

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-80811

(P2012-80811A)

(43) 公開日 平成24年4月26日 (2012.4.26)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
AO1G 1/04 (2006.01) AO1G 1/04 IO2 2BO11
 AO1G 1/04 Z

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2010-228793 (P2010-228793)
 (22) 出願日 平成22年10月8日 (2010.10.8)

(71) 出願人 504150461
 国立大学法人鳥取大学
 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地
 (71) 出願人 592072791
 鳥取県
 鳥取県鳥取市東町1丁目220
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ショウロ培養菌糸体接種による子実体生産技術

(57) 【要約】 (修正有)

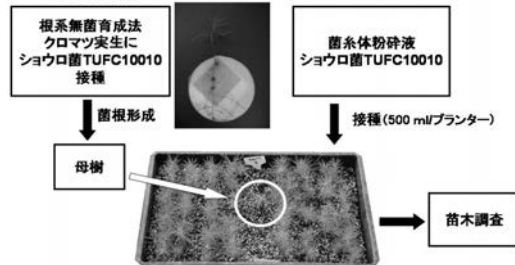
【課題】 簡便にショウロ子実体を製造する方法を提供する。

【解決手段】 ショウロ菌根を形成したクロマツ実生を、クロマツ実生を育成させた環境の土壤に母樹として定植し、これらのショウロ菌根を形成したクロマツ実生あるいはショウロ菌を接種していない実生の根または育成している土壤に、ショウロ菌糸体粉砕物、あるいはショウロ菌糸体粉砕物およびミネラルを含む混合物、あるいはショウロ菌糸体粉砕物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物を接種することにより、ショウロ菌根の数を増大させるショウロ子実体。

【選択図】 図1

母樹感染場面におけるショウロ菌糸体粉砕物の接種効果(育苗箱試験)

・ 実験方法



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) ショウロ菌根を形成したクロマツ実生を、クロマツ実生を育成させた環境に母樹として定植し、次いで、

(b) 母樹を定植した該環境にショウロ菌系体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤を含む混合物を接種し、ショウロ子実体を形成させる
を特徴とする、ショウロ子実体の製造方法。

【請求項 2】

工程 (a) における母樹の菌根が、ショウロ菌系体粉碎物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物を、クロマツ実生に接種することにより形成されたものである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

工程 (b) におけるショウロ菌系体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤を含む混合物の接種が、母樹の定植後、1～2ヶ月おきに2～3回行われる、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

ショウロ菌株が独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され受領番号 N I T E A P - 9 7 9 を付与されたものである、請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され受領番号 N I T E A P - 9 7 9 を付与されたショウロ菌株。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キノコの子実体の生産技術に関する。詳細には、本発明は、食用キノコであるショウロの子実体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ショウロは海岸クロマツ林で発生する食用のきのこである。ショウロはクロマツの根に感染して共生する外生菌根菌である。ショウロはクロマツ林の分布に伴って広く分布しているが、その子実体の生産量は年々減少し、最近ではごく僅かしか子実体が得られない。その一方で、ショウロには高級食材としての需要がある。

30

【0003】

ショウロ子実体を生産するために、クロマツ根へのショウロの菌人工感染に関する研究が今日まで行われてきたが、その方法は主に、1) 無菌条件下でショウロ菌系体を接種する方法 (非特許文献 1)、2) 自然条件下でショウロの孢子懸濁液や子実体粉碎液を接種する方法 (非特許文献 2) であった。従来の無菌条件下で接種する方法においては、無菌条件を形成・維持するための設備や技術を必要とし、多大な経費を伴うこと、また、自然条件下での孢子接種においては、自然界で生産される子実体を集めなければならないなどの制約がある。したがって、簡便にショウロ子実体を製造する方法は確立されていなかった。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】 Yamada A, Ogura T, Ohmasa M (2001) Mycorrhiza 11:59-66

【非特許文献 2】 平佐隆文 (1992) 島根県林業技術センター研究報告 43: 25-30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

