

皇居で採取されたホシゴケ目地衣類に共生する スミレモ類の単離培養による形態観察

半田 信司^{1*}・アンドレアス フリッシュ²・大村 嘉人²

¹広島県環境保健協会 〒730–8631 広島市中区広瀬北町9–1

*E-mail: shinji.handa@kanhokyo.or.jp

²国立科学博物館植物研究部 〒305–0005 茨城県つくば市天久保4–1–1

Morphology of Trentepohlialean Photobionts Isolated from Arthoniales of the Imperial Palace Grounds, Tokyo, Japan

Shinji Handa^{1*}, Andreas Frisch² and Yoshihito Ohmura²

¹Hiroshima Environment and Health Association,

9–1 Hirosekita-machi, Naka-ku, Hiroshima 730–8631, Japan

*E-mail: shinji.handa@kanhokyo.or.jp

²Department of Botany, National Museum of Nature and Science,
4–1–1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305–0005, Japan

Abstract. The photobionts of trentepohlioid lichens in Arthoniales (4 genera, 6 species) were isolated from 9 specimens collected in the Imperial Palace Grounds, Tokyo, Japan. Results of morphological investigations on the obtained algal cultures confirm the identity of the photobiont in the samples of *Arthonia pertabescens*, *Arthonia* sp. and *Opegrapha* sp. with *Printzina lagenifera* that is generally known as polyphyletic. By the contrast, the photobionts of *Dendrographa decolorans*, *Enterographa anguinella*, *E. hutchinsiae* were identified as *Phycopeltis* cf. *umbrina* or *Phycopeltis* sp.

Key words: *Arthonia*, *Dendrographa*, *Enterographa*, *Opegrapha*, *Phycopeltis umbrina*, *Printzina lagenifera*.

は じ め に

スミレモ類（スミレモ科 Trentepohliaceae, アオサ藻綱 Ulvophyceae）を共生藻に持つ地衣類は、全体の2～3割ともいわれている (Ahmadjian, 1993; Nelsen *et al.*, 2011). これは、少なくとも見積もっても、地衣類の約4,000種がスミレモ類と共生していることになる。Nelsen *et al.* (2011)によれば、スミレモ類共生の地衣類のうち、ホシゴケ目 Arthoniales の約1,500種は、ピンタケ目 Ostropales の約1,700種に次いで多いものである。しかし、ホシゴケ目に共生するスミレモ類を単離培養して同定した報告は非常に少ない (Tschermaek-Woess, 1988). 本研究では、皇居内から採取されたホシゴケ目地衣類

の共生藻を単離培養し、形態観察によって分類学的な検討を行った。4属6種のホシゴケ目地衣類から異なる形態的特徴を持つ3つのタイプの共生藻を同定したので報告する。

材料および方法

共生藻単離用の地衣類試料は、2013年3月7日に皇居内より採取された4属6種のホシゴケ目地衣類を用いた。地衣類種名および標本番号は Ohmura *et al.* (2014) で示したものに一致している。用いた地衣類の証拠標本は、すべて国立科学博物館植物標本庫 (TNS) に保管してある。

共生するスミレモ類の単離株は、地衣体の断片

をBBM (Bischoff and Bold, 1963) 寒天平板上で $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 12時間/12時間の明暗期条件下に置き, 共生状態から伸長してくる糸状体を実体顕微鏡下で直接ピックアップして得た. それらの単離株は, 引き続きBBM寒天平板上で培養し, 形態観察を行った.

結 果

単離を行った地衣類9試料について, その単離状況と培養株の形態をFigs. 1–9に示す. 図はそれぞれa: 地衣体の実体顕微鏡写真, b: 地衣体内での共生状態, c: 地衣体から共生藻が伸長している培養開始後1ヶ月前後の段階, d, e: 単離培養株の顕微鏡写真を示している.

