

栽培きのこのウイルスと検出方法

Virus and detection method of cultivated mushroom.

松本哲夫・伊藤将視^{*)}・砂川政英^{**)}・馬替由美^{**)}

栽培きのこのウイルスについて、サンプルの収集、ウイルス感染株、ウイルスフリー株の栽培試験を行い、病徴の再現性、ウイルスの有無を調査すると共に、検出方法について検討した。

- 1 県内からウイルスの感染が疑われるシイタケ10株、ハタケシメジ24株を採取し、菌株を収集した。
- 2 褐変化したエノキタケからはS1、S2、L1の3種類の2本鎖RNAが分離され、褐変変化症状にはL1が関与していると考えられた。また、ウイルスフリーのブナシメジには病徴が現れなかった。
- 3 ハタケシメジからは低分子の2本鎖RNAが3種類、高分子の2本鎖RNAが2種類分離され、最も高分子の2本鎖RNAが奇形子実体形成に関与していると考えられた。
- 4 本研究において開発された検出技術は、シイタケのウイルス検出に有効であると考えられた。

キーワード：ウイルス、エノキタケ、褐変、ハタケシメジ、検出技術

I はじめに

現在、栽培されているきのこの約85%は菌床栽培によるものである。菌床栽培では、バクテリアや糸状菌、キノコバエ、ナメクジといった病害虫の被害を受けることがしばしば見られる。また、高温障害や乾燥等が原因となって栽培不良が生じることもある。ところが、近年、原因の特定できない栽培不良症状が発生し、まん延することが報告されるようになってきた。その中には、ウイルスが関与するものが含まれることが明らかになった。ウイルスに感染したきのこは、その症状として菌糸まん延の遅れ、収量の減少、奇形子実体の形成等が生じ、栽培に大きな影響を与えることとなる。

エノキタケでは、本来は純白系の品種であるシナノ6号に突然褐変した子実体が生じ、分離した菌糸について調べたところ、親株には認められないS1、S2、L1の、3種類の2本鎖RNA(以下dsRNA)が存在していた¹⁾。その後、S1、S2は、粒子構造をとっている同一種のウイルスを構成するdsRNAであり、L1は、非粒子性である別のウイルスのdsRNAであることがわかってきた。

ハタケシメジでは、傘にイボ状の突起を持つ奇形子実体が生じることがあるが、ウイルスが原因ではないかと考えられている。また、ブナシメジに発生する吐水症状にもウイルスの関与が疑われている。

一方で、栽培きのこのウイルスに関する研究はほとんど事例がなく、防除技術も確立されていない。そのため、ウイルス検出技術を開発するとともに、ウイルスによる栽培不良症状を詳細に調べることが重要となりつつある。

そこで、発生不良の原因となっているウイルスの検出・診断方法を開発することを目標とし、本研究を実施した。

本研究は、農林水産省の競争的資金、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「栽培きのこのウイルス検出技術の開発」において、(独)森林総合研究所を中心に進められた研究である。

*長野県野菜花き試験場 ** (独)森林総合研究所

II 材料及び方法

1 ウイルス感染の疑われる子実体サンプルの収集

県内の栽培施設及び林業試験場において発生した、ウイルス感染の疑われる奇形子実体を採取し、菌株として収集した。なお、菌株保存用の培地にはPDA培地を用いた。

2 エノキタケ褐変ウイルス感染株及びブナシメジウイルスフリー株の栽培試験

エノキタケについて、純白系品種の子実体が褐変化する原因のひとつにウイルスの関与が考えられている。そこで、エノキタケの純白系品種シナノ6号について、子実体を褐変させるウイルスの感染株とウイルスフリー株、ウイルスフリー株に人為的にウイルスを感染させた株について栽培試験を行い、ウイルスが原因である褐変の再現性を確認した。

