

菌寄生植物クロヤツシロランと アキザキヤツシロラン根菌との試験管内培養

馬田 英隆¹⁾・山内 仁²⁾・橋本 季正³⁾

1) 鹿児島大学農学部付属演習林 2) 鹿児島県立武岡台養護学校

3) 千葉大学大学院自然科学研究科

In Vitro Culture of a Myco-heterotrophic Orchid *Gastrodia pubilabiata* with a Mycorrhizal Symbiont of *G. verrucosa*

UMATA Hidetaka¹⁾, YAMAUCHI Hitoshi²⁾ and HASHIMOTO Toshimasa³⁾

1) University Forests, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 21-24, Korimoto 1-chome, Kagoshima 890-0065

2) Takeokadai Yogo School, 2760, Ono-cho, Kagoshima 890-0022

3) Division of Diversity and Fractal Science, Graduate School of Science and Technology, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Inage-Ku, Chiba 263-0022

(平成12年10月25日 受 理)

Mycorrhizal symbiotic association was established *in vitro* between protocorms of an achlorophyllous orchid *Gastrodia pubilabiata* and a mycorrhizal fungus of *Gastrodia verrucosa* which is also an achlorophyllous orchid. The mycorrhizal fungus formed pelotons inside the protocorms and the roots. Formation of the roots was not combined with concentration of saccharose, irrespective of the supply of nitrogen nutrition.

Key words: achlorophyllous orchid, *Gastrodia pubilabiata*, *Gastrodia verrucosa*, myco-heterotrophyte, mycorrhizal symbiosis, root formation

キーワード：無葉緑ラン，クロヤツシロラン，アキザキヤツシロラン，菌寄生植物，菌根共生，根の形成

はじめに

無葉緑ランはクロロフィルを喪失しているため，緑色ランとは異なり“一生を通じて”その根に内生する菌類（以下，根菌という）からすべての栄養物の供給を受けていると考えられ，それゆえに，無葉緑ランのような植物を近年では菌寄生植物と呼んでいる（Leake 1994; Nakamura 1981）。無葉緑ランは少数を除けばそのほとんどが無菌条件下での一者培養が困難である（Nakamura 1981; Weatherhead et al. 1986）。根菌との二者培養も同じく困難とされているが，中には培養が可能な種もある（Tashima et al. 1978; Umata 1998a; Warcup 1985）。

以上のように，菌類は無葉緑ランの生存にとって必須の存在であるにもかかわらず，菌類のランに対する生物学的な機能，すなわち菌類のどのような作用で種子は発芽し，

菌類はどのような物質をランに供給しているのか，またどのような種類の菌類がそのランと共生しているのか，などについては不明の点が多い。その解明のためには一者培養と二者培養の二つの培養系の確立が必要であるが，前述のような困難さゆえに，得られている知見は極めて少ない（Leake 1994; Smith and Read 1996）。

筆者らは菌根共生における菌類の機能を明らかにするために，無葉緑ランの一種クロヤツシロラン（*Gastrodia pubilabiata*）の一者培養と根菌との二者培養の，二つの培養系の確立を構築中である。その過程の中で，筆者らはクロヤツシロランを一者培養で発芽・生育させることに成功した（未発表）。本研究では，クロヤツシロラン共生菌の種の特異性を知るために，一者培養で得られたクロヤツシロランのプロトコームとアキザキヤツシロラン（*Gastrodia verrucosa*）根菌との二者培養を試みた。また二者培養系の

下で、培地中の炭素源と窒素源の濃度が菌根共生に与える効果について調べた。

材料と方法

1. 研究材料

1-1. クロヤツシロラン

クロヤツシロランの種子は本学農学部附属高隈演習林内の広葉樹林で採集した。本植物は、我々のこれまでの調査によれば、高隈演習林では10月中・下旬に開花し、11月には結実する。結実したサク果は11月中旬から12月上旬にかけて裂開し、種子は風とともに飛散する。採集した種子は天日乾燥してシリカゲルとともに冷蔵保存すれば、少なくとも3年間は発芽能力を有する。

実験に供したクロヤツシロランのプロトコームは次のようにして得た。種子を前報の方法 (Umata 1998a) に準じて滅菌した後、150℃で1時間乾熱滅菌したアドバンテック東洋製の直径8 mmの円形濾紙上に無菌的に接種した。種子の培養には森らの培地 (森ら1969) を一部変更したものを基礎培地 (表1) として使用した。種子は濾紙と共に基礎培地を10ml入れた試験管内に静置した。23℃の暗黒状態で培養し、14週間後にプロトコームを得た。

