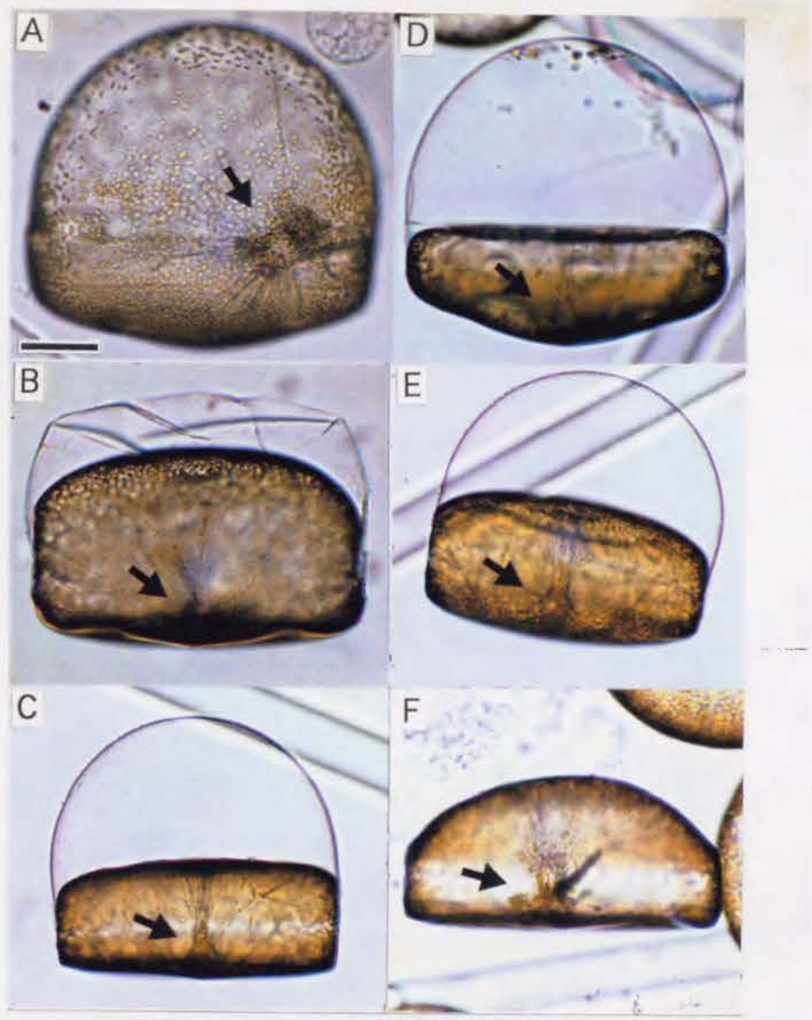


Fig. 3-14. Light microphotographs of various initial cells formed by vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture.
A, A hemispherical cell with the nucleus on the way moving to the opposite valve side; B ～ E, Initial cells with pseudo-auospore membrane and the nucleus still staying on the first initial valve side; F, A initial cell with the nucleus still staying on the first initial valve side. The nucleus indicated by an arrow in each figure. (Scale bar, 100 μ m)

多くの *C. wailesii* 細胞のＤＡＰＩ染色や光学顕微鏡観察を実施した結果、上殻を形成するための核分裂は容易に観察できたが、下殻を形成するための核分裂は１度も観察されなかった。しかしながら、上殻の形成後、下殻を形成するために殻が反対側に移動中の細胞は、低頻度ながら観察することができた（A）。多くの場合、核が上殻側にある間に（反対側に移動せず）、下殻になるはずの半球形の部分が上殻に近づき、初生細胞となった（B～F）。従って、これらの観察結果から、本種の栄養的増大による初生被殻形成においては、下殻を形成するための核の移動、および核分裂は必ずしも必要ではないと考えられる。

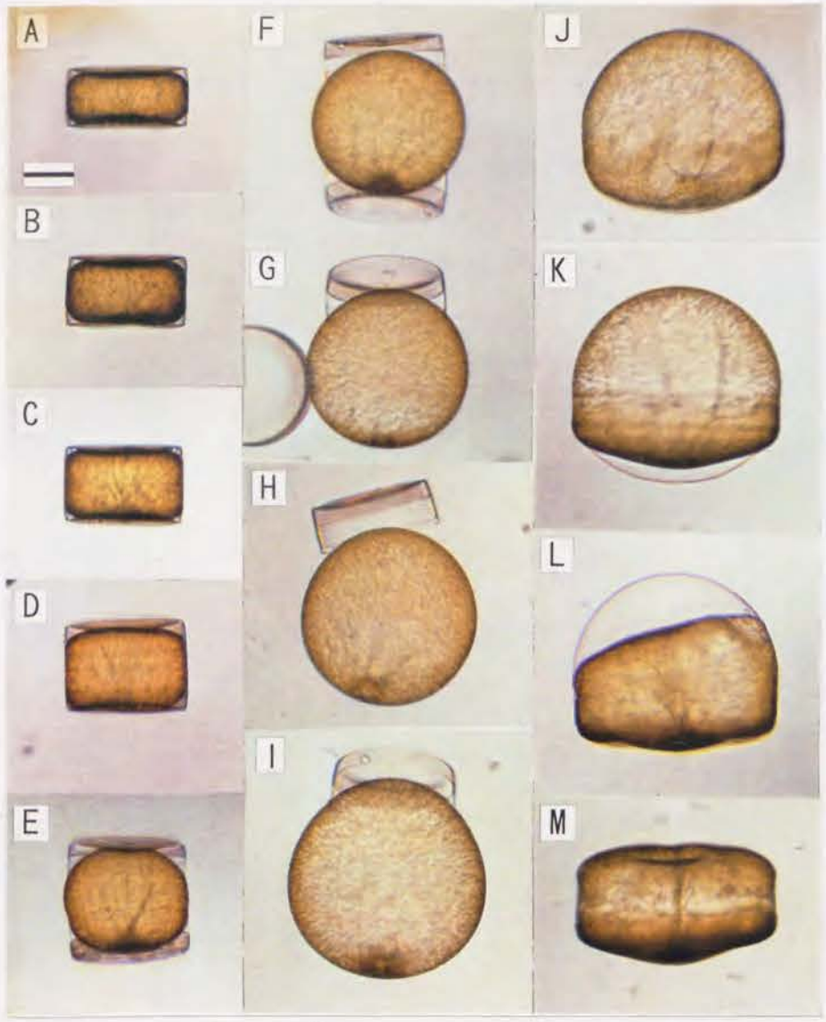


Fig. 3-15. Sequential observations of vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture.
A, A cell initiating vegetative cell enlargement showing condensation of protoplast (Start of observation); B, Beginning of expansion (After 0.5 hours); C ～ H, Progress of expansion; C, After 1.0 hour; D, After 1.5 hours; E, Splitting of frustules and expansion of cytoplasm containing chloroplasts from the valves (After 2.0 hours); F, After 2.5 hours; G, After 3.0 hours; H, Pseudo-auxospore with one parent valve still adhering to that of membrane (After 3.5 hours); I, Fully expanded pseudo-auxospore (After 4.0 hours); J, Beginning of the first initial valve formation (After 7.0 hours); K, Process of the first initial valve formation showing separation of pseudo-auxospore membrane from the initial valve (After 9.0 hours); L, Beginning of the second initial valve formation showing separation of the other pseudo-auxospore membrane from the initial valve(After 15.0 hours); M, Final stage of the second initial valve formation. (After 18.0 hours). (Scale bar, 100 μ m)

Fig. 3-15（Ａ～Ｍ）に、偽似増大胞子の形成とそれに続く過程を示した。Fig. 3-15は、同一細胞の形態変化を経時的に観察したものである。偽似増大胞子（Ｆ～Ｊ）の形成は、ConditionⅢ（Table 3-6, 実験区44）に移行後、つまり暗黒条件から光強度65 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$、明暗周期８hL/16hDの光条件下に移行後、48～72時間の間に最も頻繁に観察された。偽似増大胞子の膨張は、細胞が造精あるいは造卵細胞のように貫殻軸方向へ顕著に伸張することなく始まった（Ａ）。偽似増大胞子の膨張が開始する前に、栄養細胞内では原形質の凝縮が観察され、原形質の端部が被殻から分離した（Ｂ）。原形質の端部の凝縮が生じた後、0.5～１時間で原形質の貫殻軸方向への膨張が始まり、偽似増大胞子の形成が進行した（Ｂ～Ｄ）。この偽似増大胞子の膨張によって上被殻と下被殻は分離した（Ｅ，Ｆ）。偽似増大胞子は膨張開始後、２～４時間でほぼ完全な球形に変化した（Ｇ，Ｈ，Ｉ）。栄養細胞の被殻は、偽似増大胞子の膨張時に偽似増大胞子から外れた（Ｇ，Ｈ）。偽似増大胞子の完全な膨張の後には、核は偽似胞子中央ではなく端部に位置していた。核のある側では初生被殻の形成が進行し、偽似増大胞子の膨張が完了した後、２～３時間後には、一方の初生被殻の形成が観察された（Ｊ）。初生被殻の形成が進行するに伴い、初生被殻は偽似増大胞子膜から分離するようになり、球形の偽似増大胞子から半球形の細胞に変化した（Ｋ）。半球形になった後、６～９時間で、半球形の部分がその底面に近づくように変化し（Ｌ）、もう一方の初生被殻の形成が進行した。この様な細胞の蓋殻面はまだドーム状に近い形状をしていたが（Ｍ）、初生被殻の形成が進行するに従い通常の栄養細胞の円筒形となった。

２．栄養的増大過程で形成された増大胞子および初生被殻の微細構造について

Fig. 3-16（Ａ～Ｈ）に、栄養細胞の電子顕微鏡（ＳＥＭおよびＴＥＭ）写真を示した。殻環面からみるとほとんど長方形をしており、本種の栄養細胞は整った円筒形をしているといえる（Ａ）。小室は中央部では細かく、殻頂縁にむかってやや大きさを増す。これに対して殻套部の小室は大きさがそろっている（高野 1990）。中心域は透明で輪郭が不規則である（Ｂ）。殻蓋殻内面において、中央部を取りまいて不規則な小唇突起群があり、大きい細胞ではさらにその外側にも少数の小唇突起が散在した（Ｃ）。これらはいずれも中央に達しない小室列の中央より端部末端にあった（Ｄ）。さらに殻頂縁にも小唇突起があった（Ｃ）。殻套部の下縁には、下縁から４小室列ほど離れたところに１輪の小唇突起が存在した（Ｅ，Ｆ）。ＴＥＭでみると、１小室中に見える師膜の数は、わずかでも確認できるのを含めて、15±３個程度であった（Ｇ，Ｈ）。なお、*C. wailesii* 栄養細胞の細胞学的微細構造は、Schmid（1986）、Schmid（1987）により詳細な観察結果が報告されている。

Fig. 3-17（Ａ～Ｉ）に、偽似増大胞子、半球形の細胞（Fig. 3-15のＪ，Ｋと同程度のステージ）の光学顕微鏡およびＳＥＭによる写真を示した。本種の偽似増大胞子は増大胞子膜と呼ばれる半透明の膜で覆われており、膜の内側に直径２～３μｍの色素粒が均一に分布していた（Ａ～Ｄ）。若い増大胞子の外側表面は装飾物はなく滑らかであった（Ｂ）。一方、内側には色素粒が分布しており、それらが糸状に連結していた（Ｃ）。450℃４時間処理を行った偽似増大胞子は、その外形をほぼ完全にとどめていた（Ｅ）。また、表面は平

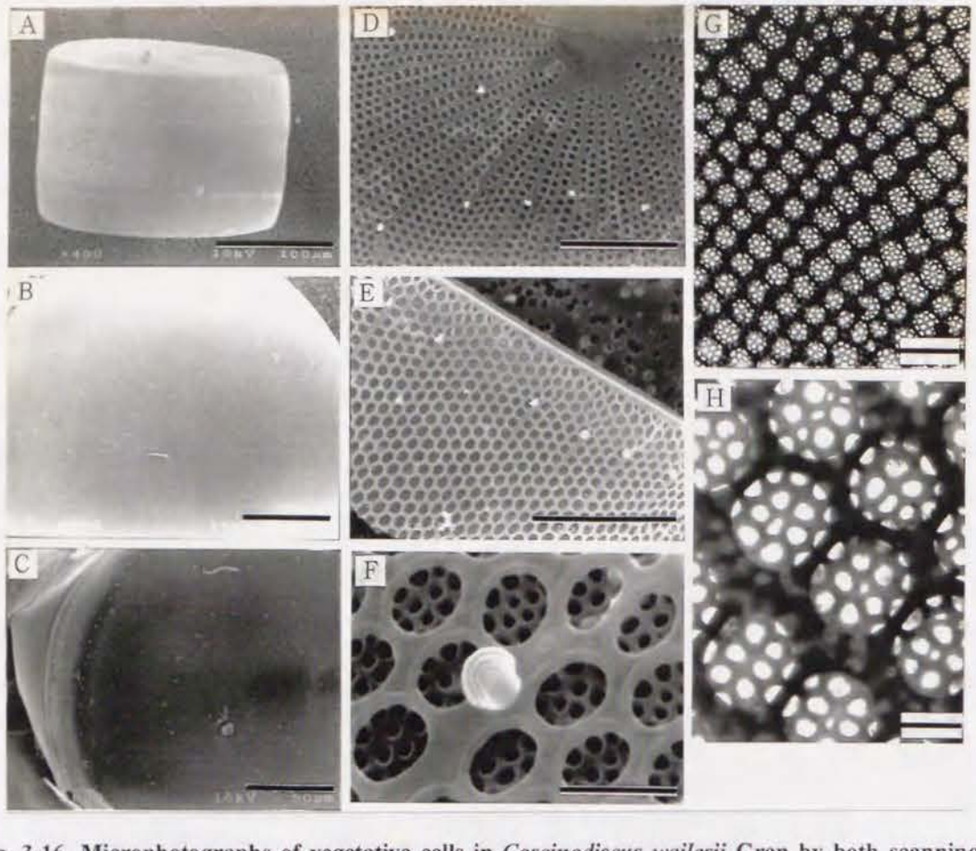


Fig. 3-16. Microphotographs of vegetative cells in *Coscinodiscus wailesii* Gran by both scanning electron and transmission electron microscopy.
A ～ F, Observations by SEM; G, H, Observations by TEM; A, A vegetative cell in girdle view; B, External valve face; C, Labiate processes sitting around central transparent area and near the margin of valve face; D, Central part of internal valve face, and labiate processes at the internal ends of radiating rows of areolae; E, Labiate processes sitting in valve mantle; F, Labiate processes sitting in valve mantle (Higher focus of E); G, Internal part of marginal field; H, High focus of internal valve face with the rows of arelae and cribrums. (Scale bars A, 100 μ m; B, C, 50 μ m; D, E, 20 μ m; F, 2 μ m; G, 4 μ m; H, 1 μ m)

滑であり、表面下で小室列の形成が観察された（F）。半球形になった直後の細胞の外側（G）、内側（H，I）から、小室列の形成の進行が観察されたが、形成はまだ不完全であった。従って、Fig. 3-15. Kに示した細胞は、初生被殻の形成が進行中の細胞であることが判った。Stosch & Drebes（1964）、Stosch et al.（1973）、Crawford（1974）、Stosch（1982）およびSchmid（1984）などにより報告されている" scale, hoop、silica band、properizonium" といった増大胞子形成時に形成される珪酸質の鱗状構造物は光学顕微鏡（A）、ＳＥＭ(Ｂ～Ｄ，Ｆ）およびＴＥＭによる観察でも確認することができなかった。従って、*C. wailesii* の栄養的増大過程で形成される偽似増大胞子には、これらの鱗状構造物が存在しないことが強く示唆された。しかし、450℃で４時間の有機物の完全焼却処理がなされた増大胞子がその原形を留めていた結果（Ｅ，Ｆ）から、増大胞子は既に珪酸質に

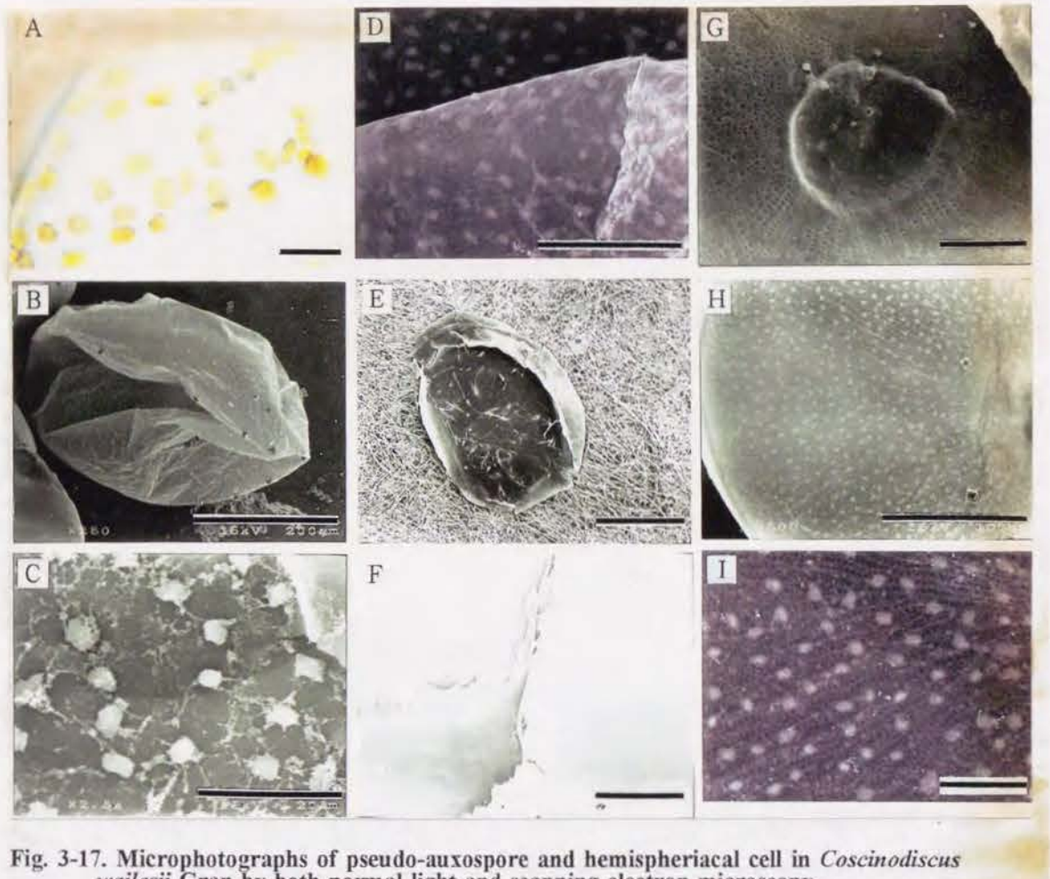


Fig. 3-17. Microphotographs of pseudo-auxospore and hemispheriacal cell in *Coscinodiscus wailesii* Gran by both normal light and scanning electron microscopy.
A, Observation by LM; B ～ I, Observation by SEM; A, Surface of pseudo-auxospore with numerous chloroplasts; B, A pseudo-auxospore; C, Internal surface of pseudo-auxospore; D, Outer surface of pseudo-auxospore; E, Treated pseudo-auxospore by burning at 450 ℃ for 4 hours; F, Progressing of the rows of areolae formation in pseudo-auxospore (Higher focus of central part of E); G, Internal surface of a hemispherical cell on the way to forming of new valve structure (rows of a reolae); H, External surface of a hemispherical cell progressing of new valve formation; I, External surface of a hemispherical cell progressing of new valve formation (Higher focus of H). (Scale bars A, F, 10 μ m; B, E, 200 μ m; C, G, I, 20 μ m; D, 40 μ m; F, 10 μ m)

富んでいることが明らかとなった。これまで増大胞子に" scales、hoops、bands、plates " 等の珪酸構造物の存在が確認されていないのは、*Stephanodiscus* 属のみであり（Round et al. 1990、Edlund and Stoermer 1991）、本種の栄養的増大による偽似増大胞子に珪酸構造物が存在しなかったことは非常に興味深い。また、本種の偽似増大胞子と、これまで報告された有性生殖の結果生じた増大胞子との間に、大きな形態学的差異を見出せなかった。

Fig. 3-18（Ａ～Ｉ）に、最初の初生被殻の形成過程を示した。しかし、同一細胞を連続的な観察することが不可能であるため、以下の内容は異なる細胞の観察に基づくものである。増大胞子が半球形になった直後の細胞の内側では、まだ初生被殻の構造は確認できなかった（Ａ，Ｂ）。おそらくFig. 3-15. Kの頃から、徐々に小室列の形成が進行し（Ｃ）、

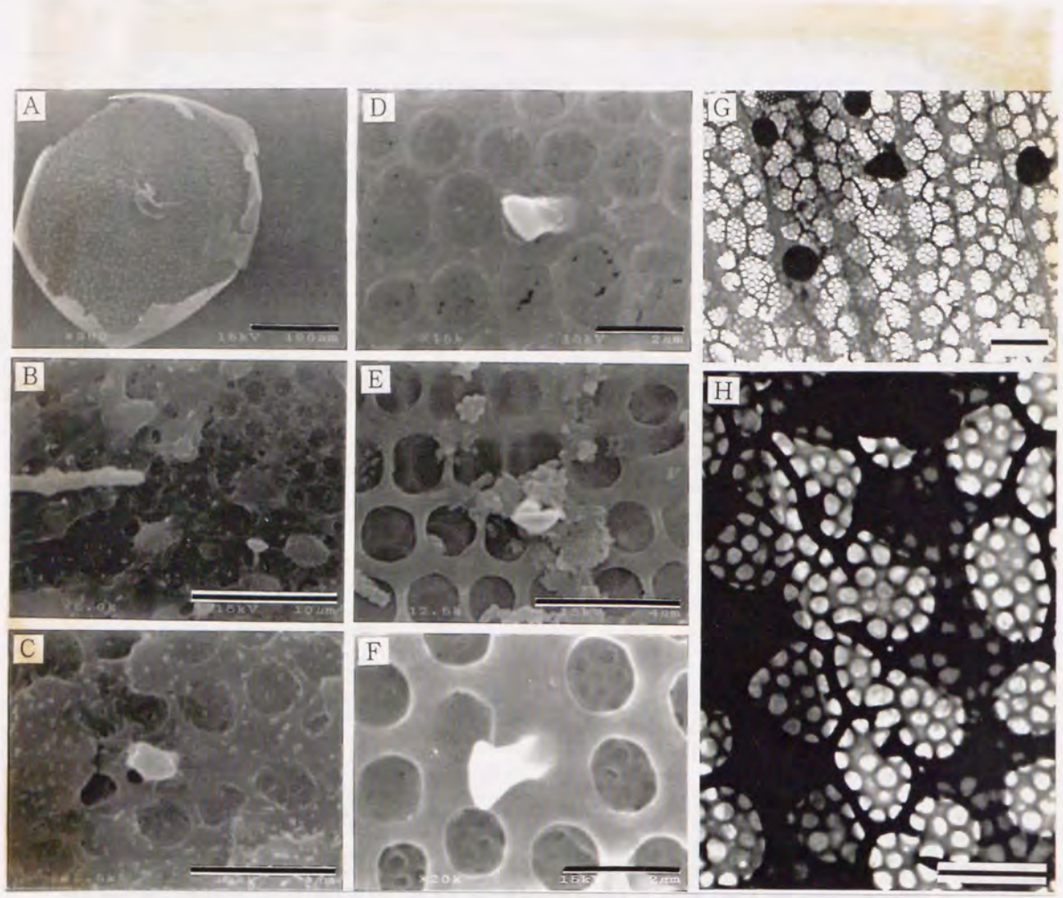


Fig. 3-18. Microphotographs of initial valves formed through vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* Gran observed by both scanning and transmission electron microscopy.
A ～ F, Observation by SEM; G, H, Observation by TEM; A ～ H, Inner surface of first initial valve in a hemispherical cell; A, Inner part of first initial valve; B, Beginnig of rows of areolae formation (Higher focus of the central part of A); C ～ E, Progressing of rows of areolae formation with a imperfect labiate process; F, Formation of cribrums; G, Imperfect rows of areolae covered cribrums; H, Higher focus of G. (Scale bars A, 100 μ m; B, 10 μ m; C, E, 4 μ m; D, F ～ H, 2 μ m)

小室の輪郭が次第に明瞭になってくるようである（D，E）。この時点で既に小唇突起は形成されている（D）。小室列の形成がさらに進行するにつれて、師膜の構造が次第に明らかになってくる（F）。この時点になると低倍率の場合ＳＥＭによる観察でも、栄養細胞の完全な蓋殻との区別ができなくなった。一方、ＴＥＭで観察すると、小室列の形成がまだ不完全であり（G）、蓋殻の内側がまだ形成途中の段階でも師膜を確認することができる（H）。しかしながら、ＳＥＭによる観察でも初生被殻の形成が細胞の内側から進行するのか、細胞の外側が先なのかは不明であり、どの様な順序で新しい被殻の形成が進行するのかは、今回の観察では完全に把握することはできなかった。

3．栄養細胞の有性化について

Fig. 3-19（Ａ～Ｍ）に、栄養細胞の有性化過程の例を示した。本種の造精細胞形成は実験区42のみで観察された。造精細胞および造卵細胞と判断される細胞の形成は、ConditionⅢ（Table 3-6）に移行後、１日後以降から観察され約７日間続いた。造精細胞は栄養細胞が貫殻軸方向に伸張した状態で形成された（Ａ～Ｄ，Ｉ）。造精細胞内では精子を形成するまで数回細胞分裂を繰り返し、造精細胞内に多数（大型の細胞では最高128個と思われる）の精子が形成された（Ｄ，Ｅ）。造精細胞内での分裂が進行するに従い、色素体が徐々に消失した（Ｃ，Ｄ，Ｅ）。このため、造精細胞の色調は薄くなった（Ｄ，Ｅ，Ｉ）。精子形成の進行に伴い色素体が細胞から切り放され、それらが造精細胞内に多数残存した（Ｇ）。精子形成のほとんどが完了した後、上被殻と下被殻に隙間が生じ、活発に遊泳する精子が殻外へ放出された（Ｅ）。この中には、精子形成が不完全で２鞭毛のままの細胞も混じっており、被殻から放出された後、分裂して精子となることもあった（Ｈ）。また、造精細胞内の原形質全てが必ずしも精子に分配されるわけではなかった。２～３回の細胞分裂の後、分裂を停止させる細胞があり、この時、分裂を停止させなかった細胞は、さらに分裂して精母細胞となり、細胞質を均等な大きさの精子に分配した。細胞分裂の途中で分裂を停止させた細胞は精子が放出された後もそのまま造精細胞内に残った（Ｉ）。精子は長径10～20μｍ、短径５～15μｍの球形ないし卵形であり（Ｅ，Ｇ～Ｊ）、長さ約30μｍの１本の鞭毛を有していた（Ｊ）。

一方、造精細胞に混じって、栄養細胞よりも長くまっすぐ伸張した細胞（Ｋ）や、”く”の字形に湾曲した細胞（Ｌ）、上被殻と下被殻の間にわずかな隙間があり、原形質の一部を露出させている細胞（Ｍ）も観察された。また、通常の栄養細胞よりも細胞全体の色調が濃いものが多かった（Ｌ，Ｍ）。これらの細胞は貫殻軸方向に伸張した後、細胞内で分裂をしなかった。このような細胞は、例えば、Stosch & Drebes（1964）、Drebes（1966）、右田（1967a, b）あるいはMizuno（1977）の報告した中心目珪藻類における造卵細胞と形態学的特徴が類似しており、本種の造卵細胞と推定される。また、精子や贈卵細胞と思われる細胞が観察された培養中において、球形の細胞（増大胞子の可能性が考えられる）を確認することができた。

一般に中心目珪藻類は、栄養細胞の数回の分裂により複数の精原細胞を形成し、その後、減数分裂を通じて精子形成を完了させる。今回の観察の結果（Fig. 3-19）から、本種の精子形成過程も一般的な中心目珪藻類のそれと同様であると判断される。また、分裂を途中で停止した精原細胞の一部が、成熟した精子の放出後も造精細胞内に残ったこと、分裂を途中で停止しなかった精原細胞はさらに分裂し、細胞質を精子に均等に分配したことから、本種の精子形成は全割型（Hologenous type）の変型であることが判った。このタイプは *Coscinodiscus* 属の精子形成様式の特徴として報告されている（Round et al. 1990）。
精子形成過程における核相の変化や減数分裂過程に関しては、フローサイトメトリーを用

いた核ＤＮＡ量の定量によって観察されており、減数分裂は精子形成が完了する前２回の細胞分裂時に行われることが明らかにされている（Vaulot & Chisholm 1987, Armbrust 1990）。

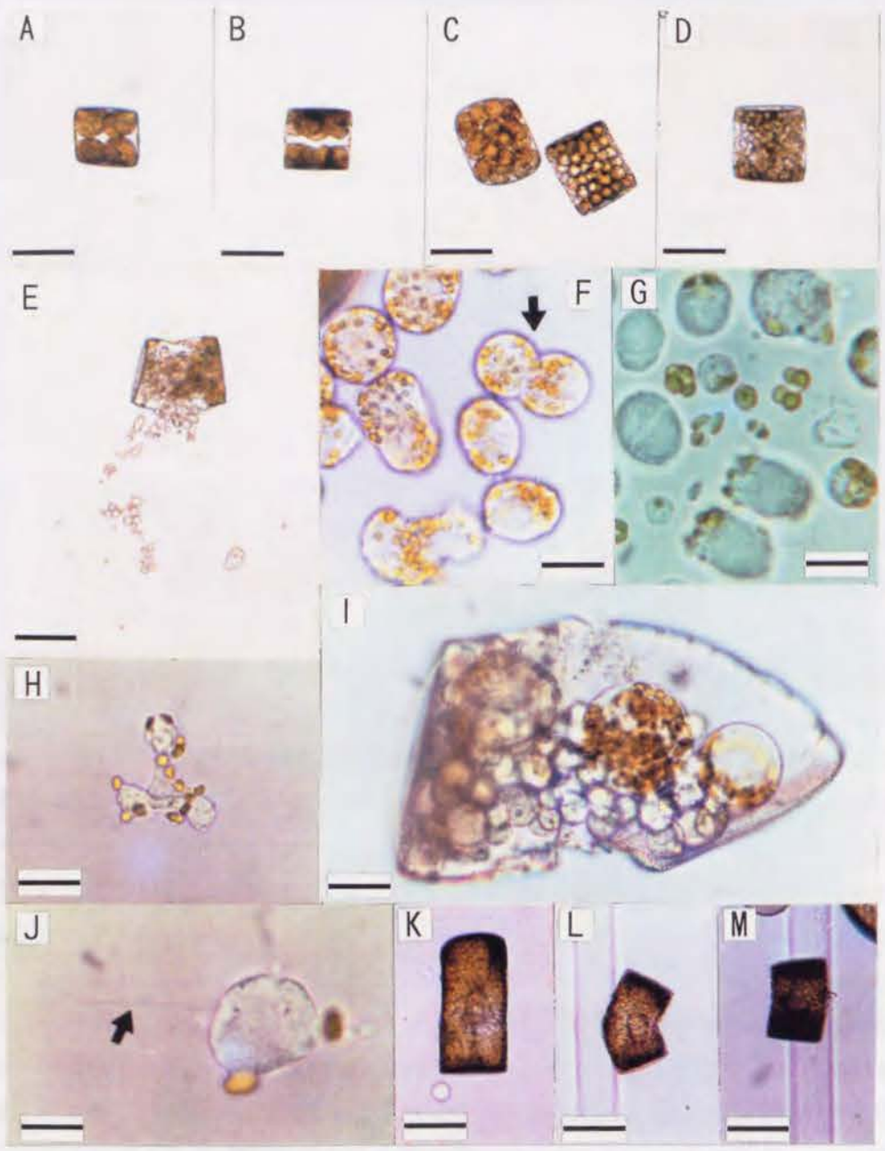


Fig. 3-19. Light microphotographs of sexualized cells of *Coscinodiwailesii* Gran.
A, Four spermatogonia formed in a spermatogonium; B, Eight spermatogonia formed in a spermatogonium; C, Sixteen and thirty two spermatogonia formed in a spermatogonium; D, spermatogenesis; E, Liberation of mature sperm; F, Unseparated spermatocyte indicated by an arrow; G, Liberated mature sperms and separated plastids from mature sperms; H, Unseparated sperms; I, spermatogenesis and production of residual body containing the plastids; J, Mature sperm, with one flagellum indicated by an arrow and two plastids; K, Straightly elongated oogonium; L, Curved oogonium; M, Elongated oogonium. Part of protoplast extricated. (Scale bars J, G, 10 μm; F, H, I, 25 μm; A ～ E, K ～ M, 100 μm)

卵形成については、３つの様式が報告されている（Stosch & Drebes 1964）。このうち、細胞の貫殻軸方向の伸張の後、細胞質分裂をすることがなく、核の第１分裂、第２分裂に伴って１核ずつが機能を失い、残りの１つが卵の核となる様式は、*Stephanopyxis* 属および多くの中心目珪藻類（例えば、*Melosira*, *Cyclotella*, *Bellerochea*, *Streptotheca* 属）で知られており（高野　1967）、*Coscinodiscus* 属もこの様式で卵形成を行うことが報告されている。本研究において、上述の報告にある造卵細胞と外観的特徴が一致する細胞が観察された（Ｋ～Ｍ）。既述のように、精子形成過程も確認できたことから、本種にも有性生殖過程が存在することが強く示唆された。今後、卵形成過程において造卵細胞内での核分裂や、精子と卵細胞の受精の瞬間を確認することにより、有性化過程あるいは有性生殖の後に生じる増大胞子形成過程を明らかにしたい。有性生殖と栄養的増大とでは、増大胞子の形態学的特徴（微細構造）や初生被殻の形成過程（metagamic mitoses）等が異なる可能性も考えられることから、今後、このような点について詳細に観察し、有性・無性の両法による大きさの回復過程の差異を比較・検討する必要があろう。

第５項　回復した細胞の大きさに影響を与える諸条件

特定の細胞サイズまで小さくならないと有性化や栄養的増大が起こらないことや、細胞が小型化しすぎると死滅するといった珪藻類の宿命を考えると、珪藻類が回復する大きさを環境条件等によりコントロールできれば、有性化や栄養的増大が可能となる細胞サイズまでに要する時間を変化させることができるはずである。現場海域においても珪藻類が回復する大きさや時期をコントロールできれば、エネルギーや時間的ロスの大きい有性生殖を最も有利な条件下で行うことが可能であるかもしれない。右田（1967c）は、中心目珪藻の *Melosira moniliformis* と *Skeletonema costatum* の増大胞子形成において、卵細胞(oogonia)と増大胞子の大きさの間に正の相関があることを示した。本種についても親細胞（parent cell；回復する元の細胞）の大きさによって、初生細胞の大きさが変化するかどうか検討した。また、栄養的増大によって得られる初生細胞の大きさを変化させる培養条件を検索した。

材料および方法

直径100～350μｍの範囲の培養株を用いて栄養的増大を誘起させ、母細胞の大きさによって、初生細胞の大きさがどう変化するか調べた。実験はTable 3-6に示した実験区44に準じて実施し、実験終了後、光学顕微鏡下、各実験区毎に初生細胞の蓋殻径を測定し、親細胞のそれと比較した。

今回は、栄養的増大において初生細胞の大きさに及ぼす光、温度および塩分の効果につ

いて調べた。まず、初生細胞の大きさに及ぼす光強度および明暗周期の効果を調べるため、平均直径220μmおよび240μmの培養株を用いて、それぞれTable 3-6に示した実験区43～45および52～54の条件下で栄養的増大を誘起し、初生細胞の大きさを光学顕微鏡下で測定した。

栄養的増大において、初生細胞の大きさに及ぼす温度の影響をみるため、増大胞子形成に及ぼす温度の効果を調べた実験（Table 3-7, Fig. 3-9）で、温度10℃（実験区56～59）、15℃(実験区60～64）、20℃（実験区①65～69；②70～74；③75～79）および25℃（実験区80～84）の温度条件毎に初生細胞の殻径の測定結果を集計し、平均値と標準偏差を求め比較した。

栄養的増大において初生細胞の大きさに及ぼす塩分の効果をみるため、増大胞子形成に及ぼす塩分の効果を調べた実験（Fig. 3-10）で、各塩分において形成された初生細胞の大きさを光学顕微鏡にて測定し、それぞれ比較した。

結果および考察

Fig. 3-20に、培養条件下における栄養的増大を通じての栄養細胞のサイズ回復過程を2例示した。細胞の膨張開始時には、被殻と細胞質の間に小さな隙間が生じた（A，F）。親細胞内での細胞質の凝集の後、細胞質は膨張を始め、増大胞子に変化した（B－C，G－H）。増大胞子が完全に膨張して約6時間後に増大胞子は半球形となり（C，H）、最初の初生被殻（上殻）が形成された（D，I）。培養開始後、20時間後に、反対側の初生被殻（下殻）の形成が進行し、半球形の細胞から初生細胞へと変化した（E，J）。蓋殻径150μm（A）と315μm（F）の親細胞は、それぞれ350μm（E）と475μm（J）の初生細胞に変化した。

Fig. 3-21に、栄養的増大における親細胞と初生細胞の大きさの関係について示した。親細胞が大きくなるにつれ、大きな初生細胞が形成される傾向にあり、親細胞（X）と初生細胞（Y）の蓋殻径（μm）の間には、Y＝0.46X+263.3（R=0.94）という高い正の相関関係が認められた。以上から、本種の栄養的増大による初生細胞の大きさは母細胞の大きさに大きく依存することが明らかとなった。同様な傾向は右田（1967c）により、*S. costatum* および *M. moniliformis* の有性生殖を通じてのサイズ回復過程においても報告されていることから、このような正の相関は、有性生殖や栄養的増大を問わずサイズ回復の際の一般的な現象かもしれない。増大胞子形成を高頻度に誘起することができないためか、これまで増大胞子の大きさの変化に関する報告例はほとんどない。

Fig. 3-22に、栄養的増大における光強度および明暗周期の効果を示した。母細胞が220μmおよび240μmのいずれの場合にもConditionⅣ（Table 3-6）に移行後の照度が高いほど、

明暗周期の明期が長いほど、初生細胞のサイズは大きくなる傾向があった。

Fig. 3-23に栄養的増大における培養温度の効果について示した。初生細胞の平均径は、25℃で他の温度区より大きくなる傾向を示した以外は、温度と初生細胞の大きさの間に明瞭な関係は認められなかった。20℃②の初生細胞の平均径と25℃のそれとの間には60μmの差が生じた。

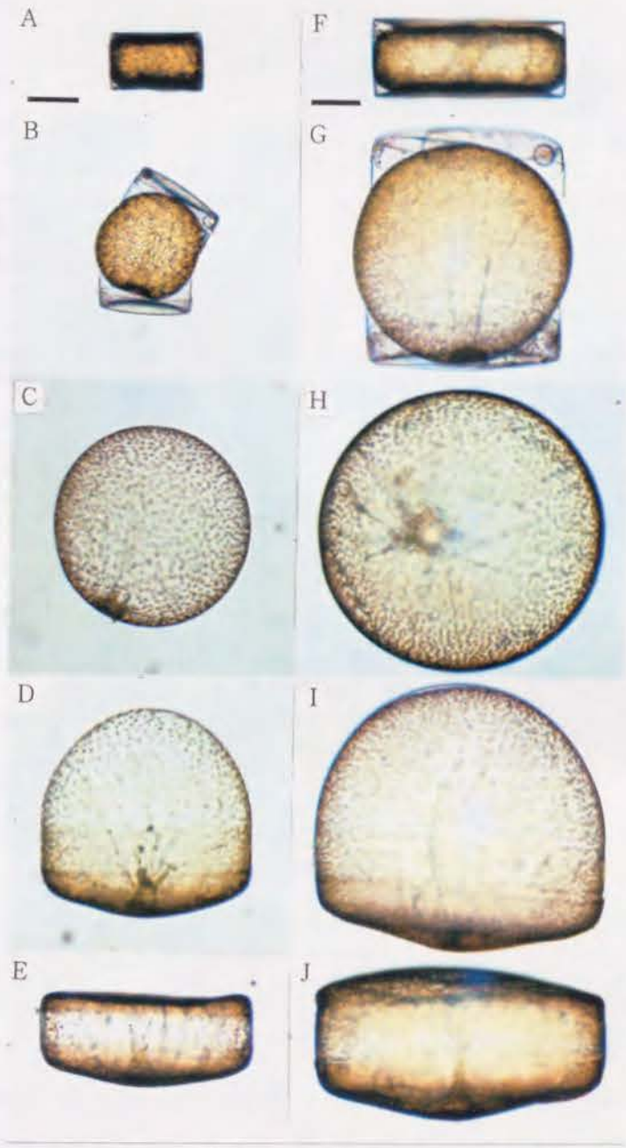


Fig. 3-20. Two series (A ～ E and F ～ J) illustrating sequential observations of vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture.
A, F, A cell initiating vegetative cell enlargement showing condensation of protoplast (Start of observation); B, G, Progress of expansion (After 3 hours); C, H, Expanding pseudo-auxospore (After 6 hours). D, I, Formation of the first initial valve (After 11 hours); E, J, Final stage of the vegetative cell enlargement (After 20 hours).
(Scale bar, 100 μm)

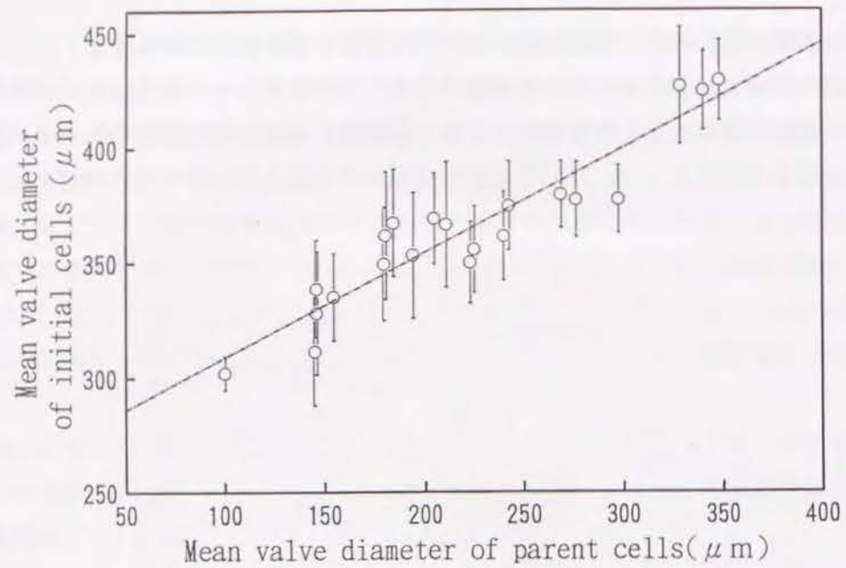


Fig. 3-21. Relationship between the mean valve diameter of parent cells and the initial cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran (Strain LA2) in vegetative cell enlargement in culture. Vertical bars indicate the standard deviations.

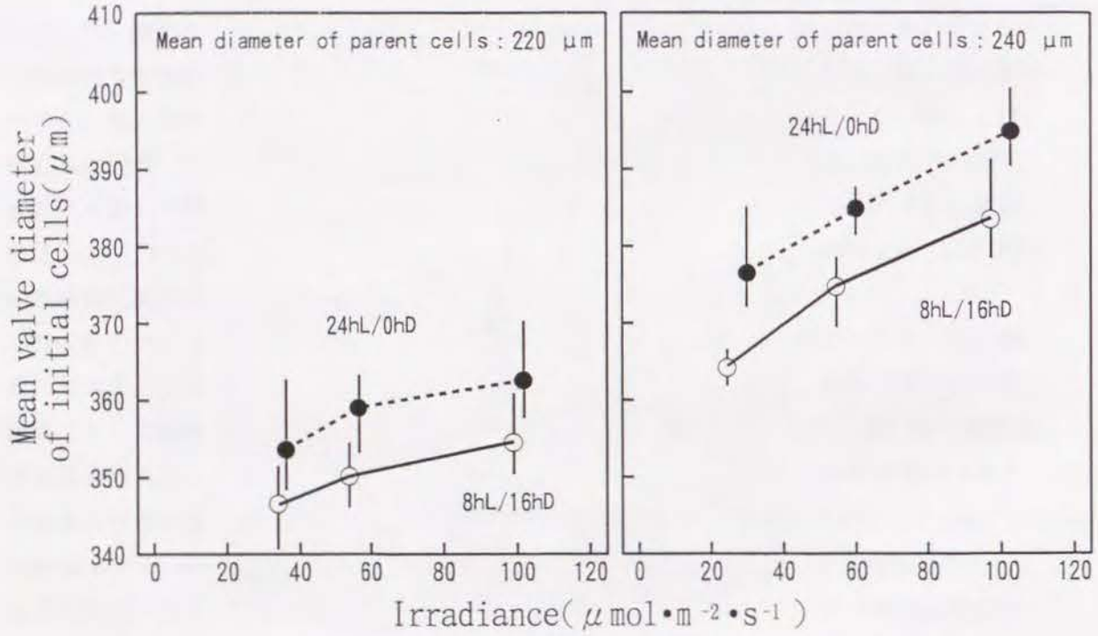


Fig. 3-22. Effects of irradiance and light/dark photo cycle on the mean valve diameter of initial cells in vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* Gran. Vegetative cell enlargement was induced under the conditions of tests 43-45 and 52-54 shown in Table 3-6. Light and dark photo-cycles on the condition Ⅳ and parent cell diameters were shown in the figure. Vertical vars show the range between minimum and maximum data.

