

ツブコナサルオガセ *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis* (地衣類) から単離された菌と藻の成長と温度, pH および糖アルコールとの関連

近 芳明^a, 柏谷博之^b, 政田正弘^a, 田村五郎^a

^a千葉大学園芸学部生物化学 271 千葉県松戸市松戸 648

^b国立科学博物館植物研究部 305 茨城県つくば市天久保 4-1-1

Effects of Culture Conditions on the Growth of Symbionts from
Usnea confusa subsp. *kitamiensis*

Yoshiaki KON^a, Hiroyuki KASHIWADANI^b, Masahiro MASADA^a and Goro TAMURA^a

^a Department of Bioresources Chemistry, Faculty of Horticulture, Chiba University

648 Matsudo, Chiba 271, JAPAN;

^b Department of Botany, National Science Museum

4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN

(Received on May 1, 1993)

Growth rate of the isolated mycobiont of *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis* was highest at 18°C and at pH 4-5. On the other hand, the growth rate of phycobiont was highest at 21°C, being not significantly affected by pH values of the medium. Sugar alcohols such as mannitol, adonitol and sorbitol added to the medium enhanced the growth of mycobiont and induced formation of tiny fibrils coated by gelatinous substance, which were similar to those fibrils artificially synthesized by both mycobiont and phycobiont.

緒言

近年、地衣体の人工培養に関する研究が進み、地衣体形成が観察しやすいオオロウソクゴケ属 (*Xatnithoria*)、ハナゴケ属 (*Cladonia*)、サルオガセ属 (*Usnea*) 等を用いて地衣体の再合成実験が活発に行われている (Bubrick and Galun 1986, Ahmadjian et al. 1980, Ahmadjian and Jacobs 1982)。これらの実験から Ahmadjian らは、地衣体の形態形成において共生菌の藻に対する種選択性はそれほど厳密ではないと報告した (Ahmadjian and Jacobs 1981, Ahmadjian and Jacobs 1987)。一方、近頃は *Usnea confusa* Asah. subsp. *kitamiensis* (Asah.) Asah. の人工培養組織から地衣体を分化させる条件として温度が重要な要因になってい

ることを報告した (Kon et al. 1990)。さらに、共生菌を別種の地衣類から得た藻と混合し、地衣体の形成頻度や地衣成分の合成能力を本来の共生藻の場合と比較したところ、異種の藻の場合には地衣体の形成頻度が著しく低下することを報告した (Kon et al. 1993)。しかし、菌と藻が共生関係に入った後、地衣体が分化してくる過程で両者はどのような役割と機能を持つかについては全く解明されていない。本研究では地衣体から分離培養した菌と藻の成長と形態の変化に与える温度、pH および糖アルコールの影響を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

(1) 菌と藻の単離

本研究で使用したサルオガセ属地衣, *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis* は1987年3月に神奈川県丹沢山で採集した。地衣体は山本らの方法 (Yamamoto et al. 1985) で一旦共生菌と共生藻からなる増殖組織として試験管内で培養した。その後その組織を温和な条件下で乳鉢ですりつぶし、麦芽・酵母エキス培地 (麦芽エキス2%, 酵母エキス0.2%, 寒天2%W/V 以後は培地と略す) の平板培地に広げ、20°Cで培養し菌と藻とを分離した。得られた菌は暗所・20°Cの条件下で約2か月ごとに継代培養し、また藻はBBM培地 (Bishoff and Bold 1963) に1%のブドウ糖を添加した培地で明所 (約13 μ mol/m²/S)・20°Cで約3か月ごとに継代培養したものを実験材料に供した。いずれの継代培養においても直径15mm, 長さ85mmの試験管を使用し、1本あたり5mlの培地を分注した。

