

# マツタケの人工栽培に関する研究

-非滅菌環境下での菌根合成法の確立と界面活性剤による菌糸体成長促進作用の検討-

進藤 克実

## 目次

1 章	はじめに	3
2 章	非滅菌環境下での菌根合成法の確立	16
2-1	非滅菌環境下におけるマツタケとアカマツの菌根合成	17
2-2	アカマツ成木へのマツタケ菌根の合成	31
2-3	広葉樹を宿主としたマツタケ菌根の合成	39
3 章	界面活性剤による菌糸体成長促進作用の検討	61
3-1	培土への Tween80 添加が外生菌根菌の菌糸体成長に及ぼす影響	63
3-2	Tween80 添加が宿主の異なるマツタケ菌株の菌糸体成長に及ぼす影響	76
3-3	培地への Tween80 添加による菌糸成長量の増加	81
3-4	界面活性剤 Tween80 がアカマツ実生の成長に及ぼす影響	95
4 章	マツタケの人工栽培に向けて	100
	謝辞	105
	引用文献	106

## 1 章 はじめに

### 食用菌としてのマツタケ

マツタケ (*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.) は、日本では古くから最も好まれてきた食用菌であり、現在では高価なきのこのひとつとして世界的に知られている (Hosford et al. 1997, Hall et al. 2003a, 2003b, Suzuki 2006). マツタケの国内生産量は、最盛期の 1941 年には年間 12,000 トン以上あったが、1950 年代以降は減少の一途をたどっている (小野寺・鈴木 1998). 林野庁の森林・林業統計要覧によると、2001 年以降は 2004 年を除き、生産量が 100 トン以下にまで減少し、2007 年の生産量は 51 トンであった. 一方、財務省の貿易統計によると、2007 年のマツタケおよびその近縁種の輸入量は 1554 トンであり、国内消費量のおよそ 97% が輸入でまかなわれている. 2007 年の輸入量の内訳をみると、中国産がおよそ 61% を占めており、最大の輸入国となっている. 以下、アメリカ (約 17%), カナダ (約 15%) と続き、このほかに韓国、トルコ、メキシコ、ブータン、モロッコ、スウェーデンからの輸入がある. マツタケの国内生産量が減少した原因としては、マツタケの主要な生育場所であるアカマツ (*Pinus densiflora*) 林の衰退や老齢化、施業の減少による土壌の富栄養化など、アカマツ林の環境がマツタケの生育に適さなくなったことや、マツ材線虫病によるアカマツ林そのものの減少などが挙げられている (Hosford et al. 1997, Wang et al. 1997, Hall et al. 2003a).

### マツタケの分布

マツタケは、日本、朝鮮半島、樺太、沿海州、台湾、中国北東部および南西部、ブータンに分布する (小川 1978; Wang et al. 1997; Murata et al. 2008). 日本ではアカマツがおもな宿主であるが、そのほかに本州ではクロマツ (*Pinus thumbergii*)、ツガ (*Tsuga sieboldii*)、コメツガ (*Tsuga diversifolia*)、北海道ではハイマツ (*P. pumila*)、トドマツ (*Abies sachalinensis*) (村田ら 2001)、エゾマツ (*Picea jezoensis*)、アカエゾマツ (*Picea glehnii*) の森林で発生することが知られている. このほか、ネズミサシ (*Juniperus rigida*) の根に菌根を形成することも知られているが (吉村 2004)、ネズミサシとの菌根形成はアカマツ林内においてみられており、ネズミサシが単独で宿主となる例は知られていない. 樺太ではオオシラビソ (*Abies mariesii*)、朝鮮半島ではアカマツ、クロマツ、チョウセンゴヨウ (*Pinus koraiensis*) の森林で発生することが知られている. 中国では、主要な産地は北東

部に位置する吉林省, および, 南西部の雲南省, 四川省に分かれている (Zang 1990; Cao and Yao 2004). このうち, 中国北東部に位置する吉林省では, マツタケの分布は日本から朝鮮半島を通じて地理的に連続しており, また, 日本と同様にマツ科のアカマツやチョウセンゴヨウ, *Pinus taiwanensis*, *Picea meyeri* などの森林に発生する. このほか, 中国北東部においてはモンゴリナラ (*Quercus mongolica*) が宿主となるという報告があるが, 小川 (1978) はこれをバカマツタケ (*T. bakamatsutake*) の可能性が考えられるとしている. 一方で, 中国南西部の雲南省, 四川省ではウンナンマツ (*Pinus yunnanensis*), 高松 (*Pinus densata*), タイワンアカマツ (*Pinus massoniana*), 油松 (*Pinus tabulaeformis*) などのマツ科針葉樹林のほか, ブナ科広葉樹林や針広混交林でも発生することが知られている (富永ら 1981, 1988; Wang et al. 1997). この広葉樹林で発生するマツタケの宿主は, コナラ属とシイ属を主とするブナ科樹木と考えられている (Zang 1990; Cao and Yao 2004; Deng et al. 2004). 富永ら (1988, 1989) は, 四川省におけるシロの現地調査により, マツタケがブナ科の川滇高山櫟 (*Quercus semicarpifolia*) や元江栲 (*Castanopsis orthantha*), 多変石櫟 (*Lithocarpus rasiolozus*) の根と菌根を形成していることを観察した. また, これらの森林で発生する子実体は, 形態的に日本産のものと同一であるという観察結果を得ている.

この広葉樹に発生するマツタケ子実体は針葉樹林に発生するマツタケ子実体と異なり, 縁シスチジアを持つ場合があり, 胞子の大きさがわずかに小さいことから, 別種の *T. zangii* としてマツタケとは区別することがある (Zang 1990; Deng et al. 2004). 一方で, 発生する森林によらず, まとめてマツタケとして扱われていることも多い. マツタケやその近縁種は種内での子実体の形態的な変異が大きいので, 上述の特徴のみから別種であるとは断定できず (Cao and Yao 2004), まだ定まった見解はない. また, 分子生物学的な解析では, 広葉樹林に発生するマツタケと, 日本や朝鮮半島のマツタケや, 中国の針葉樹林に発生するマツタケの間には違いがみられないことがわかっており (Bao et al. 2007; Matsushita et al. 2005; Sha et al. 2007a, 2007b; Xu et al. 2008), *T. zangii* を別種とするには疑問がある (Xu et al. 2008). よって, 本研究では同一種の *Tricholoma matsutake* として扱う. ただし, 種としては同一であっても, ひとつの菌の系統がマツ科とブナ科の両方を宿主とできるのか, 宿主の異なる系統が共存しているのかについては, 現在のところ明らかにされていない.

## マツタケの近縁種

マツタケはキシメジ属に置かれているが、キシメジ属の中でもマツタケの近縁種として扱われるものは限られており、日本国内に発生するものではバカマツタケ、ニセマツタケ (*T. fulvocastaneum*)、マツタケモドキ (*T. robustum*) が知られている。日本に発生しないものとしてはオウシュウマツタケ (*T. caligatum*)、アメリカマツタケ (*T. magnivelare*)、*T. nauseosum* などがある。

マツタケの近縁種の分布、宿主について、小川 (1978)、Wang et al. (1997) の記述を中心に簡単にまとめると、以下のようになる。バカマツタケは日本、中国、ニューギニア、北米で分布が知られ、コナラ属、シイ属、マテバシイ属の森林に発生する。和名の由来はマツタケよりも子実体の発生時期がはやいこと、マツタケと違い、ブナ科広葉樹林で発生することによる。ニセマツタケは日本とタイ (Rarunee et al. 2007) で分布が知られ、コナラ属とシイ属の森林に発生する。マツタケモドキは日本、朝鮮、欧州、北米で分布が知られ、マツ属、トウヒ属、ツガ属の森林に発生する。マツタケモドキは北米の *T. zelleri* や欧州の *T. robusta*, *T. focale* と近縁と考えられているが、これらの種は古くから名前は知られているが、その生態の知見は乏しく、分類や類縁関係は明らかではない (今関 1951)。オウシュウマツタケは欧州、北アフリカ、北米に分布し、ツガ属、ヒマラヤスギ属などの森林に発生する。アメリカマツタケは北米に分布することが知られているほか、中国にも分布しているという報告もある (Deng et al. 2004)。マツ科のマツ属、モミ属、ツガ属、トガサワラ属のほか、ブナ科のコナラ属、シイ属、マテバシイ属樹種の森林に発生する。*T. nauseosum* は欧州に分布し、ヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris*) を宿主としている (Bergius and Danell 2000)。これらのうち、マツタケ、バカマツタケ、オウシュウマツタケ、*T. nauseosum* にはマツタケ特有の臭気があるが、そのほかの種では臭気がないか、きわめて弱いことが知られている。

マツタケ近縁種の中でも、*T. nauseosum*、アメリカマツタケ、オウシュウマツタケは子実体の形態がマツタケと類似している (小川 1978) が、分子生物学的な研究により、アメリカマツタケ、オウシュウマツタケはマツタケとは区別されている (Bergius and Danell 2000; Kikuchi et al. 2000; Chapela and Garbelotto 2004; Xu et al. 2008)。一方で、マツタケと *T. nauseosum* は形態的 (Cao and Yao 2004)、分子生物学的研究 (Bergius and Danell 2000; Lian et al. 2003; Matsushita et al. 2005) により同種だと考えられており、今後は *Tricholoma matsutake* を保存名とすることが決定された (Ryman et al. 2000;

Gams 2002).

## マツタケ研究の現状

マツタケは、日本では古くから一般に広く認知されていたきのこであり、また、第二次世界大戦後にその生産量が一貫して減少し続けたことから、これまで多くの研究が行われてきた。それらは野外のアカマツ林を対象としたマツタケの生態の調査や実験と、実験室や圃場における研究に大別される。

### a) 野外のシロを対象とした研究

野外のシロを対象とした研究は古くから行われてきた。シロとは、土壌中のマツタケの菌根と菌糸の集合体を表す言葉であり、マツタケが長年にわたって同じ場所から発生することから「城」や「代」、土壌がマツタケ菌糸によって白くみえることから「白」の字が当てられる（小川 1978）。三根（1934）はマツタケのシロの位置と周囲に分布するアカマツの生育状態との関連について調査した。小川（1975a）はシロの構造や季節変化、シロの初期段階から発達、衰退へといたるまでの過程について、詳細に観察している。また、シロ中に存在するマツタケ菌根についても、その発達過程が観察されている（小川 1975b; Yamada et al. 1999a; Gill and Suzuki 2000a, 2000b, 2000c）。川上（1993b）はシロの成長をモデル化し、年間のシロ成長量は 17・23cm であり、孢子落下からシロが形成され、初めて子実体を発生するまでの期間はおおよそ 7 年間であると推定している。シロの年間成長量については複数の報告があり、約 10cm（小川 1975; 鈴木 2005）、6.0-15.7cm（Lian et al. 2006）という数値が挙げられている。

マツタケのシロとほかの微生物との関連に関する研究も行われてきた。マツタケの発生する林分での高等菌類相（鳥越、塩見 1987）、シロ中でマツタケ菌根の多く存在する層においては細菌、糸状菌、土壌生息性菌類の多くが排除されること（小川 1977a; Ohara and Hamada 1967）、マツタケのシロはアカマツ林の形成過程で起こる菌類遷移の中間段階で形成されること（小川 1977b）、アカマツ林の成熟に伴って土壌環境が変化し、あわせて菌類相も変化すること（小川 1977b; 鳥越、塩見 1984）が明らかにされている。

また、子実体発生の経過観察から、子実体発生やその豊凶に関する因子を推定する研究も行われてきた。衣川（1963）は子実体の生長曲線の解析と、気象要因の解析から、子実体発生の刺激温度は 19℃が上限であり、刺激後にそれ以上の高温にさらされると発生刺激

が消去されると推定している．また，シロを人為的に冷却することで子実体を発生させ，この仮説を裏付けた．また，衣川（1965a）は春に発生するマツタケと子実体原基形成温度との関係を調査した．また，子実体発生量と降水量に関する研究も行われてきた．衣川（1965b）は子実体原基形成の刺激日前後の降水量と子実体の発生本数に相関があることを明らかにした．大森（1989）は 8 月に降水量が多いほど子実体発生量が増加する傾向があるとした．川上（1990）は子実体の発生量と降水量を解析した結果，9 月の有効降雨量が発生量と相関が最も高く，さらに，刺激日の 4-20 日の間の有効降雨量との相関が最も高いことを明らかにした．川上（1993a）は子実体の発生量と降水量，降雨日数，シロの菌糸成長量を解析した結果，有効降雨量のみが発生量と関連しているとした．近年，分子生物学的手法によるシロの解析も行われ，同一のシロ中に複数のジェネットが存在する例がしばしば存在することが明らかにされた（Murata et al. 2005b; Lian et al. 2006）．

野外のシロを対象とした調査，研究が行われる一方で，マツタケの増産を目的とした研究も進められてきた．マツタケ増産を目的としたアカマツ林の施業では，通常，混交する広葉樹や下床植生の除去，林床の腐植の除去が行われる（吉村 2004; まつたけ増産のてびき編集委員会 2005）．これらの施業を行うことで，鉦質土層表層のアカマツ細根量の増加，マツタケと競合する菌類の除去，土壤微生物層の単純化がみられ，シロ数の増加や子実体発生量の増加につながる（鳥越 1982; 小川ら 1983; 下川 1985; 枯木, 川上 1989; 鳥越, 塩見 1992）．アカマツ林で行われる施業はトドマツ林でも有効であった（村田ら 2001）．このほか，尾根部の乾燥し，土壤浸食の起こる場所へ敷きわら施業を行った例（伊藤, 小川 1983）や，シロ外縁部に客土を行った例（下川 1980）も存在する．こうした森林環境の改善のほか，灌水による子実体発生量の増加を試みた研究もある（石川, 竹内 1970）．

シロを感染源として，新たなマツタケ感染苗の作出も試みられている（小川ら 1978; 能勢 1983; 枯木, 川上 1985; 升原 1992; 荒尾ら 1993）．この中で，枯木, 川上（1985）は，シロに植えて得られた感染苗を林地へ移植し，6 年目に移植苗からマツタケの子実体を得ている．シロを感染源とした手法では，成功はこの 1 例のみが知られている．一方で，感染苗を移植した後にマツタケが消失した例（荒尾ら 1993）や，感染苗にはマツタケが残存するものの，外部へ広がらない例（小川ら 1978; 能勢 1983）もみられ，技術的な確立にはいたっていない．

## b) 実験室や圃場における研究

室内において、マツタケの菌糸を分離、培養し、その生理的な性質を明らかにする研究が行われてきた（小川 1978; 島園 1979）。マツタケの菌糸成長速度は外生菌根菌の中でも遅いため、マツタケの菌糸体成長に適した培養条件について研究が行われてきた。富永（1965）は培養素材と温度の影響について検討した。Ohta（1990）はマツタケ菌糸体の培養に最適な培地条件に関して添加するキレート剤や、pH 緩衝材剤の検討や、マツタケの pH および栄養要求性の検討を行い、マツタケを含む外生菌根菌の生育のための培地組成を種ごとに明らかにした。松永ら（2003）は菌糸体増殖のための培養条件の検討として、攪拌培養の効果と、炭素源と浸透圧に関する研究を行っている。培地への物質添加により菌糸体成長を促進させる試みも複数行われており、これまでにマツタケの菌糸体成長を促進させる物質として、アカマツ樹皮（Vaario et al. 2002）、コーンファイバーの熱水抽出物（Arai et al. 2003）、非イオン系界面活性剤の Tween40 および Tween80（Guerin-Laguette et al. 2003）、オリーブ油（Guerin-Laguette et al. 2003; Lun et al. 2006）、D-イソロイシン（Kawagishi et al. 2004）が知られている。また、マツタケ菌糸の物質利用や酵素活性についても炭素源を中心に調べられている（Ohta 1997; 寺下, 河野 1989; Vaario et al. 2002; Hattori et al. 2003; Kusuda et al. 2003, 2006, 2007）。小川, 浜田（1975）は土壌を基質としたマツタケ菌糸の純粋培養により、子実体原基を形成させることに成功したが、その後、再現されたという報告がない。

また、マツタケの分離菌株を用いてアカマツとの菌根を合成し、マツタケ感染苗を作製する試みも行われてきたが、1990 年代半ばまで、マツタケはアカマツに対し寄生的な性質を持つと考えられており、アカマツ実生とマツタケの菌根合成は困難だと考えられてきた（小川 1977b, 1978; Wang et al. 1997）。しかし、近年、滅菌環境下でアカマツ実生へマツタケ菌糸体を接種し、菌根の合成に成功した報告が相次いでなされている（衛藤 1990, 1998; Guerin-Laguette et al. 2000b; Vaario et al. 2000; Yamada et al. 1999b）。また、滅菌環境下で作製した感染苗を栽培し続けることで、野外のシロと類似した状態を作り出した例もあり（Yamada et al. 2006）、滅菌環境下における実生苗を用いたマツタケ菌根の合成法はすでに確立されたと考えてよい。

近年、分子生物学的な手法が発達し、マツタケについても多くの研究が行われてきた。それらの多くは DNA の塩基配列を用いたマツタケの同定、比較に関する研究であり、特異的プライマーやマーカーの開発（Murata and Yamada 1999; Dunstan et al. 2000; Kikuchi et al. 2000; Lian et al. 2003; Xu et al. 2007）、日本国内、あるいは海外のマツタケとの種



内比較 (Guerin-Laguette et al. 2002; Matsushita et al. 2005; Murata and Babasaki 2005; Murata et al. 2005a, 2005b, 2008; Bao et al. 2007; Sha et al. 2007a, 2007b; Xu et al. 2008), マツタケおよびその近縁種との種間比較 (Bergius and Danell 2000; Murata and Yamada 2001; Murata et al. 2002; Chapela and Gargelotto 2004; Murata and Babasaki 2005; Murata et al. 2005a; Sha et al. 2005), rRNA の配列, 構造決定 (Hwang and Kim 2000), 遺伝子組み換え体の作製 (Murata et al. 2006) などが行われている。

### 外生菌根菌の人工栽培

マツタケ以外の外生菌根菌についても、人為的な子実体形成が試みられてきたが、子実体発生の成功例はごく限られている。外生菌根菌の人工栽培の方針は大きく、宿主との共生系を用いる方法と、宿主を伴わない菌根菌の単独培養による方法の 2 つに分けられる。いずれの方法でも、偶発的に子実体が形成されたものを含めても、子実体形成に成功した種は非常に少なく、担子菌において 10 属 28 種においてのみである (表 1-1, 1-2)。また、人工的に子実体を形成させることが可能な種においても、子実体形成が特定の菌株に限定される例が知られており (Ohta 1994; Selosse et al. 2001), また、宿主側の遺伝的特性にも影響される (Last et al. 1984)。さらに、菌株を分離後、培養期間が長くなると子実体形成能力が低下する例も知られている (Giltrap 1981; Yamanaka et al. 2000)。このため、子実体形成誘導処理によって子実体を形成可能な菌株を見つけることと、子実体形成に必要な誘導処理を見つけることの両方が必要となっており、子実体形成に関する研究を一層困難なものにしている。

### マツタケ人工栽培における課題

マツタケの人工栽培は、マツタケの菌糸体の子実体原基を形成し、子実体に成熟する過程を人為的に誘導、促進することであり、そのためにはマツタケの生態への理解が必要不可欠である。マツタケの人工栽培における課題はマツタケの生育過程の段階に応じて、子実体原基形成前、子実体原基形成時、原基形成後の子実体の発達および成熟時に分けて考えることができる。

#### a) 子実体原基形成前

マツタケの子実体原基は栄養成長している菌糸体から発生する。マツタケの子実体を 1

表 1. 宿主への接種により子実体の発生がみられた外生菌根菌.

種名	科名	宿主	栽培環境	成熟状態	reference
<i>Lyophyllum semitale</i>	キシメジ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	原基	Yamada et al. 2001a
<i>Lyophyllum shimeji</i>	キシメジ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	子実体	Kawai 1997
<i>Laccaria bicolor</i>	キシメジ科	<i>Pinus stroves</i> , <i>P. glauca</i> , <i>P. taeda</i>	非滅菌	子実体	Godbout and Fortin 1990
<i>Laccaria bicolor</i>	キシメジ科	<i>Pinus stroves</i>	非滅菌	子実体	Lamhamedi et al. 1994
<i>Laccaria bicolor</i>	キシメジ科	<i>Pinus banksiana</i>	非滅菌	子実体	Godbout and Fortin 1992
<i>Laccaria bicolor</i>	キシメジ科	<i>Pinus resinosa</i> , <i>P. sylvestris</i>	滅菌	原基	Massicotte et al. 2005
<i>Laccaria laccata</i>	キシメジ科	<i>Pinus sylvestris</i>	滅菌	子実体	Massicotte et al. 2005
<i>Tricholoma flavovirens</i>	キシメジ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	原基	Yamada et al. 2001a
<i>Tricholoma portentosum</i>	キシメジ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	子実体	Yamada et al. 2001a
<i>Tricholoma saponaceum</i>	キシメジ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	子実体	Yamada et al. 2001a
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	フウセンタケ科	<i>Pinus pinaster</i>	滅菌	子実体	Debaud and Gay 1987
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	フウセンタケ科	<i>Quercus acutissima</i>	非滅菌	子実体	Oh et al. 1995
<i>Suillus granulatus</i>	イグチ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	原基	Yamada et al. 2001a
<i>Suillus leteus</i>	イグチ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	原基	Yamada et al. 2001a
<i>Boletus communis</i>	イグチ科	<i>Pinus ellioti</i>	非滅菌	子実体	Bryan and Zak 1961
<i>Lactarius hatsudake</i>	ベニタケ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	原基	Yamada et al. 2001a
<i>Lactarius akahatsu</i>	ベニタケ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	子実体	Yamada et al. 2001a
<i>Lactarius delciosus</i>	ベニタケ科	<i>Pinus sylvestris</i>	非滅菌	子実体	Guerin-Laguette et al. 2000a
<i>Cantharellus cibarius</i>	アンズタケ科	<i>Pinus sylvestris</i>	非滅菌	子実体	Danell and Camacho 1997
<i>Thelephora terrestris</i>	イボタケ科	<i>Pinus virginiana</i>	非滅菌	子実体	HacsKaylo 1965
<i>Rhizopogon luteorus</i>	ショウロ科	<i>Pinus taeda</i>	不明	子実体	Young 1937
<i>Rhizopogon rubescens</i>	ショウロ科	<i>Pinus densiflora</i>	非滅菌	子実体	Yamada et al. 2001a

表 1-2. 宿主なしの単独培養で子実体の発生がみられた外生菌根菌.

種名	科名	成熟状態	reference
<i>Lyophyllum shimeji</i>	キシメジ科	子実体	Ohta 1994
<i>Tricholoma matsutake</i>	キシメジ科	原基	小川, 浜田 1975
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	フウセンタケ科	原基	Debaud and Gay 1987
<i>Hebeloma radicosum</i>	フウセンタケ科	子実体	Ohta 1998
<i>Hebeloma radicosoides</i>	フウセンタケ科	子実体	Ohta 1998; Sagara et al. 2000
<i>Suillus piperatus</i>	イグチ科	未成熟子実体	Giltrap 1981
<i>Boletus badius</i>	イグチ科	未成熟子実体	Giltrap 1981
<i>Boletus porosporus</i>	イグチ科	未成熟子実体	Giltrap 1981
<i>Boletus subtomentosus</i>	イグチ科	未成熟子実体	Giltrap 1981
<i>Boletus reticulatus</i>	イグチ科	子実体	Yamanaka et al. 2000
<i>Boloetus sp.</i>	イグチ科	子実体	Ohta and Fujiwara 2003

本発生させるためには乾燥重量で約 100g の菌糸体が必要であると考えられている（鈴木 2005）。このため、マツタケの人工栽培には、まず多量の、成熟段階のそろった、ひとつのコロニーとして働くマツタケ菌糸が必要とされる（小川 1978）。そうした多量の菌糸を賄うための手法として、マツタケの単独培養で多量の菌糸体を得る方法、および、大型の宿主との共生系の構築による方法のふたつが考えられる。

外生菌根菌においては、一部の種では宿主なしの単独培養で、子実体原基や成熟した子実体の発生がみられている（表 1-2）。特にホンシメジにおいては、デンプンを炭素源として利用する能力の高さが単独での人工栽培成功の理由のひとつとして挙げられており（Ohta 1997; 太田 1998）、おが屑やデンプンを分解する能力が認められている（Ohta 1997; 太田 1998; Vaario et al. 2002; Kusuda et al. 2003, 2006）マツタケにおいても、子実体形成の可能性が考えられる。実際、これまでに土壌を基質とした系において、マツタケの子実体原基が形成されたことがある（小川, 浜田 1975）。土壌は通気性と保水性を併せ持ち、深く均質な培養環境をつくることができるため、菌糸の多量培養に適していると考えられる。しかし、この手法はその後、原基形成が再現されたという報告がなく、確立された方法にはなっていない。マツタケは菌糸の成長速度が遅いため、これまでも上述のように培養条件や成長促進物質についての探求がなされてきた。しかし、これまでは特定の物質の添加による効果を研究したものが多く、培養環境全体を捉えた研究は少ない。

現在知られている限り、外生菌根菌において、宿主なしで子実体を形成することのできる種はごく限られており、また、子実体の形成が知られている種でも、多くは原基の形成にとどまっており、子実体の成熟にいたっていない。また、後述するように、原基形成に必要な条件と原基の発達に必要な条件は異なると考えられるため、菌糸のみの単独培養で子実体の発達、成熟段階まで到達できるかは不明である。しかし、菌糸体の大量増殖手法の発達は、宿主との共生による子実体形成法においても有益であると考えられる。

マツタケはアカマツの根と菌根を形成する外生菌根菌であり、自然状態では宿主から養分を得て生活している。また、現在までに人工的な子実体形成に成功した外生菌根菌も、多くは宿主との共生条件下で子実体を形成していること（表 1-1）から、アカマツの根にマツタケの外生菌根を人工的に形成させ、さらに形成させた菌根からシロを発達させる手法を確立することにより、マツタケの人工栽培が可能になると考えられている。アカマツにマツタケを感染させる接種源としては、既存のシロを利用する方法と、培養菌糸体を利用

する方法が試みられている。

シロを接種源とする方法では、これまでに 1 例だけ子実体の発生まで成功した例がある（枯木, 川上 1985）。一方で、得られた感染苗を移植した後にマツタケが消失した例（荒尾ら 1993）や、感染苗にはマツタケが残存するものの、外部へ広がらない例（小川ら 1978; 能勢 1983）もみられ、作製後の感染苗を維持する手段は技術的に確立されていない。さらに、この手法は感染苗の植え付けや掘り取り時にシロの損傷を伴い、また、既存のシロがなければ感染苗を作製できず、感染苗の大量生産には向かないといった問題点も指摘されており（衛藤 1990）、マツタケ発生量が減少し、シロが希少となった現在においては、この手法のみでのマツタケの増産は困難だと考えられ、ほかの手法をあわせて検討する必要がある。

現在までに、培養菌糸を用いた滅菌環境下でのアカマツ実生とマツタケの菌根合成法は確立されており（衛藤 1990, 1998; Guerin-Laguette et al. 2000b; Vaario et al. 2000; Yamada et al. 1999b）、滅菌環境下で小さなシロを形成するにいたっている（Yamada et al. 2006）。しかし、滅菌環境下で形成された菌根は非滅菌環境下へ移植すると、発達せずに消失してしまっており、非滅菌環境への移行手法は確立されていない。人工栽培を考える場合には、実生苗では多量の菌糸を支持できるとは考えられず、宿主の大型化が必要とされる。こうしたときに、実生から苗を育てる場合には、大型化する系を長期間滅菌状態を維持しなくてはならず、あまり实际的ではない。そこで、子実体形成を目的とする場合には、非滅菌環境下でのマツタケ菌根の維持、発達のための手法が必要とされる。そのための手法として、滅菌環境下で作製した感染苗を馴化させる方法と、非滅菌環境下で感染苗を作成する方法が考えられる。無菌環境下で作製したマツタケ感染苗の林地への移植（山田, 小林 2008）は試みられているものの、現時点ではシロを形成させることには成功していない。一方、非滅菌環境下で感染苗を作成する方法はこれまで確立されていない。

#### b) 子実体原基形成時

野外における子実体発生の研究により、衣川（1963）は、原基形成には低温刺激が必要であり、その上限温度が 19℃であること、低温刺激を受けた後にふたたび高温にさらされると、刺激が解除されることを発見した（衣川 1963）。また、刺激温度の下限については小川, 浜田（1975）は 15℃付近であろうと推定している。しかし、より冷涼な地域のマツタケのシロにおいては、刺激温度帯は上限、下限ともにより低くなるといわれている（吉

村 2004; まつたけ増産のてびき編集委員会 2005). また、スウェーデンでは、子実体がスウェーデンにおいて温暖な時期である 8 月に発生がみられるため、原基形成は低温刺激によらない可能性が指摘されている (Bergius and Danell 2000). このほか、一般に、腐生菌の子実体の形成は、環境条件が栄養成長に不利な条件に変化することで誘導される場合が多いが (北本, 鈴木 1992), マツタケにおいては現在のところ、低温刺激以外に必要な条件についてはわかっていない.

#### c) 子実体の発達, 成熟時

人為的に子実体原基を形成させる手法がまだ確立されていないため、原基形成以降に必要な条件についてはほとんどわかっていない. しかし、腐生菌においては子実体原基の形成とその後の発達では必要な条件が異なることが多いため (例えば Morimoto and Oda 1973; 北本, 鈴木 1992; Ellis et al. 1999), マツタケにおいても同様のことがあると考えられる. また、野外におけるマツタケの子実体発達の研究によると、原基形成後の降水量が発生量に関連することがわかっており (衣川 1965b; 川上 1990; 川上 1993a), 子実体の発達には多量の水分を要求すると考えられる. ほかの外生菌根菌においても、この段階についてはあまり研究が進んでいないが、これまでに研究された数種の例では、形成された原基の発達は、その時点で宿主から供給される炭素源に依存していることが知られており (Last et al. 1979; Lamhamedi et al. 1994), マツタケにおいても原基形成以降の継続的な炭素供給が必要であることが推察される.

