

(資料)

日本産トガリアミガサタケ類 6 菌株の培養特性

成松 眞樹・坂本 裕一*・佐藤 志穂*

Cultural characteristics of 6 strains of black *Morchella* species in Japan.

Maki Narimatsu, Yuichi Sakamoto*, Shiho Sato*

要 旨

日本産トガリアミガサタケ類*の培養特性を明らかにするため、温度別、pH 別培養試験や木材腐朽能試験を行った。3 種各 2 菌株、計 6 菌株を 5, 10, 15, 20, 25 および 30°C の 6 温度条件で培養した結果、平均菌糸伸長速度は 5°C から 25°C までは培養温度に応じて増大し、30°C では顕著に低下した。また、培地 pH を 5, 6, 7 および 8 として培養した結果、平均菌糸伸長速度は pH8 が最も速かったが、条件間の差は温度より小さかった。さらに、各菌株を接種した培地でパーベンダム反応が見られたことから、各菌株はいずれも木材腐朽能を有すると推測された。以上の結果から、日本産トガリアミガサタケ類の菌糸伸長に及ぼす影響は、今回試した範囲では温度が pH より大きいことや、木材腐朽能を有することが示唆された。

*アミガサタケ属菌 (*Morchella* sp.) の黒色種

キーワード: 培養温度, 培地 pH, 木材腐朽能, トガリアミガサタケ

目 次

はじめに	3.2 結果と考察
1 培養至適温度	おわりに
1.1 材料と方法	謝辞
1.1.1 供試菌株	引用文献
1.1.2 供試培地	
1.1.3 菌糸の培養と測定	
1.2 結果と考察	
2 培養至適 pH	
2.1 材料と方法	
2.1.1 供試菌株	
2.1.2 培養条件と測定	
2.2 結果と考察	
3 木材腐朽能	
3.1 材料と方法	
3.1.1 供試菌株	
3.1.2 培養条件と測定	

* 公益財団法人岩手生物工学研究センター

はじめに

アミガサタケ属菌 (*Morchella* sp.) は北半球を中心に分布する子囊菌類で、子実体の形状から黄色種 (*Esculenta* clade)、黒色種 (*Elata* clade) および *Rufobrunnea* clade に大別される (O'Donnell et al. 2011)。このうち黒色種の数種類 (*M. importuna*, *M. septimelata* など) は、主に中華人民共和国で食用として栽培されている (Liu et al. 2018)。

これまでの分子系統解析により、アミガサタケ属菌の黒色種 (以下、トガリアミガサタケ類と記す) は、日本に少なくとも3種が分布することが判明しており (坂本ら2022)、これらはいずれも岩手県内に発生することから、県内での栽培化が期待されている。筆者らは、これまでに露地やパイプハウスで栽培試験を行い、子実体の発生や栽培期間の短縮に成功したが (成松2021, 成松2022)、商業栽培を想定すると、種菌培養期間の短縮や、栽培管理手法の構築も必要である。一般に培養中の菌糸の伸長速度は、培養温度や培地の水素イオン濃度 (pH) に影響される。また、温度は栽培環境の管理指標としても重要である。さらに、アミガサタケ属菌は、種類によって腐生性を示すため (Hobbie et al. 2017)、腐生性の確認は、培地組成を決定するうえで重要である。しかし、日本産トガリアミガサタケ類の培養至適温度、培養至適pHや腐生性と言った培養特性は不明である。そこで、pHや培養温度を変えてトガリアミガサタケ類の菌糸を培養し、菌糸伸長速度を比較した。併せて、パーベンダム反応により腐生性 (リグニン分解能力) の有無を調査した。

1. 培養至適温度

1.1 材料と方法

1.1.1 供試菌株

供試菌株は日本産トガリアミガサタケ類3種類の各2菌株、計6菌株である (表、図1)。このうちmor4S①1とMB149S③2の2菌株の種 (Genealogical concordance phylogenetic species recognition) は *Morchella* sp. *Mel*-21 であり、MB22S①1とMB86①、MB30S①1とMB130SC①4の各菌株は、それぞれ同一の不明種である (坂本ら2022)。以上の各菌株は、使用まで4℃で