まず、2種類のウイルスに感染したシナノ6号褐色変異株(以下S6B)と、ウイルスフリーのシナノ6号(以下S6)を用意した。ウイルスに感染したS6Bにおいて、シナノ6号褐変ウイルス画分をPEG及びNaClで沈殿させた後、超遠心してさらに濃縮した。超遠心後にはS1、S2、L1の存在が確認できた。この2種類のウイルスとプロトプラスト化したS6をPEGとCaCl₂の存在下で混合し、ウイルスを感染させてウイルス感染株(以下感染株)とした。比較対照として、S6BとS6の菌糸同士を接触させてS6Bから2種のウイルスを移行感染させた、菌糸間感染株(以下接触株)も用意した。これらのS6B、S6、感染株、接触株を供試菌株とし、それぞれ栽培して発生した子実体の色を比較した。また、子実体中のウイルス濃度についても調査した。

栽培条件は表-1のとおりである。調査項目は、接種してから収穫までの平均日数(以下栽培日数)、子実体の平均収量(以下収量)、子実体の色とした。収穫された子実体については、ウイルスの存在について確認した。

また、ブナシメジでは、しばしば吐水症状が発生し、まん延することがある。吐水症状にもウイルスの関与が疑われている。そこで、ウイルスフリーのブナシメジを栽培し、病徴が発生しないことを確認した。

栽培条件は表-2のとおりである。発生処理の際には菌かき(まんじゅうがき)と注水を行った。供試数は31本とした。調査項目は栽培日数、収量、病徴の認められた栽培ビンの数(以下病徴本数)とした。

表-1 エノキタケ栽培条件

培地基材	: スギオガコ
培地添加物	: 生コメヌカ
混合割合	: 培地基材 : 培地添加物 = 3 : 1 (容積比)
含水率	: 62%
容器	: PPビン(口径58mm、容量850ml、550±20g 詰め)
滅菌	: 高压滅菌(培地内温度120℃で40分)
接種源	: 寒天培地に成長させた菌糸体
培養条件	: 温度16℃、湿度70%
芽だし	: 温度15℃、湿度95%
ならし	: 温度8℃、湿度90%
抑制・生育	: 温度6℃、湿度80%
供試数	: 各試験区16本

表-2 ブナシメジ栽培条件

培地基材	: ブナオガコ
培地添加物	: 生コメヌカ
混合割合	: 培地基材 : 培地添加物 = 10 : 2 (容積比)
含水率	: 64%
容器	: PPビン (口径58mm、容量850ml、550±20 g 詰め)
滅菌	: 高压滅菌 (培地内温度120℃で40分)
培養条件	: 温度23℃、湿度65%、92日間
発生条件	: 温度15℃、湿度90%

3 ハタケシメジ子実体中に存在するdsRNAの調査

ハタケシメジの奇形子実体及び保存方法の異なる菌糸体におけるウィルスの有無について調査を行った。

子実体については、群馬県内の栽培施設から傘にイボ状の突起ができた奇形子実体を採取し、サンプルとした(図-1)。菌糸体については、PDA培地を用いて冷蔵保存した株と凍結保存した株をサンプルとした。冷蔵保存株については、平成11年から年に一度斜面培地に継代培養し、温度22℃で菌糸を十分まん延させた後、温度5℃にて冷蔵保存したものを使用した。凍結保存株については、平成11年に平板培地に植え継ぎ、温度22℃で菌糸を十分まん延させた後、そのまま温度-85℃で凍結保存したものを使用した。供試菌株は、群馬GLD-17号と群馬GLD-21号とした。



図-1 ハタケシメジの奇形子実体

サンプルについては、PEG沈殿処理あるいは超遠心処理を行い、dsRNAの回収を試みた。

PEG沈殿法については、まずサンプルを0.1Mのリン酸バッファー中で破碎し、15,000×gで20分遠心した。その上清に濃度10%のPEG-8000と0.15MのNaClを加えて攪拌し、4℃で一晩放置した。翌日、生じた沈殿を15,000×g、20分間の遠心で回収し、TES(10mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0.15M NaCl, pH7.0)でけん濁した。その後、13,000×g、10分間遠心して上清を回収し、電気泳動用のサンプルとした。