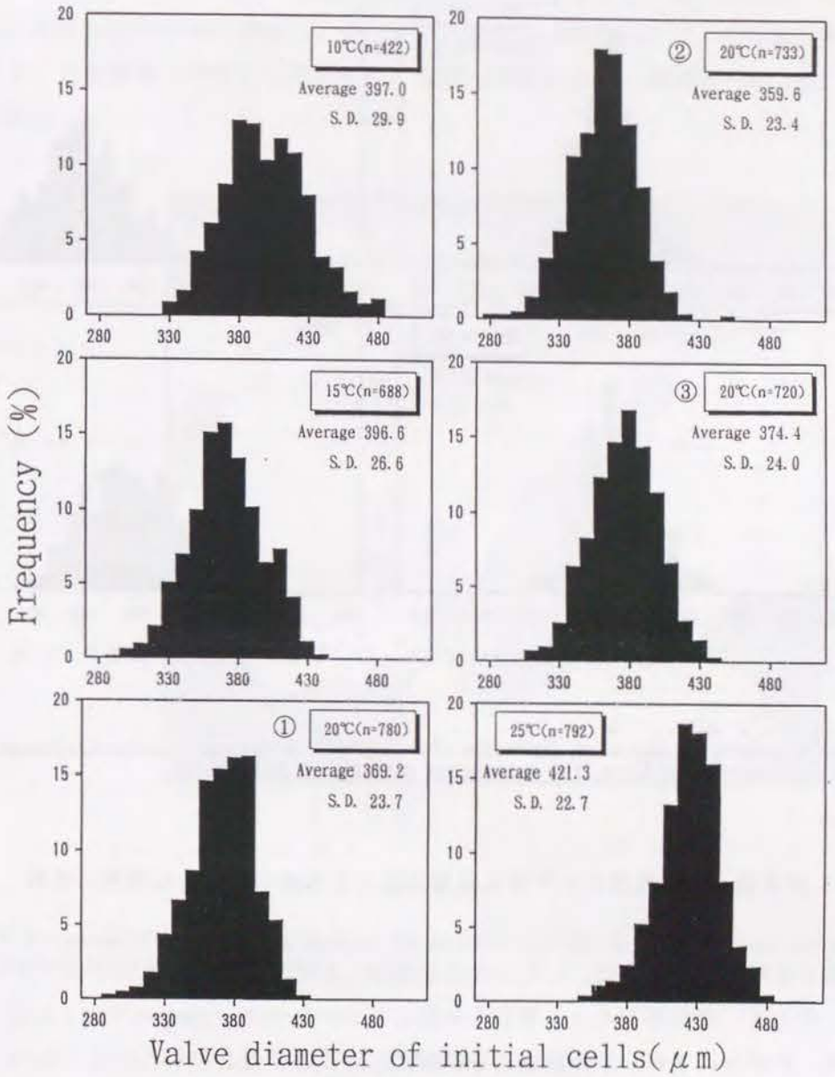


Fig. 3-23. Effects of temperature on the valve diameters of initial cells in vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* Gran. The experiment corresponds to Fig.3-9.

Fig. 3-24に、栄養的増大における塩分の効果を示した。塩分が20、25、30および35における初生細胞の平均径はそれぞれ417、412、407および383μmであり、塩分が低いほど初生細胞のサイズが大きくなる傾向が認められた。これら初生細胞のサイズと光・温度・塩分の関係から、細胞の膨張過程において培養条件の違いにより、細胞内に何らかの生理的差異が生じ、初生細胞のサイズに影響を与えている可能性が考えられた。

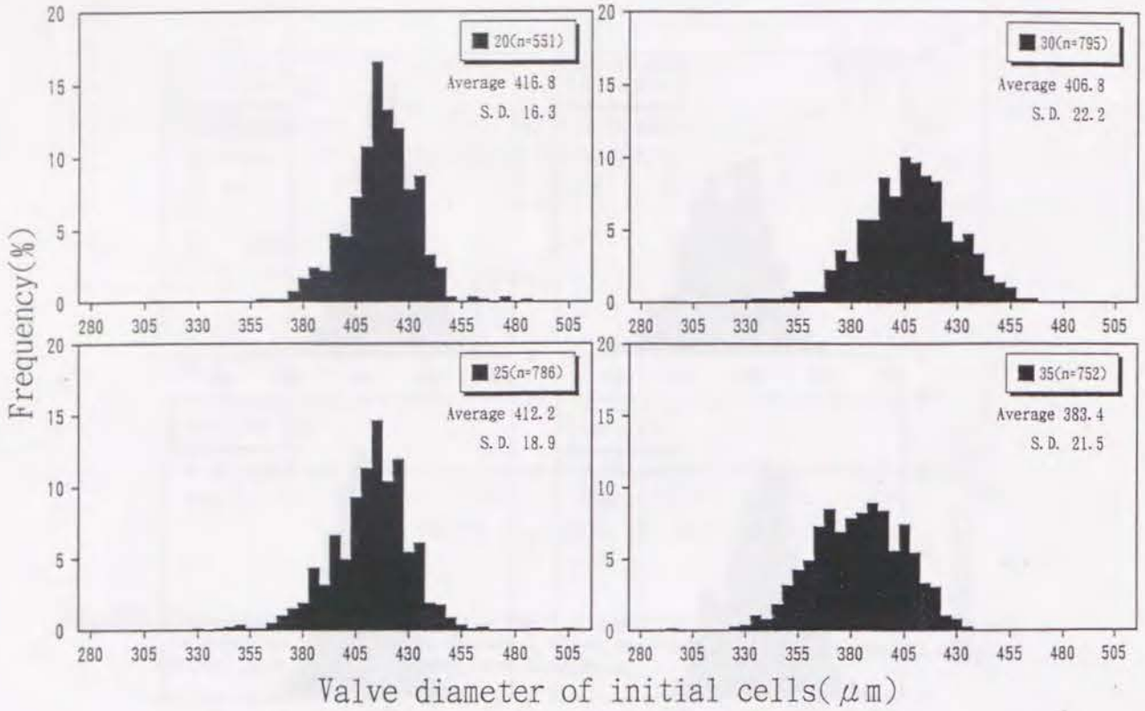


Fig. 3-24. Effects of salinity on the valve diameters of initial cells in vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* Gran. The experiment corresponds to Fig.3-10.

第６項　培養株間における偽似増大胞子を形成する能力の差異の検討

休眠胞子を形成する能力は、いくつかの珪藻種においては、限られたクローンしかもっておらず、例えば、ナラガンセット湾から分離した *Leptocylindrus danicus* では、50以上の培養株の内、わずかに３株しか休眠胞子を形成しないことが報告されている（Hargraves & French 1983）。*C. wailesii* の栄養的増大による細胞サイズの回復する能力についても、*L. danicus* と同様な傾向が、一定の培養条件下で観察された。本項では、大量に無菌株を分離し、一定条件下において栄養的増大を起こす性質の、株間（同じ日に同じ調査地点で採集した）および個体群間（異なる場所や時期に採集した）の差異を検討した。

材料および方法

栄養的増大を起こす性質の株間、および個体群間における差異を検討するため、1992年11月～1994年２月にかけて、Fig.3-25に示した９地点において *C. wailesii* を採集し、上述のFig.3-7に示した方法を用いて複数の無菌クローン株を確立した。そして、Table 3-6に

示した実験区44の培養条件下で栄養的増大を誘起した。培養終了後、光学顕微鏡下にて増大胞子および初生細胞の有無を観察し、各グループ毎に栄養的増大を起こした株の割合を求めた。また、栄養的増大を生じた株とそうでなかった株に分けて蓋殻径を測定し、それぞれ比較した。

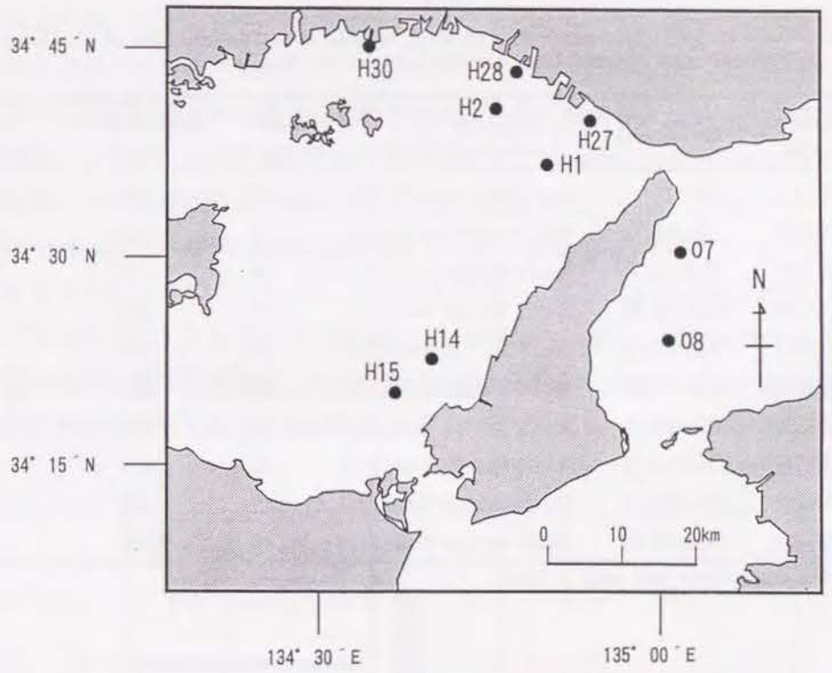


Fig. 3-25. Locations of the sampling stations for isolating vegetative cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran in Harima-Nada.

結果および考察

Table 3-9に、簡易無菌化法により確立された *C. wailesii* クローン培養株を用いて、一定条件下（実験区44；Table 3-6）で栄養的増大を誘起し、栄養的増大の起き易さについて、株間（同じ日に同じ調査地点で採集した）および個体群間（採集した日が同じでも採集地点が異なるか、あるいは異なる時期に採集した場合）における差異を検討した結果を示した。1992年11月～1994年２月の間に大阪湾および播磨灘から分離した10グループについて、それぞれ３度実験を繰り返した結果、増大胞子を形成しやすい株の割合は、グループにより大きく異なることが判った。また、1992年11月に大阪湾西部海域から分離したグループ、および1993年２月に播磨灘北部海域から分離したグループが高頻度（全体の約50％の株）に栄養的増大を起こす性質を有していることが判った。1993年２月４日に播磨灘北部海域

から分離したグループでは栄養的増大を起こしやすい株の割合が高かったのに対し、同じ日に同灘の南部海域から分離したグループからはそのような株を見い出すことはできなかった。

Table 3-9. Rates of pseudo-auxospore forming strains in the populations of *Coscinodiscus wailesii* Gran isolated from eastern Seto Inland Sea.

Sample name	Sampling date	Sampling sea-area(Sta.)	Number of strains	Mean diameter (μm)	Rate of* formation(%)
WO9211	1992/11/15	West Osaka-bay(O7,O8)	18	230	53.7
WO9301	1992/01/14	West Osaka-bay(O7,O8)	19	250	21.1
NH9301	1993/01/07	North Harima-Nada(H1,H2)	3	170	11.1
NH9302	1993/02/04	North Harima-Nada(H27)	19	260	47.7
SH9302	1993/02/04	South Harima-Nada(H14)	14	250	0.0
NH9305	1993/05/01	North Harima-Nada(H28)	18	250	0.0
NH9308	1993/08/06	North Harima-Nada(H1,H28)	12	270	16.7
NH9312	1993/12/01	North Harima-Nada(H27)	20	260	3.3
NH9402	1994/02/03	North Harima-Nada(H30)	40	250	2.5
SH9402	1994/02/02	South Harima-Nada(H15)	40	260	2.5

*:The experiment was made 3 times.

Fig. 3-26. Rates of pseudo-auxospore forming strains of *Coscinodiscus wailesii* Gran in vegetative cell enlargement.

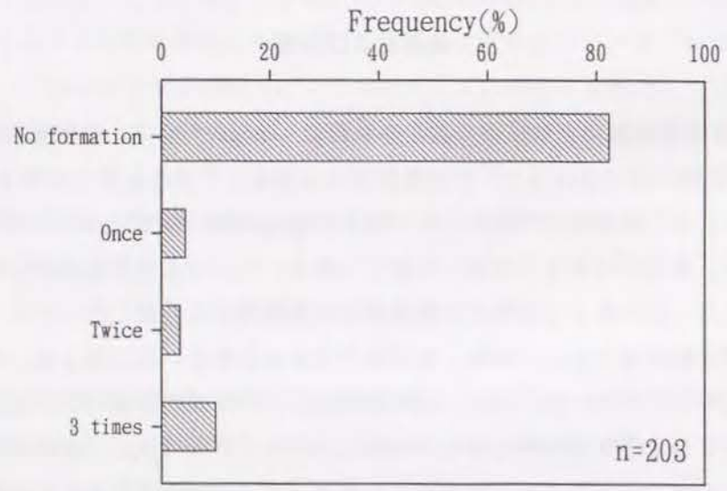


Fig. 3-26に、３度実施した栄養的増大誘起実験（Table 3-9）において、実験に用いた全株数（合計203株）に対する０～３の各回数だけ栄養的増大が観察された株数の全株数に対する割合を示した。１度も栄養的増大を起こさなかった株、１度だけ起こした株、２度起こした株、および３度とも起こした株の割合はそれぞれ82.3、4.4、3.4および9.9%であった。１度だけ起こした株および２度起こした株の割合に比べ、３度とも起こした株数の割合は２倍以上であったことから、栄養的増大が起こりやすい性質を有する株とそうでない株の存在することが示唆された。

Fig. 3-27に、栄養的増大が一度でも観察された株と全く観察されなかった株間の細胞サイズ（蓋殻径）の差異について検討した結果を示した。Mann-WhitneyのU検定（有意水準0.05）の結果、両者の殻径分布に差があるとは言えなかった。従って、Table 3-9、Fig. 3-26およびFig. 3-27で行った培養条件の範囲において、栄養的増大の起こり易さが、大きさの差異に由来するのではなく、*C. wailesii* の栄養的増大を起こしやすい株が存在すること、この株の存在比がグループ間で大きく異なることが判った。また、実験に用いた多くの培養株で栄養的増大が観察されなかったことから、*C. wailesii* の栄養的増大を高頻度に起こす別の未知の条件のある可能性が示唆された。

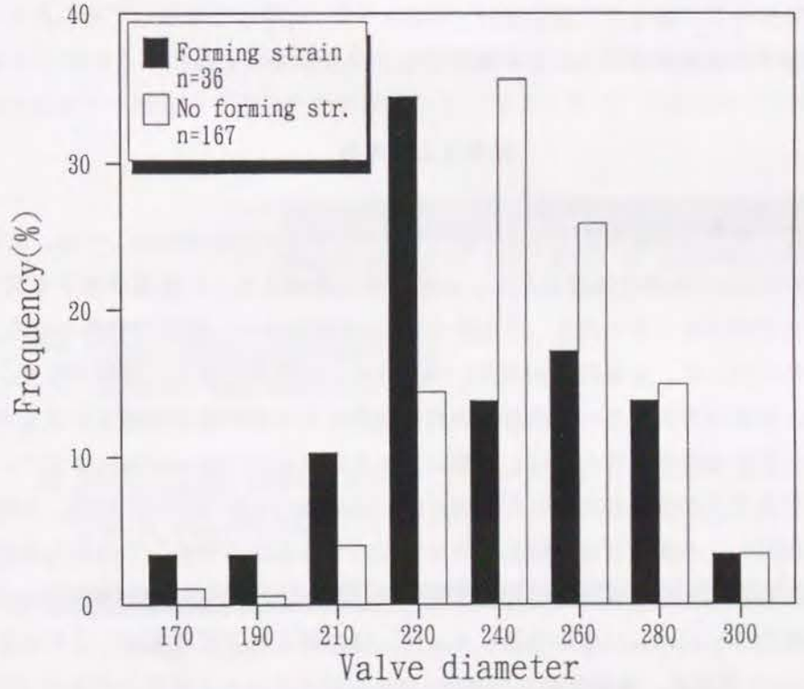


Fig. 3-27. Frequency distributions of valve diameters between pseudo-auxospore forming strains and no forming strains of *Coscinodiscus wailesii* Gran.

第７項　細胞の大きさと生活環

19世紀後半には既に、増大胞子形成における細胞のサイズの効果はPfitzer（1871）などにより指摘されていた（Drebes 1977）。その後、Geitler（1932）により羽状目珪藻のクローン培養株と現場調査との包括的な研究から、有性化と細胞サイズの関係が世界で最初に明らかにされた。以来、中心目および羽状目のほとんど全ての種類で、増大胞子形成と細胞サイズの間に密接な関係のあることが報告されている。また、Lewis（1984)は、珪藻類の有性化は環境条件だけではなく、細胞サイズの減少によっても引き起こされており、このため”MacDonald-Pfitzer's rule”に従った細胞分裂は、有性化の精密時計として機能すると述べ、珪藻類の有性化における細胞サイズの重要性を指摘した。そこで本項では、*C. wailesii* の栄養的増大と有性生殖が生じる細胞サイズについて検討した。

材料および方法

培養実験は、殻径70～400μmまでの大きさの異なる複数の培養株を用いて行った。偽似増大胞子と造精細胞の形成が起こる殻径の範囲は、Tables 3-6～3-9およびFigs. 3-9, 10に示した全実験条件と、加えて、実験区44（Table 3-6）に準じて培養して得られたサンプルを光学顕微鏡下で観察することにより推定した。

結果および考察

偽似増大胞子形成は親細胞の大きさが90～350μmの時に観察された。一方、造精細胞の形成は90～200μmの範囲で観察された。造精細胞の形成は多くの培養条件下で試みたにも関わらず極めて低頻度であったが、このうち100μm前後の狭い範囲で観察されることが多かった。これに対して、栄養的増大は150～350μmの広範囲で頻繁に観察された。よって、有性生殖は、栄養的増大に比べて母細胞の大きさがより小さい時に限定されるものと推察された。中心目珪藻類の有性生殖は、細胞の大きさが最大時の20～50%にまでついて減少した時に生じることが報告されており（例えば、Stosch 1956, Drebes 1966, 右田 1967a, b, Drebes 1977）、本種の有性生殖も、造精細胞の大きさから判断して同様な範囲で生じると考えられる。また、これまでの培養実験で得られた初生細胞の大きさは240～520μmであり、母細胞の1.11～3.17倍の範囲にあった。偽似増大胞子形成実験により観察された最大径520μmの細胞を、播磨灘産 *C. wailesii* の最大径とすると、細胞の有性化は約40%以下（90～200μm)、栄養的増大は約70%以下（90～350μm）にまで径が減少した時に生じうることが判った。右田（1967a）は、*Melosira moniliformis* の有性生殖が、最大径の20～50%の範囲で観察された結果から、有性生殖を行うための条件としてまず細胞の縮小という

内部条件が外部環境条件に先行することを指摘した。これに対し、これまで、*C. wailesii* の栄養的増大を観察できた栄養細胞の大きさは、殻径90～350μm（最大径の20～70%）の広範囲にあった。従って、本種の栄養的増大の発現は、細胞の大きさという内的要因よりも、環境という外的要因によって大きく左右されている可能性が高い。

初生細胞の大きさが母（親）細胞の大きさや環境条件により変化するという特徴（Figs. 3-20～24）は、細胞サイズが”sex clock”として機能する珪藻類において、個体群の内で有性生殖や栄養的増大が起こるタイミングを調節する役割を果たしている可能性も考えられる。当然、細胞サイズのバリエーションを増大させる原因にもなるだろう。

Fig. 3-28に、*C. wailesii* の殻径と生活環の関係を模式的に示した。本研究で得られた結果から、播磨灘産 *C. wailesii* の培養条件下における最大径は520μmであり、分裂を繰り返すにつれて大きさが減少することが示された。細胞径350μm、すなわち最大径の約70%にまで蓋殻径が減少した時に、栄養的増大により大きさを回復することができる。そして、大きさが約200μmにまで減少した時、有性生殖により増大胞子を形成するようになると考えられる。増大胞子（偽似）の形成は、大きさが約100μmに減少するまで可能であり、それでもなお、大きさを回復させなかった栄養細胞は死滅するまで細胞分裂を繰り返すことになる。分裂の停止は大きさが70μm前後になった時に起こり、以後細胞は死滅してしまう。

C. wailesii が天然でもこのような生活史を有しているならば、有性生殖と栄養的増大の両方の方法で大きさを回復させることができることになる。ただ、栄養的増大が起こり得

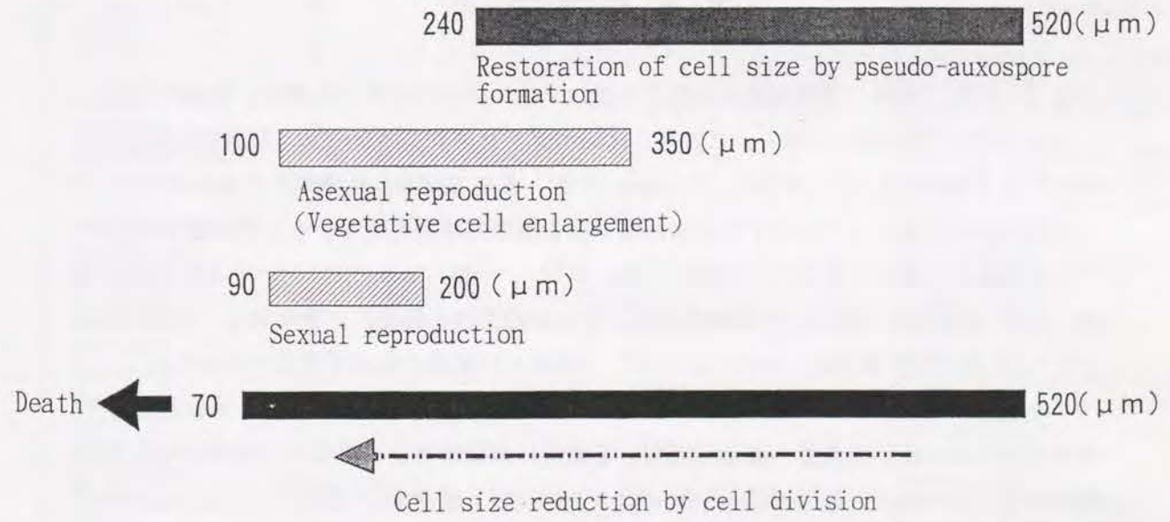


Fig. 3-28. Relationship between valve diameter and life cycle (sexual and asexual) of *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture.

る細胞径の範囲から考えて、播磨灘産 *C. wailesii* の大きさの回復は、栄養細胞がそれほど小型化しないうちに、有性生殖よりも栄養的増大によりなされている可能性が高い。なお、大きさの回復は、一度に全ての栄養細胞で生じるのではなく、むしろ散発的に生じると思われる。この時、大きさを回復しなかった栄養細胞は分裂を繰り返し、さらに大きさが減少する。これを何度か繰り返した場合、大きさが広範囲に及ぶ集団が形成されるであろう。つまり、このような集団には有性生殖、あるいは、栄養的増大が可能な大きさの細胞が常に存在することになる。無性生殖の有利さは、配偶の相手を捜す必要がなく、そのための時間やエネルギーが不必要なことにある（Gallagher 1983, 巌佐 1987）。大きさの回復時における増殖の停止は個体群の拡大にマイナスになるので、より短期間における大きさの回復は、より長期間の集団の繁栄を維持することになるだろう。一方、有性生殖の有利な点は、遺伝情報の組み替えによって、個体群の遺伝的多様性を保持することにある。その結果、環境変化への適応能が大きくなると考えられる（左子・石田 1986, 左子 1988, 1995）。以上から、有性生殖と無性生殖の両方により大きさの回復が可能な集団は、珪藻種にとって最も安定した理想的な集団といえ、環境変化に対応する上で極めて有利と推察される。珪藻類における大きさの回復は、優占させた”population”を長期間継続させ、さらに繁栄させるための積極的戦略と考えられる。

第２節　休眠細胞の形態と生理

第１項　休眠細胞の形成

温帯の沿岸、内湾、湧昇域等に生息する植物プランクトンの多くの種は、季節的に著しい消長を示す（Smayda 1980）。このような植物プランクトンの中には、有害赤潮の代表ともいえる *Chattonella*（*C. antiqua*, *C. marina*）や、多くの種類の珪藻類が含まれる。これらの生物は生活史の中でシストや休眠状態にある細胞の時期を持ち、その間海底で過ごすことが知られてきた（今井ほか 1984, Imai & Itoh 1988, 今井 1990, 今井ほか 1990, 板倉 1990, 板倉ほか 1992）。浮遊珪藻類は、その生活史の一時期に、休眠胞子”restingspore”、あるいは休眠細胞”resting cell”と呼ばれる細胞を形成することが知られている（小久保 1955, Garrison 1984, Ishizaka et al. 1987, Pitcher 1990）。休眠胞子と呼ばれるものは、厚い珪酸質の被殻を持ち、形態的に栄養細胞とは異なった特徴を有する細胞である（Hargraves & French 1983, Garrison 1984, 板倉ほか 1992）。これらの休眠胞子の中でも、*Chaetoceros* 属が形成する休眠胞子は、現場海水中にもしばしば観察され、その形態に関する知見は比較的多く、種の分類基準としても重要とされている（小久保 1960, Rines & Hargraves 1986, Stockwell & Hargraves 1986, Rines & Hargraves1988）。一方、休眠細胞は色素の暗化や凝集が起こるが、形態的には栄養細胞と酷似した細胞である(Hargraves & French 1983, Garrision 1984, Sicko-Goad et al. 1989, 板倉1991）。

内湾、沿岸域で多くの植物プランクトンが形成するシスト等の耐久性細胞は海底に沈降して、海底泥中で生存することが知られている。また、海底泥を口過海水や培養液等に懸濁すると、浮遊珪藻類が出現する（Gucluer & Gross 1964, Zgurovskaya 1977, Imai et al. 1984, Yamochi 1989b, 今井ほか 1990）ことから、これらの休眠細胞も海底泥中で生存していることが示唆されている。

珪藻類の休眠細胞および休眠胞子の形成条件については、Stosch & Drebes（1964）、Drebes（1966)、Hargraves & French（1975）、Durbin（1978）、Stosch & Fecher(1979)、French & Hargraves（1980）、Davis et al.（1980）、Hollibaugh et al.（1981）、桑田（1989）、および板倉ほか（1993）などの研究がある。Table 3-10にそれらの結果を種類別、形成条件別にまとめた。条件を光、温度、栄養の３つに大別すると、これら休眠期細胞の形成には栄養（特にＮ欠）の影響が大きく、つづいて光（低照度）、温度が影響するという傾向が認められる。

Table 3-10. Variables inducing resting spore and resting cell formations.

Species	N	P	Si	Fe	pH	Tem.	Light	Photo period	Source
A. coffaeformis						+	+		Anderson(1975)
Chaetoceros spp.	+						(+)		French & Hargraves(1980)
C. debile	+								Garrison(1981)
C. diadema	+						(+)		French & Hargraves(1980)
C. diadema								+	Hollibaugh et al.(1981)
C. dydimus								+	Hollibaugh et al.(1981)
C. dydimus	+								Itakura et al.(1993)
C. pseudocurvisetus	+								Kuwata & Takahashi(1990)
C. sociale	+								French & Hargraves(1980)
C. teres	+								French & Hargraves(1980)
C. vanheurckii	+								Garrison(1981)
C. vanheurckii								+	Hollibaugh et al.(1981)
D. brightwellii	+								Hargraves(1982)
D. confervacea	+					(+)			Durbin(1978)
E. soleirolii	+	+	+	+	+	+			Stosch & Fecher(1979)
L. danicus	+								Davis et al.(1980)
L. danicus	+					(+)			French & Hargraves(1980)
M. granulata						+	+		Sicko-goad et al.(1989)
S. costatum							+		Itakura(1992)
S. palmeriana								+	Steele(1965)
S. palmeriana	+	+							Drebes(1966)
S. turris						+	+		Stosch & Drebes(1964)
S. turris	+								French & Hargraves(1980)
T. nordenskioeldii	+					(+)			Durbin(1978)

+:effective,(+):has effect when coupled with primary factor (The table was modified Table 1. in Hargraves & French 1983)

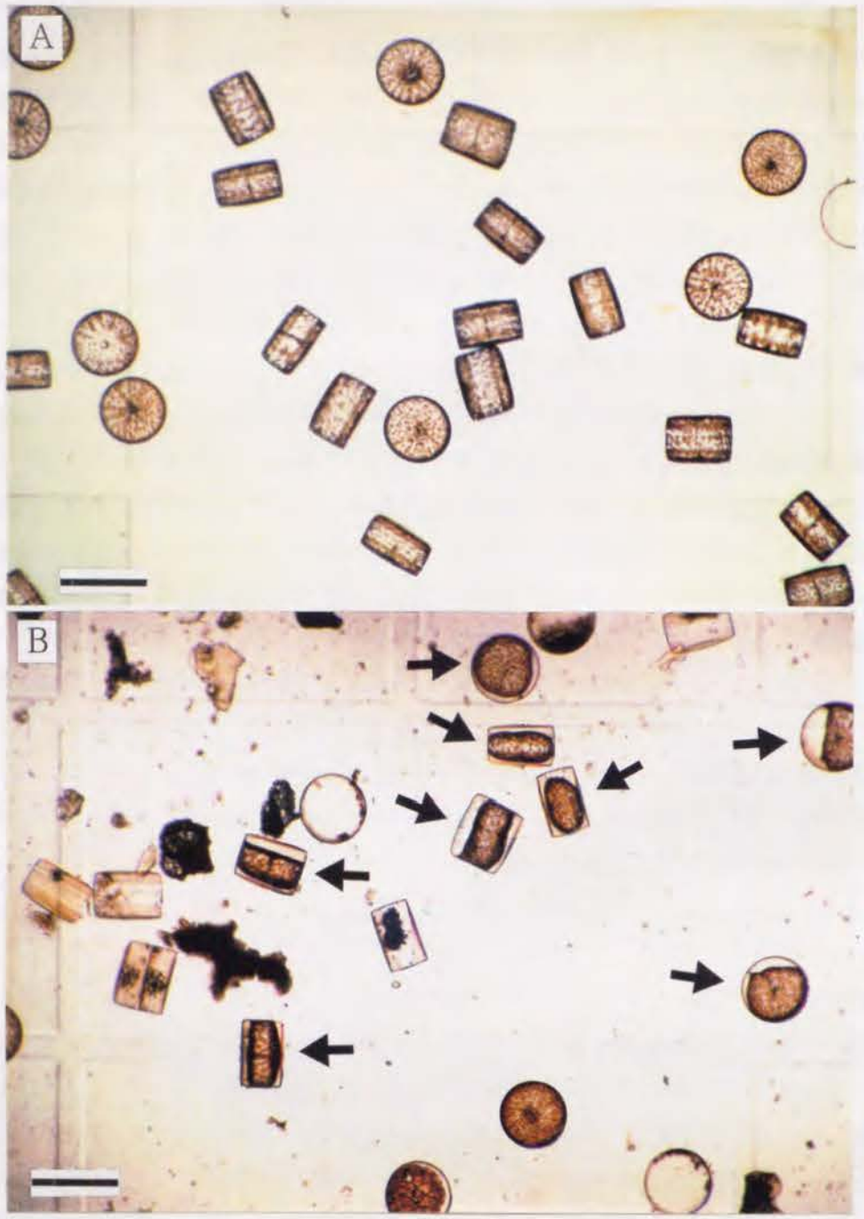


Fig. 3-29. Light microphotographs of normal vegetative cells(A) and resting cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran formed in the sediments(B) in darkness in culture. Resting cells were indicated by arrows. (Scale bars, 100 μ m)

本項においては、*C. wailesii* についても現場水域の海底に休眠期細胞の状態で存在していると考え、これまで報告された休眠期細胞の形成条件を参考にし、培養条件下において *C. wailesii* の休眠期細胞の形成を試みた。播磨灘から採取した海底泥を用いた結果、休眠細胞の形成に成功した。光（照度および明暗周期）・栄養塩濃度等の組み合わせによる形

成実験も実施し、形成条件について詳細に検討した。さらに形成された休眠期細胞の形態、復活過程等について検討した結果を述べる。なお、休眠胞子の”germination”（発芽）に相当する用語である、休眠細胞の”rejuvenation”（Sicko-Goad et al. 1986, Sicko-Goad et al. 1989）を本論文では、板倉ほか（1992）に従い、”復活”と呼ぶことにする。

材料および方法

培養条件下において *C. wailesii* の休眠期細胞の形成条件を栄養、温度および明暗周期についてこれらを組み合わせて検討した。まず、栄養塩について、ＭＰ１液（Table 3-1）、ＭＰ１液からＮ成分を除いた（Ｎ free）、ＭＰ１液からＰ成分を除いた（Ｐ free）、およびＭＰ１液からSi成分を除いた（Si free）培養液をそれぞれ作製した。光条件については白色蛍光灯下、光強度45 μmol•m^{-2}•s^{-1}のもと、明暗周期を８hL/16hDおよび16hL/８hDの２段階設定した。培養温度については10, 15, 20および25℃の４段階設定した。200ml容三角フラスコ（Vidrex製）にそれぞれの培養液を無菌的に100ml入れ、これに *C. wailesii* 無菌培養を50～200細胞接種した後、それぞれの温度および明暗周期条件下で１～２週間培養した。各温度条件のＭＰ１液における培養が定常期に達した時点で、フラスコを同温の暗黒条件下で保存した。なお、10℃で培養したものについては６℃の暗黒条件下でも保存した。一方、人工的に *C. wailesii* の休眠期細胞を形成させる一つの試みとして、海底泥中に *C. wailesii* の栄養細胞を懸濁することにより、休眠期細胞の形成について検討した。すなわち、各温度条件下、ＭＰ１液で中期対数増殖期まで培養した *C. wailesii* 約1000細胞を、播磨灘北部海域のSta. H2でＫＫ式柱状採泥器により採集した海底泥約15gに懸濁し、暗黒条件下に保存した。

復活過程の観察は、形成された休眠細胞をマイクロピペットにより分離し、1.5mlのＭＰ１液を入れた組織培養用容器（Costar製, 24区画）の１区画に１細胞収容した。培養条件は温度20℃、白色蛍光灯下、光強度65 μmol•m^{-2}•s^{-1}、連続照明とし、培養開始後の同一細胞形態の経時変化を倒立落射蛍光顕微鏡の通常光下で観察した。

結果および考察

海底泥に栄養細胞を懸濁した後、暗黒条件下で保存すると、Fig. 3-29（Ａ, Ｂ）に示したように栄養細胞（Ａ）と形態が異なる細胞（Ｂ）が形成された。形成された細胞の形態的特徴は、細胞質が被殻から分離し、細胞の中央付近で凝集することであり（Ｂ）、栄養細胞（Ａ）とは容易に区別することができた。休眠胞子の形成に際しては、栄養細胞の二分裂とは異なった細胞分裂を伴うため、外部形態的に栄養細胞と著しく異なった（珪酸質の蓄積、装飾物等）を持つ細胞となる場合が多い（Hargraves & French 1983, Garrison

1984）。しかし、Fig. 3-29に示した細胞は、特別な細胞分裂をして形成された痕跡がなく、その形態も休眠胞子と栄養細胞（例えば、*Chaetoceros* や *Stephnopyxis* 属）ほど差異は大きくなかった。一方、休眠細胞はその形成の際には特別な細胞分裂は伴わないと考えられ、その外部形態から栄養細胞と区別するのは困難である（板倉ほか 1992）。しかし、休眠細胞は、細胞内に色調が暗化した細胞質の凝集体を持つ点などにおいて、通常の栄養細胞と

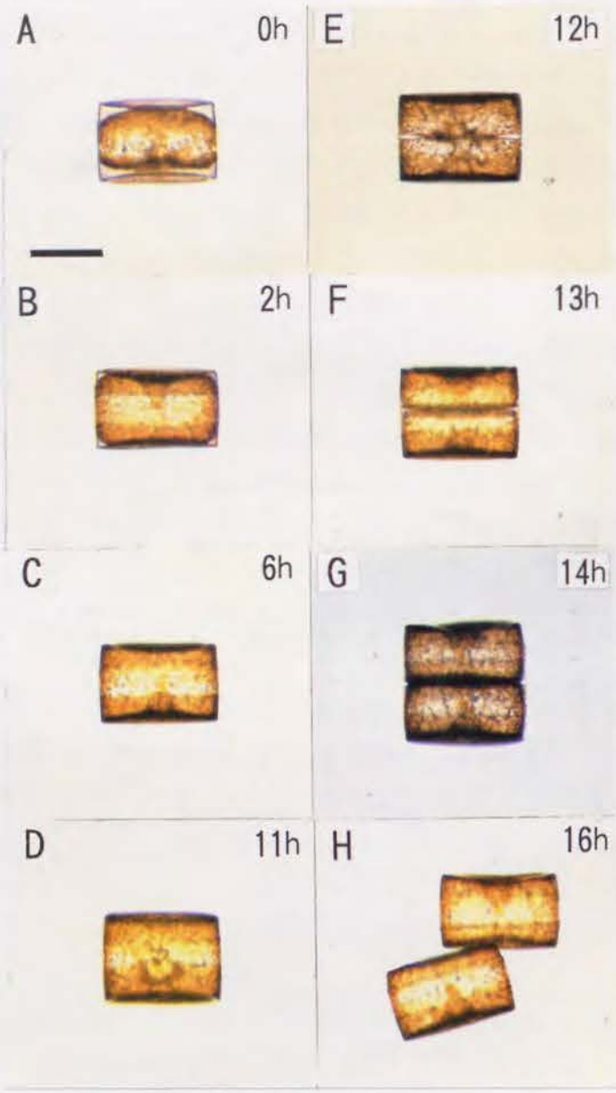


Fig. 3-30. Sequential observation of a rejuvenation process of a resting cell of *Coscinodiscus wailesii* Gran formed in culture.
A, A resting cell of *C. wailesii* at the onset of incubation; B, Beginning to change for rejuvenation; C, The resting cell indistinguishable from normal vegetative cell; D, E, Elongation of the cell and formation of cell disk; F, G, Growth of each daughter cell; H, First cell division. (Scale bar, 100 μ m)

は異なった特徴を持っている（Anderson 1975, Garrison 1984, Hargraves & French 1983, Sicko-Goad et al. 1986, 板倉ほか 1992）。これまで報告されている休眠細胞の形態学的特徴から、Fig. 3-29に示した細胞（B）は *C. wailesii* の休眠細胞であると判断できる。

Fig. 3-30（A～H）に、人工的に形成された休眠細胞の復活過程を示した。休眠細胞（A）は培養開始後、速やかに復活し始め（B）、6時間後には通常の栄養細胞と区別できなくなった（C）。休眠細胞は、復活時に新しい被殻を形成することなく、元の被殻が復活した細胞の被殻となった。栄養細胞と区別できなくなった細胞は、11時間後にはわずかながら貫殻軸方向に伸張し（D）、12時間後には細胞版の形成が進行した（E, F）。培養開始後、14時間後には細胞分裂が始まり（G）、16時間後には最初の細胞分裂が完了した（H）。復活は光がない条件では起こらなかった。

Fig. 3-31に、*C. wailesii* 休眠細胞の形成条件を、栄養、培養温度、および明暗周期についてこれらを組み合わせて検討した結果を要約して示した。今回実験した条件において、多くの珪藻類で休眠胞子の形成を誘引する条件として知られるN欠培地中においても休眠細胞を形成することはなかった。休眠細胞の形成は、やはり栄養細胞を海底泥に懸濁し、暗黒条件下に保存した場合にのみ観察され、今回実験した6～25℃のいずれの温度でも形成が確認された。

Temperature(℃)

Culture medium	10→10*	10→6	15→15	20→20	20→10	25→25	Light/dark photo cycle
MP1**	−	−	−	−	−	−	8hL
	−	−	−	−	−	−	16hL
MP1 (N free)	−	−	−	−	−	−	8hL
	−	−	−	−	−	−	16hL
MP1 (P free)	−	−	−	−	−	−	8hL
	−	−	−	−	−	−	16hL
MP1 (Si free)	−	−	−	−	−	−	8hL
	−	−	−	−	−	−	16hL
MP1+ Sediment	+	+	+	+	+	+	8hL
	+	+	+	+	+	+	16hL

+ : formation of resting cells, − : no formation

Fig. 3-31. Screening of conditions for inducing resting cells formation of *Coscinodiscus wailesii* Gran under various temperature, light and dark photo cycle (8hL/16hD, 16hL/8hD), nutrients (MP1, MP1 of (N free, PO_4-P free, SiO_2-Si free)), and mixing vegetative cells with sediments in culture. * :Left of the arrow, during incubation at irradiance of 45 μ mol·m^{-2}·s^{-1}, right of the arrow, during storage in darkness.

第２項　休眠細胞の形成条件

休眠期細胞の形成条件や発芽（あるいは復活）条件は、水域における植物プランクトン種の季節的出現性と深く関わりを持つため、植物プランクトン種の交代あるいは遷移現象を考える上で必要不可欠な研究と考えられる。これまで報告されている多くの珪藻類（特に *Chaetoceros* 属）について、休眠胞子の形成条件が調べられているが、多くの場合栄養塩（特に窒素）欠乏が休眠期細胞の形成を引き起こす主要因であることが、培養条件下および現場調査の結果から報告されている（Garrison 1981, Hargraves & French 1983, 板倉・今井 1994；Table 3-10）。一方、*S. costatum* では、栄養細胞の状態ではほとんど増殖できないような光強度（約10 μ mol•m^{-2}•s^{-1}以下あるいは暗黒）に置かれた場合に休眠細胞を形成し、栄養細胞が活発に増殖できるような光強度下（約80 μ mol•m^{-2}•s^{-1}）では休眠細胞を形成しないことが報告されている（板倉 1992）。また、彼らは *S. costatum* 休眠細胞形成における栄養塩の影響について、栄養塩（窒素あるいは燐）の欠乏が引き金になるのではなく、逆にいずれかの栄養塩濃度があまり低くなると休眠細胞が形成されなくなってしまうと述べている。

光が珪藻類の休眠期細胞形成に与える影響については、休眠胞子の場合、暗条件によって胞子形成が引き起こされることはないとされている（Hargraves & French 1975）。一方、羽状目珪藻の *Amphora coffaeformis* の休眠細胞は、暗条件に置くことによって形成されることが明らかにされており（Anderson 1975）、休眠胞子と休眠細胞では光の影響が異なると考えられている（French & Hargraves 1980）。前項では、海底泥に栄養細胞を懸濁した後、暗黒条件下で保存すると休眠細胞の形成が促進されることを明らかにした。本項では、播磨灘北部の７地点から採取した海底泥中を用いて休眠細胞の形成を試み、その形成頻度や生残等と海底泥の性質の関連について調べた。

材料および方法

1994年７月にFig. 3-32に示した播磨灘北部の７調査地点の海底泥を、Sta. H2, H7ではＫＫ式柱状採泥器（木俣ほか 1960）により、Sta. HA1～HA5ではドレッジにより採取し、実験室に持ち帰り10℃の冷暗所に保存した。温度20℃、光強度45mol•m^{-2}•s^{-1}、明暗周期８hL/16hDの条件下で対数増殖期中～後期まで培養した *C. wailesii* RG1株（クローン無菌培養株、以下の休眠細胞の全ての実験に用いた）約1000細胞（200 μ l のＭＰ１液を含む）を各地点で採集した海底泥約15ｇにそれぞれ懸濁し、これらを10ml 容ねじ口ガラス瓶（日電理化ガラス製）に詰め、20日間暗黒条件下で保存した。20日後、各ビンの100～500 μ mの画分を篩洗浄法（Imai et al. 1984, 板倉ほか 1992）により取り出し、滅菌濾過海水にて10～20ml にメスアップした。このうち１～２ml をよく攪拌しながらマイクロピペットにより取り出し、光学顕微鏡下、全細胞生残率（生存細胞数÷実験開始時の細胞数×100（％）；以下、S/Tと略称する）、休眠細胞率（休眠細胞数÷生存細胞数×100（％）；以下、R/Sと略称する）、休眠細胞形成率（休眠細胞数÷実験開始時の細胞数×100（％）；以下、R/Tと略称する）を求めた。同時に、実験に用いた泥の水分含量、粒度組成、中央粒径および硫化物量を求めた。硫化物量については、ヘドロテック－Ｓ（ガステック製）により測定した。

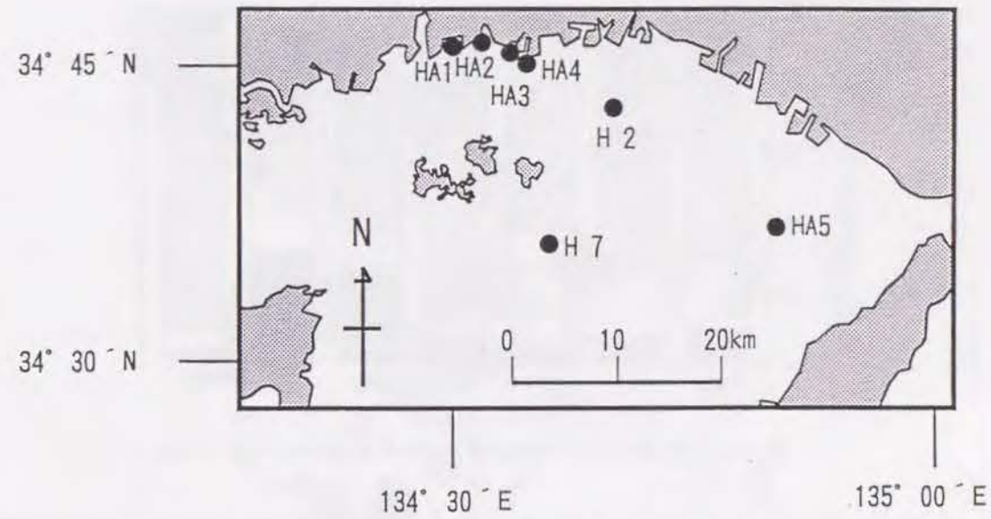


Fig. 3-32. Location of the sampling stations in Harima-Nada, eastern Seto Inland Sea.