表 供試菌株

菌株番号	種*	採取地	採取年	分離源
mor4S①1	<i>Morchella</i> sp. <i>Mel</i> -21	岡山県	2018	多胞子
MB22S①1	不明種1	岩手県	2018	多胞子
MB30S①1	不明種2	青森県	2018	多胞子
MB86①	不明種1	岩手県	2019	組織
MB130SC①4	不明種2	北海道	2020	単胞子
MB149S③2	<i>Morchella</i> sp. <i>Mel</i> -21	岩手県	2021	多胞子

*5 遺伝子座 (rDNA, ITS, *EF-1*, *RPB1*, *RPB2*) の塩基配列に基づく分類 (坂本ら 2022)

保存した。



図1 供試菌株を分離した子実体

左から mor4, MB22, MB86, MB86, MB130, MB149 (バーは 50 mm)

1.1.2 供試培地

前培養にはポテトデキストロース寒天 (PDA) 平板培地 (PDA (日水製薬) 39 g, 純水1000 mL) を用いた。本培養にはポテトデキストロース酵母寒天 (PDYA) 平板培地 (PDA39 g, 酵母抽出物 (OXOID) 1.5 g, 純水1000 mL) を調製し、1規定水酸化ナトリウム水溶液でpHを6に調整して、直径9 cmのプラスチック製ペトリシャーレに分注後、オートクレーブにて121℃で20分間、滅菌して用いた。シャーレの裏側には十字線を記し、菌糸伸長速度の測定線とした。

1.1.3 菌糸の培養と測定

前培養として、各供試菌株を6日間培養した。培地上に伸長した菌叢の先端を内径7 mmのコルクボウラーで打ち抜いて、各培地の中央に一片を接種し、5, 10, 15, 20, 25および30℃の6温度条件にて暗培養した。反復は菌株、温度ごとに5個とした。培養終了後、シャーレの裏側を実体顕微鏡で観察し、菌叢の先端と測定線の交点を油性ペンで標識した。接種した菌糸片の縁と各交点の距離をデジタルノギスで測定し、測定線4本の平均値を当該試料の代表値として、培養日数(4日)で除して菌糸伸長速度を算出した。

1.2 結果と考察

菌糸伸長は各条件で見られた (図2, 図3)。菌糸伸長速度は5℃から25℃までは培養温度に応じて増大し、30℃ではMB149S③2を除いて顕著に低下した (図2)。供試6菌株の平均菌糸伸長速度は8.4 mm/日 (25℃) ~ 0.9 mm/日 (5℃) で、

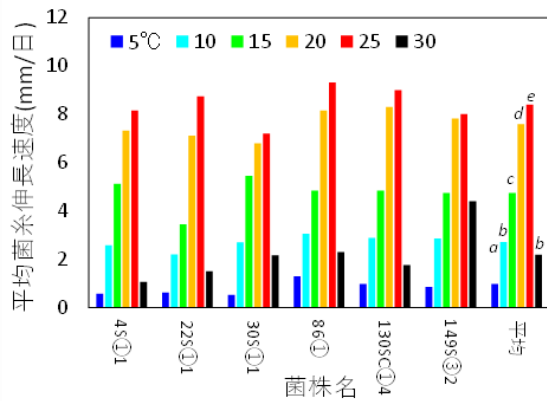


図2 各培養温度における各菌株の平均菌糸伸長速度

各菌株を图中的各培養温度で pH6 にて 4 日間培養した。異なるアルファベットは培養温度間の有意差を示す。(p<0.05, Tukey-Kramer の多重比較)

25 °C が他の温度より速かった (p<0.05, Tukey-Kramer の多重比較, 図2, 図4)。一方, 菌株ごとに見ると, 6 菌株中 4 菌株は, 25 °C と 20 °C が同程度であった。

