

〈資 料〉

菌根性と考えられるきのこの菌株収集 (第1報)

長谷川美奈・河合昌孝

Isolation from Fruit-bodies Supposed to be of Ectomycorrhizal Fungi Collected in 2001

Mina HASEGAWA and Masataka KAWAI

菌根性と考えられるきのこを多数採集し、そのうち新鮮で虫食いなどの損傷が少なかった188個について、数種類の培地を用いて分離を試みた。その結果、11科にまたがる146個のきのこで分離に成功し、その内、10科110個のきのこでは継代培養にも成功し、奈良県保存菌株とした。6科36個のきのこについては、発菌はしたものの継代培養を数回繰り返すと成長が止まり、再発菌しなくなった。6科42個のきのこは、今回用いた培地では全く発菌しなかった。

1. はじめに

菌根性きのこは、一般に腐生性きのこに比べて分離が難しいことに加え、初期の継代培養が困難であり、生長も極めて遅いものが多いため¹⁾菌株の収集が難しい。しかし、菌根菌の中には樹木の生長を助けたり^{2,3)}、病害抵抗性を高める働きをするものがあることが知られており^{4,5)}、その収集は有用である。そこで、今回、多数の菌根性きのこの分離培養を試みたので、2001年の結果について報告する。

2. 材料と方法

2.1 供試したきのこ

2001年6月下旬から11月にかけて、奈良県内できのこ採集を行い、そのうち菌根性と思われるきのこについて分離を試みた。他にも、県内在住者から提供を受けた菌根性きのこや、著者らが他県で採集してきたきのこについても同様の処理を行った。分離を試みたきのこは、把握できているだけで188個あった。

2.2 採集方法

きのこは柄の基部から丁寧に掘り取り、潰れないように紙袋に入れ、保冷剤を入れたクーラーボックスに収納し持ち帰った。同定作業後、菌根性きのこと思われるものは、可能な限りその日のうちに分離作業を行った。やむを得ず分離を翌日に持ち越す場合は、紙袋のままポリ袋に入れて密閉し、冷蔵庫で保存した。

雨などで濡れている場合には、紙袋に入れてそのまま冷蔵庫で1日乾かし、その後分離作業を行った。

2.3 分離作業

分離に用いるきのこはまず、ハケやピンセットを用いて表面に付着したゴミや泥を取り除いた。柄の基部に付着した土が多い場合は、基部を切り落とした。また、キノコバエなどによる食害のひどい部分もあらかじめ除去した。クリーンベンチ内や、バーナーの上昇気流内の清浄な場所できのこを裂き、キノコバエなどによる食害のないきれいな組織を火炎滅菌したピンセットでつまみ取り、1シャーレあたり3断片ずつ分離培地(表1)上に置床した。シャーレの縁は幅約2cmに切ったポリメチルペンテンフィルムで巻いて、その後、22±2℃の恒温室に置いて発菌を待った。細菌に汚染されていた場合には抗生物質入り培地(500ppmのストレプトマイシン、または100ppmのペニシリン)に移植するなどして細菌の除去を試みた。

発菌したものは、直径5mm以上成長するのを待って、伸びた部分を切り出し、移植用培地に移して、再発菌するかどうかを確かめた。再発菌が確かめられたものは、菌株名を付けて保存菌株リストに登録し、スラントに移植して、ある程度生長させた後、冷蔵庫保存とした。移植後発菌が止まった菌については、培地を変えるなどして、再発菌を試みた。

2.3 分離培地

分離には表1に示す組成の培地を用いた。一部の培地にはトマトミックスジュースタイプの野菜ジュース(カゴメ株式会社)のろ過液を加えた。ろ過はまず、エリエールクッキングペーパー(大王製紙株式会社)で行い、次いでTOYO No.101でさらに濾した。ろ過液は少量ずつに分けて-20℃で冷凍保存し、培地作成時に必要量ずつ解凍して添加した。

表1 分離・継代培養・保存に用いた培地の組成
表1-1 培地の組成 (1リットルあたり/寒天15g)

組成\培地	OH	1/2OH	1/5OH	1/5OH+J
グルコース	10g	5g	4g	4g
イーストエキス	2g	1g	0.4g	0.4g
ハイポネックス® (粉末)	0.5g	0.25g	0.1g	0.1g
野菜ジュース(注1)				10ml

