

大悟法 滋*： ヤマハナワラビの配偶体に内生する菌類**

Sigeru DAIGOBO*： Endophytic fungi in the gametophyte
of *Botrychium multifidum*

ハナワラビ属 (*Botrychium*) シダの配偶体に内生菌が存在することは、Hoffmeister (1855), Jeffrey (1897), Bruchmann (1906) らの報告によって古くから知られている。Jeffrey (1897) はナツノハナワラビ (*B. virginianum*) の内生菌について、*Pythium* と *Completozia* の中間的な形態を示す菌であると報告し、Campbell (1911) はハナワラビ属を含むハナヤスリ科の配偶体の内生菌について、ツユカビ目 (Peronosporales) を推定した。その後、西田 (1956) もナツノハナワラビとオオハナワラビ (*B. japonicum*) の内生菌がツユカビ目の菌であることを報告し、Burgeff (1938) の *Thamniscophagie mycorrhiza* type であり、Kelley (1950) の *Vesicular arbuscular mycorrhiza* type にあたると述べている。一方、Bass-Becking (1921) は数種のハナワラビ属の配偶体の観察から、その内生菌がリュウビンタイ科シダの内生菌として West (1917) によって報告されたケカビ目 (Mucorales) の *Stygesporium marattiacearum* によく似た菌であると報告している。また、Campbell (1907) のハナヤスリ科での観察、Bruchmann (1910) らのヒカゲノカズラ科シダでの研究により、このような配偶体内の菌が、孢子発芽後の 3~6 細胞期頃に外部より侵入し、菌糸の侵入がない配偶体は生長が止まってしまうことが知られており、Whittier (1972), Gifford & Brandon (1978) のハナワラビ属配偶体の無菌培養の結果、通常の培地にショ糖を加えると内生菌の存在なしに配偶体が生長することが明らかにされている。

しかしながら、このハナワラビ属シダの配偶体の内生菌についての詳細な研究はまだ少なく、報告の多くは配偶体内における菌の分布状態や形態の断片的な記載であり、菌の分離や接種試験などの報告はまだない。また、こうした内生菌の観察の多くは、成熟後の比較的古い配偶体についてなされており、それぞれの配偶体内の菌糸は同一種の菌として記載される例が多いが、Campbell (1908) がハナヤスリ属 (*Ophioglossum*) 配偶体の仮根内部の菌糸の観察から示唆しているように、特に古い配偶体については 2 次的に外部より菌が侵入することを考慮し、2 種以上の菌が内生する可能性も検討する必要があると思われる。

前報 (大悟法 1979) において、ハナワラビ属 ヤマハナワラビ (*B. multifidum*) の配

* 筑波大学 生物科学系, Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki 305.

** 筑波大学 菅平高原実験センター研究業績 69 号.

偶体について報告し、その内生菌の分布状態について述べたが、本研究ではその内生菌の形態を配偶体の発達過程を追って観察し、合わせて菌の分離実験を試みた。

材料と方法 配偶体内の菌糸の形態観察には、前報の配偶体の内部形態観察用に作成したパラフィン切片法によるヘマトキシリンとファストグリーン染色したプレパラートを主として用いた。他に、材料をグルタルアルデヒド固定し、Epon 812 を用いてエポキシ樹脂包埋法による顕微鏡切片を作製し、トルイジンブルー染色したものや、特に比較的大形の配偶体については徒手切片法による生材料の観察も行った。内生菌の分離・培養は、発達段階の異なる配偶体を8個体選らび、その表面を昇こう水で殺菌し、滅菌蒸留水で洗滌後それぞれ適当な大きさに切り、トウモロコシ抽出液寒天培地上に置いて室温で培養し、出現した菌のコロニーの一部または菌糸を麦芽寒天培地に移植した。分離された菌はコロニーの色や形、菌糸の形態などで識別した。