以上の結果から, 今回用いた菌株の培養至適温度は, 20°C ~ 25°C の範囲にあることが推察された。蔡ら(2020)は, *Morchella* sp. *Mel*-21 の菌糸伸長至適温度を 23 °C としている。また, Winder2006 は, トガリアミガサタケ類の 1 菌株を 24°C で培養し, 菌糸伸長速度を 9.0 mm/日と報告している。今回の結果は, これらの既報と同程度であった。一方, 30 °C では 6 菌株中 5 菌株で菌糸伸長速度が急速に低下した。これらのことから, 精密な温度管理が難しい野外での栽培において, 高温による菌糸伸長の抑制(高温障害)を回避するためには, 20 °C を上限として管理することが妥当と考える。

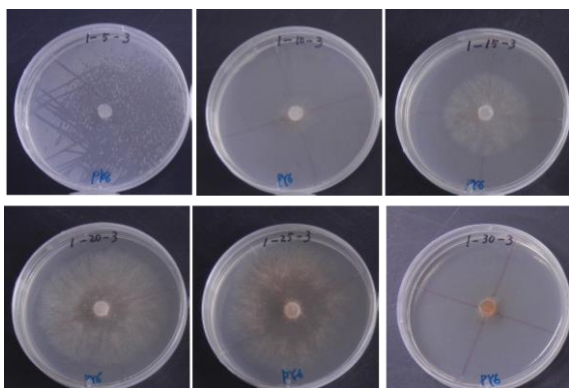


図3 各培養温度で培養した 4S①1 株の菌叢
左上から右下に, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C および 30°C で 4 日間培養した菌叢を示す。

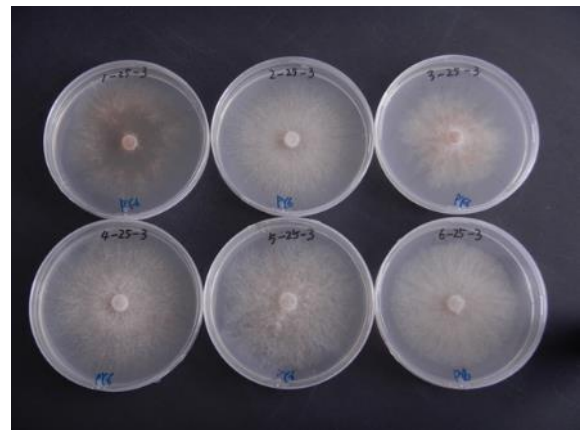


図4 25°C で 4 日間培養した各菌株の菌叢
左上から右下に, mor4S①1, MB22S①1, MB30S①1, MB86①, MB130SC①4 および MB149S③2 の各菌株を示す。

2 培養至適 pH

2.1 材料と方法

2.1.1 供試菌株

1. 培養至適温度調査と同一の菌株を用いた(表1)。

2.1.2 培養条件と測定

PDYA 培地(1.1.2)の pH を, 1 規定水酸化ナトリウム水溶液で 5, 6, 7 および 8 に調整した。培養至適温度調査と同様に滅菌, 分注, 接種し, 20°C で 4 日間暗培養した。反復数は各条件 5 個とした。培養終了後, 培養至適温度調査と同様に菌糸伸長速度を算出した。

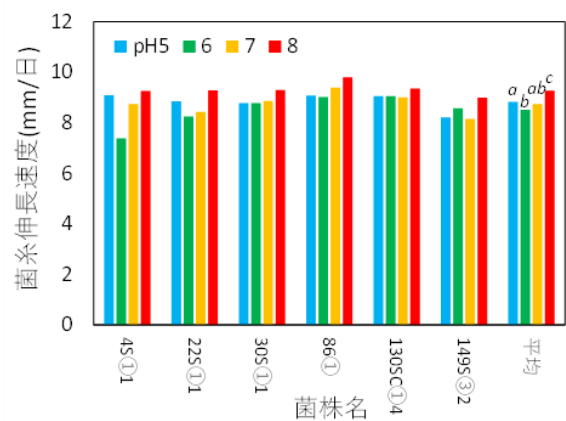


図5 各培地 pH における各菌株の平均菌糸伸長速度

各菌株を图中的各 pH の培地で 20°C にて 4 日間培養した。異なるアルファベットは培地 pH 間の有意差を示す。(p<0.05, Tukey-Kramer の多重比較)