結果および考察

Fig. 3-33に、播磨灘の７地点で採取された海底泥の粒度組成を示した。Sta. HA1～HA4およびSta. H2の海底泥は125～250 μ mの画分が最も多く全体の50～60％を占めており、これらの地点の粒度組成はよく類似した。Sta. HA5では1000 μ m以上の画分が60％以上を占めており、砂礫がほとんどであった。Sta. H7では250～500 μ mと63 μ m以下の画分がそれぞれ約30％を占めており、他の地点より、細かい粒子の占める割合が若干多かった。

Table 3-11に、７地点で採集した海底泥間における各泥の水分含量、中央粒径、硫化物量の違いと休眠細胞の生存や形成の差異について示した。水分含量はSta. HA5で12.4％と低く、Sta. H7で51.7％と高かった。中央粒径はSta. HA5で＞1000 μ mと著しく大きかった他は150～220 μ mの範囲にあり、大きな差異はなかった。硫化物量は＜0.02～1.03mg／g(乾泥)の範囲にあり、Sta. HA1, HA2で著しく高く、HA3でも比較的高かった。

S/TはSta. HA1～HA3で著しく低く、特にSta. HA1では実験終了時には全細胞が死滅していた。S/Tのこの低さは硫化物量と対応しており、海底泥中における *C. wailesii* の栄養細胞

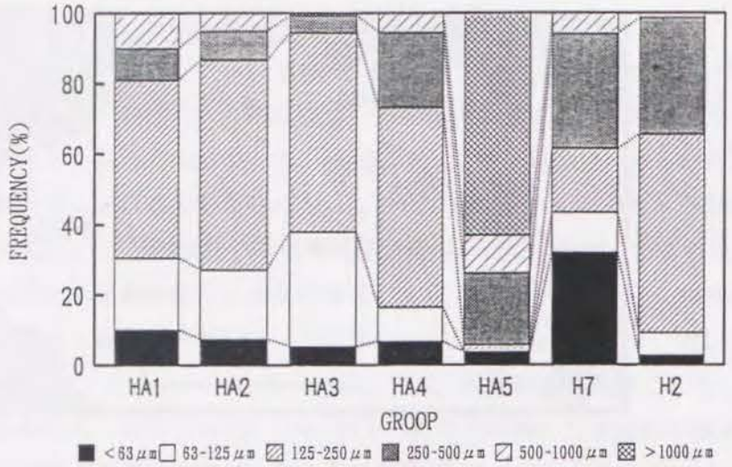


Fig. 3-33. Frequency distributions of size fractions of the sediment samples collected at 7 stations in Harima-Nada in July 1994.

Table 3-11. Effects of moisture content, median diameter and sulfide amount in the sediments on survival and formation of resting cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran in darkness.

Station	HA1	HA2	HA3	HA4	HA5	H7	H2
Moisture content(%)	30.1	30.7	29.5	27.7	12.4	51.7	27.6
Median diameter(μm)	175	175	154	200	>1000	176	218
Sulfide (mg/g dry sediments)	0.89	1.03	0.51	0.09	<0.02	<0.02	0.07
S/T(%)*	0.0	3.0	7.3	43.8	4.3	52.1	43.9
R/S(%)**	0.0	71.4	86.7	94.8	74.1	92.3	96.2
R/T(%)***	0.0	2.2	6.4	41.5	3.2	48.1	42.2

*: Rate of survived cells number to total cells number, **: Rate of formed resting cells number to survived cells number, ***: Rate of formed resting cells number to total cells number.

および休眠細胞の生存にとって、硫化物は著しい悪影響を及ぼすことが判った。一方、Sta.HA5においてもS/Tは4.3%と低かった。本地点における硫化物量は0.02mg／g(乾泥）と少なかったが、水分含量は12.4%と他の地点より著しく少なかった。また、中央粒径が>1000μmであり、よって、水分含量が少ないこと、あるいは粒子径が大きすぎることによってもS/Tが低下することが示唆された。



Fig. 3-34. Light microphtograph of formed a resting cell and dead cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran under the conditions of high concentration of sulfide. (A, a resting cell shown by an arrow; B, high forcus of A). (Scale bars, 100 μ m)

Fig.3-34（A，B）に、Sta.HA3の海底泥中により形成された休眠細胞の光学顕微鏡写真を示した。多くの死滅した細胞の中（A）、休眠細胞が生存していた（B）。Sta.HA3の海底泥における休眠細胞形成率R/Sは86.7%であり、生存している細胞のほとんどが休眠細胞であった。多くの細胞は硫化物の影響で死滅したが、6.4%の休眠細胞が生残していた。一

方、Sta. HA4, H2およびH7の海底泥ではR/Sは高く、いずれも90%以上であり、全細胞生残率R/Tもそれぞれ41.5, 48.1および42.2%であった。Sta. H7の海底泥において、他の地点より水分含量が多かったこと、63μm未満の粒子の存在割合の高かったことが、R/Tが最も高かった原因ではないかと推測された。

第3項　休眠細胞の形成に関わる海底泥の作用

C. wailesii の休眠細胞形成においては、栄養塩の欠乏および暗黒条件の効果は認められず、海底泥に懸濁させたものを暗黒条件に放置することにより形成されたので、海底泥中の何らかの因子が *C. wailesii* の休眠細胞形成を促進している可能性が考えられた。本項においては、海底泥中の、①間隙水中の未知成分、②ｐＨ、③粒子の存在、④嫌気条件について、*C. wailesii* の休眠細胞の形成を促進する可能性のある因子として注目し、検討を行った。

材料および方法

播磨灘北部のSta. H2で得られた海底泥を用い、ＭＰ１液無添加、ＭＰ１液に対する泥の混合割合が1/2（泥10ｇに対してＭＰ１液10ml となるよう調製）、1/3、1/5、1/10、および1/200になるよう、泥とＭＰ１液の混合液を作製し、よく攪拌しながら10ml 容ねじ口ガラス瓶（日電理化ガラス製）に9.5ml 入れた。なお、採取した海底泥のｐＨが7.5であったため、ｐＨを7.5に調整したＭＰ１液を用いた。これらの混合液に、温度20℃、光強度45μmol・m^{-2}・s^{-1}、明暗周期８hL/16hDの条件下で対数増殖期中～後期まで培養した *C. wailesii* 約1000細胞（200μl のＭＰ１液を含む）を接種し、ねじ口ガラス瓶を密封した後、20℃の暗黒条件下で20日間保存した。20日後、各ガラス瓶中の *C. wailesii* を前述の方法で集め、光学顕微鏡下、瓶毎にR/S（本節第１項の材料と方法を参照）を求め、３本の平均値および標準偏差として各実験区毎に示した。

休眠細胞の形成に及ぼすｐＨの効果を調べるため、ｐＨを6.5～8.5まで間、0.5毎に５段階に変化させたＭＰ１液を作製した。温度20℃、光強度45μmol・m^{-2}・s^{-1}、明暗周期８hL/16hDの条件下で対数増殖期中～後期まで培養した *C. wailesii* 約500細胞（100μl のＭＰ１液を含む：実験直前に設定した各ｐＨの培養液と交換した）を、各ｐＨのＭＰ１液 9.5ml に、接種し、それぞれ10ml 容ネジ口ガラス瓶（日電理化ガラス製）に入れた後、20℃の暗黒条件下で20日間密封保存した。20日後、上述の実験同様、各実験区毎にR/Sを求めた。

休眠細胞の形成に及ぼす種々の大きさの粒子の効果を調べるため、粒度組成分画（Fig. 3-33）で得られた、直径＜63μm、63～125μm、125～250μm、250～500μmの範囲の海底泥粒子を用いて、休眠細胞の形成を試みた。海底泥粒子は、水道水および蒸留水でよく洗浄

した後、110℃で乾燥させたものを使用した。そして、ＭＰ１液に対する海底泥粒子の混合割合が２/３（海底泥粒子14gに対してＭＰ１液７ml となるよう）になるよう海底泥粒子をＭＰ１液に混合し、10ml 容ねじ口ガラス瓶（日電理化ガラス製）に各粒子画分につき３本ずつ入れた。温度20℃、光強度45μmol・m^{-2}・s^{-1}、明暗周期８hL/16hDの条件下で対数増殖期中～後期まで培養した *C. wailesii* 約1000細胞（200μl のＭＰ１液を含む）を各ガラス瓶に接種した後、20℃の暗黒条件下に保存した。20日後、休眠細胞形成率を各実験区毎に求めた。また、本実験では実験に用いた全細胞、および形成された休眠細胞の生残について知るため、S/TおよびR/T（本節第１項の材料と方法を参照）についても求めた。

休眠細胞の形成に及ぼす海底泥間隙水（播磨灘Sta. H2で採集した海底泥の間隙水、以下、間隙水と省略する）、細菌および嫌気条件の効果について検討した。すなわち、10ml 容ねじ口ガラス瓶（日電理化ガラス製）に、間隙水、ＭＰ１液（ｐＨ7.5に調整）、海底泥（間隙水を分離したものと同じサンプル）、およびオートクレーブ（121℃・15分）した海底泥を、それぞれにつき３本、９ml（海底泥は約15ｇ）ずつ入れ、これらをガスパック嫌気システム（ＢＢＬ製）に入れる場合（嫌気条件）と、入れない場合（好気条件）の合計２セットを用意した。なお、間隙水は、播磨灘のSta. H7においてＫＫ柱状採泥器により採取した海底泥約200ｇを、350ml 容ポリプロピレン遠沈管に入れ、遠心分離（室温, ×5000rpm, 20分）し、上澄を目合い0.22μmのミリポアフィルターを用いて無菌濾過することにより得た。そして、各ねじ口ガラス瓶に、温度20℃、光強度45μmol・m^{-2}・s^{-1}、明暗周期８hL/16hDの条件下で対数増殖期中～後期まで培養した *C. wailesii* 約1000細胞（200μl のＭＰ１液を含む）を接種した。２セット用意した内の一方は、それぞれ瓶の蓋を緩く閉めた後に嫌気システムに入れ、もう一方はそれぞれの瓶の蓋を堅く閉め、20℃の暗黒条件下で20日間保存した。嫌気システム中における嫌気状態は、ガスパック嫌気インジケーター（ＢＢＬ製）を嫌気システムに入れることによりチェックした。20日後、S/T, R/SおよびR/Tを各実験区毎に求めた。

結果および考察

Fig. 3-35に、休眠細胞の形成に対する海底泥の添加量（ＭＰ１液に対する）の効果について示した。海底泥をＭＰ１液で薄めていない実験区ではR/Sが71.7%であったことに対し、1/200実験区では6.7%となり、R/SはＭＰ１液に対する海底泥の添加量が少なくなるにつれ大きく減少した。従って、*C. wailesii* 休眠細胞の形成は海底泥中の何らかの因子の効果により促進されることが判明した。

休眠細胞の形成に及ぼすｐＨの効果について検討した結果、今回設定した範囲（6.5～8.5)における休眠細胞の形成は全く観察することができなかった。よって、海底泥の持つ休眠細胞の形成促進効果は、ｐＨによってもたらされる直接的効果ではないと判断された。

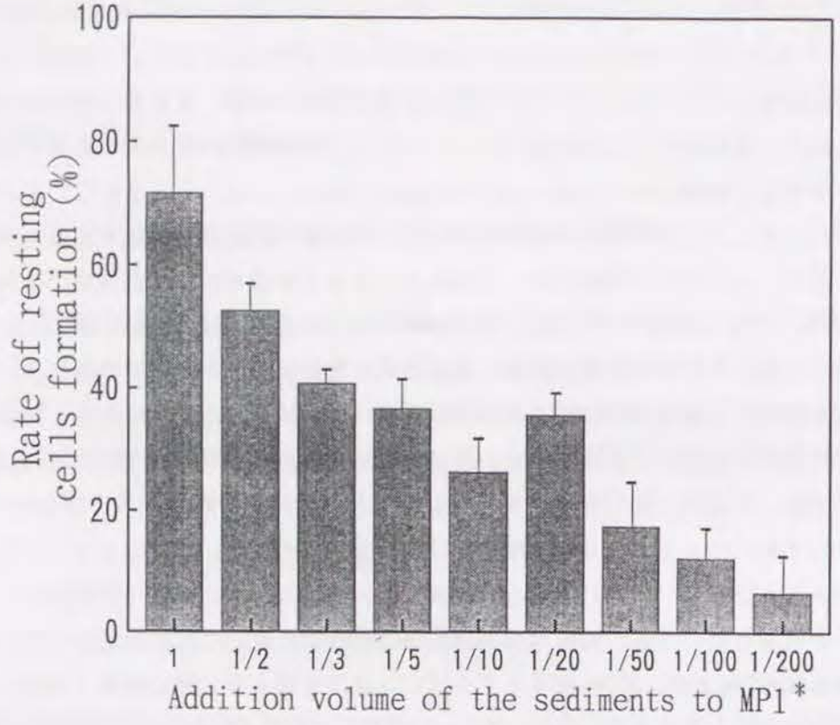


Fig. 3-35. Relationship between addition volume of sediments to the MP1 medium and resting cell formation of *Coscinodiscus wailesii* Gran in darkness.

Table 3-12に、休眠細胞の形成に対する添加海底泥粒子の大きさの違いが与える効果について示した。生存した細胞（S/T）は＜63μmの粒子で8.5%と他より低く、次いで250～500μmの画分で15.6%と低かった。63～125μmおよび125～500μmのS/Tはそれぞれ21.8、22.6%と＜63μmや63～125μmのそれに比べて高かった。R/Sについては、＜63μmおよび63～125μmの大きさの粒子で高く、それぞれ72.4、77.8%であったのに対して、125～250μmおよび250～500μmの粒子ではそれらに比べ低く、いずれも33.0%であった。従って、粒子の存在により休眠細胞の形成が促進されることが判った。また、*C. wailesii* 細胞の生残、および休眠細胞の形成にとって、それぞれ適した粒子の大きさのあることが示唆された。しかしながら、Sta.H7で採取した海底泥中におけるS/Tが52.1%（Table 3-11）であったことに対して、本実験においてS/Tが最も高かった63～125μm画分でも21.8%であり、Sta.H7のS/Tの約1/3と低い値であった。また、R/SについてもSta.H7のR/Sは92.3%であった（Table 3-11）ことに対し、63～125μm画分のR/Sは77.8%であり、Sta.H7のR/Sに比べて少し低かった。今回実験した粒子画分の範囲がいずれも狭かったことに対して、Sta.H7で採取された海底泥の粒子は、種々のサイズを含んでおり、このような性質がR/SやR/Tを高めている可能性も考えられた。

Table 3-12. Effects of different size fractionated sediments on resting cells formation of *Coscinodiscus wailesii* Gran in darkness.

		Fraction (μm)			
		＜63	63～125	125～250	250～500
S/T(%)*	AVG	8.5	21.8	22.6	15.6
	S.D.	0.6	4.3	3.5	3.5
R/S(%)**	AVG	72.4	77.8	33.0	33.0
	S.D.	7.0	6.8	8.6	10.5
R/T(%)***	AVG	6.2	16.7	7.6	4.9
	S.D.	1.0	1.9	2.6	1.2

*: Rate of survivor cell number to total cells number, **: Rate of formed resting cell number to survivor cell number, ***:Rates of formed resting cells number to total cells number.

Fig. 3-36に、休眠細胞の形成に及ぼす間隙水、および嫌気条件の効果を示した。間隙水の効果は、好気的条件下でS/T、S/R、およびR/Tはそれぞれ88.5、5.9、5.2%であり、わずかに休眠細胞の形成が観察された程度であった。これに対して、嫌気条件下ではS/T、S/R、およびR/Tはそれぞれ48.0、83.3、39.9%であり、嫌気条件の効果が、*C. wailesii* の休眠細胞が形成を促進していることが判明した。好気的条件下の間隙水において休眠細胞の形成がわずかながら観察された理由の一つとして、実験を開始した時点での間隙水中の溶存酸素量が低かった可能性が考えられた。

ＭＰ１液（ｐH7.5に調整）、未処理の海底泥、およびオートクレーブした海底泥についてみると、好気条件下ではオートクレーブした海底泥のS/Tが50.7%と低かった他は、いずれの実験区も70%以上であった。ＭＰ１液（ｐH7.5に調整）では休眠細胞の形成は全く観察されず、R/SおよびR/Tはいずれも０%であった。未処理の海底泥でのR/Sは92.1%と高かったが、オートクレーブした海底泥では33.4%と低くなった。一方、嫌気条件下では、ＭＰ１液および未処理の海底泥でのS/Tは、それぞれ81.3、68.8%であり高い値を示し、好気条件下での値と同程度であったが、オートクレーブした海底泥では27.3%であり、好気条件下で得られた値に比べて著しく低下した。このS/Tの低下の原因は不明であった。また、R/Sについては、好気条件下の値に比べてＭＰ１液、未処理の海底泥、およびオートクレーブした海底泥でいずれも80%を上回り、嫌気条件の作用によって休眠細胞の形成が著しく促進されることが判明した。オートクレーブした海底泥中において、嫌気条件下に比べて好気条件下でのR/Sが低かった原因は、好気条件下では、未処理の海底泥中のように、泥中に生存する細菌によって酸素が消費されず、嫌気的雰囲気からある程度解放されたためと推測される。R/Tは好気条件下の未処理の海底泥、嫌気条件下のＭＰ１液、および未処理の海底泥で高くそれぞれ65.7、67.0、および59.3%であった。嫌気条件下で間隙水やＭＰ１

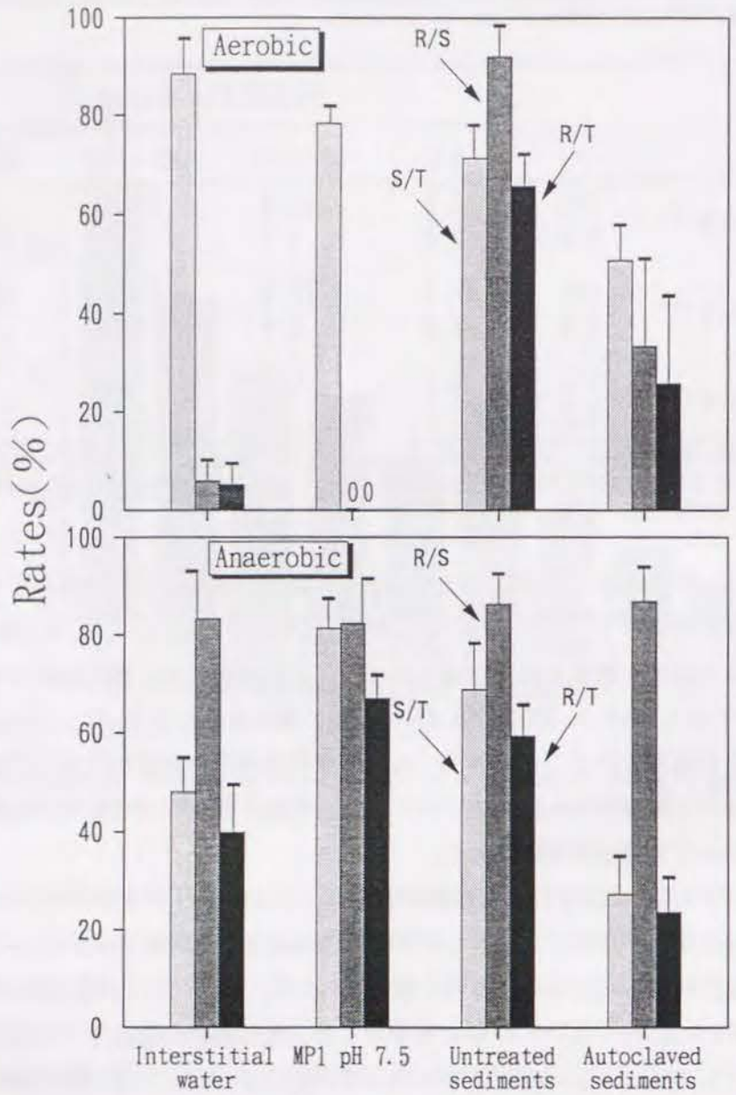


Fig. 3-36. Effects of anaerobic treatment on resting cells formation of Coscinodiscus wailesii Gran in darkness. S/T, rates of survivor cells to total cells; R/S, rates of formed resting cells to survivor cells; R/T, rates of formed resting cells to total cells.

液中で、高頻度に休眠細胞が形成されたことは、嫌気条件下であれば、粒子が無くても休眠細胞が形成されることを意味している。

Fig. 3-37に、嫌気条件下のＭＰ１液中で形成された休眠細胞の光学顕微鏡写真を示した。形成された休眠細胞は、Fig. 3-33に示した細胞同様、細胞質が被殻から分離し、中央付近で凝集しているのが判る。

有害赤潮藻の *Chattonella* 属の培養条件下におけるシスト形成においてもガラスビーズ（粒子）の効果が報告されているが（Imai 1989, 今井 1990）、この場合、*Chattonella* 属はシストの付着基質としてガラスビーズを利用するだけで、粒子の存在がシスト形成の引き金になるわけではないようである。*C. wailesii* の休眠細胞形成における粒子の効果については、以下のように推測できる。すなわち、海底泥に懸濁され、暗黒条件下に置かれた栄養細胞は光合成ができず、呼吸のみをしなければならない。個々の細胞は、周囲が粒子に囲まれ閉鎖的環境下にあり、呼吸するにつれ、細胞周囲の微環境は嫌気状態へと序々に変化していく。嫌気状態の進行に伴い、休眠細胞が活発に形成されることになる。この嫌気状態の進行の程度の差異、加えて、水分含量、粒子サイズや硫化物量の違いによって休眠細胞の形成や生残に大きな影響が与えられる可能性が、Table 3-11, 3-12に示した結果から十分に伺えよう。矢持（1989a）も、大阪湾東部沿岸海域と湾奥海域から採取した海底泥における、*Heterosigma akashiwo* および *S. costatum* の休眠期細胞の耐久能について検討した結果、底質の有機汚濁の進行している湾奥海域の底泥では、両種とも生存期間が短くなった結果から、底質の性状またはそれと関連した要因が休眠期細胞の生残に大きく関与することを示唆している。



Fig. 3-37. Light microphtographs of *Coscinodiscus wailesii* Gran resting cells formed into MP1 medium (pH 7.5 adjust) under anaerobic conditions in darkness. Arrows indicate typical resting cells. (Scale bar, 100 μ m)

第４項　人工的に形成させた休眠細胞の生理

休眠細胞が低温や高温条件あるいは暗黒条件等といった、生存に不適な環境下で、どれだけの期間生存可能かということは、現場海域における本種の生残と分布を考察する上で、極めて重要である。休眠期細胞はいずれも内湾、沿岸、湧昇域などにおいて、栄養細胞の増殖不適期を過ごすためのステージであると考えられている（例えば、French & Hargraves 1980, Garrison 1984, Pitcher 1990）。しかし、珪藻類の休眠期細胞がそういった環境不適期をどのように乗り越えるかといったことを含め、その形成・成熟・発芽に関わる生理学的特徴についての知見は少ない。

第１項において人工的に形成された休眠細胞が、増殖に好適な条件下で比較的速やかに復活・増殖することを明らかにした。第２項においては、*C. wailesii* の休眠細胞の形成は嫌気条件下で効果的に促進されることを示した。本項では、第１項および第２項において人工的に形成させた休眠細胞の復活条件、休眠期間（復活できない期間）の有無、および暗黒条件下における生存期間等の生理について検討した。また、*C. wailesii* 休眠細胞の現場水域での生態について考察するため、嫌気条件下においても休眠細胞が増殖に好適な栄養塩、温度、および光条件下で復活可能かどうかを検討した。最後に、形成条件、休眠期間および発芽条件を、他の珪藻類および他の分類群に属する植物プランクトンの耐久細胞と比較し、本種の休眠期細胞と他の植物プランクトンの休眠機構や" survival strategy"（生存戦略）の違いについて論じた。

材料および方法

まず嫌気条件下で *C. wailesii* の休眠細胞が復活できるかどうかの検討を以下のように行った。第２項で、休眠細胞の形成に及ぼす嫌気条件の効果について検討した実験の終了時に、嫌気条件下において、ＭＰ１液に栄養細胞を入れたガラス瓶（高頻度に休眠細胞が形成されていた）の蓋を酸素が混入しないように堅く閉め、その上からビニールテープで密封した。その瓶を温度20℃、光強度45 μmol･m^{-2}･s^{-1}、明暗周期８hL/16hDの条件下で10日間培養し、10日後、倒立顕微鏡下で栄養細胞の生存・増殖を調べることにより復活の有無を確認した。

人工的に形成させた休眠細胞の復活に及ぼす温度および光強度の効果を以下のように検討した。*C. wailesii* 培養株を光強度45 μmol･m^{-2}･s^{-1}、明暗周期12hL/12hDの光条件下、10、15、20、25℃の４段階の温度条件下で対数増殖期の後期まで培養した。播磨灘のSta. H2で採集した海底泥約15ｇに *C. wailesii* 約1000細胞（200 μ *l* のＭＰ１液を含む）を懸濁した後、10*ml* 容ネジ口ガラス瓶に入れ、各温度条件の暗黒条件下で20日間密封保存した。20日後、篩洗浄法（Imai et al. 1984, 板倉ほか 1992）により、100～500 μmの画分を取り出し、

形成された休眠細胞を２*ml* のＭＰ１液を入れた組織培養用容器（Costar製, 24ウェル）の各ウェルに１細胞ずつ、各条件につき12細胞接種した。明暗周期12hL/12hD、光強度０、５、20、45、90、150 μmol･m^{-2}･s^{-1}で６段階設定し、合計24の実験区を設けた。10℃では７日間、それ以外は４日間培養した。休眠細胞が最初の分裂を完了した時点で復活したと見なし、毎日、各ウェル中の復活・分裂した細胞数を計数し、各実験区１日毎に復活した株の割合を求めた。最初の細胞分裂が完了するのに要する時間を比較するため、栄養細胞についても24実験区において最初に分裂した株の割合を求めた。

人工的に形成させた休眠細胞の復活に与える光強度の効果をさらに詳細に調べるため、温度20℃、明暗周期12hL/12hDの条件下、光強度を０, 2.5, ５, 10, 20, 50, 70, 90, 110, 150および200 μmol･m^{-2}･s^{-1}の11段階設定し、休眠細胞を培養した。実験には、上述の実験温度20℃で形成された休眠細胞を用い、上述の実験同様、休眠細胞を組織培養容器(各条件につき８細胞ずつ）で10日間培養した。毎日、各ウェル中の復活・分裂した細胞数を倒立顕微鏡下で計数し、１ウェル当たりの細胞密度として片対数グラフにプロットした。その直線部分（対数増殖期）について、最小自乗法（Guillard 1979, 山口 1994）により分裂速度（μ ：divisions･day^{-1}）を計算した。

人工的に形成させた休眠細胞の、暗黒条件下における生存に及ぼす培養温度の効果についての検討は以下のように行った。*C. wailesii* 培養株を、光強度45 μmol･m^{-2}･s^{-1}、明暗周期12hL/12hDの光条件下、６、10、15、20、25℃の５段階の温度条件下で対数増殖期の後期まで培養した。播磨灘のSta. H2で採集した海底泥約15ｇに *C. wailesii* 約1000細胞（200 μ *l* のＭＰ１液を含む）を懸濁した後、10*ml* 容ネジ口ガラス瓶に入れ密封した。これを６, 10, 15, 20, 25℃において、それぞれ25, 25, 20, 16, 10本準備し、栄養細胞を培養した時と同一温度の暗黒条件下に保存した。これら２本ずつを一定期間毎に取り出し、篩洗浄法により、100～500 μmの画分を集め（２本をまとめて）、光学顕微鏡下、形成された休眠細胞を２*ml* のＭＰ１液を入れた組織培養用容器（Costar製, 24ウェル）の各ウェルに１細胞ずつ、各温度につき８～12細胞ずつ、光強度45 μmol･m^{-2}･s^{-1}、明暗周期12hL/12hDの光条件下、ガラス瓶を保存した時と同一温度で培養し、７～10日後、倒立顕微鏡下、休眠細胞が復活したかどうかを確認し、１細胞でも復活した場合を" 生存" と判定した。

海底泥中に栄養細胞を懸濁して暗黒条件下に保存した場合に、休眠細胞が形成される速さ、および復活能力獲得期間（復活に充分な条件に置かれても復活しない期間）の有無についての影響は、以下のように行った。*C. wailesii* 培養株を光強度 45 μmol･m^{-2}･s^{-1}、明暗周期12hL/12hDの光条件下、６、10、15、20、25℃の５段階の温度条件下で対数増殖期の後期まで培養した。播磨灘のSta. H2で採集した海底泥約15ｇに *C. wailesii* 約1000細胞（200 μ *l* のＭＰ１液を含む）を懸濁した後、10*ml* 容ねじ口ガラス瓶に入れ密封した。これを各温度につき14本ずつ準備し、栄養細胞を培養した時と同一温度の暗黒条件下に保存した。これらを２本ずつ一定期間毎に取り出し、篩洗浄法により、100～500 μmの画分を集め（２

本をまとめて）、光学顕微鏡下、まず、S/T（全細胞生残率：本節第１項の材料および方法を参照）とR/S（休眠細胞率）を求めた。次に、形成された休眠細胞を、２mlのＭＰ１液を入れた組織培養用容器（Costar製，24ウェル）の各ウェルに１細胞ずつ、各温度につき12細胞ずつ接種して、光強度45μmol•m^{-2}•s^{-1}、明暗周期12hL/12hDの光条件下、ガラス瓶を保存した時と同一温度で培養し、７～10日後、復活した細胞の割合（復活した細胞数÷培養した休眠細胞数×100（％））を温度毎に求めた。なお、６℃で保存したものについては、６および10℃でも培養した。

結果および考察

嫌気条件下の休眠細胞を前述の栄養塩、温度、および光条件下における復活の有無について検討した結果、実験終了時に全ての細胞が死滅していた。実験開始後、どの程度の期間で細胞が死滅したのかは明らかではないが、嫌気条件下では、*C. wailesii* 休眠細胞は栄養細胞の増殖に好適な栄養、温度および光条件下に置かれると一旦、復活の過程に入るが、おそらくその後酸素不足で死滅するものと考える。矢持（1989a）も、大阪湾から採取した海底泥中に存在する *Heterosigma akashiwo*、 *Heterocapsa triquetra* および *S. costatum* の海底泥からの発現・出現量が嫌気条件下で著しく抑制されることを報告している。また、遠藤・長田(1984）も海産の *Peridinium* sp. のシストにおいて、嫌気条件による発芽の抑制効果を指摘している。この様な休眠期細胞の生存・復活に関する生理学的情報は、現場海域における生態を考察する上で、非常に重要な知見と考えられる。

Fig. 3-38に、人工的に形成させた休眠細胞から復活した細胞の、最初の細胞分裂に及ぼす温度、および光強度の効果について検討した結果を示した。*C. wailesii* の休眠細胞は、光がない条件下では復活が認められず、５μmol•m^{-2}•s^{-1}以上の光強度条件下で観察された。休眠細胞が復活後、最初の分裂を終えるまでに要した時間は、10℃以上の温度条件下ではほとんど48時間以内であり、温度が高いほど早く最初の分裂を完了させる傾向が認められた。しかし、各温度とも、最初の分裂が完了した細胞数の全細胞数に対する割合の光強度の違いによる明瞭な差異は認められなかった。休眠胞子の発芽が、温度の上昇とともに早く起こることは一般的な現象として捉えられている（Hargraves & French 1983）。また、この様な休眠細胞から復活した細胞の分裂に関する傾向は、栄養細胞でも同様であった。栄養細胞が、同一温度条件下で最初に分裂を完了するのに要した時間は、休眠細胞のそれよりも若干短い傾向にあったが、大きな差異は認められなかった。以上から、*C. wailesii* の休眠細胞の復活には光を必要とするが、復活後は速やかに栄養細胞へと変化し、増殖できることが判った。

Fig. 3-39に、人工的に形成させた休眠細胞の復活・増殖に及ぼす光強度の効果について検討した結果を示した。復活は、光強度2.5μmol•m^{-2}•s^{-1}においても観察されたが、その

ほとんどは、Fig. 3-31に示した栄養細胞と区別できない細胞（C）にまで変化したままであり、分裂しなかった。５～50μmol•m^{-2}•s^{-1} の間では分裂速度は光強度とともに直線的に増加した。50～100μmol•m^{-2}•s^{-1}での分裂速度は一定で約1.1divisions•day^{-1}であり、50μmol•m^{-2}•s^{-1}で飽和した。110μmol•m^{-2}•s^{-1}では分裂速度が1.0divisions•day^{-1}と減少し、150μmol•m^{-2}•s^{-1}以上では、ほとんど全ての休眠細胞が復活はしたが培養３～４日後には全細胞が死滅してしまった。よって、110μmol•m^{-2}•s^{-1}以上の光強度では休眠細胞の復活は起こるが、その後の細胞分裂が阻害されているものと思われる。

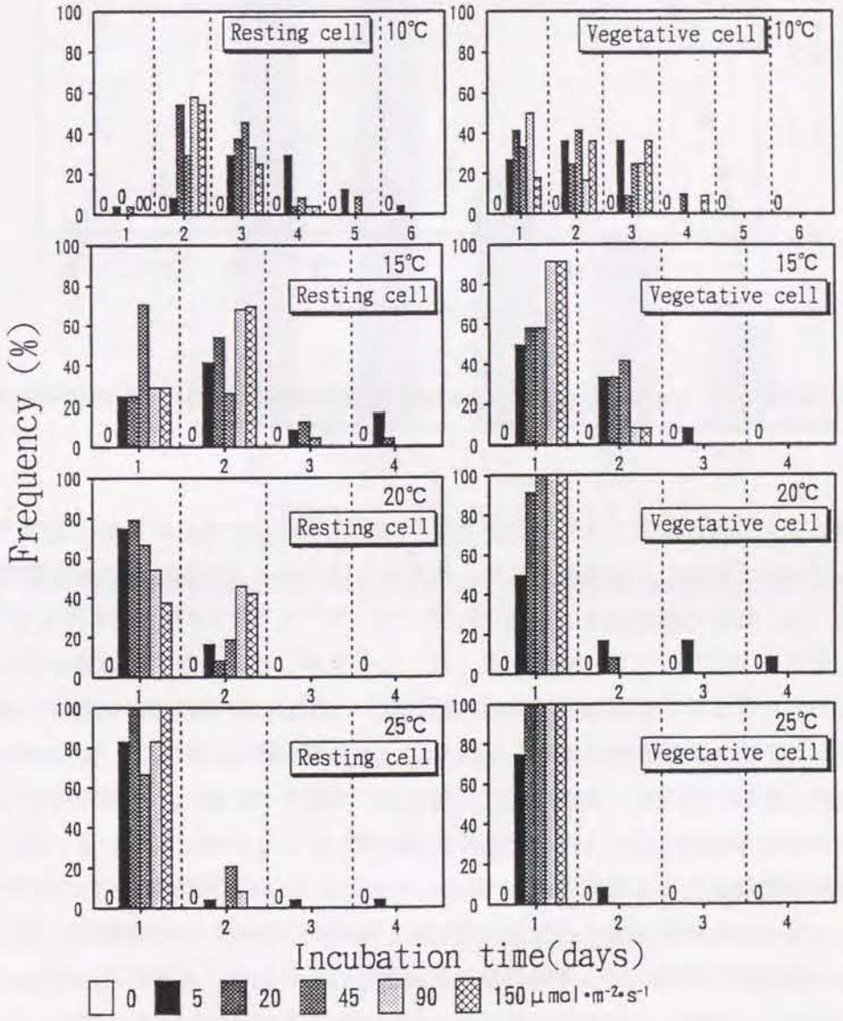


Fig. 3-38. Frequency distribution of elasped time for the first cell division of rejuvenated cells from resting cells under several temperatures and irradiance in *Coscinodiscus wailesii* Gran.

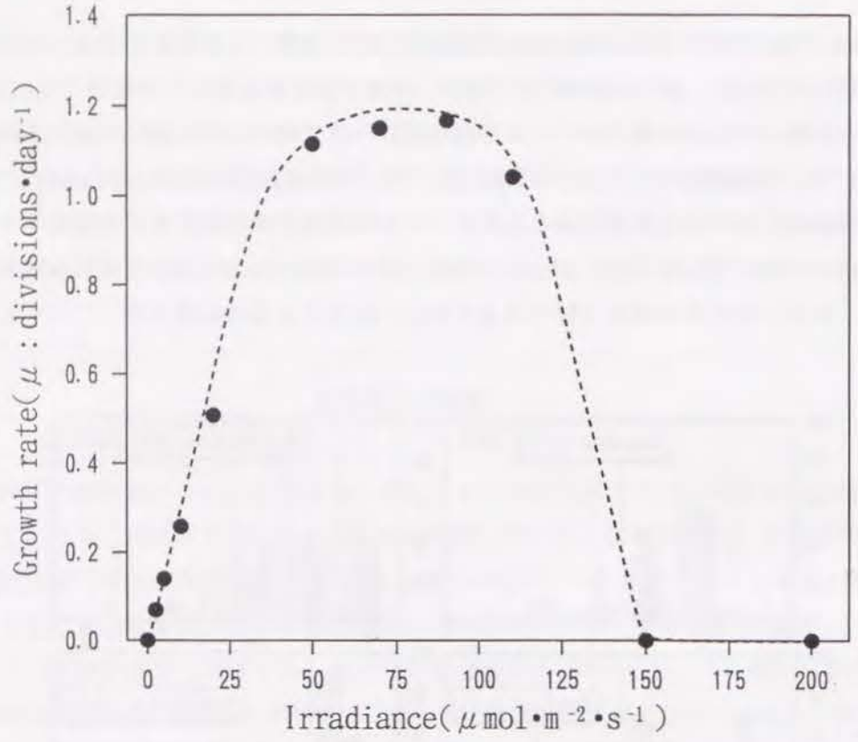


Fig. 3-39. Effects of irradiance on division rate of rejuvenated cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran in culture .

Fig. 3-40に、人工的に形成させた休眠細胞の、海底泥中における生存日数に及ぼす保存温度の違いについて検討した結果を示した。暗黒条件下における休眠細胞の生存期間は、10，6，15，20，25℃の順に長く、それぞれ12，8，4，3，1.5ヶ月の間その生存が確認できた。暗黒条件下における保存期間が長くなっても生存している全ての細胞が休眠細胞に変化するわけではなく、栄養細胞と形態的に区別がつかない細胞の生存も同時に観察された。明らかにそれとわかる休眠細胞を形成しない珪藻類の多くの種では、栄養細胞と形態学的に識別できない細胞か、被殻の変化を伴わずに生理学的に変化した細胞のどちらかによって、不適な環境条件下でも生存できる能力を持つことが示唆されている（Garrison 1984）。後期対数増殖期まで培養した *C. wailesii* をそのまま10℃の暗黒条件下に保存した場合、約3ヶ月しか生存できなかったのに対して、海底泥中において栄養細胞と区別できない細胞も休眠細胞と同様に12ヶ月間の生存が確認されたことは、本種においても、Garrison（1984）が示唆した生理学的な休眠を行っている可能性が高い。今回は、休眠細胞の細胞学的な研究を行わなかったが、今後、休眠細胞の細胞学的研究を実施することにより、休眠細胞へ変化していく過程や、形態的には栄養細胞と区別できない細胞の生理学的休眠について検討を行い、両者の違いを明確にしておく必要があろう。

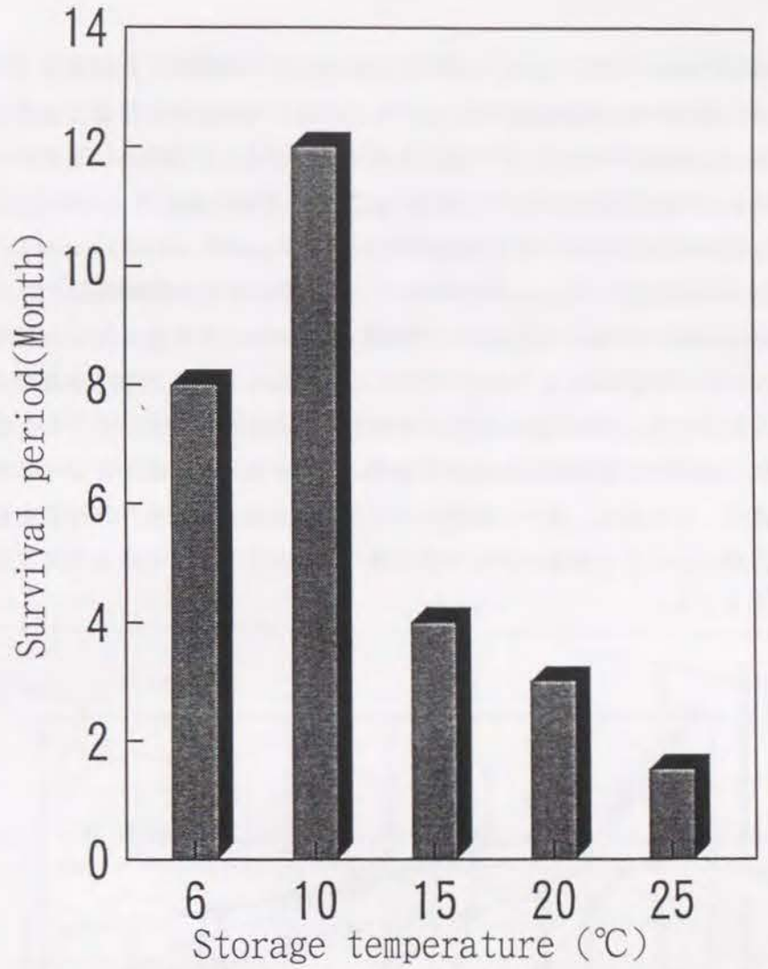


Fig. 3-40. Survival periods of resting cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran under various temperature in the sediments in darkness.

Fig. 3-41に、海底泥、暗黒条件下における *C. wailesii*（栄養細胞と形成された休眠細胞）の生残における培養温度の影響について示した。S/Tは6～20℃の範囲では、暗黒条件下での保存日数が長くなるに従い、緩やかに低下した。しかし、25℃ではS/Tは保存日数が長くなるに従い、急激に低下した。この結果は、暗黒条件下における *C. wailesii* の生存期間が25℃で1.5ヶ月間と最も短かったこと(Fig. 3-40)と一致している。珪藻類の栄養細胞、休眠胞子および休眠細胞の暗黒条件下における生存期間は、*Bellerochea polymorpha*、*Cyclotella cryptica*(Antia 1976)、*Melosira* 属（Lund 1954、Antia 1976, Sicko-Goad et al. 1986)、*Chaetoceros* 属（Hargraves & French 1975, Hollibaugh et al. 1981)、*Detonula confervacea*（Hargraves & French 1975）、*Thalassiosira* 属（Hargraves & French 1975, Antia 1976）、*Eunotia soleirolii*(Stosch & Fecher 197)、*Leptocylindrus danicus*（Davis etal. 1980, Hargraves & French 1983)、*S. costatum*(Umebayashi 1972, Smayda & Mitchell-Innes 19

74, Hargraves & French 1975, Antia 1976、矢持 1989a, 今井ほか 1990）などで詳細に調べられており、暗黒や無酸素条件下で、長いものでは十年間も生存可能であることが知られている。また、植物プランクトンの暗黒条件下における生存期間は、温度によって異なることが知られ、①低温ほど長くなる傾向のある種（*S. costatum*, *D. confervacea*, *T. nordenskioeldii*）、②ある温度で長くなる傾向のある種（*C. gracilis*, *B. polymorpha*）、③高温ほど長くなる傾向のある種（*Fragilaria pinnata*）、④温度にあまり影響を受けない種（*C. diadema*, *Navicula incerta*, *Nitzschiaangularis*）の４つのパターンが報告されている（Antia 1976, Durvin 1978, Hargraves & French 1983）。*C. wailesii* は10℃で最も長期間の生存が可能であったことから、②のパターンに含まれる。このように暗黒条件下の生存期間における培養温度の効果が、同属あるいは同じ海域に出現する種類の間でも異なることは興味深い現象である。この様な、種々の温度における休眠細胞の暗黒条件下での生存期間の差異は、天然水域における出現種の分布や優占種の季節性を決定する大きな要因の一つと考えることができよう。

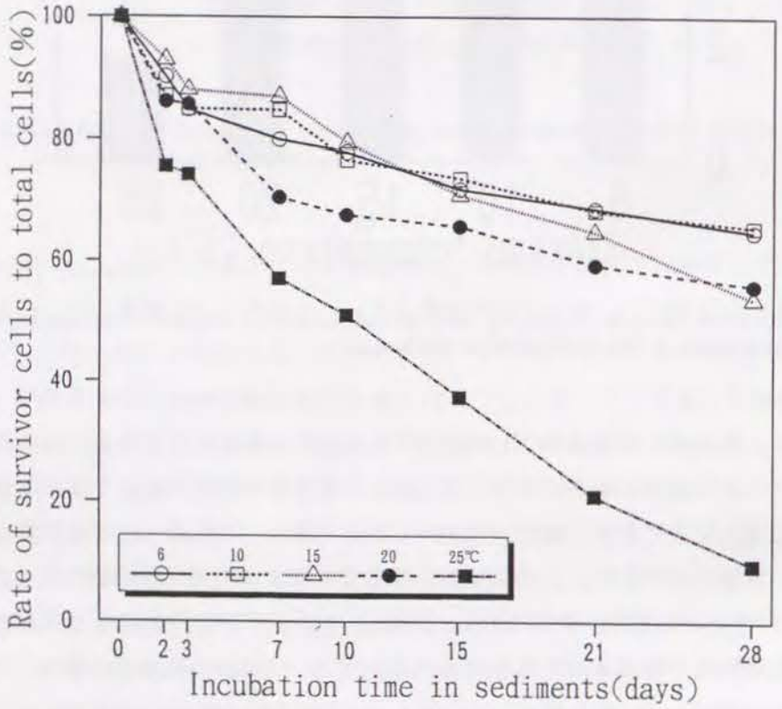


Fig. 3-41. Changes of rate of survivor cells to total cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran under several temperatures in the sediments in darkness.