超遠心処理では、サンプルを液体窒素中で破碎した後30,000×gで超遠心処理を行い、電気泳動用のサンプルとした。それぞれの方法で得られた電気泳動用のサンプルにセパゾールを加えてRNAを抽出した後、DNase及びS1 nucleaseで処理し、電気泳動でdsRNAを確認した。

また、凍結保存株については栽培試験を行い、子実体の形状を確認した。

4 ウイルス検出技術の実証

本研究において開発されたウイルス検出技術を用いて、ウイルスの有無を調査した。サンプルは群馬県内の栽培施設で採取されたシイタケおよび当場の栽培施設で栽培されたハタケシメジを用いた。サンプルの詳細については表-3のとおりである。サンプルのすりつぶしにはバイオマッシャー(図

ー2)を用いた。電気泳動用サンプルの調整法として、以下の3とおりの方法を行った。

(1) バイオマッシャーですりつぶし、そのままdsRNAを抽出する方法

バイオマッシャーにサンプルとRNA-Inhibitorを5 μ l投入し、15,000 \times gで10秒間遠心した。その後、RT-PCRにかけて電気泳動用サンプルとした。

(2) セパゾール処理法

まず、セパゾール500 μ lとクロロフォルム100 μ lを混合し、バイオマッシャーに入れた。次に、サンプルと0.1Mリン酸バッファーを100 μ l、バイオマッシャーに入れ、15,000 \times gで10秒間遠心した。抽出されたサンプルを15,000 \times gで5分間遠心し、上清を取り出し、200 μ lのイソプロパノールを添加した。15,000 \times gで5分間遠心した後、沈殿物に75%のエタノールを200 μ l添加した。15,000 \times gで5分間遠心した後、エタノールを捨て、乾燥させた。水を5 μ l添加、軽く遠心(3,000 \times gで10秒程度)し、RT-PCRにかけて電気泳動用サンプルとした。

(3) PEG沈殿法

50%のPEG20 μ lと5MのNaCl4 μ lを混合し、バイオマッシャーに入れ、15,000 \times gで5分間遠心した。TESで懸濁して4 $^{\circ}$ Cで一晩保存した後、RT-PCRにかけて電気泳動用サンプルとした。

上記3とおりの手法によって調整された電気泳動用サンプルを用いて電気泳動を行い、dsRNAの有無を調査した。



図ー2 バイオマッシャー

No.	きのこの種別
①	シイタケA 菌柄徒長子実体
②	シイタケA 正常子実体
③	シイタケB 正常子実体
④	ハタケシメジ群馬GLD-17号

III 結果及び考察

1 ウイルス感染の疑われる子実体サンプルの収集

サンプルとして、シイタケについては菌柄の徒長3株、菌柄の肥大1株、波状のヒダ2株、菌傘の未形成2株、凸型の菌傘1株、正常1株の合計10株、ハタケシメジについては菌傘にイボ状突起形成18株、正常6株の合計24株を採取し収集した。

2 エノキタケ褐色変異ウイルス感染株及びブナシメジウイルスフリー株の栽培試験

エノキタケ栽培試験の結果を表ー4に示す。褐色変異株であるS6Bについては栽培日数が最も短かったが、バクテリアの発生により8本を廃棄した。また、残ったビンにも一部にバクテリアの発生が見られたものがあり、収量は100g以下と少なかった。発生した子実体については、全て褐色変異していた。コントロールであるS6については、全て白色の子実体が形成された。接触株については、7本において子実体が形成されなかった。こちらについては、原因の特定には至らなかった。

一方、人為的にウイルスを感染させた感染株と接触株については子実体全体が褐色になることはなかったが、部分的に褐色変異した子実体が発生した。部分的な褐色変異は主として傘部に見られた。

