

## 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—

菅原冬樹・阿部実・菱川敬太\*・田中修\*

\* 甲南大学大学院自然科学研究科

Development of cultivation of *Tricholoma matsutake*

—Cultivating method of *Tricholoma matsutake* and fungal flora in red pine  
(*Pinus densiflora*) forests—

Fuyuki SUGAWARA, Minoru ABE, Keita HISHIKAWA and Osamu TANAKA

### 要 旨

アカマツ林試験地におけるマツタケ子実体の発生誘導を目的に次の試験および調査を行った。林地接種のための種菌としてマツタケ菌感染苗の育成について検討を行ったところ、アカマツ実生苗とマツタケ菌の二員培養により菌感染苗を得ることができた。その菌感染苗を含めて培養菌糸体などを種菌としてマツタケ菌の林地接種を行ったが、マツタケ子実体の発生には至らなかった。また、アカマツ林試験地の10年間にわたるキノコ相調査において、試験地内のキノコの発生状況がアマタケやヌメリイグチおよびキシメジなどに推移してきており、これらキノコがマツタケ発生適地の指標キノコであることから、腐植層除去や菌糸体埋設などの林地攪乱処理による環境改善効果があったと考えられた。

### I. はじめに

キノコ類をはじめとする特用林産物は、食生活の多様化および健康・自然志向の高まりなどから需要の伸びに支えられ、農林複合経営の主要作目として位置づけられ、農山村地域経済を支える重要な地場産業として定着してきている。しかしながら、近年、安価な輸入キノコの増大や全国各地における大規模生産からの攻勢により、キノコ類の価格は低迷し続け、農山村地域におけるキノコ生産は大変深刻な状況下におかれている。そういった打開策の一つとして、これまで市場性が有望で目新しい数種きのこの栽培開発取り組んできており、その中の一つが未だ人工栽培に成功しておらず、超高価格で市場を賑わせているマツタケである。国内におけるマツタケの生産量は年ごとの変動はあるものの年々漸減傾向にあるため、価格も異常な高値を続けている。一方、外国産マツタケの輸入量は年々増加傾向にあり、国内産の約10倍近くまで増えてきたが、依然としてマツタケの需要は旺盛で

ある。

マツタケは人工培地上での生育が非常に遅いため、菌糸を大量に培養できないことが人工栽培化の困難な原因の一つと考えられている。そこで、イモ類を主成分とした人工培地で、従来の培地と比較して十数倍にマツタケ菌糸が増殖するという研究成果を得た(菅原・田中, 1999)ことから、本課題はそれを踏まえてアカマツ林におけるマツタケ発生の栽培開発を目的に、2001年～2010年に実施したものである。

## II. 方法および材料

### 1. 試験地

秋田県内のアカマツ林における試験地は、前研究課題(阿部, 2003)で設定した3箇所で、表-1に示すとおり西仙北試験地(以下「西仙北」とする)、雄物川試験地(同「雄物川」)および山本試験地(同「山本」)である。また、その3試験地において、2001年以降、「西仙北」および「雄物川」については2002年、2003年、2004年そして2008年、2009年、2010年の計6回、そして「山本」については2009年の1回、腐植層の除去やマツ枯れ被害木の伐採・搬出等の林床整備施業を行った。

表-1 試験地概況

	西仙北	雄物川	山本
場所	大仙市西仙北土川	横手市雄物川上法寺	三種町下岩川
試験地設定	1995年	1998年	1999年
標高	80～110m	80～90m	60～80m
アカマツ林	32年生	43年生	28年生
立木密度	1700本/ha	1100本/ha	1700本/ha
平均胸高直径 (設定時)	13.4cm	17.0cm	5.7cm
平均樹高 (設定時)	10.9m	12.7m	4.3m
斜面方位	南	西南西	北北西
斜度	15～25度	10～15度	15度
面積	300㎡	300㎡	300㎡
土壌型	乾性褐色森林土	弱乾性褐色森林土	乾性褐色森林土

### 2. 林地接種用の種菌の調製

#### 1) マツタケ培養菌糸体の調製

##### (1) 接種源の調整

供試菌は、滋賀県産マツタケ子実体ヒダ部より得られた菌糸体(ATM30)と秋田県産マツタケ子実体の菌傘部組織から得られた菌糸体(ATM上新城)の2系統を用いた。接種源は、寒天培地あるいは液体培地で培養した菌糸体とした。寒天培地の接種源は、HAMADA氏寒天培地(グルコース20g, エピオス5g, 1N HCl 1.6ml / 1,000ml, pH5.1)で3週間培養した菌糸体先端部1g(F.w.)に20mlの滅菌水を加え、セルマスターで10,000rpm, 5秒間粉碎した。この菌糸体懸濁液5mlを20mlMMN液体培地(グルコース10g, 酒石酸アンモニウム1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05g,  $\text{FeCl}_3$  12mg, 塩酸アミン  $100 \mu\text{g}$ , マルティン 3g, イーストエキス 2g, 野菜ジュース 10ml / 1,000ml, pH5.1)に接種し、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,

暗黒下で培養した。60日間培養後、菌糸体を滅菌水で洗浄後、滅菌水100mlを加え、セルマスターで10,000rpm, 5秒間粉碎して菌糸体懸濁液とし、これを接種源とした。