#### 本研究の目的

本研究では、マツタケの人工栽培のうち、子実体原基形成前の段階に焦点を当てて研究を行った. マツタケはアカマツの根と菌根を形成する外生菌根菌であり、自然状態では宿主から養分を得て生活している. このため、アカマツの根にマツタケの外生菌根を人工的に形成させ、さらに形成させた菌根からシロを発達させる手法を確立することにより、マツタケの人工栽培が可能になると考えられる. 実際には、アカマツの苗木の根にマツタケを接種して菌根を形成させた後に、その感染苗を林地に植栽してシロを発達させる方法や、林地のアカマツ成木の根にマツタケを直接接種して菌根を形成させた後に、その場所でシロを発達させる方法が考えられる. これまでに、無菌条件下においてアカマツの実生にマツタケ菌根を合成させる方法は確立されているが、苗木や成木にマツタケ菌根を人工合成

する場合、無菌状態で菌根を形成させることは不可能である。そこで、2章において、非滅菌条件下での菌根合成方法を新たに確立することを目的として、大型苗木と成木への菌糸の接種方法を検討した。また、マツタケは培地上での菌糸成長が非常に遅いため、効率よくシロを形成させるためには、菌糸体成長を促進させる手法を確立することが重要である。そこで3章において、マツタケ菌糸の成長促進効果が確認されている界面活性剤 Tween80 について、その促進効果を高めることを目的として、培地への添加方法を検討した。そして、4章において、マツタケの人工栽培における本研究の結果の位置づけと、人工栽培に向けた今後の課題について検討した。

## 2 章. 非滅菌環境下での菌根合成法の確立

### はじめに

マツタケはアカマツの根と菌根を形成する外生菌根菌であり，自然状態では宿主から養分を得て生活し，子実体を発生していること，また，現在までに人工的な子実体形成に成功した外生菌根菌においても，多くは宿主との共生条件下で子実体を形成している（表 1-1）ことから，マツタケの人工栽培においても，このような感染苗を利用する方法が有効であると考えられる．近年，滅菌環境下での，アカマツ実生とマツタケの菌根合成法は確立されたが（Guerin-Laguet et al. 2000b; Vaario et al. 2000; Yamada et al. 1999b），作製した感染苗を非滅菌環境へと移行する手法は確立されていない（山田，大政 2003）．また，マツタケは炭素源を宿主植物の光合成産物に依存していることから，子実体発生に必要な多量の菌糸を支えるためには，大型の宿主が必要とされることが考えられるが，苗畑で栽培した苗木や，自然状態のアカマツの根には他種の外生菌根が形成されており，マツタケを接種する上での障害となっている．一方で，マツタケのシロ中では微生物の多くが排除されることから（小川 1977a; Ohara and Hamada 1967），競争の少ない条件下でマツタケ感染苗を作成し，シロを誘導してから林地へと移植することで，これら他種の微生物に対する競争力を与えられると考えられる．

そこで，本章では，大型の宿主を用いた感染苗の作製を目的とし，非滅菌環境下におけるマツタケとアカマツの菌根合成手法の確立と，その手法を用いた大型宿主とマツタケの菌根合成を試みた．

また，中国南西部に発生するマツタケはマツ科樹種のほかに，ブナ科樹種を宿主とすることが考えられている．宿主の異なるマツタケでは，生理的な性質が異なる可能性が考えられるほか，日本産のマツタケが広葉樹と共生可能であれば，人工栽培において宿主の選択肢が広がることになる．このため，中国雲南省産と日本産のマツタケについて，ブナ科樹種を宿主とすることができるか調査した．



## 2-1 非滅菌環境下におけるマツタケとアカマツの菌根合成

本節では、アカマツの実生苗を用いて、非滅菌環境下でのマツタケ菌根の合成を試みた。その際、菌根形成に与える培土の影響を調べるため、4種類の培土を用いて比較を行った。また、ホンシメジにおいて、空中取り木法によって得たアカマツの外生菌根菌未感染苗に培養菌糸体を接種し、作製した感染苗の栽培によって子実体の発生がみられている (Kawai 1997)。このことから、アカマツの大型苗の作製手法として空中取り木法を用い、得られた苗に対してマツタケ菌根の合成を試みた。また、この接種法が他の外生菌根菌でも応用できるか確認するために、アカハツを用いた接種試験も同時に行った。アカハツはマツ科樹木と共生する典型的な外生菌根菌の1種である。

### 材料と方法

#### 接種源の作製

マツタケ菌株は、長野県伊那市のアカマツ林に発生したマツタケ子実体より分離された T2 菌株を用いた (Guerin-Laguette et al. 2002)。太田平板培地 (Ohta 1990) で培養した菌叢外縁部を直径 5mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜き、その寒天片を新たな太田平板培地に接種し、23℃、暗黒下で 25 日間培養した。培養後、菌糸体を 5~10mm<sup>3</sup> 角に培地ごと切り取り、菌糸体 20 片を 100ml 容三角フラスコ中の 10ml の 5X 液体培地 (Guerin-Laguette et al. 2000a) に接種し、23℃、暗黒下で 4 週間静置培養した。得られた菌糸体を滅菌水で洗浄した後、およそ 1cm 四方に切ったものを接種源とした。

アカハツ菌株には AT583 (Yamada et al. 2001a) を用いた。接種源の作製方法は Guerin-Laguette et al. (2000a) に倣った。5X 平板培地上で培養した菌叢外縁部を直径 5mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜いた。100ml 容の培養ビン中に 60ml の 5X 液体培地を入れ、打ち抜いた寒天片 1 片を液面に接するようにニクロム線で吊るして固定し、23℃、暗黒下で静置培養した。6 週間後、5X 液体培地を新たなものと置換した。さらに 6 週間の培養後、得られた菌糸体を 1.25mM MES 溶液 (pH 5.3) で洗浄し、3 等分に切ったものを接種源とした。

#### アカマツ実生苗の作製

アカマツ種子は長野県で採取された市販のものを使用した (大幸産業)。アカマツ種子を

4℃の蒸留水中に 1 日浸漬した後、30%過酸化水素水に 15 分間浸漬して表面殺菌した。殺菌した種子を滅菌蒸留水で 2 回洗浄した後に、0.2%グルコース寒天培地上に播種し、23℃、白色蛍光灯 ( $150\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) 下で 11 日間栽培した。ここまでの過程で雑菌の混入は認められなかった。得られた実生苗を、開放型の 100ml 容の育苗箱 (roottrainer, Ronaash 社) に 1 本ずつ移植した。培土はパーライトとバーミキュライトを等容量混合した後に、121℃、60 分間オートクレーブしたものを用いた。移植した実生苗は、23℃、 $110\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (波長 400~700nm, 明期 16 時間, 暗期 8 時間) の、非滅菌環境下のグロースチャンバー内で 3 ヶ月間栽培し、接種実験に供した。灌水は、移植後 3 週間は毎日蒸留水を 5ml 与え、その後は週に 1 回、Nylund and Wallander (1989) の A+B 液の 1000 倍希釈液 (以下、Pine Solution) を 6ml と、週に 3 回蒸留水を 6ml 与えた。

### 取り木苗の作製

東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無試験地 (以下、田無試験地) の第一苗畑に植栽された 9 年生アカマツに対して、Kawai (1997) の方法に従い空中取り木処理を行った。アカマツの枝の 1 年生の部位を 15~20cm の幅に渡って摘葉し、摘葉部の中心付近を約 3cm 幅に環状剥皮した。剥皮部に接する部位の枝側の樹皮に、0.5% IBA 粉剤 (オキシベロン, 塩野義製薬社) と 10 倍量の脱水ラノリンとを混合したものを塗布した (図 2-1-1A)。水道水を含ませたミズゴケで剥皮部分を包み、その上からポリエチレンシートを巻きつけて覆い、両端をビニール紐で結んで固定した (図 2-1-1B)。遮光のため、さらにポリエチレンシートの上からアルミ箔で覆った。取り木処理は 100 本の枝に対して行った。1 ヶ月ごとにポリエチレンシートの外部から目視で発根の有無を確認した。処理 4 ヶ月~5 ヶ月後に、発根のみられた処理枝を剥皮部分の下で切断し、取り木苗を得た。得られた取り木苗を 2.7L 容のポット (WM コンテナ, Thermoflan 社) に 1 本ずつ移植し、自然光、非滅菌環境のガラス室内で 3 ヶ月間栽培した後、接種実験に供した。移植時にミズゴケは根を傷付けない程度に取り除いた。培土はパーライトとバーミキュライトを等容量混合した後に、121℃、60 分間オートクレーブしたものを用いた。栽培期間中は毎日、水道水を十分に与えた。

### 培土の調製

菌根合成に与える培土の影響を調べるため、接種後の栽培には表 2-1-1 に示した 4 種類の



図 2-1-1. 取り木処理の様子. A : アカマツの 1 年生枝に環状剥皮を行い，発根促進剤を塗布したところ. B : 処理部を湿らせたミズゴケで包み，その上からポリエチレンシートを巻きつけて覆い，両端をビニール紐で結んで固定したところ.

表 2-1-1. アカマツ - マツタケ菌根合成に使用した培土の組成

種類	組成	体積比
P 培土	パーライト：バーミキュライト	1：1
B 培土	パーライト：バーミキュライト：アカマツ樹皮粉末	5：5：1
C 培土	弥生土*：バーミキュライト：アカマツ樹皮粉末	5：5：1
F 培土	加計土**：バーミキュライト：アカマツ樹皮粉末	5：5：1

\* 弥生土：東京大学弥生キャンパス構内（東京都文京区）のマテバシイの下から採取した。

\*\* 加計土：広島県安芸太田町のアカマツ林で採取した。

混合培土を用いた。弥生土および加計土は 3mm の篩を通してリターや岩石を取り除き、60℃で 24 時間乾燥させた。パーライトは 1mm の篩にかけ、粉末部分を取り除いて使用した。アカマツ樹皮は田無試験地に植栽されたアカマツ成木から採取し、フードミル（HL-2053, Philips 社）で 20 秒間粉碎した。これらの材料を表 2-1-1 に示した割合で混合し、蒸留水を 15% (w/v)加えた後に、121℃, 60 分間オートクレーブしたものを培土とした。

## 接種

実生苗を rootrainer から取り出し、その根を蒸留水で洗浄した後、細根の 3～4 ヶ所にマツタケもしくはアカハツの接種源を 1 つずつ木綿糸で縛り付けて固定した。その後、滅菌した 4 種類の培土を用いて rootrainer に植え戻した。接種は、各培土につき 3 本の実生苗に対して行った。対照の非接種苗は P 培土についてのみ作製した。接種した苗は、23℃,  $110\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ （波長 400～700nm, 明期 16 時間, 暗期 8 時間）の、非滅菌環境下のグロースチャンバー内で栽培し、各週に 23ml の蒸留水を 4 日に分けて与えた。

取り木苗には、100ml 容三角フラスコ 1 本分の量のマツタケ培養菌糸を苗 1 本分への接種源とし、実生苗と同様に木綿糸で菌糸片を根に縛り付けて接種を行った。10 本の苗の根に接種を行い、滅菌した B 培土を用いてポットに植え戻した。20℃, 自然光下のガラス室内で栽培した。接種後の苗には、週に 1 回 Pine Solution を 60ml と、週に 2 回水道水を 60ml 与えた。

## 菌根の観察と DNA 解析

マツタケ菌糸体接種後の実生苗を、接種 1, 2, 3 ヶ月後に各培土につき 1 本採取した。取り木苗は、接種 10 週間後に 6 本、20 週間後に 4 本を採取した。採取した苗の接種部付近の根を実体顕微鏡下で観察し、Gill and Suzuki (2000b) によるマツタケ菌根の形態的特徴の記述に従い、マツタケ菌根の形成の有無を記録した。菌根の発達状況を確認するため、観察されたマツタケ菌根を採取し、染色によりハルティヒネットの観察を行った。各苗につき 4～47 個のマツタケ菌根を採取し、70%エタノールに浸漬して保存した。Gill et al. (1999) の方法に従って細根の染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

また、形成された菌根がマツタケのものであることを確認するため、DNA 解析を行った。DNA 解析では、苗ごとに 1～5 個のマツタケ菌根を採取し、ひとまとめにして凍結乾燥を

行い、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。対照として、マツタケ培養菌糸、接種前のアカマツの細根、非接種処理のアカマツの細根からも同キットを用いて DNA を抽出した。rDNA-ITS 領域のプライマー対 (ITS1 と ITS4) (White et al. 1990) とマツタケ特異的プライマー対 (TmF と TmR) (Kikuchi et al. 2000) を用いた nested-PCR 法により、DNA を増幅した。PCR は Perkin-Elmer GeneAmp 9600 Thermal Cycler を用い、Kraighter et al. (2005) の方法に従って行った。DNA 抽出物を添加しない対照を各反応に含めた。PCR による DNA 増幅の有無と増幅産物の分子サイズを確認するために、1.5%アガロースゲルを用いて 0.5×Tris-ホウ酸-EDTA 緩衝液中で PCR 産物の電気泳動を行った。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液 (1µg/ml) 中で 30 分間染色し、EDAS 290 システム (Kodak 社) を用いて泳動像を観察後、撮影した。

アカハツ接種後の実生苗は、接種 1, 2, 3 ヶ月後に各培土につき 1 本採取した。採取した苗の接種部付近の根を実体顕微鏡下で観察し、Yamada et al. (2001b) のアカハツ菌根の形態の記述に従い、アカハツ菌根の形成の有無を記録した。形成されていたアカハツ菌根を採取し、ハルティヒネットの観察に供した。ハルティヒネット観察用の菌根は、70% エタノールに浸漬して保存した。Gill et al. (1999) の方法に従って菌根の染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。アカハツ接種苗については、菌根の消長を調べるため、サンプリング後に苗を植え戻し、元の環境下でさらに栽培した。1 回目のサンプリングからそれぞれ 3 ヶ月後、すなわち、接種 4, 5, 6 ヶ月後に、再度菌根の観察とサンプリングを行った。

## 結果

### 実生苗を用いたマツタケ菌根合成

マツタケ菌根の観察結果を表 2-1-2 に示す。P 培土では、接種 1 ヶ月後および 3 ヶ月後に採取した個体の接種部付近において、マツタケ菌根が観察された (図 2-1-2A)。C 培土では、接種 1, 2, 3 ヶ月後に採取した個体において、B 培土および F 培土では接種 1 ヶ月後および 2 ヶ月後に採取した個体において、マツタケ菌根が観察された。これらの菌根は、棒状のものからハウキ状に分枝しているものまでであった。菌根の先端部はクリーム色から明るい褐色で、基部は暗褐色であった。菌根の中程にくびれがあり、ここを境に色調が異なっていた。また、一部の菌根では、根外菌糸体とみられる白色の菌糸が表面に付着していた (図 2-1-2A の矢印)。しかし、培土中ではマツタケのものと思われる白色の菌糸が接種部

付近にわずかにみられたほかは、マツタケの菌糸は観察されなかった。一方、マツタケ菌根と異なる形態的特徴を持つ菌根は、いずれの培土においても観察されなかった。

これらのマツタケ菌根について、ハルティヒネットの観察を行った（表 2-1-2）。P 培土では、接種 3 ヶ月後に採取した個体の根において、25 根端中 2 根端でハルティヒネットが観察された。B 培土では、接種 2 ヶ月後に採取した個体において、47 根端中 2 根端でハルティヒネットが観察された。C 培土では、接種 3 ヶ月後に採取した個体において、23 根端中 1 根端でハルティヒネットが観察された。F 培土では、接種 1 ヶ月後および 2 ヶ月後に採取した個体で、それぞれ 36 根端中 1 根端、15 根端中 2 根端でハルティヒネットが観察された（図 2-1-2B）。一方、P 培土では 1 ヶ月後、C 培土においては 1 ヶ月後と 2 ヶ月後、B 培土では 1 ヶ月後に採取した個体においてもマツタケ菌根が観察されたが、これらの菌根中にはハルティヒネットは確認できなかった。

接種 1 ヶ月後および 3 ヶ月後に採取したマツタケ菌根について、DNA 解析を行った。その結果、対照とした T2 菌株の培養菌糸と同一分子サイズの DNA が増幅された（図 2-1-3）。一方、マツタケ接種前の実生苗やマツタケ非接種の対照苗から採取した細根、ネガティブコントロールでは、DNA の増幅はみられなかった。

#### 取り木苗を用いたマツタケ菌根合成

接種 10 週間後に採取した 6 本の苗のうちの 2 本と、20 週後に採取した 4 本の苗のうちの 1 本の苗で、マツタケ菌根が観察された。マツタケ菌根が観察された苗のうち、接種 10 週後の 1 本の苗のマツタケ菌根と 20 週後の苗のマツタケ菌根ではハルティヒネットが観察された（図 2-1-4）が、接種 10 週後の 1 本の苗のマツタケ菌根ではハルティヒネットが認められなかった。また、形成されたマツタケ菌根の DNA 解析を行ったところ、3 本すべてにおいて、マツタケに特異的な DNA の増幅がみられた。一方、いずれの苗木においても、マツタケ以外の形態的特徴を持つ菌根は観察されなかった。

#### 実生苗を用いたアカハツ菌根合成

すべての培土において、アカハツ接種 1 ヶ月後と 3 ヶ月後に観察した苗に、アカハツの菌根形成が確認された（図 2-1-5A）。接種 2 ヶ月後に観察した苗では、B 培土でのみ菌根形成が確認された。観察されたアカハツの菌根は、いずれも黄土色から淡い黄土色で、菌鞘が発達しており、表面は平滑で、光沢のないくすんだ色をしていたが、根端部は光沢を持

表 2-1-2. アカマツ実生苗におけるマツタケ菌根形成の有無.

接種後の栽培期間		1 ヶ月	2 ヶ月	3 ヶ月
培土の種類	P 培土	+	—	2/25
	B 培土	+	2/47	—
	C 培土	+	+	1/23
	F 培土	1/36	2/15	—

\* 数値は (ハルティヒネットの観察された根端数) / (観察した根端数) を表す.

\*\* + は菌根が観察されたがハルティヒネットが観察されなかったことを,  
— は菌根が観察されなかったことを示す.



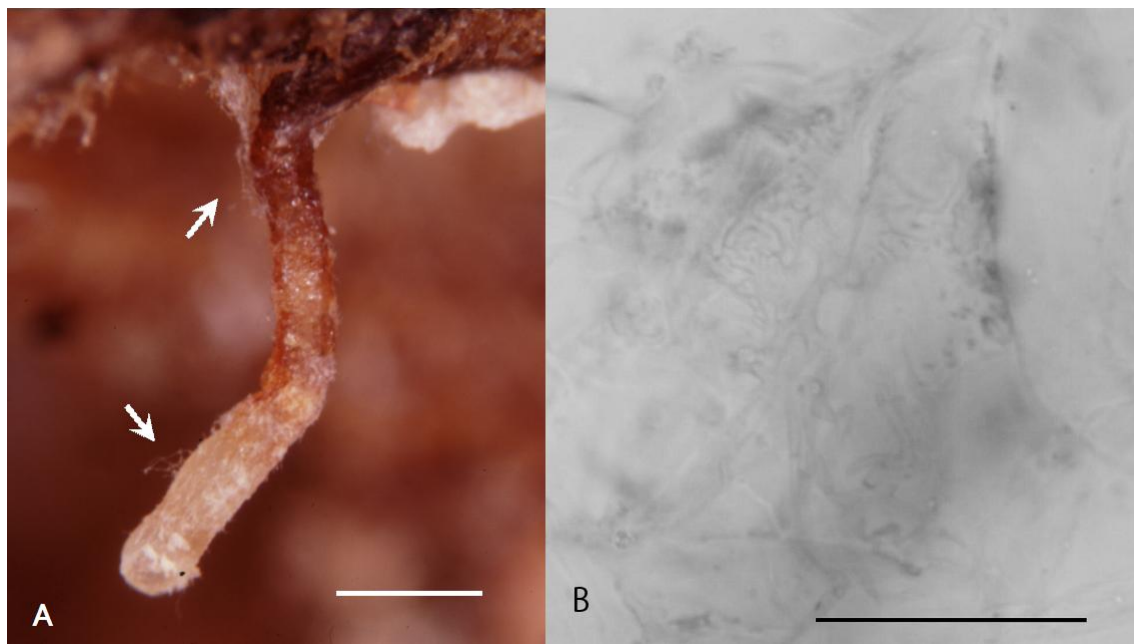


図 2-1-2. A : マツタケ菌接種 1 ヶ月後に, P 培土に植栽したアカマツ実生苗の細根に形成されたマツタケ菌根. 矢印は, 菌根表面に付着する根外菌糸体. バー, 0.5mm. B : マツタケ接種 2 ヶ月後に, F 培土に植栽したアカマツ実生苗の菌根中に観察されたハルティヒネット. バー, 20 $\mu$ m.

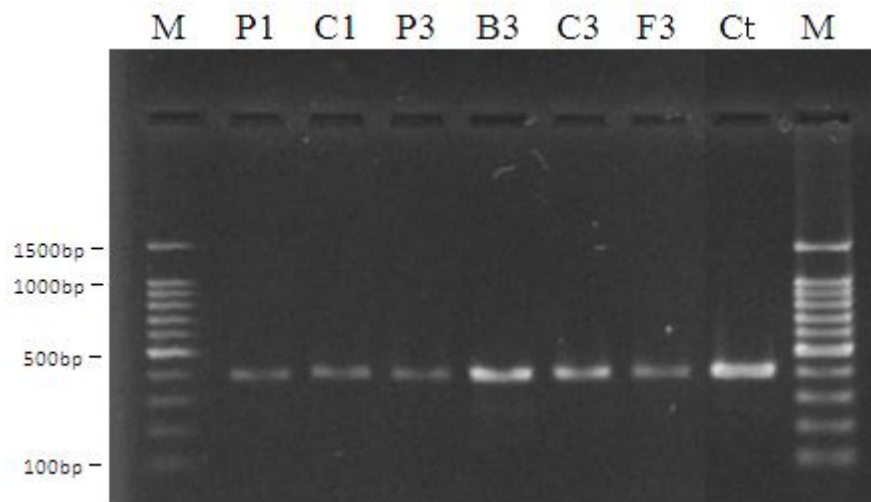


図 2-1-3. マツタケを接種したアカマツ実生苗の菌根から抽出した DNA の nested-PCR 法による増幅結果. 接種後 1 ヶ月および 3 ヶ月に採取したすべてのサンプルで、マツタケ特異的 DNA 断片が増幅された. P, B, C, F は、菌根合成に用いた培土の種類. 数字は、接種後の月数. Ct : マツタケの培養菌糸 (対照), M : 100 bp サイズマーカー.

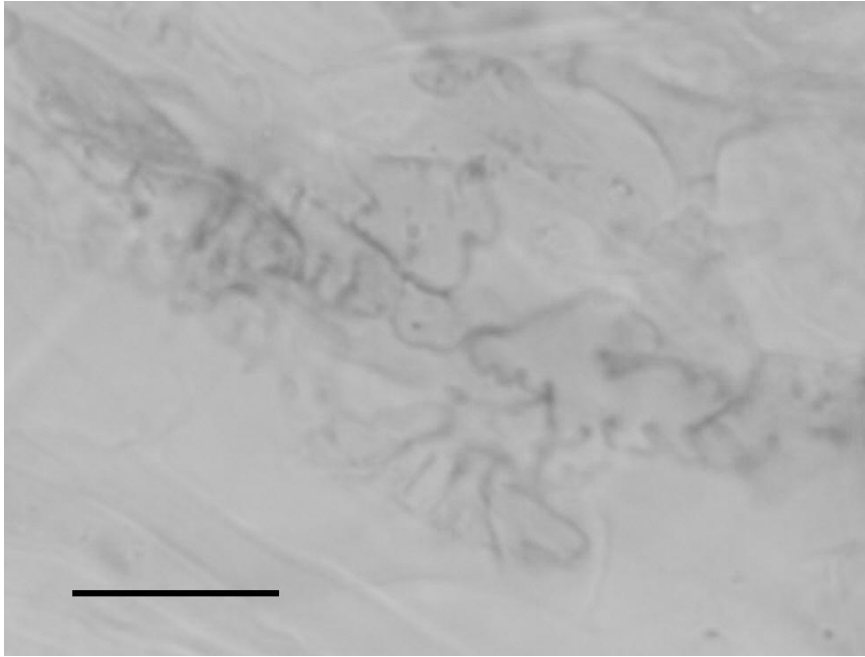


図 2-1-4. マツタケ接種 10 週後のアカマツ取り木苗の細根中に形成されたハルティヒネット。バー, 10 $\mu$ m.

つものも多くみられた。このような特徴は、Yamada et al. (2001b) のアカハツ菌根の形態の記載と一致した。また、菌鞘と接続した菌糸束もしばしばみられた (図 2-1-5A 矢印)。一方、アカハツ菌根と異なる形態的特徴を持つ菌根は、いずれの培土においても観察されなかった。菌根形成が観察された苗を植え戻して、3 ヶ月栽培した後に観察した結果、枯死した 2 本を除くすべての苗でアカハツの菌根が確認された。2 度目の観察時には、菌根の形成は、接種源付近のみでなく、根系全体に広がっていた (図 2-1-5B)。これらのアカハツ菌根について、ハルティヒネットの観察を行ったところ、観察したすべての根端で厚い菌鞘と発達したハルティヒネットが観察された (図 2-1-6)。

## 考察

マツタケ培養菌糸をアカマツ実生苗へ接種した結果、接種 1 ヶ月から 3 ヶ月後の観察で、接種部付近にマツタケ菌根の形態的特徴を持った菌根の形成が認められた。また、マツタケ特異的プライマーを用いた PCR により、これらの菌根から抽出した DNA で DNA 断片の増幅が確認された。したがって、今回の接種方法では、1 ヶ月未満の期間で、マツタケ菌根が形成されていたと推測される。観察されたマツタケの菌根は、色調が明るく、根外菌糸体をはっきり観察されるといった特徴があった。これは、Gill and Suzuki (2000b) によるマツタケ菌根の形態的特徴に基づいたタイプ分けに従うと、タイプ 1 からタイプ 2 に相当する発達途上にある若い菌根である。接種 1 ヶ月後または 2 ヶ月後に採取したマツタケ菌根では、ハルティヒネットが観察されない場合があったが、これらの菌根ではハルティヒネットがまだ発達していなかったものと推測される。

実生苗への接種実験では、すべての培土で菌根が形成され、菌根の形成量には培土間で大きな違いがみられなかった。本研究で培土に用いた材料のうち、弥生土はマツタケの菌糸成長に好適であり (Guerin-Laguette et al. 2003)、アカマツ樹皮はマツタケが菌糸成長に利用できる (Vaario et al. 2002) ことが報告されている。また、加計土は、マツタケ子実体が発生するアカマツ林下から採取したものである。しかし、本研究の結果から、非滅菌環境下での菌根合成において、これらの材料はマツタケの菌根形成を促進する大きな効果はないと推測される。また、今回の結果では、いずれの培土においても菌根形成率は低く、ハルティヒネットの観察された根端は苗 1 本当たり 2 根端以下であった。菌根形成率の低さの原因については明らかではないが、滅菌環境下での菌根合成と比較したとき、腐生菌などの土壌中の微生物と競争があること、閉鎖系でないために土壌水分や温度の変化



図 2-1-5. アカハツ接種後に形成された菌根. A : P 培土に植栽した苗で接種 1 ヶ月後に観察された菌根. 矢印はアカハツの菌糸束. バー, 0.5mm. B : C 培土に植栽した苗で接種 4 ヶ月後に観察された菌根. バー, 1mm.

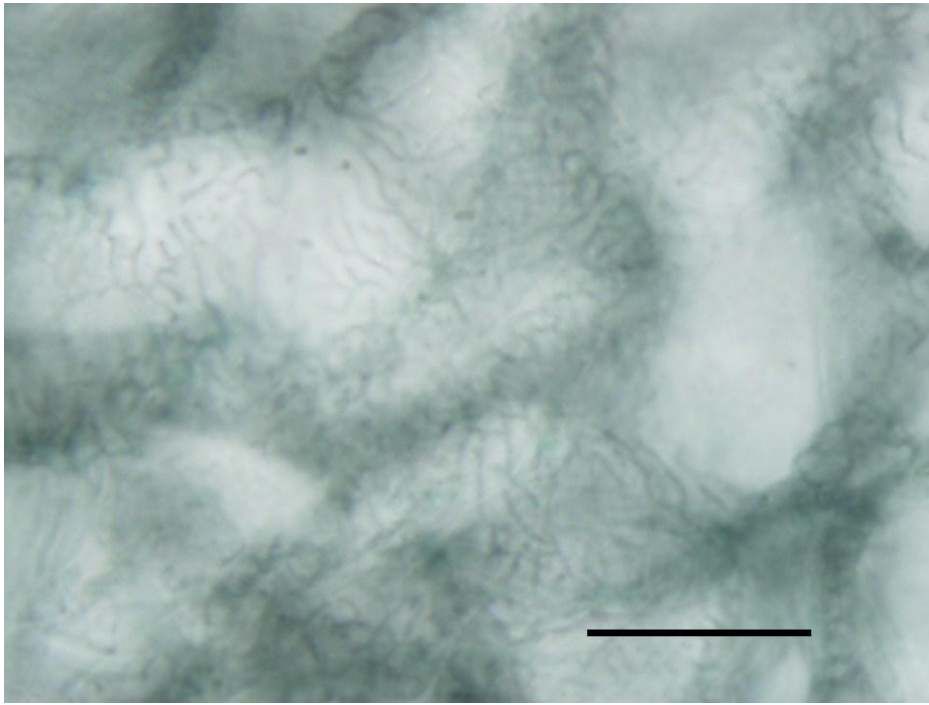


図 2-1-6. アカハツ接種 3 ヶ月後に、P 培土に植栽したアカマツ実生苗の菌根中に観察されたハルティヒネット。バー，25 $\mu$ m.

量が大きいことが可能性として考えられる。しかし、本研究では、各培土について供試したアカマツが 3 本ずつと少数であったため、培土の差異が菌根の形成と発達に及ぼす影響については、更なる研究を要する。

取り木苗においては、接種 10 週および 20 週後の観察で、接種部付近にマツタケ菌根の形成が認められた。したがって、取り木苗では接種後 10 週間未満の期間で、マツタケ菌根が形成されていたと推測された。実生苗においては最短で接種 1 ヶ月未満で菌根が形成され、その一方で接種 1 ヶ月後または 2 ヶ月後に採取した菌根では、ハルティヒネットが観察されない場合があったことから、取り木苗と実生苗における菌根形成までの期間に差はみられないと考えられる。また、実生苗と同様、取り木苗を用いた接種実験においても感染率は低かった。今後、感染苗からのシロ形成において、感染率の向上が課題となる。

本実験において、実生苗に加え、取り木苗を用いたマツタケ感染苗の作製に成功した。取り木苗は発根し、採取する時点で苗高が 50cm から 1m ほどであり、林地への移植が可能なサイズである。今後、感染苗からシロを形成させる方法を研究することで、ホンシメジのような鉢植え栽培や (Kawai 1997)、林地への移植による栽培につながると考えられる。

また、同一の実験系を用いて、アカマツ実生苗にアカハツ培養菌糸を接種した結果、接種後 1 ヶ月から 3 ヶ月の観察で、接種部付近にアカハツ菌根の形成が認められた。さらに、その後の観察により、菌根の形成が接種部付近のみではなく、根系全体に拡大することが確認された。したがって、今回の接種方法では 1 ヶ月未満の期間で、菌根の形成が始まり、栽培期間中は菌根の形成が続いていたと推測される。2 回目の観察において、2 本の実生苗が枯死したが、そのほかの苗ではアカハツの感染が広がっており、初回のサンプリングによる影響はなかったと考えられる。このことから、今回用いた実験系では、安定的なアカマツ-アカハツ菌根共生系を構築できたと考えられる。アカハツにおいては、すべての培土で 3 本中 2 本ないし 3 本の苗に菌根が形成され、また、菌根の形成量には培土間で大きな違いがみられなかった。本研究の結果から、非滅菌環境下においては、これらの培土の違いはアカハツの菌根形成にも大きな影響はないと推測される。アカハツにおいても菌根合成に成功したことから、今回用いた系は、他の外生菌根菌の接種にも応用可能であると考えられる。

## 2-2 アカマツ成木へのマツタケ菌根の合成

1 節において、非滅菌環境下でマツタケをアカマツ実生苗と取り木苗に接種し、菌根を形成させることに成功した。マツタケのシロを形成させるには、感染苗を作製して栽培する方法のほかに、アカマツ林の成木に対して直接マツタケを接種し、マツタケ菌根を作製する方法が考えられる。本節では、アカマツ成木に対して発根処理を行い、得られた菌根菌未感染根に対してマツタケ菌根の合成を試みた。また、この接種法が他の外生菌根菌でも応用できるか確認するために、アカハツを用いた接種試験も同時に行った。

### 材料と方法

#### 成木への発根処理

試験地は広島県安芸太田町に位置するアカマツ林とした。2001 年 10 月に 17 個体の 50 年生アカマツから 50 箇所のアカマツの根（長さ約 40-60cm, 直径 5-10mm）を、上下端を切断しないように慎重に掘り起こし、付着した土壌を水で洗い流した。生じていた側根は滅菌したハサミで数 cm を残して切断した。根にカッターナイフを用いて形成層に達するように切り傷を全面につけた。付傷した根に 0.5% IBA 粉剤（オキシベロン、塩野義製薬社）を、ブラシを用いて根 1 本当たり 2-5mg すりこんだ。湿らせたミズゴケで処理部分を包み、その上からポリエチレンシートを巻きつけて覆い、両端および中央部を結んで固定した（図 2-2-1A）。これを埋め戻し、12 ヶ月間放置した。

#### 接種源の作製

供試菌株、接種源の作製方法は 1 節と同様に行った。ただし、アカハツの接種源の作製については菌糸体の培養期間を最初の培地で 25 日間、培地を移し替えてから 15 日間とした。

#### 接種

発根処理を行った根を掘り起こし、細根の発生の有無と外生菌根菌の感染の有無を目視で確認した。細根の発生がみられ、菌根菌感染のみられなかった根を選び、接種源を、木綿糸を用いて細根に縛り付けた。接種は、発根処理を行った長さおよそ 20cm の部分に対して、8-12 箇所に行った。接種を行った根を滅菌した混合培土で包み込み、ポリエチレンシ



ートで覆い、両端および中央部を結んでから埋め戻した。混合培土はマツタケに対しては弥生土、バーミキュライト、アカマツ樹皮粉末を体積比で 5 : 5 : 1 の割合で混合したもの（マツタケ用混合培土）を用いた。アカハツに対してはパーライト、バーミキュライトを体積比で 1 : 1 の割合で混合したものをを用いた。マツタケは 6 箇所、アカハツは 4 箇所の根に対して接種を行った。これらの根は、それぞれ 1 本のアカマツ成木から発生していたものである。対照として、処理根のそばに位置する 3 ヶ所の発根処理根を、接種をせずにマツタケ用混合培土で包み込み、ポリエチレンシートで覆い、両端および中央部を結んでから埋め戻した。

### 菌根の観察と DNA 解析

マツタケを接種した根は 20 週間後に掘り起こし、実体顕微鏡下で観察した。残存している接種源 (I)、形態的にマツタケに感染していると思われる細根 (R)、シロ状に土壤中に伸張している菌糸 (SL) をそれぞれサンプリングした。

それぞれのサンプルについて、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。DNA の抽出に、I サンプルは 2-5mg、R サンプルは 1-5 根端、SL サンプルは菌糸の付着した土壌 5-15mg を、それぞれ用いた。rDNA-ITS 領域のプライマー対 (ITS1 と ITS4) (White et al. 1990) とマツタケ特異的プライマー対 (TmF と TmR) (Kikuchi et al. 2000) を用いた nested-PCR 法により、DNA を増幅した。PCR 反応液は dNTP 各 50mM (Applied Biosystems 社)、プライマーをそれぞれ 0.2mM (Kurabo 社)、Taq ポリメラーゼ 1 ユニット、PCR バッファー (Perkin-Elmer 社) とした。PCR は Perkin-Elmer GeneAmp 9600 Thermal Cycler を用い、Kraighter et al. (2005) の方法に従って行った。DNA 抽出物を添加しない対照を各反応に含めた。PCR による DNA 増幅の有無と増幅産物の分子サイズを確認するために、2%アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン社) を用いて 0.5×Tris-ホウ酸-EDTA 緩衝液中で PCR 産物の電気泳動を行った。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液 (1µg/ml) 中で 30 分間染色し、EDAS 290 システム (Kodak 社) を用いて泳動像を観察後、撮影した。

接種部付近の根端サンプルについて、Gill et al. (1999) の方法に従ってクロラゾールブラック E で染色を行い、光学顕微鏡 (Olympus BH2) 下で観察した。

アカハツは 5 週間後に接種根を掘り起こし、実体顕微鏡下で観察した。採取した根の接種部付近の細根を実体顕微鏡下で観察し、Yamada et al. (2001b) のアカハツ菌根の形態

の記述に従い、アカハツ菌根の形成の有無を記録した。形成されていたアカハツ菌根を採取し、ハルティヒネットの観察に供した。ハルティヒネット観察用の菌根は、70%エタノールに浸漬して保存した。Gill et al. (1999) の方法に従って菌根の染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

接種を行わなかった対照の処理根についても同様の観察処理を行った。

## 結果

### 発根処理による細根の発生

発根処理を行った 50 箇所のうち、38 箇所で新たな発根がみられた (図 2-2-1B)。残りは十分な発根がみられなかったり、成長しなかったり、あるいは枯死していた。肉眼での観察の結果、34 箇所の発根した細根には菌根の感染はなかったが、4 箇所では白色からクリーム色の菌鞘を持つ未同定菌が菌根を形成していた。この菌根に感染していた根は接種処理から除外した。

### マツタケ菌根の形成

接種箇所から数 cm の長さに渡って菌糸が伸長し、部分的に繁殖している様子 (図 2-2-2A) や細根に取り付いている様子 (図 2-2-2B) が観察された。これまで報告されているマツタケ菌根 (Vaario et al. 2000) と同様のハルティヒネットが、R サンプルの観察した根端のおよそ 3 分の 2 で観察された (図 2-2-2C)。PCR による DNA 増幅の結果、R サンプルの 21 個のうち 17 個でマツタケ DNA の増幅がみられた。SL サンプルでは 10 サンプル中 7 個、I サンプルでは 2 個のサンプルの両方でマツタケ DNA の増幅がみられた (図 2-2-3)。対照の非接種処理の根端サンプルからはマツタケ特異的な DNA の増幅はみられなかった。

### アカハツ菌根の形成

4 箇所のうち、2 箇所の処理根の接種部付近において、アカハツ菌根が観察された (図 2-2-4A)。これらの菌根は淡い黄土色で、菌鞘が発達しており、表面は平滑で、光沢のなくすんだ色をしていたが、根端部は光沢を持つものも多くみられた。また、菌鞘と接続した菌糸束もみられた。一方、アカハツ菌根と異なる形態的特徴を持つ菌根は観察されなかった。これらのアカハツ菌根について、ハルティヒネットの観察を行ったところ、発達したハルティヒネットが観察された (図 2-2-4B)。



図 2-2-1. アカマツ成木に対する発根処理の様子. A：発根処理を行った根. 矢印は処理前のアカマツの根. B：発根処理 12 ヶ月後に観察された新しい細根.

