

## 両生類の卵塊と微細藻類の共生

宮下英明<sup>1</sup>, 武藤清明<sup>1</sup>, 武井萌<sup>1</sup>, 神川龍馬<sup>2</sup>, 西川完途<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院人間・環境学研究科 〒606-8501 京都市左京区二本松町

<sup>2</sup>京都大学大学院農学研究科 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

<sup>3</sup>京都大学大学院地球環境学堂 〒606-8501 京都市左京区吉田本町

### Microalgal symbiosis in amphibian eggs

Hideaki Miyashita<sup>1</sup>, Kiyooki Muto<sup>1</sup>, Megumi Takei<sup>1</sup>, Ryoma Kamikawa<sup>2</sup>,  
Kanto Nishikawa<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University,  
Yoshida-nihonmatsu-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku,  
Kyoto 606-8502, Japan

<sup>3</sup>Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University, Yoshida-honmachi,  
Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Keywords: amphibians, *Hynobius nigrescens*, microalgae, *Oophila*, symbiosis

DOI: 10.24480/bsj-review.13a5.00223

### 1. はじめに

両生類は胚がゼリー層に包まれた卵を水中や湿潤な場所に産む。一部の両生類の卵は、ゼリー層に藻類が共生することによって緑色に色づくことが知られている。この共生関係は、藻類と脊椎動物との共生において唯一、相利関係をもつ事例であると考えられている。北米に分布する両生類の研究では、卵のゼリー層に共生する藻類が、いずれも緑藻綱オオヒゲマワリ目 *Oophila* クレードに帰属するうえ、特定の両生類種の卵には特定のサブクレードの *Oophila* が共生するという1対1の共生関係が成立していることが報告されている (Kim et al. 2014)。日本固有種であるクロサンショウウオ (*Hynobius nigrescens*) においても、産卵直後には透明あるいは白濁した卵塊のゼリー層が、胚の発生が進み孵化する頃になると単細胞緑藻が共生して緑色になることが知られていた。そこでクロサンショウウオに共生する藻類を調べたところ、*Oophila* クレードに帰属する藻類であったものの、北米から報告されている系統とは異なる第5のサブクレードであった (Muto et al. 2017)。そのうえ直線距離で相互に100km以上離れた異なる3地域の5地点で採取した卵に共生する *Oophila* の18S rRNA 遺伝子配列は、全く同じであった。これらの結果は、*Oophila* と宿主両生類の共生関係には種特異性があるという北米の先行研究結果を支持した。一方で、両生類の卵塊に共生する藻類には、多様性があることもわかってきた。本稿では、クロサンショウウオに共生する単細胞緑藻に関する結果を中心に、両生類の卵に共生する藻類の不思議な関係とそこから巻き起こる疑問について述べる。

## 2. 両生類の卵と藻類の共生

サンショウウオやカエルに代表される両生類は、水中や湿潤な場所に卵を産む。卵は胚が何層かのゼリー層に包まれた構造をもち、複数の卵が卵嚢に包まれた状態で産卵されることもある。卵のゼリー層は繊維状の糖たんぱく質が密に網目状になった構造であり (Gilbert 1942; Humphries 1966; Shivers and James 1970; Bonnell and Chandler 1996) , ゼリー層の数は両生類種によって異なる。このゼリー層は、卵の物理的ダメージからの保護、乾燥の防止、懸濁物の混入防止、温度変化や紫外線照射などの環境ストレスからの保護、天敵や病原体からの防御、多精受精の防止などの役割を担っている (Marco and Blaustein 2000)。

北米大陸の東側に広く分布するキボシサンショウウオ (*Ambystoma maculatum*) でも、ゼリー層に藻類が共生することにより、卵塊が緑色になることが古くから報告されている (Orr 1888; Gilbert 1942, 1944) 。共生している藻類は、球状またはやや凹凸のある細胞外皮をもつ単一種の緑藻であり (Gilbert 1942, 1944) , 1909 年には卵塊に共生することを特徴とする緑藻の所属不明種として *Oophila amblystomatis* と命名されている (Wille 1909) 。