感染株と接触株のうち、褐色変異を生じている子実体と白色の子実体を破碎しdsRNAを抽出して比較し

たところ、S1、S2の濃度に違いはなく、白色子実体にもウイルスが確かに感染していることが確認できた。しかし、L1の濃度には違いがあり、白色子実体に比べて褐色子実体中に非常に高い濃度で存在することが明らかになった(図-3)。

以上の結果から、子実体の褐変にはS6BでみつかったウイルスのうちS1、S2は影響を与えず、L1が関与していることが明らかになった。

ブナシメジ栽培試験の結果を表-5に示す。栽培日数は116日と平均的な数値であり、収量については135.4gとやや少なめだったが、病徴本数は0であった。全てが正常な子実体を形成しており、子実体及び栽培ビン中に吐水症状は見られなかった(図-4)。したがって、ウイルスフリーであれば、病徴は生じないものと確認された。

表-4 エノキタケ栽培試験結果

No.	栽培日数(日)	収量(g)	子実体の色	収穫ビン数(本)
S6B	65	94.3	褐変	8
S6	72	101.5	白色	16
感染株	73	117.2	部分的に褐変	15
接触株	75	77.4	部分的に褐変	9

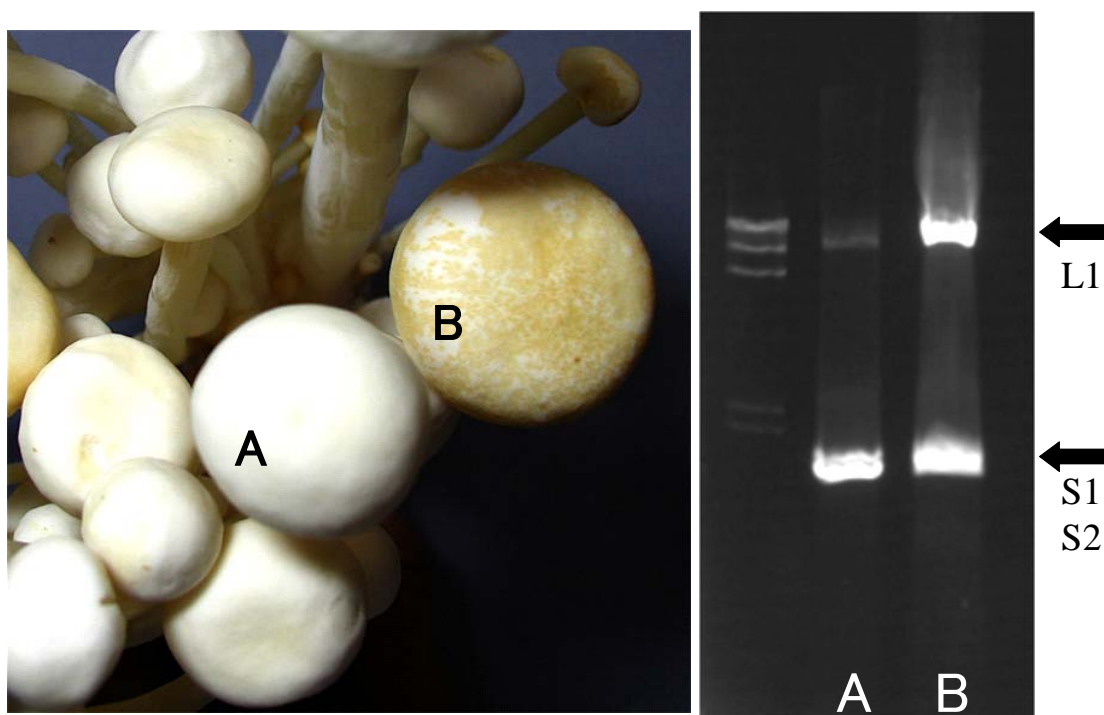


図-3 子実体とdsRNAの濃度

表-5 ブナシメジ栽培試験結果

栽培日数(日)	収量(g)	病徴本数
116	135.4	0



図-4 子実体発生状況

3 ハタケシメジ子実体中に存在するdsRNAの調査

正常子実体と奇形子実体をPEG沈殿法で調査した結果を図-5に示す。正常子実体、奇形子実体共に、2 kb以下の低分子側3箇所(dsRNA)のバンドが確認された。正常子実体と奇形子実体と同様の傾向を示していたことから、このdsRNAは奇形の形成に関与しないと考えられた。

