

対峙培養法におけるヒラタケとカビの成長範囲変化

班員 奥原 世梨、清水 茉優、延田 考聰、本多 正樹
担当教諭 谷野 智了

キーワード：PDA培地、対峙培養法、帶線

Mold can grow during the mushroom cultivation process and be discarded. Therefore, in order to clarify the interaction between edible mushrooms and molds that grow on food, in this study, we discussed the survival strategies of black mold, blue mold, and oyster mushrooms by using a dual culture method. Mycelial extension of the oyster mushrooms was reduced after contact with black mold, and growth was stopped after contact with blue mold.

1 はじめに

地球上に存在する菌類は510万種以上と推定されているが^[1]、菌類研究が進んでいるヨーロッパでも2000種程度しか知られていない^[2]。菌類の本体は菌糸で構成されており、菌糸体と呼ばれている。我々が肉眼で確認することができる子実体（きのこ）も菌糸が集まって構成され、菌類は子実体を利用して次世代の子孫を残すための胞子を散布する（図1）。同じ枯れ木内において、複数種の菌類が入り込むことで、「帶線」と呼ばれる模様が観察されることがある（図2）。これは枯れ木内部に各菌類がコロニーを形成し、資源を他種に利用されないように確保するため”バリア”的な役割を担っている。しかし、これらの菌類がどのような条件のときに帶線を形成するのかはよく分かっておらず、このような帶線をはじめとした各菌類間の相互作用は、510万種以上存在する菌類の中で、わずか数十種類の組合せでしか調べられていない^[3]。また、私たちが行ったハイネファーム（石川県かほく市でキクラゲとヒラタケを栽培している農家）への調査から、食用キノコにもまれにカビがついてしまい、廃棄しなければならないということがわかった。カビも食用キノコと同様に真菌類に属していることから両者の相互作用について調べることはこれからキノコ栽培において有用な情報を提供できるのではないかと考えた。そこで、

本研究では、菌糸成長の早いヒラタケと食品につきやすいクロカビ・アオカビ間の相互作用を明らかにすることを最終的な目標として、「対峙培養法」という古典的手法で各種の菌糸体の成長を培地上で観察した。

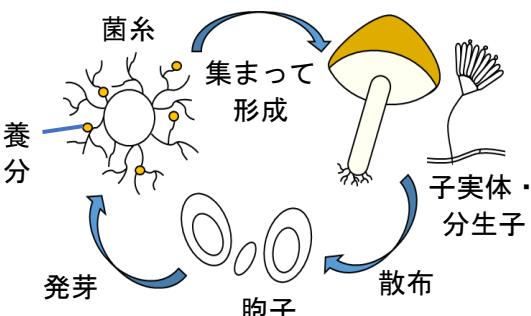


図1 菌類のライフサイクル

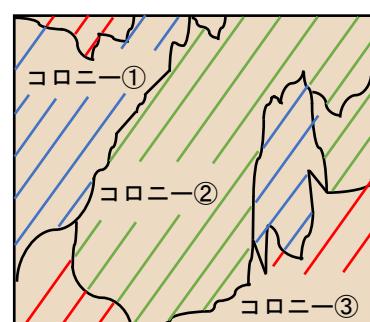


図2 枯れ木内の菌糸の陣地イメージ

2 材料と方法

○材料

- ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)
- クロカビ (*Aspergillus* sp)
- アオカビ (*Penicillium* sp)

○方法

PDA寒天培地（メルク社製）を作成し、寒天培地の中心から1cmずつ離した位置にヒラタケとクロカビ、ヒラタケとアオカビの菌糸片といった組み合わせで植菌した（図3）。この方法は「対峙培養法」といい、2種の菌類間の相互作用を実験室内でも簡便に観察できる方法である^[3]。温度27度、湿度95%下でヒラタケ・クロカビは11日間、ヒラタケ・アオカビは15日間インキュベーター内で培養を行った。

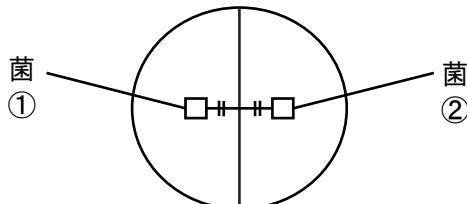


図3 対峙培養法

また、本研究では、培養皿の写真撮影を行い、画像解析ソフト「ImageJ」を用いて菌糸体の成長範囲の面積を測定し、定量的な解析も行った。

3 結果

○ヒラタケ vs クロカビの実験

ヒラタケは3日目まで菌糸体を拡大したが、クロカビは8日目まで菌糸体を拡大し、その後は両種ともほぼ菌糸体が成長しなかった（図4）。また、クロカビはヒラタケよりも菌糸体拡大が速かった。さらに、クロカビの菌糸体はヒラタケの菌糸体に上から覆い被さるように成長する様子のみ見られた（図6）。