表1-2 培地の組成 (1リットルあたり/寒天15g)

組成\培地	mMMN	mMMN (G5g)	MMNH
グルコース	10g	5g	10g
モルトエキス	3g	3g	3g
リン酸水素カリウム	500mg	500mg	500mg
酒石酸アンモニウム	500mg	500mg	500mg
硫酸マグネシウム水和物	150mg	150mg	150mg
クエン酸鉄アンモニウム	8mg	8mg	8mg
塩化カルシウム水和物	70mg	70mg	70mg
塩酸チアミン	0.1mg	0.1mg	0.1mg
野菜ジュース(無塩) 注	10ml	10ml	10ml
ハイポネックス® (粉末)			0.5g

(注) : カゴメ野菜ジュース (トマトミックスジュース) のろ液

(注) : カゴメ野菜ジュース (トマトミックスジュース ; 食塩無添加) のろ液

9月中旬以降の分離には、特に断りのあるもの以外は、1/5OH、1/5OH+J、mMMN(G5g)の3種類の培地を、各1シャーレ(9cmシャーレ)ずつ、3枚1組で用いた。それ以前のものについては、1/5OH、OH、mMMN、MMNHなどを用いた。移植には1/2OHを、保存にはOHまたは1/2OHを用いた。

3. 結果と考察

今回、主に3種類の培地を用いた分離操作により、11科67種、145個のきのこで組織から発菌が見られた。そのうち、11科48種、115個では、少なくとも1回、植え継ぐことができ、菌株名を付けたが、その後、7菌株は、成長が止まった。また、カノシタについては組織分離はできなかったものの、多孢子分離により、2菌株を得ることができた。その結果、奈良県保存菌株には110系統の菌根菌が加えられた。2001年分離菌根菌のリストは表2-1~5のとおりである。

今回、9月中旬までは、いろいろな培地を分離に使い、各きのこに用いるシャーレの数もバラバラであったが、最終的には、きのこ1個につき、1/5OH、1/5OH+J、mMMN(G5g)の3種類の培地(表1)を各1シャーレずつ

つ用い、3枚1組という方式に落ち着いた。きのこ1個に使うシャーレの数を制限することにより、より短時間で多くのきのこを処理できるようになり、さらに、培養スペースも節約することができた。また、どのきのこも同じ数のシャーレで扱えることから、整理がしやすく、植え継ぎの見落としなどのミスも減らすことができた。今回、主にこの方式を用いて、分離の第一段階である、子実体組織からの発菌には77.7%の成功率を収めたことから、この方式は、多くの菌根性きのこに対して、今後とも用いて良いものと考えられる。しかし、この方式で分離できなかった種や、分離効率の極めて低い種については、培地の変更や分離部位の検討が必要である。一方、発菌後の植え継ぎについては、作業の効率化を図るために1/2OHで統一したところ、再発菌しなくなるものが36菌株(分離に成功した菌の24.7%)にも及んだため、培地組成を変える、あるいは植え継ぎでも数種類の培地を用いるなど、改善の必要があると考えられた。

引用文献

- 1) 古川久彦編：4-2-2共生菌B外生菌根菌. きのこ学. 東京, 共立出版(株), 2000, 130-134.

- 2) Burgess, T.I.; Malajczuk, N. : The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globules* Labill. And *E. diversicolor* F. Muell. Plat and Soil. 153, 155-164 (1993)
- 3) Garbaye, J. [a]; Churin, J.L.: Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. Forest Ecology and Management. 98(3), 221-228 (1997)
- 4) Sinclair, W.A.; Sylvia, D.M.; Larsen, A.O.: Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. Forest Science. 28, 191-201 (1982)
- 5) Sylvia, D.M.; Sinclair, W.A.: Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fuzarium oxysporum* and on Douglas-fir seedlings. Phytopathology. 73, 384-389 (1983)
- (2002年9月12日受理)

