

シナノショウキランの人工増殖と新種共生菌について

*¹津田その子 ¹守谷栄樹 ²原田幸雄 ²富田正徳
¹中部電力(株)エネルギー応用研究所(名古屋市緑区大高町字北関山 20-1)
²弘前大学農学生命科学部(青森県弘前市文京町 3)

ARTIFICIAL PROPAGATION AND THE NEW SYMBIOTIC MYCORRHIZA OF *YOANIA FLAVA*, A TERRESTRIAL SAPROPHYTIC ORCHID, CENTRAL JAPAN

*¹Tsuda, S., ¹Moriya, H., ²Tomita, M., and ²Harada, Y.
¹ Energy Application R&D Center, Chubu Electric Power Co., Inc, Nagoya, Aichi
²Faculty of Agri. and Life Sci., Hirosaki Univ., Hirosaki, Aomori

Summary

Yuania flava just was stated in 2002 May in new species, a terrestrial saprophytic orchid from Southern Nagano, Central Japan. Although there has been confirmed two species of genus *Yuania* in Japan, facing the crisis of extinction, artificial propagation was impossible so far. We have tried the protection of *Yuania flava* from 2000, the artificial multiplication and transplantation to their habitat become possible.

We succeeded to raise the rate of fruition by artificial pollination, do the sterile germination on the artificial culture medium, and make it grow to a rhizome. We succeeded also in an isolation of an endophyte, and checked that it was the new species, which is not known as symbiotic fungus until now. In the symbiotic germination, 76% of seeds, which cannot germinate under the sterile condition were germinating and growing to rhizome. Rhizome also showed 7 times as growth as nonsymbiotic propagation two months after. Burring rhizome to their habitat, nonsymbiotic rhizome had disappeared 130 days after, but symbiotic rhizome has survived 490 days after and furthermore grew.

緒言

シナノショウキラン(*Yuania flava*)は長野県南部に生息する腐生ランで、2002年5月に新種として記載されたばかりである(Inoue & Yukawa 2002)。日本にはこれまで、ショウキラン(*Y. japonica*)とキバナショウキラン(*Y. amagiensis*)の2種のショウキラン属が確認されていたが、人工増殖は成功しておらず、いずれも絶滅の危機に瀕している。シナノショウキランについても詳細な生態は不明であったが、筆者らは、1999年から中部電力管内に生育している絶滅危惧種であるシナノショウキランの保護に取り組み、*in vitro*での無菌発芽・無菌増殖に成功した。このランは葉緑素を持たないため屋外での生育には共生菌が不可欠であるが、共生菌の分離にも成功し、共生培養によって発芽率および生育速度が大幅に向上するとともに、生息地への戻し導入移植が可能になったので報告する。

材料および方法

生態調査と試料採取

シナノショウキランの生育地は、長野県南部にあり、筆者らは1999年から群落保護を目的に生態調査を開始した。開花・結実期以外は地上に現れないため、毎年5月末から8月にかけて生育地に入り、環境条件として気温、湿度、地温、土壌、生態として各年の群落場所と数およびその推移、着花数、結実数を調査した。

2001年からは結実率向上のため人工授粉を試みた。人工増殖のための試料として、花茎、さく果、および地下茎を採取した。採取数は、群落への影響を考慮し最小限とした。

無菌発芽と無菌増殖

採取したさく果は表面殺菌したのち半分は割り、中の種子を掻き出して、植物用無菌栄養培地に置床し、培地の種類、超音波処理の有無、明暗条件などを変え、発芽状況を観察した。発芽後プロトコム状あるいはリゾームへと成長した段階で、数種の増殖用培地へ移植し、定期的な重量測定、写真撮影などを行い経過を観察した。

共生菌の単離

共生菌の単離のため、自生の植物組織内から採る方法、土壌から採る方法、種子を埋め感染させた菌をプロトコムから採る方法を試した。

採取した植物体(根茎部)の一部は、表面を殺菌して固定し、顕微鏡下で組織内の共生菌の観察を行った。共生菌の存在が確認できた根茎の残り半分を5mm厚の切片にして菌栄養培地に置床し、発生してくる菌を順に拾って培養した。

現地土壌は希釈法により菌栄養培地に塗布し、発生する菌を拾った。

種子は不織布にはさんでマウントで固定し、群落確認場所に埋めた。50日後に種子の肥大や発芽を確認し、一部を持ち帰って培地上に播種し菌の発生を待った。他の種子は現地に残し、さらに130日後、490日後にも調査を行った。

