

(資 料)

土壌中におけるマツタケ菌糸成長の培養温度および菌株間での比較

成松 眞樹¹⁾, 山口 宗義²⁾, 山中 高史²⁾, 宜寿次 盛生³⁾, 東 智則³⁾, 玉井 裕⁴⁾,
藤田 徹⁵⁾, 河合 昌孝⁶⁾,

¹⁾岩手県林業技術センター, ²⁾国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所, ³⁾北海道立総合研究機構森林研究本部林産試験場, ⁴⁾北海道大学, ⁵⁾京都府農林水産技術センター森林技術センター, ⁶⁾奈良県森林技術センター

Comparison of mycelial growth of different *Tricholoma matsutake* strains in soil medium at varying temperatures

Maki NARIMATSU¹⁾, Muneyoshi YAMAGUCHI²⁾, Takashi YAMANAKA²⁾, Seiki GISUSI³⁾,
Tomonori AZUMA³⁾, Yutaka TAMAI⁴⁾, Tohru FUJITA⁵⁾ and Masataka KAWAI⁶⁾
¹⁾Iwate Pref. For. Tech. Ctr.; ²⁾FFPRI; ³⁾Hokkaido For. Pro. Res. Insti.; ⁴⁾Hokkaido Univ.
⁵⁾Kyoto Pref. For. Tech. Ctr.; ⁶⁾Nara For. Res. Inst.

要 旨

土壌中におけるマツタケの菌糸成長至適温度の解明を目的に、日本国内の4地域から分離した7菌株を土壌培地に接種して、6温度条件(5~30℃)で培養し、89日後の菌糸伸長速度と菌糸密度を培養温度で比較した。その結果、菌糸成長至適温度は18℃程度と推定され、寒天培地や液体培地を用いた既報の推定値より低かった。森林や苗木への接種源としてマツタケの菌糸を土壌培地で培養する際には、18℃程度で培養することにより、培養効率の改善が期待できることが明らかになった。

キーワード：土壌培地, 成長至適温度, 菌糸伸長速度, 菌糸密度, 定量PCR

目 次

1. はじめに	10
2. 材料と方法	10
2.1 供試菌株	10
2.2 菌糸の培養	10
2.2.1 菌糸の分離	10
2.2.2 成長測定用培地の調製	11
2.2.3 菌糸の接種と培養	11
2.4 データ解析	12
3. 結果と考察	12
3.1 菌糸の伸長	12
3.2 菌糸密度の増加	12
3.3 菌糸成長至適温度と気温の関係	13
3.4 土壌培地における菌糸成長至適温度	13
4. おわりに	14
謝辞	14
引用文献	14

本報告は、以下の論文を翻訳したものである：“Narimatsu *et al* (2019) Comparison of mycelial growth of different *Tricholoma matsutake* strains in soil medium at varying temperatures” Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology 5:1-8.

本研究は、農林水産技術会議委託プロジェクト「高級菌根きのこ栽培技術の開発」で実施した。

1. はじめに

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) はアカマツ (*Pinus densiflora*) 等の樹木との共生菌であり (小川 1975), 菌糸は宿主樹木の細根に外生菌根を形成する (Yamada *et al.* 1999)。菌根からは菌糸が周囲の土壤に伸長し, 菌根, 菌糸および土壤は白色の堅密な塊(シロ)を形成する (浜田 1953; 小川 1975; Yamada *et al.* 1999)。

マツタケは経済的に重要な林産物である。2018年の岩手県のマツタケ生産量は9.0 tで国内2位であり, 国内生産量の14%を占める (農林水産省 2018)。また, 2012年~2016年の東京都中央卸売市場築地市場での岩手県産マツタケの平均単価は39,846円/kgで (東京都 2017), 年により変動するものの, 他の農産物と比較して高額である。マツタケは, その単価の高さから, 発生地域周辺の住民の重要な収入源となっている (有岡 1997)。しかし, 施設栽培技術が確立されていないため (Wang and Hall 2004), 市場への出荷量 (生産量) は森林からの発生量に規定される。一方で, マツタケ発生林内の気象条件は変動するため, 発生量が不安定である (Narimatsu *et al.* 2015)。したがって, 減産の回避には, マツタケ未発生林への菌糸, 菌根苗などの接種源の埋設 (接種) による, 新たなシロの形成が有効であり, その実現には菌糸の培養条件の最適化が必要である。