Fig. 3-42に、休眠細胞が海底泥中で形成される速さ、および形成された休眠細胞の休眠期間の有無について、温度を種々変化させて検討した結果を示した。休眠細胞の形成は、６℃で他より若干低い傾向を示したが、10℃以上では10日目以降R/Sが70％を上回り、温度の違いによるR/Sの差異は明瞭ではなかった。しかし、休眠細胞は温度が高いほど速く形成される傾向を示し、20℃以上では、暗黒条件下で保存２日後には休眠細胞が確認された。また、形成された休眠細胞を直ちに取り出して培養すると、10℃以上では80～100％の割合で復活・増殖したことから、*C. wailesii* の休眠細胞は発芽能力の獲得に必要な期間をほとんど持たないことが判明した。以上の結果から、*C. wailesii* は長期間の"dark survival"に耐えうる能力と、嫌気と暗黒条件下で速やかに休眠細胞を形成し、かつ栄養細胞の増殖に好的な環境条件下で素早く復活できるという、比較的短期間の環境変動に対応できるという２つの能力を持つことが示唆された。

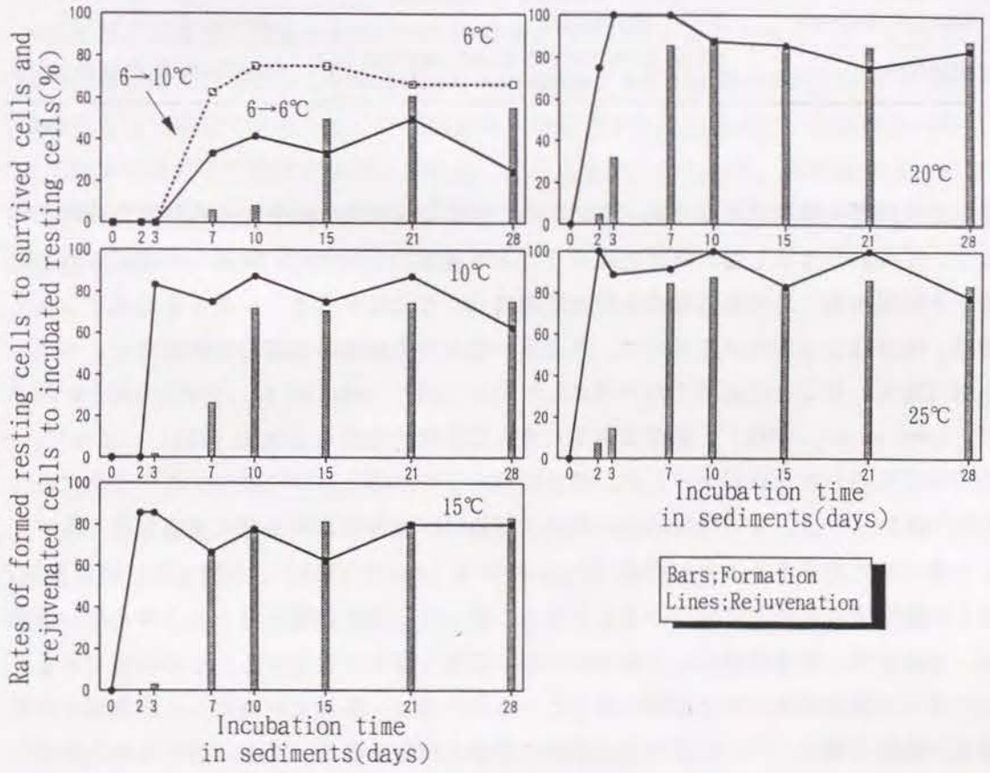


Fig. 3-42. Effects of temperature on resting cells formation in the sediments in darkness and rejuvenation in the MP1 medium in *Coscinodiscus wailesii* Gran.

Table 3-13. Acquisition conditions and the periods of germinability on cysts, resting spores and resting cells of several species of phytoplankton.

Species	Acquisition periods and the conditions of germinability	Source
Pyrodinium bahamense	16℃, ≧6 months	Wall & Dale(1969)
Gonyaulax tamarensis	5℃, 4 month and 22℃, 1 month	Anderson(1980)
Peridinium cunningtonii	5℃, 1 month	Sako et al.(1985)
Chattonella antiqua	≦11℃, ≧4 months	Imai & Itoh(1987)
Chattonella marina	≦11℃, ≧4 months	Imai et al.(1989)
Heterosigma akashiwo	20℃, ≦3 weeks	Itakura et al.(1995)
Many dinoflagellates	several weeks or months under cold treatment	Dale(1983)
Eunotia soleirolii	−2～15℃, 4～5 weeks	von Stosch & Fecher(1979)
Leptocylindrus danicus	15℃, ≦6 days	French & Hargraves(1980)
Chaetoceros spp.	17℃, >1.3 μmol•m^{-2}•s^{-1}	Hollibaugh et al.(1981)
Skeletonema costatum	22℃, ≦1 week	Itakura(1992)
Chaetoceros didymus	22℃, 8～13days	Itakura et al.(1993)
Many diatoms	quick germination under appropriate light and temperature conditions	Hargraves & French(1983)

Table 3-13に、植物プランクトンのシスト、休眠胞子や休眠細胞の休眠解除の条件と期間について要約して示した。渦鞭毛藻やラフィド藻類のシストと、珪藻の休眠期細胞（休眠胞子や休眠細胞）の休眠解除の条件と期間について比較すると、シストを形成する多くの種は、発芽能力を獲得するために、数週間～数ヶ月の比較的長期の休眠期間と、冬季の低水温に曝されることが必要であり(Wall & Dale 1969, sako et al. 1985, Imai & Itoh 1987, Imai et al. 1989）、温度は発芽に重大な影響を与える（Dale 1983）。よって、一年の内のごく限られた時期だけしか、栄養細胞として出現し水中で増殖することができないものが多い。一方、多くの珪藻類の休眠期細胞は、栄養細胞の増殖に適度な光・温度条件下で速やかに発芽することができ（Hargraves & French 1983）、温度は他の微細藻類のシストの発芽ほど重要ではないと考えられる。従って、休眠期間をほとんど持たない珪藻類は、ほぼ周年、栄養細胞として海底泥中から回帰し水中で生存することが可能である。一年を通じた現場海域での長期間の優占という点からは、生活史戦略として珪藻類の休眠期細胞が渦鞭毛藻のシストに比べて圧倒的に有利と推察される。発芽に対する光の影響については、*A. tamarense*（Anderson & Wall 1978）、*C. antiqua* や *C. marina*(今井 1990）、および *H. akashiwo*（今井 1992）のシストにおいてはほとんど光を必要としないのに対して、*Chaetoceros* 属、*S. costatum* および *C. wailesii* の休眠期細胞の発芽には、それぞれ>1.3 μmol•m^{-2}•s^{-1}（Hollibaugh et al. 1981）、≧1.8 μmol•m^{-2}•s^{-1}（今井 1992）、≧5 μmol•m^{-2}•s^{-1}（本実験結果；Fig.3-40）の光強度が必要であり、有光層以深での発芽にはシストの方が有利と考えられる。暗黒条件下における生存期間については、シストは数年～数十年海底泥中での生存が可能であり（Dale 1983）、*C. antiqua* や *C. marina*（Imai et al. 1989）のように二次休眠が可能な種類も多いと推測される。一般に高等植物における二次休眠とは、正常に発芽できる生理状態にある種子が、一時的に不適な環境条件下に置かれると再度休眠状態になってしまうことをいう（藤伊 1975）。これに対して、ほとんどの珪藻休眠期細胞の生存期間は、数年未満であり（Umebayashi 1972, Smayda & Mitchell-Innes 1974, Hargraves & French 1975, Antia 1976, Hollibaugh et al.1981）、二次休眠する種も *Eunotia soleirolii*（Stosch & Fecher 1979）で知られている程度である。従って、渦鞭毛藻やラフィド藻類は、一年の内の限られた時期にしか栄養細胞として増殖できない不利さを、海底泥中での長期間の生存を可能にすることにより補い、珪藻類の生存戦略に対抗しているのであろう。この様な種による休眠機構の違いが、現場水域での植物プランクトンの季節的な出現特性や、優占種交替過程とも密接に関連していると考えられる。本項において、*C. wailesii* 休眠細胞の休眠と復活に関わる整理について調べた結果、休眠細胞の海底泥・暗黒条件下での生存期間は10℃で約1年間であること、しかし、生存期間は温度によって大きく異なること、5 μmol•m^{-2}•s^{-1}以上の光強度があれば復活し、栄養細胞として増殖できること、休眠細胞は比較的速やかに形成され、栄養細胞の増殖にとって好適な条件下で素早く復活してくることなどを明らかにした。第Ⅳ章では、培養条件下で得られたこれらの結果を含めて、現場水域での *C. wailesii* 休眠細胞や栄養細胞の動態や生活史戦略について考察する。

第Ⅳ章　現場水域における生活環の解明

珪藻プランクトンの季節的消長については、おもに栄養細胞による栄養塩の取り込み速度や、環境要因に対する耐性などの観点から、多くの研究が行われている（Smayda 1980）。栄養細胞以外では、その季節的消長について、生活環の観点から増大胞子と休眠期細胞のそれぞれの役割の重要さが指摘されている。一方、地理的分布についても多くの研究が行われ（Smayda 1958, Guillard & Kilham 1977）、季節的消長と同様に、栄養細胞の環境要因に対する耐性と休眠期細胞の役割が、地理的分布に大きな意義を持つといわれている。しかし、増大胞子については、地理的分布における役割はよく理解されていない（French 1980, Hargraves & French 1983)。これに対して、上野（1991）は最近の研究で、*S. costatum* の地理分布の南限と北限は、増大胞子形成の下限水温に強く影響されていることを示唆している。一方、珪藻類の細胞サイズと分裂速度の関係については種特異的であり、分裂速度と細胞サイズが負の相関関係にある種、逆に、正の相関が見られる種、あるいは分裂速度が細胞サイズにほとんど依存しない種が存在する（第Ⅲ章参照）。このことは、天然個体群の消長に直接関与すると考えられる分裂速度が、細胞サイズの減少と回復という”生活環”の過程に大きく依存していることを意味している。

また、有害赤潮藻の *Chattonella* 属や *Heterosigma akashiwo*、麻痺性貝毒原因種である *Alexandrium tamarense* において、シストに関する生理生態学的研究など生活環に関わる研究が精力的に行われたことにより（福代 1987, 矢持 1989a, 今井 1990, 吉松 1992）、赤潮の発生機構の解明が飛躍的に進んだことは云うまでもなく、天然個体群の生活環の解明は、その出現動態を理解する上で、基本的かつ重要な研究課題と考えられる。

播磨灘における *C. wailesii* の出現動態については不明な点が多い。生活史、特に大量発生期以外の夏期の生態、さらには”seed population”としての休眠生活期の細胞の有無等は全く知られておらず、*C. wailesii* の生活環に関する研究は、大量発生機構の解明や発生予察を進めるために、緊急を要する重要研究課題であった。第Ⅲ章では、培養条件下において、*C. wailesii* の分裂に伴う細胞サイズの減少、増大胞子形成による細胞サイズの回復を観察した。また、休眠細胞の存在を明らかにし、形成条件、復活過程、復活能獲得期間の有無、暗黒条件下における生存期間等の生理学的諸性質について調べた。その結果、現場水域において *C. wailesii* が展開している生活環をより深く理解するための生理学的裏付けを得ることができた。

以上のような観点から、本章では現場水域における天然個体群の生活環を明らかにすることにより、生活環の面から発生・増殖に関わる条件を解明することを目的とした。まず、第１節では、現場水域における細胞サイズの減少とその回復の過程を調べた。第２節では、まず、現場水域の海底泥中に生存する休眠細胞を探索し、形態や復活過程について調べた。

次に、播磨灘における水中の栄養細胞と海底泥中における休眠細胞の関係、すなわち、”population dynamics”について詳く調査し、海底泥中の休眠細胞が、水中の栄養細胞の”seed population”としての役割を果たしているかどうかについて検討した。

第１節　現場水域における大きさの回復

これまで、珪藻類の天然個体群における細胞サイズの回復については、松江（1936）, 江草（1949, 1957）, 右田（1969）, Beillinger（1977）, 水野（1984）, Mann（1988）, Mizuno & Okuda（1985）, 上野（1991）, Jewson（1992a, b）等により報告されており、大きさの回復の周期性やその”Trigger”となる環境因子について、あるいは細胞サイズの回復の持つ生態学的意義に関する議論がなされてきた。松江（1936）は、東京湾品川港において *S. costatum* の殻径組成の季節変化と海水比重との間に得られた関係から、殻径の季節変化は浮遊適応の結果であると指摘した。これに対して、江草（1949）と右田（1969）は、それぞれ渥美湾と長崎港において、*S. costatum* の殻径が初夏と秋に増大することを観察し、殻径の季節変化が、松江（1936）が指摘した現場比重とは関係なく、栄養細胞の分裂による殻径の縮小と、増大胞子形成による回復という生活環の結果であることを明らかにした。

珪藻類の天然個体群における大きさの回復は、細胞サイズが小さくなりすぎると死滅せざるを得ない珪藻類の宿命から考えると、必要不可欠な事象である。細胞サイズの変化とともにその容積が劇的に変化する *C. wailesii*（Figs. 3-2, 3-4)においては、栄養塩の取り込み量も大きく異なることが予想される。従って、*C. wailesii* 個体群の出現動態の把握や、大量発生時における栄養塩濃度の短期的変動予測を行う上で、天然個体群の細胞サイズの把握は必要不可欠な研究と考えられる。以上のような観点から、本節では播磨灘における *C. wailesii* 天然個体群の殻径の変化を調査し、細胞サイズの減少・回復の過程と環境条件の関係、その周期性や大量発生との関連等について検討した。

材料および方法

1990年11月から1995年４月にかけては原則として毎月上旬、夏季は毎週、Fig. 4-1に示した播磨灘北部の５地点においてプランクトンネットでの鉛直曳きを行い、*C. wailesii* 栄養細胞を採集した。計73回の調査の内、1992年５月まで（前の18回）は300 μm、それ以降はの55回は、100 μmの目合いのネットを使用した。同時に水温、塩分、栄養塩（DINおよびPO_4-P）、日射量、および日照時間について調べた。なお、水温、塩分、栄養塩の測定方法は第Ⅱ章の第１節で示したものと同じ方法である。光学顕微鏡下で *C. wailesii* 栄養細胞の

蓋殻径を、細胞密度が著しく低い時期を除き５地点の合計が300細胞以上になるよう測定した。そして、調査毎に殻径の平均径および標準偏差等を求めた。

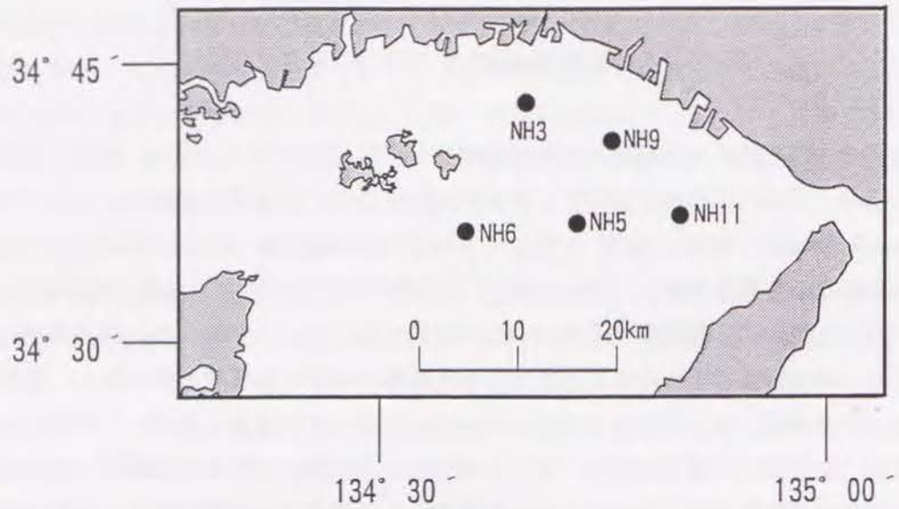


Fig. 4-1. Location of the sampling stations in Harima-Nada, eastern Seto Inland Sea.

結果および考察

Fig. 4-2に、*C. wailesii* 栄養細胞の播磨灘５地点平均の殻径（地点間には殻径に差が認められなかった）の変化について示した。調査期間中、採集された栄養細胞の殻径は、180～500μmの範囲にあった。栄養細胞の平均殻径は、1990年から1991年４月にかけて、1992年９月、ならびに1995年１月の３度大きくなった。平均殻径は３度とも約350μmにまで回復した。1992年９月および1995年１月の急激な大きさの回復は、殻径がいずれも平均約270μmにまで減少した時に観察された。また、1992年９月の大きさの急激な回復後、1993年７月までの10ヶ月間の平均殻径は緩やかな減少を示したのに対して、同年８月～11月までの４ヶ月間のそれは比較的速やかに減少した。大規模なブルーミングが起これば、盛んな細胞分裂によって、平均殻径が速やかに減少することは予想されるが、1992年９月～1993年11月までは、大きなブルームを形成した痕跡もなく（Fig. 3-2）、両者の期間の平均殻径が異なった減少傾向を示した原因については不明だった。平均殻径が最大（350μm）から最小（270μm）に減少する（1991年４月～1992年６月、1992年９月～1993年11月）までに14ヶ月かかった。ただ、平均殻径が最小になった後、比較的短期間（３ヶ月）の間に急激な殻径の回復が生じる場合（1992年９月）と、長期間（１年以上）かかる場合（1995年１月）があった。平均殻径の回復サイクルは、１年半ないし２年半であり、季節性等の明瞭な周期性は確認されなかった。培養条件下において、*C. wailesii* の栄養的増大は殻径90～

350μm、精子形成（有性生殖）は90～200μmの範囲において観察されたという結果（Fig. 3-28）と、天然個体群において殻径の回復が生じる直前の殻径から判断して、播磨灘の *C. wailesii* 個体群は、主に栄養的増大を通じて殻径を回復していることが強く示唆された。一方、播磨灘において観察された殻径の回復と、*C. wailesii* の大量発生（Fig. 2-2）との明瞭な対応関係は認められなかった。

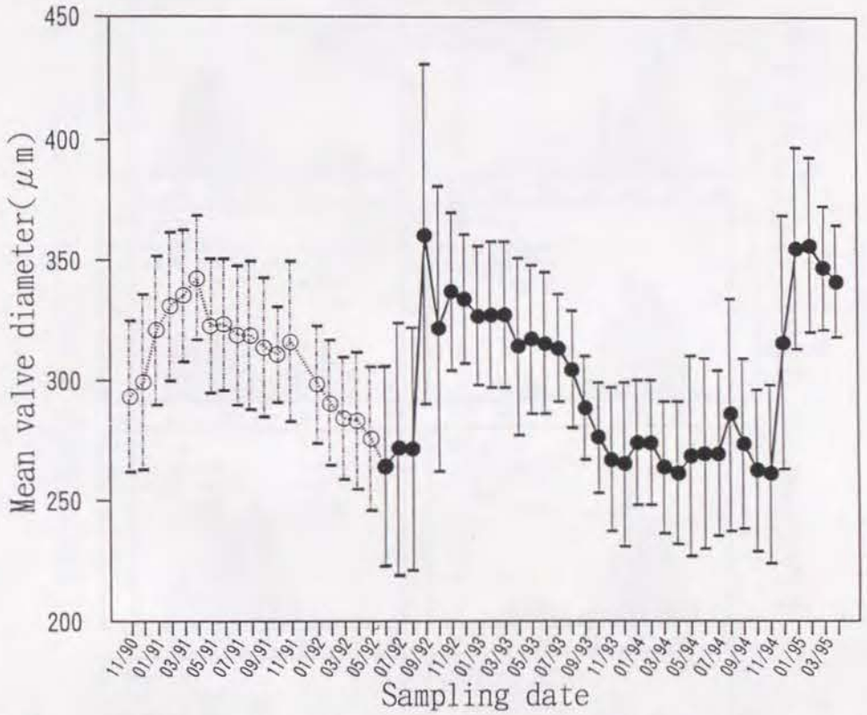


Fig. 4-2. Change of cell diameter of *Coscinodiscus wailesii* Gran in natural samples in Northern Harima-Nada collected from November 1990 to April 1995 . Mesh size of the net for vertical towing was 0.3mm (during the period shown with open circles) and 0.1mm (closed circles), respectively. The mean valve diameters were shown as average of amount of 5 stations. (Vertical bars, standard deviation).

Fig. 4-3に、1992年６～12月の間に播磨灘（５地点の合計）において観察された *C. wailesii* 栄養細胞の大きさの回復過程について、殻径の頻度分布の変化を示した。1992年の場合、栄養細胞の大きさの回復は６月下旬頃から始まった。殻径240μmを中心とした細胞の出現頻度が減少し、400μm前後の細胞の頻度が高くなっていく様子から、殻径240-250μmを中心とした細胞群が大きさを回復したことが判る。８月上旬には、頻度は明瞭なバイモーダル分布を示し、８月下旬には平均殻径は最大（361μm，８月31日）となり、標準偏差も最大になった（78μm，８月24日）。また、８月24日～12月１日の頻度分布において、大きさを回復させた細胞群の殻径の中心が徐々に減少するという、サイズを回復した細胞が再び大きさを減少させる過程を捉えることができた。11月５日には頻度分布は１つのピークとなり、12月１日には小型の細胞群のピークも消失した。

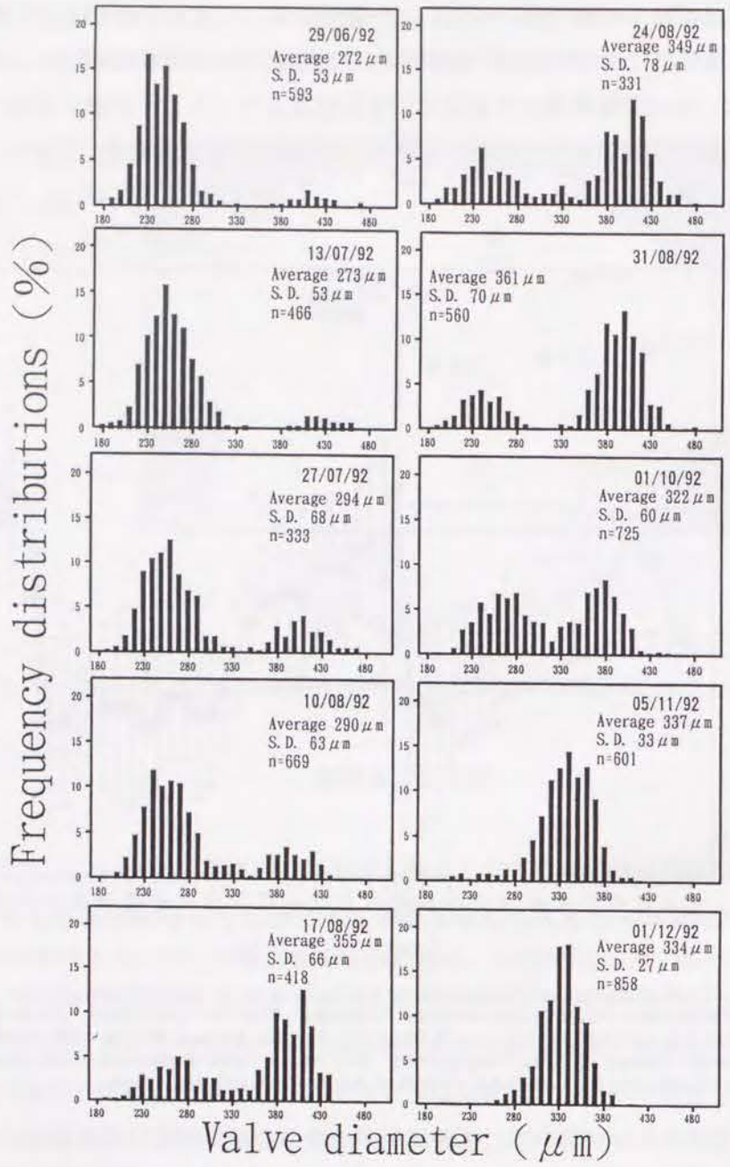


Fig. 4-3. Restoration process of cell sizes in *Coscinodiscus wailesii* Gran natural populations (the second time). Frequency distributions of the valve diameters were shown as amount of 5 stations.

Fig. 4-4に、1994年８月～1995年３月の間に播磨灘（５地点の合計）において観察された *C. wailesii* 栄養細胞の大きさの回復過程について、平均殻径の頻度分布の変化を示した。1994年の８月上～下旬にかけて、一度、平均殻径の小規模な回復が観察されたが、その後、10月上旬頃まで平均殻径を減少させた。11月上旬に、再び殻径250μmを中心とする細胞群から殻径の回復が始まり、1995年２月頃まで続いた。今回の殻径の回復過程では、1992年

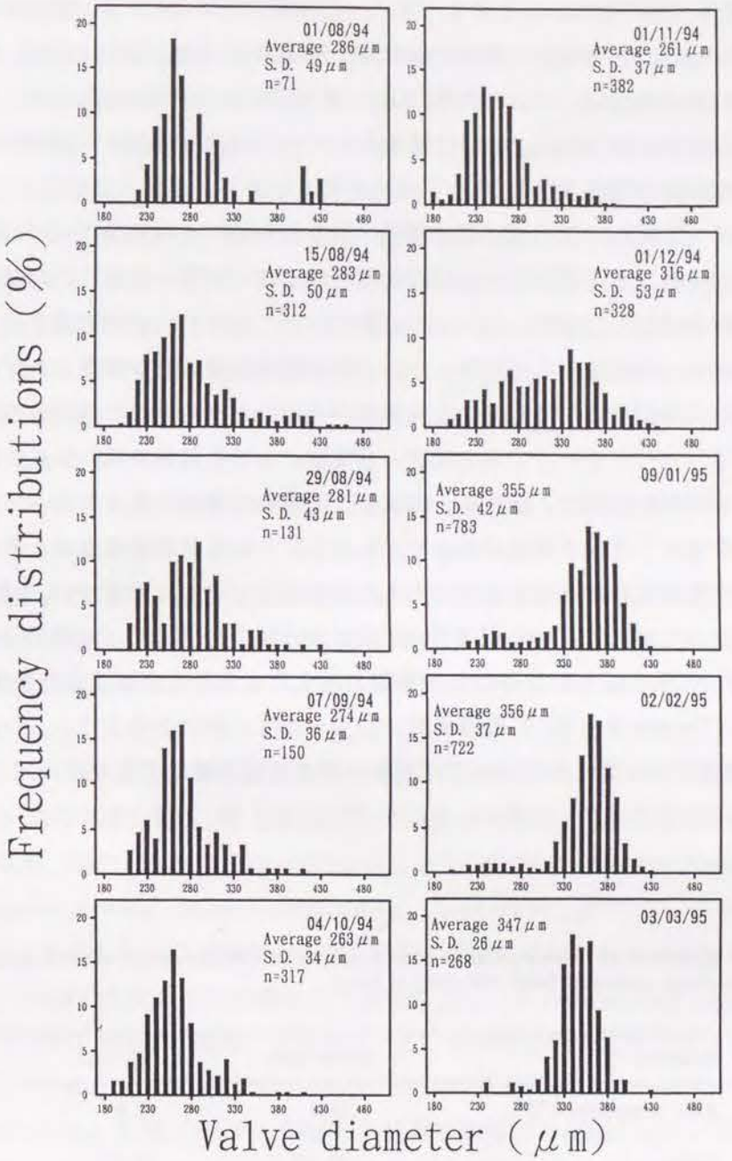


Fig. 4-4. Restoration process of cell sizes of *Coscinodiscus wailesii* Gran natural populations (the third time). Frequency distributions of the valve diameters were shown as amount of 5 stations in northern Harima-Nada.

に観察されたような明瞭なバイモーダル分布を示さず、頻度が低く範囲の広いなだらかなピークを示した。平均殻径の回復過程において前回の場合とこの様な差異が生じた大きな原因は、前回1992年の平均殻径の回復が約240μmの細胞群から約400μmの細胞群へと変化したことに対して、今回（1994～1995年）のそれが約250μmの細胞群から、12月上旬に330～360μmを中心とした少し小型の細胞群が生じ、その後に１月にはそれより大きい約370

μmの細胞群が生じたことにあると考えられる。培養条件下における *C. wailesii* の偽似増大胞子形成をみると、初生細胞の殻径が親細胞の殻径の違いによって、あるいは、光・温度・塩分等の培養条件の違いによって異なった（Fig. 3-20～3-24）ことから、天然個体群のサイズの回復過程においても、微妙な環境条件の違いによって殻径の頻度分布に影響が生じたのではないかと推察される。

Table 4-1に、*C. wailesii* 天然個体群の殻径の回復時における環境条件について検討するため、1992年８月３日（夏期）および1994年11月１日（秋期）に見られた殻径の回復の直前の環境条件を示した。なお、1990－1991年にかけて見られた殻径の回復は、調査時に目合い300μmのネットを使用しており、それより小型の栄養細胞が捕集されず、殻径の頻度分布にかなり大きな影響を与えている可能性があることから、この期間の大きさの回復時の環境条件を示さなかった。２回の殻径の回復時における環境条件の差異を検討した結果、1994年は1992年に比べて、低水温、高塩分、高栄養塩濃度、低日射量（日照時間はさほど差違はなかった）という特徴があった。しかし、これらの環境条件は、単に1992年が夏期、1994年が秋期における調査結果であることを示しているにすぎない。1992年夏期には大きさを回復したが、1994年の夏は平均殻径が十分減少していたにも関わらず回復しなかった。培養条件下における *C. wailesii* の栄養的増大が、栄養塩が枯渇した条件下では起こらないこと（Tables 3-6, 8）、最適温度が20℃～25℃の間にあることと（Fig. 3-9）、1994年の夏が異常な高水温（25℃以上では栄養的増大には不適）であり(Fig. 2-3)、栄養塩、特にDINとSiO_2-Si濃度が著しく低かったこと（Figs. 2-6, 8）とは、条件的に一致している。

Table 4-1. Comparison of environmental conditions when *Coscinodiscus wailesii* Gran natural populations restored their cell sizes of later.

Conditions	03/08/1992	01/11/1994
Water temperature (℃)	24.4	16.4
Salinity	31.63	32.73
DIN(μM)	3.9	11.8
PO_4-P (μM)	0.33	0.71
Solar radiation * (MJ/m^2)	19.7(July)-17.8(Aug.)	12.3(Oct.)-8.9(Nov.)
Irradian time ** (hours/month)	163.4(July)-172.1(Aug.)	163.1(Oct.)-137.6(Nov.)

* : The data were used the results of stationary observation in Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.

** : The data were picked up the monthly reports by Kobe Marine Meteorological Observation.

Fig. 4-2およびFig. 4-4をみると、1994年８月に一度大きさの回復がごく低頻度ながら起こっている。このような現象が生じた原因は、細胞の大きさの点では栄養的増大が可能であったため、一部の個体群内で偽似増大胞子が形成されたが、環境条件が不適であったため、ほとんどの個体群の偽似増大胞子形成が抑制されたためと推察される。また、本種の栄養的増大は、栄養細胞を数日～２週間、暗黒条件下に置いた後、増殖に好適な培養（光）条件下で培養することにより、高頻度に起こることが判明している(Table 3-6, Fig. 3-9)。1990～1991年および1994～1995年にかけてみられた大きさの回復は、鉛直混合期に起こっていること、1992年９月についても、台風通過後の海水の擾乱（本章第３節参照）の後に起こっていることから、現場水域における大きさの回復にも、鉛直混合や海水の擾乱に伴う栄養細胞の底層（暗黒）から有光層への舞い上がりという光の劇的な変化が効果的に作用するのかもしれない。

今回、*C. wailesii* 天然個体群の殻径の回復に関わる共通した環境条件、すなわち回復の"Trigger"となる要因を明確にすることはできなかった。しかし、1992年の殻径の回復は比較的短期間の内に生じ、*C. wailesii* 個体群内での非常に高い同調性が観察されたこと、1994－1995年の場合においては、一度、殻径をわずかに回復した後にその過程が中断され、再び同調的な回復が観察された結果から、殻径の回復を誘導する何らかの要因が存在すると考えられる。

珪藻類の天然個体群の殻径に変化については、*Skeletonema costatum*（松江 1936, 江草 1949, 右田 1967c, 1969, 上野 1991）, *Biddulphia sinensis*（江草 1949）, *Rhizosolenia setigera*（江草 1957）, *Melosira moniliformis*（右田 1969）, *Berleleya rurilans*（水野 1984）, *Asterionella formosa*, *Stephanodiscus astraea*（Bellinger 1977）などにおいて、年に１度もしくは２度の大きさの回復が見られ、明瞭な季節性を示すことが報告されている。右田（1967c, 1969）は野外での観察と室内実験により、*S. costatum* の増大胞子の形成が特定の条件下（特に水温が効果的）でのみ起こることが殻径の季節変化の一つの原因であることを示した。また、水野（1984）は樹枝上群体珪藻 *Berkeleya rutilans* 天然個体群の殻径の変化においても、右田（1967c, 1969）と同様の原因により起こっていることを指摘している。上野（1991）も函館・東京・洞海湾および有明海における *S. costatum* の殻径の回復の季節性から、本種の増大胞子形成において水温が重要な因子であることを報告している。Bellinger（1977）および水野（1984）は、珪藻類の殻径が、ブルームの起こる前に大きく、ブルーム形成時に次第に小型化すると報告している。また、Taguchi（1970）によれば、９月の厚岸湾（北海道）において *S. costatum* の大型細胞出現時と、本種の高密度出現および植物プランクトン群集の高い *Pmax*（光飽和光合成速度）とが一致したという。増大胞子の形成が増殖に好適な条件下で起きることは、複相世代型の生活環を持つ珪藻では一般的な現象（Drebes 1977, 中原 1986）として認識されている（上野 1991）。このように殻径が季節変化を示し、変化周期が一年である珪藻種の場合は、増殖期に殻径を大幅に減少さ

せた後、増大胞子を形成することにより殻径を回復する。そして、次の増殖期が到来するまで殻径を減少させるのが一般的パターンのようである。年々の水温・栄養塩等の環境条件によって、分裂速度が変化するため、殻径の減少量も差異が生じてしまう。そして、増大胞子形成が可能な季節に、増大胞子の形成が可能な細胞サイズにまで小型化しているか否かによって、一年に1度だけ回復する年と、2度回復する年が生じることになる。このような珪藻種の共通した特徴は、一年の内に増大胞子を形成し得る大きさにまで殻径を充分減少させることが可能なことである。

一方、播磨灘産 *C. wailesii* のように、殻径の回復サイクルが季節性を示さない種も現実に知られている。この様な種における天然個体群の殻径の変化を調べた古典的な研究でも、短いもので2年、長いものでは40年の殻径の回復サイクルを持つ種の存在が報告されている（Mann 1988）。回復サイクルが数年以上と長い珪藻種の報告においては、サンプリングエラーが原因で、殻径の回復過程を見逃してきた可能性の高いことが指摘されており、古典的な研究データの見直しがなされている（Mann 1988, Jewson 1992a）。信頼できる研究では、*Tabellaria fenestrata* や *Nitzschia sigmoidea* で7～8年（Mann 1988）、*Aulacoseira subarctica* で4～6年（Jewson 1992a）、*Stephanodiscus* sp. で3～4年（Jewson 1992b）といった報告がある。

Mann（1988）は *N. sigmoidea* 天然個体群の殻径の変化について調べた結果、*N. sigmoidea* の殻径の頻度分布は"multimodal"であり、低頻度で毎年に起こる有性生殖によって一部殻径が回復することにより、多くの年級群が存在すると報告している。殻径の回復サイクルが1年以上である種は、一年以内に殻径が増大胞子形成が可能なサイズにまで減少せず、増大胞子の形成が可能な時期に大きさの十分な回復が行えない種であると定義できよう。すなわち、初生細胞の殻径と増大胞子形成が可能な細胞の殻径の差に対する、一年の殻径の減少比が *N. sigmoidea* のように小さい種ほど多くの年級群が存在し、殻径の回復サイクルが長くなる。これに対して、播磨灘産 *C. wailesii* のように殻径の減少サイクルが約15ヶ月と比較的短い種では年級群の存在はほとんど検出されず、大きさの回復に高い同調性が見られ、殻径の回復サイクルも1年半～2年半と比較的短期である。

培養条件下において、*C. wailesii* の栄養的増大が複数の条件下で起こることが判明している。増大胞子形成が可能となる殻径にまで減少する季節が一定でない *C. wailesii* にとって、有性生殖に比べてロスのない栄養的増大が複数の条件下で起こることは、殻径を回復する、より多くのチャンスを獲得するための積極的な戦略と理解することができる。

Lewis（1984）は、珪藻類における殻径の減少が有性生殖が起こるためのタイマーとして機能しており、その主要な意義は"preventing it from occurring too frequently"であると述べている（Mann 1988）。このような観点から考えると、*N. sigmoidea* 等の多くの年級群が存在する天然個体群において、毎年、各年級群が殻径を徐々に減少させる過程で、有性生殖による殻径の回復がごく低頻度に起こることは、有性生殖による遺伝的多様性の

保持を、ロスのない適度な頻度で行えるという大きなメリットを得ている可能性も十分考えられ、種の繁栄を維持するための一つの生存戦略とも考えられよう。しかしながら、小型化しすぎると死滅するという不利な特徴や、分裂速度における細胞サイズの効果が種特異的であることなどから考えて、珪藻類の有性生殖や栄養的増大が限られた細胞サイズでしか起こらないことの、進化の面からみた真の意義については、まだ明らかになったとはいえない。しかし、今後、多くの珪藻種の天然個体群の殻径の変化パターンの解析や、培養条件下で大きさの回復に関わる生活環が詳細に調べられることにより、前述したような珪藻天然個体群の異なる殻径の回復パターンのそれぞれの生態学的意義が明らかになると思われる。

第2節　現場水域における休眠細胞の生理生態

第1項　休眠細胞の形態と復活

瀬戸内海のような浅海の内湾域に生息する植物プランクトンは、それらの生活史の中で耐久性のある細胞になる時期を持つことが知られるようになってきた（鳥海ほか 1987, Imai & Itoh 1988, 矢持 1989a, 今井ほか 1990, 板倉ほか 1992, 吉松 1981, 1984, 1992, 山口ほか 1995）。これらの耐久性の細胞はいずれも内湾、沿岸、湧昇域などにおいて、栄養細胞の生息環境不適期を乗り切るための生存戦略と考えられており（Garrison 1984, 今井ほか 1990）、生態学的に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、珪藻類の休眠期細胞がそういった環境不適期をどのように乗り越えるかということをも含め、その形成・成熟・発芽に関わる生理学的特徴についての知見は殆ど無い。海産浮遊珪藻種の内、休眠細胞の存在が知られている種は少なく、現場海域で休眠細胞が果たしている生態学的役割については、いまだに多くの疑問が残されているのが現状である（中原 1986）。Round et al.（1990）も総説の中で、珪藻類の休眠期細胞の役割について、"but their function remains mysterious"と述べている。*Coscinodiscus* 属の中で休眠胞子あるいは休眠細胞を形成する種は、未だ知られていない。本研究において、室内培養条件下で、人工的に *C. wailesii* の休眠細胞を形成させることに成功し（第Ⅲ章第二節）、その形態や復活過程、復活能獲得期間や暗黒条件下における生存期間等について明らかにした。本節では、播磨灘海底泥中から、*C. wailesii* の休眠細胞を探索し、培養条件下において形成された休眠細胞と同様な形態的特徴を持った *C. wailesii* の休眠細胞を見出した。そして、*C. wailesii* の季節的消長において休眠ステージが果たす生態学的役割を明らかにしていくための第一歩として、海底泥から発見した休眠細胞が活性化して再び分裂、増殖を開始する

過程、ならびに休眠細胞の形態等について調べた。

材料および方法

1．休眠細胞探索用試料の採集と調製

1992年３月２日に播磨灘のSta.H2（Fig.4-5）でＫＫ式柱状採泥器（木俣ほか 1960）を用いて海底泥を採取した。底泥試料は実験室に持ち帰った後、表面から３㎝深までをポリエチレン製不透明容器に速やかに分取し、暗黒条件下10±１℃で約10ヶ月間密封保存した。

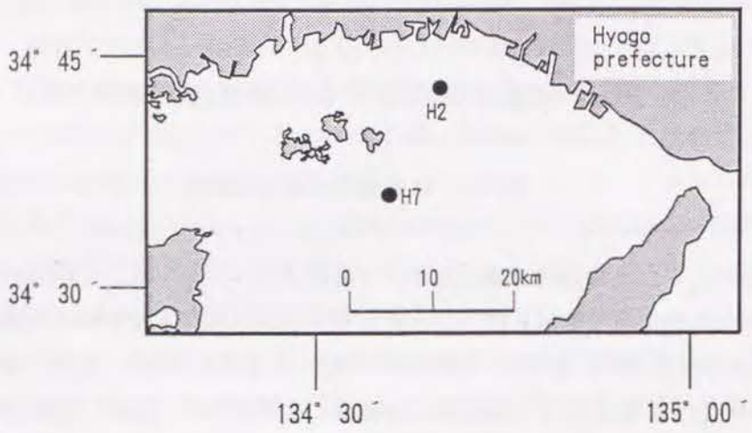


Fig. 4-5. Location of the sampling stations in nothern Harima-Nada, eastern Seto Inland Sea.

