

ナメコ *Pholiota nameko* 培養菌糸のクランプコネクション直接観察法

皆川勝之¹

1 新潟県森林研究所

要旨：ナメコの菌糸を寒天培地で培養しながら、二核菌糸の形態的マーカーであるクランプコネクションを観察する方法を考案した。具体的には、寒天培地の一部を取り去ることであらわになったシャーレの底面を菌糸が伸びる現象を利用する方法である。この菌糸はシャーレの裏面から直接検鏡できるため、無菌的かつ非破壊的にクランプコネクションを観察することが可能となる。この方法を用いて交配におけるクランプコネクションの有無を確認する方法を試みたところ、従来法と比べて作業性が大幅に向上することがわかった。

キーワード：ナメコ，交配，クランプコネクション，菌糸，検鏡

Direct detection of clamp connections in hyphae of *Pholiota nameko* agaricomycetes grown on agar plates

Katsuyuki MINAGAWA¹

Niigata Prefectural Forest Research Institute, Murakami Niigata 958-0264

I はじめに

きのこの菌糸には通常、孢子から発芽伸長する一核菌糸（一つの菌糸細胞に核がひとつ）と、それらが交配してできる二核菌糸（一つの菌糸細胞に核がふたつ）がある。二核菌糸は、その細胞が分裂する際にクランプコネクションという突起状の構造を生ずるため、検鏡により一核菌糸と区別ができる。

きのこの品種改良では異なる孢子から得られた一核菌糸を交配させることがある。交配は成立しないこともあるが、成立すると二核菌糸となるので、クランプコネクションにより交配の成立が確認できる。この確認では、通常、寒天培地に伸長している菌糸を一部取り出し、顕微鏡で観察をするが、この方法ではプレパラートの作製に時間や労力、また経験が必要になるなどの問題点があった。

そこで本研究では、きのこの菌糸が、寒天培地の一部を取り去ることであらわになったシャーレの底面を沿うように伸びる現象（図-1）を利用して、寒天培地で培養中の菌糸のクランプコネクションを、シャーレのふたを開けずに直接検鏡する方法を考案した。この方法を用いることにより、きのこの交配試験が従来よりも容易になったので報告する。

またこの方法を応用して、寒天培地中央に接種した菌糸（たとえば、交配後移植した菌糸など）を培養しながらクランプコネクションを検鏡できないか検討した。し

かし、菌糸の繁茂により数日で観察が困難になり、試験日程が制約されることがわかった。

そこで、菌糸が接種位置から同心円状に伸長することを利用して、観察可能期間を延ばす方法も考案したので合わせて報告する。

なお本稿ではこの寒天培地の一部を取除いてできた、菌糸を観察する孔を「検鏡孔」、検鏡孔を用いて菌糸を観察する方法を「検鏡孔法」と呼ぶ。

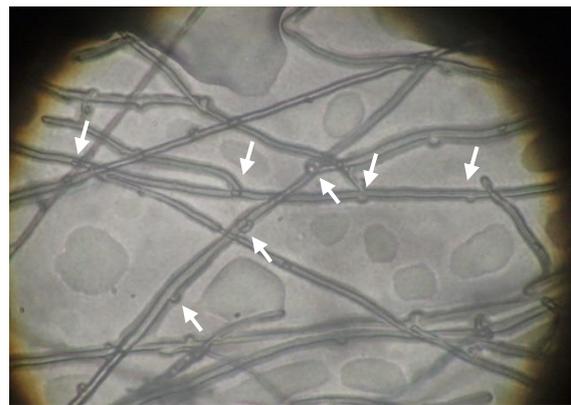


図-1. 検鏡孔の孔底を菌糸が伸びる現象

✓がクランプコネクション。倍率を 10×40 として、接眼レンズからカメラのズームを使って撮影。

II 材料と方法

1. **材料と使用機材** 交配に供した一核菌糸は、ナメコ（登録品種新潟森研 Pn1 号の従属品種 11-1(J)と野生

種 Pn1201) から単孢子分離にて得られたものである。寒天培地はポテトデキストロース寒天培地 (PDA, 日本製薬株式会社) を直径 60mm×深さ 15mm の滅菌プラスチックシャーレに作製した。顕微鏡はオリンパス CK2 (位相差観察可) で、倍率は主に 10×40 (作動距離 1.9mm) とした。

2. 方法

ア. 交配試験における検鏡 寒天培地にコルクボーラー (外径 5.0mm) で穿孔した 2 つの検鏡孔間に、交配するナメコの一核菌糸 (栽培種と野生種を 1 対とした) を接種した (図-2)。検鏡孔の位置は、善如寺・渡辺⁽²⁾の方法において検体を採取する位置とした。このシャーレを 20℃ で培養した。菌叢が検鏡孔に到達したら、その検鏡孔はクランプコネクションが確認できるまで検鏡した。最長、接種後 22 日目まで検鏡した。

