

## 担子菌の選択的分離を試みる -もうひとつの微小菌類の世界-

○中島淳志 (筑波大・生命環境), 出川洋介 (筑波大・生命環境)

目に見えない微小菌類は、分解者として生態系において重要な役割を果たしているが、それらを可視化し、多様性を明らかにするには「培養法」を用いる。これは、菌が生息している基質を寒天培地上で培養し、特定の菌のみを分離培養する手法である。これまで多くの研究者により、土壌や植物残渣、動物の遺体など、様々な基質にこの手法が適用されてきたが、こうして得られるほとんどの菌は接合菌や子囊菌およびその無性世代であり、担子菌が分離されることは稀である。一般に担子菌は生長が遅く、培養下では他の菌に覆われてしまうためである。また、担子菌は多くの場合、培養下で孢子形成を行わないため、形態による同定がほぼ不可能であり、従来の研究では「不稔菌糸 (mycelia sterilis)」として一括りに扱われてきた。担子菌は肉眼的な子実体(きのこ)を作ることから菌類の中では認識されやすいグループであるにもかかわらず、以上の理由から微小菌類の研究手法ではほとんど実体が明らかにされてこなかった。結果として、担子菌の真の分布や多様性は、従来の研究では見落とされてきたおそれがある。中部山岳地域における担子菌の真の分布と多様性を解明するために、本研究ではまず、担子菌選択培地を用いた分離手法を開発し、その有効性を評価した。

担子菌選択培地は原則として Worrall (1991) の処方に従い、これを改変した。即ち、処方にある抗生物質 (ペノミル・ジクロラン・ストレプトマイシン) に加え、新たに 0.5 g/L の n-没食子酸プロピルを添加し、リグニン分解能を持つ菌の選抜を可能にした (Bavendamm 反応: ラッカーゼに反応して培地が褐変する)。また、これを 24 ウェルプレートに分注することでスクリーニングの効率化を図った。

選択性の検証のため、まず 7 属の頻出子囊菌・接合菌を担子菌選択培地に接種し、3-7 日培養後の生長阻害率を測定したところ、4 属では全く生長せず、2 属は 7 割生長が阻害され、本培地の有効性が示された (図 1)。

次に、12 地点から計 4 種の針葉樹の球果を採集し、表面殺菌処理を施したのち、担子菌選択培地を加えた 24 ウェルプレートに置床して褐変ウェルに出現した不稔菌糸を分離培養し、核 rRNA 遺伝子 ITS 領域を用いて DNA バーコーディングによる同定を行った。その結果、担子菌が 12 種、子囊菌が 23 種であり、3 割以上が担子菌であった (図 2)。また、子囊菌 23 種のうち 8 種はペノミルが無効とされるプレオスポラ目菌類であり、これを含む暗色の菌糸を分離対象から除外することで担子菌の選択率が高まると考えられた。また、従来子囊菌はリグニン分解に対する寄与が低いといわれてきたが、実際にはリグニン分解能を持ち、材腐朽に関与するものも多いことが明らかになった。

最後に、担子菌選択培地と通常の CMA 培地での結果を定量的に比較するために、両者を加えた 24 ウェルプレートに表面殺菌処理を施したアカマツ・ドイツトウヒの球果断片を計 384 個、同時に同数置床し、一定期間培養して褐変したウェルから不稔菌糸を分離し分離培養・同定した。菌の出現ウェル数、出現菌数はいずれも通常の CMA 培地において有意に高かったが (Paired t-test,  $p < 0.05$ )、Bavendamm 反応が起きたウェルの割合は担子菌選択培地の方が高く、本培地は通常の分離法よりもリグニン分解菌の分離に適することが分かった。今後、本培地を用いて中部山岳地域における担子菌の生態・多様性の調査を進める予定である。

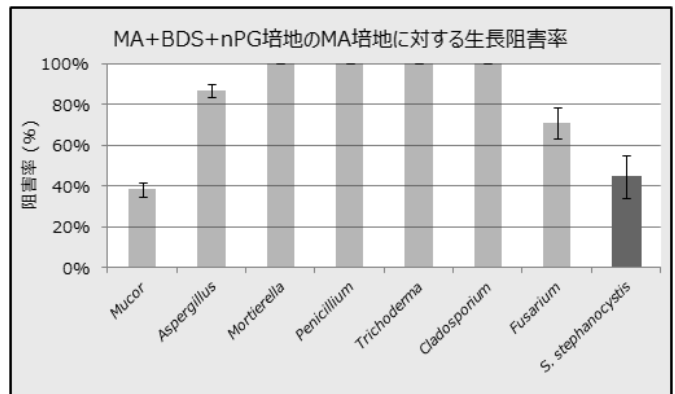


図 1. 担子菌選択培地による生長阻害率の比較 (一番右の *S. stephanocystis* は担子菌)

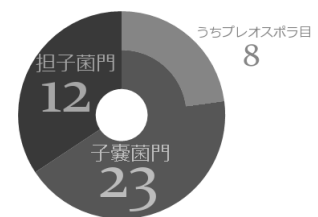


図 2. 分離された菌類の内訳