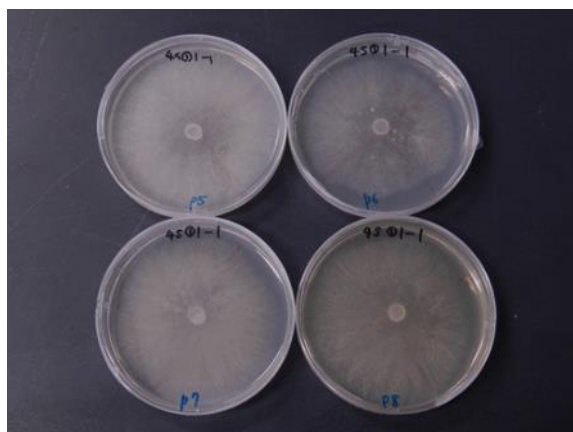


図6 各培地 pH で培養した 4S①1 株の菌叢
 左上から右下に、pH5、pH6、pH7 および pH8 の各培地で 4 日間培養した菌叢を示す。

2.2 結果と考察

菌糸伸長は各条件で見られた(図5, 図6)。各培地pHにおける供試6菌株の平均菌糸伸長速度は、pH5が8.8mm/日、pH6が8.5mm/日、pH7が8.7mm/日、pH8が9.2mm/日であり、pH8が最も速かった ($p < 0.05$, Tukey-Kramerの多重比較, 図5, 図7)。菌株ごとに見た場合でも、菌糸伸長速度がpH8で速い傾向は、子実体発生能を有するMB4S①1株やMB149S③2株を含む各菌株で認められた(図5)。以上の結果から、今回用いた菌株の培養至適pHは8ではあるものの、条件間の差は培養温度に比べて小さいことが明らかになった。トガリアミガサタケ類の培養至適pHは、6~8(趙 et al., 2009)或いは7~7.5(Winder, 2006)とされており、今回の結果は既報と同程度であった。

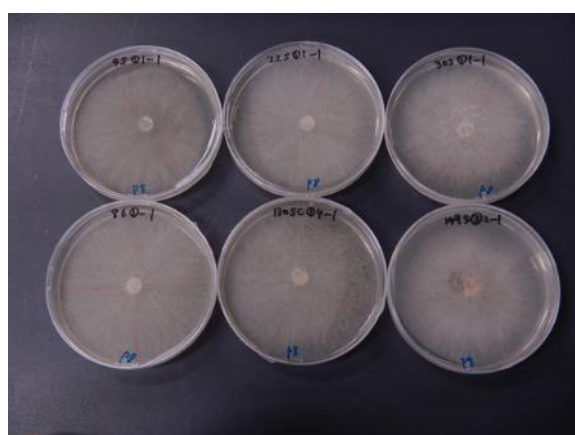


図7 pH8 の培地で 4 日間培養した各菌株の菌叢

左上から右下に、mor4S①1、MB22S①1、MB30S①1、MB86①、MB130SC①4 および MB149S③2 の各菌株を示す

3 木材腐朽能

3.1 材料と方法

3.1.1 供試菌株

1.培養至適温度調査と同一の菌株(表)に加え、木材腐朽能力の比較のため、シイタケ(*Lentinula edodes*, 森290号, 森産業)も用いた。

3.1.2 培養条件と測定

PDA培地を50%濃度にて調製し、*o*-メトキシフェノール(グアヤコール, 和光純薬工業)を培地重量の0.01%添加した(玉井1991を改変)。グアヤコールはフェノール類の一種であり、リグニン分解酵素などのフェノール酸化酵素の存在下で着色体を形成することから(パーベンダム反応)、木材腐朽菌におけるリグニン分解能力の指標の一つとして用いられる(Nishida et al., 1988)。培養至適温度調査と同様に滅菌、分注した後、各菌株を接種し、20℃で4日間暗培養した。反復数は各条件5個とした。培養終了後、菌叢周辺の培地の褐変(呈色反応)の有無を観察し、呈色反応が認められた場合には、当該試料がリグニン分解能力を有するとみなした。