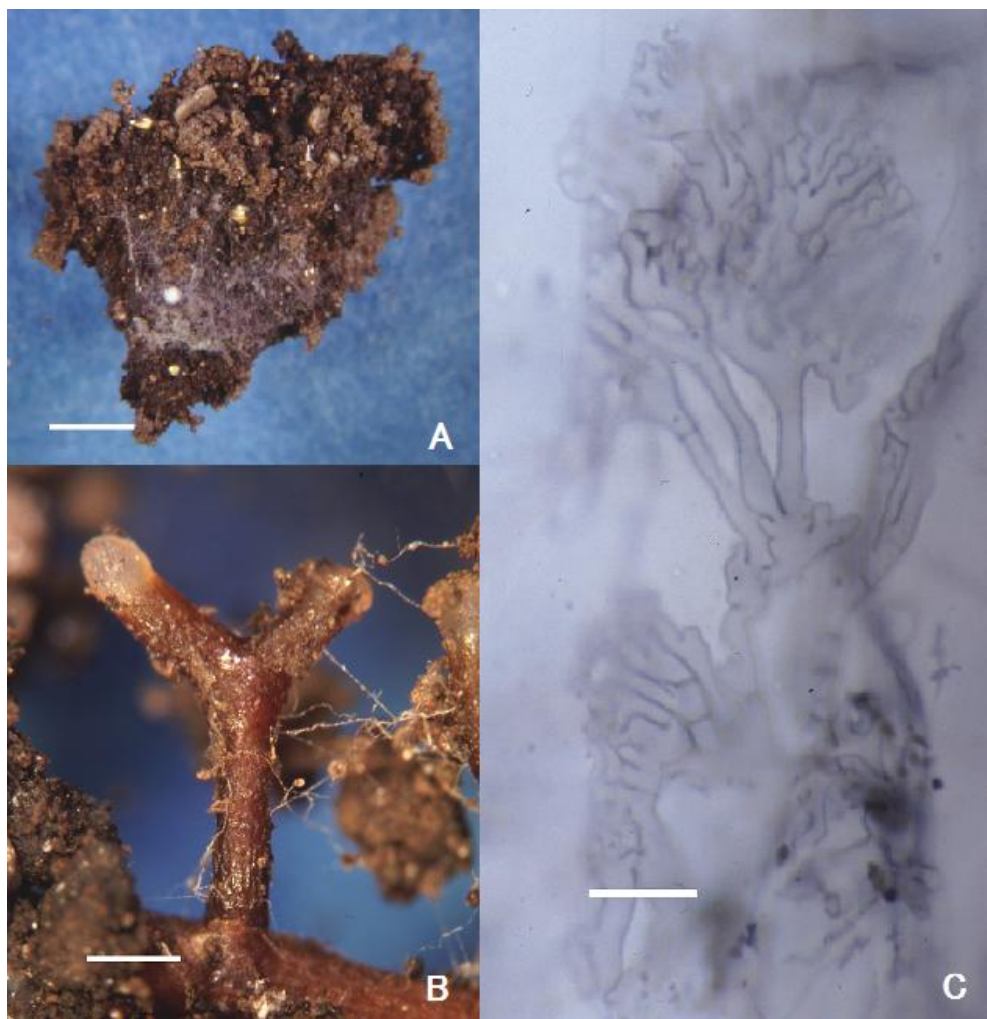


図 2-2-2. アカマツ成木に形成された典型的なマツタケ菌根. A: 土壌粒子にマツタケ菌糸が繁殖している様子. バー, 3mm. B: 発達初期段階のマツタケ菌根. バー, 1mm. C: 菌根中で観察された典型的なマツタケハルティヒネット. バー, 15 $\mu$ m.



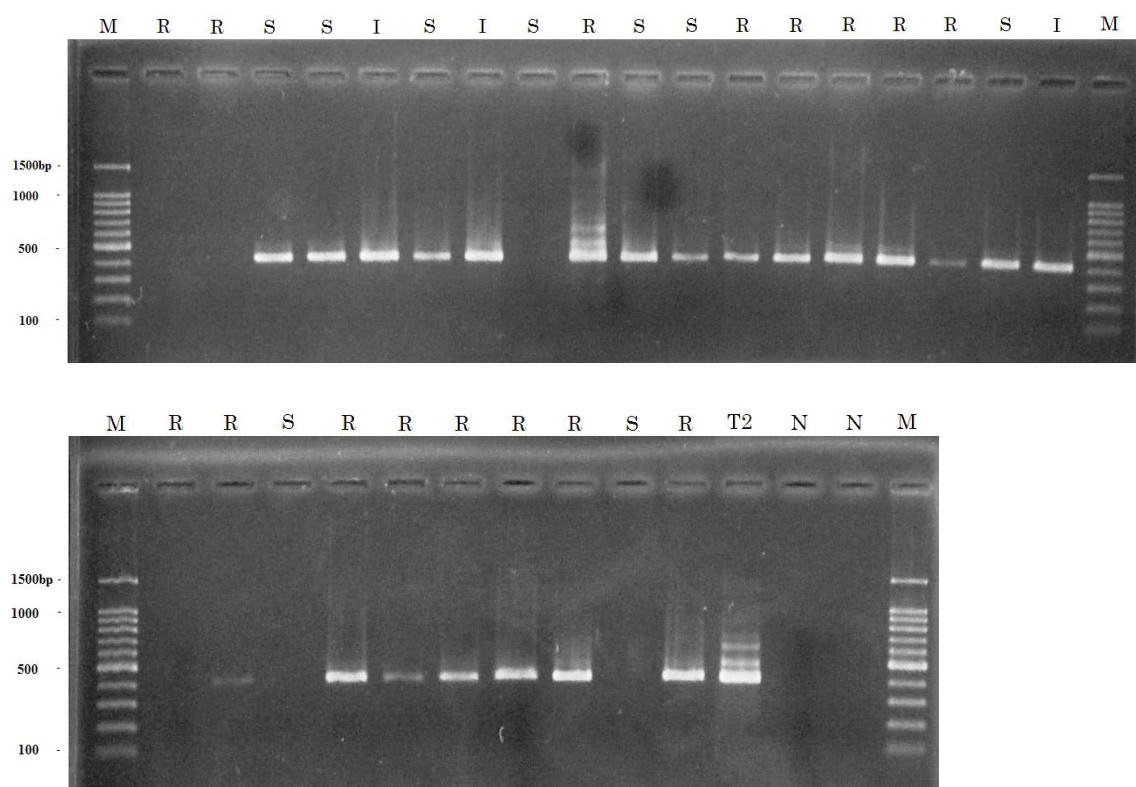


図 2-3-3. 3 種類のサンプルから抽出した DNA の nested-PCR の結果. ITS1/4 による PCR 増幅産物を, マツタケ特異的プライマーTmF/TmR で再度 PCR 増幅した DNA 断片の電気泳動像. 多くのサンプルでマツタケ特異的な DNA 断片の増幅がみられた. I : 残存していた接種源, R : 形態的にマツタケ菌根と同定された細根, SL : シロ状に土壤中に伸びていた菌糸. T2 : マツタケ培養菌糸から抽出した DNA (対照). N : ネガティブコントロール. M : サイズマーカー.

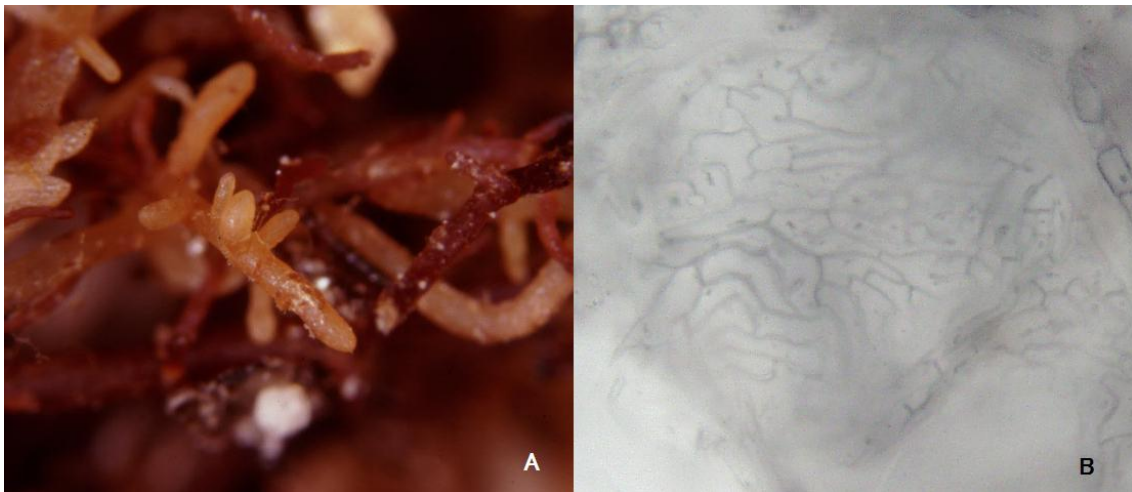


図 2-2-4. A : アカハツ接種 5 週間後に, アカマツ成木の細根に形成された菌根. B : アカハツの菌根中に観察されたハルティヒネット.

## 考察

アカマツ成木に対する発根処理により、76%の処理根において発根が認められ、その大部分が菌根菌に未感染であった。オーキシシンによる発根促進効果はマツ属を含む多くの樹種で知られている（高橋，増田 1994）。このことから、アカマツ成木への発根処理には付傷，オーキシシン塗布が有効であると考えられた。得られた菌根菌未感染根のうち，6 箇所の根に対してマツタケ培養菌糸の接種を行い，うち 5 箇所の根にマツタケ菌根の形成に成功した。また，マツタケ特異的プライマーを用いた DNA 解析により，一部のサンプルで DNA の増幅がみられないものも存在したが，これらの菌根から抽出したほとんどの DNA サンプルで DNA 断片の増幅が確認された。DNA の増幅のみられなかったものは，抽出した DNA が少なすぎたために増幅されなかった可能性が考えられるが明らかではない。シロ様の菌糸や接種源からもマツタケ DNA が検出されており，また，根端サンプルにおいて，マツタケの DNA がどこに存在していたかを同定することができないため，DNA 解析の結果のみから形成された菌根がマツタケ菌根か否かの判断はできない。しかし，菌根の形態的特徴がマツタケ菌根のものと一致すること，対照の非接種苗では菌根の形成がみられず，マツタケ特異的な DNA の増幅もみられなかったことから，あわせて考えると，形成されていた菌根はマツタケのものと考えられる。本研究で接種を行った根はすべて同一のアカマツ成木に対して発根処理を行ったものであるが，これまでの研究において，マツタケの菌根形成に対するアカマツの個体や系統による特性は知られていないため，本研究の結果から，他のアカマツ成木に対してもマツタケ菌根の合成は可能であると推測される。

観察されたマツタケの菌根は，根端部は淡黄色から赤褐色で，基部は濃褐色から暗褐色であった。これは，Gill and Suzuki（2000b）によるマツタケ菌根の形態的特徴に基づいたタイプ分けに従うと，タイプ 1 からタイプ 2 に相当する発達途上にある若い菌根である。接種から 20 週間経過した採取時点で，より発達したタイプ 3，4 に菌根が観察されなかったことから，マツタケの菌根形成からシロの形成にはまだ至っていないと考えられる。成木に対する局所的な接種は，野外においてマツタケの共生系をつくるための最初の過程であり，今後は接種規模のスケールアップや，接種後のマツタケ菌根の維持に関するモニタリングが必要となると考えられる。

アカハツについても，4 箇所の接種根のうち 2 箇所において菌根の形成に成功したことから，発根処理根に対する接種法は，他の外生菌根菌の接種にも応用可能であると考えられる。本実験で供試したアカハツの AT583 菌株は，アカマツ実生を宿主として，アカマツ林

土壌を培土とした非滅菌環境下での栽培において、子実体の形成がみられている (Yamada et al. 2001a). また、アカハツと近縁の *Lacatrius deliciosus* はヨーロッパアカマツ実生苗を宿主として、非滅菌環境下でパーライトとバーミキュライトを混合した培土に Pine Solution を養分として与えた栽培において、子実体の形成がみられている (Guerin-Laguet et al. 2000a). 1 節において、アカハツの菌根形成に及ぼす培土の影響は小さいことが明らかにされたが、これらの研究から、アカハツは子実体形成においても培土の影響は小さいと考えられる. したがって、子実体形成条件を明らかにすることで、アカハツにおいては宿主との共生系を基本とする栽培方法が確立できると考えられる.



### 2-3 広葉樹を宿主としたマツタケ菌根の合成

中国ではマツタケの主要な産地は北東部に位置する吉林省，および，南西部の雲南省，四川省に分かれている (Zang 1990; Cao and Yao 2004)．このうち，中国北東部に位置する吉林省では，マツタケは日本から朝鮮半島を通じて地理的に連続して分布しており，日本と同様にマツ科樹木のアカマツなどの森林に発生する．一方で，中国南西部の雲南省，四川省ではマツ科針葉樹林のほか，ブナ科広葉樹林や針広混交林でも発生することが知られている (富永ら 1981, 1988; Wang et al. 1997)．この広葉樹林で発生するマツタケの宿主はコナラ属，シイ属を主とするブナ科広葉樹と考えられている (Zang 1990; Cao and Yao 2004; Deng et al. 2004)．また，これらの森林で発生するマツタケについては，ひとつの菌の系統がマツ科とブナ科の両方を宿主とすることができるのか，宿主の異なる系統が共存しているのかが明らかにされていない．もしもマツタケが広葉樹を宿主とすることができるのなら，人工栽培における，宿主の選択肢が広がることになる．

本節では，中国雲南省の 3 ヶ所の森林で採取したマツタケのシロを対象としたマツタケの宿主の確認と，分離菌株によるブナ科樹木への接種試験を行った．1 小節では，マツタケがブナ科樹木を宿主としているかを解剖学的，分子生物学的な手法を用いて明らかにすることを目的とした．そのために，現地で採集した針葉樹林および広葉樹林のシロ中の根と菌根の形態観察，DNA 解析を行った．2 小節では，3 ヶ所の子実体より分離した菌株を用いて，ブナ科樹木への接種試験を行った．

## 2-3-1 現地調査

### 材料と方法

#### 試料の採取地

2003 年 8 月に、中国雲南省の 3 箇所、楚雄イ族自治州禄豊県舍資鎮（以下、舍資鎮）、迪慶藏族自治州香格里拉県建塘鎮（以下、建塘鎮）、麗江市玉竜納西族自治県太安郷（以下、太安郷）、の森林から、マツタケの子実体およびシロ内の根系を採取した（図 2-3-1）。採取した子実体からは菌株を分離し、接種試験に用いた。採取した根系は 70%エタノール中で保存した。舍資鎮の林相は元江栲（*Castanopsis orthacantha*）が高密度で優占する広葉樹林であった（図 2-3-2A）。その中にウンナンマツ（*Pinus yunnanensis*）が混交していたが、試料の採取地周辺には分布していなかった。建塘鎮の林相は黄背櫟（*Quercus pannosa*）が優占する広葉樹林であった（図 2-3-2B）。その中に麗江雲杉（*Picea likiangensis*）が混交していたが、試料の採取地周辺には分布していなかった。一方、太安郷の林相はウンナンマツの優先する針葉樹林で、タカネゴヨウ（*Pinus armandii*）や高山櫟（*Quercus* spp.）が混交していた（図 2-3-2C）。

#### PCR によるマツタケの同定

シロ中の細根から DNA を抽出し、マツタケ特異的なプライマーにより rDNA の ITS 領域の増幅を試みた。それぞれのサンプルについて、DNeasy Plant Mini Kit（Qiagen 社）を用いて DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。DNA の抽出にはそれぞれ 1-5 根端を用いた。マツタケ特異的プライマー対（TmF と TmR）（Kikuchi et al. 2000）を用いた PCR により、DNA を増幅した。PCR 反応液は 10 $\mu$ l に対し、dNTP 各 0.2mM（Bioline 社）、プライマーを各 0.3mM（インビトロジェン社）、Taq ポリメラーゼ 0.8 ユニット（Bioline 社）、1X NH<sub>4</sub> PCR バッファー（Bioline 社）とした。PCR は Takara Thermal Cycler Dice Standard TP65 を用い、以下のプログラムに従って行った。変性 94 $^{\circ}$ C、60 秒ののち、変性 94 $^{\circ}$ C、30 秒、アニーリング 54 $^{\circ}$ C、30 秒、伸長 72 $^{\circ}$ C、1 分 30 秒を 30 サイクル、伸長 72 $^{\circ}$ C、7 分。DNA 抽出物を添加しないネガティブコントロールを PCR ごとに含めた。PCR による DNA 増幅の有無と増幅産物の分子サイズを確認するために、GelRed（Biotium 社）を含む 1.5%アガロースゲル（Agarose S, ニッポンジーン社）を用いて 0.5 $\times$ Tris-酢酸-EDTA 緩衝液中で PCR 産物の電気泳動を行った。泳動後のゲルを、FAS-III システム（Toyobo 社）



図 2-3-1. 試料の採取地. 中国雲南省の 3 ヶ所の森林（緑色の印）でシロの採取を行った.



図 2-3-2. 試料採取地の林相. A : 舍資鎮. 元江栲 (*Castanopsis orthacantha*) が高密度で優占しており, その中にウンナンマツ (*Pinus yunnanensis*) が混交していた. B : 建塘鎮. 黄背櫟 (*Quercus pannosa*) が優占し, 麗江雲杉 (*Picea likiangensis*) が混交していた. C : 太安郷. 雲南松の優占する針葉樹林中, タカネゴヨウ (*Pinus armandii*) や高山櫟 (*Quercus spp.*) が混交していた.

を用いて泳動像を観察後、撮影した。

## 菌根の形態観察

採取した細根は実体顕微鏡下でその形態的特徴を観察した。また、舎資鎮の 21 根端、建塘鎮の 23 根端、太安郷の 18 根端について、根端部から 0.5~1mm ほど離れた、その根端において平均的な太さの部分で菌根の直径を測定した。形成されていた黒色の菌根を採取し、Gill et al. (1999) の方法に従って菌根の染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

## 宿主植物の推定

菌根を形成している宿主植物が針葉樹であるか、広葉樹であるかを判別するため、採取した根の組織中の導管の有無を調べた。採取したシロ中の根系の中で、菌根化した細根に接続している根の、直径 1mm 程度の部分を採取して、以下の手順でテクノビット 7100 樹脂 (Heraeus Kulzer 社) に包埋した。採取した試料からごみを取り除き、99.5%エタノールに浸漬して 1 晩置いた。水流アスピレーターで 10 分間脱気を行った。無水エタノールに置換し、脱気を 10 分間行った。その後、ローテーター (TAAB 社) で 4rpm, 20 分間回転した。さらに、もう一度置換、脱気、回転を繰り返した。無水エタノールの半量をテクノビット 7100 主液 100 ml と 7100 硬化剤 I, 1 g の混合液 (浸漬液) に置換し、脱気、回転を行った。次に全量を予備浸漬液に置換し、脱気後、回転を 3.5 時間行った。さらに、もう一度浸漬液に置換し、脱気後、回転を 3.5 時間行った。浸漬液 15ml に対して硬化剤 II を 1ml の割合で混合した包埋液を作製し、その中に試料を入れて 4℃で 1 晩静置した。その後、常温でテクノビット 3040 の粉末と液体を 2:1 の割合で混合した樹脂で表面を覆い、硬化、重合を完了させた。

作製した樹脂ブロックから、ミクロトーム (RM 2145, Leica 社) で厚さ 5  $\mu$  m の根の横断切片と縦断切片を作成し、水道水中で伸展させ、スライドガラスに貼り付けた。これを 60℃で 1 晩伸展、乾燥させ、顕微鏡下で観察した。

## 結果

### PCR によるマツタケの同定

シロ中の細根から DNA を抽出し、マツタケ特異的なプライマーにより rDNA の ITS 領域の増幅を試みたところ、3 箇所すべてのサンプルで DNA 断片の増幅がみられた (図 2-3-3)。

増幅された DNA 断片のバンドサイズは、いずれも対照とした T2 菌株の培養菌糸と同一であった。

### 菌根の形態観察

シロから採取した細根は多量の白色の菌糸と黄土色の土壌粒子に埋もれている状態であった。細根の実体顕微鏡による観察の結果、ほぼすべての細根で黒色の菌根が形成されており、菌根の形成されていない細根はほとんどみられなかった。形成されていた菌根は表面全体が基部から先端部まで一様に黒色で、先端部がやや膨らんでいるもの、明確にくびれのあるもの、全体が不定形に膨らんでいるもの、棒状であまり膨らみのみられないものがあった（図 2-3-4）。これらの特徴は互いに明瞭に区別できるものではなかったが、舍資鎮および建塘鎮のシロでは棒状のものが約半数を占めており、最も割合が高かった。太安郷のシロでは他の 2 箇所と異なり、太さの一定しない不定形のものが約半数で最も割合が高く、棒状のものは約 3 割であった。また、いずれのシロにおいても根の表面に灰白色の菌糸を帯びているものがみられた。菌根の太さは採取地間で異なっており、舍資鎮では  $0.17 \pm 0.02\text{mm}$ （平均値±標準偏差、以下同様）、建塘鎮では  $0.22 \pm 0.03\text{mm}$ 、太安郷では  $0.27 \pm 0.03\text{mm}$  であった。菌根の形成されていなかった細根は、白色で太さは基部から先端部まで一定であり、菌根化した細根とは形態的に明らかに異なっていた。

また、観察された菌根をクロラゾールブラック E で染色、観察したところ、すべての菌根でハルティヒネットが形成されているのが確認された（図 2-3-5）。この菌根は菌鞘が薄く、菌糸がクランプを欠くなど、これも日本のマツタケのものと特徴がよく一致していた。菌根の形態を採取地間で比較すると、舍資鎮および建塘鎮の菌根では、ハルティヒネットを形成している層の宿主細胞が中心柱に対して平行に、かつやや傾いて配列されていたのに対し、太安郷の菌根ではハルティヒネットを形成している層の宿主細胞は球形に近く、不規則に配置されていた。

### 宿主植物の推定

根の切片を観察したところ、広葉樹の優占していた 2 箇所（舍資鎮および建塘鎮）の根に導管が観察された（図 2-3-6A, B）。このことから、この 2 箇所の森林においては広葉樹が宿主になっていることがわかった。一方、太安郷で採取したサンプルの根では導管は確認されず、木部に樹脂道が観察された（図 2-3-6C）。

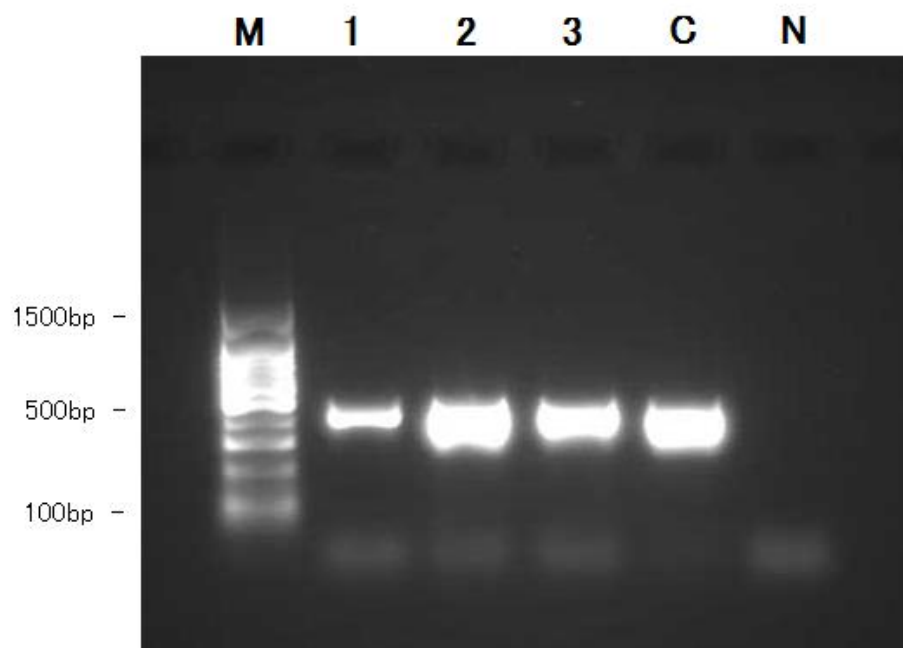


図 2-3-3. シロ中から採取した黒色の菌根から抽出した DNA の、マツタケ特異的プライマーによる増幅結果. 雲南省内の 3 箇所で採取したすべてのサンプルで, マツタケ特異的 DNA 断片が増幅された. M : 100 bp サイズマーカー. 1 : 舍資鎮で採取した菌根サンプル. 2 : 建塘鎮で採取した菌根サンプル. 3 : 太安郷で採取した菌根サンプル. C : 日本産マツタケ (T2 菌株) の培養菌糸 (対照). N : 蒸留水 (対照).

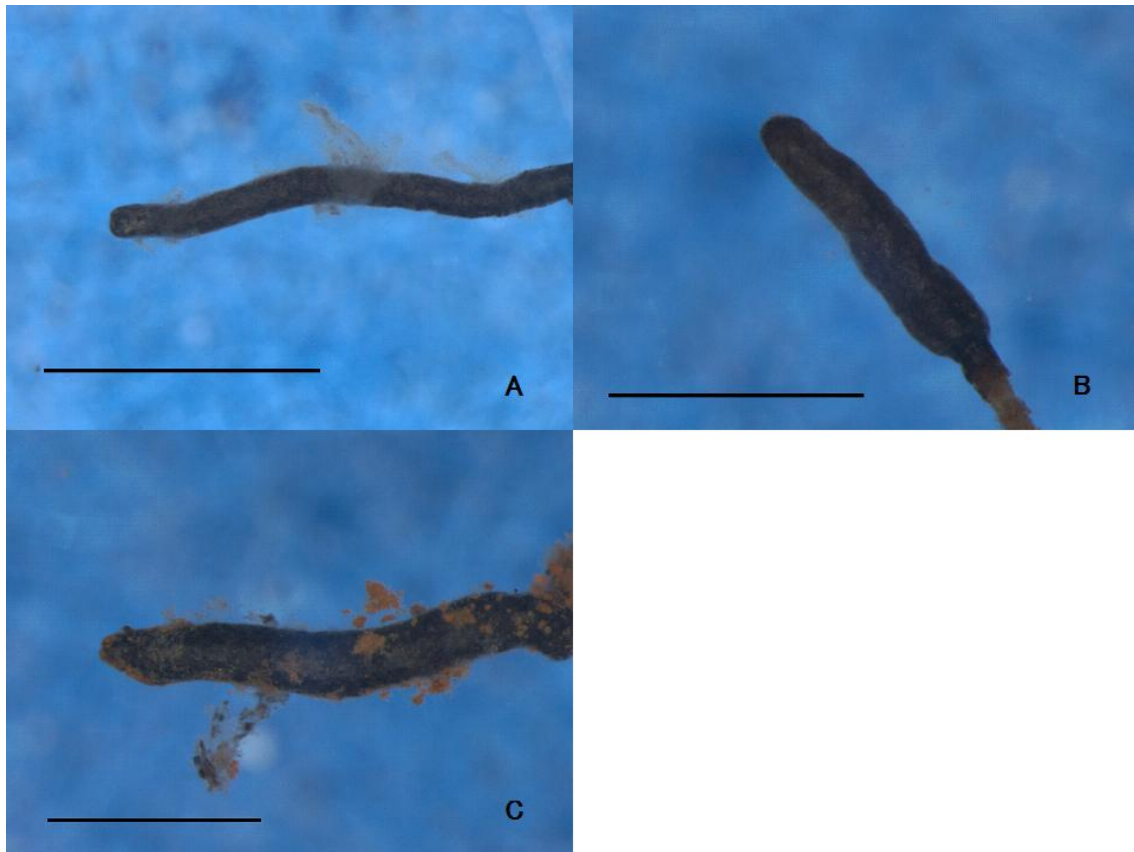


図 2-3-4. 観察された菌根の形態. A: 舍資鎮で採取した菌根. B: 建塘鎮で採取した菌根. C: 太安郷で採取した菌根. バーはすべて 1mm.



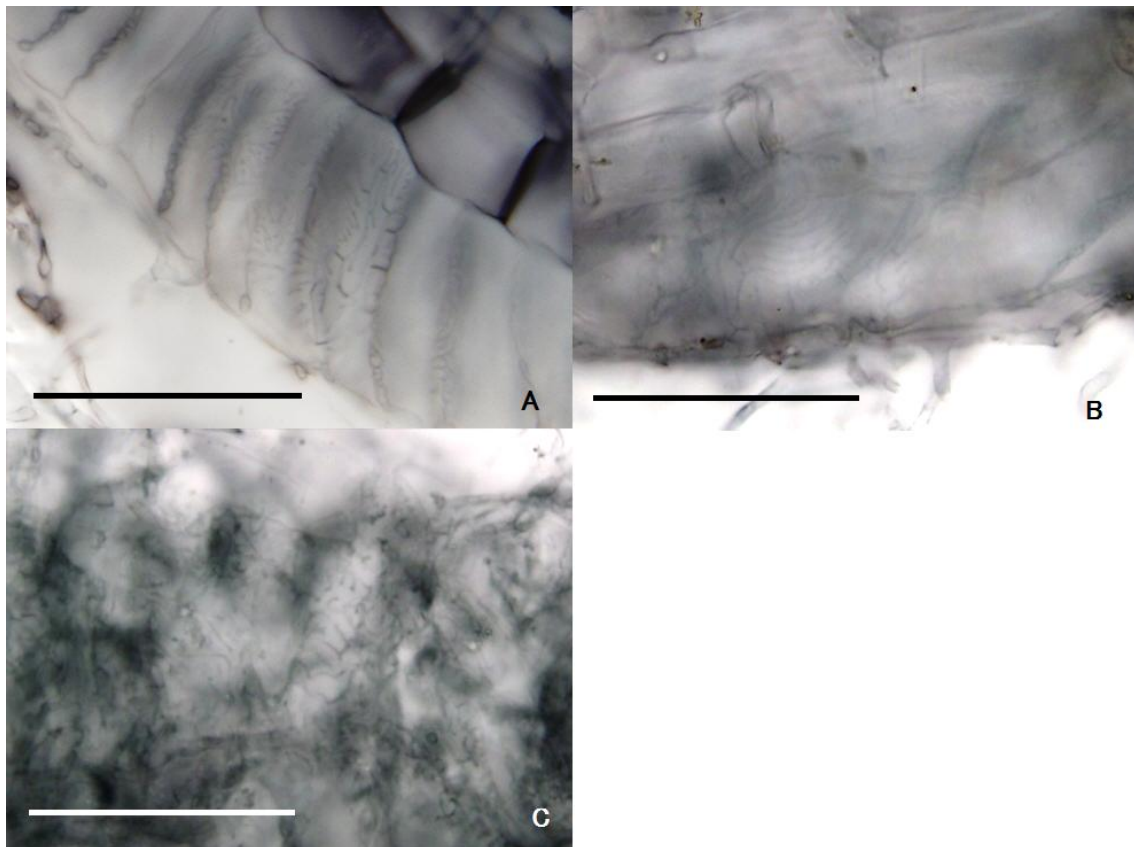


図 2-3-5. 菌根中に観察されたハルティヒネット. A: 舍資鎮で採取した菌根. B: 建塘鎮で採取した菌根. C: 太安郷で採取した菌根. バーはいずれも 50 $\mu$ m.

