

マヤランの試験管内開花をめぐる問題

Some speculations on *in vitro* flowering of a mycoparasitic orchid, *Cymbidium nipponicum*.

株式会社 学習研究社
植物工学研究所
水野直美

1991年12月25日

1 緒言

マヤランはラン科のシンビジウム属に属する、菌寄生性の植物であり、房総半島以西の本州、四国、九州に分布する（前川 1971）。緑葉と根を欠き、根茎、花茎、花器、鱗片葉からなる。

植物寄生性の顕花植物は人工培養可能で、試験管内開花をするものがあることが知られている（Tashima, *et al.* 1974, Okonkwo 1961）。しかし、菌寄生性顕花植物の無菌培養は、ツチアケビ（Nakamura 1962, 1967, 1976, 1982, Nakamura, *et al.* 1975, 中村 1978）及びマヤラン（沢ら 1979）について知られているのみであり、試験管内開花の成功例については知られていない。

筆者らは、マヤランの無菌培養、試験管内開花、試験管内結実に成功した（水野ら 1991）。これは、おそらく、種子発芽のみの成功以外では菌寄生性植物の無菌培養の3番目の成功例であると共に、もしそうだとすれば、当然の事ながら、この種の植物における試験管内開花、試験管内結実、及び試験管内における生活環の完結の初めての例でもある。この成功は同時に、様々な問題を提起する。本論文では、前論文で言及できなかったいくつかの実験的事実について及び、これら諸問題について考察を行う。なお、無葉緑ランについてはすでにすぐれた総説があり（中村 1978）、また、菌根についても数多くの総説（中村 1971, Arditti *et al.* 1990 及び、それらの引用文献）があるので、参考にされたい。

2 培養の成功について

2.1 無菌培養下における発芽, 生育, 開花

これまで菌寄生性顕花植物の無菌培養はラン科でのみ知られており, それもごく限られた成功例があるのみであった. ツチアケビは, 種子の無菌発芽から 3cm 程度の植物体が得られている (Nakamura 1962, 1967, 1976, 1982, Nakamura, *et al.* 1975, 中村 1978). *Corallorhiza* では, 無菌発芽には成功しているが, その後の生長は認められていない (Harvais 1974). *Limodorm* では発芽は見られているが, その後の発達については不明で (Van Waes and Debergh 1986), *Didymoplexis minor* では少なくともプロトコームステージまで観察されている (Burgeff 1936). 沢らは, 10種の菌寄生性ランを含む発芽試験で, アキザキヤツシロラン, ハルザキヤツシロラン, ツチアケビが, プロトコーム段階まで到達し, マヤランではリゾーム段階に至っているが, シュート形成はみられていないとしている (沢ら 1979). このように, プロトコーム形成以降の段階まで進んだ培養例としては, 中村によるツチアケビが最初のものであり, 2番目が, 沢によるマヤランで, 3番目が水野らによるマヤランである.

マヤランの発芽率のデータはないが, 試験管内開花で採取した種子の無処理播種では, カンランなどよりずっと良く, シュンランよりかなり良いという印象である. 恐らく, 数%以上と思われる. 未熟種子の播種や, 完熟種子の予措 (各種の有機溶媒処理, 及び単独又は前者と組み合わせた種々の時間や濃度の KOH 処理), 殺菌剤の種類と殺菌時間, 超音波処理, 殺菌後の長時間洗滌, 培地条件, 温度, 照度等を丹念に調べる事で, 最適発芽条件に到達できるであろう.

ツチアケビでは無菌発芽させたものの栄養要求についてかなり詳しくしらべられている (Nakamura 1982) が, 生長のキーファクタは未発見で, 自然状態のものや, 人工的な共生培養下のもの (Terashita 1985) と比較してはるかに劣る. これに対して, マヤランでは糖と無機塩のみの簡単な培地で開花まで至っていることは, その栄養要求性が単純であり, 種々の複雑な物質を自力で合成できることを示している. おそらく, マヤランが通常の緑葉ランから, あらゆる栄養を寄主に依存するという高度な菌寄生性ランへの進化の途上にある, 原始的な菌寄生性ランであり, まだ菌に依存する部分が大きくないためと考えられる. 植物体に緑色部分があることも, 菌寄生性ランとして原始的であることを支持する. なお, 沢らの実験で, マヤランにシュート形成がみられないのはおそらく明所で培養されたためと考えられる.

2.2 他の緑色無葉ランの培養

このように, マヤランは, 菌寄生性ランとして原始的であるので, 栄養要求性が通常の緑葉を持つランと余り変わるところがない程度に単純であり, 従って通常のランと同じく, 糖と無機塩だけの培地で培養できたと考えられる. マヤランと同じ様な緑色無葉ランも同様に, 容易に培養が可能ではないかと考えられる.

2.3 糖と無機塩だけで培養可能か

今回培地として、Hyponexを用いた（塚本ら 1961, Tsukamoto *et al.* 1963, 狩野 1965, 狩野 1968）。Hyponexは米国製の配合肥料で、化成肥料、重過磷酸石灰、硫酸の混合物である。既に指摘されているとおり（水野ら 1991¹）、Hyponexについては様々な誤解があるが、使用したのはN-P₂O₅-K₂O=6.5-6-19（N-P-K=6.5-2.6-15.8）のいわゆる微粉ハイポネックスである。また、この分量は、肥料取締法上の保証量で、実際にはこれ以上の量が含まれている。さらに、三要素以外の成分として、かなり多量の硫酸イオンとカルシウム、少量のマグネシウムと鉄、その他微量元素を含んでいる（水野、門馬 1992, 水野 未発表）。

栄養要求性についての問題としては、これは可能性としてであるが、Hyponexに上記無機成分以外にマヤランの成長を補うようなある種のホルモンや、ビタミンが含まれているのではないかという事である。1961年からの狩野論文以降（塚本ら 1961, Tsukamoto *et al.* 1963, 狩野 1965, 狩野 1968）、特に日本におけるランの無菌培養及び、一般栽培では、諸外国に例を見ないほどHyponexが多用されてきた。Hyponex培地は、一般には調整が極めて容易である事を理由として多用されていると考えられているが、いくら調整が容易であるとしても、培養がうまく行かなかつたら使われる筈がない。それに、Hyponex培地は、確かに調整が簡単ではあるが、他の培地に比べて特に安価という事はなく、更に、砂状及び懸濁状態で残る不溶物がかなり含まれているし、調整直後のpHがかなり低く、オートクレーブ後のpHの変化も大きいなど欠点も多い。園芸肥料を無菌培養の培地に流用しようという試みはHyponex以外に存在し（たとえばGaviota—狩野 1968）、またHyponex自体にしても、狩野論文で用いられた、いわゆる微粉Hyponex以外に、ハイポネックスの名を持つ何種類かの商品があつて、これらを培地に用いた研究は存在する（たとえば、5—10—5のハイポネックスを用いた、小松田、米内 1989, 20—20—20の、阿部、安藤 1982）。しかし、何れも結果が良好でなかつたり、良好でも多数の人に広く受け入れられる状態にはなっていない。筆者の考えでは、Hyponex培地が広く受け入れられている原因は、これを用いて、ランの無菌培養を行うと、一般に他の培地に比べて、苗の状態が非常に健全に見え、発根も良いように見える事が多いことである。たとえば、Ichihashi 1979は12種類の培地上における各種ランの実生実験で、*Dendrobium nobile*, *Laelia anceps*がHyponex培地以外では正常に生育しない事、シランで根の発育が良好であった事を報告している。ランは一般的に、糖と無機塩だけの培地で良好に生育するが、一部には、健全な発育のために添加物を要求するものがある（阿部、安藤 1982, 市橋 1983, 渋谷ら 1983）。Hyponex培地では「健全」に発育する事が多いので、何らかのビタミンやホルモンが含まれているのではないかという疑問が残る。マヤランの培養では、少なくとも20℃暗培養の条件ではHyponex培地以外は使われていないので、この点について判断できない。この点については、他の、糖と無機塩の培地や、Hyponexの元素分析結果に基づく再構成培地での培養を行えば、糖と無機塩だけで十分な成長をする事が証明できるであろうし、また、直接的に、ビタミンやホルモンの分析を行う事も可能であるので、今後期待する。多量