休眠細胞探索用試料の調製（Imai et al.（1984），板倉ほか（1992）に準拠した）には、まず５ｇの密封保存した底泥試料を100㎖容ポリプロピレン製ビーカーに分取し、約30㎖の濾過海水に懸濁し、ナイロン網地製篩を用いた濾過洗浄により100～500μｍの粒径画分を得た。この画分を元の試料の湿重量に換算して0.5ｇ／㎖の濃度になるように濾過海水中に懸濁した。実験に用いた海水は、明石海峡北岸で採水し、グラスファイバー製フィルター（Whatman GF/C）によって濾過したものである。

2．休眠細胞の分離と培養

C. wailesii の外観的特徴は殻頂面がやや凹入し、殻環部が比較的高い円筒形をしており、殻頂面と殻套部が鋭角をなすこと、中心域は透明で輪郭が不規則であり、殻套部に隣接する接蓋帯片は幅広く、その次の帯片は狭くて上舌を持つことなどであり（高野 1990）、他種とは比較的容易に区別できる。

倒立落射蛍光顕微鏡を用いて探索用試料を観察し(今井ほか 1990)、青色励起光下でクロロフィルａに由来する赤色自家蛍光を発する複数種の珪藻休眠期細胞の中から *C. wailesii* 休眠細胞を探索し、その形態的特徴を通常光下で確認した。また、見出した本種の休眠細胞と思われるものをマイクロピペットで45個分離し、1.5㎖のＭＰ１培養液を入れた組織培養用容器（Costar製，24区画）２ケースの各区画に１個ずつ収容した。培養条件は温度20℃、白色蛍光灯下、65μmol•m^{-2}•s^{-1}、連続照明とし、培養開始後、同一細胞における形態の経時変化を倒立落射蛍光顕微鏡の通常光下で２～３時間間隔で観察した。また休眠細胞の復活過程において、休眠細胞が最初の細胞分裂を完了するまでに要する時間を知るため、培養開始後から24時間毎に細胞分裂した細胞数を数えた。さらに培養開始時に、各休眠細胞の蓋殻径と殻高を測定し、これらと休眠細胞の復活との間の関係を検討した。上記の方法により探索し、識別した休眠細胞の蓋殻径を光学顕微鏡下により測定し、その大きさについて調べた。

天然の海底泥から得られた休眠細胞についても、増殖に好適な条件下において復活に及ぼす嫌気条件の効果を検討した。まず、10㎖容ネジロガラス瓶にｐＨ7.5に調整したＭＰ１液を９㎖入れ、蓋を閉めないままガスパック嫌気システム（ＢＢＬ製）において48時間放置し、液内を嫌気状態にした。ＭＰ１液中の溶存酸素量については、ウインクラー法（気象庁 1970）により測定し、溶存酸素がほとんど存在しないことを確認した。
1994年３月に播磨灘のSta.H2で採集された海底泥中の休眠細胞を、上述の方法により探索し、マイクロピペットにより合計10個分離した。これらを嫌気状態のＭＰ１液を入れたネジロガラス瓶に接種し、再び嫌気システムに入れた後、暗黒条件下に放置した。48時間後、ガラス瓶を嫌気システムから取り出し、酸素が溶存しないように素早く蓋を堅く閉め、その上からビニールテープで密封した。その瓶を温度20℃、光強度45μmol•m^{-2}•s^{-1}、明暗周期８hL/16hDの条件下で10日間培養し、10日後、倒立顕微鏡下で栄養細胞の生存・増殖を調べることにより復活の有無を確認した。

結果および考察

1．海底泥中より分離した休眠細胞の培養と観察

Fig.4-6（Ａ，Ｂ）に、播磨灘のSta.H2より得た海底泥試料から分離した、天然の *C. wailesii* 休眠細胞の光学顕微鏡および蛍光顕微鏡写真を示した。休眠細胞の形態的特徴は、細胞質が被殻から分離し、中央付近で凝集することであり、栄養細胞とは明確に区別できた。形態的特徴については後で詳述するが、海底泥中における休眠細胞の発する自家蛍光は強く、探索は容易であった。

Fig.4-7に、休眠細胞の培養過程における形態変化（復活過程）の観察結果を２例示した。海底泥試料から分離した直後の休眠細胞（Ａ，Ａ'）は、細胞質が被殻から分離し、栄養

細胞とは明確に区別することができた。休眠細胞は培養開始後、速やかに変化し始め（B，B’）、約10時間後には、通常の栄養細胞と形態的に区別できなくなった（C，C’）。*C.wailesii* 休眠細胞の復活過程において、色調が何等変化しない場合（A～F）と、暗褐色の色調が一旦薄く半透明状になる過程を経て通常の栄養細胞の色調へと変化する場合（A

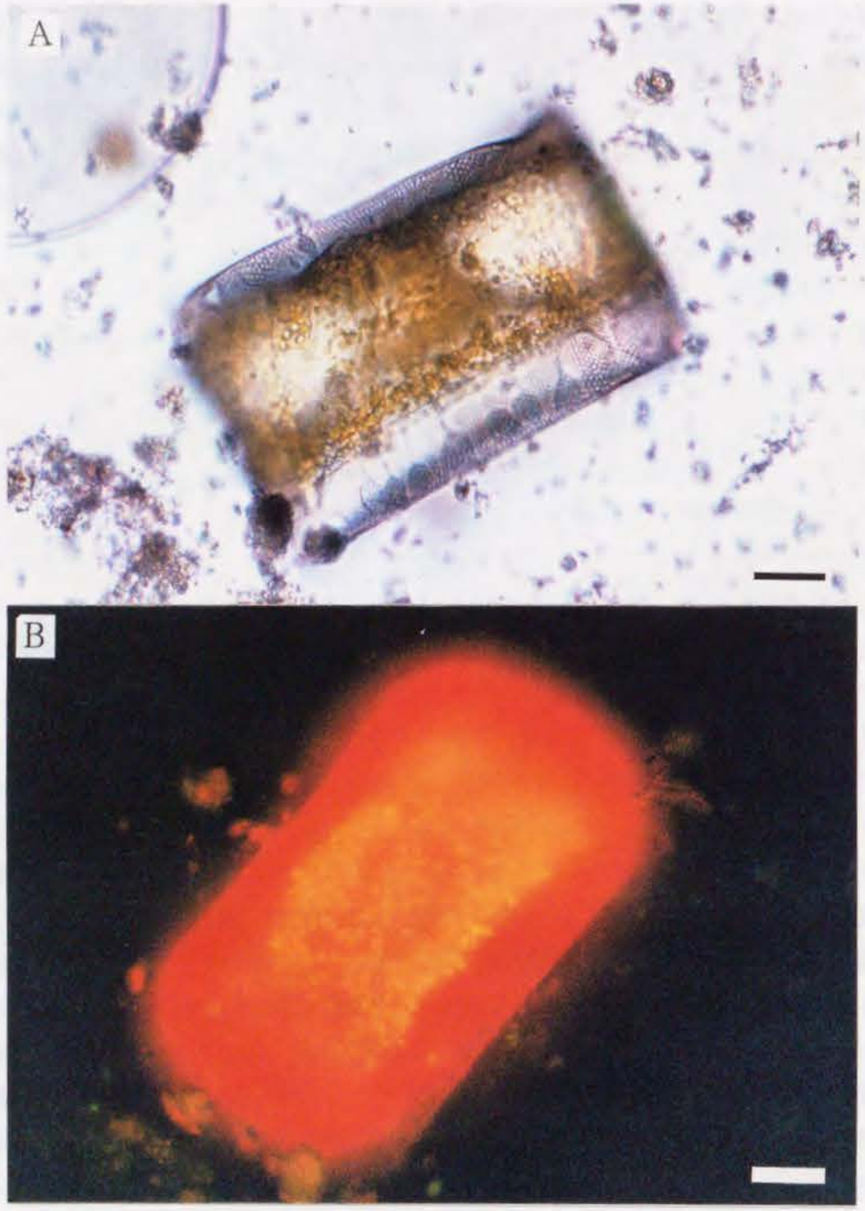


Fig. 4-6. Normal light (upper) and epifluorecence (lower) micrographs of *Coscinodiscus wailesii* Gran resting cells in nature collected at Sta. H2 in Harima-Nada. (Scale bars, 100 μ m)

’～F’の中のB’）の２通りのパターンを観察することができた。休眠細胞は、復活時に新しい被殻を形成することなく、元の被殻が復活した細胞の被殻となった。栄養細胞と区別できなくなった細胞は、わずかながら貫殻軸方向へ伸張し、培養開始後約20時間後には細胞板が形成された（D，D’）。細胞板の形成後、各細胞はさらに貫殻軸方向へ伸長し（E，E’）、培養開始後29時間（F）および26時間（F’）後に、それぞれ最初の細胞分裂を完了した。

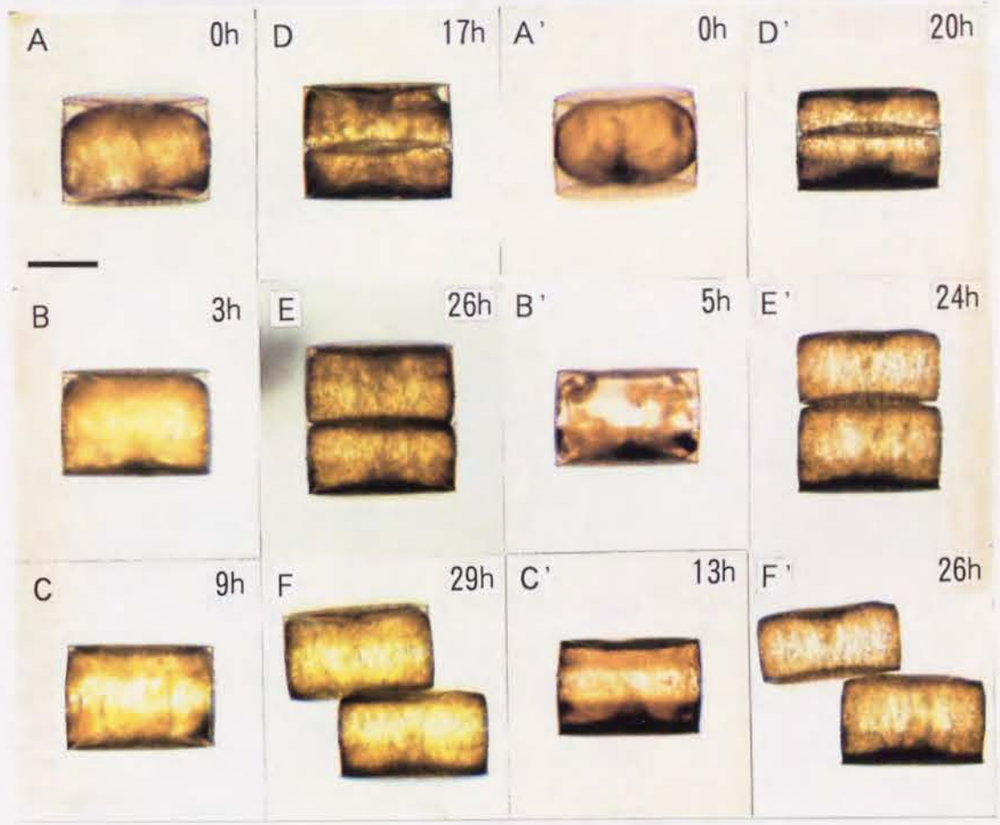


Fig. 4-7. Two sequential observations of rejuvenation process in *Coscinodiscus wailesii* Gran resting cells isolated from a sediments sample of Harima-Nada. Incubation time is indicated on the upper right of each picture.
A-F, A’-F’, Two examples of rejuvenation process; A, A’, Resting cells of C. wailesii at the onset of incubation; B, B’, Resting cells beginning to change for rejuvenation; C, C’, Resting cells indistinguishable from normal vegetative cells; D, D’, Elongation of cells and formation of cell disk; E, E’, Growth of each daughter cell; F, F’, First cell division. (Scale bar, 100 μ m)

今回45個の休眠細胞を分離培養したが、そのうち30個（67%）が復活し、培養開始後3～10時間で通常の栄養細胞と区別できなくなった。また休眠細胞の復活過程において、培養開始から24時間毎に細胞分裂を完了した細胞数を数え、その割合をFig. 4-8に示した。本結果から判るように、復活した細胞が最初の細胞分裂までに要する時間は96時間以内であり、その約80%が48時間以内であった。

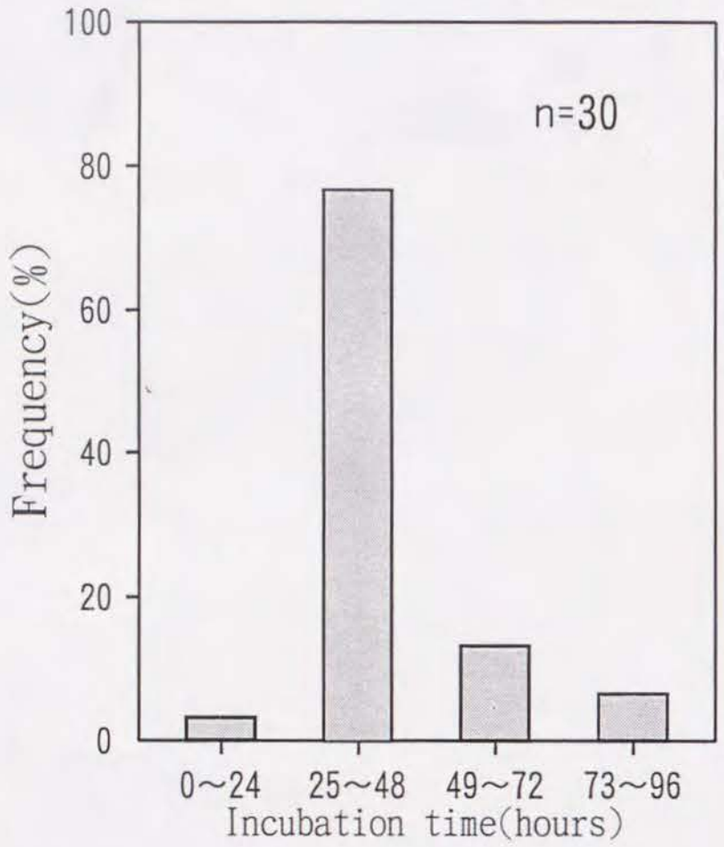


Fig. 4-8. Frequency distribution of elasped time for the first cell division of *Coscinodiscus wailesii* Gran natural resting cells in culture.

2．休眠細胞の形態

Fig. 4-9（A～L）に、播磨灘海底泥中から見出された12例の *C. wailesii* の休眠細胞を示した。これらの中で、復活し栄養細胞に変化した休眠細胞の例をA～Fに、復活しなかった休眠細胞の例をG～Lにそれぞれ分けて示した。*C. wailesii* 休眠細胞には、*Melosira granulata*（Sicko-Goad et al. 1986, 1989）や *Skeletonema costatum*（板倉ほか 1992）で報

告されているような休眠細胞内にある暗褐色の明瞭な凝集体は認められなかったが、色調は栄養細胞のそれ（Fig. 3-2）と比較して濃いものが多かった。*C. wailesii* 休眠細胞は、栄養細胞の形態と外部形態的にはほとんど変わらず、蓋殻と帯片が接する被殻部分から細胞内容がわずかに分離しているもの（A, E, I, J, K）、蓋殻と帯片が接する被殻部分だけではなく、蓋殻部分の細胞内容のほとんどが被殻から分離し、球状に凝集している

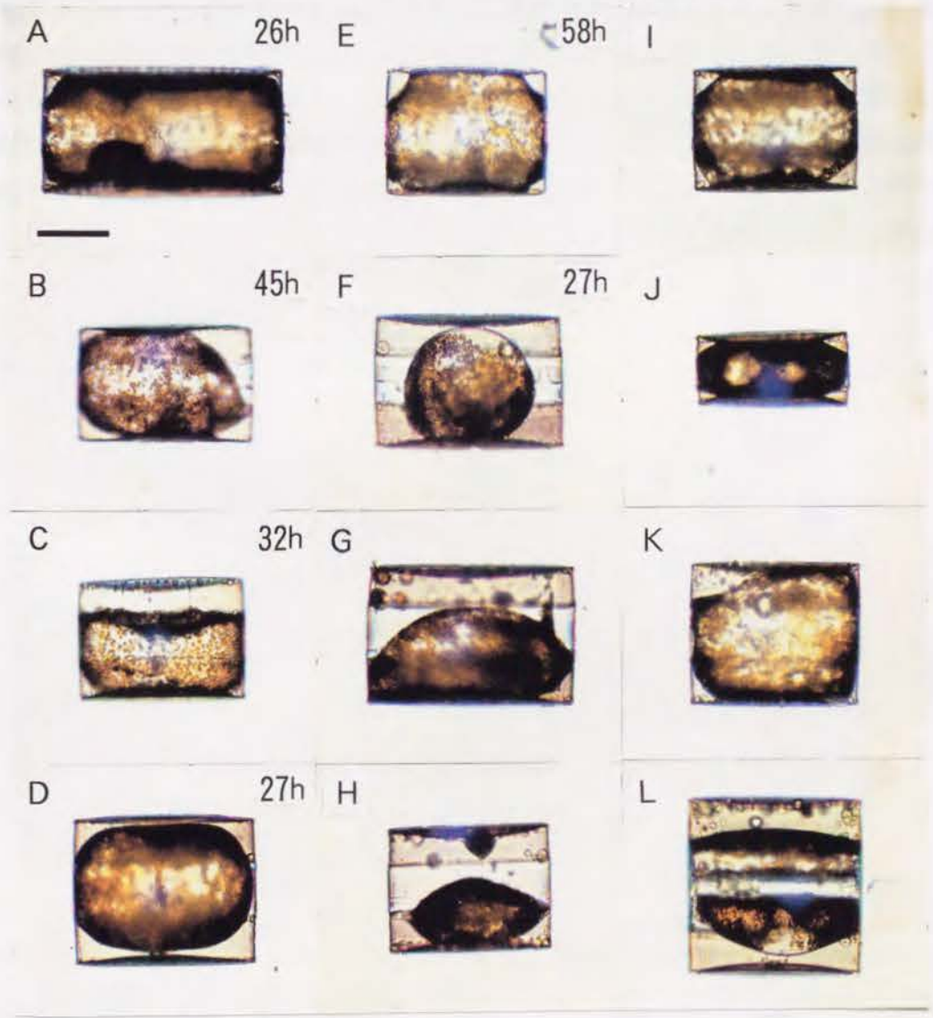


Fig. 4-9. Various resting cells of *Coscinodiscus wailesii* Gran observed in a sediment sample of Harima-nada. All pictures are the same magnification.
A ～ F, Resting cells rejuvenated after incubation. The hours on the upper right of each picture indicate the time needed for the first cell division. G ～ L, Resting cells which failed to rejuvenate. A, E, I, K, Resting cells with cytoplasms separated from their frustules slightly.; B, D, F, Resting cells with spherical cytoplasms concentrated in the center of the cell.; C, Resting cell with cytoplasm connected to one valve by filaments.; G, H, Resting cell with relatively small cytoplasm.; J, Resting cell with low valve height that might be formed just after vegetative cell division.; L, Resting cell that might be formed just before vegetative cell division. (Scale bar, 100 μ m)

もの（B，D，F，H）、片方の蓋殻面の被殻から細胞内容が全て分離しているもの（C，G，L）等の、種々の形態的特徴を示した。細胞内容物内、あるいは細胞内容物外に半透明な緑色の色素粒を複数持つ休眠細胞（B，C，G，I，L）、あるいは細胞分裂した直後に形成されたと考えられる休眠細胞（J）、細胞分裂直前に形成されたと判断される休眠細胞（L）等が見出された。復活しなかった休眠細胞は、被殻の容積に対して凝集した細胞内容物の容積が著しく小さいものが多かった（例えばG，H）。しかしながら、EとIのように形態的特徴の類似した休眠細胞のうちで、一方が復活し、もう一方が復活しなかったことから考えると、*C. wailesii* 休眠細胞の復活能力の有無を以上のような形態的特徴から厳密に判定することは難しいように思われる。

Fig. 4-10に、*C. wailesii* 休眠細胞のサイズ（蓋殻径および殻高）と復活能力との関係について示した。Fig. 4-10から、休眠細胞の蓋殻径と殻高との間、あるいは蓋殻径および殻高と復活能力との間には明瞭な関係は認められなかった。

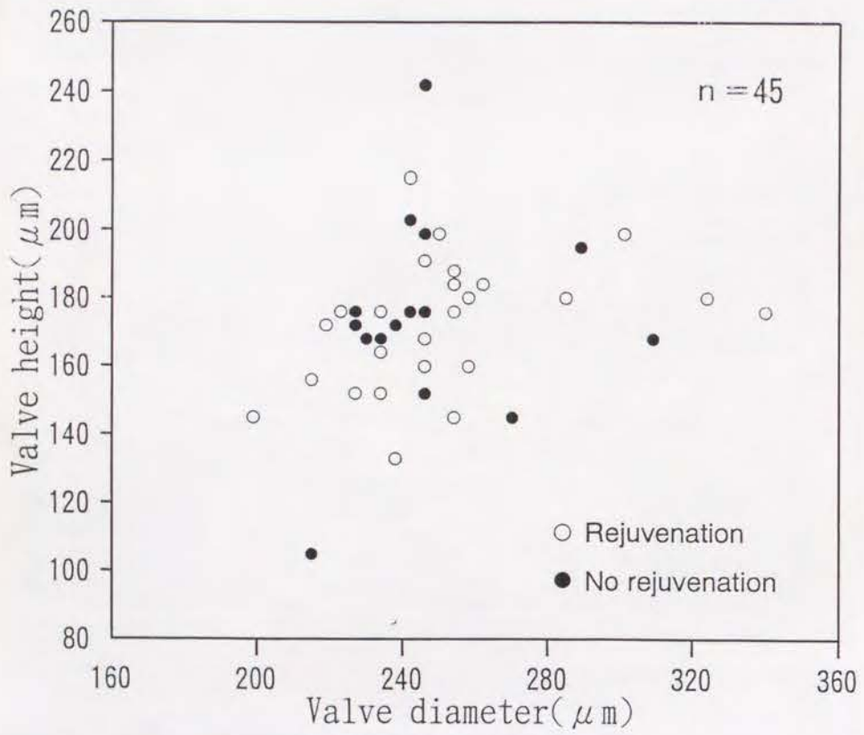


Fig. 4-10. Relationship between valve height and valve diameter of *Coscinodiscus wailesii* Gran natural resting cells.

Fig. 4-11に、1992年の3～9月の間に播磨灘のSta. H2より採集した海底泥中から識別した休眠細胞の蓋殻径を測定した結果を示した。これまで識別した休眠細胞の蓋殻径は185～340μmの範囲にあり、平均252μm、標準偏差27μmであった。

嫌気条件下において、天然の海底泥から分離した休眠細胞が増殖に好適な栄養塩、温度、および光条件下において復活可能かどうか検討した結果、培養条件下で形成させた休眠細胞と同様、実験した全ての休眠細胞が復活せずに死滅していた。従って、嫌気状態、つまり貧酸素状態は、*C. wailesii* 休眠細胞の復活にとって、非常に強い増殖制限因子になることが判明した。しかしながら、このような増殖に好適な条件下では復活せずに死滅してしまうという嫌気条件の作用は、培養する光強度や培養温度の違いによって変化する可能性が十分考えられることから、今後、嫌気条件が休眠細胞の復活にとって、どの程度の制限要因となるのか定量的な方法によって確認する必要があろう。

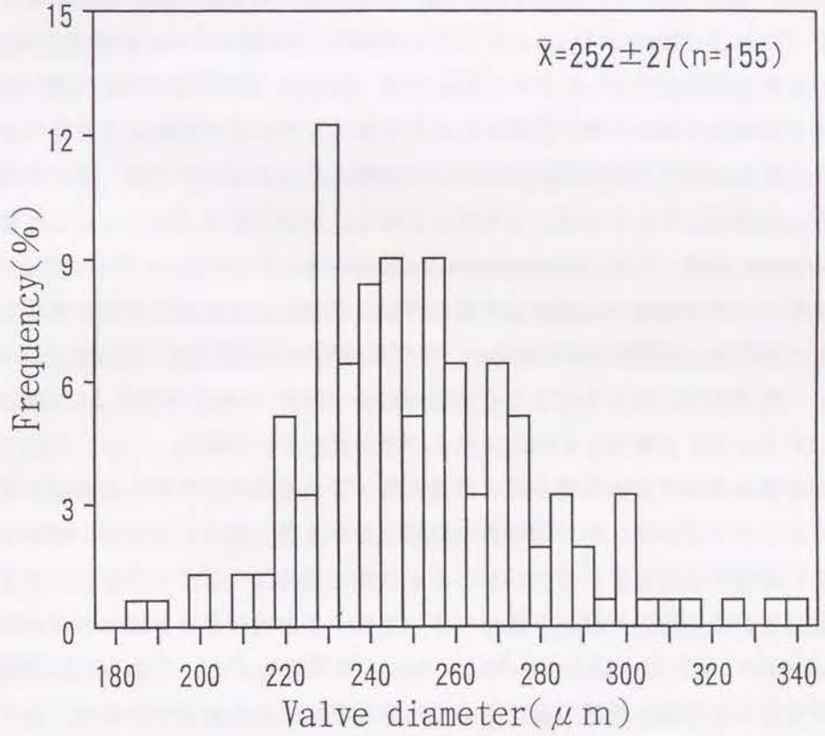


Fig. 4-11. Frequency distribution of valve diameter for *Coscinodiscus wailesii* Gran resting cells, observed in sediment samples collected in Harima-Nada from March to September, 1992.

培養実験の結果から、*C. wailesii* 休眠細胞は増殖に適した光、温度、栄養条件下で、速やかに栄養細胞に復活し増殖できること、そして10±1℃の暗黒条件下において、少なくとも10ヶ月は復活可能な生理状態で生存できることが判った。また、復活した休眠細胞が最初に細胞分裂を完了するまでに要した時間は、前述の培養条件下では1～4日であった。*Melosira italica* および *Melosira granulata* では、温度18℃、50 μ mol・m^{-2}・s^{-1}の白色蛍光灯照明、16hL－8hDの明暗周期条件下で1日～数日（Lund 1954, Sicko-Goad et al. 1986）、*Skeletonema costatum* では温度22℃、照度3500lx、16hL－8hDの明暗周期条件下で7～9時間（板倉ほか 1992）と報告されている。種間におけるこのような差異は、現場水域における休眠細胞の復活、栄養細胞の増殖、他種との競合といった”population dynamics”を考える上で重要になると思われる。

珪藻類の休眠胞子はその形成に際して、通常の栄養細胞の二分裂とは異なった特別な細胞分裂を伴い、その形成過程も複数あることが知られている(Syvertsen 1979, Hargraves & French 1983）。また、発芽時には、休眠胞子の被殻は脱ぎ捨てられる場合がある（板倉ほか 1993）。これに対して、*C. wailesii* 休眠細胞の被殻の形態が栄養細胞のそれと変わらないこと（Figs. 3-29と30, Figs. 4-6, 7, 9）、復活した細胞が新しい被殻を形成せずに、元の細胞の被殻を利用した（Fig. 3-30, Fig. 4-7）ことは、休眠細胞が特殊な被殻を形成するための特別な細胞分裂をせずに形成されることを示しているといえよう。また、休眠細胞の蓋殻径と殻高の間に一定の関係が認められなかったこと（Fig. 4-10）は、休眠細胞が細胞周期とは無関係に形成されることを示しており、複数の形成過程はないと推察される。一方、*S. costatum* においては、*Thalassiosira nordenskioeldii*（Syvertsen 1979）で示された外性的休眠胞子と半内性的休眠胞子に形態的特徴が類似した休眠細胞が報告されている（板倉ほか 1992）。珪藻類の休眠細胞が、特別な細胞分裂過程を経て形成されるのか否かについては、現段階では明らかではなく（Garrison 1984）、休眠細胞および休眠胞子の定義を明確にする上で、今後詳しく検討されるべき課題と考えられる。

珪藻類の休眠細胞および休眠胞子は、暗黒条件下で長期間（～十年）生存可能なことが知られており、その報告例については第Ⅲ章第2節第4項で紹介した。*C. wailesii* 休眠細胞については培養条件下において、10℃、12ヶ月間の暗黒条件下でも生存し復活可能であるのを確認している（Fig. 3-40）。瀬戸内海に出現する海産珪藻 *S. costatum* や *Chaetoceros* spp.、*Thalassiosira* spp. および *Leptocylindrus* spp. の休眠細胞についても、11℃の暗黒条件下で、少なくとも3年間、復活可能な状態で生存していることが報じられている（今井ほか 1990）。 天然の *C. wailesii* 休眠細胞については、播磨灘から海底泥を採集した後、10℃の暗黒条件下で15ヶ月間保存した後も、復活できることを確認しており、相当長期間生存できるものと考えられる。Smayda & Mitchell-Innes（1974）、Antia（1976）およびTomas（1978）は、それぞれ海水中において、*S. costatum* および *H. triquetra*（渦鞭毛藻の1種）の暗黒条件下での生存能を実験的に調べた。これに対して、矢持（1989a）は海底泥を保存基質にした場合の *S. costatum* および *H. triquetra* 暗黒条件下における生存能を調べた。その結果、彼らの結果と、矢持の実験結果との間に有意な差が見られ、海底泥を保存基質にすると海水中で保存するより明らかに長期間生存したことから、矢持は海底泥中には植物プランクトンの休眠期細胞の生存機能を保護する作用があると考察している。また、板倉・今井（1991）は、広島湾では *S. costatum*、*Chaetoceros* spp.、*Thalassiosira* spp. の珪藻類が、1年の内のかなりの期間、栄養細胞として水柱中に存在していること、しかし、夏に水温成層が顕著になる時期や、冬の低水温期などは海水中から全く姿を消してしまう期間があることを観察した。そして、そのような時期にも、海底泥中にはそれぞれの休眠期細胞が比較的高密度で存在することを明らかにし、現場水域の海底泥が”seed bank”（沼田 1981）として重要な役割を果たしていることを述べている。

第2項　水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞の出現動態

有害赤潮藻の *Chattonella* 属の赤潮発生には、越冬したシストが”seed population”として重要な役割を果たしていることが指摘されており、一年のほとんどをシストとして海底泥中で過ごすこと、また、海底泥に存在するシストは、その生理的性質（休眠, 成熟, 発芽等）が著しい季節性を示すことが報告されている（今井 1990）。一方、珪藻類の休眠期細胞の生態、特にその出現の季節性についてはHargraves & French（1975）、Garrison（1981）および板倉・今井（1991）が報告している。Garrison（1981）は、Monterey湾における調査で、*Chaetoceros debile* や *C. vanheurckii* の休眠胞子が、板倉・今井（1991）は広島湾における調査で、*S. costatum*、*Chaetoceros* spp. および *Thalassiosira* spp. の休眠細胞がほぼ一年を通して、海底泥中に存在することを明らかにし、栄養細胞が海水中から検出されない時でも、その”seed”としての役割を果たしていることを指摘している。これに対して、Hargraves & French（1975）は、Narragansett湾での調査で、*Chaetoceros* 属等の休眠期細胞は海水中に栄養細胞が多く存在する場合には、海底泥中にも観察されるが、その数週間後には検出されなくなると報じ、Narragansett湾において、これらの休眠胞子は、栄養細胞の発生のための”seed”とはなっていないだろうと推測している。以上のように海水中における栄養細胞の出現を考える上で、休眠期細胞の役割を明らかにすることは重要な課題といえる。

第Ⅲ章の第2節第3項および本章第2節第1項において、培養条件下で形成された *C. wailesii* 休眠細胞および天然海底泥中で形成された休眠細胞が比較的長期間、暗黒条件下でも生存可能であることを明らかにした。また、培養条件下において、*C. wailesii* 休眠細胞の形成は、海底泥中・暗黒条件下に放置後、2、3日後には観察され、栄養細胞の増殖に適当な条件下で培養すると速やかに復活することを示した（第Ⅲ章第2節第3項）。よって、本種は、長期間の暗黒条件下で生存できるだけではなく、短期間の環境変動にも適

応できる休眠機構を持つことが明らかになった。本項では、このような性質を持つ本種の休眠細胞が、現場水域において栄養細胞の大量発生とどのような関わりを持つのか知るため、播磨灘北部海域の調査定点において３年間、水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞の密度を調査し、両者の生態学的な関係、すなわち" population dynamics" の解明を試みた。

材料および方法

調査は、1992年３月～1995年３月にかけて、播磨灘のSta. H2（水深約20m）およびSta. H7(水深約38m)(Fig. 4-5）において合計62回実施した。採水は表層（0.5m）、５m、10m、および底層（海底上１m）の４層で実施し、表層水は原則としてポリバケツで、５mと10m層水は北原式採水器、底層水は眞鍋・反田（1985）により考案された採水器を用いて採水した。採水は、原則として毎月上旬１回、夏期はほとんど毎週１回行った。水温、塩分、および栄養塩の測定については、第Ⅱ章で述べた方法で実施した。栄養塩の分析および海水中の *C.wailesii* 栄養細胞の計数は、表層、10mおよび底層の３層で実施した。海水中の *C. wailesii* は、200m*l* の試水をグラスファイバー製フィルター（ADVANTEC TOYO ＧＡ200）により吸引濾過し、フィルター上に補集された栄養細胞を肉眼により計数し、３層を平均して、１*l* 当りの細胞密度を算出した。出現密度が低い時期は、口径45cm、目合い100μmのネットの鉛直曳き（水深20m～）により、*C. wailesii* 栄養細胞を捕集し、その細胞数とネットの濾水量から１*l* 当たりの細胞密度を算出した。海底泥中における *C. wailesii* 休眠細胞の密度の測定において、海底泥の採集、保存および休眠細胞探索用試料の調製は本節第１項で述べたのと同法で実施した。なお、休眠細胞の計数は海底泥を採集後１週間以内に行った。

結果および考察

Fig. 4-12に、Sta. H2における1992年３月～1995年３月までの水温、塩分、DINおよびPO_4-Pの季節変化を示した。なお、平年の環境と比較するため、Fig. 2-12に示した値を平年値として、３年間の水質環境を比較した。

まず、水温について見ると、1992年は平年並みに推移した。1993年の夏期は、全国的に天候が不順で、低温、多雨、日照不足であり（辻 1994）、播磨灘の水温は表層でも最高26.3℃までしか上昇せず、低水温であった。一方、1994年の夏期は高温や小雨の記録が続出し、観測史上記録的な猛暑、渇水の夏となった（原田 1995）。水温は表層で最高30.9℃まで上昇し、1993年と1994年の夏の表層における最高水温は4.6℃もの差が生じた。底層水温も高く、８月上旬から９月の下旬まで26℃以上で推移した。

塩分に関しては、1992年は水温と同様に平年並みに推移した。1993年は記録的な降水が

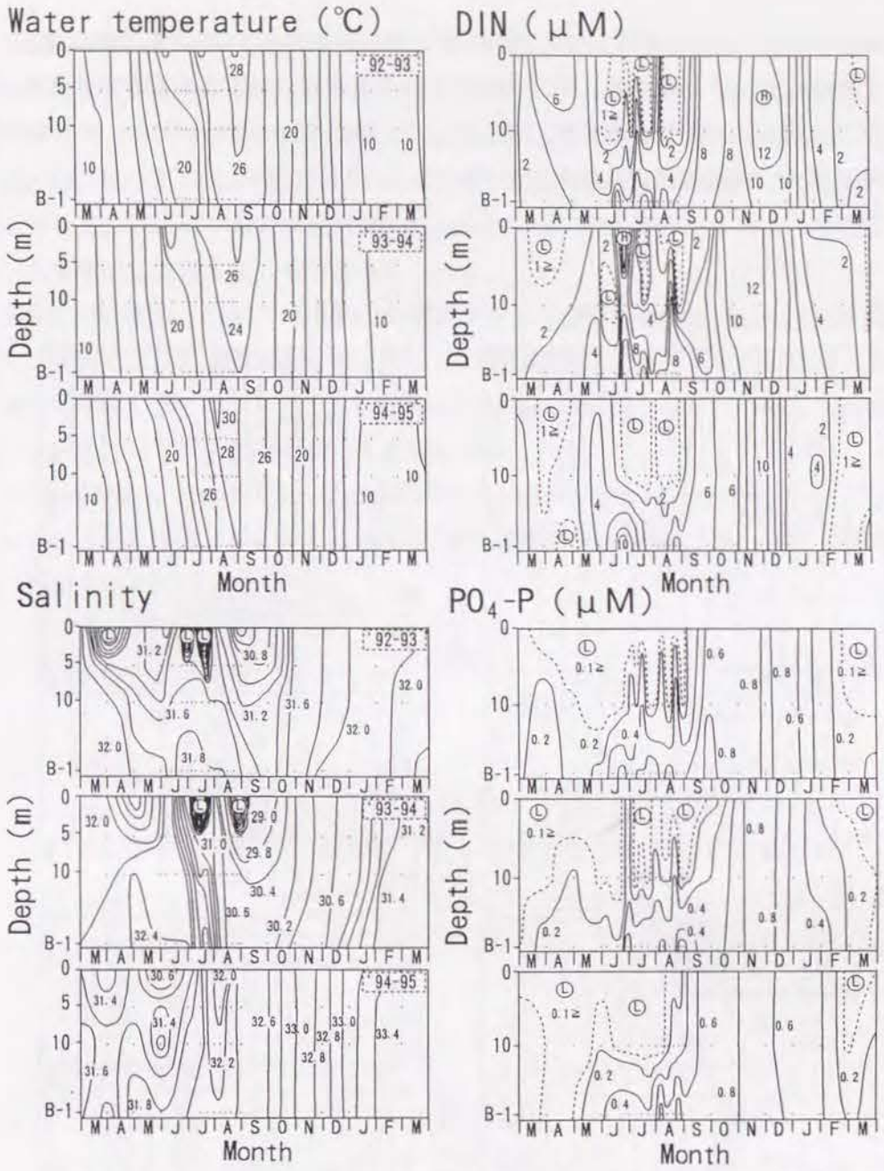


Fig. 4-12. Changes of water temperature, salinity, DIN and PO_4-P at Sta. H2 in Harima-Nada from March 1992 to March 1995.

あり、８月上旬から12月下旬までの間、表層から底層まで塩分は30台で推移した。この著しい低塩分現象は1994年の春頃まで続いた。これに対して、1994年の夏期には猛暑、小雨のせいで塩分は上昇を続け、一転して高塩分となった。その後1995年３月には、底層で33.8を記録した。

DIN濃度については、1992および1994年の６～８月にかけて低く、表層から10m層付近まで１μMを下回る推移を示した。これに対して、1993年の夏期は、記録的な降水により河川から大量の栄養塩が供給された結果、とりわけ10m以深で濃度は高い値を示した。

PO_4-P濃度を見ると、３～９月上旬の表層において、３年間ともに0.1μMの低濃度で推移した。しかしながら、両栄養塩（DINとPO_4-P）は９月中旬の鉛直混合期が始まるとともに、濃度が急上昇し、12月には最高値に達した。その後、*C. wailesii* を中心とする春のブルームが始まると、栄養塩濃度は急速に低下した。

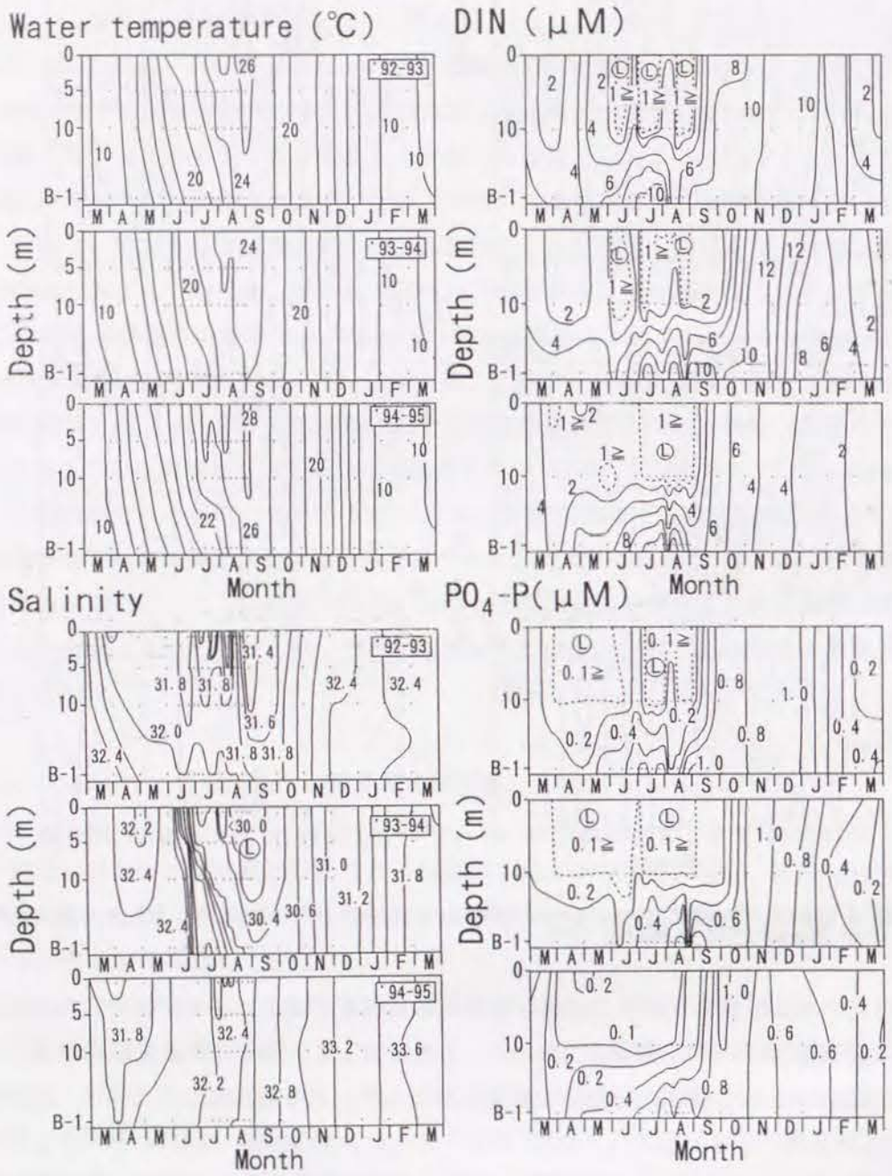


Fig. 4-13. Changes of water temperature, salinity, DIN and PO_4-P at Sta. H7 in Harima-Nada from March 1992 to March 1995.

Fig. 4-13に、Sta. H7における1992年３月～1995年３月までの水温、塩分、DINおよびPO_4-Pの季節変化を示した。まず、水温の変化傾向については、Sta. H2とほぼ同様で、1992年は平年並み、1993年の夏期は、表層でも最高25.9℃までしか上昇せず低水温で推移した。一方、1994年の夏期は表層は28.9℃まで上昇した。Sta. H2では最高30.9℃まで上昇したことに対して、Sta. H7で最高水温が２℃低かったのは、Sta. H7がSta. H2より沖合に位置するという地理的な原因によるものと考えられる。

塩分については、1992年は水温と同様に平年並みに推移した。1993年は記録的な降水があり、表層では７月上旬から11月上旬までの間、底層では８月下旬から11月上旬まで塩分は30台で推移した。これに対して、1994年の夏期には上昇を続け、一転して高塩分となった。1995年３月には、底層で33.7を記録した。

DIN濃度に関しては、1992および1994年の７～８月にかけて低く、表層から10m付近まで１μMを下回る推移を示した。これに対して、1993年の夏期は、10m以深で濃度は比較的高い傾向を示した。

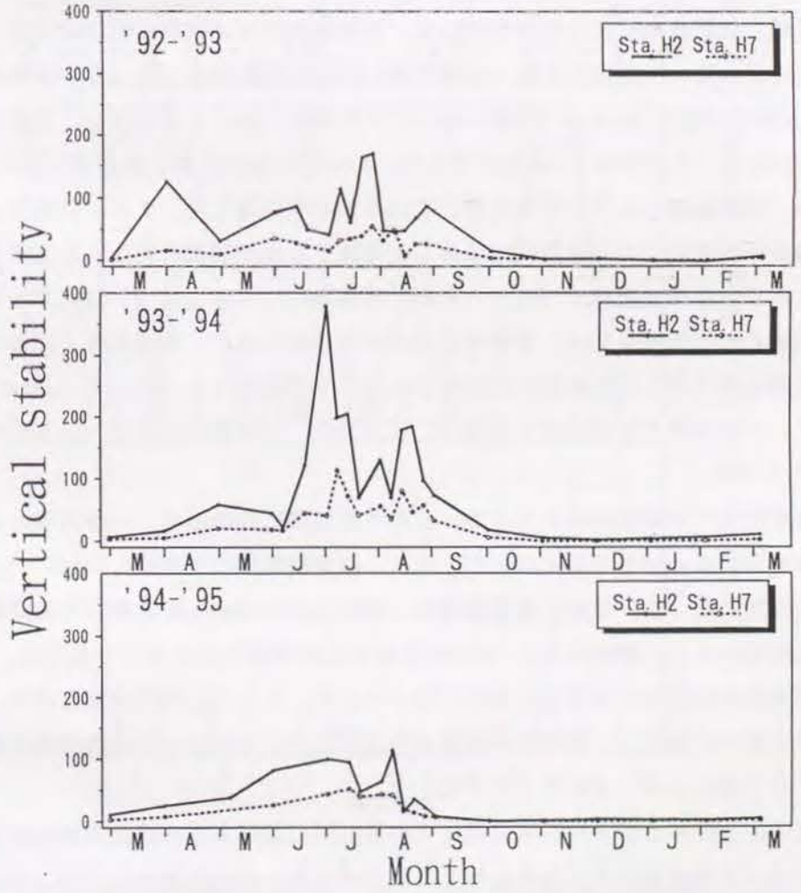


Fig. 4-14. Changes of vertical stability at Sta. H2 and Sta. H7 in Harima-Nada from March 1992 to March 1995.

