

## 菌根性きのこの安定生産技術の開発

藤原直哉, 竹内隆人\*

Development of stable production technology for mycorrhizal fungi.

Naoya FUJIWARA, Takato TAKEUCHI\*

## 要 旨

藤原直哉・竹内隆人：菌根性きのこの安定生産技術の開発 岡山県林試研報19：35～43 2003 野外試験地3か所を設置し、腐植層の除去、被陰木の伐採等、発生環境整備を実施した。施業実施後2年間はマツタケ子実体の発生量が増加した。混合微生物散布区ではシロの面積拡大の効果は確認できなかったが、客土・混合微生物散布区ではシロの拡大割合が上昇し効果を認めた。また、客土については、子実体の品質向上の効果を認めた。ホンシメジについては、春季と秋期の2回子実体が発生することを確認した。

菌糸による林地接種について、菌根の形成は確認できなかった。また、円形プランターを利用した集根方法についても有効性は見出さなかった。胞子による林地接種については、滅菌土に混合して埋設したところ樹木の根が侵入し、菌根を形成した。菌根菌の種類は確認できなかった。

菌根性きのこの現地接種法の開発を目的に、胞子発芽と菌根の観察を行った。野外試験地から採取したマツタケ、ホンシメジ、アマタケからそれぞれ胞子を採取し、平板希釈法により胞子を分離した。培養後ホンシメジの胞子は発芽し、一次菌糸の伸長が観察されたが、マツタケ、アマタケの発芽率は低く、伸長に数十日を要した。また、樹脂包埋法により圃場のアカマツ幼苗の細根に形成された菌根を顕微鏡観察したところ、細胞間隙に菌糸の侵入とハルティヒネットの形成を確認した。特にテクノビット樹脂を用いた場合、良好な画像が得られる切片が得られた。

菌根性きのこの菌糸についても、凍結保存が可能であることが判明した。

キーワード：胞子、環境整備、菌根、ハルティヒネット、凍結保存

## I はじめに

マツタケを代表とする菌根性きのこの人工栽培は現在でも困難であり、アカマツ林において基盤整備施業として腐植層や被陰木の調整、客土等の発生環境整備が中心に行われている。発生環境整備の効果としては、実施後5～8年で新しいシロが増加することが確認されている(藤田 1998)。シロの増加に伴う二次的な結果として、発生量の増加が期待できる手法である。シロの活性化に関して過去に岡山県では、マツタケのシロ周辺の雑菌を排除することにより、間接的なシロの活性化を図る混合微生物が開発された(下川 1985)。試験管内の効果は検証によって認められているが、今回野外試験地での効果を検証した。

これまで子実体を林内に発生させるために、①菌付き苗を植栽する方法、②培養菌糸を埋設する方法、③胞子を散布する方法が研究されてきた。

菌付き苗法による子実体の発生は、過去にホンシメジ(河合 1998)の報告があり、既に実用化されているが、マツタケでは枯木(1985)の報告以降、成功例は確認されていない。培養菌糸の埋設による手法では、イノシシやアリによる接種源の食害や、乾燥、腐敗によるダメージを受けることから、ホンシメジ以外の菌根性きのこの成功例は少ない。しかし、

菌根形成の成果も報告されているため、今回は改良法を検討した。また、接種に伴う前処理として、新根を誘導するための集根処理の効果についても検討した。

過去に子実体の傘部をマツ林の地表に置き、胞子の感染を期待する「預けマツタケ」法に代表される胞子の散布は、特別な培養操作を必要とせず、簡便な方法として一般に行われている。このうちアマタケ(大森 1990)、ショウロ(藤田 1998)では胞子を散布することによって子実体の発生が確認されている。マツタケでも成功例が報告されているが(吉村 2002)、胞子が高温や乾燥に弱く非常に発芽しにくいことから、これ以外にシロの形成や子実体の発生は認められていない。一般的な担子菌類の生活環の例から、マツタケも胞子の散布によってシロが形成される可能性がある。そこで、土壤に落下した胞子の生態的な動向を明らかにするため、土壤微生物の分離や計測に用いられる希釈平板法を用いて、マツタケ、アマタケ、ホンシメジの胞子を分離し、発芽と菌糸の伸長を観察した。さらに野外試験地へ胞子を接種し、その効果についても検証を行った。ホンシメジ、シャカシメジについては、胞子を得るため人工培養を行った。

人工培養法では、ホンシメジの人工培養法(太田 1998)、シャカシメジの人工培養法(衛藤 2000)の2つの栽培法が

\* 元岡山県林業試験場

開発されているが、どちらの場合でも菌の系統により子実体形成能力に大きな差があることが指摘されている。種菌の活性を維持するためには継代培養による多大な労力を必要とするうえ、変異も起こるため、胞子と菌糸の凍結保存方法にも取り組んだ。

また、子実体の発生の兆候を示す菌根の顕微鏡観察について、疎水性の低粘度エポキシ樹脂のスーパー樹脂と親水性のテクノビット樹脂を用いて切片を作成する方法を試したところ、鮮明な観察が可能となったので、その技術について述べる。

なお、本研究は国庫補助課題「菌根性きのこの安定生産技術の開発」と単県課題「マツタケ・アマタケ等安定生産技術に関する研究」で実施した。

## II 材 料 と 方 法

### 1. 発生環境整備

マツタケの研究を行うには、有機物の少ない痩せた土壌の環境が必須条件であるため、最初に試験地で発生環境整備施業を継続し、効果を検証した。

1991年度から2002年度までマツタケ、ホンシメジが発生している野外試験地を県内3か所に設定し(表-1)、腐植層の調整、被陰木の調整、マツクイムシ被害木等枯損木の除去を環境整備マニュアル(岡山県 1991)に従って行った。