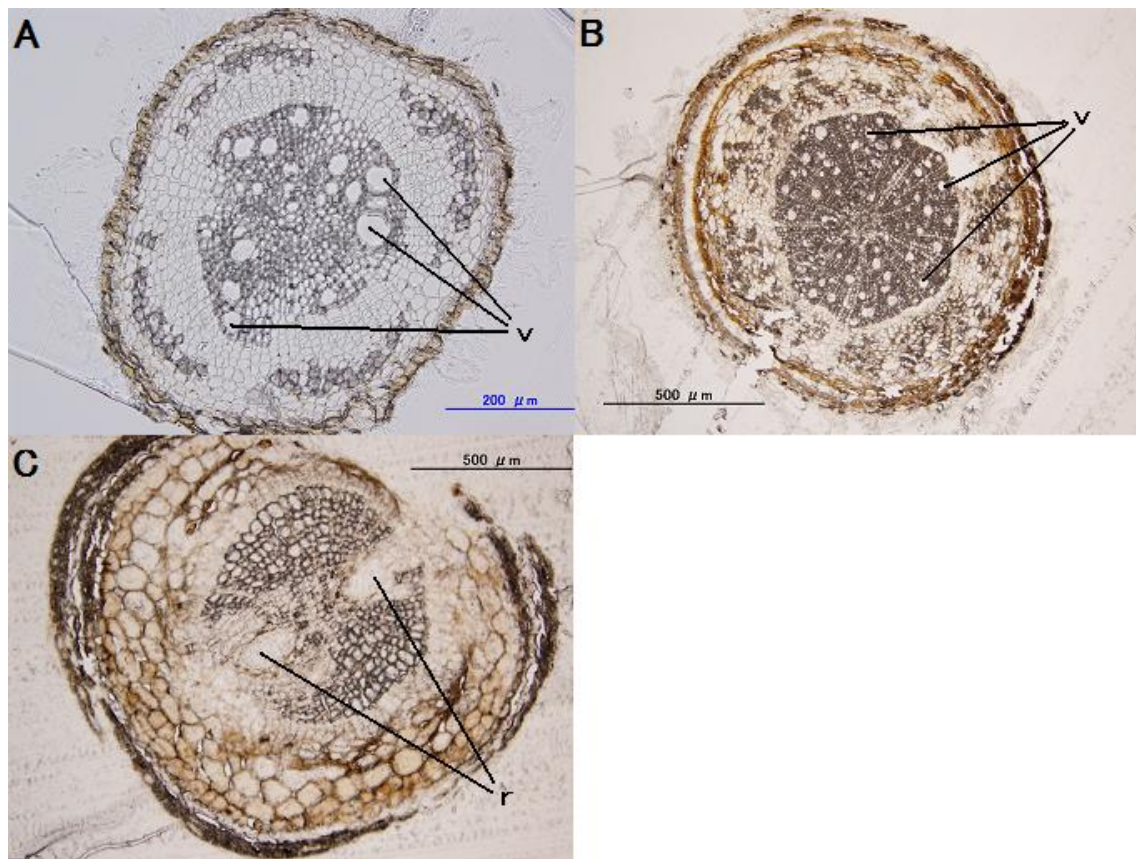


図 2-3-6. 菌根に接続した直根の横断面. A: 舍資鎮で採取した根. B: 建塘鎮で採取した根. C: 太安郷で採取した根. v: 導管, r: 樹脂道.

## 考察

PCRにより、シロ中に形成されていた菌根から、日本のマツタケと同一サイズのDNA断片が増幅された。また、発生していた子実体から分離した菌株のrDNAのITS領域の塩基配列は、日本産のマツタケと完全に一致することがわかっている(Matsushita et al. 2005)。これらの結果から、形成されていた菌根はマツタケのものであると考えられる。

観察された菌根は表面全体が先端部まで一様に黒色で、棒状もしくは不規則に膨らんだ形態をしていた。また、菌根表面にはほとんど菌糸は観察されなかったが、表面にごくわずかに白色の菌糸を帯びているものもみられた。これらの特徴は日本のマツタケのシロで見られる菌根とよく一致しており、Gill and Suzuki (2000b) の分類に従うと、マツタケ菌根の最も発達した段階であるタイプ4に相当していると考えられる。菌根の発達段階は3ヶ所すべての採取地で共通しており、採取地の間で差はみられなかった。これは、シロサンプルを採取した場所が子実体発生位置の付近であり、子実体が発生するのは、シロの構造の中で成熟した菌根を多く含む層の位置のため(小川 1975a) であると考えられる。

細根につながる根の解剖観察において、舍資鎮および建塘鎮の根では切片中に導管が観察された。このことから、この2箇所においてはマツタケが広葉樹を宿主としていることが確認された。しかし、これらが現地で優占していたブナ科樹木であるかは確かめられていない。一方、太安郷の根では導管は観察されず、木部樹脂道が観察された。木部樹脂道の存在はマツ科樹木には知られているが(Cutler et al. 1987; Biswas and Johri 1997)、ブナ科樹木では知られていない(Metcalf and Chalk 1983)。このことから、太安郷においては優占していたウンナンマツ、あるいはタカネゴヨウがマツタケの宿主になっている可能性が高いと考えられる。このうち、ウンナンマツについては四川省においてマツタケと菌根を形成していることがわかっているが(富永ら 1989)、タカネゴヨウがマツタケと菌根を形成した例は知られていない。

以上のことから、雲南省産のマツタケは、広葉樹およびマツ属樹木を宿主とすることがわかった。

## 2-3-2 ブナ科樹木への接種試験

### 材料と方法

#### 接種源の作製

中国雲南省の3箇所、楚雄彝族自治州禄豊県舍資鎮、迪慶藏族自治州香格里拉県建塘鎮、麗江市玉竜納西族自治県太安郷の森林から、マツタケの子実体を採取し、分離した菌株（それぞれ TmY1, TmY11, TmY6, Matsushita et al. 2005）を用いた。対照として、日本産の T2 菌株を用いた。接種源の作製方法は1節と同様に行った。ただし、液体培地は 1000ml 容三角フラスコ中に 100ml とし、そこに直径 9 cm シャーレ 1 枚分の菌糸体を接種した。

#### 培土の調整

培土にはパーライト、バーミキュライトを体積比で等量混合したもの（PV 培土）、パーライト、バーミキュライト、弥生土、芝目土を体積比で等量混合したもの（土壌培土）の2種類を用いた。培土は 121℃、60 分間オートクレーブして使用した。

#### 実生苗の作製

宿主にはシラカシ（*Quercus myrsinifolia*）、コナラ（*Quercus serrata*）、スダジイ（*Castanopsis sieboldii*）、およびアカマツを供試した。シラカシ、コナラ、スダジイの種子は水道水の流水中に 1 日浸漬した後、オートクレーブ滅菌した培土にならべ、その上に種子が隠れる程度に培土をかぶせた。播種後、自然光室（昼間 25℃、夜間 20℃）内で 1 年間栽培した。アカマツ種子は蒸留水中に 1 日浸漬した後、30%過酸化水素水に 15 分間浸漬して表面殺菌したものを同様に播種した。播種後、23℃、200 $\mu$ mol $\cdot$ s $^{-1}$  $\cdot$ m $^{-2}$ （明期 16 時間、暗期 8 時間）の条件下で 7 ヶ月間栽培した。灌水はいずれも水道水を適宜与えた。

栽培後、作製した苗の根から培土を脱イオン水で洗い落とした。根は約 10cm を残して切り詰め、発根促進剤（メネデール 100 倍溶液）に 1 時間浸した。その後、苗を 2 本ずつ平箱に植えつけ、接種まで 5 週間栽培した。栽培には、プラスチック製の平箱（21×15×3cm）を超音波カッターで半分の厚さにし、上端を切り落としたものを漂白剤で除菌して用いた。培土には上述した PV 培土と土壌培土の 2 種類を用い、それぞれの培土で各樹種で 1 箱ずつ作製した。灌水は、PV 培土は Pine Solution、土壌培土は脱イオン水を週に 2 回与えた。

## 実験の処理と接種

あらかじめ 2 本ずつ苗を植えてある平箱を開け、細根の発根している部位に菌糸片を置いた。接種量は、中国産 3 菌株は平箱ひとつあたりに 1/2 フラスコ分、T2 菌株は 1/3 フラスコ分とした。各菌株について、4 樹種すべてに対して、2 種類の培土で接種を行った。接種後、各平箱は蓋をして輪ゴムで止め、培土部分はアルミ箔で遮光した。すべての平箱は 23°C, 200 $\mu$ mol $\cdot$ s $^{-1}$ m $^{-2}$ (明期 16 時間, 暗期 8 時間)の条件下で 4 週間栽培した(図 2-3-7)。灌水は、PV 培土は Pine Solution, 土壌培土は脱イオン水を週に 2 回与えた。

## 菌根の観察と DNA 解析

採取した苗の接種部付近の根を実体顕微鏡下で観察し、根毛を欠き、菌根と思われる細根の有無を記録した。観察された細根が菌根であるかを確認するため、ハルティヒネットの観察を行った。ハルティヒネットが観察された場合には、形成された菌根がマツタケのものであることを確認するために DNA 解析を行った。ハルティヒネットの観察では、各苗につき 12-20 根端を採取し、70%エタノールに浸漬して保存した。Gill et al. (1999) の方法に従って採取した細根の染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

DNA 解析では、ハルティヒネット観察に用いた根端と同所的に存在していた根端を採取して-20°Cで冷凍保存した。また、残存していた接種源も採取した。保存されたサンプルを凍結乾燥した後に、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社)を用いて DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。マツタケ特異的プライマー対 (TmF と TmR) (Kikuchi et al. 2000) を用いた PCR により、DNA を増幅した。PCR の方法はシロから採取した菌根と同様に行った。

## 結果

接種 4 週間後に観察した細根の接種部付近において、菌根と考えられる細根が観察された(図 2-3-8)。一部の細根は、棒状で、基部の側がやや膨らんだ形態をしていた(図 2-3-8A)。しかし、多くの細根は根毛を欠くほかは接種部以外の部位の細根と外観上は変化がみられず、菌根の識別は困難であった。細根の色は通常の根毛を持った細根と変わらなかった。一方、アカマツでは接種源の中に細根が侵入し、分岐している様子がしばしば観察された(図 2-3-8B)。培土中ではマツタケのものと思われる白色の菌糸はほとんど観察されず、混入した糸状菌が多数認められた。しかし、菌鞘が発達していたり、根端の色が異なってい



図 2-3-7. 実験に使用した平箱. 樹種はシラカシ. バー, 10cm.

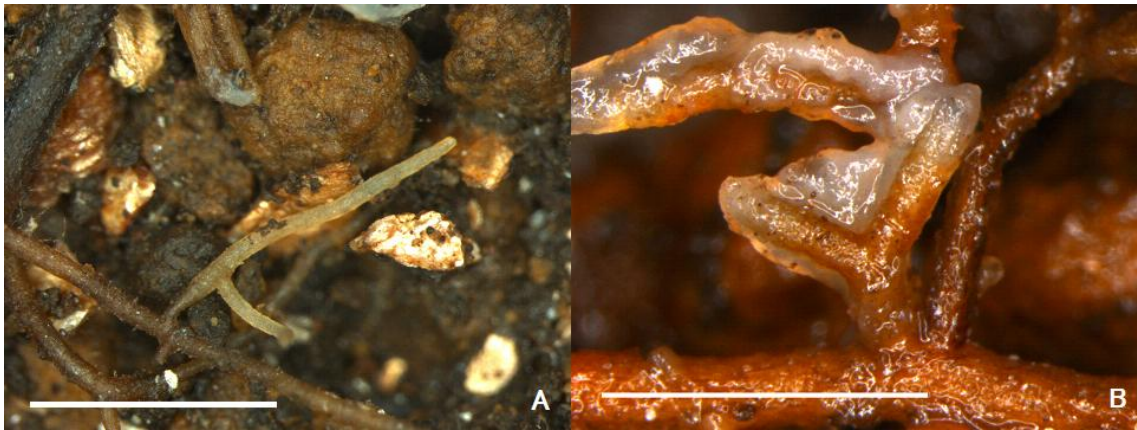


図 2-3-8. 観察された菌根. A: シラカシに TmY1 菌株を接種した細根, B: アカマツに TmY11 菌株を接種した細根. バー, 2mm.



るなどの、マツタケ菌根と明らかに異なる形態的特徴を持つ菌根は、いずれの培土においても観察されなかった。

表 2-3-1 に樹種と菌株の組み合わせごとにハルティヒネットの観察結果を示す。シラカシ、アカマツではすべての菌株でハルティヒネットが観察された（図 2-3-9A, B）。コナラでは TmY1 菌株を除く 3 菌株でハルティヒネットが観察された（図 2-3-9C, D）。スダジイでは TmY1 と T2 菌株でハルティヒネットが観察された。形成されていたハルティヒネットには樹種、菌株間で形態的な差は認められなかった。これらのハルティヒネットの観察された菌株と樹種の組み合わせについて、抽出した DNA の増幅を試みたところ、すべての組み合わせにおいて、同一分子サイズの DNA が増幅された（図 2-3-10）。一方、ネガティブコントロールでは、マツタケの DNA 断片と同一サイズの DNA の増幅はみられなかった。

## 考察

マツタケ 4 菌株の接種により、ブナ科 3 樹種とアカマツに菌根が形成された。また、ハルティヒネットの観察された菌株と樹種の組み合わせについて、抽出した DNA の増幅を試みたところ、すべての組み合わせにおいて、同一分子サイズの DNA が増幅された。現在までに、マツタケとアカマツの形成する菌根の形態は Gill and Suzuki (2000b, 2000c) によって詳細に観察されているが、ブナ科樹種と形成した菌根の発達過程についてはまったくわかっていない。また、シロ中から採取したマツタケ菌根はすべて成熟段階のものであったため、ブナ科樹種において発達途上段階にあるマツタケ菌根については比較できる資料がない。しかし、染色観察においては、根の周囲には雑菌の混入が多くみられたが、ハルティヒネットを形成している菌糸の形態は、シロから採取した菌根やアカマツの根と形成したハルティヒネットと一致していた。また、ハルティヒネットが観察された根端であっても発達した菌鞘を形成せず、特異的な色を呈さないなどの特徴はアカマツに形成された若いマツタケ菌根と共通していた。さらに、ハルティヒネットの観察された樹種と菌株の組み合わせのすべてにおいてマツタケ特異的な DNA の増幅がみられたことから、形成された菌根はマツタケのものであると考えられる。今後、滅菌環境下での接種試験により、形成される菌根を観察することで、ブナ科樹種に形成されるマツタケ菌根の形態的な発達過程について明らかにされるものと考えられる。

ハルティヒネットの形成された菌株と樹種の組み合わせと、菌株の採取地の林相には関連がみられず、また、日本産の T2 菌株でもブナ科樹種と菌根を形成したことから、マツタ



表 2-3-1. ハルティヒネットの観察された宿主と菌株の組み合わせ

	シラカシ	コナラ	スダジイ	アカマツ
TmY1	+	—	+	+
TmY11	+	+	—	+
TmY6	+	+	—	+
T2	+	+	+	+

\* +はハルティヒネットが観察されたことを，—は観察されなかったことを示す．

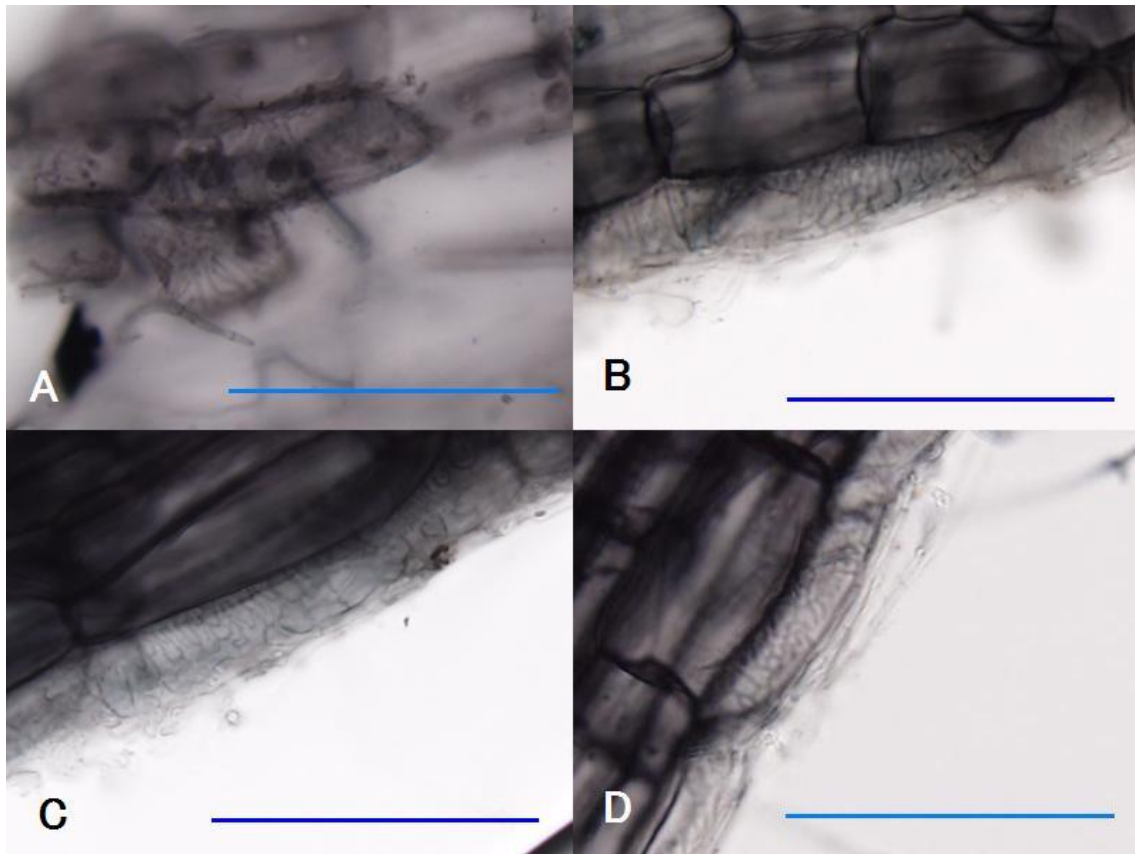


図 2-3-9. 観察されたハルティヒネット. A : シラカシに TmY1 菌株を接種した細根, B : シラカシに T2 菌株を接種した細根, C : コナラに TmY11 菌株を接種した細根, D : コナラに TmY6 菌株を接種した細根. バーはすべて 50 $\mu$ m.

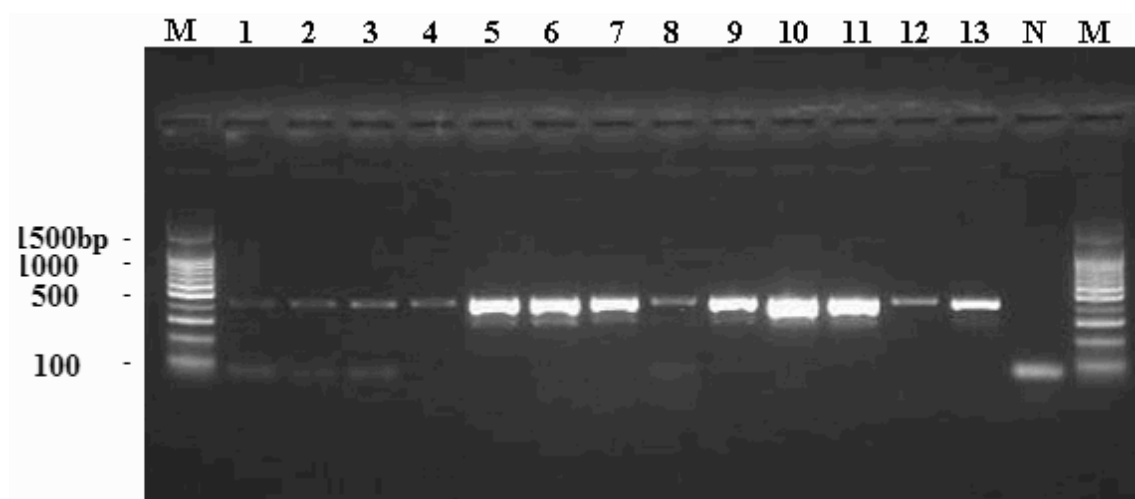


図 2-3-10. マツタケを接種した細根から抽出した DNA の、マツタケ特異的プライマーによる増幅結果. M : 100 bp サイズマーカー, 1 : シラカシ+TmY1, 2 : シラカシ+TmY11, 3 : シラカシ+TmY6, 4 : シラカシ+T2, 5 : コナラ+TmY11, 6 : コナラ+TmY6, 7 : コナラ+T2, 8 : スダジイ+TmY1, 9 : スダジイ+T2, 10 : アカマツ+TmY1, 11 : アカマツ+TmY11, 12 : アカマツ+TmY6, 13 : アカマツ+T2, N : 蒸留水 (対照).

ケはブナ科樹種を宿主とする系統とマツ科樹種を宿主とする系統に分化しているわけではなく、ひとつの菌株が、ブナ科樹種とマツ科樹種の両方を宿主とすることができると考えられる。分子生物学的な研究では、中国雲南省において、優占する樹木の異なる森林間でのマツタケの遺伝的交流が示唆されている (Xu et al. 2008)。また、雲南省産や四川省産の菌株と、吉林省や日本産の菌株の分子生物学的な比較により、地理的な変異はみられる (Bao et al. 2007; Murata et al. 2008) もの、rDNA の ITS 領域の配列はきわめて同一性が高いこと (Matsushita et al. 2005; Sha et al. 2007b; Xu et al. 2008)、また、ITS 領域よりも変異速度が大きいとされる IGS 領域の配列においても制限酵素による DNA の断片パターンが共通であること (Sha et al. 2007a, 2007b) から、これらの産地間での遺伝的な分化の程度は小さいと考えられる。こうしたことから、日本産のマツタケについても、潜在的にブナ科樹木との菌根形成能力を持っていると考えられる。本実験では日本産のブナ科樹種を用いたが、今後、雲南省の現地で共生しているとされる樹種を用いた接種試験が必要とされる。

一方、日本やその周囲に分布するマツタケでは針葉樹以外との共生は確認されておらず、なぜ中国南西部でブナ科広葉樹との共生がみられるのかはわかっていない。中国雲南省では、マツタケは日本と比較して低緯度、高標高の場所に発生し、気象条件や土壌条件も日本のマツタケ発生林とは異なっている (富永ら 1981)。日本のアカマツ林でも、マツタケのシロの存在する環境条件は、貧栄養土壌で乾燥気味の場所に限られている (小川 1978)。広葉樹が多く存在するアカマツ林では腐植層が厚くなり、マツタケの生育に有害な競合する菌類が増加することから、マツタケの生育には適していないことが知られている。日本においてマツタケがマツ科針葉樹のみと共生しているのは、樹種だけでなく、こうした環境条件にも左右されている可能性が考えられる。

### 3 章 界面活性剤による菌糸体成長促進作用の検討

#### はじめに

マツタケは、土壤中にシロを形成しながら生息域を拡大し、子実体を形成する。このため、シロを人工的に形成させることが人工栽培にいたる重要なステップとなると考えられている（鈴木 2005）。マツタケは培地上での菌糸成長が非常に遅いため、効率よくシロを形成、発達させるためには、菌糸体成長を促進させる手法を確立することが重要である。また、ホンシメジに代表される一部の種では、外生菌根菌の単独培養で、子実体原基や成熟した子実体の発生がみられている（表 1-2）。ホンシメジにおいては、デンプンを炭素源として利用する能力の高さが、単独での子実体形成成功の理由のひとつとして挙げられている（Ohta 1997; 太田 1998）。したがって、おが屑やデンプンを分解する能力が認められている（Ohta 1997; 太田 1998; Vaario et al. 2002; Kusuda et al. 2003, 2006）マツタケにおいても、単独培養による子実体を形成する可能性がある。このため、菌糸体の大量増殖手法の発達には、純粋培養による子実体形成法においても有益であると考えられる。

Tween80 は、培土へ添加することにより、マツタケの菌糸体成長を促進することや（Guerin-Laguet et al. 2003; Lun et al. 2006）、また、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性を増大させることでアカマツ樹皮の利用を促進すること（Vaario et al. 2002）が明らかにされている。また、Tween をはじめとする界面活性剤の添加により、各種の細胞壁分解酵素の収量や活性が増大することが、さまざまな菌類で知られている（Reese and Maguire 1969; Park et al. 1992; Okeke and Obi 1993; Gomes et al. 1994; Pushalkar et al. 1995; Pardo 1996）。その理由として、界面活性剤は細胞に結合している酵素の遊離を促進させるほか、膜透過性を変化させることで酵素の分泌量を増やすことが考えられている。一方、Tween80 を添加することにより、菌糸体成長が増加することも知られている（Unestam and Sun 1995; Pardo 1996; Yang et al. 2000; Hsieh et al. 2008）。疎水性の外生菌根菌の菌糸においては、界面活性剤や植物油によって菌糸の疎水性が緩和され、培地への接触が増えて養分吸収が増大したこと、また、接触部では菌糸を経由した養分の輸送に頼らずに、その場の養分で増殖できることが理由として考えられている（Unestam and Sun 1995）。マツタケにおいては、Guerin-Laguet et al. (2003) が、炭素源の欠乏した寒天培地では菌糸体成長が続かないことと、炭素源を含む寒天培地では、菌叢の形態が Tween80 やオリーブ油の添加によって培地中へもぐりこむような形態へ変化することから、Tween 添加による土壤中での

菌糸体成長促進は炭素源としてではなく、菌糸の疎水性の変化や酵素活性の増大により、養分吸収が促進されたことによると考察している。

土壌の性質は滅菌処理によって、滅菌前の状態から変化することが知られており (Trevors 1996; Berns et al. 2008), その変化は滅菌法により異なる。オートクレーブは土壌の表面積などの物理性を変化させるが (Lotrario et al. 1995), ガンマ線処理は土壌の物理性にほとんど影響しない (McNamara et al. 2003)。一方、化学性については、いずれの滅菌法も影響を与えるが、オートクレーブ滅菌よりもガンマ線滅菌のほうが影響は小さい (Salonius et al. 1967; McNamara et al. 2003)。これまでのマツタケの菌糸体成長に関する研究はオートクレーブ滅菌によって行われており、ガンマ線滅菌による評価は行われていない。

本章では、マツタケ菌糸の成長促進効果が確認されている非イオン系界面活性剤の Tween80 について、その促進効果を高めることを目的として、培土と Tween80 の滅菌方法について検討した。また、Tween80 が宿主であるアカマツや、他種の外生菌根菌に及ぼす影響についてあわせて検討した。

### 3-1 培土へ添加した Tween80 が外生菌根菌の菌糸成長に及ぼす影響

Tween80 がマツタケの菌糸体成長を促進することは知られているが (Guerin-Laguette et al. 2003), この促進効果に対するオートクレーブ処理の影響はわかっていない. そこで, Tween80 添加による菌糸体成長促進効果を高めるため, 培土および Tween80 の滅菌法がマツタケの菌糸体成長へ及ぼす影響について検討した. また, Tween80 が他種の外生菌根菌に及ぼす影響についてもあわせて検討した.

#### 材料と方法

##### 接種源の作製

供試菌株はマツタケ (T2 菌株) のほか, ホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*), キツネタケ (*Laccaria laccata*), アミタケ (*Suillus bovinus*), アカハツ (*Lactarius akahatsu*) を用いた. 各菌株を, 厚さ 3mm の 5X 寒天培地上で 23°C, 暗黒下で培養した. 菌叢外縁部からコルクボーラーで寒天片 (直径 5mm) を打ち抜き, 直径 9 cm シャーレ中の 5X 平板培地に 5 片ずつ接種し, 23°C, 暗黒下で 4 週間培養した. 培養菌糸の菌叢を 5~10mm<sup>3</sup> 角に培地ごと切り取り, シャーレ 1 枚分を 100ml の 5X 液体培地に接種し, 4 週間静置培養した. 得られた菌糸体を 40ml の培地中で, ブレンダー (AM-3 Ace Homogenizer, 日本精機) を用いて 12500rpm で 2 秒間破碎した. さらに同条件で, もう 1 回破碎した後, 破碎した菌糸体を 200ml の新たな培地に培地ごと添加した. ただし, アカハツは液体培地中での菌糸成長が遅いため, 破碎を 1 回のみ行った. これを 1000ml 容三角フラスコ 2 つに分注し, 23°C, 暗黒下で 3 日間静置培養した. 得られた培養菌糸体を, オートクレーブ滅菌したナイロンメッシュ (メッシュサイズ 24×30  $\mu$ m) で集め, 300ml の 10mM MES 溶液 (pH 5.1) で洗浄した後, 100ml の 10mM MES 溶液 (pH 5.1) に懸濁させ, 接種源とした.

##### 培土の調製

培土には弥生土を使用した. 滅菌法が菌糸成長に与える影響を調べるため, 培土と Tween80 のそれぞれをオートクレーブとガンマ線によって滅菌し, それを組み合わせる培土とした (表 3-1-1 の AA, AG, GA, GG 処理). オートクレーブは 121°C, 30 分間行った後, さらに 1 週間後に 121°C, 20 分間行った. ガンマ線滅菌は日本アイソトープ協会甲賀研究所で, コバルト 60 ガンマ線照射を行った. 照射線量は 25.5~29.4kGy であった.