### (2)イモ培地および土壌培地の調製

新鮮なサツマイモを皮ごとブレンダーにかけて粉碎し、これを100ml容培養UMサンプル瓶に約20g入れて、前述のMMN液体培地を20ml加えた。一方、土壌培地はこれまで報告のあったホンシメジ培地(藤田, 1992)を参考に次のとおり調整した。広葉樹オガ粉300g, 鹿沼土360g, バーミキュライト180g, 大麦1000g, フスマ160g, エビオス10g, 水500mlの割合で混合したものを、300ml容の植物培養用ポリカーボネイト製容器に200g詰めた。滅菌した両培地1個あたりに、(1)の菌糸体懸濁液5mlを接種し、培養は22℃, 相対湿度約65%の培養室で約100日間行った。

### (3)林地接種用のマツタケ培養菌糸体の調製

乾燥水苔を一昼夜水道水に浸けて戻し、その適量を各種保護材(雨樋用塩ビパイプ, 種苗育成用ジフィポット, 種苗育成用分解性ポット)を写真-1のように詰めてさらにその上にイモ培地培養の菌糸体および土壌培地菌糸体を詰めた。その2個を一对で用いて1個の種菌とし、林地でアカマツの細根を挟み込む形で埋設することとした(写真-2)。

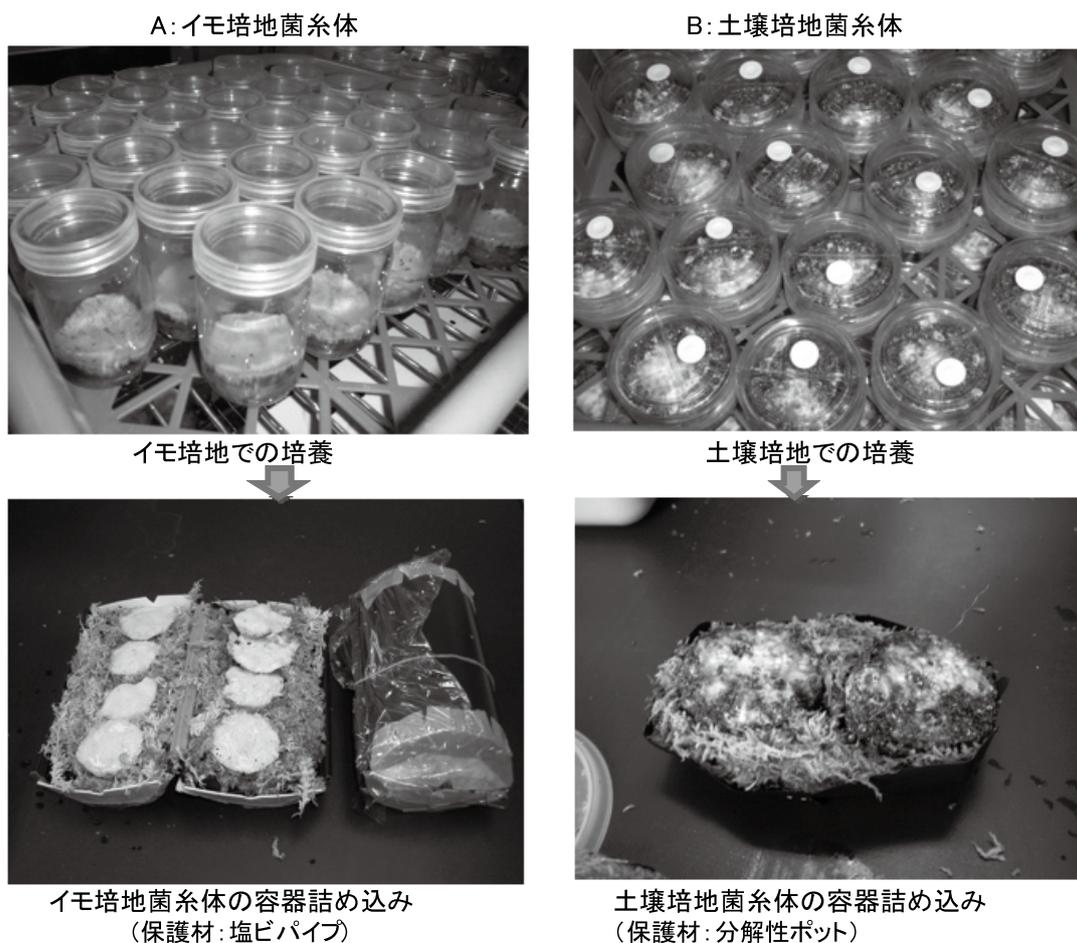


写真 - 1 接種菌糸体の調製



1. 細根の掘り出し



3-①塩ビパイプ



2. 菌糸体による細根の挟み込み



3-②ジフィポット



4. 種菌の覆土



3-③分解性ポット

## 写真 - 2 菌糸体(種菌)の接種方法

### 2) マツタケ菌感染苗の調製

#### (1) マツ類の無菌苗調製

アカマツはマツノザイセンチュウ抵抗性暫定採種園産の種子1000粒を、クロマツは精英樹採種園産の種子1000粒を用いて無菌苗を調整した。マツ類の種子を1晩流水中で放置し、水洗後70%エタノールで3分間攪拌し、滅菌濾紙上で風乾した。風乾した種子を10%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間攪拌した後、滅菌水で3回洗浄した。約20mlホルモンフリー改変LP培地 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2g,  $\text{KNO}_3$  0.9g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.6g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.135g,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  30mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6.2mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.6mg,  $\text{KI}$  0.08mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.25mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.025mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.025mg, ミオシトル 1g, 塩酸アミン 0.2mg, サッカース 20g, 寒天 8g / 1,000ml, pH5.6) (Abo EL-Nil, M.M.