表-1 試験地の概要

所在地	施業	面積	林令
久米郡旭町	1993	1,100㎡	50年
〃 中央町	1994	5,450㎡	35年
和気郡佐伯町	1991	1,890㎡	30年

※ 植生は、アカマツ、ツツジ類、ウルシ、ヒサカキ、ネジキ等



写真-1 施業を行ったシロの状況 (中央町試験地)

表-2 NH培地の組成

イーストエキス	4 g / 1
ブドウ糖	20 g / 1
リン酸1カリ	1 g / 1

### 2. 客 土

既存のシロに対しては、現地の深層土を掘り起こし、幅30cm、厚さ5cm程度を目安に既存のシロ周辺へ客土し、試験地

それぞれに発生した子実体の発生量を調査した(写真-1)。シロの調査は、子実体が発生した場所の周辺の土壌を少しずつ掻き取って行い、土壌中に存在する純白の菌糸をマツタケ菌糸と判断した。マツタケ菌糸の存在は、秋期に土壌中の菌糸を採取し、マツタケの香りを確認することで判定した。子実体からは菌の分離を行い、保存した。培地には、NH(ニュー浜田)培地を用いた(表-2)。

### 3. 混合微生物の散布

1994年度から中央町試験地内の近接したシロ3か所にマツタケ菌以外の雑菌に対して静菌効果が期待される混合微生物(下川 1985)を散布した。そして毎年子実体の発生が終了した後シロの面積を調査し、混合微生物が野外のシロに与える効果を検討した。シロ面積の測定方法については、中心部から放射状にシロを16等分し、それぞれの区分の菌糸の成長を測定し、その先端を直線で結んで16角形を描いて積算した。また1996年度は、中央町試験地のホンシメジ発生地に混合微生物を散布して効果を観察した。ホンシメジのシロは子実体の発生か所を直線で結んで面積を算出し、年間の拡大割合を比較した。

### 4. 集根処理

1996年度から1999年度まで、中央町と佐伯町試験地の2か所に、現地で採取した赤土を園芸用の円形プランター(直径20cm)に詰め、反転させて地表に伏せた。処理の目的は、菌糸や胞子を接種するために新根を任意の場所へ誘導することである。プランターは、大型のアンカーボルトで固定した。翌年から定期的にプランターを外して、樹木の根の侵入状況を調査した(表-3)。

表-3 集根処理数

試験地	処 理 数			
	'96	'97	'98	'99
中央町	10	—	8	—
佐伯町	5	—	5	—

### 5. 培養菌糸の接種

1996年度から1999年度まで、NH培地を浸透させた日向土を植物組織培養用ポットに入れて滅菌し、伸長が早いマツタケ菌の系統(美星77)を接種・培養した(気温24℃)。30日後、菌糸が蔓延した培地をポットから取り出し、滅菌したまき土を詰めた円形プランターに入れて、集根処理と同様に中央町試験地に伏せて設置し(写真-2)、翌年以降円形プランターを開封して菌根の形成状況を調査した。

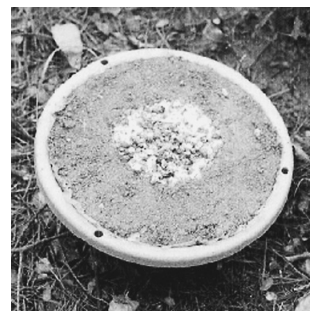


写真-2 培養菌糸による接種源の状況

6. 胞子の接種

中央町・佐伯町の試験地とマツタケ・ホンシメジ・アマタケが未発生と確認されている林業試験場内の試験地（表-4）に1996年度から2002年度まで、マツタケ・ホンシメジ・アマタケの胞子を、滅菌した赤玉土に混合し、野外試験地に埋設した。また円盤状に成型した赤土を滅菌し（120℃、30分間）、胞子を塗布してアカマツの細根に密着させて埋設した（表-5）。

接種した場所は定期的に掘り起こして、菌根の形成状況を調査した（写真-3）。



写真-3 円盤状に成型した接種源

表-4 林業試験場内の試験地概要

所在地	面積	林令
勝田郡勝央町	40m <sup>2</sup>	20年

※ 植生はアカマツ、ツツジ類等

表-5 胞子接種か所数

試験地	接種か所数						
	'96	'97	'98	'99	'00	'01	'02
マツタケ							
勝央町	5	5	1	5	-	-	-
中央町	5	-	-	-	10	-	5
佐伯町	10	10	10	-	-	-	-
ホンシメジ							
勝央町	-	-	-	2	-	-	-
中央町	-	-	-	-	1	-	-
アマタケ							
勝央町	1	2	-	7	-	-	-
中央町	-	-	-	-	48	-	-

7. ホンシメジ・シャカシメジの人工培養

ホンシメジとシャカシメジの胞子を得るため、太田の人工培養法（1998）を用いて、林業試験場保存の系統と新潟県、滋賀県、京都府、山口県の子実体形成能力の高い系統について人工培養を行い、子実体形成の確認を行った（表-6）。また、シイタケの廃ホダを粉碎したおが粉8割と米ぬか2割を混合した培地で京都府の系統（京S-1）を培養し、2002年4月9日に中央町試験地のコナラ・アカマツ混交林に3個ずつ33か所、同年4月10日に場内の混交林に6か所接種し、