なお従来法と検鏡孔法の作業時間を比較するため、従来法で 6 菌糸体について各 1 回検鏡した。

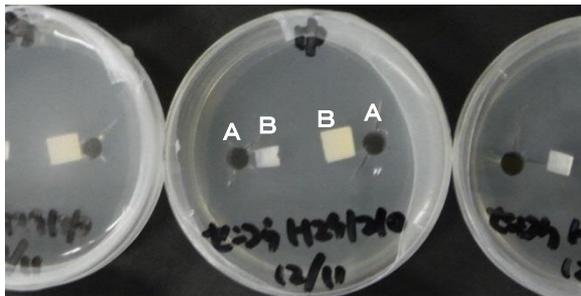


図-2. 交配の有無を確認する場合の検鏡孔 (A) と一核菌糸接種位置 (B)

イ. 同心円状に伸長する菌糸の検鏡

寒天培地中央から扇形にメスを入れ培地を除去し (以下、扇形検鏡孔)、要の位置に菌糸を接種した (図-3)。扇形検鏡孔は、日を追うごとに接種位置付近から外側に向かって菌糸の密度が高くなるため観察が困難になり、やがて孔全体が菌糸で埋もれて観察できなくなるが、それまでの間、菌叢の先端部などの適度な密度の場所で観察が可能となる。これを 20℃ で培養し、伸びてきた菌糸を観察した。

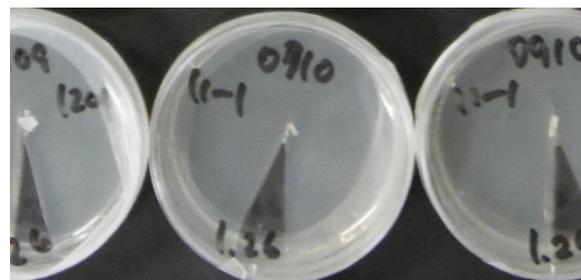


図-3. 扇形検鏡孔

III 結果と考察

交配試験における検鏡では、クランプコネクションを良好に確認できた。

また検鏡孔法では、クランプコネクションの存在のみならず一核菌糸と二核菌糸の形態の違いからも判別しやすくなることがわかった。交配が成立した寒天培地の中は、先行してまん延した一核菌糸の中を、その後が生じた二核菌糸が伸びていく状態となる。従来法ではプレパラート作製の過程で菌糸同士が混ざってしまうため、主にクランプコネクションの有無に注目するしか二核菌糸を判別する方法はない。しかし検鏡孔法の場合は、菌糸が伸びた様子そのままを観察できるので、一核菌糸が網状に広がっている中を二核菌糸が比較的直線的に伸びる様子や、そこにクランプコネクションが等間隔に配置している様子 (図-1) が比較的目にとまりやすかった。このことから二核菌糸をより視認しやすくなった。

作業時間について単純に比較すると、検鏡孔法は従来法と比べて平均 1/6 の時間で作業できた (従来法=平均 9 分、検鏡孔法=平均 1 分 34 秒)。検鏡孔法は、あらかじめ穿孔が必要なものの熟練を要しない上、従来法に必要な工程の大半を省くことができた。

これらのことから、検鏡孔法は交配試験に有効な方法であると考えられる。

今回は作業性を考慮してコルクボーラーで穿孔したが、今後は形状も工夫して、たとえば観察可能期間の長い形状などを検討することも考えられる。

同心円状に伸長する菌糸の検鏡でも、菌糸およびクランプコネクションの様子が良好に確認できた (菌糸については試験に供した 378 孔全てで確認できた)。また扇形検鏡孔は、中心部が菌糸で埋め尽くされたとしても周辺部では検鏡に適した密度だったため、観察可能期間を倍に伸ばすことができた (コルクボーラーによる検鏡孔=9 日間、扇形検鏡孔=18 日間)。これにより、余裕のある試験計画を立てやすくなった。今後は菌糸を観察する様々な試験に応用できると考える。

今回は検鏡孔内の二核菌糸の伸びが寒天培地内と同様であるとの前提で試験を行ったが、今後は従来法を用いるなどして比較検討する必要があると考える。

引用文献

- (1)伊藤幸介 (2015) ナメコ選抜菌株「11-1」の特性調査。新潟県森林研究所研究報告 56, 17-20
- (2)善如寺厚・渡辺直明 (1987) きのご実験マニュアル。講談社、東京：98