PO_4-P濃度については、Sta. H2同様、表層の３～９月上旬において３年間ともに約0.1μMの低濃度で推移し、変化傾向に年ごとの明瞭な差異は認められなかった。

Fig. 4-14に、Sta. H2およびSta. H7における1992年３月～1995年３月までの鉛直安定度の変化を示した。鉛直安定度は、４～９月までの間は３年ともにSta. H2の方が大きい値を示した。これは、Sta. H2がSta. H7より沿岸寄りに位置し、陸水の影響を受けやすく、表層が低塩分になりやすい（Figs. 4-12, 13）ことに起因していると考えられる。Sta. H7よりSta. H2の方が夏期に強い密度成層が形成されることが判る。Sta. H2における1993年夏期の鉛直安定度の著しい上昇は、記録的な降水に伴う塩分の低下が原因と考えられる。一方、1994年夏期は記録的な猛暑であり、水温上昇が著しかったにもかかわらず、鉛直安定度は1992年に比べて高くなく、また、成層崩壊による鉛直安定度の低下が1992年や1993年より約１ヶ月程度早かった。この原因は、記録的な小雨により表層と底層の間の塩分差がみられなかったこと、さらには底層の水温上昇が例年より早く（Fig. 4-12）、表層水と底層水の間の密度差が早く小さくなったためと推察される。

Fig. 4-15に、1992年３月～1995年３月までのSta. H2における水中の栄養細胞密度と、海底泥中における休眠細胞密度の変動を示した。栄養細胞密度は明瞭な季節変化を示し、成層崩壊期に密度は高く、成層形成期（特に夏期）に低くなる傾向にあった。栄養細胞の最低密度は、1992、1993、および1994年においてそれぞれ0.36（６月15日）、1.67（６月２日）、および0.05（７月25日）cells/*l*であり、Sta. H2においては、夏期には極めて低密度であるが、栄養細胞として一年中生存していることを確認した。また、1993年の夏期には、栄養細胞は低密度ながら短期間ではあるが増殖するのが観察された。鉛直混合期の大量発生時にみられる栄養細胞や1993年の夏期に採集されたものに比べ、1992および1994年の夏期に採集された栄養細胞は、そのほとんどが半透明であり、培養条件下において定常期を過ぎ栄養塩が欠乏した培養液中で観察されるような細胞であった。*C. wailesii* 栄養細胞にとって、一年の内で夏期が最も不適で”critical”な季節であることは明白である（Figs. 2-2, 2-12）。

一方、海底泥中の休眠細胞は２月上旬～８月中旬の間に検出され、栄養細胞と同様、明瞭な季節性を示すことが明らかとなった。また、調査期間中の密度は0.4未満～13.0cells/g(湿泥)の範囲にあった。なお、調査期間中、他の *Coscinodiscus* 属の種の休眠期細胞を観察することはなかった。海水中の *C. wailesii* 栄養細胞が衰退し始める３～４月に、海底泥中の休眠細胞密度は急激に増加する傾向が認められた。そして、休眠細胞密度は、水温の上昇につれて徐々に減少し、秋期の鉛直混合の始まりとともに水中の栄養細胞の密度を増加させる８月下旬には検出されなくなった。

Fig. 4-16に、1992年３月～1995年３月までのSta. H7における水中の栄養細胞密度と、海底泥中における休眠細胞密度の変動を示した。栄養細胞の最低密度は、1992、1993、および1994年においてそれぞれ　0.02（７月27日）、0.06（４月５日）、および0.04（７月４

日）cells/*l*であり、栄養細胞として一年中生存していることをSta. H2と同様に確認した。３年間の内、1993年だけ夏期に栄養細胞の短期間の増殖が観察された。この傾向はSta. H2においても同様であり（Fig. 4-15）、19地点平均においてもわずかな出現ピークとして検出されている（Fig. 2-2）。これは、日照不足、低水温かつ降水によって陸水から頻繁に栄養塩が供給される1993年のような夏には、鉛直安定度が高い条件下でも、短期間であれば、栄養細胞が増殖可能となることを示した結果と考えられる。一方、1994年秋期については、水中の栄養細胞密度は11月上旬にわずかに増加したが、Fig. 2-2をみても判るようにブルー

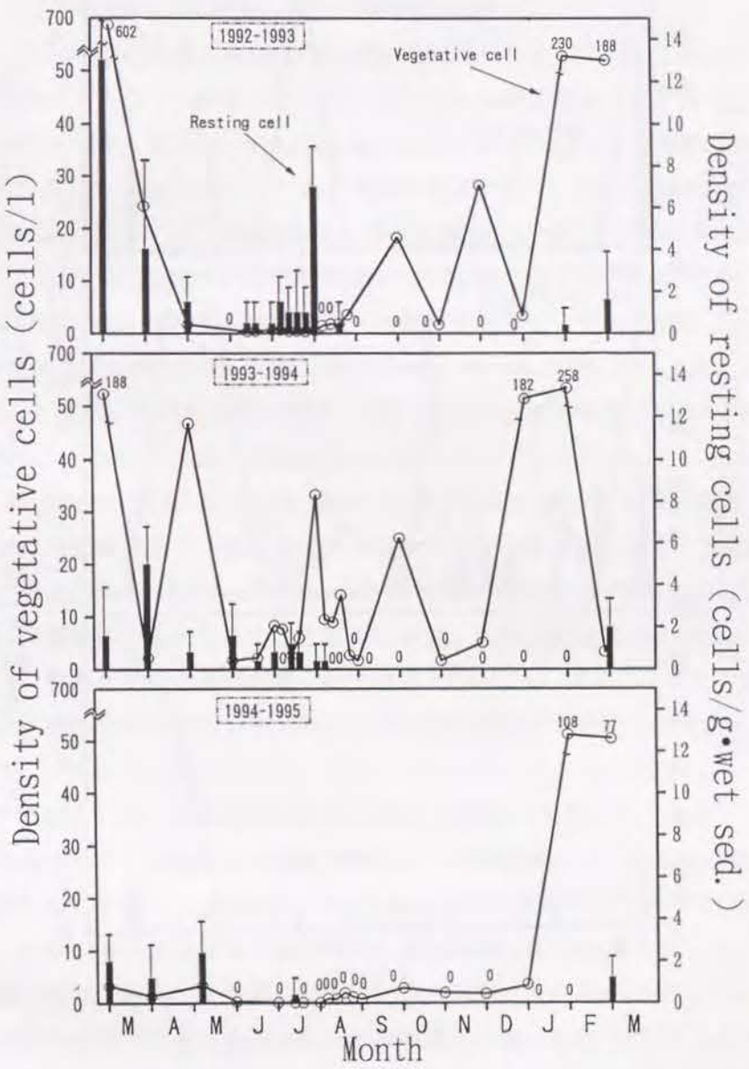


Fig. 4-15. Changes of *Coscinodiscus wailesii* Gran resting cells in the sediments and vegetative cells in water column at Sta. H2 in Harima-Nada from March 1992 to March 1995.

ミングはなかったと判断できよう。海底泥中の休眠細胞は３～８月の間 0.4未満～9.0cells/g(湿泥)の密度で検出された。1992年３月～1994年３月までの休眠細胞の、鉛直混合期には検出されないという傾向は、Sta.H2とほぼ同様であった。しかし、Sta.H2では1994年の４、５月に休眠細胞が検出されたのに対して、Sta.H7では1994年４月～1995年２月まで休眠細胞を検出することができなかった。

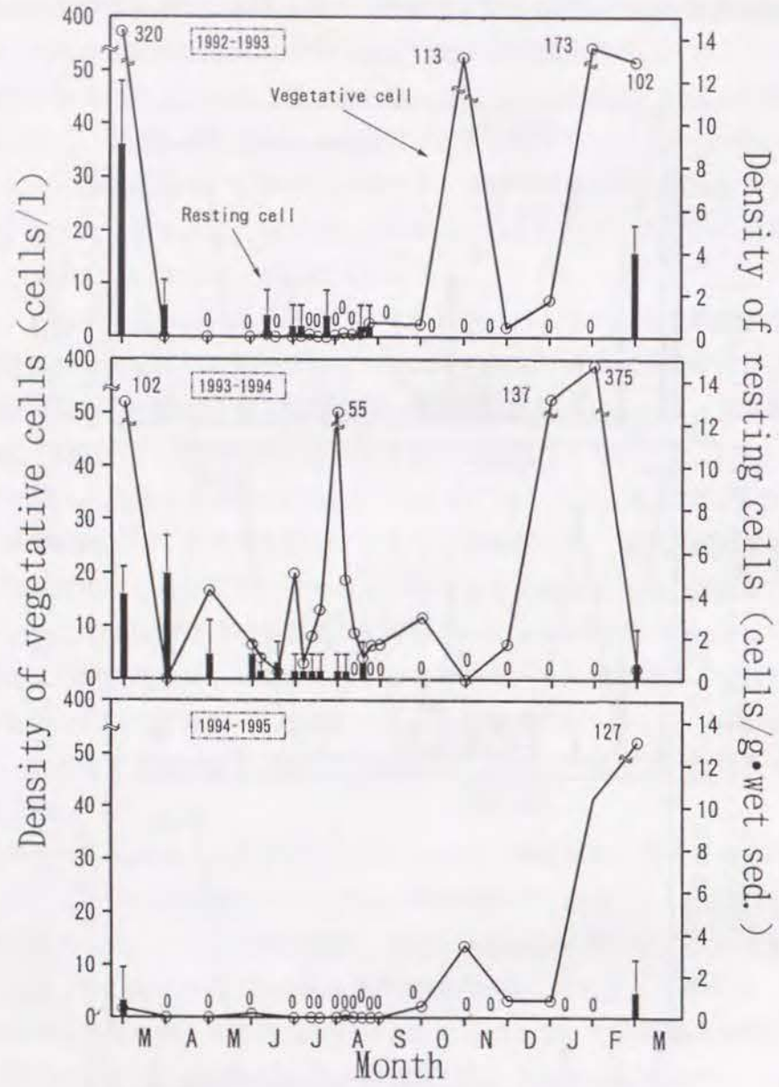


Fig. 4-16. Changes of *Coscinodiscus wailesii* Gran resting cells in the sediments and vegetative cells in water column at Sta. H7 in Harima-Nada from March 1992 to March 1995.

C. wailesii の春のブルームが衰退した後、海底泥中の休眠細胞が急激に増加する３、４月上旬の海底泥において、少数ながら栄養細胞を検出することができた。また、培養条件下において、栄養細胞を海底泥に懸濁した後、暗黒条件下に置くことにより休眠細胞の形成が起こることが判明しており（第Ⅲ章第２節参照）、従って、春期における休眠細胞の形成は、栄養細胞が海底泥表面に沈降した後に起こると推論された。また、天然の海底泥中から見出された休眠細胞が、特殊な被殻を形成するための特別な細胞分裂をせずに形成されることや、細胞周期とは無関係に形成される（Figs.4-9,10）ことなどから判断して、形成された *C. wailesii* 休眠細胞は自発的休眠" spontaneous dormancy"ではなく、強制休眠" enforced dormancy"の状態にある可能性が高い。

1992および1993年の夏期の海底泥中には休眠細胞が生存していること、そして、その後秋期に大量発生することも観察された。一方、1994年の夏期は、海底泥中から休眠細胞はほとんど検出されず、秋期のブルームも起こらなかった。従って、夏期の海底泥中における休眠細胞の存在は、秋期のブルームと密接な関係にあり、休眠細胞が秋期のブルームの" seed population"としての役割を果たしている可能性が強く示唆された。

一般的に、温帯域に生息する浮遊珪藻類については" spring bloom"などの大量発生時に栄養塩が枯渇し、その結果、休眠細胞（休眠胞子を含む）を形成することが知られている（Hargraves & French 1975,1983, Hollibaugh et al. 1981, Garrison 1981, 中田 1982, Smetacek 1985, Odate 1987, 板倉・今井 1994）。栄養塩類の中でも特に窒素(NO_3-N)の欠乏（概ね１μM以下）が、休眠細胞の形成に作用するといわれている（Davis 1980, French & Hargraves 1980, Garrison 1981, Hargraves & French 1983, 板倉・今井 1994）。休眠胞子は、栄養細胞よりも厚い珪酸質の殻を持つため比重が大きく、形成後は速やかに沈降すると考えられる（French & Hargraves 1980, Kuwata & Takahashi 1990）。この様な性質は、栄養細胞のままでは生存が困難な高温、強光、貧栄養の表層水からの逃避という観点から、その適応的意義が考察されている（Smetacek 1985）。また、素早い沈降によって、その水域から消失するのを逃れるための生存戦略とも考えられている（中原・左子 1987）。

培養条件下において、*C. wailesii* の休眠細胞は栄養塩（Ｎ欠、Ｐ欠など）の欠乏した環境下では形成されず、栄養細胞を嫌気条件において暗黒条件下で保存することにより、形成は促進された。また、*C. wailesii* にとって最も不適な季節である夏期に、水中に栄養細胞としてわずかにしか存在せず、海底泥中に休眠細胞として存在することから考えると、生存が困難な高温、強光、貧栄養の表層水からの逃避（Smetacek 1985）や、素早い沈降によるその水域から消失するのを逃れるための戦略（中原・左子 1987）という点については、本種にも当てはまるように思われる。

水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞密度の調査を実施した1992～1995年の期間は、播磨灘における *C. wailesii* の大規模な発生がなかった（Figs.4-15,16）。このような" popu-

lation dynamics" に関する詳細な現場調査を、*C. wailesii* が大発生していた1984～1986年頃に実施していたならば、水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞の生態学的関係の、より明快な回答が得られたものと推察されるが、残念ながらこの時期のデータは欠けている。今後の課題として、*C. wailesii* の大規模に発生する年に同様な調査を実施し、両者の関係をさらに検討する必要があろう。

第３項　秋季大量発生と鉛直混合の関係

Lund(1954)は、淡水産珪藻 *Melosira italaica* subsp. *subarctica* の天然個体群において、水中の栄養細胞と底泥中の休眠細胞の相互の関わりを調査した結果、鉛直混合による休眠細胞の有光層への懸濁により、春の" vegetative bloom"が起こること、そして、成層化が顕著になった時点で、水中の個体群（vegetative population）はすぐに消失し、これに対応して底泥中の休眠細胞が急増することを観察している。

前項では、夏期の海底泥中における休眠細胞が、秋期のブルームの" seed population"としての重要な役割を果たしている可能性を指摘した。本項では、1992年６月下旬～８月下旬までの夏期の成層期～秋期の鉛直混合が始まる時期において、海水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞の動態を詳細に調べた。1992年８月上旬には２度の台風が播磨灘を通過し、台風の通過による擾乱の後、海底泥中の休眠細胞が栄養細胞として復活・増殖し、秋期の大量発生に関与する過程を捉えることができた。そして、休眠細胞が秋期の大量発生の" seed population"としての機能を果たしている状況証拠を得ることができたので述べる。

材料および方法

調査は、播磨灘北部のSta.H2において、1992年６月29日～８月31日まで一週間に１回、合計10回実施した。測定項目は、水温、塩分、溶存酸素飽和度、透明度、DIN、PO_4-P、植物プランクトン細胞密度、*C. wailesii* 栄養細胞密度、および海底泥中の休眠細胞密度である。透明度の測定はSecchi discによった。溶存酸素飽和度は、ウインクラー法により測定した（気象庁 1970）。水温、塩分、DIN、PO_4-Pの測定、植物プランクトン細胞数、および休眠細胞の計数は、第Ⅱ章で述べたものと同法で実施した。海水中の *C. wailesii* 栄養細胞の計数は第Ⅱ項で述べた方法の内、鉛直ネット曳きによる方法を用いて計数した。また、1994年の夏期に播磨灘の２調査地点において水中光量子量（アレック電子製超小型メモリー照度計、MDS-L型）を測定し、海底泥表面に生存する休眠細胞が復活できる状態にあるのかどうかについて検討した。

結果および考察

Fig.4-17に、調査期間中の透明度、水温、塩分、溶存酸素飽和度、DIN、PO_4-P、小型植物プランクトン細胞数、海水中の *C. wailesii* 栄養細胞および海底泥中の休眠細胞数の変化について示した。調査期間中の透明度は2.5～10.9m、水温は18.2～28.3℃、塩分は29.10～31.89、溶存酸素飽和度は42.0～133.5%、DINは0.0～10.0μM、およびPO_4-Pは0.00～0.81μMの範囲で推移した（水温～PO_4-Pの変動範囲は３層の値）。これらの環境要因の比較から、７月27日まで強い成層が形成されていたことが判る。第２項で述べたように、本年の水温および塩分は、平年並みで推移した。表層のDINは１μM*l*以下と低いレベルにあったのに対して、底層では４μM以上の高い値を示した。中層では７月６日と７月20日に上昇したが、これは表層の塩分および透明度の急激な低下から判るように、降水によって栄養塩が河川水から供給されたものと推察される。兵庫県二見市では７月５日に14mm、７月17～19日に18mmの降水が記録されている（長井ほか 1993）。７月６日に底層のDIN濃度の低下がみられたことから、強風による海水の擾乱の起こった可能性が考えられたが、７月６日やその２、３日前に平均風速の増大は観察されていない（長井ほか 1993）。それ以外の日では、DINは表層と同レベルの低いで推移した。また、PO_4-Pについては、DINとほぼ同様の変動傾向を示した。植物プランクトン細胞数は、１～4215cells/m*l*の範囲で推移し、７月６日と７月20日に主に表層で高い値を示した。これは降水に伴い陸水から供給された栄養塩を植物プランクトンが急速吸収したものと考えられ、このため７月６日と20日の栄養塩濃度は中層では高い値を示したのに、表層では示さなかった原因ではないかと推測される。海水中の *C. wailesii* 栄養細胞は0.4～3.6cells/*l*の範囲で推移し、細胞密度は８月３日を境にして増加傾向を示した。一方、海底泥中の休眠細胞密度は、0.4未満～7.0cells/g(湿泥)の範囲で推移し、８月３日を境にして、８月24日を除き検出されなかった（翌年の２月まで，Fig.4-15参照）。なお休眠細胞の密度は、８月３日に急激な増加を示している。これは、７月下旬頃から底層水の溶存酸素飽和度が低下しており（８月３日、51.0%）、おそらく海底泥表面は貧酸素化が進行していた結果、底層付近に生存していた栄養細胞が休眠細胞へと変化したことが原因ではないかと推測される。

播磨灘を８月３日～４日および７日にかけて２度台風が通過した。Fig.4-17は、この台風の通過により、８月３日直前まで形成されていた強い成層が崩壊し、環境要因の鉛直差が消失したことを示している。特に栄養塩（DIN）をみるとその傾向は顕著であり、海水の擾乱があったことは明らかである。従って、台風の通過により海水が鉛直的に攪拌され、海底泥中の休眠細胞が海水中に拡散し、速やかに復活し、栄養細胞として増殖した結果、８月３日を境にして、海水中の栄養細胞密度と海底泥中の休眠細胞の密度とは逆の変動傾向を示した可能性が考えられる。

これらの結果から、播磨灘において、海水中の *C. wailesii* 栄養細胞が春のブルームを形

成した後に衰退し、海底泥中の休眠細胞密度は急激に増加した。そして、休眠細胞の密度は、水温の上昇につれて徐々に減少し、8月下旬頃の秋期の鉛直混合の始まりとともに海底泥中からは検出されなくなると、逆に海水中の栄養細胞は増加するという秋期のブルーミング形成の初期過程を捉えることができた。さらに、1994年の夏期には海底泥中の休眠細胞はほとんど検出されず、秋期のブルームもほとんど起こらなかったことから、休眠細胞が秋期のブルームの”seed population”としての重要な役割を果たしていることが強く

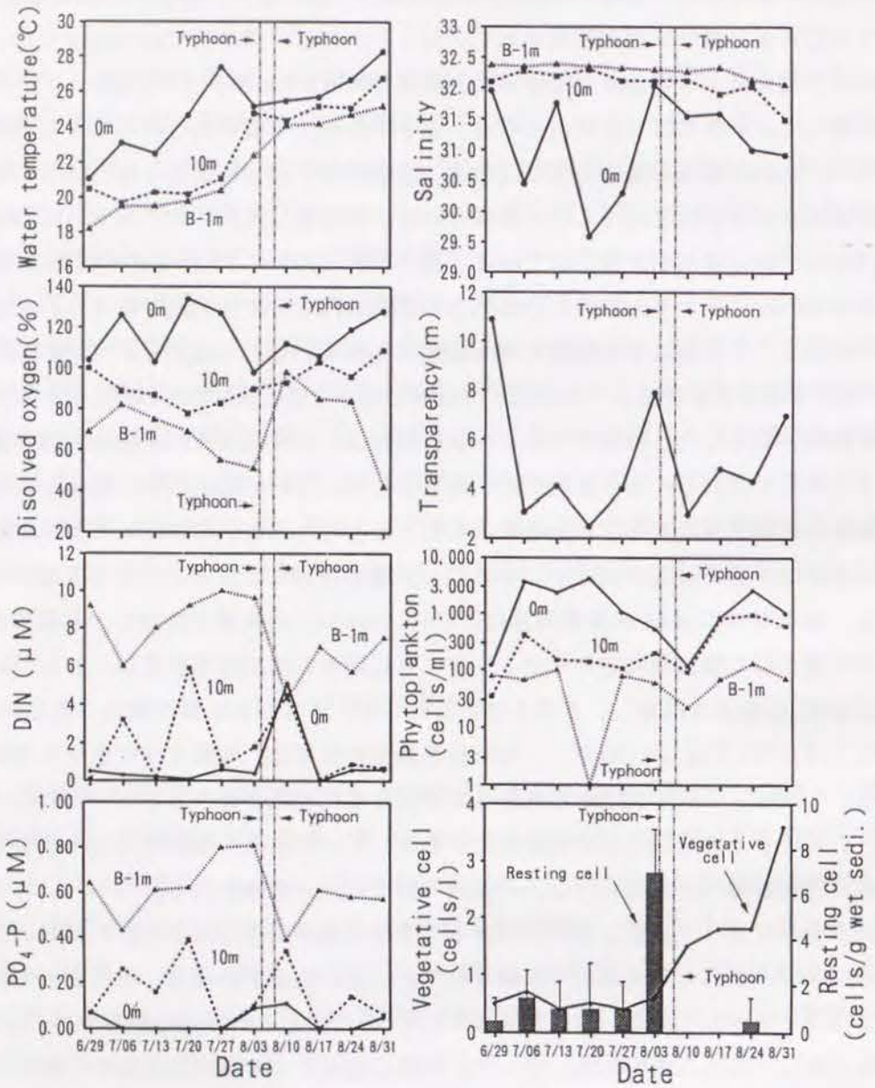


Fig. 4-17. Changes of water temperature, salinity, dissolved oxygen, transparency, DIN-N, PO_4-P, phytoplankton, vegetative cells in water column and resting cells of *Coscinodiscus*

示唆された。しかし、1992年には、秋期の大規模なブルーミングが起こらなかったことから、本種の秋期のブルームには、休眠細胞が復活し、栄養細胞へと変化した後の環境条件が影響を与えることが推測された。また、鉛直混合期が始まる前でも台風が通過したような場合、休眠細胞の海底泥からの復活が速められる可能性が示唆された。休眠細胞にとって鉛直混合の有利な点は、①貧酸素からの解放（嫌気条件が休眠細胞の復活に対する強い制限因子になっている，本節第1項参照）、②大量の栄養塩の有光層への供給（夏の間に底層で蓄積されたもの）、③休眠細胞の有光層への持ち上げ（有光層での滞在が長くなり、復活・増殖が保証される）等である。しかしながら、海水中において越夏する栄養細胞の存在が毎年確認されたことから、越夏細胞が秋期の大量発生に関与している可能性もあるいは考えられる。

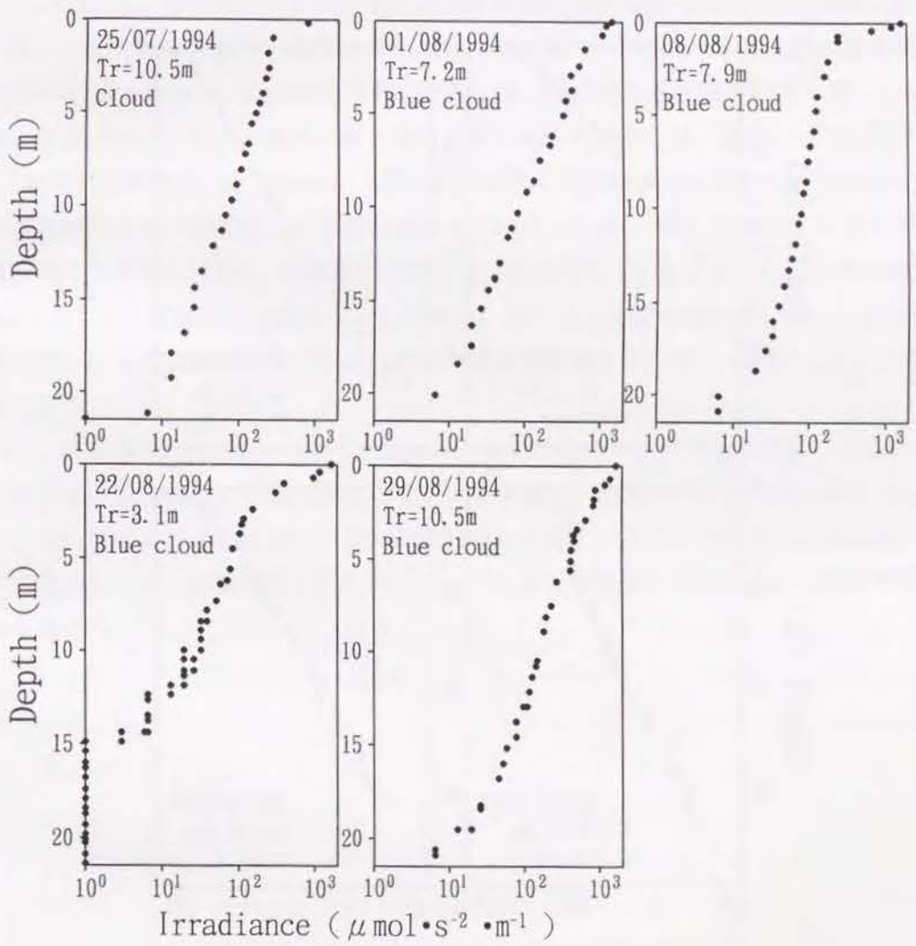


Fig. 4-18. Vertical profiles of photon flux during summer at sta. H2 in Harima-Nada in 1994.

Fig. 4-18に、1994年の夏期に播磨灘のSta. H2において水中光量子量を測定した結果を示した。Sta. H2は水深20～21mであるが、晴天時、透明度が７m以上であれば、光量子量は底層においても５μmol・m^{-2}・s^{-1}以上あることが判明した。しかし、透明度が低い場合（８月22日、透明度3.1m）、水深15mでさえ、光が十分に届かなくなることが判った。

Fig. 4-19に、1994年の夏期に播磨灘のSta. H7において水中光量子量を測定した結果を示した。Sta. H7は水深37～38mであり播磨灘の最深部付近に位置している。Sta. H7では、透明度が７m以上あると、水深30m程度までは光が到達することが判った。培養実験の結果、明暗周期12hL/12hDにおいて、５μmol・m^{-2}・s^{-1}以上の光強度があれば、*C. wailesii* 休眠細胞は速やかに復活・増殖できることを確認しており（Figs. 3-38, 39）、本種の復活・増殖可能な光強度と現場での水中光量子量を考えると、透明度が７m以上であれば水深20m以浅の水域において、休眠細胞は底層でも酸素が十分にあれば復活が可能であり、休眠細胞

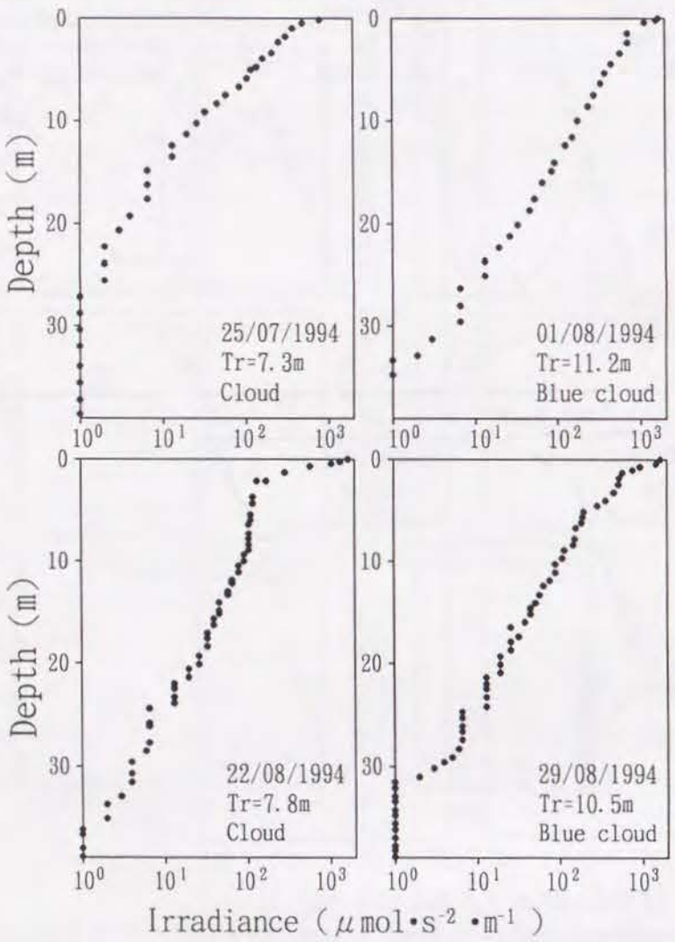


Fig. 4-19. Vertical profiles of photon flux during summer at sta. H7 in Harima-Nada in 1994.

としての機能を十分に発揮できることが推論された。French & Hargraves（1980）は、時折の海水の擾乱によって底泥中に生存する珪藻類の休眠胞子が、短期間有光層へ運ばれることにより、生存能力をバッテリーのように再充電できるのではないかと述べている。播磨灘における *C. wailesii* についても、強風の連吹等によって海水が攪拌され、有光層にまで浮上できた場合、速やかに栄養細胞に復活し少し増殖した後、再び沈降すれば、新鮮な休眠細胞となることが可能であろう。また、*C. wailesii* 休眠細胞の海底泥中、暗黒条件下での生存期間が10℃以上の温度では、高温になるに従い短くなった結果（25℃では1.5ヶ月, Fig. 3-40）から、*C. wailesii* についても再充電が必要になる場合があると考えられる。光がなくても発芽できる多くの渦鞭毛藻類のシストとは異なり、復活に光が必要な *C. wailesii* や多くの珪藻類の休眠期細胞にとって、このような再懸濁の効果は、休眠細胞が埋没した地点の水深によっても大きく異なることが予想される。

今井（1992）は、海底泥中に存在する珪藻休眠細胞と渦鞭毛藻（主に *H.akashiwo* ）のシストでは、与えられる光強度で発芽の様相が異なり（強光下では *S. costatum* 等の珪藻類、弱光下では *H. akashiwo* ）、それにより海水表面において卓越する生物が決まってくる可能性を示唆している。また、現場水域（瀬戸内海）の海底泥中には、周年、10^2～10^6cell s/cm^3（湿泥）の密度で、*S. costatum*、*Chaetoceros* 属、*Leptocylindrus* 属および *Thalassiosira* 属等の休眠細胞および休眠胞子が存在している（Imai et al. 1984, Yamochi & Joh 1986, 矢持 1989b, 今井ほか 1990、板倉ほか 1994）。海底泥中に存在するこれらの細胞が、"bloomのタネ"として重要な役割を果たしており、種による休眠機構の違いから、水域によって優占種が異なる現象や、種の季節的消長や優占種交替過程が起こっていることは容易に想像できる。

今後は、播磨灘の海底泥中における *C. wailesii* 休眠細胞の水平的な分布密度、あるいは、夏期の海水中の栄養細胞の分布水深をセジメントトラップなどを用いて詳細に調べることにより、春～夏にかけての海底泥中の休眠細胞群の維持メカニズムや水中の栄養細胞の生存過程を明らかにし、両細胞群と秋期のブルーミングとの関連についてさらに解明する必要があるだろう。

V章　総　括

東部瀬戸内海は生物生産の高い海域として知られ、沿岸漁業や海面養殖業が盛んに行われてきた。しかしながら、1950年代後半からの北部臨海域の工業地帯化に伴い、工業排水・生活排水等が大量に流入し富栄養化が進行した。富栄養化の進行とともに多大な漁業被害を伴う *Chattonella* 赤潮が頻発し、赤潮訴訟が起こるなど大きな社会問題となったのは記憶に残るところである。また、*Alexandrium* 属による食用貝類の毒化など赤潮のように海水が着色しなくても漁業被害をもたらす植物プランクトンも知られている。

ノリ養殖は、富栄養化の進行と浮き流し式養殖技術の発達のおかげで盛んに行われるようになり、播磨灘は全国有数のノリ産地として有名になった。ところが十数年程前から、播磨灘には大型の中心目珪藻の１種 *Coscinodiscus wailesii* Granが秋～春期に大量発生するようになり、本種による栄養塩類の取り込みのため、灘全域で栄養塩類濃度の顕著な低下現象がみられるようになった。この栄養塩類濃度の低下時期はノリ養殖の最盛期と一致しており、このため養殖海苔の色落ち等の品質低下が生じ、漁業被害をもたらしており、年によっては２～３億円の減益となる場合もある。そのため、本種の大量発生機構の解明およびそれに対する対策が望まれてきた。

C. wailesii による漁業被害を防止するためには、より正確な発生予知手法の開発が必要であり、そのためにはまず本種の大量発生機構を明らかにすることが前提となる。

以上のような背景から、*C. wailesii* の大量発生機構の解明と発生予知のための生物学的基礎情報、主に生活環に関する情報の強化を図ることを目的とした。まず、現場調査によって大量発生に関わる環境因子の抽出を行うとともに、培養条件下において、また、現場水域において本種の生活環に関する生理生態を明らかにすることにより、生活環の面から発生に関わる条件を解明することを目的として本研究を実施した。得られた成果は要約すると以下の通りである。

１．1984年３月～1995年３月まで、播磨灘において現場調査を実施し、*C. wailesii* 栄養細胞の出現および大量発生に関わる環境要因について調べた。*C. wailesii* の大量発生は鉛直混合期とほぼ一致して起こり、５～８月の成層形成期にはほとんど出現しなかった。本種は秋期と春期に明瞭な２峰的出現特性を示す種であることが判った。本種の発生は、水温・塩分がそれぞれ19～25℃、30.5～32.5の範囲と７～11℃、31.5～33.5の範囲に集中していた。前者は９～11月の水温・塩分と一致し、後者は１～４月の水温・塩分と一致した。また、沈降速度が大きいため、出現の最盛期においても底層で最も細胞密度が高くなった。

２．*C. wailesii* 個体群の発生に関与する環境要因を詳しく検討するため、主成分分析を用いて *C. wailesii* 大量発生に関わる条件抽出を試みた。主成分分析の結果は、５～９月に本種が大量発生しない原因が、主に栄養塩濃度の低さにあることを指摘した。また、11～

１月の細胞密度の落ち込み（秋と春の大量発生の谷間）が日射量の不足に起因していることを明確に示した。*C. wailesii* の発生の季節性は水温、塩分、栄養塩、日射量といった主に物理・化学的環境要因の単純な直接的作用というより相互的な作用と、沈降速度が大きいという *C.wailesii* のもつ生物学的性質によりもたらされる可能性が示唆された。しかしながら、主成分分析の結果においても、*C. wailesii* の大量発生と非発生の間の環境条件の差異を検出することはできなかった。

３．培養条件下において、栄養細胞の分裂に伴う細胞径の減少過程や細胞径と分裂速度の関係、および細胞の形態変化について調べた。栄養細胞は分裂する毎に大きさを減少させ、小型化するほど奇形化した細胞や異常分裂する細胞の割合が増加し、殻径が70μmまで減少した時死滅した。殻径100～380μmの培養株の分裂速度は、温度22.5℃、光強度65μmol•m^{-2}•s^{-1}、明暗周期16hL/８hDの条件下で1.2～1.9divisions/day^{-1}の範囲にあり、株間の差異が大きく、分裂速度と殻径の間に一定の関係は認められなかった。*C. wailesii* の殻径と被殻の厚さの関係を調べた結果、殻径100～380μmの培養株の被殻の厚さは0.96～1.28μmの範囲にあり、両者の間には正の直線関係が認められた。

４．培養条件下において、温度、光強度、明暗周期および培養日数を組み合わせて変化させ、*C. wailesii* の増大胞子形成条件を検索した。その結果、栄養的増大（偽似増大胞子形成）は主に明→暗（数日～２週間程度）→明条件という光の劇的な変化によって高頻度に誘起できること、また、栄養細胞を栄養塩の欠乏した培養液から新しい培養液に接種して培養することにより、低頻度ながら誘起できることなど、複数の条件下で栄養的増大の起こることが判明し、ある限られた条件のみが必須となるようなことはなかった。

５．*C. wailesii* の栄養的増大を通じての大きさの回復過程における偽似増大胞子の形成から初生細胞の形成に至るまでの形態変化過程を、同一細胞の連続的変化として光学顕微鏡下で観察することに成功した。電子顕微鏡により、偽似増大胞子の表面や初生細胞の蓋殻構造を観察した結果、偽似増大胞子の外側表面に装飾物は無く滑らかであり、" scale" 等の他種の増大胞子において報告されている珪酸質の鱗状構造物は観察されなかった。しかし、偽似増大胞子を温度450℃で４時間焼却処理を行っても原形を留めていた結果から、偽似増大胞子は既に珪酸質に富んでいることが強く示唆された。また、ＤＡＰＩを用いた核染色により本種の栄養的増大がオートガミーや単為発生といった有性生殖の結果ではないことを明らかにした。

６．*C. wailesii* の造精器形成を観察した。精子形成過程において、分裂を途中で停止した精原細胞の一部が、成熟した精子の放出後も造精器内に残ったこと、分裂を継続した精原細胞は最終的に細胞質を均等に精子に配分したことから、本種の精子形成は、全割型（hologenous type）の変型であることが判った。また、他種で報告されている造卵細胞と外観的特徴が一致する（貫殻軸方向に伸張した）細胞が観察されたことから、本種にも有性生殖による増大胞子形成過程が存在することが示唆された。また、増大胞子形成が可能

となる親細胞の殻径について、大きさの異なる複数の培養株を用いて検討した結果、細胞の有性化は90～200μm（最大径の17～38%）、栄養的増大は90～350μm（19～67%）の範囲で起こり、生活環と細胞径が密接な関係にあることが判明した。

7．栄養的増大における初生細胞の大きさを変化させる条件について検討した結果、親細胞の大きさによって初生細胞の大きさが著しく変化すること、両者は正の強い直線的相関関係にあることが判った。また、初生細胞の大きさは、光強度や明暗周期等によっても若干変化することが明らかになった。

8．培養条件下において、*C. wailesii* の休眠細胞形成に成功した。形成された休眠細胞の形態的特徴は、細胞質が被殻から分離し細胞の中央付近で凝集することであり、栄養細胞とは容易に区別することができた。休眠細胞の形成は、海底泥に栄養細胞を懸濁した後、暗黒条件下で保存した場合に起こり、実験した６～25℃のいずれの温度でも形成が確認された。一方、Ｎ欠やＰ欠培養液中での休眠細胞形成は全く観察されなかった。海底泥中の休眠細胞形成を促す因子をスクリーニングした結果、休眠細胞は主に嫌気条件と僅かに粒子の存在、かつ暗黒条件の効果により形成が促進されることが判明した。

9．播磨灘の７地点から採集した海底泥を用いて休眠細胞を形成させ、生残率、休眠細胞形成率を比較した結果、水分含量が低く、粒子径が大きい（中央粒径：＞1000μm）海底泥や硫化物量が多い海底泥での生残率は低くなり、休眠細胞も死滅してしまうことが判明した。このことは、海底泥の性質（粒子径、水分含量、硫化物量など）によって天然における本種の分布が大きな影響を受けることを示唆するものである。

10．休眠細胞の形成は、泥中・暗黒条件下に放置後、２～３日後には観察され、培養温度が高いほど速く形成される傾向が認められた。またそれらを栄養細胞の増殖に好適な条件下で培養すると速やかに復活し、10～25℃の範囲ではほとんどが48時間以内に最初の細胞分裂を完了した。従って、本種の休眠細胞は、発芽能獲得に必要な期間をほとんど持たないことが判明した。また、休眠細胞は10～25℃の温度範囲で５$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$以上の光強度で復活・増殖の可能なことが判った。海底泥、暗黒条件下における休眠細胞の生存期間について調べたところ、10，６，15，20および25℃の順に長く、それぞれ12，８，４，３および1.5ヶ月であり、比較的長期間の”dark survival”の能力を持つことが判明した。

嫌気条件下の休眠細胞を前述の栄養塩、温度、および光条件下における復活の有無について検討した結果、実験終了時に全ての細胞が死滅していた。嫌気条件下では、休眠細胞は栄養細胞の増殖に好適な栄養、温度および光条件下に置かれると一旦、復活の過程に入るが、おそらくその後酸素不足で死滅するものと考えられる。

11．1990年11月～1995年４月に、播磨灘において *C. wailesii* 天然個体群の殻径の変化について調べた。調査期間中、採集された栄養細胞の殻径は180～500μmの範囲にあった。平均殻径は、1991年４月、1992年９月、および1995年１月の３度大きくなった。平均径は３度とも約350μmまで回復した。1992年９月および1995年１月の大きさの回復は、殻径がいずれも約270μmにまで減少した時に観察された。また、大きさの急激な回復後、殻径は減少し、平均径の最大（350μm）から最小（270μm）に減少するまでに約15ヶ月要した。殻径の回復サイクルは１年半、ないし２年半であり、殻径回復の季節性等の明瞭な周期性は観察されなかった。培養条件下で、*C. wailesii* の栄養的増大が殻径 90～350μm、精子形成（有性生殖）が90～200μmの範囲において観察された結果と、天然個体群において殻径の回復が観察された直前の殻径から判断して、播磨灘における *C. wailesii* 個体群は、主に栄養的増大により殻径を回復することが強く示唆された。一方、播磨灘において観察された殻径の回復と *C. wailesii* の大量発生との明瞭な対応関係は認められなかった。殻径の急激な回復と環境要因の関係について検討したが、回復の”Trigger”となる要因を抽出することはできなかった。しかし、個体群内での高い同調性が観察されたことから、殻径の回復を誘導する何らかの要因が存在すると考えられる。

12．播磨灘から採集した海底泥中から、*C. wailesii* の休眠細胞を見出した。海底泥中から見出した休眠細胞は、栄養細胞の色調と比較して濃いもの、細胞内容物内や被殻と細胞質の間に半透明な緑色の色素粒を複数持つ休眠細胞が多かった。10℃の暗黒条件下に10ヶ月間保存した海底泥から分離した *C. wailesii* を温度20℃、光強度65$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$、連続照明条件下で培養すると、約70%が復活し、その約80%が48時間以内に最初の細胞分裂を完了した。本種の休眠細胞が、播磨灘から採集した後10℃の暗黒条件下で15ヶ月間保存した海底泥から復活してくるのが確認され、相当長期間海底泥中で生存できるものと考えられる。従って、本種は暗黒条件下での長期間の生存能を持つだけではなく、短期間の環境変動にも即応して発芽できる休眠機構を持つことが明らかとなった。

13．1992年３月～1995年３月にかけて、播磨灘の北部調査地点において、海水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞密度の変動について調査を実施した。栄養細胞は、夏期極端に密度が低下し、最低密度はSta. H2およびSta. H7においてそれぞれ、0.05（1994年７月25日）および0.02（1992年７月27日）cells/*l* であり、周年播磨灘の海水中に生存することが判明した。一方、休眠細胞は２～８月の間に検出され、その密度は、Sta. H2およびSta. H7において、それぞれ0.4未満～13.0および0.4未満～9.0cells/g(湿泥)の範囲にあり明瞭な季節性を示した。鉛直混合の開始後、泥中の休眠細胞は激減し、水中の栄養細胞が増加した。また、1994年の夏期には海底泥中の休眠細胞がほとんど無く、秋期のブルームも起こらなかったことから、播磨灘においては休眠細胞が秋期のブルームの”Seed population”としての役割を果たしている可能性が示唆された。また、秋の鉛直混合が始まる前でも台風が通過するような場合、休眠細胞の復活が早められる可能性が示唆された。休眠細胞にとって、鉛直混合の有利な点は、①貧酸素からの解放（嫌気条件が休眠細胞の復活に対する強い制限因子となっている）、②大量の栄養塩の有光層への供給、③休眠細胞の有光層への持ち上げ（有光層での滞在が長くなる）等である。

以上によって得られた結果から、*C. wailesii* の休眠細胞の形成といった生活環が播磨灘

における *C. wailesii* の発生と密接な関わりを持つことが判明した。*C. wailesii* の生活環を考慮し、播磨灘における *C. wailesii* の発生・衰退に至る過程と、これらの過程に関与すると想定される種々の要因を模式化し、Fig. 5-1に示した。

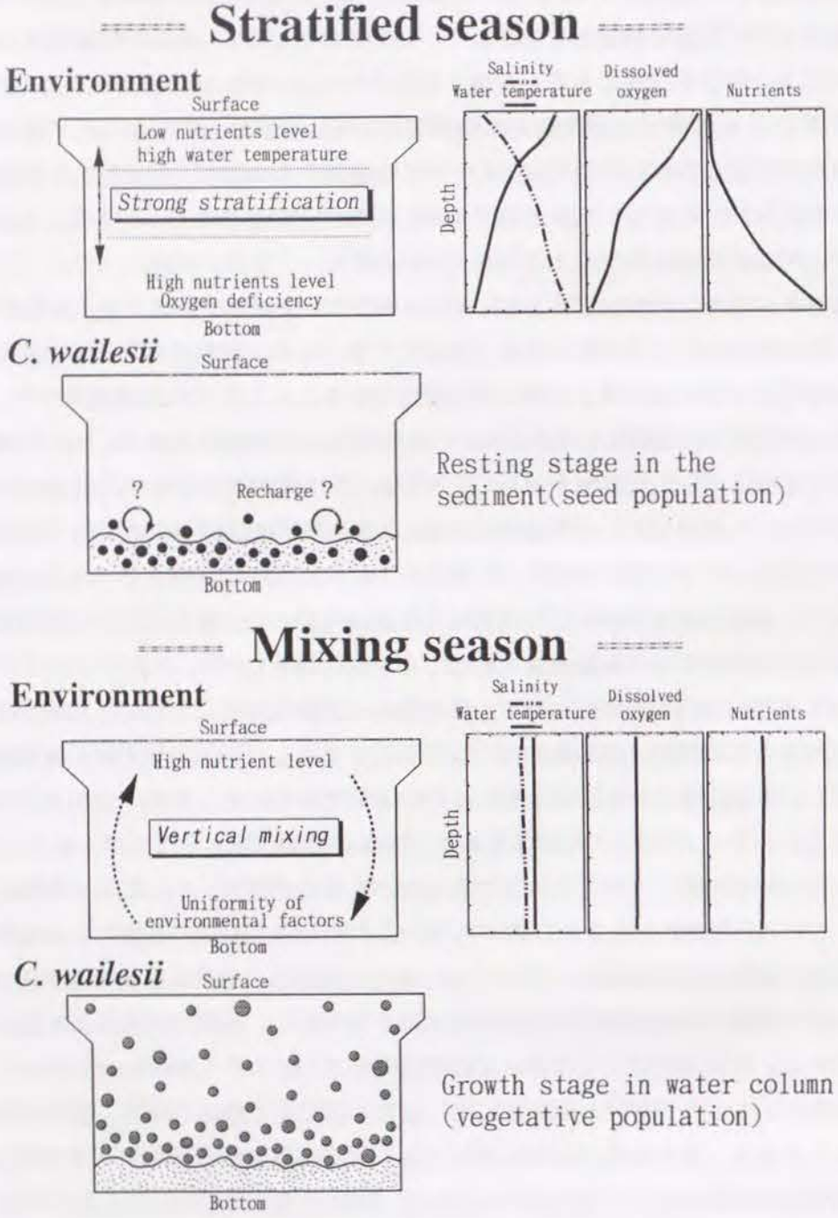


Fig.5.1. A schematic representation of biological phase in rise and fall of *Coscinodiscus wailesii* Gran and factors affecting seasonal occurrences in Harima-Nada.

