

(論 文)

寒冷地域におけるマツタケの生態と栽培

成松 眞樹

Ecology and cultivation of edible mushroom *Tricholoma matsutake* in cold region

Maki NARIMATSU

目 次

第1章 緒言	4	I. はじめに	22
I. マツタケの生態的・生理的な特徴	4	II. 材料と方法	21
II. マツタケの経済的価値と生産量	5	調査地	21
III. アカマツ林を用いたマツタケの人工栽培：自然発生量の安定化	5	子実体サンプル	21
IV. コロニー形成過程の推定	7	ジェネットの判別	22
V. コロニーの人工的な形成	8	SSR マーカーの有効性の確認と集団遺伝学的解析	22
VI. 本論文の目的と構成	9	III. 結果	23
第2章 寒冷地域におけるマツタケの生態	11	子実体とコロニーの分布	23
第1節 マツタケのジェネット判別に有効なSSRマーカーの開発	11	ジェネット解析	23
I. はじめに	11	ジェネット間の空間的・遺伝的な関係	23
II. 材料と方法	12	IV. 考察	24
調査地	12	マツタケのジェネットの存続	24
供試菌株	12	コロニーの形成過程	24
DNA の抽出	13	孢子散布がジェネット形成に果たす役割	25
SSR 領域の抽出とプライマー設計	13	森林内の攪乱とアカマツの更新がマツタケのコロニー形成に果たす役割	25
PCR による DNA の増幅の確認	13	菌類遷移におけるマツタケの位置づけ	26
プライマーの多型性スクリーニング	13	おわりに	26
解析能力の確認	13	第3節 アカマツ林におけるマツタケの子実体コロニーの拡大速度の推定と、気象条件および子実体発生本数との関係	34
SSR マーカーの多型性の評価	14	I. はじめに	34
III. 結果	14	II. 材料と方法	34
SSR 領域の抽出と増幅	14	調査地	34
多型性スクリーニング	14	子実体発生調査	34
解析能力の確認	14	データ解析：コロニーの拡大速度の推定	35
IV. 考察	14	データ解析：気象データ	36
SSR 領域の抽出	14	III. 結果	36
SSR マーカーの多型性	15	子実体の発生本数と分布	36
多型性を有する SSR マーカーの確立	15	コロニーの中心点の推定	37
第2節 SSR 解析に基づくマツタケのコロニー形成過程の推定	21		

コロニーの直径と拡大速度の推定	37	子実体発生時期前の気象条件が子実体発生本数に及ぼす影響	70
気象条件の変化とコロニーの拡大速度, 子実体発生本数の関係	37	子実体発生時期の気象条件が子実体発生本数に及ぼす影響	71
コロニーの拡大速度と子実体発生本数の関係	38	降水量が子実体発生本数に及ぼす影響	71
IV. 考察	38	おわりに	72
コロニーの直径と拡大速度の推定	38	第6節 マツタケ子実体サイズと環境条件および遺伝条件の関係	80
気象条件とコロニー拡大速度の関係	38	I. はじめに	80
気象条件と子実体発生本数の関係	39	II. 材料と方法	80
コロニーの拡大速度と子実体発生本数の関係	40	調査地	80
第4節 寒冷地域におけるマツタケの原基形成温度の推定	55	子実体発生調査	80
I. はじめに	55	子実体の採取と生育期間の算定	80
II. 材料と方法	55	子実体の測定	80
調査地	55	環境条件の測定	81
子実体のジェネット区分	55	子実体の遺伝条件	81
子実体の成長調査	55	データ解析	81
気象データ	56	III. 結果	81
データ解析	56	子実体発生量	81
III. 結果	57	子実体の生重量	81
子実体発生と地温の推移	57	子実体のサイズ	82
子実体の成長と成長式の選定	57	子実体の生重量とサイズの関係	82
原基形成温度の推定	57	環境条件と子実体サイズの関係	82
原基形成と温度変化	57	遺伝条件と子実体生重量および子実体サイズの関係	82
IV. 考察	57	遺伝条件と環境条件が子実体サイズに及ぼす影響の比較	82
子実体の成長経過	57	IV. 考察	83
寒冷地域における原基形成温度の推定	58	子実体重量, サイズの年変動	83
原基形成温度が遺伝的要因として子実体発生時期に及ぼす影響	58	環境条件と子実体重量およびサイズとの関係	83
温度変化と子実体原基の関係	58	遺伝条件と子実体重量およびサイズの関係	83
第5節 マツタケの子実体発生量に影響を及ぼす気象条件	68	遺伝条件と環境条件が子実体サイズに及ぼす影響の比較	84
I. はじめに	68	おわりに	84
II. 材料と方法	68	第3章 寒冷地域産の菌株を用いたマツタケ菌根苗の培養	94
調査地	68	第1節 菌糸成長至適温度の推定	94
気象データ	68	I. はじめに	94
コロニーの円周1mあたりの子実体発生本数の算出と, 気象条件との相関分析	68	II. 材料と方法	94
III. 結果	69	菌糸成長至適温度の推定	94
子実体発生本数	69	菌糸伸長速度のジェネット間比較および子実体サイズとの関係	94
子実体発生量に影響を及ぼす気象条件	69	III. 結果	95
IV. 考察	70	菌糸成長至適温度の推定	95
子実体発生本数の変動と, コロニー拡大速度との関係	70		

菌糸伸長速度のジェネット間比較および子実体サイズとの関係	95	培養時の振盪の有無が菌糸の成長と形態に及ぼす影響	103
IV. 考察	95	第3節 土壌培地と種菌シートを用いたアカマツ実生へのマツタケ菌根形成	107
寒冷地域産菌株の菌糸成長至適温度	95	I. はじめに	107
菌糸成長速度の菌株間での比較	96	II. 材料と方法	107
菌糸成長速度と子実体サイズ, 環境条件との関係	96	供試菌株と種菌シートの培養	107
第2節 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成長に与える影響	100	土壌培地を用いた培養と実生の移植	108
I. はじめに	100	根の測定と菌根形成の確認	108
II. 材料と方法	100	III. 結果	108
供試菌株	100	菌根の形成	108
一次培養	100	菌根形成率に基づく実生移植本数の検討	109
二次培養	100	IV. 考察	109
本培養	101	菌根の形成	109
培養方法の比較	101	菌根形成率に基づく実生移植本数の検討	110
菌糸塊の発菌能力の確認	101	第4章 総合考察～寒冷地域のアカマツ林を活かしたマツタケの栽培	118
菌糸成長量の評価	101	研究結果の概要	118
PCR法による菌種の判定	101	寒冷地域のマツタケで見出された生態的な特徴	118
III. 結果	101	アカマツ林の皆伐に対応したマツタケの発生量の維持	118
担体の種類が菌糸塊の形態に及ぼす影響	101	人工的なコロニー形成～コンテナ苗の利用	119
担体の種類が培養後の菌糸の乾燥重量に及ぼす影響	102	要旨	120
培養時の振盪の有無が培養後の菌糸の乾燥重量と形態に及ぼす影響	102	I. 寒冷地域におけるマツタケの生態	120
PCR法による菌種の判定	102	II. 寒冷地域におけるマツタケの栽培	120
IV. 考察	102	謝辞	122
担体の種類が菌糸塊の形態に及ぼす影響	102	引用文献	123
担体の種類が菌糸の成長に及ぼす影響	103		

*本論文の内容は、岩手大学大学院連合農学研究科学位論文「寒冷地域におけるマツタケの生態と栽培」に基づくものである。

第1章 緒言

I. マツタケの生態的・生理的な特徴

マツタケ(*Tricholoma matsutake*)は、担子菌門ハラタケ亜門ハラタケ綱ハラタケ亜綱ハラタケ目キシメジ科キシメジ属に属する真菌類であり(勝本 2010), 東アジアと北欧を中心に分布する(Wang *et al.* 1997; Bergius and Danell 2000; 山中ら 2011)。子実体は主として秋に発生し、子実体からは担子胞子が散布される(小川 1991)。担子胞子からは菌糸が発芽し(Ohta 1986; 玉田・練 2004), 菌糸は木本植物の根に外生菌根(後述)を形成する(Yamada *et al.* 1999a)。この菌根はマツタケの本体と言うべき部分であり、成長して「シロ」(後述)を形成する(小川 1975a)。シロには低温刺激(衣川 1963; 小川・浜田 1976; Inaba *et al.* 1995)で子実体原基が形成され、形成された原基が成長して子実体となる(衣川 1963)。こうした生活環は外生菌根菌類に共通であるが、マツタケを含む幾つかの菌根菌類は、明瞭なシロを形成する点で特徴的である。本論文では、ケッペンの気候区分における気候区が亜寒帯湿潤気候(Df), すなわち最寒月平均気温が-3℃未満で最暖月平均気温が10℃以上の条件に該当する地域を寒冷地域と定義し、寒冷地域に属する岩手県内陸北部のアカマツ林で研究を行う。

マツタケの主たる栄養摂取形態は菌根共生である(小川 1975a)。菌根共生は多くの植物でみられ、根に侵入した菌糸と植物細胞の間で水分や養分がやり取りされることが特徴である(Smith and Read 1996)。菌根は形状によってアーバスキュラー菌根、外生菌根、内外生菌根、ラン型菌根、ジャクジョウソウ型菌根、イチヤクソウ型菌根、ツツジ型菌根に区分される(山田 2003)。このうちマツタケが形成する菌根は外生菌根である(Yamada *et al.* 1999a; Yamada *et al.* 1999b)。外生菌根は、宿主植物(後述)の根の周囲への菌鞘形成、根の皮層細胞の間隙に侵入した菌糸による網状の構造物(Hartig net)で特徴づけられる(Smith and Read 1996)。マツタケでも、白色の菌鞘やハルティッヒネットを有する菌根が、野外のシロ(Yamada *et al.* 1999a, 後述)やアカマツとの二員培養(Yamada *et al.* 1999b)で確認されている。

マツタケの宿主は主としてマツ目(*Pinales*)に属する針葉樹である。日本ではマツ科(*Pinaceae*)のアカマツ(*Pinus densiflora*) (小川 1975a; Yamada *et al.* 1999a), ハイマツ(*Pinus pumila*) (Ogawa 1976), コメツガ(*Tsuga*

diversifolia) (Ogawa 1977b; Endo *et al.* 2015), トドマツ(*Abies sachalinensis*) (村田ら 2001), シラビソ(*Abies veitchii*) (Endo *et al.* 2015) およびヒノキ科(*Cupressaceae*)のネズ(*Juniperus rigida*) (富永 1971)など、北欧ではマツ科の *Pinus sylvestris* や *Picea abies* (Vaario *et al.* 2015)が宿主として知られる。また、中国ではマツ科の *Pinus densiflora*, *P. massoniana*, *P. tabulaeformis* に加え、ブナ科広葉樹の *Quercus semicarpifolia*, *Castanopsis orthanta*, *Lithocarpus rasiolozus* も宿主とされる(富永ら 1981; 富永ら 1988)。さらに、室内実験では中南米原産のセンダン科広葉樹の *Cedrela odorata* にも菌根を形成する(Murata *et al.* 2013)。マツタケと同様に大型の子実体を発生させる外生菌根菌としては、針葉樹と共生するオオモミタケ(*Catathelasma imperiale*), スメリイグチ(*Suillus luteous*), コウタケ(*Sarcodon aspratus*), クロカワ(*Boletopsis leucomelaena*)や、広葉樹と共生するタマゴタケ(*Amanita hemibapha*) (Endo *et al.* 2013), トリュフ(*Tuber melanosporum* など), ヤマドリタケ(*Boletus edulis*)などが知られる。

一般に外生菌根の形成により宿主樹木のリンの吸収量や成長量が増大する(Smith and Read 1996)。例えば外生菌根菌 *Lactarius rufus* に感染した宿主樹木 *Picea sitchensis* の実生は、主軸の伸長成長が促進される(Alexander 1981)。 *Lactarius rufus* と同様に、マツタケの菌根形成によってもアカマツ実生の成長が促進される(Yamada *et al.* 1999b)。

前述のとおり、マツタケの菌糸は宿主樹木の細根に侵入し、細根には外生菌根が形成される(小川 1975a; Yamada *et al.* 1999a)。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を形成する(小川 1975a; Yamada *et al.* 1999a)。この塊は「シロ」と呼ばれる(浜田 1953)。マツタケのシロは抗菌活性を有し(Ohara 1966), 近縁種のアメリカマツタケ(*Tricholoma magnivelare*)の菌糸も抗菌性の塩素化合物を分泌する(Wood and Lefevre 2007)。こうした物質が、シロの維持に貢献している(小川 1975b)。シロからは、マツタケが集団的に発生する(浜田 1953; 小川 1975a)。おそらくは地下のシロの形状を反映し、子実体の集団は円形や弧状の菌環(Fairy ring, Dix and Webster 1994)を呈する(浜田 1970; Ogawa 1981)。本研究では、こうした子実体の集団によりその位置が推定される地下の菌根と菌糸の集合体を、コロニーと称する。

マツタケの菌糸成長最適温度は 20℃から 25℃

の範囲とされる(浜田 1974; 山田・寺崎 1998; Lee *et al.* 2007)。一般に菌糸の成長速度は、生育環境中の温度、水分量、養分量、酸素濃度といった条件に影響される(Carlile *et al.* 2001)。これらのうちで温度は、森林内における子実体発生量変動要因の解析や、菌糸の培養を行う上で重要な要因である。多くの真菌類の菌糸成長温度は、0 °Cから 40 °Cの範囲である(Carlile *et al.* 2001)。このうち、20 °Cより上では生育できない菌は低温菌、20 °Cより下では生育できない菌は高温菌と総称されるが、大多数はこれらの中間的な温度帯を好む中温菌である(Carlile *et al.* 2001)。マツタケも前述の区分における中温菌に該当すると推察される。しかし、寒冷地域の菌株で菌糸成長至適温度を調査した例はない。また、同一の温度でマツタケの菌糸を培養しても、菌糸成長速度は他の担子菌類と同様に、菌株によって異なる可能性がある(衣川 1990)。マツタケの菌糸成長速度は、アマタケ(*Suillus bovinus*)やホンシメジ(*Lyophyllum shimeji*)といった、アカマツ林で生育する他の外生菌根菌よりも遅いため(浜田 1953; Ohta 1990; 小川 1991)、接種源の培養を目的とした菌糸の培養に用いる場合は、成長速度の速い菌株が有利である。

II. マツタケの経済的価値と生産量

マツタケの子実体は、少なくとも 8 世紀後半から食用として日本人に利用されてきた(有岡 1997)。子実体は大型で食味、食感、香気に優れ、その用途は食用のみならず儀礼的な意味合いを含むために(有岡 1997)、市場価格は高く、発生地域の住民の重要な現金収入源となっている(八百 1991; 有岡 1997)。国内での生産量は、1940 年代に約 12,000t のピークを示したが、その後大きく減少している(山中 2012)。減少の原因の一つとして、マツノマダラカミキリ(*Monochamus alternatus*)がマツノザイセンチュウ(*Bursaphelenchus lignicolus*)を媒介することによる松くい虫被害で、アカマツ林が減少した(Kosaka *et al.* 2001)ことが挙げられる(小川 1991)。こうしたアカマツ林の減少はマツタケの産地構造にも影響を及ぼした。マツタケの主産地は、1990 年代以前は広島県や京都府といった温暖地域であったが、現在では長野県、岩手県および北海道といった寒冷な地方に移行しつつある(農林水産省 2014, 東京都中央卸売市場築地市場 市場統計月報・産地別取扱実績(まつたけ))。本研究を実施した岩手県は、アカマツ林の面

積が約 22 万 ha と全国で最も多い(林野庁 2012)。このうちマツタケが発生するアカマツ林は主として天然林であるが、近年では人工林からも発生している(岩瀬・伊藤 1997; 吉村 2005)。岩手県でも松くい虫被害は増加しているが、マツタケの主産地である沿岸部や内陸北部では、被害が軽微または未発生である(岩手県 2015)。

国内生産量の減少に伴い、東アジアをはじめとする世界の複数地域からは、マツタケとその近縁種が日本へ輸出されており(Yang *et al.* 2008; 松尾 2010)、マツタケはトリュフ類(*Tuber melanosporum* など)、アンズタケ類(*Cantharellus cibarinus* など)、ヤマドリタケ(*Boletus edulis*) などと同様に、世界的にも重要な食用菌根菌類として認識されている(Wang *et al.* 1997)。このようにマツタケの経済的価値は高いが、狭義の人工栽培技術、すなわち施設栽培技術は開発されていない(鈴木 2005)。これまでに施設栽培化を目的とした菌糸の培養試験が行われたが(川合・小川 1976; 近藤・大賀 2011)、子実体原基の形成(小川・浜田 1976; Inaba *et al.* 1995)は認められたものの、完全な子実体の発生には至っていない。このため、マツタケの生産量は不安定な自然発生量に依存している(Wang *et al.* 1997)。

III. アカマツ林を用いたマツタケの人工栽培: 自然発生量の安定化

マツタケの生産量が変動する要因の一つとして、人工栽培技術が確立されていないことが挙げられる。一般的な農林水産物の生産量は、天然からの発生量(自然発生量)と人工的な栽培による発生量に区分される。現在、市場で流通している食用きのこのほとんどは、シイタケ(*Lentinula edodes*)やナメコ(*Pholiota microspora*)に代表される腐生菌類である(松尾 2010)。これらの腐生菌類は、菌床や丸太を用いて人工的に子実体を発生させることが可能である(古川 1992)。一方、一般に菌根菌類の人工栽培は困難で(山田 2002)、ホンシメジ(*Lyophyllum shimeji*)(Ohta 1994)やヤマドリタケ属の一種(*Boletus* sp.)(Ohta and Fujiwara 2003)といった例外を除き、人工的な栽培技術が開発されていない(Wang and Hall 2004)。マツタケも同様に、無菌的な菌根合成法は確立されているものの(Guerin-Laguette *et al.* 2000; Yamada *et al.* 2006; 小林ら 2007; 横田ら 2011)、施設栽培技術が確立されていないため(鈴木 2005)、子実体の生産量は森林から

の自然発生量に規定される。しかし、マツタケの自然発生量は年次間で変動し(小川 1991; Narimatsu *et al.* 2015), 市場における価格の変動も食用栽培きのこと比較して大きい(松尾 2010)。マツタケは地域住民の現金収入源であるため(八百 1991; 有岡 1997), 発生量や価格の変動により、マツタケの採取に従事する者の収入も変動することは、地域経済上の問題である。

生産量の安定化には、人工栽培が有効である。人工栽培は、狭義の人工栽培と広義の人工栽培に区分される。このうち前者には、人工的に環境を制御した室内などで、菌糸の培養物を用いて行う施設栽培が該当する。後者の例としては、マツタケ発生林内における発生量の安定化や新規コロニーの形成が挙げられる。

一般にきのこ類の自然発生量は、気温や降水量といった気象条件に影響される(鈴木 1979)。マツタケも同様であることから(小川 1991; 藤田ら 2002), 発生量の安定化には、発生量変動要因の解析が不可欠である。こうした解析の多くは、主に温暖な関西地方の発生地で行われ、子実体の発生量には温度や降水量などが影響を及ぼすことが示されている(衣川 1965; 石川・竹内 1970; 川上 1990; 衛藤ら 1999)。前述のとおり、関西地方は古くからマツタケの主産地であったが(有岡 1997), アカマツ林が松くい虫被害で減少しているために、生産量も低下している(松尾 2010; 農林水産省 2014)。現在の生産量は岩手県、長野県といった寒冷な地方で多く(農林水産省 2014), 岩手県も今後主産地となる可能性が高いが、気象条件と子実体発生量の関係についての詳細な解析事例は少ない(大森 1997; Narimatsu *et al.* 2015)。

子実体発生量を規定する要因の一つは菌糸量である。腐生菌類の場合、子実体発生量は木材、菌床およびホダ木といった、基質中の菌糸量に影響される(Tokimoto *et al.* 1984; 時本 2010), 菌糸量は培養時の温度や基質中の水分量などに影響されることが実験的に解明されているが(時本・小松 1982), 菌根菌に関する知見は少ない。その理由として、実験室内での栽培試験が困難なことに加え、森林内で菌糸や菌根が地下に存在するため、その定量的かつ経時的な把握が困難であること(Douhan *et al.* 2011), 子実体の分布から地下の菌のバイオマスを推定する場合でも、両者の分布域は必ずしも一致しないこと(Zhou *et al.* 2000; Van Der Linde *et al.* 2009)が挙げられる。一方、マツタケの子実体の発生位置は円形や弧状を呈し

(浜田 1970; Ogawa 1981; Narimatsu *et al.* 2015), 菌糸と菌根は主として子実体の直下に存在する(Lian *et al.* 2006)。このため、子実体発生位置に基づく地下のコロニー位置の把握が比較的容易な種類と言える。この特徴を利用して、円弧の直径やその拡大速度を代替的な把握手段とした、地下のバイオマスの推定が試みられてきた(川上 1994)。一方、マツタケのコロニーの拡大速度を推定するうえで、コロニーが円形に近似できる点は有利であるが、野外において、マツタケの子実体の発生位置は、真円を呈するとは限らない(小川 1975a)。そのため、拡大速度の定量的な推定は困難である。しかし、野外における拡大速度の推定方法の検討は十分とは言えず、寒冷地域での解析事例も少ない(村田ら 2001)。

自然発生量を安定させる手段としては、発生林内の環境制御による子実体の発生促進が挙げられる。その具体的な方法として、これまでに林内灌水(石川・竹内 1970), シロの被覆(富永 1975; 岩瀬 1988)などが報告されてきた。こうした管理を行う上で重要な指標が、子実体原基(原基)の形成温度である。一般に子実体の発生は、菌糸の増殖、原基の形成、原基の成長といった段階を経る(堀越・鈴木 1990; Kües and Liu 2000; Carlile *et al.* 2001)。基質中の菌糸が一定の量に達し、温度、湿度、光などの環境条件が適正な場合や(鈴木 1979; Koo *et al.* 1999), 温度降下、電撃などの刺激を受けた場合に(鈴木 1979; Takaki *et al.* 2009), 菌糸中に原基が形成または原基が成長し、子実体が形成される(鈴木 1979; 時本 2010; Islam and Ohga 2012)。こうした菌の性質を利用して、シイタケなどの腐生菌類の栽培では、菌糸が十分に蔓延した培養基に散水や打撃などの刺激を加えることにより、原基を形成、または形成された原基を成長させて、子実体を得ている(大森 2001)。

マツタケの子実体発生は、地温の低下に応じて始まることから(浜田 1953; 衛藤ら 1999; Vaario *et al.* 2015), 原基形成要因として地温が注目されてきた。衣川(1963)は、マツタケ子実体の成長を経時的に測定し、*Logistic* 成長式で近似させることにより、「子実体形成の誘発時期」を推定した。さらに、この時期の地下 5 cm の温度を原基形成上限温度とみなし、冷却実験結果も併せて 19 °Cであることを明らかにした。衣川(1963)の実験は京都府で行われたが、本研究の調査地は京都府より北方に位置するため、平均気温が低く、衣川(1963)と深さは異なるものの、地下 10 cm の地温が 20 °C を超える時期は短い(大森

1997)。したがって、原基形成温度は衣川(1963)の 19 °C よりも低い可能性があるが、詳細な解析は行われておらず、実態は不明である。さらに、一般的に菌の生理的な性質は遺伝的に規定され、同一種でも系統間で異なることから(衣川 1990)、原基形成温度の比較は複数の系統(ジェネット)で行う必要がある。

マツタケを換金作物とみなした場合には、発生量のみならず、子実体の重量やサイズも、販売時の単価を規定する要因として重要である(マツタケ研究懇話会 1983; 岩瀬・伊藤 1997)。子実体の重量やサイズに影響を及ぼす要因として、マツタケと同様にハラタケ型の子実体を形成する数種類の担子菌では、子実体発生期の温度(大平ら 1982)や湿度(鈴木 1988)といった環境条件が報告されている。マツタケ子実体の生重量の 88.3 % は水分であることから(文部科学省 2005)、マツタケにおいても、少なくとも重量は水分に関連した環境条件に影響を受けることが予想される。また、マツタケの子実体は地下のコロニーから発生し(小川 1975a; Yamada *et al.* 1999a)、その成長過程で地中と大気中の二種類の環境にさらされるため、それぞれの環境における環境条件の影響を検討する必要がある。こうした温度や水分量は、マツタケの子実体発生量に影響を及ぼすことが示されているが(石川・竹内 1970; 衛藤ら 1999; Narimatsu *et al.* 2015)、環境条件が子実体の重量やサイズに及ぼす影響は不明である。さらに、通常、コロニーの上には A₀ 層が堆積しており(小川 1975a)、その厚さが子実体の長さに影響を及ぼすことが示唆されているが(岩瀬・伊藤 1997; 藤田ら 2002)、寒冷地域における知見はない。

一般に担子菌類の子実体のサイズは、環境条件に加えて遺伝的な因子の影響も受ける(長谷部ら 1998)。この性質に基づき、シイタケ(*Lentinula edodes*)(寺島 2015)、ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)(Gaitán-Hernández and Salmones 2008)、ナメコ(*Pholiota nameko*)(伊藤 2010)などでは、優良系統の選抜が行われており、腐生菌類の数種類は品種登録制度の対象となっている(農林水産省 2015)。しかし、マツタケは人工的な栽培が行われておらず、野外でも遺伝的な系統の判別が難しいことから、遺伝学的な根拠に基づき子実体のサイズを比較した例は無い。一方、近年、マツタケの個体を識別する DNA マーカー(SSR マーカー、後述)が開発され(Lian *et al.* 2003)、野外で自然発生した子実体でも、系統の

判別が可能となった。

IV. コロニー形成過程の推定

前述のとおり、マツタケのコロニーを新たに形成して一定量以上の発生量を確保することも、生産量の安定化を目的とした広義の人工栽培とみなせる。新規コロニーの形成には、自然におけるコロニー形成過程の理解が必要である。マツタケを含む外生菌根菌類は、担子胞子の散布、菌糸の断片化、菌核の分散といったさまざまな手段で個体群を拡大する(Dahlberg and Stenlid 1995)。これらのうち、担子胞子は新しいジェネットを形成する唯一の手段であるという点で、外生菌根菌の個体群の形成と維持において重要である(Nara 2009)。なお、本研究ではジェネットを「遺伝的に同一な子実体の発生位置から推定される、おそらくは遺伝的に同一な地下の菌根と菌糸の集団」と定義する。マツタケに関しても、これまでにコロニー形成の観察が行われ(小川ら 1980; 川上 1994)、コロニー形成における担子胞子の重要性は示唆されてきたが(Park and Ka 2010)、担子胞子の分散や定着といった、コロニーの形成過程は不明である。

コロニー形成過程の推定には、遺伝子流動解析を含む集団遺伝学的解析が有効である(Jones and Ardren 2003)。マツタケに関し、これまでも集団遺伝学的解析は行われてきたが(Murata *et al.* 2005; Lian *et al.* 2006; Amend *et al.* 2009)、森林内におけるコロニーの形成過程に関し、詳細な遺伝子流動解析は行われていない。また、すべてのコロニーから毎年子実体が発生するとは限らないため(Guidot *et al.* 2004)、子実体に基づきコロニーの形成や維持について議論するためには、長期間の観察が必要である(Douhan *et al.* 2011)。

コロニーの形成過程の解明を目的とした集団遺伝学的解析を行うには、定量的なジェネット識別手段が必要である(Jones and Ardren 2003)。近年、ゲノム DNA の塩基配列中の反復領域(Simple sequence repeat, SSR)を標的としたジェネット識別マーカーが、菌類を含む様々な生物を対象に開発されている(Douhan *et al.* 2011; Guichoux *et al.* 2011)。SSR とは 1 塩基から数塩基の反復からなる塩基配列である。SSR の反復回数は、SSR を含む配列の塩基長に反映されるため、PCR で SSR を含む配列(SSR マーカー)を増幅し、増幅断片長を比較することにより、サン

プル間の遺伝的な差異を定量的に把握することが可能である(津村・陶山 2012)。SSR マーカーは、共優性で多型性を有し、かつ抽出される対立遺伝子数も多いことから、集団遺伝学的解析に適している(Jarne and Lagoda 1996)。SSR マーカーはいくつかの菌類でも開発されており(Kikuchi *et al.* 2000; Dutech *et al.* 2007; Kikuchi *et al.* 2007), その一部は集団遺伝学的解析にも用いられているが(Burchhardt *et al.* 2011; Wadud *et al.* 2014), マツタケの属する *Tricholoma* 属の報告は少ない(Lian *et al.* 2003; Carriconde *et al.* 2008)。筆者らはこれまでに、岩手県内のアカマツ林で4個のマツタケ SSR マーカー(Lian *et al.* 2003)を用いて子実体を個体識別し、ジェネット解析を行った(Lian *et al.* 2006)。その結果、各コロニーは、それぞれ1個から4個のジェネットで構成されることを明らかにした。しかし、調査期間が3年間と短かったため、コロニーの形成過程や、新たなコロニーを構成するジェネットは不明である。これらを明らかにするためには、長期間にわたる調査と、複数の SSR マーカーを用いた詳細な集団遺伝学的解析、特に地域内遺伝子流動分析(Local geneflow analysis)が必要であるが、前報(Lian *et al.* 2006)で用いた SSR マーカーは4個と少ないため、詳細な分析は困難である。

SSR マーカーを開発する際には、SSR を含む塩基配列(SSR 領域)をゲノム DNA 塩基配列中から単離する必要がある。従来、SSR 領域の単離は、コロニーハイブリダイゼーション法や dual-suppression-PCR 法(Lian *et al.* 2001)などで行われてきたが、これらの方法は、解析精度の劣る多型性遺伝マーカー(*e. g.*, AFLP 法, RAPD 法)の開発と比して費用と労力を要する(Guichoux *et al.* 2011)。近年利用が一般的となった第二世代シーケンサーは、塩基配列の効率的な決定が可能であるため、マーカーの開発に要する費用と労力の低減に有効である(Guichoux *et al.* 2011; Hunter and Hart 2013)。

V. コロニーの人工的な形成

これまでに述べたとおり、マツタケはアカマツ等の宿主樹木と外生菌根による共生関係を構築した後、子実体を形成することが知られているが(小川 1975a; Yamada *et al.* 1999), 菌糸の純粋培養による子実体の形成技術は未解明である(鈴木 2005)。一方、枯木・川上(1985)は、この共生関係に着目し、マツ

タケのコロニーの周縁部へアカマツの苗木を植栽して菌根を形成させ(菌根苗)、この苗木を試験地内の尾根に移植することにより子実体を発生させることに成功した。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、すなわち人為的な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。

共生関係の効率的な構築には、大量の菌糸が必要である。共生関係を構築させる場合、菌を宿主へ導入すること(接種)が必要となり、菌の接種源としては既存コロニー、担子孢子、培養菌糸や、あらかじめマツタケの菌根を形成させた苗木(菌根苗)が想定される(岩瀬・伊藤 1997; 山田・小林 2008)。また、宿主の形状としては、成木や苗木が想定される。接種源のうち既存コロニーは、現存のシロを破壊することから効率が悪いうえに、枯木・川上(1985)以降の成功例がない。また、担子孢子による菌根形成は成功例が少なく、形成率も低い(藤原 2007; 菅原ら 2012)。一方、培養菌糸の接種による菌根形成に関しては、森林内のアカマツの根を剥皮し、インドール酢酸を塗布することで無菌根の細根を伸長させ、これに培養菌糸を接種して、マツタケの菌根を形成させた例(Guerin-Laguette *et al.* 2005)や、マツタケを培養した土壌にアカマツの実生を植栽して、容器内で大型のマツタケ菌根苗を無菌的に育成した例(小林ら 2007)がある。こうして形成された菌根から子実体を発生させるためには、菌根の増殖によるコロニーの形成が必要となるが、マツタケは地中で他の生物と競合するため(小川 1977a; 鳥越・塩見 1984), 人為的にコロニーを形成させることは難しいとされている(下川 1989)。競合を低減させる手段の一つは、アカマツに接種する菌糸量を増加させることである。しかし、マツタケの菌糸成長速度は一般的な腐生菌と比べて遅いため(浜田 1953), 接種用菌糸の大量かつ短期間での増殖は困難である。

マツタケ菌糸の大量増殖には、培養方法の改良が必要である。一般に菌類の大量培養は、液体培養で行われる(Carlile *et al.* 2001)。また、培養効率の向上には、液体培地と担体の併用や(川合・小川 1976), 振盪培養による菌糸への酸素供給(吉田 1992)が有効とされる。さらに、成長した菌糸(菌糸塊)の形態は、担体の材質(Ruimin *et al.* 1993)や振盪強度(柳田 1985; Carlile *et al.* 2001)によって異なることも報告されている。ここでマツタケの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(長谷川・河合 2003), 接種源の形状は、

例えば飢餓培養や残存培地の除去が容易で、かつ根に密着させやすい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塊の培養方法は明らかにされていない。

マツタケの野外への接種には、菌根苗の利用が有望である。菌根菌は生育に必要な養分のうち、炭素の多くを宿主の樹木に依存している(Smith and Read 1996)。一方、菌糸を培養する際には、炭素源として糖質を培地に添加することが一般的である(古川 1992)。従って、培養菌糸を野外への接種源に用いる場合には、他の菌類との競合を避けるために、菌糸や担体に付着した糖質(培地)を除去することが望ましいが、除去は技術的に困難であるばかりか、接種後の菌糸の生存や成長に必要な炭素が不足する可能性がある。一方、マツタケの菌糸(Wood and Lefevre 2007)やシロ(Ohara 1966)は抗菌物質を分泌する。こうした物質による競合菌類の増殖抑制が、シロが維持されている理由の一つとされる(小川 1977b)。したがって、菌糸単体よりも、マツタケの菌根そのもの、例えば菌根苗を接種源に用いることにより、接種時の微生物との競合が抑制され、かつ炭素が宿主から供給されて、接種後のマツタケの生存や成長が改善される可能性がある。実際に、マツタケの人工的なコロニー形成と子実体発生の唯一の例は、前述のとおり野外のコロニーで育成した菌根苗の移植によるものである(枯木・川上 1985)。また、ホンシメジでも、培養菌糸と無菌根苗を同時に埋設することで、コロニー形成や子実体発生に成功している(河合 1999)。菅原ら(2012)は、アカマツとマツタケの二員培養により、アカマツにマツタケの菌根を形成させ、アカマツ林に移植した。また、Kobayashi and Terasaki (2015)は、大型のマツタケ菌根苗をアカマツ林に植栽し、植栽後の2年間は菌根が生存することを明らかにした。しかし、枯木・川上(1985)を除くいずれの場合でも、植栽後に菌根苗が死滅、あるいは菌根苗の根が植穴の外側に伸長しないなど(能勢 1983)、菌根苗を起点とした、野外の根へのマツタケの菌根形成(二次感染)や子実体の発生は観察されていない(山田・小林 2008)。

培養した菌根苗による二次感染が成功しない原因として、移植時の培地の養分過多や、菌根量の不足が予想される。マツタケの菌根合成に関するこれまでの研究の多くは、バーミキュライトや鹿沼土といった基材に、グルコース、圧ぺん大麦(押し麦)、酵母抽出物といった養分を添加した培地を用いてい

る(Gill *et al.* 1999; Yamada *et al.* 1999b; Guerin-Laguette *et al.* 2000; 菅原ら 2012)。こうした培地の養分濃度は土壌の養分濃度よりも高いと推察される。一般に菌糸は養分の濃度が高い方向へ伸長する(Carlile *et al.* 2001)。したがって、培養した感染苗を接種源として野外に移植する場合、培地中に残存する養分の濃度が周囲の土壌より高いと、苗から土壌への菌糸、菌根の伸長が妨げられる可能性がある。これらのことから、残存養分は競合微生物の増殖を促進するのみならず、菌根苗から周囲の根への、マツタケの二次感染を阻害する可能性もある。しかし、菌根苗を野外へ移植する際に、培地の基材に用いた土壌から剰余の養分を除去することは困難である。こうした問題を解決するためには、小林ら(2007)のように、貧栄養の培地で菌根量の多い菌根苗を育成し、これを野外への感染源に用いる必要がある。

VI. 本論文の目的と構成

これまでに述べた通り、マツタケの主産地は岩手県を含む寒冷地域に変わりつつあるものの、マツタケに関する研究は主として温暖地域で行われてきたため、寒冷地域におけるマツタケの生態や生理に関する知見は少ない。そこで本研究の第2章では、寒冷地域におけるマツタケの生態の解明を目的として、コロニー形成から子実体発生に至る自然界での生育段階に準じて、各段階を対象とした解析を行い、温暖地域との違いを示した。さらに第3章では、コロニーの新規形成を最終的な目的として、寒冷地域で得られた菌株を用いて、菌根苗培養の効率化を検討した。以下に各章の構成と目的を示す。

本研究のうち生態に関する解析の多くは、再現性の高いジェネット識別を必要とする。そこで第2章第1節では、マツタケのジェネット識別が可能なSSRマーカーを開発することを目的とした。そのために、第二世代シーケンサーを用いてマツタケの核ゲノムDNAを解析し、得られた塩基配列に基づいて複数のSSRマーカーを作成した。これらのSSRマーカーを用いて、他県産を含む複数の菌株を解析し、SSRマーカーの多型性を評価した。さらに、調査地内と近隣地域で採取された試料を対象に、SSRマーカーの解析能力を確認した。生産量の安定化を目的とした広義の人工栽培の一形態として、コロニーの新規形成による発生量の確保も挙げられる。新規コロニーの形成には、自然におけるコロニー形成

過程の理解が必要である。そこで第2節では、マツタケのコロニーの形成過程、即ち胞子の拡散と定着条件の解明を目的に、第1節で開発した SSR マーカーと 18 年間の子実体発生データを用いて、子実体のジェネット判別と集団遺伝学的解析を行った。形成後のコロニーの拡大速度は、気象条件や子実体発生量と連関すると推察されるが、寒冷地域での調査事例は少なく、拡大速度の定量的な解析方法も不明である。そこで第3節では、コロニーの拡大速度と気象条件、子実体発生本数との関係の解明を目的に、18 年間の子実体発生位置調査に基づき、統計学的手法(階層ベイズモデル)を用いてコロニーの拡大速度を推定した。コロニー拡大後には子実体原基が形成されるが、形成の契機となる温度は寒冷地域では不明である。そこで第4節では、寒冷地域におけるマツタケ子実体の原基形成温度の推定を目的に、調査地でマツタケ子実体の成長過程を調査し、地温との関係をジェネットごとに解析した。発生したマツタケの子実体を換金手段と捉える場合、子実体発生量の変動は、収入の不安定をもたらす。そこで第5節では、子実体発生量の変動要因の解明を目的に、気象条件と子実体発生量との関係について詳細な解析を行った。また、マツタケの子実体のサイズは、単価を規定する重要な要素であることから、第6節では子実体サイズの決定要因の解明を目的に、環境条件や遺伝条件が子実体のサイズに及ぼす影響について検討した。

第3章では、マツタケの栽培化を目指した菌根合成試験について述べる。前述のとおり、マツタケの人工的なコロニー形成は、菌根苗を接種源に用いた1例のみで成功している。他の例では植栽後に菌根苗が死滅あるいは根が植穴の外部に伸長しないことが問題である。さらに寒冷地域では、菌根苗の培養における重要な条件である菌糸成長至適温度も不明である。今後、寒冷地域での栽培化を実現させるためには、菌糸成長温度の解明や、菌根苗の培養が必要である。一方、こうした試験に他の地域の菌株を用いると、遺伝的な攪乱を招く恐れがある。そこで第3章では、寒冷地域(岩手県)産の菌株を用いた菌糸培養試験と菌根苗育成試験を行うこととした。第1節では、寒冷地域産のマツタケの菌糸成長至適温度の解明を目的に、複数の岩手県産菌株を用いて温度別に培養試験を行った。アカマツにマツタケを接種する際には、大量の菌糸が必要であるが、マツタケの菌糸成長速度は遅い。そこで第2節では、マツ

タケ菌糸の効率的な培養技術の開発を目的に、液体培養における担体と振盪条件を検討した。さらに、第3節では、貧栄養の培地で菌根量の多い菌根苗を育成することを目的に、担体上に培養したマツタケの菌糸を接種源に、滅菌土壌を基材に用いて、アカマツの無菌発芽実生に対する菌根形成試験を行った。なお、本論文の一部は、既に岩手県林業技術センター研究報告等(成松 2016b; Narimatsu *et al.* 2016 など)で報告している。本論文は、これらの研究成果をまとめたものである。

第2章 寒冷地域におけるマツタケの生態

第1節 マツタケのジェネット判別に有効な SSR マーカーの開発

I. はじめに

第1章で述べたように、マツタケの人工的な栽培方法は確立されておらず、生産量は不安定な自然発生に依存する(鈴木 2005)。また、マツノザイセンチュウの被害によりアカマツ林が減少していることも、マツタケの生産量が低下している原因の一つである(小川 1991; 鈴木 2005)。これらのことから、一定量以上の生産量を確保するためには、未発生地への菌の導入による、コロニー(マツタケの子実体発生位置からその存在と位置を類推された、マツタケの菌糸・菌根からなる地下の構造体)の形成が必要である。コロニー形成技術の開発には、自然状態においてマツタケのコロニーが形成される過程を理解する必要があり、そのためには各コロニーを構成する子実体の遺伝子型からジェネットを判別し、集団遺伝学的解析を行うことが有効である。

コロニー形成過程の推定には、遺伝子流動解析を含む集団遺伝学的解析が有効である(Jones and Ardren 2003)。マツタケに関し、これまでも集団遺伝学的解析は行われてきたが(Murata *et al.* 2005; Lian *et al.* 2006; Amend *et al.* 2009)、森林内におけるコロニーの形成過程に関し、詳細な遺伝子流動解析は行われていない。また、すべてのコロニーから毎年子実体が発生するとは限らないため(Guidot *et al.* 2004)、子実体に基づきコロニーの形成や維持について議論するためには、長期間の観察が必要である(Douhan *et al.* 2011)。

コロニーの形成過程の解明を目的とした集団遺伝学的解析を行うには、定量的なジェネット識別手段が必要である(Jones and Ardren 2003)。近年、ゲノム DNA の塩基配列中の反復領域(Simple sequence repeat, SSR)を標的としたジェネット識別マーカーが、菌類を含む様々な生物を対象に開発されている(Douhan *et al.* 2011; Guichoux *et al.* 2011)。SSR とは、1塩基から数塩基の反復で構成される塩基配列である。SSR の反復回数は、SSR を含む配列の塩基長に反映されるため、PCR で SSR を含む配列(SSR マーカー)を増幅し、増幅断片長を比較することにより、サンプル間の遺伝的な差異を定量的に把握することが可

能である(津村・陶山 2012)。SSR マーカーは、共優性で多型性を有し、かつ抽出される対立遺伝子数も多いことから、集団遺伝学解析に適している(Jame and Lagoda 1996)。SSR マーカーはいくつかの菌類でも開発されており(Dutech *et al.* 2007; Kikuchi *et al.* 2007)、その一部は集団遺伝学的解析にも用いられているが(Burchhardt *et al.* 2011; Wadud *et al.* 2014)、マツタケの属する *Tricholoma* 属の報告は少ない(Lian *et al.* 2003; Carriconde *et al.* 2008)。筆者らはこれまでに、岩手県内のアカマツ林で4個のマツタケ SSR マーカー(Lian *et al.* 2003)を用いて子実体を個体識別し、ジェネット解析を行った(Lian *et al.* 2006)。その結果、各コロニーは、それぞれ1個から4個のジェネット構成されることを明らかにした。しかし、調査期間が3年間と短かったため、コロニーの形成過程や、新たなコロニーを構成するジェネットは不明である。これらを明らかにするためには、長期間にわたる調査と、複数の SSR マーカーを用いた詳細な集団遺伝学的解析、特に地域内遺伝子流動分析(Local geneflow analysis)が必要であるが、前報(Lian *et al.* 2006)で用いた SSR マーカーは4個と少ないため、詳細な分析は困難である。

SSR マーカーを開発する際には、SSR を含む塩基配列(SSR 領域)をゲノム DNA 塩基配列中から単離する必要がある。従来、SSR 領域の単離は、コロニーハイブリダイゼーション法や dual-suppression-PCR 法(Lian *et al.* 2001)などで行われてきたが、これらの方法は、解析精度の劣る多型性遺伝マーカー(*e. g.*, AFLP 法, RAPD 法)の開発と比して費用と労力を要する(Guichoux *et al.* 2011)。一方、近年利用が一般的となった第二世代シーケンサーは、塩基配列の効率的な決定が可能であるため、マーカーの開発に要する費用と労力の低減に有効である(Guichoux *et al.* 2011; Hunter and Hart 2013)。

そこで本研究では、マツタケの個体識別が可能な SSR マーカーを開発することを目的とした。そのために、第二世代シーケンサーを用いてマツタケのゲノム DNA を解析し、得られたゲノム DNA 塩基配列データに基づいて SSR マーカーを開発した。これらの SSR マーカーを用いて、他県産を含む複数の菌株を対象に、SSR マーカーの多型性を評価した。さらに、調査地(後述)と近隣地域で採取された試料を対象に、SSR マーカーの解析能力を確認した。

II. 材料と方法

調査地

第2章で示す研究は、岩手県林業技術センターの四日市試験林(岩手県岩手郡岩手町, 北緯39度56分, 東経141度14分)のアカマツ林の一部で実施した(図2-1-1)。以後、特に断りの無い場合には、このアカマツ林を「調査地」と表記する。調査地内のマツタケの子実体の発生位置は、1994年から調査されている(Narimatsu *et al.* 2015)。調査地内には3本の尾根が含まれ、尾根は互いに200 mから300 m離れている。斜面方位は南西、標高は360 mから380 mである。傾斜は約20°であり、既報の最大40°(衛藤ら 1999)、30°から36°(村田ら 2001)、20°から30°(小川 1975a)と比較して、マツタケの発生地としては緩傾斜であることが特徴的である。調査地最寄り(南東約10km)の地域気象観測システム(アメダス)観測所(岩手県盛岡市好摩, 北緯39度52分, 東経141度10分, 標高205 m)における年間平均気温は9.4 °C, 年平均降水量は1145 mm, 最寒月平均気温は-3.1 °C(1月), 最暖月平均気温は22.6 °C(8月)であり(気象庁, ケッペンの気候区分では亜寒帯湿潤気候(Df)のうちDfa(最暖月平均気温が22 °C以上)に該当する(宮本 2009))。

調査地内に、8個の調査区を設定した(図2-1-1)。調査区の呼称は、それぞれsite1, 2, 3, 4-1, 4-2, 5, 6, および7である。これらの調査区の全部または一部を、各節に示す研究内容に応じて使用した。このうちsite4-2以外は、いずれもマツタケが概ね毎年発生するアカマツ林内に設定した。site4-2を除く7調査区のアカマツの樹齢は約90年、平均胸高直径は25.5 cm, 平均立木密度は981本/ha, 平均胸高断面面積合計は52.6 m²/haである。site4-2はsite4-1に隣接する。site4-2では、約50年前に広葉樹が皆伐され、その後にアカマツが天然更新している(岩手県林業技術センター森林簿)。site4-2のアカマツに関し、平均胸高直径は他の調査区より小さく、立木密度は他の調査区よりも高い。アカマツの樹齢は約50年、平均胸高直径は11.8 cm, 立木密度は2666本/ha, 平均胸高断面面積合計は29.1 m²/haである。いずれの調査区でも、低木層ではマルバアオダモ(*Fraxinus sieboldiana*)が優占し、他にコナラ(*Quercus serrata*)、オオヤマザクラ(*Prunus sargentii*)、アズキナシ(*Aria alnifolia*)などが観察される。マツタケ以外の外生菌根菌は、*Cenococcum geophilum*, *Cortinari* sp.,

Lactarius sp., *Rhizopogon* sp., *Russula* sp., *Tomentella* sp., *Tricholoma* sp. などが分布する(Lian *et al.* 2006)。調査地では、調査期間中に管理作業(刈り払い, 間伐など)は行わなかった。

供試菌株

SSR領域の特定には、調査地内の調査区site1(図2-1-1)で2009年10月に分離した*Tricholoma matsutake* IPFTC-Tm Is01株を用いた(以後は*Tricholoma matsutake* IPFTC-Tmを略して、菌株の番号のみを記す)。プライマーによる増幅の確認には、Is01株と、同調査地内で分離されたマツタケ23-20株の2菌株を用いた。菌株の継代培養にはグルコース濃度1/2の改変浜田培地(1.0%グルコース, 0.2%酵母エキス, 1.5%寒天, 脱イオン水)(小川 1991)を用いた。実験には、1規定塩酸でpHを5.0に調整した改変MYPG平板培地(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, 2.0%寒天, 脱イオン水)(Sato *et al.* 2014)を用いて、22 °Cにて培養した菌叢を用いた。

SSRマーカーの多型性のスクリーニングには、マツタケ23-20株に加え、調査地のsite6(図2-1-1)から2011年10月に分離した04-T71株, 04-T57株と、長野県産3株, 宮城県産1株, 滋賀県産1株の、合計8菌株を用いた。

SSRマーカーの解析精度の確認には、調査区site1, 2および5に分布する, colony1-1, 1-2, 2-2, 5-2の4か所のコロニー(図2-1-2)で採取した子実体を用いた。このうちcolony2-2を除く各コロニーでは、数年間連続して子実体の発生が観察されている(Narimatsu *et al.* 2015)。子実体の発生位置は各コロニーで円形や弧状を呈し、それぞれのコロニーは外観で明瞭に区分される。各コロニー間の距離は5 m (colony 1-1~colony 1-2)から200 m (colony 1-1~colony 5-2)である。解析精度の確認を目的としたSSR解析には、各コロニーあたり3個から8個, 合計24個の子実体を用いた(図2-1-2)。2010年の秋に、各コロニーで発生した子実体を、菌傘が完全に開いた後に採取した。採取後の子実体は菌傘の直下を切断し、軸の最上部から1 cm × 1 cm × 1 cmの試料を調製した。調製された試料を粒状のシリカゲルに投入し、実験まで室温で保管した。さらに、調査地近隣の岩手山周辺で採取したマツタケ子実体から分離した06-2株, 06-3株およびMTm11-75株(宮城県林業総合センター譲渡菌株)の3菌株と、地域外の宮城県気仙沼市で採取したマ

ツタケ子実体から分離した *Tr2* 野気仙沼1株(宮城県林業総合センター譲渡菌株), *Tr2* 野気仙沼2株(同)および *MTm11-76* 株(同)の3菌株も解析に供試した。

DNAの抽出

乾燥した子実体または培養菌叢の一部をメスで少量削り取り、直径5 mmの滅菌ジルコニアビーズと共に、2.0 mL容のマイクロチューブに投じ、試料粉砕機(MS-100, トミー精工社)で2500 rpm×65秒間粉砕した。粉砕後の試料をDNA抽出に供した。抽出には MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies 社, ワイオミング)を用いた。抽出操作は製品のマニュアルに従った。抽出後のDNAは30 µLのTE緩衝液(pH=8.0)に溶解し、NanoDrop 2000 (Thermo Scientific 社, マサチューセッツ)で濃度を測定した後、実験まで4 °Cにて保管した。

SSR領域の抽出とプライマー設計

公益財団法人岩手生物工学研究センターで、第2世代シーケンサー Illumina Genome Analyzer Iix system (Illumina 社, カリフォルニア)を用いて解析済みのゲノムDNA配列から、解析ソフトウェア REPEAT MASKER WEB SERVER ver. 4.0.3 (以後、ソフトウェアはスモールキャピタル体で示す) (Smit *et al.* 2013)を用いて、SSR領域を含む配列を抽出した。次に、このSSR領域を増幅するためのプライマーペアを設計した。設計には PRIMER 3 ver 0.4.0 (Koressaar and Remm 2007; Untergasser and Cutcutache 2012)を用いた。設計の条件はプライマー長20 bp, Tm値60 °C, GC含有率60%, 増幅産物長200 bp前後とし、これ以外は初期条件に従った。

PCRによるDNAの増幅の確認

得られたプライマーペアを用いて、PCR法によりDNAの増幅を行った。反応には0.2 mL容の8連チューブを用いた。PCR反応液の総量は25 µLで、組成は、2.5 µL 10×Reaction Buffer (MgCl₂含有), 0.16 mM of each dNTP Mix, 0.625 U *Taq* DNA Polymerase (Ex- *Taq*®, タカラバイオ社, 滋賀県), 0.2 µM 各 Primer (計25組), 18.875 µL 脱イオン水, 1.0 µL Template DNA である。サーマルサイクラーは MyCycler (Bio-Rad 社, カリフォルニア)を使用し、反応条件を1×[94 °C/10分], 30×[94 °C/1分, 55 °C/1分, 72 °C/5分], 1×[72 °C/10分]に設定した。以上の

PCRで得られた増幅産物を、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)上にて100 Vで30分間電気泳動し、泳動後のゲルをトランスイルミネーター上に移してUV(400 nm)照射下でバンドパターンを確認した。

プライマーの多型性スクリーニング

増幅が確認されたプライマーペアについて、上流側プライマーの5'末端にU19配列(5'-GGTTTTCCAGTCACGACG-3')を付加した(Schuelke 2000)。このプライマーを用いて、以下のPCRを行った: PCR反応には0.2 mL容の96穴プレートを用いた。PCR反応液の総量は7 µLとし、組成は、0.7 µL 10×Reaction Buffer, 0.16 mM dNTP Mix, 0.28 U *Taq* DNA Polymerase (Bio *Taq*®, BIOLINE, ロンドン), 0.5 µM 上流側 Primer, 0.1 µM 下流側 Primer, 0.5 µM U19(6-FAMにて修飾), 2.970 µL 脱イオン水, 2.0 µL Template DNA である。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Applied biosystems 社, カリフォルニア, 以下同)を使用し、反応条件を1×[94 °C/1分], 32×[94 °C/30秒, 54 °C/30秒, 72 °C/30秒], 1×[72 °C/5分]に設定した。以上のPCRで得られた産物を10.8 µL Hi-Di™ Formamide (Applied biosystems 社), 0.16 µL GeneScan™ 600 LIZ Size Standard v2.0 (Applied biosystems 社)とともに96穴プレートに投じ、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9700, Applied biosystems 社)で95 °C/5分, 4 °C/5分にて熱処理を行った。熱処理後の試料をキャピラリー型自動蛍光シーケンサー(ABI3130xl, Applied biosystems 社)で泳動し、増幅産物の多型性を確認した。キャピラリーの長さは50 cm, ポリマーは3130 POP-7™ (Applied biosystems 社)を用いた。波形の判読は GENEMAPPER ver.4.1 (Applied biosystems 社)で行った。

解析能力の確認

前項のスクリーニングで多型が確認され、かつ主ピークが2個以内で明瞭であったマーカーを対象に、マルチプレックスPCRにてサンプルを増幅した。マルチプレックスPCRでは、12個のマーカーを6個のグループに分けて用いた(表2-1-2)。マーカーの組み合わせは、スクリーニングで得られたフラグメントサイズに基づき決定した。各組のマーカーは、(1)*Trma-11, 12, 110* (2)*Trma-14, 13, 111* (3)*Trma-15, 16* (4)*Trma-17* (5)*Trma-18* (6)*Trma-19, 112* とした。増幅には

Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ社)を用いた。反応液の組成は 0.06 μ L PCR Mixture1, 6 μ L PCR Mixture2, 0.08 μ M 上流側 Primer, 0.42 μ M 下流側 Primer, 0.21 μ M U19, 0.7 μ L Template DNA を、脱イオン水で 11.28 μ L にメスアップした。U19 は、プライマーセットごとに異なる蛍光物質で修飾した (Schuelke 2000) (表 2-1-2) : (1) と (5) は 6-FAM™ (6-Carboxyfluorescein), (2) と (6) は PET® (Applied biosystems 社), (3) は VIC® (Applied biosystems 社), (4) は NED™ (Applied biosystems 社)。サーマルサイクラーは My Cyclor (Bio-Rad 社, カリフォルニア) を使用し、反応条件を 1×[94 °C/1 分], 32×[94 °C/30 秒, 54 °C/30 秒, 72 °C/30 秒], 1×[72 °C/5 分] に設定した。得られた試料を滅菌脱イオン水で 30 倍から 75 倍に希釈した後、スクリーニングと同様に、熱処理、フラグメント解析を行い、試料間で各マーカーの断片長(フラグメントサイズ)を比較した。

SSR マーカーの多型性の評価

フラグメント解析の結果から、各マーカーにおける対立遺伝子数、ヘテロ接合体率の観察値(H_o)と期待値(H_e)を算出した。これらの算出には CERVUS3.0(Kalinowski *et al.* 2007)を用いた。

III. 結果

SSR 領域の抽出と増幅

公益財団法人岩手生物工学研究センターにおいて解析されたマツタケゲノム DNA 配列から、SSR を含み、かつ単位配列以外の塩基を含まない領域が 25 個、抽出された。そのうち 3 個は 1 塩基、13 個は 2 塩基、8 個は 3 塩基、1 個は 4 塩基の単位配列からなる反復配列であり、いずれの SSR 領域中にも単位配列以外の塩基が含まれなかった。

得られた配列を基にプライマーを設計し、PCR を行った結果、全てのプライマーで DNA の増幅が確認された(図 2-1-3, 表 2-1-1)。このうち 21 ペアのプライマーによる増幅では、顕著なバンドが 1 本もしくは 2 本認められた。残り 4 ペア(図 2-1-3; レーン 1, 3, 20, 22)では、3 本以上のバンドが観察された。マツタケの子実体は 2 核菌糸で構成される(Iwase 1994; Murata *et al.* 2015)。今回解析に用いた DNA サンプルは子実体由来することから、PCR によって目的の遺伝子座のみが増幅されている場合は、2 種類または 1 種類の断片長からなる増幅産物が観察されるこ

とが期待される。一方、観察された増幅産物の断片長が 3 種類以上であった場合には、対象外の遺伝子座が増幅されていると推察される。これらの結果から、上述の 4 ペアのプライマーのうち、*Trma-112* を除いては、次節以降の解析に用いなかった。

多型性スクリーニング

25 個中 12 個の SSR 領域で、サンプル間に多型が認められた(表 2-1-1)。すなわち、異なるサンプル間では、少なくとも 1 個以上のマーカーで、増幅産物の塩基長が異なった。多型が認められた領域に含まれる反復配列の塩基数は、1 塩基が 1 個、2 塩基が 6 個、3 塩基が 5 個であった。これらのうち *Trma-16* では、多くのサンプルで顕著なピークが 3 本観察された。残りの 11 領域では、顕著なピークが 1 本または 2 本であった。前項と同様の理由により、*Trma-16* を除く 11 領域を多型性 SSR マーカーとして、以後の解析を行った(表 2-1-2)。

各マーカーにおける対立遺伝子数は 3 個から 10 個、平均 $5.7 \pm 2.2SD$ 個であった(表 2-1-2)。各マーカーにおけるヘテロ接合体率の観察値(H_o)は 0.40 から 1.00 であった。期待値(H_e)は 0.43 から 0.91、平均値は $0.71 \pm 0.18SD$ であった。

解析能力の確認

11 個の多型性 SSR マーカーの組み合わせにより、30 個のサンプルが 10 個のジェネットに区分された(表 2-1-3)。調査地の 4 か所のコロニーから得られた 24 サンプルでは、同一のコロニー(図 2-1-2)に属するサンプルは、全てのマーカーでフラグメントサイズが一致し、異なるコロニーに属するサンプルは複数のマーカーでフラグメントサイズが異なった。これらのことにより、24 サンプルが 4 個のジェネットに区分され(表 2-1-3)、その区分は子実体の発生位置により得られたコロニーの区分と一致した。気仙沼、岩手山の各地域で得られたサンプル(各 $n=3$)は、地域内、地域間のいずれのサンプルと比較しても、複数のマーカーでフラグメントサイズが異なり、それぞれ異なる遺伝子型を有するとみなされた(表 2-1-3)。

IV. 考察

SSR 領域の抽出

集団遺伝学的解析を行う際には、SSR 領域中に、単位配列以外の配列が含まれない単純な塩基の配列

(i.e., perfect repeat)が望ましいとされる(Guichoux *et al.* 2011)。本研究では、perfect repeat からなる SSR 領域をマーカー候補として抽出し、最終的に 11 個の SSR マーカーを得た。第二世代シーケンサーで解読されたゲノム DNA 塩基配列の情報を用いることにより、perfect repeat からなる SSR 領域を、効率的に抽出することができた。

SSR マーカーの多型性

本研究で得られた SSR マーカーにおけるマーカーあたりの対立遺伝子数は平均で $5.7 \pm 2.2SD$ 個、ヘテロ接合体率の期待値は平均で $0.719 \pm 0.18SD$ であった。一方、これまでに開発されたマツタケの SSR マーカーでは、マーカーあたりの対立遺伝子数が 2 個から 9 個、ヘテロ接合体率の期待値が 0.098 から 0.803 であった(Lian *et al.* 2003)。また、他の菌根菌類で開発された SSR マーカーと比較すると、*Laccaria bicolor* ではマーカーあたりの対立遺伝子数が 5 個から 9 個であった(Jany *et al.* 2006)。*Stiellus bovinus* では、マーカーあたりの対立遺伝子数が 1 個から 7 個、平均で 1.8 個であった(Kikuchi *et al.* 2007)。*Pisolithus albus* では、10 マーカーのうち多型を示したものは 2 マーカーであった(Hitchcock *et al.* 2011)。さらに、同じ真菌類のアラゲキクラゲ (*Auricularia auricula-judae*)を対象に開発された SSR マーカーでは、マーカーあたりの対立遺伝子数が平均 4.7 個、PIC (多型情報含有率) の平均値が 0.47 であった(Zhang *et al.* 2012)。本節の SSR マーカーはそのいずれも上回り、多型性が高いことが示された。

多型性を有する SSR マーカーの確立

以上の結果から、本研究で抽出された SSR 領域の多くは、マーカーの作成に用いたマツタケとは異なる系統のゲノム DNA 中にも共通して存在しており、ジェネット識別マーカーとして用いることが可能であった。また、11 個の SSR マーカーによる増幅産物の断片長は、地理的な距離が近い個体間では同一の値を示し、距離が遠い個体間では異なる値を示した。これらのことから、本研究で開発した 11 個のマーカーによる解析結果には、集団の有する遺伝的構造が反映されていると判断され、集団遺伝学的解析に必要な精度を有すると推察される。本節で得られた SSR マーカーを、これまでに報告されているマツタケの SSR マーカー(Lian *et al.* 2003)と併用することにより、精度の良い集団遺伝学的解析を行うことが

可能である。さらに、本報の SSR マーカーは、複数のマーカーを組み合わせるマルチプレックス PCR を行うことが可能であり、従来の PCR に比べて効率的に増幅を行うことができた。以上のことから、本研究で開発した SSR マーカーを用いることにより、従来より高精度かつ効率的な、マツタケの SSR 解析を行うことが可能である。