培養した菌と無菌の培養リゾームを一晩共存させたのち、2週間後に切片を観察して、組織内への菌の侵入の有無を確認した。さらに、その組織から菌を再単離し、再感染させた組織の成長記録から共生関係のある菌を選抜した。

共生培養

無菌発芽試験で発芽しなかった種子を使って



写真1 シナノショウキラン

共生発芽試験を実施した。継代していた無菌発芽用培地の影響を除くため、種子を糖抜き培地で1ヶ月順化した。二分シャーレの一方に菌の栄養培地を入れて菌を繁殖させ、もう一方には水寒天を入れ、菌糸が侵入したのち水寒天上に播種し、発芽率を調査した。対照区は無菌で水寒天の上に播種した。また、これまでの知見で種子は無菌でも発芽できるため、無菌発芽用培地を改変して菌と種子を共存させながら培養し、発芽率を調査した。種子は熟度による共生効果を把握するため、受粉から採取までの期間別に3種類に分け、発芽数を計測した。対照区は無菌で通常の発芽用培地とした。

続いて共生菌がリゾームの成長に与える効果を確認した。共生発芽と同様、無菌増殖用培地から糖を抜いた培地で1ヶ月順化したリゾームを用い、二分シャーレの一方に菌栄養培地を入れて菌を繁殖させ、もう一方の水寒天上にリゾームを置床した。対照区は無菌の水寒天上に置床し重量の変化を計測した。

戻し導入移植

人工増殖したリゾームを生育場所に戻し、定着可能であるかを確認した。無菌リゾームおよび共生菌に感染させたリゾームを試料採取した群落確認場所に埋め戻し、50日後、130日後、490日後に掘り返して、リゾームの成長を調査した。

結果

生態調査と試料採取

1)生育環境 シナノショウキランの生育場所はヒノキ植林された山林の川筋にそった照葉樹林帯にあり、キリシマミズキ、サワグルミなどの樹木、スゲ類、シダ類が主に生育している。近くにはギンリョウソウの群落もある。

開花・結実期にあたる7～8月の気温は12～26で名古屋と比較して平均10ほど低く、地

温は10cm深さで17～18、40cm深さで15～17であった。湿度は66～99%と非常に高く、照度610～43,700lx、光子量11～658(μmol/m²s)と直射の届かない場所にあった。生育土壌の表層は腐植が多く、その下は粘土質と大量の礫で埋まっている状態であった。

2)生態 シナノショウキランの花はクリーム色でキバナノショウキランと間違えやすいが、花型からはむしろショウキランに近いといえる。地下茎もキバナノショウキランと異なり、珊瑚状の固まりは見られず横に長く這うとされている(Inoue & Yukawa 2002)。筆者らの観察でも土壌中の礫の間を縫うようにして地表に到達している地下茎がみられたが、途中で切れてしまい、さらに奥はどのようになっているのか確認できなかった。

開花は6月上旬から中旬で、蕾をもった花茎が地表に現れると数日で開花し、一週間ほどの中には褐変して終わる。調査を開始した1999年には9箇所に計40花序が出現し、1花序あたり1～6花をつけ、花の総数は100以上みられた。群落の場所は毎年変わることが多く、花数もその後減少傾向で2002年には9花しか観察できなかった。

受精した場合には、直後から花弁の褐変が始まり、やがて花の基部が膨らみ始めた。開花3週間後には大きなさく果となり、その後1ヶ月の間に熟すが、多くはこの過程で虫に食害を受けることが多く、自然状態での着果数は1999年度に6個、2000年には0であった(表1)。

表1 シナノショウキラン開花調査

年度	群落数	花序数	花茎数	花数	着果数
1999	9	40	1～6	100<	6
2000	3	15	1～4	33	0
2001	5	20	1～3	53	4
2002	5	5	1～3	10	1

3)試料採取 人工増殖試験の材料として、花序、地下茎、さく果を採取した。

花序は茎頂培養に使えるものを花数の多い群落から1～2本採取した。

地下茎は、同じく規模の大きい群落で礫を取り除きながら掘り進み、30cm程度のものを採取した。

さく果の採取のためには、自然状態での結実率が不安定であることから2001年から人工授粉を実施した。自然状態での結実率は2001年も0であったが、人工授粉した4花のうち、他家受粉した1花はさく果の成熟が悪かったが、自家受粉した3花は正常に結実した。2002年には花数が非常に