50

簡便にショウロ子実体を製造する方法を確立することが本発明の課題であった。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決せんと鋭意研究を重ね、ショウロ菌根を形成したクロマツ実生を母樹とする母樹感染法場面で、ショウロ菌系体粉碎物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物を、クロマツ実生の根に接種することにより、ショウロ子実体を得ることに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下の方法および菌株を提供する。

(1)(a)ショウロ菌根を形成したクロマツ実生を、クロマツ実生を育成させた環境に母樹として定植し、次いで、

(b)母樹を定植した該環境にショウロ菌系体粉碎物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物を接種し、ショウロ子実体を形成させる
を特徴とする、ショウロ子実体の製造方法。

(2)工程(a)における母樹の菌根が、ショウロ菌系体粉碎物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物を、クロマツ実生に接種することにより形成されたものである、(1)記載の方法。

(3)工程(b)におけるショウロ菌系体粉碎物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物の接種が、母樹の定植後、1~2ヶ月おきに2~3回行われる、(1)または(2)記載の方法。

(4)ショウロが独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターから受領番号NITE AP-979を付与されたものである、(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5)独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターから受領番号NITE AP-979を付与されたショウロ菌株。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、簡便にショウロ子実体を製造することができ、高級食材であるショウロ子実体を、より多く供給することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、母樹感染場面におけるショウロ菌系体粉碎液の接種効果を調べる実験における、実験の概略を示す図である。

【図2】図2は、母樹感染場面におけるショウロ菌系体粉碎液の接種プログラムを示す図である。

【図3】図3は、母樹感染場面におけるショウロ菌系体粉碎液の接種効果を、菌根数で示した図である。

【図4】図4は、母樹感染場面においてショウロ菌系体粉碎液を接種することにより得られたショウロ子実体の写真である。

【図5】図5は、TUF C 10010培養菌系体と上記実験で採取した子実体の遺伝子型を調べた結果を示す図である。上パネルはTUF C 10010培養菌系体のDNAのピークパターン、下パネルは実験で採取した子実体のDNAのピークパターンを示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、1の態様において、

(a)ショウロ菌根を形成したクロマツ実生を母樹として、クロマツ実生を育成させた環境に母樹として定植し、次いで、

(b)母樹を定植した該環境にショウロ菌系体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤を含む混合物を接種し、ショウロ子実体を形成させる
を特徴とする、ショウロ子実体の製造方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明の方法は、従来的人工感染技術（非特許文献 1、2）とは異なり、例えばプランター内などの開放系において実施できる、新規、簡便かつ効果的なショウロ子実体の製造方法である。

【 0 0 1 2 】

本発明のショウロ子実体形成方法の第 1 工程（a）は、ショウロ菌根を形成したクロマツ実生を、クロマツ実生を育成させた環境に母樹として定植する工程である。

【 0 0 1 3 】

ショウロ菌根を形成したクロマツ実生は、天然のクロマツ実生であってもよく、あるいは人工的にクロマツ実生にショウロ菌を感染させたものであってもよい。クロマツ実生は発芽から 3 ヶ月～4 ヶ月ほど経たものが好ましく用いられる。

10

【 0 0 1 4 】

天然のクロマツ実生であっても適当期間育成すればショウロ菌根を形成することがあるが、子実体形成確率を上げるためには菌根数が多い方が好ましいので、クロマツ実生にショウロ菌を接種したものを育成することが好ましい。接種は、一般的には、クロマツ実生の根や周囲土壤にショウロ菌糸を適量適用することにより行うことができる。適用される菌糸の量は、当業者が適宜決定できる。かかる接種法および接種手段は当業者が適宜選択して適用することができる。

【 0 0 1 5 】

クロマツ実生の育成土壤については特に制限はなく、天然のものであってもよく、あるいは例えば、パーミキュライト：パーク堆肥の混合物などを用いることができる。菌根の形成は、開放系において、ポットやプランターなどの適切な容器中で行ってもよい。菌根が形成されるまで、適宜灌水する。接種後、適当期間クロマツ実生を育成すると、その根にショウロ菌根が形成される。菌根の形成はルーペや実体顕微鏡などにて根を直接観察することにより確認することができる。

