

(資 料)

## 菌糸担体を用いた液体培養における培養条件がマツタケ菌糸の増殖に与える影響

成松 眞樹

Effect of culture condition on submerged culture with carrier for mycelial growth of *Tricholoma matsutake*.

Maki NARIMATSU

### 要 旨

マツタケ菌の林地導入に適した接種源の作成を目的に、液体培養における担体の種類と振盪の有無が、菌糸増殖量とその形態へ与える影響について検討した。その結果、菌糸増殖量は Poly Ethylene Terephthalate (PET) 不織布を担体として用いた場合に無処理に比べ160%増加した。また、PET 不織布を用い、振盪培養と静置培養を比較した場合、菌糸増殖量に差異は観察されなかった。しかし、菌糸体の形態は異なり、静置培養では層状、均質の、振盪培養では半球状、不均質の菌糸体が形成された。これらのことから、PET 不織布を用いた静置培養により、均質なシート状のマツタケ菌糸体を大量培養することが可能となった。

キーワード：マツタケ、接種、PET 不織布、菌糸体、シート

### 目 次

1 緒 言.....	32	3 結果と考察.....	33
2 材料と方法.....	32	3.1 担体条件が菌糸体の形態に及ぼす影響.....	33
2.1 供 試 菌.....	32	3.2 担体条件が菌糸の増殖量に及ぼす影響.....	34
2.2 菌糸担体の材質の比較.....	32	3.3 振盪の有無が菌糸の増殖量と形態に及ぼす影響.....	35
2.2.1 一次培養.....	32	3.4 PCR による菌種の判定.....	35
2.2.2 二次培養.....	32	4 結 論.....	35
2.2.3 本培養.....	33	謝 辞.....	36
2.3 培養方法の比較.....	33	引用文献.....	36
2.4 菌糸体増殖量の評価.....	33		
2.5 PCR による菌種の判定.....	33		

本報告に記載されている、Poly Ethylene Terephthalate (PET) 製不織布を用いたマツタケ菌糸の液体培養法は、日本国内特許取得済みである(「菌根性茸用接種シートの製造方法」)特許第3696579号, 2005)。

本報告の一部は、2005年度日米菌学会合同大会(2005年8月, 米国)、東北森林科学会第7回大会(2002年8月, 福島)において発表した。

# 1 緒 言

2004年の岩手県におけるマツタケ (*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.)の生産量は2 t<sup>13)</sup>で国内主要産地の一つだが、生産量は気象などの影響を受け不安定である。そのため、収量の安定化と増産がマツタケの生産に関する課題である。

マツタケ菌糸はアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)等の宿主と外生菌根による共生関係を構築した後、子実体を形成する<sup>11, 19)</sup>ことが知られているが、菌糸の純粋培養により子実体を形成させることは困難である<sup>6)</sup>。一方、枯木ら<sup>5)</sup>は、この共生関係に着目し、アカマツ苗木に菌根を形成させた後、苗畑へ植栽しマツタケ子実体を発生させることに成功している。したがって、マツタケの増産には、宿主に菌根を形成させること、すなわち人為的に共生関係を構築させることが有効な手段であると考えられる。

共生関係を構築させる場合、菌を宿主へ導入することが必要となるが、その手段としては担子胞子の散布、培養菌糸の接種が想定される。しかし、担子胞子の散布による菌根の形成は報告されていない<sup>2)</sup>。一方、培養菌糸の接種に関しては、林地のアカマツの根に接種して、マツタケの菌根を形成させる報告<sup>1)</sup>がある。最終的に子実体を発生させるためには、これら菌根の増殖による菌根塊（以後シロとする）の形成が必要となるが、マツタケはアカマツ林における土壤微生物の遷移の中間段階で侵入、定着する菌であり<sup>12)</sup>、地中で他の生物に被圧される<sup>17)</sup>ため、遷移が進んだアカマツ林に、人為的にシロを形成させることは難しいとされている<sup>16)</sup>。こうした被圧の対処法の一つとして、アカマツに接種する菌糸量を増加させることが有効であると考えられる。しかし、マツタケの菌糸増殖速度は一般的な腐生菌と比べて遅いため<sup>3)</sup>、接種用菌糸体の大量増殖は困難である。