観察結果 生殖器官形成前の長さ 0.2-0.5 mm ほどの若い配偶体には、生長点の周辺を除くほぼ全域の細胞内に、Fig. 2-1 のような菌糸がみられる。この菌糸は無色でファストグリーンで緑色に染まり、多くは塊状になって存在するが、しばしば糸状になり、不規則にからみあって伸長する。細胞壁は薄く、太さ約 1-2 μm で隔壁は認められない。この菌糸は配偶体のどの発達段階においても常に存在するが、配偶体細胞が古くなるとそのほとんどが塊状となり (Fig. 1a)、やがて菌糸としての形態をほとんど示さなくなる傾向がある。

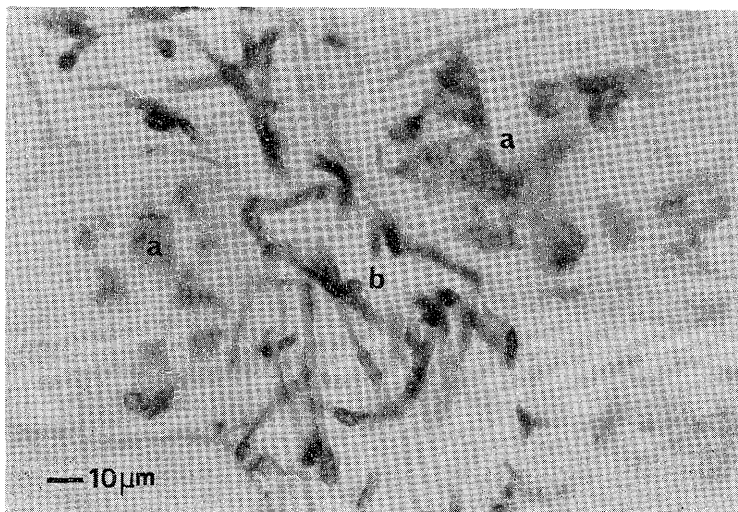


Fig. 1. Mycelia in a mature gametophyte. a. Primary endophyte. b. Secondary infector.