少なかったが、人工授粉により1花が結実した。さく果の採取は1999年に半分の3果、2001年には無菌発芽の目途がたったことから、結実した3果すべてを採取した。

無菌発芽と無菌増殖

1)無菌発芽 採取時期により熟度の異なる種子を用いて発芽試験を行った。シナノショウキランの種子は熟度が進むと種子表面の筋模様は濃くはっきりしてくる。さく果には虫喰いなど痛みが多く、さく果を表面殺菌しても培養中にコンタミネーションが多く発生した。コンタミネーションを起こした種子は、いったん培地から取り出して再度滅菌すると、再び発芽試験に用いることができた。

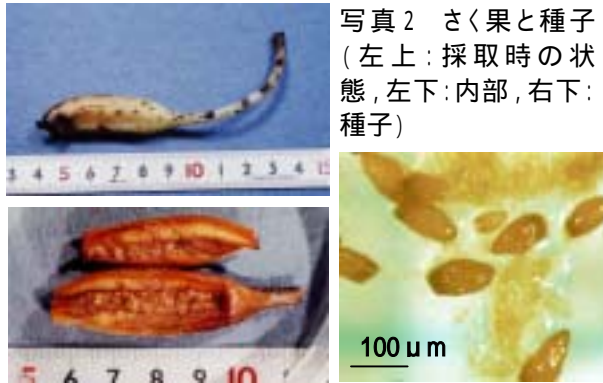


写真2 さく果と種子 (左上:採取時の状態, 左下:内部, 右下:種子)

置床後2~3ヶ月たつと、一部の種子からプロトコム状に白く膨らんだ組織ができ、これを発芽とした。種子の熟度によって発芽率に差があるほか、発芽のタイミングはまばらであった。また、培地により、発芽率の違いのほか、発芽後順調に肥大・成育するものと、発芽はするもののその後の肥大や生育がみられないものがあった。

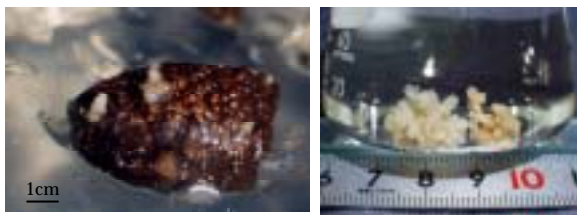


写真3 発芽と発達したプロトコム

2)無菌増殖 培地組成の違いは、その後の成長や形態にも影響を与えており、プロトコムが集まったような形態のまま増殖するものや、リゾーム状に長く伸び、リゾイドを形成するものに分かれた。リゾームとしても、細く枝分かれの多いタイプ、太く発達するタイプの培地があり、大量増殖段階と肥育段階で培地を使い分けができる。また、培地上で細く枝分かれしているリゾームでも、枝数が増えて塊状になると、1~

2本のリゾームだけが太く発達して伸びてくることがあった。

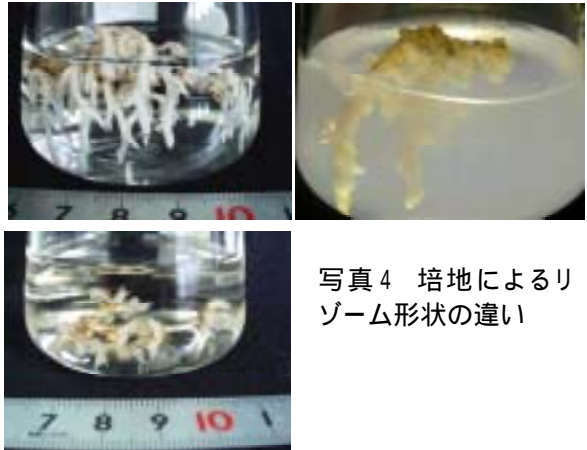


写真4 培地によるリゾーム形状の違い

共生菌の単離

自生地の土壌および埋土種子からは、菌を採取することはできなかった。しかし、採取した根茎の切片では、細胞中に共生菌の存在を確認ことができ、共生菌とみられる菌糸の塊が、表皮から数細胞内側の形成層付近の細胞内にみられた。

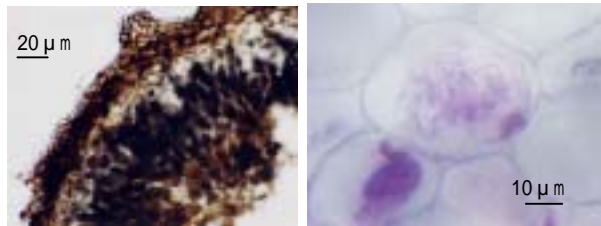


写真5 リゾーム内の菌糸

培地上に置床した切片から、3種類の菌を分離することができた。このほか腐性ランの共生菌で知られるナラタケ菌5系統およびナラタケモドキ菌1系統を取り寄せ、計9系統の菌について共生するか確認を行ったところ、地下茎から分離した1種類の菌のみが細胞内に侵入することを確認した。ナラタケ菌およびナラタケモドキ菌では細胞内への菌糸の侵入はみられなかった。

