

原 著

担子菌マルミノヒトヨタケの 交配系と子実体形成条件の検討

美祢弘子¹⁾ 村上重幸²⁾ 武丸恒雄¹⁾

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科¹⁾
日本きのこセンター 菌茸研究所²⁾

(平成5年3月31日受理)

Studies on the Mating System and Fruit-body Formation
in the Basidiomycete *Coprinus kimurae*.

Hiroko MINE¹⁾, Shigeyuki MURAKAMI²⁾ and Tsuneo TAKEMARU¹⁾

*Department of Clinical Nutrition,
Faculty of Medical Professions,
Kawasaki University of Medical Welfare¹⁾
Kurashiki, 701-01, Japan
Tottori Mycological Institute²⁾,
Tottori, 689-11, Japan
(Accepted Mar. 31, 1993)*

Key words : *Coprinus kimurae*, basidiomycete, fruit-body formation,
mating reaction, potato-galactose-agar medium

Abstract

Two wild stocks of *Coprinus kimurae*, CK-I and CK-II, were collected in Tottori city. Fifteen monokaryons were isolated from each of the wild stocks and were crossed in all possible combinations. The results shown in Tables 1 and 2 suggest that the mating system of this fungus may be tetrapolar heterothalism. Unexpectedly, however, clamp-connections observed were all true. More detailed cytological observation should be made before the conclusion.

A potato-extracted medium supplemented with 0.2% of galactose and 6% of agar was shown to be most suitable for the formation of fruit-bodies in this fungus.

要 約

鳥取市内で、マルミノヒトヨタケの2菌株、CK-I株およびCK-II株を採取した。それぞ

れの野生株から15系統ずつ一核菌糸を単離し、同一菌株内で総当り交配を行った結果(表1と表2)、本菌が四極性ヘテロタリズムであることが暗示されたが、形成されたクランプ構造のより詳細な観察を待って最終結論を出すのが適当と考えられる。

なお、本菌の子実体形成に好適な培地条件について種々検討を行った結果、バレイショ抽出液にガラクトースを0.2%、寒天を6%添加した培地が子実体形成に最も適していることが示された。

はじめに

野外には非常に多くの種類のキノコ類(担子菌類)が自生しているが、研究室で実際に実験系として使えるものはごくわずかである。実験系として最良の条件を満たしているものはウシグソヒトヨタケ(*Coprinus cinereus*)¹⁾²⁾³⁾とスエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)⁴⁾⁵⁾の2種で、これらの菌種について多くの実験・研究が行われてきたが、かねがね更に多くの優れた実験系の開発が望まれていた。優れた実験系の要件としては、(1)培養が容易であること、(2)ライフサイクルが短いこと、(3)担子孢子とよばれる有性孢子形成器官である子実体が短期間に安定して確実に発生すること、(4)子実体の発生過程が同調的であること、(5)担子孢子の発芽率が高いこと、などがあげられる。

本研究では、有望な候補菌としてマルミノヒトヨタケ(*Coprinus kimurae*)⁶⁾を選んだ。マルミノヒトヨタケの種名は本菌の発見者である木村勘二博士(岡山大学名誉教授)にちなんだものである。春から夏にかけて、腐りつつある稲わら(古むしろ、古だたみ、わら屑など)上に群生ないし数本ずつ束生する。黒褐色で球形の特徴のある担子孢子を形成する。

今回は、野外から採取した2菌株のマルミノヒトヨタケについて交配系の決定と、実験室内で安定して子実体を形成する培地条件の検討をおこなった結果について報告する。前者に関しては、著者らの一人武丸(1961)⁷⁾が*Coprinus* sp.として、本菌の交配系が四極性ヘテロタリズムであることをすでに発表しているが、この問題についてより詳細な研究を行った。

本論文は、川崎医療福祉大学の平成3年度プロジェクト研究費による研究結果の一部をまとめたものである。

材料と方法

1) 材料の採取

1991年6月に鳥取市内で古だたみに発生していた2菌株(CK-I株およびCK-II株)を採取し、子実体や担子孢子の形態などから、マルミノヒトヨタケと同定して実験に用いた。