ら, 1982) が入ったシャーレ(90 x 20 mm) に種子を置床した。発根後, 根が1~2cmに伸長したものは, バーミキュライトをハイポネックス (N:P:K=6:10:5)1,000倍液で含水率70%に調整し (ハイポネックス培地), 100ml容培養UMサンプル瓶に50g充填し滅菌・冷却した培地に移植し, 120日間育成した。発芽および苗木育成条件は, 1日16時間日長・約5,000luxの植物育成用蛍光照明下, 約25℃の恒温条件下とした (石井ら, 1993)。

## (2)接種源の調製

供試菌は, 秋田県産マツタケ子実体の菌傘部組織から得られた菌糸体(ATM6)および岩手県産と滋賀県産マツタケ子実体ヒダ部より得られた菌糸体(ATM19,30)の3系統を用いた。接種源は, 寒天培地あるいは液体培地で培養した菌糸体とした。寒天培地の接種源は, HAMADA氏寒天培地で3週間培養した菌糸体先端部1g (F.w.)に20mlの滅菌水 (No.1) あるいはMMN液体培地 (No.2) を加え, セルマスターで10,000rpm, 10秒間粉碎した菌糸体懸濁液とした。液体培地の接種源は, HAMADA氏寒天培地で3週間培養した菌糸体先端部100mg (F.w.)を20ml MMN液体培地に接種し, 22±1℃, 暗黒下で60日間培養した。菌糸体を滅菌水で洗浄後, 菌体量1g (F.w.)当たり滅菌水 (No.3) あるいはMMN液体培地 (No.4) 20mlを加え, セルマスターで10,000rpm, 10秒間粉碎した菌糸体懸濁液とした。

## (3)マツ類とマツタケ菌の二員培養

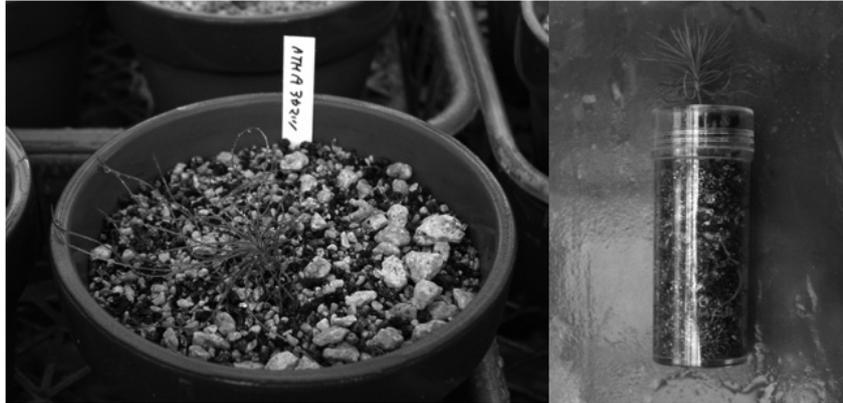
二員培養は, 100ml容培養UMサンプル瓶でバーミキュライトにMMN液体培地で含水率65%に調整した培地30gに60日間マツタケ菌を培養した上部にハイポネックス培地20gを置床した培地 (A) と, ハイポネックス培地50g (B) を充填したそれぞれの容器に播種後150日が経過したアカマツとクロマツの無菌苗をそれぞれ1本ずつ移植した。移植後, 培地A, BにNo.1~No.4の菌糸体懸濁液5mlをマツ類の移植した培地に接種し6ヶ月間二員培養を行った (写真-3)。培養条件は, 1日16時間日長・約5,000luxの植物育成用蛍光照明下, 約25℃の恒温条件下とした。二員培養期間中は, 乾燥に注意しながら定期的に滅菌ハイポネックス1,000倍液を投与した。



1. マツ類の無菌苗(120日目)

2. 二員培養(60日目)

写真-3 マツ類とマツタケ菌の二員培養



1. 素焼き鉢

2. スチロールねじ瓶

写真-4 順化处理した感染苗

#### (4)順化处理と菌根形成の確認

播種1年経過した二員培養のマツ類苗木の菌根形成の有無を顕微鏡およびDNAによる種の識別により確認した。菌根形成が確認できた試験区苗木を滅菌済みの鹿沼土と赤玉土が入った素焼き鉢と滅菌済みバーミキュライトを充填した口径35mmのスチロールねじ瓶に移植し(写真-4), 1年間順化・育成した(写真-5)。