¹ この論文の本文の表1の説明は誤りである。[N-P-K]と[N-P₂O₅-K₂O]が入れ替わっており、この表及び和文注釈の数値も違う

要素についての分析と再構成についてはすでに報告がある（水野，門馬 1992）。なお，通常のビタミンやホルモンは除去できると考えられる，Hyponex のメタノール洗滌を行ったものを用いて培地を作成した場合，生育が良好になり，抽出物を培地に加えると生育が抑制されたという報告がある（Ichihashi 1989）。また，マヤランに於いても，水野ら 1991 に記したように，培養法確立の途上で，少数個体の材料で，様々な条件試行を行った中で，MS 培地を用い明所培養を行った事があるが，顕著な差は見いだせなかった。これらの事実は，Hyponex の効果は，ビタミンやホルモンによるものではない事を示唆する。したがって，今の段階では，マヤランは糖と無機塩だけで培養可能であると判断するのが妥当である。

2.4 暗培養好成績

Cymbidium の種子発芽やその後の根茎の成長，成長点培養後に形成される根茎の成長は，暗黒下がよいとする報告がすでにある（萩屋，藤田 1968，Hasegawa and Goi 1987）。また他の寄生植物でも，ナンバンギセルの発芽やその後の良好な成長に暗黒が必要であるとされている（Tashima *et al.* 1974）。これらの植物の開花前の段階では，植物体はその全体が地中にある。地下器官には，光が当たった部分の生長が抑えられる屈光性や，重力の方向に伸長するという屈地性が存在し，地下器官が不用意に地上に姿を現わさない様になっている。屈光性が強ければ，光が当たった部分の生長が強く抑えられると考えられ，マヤランはこの性質を強く持つため，植物体のすべての部分に光のあたる明所での生長が著しく悪いと考えられる。

2.5 最適培養条件をめぐる問題

水野ら 1991 は，少数個体を用いて，多数の培養条件を調べ，たまたま Hyponex 培地／暗培養／20℃という条件を見いだしたにすぎず，その条件は本来の「最適」とはほど遠いものではないかと考えられる。少なくとも培地については，20℃／暗培養下で試されたものは Hyponex 培地のみである。Hyponex 以外の培地の無機成分はどうか。市橋は，多数のランで最適培地を決定しているが，マヤランにおいても最適培地を決定しなければならない。マヤランは特殊な栄養摂取形態を取っているため，その栄養要求性が一般のランとどう違うかは非常に興味深い。また，無葉である事から，マグネシウムの要求量はかなり小さい事が予想される。Hyponex 培地自体にしても，通常の苗の商業的生産では様々な添加物（ペプトン，トリプトン，ココナットウォーター，ジャガイモ，バナナ，リンゴ等々）と共に用いられる事が多いが，これらについても調べたい。糖濃度は，シュンランの根茎ではより高濃度域が最適条件であるので（上田，鳥潟 1968），本種に於いても同様な事が考えられる。

温度は，恐らく 20℃付近に最適値があるものと考えられるが，真の最適温度はいくらであろうか。また，この最適温度は，恒温条件における最適であるが，任意の変温が可能であるとすれば，どの様な温度変化の軌道が最適になるのでであろうか。

照度は高いと明らかに根茎の成長を，他のシンビジウムと比較しても著しく抑制するが，微弱な光の作用はどの程度のものなのか。どの程度の光で，どの程度の抑制があるか，

dose-response 関数の形はどの様なものなのか。暗条件を作るために用いたのは、スチール本棚であって、肉眼では緑化は全く認められないものの、真の暗黒条件とはほど遠い（迷光がかなりある）ものであるが、真の暗黒にすると更に成長が促進されるであろうか。いったん開花が始まったものは、明所に移してもその後の開花が継続的に起きるが、当初からずっと明条件であれば当然、成長は極めて遅いが、この場合時間さえかければ開花が起きるのであるか。

以上の問題を解決して得られる最適発芽条件と、最適培養条件を組み合わせて、播種から開花までの最適培養条件—最短培養時間を考える事ができる。これは恐らく2年以下で播種から初花を見ることのできるものになるであろう。これが事実だとすれば、シンビジウムの開花の実験系として画期的な、短時間の系であるといえよう。

培養条件に関する問題として、根茎の太さがある。根茎の太さは何で決まるのであろうか。確率の問題であるが、細い根茎には着花しがたいようである。伸長速度は細い根茎の方が明らかに早い。体積ベースの成長速度は恐らく大差無いのではないと思われる。同一個体の中の、根茎の分枝の中に、細い枝と、太い枝が混在する。これらは、将来、高度の菌寄生ラン、*Gastrodia* 等にみられる、大きな根茎塊と、糸状のランナーへと進化する元となるものであろうか。無菌培養下のシュンラン、カンランの根茎をマヤランのものと比較すると、シュンランは細く、カンランはいつそう細い。天然のものは3種とも同じように太い。無菌培養下で、このような差がでるのは何が原因であろうか。

培養条件に関する他の問題として、培地の褐変の問題がある。播種培地は、通常極めて強く褐変する。発芽したプロトコームを1個体ずつ培養すると、個体により培地に強く褐変が起こるものと、全く変色しないものがある。褐変は、組織培養において場合によりかなり重要な問題であるにもかかわらず、ほとんど解明が行われていない。マヤランの褐変株／非褐変株を用いれば、この問題を解く有効な手がかりを得られるかも知れない。

2.6 共生培養

今までに多数のランで共生発芽が成功している (Arditti 1990)。共生させる菌は、親株、同種のラン、別種のラン、さらには全然別の科の植物の病原菌であったりする (Smreciu and Currah 1989)。菌とランの関係の特異性については、古くから種々の報告があるが、今の所、オーストラリア産の一部のもの以外では余り明確ではない (Warcup 1981)。ランの菌根菌は主に *Rhizoctonia* である。分類の難しいグループであるが、近年、形態的差異や、菌糸融合群、完全世代等に関する知識が蓄積されてきた (Moore 1987, Ogoshi 1985)。当然これらと、菌根形成能の関心に興味をもたれるところであるが、菌根菌として採集された120菌株以上の菌株の分類群と菌根形成能の関連性が調べられたにも関わらず、残念ながら今の所余り明確になっていない (植竹ら 1988)。遺伝子レベルの関係については、VA菌根を作るエンドウとソラマメで、菌根を作らないミュータントが発見されている (Duc *et al.* 1989)。自然界でランは共生発芽が必須なので、この様なものを発見するのが難しいであろうが、人工栽培下では発見される可能性がある。より明確な関係は、マメ／根粒菌の関係で見いだされており、細菌側の *sym* プラスミド上の *hsn* (host specific nodulation) 遺伝子群により宿主選択性が支配されている事 (Lugtenberg 1986, Long *et al.*

1982, Kondorosi *et al.* 1984), さらにマメの側の *Rj* 遺伝子群により根粒菌が選択される事が分かっている (Williams and Lynch 1954, Caldwell 1966, Vest 1970, Vest and Caldwell 1972). また, 植物病原菌において, 菌の病原性とウイルスの関係についても知られている (Anagnostakis 1982). 更に Arditti 1990 は, 菌/ランの関係にプラスミド関与の可能性について言及している. 以上の事から, ランの場合にもこれらの関与は可能性がある. *Rhizoctonia* ではすでに, プラスミド, ウイルスの存在が知られているので (Miyashita *et al.* 1990, Finkler *et al.* 1985), 今後の展開には興味を持たれる.

菌寄生性のランの菌根菌についての情報は多くない. 自然状態における関係の判明したものを次に示す (第1表).

第1表 菌寄生性顕花植物と菌の関係 (菌の未同定のは大部分省略)

顕花植物	菌	文献
オニノヤガラ	ナラタケ	Kusano 1911
<i>Neottia nidus-avis</i>	<i>Rhizoctonia neottiae</i>	Wolf 1927
<i>Didymoplexis pallidae</i>	<i>Marasmius coniatatus</i>	Burgeff 1932
<i>Gastrodia javanica</i>	<i>Xerotus javanicus</i>	Burgeff 1932
<i>Galeola hydra</i>	<i>Fomes sp.</i>	Burgeff 1936
ツチアケビ	ナラタケ	Hamada 1939
<i>Galeola cunninghamii</i>	ナラタケ	Campbell 1962
タカツラン	<i>Hymenochaete crocicreas</i>	Hamada & Nakamura 1963
<i>Rhizanthella gardneri</i>	<i>Thanatephorus gardneri</i> *	Warcup 1985(*Warcup 1991)
ツチアケビ	<i>Armillariella tabescens</i>	Terashita & Chuman 1987
<i>Rhizanthella slateri</i>	<i>Rhizoctonia sp.</i>	Warcup 1991

この他にも, 未同定の菌の分離の報告は多い. 共生発芽, 培養に成功した組み合わせを示す (第2表).