表2 2001年分離菌根菌
表2-1 スラント保存菌株

科名	種名	菌株名	採集場所	採集月日
ヌメリガサ科	コクリノカサ	NHa-1	吉野町六田	9/12
	アケボノサクラシメジ	NHf-1	野迫川村	10/13
	サクラシメジ	NHru-1	西吉野村本谷	9/19
キシメジ科	シャカシメジ	Nlf-8	野迫川村	10/13
		NLf-9	野迫川村	10/13
	シモコシ	NTA-2	西吉野村本谷	10/23
	シロシメジ	NTj-1	西吉野村本谷	10/23
		NTj-2	西吉野村本谷	11/15
	カクミノシメジ	NLsy-2	野迫川村北今西	10/13
	シモフリシメジ	NTp-3	西吉野村本谷	10/23
	ミネシメジ	NTsa-1	十津川村殿井	10/19
	ホンシメジ	NS75	野迫川村	10/13
		NS76	野迫川村	10/13
		NS77	野迫川村	10/13
		NS78	野迫川村	10/13
		NS79	東吉野村平野	10/24
		NS80	東吉野村平野	10/24
		NS81	東吉野村平野	10/24
		NS82	東吉野村平野	10/24
		NS83	野迫川村	10/14
	マツタケ	NF2937	東吉野村平野	10/24
		NF2938	東吉野村平野	10/24
		NF2939	東吉野村平野	10/24
マツタケモドキ	NF2808	東吉野村鷺家	11/19	
	NF2809	東吉野村鷺家	11/19	

表2-1 続き

科名	種名	菌株名	採集場所	採集月日	
キシメジ科	マツタケモドキ	NF2810	西吉野村西野	10/31	
		NF2811	西吉野村西野	10/31	
	オオキツネタケ	NLb-4	野迫川村北今西	10/14	
		NLb-5	西吉野村本谷	10/23	
		NLb-6	西吉野村本谷	10/23	
		NLb-7	奈良市阪原	10/29	
		NLb-8	奈良市阪原	10/29	
	ウラムラサキ	NLam-1	西吉野村本谷	10/23	
		キツネタケ属の一種	Laccaria sp-1	西吉野村永谷	10/29
テングタケ科	ガンタケ	NAr-2	西吉野村永谷	9/21	
フウセンタケ科	ニセアブラシメジ	NCt-2	西吉野村本谷	9/19	
		ムラサキアブラシメジモドキ	NCs-1	西吉野村永谷	9/21
		NCs-2	西吉野村永谷	9/21	
		NCs-3	西吉野村永谷	9/21	
	ムラサキフウセンタケ	NCs-4	室生村向湖	10/10	
		NCv-1	吉野町六田	9/12	
	ショウゲンジ	NRc-1	西吉野村永谷	9/18	
	ヒメワカフサタケ	NHs-1	高取町吉備	10/11	
	アカヒダワカフサタケ	NHv-1	吉野町六田	9/12	
	イグチ科	アミタケ	NSb-23	野迫川村北今西	10/13
NSb-24			野迫川村北今西	10/14	
NSb-25			西吉野村本谷	10/23	
NSb-26			西吉野村西野	10/31	
NSb-27			西吉野村西野	10/31	
NSb-28			十津川村(果無)	10/20	
NSb-29			西吉野村本谷	10/23	
ヌメリイグチ			NSLu-9	吉野町六田	9/12
NSLu-10			野迫川村北今西	10/13	
NSLu-11			野迫川村北今西	10/14	
NSLu-12			五條市大深	10/22	
ワタゲヌメリイグチ			NSt-1	西吉野村永谷	9/18
チチアワタケ		NSg-5	沖縄県(与那覇岳)	11/2	
		NSg-6	沖縄県(名護岳)	11/2	
ベニハナイグチ		NSp-1	西吉野村永谷	9/18	
ヤマドリタケモドキ		NBR-7	橿原市久米町	6/28	
		NBR-8	橿原市久米町	6/28	
		NBR-9	橿原市久米町	6/28	
		NBR-10	西吉野村本谷	9/19	
		NBR-11	西吉野村本谷	9/19	
イロガワリ		NBR-12	橿原市久米町	6/28	
		NBp-3	高取町吉備	7/5	
		NBp-4	高取町吉備	7/5	
	NBp-5	野迫川村	10/14		