1. 素焼き鉢



2. スチロールねじ瓶



3. 林地移植

写真-5 順化处理後1年経過の感染苗およびその林地移植

#### (5)DNAによる種の識別 (DNAの抽出・精製・増幅)

乳鉢に100~200mgの培養菌糸体および菌根を入れ, 液体窒素を加えて完全にすりつぶし, エッペンendorfチューブ(1.5ml)に移した。750 $\mu$ lの2%CTAB溶液を加え, 転倒混和した。65 $^{\circ}$ Cに熱したヒートブロックにチューブを移し, 1時間加温した。室温まで低下した後, 等量のクロロホルムを加

え、20分間穏やかに攪拌した。10,000rpmで10分間遠心分離し、このうち上層の水層650 $\mu$ lを新しいチューブに移した。この操作をもう1度繰り返し行い、等量の1%CTAB溶液を加え、転倒混和後、1時間室温で静置し、15,000rpmで5分間遠心分離を行った。上静を捨て、沈殿に400 $\mu$ lの70%エタノールを加え、15,000rpmで5分間、遠心分離を行った。上静を捨て、沈殿を風乾し、50 $\mu$ lのTEバッファーに溶かした。増幅には、マツタケに特異的なプライマー（菊地ら，2000，村田ら，2005）（表 - 2）を用いた。また、PCR産物を電気泳動後、目的の増幅DNAバンドを確認した。また、菌根のDNA抽出時に共に抽出されるマツ類のDNAを植物DNA検出プライマー（表 - 3）を使い確認した。

表 - 2 マツタケ用プライマーと PCR 条件

Forward	5' -ACCTTTCAGACCATGATGAACGACATCTTC-3'	(30mer)
Reverse	5' -TTTCTTGCCGTCATGAAGTACTCGAGGTT-3'	(30mer)
PCR-Cycle		
95 $^{\circ}$ C 10min、94 $^{\circ}$ C 30sec - 56 $^{\circ}$ C 1min - 72 $^{\circ}$ C 1min(40 cycle)、72 $^{\circ}$ C 7min		

表 - 3 植物 DNA 検出プライマー

Forward	5' -CGGACGAGAATAAAGATAGAGT-3'	(22mer)
Reverse	5' -TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA-3'	(22mer)

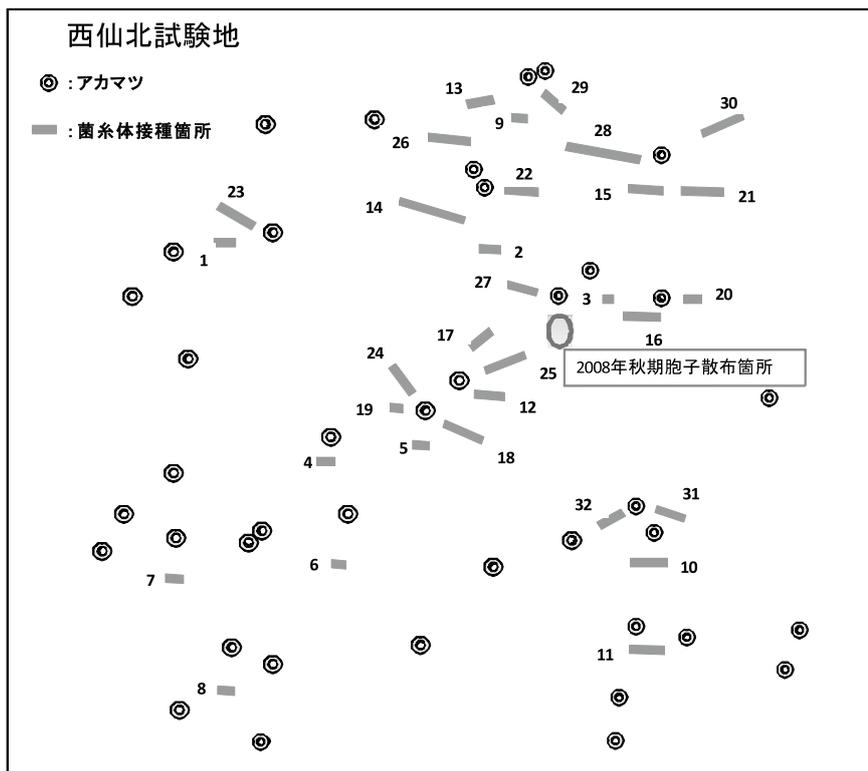
### 3) マツタケ孢子懸濁液の調製

岩手県岩手町産の1本あたり約100gマツタケ子実体4本から、ヒダ部分の組織を切り取り、それに蒸留水500ml加えてブレンダーにかけた。それを3等分してビーカに分注し、蒸留水を加えて2000mlとした。さらに孢子の発芽率を高めるために（太田，1986）n-酪酸を加えて0.005%溶液になるように調製して孢子懸濁液とした。

## 3. マツタケ種菌の林地接種

### 1) マツタケ培養菌糸体

3試験地における培養菌糸体の林地接種は、2002年から2010年まで実施した。接種方法は、写真 - 2に示すように、アカマツの細根が地表面に露出する程度まで掘り出し、細根を蒸留水で洗浄した後、菌糸体種菌によって細根を挟み込む形で置床し、接種種菌全体をバーミキュライトで被覆した。その年次別の箇所数や種菌数は表 - 4, 5, 6に、また、接種箇所等は図 - 1, 2, 3に示した。