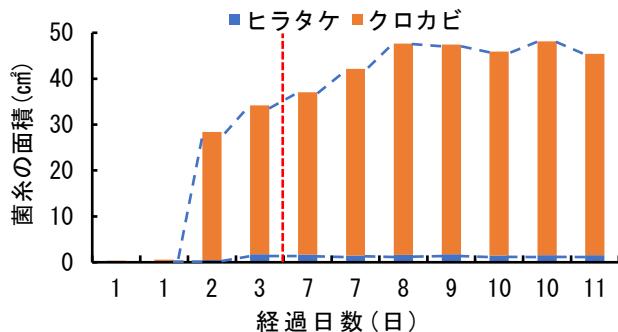


図4 ヒラタケvsクロカビの培地の各菌糸の面積



図5 1日目のヒラタケ vs クロカビ

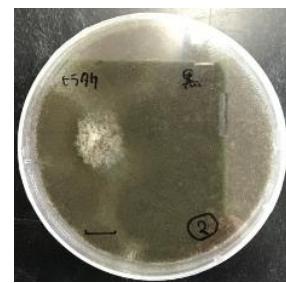


図6 11日目のヒラタケ vs クロカビ

○ヒラタケ vs アオカビの実験

ヒラタケとアオカビとともに11日目まで菌糸体を拡大し、両種とも同じ時期に成長が止まった（図7）。アオカビの菌糸はヒラタケの菌糸体に接した部分、もしくは少し離れたところで両種とも成長が止まっている様子（図9）が見られた。また、クロカビほどではないものの一部、ヒラタケの上にアオカビが覆いかぶさっている箇所も確認できた（図10）。

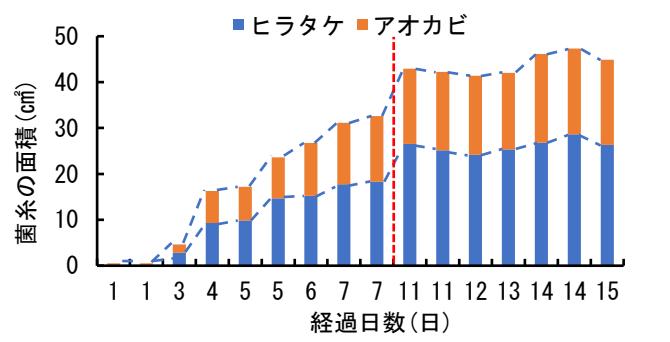


図7 ヒラタケ vs アオカビの培地の各菌糸の面積



図8 1日目のヒラタケ vs アオカビ



図9 15日目のヒラタケ vs アオカビ

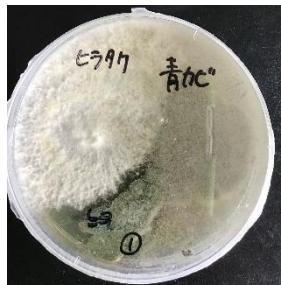


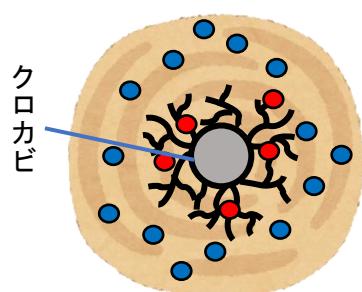
図10 覆いかぶさった培地

4 考察

本研究により、対峙培養法によって各菌類の森林生態系内における生存戦略が培地上で再現できていると考えられる。

○クロカビの生存戦略について

クロカビは増殖が速く、菌糸体をいち早く伸ばして資源を確保していることが示唆される。クロカビは正式にはアスペルギルス属という森林内の土壤中に生息する糸状菌のグループに属している^[4]。森林内で、土壤から新しい倒木や枯れ木内、落葉といった資源に素早く侵入して、比較的利用しやすい資源を利用する生存戦略をとっていることが考えられる（図11）。



● 利用しやすい資源…師管液
● 利用しにくい資源…リグニン・多糖類

図11 クロカビの生存戦略

○アオカビの生存戦略について

アオカビはクロカビに比べて増殖は速くないが、ヒラタケとアオカビの両種の成長が止まっている様子が見られたことから何らかの化学物質を使って他種の菌糸体成長を抑制している可能性が考えられる（図12）。アオカビは過去に細菌相手にペニシリンという抗生物質を生産することが知られていることからも^[5]、何らかの化学物質を用いて他種と資源獲得競争を行っている可能性が考えられる。