第2表 菌寄生性顕花植物の共生培養成功例

顕花植物	菌	文献
<i>Didymoplexis minor</i>	<i>Marasmius coniatatus</i>	Burgeff 1936
<i>Galeola sp.</i>	<i>Fomes sp.</i>	Burgeff 1936
アキザキヤツシロラン	two clamp connection-bearing fungi	Tashima <i>et al.</i> 1978
<i>Rhizanthella gardneri</i>	<i>Thanatephorus gardneri</i>	Warcup 1985
ツチアケビ	ナラタケ	Terashita 1985
<i>Corallorhiza macrantha</i>	<i>Rhizoctonia anaticula</i>	Smreciu & Currah 1989
<i>C. trifida</i>	<i>Ceratobasidium cereale</i>	
<i>Neottia nidus-avis</i>		
<i>Rhizanthella gardneri</i>	<i>Thanatephorus gardneri</i>	Warcup 1991

漏れているものもあろうが, 何れにしても例数は極めて少ない. 通常のランの菌根菌がほとんど *Rhizoctonia* であるのに対して, 菌寄生ランの菌根菌には木材腐朽菌が入っている. また菌根の構造も違っていることもある (Burgeff 1936). これらのランは, 高度な菌

寄生性であるが、マヤランはそうではないし、同属に、通常の緑葉ランをもつ。この様なものの菌根菌がどの様なものであるか非常に興味を持たれる。マヤランにおいてもぜひ、野生株からの菌根菌の分離と、共生培養の実験を行ってみたい。さらに、他の由来の菌との共生試験も行いたい。器内の共生培養に成功したら、次には器外での共生培養を行ってみたい。要するに、鉢植え、庭植えのマヤラン栽培ができないかという事である。どの様な条件を整備してやればこの様な事が可能か、自然状態でマヤランが要求している環境がどの様なものかを推定するための良いデータとなるであろう。

Rhizanthella では、開放系での共生培養の試行がある (Warcup 1985, 1991)。この様な条件下では、結果のばらつきが大きい、*Rhizoctonia* に寄生する様な菌の存在が知られているので (Truhan 1990)、これらは、単に環境が良好ではなかったというだけではなく、菌根菌に干渉する菌の影響があったとも考えられる。

3 試験管内開花, 結実

3.1 寄生植物の試験管内開花例

今回菌寄生植物のマヤランで試験管内開花がみられたが、一般的な緑色植物は純粹培養（無菌培養）でも生活環を完結できると考えられる。しかし通常半寄生植物や完全寄生植物では必ずしもこれが可能でなく、試験管内開花や、生活環の完結の報告は多くない。緑色植物と言っても、菌根菌に依存するところが大きいと考えられるラン科植物では、試験管内開花が可能で、これまでにいくつかの報告がある (Knudson 1930, Tanaka 1957, Livingston 1962, 渡辺 1975, Kerbauy 1984, Wang 1988, Peak *et al.* 1989)。菌寄生のランの培養としては、オニノヤガラ（報告があるが、開花には至っていない (Nakamura 1962, 1967, 1976, 1982, Nakamura, *et al.* 1975, 中村 1978)）。ラン以外の寄生植物では、半寄生の *Striga senegalensis* や (Okonkwo 1964)、全寄生のナンバンギセルの開花例が知られている (Tashima, *et al.* 1974)。菌寄生性のランの二員培養では、*Dimymoplexis minor* (Burgeff 1936)、*Gastrodia verrucosa* (Tashima *et al.* 1978) で開花がみられたとされており、少なくとも両者で開花直前まで行った様ではあるが、何れも実際の開花の証拠（開花中の写真、図版など）の提示はない。

3.2 花芽の分化と発達に必要な条件—光, 温度

Cymbidium の開花には、温度、日長、シュートのエイジ等様々なファクタがからんでおり、未だ明確な花芽分化条件は知られていない。これらのファクタと開花の関連を説明する概念として、Flowering Target Area が提案されている (Vacin 1952)。また、根茎の試験管内培養では時々開花を見る事があるが、花芽分化には特定のホルモン条件が必要である (渡辺 1975, Wang 1988, Paek *et al.* 1989)。これらに対し、マヤランでは、特定の気候条件や、外生ホルモンと言ったものは必要とせず、20℃恒温暗黒下または16時間日長下でも花芽分化やその後の発達が可能であることが明らかになった。このような条件下では、どの様な機構によって花芽分化やその後の発達が起きているかは非常に興味深い問

題である。恐らく時間が非常に重要な要因としてはたらいっているものと思われる。培養植物の観察によると、栄養成長が一定量になると花芽形成がおき、根茎の先端に鱗片葉で包まれた花芽が形成される。この後2カ月程度で開花にいたる。いったん開花すると、その花茎の付け根付近の根茎上に別の花芽が形成され易くなり、しばしば、根茎の一部から多数の花茎が叢生する(水野ら 1991, 第6, 8図)。開花を開始した個体は、培地の更新が定期的に行われていさえすれば、年中適当な間隔で開花を続ける。培地の更新を怠ると、徐々に開花しにくくなり、開花した場合も花茎が極めて短く(10cm以下)、ついには全く開花しなくなる。この場合でも根茎の成長は続く。このような状態になったものを植え替えると、植替後1~3ヶ月にかけて、目立って開花が多くなる。このような事から、マヤランの開花リズムは条件が良ければフリーランニングで、栄養飢餓状態にする事で、ある程度と同調化が可能であると考えられる。もちろん、マヤラン自体の持つ開花リズムの実態を明らかにする事も必要で、栄養条件や環境条件をできるだけ一定にした状態で培養し、開花の記録を取る必要がある。栄養条件を一定にするためには定期的な植替が必要であるが、このとき、植替による障害が出る可能性があり、障害を最少にするためには液体培地に半浸漬で培養するのがよいと思われる。液体培地を使えば、培地成分の変化のモニタリングも容易で、通常のサンプリング分析の他、EC(塩類濃度を反映)や屈折率(糖濃度を反映)ならば外部から非接触で測定可能である。

一方、中部日本の自然条件下では、開花は6~11月までみられるが、主な開花期は7月である。人工培養下ではフリーランニングのリズムが、自然条件下では同調化している。これは恐らく、温度による制御の結果であると考えられる。菌根菌の活動の温度特性、従って、マヤランからみると、各種養分の availability の温度特性についても考えなくてはならないが、これについては全くデータがないので、とりあえず、マヤランについてのみ考える。基本的には、マヤランの開花リズムは、自然状態でもフリーランニングであり、花芽形成ないし花熟状態へは季節にかかわらず切り替わるものとする。しかし低温下では実際の花器官の形成は抑制され、暖かくなってから成長が開始される。このため、7月に開花が起こる。8~11月の開花は、開花の2ヶ月前の5~9月の段階で始めて花熟状態になったものによるものであろうと考えられる。9月以降に花熟状態になったものは、翌年の開花になるであろう。特に9月頃の秋まだ暖かい内に花熟状態になったものは、恐らく翌年のいちばん早く6月に開花するものではないであろうか。この仮説を検証するためには、自然群落の開花数調査と環境計測を継続的に行い、「花熟状態への到達速度の温度応答関数」と「花器発達の温度応答関数」のパラメータ推定を行えば良い。具体的な方法は、水野、加古 1982 に詳しい。この方法は、栄養成分の変動が、花成に及ぼす影響の解析にも応用できる。いずれにしろ、この様な研究により、温度や栄養成分の制御により、同調培養系を作成できる。同調培養系と言っても、最短周期、最長周期、最良周期(分散最少)等が考えられる。この様な培養系が出来ると、今度は、マヤラン自体の体内成分の変動を追跡する事が意味を持つようになる。どの様な代謝変動が花成を支えているかと言う事が種々の物質レベルで明らかにする事ができ、何が花成にキーファクタかが明確化されるであろう。

水野ら 1991 に記したように、育成した個体の中には、試験管内で非常に良く開花するものと、全く開花しないものが含まれている。これらの株間には外見上の大きな違いはなく、