(2)成長量の測定

菌の成長量の測定は次のように行った。試験管内で継代培養した菌を温和な条件下で乳鉢ですりつぶし、蒸留水に懸濁する。この懸濁液を攪拌しながら、その一定量 (乾燥重量で約1mg) を10mlの培地を含む直径25mm, 長さ120mmの試験管内に置床し、ポリエチレン製のキャップで栓をした。一定期間 (8または9週間) 暗所で培養後、寒天から分離し、45°Cで1日乾燥後、その乾燥重量を測定した。培地のpHは5.8に設定し、温度に関しては10, 15, 18および21°Cに設定した。培地のpHの影響に関しては、オートクレーブ後、水酸化カリウムまたは塩酸を使用して4, 5, 6, 7, 8および9に調整し、いずれも18°Cで暗所培養した。マニトール, アドニトールおよびソルビトールの各糖アルコールについては0%, 1%, 2%の濃度で組み合わせて培地に加え、上に述べた方法で成長への影響を調べた。

藻の成長量は寒天平板培地上で増殖した藻の packed cell volume (PCV) で測定した。試験管内で継代培養した藻を蒸留水中に懸濁し、その一定量を直径90mmのプラスチックシャーレの寒天培地上にガラススプレッダーで広げた後、光量13 μ mol/m²/sのもとで培養した。一定期間 (6週間) 培養後、すべての藻を蒸留水に懸濁し、その

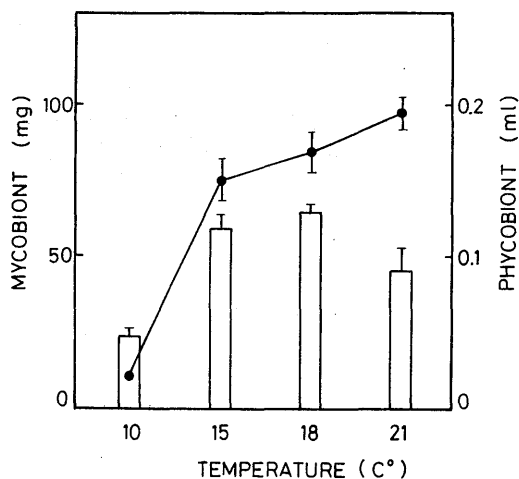


Fig. 1 Effect of the temperature on the growth rate of the isolated mycobiont and phycobiont from *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis*. Each column represents the mean \pm S. D. of 10 determinations of mycelia (left), and each plot represents the mean \pm S. D. of 3 determinations of phycobiont (right). Vertical bars give \pm S. D. where larger than the symbols. The culture conditions are described in the text.

PCVを測定した。培養温度は10, 15, 18および21°Cに設定した (培地pHはいずれも5.8に調整)。培地のpHはオートクレーブ後、水酸化カリウムまたは塩酸を使用して調整し4, 5, 6, 7, 8および9に設定した (培養温度いずれも18°C)。

(3)微小突起の観察

形態： 微小突起の内部形態の観察は、GAW溶液 (グリセリン：エチルアルコール：水=1：1：1 V/V) を用いて封入した後、光学顕微鏡を用いて行った。微小突起の形成および外部形態の観察は走査型電子顕微鏡を使用し、試料の処理方法は近らの方法 (Kon et al. 1990) に従った。

微小突起形成頻度の測定： 突起形成に対する温度の効果を調べるために、2%マニトールを加えた培地を40本用意し、各10本を10, 15, 18および21°Cで培養した。10本の試験管あたり、微小突起が少なくとも1本以上形成した試験管の本数を%で表した。培養条件は成長量測定時と同じである。