奇形子実体を超遠心処理で調査した結果を図-6に示す。PEG沈殿法では認められなかった9 kb以上の高分子側2箇所(dsRNA)のバンドが確認された。

継代培養株と凍結保存株を超遠心処理で調査した結果を図-7に示す。継代培養株、凍結保存株共に9 kbのバンドは確認できたが、より高分子のバンドは継代培養株にのみ確認された。

凍結保存株を栽培して得られた子実体を図-8、9に示す。どちらも正常な子実体を形成していた。

ハタケシメジにおけるウイルス検出方法は、PEG沈殿法では回収されなかったバンドが確認でき、超遠心処理法が有効な方法と思われた。また、継代培養株と凍結保存株では高分子のバンドについて差が生じていたこと、凍結保存株で正常な子実体を形成していたことから、この高分子のバンドが奇形子実体の形成に影響

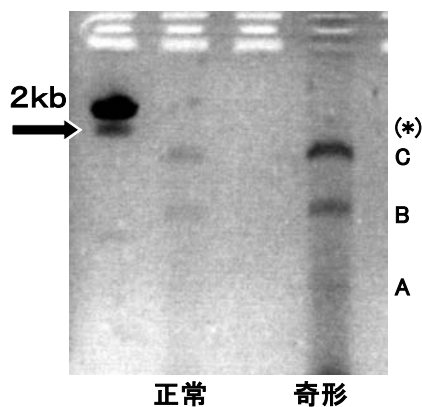


図-5 PEG沈殿法の結果

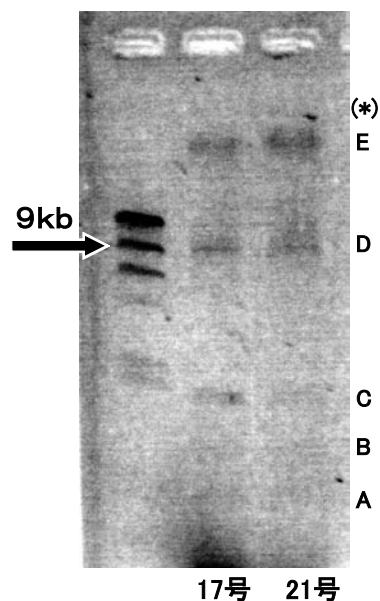


図-6 超遠心処理の結果

する可能性が示唆された。ただし、継代培養株が全て奇形になるとは限らないことから、奇形子実体の形成には、さらなる調査を進める必要があると思われた。