キボシサンショウウオと *Oophila* の共生は、相互依存的な相利関係にあると考えられている。*Oophila* が存在する卵塊において、光照射した卵塊から孵化した幼生は、暗所の卵塊や藻類のない卵塊の幼生よりも体長が大きく、孵化にかかる日数が短くなり孵化率も高くなることが報告されている (Gilbert 1942; Marco and Blaustein 2000) 。これは、*Oophila* の光合成によって、卵塊中の酸素濃度が増加するためであると考えられている (Hutchison and Hammen 1958; Small et al. 2014) 。一方、共生藻は、胚の発生にともなって排出される二酸化炭素とアンモニアを利用して急速に増殖することができる (Goff and Stein 1978; Small et al. 2014) 。ゼリー層は必ずしもガスや物質の交換速度が速くないため、両生類の胚にとっては、共生藻によって局所的に酸素が供給され (Bachmann et al. 1986; Pinder and Friet 1994) , 呼吸によって生成した二酸化炭素や代謝によって生成したアンモニアが効率的に除去されるメリットもあるとされている (Goff and Stein 1978) 。また、藻類が胚の周囲に共生することによって、胚が有害な紫外線から守られ、浅い場所での卵の発達を可能にしているメリットも示唆されている (Marco and Blaustein 2000) 。一方で、相利関係を表す明確なデータはないとする主張も散見される (Anderson 1971; Marco and Blaustein 2000) 。

両生類の卵塊に共生する藻類は、長い間、*Oophila amblystomatis* の1種のみであるとして捉えられてきた。2014 年に報告された北米大陸に生息する4種の両生類の卵塊に共生する藻類の広域的な調査結果によって、両生類の卵塊に共生する *Oophila* の遺伝的多様性が明らかになるとともに、共生両生類種と *Oophila* のサブクレードとの間に特異的な関係が存在することが見出されている (Kim et al. 2014) 。それによると、緑色に色づいた卵塊に共生する藻類はいずれも緑藻綱オオヒゲマワリ目内の *Oophila* クレードに帰属する単系統の藻類であった。*Oophila* クレードは、4つのサブクレード (I~IV) に分けられ、各サブクレードの藻類は特定の両生類種の卵塊に固有のものであった。サブクレード I, II, IV はそれぞれキボシサンショウウオ、ブラウンサラマンダー (*A. gracile*) , カナダアカガエル (*Lithobates sylvaticus*) の卵にのみ検出された。サブクレード III は、他のサブクレードとは異なり、キボシサンショウウオとアカアシガエル (*L. aurora*) の卵の両方に検出された。これらに基づ

き、Kim ら (2014) は、両生類卵に含まれる共生藻はすべて *Oophila* クレードに帰属する単細胞緑藻であり、両生類種とはサブクレードごとにほぼ 1 対 1 の共生関係にあると述べている。現在では、両生類の卵塊に共生する藻類として、オオヒゲマワリ目内の *Chlorococcum* 属の 1 種も見出されており、それらを *Chlorococcum amblystomatis* とすることが提案されている (Nema et al. 2019; Correia et al. 2020a, b)。また、我々も卵塊に共生する共生藻類として *Oophila* とは異なるオオヒゲマワリ目藻類や黄金色藻類を見出しており (未発表)、今後、両生類のゼリー層に共生する藻類の多様性は広がってゆくものと考えられる。

### 3. 日本固有種クロサンショウウオの卵塊に共生する藻類

サンショウウオ科の両生類は、日本で著しく多様化している生物群の一つである。このうちクロサンショウウオは、東北、関東北部、中部、北陸地方に分布する成体の全長が 13–16 cm 程度の小型サンショウウオで、海岸付近から高山帯に生息している日本固有種である (図 1)。春に池や沼などの止水環境で繁殖し、メスは 1 匹あたり 20–70 個ほどの卵を含む、紡錘型で透明または乳白色の卵囊を極浅い水中の枯れ枝などに産み付ける (図 2) (松木 2016)。クロサンショウウオの卵塊が、緑色に色づくことは古くから知られており、それが卵の中に単細胞の緑藻類が存在するためであることも報告されている (図 3)



図 1. クロサンショウウオ (成体)



図 2 クロサンショウウオの卵塊 (丹羽奎太氏撮影)