マツタケの菌糸伸長速度は, ショウロ (*Rhizopogon roseolus*) やアミタケ (*Suillus bovinus*) といった他の外生菌根菌に比して遅く (Ohta 1990), 培養に長期間を要するため, 実験の効率化が困難である。担子菌類の菌糸成長, すなわち伸長速度や重量増加率は生育環境の温度に影響されることから (Carlile *et al.* 2001), 温度は培養条件を決定づける重要な因子である。温度が菌糸成長に及ぼす影響は, 腐生菌

のみならず, ヤマドリタケ属 (*Boletus edulis*) やチチタケ属 (*Lactarius deliciosus*) の菌根菌でも知られる (De La Varga *et al.* 2013)。また, マツタケのシロの年間拡大速度は, 気温と正の相関を示す (Narimatsu *et al.* 2015)。この現象は, 気温が地温を介して菌糸の成長に影響を及ぼすことを示唆する。寒天培地上におけるマツタケの菌叢の拡大速度は, 23℃前後で最大値を示す (浜田 1953)。一方, マツタケの菌糸は自然界で地中に生育するにもかかわらず (Yamada *et al.* 1999), 土壤中の温度が菌糸成長に及ぼす影響に関する知見は少ない。また, 腐生菌において, 菌糸伸長至適温度は, 種間に加え, 遺伝的に異なる菌株間でも違いがみられる (Dowson *et al.* 1989)。しかし, マツタケに関し, 異なる菌株を用いて, 土壤中での菌糸成長を比較した例はない。そこで本研究では, 日本国内の4地域から分離した菌糸を土壤培地に接種して, 6条件の温度で培養することにより, マツタケの菌糸成長に及ぼす培養温度と菌株の影響を検討した。

2. 材料と方法

2.1 供試菌株

北海道産2系統, 岩手県産3系統, 京都府産1系統, 奈良県産1系統, 計7系統の菌株を用いた (表1)。採取地の高木層優占種は, 上富良野はアカエゾマツ (*Picea glehnii*), 雌阿寒はハイマツ (*Pinus pumila*), 他はアカマツである。菌株の産地間の最大距離は, 約1238 kmである。菌株は各著者の所属機関で継代保存されている。

2.2 菌糸の培養

2.2.1 菌糸の分離

本研究で用いた菌糸は, NF2970株を除いて子実層

表1 菌糸量の増加率

菌株	採取地	緯度	経度	年間平均気温 (°C) ^(a)	気象観測地点 ^(b)	菌糸成長至適温度 (°C)	
						菌糸伸長速度	菌糸密度増加
H18	上富良野(北海道)	43°24'N	142°36'E	6.2	上富良野	20.6	17.8
Rin10	雌阿寒(北海道)	43°22'N	143°59'E	3.9	阿寒湖畔	17.1	17.3
I122	岩手町(岩手県)	39°56'N	141°14'E	9.4	好摩	20.8	17.7
I129	岩手町(岩手県)	39°56'N	141°14'E	9.4	好摩	20.3	17.3
I33	岩手町(岩手県)	39°56'N	141°14'E	9.4	好摩	20.5	17.7
Sakai	坂井(京都府)	35°11'N	135°20'E	14.3	福知山	18.9	15.6
NF2970	吉野(奈良県)	34°10'N	135°41'E	14.6	五條	19.6	19.8
平均±標準偏差						19.6±1.3	17.6±1.2

^(a)採取地最寄りの気象庁アメダス観測地点^(b)における年間平均気温

から分離した。NF2970 株はヒダから分離した。分離に用いた培地の一例は、改変 MYPG 平板培地 (Sato 1998) (0.25 % 麦芽エキス, 0.1 % 酵母エキス, 0.1 % ペプトン, 0.5 % グルコース, 2.0 % 寒天, 脱イオン水) である。分離後の菌糸は使用まで 4 °C で保管した。