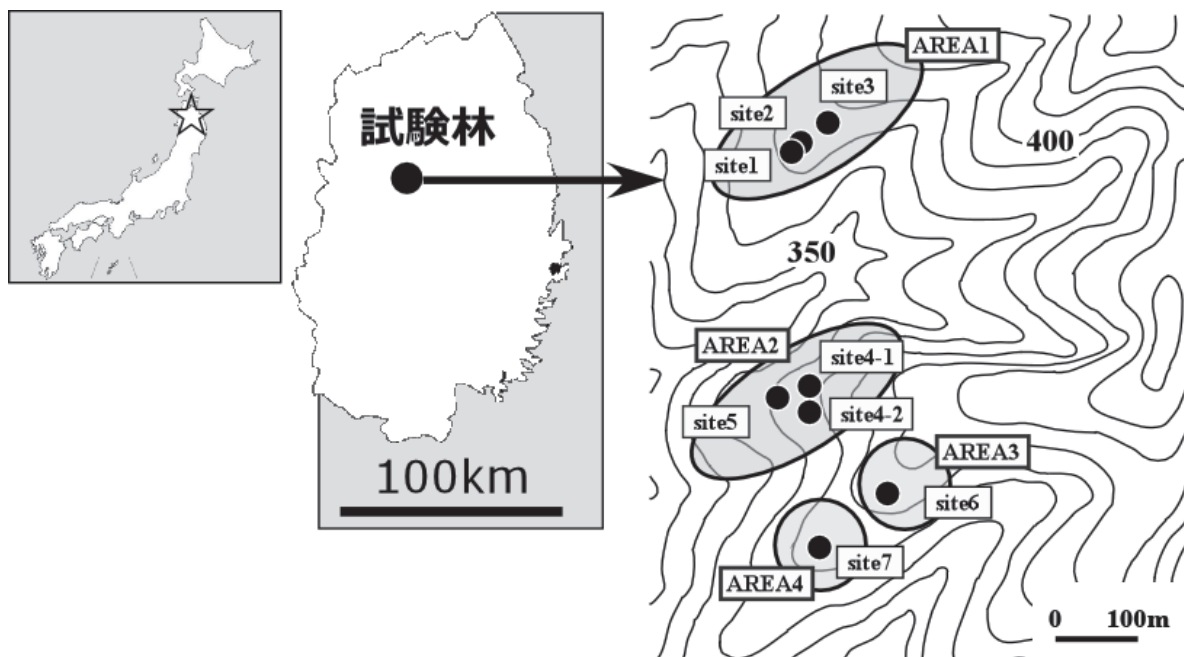


図 2-1-1 岩手県林業技術センター四日市試験林のアカマツ林内に設けた 8 個の調査区

岩手県林業技術センター四日市試験林(岩手県岩手郡岩手町)のアカマツ林内に、4 個の調査エリアを設定し、各調査エリアに計 8 個の調査区(site)を設定した。右図中の●は調査区的位置を、数字は調査区の番号を示す。灰色の網掛けは、調査エリアを示す(第 2 章第 3 節で使用)。

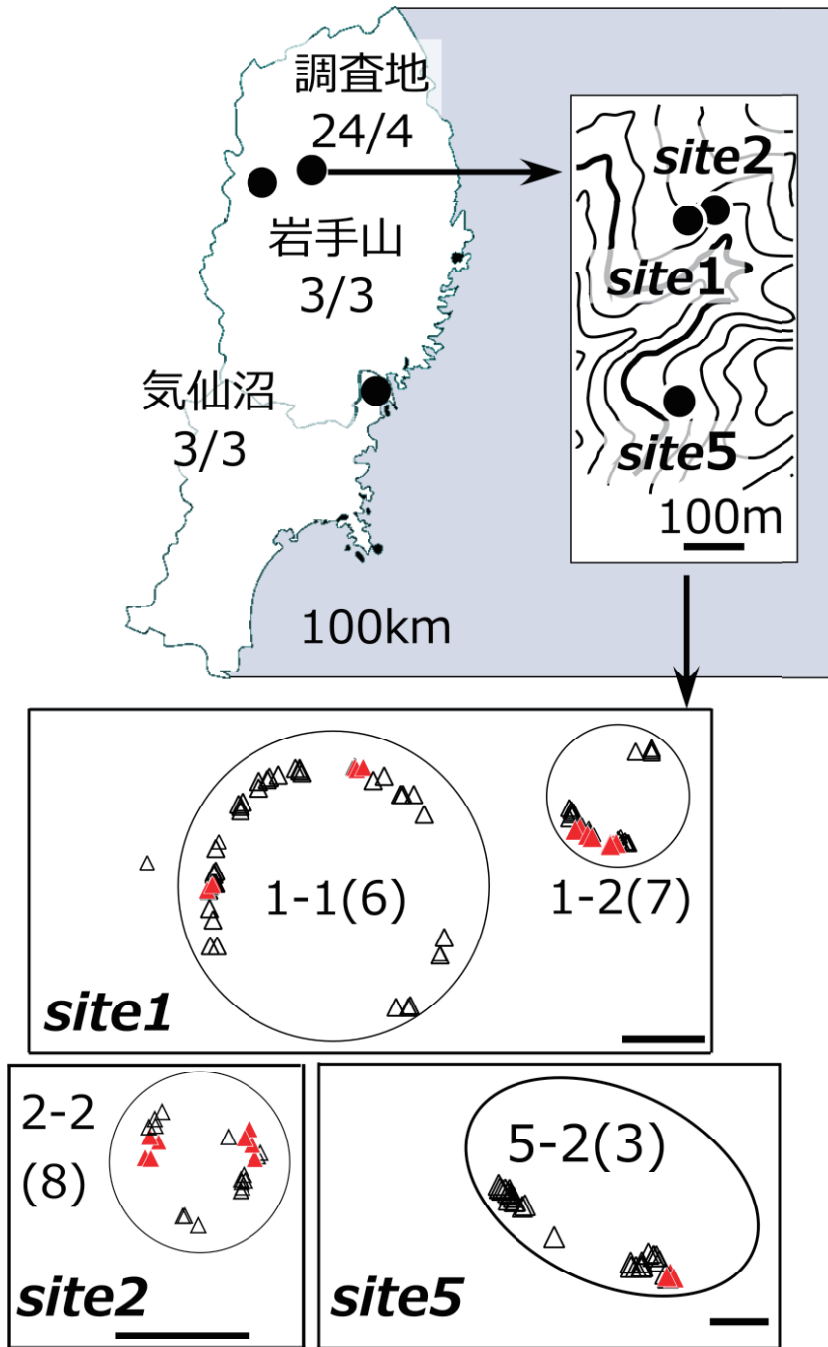


図 2-1-2 四日市試験林(調査地), 岩手山および気仙沼における菌株または子実体の採取地
 上図の数字は供試子実体本数 / 採取地箇所数を示す。図中の site は調査区(図 2-1-1)を示す。下図の数字はコロニーの番号を, ()内の数字は各コロニーで供試した子実体の本数を示す。△は子実体の発生位置を, ▲は多型性マーカーの解析能力の確認に用いた子実体の発生位置を示す。

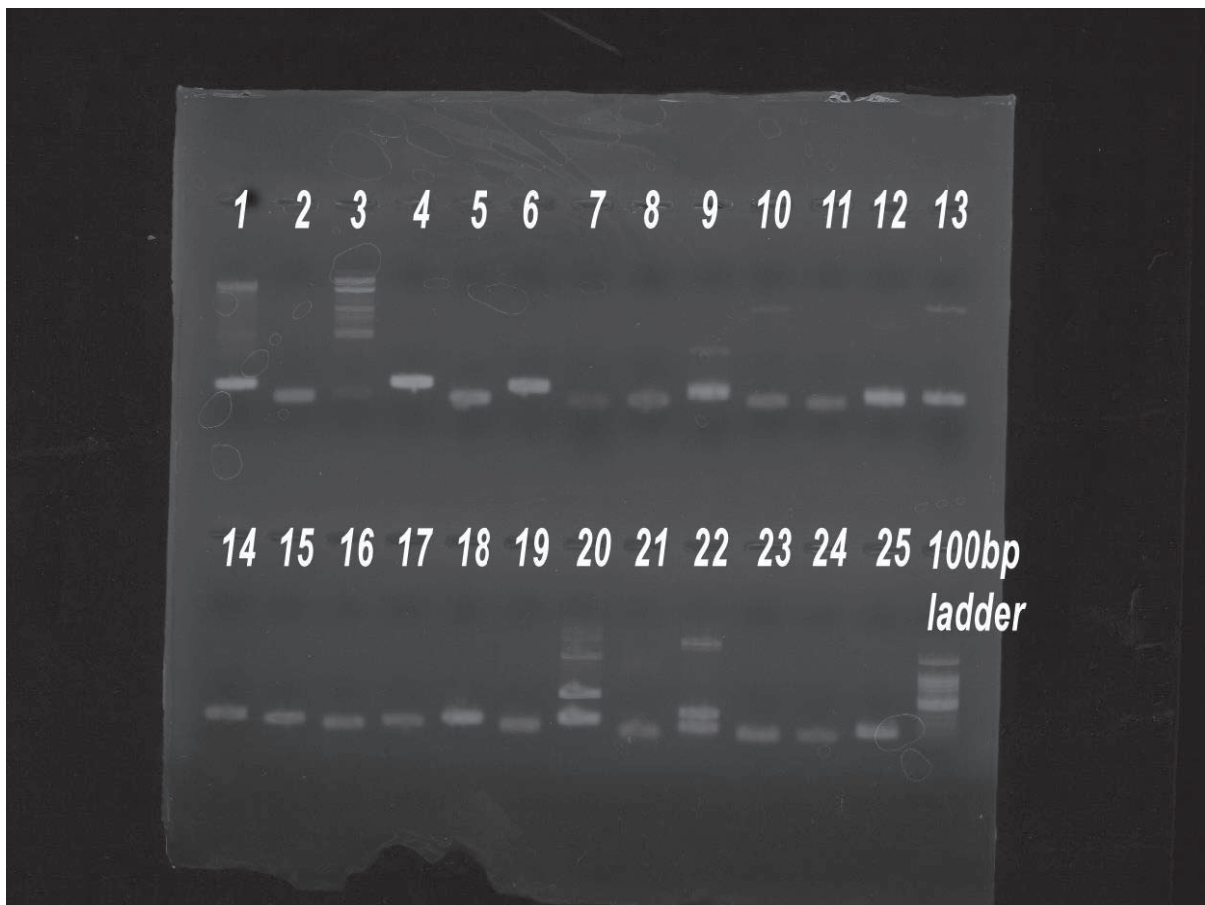


図 2-1-3 25 個のマーカ候補配列ごとに設計したプライマーを用いた PCR による、各プライマーの増幅性能とバンド数の確認

図中の数字はマーカの番号(=レーンの番号)を示す。下段右端のレーン(26)はサイズマーカ。サンプルはマツタケ 23-20 株。いずれのマーカでも塩基断片が増幅され、各マーカで 1, 2 または 3 本以上のバンドが見られる。

表 2-1-1 SSR 領域の多型性スクリーニング

レーン番号	SSR領域名	反復配列	反復数	増幅	多型	SSRマーカー名
1	3926	(AGC)	8	有	無	-
2	4085	(CT)	11	有	有	<i>Trma-I1</i>
3	4102_1	(T)	28	有	無	-
4	4102_2	(ATG)	7	有	有	<i>Trma-I2</i>
5	4294_1	(AAAAAC)	5	有	無	-
6	4294_2	(AGC)	8	有	有	<i>Trma-I3</i>
7	4615	(AC)	18	有	無	-
8	5101	(CT)	12	有	有	<i>Trma-I4</i>
9	7029	(GT)	11	有	無	-
10	7161	(GAC)	10	有	有	<i>Trma-I5</i>
11	8045	(AT)	10	有	無	-
12	10435	(GTA)	8	有	無	-
13	14821	(CAT)	9	有	無	<i>Trma-I6*</i>
14	29449	(CT)	13	有	有	<i>Trma-I7</i>
15	29922_1	(T)	14	有	無	-
16	29922_2	(AC)	11	有	無	-
17	30013	(GT)	20	有	有	<i>Trma-I8</i>
18	30321	(AG)	10	有	無	-
19	31356	(GT)	10	有	有	<i>Trma-I9</i>
20	32071_1	(ATG)	10	有	無	-
21	32071_2	(TGA)	10	有	有	<i>Trma-I10</i>
22	47253	(AT)	11	有	有	<i>Trma-I12</i>
23	85239	(CT)	12	有	無	-
24	86044_1	(T)	14	有	有	<i>Trma-I11</i>
25	86044_2	(GT)	13	有	無	-

レーン番号は図 2-1-3 の電気泳動結果に対応する。増幅は PCR による増幅の有無を、多型はスクリーニングに用いた 8 菌株間で増幅産物の塩基長が異なった(多型が認められた)ことを示す。ただし、*Trma-I6* は、多くのサンプルで顕著なピークが 3 本観察された。多型が認められた SSR 領域のうち、*Trma-I6* を除く 11 領域を、以後の解析で SSR マーカーとして用いた(*Trma-I1*~*I5*, *I7*~*I12*)。

表 2-1-2 開発した SSR マーカーの特性

マーカー名	蛍光色素	セット	反復配列	反復回数	プライマーの塩基配列(5'-3')	Ta(C)	Allele range(bp)	A	Ae	Ho	He
Trma-11	6-FAM	1	(CT) 11		F: GGATCCTGAGCTCTGCTCATA R: CGTCTTCTTGTCACACACA	59	158-173	7	7.14	0.60	0.86
Trma-12	6-FAM	1	(ATG) 7		F: GGTTAACTTTGGCGTTGAGC R: CTCCATTCCGTCATGTTA	59	302-310	4	1.75	0.40	0.43
Trma-13	PET	2	(AGC) 8		F: ATATTTCCTTCGCCCCATT R: CATCTGTTCGGCATGATAGG	59	271-277	3	2.08	0.67	0.52
Trma-14	PET	2	(CT) 12		F: GCGTTTCCAATTCCTGCTT R: TTCATTCATACCCGCTCTCA	59	152-169	6	4.54	0.44	0.78
Trma-15	VIC	3	(GAC) 10		F: TAGTGTAGAAAGCGGTGAGC R: ATCGCACCTTGAATACCG	59	143-161	3	1.85	0.40	0.46
Trma-17	NED	4	(CT) 13		F: AATGTTCCGGACAACCTCAC R: GCCACTTACGTGATGGGTTA	59	224-228	4	2.63	0.40	0.62
Trma-18	6-FAM	5	(GT) 20		F: CCCGATCTTCTGTAGACC R: CCAGCATCCGCTATGTGTAA	59	148-181	10	11.11	0.80	0.91
Trma-19	PET	6	(GT) 10		F: ATGGGGGAAGTAAGTGGTGA R: AACTGTCTCGGTTGCCATCT	59	159-168	6	5.00	0.50	0.80
Trma-110	6-FAM	1	(TGA) 10		F: ACATGGAGGATGAGGACAGG R: CCAGCCTTTTGCAGTACCT	59	111-128	8	7.69	1.00	0.87
Trma-111	PET	2	(T) 14		F: ATTTTCTCGATCCGCGTTA R: GCCTTGAAGCATGAACTGAA	59	123-128	5	5.00	0.44	0.80
Trma-112	PET	6	(AT) 11		F: CTCCAACATCTCTGCACCA R: GTGCCATTTGGGGTTTGA	59	180-189	7	5.55	0.60	0.82
平均値±SD								5.7±2.2	0.71±0.18		

Fは上流側プライマー，Rは下流側プライマー，Taはアニーリング温度，Allele range は各マーカーの断片長範囲を示す。Aは対立遺伝子の個数を，Aeは有効対立遺伝子個数を示す。Hoはヘテロ接合度の観測値を，Heは期待値を示す。

表 2-1-3 気仙沼，岩手山および四日市試験林から得たサンプルにおけるマーカー・サンプル毎の増幅産物の塩基長

サンプル名	SSRマーカー名												サンプル数										
	Trma-11a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	7a	7b		8a	8b	9a	9b	10a	10b	11a	11b	12a	12b
Kesen'numa1	165	167	304	304	271	274	158	164	158	161	227	227	148	173	165	165	117	124	125	127	187	187	1
Kesen'numa2	165	173	304	304	271	274	158	158	161	161	224	228	175	177	164	168	112	124	127	127	187	189	1
Kesen'numa3	158	158	304	307	-	-	-	-	161	161	224	224	173	173	164	168	111	114	-	-	181	186	1
Mt.Iwate1	163	163	304	304	271	271	158	158	158	158	227	227	166	173	165	165	117	125	128	128	187	187	1
Mt.Iwate2	167	171	302	307	271	277	162	162	161	161	224	228	169	169	164	166	112	117	123	126	180	186	1
Mt.Iwate3	165	167	304	304	271	274	164	164	158	161	224	226	175	179	159	159	112	115	126	126	184	184	1
colony 1-1	165	167	304	304	271	274	152	164	161	161	227	227	166	181	163	165	115	125	127	127	181	189	6
colony 1-2	159	167	304	310	271	277	164	164	161	161	227	227	174	176	165	165	112	115	126	126	187	189	7
colony 2	163	163	304	304	271	271	164	169	143	161	224	227	169	175	163	163	125	128	125	128	189	189	8
colony 5	159	159	304	307	271	271	152	159	158	161	227	227	166	181	159	165	112	115	123	127	182	187	3

colony1-1~5は調査地内のコロニー1-1~5を示す。Kesen'numa3にみられる-は，PCRで増幅産物が得られなかったことを示す。サンプル数は各マーカーで解析に用いた子実体の本数を示す。

第2節 SSR解析に基づくマツタケのコロニー形成過程の推定

I. はじめに

第1節で述べたように、マツタケの生産量は自然発生量に規定され、自然発生量は不安定であるため、一定量以上の生産量を確保するためには、未発生地への菌の導入による、新たなコロニーの形成が必要である。導入技術の開発には、自然状態においてマツタケのコロニーが形成される過程を理解する必要がある。

マツタケを含む外生菌根菌類は、担子胞子の散布、菌糸の断片化、菌核の分散といったさまざまな手段で個体群を拡大する(Dahlberg and Stenlid 1995)。これらのうち、担子胞子は新しいジェネットを形成する唯一の手段であるという点で、外生菌根菌の個体群の形成、維持において重要である(Nara 2009)。なお、本研究ではジェネットを「遺伝的に同一な子実体の発生位置から推定される、おそらくは遺伝的に同一な地下の菌根と菌糸の集団」と定義する。マツタケに関しても、これまでにコロニー形成の観察が行われ(小川ら. 1980; 川上 1994)、コロニー形成における担子胞子の重要性は示唆されてきたが(Park and Ka 2010)、担子胞子の分散や定着といった、コロニーの形成過程は不明である。

コロニー形成過程の推定には、遺伝子流動解析を含む集団遺伝学的解析が有効である(Jones and Ardren 2003)。マツタケに関し、これまでも集団遺伝学的解析は行われてきたが(Murata *et al.* 2005; Lian *et al.* 2006; Amend *et al.* 2009)、森林内におけるコロニーの形成過程に関し、詳細な遺伝子流動解析は行われていない。また、すべてのコロニーから毎年子実体が発生するとは限らないため(Guidot *et al.* 2004)、子実体に基づきコロニーの形成や維持について議論するためには、長期間の観察が必要である(Douhan *et al.* 2011)。

コロニーの形成過程の解明を目的とした集団遺伝学的解析を行うには、定量的なジェネット識別手段が必要である(Jones and Ardren 2003)。近年、ゲノム DNA の塩基配列中の反復領域(Simple sequence repeat, SSR)を標的としたジェネット識別マーカーが、菌類を含む様々な生物を対象に開発されている(Douhan *et al.* 2011; Guichoux *et al.* 2011)。SSR とは1から数塩基の反復からなる塩基配列である。SSR の反復回数は、SSR を含む配列の塩基長に反映される

ため、PCR で SSR を含む配列(SSR マーカー)を増幅し、増幅断片長を比較することにより、サンプル間の遺伝的な差異を定量的に把握することが可能である(津村・陶山 2012)。SSR マーカーは、共優性で多型性を有し、かつ抽出される対立遺伝子数も多いことから、集団遺伝学解析に適している(Jarne and Lagoda 1996)。SSR マーカーはいくつかの菌類でも開発されており(Dutech *et al.* 2007; Kikuchi *et al.* 2007)、その一部は集団遺伝学的解析にも用いられているが(Burchhardt *et al.* 2011; Wadud *et al.* 2014)、マツタケの属する *Tricholoma* 属の報告は少ない(Lian *et al.* 2003; Carriconde *et al.* 2008)。筆者らはこれまでに、岩手県内のアカマツ林で4個のマツタケ SSR マーカー(Lian *et al.* 2003)を用いて子実体を個体識別し、ジェネット解析を行った(Lian *et al.* 2006)。その結果、各コロニーは、それぞれ1個から4個のジェネットで構成されることを明らかにした。しかし、調査期間が3年間と短かったため、コロニーの形成過程や、新たなコロニーを構成するジェネットは不明である。これらを明らかにするためには、長期間にわたる調査と、複数の SSR マーカーを用いた詳細な集団遺伝学的解析、特に地域内遺伝子流動分析(Local geneflow analysis)が必要であるが、前報(Lian *et al.* 2006)で用いた SSR マーカーは4個と少ないため、詳細な分析は困難である。そこで第2節では、マツタケのコロニーの形成過程や維持期間の推定を目的に、10年間隔の子実体調査結果に基づき、第1節で述べた SSR マーカーを用いて、集団遺伝学的解析を行った。

II. 材料と方法

調査地

調査地内の3本の尾根上に4個の調査エリアを設け、調査エリア内に合計8個の調査区を設けた(第2章第1節 図2-1-1)。各調査エリアに含まれる調査区(site)の箇所数は、それぞれエリア1が3個、エリア2が3個、エリア3が1個、エリア4が1個である(図2-1-1)。各エリアで、マツタケの子実体の発生位置は1994年から調査されており(Narimatsu *et al.* 2015)、過去に SSR マーカーを用いたマツタケのジェネット判別も行われている(Lian *et al.* 2006)。

子実体サンプル

子実体サンプルを前述の調査地で2001年と2010

年に採取した(表 2-2-1)。マツタケの子実体は、9 月上旬から 10 月下旬の間に発生するため(Narimatsu *et al.* 2015), 期間中は 1 日から 3 日間隔で子実体調査を行った。すべての子実体は、菌傘が完全に開いた後に採取した。2001 年には 255 個の、2010 年には 557 個の子実体試料を採取した。採取した子実体の軸の上部から一片 1 cm の立方体を分取し、シリカゲル中に封入して実験まで室温で貯蔵した。子実体の位置からコロニーの位置を類推することを目的として、子実体の採取前に発生位置をグラスファイバー製の棒で標識し、標識の位置を冬季に光波トランスミット(CS-20A, Topcon, 東京)で測量した。測量結果から経緯距計算を行い、子実体の座標を算出した。

ジェネットの判別

2001 年に採取した子実体試料から、改変 CTAB 法(Lian *et al.* 2001)を用いてゲノム DNA を抽出した。また、2010 年に採取した試料から、MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies 社, ワイオミング)を用いてゲノム DNA を抽出した。いずれの場合も、抽出した DNA は 96 穴 PCR プレートに分注し、スピンドウン後にサーマルサイクラーのヒートブロック上で乾燥させて密封し、実験まで 4 °C で保管した(Kenta *et al.* 2008)。

SSR マーカーは、前節で開発結果を示した 11 個(*Trma-11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 110, 111* および *112*)と、多型性が確認されている既報のマーカー(*Trma14*, Lian *et al.* 2003 a)の計 12 個を用いた(表 2-2-2)。これらのマーカーを以下のように組み合わせ、マルチプレックス PCR を行った: マーカーセット 1(*Trma-15, 17, 110*), マーカーセット 2(*Trma-14, 111, Trma14*), マーカーセット 3(*Trma-13, 19, Trma112*), マーカーセット 4(*Trma-11, 12, Trma18*)。上記の組み合わせは、プライマースクリーニング(第 2 章第 1 節)で得られた各マーカーの PCR 産物の塩基長に基づき決定した。上流側プライマーの 5'末端は、6-FAM, VIC, PET または NED の蛍光色素で直接修飾した(表 2-2-2)。プライマーによる DNA 増幅効率の違いによる蛍光強度の違いを低減するために、上流側プライマーは修飾・非修飾プライマーを適宜、混合した(津村・陶山 2012)。混合比は予備実験にて決定した。たとえば *Trma11* プライマーでは、蛍光:非蛍光=1:14 である。DNA の増幅時における増幅産物へのアデニン A の非特異的付与を避けるために、すべての下流側プライマーの 5'末端に、7 塩基からなる配列

CTTTCTT を付加した(PIG-tail 法)(Brownstein *et al.* 1996)。

マルチプレックス PCR は、96 穴の PCR プレート上で行った。増幅には Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ株式会社, 滋賀)を用いた。反応液の組成は 0.06 μ L PCR Mixture1, 6 μ L PCR Mixture2, 0.2 μ M 上流側プライマー, 0.2 μ M 下流側プライマー, 約 30 ng Template DNA で、脱イオン水で総量を 12.00 μ L にメスアップした。電気泳動とフラグメント解析は、プライマースクリーニング(第 2 章第 1 節)と同様の方法で行った。アリルのピークが不明瞭な場合には、再度泳動を行った。7 遺伝子座以上のデータが得られたサンプルについて、遺伝子型を決定した。決定の際には CERVUS ver. 3.0.7 (Kalinowski *et al.* 2007)で判別分析を行い、排除確率が 0.1 %未満のサンプルは、同一の遺伝子型とみなし、同一の遺伝子型を有するサンプルを、同一のジェネットとみなした。以上により得られたデータセットを以後の解析に用いた。

SSR マーカーの有効性の確認と集団遺伝学的解析

アリル数、ヘテロ接合度の観察値(H_o)と期待値(H_e)、ハーディワインベルグ平衡(HWE)からの乖離、多型情報含有値(PIC)、平均排除率およびヌルアリル頻度を、CERVUS ver. 3.0.7 で推定した。このうち、ハーディワインベルグ平衡からの乖離は、あらかじめボンフェローニ補正を行ったうえで、 χ^2 検定で確認した。ヌルアリルの推定では、ヌルアリル頻度が 0.2 以上と推定された SSR プライマーを、ヌルアリルを有するものとみなした(Dakin & Avise 2004)。

ジェネット間の遺伝的分化の程度を推定するために、Weir & Cockerham の F_{ST} (Weir and Cockerham 1984)を、GENEPOP ver. 4.2. (Rousset 2008)を用いて算出した。ジェネットの組み合わせ間の遺伝的な分化の程度を定量するために、根井の遺伝距離(Nei 1987)を GENALEX ver. 6.5 (Peakall and Smouse 2012)を用いて算出した。また、遺伝距離と地理的距離の関係の有義性について、GENALEX ver. 6.5 を用いてマンテルの方法により検定した。さらに、ジェネットの空間的な集合を検出するために、GENALEX ver. 6.5 を用いて空間自己相関解析を行った。この解析では、2010 年に観察されたすべてのジェネットを対象に、各ジェネットから発生した子実体の集団の中心点を算出し、各ジェネットの位置とした。次に、遺伝的、地理的な距離をすべてのジェネットの組み合わせ間で算出した。これらの結果を地理的距離の階級(距

階級)ごとに集約した。ただし、各階級に約 200 個の組み合わせが含まれるように、距離階級を設定した。続いて、各距離階級で、地理的距離と遺伝的距離の空間自己相関係数(r)を算出した。 r の算出は 9999 回の反復計算によった。また、各距離階級で 95 %信頼区間も計算し、信頼区間の上に位置する r を、統計的に有意な正の空間自己相関を示すものとみなした。なお、負の自己相関については検討しなかった。

遺伝子流動の解析では、血縁度解析と両親解析を行った。血縁度解析では、すべてのジェネットの組み合わせについて、KINGROUP ver. 2.08+ (Konovalov *et al.* 2004)を用いて最尤推定法により血縁度を算出した。解析の際の第一仮説は完全兄弟、帰無仮説は半分兄弟とした。尤度比が有意水準 1 %で推定された場合に、そのジェネットの組み合わせが統計的に有意な完全兄弟関係を有するものとした。両親解析は、CERVUS ver. 3.0.7 (Kalinowski *et al.* 2007)を用いて最尤推定法により行った。この解析の目的は、2010 年の調査で見出された 6 個の新規ジェネットを子孫とみなし、その両親候補のジェネットを LOD(対数尤度比)に基づき推定することである。LOD は尤度比を自然対数変換して得た値であり、以下の条件で行った試算に基づき推定した：子孫数 1 万個体、親の数 100 個体、親個体の採取率 80 %、遺伝子型の決定における誤差率 1 %、5 遺伝子座以上での推定。信頼度 0.8 以上で正の LOD を示したジェネットを 1 番目の親とみなした。次に、以下の各条件を満たすジェネットを 2 番目の親とみなした：1 番目の親に対応する候補親であること；信頼度 0.8 以上の正の LOD を示すこと。

III. 結果

子実体とコロニーの分布

調査地で発生した子実体の多くは、円または弧を形成した(図 2-2-1)。子実体の発生位置は円弧の外側に向かって移動し、円弧の形は調査期間を通じて維持された。子実体の発生位置に基づき、調査期間中に合計 41 個、 0.013 ± 0.009 SD 個 / m^2 のコロニーが推定された(表 2-2-1)。41 個中 27 個のコロニーは、2010 年の調査のみでみられた。それらのうち 5 個のコロニー(1-2-1, 2-2-1, 4-4-1, 4-5-1 の 4 コロニーおよび、4-6-1 と 4-6-2 からなる 1 コロニー)は、1994 年から 2010 年における調査でも観察されていない

(図 2-2-1)。これら 5 個のコロニーはそれぞれ菌環を形成し、2001 年以前に形成されたコロニー(既存コロニー)とは明瞭に区別できた(図 2-2-1)。新規コロニーの直径は 2 m から 5 m であり、既存コロニーの直径(7 m 以上)よりも小さかった(図 2-2-1)。新規コロニーのうち 2 個はそれぞれ *site1* と *site2* で、残りの 3 個は *site4-2* で見いだされた。*site1* と *site2* で見られたコロニーは、調査員や監視人が頻繁に通る歩道上で発見された。*site4-2* は、約 50 年前の広葉樹の皆伐、搬出後に天然下種更新により成立したアカマツ林である(第 2 章第 1 節)。

ジェネット解析

第 1 節で述べた 11 個の SSR マーカーと 1 個の既報 SSR マーカー(表 2-2-2)を用いてジェネット解析を行った結果、*Trma14* と *I9* はヌルアリアル頻度がそれぞれ 0.30, 0.22 と推定され、ヌルアリアルを含むと推定された。また、両マーカーは *HWE* から乖離していた($p < 0.01$)。これらの結果は集団遺伝学的解析における精度の低下を示唆するため、*Trma14* と *I9* は以後の解析に用いなかった。*Trma14* と *I9* を除く 10 個の SSR マーカーにより、2001 年と 2010 年の 2 調査年間で合計 65 個のジェネットが識別された。このうち 16 個(24 %)は両年で、9 個(13 %)は 2001 年に、40 個(61 %)は 2010 年に、それぞれ観察された(表 2-2-1)。各ジェネットは独立的に分布した(図 2-2-1)。前述の 5 個の新規コロニーを構成するジェネットは、互いに異なっていた。また、2001 年以前から観察されている他のコロニーともジェネットが異なっていた。新規コロニーのうち 4 個はそれぞれ 1 個のジェネットで構成され、残りの 1 個は 2 個のジェネットで構成されていた。

ジェネット間の空間的・遺伝的な関係

全調査地内での F_{st} は 0.0803 であり、ジェネットの遺伝的分化は中程度であった。ジェネット間の地理的距離は 183.67 ± 144.34 SD m、最短距離は 0.24 m、最長距離は 547.08 m であった(図 2-2-2)。ジェネット間の遺伝的な違いを表す遺伝的距離は、ジェネット間の地理的距離と弱い正の相関を示した($r^2 = 0.06$; $p < 0.01$; マンテル検定)。空間自己相関解析の結果、42 m 未満の範囲で信頼度 95 %以上の正の自己相関が認められた(図 2-2-3)。また、血縁度解析の結果、4160 組み合わせ中 31 組み合わせ(0.7 %)のジェネット間で有意な完全兄弟関係が認められ($p < 0.01$ 表

2-2-3), 31 組み合わせ中の 27 組み合わせ(87%)は当該ジェネットが各々、同一の調査エリア内に分布した(表 2-2-3, 図 2-2-4)。また、有意な血縁度を示した組み合わせの多くで、当該ジェネット間の距離は 50 m 以内であり(図 2-2-5), 平均距離は 30.6 ± 66.2 m であった。

両親解析の結果、5 個の新規コロニーに属する 6 個のジェネット(新規ジェネット)のうち 4 個で、80% 以上の信頼度のもとに、両親が推定された(図 2-2-4)。また、1 個の新規ジェネットでは 80% 以上の信頼度のもとに片親が推定された。いずれの場合にも、候補親は同一の調査エリア内に分布した。また、いずれの候補親も、若いアカマツ林(site4-2)には分布しなかった。新規ジェネット 2-2-1 では既存ジェネット 2-1-2 が、新規ジェネット 4-4-1 では既存ジェネット 4-3-1 と 4-10-1 が、新規ジェネット 4-5-1 と 4-6-1 では既存ジェネット 4-4-1 と 4-7-1b が、新規ジェネット 4-6-2 では既存ジェネット 4-7-1 と 5-15-1 が、それぞれ親ジェネットとして推定された。新規ジェネットと親候補ジェネットの距離は 7.02 m から 40.72 m, 平均 19.59 ± 14.73 m であった。

IV. 考察

マツタケのジェネットの存続

24%のジェネットが 2001 年と 2010 年の両年に観察されたことから(表 2-2-1), マツタケのジェネットは少なくとも 10 年間は存続が可能であることが推定された。これまでにも、遺伝学的な背景は不明ながら、マツタケのコロニーが数十年間は維持されることが報告されている(小川 1977a; 衛藤ら 1999)。また、成松(2004)は、マツタケのコロニーが 10 年間は維持されることを本調査地で報告しているが、同様に遺伝学的な背景は不明であった。本研究は、単一のジェネットで構成されたマツタケのコロニーが、10 年以上維持されることを明確に示した最初の報告である。

今回推定されたマツタケのジェネットの存続期間は、*Laccaria bicolor* の少なくとも 3 年(Delabastide *et al.* 1994; Seloisse *et al.* 2001)よりも長い。さらに、*L. amethystina* や *L. laccata* に関しては、年毎のジェネットの更新も報告されている(Wadud *et al.* 2014)。これらの *Laccaria* 属菌は、外生菌根菌類の遷移(Pugh 1980)における先駆種(Nara 2009)あるいは R-戦略種(Frankland 1998)として知られる。これらとは対照的

に、遷移上の後期出現種に分類される *Russula brevipes* のジェネットの存続期間は、11 年以上とされている(Bergemann and Miller 2002)。本研究により、マツタケのジェネット存続期間は *Laccaria* 属菌類より長く、*Russula brevipes* と同程度であることがわかった。こうした見解とは異なり、Amend *et al.* (2009) は、様々な傍証(例えば Ohta (1986); Hosford *et al.* (1997)など)からマツタケを後期出現種とみなしたうえで、マツタケは後期出現種であってもジェネットは長く維持されないと主張した。この主張が本研究と異なる原因は、本研究では 10 年間隔で多くのサンプルを解析したことと考える。

コロニーの形成過程

10 年目の調査で、新たに 27 個のコロニーが観察された。このうち 5 個の円形コロニーは、コロニーの直径が小さいことや、ジェネットが 2001 年以前に確認されたコロニー(既存コロニー)と異なることから、新規コロニーとみなされた。これらの新規コロニーの形成時期は、調査地におけるコロニー拡大速度(Narimatsu *et al.* 2015)とコロニーの直径から、11 年から 29 年前と推定された。また、新規コロニー形成時のアカマツの樹齢は、コロニーの直径と拡大速度から、最小で 21 年生と類推されるが、前生広葉樹の伐採からアカマツの定着までに要する期間を考慮すると、コロニー形成時の樹齢はさらに若かった可能性がある。

小川(1980)は、マツタケの子実体は、コロニー形成の数年後から発生することを示唆している。また、10 年目の調査が行われた 2010 年はマツタケの豊作年であった(Narimatsu *et al.* 2015)。これらのことから、新規コロニーは 2010 年以前に形成されていたが、菌糸量が不十分であったり、気象条件が不適当であったりしたために、最初の子実体発生が 2010 年になったと考える。

5 個の新規コロニーのうち、4 個は 1 個のジェネットからなり、それらのジェネットはいずれも新しく確認されたものであった。また、新規コロニーの 5 個中 3 個が観察された site4-2 は、広葉樹の伐採後に天然下種更新により成立したアカマツ林であるため、アカマツ林の成立以前にマツタケのコロニーが存在した可能性は低く、マツタケが苗木に付着して持ち込まれた可能性も無い。これらのことから、これまでに本調査地(Murata *et al.* 2005; Lian *et al.* 2006)や他の調査地(Xu *et al.* 2008; Amend *et al.* 2009)でマツタケ

を対象に行われた、あるいは他の外生菌根菌、*Suillus* 属(Burchhardt *et al.* 2011; Zhou *et al.* 1999)や *Laccaria* 属(Fiore-Donno & Martin, 2001; Wadud *et al.* 2014)および *Russula* 属(Redecker *et al.* 2001)を対象に行われた研究と同様に、マツタケの新規コロニー形成は、孢子散布によるものと考えられる。一方、新規コロニーの5個中1個には、2個のジェネットが含まれた。こうした現象は、既存コロニーでも観察される(site2, 図2-2-1)。過去に本調査地で行われた解析でも(Murata *et al.* 2005; Lian *et al.* 2006), 複数のジェネットを含むコロニーが観察された。小川(1975a)は、複数のジェネットを含むコロニーは、ジェネットの異なる複数のコロニーが成長する過程で融合することにより形成されたものと考察した。本研究の結果は、小川(1975a)の見解を支持するものと考えられる。2010年に新たに確認された他のコロニーの一部は、近隣のコロニーと同一の遺伝子型を示し、その形状は弧状であったことから、成長に伴い断片化したコロニー(小川1975a)と考える。

孢子散布がジェネット形成に果たす役割

調査地間の遺伝的な分化の程度を表す F_{ST} の値は、中程度の分化を示した。また、遺伝的距離と地理的距離の相関分析の結果が、弱いながらも有意な正の相関を示したことは、調査地内の遺伝子流動が距離によって制限されていることを示唆する。42m未満の距離階では、正の遺伝的空間自己相関が認められ(図2-2-3)、近縁なジェネットの95%は50m以内に分布した。(図2-2-5)。さらに、6個の新規ジェネットを対象とした両親解析でも、推定された候補親は近隣のコロニーであった(図2-2-4)。前項ではマツタケのコロニーは孢子により形成されることを示したが、本項の結果から、マツタケの孢子は主として子実体の近傍に散布されると結論付ける。

孢子が主として子実体の近傍に散布されるという結果は、他の *Tricholoma* 属菌(Carriconde *et al.* 2008)や、他の外生菌根菌、例えば *Suillus grevillei*(Zhou *et al.* 2001)や *Laccaria* 属(Wadud *et al.* 2014)でも報告されている。Amend *et al.* (2009)は、本研究と同様の林齢のマツ林でマツタケのジェネットの空間自己相関解析を行い、マツタケの個体群構造は小規模で、遺伝子流動も制限されることを報告している。マツタケの孢子散布は子実体の近傍に限られるとする本研究の結論は、それらの先行研究を、長期間の調査に基づき支持するものである。

遺伝学的な解析は行われていないが、孢子の散布距離に関し、いくつかの外生菌根菌では、95%の担子孢子が子実体の1m以内に落下することが、数理モデルを用いて推定されている(Galante *et al.* 2011)。また、マツタケでもプレバートを用いた調査により、同様の結果が報告されている(Park and Ka 2010)。本研究で推定された散布距離は Park and Ka (2010)より長い。孢子から発芽した菌糸が、コロニーを形成せずに数m伸長し、その先にコロニーを形成することは困難と推察されるため、孢子の着地点はコロニーの中心付近と考える。従って、本研究の結果は、マツタケの孢子は Park and Ka (2010)の結果よりも遠くに到達するものの、孢子散布は依然として子実体の近傍に限られることを、遺伝学的な解析結果に基づき高精度で示し、近隣の子実体からの孢子散布がコロニー形成に重要とする Amend *et al.* (2009)の見解を支持するものである。

森林内の攪乱とアカマツの更新がマツタケのコロニー形成に果たす役割

マツタケの子実体は調査地の各所で発生するため、孢子も調査地全体に散布されていると考える。一方、新規コロニーが観察された場所は、2つの特徴的な立地に限られる：すなわち前生樹の皆伐後に更新したアカマツ林と、頻繁に使用される歩道上である。前者に関し、4個の新規ジェネットが観察された site4-2 では、約50年前に広葉樹が皆伐、搬出された。材の搬出時には、地表に堆積していたリターや腐植が移動し、鉍物質土壌が露出したと推察される(Martin 1988)。後者に関し、site1とsite2は成熟したアカマツ林内に位置するが、それらのサイトで観察された新規ジェネットは、いずれも研究者や巡視員が頻繁に用いる歩道上で見いだされた。歩道上では有機物の堆積が少なく、部分的に鉍物質土壌が露出している。これらの新規ジェネット形成箇所は、有機物層の移動や鉍物質土壌の露出といった、地表攪乱が発生した点で共通する。

有機物層の除去は、マツタケ(伊藤・小川 1979; 小川ら 1980)や近縁種のアメリマツタケ *T. magnivelare* (Hosford *et al.* 1997)における慣行的なコロニー形成技術の一つである。有機物層は外生菌根菌の接種源を含み(Parke *et al.* 1983)、その一部はマツタケと競合すると推察される。小川ら(1980)は、孢子の定着環境に着目して、マツタケのコロニー形成における有機物の除去の必要性を示した。すなわち、

胞子と細根の接触機会を増やし、かつ競合菌類を除去する効果である。これらの知見を総合的に考慮すると、本調査地において、地表の攪乱は新規ジェネットの形成に貢献したと推察される。また、アカマツの定着には、マツタケをはじめとする外生菌根との共生が不可欠であるという観点から、こうした地表の攪乱が、アカマツの更新にも有効であることは(正木 2005)、注目に値する。

site4-2 に新規コロニーが形成された要因は、細根の分布の観点からも説明される。外生菌根菌の遷移は、細根の密度に影響される(Peay *et al.* 2011)。また、マツタケのコロニー形成には、アカマツの細根が高密度で露出していることが重要である(小川ら 1980)。site4-2 のアカマツ林は皆伐後に更新したもので、樹齡は他の調査区より低く、立木密度は高い(第 2 章第 1 節)。アカマツの直径 2 mm 未満の細根は、土壌の表層に遍在し(Karizumi 1976)、細根のバイオマスは、胸高断面積合計 500 cm² 程度の若い林でもっとも多い(Karizumi 1974)。

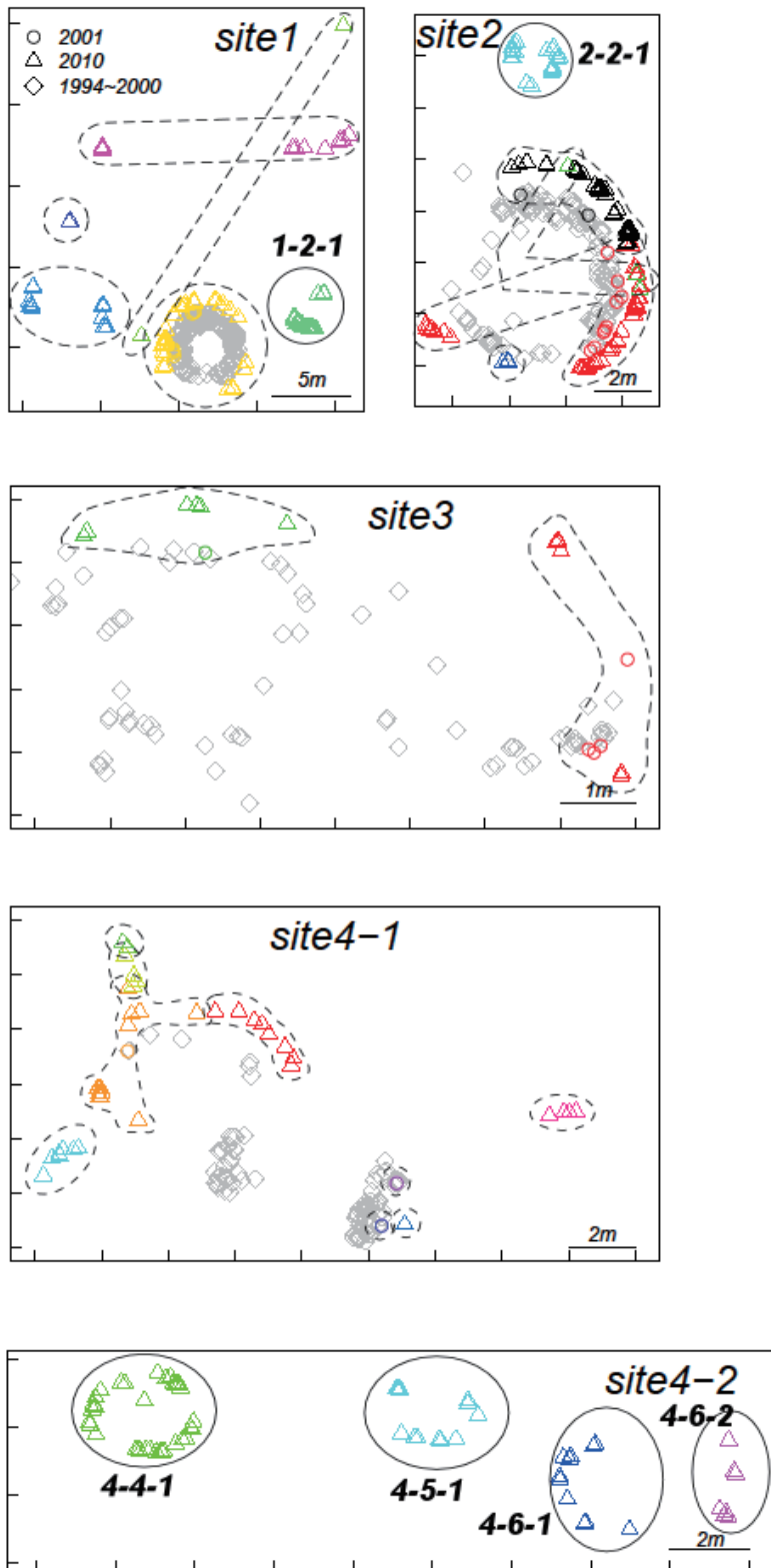
以上のことにより、新規ジェネットが見出された場所では、鉱物質土壌の露出や地表付近での細根量の増加といった、マツタケが定着しやすい環境が、地表攪乱あるいはアカマツの更新によって形成され、その環境が維持されている期間中に、胞子が落着いたと考える。

菌類遷移におけるマツタケの位置づけ

本研究では、10 年間隔で調査を行うことにより、2 種類の攪乱サイトにおいてコロニーの新規形成を観察することができた。この観察結果は、マツタケの定着が地表攪乱に依存し、菌類遷移の比較的早い段階に行われることを示唆する。一方、小川(1977a)は、マツタケ発生地で菌類の子実体発生を観察し、マツタケは菌類遷移の中間的な段階で侵入する種とした。本研究の結果からは、マツタケが菌類遷移の初期段階で侵入し、コロニーは 10 年以上維持されること、およびマツタケは子実体発生に 10 年程度を要することが推察されていることから、地下に形成されていたコロニーの存在が認識できない子実体調査(小川 1977a)では、遷移中間段階での侵入種とみなされていたことが示唆される。コロニー形成に関する詳細な認識は、第 2 章第 1 節で開発した SSR マーカーを用いて地下のマツタケのジェネットの動態を解明することにより可能となる。

おわりに

本研究により、マツタケのジェネットや、ジェネットにより構成されるコロニーの形成には、胞子供給源としてのマツタケ発生林と、胞子定着サイトとしての攪乱されたアカマツ林が必要であることが結論付けられる。したがって、マツタケ発生地のアカマツ林を皆伐する際には、マツタケの発生サイトのアカマツは保残して、胞子の供給源を維持するとともに、これに隣接する伐採箇所の地表を攪乱して、胞子の定着環境を確保することが重要である。また、形成されたコロニーは、少なくとも 10 年間は維持されることが期待できる。本研究の結果は森林内におけるマツタケの保全と管理に貢献する。



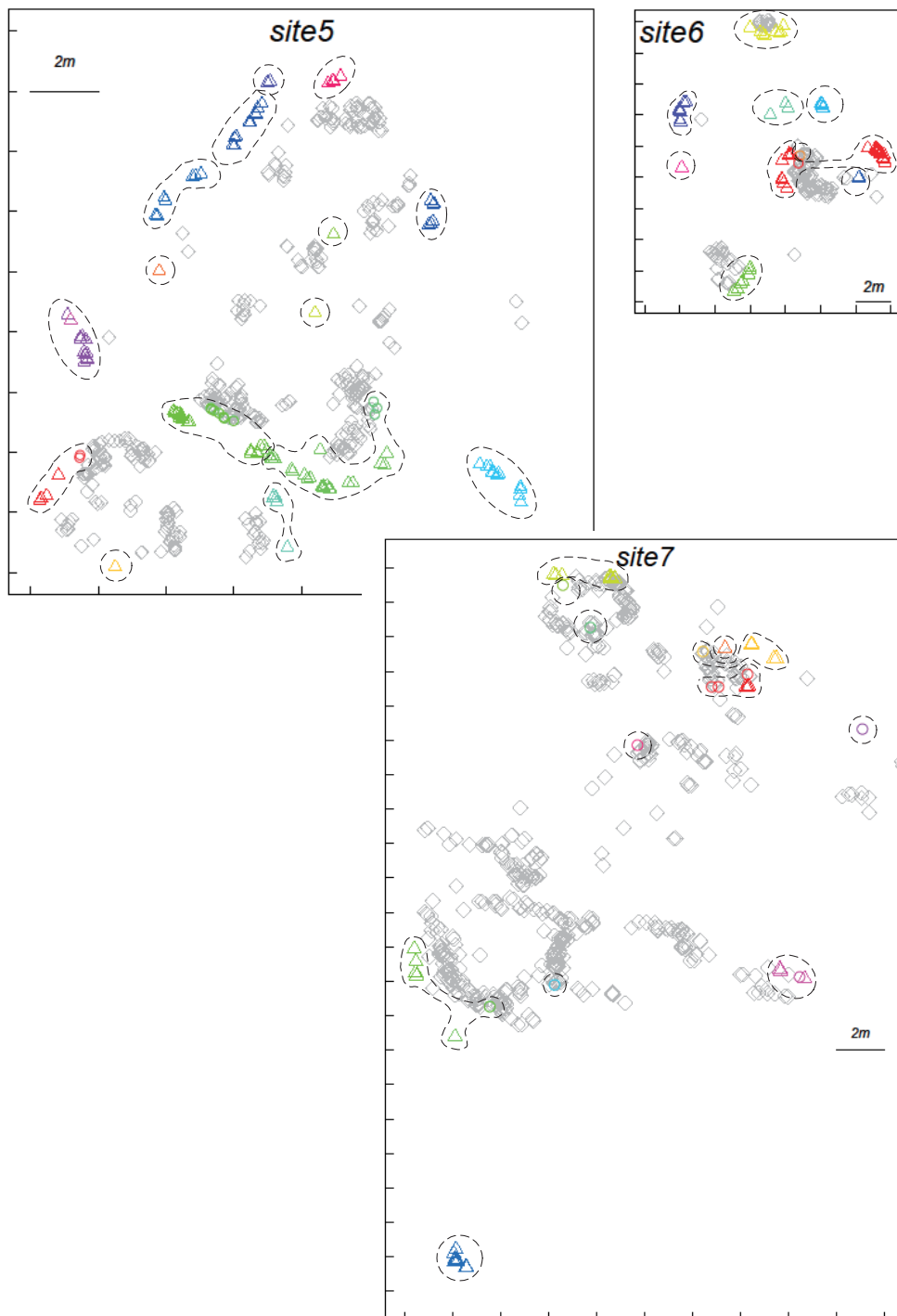


図 2-2-1 四日市試験林内調査地の 1994 年から 2010 年における子実体の位置と、2001 年および 2010 年におけるジェネットの位置

調査地内の 8 個の調査区における子実体とジェネットの位置を示す。△は 2010 年の、○は 2001 年の子実体発生位置をそれぞれ示す。同一のジェネットに区分された子実体は同じ色で示した。ただし、調査区が異なる場合には、色が同じでもジェネットは異なる。ジェネットは実線と点線の囲みでも示した。このうち実線は新規コロニーを構成するジェネット(新規ジェネット)、点線はそれ以外のジェネットを示す。実線に付した数字は新規ジェネットの番号を示す。◇は 2000 年以前に発生した子実体の位置で、本研究の解析からは除外した。

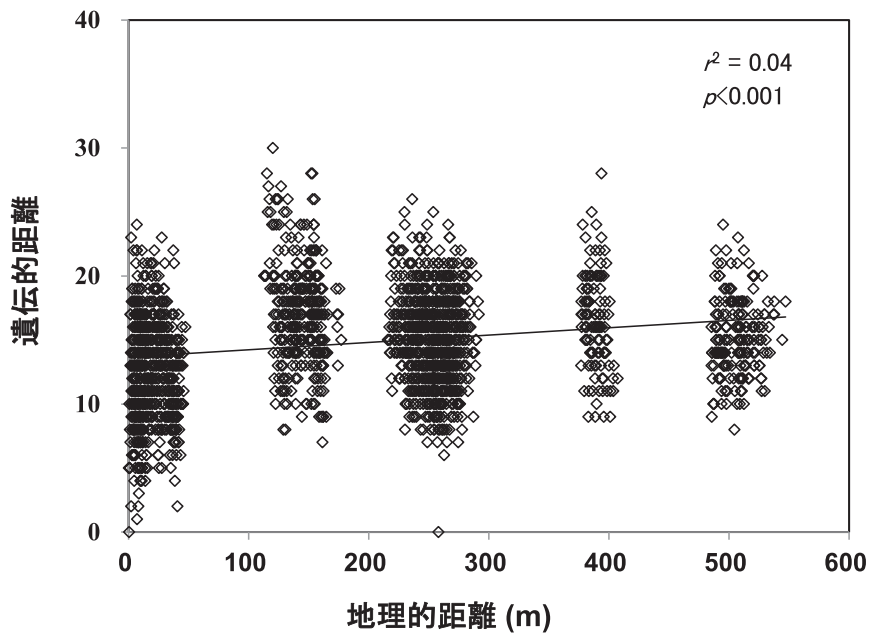


図 2-2-2 ジェネット間の地理的距離と遺伝的距離

グラフの横軸はジェネット間の地理的距離を、縦軸はジェネット間の遺伝的距離を示す。ジェネットの組み合わせ間の遺伝的な分化の程度を定量するために、根井の遺伝距離(Nei 1987)を算出した。また、遺伝距離と地理的距離の関係の有意性についてマンテルの方法により検定した。ジェネット間の地理的距離は $183.67 \pm 144.34SD$ m、最短距離は 0.24 m、最長距離は 547.08 m であった。

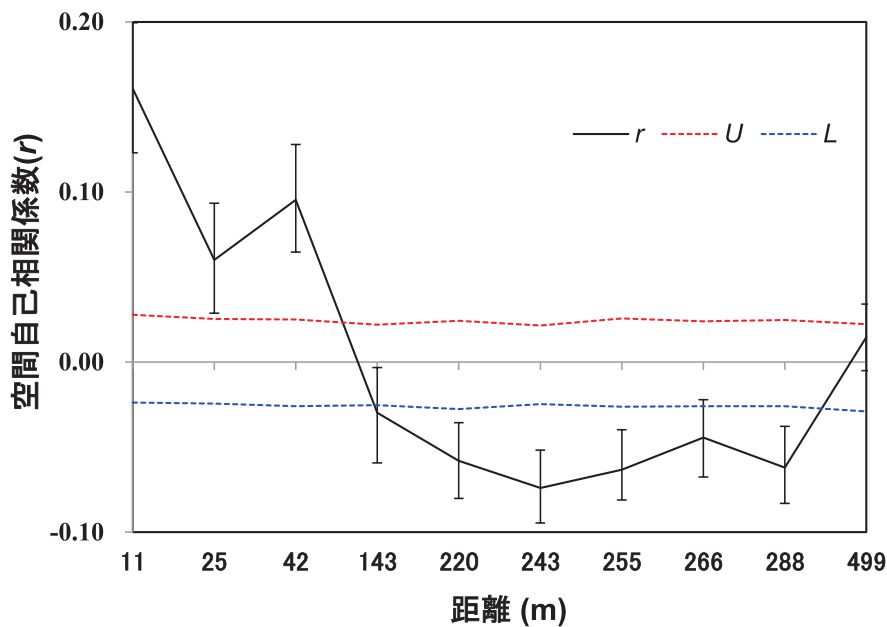


図 2-2-3 ジェネット間の空間自己相関

グラフの横軸はジェネット間の距離区分を、縦軸は各距離区分におけるジェネット間の空間自己相関係数(r)の平均値を示す。点線は r の 95% 信頼区間を、エラーバーは各距離区分における r の 95% ブートストラップ推定区間を示す。

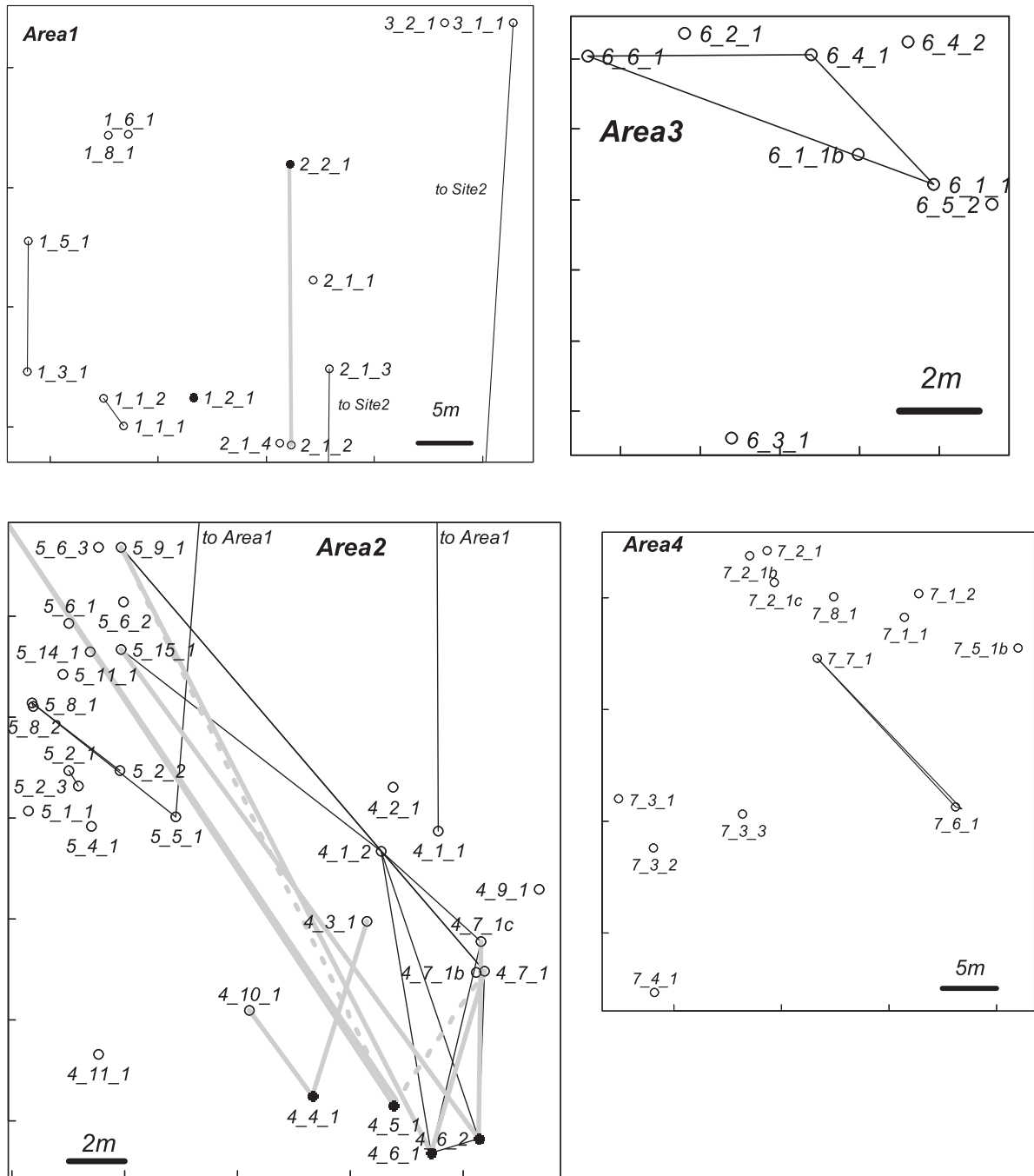


図 2-2-4 ジェネット間の距離的・遺伝的な関係

最尤推定法に基づき推定したジェネット間の血縁関係，親子関係を示す。○はジェネットの位置を，●は新規コロニーを構成するジェネット(新規ジェネット)を示す。黒い細線はジェネット間に危険率 1% で完全兄弟関係が推定されたことを示す。灰色の線は新規ジェネット既存ジェネット間の親子関係を示し、このうち実線は信頼度 95 %，点線は信頼度 80 %にて推定されたことを示す。解析の際には，新規ジェネットを既存ジェネットの子孫とみなした。

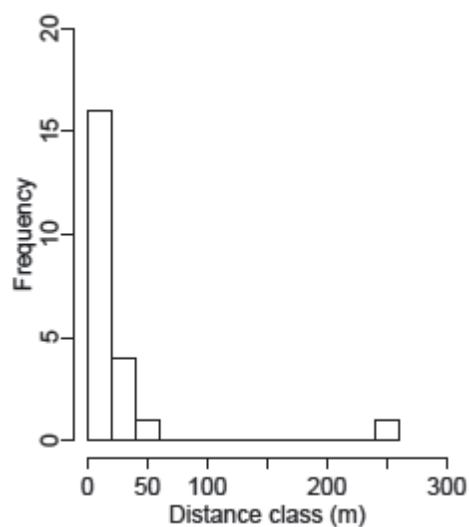


図 2-2-5 近縁ジェネット間距離の頻度分布

血縁度解析で危険率 1 %にて完全兄弟関係が認められたジェネット(近縁ジェネット)23 組における、ジェネット間距離の頻度分布を示す。横軸はジェネット間の距離区分を、縦軸は距離区分ごとのジェネットの個数を示す。近縁ジェネットの 95 %は、互いに 50 m 以内に分布した。