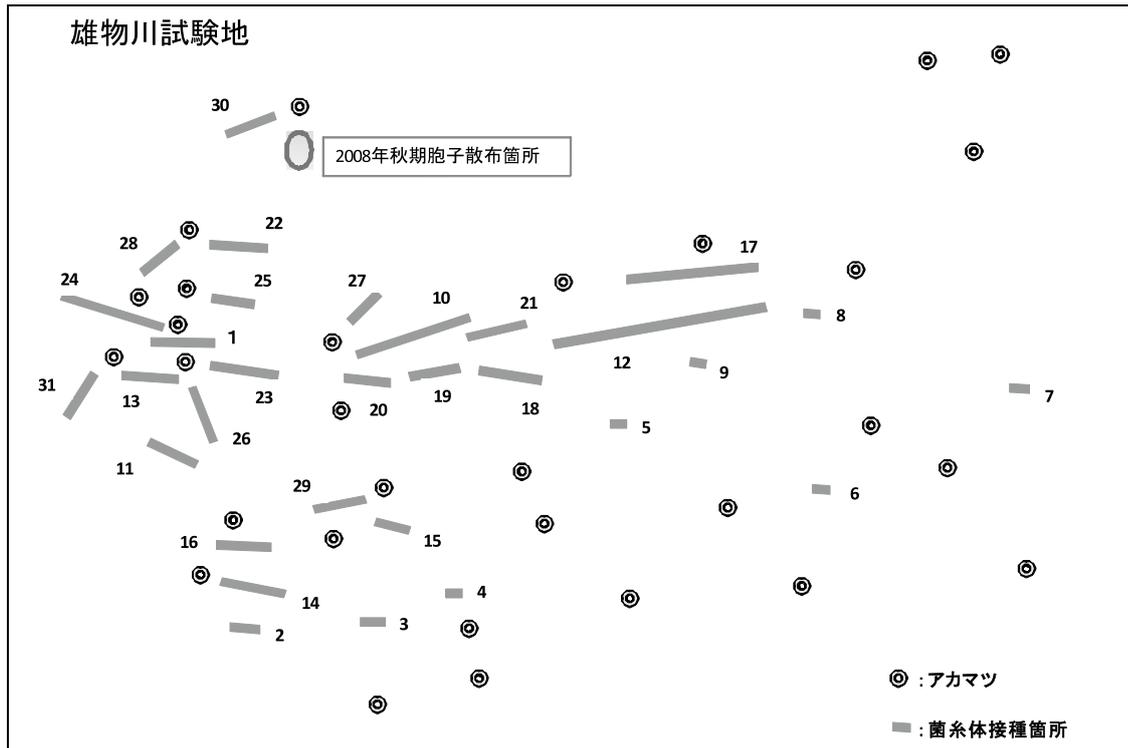
No.	接種年	時期	種菌数
1	2002年	春期	2個
	2002年	秋期	1個
2	2002年	春期	3個
	2002年	秋期	4個
3	2002年	春期	2個
4	2002年	春期	3個
	2003年	春期	4個
5	2002年	秋期	2個
6	2002年	秋期	2個
	2003年	春期	1個
7	2003年	春期	3個
8	2003年	春期	4個
9	2003年	秋期	6個
10	2004年	春期	10個
11	2004年	春期	10個
12	2004年	春期	10個
13	2004年	秋期	9個
14	2004年	秋期	21個
15	2005年	春期	9個
16	2005年	春期	9個
17	2006年	春期	4個
18	2006年	春期	11個
19	2006年	春期	3個
20	2006年	秋期	4個
21	2006年	秋期	14個
22	2007年	春期	8個
23	2007年	春期	10個
24	2008年	春期	11個
25	2008年	春期	12個
26	2008年	秋期	12個
27	2009年	春期	8個
28	2009年	春期	20個
29	2009年	秋期	7個
30	2009年	秋期	11個
31	2010年	春期	11個
32	2010年	春期	11個

図 - 1 菌糸体接種状況(西仙北)

表 - 4 菌糸体接種状況(西仙北)

年次	時期	箇所数	種菌個数	菌糸体※	保護材料
2002年	春期	4	10	A	塩ビパイプ
	秋期	4	8	A	塩ビパイプ
2003年	春期	4	11	A	塩ビパイプ
	秋期	1	6	A	ジフィーポット
2004年	春期	3	30	A	ジフィーポット
	秋期	2	30	A	塩ビパイプ
2005年	春期	2	18	A	塩ビパイプ
	秋期	0	0	—	—
2006年	春期	3	18	A	塩ビパイプ
	秋期	2	18	A	塩ビパイプ
2007年	春期	2	18	A	塩ビパイプ
	秋期	0	0	—	—
2008年	春期	2	23	A	分解性ポット
	秋期	1	12	A	分解性ポット
2009年	春期	2	28	A	分解性ポット
	秋期	2	18	B	分解性ポット
2010年	春期	2	22	B	分解性ポット
	秋期	0	0	—	—
合計		36箇所	270個		

※A:イモ培地菌糸体 B:土壌培地菌糸体(写真 - 1 )