2.2.2 成長測定用培地の調製

平均粒径 1.4 mm の赤玉土 (芝目土, 株式会社こうじや, 茨城県) を MYPG 液体培地 (0.25 % 麦芽エキス, 0.1 % 酵母エキス, 0.1 % ペプトン, 0.5 % グルコース, 脱イオン水) に 16 時間浸漬し, 培地を十分に吸収させた後, プラスティック製のカゴ上で 30 分間放置して, 余剰の液体培地を除いた。岩手町採取地 (表 1) の近傍で, 深さ 10-20 cm から B 層土壌 (褐色森林土) を採取し, 温室で風乾した後, 目開き 7 mm の金属製篩で粗大な石や根を除いた。処理済みの赤玉土と B 層土壌を, 体積比 3:1 にて混合し, 湿量基準含水率を水道水で 25 % に調整した。得られた培地を直径 30 mm, 高さ 120 mm の管ビンに高さ 8 cm (重量 48.5 g) まで充填し (図 1), オートクレーブを用いて 121 °C で 60 分間滅菌した。以後, この培地を「土壌培地」と称する。

2.2.3 菌糸の接種と培養

各供試菌株の菌糸を, 改変ノークランズ C 平板培地 (Yamada and Katsuya 1995) に接種して, 23 °C で 57 日間, 培養した。菌叢の先端を内径 9 mm のコルクボウラーで打ち抜き, 得られたプラグを, 125 mL 植物培養用フラスコ中の MYPG 液体培地に 5 個投じ, サンキャップシート (旭テクノグラス社, 東京) で封じて, 23 °C で毎分 35 回転にて振盪培養し

た。34 日間の培養後, 菌糸体をホモジナイザー (フィスコロン, 株式会社マイクロテック・ニチオン, 千葉県) を用いて毎分 1800 回転で 5 秒間, 磨砕して, 同一のフラスコ内でさらに 23 日間培養した。

以上の培養で得られた, ペレット状の菌糸体を含む液体培地を, 土壌培地の上面に 2 mL 接種し, プラスティック製のキャップとパラフィルム (Bemis Flexible Packaging, USA) で封じて, 5, 10, 15, 20, 25 および 30 °C で 89 日間培養した。各菌株・温度条件ごとに, 5 本の試験体を供試した。以上の培養は, 全て暗黒, 無菌条件下にて行った。

2.3 菌糸伸長速度と菌体バイオマスの測定

89 日間の培養後, 各容器の側面に 4 本の垂線を引いて測線とし, 菌叢の先端を実体顕微鏡の視野下で測線に記した。菌叢先端と接種源の距離を測定して, 菌糸伸長量とした。各試験体の 4 測線で菌糸伸長量を平均し, 培養日数の 89 日で除して, 試験体ごとの菌糸伸長速度を算出した。測定終了直後に, 菌糸を含む土壌培地を回収し, -30 °C で保存して, 定量 PCR 解析に供した。

各試験体の土壌培地に含まれるマツタケの菌糸重量を, 定量 PCR 解析にて測定した。土壌 DNA の抽出は Yamaguchi *et al.* (2016) の方法に従った。凍結乾燥された土壌培地に 0.6 % スキムミルクを含む 2 % CTAB 液 650 μ L を加え, 65 °C で 1 時間攪拌しながら溶解後, 750 μ L のクロロホルム / イソアミルアルコール混合液 (24:1) で 2 回抽出し, 上清を採取した。イソプロパノールで DNA を沈殿, 乾燥後, 滅菌水 100 μ L に溶解し, 抽出試料とした。抽出試料を鋳型 DNA として, ライトサイクラー 2.0 (Roche, Basel, Swiss Confederation) を用いて qPCR を行