観察の結果, *Arthonia pertabescens* Nyl., *Arthonia* sp. 1 (= *Inoderma nipponicum* ined.) および *Opegrapha* sp. 3の共生藻は, プリンツスミレモ *Printzina lagenifera* (Hildebrand) Thompson & Wujekの形態を示した. プリンツスミレモは分子系統解析によって多系統であることが知られているが(Rindi *et al.*, 2009; Nelsen *et al.*, 2011), 本研究で単離した株にも多様な形態が観察され, 多系統性を支持する観察結果が得られた. 一方, *Dendrographa decolorans* (Turner & Borrer) Ertz & Tehler, *Enterographa anguinella* (Nyl.) Redinger および *E. hutchinsiae* (Leight.) A. Massal. からは, *Phycopeltis* cf. *umbrina* (Kützinger) Thompson & Wujek または *Phycopeltis* sp. と同定される共生藻が確認された.

それぞれの単離培養株の特徴は以下のとおりである.

1. Handa-2540-a 株

単離元: *Arthonia* sp. 1 (= *Inoderma nipponicum* ined.), 標本番号: AF13/Jp1D2.

共生藻同定結果: *Printzina lagenifera*

[Fig. 1: a–e]

共生状態の細胞は楕円体で, 短径が $8\text{--}10 \mu\text{m}$, 長径が $10\text{--}15 \mu\text{m}$ である. 細胞は集合した藻体を形成しているが, 部分的に単独で見られることもある. ヘマトクローム色素はやや多く, 黄褐色に見える部分が目立つ. 培養によると直径 $4\text{--}7 \mu\text{m}$, 長さ $10\text{--}20 \mu\text{m}$ の樽型の細胞からなる糸状体が伸長し, 不規則な分枝も生じる. 単離した培養株は寒天培地上にまばらに分枝したラフな盤状のコロニーを形成する. 細胞は直径に変化はないが, 長さが

$20\text{--}40 \mu\text{m}$ と長くなり, ほとんど筒型になる部分も見られる. ヘマトクローム色素は, 糸状体の先端に微小なものが集合する場合があるが, 全体的に少ないため藻体はほぼ緑色に見える.

2. Handa-2542-a 株

単離元: *Arthonia* sp. 1 (= *Inoderma nipponicum* ined.), 標本番号: AF13/Jp10D3.

共生藻同定結果: *Printzina lagenifera*

[Fig. 2: a–e]

共生状態の細胞は楕円体で, 短径が $5\text{--}8 \mu\text{m}$, 長径が $8\text{--}15 \mu\text{m}$ である. 細胞は単独あるいは集合した藻体となり, 短い糸状体を形成している部分もある. ヘマトクローム色素はさほど多くなく, 茶緑色に見える. フラスコ型の胞子嚢の形成も確認されなかった. 培養による形態は2540-a株とほぼ同様であった.

3. Handa-2538-b 株

単離元: *Arthonia* sp. 1 (= *Inoderma nipponicum* ined.), 標本番号: AF13/Jp31D.

共生藻同定結果: *Printzina lagenifera*

[Fig. 3: a–e]

共生状態の細胞は球形から楕円体で, 短径 $6\text{--}8 \mu\text{m}$, 長径 $8\text{--}12 \mu\text{m}$. 集合した藻体を形成している部分が主体となる. ヘマトクローム色素はさほど多くなく, ほぼ緑色に見える. 培養による形態は前出の2株と同様で, フラスコ型の胞子嚢の形成も確認されなかった.

4. Handa-2541-a, b 株

単離元: *Opegrapha* sp. 3, 標本番号: AF13/Jp2D2.

共生藻同定結果: *Printzina lagenifera*

[Fig. 4: a–e]

共生状態の細胞は球形または楕円体で, 短径が $6\text{--}8 \mu\text{m}$, 長径が $8\text{--}10 \mu\text{m}$ とやや小型で, 細胞は密に集合している. ヘマトクローム色素は中程度で細胞は茶緑色であるが, 地衣体の色の影響もあり全体的には褐色に見える. 培養によると直径 $4\text{--}6 \mu\text{m}$, 長さ $10\text{--}15 \mu\text{m}$ の細長い樽型の細胞からなる糸状体が伸長し, 不規則に分枝する.

共生状態での細胞が小型で, 地衣体からの伸長期も小型の細胞からなる糸状体であったが, 単離培養株は *Arthonia* sp. 1 の共生株と同様の形質であった. また, 本株も胞子嚢形成を行わず, フラスコ型の胞子嚢を確認することができなかった.