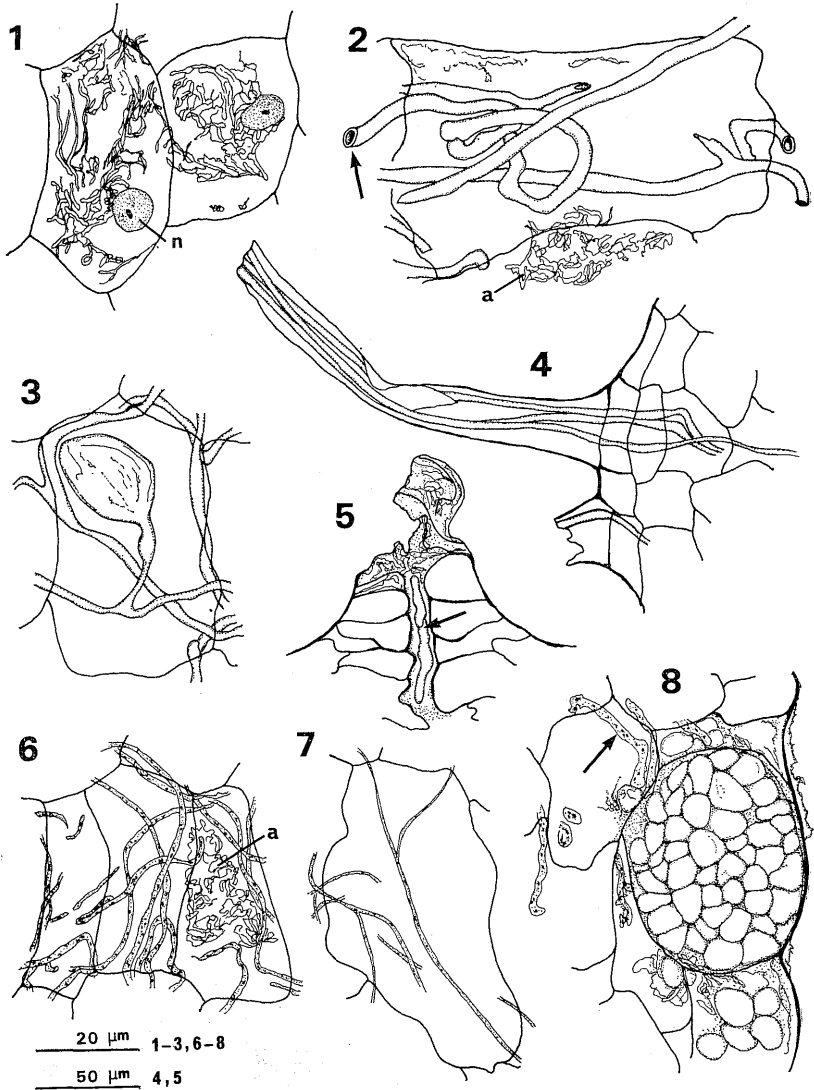


Fig. 2. 1. Hyphae in a young gametophyte. n. Nucleus of a gametophyte cell. 2. Hyphae in a mature gametophyte. a. Primary endophyte. 3. Vesicle. 4. Hyphae in a broken rhizoid of the gametophyte. 5. Hypha in an old archegonium (arrow). 6, 7. Hyphae in an old gametophyte. a. Primary endophyte. 8. Microsclerotia-like cells and adhering hyphae (arrow).

造精器が形成される段階の長さ 0.5-3 mm くらいのやや若い配偶体には、しばしば上述の菌糸の他に Fig. 1b, Fig. 2-2 のような菌糸が観察される。この菌糸は造卵器を形成した長さ 3 mm 以上の成熟した配偶体ではほとんどの個体に存在し、胞子体が形成され配偶体が古くなるにつれて、その生長が盛んになるようにみえる。褐色の菌糸でヘマトキシリンにより青紫色に染まり、太さ約 3-4 μm で Fig. 2-2 の断面 (矢印) に示されるように細胞壁が厚く、まれに隔壁状の構造がみられる。しばしば分枝し、また、ゆるくからみ合って球状になるものも多く、分枝した菌糸の先端に Fig. 2-3 のようなう状体を形成する。このう状体は古い配偶体で数多く形成され多くは卵形で厚い細胞壁をもつが、球状のものや形のゆがんだもの、細胞壁の薄いものなどもみられ、大きさも約 15-30 μm で幅がある。この菌糸は Fig. 2-4 のように古い仮根から侵入しているのがしばしば観察され、まれに Fig. 2-5 (矢印) のように古い造卵器や配偶体の表皮から直接侵入したようすも見られる。

長さ 3 mm 以上の成熟した配偶体では、Fig. 2-6 のような菌糸も数多く観察される。この菌糸は淡い褐色で細胞壁は薄く、太さは 2 μm 前後でヘマトキシリンで淡紫色に染まり、内部に顆粒状のものが目立つ。

また、比較的発達した胞子体をつけた長さ 8 mm 前後の配偶体の表面に近い部分には、Fig. 2-7 のような太さ 1 μm 以下の細い菌糸が見られることがある。この菌糸はまばらに分枝し、内部に顆粒状のものが散在する。同じような大形の古い配偶体には、Fig. 2-8 のような小菌核状のものもまれに見られる。この菌は配偶体の表皮細胞中のみ存在し、多くはその周辺に矢印で示すような菌糸が観察されるが、両者の関係は明らかではない。

配偶体内からの菌の分離培養の結果を Tab. 1 に示した。配偶体番号は実験に用いた各個体の相対的な発達段階を表わし、1~3はそれぞれ 1 mm, 1.5 mm, 3 mm の造精器をつけた比較的若い配偶体であり、4~7はそれぞれ 4 mm, 5 mm, 8 mm, 10 mm の成熟した配偶体で、若い胞子体が形成されている。8はよく発達した胞子体をつけ、すでに形がくずれかかった配偶体である。なお、菌の種類についての数値は菌出現切片数を示す。

