〈研 究〉

木材腐朽菌 *Hymenochaete crocicreas* 6 菌株の 生理的性質 (第 1 報)

—菌の生長に及ぼす温度条件, バーベンダム反応及び
タカツルランの種子発芽について—

馬 田 英 隆*

Physiological Properties of Six Strains of a Wooddecaying
Fungus *Hymenochaete crocicreas* (I)
Temperature conditions on fungal growth, Bavendamm
reaction, and germination of *Galeola altissima*

Hidetaka UMATA*

Summary

Some physiological properties of six strains of *Hymenochaete crocicreas* Berk. et Br., including the symbiotic germination of *Galeola altissima* Reich. fil., were investigated. *H. crocicreas* distributed in the tropical Asia is one of white pocket rot fungi, and *G. altissima* is a chlorophyll free orchid of which habitat is the south of Tanegashima Island of Japan, Formosa, Malaysia, and India.

In the temperature-growth test, 6 isolates of *H. crocicreas* are divided into two groups due to their growth at high temperature, namely one group grows well at 35°C, but another is reduced their growth. In Bavendamm reaction, all isolates show positive reaction which suggests the presence of polyphenol oxidases. In the germination test, the symbiotic germination takes place with 5 isolates at 23°C and 30°C, and protocorms are larger at 30°C than 23°C except one isolate. Some variation in the ratio of germination and the size of protocorms arise from fungal partners.

要 旨

タカツルラン短根等から分離された木材腐朽菌 *Hymenochaete crocicreas* 6 菌株の生理的性質について調べた。

(1) *H. crocicreas* 菌の生長に及ぼす温度の影響
35°Cの温度条件での生長結果から 6 種類の菌株は、高温に対して強い菌株と弱いその 2 つのグループに分けられた。

(2) Bavendamm 反応

すべての菌株が反応陽性となりリグニン分解と関係のあることが示唆された。

(3) タカツルランの種子発芽

5 菌株との共生で培養種子は発芽することを認めた。発芽した温度は 23°C と 30°C で、プロトコーム (発芽種子) の大きさは、1 菌株との共生以外は 30°C の方が大きかった。また発芽率、プロトコームの大きさは菌株の種類による差を認めた。

* 鹿児島大学農学部付属演習林

* Research Institute of University Forests, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890

1. 緒 言

Hymenochaete crocicreas Berk. et Br. は熱帯アジアに分布する木材腐朽菌¹⁾で、日本では1957年鹿児島県種子島¹⁾、1963年鹿児島県佐多岬²⁾で採集された。またタカツラン (*Galeola altissima* Reichb. fil.) はツルツアケビとも称し、茎長が著しく伸長する大型の蔓状の無葉緑ランである。わが国では種子島以南に生育し、琉球、台湾、マレーシア、インドに分布している²⁾。

浜田・中村¹⁾はタカツランの内生菌根の菌根型を Tolypophagie であるとし、また内生菌根菌は青島・古川によって木材腐朽菌の1種である *Hymenochaete crocicreas* と同定された^{1,3)}。なお、タカツランの種子発芽は非共生(単独)培養による報告例はなく、*H. crocicreas* 菌との共生培養によって初めて起こる⁴⁾。

本報告はタカツラン短根からの分離菌5菌株、子実体からの分離菌1菌株の計6菌株について、生長に及ぼす温度条件、バーベンドム反応及び共生培養によるタカツラン種子の発芽について調べたものである。これら菌株の材質腐朽性については第2報で報告する予定である。

2. 材料及び実験方法

2.1 材 料

2.1.1 木材腐朽菌 *Hymenochaete crocicreas*

供試腐朽菌の菌株名(仮称)と採集場所、分離者、分離年月、分離箇所は次の通りである。また各菌株はバレイショ・ブドウ糖培地で継代培養してきたものである。

- 1) Ga1001; 鹿児島県熊毛郡西之表町古田(屋久川国有林), 中村信一, 1957年7月, タカツランの短根
- 2) Ga1002; 鹿児島県肝属郡佐多町佐多岬, 古川久彦, 1963年10月, 子実体
- 3) Ga1003; 沖縄県名護市南明治山(沖縄県林業試験場試験林), 寺下隆喜代, 1984年11月, タカツランの短根
- 4) Ga1004; 沖縄県名護市南明治山(沖縄県林業試験場試験林), 寺下隆喜代, 1984年11月, タカツランの短根
- 5) Ga1005; 鹿児島県熊毛郡上屋久町口永良部島, 寺下隆喜代, 1986年5月, タカツランの短根
- 6) Ga1006; 鹿児島県熊毛郡上屋久町口永良部島, 寺下隆喜代, 1986年5月, タカツランの短根