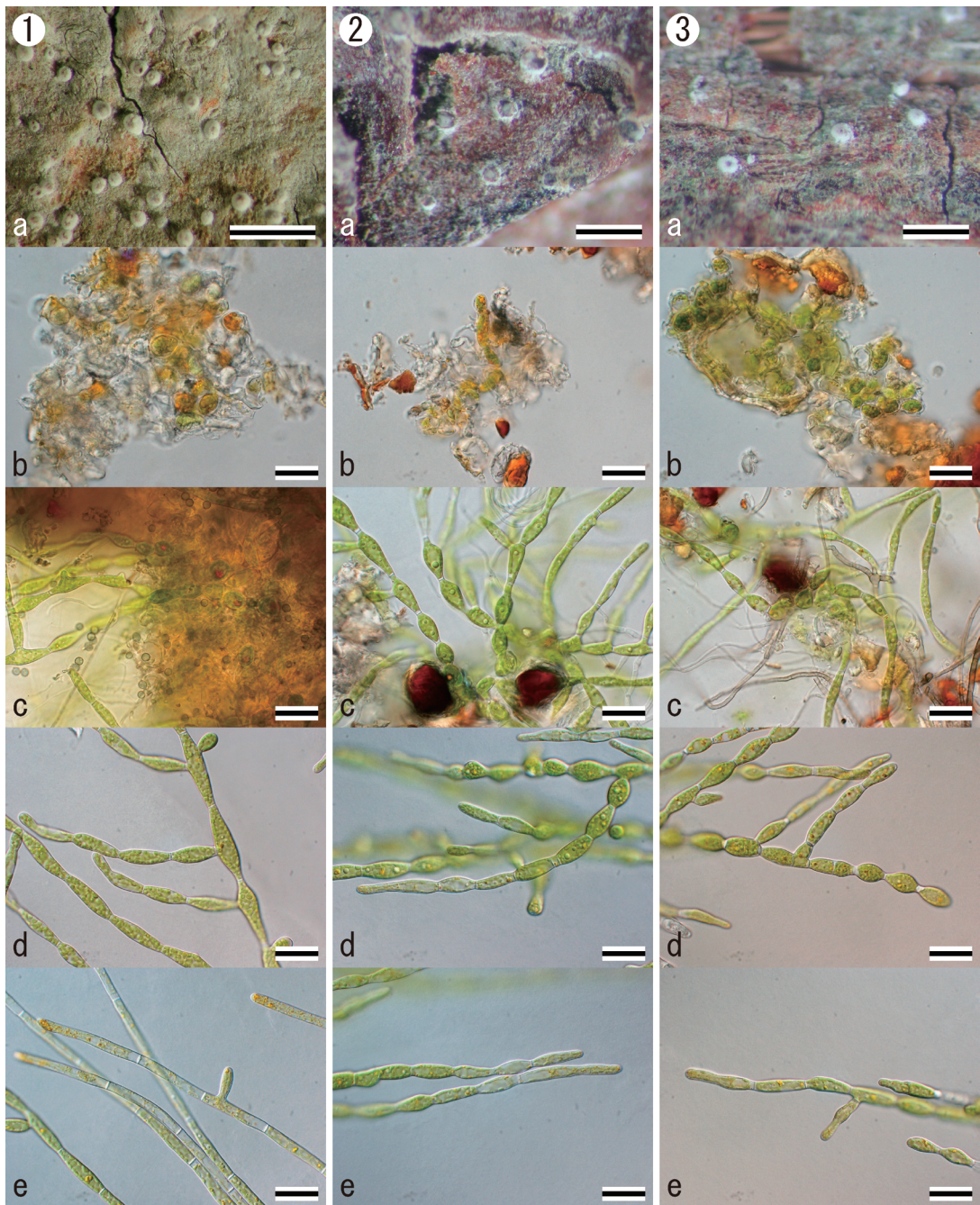


Fig. 1 (a-e). *Printzina lagenifera* (AF13/Jp1D2: *Arthonia* sp. 1). Fig. 2 (a-e). *P. lagenifera*. (AF13/Jp10D3: *Arthonia* sp. 1), Fig. 3 (a-e). *P. lagenifera*. (AF13/Jp31D: *Arthonia* sp. 1). a. Lichen thallus, b. Photobiont, c. Release of filaments of free-living state from symbiosis, d, e. Habit of a cultured specimen. Scale bars: 1 mm (1-a), 0.5 mm (2-a, 3-a), 20 μ m (others).