表 2-2-1 四日市試験林内に設定した調査エリアの概要

調査エリア	調査区	面積(m ²)	コロニー個数	2010年のみに見られたコロニーの個数	調査対象子実体本数		ジェネットの個数			合計
					2001 ^b	2010 ^c	2001 ^d	2010 ^e	2001 & 2010 ^f	
1	1-3	1151	10	6	134	219	0	7	7	14
2	4-5	1717	20	16	70	238	2	23	4	29
3	6	214	6	4	34	61	1	5	2	8
4	7	683	5	1	17	39	6	5	3	14
合計		3765	41	27	255	557	9	40	16	65
平均		941±557	10.2±6.8	6.75±6.5	63.7±44.8	139.2±89.3	2.2±2.2	10.0±7.5	4.0±1.8	16.2±7.7
			0.013±0.009/m ² ^a				13%	61%	24%	100%

^a 2010年の測定値 ^b 2001年に発生した子実体の本数 ^c 2010年に発生した子実体の本数 ^d 2001年のみに観察されたジェネットの個数 ^e 2010年のみに観察されたジェネットの個数 ^f 2001年と2010年に観察されたジェネットの個数

表 2-2-2 SSR マーカーの概要

マーカー名	蛍光色素	セット	Ta(C)	断片長の範囲(bp)	A	Ho	He	PIC	NE-PP	F(Null)
Trma-I1	VIC	4	59	158-173	9	0.79	0.83	0.80	0.170	0.0249
Trma-I2	NED	4	59	302-310	5	0.60	0.58	0.51	0.508	-0.0212
Trma-I3	NED	3	59	271-277	7	0.62	0.70	0.66	0.328	0.0728
Trma-I4	VIC	2	59	152-169	5	0.29	0.55 *	0.44	0.631	0.3044
Trma-I5	VIC	1	59	143-161	8	0.57	0.67	0.59	0.416	0.0579
Trma-I7	NED	1	59	224-228	4	0.43	0.39	0.35	0.669	-0.0611
Trma-I8	6-FAM	4	59	148-181	16	0.65	0.86	0.83	0.109	0.1378
Trma-I9	VIC	3	59	159-168	6	0.43	0.69	0.64	0.364	0.2232
Trma-I10	6-FAM	1	59	111-128	6	0.86	0.78	0.73	0.256	-0.0619
Trma-I11	6-FAM	2	59	123-128	9	0.83	0.81	0.77	0.195	-0.0239
Trma-I12	PET	3	59	180-189	10	0.80	0.80	0.77	0.188	-0.0157
Trma-14 ¹⁾	PET	2	60	136	4	0.79	0.60	0.51	0.537	-0.1463

Taはアニーリング温度を、Aは対立遺伝子の個数を示す。Hoはヘテロ接合度の観測値、Heはヘテロ接合度の期待値を示し、*はHeがハーディ・ワインベルグ平衡から有意に乖離していることを示す($p < 0.01$, χ^2 検定)。PICは多型情報含有率、NE-PPは両親解析における平均排除率、F(Null)はヌルアリル頻度の推定値を示す。 ¹⁾ Lian *et al.* (2003)

表 2-2-3 血縁度解析の結果

調査エリア	N ^a	AS ^b	SS ^c	SS/AS	OS ^d	NS ^e
1	14	4	2	0.50	2	10
2	29	21	19	0.90	2	8
3	8	3	3	1.00	0	5
4	14	3	3	1.00	0	11
total	65	31	27	0.87	4	34

^aは解析したジェネットの数, ^bは危険率1%未満で有意な血縁関係(近縁ジェネット)を示したジェネットペアの数, ^cは同一の調査エリア内に近縁ジェネットを有するジェネットペアの数, ^dは異なる調査エリアに近縁ジェネットを有するジェネットのペアの数, ^eは調査地内に近縁ジェネットがなかったジェネットの数を示す。

第3節 アカマツ林におけるマツタケの子実体コロニーの拡大速度の推定と、気象条件および子実体発生本数との関係

I. はじめに

第1章で述べたように、マツタケはマツ科植物を中心とする樹木の根に外生菌根を形成し、菌根の集合体、すなわち「シロ」から子実体が発生する。子実体は円形や弧状に発生し、その形状は、おそらくはシロの形に規定される。本研究ではこうした子実体の集団によりその位置が推定される地下の菌根集団を、コロニーと称する。マツタケの子実体の経済的な価値は高いが、人工的な栽培技術は確立されていない。子実体の生産量は自然発生量に規定され、自然発生量は変動するために、生産量も不安定である。マツタケの生産量の安定化には、子実体の年間発生量の変動に影響を与える要因を明らかにすることが重要である。

一般にきのこ類の自然発生量は、気温や降水量といった気象条件に影響される(鈴木 1979)。マツタケも同様であることから(小川 1991; 藤田ら 2002)、発生量の安定化には、発生量変動要因の解析が不可欠である。こうした解析の多くは、主に温暖な関西地方の発生地で行われ、子実体の発生量には温度や降水量などが影響を及ぼすことが示されている(衣川 1965; 石川・竹内 1970; 川上 1990; 衛藤ら 1999)。前述のとおり、関西地方は古くからマツタケの主産地であったが(有岡 1997)、アカマツ林が松くい虫被害で減少しているために、生産量も低下している(松尾 2010; 農林水産省 2014)。現在の生産量は岩手県、長野県といった寒冷地域で多く(農林水産省 2014)、岩手県も今後主産地となる可能性が高いが、気象条件と子実体発生量の関係についての詳細な解析事例は少ない(大森 1997; Narimatsu *et al.* 2015)。

子実体発生量を規定する要因の一つは菌糸量である。腐生菌類の場合、子実体発生量は木材、菌床およびホダ木といった、基質中の菌糸量に影響され(Tokimoto *et al.* 1984; 時本 2010)、菌糸量は培養時の温度や基質中の水分量などに影響されることが実験的に解明されているが(時本・小松 1982)、菌根菌に関する知見は少ない。その理由として、実験室内での栽培試験が困難なことに加え、森林内で菌糸や菌根が地下に存在するため、その定量的かつ経時的な把握が困難であること(Douhan *et al.* 2011)、子実体の分布から地下の菌のバイオマスを推定する場合でも、

両者の分布域は必ずしも一致しないこと(Zhou *et al.* 2000; Van Der Linde *et al.* 2009)が挙げられる。一方、マツタケの子実体の発生位置は円形や弧状を呈し(浜田 1970; Ogawa 1981; Narimatsu *et al.* 2015)、菌糸と菌根は主として子実体の直下に存在する(Lian *et al.* 2006)。この特徴を利用して、円弧の直径やその拡大速度を代替的な把握手段とした、地下のバイオマスの推定が試みられてきた(川上 1994)。マツタケのコロニーが円形に近似できる点は、コロニーの拡大速度を推定するうえで有利であるが、野外において、マツタケの子実体の発生位置は、真円を呈するとは限らない(小川 1975a)。そのため、拡大速度の定量的な推定は困難である。しかし、野外における拡大速度の推定方法の検討は十分とは言えず、寒冷地域での解析事例も少ない(村田ら 2001)。

そこで本研究では、菌糸量が子実体発生量に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、18年間のマツタケ子実体発生位置の調査結果に基づき、統計的手法(階層ベイズモデル)を用いてコロニーの拡大速度を推定し、コロニーの拡大速度と気象条件、子実体発生本数の関係を解析した。

II. 材料と方法

調査地

第2章第1節に示した調査地(図2-1-1)で、18年間ほぼ連続して発生した子実体の集団(コロニー)を5個選定し、それらを「colony」と称した(図2-3-1)。コロニーはいずれも調査地の3本の尾根上に分布する。colony1とcolony2、colony3とcolony4はそれぞれ近接しており、colony1、colony2、およびcolony5は、colony3、colony4から離れて分布している(図2-3-1)。コロニー間の最大距離は約500m(colony2~colony5)、最小距離は約20m(colony1~colony2)である。

子実体発生調査

上記の各コロニーで、1994年から2011年の18年間に子実体の発生本数と発生位置を調査した。調査は9月から10月の子実体発生時期に2日から3日の間隔で行った。マツタケの新規コロニー形成は、主として胞子で行われるため(第2章第2節)、胞子散布を妨げないように、子実体の採取は菌傘が完全に開いた後に行った。子実体発生時期を決定するために、各年で子実体が最初に採取された日を記録した。ただし、1996年には子実体が発生しなかったた

め、同年の発生時期は、1996年を除く17年間の平均である9月中旬とした。発生調査の際に、子実体の発生位置を標識で記録した。標識はグラスファイバー製の丸棒(直径5mm, 東電ニトポール, 京セラケミカル社, 東京)を長さ30cmに切断したものを用いた。標識の上部は発生年毎に異なる色で着色し、各年毎に一連の番号を付した。発生終了後の冬季に、トータルステーション(CS-20A, TOPCON社, 東京)を用いて子実体発生位置を測量した。得られた値から定法により経緯距を算出して子実体発生位置を座標化し、解析に供した。

データ解析：コロニーの拡大速度の推定

コロニーの拡大速度を推定するために、統計言語R 2.14.0 (R Development Core Team 2011)を用いて統計学的手法に基づく解析を行った。本研究では、各年の子実体位置はある円周上に位置し、中心座標は変わることなく円が毎年拡大していくというモデルを仮定し、階層ベイズ法(久保 2012)によりモデルのパラメータをコロニーごとに推定した。基本的なモデルは

$$R_{i+1} = R_i + G_i$$

とした。ここで R_i と G_i はそれぞれ、測定年*i*における円の半径と、*i*年から*i+1*年にかけての半径の増加(拡大速度)を示す。また、円の中心(BC)の座標を(C_x, C_y)、測定年*i*における子実体*j*の座標を

$$(\hat{x}_{ij}, \hat{y}_{ij}) \text{ とすると,}$$

$$\hat{x}_{ij} = C_x + R_i \cos(\theta_{ij})$$

$$\hat{y}_{ij} = C_y + R_i \sin(\theta_{ij})$$

と計算される。ここで θ_{ij} は、*i*年の子実体*j*の円の中心からみた方位角を示す。測量により得られた子実体発生位置の座標の観測値を(x_{ij}, y_{ij})とすると、それらの値は以下の正規分布に従うものとする。

$$x_{ij} \sim N(\hat{x}_{ij}, \sigma^2)$$

$$y_{ij} \sim N(\hat{y}_{ij}, \sigma^2)$$

このモデルのパラメータは、それぞれ以下のような確率分布に従うものとする。まず、中心座標、および中心からみた各子実体の方位角の無情報事前分布は、

$$C_x \sim N(0, 1000)$$

$$C_y \sim N(0, 1000)$$

$$\theta_{ij} \sim U(-2\pi, 2\pi)$$

とした。ここで、中心座標は、その分布する範囲が事前にわからないため、マイナス無限大からプラス無限大の値をとりうる正規分布とした。方位角 θ は $-\pi$ から π の範囲であるため一様分布としたが、後述するMCMC法で数値解を求める際に幅広く変動できるように -2π から 2π まで余裕をもたせた。

観測値の誤差を示す σ^2 の無情報事前分布については、その逆数が以下のようにガンマ分布に従うものとした。

$$\tau = 1/\sigma^2$$

$$\tau \sim \Gamma(0.0001, 0.0001)$$

調査開始初年の子実体の分布する円の直径 R_1 の無情報事前分布は、その値が非負であることを考慮し、

$$R_1 \sim \Gamma(0.0001, 0.0001)$$

のガンマ分布とした。また、半径の拡大速度 G_i の事前分布は、超パラメータを含む以下の正規分布とし、

$$G_i \sim N(\mu_G, \sigma_G^2)$$

それぞれの超パラメータは、以下の無情報事前分布にしたがうものとした。

$$\mu_G \sim N(0, 0.0001)$$

$$\tau_G = 1/\sigma_G^2$$

$$\tau_G \sim \Gamma(0.0001, 0.0001)$$

以上のモデルのパラメータの推定には WinBUGS ver. 1.4.3(Lunn *et al.* 2000)によるMCMC法を用いた。何回かの試行をおこなった結果から、繰り返し回数100,000回に設定し、初期の50,000回を切り捨て、5ステップごと、合計10,000回のサンプリングをおこなって各パラメータの事後分布を推定した。3通りのランダムな初期値を与えて推定をおこなったところ、得られたサンプル列は、いずれのコロニーにおいても見た目によく収束しており、Gelman-Rubinの収束診断は1.00から1.05の値を示した。本研究では、上記により推定された事後分布の平均値および標準偏差をパラメータ推定の代表値として用いた。また、測定期間中の任意の年、*i*年における子実体

の発生位置を、 C_x , C_y , G_l-G_r , R_l-R_r の事後分布からのランダムサンプリングに基づき予測した。この際に、方位角 θ は $-\pi$ から π の一様分布からランダムサンプリングした。

これらの計算により推定されたコロニーの中心BCの位置と比較するために、各コロニーで子実体発生位置のx座標、y座標の平均値を算出し、これを「重心法」として、中心ACとし、子実体とAC、BCの距離をそれぞれ算出した。この距離を各コロニーで平均し、変動係数を算出した。ここで、変動係数は、それぞれの中心点と各子実体間の距離のバラ付きの程度を示し、推定された中心点が真の中心点に近いほど、その値は小さくなると考えられる。

データ解析：気象データ

コロニーの拡大速度に影響を及ぼす気象条件を明らかにするために、1994年から2011年の気温、地温、降水量と日照時間を調査した(表2-3-1)。地温を除くすべてのデータは、調査地最寄り(南東約10km)の地域気象観測システム(アメダス)観測所(岩手県盛岡市好摩、北緯39度52分、東経141度10分、標高205m)の観測値を用いた(第2章第1節)。地温はcolony3付近で8月下旬から10月上旬の間に測定した(第2章第4節)。測定深度は地表面から10cmである。さらに、マツタケの菌糸成長は5℃以上で観察されることから(浜田1953)、温度がマツタケの菌糸成長に及ぼす影響を明らかにするために、5℃を基準とする一種の有効積算温度(吉良1949)を算出した。即ち、日平均気温が5℃を超えた日について、平均気温から5℃を減じ、その値を積算した(WI_5)。ただし、12月から2月の間は、多くの日で平均気温が5℃を下回るため、計算から除外した。また、マツタケの菌糸成長速度は23℃付近で最大値を示すため(浜田1953; 山田・寺崎1998)、 WI_5 と同様に、日平均気温が20℃を超えた日について、平均気温から20℃を減じ、その値を積算した(WI_{20})。さらに、マツタケを含む菌根菌は、成長に必要な炭素を宿主樹木の光合成産物に依存しているため(Smith and Read 1996)、日照時間の日積算値も解析に用いた。気象データの集計は、各月の1日から10日(月上旬)、11日から20日(中旬)および21日から末日(下旬)の各期間(旬)を単位として行った。日平均気温は年、月および旬毎の、地温は旬毎の平均値を解析に用いた。日降水量、 WI_5 、 WI_{20} および日照時間は、年、月および旬毎の積算値を用いた。

本研究では、気象条件を子実体発生前と子実体発生後の2つの期間に分けて解析を行った。期間の区分には、各年の最初の子実体採取日(初採取日)を用いた。子実体発生前は3月上旬から子実体初採取日の属する旬の前の旬まで、子実体発生後は子実体初採取日の属する旬から11月下旬とした。例えば初採取日が9月15日であった場合、子実体発生前は3月から9月上旬まで、子実体発生後は9月中旬から11月下旬までとなる。これらの2つの期間のうち、子実体発生前は当年のコロニーの拡大速度との関係、また子実体発生後は翌年の拡大速度との関係の解析に用いた。後者の理由は、コロニーの拡大速度は子実体の発生位置に基づいて推定されるため、子実体が発生した時点で同年の拡大速度は決定されるからである。期間を区分した後、気温を各期間で平均し、日降水量、 WI_5 、 WI_{20} および日照時間は各期間で積算した。同様の方法にて、地温は8月下旬から10月上旬の間を2分し、各期間で平均地温を算出した。

コロニーの拡大速度と気象条件および子実体発生本数の関係を明らかにするために、相関分析を行った。さらに、相関分析で有意な関係が見出された項目を説明変数として、コロニーの拡大速度を応答変数とする線形モデルを構築し、赤池情報規準(AIC, 次式)の値に基づき、説明変数がコロニーの拡大速度に及ぼす効果を比較した。

$AIC = \text{モデルからの残差逸脱度} + 2 \times \text{推定に用いたパラメーター数}$

III. 結果

子実体の発生本数と分布

18年間の調査期間中に、合計で1369本の子実体が観察された。各年における子実体発生本数のコロニー間平均値の最大値は 48.4 ± 31.9 本/年・コロニー(平均±標準偏差, 2010年)、最小は0本/年・コロニー(1996年)で(図2-3-2)、調査期間中の平均は 12.5 ± 8 本/年・コロニーであった。また、2006年に発生した子実体は、colony1の1本のみであった。発生本数は調査期間中に変動し、一元配置分散分析を行った結果、年次間に $p < 0.001$ で有意差が認められた(図2-3-2)。子実体の初採取日は年により異なり、9月上旬が調査期間18年中7か年、9月中旬が同4か年、9月下旬が同5か年、10月上旬が同2か年であった。

各コロニーにおける子実体の発生位置は円形や弧

状を呈し、調査初年におけるコロニーの形状は、*colony1*, 2, 5は円形、*colony3,4*は弧状であった(図 2-3-3)。子実体の発生位置は、それぞれ円或いは弧の形状を保持したまま経年的に移動した。移動方向は前年の円弧の外側であり、結果的に各年の子実体発生位置が同心円を呈した。また、いずれのコロニーでも、円弧の内側からは子実体が発生しなかった。

コロニーの中心点の推定

階層ベイズモデルによる解析の結果、全てのコロニーで、中心点の有効な推定値が得られた。階層ベイズモデルと重心法で推定された各コロニーの中心点を、それぞれ *BC*, *AC* で示す(図 2-3-3)。円形の *colony1*, *colony2* および *colony5* において、中心点 *BC* の位置は、各コロニーの中心付近に推定された。一方、重心法で推定された中心点 *AC* の位置は、*BC* よりも子実体の発生位置に接近した。また、接近した部分では、子実体の集中的な発生が認められた。弧状の *colony3* と *colony4* では、中心 *BC* の位置は弧の内側で、かつ調査期間中に子実体の発生が観察されなかった場所に推定されたのに対して、中心 *AC* の推定位置は、弧上で、かつ子実体が発生した範囲に含まれた。さらに、子実体と中心点の距離の変動係数を、推定方法ごとに平均したところ、*BC* では 0.26 ± 0.09 , *AC* では 0.47 ± 0.08 であり、*BC* が *AC* より小さかった(*t*-検定, $p < 0.05$)。これらのことから、*BC* が真の中心点により近いことが示されたため、以後の解析では *BC* を中心点として採用することとした。

コロニーの直径と拡大速度の推定

調査初年の1994年における各コロニーの直径は、それぞれ 3.20 ± 0.20 m (*colony1*), 5.19 ± 0.07 m (*colony2*), 1.83 ± 0.09 m (*colony3*), 1.90 ± 0.15 m (*colony4*), 2.78 ± 0.12 m (*colony5*)であり、5個のコロニーの平均値は 2.98 ± 1.36 m と推定された(図 2-3-4)。17年後の2010年における推定値は、それぞれ 5.84 ± 0.06 m (*colony1*), 8.17 ± 0.11 m (*colony2*), 5.18 ± 0.10 m (*colony3*), 4.91 ± 0.20 m (*colony4*), 平均 6.02 ± 1.48 m ($n=4$)であった。*colony5* では2011年に子実体が発生しなかったが、2010年における推定値は 5.50 ± 0.09 m であった。1994年におけるコロニーの直径は、弧状のコロニーより円形のコロニーで大きく、その傾向は2010年も変わらなかった。

連続する2年間における直径の差を拡大速度としてコロニー毎に推定し、年毎に平均した(図 2-3-5)。

colony5 では2011年に子実体が発生しなかったため、2010年から2011年の拡大速度は推定されなかった。コロニーの拡大速度は調査期間を通じて一定ではなく、明瞭な周期性は観察されなかった。調査期間中の拡大速度の最大値は 0.21 ± 0.11 m/年(2009~2010年)、最小値は 0.15 ± 0.02 m/年(2007~2008年)、平均値は 0.17 ± 0.01 m/年($n=17$)であった。

気象条件の変化とコロニーの拡大速度、子実体発生本数の関係

年間平均気温、年間積算降水量は、年毎に変化した(図 2-3-6)。年間平均気温の最低値は 8.8 °C (1996年)、最高値は 10.5 °C (1999年, 2010年)であった。平均気温と同様に、平均地温も1996年が 14.9 °C で最も低く、2010年が 18.7 °C で最も高かった。また、年間積算降水量も1996年が 777 mm で最も少なく、2010年が 1549 mm で最も多かった。同様の傾向は、 WI_5 と WI_{20} でも観察されたが、年間積算日照時間では観察されなかった。調査期間毎(子実体発生前と子実体発生後)では、 WI_5 と WI_{20} の積算値は、 WI_5 は子実体発生前で 1738.2 °C (2003年) から 2380.7 °C (2000年)、子実体発生後で 218.6 °C (2001年) から 771.2 °C (1998年)であった。また、 WI_{20} は子実体発生前で 72.8 °C (2003年) から 382.7 °C (2000年)、子実体発生後で 0 °C (1995, 1996, 2000, 2001, 2006, 2011年) から 33.5 °C (1998年)であった。子実体発生前、子実体発生後のいずれでも、 WI_5 , WI_{20} と平均気温には正の相関が認められた(WI_5 , WI_{20} のいずれも $r^2 > 0.72$, $p < 0.01$)。各旬の地温と平均気温の間には、9月中旬と下旬を除いて正の相関が認められた($r^2 > 0.46$, $p < 0.01$)。さらに、地温と WI_5 , WI_{20} には、各旬で正の相関が認められた($r^2 > 0.32$, $P < 0.05$)。積算降水量は子実体発生前で 530 mm (1994年) から 1097 mm (2000年)、子実体発生後で 127 mm (2001年) から 477 mm (2004年)であった。

コロニーの拡大速度と子実体発生前、子実体発生後における気象条件の関係を表 2-3-1 に示す。回帰分析の結果、子実体発生前ではコロニーの拡大速度と平均気温($r^2=0.32$, $p < 0.05$; 図 2-3-7 左), WI_5 ($r^2=0.28$, $p < 0.05$; 図 2-3-8 左), WI_{20} ($r^2=0.37$, $p < 0.01$; 図 2-3-9 左)との間に正の相関が認められた。コロニーの拡大速度と WI_5 , WI_{20} の相関を月毎に解析した結果、 WI_5 , WI_{20} とともに8月で最も高かった(WI_5 : $r^2=0.37$, $p < 0.01$; WI_{20} : $r^2=0.34$, $p < 0.05$)。平均地温($r^2=0.25$, $p < 0.05$; 図 2-3-10 左), 積算降水量($r^2=0.31$, $p < 0.05$;

図 2-3-11 左)も、コロニーの拡大速度と正の相関を示した。一方、積算日照時間とコロニーの拡大速度との間には有意な相関が認められなかった($p>0.05$; 図 2-3-12 左)。これらの結果に基づき、 WI_{20} と積算降水量を説明変数に用いて、コロニーの拡大速度を応答変数とする 4 種類の線形モデルを構築した(表 2-3-2): WI_{20} のみを説明変数に用いるモデル(T)、積算降水量のみを説明変数に用いるモデル(P)、 WI_{20} と積算降水量を説明変数に用いるモデル(F)、説明変数を用いないモデル(N)。他の気象条件は、回帰分析で相関が有意でないか($p>0.05$)、他の条件との相関係数が高かったため、説明変数に採用しなかった。各モデルの AIC を算出したところ、モデル T は-88.53、モデル P は-86.87、モデル F は-88.17、モデル N は-82.58 であり、 WI_{20} のみを説明変数に用いたモデル(T)の AIC が最も小さかった。一方、子実体発生後では、 WI_5 、 WI_{20} を含まないいずれの気象条件についても、コロニーの拡大速度との間に有意な相関が認められなかった($p>0.05$; 図 2-3-7~12 各図右)。

子実体発生本数と、子実体発生前の平均気温($r^2=0.37$, $p<0.01$; 図 2-3-13)、 WI_{20} ($r^2=0.37$, $p<0.01$; 図 2-3-14)には、コロニー拡大速度と同様に、正の相関が認められた。

コロニーの拡大速度と子実体発生本数の関係

各年におけるコロニーの平均拡大速度と子実体平均発生本数を図 2-3-15(左)に示す。前述の通り、コロニーの拡大速度は 2009 年から 2010 年で最大値を示し、子実体発生本数も 2010 年に最大値を示した。子実体発生本数は拡大速度に応じて増加した($r^2=0.39$, $p<0.01$)。対照的に、拡大速度と翌年の子実体発生本数との間には、相関が認められなかった($p>0.05$; 図 2-3-15 右)。

IV. 考察

コロニーの直径と拡大速度の推定

マツタケの子実体は円形または弧状に発生し、コロニーとして認識された。本調査地では、マツタケの菌根は子実体の直下に分布する(Lian *et al.* 2006)。したがって、子実体の分布パターンは菌根の分布パターンを示し、子実体の分布パターンから導出される年間のコロニー拡大速度は、その年に拡大したコロニーの面積を近似することにより、菌根の総量を反映すると推察される。

階層ベイズモデルにより、コロニーの平均拡大速度は 0.17 ± 0.02 m/年と推定された。これまでに日本国内で推定されたマツタケのコロニーの拡大速度は、0.083m から 0.3 m/年である(浜田 1953; 川上 1994; 村田ら 2001; 鈴木 2005)。推定方法に違いはあるものの、本研究で得られた拡大速度は、村田ら(2001)を除く既報よりも小さかった。村田ら(2001)の研究は北海道で行われ、これを除いては、本研究の調査地は既報よりも北方に位置するため、他の調査地よりも平均気温が低い。このことが、村田ら(2001)を除く既報と本研究との、拡大速度の差をもたらした可能性がある(後述の「気象条件とコロニーの拡大速度の関係」参照)。

近縁種におけるコロニーの拡大速度は、ニセマツタケ(*Tricholoma fulvovocastaneum*)(小川 1978)とバカマツタケ(*T. bakamatsutake*)(小川・小原 1978)で、いずれも 0.3 m/年と推定されている。一方、アメリカマツタケ(*T. magnivelare*)の拡大速度はそれらより遅く、0.04 m/年と推定されている(Hosford *et al.* 1997)。他の幾つかの外生菌根菌では、*Hebeloma crustuliniforme* で 0.153 m/年(Last *et al.* 1984)、*Lactarius pubescens* で 0.248 m/年(Last *et al.* 1984)と推定されている。さらに、いくつかの腐生菌類も fairy ring を作ることで知られるが(Dix and Webster 1994)、その拡大速度は、シバフタケ(*Marasmius oreades*)で 0.099 m から 0.35 m/年、*Agaricus tabularis* で 0.120 m/年と推定されている(Dix and Webster 1994)。一般に栄養培地上における菌糸成長速度は、マツタケやアメリカマツタケを含む外生菌根菌よりも、他の高等菌類で速い(Ohta 1990; 古川 1992; Hosford *et al.* 1997)。本研究で推定されたコロニーの拡大速度は、アメリカマツタケを除く他種よりも遅かったことから、本研究で得られた、長期の野外調査と統計学的手法に基づく解析結果は、既報の傾向と矛盾しない。

気象条件とコロニー拡大速度の関係

子実体発生前の平均気温と平均地温は、いずれもコロニーの拡大速度と正の相関を示した。また、地温と気温にも正の相関が認められた。菌糸の成長速度は、温度をはじめとする環境的要因に影響される(Carlile *et al.* 2001)。また、地中の菌糸に直接、影響を及ぼす温度要因は地温である。本研究の結果により、気温が地温を介してコロニーの拡大速度に影響を及ぼすことが示唆され、本研究で推定されたコロニーの拡大速度が既報よりも遅かった原因は、他の

調査地よりも気温が低いことと考えられる。

コロニーの拡大速度は温度に律速され、温度の影響は夏季に大きかった。コロニーの拡大速度は、5℃以上の有効積算温度(WI_5)と正の相関を示したことから、マツタケの菌糸成長は、5℃以上で観察される(浜田 1953)との知見を支持する。同様の関係が、コロニーの拡大速度と 20℃以上の有効積算温度(WI_{20})の間にも認められ、その相関係数は WI_5 より大きかった。真菌類の多くで、菌糸成長の最適温度は 25℃から 30℃であり(Dix and Webster 1994)、マツタケでも約 23℃である(浜田 1953; 山田・寺崎 1998)。さらに、コロニーの拡大速度と気温の相関係数は、8月で最も大きかった。前述の通り、本調査地の平均気温は8月に最高値の 22.8℃を示す。また、地温は気温の影響を受ける。これらのことから、夏季はその温度の高さゆえに、マツタケの菌糸成長にとって重要な時期であると考えられる。その上、調査地が存在する東北地方は、梅雨時期の気温が低いことが特徴である。通常、梅雨の終期は7月中旬から下旬であるが(気象庁 2015)、年によっては8月まで続き、そのような年には夏季の気温の低下が観測される。したがって、8月は同年のコロニー拡大速度に大きな影響を与える重要な月と考える。これらのことが、気温とコロニーの拡大速度の相関が8月で高い理由と考えられる。このことは、東北地方において、地温の上昇がコロニーの成長を促進する(吉村 2005)との主張を支持する。本研究では、地温は地表から 10 cm の深さで測定された。本調査地では、マツタケの菌根層の上面は、地下 5 cm 付近で観察される。地温とコロニーの拡大速度の関係に関する、より明瞭な結果を得るためには、地下 5 cm 付近の温度を長期間測定することが必要である。

気温と同様に、子実体発生前の降水量も、コロニーの拡大速度と正の相関を示した。降水量は土壤水分量に影響を与えられ、菌糸成長にとって、土壤中の水分量も気温と同様に重要な条件である(Carlile *et al.* 2001)。同様の関係は、外生菌根のバイオマスと降水量の間にも見出される(Valdés *et al.* 2006; Okada *et al.* 2011)。

積算日射時間とコロニーの拡大速度との間には、有意な相関が観察されなかった。外生菌根菌は宿主樹木に炭素源を依存し(Smith and Read 1996)、炭素は宿主樹木の光合成で得られるが、炭素の葉から根への転流量は、日射時間のみならず、多くの要因に影響を受けると推察される。詳細な知見を得るために

は、マツタケと宿主樹木の共生状態を構築したうえで、植物生理学的な実験を行うことが必要である。

コロニー拡大速度への影響は、気温が降水量より大きかった。線形モデルの AIC に基づき、コロニーの拡大速度に対する影響を WI_{20} と降水量で比較したところ、 WI_{20} と降水量を説明変数に用いたモデルの AIC は、説明変数を用いなかったヌルモデルに比して小さかったことから、 WI_{20} と降水量は、いずれも拡大速度に影響を及ぼしていると考えられる。さらに、 WI_{20} のみを説明変数に用いたモデルでは、降水量のみを用いたモデルよりも AIC が小さいことから、本調査地において、気温がコロニーの拡大速度に及ぼす効果は、降水量よりも大きいと考えられる。本調査地の土壤マトリックポテンシャルは -6 kPa から -31 kPa であり(成松 2007)、他の調査地で報告された値(-49~-152 kPa)よりも大きく(石川・竹内 1970)、土壤中には、他の発生地よりも多くの水分が含まれると推察される。このことが、本調査地におけるコロニーの拡大速度に対する降水量の影響が、気温と比べて低い理由と考える。

注目すべきことに、コロニーの拡大速度と前年の子実体発生前(おおよそ前年の9月から11月)の気象条件の間には、有意な相関が見いだされなかった。地温、気温、 WI_{20} といった、温度に関係する気象要因は、子実体発生前でコロニーの拡大速度と相関が高かったが、9月以降は11月に向けて低下することから、子実体発生前は菌糸成長の好適な機会が少なくなると考えられる。以上のことから、コロニーの拡大速度は主として当年、子実体発生前の温度に決定付けられると考える。

気象条件と子実体発生前の本数の関係

コロニーの拡大速度と同様に、子実体発生前の WI_{20} と当年の子実体発生前本数には正の相関が見出された。腐生菌では、菌糸の量は子実体発生前量を決定付ける重要な因子の一つである(Tokimoto *et al.* 1984; 時本 2010)。前述のとおり、コロニーの拡大速度は、春と夏、すなわち子実体発生前の気象条件の影響を受ける。したがって、この時期の気象条件は、前年の子実体発生前の気象条件に比べて、子実体発生前量を決定づけるうえで重要である。将来的には、地下の菌糸量を測定したうえで、子実体発生前の気象条件による子実体発生前量の予測も検討されるべきである。

子実体発生前や各月の降水量は、子実体発生前本数

と有意な相関を示さなかった。この結果は、中華人民共和国の山岳地帯で行われた既報(Yang *et al.* 2012)とは異なった。Yang *et al.* (2012)は、本研究と同様に、夏季の気温が子実体発生量に促進的な効果を及ぼすことを指摘している。また、本研究と Yang *et al.* (2012)の調査地における降水量は同程度である。すなわち、本研究では9月に170 mm, Yang *et al.* (2012)では8月に173 mmの降水量が報告されている。前述の通り、本研究の調査地は土壌マトリックポテンシャルが大きい(圃場容水量が多い)ため、Yang *et al.* (2012)の調査地に比べて降雨が土壌中に保持され、土壌水分量が多いと推察される。それゆえに、本調査地において、8月を含む子実体発生前の降水量は、子実体発生本数の決定における重要性が温度よりも低いと推察する。

コロニーの拡大速度と子実体発生本数の関係

既報(川上 1992; 成松 2004)とは異なり、コロニーの拡大速度と当年の子実体発生本数には、正の相関が認められた。その理由として、本研究では18年間という長期間の調査結果に基づき、コロニーの拡大速度を定量的に把握したことが挙げられる。腐生菌では、菌糸量は子実体発生量を決定付ける重要な因子の一つである(Tokimoto *et al.* 1984; 時本 2010)。本研究の結果はこの知見と矛盾せず、コロニーの拡大速度は野外においても子実体発生量を決定付ける要因と推察される。さらに、 WI_{20} はコロニーの拡大速度と子実体発生本数の双方と正の相関を示した。これらのことから、子実体発生本数はコロニーの拡大速度を介して気象条件の影響を受けていると考える。近年、北東アジアでは年間平均気温の上昇が観察されている(Stocker *et al.* 2013)。また、気温の上昇は外生菌根の菌糸成長を促進させる要因として報告されている(Clemmensen *et al.* 2006; Simard and Austin 2010)。これらのことから、平均気温の上昇に伴い、子実体発生量も増加する可能性がある。しかしながら、拡大速度と子実体発生本数に見られる正の相関は、大豊作年(2010年)を除いて解析した場合には有意ではなかった。2010年の特徴は、他の年よりも気温が高かったことであるが、前述の結果は、気温以外の要因も子実体発生本数に影響を及ぼす可能性を示唆する(鈴木 1979; Pinna *et al.* 2010)。平均気温は世界的に上昇していることから(Stocker *et al.* 2013)、今後も2010年と同様な高い気温が再び観察される可能性がある。さらに、気候変動の影響は、子実体の

発生時期にも影響を及ぼす(Kausrud *et al.* 2012; Boddy *et al.* 2014)。したがって、地域内の気温の上昇が自然界におけるきのこ生産に及ぼす影響を深く理解するためには、長期間に亘り注意深く観察する必要がある。そのうえで、本研究はこの地域における将来の調査に対して貴重な始点を提供するものである。今後は、分子生物学的手法に基づく、地下のマツタケバイオマスの定性的かつ定量的な調査が必要である。

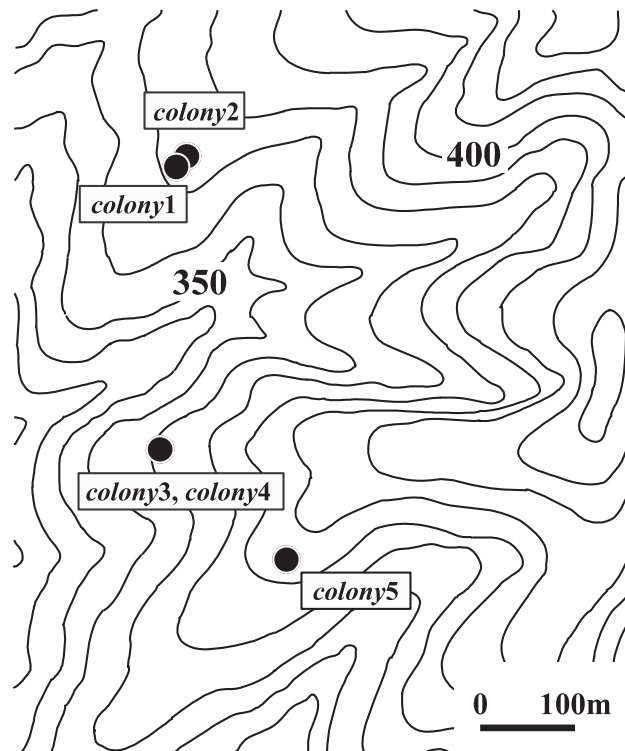


図 2-3-1 岩手県四日市試験林内の調査地で拡大速度の推定に供したコロニーの位置
●は解析の対象としたコロニーの位置を示す。

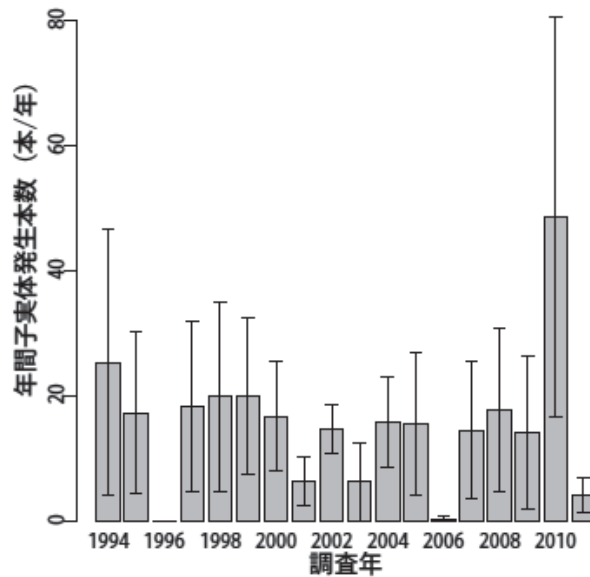
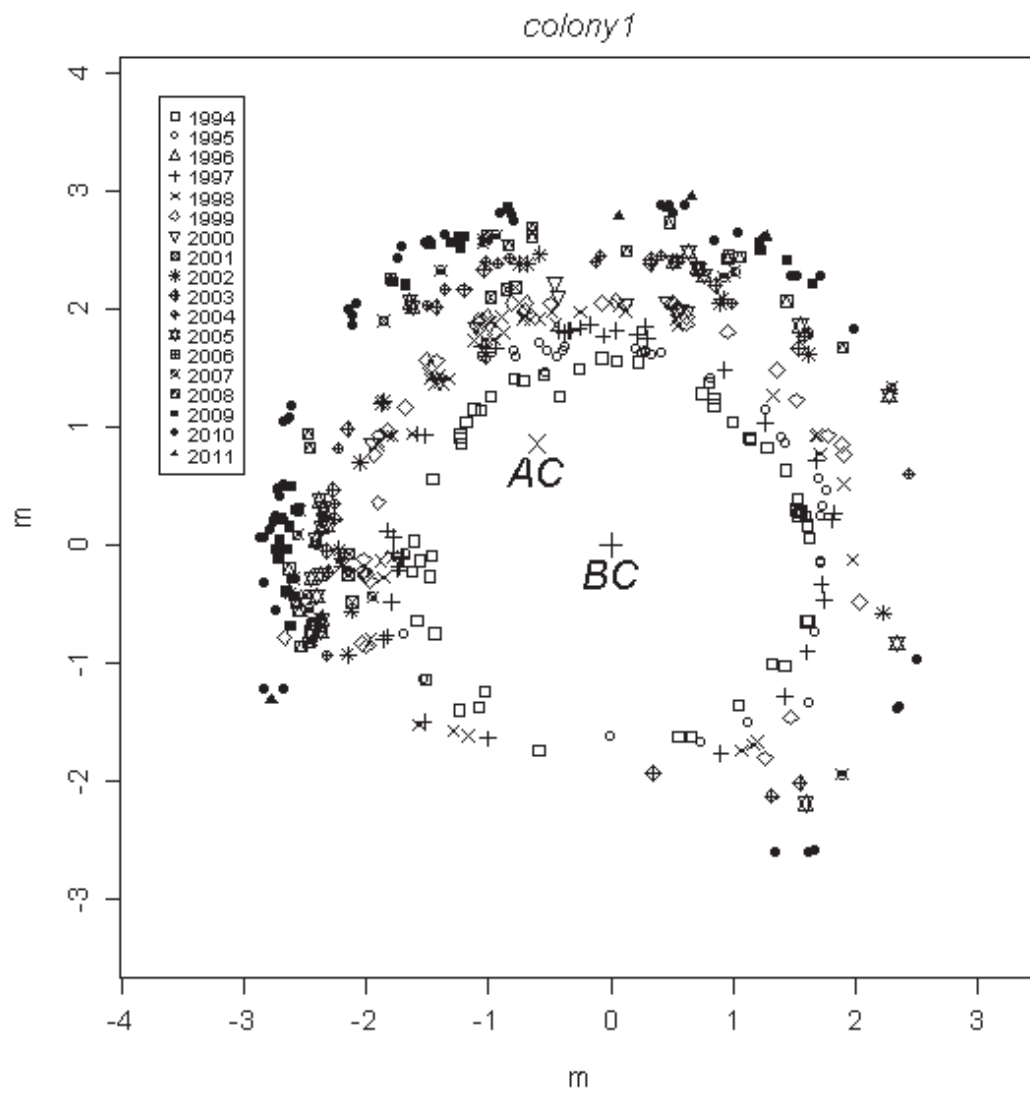
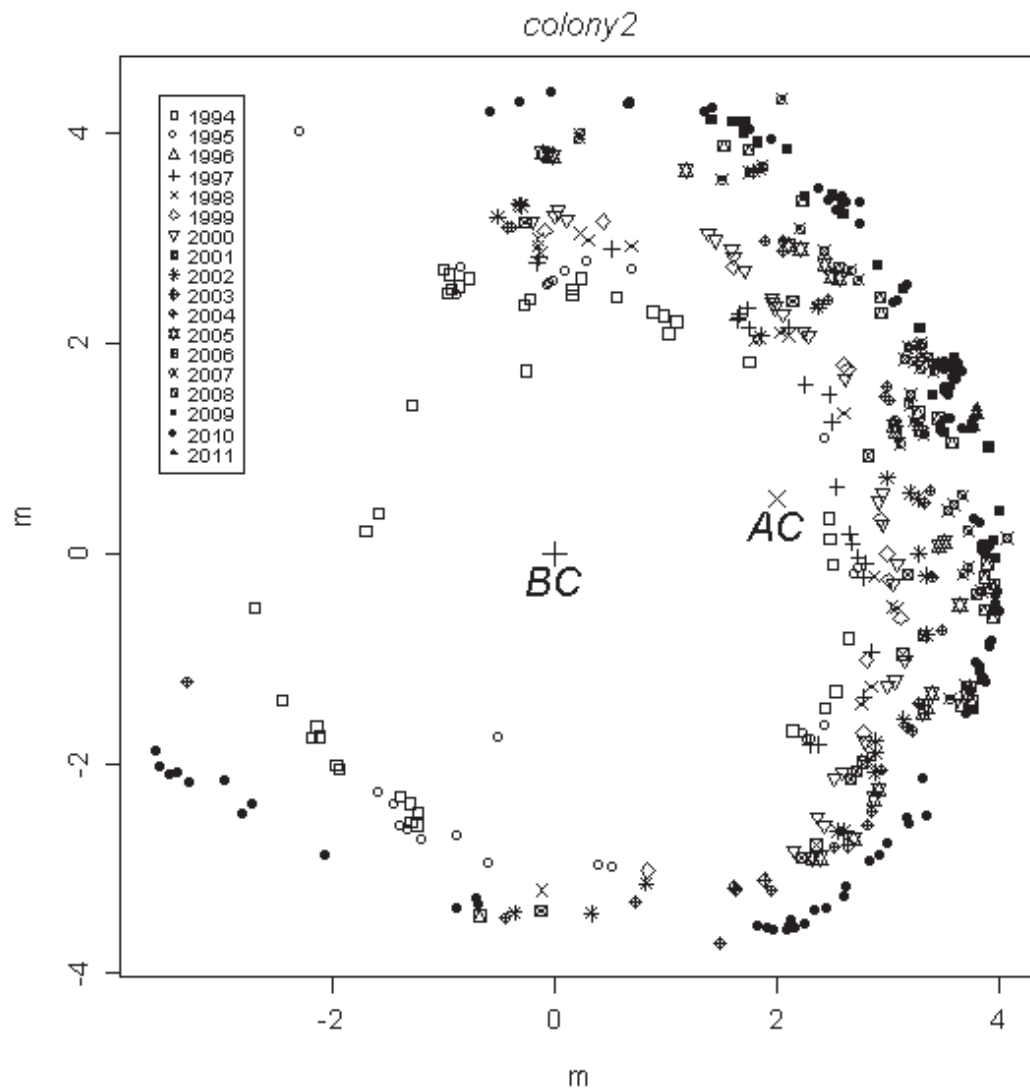
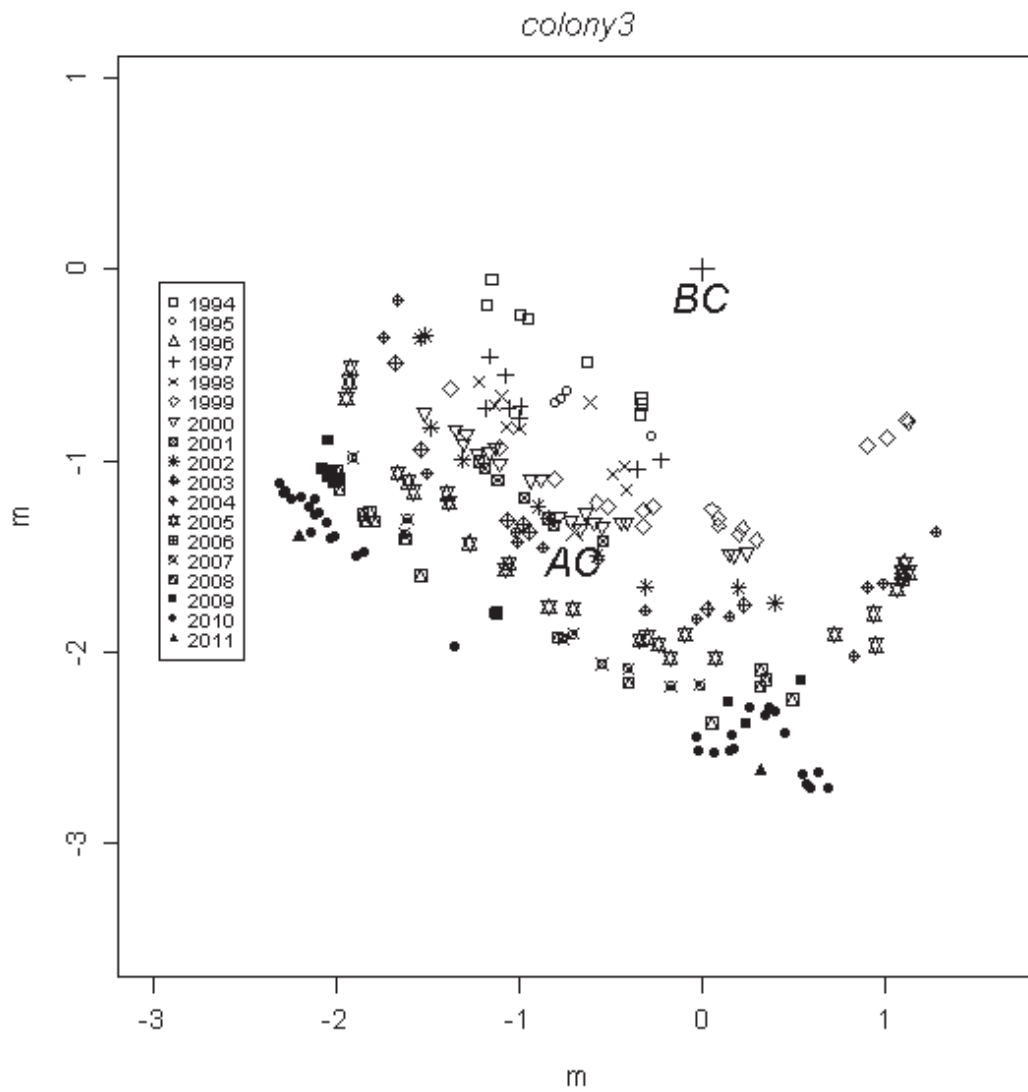


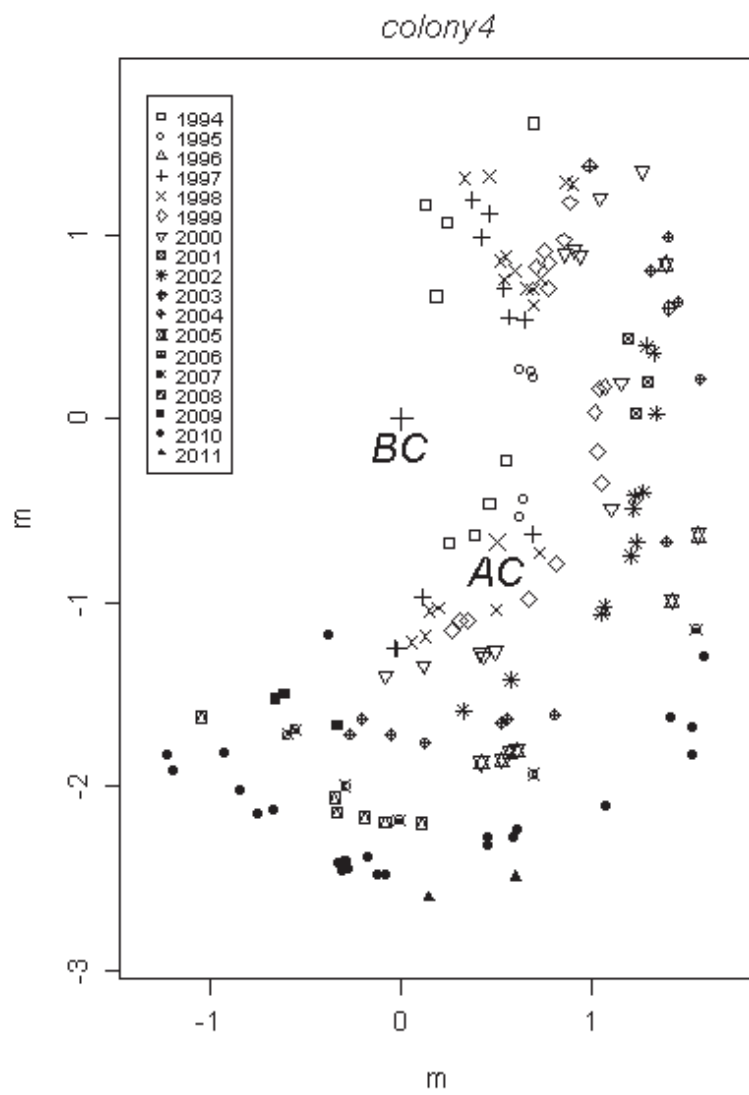
図 2-3-2 子実体発生本数の年次変動

横軸に調査年，縦軸に発生本数(5 個のコロニーの平均値)を示す。エラーバーは標準偏差を示す($n=5$)。各年の発生本数は有意に異なった($p<0.001$, 一元配置分散分析)。平均子実体発生本数の最大値は 48.4 ± 31.9 本/年・コロニー(平均 \pm 標準偏差, 2010 年), 最小は 0 本/年・コロニー(1996 年), 調査期間中の平均は 12.5 ± 8 本/年・コロニーであった。









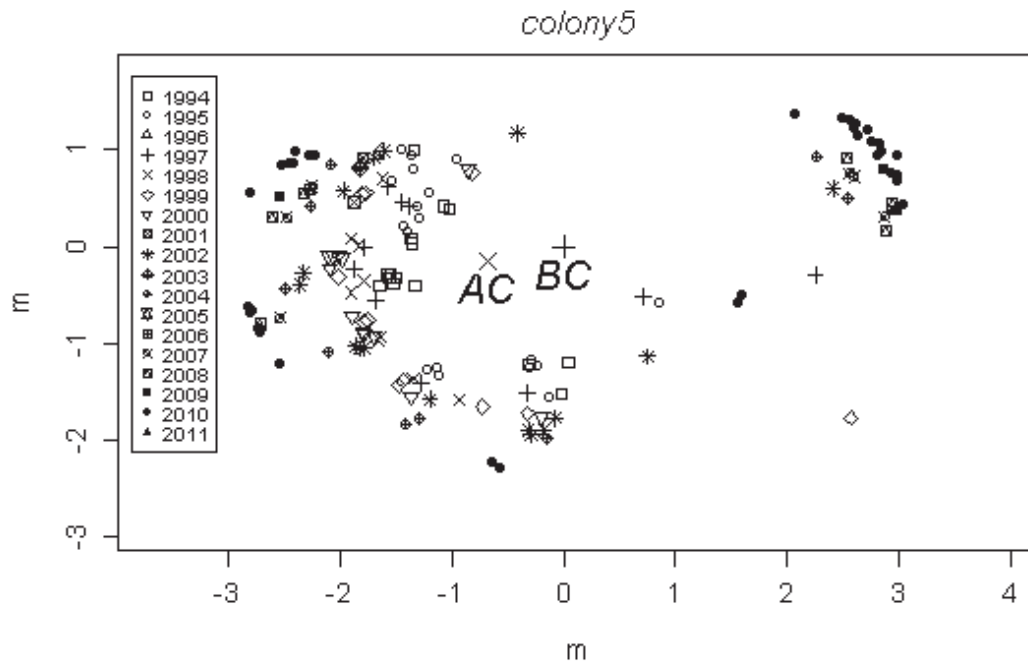


図 2-3-3 各コロニーにおける子実体の分布

シンボルは子実体の発生位置，シンボルの違いは発生年の違いを表す。+は階層ベイズモデルで求めたコロニーの中心(BC)，×は重心計算で求めたコロニーの中心(AC)を示す。両軸の目盛は1mを示す。

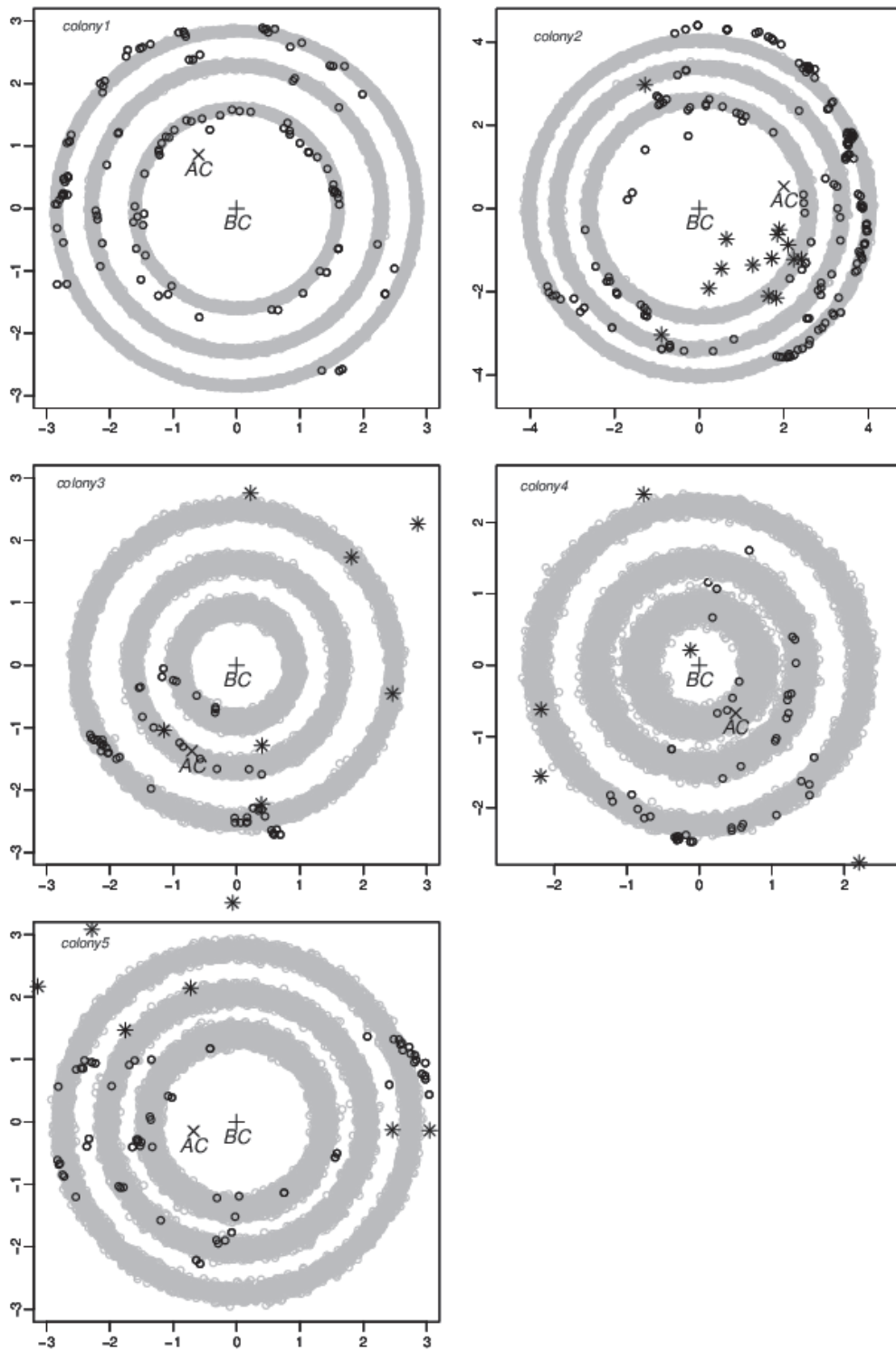


図 2-3-4 各コロニーの 1994 年, 2002 年, 2010 年における子実体発生位置の推定値と実測値
 灰色の丸は階層ベイズモデルによる推定値, 黒色の丸は実測値を示す。内側の帯は 1994 年, 中央の帯は 2002 年, 外側の帯は 2010 年の推定結果を示す。+は階層ベイズモデルで求めたコロニーの中心(BC), ×は重心計算で求めたコロニーの中心(AC)を示す。両軸は BC からの距離(m), *はアカマツの位置を示す。

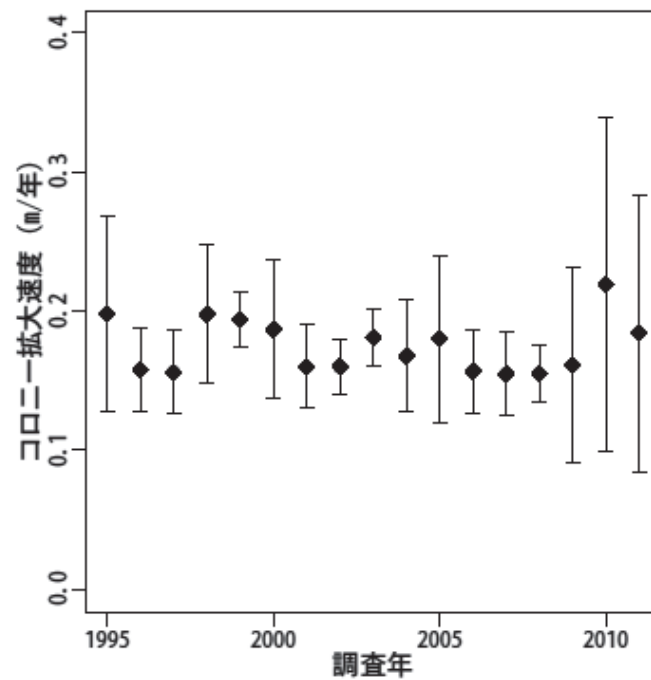


図 2-3-5 コロニーの平均年間拡大速度

横軸は調査年, 縦軸は 1994 年～1995 年から 2010 年～2011 年の各年におけるコロニーの拡大速度の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す($n=5$)。

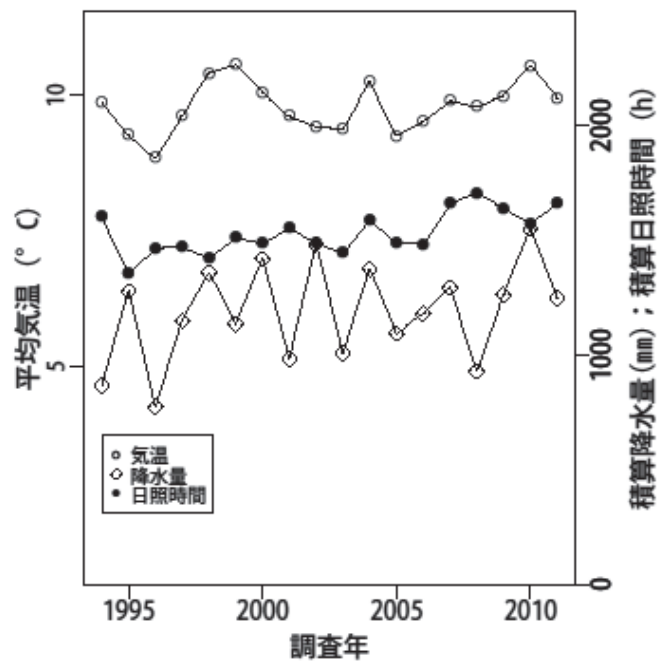


図 2-3-6 調査地の年間降水量, 平均気温, 積算日照時間

横軸は調査年, 左縦軸は 1994 年から 2011 年の各年における平均気温(○), 右縦軸は各年の積算降水量(◇)と積算日照時間(●)を示す。年間平均気温の最低値は 8.8 °C (1996 年), 最高値は 10.5 °C (1999 年, 2010 年)であった。