2.1.2 タカツラン種子

1986年11月鹿児島県熊毛郡上屋久町口永良部島でスダジイ (*Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*) の立枯折損木(胸高直径50~150cm, 地上高3~5m)に着生している植物体より果実を採集した。採集した果実表面はミューズ石鹼で洗浄後, 75% アルコールで十分にふき, 滅菌濾紙に包み込みデシケート中(室温)に保存した。

2.2 実験方法

2.2.1 *H. crocicreas* 菌の生長に及ぼす温度条件

① 6種の菌株を下記培地10ml入りペトリ皿(φ90mm)の中央に接種し, 23°Cの温度条件で10日間培養した。

培地組成: Glucose 5.0g, Difco yeast extract 2.0g, Difco bacto-agar 10.0g, 蒸留水1000ml, pH 5.7±0.1 (0.5N HCl あるいは0.5N NaOH にて調整)

② ①で培養した菌のコロニー縁辺部を, 滅菌したポリプロピレン製ストロー(φ5mm)で円盤状にくりぬき, 下記培地10ml入りペトリ皿(φ90mm)の中央に接種し, 5°C, 15°C, 23°C, 30°C, 35°Cの温度条件でそれぞれ10日間培養後, 接種した種菌ディスク縁からコロニーの縁までの距離を測定した。

培地組成: Ca(NO₃)₂·4H₂O 170mg, MgSO₄·7H₂O 240mg, KCl 80mg, NH₄NO₃ 60mg, KH₂PO₄ 40mg, EDTA-Na-Fe Salt 3,850mg, MnCl₂·H₂O 0.4mg, CuSO₄·5H₂O 0.05mg, ZnSO₄·7H₂O 0.05mg, H₃BO₃ 0.6mg, H₂MO₄·H₂O 0.02mg, Sucrose 20.0g, Difco yeast extract 2.0g, Difco bacto-agar 10.0g, 蒸留水1000ml, pH 5.7±0.1 (0.5N HCl あるいは0.5N NaOH にて調整)

2.2.2 Bavendamm 反応

この反応の試験はNobles⁵⁾の方法に従って行った。

① 下記培地10ml入りペトリ皿(φ90mm)の中央に接種し, 23°Cの温度条件で10日間培養した。

培地組成: Difco malt extract 12.5g, Difco bacto-agar 20.0g, 蒸留水1000ml, pH 5.7±0.1 (0.5N HCl あるいは0.5N NaOH にて調整)

② ①で培養した菌のコロニー縁辺部を2.2.1の②と同様の方法で, 下記培地10ml入りペトリ皿(φ90mm)の中央に接種した。23°Cの温度条件で7日間培養した後, 菌糸の生長, 酸化帯の有無, 着色の強さなどを調べた。またタンニン酸, 没食子酸を含まない培地にも接種して比較した。

培地組成: Difco malt extract 15.0g, Difco bacto-

agar 20.0g, Gallic(あるいはTannic) acid 5.0g, 蒸留水1000ml, pH5.7±0.1(0.5N HCl あるいは0.5N NaOHにて調整)

2.2.3 タカツラン種子の共生発芽試験

① 菌の培養

6種類の菌株を下記培地10ml入の試験管(18mm×180mm)に接種し、23°Cの温度条件で26日間培養した。

培地組成: Ca(NO₃)₂·4H₂O 170mg, MgSO₄·7H₂O 240mg, KCl 80mg, NH₄NO₃ 60mg, KH₂PO₄ 40mg, EDTA-Na-Fe Salt 3,850mg, MnCl₂·H₂O 0.4mg, CuSO₄·5H₂O 0.05mg, ZnSO₄·7H₂O 0.05mg, H₃BO₃ 0.6mg, H₂MO₄·H₂O 0.02mg, D-Man-nitol 20.0g, Difco yeast extract 2.0g, Difco bacto-agar 10.0g, 蒸留水1000ml, pH5.7±0.1(0.5NHCl あるいは0.5N NaOHにて調整)

② 種子の前培養

種子は75%アルコール30秒, 10% 晒粉で10分間滅菌し, その後滅菌蒸留水で水洗, デシケータ中で1日乾燥後, 乾燥滅菌した円盤状の汙紙(東洋汙紙KK製ペーパーディスクφ8mm)上に散布し, 汙紙と一緒に下記培地に植え込み23°Cの温度条件で8日間培養し, 雑菌混入のないものを共生実験に供した。