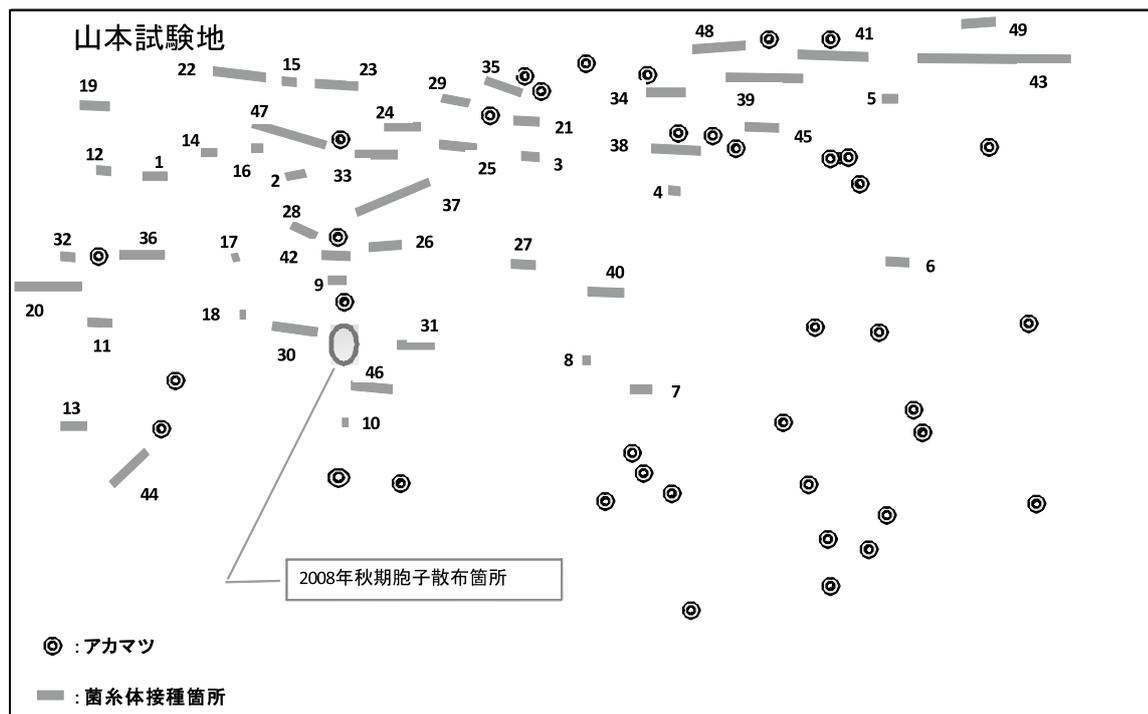
No.	接種年	時期	種菌数
1	2002年	春期	2個
	2002年	秋期	3個
	2003年	春期	5個
2	2002年	春期	3個
	2002年	秋期	4個
	2003年	春期	2個
3	2002年	春期	1個
	2003年	春期	3個
	2003年	秋期	2個
4	2002年	春期	4個
	2002年	秋期	2個
5	2002年	春期	2個
	2002年	秋期	3個
6	2002年	春期	3個
	2003年	春期	1個
	2003年	春期	2個
7	2002年	春期	2個
	2003年	春期	2個
	2003年	春期	2個
8	2003年	春期	2個
	2003年	春期	3個
	2003年	秋期	18個
9	2003年	春期	3個
	2003年	秋期	18個
10	2003年	秋期	18個
	2004年	春期	15個
11	2004年	春期	15個
	2004年	春期	35個
12	2004年	春期	35個
	2004年	秋期	14個
13	2004年	秋期	14個
	2004年	秋期	18個
14	2004年	秋期	18個
	2004年	秋期	18個
15	2004年	秋期	18個
	2005年	春期	8個
16	2005年	春期	13個
	2005年	春期	13個
17	2005年	春期	22個
	2005年	春期	22個
18	2006年	春期	15個
	2006年	春期	15個
19	2006年	春期	15個
	2006年	春期	15個
20	2006年	秋期	11個
	2006年	秋期	14個
21	2006年	秋期	14個
	2006年	秋期	14個
22	2007年	春期	15個
	2007年	春期	15個
23	2007年	春期	15個
	2008年	春期	38個
24	2008年	春期	38個
	2008年	秋期	10個
25	2008年	秋期	10個
	2009年	春期	22個
26	2009年	春期	22個
	2009年	春期	22個
27	2009年	春期	13個
	2009年	春期	13個
28	2009年	春期	13個
	2009年	秋期	16個
29	2009年	秋期	16個
	2009年	秋期	15個
30	2010年	春期	12個
	2010年	春期	13個
31	2010年	春期	13個
	2010年	春期	13個

図 - 2 菌糸体接種状況(雄物川)

表 - 5 菌糸体接種状況(雄物川)

年次	時期	箇所数	種菌個数	菌糸体※	保護材料
2002年	春期	7	17	A	塩ビパイプ
	秋期	4	12	A	塩ビパイプ
2003年	春期	7	16	A	塩ビパイプ
	秋期	1	18	A	ジフィポット
2004年	春期	2	50	A	ジフィポット
	秋期	3	40	A	塩ビパイプ
2005年	春期	2	35	A	塩ビパイプ
	秋期	0	0	—	—
2006年	春期	2	30	A	塩ビパイプ
	秋期	2	25	A	塩ビパイプ
2007年	春期	2	30	A	塩ビパイプ
	秋期	0	0	—	—
2008年	春期	1	38	A	分解性ポット
	秋期	1	10	A	分解性ポット
2009年	春期	2	35	A	分解性ポット
	秋期	2	31	B	分解性ポット
2010年	春期	2	25	B	分解性ポット
	秋期	0	0	—	—
合計		40箇所	412個		

