

ヒラタケの飢餓に伴う線虫捕食量の変化

河原大智 木下裕貴 佐藤凜星 野上健二郎 八木亮太
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

線虫捕食菌と呼ばれる、線虫を捕捉しそれを食する菌類が知られている。線虫捕食菌の線虫捕捉能力はどのような条件で活性化するかを調べるために、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) と線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて実験した。ヒラタケは、菌糸からトランス-2-デセン酸という線虫毒性を持つ毒素を分泌し、線虫を殺して養分にする線虫捕食菌である。ヒラタケの菌糸が生育できる PDA 培地の栄養状態に着目して実験を行ったところ、栄養が不足している状態ではヒラタケがより多量の毒素を分泌し、線虫の捕捉能力が上がる傾向にあることが分かった。

1. 序論

1.1. はじめに

線形動物門に属する動物は、総称して線虫と呼ばれる。線虫の中には、作物の根などを摂食して農業被害を及ぼすものがあり、これらの線虫被害を防除することが農業を行う上で有益となることがある。(田村弘忠 1973)実際に、線虫を減らすことで土壌を改良する資材が商品化されているが、線虫被害低減のメカニズムの1つとして、線虫捕食菌を活用するというものがあった。

線虫捕食菌とは、担子菌門や子囊菌門など菌界の複数の分類群内に分かれて存在しており、線虫を菌糸で捕えて捕食するもののことを特にする。前述した土壌改良資材には線虫捕食菌が含まれており、それらが線虫を捕食することで農業被害を抑える、という仕組みになっている。

本研究に用いた担子菌門のヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) は、ヒラタケ属 (*Pleurotus* 属) の代表的な一種で、ヒラタケ属にはいくつかの種は、線虫毒性活性を有する毒素を産生することが示されている。(Kwok et al., 1992; Nordbring et al., 1995; Satou et al., 2008)。ヒラタケはリノール酸に由来する線虫毒性を有する毒素であるトランス-2-デセン酸を生成する。この毒素は線虫だけでなく、昆虫や他の菌類にも作用する。(Kwok et al,1992)

1.2. 研究目的

線虫捕食菌は生育するうえで全ての必要な栄養を

周囲にいる線虫から得るのではない。農業を行うような土壌は富栄養であることが多いため、線虫捕食菌は自身の菌糸を発達させて線虫捕獲に必要な捕捉器官を発達させずとも生育することができる。そのため、もし富栄養状態において線虫捕食菌の線虫捕食能力が衰えるなどの事実があった場合、土壌改良資材に含まれる線虫捕食菌が本来の意図通りに、線虫を捕食するかどうか疑問であり、資材を添加する行為は作物に益のない行動となってしまう。

そこで我々は、線虫捕食菌であるヒラタケを用いて線虫捕食の度合いが生育環境の栄養状態によってどの程度変動するか、栄養状態が変わることによって捕食の速さが変わるのかを検証することとした。



図1 線虫捕食菌の菌糸
菌糸状に見える
球状のものは毒素球



図2 線虫捕食菌の菌糸
ヒラタケ子実体から
成長している

1.3. 仮説

線虫捕食菌の線虫捕食性は周囲環境の栄養が欠乏するにつれ上がるのではないかと。

2. 本論

2.1. 線虫 実験準備

カエノラブディティス・エレガンス (*Caenorhabditis elegans*, 以下エレガンス)を実験用の線虫とした。なぜならエレガンスの体長は約 1 mmと他線虫に比べて巨大であるため(二井一禎・水久保隆之 2014) 5 から 50 倍の倍率をもつ実体顕微鏡を用いても動きを正確に観察することができ、個体が生存しているか死亡しているかの判別が付きやすいからである。他の理由としては、標本線虫として広く使われているため入手しやすく、また培養方法が確立しており実験室内での作業が行いやすいことがあげられる。

実験に必要なエレガンスは理化学研究所の川野武弘博士から、兵庫県立神戸高等学校の生徒を通じて分譲していただいた。

2.2. 線虫の培養

エレガンスの培養には NGM(Nematode Growth Medium)培地を使用した。

NGM 培地の調整方法は以下の通りである。(二井一禎・水久保隆之 2014)

1. 寒天 17 g、ペプトン 3 g、NaCl 3g、蒸留水 975 ml、1 M の塩化カルシウム 1 ml、1 M の硫酸マグネシウム 1 ml、1 M のリン酸カリウム緩衝液 25 ml, 5mg/ml コレステロールを無菌的にフラスコに入れ、スターラーで攪拌する。
2. 手順 1 で作った混合液をオートクレーブ処理にかける。
3. 素手で触れる温度(60~70 °C)になったら、滅菌されたクリーンベンチ内で直径 9 cm のペトリ皿 40 枚に分注する。
4. 寒天が固化するまで(24 時間程度)静置する。

手順 1 ~ 4 で作った NGM 培地にエレガンスの餌となる大腸菌 OP50 株を塗布して大腸菌プレート进行调整し、その大腸菌プレート上でエレガンスを培養する。