表-6 人工培養した系統

名称	採取地
ホンシメジ	
中央96	岡山県
新見	〃
加茂川	〃
黒ト97	新潟県
黒3	〃
黒298	〃
黒00	〃
見附00	〃
京S-1	京都府
山LS6	山口県
シャカシメジ	
柵原	岡山県
新見	〃

観察した。京都府の系統を用いた理由は、子実体が発生した時に岡山県産のものと系統判別が可能なためである。

8. 胞子の観察

1999年11月11日に中央町試験地に発生したマツタケ、アマタケ、ホンシメジの子実体の柄を切除し、傘を滅菌した不織布に伏せ、室温で24時間放置し、胞子を採取した。落下した胞子を布ごと霧吹きで湿した後、発泡スチロールの箱に入れ、気温2℃に設定された冷蔵室内に湿状態で保存し、実験に供した。

マツタケ胞子の発芽促進については、Ohta（1986）の報告に基づいて行った。7日後、胞子の付着した布を冷蔵庫から取り出し、付着した胞子紋を1平方cm角に切断した。これを、0.005%のn-酪酸を含む100mlの滅菌水中に、布片を投入してピペティングにより懸濁した。その後、室温24℃、暗黒下でさらに一昼夜置いた。

アマタケ、ホンシメジについても同様の処理をした。

n-酪酸は一次菌糸の成長を阻害する可能性がある（太田1986）。そのため、この懸濁液を原液のまま用いたものと、また、比較としてうち10mlをさらに50mlの滅菌水中に懸濁した希釈液を作成した。これらはそれぞれピペティングの後に太田氏の培地（藤原1999）に、2mlずつ分注した。培地の水素イオン濃度は、1N水酸化カリウムで5.1に調整した。固化剤に使用した寒天は8g/lと柔らかい培地に調整した。直径9cmのシャーレに12mlずつ分注した。供試したシャーレの数はそれぞれ20枚である。シャーレの蓋には、滅菌したアルミホイルで作ったスパーサーを挟んで隙間を作り、クリーンベンチ内に静置した。2日後寒天に胞子が固着したのを確認した後、インキュベーターで培養した（気温24℃）。残液の胞子濃度をトーマ血球計算板で計測し、発芽率の目安とした。コンタミネーションは、バクテリア等のコロニーを早めに取り除くことで防止した。発生したコロニーは、ワックス

マン液体培地（表-7）で培養し、バクテリアの付着が無いことを確認した。

表-7 ワックスマン液体培地の組成

ブドウ糖	10 g/1
肉エキス	5 g/1
ペプトン	5 g/1
塩化ナトリウム	5 g/1
pH	6.8

### 9. 胞子と菌糸の凍結保存

2000年度から微生物の凍結保存法の手法（長谷部 1992）により、凍結防護剤としてグリセリン、ジメチル硫酸塩、ポリエチレングリコールを使用し、マツタケ・ホンシメジ・シャカシメジの胞子を培養した二次菌糸を、-85℃に設定したディープフリーザーに保存し、順次解凍して保存した。次に栽培きのこの直接凍結維持法（馬場崎 1999）により、同様に胞子と二次菌糸を保存し、順次解凍して培養した。

### 10. 菌根観察方法の開発

2001年5月17日に林業試験場内苗畑に養成した1年生アカマツ苗を掘取り、細根に形成されている菌根を観察した。

アカマツ苗は地上部を切除し、根系をバットに入れて水道水で緩やかに洗浄した。そして、菌根が形成されている細根を先端部から、2 cm程度を分離した。菌根の確認は、Agerer (1993) のチェックリスト及び菌根の模式図と比較から、細根が変形し、菌糸の厚い層（マントル）が形成されている部分を菌根と判断した。分離した菌根は、5~10mmの長さに調整し、シャーレに入れた蒸留水に浮かべた。次にリン酸緩衝液で洗浄し、固定した。スパー樹脂による樹脂包埋法は、高相らの手法（1997）に従い、テクノビット樹脂については、塚谷（1996）の方法と取り扱い説明書を参考に行った。この場合、サンプルの樹脂置換の反応時間を改変し、減圧ポンプを使用して樹脂の浸透性を高める工夫を行った。スパー樹脂は低粘度であるため、他の疎水性樹脂に比較して細胞の隙間にも染み込みやすいが、試料が硬質になるためウルトラミクロトームを用いて0.1~1.0 μm厚で切削した。テクノビット樹脂は親水性で、気泡や染色むらが生じにくく、試料が軟質であるため、滑走式ミクロトームで3~5 μm厚で切削した。いずれの場合でも、ミクロトームの刃は新しい部位を使用した。染色はトルイジンブルーOを用いた。この染色法では、核、細胞壁、リグニンを染めることができる。染色した切片はエンテランニューで封入し、微分干渉顕微鏡と位相差顕微鏡を用いて観察した。

## III 結果と考察

### 1. 発生環境整備

#### 【マツタケ】

岡山県全域のマツタケ生産量と試験地3か所の発生量を図-1に、マツタケ発生状況を写真-4に示す。

岡山県内のマツタケ生産量は、1994年度には8,362kgであっ

たが、96年度には63,074kgと急激な上昇を示した。しかしこの年をピークに急激に下降し、99年度には最低の5,348kgになった。2000年度にやや持ち直している。99年度以降、秋期の天候が安定せず、残暑が9月下旬まで続くなど、マツタケの発生が減少する要因となった。