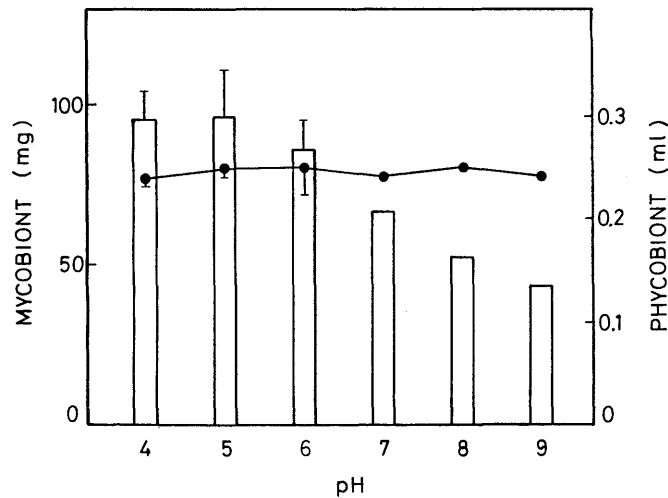


Fig. 2 Effect of pH on the growth rate on the isolated mycobiont and phycobiont from *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis*. Each column represents the mean \pm S. D. of 10 determinations of mycelia (left) and, each plot represents the mean \pm S. D. of 3 determinations of phycobiont (right). Vertical bars give \pm S. D. where larger than the symbols. The culture conditions are described in the text.

結果および考察

分離した菌ならびに藻の成長と温度との関係を Fig. 1 に示した。培養9週間では、設定した 10, 15, 18 および 21°C の各温度での菌の成長量の平均値は、試験管あたりのおおの 22.4, 58.4, 63.9, 44.4mg であった。設定した温度の中では 18°C がもっとも成長が良く、次に 15, 21°C と続き、10°C では 18°C の約 3分の1 程度であった。いずれの菌も培地上に褐色の菌糸塊を作るが、菌糸は培地中には伸びていなかった。

藻の成長量は、培養期間3週間から6週間の間で明かな成長の違いが認められ、培養6週間後での比較では 21°C がもっとも良く、18 および 15°C ではわずかに低下し、10°C では極端な低下が認められた。

Fig. 2 は、菌ならびに藻の成長量と培地の pH との関係を示した。培養9週間では、pH を 4, 5, 6, 7, 8 および 9 に設定した条件下での菌の成長量の平均値は、試験管あたりのおおの 95.4, 96.4,

86.2, 66.2, 52.0, 43.0mg であり、酸性側で良くアルカリ性側になるにしたがって低下する傾向が認められた。一方、藻の成長量は、培養6週間後では pH の違いによる大きな差は認められなかった。

Fig. 3 は菌の成長におよぼす糖アルコールの効果を示している。Fig. 3-A はマニトールとアドニトール、Fig. 3-B はマニトールとソルビトールを組み合わせて使用し、培養8週間後の結果である。マニトールを 0, 1 および 2% のときの成長量を 100 とし、それにアドニトールを 1 または 2% の割合で加えたときの成長量を相対的に比較すると次のような結果が得られた。すなわち、マニトール 0% の時にはアドニトールの効果は 148, 191 であった。また、マニトール 1% でのその効果は 141, 186 であり、マニトール 2% では、135, 169 であった。このことから、マニトールに加えたアドニトールの効果は菌の成長に対して相加的な効果があることが判明した。また、アドニトールに対するマニトールの効果も同様に相加的で