一週間ごとに大腸菌プレートを 0.5 cm 角の立方体状に切り出して次のプレートに移すことで継代を行う。

2.3. 線虫捕食菌 実験準備

線虫捕食菌としてヒラタケ(*Preurotus Ostreatus*, 以後ヒラタケ)を選んだ。これは(XIANG Hong-

qiong, FENG Zhi-xin 2000)である通り、線虫捕食菌の線虫捕食性を調べる実験を行う際に使われた前例があり、対照実験に有用であると考えたからである。

実験に必要なヒラタケは、ヒラタケを培養してある菌糸瓶や、食用の生鮮ヒラタケから採取したものをを用いてある。

2.4. 線虫捕食菌の培養

ヒラタケの培養には PDA(Potato Dextrose Agar)培地を使用した。

PDA 培地の調整方法は以下の通りである。(第三節 糸状菌を培養する 2023)

1. 蒸留水 200 ml につき PDA が 7.8 g、寒天が 3.0 g

含まれるように無菌的にフラスコに入れ、スターラーで攪拌する。

- 2 ~ 4. NGM 培地の手順 2 ~ 4 に同じ。

上記の手順で調整した培地の PDA 濃度を規定濃度とする。普段の培養においては PDA が規定濃度含まれているものを用い、実験時には PDA の濃度が規定濃度に対し 1/10 や 1/100 など、異なる濃度 PDA を調整したものを使用する。

ヒラタケは 25 °C で湿度 80 、エレガンスは 20 °C で湿度条件はなしで培養を行い、実験時はヒラタケ培養時の環境で行った。(三井康 1975)

2.5. 実験方法

エレガンスを培養した NGM 培地の一部を切り出し、用意したヒラタケの培地の上にのせ、その時点でエレガンスが生存していることを確認した。

そこから 30 分毎に 3 回、各培地におけるエレガンスの生存数を顕微鏡で観察し、表にまとめた。観察を終えた培地のシャーレはすぐに人工気象器に入れることで、培地の周囲の環境に配慮した。表には各時間、各培地内の一定範囲の中に確認される全エレガンスの個体数と、そのうち明らかに動いている(すなわち生存している)個体数をそれぞれ記録した。また、(生存数) / (総数) の値を各培地における生存割合としてまとめた。

実験開始 24 時間後にも上記と同様の方法で計測した。

3. 結果

図3より、元々エレガンスが存在していた領域に菌糸が伸びていることから、ヒラタケがエレガンスを摂食してエレガンスは死亡し、ヒラタケがその栄養分を用いて菌糸を成長させることが新たに分かった。

エレガンスの時間経過による生存数と計上したすべてのエレガンス個体数について下記の表1、表2の結果が得られた。その結果を下記の図4、図5のグラフに示した。「ヒラタケあり」で「規定濃度の1/10」の条件については、その時の結果を同色の棒線で示してある。図4、図5のグラフより、ヒラタケの菌糸存在条件下において非存在条件下よりもエレガンスの生息個体数の割合が大きく減少し、24時間経過後には0に近づいていることが分かった。また菌糸存在条件下にて、実験に使用したPDA培地の栄養濃度が低下するにつれてエレガンスの生存数の減少が急速になることも読み取れた。



図3

表1 菌糸非存在条件下での線虫の生存率

時間 濃度	0分	30分	60分	90分	24時間
1	100%	98%	100%	100%	73%
1/10	100%	97%	94%	100%	87%
1/100	100%	100%	100%	100%	88%
0	95%	100%	98%	86%	59%

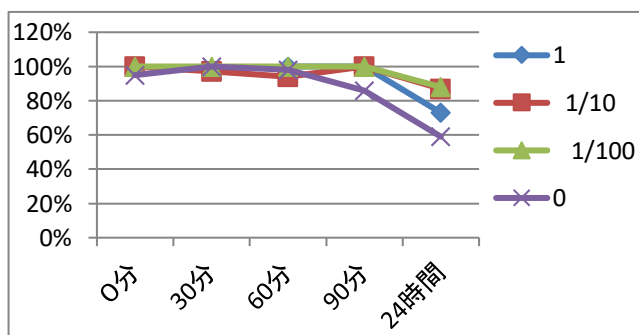


図4

表2 菌糸存在条件下でのエレガンスの生存率

時間 濃度	0分	30分	60分	90分	24時間
1	100%	100%	71%	55%	0%
1/10	100%	90%	53%	47%	0%
1/100	100%	99%	50%	44%	0%
0	100%	74%	28%	17%	0%

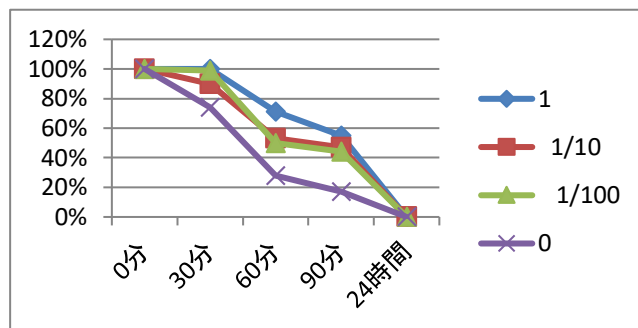


図5

4. 考察

経過時間を（エレガンスを投入した時間を0 minとして）横軸、エレガンスの生存率を百分率で表したものの{(エレガンスの生存数) ÷ (全体的エレガンス数)}を縦軸にとってグラフを作成した。