20

【 0 0 1 6 】

天然のクロマツ実生（ショウロ菌を接種していない実生）あるいはショウロ菌を接種したクロマツ実生を育成している土壤またはクロマツ実生の根に、ショウロ菌糸体粉砕物、あるいはショウロ菌糸体粉砕物およびミネラルを含む混合物、あるいはショウロ菌糸体粉砕物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物を接種することにより、ショウロ菌根の数を増大させることができる。ショウロ菌糸体粉砕物、ミネラルおよび界面活性剤を含む混合物を接種することにより、ショウロ菌根数を飛躍的に増大させることができる。

30

【 0 0 1 7 】

ショウロ菌糸体粉砕物、あるいは上記混合物の接種は、クロマツ実生の近辺の土壤に混合物を注入することにより、あるいはクロマツ実生の根に混合物を直接接触させることにより、行うことができる。上記混合物は水性懸濁液の形態とするのが便利である。例えば、ミネラルおよび界面活性剤を含む水溶液にショウロ菌糸体粉砕物を懸濁したものであってもよい。

【 0 0 1 8 】

クロマツ実生への上記混合物の接種は、1 回であってもよいが、複数回（例えば、数回）行うほうが好ましい結果が得られる。複数回適用する場合には、約 2 週間～約 2 ヶ月間隔で接種を行ってもよい。菌根数の多い実生を母樹として選定し、本発明の方法の第 2 工程（b）に用いることができる。

40

【 0 0 1 9 】

ショウロ菌糸体は、常法により、菌糸を培地に接種して、好氣的に培養することにより得ることができる。例えば、ショウロ菌糸体を寒天培地上に接種して適温にて培養し菌糸を増殖させ、得られた菌糸を液体培地に接種して、適温にて振盪培養することにより、さらに多くの菌糸体を得てもよい。ショウロ菌株の培養方法、ならびに培地成分およびその組成、培養温度、培養時間などの培養条件は、当業者に公知である。

【 0 0 2 0 】

50

ショウロ菌系体の粉碎は、水、ミネラル水溶液、界面活性剤の水溶液などにショウロ菌系体を懸濁し、公知の粉碎手段を用いて、常温または冷却しながら行うことができる。あるいは、水などのショウロ菌系体を懸濁したものを粉碎処理し、これにミネラルおよび界面活性剤を添加してもよい。ショウロ菌系体の粉碎手段としては、ホモジナイザー、ダイノミル、らいかい器などが公知であり、使用可能である。

【0021】

ショウロ菌系体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤を含む混合物を調製して用いる場合、混合物中のショウロ菌系体量、ミネラルの種類および量、界面活性剤の種類および量は、適宜選択することができる。

【0022】

上記混合物中に添加するミネラルはいずれのものであってもよく、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、リン、塩素などが例示されるが、これらに限定されない。ミネラルは単体、塩、イオンなどの形態であってよい。上記混合物中に添加する好ましいミネラルとしては、NaCl、KClなどが例示されるが、これらに限定されない。混合物中のミネラルの濃度は適宜変更できるが、例えばNaClでは10mM~50mM程度、好ましくは25mM~30mM程度、KClでは1mM~20mM程度、好ましくは5mM~10mM程度であってよい。

【0023】

上記混合物中に添加する界面活性剤はいずれのものであってもよく、公知のものを使用でき、アニオン性、カチオン性、双性、ノニオン性の界面活性剤や、サポニン、リン脂質などが例示されるが、これらに限定されない。上記混合物中に添加する好ましい界面活性剤としては、脂肪酸ソルビタンエステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、アルキルグリコシドなどが例示されるなどが、これらに限定されない。混合物中の界面活性剤の濃度は適宜変更できるが、例えばツイン80では0.05%~0.5%程度、好ましくは0.1~0.3%程度であってよい。

【0024】

クロマツ実生にショウロ菌根が形成されたならば、そのクロマツ実生を母樹とし、クロマツ実生を育成させた環境に該母樹を定植する。クロマツ実生を育成させた環境は、天然の環境であってよいが、好ましくは、プランターなどの適当な容器にクロマツ実生を複数本育成させた環境であってよい。母樹を定植する際の該環境中のクロマツ実生は、発芽から20日~40日ほど経過したものであってよく、発芽直後の稚苗であってよい。該環境中のクロマツ実生は、それらの根が互いに接触する程度の間隔で配置することが好ましい。例えば、35cm x 50cmのサイズのプランターであれば、80本~100本のクロマツ実生を等間隔に配置してもよい。