その理由は不明である。現在の環境条件は、すべてのマヤランに100%開花を誘導する条件にはなっておらず、なにか、マヤランにとって中途半端な条件下で培養を行っているのであろう。これとは別に、本来開花する個体が始めて開花する場合に、開花に必要な条件は何であろうか。サイズ、体重（生重、乾物重）、デンプン蓄積、養分蓄積、フロリゲン？、温度、高糖濃度など、様々な要因が考えられるが、明確化したいものである。

これまでの実験では、試験管内開花をした個体のうち、約40%がなんら手を加える事なく結実した（水野ら1991）。ただし、大きなさくの中に、充実した種子を多量につくる個体であっても、常に開花すれば必ず結実するというわけではなく、全く結実せず落花したり、結実してもほとんどさくが肥大しない事もあり、更にかなり大きなさくでも胚のある種子が少なかったりする。なぜこのような差が生ずるのかは明確ではないが、培地の更新直後には起こりにくい事から、母株の栄養状態によるものと考えられる。同一個体にもこのような差が生ずるが、その他に開花はするが、一向に結実しない個体がある。この内の一部分は pelorism による薬柱の奇形が原因であると考えられる。最初に開花した個体はこの例である（水野ら1991, 第5, 7図参照）。そして、非結実個体の半数以上は peloria であると思われる。ラン科植物は一般に高度の虫媒花であると考えられているが、中には自家受粉を行うものも知られている。マヤランの場合は、(A) 自然状態と同様の受精を伴わない胚発生、(B) 試験管内という特殊な環境下で発現した受精を伴わない胚発生、(C) 自然状態と同様の自家受粉、(D) 試験管内という特殊な環境下で発現した自家受粉等が考えられるが、たぶん(C)ではないかと考える。

4 生理及び個体生態

生理的問題で最も興味のある問題は、通常の緑葉ランと比較して、どの様な機能や代謝が異なっているであろうかという点、つまり、菌寄生性の物質的基盤である。この点を本質的に明らかにするためには、通常の緑葉ラン、無葉緑有葉ラン、緑色無葉ラン（マヤラン）、無葉緑無葉ラン相互の比較検討が必要であろう。これはマヤランだけを扱っては恐らく解決しない。しかしマヤランだけについても、「無葉性」を支える物質的（代謝的）基礎、無葉になった事で逆に植物の変化させられている部分は何か、「緑色」である事により果たされている様々な機能などについて考えたい。クロロフィルを持っているようだが事実か、クロロフィルなど光合成関連色素の定量、光合成をしているのか、光合成量の測定、根茎、花、果実の呼吸量の測定、地上部の出現から枯死までの総光合成量／総呼吸量はどの程度か、これらの事実が明らかになれば菌依存度／光合成依存度がはっきりし、マヤランの炭素経済の全貌が明らかになる。

さらに、「緑色」問題と関連して、白色根茎を明所に移して培養しても、緑化が非常に遅い。緑色根茎も、カンラン、シュンランの根茎よりかなり緑色が薄い。葉緑体の構造、機能には違いがないか等々の問題がある。

また、アントシアニンは通常光が当たると合成される事が多いが、暗黒下で培養されたマヤランの花には、照明下で培養されたものと同様にアントシアニンの着色がある。暗黒下で植物を培養すると、節間が著しく伸長し、いわゆるモヤシになるが、マヤランの場合にはそのようにならない。

5 形態

5.1 出葉

マヤランの最大の形態的特徴は、無葉である事である。他の温帯性シンビジウムと比較した場合は、根茎自体は同様なものであるし、根茎に根がない事も同様である。他の温帯性シンビジウムは、自然状態ないし培養条件下でも、なんら特別な処理をする事なく出葉する。ただ、無処理条件下では、根茎の先の芽の数に比べて、実際に出葉するのは圧倒的に少数である。この様なものでも、サイトカイニン処理をする事により出葉させる事ができる（上田，鳥瀉 1969）。マヤランの根茎にサイトカイニン（BA）処理を行い、他の温帯性シンビジウムと同様の出葉を期待したが、不調であった。確かに、苞葉は通常の2倍近くに大きくなったが、それがさらに成長する事はなかった。サイトカイニン濃度を上げると次第に成長は鈍り、培地が褐変した。この様なものをホルモンフリー培地へ移しても展葉はしなかった。サイトカイニンの種類を替えたり、オーキシンやジベレリン処理と組み合わせたらどうであろうか。その他、ABA，エチレン，ブラシノライド，各種抗ホルモン剤，ビタミン，ポリアミン，等々をはじめとする，ホルモン，アンチホルモン，代謝阻害物質等様々な生理活性物質をテストして，出葉するかどうか確かめたい。

5.2 peloria 株と非 peloria 株の比較

前述のように，この三宅島産種子由来の個体群中には，かなり多数の peloria 個体が含まれていた。このことは，この種子の遺伝的背景として，peloria があつたと考えるべきであろう。マヤランの peloria は，全く唇弁と同一形態というのではなく，多数のランに一般的にみられるような，唇弁と花弁との中間形態を取るものである。そして，少なくとも一部は，薬柱が棒状で，薬帽が3個あり，花粉形成不全であるという，薬柱の奇形を伴う。ただし，開花中個体の器外からの観察によれば，必ずしも奇形を伴わない peloria があるようで，また，peloria の程度も個体ごとに違う（つまり連続変異）様に見える。

その他，特記すべき形態上の事項として，背地性（negative geotropism）枝の出現の問題がある。良く知られているように（Morel 1974, fig. 4-18），温帯性シンビジウムの根茎は，強い屈地性を持っている。しかし，マヤランの根茎の培養中には，1個体の中の，多数の根茎の分枝の中に，花茎とは別に，花茎や，根茎と全く形態の異なる1～数本の背地性の枝が出現する事がある。その特徴は，背地性でまっすぐ上に向かって伸長する事，リゾイドがないこと，節間が花茎や通常の根茎より短いこと，苞葉が若干大きいこと，花茎と同様背地性ではあるが，決して花をつけないことなどである。この様に，通常の花茎や，根茎と著しく形態の違うものが突如出現し，成長を続ける。形態学的，解剖学的な詳細な記録が必要であるし，その正体はなにか，なぜ背地性が生ずるのか，天然には存在するのか，背地性枝を屈地性枝に人為的に転換できるのか，正の屈地性枝を背地性枝に人為的に転換できるのか，花茎への転換は可能なのかなど，さまざまな問題がある。これは，Nitsch and Nitsch 1967 が *Plumbago* で報告している“Vegetative inflorescences”である可能性がある。

6 生態

6.1 saprophyte/mycoparasite

従来マヤランなどの植物に対して、腐生植物 saprophyte ないし、腐生者 saprophagous organism と呼んで来たが、腐生 saprophagy という観点からみると、腐生する菌類や動物に対して、腐生植物の栄養摂取形態は明らかに異なっている。つまり、腐生動物や腐生菌類は生物遺体を直接消化する能力を持っているが、ランの種子発芽過程で知られているように、腐生植物にはそのような力はなく、そのような能力のある菌に寄生をすることにより生活している。このような事実に対しては、すでに Arditti が saprophitic ではなくて parasitic であると述べている (Arditti 1982)。したがって、この様な植物に対しては腐生植物 saprophyte ではなく、菌寄生者 mycoparasite という表現が最も適当であろう。これにたいして、糖+無機塩というマヤランの人工培養条件下の栄養摂取法は、まさに典型的な saprophytism である。

寄生植物の中には様々な形態の物があるが、種子発芽から花芽形成までの段階を地中で過ごし、その後花茎伸長が起き、地上に姿を現し、開花結実するものも多い。このような形態の寄生性植物は通常葉緑素を欠き白色の物が多いが、本種の地上部は緑色であり葉緑素は存在すると思われる。しかし、緑葉は存在しておらず、花茎と結実したさく果が緑化するのみで、光合成可能な部分の面積は小さいので、全炭素同化に占める光合成の割合は小さいと考えられ、いわゆる強度の菌栄養 (strongly mycotrophic) 植物と言えようが、詳細については今後の研究に待ちたい。なお、さく果の光合成量は極めて小であるとする報告がある (Benzing and Pockman 1989)。また全暗黒下でも、明瞭な徒長を起こすことなく開花を見たことにより、炭素同化のみならず、形態形成の面でも光の役割は小さいと考えられる。おそらく菌根菌との二員培養でも同様に全暗黒下の開花が期待され、この場合は絶対的菌栄養 (absolutely mycotrophic) ないし、完全菌栄養 (obligatory mycotrophic) ということができる。