長さ 3 mm 以下の造精器形成段階の配偶体からは菌を分離できなかったが、4 mm 以上の造卵器形成後の配偶体からはいくつかの菌が分離された。Tab. 1 に示した菌 A~F はいずれも褐色の不稔菌糸で、未同定とした菌は無色の不完全菌であるが、菌糸の形態とコロニーの状態から一応の識別をした。No. 8 の形がくずれかかった配偶体からは、2種の土壌菌が分離された。

考察 配偶体の発達段階を追ってその内生菌の形態を観察した結果、配偶体の初期段階から内生する菌の他に、成熟後の配偶体には2次的に侵入したいくつかの菌が見られた。配偶体の初期段階から内生する無色塊状の菌糸は、Bruchmann (1906), Campbell

(1922)らのハナワラビ属配偶体の報告の中によく似た図や記載があり、Campbell(1907)のハナヤスリ属の配偶体のごく初期に侵入しつつある菌糸とも類似している。また、この菌糸の内在する細胞の核は Fig. 2-1, n のように正常な形態を示すことから、この菌が配偶体細胞に障害を与えてはいないことが推定される。

成熟後の配偶体内にみられる太い褐色の菌糸も、Jeffrey(1897)、Campbell(1921)らの報告にみられる菌糸とよく似ており、特にそのう状体の形成が注目されている。西田(1956)はナツノハナワラビの配偶体についての報告で、この菌糸と上述の無色塊状の菌糸とよく似た菌について記載し、両者が同一の菌であり、塊状の菌糸体が枝状体菌糸の消化残渣であると報告している。しかしながら、少くともヤマハナワラビでの観察によれば、菌糸の色、形、染色性、出現の時期、菌糸間の不連続性などから、配偶体の初期段階からみられる無色塊状の菌糸とこの太い褐色の菌糸とは別の菌であり、前者が真の内生菌と呼べるものであり、後者は明らかに2次的に侵入した菌である。このような2次的な菌の侵入は、特に成熟後の配偶体でよく見られ、大形の古い配偶体ではしばしばその内部に数種の菌が観察されており、菌の分離実験の結果もこのことを裏づけている。

今回の菌の分離実験では、造精器形成期までの配偶体からは菌が分離できなかった。このことは配偶体初期からの真の内生菌の寄主依存性が高いことを暗示する。成熟後の孢子体をつけた配偶体からはいくつかの菌が分離され、形態観察との正確な対比や菌の同定は行われてはいないが、古い配偶体ほど多くの菌が内在する傾向が認められた。

Tab. 1. Fungi isolated from *Botrychium multifidum* gametophyte.

Gametophyte No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Number of sections	4	5	3	5	7	12	16	6
Number of sections from which fungi were isolated	0	0	0	4	7	6	5	6
Sterile mycelium A				4	7			
B						5		
C						1		
D							3	
E							1	
F							1	
Unidentified							1	
<i>Fusarium</i> sp.								5
<i>Gliocladium roseum</i>								3

以上の結果は、ハナワラビ属配偶体の内生菌をさらに詳細に研究するためには、これまでの研究の多くが対象としてきた成熟後の配偶体では、2次的な菌の侵入についてよく検討する必要があることを示唆している。今後は菌の分離方法の検討を含めて、若い配偶体を対象とした観察、実験によって内生菌の種類、菌と配偶体の相互関係などを明らかにしていく必要があると思われる。

この報告をまとめるにあたり、筑波大学生物科学系椿啓介教授には有益な助言をいただいた。また、筑波大学菅平高原実験センターの徳増征二博士には材料の採集、菌の分離培養などで多くの助力をいただいた。ここに心からの謝意を表する。

Summary

Endophytic fungi in the gametophyte of *Botrychium multifidum* were morphologically studied. In young stages of the gametophyte, colorless mycelia were observed in the form of a tangled mass. The hyphae of the massive mycelium were 1-2 μm thick, sometimes elongated and formed irregular aseptate branches. In the mature gametophyte, brown thick-walled hyphae were observed along with the primary endophytes. The hyphae were 3-4 μm thick, branched frequently and bore spherical or ovoid vesicles 15-30 μm at the tips.

