

ボタンタケ属の孢子類の走査電顕による観察

1. 部分孢子(子嚢孢子)の対合部の表面構造

土 居 則 子・青 木 紀美江

(昭和62年9月30日受理)

Studies on *Hypocrea* Spores by Scanning Electron Microscopy

1. The Exosporium Ornamentation of Jointed Portion of Paired Part-spores

Noriko DOI and Kimie AOKI

(Received September 30, 1987)

緒 言

ボタンタケ属 *Hypocrea* は、子嚢菌門、核菌綱、ボタンタケ目に分類される菌類で、微小なきのこを生じ、その分生子時代の多くはセルロース分解力の強いトリコデルマ *Trichoderma* として知られる。

ボタンタケ属の子嚢孢子は、成熟した状態では16の部分孢子(part spore, partspore, または part-spore)を形成しているが、その形成過程については2説がある。その一つは、伝統的な説で、まず中央部に隔壁をもつ8個の子嚢孢子が形成され、その隔壁部から2つの部分孢子に分離するとする説である。他は、DOI(1969)¹⁾により提唱された説で、8個の子嚢孢子は、キチン質の細胞壁のできるより前の段階で、多分くびれこみ法(furrowing)によって16個の部分孢子に分離し、その後にキチン質の孢子壁が形成されるとする説である。この点に関しては、対になっている成熟した部分孢子の接触部分の細胞壁の性質を調べることによって、間接的に判定可能と考えられる。今回は、この点に関する観察を走査電子顕微鏡(SEM)によって行った。

観 察 試 料

SEM観察に用いたボタンタケ属の子嚢孢子は、国立科学博物館植物研究部所蔵の、子実体標本に添えられているアルミホイルに付着させたものを用いた。試料の学名および採集データは次のとおりである。

Hypocrea splendens PHILL. et PLOWR. 北海道上磯郡チリチリ川上流域, 6-IX-1986, Y. DOI, D. 6382(TNS-F-237191), [Fig. 11]

H. pachybasioides DOI, 北海道上磯郡チリチリ川上流域, 7-IX-1986, Y. DOI, D. 6430(TNS-F-243750). [Fig. 10]

Hypocrea sp.-1, *Homalocrea* 節 *Pulvinata* 亜節に位置づけられる未記録種, 鳥取県西伯郡伯耆大山三ノ沢, 26-IX-1986, Y. DOI, D. 6537(TNS-F-237197). [Fig. 1, 5, 6]

H. lutea (TODE) PETCH, 北海道松前郡大千軒岳, 10-IX-1986, Y. DOI, D. 6478(TNS-F-243749). [Fig. 9]

H. flavo-virens BERK. 鳥取県西伯郡伯耆大山三ノ沢, 25-IX-1986, Y. DOI, D. 6584(TNS-F-243752). [Fig. 17]

H. aureoviridis PLOWR. et COOKE, 東京都港区白金台 自然教育園, 2-IX-1987, Y. DOI, D. 6740(TNS-F-243753). [Fig. 16, 18]

Hypocrea sp.-2, 鳥取県西伯郡伯耆大山, 25-IX-1986, Y. DOI, D. 6571(TNS-F-237204); D. 6572(TNS-F-237205). [Fig. 2, 3, 4]

H. aurantia P. HENN, 鳥取県西伯郡伯耆大山, 25-IX-1986, Y. DOI, D. 6585(TNS-F-244742) [Fig. 7]

H. muroiana HINO et KATSUMOTO, 鳥取県西伯郡伯耆大山, 25-IX-1986, Y. DOI, D. 6549(TNS-F-237200), D. 6575(TNS-F-237206). [Fig. 8, 12]

H. schweinitzii (FR.) SACC. 北海道上磯郡チリチリ川上流域, 8-IX-1986, Y. DOI, D. 6450(TNS-F-237195), ミナゴヤ川中流域, 7-IX-1986, Y. DOI, D. 6443(TNS-F-243751). [Fig. 13, 14, 15]