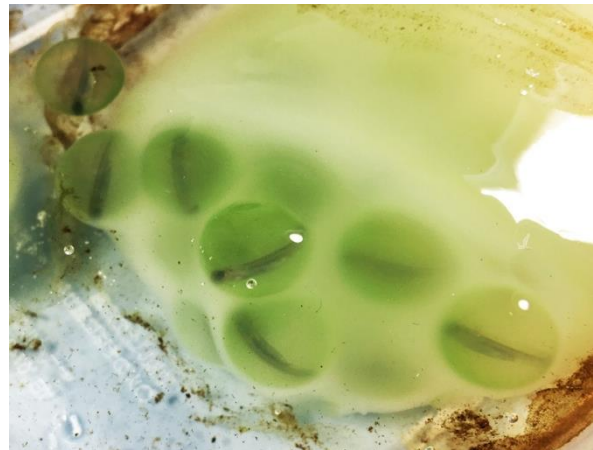


図 3 卵囊のなかの卵

(田子 1931; 佐藤 1943)。

我々は、クロサンショウウオの卵塊に共生する緑藻の実体を明らかにすることを目的に、共生緑藻の形態的特徴の観察および分子系統学的位置の解析を行った (Muto et al., 2017)。緑藻はゼリー層全体に分布し、特に卵黄膜の外側のゼリー層に最も高密度に存在していた (図 4)。ゼリー層に観察された藻類は、単細胞の緑藻ほぼ 1 種のみで、細胞は、球形ある

いは表面に脈絡状突起をもつ厚い細胞壁に包まれた、直径 4.0–6.3 μm の球形の不動細胞であった (図 5)。葉緑体はピレノイドを欠き、不規則な切れ込みのある杯状であった。これらの特徴は北米から報告された *Oophila* の特徴に一致した。直線距離で相互に 100km 以上離れた異なる 3 地域の 5 地点で採取した卵塊に共生する緑藻の 18S rRNA 遺伝子配列はすべて一致し、その配列は *Oophila* クレードに帰属したものの、北米から報告されている 4 つのサブクレードとは異なる第 5 のサブクレード (J1 クレードと命名) を形成した (図 6) (Muto et al. 2017)。つまり、日本固有種であるクロサンショウウオの卵塊に共生する *Oophila* は、クロサンショウウオの卵塊にのみ検出される J1 クレードの *Oophila* で、クロサンショウウオと *Oophila* との間に 1 対 1 の共生関係が成立していた。この結果は、共生緑藻と宿主両生類の共生関係に種特異性があるという北米の先行研究結果を支持するものであった。

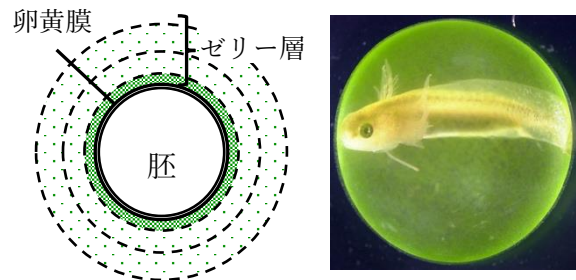


図4 クロサンショウウオの卵の模式図 (左)と卵黄膜の外側に存在する藻類(右)