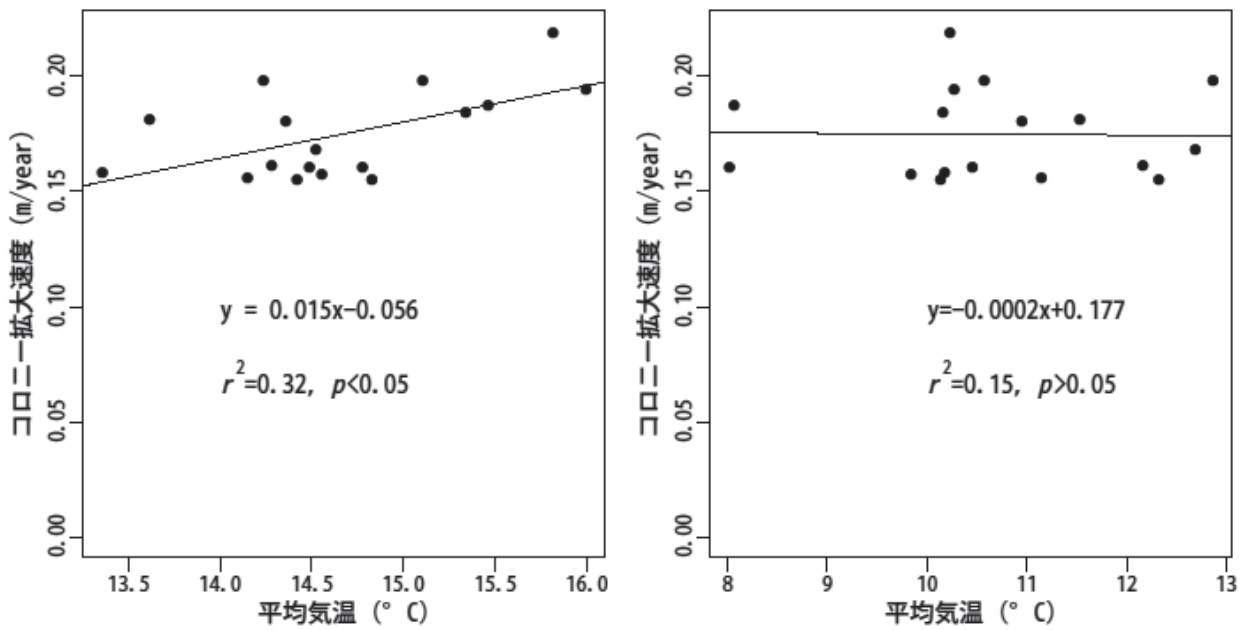


図 2-3-7 コロニーの年間拡大速度と平均気温の関係

横軸は当年の子実体発生前(左図)または前年の子実体発生後(右図)の平均気温, 縦軸は 1994 年～1995 年から 2010 年～2011 年の各年におけるコロニーの拡大速度の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

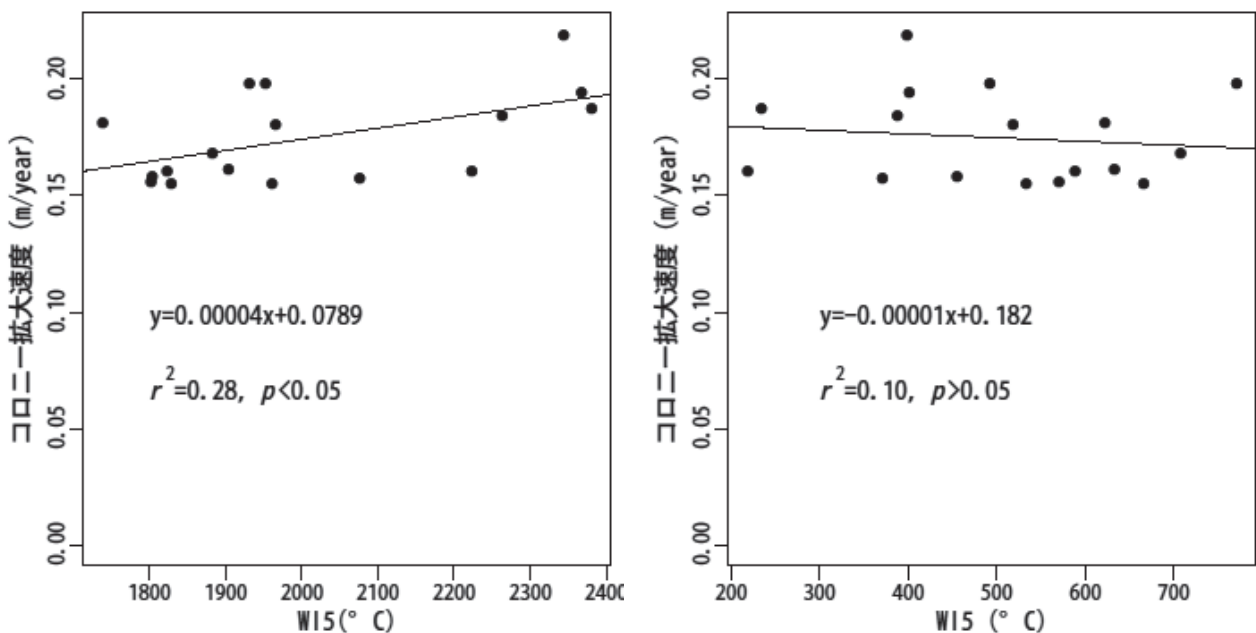


図 2-3-8 コロニーの年間拡大速度と $W15$ の関係

横軸は当年の子実体発生前(左図)または前年の子実体発生後(右図)の 5 °C以上の気温の積算値($W15$), 縦軸は 1994 年～1995 年から 2010 年～2011 年の各年におけるコロニーの拡大速度の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

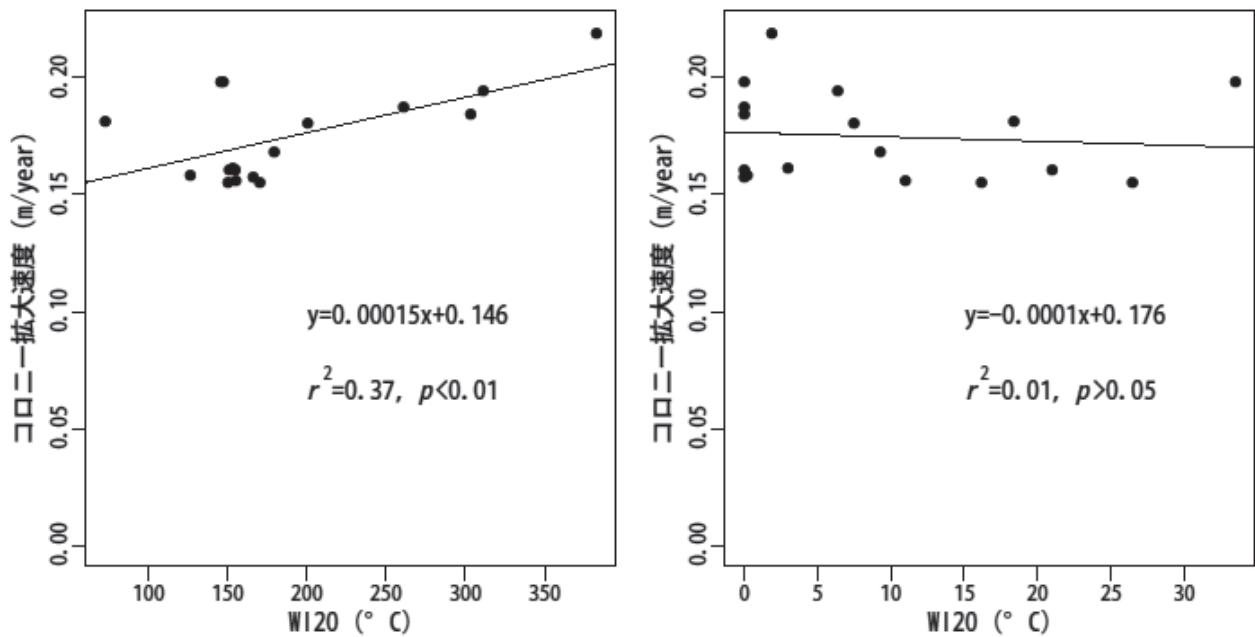


図 2-3-9 コロニーの年間拡大速度と WI_{20} の関係

横軸は当年の子実体発生前(左図)または前年の子実体発生後(右図)の 20 °C 以上の気温の積算値(WI_{20}), 縦軸は 1994 年~1995 年から 2010 年~2011 年の各年におけるコロニーの拡大速度の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

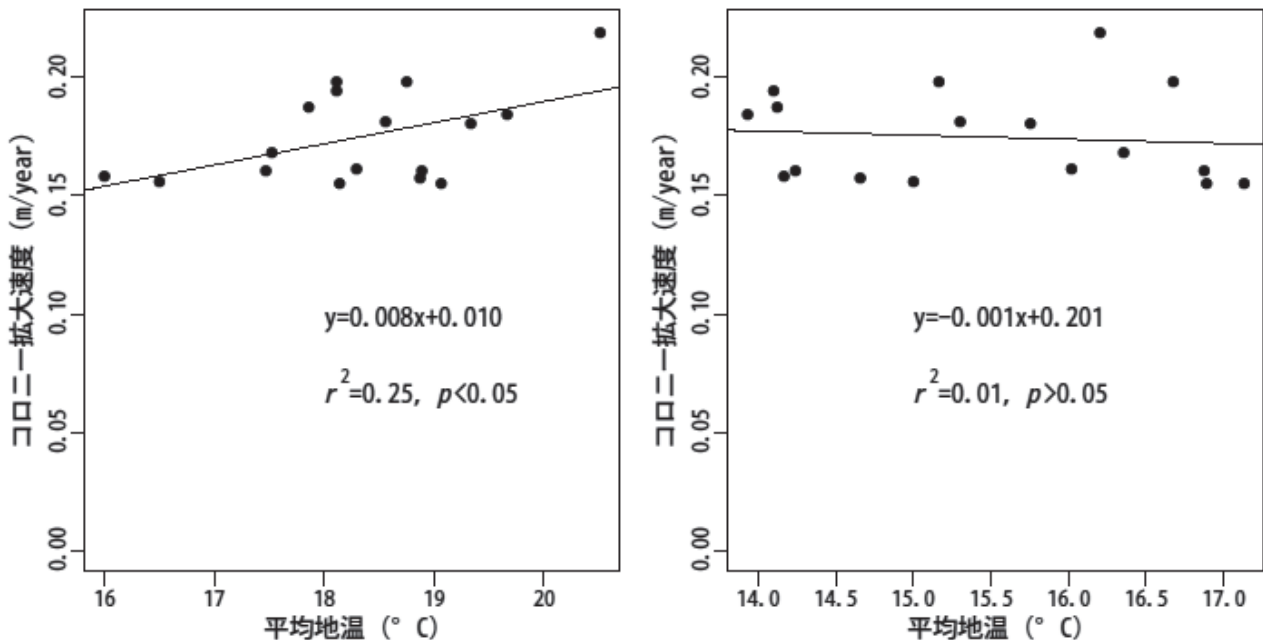


図 2-3-10 コロニーの年間拡大速度と地温の関係

横軸は当年の子実体発生前(左図)または前年の子実体発生後(右図)の平均地温, 縦軸は 1994 年~1995 年から 2010 年~2011 年の各年におけるコロニーの拡大速度の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

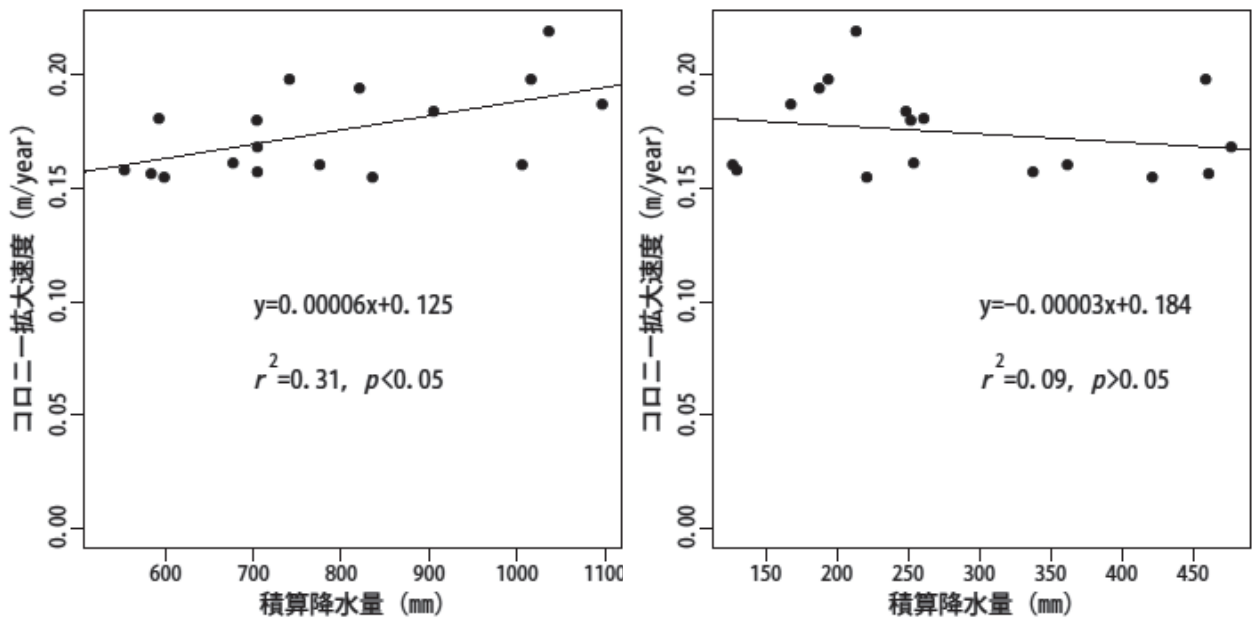


図 2-3-11 コロニーの年間拡大速度と積算降水量の関係

横軸は当年の子実体発生前(左図)または前年の子実体発生後(右図)の積算降水量, 縦軸は1994年～1995年から2010年～2011年の各年におけるコロニーの拡大速度の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

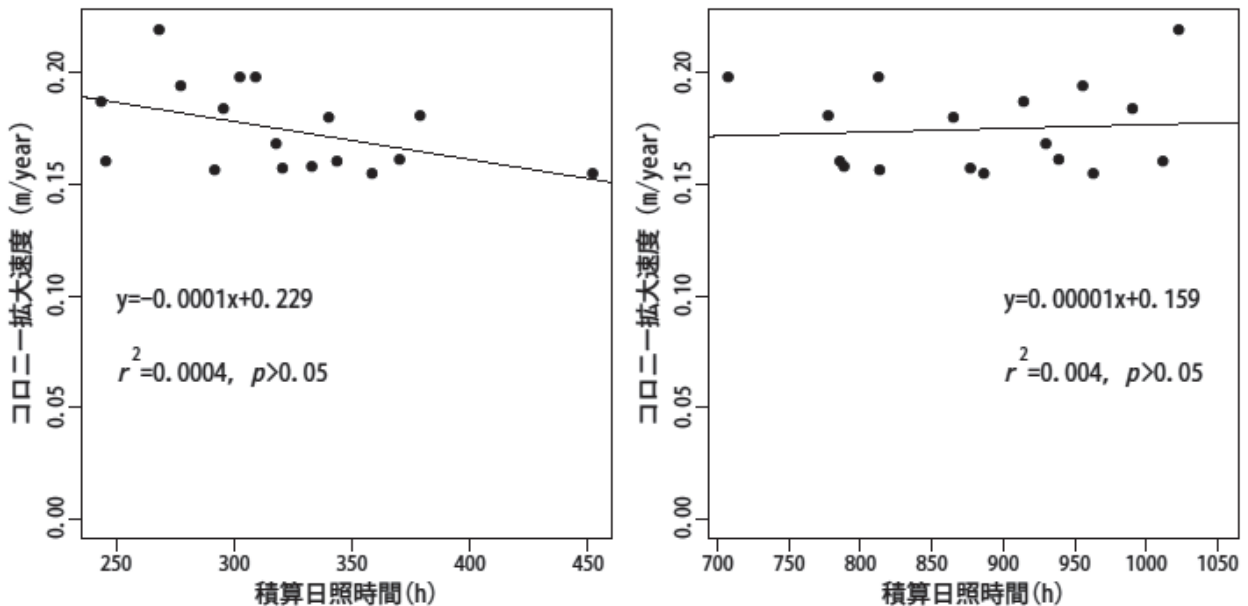


図 2-3-12 コロニーの年間拡大速度と積算日照時間の関係

横軸は当年の子実体発生前(左図)または前年の子実体発生後(右図)の積算日照時間, 縦軸は1994年～1995年から2010年～2011年の各年におけるコロニーの拡大速度の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

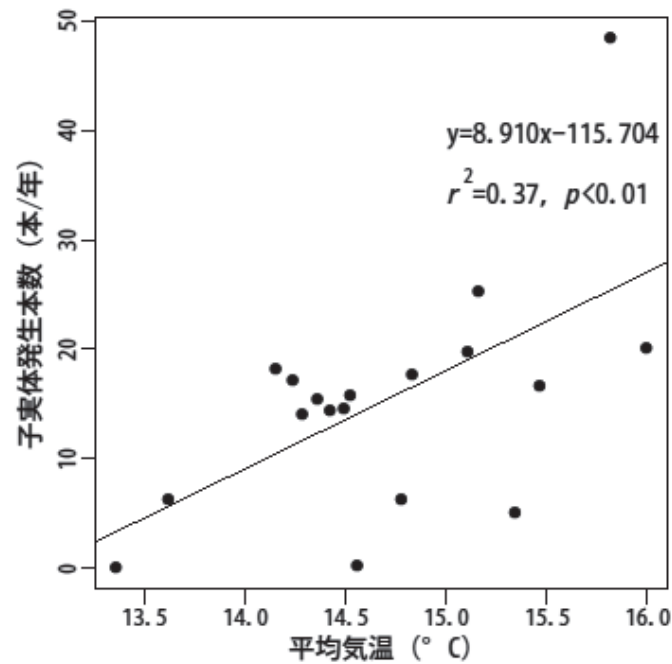


図 2-3-13 子実体発生本数と平均気温の関係

横軸は 1994 年から 2011 年の各年における子実体発生前の平均気温, 縦軸は各年における子実体発生本数の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

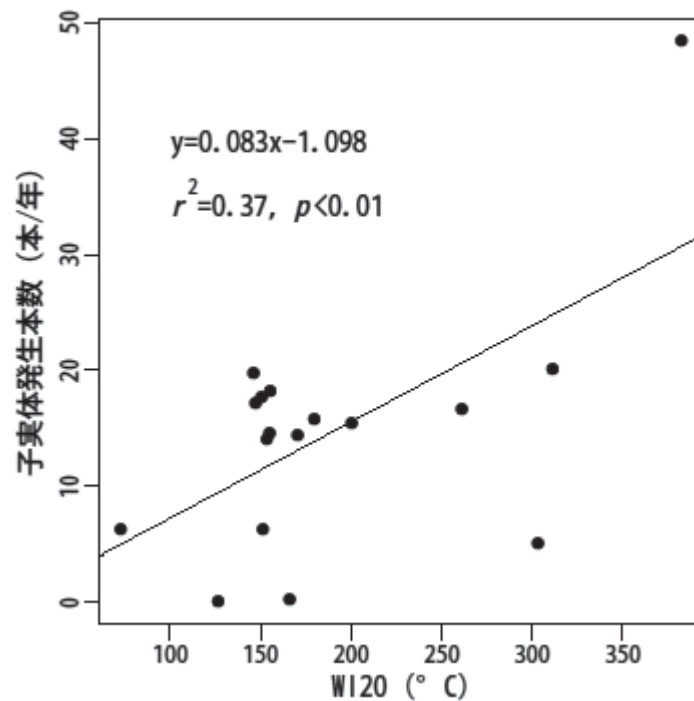


図 2-3-14 子実体発生本数と WI_{20} の関係

横軸は 1994 年から 2011 年の各年における子実体発生前の 20 °C 以上の気温の積算値(WI_{20}), 縦軸は各年における子実体発生本数の平均値を示す。 r^2 は寄与率を, p は有意確率を示す。

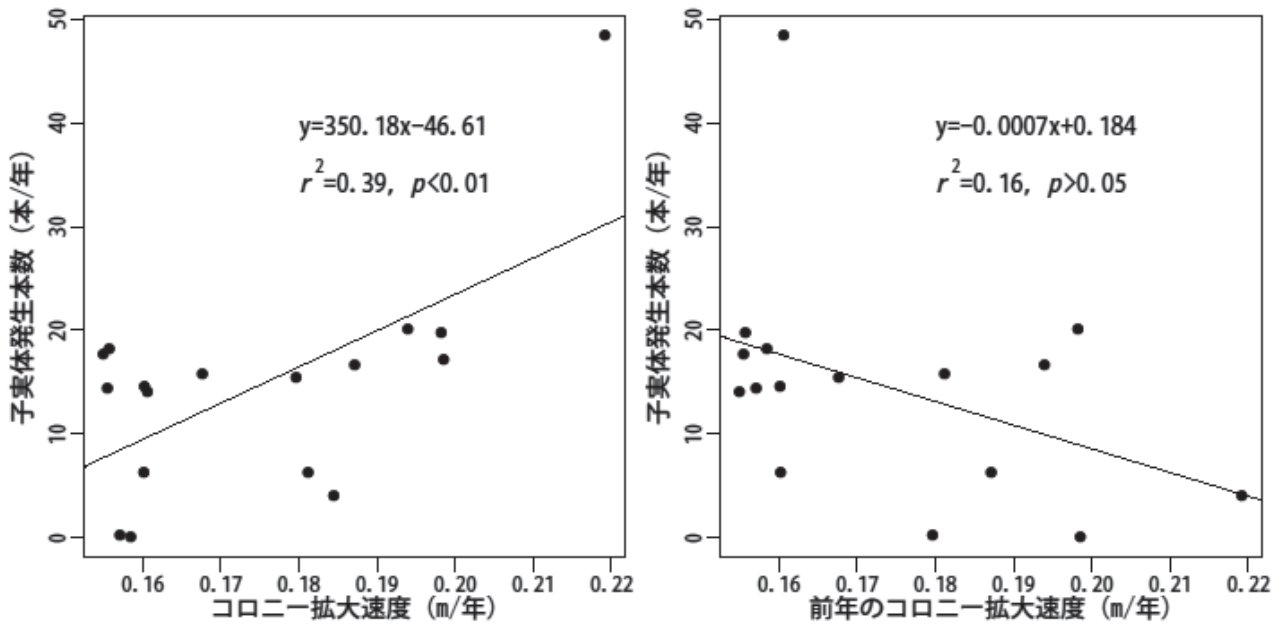


図 2-3-15 子実体発生本数とコロニーの年間拡大速度の関係

横軸は当年(左図)または前年(右図)のコロニーの拡大速度の平均値を、縦軸は各年の子実体発生本数の平均値を示す。 r^2 は寄与率を、 p は有意確率を示す。

表 2-3-1 岩手県四日市試験林における気象条件とマツタケのコロニー拡大速度の関係

説明変数	単位	寄与率 (r^2)	
		発生時期前	発生時期後
平均気温 ¹	°C	0.32*	0.15 ^{ns}
WI_5 ²	°C	0.28*	0.10 ^{ns}
WI_{20} ³	°C	0.37**	0.01 ^{ns}
平均地温 ⁴	°C	0.25*	0.01 ^{ns}
積算降水量 ⁵	mm	0.31*	0.09 ^{ns}
積算日照時間 ⁵	時間	0.004 ^{ns}	-0.004 ^{ns}

地温を除く気象条件を、2つの異なる期間で集計した：当年の子実体発生前(3月から子実体の初発日を含む旬の前の旬まで)；前年の子実体発生後(子実体の初発日を含む旬から、11月下旬まで)。地温は以下の期間で集計した：子実体発生前(8月下旬から子実体の初発日を含む旬の前の旬まで)；子実体発生後(前年の子実体の初発日を含む旬から、10月下旬まで)。¹年間、子実体発生前および子実体発生後の平均値²日平均気温が5°Cを超えた値の、集計期間における積算値³日平均気温が20°Cを超えた値の積算値⁴子実体発生前と発生後の各集計期間における平均値⁵子実体発生前および発生後の日値の積算値。*、**、nsは、各説明変数の有意確率を示す(それぞれ $p < 0.05$ ； $p < 0.01$ ； $p > 0.05$)

表 2-3-2 コロニー拡大速度を応答変数としたモデルの比較

説明変数	モデル名	AIC ³
WI_{20} ¹	<i>T</i>	-88.53
積算降水量 ²	<i>P</i>	-86.87
WI_{20} + 積算降水量	<i>F</i>	-88.17
-	<i>N</i>	-82.58

¹子実体発生時期前 (3月から子実体の初発日を含む旬の前の旬までの、日平均気温が20°Cを超えた値の積算値²子実体発生時期前の積算値各集計期間における平均値³モデルからの残差逸脱度+2×推定に用いたパラメーター数

第4節 寒冷地域におけるマツタケの原基形成温度の推定

I. はじめに

第1章でも述べたように、マツタケは狭義の人工栽培技術が確立されておらず、生産量は自然発生量に規定されるため、不安定である。自然発生量を安定させる手段としては、発生林内の環境制御による子実体の発生促進が挙げられる。その具体的な方法として、これまでに林内灌水(石川・竹内 1970)、シロの被覆(富永 1975; 岩瀬 1988)などが報告されてきた。こうした管理を行う上で重要な指標が、子実体原基の形成温度である。

一般に子実体の発生は、菌糸の増殖、子実体原基(原基)の形成、原基の成長といった段階を経る(堀越・鈴木 1990; Kües and Liu 2000; Carlile *et al.* 2001)。基質中の菌糸が一定の量に達し、温度、湿度、光などの環境条件が適正な場合や(鈴木 1979; Koo *et al.* 1999)、温度降下、電撃などの刺激を受けた場合に(鈴木 1979; Takaki *et al.* 2009)、菌糸中に原基が形成または原基が成長し、子実体が形成される(鈴木 1979; 時本 2010; Islam and Ohga 2012)。こうした菌の性質を利用して、シイタケなどの腐生性きのこの栽培では、菌糸が十分に蔓延した培養基に散水や打撃などの刺激を加えることにより、原基を形成、または形成された原基を成長させて、子実体を得ている(狭義の人工栽培)。

マツタケの子実体発生は、地温の低下に応じて始まることから(浜田 1953; 衛藤ら 1999; Vaario *et al.* 2015)、原基形成要因として地温が注目されてきた。衣川(1963)は、マツタケ子実体の成長を経時的に測定し、*Logistic* 成長式で近似させることにより、「子実体形成の誘発時期」を推定した。さらに、この時期の地下5 cmの温度を原基形成上限温度とみなし、冷却実験結果も併せて原基形成上限温度が19 °Cであることを明らかにした。衣川(1963)の実験は京都府で行われたが、本研究の調査地は京都府より北方に位置するため平均気温が低く、衣川(1963)と深さは異なるものの、地下10 cmの地温が20 °Cを超える時期は短い(大森 1997)。したがって、原基形成温度は衣川(1963)の19 °Cよりも低い可能性がある。さらに、一般的に菌の生理的な性質は遺伝的に規定され、同一種でも系統間で異なることから(衣川 1990)、原基形成温度の比較は複数の系統(ジェネット)で行う必要がある。

そこで本研究では、寒冷地域におけるマツタケ子実体の原基形成温度の推定を目的に、調査地でマツタケ子実体の成長過程とジェネットを調査し、ジェネット毎に地温との関係を解析した。

II. 材料と方法

調査地

調査地内の調査区 *site1*, 2, 5, 6 および7で(第2章第1節 図 2-1-1)、集団的に発生している子実体(コロニー)を5個、選定し(第2章第3節 図 2-3-1)、以下に示す調査、解析を行った。

子実体のジェネット区分

各コロニーに属する子実体のジェネット(同一の遺伝子型を示す子実体の集団)を、同時期に調査地で実施されたSSR解析結果(Lian *et al.* 2006)に基づき36タイプに区分した(図 2-4-1)。このうち発生本数の多いジェネットを各調査区から合計6個(1*a*, 2*a*, 2*b*, 5*a*, 6*a*, 7*g*)選出し、当該ジェネットに属する子実体を調査の対象とした(表 2-4-1)。コロニーのうち *colony2* では、円形のコロニーに3個のジェネットが含まれたため(図 2-2-1)、そのうち2個のジェネット(2*a*, 2*b*)を対象とした。これ以外のコロニーでは、1コロニーあたり1個のジェネットを選定した。

子実体の成長調査

2001年から2004年に上記の6ジェネットで発生した合計112本の子実体を対象に、子実体の地上高を継続的に測定した(図 2-4-2)。子実体発生調査は9月中旬から10月上旬のほぼ毎日に行い、子実体の存在を確認した日を初認日とした。調査は前年の子実体発生位置に注目して行い、*A₀*層の表面(地表面)がわずかに盛り上がるなど、子実体の存在が疑われる場合には、*A₀*層を持ち上げ、子実体の有無を確認した後に、*A₀*層を復元した。

子実体の測定方法は衣川(1963)に準じた。初認日に、子実体の真横にグラスファイバー製の丸棒を垂直に立てた。三角定規の長辺を子実体の頂部に、短辺を丸棒にそれぞれ当て、直角部分の位置を油性ペンで丸棒に記し、調査日における子実体の地上高とした。地上高の測定はほぼ毎日、行った。子実体下面の被膜が開放し、菌傘が反り返り、菌傘の周辺部に亀裂が生じた時点で測定を終了し、子実体を採取した。採取後、軸の地表面と接する部分から末端ま

での曲線長(地下部長)を測定し、地表から地下の菌糸塊(シロ)の上面までの深度(深度)として地上高に合算した。この値を子実体の全長 L として解析に供した。

気象データ

各調査対象ジェネット付近にデータロガー(サーモレコーダーRS-12, エスペックミック社, 愛知)を設置して、地温を測定・記録した。センサーの設置深度は、衣川(1963)と同様に、 A_0 層表面から5 cmとした。なお、この深度は、調査地におけるマツタケのシロ上面の平均深度と同程度である(成松 2007)。気温は調査地最寄り(南東約 10km)の地域気象観測システム(アメダス)観測所(岩手県盛岡市好摩, 北緯 39 度 52 分, 東経 141 度 10 分, 標高 205 m)の観測値を用いた(第2章第1節)。

地温の変化が子実体発生に及ぼす影響を明らかにするために、全調査年で子実体が発生したジェネット $1a$ が属するコロニー1(第2章第3節 図2-3-1)を対象として、2001年から2004年の8月と9月に、地温の前日差(調査日前日の最高地温から当日の最低地温を減じた値; 値が大きいほど地温の降下が大きいことを示す)を算出した。このうち2001年は9月15日から9月20日の地温が欠測であったため、8月15日から9月14日の最高地温と最高気温、最低地温と最低気温について、それぞれ回帰分析を行い、得られた回帰式に最高気温、最低気温を代入することにより、欠測期間中の最高地温と最低地温を推定した。この推定値から、欠測期間中の地温前日差と平均地温を算出した。なお、推定式は以下のとおりである:

$$y_{\max} = 0.1997x_{\max} + 12.662 \quad (r^2=0.30, p<0.01)$$

$$y_{\min} = 0.2371x_{\min} + 13.022 \quad (r^2=0.58, p<0.001)$$

y_{\max} : 調査日における最高地温

x_{\max} : 調査日における最高気温

y_{\min} : 調査日における最低地温

x_{\min} : 調査日における最低気温

データ解析

以後に示す計算は、すべて統計言語 R 3.1.2 (R development core team 2014)で行った。

(1)成長式の選定

一般に生物の個体成長は、ロジスティック性の成長経過を示す。ロジスティック性成長経過の近似式

として、*Logistic* 式と *Gompertz* 式が挙げられる。この2式からマツタケの子実体成長の近似に適した式を選定するために、以下により算出した値を「実測値」として試算を行った: 2002年と2004年に *site1* のジェネット $1a$ で得られた子実体を対象に、各子実体の初認日を基準日として、各日の子実体全長を平均した。得られた実測値を *Logistic* (eq. 1), *Gompertz* (eq. 2)の各成長式で近似させた。

ここで、

$$\text{Logistic 式: } y=a/(1+b*\exp(-cx)) \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{Gompertz 式: } y=a*\exp(b*\exp(-cx)) \quad (\text{eq. 2})$$

x : 測定日

y : x 日目における子実体全長

得られた各近似式について、次式により赤池情報規準(AIC)を算出した。

$$AIC = \text{残差の逸脱度} + 2(\text{変数の数})$$

得られた AIC を *Logistic* 式と *Gompertz* 式で比較し、AIC が小さい式、すなわち予測精度が高いとみなせる式を、成長式として採用した。

(2)原基形成温度の推定

上記(1)で選定した式に、子実体ごとに各日の子実体全長を代入し、各子実体の成長式を決定した。ただし、初認日を $x=1$ とした。次に、子実体の全長が 0 を示す日、すなわち $y=0$ の日付 x_0 を求めるが、*Logistic* 式、*Gompertz* 式ともに $y=0$ に漸近するため、 y に 0 を代入することによって x_0 を算出することはできない。ここで、*Logistic* 式は変曲点を中心として曲線が点対称を示す。そこで、変曲点に対応する x_{mid} を、(1)で推定されたパラメーターから次式により求めた:

$$x_{\text{mid}} = \log_b e/c$$

b, c : 推定されたパラメーター

e : ネイピア数

得られた x_{mid} を実際の日付に置き換え、子実体長が最大高の 1/2 となる日 $x_{0.5}$ とみなした。次に、子実体の最大日 x_{max} と $x_{0.5}$ の間の日数を 2 倍にして x_{max} から減じ、得られた日 x_0 を子実体の全長が 0 の日とみなして、原基形成日とした。さらに、この日の地温の最低値を原基形成温度 t_0 とした。得られた t_0 について、ジェネットと調査年を要因とした二元配置分散分析を行い、 $p<0.05$ で交互作用が認められた場合には、各要因で単純主効果検定を行った。

原基形成温度 t_0 の決定要因を推定するために、 t_0 、深度、積算気温(初認日と x_{max} の間の日平均気温の積

算値), 積算降水量(初認日と x_{max} の間の日降水量の積算値)を子実体毎に算出し, t_0 と要因間の相関分析を行った。

III. 結果

子実体発生と地温の推移

各年の6ジェネット合計の子実体発生本数は, 最多が2002年で43本, 最少が2003年で14本であった。すべての年に発生したジェネットは, $1a$ のみであった(表2-4-1)。2002年, 2004年にはすべてのジェネットで子実体が発生したが, 2001年にはジェネット $5a$ と $6a$ から発生しなかった。また, 2003年に発生したジェネットは $1a$ のみであった(図2-4-3)。2001年から2004年の合計発生量は, $1a$ が44本, $2a$ が18本, $2b$ が8本, $5a$ が17本, $6a$ が9本, $7g$ が16本, 平均 18.6 ± 13.1 本であった(表2-4-1)。

子実体の初発日(6ジェネットを通じて最も早い初認日)は, 調査年で異なった(図2-4-3)。各年の初発日は2001年が10月1日, 2002年が9月2日, 2003年が9月12日, 2004年が9月8日であり, 2002年が最も早く, 2001年が最も遅かった。このうち2002年は, 初発日の16日後に次の発生が観察された。不作だった2003年を除き, 各年で子実体が最初に発生したジェネット(初発ジェネット)は $7g$ であった。

最低地温は最低気温に応じて, かつ最低気温よりも高めに推移した(図2-4-3)。変動は気温が地温より顕著であった。調査地中央のジェネット $5a$ 付近における子実体発生前後の最低地温は, 19°C 未満で推移した。

子実体の成長と成長式の選定

いずれのジェネットでも子実体は経時的に成長し, 調査期間の後半には成長量が鈍化するなど, 概ねS字状の成長過程を示した(図2-4-4)。

ジェネット $1a$ の実測値に基づき, 以下の2つの成長式が得られた(図2-4-5)。

$$\text{Logistic 式: } y=89.69/(1+6.76*\exp(4.23x))$$

$$\text{Gompertz 式: } y=122.16*\exp(2.14*\exp(-0.89*x))$$

各式の係数は, いずれも $p<0.001$ で0から乖離していた。AICはLogistic式が50.8, Gompertz式が53.5であり, Logistic式のAICが小さかったことから, 以後の解析ではマツタケの子実体成長の近似式としてLogistic式を採用した。

Logistic式により, 各ジェネットの子実体成長が

近似された(図2-4-4)。近似曲線は, 子実体の成長経過と概ね適合していた。近似曲線の形状はジェネットにより異なり, ジェネット $1a$, $5a$ は他のジェネットよりも観察期間の後半における成長の鈍化が顕著であり, 成長曲線の平坦部の到達高も低かった。

原基形成温度の推定

2001年から2004年に5調査区, 6ジェネットで得られた子実体112本の, 原基形成温度 t_0 (子実体の全長が0と推定された日(x_0)の最低地温)の総平均値は, 14.6 ± 1.8 SD $^\circ\text{C}$ であった(表2-4-1)。2元配置分散分析の結果, ジェネットと調査年に有意な交互作用 ($p<0.01$)が認められた。単純主効果検定の結果, ジェネット間の有意差は2004年に認められた ($p<0.01$)。2004年における原基形成温度は $7g$ が 17.0°C で最も高く, 子実体発生も $7g$ が最も早かった(図2-4-3)。ジェネット毎の原基形成温度の調査年間平均値は, 最低で $13.7 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ($2a$), 最高で $15.3 \pm 2.5^\circ\text{C}$ ($7g$)であった(表2-4-1)。調査年間の有意差は, 全てのジェネットでは認められた ($p<0.05$)。調査年毎の原基形成温度のジェネット間平均値は, 最低で $12.7 \pm 0.7^\circ\text{C}$ (2001年), 最高で $16.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$ (2003年)であり, 初認日の最も遅い2001年が最低であった。

相関分析の結果, 原基形成温度と深度, 積算気温, 積算降水量の間には, いずれも有意な相関が認められなかった ($p>0.05$)。

原基形成と温度変化

ジェネット $5a$ や $6a$ では, 原基形成日 x_0 の前に地温の低下が見られた(図2-4-4)。また, ジェネット $1a$ の原基形成日 x_0 (2002年, 2004年)またはその直前(2001年, 2003年)には, 地温前日差のピークが見られた(図2-4-6)。

IV. 考察

子実体の成長経過

寒冷地方の調査地で4年間に112本のマツタケ子実体の成長を調査した結果, 子実体の成長経過はS字状のLogistic曲線式にて近似された。この結果は, 衣川(1963)が温暖地域で得た結果と同様であり, 寒冷地域であっても温暖地域と同様に, マツタケの子実体はLogistic性の成長経過を示すことが明らかになった。また, 今回得られたマツタケ子実体のS字状の成長曲線は, エノキタケ(*Flammulina velutipes*)

で報告された成長曲線(Kinugawa and Furukawa 1965; Gruen 1969)とも同様であった。一方、成長曲線のS字の形状は、ジェネットにより異なった。Kinugawa & Furukawa (1965)は、原基形成後の育成温度が高いほど、子実体の成長が阻害されることを、エノキタケの同一菌株を用いた栽培試験で示している。Kinugawa & Furukawa (1965)とは異なり、今回の調査は同一の調査地で行い、地温にも顕著な差は認められない一方で、成長調査の対象とした子実体は異なるジェネットに属する(Lian *et al.* 2006)、即ち遺伝的に異なることから、今回みられたジェネット間での成長経過の違いは、遺伝的な因子によるものと考えられる。

寒冷地域における原基形成温度の推定

4年間、6ジェネットの成長調査により、寒冷地域の本調査地におけるマツタケの原基形成温度は 14.6 ± 1.8 SD °Cと推定された。これらは寒冷地域で初めての推定結果である。今回の推定値は、衣川(1963)が京都府で推定した19°Cや、小川・浜田(1976)が長野県産の菌株を用いた室内実験で示した17~19°Cより低い。調査地では8月でも地温が19°Cを超える日は少ないことから(図2-4-6)、今回得られた、既報(衣川 1963; 小川・浜田 1976)より低い原基形成温度は、供試ジェネットが調査地の低い地温に適応した結果であると考えられる。

原基形成温度が遺伝的要因として子実体発生時期に及ぼす影響

原基形成温度はマツタケの子実体発生時期に影響を及ぼす遺伝的要因の一つであると推察される。ジェネット7gでは、不作年を除く4年中3年で、最も早く子実体発生が観察された。今回の調査は同一の調査地で行い、調査地内で地温は同程度であることから、ジェネット7gにおける子実体発生時期の早さは、他のジェネットよりも温度の高い時期に原基が形成されたことを示唆する。実際に、ジェネット7gの原基形成温度の推定値は他のジェネットよりも高かった。原基形成温度は積算気温、積算降水量の影響を受けなかったことから、遺伝的に規定されると考える。これらのことから、マツタケの子実体発生時期は、原基形成温度を介して遺伝的な影響を受けることが示唆された。

橋岡ら(1961)は、シイタケ(*Lentinula edodes*)の子実体発生温度を高温型、中温型、低温型の発生温度型

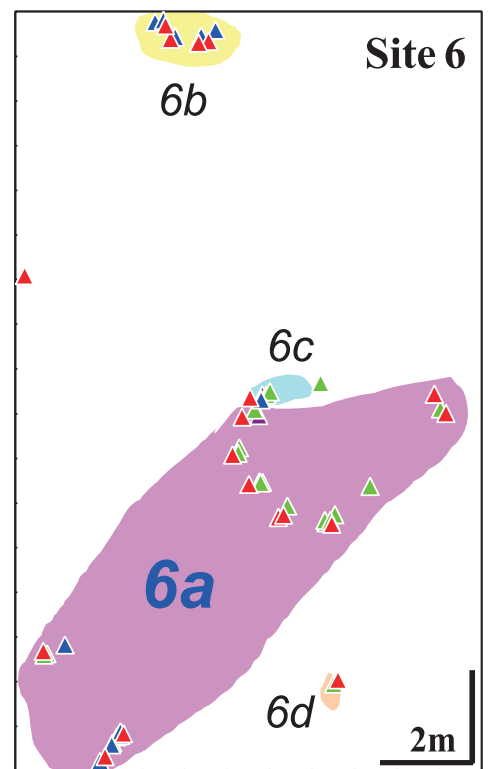
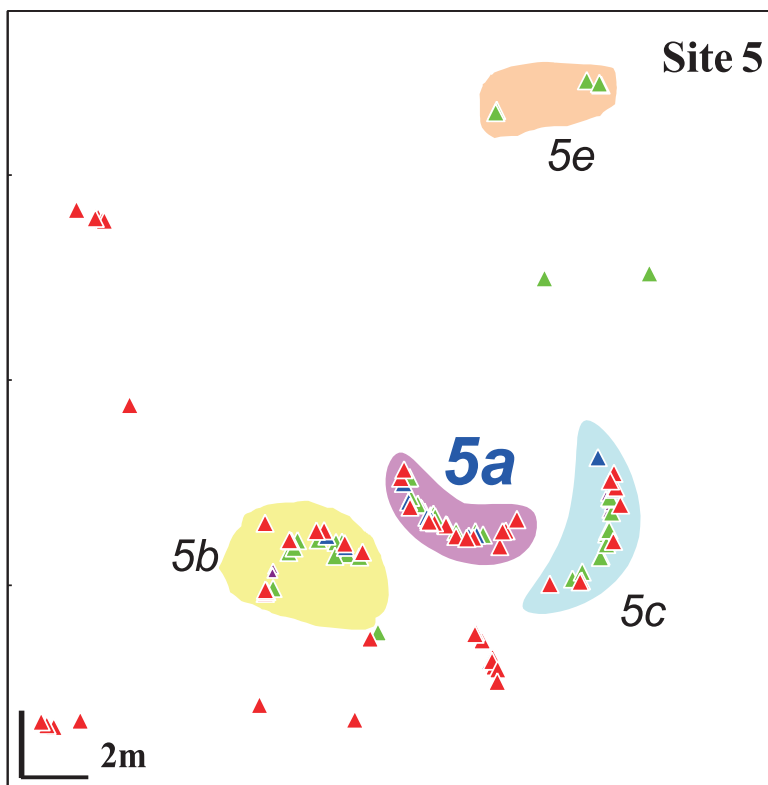
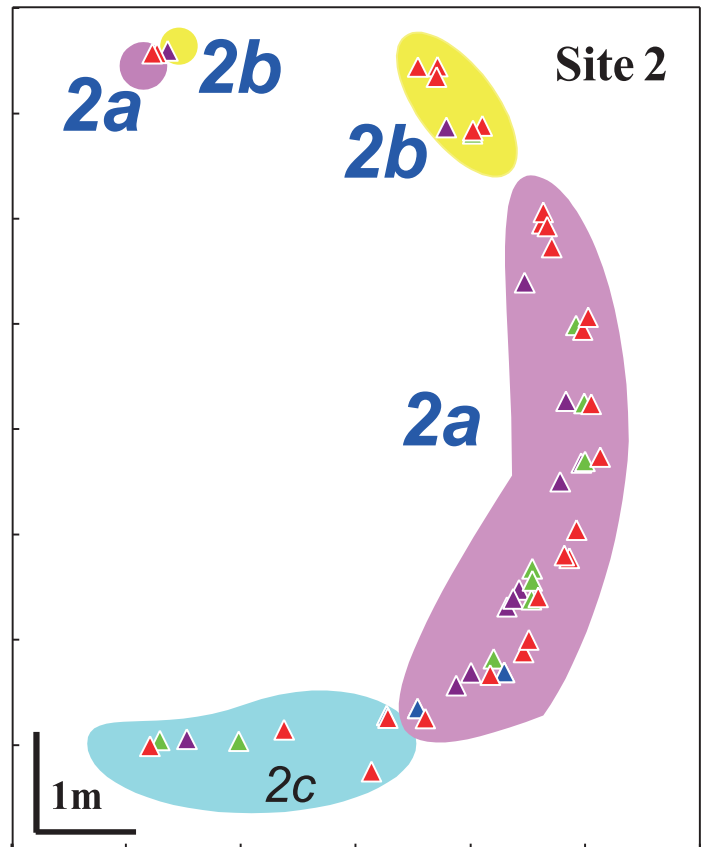
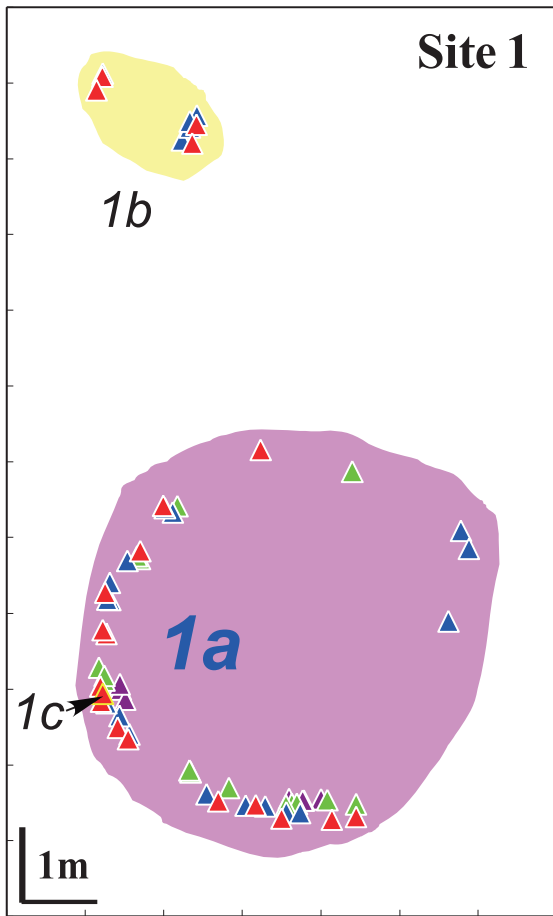
に類型化し、長谷部ら(1998)は、シイタケの発生温度型(橋岡 1961)が遺伝的に規定されることを示した。マツタケは狭義の人工栽培技術が確立されていないため、シイタケと同様の方法で原基形成温度を確認することができず、人為的に世代を進めることが出来ないために、遺伝学的な解析も不可能である。本研究の結果は、マツタケの原基形成温度がシイタケと同様に遺伝的に規定される可能性を、野外調査に基づき示したものである。

温度変化と子実体原基の関係

同一ジェネットでも、原基形成温度は調査年によって異なった。調査年によって初認日も異なり、初認日が遅い年では、原基形成温度も低かった。一方、いずれの年でも、原基形成日 x_0 やその直前には、衣川の結果(衣川 1963)と同様に、地温の低下が見られた(図2-4-6)。

マツタケと同様な外生菌根菌のホンシメジ(*Lyophyllum shimeji*)では、菌糸を23°Cで培養した後に15°Cで培養すると、原基が形成される(Ohta 1994)。腐生菌のエノキタケでも、菌糸を25°Cで培養した後に5°C、10°Cまたは15°Cで培養すると、原基が形成される(Kinugawa and Furukawa 1965)。一方、時本・小松(1982)は、シイタケの原基が20°Cの恒温培養で形成され、低温の変温条件下に移すと子実体に成長することを示した。

一般に形成された原基の成長開始には何らかの刺激が有効であり(鈴木 1979)、温度変化は成長刺激の一つとされる(小松 1961; Tusue 1969; Kües and Liu 2000; 時本 2010)。マツタケにおいて、温度の低下が原基の形成と、原基からの子実体成長のどちらにより強く影響を及ぼすか不明であるが、今回の、寒冷地域における調査の結果からは、原基の形成は15°C前後の温度帯で、原基の成長はその温度帯付近における温度変化を契機に、それぞれ行われている可能性が示唆される。腐生性の栽培きのこのバイリング(*Pleurotus eryngii* subsp. *tuoliensis*, Fu *et al.* 2016)やエノキタケ(Sakamoto *et al.* 2002)では、低温刺激後に発現量が増大する遺伝子やたんぱく質が解明されている。狭義の人工栽培技術が確立されていないマツタケで、温度変化と原基形成や成長の関係を正しく理解するためには、子実体発生時期前後の菌根を試料とした遺伝子発現解析が必要である。



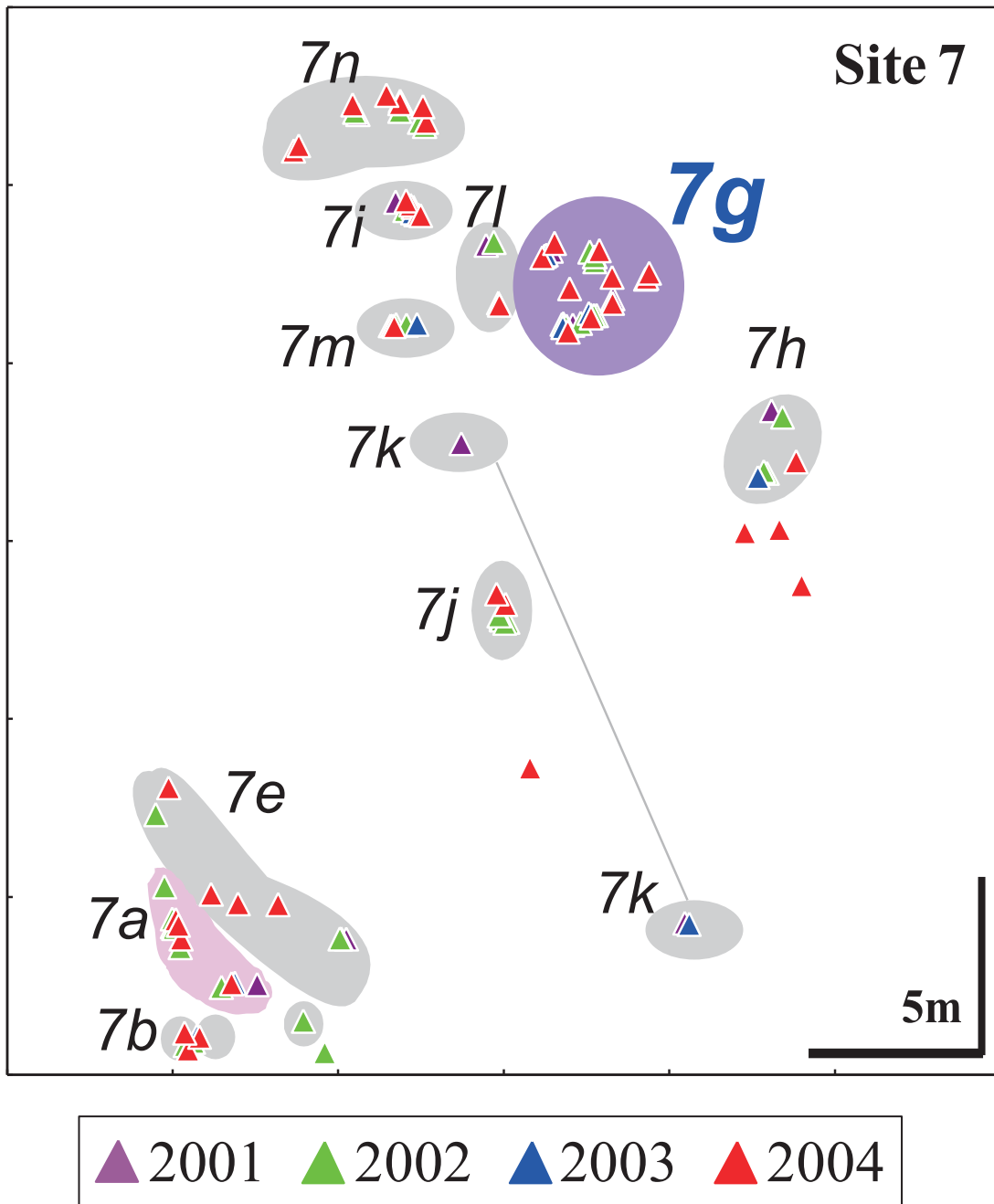


図 2-4-1 2001 から 2004 年の 5 つの調査区におけるジェネットの区分

区分は Lian *et al.* (2006) に基づく。▲ は子実体の発生位置を，色は発生年を表す。色塗りは同一のジェネットに区分された子実体の発生範囲を示し，数字+アルファベットはジェネットの名称を示す。太字は解析の対象としたジェネットを示す。(例：7g)

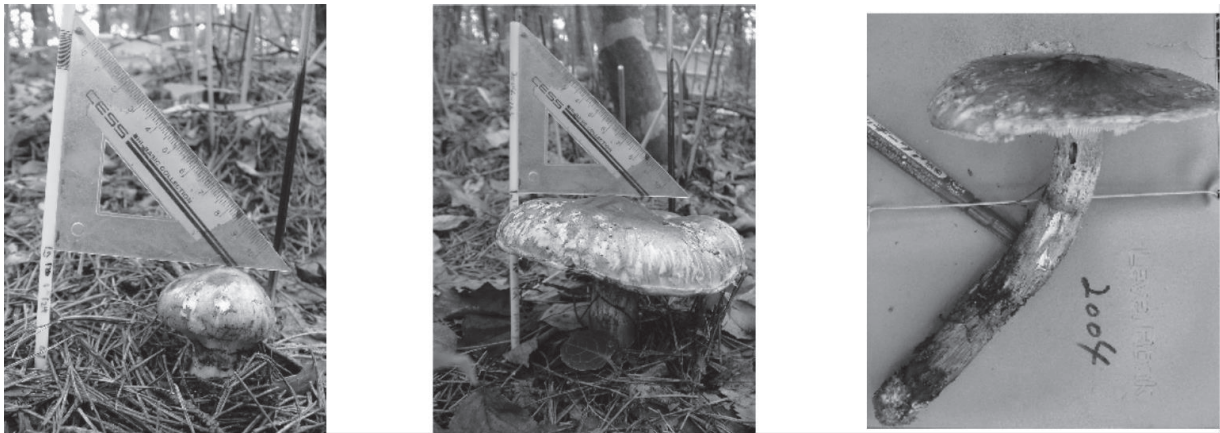
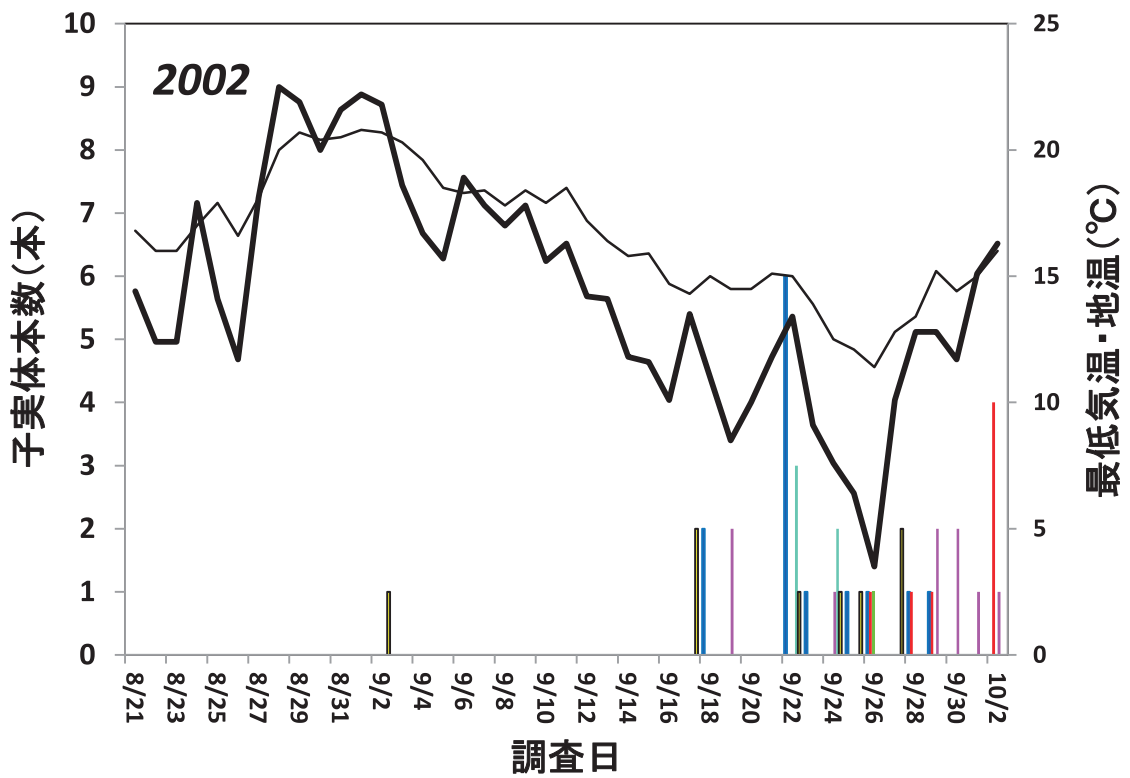
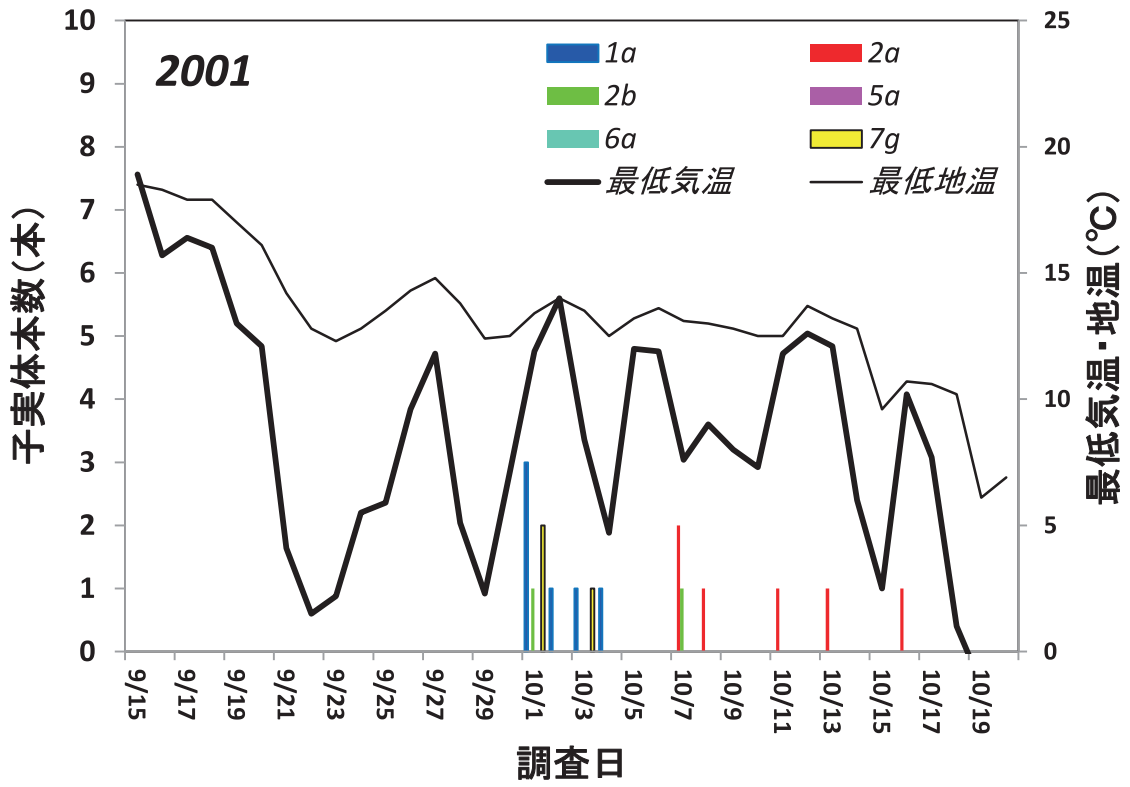


図2-4-2 子実体の地上高と地下部長の調査方法

左図と中図は子実体の地上高測定方法を示す。子実体の真横に立てたグラスファイバー製の丸棒に、三角定規を用いて子実体の頂部の地上高を記し(図中の棒に記した赤、黒または青色の線)、調査日における子実体の地上高とした。採取後、軸の地表面と接する部分(地際線、右図の黄線)から末端までの曲線長を測定し、地表から地下の菌糸塊(シロ)の上面までの深さ(地下部長)とした。