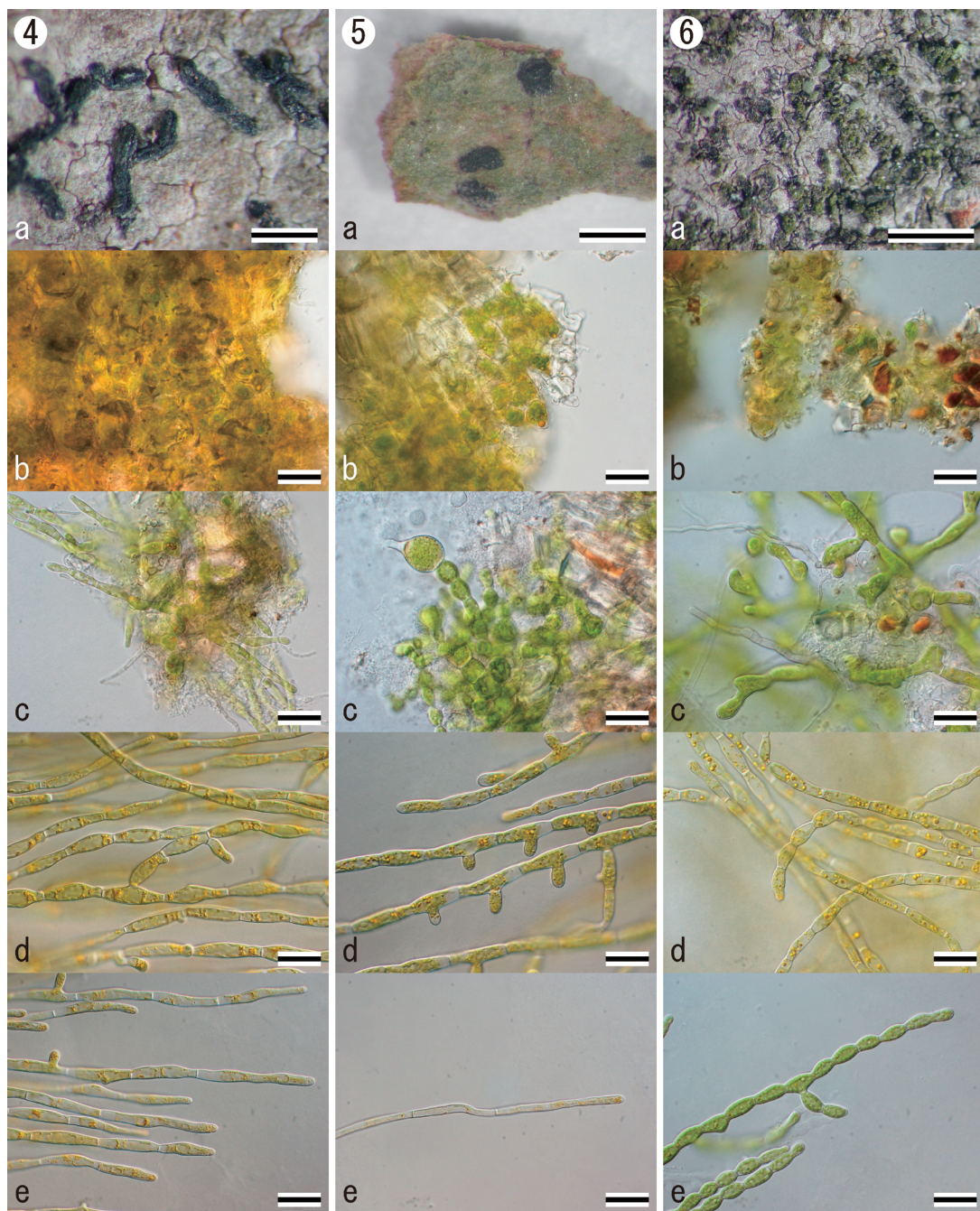


Fig. 4 (a-e). *Printzina lagenifera* (AF13/Jp2D2: *Opegrapha* sp. 3). Fig. 5 (a-e). *P. lagenifera* (AF13/Jp5D: *Arthonia pertabescens*). Fig. 6 (a-e). *P. lagenifera* (AF13/Jp23D: *Arthonia* cf. *pertabescens*). a. Lichen thallus, b. Photobiont, c. Release of filaments of free-living state from symbiosis, d, e. Habit of a cultured specimen. Scale bars: 1 mm (6-a), 0.5 mm (4-a, 5-a), 20 μm (others).