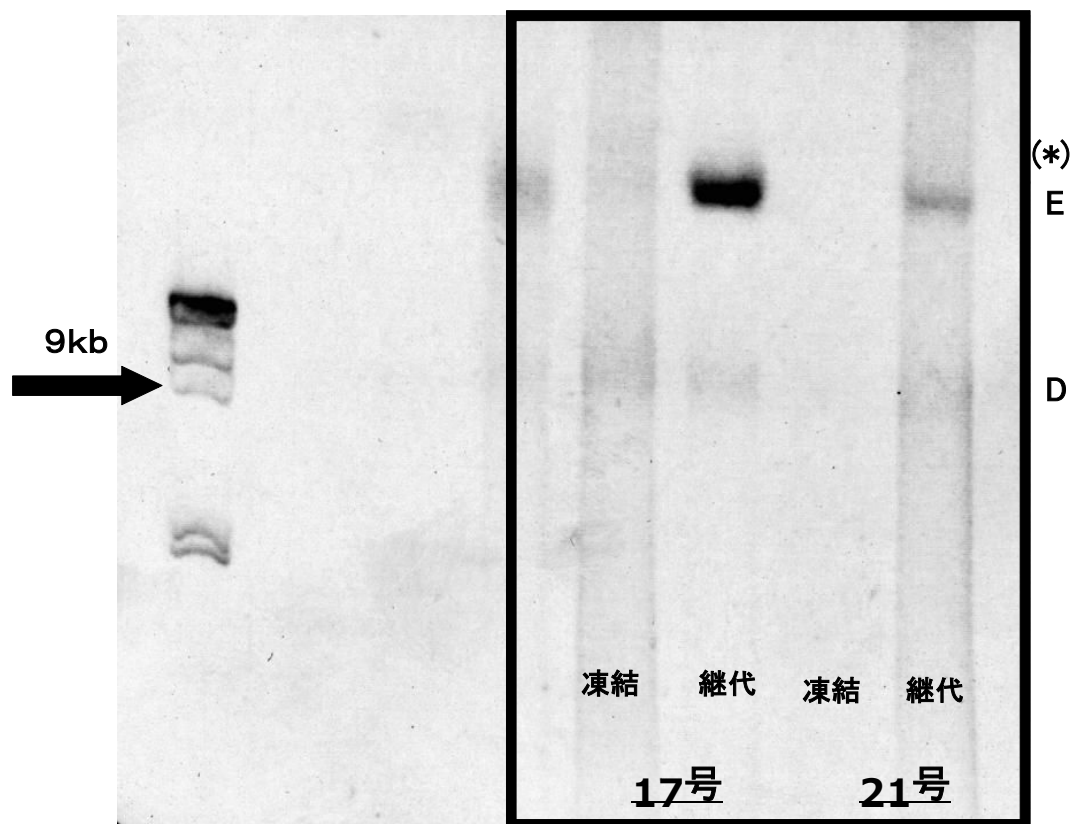


図-7 超遠心処理による継代培養株と凍結保存株の比較

(*) 図-5～7中における同一のアルファベットは同じ大きさのバンドを示す。

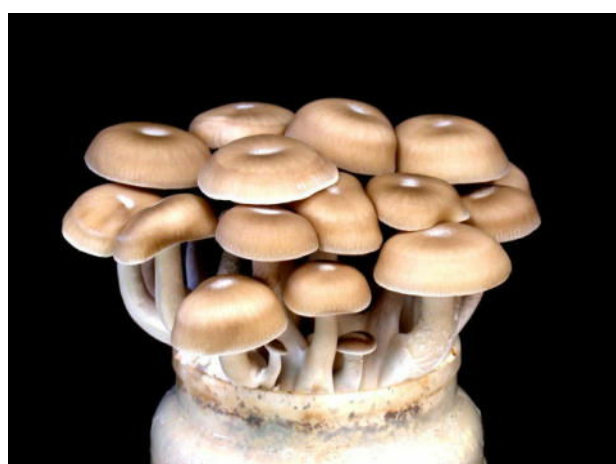


図-8 群馬GLD-17号の凍結保存株



図-9 群馬GLD-21号の凍結保存株

4 ウイルス検出技術の実証

結果を図-10に示す。白丸部分にdsRNAを検出した。シイタケについては、処理方法(1)で①から、

処理方法(2)で②③からdsRNAが検出された。このことから、今回処理したシイタケのサンプルはすべて、ウイルスに感染している可能性があることが示唆された。一方で、ハタケシメジについては、検出することができなかった。

以上の結果から、シイタケのウイルスの検出方法として、(1)と(2)の処理方法は有効な手段であり、組み合わせることでよりウイルス検出の確率が高まると考えられた。しかし、ハタケシメジについてはさらなる検討が必要と思われた。