Tween80 は蒸留水に溶解させた状態で滅菌を行った。以上の 4 種類に加え、対照として、培土と Tween80 をあらかじめ混合してからオートクレーブまたはガンマ線滅菌した 2 種類（表 3-1-1 の mA, mG 処理）、および、滅菌蒸留水を滅菌した培土に添加した 2 種類（表 3-1-1 の cA, cG 処理）の、合計 8 種類の処理を各菌株に行った。Tween80 の添加量は 5% (w/v) とし、すべての処理において、最終的な水分量は土壌に対して 20% (w/v) となるように調整した。

### 接種および菌糸体量の解析

調整した培土を 35ml ずつ 9cm シャーレに入れ、そこへ 5ml の菌糸懸濁液をシャーレ全面に分散するように、滅菌したピペットで滴下して接種した。反復は処理ごとに 5 つとした。23℃暗黒下で 12 週間培養後、培土を菌糸ごと乳鉢で粉碎し、凍結乾燥した。サンプルに冷エタノール（和光純薬工業）を 5ml 添加した後に攪拌し、エルゴステロールを抽出した。サンプル量は含まれる菌糸体量に応じて、0.75～5.64g とした。エルゴステロール量の測定は Martin et al. (1990) の方法に従って行った。分析には日立社の HPLC 装置 (L-7100 ポンプ, L-7200 オートサンプラー, L-7300 カラムオープン, L-7400UV 検出器, D-7500 分析装置) を用いた。測定波長は 280nm とした。

### 統計解析

得られたエルゴステロール量のデータは Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。解析は JMP5.0.1J (SAS Institute) で行った。

## 結果

### 培土への Tween80 添加による菌糸成長量の増加

接種 12 週間後の菌糸体の成長の様子を図 3-1-1 から図 3-1-5 に、また、培土中のエルゴステロール量を図 3-1-6 に示した。マツタケの AA および mG 処理、アミタケの mG 処理では菌糸の成長がみられず、エルゴステロールが検出されなかったが、ほかの菌株と処理の組み合わせでは菌糸体成長がみられた。5 菌株の各培土への応答をみると、全般的に成長量の小さいマツタケ、アミタケ（低成長グループ）と、全般的に成長量の大きいホンシメジ、キツネタケ、アカハツ（高成長グループ）の 2 つのタイプに分けられた。低成長グループでは、いずれも最大のバイオマスを示したのは GG 処理であったが、GG 処理において



表 3-1-1. 実験の処理および培土の滅菌法

略称	培土の組成
cA	オートクレーブした培土のみ（対照）
cG	ガンマ線滅菌した培土のみ（対照）
AA	培土および Tween80 を個別にオートクレーブした後に，混合したもの
AG	オートクレーブした培土とガンマ線滅菌した Tween80 を混合したもの
GA	ガンマ線滅菌した培土とオートクレーブした Tween80 を混合したもの
GG	培土および Tween80 を個別にガンマ線滅菌した後に，混合したもの
mA	培土および Tween80 を混合した後にオートクレーブしたもの
mG	培土および Tween80 を混合した後にガンマ線滅菌したもの

オートクレーブは 121℃，30 分間行い，さらに 1 週間後に 121℃，20 分間行った．

ガンマ線滅菌の照射線量は 25.5～29.4kGy であった．

も、エルゴステロール量はマツタケで  $24.2\mu\text{g} / \text{g dry soil}$ 、アミタケで  $17.1\mu\text{g} / \text{g dry soil}$  と低く、また、各培土のうちで、好適な処理条件以外ではほとんど菌糸体成長がみられなかった。また、mG 処理においてまったくエルゴステロールが検出されなかったことも共通していた。一方、高成長グループは、ホンシメジの mA 処理で  $99.1\mu\text{g} / \text{g dry soil}$ 、キツネタケの GA 処理で  $178.2\mu\text{g} / \text{g dry soil}$  のエルゴステロールが検出され、非常に成長が旺盛であった。また、対照処理である cA および cG 処理に対し、ほぼすべての培土でバイオマスが増加していたことも低成長グループとは対照的であった。アカハツではバイオマスが最大であった mG 処理でも、エルゴステロール量が  $22.8\mu\text{g} / \text{g dry soil}$  と同グループのほか 2 種の値と比較して低い値であったが、アカハツは一般的な培地上でもこの 2 種と比べて成長が遅いこと、また、AG を除く各培土でバイオマスの増加がみられたことから、低成長グループと高成長グループの中間的な性質ながら、後者に属すると考えられた。

#### Tween80 および培土の滅菌法が与える影響

個別滅菌法において、オートクレーブ滅菌した Tween80 およびガンマ線滅菌した Tween80 を添加した処理のそれぞれにおいて、オートクレーブ滅菌した培土とガンマ線滅菌した培土を比較した場合、エルゴステロールの検出されなかったマツタケの AA 処理を除く、すべての組み合わせ、菌株において、ガンマ線滅菌培土を使用した処理におけるエルゴステロール量が、オートクレーブ培土を使用した処理よりも有意に大きな値を示した。また、Tween80 非添加処理の cA 処理と cG 処理を比較した場合でも、ホンシメジにおいては cG 処理のエルゴステロール量は cA 処理よりも有意に大きな値を示したが、マツタケを含むほかの 4 菌株では有意差はみられなかった。

一方で、培土の滅菌法の共通する処理において、Tween80 の滅菌法の影響を比較すると、菌株によって反応が異なった。ホンシメジ、キツネタケ、アカハツにおいては、オートクレーブ処理のほうがガンマ線滅菌処理と比較して、エルゴステロール量が大きな値を示すか、または両者の間に差がみられなかった。マツタケにおいては逆に GG 処理のエルゴステロール量は GA 処理に比べて約 16 倍と、極めて大きな値を示した。アミタケのエルゴステロール量には Tween80 の滅菌法の影響はみられなかった。マツタケの場合を除き、Tween80 の滅菌法がエルゴステロール量に及ぼす影響は培土の滅菌法による影響よりも小さかった。

オートクレーブ前に培土と Tween80 を混合した mA 処理の場合、アカハツを除く 4 菌株

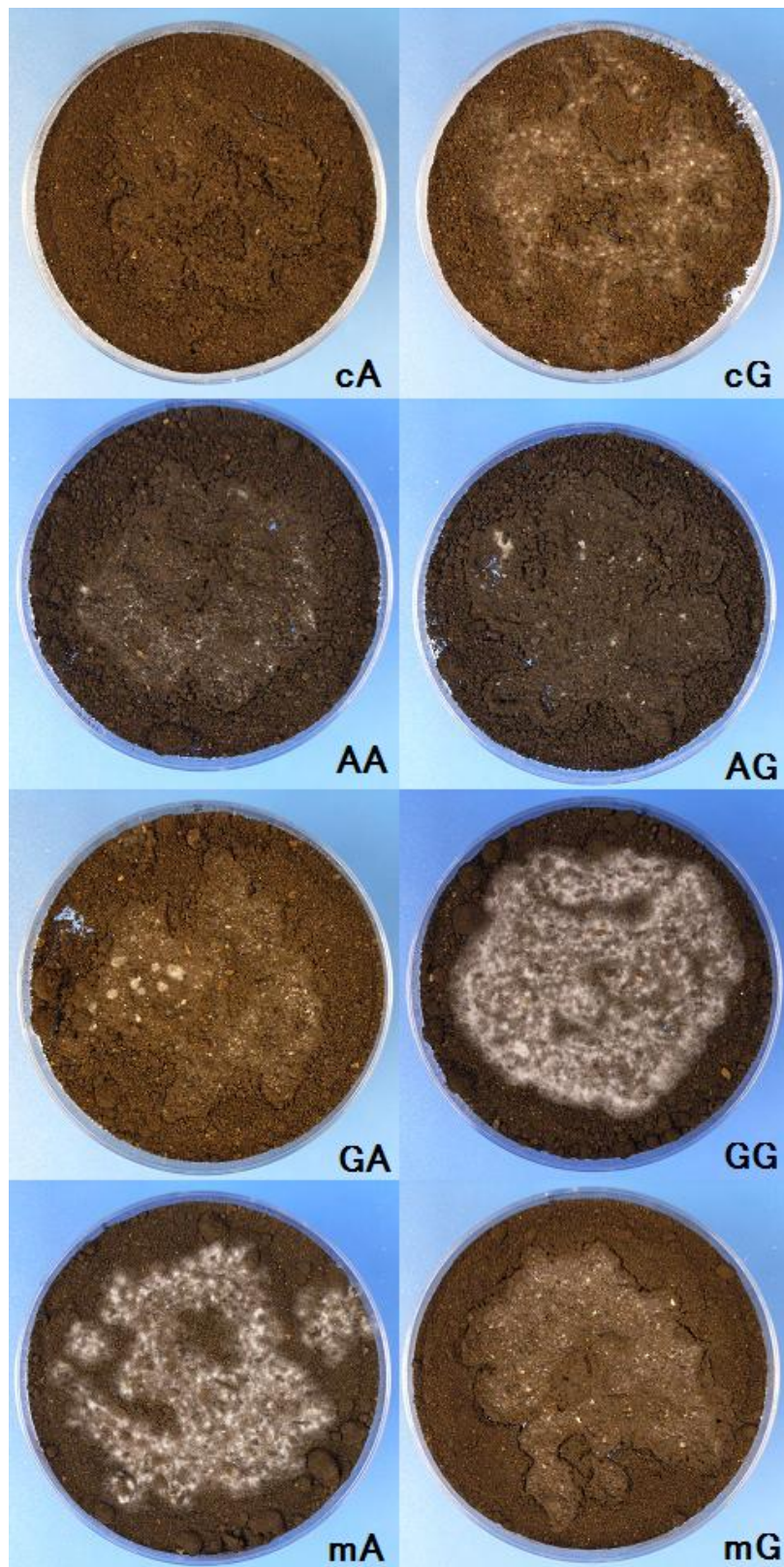


図 3-1-1. 接種 12 週間後のマツタケの菌糸体成長の様子. 培土の名称は表 3-1-1 と同じものを使用した.



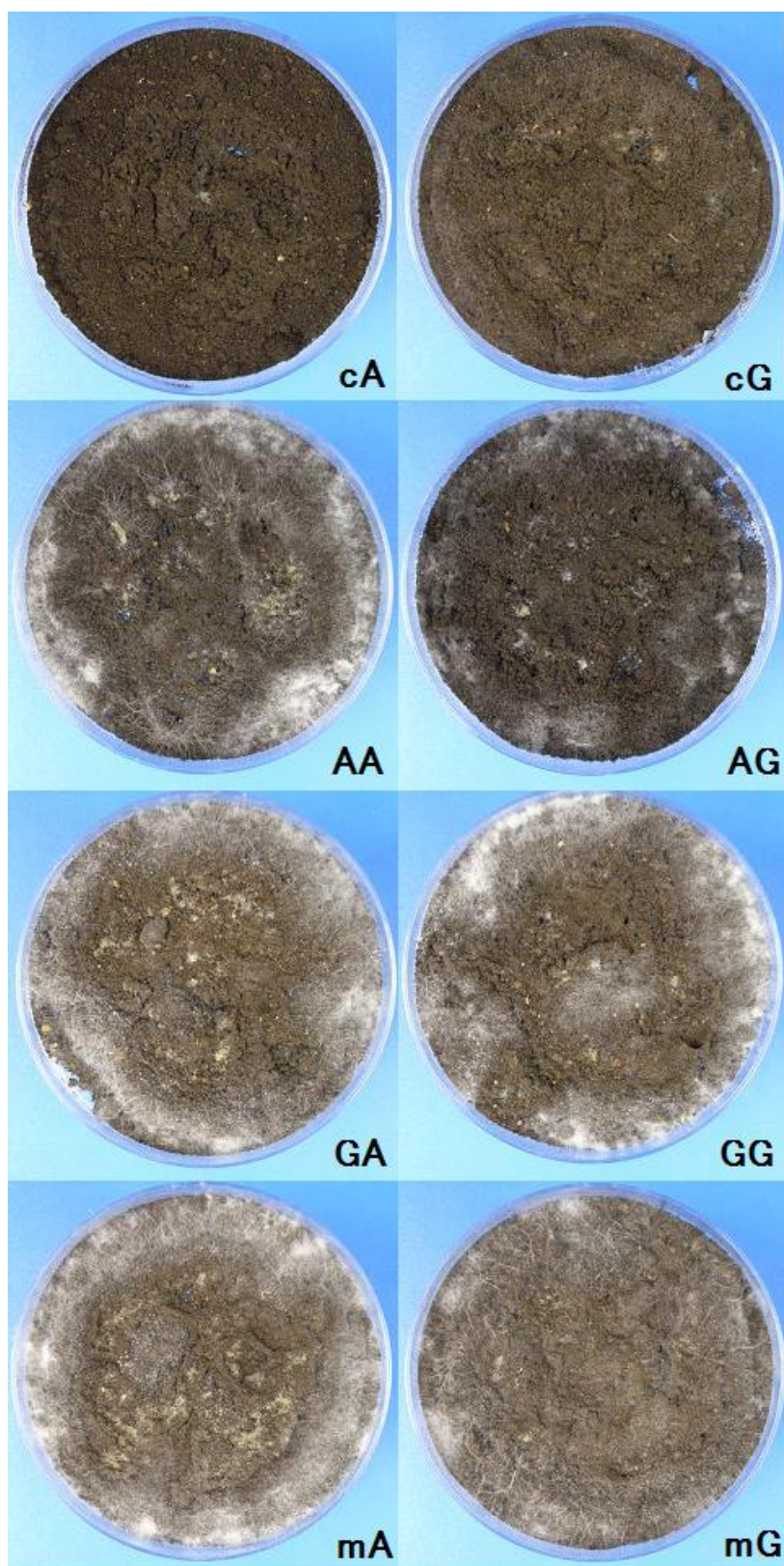


図 3-1-2. 接種 12 週間後のホンシメジの菌糸体成長の様子．培土の名称は表 3-1-1 と同じものを使用した．

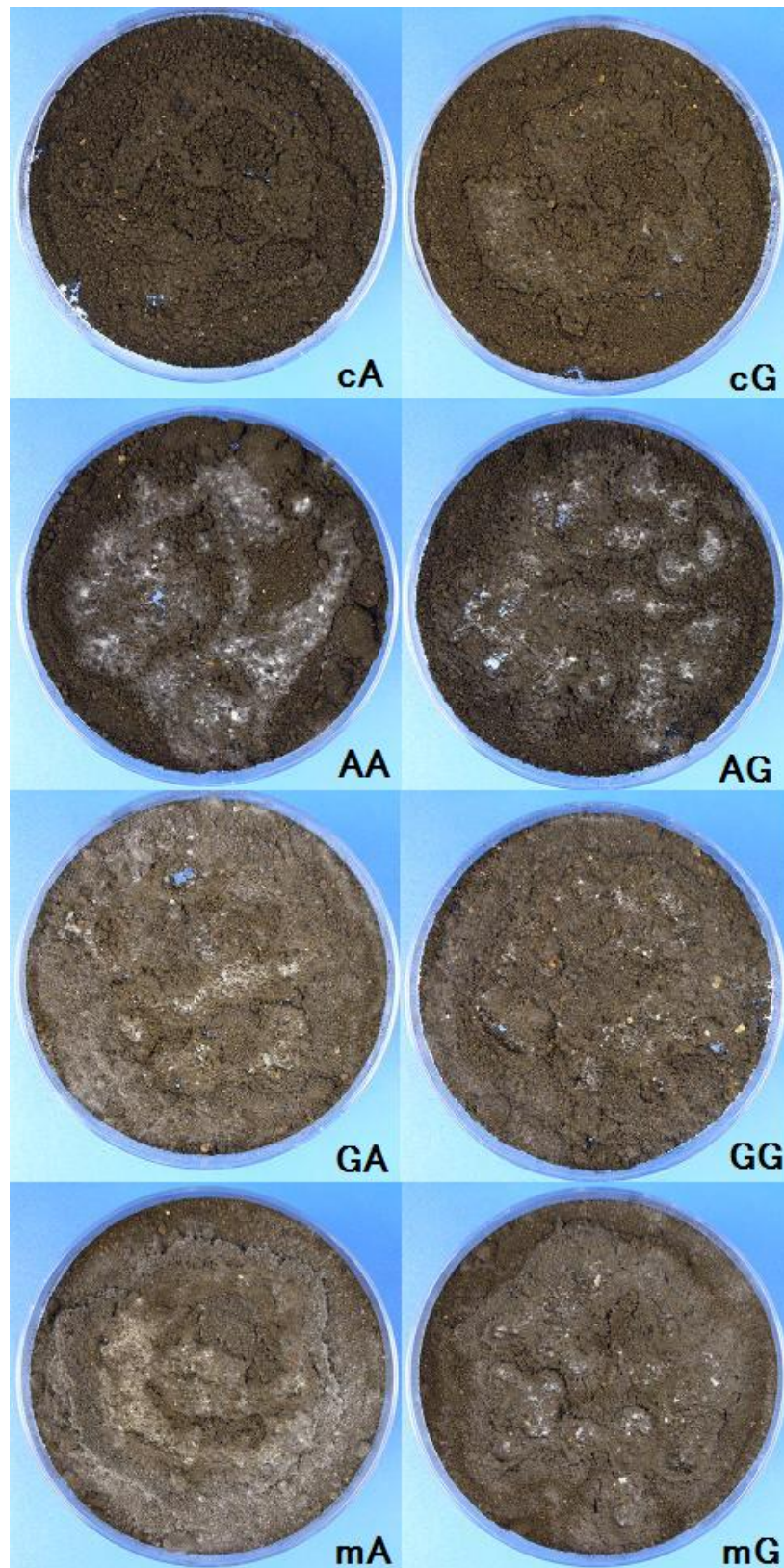


図 3-1-3. 接種 12 週間後のキツネタケの菌糸体成長の様子。培土の名称は表 3-1-1 と同じものを使用した。



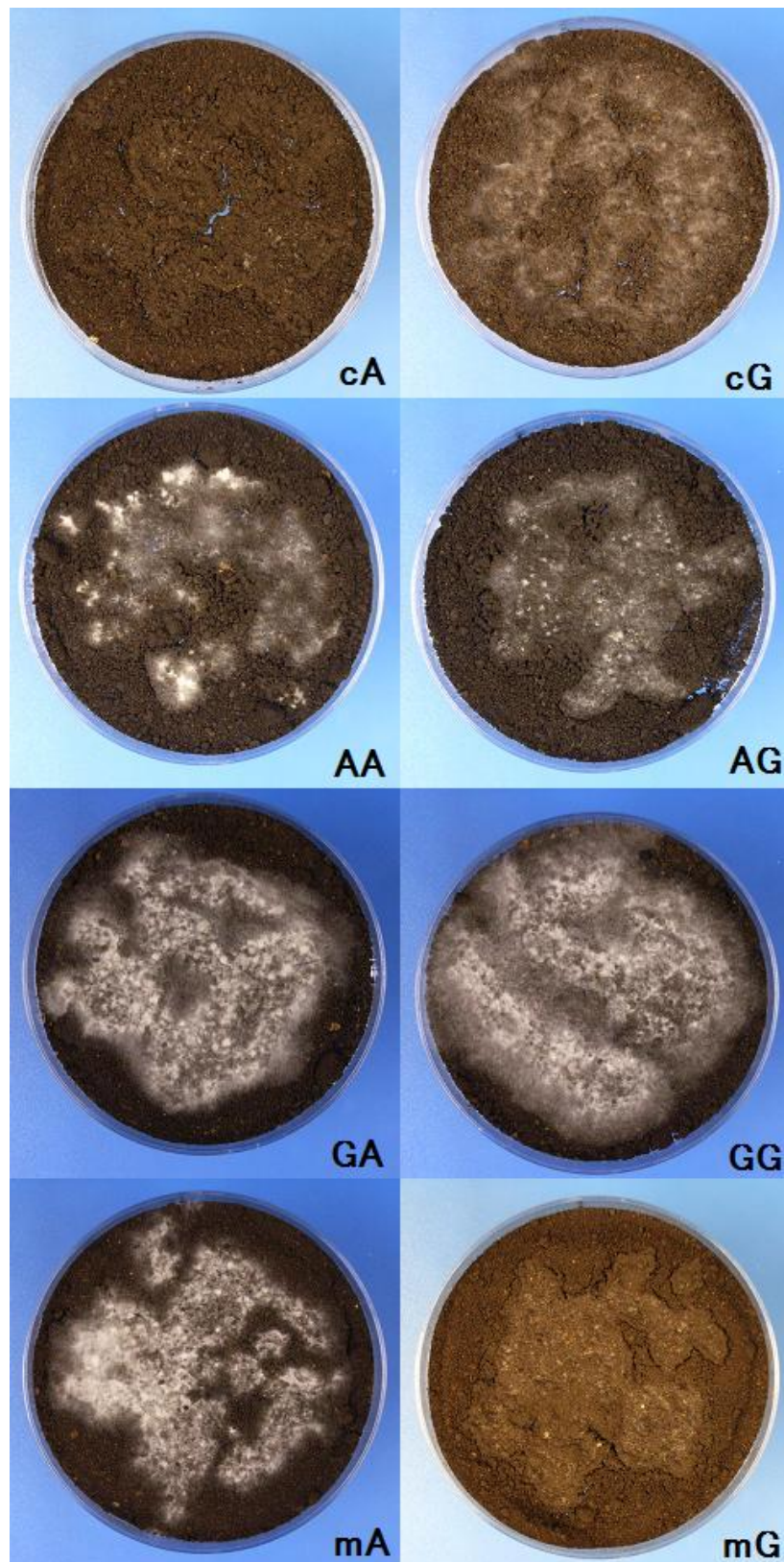


図 3-1-4. 接種 12 週間後のアミタケの菌糸体成長の様子. 培土の名称は表 3-1-1 と同じものを使用した.

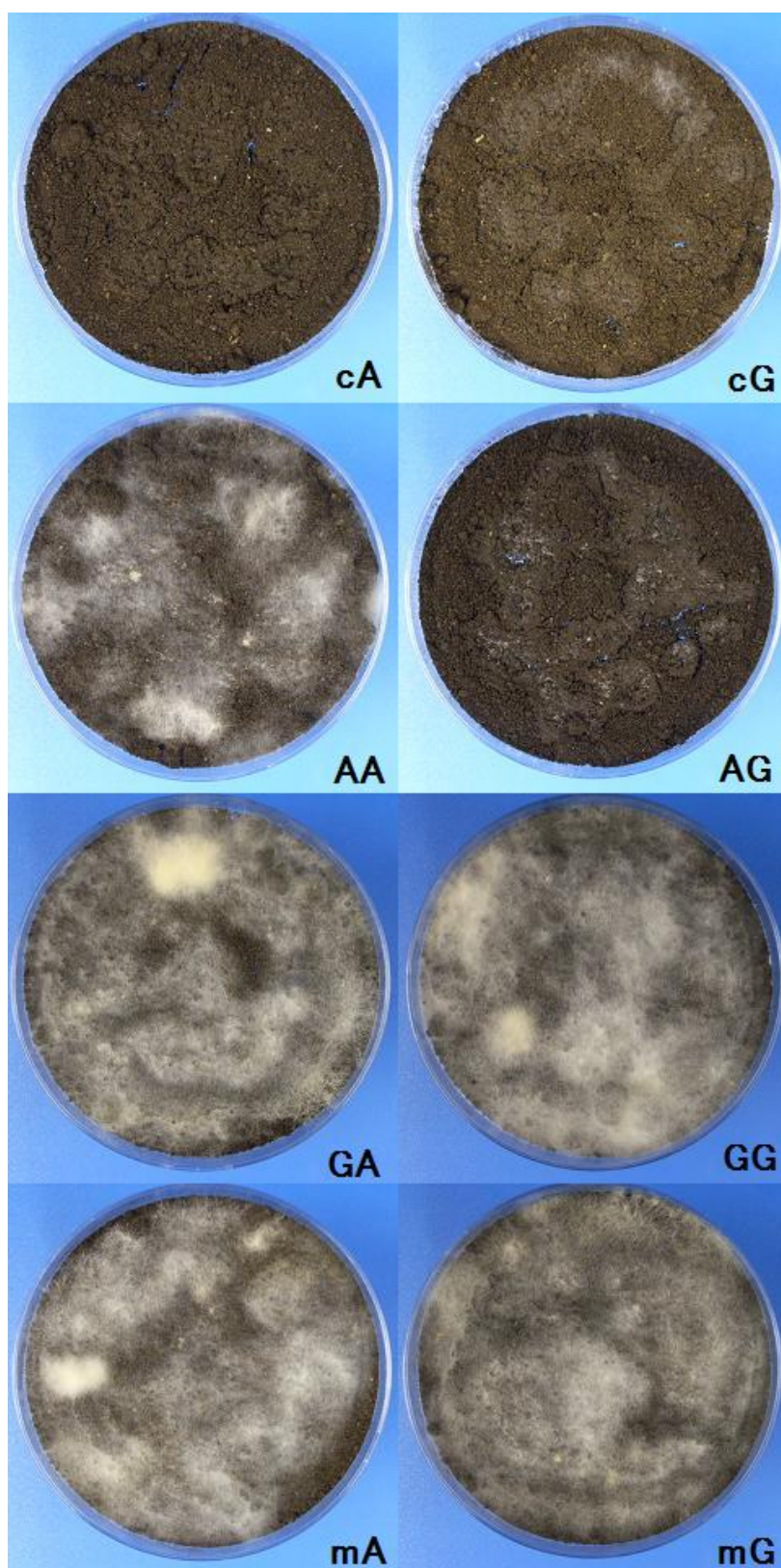


図 3-1-5. 接種 12 週間後のアカハツの菌糸体成長の様子。培土の名称は表 3-1-1 と同じものを使用した。

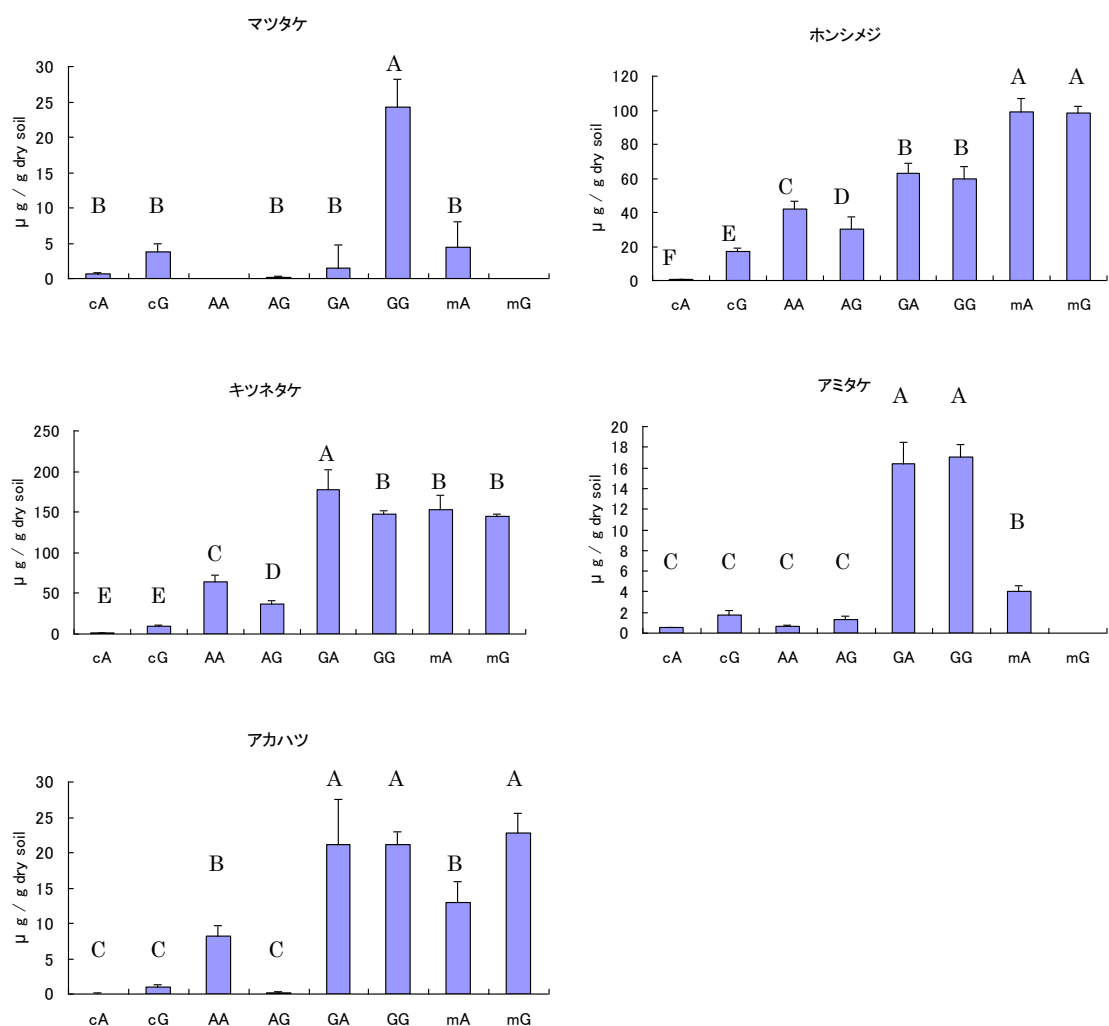


図 3-1-6. 培土実験における、各菌株接種 12 週間後の培土乾重 1g 中に含まれるエルゴステロール量の平均値。縦軸はエルゴステロール量 ( $\mu\text{g} / \text{g dry soil}$ )。培土の名称は表 3-1-1 と同じものを使用した。バーは標準偏差。異なるアルファベットは有意に成長量が異なることを表す (Tukey-Kramer の HSD 検定, 有意水準 5%)。



で、滅菌後に混合した AA 処理と比較してバイオマスの増加がみられた。アカハツでは両処理間で有意差はみられなかった。一方で、ガンマ線滅菌前に培土と Tween80 を混合した mG 処理の場合、低成長グループでは菌糸成長がまったくみられなかった。高成長グループでは、ホンシメジでは GG 処理区比較した場合に菌糸体量の増加がみられ、ほか 2 菌株でも GG 処理と同等の成長量がみられた。

## 考察

Tween80 を添加処理により、外生菌根菌 5 種のすべての菌株において菌糸体成長が促進された。このことから、Tween80 の添加による菌糸体成長促進作用は外生菌根菌全般に共通していると考えられる。5 菌株の各処理への応答をみると、全般的に成長量の小さいマツタケ、アマタケ（低成長グループ）と、全般的に成長量の大きいホンシメジ、キツネタケ、アカハツ（高成長グループ）の 2 つのタイプに分かれた。低成長グループでは、一部の処理以外ではほとんど菌糸体成長がみられず、また、まったくエルゴステロールが検出されず、菌糸体が死滅してしまったと考えられる処理も存在した。一方、高成長グループでは、Tween80 を添加したほぼすべての処理で非添加処理に比べて菌糸体量が増加しており、菌糸体成長の可能な条件が低成長グループに比べて広いことがわかる。

また、オートクレーブ滅菌した培土とガンマ線滅菌した培土を比較した場合、すべての組み合わせ、菌株において、ガンマ線滅菌培土を使用した処理におけるエルゴステロール量が、オートクレーブ培土を使用した処理よりも大きな値を示した。このことは滅菌法の違いにより、培土の性質が異なったものになっていることを表していると考えられる。また、菌糸体成長への影響が 5 種の菌すべてで等しくみられたことから、培土の滅菌法が及ぼす影響は外生菌根菌全般に共通していると考えられた。細菌の生育にはオートクレーブ培土よりもガンマ線滅菌培土のほうが好適であることが知られており (Salonius et al. 1967; Berns et al. 2008)、本実験では外生菌根菌においても同様の結果が得られた。オートクレーブは培土の物理性と化学性の両方に、ガンマ線照射は主に化学性に影響することが知られている (Salonius et al. 1967; McNamara et al. 2003)。しかし、ガンマ線照射が菌糸体成長に正の影響を及ぼすような変性を培土に起こしたのか、オートクレーブ処理による高温、高圧条件が菌糸体成長に負の影響を及ぼすような変性を培土に起こしたのか、あるいはその両方であるのかは明らかではない。今後、滅菌処理による培土の物理性、化学性の変化について測定することで、菌糸体成長に影響を及ぼす要因が明らかにされると

考えられる。

一方で、Tween80 に対する滅菌法の影響を比較すると、菌株によって反応が異なっていた。高成長グループにおいては、オートクレーブ処理はガンマ線滅菌処理と比較して、エルゴステロール量が大きな値を示すか、または両者の間に差がみられなかった。この傾向は培土がオートクレーブ滅菌であった場合に顕著であった。しかし、GG 処理で最大のエルゴステロール量が検出されたマツタケの場合を除き、Tween80 の滅菌法によるエルゴステロール量の差は培土の滅菌法による差よりも小さかった。このことから、菌糸体成長に与える影響は培土の滅菌法よりも小さいといえる。

培土と Tween80 を個別に滅菌した場合と、混合してから滅菌した場合を比較すると、オートクレーブ前に培土と Tween80 を混合した mA 処理の場合、アカハツを除く 4 菌株で滅菌後に混合した AA 処理と比較してエルゴステロール量の増加がみられた。アカハツでは両処理間で有意差はみられなかった。一方で、ガンマ線滅菌前に培土と Tween80 を混合した場合、低成長グループでは菌糸成長がまったくみられなかった。高成長グループでは、ホンシメジでは GG 処理区と比較した場合に菌糸体量の増加がみられ、ほか 2 菌株でも GG 処理と同等の成長量がみられた。滅菌時の土壤水分量により、滅菌処理が土壤の性質へ及ぼす影響が変化することは知られており、乾燥状態では土壤の性質がほとんど変化しないことが知られている (Salonius et al. 1967; McNamara et al. 2003)。このことから、滅菌時の土壤水分量によってこのような結果の差が生じた可能性が考えられる。あるいは、オートクレーブ処理中に培土と Tween80 が混在することで何らかの変化が生じており、それが菌糸成長に正の影響を及ぼしたことも考えられる。また、ガンマ線滅菌においては、培土の作製からガンマ線照射処理までには 4 日の間があったが、この間、個別滅菌処理では乾燥状態の培土と Tween80 水溶液が隔離されていたのに対し、混合処理では滅菌前の土壤に Tween80 水溶液が混合されていた。このため、混合処理ではガンマ線照射前に土壤中の微生物の影響により、培土もしくは Tween80 が変性した可能性が考えられる。個別滅菌処理では低成長グループでは、その変質が大きな影響となっていると考えられる。一方、高成長グループの菌はその影響をほとんど受けなかったか、逆に変性の影響が正に働いたものと思われる。

培土への添加により、Tween80 がマツタケの菌糸体成長を促進することはすでに知られている (Guerin-Laguet et al. 2003)。Guerin-Laguet et al. (2003) の実験では、Tween80 を培土へ混合後にオートクレーブ滅菌しており、これは本実験の mA 処理に、また、Tween80

非添加の対照は cA 処理に相当している。Guerin-Laguette et al. (2003) と本実験では培養期間や Tween80 添加濃度が異なるため、エルゴステロール量を直接比較することはできないが、本実験においては、マツタケの GG 処理において、mA 処理の 5.4 倍のエルゴステロール量が得られた。このことから、Tween80 と培土をガンマ線滅菌後に混合する手法は従来の手法よりもマツタケの培養に有効であると考えられる。一方で、Tween80 と培土の滅菌法と添加法が、菌糸体の成長促進作用に及ぼす原因に関しては、今後、滅菌時の水分条件等の影響を含め、さらに明らかにされる必要がある。

### 3-2 Tween80 添加が宿主の異なるマツタケ菌株の菌糸体成長に及ぼす影響

2 章において、中国雲南省に発生するマツタケはマツ科、ブナ科樹木の両方を宿主としていることが明らかにされた。こうした、宿主や生育環境の異なる菌株においては、生理的性質が異なることが考えられる。また、Tween80 添加による菌糸体成長促進作用は日本産の菌株によって評価されており、日本以外の地域の菌株との比較はされていない。本研究では、これらの菌株間の性質の違いのひとつとして、Tween80 添加による菌糸体成長促進作用の違いを比較した。

