

容器内でアカマツと共生したマツタケのバイオマス経時変化と自然界のシロ土壤との比較

山口宗義・小林久泰

¹⁾森林総合研究所, ²⁾茨城県林業技術センター

要旨: 定量 PCR 法(以下 qPCR 法)を用いて開発した土壤中の菌糸体量を特異的に定量可能な技術を用いて、接種後 3 か月~36 か月の菌根苗土壤断面中のマツタケ菌バイオマスを測定し、菌が成長する過程を定量的に解析した。また、野外のマツタケシロにおける菌糸体量も同じ手法で測定し比較した。その結果マツタケは、3ヶ月では容器中心部では検出されず接種源近くの外側で検出され、6~24ヶ月では全体的に検出された。30~36ヶ月では、菌密度が低い箇所が多くなり、検出されない箇所が増えた。培養期間 36ヶ月に至るほぼ全ての期間で局所的に野外シロに近い菌密度に達していた。このことから、天然のマツタケシロの地下でおこっている共生現象が、容器内で局所的に再現されたのではないかと考えられる。

キーワード: マツタケ, 定量 PCR 法, アカマツ, 共生, 菌糸体定量

Temporal change of the *Tricholoma matsutake* biomass in soil associated with *Pinus densiflora* in culture bottles and its comparison with the biomass of natural mycelial blocks called “shiro” in the forest.

Muneyoshi Yamaguchi¹⁾, Hisayasu Kobayashi²⁾

¹⁾ Forestry and Forest Products Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, JAPAN

²⁾ Ibaraki Prefectural Forestry Research Institute, Naka, Ibaraki 311-0122, JAPAN

Abstract: Using a qPCR assay that specifically quantifies biomass, we measured the *Tricholoma matsutake* biomass in soil associated with pine seedlings in the culture bottles 3 to 36 months after inoculation. At the same time, we compared them with that at the natural soil including densely developed *T.matsutake* mycelia, called “shiro” in the forest. As results, it was detected in the marginal region of the soil in the bottle 3 month after inoculation. They were detected extensively in the soil 6 to 24 months after inoculation. Soil regions with low density or nondetection increased. High density regions compared with those of the natural soil were observed partially in the bottles 3 to 36 months after inoculation. They suggested that symbiotic phenomena in the natural soil could reproduce partially in the culture bottles.

Keywords: *Tricholoma matsutake*, qPCR method, *Pinus densiflora*, symbiosis, quantification of mycelium

I はじめに

マツタケは古くから日本で食されてきたきのこで、季節を味わう食材として珍重されてきた。近年は収穫量が著しく低下し、2020年現在絶滅危惧種に指定されるまでになった。マツタケは主にアカマツと共生関係を築きながら土壤中にシロと呼ばれる塊状の構造を形成して存在し、条件が揃うことによってそこから子実体を発生させる(4)。このように大半の生活を土壤中で過ごす菌であるため、その生態にはまだまだ未解明な点が多い。我々は土壤中の生態を明らかにするために、マツタケを特異的に定量可能な qPCR 法を開発した(7)。また、マツタケをアカマツの根に共生させ、野外のシロのような構造を作らせた苗(以下、菌根苗という)を無菌的に作出することに成功した(1, 6)。しかし、この菌根苗を育苗している土壤中において、マツタケ菌が拡大して蔓延してい

く過程は、定量的には明らかになっておらず、できたシロのような塊が形態学的に評価されるのみである(1, 6)。そこで、本稿はアカマツと共生したマツタケ菌の菌根苗作出土壤中での拡大蔓延過程を明らかにするため、土壤中のマツタケ菌糸量を qPCR による定量法で経時的に測定するとともに、できたシロのような塊が野外のシロと質的に同等であるか、菌糸密度の観点から比較検討した結果を報告する。

II 材料および方法

1. 材料 マツタケ菌株は、*Tricholoma matsutake* AT 638 株(茨城県林業技術センター保存株)、アカマツはマツノザイセンチュウ抵抗性品種の種子(茨城県林業技術センター構内採取)を供試した。土壤は、茨城県常陸太田市と常陸大宮市のマツタケ発生地近傍アカマツ林の B 層土

壤を5-6 mmメッシュの篩で篩った後、乾燥して保存したものを1:1 (V/V) で混合後、含水率を10% (W/W) に調整したものを使用した。容器はナルゲン社製1L 広口円筒容器を既報(1)にしたがった方法で加工したものを用いた。