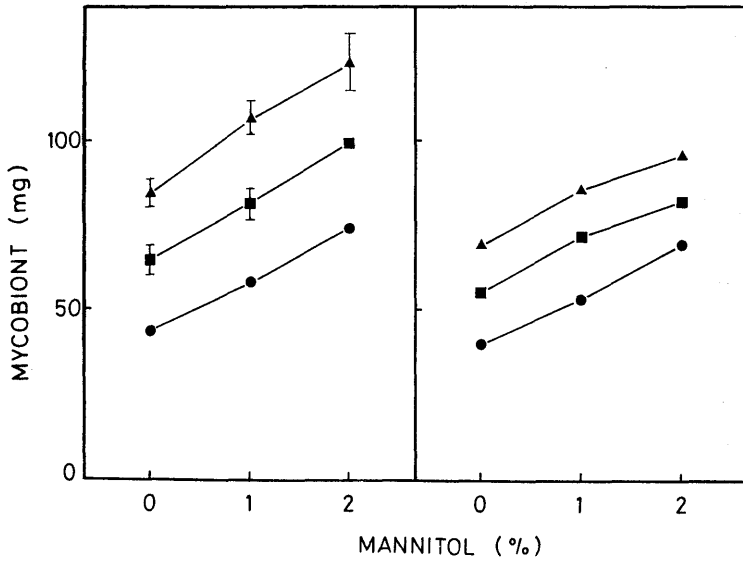
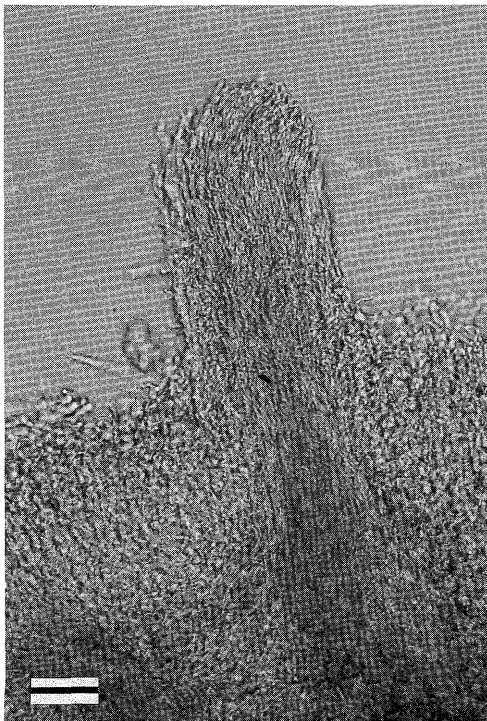


Fig. 3 Effects of various sugar alcohols on the growth rate of the isolated mycobiont from *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis*. (A) The effect of mannitol and adonitol on the growth rate. ●, adonitol 0%; ■, adonitol 1%; ▲, adonitol 2%. (B) The effect of mannitol and sorbitol on the growth rate. ●, sorbitol 0%; ■, sorbitol 1%; ▲, sorbitol 2%. Vertical bars give S. D. where larger than the symbols. The culture conditions are described in the text.



あった。

マニトールとソルビトールを組み合わせた時の結果を Fig. 3-B に示した。 Fig. 3-A と同様に、マニトール 0%でのソルビトールの効果は 139, 173であった。また、マニトール 1%では 133, 160であり、2%では 118, 138であった。マニトールに対するソルビトールの効果もアドニトール同様に相加的であった。

培地に 1%または 2%の濃度でマニトールまたはアドニトールを添加して培養すると、6-8 週間後に、褐色の菌糸の塊のところどころに微小な突起が観察された。その突起は培養 3 ヶ月を経過しても伸長が認められず、その大きさはもっとも伸長したもので長さ約 80 μ m、幅は突起の中央部

Fig. 4 Formation of the small fibril on the surface of colony cultured with the addition of 2% mannitol. Longitudinally running hyphae (2-2.5 μ m thick) was observed in the center of the fibril. scale bar=20 μ m. The culture condition are described in the text.

分で約 $45\mu\text{m}$ であった。内部には長軸に沿って中軸様の細い菌糸 ($2-2.5\mu\text{m}$) の束が観察された。これは下の菌組織の中にも認められた。しかし、菌と藻の混合培養組織から分化して、形成された地衣体の皮層と中軸の間に位置し、共生藻と接する球状の菌糸細胞 (Kon et al. 1990) はまったく観察されなかった (Fig. 4)。

走査型電子顕微鏡でその表面構造を観察すると、粘液様の物質によっておおわれていることが認められた (Figs. 5-A, B)。同様の粘液様の物質の存在は *Usnea strigosa* (Ach.) Eaton または *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis* の共生菌と共生藻から再合成された地衣体の表面にも認められている (Ahmadjian and Jacobs 1982, Kon et al. 1990)。しかし、糖アルコールを含まない培地で培養された菌糸の塊から形成される微小な突起では、糖アルコール添加の場合に認められたような粘液様物質の存在はまったく観察されなかった (Fig. 5-C)。