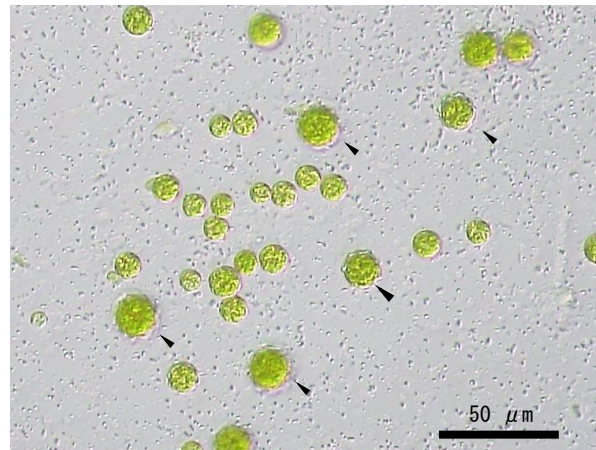


図5 ゼリー層の藻類

矢じりは表面に脈絡状突起をもつ厚い細胞壁をもつ細胞を示す。

#### 4. 両生類の卵と共生藻の不思議な関係とさまざまな疑問

さて、この共生関係にはさまざまな疑問が生ずる。まず、*Oophila* はどこから来て両生類の卵塊に共生するのか、という疑問である。*Oophila* 細胞の由来については、キボシサンショウウオの研究から 2 つの説が提案されている。一つは、産卵後に、水中に存在する *Oophila* が卵塊に侵入するという考え方である (Gilbert, 1942)。この考え方は、サンショウウオの卵塊に緑藻が共生することが研究された当初からの考え方である。サンショウウオが産卵する止水環境に *Oophila* が存在することは、PCR 法による本藻由来 DNA の検出によって明らかにされており、産卵場所には *Oophila* が定常的に生育している可能性が示唆されている (Lin and Bishop 2015)。サンショウウオの産卵行動につ

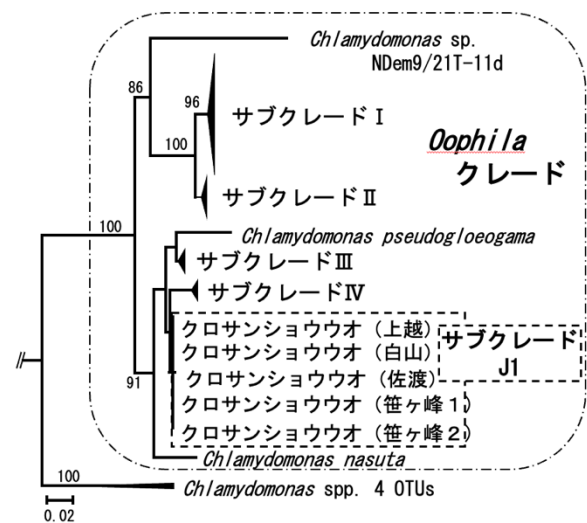


図6 クロサンショウウオに共生する緑藻の分子系統位置 (18S rRNA 遺伝子)

いては、まだ未解明な部分が多いものの、サンショウウオが特定の止水環境において産卵する傾向も、藻類との共生と関係しているかもしれない。一方で、サンショウウオの体内や細胞内に *Oophila* が侵入していることが観察されている。そのため、近年、メスのサンショウウオの体内に *Oophila* が共生しており、産卵時に卵に受け継がれるという考え方が提案されている (Kerney et al. 2011, 2019)。しかし、全ての個体に *Oophila* が保持されているかどうか不明であること、緑色に色づかない卵塊も存在すること、他種での研究が進んでおらず一般化できるか疑問であることなど、まだまだ未解明な部分が多い。そのうえ、サンショウウオと *Oophila* の共生成立の過程は、種ごとに異なる可能性も考えられる。たとえば、体内に *Oophila* が検出されたキボシサンショウウオの卵塊では、発生が進むなかで卵黄膜 (vitelline membrane) の内側 (ヒトの羊水にあたる液体部分) にまで *Oophila* が侵入することが知られているものの (Kerney 2011; Kerney et al. 2011)、クロサンショウウオでは、卵黄膜の内側に侵入した *Oophila* は観察されていない。また、この疑問と関連して、1対1の共生関係はどのように成立したか、も大きな疑問の1つである。メスの体内に共生するという考え方であれば、地域的隔離によって宿主(サンショウウオ)の種分化とともに、*Oophila* のサブクレードが分かれた理由も理解しやすい。しかし、*Oophila* はサンショウウオと絶対共生しているわけではなく、自由生活が可能であり、他のサンショウウオと接触することも可能であることから、他種のサンショウウオやカエルから分離された *Oophila* を別の種の卵塊に共生可能かどうか等の研究が必要になってくる。異なる共生関係のサンショウウオと *Oophila* とを共培養した実験では、卵塊への共生藻の侵入度合いがそれぞれ異なり、相互に種特異性を認識する仕組みが備わっている可能性が示唆されている (Kerney et al. 2019)。

