

マツタケ保存菌株の特性調査
- 培地特性とDNA判定 -

藤原 直哉

Peculiarity investigation about preserved strain of *Tricholoma Matsutake*
- Medium investigation and DNA analysys -

Naoya FUJIWARA

要 旨

藤原直哉：マツタケ保存菌株の特性調査 岡山県林試研報21：87 - 90 2005 マツタケ保存菌株の培養特性等を調べた。7菌株の菌糸を顕微鏡観察したところ、隔壁を確認し、細胞に隔壁を持たない *Mortierella sp.* と識別することができた。クランプコネクションは確認されず、マツタケ菌糸の特徴と一致した。また、マツタケ特有の DNA 配列を検出し、分子生物学的に種の確認ができた。これらの菌糸を異なる4種類の培地で培養したところ、培地によってそれぞれコロニーの伸長や外観が異なり、HYPONEX培地とOTA培地がいずれの菌株に対しても適することが判明した。
キーワード：マツタケ，菌糸，培地，培養，DNA

はじめに

岡山県におけるマツタケ生産量は、年々減少する傾向にある。既に100年以上にわたり、全国的に人工栽培の研究が行われてきたが、子実体発生に関する顕著な成果は上がっていない(伊藤・岩瀬 1997)。各研究機関で保存している菌株についても長期間を経過し、伸長速度の低下や死滅など特性の変化や劣化が認められ、試験結果に与える影響が大きいことが推定される。また研究初期には、使用した菌株がマツタケと異なる事態も生じたこともある。一般的に、マツタケ菌糸は、培地上のコロニーの外観、匂い、菌糸の顕微鏡観察から断定される(小川 1976)。しかし *Mortierella sp.* など、外観が酷似した他の糸状菌も報告されている(岩瀬 1992)ため、さらに確実な確認方法が求められている。

一方、菌株の長期保存については、弊害として細胞中のミトコンドリア DNA の変異も確認されており(森永 私信)、安定的な長期保存方法も求められている。そこで今後の試験を展開するにあたり、岡山県林業試験場で保存しているマツタケ菌株7系統について、培地適性と種の確認を行うため、4種類の培地における成長特性、菌糸の顕微鏡観察およびマツタケ特有の DNA 配列の検出を行った。

材料と方法

試験には、5 に設定したインキュベーターで継代培養により20年以上保存したマツタケの二次菌糸7菌株(表-1)を供試した。これらの菌株は一旦斜面培地から平板培

地に接種し、成長したコロニーの先端を接種源として供試した。

なお採集地の名称は、菌株の由来を明確化するため、平成の市町村合併が行われる以前の旧市町村名とした。

表 - 1 供試したマツタケ菌株

名 称	保存年	採集地
美星77	1977	小田郡美星町
林試75	1975	勝田郡勝央町植月中
御津81	1981	御津郡御津町
多孢子	不明	不明
哲多79	1979	阿哲郡哲多町
豊永78	1978	新見市豊永
吉永77	1977	和気郡吉永町

1. 培養特性調査

これらの菌株を、それぞれ NH (改変浜田) (小川 1976) , OTA (太田) (Ohta 1990) , HYPONEX (藤原 1999) , PDA (diffico 製) , 4種類の平板培地に接種し、経時的に90日間コロニーの伸長量を調査した。調査方法は、コロニーの垂直と水平2方向の直径を測定した。試験は3反復し、その平均値を求めた。

2. 菌糸の顕微鏡観察

平板培地に培養した7菌株の菌糸先端をトリパンブルー染色液で染色し、倒立顕微鏡で観察した。

3. マツタケ遺伝子の検出

予め HYPONEX 液体培地で、60日間培養した菌体を供試した。菌体は真空凍結乾燥器(EYELA 製 FD-1)で12~15時間乾燥させ、さらに液体窒素で凍結させた後、乳鉢で粉碎した。DNAの抽出はCTAB法に準じ、除たんぱく処理を行った。精製したDNAは、PCRサーマルサイクラー(TAKARA 製 PJ2000)で増幅した。プライマーには、マツタケ検出用に設計されたITSプライマー(表-2)を使用した(Kikuchi *et al.* 2000)。増幅プログラムを表-3に示す。増幅したDNAは、電気泳動装置(COSMO BIO 製 i-MyRun)で1.5%寒天ゲルに電気泳動(75V, 60min.)を行って分離し、トランスイルミネーター(フナコシ製 UVP)の紫外線照射下でデジタルカメラにより撮影した。なおPCR反作用バッファーのうちTaqには、TAKARA 製 TAKARA Ex Taqを使用し、感度が弱い場合には、鋳型DNAを100倍または1000倍に希釈処理を行い、PCR増幅した。