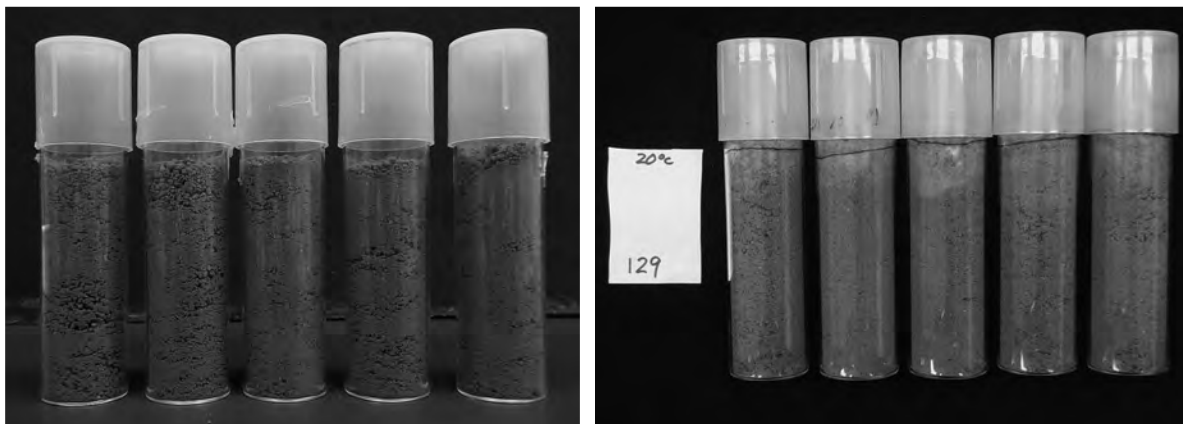


図1 土壌培地

左側の画像はマツタケ菌糸の接種前, 右側は1129株を接種後, 20 °C で89日間培養したものの

い、菌糸重量を算出した。qPCR の条件および菌糸量算出方法は Yamaguchi *et al.* (2016) の方法に従った。得られた菌糸重量を試料の乾燥重量で除して、菌糸密度を算出した。

2.4 データ解析

土壌培地におけるマツタケの菌糸成長の至適温度を推定するために、菌糸伸長速度や菌糸密度の培養温度による変化を、2次式モデルと3次式モデルで近似した。2次式と3次式を用いた理由は、菌糸伸長速度と菌糸密度の実測値の分布が、いずれも単一のピークを有し、片側に裾を引く傾向を示したことによる(図2, 図3)。菌株ごとに、2次式モデルと3次式モデルへの適合性を赤池情報量規準(AIC)で比較し、AICが低いモデルを最も適合度の高いモデルとして選定した。

$$AIC = \text{残差分散} + 2 \times \text{変数の数}$$

得られたモデル式を微分し、増加率0における培養温度を菌糸成長至適温度として、菌株ごとに推定した。以上の解析は、統計言語R (ver3.4.1, R development core team 2017)で行った。

3. 結果と考察

3.1 菌糸の伸長

土壌培地中でのマツタケの菌糸伸長は、全ての供試菌株で、30℃を除く各培養温度にて観察された(図2)。各温度における菌糸伸長速度の平均値は、7菌株中6菌株で20℃が最高であった。20℃における菌糸伸長速度は菌株間で異なり ($p < 0.01$, 分散分析)、最小で0.12 mm/日 (Rin10株, I33株)、最大で0.19 mm/日 (I129株)であった。菌糸伸長速度は25℃から30℃に掛けて急速に低下し、既報の結果(浜田1953)を支持した。

実測値の2次式および3次式モデルへの近似(2.4)の結果、AICは全ての菌株で3次式が小さく(図2)、最適モデルとして3次式モデルが選定された。3次式モデルへの近似により、菌糸伸長至適温度は17.1℃ (Rin10株) ~ 20.8℃ (I122株)と推定され(表1)、その平均値は19.6℃ ± 標準偏差1.3℃であった。