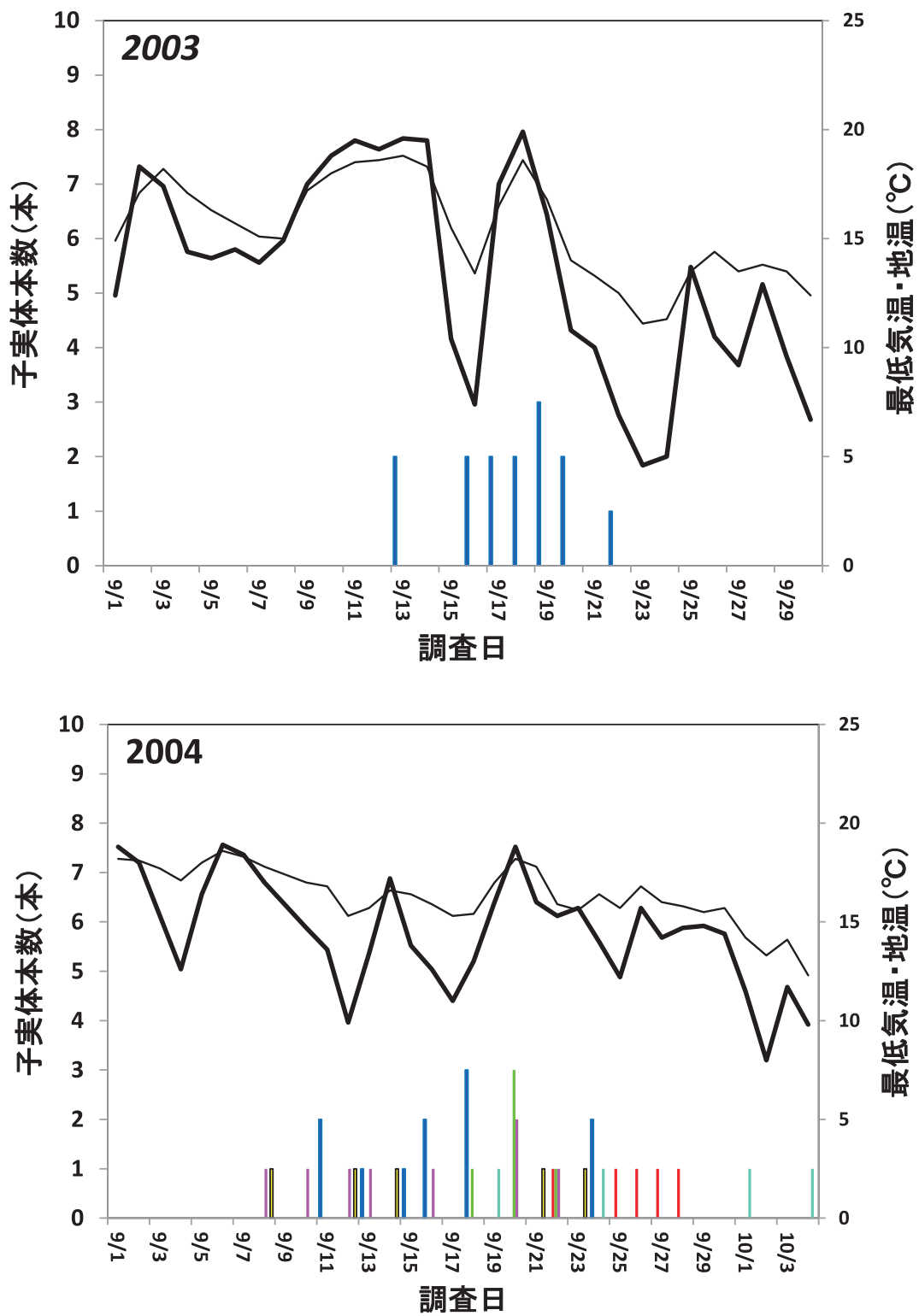


図 2-4-3 2001 から 2004 年の 6 個のジェネットにおける各日の子実体発生本数と最低気温, 最低地温の推移

左上の数字は調査年, 棒グラフ(左軸)は各調査日に発生を確認した子実体の本数, 色はジェネットを示す。太線(右軸)は気象庁好摩観測所の最低気温, 細線(右軸)は調査地中央のジェネット 5a 付近における最低地温を示す。

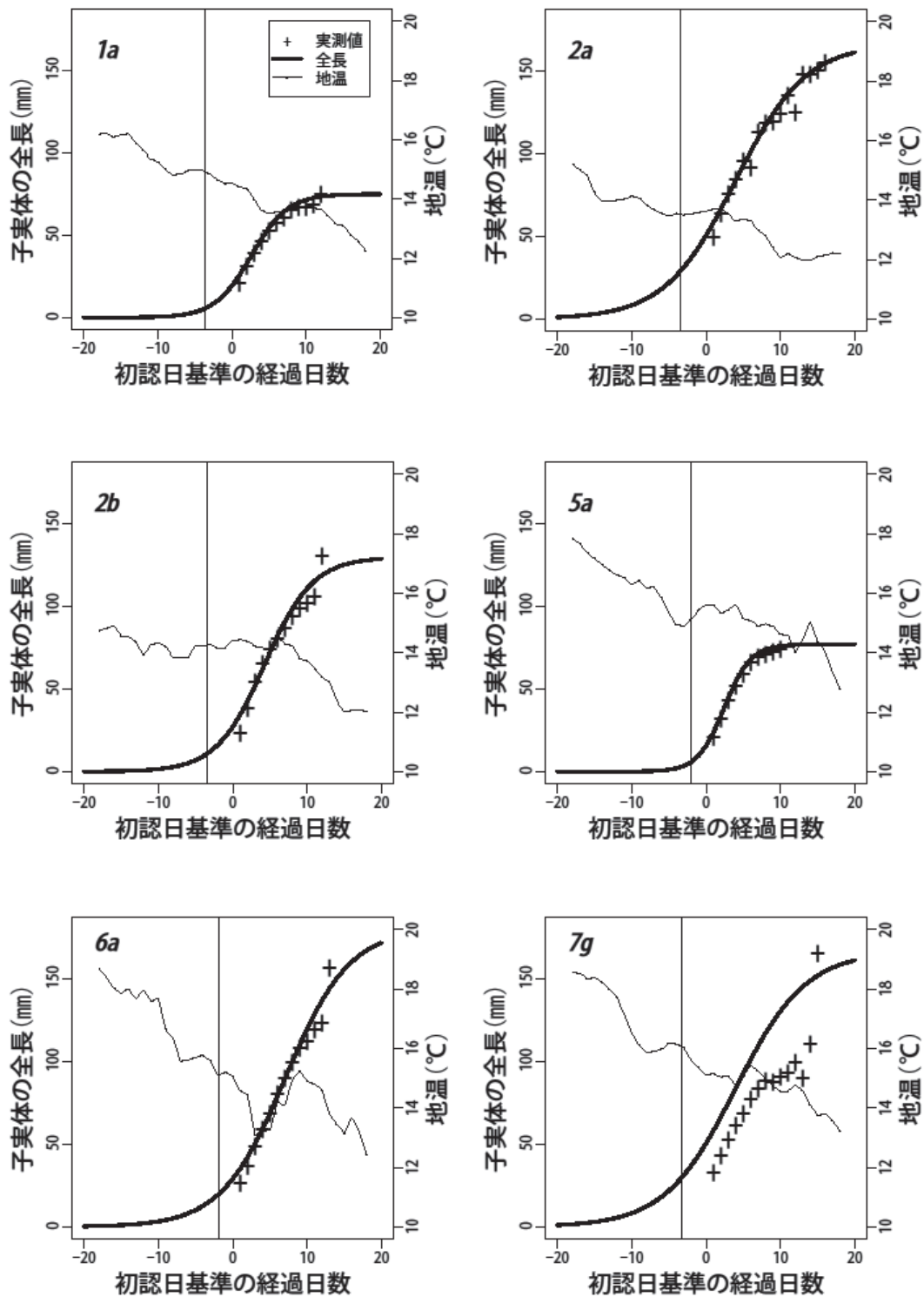


図2-4-4 2001 から2004年の6個のジェネットにおける子実体の成長曲線

図中の+は実測値：各子実体の調査日を初認日基準に換算し(横軸)，各日の子実体全長を各ジェネットで平均したもの。太線(左縦軸)は推定された成長式に基づく成長曲線，細線(右縦軸)は各日(初認日基準)の最低地温を当該ジェネットに属する子実体間で平均した値。縦線は推定された原基形成日(x_0)を示す。

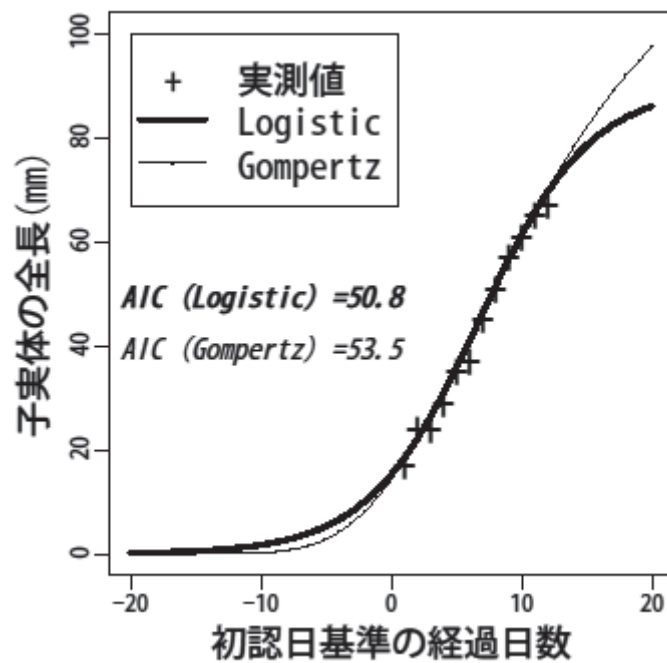


図 2-4-5 成長式の選定

ジェネット 1a の 2002 年と 2004 年における各子実体の調査日を初認日基準に換算し(横軸), 各日の子実体全長を平均して実測値とした。実測値を 2 種類の成長式, *Logistic* 式(太線)と *Gompertz* 式(細線)に代入し, 得られた予測値と実測値をそれぞれプロットした。

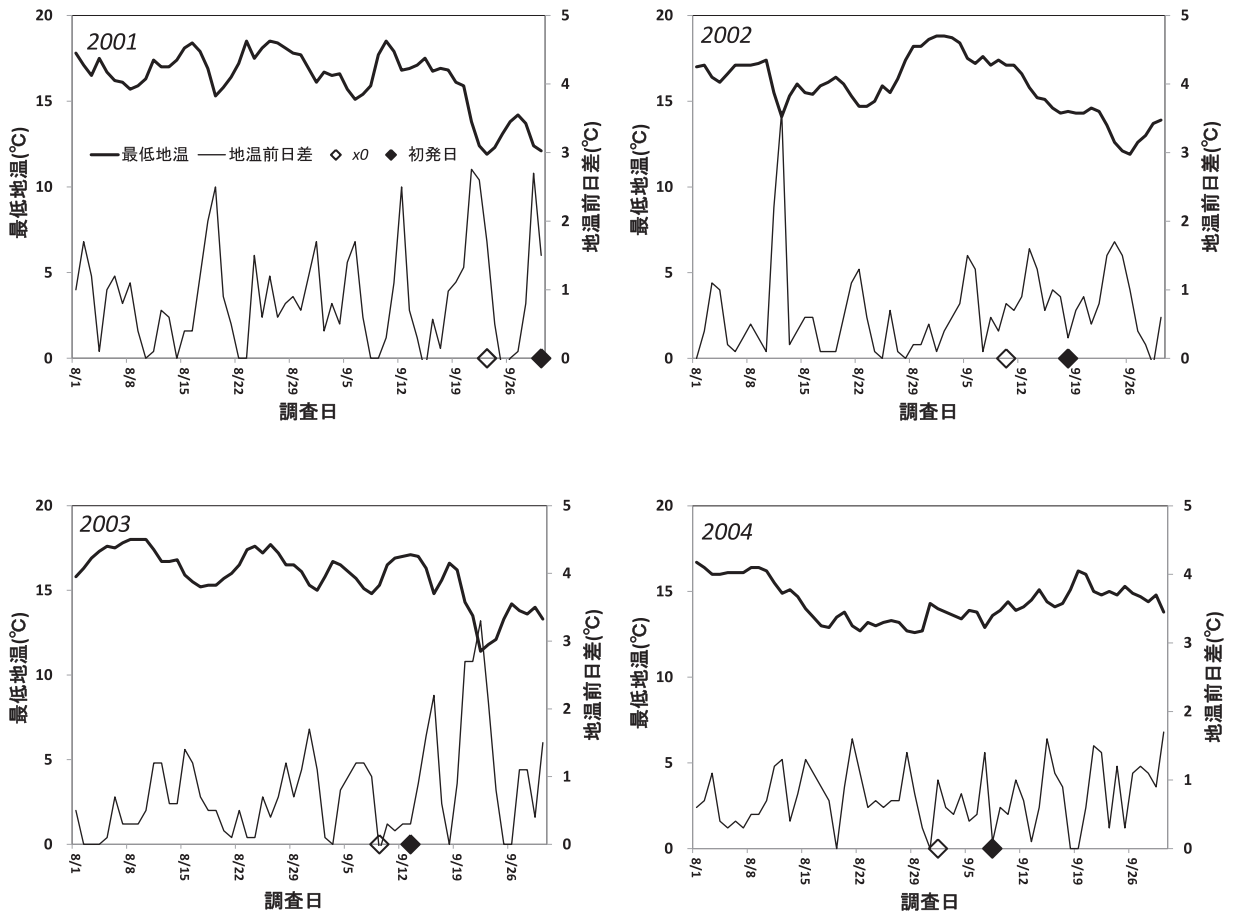


図 2-4-6 コロニー1 における最低地温，地温前日差の変化と，原基形成推定日および初認日
 左上の数字は調査年，太線(左縦軸)は，ジェネット 1a が属するコロニー1 の地下 5 cm における各日の最低地温，細線(右縦軸)は地温の前日差(調査日前日の最高地温から調査日の最低地温を減じた値)を示す。◆はジェネット 1a で子実体を最初に確認した日(初認日)，◇はジェネット 1a で最初に確認された子実体(◆に対応)の原基形成推定日(x_0)を示す。

表 2-4-1 岩手県四日市試験林内の 6 ジェネット で 2001 から 2004 年に推定した原基形成温度

調査年	ジェネット						平均 ± 標準偏差
	1a ***	2a ***	2b ***	5a ***	6a *	7g *	
2001	12.9 ± 0.5	12.8 ± 0.7	12.1 ± 0.3	- ± -	- ± -	12.3 ± 1.3	12.7 ± 0.7
2002	14.3 ± 1.6	13.3 ± 1.1	12.1 ± -	13.2 ± 1.8	14.0 ± 1.0	15.4 ± 2.6	14.0 ± 1.8
2003	16.5 ± 0.8	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -	16.5 ± 0.8
2004***	14.3 ± 0.4	15.4 ± 0.5	14.9 ± 0.7	16.5 ± 1.4	15.7 ± 0.8	17.0 ± 0.9	15.5 ± 1.3
平均±標準偏差	14.8 ± 1.6	13.7 ± 1.3	13.9 ± 1.5	14.8 ± 2.3	14.7 ± 1.2	15.3 ± 2.5	14.6 ± 1.8
子実体本数(本)	44	18	8	17	9	16	18.6 ± 13.1

表中の数字は原基形成温度(子実体の全長が 0 と推定された日(x_0)の最低地温)の平均値±標準偏差。-は子実体が発生しなかった, または発生本数 1 本で標準偏差が得られなかった(2002 年のジェネット 2b)ことを示す。ジェネット番号に続くアスタリスクマークは, 単純主効果判定で年次間に $p<0.001$ (***)または $p<0.05$ (*)で有意差が認められたことを示す。同様に, 単純主効果判定で 2004 年にはジェネット間に $p<0.001$ (***)で有意差が認められた。

第5節 マツタケの子実体発生量に影響を及ぼす気象条件

I. はじめに

これまでに述べた通り、マツタケの子実体は経済的価値が高く、発生地域の住民の重要な現金収入源となっているが(有岡 1997)、アカマツ等のマツ科樹木との共生菌であるために、腐生性の食用きのここと異なり施設栽培方法が確立されていない(鈴木 2005)。このため、子実体の生産量は自然発生量に規定され、不安定である。

一般にきのこ類の自然発生量は、気温や降水量といった気象条件に影響される(鈴木 1979)。マツタケも同様であることから(小川 1991; 藤田ら 2002)、発生量の安定化には、発生量変動要因の解析が不可欠である。こうした解析の多くは、主に温暖な関西地方の発生地で行われ、子実体の発生量には温度や降水量などが影響を及ぼすことが示されている(衣川 1965; 石川・竹内 1970; 川上 1990; 衛藤ら 1999)。前述のとおり、関西地方は古くからマツタケの主産地であったが(有岡 1997)、アカマツ林が松くい虫被害で減少しているために、生産量も低下している(松尾 2010; 農林水産省 2014)。現在の生産量は岩手県、長野県といった寒冷地域で多く(農林水産省 2014)、岩手県も今後主産地となる可能性が高いが、気象条件と子実体発生量の関係についての詳細な解析事例は少ない(大森 1997; Narimatsu *et al.* 2015)。さらに、マツタケの子実体は円形や弧状のコロニーから集団的に発生するが、コロニーの直径や円周長は経時的に拡大するため(第2章第3節)、子実体発生量に影響を及ぼす気象条件を検討する際には、円周長の拡大の影響を排除する必要がある。そこで本節では、寒冷地域におけるマツタケ子実体発生量に影響を及ぼす気象条件の解明を目的に、調査地でコロニーの円周長あたりの子実体発生本数と気象条件の変動を調査し、それらの関係を解析した。

II. 材料と方法

調査地

調査地内で数年間連続して発生した子実体の集団(コロニー)を5個選定した(*colony*1~5; 第2章第3節 図 2-3-1)。選定した各コロニーを対象に、以下に示す解析を行った。

気象データ

気温と降水量は、調査地最寄り(南東約10km)の地域気象観測システム(アメダス)観測所(岩手県盛岡市好摩, 北緯39度52分, 東経141度10分, 標高205m)の公表値を用いた(気象庁 2015)。地温は調査地の地表面下10cmに設置したセンサーにより測定し、測定値は1994年から1997年は自記式隔測温度計(いすゞ製作所)で、1998年以降は電子式データロガー(サーモレコーダーRS-12, エスペックミック社, 愛知)で記録した。後者の記録間隔は60分毎であり、24時間の測定値を平均して各日の平均地温とした。

気温について、3月から10月の各月と各月の10日毎(旬)で、日平均気温の平均値を算出し、各期間中の平均気温とした(表 2-5-1)。次に、3月から10月の各日を対象として、1994年から2011年の調査期間中における平均気温の平均値を算出し、これを平均気温の各日の平年値(年平均気温)とした。各年の3月から10月の各日で平均気温から年平均気温を減じ、日平均気温の平年偏差とした。この平年偏差を上述の各月、各旬で積算し、各期間の積算平均気温偏差とした。また、日平均気温が年平均気温を超えた日数を、同様に各期間で積算した。これらの値を、日最高気温、日最低気温についても同様に算出した。さらに、各日で平均気温が5℃、10℃、15℃、20℃および25℃を超えた場合、超過した値を上述の各期間で積算した。地温については、各年の8月下旬から10月中旬の各旬における平均値を算出した。降水量については、各月・各旬で積算降水量を算出した。また、1mm以上の降雨が観測された日を降雨日とし、その日数を各期間で気温と同様に積算した。さらに、気温と同様に降水量の各日の平年値を算出し、平年値からの偏差と、平年値を超えた日数を各期間で積算した。以上により得られた気象条件を以後の解析に供した。

コロニーの円周1mあたりの子実体発生本数の算出と、気象条件との相関分析

子実体の発生位置(第2章第3節 図 2-3-3)から、階層ベイズモデルを用いて各コロニーの直径を年毎に推定した(第2章第3節)。得られた直径からコロニーの円周を算出し、円周で子実体本数を除して、各年・各コロニーの円周1mあたりの子実体発生本数とした。なお、子実体が弧状、即ち円周上の一部のみで発生しているコロニー(例えば *colony*5-2)では、弧の両端を各年で正確に把握できないため、コロニ

一の形状を円形とみなして、円周 1 m あたりの子実体発生本数を算出した。得られた円周 1 m あたりの子実体発生本数を 5 個のコロニーで平均し、各年の円周 1 m あたりの子実体発生本数とした。また、円周 1 m あたりの子実体発生本数の頻度分布に基づき、各年の作柄を豊作、並作、不作に区分した。

発生量に影響を及ぼす気象条件を明らかにするために、円周 1 m あたりの子実体発生本数と各気象条件の単相関分析を行った。次に、子実体発生本数に及ぼす影響の大きい要因を選ぶために、単相関分析で Pearson の積率相関係数 r が 0.6 以上、有意確率 p が 0.05 未満を示した気象条件を説明変数に、円周 1 m あたりの子実体発生本数を応答変数に用いて複数の回帰モデルを作成し、重相関分析を行った。モデルの比較は赤池情報規準(AIC)に基づき、AIC の値の小さいモデルを、より予測精度の高いモデルとみなして、そのモデルに含まれる説明変数を、より影響の大きな要因とした。さらに、上記の説明変数を用いて主成分分析を行い、説明変数と作柄の関係を検討した。以上の解析は、統計言語 R ver. 3.1.2 (R development core team 2015) により行った。

III. 結果

子実体発生本数

コロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数と調査地全体の発生本数には、正の相関が認められた ($r=0.92$, $p<0.001$; 図 2-5-1)。円周 1 m あたりの子実体発生本数の年平均値は調査期間中で変動し、最大が 1994 年で 2.47 ± 1.73 SD 本/m, 最小が 1996 年で 0.00 本/m, 平均が 1.04 ± 0.60 SD 本/m であった(図 2-5-2)。コロニー間で比較すると、最大が colony1 (1.69 ± 1.54 本/m), 最小が colony6 (0.71 ± 0.67 本/m) であり、コロニー間には有意差が認められた ($p<0.05$, 一元配置分散分析)。

円周 1 m あたりの子実体発生本数は、コロニーの平均拡大速度(第 2 章第 3 節)と正の相関を示した ($r=0.61$, $p<0.01$, 図 2-5-3)。前年の円周 1 m あたりの子実体発生本数と、当年の円周 1 m あたりの子実体発生本数の相関は認められなかった ($r=0.02$, $p>0.05$; 図 2-5-4)。

各年におけるコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(図 2-5-2)に基づき、各年の作柄を区分した(図 2-5-5)。すなわち、円周 1 m あたりの子実体発生本数が 0.5 本/m 以下の 1996, 2001, 2003, 2006 お

よび 2011 年の各年を不作年($n=5$), 円周 1 m あたりの子実体発生本数が 1.5 本/m 以上の 1994, 1995, 1997, 1998, 1999 および 2010 年の各年を豊作年($n=6$), これらを除く各年を並作年($n=7$)とした。

子実体発生量に影響を及ぼす気象条件

円周 1 m あたりの子実体発生本数は、気象条件の一部と相関係数 $r>0.6$, 有意確率 $p<0.01$ の正の相関を示した(表 2-5-2)。これらのうち、降水量の代表値として「9 月下旬の降雨日数」(図 2-5-6)を選択した。また、子実体発生時期中の温度の代表値として、「9 月下旬の日最低気温の平均値」(図 2-5-7)を選択した。さらに、子実体発生時期前の積算温度の代表値として、積算対象期間が最も短い「4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数」(図 2-5-8)を選択した。「4~8 月の最高気温が平年値を超えた日数」も、 r が上記の「4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数」と同程度であったが、子実体発生本数の予測に用いることを考慮し、積算対象期間が短い後者(4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数)を選択した。「4~10 月の平均気温が平年値を超えた日数」は、 r が「4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数」より大きかったが、前者の積算対象期間は子実体発生時期の 10 月を含むため、予測に用いることは不適当と考え、選択しなかった。「7 月下旬の平均気温」, 「7 月下旬の最低気温」は、上記で選択した「4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数」と多重共線性を示すため、選択しなかった。

4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数, 9 月下旬の日最低気温の平均値, 9 月下旬の降雨日数を用いて主成分分析を行ったところ、第 1 主成分の寄与率(各標準偏差が標準偏差の合計に占める割合)は 0.892 と高く、第 2 主成分までの累積寄与率は 0.991 であった。そこで、第 1 主成分(横軸)と第 2 主成分(縦軸)の散布図を作成したところ(図 2-5-9), 第 1 主成分は不作年で低く、豊作年で高い傾向が認められた。さらに、第 1 主成分得点は 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数に応じて増大したことから(図 2-5-9), 両者の関係性が強いと判断される。一方、第 2 主成分は第 1 主成分と比較して明瞭な傾向が認められなかった(図 2-5-9)。

選択された上記 3 個の気象条件を説明変数に(表 2-5-3), 円周 1 m あたりの子実体発生本数を応答変数に用いた重回帰モデル(フルモデル)は、自由度調整済み寄与率 $R^2=0.568$, 有意確率 $P<0.01$, 赤池情報量

規準 $AIC=28.32$ であったが、フルモデルにおける 9 月下旬の降雨日数は有意ではなかった($p>0.05$)。そこで、4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数と 9 月下旬の日最低気温の平均値を説明変数に、円周 1 m あたりの子実体発生本数を応答変数に用いて重回帰分析を行ったところ、 $R^2=0.571$, $P<0.001$, $AIC=27.42$ と、フルモデルより AIC が小さく、予測精度が高い下記のモデル(日数気温モデル)が得られた。4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数と 9 月下旬の日最低気温の平均値との相関は $r=0.29$ ($p>0.05$)であり、両変数間の多重共線性は低いと判断された。これ以外の予測値の組み合わせでは、いずれも AIC が増大し、予測性が低下した(表 2-5-3)。

[日数気温モデル]

$$y=0.030x_1+0.101x_2-1.862$$

y = コロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数

x_1 = 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数

x_2 = 9 月下旬の最低気温

上記のモデルにより得られた予測値の変動傾向は実測値の変動傾向と同様であり(図 2-5-10)、1996 年、2001 年、2003 年、2006 年および 2011 年の不作年や、1994 年、1998 年、1999 年および 2010 年の豊作年などが再現されていた。また、予測値の実測値に対する寄与率は、 $R^2=0.62$ ($p<0.001$)と高かった(図 2-5-11)。

IV. 考察

子実体発生本数の変動と、コロニー拡大速度との関係

本節で用いたコロニー円周 1 m あたりの子実体発生本数には、コロニー周縁部の菌糸密度または原基数が反映されると考える。コロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数と調査地全体の発生本数には $r>0.9$ の高い正の相関が認められたことから(図 2-5-1)、円周 1 m あたりの子実体発生本数は、調査地全体の発生本数の変動傾向を反映しているとみなされる。

コロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数には、コロニー間で有意差が認められた。本節におけるコロニーは、*colony2*(複数のジェネットで構成)を除いて、第 2 章第 4 節のジェネット(図 2-4-1; 表 2-4-1)に相当する。(例えば *colony1* = *genet1*) 今回の調査は

同一の調査地で行い、調査区間で地温の顕著な差は認められず、林冠構成木のアカマツのサイズも、本章の調査区間では同程度であることから、温度に対する菌糸の反応、すなわち菌糸成長速度が、遺伝的に異なる可能性がある。

コロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数とコロニーの拡大速度には正の相関が認められたことから(図 2-5-3)、コロニーの拡大速度が大きい年には、菌糸密度や原基数も増大することが示唆される。一方、前年の円周 1 m あたりの子実体発生本数と当年の円周 1 m あたりの子実体発生本数の相関は低かったことから(図 2-5-4)、菌糸密度や原基数が翌年の発生量に及ぼす影響は小さいと判断される。

子実体発生時期前の気象条件が子実体発生本数に及ぼす影響

本節の研究により、子実体発生時期前における気温の、子実体発生に対する促進的効果が示された。温暖地域でマツタケの子実体発生量と気象条件の関係を解析した例は多いが(小川 1991; 藤田ら 2002 など)、気温の促進的効果を述べた例は少ない。一般にきのこ類の子実体発生量は菌糸量と原基数に影響されることから(Tokimoto *et al.* 1984; 時本 2010)、本節で見られた、気象条件とコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数の正の相関は、子実体発生前の菌糸成長と、子実体発生期の原基形成または原基成長の 2 側面から解釈することが可能である。

菌糸成長に関して、第 2 章第 3 節では、菌糸量を指標するであろうコロニーの拡大速度が、子実体発生時期前の気温(図 2-3-9)や子実体発生本数(図 2-3-15)と正の相関を示し、気象条件がコロニーの拡大速度を介して、コロニーあたりの子実体発生本数に影響を及ぼしている可能性を明らかにした。一方、本節で示した円周 1 m あたりの発生本数には、菌糸の密度が反映されると考える。このことから、本節で示した、子実体発生前の積算温度とコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数の正の相関は、菌糸の密度に温度が影響を及ぼすことを示唆する。さらに、コロニーの拡大速度と気温の関係(第 2 章第 3 節)を考慮すると、子実体発生時期前における気温は、コロニーの拡大速度(菌糸量)と菌密度の増大に寄与することが示唆される。

菌糸成長の最適温度は、菌根菌類のホンシメジが 24.9 °C(Ohta 1994)、腐生菌類のシイタケが 25~27 °C(大森 2001)、ムキタケが 20~23 °C(渡部 2001)、

ナメコが 22~28 °C(熊田 2001), マイタケが 26~30 °C(川島 2001)など, 25 °Cから 30 °Cであり, マツタケでも約 23 °Cとされる(浜田 1953; 山田・寺崎 1998)。本節では, 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数が, 円周 1 m あたりの子実体発生本数と比較的高い相関を示した。本調査地の子実体発生は 9 月以降であることから, 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数は子実体発生前の気温の高さと解釈できる。また, 地温は気温の影響を受けるため, 地温の変動傾向は 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数に反映されると推察される。調査地が存在する東北地方の北部は, 梅雨時期の気温が低い(気象庁 2015)。同地域において, 通常, 梅雨空けは 7 月中旬から下旬であるが(気象庁 2015), 年によって梅雨が 8 月まで続き, そのような年には夏季の気温が低い傾向が認められる。また, 本調査地における平均気温は関西地方よりも低く, 最高でも 22.8 °C(8 月)であることから(気象庁 2015), 菌糸は主として夏季に成長すると推察される。したがって, 夏季はその年の菌糸成長量を決定づけるうえで重要な時期であり, 4~7 月の気温が低い年は, 菌糸の伸長量も小さいと推測する。Clemmensen *et al.* (2006)や Simard & Austin (2010)は, 気温の上昇が外生菌根の菌糸成長を促進させる要因として報告している。また, 腐生担子菌類のシイタケでは, 菌床培養の中期に培養温度を 30 °Cに上げると子実体発生量が増加した(阿部ら 2002)。これらのことから, 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数が多い年は, 子実体発生前の地温が高くなり, 地下の菌糸密度が増大したため, 円周 1 m あたりの子実体発生本数が増大したと考えられる。

子実体発生前の温度は, コロニーの円周 1 m あたりの子実体原基形成数に影響を及ぼした可能性もある。シイタケの原基数は, 20 °Cで最大値を示す(時本・小松 1982)。小川・浜田(1976)は, 17~19 °Cでマツタケを培養し, 得られた菌糸塊を子実体原基としている。調査地の気温は温暖地域よりも低い。気温の推移は地温に影響を及ぼし(第 2 章第 4 節 図 2-4-3), 深さ 5 cm の地温は 8 月でも 20 °C未満の日が多い(第 2 章第 4 節 図 2-4-6)。このことから, 調査地の原基形成は基本的に低温により抑制されているが, 夏季の気温が高い年には原基が多く形成され, 円周 1 m あたりの子実体本数も増加したことが示唆される。

子実体発生時期の気象条件が子実体発生本数に及ぼす影響

9 月下旬の日最低気温の平均値と, 円周 1 m あたりの子実体発生本数の間で見られた正の相関については, 気温の低下が原基の形成や成長に及ぼす影響として解釈できる。すなわち, 子実体は菌糸中に形成された原基が成長することで顕れる(堀越・鈴木 1990)。また, 調査地におけるマツタケ原基形成温度または原基成長開始温度(発生温度)は, 約 15 °Cと推定されている(第 2 章第 4 節)。したがって, 9 月下旬の最低気温が低い年には, 地温の低下も早く, 発生温度を下回ることにより, 原基形成または原基成長が行われずに, 円周 1 m あたりの子実体発生本数が減少したと推察する。Yang *et al.* (2012) は, 本研究と同様に, 発生時期(8 月)の気温と子実体発生量に正の相関が認められることを, 中国の雲南省で行った調査に基づき示している。一方, 関西地方で行われた研究では, 発生時期の温度が高いと子実体発生量が減少することが示されている(衣川 1965; 竹内 1970)。前者(Yang *et al.* 2012)の調査地における夏季の平均気温は本調査地と同程度であることから, 本節および第 2 章第 4 節の解析で示された結果は, 寒冷地域に特徴的な傾向であると考えられる。

降水量が子実体発生本数に及ぼす影響

本調査地において, 降水量の影響は小さかった。降水量について, 関西地方や広島県で行われた研究ではその重要性が指摘されてきた(佐多 1937; 三木・阿部 1937; 衣川 1965; 竹内 1970; 枯木 1972; 川上 1990; 衛藤ら 1999)。また, 石川・竹内(1970)は, マツタケのコロニーに灌水し, 子実体発生本数を増加させた。一方, 本研究において, 単回帰モデルでは 9 月下旬の降雨日数と円周 1 m あたりの子実体発生本数の間に比較的高い相関が見出されるものの(図 2-5-6), 重回帰モデルの予測性は, 降水量を用いた場合に低下したことから, 降水量が発生量に及ぼす影響は, 気温, すなわち 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数や 9 月下旬の最低気温よりも小さいと考える。また, 9 月下旬の平均気温は 9 月下旬の降雨日数との間に正の相関を示したことから($r=0.65$, $p<0.01$), 9 月下旬には降雨が気温を介して円周 1 m あたりの子実体発生本数に影響を及ぼした可能性がある。

降水量の影響に関し, 仮に調査地の降水量が豊富であれば, 降水量が制限要因とならず, 円周 1 m あ

たりの子実体発生本数に及ぼす影響は小さいと推察される。そこで、年間降水量の積算値を本調査地と既報(浜田 1953; 川上 1994; 村田ら 2001; 鈴木 2005)の調査地と比較すると、本調査地が1145.9 mmであるのに対し、既報は1013.5 mm(北海道)から1491.3 mm(京都市)の範囲であり、本調査地は2番目に少なかった。また、子実体発生前の時期に相当する3月から9月の年間降水量の積算値では、本調査地が最も少なかった。これらのことから、本調査地の降水量が、既報(浜田 1953; 川上 1994; 村田ら 2001; 鈴木 2005)の調査地より顕著に多い事実はなく、積算降水量によって、降水量が子実体発生本数に及ぼす影響の小ささを説明することは困難である。一方、本研究の調査地の平均気温は、関西地方や広島県より低い。一般に気温が低いと、地表からの土壌水分の蒸散が抑制される。このことから、本研究の調査地では、温暖地域の調査地と比較して土壌の乾燥の程度が小さいため、降水量の影響が小さかったと考える。一方、本調査地と同様に寒冷な、北海道のトドマツ林における報告では、降水量を気温で除した値と子実体発生本数の間に有意な相関が見出されているが(村田ら 2001)、本研究で同様の解析を行っても、円周1 mあたりの子実体発生本数との間に有意な相関は認められなかった($r=0.14$, $p>0.05$)。ここで、本調査地の傾斜角は、マツタケの発生地としては小さい(第2章第1節)。一般に斜面の傾斜角が大きいと、土壌が乾燥しやすい。実際に、調査地の土壌マトリックポテンシャルは-6 kPaから-31 kPaであり(成松 2007)、他の調査地で報告された値(-49~-152kPa)(石川・竹内 1970)よりも大きく、土壌中には、他の発生地よりも多くの水分が含まれることが推察される。これらのことから、本調査地で降水量が子実体発生本数に及ぼす影響が温度よりも小さかった原因として、関西地方より気温が低いという、寒冷地域特有の条件に加え、既報よりも傾斜が緩く、土壌の圃場含水量が多いという調査地特有の条件により、降雨への依存度が低いことが推測される。

おわりに

以上のことから、本調査地におけるマツタケ子実体発生量の抑制要因は、菌糸成長期と子実体発生期の低温であること、いずれの期間でも降水量の影響は小さいことが明らかになり、高温や乾燥が発生量を抑制するという温暖地域の知見とは異なる結果が得られた。本研究では、温暖地域の解析結果と比較

することにより、寒冷地域の特徴を明らかにすることを試みたが、比較の対象とした既報は、いずれも実施年が異なる。一般に気温、降水量といった気象条件は年により異なる。さらに、平均気温は世界的に上昇しており(Stocker *et al.* 2013)、気温の上昇により寒冷地域における子実体発生量が増加する可能性もあるが、気候変動の影響は、子実体の発生時期にも影響を及ぼす(Kauserud *et al.* 2012; Boddy *et al.* 2014)。したがって、気象条件が子実体発生量に及ぼす影響について、寒冷地域の特徴を明らかにするためには、同一の時期に行われた解析結果を、長期間に亘り比較する必要がある。

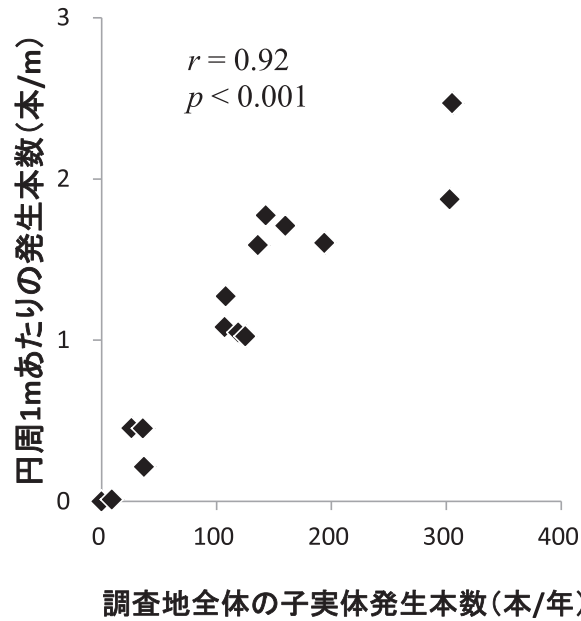


図 2-5-1 円周 1 m あたりの子実体発生本数と、調査地全体の子実体発生本数の関係
 縦軸にコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の、各調査年における平均値)、横軸に調査地全体の発生本数を示す。 r は Pearson の積率相関係数、 p は有意確率を示す。調査地全体の発生本数は、2007 から 2009 年に欠測であったため、上記の解析は 2007 から 2009 年のデータを除いて行った。

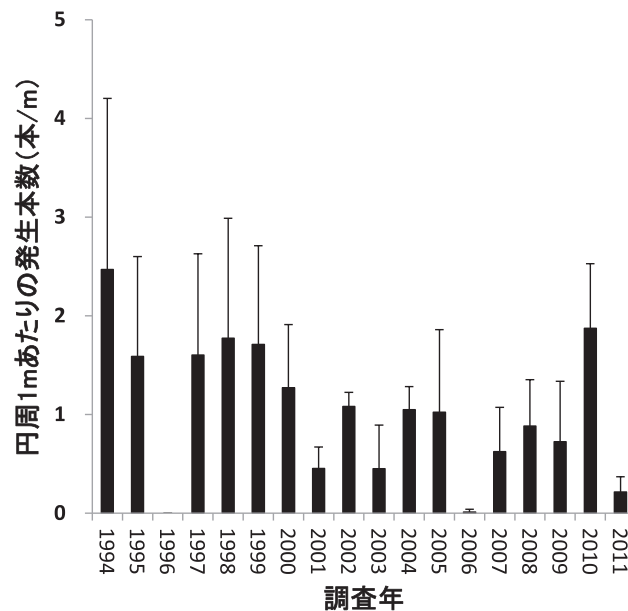


図 2-5-2 円周 1 m あたりの子実体発生本数の年次変動
 縦軸にコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の、各調査年における平均値)、横軸に調査年を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

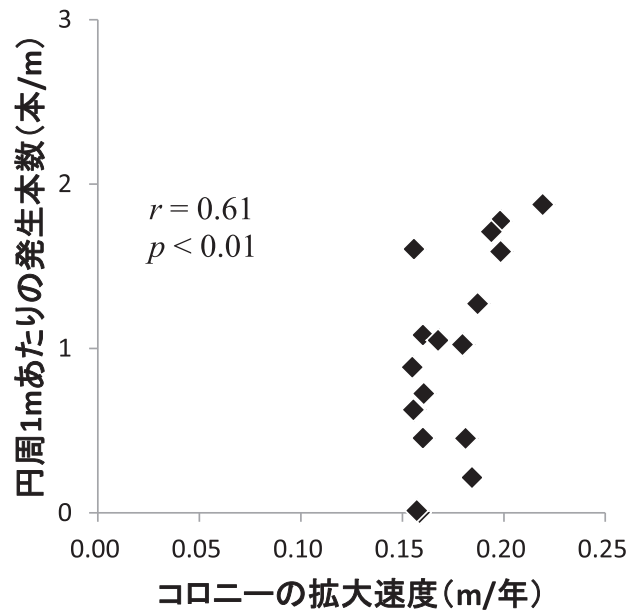


図 2-5-3 コロニーの拡大速度と円周 1 m あたりの子実体発生本数の関係

横軸に各年のコロニーの拡大速度の年平均値(第 2 章第 3 節参照), 縦軸にコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の, 各調査年における平均値)を示す。 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

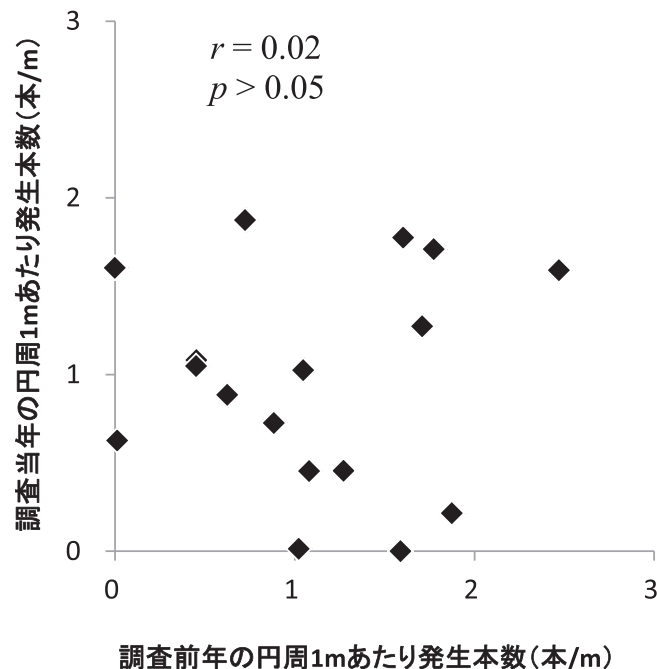


図 2-5-4 調査前年と当年の円周 1 m あたりの子実体発生本数の関係

縦軸に調査当年におけるコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の, 各調査年における平均値), 横軸に調査前年における円周 1 m あたりの子実体発生本数を示す。 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

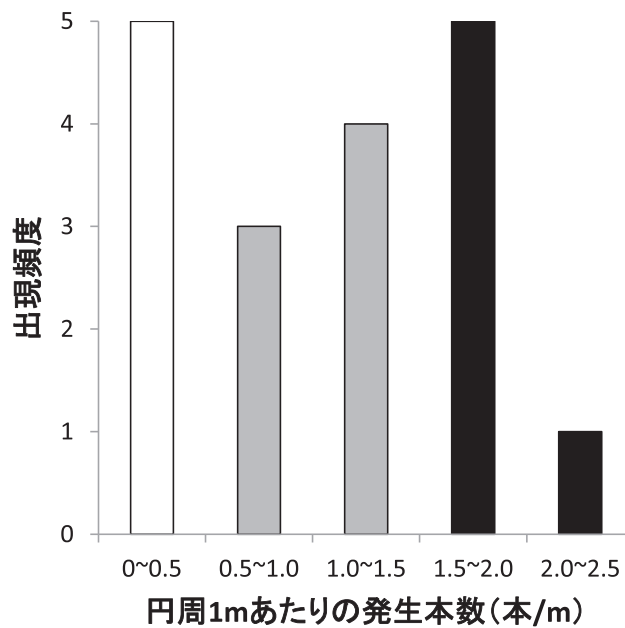


図 2-5-5 円周 1 m あたりの子実体発生本数の頻度分布と作柄の区分

横軸にコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の、各調査年における平均値)の階級区分、縦軸に各階級の出現頻度を示す。円周 1 m あたりの子実体発生本数が 0.5 本/m 未満の年を不作年(白色の棒)、1.5 本/m 以上の年を豊作年(黒色)、それ以外を並作年(灰色)とした。

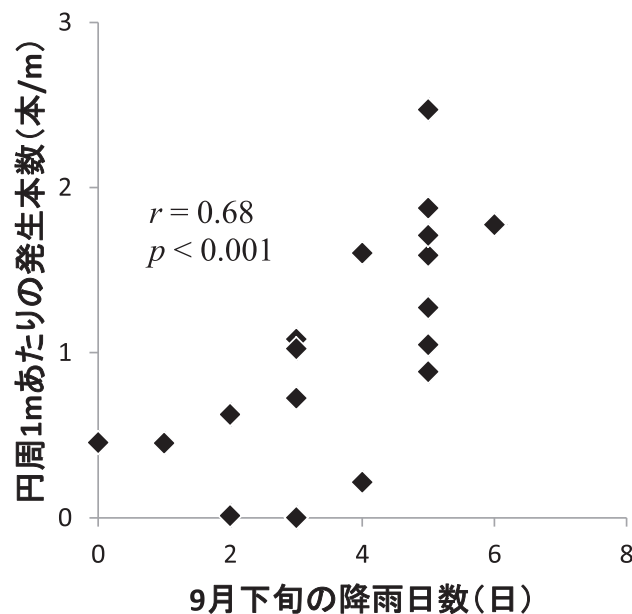


図 2-5-6 9 月下旬の降雨日数と円周 1 m あたりの子実体発生本数の関係

横軸に各年の9月下旬の1 mm以上の降雨日数、縦軸にコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の、各調査年における平均値)を示す。 r は Pearson の積率相関係数、 p は有意確率を示す。

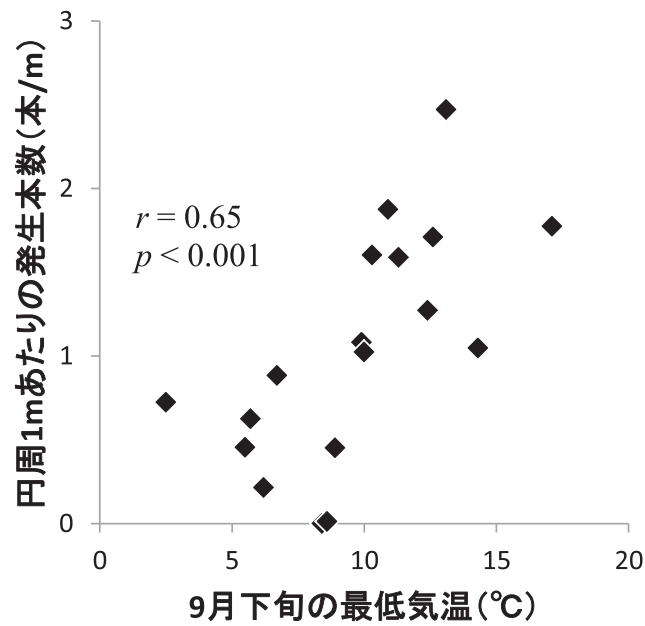


図 2-5-7 9月下旬の最低気温と円周1 m あたりの子実体発生本数との関係

横軸に各年の9月下旬の日最低気温の平均値, 縦軸にコロニーの円周1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の, 各調査年における平均値)を示す。 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

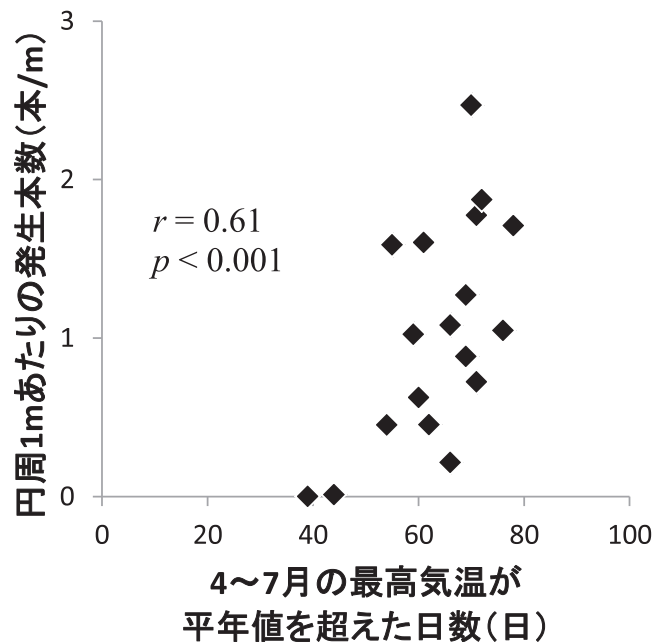


図 2-5-8 4~7月の最高気温が平年値を超えた日数と, 円周1 m あたりの子実体発生本数の関係

横軸に各年で4~7月の最高気温が平年値を超えた日数, 縦軸にコロニーの円周1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の, 各調査年における平均値)を示す。 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

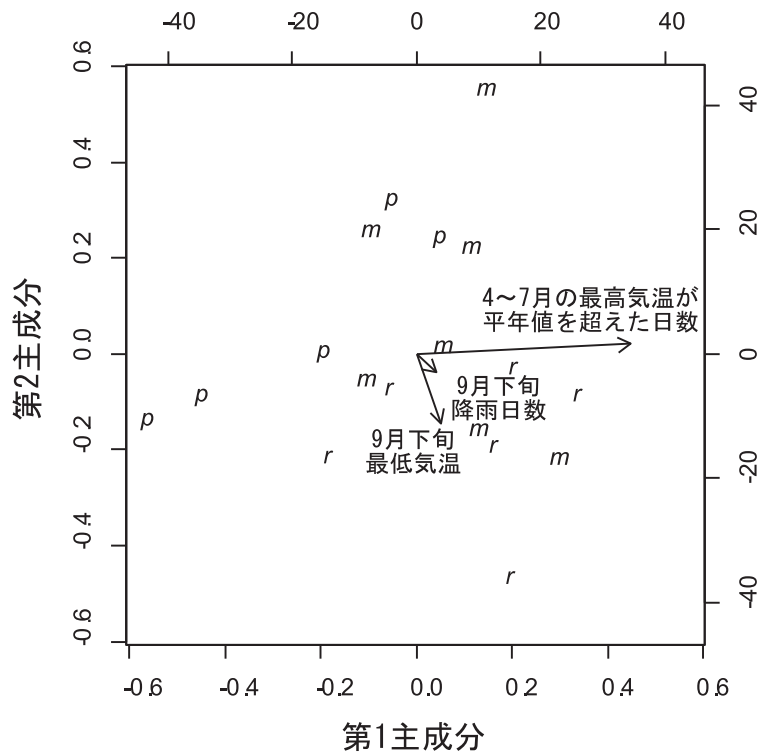


図 2-5-9 主成分分析による作柄の判別と主成分得点の分布

横軸に第 1 主成分，縦軸に第 2 主成分を示す。図中のアルファベットは各調査年の作柄を表し，それぞれ *r* : 豊作年，*m* : 並作年，*p* : 不作年を示す。上軸，右軸には各成分の主成分得点を示す。第 1 主成分は 4~7 月の最高気温が平年値を超えた日数と関係性が強い。

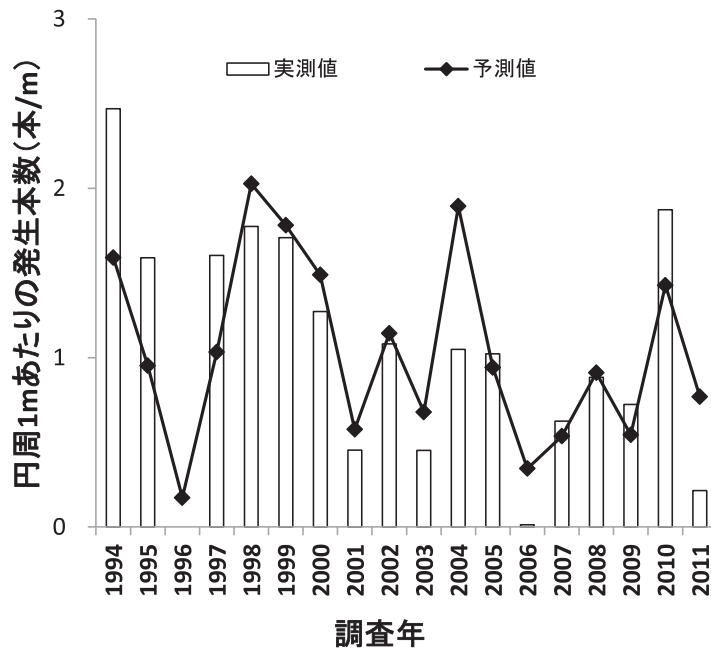


図 2-5-10 円周 1 m あたりの子実体発生本数の実測値と予測値の年変化

横軸に調査年，縦軸にコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の，各調査年における平均値)の実測値(棒)と予測値(折れ線)を示す。

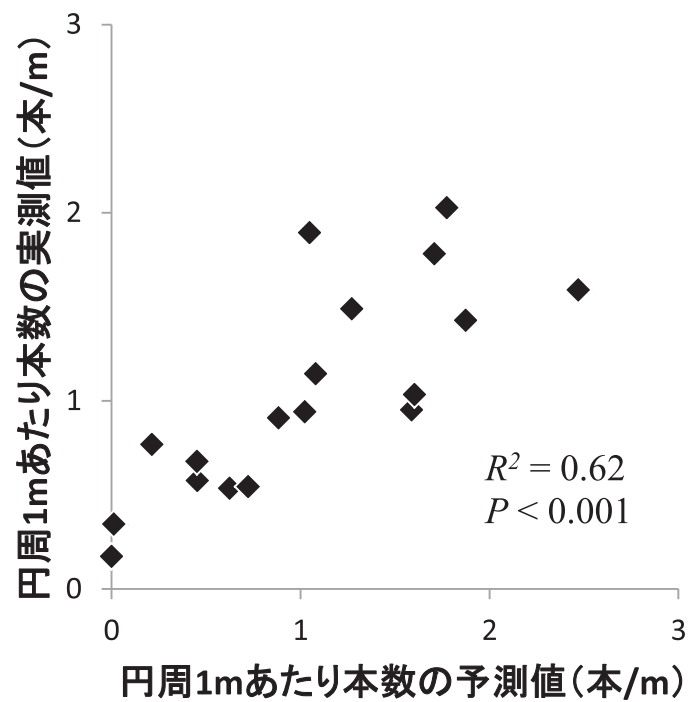


図 2-5-11 日数-最低気温モデルに基づく円周 1 m あたりの子実体発生本数の予測と実測値の関係
横軸にコロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の、各調査年における平均値)の予測値、縦軸に実測値を示す。 R^2 は寄与率、 P は有意確率を示す。

表 2-5-1 気象条件の要約

項目	集計方法
気温	最高, 最低, 平均 平年気温偏差 ^a の積算値 最高, 最低, 平均気温が各平年値を超えた日数 日平均気温の5°C・10°C・15°C・20°C・25°Cからの超過分
地温	平均
降水量	積算, 降雨日数(1mm以上), 平年降水量偏差の積算値 ^b 日降水量が平年値を超えた日数

各項目の集計期間は3月から10月の各月, 各月の10日毎(旬)および年。ただし地温は8月下旬から10月中旬の各旬。

^a1994年から2011年の各日における平均, 最高, 最低気温の各平均値(平年値)と観測値の差。

^b1994年から2011年の各日における降水量の平均値(平年値)と観測値の差

表 2-5-2 円周1 m あたりの子実体発生本数と気象条件の単相関分析結果

気象条件 ^a	相関係数 r	有意確率 p	説明変数 ^b
9月下旬の降雨日数	0.689	<0.001	+
7月下旬の平均気温	0.667	<0.001	-
9月下旬の最低気温	0.658	<0.001	+
7月下旬の最低気温	0.624	<0.001	-
最高気温が平年値を超えた日数(4~7月)	0.610	<0.001	+
最高気温が平年値を超えた日数(4~8月)	0.610	<0.01	-
平均気温が平年値を超えた日数(4~10月)	0.632	<0.001	-

^a コロニーの円周1 m あたりの子実体発生本数(各コロニーの子実体発生本数をコロニーの円周長で除した値の, 各調査年における平均値)との間に, $r>0.6$, $p<0.01$ の相関が認められた気象条件

^b 重回帰分析の説明変数として用いた気象条件を+で示す

表 2-5-3 円周1 m あたりの子実体発生本数と気象条件の重回帰分析結果

モデル	自由度調整済み寄与率 R^2	有意確率 P	AIC^a
日数 ^b +最低気温 ^c	0.571	<0.001	27.42
最低気温+降雨日数 ^d	0.489	<0.01	30.57
日数+降雨日数	0.494	<0.01	30.42
日数+最低気温+降雨日数	0.568	<0.01	28.32

^a 赤池情報規準

^b 最高気温が平年値を超えた日数の4~7月における積算値

^c 9月下旬の日最低気温の平均値

^d 9月下旬の1 mm以上の降雨日数

第6節 マツタケ子実体サイズと環境条件および遺伝条件の関係

I. はじめに

マツタケの経済的価値は高く、市場での単価は入荷量などの影響により変動するが、同一取引日における子実体一本あたりの単価は、主として重量やサイズと子実体の状態に規定される(マツタケ研究懇話会 1983)。従って、収入の向上には、子実体一本あたりの重量やサイズを増加させることが効果的である。

子実体の重量やサイズに影響を及ぼす要因として、マツタケと同様にハラタケ型の子実体を形成する数種類の担子菌では、子実体発生の温度(大平ら 1982)や湿度(鈴木 1988)といった環境条件が報告されている。マツタケ子実体の生重量の 88.3%は水分であることから(文部科学省 2005)、マツタケにおいても、少なくとも重量は水分に関連した環境条件に影響を受けることが予想される。また、マツタケの子実体は地下のコロニーから発生し(小川 1975a; Yamada *et al.* 1999a)、その成長過程で地中と大気中の二種類の環境にさらされるため、それぞれの環境における環境条件の影響を検討する必要がある。温度や水分量の影響に関して、マツタケでは主に発生量の変動要因の解明を目的とした研究が行われ(第2章第5節)、子実体の発生量には温度や降水量などが影響を及ぼすことが示されているが(石川・竹内 1970; 衛藤ら 1999; Narimatsu *et al.* 2015)、環境条件が子実体の重量に及ぼす影響は不明である。さらに、通常、コロニーの上には A₀ 層が堆積しており(小川 1975a)、その厚さが子実体の長さに影響を及ぼすことが示唆されているが(岩瀬・伊藤 1997; 藤田ら 2002)、寒冷地域における知見はない。

環境条件に加え、子実体のサイズは遺伝的な因子の影響も受ける(大平ら 1982)。この性質に基づき、腐生性菌類の数は品種登録制度の対象となっており(農林水産省 2015)、例えばシイタケ *Lentinula edodes* (寺島 2015)、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (Gaitán-Hernández and Salmones 2008) などでは系統選抜が行われている。しかし、マツタケは人工的な栽培が行われておらず、野外でも系統の判別が難しいことから、遺伝学的な背景に基づき子実体のサイズを比較した例は無い。一方、第1章で述べたように、近年、マツタケのジェネットを判別する SSR マーカーが開発され(Lian *et al.* 2003)、野外で自然発生

した子実体でも、系統の判別が可能となった。

そこで本節では、寒冷地域におけるマツタケ子実体重量やサイズの制御を目的に、気温、地温、降水量、土壌水分状態、A₀層の厚さといった環境条件や、SSR マーカーを用いて判別したジェネット(遺伝条件)が、子実体の重量やサイズに及ぼす影響を明らかにした。

II. 材料と方法

調査地

調査地内に5個の調査区を設け(site1~site 5、第2章第1節 図 2-1-1)、以下に示す調査を行った。

子実体発生調査

調査区における子実体発生期間を9、10月と想定し(大森 1997)、2001年から2005年の5年間の子実体発生期間中の概ね毎日、子実体の発生調査を行った。発生調査は前年の子実体発生地点付近の観察によった。子実体の一部が地表に露出し、もしくは地表の落葉層が顕著に盛り上がり、子実体の存在が地上から容易に認識される状態となった日を子実体発生日とした。

子実体の採取と生育期間の算定

2001年から2005年に、調査区内で発生したマツタケの子実体を全て採取した。マツタケ子実体の成長は、傘下面の膜が切れ、ヒダが開放(開傘)された後に停止する(浜田 1953; 衣川 1963; 成松 2005a)。そこで、重量とサイズを正確に把握するために、開傘後に子実体を採取した。採取に先立ち、子実体の軸と A₀ 層表面との接線を記録し、これを地際線とした。その後、子実体を軽く揺動して軸の基部と菌根層との接合部を切断し、採取した。軸の基部に付着した菌根や土などは、採取時に除去した。各子実体の発生日と採取日の間を生育期間とした。採取された子実体のうち、発生日を確認できなかったもの、成長停止までに腐敗したものなどを以後の解析から除いた。これらのうち、A₀層中で開傘した子実体の数は11本であった。以上の子実体を除く530本を以後の測定に供した。

子実体の測定

採取した全ての子実体の生重量を測定した。乾燥による重量の変化を防ぐために、子実体は測定の直

前まで保冷庫に保管し、かつ測定は採取から 24 時間以内に行った。測定には精密電子天秤(PM600, Mettler Toledo 社, 東京)を用いた。生重量の測定後、軸を傘から切断し、切断面と軸の末端の曲線長を、伸縮性の低い糸を用いて測定した。また、傘側の切断面と傘の頂部間の距離をノギスで測定した。これらの値を合算し、子実体の全長とした。採取時に記録した地際線と、軸の末端までの曲線長を測定し(第 2 章第 4 節, 図 2-4-1), この値を地下部長とした。さらに、全長から地下部長を減じ、その値を地上部長とした。なお、地下部長は、コロニー上部に堆積した A_0 層の厚さを近似する環境条件としても扱う(次項参照)。

環境条件の測定

気温と降水量は、調査地最寄り(南東約 10km)の地域気象観測システム(アメダス)観測所(岩手県盛岡市好摩, 北緯 39 度 52 分, 東経 141 度 10 分, 標高 205 m)の公表値を用いた(気象庁 2015)。地温は調査地の地下 5 cm に設置したセンサー(RTH-1010, エスペックミック社, 愛知)により測定し、測定値を一時間毎にデータロガー(RS-12, 同社製)で記録した。また、土壌中の水分状態の指標値として、土壌のマトリックポテンシャル(以下、 ψ_m と表記する)を測定した(小林 1999)。測定は調査地の地下 10 cm に設置したセンサー(SS-203A, ログ電子社, 札幌)により行い、測定値を一時間毎にデータロガー(D1 土壌水分 8A, ログ電子社, 札幌)で記録した。なお、 ψ_m は、その値が高いほど、生物にとって水が利用しやすい状態であることを示す。