観 察 方 法

子実体からの子嚢胞子の採取法、固定、洗浄、脱水および乾燥法等については、土居ら²⁾および天児ら³⁾の方法に準じて次のとおり行った。

① 子嚢胞子試料：野外から採集した子実体の生品から得られた試料を用いた。土居ら²⁾によると、基物上の生品の子座の部分アルミホイルで包み、数時間～1晩放置して、子嚢殻の開口部から射出される子嚢胞子をホイル上に付着させたものである。

② 子嚢胞子外形の復元および固定：アルミホイル上に子嚢胞子が分散付着している部分を選んで、そのホイル部分を5mm角位の大きさに切り取り、上下を濾紙(定量用No.6)で密閉した網カゴ(直径15mm)に入れ、小シャーレ中の%リン酸緩衝液(pH7.2)に浸漬し、1時間～1晩置いて子嚢胞子を膨潤させた後、グルタルアルデヒド2%、4%または6%液(%リン酸緩衝液で希釈)を用い、2～4℃で約2時間固定した。

③ 洗浄および脱水：%リン酸緩衝液で20分ごとに3回洗浄した後、アセトン50、70、80、90、95、99.5%液で15分ごとに各1回、さらに100%液で2回脱水を行った。

④ 臨界点乾燥(CPD)：脱水した試料を中間液(酢酸イソアミルとアセトンの1:1混合液)に10分間浸漬した後、さらに移行液(93%酢酸イソアミル)に浸漬した状態で冷蔵(2～4℃)した。翌日、HCP-2型日立臨界点乾燥装置を用いてこの試料の乾燥を行った。

⑤ 試料の蒸着：日立1B-3型イオンコーターを用いて、通常の方法でAuコーティングを行った。

⑥ SEMによる観察：日立S-450型走査電子顕微鏡を用い、加速電圧20kvで観察した。撮影にはフジフィルムSSブローニー判を用いた。

観 察 結 果

得られた子嚢胞子のSEM像から、対になっている部分胞子(以下「対胞子」と略記する)の接触部分の表面構造について以下のような知見が得られた。

Fig. 1で、対胞子間の接触部を側面から見ると、ごく平滑な細胞壁が突起物のある部分から伸び出して対胞子との接触部の縁部を形成しているように見える(白矢印)。しかし、同様の部分に切れこみの入った胞子个体(黒矢印)も見られ、この部分が本来の細胞壁(epispo-

rium)でないことを示している。この構造は、Fig. 6の部分胞子にも見られる(矢印)。

Fig. 2, 3では、接触面の縁部を形成している部分の切れこみが更に著しい例(矢印)が見られ、この部分が突起物の変形したもの、あるいは子嚢内の粘質物が縁部に稜線状に付着したものによって形成されていることを示している。Fig. 2の対胞子間の接触部表面(矢印2)は、この胞子の他の部分の細胞壁と同様に突起に被われた構造を示している。

Fig. 4の中には、接触部がごく平坦で穴が不規則にあいた例(白矢印)が見られるが、その他方の対胞子側の接触面は突起で被われ(黒矢印)、その縁部に癒合した突起物(または子嚢内の粘質物)によって形成された稜線が見られる。

Fig. 5の対胞子との接触部分が手前を向いた部分胞子(黒矢印)では、対胞子の圧迫で突起物が変形しているようであるが、他部分の細胞壁と同様の突起に被われていることを示している。別の部分胞子(白矢印)では、突起物がごく平坦に変形したか、あるいは子嚢内粘質物の付着によって、ごく平坦に見える部分が形成されたと考えられるが、平坦部が形成されなかった部分があり、その間隙には突起物の散在する細胞壁が見られる。