表-2 プライマーの配列 (Kikuchi *et al.* 2000)

primer	sequence (5' to 3')
TmF	CATTTTATTATACACTCGGT
TmR	GACGATTAGAAGCCGACCTA

表-3 PCR増幅プログラム

熱変性	95	2min.	} 30cycle
熱変性	95	30sec.	
アニーリング	55	30sec.	
伸長	72	30sec.	
伸長	72	10min.	
保存	12		

結果と考察

1. 培養特性調査

それぞれの菌株は、培地によって外観上、コロニーの菌糸密度、しわ、成長量が異なった。NH, PDA培地のコロニーはしわの幅が小さく、OTA, HYPONEX培地では、幅が大きくなった(写真-1)。

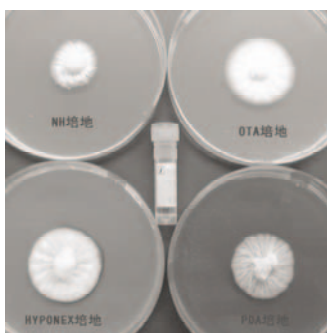


写真-1 培地上に形成されたコロニー

菌糸伸長量について、培養70日目の累積値を培地の種類ごとに図-1に示す。最も数値が大きいのは、簡易的に使用されるHYPONEX培地であった。従来から使用されてきたNH培地は、最も小さい値を示した。特に林試75, 多胞子, 哲多79, 豊永78の4菌株について、いずれもNH培地で成長が小さい傾向が見られたが(図3~9)、他の培地で成長は同等であった。同一の培地で7菌株を試験する場合、NH培地の使用は、一部の菌株に対し、菌糸伸長に大きな影響を与える可能性があるため、試験への使用には注意が必要である。このうちOTA培地は、明確な無機塩類で構成されており、熱に対する安定性が高い。今回の試験でも安定的な伸長を示し、精度を必要とする試験に向くと思われる。またHYPONEX, PDAの両培地は、成分組成が一部不明で培地滅菌時の安定性に不安はあるが、調整が簡便なため、保存を目的とする場合に適していると思われる。

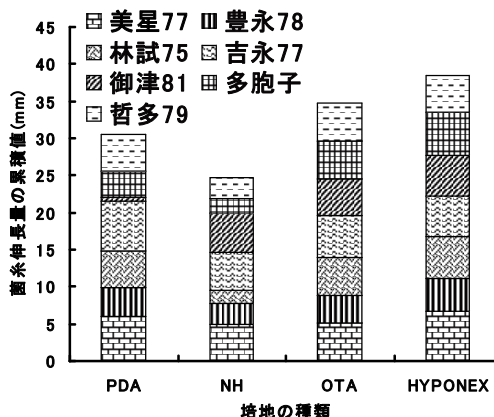


図-1 培地の種類による菌糸伸長量(培養70日目)

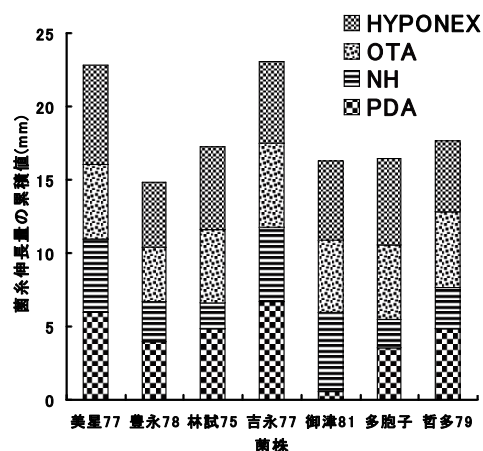


図-2 菌株による菌糸伸長量(培養70日目)