Several investigators have observed similar endophytic fungi in *Botrychium* gametophytes and pointed out the vesicle as an important characteristic. In *B. multifidum*, however, the brown vesicle-tipped hypha is evidently a different fungus from the primary infector observed in the young gametophyte stages. In most cases, these hyphae probably enter through the broken rhizoids of the gametophyte.

Several additional fungi were often observed in the older stages of the gametophyte. They seem to be carried by the secondary infection. The idea that these fungi are indeed secondary infections is supported by the fact that only isolates from mature gametophytes could be successfully cultured.

References

- Bass-Becking, L. G. M. 1921. The origin of the vascular structure in the genus *Botrychium* with notes on the general anatomy. Rec. Trav. Bot. Néerl. 18: 333-372. Bruchmann, H. 1906. Über das Prothallium und die Sporenpflanze von *Botrychium lunaria* Sw. Flora 96: 203-230. — 1910. Die Keimung

der Sporen und die Entwicklung der Prothallien von *Lycopodium clavatum* L., *L. annotinum* L. und *L. selago* L. Flora 101: 220-267. Burgeff, H. 1938. Mycorrhiza. In Manual of pteridology. Martinus Nijhoff, The Hague: 159-191. Campbell, D.H. 1907. Studies on the Ophioglossaceae. Amales Jardin Bot. Buitenz. 6: 138-194. — 1908. Symbiosis in fern prothallia. Amer. Natur. 42: 154-165. — 1911. Eusporangiatae. Carnegie Inst., New York: 21-22. — 1921. The gametophyte and embryo of *Botrychium obliquum* Muhl. Ann. Bot. 35: 141-158. — 1922. The gametophyte and embryo of *Botrychium simplex* Hitch. Ann. Bot. 36: 441-455. Daigobo, S. 1979. Observations on the gametophytes of *Botrychium multifidum* from nature. Journ. Jap. Bot. 54: 169-177. Gifford, E.M. & Brandon, D.D. 1978. Gametophytes of *Botrychium multifidum* as grown in axenic culture. Amer. Fern. J. 68: 71-75. Hoffmeister, W. 1855. Keimung des *Botrychium lunaria* Sw. Bonplandia 24: 331-335. Jeffrey, E.C. 1897. The gametophyte of *Botrychium virginianum*. Trans. Canadian Inst. 5: 265-294. Kelley, A.P. 1950. Mycotrophy in plants. Chr. Bot. Comp. Nishida, M. 1956. The gametophyte of *Botrychium virginianum* Sw. and its endogenous fungus. Phytomorph. 6: 67-73. Whittier, D.P. 1972. Gametophytes of *Botrychium dissectum* as grown in sterile culture. Bot. Gaz. 133: 336-339. West, C. 1917. On *Stigeosporium marattiaceanum* and mycorrhizae of the Marattiaceae. Ann. Bot. 31: 77-99.

○*Pedicularis corymbosa* Prain の学名訂正 (山崎 敬) Takasi YAMAZAKI:
Correction on the Latin name of *Pedicularis corymbosa* Prain

本巻15頁に発表した *Pedicularis corymbosa* の学名の改訂は *P. evrardii* Bonati が使われるべきであったのに、うっかりして不必要な新名を作ったので以下のように訂正する。

Pedicularis evrardii Bonati in Bull. Sco. Bot. Genève. ser. II, 15: 113 (1924).

Pedicularis shanensis Yamazaki var. *evrardii* (Bonati) Yamazaki in Journ. Jap. Bot. 58: 15 (1983), nom. superfl.

var. *shanensis* Yamazaki, nom. nov.

Pedicularis corymbosa Prain in Journ. As. Soc. Bengar. 58: 277 (1889), non Pallas 1823—*Pedicularis shanensis* Yamazaki in Journ. Jap. Bot. 58: 15 (1983), nom. superfl. (東京大学 理学部附属植物園)