2) 培養方法

直径9cmのプラスチックシャーレに寒天培地20mlをそそいで平板培地とし、これに菌糸または担子孢子を植えて培養した。培養温度は25℃とし、12時間ごとの明暗周期で培養した。

3) 培地の組成

400gのバレイショ(メークイーン、なるべく新しい発芽していないものが望ましい)の皮をむき、薄切りにして1リットルの蒸留水を加えて120℃、15分間オートクレーブ中で煮る。4枚に重ねたガーゼでこした後失われた蒸留水を補って再び1リットルとする。このバレイショ浸出液が今回の実験に用いた培地の基本であり、実験に応じてこれに各種の糖と寒天を様々な濃度で添加した培地を用いた。子実体は形成させず、菌糸のみを培養する場合や交配系の検定をおこなう場合には、バレイショ浸出液にグルコースを2%、寒天を1.5%となるように添加した培地(グルコース・バレイショ培地)を用いた。

4) 交配系の特定法

2株のマルミノヒトヨタケ、CK-I株およびCK-II株についてそれぞれの交配系を検定した。担子孢子をグルコース・バレイショ培地上にうすくまいて発芽させ、Milesらの方法⁴⁾によって、各菌株からそれぞれ15系統ずつの一核菌糸(CK-I-1~15およびCK-II-1~15)を単離し、各菌株ごとに一核菌糸間で総当り交配⁸⁾をおこなった。交配の結果二核菌糸となったかどうかは、クランプの存在を顕微鏡で調べることにより判定し

た。

5) 二核菌糸の子実体形成能の比較とテスター菌糸の選定

交配系決定後に各菌株から交配系の異なる一核菌糸を5系統ずつ(CK-I-a~e および CK-II-a~e) 選び、同じ菌株内および異なる菌株間における交配をおこなった。交配の結果得られた二核菌糸をガラクトース・バレイショ培地(「結果」2d 参照)に移植して子実体形成能を比較した。子実体形成のみられた4種類の二核菌糸(CK-I-a+CK-I-d, CK-I-a+CK-II-d, CK-I-b+CK-II-c, CK-I-b+CK-II-e)をテスター菌糸として選定し、子実体形成用培地の組成検討実験に使用した。

結 果

1. 交配系の決定

a) CK-I 株および CK-II 株の交配系の検討

CK-I 株の担子胞子を発芽させ15系統の一核菌糸を単離した。これらの一核菌糸を総当りで交配したところ、表1のような結果を得た。コロニー全体にクランプの形成がみられるものは、交配の結果二核菌糸となったと判断し+の記号で示した。クランプが全くみあたらないものは二核菌糸が形成されなかったものと判断し、-とした。また、クランプの形成が交配一核菌糸の接触帯もしくはそこから生じたと思われるセクター一部だけにおこっている場合を±であらわした。この表から明らかなように、CK-I 株由来の一核菌糸は交配模様の異なる a~e の5群に分類することができた。しかし今回観察した限りでは、+で示したコロニーのクランプと±で示したコロニーのクランプの細胞学的違いを見いだすことができなかった。

CK-II 株についても同様の結果が得られた(表2)。

b) 同一菌株内および異種菌株間の交配と子実体形成

CK-I 株および CK-II 株由来の交配型の異なる5群から代表的なものを1系統ずつ、計10系統の一核菌糸を選び、同一菌株内および異種菌株間の交配によりクランプが形成されたものについて、ガラクトース・バレイショ培地上にお