次に菌株ごとの菌糸伸長量を図-2に示す。吉永77は、美星77とほぼ同値で高い数値を示し、活性の高い傾向があった。他の5系統は、同程度の累積値を示した。

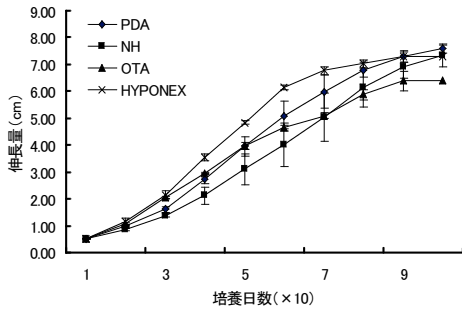


図 - 3 美星77の伸長成長

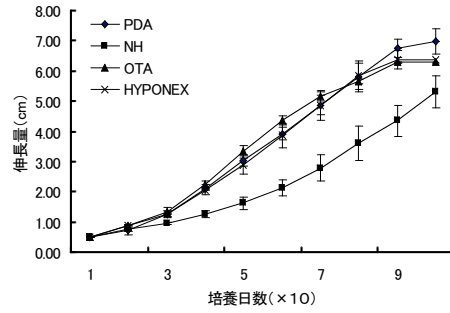


図 - 7 哲多79の伸長成長

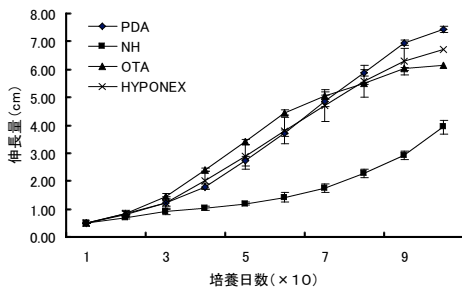


図 - 4 林試75の伸長成長

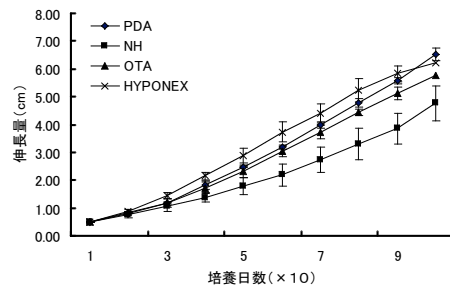


図 - 8 豊永78の伸長成長

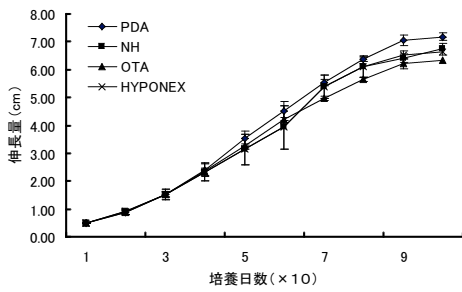


図 - 5 御津81の伸長成長

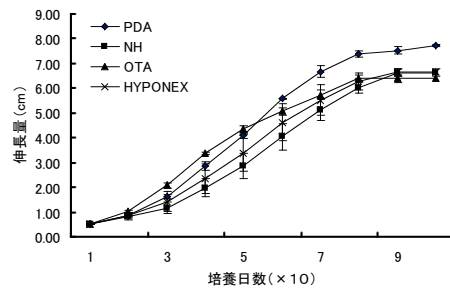


図 - 9 吉永77の伸長成長

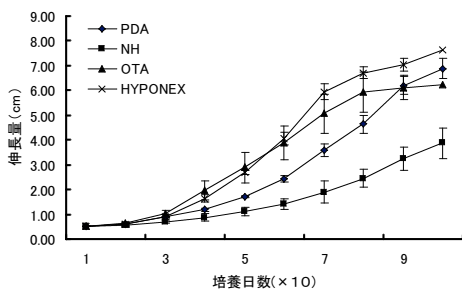


図 - 6 多孢子の伸長成長

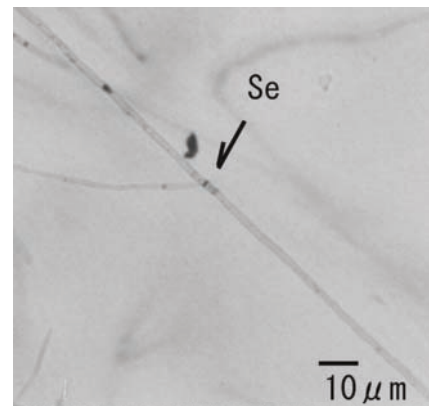


写真 - 2 隔壁の確認 (美星77)
Se : Septem (隔壁)