菌糸の大量培養に関する手法として、液体培地と担体の併用による菌糸の増殖速度の向上<sup>7)</sup>、振盪培養による菌糸への酸素供給<sup>21)</sup>が挙げられる。また、担体の材質<sup>14)</sup>や振盪強度<sup>20)</sup>により菌糸の増殖形態が異なることも報告されている。一方、屋外での接種作業を想定すると、雑菌増殖の抑制、接種作業効率の向上が重要となり<sup>4)</sup>、接種源の形状はシート状であることが有利であると考えられる。しかし、このようなマツタケ菌糸体の培養方法は明らかにされていない。

そこで本報では、シート状接種源の作成を目的として、菌糸担体を用いたマツタケ菌糸の液体培養を行い、担体の種類及び振盪の有無が菌糸体の増殖量及び形態に与え

る影響について検討した結果を報告する。

# 2 材料と方法

## 2.1 供試菌

供試菌として、*Tricholoma matsutake*, I-101株を用いた。これは、岩泉町のアカマツ林で採取された子実体から分離され、岩泉まつたけ研究所から分譲を受けた菌株である。

## 2.2 菌糸担体の材質の比較

### 2.2.1 一次培養

培養工程を図1に示す。一次培養には1N HClでpHを5.0に調整した改変MYPG培地<sup>15)</sup>(0.25% Malt extract, 0.1% Yeast extract, 0.1% Pepton, 0.5% Glucose, 2.0% Agar, 脱イオン水)を121°Cで20分間オートクレーブ滅菌して用いた。改変浜田斜面培地(1.0% Glucose, 0.2% Yeast extract, 1.5% Agar, 脱イオン水)を用いて継代培養された菌株を平板培地に接種した。なお、培養条件は暗黒、23°Cとし、以後の培養は同様の条件で行った。

### 2.2.2 二次培養

液体培養には、改変MYPG液体培地を用いた。培地組成は改変MYPG培地からAgarを除いたものである。

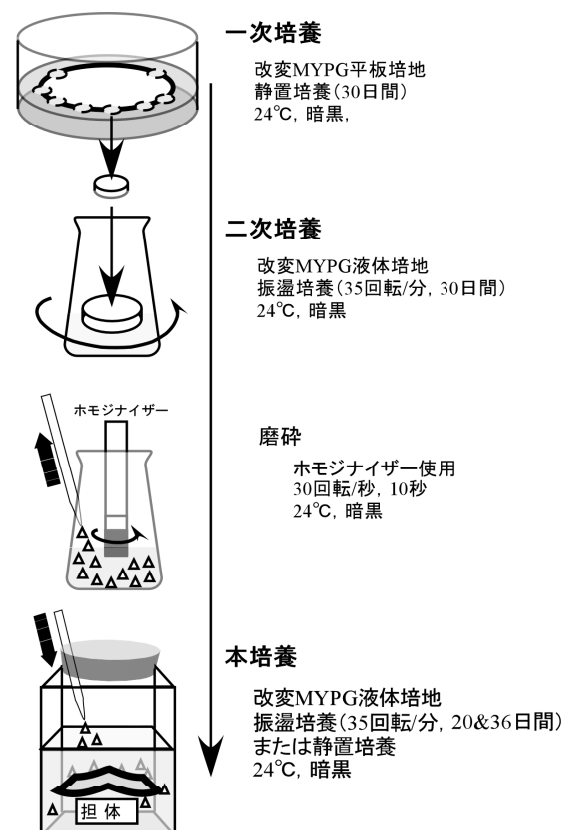


図1 培養方法

培地は125mL容コニカルビーカーに入れて、メンブレンフィルター付きアルミ箔（サンキャップシート<sup>®</sup>、旭テクノグラス(株)）で上面を塞ぎ、一次培養と同様に滅菌して用いた。一次培養で培地上に形成された円形のコロニーの外縁部をコルクボーラー（ $\phi=7\text{mm}$ ）で打ち抜き、液体培地に投入し、振盪機(R-30, タイテック(株)）に設置して、35回転/分で30日間振盪培養を行った。培養中はParafilm M<sup>®</sup>(Pechiney Plastic Packaging, Inc. USA)でサンキャップシートの下部を密封した。