Fig. 7の部分胞子の接触部には、他の部分胞子表面のものより長い突起物が見られる。

Fig. 8および9の接触部はかなり平滑で、この程度に平滑であると子嚢胞子中に形成された隔壁部から部分胞子が分離したとみなせなくもない。しかし、他部分のものと同様の突起物が圧迫されて変形したと考えられる鈍い突起が接触面上に散在し、隔壁形成説では説明が困難である。

Fig. 10および12では、部分胞子の側面から見ると接触部は平坦になっている(truncate)が、Fig. 2, 3および6と同様にその縁部の稜線に切れこみがあり、突起物の癒合・変形または粘質物による稜線の形成であることを示している。

Fig. 11の右下の部分胞子(矢印1)の対胞子との接触部の表面は、Fig. 4の黒矢印の胞子と同様の突起と稜線部が見られる。また、右上部の部分胞子の接触面(矢印2)は、突起に被われ、縁部の稜線がほとんど見られない。

Fig. 13, 14および15は、*H. schweinitzii*の部分胞子である。本種の部分胞子は、対になっている部分胞子

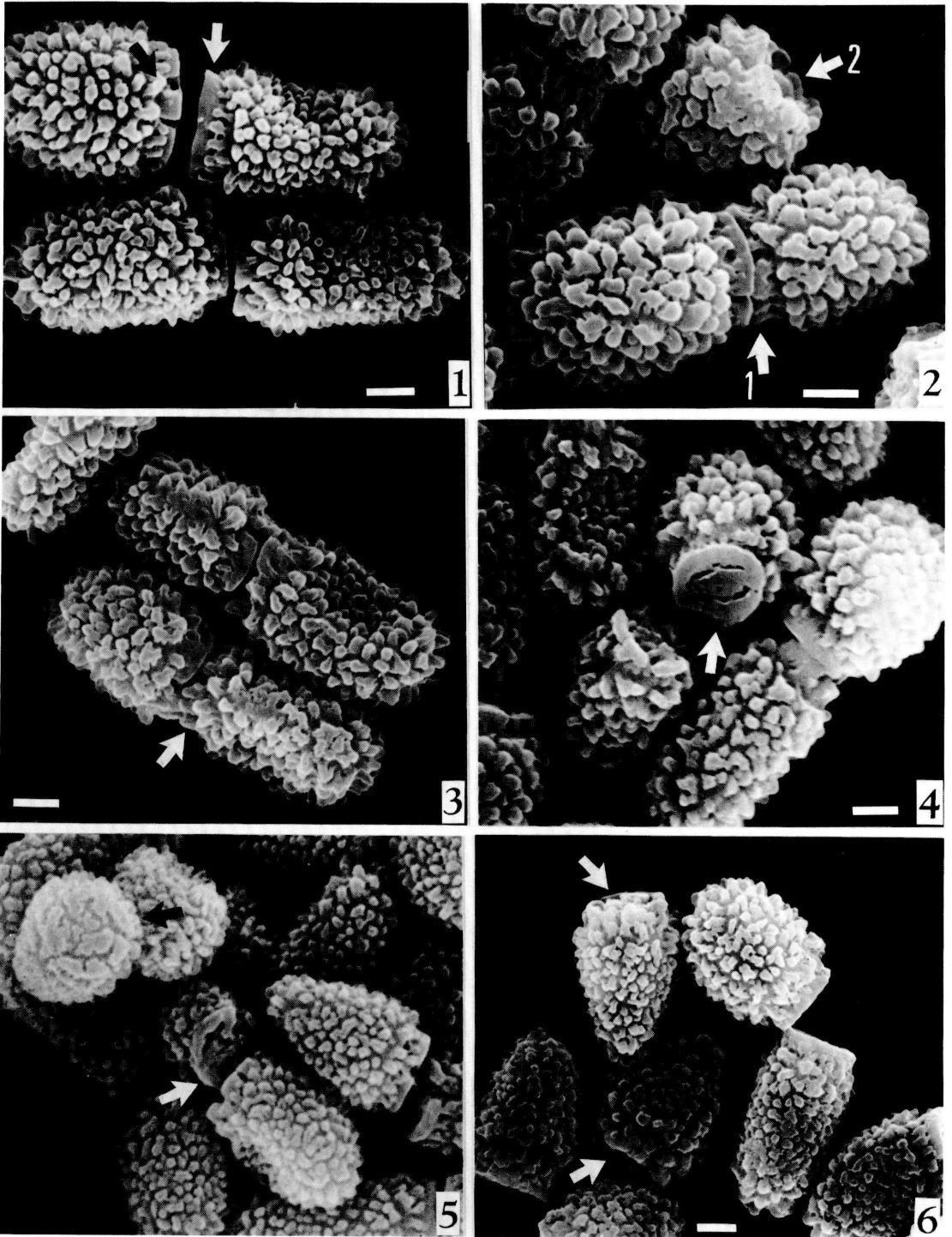


Fig. 1, 5 & 6. *Hypocrea* sp. -1 (TNS-F-237197)