2. マツタケ菌糸体およびアカマツ実生の調整と育苗

予めmodified Norkrans's "C" (MNC) 寒天平板培地を用いて、20℃で培養したマツタケ菌糸体を切り出し、MNC液体培地20 mlを入れた100 ml容のポリメチルペンテン製広口ボトル(アズワン社製)に移植し、20℃で2-3ヶ月間培養した(1)。その後、1L 広口円筒培養容器中の滅菌土壌へ、容器あたりボトル1-2本分の培養菌糸体を接種した。培養菌糸体は1 cm角程度に切り分け、広口容器中の中央部に深さ2 cm程度の所に1箇所、周辺部に均等に深さ6 cm程度の所に4箇所、計5箇所接種した。その後、20℃暗黒条件下で3ヶ月静置培養した。

アカマツ種子を既報(1)に従い表面殺菌後、MNC培地上で発芽させて無菌状態が確認された実生のみを用いた。実生1本を上記で3ヶ月培養した土壌表面中央部に無菌的に移植し、蓋をしてから、地下部容器表面をアルミフイルドで遮光した。苗を20℃、20,000 Lxで24時間連続照射している人工気象室で育苗し、滅菌水を用いて2ヶ月に一度の間隔で灌水した。育苗期間は36ヶ月間で、この間3ヶ月、6ヶ月12ヶ月、24ヶ月、30ヶ月、36ヶ月間経過した苗を1本ずつ以下に示すqPCR法による定量分析に供試した。

3. DNAの抽出および定量 DNAの抽出はYamaguchiら(7)の方法にしたがった。各培養期間後、育苗した苗を容器のまま凍結し、円筒状の苗の土壌部を直径に対して平行に直径線に沿った断面を得た。また、本断面は接種源を含むように設定した。断面に対し、中心軸から垂直・水平方向に1 cm³の土壌を採取し(図-1)、各々個別に

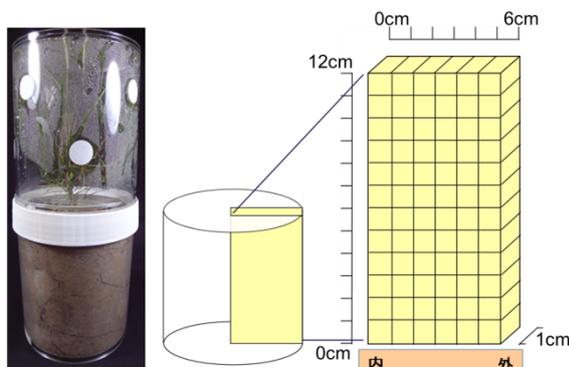


図-1 共生苗の土壌採取概略図

Fig.1 The soil collection schema of the symbiosis seedling.

凍結乾燥した。乾燥した土壌試料に0.6%スキムミルク

を含有した2%CTAB液650 μlを加え、65℃1時間攪拌しながら混和後、750 μlのクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で2回抽出し、上清を採取した。イソプロパノールでDNAを沈殿、乾燥後、滅菌水100 μlに溶解し、抽出試料とした。抽出試料をライトサイクラー2.0(ロシュ社製)を用いてqPCRを行い、菌糸体量を算出した。qPCRの条件および算出方法はYamaguchiら(7)の方法にしたがった。

4. 野外マツタケシロ土壌の採取、抽出および定量

野外におけるマツタケシロ土壌は、岩手県岩手町のマツタケ発生地の子実体直下土壌を採取した。土壌サンプラーとして直方体状(5 cm×5 cm×14 cm)ステンレスサンプラーを用い(図-5)、2 cm深さ毎の土壌を切り分け、深さ毎の土壌を3分割し土壌サンプルとした。DNA抽出はYamaguchiら(7)の方法にしたがい、上記と同様に土壌中のマツタケ菌糸体量を算出した。

III 結果および考察

1. qPCR法によるマツタケ菌糸体定量結果

36ヶ月間育苗したもののうち、6、12、24、36ヶ月間経過した菌根苗の写真を示す(図-2)。12ヶ月でアカマツの根はポット内の隅々まで伸び、36ヶ月にわたって分岐しながら広がっていた。一方マツタケ菌糸も白色

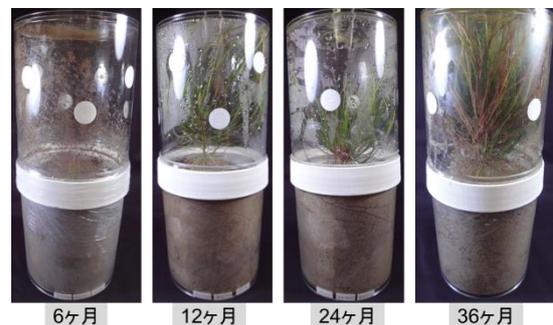


図-2 共生培養した苗の成長経過

Fig.2 The growth process of the pine seedling with *T.matsutake*.