表 2-1 続き

科名	種名	菌株名	採集場所	採集月日
イグチ科	キイロイグチ	NPr-1	吉野町六田	8/30
		NPr-2	西吉野村永谷	9/21
	キアミアシイグチ	NBo-1	橿原市戒外町	9/12
		NBo-3	橿原市戒外町	9/12
		NTN-1	吉野町六田	9/12
	モエギアミアシイグチ	NBgr-1	西吉野村本谷	9/19
	オオミノクロアワタケ	NBgr-2	西吉野村本谷	9/21
		NBgr-3	西吉野村永谷	9/18
		スミゾメヤマイグチ	NLgr-1	吉野町香東
	NLgr-2		吉野町香東	9/5
	ブドウニガイグチ	NTv-1	五條市大深	9/20
		NTv-2	五條市大深	9/20
		NTv-4	吉野町六田	8/30
NTv-4			吉野町六田	8/30
オニイグチ科	コオニイグチ	Nsse-1	橿原市久米町	9/13
	セイタカイグチ	NBRu-2	橿原市(畝傍山)	9/5
	クリカワヤシイグチ	NAg-1	西吉野村本谷	9/19
ベニタケ科	アカハツ	NLa-10	沖縄県(名護岳)	11/2
ベニタケ科	アカハツ	NLa-11	沖縄県(与那覇岳)	11/2
		ハツタケ	NLh-10	西吉野村永谷
NLh-11	西吉野村永谷		9/21	
アカモミタケ	NLL-3		十津川(村果無)	10/20
ベニタケ科	キチチタケ	NLch-1	五條市大深	10/22
		ハウキタケ科	ハウキタケ	NRo-4
NRo-5	西吉野村本谷			9/19
イボタケ科	ケロウジ	NSsc-2	西吉野村本谷	9/19
腹菌類	コツブタケ	NPt-2	橿原市久米町	6/28
		NPt-3	高取町吉備	9/17

表 2-2 スラントに移植したが、まだ冷蔵庫保存になっていない菌株

科名	種名	菌株名	採集場所	採集月日
キシメジ科	シモコシ	NTA-5	西吉野村本谷	9/21
		NTp-4	西吉野村本谷	10/23
イグチ科	キアミアシイグチ	NBo-2	橿原市戒外町	9/5
		NBf-2	高取町吉備	9/17
オニイグチ科	オニイグチモドキ	NSco-1	西吉野村永谷	9/18
		NSco-2	西吉野村永谷	9/21
		NSco-3	西吉野村永谷	9/21
		NSco-4	西吉野村永谷	9/21
ベニタケ科	キチチタケ	NLch-2	西吉野村永谷	9/21
		NLch-3	西吉野村本谷	10/31
		NLch-4	西吉野村本谷	9/18
			西吉野村本谷	9/18
カノシタ科	カノシタ(注1)	NHT-15	五條市大深	10/22
		NHT-16	五條市大深	10/22
イボタケ科	ケロウジ	NSsc-3	西吉野村本谷	9/19

注 1: 多孢子分離

表2-3 スラントに移植後、発菌しなかった菌株

科名	種名	菌株名	採集場所	採集月日
キシメジ科	シモコシ	NTA-3	西吉野村本谷	10/23
		NTA-4	西吉野村本谷	9/19
		オオキツネタケ	NLb-3	西吉野村本谷
イグチ科	ラサキヤマドリタケ	NBv-2	橿原市久米町	7/2
		NBv-3	橿原市久米町	9/5
	ブドウニガイグチ	NTv-3	西吉野村本谷	9/19
オニイグチ科	コオニイグチ	NSse-2	橿原市久米町	9/13