【0025】

該環境中に上記母樹を定植する。好ましくは、該環境の中央部に母樹を定植する。母樹の根と周囲のクロマツ実生の根が接触するように母樹を定植することが好ましい。これとは逆に、菌根を形成した母樹を育苗箱などにあらかじめ定植しておき、その周囲にクロマツ実生を配置してもよい。また、菌根を形成した母樹とクロマツ実生を同時に育苗箱などに植えてもよい。菌根を形成した母樹の根が伸長し、周囲のクロマツ実生の菌根形成が促進され、母樹感染が引き起こされる。

【0026】

本発明のショウロ子実体形成方法の第2工程は、母樹を定植した上記環境に、ショウロ菌系体粉碎物、あるいはショウロ菌系体粉碎物およびミネラルを含む混合物、あるいはショウロ菌系体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤を含む混合物を接種し、ショウロ子実体を形成させる工程である。ショウロ子実体形成数を増加させるためには、ショウロ菌系体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤を含む混合物を、母樹を定植した上記環境に接種することが特に好ましい。

【0027】

上記混合物中の成分や形態については、上で説明したとおりである。

10

20

30

40

50

【0028】

ショウロ菌糸体粉碎物、あるいは上記混合物の上記環境への接種は、例えば、混合物を、あるいはクロマツ実生の近辺の土壌に混合物を注入することにより、あるいはクロマツ実生の根に混合物を直接接触させることにより、行うことができる。かかる接種法および接種手段は当業者が適宜選択して適用することができる。

【0029】

クロマツ実生への上記混合物の適用は、1回であってもよく、複数回（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10回）であってもよい。複数回適用する場合には、適当な間隔で、例えば約2週間～約2ヶ月間隔で適用を行ってもよい。例えば、2回適用する場合には、1回目の適用から約1ヶ月～約2ヶ月後に2回目の適用を行ってもよい。例えば、3回適用する場合には、1回目の適用から約1ヶ月～約2ヶ月後に2回目の適用を行い、2回目の適用から約1ヶ月～約2ヶ月後に3回目の適用を行ってもよい。

10

【0030】

適用される菌糸体粉碎物の量は、当業者が適宜決定できる。クロマツ実生の育成土壌については特に制限はなく、天然のものであってもよく、あるいは例えば、パーミキュライト：パーク堆肥の混合物などを用いることができる。子実体が形成されるまで、適宜灌水する。子実体の形成は開放系で行うことができる。常温であれば、母樹を定植してから通常約180日～約270日で子実体が形成される。子実体の形成は肉眼にて直接観察することにより確認することができる。

【0031】

本発明のショウロ子実体の形成方法に使用するショウロ菌株はいずれのものであってもよいが、感染性の強いものが好ましい。そのようなショウロ菌株の一例として、T U F C 1 0 0 1 0 株（鳥取大学農学部附属菌類きのご遺伝資源研究センター）が挙げられる。T U F C 1 0 0 1 0 株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され、2010年9月16日付けで受領番号N I T E A P - 9 7 9を付与された。このショウロ菌株を本発明の方法用いることにより、容易かつ効率的にショウロ子実体を得ることができる。

20

【0032】

本発明の方法は、ショウロ以外の外生菌根菌についても適用可能である。本発明の方法を適用するに際して、外生菌根菌の種類に応じて母樹の種類を選択することができる。本発明の方法を適用して子実体を形成しうる外生菌根菌の例としては、マツタケ、トリュフなどが挙げられる。

30

【0033】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

【実施例1】

【0034】

クロマツ実生のショウロ菌根形成に及ぼす界面活性剤の影響を調べた。

【0035】

(1) 菌糸体粉碎液の調製

ショウロ菌糸体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤を含む混合物を下記の手順に従って調製した。