培地組成: Sucrose 10.0g, Dried yeast powder 5.0g, Difco bacto-agar 10.0g, 蒸留水1000ml, pH5.7±0.1(0.5N HCl あるいは0.5N NaOHにて調整)

③ 共生培養

前培養した種子は汙紙と一緒に菌培養試験管に置床し, それぞれ5°C, 15°C, 23°C, 30°C, 35°Cの温度条件に設定したインキュベータで6ヶ月間培養した後, プロトコム(発芽種子)の大きさ, 発芽率を調べた。なお発芽率は試験管10本に対する発芽した試験管本数とした。

3. 結果と考察

3.1 *Hymenochaete crocicreas* 菌の生長に及ぼす温度条件

5°C, 15°C, 23°C, 30°C, 35°Cの温度条件下で9日間培養した各菌株の生長結果を表-1に示す。この表に明らかなように, 低温の5°CではGa1005及びGa1006だけが非常にわずかに生長する。またGa1002は23°C, 30°C, 35°Cで旺盛な生長を示し, ペトリ皿(φ90mm)を超えて生長したため評価できなかったが, それぞれの菌株の生長が最高に達する温度は, Ga1006が23°Cで, Ga1001, Ga1003~Ga1005は30°Cであった。また高

表-1 接種10日後の6菌株の菌糸生長*と温度
Table 1 Temperature and mycelium growth* of 6 isolates of *H. crocicreas* 10 days after inoculation.

Isolate 菌株名	Temperature (°C)				
	5°C mm	15°C mm	23°C mm	30°C mm	35°C mm
Ga1001	0	2	18	30	13
Ga1002	0	18	>43**	>43**	>43**
Ga1003	0	5	38	>43**	38
Ga1004	0	2	15	25	25
Ga1005	1	12	30	35	0
Ga1006	1	20	37	37	18

* 種菌ディスクの縁からコロニー縁までの平均距離(mm)

Mean distance (mm) from the edge of inoculated mycelium disk to the edge of colony.

** 90mm ペトリ皿での最大生長距離(mm)

Maximum growth distance (mm) in a 90mm Petri dish.

温35°CにおいてGa1002, Ga1004は30°Cと変わらない生長を示すが, Ga1001, Ga1003, Ga1005, Ga1006は生長が低下し, 特にGa1005は全然生長を示さず, 23°Cに移しても菌糸生長は認められなかった。なお生長に対する温度要求の産地別差は認められない。

以上のことから, Ga1002及びGa1004は高温に対して強い菌, その他は高温に対して弱いと考えられる。

3.2 Bavendamm 反応

表-2及び写真-1は5%タンニン酸または5%没食子酸を添加した培地と, これら2つの酸を含まない培地に各菌株を接種し, 7日間培養した結果を示した。これらの表・写真が示すように, タンニン酸または没食子酸の添加によりすべての菌株に酸化帯が認められる。また写真-1に見られるようにタンニン酸(B)はすべての菌株に対し生長阻害を与え, 特にGa1005, Ga1006は全然生長を示さない。同様に没食子酸(C)はGa1004以外の菌株に対し生長阻害を与え, 特にGa1005はタンニン酸添加区と同様全然生長を示さない。しかし, Ga1004は他の菌株とは反対にわずかな生長促進が見られる。

以上のように, Bavendamm 反応では各菌株とも陽性を示し, リグニン分解能を有するものと思われ, このことは本菌が白色腐朽を起こすという報告¹⁾に一致する。しかし, タンニン酸, 没食子酸の添加による6種の菌株の反応は様でなく, タンニン酸はGa1005, Ga1006の

表-2 タンニン酸, 没食子酸添加培地と無添加培地に接種 7 日後の菌糸生長*と Bavendamm 反応

Table 2 Mycelium growth* and Bavendamm reaction of *H. crocicreas* 7 days after inoculation on tannic acid, gallic acid and no acid agar medium.

Isolate 菌株名	Control コントロール	Tannic Acid (5%) 5% タンニン酸	Reaction 反応	Gallic acid (5%) 5% 没食子酸	Reaction 反応
	Growth 生長(mm)	Growth 生長(mm)		Growth 生長(mm)	
Ga1001	15	2	++	5	+++
Ga1002	25	9	++	15	+++
Ga1003	25	11	++	16	+++
Ga1004	4	1	++	5	+++
Ga1005	11	0	+	0	+
Ga1006	22	0	+	14	+++

* 種菌ディスクの縁からコロニー縁までの平均距離 (mm)
Mean distance (mm) from the edge of inoculated mycelium disk to the edge of colony.
酸化帯有り presence of the colored zone.
+: 淡褐色 pale brown ; ++: 褐色 brown ; +++: 濃褐色 strong brown.