### 2. 2. 3 本培養

二次培養で形成された菌糸体を液体培地中で磨砕し、本培養時の母菌として用いた。磨砕は切削部を滅菌したホモジナイザー（ヒスコトロン<sup>®</sup>、マイクロテック・ニチオン(株)）で行い、磨砕速度は30回転/秒、磨砕時間は10秒とした。以上の工程で得られた5mg（乾重）/mLの菌糸を含む懸濁液を、二次培養と同じ培地に接種した。培地量は容器1個あたり60mL、接種量は同1mLとし、容器はフィルター付きポリカーボネイト製角型培養容器（カルチャーボトル<sup>®</sup>CB-3, アズワン(株)）を用いた。さらに、厚さ約0.1mmのPoly Ethylene Terephthalate製不織布（PET布）と、厚さ約0.3mmでメッシュサイズ約0.5mmの木綿布を、菌糸の担体として培地中に浸漬した。担体のサイズは64cm<sup>2</sup>（8cm四方）とし、予め乾燥重量を測定した後に、各容器につき1枚投入した。さらに、担体を使用しない無処理条件を設けた。以上の各条件で繰り返しを10とし、二次培養と同様に振盪培養を行った。

### 2. 3 培養方法の比較

本培養時に、PET布を用いた静置培養を行った。培地、容器、担体のサイズ等は上記2. 2. 3と同一である。

### 2. 4 菌糸体増殖量の評価

本培養開始から20, 36日後に、菌糸が付着した担体（ただし無処理では菌糸体）を、各担体、培養方法別に5個ずつ取り出して、脱イオン水で洗浄した。次に菌糸体を秤量瓶に投じて80°Cで72時間乾燥し、重量を測定した。重量測定には精密電子天秤（AT-400, Mettler Toledo International Inc. USA）を用いて0.1mgまで測定し、測定値から担体の重量を減じて菌糸体の増殖量とした。

### 2. 5 PCRによる菌種の判定

培養により増殖した菌糸体が、培養中に混入した雑菌ではないことを確認するために、DNAによる菌種の判定を行った。最終培養で得られた菌糸体から、ISOPLANT II<sup>®</sup>（ニッポンジーン(株)）を用いて抽出したDNAを、TE（pH=8.0）に溶解し、PCR法による増幅のテンプレートDNAとした。

プライマーにはマツタケの識別に有効なAY1/AY1<sup>10)</sup>及

びTmF/TmR<sup>8)</sup>の2組を用いた。各プライマーペアの増幅標的は、AY1/AY1がレトロエレメント、TmF/TmRが5.8SrRNAを含むITS領域である。反応には500 $\mu\text{L}$ のチューブを用いた。PCR反応液の量は25 $\mu\text{L}$ とし、組成は2.5 $\mu\text{L}$  10 $\times$  Reaction Buffer(MgCl<sub>2</sub>含有), 0.16mmol/L dNTP Mix, 0.625U Taq DNA Polymerase(Gene Taq<sup>®</sup>, ニッポンジーン(株)), 0.2 $\mu\text{mol/L}$  各Primer, 18.875 $\mu\text{L}$  脱イオン水, 1.0 $\mu\text{L}$  Template DNAである。

サーマルサイクラーはAB-1820(ATTO inc.)を使用し、反応条件を1 $\times$ [94°C/10分], 30 $\times$ [94°C/1分, 55°C/1分, 72°C/5分], 1 $\times$ [72°C/10分]に設定した。以上のPCRで得られた産物を、1% w/vアガロースゲル(0.01% w/v エチジウムブロマイド含有)にアプライして100Vで45分間電気泳動し、ゲルをトランスイルミネーター上に移してUV(400nm)照射下でバンドパターンを確認した。