以上の測定値から、測定の対象とした全ての子実体について、その生育期間中の日平均気温、日降水量、日平均地温の積算値と、 ψ_m の平均値を算出し、それらを各子実体の生育期間における環境条件とした。ここで、マツタケの子実体はコロニーから発生し(Lian *et al.* 2006)、本調査地のマツタケのコロニーは A_0 層の直下に存在する(Sawahata and Narimatsu 2006)。従って、本報で測定した地下部長(地際から軸の末端までの曲線長)は、コロニーの上部に堆積した A_0 層の厚さの近似値と考えられることから、地下部長も環境条件とみなして解析に用いた。

子実体の遺伝条件

遺伝条件として、子実体のジェネット区分を用いた。調査地では、本研究と同時期にマツタケ特異的

SSR マーカー(Lian *et al.* 2003)を用いたマツタケ子実体の SSR 解析が行われ、子実体のジェネットが特定された(Lian *et al.* 2006)。調査地で 2001 年から 2003 年に採取した子実体のうち、この解析でジェネットが特定された子実体を、本項の解析対象とした。Lian *et al.* 2006 による解析の結果、211 個の子実体が 23 タイプのジェネットに区分され、ジェネット毎の子実体本数は 2 個から 36 個、平均 9.1 ± 8.4 個/ジェネットであった。

データ解析

各条件で平均値を算出し、一元配置分散分析で条件間の差の有意性を検定した。有意確率 $p < 0.05$ で有意差が認められた場合には、Tukey の方法による多重比較を用いて、組み合わせごとの有意差を $p < 0.05$ で検定した。また、子実体サイズに及ぼす影響の程度を環境条件と遺伝条件で比較するために、子実体サイズを応答変数、環境条件と遺伝条件を説明変数に用いた一般線形モデルを構築し、モデルの AIC(赤池情報規準)を算出した。以上の解析は統計言語 R 3.1.2 (R development core team 2015)で行った。

III. 結果

子実体発生量

2001 年から 2005 年に発生した子実体の総重量、本数、平均重量を表 2-6-1 に示す。総重量は年次間で異なり、最小値は 2943.8g(2001 年)、最大値は 24664.8g(2004 年)であった。発生本数も同様の傾向を示した。子実体の 1 本当たり重量の年平均値は最小値が 84.5g/本(2005 年)、最大値は 137.7g/本(2004 年)、5 年間の平均値は 99.3g/本であった。重量に関し、2004 年を除く年次間の差は小さかった。

子実体の生重量

子実体生重量の 2001 年から 2005 年の各年における相対頻度分布を図 2-6-1 に示す。相対頻度は、頻度分布図に示した各階級に属する子実体本数を、各年の合計本数で除することにより算出し、百分率で表した。相対頻度は階級により異なり、分布型は右裾広がりの一山型であった。300g 以上の子実体の多くは、年毎の平均重量と発生量が最大であった 2004 年に発生した。2004 年を除く年次間では、分布型の顕著な違いが認められなかった。

子実体のサイズ

子実体の全長、地下部長、地上部長を表 2-6-2 に示す。5 年間の平均値は全長が 134.9 mm、地下部長が 56.5 mm、地上部長が 78.4 mm で、地下部長が全長に占める割合は 41 %であった。全長、地上部長の各項目は年次間で有意差が認められた($p < 0.01$, 一元配置分散分析)。これらとは逆に、地下部長の年次間での差は小さかったが($p > 0.05$, 一元配置分散分析)、2004 年と 2003 年は他の年よりも長い傾向を示した。全長と地下部長(図 2-6-2)、全長と地上部長(図 2-6-3)、には、それぞれ $r > 0.7$ ($p < 0.01$) の高い正の相関が認められた。一方、地上部長と地下部長の相関は $r = 0.08$ ($p < 0.05$) と低かった(図 2-6-4)。

子実体の生重量とサイズの関係

子実体の生重量と全長には、相関係数 $r = 0.61$ の正の相関が認められた(図 2-6-5)。また、生重量と地上部長(図 2-6-6)、地下部長(図 2-6-7)との相関係数 r は、それぞれ 0.56、0.34 であった。そこで、子実体生重量を応答変数に、地上部長、地下部長を説明変数として重回帰分析を行った結果、以下に示す重回帰式が得られた。

$$y = 1.76x_1 + 1.04x_2 - 92.74 \quad (R^2 = 0.40, P < 0.001)$$

ただし y : 子実体生重量, x_1 : 地上部長, x_2 : 地下部長, R^2 : 自由度調整済み寄与率, P : 有意確率

これらの結果から、子実体の生重量はその全長が伸びるほど増し、生重量の増加に与える影響は、地下部よりも地上部が大きいことが明らかになった。

環境条件と子実体サイズの関係

子実体の生重量と相関が高かった地上部長について、環境条件の各項目と回帰分析を行った結果、いずれの項目も地上部長との相関が低かった(表 2-6-4)。また、地下部長と環境条件の相関も、これらと同様に低かった(表 2-6-4)。一方、地下部長は A_0 層の厚さを近似するが、前述のとおり、地下部長と全長の相関は $r = 0.71$ と高かった(図 2-6-2)。

遺伝条件と子実体生重量および子実体サイズの関係

子実体の生重量はジェネットでも異なった(図 2-6-8)。2001 年から 2003 年に採取した子実体を対象に、23 タイプの各ジェネットでも生重量の平均値を算出した

ところ、最小で 45.0 g(ジェネット 7n)、最大で 139.1 g(ジェネット 2a)であった。ジェネット間には $p < 0.001$ で有意差が認められた。

子実体の全長もジェネットでも異なった(図 2-6-9)。2001 年から 2003 年に採取した子実体を対象に、23 タイプの各ジェネットでも全長の平均値を算出したところ、最小で 110.5 mm(ジェネット 1a)、最大で 182.1 mm(ジェネット 2a)であった。ジェネット間には $p < 0.01$ で有意差が認められた。ジェネットの地理的な分布と全長の間には、一定の傾向は見いだせなかった。すなわち、特定の調査区に全長の大きな(或いは小さな)ジェネットが分布することはなかった。

ジェネット毎の地下部長もジェネット間で異なった(図 2-6-10)。ジェネット毎の地下部長は最小で 38.2 mm(ジェネット 7n)、最大で 89.3 mm(ジェネット 7k)であり、全長と同様にジェネット間で有意差が認められた($p < 0.01$)。子実体全長の平均値について、ジェネット間で多重比較を行った結果、ジェネット間に有意差($p < 0.05$)が認められたのは 253 組み合わせ中 15 組み合わせであった。これらの 15 組み合わせのうち 11 組み合わせは、地下部長に有意差($p < 0.05$)が認められなかった。

ジェネットの地上部長も、ジェネット間で異なった(図 2-6-11)。ジェネットの地下部長と地上部長の間には、有意な相関が認められなかった($p > 0.05$, 図 2-6-12)。また、ジェネットの地上部長と子実体発生本数にも、有意な相関が認められなかった($p > 0.05$, 図 2-6-13)。

遺伝条件と環境条件が子実体サイズに及ぼす影響の比較

応答変数に子実体の全長を、説明変数にジェネット、地下部長(A_0 層の厚さ)、地下部長とジェネット双方を用いた 3 種類の一般線形モデルを構築し(それぞれジェネットモデル、地下部長モデル、フルモデルとする)、モデル間で AIC を比較した。その結果、 AIC はジェネットモデルが 2002、地下部長モデルが 1949、フルモデルが 1919 であり、地下部長とジェネット双方を用いたフルモデルの予測性が最も高かった。このことから、子実体の全長に及ぼす影響は、遺伝条件(ジェネット)より環境条件(地下部長)が大きい、その影響は相加的であることが示唆される。

地下部長が同程度のジェネットでも地上部長に違いが見られたことから(前項)、応答変数に子実体の地上部長を、説明変数に積算降水量、ジェネット、

積算降水量とジェネット双方を用いた3種類の一般線形モデルを構築し(それぞれ降水量モデル, ジェネットモデル, フルモデルとする), モデル間でAICを比較した。その結果, AICはジェネットモデルが953, 降水量モデルが911, フルモデルが967であり, ジェネットよりも降水量を用いたモデルの方が, 予測性が高かった。このことから, 子実体の地上部長に及ぼす影響は, 遺伝条件(ジェネット)よりも環境条件(子実体の生育期間中の降水量)が大きい, その影響は小さい(表2-6-4)ことが示唆される。

IV. 考察

子実体重量, サイズの年変動

子実体生重量の相対頻度分布は年によって異なり, 生重量が350gを超える子実体の多くは2004年に見られた。また, 地下部長は2004年と2003年と他の年より長い傾向を示した。さらに, 2004年は発生量が最大であった。発生量が多い年には, より深い場所に位置するコロニー(深いコロニー)からの発生頻度が高まる(成松・小岩 2011)。これらのことから, 2004年には深いコロニーからの発生量が増大し, 地下部長や生重量の頻度分布に影響を及ぼしたと推察される。

環境条件と子実体重量およびサイズとの関係

子実体の生重量と全長には正の相関が認められた。すなわち, 子実体の生重量はその全長が伸びるほど増し, 生重量の増加に与える影響は, 地下部よりも地上部が大きいことが明らかになった。子実体のサイズと, 子実体生育期間中の温度, 降水量や土壌水分ポテンシャルといった環境条件との相関は低かった。腐生性担子菌類のアカヒダワカクサタケ(*Hebeloma vinosophyllum*)の子実体を培地上で発生させた実験では, 空気中の湿度に応じて子実体の柄が長くなるなど, 湿度がサイズに影響を及ぼす(鈴木 1988)。一方, マツタケの菌糸は土壌中に存在する(小川 1975a)。地下のコロニーから菌傘までが連結した菌糸で構成されるというマツタケの子実体の構造から(水口 2002), 土壌から子実体に水分が移動することが推察される。本調査地の土壌マトリックポテンシャルは-6 kPaから-31 kPaであり(成松 2007), 他の調査地で報告された-49 kPaから-152 kPa(石川・竹内 1970)よりも大きく, 本調査地の土壌中には, 他の発生地よりも多くの水分が含まれている。これらのこ

とから, 少なくとも本調査地において, 子実体サイズに対する降水量や土壌水分ポテンシャルの影響は小さいと推察される。

本研究では対象としなかったが, 二酸化炭素濃度や光の波長も子実体のサイズに影響を及ぼす環境条件である(堀越・鈴木 1990)。施設内で栽培するブナシメジ(*Hypsizigus marmoreus*)では, 二酸化炭素濃度が子実体の全長に影響を及ぼし, 1300 ppm程度で全長が最大となる(松山ら 1997)。また, 同様に施設栽培のシイタケでは, 青色発光ダイオードの照射により, 子実体の傘の直径が増大する(阿部・西澤 2011)。一方, マツタケは野外で発生するため, 施設内で栽培されるきのこよりも, 二酸化炭素濃度や光から受ける影響は小さいと考えられる。土壌の空隙率や堅密度も, 土壌中のガス濃度や水分量, さらに子実体成長の物理的な抑制を介して子実体サイズに影響を及ぼす可能性があるが, これらに関する知見はなく, 今後の研究が必要である。

これらと異なり, 地下部長により近似されるA₀層の深さは, 子実体の全長との間に高い相関を示した。材料と方法で示した通り, A₀層中で開傘した子実体は少なかったことから, 成長を開始した子実体の多くは, 少なくともその頂部がA₀層の上に露出するまでは成長を続けることが推察される。また, 子実体のサイズに示した通り, 地下部長は全長の41%を占める。従って, A₀層の厚さが地下部長を規定し, その結果が全長や生重量にも反映されたと考える。

以上のことから, 野外におけるマツタケの子実体の重量やサイズに影響を及ぼす主要な環境条件は, A₀層の厚さと結論付ける。

遺伝条件と子実体重量およびサイズの関係

子実体1本あたりの生重量はジェネットで異なった。生重量が最大の2aと最小の7nで比較すると, 2aが7nの3.0倍となる。子実体の品質が同等であれば, この重量比は価格比となる。ここで, 平成27年次の東京都卸売市場築地市場における国産マツタケの平均単価は34,181円/kgであり(東京都中央卸売市場築地市場 市場統計月報・産地別取扱実績(まつたけ)), この単価に前述の重量比を乗じると, 2aと1aの子実体1本あたりの金額の差は3,216円となる。これらのことから, マツタケの栽培における, 遺伝的な選抜の重要性が示唆される。

子実体の地上部長もジェネット間で異なったが, 地上部長と環境条件の相関は低かった(前項参照)。

一方、子実体の地下部長もジェネット間で異なったが、地下部長が同程度のジェネット間でも地上部長は異なった。これらのことは、遺伝的な因子も子実体のサイズに影響を及ぼすことを示唆する。菌根性きのこは一般に栽培が困難であり(山田 2002)、子実体のサイズを菌株間で比較した例はない。本研究は野外で発生したマツタケの子実体サイズを遺伝学的な背景に基づいて比較した最初の例であり、マツタケでも腐生性の担子菌類と同様に(長谷部ら 1998)、遺伝的な因子が子実体のサイズに影響を及ぼすことが示唆された。

遺伝条件と環境条件が子実体サイズに及ぼす影響の比較

子実体の全長は地下部長と地上部長で決定される。このうち、調査地における地下部長は環境条件(A_0 層の厚さ)と同等とみなされ、全長に及ぼす影響は遺伝条件(ジェネット)より大きかった。地上部長と環境条件の相関は概して低かったが、地上部長への影響は遺伝条件よりも積算降水量が大きいことが、モデルの比較により示唆された。マツタケも他の担子菌類と同様に子実体サイズが遺伝的に規定されていると推察されるが、野外では、環境が制御されている栽培施設内に比べ、子実体生育期間中の環境条件、特に気象条件の変動が大きいため、子実体の地上部長に顕れる遺伝的な影響が低下したと考える。

おわりに

以上の結果から、 A_0 層の厚さを変えることにより、子実体の全長を制御できる可能性が示唆された。実際に、湿潤させたオガ粉を用いたコロニーの被覆により子実体を大型化させた事例も報告されている(藤田ら 2002)。一方で、 A_0 層が厚い場所ではマツタケ菌と競合する菌類が増加する(小川 1977b; 伊藤・小川 1979; 下川 1981)。また、被覆処理による発生量への影響も不明である。従って、子実体サイズの制御については、今後の検討が必要である。また、子実体サイズは遺伝的な因子にも影響を受けることから、将来の人工栽培化を考慮すると、コロニー毎に子実体の平均的なサイズを把握したうえで、適当なコロニーから菌株を分離すれば、目的に応じた菌株を選択できると考える。一方、腐生性担子菌類では、子実体のサイズは菌糸量当たりの子実体発生本数にも影響を受けることが知られ、菌糸量が同程度であれば、発生本数と子実体サイズには負の相

関がみられる。今後は、ジェネット毎に菌糸量と発生量を把握し、子実体サイズとの関係を明らかにする必要がある。

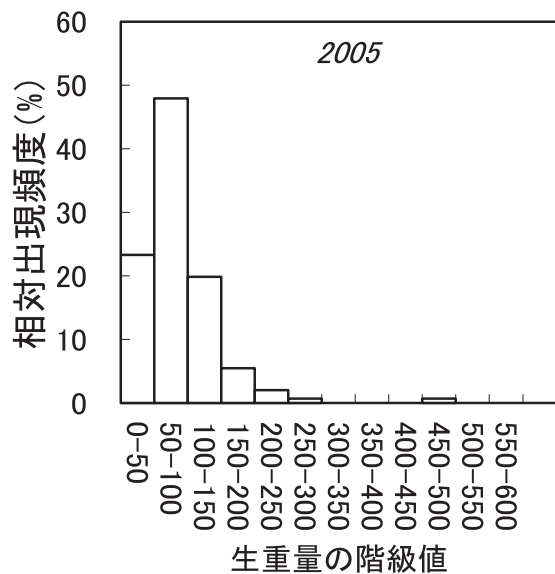
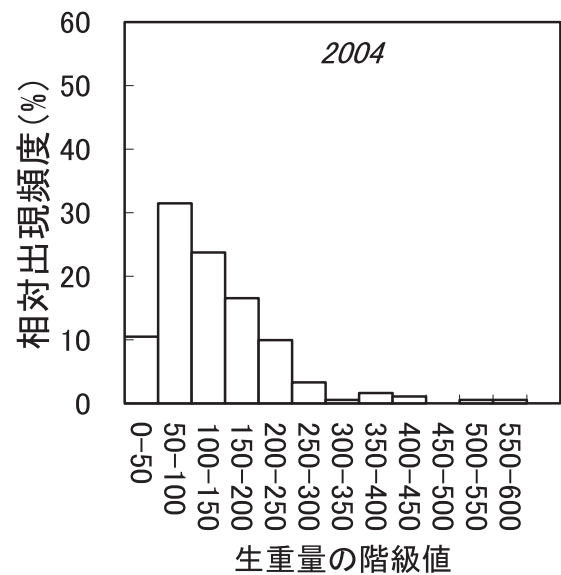
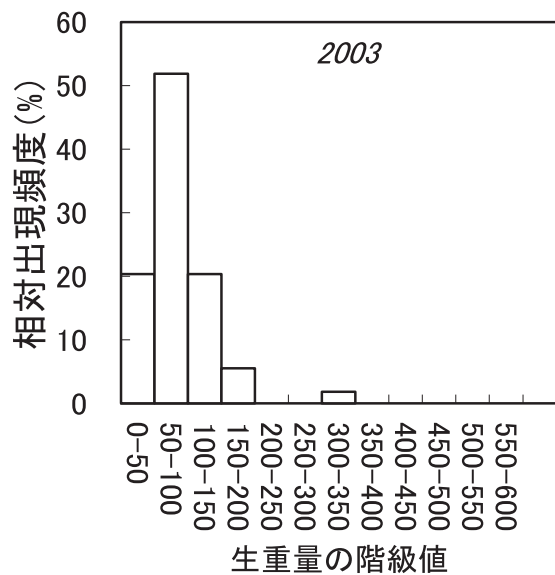
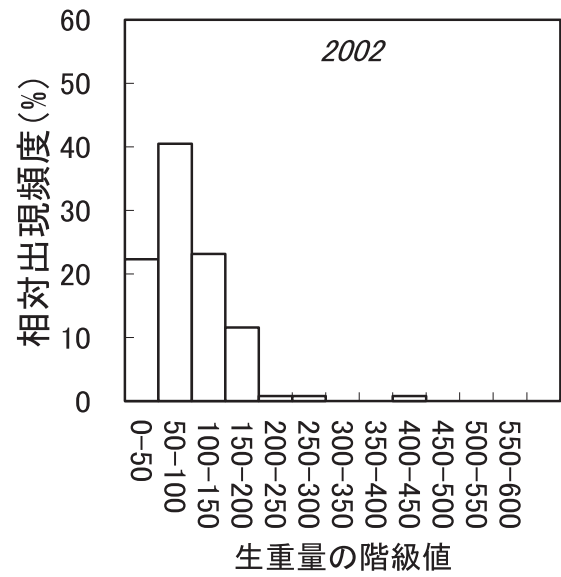
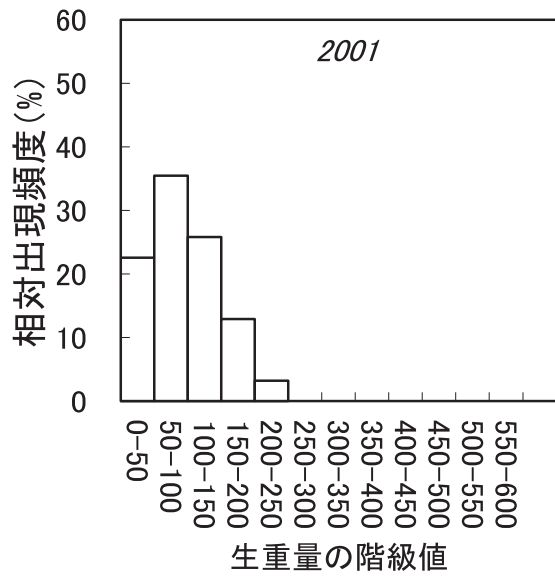


図 2-6-1 子実体生重量の相対頻度分布
2001 から 2005 年の各年における子実体生重量。横軸の数字はデータが属する階級の上限值を示す。

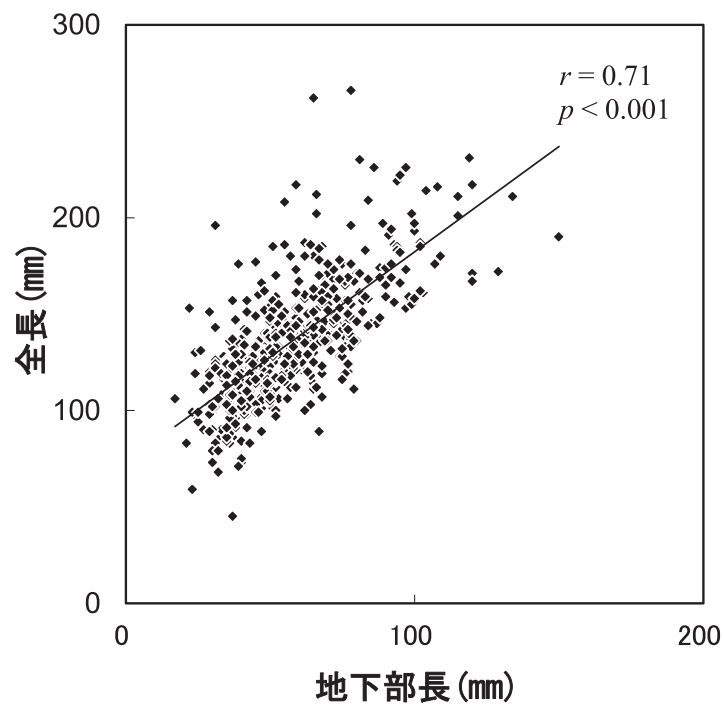


図 2-6-2 子実体の地下部長と全長の関係

r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

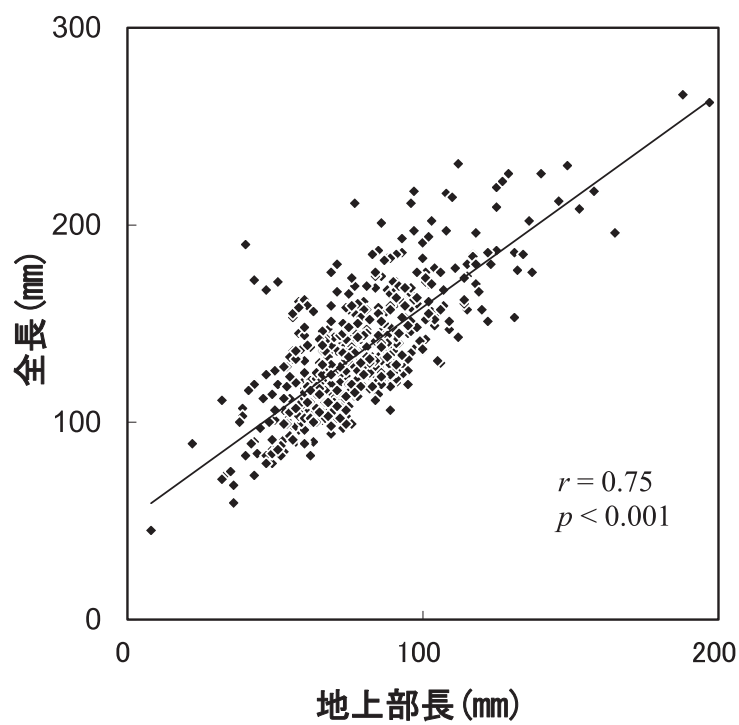


図 2-6-3 子実体の地上部長と全長の関係

r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

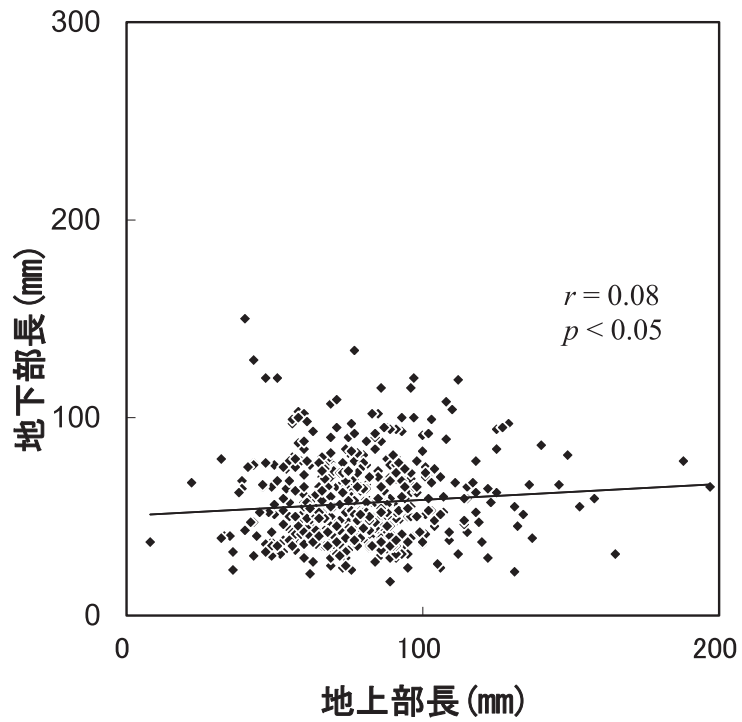


図 2-6-4 子実体の地上部長と地下部長の関係
 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

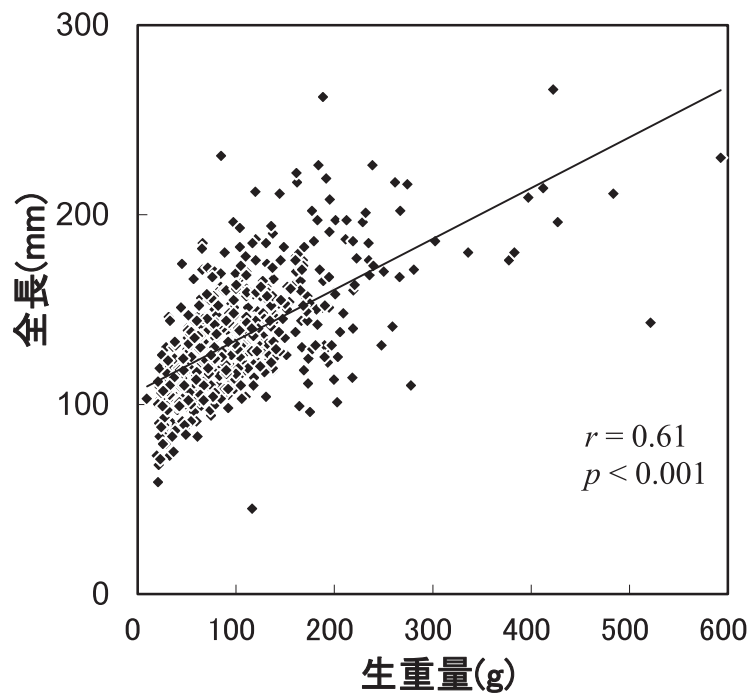


図 2-6-5 子実体の生重量と全長の関係
 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

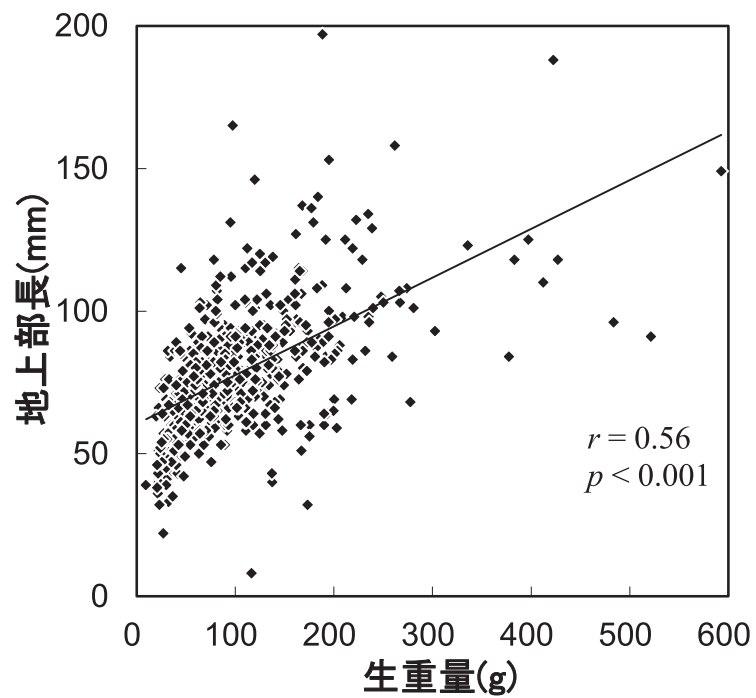


図 2-6-6 子実体の生重量と地上部長の関係

r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

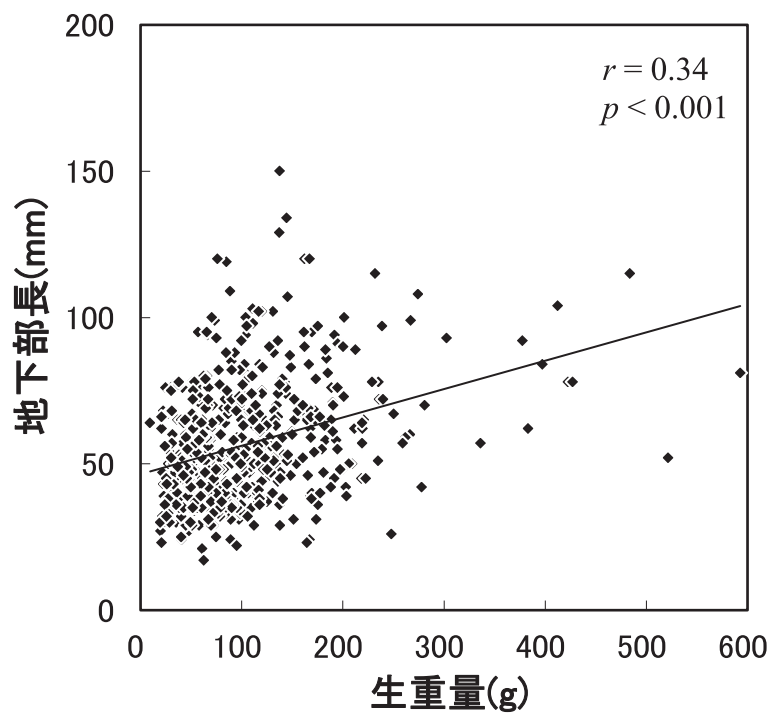


図 2-6-7 子実体の生重量と地下部長の関係

r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

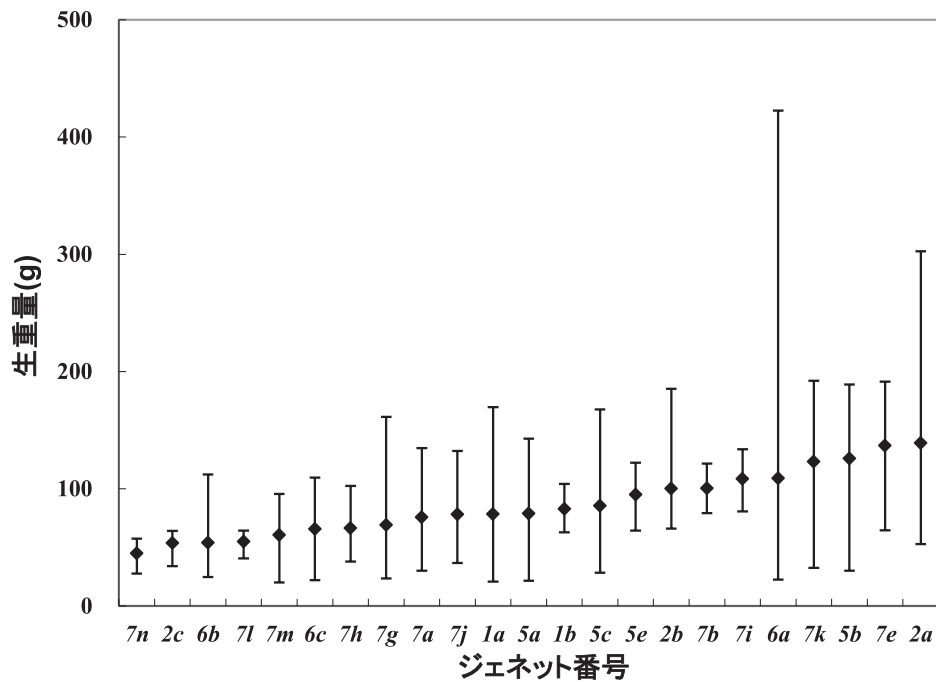


図 2-6-8 ジェネットごとの子実体の生重量

2001年から2003年に採取した子実体のジェネットを、Lian *et al.* (2006)に基づき区分し、ジェネット毎に子実体の生重量の平均値を算出した。横軸はジェネット番号、バーの上端は最大値、下端は最小値を示す。

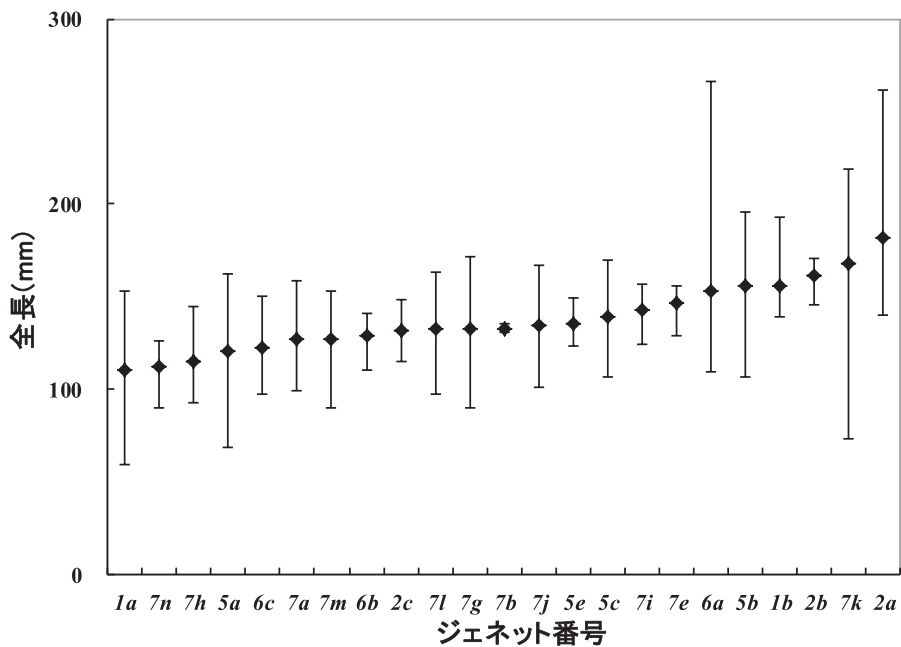


図 2-6-9 ジェネットごとの子実体の全長

2001年から2003年に採取した子実体のジェネットを、Lian *et al.* (2006)に基づき区分し、ジェネット毎に子実体の全長の平均値を算出した。横軸はジェネット番号、バーの上端は最大値、下端は最小値を示す。

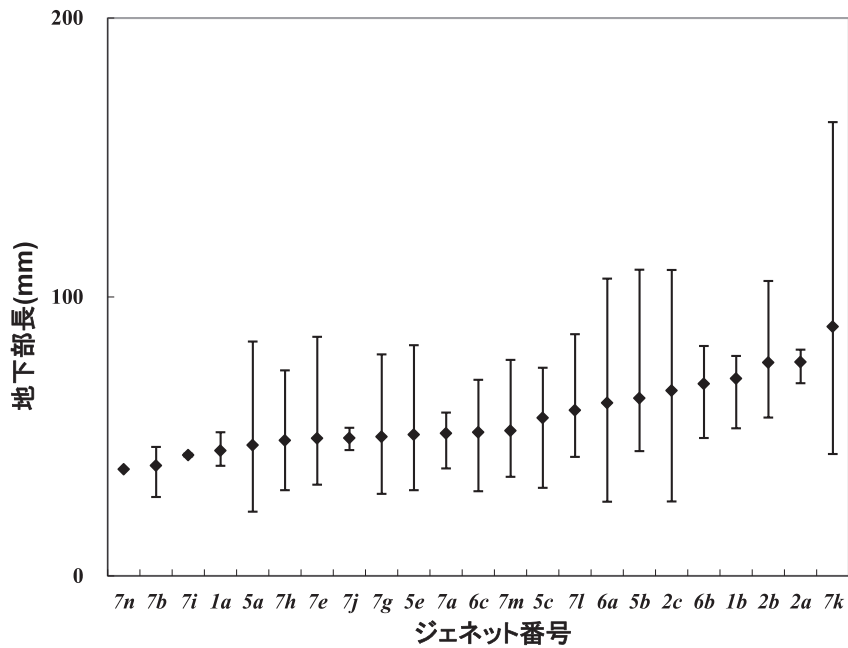


図 2-6-10 ジェネットごとの子実体の地下部長

2001年から2003年に採取した子実体のジェネットを、Lian *et al.* (2006)に基づき区分し、ジェネット毎に子実体の地下部長の平均値を算出した。横軸はジェネット番号、バーの上端は最大値、下端は最小値を示す。

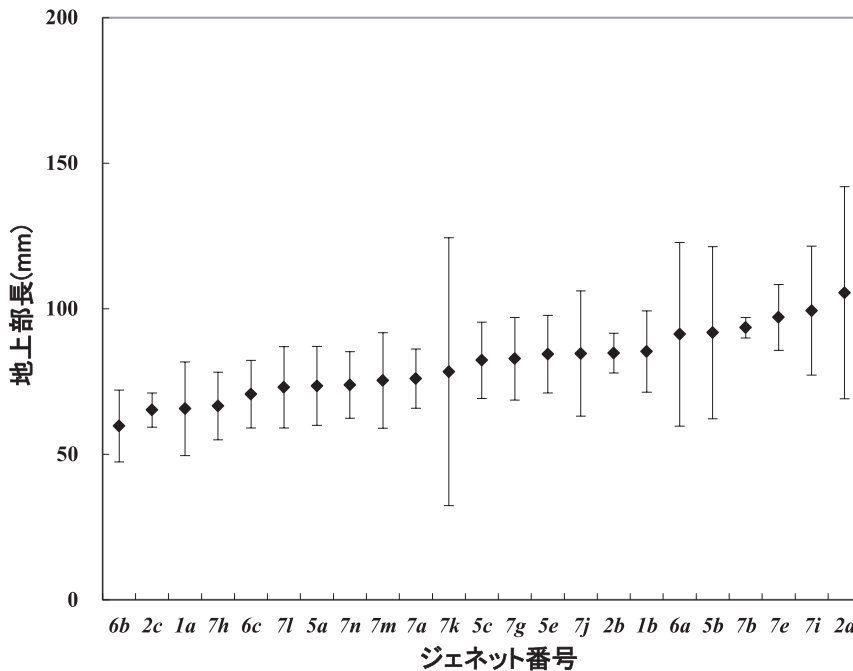


図 2-6-11 ジェネットごとの子実体の地上部長

2001年から2003年に採取した子実体のジェネットを、Lian *et al.* (2006)に基づき区分し、ジェネット毎に子実体の地上部長の平均値を算出した。横軸はジェネット番号、バーは標準偏差を示す。

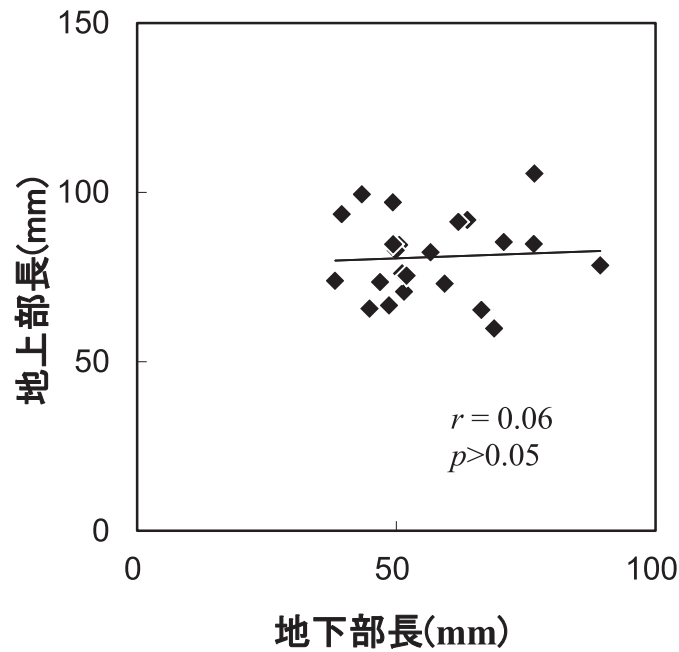


図 2-6-12 ジェネットの地下部長と地上部長の関係

横軸は各ジェネットの地下部長の平均値, 縦軸は各ジェネットの子実体地上部長の平均値を示す。2001年から2003年に採取した子実体を対象とし, 子実体のジェネット区分は Lian *et al.* (2006)によった。 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

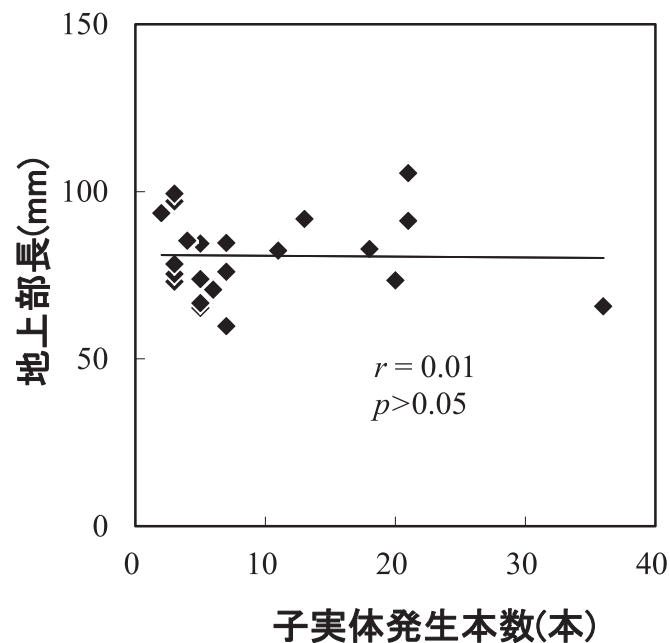


図 2-6-13 ジェネットの子実体発生本数と地上部長の関係

横軸は各ジェネットの子実体発生本数の平均値, 縦軸は各ジェネットの子実体地上部長の平均値を示す。2001年から2003年に採取した子実体を対象とし, 子実体のジェネット区分は Lian *et al.* (2006)によった。 r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

表 2-6-1 岩手県林業技術センター四日市試験林に設置した 5 調査区における 2001 年から 2005 年の子実体発生量と本数

調査年	総重量 (g)	本数 (本)	平均重量 (g/本)
2001	2943.8	31	94.9
2002	11278.0	121	93.2
2003	4568.8	53	86.2
2004	24664.8	179	137.7
2005	12341.0	146	84.5
平均	11159.3	106.0	99.3

表 2-6-2 岩手県林業技術センター四日市試験林に設置した 5 調査区で 2001 年から 2005 年に発生した子実体の全長, 地下部長および地上部長の年平均値

調査年	全長 (mm)	地下部長 (mm)	地上部長 (mm)
2001	140.7 ± 44.8 ab	57.6 ± 26.6	83.0 ± 34.0 abc
2002	138.4 ± 30.1 a	54.1 ± 17.5	84.2 ± 22.6 a
2003	131.4 ± 32.5 ab	58.1 ± 23.7	73.2 ± 19.3 bc
2004	138.7 ± 32.3 a	58.1 ± 20.8	80.6 ± 22.1 ab
2005	127.3 ± 25.7 b	55.6 ± 19.4	71.7 ± 16.5 c
平均	134.9 ± 31.5	56.5 ± 20.5	78.4 ± 22.1

表中の数字は[平均値±標準偏差]を示す。アルファベットは年次間に $p < 0.05$ で有意差が認められたことを示す。(Tukey-Kramer の多重比較)

表 2-6-3 岩手県林業技術センター四日市試験林に設置した 5 調査区における 2001 年から 2005 年の環境条件の年平均値

調査年	積算気温 (°C)	積算降水量 (mm)	積算地温 (°C)	平均 ψm (KPa)
2001	122.3 ± 38.2 bc	22.2 ± 17.3 a	122.5 ± 37.0 ab	-31.0 ± 14.1 a
2002	156.3 ± 50.6 a	66.5 ± 26.4 b	145.5 ± 41.8 c	-26.2 ± 15.9 a
2003	122.0 ± 41.9 b	22.2 ± 18.6 a	117.4 ± 38.3 a	-21.2 ± 8.7 b
2004	142.8 ± 42.8 c	75.4 ± 47.9 b	135.0 ± 39.4 bc	-13.0 ± 10.2 c
2005	138.9 ± 43.0 bc	20.9 ± 11.8 a	139.1 ± 43.5 bc	-6.0 ± 1.9 d

子実体ごとに算出した値を, [平均値±標準偏差] で示した。 ψm は土壌のマトリックポテンシャル。アルファベットは年次間に $p < 0.05$ で有意差が認められたことを示す。(Tukey-Kramer の多重比較)

表 2-6-4 岩手県林業技術センター四日市試験林に設置した 5 調査区における 2001 年から 2005 年の地上部長, 地下部長と環境条件の関係

	積算気温		積算降水量		積算地温		平均 ψm	
	r	p	r	p	r	p	r	p
地上部長	0.08	>0.05	0.19	<0.001	0.07	>0.05	0.08	<0.01
地下部長	0.29	<0.001	0.14	<0.001	0.31	<0.001	0.01	>0.05

r は Pearson の積率相関係数, p は有意確率を示す。

第3章 寒冷地域産の菌株を用いたマツタケ菌根苗の培養

第1節 菌糸成長至適温度の推定

I. はじめに

第3章では、マツタケの栽培化を目指した菌根合成試験について述べる。前述のとおり、マツタケの人工的なコロニー形成は、菌根苗を接種源に用いた1例(枯木・川上 1985)のみで成功している。他の例では植栽後に菌根苗が死滅、あるいは菌根が植穴の外部に伸長しないことが問題である。さらに寒冷地域では、菌根苗の培養における重要な条件である菌糸成長至適温度も不明である。今後、寒冷地域での栽培化を実現させるためには、菌糸成長温度の解明や、菌根苗の培養が必要である。一方、こうした試験に他の地域の菌株を用いると、遺伝的な攪乱を招く恐れがある。そこで第3章では、寒冷地域産の菌株を用いた菌糸培養試験と菌根苗育成試験を行うこととした。

一般に菌糸の成長速度は、生育環境中の温度、水分量、養分量、酸素濃度といった条件に影響される(Carlile *et al.* 2001)。これらのうちで温度は、森林内における子実体発生量変動要因の解析(第2章第3節、第5節)や、菌根苗の培養(第3章第3節)を行う上で重要な要因である。多くの真菌類の菌糸成長温度は、0℃から40℃の範囲である(Carlile *et al.* 2001)。このうち、20℃より上では生育できない菌は低温菌、20℃より下では生育できない菌は高温菌と総称されるが、大多数はこれらの中間的な温度帯を好む中温菌である(Carlile *et al.* 2001)。マツタケの菌糸成長至適温度は20℃から25℃の範囲とされることから(小川 1991; 山田・寺崎 1998)、前述の区分における中温菌に該当すると推察される。しかし、寒冷地域の菌株で菌糸成長至適温度を調査した例はなく、岩手県産の菌株に関する知見もない。一方、同一の温度でマツタケの菌糸を培養しても、菌糸成長速度は菌株によって異なる可能性がある(衣川 1990)。マツタケの菌糸成長速度は、アマタケ(*Suillus bovinus*)やホンシメジ(*Lyophyllum shimeji*)といった、アカマツ林で生育する他の外生菌根菌よりも遅いため(浜田 1953; Ohta 1990; 小川 1991)、接種源の作成を目的とした菌糸の培養では、成長速度の速い菌株が有利である。そこで、岩手県産のマツタケ菌株を用いて温度別の菌糸成長速度を測定し、菌糸成長至適温度を

調査した。併せて、菌株間の菌糸成長速度の差異や、菌糸成長速度と子実体サイズとの関係を検討した。

II. 材料と方法

菌糸成長至適温度の推定

菌株は、岩手県林業技術センター保有の11-1, 11-3, 11-5, 11-6, 11-8, 11-9, 11-14株の7系統と、岩泉まつたけ研究所より譲渡を受けた1101株の、合計8系統を用いた。いずれも岩手県内で1990年(1101株)または1999年(1101株以外)に採取した子実体より分離した菌株である。このうち11-8株、11-9株および1101株は岩手県下閉伊郡岩泉町で、それら以外は調査地(第2章第1節)で採取した。菌株は供試まで改変浜田斜面培地(第2章第1節)を用いて継代培養法により保存した。

菌株の前培養は浜田平板培地(2.0% グルコース, 0.2% 酵母エキス, 1.5% 寒天, 脱イオン水; pH=5.0)(小川 1991)で23℃の暗黒条件下にて行った。成長した菌叢の周縁部を、コルクボウラー($\phi=5$ mm)で打ち抜いて、浜田液体培地(2.0% グルコース, 0.2% 酵母エキス, 脱イオン水; pH=5.0)に接種し、15℃と25℃で培養した。反復数は各菌株、培養温度あたり4個である。さらに、菌糸成長至適温度を正確に推定するために、11-9株を5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃および30℃の5℃刻み、6段階の温度で培養した。各条件の供試数は5℃が3個, 10℃が4個, 15℃から25℃が6個, 30℃が3個である。いずれの培養も温度勾配培養器(MTI-202A, EYELA 社, 東京)を用いて暗黒条件下で行った。試験体を30日間静置培養した後、形成された菌糸塊を取り出し、脱イオン水で十分に洗浄した後、あらかじめ絶乾重量を測定したガラス製秤量瓶に入れ、105℃で8時間乾燥後、精密電子天秤(AT-400, Mettler Toledo 社, 東京)で重量を測定した。

菌糸伸長速度のジェネット間比較および子実体サイズとの関係

菌株は05-33株, 05-58株, 05-122株, 05-129株, 05-148株, 05-149株, 2010-11株, 2011-62株, 2011-97株, 2012-02株, 2012-04株, および2010-18株の12系統を用いた。これらの菌株は、いずれも調査地内の異なるジェネット(第2章第2節)の子実体から分離されたものである(図3-1-1)。分離は2005年から2012年に掛けて行い、菌株番号の最初の05は2005年、

2010-は2010年, 2011-は2011年, 2012-は2012年に, それぞれ分離した菌株であることを示す。菌株の前培養は MYPG 平板培地(pH=5.0, 第2章第1節)で 23 °C の暗黒条件下にて行った。伸長した菌叢の周縁部を, コルクボウラー($\phi=5$ mm)で打ち抜いて, pH=5.2 の MNC 平板培地(Yamada and Katsuya 1995) の中心に接種した。接種後は 23 °C の暗黒条件下にて培養し, 7日ごとに28日目まで計4回, 菌叢の半径を測定した。なお, 半径の測定は, 接種片を中心として直交する2測線上で行った。反復数は各菌株4枚とした。各菌株で培養14日目, 28日目における平均値を算出し, それぞれ一元配置分散分析で菌株間の平均値の差の有意性を検定した。有意確率 $p<0.05$ で有意差が認められた場合には, Tukey の方法による多重比較を行った。さらに, 各ジェネット で2010年に発生した子実体の全長, 重量およびジェネットの存在する深さ(地下部長; 子実体採取時の地際から軸の末端の曲線長。第2章第4節)を平均し, 各平均値と培養28日目における菌叢の平均半径との相関分析を行った。

III. 結果

菌糸成長至適温度の推定

岩手県産の8系統の菌株を 15 °C と 25 °C で 30 日培養した結果, いずれの菌株も 15 °C より 25 °C で成長が良い傾向が認められ(図 3-1-2), 平均値は 15 °C が 2.9 ± 1.6 SD mg, 25 °C が 4.8 ± 3.1 mg であった。このうち H-5 株, H-6 株, H-8 株は, 15 °C より 25 °C の菌糸乾燥重量が有意に多かった($p<0.05$, t-検定)。15 °C と 25 °C の培養における, 菌糸乾燥重量の菌株間の順位には, 正の相関が認められた(図 3-1-3 ; $r=0.88$, $p<0.01$)。

岩手県内で分離した H-9 株を 5 °C から 30 °C の 5 °C 刻み, 6 段階で培養した結果, 最低値の 5 °C, 最高値の 30 °C を含む各温度で菌糸が成長した(図 3-1-4)。菌糸乾燥重量は 5 °C から 20 °C にかけて概ね同程度の割合で増加したが, 25 °C から 30 °C に掛けては顕著に減少した。菌糸乾燥重量の最大値は 20 °C で 7.0 ± 1.1 mg, 最低は 30 °C で 3.3 ± 0.5 mg, ついで 5 °C で 3.6 ± 0.5 mg であり, 培養温度間に有意差が認められた(一元配置分散分析, $p<0.05$)。また, 5 °C と 20 °C, 15 °C と 30 °C, 20 °C と 30 °C の各温度間にも, 有意差が認められた($p<0.05$, Tukey の多重比較)。

菌糸伸長速度のジェネット間比較および子実体サイズとの関係

異なるジェネットから分離した 12 菌株を 23 °C で培養したところ, 培養 14 日目における菌叢の平均半径の平均値は 17.1 ± 1.4 SD mm, 菌糸伸長速度は 1.22 mm/日であった(図 3-1-5)。平均半径の最大値は 20.0 ± 0.8 mm (05-122 株), 最小値は 14.3 ± 0.7 mm (2012-18 株)であり, 菌株間に最大 1.4 倍の差があった。平均半径には菌株間で有意差が認められ(一元配置分散分析, $p<0.001$), 多重比較でも 66 組み合わせ中 37 組み合わせで有意差が認められた($p<0.05$, Tukey の多重比較)。同様に, 培養 28 日目における菌叢の平均半径の平均値は 24.9 ± 1.6 SD mm, 菌糸伸長速度は 0.88 mm/日であった(図 3-1-5)。平均半径の最大値は 28.1 ± 1.1 mm (05-122 株), 最小値は 22.2 ± 0.8 mm (05-33 株)であり, 菌株間に最大 1.2 倍の差があった。平均半径には菌株間で有意差が認められ(一元配置分散分析, $p<0.001$), 多重比較でも 66 組み合わせ中 33 組み合わせで有意差が認められた($p<0.05$, Tukey の多重比較)。

培養 14 日目と 28 日目の菌叢半径の順位に関し, 上位と下位の各 3 菌株は, 培養 14 日目と 28 日目で共通だった。これらを除く一部の菌株間では, 培養 14 日目と 28 日目で順位の入れ替わりが認められた。すべての菌株における, 培養 14 日目と 28 日目の順位相関係数は 0.88 であった。

培養 28 日目における菌叢の平均半径と, 各菌株が属するジェネットから 2010 年に発生した子実体の平均全長, 平均生重量, ジェネットの深さの平均値との相関係数 r は, それぞれ -0.02, -0.0, および 0.12 であり, 子実体のサイズや環境条件と菌糸伸長速度の間には, 明瞭な相関が認められなかった。

IV. 考察

寒冷地域産菌株の菌糸成長至適温度

岩手県内で分離したマツタケ H-9 株の, 30 日間培養後の菌糸乾燥重量は, 5 °C から 20 °C にかけて概ね同程度の割合で増加し, 25 °C から 30 °C に掛けて急激に減少した。このことから, 寒冷地域の岩手県内で得られたマツタケの菌糸成長至適温度は, 20 °C 前後に存在することが推定された。こうした傾向は, 京都府産(浜田 1974)や茨城県産(山田・寺崎 1998)の菌株を用いて行われたマツタケの温度別成長試験

の結果と同様である。さらに、他の7菌株を15℃と25℃で培養したところ、いずれも25℃で成長が良く、低温で相対的に良好な成長を示す知見は得られなかった。これらのことから、寒冷地域に生育する系統であっても、菌糸成長至適温度は、温暖地域に生育する系統と同程度であることが推察された。調査地は冷温帯に属し、温暖地域よりも低温である。温暖地域の菌株と成長至適温度が同程度であれば、温暖地域の発生地と比較して、菌糸成長が旺盛な期間が短いと考える。このことは、第2章第3節と第5節で示した、夏季の温度がコロニーの拡大や子実体発生量に促進的効果を及ぼすという見解を支持する。一方、前述(第2章第4節)のとおり、原基形成温度は温暖地域より低いと推察されたことから、岩手県産菌株の、寒冷的な気候への適応は、栄養成長面よりも生殖成長面で実現されていると結論付ける。菌糸成長至適温度より低い培養温度、例えば10℃における、温暖地域産の菌株との成長速度の比較が、今後の課題である。

菌糸成長速度の菌株間での比較

培養至適温度付近にて、液体培地と平板培地で複数の菌株を培養したところ、培養終了後の菌糸乾燥重量や菌叢半径はそれぞれ菌株間で異なり、菌叢半径の最大と最小の差は1.4倍であった。玉田・練(2004)は、本研究の調査地で得た複数の孢子分離株(複核菌糸)を比較し、同様に2.5倍の差を報告している。さらに、平板培養において、菌株間の菌叢半径の順位は、培養14日目と28日目で類似する傾向がみられ、この傾向は菌叢半径の上位と下位の菌株で顕著であった。以上の結果から、菌糸成長が速い菌株を得ようとする場合には、培養試験による選抜が有効であり、培養14日目の菌叢半径に基いた早期選抜の可能性が見出された。

菌糸成長速度と子実体サイズ、環境条件との関係

子実体のサイズや環境条件と菌糸成長速度の間には、明瞭な相関が認められなかった。28日間培養後の菌叢半径が最大であった05-122株と最小であった05-33株は、それぞれジェネット5*b*と1*b*に該当するが(第2章第4節図2-4-1)、これらの子実体全長は、いずれも上位に属する(第2章第6節 図2-6-9)。また、A₀層の深さを近似する地下部長も、05-122株と05-33株と同程度であった。これらの結果から、菌糸成長速度と子実体サイズ(第2章第6節)は、そ

れぞれ遺伝的な因子の影響を受けるものの、遺伝的因子から菌糸成長速度と子実体サイズが受ける影響は、必ずしも同調的ではないことが示唆される。菌糸伸長速度とコロニー拡大速度や菌根形成効率との関係は、今後の検討課題である。

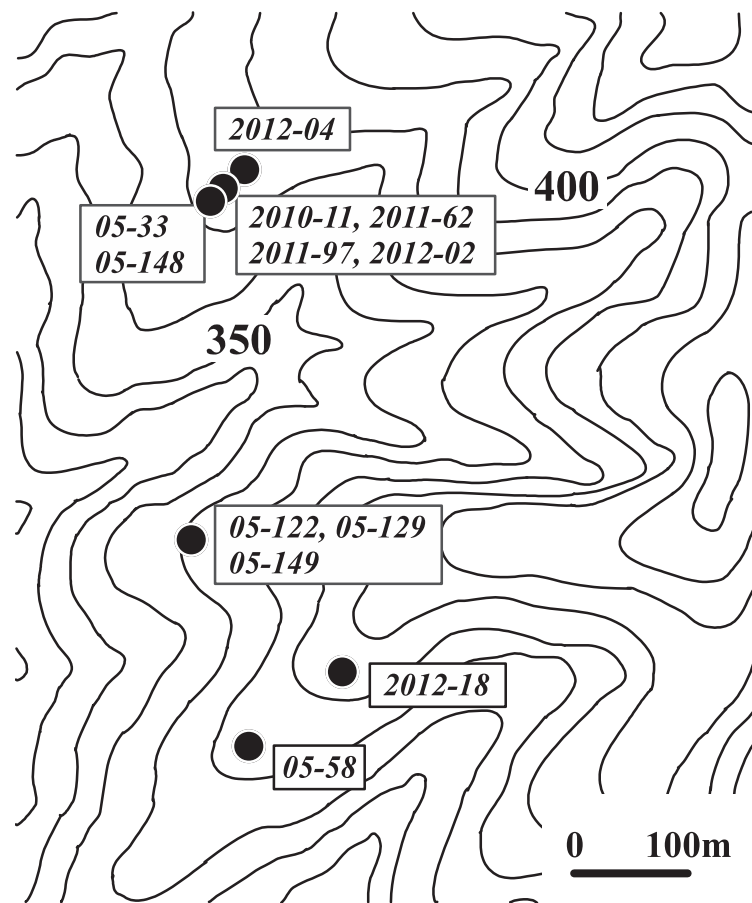


図 3-1-1 岩手県林業技術センター四日市試験林内の菌株の採取地点

●は、菌糸成長速度のジェネット間比較および子実体サイズとの関係の解析に用いた菌株を分離した、おおよその位置を示す。数字は菌株の番号を示す。

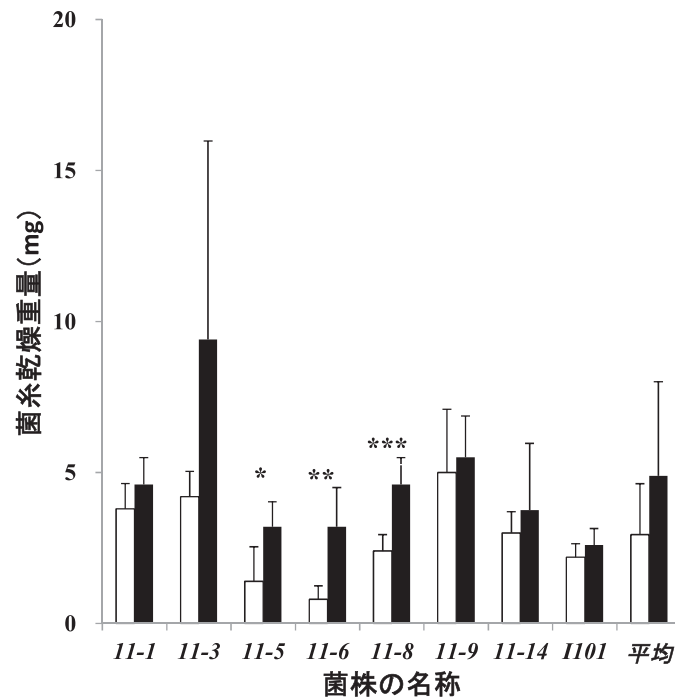


図 3-1-2 岩手県産マツタケ菌株の 15 °C と 25 °C の液体培養における菌糸乾燥重量の比較
 岩手県産のマツタケ 8 菌株を、15 °C (白棒) と 25 °C (黒棒) で 30 日間培養して得られた菌糸塊の乾燥重量を示す。エラーバーは標準偏差を示す。*は $p < 0.05$ で、**は $p < 0.01$ で、***は $p < 0.001$ で、それぞれ 15 °C と 25 °C 培養における菌糸乾燥重量に有意差があることを示す (t 検定)。