この微小突起の形成頻度と培養温度との関係を調べたところ、 18°C でもっとも良く、培養 12 週間後における形成頻度は 80% であった。しかし、 15°C では 20% に低下し、 10°C および 21°C では

突起の形成はまったく認められなかった。この温度依存性は、混合組織からの地衣体の形成率と温度との関係 (Kon et al. 1990) と同じ傾向を示した (Fig. 6)。

Usnea confusa subsp. *kitamiensis* から分離した菌の成長量と培養温度との関係において、 18°C が最も良く、 21°C では成長量は低下した。山本らは (Yamamoto et al. 1987) さまざまな気候区から採集した地衣類から得た増殖組織 (菌・藻類混合) の成長量は、温度によって大きく影響を受け、その最適温度はその地衣類が生育していた環境条件に似ていることを報告している。つまり、*Usnea diffracta* Vainio などの落葉広葉樹林帯に生育するサルオガセ属地衣類の増殖組織は培養温度 $15-20^\circ\text{C}$ で成長がよく 29°C では成長は認められない。本実験に使用した *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis* は本州の落葉広葉樹林帯に属する神奈川県丹沢山から採集したもので、成長の最適温度が 18°C であることは山本らの上記の結果と一致する。また、この 18°C は共生菌とそれ本来の共生藻とから地衣体が再分化する際の最適温度 (Kon et al. 1990) とも一致する。しかし、藻と温

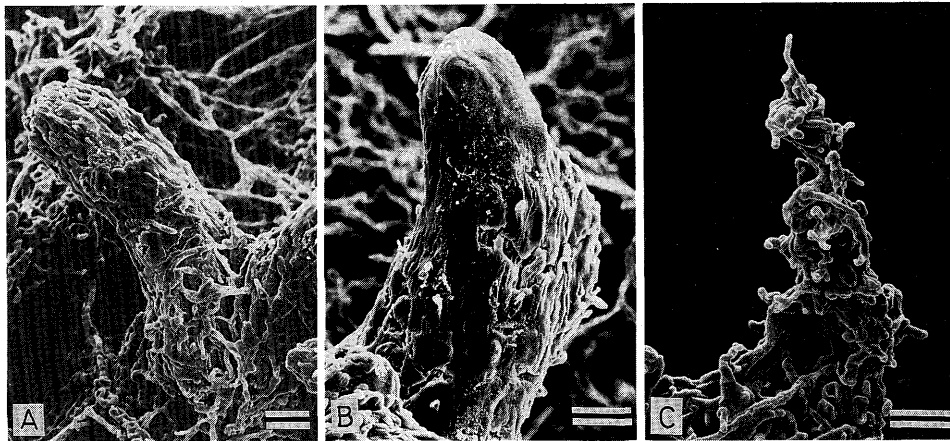


Fig. 5 Effects of mannitol and adonitol on the culture of mycobiont from *Usnea confusa* subsp. *kitamiensis*. (A) Effect of mannitol on the culture. Small upright fibrils were formed and coated with extracellular material. scale bar = $10\mu\text{m}$. (B) Effect of adonitol on the culture. Small upright fibrils were formed and coated with extracellular material. scale bar = $10\mu\text{m}$. (C) Aerial hyphae protruded from colony formed by mycobiont cultured on substratum containing no sugar alcohol and not coated with extracellular material. scale bar = $10\mu\text{m}$. The culture conditions are described in the text.

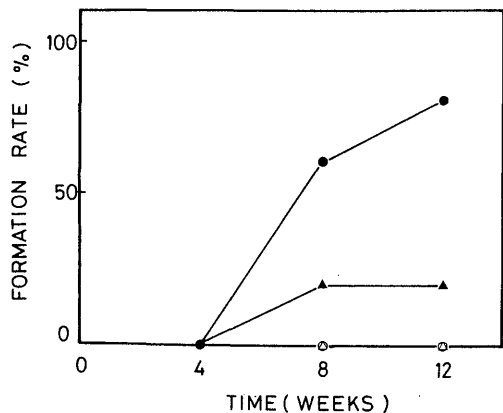


Fig. 6 Effect of temperature on fibril formation rate. The culture conditions are described in the text. ○; 10°C; ▲, 15°C; ●, 18°C; △, 21°C.