写真-4 マツタケ子実体の発生状況

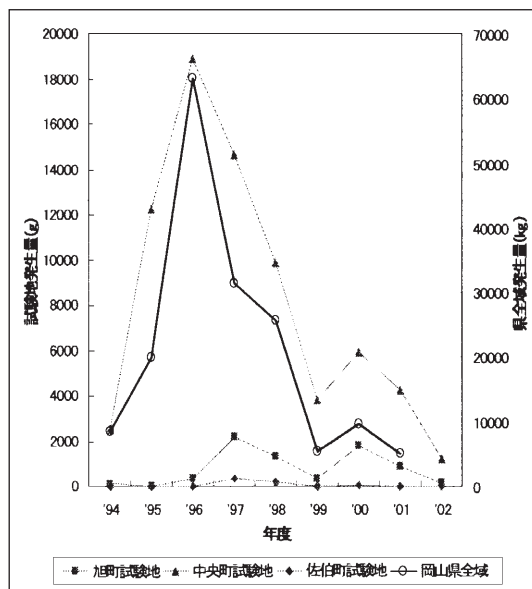


図-1 県全域と試験地のマツタケ発生状況

試験地のマツタケ発生量は、中央町試験地が岡山県全域の生産量と同じ傾向を示している。旭町、佐伯町試験地は97年度にピークを示し、2000年度に微増した。発生傾向は県下の生産量とほぼ同様に推移している。いずれの試験区でも5年間程度は、施業前より発生量が増加しているが、子実体の発生は地温や湿度、土壌水分等の外的要因によって大きく左右されるため、明確な施業の効果は不明であった。施業実施後の各シロの数を図-2に示す。旭町試験地のマツタケシロの増減は調査開始時から変化が無かったが、中央町試験地は施業実施後2年後までにシロの数が1.8倍に増加した。

この現象について、通常シロの形成には施業後5年以上必要である（藤田 1998）ので、施業の効果によって既存のシロが成長し、発見されたものと推察された。この試験地はマツクイムシ被害木の増加に伴い、7年目以降2か所のシロが消滅し、佐伯町試験地のシロ数は施業後6年目から増加した。

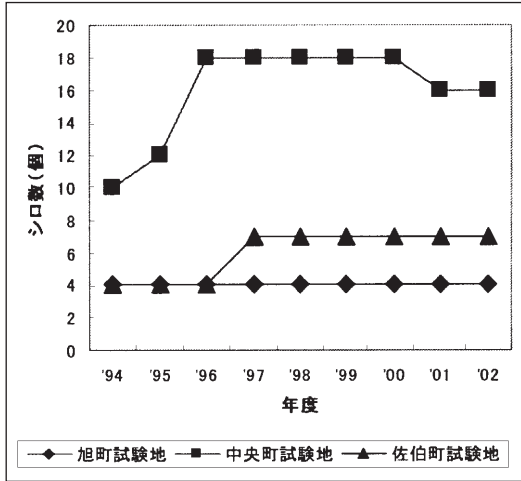


図-2 マツタケシロの数量

増加したシロが直径15~20cm程度と小さいこと、周辺に連続したシロや、子実体の発生が無いことから発生環境整備によって新しくシロが形成されたと考えられる。シロを増加させることにより子実体の発生量が増加する可能性があり、施業による新しいシロの形成が期待される。

【ホンシメジ】

ホンシメジについて、シロの数と発生量を図-3に示す。

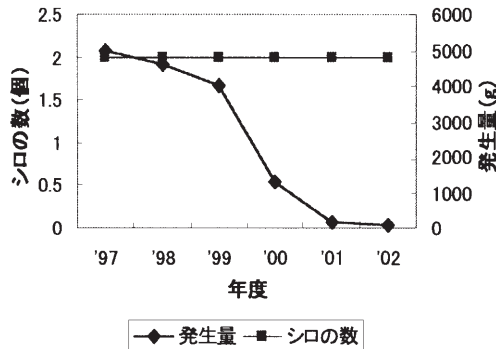


図-3 ホンシメジのシロ数と発生量 (中央町試験地)

表-8 保存した菌根性きのこ

種名	採取地	年度	分離用培地
マツタケ	中央町	1996	NH
〃	〃	〃	〃
ホンシメジ	中央町	1996	PDA
〃	新見市	〃	〃
シャカシメジ	柵原町	1996	PDA
〃	新見市	1997	〃
アマタケ	勝央町	1996	PDA
〃	中央町	〃	〃
〃	佐伯町	〃	〃

ホンシメジは線状にシロを形成し、1年に50~60cmずつ徐々に斜面下方へ移動しながら子実体が発生した。調査開始当初は、5月と10月の2期間子実体が発生したが、2000年度以降5月発生は激減した。ホンシメジはやや湿度のある窪地を好むきのこであることから、腐植層の除去や被陰木の伐採によって発生地が乾燥が進んだ影響も考えられたが、それ以外の原因は不明である。この試験期間中に、試験地等からはマツタケ2系統、ホンシメジ2系統、シャカシメジ2系統、アマタケ3系統を分離し、それぞれの菌糸を保存することができた(表-8)。

2. 客土

最も安定的に発生した中央町試験地の子実体の重量変化を図-4に示す(図-4)。

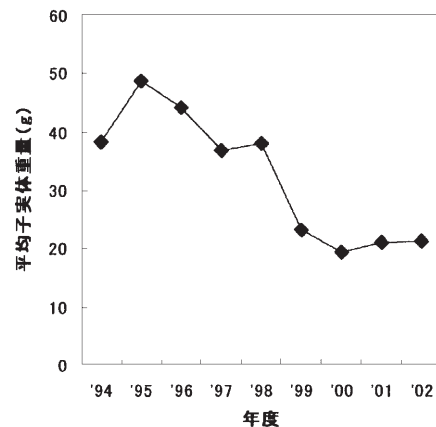


図-4 子実体重量の変化 (中央町試験地)