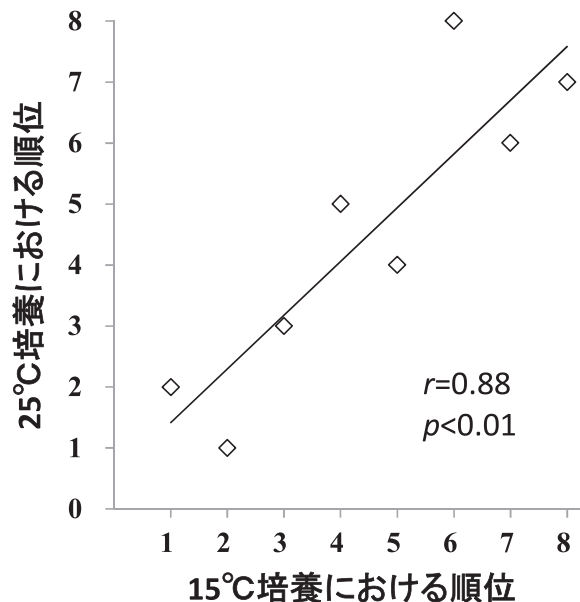


図 3-1-3 岩手県産マツタケ菌株の 15 °C と 25 °C の液体培養における菌糸乾燥重量の菌株間順位の相関

岩手県産マツタケ 8 菌株を 30 日間培養して得られた菌糸乾燥重量の、15 °C 培養と 25 °C 培養における順位の関係。 r は順位相関係数、 p は有意確率を示す。

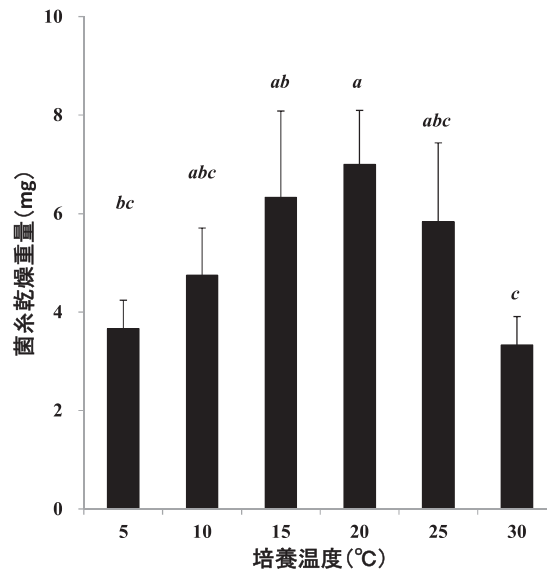


図 3-1-4 岩手県産マツタケ菌株の温度別液体培養試験

マツタケ IPFTC Tm11-9 株を 5, 10, 15, 20, 25 および 30 °C で 30 日間培養して得られた菌糸塊の乾燥重量を示す。エラーバーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは、培養温度間で平均値に有意差が認められたことを示す ($p < 0.05$, Tukey の多重比較)。

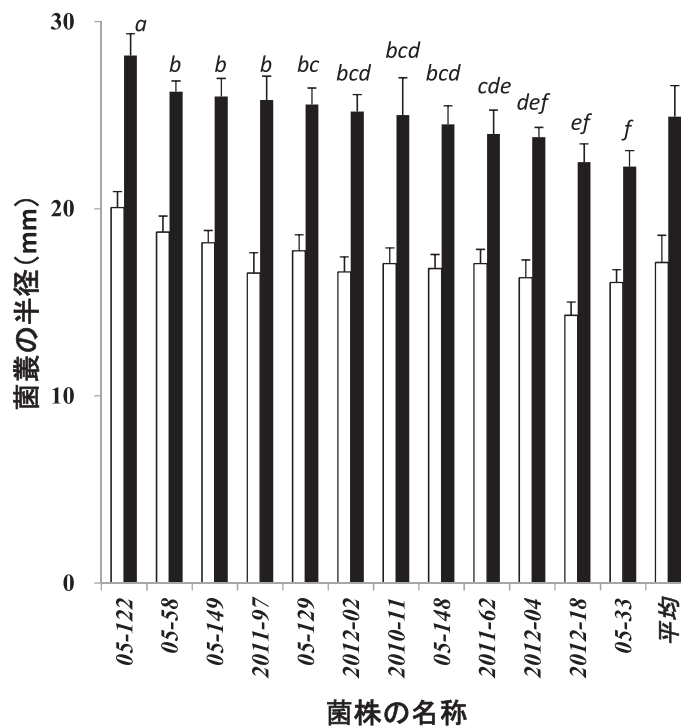


図 3-1-5 12 系統の菌株間における菌叢半径の比較

異なるジェネットから分離されたマツタケ 12 菌株を、23 °C で 14 日間(白棒)または 28 日間(黒棒)培養して得られた菌叢の半径を示す。ただし、培養 28 日目の半径が大きい順に菌株を並べた。エラーバーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは、28 日間培養後の菌叢半径の平均値にジェネット間で有意差があることを示す ($p < 0.05$, Tukey の多重比較)。

第2節 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成長に与える影響

I. はじめに

これまでに述べたとおり、マツタケはアカマツ等の宿主と外生菌根による共生関係を構築した後、子実体を形成することが知られているが(小川 1975a ; Yamada *et al.* 1999), 菌糸の純粋培養による子実体の形成技術は未解明である(鈴木 2005)。一方、枯木・川上(1985)は、この共生関係に着目し、マツタケのコロニーにアカマツ苗木を植え、マツタケの菌根を形成させた後、苗畑へ植栽して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、すなわち人為的な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。

共生関係の効率的な構築には、大量の菌糸が必要である。共生関係を構築させる場合、菌を宿主へ導入すること(接種)が必要となり、菌の接種源としては既存コロニー、担子孢子、培養菌糸や、あらかじめマツタケの菌根を形成させた苗木(菌根苗)が想定される(岩瀬・伊藤 1997; 山田・小林 2008)。また、宿主の形状としては、成木や苗木が想定される。接種源のうち既存コロニーは、現存のシロを破壊することから効率が悪いのに、枯木・川上(1985)以降の成功例がない。また、担子孢子による菌根形成は成功例が少なく、形成率も低い(藤原 2007; 菅原ら 2012)。一方、培養菌糸の接種による菌根形成に関しては、森林内のアカマツの根を剥皮し、インドール酢酸を塗布することで無菌根の細根を伸長させ、これに培養菌糸を接種して、マツタケの菌根を形成させた例(Guerin-Laguet *et al.* 2005)や、マツタケを培養した土壌にアカマツの実生を植栽して、容器内で大型のマツタケ菌根苗を無菌的に育成した例(小林ら 2007)がある。こうして形成された菌根から子実体を発生させるためには、菌根の増殖によるコロニーの形成が必要となるが、マツタケは地中で他の生物と競合するため(小川 1977a; 鳥越・塩見 1984), 人為的にコロニーを形成させることは難しいとされている(下川 1989)。競合を低減させる手段の一つは、アカマツに接種する菌糸量を増加させることである。しかし、マツタケの菌糸成長速度は一般的な腐生菌と比べて遅いため(浜田 1953), 接種用菌糸の大量かつ短期間での増殖は困難である。

マツタケ菌糸の大量増殖には、培養方法の改良が

必要である。一般に菌類の大量培養は、液体培養で行われる(Carlile *et al.* 2001)。また、培養効率の向上には、液体培地と担体の併用や(川合・小川 1976), 振盪培養による菌糸への酸素供給(吉田 1992)が有効とされる。さらに、成長した菌糸(菌糸塊)の形態は、担体の材質(Ruimin *et al.* 1993)や振盪強度(柳田 1985; Carlile *et al.* 2001)によって異なることも報告されている。ここでマツタケの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(長谷川・河合 2003), 接種源の形状は、例えば飢餓培養や残存培地の除去が容易で、かつ根に密着させ易い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塊の培養方法は明らかにされていない。そこで本節では、シート状接種源の作成を目的に、菌糸担体を用いてマツタケの液体培養を行い、担体の種類と振盪の有無が菌糸の成長と形態に与える影響を明らかにした。

II. 材料と方法

供試菌株

供試菌として、*I-101* 株を用いた。これは、岩手県下閉伊郡岩泉町のアカマツ林で 1990 年に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。菌株は供試まで改変浜田斜面培地(第 2 章第 1 節)を用いて継代培養法により保存した。

一次培養

培養工程を図 3-2-1 に示す。上記の供試菌株を、1 規定の塩酸を用いて pH を 5.0 に調整した改変 MYPG 平板培地(第 2 章第 1 節)に接種して、30 日間培養した。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。

二次培養

二次培養は液体培養にて行い、培地は改変 MYPG 液体培地を用いた(図 3-2-1)。培地組成は改変 MYPG 培地から寒天を除き、1 規定の塩酸を用いて pH を 5.0 に調整したものである。培地は 125 mL 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®, 旭テクノグラス社, 東京)で上面を塞ぎ、オートクレーブで 121 °C, 20 分間滅菌して用いた。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($\phi=7$

mm)で打ち抜いて液体培地に投入した(図 3-2-1)。ビーカーを振盪機(R-30, タイテック社, 埼玉)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®(Pechiney Plastic Packaging 社, シカゴ)でサンキャップシートの下部を密封した。

本培養

二次培養で形成された菌糸塊を液体培地中で磨砕し, 本培養時の種菌として用いた。磨砕は切削部を滅菌したホモジナイザー(ヒスコトロン®, マイクロテック・ニチオン社, 千葉)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, ピペッターを用いて, 二次培養と同じ培地に接種した(図 3-2-1)。培地量は容器 1 個あたり 60 mL, 接種量は同 1 mL 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®CB-3, アズワン社, 大阪)を用いた。さらに, 厚さ約 0.1 mm で糸密度(担体の面積に対する糸の投影面積の割合)が約 25% の Poly Ethylene Terephthalate 製不織布(PET 布: 三角コーナー用水切り袋, 福助工業, 愛媛), もしくは厚さ約 0.3 mm で糸密度約 75% 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 64 cm² (8 cm 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。また, 担体を使用しない無処理条件を設けた。以上の 3 条件で各条件の反復を 10 とし, 二次培養と同様に振盪培養を行った。培養期間は 20 日間または 36 日間とした。

培養方法の比較

本培養時に, PET 布を用いた静置培養を行い, 振盪培養と比較した。培地, 容器, 担体のサイズ等は上記と同一である。

菌糸塊の発菌能力の確認

本培養時終了後に, PET 布の担体上に形成された菌糸塊の一部をクリーンベンチ内で無菌的に採取し, MYPG 平板培地に接種した。接種から 14 日後に, 接種した菌糸塊から伸長した菌糸の有無を, 目視にて観察した。木綿布と無処理で得られた菌糸塊の発菌試験は行わなかった。

菌糸成長量の評価

本培養開始から 20 日, 36 日後に, 菌糸塊が付着した担体(ただし無処理では菌糸塊)を, 培養条件別

に 5 個ずつ取り出して, 脱イオン水で洗浄した。次に菌糸塊と担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 社, 東京)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の乾燥重量とした。

PCR 法による菌種の判定

培養により成長した菌糸塊が, 培養中に混入した雑菌ではないことを確認するために, PCR 法(Polymerase chain reaction)による菌種の判定を行った。最終培養で得られた菌糸塊, 二次培養菌糸および保存菌株から, ISOPLANT II® (Nippon Gene 社, 東京)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*(Murata and Yamada 1999) と *TmF/TmR*(Kikuchi *et al.* 2000)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 5.8S rRNA 遺伝子を含む ITS 領域である。反応には 500 μ L 容のチューブを用いた。PCR 反応液の量は 25 μ L とし, 組成は, 2.5 μ L 10 \times Reaction Buffer(MgCl₂ 含有), 0.16 mmol/L dNTP Mix, 0.625U Taq DNA Polymerase(Gene Taq®, ニッポンジーン社), 0.2 μ mol/L 各 Primer, 18.875 μ L 脱イオン水, 1.0 μ L Template DNA である。サーマルサイクラーは AB-1820(ATTO 社, 東京)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, 泳動後のゲルをトランスイルミネーター上に移して, UV(400nm)照射下でバンドの有無とサイズを確認した。

III. 結果

担体の種類が菌糸塊の形態に及ぼす影響

36 日間の本培養後, PET 布, 木綿布および無処理の各条件で, 菌糸塊が形成された(図 3-2-2)。無処理では, 各容器あたり 1 個から数個の菌糸塊(直径 27 mm から 54 mm)が形成された。菌糸塊は白色, 表面が平滑, 不定形で, 通常の液体培養で得られる菌糸塊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

糸塊が形成され、担体の下面では菌糸塊が認められなかった。菌糸塊の直径は後述の木綿布より小さく、逆に個数は多かった。菌糸塊の多くは周辺の菌糸塊と癒合していたが、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、菌糸塊は容易に担体から剥離された。なお、菌糸塊の境界は不明瞭だったため、菌糸塊の個数及びサイズの測定は行わなかった。PET 布上に成長した菌糸塊の一部を改変 MYPG 平板培地に接種したところ、菌糸塊から発菌し、接種から 14 日後には培地上にコロニーが観察された(図 3-2-3)。このことから、PET 布上に形成された菌糸塊は、発菌能力を有することが明らかになった。

木綿布を菌糸担体とした場合では、PET 布と同様に白色で表面が平滑な菌糸塊が担体上に形成された(図 3-2-2)。試験体 5 枚のうち 1 枚に形成された菌糸塊の個数とサイズを測定したところ、菌糸塊個数は 43 個(0.67 個/ cm²)、各菌糸塊の最大直径の平均値±標準偏差は 6.1 mm±2.9、最大値は 15.3 mm、最小値は 2.2 mm で、最大の菌糸塊の高さは約 3 mm だった。菌糸塊の形状は直径により異なっていた。すなわち、菌糸塊の直径の増加に伴い、その形状は半球状となり、菌糸塊の多くは他の菌糸塊と接すること無く、独立して担体上に形成されていた。また、観察された菌糸塊は担体と密着し、剥離することは困難であった。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、菌糸塊から気中への菌糸成長は認められなかった。これらのことから、菌糸塊の形態は担体で異なることが明らかとなった。

担体の種類が培養後の菌糸の乾燥重量に及ぼす影響

マツタケ菌糸の培養効率は、PET 布で最大であった。20 日間培養後の菌糸乾燥重量の平均値を担体間で比較したところ、PET 布が 0.18 g、木綿布が 0.01 g、無処理が 0.07 g であり、PET 布の菌糸乾燥重量が最大で、木綿布が最小だった(図 3-2-4)。この傾向は 36 日間の培養でも変わらず、各条件の乾燥重量は PET 布が 0.22 g、木綿布が 0.13 g、無処理が 0.10 g であり、PET 布の菌糸乾燥重量は無処理の 1.6 倍、木綿の 2.2 倍であった。さらに、PET 布と木綿布および無処理の間には、培養 20 日目と 36 日目において、それぞれ有意差が認められた(図 3-2-4 : $p < 0.05$, Tukey の多重比較)。

培養時の振盪の有無が培養後の菌糸の乾燥重量と形態に及ぼす影響

振盪は菌糸塊の形状に影響を及ぼした。PET 布で振盪培養と静置培養を 36 日間行い、菌糸乾燥重量の平均値を比較したところ、振盪培養、静置培養ともに 0.22 g となり、菌糸乾燥重量については振盪の効果が認められなかった(表 3-2-1)。一方、菌糸塊の形態は培養方法で異なった。すなわち、静置培養を行った PET 布上に形成された菌糸塊は、振盪培養で PET 布上に形成された半球状の菌糸塊(図 3-2-2)とは異なり、層状を呈した(図 3-2-5)。菌糸塊は担体の上面を完全に覆い、湿潤状態での菌糸塊の厚さは約 3 mm(担体込み)であった。

PCR 法による菌種の判定

PCR 法により、得られた菌糸塊はマツタケであることが確認された。菌糸の乾燥重量が最大だった PET 布から採取した菌糸塊、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図 3-2-6 に示す。*TmF/TmR* プライマーによる PCR では、400 bp 付近に増幅産物のバンドが認められた。また、*AY1/AY1* プライマーによる PCR では、900 bp 付近にバンドが認められた。これらのバンドサイズは、既報(Murata and Yamada 1999; Kikuchi *et al.* 2000)で明らかにされたマツタケのサイズと一致する。さらに、各プライマーによる増幅産物のバンドサイズは、保存菌株のバンドサイズと一致した。以上の結果から、今回の培養で得られた菌糸塊は、マツタケであることが確認できた。

IV. 考察

担体の種類が菌糸塊の形態に及ぼす影響

PET 布を担体に用いてマツタケの液体培養を行った結果、担体上に菌糸塊が形成された。この現象は、水中の固形物の表面における微生物の増殖(柳田 1985)と同様である。担体により菌糸塊の形態が異なった原因としては、担体の糸密度と材質の違いが挙げられる。Ruimin *et al.* (1993)は、マツタケと同じ糸状菌類である *Trichoderma* 属菌について、担体のメッシュサイズの減少が、菌糸の定着に寄与することを示唆している。メッシュサイズは糸密度と逆の概念であり、今回用いた木綿布の糸密度は約 75 % で、PET 布の約 25 % より大きいため、PET 布に比べて菌糸が定着しやすく、より大型の菌糸塊が形成された

と考えられる。また、材質の違いに関しては、担体を構成する単繊維が PET 布より木綿布で細いため、木綿布で菌糸の定着性が向上したと推察されるが、繊維の表面構造と糸密度の交互作用が不明であるため、今後の検討が必要である。

培養では、振盪の必要性は低いと考える。

担体の種類が菌糸の成長に及ぼす影響

液体培養後の菌糸乾燥重量は、PET 布を担体にした場合に最大だった。松永ら(2003)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。糸状菌類である *Aspergillus nidulans* では、半径が 2.5 mm を超えた菌糸塊の内部で酸素濃度が低下して、菌糸塊の成長が酸素濃度に律速される(Trinci 1970)。また、同一の材質の担体でも、目開きを変えることにより、担体の上面に形成される菌糸塊の形状が変化する(成松 2006a)。さらに、前項で述べたとおり、木綿布は PET 布に比して糸密度が大きく、単繊維が細いため、相対的に菌糸が定着しやすく、菌糸塊のサイズも大きくなると考えられる。このことから、木綿布に形成された大型の菌糸塊の成長は、菌糸塊内部における酸素の欠乏により抑制され(Carlile *et al.* 2001)、内部で菌糸密度が低下または空洞化するなど、各担体における菌糸塊が大きくなる一方で菌糸の総量は減少したと推察される。その結果、菌糸塊は小さいが数が多い PET 布で、菌糸の総重量が木綿布を上回ったと考えるが、今回の実験では菌糸塊の内部の状態が明らかにされていないため、今後の検証が必要である。

培養時の振盪の有無が菌糸の成長と形態に及ぼす影響

培養時の振盪により菌糸塊は層状から半球状に変化した。培養後の菌糸の乾燥重量は静置培養と差がなかった。振盪培養が形態に及ぼす影響については、培養液の流動が菌糸塊のペレット化を促進し(松永ら 2003)、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(柳田 1985)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。

今回の培養物の用途はアカマツの細根に対する接種源であり、菌糸塊が対象物に接する面積は、ペレット状よりも層状の方が大きく、より接種に適している。従って、振盪培養と静置培養で菌糸の乾燥重量は同等であったが、培養後の菌糸塊の形状や、菌糸のペレット化による増殖速度の低下(松永 2003)を考慮すると、接種源の培養を目的とした液体

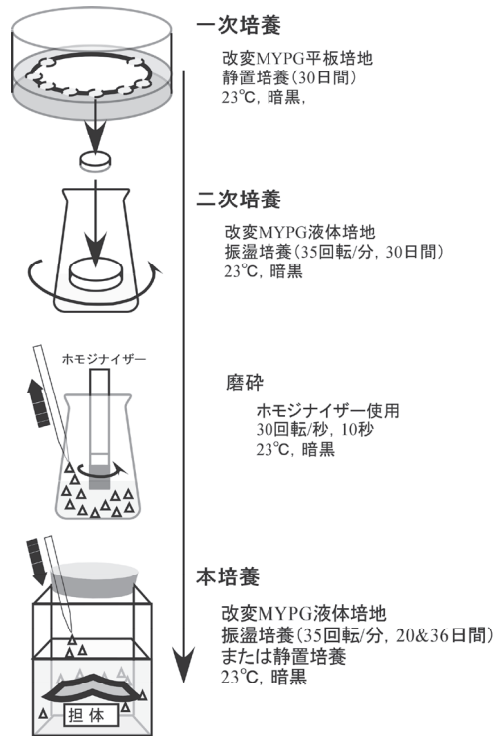


図 3-2-1 担体を用いた液体培養によるマツタケの培養方法

平板培地での一次培養から担体を用いた液体培養に至る各工程を示す。本培養工程で容器中に示した青い多角形が担体。

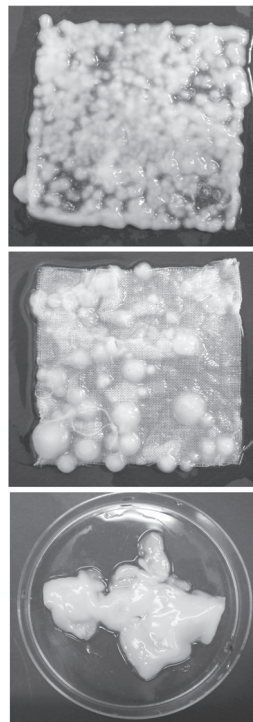


図 3-2-2 マツタケ 1101 株の振盪培養により各条件で形成された菌糸塊

上段：PET 布，中段：木綿布，下段：無処理の各条件で形成された菌糸塊。(培養 36 日目)

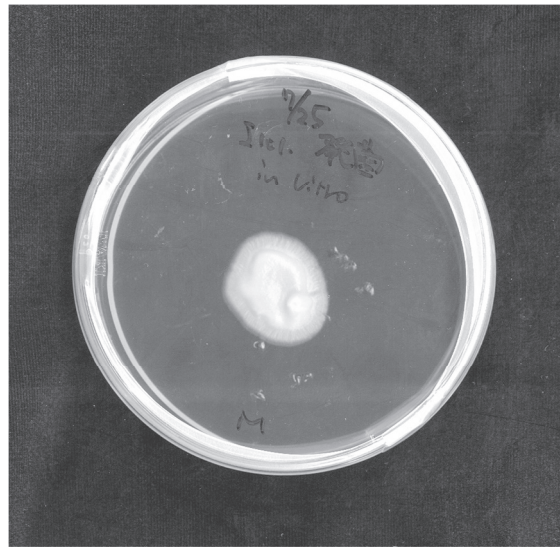


図 3-2-3 PET 布上に形成されたマツタケ菌糸塊の発菌性の確認
 本培養時(振盪培養)に PET 布上に形成されたマツタケ I101 株由来の菌糸塊の一部を, MYPG 平板培地に接種して得られた菌叢(接種から 14 日目)。

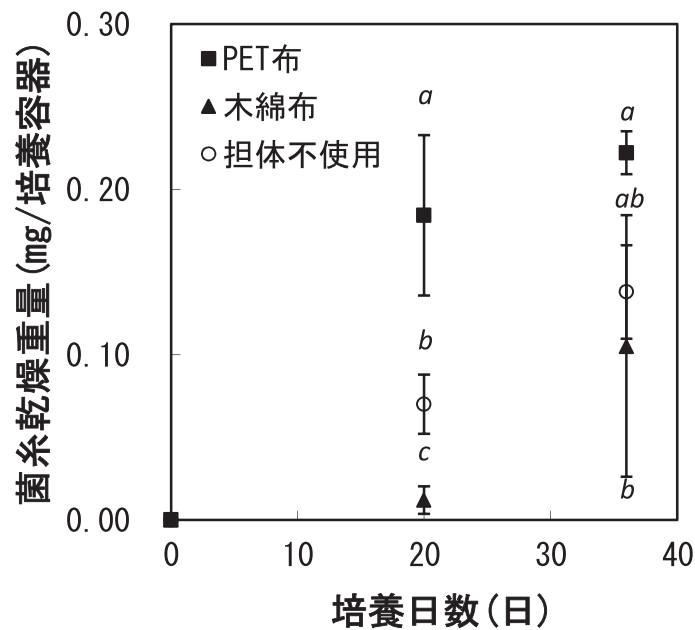


図 3-2-4 担体別の培養日数と菌糸乾燥重量の関係
 横軸に培養日数, 縦軸に振盪培養 20 日目と 36 日目における菌糸塊の乾燥重量を示す。異なるマーカーは担体の種類や有無を示し, エラーバーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは, 各培養日数における菌糸乾燥重量の平均値に条件間で有意差があることを示す($p < 0.05$, Tukey の多重比較)。

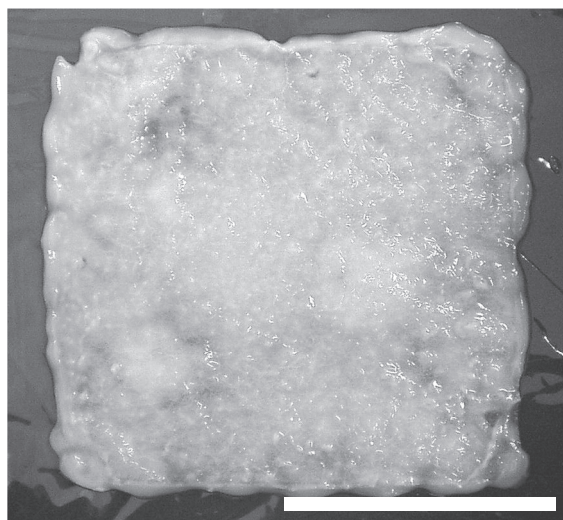


図 3-2-5 静置培養により PET 布上に形成されたマツタケの菌糸塊(培養 36 日目)
振盪培養で形成された菌糸塊(図 3-2-2)とは異なり，菌糸塊は層状を呈した。図中右下のバーは 5 cm を示す。

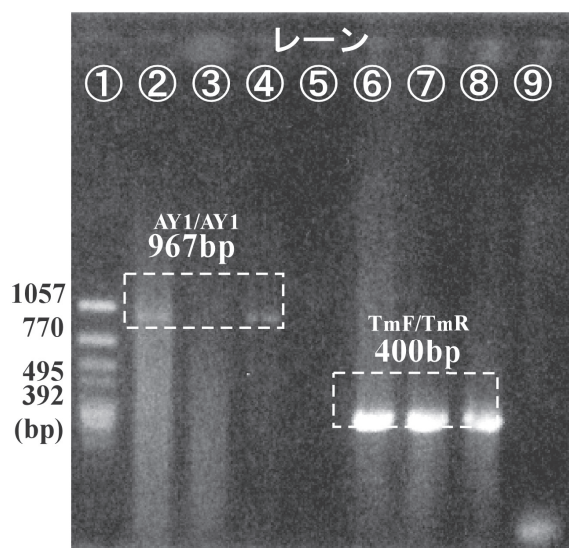


図 3-2-6 培養後の菌糸塊と供試菌株由来の PCR 産物の電気泳動
レーン 1; マーカー(ϕ X174/*Hinc* II digest), 2; 供試菌株(*I101*), 3; 二次培養菌糸, 4; 本培養菌糸, 5; テンプレート DNA 無添加(使用プライマー;*AY1/AY1*) レーン 6~9; レーン 2~5 と同じテンプレート(使用プライマー;*TmF/TmR*)

表 3-2-1 培養条件別のマツタケ菌糸の乾燥重量(培養 36 日目)

培養条件	菌糸乾燥重量 (g/培養容器)	標準偏差
振盪培養	0.22 ^a	0.01
静置培養	0.22 ^a	0.03

第3節 土壌培地と種菌シートを用いたアカマツ実生へのマツタケ菌根形成

I. はじめに

第3章第2節では、合成繊維の不織布上にマツタケ菌糸を培養し、層状の菌糸(種菌シート)を得た(成松 2006b)。これをアカマツの苗木(成松 2002)や成木(成松 2005b)の細根に接種したところ、菌根は形成されるものの、その後の増加、コロニーの形成や子実体の発生には至っていない。この原因として、接種時に形成された菌根量の不足や、種菌シートに付着した糖質に起因する、他の菌類との競合が考えられる。これらの点を解決するためには、糖質の持ち込みが少なく、接種時点で菌根が確保されている接種方法を用いる必要がある。

マツタケの野外への接種には、菌根苗の利用が有望である。菌根菌は生育に必要な養分のうち、炭素の多くを宿主の樹木に依存している(Smith and Read 1996)。一方、菌糸を培養する際には、炭素源として糖質を培地に添加することが一般的である(古川 1992)。従って、培養菌糸を野外への接種源に用いる場合には、他の菌類との競合を避けるために、菌糸や担体に付着した糖質(培地)を除去することが望ましいが、除去は技術的に困難であるばかりか、接種後の菌糸の生存や成長に必要な炭素が不足する可能性がある。一方、マツタケの菌糸(Wood and Lefevre 2007)やシロ(Ohara 1966)は抗菌物質を分泌する。こうした物質による競合菌類の増殖抑制が、シロが維持されている理由の一つとされる(小川 1977b)。したがって、菌糸単体よりも、マツタケの菌根そのもの、例えば菌根苗を接種源に用いることにより、接種時の微生物との競合が抑制され、接種後のマツタケの生存や成長が改善される可能性がある。実際に、マツタケの人工的なコロニー形成と子実体発生の唯一の例は、野外のコロニーで育成した菌根苗の移植によるものである(枯木・川上 1985)。また、ホンシメジでも、培養菌糸と無菌根苗を同時に埋設することで、コロニー形成や子実体発生に成功している(河合 1999)。菅原ら(2012)は、アカマツとマツタケの二員培養により、アカマツにマツタケの菌根を形成させ、アカマツ林に移植した。また、Kobayashi and Terasaki (2015)は、大型のマツタケ菌根苗をアカマツ林に植栽し、植栽後の2年間は菌根が生存することを明らかにした。しかし、枯木・川上(1985)を除くいずれの場合でも、植栽後に菌根苗が死滅、あるいは

菌根苗の根が植穴の外部に伸長しないなど(能勢 1983)、菌根苗を起点とした、野外の根へのマツタケの菌根形成(二次感染)や子実体の発生は観察されていない(山田・小林 2008)。

培養した菌根苗による二次感染が成功しない原因として、移植時の培地の養分過多や、菌根量の不足が予想される。マツタケの菌根合成に関するこれまでの研究の多くは、バーミキュライトや鹿沼土といった基材に、グルコース、圧ぺん大麦(押し麦)、酵母抽出物といった養分を添加した培地を用いている(Gill *et al.* 1999; Yamada *et al.* 1999b; Guerin-Laguette *et al.* 2000; 菅原ら 2012)。こうした培地の養分濃度は土壌の養分濃度よりも高いと推察される。一般に菌糸は養分の濃度が高い方向へ伸長する(Carlile *et al.* 2001)。したがって、培養した感染苗を接種源として野外に移植する場合、培地中に残存する養分の濃度が周囲の土壌より高いと、苗から土壌への菌糸、菌根の伸長が妨げられる可能性がある。これらのことから、残存養分は競合微生物の増殖を促進するのみならず、菌根苗から周囲の根への、マツタケの二次感染を阻害する可能性もある。しかし、菌根苗を野外へ移植する際に、培地の基材に用いた土壌から剰余の養分を除去することは困難である。こうした問題を解決するためには、小林ら(2007)のように、貧栄養の培地で菌根量の多い菌根苗を育成し、これを野外への感染源に用いる必要がある。

一般に菌糸の量は炭素、窒素といった養分量に規定され、菌根菌が樹木から受け取る炭素(Smith and Read 1996)の量は、樹木の地上部の現存量などに影響を受ける。菌と実生の2員培養による菌根合成実験では、地上部の現存量は実生の本数や個体サイズに規定される。そこで本節では、苗木や成木などに対する接種源として、貧栄養の培地で菌根量の多い菌根苗を育成することを目的に、アカマツ-マツタケの無菌系2員培養試験を行い、担体上に培養したマツタケの菌糸(種菌シート)を接種源に、滅菌土壌を基材に用いて、アカマツの無菌発芽実生の移植本数を検討した。

II. 材料と方法

供試菌株と種菌シートの培養

2005年9月に調査地で採取したマツタケ子実体のヒダの基部から定法により菌糸を分離し、グルコース濃度を1/2に減じた改変浜田斜面培地(第2章第1

節)を用いて、継代培養法により保存した菌株(05-129株)を用いた。種菌シートの培養は、第3章第2節に示した方法により行った。

土壤培地を用いた培養と実生の移植

培地の基材には、マツタケ発生地付近のB層土壤を用いた。B層土壤は、調査地のsite4-1(第2章第1節：図2-1-1)のマツタケのコロニー付近で、かつマツタケが到達していないと推察される場所から採取した。採取後は石や粗大な根を除去した後、目開き5 mmから6 mmの標準ふるいで細根等を除去し、風乾した。風乾後は紙袋に入れて実験室内で保管し、供試の直前に湿量基準含水率を水道水で25 % (w/w)に調製した。培養容器は1.5 L容のポリプロピレン製円筒容器(スクリュートップキーパー、岩崎工業社、奈良)を用いた。容器内外のガス交換を目的として、容器側面の上部に直径5 mmの穴を3か所開け、孔径0.45 μm のPTFE(フッ素樹脂)製シール型フィルター(ミリシール、メルクミリポア社、マサチューセッツ)で封じた。この容器に含水率調整済みのB層土壤を深さ5 cm、500 mL充填し、オートクレーブで121 $^{\circ}\text{C}$ 、60分間滅菌した。放冷後、B層土壤の表面に種菌シートを1枚載せた。種菌シートの上には、別にオートクレーブ袋で60分間滅菌したB層土壤を厚さ5 cm、500 mL載せた(図3-3-1)。この5 cmは、調査地におけるマツタケのシロの平均的な深さである(成松 2007)。容器の蓋を閉めてパラフィルムで封じた後、22 $^{\circ}\text{C}$ の暗黒条件下で47日間、培養した。

無菌発芽実生を得るために、アカマツ種子の表面を滅菌し(山田 2001)、PDA平板培地上に置いて、24時間の蛍光灯照明下で発根させた。雑菌汚染が無いことを確認した後、長さ1 cm程度に発根した種子を、マツタケを培養したB層土壤(前段参照)の表層に移植した(図3-3-1)。移植本数は容器あたり1本、5本および10本とした。以後はそれぞれを1本区、5本区および10本区と論述する。各条件の反復は3個とした。以上の作業はクリーンベンチ内で行った。移植後は24時間の明条件下で22 $^{\circ}\text{C}$ にて9か月間、培養した。照明には蛍光灯を用いた。照度は容器の蓋の上面で6772 lux(培養棚5カ所の平均値)である。

根の測定と菌根形成の確認

培養容器から実生を種菌シートごと取り出し、地上部長と細根長を測定した。1本区ではすべての実生を測定した。また、5本区では各反復あたり3本、

10本区では各反復あたり3本もしくは4本の実生を無作為に採取して測定の対象とした。実体顕微鏡の視野下で細根を観察し、根端の総数(総根端数)と菌根の根端数(菌根数)を測定した。条件間の平均値を、一元配置分散分析とTukeyの方法による多重比較で比較した。データ解析は統計言語 R ver. 3.1.2 (R development core team 2015)で行った。

細根の一部を採取し、洗浄後にパラフィルムで固定、実体顕微鏡の視野下でステンレス製の剃刀を用いて横断切片を作成した(Brundrett *et al.* 1996)。切片をShare氏のマウント液でカバーガラス下に封入した後、微分干渉顕微鏡の視野下で形状を観察した。さらに、細根の表面を次亜塩素酸カルシウム水溶液で殺菌、滅菌水で洗浄後に滅菌メスで切断し(山田 2001)、改変MNC平板培地(Yamada and Katsuya 1995)上に置いて、15日後に細根からの菌糸の伸長を観察した。

III. 結果

菌根の形成

種菌シートから培地中に菌糸が伸長し、菌糸に接触した細根は色や形状が変化した。種菌シートの接種から4か月後には、土壤中の菌糸が容器の側面から観察された。無菌実生の移植から9か月後に、種菌シートを土壤ごと取り出して観察した結果、種菌シートの上面には細根が面状に伸長し(図3-3-2)、細根の周囲には直径1 cm程度の土壤の塊が形成されていた(図3-3-3)。この塊を実体顕微鏡で観察したところ、土壤の塊中に白色の菌糸が存在し、菌糸が周囲の土壤を緊結していた(図3-3-4)。また、細根の一部は根毛が消失、黒変し、表面には白色の菌糸が付着していた(図3-3-5)。さらに、同様の細根は、種菌シートの裏面でも観察された。

シート上に伸長したアカマツの細根には、マツタケの菌根が形成された。細根の横断面を微分干渉顕微鏡で観察したところ(図3-3-6)、細根の表皮細胞(epidermal cell)の周囲に菌鞘(mantle)が形成され、菌鞘からは外生菌糸(external hyphae)が伸びていた。また、皮層細胞(cortical cell)の間隙には、侵入した菌糸により迷路状のハルティッヒネット(Haltig net)が形成されていた。菌根の周囲には多数の厚膜孢子(chlamyospore)様の器官が観察された(図3-3-7)。さらに、菌根化した細根の一部からは、マツタケと類似した白色の菌糸が培地上に分離された(図3-3-8)。

菌根形成率に基づく実生移植本数の検討

マツタケ菌根の形成は5本区で多い傾向が見られた。実生の地上部長は1本区が 51 ± 11 SD mm, 5本区が 48 ± 2 mm, 10本区が 46 ± 6 mmで、条件間で同程度であった($p > 0.05$)。実生1本あたりの総根長は、1本区が 3185 ± 917 mm/本, 5本区が 1906 ± 299 mm/本, 10本区が 1288 ± 345 mm/本で、実生の移植本数に応じて減少した($p < 0.05$; 図 3-3-9)。総根長と地上部長には、正の相関が認められた($r = 0.60$, $p < 0.01$)。実生1本あたりの総根端数は、1本区が 1612 ± 497 個/本, 5本区が 1039 ± 477 個/本, 10本区が 473 ± 203 個/本で、10本区が他の2区より少なかった($p < 0.05$; 図 3-3-10)。総根長あたりの総根端数は、1本区が 0.59 ± 0.06 個/mm, 5本区が 0.53 ± 0.16 個/mm, 10本区が 0.36 ± 0.09 個/mmで、5本区が10本区より多かった($p < 0.05$; 図 3-3-11)。一方、実生1本あたりのマツタケ菌根の根端数は、1本区が 37 ± 37 個/本, 5本区が 46 ± 33 個/本, 10本区が 25 ± 37 個/本で、5本区が多い傾向を示したが、他の本数との差は有意ではなかった($p > 0.05$; 図 3-3-12)。また、総根端数あたり($p > 0.05$; 図 3-3-13)、総根長あたりのマツタケ菌根の根端数も、5本区が多い傾向を示したが、他の本数との差は有意ではなかった。

IV. 考察

菌根の形成

種菌シートと滅菌土壌を用いたアカマツとマツタケの閉鎖系2員培養により、アカマツの細根に土壌中のマツタケが感染し、種菌シートの上下に菌根が形成された。形成された菌根の観察結果は、外生菌根の定義(Smith and Read 1996)と一致していた。また、マツタケ菌根苗の培養に関する既報(Gill *et al.* 1999; Yamada *et al.* 1999b; Guerin-Laguette *et al.* 2000)とは異なり、今回用いた培地には、小林ら(2007)と同様に養分を添加していないが、菌根と菌糸が周囲の土壌と塊を形成するなど、野外のマツタケのシロの観察(小川 1975b; Yamada *et al.* 1999a)や菌根合成試験(Guerin-Laguette *et al.* 2000; Yamada *et al.* 1999b)の結果と類似した構造が形成された。形成された菌根の周囲では、マツタケ(Yamada *et al.* 1999b)や近縁種のバカマツタケ(*T. bakamatsutake*, Yamanaka *et al.* 2014)での報告例と同様に、厚膜胞子様の器官が観察された。一般に厚膜胞子は、菌糸の生育環境中の栄

養状態が悪化した場合に形成される(Carlile *et al.* 2001)。培地基材のB層土壌には炭素源や窒素源が含まれる。また、接種源の種菌シートに付着した液体培地により、培養系には炭素源や窒素源が持ち込まれる。しかし、それらの量が菌糸の成長に十分ではなかったため、厚膜胞子が形成されたと考える。

本研究の培地には養分を添加していないため、従来の菌根苗よりも、野外のアカマツ林への接種の成功率が向上することが期待される。アカマツ林への接種における直接的な接種対象は、既存のアカマツ成木の細根である。細根に接種源を接触させる手段として、あらかじめ細根を発生させて培養菌糸を接触させる場合(Guerin-Laguette *et al.* 2005; 成松 2005b)や、菌根苗をアカマツ林に移植し、周囲のアカマツの細根への感染を期待する場合(小川ら 1978; 山田・小林 2008; Kobayashi and Terasaki 2015)が挙げられるが、いずれの方法でもコロニー形成は報告されていない。形成されない原因について、後者に関しては、植栽した菌根苗の菌根が、外部に伸長しないことが示唆される(能勢 1983)。その原因の一つとして、菌根苗と同時に地中へ埋設された培地の栄養濃度が外部の土壌よりも高いことが挙げられる。本研究で用いた、養分無添加の土壌は、養分の付着が少なく、拮抗微生物の増殖抑制などの点で有利であると考えられる。他の原因としては、苗のサイズが小さいことが挙げられる。菌根苗が宿主から得る炭素(Smith and Read 1996)の量は、苗のサイズに規定されると推察される。苗のサイズの向上には、菌根苗の育成に用いる実生の大型化も検討する必要がある(後述)。

本研究と同様に養分無添加の滅菌土壌を培地基材に用いた菌根合成実験では、基材として花崗岩質土壌を用いている(小林ら 2007)。花崗岩質土壌は温暖地域のマツタケ発生林で普遍的にみられるが(小川 1991)、調査地の基岩は頁岩である。今回の実験から、頁岩を母材として形成された褐色森林土壌を用いた場合でも、養分を添加せずにマツタケの培養が可能であり、培養された菌糸により菌根が形成されることが明らかになった。一方、本研究と同様に1年間の2員培養を行った実験(小林ら 2007)では、容器中に大きな塊状の菌根が形成されている。小林ら(2007)とは異なり、本研究では菌根長を測定していないため、直接の比較はできないが、本研究により得られる菌根の量は、小林ら(2007)より少ないと推測される。さらに、アカマツ実生の地上部長の平

均値を、それぞれの研究において最大値を示した条件で比較すると、本研究が小林ら(2007)より 14 mm 小さい。こうした差異が生じた原因の一つとして、2 員培養時の光量の違いが挙げられる。アカマツは陽樹であるため、小サイズの個体は他の植物と光を競合した際に枯損する可能性がある。従って、今回得られた小型の菌根苗の用途は、野外への接種源とするよりも、無菌根の大型苗への接種源とすることが合理的である。本研究で得られた菌根はシート上に形成され、シートは可塑性を有するため、非接種木の根に密着させることが可能であり、野外での接種に必要な、接種作業の効率化(長谷川・河合 2003)も期待できる。今回得られた層状の菌根を接種源として用いることにより、従来の菌根苗よりも、被接種木の根に菌根が形成される確率が向上すると考える。菌根苗の接種によりマツタケの菌根が形成された大型苗を、野外のアカマツ細根への接種源とすることにより、コロニーの形成が可能となることが期待される。(図 3-3-14)

菌根形成率に基づく実生移植本数の検討

マツタケの菌根は、アカマツ実生を 5 本移植した場合に多い傾向を示した。容器あたりのマツタケ菌根の総量は 10 本区で多いが、実生あたりの総根長や根端数は 10 本区で少なかった。さらに、無菌実生の移植作業時における雑菌汚染の発生確率は、実生の移植本数に応じて増大すると思われることから、10 本区は 5 本区よりも雑菌汚染の可能性が大きいと推察される。これらの結果から、今回用いた培養系では、容器あたり 5 本の無菌実生を移植することが適当と判断する。

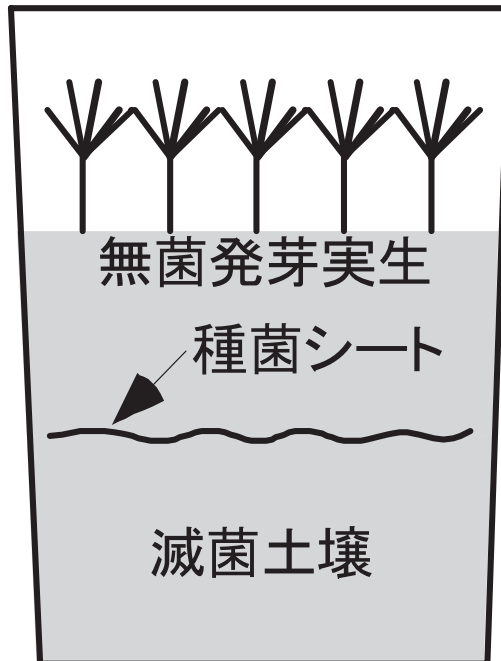


図 3-3-1 種菌シートと滅菌土壌を用いた、アカマツとマツタケの無菌系 2 員培養

調査地のマツタケのコロニー付近で採取した B 層土壌を湿量基準含水率 25 % (w/w) に調製し、1.5L 容のポリプロピレン製円筒容器に深さ 5 cm 充填して、121 °C、60 分間滅菌した。容器の上部には直径 5 mm の穴を 3 か所開け、孔径 0.45 μm の PTFE 製シール型フィルターで封じた。放冷後、B 層土壌の表面に種菌シート(第 3 章第 2 節)を 1 枚載せ、滅菌済みの B 層土壌を 5 cm 覆せた後、22 °C の暗黒条件下で培養した。47 日間培養後に、アカマツの無菌発芽実生を容器あたり 1 本、5 本または 10 本、移植して、24 時間の蛍光灯照明下(6772 lux)で 22 °C にて 9 か月間、培養した。

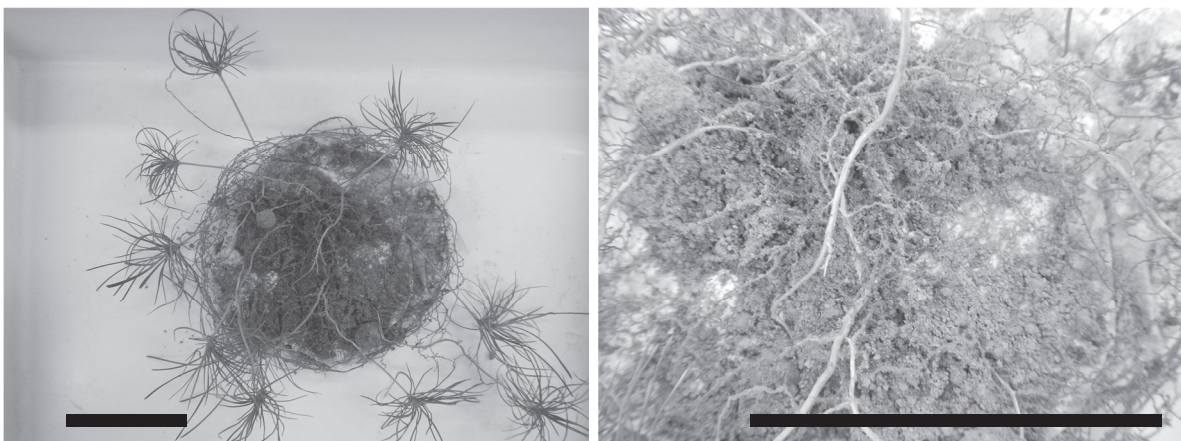


図 3-3-2 種菌シート上に伸ばしたアカマツ無菌発芽実生の細根(10 本区)

左図は苗を容器から取り出したところ。右図の根系の背景の白色部分は種菌シート。図中のバーは、ともに 5 cm を示す。いずれも培養 9 か月目。

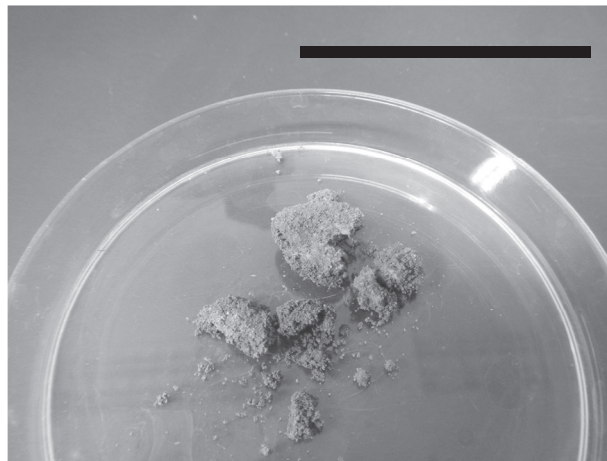


図 3-3-3 種菌シート上に形成された土壌の塊

土壌の塊を直径 9 cm のプラスチック製シャーレに取り出したところ。塊の表面に白色の菌糸が見られる。図中のバーは 5 cm を示す。(培養 9 か月目)

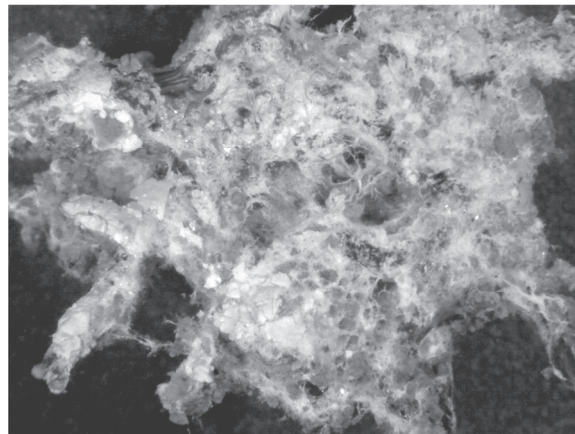


図 3-3-4 種菌シート周辺の土壌に見られた菌根と白色の菌糸

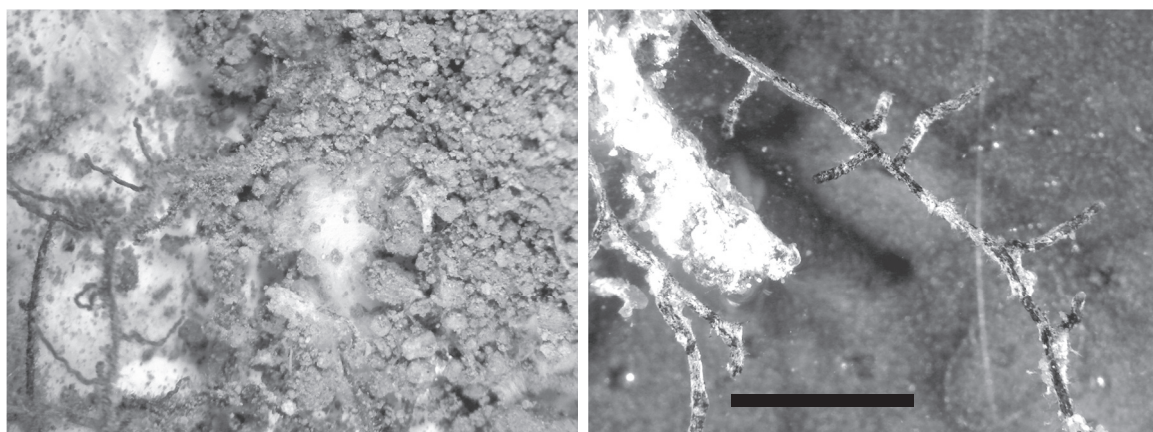


図 3-3-5 種菌シート付近に形成された菌根

左図は種菌シート上、右図は菌根を取り出して洗浄したもの。右図中のバーは 5 mm を示す。いずれも培養 9 か月目。

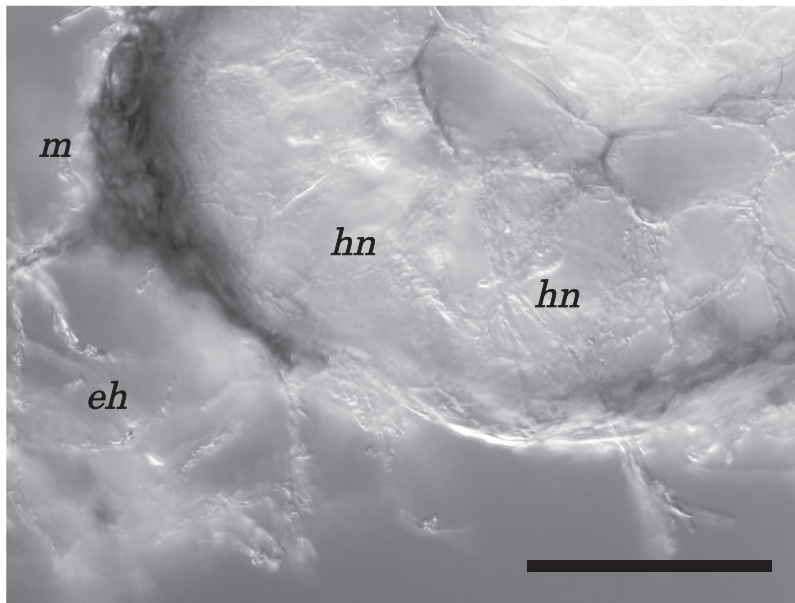


図 3-3-6 種菌シート付近に形成された菌根の横断面(1 本区)

図中の *m* はマントルを, *hn* はハルティッヒネットを, *eh* は外生菌糸を示す。バーは 100 μm を示す。
(培養 9 か月目)

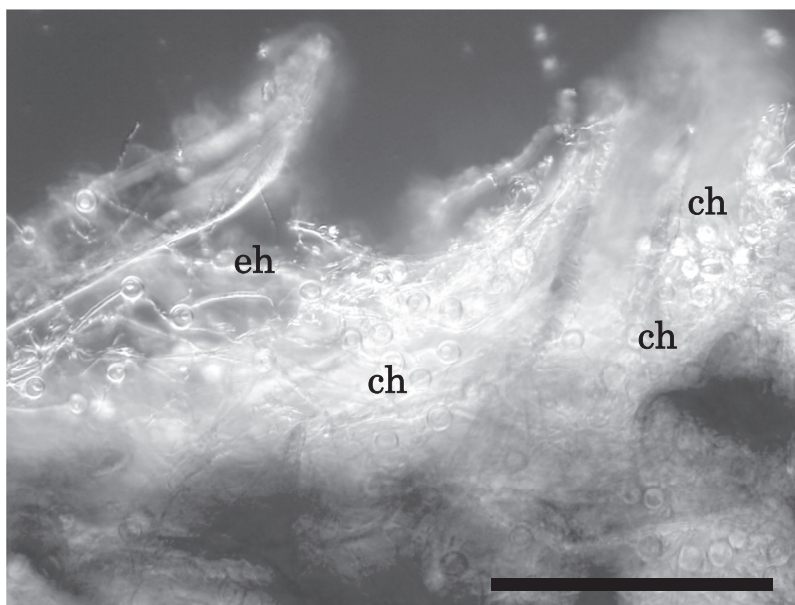


図 3-3-7 菌根の表面で観察された厚膜孢子様の器官(1 本区)

図中の *ch* は厚膜胞子を, *eh* は外生菌糸を示す。バーは 100 μm を示す。(培養 9 か月目)

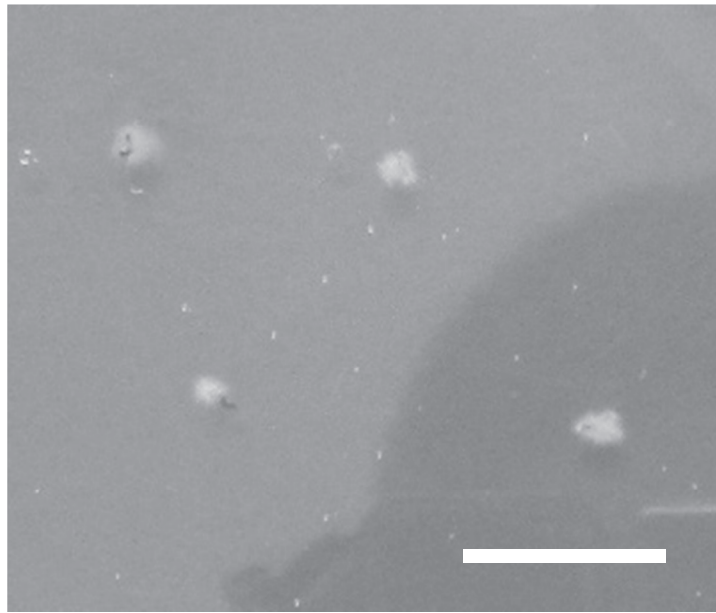


図 3-3-8 形成された菌根からの発菌

培養 9 か月目に菌根を採取し、表面を殺菌，切断したものを，改変 MNC 平板培地(Yamada & Katsuya 1995)上に 15 日間置いて，山田(2001)により菌を分離した。バーは 10 mm を示す。

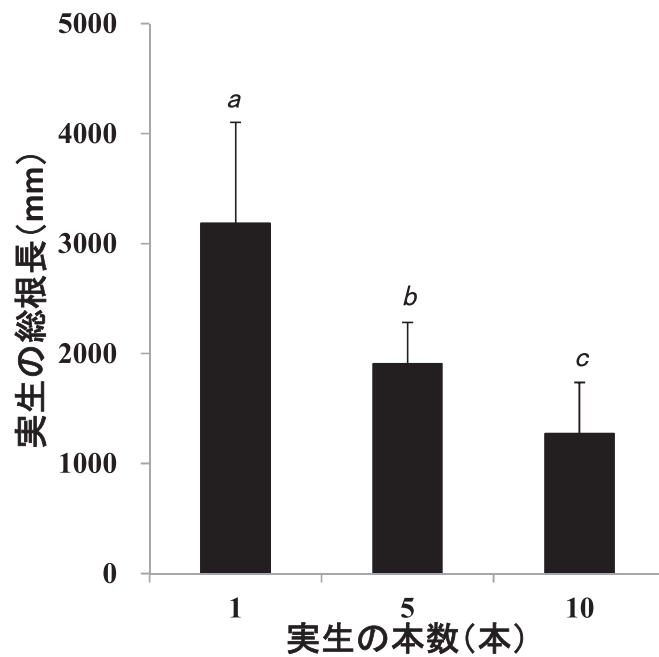


図 3-3-9 実生 1 本あたりの総根長

マツタケを培養した土壌培地に、本数を変えてアカマツの無菌発芽実生を移植し、9 か月間育成して得られた実生の総根長を示す。エラーバーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは、実生の移植本数間で平均値に有意差があることを示す($p < 0.05$, Tukey の多重比較)。

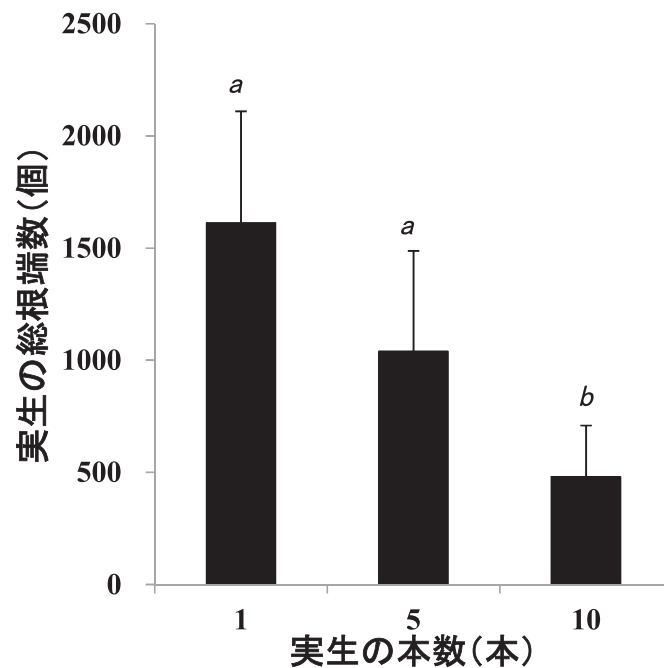


図 3-3-10 実生 1 本あたりの総根端数

マツタケを培養した土壌培地に、本数を変えてアカマツの無菌発芽実生を移植し、9 か月間育成して得られた実生の総根端数を示す。エラーバーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは、実生の移植本数間で平均値に有意差があることを示す($p < 0.05$, Tukey の多重比較)。

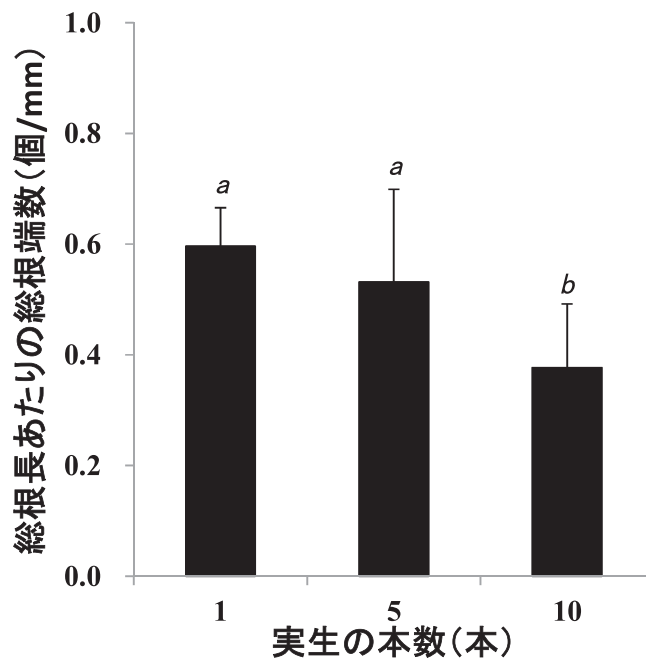


図 3-3-11 総根長あたりの総根端数

マツタケを培養した土壤培地に、本数を変えてアカマツの無菌発芽実生を移植し、9 か月間育成して得られた実生の総根長あたりの総根端数を示す。エラーバーは標準偏差を示す。異なるアルファベットは、実生の移植本数間で平均値に有意差があることを示す($p < 0.05$, Tukey の多重比較)。