#### 材料と方法

##### 供試菌株と接種源の作製

中国雲南省産の菌株は 2 章と同じ TmY1, TmY11, TmY6 (Matsushita et al. 2005) を供試した。対照として、日本産の T2 菌株、スウェーデン産の *T. nauseosum* (Tn9, Matsushita et al. 2005) を用いた。接種源の作製方法は 1 節と同様に行った。ただし、液体培地での培養期間を 4 週間から 46 日間に変更した。

##### 培土の調製

培土には弥生土を使用した。培土のオートクレーブ処理ではガンマ線処理と比較して菌糸体成長が劣ることが明らかになったため、1 節の処理のうち、cG, GA, GG, mG 処理のみを行った (表 3-2-1)。また、1 節において、mG 処理における菌糸成長が低い原因として、培土混合後からガンマ線滅菌までの 4 日間に培土が変質することが考えられたため、mG 処理は培土混合後、ガンマ線滅菌まで常温においておく処理 (従来の mG 処理) と、滅菌まで 4℃で冷蔵しておく処理 (mG<sub>co</sub>) の 2 つに分けた。GA 処理の Tween80 水溶液は 121℃, 30 分間で一度オートクレーブし、1 週間後に 121℃, 30 分間行った。ガンマ線滅菌は日本アイソトープ協会甲賀研究所でコバルト 60 ガンマ線照射を行った。照射線量は 26.1~27.1kGy であった。すべての処理において、最終的な水分量は土壌に対して 20% (w/v), Tween80 の添加量は 5% (w/v) となるように調整した。

##### 接種および菌糸体量の解析

接種および菌糸体量の測定は 1 節と同様に行った。反復は処理と菌株の組み合わせごと

表 3-2-1. 実験の処理および培土の滅菌法

略称	培土の組成
cG	ガンマ線滅菌した培土のみ（対照）
GA	ガンマ線滅菌した培土とオートクレーブした Tween80 を混合したもの
GG	培土および Tween80 を個別にガンマ線滅菌した後に，混合したもの
mG	培土および Tween80 を混合した後に常温で保管し，ガンマ線滅菌したもの
mGco	培土および Tween80 を混合した後に 4 度で保管し，ガンマ線滅菌したもの

Tween80 のオートクレーブは 121℃，30 分間で行い，1 週間後に 121℃，20 分間行った．  
ガンマ線滅菌の照射線量は 26.1～27.1kGy であった．

に4とした。また、培養期間は5週間とした。

## 統計解析

得られたエルゴステロール量のデータは菌株ごとに Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。解析は JMP5.0.1J (SAS Institute) で行った。

## 結果

すべての処理で、GG 処理が有意に大きなエルゴステロール量を示した (図 3-2-1)。これは、日本産、中国産、スウェーデン産の 5 菌株すべてで共通していた。日本産の T2 菌株では、mG 処理のエルゴステロール量が対照の cG 処理のエルゴステロール量を下回った。中国産 3 菌株とスウェーデン産 1 菌株では、GG 処理以外の処理間に有意差は検出されなかった。2 つの mG 処理間では、すべての菌株で常温処理と冷蔵処理の間でエルゴステロール量に差はみられなかった。

## 考察

すべての菌株において、GG 処理において最もエルゴステロール量が大きくなった。また、T2 菌株において、mG 処理のエルゴステロール量は、対照の cG 処理のエルゴステロール量を下回った。これらの結果は、1 節の結果と一致しており、実験の再現性が確認された。T2 菌株の mG 処理は、1 節においてはエルゴステロールがまったく検出されなかったが、これは培養期間の違いによるものと考えられる。mG 処理について、ガンマ線滅菌までの温度処理によるエルゴステロール量に差はいずれの菌株においてもみられなかった。このため、GG 処理と mG 処理におけるマツタケの菌糸体成長の差については、ガンマ線照射までの微生物の影響は小さいと考えられた。

また、各培土に対するエルゴステロール量の応答はすべての菌株で共通していた。このことから、中国雲南省産の 3 菌株と日本産 T2 菌株、および *T. nauseosum* に対して、Tween80 添加による菌糸体成長促進効果は共通していると考えられる。中国南西部やブータンなどに分布する、広葉樹と共生するマツタケの生理的な性質についてはほとんど知られていない。Kusuda et al. (2007) は日本産菌株とチベットの広葉樹林で採取された菌株について炭水化物利用能力の比較を行い、おが屑に対する菌糸体成長の応答や菌糸成長の最適グルコース濃度が異なるとしている。しかし、これは日本産、チベット産ともに 1 菌株の結果

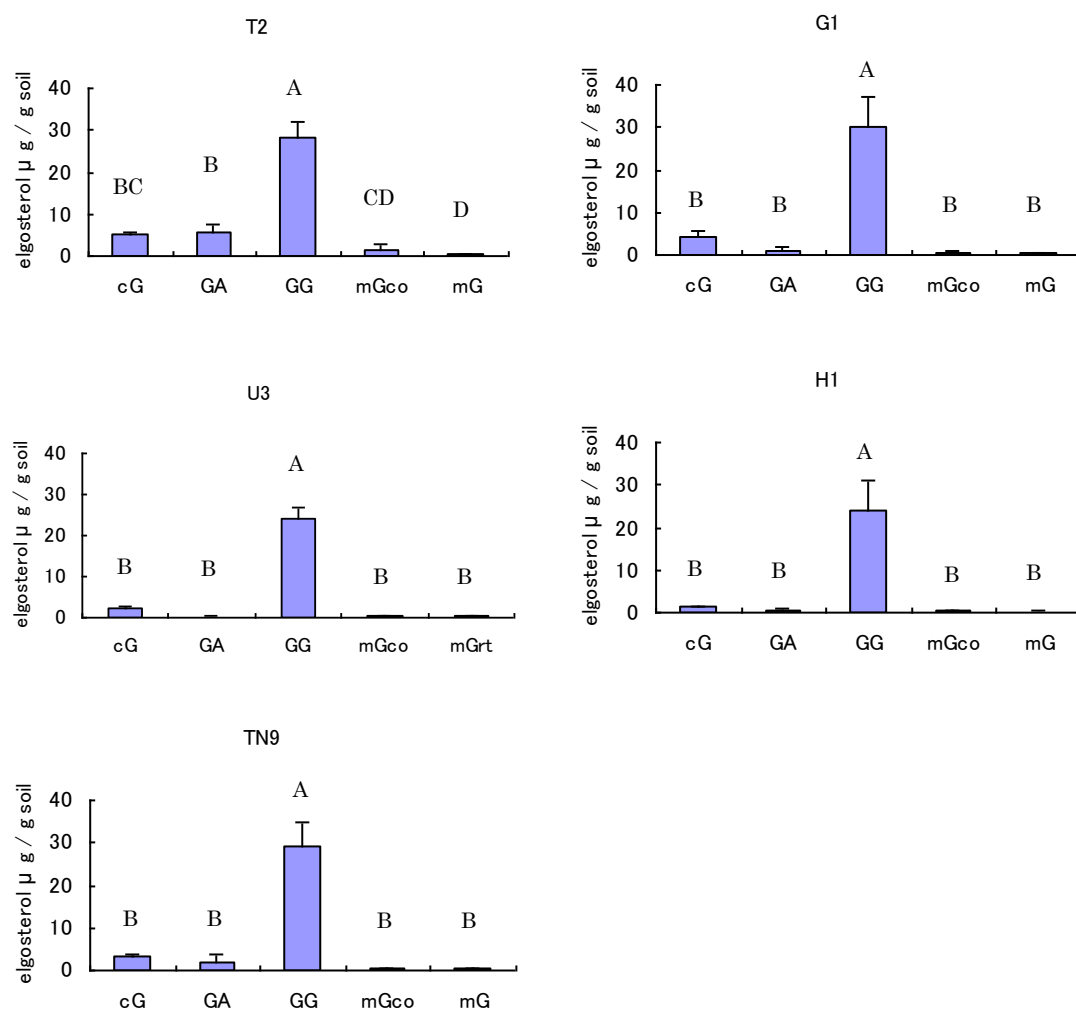


図 3-2-1. 各菌株接種 5 週間後の培土乾重 1g 中に含まれるエルゴステロール量の平均値。縦軸は培土中のエルゴステロール量 ( $\mu\text{g/g dry soil}$ )。培土の名称は表 3-2-1 と同じものを使用した。バーは標準偏差。各グラフにおいて、異なるアルファベットは有意に成長量が異なることを表す (Tukey-Kramer の HSD 検定, 有意水準 5%)。

であり，結果の普遍性については不明である．今後，宿主，生育環境の異なるマツタケの生理的な性質に関し，さらに明らかにしていく必要がある．



### 3-3 培地への Tween80 添加による菌糸成長量の増加

1 節において、Tween80 を培土へ添加することにより、5 種の外生菌根菌すべての菌糸体成長が促進されることが明らかにされた。この成長促進効果の要因について、マツタケにおいては Tween80 が炭素源として働くことは否定されている (Guerin-Laguette et al. 2003)。しかし、ほかの外生菌根菌における、Tween80 による菌糸体成長促進作用の要因はわかっていない。Tween80 は分子中に側鎖としてオレイン酸を含んでおり、これが炭素源として利用されている可能性が考えられる。そこで、Tween80 の炭素源としての効果をみるために、糖を含まない培地へ Tween80 を添加し、菌糸体成長がみられるかを調べた。

#### 材料と方法

##### 接種源の作製

供試菌株は 1 節で用いた 5 種に加え、ウラムラサキ (*Laccaria amethystea*) を用いた。アカハツの菌株は厚さ 3mm の 1/5 希釈の浜田平板培地、ほかの 5 菌株は厚さ 3mm の 5X 平板培地上で 23℃、暗黒下で培養した。菌叢外縁部からコルクボーラーで寒天片 (直径 5mm) を切り出し、新たな厚さ 3mm の寒天培地上に接種し、23℃、暗黒下で 4 週間培養した。用いた培地は、アカハツには 1/5 希釈の浜田培地、ほかの 5 菌株には 5X 培地を用いた。菌叢の外縁部から直径 5mm のコルクボーラーで培地ごと菌糸体を打ち抜き、接種源とした。

##### 培地の調製

培地の組成は Guerin-Laguette et al. (2003) の A 培地に倣った (表 3-3-1)。寒天濃度は 1.4%とした。実験に用いた培地は、A 培地のみ、A 培地に 2% (w/v) の Tween80 を添加したもの (T 培地)、A 培地に 1% (w/v) のグルコースを添加したもの (G 培地) の 3 種類とした。すべての培地の pH を、オートクレーブ前に 1 規定 HCl を用いて 5.1 に調整した。T 培地、G 培地ではそれぞれ Tween80 およびグルコースを添加後に pH を調整した。オートクレーブ滅菌 (121℃, 20 分) した培地を 9cm シャーレに厚さ 3mm になるように分注し、固化後にオートクレーブ滅菌したセロファンシート (No. 1650963, Bio-Rad) を培地上にかぶせた。

液体培地は寒天を除いて同様に作製し、20ml ずつを 200ml 容の三角フラスコに分注して

表 3-3-1. A 培地の組成表 (1000ml あたり)

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.33g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.34g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.62g
$\text{CaCl}_2$	0.05g
KCl	0.19g
micronutrients <sup>*1</sup>	6ml
vitamins <sup>*2</sup>	6ml
Fe solution <sup>*3</sup>	3ml

<sup>\*1</sup> Ohta (1990)から  $\text{FeCl}_3$  を除いたもの.

<sup>\*2</sup> Ohta (1990)による.

<sup>\*3</sup> 1%のクエン酸鉄(Ⅲ)を 1%クエン酸溶液に溶かしたもの

接種に用いた。

## 接種

寒天培地へはシャーレ中央部のセロファン上に接種源の寒天片をひとつずつ接種した。反復は各培地と菌株の組み合わせごとに 5 とした。接種後、23℃、暗黒下で 4 週間培養した。

液体培地へは、接種源の寒天片ひとつずつをフラスコに接種し、23℃、暗黒下で 2 週間培養した。反復は各培地ごとに 5 とした。

## 菌糸体量の測定

寒天培地の実験では培養後、セロファンシート上の菌叢の直径を直行する 2 方向について測定し、セロファンシート上から菌糸体を分離し、105℃、4 時間乾燥させ、秤量した。

液体培地の実験では培養後、菌糸体をナイロンメッシュ（メッシュサイズ 24×30μm）で集め、105℃、4 時間乾燥させ、秤量した。

## 統計解析

得られたデータは Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。解析は JMP5.0.1J (SAS Institute) で行った。

## 結果

培養終了後の各菌株の様子を図 3-3-1 から図 3-3-5 に、直径成長量を図 3-3-6 に示した。いずれの菌株においても、A 培地では菌糸は培地上に薄く、疎に伸長した。G 培地では密な、厚みのある菌叢を形成した。T 培地では、アカハツは A 培地と比較して密な菌叢を形成した。ウラムラサキ、アミタケでは菌糸体成長が抑制された。マツタケ、キツネタケでは菌叢の形態において A 培地と大きな違いはみられなかった。直径成長は各菌株で、それぞれ異なる反応がみられた。アミタケを除く 4 菌株では A 培地での直径成長量が G 培地の直径成長量を上回った。ウラムラサキ、マツタケ、アミタケでは A 培地での直径成長量が T 培地の直径成長量を上回ったのに対し、キツネタケでは T 培地の直径成長量を下回り、アカハツでは有意差がみられなかった。

次に、乾重を図 3-3-7 に示した。すべての菌株で、グルコース添加により A 培地に比べ

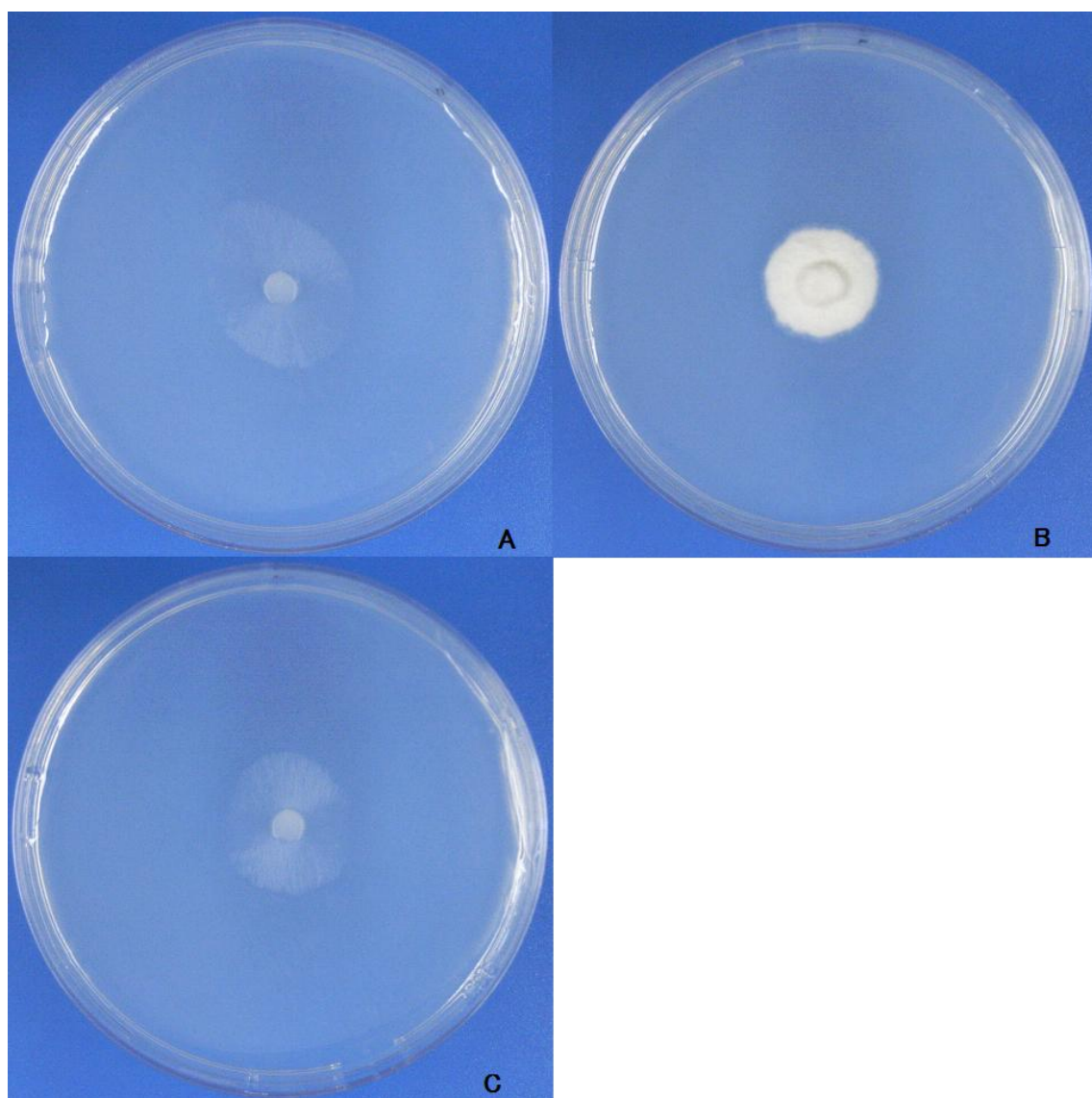


図 3-3-1. 寒天培地実験における，接種 4 週間後のマツタケの菌糸体成長の様子．A : A 培地，B : G 培地，C : T 培地．

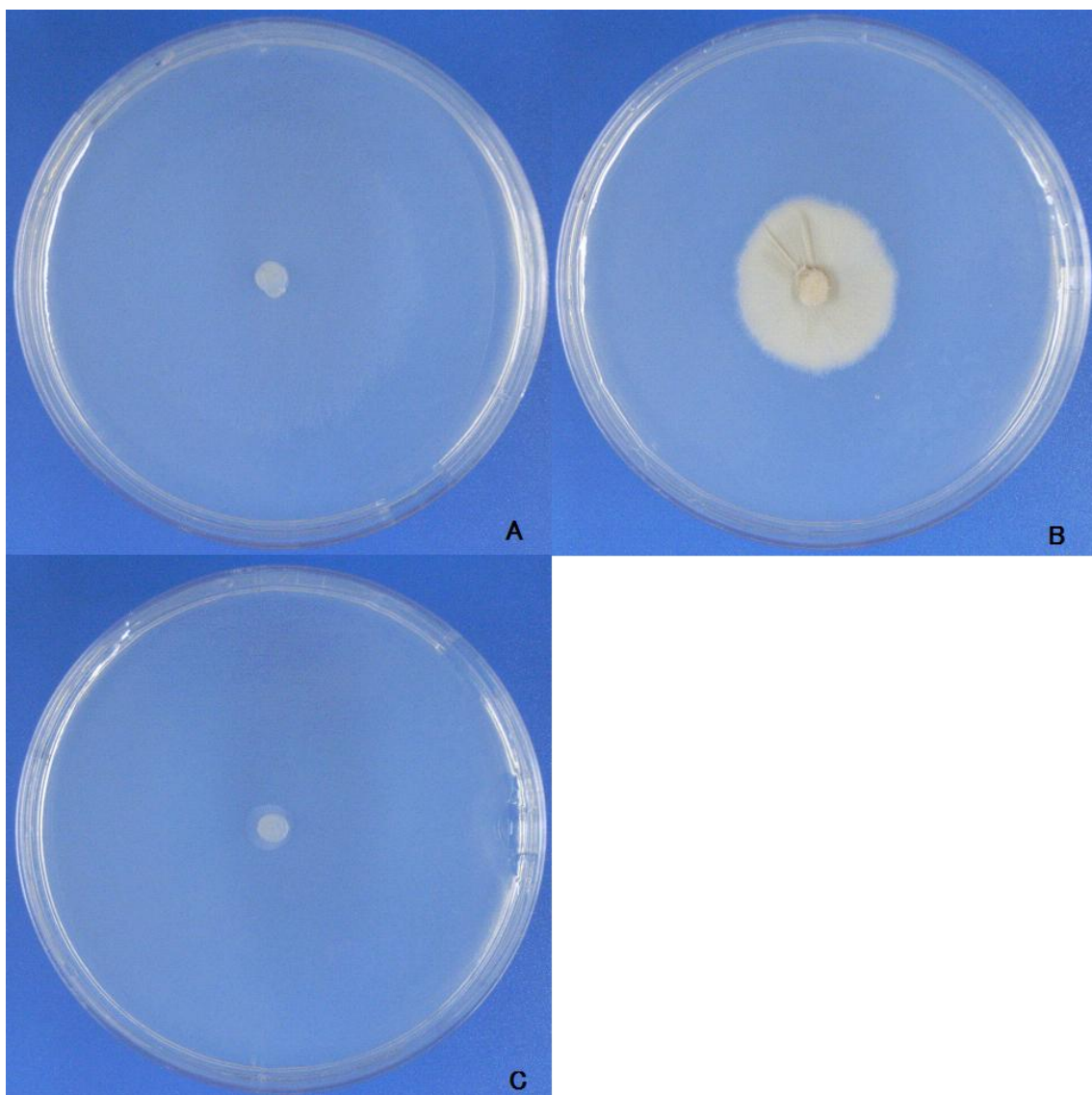


図 3-3-2. 寒天培地実験における，接種 4 週間後のウラムラサキの菌糸体成長の様子．A : A 培地，B : G 培地，C : T 培地．

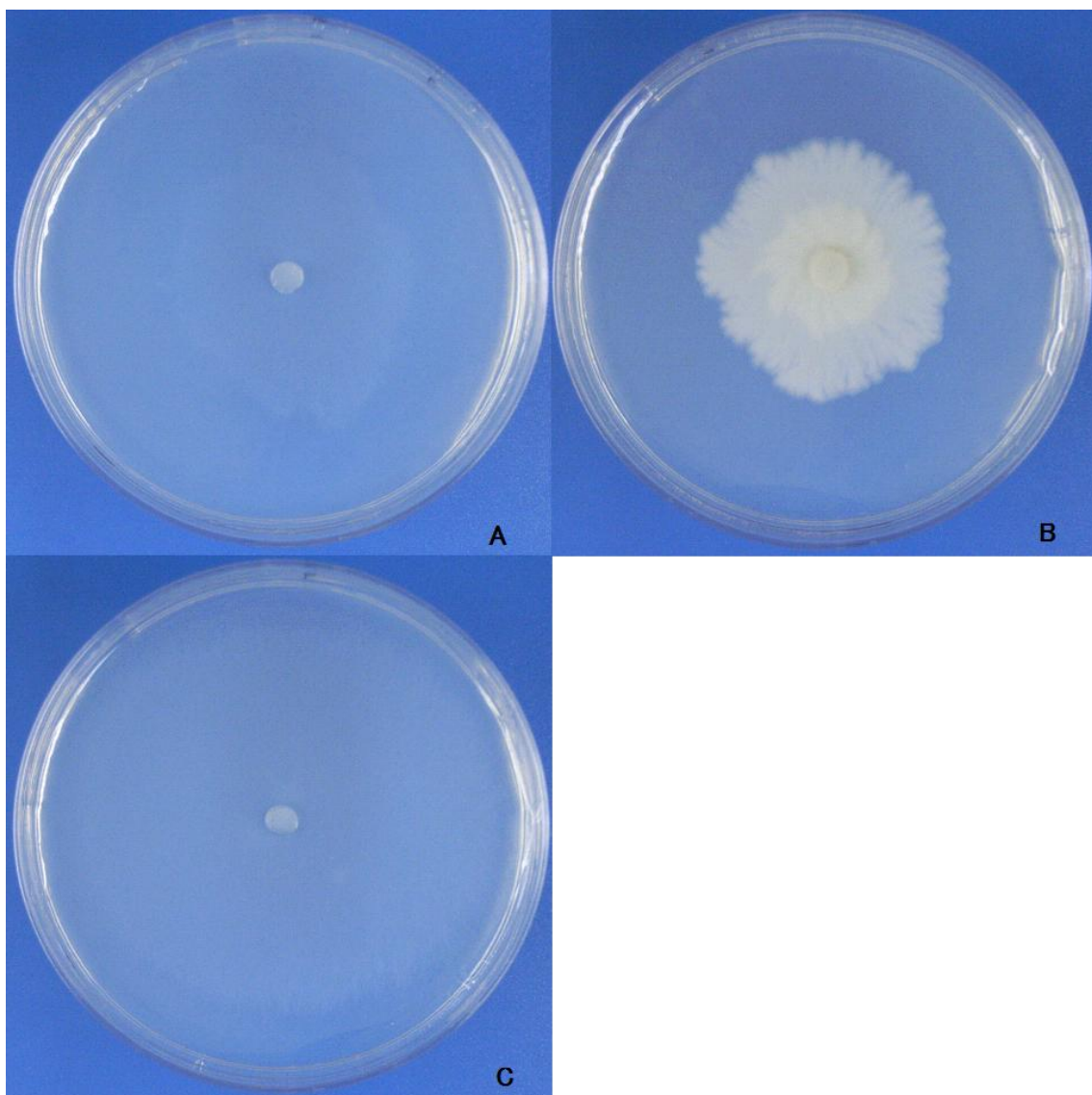


図 3-3-3. 寒天培地実験における，接種 4 週間後のキツネタケの菌糸体成長の様子．A：A 培地，B：G 培地，C：T 培地．



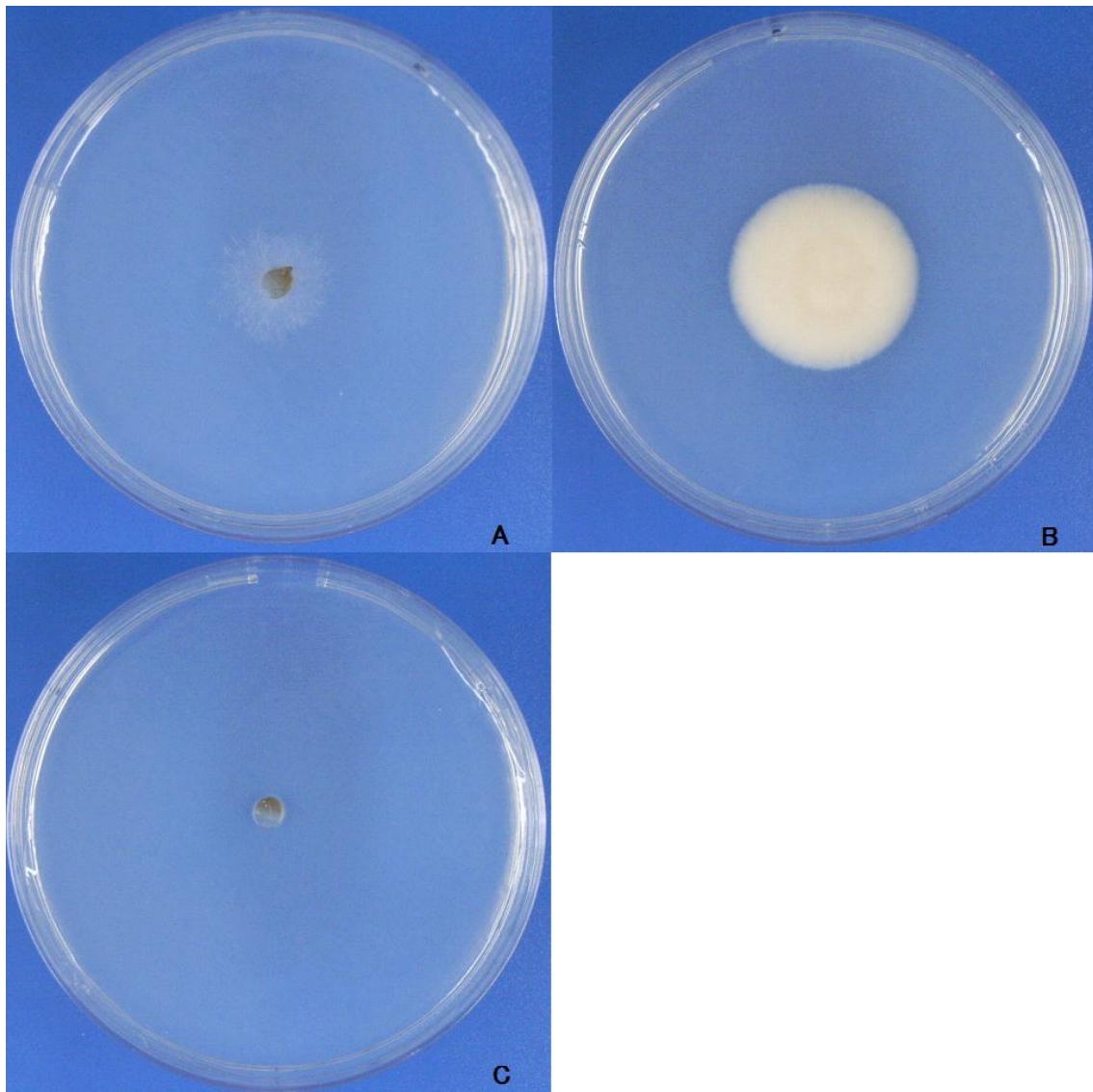


図 3-3-4. 寒天培地実験における，接種 4 週間後のアミタケの菌糸体成長の様子．A : A 培地，B : G 培地，C : T 培地．

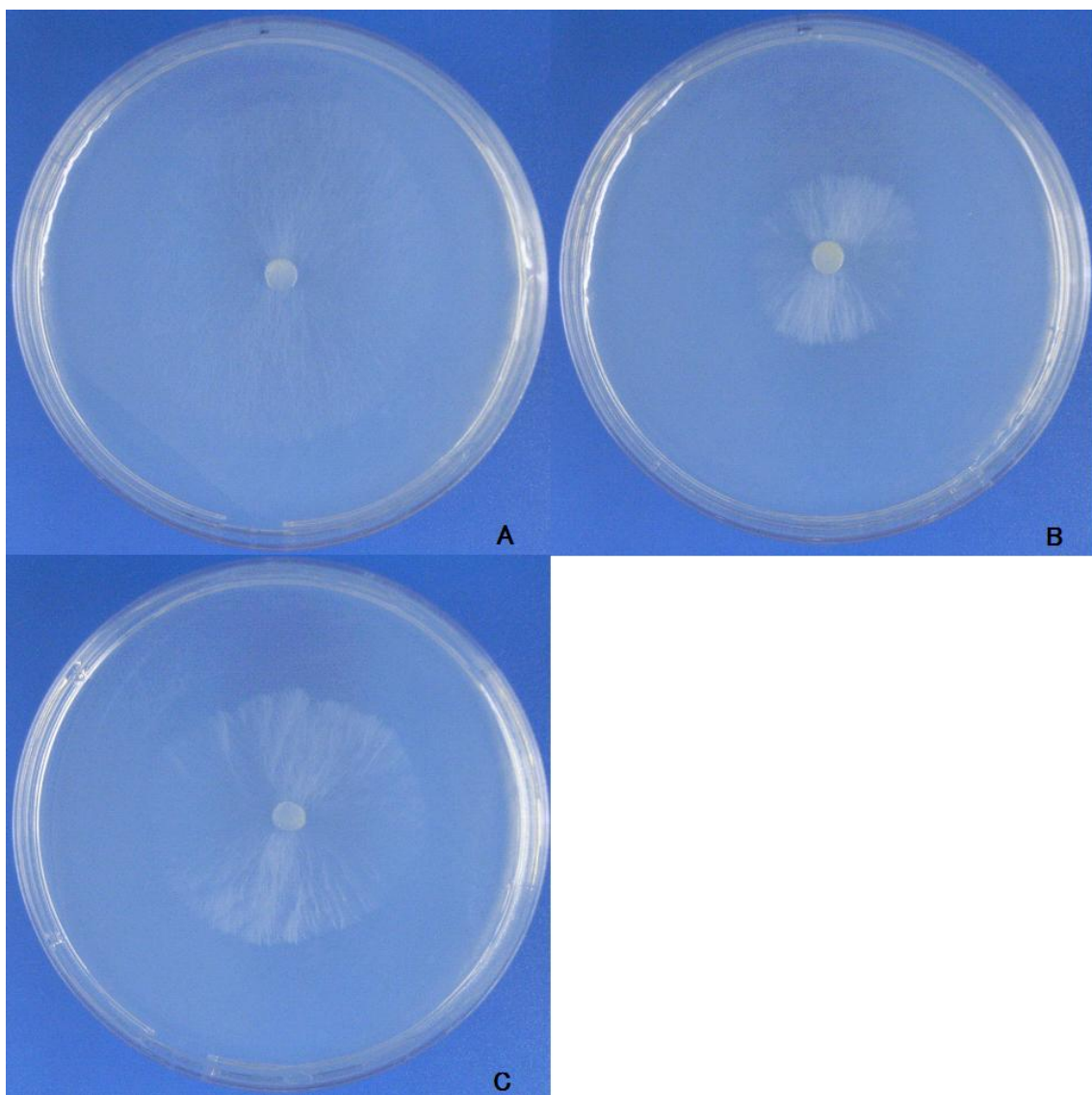


図 3-3-5. 寒天培地実験における，接種 4 週間後のアカハツの菌糸体成長の様子．A : A 培地，B : G 培地，C : T 培地．



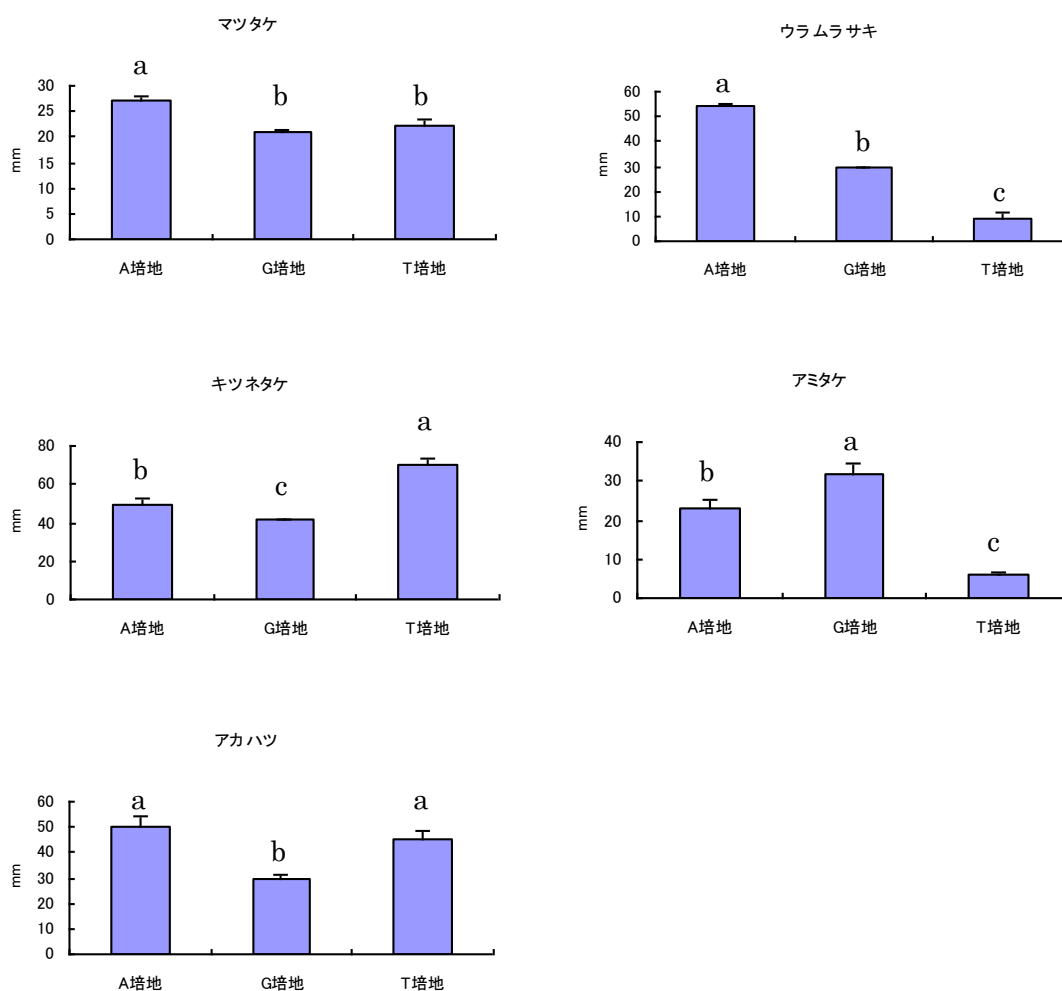


図 3-3-6. 寒天培地実験における，各菌株接種 4 週間後の菌糸の直径成長量の平均値．縦軸は菌叢直径（mm）．バーは標準偏差．異なるアルファベットは有意に成長量が異なることを表す（Tukey-Kramer の HSD 検定，有意水準 5%）．