状に局所的にシロのような塊を形成していた。地上部のアカマツも順次成長し、葉の形成も培養期間に沿って増加していることが観察された。

次に、各期間後の容器内土壌中のマツタケ菌糸体量分布を示す(図-3)。容器内の土壌中の菌糸は、培養期間によって異なる分布様式を示しながらも、36ヶ月間マツタケのDNAが検出された。3ヶ月では容器中心部では検出されず外側の接種源に近い場所で検出され、6~24ヶ月では全体的に検出されていることが検出箇所分布状況から確認された。30~36ヶ月の培養後期では、断面全体で検出されている傾向は変わらないが、菌密度が低い箇所が多くなり、検出されない箇所が増えることが確認された。アカマツ根の広がり状況と比較すると、アカマツ

マツタケ菌糸体 $\mu\text{g/g}$ -土壌

内		外		内		外		内		外		内		外		内		外																							
0	0	3	5	4	43	128	0	20	29	160	104	145	204	56	59	21	24	0	14	6	2	2	16	0	0	44	38	17	32							21	6	23	11	12	30
8	39	0	0	14	33	600	60	99	99	53	89	39	54	36	5	69	12	12	2	3	8	6	20	17	7	25	0	0	55	0	1	0	2	0	0	8	3	9	0	23	0
10	7	15	10	40	35	125	43	102	56	93	306	127	106	0	55	0	0	0	0	3	5	7	40	0	9	3	161	172	6	5	0	0	3	0	11	0	9	0	0	0	0
27	27	15	10	40	42	75	180	20	54	26	40	79	0	0	68	64	86	8	14	3	5	17	6	25	7	7	0	0	0	151	0	0	0	3	0	0	5	1	18	2	0
2	6	14	13	23	53	39	23	30	16	16	0	0	0	208	47	63	0	3	34	3	11	43	16	24	21	15	0	21	0	0	5	4	0	0	0	7	8	8	39	4	0
0	3	9	39	39	19	109	89	13	42	23	41	33	49	0	0	10	0	11	7	22	17	5	5	8	36	13	0	34	92	10	3	0	0	0	0	8	24	11	16	0	13
0	0	37	15	21	5	13	26	68	61	51	279	0	0	30	57	4	80	11	21	18	31	23	68	0	120	9	23	17	250	1	9	5	4	22	17	4	0	16	10	13	1
22	56	17	129	62	117	27	9	12	28	27	150	6	4	18	4	13	78	166	23	0	20	39	115	10	0	20	60	63	228	19	5	0	5	19	6	7	27	1	0	3	24
0	3	136	428	581	404	0	2	36	17	41	49	15	222	36	33	16	20	53	23	5	36	50	9	4	0	64	0	56	108	15	16	27	0	0	16	21	0	0	62	0	65
0	0	0	127	402	223	35	7	14	24	49	29	21	14	44	14	81	74	75	13	225	0	0	37	5	23	47	11	32	60	44	0	0	11	0	56	0	23	27	45	135	0
0	0	0	94	245	196	13	69	9	14	14	19	12	70	13	7	61	28	14	15	57	45	70	42	20	28	10	46	58	39	0	0	0	5	37	41	160	37	0	0	0	233
0	0	0	0	168	102	2	9	125	3	7	110	17	10	31	0	13	52	7	3	10	23	55	38	7	35	43	16	68	79	0	0	42	26	0	0	0	0	163	167	0	9
3ヶ月		6ヶ月		12ヶ月		18ヶ月		24ヶ月		30ヶ月		36ヶ月																													

図-3 各培養期間後のマツタケ菌糸体量分布
Fig.3 *T.matsutake* mycelium distributions of culture bottles after inoculation.