1994年度に施業を開始してから、次年度は重量が50gまで増加し、96年度から2年間は緩やかに下降した。98年度から急激に減少し、以降は20g前後で推移している子実体の重量増減については、発生時の水分条件の影響が非常に大きい、98年度までは平均的に40g前後を維持した。

特に客土中から発生した子実体は大型化し、子実体の品質向上と収量増加については効果があると思われた。同様の効果は過去にも報告されており(下川 1980)、岩手県岩泉マツタケ研究所では、この現象について、客土中に寄主であるアカマツの細根が増加して栄養の供給量が増加するためと説明している(吉村 2002)。2000年度以降は秋期の異常気象による高温と乾燥が続き、子実体の品質と収量は低下した。

3. 混合微生物の散布

【マツタケ】

混合微生物を散布した場合の効果を知るため、3か所のマツタケシロの先端部にそれぞれ客土・混合微生物散布区、混合微生物散布区、無処理区を設定し、マツタケシロの面積成長率(割合)を測定した結果、客土・混合微生物散布区は、3年後まで成長の割合が上昇したのに対し、無処理区や混合微生物区では、2年後まで上昇を続けたが、3年後に減少した(図-5)。

個々のシロの成長割合は異なり比較はできないが、無処理

区と同じ傾向を示す混合微生物の散布区では、シロに対する効果を認められなかった。客土・混合微生物散布区は拡大割合を維持し、効果を認めた。

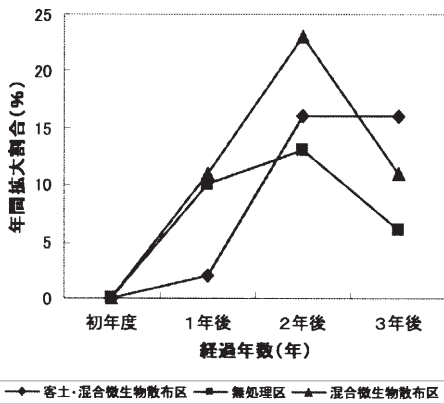


図-5 処理別シロ面積 (中央町試験地)

【ホンシメジ】

1996年から混合微生物を散布した。散布後3年間は4000g以上のホンシメジ発生量を維持し、効果を認めたが(図-3),その後減少した。

4. 集根処理

円形プランターを設置して以降2年間、それぞれの試験地で調査したが、樹木の根の侵入は確認できなかった(写真-5)。円形プランターはプラスチック製で雨水を通さないため、内部の土壌が極度に乾燥し、樹木の根が侵入しなかったと思われる。改良には透水性の素材を用いることが考えられるが、滞水した場合には土壌中のバクテリアが大量に繁殖する恐れもあり、検討を要する。



写真-5 集根処理後の調査状況

5. 培養菌糸の接種

1999年まで、マツタケの培養菌糸を接種した。しかし、接種源は乾燥や虫による食害により全て崩壊し、菌根の形成や菌糸の拡がり確認できなかった。接種源の形態に改良を加えた場合でも、獣害が報告されており(井上 2002),菌糸成長の遅いマツタケ菌糸の接種方法として、当手法は不適当と思われた。

6. 胞子の接種

【マツタケ】

マツタケについて、1997年2月に佐伯町試験地の接種地を調査したところ、10か所中2か所で菌糸体の発生を確認したが、種の同定は困難であった。また、1999年度に勝央町試験地に埋設した接種源を2001年度に掘り出したところ、樹木の根の侵入と緻密な白色の菌根形成を確認した。しかし、この場合でも種の同定はできなかった。埋設後2年間で根の侵入を確認したが、ほとんど根の侵入が無いものもあった。確認には少なくともさらに3年以上の静置が必要である。

【ホンシメジ】

ホンシメジについては、根の侵入と白色の菌根形成を確認したが、種の同定はできなかった。

【アマタケ】

アマタケについて根の侵入と白色の菌根形成を確認したが、熱湯に浸漬しても赤紫色に変色せず、アマタケと異なることが判明した。

7. ホンシメジ・シャカシメジの人工培養

山口県の系統(山LS6)を用いて人工培養した結果、培養に74日と2か月以上を要した。また、発生処理を行って17日後に長さ5~7cm程度の子実体が発生した(写真-6)。



写真-6 発生したホンシメジの子実体  
※ 比較はフィルムケース

シイタケやヒラタケなど、他の栽培きのこと比較して菌糸の伸長が遅く、原基形成から子実体の成長まで長期間を必要としたため、子実体は乾燥により、途中で成長を停止した。

この手法により、ホンシメジの胞子を採取することは可能となったが、その他の系統は発生しなかった。麦培地中のデンプンの利用能力が系統によって異なるために、子実体の形成能力が異なると推察された。

今後、子実体形成能力の高い岡山県産の系統の確保と、多系統の収集や交配による新しい系統の作出や育種が必要である。

シャカシメジについて子実体は形成されなかった。

野外に培養菌糸を接種した場所から子実体の発生は無かった。

8. 胞子の観察

培養前のマツタケの胞子の大きさは、4~6 μm, アミタ

ケは、8～10 $\mu$ m、ホンシメジは3～5 $\mu$ mと推測された。胞子は3日後の観察では、ほぼ全数が2～3倍に膨潤し、表面に「へそ」様の模様が現れた(写真-7)。