度との関係は、菌のそれとは必ずしも一致しなかった。

菌の成長におよぼす pH の影響は、pH4 から 6 において成長が良く、アルカリ性側で低下した。このことは Hamada (1989) の *Ramalina siliquosa* (Hud.) A. L. Sm. での結果と一致する。ところが、藻と培地 pH との関係においては、菌ほどおおきな影響は認められなかった。同様の藻の特性は吉村ら (Yoshimura et al. 1987) も *Cladonia vulcani* Sav. を用いて報告している。以上のことから、共生藻をもつ増殖組織からの地衣体の分化には、それを構成する共生菌の活発な成長が必要であることが推察される。

共生菌と共生藻からの地衣体の再分化の過程は、Ahmadjian および近らによって述べられている (Ahmadjian and Jacobs 1982, Kon et al. 1990)。すなわち、発生の初期段階では菌糸と藻がソレジア状のものを形成し、その後そのソレジア状のものを構成する菌糸はある一定方向を向いて伸長していく。このとき、菌糸表面には粘液様の物質が認められる。この粘液様の物質は菌糸相互を連結させる機能を持ち、地衣体の形態形成に重要な働きを担っていることが推察されている (Ahmadjian and Jacobs 1985)。加えて、粘液様物質によって接着した菌糸束内で藻細胞の成長が抑制され本来のゴニジア層内にとどまるように機能している

とも推察される。

天然の地衣体では、光合成によって得た炭水化物は *Trebouxia* などの緑藻ではアドニールのかたちで菌類に送られ、菌糸内でマニトールなどの異なった糖アルコールに変換され蓄積される (Vicente and Legaz 1988)。再合成実験における地衣体形成時においても、光照射が地衣体形成において重要な培養条件であることから (Kon et al. 1990)、試験管内で再合成された地衣体中においても天然と同じ糖アルコールの転流が起きていると推察できる。このことから、共生菌に与えられた糖アルコールの一部は粘液様物質の合成に利用され、その結果として菌糸相互が接着し、ある一定方向を向いて伸長すると考えられる。突起の中心部には、細い菌糸束からなるサルオガセ属に特有な中軸構造が認められた。この中軸構造は突起の下の菌の組織の中にも伸長している。Ahmadjian ら (Ahmadjian and Jacobs 1982) は共生菌と共生藻からの再合成実験において、中軸構造の形成を認めているが、その形成の時期を明らかにしていない。しかし、地衣体の形成がある程度進んだ時期に形成されるものと推察している。近ら (Kon et al. 1990) も、共生菌と共生藻からなる増殖組織からの地衣体形成の段階において、培養 3 ヶ月後の地衣体の内部で中軸の存在を認めており、またそれは下の共生菌と共生藻からなる増殖組織の中にも延びていることを報告している。

共生菌と共生藻からの地衣体の再合成による地衣体形成の場合には皮層と中軸の間にはさまれ、共生藻と接近した球形の菌糸がみられる。しかし、糖アルコールを与えた菌から形成された微小な突起の中ではそのような菌糸は認められない。サルオガセ属地衣類の髄層は細い菌糸から成り立っているが、共生藻と接近した菌糸は細胞壁が肥厚していて、細い菌糸は認められず、再合成地衣体内部の球形の菌糸との類似性が考えられている (Kon et al. 1990)。菌のみから形成された微小突起中には球状菌糸が認められないことは、菌糸が藻細胞と接触していないためとも推察される。培地に糖アルコールを添加した今回の実験では、菌のみでも微小な突起形成が観察されたことは注目し得る。この突起の形成は、共生菌と共生藻の