5. Handa-2536-a 株

単離元: *Arthonia pertabescens*, 標本番号: AF13/Jp5D.

共生藻同定結果: *Printzina lagenifera*

[Fig. 5: a-e]

共生状態の細胞は、短径6–10 μm 、長径10–15 μm の変形した楕円体で、短い糸状体あるいは盤状に集合した藻体を形成している。ヘマトクローム色素は比較的少なく、緑色の部分が目立つ。培養によると、細胞は直径6–10 μm の球形細胞から、直径6–8 μm 、長さ8–15 μm の樽型の細胞が伸長し、不規則に分枝した糸状体を形成する。単離した培養株は寒天培地上にまばらに分枝したラフな盤状のコロニーを形成する。細胞は直径に変化はないが、長さが20–30 μm と長くなり、ほとんど筒型になる部分も見られる。また、伸長が進むと、直径が3–4 μm で長さが50 μm を超える、非常に細長い細胞からなる糸状体となることもある (Fig. 5-e)。本株ではプリンツスミレモの特徴であるフラスコ型の孢子嚢 (Fig. 5-c) が確認されたが、非常に細長い細胞からなる糸状体の形質が独特であった。

6. Handa-2539-a 株

単離元: *Arthonia pertabescens*, 標本番号: AF13/Jp23D.

共生藻同定結果: *Printzina lagenifera*

[Fig. 6: a-e]

共生状態の細胞は、前サンプルと同様であるが、培養によると、細胞の形態が変化に富む糸状体が伸長してくるのが特異である。しかし、単離培養株では直径4–8 μm 、長さ8–20 μm の樽型または筒型プリンツスミレモの形態を示した。

7. Handa-2543-a 株

単離元: *Dendrographa decolorans*, 標本番号: AF13/Jp9D.

共生藻同定結果: *Phycopeltis* cf. *umbrina*

[Fig. 7: a-e]

共生状態の細胞は楕円体から球形で、大型のものは直径16 μm になる。細胞は集合した藻体を形成し、ヘマトクローム色素は中程度で、藻体は茶緑色である。培養によると直径6–10 μm 、長さ8–15 μm の短い樽型の細胞からなる分枝した糸状体が伸長する。単離培養株は分枝の多い糸状体 (Fig. 7-d) となり、寒天培地上で密に集合した盤状のコロニーを形成する。細胞内にはヘマトクロ

ム色素が充満し、藻体は茶褐色である。また、変形した大型の孢子嚢も観察され、2鞭毛の遊走細胞の放出を確認した。

糸状体が密に分枝した盤状の藻体を形成する特徴は、サビスミレモ *Phycopeltis umbrina* [= *Trentepohlia umbrina* (Kützinger) Bornet] に該当する。また、孢子嚢の形態も類似しており、サビスミレモと同種と思われるが、共生関係により分化した近縁種である可能性も考慮して *Phycopeltis* cf. *umbrina* とした。

8. Handa-2535A-a, -g 株

単離元: *Enterographa anguinella*, 標本番号: AF (13/Jp4D).

共生藻同定結果: *Phycopeltis* sp.

[Fig. 8: a-e]

共生状態の細胞は直径6–8 μm の球形から12 $\times$ 16 μm の大型の楕円体で、単独あるいは短い糸状体ややまばらに集合している。ヘマトクローム色素が多く、藻体は緑褐色である。培養によると細胞内のヘマトクローム色素は減少し、直径10–12 μm 、長さ12–16 μm の、短い樽型の細胞からなる分枝した糸状体が伸長する。培養株では糸状体の先端に形成される15 $\times$ 20 μm 程度の孢子嚢 (Fig. 8-d) や、糸状体の中間部などで放出孔が細長く伸びた孢子嚢 (Fig. 8-e) が観察された。寒天培地上のコロニーは密に集合した不規則な盤状で、生長が極めて遅い。本株もサビスミレモに類似した形態であるが、培養状態で良好な生長を行わない特性は地衣共生藻としての独自の形質である可能性もあり、自由生活性のスミレモ類に該当しない可能性を考慮して *Phycopeltis* sp. とした。

9. Handa-2537-a 株

単離元: *Enterographa hutchinsiae*, 標本番号: AF13/Jp19D.