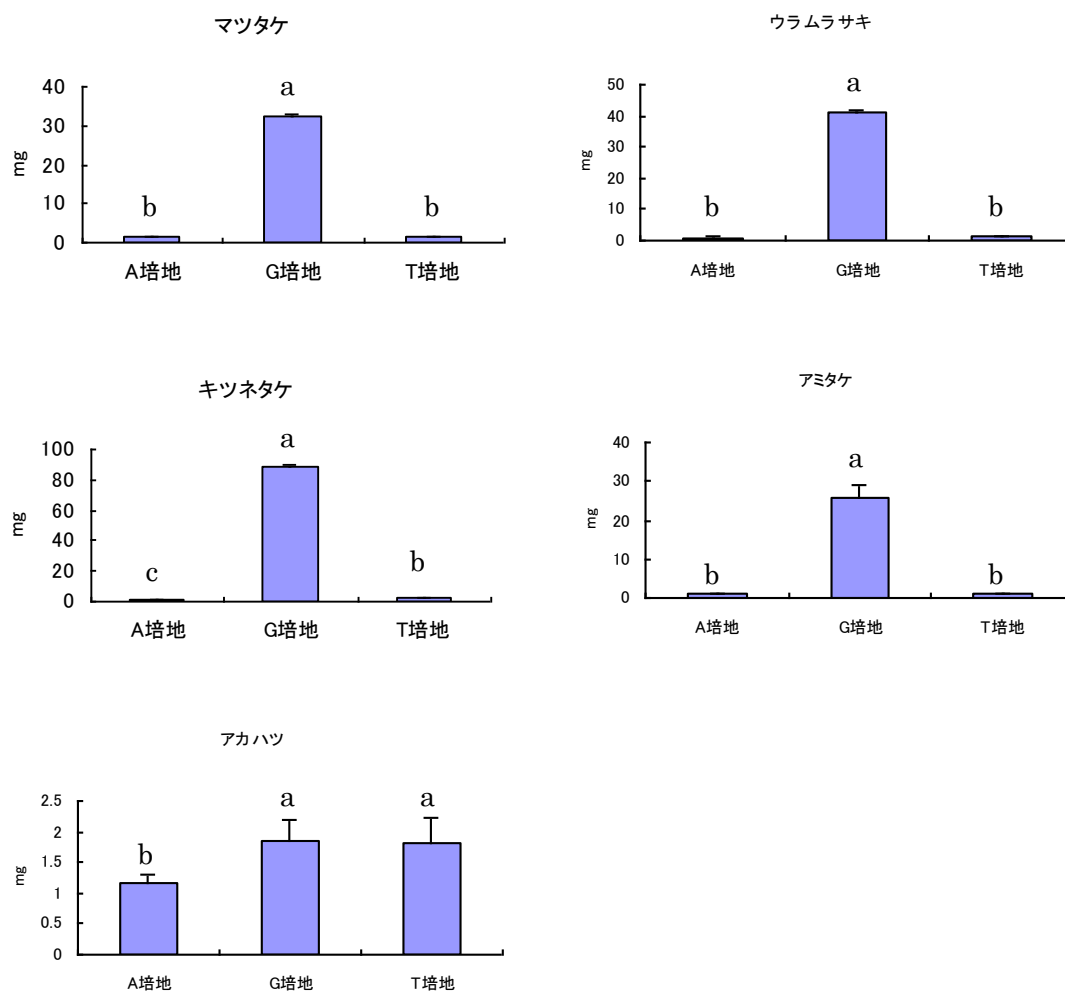


図 3-3-7. 寒天培地実験における, 各菌株接種 4 週間後の菌糸体量の平均値. 縦軸は乾重 (mg).  
バーは標準偏差. 異なるアルファベットは有意に成長量が異なることを表す  
(Tukey-Kramer の HSD 検定, 有意水準 5%).

て菌糸体量は増加した。ウラムラサキ、マツタケ、アミタケでは、Tween80 の添加は菌糸体量に影響しなかった。一方、キツネタケとアカハツにおいては Tween80 添加によって菌糸体量は有意に増加した。キツネタケではグルコース添加よりも効果は小さかったが、アカハツにおいては G 培地でも菌糸体量の増加があまり大きくなかったこともあり、Tween80 添加はグルコース添加と同等の効果を示した。

ホンシメジ接種処理においては、A 培地と T 培地において、接種部付近のセロファンが分解され、培地中へ菌糸が伸長しているのが観察された。G 培地ではセロファンに変化は観察されなかった。このことから、A 培地と T 培地では炭素欠乏状態のホンシメジがセロファンのセルロースを分解し、炭素源として利用していたと考えられる。このため、寒天培地の実験からはホンシメジのデータを除外し、液体培地による追試を行った。

液体培地でのホンシメジ培養後の様子を図 3-3-8 に示した。T 培地および G 培地では、菌糸体の成長が旺盛であったが、A 培地では接種源の寒天片からわずかな菌糸が伸びているのにとどまった。また、G 培地では気中菌糸が菌叢上に発生していたが、T 培地では気中菌糸はみられなかった。次に乾重を図 3-3-9 に示した。T 培地におけるホンシメジの菌糸体量は A 培地よりも有意な値を示した。

## 考察

1 節において低成長グループに属していたマツタケ、アミタケは、本実験において、Tween80 添加による菌糸体成長の促進がみられなかった。マツタケが Tween80 を炭素源として利用できないことはすでに報告されている (Guerin-Laguette et al. 2003)。本研究においても、マツタケは Tween80 の添加による菌糸体成長の促進はみられなかった。同様に、アミタケも Tween80 を炭素源として生育する能力はないか、ごく限定的なものだと考えられる。今回の結果からは、ウラムラサキも低成長グループに属する菌であると考えられる。

一方で、1 節において高成長グループに属していたホンシメジ、キツネタケ、アカハツの 3 菌株では Tween80 添加による菌糸体量の増加がみられた。今回の実験は寒天培地もしくは液体培地で行われており、養分は水溶性であったことから、Tween80 の界面活性剤としての効果による培地中の養分へのアクセス増加は考えにくい。低成長グループで Tween80 の添加の効果がみられなかったのもこうした理由によると考えられる。したがって、これら 3 菌株は Tween80、もしくは、そのオートクレーブによる変性、分解産物を養分として利用し、成長する能力を持っていると考えられる。A 培地は炭素源欠乏培地であり、グルコ

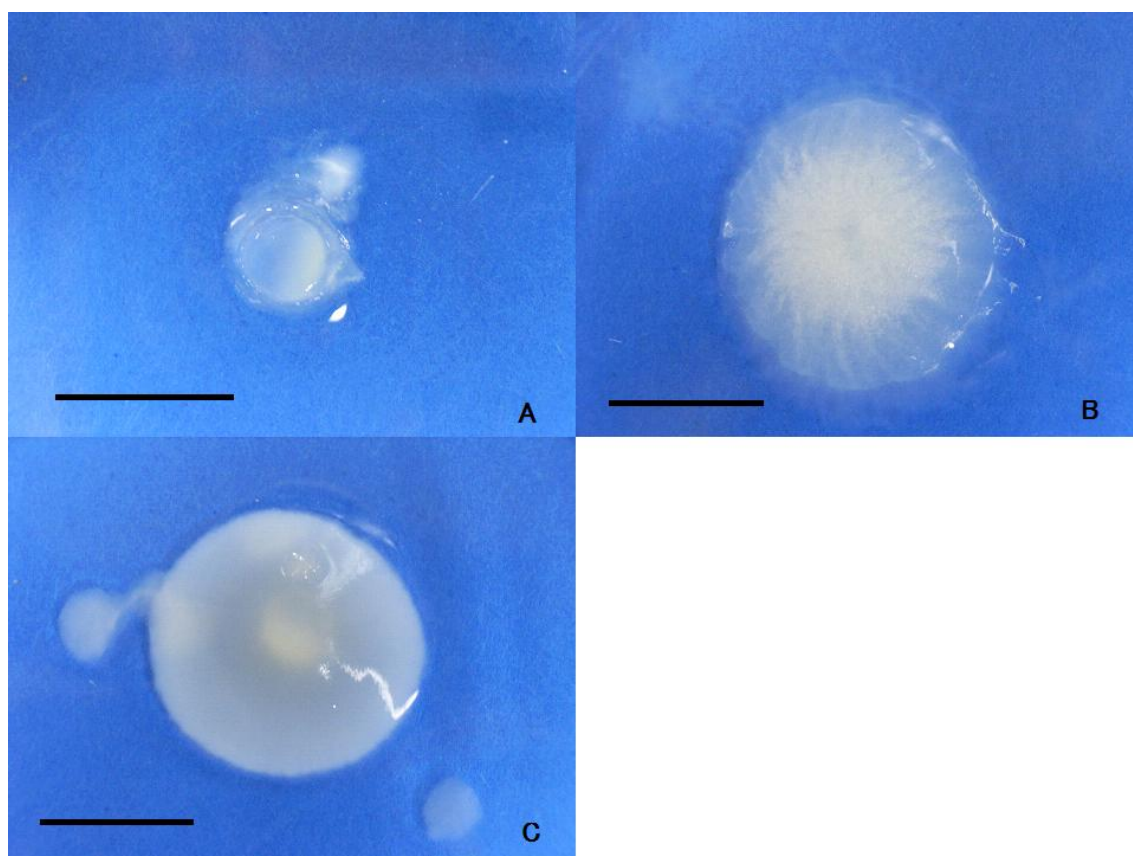


図 3-3-8. 液体培地実験における，接種 4 週間後のホンシメジの菌糸体成長の様子．A：A 培地，B：G 培地，C：T 培地．バーはすべて 5mm.

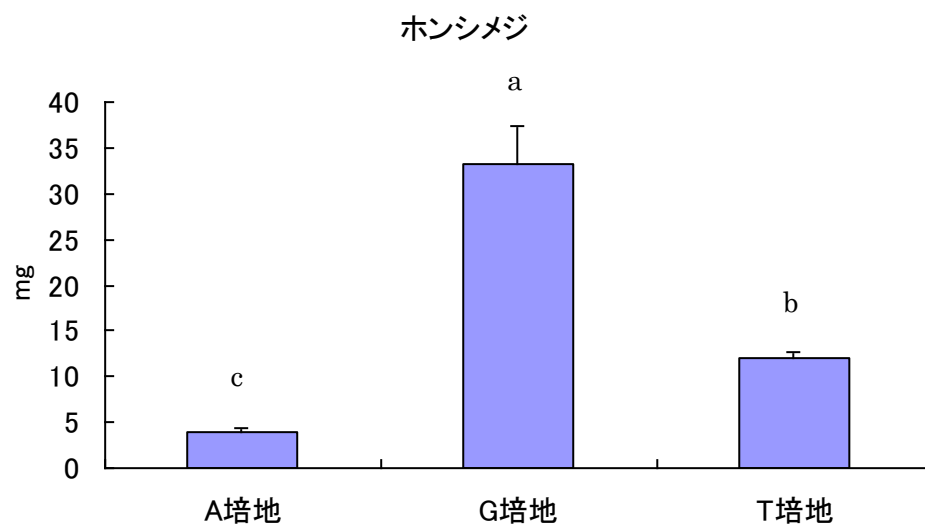


図 3-3-9. 液体培地実験における，ホンシメジ接種 4 週間後の菌糸体量の平均値．縦軸は乾重（mg）．バーは標準偏差．異なるアルファベットは有意に成長量が異なることを表す（Tukey-Kramer の HSD 検定，有意水準 5%）．

ース添加により菌糸体成長量が大きく増加すること、Tween80 は分子式が  $C_{64}H_{124}O_{16}$  であり、炭素、水素、酸素以外の元素を持たないことから、これらの菌は Tween80 を炭素源として利用していると考えられる。Tween80 を炭素源として利用する例は細菌において知られている (Li et al. 2001)。

Tween80 はソルビタンの水酸基の一部をオレイン酸でエステル化し、エチレンオキシド約 20 分子を縮合させた構造をしている (図 3-3-10)。マツタケの菌糸体成長を促進する (Guerin-Laguet et al. 2003) ことが知られているオリーブ油にもオレイン酸エステルが含まれていることから、オレイン酸が炭素源として菌根菌に利用されていることが考えられる。Hattori et al. (2003) は 32 種の外生菌根菌が脂肪酸や脂質を炭素源として利用して成長できるかを調べており、その中にはオレイン酸も含まれている。その結果によると、ウラムラサキ 1 菌株、ホンシメジ 1 菌株はオレイン酸を利用可能、キツネタケ 1 菌株は利用不可能、マツタケおよびアマタケはそれぞれ 2 菌株のうちの 1 菌株が利用可能という結果であった。アカハツは実験に含まれていなかった。今回の結果と比較すると、ホンシメジでは結果が一致したが、ウラムラサキやキツネタケでは一致しなかった。培養条件や供試菌株が異なることから、本実験で供試した菌株がオレイン酸を利用できるかについては断定できない。また、オレイン酸を加水分解した残りの側の、ソルビタンにエチレンオキシドを縮合させた分子については炭素源として利用可能であるかわかっていない。高成長グループの外生菌根菌が Tween80 をどのように利用しているかについては今後の研究が必要である。

以上の結果から、マツタケを含む低成長グループの菌は Tween80 を炭素源として利用できないが、高成長グループの菌は Tween80 を炭素源として利用可能であると考えられる。

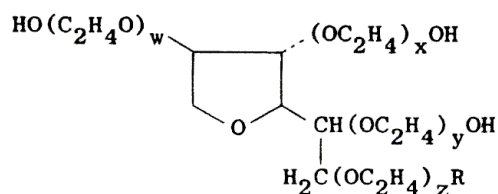


図 3-3-10 Tween80 の分子構造.  $x + y + z + w = 20$ .  $R = (C_{17}H_{33})COO$ .

### 3-4 界面活性剤 Tween80 がアカマツ実生の成長に及ぼす影響

これまでの実験により、培土へ Tween80 を添加することで、外生菌根菌の菌糸体成長を促進することが明らかにされた。今後、外生菌根菌を宿主へ接種し、菌根合成を行う際に Tween80 を利用するためには、宿主の成育に Tween80 が及ぼす影響を把握しておく必要がある。そのため、アカマツの生育に、Tween80 添加と滅菌法が及ぼす影響を調べた。

#### 材料と方法

##### アカマツ実生苗の作製

市販のアカマツ種子を蒸留水中に 1 日浸漬した後、30%過酸化水素水に 15 分間浸漬して表面殺菌した。殺菌した種子を滅菌蒸留水で 2 回洗浄した後に、0.2%グルコース寒天培地上に播種し、23°C、 $150\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  の光条件下で 9 日間栽培した。

##### 培土の調製

培土は弥生土を使用した。滅菌法がアカマツの成長に与える影響を調べるため、培土と Tween80 の滅菌にはオートクレーブとガンマ線滅菌の 2 種類を行った。オートクレーブは 121°C、30 分間で一度滅菌し、2 日後に 121°C、20 分間滅菌を行った。ガンマ線滅菌は日本アイソトープ協会甲賀研究所でコバルト 60 ガンマ線照射を行った。いずれも Tween80 は蒸留水に溶解させた状態で、土壌に対して Tween80 の添加量が 5% (w/v) になるように培土と混合した後に滅菌した。対照として、Tween80 を添加せずに蒸留水のみを添加した培土を用いた。すべての処理において、水分量は土壌に対して 20% (w/v) となるように調整した。

##### 栽培

実生苗を、育苗箱 (roottrainer, Ronaash 社) 中の 70ml の培土に 1 本ずつ移植した。実生苗には移植時に 3.5ml の蒸留水を与えた。以後、サンプリングまで毎日 1 回、蒸留水を苗 1 本につき 4ml ずつ与えた。移植した実生苗は、23°C、 $430\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (明期 16 時間、暗期 8 時間) の条件下で 12 週間栽培し、バイオマスの測定に供した。各条件で栽培する苗は 10 本としたが、栽培中に枯死したものを解析から除いたため、最終的な苗の本数は各処理で 4-8 本となった。

## バイオマスの測定

アカマツを培土から取り出し、地際で地上部と地下部に切り分けた。地下部は脱イオン水中で洗浄し、根から培土を取り除いた。それぞれを 105℃で一晩乾燥させ、乾重を測定した。

## 統計解析

Tween80 の培土への添加と培土の滅菌法という 2 要因の効果を調べるため、二元配置の分散分析を行った。

## 結果

培養終了後のアカマツ実生の地上部、地下部、苗全体の乾重を図 3-4-1 に示した。また、それぞれの二元配置の分散分析表を表 3-4-1 に示した。地上部と地下部の双方において、培土の滅菌法によらず、Tween80 の添加はアカマツのバイオマスに負の影響を及ぼした。その結果、実生苗全体においても Tween80 の添加は有意に成長に負の影響を及ぼしていた。一方、培土の滅菌法を比較すると、ガンマ線滅菌法のほうがオートクレーブ処理よりもアカマツの地下部のバイオマスが大きいことがわかった。地上部乾重と苗全体のバイオマスでは滅菌法の違いによる有意差は検出されなかった。また、Tween80 添加の有無と培土の滅菌法の間に交互作用は認められなかった。

## 考察

本実験により、培土への Tween80 の添加は、アカマツの生育に負の影響を及ぼすことが確認された。界面活性剤は植物の生育に負の影響を及ぼすことが知られている (Parr and Norman 1964; Singh and Orsenigo 1984; Rinnalo et al. 1988; Bellani et al. 1995)。一方で、植物の成育に正の影響を及ぼす場合も知られている (Parr and Norman 1964; Rinnalo et al. 1988)。これらの研究によると、界面活性剤の添加濃度が低い場合には正の影響が見られる場合があるが、一般に濃度が高くなるにつれて負の影響が強くなる。本実験の Tween80 の添加濃度 5%は、これらの研究で使用された濃度よりも高く、アカマツに負の影響を及ぼしたと考えられる。

培土にオリーブ油を添加した実験では、アカマツ実生の成長阻害と、マツタケの菌根感



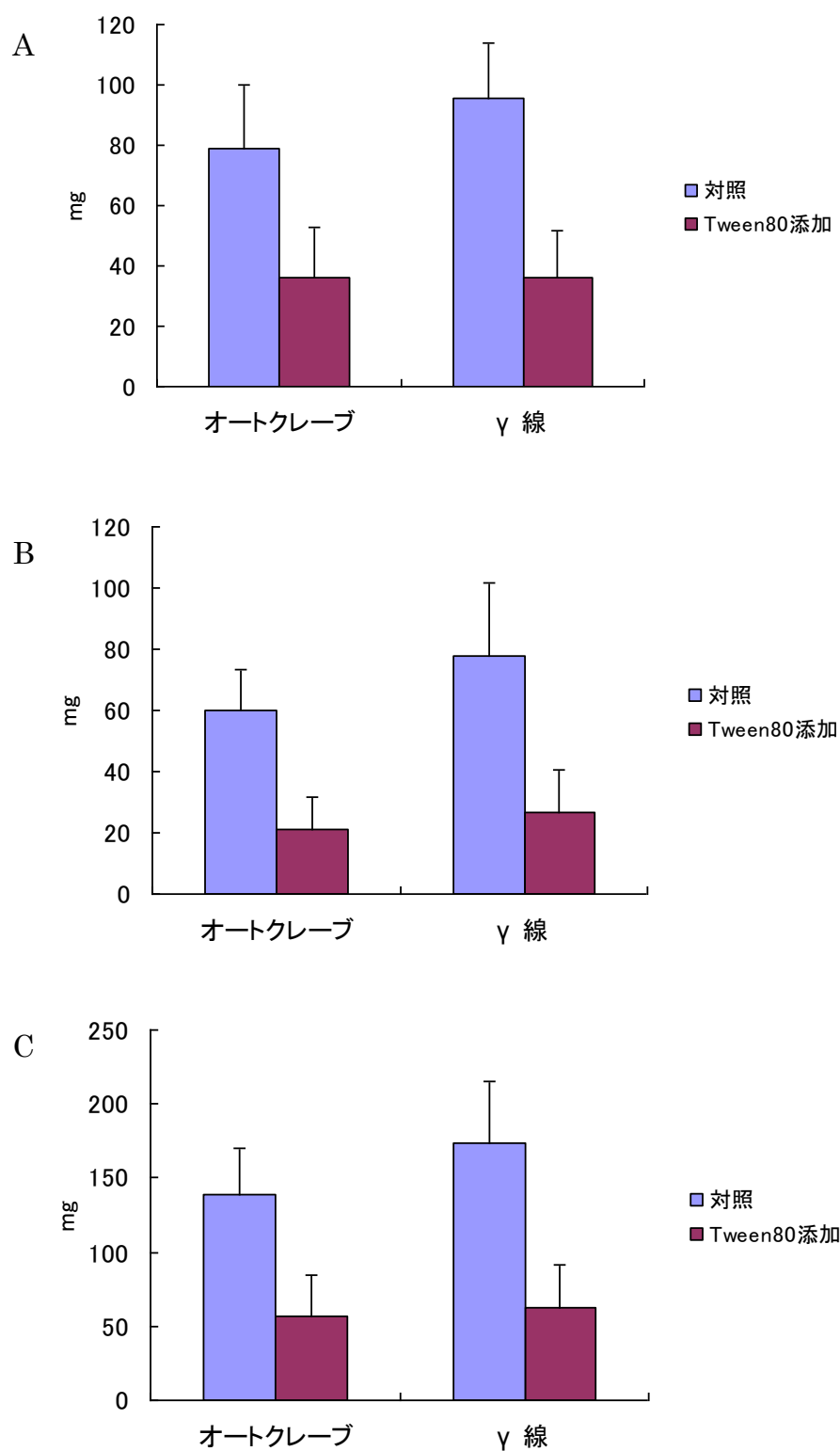


図 3-4-1. アカマツ実生苗の乾重. 縦軸は乾重 (mg). A. 地上部の乾重. B. 地下部の乾重. C. 苗全体の乾重. バーは標準偏差. 統計解析の結果は表 3-4-1 に示した.

表 3-4-1. アカマツの乾重の二元配置分散分析表

A. 地上部の乾重

要因	自由度	平方和	平均平方	F 値
滅菌法	1	1641.04	1641.04	2.93818
Tween80 添加	1	11563.7	11563.7	20.7041 *
交互作用	1	929.726	929.726	1.66462
残差	20	11170.4	558.522	
全体	23	25499.2		

B. 地下部の乾重

要因	自由度	平方和	平均平方	F 値
滅菌法	1	1864.09	1864.09	4.4161 *
Tween80 添加	1	9248.52	9248.52	21.9102 *
交互作用	1	533.862	533.862	1.26474
残差	20	8442.22	422.111	
全体	23	20273.3		

C. 実生苗全体の乾重

要因	自由度	平方和	平均平方	F 値
滅菌法	1	7003.15	7003.15	3.83848
Tween80 添加	1	41495.2	41495.2	22.7439 *
交互作用	1	2872.62	2872.62	1.57451
残差	20	36489.2	1824.46	
全体	23	88619.3		

\*は有意水準 5%で有意差が検出されたことを示す.

染率の低下がみられている (Guerin-Laguet et al. 2003). そのため、外生菌根そのものへの影響は不明であるが、Tween80 を添加した場合においても、宿主の生育阻害により、感染可能な細根量の減少によって、菌根菌の感染機会の低下や感染率の低下が考えられる。一方で、マツタケの菌糸体成長は、Tween80 の培土への添加濃度が高くなるにつれて促進されることから (Guerin-Laguet et al. 2003)、Tween80 を菌糸体成長の促進に用いる場合には濃度を下げないほうが望ましい。したがって、宿主の根と Tween80 の接触を避けるような工夫が必要になると推察される。

また、培土の滅菌法では、オートクレーブ処理での地下部成長量はガンマ線滅菌よりも小さくなった。培土のオートクレーブは、外生菌根菌の菌糸体成長においてもガンマ線滅菌土と比較して成長量が低下した。培土の滅菌法の外生菌根そのものへの影響は不明であるが、宿主の根の成長量が低下して菌根菌の感染機会が減少すること、菌根菌の菌糸体成長量も低下することから、菌根合成に際してはガンマ線滅菌土を使用するほうがよいと考えられる。

## 4章 マツタケの人工栽培に向けて

### 非滅菌環境下での菌根合成法の確立

これまで、マツタケ感染苗の作製において、宿主となるアカマツには特別の注意は払われておらず、培養菌糸体を接種源とする感染苗作製においては、無菌苗の作成と滅菌環境の維持の容易さから、もっぱら実生苗が用いられてきた。しかし、マツタケの子実体を 1 本発生させるためには乾燥重量で約 100g の菌糸体が必要であると考えられている（鈴木 2005）。こうした条件を考えると、個体サイズが小さいため、光合成量や菌根菌の感染可能な細根量が限られている実生苗は人工栽培の際の宿主として不適當であると考えられ、宿主のサイズは大型のものが必要とされる。また、マツタケ感染苗を別の宿主への接種源として用いる場合にも、野外で生残させるためにはある程度の個体サイズが必要となると考えられる。しかし、現在は滅菌環境下でのみ菌根を形成、維持可能であるため、実生から苗を育てる場合には、大型化する系で長期間滅菌状態を維持しなくてはならず、あまり实际的ではない。そのため、非滅菌環境下でのマツタケ菌根の維持、発達のための手法が必要とされる。

本研究では、2 章において、非滅菌環境下でのマツタケ菌根の合成法の確立を目的とし、アカマツ実生苗に対するマツタケ菌糸の接種を行った。また、同様の接種法により、空中取り木法により得た菌根菌未感染苗、および、発根処理によりアカマツ成木より得た菌根菌未感染根に対しても菌根合成を試みた。アカマツの実生苗に対してマツタケの培養菌糸を接種した結果、マツタケ菌根の形成が確認された。また、同様の接種法によって空中取り木苗にもマツタケ菌根が形成されたことから、大型の苗木に対してもマツタケ菌根の合成は可能であることが示された。さらに、アカマツ成木より得られた細根にマツタケ培養菌糸を接種することにより、マツタケ菌根を合成することに成功した。なお、マツタケと同様の実験系でアカハツ培養菌糸を接種源として用いることにより、アカハツ菌根の合成にも成功した。このことから、本研究で用いた接種法は他の外生菌根菌に対しても有効な接種法であると考えられた。

また、ブナ科樹種がマツタケの宿主であるかを調べるため、中国雲南省の 3 ヶ所の森林にあったマツタケのシロを採取し、含まれている根の解剖観察によって樹種の推定を行った。その結果、ブナ科樹種の優占していた 2 ヶ所の森林のシロでは、マツタケが広葉樹を宿主としていることが確認された。一方、マツ属樹種の優占していた森林のシロでは、マ

ツ属樹種が宿主となっているものと考えられた。また、これら宿主の異なるマツタケの培養菌糸片をブナ科樹種およびアカマツに接種したところ、菌株の採取地の林相にかかわらず、ブナ科樹種とアカマツの両方に菌根が形成された。このことから、マツタケはひとつの菌株が、ブナ科樹種とマツ科樹種の両方を宿主とすることができると考えられた。したがって、マツタケの人工栽培において、ブナ科樹種を宿主として利用できる可能性が考えられた。また、世界の菌株を広く収集し、比較をすることで感染苗の作成やシロの形成に適した菌株を見つけることも考えられる。

これらの結果から、非滅菌環境下においてマツタケ菌感染苗を作製できることが明らかになった。そして、樹齢や樹体の大きさに関わらずマツタケ菌根を形成させることが可能になり、苗木や成木を用いて子実体形成の可能な大きなシロの形成が可能となると考えられる。取り木苗を用いた方法は、1年生枝から苗を作製するために、野外へ移植可能なサイズのマツタケ菌感染苗を、実生から育成する場合に比べて、1年以上期間を短縮して作製することができる。アカマツは挿し木による苗の作製が困難であるため、取り木による大型苗作成法は、マツタケの人工栽培を行ううえで有効な手法になると考えられる。また、根を掘り起こして発根処理を行う手法も菌根菌未感染の根を作製するのに有効な方法であった。アカマツ林の成木のほか、苗畑などに植栽されている大型の宿主に対して発根処理を行うことでマツタケ接種可能箇所を作製できると考えられる。今後、作製した感染苗でシロを形成させることにより、ホンシメジ (Kawai 1997) のような感染苗の鉢植え栽培による子実体形成や、アカマツ林への感染苗の植栽によるマツタケ発生林の造成が考えられる。鉢植え栽培では、マツタケのシロは成長するにつれて内部にイヤ地を形成するため、継続的に子実体を発生させることは困難だと考えられるが、栽培環境を制御しやすいという利点があり、子実体発生条件の解明にも役立つと考えられる。一方で、林地へ感染苗を移植してマツタケを定着させる方法は確立されていないため (山田, 大政 2003), 感染苗を用いたマツタケ発生林の造成には、シロの定着を阻害する要因について明らかにし、シロを定着、拡大させる方法を解明していく必要がある。林地にシロを定着させるとことができれば、継続的な子実体の発生が期待できる。

#### 界面活性剤による菌糸体成長促進作用の検討

マツタケは他種の外生菌根菌と異なり、感染苗において根外菌糸体の発達が悪く (Guerin-Laguet et al. 2000b; Vaario et al. 2000), また、培地上においても菌糸成長が

非常に遅いため（小川 1978），効率よくシロを形成させるためには，菌糸体成長を促進させる手法が重要となると考えられる．また，マツタケ菌糸の単独培養で子実体原基が形成された例があり（小川，浜田 1975），菌糸体成長の促進は菌糸の単独培養による子実体形成にも有用であると考えられる．これまでにマツタケの菌糸体成長を促進させる物質として，Tween80 をはじめとする数種の物質が知られている．また，培養基質となる土壌の性質は滅菌処理によって変化することが知られており（Trevors 1996; Berns et al. 2008），その変化は滅菌法により異なる．これまでのマツタケの菌糸体成長に関する研究は，オートクレーブ滅菌によって行われており，ガンマ線滅菌による評価は行われていない．

3 章において，マツタケ菌糸の成長促進効果が確認されている Tween80 について，その促進効果を高めることを目的として，培土と Tween80 の滅菌方法について検討した．その結果，Tween80 および培土を個別にガンマ線滅菌し，混合した場合に菌糸体量が最大になることがわかった．また，Tween80 の添加に対するマツタケの菌糸体成長は，菌株の産地や宿主となっている樹種によらず同一の反応を示したことから，Tween80 添加による菌糸体成長促進効果は共通していると考えられた．