6.2 ‘parasite’ を使う理由

この問題に関連して、さらに事態を混乱させている事は、マヤランなどの植物を、菌養ラン (mycotrophic orchids) と呼ぶのか、菌寄生ラン (mycoparasitic orchids) と呼ぶのかという問題である。前者の mycotrophic というのは栄養学 (つまり生理学) の用語で、栄養摂取形態の分類である。autotrophic, lithotrophic, mixotrophic, heterotrophic, organotrophic 等々の用語の中の mycotrophic である。後者の mycoparasitic は食性 (つまり生態学, 行動学) の用語で, parasitic, carnivorous, phytophageous, saprophytic, saprophagous 等の用語と同列である。従って、ある植物の性質をいう場合には、栄養学用語を使っても、食性用語を使っても、基本的には相互の読み替えが可能であるので、問題がないはずであるが、実はこの様な場合通常、例えばシオガマガクは hemiparasite, ナンバンギセルは holoparasite 等と記述する事が圧倒的に多いので、視点を統一する意味から、これら呼称の選択の習慣に合わせて、マヤランを parasite, より詳しくは mycoparasite と呼ぶべきであると考える。

6.3 mycoparasite と phytoparasite の純粋培養

寄生植物を分類すると次のようになる（第3表）。

第3表 寄生性植物および菌の分類

寄生者	寄 主	
	顕花植物	菌
菌	植物病原菌	菌寄生菌
	phytoparasitic fungi	mycoparasitic fungi
顕花植物	植物寄生顕花植物	菌寄生顕花植物
	phytoparasitic phanerogams	mycoparasitic phanerogams

今のところ、何れのカテゴリーの parasite にも純粋培養が成功しているものと不成功のものがある。植物病原菌には、人工培養が容易のものが多いが、ウドンコ病菌やサビ菌のように困難なものもある (Roberts and Boothroyd 1984)。菌寄生菌についても同様である (Manocha 1991, Barnett 1964)。植物寄生顕花植物の試験管内開花については前述した (Tashima, *et al.* 1974, Okonkwo 1961)。菌寄生顕花植物の純粋培養はマヤランの他にはツチアケビの例があるのみである (沢ら 1979, 水野ら 1991, Nakamura 1962, 1967, 1976, 1982, Nakamura, *et al.* 1975, 中村 1978)。

6.4 自然保護

マヤランのように、もともと稀で、そのうえ発見が困難な植物で、しかも生育適地が限られた、繁殖力の弱い植物では、得られる個体数が少ないため植物学的な研究が困難であったり、群落の保護が問題になることがある。しかし、本種の栽培、増殖が自由になったことにより、人工培養下で増殖育成した個体を共生菌を接種した上で、適地に移植することにより、絶滅した、あるいは絶滅に瀕した群落を復元することも可能であろう。また、かつての産地なら、共生菌がまだ存在している可能性もあり、この場合は、単に試験管内結実をした種子を蒔くかあるいは、非共生状態の根茎を植えるだけでよいかも知れない。さらには、マヤランが自然状態で要求している要因を詳しく分析する事により新設の自然公園とか、植物園の一角などで、環境を整える事で、マヤランの群落を全く新しく創生する事もできるかもしれない。

7 分類

7.1 *Cymbidium*

たとえば、本種の植物学的地位について、かつては *Pachyrhizanthus* 属とする見解もあったが (Nakai 1931)、現在はほぼ否定されており (前川 1971, Seidenfaden 1983)、*Cymbidium* 属に属するという点では問題が無いようである。種レベルの分類については、*C. macrorhizon* との関係、及び、*C. sagamiense* との関係など若干の疑問が残ると考えられ、その地位に

については生体資料の比較が望まれている（柳川ら 1981, Seidenfaden 1983）。しかし、本研究で開発された人工培養法によって、野生群落を破壊する事なく多数の生体試料の調査、比較が可能となったので、この情報を基に、過去の記載や標本の再評価が意味を持つことになるものと考えられる。サガミランにしても、交配や、F₂の展開が *in vitro* で可能であるので、通常のアルビノと同様な、単因子劣性遺伝子によるアントシアニン合成欠損であるか検証可能である。

7.2 メリクロン

実生起源の培養個体間の比較では、研究対象としたい野生群落内の特定個体（群）間の比較は意味を持たない場合が有り得る。この場合には、シュンラン等で行われているような、花茎腋芽の培養を行えば（島崎ら 1985）野生個体のクローンを *in vitro* の系で扱う事が可能となる。またこの系を使えば、「培養」という操作によって、野生植物の表現型が変形させられてしまうという危惧についても一定の知識が得られ、野外での表現型（field phenotype）を再現するような培養法を行う事ができるであろう。

8 遺伝

8.1 菌寄生性の遺伝的背景と進化

菌寄生性は形態的には植物寄生性顕花植物の多くと同様に、無葉性と、無葉緑性によって特徴付けられている。無葉性も、他の植物の形質と同様に遺伝的に支配されていると考えられる。遺伝的な背景の分かっている無葉の植物の例は、エンドウ（Snoad 1974, Pyke and Hedley 1983）とトマト（Mathan and Jenkins 1962, Mathan and Cole 1964, Ali and Curason 1976）で知られているが、寄生植物の形態とは相当イメージが違う。ラン科植物のクモラン等や、乾燥地の植物、アスパラガス、カワゴケソウ等も真葉を持たないが、遺伝的機構については明らかではない。薬剤処理で葉の形成を抑えることができることも知られている（Haccius 1975, Varley and Nigram 1981）がメカニズムは明らかではない。

一方、無葉緑性は、一般には葉緑素の合成不能としてとらえられる。しかし、ランの場合は、菌根の炭素経済に対する貢献が大きいため、葉緑素が全くない植物や、葉緑素は十分持っているが、他の何らかの理由により、光合成能がない又は極めて少ない植物が生存可能である。前者については、他の植物では、発芽後数日で枯死してしまうようなアルビノでさえ、長年生育可能で、開花に至り増殖する事が知られている。今までに知られているものとして、*Cephalanthera damasonium* (Godfrey 1933, Renner 1938, 1943), *C. longifolia* (Renner 1943), *C. rubra* (Burgeff 1954), *Epipactis atrorubens* (Füller 1964), *E. helleborine* (Mousley 1927, Godfrey 1933, Renner 1938, Griesbach 1979, Jorgensen 1982, Salmia 1986, 1989a, 1989b), *E. purpurata* (Godfrey 1933, Brooke and Bone 1950, Wiefelspuz 1970, Ricek and Gutermann 1971), *Platanthera hyperborea* (Light and MacConaill 1989), *P. sparsiflora* (Luer 1975), *Triphora trianthophora* (Keenan 1988) 等がある。葉緑素形成に関する遺伝子は核内と葉緑体内に存在し、多くの植物で多数同定されている。上記の植物は恐らく一般

的には核内あるいは葉緑体上の遺伝子の突然変異による白色個体であると考えられるであろうが、単純なポイントミューテーションではない可能性もある。組織培養で得られた白色個体の葉緑体ゲノムで、かなりの頻度での欠失が知られている (Dunford 1991)。植物寄生性顕花植物の例では、*Epifagus virginiana* の葉緑体が調べられており、やはり大幅な欠失がみられているが、半寄生の *Striga asiatica* ではこの様なことは認められていない (dePamphills and Palmer 1990)。菌寄生ランの *Corallorhiza* でも葉緑体DNAは調べられているが、*Oncidium* のプローブに対する反応だけであり、葉緑体DNAの大きさや欠失についての報告はない (Freudenstein 1990)。そのほか遠縁交雑、暗黒 (Beau 1920) や化学薬品 (Grumbach 1982) 等によっても植物は白色化する。後者については今の所、気孔が全くないランとか、電子伝達系がブロックされているランなどが見つかっていないようであるので、この点についてはこれ以上立ち入らない。