この菌を再分離し、再感染することを確認した。さらに感染リゾームは二分シャーレの水寒天上でも伸張を続けていたことから、共生関係が成り立っていると判断した。

この菌は既知のラン菌に似たものがなく、分生子の形が *Spinurosopora pucciniiphila* (Deighton 1973) に近いことがわかったため、SLF菌株 (*Spinurosopora* - like fungus) と呼ぶことにした (写真6)。

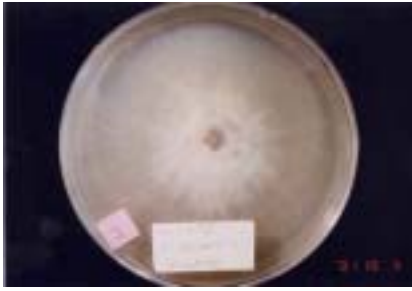


写真6 分離した共生菌 SLF 菌株

共生培養

共生関係が樹立している状態では、対照区ではまったく発芽しない状態の種子が、約 1.5 ヶ月後から次々と発芽するようになり、3 ヶ月後には 8 割近くが発芽するものもあった（写真 7）。種子の状態により発芽率は異なり、共生させるには熟度が関係していることが明らかになった。



写真7 共生発芽処理 3 ヶ月後 (左: 無菌発芽 右: 共生発芽)

リゾームの共生内容では、菌の栄養素となる成分の違いがリゾームの成長率に大きな影響を与えた。現状で最も最適と思われる培地では、2 ヶ月後に無菌培養の最大 7 倍の増加を示したが、その他の培地では無菌のリゾームでの最適培地と同等の成長しかしなかった。

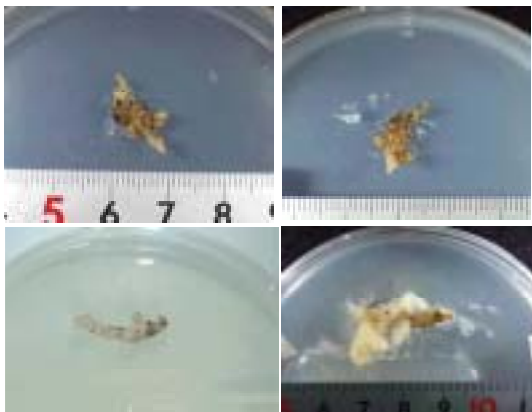


写真8 上段: 未感染リゾーム, 下段: 共生培養リゾーム (ともに左: 開始時, 右: 130 日後)

戻し導入移植

埋め戻し 50 日後には、無菌のまま埋め戻した

リゾームはすべて消滅しており、一方、共生菌に感染させておいたリゾームはすべて生き残っていた。130 日後には、感染リゾームの重量は、現地で簡易に洗浄し測った限りあまり変化は見られなかったが、外観上は引き締まった感じであった。

埋め戻し 490 日後になると、一部のリゾームを残し消滅しているものが多かった。しかし、生き残っていたリゾームは明らかに成長しており、現地で菌とともに定着している様子であった(写真 9)。

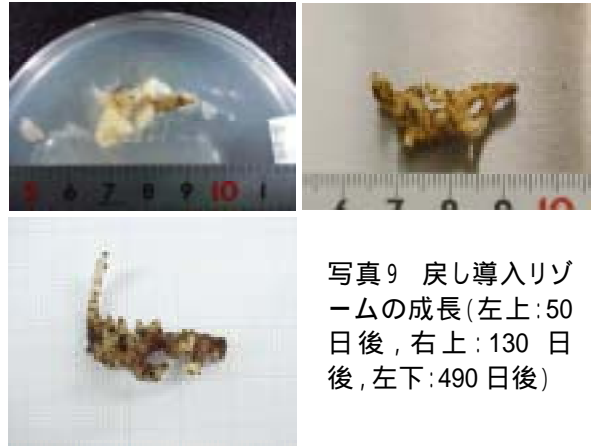


写真9 戻し導入リゾームの成長 (左上: 50 日後, 右上: 130 日後, 左下: 490 日後)

考察

ショウキラン属はこれまでほとんど研究例がなく、シナノショウキランの保護策を確立するために、人工授粉、無菌培養、共生菌の探索、共生培養、戻し導入移植に取り組んできた。