※A:イモ培地菌糸体 B:土壌培地菌糸体(写真 -1 )



No.	接種年	時期	種菌数
1	2002年	春期	1個
1	2002年	秋期	1個
2	2002年	春期	2個
2	2002年	秋期	2個
3	2002年	春期	2個
3	2002年	秋期	2個
4	2002年	春期	1個
4	2002年	秋期	1個
5	2002年	春期	2個
5	2002年	秋期	1個
5	2003年	春期	1個
5	2003年	春期	1個
6	2002年	春期	2個
6	2002年	秋期	1個
6	2003年	春期	2個
7	2002年	春期	2個
7	2002年	秋期	2個
7	2003年	春期	2個
7	2003年	春期	2個
7	2004年	春期	9個
8	2002年	春期	1個
9	2002年	春期	2個
9	2003年	春期	1個
10	2002年	春期	1個
11	2002年	春期	2個
11	2003年	春期	2個
12	2002年	秋期	1個
13	2003年	春期	4個
14	2003年	春期	2個
15	2003年	春期	2個
16	2003年	春期	2個
17	2003年	春期	1個
18	2003年	春期	2個
19	2004年	春期	9個
20	2004年	春期	16個
21	2004年	春期	9個
22	2004年	秋期	10個
23	2004年	秋期	11個
24	2004年	秋期	10個
25	2004年	秋期	9個
26	2005年	春期	12個
27	2005年	春期	6個
28	2005年	春期	7個
29	2005年	春期	5個
30	2006年	春期	14個
31	2006年	春期	14個
32	2006年	秋期	2個
33	2006年	秋期	10個
34	2006年	秋期	11個
35	2007年	春期	15個
36	2007年	秋期	13個
37	2007年	秋期	27個
38	2007年	秋期	18個
39	2007年	秋期	22個
40	2007年	秋期	9個
41	2008年	春期	20個
42	2008年	秋期	12個
43	2008年	秋期	30個
44	2009年	春期	14個
45	2009年	春期	9個
46	2009年	春期	14個
47	2009年	秋期	27個
48	2010年	春期	16個
49	2010年	春期	9個

図 - 3 菌糸体接種状況(山本)

表 - 6 菌糸体接種状況(山本)

年次	時期	箇所数	種菌個数	菌糸体※	保護材料
2002年	春期	11	18	A	塩ビパイプ
	秋期	8	12	A	塩ビパイプ
2003年	春期	9	18	A	塩ビパイプ
	秋期	0	0	A	ジフィポット
2004年	春期	3	34	A	ジフィポット
	秋期	4	40	A	塩ビパイプ
2005年	春期	4	30	A	塩ビパイプ
	秋期	0	0	—	—
2006年	春期	2	28	A	塩ビパイプ
	秋期	3	23	A	塩ビパイプ
2007年	春期	1	15	A	塩ビパイプ
	秋期	5	89	A	分解性ポット
2008年	春期	1	20	A	分解性ポット
	秋期	2	42	A	分解性ポット
2009年	春期	3	37	A	分解性ポット
	秋期	1	27	B	分解性ポット
2010年	春期	2	25	B	分解性ポット
	秋期	0	0	—	—
合計		59箇所	458個		

※A:イモ培地菌糸体 B:土壌培地菌糸体(写真 - 1)

## 2)マツタケ菌感染苗

素焼き鉢およびスチロール瓶に移植1年後、DNAによる種の識別によりマツタケ菌の生存を確認した苗木を2009年6月に山本試験地内に移植した（写真 - 5）。

## 3)孢子懸濁液

孢子懸濁液の林地散布方法は、写真 - 6に示すように、3試験地において、約1㎡の範囲でアカマツの細根が地表面に露出する程度まで掘り出し、掘り出した部分に細根が埋没しないようにバーミキュライトを敷き詰めた。その箇所全体に2000mlの孢子懸濁液を散布し、バーミキュライトで被覆した。孢子散布は2008年10月に実施し、散布箇所は図 - 1, 2, 3に示した。

## 4. 林地接種種菌の掘り取り調査

培養菌糸体、菌感染苗および孢子散布などの種菌接種による菌根形成状況を確認するため、3試験地において、表 - 7に示す種菌接種箇所より、2009年12月に掘り採り、菌根の有無と遺伝子レベルでマツタケ菌生存の確認を行った。なお、2002年から2005年まで実施した菌糸体種菌の接種箇所については、ツキノワグマやアナグマ等野生動物による掘り起こし被害を受けるなど接種種菌が不明瞭な状態のため、掘り取り調査は2006年以降のものとした。



1. 細根の掘り出し



2. 土壌へのバーミキュライト施用



3. 孢子懸濁液の散布



4. バーミキュライトによる覆土

## 写真 - 6 孢子散布方法

表 - 7 接種種菌の掘り取り調査箇所

種菌接種		試験地		
接種年	時期	西仙北	雄物川	山本
2006年	春期	○	○	○
	秋期	○	○	○
2007年	春期	○	○	○
	秋期	—	—	○
2008年	春期	○	○	○
	秋期	○	○	○
	秋期・孢子	○	○	○
2009年	春期	○	○	○
	春期・感染苗	—	—	○