T U F C 1 0 0 1 0 株を2%麦芽エキス培地で約1ヶ月培養した菌糸体を集め、水道水で洗浄した。菌糸体の生鮮重量1gに対しミネラル液10mlを添加し、ホモジナイザーで粉碎した。ミネラル液の成分は、30mM NaCl, 7mM KClであった。

40

【0036】

得られた菌糸体粉碎物およびミネラル液の混合物にツイン80を0.2%になるように添加して得られた混合物と、ツイン80無添加の混合物を、それぞれ試験に使用した。さらに、ミネラル液のみ、およびミネラル液にツイン80を0.2%になるように添加して得られた混合物を、それぞれ試験に使用した。

50

【0037】

パーミキュライト/ピートモス土壌(1:1 v/v)を用土として小型ポット(直径6cm,高さ5cm)にてクロマツ実生1本を4ヶ月育成し、その土壌に上で調製した混合物を滴下(実生1本あたり10ml)することによりショウロ菌を接種した。接種を月2回のペースで継続した。実生育成中は適宜散水した。

【0038】

3ヶ月後、各試験区のクロマツ実生における菌根数を実体顕微鏡で調査した。結果を表1に示す。

【表1】

処理区	菌根数(個/実生)
ミネラル液	1.4±2.8 a
ミネラル液+ツイン80	2.8±4.3 ab
ミネラル液+菌糸体粉碎物	7.0±6.6 ab
ミネラル液+菌糸体粉碎物+ツイン80	19.2±16.8 b

10

a、b 同一符号間は5%水準で有意差が無いことを示す。

【0039】

上と同様の試験を、中型ポット(幅15cm×長さ40cm×高さ20cm)にてクロマツ実生10本を用いて行った。ミネラル液のみの場合の平均菌根数は55個/実生、ミネラル液+菌糸体粉碎物+ツイン80の場合の平均菌根数は145個/実生であった。

20

【0040】

これらの結果から、ミネラル液+菌糸体粉碎物+ツイン80をクロマツ実生に接種した場合に、菌根数が著しく増加することが確認された。

【実施例2】

【0041】

母樹感染場面におけるショウロ菌糸体粉碎液の接種効果を調べた(育苗箱試験)。本実施例において、「ショウロ菌糸体粉碎液」または「粉碎液」は、ショウロ菌糸体粉碎物、ミネラル水溶液および界面活性剤(ツイン80)を含む混合物(実施例1のミネラル液+菌糸体粉碎物+ツイン80)をいう。

30

2009年4月下旬にパーミキュライト:パーク堆肥(5:5 v/v)を用土として育苗箱(35cm×50cm×15cm)にクロマツ種子を撒き、実生を育成し、2009年6月上旬に母樹を定植した。母樹は、根系無菌育成法を用いてクロマツ実生にショウロ菌TUF C 10010を接種することにより菌根を形成させたものであった。

【0042】

粉碎液の接種は2とおり行った。1つの系では、2009年7月上旬および2009年9月上旬に粉碎液をプランター中の土壌に接種した(各回500ml/プランター(菌糸体の生鮮重量約50g/プランター))。もう1つの系では、2009年7月上旬、2009年8月上旬および2009年9月上旬に粉碎液をプランター中の土壌に接種した(各回500ml/プランター(菌糸体の生鮮重量約50g/プランター))。さらに、粉碎液を接種しない系をコントロールとした。上記実験の概略を図1に、粉碎液の接種プログラムを図2にまとめた。

40

【0043】

2009年12月に苗木調査を行い、各実生における菌根数を調べた(部位別感染程度の調査)。結果を図3にまとめた。実生に形成された菌根数は、いずれの粉碎液接種区においても粉碎液接種なしの区をはるかに上回った。2ヶ月毎粉碎液接種区と毎月粉碎液接種区とでは、菌根数はあまり差がなかった。

