

観察教材としてのミズカビの培養法の改良

竹下 俊治・高尾 彰*

(2016年12月22日受理)

Modification of Culturing Method for *Saprolegnia* sp. as the Observation Material in Biology

Shunji TAKESHITA and Akira TAKAO

Saprolegnia spp., common aquatic fungi, are known as one of the appropriate material to observe the reproductive process in its life cycle. The aim of the present study is to modify culturing method of *Saprolegnia* sp. We prepared culture media containing various concentration of the Cannabis extract solidified by agar. The hyphae of *Saprolegnia* sp. were cultured in sterilized water with small pieces of the agar media. As the result, many zoosporangia and archegonia were observed under the light microscope. In comparison with the ordinary culturing method using whole cotyledon of Cannabis, the colonies of *Saprolegnia* sp. obtained by this modified method were suitable to observe various stage of life cycle. The nutritional conditions in culturing are able to be controlled by this method. Therefore, it will be used as the practical method in the biology class.

Key words : *Saprolegnia*, life cycle, culturing method

はじめに

生物の生殖様式は種類によって様々であり、生物の多様性を理解するには、多様な生殖様式を知ることも重要である。生殖様式を観察するための教材生物としては、コケ植物やシダ植物が用いられることが多い。しかし、野外で採取したサンプルでは、生殖器官を観察できる期間に限られているため、観察する時期に合わせて事前に培養しておく必要があるなど、授業での観察材料としては利便性が低いと言える。そこで、季節を問わず採集が可能で、培養も容易なミズカビに着目した。ミズカビは水生の腐生あるいは寄生性の菌類で、遊走子による無性生殖と、造卵器と造精器による有性生殖を行う(宇田川ほか1978)。短期間で生殖器官を形成し、形成された生殖器官は光学顕微鏡による観察が可能で、遊走子嚢から遊走子が放出される様子も見るができる。

ミズカビを用いた観察実験法については、既に報告されている(たとえば今堀ほか1986, 竹内・石原1992など)。また、高等学校での実践例も報告されている(八牧1970)。これらの方法は、ア

サの子葉などの基質とミズカビの菌糸を滅菌水に入れ、アサの子葉表面に菌糸を生育させ、形成された生殖器官を観察するものである。この方法は容易である一方、生殖器官を形成する時期や数が培養条件によって異なる可能性があり、授業日に適切な状態で必要な数の試料を得るためには、事前の予備培養が不可欠である。そこで本研究では、生殖器官の形成時期を明確にさせ、かつ、数多く形成させるための培養方法について検討した。

材料の採取

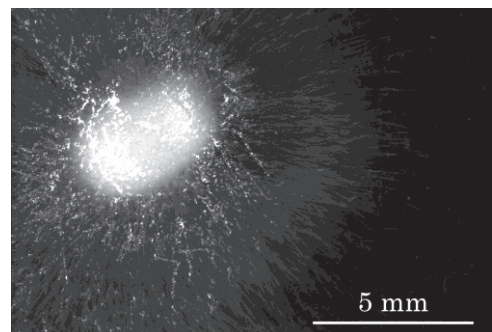


図1. アサの子葉に生育するミズカビ。

*佐賀県立鹿島高等学校

本研究では、ミズカビ (*Saprolegnia* sp.) を釣菌法 (釣り餌法, ベイティング法) により採集した (図 1)。釣菌法とは、ミズカビの遊走子を含む水にアサの子葉などミズカビが好む「餌」を入れ、その表面に菌を生育させて採取する方法である (青島ほか 1983)。本研究では東広島市黒瀬川の水を用いた。固形物には、鳥の飼料として市販されているアサの果実を用いた。アサの果実を茹で、殻を除去して子葉を取り出して使用した。培養温度は 20℃とした。

培養方法の検討

一般に、真菌類は良好な生育環境下では無性生殖を行い、環境の変化や悪化に伴って有性生殖を行うと考えられている (柿畷・徳増 2014)。したがって、培地の栄養条件を変えることで、ミズカビの生殖器官の形成をある程度制御できる可能性がある。