3.2 結果と考察

各菌株で接種片を中心に培地が変色した(図8)。呈色反応の範囲はシイタケ(図8右下)よりも大きかったことから、今回用いた菌株は、いずれもシイタケと同程度以上のリグニン分解能力を有すると推測された。一般にトガリアミガサタケ類の栽培では、培地基材として木粉や稲わら等の植物由来の資材が用い

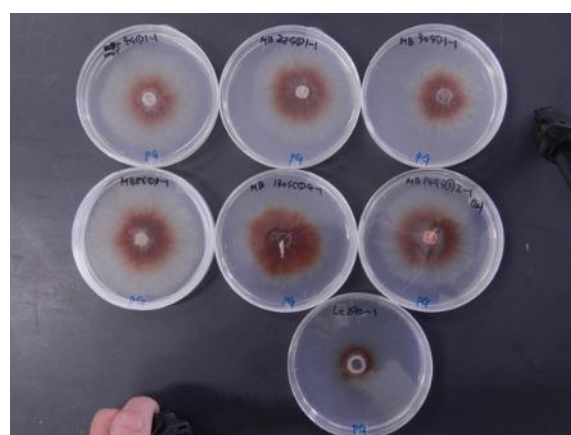


図8 各菌株の菌叢周辺で呈された培地の褐変
 左上から右下に、mor4S①1、MB22S①1、MB30S①1、MB86①、MB130SC①4、MB149S③2 およびシイタケ森290号の各菌株を、グアヤコール添加培地で4日間培養した結果を示す。

られる(Liu et al. 2018)。培地基材の主目的は、通気性の確保や菌糸の担体であるが、今回の供試菌株を含む、リグニン分解能力を有する菌株を用いた場合には、培地基材を分解し、栄養分を得ている可能性がある。

おわりに

本研究の結果から、日本産トガリアミガサタケ類の菌糸伸長に及ぼす影響は、今回試した範囲では温度がpHより大きいことや、木材腐朽能を有することが示唆された。

謝辞

子実体や情報をご提供いただいた皆様に、心より御礼を申し上げます。中華人民共和国中国科学院昆明植物研究所趙琪博士、雲南省高原特色農業産業研究所桂明英副院長、雲南農業大学馬嘯教授、岩手県雲南事務所職員、他雲南省各位に感謝します。実験方法をご指導いただいた北海道大学玉井裕教授に謝意を表します。

引用文献

- 蔡英丽・马晓龙・路等学・张亚・刘伟 (2020) 野生羊肚菌*Mel-21*的系統發育分析和馴化. 食用菌学报27: 23-29
- Hobbie, A., Rice, F., Weber, S., Smith, E. (2016) Isotopic evidence indicates saprotrophy in post-fire *Morchella* in Oregon and Alaska. *Mycologia* 108: 638-645
- Liu Q., Ma H., Zhang Y., Dong C. (2018) Artificial cultivation of true morels: current state, issues and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnolog* 38: 259-271
- 成松眞樹(2021) 日本産菌株を用いたアミガサタケ栽培技術の開発(1) 菌株収集と屋外栽培試験. 岩手県林業技術センター研究成果速報No. 365
- 成松眞樹(2022) 日本産菌株を用いたアミガサタケ栽培技術の開発(2) パイプハウスを用いた栽培試験. 岩手県林業技術センター研究成果速報No. 372
- Nishida T., Kashino Y., Mimura A., Takahara Y. (1988) Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. screening of lignin-degrading fungi. *Mokuzai gakkaiishi* 34: 530-536
- O' Donnell, K., Rooney, P., Mills, L., Kuo, M., Weber, S., Rehner, A. (2011) Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. *Fungal Genetics and Biology* 48: 252-265
- 坂本裕一・佐藤志穂・木下晃彦・成松眞樹(2022) 日本産黒色型アミガサタケの系統解析. 日本きのこ学会第25回大会講演要旨集**

玉井裕(1991) 電氣的細胞融合による食用担子菌の品種改良に関する研究. 北海道大学. 博士(農学) 甲第2934号

Winder, S. (2006) Cultural studies of *Morchella elata*. *Mycological Research* 110: 612-62

赵琪・徐中志・程远辉・戚淑威・侯志江 (2009) 尖頂羊肚菌仿生栽培技術. 西南農業学报22: 1-4