3.2 菌糸密度の増加

土壌培地中におけるマツタケの菌糸密度の増加は、各培養温度で観察された(図3)。菌糸伸長速度と同

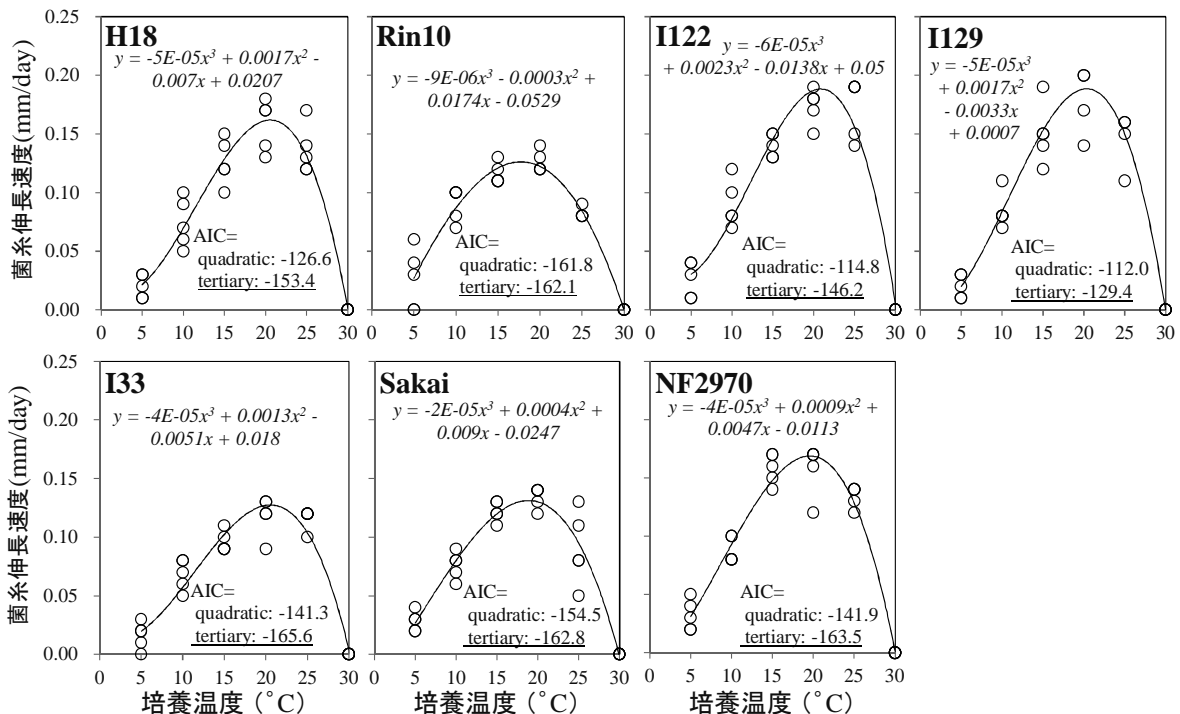


図2 培養温度が土壌培地中のマツタケ菌糸の伸長速度に及ぼす影響

各図の左上は菌株名、図中の○は89日間培養後の実測値を、曲線は近似曲線を示す。近似は2次式モデル (quadratic) または3次式モデル (tertiary) のうち、赤池情報量規準 (AIC) が小さいモデル (下線) によった。

様に、20 °Cにおける菌糸密度は菌株間で異なった($p<0.05$, 分散分析)。一方、菌糸密度も菌糸伸長速度と同様に25 °Cと30 °Cの間で低下したが、培養温度30 °Cにおいても菌糸は検出された。この理由は、菌糸定量時の試料に接種源由来の菌糸も含まれたためと推察される。

AICはH18株とNF2970株で3次式モデルが、残りの5菌株で2次式モデルが小さかった(図3)。各菌株に適合したモデルによる近似の結果、菌糸密度増加の至適温度は、15.6 °C(Sakai株)~19.8 °C(NF2970株)と推定され(表1)、その平均値は17.6 °C \pm 1.2 °Cであった。菌糸密度増加の至適温度は菌糸伸長至適温度よりも幾分低かった($p<0.01$, t検定)。一方、菌糸密度増加と菌糸伸長の至適温度には、明瞭な相関は認められなかった($r=0.24$, $p>0.05$)。菌糸伸長と菌糸密度増加で至適温度が異なった詳細な理由は不明であるが、菌糸伸長と菌糸密度増加という、異なる生理的現象に係るメカニズムの違いが、各現象の温度への反応に影響を及ぼした可能性がある。

3.3 菌糸成長至適温度と気温の関係

各供試菌株の菌糸伸長や菌糸密度増加の至適温度

と菌株採取地の平均気温(表1)には、明瞭な関係が認められなかった($r<0.2$, $p>0.05$)。この結果は、寒冷な地域から得られた菌糸の成長が、必ずしも温暖な地域の菌糸より遅いとは限らないことを、既報(河合・阿部1976)と同様に示唆する。一方、マツタケは北欧(Vaario *et al.* 2015)から東南アジア(山中ら2011)に掛けて分布することが知られ、その範囲は今回の研究対象より著しく広い。また、マツタケ生育地の年間平均気温は、フィンランドで4.4 °C~6.7 °C(Vaario *et al.* 2017)、ラオスで19.6 °C(World Weather Online 2019)と、地理的な広がりに対応して気温の幅も本報に比して大きい。より広い範囲から収集した菌株を用いて実験することにより、生育地の気温と菌糸成長至適温度の関係を検証することが、今後の課題である。