同様に、環境中に生育する *Oophila* が卵塊に侵入するという考え方にも多くの難解な問題がある。すなわち、水中に存在する多様な藻類のなかで、なぜ、特定のクレードの *Oophila* だけが特定の両生類の卵塊に侵入および生育が可能なのか、である。その理解には、藻類側の能力と卵塊側の工夫の両方に関する検討が必要になる。藻類側の能力としては、特定の両生類の卵が産み落とされたことを感知し、そこに泳いでゆく能力 (走化性) と、ゼリー層のなかに侵入し、かつゼリー層のなかにおいて胚に近づく能力が不可欠である。一方、卵塊側の工夫には、他の藻類の侵入を排除し特定のクレードの藻類を受け入れる仕組みを作らなければならない。あるいは上記以外に、産卵時期の産卵場所の環境が *Oophila* を選択している可能性も否定できない。我々の初歩的な実験では、クロサンショウウオから分離した *Oophila* には、クロサンショウウオの卵塊に向かって泳ぐ傾向がみられている。しかし、それが天然環境中で同様に機能するものかどうかを含め再検討を要する。

藻類学として不思議なことは、クロサンショウウオのゼリー層内で *Oophila* どのように増殖しているのか見当がつかないことである。キボシサンショウウオでは、卵黄膜の内側およびゼリー層に、しずく型の遊走細胞が観察されていることから、*Oophila* には *Chlamydomonas/Chlorococcum* 型の通常の生活環が回っているものと考えられる。しかし、クロサンショウウオでは、ゼリー層内に観察される *Oophila* が、すべて球形の不動細胞であり (図5)、遊走細胞が観察されることはほぼ無い。また、球形細胞の多くは脈絡状突起をもつ厚い細胞壁に包まれている。この細胞壁の構造は *Chlamydomonas* 等の接合子におい

てよく知られている細胞壁構造と良く似ており、これらが接合子である可能性もある。さらに、活発に生育しているのであれば、遊走子形成あるいは不動胞子形成をした細胞が見つかるはずであるが、球形の不動細胞には胞子形成をしている細胞が見つからない。これらの観察結果からは、クロサンショウウオの卵塊のゼリー層内で *Oophila* が活発に生育しているとは思えない。この理由の1つとしては、我々が観察した卵塊がすでに緑色になっている卵塊であり、遊走細胞が存在するステージを過ぎ、すべて不動細胞になっている状況を観察していた可能性と、*Oophila* にわれわれの知らない特異な生活環がある可能性などが考えられる。上述の *Oophila* 細胞の由来とともに、ゼリー層内での *Oophila* の増殖方法を解明するためには、産卵直後の卵塊を天然の環境に触れないまま採取し、*Oophila* の増殖の有無、増殖方法等を詳細に解析する必要があると考えられる。

両生類と *Oophila* の共生において、ゼリー層内の *Oophila* が幼生の孵化後にどうなるのか、についても興味深い。クロサンショウウオの卵塊では、*Oophila* が、ゼリー層から飛び出し自由生活になることができることは明らかである。それは、*Oophila* 細胞を含むゼリー層を培養液中にいれ光照射下においておくと *Oophila* の遊走細胞が増殖してくることからわかる。しかし、孵化後しばらくは、ゼリー層から抜け出し自由生活する細胞が観察されないことから、ゼリー層から抜け出し遊走細胞が出現するまでにはある程度の時間がかかる。それでは、産卵場所に、孵化後の緑色のゼリー層の塊が水中に漂っているかというところでもなさそうである（そのことに着目した観察結果はない）。1つの可能性として、孵化した幼生に *Oophila* がゼリー層ごと食べられている可能性がある。それは、これまでの卵塊の収集の過程において幾度か見られた現象から推定できる。緑色に色づいた卵塊を採取し、小さな容器に入れて研究室に運ぶ過程で一気に孵化が進んでしまい、ゼリー層が殆ど見当たらないサンプルがあった。このとき、比較的多い糞が存在していた。このサンプルでは、孵化した幼生がゼリー層ごと *Oophila* を食べた可能性が極めて高い。もし仮に、ゼリー層に *Oophila* を共生させることが、孵化直後の幼生の初期の餌として利用させるクロサンショウウオの戦略であったとすれば、極めて興味深い。ただし、クロサンショウウオによる輸送中のゼリー層の捕食は容器の中に閉じ込められたことによるアーティファクトである可能性もある。さらに、捕食されることが *Oophila* の拡散戦略である可能性もある。ゼリー層に存在する *Oophila* 細胞は、表面に脈絡状突起をもつ厚い細胞壁をもつことが多い。この細胞はオオヒゲマワリ目藻類などに見られる接合子の表面構造と良く似ている。このような厚い細胞壁をもつ細胞は、クロサンショウウオの幼生に捕食されても消化されないかもしれない。その結果、生きて細胞のまま糞に混ざって排出され、広く拡散される可能性があり、それが *Oophila* がゼリー層に共生するメリットである可能性も否定できない。これらの孵化後のゼリー層のなかの *Oophila* の行方を明らかにするには、やはり産卵現場におけるゼリー層の消失過程の観察や幼生の糞の収集・観察が必要であろう。