なお、全ての試験は2001~2002年に実施された。

## 3 結果と考察

### 3. 1 担体条件が菌糸体の形態に及ぼす影響

36日間の本培養により各条件で形成された菌糸体を写

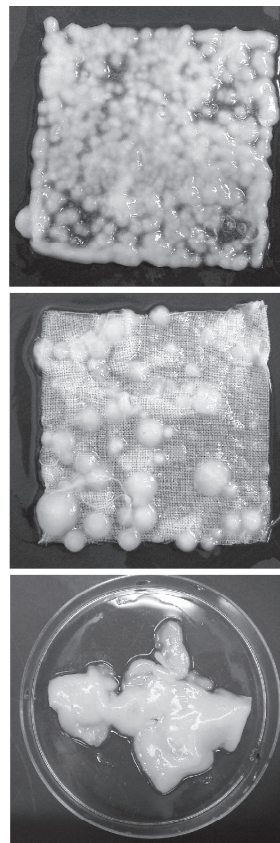


写真1 各条件で形成された菌糸体  
(培養36日、上:PET、中:木綿、下:無処理)

真1に示す。無処理では、各容器あたり1～数個の菌糸体(直径27～54mm)が形成された。菌糸体は白色、表面が平滑、不定形で、通常の液体培養で得られる菌糸体と同様の形状を呈した。

PET布を菌糸担体とした場合では、担体上に白色、表面が平滑で半球状の菌糸体が形成され、担体の下面では菌糸体が認められなかった。菌糸体の直径は木綿布より小さく、逆に個数は多かった。菌糸体の多くは周辺の菌糸体と融合していたが、完全な層状を呈するには到らず、担体が一部露出していた。また、菌糸体は容易に担体から剥離された。なお、菌糸体の境界は不明瞭だったため、菌糸体の個数及びサイズの測定は行わなかった。

木綿布を菌糸担体とした場合では、PET布と同様に白色、表面が平滑な菌糸体が担体上に形成された。試験体5枚のうち1枚に形成された菌糸体についてサイズ等を測定したところ、菌糸体個数は0.67個/cm<sup>2</sup>、各菌糸体の最大直径の平均値は6.1mm、最大値は15.3mm、最小値は2.2mm、標準偏差は2.9で、最大の菌糸体の高さは約3mmだった。また、観察された菌糸体は担体と密着し、剥離することは困難で、その形状は直径により異なっていた。菌糸体の直径の増加に伴い、その形状は半球状となり、多くの菌糸体は他の菌糸体と接すること無く、担体上に形成されていた。なお、上記いずれの担体条件においても、すべての担体は培地中に沈んで容器底部に接し、菌糸体からの気中への菌糸増殖は認められなかった。これらのことから、菌糸体の形態は担体条件で異なることが明らかとなった。

本実験に関して、液体培地中の担体に菌糸体が形成された結果は、水中の固形物の表面は微生物の増殖の場となる<sup>20)</sup>ことで説明ができる。また、担体により菌糸体の形態が異なった要因としては、担体のメッシュサイズと材質の違いが挙げられる。Ruimin *et. al.*<sup>14)</sup>は、マツタケと同じ糸状菌類である *Trichoderma* 属菌について、メッシュサイズの減少による担体の表面積の増加が、菌糸の定着に寄与することを示唆している。

今回用いた木綿布のメッシュサイズはPET布より小さいため、PET布に比べて菌糸が定着しやすいと考えられる。また、材質の違いに関しては、木綿布では高温の滅菌工程における紡績繊維の収縮などに起因するメッシュサイズの乱れにより、同一の担体上で菌糸の定着性や資源の吸着性に差が生じ、その結果、菌糸体の配置が不均一になったと推察されるが、繊維の表面構造とメッシュサイズの交互作用が不明であるため、これらの点に関する今後の検討が必要である。