【0044】

上記実験において2009年12月から2010年2月にかけて子実体形成の有無を観察した。その結果、2ヶ月毎粉碎液接種区では育苗箱4個あたり8個、毎月粉碎液接種区

50

では育苗箱4個あたり5個の子実体形成が認められた。上記実験において形成された子実体の写真を図4に示す。

【0045】

マイクロサテライトマーカーを用いて、TUFC10010培養菌糸体と上記実験で採取した子実体の遺伝子型を調べた。その結果、両者のDNAのピークパターンが一致した(図5)。この結果から、採取した子実体はTUFC10010と同じ菌株であることが示された。

【0046】

このように、本発明の方法を用いれば、実際にショウロ子実体を得られることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0047】

本発明は食品産業および菌類の研究の分野において利用可能である。

【受託番号】

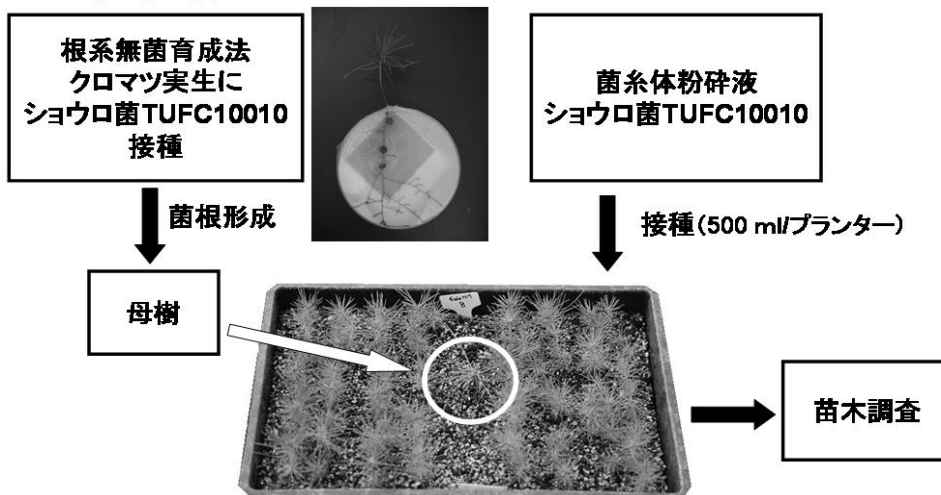
【0048】

TUFC10010株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され、2010年9月16日付けで受領番号NITE AP-979を付与された。

【図1】

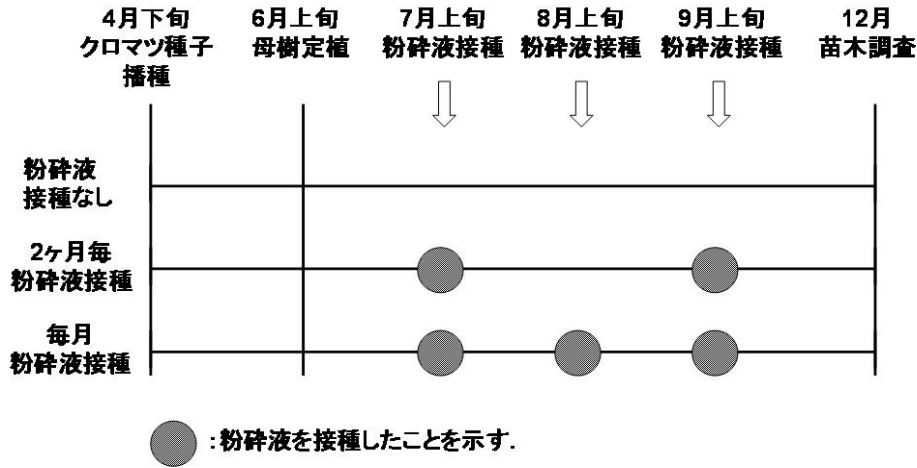
母樹感染場面におけるショウロ菌糸体 粉碎液の接種効果(育苗箱試験)