共生藻同定結果: *Phycopeltis* sp.

[Fig. 9: a-e]

共生状態の細胞の形態は *E. anguinella* の共生藻と同様だが、本試料ではヘマトクローム色素は少なめで、藻体は茶緑色である。培養による形態も、寒天培地上のコロニーの形状が異なり、盛り上がったカルス状となる。しかし、生長が遅く、培養状態の形態や多様な形状の孢子嚢を形成する特徴 (Fig. 9-d) が、*E. anguinella* の共生藻と同様であることから *Phycopeltis* sp. とした。

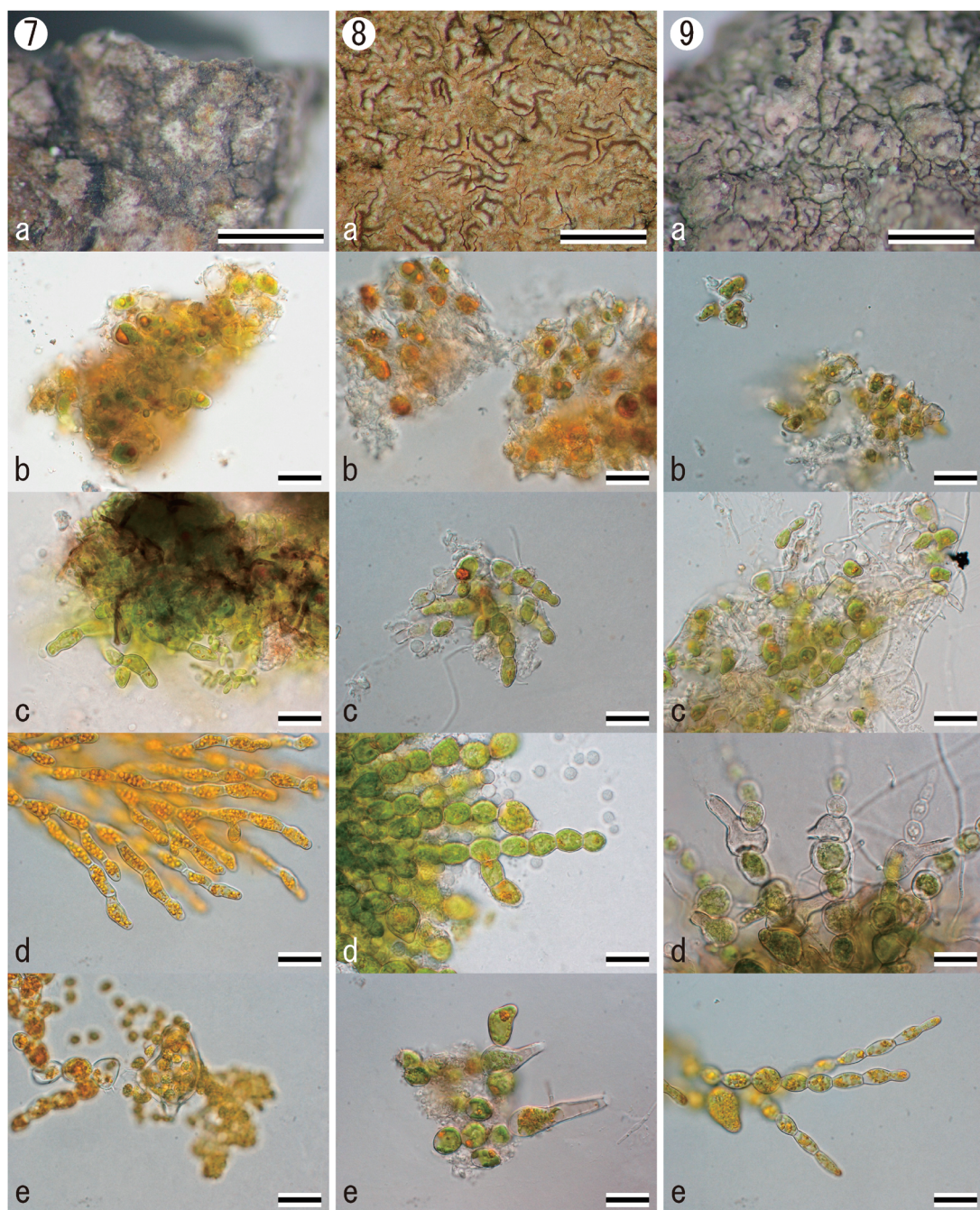


Fig. 7 (a–e). *Phycopeltis* cf. *umbrina* (AF13/Jp9D: *Dendrographa decolorans*). Fig. 8 (a–e). *Phycopeltis* sp. (AF13/Jp4D: *Enterographa anguinella*). Fig. 9 (a–e). *Phycopeltis* sp. (AF13/Jp19D: *Enterographa hutchinsiae*). a. Lichen thallus, b. Photobiont, c. Release of filaments of free-living state from symbiosis, d, e. Habit of a cultured specimen. Scale bars: 1 mm (a), 20 μm (b–e).

考 察

共生藻の分類学的研究が進んでいないホシゴケ目について、共生するスミレモ類を単離培養し、形態観察を行なった。その結果、*Arthonia pertabescens*, *Arthonia* sp. 1 および *Opegrapha* sp. 3 からはプリンツスミレモ *Printzina lagenifera* の形態を示す藻体を確認され、*Dendrographa decolorans*, *Enterographa anguinella* および *E. hutchinsiae* からは、*Phycopeltis* cf. *umbrina* または *Phycopeltis* sp. と同定される共生藻が確認された。