混合組織から形成された地衣体と次の点でよく似ている; 1) 温度の依存性が同じである。2) いずれにも表面には粘液様物質が観察される。3) 表面菌糸は粘液様物質におおわれながら長軸方向に伸長しており、内部には未熟であるが中軸構造が観察されるなどである。しかし相違点として; 1) 軸の周囲には混合組織から形成された地衣体にみられるように球状の細胞からなる菌糸が認められない。2) 共生藻を持つものでは地衣体長が3mm以上に達するのと比較して、菌糸単独では培養4ヵ月経過しても極端に成長が悪いなどである。さらにこの突起を若い天然地衣類と比較すると、表面が粘液様物質におおわれているものの中軸、皮層および髄層の発達・分化が極端に悪い。以上の点を考慮すると、分化に必要な培養条件に加えて、藻細胞は地衣体の成長や分化においてただ単に糖アルコールの供給以外に何らかの重要なはたらきをしていると推察される。

また、糖アルコールを添加した培地で培養した菌は、それを含まない培地での菌と比較して、ウスニン酸および天然地衣類には検出されない未知の成分を合成することが認められる。この未知成分の構造に関しては別途に報告するつもりである。

本論文をまとめるにあたり黒川 道博士に有益なご助言を頂いた。この場をお借りして感謝申し上げます。

引用文献

- Ahmadjian V., Russell L. A. and Hildreth K. C. 1980. Artificial reestablishment of lichens. I. Morphological interactions between the phycobionts of different lichens and the mycobionts *Cladonia cristatella* and *Lecanola chrysoleuca*. *Mycologia* **72**: 73-89.
- and Jacobs J. B. 1981. Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. *Nature* **289**: 169-172.
- and —— 1982. Artificial reestablishment of lichens. III. Synthetic development of *Usnea strigosa*. *Journ. Hattori Bot. Lab.* **53**: 393-399.
- and —— 1985. Artificial re-establishment of lichens IV. Comparison between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. *Lichenologist* **17**: 149-165.
- and —— 1987. Studies on the development of synthetic lichens. *Bibl. Lichenol.* **25**: 47-58.
- Bischoff H. W. and Bold H. C. 1963. Some soil alga from enchanted rock and related algal species. *Physiological studies IV. Univ. Texas Publ. No 6318*: 95.
- Bubrick P. and Galun M. 1986. Spore to spore resynthesis of *Xanthoria parietina*. *Lichenologist* **18**: 47-49.
- Hamada N. 1989. The effects of various culture conditions on depside production by an isolated lichen mycobiont. *The Bryologist* **92**: 310-313.
- Kon Y., Kashiwadani H. and Kurokawa S. 1990. Induction of lichen thalli of *Usnea confusa* Asah. ssp. *kitamiensis*(Asah.) Asah. in vitro. *J. Jpn. Bot.* **65**: 26-33.
- , ——, Masada M. and Tamura G. 1993. Artificial synthesis of mycobiont of *Usnea confusa* ssp. *kitamiensis* and *Usnea orientalis* with their natural and non-natural phycobiont. *J. Jpn. Bot.* (in press).
- Vicente C. and Legaz M. E. 1988. Lichen enzymology. *In CRC Handbook of Lichenology*, chapter IV. C 239-281. CRC press.
- Yamamoto Y., Mizuguchi R. and Yamada Y. 1985. Tissue culture of *Usnea rubescens* and *Ramalina yasudae* and production of usnic acid in their culture. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 3347-3348.
- , ——, Takayama S. and Yamada Y. 1987. Effects of culture conditions on the growth of Usneaceae lichen tissue cultures. *Plant Cell Physiol.* **28**: 1421-1426.
- Yoshimura Y., Kurokawa S., Nakano T. and Yamamoto Y. 1987. A preliminary report of cultures of *Cladonia vulcani* and the effects of the hydrogen ion concentration on them. *Bulletin of Kochi Gakuen College* **18**: 335-343.