Fig. 2, 3 & 4. *Hypocrea* sp. -2 (TNS-F-237204)

Bar : 1 μ m

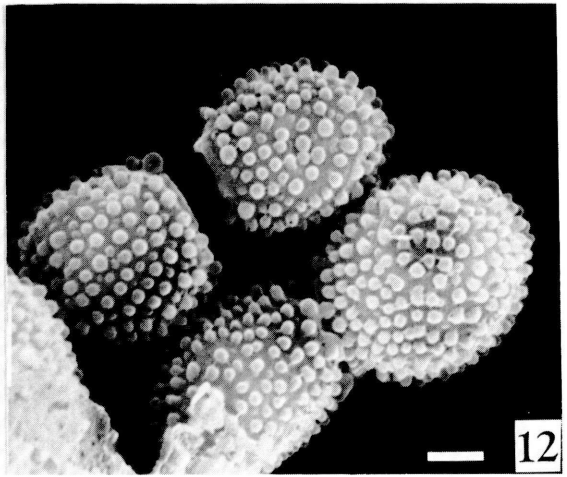
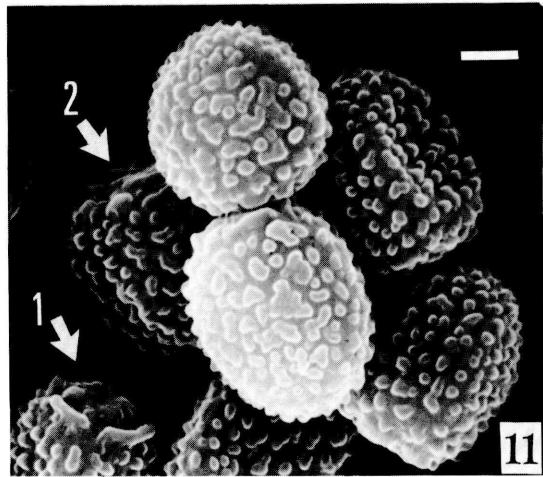
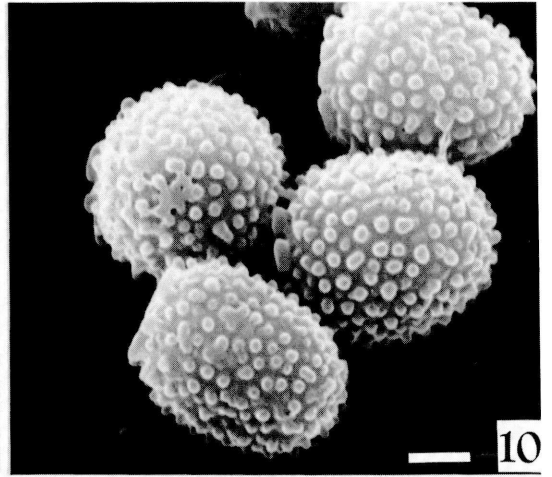
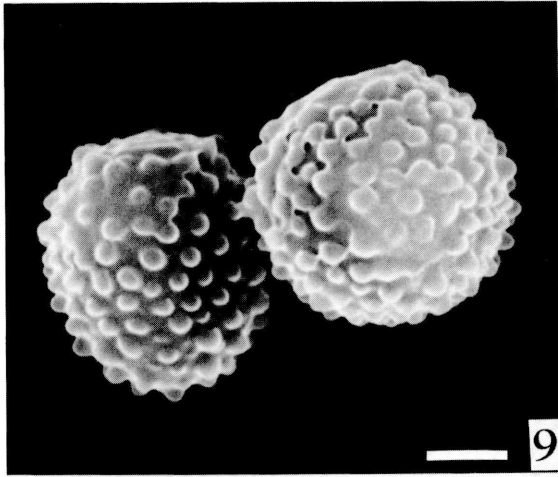
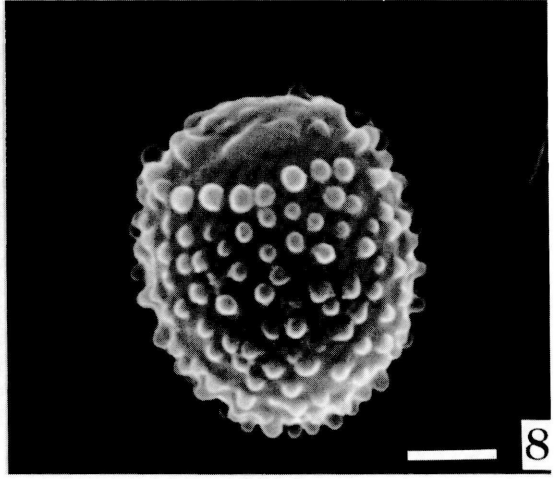
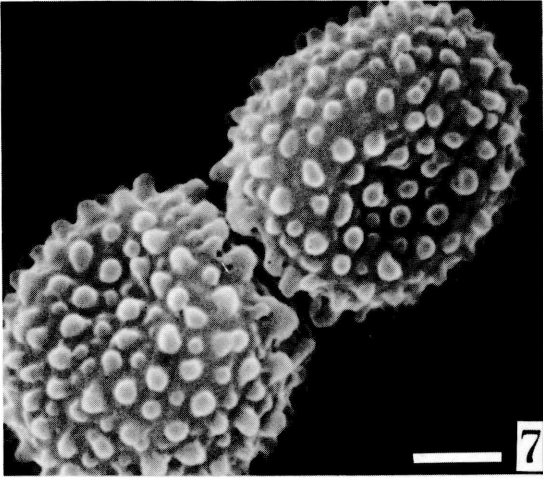