原液および希釈液中のマツタケ、アマタケ胞子は、ともに90日前後から胞子の発芽と菌糸の成長が確認された(写真-8, 9, 10)。その後、さらに2ヶ月間観察を継続したが、マツタケの胞子を培養したシャーレに白色で成長の遅いコロニーが1個だけ出現したほかには、これらの菌糸に変化は認められなかった。変化の見られなかった菌糸を分離し、ワックスマン液体培地で培養したが白濁せず、バクテリアの付着が無いことを確認した。

アマタケ胞子もマツタケと同様発芽、伸長したが、コロニーは確認されなかった。

ホンシメジは原液、希釈液中で、ともに培養直後から発芽した。特に13日経過後から次々に発芽し、一次菌糸が伸長した。培養を開始してから27日後には、シャーレの培地上に直径5～30mmのコロニーが確認された。コロニーの数は2～75個/枚で、平均は33.5個/枚であった。

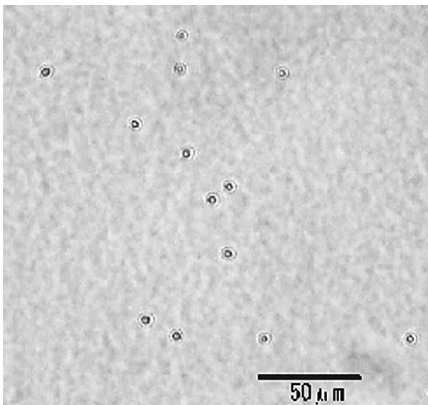


写真-7 膨潤したマツタケの胞子

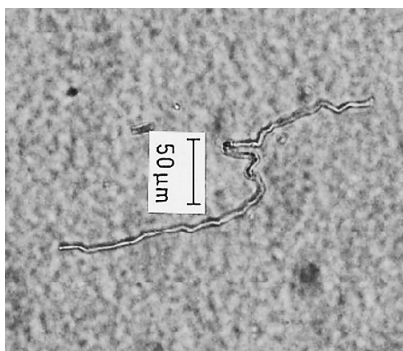


写真-8 発芽したマツタケの胞子

菌糸が分岐する頃から視野は菌糸で充満し、顕微鏡観察は困難になった。ホンシメジの胞子を分離・培養し、大量の一次菌糸を得ることは、マツタケ、アマタケより比較的容易であった。特にアマタケは、コロニーが得られなかったことから、培養条件の改善が必要である。

胞子接種に適した胞子の濃度は不明であるが、胞子の濃度を計測した結果を図-6に示す。胞子の接種方法の1ml当り

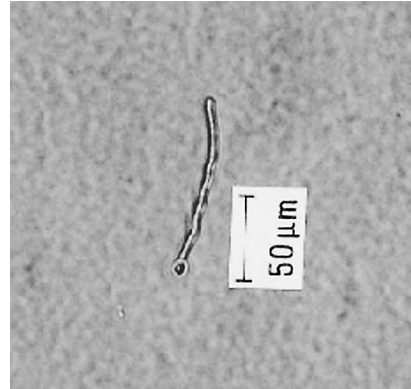


写真-9 発芽したホンシメジの胞子

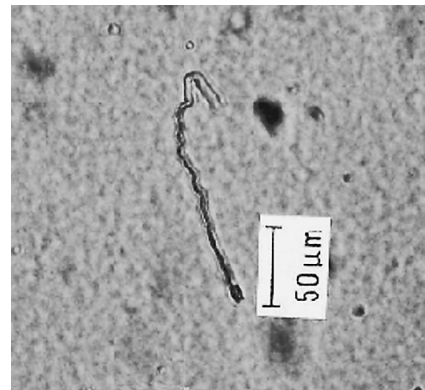


写真-10 発芽したアマタケの胞子

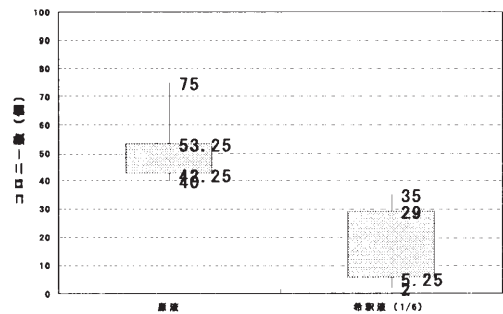


図-6 ホンシメジ胞子の希釈液と生成コロニーの関係

の胞子数が、マツタケとアマタケの密度はほぼ同値、ホンシメジがやや多い。しかし、胞子の落下数は気温や湿度により大きく変化する(伊藤 1981)。そのため今回の方法では、密度を一定にはできなかった。

### 9. 胞子と菌糸の凍結保存

微生物用の凍結保存法ではマツタケ、ホンシメジ、シヤカシメジの二次菌糸は、全く再生しなかったが、腐生性の栽培きのこシイタケ、ヒラタケの手法で6ヶ月間の生存を確認した。胞子については前処理区でバクテリアのコンタミネーションが発生し、生存の確認はできなかった。アマタケ、ハナイグチ、ハツタケの菌糸は6ヶ月間の保存が可能であった。現在、菌根性きのこの凍結保存方法は発表されていないが、有

用な菌根性きのこの収集・保存等ジーンバンク化を進めるには、実用的な保存方法を開発する必要がある。

### 10. 菌根観察方法の開発

Agererのチェックリストにより、アカマツ菌根の外観は“Simple=unramification”の形態で、その表面は“stringy”と判定した。

スパー樹脂を用いた横断切片の写真を写真-11, 12, 13に示す。

この横断写真の観察では、変形した表皮細胞をはじめ、細胞壁の間に侵入した菌糸、ハルティヒネットの形成が確認された。菌糸は表皮の周囲を緻密に囲み、さらに下皮にも充満しており、細胞間隙は菌糸の侵入により著しく変形していたが、それより内層や髄には侵入していなかった。菌糸の幅は、スケールとの比較から0.5 μm程度と推定された。