1-2. 供試菌

供試菌は、寺下がアキザキヤツシロランの短根から

fragmentation法 (Warcup and Talbot 1967) によって分離した菌 “n58” を用いた。本菌はクランプを有し、アキザキヤツシロランと共生関係を樹立したことが報告されている (Tashima et al. 1978)。

2. 共生培養の方法

培地組成は基礎培地を基にして、炭素源の濃度を変え、窒素源の有無との組み合わせとした (表2)。すなわち、炭素源はサッカロースを使用し、濃度は0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 % (W/V) に設定した。窒素源は硝酸カルシウムと硝酸アンモニウムを用い、基礎培地のままの場合と基礎培地から2種類の窒素源を除いた、2つの条件を設定した。各濃度の炭素源と窒素源が入った培地をシャーレ (直径90 mm) に20ml入れ、シャーレの中央に供試菌を接種し23℃で培養した。培養1週間後に供試菌のコロニー周縁部に20個のプロトコームを静置し、23℃の暗黒条件で培養した。二者培養を11週間行った後に、プロトコームからの発根の有無を観察した。各試験区あたり5枚のシャーレを用意した。本報告では、発根したプロトコームを植物体と定義した。

表2 培地中のサッカロース濃度と窒素源の組み合わせ

| 窒素源 | サッカロース濃度 (%) | | | | |
|-----|--------------|-----|-----|-----|-----|
| 有り | 0.25 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 |
| 無し | 0.25 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 |

表1 基礎培地の組成

| | |
|--------------------|---------|
| 糖源 | |
| サッカロース | 20 g |
| 窒素源 | |
| 硝酸カルシウム | 170 mg |
| 硝酸アンモニウム | 60 mg |
| リン酸、カリウム | |
| リン酸二水素カリウム | 40 mg |
| 塩化カリウム | 80 mg |
| 微量元素 | |
| 塩化マンガン | 0.4 mg |
| 硫酸マグネシウム | 240 mg |
| 硫酸銅 | 0.05 mg |
| 硫酸亜鉛 | 0.05 mg |
| モリブデン酸 | 0.02 mg |
| エチレンジアミン四酢酸ナトリウム鉄塩 | 38.5 mg |
| ビタミン | |
| イーストエクストラクト | 2 g |
| 培地支持体 | |
| 精製寒天 | 10 g |

上記試薬を蒸留水に溶かして1000mlとし、これに寒天を加えた。pHはオートクレーブ前に、0.5モルの塩酸または水酸化ナトリウムで5.7±0.1に調整した。

結果と考察

1. 共生の成立と共生菌の種の特異性

写真1に発根植物体を、写真2にプロトコームの細胞の中に形成されたn58の菌叢を示す。菌叢の形成は、クロヤツシロランとアキザキヤツシロランの根菌n58との間に、共生関係が樹立したことを示している。

この結果に関連して、無葉緑ランで2, 3の類似の結果が報告されている。すなわち、ハルザキヤツシロラン (*Gastrodia japonica*) の根菌がアキザキヤツシロランと (Tashima et al. 1978), また *Didimoplexis minor* の根菌が *D. pallens* と、*Galeola hydra* の根菌が *Galeola sp.* と (Burgeff 1932), それぞれ共生関係を樹立した。今回の結果とこれらの報告の間で共通するのは、根菌と共生したランが、根菌の分離源であるランとそれぞれ属レベルで同じであったことである。Warcup (1981) はあるグループの緑色ランとその根菌との関係について、例外的な事例が存在することは認めた上で、ある特定の分類群に属するランには特定の根菌が関係し、この特異的な関係はランの亜族レベルで認められるとした。