Fig. 7. *Hypocrea aurantia* P. HENN.

(TNS-F-244742)

Fig. 8. *H. muroiana* H. et K. (TNS-F-237206)

Fig. 9. *H. lutea* (TODE) PETCH (TNS-F-243749)

Fig. 10. *H. pachybasiioides* DOI (TNS-F-243750)

Fig. 11. *H. splendens* P. et P. (TNS-F-237191)

Fig. 12. *H. muroiana* H. et K. (TNS-F-237200)

Bar : 1 μ m

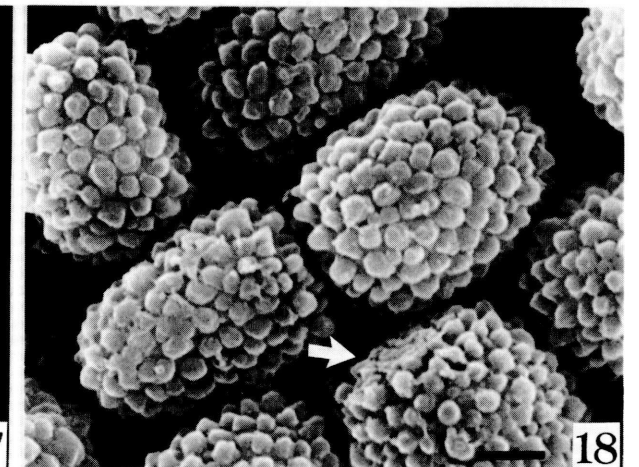
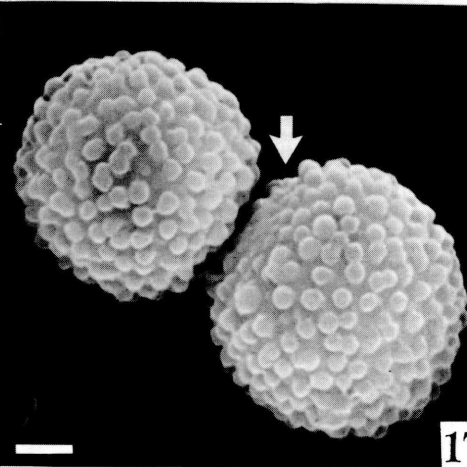
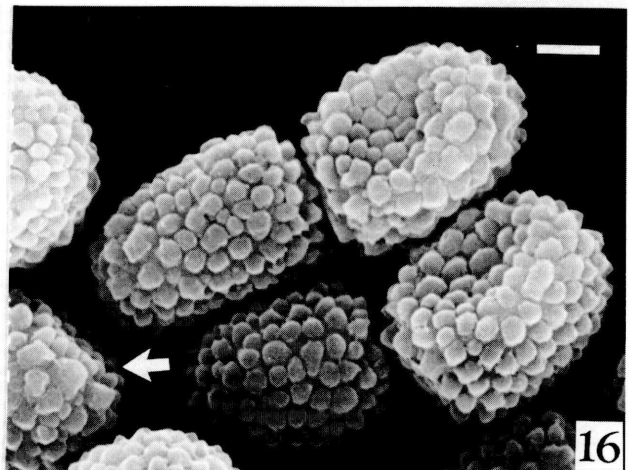
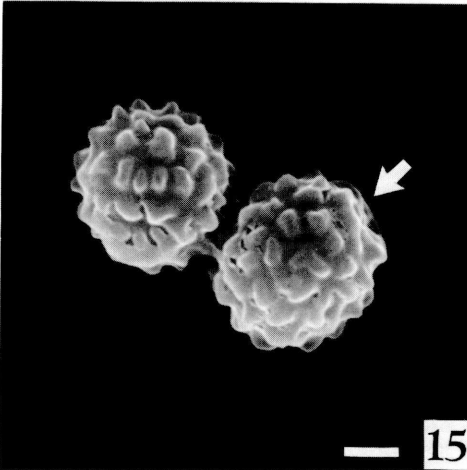
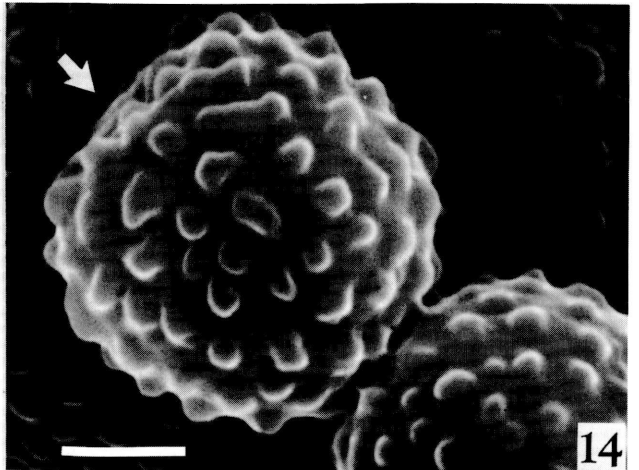
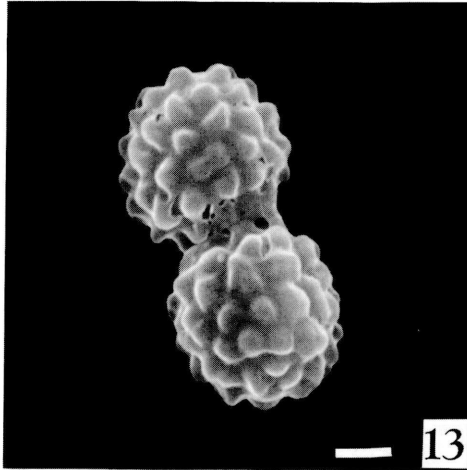