このように、*Cephalanthera* や *Epipactis*, *Platanthera* は、単にアルビノになるだけで、菌寄生性ランとして、開花に至る事が可能であり、成熟種子も確認されている (Griesebach 1979, Salmia 1989b)。同様なアルビノは、半寄生の植物寄生性顕花植物においても想定でき、事実発見されている (Renner 1948)。これに葉形成を司る遺伝子 (群) の機能不全が起これば、典型的な全寄生植物となる。*Epipactis*, *Platanthera* には典型的な菌寄生ランは知られていないが、*Cephalanthera* には今の所、*C. austinae*, *C. calcarata* の2種が存在する (Cheng and Lang 1986)。したがって、菌寄生性の *Cephalanthera* は、通常のラン→無葉緑有葉ラン→無葉緑無葉ラン (通常の菌寄生性ラン) という経路で進化したものと思われる。この様な経路とは別に、マヤランのようなタイプを移行形態として含む経路、つまり、通常のラン→緑色無葉ラン→無葉緑無葉ランという経路も考えられる。ところが、*Cephalanthera* には、さらに *C. subaphylla* (ユウシュンラン) という通常のランと、緑色無葉ランの中間の形態のものも存在する (前川 1971)。したがって、これらの事実から、菌寄生性の *Cephalanthera* の成立過程は、両方の経路が考えられ、どちらであったかをいうのは困難である。

いずれにしても、菌寄生性の *Cephalanthera* や *Epipactis*, *Platanthera* の種の成立基盤は以上のように説明可能であるが、マヤランが種として成立するためにはこれだけでは不十分で、マヤランが温帯性シンビジウムであるために生ずる更にもう1個の要因、ネオテニーを考える必要がある。良く知られているように、熱帯性シンビジウムは通常の洋ランと同様に、発芽した種子はプロトコームを形成し、それがある程度成長した後に出葉して植物体を形成する。それに対し、温帯性シンビジウムは、プロトコーム形成の後、直ちに出葉することなく、いったん根茎 (リゾーム) を形成する。この根茎はある程度成長した後に何らかのきっかけで出葉し、植物体を形成する。シンビジウムの根茎は、一般植物の根茎とは異なり、通常地表と水平に伸長せず、また、根茎から直接発根する事なく、さらに、強い屈地性を持つので、発芽点から伸長を開始した根茎はしばしば地下1mにも達する。この様な根茎上に、突然幼植物体の芽が形成され、この芽から形成された茎は通常の植物の性質を持つので当然強い背地性があり、上方に向かって伸長を続け、地上に達した後緑化し、通常の植物体を形成する。地中にあるこの様な背地性の茎は、形態的に明らかに根茎とは異なって、厚いクチクラ、大きな苞葉、疎らなりゾイド、背地性、ときに地表に近い部位からの発根などが特徴である。地上に出現した植物体はその後成長を続け、成体となっ

て開花にいたる。温帯性シンビジウムの根茎は、成体植物や地上に向かって伸長中の幼植物の芽などとは、明らかに異なった発育相に属すると考えられ、一種の幼生 (larva または fetus) であると考えられる。つまり、マヤランは通常の植物でいう、栄養成長相が普通の意味での栄養成長相と幼生相にさらに2分される、あるいは、この3者を同列に考え、成長相全体を3分するような相変化を行うと考える。通常の温帯性シンビジウムの根茎は、自然界でも、人工培養下でもそのままの状態、上方への成長、出葉、発根、開花をみる事はなく、何らかのきっかけで成体植物に相転移しなければそのまま成長を続ける。このため、切断された根茎もまた、新たな個体として成長をし、幼生のままの増殖も可能である。根茎からの直接開花は自然条件下のものでも、通常の人工培養下のものでも見られないために存在しないと考えられていたが、特殊な無菌培養条件下で、根茎から直接ないし、若干の成体葉形成を伴って開花させる事ができる事が分かった (渡辺 1975, Wang 1988, Paek *et al.* 1989)。この様な事から、温帯性シンビジウムが、菌寄生性ランに進化するためには、前述のどちらの経路を通るにしても、葉を失う段階で、幼生状態のまま開花するという、いわゆるネオテニーを種の性質としてもつ必要がある。もちろん、本種とは異なり、生殖成長相のまま葉を失い、更に節間を著しく短縮させるように進化すれば——つまり温帯シンビジウムの幼若相 + *Lecanorchis* 型の生殖成長相という菌寄生性ランではネオテニーは不要である。なお通常の緑葉ランの根茎からの直接開花は、モイワランについてあるとされているが (前川 1971)、詳しい事実関係が不明なので、議論を差し控える。

本種は、他の多くの寄生植物と同様無葉性であるが、一般にラン科植物は、遠縁交雑が容易であるので、もし、マヤランと他の *Cymbidium* との交配が可能であり、更にその後代も可稔なら、交配種やその後代の形質の遺伝的解析により、葉の形態形成の遺伝的背景を明らかにする上で重要な実験系となることが期待される。もちろん、このような事が可能であれば、通常の菌寄生ランが成立する上で重要な形質である、葉形成のみならず、花芽形成やネオテニーの遺伝的背景も明らかになる可能性がある。

実際の交配は、発芽の容易な小型の原種、例えばキンリョウヘン等を用いるのがよいであろう。この交配の F1 および、後代の形質を調べる事により、葉形成にはいくつの遺伝子が関与しているかが推定できるし、同様に「根茎形成性」、「難発芽性」などの遺伝的背景についても解明できるであろう。

このように、単純な条件下で花芽分化及びその後の発達が起きることから、この種を交配親に使うことにより、早期開花シンビジウム、四季咲性ないし不定期咲性のシンビジウムが誕生する可能性がある。また、草丈 (花茎長) が従来のシンビジウムよりもはるかに短いので、矮性のシンビジウムを作出できるかも知れない。また見方を変えて、*in vitro* flowering 可能な、観賞価値の高いシンビジウムや、*peloria* 株を使って、*splash type* のシンビジウムが育成できるかもしれない。

9 要約

- マヤランは 20°C / 暗黒下 / 糖と無機塩のみで生活環を完結できるが、これが最適条件というわけではない。

- マヤランには根茎と花茎の他に、少なくとも無菌培養下では正体不明の背地性茎が存在する。
- マヤランにはペロリアがある。
- マヤランのような生態型のランは、腐生ランや菌養ランではなくて、菌寄生ランと呼ぶべきである。
- 内生菌との関係を含む自然環境下での環境とマヤランの相互関係について明らかにし、マヤランのような環境の擾乱に弱い植物の保護対策が可能である。
- マヤランの無菌培養系は、分類学、生態学、進化学、遺伝育種学、園芸学などにとって、重要な手段となり得る。
- 温帯性シンビジュウムの根茎は、従来の生殖成長相、栄養成長相の区分とは別の成長相、つまり幼若相 (larva, or fetus) と考えるべきである。
- マヤランは、幼若相のまま生殖能力を持つに至ったネオテニーである。

10 文献

1. 阿部真理子, 安藤敏夫. 1982. *Dendrobium* における類縁関係について (第4報) 発芽好適培地の検討と, 有機物要求性の存在. 園学要旨昭57春: 292—293.
2. Ali, M. H., and J. L. Caruso. 1976. Morphogenetic aspects of a leafless mutant in tomato. III. Growth and peroxidase activity of roots. *J. Exp. Bot.* 27:942-946.
3. Anagnostakis, S. L. 1982. Biological control of chestnut blight. *Science* 215:466-471.
4. Arditti, J. 1982. North American Terrestrial Orchids. Orchid seed germination and seedling culture. -A manual.(ed. J. Arditti.). *Orchid Biology, Review and Perspectives, II* :278-293. ed. J. Arditti. Cornell Univ. Press, Ithaca.
5. Arditti, J., R. Ernst, T. W. Yang, and C. Glabe. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana* 5(4):249-255.
6. Barnett, H. L. 1964. Mycoparasitism. *Mycologia* 56(1):1-19.
7. Beau, C. 1920. Sur le rôle trophique des endophytes d'orchidées. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 171:675-677.
8. Benzing, D. H., and W. T. Pockman. 1989. Why do nonfoliar green organs of leafy orchids fail to exhibit net photosynthesis? *Lindleyana* 4(2):53-60.
9. Brooke, J., and G. Bone. 1950. *The wild orchids of Britain*. London. 139pp
10. Burgeff, H. 1932. *Saprophytism und Symbiose*. G. Fischer Verlag, Jena. 249pp.
11. Burgeff, H. 1936. *Samenkeimung der Orchideen*. G. Fischer Verlag, Jena. 312pp.
12. Burgeff, H. 1954. *Samenkeimung und Kultur europäischer Erdorchideen*. G. Fischer Verlag, Stuttgart. 48pp.