ハルティヒネットのタイプは模式図との比較からAタイプ (Common and widely distributed type with typical palmetti and single hyphal rows.) と判定した。

菌糸の観察には位相差顕微鏡が適し、切片の観察には微分干渉顕微鏡の方が鮮明な画像が得られた。切片はウルトラミクロトームの場合、厚さ1.0 μmが最も鮮明な視野が得られた。

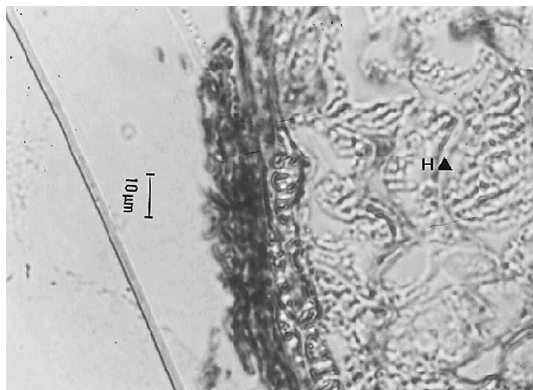


写真-13 細胞間隙に発達したハルティヒネット

切片がこれより薄いと細胞間に侵入した菌糸の観察が困難になり、特に滑走式マイクロトームを使用した場合には、厚くなると、菌糸や細胞の内容物が複数重なり観察が困難になった。今回使用したスパー樹脂とテクノビット樹脂8100では、2日間の処理時間を要したが、テクノビット7100は1日間と短く、取り扱いも簡便であり、パラフィン包埋と同様に滑走マイクロトームや回転マイクロトームで切片作成が可能である。

### IV 結 論

今回野外試験を中心に、発生環境整備、混合微生物の散布、集根処理、培養菌糸・胞子の接種を行い、このうちマツタケ発生環境整備についてはシロの増加を認めた。また客土による子実体の品質向上や収量増加と、客土・混合微生物散布によるシロの拡大効果を認めた。これらのことから、環境整備はマツタケの増産には、必須の条件であることが判明した。しかし、ホンシメジの発生環境整備や混合微生物の散布、集根処理については、成果を得られなかった。また新しくシロを形成させる目的で行った培養菌糸・胞子の接種試験については、菌根の同定が不可能であったことから、結果の評価はできなかった。これらの野外試験におけるシロ形成の効果を早期に証明するためには、菌根菌の種類を同定する技術が必要である。

胞子の観察について、ホンシメジの胞子の膨潤から発芽、一次菌糸の成長およびコロニーの形成過程が観察でき、以下の重要な情報が得られた。

マツタケについては、胞子の発芽と菌糸の伸長が確認されたが、一次菌糸の分岐やコロニーの形成はごくわずかであり、アマタケについては、コロニー形成は確認できなかった。通常マツタケの胞子を大量に培地に接種すると、二次菌糸やコロニーを容易に得ることができる。しかし今回の試験では、単胞子から伸長した一次菌糸は、ほぼ全数が成長を停止し、コロニーには成長しなかった。これらのことからコロニーに形成するのは二次菌糸であると推察された。そのため、胞子によるマツ細根への感染やシロへの成長には、一次菌糸同士の交配が必要であり、高濃度の胞子接種が有効であることが示唆された。

菌糸の凍結保存は、短期間であったが可能であった。将来的に低コストな人工培養法や感染力の強い林地用接種源を開発するうえで、多数の系統収集が菌根性きのこに関する研究

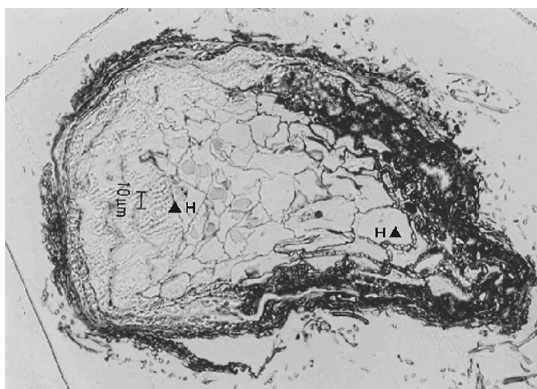


写真-11 菌根の横断切片

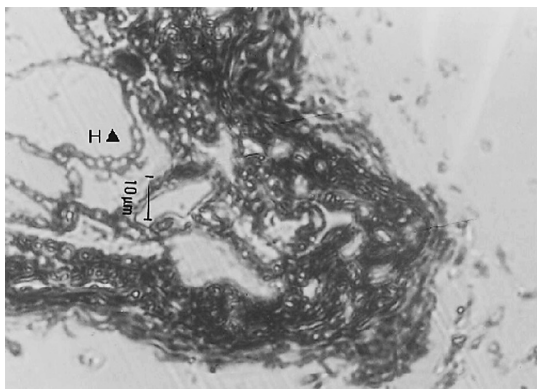


写真-12 著しく変形した細胞



の成否を左右すると考えられている現在、凍結保存による変異の防止や種菌の長期保存が可能になることは意義が大きい。

菌根の観察にスパー樹脂とテクノビット樹脂を用いて、菌根断面を明瞭に観察することができた。この手法により作成された切片は、長期間の保存が可能であるうえ、他の手法に比較し、得られる画像が非常に鮮明であるため、特に写真撮影に適していた。