Isolates Control Tannic acid (5%) Gallic acid (5%)
菌株名 コントロール 5% タンニン酸 5% 没食子酸

写真-1 *H. crocicreas* 6 菌株のバーベンドム反応
Fig. 1 Bavendamm reaction of 6 isolates of *Hymenochaete crocicreas*

生長を停止させ、没食子酸は Ga1005 の生長を停止させ、一方 Ga1004 の生長をわずかながら促進させる。

したがって以上 2 つの実験結果から、これら 6 種の菌株のあいだには生理的な差が存在しているものと思われる。

3.3 種子発芽

種子発芽に及ぼす菌株による違いと温度の影響を表-3, また一例として Ga1004 との共生発芽, 同菌株との共生生長 (培養後約 1 年) の状況を写真-2, 写真-3 に示す。

表-3 にみられるようにいずれの温度でも Ga1001 との共生培養だけが種子発芽を見ない。共生発芽した中で、Ga1003~Ga1006 との共生は 80~100% と高い発芽率を示すが、Ga1002 との共生はおよそ 30% と低い。さらにプロトコムの大きさは (Ga1004, Ga1006) > (Ga1005, Ga1002) > Ga1003 となり、明らかに菌株による差を示している。また共生発芽した温度は 23°C, 30°C だけで、しかも Ga1002 以外のプロトコムの大きさは 30°C で大きい。

これまでの報告によれば^{6,7)}, 緑色地上ランは共生菌の種類と系統により共生現象がかなり異なる。本実験の結果でも発芽率やプロトコムの大きさが菌株の種類によって異なることが明らかになった。このことが本菌 6 菌株の生理的な違いとどのように関連するか現在のところ不明で、今後検討する予定である。

表-3 共生培養 6 ヶ月後のタカツラン種子の発芽率とプロトコームの直径

Table 3 Ratio of germination and diameter of protocorm of *Galeola altissima* 6 months after symbiotic culture with *H. crociereas*.

Isolate 菌株名	5°C		15°C		23°C		30°C		35°C	
	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm	%	mm
Ga1001	—		—		—		—		—	
Ga1002	—		—		30	1.0-1.5	30	<1.0	—	
Ga1003	—		—		80	<1.0	80	<1.0	—	
Ga1004	—		—		100	1.0-1.5	100	1.5-2.0	—	
Ga1005	—		—		—		100	1.0-1.5	—	
Ga1006	—		—		100	<1.0	100	1.5-2.0	—	

% 発芽率, Ratio of germination
mm プロトコーム直径(mm), Diameter of protocorm
— 未発芽, no germination

写真-2 Ga1004 によるタカツランの共生発芽
Fig. 2 Symbiotic germination of *Galeola altissima* with *H. crociereas* Ga1004

謝 辞

この研究を行うにあたり鹿児島大学田島良男名誉教授（現 南九州大学教授）に貴重な教示を賜った。前鹿児島大学寺下隆喜代教授にはタカツラン共生菌のすべてを譲り受けるとともに菌株の保存をまかされ、さらに貴重な助言を頂いた。両教授に謹んで感謝の意を表する。また鹿児島大学藤田晋輔教授、鹿児島大学黒木晴輝助教授の有益な助言に対しても深謝する。

写真-3 Ga1004によるタカツランの共生生長（共生培養約 1 年後、スタジイおがくず培地）
Fig. 3 Well developed *Galeola altissima* with symbiosis of *H. crociereas* Ga1004 on the medium containing sawdust of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* about 1 year after
A: 鱗片葉, Scaly leaf; B: 短根, Short root
C: 長根, Long root

引用文献

1) M.Hamada und S.I. Nakamura: Wurzelsymbiose von *Galeola altissima* Reichb. f., Einer chlorophyllfreien Orchidee, mit dem

- Holzerstronden Pilz *Hymenochaete crocicreas*
Berk. et Br., Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV
(Biol.) **29**, 227~238 (1963)
- 2) 大井次三郎: “日本植物誌 顕花篇”, 1978 p.417
- 3) 古川久彦: 私信 (1991)
- 4) 田島良男, 馬田英隆: 未発表
- 5) M.K. Nobles: Identification of cultures of
woodinhabiting Hymenomycetes. Can. J.
Botany, **43**, 1097~1139 (1965)
- 6) G. Hadley: Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. New Phytol., **69**, 1015~1023 (1970)
- 7) J.H. Warcup; Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. New Phytol., **72**, 387~392 (1973)
- (1992. 1. 9受理)