播磨灘において、*C. wailesii* の発生・衰退に至る過程は、成層形成期と成層崩壊期（鉛直混合期）の大きく２つに分けることができよう。すなわち、成層形成期になると、海水の鉛直的な密度差が生じて強い成層が形成され、表層では強光、高水温、栄養塩の枯渇現象が生じる（高水温期の植物プランクトンによる赤潮形成などによって消費される）。一年の内でこの時期が、北方性種として知られる *C. wailesii* にとって最も”critical”な季節であるといえる。表層付近で *C. wailesii* が仮に増殖できたとしても、その沈降速度の大きさから底層に沈んでしまう。一旦沈降してしまうと強い成層が形成されているため、再浮上は難しい。このため、水中の栄養細胞の密度は激減する。一方、底層付近では貧酸素化が進行しており、栄養塩類は海底泥からの溶出等により高濃度に分布している。底層付近に沈降した *C. wailesii* は海底泥の貧酸素の効果によって、休眠細胞の状態へと移行する。海底泥中に生存している休眠細胞は海水の擾乱によって可能となる、時折の”再懸濁”により生存を長らえながら、秋期の鉛直混合期が始まるまでの時期を”resting stage”として生残している。これに対して、密度成層が均一化し鉛直混合が始まると、海底泥中の休眠細胞は有光層に持ち上げられ、貧酸素からの解放、大量の栄養塩の有光層への供給によって、速やかに復活・増殖し、秋期のブルームを形成すると考えられる。*C. wailesii* にとって、成層形成期は”resting stage”であることに対して、鉛直混合期は”growth stage”とみなすことができよう。

この”growth stage”に、水中の栄養細胞は分裂毎に大きさを減少させ、ある程度まで減少する（平均約270μm）と、主に栄養的増大により細胞径を回復すると考えられる。大きさの回復サイクルは季節性を示さず、本研究においては、本種の消長と大きさの回復の間に明瞭な対応関係を見出すことはできなかった。しかし、大きさの回復は、小型化するにつれ異常分裂する頻度が高くなり死滅してしまうという珪藻類の宿命から考えると、非常に重要かつ必要不可欠な事象であり、播磨灘において *C. wailesii* 個体群は高い同調性を持って、積極的に殻径を回復していることが明らかとなった。

本研究において、培養条件下、および現場調査において *C. wailesii* の生活環の多くの部分について明らかにできた結果、播磨灘における本種の大量発生機構についてこれまで不明であったかなりの部分が解明された。

人工的に形成させた休眠細胞の泥中での生存期間が、温度が高くなるに従い短くなったこと（10℃以上）、1994年のような夏期高水温の年には播磨灘海底泥中の休眠細胞をほとんど検出することができず、秋期のブルームも起こらなかったことから、春～夏期（休眠細胞の検出できる時期）の水温と秋期のブルームとは密接な関係にあることが考えられた。そこで、Fig. 5-2に1984～1995年までの播磨灘19地点の３層平均の水温の３～８月までの月毎の積算値（X）と、同じく *C. wailesii* 細胞密度の９～11月の月毎の積算値（Y）の関係について調べた結果を示した。両者の間は、$Y = -0.16X + 17.23$（$n = 11$, $r = 0.70$）、1990年を除いた場合、$Y = -0.20X + 20.32$（$n = 10$, $r = -0.85$）の負の強い直線関係に

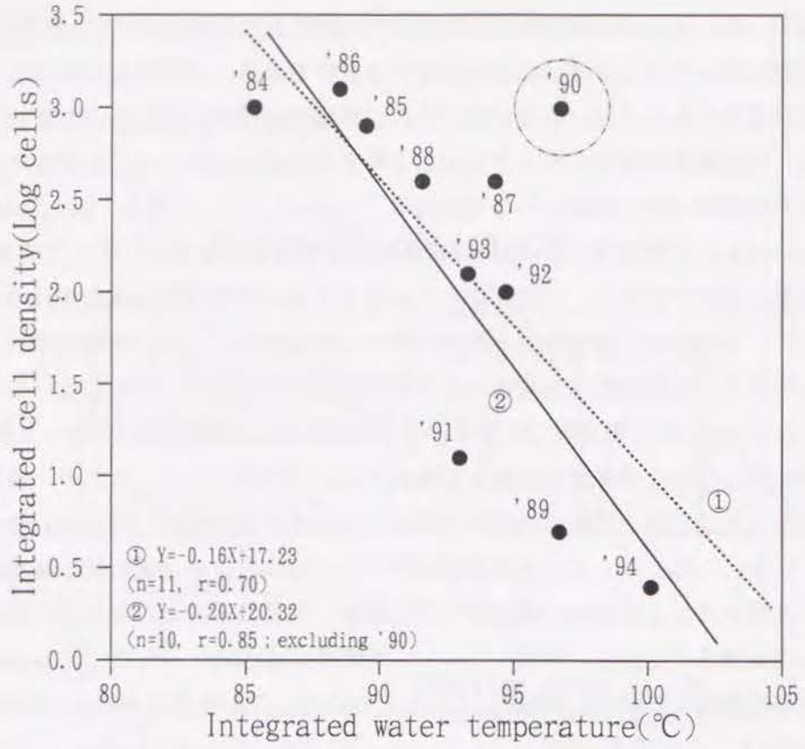


Fig. 5-2. Relationship between integrated cell density of *Coscinodiscus wailesii* Gran and integrated water temperature. Total of vegatative cell densities from August to November were definited the integrated cell density in each year. And total of water temperature from March to August were definited the integrated water temperature in each year. Monthly data were averaged 3 layer of 19 sampling stations in Harima-Nada.

あることが判った。これは、*C. wailesii* にとって夏期が最も" critical" な季節であり、海底泥中の休眠細胞と水中の栄養細胞の生存が、春～夏期の水温に大きく左右されることを示すものである。一旦鉛直混合が始まると、栄養細胞として増殖し秋期のブルームを形成するが、12月に入ると日射量の低さによってブルームは衰退してしまう。つまり、Fig. 5-2は、秋期の発生量が鉛直混合が始まる直前の、越夏した両細胞群の生存密度でおおよそ決定していることを示している。そして、各年の値の回帰直線からのばらつきは、その年ごとの秋期～冬期（日射量が最低となる）までの環境条件の差異によって発生量が影響を受けていることを示唆している。よって、あらかじめ３～８月の水温の積算値を調べるだけで、*C. wailesii* の秋期発生量をある程度予察することが可能となった。

東部瀬戸内海において、*C. wailesii* は休眠細胞を" Seed population" として機能させることにより環境適応能を増大させた。加えて、栄養的増大による速やかな大きさの回復により、個体群がより長く繁栄できるよう積極的な生存戦略（Survival strategy）を展開していることが示唆された。

瀬戸内海各地では、ほとんど毎年のように *Chattonella* 、*Gymnodinium* 、*Heterosigma* 等の有害植物プランクトンの異常増殖により莫大な漁業被害を被っている（瀬戸内海漁業調整事務所 1973-1994）。それに対する有効な対策がない現状では、その発生を事前に予知し、漁業被害を最小限に食い止めることが緊急を要する最重要研究課題である。近年になり、多くの研究者により有害赤潮の精度の高い発生予知手法の開発が進められている。本研究で得られた知見が、有害植物プランクトンの発生機構解明および予知手法の開発のための基礎資料の一つとなれば幸いである。

摘　要

大型の珪藻 *Coscinodiscus wailesii* は十数年ほど前から、東部瀬戸内海において主に冬期のノリ養殖の最盛期に大量発生し、兵庫県のノリ供販枚数に影響を与えてきた。そのため、本種による赤潮発生機構の解明、およびそれに対する対策が望まれてきた。本論文は、*C. wailesii* の大量発生機構の解明と発生予知のため、現場海域における大量発生要因の抽出、培養条件下、および現場水域における生活環の解明等、生物学的情報を取りまとめたもので、その主な内容は次の通りである。

播磨灘を対象とした現場調査により、*C. wailesii* の栄養細胞の季節的出現と大量発生期における環境要因を調べた。*C. wailesii* の発生の季節性をもたらす要因として、水温、塩分、栄養塩、日射量といった主に無機的環境要因の単純な直接的作用というより、相互的な作用と、加えて沈降速度が大きいという *C. wailesii* のもつ生物学的性質が重要であることを明らかにした。

培養条件下において、栄養細胞の分裂に伴う細胞径の減少過程、細胞径と分裂速度の関係、細胞の形態変化について調べた。栄養細胞は分裂する毎に大きさを減少させ、殻径が70μmまで減少した時、死滅した。殻径100～380μmの培養株の分裂速度は、温度22.5℃、光強度65μmol・m^{-2}・s^{-1}、明暗周期16hL/８hDの条件下で1.2～1.9divisions/day^{-1}の範囲にあり、分裂速度と殻径の間には明瞭な対応関係が認められなかった。

培養条件下において、温度、光強度、明暗周期および培養日数を組み合わせて変化させ、*C. wailesii* の増大胞子形成条件を検索した。その結果、栄養的増大（偽似増大胞子形成）は、主に明→暗（数日～２週間程度）→明条件という光の劇的な変化によって高頻度に誘起できること、また、栄養細胞を栄養塩の欠乏した培養液から新しい培養液に接種して培養することにより、低頻度ながら誘起できることなど、複数の条件下で栄養的増大の起こることが判明した。

C. wailesii の造精器形成を観察した。本種の精子形成は全割型（hologenous type）の変

型であることが判った。また、他種で報告されている造卵細胞と外観的特徴が一致する細胞が観察されたことから、本種にも有性生殖による増大胞子形成過程が存在することが示唆された。また、増大胞子形成が可能となる親細胞の殻径について、大きさの異なる複数の培養株を用いて検討した結果、細胞の有性化は90～200μm（最大径の17～38%）、栄養的増大は90～350μm（同17～67%）の範囲で起こり、生活環と細胞径が密接な関係にあることが判明した。

培養条件下において、*C. wailesii* の休眠細胞形成に成功した。休眠細胞の形成は、海底泥に栄養細胞を懸濁した後、暗黒条件下で保存した場合に観察され、実験した６～25℃のいずれの温度でも形成が確認された。一方、Ｎ欠やＰ欠培養液中での休眠細胞形成は全く観察されなかった。海底泥中かつ暗黒条件下において、休眠細胞形成を促す因子をスクリーニングした結果、休眠細胞は主に嫌気条件の効果で、僅かに粒子の存在下で形成が促進されることが判明した。

播磨灘の７地点から採集した海底泥を用いて休眠細胞を形成させ、生残率、休眠細胞形成率を比較した結果、海底泥の性質（粒子径、水分含量、硫化物量など）によって、生残率、休眠細胞形成率が異なることが判明した。

休眠細胞は、泥中・暗黒条件下に栄養細胞を放置後、２～３日後には観察され、培養温度が高いほど速く形成される傾向が認められた。また、それらを栄養細胞の増殖に好適な条件下で培養すると速やかに復活し、10～25℃の範囲ではほとんどが48時間以内に最初の細胞分裂を完了した。従って、本種の休眠細胞は、発芽能獲得に必要な期間をほとんど持たないことが判明した。また、休眠細胞は10～25℃の範囲では、５$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$以上の光強度で復活・増殖の可能なことが判った。海底泥中、暗黒条件下における休眠細胞の生存期間について調べた結果、10，６，15，20および25℃の順に長く、それぞれ12，８，４，３および1.5ヶ月であった。

1990年11月～1995年４月に播磨灘において *C. wailesii* 天然個体群の殻径の変化について調べた。平均殻径は、調査期間中、３度急激に大きくなった。大きさの回復後、殻径は栄養細胞の増殖とは対応せずに減少した。殻径の回復サイクルは１年半、ないし２年半であり、季節性等の明瞭な周期性は観察されなかった。殻径の回復が観察された直前の殻径から判断して、播磨灘において *C. wailesii* 個体群は、主に栄養的増大により殻径を回復することが強く示唆された。

播磨灘から採集した海底泥中から、*C. wailesii* の休眠細胞を見出した。海底泥中から見出した休眠細胞は、細胞質が被殻から分離し、細胞の中央付近で凝集しており、栄養細胞とは容易に区別することができた。10℃の暗黒条件下に10ヶ月間保存した海底泥から分離した *C. wailesii* を温度20℃、光強度65$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$、連続照明条件下で培養すると、約70%が復活し、その約80%が48時間以内に最初の細胞分裂を完了した。本種の休眠細胞が、播磨灘から採集した後10℃の暗黒条件下で15ヶ月間保存した海底泥からも復活してくるのを確認しており、本種は暗黒条件下での長期間の生存能を持つだけではなく、短期間の環境変動にも適応できる休眠機構を持つことが明らかとなった。

1992年３月～1995年３月にかけて、播磨灘北部の調査地点において、海水中の栄養細胞と海底泥中の休眠細胞密度についての調査を実施した。栄養細胞は、夏期極端に密度を低下させたが、周年播磨灘の海水中に生存することが判明した。一方、休眠細胞は２～８月の間に海底泥中に検出され、明瞭な季節性を示した。鉛直混合の開始後、泥中の休眠細胞は激減し、水中の栄養細胞が増加した。1994年の夏期には泥中の休眠細胞がほとんどなく、秋期のブルームも起こらなかったことから、播磨灘において休眠細胞が秋期のブルームの”Seed population”としての役割を果たしている可能性が強く示唆された。

1984～1995年までの播磨灘19地点の３層平均の水温の３～８月までの月毎の積算値（X）と、同じく *C. wailesii* 細胞密度の９～11月の月毎の積算値（Y）の関係について調べた結果、両者の間には、$Y = -0.16X + 17.23$（$n = 11$，$r = -0.70$）、1990年を除いた場合$Y = -0.20X + 20.32$（$n = 10$，$r = -0.85$）の負の強い直線関係にあることが判明した。従って、あらかじめ３～８月の水温の積算値を調べれば、*C. wailesii* の秋期発生量をある程度予察することが可能といえる。

Summary and Conclusions

The diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran is one of the harmful species that cause serious damage to Nori (*Porphyra*) culture by consumption of nutrients such as inorganic nitrogen from autumn to spring in the coastal sea of Japan. Total number of Nori product in Hyogo Prefecture had a good correlation to total cell density of *C. wailesii* (vegetative population) in Harima-Nada in each year from 1984 to 1994 in Harima-Nada. Therefore the elucidation of the mechanism of mass occurrence of *C. wailesii* and its prediction have been expected among Nori farming managers. To understand the life cycle of the species, it is essential to clarify the outbreaking mechanisms of the bloom, but the information on the life cycle has been so far limited.

The present study was conducted to elucidate of the mechanism of mass occurrence of *C. wailesii* and for its prediction. Screening of major environmental factors involved in the mass occurrence was made by field surveys, and the life cycles of the oraganisms were investigated under laboratory conditions and by field surveys. The ecological role of the life cycle was discussed concerning mass occurrence of the diatom.

The relationships between mass occurrence of *C. wailesii* and the causative major environmental factors were investigated for about 11 years in Harima-Nada. The ranges of water temperature and salinity under which mass occurrences of the species were limited : 19 ～ 25 ℃ and 30.5 ～ 32.5, or 7 ～ 11 ℃ and 31.5 ～ 33.5. The former conditions corresponded to these from September to November and the latter those from January to April. Accordingly, it was clarified that *C. wailesii* shows obvious bimodal appearance in autumn and spring.

To clarify the factors involving in the occurrences of the species, yearly environmental conditions under which mass occurrence of *C. wailesii* was analyzed by the principal component analysis (PCA). The result of PCA pointed out that less growth of the species during stratified season depends on low concentration of nutrients. Also they showed that the low density of the vegetative cells during the period from November to January was caused by the lack of solar radiation. Therefore, the seasonality of the occurrence of the species is possibly resultant from the interaction of some environmental factors rather than each independant factor. In addition, the biological characteristics such as the large sinking rate could influence the seasonality.

To clarify the life cycles in *C. wailesii*, changes in cell size caused by the vegetative cell division and auxospore formation (sexual reproduction and vegetative cell enlargement) were investigated under laboratory conditions. The mean valve diameters of two sets of cultures, which had been about 250 μ m and 100 μ m initially, decreased with the rates of about 7.4 and 5.6 μ m per month respectively, under the conditions of a temperature of 10 ℃ with a irradiance of 35 μ mol·m^{-2}·s^{-1}, on an 8 h light and 16h dark photo-cycle. When the cell size decreased to about 70 μ m they became unable to divide any more and died. The division rates of six sets cultures, which the range of valve diameters had been from 100 to 380 μ m initially, ranged from 1.2 to 1.9 divisions/day^{-1} under the conditions of a temperature of 22.5 ℃ with irradiance of 65 μ mol·m^{-2}·s^{-1}, on a 16h light and 8 h dark photo-cycle. And as a result of investigations of the width of the girdle of vegetative cells which their diameter ranges were 100 ～ 380 μ m, the width of the girdle ranged from 0.96 to 1.28 μ m and a positive correlation was admitted between the valve diameter and the width of the girdle.

The conditions inducing the auxospore formation was searched by combining several conditions such as temperature, irradiance, photo period, or incubation time. The vegetative cell enlargement of cells and sexualization of vegetative cells could be induced by elevating the incubating temperature from 10 to 20 ℃, and by changing irradiance from high to low and to high again. Vegetaitve cell enlargements were also observed when old, nutrient-limited cultures were transferred to fresh medium. It became clear that vegetative cell enlargement could be induced under several incubating conditions. By staining of the nucleus with DAPI (4'-,6'-diamidino-2-phenylindole), the cell size restoration observed in this study was not from the results of autogamy or parthenogenesis but from true vegetative cell enlargement. As the result of scanning electron microscopic observation of the surface of pseudo-auxospore and the initial valve structures, the surface of pseudo-auxospores were smooth without any decorations, and no silicified scales which were reported with other centric diatom species could found out. But it was strongly suggested that much silicate was already included in the pseudo-auxospore because those were not burned down and kept their own shapes even after a combustion at 450 ℃ for 4 hours.

The formation of spermatogonia and the probable oogonia were observed in the culture with valve diameters ranging from 90 to 200 μ m. In the cultures in which the vegetative cell enlargement was observed, the valve diameters of parent cells ranged from 90 to 350 μ m. The initial cell sizes after vegetative cell enlargement were 240-520 μ m, and were 1.11-3.17 times larger than those of the parent cells in valve diameter. As a result of examination on conditions that control the size of initial cells, a significant correlation was observed between valve diameter of parent cells(X) and initial cells(Y) ; $Y = 0.46X + 263.3$ ($r = 0.94$). Therefore, the valve diameter of the parent cells influences the size of the initial cells. And it was clarified that the sizes of initial cells were influenced by the difference of the irradiance and photo-cycle, even salinity.

The formation of the resting cells of *C. wailesii* was tried under laboratory conditions. The resting cells were formed with high frequency when vegetative cells were mixed in sediments and were placed in darkness under the temperature range from 6 to 25 ℃. The formed resting cells could be distinguished from vegetative cells because the cytoplasms of resting cells were partially separated from their frustules and were concentrated in the center of the cell.

Survival and formation rates of resting cells were compared between the sediments collected from 7 sampling stations. The survival rate of the resting cells were lower in the sediments of lower moisture contents(for example, 12.4 %) and of greater median diameter(> 1000 μ m), or in the sediments with

higher sulfide volume($\geqq$ 0.51mg/g dry sediments). These results suggest that horizontal distributions of *C. wailesii* in the sediments are greatly influenced by the characteristics of the sediments. And then as a result of screening of the inducing factors of the resting cell formation, it was clarified that the most principal factor was anaerobic condition with the existences of the mud particles.

The resting cell formation was observed within a few days after the mixing of the vegetative cells in the sediments and placed in darkness. And the higher temperatures were more affective. Newly formed resting cells could rejuvenate under suitable conditions for the vegetative growth. They rejuvenated and finished their first cell divisions within 48 hours under the temperature range from 10 ℃ to 25 ℃. Accordingly it is claear that the resting cells of *C. wailesii* have very short mandatory period of dormancy. The resting cells could rejuvenate at an irradiance of 5 μ mol·m^{-2}·s^{-1} or greater with a 16h light and 8 h dark photo-cycle under the temperature range from 10 ℃ to 25 ℃. The dark survival periods of the resting cells in the sediments were long in the order of temperatures of 10, 6, 15, 20, 25 ℃ with the periods of 12, 8, 4, 3, 1.5 months, respectively. However no resting cells could rejuvenate under an anaerobic condition.

The mean valve diameters of natural vegetative populations of *C. wailesii* were measured during the period from November 1990 to April 1995 in northern Harima-Nada. The valve diameters ranged from 180 to 500 μ m. The diatom populations restored their sizes three times : April 1991, September 1992 and January 1995. The mean diameters restored to about 350 μ m at all times. The sharp restorations of the cell sizes ocuurred when the mean diameters decreased to about 270 μ m. The spermatogonia and probable oogonia were observed in cultures with cell diameters ranging from 90 to 200 μ m. On the other hand, in the cultures in which vegetative cell enlargement was observed, the valve diameters of the parent cells ranged from 90 to 350 μ m. Based on these observations, the natural population presumably restore the cell size, by vegetative cell enlargement rather than sexual reproduction. The restoration cycles of the mean diameters were 1.5 or 2.5 years and no periodicity such as seasonality was clearly observed. There was no clear correspondent relationship between the sharp restorations of the cell sizes and the mass occurrences of *C. wailesii* in Harima-Nada. It is unclear that what do act as environmental factors as the trigger of sharp cell size restoration. There may be some factors to induce the restoration because the high synchronicity of the cell size restoration was observed in the sea.

The resting cell of *C. wailesii* were found for the first time in the sediments in Harima-Nada. Natural resting cells found in the sediments had some hemitransparent and green colored granules within their cytoplasms and also between their frustules and cytoplasm. And the color was darker than that of vegetative cells. When isolated resting cells were incubated at 20 ℃ under continuous illumination of 65 μ mol·m^{-2}·s^{-1}, these cells quickly changed into vegetative cells. About 80 % of the resting cells finished and rejuvenation and their first cell divisions within 48 hours. The natural resting cells could survive at least 15 months in darkness.

The density of the vegetative cells in water column and that of the resting cells in the sediments were

investigated in northern Harima-Nada from March 1992 to March 1995. The lowest densities of vegetative cells at Sta.H2 and H7 were 0.05, 0.02 cells/l, respectively during the investigation periods. Therefore, the existence of vegetative cells in water column were confirmed in every season of the year. Resting cells were detected from February to August. Densities of them in sediments at Sta.H2 and H7 ranged from $<$ 0.4 $\sim$ 13.0 and $<$ 0.4 $\sim$ 9.0 cells/g wet sediments, respectively. When vegetative populations started to decline in number in water column, resting cells increased in the surface sediments. And then resting cells gradually decreased with the rise of water temperature and disappeared in late August, when vegetative cells started to increase in the water column with the initiation of mixing. The resting cells, therefore, get the following 3 advantages, ① being released from oxygen deficiency, ② receiving of enriched nutrients, ③ staying in euphotic zone for a relatively longer periods by vertical mixing.

Summer is the most unsuitable and critical period for vegetative growth of *C. wailesii* of all the seasons. In 1992 and 1993 the resting cells were observed during summer in the sediments and autumn boom of *C. wailesii* occured in the water column. On the other hand, few resting cells were detected in 1994 and there was no autumn bloom. The existence of the resting cells in the sediments during summer has a close relationship with the autumn bloom of *C. wailesii*. In conclusion, the resting cells play an important role as seed populations in initiating the autumn bloom in Harima-Nada.

The dark survival periods of the resting cells became shorter with the rise of storage temperature. In the summer of 1994, water temperature was unusually high, and few resting cells were detected in the sediments of Harima-nada. There was no autumn bloom in water column. Consequently, it became clear that water temperature during spring to summer has a significant negative correlation with the degree of the autumn bloom of *C. wailesii*. Therefore it became possible that the prediction of the degree of the autumn bloom of *C. wailesii* by monitoring the water temperature during March to August in Harima-Nada.

謝　辞

本稿をとりまとめるにあたり、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った京都大学農学部教授 石田祐三郎先生、京都大学熱帯農学専攻 今井一郎助教授、兵庫県立但馬水産事務所水産試験研究室長 眞鍋武彦博士に、深甚なる感謝の意を表しますとともに、本論文について御助言と御校閲の労を賜った京都大学熱帯農学専攻 中原紘之教授、京都大学農学部 田中克教授に深厚なる謝意を表します。

本研究の機会を与えられ、その遂行に暖かい御理解と便宜を与えて下さった兵庫県立水産試験場長 山内幸児博士、丹下勝義資源部長、ならびに松田泰嗣増殖部長に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、有益な御教示を賜った水産大学校増殖学科 大貝政治教授、養殖研究所企画連絡室長 本城凡夫博士、京都大学農学部 内田有恆助教授、ならびに兵庫県立但馬水産事務所水産試験研究室 反田　実主任研究員に衷心より感謝します。京都大学農学部講師 左子芳彦博士、同助手 吉永郁生博士、南西海区水産研究所赤潮環境部赤潮生物研究室長 山口峰生博士、同研究室研究員 板倉　茂技官、長崎慶三博士、赤潮環境部海況動態研究室長 内田卓志博士、同研究室研究員 松山幸彦技官には、終始懇切なる御指導と暖かい励ましを頂きました。心から御礼申し上げます。

本論文の参考文献の引用において有益な御教示を賜った南西海区水産研究所赤潮環境部長 池田　勉博士に深く感謝の意を表します。

統計的解析をするにあたり、コンピュター解析ソフトの活用に、有益な御助言を頂いた水産大学校増殖学科講師 浜野龍夫博士に深く御礼申し上げます。

さらに、試料の採集にあたって、海上作業にご協力頂いた兵庫県立水産試験場調査船の森脇胖二前船長、中筋晴喜船長、ならびに船員の方々に厚く御礼申し上げます。

本研究に対し、多くの御協力と有益な御意見を頂いた兵庫県立水産試験場資源部 堀　豊主任研究員、宮原一隆研究員、ならびに同職員に深謝します。

引用文献

Alldredge A.L. and Gotschalk C.C., 1989 : Direct observation of the mass flocculation of diatom blooms : characteristics, settling velocity and formation of diatom aggregates. *Deep-Sea Res.*, **26**, 159-171.

Anderson, O.R., 1975 : The ultrastructure and cytochemistry of resting cell formation in *Amphora coffaeformis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **11**, 272-281.

Anderson, D.M. and D. Wall, 1978 : Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. *J. Phycol.*, **14**, 224-234.

Anderson, D.M. and F.M.M. Morel, 1979 : The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarensis* hypnocysts. *Est. coast. mar. Sci.*, **8**, 279-293.

Antia, N.J., 1976 : Effects of temperature on the darkness survival of marine microplanktonic algae. *Microb. Ecol.*, **3**, 41-54.

Armbrust, E.V., S.W. Chisholm and R.J. Olson, 1990 : Role of light and the cell cycle on the induction of spermatogenesis in a centric diatom. *J. Phycol.*, **26**, 470-478.

安楽正照, 1985a : プラントン研究ノート（34）環境調査とプランクトン（26）赤潮の発生予知－1．海洋と生物, **38**, 183-188.

安楽正照, 1985b : プラントン研究ノート（35）環境調査とプランクトン（27）赤潮の発生予知－2．海洋と生物, **39**, 302-307.

Banse, K., 1976 : Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell size. *J. Phycol.*, **12**, 135-140.

Bellinger, E.G., 1977 : Seasonal size changes in certain diatoms and their possible significance. *Br. Phycol. J.*, **12**, 233-239.

Bienfang, P.K., 1980. Phytoplankton sinking rates in oligotrophic waters off Hawaii, USA. *Mar. Biol.*, **61**, 69-77.

Bienfang, P.K., P.J. Harisson and L.M. Quarmby, 1982 : Sinking rate response to depletion of nitrate, phosphate and silicate in four marine diatoms. *Mar. Biol.*, **67**, 295-302.

Bienfang, P.K., J.P. Szyper and E. Laws, 1983. Sinking rate and pigment response to light-limitation of a marine diatom : implications to dynamics of chlorophyll maximum layers. *Oceanol. Acta*, **6** : 55-62.

Boalch, G.T. and Harbour, D.S., 1977. Unusual diatom off the coast of south-west England and its effect on fishing. *Nature*, **269** : 687-688.

Bruckmayer-Berkenbusch, H., 1954 : Die Beeinflussung der Auxosporenbildung von *Melosira nummuloides* durch AuBenfaktoren. *Arch. Protistenk*, **100**, 183-211.

Chan, A.T., 1978 : Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. I. Growth under continuous light. *J. Phycol.*, **14**, 396-402.

Chen, Y.L.L., 1992 : Factors affecting the phytoplankton assemblages in a tropical coastal water influenced by thermal effluent of a power plant. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **39**, 25-39.

Costello, J.C. and S.W. Chisholm, 1981 : The influence of cell size on the growth rate of *Thalassiosira weissflogii*. *J. Plankton Res.*, **3**, 1981.

Crawford, R.M., 1974 : The auxospore wall of the marine diatom *Melosira nummuloides* (Dillw.) C.AG. and related species. *Br. Phycol. J.*, **9**, 9-20.

Crawford, R.M., 1995 : The role of sex in the sedimentation of a marine diatom bloom. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 200-204.

Culver, M.E. and W.O. Smith Jr., 1989. Effects of environmental variation on sinking rates of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **25**, 262-270.

Cupp, E.E., 1943 : Marine planktonic diatoms of the west coast of North America, *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.*, **5**, 1-237.

Dale, B., 1983 : Dinoflagellate resting cysts : " benthic plankton". In " *survival strategies of the algae*" (ed. by Fryxell, G. A.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 69-136.

Davis, C.O., P.J. Harrison, and R.C. Dugdale, 1973. Continuous culture of marine diatoms under silicate limitation. I. Synchronized life cycle of *Skeletonema costatum*. *J. Phycol.*, **9**, 175-180.

Davis, C.O., J.T. Hollibaugh, D.L.R. Seibert, W.H. Thomas, and P.J. Harrison 1980 : Formation of resting spores by *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) in a controlled experimental ecosystem. *J. Phycol.*, **16**, 296-302.

Drebes, G., 1964 : Über den Lebenszyklus der marinen planktondiatomee *Stephanopyxis turris*(Centrales) und seine Steuerung im Experiment. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, **10**, 153-154.

Drebes, G., 1966 : On the life history of the marine plankton diatom *Stephanopyxis palmeriana*. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, **13**, 101-114.

Drebes, G., 1967 : *Bacteriastrum solitarium* Mangin, a stage in the life history of the centric diatom *Bacteriastrum hylinum*. *Mar. Biol.*, **1**, 40-42.

Drebes, G., 1977 : Sexuality. In "*The Biology of Diatoms*" (ed. by D. Werner), Blackwell Scientific Publ., Oxford, 250-283.

Droop, M.R., 1954 : A note on the isolation of small marine algae and flagellates for pure cultures. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **33**, 511-514.

Durbin, E.G., 1977. Studies on the autecology of the marine diatom *Thalassiosira nordenskioeldii*. II. The influence of cell size on growth rate, and carbon, nitrogen, chlorophyll-a and silica content. *J. phycol.*, **13**, 150-155.

Durbin, E.G., 1978. Aspects of the biology of resting spores of *Thalassiosira nordenskioeldii* and *Detonula confervacea*. *Mar. Biol.*, **45**, 31-37.

Durbin, E.G., R.W. Krawiec and T.J. Smayda, 1975. Seasonal studies on the relative importance of different size fractions of phytoplankton in Narragansett Bay (USA). *Mar. Biol.*, **32**, 271-287.

Edlund, M.B. and E.F. Stoermer, 1991 : Sexual reproduction in *Stephanodiscus niagarae* (Bacillariophyta). *J. Phycol.*, **27**, 780-793.

Eppley R.W., 1977 : The growth and culture of diatoms. In "*The biology of diatoms*" (ed. by D. Werner), Blackwell, Scientific Publ., Oxford, 24-64.

Eppley R.W., R.W. Holmes and J.D.H. Strickland, 1967. Sinking rates of marine phytoplankton measured with a fluorometer. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **1** : 191-208.

江草周三, 1949 : 浮遊珪藻の大きさの変化と其の生態学的意義に関する若干の考察. 日水誌, **15** : 332-336.

江草周三, 1957 : 浮遊珪藻 *Rhizosolenia setigera* の大きさの季節変化. 水産学集成, 末廣恭雄他（編）, 東京大学出版会, 東京, 393-405.

遠藤拓郎・長田　宏, 1984 : 渦鞭毛藻 *Peridinium* sp. のシストの休眠と発芽. *Bull. Plankton Soc. Japan.*, **31**, 23-33.

藤伊　正, 1975 : 植物の休眠と発芽. 東京大学出版会, 東京, 107p.

Fukami K., T. Nishijima, H. Murata, S. Doi, and Y. Hata, 1991 : Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2321-2326.

福代康夫, 1982 : 日本沿岸における *Protogonyaulax* の分類と生態に関する研究. 東京大学学位論文, 220p.

福代康夫, 1987 : 生活史. 赤潮の科学, 岡市友利編, 恒星社厚生閣, 東京, 53-61.

French, F.W. and P.E. Hargraves, 1980 : Physiological charasteristics of plankton diatom resting spores. *Mar.Biol. Lett.*, **1**, 185-195.

French, F.W. and P.E. Hargraves, 1985 : Spore formation in the life cycles of the diatoms *Chaetoceros diadema* and *Leptocylindrus danicus*. *J. Phycol.*, **21**, 477-483.

French, F.W. and P.E. Hargraves, 1986 : Population dynamics of the spore forming diatom *Leptocylindrus danicus* in Narragansett Bay, Rhode Island. *J. Phycol.*, **22**, 411-420.

Furnas, M.J., 1985 : Diel synchronization of sperm formation in the diatom *Chaetoceros curvisetum* Cleve. *J. Phycol.*, **21**, 667-671.

Gallagher, J.C., 1980 : Population genetics of *Skeletonama costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay. *J. Phycol.*, **16** : 464-474.

Gallagher, J.C., 1982 : Physiological variation and electrophoretic banding patterns of genetically different seasonal populations of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **18**, 148-162.

Gallagher, J.C., 1983 : Cell enlargement in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **19**, 539-542.

Garrison, D.L., 1981 : Monterey Bay Phytoplankton. II. Resting spore cycles in coastal diatom populations. *J. Plankton Res.*, **3**, 137-156.

Garrison, D.L., 1984 : Planktonic diatoms, In "*Marine Plankton Life cycle Strategies*" (eds. by Steidinger, K. A., and L. M. Walker). CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-17.

Geitler, L., 1932 : Der formwechsel der pennaten diatomeen (kieselalgen). *Arch. Protistenk*, **78**, 1-226.

Geitler, L., 1957 : Die sexuelle fortpflanzung der pennaten diatomeen. *Biol. Rev.*, **32**, 261-295.

Geitler, L., 1973 : Auxosporenbildung und systematik bei pennaten diatomeen und die zytologie von *Cocconeis*-sippen. *Österr. Bot. Z.*, *122*, 299-321.

Gross, F., 1937 : The life history of some marine plankton diatoms. *Phil. Trans. R. Soc. London*, **228B**, 1-47.

Gross, F., 1939a : The development of isolated resting spores into auxospores in *Ditylum brightwellii*(West). *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **24**, 375-380.

Gross, F., 1939b : The osmotic relations of the plankton diatom *Ditylum brightwellii* (West). *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **24**, 381-415.

Gucluer, S.M. and M.G. Gross, 1964 : Recent marine sediments in Saanich Inlet, a stagnant marine basin. *Limnol. Oceanogr.*, **9**, 359-376.

Guillard, R.R.L., 1979 : Division rates. In "*Handbook of phycological methods. Culture method & growth mesurements*" (ed. by D. Werner), Blackwell, Oxford, 372-469.

Guillard, R.R.L. and P. Kilham, 1977. The ecology of marine planktonic diatoms In "*The biology of diatoms*"(ed by D. Werner), Blackwell, Oxford, 372-469.

原田建夫, 1995 : 1994年夏の異常な天候について. 神戸海洋気象台彙報, **214**, 12-16.

Hargraves, P.E., 1984 : Resting spore formation in the marine diatom *Ditylum brightwellii*(West) Grun. ex V.H. In "*proceeding of the 7 th international diatom symposium.* " (ed. by D.G. Mann, Koenigstein, O. Koeltz), 33-46.

Hargraves P.E. and F.W. French, 1975 : Observations on the survival of diatom resting spores. *Nova Hedwigia Beih.*, **53**, 229-238.

Hargraves P.E. and F.W. French, 1983. Diatom resting spore : significance and strategies, In "*survival strategies of the algae*"(ed. by Fryxell, G. A.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 49-68.

Hofker, J., 1928 : Die teilung, mikrosporen und auxosporenbildung von *Cocsinodiscus biconicus* v. Breemen. *Annls. Protist.*, **1**, 167-194.

Hollibaugh, J.T., D.L.R. Seibert and W.H. Thomas, 1981 : Observations on the survival and germination of resting spores of three *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species. *J. Phycol.*, **17**, 1-9.

Holmes, R.W., 1966 : Short-term temperature and light conditions associated with auxospore formation in the marine centric diatom, *Coscinodiscus concinnus* W. Smith. *Nature*, **209**, 217-218.

Holmes, R.W., 1967 : Auxospore formation in two marine clones of the diatom genus *Coscinodiscus*. *Amer. J. Bot.*, *54*, 163-168.

Hostettor, H.P. and K.D. Rutherford, 1976 : Polymorphism of the diatom *Pinnularia brebissonii* in culture and a field collection. *J. Phycol.*, **12**, 140-146.

Hirayama, K. and K. Numaguchi, 1972 : Growth of *Gymnodinium* type-'65, causative organism of red tide in Omura Bay, in medium supplied with bottom mud extract. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **19**, 13-21.

平山和次・飯塚昭二・米司　隆, 1972 : 1971年夏季の大村湾海水による赤潮プランクトン *Gymnodinium* '65年型種の培養. 長大水研報, **33**, 11-20.

平山和次・川端豊喜, 1982 : 大村湾南部水域海水による赤潮プランクトン *Gymnodinium* sp. ('65年型種) の培養－I. 1977, 1978, 1979年夏期の海況と生物学的分析結果. 長大水研報, **52**, 29-40.

Hitchcock, G.L. and T.J. Smayda, 1977 : The importance of light in the initiation of the 1972-1973 winter-spring diatom bloom in Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **22** : 126-131.

本城凡夫, 1974 : 博多湾における赤潮発生機構に関する研究－IV. 赤潮発生期の内湾環境

と発生要因．東海水研報，**79**，77-121.
本城凡夫，1982：生理活性物質－藻類の生長制御－．海洋科学，**14**：39-45.
Honjo, T., 1987 : Growth potential of *Chattonella marina* (raphidophyceae) collected in Gokasho Bay, central Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **34**, 119-124.
Honjo, T., 1994 : The biology and prediction of representative red tides associated with fish kills in Japan. Reviews in *Fisheries Science*, **2**, 225-253.
本城凡夫・花岡　資，1973：博多湾における赤潮発生機構に関する研究 Ⅱ．赤潮渦鞭毛藻，*Heterosigma* sp. の培養に関する一般的性質．日本プランクトン学会報，**19**，17-23.
本城凡夫・下鵜瀬　忠・上田直子・花岡　資，1978：赤潮発生時における植物プランクトン組成の推移とその特徴．日本プランクトン学会報，**25**，13-19.
保坂三継，1990：東京湾における *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachiの出現．*Bull. Plankton Soc. Japan*, **37**, 69-75.
M. Hosaka, 1992 : Growth characteristics of a strain of *Heterosigma akashiwo*(Hada) Hada isolated from Tokyo Bay, Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **39**, 49-58.
兵庫県漁業組合連合会，1984－1994：のり共販資料．
出井雅彦・千原光雄，1991：珪藻の有性生殖と系統．遺伝．**45**，39-45.
Idei M., and M. Chihara, 1992 : Successive observations on the fertilization of a cetric diatom *Melosira moniliformis* var. *octagona*. *Bot. Mag. Tokyo*, **105**, 649-658.
Ignatiades, L. and T.J. Smayda, 1970 : Autecological studies on the marine diatom *Rhizosolenia fragilissima* Bergon. Ⅰ. The influence of light, temperature, and salinity. *J. Phycol.*, **6** : 332-339.
飯田貴次・三浦　薫・若林久嗣・小林正典，1993：アクリジン・オレンジ染色によるウナギ好球中内細菌活性の測定．魚病研究，**28**，49-50.
飯塚昭二，1972：大村湾における *Gymnodinium*' 65年型種赤潮の発生機構．日本プランクトン学会報，19，22-33.
飯塚昭二，1989：（4）ギムノディニウムの生理・生態に関する基礎研究．無酸素化現象と *Gymnodinium* 赤潮発生との関連に関する研究．「昭和63年度赤潮対策技術開発試験報告書 2－生物的赤潮防除技術開発試験」，1-17.
飯塚昭二・入江春彦，1966：1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害－Ⅱ，後期赤潮とその生物学的特徴について．長大水研報，**21**，67-101.
飯塚昭二・入江春彦，1969a：赤潮無発生年における赤潮プランクトンの動勢．1966年大村湾の場合．長大水研報，**27**，19-37.
飯塚昭二・入江春彦，1969b：大村湾における *Gymnodinium* 赤潮発生と海底水無酸素化現象との関連．日本プランクトン学会報，**16**，99-115.
飯塚昭二・峰　邦宏，1983：培養条件下で期待される赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium* sp.（'65 年型種）の最高生長速度．日本プランクトン学会報，**30**，139-146.
飯塚昭二・中島敏光，1975：赤潮鞭毛藻の硫化物に対する反応．日本プランクトン学会報，**22**，27-32.
池田武彦，1971：赤潮プランクトンに関する研究Ⅲ．海産ミドリムシの栄養生理について．山口内海水試報，**2**，4-9.
池田武彦・松野　進・桃山和夫，1987：昭和60年夏季発生の *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮について．山口内海水試報，**15**，58-66.
池田三郎・中田英昭，1987：赤潮発生現象のシステム分析．赤潮の科学，岡市友利編，恒星社厚生閣，東京，255-285.
Imai, I., 1989 : Cyst formation of the noxious red tide flagellate *Chattonella marina*(Raphidophyceae) in culture. *Mar. Biol.*, **103**, 235-239.
今井一郎，1990：有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究．南西水研報，**23**，63-166.
今井一郎，1992：珪藻休眠細胞の休眠および発芽と環境要因－Ⅲ－．有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究．平成３年度報告書，35-45.
今井一郎・板倉　茂・伊藤克彦，1990：播磨灘および北部広島湾の海底泥中における珪藻類の休眠細胞の分布．沿岸海洋研究ノート，**28**，75-84.
Imai. I. and K. Itoh, 1987 : Annual life cycle of *Chattonella* spp., causative flagellates of noxious red tides in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.*, **94**, 287-292.
Imai, I. and K. Itoh, 1988 : Cysts of *Chattonella antiqua* and *C. marina*(Raphidophyceae) in sediments of the Inland Sea of Japan. *Bull. Plankton Soc. Jpn.*, **35**, 35-44.
Imai, I., Y. Ishida and Y. Hata, 1993 : Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, **116**, 527-532.
Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguchi and Y. Hata, 1995 : Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science*, **61**, 628-636.
Imai, I., Y. Ishida, S. Sawayama and Y. Hata, 1993 : Isolation of a marine gliding bacterium that kills *Chattonella antiqua*(Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1409.
Imai, I., S. Itakura and K. Itoh, 1993 : Cysts of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo*, raphidophyceae, found in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1669-1673.
Imai, I., K. Itoh and M. Anraku, 1989 : Dormancy and maturation in the cysts of *Chattonella* spp. (Raphidophyceae), red tide flagellates in the inland sea of

Japan. In "*Red tides: Biology, environmental science, and toxicology*" (eds. by T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto), Elsevier, New York, 289-292.