培地の栄養条件をコントロールするため、当初は液体培地での培養を試みたが、雑菌の汚染により観察に適した状態を維持するのが困難であった。しかし、アサの子葉を細かく砕いたものと滅菌水で培養すると、まれに早期に生殖器官が形成されることがあった。そこで、アサの子葉をすり潰し、その抽出液を寒天で固めたものを用いることとした。このことで培地の栄養条件を一定にできると考えられる。本研究では、ミズカビの培養に適切なアサの子葉抽出液の濃度について検討した。また、ミズカビをアサの子葉に育成させる場合と、アサの子葉の抽出液を含む寒天片に育成させる場合とで、1 日ごとに遊走子嚢と造卵器の形成状態を比較した。

アサの子葉 30 個をミズカビの菌糸 20 本程度とともに滅菌水へ入れ培養し、生殖器官が確認された子葉の数を記録した。

アサの子葉抽出液の寒天培地については、抽出液の適切な濃度を検討するため、市販のアサの果実を 5, 10, 15, 20, 25, 30 g とり、それぞれ 30 分間煮沸した後、乳鉢ですりつぶし、茶こし (網目 1 mm) とガーゼ 1 枚でろ過、ろ液に水を加え 50 mL に調整してアサの子葉の抽出液とした。抽出液をシャーレに厚さ 2 mm 程度になるように入れ、寒天粉末を加え (約 2%), オートクレーブで 121 °C, 15 分間の加圧滅菌を行った。滅菌後、クリーンベンチ内で冷却し寒天を固め、1 mm 角, 2 mm 角, 3 mm 角の寒天片をメスで切り取り、滅菌水を入れたシャーレに 10 個ずつ入れた (図

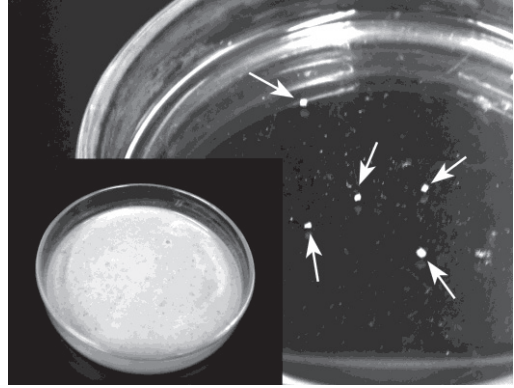


図 2. アサの子葉抽出液の寒天培地と切り出した寒天片 (矢印)。

2)。その後、採取したミズカビの菌糸 20 本程度を入れ、20 °C で培養を行い、1 日ごとに 10 個の寒天片に生育した菌糸を観察し、生殖器官が観察された寒天片の数を記録した。

結果

アサの子葉で培養した結果を表 1 に示す。遊走子嚢は 2 日目から確認され始め、6 日目までの 5 日間確認できた。3~5 日目にピークがあるが、30 個中 20 個程度しか観察できなかった。造卵器は 4 日目から確認され、7 日目にはほとんどの子葉に造卵器が形成された。

表 1. 遊走子嚢および造卵器が確認されたアサの子葉 30 個中の数

日数 (日)	1	2	3	4	5	6	7
遊走子嚢	・	11	20	17	20	5	・
造卵器	・	・	・	8	7	21	28

表 2 に 1 mm 角の寒天片で培養した結果を示す。遊走子嚢、造卵器ともに 2 日目から確認され始めたが、遊走子嚢は 4 日目にはほぼ観察されなかったのに対し、造卵器は 7 日目までほぼすべての寒天片で観察された (図 3)。

表 3 に 2 mm 角の寒天片で培養した結果を示す。遊走子嚢は 2 日目から確認され始め、5 日目にはほとんど観察されなかった。造卵器は、3 日目から確認され始め、その後 7 日目までほぼすべての寒天片で観察された。

表 4 に 3 mm 角の寒天片で培養した結果を示す。遊走子嚢は 3 日目~5 日目で観察できたが、わずかであった。一方、造卵器は、3 日目から確認され始め、その後 7 日目まで多くの寒天片で観察された。

表 2. 遊走子嚢および造卵器が確認された寒天片 (1 mm 角) 10 個中の数

遊走子嚢		培養日数 (日)						
アサの果実 の量 (g)	1	2	3	4	5	6	7	
5	・	8	1	・	・	・	・	
10	・	8	1	1	・	・	・	
15	・	10	8	・	・	・	・	
20	・	10	10	・	・	・	・	
25	・	10	8	・	・	・	・	
30	・	10	6	1	・	・	・	