13. Burgeff, H. 1959. Mycorrhiza of orchids. The orchids, a scientific survey :361-395. ed. C. L. Withner. John Wiley, N. Y. 648pp.
14. Caldwell, E. B., K. Hinson, and H. W. Johnson. 1966. A strain-specific ineffective nodulation reaction in the soybean, *Glycine max* L. Merrill. Crop Sci. 6:428-496.
15. Campbell, E. O. 1962. The mycorrhiza of *Gastrodia cunninghamii* Hook. f. Trans. Roy. Soc. NZ., Botany. 1(24):289-296
16. Chen, S. C., and K. Y. Lang. 1986. *Cephalanthera calcarata*, a new saprophytic orchid from China. Acta Bot. Yunnanica. 8(3):271-274.
17. Duc, G., A. Trouvelot, V. Gianinazzi-Pearson, and S. Gianinazzi. 1989. First report of non-mycorrhizal plant mutants(*myc*-) obtained in pea(*Pisum sativum* L.) and fababea(*Vicia faba* L.). Plant Sci. 60:215-222.
18. Dunford, R., and R. M. Walden. 1991. Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. Curr. Genet. 20:339-347.
19. Finkler, A., Y. Koltin, I. Barash, B. Sneh, and D. Pozniak. 1985. Isolation of a virus from virulent strains of *Rhizoctonia solani*. J. Gen. Virol. 66:1221-1232.
20. Freudenstein, J. V., and J. J. Doyle. 1990. Evolution of chloroplast DNA in *Corallorhiza*, a genus of leafless orchids. Amer. J. Bot. 77(6 suppl.):132-133.
21. Füller, P. 1964. *Epipactis* und *Cephalanthera*. Neue Brehmbucherei 329:1-52. Wittenberg. (In Salmia 1986)
22. Godfery, M. L. 1933. Monograph and iconograph of native British *Orchidaceae*. University Press, Cambridge. 259pp
23. Griesbach, R. J. 1979. The albino form of *Epipactis helleborine*. Amer. Orchid Soc. Bull. 48(8):808-809.
24. Grumbach, K. H. 1982. Herbicides which inhibit electron transport or produce chlorosis and their effect on chloroplast development in radish seedlings. 1. Chlorophyll a fluorescence transients and photosystem II activity. Z. Naturforsch. sect. C. Biosci. 37(3-4):268-275.
25. Haccius, B. 1975. Durch Phenylboronsäure-Applikation experimentell induzierte "blattlose Knoten". Bot. Jahrb. Syst. 96:90-106.
26. 萩屋薫, 藤田哲子. 1968. シュンランの種子発芽に及ぼす光と温度の影響. ラン科植物の種子形成と無菌培養: 238—244. 鳥潟博高編著. 誠文堂新光社, 東京.
27. Hamada, M. 1939. Studien über die Mykorrhiza von *Galeola septentrionalis* Reichb. f. -Ein neuer Fall der Mykorrhiza-Bildung durch intraradicale Rhizomorpha. Jap. J. Bot. 10:151-211.
28. Hamada, M., and S. I. Nakamura. 1963. Wurzelsymbiose von *Galeola altissima* Reichb. f., Einer chlorophyllfreien orchidee, mit dem Holzzerstörenden pilz *Hymenochaete crocicreas* Berk. et Br. Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV(Biol.) 29:227-238.
29. Harvais, G. 1974. Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts. Can. J. Bot. 52:451-460.

30. Hasegawa, A., and M. Goi. 1987. Rhizome formation in *Cymbidium georingii* Reichb. f. and *Cymbidium kanran* Makino in shoot tip culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 56(1):70-78.
31. Ichihashi, S. 1979. Studies on the media for orchid seed germination. IV. Influence of the characteristics of some culture media on the growth of orchid seedlings. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 48(3):345-352.
32. 市橋正一. 1983. ラン科植物の種子発芽培地における有機質添加の影響 (第1報) ノビル系デンドロビウム. 園学要旨昭83秋:352—353.
33. Ichihashi, S. 1989. Seed germination of *Poneorchis graminifolia*. Lindleyana 4(4):161-163.
34. Jorgensen, E. 1982. *Epipactis helleborine* of Milwaukee's lake park - Revisited after fifty years. Amer. Orchid Soc. Bull. 51(1):41-42.
35. Kano, K. 1965. Studies on the media for orchid seed germination. Mem. Fac. Agr. Kagawa Univ. 20:1-74.
36. 狩野邦雄. 1968. ラン種子の無菌発芽培養基に関する研究. ラン科植物の種子形成と無菌培養:95—152. 鳥潟博高編著. 誠文堂新光社, 東京.
37. Keenan, P. E. 1988. Three-birds orchids at Golden Pond. Amer. Orchid Soc. Bull. 57(1):25-27.
38. Kerbauy, G. B. 1984. *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (*Orchidaceae*). Plant Sci. Lett. 35:73-75.
39. Knudson, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73(1):1-25.
40. Knudson, L. 1930. Flower production by orchids grown non-symbiotically. Bot. Gaz. 89:192-199.
41. 小松田美津留, 米内貞夫. 1989. 組織培養によるカトレアウイルスフリー株の作出 (第1報) 小さく切りだした茎頂組織の培養. 園学雑58別1:478—479.
42. Kondorosi, E., Z. Banfalvi, and A. Kondorosi. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 193:445-452.
43. Kusano, S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. J. Coll. Agric. 4(1):1-66+pl.I-V.
44. Light, M. H. S., and M. MacConaill. 1989. Albinism in *Platanthera hyperborea*. Lindleyana 4(3):158-160.
45. Livingston, R. B. 1962. *Oncidium pusillum* blooming in flask! Amer. Orchid Soc. Bull. 31(12):1007.
46. Long, S. R., W. J. Buikema, and F. M. Ausubel. 1982. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of *Nod*- mutants. Nature 298:485-488.
47. Luer, C. A. 1975. Native orchids of the United States & Canada. NY Botanical. 363pp. ISBN:0-89327-015-6. (In Light and MacConaill 1989)
48. Lugtenberg, B. 1986. Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interaction, Springer-Verlag.

49. 前川文夫. 1971. 原色日本のラン. i-viii, 1-497. 誠文堂新光社, 東京.
50. Manocha, M. S. 1991. Physiology and biochemistry of biotrophic mycoparasitism. Handbook of applied mycology. vol. 1. D. K. Arora et al. ed. Marcel Dekker Inc.
51. Mathan, D. S., and J. A. Jenkins. 1962. A morphogenetic study of lanceolate, a leaf-shape mutant in the tomato. Amer. J. Bot. 49:504-514.
52. Mathan, D. S., and R. D. Cole. 1964. Comparative biochemical study of two allelic forms of a gene affecting leaf-shape in the tomato. Amer. J. Bot. 51(5):560-566.
53. Miyashita, S., H. Hirochika, J. Ikeda, and T. Hashiba. 1991. Linear plasmid DNAs of the plant pathogenic fungus, *Rhizoctonia solani*, with unique terminal structures. Mol. Gen. Genet. 220:165-171.
54. 水野直美, 加古舜治. 1982. 変温度環境下の実験データに基づく温度応答曲線の推定. 生物環境調節 20 (1): 43—50.
55. Moore, R. T. 1987. The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Cera-torhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. Mycotaxon 29:91-99.
56. Morel, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. The orchids, scientific studies. :169-222. ed. C. L. Withner. John Wiley & Sons, Inc. N. Y.
57. Mousley, H. 1927. The genus *Amesia* in north America. Canad. Field Naturalist 41:1-6, 28-31.
58. Nakai, T. 1931. *Pachyrhizanthe* Nakai, gen. nov. Bot. Mag. Tokyo 45: 109-111.
59. Nakamura, S. J. 1962. Zur Samenkeimung einer chlorophyllfreien Erdorchidee *Galeola septentrionalis* Reichb. f. Z. Bot. 50:487-497.
60. 中村信一. 1971. ラン—菌根—菌根菌. 遺伝 25 (10): 28—34.
61. Nakamura, S. J. 1976. Atmospheric conditions required for the growth of *Galeola septentrionalis* seedlings. Bot. Mag. Tokyo 89:211-218.
62. 中村信一. 1978. 培養技術は菌根に代わり得るか—無菌生物学的考察. 日菌報 19: 325—331.
63. Nakamura, S. J. 1982. Nutritional conditions required for the non-symbiotic culture of an achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis*. New Phytol. 90:701-715.
64. Nakamura, S. J., T. Uchida, and M. Hamada. 1975. Atmospheric conditions controlling the seed germination of an achlorophyllous orchid, *Galeola septentrionalis*. Bot. Mag. Tokyo 88:103-109.
65. Nitsch, C., and J. P. Nitsch. 1967. The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. II. The production of reproductive buds. Planta 72:371-384.
66. Ogoshi, A. 1985. Anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*. Fitopathol. Bras. 10(3):371-390.
67. Okonkwo, S. N. C. 1964. In vitro culture of seedlings of *Striga senegalensis* Benth. Nature 204:1108-1109.
68. Paek, K. Y., G. B. Shim, and J. J. Kim. 1989. Exploitation of temperate Cymbidiums and establishment of micropropagation system. I. Asymbiotic germination of

temperate Cymbidiums and effect of media and growth regulators on organogenesis. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 30(3):234-247.