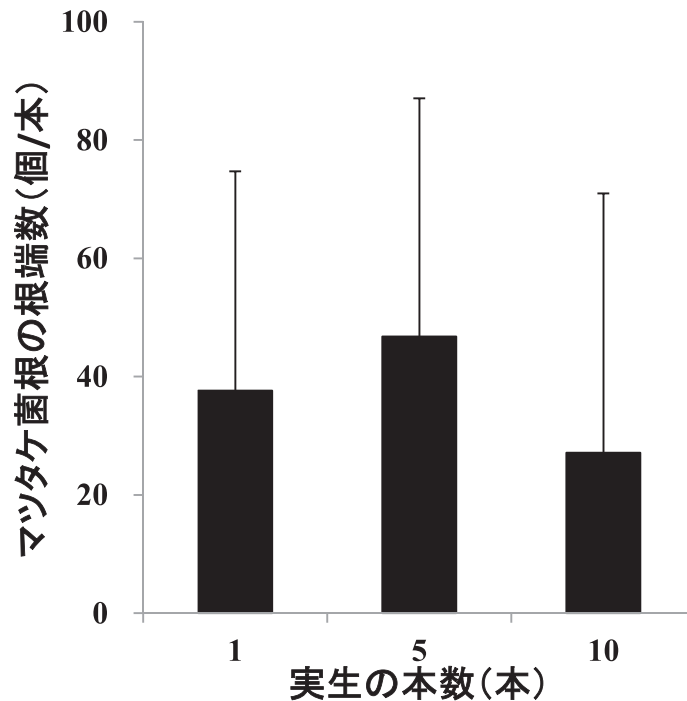


図 3-3-12 実生 1 本あたりのマツタケ菌根の根端数

マツタケを培養した土壤培地に、本数を変えてアカマツの無菌発芽実生を移植し、9 か月間育成して得られた実生のマツタケ菌根の根端数を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

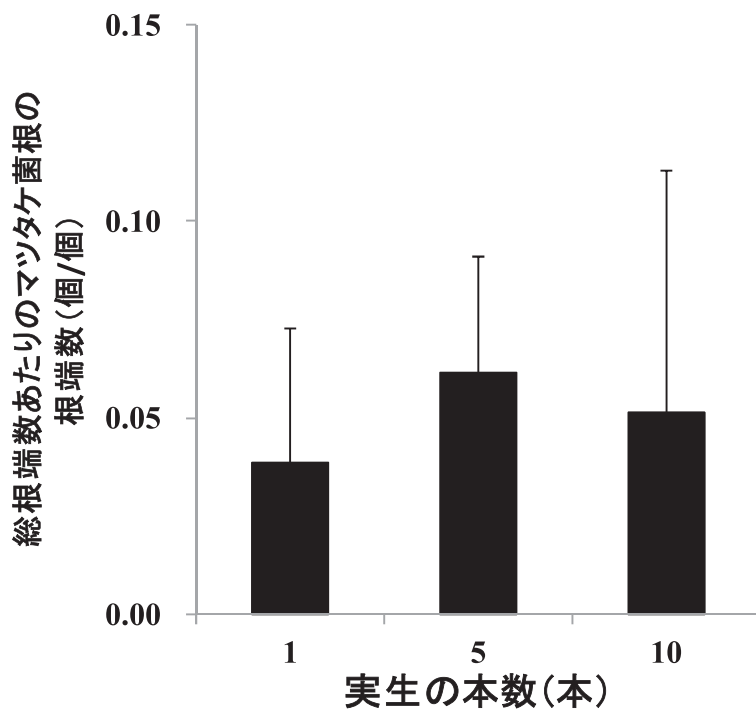


図 3-3-13 総根端数あたりのマツタケ菌根の根端数

マツタケを培養した土壌培地に、本数を変えてアカマツの無菌発芽実生を移植し、9 か月間育成して得られた実生の総根端数あたりのマツタケ菌根の根端数を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

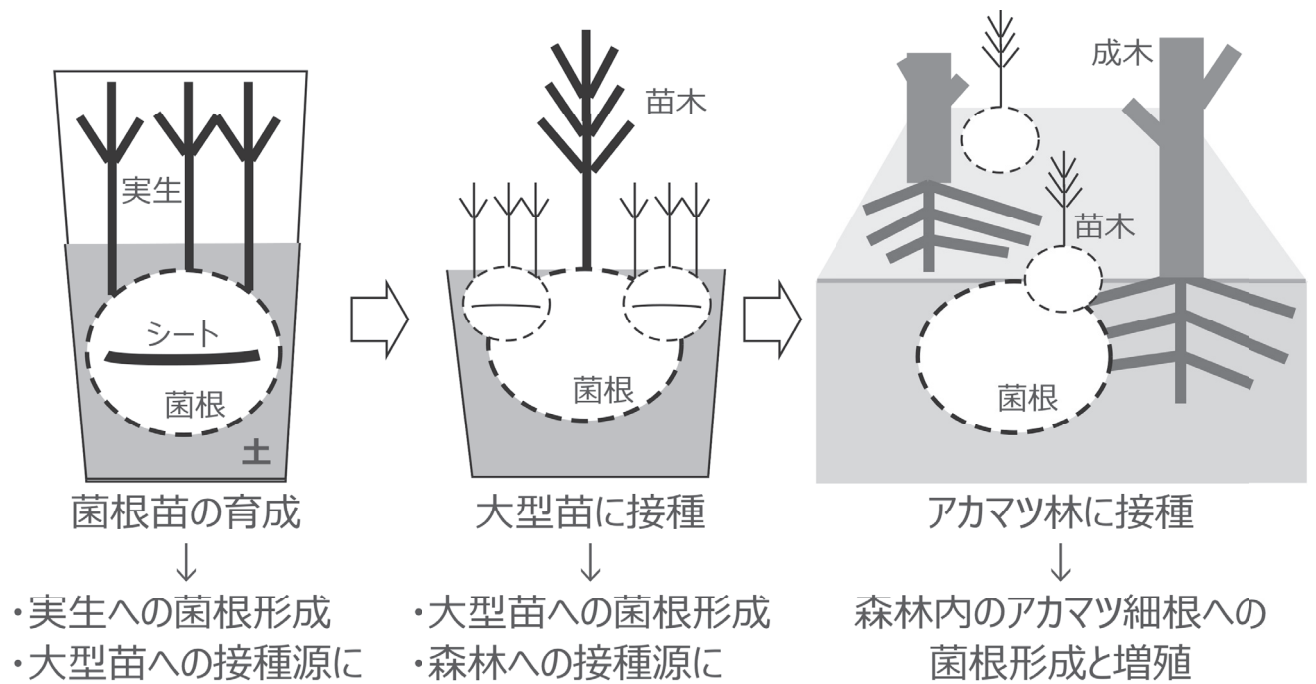


図 3-3-14 菌根苗と大型苗を用いた野外へのコロニーの形成

第4章 総合考察～寒冷地域のアカマツ林を活かしたマツタケの栽培

研究結果の概要

本研究では、寒冷地域におけるマツタケの栽培技術を確立することを目的とした研究を行った。そのために、マツタケの生態に関する基礎的な知見を得ることを目的として、岩手県内陸部のアカマツ林における調査結果を解析した。さらに、寒冷地域産のマツタケ菌株の培養特性を明らかにする目的で、菌糸の培養方法、菌根苗の育成方法を検討した。このうち生態に関しては、野外におけるマツタケの生活史に応じて、マツタケのコロニー形成過程、コロニーの拡大速度の律速要因、子実体発生量の変動要因、子実体原基形成要因および子実体サイズの決定要因を検討した。その結果、自然状態におけるコロニーの形成には、孢子散布源としてのコロニーに加え、散布された孢子の定着サイトとして、隣接アカマツ林の更新や地表攪乱が必要であることを明らかにした。また、コロニーの形成後は、寒冷な気候に応じたコロニーの拡大、子実体発生や発生量の変動が起こることを明らかにした。さらに、子実体のサイズには環境条件と遺伝条件が影響を及ぼし、その影響は環境条件が大きいことを明らかにした。培養に関しては、岩手県産のマツタケ菌株について、菌糸成長至適温度を検討した結果、温暖地域産の菌株と同程度であることが推察された。また、PET製の不織布を担体に用いた静置培養により、均質な層状のマツタケ菌糸塊（種菌シート）が短期間に得られることを明らかにした。さらに、種菌シートを用いて滅菌B層土壌に菌糸を蔓延させ、これにアカマツの実生を無菌的に移植することにより、種菌シート上に菌根が形成されることを、閉鎖系の実験で明らかにした。

寒冷地域のマツタケで見出された生態的な特徴

コロニーの拡大速度や子実体発生量には、温暖地域と異なり温度が促進的な効果を示した。近年、北東アジアでは年間平均気温の上昇(温暖化)が観察されている(Stocker *et al.* 2013)。この傾向は日本でも同様で、上昇の程度は北日本ほど顕著である(気象庁 2013)。こうした温暖化は、マツタケのコロニーの拡大速度や菌糸量を増大させる可能性がある(第2章第3節)。一方で、温暖化は松くい虫の被害拡大の一因であり(庄司 1979)、松くい虫被害により温暖地域

のマツタケ発生林が減少したことから(小川 1991)、今後は寒冷地域でも温暖地域と同様に松くい虫への注意が必要である。したがって、アカマツの伐採跡地で前述のコロニー形成を行う場合には、地表攪乱サイトにおけるアカマツの更新手段として、マツノザイセンチュウ抵抗性品種(蓬田 2014)のアカマツ苗木の植栽も考慮するべきである。

松くい虫の被害に加え、マツタケ山のアカマツの高林齢化も、日本のマツタケ生産における問題点の一つである(吉村 2005)。一般に、森林の成立から年数が経過すると、樹冠からのリター供給によりA₀層が厚くなり、菌類遷移が進行する(Frankland 1998)。マツタケはアカマツ林成立の初期に定着する菌と推定され(第2章第2節)、定着後の子実体発生量はアカマツの加齢に伴い変化する(小川 1991)。温暖地域における発生量のピークは林齢30年から50年頃で、60年から80年頃には発生が終了するとされる(岩瀬・伊藤 1997)。一方、調査地の林齢は約90年であり、調査年により発生量は変動するものの、発生量の極端な減少傾向は観察されていない(第2章第5節)。また、本研究の調査地より約50km東の岩手県下閉伊郡岩泉町では、マツタケが発生を開始するアカマツ林の林齢が30年から50年とされる(吉村 2005)。これらのことから、寒冷地域におけるマツタケのコロニーの衰退時期は、温暖地域より遅いことが示唆される。岩手県のアカマツ天然林の面積は51年から60年生が約16%と最大であり、次いで41年から50年生が約11%を占めていることから(林野庁 2012)、現在でもアカマツ林におけるマツタケのコロニーの活性は保たれていることが推察される。したがって、現時点であれば、子実体の採取を孢子散布以降とし、子実体の周辺で地表攪乱とアカマツの更新を行うことにより、コロニーの形成と発生量の維持が可能と推察される。

アカマツ林の皆伐に対応したマツタケの発生量の維持

これまでに述べたとおり、マツタケは主としてアカマツ林に生育するが、アカマツ林では皆伐が進むことが予想される。近年、東北地方を含む各地には、木質バイオマスを燃料とする発電施設(バイオマス発電施設)が稼働しており(林野庁 2015)、その燃料の確保を目的とした皆伐面積の増加が予想される。また、丸太の燃料需要の増大により、丸太を原料とする他の産業、例えば製紙業、製材業、合板・集成材

製造業でも丸太が不足し(安藤 2014), その不足を補う目的でも森林の皆伐面積が増大する可能性もある。東北地方北部, 特に岩手県にはアカマツ林が多く(林野庁 2012), その多くは比較的市街地の近くに分布することから(正木 2005), 今後, 前述の皆伐の対象となることが予想される。

皆伐が行われた地域で, マツタケの発生量を維持するためには, コロニー数の維持が必要である。一方で, アカマツを皆伐する際に, マツタケのコロニーの維持や形成を考慮することは可能である。マツタケのコロニーの形成には, 地表攪乱や更新されたアカマツ林に, マツタケの胞子が散布されることが必要である(第2章第2節; Narimatsu *et al.* 2016)。皆伐の対象となったアカマツ林でマツタケの発生が確認されている場合には, 皆伐の際に, マツタケのコロニーが存在するアカマツのパッチ(発生サイト)の保残と, 発生サイトに隣接した斜面の地表攪乱を行うことで, 新たなコロニーの形成が期待できる。また, 発生サイトは尾根に存在することが多いため(小川 1975a), 保残した発生サイトが尾根の防風林として機能し, 後継樹の定着を促進することも期待できる(竹内・北田 1986)。

人工的なコロニー形成～コンテナ苗の利用

伐採後の天然更新や子実体からの胞子散布が期待できないアカマツ林において, マツタケのコロニーを人工的に形成させるには, あらかじめマツタケの菌根を形成させたアカマツ苗(菌根苗)の利用が有望である。岩手県内のアカマツ林では, 燃料や緑肥への利用を目的とした低木や地表堆積物の採取(栗原 2012)が行われなくなったために, 林床の植生量が増加し, アカマツの天然更新に不適当な状態となっている(正木 2005)。また, 皆伐や攪乱が行われた場所の近くに, マツタケのコロニーが存在するとは限らない。そのような, マツタケの胞子やアカマツ実生の定着が困難な場所に, マツタケのコロニーを形成させる際には, 菌根苗を接種源として用いた接種が有効である。第3章第3節で示した菌根苗は, 培地に養分を添加していないこと, 層状の菌根(菌根マット)が形成されることから, 野外での接種に適すると推察される。一方で, この菌根苗は苗高が小さいことから, 植栽後に競合植生から被圧され, 菌根苗が枯損または菌根が脱落(荒尾ら 1993)することが懸念される。

前述の菌根苗による接種を成功させるには, 苗高

が大きく, 生存や成長の良い苗木が必要である。近年, 我が国の造林作業では, 林業用マルチキャビティコンテナを用いて育成された苗木(コンテナ苗)が用いられる(遠藤 2007)。この苗の形態的な特徴は, 育苗中に形成された円柱状の根鉢から, 細根が速やかに土壌へ伸長することである(Tinus 1974)。このことによりコンテナ苗の活着率は高く(成松ら 2016), 成長率も通常の苗木に劣らない(八木橋ら 2015)。また, コンテナ苗は室内での育苗が可能であるため, 育苗中に目的外の外生菌根が形成されず, 接種により目的の菌の菌根を形成させることが可能である(成松 2013)。本研究で得られた層状の菌根を, アカマツのコンテナ苗の根鉢に巻き付けることにより, コンテナ苗にマツタケの菌根が形成されれば, 苗高の小ささに起因する植栽後の被圧や枯損といった点が解消され, 野外のアカマツ細根への安定的な接種源となる可能性がある。

要旨

I. 寒冷地域におけるマツタケの生態

マツタケ(*Tricholoma matsutake*)は経済的に重要な食用担子菌であるが、アカマツ(*Pinus densiflora*)などの樹木と菌根で共生するため、施設栽培技術は確立されていない。また、マツタケの生態に関する研究の多くは温暖地域で行われ、寒冷地域における知見は少ない。そこで本研究では、寒冷地域におけるマツタケの栽培技術の確立を最終的な目標として、栽培に関する基礎的な知見を得ることを目的に、岩手県内陸部のアカマツ林(調査地)で調査を行い、マツタケの生態を解析した。

マツタケの生産量は自然発生量に依存して不安定である。自然発生量の安定化にはコロニーの新規形成が有効であり、形成技術の確立には、自然におけるコロニー形成過程の理解が必要であるが、長期間の調査に基づく詳細な解析事例はない。そこで、調査地で採取したマツタケ子実体の核ゲノム DNA 配列に基づき、多型性の Simple sequence repeat (SSR) マーカーを 10 個開発して、2001 年と 2010 年に子実体の発生位置とジェネットを解析した。その結果、2010 年に 5 個の新規コロニーが確認された。新規コロニーは既存コロニーと独立して円形を呈し、新規コロニーを構成するジェネット(新規ジェネット)は既存コロニーのジェネット(既存ジェネット)と異なったことから、新規コロニーの形成は孢子によることが示唆された。また、新規ジェネットの親は近隣の既存ジェネットと推定され、親子間の平均距離は 19.59 m であった。さらに、新規ジェネットは、皆伐跡や歩道といった地表攪乱跡地で見出され、皆伐跡には若いアカマツ林が成立していた。地表攪乱による鉱質土層の露出やアカマツ林の更新は、マツタケの孢子が細根に到達する確率を上げる点で重要とされる。以上のことから、孢子が定着しやすい環境(定着サイト)が地表攪乱や森林更新によって出現し、そこに近隣の既存コロニーから孢子が到来して新規コロニーが形成されたと推測され、マツタケのコロニー形成において、孢子の散布源が定着サイトの近隣に存在することの重要性が示された。

子実体発生量の制御には、変動要因の解析が必要である。主な変動要因は気温や降水量などの気象条件であり、このうち気温の作用機序の一つとして、菌糸量への影響が予想される。そこで、調査地における 18 年間の子実体発生位置を階層ベイズモデル

で解析し、コロニー直径の拡大速度(菌糸量の近似値)と気象条件の関係を推定した。その結果、拡大速度は子実体発生前の気温に応じて増大し、子実体発生本数と正の相関を示したことから、気温がコロニーの拡大速度を介して子実体発生量に影響を及ぼすことが示唆された。また、コロニーの円周 1 m あたりの子実体発生本数は、(a)4~7 月(菌糸成長または原基形成時期)の最高気温が平年値を超えた日数、(b)9 月下旬(子実体発生時期)の日最低気温の平均値、(c)9 月下旬の降雨日数と正の相関を示した。このうち(a)は地温を介したコロニーの菌糸密度や原基数への影響、(b)は低温による原基成長の停止と発生量の減少で説明される。降水量の影響(c)は、気温(a)や(b)よりも小さかった。以上のことから、本調査地におけるマツタケ子実体発生量は、菌糸成長または原基形成時期と発生時期の低温で抑制されること、降水量の影響は気温よりも小さいことが明らかになり、高温や少雨が発生量を抑制するという温暖地域の知見とは異なる結果が得られた。

II. 寒冷地域におけるマツタケの栽培

アカマツ林にマツタケのコロニーを形成させるには、あらかじめマツタケの菌根を形成させた苗木(菌根苗)の利用が有効である。菌根苗の育成を行うには、菌糸成長至適温度の把握が必要であるが、寒冷地域の菌株に関する知見は無い。そこで、岩手県産の 8 菌株を 15 °C と 25 °C にて MYPG 液体培地で 30 日間培養した結果、菌糸重量は各菌株で 25 °C の方が多い傾向を示した。このうち 1 菌株を 5 °C から 30 °C の 6 段階の温度で液体培養した結果、菌糸重量は 20 °C で最大だった。以上のことから、寒冷地域のマツタケ菌株の菌糸成長至適温度は 20 °C から 25 °C の間に存在し、温暖地域の菌株と同程度であることが示された。

菌根苗の育成には大量の菌糸が必要であるが、マツタケの菌糸成長速度は一般的な腐生菌と比べて遅い。そこで、培養効率の向上を目的として、液体培養における担体の種類と振盪の有無が、菌糸成長量と菌糸塊の形態へ与える影響を検討した。担体に Poly Ethylene Terephthalate 製不織布(PET 布)または木綿布を用いて MYPG 液体培地で 35 日間、振盪培養を行った結果、PET 布で菌糸成長量が木綿布の 220% に、担体不使用の 160% に、それぞれ増加した。また、PET 布を用いた振盪培養と静置培養では、菌糸成長量は同程度であったが、静置培養では層状で

均質の菌糸塊が得られた。以上のことから、PET布を担体に用いた静置培養により、層状のマツタケ菌糸塊(種菌シート)を大量培養することが可能となった。

菌根苗を野外での接種に用いるためには、培地の養分濃度を下げ、他の菌の増殖を抑えることが必要である。そこで、マツタケ発生地(B層)土壌を滅菌し、種菌シートを接種して菌糸を蔓延させた後に、アカマツ無菌実生を移植して、明条件で9か月間育成した。その結果、アカマツの細根が種菌シート上に層を形成し、その一部に菌根が形成された。以上のことから、寒冷地域産の菌株と滅菌土壌を用いた菌根形成が可能となった。

Tricholoma matsutake is an economically valuable fungus in Japan. Its fruiting bodies (basidiocarps) occur in colonies established in natural pine forests. Little is known about colony establishment processes and relationship between the number of basidiocarps and the expansion rate of the colony, or meteorological factors especially in cold region. A final objective of this study is to develop cultivation method of *T. matsutake* in pine forest of cold region. To obtain a fundamental knowledge of *T. matsutake*, field survey and cultivation experiment were conducted. For the former, study sites were set on Japanese red pine forest in Iwate prefecture, and colony establishment processes of *T. matsutake* were traced in 2001 and 2010 by using 12 microsatellite markers including 11 novel ones. Results showed that *T. matsutake* genets persisted at least for a decade. Comparing colonies found in 2001 and 2010, five novel colonies were observed in 2010, where the organic layer was removed or pine trees were regenerated less than 50 years ago. The novel colonies were genotyped, and all of them were different from colonies found in 2001, indicating that these colonies were established by dispersed basidiospores. Novel genets and candidate parent genets were located in the same ridge, and the mean geographical distance between a novel genet and a parent genet was 19.59 ± 14.73 m, indicating that basidiospores may colonize more easily on roots of hosts near parental basidiocarps. In conclusion, sufficient basidiospore supply and organic layer removal or pine tree regeneration were essential factors for colony establishment of *T. matsutake*. When data from an 18-yr survey were analyzed using a

hierarchical Bayesian framework, the expansion rate of colony was estimated to be 0.17 ± 0.01 m yr⁻¹. Positive correlations were found between the expansion rate and the number of basidiocarps, mean air and soil temperature, and total precipitation. Similarly, there was a positive correlation with an index of accumulated warmth, termed WI_{20} , especially in the pre-emergence season. The Akaike information criterion (AIC) of linear models decreased when precipitation was excluded as an explanatory variable. Furthermore, mean air temperature and WI_{20} showed positive correlations with the number of basidiocarps. These results suggest that the effect of temperature in the pre-emergence season is greater than that of precipitation with respect to the expansion rate of colony, which in turn affects the numbers of basidiocarps. Temperature was also affected basidiocarps occurrence. A “key” temperature for basidiocarps initiation or basidiocarps growth in the soil was estimated as 14.6 ± 1.8 °C, and this estimated value was lower than warm region. *T. matsutake* in cold region was, therefore, thought to be adapted for cold climate by basidiocarps initiation. A size of basidiocarps was affected by both A₀ layer thickness and genets, and influence for the size was greater in former.

In vitro experiments were obtained to elucidate specificity of *T. matsutake* strains collected in cold region. Results showed no difference about temperature for mycelial growth of strains collected in warm region. This result and field observation suggest that strains which live in cold region are adapted for cold climate by basidiocarps initiation rather than mycelial growth. Mycelial growth of strains collected in cold region is, either way, slower than other cultivated edible mushrooms. Improvement of culture method was conducted for *T. matsutake* mycelia. Result shows that PET sheet is effective for shortening of culture period when it was used as carrier on liquid static culture, and “matsutake mycelial sheet” was obtained by the experiment. By using the matsutake mycelial sheet, B horizon soil and pine seedlings, ectomycorrhizae were formed on the fine roots of the seedlings *in vitro*. Further experiment will be needed to introduce *T. matsutake* by larger ectomycorrhizal seedling into pine forest, because the seedlings seemed too small to survive on forest floor. To resolve this problem, containerized seedling infected *T.*

matsutake will be useful as a second carrier, and small ectomycorrhizal seedlings should be used as inoculation source of *T. matsutake* to the containerized seedling.

謝辞

本論文のとりまとめ全般にわたり、懇切なご指導、ご助言をいただいた山形大学農学部食料生命環境学科 俵谷圭太郎 博士に、心より感謝します。論文のとりまとめにあたり、菌根菌と森林、林業の関わりという視点から、有益なご指導、ご助言をいただいた元山形大学農学部食料生命環境学科 故 小山浩正 博士、山形大学農学部食料生命環境学科 森茂人 博士、菌類の生理、遺伝子解析ならびに論文執筆についてご指導、ご助言をいただいた公益財団法人岩手生物工学研究センター 坂本裕一 博士に感謝の意を表します。このうち、研究半ばで惜しくも逝去された故 小山浩正 博士には、謹んでご冥福をお祈りします。集団遺伝学的解析の理論と実験方法をご指導いただいた東京大学アジア生物資源環境研究センター 練春蘭 博士、黒河内寛之 博士、岩手県環境保健研究センター 山内貴義 博士、統計解析に関してご助言をいただいた国立研究開発法人森林総合研究所 正木隆 博士に、心から御礼を申し上げます。さらに、研究の道に導いていただいた元国立研究開発法人森林総合研究所 杉田久志 博士、元岩手県林業技術センター 作山健 博士、元岩泉まつたけ研究所 吉村文彦 博士、マツタケをはじめとする菌根菌の生理、生態について、ご指導と多くの有益な情報、議論の時間をいただいた、信州大学農学部応用生命科学科 山田明義 博士、茨城県林業技術センター 小林久泰 博士、国立研究開発法人森林総合研究所 山口宗義氏、近畿大学農学部環境管理学科 澤島拓夫 博士、宮城県農林水産部 玉田克志氏、貴重な学術資料をご提供いただいた山梨県森林総合研究所 柴田尚 博士をはじめ、多くの菌根研究者の諸先輩方に、深甚の謝意を申し上げます。実験用の菌株をご提供いただいた宮城県林業技術総合センターに、深く感謝します。

岩手県におけるマツタケ研究の実施と連合大学院への進学に、ご理解とご助言をいただいた、元岩手県林業技術センター所長 石川敏彦氏、同じく伊藤琢也氏ならびに岩手県林業技術センター職員の皆様に、心より感謝します。数多くの試料の整理と実

験にご助力いただいた、岩手県林業技術センター 田高聡子氏、元岩手県林業技術センター 仲谷恭子氏、公益財団法人岩手生物工学研究センター職員の皆様に、深く感謝します。研究生活を支えてくれた成松咲樹氏と家族に心より感謝します。

引用文献

- 阿部正範, 飯田繁, 大賀祥治 (2002) シイタケ子実体発生に及ぼす培養温度の影響. 日本応用きのこ学会誌 10:129-134.
- 阿部正範, 西澤元 (2011) 青色発光ダイオードによる光照射がシイタケ子実体の発生に及ぼす影響 (I). 徳島県森林林業研究所研究報告 7:1-7.
- Alexander IJ (1981) The *Picea sitchensis*+*Lactarius rufus* mycorrhizal association and its effects on seedling growth and development. Trans Br Mycol Soc 76:417-423. doi: 10.1016/S0007-1536(81)80068-X
- Amend A, Keeley S, Garbelotto M (2009) Forest age correlates with fine-scale spatial structure of Matsutake mycorrhizas. Mycol Res 113:541-551. doi: 10.1016/j.mycres.2009.01.005
- 安藤範親 (2014) 未利用材の供給不足が懸念される木質バイオマス発電 一地域別需給推計と展望一. 農林金融 67:364-378.
- 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. 高知県林業試験場研究報告 22 : 84-86.
- 有岡利幸 (1997) 松茸. 法政大学出版局, 東京
- Bergemann S, Miller S (2002) Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late - stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. New Phytol 156:313-320.
- Bergius N, Danell E (2000) The Swedish matsutake (*Tricholoma nouseosum* syn. *T. matsutake*): distribution, abundance and ecology. Scand J For Res 15:318-325.
- Boddy L, Buntgen U, Egli S, Gange AC, Heegaard E, Kirk PM, Mohammad A, Kausarud H (2014) Climate variation effects on fungal fruiting. Fungal Ecol 10:20-33. doi: 10.1016/j.funeco.2013.10.006
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. Biotechniques 20:1004-6, 1008-10.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia
- Burchhardt KM, Rivera Y, Baldwin T (2011) Analysis of genet size and local gene flow in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus spraguei* (synonym *S. pictus*). Mycologia 103:722-730. doi: 10.3852/10-334
- Carlile M, Watkinson S, Gooday G (2001) The fungi, Second edi. Academic Press, London, UK
- Carriconde F, Gryta H, Jagreat P, Mouhamadou B, Gardes M (2008) High sexual reproduction and limited contemporary dispersal in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum* : new insights from population genetics and spatial autocorrelation analysis. Mol Ecol 17:4433-4445. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03924.x
- Clemmensen KE, Michelsen A, Jonasson S, Shaver GR (2006) Increased ectomycorrhizal fungal abundance after long-term fertilization and warming of two arctic tundra ecosystems. New Phytol 171:391-404. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01778.x
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity (2004) 93, 504-509. doi:10.1038/sj.hdy.6800545
- Dahlberg A, Stenlid J (1995) Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations. Can J Bot 73:1222-1230. doi: 10.1139/b95-382
- Delabastide P, Kropp B, Piche Y (1994) Spatial-distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. New Phytol 127:547-556. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb03973.x
- Dix NJ, Webster J (1994) Fungal ecology. Chapman & Hall Ltd, London, UK
- Douhan GW, Vincenot L, Gryta H, Selosse M a. (2011) Population genetics of ectomycorrhizal fungi: From current knowledge to emerging directions. Fungal Biol 115:569-597. doi: 10.1016/j.funbio.2011.03.005
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barrès B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T (2007) Challenges of microsatellite isolation in fungi. Fungal Genet Biol 44:933-949. doi: 10.1016/j.fgb.2007.05.003
- Endo N, Dokmai P, Suwannasai N, Phosri C, Horimai Y, Hirai N, Fukuda M, Yamada A (2015)

- Ectomycorrhization of *Tricholoma matsutake* with *Abies veitchii* and *Tsuga diversifolia* in the subalpine forests of Japan. *Mycoscience* 1–11. doi: 10.1016/j.myc.2014.12.004
- Endo N, Giusi S, Fukuda M, Yamada A (2013) *In vitro* mycorrhization and acclimatization of *Amanita caesareoides* and its relatives on *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 23:303–15. doi: 10.1007/s00572-012-0471-x
- 遠藤利明 (2007) コンテナ苗の技術について. 山林 1478: 60-68.
- 衛藤慎也, 田辺紘毅, 坂田勉, 川上嘉章, 山本忠義, 枯木熊人, 板橋正人 (1999) 甲山試験地における30年間のマツタケ発生に関する調査結果. 広島県立林業技術センター研究報告 31:45–56.
- Fiore-Donno aM, Martin F (2001) Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytol* 152: 533-542.
- Frankland JC (1998) Fungal succession — unravelling the unpredictable. *Mycol Res* 102:1–15. doi: 10.1017/S0953756297005364
- Fu YP, Liang Y, Dai YT, Yang CT, Duan MZ, Zhang Z, Li Y (2016) De novo sequencing and transcriptome analysis of *Pleurotus eryngii* subsp. *tuoliensis* (Bailinggu) mycelia in response to cold stimulation. *Molecules* 21:560
- 藤田博美, 藤田徹, 野崎愛 (2002) アカマツ林の造成とマツタケの増産技術. 独立行政法人森林総合研究所編. 公立林業試験研究機関研究成果選集 1:33-34.
- 藤原直哉 (2007) 菌根性きのこのシロ形成技術の開発 藤. 岡山県林業試験場研究報告 23:21-26.
- 古川久彦 (1992) きのこ学. 共立出版, 東京
- Galante TE, Horton TR, Swaney DP (2011) 95 % of basidiospores fall within 1 m of the cap : a field- and modeling-based study. *Mycologia* 103:1175–1183. doi: 10.3852/10-388
- Gill WM, Lapeyrie F, Gomi T, 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. doi: 10.1007/s005720050271
- Gruen HE (1969) Growth and rotation of *Flammulina velutipes* fruit bodies and the dependence of stipe elongation on the cap. *Mycologia* 61:149–166.
- Guerin-Laguette A, Vaario L-M, Gill WM, Lapeyrie F, Matsushita N, Suzuki K (2000) Rapid *in vitro* ectomycorrhizal infection on *Pinus densiflora* roots by *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 41:389–393. doi: 10.1007/BF02463952
- Guerin-Laguette A, Matsushita N, Lapeyrie F, Shindo K, Suzuki K (2005) Successful inoculation of mature pine with *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15:301–305. doi: 10.1007/s00572-005-0355-4
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11:591–611. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x
- Guidot A, Debaud JC, Effosse A, Marmeisse R (2004) Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytol* 161:539–547. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00945.x
- 浜田稔 (1953) マツタケ. 自然 8:56–64.
- 浜田稔 (1970) マツタケ日記-5-. 日本菌学会会報 11:81–86.
- 浜田稔 (1974) マツタケ —分布, 研究の現状と将来の展望. 醗酵協会誌 32:458–462.
- 長谷部公三郎, 大平郁男, 有田郁夫 (1998) シイタケのほだ木栽培における子実体発生温度型:高温型, 中温型および低温型の遺伝的關係. 菌蕈研究所研究報告 36:21-28.
- 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.
- 橋岡良夫 (1961) 交雑によって得られたシイタケ子実体の形態学的ならびに生理学的形質. 菌蕈研究所研究報告 1:69-84.
- Hitchcock CJ, Chambers SM, Cairney JWG (2011) Genetic population structure of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* suggests high gene flow in south-eastern Australia. *Mycorrhiza* 21:131–137.
- 堀越孝雄, 鈴木彰 (1990) きのこの一生. 築地書館, 東京
- Hosford D, Pilz D, Molina R, Amaranthus M (1997)

- Ecology and management of the commercially harvested American matsutake. General Technical Report of U.S. Department of Agriculture, Forest Service PNW-GTR-41.
- Hunter ME, Hart KM (2013) Rapid microsatellite marker development using next generation pyrosequencing to inform invasive burmese Python-*Python molurus bivittatus*-management. Int J Mol Sci 14:4793–804. doi: 10.3390/ijms14034793
- Inaba K, Yoshida T, Takano Y, Mayuzumi Y, Mitsunaga T, Koshijima T (1995) An Instance of the Fruiting-Body Formation of *Tricholoma matsutake*. Environ Control Biol 33:59–64. doi: 10.2525/ecb1963.33.59
- 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およぼす影響. 日本林学会誌 52:362-368.
- Islam F, Ohga S (2012) The response of fruit body formation on *Tricholoma matsutake in situ* condition by applying electric pulse stimulator. ISRN Agronomy 2012:1-6.
- 伊藤幸介 (2010) ナメコ野生菌株の選抜-野生菌株 (Pn701~828)の菌床栽培特性調査. 新潟県森林研究所研究報告 51:23–26.
- 伊藤武, 小川眞 (1979) マツタケ菌の増殖法(II): 林内植生の手入れとマツタケのシロの増加. 日本林学会誌 61:163–173.
- 岩瀬剛二 (1988) マツタケのシロの環境制御による子実体の発生促進. 日本菌学会会報 29:97–105.
- Iwase K (1994) Distribution of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* and the related species and some characteristics of their isolates. in: Soil microorganisms Tsukuba office of MAFF research council (eds) The Second Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan International Workshop on Genetic Resource 179-188.
- 岩瀬剛二, 伊藤武 (1997) マツタケ. 農山漁村文化協会, 東京
- 岩手県 (2015) 岩手県の松くい虫被害の現状と対策. 岩手県森林審議会松くい虫対策部会会議資料 1
- Jany J-L, Bousquet J, Gagné A, Khasa DP (2006) Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications. Mycol Res 110:51–9. doi: 10.1016/j.mycres.2005.09.011
- Jarne P, Lagoda P (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in ecology & evolution 11:424-429.
- Jones AG, Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. Mol Ecol 12:2511–2523. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01928.x
- 枯木熊人 (1972) 降雨量とマツタケ生産量との関係. 広島県林試研報 7:71-79.
- 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.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol Ecol 16:1099–106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x
- Karizumi N (1974) The mechanism and function of tree root in the process of forest production. II. Root biomass and distribution in stands. Bull Gov For Exp Stn 267:1–88.
- Karizumi N (1976) The mechanism and function of tree root in the process of forest production, 3: Root density and absorptive structure. Bull Gov For Exp Stn 285:43–149.
- 勝本謙 (2010) 日本産菌類集覧. 日本菌学会関東支部, 船橋市
- Kausserud H, Heegaard E, Büntgen U, Halvorsen R, Egli S, Senn-Irlet B, Krisai-Greilhuber I, Dämon W, Sparks T, Nordén J, Høiland K, Kirk P, Semenov M, Boddy L, Stenseth NC (2012) Warming-induced shift in European mushroom fruiting phenology. Proc Natl Acad Sci U S A 109:14488–93. doi: 10.1073/pnas.1200789109
- 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. 日本菌学会会報 17:499-505.
- 河合昌孝 (1999) ホンシメジ培養菌糸体の林地埋設による人工感染と子実体の発生. 奈良県林業試験場研究報告 29:1-7.
- 川上嘉章 (1990) マツタケ発生量に影響を及ぼす要因(1). 広島県林業試験場研究報告 24:7-20.

- 川上嘉章 (1992) マツタケ発生量に影響を及ぼす要因(2). 広島県林業試験場研究報告 27:135-142.
- 川上嘉章 (1994) マツタケシロの形成と成長. 広島県林業試験場研究報告 28:49-54.
- 川島祐介 (2001) マイタケ.(キノコ栽培全科. 大森清寿, 小出博志編, 社団法人農山漁村文化協会, 東京) 97-109.
- Kenta T, Gratten J, Haigh NS, Hinten GN, Slate J, Butlin RK, Burke T (2008) Multiplex SNP-SCALE: A cost-effective medium-throughput single nucleotide polymorphism genotyping method. *Mol Ecol Resour* 8:1230-1238. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02190.x
- Kikuchi K, Matsushita N, Guerin-Laguette A, Ohta A, Suzuki K (2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. *Mycol Res* 104:1427-1430. doi: 10.1017/S0953756200002653
- Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K (2007) Development of SSR markers from an ectomycorrhizal fungus, *Suillus bovinus*. *Mycoscience* 48:255-258. doi: 10.1007/s10267-007-0356-6
- 衣川堅次郎 (1963) マツタケの発生に関する生態学的研究 —成長曲線とその解析—. 大阪府立大学紀要 14:27-60.
- 衣川堅次郎 (1965) マツタケ豊凶予想に関する一考察. 日本林学会誌 47:74-76.
- Kinugawa K, Furukawa H (1965) The Fruit-body Formation in *Collybla velutipes* induced by the lower temperature treatment of one short duration. *Bot Mag Tokyo* 244:240-244.
- 衣川堅二郎 (1990) きこの遺伝と育種. 築地書館, 東京
- 吉良竜夫 (1949) 日本の森林帯. (林業解説シリーズ. 日本林業技術協会, 東京) 17:42.
- 気象庁 (2013) 第2章 気温の将来予測. 地球温暖化予測情報 第8巻.
- 気象庁 (2015) アメダスデータ.
- 小林久泰, 綿引健夫, 倉持眞寿美, 小野瀬究明, 山田明義 (2007) 大型培養容器によるマツタケのシロ様構造を有するマツ菌根苗の生産. 日本きのこ学会誌 15:151-155.
- Kobayashi H, Terasaki M (2015) Two-year survival of *Tricholoma matsutake* ectomycorrhizas on *Pinus densiflora* seedlings after outplanting to a pine forest. *Mushroom Sci Biotechnol* 23:108-113.
- 小林政広 (1999) 森林立地調査法. 博友社, 東京, 169-171.
- 小松光雄 (1961) 変温環境ならびに子実体形成過程におけるシイタケ菌糸の形態的变化. 菌蕈研究所研究報告 6:45-59.
- 近藤民雄, 大賀祥治 (2011) マツタケの菌床栽培を目指して-水環境の立場から. 九州大学農学部演習林報告 92:1-3. doi: 10.15017/19557
- Kononov DA, Manning C, Henshaw MT (2004) kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol Ecol Notes* 4:779-782. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00796.x
- Koo C-D, Kim J-S, Cho N-S, Min D-S, Ohga S (1999) Effect of moisture content for mycelial growth and primordial formation of *Lentinula edodes* in a sawdust-based substrate. *Mushroom Sci Biotechnol* 7:169-174.
- Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289-91. doi: 10.1093/bioinformatics/btm091
- Kosaka H, Aikawa T, Ogura N, Tabata K, Kiyohara T (2001) Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: The induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. *Eur J Plant Pathol* 107:667-675. doi: 10.1023/A:1011954828685
- 久保拓弥 (2012) データ解析のための統計モデリング入門. 岩波書店, 東京
- Kües U, Liu Y (2000) Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:141-152. doi: 10.1007/s002530000396
- 熊田淳 (2001) ナメコ.(キノコ栽培全科. 大森清寿, 小出博志編, 社団法人農山漁村文化協会, 東京) 65-75.
- 栗原健一 (2012) 里山と奥山. (森林の江戸学. 徳川林政史研究所編, 東京堂出版, 東京). 251.
- Last FT, Mason PA, Ingleby K, Fleming LV (1984) Succession of fruitbodies of sheathing mycorrhizal fungi associated with *Betula pendula*. *For Ecol Manage* 9:229-234. doi: 10.1016/0378-1127(84)90050-1
- Lee WH, Han SK, Kim BS, Shrestha B, Lee SY, Ko CS,

- Sung GH, Sung JM (2007) Proliferation of *Tricholoma matsutake* mycelial mats in pine forest using mass liquid inoculum. *Mycobiology* 35:54-31. doi: 10.4489/MYCO.2007.35.2.054
- Lian C, Zhou Z, Hogetsu T (2001) A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of Inter-simple Sequence Repeat (ISSR). *J Plant Res* 114:381-385. doi: 10.1007/PL00014001
- Lian C, Hogetsu T, Matsushita N, Guerin-Laguette A, Suzuki K, Yamada A (2003) Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake*, by an ISSR-suppression-PCR method. *Mycorrhiza* 13:27-31. doi: 10.1007/s00572-002-0193-6
- Lian C, Narimatsu M, Nara K, 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. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01801.x
- Lunn DJ, Thomas A, Best N, Spiegelhalter D (2000) WinBUGS - A Bayesian modelling framework: Concepts, structure, and extensibility. *Stat Comput* 10:325-337. doi: 10.1023/A:1008929526011
- Martin CW (1988) Soil Disturbance by Logging in New England--Review and Management Recommendations. *North J Appl For* 5:30-34.
- 正木隆 (2005) 人為攪乱に依存するアカマツ—南部アカマツ林の形成—。(森の生態史 北上山地の景観とその成り立ち. 大住克博, 杉田久志, 池田重人編, 古今書院, 東京) 138-159.
- 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 Ind* 20:37-26.
- 松尾忠直 (2010) 日本におけるキノコ類産地の地域的变化. *地域環境研究* 12:53-67. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- マツタケ研究懇話会 (1983) マツタケ山の作り方. 創文, 東京
- 松山正彦, 寺澤泰, 堀部和雄 (1997) ファジィ数を用いた植物生産環境システムの栽培技術 (第2報) きこの形状と芽だし・生育環境. *植物工場学会誌* 9:114-123. doi: 10.2525/jshita.9.114
- 三木元三郎, 阿部義賢 (1937) 松茸発生の豊凶予想について. *日本林学会誌* 19:381-387.
- 宮本昌幸 (2009) 東北地方北部から北海道地方におけるケッペンの気候区分の再検討. *地理学論集* 84:111-117.
- 水口茂 (2002) マツタケ子実体の菌糸走向性に関する形態学的観察. *日本応用きのこ学会誌* 10:103-109.
- 文部科学省 (2005) 五訂増補日本食品標準成分表.
- 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.
- Murata H, Ohta A, Yamada A, Narimatsu M, Futamura N (2005) Genetic mosaics in the massive persisting rhizosphere colony “shiro” of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15:505-512. doi: 10.1007/s00572-005-0358-1
- Murata H, Yamada A, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Shimokawa T (2013) Root endophyte interaction between ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and arbuscular mycorrhizal tree *Cedrela odorata*, allowing *in vitro* synthesis of rhizospheric “shiro”. *Mycorrhiza* 23:235-42. doi: 10.1007/s00572-012-0466-7
- Murata H, Ohta A, Yamada A (2015) Monokaryotic hyphae germinated from a single spore of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 56:287-292.
- 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. *北海道林業試験場研究報告* 38:1-22.
- Nara K (2009) Spores of ectomycorrhizal fungi: Ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytol* 181:245-248. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02691.x
- 成松眞樹 (2002) シート状マツタケ接種源の開発(2)—マツタケ感染アカマツ苗木の育成に成功—。岩手県林業技術センター研究成果速報 117.
- 成松眞樹 (2004) 岩手県内陸部のアカマツ林におけるマツタケのシロ成長量と子実体発生本数の関係. *岩手県林業技術センター研究報告* 12:19-27.

- 成松眞樹 (2005a) 寒冷地域におけるマツタケ子実体原基形成刺激温度の推定. 日本森林学会大会発表データベース 196. doi: 10.11519/jfsc.116.0.196.0
- 成松眞樹 (2005b) 種菌シートを用いたマツタケ菌の林地導入(1)アカマツ成木への接種試験. 岩手県林業技術センター研究成果速報 154.
- 成松眞樹 (2006a) マツタケ菌糸の液体培養における担体の違いが菌糸体の形状, 重量に及ぼす影響. 岩手県林業技術センター研究成果速報 244.
- 成松眞樹 (2006b) 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. 岩手県林業技術センター研究報告 14:31-36.
- 成松眞樹 (2007) アカマツ林内の環境的条件がマツタケ子実体の重量とサイズに及ぼす影響. 岩手県林業技術センター研究報告 15:45-50.
- 成松眞樹・小岩俊行 (2011) 夏季における地温の上昇がマツタケ子実体の発生に及ぼす影響. 日本きのこ学会第15回大会講演要旨集 124.
- 成松眞樹 (2013) マルチキャビティコンテナとアカマツ幼苗を用いたアマタケ菌根苗の育成. 岩手県林業技術センター研究成果速報 300.
- 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 Ecol* 15:18-28. doi: 10.1016/j.funeco.2015.02.001
- 成松眞樹・八木貴信・野口麻穂子 (2016) カラマツコンテナ苗の植栽時期が植栽後の活着と成長に及ぼす影響. 日本森林学会誌 98:167-175.
- Narimatsu M, Koiwa T, Sakamoto Y, Natsume S, Kurokuchi H, Lian C, Nakajima Y, Nakade K, Yoshida K, Tawaraya K (2016) Estimation of novel colony establishment and persistence of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* in a *Pinus densiflora* forest. *Fungal Ecol* 24:35-43. doi: 10.1016/j.funeco.2016.08.001
- Nei M (1987) Genetic distance and molecular phylogeny. in: Ryman N, Utter F (eds) *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle
- 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. 石川県林業試験場研究報告 13:11-17.
- 農林水産省 (2014) 特用林産基礎資料. <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001149816>
- 農林水産省 (2015) 種苗法施行規則. <http://www.hinsyu.maff.go.jp/act/houritu/04-0-seko ukisoku-all.pdf>.
- 小川眞 (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-1-マツタケのシロ. 林業試験場研究報告 272:79-121.
- 小川眞 (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-2-マツタケの菌根. 林業試験場研究報告 278:21-49.
- Ogawa M (1976) Microbial ecology of "Shiro" in *Tricholoma matsutake* (S. ito et Imai) Sing. and its allied species. II. *Tricholoma matsutake* in *Pinus pumila* var. *yezoalpina* forest. *Trans Mycol Soc Japan* 17:176-187.
- 小川眞, 浜田稔 (1976) 純粋培養によるマツタケ子実体原基の形成. 日本菌学会会報 16:406-415.
- 小川眞 (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-4-菌類社会におけるマツタケのシロ. 林業試験場研究報告 297:59-104.
- 小川眞 (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-3-マツタケのシロ土壌と菌根における菌類相. 林業試験場研究報告 293:105-170.
- Ogawa M (1977a) Microbial ecology of mycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. in pine forest. IV. The Shiro of *T. matsutake* in the fungal community. *Bull For For Prod Res Inst* 297:59-104.
- Ogawa M (1977b) Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. ito et Imai) Sing. and its allied species. IV. *Tricholoma matsutake* in *Tsuga diversifolia* forests. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 18: 20-33.
- 小川眞 (1978) マツタケおよびその近縁種における“シロ”の微生物生態学的研究-7-コジイ林のニセマツタケ. 日本菌学会会報 19:37-46.
- 小川眞, 小原弘之 (1978) マツタケとその近縁種における“シロ”の微生物生態学的研究-8-ミズ

- ナラ,コナラ林のバカマツタケ. 日本菌学会会報 19:391-405.
- 小川眞, 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. 日本林学会誌 60:119-128.
- 小川眞, 伊藤武, 小林藤雄, 藤田博美 (1980) マツタケのシロ形成初期の状態について. 日本菌学会会報 21:505-512.
- Ogawa M (1981) Ecological characters of ectomycorrhizal fungi and their mycorrhizae: An introduction to the ecology of higher fungi. 17th IUFRO Congr 305-315.
- 小川眞 (1991) 「マツタケ」の生物学, 補訂版. 築地書館
- Ohara H (1966) Antibacterial Activity of Mycorrhiza of *Pinus densiflora* Formed by *Tricholoma matsutake*. Proc Jpn Acad 42:503-506.
- 大平郁男, 松本晃幸, 大久保充, 前田俊夫, 山根光治 (1982) シイタケ子実体発生および形態におよぼす温度の影響. 菌蕈研究所研究報告 20:123-139.
- 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.
- 大森清寿 (2001) シイタケ. (キノコ栽培全科. 大森清寿, 小出博志編, 社団法人農山漁村文化協会, 東京) 44-45.
- Ohta A (1990) A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. Trans Mycol Soc Japan 31:323-334.
- Ohta A (1994) Some cultural characteristics of mycelia of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*. Mycoscience 35:83-87. doi: 10.1007/BF02268533
- Ohta A, Fujiwara N (2003) Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. Mycoscience 44:295-300. doi: 10.1007/S10267-003-0120-5
- Okada K, Okada S, Yasue K, Fukuda M, Yamada A (2011) Six-year monitoring of pine ectomycorrhizal biomass under a temperate monsoon climate indicates significant annual fluctuations in relation to climatic factors. Ecol Res 26:411-419. doi: 10.1007/s11284-011-0800-0
- Park H, Ka K (2010) Spore dispersion of *Tricholoma matsutake* at a *Pinus densiflora* stand in Korea. Mycobiology 38:203-205. doi: 10.4489/MYCO.2010.38.3.203
- Parke JL, Linderman RG, Trappe JM (1983) Effects of forest litter on mycorrhiza development and growth of douglas-fir and western red cedar seedlings. Can J For Res 13:666-671.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. Bioinformatics 28:2537-9. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD (2011) Rethinking ectomycorrhizal succession: Are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation? Fungal Ecol 4:233-240. doi: 10.1016/j.funeco.2010.09.010
- Pinna S, Gévrý M-F, Côté M, Sirois L (2010) Factors influencing fructification phenology of edible mushrooms in a boreal mixed forest of Eastern Canada. For Ecol Manage 260:294-301. doi: 10.1016/j.foreco.2010.04.024
- Pugh GJF (1980) Strategies in fungal ecology. Trans Br Mycol Soc 75:1-14.
- R development core team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ, Bruns TD (2001) Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. Molecular Ecology 10: 1025-1034.
- 林野庁 (2012) 森林資源の現況. <http://www.rinya.maff.go.jp/j/keikaku/genkyou/h24/index.html>
- 林野庁 (2015) 平成26年度森林・林業白書.
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular ecology resources 8: 103-106.
- Ruimin Z, Zueteh M, Kaetsu I, Kumakura M (1993) Immobilization of *Trichoderma reesei* by radiation polymerization. Radiat Phys Chem 42:943.
- Sakamoto Y, Ando A, Tamai Y, Miura K, Yajima T (2002) Protein expressions during fruit body induction of *Flammulina velutipes* under reduced temperature.

- Mycol Res 106:222-227.
- 佐多一至 (1937) 松茸の産地と環境因子特に有効水分の配布状態との関係に就いて. 日本林学会誌 19: 752-776.
- Sato T, Yaegashi K, Ishii S, Hirano T, Kajiwara S, Shishido K, Enei H (2014) Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. Biosci Biotechnol Biochem 62:2346-2350. doi: 10.1271/bbb.62.2346
- Sawahata T, Narimatsu M (2006) The abundance of Collembola collected from ectomycorrhizal hyphal mats of *Tricholoma matsutake*. Eur J Soil Biol 42:S301-S304. doi: 10.1016/j.ejsobi.2006.07.035
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat Biotechnol 18:233-234.
- Selosse M, Martin F, Le Tacon F (2001) Intraspecific variation in fruiting phenology in an ectomycorrhizal *Laccaria* population under douglas fir. Mycol Res 105:524-531. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756201003975>
- 庄司次男 (1979) マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus lignicolus*) の低温耐性. 日本線虫研究会誌 9:5-8. doi: 10.14855/jjn1972.9.5
- 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.
- 下川利之 (1981) アカマツ林の下層植生の調節とAo層の除去がきのことと土壌生物に与える影響. 森林立地 23:1-8.
- Simard S, Austin M (2010) The role of mycorrhizas in forest soil stability with climate change. In: Simard S (ed) Climate Change and Variability. InTech Europe. InTech Europe, Rijeka, Croatia, 283-284
- Smit AFA, Hubley R, Green, P (2013) RepeatMasker Open-4.0. <http://www.repeatmasker.org>
- Smith SE, Read DJ (1996) Mycorrhizal Symbiosis, 2nd edn. Academic press, London, UK
- Stocker T, Qin D, Plattner G (2013) Climate change 2013: The physical science basis.
- 菅原冬樹, 阿部実, 菱川敬太, 田中修 (2012) マツタケ栽培技術の開発—アカマツ林におけるマツタケ菌の増殖およびキノコ相調査—. 秋田県森林技術センター研究報告 21:82-102.
- 鈴木彰 (1979) 同担子菌類の子実体原基形成に関する環境要因. 日本菌学会会報 20:253-265.
- 鈴木彰 (1988) 子実体の発育と環境 (きのこの生物学<特集>). 遺伝 42:9-14.
- 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. 日本森林学会誌 87:90-102.
- Takaki K, Yamaguchi R, Yamazaki N, Mukaigawa S, Fujiwara T, Kofujita H, Takahashi K, Sakamoto Y, Narimatsu M, Nagane K (2009) Fruit body formation of *Lentinula edodes* by pulse electric field stimulations. In: 2009 IEEE Pulsed Power Conference. IEEE, 1094-1098.
- 竹内栄 (1970) マツタケ発生期の気象が豊凶に及ぼす影響について. 日本林学会講演要旨集 81: 367-368.
- 竹内美次, 北田健二 (1986) 保護樹林の寒害回避効果. 緑化工技術 12:12-18.
- 玉田克志, 練春蘭 (2004) マツタケ胞子分離により得られた菌糸体の特性. 東北森林科学会誌 9: 90-93.
- 寺島和寿 (2015) 美味・厚肉で収穫期間が長くブランド力のある原木シイタケ品種の開発. 菌茸 61:20-23.
- Tinus R (1974) Characteristics of seedlings with high survival potential. Proc North Am Contain For tree Seedl Symp 276-282.
- 時本景亮 (2010) シイタケ原木栽培の基礎. 日本きのこ学会誌 18:131-138.
- 時本景亮, 小松光雄 (1982) シイタケの菌糸成長および子実体原基形成におよぼす温度の影響 (故浜田稔博士記念号-2-). 日本菌学会会報 23:385-390.
- Tokimoto K, Fukuda M, Tsuboi M (1984) Physiological studies of fruitbody formation in bedlogs of *Lentinus edodes*. Reports of the Tottori Mycological Institute 22:78-79.
- 富永保人 (1971) マツタケ発生地菌根に関する研究-1-マツタケとネズの菌根について. 広島農業短期大学報告 4:123-130.
- 富永保人 (1975) マツタケのトンネル方式(広島方式)栽培に関する研究-1-1974年の促成栽培について. 広島農業短期大学研究報告 5:165-180.
- 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-1-雲南省のマツタケ. 広島農業短期大学研究報告 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-2-四川省馬爾康県と小金県のマツタケ. 広島農業短期大学研究報告 8:559-570.
- 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.
- Trinci A (1970) Kinetics of the growth of mycelial pellets of *Aspergillus nidulans*. Arch Microbiol 73:353-367.
- 津村義彦, 陶山佳久 (2012) 森の分子生態学2. 文一総合出版, 東京
- Tusue YM (1969) Experimental control of fruit-body formation in *Coprinus macrorrhizus*. Dev Growth Differ 11:164-178. doi: 10.1111/j.1440-169X.1969.00164.x
- Untergasser A, Cutcutache I (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40:115.
- Vaario L-M, Savonen E-M, Peltoniemi M, Miyazawa T, Pulkkinen P, Sarjala T (2015) Fruiting pattern of *Tricholoma matsutake* in southern Finland. Scand J For Res 30:1-7. doi: 10.1080/02827581.2015.1006246
- Valdés M, Asbjornsen H, Gómez-Cárdenas M, Juárez M, Vogt KA (2006) Drought effects on fine-root and ectomycorrhizal-root biomass in managed *Pinus oaxacana* Mirov stands in Oaxaca, Mexico. Mycorrhiza 16:117-24. doi: 10.1007/s00572-005-0022-9
- Van Der Linde S, Alexander IJ, Anderson IC (2009) Spatial distribution of sporocarps of stipitate hydroid fungi and their belowground mycelium. FEMS Microbiol Ecol 69:344-352. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00716.x
- Wadud MA, Nara K, Lian C, Ishida TA, Hogetsu T (2014) Genet dynamics and ecological functions of the pioneer ectomycorrhizal fungi *Laccaria amethystina* and *Laccaria laccata* in a volcanic desert on Mount Fuji. Mycorrhiza 24:551-563. doi: 10.1007/s00572-014-0571-x
- Wang Y, Hall IR, Evans LA (1997) Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies I. *Tricholoma matsutake* and related fungi. Econ Bot 51:311-327. doi: 10.1007/BF02862101
- Wang Y, Hall IR (2004) Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. Can J Bot 82:1063-1073. doi: 10.1139/b04-051
- Wood WF and Lefevre CK (2007) Changing volatile compounds from mycelium and sporocarp of American matsutake mushroom, *Tricholoma magnivelare*. Biochemical Systematics and Ecology 35:634-636.
- 渡部正明 (2001) ムキタケ. (キノコ栽培全科. 大森清寿, 小出博志編, 社団法人農山漁村文化協会, 東京) 149-152.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution (N Y) 38:1358-1370.
- Xu J, Sha T, Li YC, Zhao ZW, Yang ZL (2008) Recombination and genetic differentiation among natural populations of the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake* from southwestern China. Mol Ecol. 17: 1238-47.
- 八木橋勉, 中村克典, 齋藤智之, 松本和馬, 八木貴信, 柴田鏡江, 野口麻穂子, 駒木貴彰 (2015) クロマツコンテナ苗の当年生苗利用と通年植栽の可能性. 日本森林学会誌 97:257-260. doi: <http://doi.org/10.4005/jjfs.97.257>
- Yamada A, Katsuya K (1995) Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. Mycoscience 36:315-323. doi: 10.1007/BF02268607
- 山田明義, 寺崎正孝 (1998) 茨城県産マツタケ培養菌株の性状. 日本林学会論文集 109:483-484.
- Yamada A, Kanekawa S, Ohmasa M (1999a) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on *Pinus densiflora*. Mycoscience 40:193-198. doi: 10.1007/BF02464298
- Yamada A, Maeda K, Ohmasa M (1999b) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* *in vitro*. Mycoscience 40:455-463. doi: 10.1007/s00572-005-0021-x
- 山田明義 (2001) 菌類の採集・検出と分離: 外生菌根菌(III)分離培養法ならびに釣菌法. 日本菌学会会報 42:177-187.

- 山田明義 (2002) 日本産菌根性きのこ類の食資源としての利用性. 信州大学農学部紀要 38:1-17.
- 山田明義 (2003) 菌根共生. (土壌微生物生態学. 堀越孝雄, 二井一禎編, 朝倉書店, 東京) 44-60.
- Yamada A, Maeda K, Kobayashi H, Murata H (2006) Ectomycorrhizal symbiosis *in vitro* between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring “shiro.” *Mycorrhiza* 16:111–116.
- 山田明義, 小林久泰 (2008) マツタケ人工栽培の展望(<第2特集>マツタケ研究の最前線). 森林科学 53:41-42.
- 山中勝次, 曾見忠則, 万佳宁, 曹暉, 陳明杰 (2011) アジアのマツタケおよびマツタケ近縁種の宿主樹木. 日本きのこ学会誌 19:79-87.
- 山中高史 (2012) マツタケ人工栽培技術開発に向けた研究. 森林総合研究所研究報告 11:85-95.
- Yamanaka T, Ota Y, Konno M, Kawai M, Ohta A, Neda H, Terashima Y, Yamada A (2014) The host ranges of conifer-associated *Tricholoma matsutake*, *Fagaceae*-associated *T. bakamatsutake* and *T. fulvocastaneum* are wider *in vitro* than in nature. *Mycologia* 106: 397-406. doi: 10.3852/13-197
- 柳田友道 (1985) 微生物学2. 学会出版センター, 東京
- Yang X, He J, Li C, Ma J, Yang Y, Xu J (2008) Matsutake trade in Yunnan province, China: an overview. *Econ Bot* 62:269–277. doi: 10.1007/s12231-008-9019-6
- Yang X, Luedeling E, Chen G, Hyde KD, Yang Y, Zhou D, Xu J, Yang Y (2012) Climate change effects fruiting of the prize matsutake mushroom in China. *Fungal Divers* 56:189–198. doi: 10.1007/s13225-012-0163-z
- 八百俊介 (1991) 都市近郊における入会林野の変容と村落社会運営. 人文地理 43:1-19.
- 横田一郎, 沼田多佳子, 鮎沢澄夫, 菊地恵美, 夏秋知英 (2011) 試験管を用いたアカマツとマツタケの簡易共培養による菌根合成. 植物環境工学 23:107-112.
- 蓬田英俊 (2014) アカマツ精英樹と被害地から選抜した抵抗性候補木のマツノサイセンチュウ接種検定による抵抗性評価. 岩手県林業技術センター研究報告 22:1-8.
- 吉田敏臣 (1992) 菌糸体生産.(きのこ学. 古川久彦編, 共立出版センター, 東京) 185-188.
- 吉村文彦 (2005) マツタケと森林管理 —マツタケ山の盛衰—. (森の生態史 北上山地の景観とその成り立ち. 大住克博, 杉田久志, 池田重人編, 古今書院, 東京) 160-174.
- Zhang RY, Hu DD, Gu JG, Hu QX, Zuo XM, Wang HX (2012) Development of SSR markers for typing cultivars in the mushroom *Auricularia auricula-judae*. *Mycol Prog* 11:587–592. doi: 10.1007/s11557-011-0798-2
- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T (1999) Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytol* 144: 55-63.
- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T (2000) Genet distribution of ectomycorrhizal fungus *Suillus grevillei* populations in two *Larix kaempferi* stands over two years. *J Plant Res* 113:365–374. doi: 10.1007/PL00013944
- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T (2001) Polymorphism of simple sequence repeats reveals gene flow within and between ectomycorrhizal *Suillus grevillei* populations. *New Phytol* 149:339–348. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00029.x