3.4 土壌培地における菌糸成長至適温度

以上述べたように、本研究では自然の状態に近い土壌培地でマツタケの菌糸を培養し、菌糸成長至適温度を約18 °Cと推定した。この結果は、寒天培地を用いた実験で推定された23 °C(浜田1953)や、液体培地で得られた25 °C(Lee *et al.* 2007)より3~5 °C程度、低かった。また、今回得られたマツ

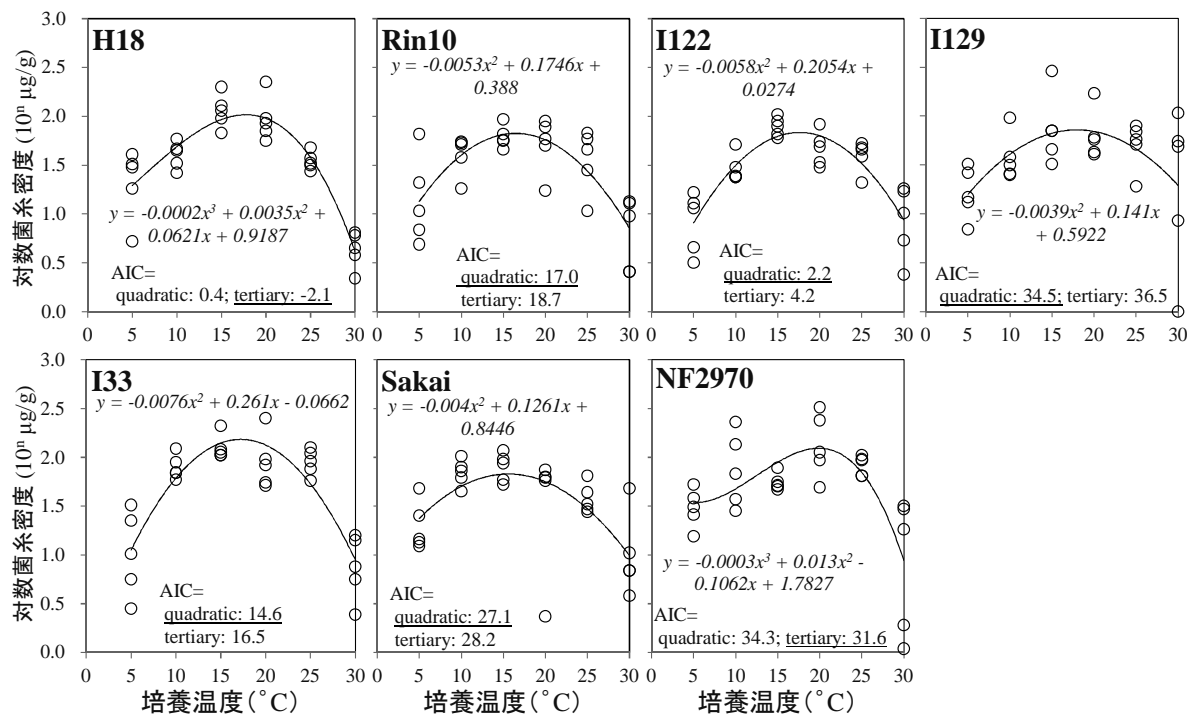


図3 培養温度が土壌培地中のマツタケ菌糸密度に及ぼす影響

各図の左上は菌株名、図中の○は89日間培養後の実測値を、曲線は近似曲線を示す。近似は2次式モデル(quadratic)または3次式モデル(tertiary)のうち、赤池情報量規準(AIC)が小さいモデル(下線)によった。

タケの菌糸成長至適温度は、外生菌根菌 62 種の液体培養における菌糸重量増加至適温度 (赤間ら 2008) や、マツタケの近縁種であるニセマツタケ (*T. fulu-vocastaneum*) (藤堂・鳥越 1996) およびバカマツタケ (*T. bakamatsutake*) (Jeon *et al.* 2014) の、寒天培地上における菌糸成長至適温度よりも低かった。本研究の土壌培地で得られた成長至適温度が、寒天や液体培地による既報より低かった理由は不明であるが、マツタケの生育地の地温は、特に東北地方において、夏季でも 20 °C を超えるとは限らない (大森 1997) ことから、本研究の結果はマツタケの生育地の気象条件に適合しているものと考えられる。