実生の根が広がっていない培養3ヶ月時は、マツタケ菌糸は接種された外縁部地点の土壌周辺でマツタケ菌のみで成長していたために、このような菌糸体の分布になったと推定できる(3)。一方、根が広がり始めた6ヶ月および容器底部まで広がった12ヶ月以降は、アカマツ根に沿ってマツタケ菌糸は全体的な蔓延をしたと推定される。次に、未検出箇所に着目すると、24ヶ月以降マツタケ菌糸検出できていない箇所が増えている。一旦は蔓延した菌糸体が衰退したようにも見えるが、生残している領域の菌糸体密度は作出初期と同等のものも散見された。時間が経つ毎にマツタケ菌糸はアカマツ根と局所的共生関係を結ぶようになっていったと推定される。

次に、容器内におけるマツタケ菌糸体密度の推移を示す(図-4)。ばらつきは大きいものの、ポット内のマツタケ菌糸は、期間後期ではマツタケ菌が検出できない土壌も存在したが、概ね40 μg 菌糸体/g-土壌前後で推移

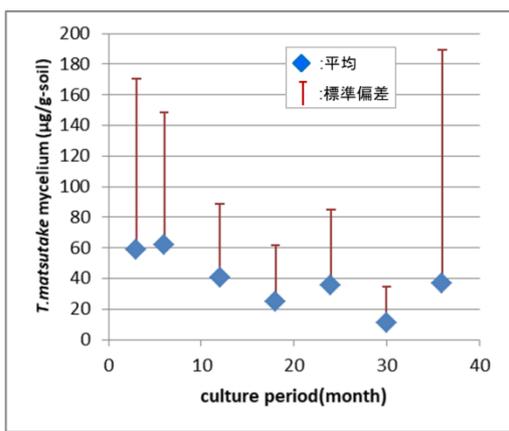


図-4 共生苗内におけるマツタケ平均菌糸体量の推移
Fig.4 Variance of the average of *T.matsutake* mycelium in the symbiosis seedling.

していた。本実験条件は閉鎖系であり、1個体のアカマツの根から供給される炭素源栄養でマツタケ菌は生育する。それゆえ、アカマツの光合成産物のうち、アカマツ自身の利用した後の残りが地下部土壌に供給され、菌根

を介してマツタケ菌によって利用されていると考えられる。今回の人工気象室条件で36ヶ月間マツタケのDNAが検出され、アカマツも生育し続けたことが確認されたが、容器内のマツタケ菌糸体総量が期間を通じて一定で推移したのは、人工光源を用いた小さな苗木の光合成能力では限界があり、それによって供給される光合成産物が均等に地下部に分配されず、そのため菌の成長は局所的になっていたのではないかと想像される。元々、アカマツは太陽光を強く好む植物であり、野外のアカマツが生育している地点は尾根線や他の植物に影響されにくいところである。一般的に、野外の快晴で100,000 Lx、曇天で30,000 Lxであり(5)、20,000 Lxという人工照明としては非常に強力な光でもアカマツにとっては足りない可能性がある。

2. 野外マツタケシロ土壌のマツタケ菌糸体定量結果

マツタケ子実体が発生した地点直下のシロ土壌におけるマツタケ菌糸の分布を示す(図-5, 図-6)。

本採取地点におけるA層は0-4 cm, B層は4-14 cmであった。深さ6-8 cmおよび8-10 cmのB層土壌にマツタケ菌糸が高密度に検出され、6-10 cmでの全ての採取分割サンプルで200 μg 菌糸体/g-土壌程度の菌密度が検出された。各分析値は1分割あたり約17 cm^3 の体積に相当し、その菌密度を平均的に示しており、6-10 cm深度範囲全体では約100 cm^3 の土壌体積に相当する。自然状態におけるマツタケシロにおいては、少なくともシロ範囲面積25 cm^2