Fig. 13 & 15. *Hypocrea schweinitzii* (FR.) SACC.
(TNS-F-243751)

Fig. 14. *H. schweinitzii* (TNS-F-237195)

Fig. 16 & 18. *H. aureoviridis* PLOWR. et COOKE.
(TNS-F-243753)

Fig. 17. *H. flavo-virens* BERK. (TNS-F-243752)

Bar : 1 μ m

の接触圧迫による変形が少なく、独立した16個の胞子のように見える場合が多い。図に示した部分胞子は、やや圧迫された例 (Fig. 14および15の矢印) や、ばらばらになると接触部がわからなくなると思われる例 (Fig. 13) である。対胞子との接触部の突起物は、他部分の表面のものとはほとんど同じである。

Fig. 16, 17および18に示した *Creopus* 亜節の2種の部分胞子は、今までの観察例では例外なくこのような大型の半球状の突起で密に被われている (colliculate)。これらの部分胞子の矢印部に見られる対胞子との接触部は、多少平坦になっているが、他部分の表面構造とほとんど差が見られない。

考 察

ボタンタケ属の子嚢胞子の16個の部分胞子は、まず8個の子嚢胞子の各々の中央部に隔壁が形成された後に隔壁部から部分胞子に分離すると記載された例が従来は多かったが、今回の対胞子間の接触部のSEM像からは、隔壁が二重壁化して部分胞子に分離したと考えられる表面構造は見られなかった。すなわち、まず8個の子嚢胞子の段階でその胞子内に隔壁が形成され、その隔壁が二重壁構造になり (schizolytic-like)、キチン化してその中間から分割されたとすれば、その分割された細胞壁表面に部分胞子の他部分の表面に見られるような顕著な突起物が形成されることはありえない筈である。程度の差はあるけれども、対胞子との接触部の細胞壁の表面構造は、他の部分の細胞壁の表面構造と同じで、対胞子間の接触・圧迫による平坦化、突起物の鈍化あるいは接触部の縁部の稜線化などの変形を示していると考えられる。従って、ボタンタケ属の8個の子嚢胞子に隔壁が出来た後に分離するのではなく、細胞壁が出来る前に16個の部分胞子に分離し、その後にキチン質の細胞壁が形成され、そして前述のように対胞子との接触面は、細胞壁の形成中または形成後に圧迫によって変形したと見るのが妥当と思われる。8個の子嚢胞子の16個の部分胞子への分離は、細胞膜を持っていないごく若い段階に行われる場合や細胞膜が形成された後にくびれ込み (furling) によって行われる場合があり得る。仮に、8個の子嚢胞子に隔壁が形成されるとすれば、そのような隔壁のある子嚢胞子が若い段階だけでなく完熟した子嚢胞子にも時折例外的に残っていてもよい筈である。しかし、従来の筆者らの光学顕微鏡による観察では、ごく若い段階に強く