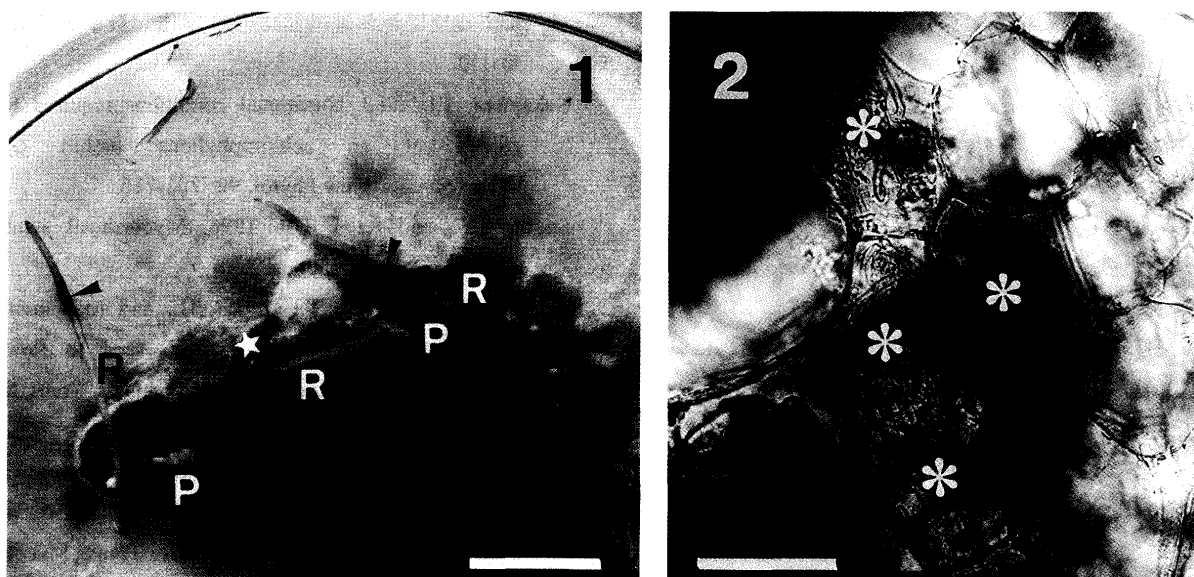


写真1 アキザキヤツシロラン根菌との二者培養で得られたクロヤツシロランの植物体（培地条件：サッカロース2%，窒素源無し）。P：プロトコーム，R：プロトコームから発生した根。星印は軟腐朽のために褐変，萎凋化した根を，矢印は根菌による侵菌が特に激しい褐変した個所をそれぞれ示す。Scale bar: 2cm

写真2 クロヤツシロランのプロトコームの細胞内に形成されたアキザキヤツシロラン根菌の菌毯（☆）。Scale bar: 50/μm

一般に無葉緑ランと根菌との間の種特異性は高いと考えられている。しかし、タカツラン (*Erythrorchis ochobiensis*) は多種多様の菌と共生関係を樹立し (Umata 1998a, 1998b, 1999), 種特異性が低いことが示唆されている。同じように、本研究に用いたクロヤツシロランと近縁のアキザキヤツシロランも18種の根菌との間に共生関係が認められている (Tashima et al. 1978)。この18種の根菌間の分類的な関係は明らかでないが、コロニーの色や形状から複数の種に分かれるようである (馬田・寺下, 未発表)。また、もう一つの近縁種ハルザキヤツシロランの根菌はアキザキヤツシロランに共生機能を示している (Tashima et al. 1978)。これらの結果と今回の結果は、3種のランの根菌には共通の種が存在する可能性を示唆している。従って、共生菌の種が分類的に多様で、しかもそれぞれ3種のランと共生関係を成立していることを明らかに出来れば、種の特異性という問題に新たな見解を提案することが可能である。

2. 植物体の形成

表3に糖濃度、窒素の有無と発根した植物体数の結果を示す。表3から明らかのように、クロヤツシロランのプロトコームからの発根個体数は窒素源の有無に関わらず、糖濃度に関係しなかった。

緑色ランの *Orchis morio* のプロトコームは、(1) 高濃度の糖類 (1% デンプン) と低濃度の窒素 (1 mM 硫酸アンモニア) との組み合わせの時は、菌毯形成とプロトコームの生長が促進され、(2) 高濃度の糖と高濃度の窒素 (10 mM 硫酸アンモニア) の時は、プロトコームの生長は無く、

表3 サッカロース濃度と窒素源の有無が、クロヤツシロランのプロトコームの発根に与える効果：シャーレ1枚当たり (20個のプロトコームを接種) の発根個体数

| サッカロース濃度 (%) | 窒素源 | |
|--------------|----------|----------|
| | 有 | 無 |
| 0.25 | 1.4±1.36 | 1.2±1.17 |
| 0.5 | 1.8±0.98 | 2.0±2.10 |
| 1.0 | 1.8±0.98 | 3.0±1.26 |
| 2.0 | 3.0±1.10 | 2.8±1.94 |
| 4.0 | 0.2±0.40 | 0.4±0.80 |

Tukeyの方法で処理した結果、それぞれの間に1%で有意差はなかった。

(3) 低濃度の糖 (0.1% デンプン) だと窒素濃度の高低に関わらず、プロトコームには軟腐朽が生じ共生関係は破綻し、プロトコームは生長しなかったことが報告されている (Beyrle et al. 1995)。すなわち、*Orchis morio* の場合は糖濃度と窒素濃度との組み合わせが共生成立の大きな要因となったことを示唆している。