4 年間の生態調査では、毎年同じ場所に発生することはまれで、特に大きな群落は翌年同じ場所に出ることはなかった。このため、土壌から現れるタイミングを観察したり、開花初期から虫害防除を施したりすることがほとんどできなかった。また、自然状態でいかに種子がつかないか、ついても成熟まで達するものが非常に少なく、保護、増殖の難しい植物であることを実感した。

人工授粉は、初年度に失敗したが、翌年からは正しい手法を学び適期に受粉をすれば成功するようになった。これまでの供試数からは自家受粉と他家受粉のどちらが適当であるかは明言できないが、人工授粉の有効性は示されたと考えている。

共生菌が明らかになる前は、人工栄養培地による無菌発芽と無菌増殖に取り組んだ。完全に滅菌できていれば 2 ヶ月後から発芽は可能であったが、種子の熟度によるほか、発芽数がまばらで 1cm のプロトコーム状に成長するまでに 1 年程度かかるなど、成長は緩慢であった。その後、発芽困難なランに使われる数種の培地を用いることにより、組成が明らかで生育の早い人工栄養培地を見つけ

ることができた。培養中には様々な形態の地下茎ができ、増殖に適した培地、肥大成長に適した培地についての知見も得ることができ、*in Vitro*での開花につながる太くがっしりしたリゾームになる条件も明らかになった。また、培養中に、キバナショウキランの地下茎のような細く枝分かれし小型の塊のようになったリゾームから、シナノショウキランの特徴とされるような長く太いリゾームへと形態が変化したことは非常に興味深く、シナノショウキランの地下茎も大元ではキバナノショウキランのような形態を呈しているのではないかと推測している。

菌を扱うのは初めてであったが、幸運にも共生菌を分離することができた。この菌との共存培養によって、発芽率や生長率が上がり、増殖効率を向上させることが可能になった。また、共存培養での培地組成や、無菌人工栄養培養での添加物をさらに詳細に詰めていけば、菌がシナノショウキランに供給している物質を知ることができるのではないかと考えている。

ところで、この菌は既知のラン菌に似たものがなく、分生子の形が非常に特徴的で、これまでの同定結果からは、新種であることがわかっている。また、日本では近い属が無く、*Spinurosopora pucciniiphila* (Deighton 1973) に近いと思われるため、SLF 菌株 (*Spinurosopora* - like fungus) と呼んでいる。現在同定中であり、属が決定すれば新種として記載する予定で、ラン菌研究の新たな知見になればと思う。

戻し導入では、群落確認場所の朽ちた樹木に接するように埋め戻しを行ったが、490 日後に定着していたのはわずかだった。今後、SLF 菌株の栄養要求性が明確になれば、戻し導入箇所も絞ることができ、生残率を上げることができるのではないかと期待している。また、本稿には記載していないが、ショウキランから分離した菌株がシナノショウキランと共生関係を樹立することも確認しており、共生菌の選択性がショウキラン属全体へと広がれば、すべてのショウキラン属の保護が可能になるのではないだろうか。

中部電力では、管内の稀少種、絶滅危惧種の保護策に取り組んでいる。絶滅に近づいている生物の環境は様々な要因で常に崖っぷちにあり、これらを保護してゆくには、植物体だけでなく、共生菌を始め土壌微生物やその他の環境条件などに包括的に取り組むことが必要である。シナノショウキランの保護研究は H15 年度で終了となるが、本発表を通じて中部電力の環境への取組みを知っていただくとともに、本研究の成果が、ショウキランを始めとする腐性ランや、その他ラン科植物の保護に携わる研究者のお役にたてば幸いである。

謝辞

本研究は、多くの方々からご指導、ご助言により推進することができました。愛知教育大学 市橋教授、鹿児島大学 馬田教授、ショウキランからの分離菌を分譲くださった千葉大学 谷亀氏に感謝しお礼申し上げます。そして、シナノショウキランの記載者でありショウキランの同定にご協力いただいた信州大学 故井上健教授のご冥福をお祈りいたします。

引用文献

- Inoue, K. & Yukawa, T. 2002. A New Species of *Yoania* (Orchidaceae) from Southern Nagano, Central Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 53(2) : 107-114
- Deighton, F.C. 1973. *Sclerographiopsis* and *Spinulospora*, two new monotypic hyphomycetous genera from sterra leone. *Transaction British Mycological Society* 61:195-196
- 寺下隆喜代 巨大な菌根. 1987. 寒蘭. 土佐愛蘭会 70 : 87-89