それらの地衣類のうち、ホシゴケ属 *Arthonia* はホシゴケ科 *Arthoniaceae* に所属し、デンドログラファ属 *Dendrographa* およびクチナワゴケ属 *Enterographa* はリトマスゴケ科 *Roccellaceae* に所属する。キゴウゴケ属 *Opegrapha* の種についてはリトマスゴケ科またはキゴウゴケ科のいずれかに所属するとされるが (Ertz *et al.*, 2011), *Opegrapha* sp. 3 の所属については現段階では不明である。本研究では、同属内や近縁属間で共通の共生藻を持つ場合もあったが、菌類の高次分類群と対応する共生藻との関連については、さらにデータを蓄積した上で議論が必要である。

ホシゴケ属の共生藻は *Trentepohlia umbrina* であるという記述が見られるが (Gilbert, 2000), 共生状態の細胞が楕円体であることから、誤認されているものと思われる。キゴウゴケ属の共生藻についても、葉上生のものに *Phycopeltis* が見られるほかは *Trentepohlia* が主体となっているという、今回の結果とは異なる報告があるが (Ertz *et al.*, 2009), 培養により確かめられたものではないため確実とはいえない。

プリンツスミレモは、自由生活性の種として、日本でも陸上の多様な気生環境から報告されているほか、モジゴケ属 *Graphis* やサネゴケ属 *Pyrenula* などの共生藻としても知られている (Akiyama, 1964; Handa and Nakano, 1988; Nakano, 1988; Nakano *et al.*, 1991; Nakano and Ihda, 1996)。しかし、本種は近年の遺伝子による系統解析で多系統であることが判明している (Rindi *et al.*, 2009; Nelsen *et al.*, 2011)。本研究では、*Arthonia* sp. 1 の共生藻のように、地衣類が同種である場合には共生株は類似した形態であるが、異なる地衣類の種から得られた共生株では形態にも違いがみられることが確認され、プリンツスミレモの多系統性が地衣類の分化に対応している可能性が推察された。なお、*Arthonia* sp. 1 はホシゴケ属とは別属として扱われるべき種で