2. 菌糸の顕微鏡観察

顕微鏡観察の結果、全ての菌株で隔壁が確認された（写真-2）。マツタケ菌糸の特徴として、隔壁の存在が挙げられる。カビの1種である *Mortierella sp.* は、菌糸の構造に隔壁を持たないため（小川 1976）、少なくとも顕微鏡観察により、同種ではないことが確認できた。隔壁が確認できたことから、全ての菌株は *Mortierella sp.* と異なることが判明した。また、通常担子菌が有するクラムコネクションも観察されず、マツタケ菌糸の特徴と一致した。

3. マツタケ遺伝子の検出

PCR 増幅の結果、使用した菌株全てが、control とした標準菌株 Tm 広島のバンド（約500bp）と一致したので、DNA 配列の比較からもマツタケであることを判明させることができた（写真-3）。negative-control としたホンシメジの菌株 LS 中央は、全ての希釈倍率でもバンドが検出されず、増幅されないことが確認された。

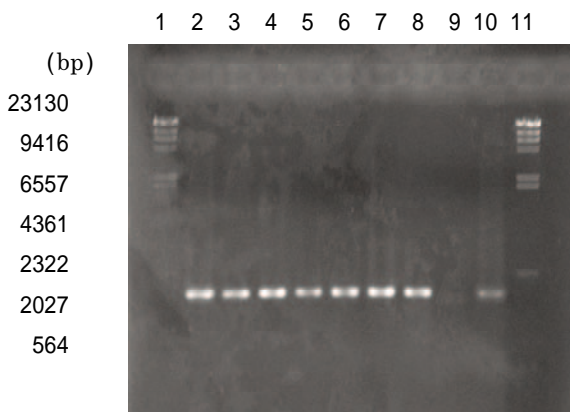


写真-3 保管菌株の PCR 増幅結果（lane 1:marker; lane 2:美星77;lane 3:林試75;lane 4:御津81; lane 5:多胞子;lane 6:哲多79;lane 7:吉永77; lane 8:豊永78;lane 9:negative control Ls 中央;lane 10: positive control Tm 広島;lane 11:marker）. 分子量 marker, λ -Hind digest

(size=23130,9416,6557,4361,2322,2027,564,125bp.)

結論

保存するマツタケ7菌株について、菌糸の培養特性調査と顕微鏡観察、および DNA 配列による種の確認を行った。培養特性調査では、従来使用されてきた NH 培地は、その後開発された菌根性きのこの用の培地に比較し、菌糸伸長量が劣る傾向であった。菌糸伸長量は、HYPONEX, OTA, PDA, NH 培地の順に良好であり、変異や死滅などが発生しにくい安定した菌糸の保存には、このうち HYPONEX, OTA 培地の使用が適当と思われた。また菌株では、吉永77, 美星77の2系統の菌糸

伸長が良好であり、最も成長量が低かった豊永78との差も大きいと、各種試験の基準となる菌株として利用できると思われる。

顕微鏡観察では、全ての菌株に隔壁の存在とクラムコネクションの欠如が確認され、マツタケ菌糸の特徴と一致した。

マツタケ遺伝子の検出では、PCR 増幅の結果全ての菌株の二次菌糸から抽出した DNA から、マツタケ特有の配列が検出され、マツタケであることが確認された。

これらのことから、保管している菌株全てがマツタケであることが確認された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、県立広島大学の森永力博士に適切な助言を頂いた。ここに厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 藤原直哉 (2000) 希釈平板法を用いた菌根性きのこの胞子観察. 森林応用研究9巻2号:pp61-64
- 伊藤武・岩瀬剛二 (1997) 誇り高き野生きのこのだから。「マツタケ」, pp10-12. 農文協, 東京.
- 岩瀬剛二 (1992) マツタケ. 「きのこの増殖と育種」, 292pp. 農業図書, 東京.
- 小川真 (1976) いろいろな分離培養用の培地. 「マツタケ」の生物学, 181pp. 築地書館, 東京.
- 小川真 (1976) 菌糸の形態. 「マツタケ」の生物学, 187pp. 築地書館, 東京.
- Akira Ohta (1990) A new medium for micerium growth of mycorrhizal fungi. Trans. Mycol. Soc. Japan 31:323-334
- Kikuchi, K., Matsushita, N., Guerinlaguette, A., Ohta, A. and Suzuki, K. (2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. Mycol. Res. 104 (12):1427-1430.