69. dePamphillis, C. W., and J. D. Palmer. 1990. Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. Nature 348:337-339.

70. van der Pijl, L. 1934. Die Mycorrhiza von *Brumannia* und *Epiphrizanthus* und die Fortpflanzung ihres Endophyten. Rec. Trav. Bot. Neerl. 31:761-779.

71. Pyke, K. A., and C. L. Hedley. 1983. Growth and photosynthesis of mutant pea seedlings. Ann. Bot. 52:719-724.

72. Renner, O. 1938. Über blasse, saprophytische *Cephalanthera alba* und *Epipactis latifolia*. Flora 132:225-233.

73. Renner, O. 1943. Notiz über blasse *Cephalanthera* und *Tozzia*. Flora 136:309-317.

74. Ricek, E. W., and W. Gutermann. Beobachtungen an *Epipactis purpurata* Sm. und ihrer chlorophyllfreien Form. Mitt. Naturwiss. Ver. Steiermark 100:294-298.

75. Roberts, D. A., and C. W. Boothroyd. 1984. Fundamentals of plant pathology. W. H. Freeman & Co. N. Y.

76. Salmia, A. 1986. Chlorophyll-free form of *Epipactis helleborine* in SE Finland. Ann. Bot. Fenn. 23:49-57.

77. Salmia, A. 1989a. Features of endomycorrhizal infection of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine*. Ann. Bot. Fenn. 26:15-26.

78. Salmia, A. 1989b. General morphology and anatomy of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine*. Ann. Bot. Fenn. 26:95-105.

79. 沢完, 種田素顕, 藤森律子, 1979. 日本産野生ランの種子発芽に関する研究 (第1報) 四国産野生ランの無菌発芽. 園学要旨昭54春:278—279.

80. Seidenfaden, G. 1983. Orchid genera in Thailand XI. *Cymbidieae* Pfitz. Opera Bot. 72:1-124.

81. 渋谷紀子, 中田耕二, 安藤敏夫. 1983. *Dendrobium* における類縁関係について (第5報) セッコクの有機物要求性. 園学要旨昭58秋:356—357.

82. 島崎一彦, 上本俊平, 白石真一, 郭慶徳. シンビジウムの器官形成に関する研究 (第2報) シュンランの花梗腋芽の培養. 園学要旨昭60秋:372—373.

83. Smreciu, E. A., and R. S. Currah. 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of north America and Europe. Lindleyana 4(1):6-15.

84. Snoad, B. 1974. A preliminary assessment of 'leafless pea'. Euphytica 23:257-265.

85. Tanaka, H. 1957. Orchids flowered in flask. Na Pua Okika o Hawaii Nei. 7(3):100-102.(In Kerbauy, 1984.)

86. Tashima, Y., M. Matsumoto, and S. Kuroki. 1974. Flower initiation of holoparasite, *Aeginetia indica* L. under the nonparasitic condition of sterile culture. Proc. Japan Acad. 50(7):493-496.

87. Tashima, Y., T. Terashita, H. Umata, and M. Matsumoto. 1978. *In vitro* development from seed to flower in *Gastrodia verrucosa* under fungal symbiosis. Trans. Mycol. Soc. Japan.19:449-453.

88. Terashita, T. 1985. Fungi inhabiting wild orchids in Japan (III). A symbiotic experiment with *Armillariella mellea* and *Galeola septentrionalis*. Trans. Mycol. Soc. Japan. 26:47-53.
89. Terashita, T., and S. Chuman. 1987. Fungi inhabiting wild orchids in Japan. IV. *Armillariella tabascens*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis*. Trans. Mycol. Soc. Japan. 28:145-154.
90. 寺下隆喜代, 川上義弘. 1991. キリシマシャクジョウの内生菌根菌. 日菌報 32:207—215.
91. 塚本洋太郎, 狩野邦雄, 勝浦孝昌. 1961. ランの無菌発芽に関する研究 (第1報). 園学要旨 36春:34—35.
92. Tsukamoto, Y., K. Kano, and T. Katsuura. 1963. Instant media for orchid seed germination. Amer. Orchid Soc. Bull. 32:345-355.
93. Turhan, G. 1990. Further hyperparasites of *Rhizoctonia solani* Kuhn as promising candidates for biological control. J. Plant Dis. Protect. 97(2):208-215.
94. 上田博, 鳥瀧博高. 1968. *Cymbidium* の生長点培養における器官形成 (第1報) 連続照明下における培養基添加物の与える影響について. 園学雑 37 (3):240—248.
95. 上田博, 鳥瀧博高. 1969. *Cymbidium* の生長点培養における器官形成 (第2報) 暗培養における生長調節物質の与える影響について. 園学雑 38 (2):188—193.
96. 上田博, 鳥瀧博高. 1969. *Cymbidium* の生長点培養における器官形成 (第3報) シュンランの Rhizome-tip からの shoot 形成過程についての組織学的研究. 園学雑 38 (3):262—266.
97. 植竹ゆかり, 小林喜六, 生越明, 筒井澄. 1988. ラン科植物から分離された *Rhizoctonia* 属菌の同定について. 日植病報 54 (1):114.
98. Vacin, E. F. 1952. Growth and flowering of *Cymbidium* in their original habitats. Amer. Orchid Soc. Bull. 21:601-613.
99. Van Waes, J. M., and P. C. Debergh. 1986. *In vitro* germination of some western european orchids. Physiol. Plant. 67:253-261.
100. Varkey, M., and R. K. Nigram. 1981. Chlorflurenol-induced leafless nodes in *Ricinus communis* L. Ann. Bot. 47:699-701.
101. Vest, G. 1970. *Rj3*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. Crop Sci. 10:34-35.
102. Vest, G., and B. E. Caldwell. 1972. *Rj4*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. Crop Sci. 12:692-693.
103. Wang, X. 1988. Tissue culture of *Cymbidium*: Plant and flower induction *in vitro*. Lindleyana 3(4):184-189.
104. Warcup, J. H. 1981. The mycorrhizal relationships of australian orchids. New Phytol. 87:371-381.
105. Warcup, J. H. 1985. *Rhizanthella gardneri*, its *Rhizoctonia* endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* in western Australia. New Phytol. 99:273-280.

106. Warcup, J. H. 1991. The *Rhizoctonia* endophytes of *Rhizanthella*. Mycol. Res. 95(6):656-659.
107. 渡辺富士雄. 1975. *Cymbidium virescens* の器官形成に関する研究. 東京農業大学昭和49年度卒業論文. pp. 52.
108. Wiefelspütz, W. 1970. Zur Verbreitung der europäischen allogamen *Epipactis*-Arten. Jahresber. Naturwiss. Ver. Wuppertal. 23:38-42.
109. Williams, L. F., and D. L. Lynch. 1954. Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. Agron. J. 46:28-29.
110. Wolff, H. 1927. Zur Physiologie der Wurzelpilze von *Neottia nidus avis* Rich. und von einigen grünen Orchideen. Jahrb. f. wiss. Bot. 66:1(In Burgeff 1936)
111. 柳川定春, 高橋秀男, 大場達之. 1981. 神奈川県のマヤラン類. 神奈川自然誌資料2:47—54.