あり (= *Inoderma nipponicum* ined.), 狭義のホシゴケ属と本種の共生藻との関連についても詳しく調べていく必要がある。

近年、スミレモ類を共生藻に持つ地衣類の系統学的研究は、遺伝子レベルで進められており、菌類からのアプローチ (Ertz *et al.*, 2009; Nelsen *et al.*, 2009) がなされているほか、地衣類に共生するスミレモの系統を総括的に調べた報告もある (Nelsen *et al.*, 2011)。しかし、地衣類の共生藻の遺伝子解析は、地衣体から直接得たものであり、共生藻の形態による分類学的な検討は十分に行われていない。本研究では、単離培養株の形質を観察することで、自由生活性のスミレモ類との細胞や糸状体の形態の比較のみならず、地衣体内では形成されない孢子囊の観察も行った。以上のことから、スミレモ類の野生種と共生種との関係を探る上で、共生藻の単離培養の重要性が示唆された。今後は、単離培養株の遺伝子による系統解析を行うことで、系統的な研究も含めた検討を進める計画である。

謝 辞

皇居調査を実施するにあたり、宮内庁庭園課の松本英昭氏、矢藤光三氏には現地調査に関わるさまざまな面でご協力・ご支援を頂いた。記して感謝の意を表する。なお、本研究の一部はJSPS 科研費 2301706 および 24657042 の助成を受けたものである。

要 旨

皇居内のスミレモ類を共生藻に持つ地衣類4属6種(9株)について、共生藻を単離培養し、形態観察を行った。その結果、ホシゴケ属の *Arthonia pertabescens*, *Arthonia* sp., *Opegrapha* sp. の共生藻は、いずれもプリンツスミレモ *Printzina lagenifera* の形態を示した。プリンツスミレモは多系統群であることが知られているが、今回単離した株も形態的に多様であり、本種の多系統性が支持される結果となった。一方、*Dendrographa decolorans*, *Enterographa anguinella*, *E. hutchinsiae* からは、*Phycopeltis* cf. *umbrina* または *Phycopeltis* sp. と同定された共生藻が確認された。

引用文献

- Akiyama, M., 1964. Verzeichnis der Süßwasseralgen in San-in Region, Japan. *Bulletin of the Shimane University (Natural Science)*, **14**: 92–121.
- Ahmadjian, V., 1993. The Lichen Symbiosis. 250 pp. John Wiley, New York.
- Bischoff, H. W. and H. C. Bold, 1963. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Phycological studies* IV. Univ. Texas Public. No. 6318: 1–95.
- Ertz, D., J. Miadlikowska, F. Lutzoni, S. Dessein, O. Raspé, N. Vigneron, V. Hofstetter and P. Diederich, 2009. Towards a new classification of the Arthoniales (Ascomycota) based on a three-gene phylogeny focusing on the genus Opegrapha. *Mycological Research*, **113**: 141–152.
- Gilbert, O., 2000. Lichens. Collins New Naturalist series. 222 pp. Harper Collins, London.
- Handa, S. and T. Nakano, 1988. Some corticolous algae from Miyajima Island, western Japan. *Nova Hedwigia*, **46**: 165–186.
- Nakano, T., 1988. Phycobionts of some Japanese species of the Graphidaceae. *Lichenologist*, **20**: 353–360.
- Nakano, T., S. Handa and S. Takeshita, 1991. Some corticolous algae from the Taishaku-Kyo Gorge, western Japan. *Nova Hedwigia*, **52**: 427–451.
- Nakano, T. and T. Ihda, 1996. The identity of photobionts from the lichen *Pyrenula japonica*. *Lichenologist*, **28**: 437–442.
- Nelsen, M. P., R. Lücking, M. Grube, J. S. Mbatchou, L. Muggia, E. R. Plata and H. T. Lumbsch, 2009. Unraveling the phylogenetic relationships of lichenised fungi in Dothideomyceta. *Studies in Mycology*, **64**: 135–144.
- Nelsen, M. P., E. R. Plata, C. J. Andrew, R. Lücking and H. T. Lumbsch, 2011. Phylogenetic diversity of trentepohlialean algae associated with lichen-forming fungi. *Journal of Phycology*, **47**: 282–290.
- Ohmura, Y., G. Thor, A. Frisch, H. Kashiwadani and K. H. Moon, 2014. Increase of lichen diversity in the Imperial Palace Grounds, Tokyo, Japan. *Memoirs of the National Museum of Nature and Science*, (49) (in press).
- Rindi, F., D. W. Lam, and J. M. López-Bautista, 2009. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**: 329–339.
- Tschermak-Woess, E., 1988. The algal partner. In: M. Galun (ed.), *CRC Handbook of Lichenology I*: 39–92. CRC Press, Inc., Boca Raton.