造卵器		培養日数 (日)						
アサの果実 の量 (g)	1	2	3	4	5	6	7	
5	・	・	5	8	9	7	9	
10	・	3	10	7	10	9	10	
15	・	1	7	9	9	8	9	
20	・	1	10	5	10	8	10	
25	・	3	・	10	10	10	10	
30	・	1	5	6	9	8	9	

表 3. 遊走子嚢および造卵器が確認された寒天片 (2 mm 角) 10 個中の数

遊走子嚢		培養日数 (日)						
アサの果実 の量 (g)	1	2	3	4	5	6	7	
5	・	・	・	・	・	・	・	
10	・	1	9	・	・	・	・	
15	・	・	3	・	・	・	・	
20	・	6	10	・	・	・	・	
25	・	・	9	1	・	・	・	
30	・	・	8	4	1	・	・	

造卵器		培養日数 (日)						
アサの果実 の量 (g)	1	2	3	4	5	6	7	
5	・	・	7	10	10	10	2	
10	・	・	・	10	5	9	8	
15	・	・	2	9	9	10	10	
20	・	・	・	9	10	8	7	
25	・	・	・	5	7	10	9	
30	・	・	・	5	3	7	5	

表 4. 遊走子嚢および造卵器が確認された寒天片 (3 mm 角) 10 個中の数

遊走子嚢		培養日数 (日)						
アサの果実 の量 (g)	1	2	3	4	5	6	7	
5	・	・	・	・	・	・	・	
10	・	・	1	・	・	・	・	
15	・	・	・	・	・	・	・	
20	・	・	・	1	・	・	・	
25	・	・	・	・	・	・	・	
30	・	・	・	・	5	・	・	

造卵器		培養日数 (日)						
アサの果実 の量 (g)	1	2	3	4	5	6	7	
5	・	・	4	10	10	10	10	
10	・	・	2	1	9	10	8	
15	・	・	・	1	5	5	9	
20	・	・	・	・	6	6	8	
25	・	・	・	・	2	2	・	
30	・	・	・	4	3	3	・	

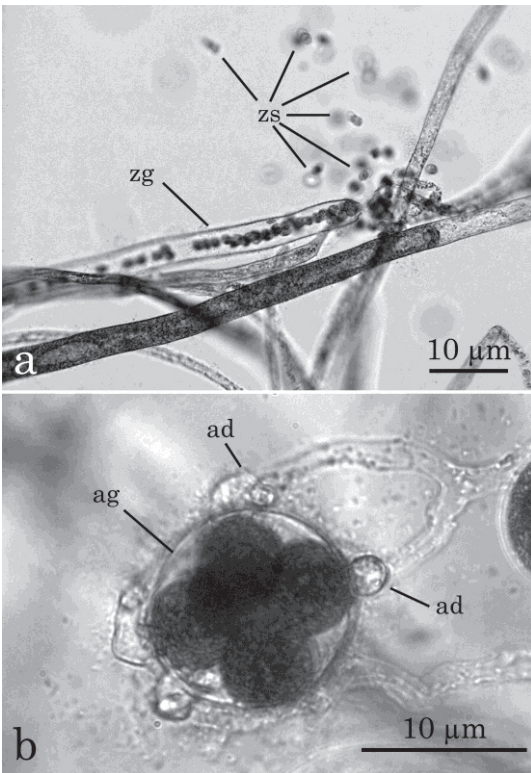


図 3. 観察された遊走子嚢および造卵器。
a: 遊走子嚢 (zg) と放出された遊走子 (zs)。b: 造卵器 (ag) と菌糸を伸長させて造卵器に付着する造精器 (ad)。

考察

1. 遊走子嚢の形成について

遊走子嚢は、アサの子葉、1 mm 角および 2 mm 角の寒天片で 2 日目から確認された。3 mm 角の寒天片では、3 日目～5 日目にわずかに確認されただけであった。子葉の方は遊走子嚢を観察できる期間が長い、これは子葉によって遊走子嚢の形成の有無が異なるためであり、全体の 1/3 は遊走子嚢が確認されていないことから、観察材料として用いるには、寒天片の方が適していると言え