今井一郎・伊藤克彦・安楽正照, 1984：播磨灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と発芽温度. 日本プランクトン学会報, **31**, 35-42.

Imai, I., K. Itoh and M. Anraku, 1984 : Extinction dilution method for enumeration of dormant cells of red tide organisms in marine sediments. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **31**, 123-124.

Imai, I. and M. Yamaguchi, 1994 : A simple technique for establishing axenic cultures of phytoflagellates. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **9**, 15-17.

今井正直・榎原資嗣・沖村英幸・角野康二, 1990：対馬暖流の栄養塩について. 海と空, **66**, 93-111.

入江春彦・浜島謙太郎, 1966：1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害－I. 1965年夏期大村湾赤潮の概説. 長大水研報, **21**, 59-65.

Ishida, Y, K. Shibahara, H. Uchida, and H. Kadota, 1980 : Distribution of obligately oligotrophic bacteria in Lake Biwa. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 1151-1158.

Ishimaru, T., T. Takeuchi, Y. Fukuyo, and M. Kodama, 1989 : The selenium requirement of *Gymnodinium nagasakiense*. In "*Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology*" (eds. by T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto), Elsevier, New York, 357-360.

Ishizaka, J., M. Kaichi and M. Takahashi, 1987 : Resting spore formation of *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) during short time-scale upwelling and its significance as predicted by a simple model. *Ecol. Res.*, **2**, 229-242.

磯田　豊, 1989：日本海上層水温場の長周期変動－1984年気象庁海洋気象ブイロボット資料解析－. 海と空, **64**, 217-232.

板倉　茂, 1990：海底泥中に存在する珪藻類の休眠細胞. 有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究. 平成元年度報告書, 7-20.

板倉　茂, 1992：浮遊性珪藻 *Skeletonema costatum* の休眠細胞形成条件. 有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究. 平成３年度報告書, 7-15.

板倉　茂・今井一郎, 1991：海底泥中の珪藻類休眠細胞密度の地理的分布と季節変化. 有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究. 平成２年度報告書, 15-30.

板倉　茂・今井一郎, 1994：1991年夏季播磨灘の海況と表層水中における浮遊性珪藻類 *Chaetoceros* 休眠胞子の分布. 水産海洋研究, **58**, 29-42.

板倉　茂・今井一郎・伊藤克彦, 1992. 海底泥中から見出された珪藻 *Skeletonema costatum* 休眠細胞の形態と復活過程. 日本プランクトン学会報, **38**, 135-145.

板倉　茂・長崎慶三・今井一郎, 1994：東部瀬戸内海の海底泥中における浮遊珪藻類休眠期細胞の分布密度. 有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究. ５ヶ年の研究報告書, 21-33.

板倉　茂・長崎慶三・山口峰生・中桐　栄・今井一郎, 1995：現場試料を用いた *Heterosigma akashiwo* のシスト形成. 平成７年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 日本水産学会, 321p.

板倉　茂・山口峰生・今井一郎, 1993：培養条件下における浮遊性珪藻 *Chaetoceros didymus* var. *protuberans* の休眠胞子形成と発芽. 日水誌, **59**, 807-813.

伊藤克彦・今井一郎, 1986：橈脚類による *Chattonella marina*(Raphidophyceae)の摂食とふん粒の排泄. 南西水研研報, **20**, 115-126.

伊藤克彦・今井一郎, 1988：赤潮・その対策と研究の歩み. in 「21世紀の漁業と水産界洋研究」（水産海洋部会編）. 恒星社厚生閣, 東京, 228-237.

巌佐　庸, 1987：有性生殖の進化に関する理論的諸研究. *Net. Evol. Biol.*, **4**, 39-49.

岩崎英雄, 1967：微細藻類の分離と培養. 日本水産資源保護協会, 東京, 1-55.

岩崎英雄, 1971：赤潮鞭毛藻に関する研究－IV. 1970年、備後灘に出現した *Eutreptiella* sp. と *Exuviaella* sp. について. 日本海洋学会誌, **27**, 152-157.

岩崎英雄, 1973：赤潮鞭毛藻の生理特性からみた赤潮の発生機構. 日本プランクトン学会報, **19**, 46-56.

Iwasaki, H., 1979 : Physiological ecology of red tide flagellates. In "*Biochemistry and Physiology of Protozoa*" (eds. by M. Levandowsky and S.H. Hutner), 2nd Ed, Vol.1, Academic Press, New York, 357-393.

岩崎英雄, 1980：赤潮生物の栄養要求性. 赤潮－発生機構と対策, 水産学シリーズ 34, 日本水産学会編, 恒星社厚生閣, 東京, 11-24.

岩崎英雄・藤山虎也・山下栄次, 1968：赤潮鞭毛藻に関する研究. I. 福山沿岸水域に出現した *Entomosigma* sp. について. 広島大水畜産学部紀要, **7**, 259-267.

岩崎英雄・佐々田憲, 1969：赤潮鞭毛藻に関する研究－II. 五ヶ所湾に出現した *Heterosigma inlandica* について. 日水誌, **35**, 943-947.

Jewson, D.H., 1992a : Size reduction, reproduction strategy and the life cycle of a centric diatom. Phil. *Trans. R. Soc. Lond.* **B 335**, 191-213.

Jewson, D.H., 1992b : Life cycle of a *Stephanodiscus* sp. (Bacillariophyta). *J. Phycol.*, **28**, 856-866.

Jitts, H.R., C.D. McAllister, K. Stephens and J.D.H. Strickland, 1964 : The cell division rates of some marine phytoplankters as a function of light and temperature. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **21**, 139-157.

木俣正夫・河合　章・石田祐三郎, 1960：海底泥土の採取法. 日水誌, **26**, 1227-1230.

気象庁編，1970．海洋観測指針．日本海洋学会，87-89.

Kobayashi, S., 1995 : First record of cysts of *Scrippsiella spinifera* Honsell & Cabrini (Dinophyceae). *Bull. Plankton Soc. Jpn.*, **42**, 75-79.

古武家善成・北村弘行，1979：播磨灘中北部における栄養塩類の季節変動．兵庫公害研研報，**11**，25-32.

小久保清治，1955：浮遊珪藻類．日本学術振興会，東京，316pp.

小久保清治，1960：浮遊珪藻類．恒星社厚生閣，東京，330pp.

近藤正人，1978：瀬戸内海における栄養塩類などの分布と季節変化．海と空，**54**：99-111.

Koroleff, k., 1976. Determination of silicon. In "*Methods of Seawater analysis*" (eds. by Grasshoff, K. et al.), Verlag Chemie, Weinheim, New York. 174-181.

Kranck, K. and T.G. Milligan, 1988 : Macroflocs from diatoms : in situ photography of particles in Bedford Basin, Nova Scotia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **44**, 183-188.

Kroes, H.W., 1972 : Growth interactions between *Chlamydomonas globosa* Snow and *Chlorococcum ellipsoideum* Deason and Bold : The role of extracellular products. *Limnol. Oceanogr.*, **17**, 423-432.

桑田　晃，1989：局地性湧昇域における珪藻の休眠胞子形成．月刊海洋，**21**，588-592.

Kuwata, A. and M. Takahashi, 1990 : Life-form population responses of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, to oligotrophication in regionally upwelled water. *Mar. Biol.*, **107**, 503-512.

Lewis, W.M. Jr., 1984. The diatom sex clock and its evolutionary significance. *Am. Nat.*, **123**, 73-80.

Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments, Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 343-346.

Lund, J.W., 1954 : The seasonal cycle of the Plankton diatom, *Melosira italica*(Ehr.) Kütz. subsp. *subarctica* O. Müll. *J. Ecol.*, **42**, 151-179.

眞鍋武彦，1969：インドフェノール改良法による海水中微量アンモニアの直接定量．日水誌，**35**：897-906.

眞鍋武彦，1988：内海域の栄養塩類分布に及ぼす植物プランクトンの影響．日本プランクトン学会報，**35**，115-120.

眞鍋武彦，1991．瀬戸内海東部海域における堆積物の汚染について．海と空，**67**：1-9.

Manabe, T. and S. Ishio, 1991 : Bloom of *Coscinodiscus wailesii* and DO deficit of bloom water in Seto Inland Sea. *Mar. Poll. Bull.*, **23**, 181-184.

眞鍋武彦・近藤敬三，1987：（３）珪藻赤潮と栄養塩環境に関する研究．イ　播磨灘における大型珪藻 *Coscinodiscus wailesii* と栄養塩環境に関する研究．昭和61年度赤潮対策技術開発試験報告書．４－珪藻赤潮被害防止技術開発試験．1-26.

眞鍋武彦・近藤敬三，1988：（３）珪藻赤潮と栄養塩環境に関する研究．イ　播磨灘における大型珪藻 *Coscinodiscus wailesii* と栄養塩環境に関する研究．昭和62年度赤潮対策技術開発試験報告書．４－珪藻赤潮被害防止技術開発試験．1-36.

眞鍋武彦・長井　敏・堀　豊，1994a：厳しさを増す沿岸漁業．「水産と環境」（清水　誠編），水産学会シリーズ 103，恒星社厚生閣，東京，9-18.

眞鍋武彦・反田　實，1985：浅海域底層水の採取法．日水誌，**51**，1745.

眞鍋武彦・反田　實，1986：海水中に含まれる微量の反応性珪酸，反応性燐酸，アンモニア，亜硝酸および硝酸の同時自動分析法について．海と空，**62**，25-37.

眞鍋武彦・反田　實・安田　基，1987：播磨灘および大阪湾の富栄養化と微細プランクトン．海と空，**63**，63-77.

眞鍋武彦・反田　實・堀　豊・長井　敏・中村行延，1994b：播磨灘の漁場環境と植物プランクトンの変動，20年間のモニタリングの成果．沿岸海洋研究ノート，**31**，169-181.

Malone, T.C., 1980 : Algal size. In "*The physiological ecology of phytoplankton*", (ed. I. Morris). Blackwell, Scientific Publ., Oxford, 433-463.

Mann, D.G., 1988 : Why didn't Lund see sex in *Asterionella*? A discussion of the diatom life cycle in nature. In "*Algae and the Aquatic Environment.*" (ed. Round, F.E. Contributions in honor of J.W.G. Lund. Biopress), Bristol, 384-412.

Mann, D.G., 1993 : Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Hydrobiologia*, **269/270**, 11-20.

Martin, J.H., 1965 : Phytoplankton-zooplankton relationships in Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 185-191.

松江吉行，1936：浮遊珪藻 *Skeletonema costatum*(Grev.)Grun. の季節による形態変化．海と空，**16**，225-230.

松山幸彦・永井清仁・水口忠久・藤原正嗣・石村美佐・山口峰生・内田卓志・本城凡夫，1995：1992年に英虞湾において発生した *Heterocapsa* sp. 赤潮発生期の環境特性とアコヤガイ斃死の特徴について．日水誌，**61**，35-41.

右田清治，1967a：*Melosira moniliformis* の有性生殖．長大水研報，**23**，123-133.

右田清二，1967b：*Skeletonema costatum* の有性生殖について．日水誌，**33**，392-398.

右田清二，1967c：中心珪藻目２種の有性生殖とその生態．日本プランクトン研究連絡会報，**14**，13-22.

右田清二，1969：珪藻 *Skeletonema costatum* と *Melosira moniliformis* の大きさの季節的変化．長大水研報，**27**，9-17.

Mitsutani, A., K. Takesue, M. Kirita, and Y. Ishida, 1992 : Lysis *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp. isolated from the coastal water of the Ariake Sea. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2159-2169.

宮原一隆・長井　敏，1995．明石における定置観測結果の整理．兵庫水試研報，**32**，37-54.

三浦秀夫・矢沼　隆，1991：西部瀬戸内海における *Gymnodinium nagasakiense* の初期出現域とその環境特性．日水誌，**57**，2179-2186.

水野　真，1984：海産樹枝上群体珪藻 *Berkeleya rutilans* の季節的消長と大きさの変化．藻類，**32**，262-268.

Mizuno, M., 1977 : Sexual reproduction of *Melosira* sp. from Oshoro Bay, Hokkaido. *Bull. Jap. Soc. Phycol.*, **25**, 149-157.

Mizuno, M., 1991 : Influence of cell volume on the growth and size reduction of marine and estuarine diatoms. *J. Phycol.*, **27**, 473-478.

Mizuno, M. and K. Okuda, 1985 : Seasonal change in the distribution of cell size of *Cocconeis Scutellum* Var. *Ornata* (Bacillariophyceae) in relation to growth and sexual reproduction. *J. Phycol.*, **21**, 547-553.

森　勇・入江春彦，1966：1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害－Ⅲ．赤潮発生時の大村湾沖合域の海況．長大水研報，**21**，103-113.

森口祐三・古城方和・金沢良昭・久宝佳苗・北村弘行，1981．播磨灘北西部における栄養塩類の挙動について．兵庫公害研報，**13**：34-38.

Mullin, M.M. and E.R. Brooks, 1967 : Laboratory culture, growth rate, and feeding behavior of a planktonic marine copepod. *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 657-666.

村上彰男，1976．地理．「瀬戸内海の海域生態と漁業」（村上彰男編），フジテクノシステム，東京，3-13.

Murphy, T.P., D.R.S. Lean and C. Nalewajko, 1976. Blue-green algae : their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae. *Science*, **192**, 900-902.

Nagai, S., Y. Hori, T. Manabe and I. Imai, 1994. Promotion of sperm formation of a giant diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran by a marine bacterium. *Fisheries Sci.*, **60**, 625-626.

長井　敏・増田恵一・谷田圭亮，1993．5．定置観測．平成4年度兵庫水試事報，73-91.

Nagasaki, K., M. Ando, I. Imai, S. Itakura, and Y. Ishida, 1994 : Virus-like particles in *Heterosigma akashiwo* (Raphidphyceae) :a possible red tide disintegration mechanism. *Mar. Biol.*, **119**, 307-312.

中田　薫，1982：北海道噴火湾の1981年春季増殖期における植物プランクトンの組成．水産海洋研究報，**41**，27-32.

長田　宏，1994：1986年冬・春季の佐渡海峡における植物プランクトン主要出現群の経日変化．日水研研報，**44**，139-142.

中野貴彦・金沢良昭・田中英樹，1983．播磨灘に流入する河川の栄養塩類を中心とした水質特性．兵庫公害研研報，**15**，34-39.

Nakahara, H., 1978. Studies on phytoplankton in Maizuru Bay. I. Seasonal variation and vertical microdistribution. *Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ.*, **112**, 49-82.

中原紘之，1986：藻類の生活史と生態．「藻類の生態」．（秋山　優・有賀祐勝・坂本充・横浜康継編），内田老鶴圃，東京，533-592.

中原紘之・左子芳彦，1987：”淡水植物プランクトンの生活史”淡水赤潮（門田　元編）恒星社厚生閣，東京，21-77.

中村行延・松田泰祠・安田　基・眞鍋武彦，1989．播磨灘における植物プランクトンの出現状況，兵庫水試研報，**26**：11-17.

Nakamura, Y., 1985a : Ammonium uptake kineticks and interactions between nitrate and ammonium uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **41**, 33-38.

Nakamura, Y., 1985b : Kinetics of nitrogen- or phosphorus-limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **41**, 381-387.

Nakamura, Y., J. Takashima, and M. Watanabe, 1988 : Chemical environmental for red tides due to *Chattonella antiqua* in the Seto Inland Sea, Japan. Part 1. Growth bioassay of the seawater and dependence of growth rate on nutrient concentrations. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **44**, 113-124.

Nakamura, Y., M.M. Watanabe, 1983a : Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) Part 1. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 110-114.

Nakamura, Y., M.M. Watanabe, 1983b : Growth characteristics of *Chattonella antiqua* Part 2. Effects of nutrients on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 151-155.

Nakamura, Y., M.M. Watanabe, 1983c : Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 167-170.

Nakamura, Y., Y. Yamasaki, and J. Hiromi, 1992 : Growth and grazing of a heterotrophic dinoflagellate, *Gyrodinium dominans*, feeding on a red tide flagellate, *Chattonella antiqua*. *Mar. Ecol. Pro. Ser.*, **82**, 275-279.

中田憲一・飯塚昭二，1987：赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の越冬に関する一観察．日本プランクトン学会報，**34**，199-201.

西村昭史，1982：魚類養殖漁場の有機汚染が赤潮生物 *Gymnodinium* type-'65および *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす影響．日本プランクトン学会報，**29**，1-7.

Nishimura, S., 1965 : The zoogeographical aspects of the Japan Sea. Part Ⅱ. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.*, **13**, 81-101.

西島敏隆・畑　幸彦，1984：*Heterosigma akashiwo* HadaのＢ群ビタミン要求に関する増殖生理．日水誌，**50**，1505-1510.

西島敏隆・畑　幸彦，1986：*Skeletonema costatum*（Greville）Cleve 及び *Eutreptiella* sp.のＢ群ビタミン要求に関する増殖生理．日水誌，**52**，173-179.

Norris, L. and K.K. Chew, 1975. Effect of environmental factors on growth of *Gonyaulax catenella*. In "*Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates*" (ed. by V.R. LoCicero), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 143-152.

沼口克之・平山和次，1972：大村湾赤潮原因種 *Gymnodinium*'65年型種の培養に好適なｐＨと塩分について．長大水研報，**33**，7-10.

沼田　真，1981：種子の生態学．種子の科学－生態学の立場から－，沼田　真編，研成社，東京，９-16.

大内　晟，1982：重回帰式による赤潮発生予測．日水誌，**48**，1245-1250.

大内　晟・楠木　豊・高山晴義，1983：珪藻赤潮の重回帰式と海域区分について．日水誌，**49**，867-873.

大内　晟・高山晴義，1981：主成分分析による赤潮図について，日水試，**47**，1275-1279.

大内　晟・高山晴義，1984：赤潮図による *Gymnodinium*'65年型種赤潮の予察について．日水誌，**50**，1201-1205.

小野知足，1988：播磨灘における赤潮生物の細胞周期と群生長速度．香赤潮研報，**3**，1-67.

小野知足・楠　豊・九万田一巳・代田昭彦・城　久・田原恒男・深瀬　茂・吉田陽一・村上彰男・渡辺　弘，1980：赤潮の発生は予知できるか．赤潮に関する最近の知見と研究の問題点，赤潮研究会編，日本水産資源保護協会，東京，147-181.

Odate, T., 1987 : Temporal and horizontal distribution of the diatom community during the spring bloom in Funka Bay, southern Hokkaido. *Bull. Plankoton. Soc. Japan*, **34**, 33-42.

岡市友利，1983：赤潮に関する生物環境学的研究．日本海洋学会誌，**39**，267-278.

岡山県・兵庫県・徳島県・香川県・大阪府・（株）東京久栄・芙蓉海洋開発（株）・阪神臨海測量（株）・新日本気象海洋（株），1995：平成６年度 赤潮対策技術開発試験，海域特性による赤潮被害防止技術開発試験．瀬戸内海東部海域赤潮広域共同調査報告書，1-173.

Paerl, H. W., 1988 : Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnol. Oceanogr.*, **33**, 823-847.

Parsons T.R., and M. Takahashi, 1973 : Environmental control of phytoplankton cell size. *Limnol. Oceanogr.*, **18**, 511-515.

Paasche, E., 1968 : Marine plankton algae grown with light-dark cycles. Ⅱ. *Ditylum brightwellii* and *Nitzschia turgidula*. *Physiologia Pl.*, **21**, 66-77.

Paasche, E., 1973 : The influece of cell size on growth rate, silica content, and some other properties of four marine diatom species. *Norw. J. Bot.*, **20**, 197-204.

Passow, U., 1991 : Species-specific sedimentation and sinking velocities of diatoms. *Mar. Biol.*, **108**, 449-455.

Percival, E., M.A. Rahman, and H. Weigel, 1980 : Chemistry of the polysaccharides of the diatom *Coscinodiscus nobilis*. *Phytochemistry*, **19**, 809-811.

Pfitzer, E., 1871 : Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Bacillariaceen (Diatomeen). *Botan. Abhandl., hrsg.* von *Hanstein, J.*, **2**, 1-189.

Pincemin J.M., 1969 : Apparation d'une eau rouge a *Cochlodinium* sp. devant Juanles-Pins. *Rev. Intern. Oceanogr. Med.*, Tome ⅩⅢ-ⅩⅣ, 205-216.

Pitcher, G. C., 1990 : Phytoplankton seed population of the cape Peninsula upwelling plume, with particular reference to resting spores of *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) and their role in seeding upweling waters. *Estuar. coast. Shelf Sci.*, **31**, 283-301.

Pratt, D.M., 1959 : The phytoplankton of Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **4**, 425-440.

Pratt, D.M., 1965 : The winter-spring diatom flowering in Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 173-184.

Pratt, D.M., 1966 : Competition between *Skeletonema costatum* and *Olithodiscus luteus* in Narragansett Bay and in culture. *Limnol. Oceanog.*, **11**, 447-455.

Pringheim, E.G., 1946 : Pure culture of algae. Cambridge University Press, Cambridge, 119p.

Proctor V.W., 1957. Studies of algal antibiosis using *Haematococcus* and *Chalamydomonas*. *Limnol. Oceanogr.*, **2**, 125-139.

Provasoli, L., J.J.A. McLaughlin and M. R. Droop, 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, **25**, 392-428.

Provasoli, L., K. Shiraishi, and J.R. Lance, 1959 : Nutritional idiosyncrasies of *Artemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **77**, 250-261.

Qasim, S.Z., P.M.A. Bhattathiri and V.P. Devassy, 1972 : The influence of salinity on the rate of photosynthesis and abundance of some tropical phytoplankton. *Mar. Biol.*, **12**, 200-206.

Rao, V.N.R., 1971 : Studies on *Cyclotella meneghiniana* Kütz. Ⅱ. Induction of

auxospore formation. *Phykos*, **10**, 84-98.

Rhee, G.Y. and I.J.Gotham, 1981 : The effect of environmental factors on phytoplankton growth : temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, **26**, 635-648.

Riebesell U., 1989 : Comparioson of sinking and sedimentation rate mesurements in a diatom winter/spring bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **54**, 109-119.

Rines, J.E.B. and P.E. Hargaraves, 1986 : Considerations of the taxonomy and biogeography of *Chaetoceros ceratosporus* Ostf. and *Chaetoceros rigidus* Ostf. In "*Proceedings of the 8 th international diatom symposium*" (ed. M. Ricard, Koenigstein, O. Koeltz), 97-112.

Rines, J.E.B. and P.E. Hargraves, 1988 : The *Chaetoceros* Ehrenberg (Bacillariophyceae) flora of Narragansett Bay, Rhodo Island,. U. S. A., J. Cramer, Berlin, 196p.

Round, F.E, 1972 : The problem of reduction of cell size during diatom cell division. *Nova Hedwigia*, **23**, 291-303.

Round, F.E., R.M. Crawford, and D. G. Mann, 1990:" *The diatoms* " Cambridge Univ. Press, Cambridge, 747p.

Crawford, R.M., 1995 : The role of sex in the sedimentation of a marine diatom bloom. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 200-204.

Roy S., R.P. Harris and S.A. Poulet, 1989 : Inefficient feeding by *Calanus helgolandicus* and *Temora longicornis* on *Coscinodiscus wailesii* : quantitative estimation using cholorophyll-type pigments and effects on dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Pro. Ser.*, **52**, 145-153.

Sakata, T., 1990 : Occurrence of marine *Saprospira* sp. possessing algicidal activity for diatoms. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1165.

左子芳彦, 1988. 渦鞭毛藻の生活環. 海洋科学, **20** : 80-84.

左子芳彦, 1995. 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* の生活環と広域化. 月刊海洋. **27**, 628-635.

左子芳彦・石田祐三郎, 1986 : 渦鞭毛藻における有性生殖の生態学的意義. 微生物の生態14－進化をめぐって. 日本微生物生態学会編, 学会出版センター, 東京, pp.99-113.

Sako Y., Y. Ishida, H. Kadota and Y. Hata, 1984 : Sexual reproduction and cyst formation in the freshwaret dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 743-750.

Sako, Y., Y. Ishida, H. Kadota and Y. Hata, 1985 : Excystment in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 267-272.

左子芳彦・金　昌勲・石田祐三郎, 1992 : 麻痺性貝毒の起源－海産渦鞭毛藻 *Alexandrium*

属. 化学と生物, **30**, 726-734.

Sako, Y., M. Nakanishi, T. Konda, Y. Ishida, H. Kadota, K. Shrestha, H. B. Bhandary and R. L. Shrestha, 1986 : Life cycle of *Peridinium* sp. B3(Dinophyceae) isolated from Lake Begnas, Nepal. *Bull. Japan. Soc. microb. Ecol.*, **1**, 19-27.

Schmid, A.-M.M., 1984 : Wall morphogenesis in *Thalassiosira eccentrica* : comparision of auxospore formation and the effect of MT-inhibitors. In "*proceeding of the 7 th international diatom symposium.*" (ed. by D.G.Mann, Koenigstein, O. Koeltz), 47-70.

Schmid, A.-M.M., 1986 : Wall morphogenesis in *Coscinodiscus wailesii* Gran et Angst. II. Cytoplasmic events of valve morphogenesis. In "*Proceedings of the 8 th international diatom symposium*". (ed. by M. Ricard, Koenigstein, O. Koeltz), 293-314.

Schmid, A.-M.M., 1987 : Wall morphogenesis in centric diatoms. In"*Algal Development, Molecular and Cellular Aspects*" (eds. by Wiessner, W., D. G. Robinson and R. C. Starr) , Springer. 34-41.

Schütt, F., 1893 : Wechselbeziehungen zwischen Morphologie, Biologie, Entwickelungsgeschichte und Systematik der diatomeen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **11**, 563-571.

Schultz, M.E. and F.R. Trainor, 1968 : Production of male gametes and auxospores in the centric diatoms *Cyclotella meneghiniana* and *C. cryptica*. *J. Phycol.*, **4**, 85-88.

Schultz, M.E. and F.R. Trainor, 1970 : Production of male gametes and auxospores in a polymorphic clone of the centric diatom *Cyclotella*. *Can. J. Bot.*, **48**, 947-951.

Sicko-Goad, L., E.F. Stoermer and G. Fahnenstiel, 1986 : Rejuvenation of *Melosira granulata* (Bacillariophyceae) resting cells from the anoxic sediments of Douglas Lake, Michigan. I. Light microscopy and ^{14}C uptake. *J. Phycol.*, **22**, 22-28.

Sicko-Goad, L., E.F. Stoermer and J.P. Kociolek, 1989 : Diatom resting cell rejuvenation and formation : time coures, species records and distribution. *J. Plankton Res.*, **11**, 375-389.

Smayda, T.J., 1958 : Biogeographical studies of marine phytoplankton. *Oikos*, **9**, 158-191.

Smayda, T.J., 1969 : Experimental observations on the influence of temperature, light, and salinity on cell division of the marine diatom, *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *J. Phycol.*, **5**, 150-157.

Smayda, T.J., 1971 : Normal and accelerated sinking of phytoplankton in the sea. *Mar. Jeol.*, **11**, 105-122.

Smayda, T.J., 1973 : The growth of *Skeletonema costatum* during a winter-spring bloom in Narragansett Bay, Rhode Island. *Norw. J. Bot.*, **20**, 219-247.

Smayda, T.J., 1980 : Phytoplankton species succession. In "*The phisiological ecology of phytoplankton*" (ed. by I.Morris), Blackwell, Scientific Publ., Oxford, 493-570.

Smayda, T.J., and B.J. Boleyn, 1965 : Experimental observations on the flotation of marine diatoms. I. *Thalassiosira* cf. *nana*, *Thalassiosira rorula*, and *Nitzschia seriata*. *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 499-509.

Smayda, T.J., and B.J. Boleyn, 1966a : Experimental observations on the flotation of marine diatoms. II. *Skeletonema costatum* and *Rhizosolenia setigera*. *Limnol. Oceanogr.*, **11**, 18-34.

Smayda, T.J., and B.J. Boleyn, 1966b : Experimental observations on the flotation of marine diatoms. III. *Bacteriastrum hyalinum* and *Chaetoceros lauderi*. *Limnol. Oceanogr.*, **11**, 35-43.

Smayda, T.J. and B. Mitchell-Innes, 1974 : Dark survival of autotrophic, planktonic marine diatoms. *Mar. Biol.*, **25**, 195-202.

Smetacek, V.S., 1985 : Role of sinking in diatom life-history cycles : ecological, evolutionary and geological significance. *Mar. Biol.*, **84**, 239-251.

Steele, R.L., 1965 : Induction of sexuality in two centric diatoms. *Bioscience*, **15**, 298p.

Steidinger, K.A., 1975 : Basic factors influencing red tides. In "*Proceeding of the first ineternational conference on toxic dinoflagellate blooms*". (ed. by LoCicero, V. R.), Mass. Sci. Tech. Found., Wakefield, MA., 153-162.

Stockwell, D.A. and P.E. Hargaraves, 1986 : Morphological variability within resting spores of the Marine diatom genus *Chaetoceros* Ehernberg. In" *Proceedings of the 8 th international diatom symposium*", (ed. by M. Ricard, Koenigstein, O. Koeltz), 81-95.

Stosch, H.A.von, 1950 : Oogamy in a centric diatom. *Nature*, **165**, 531-532.

Stosch, H.A.von, 1951a : Entwicklungsgeschichtliche untersuchungen an zentrischen diatomeen. I. Die auxosporenbildung von *Melosira varians*. *Arch. Mikrobiol.*, **16**, 101-135.

Stosch, H.A.von, 1951b : Zur entwicklungsgeschichte zentrischer meeresdiatomeen. *Naturwissenschaften*, **38**, 191-192.

Stosch, H.A.von, 1956 : Entwicklungsgeschichtliche untersuchungen an zentrischen diatomeen. II. Geschlechtszellenreifung, befruchtung und auxosporenbildung einiger grundbewohnender *Biddulphiaceen* der Nordsee. *Arch. Mikrobiol.*, **23**, 327-36

5.

Stosch, H.A. von, 1958 : Entwicklungsgeschichtliche untersuchungen an zentrischen diatomeen. III. Die spermatogenese von *Melosira moniloformis* Agardh. *Arch. Mikrobiol.*, 31, 274-282.

Stosch, H.A. von, 1965 : Manipulierung der zellgrösse von diatomeen im experiment. *Phycologia*, **5**, 21-44.

Stosch, H.A. von, 1982 : On auxospore envelopes in diatoms. *Bacillaria*, **5**, 127-156.

Stosch, H.A. von and K.V. Kovallik, 1964 : Entwicklungsgeschichtliche untersuchungen an zentrischen diatomeen. IV. Die planktondiatomee *Stephanopyxis turris*- ihre behandlung und entwicklungsgeschichte. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, **11**, 209-257.

Stosch, H.A. von, G. Theil and G. Drebes, 1973 : Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. V. Bau und lebenszyklus von *Chaetoceros didymum*, mit beobachtungen über einige andere arten der gattung. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, **25**, 384-445.

Stosch, H.A. von, and K. Fecher, 1979 : "Internal thecae" of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae) :development, structure and function as resting spore. *J. Phycol.*, **25**, 233-243.

Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons, 1972 : A practical handbook of sea water analysis. Bulletin 167 (second edition), 49-64 and 71-80. Fisheries research board of Canada.

水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1973－1994 : 瀬戸内海の赤潮

鈴木正明・福岡二郎・大内　東・深瀬　茂・加地郁夫, 1981a : 夏期, 播磨灘におけるクロロフィル, 栄養塩の短期変動. 海と空, **56** : 171-179.

鈴木正明・大内　東・小峰　淳・福岡二郎・加地郁夫, 1981b : 主成分分析による水質データの解析. －東京湾における栄養塩、クロロフィルなどの変動－. 海と空. 4, 161-169.

Syvertsen, E.E., 1979 : Resting spore formation in clonal cultures of *Thalassiosira antarctica* Comber, *T. nordenskioeldii* Cleve and *Detonula confervacea*(Cleve) Gran. *Nova Hedwigia Beih.*, **64**, 41-63.

Taguchi, S., 1970 : Seasonal variations of phtosynthetic behaviour of phytoplankton in Akkeshi Bay, Hokkaido, with special reference to low photosynthetic rate in summer associated with large percentage of dwarf cells. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **17**, 65-77.

Taguchi, S., 1976 : Relationship between photosynthesis and cell size of marine

diatoms. *J. Phycol.*, **12**, 185-189.

高野秀昭：Ⅳ 珪藻綱．「日本の赤潮生物」（福代康夫・千原光雄・高野秀昭・松岡数充編）内田老鶴圃，東京，1990，250-251.

Takano, H., 1954 : Preliminary report on the marine diatoms from Hachijo Island, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **19**, 1189-1196.

高野秀昭，1967．珪藻類の生殖．日本プランクトン学会報，**14**：1-12.

谷口　旭，1992：海とプランクトン36，植物プランクトン主要分類群（15）．海洋と生物，**79**，82-88.

田森裕茂・岩男　昴・神薗真人・吉川幹英・池田武彦・馬場俊典・小泉喜嗣・内間満明・三浦秀夫・矢沼　隆，1991：西部瀬戸内海における *Gymnodinium nagasakiense* の初期出現域とその環境特性．日水誌，**57**，2179-2186.

Tanaka, N., M. Sugiyama and K. Ohwada, 1983 : Ecological studies of phytoplankton in Ago Bay with special reference to the relation between growth and salinity. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **30**, 1-10.

田中　豊，1984：主成分分析．「パソコン統計解析ハンドブックⅡ　多量変解析編」（田中豊・垂水共之・脇本和昌編）共立出版，東京，401pp.

反田　實・眞鍋武彦，1984：播磨灘の透明度－Ⅰ．水平分布と時系列変動．兵庫水試研報，**22**，1-9.

反田　實・眞鍋武彦，1991：主成分分析によるクロロフィル分布の解析．兵庫水試研報，**29**，31-40.

反田　實・眞鍋武彦・浜田尚雄，1983a：播磨灘の水温－Ⅰ．海面水温の平均的分布．兵庫水試研報，**21**，77-85.

反田　實・眞鍋武彦・浜田尚雄，1983b：播磨灘の水温－Ⅱ．海面水温の統計的分布．兵庫水試研報，**21**，87-90.

寺田和夫・池内　仁・高山晴義，1987：冬季の周防灘沿岸で観察された *Gymnodinium nagasakiense*．日本プランクトン学会報，**34**，201-204.

Tomas, C.R., 1978 : *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). Ⅰ. Effects of salinity and temperature on growth, motility, and survival. *J. Phycol.*, **14**, 309-313.

鳥海三郎，福代康夫，松岡数充，1987：”第４章渦鞭毛藻”．赤潮生物研究指針（日本水産資源保護協会編）．秀和，東京，304-476.

辻　昌夫，1994：1993年夏の不順な天候について．神戸海洋気象台彙報，**213**，25-28.

辻田時美，1984．ブルーミングと赤潮の発生に関する諸過程．La mer，**22**，305-323.

上野俊士郎，1991．日本沿岸における海産珪藻 *Skeletonema* 属２種の生活環と分布に関する研究．水大研報，**40**：23-58.

上野福三，1969：赤潮発生水域の環境特性と植物性ナノプランクトンの推移について．日本プランクトン学会報，**16**，89-98.

Umebayashi, O, 1972 : Preservation of some cultured diatoms. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **69**, 55-62.

Uchida T., 1976. Excretion of ammonia by *Prorocentrum micans* Ehrenberg in urea-grown culture. *Jap. J. Ecol.*, **26**, 43-44.

Uye, S., 1986 : Impact of copepod grazing on the red-tide flagellate *Chattonella antiqua*. *Mar. Biol.*, **92**, 35-43.

Vaulot, D. and S.W. Chisholm, 1987 : Flow cytometric analysis of spermatogenesis in the diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **23**, 132-137.

Vaulot, D., R.J. Olson and S.W. Chisholm, 1986 : Light and dark control of the cell cycle in two phytoplankton species. *Exp. Cell Res.*, **167**, 38-52.

Waite, A.M., P.A. Thompson, and P.J. Harrison, 1992 : Does energy control the sinking rates of marine diatoms?. *Limnol. Oceanogr.*, **37**, 468-477.

Wall, D., 1971 : Biological problems concerning fossilizable dinoflagellates. *Geoscience and Man*, **3**, 1-15.

Wall, D., 1975. Taxonomy and cysts of red-tide dinoflagellates. In "*Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates*". (ed. by V.R. LoCicero), Mass. Sci. Tech. Found., Wakefield, MA, 249-255.

Wall, D. and B. Dale, 1968 : Modern dinoflagellate cysts and evolution of the Peridiniales. *Micropaleontology*, **14**, 265-304.

Wall, D. and B. Dale, 1969 : The "Hystrichosphaerid" resting spore of *Pyrodinium bahamense*, Plate 1906. *J. Phycol.*, **5**, 140-149.

渡辺　信・中村泰夫，1984a：赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hadaの増殖特性．１．増殖に及ぼす水温、塩分、照度、ｐＨの影響．国立公害研報，**63**，51-58.

渡辺　信・中村泰夫，1984b：赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hadaの増殖特性．２．栄養塩の利用．国立公害研報，**63**，59-68.

渡辺正孝，1986：沿岸海域における赤潮発生機構－研究の現状と今後の課題－．用水と排水，**28**，45-53.

渡辺正孝，1988：内湾域における赤潮発生機構．水，**30**，16-22.

Werner, D., 1970 : Productivity studies on diatom cultures. *Helgoländer wiss. Meeresunters*, **20**, 97-103.

Werner, D., 1971a. Der Entwicklungscyklus mit sexualphase bei der marinen diatomee *Coscinodiscus asteromphalus*. Ⅰ. Kultur und synchronisation von entwicklungsstadien. *Arch. Mikrobiol.*, **80**, 43-49.

Werner, D., 1971b. Der entwicklungscyklus mit sexualphase bei der marinen diatomee *Coscinodiscus asteromphalus*. Ⅱ. Oberflächenabhängige differenzierung während der vegetativen zellverkleinerung. *Arch. Mikrobiol.*, **80**, 115-133.

Werner, D., 1971c. Der entwicklungscyklus mit sexualphase bei der marinen diatomee *Coscinodiscus asteromphalus*. Ⅲ. Differenzierung nud spermatogenese. *Arch. Mikrobiol.*, **80**, 134-146.

Williams, R.B., 1965 : Division rates of salt marsh diatoms in relation to salinity and cell size. *Ecology*, **45**, 877-880.

Yamaguchi, M., 1992 : DNA synthesis and the cell cycle in the noxious red-tide dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense*. *Mar. Biol.*, **112**, 191-198.

山口峰生, 1994 : *Gymnodinium nagasakiense* の赤潮発生機構と発生予知に関する生理生態学的研究. 南西水研報, **27**, 251-394.

山口峰生・本城凡夫, 1989 : 有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の増殖におよぼす水温、塩分および光強度の影響. 日水誌, **55**, 2029-2036.

Yamaguchi, M. and I. Imai, 1994 : A microfluorometric analysis of nuclear DNA at different stages in the history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Phycologia*, **33**, 163-170.

山口峰生・今井一郎・本城凡夫, 1991 : 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と *C. marina* の増殖速度に及ぼす水温, 塩分および光強度の影響. 日水誌, **57**, 1277-1284.

山口峰生・板倉　茂・今井一郎, 1995 : 広島湾海底泥中における有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* および *Alexandrium catenella* シストの現存量と水平・鉛直分布. 日水誌, **61**, 700-706.

山路　勇 :　日本海洋プランクトン図鑑. 第３版, 保育社, 大阪, 1984, pp. 16-18.

山本千祐・寺井千尋・田中義興, 1989 : Ⅰ　福岡湾海域１. *Gyumnodinium nagasakense* による赤潮発生と環境. 「昭和63年度九州海域赤潮調査報告書（西海ブロック）」（水産庁・福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県・鹿児島県・宮崎県）, １-８.

Yamochi, S., 1983 : Mechanisms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay, Japan. Part 1. Nutrient factors involved in controlling the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada. *J. Oceanog. Soc. Japan*, 39, 310-316.

矢持　進, 1984a : 大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻６種の増殖に及ぼす水温の影響. 日本プランクトン学会報, **31**, 15-22.

矢持　進, 1984b : 大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻 *Prorocentrum micans, Eutreptiella* sp. および *Chattonella marina* の増殖制限因子について. 日本プランクトン学会報, **31**, 97-106.

矢持　進, 1989a : 大阪湾における *Heterosigma alkashiwo* の赤潮発生機構に関する研究. 大水試研報, **8**, 1-110.

矢持　進, 1989b : 大阪湾における *Skeletonema costatum* と *Heterosigma akasiwo* の底生期細胞の分布について. 日本プランクトン学会報, **36** : 45-51.

Yamochi, S. and H. Joh, 1986 : Effects of temperature on the vegetative cell liberation of seven species of red-tide algae from the bottom mud in Osaka Bay. *J. Oceanog. Soc. Japan*, **42**, 266-275.

Yanagi, T, 1989 : Physical parameters of forecasting red tide in Harima-Nada, Japan. In " *Red Tide: Biology, Environmental Science and Toxicology*"(eds. by T. Okaichi, D. M. Anderson, and T. Nemoto) New York: Elsevier, 149-152

吉田陽一, 1980 : 赤潮の予察. 「赤潮－発生機構と対策」（日本水産学会編）水産学シリーズ 34, 恒星社厚生閣, 東京, 90-104.

吉田陽一・沼田克己, 1982 : *Chattonella antiqua* （Hada）Onoの潮流による集積. 日水誌, **48**, 1271-1275.

吉田陽一・沼田克己, 1982 : *Chattonella antiqua* （Hada）Onoの集積に及ぼす風の影響. 日水誌, **48**, 1277-1280.

吉田陽一・沼田克己, 1982 : 鹿児島湾および周防灘における *Chattonella* sp. の集積と移動. 日水誌, **48**, 1401-1405.

吉田陽一・河田克己, 1983 : *Chattonella antiqua* （Hada）Onoの浮上性および走行性. 日本プランクトン学会報, **30**, 11-19.

吉松定昭, 1981 : 培養による *Protogonyaulax catenella* の有性生殖. Ⅰ. 異株接合. 日本プランクトン学会報, **28**, 131-139.

吉松定昭, 1984 : 培養による *Protogonyaulax catenella* の有性生殖. Ⅱ. 交配型の決定. 日本プランクトン学会報, **31**, 107-111.

吉松定昭, 1992 : 瀬戸内海における赤潮生物特に渦鞭毛藻類 *Alexandrium* 属２種、ラフィド藻類３種の生活史に関する研究. 香赤潮研報, **4**, 1-90.

吉松定昭・小野知足・藤沢節茂, 1985 : 1982年備讃瀬戸西部海域に発生した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮. 香赤潮研報, **1**, 17-27.

Zgurovskaya, L.N., 1977 : Influence of the addition of nutrients on spore germination and division of algae from bottom sediments. *Oceanology.*, **17**, 75-77.

著者関連論文

長井　敏・眞鍋武彦，1994：培養条件下における大型の珪藻類の *Coscinodiscus wailesii* の増大胞子形成．日本プランクトン学会報，**40**，151-167.

S. Nagai, Y. Hori, T. Manabe, and I. Imai, 1994 : Promotion of sperm formation of a giant diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran by a marine bacterium. *Fisheries Science*, **60**, 625-626.

長井　敏・堀　豊・眞鍋武彦・今井一郎，1995：海底泥中から見いだされた大型珪藻 *Coscinodiscus wailesii* Gran 休眠細胞の形態と復活．日本水産学会誌，61号，179-185.

S. Nagai, Y. Hori, T. Manabe, and I. Imai : Restoration of cell size by vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). *Phycologia*, **34**, 533-535.

S. Nagai, Y. Hori, K. Miyahara, T. Manabe, and I. Imai : Population dynamics of *Coscinodiscus wailesii* Gran (Bacillariophyceae) in Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan. Proceeding of the 7th Toxic Phytoplankton（印刷中）

以上の５論文の内容は主論文に含まれている。

大貝政治・若野　真・長井　敏，1991：エゾアワビ幼生の着底と稚貝の成長におよぼす付着性微細藻類の影響．水産増殖，**39**，263-266.

大貝政治・柿元　皓・花野政之・村野敏一・長井　敏，1993：アカモクの成長に及ぼすカルボン酸・塩とそれらを利用したアカモク藻場造成．水産工学，**29**，153-158.

眞鍋武彦・長井　敏・堀　豊，1994：厳しさを増す沿岸漁業．「水産と環境」．水産学会シリーズ（恒星社厚生閣）．103，9-18.

眞鍋武彦・反田　実・堀　豊・長井　敏・中村行延，1994：播磨灘の漁場環境と植物プランクトンの変動，20年間のモニタリングの成果．日本海洋学会，沿岸海洋研究ノート，**31**，169-181.

長井　敏・宮原一隆・堀　豊，1995：1994-1995年冬期播磨灘に大量発生した *Thalassiosira* sp. について．兵庫水試研報，**32**，9-17.

宮原一隆・長井　敏，1995：明石における定置観測結果の整理，兵庫水試研報，32，37-54.