・ 実験方法



【 図 2 】

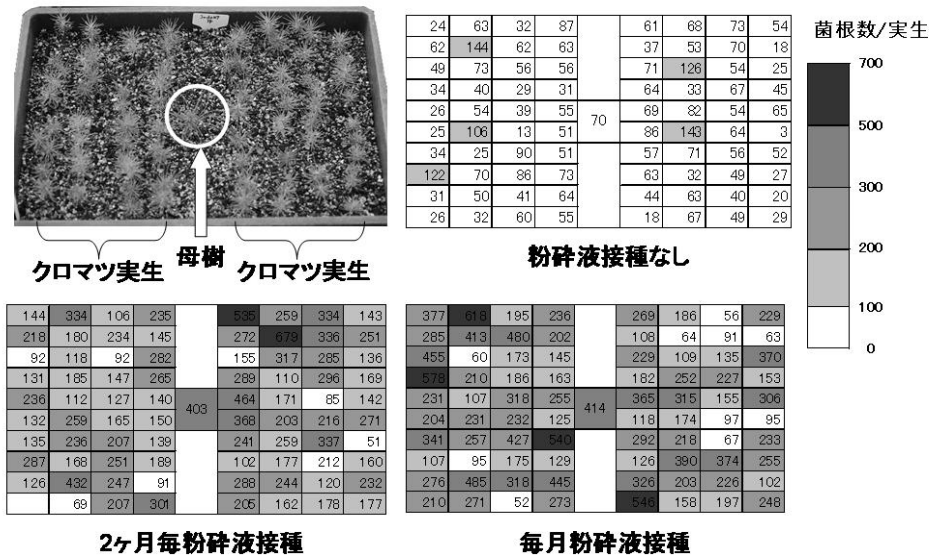
・実験の流れ



【 図 3 】

・部位別感染程度の調査

(TUFC10010接種区, パーミキュライト:パーク堆肥=5:5)



【 図 4 】

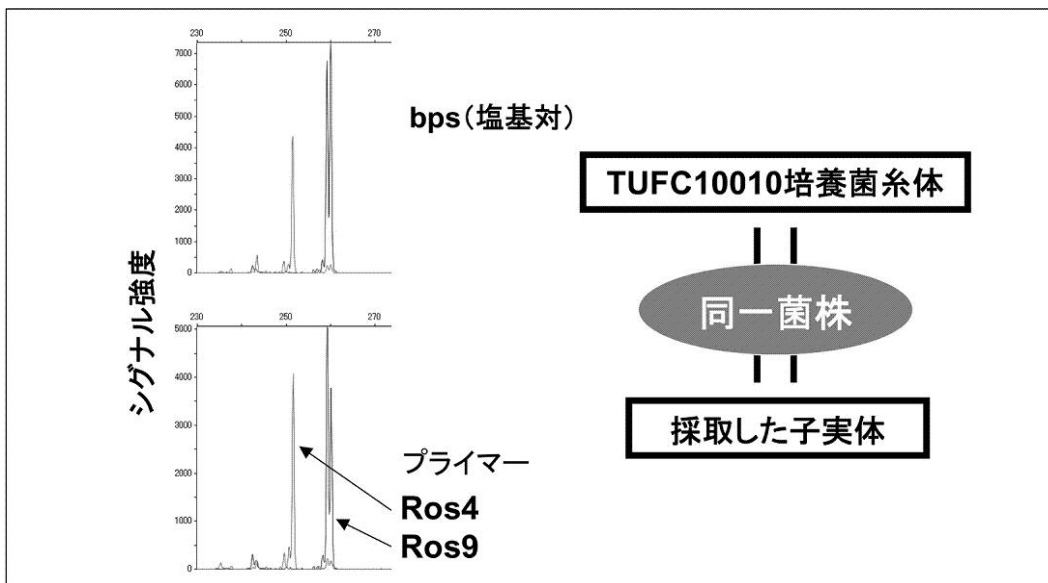


育苗箱で形成したショウロ子実体(矢印)

ショウロ子実体 → 接種菌株と採取した子実体の遺伝子型の比較

【 図 5 】

・遺伝子型の同定(マイクロサテライトマーカー)



フロントページの続き

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(72)発明者 霜村 典宏

鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内

(72)発明者 有吉 邦夫

鳥取県鳥取市河原町稲常113 鳥取県農林水産部農林総合研究所林業試験場内

Fターム(参考) 2B011 AA06 BA10 GA12 JA01 MA12