表2-4 組織から発菌したものの、植え継ぎ段階で発菌しなくなったきのこ

科名	種名	採集場所	採集月日	発菌した培地
ベニタケ科	チリメンチチタケ	橿原市戒外町	9/13	1/5OH
	ヤブレベニタケ	橿原市戒外町	9/13	MMN(G5g)
	キチチタケ	西吉野村本谷	9/19	1/5OH
	キチチタケ	五條市大深	10/22	1/5OH
	キチチタケ	奈良市阪原	10/31	1/5OH
	イロガワリベニタケ	五條市大深	9/20	1/5OH
	クロハツ	吉野町六田	9/12	1/5OH
	クロハツモドキ	高取町吉備	9/17	1/5OH
キシメジ科	シロマツタケモドキ	室生村向湖	10/10	1/5OH
	シロマツタケモドキ	室生村向湖	10/10	1/5OH
	シモコシ	西吉野村永谷	9/21	1/5OH+J
	シモフリシメジ	西吉野村本谷	10/24	1/5OH
	シロシメジ	西吉野村本谷	10/31	1/5OH
テングタケ科	カバイロツルタケ	五條市大深	9/20	1/5OH
	チャタマゴタケ (1)	高取町吉備(池の横)	7/5	?
	チャタマゴタケ (2)	高取町吉備(池の横)	7/5	?
	チャタマゴタケ (3)	高取町吉備(温室横)	7/5	?
	テングタケ	吉野町六田	9/4	1/5OH
イグチ科	アシベニイグチ	吉野町六田	8/30	MMN
	ブドウニガイグチ (1)	橿原市戒外町	9/5	1/5OH
	ブドウニガイグチ (2)	西吉野村本谷	9/19	1/5OH
	アカヤマドリ	吉野町六田	9/12	MMN(G5g)
	アワタケ	吉野町六田	9/4	1/5OH+J
	イロガワリ	高取町吉備	6/28	MMNH
	アメリカウラベニイロガワリ	橿原市戒外町	9/5	1/5OH
	ニセアシベニイグチ	橿原市久米町	9/6	1/5OH
オニイグチ科	セイタカイグチ (1)	吉野町六田	8/30	MMN
	セイタカイグチ (2)	吉野町六田	8/30	1/5OH
イボタケ科	クロカワ	野迫川村北今西	10/13	1/5OH(ストマイ入り)

表2-5 分離できなかったきのこ

科名	種名	採集場所	採集月日	用いた培地	
ベニタケ科	チリメンチチタケ	吉野町香東	9/21		
	クロハツ	吉野町六田	9/5	1/5OH	
	カワリハツ	橿原市戒外町	9/13	mMMN (G5g)	
	アイトケ (1)	橿原市久米町	6/28	OH	
	アイトケ (2)	橿原市戒外町	9/13	mMMN (G5g)	
	ヤブレベニタケ	橿原市戒外町	9/12	1/5OH	
	キチチタケ (1)	西吉野村永谷	9/18	1/5OH	
	キチチタケ (2)	西吉野村西野	10/23		
イグチ科	キイロイグチ (1)	吉野町六田	8/30	1/5OH	
	キイロイグチ (2)	吉野町六田	9/13	mMMN (G5g)	
	キイロイグチ (3)	西吉野村永谷	9/18		
	キイロイグチ (4)	西吉野村永谷	9/18		
	キイロイグチ (5)	西吉野村永谷	9/18		
	キイロイグチ (6)	西吉野村本谷	9/19		
	キイロイグチ (7)	西吉野村永谷	9/21		
	ハナガサイグチ	吉野町六田	9/12		
	アカヤマドリ	大淀町土田	9/17		
	スミゾメヤマイグチ (1)	吉野町香東	9/5		
	スミゾメヤマイグチ (2)	吉野町香東	9/6	1/5OH	
	スミゾメヤマイグチ (3)	吉野町香東	9/6	1/5OH	
	クロアワタケ	橿原市戒外町	9/12	1/5OH	
	コゲチャイロガワリ	吉野町香東	9/5		
	アカヤマドリ	橿原市久米町	9/5		
	キアミアシイグチ	西吉野村本谷	9/19		
	ムラサキヤマドリタケ	橿原市久米町	7/2	?	
	ヒメウグイスイグチ	五條市大深	9/20		
	オニイグチ科	キクバナイグチ	橿原市 (畝傍山)	9/6	1/5OH
		ベニイグチ	橿原市 (畝傍山)	9/5	1/5OH+J
テングタケ科	ツルタケ	橿原市戒外町	9/13	1/5OH	
	チャタマゴタケ	橿原市戒外町	7/2	?	
	チャタマゴタケ	橿原市戒外町	7/2	?	
	白いタマゴタケ (和名無し)	橿原市久米町 (?)	9/19	1/5OH	
フウセンタケ科	ショウゲンジ	西吉野村西野	10/31		
イボタケ科	クロカワ (1)	西吉野村本谷	9/19		
	クロカワ (2)	野迫川村	10/13		
	ケロウジ (1)	吉野町六田	9/12		
	ケロウジ (2)	西吉野村本谷	9/19		
	ケロウジ (3)	西吉野村本谷	9/19		
	ケロウジ (4)	西吉野村本谷	9/19		
	ケロウジ (5)	西吉野村本谷	9/19		
	ケロウジ (6)	西吉野村本谷	9/19		
	ケロウジ (7)	西吉野村本谷	10/23		

(注)：特に書き込みの無いものについては、1/5OH、1/5OH+J、mMMN (G5g) で分離