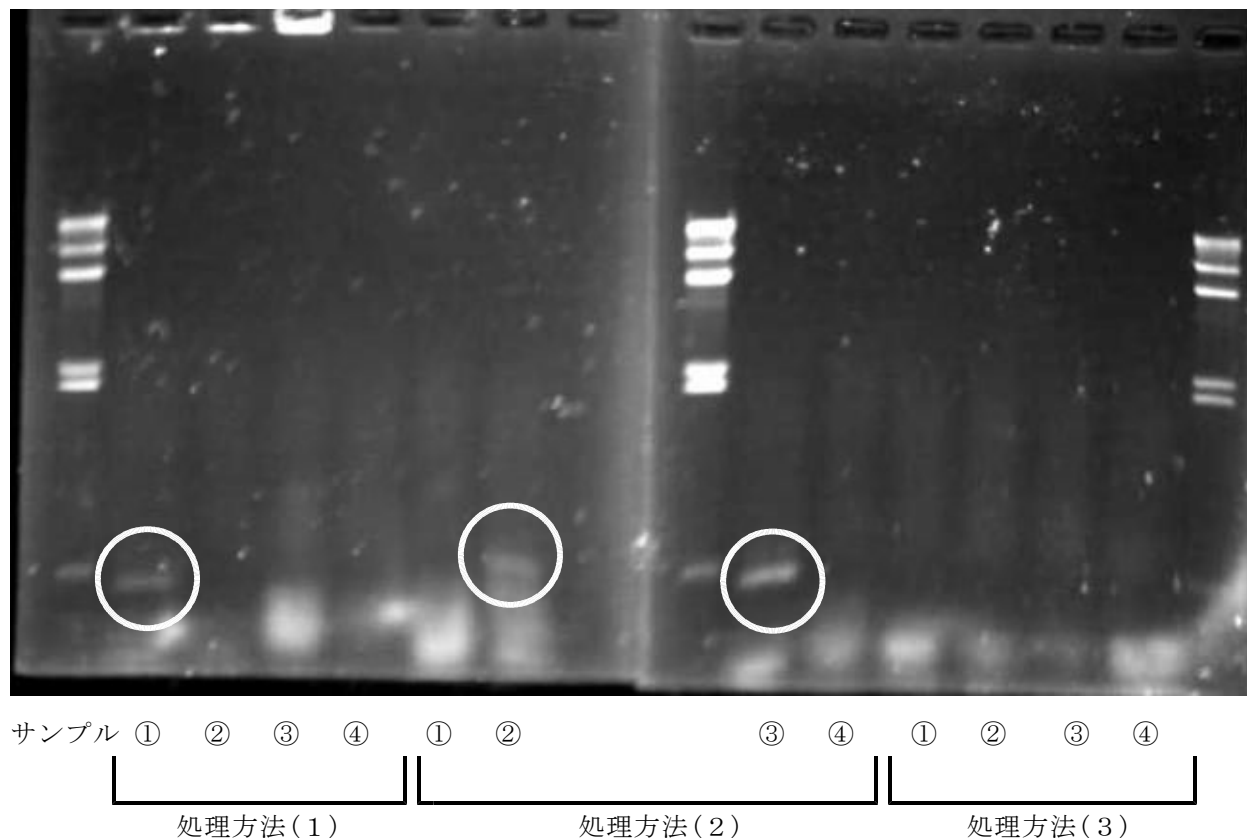


図-10 ウイルス検出の結果

IVおわりに

本研究において、きのこ類におけるウイルスの検出方法を開発した。ただ、ハタケシメジのような一部のきのこでは、検出できない可能性も考えられた。栽培きのこのウイルスについて、本格的な研究はまだ始まったばかりである。今後、研究が進めば、今まで原因不明であった発生不良の中には、ウイルスが原因と特定できるものが増えると思われる。それと同時に、防除方法の開発も重要な課題であり、研究の継続が望まれる。

引用文献

- (1) 馬替由美：エノキタケ・シナノ6号の2本鎖RNA因子：日本応用きのこ学会誌11, 93～96, (2003)