る。寒天片の大きさでは、最も高頻度で遊走子嚢を確認された 1 mm 角が観察材料に適していると言えるが、寒天片の大きさと遊走子嚢形成の間のような関係があるのかは不明である。

2. 造卵器の形成について

アサの子葉では 4 日目から造卵器が形成され始め、7 日目によろやく、ほぼ全てのコロニーで造卵器が形成された。寒天片では、培養開始後 2 日目から造卵器が確認されており、子葉の場合よりも早い段階で形成されていた。造卵器は遊走子嚢とは異なり、形成後しばらくは観察できるため、4 日目以降も観察が可能である。したがって、子葉の場合と比較して、寒天片で培養することで造卵器を早期に、かつ、観察材料を数多く得ることができると言える。寒天片の大きさによる造卵器の確認頻度に違いは見られなかったが、寒天片が大きい場合は、アサの果実の量は少ないの方が造卵器の確認頻度が高くなる傾向があったため、培地の調整の際には留意する必要がある。

3. 観察材料として

生活環の観察では、一つのプレパラート（あるいは試料）で多様な生殖細胞を一度に観察できるように材料が望まれることがある。しかし本来なら、生活環の上の特定の時期に特定の生殖器官が形成されるのを順を追って観察するのが望ましい。このような観察の際に、アサの子葉抽出液の寒天培地で培養したミズカビを用いることができる。寒天片の結果（表 2, 3）から、遊走子嚢は全培養期間の比較的早期に集中して確認され、造卵器は後半に集中していることがわかる。また、表 2, 表 3, 表 4 を見ると、遊走子嚢の形成については、アサの果実の量が多い方が遊走子嚢を確認した寒天片の数が多くなる傾向がある。一方、造卵器の形成では、アサの果実の量が少ない方が造卵器を確認した寒天片が多い傾向がある。これらのことから、遊走子嚢は比較的栄養条件の良い環境で形成され、培養期間が長くなり栄養条件が悪くなると造卵器が形成されることが推察される。このような、生育する栄養条件の違いと形成される生殖器官の関係については、真菌類では顕著に観察できることが知られており（柿島・徳増 2014）、ミズカビを用いて、生活環と生育環境の関係を考察

する実験活動を展開できる可能性が示唆された。

おわりに

本研究では、ミズカビの培養に、アサの子葉の抽出液を寒天で固化させた培地の小片を用いる方法を考案し、その寒天片上に生育したミズカビの観察材料としての適性について検討した。この培養法による観察においても、従来のアサの子葉をそのまま用いた方法と同様、遊走子嚢および造卵器を確認することができた。また、アサの子葉の抽出液を用いることで、栄養分の濃度の調整も可能となり、栄養状態など培養条件による生活環の違いを比較できるなど、教材としての有効性も期待される。さらに、プレパラートを作成する際には、寒天片をスライドガラスにのせ、そのままカバーガラスをかけて上から軽く押しつぶすだけで観察が可能で、菌糸など観察対象の損傷を極力少なくできるという利点もあった。このように、授業でミズカビを用いる際、従来の方法よりも本培養法の方が利便性が高く、学校現場における活用が期待される。

謝辞

本研究は、科学研究費基盤研究 (A) (一般) (25242015) および科学研究費基盤研究 (C) (一般) (26350235) の助成を受けて行った。

引用文献

- 青島清雄・椿啓介・三浦宏一郎 (編), 菌類研究法, 448pp., 共立出版, 1983.
- 今堀宏三・山極隆・山田卓三 (編), 生物観察実験ハンドブック (第 2 刷), 423pp., 朝倉書店, 1986.
- 宇田川俊一・椿啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹夫・横山竜夫・渡辺昌平, 菌類図鑑 (上), 792pp., 講談社サイエンティフィック, 1978.
- 柿島眞・徳増征二 (編), 菌類の生物学一分類・系統・生態・環境・利用一, 473pp., 共立出版, 2014.
- 竹内正幸・石原勝敏 (編), 生物の実験, 418pp., 裳華房, 1992.
- 八牧秀樹, 1970, 生物教材としてのミズカビ, 生物教育, 11 (3): 4-7.