### 3. 2 担体条件が菌糸の増殖量に及ぼす影響

担体別の培養日数と菌糸増殖量の関係を図2に示す。20日間培養後の菌糸増殖量の平均値を各担体条件で比較したところ、PET布が0.18g、木綿布が0.01g、無処理が0.07gとなり、PET布の増殖量が最大で、木綿布が最小だった。この傾向は36日間の培養でも変わらず、各条件の増殖量はPET布が0.22g、木綿布が0.10g、無処理が0.13gとなり、PET布の増殖量は無処理の1.6倍、木綿の2.2倍となった。さらに、PET布と無処理の2条件間には、危険率1%で有意差が認められた(t-検定)。また、3. 1に記述したとおり、PET布に比してメッシュサイズが小さい木綿布では、相対的に菌糸が吸着されやすく、菌糸体のサイズも大きくなると考えられる。糸状菌類である *Aspergillus nidulans* では、半径が2.5mmを超えた菌糸体の内部で酸素濃度が低下して、菌糸体の増殖が酸素濃度に律速される<sup>18)</sup>。このことから、木綿布に形成された大径の菌糸体の増殖は、酸素の欠乏により抑制され、結果として各担体における菌糸体の総量が低下したと推察されるが、今回の実験では菌糸体の内部の状態が明らかにされていないので、今後の検討が必要である。

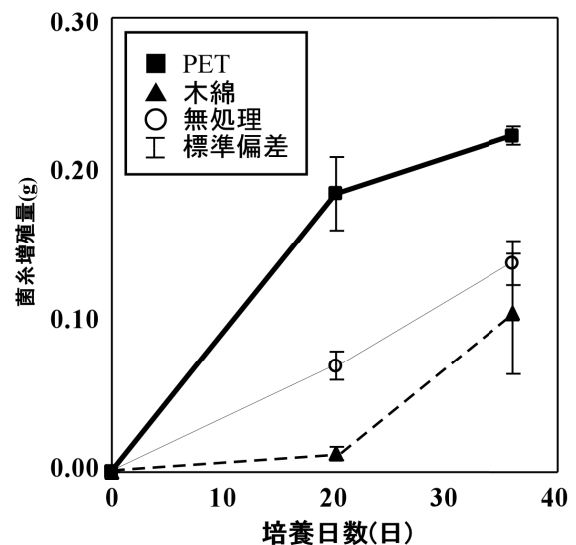


図2 担体別の培養日数と菌糸増殖量の関係

表 培養条件別の菌糸増殖量(培養36日)

培養条件	菌糸重量(乾燥) g	標準偏差
振盪培養	0.22	0.01
静置培養	0.22	0.03

### 3.3 振盪の有無が菌糸の増殖量と形態に及ぼす影響

振盪培養が菌糸の増殖量と形態に及ぼす影響を表に示す。PET 布で振盪培養と静置培養を行って菌糸増殖量の平均値を比較したところ、36日間培養後の両条件の菌糸増殖量は共に 0.22 g となり、増殖量については振盪の効果が認められなかった。一方、静置培養を行った PET 布で形成された菌糸体の形態は、3.1で述べた振盪培養のそれとは異なり、白色で層状を呈した(写真2)。菌糸体は担体の上面を完全に覆い、湿潤状態での菌糸体の厚さは約3mm(担体込み)であった。

振盪培養が形態に及ぼす影響について、培養液の流動が菌糸体のペレット化を促進し<sup>9)</sup>、振盪強度の増大に伴ってペレットのサイズが小さくなる<sup>20)</sup>ことが知られている。本実験の結果は、これらの報告と一致した。また、松永ら<sup>9)</sup>は、ペレット状の菌糸は増殖速度が遅いことを指摘している。これらのことから、接種源の培養を目的とした液体培養時には、振盪の必要性は低いと考える。

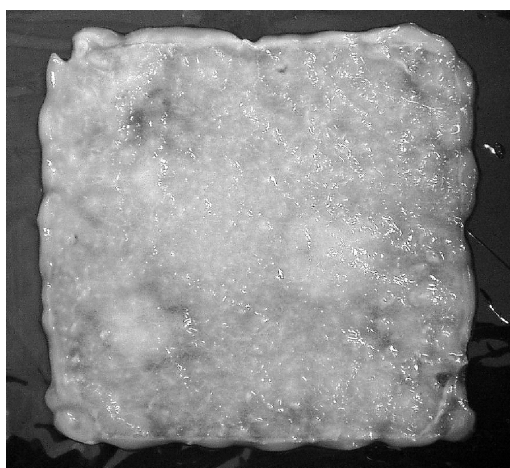


写真2 静置培養により形成された菌糸体 (培養36日)