4 おわりに

土壌培地で得られた菌糸成長至適温度は、寒天培地や液体培地を用いた実験による推定値より低かった。森林や苗木への接種源としてマツタケの菌糸を土壌培地で培養する際には、18 °C 程度で培養することにより、培養効率の改善が期待できることが明らかになった。

謝辞

実験方法をご教示いただいた太田明博士、実験に尽力された田高聡子および平川友紀の両氏に、深甚の謝意を表す。

引用文献

- 赤間慶子・岡部 宏秋・山中高史 (2008) 様々な培地上における外生菌根菌の成長様式. 森林総合研究所研究報告 7: 165-181.
- 有岡利幸 (1997) 松茸. 法政大学出版局. 東京
- Carlile M, Watkinson S, Gooday G. (2001) *The fungi*. Second. London: Academic Press.
- De la Varga H, Águeda B, Águeda T, Martínez-Peña F, Parladé J, Pera J. (2013) Seasonal dynamics of *Boletus edulis* and *Lactarius deliciosus* extraradical mycelium in pine forests of Central Spain. *Mycorrhiza* 23:391-402.
- Dowson CG, Boddy L, Rayner ADM. (1989) Development and extension of mycelial cords in soil at different temperatures and moisture contents. *Mycol Res*. 92: 383-91.
- 浜田稔 (1953) マツタケ. 自然 8: 56-64.
- Jeon SM, Ka KH, Hong KS. (2014) Mycelial growth and in vitro ectomycorrhizal synthesis

on *Pinus densiflora* seedlings of *Tricholoma bakamatsutake* in Korea. *Korean J Mycol*. 42: 312-21.

- 河合正允・阿部重雄 (1976) まつたけの栄養成長におよぼすC源およびN源の影響. 日菌報 17: 159-167.
- Lee W, Han S, Kim B, Shrestha B, Lee S, Ko C, *et al.* (2007) Proliferation of *Tricholoma matsutake* mycelial mats in pine forest using mass liquid inoculum. *Mycobiology* 35: 54-61.
- Narimatsu M, Koiwa T, Masaki T, Sakamoto Y, Ohmori H, Tawaraya K. (2015) Relationship between climate, expansion rate, and fruiting in fairy rings (“shiro”) of an ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* in a *Pinus densiflora* forest. *Fungal Ecology* 15: 18-28.
- 農林水産省 (2018) 平成 30 年特用林産基礎資料
- 小川眞 (1975) 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. 国立林業試験場研究報告 272: 79-121.
- Ohta A. (1990) A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. *Trans Mycol Soc Japan* 31: 323-34.
- 大森久夫 (1997) 岩手県におけるマツタケの発生と気象的要因. 岩手県林業技術センター研究報告 7: 67-72.
- R Development Core Team. (2017) R: A language and environment for statistical computing.
- Sato T, Yaegashi K, Ishii S, Hirano T, Kajiwara S, Shishido K, *et al.* (1998) Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzymemediated integration of plasmid DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 2346-50.
- 藤堂千景・鳥越茂 (2001) ニセマツタケ栽培試験 (1). 兵庫県立森林・林業技術センター研究報告 49: 1-4.
- 東京都 (2017) 東京都中央卸売市場年報
- Vaario L, Yang X, Yamada A. (2017) Biogeography of the Japanese gourmet fungus, *Tricholoma matsutake*. A review of the distribution and functional ecology of matsutake. In: Tedersoo L, editor. *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Cham: Springer; . p. 319-44.
- Wang Y, Hall I. (2004) Edible ectomycorrhizal mushrooms: Challenges and achievements.

- Can J Bot. 82: 1063-73.
- World weather online. (2019). Accessed 5 November 2019. Available:
<https://www.worldweatheronline.com/>
- Yamada A, Katsuya K. (1995) Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. Mycoscience 36: 315-23.
- Yamada A, Kanekawa S, Ohmasa M. (1999) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on *Pinus densiflora*. Mycoscience 40: 193-198.
- Yamaguchi M, Narimatsu M, Fujita T, Kawai M, Kobayashi H, Ohta A, Yamada A, Matushita N, Neda H, Shimokawa T, Murata H. (2016) A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil. Mycorrhiza 26: 847-861.