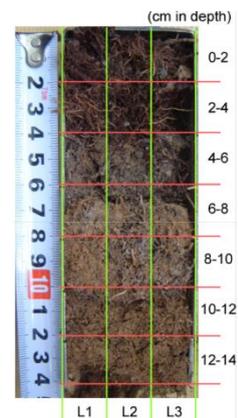


図-5 採取された土壌
Fig.5 Sampled soil

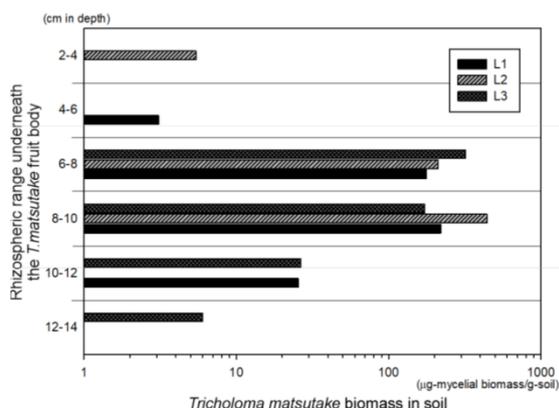


図-6 子実体直下のマツタケ菌糸体量分布
Fig.6 *T.matsutake* mycelium distribution of soil under fruit body.

において約 100 cm³の体積に平均 200 µg/g-土壌の菌密度の状態を形成していることがわかった。

3. 容器内土壌と野外シロ土壌との比較

容器内のマツタケ菌糸体量分布の各箇所における菌糸体密度は概ね 40 µg 菌糸体/g-土壌前後であり、野外のシロの平均 200 µg/g-土壌と比べ、育苗期間を通じて約 5分の1であり、どの培養期間においても野外シロの菌密度には達していないことがわかった。これは、前述のように苗の光合成産物供給不足が原因ではないかと考えられる。菌根苗を用いてシロ定着から子実体発生を目指す研究も行われているが(2)、野外のシロを再現させるためには、全体的な菌密度をさらに高める必要があることが明らかになった。

一方、容器内で野外シロ土壌の菌密度に匹敵する高菌密度を検出する箇所が多存在していた(図-3)。また、培養期間 36 ヶ月に至るほぼ全ての期間で局所的に野外シロに近い菌密度に達していた。これは、部分的にせよ、天然のマツタケシロ土壌内でおこっているような共生関係が容器内で人工的に再現され、マツタケが局所的に高密度に生育できたためではないかと考えられる。

IV まとめ

以上のように、人工環境下でアカマツとマツタケの二者のみで作出された菌根苗という人工共生系において、マツタケ菌バイオマスの経時変化の把握を試み、育苗初期から菌体量が概ね一定であること、時間の経過とともに菌糸が局在化することを明らかにした。また、天然での共生系であるシロ土壌との比較から、人工共生系は全体的に菌糸密度が低いが、局所的に同程度になっていることも明らかとなった。

人工共生系は比較的系を単純化でき、経時変化を追跡しやすいことから、遺伝子発現解析等の分子生物学的手

法も適用しやすく、共生状態の解明や菌根形成の解明のために大変有用なモデルと考えられる。菌糸密度が全体的に低いが、部分的に高いところもあり、そのばらつきの原因究明のためにこれらの手法を用いることも効果的なのではないかと考えられる。

一方、子実体形成を目的としてこの菌根苗を利用するためには、菌密度を高める必要があると考えられる。光条件等を検討して、局所的に再現された共生関係を如何にして容器全体に広げていくのか、ということが次への課題となる。

本研究は農林水産省農林水産技術会議事務局委託プロジェクト研究「森林資源を最適利用するための技術開発」の一環として実施した。また、本研究は国立研究開発法人森林総合研究所エンカレッジモデルによる研究支援を受けた。また、岩手県マツタケ発生地土壌の調査協力を受けた岩手県林業技術センターの成松眞樹氏に感謝いたします。

引用文献

- (1) 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
- (2) Kobayashi H, Terasaki, M, Yamada A (2015) 2-year survival of *Tricholoma matsutake* ectomycorrhizas on *Pinus densiflora* seedlings after outplanting to a pine forest. *Mushroom Science and Biotechnology* 23: 108-113
- (3) Narimatsu M, Yamaguchi M, Yamanaka T, Gisusi S, Azuma T, Tamai Y, Fujita T, Kawai M, (2019) Comparison of mycelial growth of different *Tricholoma matsutake* strains in soil medium at varying temperatures. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology* 5(4): 1-8
- (4) 小川真. (1978) 「マツタケの生物学」. 築地書館
- (5) 産総研 「実際の照度例」
https://www.aist.go.jp/science_town/standard/standard_03/standard_03_04.html
- (6) 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
- (7) Yamaguchi M, Narimatsu M, Fujita T, Kawai M, Kobayashi H, Ohta A, Yamada A, Matushita N, Neda H, Shimokawa T, Murata H. (2016) A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil. *Mycorrhiza* 26: 847-861