この図から、ヒラタケを培養してあるPDA培地が富栄養であれ貧栄養であれ、24時間経過後の線虫捕食率がほぼ100%になっていたため、栄養濃度の多寡に関係なく最終的には線虫防除に線虫捕食菌が有用であることが分かった。

また、PDA培地のPDAが規定濃度であるものより栄養欠乏状態であるものの方が、実験開始後30 minから90 minにかけて線虫の生存率が大きく減少していることから、線虫捕食能が上がっていることが推察される。

また同じ栄養欠乏状況下においても、PDAが規定濃度の1/10であるものより規定濃度の1/100であるもの、PDAを全く含まないものの順に線虫捕食能が徐々に上がっていくことが読み取れるため、栄養が欠乏すればするほど、線虫捕食菌はより多くの毒素を分泌し、線虫をよくとらえることができるようになるのではないか、という結論を得ることができた。

しかしPDAが規定濃度の1/10のもの、1/100のもの、含まれていないものについて線虫の生存個体の減少割合の差が相対的に小さかったため、PDAが規定濃度の1/10以下では、ヒラタケの線虫捕食能は濃度依存的には変化しないが、栄養塩の欠乏を感知することで線虫捕食能を上昇させたと考えられる。

線虫の生存率の数字の信頼性に対する根拠として、上図4で生存線虫割合のバラつきが0~10%に収まっていることがあげられる。今回の実験内で見られる誤差が最大のものであったとしても、栄養欠乏状況下において線虫捕食菌のはたらきが活発になっていることは裏付けられる。

5. 今後の展望

実験において、線虫を扱う際に不慣れによるミスが発生し、それに時間を取られてしまったことが今回の実験における第一の課題である。当初、農地等の自然環境に近い状況を想定して、ネグサレ線虫 (*Pratylenchus* sp.) を用いた実験を試みたが、飼育系と実験系が確立せず、有意な実験データを得ることができなかった。

また、センチュウ種をエレガンスに変えてからも、線虫の個体数の計測について、顕微鏡で複数視野を覗いて数え上げる方法を用いたが、寒天培地に潜り込んだ線虫を数えることが困難であり、正確な計測に至らなかった。改善案として、線虫は匂いに誘引されるので、匂いによって線虫をひきよせて狭い範囲に線虫を集中させることで、計測するエレガンスの母体数を増やし、よりデータの精度を向上させるという手法 (川野武弘博士(2023)) を用いることも考えている。

本実験の結果では「栄養欠乏が線虫補食性を上げる」という結論を出すにはやや不十分であると思われるが、条件やデータ数などの実験方法を改良し、より説得性の高い結果を追究していきたい。

6. おわりに

当初の目的であった「農業時に線虫防除のために線虫補食菌を使うのは適切であるか」という問いについては、富栄養時にもある程度の線虫補食性がみられたため「適切である」と得られた。

今後の線虫補食菌に関する研究に期待している。

7. 謝辞

本実験を始めるにあたって、必要なアドバイスをご教授いただいたり生物資源を分譲していただいたりした。

龍谷大学農学部応用線虫学研究室 岩堀英晶教授、
農業食品産業技術総合研究機構 岡田浩明教授、
理化学研究所生命機能科学研究センター 川野武弘博士

兵庫県立神戸高等学校 76 回生総合理学科 伊藤真
高松和真 待鳥恵羽 松浦万季

以上の方々へ謝辞を述べさせていただきます。

ありがとうございました。

8. 参考文献

田村弘忠(1973)線虫捕食菌研究の現状 日本線虫研究会誌

Kwok, O.C.H., Plattner, R., Weisleder, D., Wicklow, D.T., (1992) A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. J. Chem. Ecol. 18, 127-136.

Nordbring-Hertz, B., Neumeister, H., Sjollem, K., Veenhuis, M., (1995) A conidial trap-forming mutant of *Arthrobotrys oligospora*. Mycol. Res. 99, 1395-1398.

Satou, T., Kaneko, K., Li, W., Koike, K., (2008) The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. Biol. Pharm. Bull. 31, 574-576.

三井康(1975)線虫捕食菌と線虫 明治大学卒論

三井康(1973)線虫捕食菌の生態：検出方法および分布

XIANG Hong-qiong, FENG Zhi-xin(2000)

Rerationsship between biological characteristics and nematocidal toxicity of *Preurotus Ostreatus*

農研機構 www.naro.affrc.go.jp (2023.1.20 現在)

第三節 糸状菌を培養する ocw.kyoto-u.ac.jp(2023.1.30 現在)

キャンベル(2018)キャンベル生物学 11 版原書 丸善出版

二井一禎・水久保隆之(2014)線虫学実験 京都大学学術出版会

Filippe Elias de Freitas Soares,* Bruna Leite Sufiate, Jose Humberto de Queiroz (2018) Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups Agriculture and Natural Resources 52 (2018) 1-8