隣接する対胞子は観察されても、胞子内部で発達する細胞板形成 (call plate formation) 型の隔壁は観察されたことはない。従って8個の子嚢胞子の段階に隔壁ができるという説には疑問がある。この点では、ROGERSON (1970)⁴⁾ による表現 “Ascospores separating into part-spores ; asci 8-spored in early stages, at maturity appearing 16-spored” および MÜLLER & von ARX (1973)⁵⁾ の “Ascospores separating in an early stage, asci finally containing 16 one-celled spores” は、部分胞子の形成法を記述していないが問題のない表現である。一方、PETCH (1938)⁶⁾ の Ascospores at first ovoid, one-septate, then dividing into two globose, subglobose, or cuboid part-spores” は、隔壁をもつ8個の子嚢胞子の存在を明記していて、妥当ではない。DOI (1969)¹⁾ は、ボタンタケ属の子嚢胞子の形成法について次のように記している。 “Eight ascospores are delimited by cell membrane, following which the binucleate ascospores become constricted (by a process of furrowing?), to form 16 partspores, after which the chitinous cell-wall of the partspores is formed.” この形成法によっても、今回のSEM像に見られるような部分胞子の対胞子との接触面の構造は形成されることになるが、子嚢胞子の更に若い段階で、細胞膜のない8個の核が更にもう一度分裂して16個になり、ついで細胞膜、細胞壁が形成される場合があってもよい。SEM像に見られる *H. schweinitzii* の部分胞子の多くは、8個の子嚢胞子に細胞膜ができはじめの前後にかけて16個の部分胞子に分離する例で、対胞子間の影響が弱いためにそれぞれの部分胞子が独立した胞子になるのではないかと考えられるが、これについては今後さらに詳細な研究が必要と思われる。

謝 辞

本研究に際し、CPDおよびSEM装置使用の便宜をおはかり下さいました本学家政学部服飾美術学科の植松市太郎教授、装置取り扱い上で懇切な御指導を下さいました清水義雄元本学助教授 (現在信州大学助教授) ならびに澤田恭子実験助手の諸先生に深謝いたします。

なお、試料の調製およびSEM写真撮影に際しては、日本女子大学家政学部家政理学科二部卒業の石川千夏子さん (現在相模中央化学研究所勤務) にご協力を頂いた。

ここに感謝の意を表します。

本研究は、本学の特別研究費（昭和61年度）によって行った。

文 献

- 1) DOI, Y. : *Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo*, **12**, 693 (1969).
- 2) 土居祥兌・石川千夏子 : 国立科学博物館専報, 20号, 73 (1987).
- 3) 天児和暢・小池聖涼 : 微生物における電子顕微鏡技術〔上〕および〔下〕, 学会出版センター(東京), 1982, 各p. 3.
- 4) ROGERSON, C. T. : *Mycologia* **62**, 865(1970).
- 5) MÜLLER, E., & von ARX, J. A. (in AINSWORTH, G. C., et al (ed.) : *The Fungi* **4A**, 87(1973).
- 6) PETCH, T. : *Trans. Brit. mycol. Soc.*, **21**, 243(1938).

Summary

Exosporium ornamentations of the jointed portion of paired part-spores in 10 *Hypocrea* species were observed by scanning electron microscope. The surface of jointed portions of part-spores showed almost the same ornamentations as those of the other portions of part-spores in *H. schweinitzii*, *H. flavo-virens* and *H. aureoviridis*, although the portions were often flattened. In the other species the part-spores were deformed by the pressure of paired ones to form flattened and smoother jointed surfaces, appearing fairly smooth in some part-spores of *H. muroiana* and *H. lutea*. Protuberances or a kind of glutinous substances at the margin of the jointed portions were often fused with one another to form long ridgelines along the margin. If an ascospore of 8-spored stage has a septum and the ascospore is separated from the septum by a process of schizolytic-like secession, the surface of the separated portion of the septum should not have such strongly roughened exosporium ornamentations as observed in the SEM micrographs of this paper. Judging from these conditions and that a distinct septum was not found within an ascospore at any stage under a compound micro-scope, it is concluded that 8 young ascospores with or without cell membrane are separated into 16 part-spores (with a process of furrowing in the ascospores possessing cell membrane?), after which the chitinous cell wall with exosporium ornamentation of the part-spores is formed.