Tween80 を添加した培土でマツタケを含む外生菌根菌 5 種を培養した結果，すべての菌株において菌糸体成長が促進された．このことから，Tween80 の添加による菌糸体成長促進作用は外生菌根菌全般に共通していると考えられた．そして，5 菌株の各処理への応答を見ると，全般的に成長量の小さい低成長グループと，全般的に成長量の大きい高成長グループの 2 つのタイプに分かれた．マツタケは低成長グループに属していた．

また，Tween80 が宿主であるアカマツに及ぼす影響についても検討した．Tween80 の添加は地上部，地下部の双方において，アカマツのバイオマスに負の影響を及ぼした．一方，培土の滅菌法を比較すると，ガンマ線滅菌法のほうがオートクレーブ処理よりもアカマツの地下部のバイオマスが大きいことがわかった．これらの結果から，菌根合成に際してはガンマ線滅菌土を使用するほうがよいと考えられた．

Tween80 と培土をガンマ線滅菌後に混合する手法により，本研究では，今までに知られていた，Tween80 を培土に添加してからオートクレーブ滅菌する手法に対し，5.4 倍の菌糸体成長促進効果が得られた．これらの結果から，Tween80 と培土をガンマ線滅菌後に混合する手法はマツタケ菌糸体の培養に有効であると考えられた．培土のガンマ線滅菌での菌糸体成長が良好であったことから，今後の培土を用いた研究においても，オートクレーブ滅菌とガンマ線滅菌を比較検討することが必要であると考えられる．また，いずれの滅菌

法においても、滅菌前の土壌とは性質が異なっており、滅菌していない生の土壌がマツタケの菌糸体生育に及ぼす影響は知られていない。マツタケ感染苗の野外への植栽時には、滅菌していない土壌へとシロが成長していく必要があるため、こうした影響を把握すると主に、添加物質の非滅菌土壌におけるマツタケ菌糸体成長促進効果についても検討していく必要がある。また、Tween80 を含め、これまでにさまざまな添加物質がマツタケの菌糸体成長に有効であることが報告されているが、その成長促進効果は滅菌環境下での、長くても数ヶ月程度という短期間における影響を調べたものである。これらの物質を人工栽培へ応用するには、他の微生物と競争する環境における成長促進効果や、より長期間での影響を評価していく必要がある。

### マツタケの人工栽培に向けて

本研究では非滅菌環境下におけるアカマツとマツタケの菌根合成と、界面活性剤 Tween80 添加による菌糸体成長促進作用について検討した。そのなかで、今後人工栽培の研究を進めるうえで、残された課題もみつかった。非滅菌環境下でのマツタケ菌根合成は、菌根形成率が低いこと、形成された菌根もまだ発達途上の若い菌根のみであったことから、菌根形成率の向上やシロの形成に向けて、接種条件や栽培条件についてさらに検討の余地があるものと考えられた。また、Tween80 はマツタケの菌糸体成長を促進するものの、アカマツの生育には阻害的に作用するため、マツタケ感染苗作製の際に、Tween80 をそのまま添加することはできず、菌糸体の増殖部と菌根形成部を分離するなどの方法を検討する必要があると考えられた。また、マツタケ菌糸体の成長を促進し、アカマツの生育を阻害しない添加物質の探索も人工栽培に向けた方向のひとつであると思われる。そうした物質がみつければ、シロの人工形成のほかに、野外の既存のシロの成長促進にも応用可能であると考えられる。

また、他種の外生菌根菌においては、子実体形成可能な菌株が限定されている例や (Ohta 1994; Selosse et al. 2001)、菌株を分離してからの培養期間が長くなると子実体形成能力が低下する例も知られている (Giltrap 1981; Yamanaka et al. 2000)。マツタケにおいても、同様の可能性が考えられるため、採取地や DNA タイプの異なる菌株を用いた研究が必要になるかもしれない。

マツタケを人工栽培するためには、作製したマツタケ感染苗からシロを形成させる必要がある。シロの形成初期段階については、野外での観察が困難であり、また、人為的にシ

シロを形成させる手法が確立されていないことから不明な点が多い。本研究においては、シロの形成にはいたらなかったものの、非滅菌環境下においてマツタケ感染苗の作製が可能であることが示された。今後、滅菌環境下での実生苗を用いた実験系において、Tween80添加などの菌糸体増殖手法を組み合わせることで、シロ形成条件を明らかにし、取り木苗などの大型の系に応用することで、子実体発生が可能な人工シロの形成が可能になると考えられる。感染苗にシロを形成させ、成長させる過程においては、上述のように感染苗の鉢植え栽培や野外のアカマツ林への植栽が考えられる。また、アカマツ成木に対して直接接種を行い、シロを形成させることも考えられる。野外のシロにおいて、マツタケに適した生育環境は生物的、非生物的条件の両方から調査されており、人工シロの定着、拡大にも有用であると考えられる。人工シロの形成後には、子実体原基形成条件と原基から子実体への発達、成熟条件について明らかにすることが必要となってくる。低温刺激や降水量のように、現在知られている子実体原基形成条件や、マツタケ発生林の環境条件の調査をもとに、実際に野外の既存のシロや感染苗で作製した人工シロで子実体原基の形成、子実体の発達をさせることで、詳細な原基形成条件や子実体の発達、成熟条件について明らかにすることができ、最終的にマツタケの人工栽培につながると考えられる。



## 謝辞

本研究には、多くの方々のご指導、ご援助を賜った。

森林総合研究所の鈴木和夫博士は私をマツタケ研究の道へと導き、また、研究に対しご指導を下さった。New Zealand Institute for Crop and Food Research の Alexis Guerin-Laguet 博士には、外生菌根菌研究の楽しさを教えていただき、また、実験手法について伝授していただいた。東京大学の松下範久准教授には研究方針から具体的な実験の段取り、本論分の執筆まで、広く相談に乗っていただき、また、御指導を下さった。東京大学の丹下健教授、富樫一巳教授、益守眞也講師には本論文の審査、校閲をしていただいた。東京大学演習林の坂上大翼助教には、田無試験地における実験において、さまざまな便宜を図っていただいた。信州大学の山田明義准教授には本研究に使用した菌株を分譲していただいた。また、これまでの研究期間中に、私とともに森林植物学研究室に在籍していた皆様には、時には励まし、時には叱咤激励をいただいた。最後に、東京大学の寶月岱造教授には、本研究の指導から論文執筆にいたるまで、暖かいご指導、ご助言をいただいた。

現在の私があるのは、ひとえにこうした皆様のお力添えによるものである。ここにしるし、篤くお礼を申し上げる。

## 引用文献

- Arai, Y., Takao, M., Sakamoto, R., Yoshikawa, K. and Terashita, T. (2003) Promotive effect of the hot water-soluble fraction from corn fiber on vegetative mycelial growth in edible mushrooms. *J. Wood Sci.* 49: 437-443.
- 荒尾正剛, 坂本直紀, 青木昭男, 明神修二 (1993) マツタケ菌の人工接種技術に関する研究. 高知県林試研報 19: 84-86.
- Bao, D., Koike, A., Yao, F., Yamanaka, K., Aimi, T. and Kitamoto, Y. (2007) Analyses of the genetic diversity of matsutake isolates collected from different ecological environments in Asia. *J. Wood Sci.* 53: 344-530.
- Bellani, L.M., Rinnalo, C. and Bennici, A. (1995) Cyto-morphological alterations in *Allium* roots induced by surfactants. *Envir. Exp. Bot.* 31: 179-185.
- Bergius, N. and Danell, E. (2000) The Swedish matsutake (*Tricholoma nauseosum* syn. *T. matsutake*): distribution, abundance and ecology. *Scand. J. For. Res.* 15: 318-325.
- Berns, A.E., Philipp, H., Narres, H.-E., Burauel, P., Vereecken, H. and Tappe, W. (2008) *Eur. J. Soil Sci.* 59: 540-550.
- Biswas, C. and Johri, B.M. (1997) *The Gymnosperms*. 494pp. Narosa Publishing House, New Delhi.
- Bryan, W.C. and Zak, B. (1961) Synthetic culture of mycorrhizae of southern pines. *For. Sci.* 7: 123-129.
- Cao, Z. and Yao Y. (2004) Morphological and biogeographic study on *Tricholoma matsutake*-complex. *Mycosystema* 23: 43-55.
- Chapela, I.H. and Gargelotto, M. (2004) Phylogeography and evolution in matsutake and close allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. *Mycologia* 96: 730-741.
- Cutler, D.F., Rudall, P.J., Gasson, P.E. and Gale, R.M.O. (1987) *Root identification manual of trees and shrubs*. 245pp. Chapman and Hall, London.

Danell, E. and Camacho, F.J. (1997) Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385: 303.

Debaud, J.C. and Gay, G. (1987) In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol.* 105:429-435.

Deng, H., Yao, Y. and Pegler D.N. (2004) An annotated checklist of *Tricholoma* from China. *J. Fungal Res.* 2: 1-18.

Dunstan, W.A., Dell, B., Malajczk, N. and Iwase, K. (2000) Detection of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* and some related species with specific ITS primers. *Mycoscience* 41: 33-37.

Ellis, R.J., Bragdon, G.A. and Schlosser, B.J. (1999) Properties of the blue light requirements for primordial initiation and basidiocarp maturation in *Coprinus stercorarius*. *Mycol. Res.* 103: 779-784.

衛藤慎也 (1990) 菌根合成によるマツタケ菌感染苗の育成. 広島県林試研報 24: 1-6.

衛藤慎也 (1998) 容器内混合培養法によるマツタケ菌根合成苗の育成. 広島県林技セ研報 31: 21-25.

Gams, W. (2002). Report of the committee for fungi: 10. *Taxon* 51: 791-792.

Gill, W.M. and Suzuki, K. (2000a) Detection in situ of endophyte within *Tricholoma matsutake* / *Pinus densiflora* mycorrhizal roots. *J. For. Res.* 5: 289-292.

Gill, W.M. and Suzuki, K. (2000b) The external morphological characterization of *Tricholoma matsutake* infection of host *Pinus densiflora* lateral roots. *J. For. Res.* 5: 99-102.

Gill, W.M. and Suzuki, K. (2000c) Matsutake – morphological evidence of ectomycorrhiza formation between *Tricholoma matsutake* and host roots in a pure *Pinus densiflora* forest stand. *New Phytol.* 147: 381-388.

Gill, W.M. Lapeyrie, F., Gomi, T. and Suzuki, K. (1999) *Tricholoma matsutake* – an

assessment of in situ and in vitro infection by observing cleared and stained whole roots. *Mycorrhiza* 9: 227-231.

Giltrap, N.J. (1981) Formation of primordia and immature fruiting bodies by ectomycorrhizal fungi in culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77: 204-205.

Godbout, C. and Fortin, J.A. (1990) Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grown white pine seedlings. *Mycol. Res.* 94: 1051-1058.

Godbout, C. and Fortin, J.A. (1992) Effects of nitrogen fertilization and photoperiod on basidiome formation of *Laccaria bicolor* associated with container-grown jack pine seedlings. *Can. J. Bot.* 70: 181-185.

Gomes, D.J., Gomes, J. and Steiner W. (1994) Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Biotechnology* 33: 87-94.

Guerin-Laguet, A., Plassard, C. and Mousain, D. (2000a) Effects of conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can. J. Microbiol.* 46: 790-799.

Guerin-Laguet, A., Matsushita, N., Kikuchi, K., Iwase, K., Lapeyrie, F. and Suzuki, K. (2002) Identification of a prevalent *Tricholoma matsutake* ribotype in Japan by rDNA IGS1 spacer characterization. *Mycol. Res.* 106: 435-443.

Guerin-Laguet, A., Vaario, L.M., Gill, W.M., Lapeyrie, F., Matsushita, N. and Suzuki, K. (2000b) Rapid in vitro ectomycorrhizal infection on *Pinus densiflora* roots by *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 41: 389-393.

Guerin-Laguet, A., Vaario, L.M., Matsushita, N., Shindo, K., Suzuki, K. and Lapeyrie, F. (2003) Growth Stimulation of Shiro-like, mycorrhiza forming, mycelium of *Tricholoma matsutake* on solid substrates by non-ionic surfactants or vegetative oil. *Mycol. Prog.* 2: 37-44.

Hacskeylo, E. (1965) *Thelephora terrestris* and mycorrhizae of Virginia pine. *For. Sci.* 11: 401-404.

Hall, I.R., Wang, Y., Amicucci, A. (2003a) Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. Trends Biotechnol. 21: 433-438.

Hall, I.R., Stephenson, S.L., Buchanan, P.K., Wang, Y., Cole, A.L.J. (2003b) Edible and poisonous mushrooms of the world. 371pp, Timber Press, Portland and Cambridge.

Hattori, T., Ohta, A., Itaya, M. and Shimada, M. (2003) The ability of ectomycorrhizal fungi to utilize fatty acids and a lipid as a carbon source for mycelial growth. Can. J. Bot. 81: 1285-1292.

Hosford, D, Pilz, D., Molina, R. and Amaranthus, M. (1997) Ecology and management of the commercially harvested American matsutake mushroom. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-412

Hsieh, C., Wang, H., Chen, C., Hsu, T. and Tseng, M. (2008) Effect of plant oil and surfactant on production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa*. Biochem. Eng. J. 38: 198-205.

Hwang, S. and Kim, J. (2000) Secondary structural and phylogenetic implications of nuclear large subunit ribosomal RNA in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. Curr. Microbiol. 40: 250-256.

今関六也 (1951) マツタケモドキについて. 植物研究雑誌 26: 264-266.

石川達芳, 竹内栄 (1970) 林内灌水がマツタケ子実体の発生ならびに林内環境に及ぼす影響. 日林誌 52:362-368.

伊藤武, 小川真 (1983) マツタケ林環境整備施業の効果 —「アカマツ - 裸地」林相への敷きわら施業—. 広島県林試研報 18: 31-37.

枯木熊人, 川上嘉章 (1985) マツタケ菌感染苗によるシロの人工形成. 広島県林試研報 20: 13-23.

枯木熊人, 川上嘉章 (1989) マツタケ林環境整備事業の効果 —壮齡林における施業効果—. 広島県林試研報 23: 1-16.

Kawagishi, H., Hamajima, K., Takanami, R., Nakamura, T., Sato, Y., Akiyama, Y., Sano,

M. and Tanaka, A. (2004) Growth promotion of mycelia of the matsutake mushroom *Tricholoma matsutake* by D-Isoleucine. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 2405-2407.

Kawai, M. (1997) Artificial ectomycorrhiza formation on roots of air-layered *Pinus densiflora* saplings by inoculation with *Lyophyllum shimeji*. Mycologia 89: 228-232.

川上嘉章 (1990) マツタケ発生量に影響を及ぼす要因 (I) —降雨量・地温と発生量の関係—. 広島県林試研報 24: 7-20.

川上嘉章 (1993a) マツタケ発生量に影響を及ぼす要因 (II) —シロ菌糸伸長量及び雨量と発生量の関係—. 広島県林試研報 27: 135-142.

川上嘉章 (1993b) マツタケシロの形成と成長. 広島県林試研報 28: 49-54.

Kikuchi, K., Matsushita, N., Guerin-Laguette, A., Ohta, A. and Suzuki, K. (2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. Mycol. Res. 104: 1427-1430.

衣川堅二郎 (1963) マツタケの発生に関する生態学的研究 —生長曲線とその解析—. 大阪府立大学紀要 14: 27-60.

衣川堅二郎 (1965a) 春マツタケ発生原因としての温度について. 日林誌 47: 40-41.

衣川堅二郎 (1965b) マツタケ豊凶予想に関する一考察. 日林誌 47: 74-76.

北本豊, 鈴木彰 (1992) 生理. (きのこ学. 古川久彦編, 共立出版, 東京). 79-116.

Kraighter, H., Agerer, R. and Javornik, B. (1995) Ectomycorrhizae of *Lactarius lignyotus* on Norway spruce, characterized by anatomical and molecular tools. Mycorrhiza 5: 175-180.

Kusuda, M., Nagai, M., Hur, T., Ueda, M. and Terashita, T. (2003) Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*. Mycoscience 44: 311-317.

Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Yamanaka, K., Terashita, T. and Miyatake, K. (2007) Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*. Mycoscience

48: 358-364.

Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Araki, Y., Yamanaka, K., Nakazawa, M., Miyatake, K. and Terashita, T. (2006) Detection of  $\beta$ -glucosidase as saprotrophic ability from an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 47: 184-189.

Lamhamedi, M.S., Godbout, C. and Fortin, J.A. (1994) Dependence of *Laccaria bicolor* basidiome development on current photosynthesis of *Pinus strobus* seedlings. *Can. J. For. Res.* 24: 1797-1804.

Last, F.T., Mason, P.A., Pelham, J. and Ingleby, K. (1984) Fruitbody production by sheathing mycorrhizal fungi: effects of 'host' genotypes and Propagating soils. *For. Ecol. Manage.* 9: 221-227.

Last, F.T., Pelham, J., Mason, P.A. and Ingreby, K. (1979) Influence of leaves on sporophore production by fungi forming sheathing mycorrhizas with *Betula* spp. *Nature* 280: 168-169.

Lhamhamedi, M.S., Godbout, C. and Fortin, J.A. (1994) Dependence of *Laccaria bicolor* basidiome development on current photosynthesis of *Pinus strobes* seedlings. *Can. J. For. Res.* 24: 1797-1804.

Li, C., Cheng, C. and Chen, T. (2001) Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween80 as the carbon source. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 258-263.

Lian, C., Narimatsu, M., Nara, K. and Hogetsu, T. (2006) *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytol.* 171: 825-836.

Lian, C., Hogetsu, T., Matsushita, N., Guerin-Laguette, A., Suzuki, K. and Yamada, A. (2003) Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*, by an ISSR-suppression-PCR method. *Mycorrhiza* 13: 27-31.

Lotrarion, J.B., Stuart, B.J., Lam, T., Arands, R.R., O'Connor, O.A. and Kosson, D.S. (1995) Effects of sterilization methods on the physical characteristics of soil: implications for sorption isotherm analyses. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54:

668-675.

Lun, Z., Li, Y., Xing, S. and Vaario, L.M. (2006) Artificial Shiro formation of *Tricholoma matsutake*. Front. Biol. China 3: 230-235.

Martin, F., Delaruelle, C. and Hilbert, J.L. (1990) An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. Mycol Res. 94: 1059-1064.

Massicotte, H.B., Melville, L.H. and Peterson, R.L. (2005) Building a basidiocarp: a case study of *Laccaria* spp. fruitbodies in the extraradical mycelium of *Pinus* ectomycorrhizas. Mycologist 19: 141-149.

升原一介 (1992) マツタケ菌感染用苗木の育成に関する研究. 広島県林試研報 26: 45-61.

松永謙一, 千葉忠彦, 高橋栄作 (2003) マツタケ菌糸体の量産技術と健康食品への応用. バイオインダストリー 20:37-46.

Matsushita, N., Kikuchi, K., Sasaki, Y., Guerin-Laguette, A., Lapeyrie, F., Vaario, L.M., Intini, M. and Suzuki, K. (2005) Genetic relationship of *Tricholoma matsutake* and *T. nauseosum* from the northern hemisphere based on analyses of ribosomal DNA spacer regions. Mycoscience 46: 90-96.

まつたけ増産のてびき編集委員会 (2005) つくるマツタケへーまつたけ増産のてびき 改訂Ⅲ版一. 92pp. 長野県特用林産振興会, 長野.

McNamara, N.P., Black, H.I.J., Beresford, N.A. and Parekh, N.R. (2003) Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. Appl. Soil. Ecol. 24: 117-132.

Metcalf, C.R. and Chalk, L. (1983) Anatomy of the dicotyledons. v.2 Wood structure and conclusion of the general introduction. (2nd edn.) 297pp. Clarendon Press, Oxford.

三根毅 (1934) 松茸の発生と寄主 (赤松) の関係. 日林誌 16: 453-469.

Morimoto, N. and Oda, Y. (1973) Effects of light on fruit-body formation in a basidiomycete, *Coprinus macrorhizus*. Plant Cell Physiol. 14: 217-255.



Murata, H. and Babasaki, K. (2005) Intra- and inter-specific variations in the copy number of two types of retrotransposons from the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15: 381-386.

Murata, H. and Yamada, A. (1999) Identification of ectomycorrhizae formed between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* by polymerase chain reaction (PCR) targeting retroelement coding regions. *Mycoscience* 40: 531-534.

Murata, H. and Yamada, A. (2001) Amplification and cloning of putative reverse transcriptase genes from *Tricholoma* spp. by polymerase chain reaction. *Mycoscience* 42: 395-398.

Murata, H., Babasaki, K. and Yamada, A. (2005a) Highly polymorphic DNA markers to specify strains of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* based on  $\sigma_{marY1}$ , the long terminal repeat of *gypsy-type* retroelement *marY1*. *Mycorrhiza* 15: 179-186.

Murata, H., Babasaki, K., Miyazaki, Y. and Yamada, A. (2002) Genetic evidence that two types of retroelements evolved through different pathways in ectomycorrhizal homobasidiomycetes *Tricholoma* spp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1880-1886.

Murata, H., Igasaki, T., Shishido, K. and Sunagawa, M. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* that produces commercially valuable fruit bodies, matsutake. *Mycoscience* 47: 228-231.

Murata, H., Ohta, A., Yamada, A., Narimatsu, M. and Futamura N. (2005b) Genetic mosaics in the massive persistent rhizosphere colony “shiro” of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15: 505-512.

Murata, H., Babasaki, K., Saegusa, T., Takemoto K., Yamada, A. and Ohta, A. (2008) Traceability of Asian Matsutake, specialty mushrooms produced by the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*, on the basis of retroelement-based DNA markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2023-2031.

村田義一, 高橋儀昭, 洞平勝男, 安達洋 (2001) トドマツ天然林におけるマツタケの発生現況と発生環境の整備. 北海道林試研報 38: 1-22.

能勢育夫 (1983) マツタケの菌付樹育成と移植後のシロの変化について. 石川県林試研報 13: 11-17.

Nylund, J.E. and Wallander, H. (1989) Effect of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. New Phytol. 112: 389-398.

小川真 (1975a) アカマツ林における菌根菌, マツタケの微生物生態学的研究 I マツタケのシロ. 林試研報 272: 79-121.

小川真 (1975b) アカマツ林における菌根菌—マツタケ—の微生物生態学的研究 II マツタケの菌根. 林試研報 278: 21-49.

小川真 (1977a) アカマツ林における菌根菌—マツタケ—の微生物生態学的研究 III マツタケのシロ土壌と菌根における菌類相. 林試研報 293: 105-170.

小川真 (1977b) アカマツ林における菌根菌—マツタケ—の微生物生態学的研究 IV 菌類社会におけるマツタケのシロ. 林試研報 297: 59-104.

小川真 (1978) 「マツタケ」の生物学. 326pp, 築地書館, 東京.

小川真, 浜田稔 (1975) 純粋培養によるマツタケ子実体原基の形成. 日菌報 16: 406-415.

小川真, 梅原武夫, 紺谷修治, 山路木曾男 (1978) マツタケ菌の増殖法(I) マツタケ感染苗の育成法. 日林試 60:119-128.

小川博志, 篠原弥寿夫, 片倉正行, 石川豊治 (1983) 林地土壌におけるマツタケのシロ形成促進条件の解明に関する試験. 長野県林業指導所業務報告 :186-219.

Oh, K.I., Melville, L.H. and Peterson, R.L. (1995) Comparative structural study of *Quercus serrata* and *Q. acutissima* formed by *Pisolithus tinctorius* and *Hebeloma cylindrosporum*. Trees 9:171-149.

Ohara, H. and Hamada, M. (1967) Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhizas in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Singer. Nature 213: 528-529.

大森久夫 (1989) マツタケの増殖に関する調査 —マツタケの発生と気象—. 岩手県林業試験場成果報告 22: 91-95.

Ohta, A. (1990) A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 31: 323-334.

Ohta, A. (1994) Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. Mycoscience 35: 147-151.

Ohta, A. (1997) Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substance. Mycoscience 38: 403-408.

Ohta, A. (1998) Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. Mycoscience 39: 15-19.

太田明 (1998) 菌根菌栽培—林地から施設まで—：ホンシメジの施設栽培. 日菌報 39: 121-124.

Ohta, A. and Fujiwara, N. (2003) Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. Mycoscience 44: 295-300.

Okeke, B.C. and Obi, S.K.C. (1993) Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species. World J Microbiol. Biotechnol. 9: 345-349.

小野寺有子・鈴木和夫 (1998) マツタケ山の変遷 —長野県上伊那地方を事例として—. 森林文化研究 19: 123-136.

Pardo, A.G. (1996) Effect of surfactants on cellulase production by *Nectoria catalinensis*. Curr. Microbiol. 33: 275-278.

Park, J.W., Takahata, Y., Kajiuchi, T. and Akehata T. (1992) Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. Biotechnol. Bioeng. 39: 117-120.

Parr, J.F. and Norman, A.G. (1964) Effect of nonionic surfactants on root growth and cation uptake. Plant Physiol. 39: 502-507.

Pushalkar, S., Rao, K.K. and Menon K. (1995) Production of  $\beta$ -Glucosidase by *Aspergillus terreus*. Curr. Microbiol. 30: 255-258.

- Rarunee, S., Dell, B., Lumyong, P. and Lumyong, S. (2007) First record of *Tricholoma fulvocastaneum* from Thailand. *Mycoscience* 48: 131-133.
- Reese, E.T. and Maguire, A. (1969) Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 17: 242-245.
- Rinnalo, C., Bennici, A. and Cenni, E. (1988) Effects of two surfactants on *Triticum durum* Desf. plantlets. *Envir. Exp. Bot.* 28: 367-374.
- Ryman, S., Bergius, N. and Danell, E. (2000). Proposal to conserve the name *Armillaria matsutake* against *Armillaria nauseosa* (Fungi, Basidiomycotina, Tricholomataceae). *Taxon* 49: 555-556.
- Sagara, N., Hongo, T., Murakami, Y., Hashimoto, T., Nagamasu, H., Fukiharu, T. and Asakawa, Y. (2000) *Hebeloma radicosioides* sp. nov., an agaric belonging to the chemoecological group ammonia fungi. *Mycol. Res.* 104: 1017-1024.
- Salonius, P.O., Robinson, J.B. and Chase, F.E. (1967) A comparison of autoclaved and gamma-irradiated soils as media for microbial colonization experiments. *Plant Soil* 27: 239-248.
- Selosse, M., Martin F. and le Tacon F. (2001) Intraspecific variation in fruiting phenology in an ectomycorrhizal *Laccaria* population under Douglas fir. *Mycol. Res.* 105: 524-531.
- Sha, T., Qiang, Y., Zhang, H., Ding, H., Cheng, L. and Zhao, Z. (2007a) IGS1-RFLP comparative analysis of *Tricholoma matsutake* (Tricholomataceae) from Yunnan and Japan. *Acta Botanica Yunnanica* 29: 243-246.
- Sha, T. Ding, H., Li, M., Zhang, H., Cheng, L., Zhao, Z. and Zhang, Y. (2005) Sequence analysis of the internal transcribed spacer of gene coding for rRNA in *Tricholoma matsutake* and *Tricholoma bakamastutake*. *Mycosystema* 24: 48-52.
- Sha, T., Zhang, H., Ding, H., Li, Z., Cheng, L., Zhao, Z. and Zhang, Y. (2007b) Genetic diversity of *Tricholoma matsutake* in Yunnan Province. *Chin. Sci. Bull.* 52: 1212-1216.
- 島園平雄 (1979) マツタケ, ニセマツタケおよびバカマツタケの寒天培地上におけるコロニ

一形態の比較. 日菌報 20: 176-184.

下川利之 (1980) マツタケ増殖技術開発に関する研究 I 客土による活性菌根帯の増殖. 岡山県林試研報 : 1-11.

下川利之 (1985) マツタケ増殖技術開発に関する研究 II アカマツ林の下床植生と A0 層の除去がきのことと土壌生物に与える影響. 岡山県林試研報 5: 41-53.

Singh, M. and Orsenigo, J.R. (1984) Phytotoxicity of ninionic surfactants to sugarcane. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 32: 119-124.

鈴木和夫 (2005) 外生菌根共生系の生理生態とマツタケのパズル. 日林誌 87: 90-102.

Suzuki, K. (2006) The significance of mycorrhizae in forest ecosystems. In Plantation and technology in tropical forest science. Suzuki, K., Ishii, K., Sakurai, S., Sasaki, S. (eds.), Springer, Tokyo, 41-52

高橋信孝, 増田芳雄 (1994) 植物ホルモンハンドブック [上巻]. 655pp, 培風館, 東京.

寺下隆夫, 河野又四 (1989) マツタケとその近縁種の産生する酸性プロテアーゼについて. 近畿大農紀要 22: 5-12.

富永保人 (1965) マツタケ菌糸の特性に関する研究 1. 菌糸の生長に及ぼす培養素材と温度の影響. 広島農短大報 2: 242-246.

富永保人, 荒井遼子, 伊藤稔夫 (1981) 中華人民共和国のマツタケ (松茸) について I. 雲南省のマツタケ. 広島農短大報 6: 449-458.

富永保人, 鮮明耀, 唐利民 (1988) 中華人民共和国のマツタケ (松茸) について II. 四川省馬爾康県と小金県のマツタケ. 広島農短大報 8: 559-570.

富永保人, 鮮明耀, 劉芳秀, 譚偉 (1989) 中華人民共和国のマツタケ (松茸) について III. 四川省塩源県と徳昌県のマツタケ. 広島農短大報 8: 733-742.

鳥越茂 (1982) マツタケ菌の増殖法 (I) 腐植層かきとり施業によるシロ数の増加. 兵庫県林試研報 24: 1-11.

鳥越茂, 塩見晋一 (1984) マツタケのシロの形成と環境 (I) —マツタケ山の林内及び土壌環境—. 兵庫県林試研報 26: 56-67.

鳥越茂, 塩見晋一 (1987) マツタケのシロの形成と環境 (II) —マツタケ発生林の高等菌類の発生期間と発生条件—. 兵庫県林試研報 33: 60-71.

鳥越茂, 塩見晋一 (1992) マツタケのシロの形成と環境 (III) —施業による林内環境の変化とシロ増殖—. 兵庫県林試研報 39: 1-20.

Trevors, J.T. (1996) Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. J. Microbiol. Meth. 26: 53-59.

Unestam, T. and Sun, Y. (1995) Extramatrical structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 5: 301-311.

Vaario, L.M., Guerin-Laguette, A., Gill, W.M., Lapeyrie, F. and Suzuki, K. (2000) Only two weeks are required for *Tricholoma matsutake* to differentiate ectomycorrhizal Hartig net structures in roots of *Pinus densiflora* seedlings cultivated on artificial substrate. J. For. Res. 5: 293-297.

Vaario, L.M., Guerin-Laguette, A., Matsushita, N. Suzuki, K. and Lapeyrie, F. (2002) Saprobic potential of *Tricholoma matsutake*: growth over pine bark treated with surfactants. Mycorrhiza 12: 1-5.

Wang Y., Hall, I.R. and Evans, L.A. (1997) Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies. 1. *Tricholoma matsutake* and allied fungi. Econ. Bot. 51: 311-327.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) PCR Protocols. Academic Press 315-322.

Xu, J., Guo, H. and Yang, Z. (2007) Single nucleotide polymorphisms in the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake*. Microbiol. 153: 2002-2012.

Xu, J., Sha, T., Li, Y., Zhao, Z. and Yang, Z.L. (2008) Recombination and genetic differentiation among natural populations of the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake* from southwestern China. Mol. ecol. 17: 1238-1247.

山田明義, 小林久泰 (2008) マツタケ人工栽培の展望. 森林科学 53: 41-42.

山田明義, 大政正武 (2003) マツタケ研究の動向. 山林 1428: 68-73.

Yamada, A., Kanekawa, S. and Ohmasa, M. (1999a) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on *Pinus densiflora*. Mycoscience 40: 193-198.

Yamada, A., Maeda, K. and Ohmasa, M. (1999b) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* in vitro. Mycoscience 40: 455-463.

Yamada, A., Maeda, K., Kobayashi, H. and Murata, H. (2006) Ectomycorrhizal symbiosis in vitro between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring 'shiro'. Mycorrhiza 16: 111-116.

Yamada, A., Ogura, T. and Ohmasa, M. (2001a) Cultivation of mushrooms of edible mycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. Mycorrhiza 11: 59-66.

Yamada, A., Ogura, T. and Ohmasa, M. (2001b) Cultivation of mushrooms of edible mycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. Mycorrhiza 11: 67-81.

Yamanaka, K., Namba, K. and Tajiri, A. (2000) Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. Mycoscience 41: 189-191.

Yang, F., Ke, Y. and Kuo, S. (2000) Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. Enzyme Microb. Technol. 27: 295-301.

吉村文彦 (2004) ここまで来た！まつたけ栽培. 109pp. トロント, 東京都.

Young, H.E. (1937) *Rhizopogon luteolus*, a mycorrhizal fungus of *Pinus*. Forestry 11: 30-31.

Zang, M. (1990) A taxonomic and geographic study on the songrong (matsutake) group and its allied species. Acta Mycologia Sinica, 9: 113-127.