今回観察した菌根は、①菌糸に隔壁があること ②マントルが形成されていること ③ハルティヒネット形成の特徴から、岡部(1997)の区分表により、外生菌根菌と判断された。なお同年10月、圃場にコツブタケの子実体が多数確認されたことから、この菌根はコツブタケ(*Pisolithus tinctorius* Pers.)と推測された。

今回は横断切片に止まり、縦断切片の作成まで至らなかったが、詳細に菌根の断面に侵入した菌糸を顕微鏡観察することで、菌根化の過程を明らかにすることも可能と思われる。現在のところ、きのこの種類によって菌根内の菌糸が容易に観察できないケースがある。例えばマントルを形成していても脱落したり、表面を被覆しているだけのものがあるため、切片の観察にあたり、目的とする切片を得るには切削する部位を替えて試料を多めに作成する必要がある。マントルを形成している部位だけでなく、細根の基部を切削するのも一つの手段である。

菌根性きのこの研究の難しい原因に、野外における生態を観察しにくいことが挙げられるが、孢子と菌根の観察によって得られる情報は多く、シロ形成のメカニズムを解明する足掛かりに成りうる。

発生環境整備技術は既に普及されているが、今回の検証によりその効果が再確認された。

シロ形成のメカニズムを解明するため、今後の研究では、基盤整備を基本的に行うこととした上で、菌根の観察、菌糸の収集、孢子の林地接種、種の同定技術開発に取り組む。また、人工培養技術についても、不明な要素の多い菌根性きのこの生態を、外環境の影響を排除して観察できる利点があり、意義があるものと考えられる。

今後はこれらの技術を用いて、菌根菌と寄主の関係を明らかにし、林地における菌根性きのこの利用に繋げたい。

なお、樹脂包埋の作成にあたり、多忙にも関わらず樹脂包埋の方法、ウルトラミクロトームによる切片の作成等をご指導いただいた岡山県工業技術センターの藤原技師と窪津客員研究員、ホンシメジ菌株を供与いただいた新潟県森林研究所の松本主任研究員、滋賀県森林センターの太田専門員、京都府林業試験場の藤田主任、山口県林業指導センターの井上主任に深く感謝の意を表す。

## 引用文献

- Akira Ohta (1986) Basidiospore germination of *Tricholoma matsutake* (I). Effect of organic acids on swelling and germination of the basidiospores. TRANSACTIONS OF THE MYCOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN Vol.27 : 167-173
- 馬場崎勝彦(1999)栽培きのこ菌株の直接凍結維持法及び

DNA判別法. 微生物遺伝資源利用マニュアル(5) : 3-13

- 衛藤慎也(2000)シャカシメジの純粋培養下での子実体形成. 日本応用きのこ学会第4回大会講演要旨集 : 46pp
- 藤原直哉(2000)希釈平板法を用いた菌根性きのこの孢子観察. 森林応用研究9巻2号 : 61-64
- 藤田徹(1998)マツタケ(キシメジ科)とその他の知識. (林業技術ハンドブック. 全国林業改良普及協会発行, 1969pp, 技秀堂, 東京). 1813-1828
- 井上祐一(2002)菌根性きのこの安定生産技術の開発. 平成13年度山口県林業指導センター度業務報告書 : 16-17
- 伊藤武(1981)マツタケ孢子の生理生態に関する研究. 昭和55年度京都府林業試験場業務報告 : 57-64
- 岩瀬剛二(1992)マツタケ. (きのこの増殖と育種. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編, 農業図書株式会社, 東京). 291pp
- 枯木熊人(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第20号 : 13-23
- 河合昌孝(1998)菌根菌栽培—林地から施設まで—取り木を利用したホンシメジの栽培. 日本菌学会会報39号 : 117-120
- 岡部宏秋(1997)菌根と菌根菌のいろいろ森づくりと菌根菌. 7-10, (勸業林業科学技術振興所, 東京).
- 岡山県農林部林政課・岡山県林業試験場(1991)マツタケ・ホンシメジの栽培—増産技術の手引—, 4-7, 岡山
- 大森久夫(1990)菌根性食用きのこの栽培技術に関する研究. 平成2年度岩手県林業試験場業務報告 : 31pp
- 太田明(1998)ホンシメジの実用栽培のための栽培条件. 日本菌学会報39-1 : 13-20
- Reinhard Agerer (1993) COMMENTS ON CHECK-LIST. COLOR ATLAS of ECTOMYCORRHIZAE, 9 i-32i. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Munchen
- 下川利之(1980)マツタケ増殖技術開発に関する研究(1)客土による活性菌根帯の増殖. 岡山県林業試験場研究報告4巻 : 1-7
- 下川利之(1985)マツタケ増殖技術開発に関する研究Ⅲ—アカマツ林に生息する放線菌及び細菌の抗菌性—. 岡山県林業試験場研究報告6巻 : 62-85
- 高相徳志郎・戸部博(1997)光学顕微鏡用切片の作成法とその観察. (植物の細胞を観る実験プロトコル. 須磨春樹編, 秀潤社, 東京). 26-31.
- 塚谷裕一(1996)光顕によるシロイヌナズナ組織・細胞の観察法. (モデル植物の実験プロトコル. 須磨春樹編, 秀潤社, 東京) 219-222
- 吉村文彦(2002) : マツタケ. (2002年版きのこ年鑑. プラントワールドきのこ年鑑編集部編, プラントワールド, 東京) 195-201