他の日本固有種両生類の卵塊には藻類が共生するのか、共生するとしたらどのような藻類が共生しているのか、これらも非常に興味深い疑問である。サンショウウオ科の両生類は、日本で著しく多様化している生物群の一つであり、世界で 86 種が知られているうち、日本には 42 種（約 49%）が生息している（Frost, 2021）。本研究では、クロサンショウウ

オについて紹介したが、他種の両生類では、上記とは必ずしも一致しない結果が得られている。特に、日本固有のカエル類の卵塊に共生する藻類の多様性についても研究を始めているが、それらの結果も必ずしもキボシサンショウウオやクロサンショウウオの事例とは一致していない（未発表）。これまでの我々の初歩的な研究結果で明らかなのは、両生類の卵のゼリー層が微細藻類の新たなニッチの1つであり、両生類の卵塊と微細藻類の間には想像を遙かに超えたさまざまな共生関係が存在する可能性が極めて高いことである。

## 5. おわりに

既知の共生関係と比較すると、両生類と藻類の共生関係は極めて特殊である。既知の共生関係の多くでは、宿主生物の1世代における比較的長い間、宿主と藻類との共生関係が維持される。それに対して、両生類と藻類の共生関係では、住処となるゼリー層に藻類が出会えるチャンスは1年に1度である。そのうえ、孵化するまでの極めて短い期間だけの相利的な共生関係のように見える。それにもかかわらず、藻類との宿主とは密接な共進化関係を成立させている。今のところ、卵塊が存在しない季節における *Oophila* の生態に関する詳しい報告は見られないが、*Oophila* が自らの生活環のなかで両生類の卵のゼリー層という極めて特殊なニッチをどのように利用しているのか、また、それが *Oophila* の生残戦略として有効に働いているのか非常に興味深い。同時に、両生類が卵の発生期という重要な時期に、藻類の力を借りながら孵化の時間と効率を高め、かつ、藻類との密接な共進化関係を成立させた進化的仕組みも興味深い。両生類の卵塊に共生する藻類の多様性のみならず、相互に利用し合う関係の成立過程やその仕組みなど、両生類と藻類の共生関係には興味が尽きない。

## 謝辞

クロサンショウウオの卵塊の採集にあたっては、松木崇司氏に大変お世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Anderson JD. (1971) The egg–alga relationship in *Ambystoma tigrinum*. Herpetol Rev 3: 76.
- Bonnell BS, Chandler DE. (1996) Egg jelly layers of *Xenopus laevis* are unique in ultrastructure and sugar distribution. Mol Reprod Dev: Incorporating Gamete Research 44: 212–220. doi: 10.1002/(sici)1098-2795(199606)44:2<212::aid-mrd10>3.0.co;2-4
- Bachmann MD, Carlton RG, Burkholder JM, Wetzel, RG. (1986) Symbiosis between salamander eggs and green algae: microelectrode measurements inside eggs demonstrate effect of photosynthesis on oxygen concentration. Can J Zool 64: 1586–1588. doi: 10.1139/z86-239
- Correia N, Pereira H, Silva JT, Santos T, Soares M, Sousa CB, Schüle LM, Costa M, Varela J, Pereira L, Silva J. (2020a). Isolation, identification and biotechnological applications of a novel, robust, free-living *Chlorococcum* (*Oophila*) *amblystomatis* strain isolated from a local pond. Applied Sciences 10(3040): 1–14. doi: 10.3390/app10093040