クロヤツシロランの種子発芽とプロトコームの生長を一者培養下で調べた結果、サッカロース濃度が4%以下まではプロトコームの生長停止などを伴う阻害効果は見られなかった (馬田・山内・橋本, 未発表)。この時、培地組成、温度、光などの培養条件は今回の二者培養の条件と同じであった。今回の結果は、発根個体数で見ると、糖濃度の生長に作用する効果が一者培養でも二者培養でも変わらないことを示している。*Orchis morio* は糖が低濃度だと軟腐朽が生じプロトコームは生長しなかったが、クロヤツシロランでは糖濃度の高低に関わらず発根した個体数に有意

な差はなかった(表3)。この違いが緑色ランと無葉緑ランとの違いに起因するかは今後の研究課題である。

今まで報告された無葉緑ランの根菌は、その大多数が落葉分解菌、木材腐朽菌あるいは木材の病原菌である(Burgeff 1936; Kusano 1911; Terashita and Chuman 1987)。従って、根菌は容易に細胞壁を破壊することが可能なので、たとえランと共生状態にあっても *Orchis morio* で観察されたように、環境が変化すれば根菌はランに対していつでも病原的になりうると考えられる。本研究では軟腐朽についての調査はしなかったが、*Orchis morio* の糖濃度(0.1%デンプン)に比べれば高濃度の糖(2%サッカロース)培地で根に軟腐朽が観察された(写真1)。筆者らのこれまでの経験によれば、軟腐朽の発生による共生の破綻は、蒸留水のみを添加した場合でも、また試験管の栓を抜いて培地を掻き混ぜただけでも、生じることがあった。このときに共通するのは供試菌の新たな繁茂であった。また、タカツランでは軟腐朽の程度が共生菌の種類によっても系統によっても大きく異なった(Umata 1999)。以上のことから、軟腐朽による共生の破綻には、さまざまな原因が存在するものと思われる。

文 献

- Beyrle, H.F., Smith, S.E., Peterson, R.L., and Franco, C.M.M. 1995. Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Can. J. Bot.* **73**: 1128-1140.
- Burgeff, H. 1932. Saprophytism und Symbiose. Gustav Fisher, Jena, Germany.
- Burgeff, H. 1936. Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen. Gustav Fisher, Jena, Germany.
- Kusano, S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *J. Coll. Agric. Univ. Tokyo* **4**: 1-66 with plates I-V.
- Leake, J.R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.* **127**: 171-216.
- 森寛一, 浜屋悦治, 下村徹, 池上擁春. 1969. 組織培養法によるウイルス羅病植物の無毒化. *農事試験報.* **13**: 45-110.
- Nakamura, S.I. 1982. Nutritional conditions required for the growth of an achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis*. *New Phytol.* **90**: 701-715.
- Smith, S.E., and Read, D.J. 1996. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London.
- Tashima, Y., Terashita, T., Umata, H., and Matsumoto, M. 1978. In vitro development from seed to flower in *Gastrodia verrucosa* under fungal symbiosis. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **19**: 449-453.
- Terashita, T., and Chuman, S. 1987. Fungi inhabiting wild orchids in Japan (IV). *Armillariella tabescens*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **28**: 145-154.
- Umata, H. 1998a. In vitro symbiotic association of an achlorophyllous orchid, *Erythrorchis ochobiensis*, with orchid and non-orchid fungi. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* **34**: 97-107.
- Umata, H. 1998b. A new biological function of Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a myco-heterotrophic orchid, *Erythrorchis ochobiensis*. *Mycoscience* **39**: 85-88.
- Umata, H. 1999. Germination and growth of *Erythrorchis ochobiensis* (Orchidaceae) by monokaryons and dikaryons of *Lenzites betulinus* and *Trametes hirsuta*. *Mycoscience* **40**: 365-369.
- Warcup, J.H., and Talbot, P.H.B. 1967. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. *New Phytol.* **66**: 631-641.
- Warcup, J.H. 1981. The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytol.* **87**: 371-381.
- Warcup, J.H. 1985. *Rhizanthella gardneri* (Orchidaceae), its *Rhizoctonia* endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* (Myrtaceae) in Western Australia. *New Phytol.* **99**: 273-280.
- Weatherhead, M.A., Zee, S.Y., and Barretto, G. 1986. Some observations on the early stages of development of *Eulophia yushuiana*. *Memoirs of The Hong Kong Natural History Society* **17**: 85-90.

要 約

無葉緑ランの一種クロヤツシロランのプロトコームと無葉緑ランの一種アキザキヤツシロラン根菌との間に、試験管内で菌根共生が成立した。根菌はプロトコームおよび根の中に菌毯を形成した。根の形成に対する培地組成の影響では、窒素源の添加の有無に関わりなく、炭素源の濃度は関係しなかった。