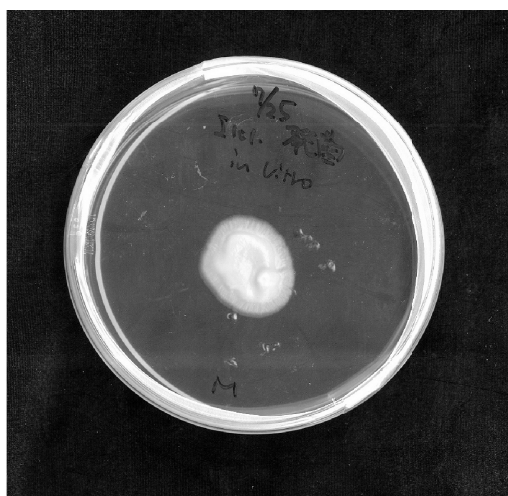


写真3 菌糸体の接種により形成されたコロニー (培養14日)

なお、PET 布上に増殖した菌糸体の一部を改変 MYPG 平板培地に接種したところ、菌糸体から菌糸が増殖し、コロニーが形成された(写真3)。このことから、PET 布上に生長した菌糸体は、発菌能力を有することが明らかになった。

### 3.4 PCRによる菌種の判定

菌糸の増殖量が最大だったPET布から採取した菌糸体、供試菌株及び二次培養の菌糸について、DNA 抽出及び PCR による増幅を行った結果を写真4に示す。TmF/TmRプライマーによる PCR では、400bp 付近に増幅されたバンドが認められた。また、AY1/AY1 プライマーによる PCR では、900bp 付近にバンドが認められた。これらのバンドのサイズは、既報<sup>8,19)</sup>で明らかにされたマツタケ DNA のサイズと一致する。さらに、供試菌株ともバンドのサイズが一致した。以上の結果から、今回の培養で得られた菌糸体は、マツタケ菌であると考ええる。

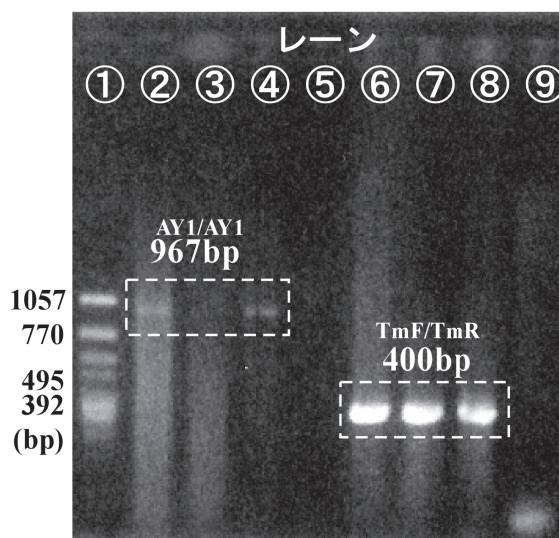


写真4 菌糸体由来PCR産物の電気泳動

レーン1: マーカー ( $\phi$ X174/Hinc II digest),  
 2: 供試菌株 (I101), 3: 二次培養菌糸, 4: 本培養菌糸,  
 5: テンプレートDNA無添加  
 使用プライマー: AY1/AY1