- Correia N, Varela J, Pereira L. (2020b) *Chlorococcum amblystomatis* (F.D.Lambert ex Wille) N.Correia, J.Varela & Leonel Pereira, comb. nov. (Chlorococcaceae). Notulae algarum No. 138 (ISSN 2009-8987).
- Frost, DR. (2021) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (20 December 2021 accessed). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi: doi.org/10.5531/db.vz.0001
- Gilbert PW. (1942) Observations on the eggs of *Ambystoma maculatum* with especial reference to the green algae found within the egg envelopes. Ecology 23: 215–227.
- Gilbert PW. (1944) The alga-egg relationship in *Ambystoma maculatum*: a case of symbiosis. Ecology 25: 366–369.
- Goff LJ, Stein JR. (1978) Ammonia: basis for algal symbiosis in salamander egg masses. Life Sci 22: 1463–1468.
- Humphries Jr AA. (1966). Observations on the deposition, structure, and cytochemistry of the jelly envelopes of the egg of the newt, *Triturus viridescens*. Dev Biol 13: 214–230.
- Hutchison VH, Hammen CS.(1958) Oxygen utilization in the symbiosis of embryos of the salamander, *Ambystoma maculatum* and the alga, *Oophila amblystomatis*. Biol Bull 115: 483–489.
- Kerney R. (2011) Symbioses between salamander embryos and green algae. Symbiosis 54: 107–119.
- Kerney R, Kim E, Hangarter RP, Heiss AA, Bishop CD, Hall BK. (2011) Intracellular invasion of green algae in a salamander host. Proc Natl Acad Sci USA 108: 6497–6502.
- Kerney R., Leavitt J., Hill E., Zhang H., Kim E., Burns J. (2019). Co-cultures of *Oophila amblystomatis* between *Ambystoma maculatum* and *Ambystoma gracile* hosts show host-symbiont fidelity. Symbiosis 78: 73–85. doi:10.1007/s13199-018-00591-2
- Kim E, Lin Y, Blumberg L, Bishop CD. (2014) Phylogenetic analysis of algal symbionts associated with four North American amphibian egg masses. PLoS ONE 9: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0108915
- Lin Y, Bishop CD. (2015) Identification of free-living *Oophila amblystomatis* (Chlorophyceae) from yellow spotted salamander and wood frog breeding habitat. Phycologia 54: 183–191. doi: 10.2216/14-076.1
- Marco A, Blaustein AR. (2000) Symbiosis with green algae affects survival and growth of northwestern salamander embryos. J Herpetol 34: 617–621. doi:10.2307/1565283
- 松木崇司 (2016) 白山のサンショウウオ.はくさん 43(3): 9-14.石川県白山自然保護センター
- Muto K, Nishikawa K, Kamikawa R, Miyashita H. (2017) Symbiotic green algae in eggs of *Hynobius nigrescens*, an amphibian endemic to Japan. Phycol Res 65: 171–174. doi:10.1111/pre.12173



- Nema M, Hanson ML, Müller KM. (2019) Phylogeny of the egg-loving green alga *Oophila amblystomatis* (Chlamydomonadales) and its response to the herbicides atrazine and 2,4-D. *Symbiosis* 81: 187–199. doi:10.1007/S13199-018-0564-1
- Orr H. (1888) Memoirs: Note on the development of amphibians, chiefly concerning the central nervous system; with additional observations on the hypophysis, mouth, and the appendages and skeleton of the head. *J Cell Sci* s2-29(115): 295–324.
- Pinder A, Friet S. (1994) Oxygen transport in egg masses of the amphibians *Rana sylvatica* and *Ambystoma maculatum*: convection, diffusion and oxygen production by algae. *J Exp Biol* 197: 17–30.
- 佐藤井岐雄 (1943) 日本産有尾類総説. 日本出版社
- Shivers CA, James JM. (1970) Morphology and histochemistry of the oviduct and egg-jelly layers in the frog, *Rana pipiens*. *Anat Rec* 166: 541–555.
- Small DP, Bennett RS, Bishop CD. (2014) The roles of oxygen and ammonia in the symbiotic relationship between the spotted salamander *Ambystoma maculatum* and the green alga *Oophila amblystomatis* during embryonic development. *Symbiosis* 64(1): 1–10. doi: 10.1007/s13199-014-0297-8
- 田子勝彌 (1931) 『蝾螈と山椒魚』 芸艸堂
- Wille N. (1909). Conjugatae und Chlorophyceae. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien Nachträge zum I. Teil, Abteilung 2 über die Jahre 1890 bis 1910. (Engler, A. & Prantl, K. Eds), 1–96. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.