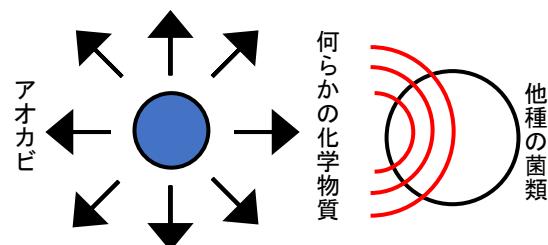
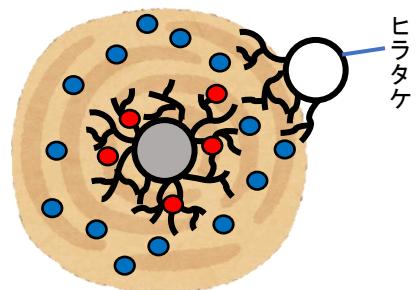


図12 アオカビの生存戦略

○ヒラタケの生存戦略について

ヒラタケは木材内における最も難分解性のリグニンを分解できる白色腐朽菌というグループに属している^[4]。これらのグループは倒木や枯れ木内でカビなどが利用しやすい資源を利用しつくした後に定着し、残りの資源を利用しきる生存戦略をとっていると考えられている。ただし、本研究で培地に用いられていたPDA培地は菌類全般にとって利用しやすい資源であることから、素早く資源の確保できるカビ類にとって有利な環境であった可能性が考えられる（図13）ため、今後詳しく調べる必要がある。



● 利用しやすい資源…師管液
● 利用しにくい資源…リグニン・多糖類

図13 ヒラタケの生存戦略

まとめると、クロカビは資源をいち早く獲得し利用しやすい資源を他種よりも早く利用する生存戦略、アオカビは何らかの化学物質を用いて他種の成長を抑制しながら資源を確保する生存戦略、ヒラタケはクロカビなどの種が利用できない難分解性の資源を利用する生存戦略をそれぞれとっていると考えられる。また、ヒラタケとクロカビの生存戦略の間にトレードオフの関係にある可能性を考えている（図14）。ヒラタケはどのような環境下でカビ類より有利に菌糸体を成長できるのか今後もより詳しく調べていくことで、森林生態系内におけるキノコ類とカビ類のトレード・オフ関係が明らかになっていくだけでなく、キノコ栽培における新たな菌床の原料や栽培方法の開発の一助になるのではないかと期待している。



図14 トレードオフの関係

5 今後の展望

以下の3つの実験を行いたいと考えている。

○単離培養実験

ヒラタケ、クロカビ、アオカビ各種の菌糸体の成長速度を明らかにすることを目的として行う予定である。他種が存在する対峙培養の結果と比較することで、各種がどのくらい相互作用の影響を受けているのか検証することができると考えている。

○温度を変更した対峙培養実験

ハイネファームへの調査の中で、ヒラタケ栽培は10°Cから15°C程度が適温であることを教えていただいた。本研究は真菌類全般が成長しやすい27°Cで実験を行ったが、ヒラタケに有利だと考えられる10°Cから15°Cでもう一度検証する必要があると考えている。

○基質を変更した対峙培養法

本研究で用いたPDA培地（メルク社製）は本来真菌類全般の培養を効率的に行うための培地である。成分にグルコースなど比較的早く代謝できる物質が含まれており、これが増殖速度の速いクロカビ

に有利に働いたのではないかと考えられる。したがって、今後はブナ材やトウヒ材といった木材を粉末化して作成した培地で同じような対峙培養実験を行っていきたいと考えている。

6 謝辞

本研究にあたってはハイネファーム様の菌床の提供・助言等、大変お世話になりました。厚く御礼を申し上げます。

7 参考文献

- [1] O'Brient HE, Parrent JL, Jackson JA, et al. (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. Applied and Environmental Microbiology 71: 5544-5550.
- [2] Stokland JN, Siitonen J, Jonsson BG (2012) Biodiversity in dead wood. Cambridge University Press, Cambridge.
- [3] Boddy L, Hiscox J (2016) Fungal ecology: Principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. Microbiology Spectrum 4(6):FUNK-0019-2016.
- [4] Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycological Research 111: 509-547
- [5] Alexander Fleming, (1945) Penicillin-its discovery, development, and uses in the field of medicine and surgery. The Journal of the Royal Institute of Public Health and Hygiene Vol 8: 36-49