レーン6~9: レーン2~5と同じテンプレート  
 使用プライマー: TmF/TmR

## 4 結 論

マツタケ菌糸体の液体培養における担体の種類と振盪の有無が、菌糸増殖量とその形態へ与える影響について検討した。以降に結果を示す。

- (1) 担体としてPET布を用いた場合、無処理に比べ菌糸増殖量は160%増加した。
- (2) PET 布を用い、振盪培養と静置培養を比較した場

合、菌糸増殖量に差異は観察されなかった。しかし、その形態は異なり、静置培養では層状、均質の、振盪培養では半球状、不均質の菌糸体が形成された。

これらのことから、PET布を用いた静置培養により、均質なシート状のマツタケ菌糸体を大量培養することが可能となった。

## 謝 辞

DNA抽出法及びPCR法について御教示頂いた財団法人岩手生物工学研究センター佐藤利次博士及び独立行政法人森林総合研究所村田仁博士、菌株の使用を御承諾頂き、菌の培養方法について御指導頂いた旧岩泉まつたけ研究所吉村文彦所長、特許出願に関する有益な御助言を頂いた森林総合研究所関谷敦微生物工学研究室長、執筆において御助言を頂いた筑波大学生命環境科学研究科土居修一教授、実験の全般について御指導頂いた元岩手県林業技術センター首席専門研究員兼特用林産部長作山健博士に深甚の謝意を表す。

## 引用文献

- 1) Guerin-Laguette, A・Matsushita, M・Lapeyrie, F・Shindo, K and Suzuki, K (2005) Successful inoculation of mature pine with *Tricholoma matsutake*. Mycorrhiza 15(4):301~305.
- 2) 藤原直哉・竹内隆人 (2003) 菌根性きのこの安定生産技術の開発. 岡山県林業試験場研究報告 19:35~43.
- 3) 浜田稔 (1953) マツタケ. 自然 8 (10) : 56~64.
- 4) 長谷川美奈・河合昌孝 (2003) 土壌を基材にしたマツタケ接種源の改良. 奈良県森林技術センター研究報告32 : 59~63.
- 5) 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. 広島県林業試験場研究報告 20:13~23.
- 6) 川合正允 (1991) 食用きのこの栽培技術Ⅱ-各論 26. きのこ技術集談会編集委員会編. 「きのこの基礎科学と最新技術」. pp.226~276. 農村文化社. 東京.
- 7) 川合正允・小川眞 (1976) まつたけの培養に関する研究 第4報 種菌培養の検討と菌床栽培の試み. 日本菌学会報17:499~505.
- 8) Kikuchi, K・Matsushita, N・Guerin-Laguette, A・Ohta, A and Suzuki, K(2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. Mycological Research 104(12) : 1427~1430.
- 9) 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. BIO INDUSTRY 20(9) : 37~46.
- 10) Murata, H・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.
- 11) 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.
- 12) 小川眞 (1977) 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. 国立林業試験場研究報告297:59~104.
- 13) 林野庁 (2004) 森林・林業統計要覧2005. P96. 林野共済会. 東京.
- 14) Ruimin, Z.・Zuete, M・Kaetsu, I・Kumakura, M(1993) Immobilization of *Trichoderma reesei* by Radiation Polymerization. Radiation Physics and Chemistry 42:943.
- 15) Satoh, T・Yaegashi, K・Ishii, S・Hirano, T・Kajiwar, S・Shishido, K and Enei, H(1998) Transformation of the Edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. Bioscience Biotechnology Biochemical. 62(12):2346~2350.
- 16) 下川利之(1989)マツタケ増殖技術開発に関する研究 IV -マツタケ増殖適地の土壌微生物条件と判定-. 岡山県林業試験場研究報告8:14~40.
- 17) 鳥越茂・塩見晋一(1984)マツタケのシロの形成と環境(Ⅱ)-マツタケ山の林内及び土壌環境-. 兵庫県林業試験場研究報告24:56~67.
- 18) Trinci, A. P. J. (1970) Kinetics of the growth of mycelial pellets of *Aspergillus nidulans*. Archives of microbiology 73(4) : 353~367.
- 19) Yamada, A・Kanekawa, S and Ohmasa, M(1999) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on *Pinus densiflora*. Mycoscience 40 : 193~198.
- 20) 柳田友道(1985)微生物学2. pp.274. 学会出版センター. 東京.
- 21) 吉田敏臣(1992)菌糸体生産-7章. 古川久彦編「きのこ学」. pp.185~188. 共立出版センター. 東京.