ける子実体形成の有無を調べた。子実体を形成したものを+、形成しなかったものを-で示した。表3でみられるようにCK-I 株由来の一核菌糸どうしの交配で得られた1種類およびCK-I 株由来の一核菌糸とCK-II 株由来の一核菌糸の異種菌株間によって得られた3種類の合計4種類の二核菌糸において子実体形成がみられた。

c) 以上の結果をもとに、マルミノヒトヨタケの一核菌糸としてCK-I-a(=CK-I-3), CK-I-b(=CK-I-11), CK-I-c(=CK-I-4), CK-I-d(=CK-I-2), CK-I-e(CK-I-9), CK-II-a(=CK-II-8), CK-II-b(=CK-II-2), CK-II-c(=CK-II-6), CK-II-d(=CK-II-7), CK-II-e(=CK-II-5)の10種類を、二核菌糸として(CK-I-a+CK-II-d), (CK-I-b+CK-II-c), (CK-I-b+CK-II-e)の3種類の異種菌株間で得られたものおよび同一菌株内の交配で得られた(CK-I-a+CK-I-d)の合計4種類をテスター菌糸として選び、以後の子実体形成実験に使用した。

2. 子実体形成に適した培地の検討

a) グルコース濃度の検討

2%のグルコースを含むグルコース・バレイショ培地では菌糸の成長は著しいものの子実体の形成はまれであった。そこでまず、添加するグルコースの濃度の検討をおこなった。寒天の含有量は1.5%とした。表4に示すように4種類のテスター菌糸すべてにおいてグルコースの含有量が0.2%の場合に最も子実体の形成能が高かった。

b) 添加物の種類の検討

添加する糖をグルコース以外に変えて子実体形成能を調べ、比較した。各糖は0.2%、寒天は1.5%の濃度で加えた。表5に示すように、ラクトース、マルトース、フコース、マンノースでは子実体の形成はまれであった。シュークロースはグルコースとほぼ同じ子実体形成能を示した。これに対してガラクトースの子実体形成能はグルコースやシュークロースに比較して高かった。

c) 寒天の濃度の検討

添加する寒天の濃度を変えて子実体形成能を比較した。表6に示すように寒天の濃度が高いほど子実体形成能も高かった。この場合添加糖

表1 CK-I株由来の一核菌糸どうしの交配結果

	a群					b群				c群		d群		e群	
	1	3	6	7	12	15	5	11	13	14	4	8	2	10	9
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	±	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	±	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	±	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	±	+
4	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

コロニー全体にクランプが形成されているものを+, クランプの形成がコロニーの特定の部域に限られているものを±, クランプが全く形成されないものを-とした。

表2 CK-II株由来の一核菌糸どうしの交配結果

	a群					b群				c群				d群	e群
	3	4	8	11	12	2	9	10	15	1	6	13	14	7	5
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+
1	±	±	±	±	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	±	±	±	±	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	±	±	±	±	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
14	±	±	±	±	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

(記号は表1に同じ)

表5 子実体形成に及ぼす添加糖の影響

	(CK-I-a+CK-I-d)	(CK-I-a+CK-II-d)	(CK-I-b+CK-II-c)	(CK-I-b+CK-II-e)
グルコース	+ + - -	- - - -	+ - - -	- - - -
ガラクトース	+ + + -	- - - -	+ + - -	+ - - -
フコース	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
マンノース	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -
マルトース	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -
ラクトース	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -
シュークロス	+ + - -	- - - -	+ - - -	+ - - -

完全な子実体が形成されたものは+, 子実体が形成されないものは-とした。+または-の数は4枚の培地における結果を示している。

表6 子実体形成に及ぼす寒天濃度の影響

	(CK-I-a+CK-I-d)	(CK-I-a+CK-II-d)	(CK-I-b+CK-II-c)	(CK-I-b+CK-II-e)
6%	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + -
3%	+ + + +	+ + - -	+ + + +	+ + - -
1.5%	+ + + -	- - - -	+ + - -	- - - -
0.5%	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -

完全な子実体が形成されたものは+, 子実体が形成されないものは-とした。+または-の数は4枚の培地における結果を示している。

よるものかを検討した。寒天を十分水洗して微量な含有物質を除去してから培地に添加しても、水洗しない寒天を用いた場合と同様の子実体形成促進効果が示された。この結果は寒天の物理的なかたさが、何らかの機構により、子実体形成に影響を与えることを示唆している。

d) 以上の結果から、マルミノヒトヨタケの子実体形成にはバレイショ浸出液に0.2%のガラクトースと3%の寒天を添加した培地(ガラクトース・バレイショ培地)が、また菌糸形成にはバレイショ浸出液に2%のグルコースと1.5%の寒天を添加した培地(グルコース・バレイショ培地)がそれぞれ好適であることが明らかになった。子実体形成力が低下した場合には、ガラクトース・バレイショ培地の寒天濃度を6%にあげたものが著しく効果的であった。

考 察

本研究で行った菌株内単離一核菌糸間での交配実験の結果は、それぞれ表1と表2に示されている。双方の菌株において、全面二核化、部分的二核化と無反応の3通りの交配反応が生じた。これらの実験結果は本菌の交配系が四極性ヘテロタリズムであることを暗示している。しかし、+と±の組み合わせで形成されたクランプを多数観察したが両組み合わせとも正常なクランプばかりで、両者間でクランプ構造の差異を見いだすことができなかった。一方、スエヒロタケ⁵⁾その他の多くの担子菌類では、±の組み合わせでは偽クランプが形成されることが知られているので、この観察結果は意外であった。そこで、今回は本菌が四極性ヘテロタリズムであると結論することはさけ、クランプについて今後の詳細な細胞学的観察の結果を待つ最終的

な結論を出したいと考えている。

野外から採取したマルミノヒトヨタケは、最初の間は既製の PSA 培地, MY 培地など⁸⁾で容易に多数の子実体を形成したが, 実験室内で培養を続けるうちに子実体形成力は低下してゆき, 上記の培地ではほとんど子実体を形成しなくなった。このため, 試行錯誤を繰り返して培地を探索した結果, 今回示したような子実体形成に好適な培地をつくりだすことができた。さ

らにすぐれた培地を検索中であるが, 各種のビタミン類やこれまでに子実体形成力を増強するものをみつけることはできなかった。むしろ, これらを添加しないほうが子実体形成力が強かった。添加する糖の種類や濃度, 寒天の濃度などがどのような機構によって子実体形成を促進しているかは今のところ不明である。今後はこの機構解明や窒素源の影響, さらに完全な合成培地の確立をおこないたい。

文 献

- 1) 武丸恒雄, 鎌田 堯 (1971) ヒトヨタケにおける子実体発生の遺伝子支配, 菌蕈研究所研究報告, **9**, 21—35.
- 2) Takemaru T and Kamada T (1972) Basidiocarp development in *Coprinus macrorhizus*. I. Introduction of developmental variations. *Botanical Magazine Tokyo* **85**, 51—57.
- 3) Kanda T, Arakawa H, Yasuda Y and Takemaru T (1990) Basidiospore formation in a mutant of incompatibility factors and in *Coprinus cinereus*. *Experimental Mycology* **14**, 218—226.
- 4) Miles PG, Takemaru T and Kimura K (1966) Incompatibility factors in the natural population of *Schizophyllum commune*. I. Analysis of incompatibility factors present in fruit bodies collected within a small area. *Botanical Magazine Tokyo* **79**, 693—705.
- 5) Raper JR (1966) *Genetics of sexuality in higher fungi*. The Ronald Press Company, New York.
- 6) 青木 実, 本郷次雄 (1966) 日本菌類誌資料 (3). *Transactions of the Mycological Society of Japan* **7**, 16—19.
- 7) Takemaru T (1961) Genetical studies on fungi. X. The mating system in *Hymenomycetes* and its genetical mechanism. *Biological Journal of Okayama University* **7**, 133—211.
- 8) 武丸恒雄 (1982) 遺伝学実験法講座, 3: 微生物学遺伝学実験法, 石川辰雄編, 共立出版, 東京, 243—278.