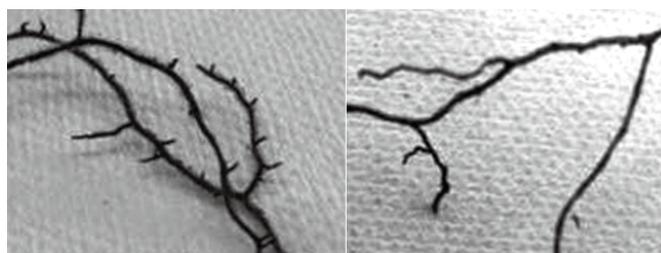
## 5. キノコ相調査

調査は、3試験地において、2001年～2010年の10年間、毎年9月上旬から11月上旬にかけて5回程度行い、調査項目は、試験地内の地面に発生するキノコについて種類、本数および発生位置とした。

## Ⅲ. 結果および考察

### 1. マツタケ菌感染苗の育成

アカマツとクロマツ種子の無菌化を確認するため、改変LP培地で発芽処理を行った。1週間後から発芽が始まり、発根後、根が1～2cmに伸長したものを100ml容培養UMサンプル瓶に移植し、約120日間無菌苗育成を行った（写真-3左）。マツタケ菌を培養した培地上部にハイポネックス培地20gを置床したもの（培地A）と、ハイポネックス培地50g（培地B）を充填したそれぞれの容器に播種後150日が経過したアカマツとクロマツの無菌苗を移植し、4種の菌糸懸濁液を接種した。6ヶ月の培養期間中、マツ類の生育に違いは見られなかった（写真-3左）。また、枯死する個体も認められなかった。二員培養終了後、根の状態を調査するため、培養瓶から植物体を取り出し、菌根形成の有無とDNAによるマツタケ菌の確認を行った。アカマツとクロマツの根の状態を写真-7に示す。接種源とマツタケ菌株の違いにかかわらず、培地Aの全てのアカマツ無菌苗の根には細根が見られ、その周囲には多くの根毛が認められた。しかし、培地Bのアカマツ無菌苗は、全ての個体で細根が認められず、根毛も見られなかった。クロマツ無菌苗は、培地A、Bともに多くの個体で写真-7右のように細根および根毛が認められなかった。DNAによるマツタケ菌の確認を行ったところ、根の観察結果と同様、培地Aのアカマツ無菌苗の根系からマツタケ菌が検出されたが、培地Bの根系からマツタケ菌は検出されなかった（写真-8）。一方、クロマツ無菌苗は培地A、Bともにマツタケ菌は検出されなかった。



アカマツ

クロマツ

写真 - 7 育成した感染苗の菌根の形状

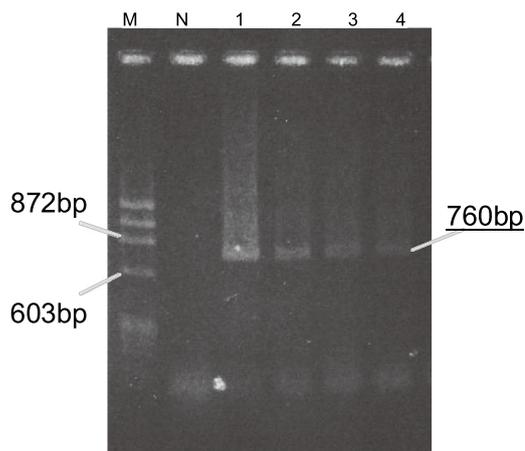


写真 - 8 DNAによるマツタケの識別

レーン M: マーカー, N: タモギタケ, 1: ATM6 2: ATM30, 3: ATM12, 4: ATM19

以上の結果から、感染苗作出には無菌苗にマツタケ菌を接種しても菌根を形成しにくいいため、予めマツタケ菌を培養した培地に無菌苗を移植すると菌根を形成しやすい。感染苗作出については、容器内でマツタケ実生苗の根にマツタケ培養菌糸体を接種すると感染が成立し、菌根は容易に得られると述べている（横山・山田, 1987, 山田ら, 1999, Guerin-Laguette, 2000）。今回の試験では、約1800個体と大量に供試したにもかかわらず、マツタケ菌糸体懸濁液接種個体からは、菌根形成が認められなかった。一方、無菌苗を移植したハイポネックス培地は無機成分が多いため、菌根形成を阻害していた可能性も考えられる。そのことを示唆するように、アカマツ無菌苗の菌根は全て培養済みのマツタケ菌が繁殖している領域で形成した。従って、マツタケ感染苗の調製には、予めマツタケ菌を培養してある容器に無菌苗を移植することが有効である。培養菌糸体懸濁液の接種は菌根形成が認められないことが解った。ただし、無菌苗の移植培地の無機成分や濃度、あるいは糖質の量を加減することで、菌糸体懸濁液接種による菌根形成に至る可能性も考慮しなければならない。また、近年、菌根形成促進物質の存在が示唆されていることから、マツ類根系へのマツタケ菌活着とその後の定着および安定性についても検討が必要である。

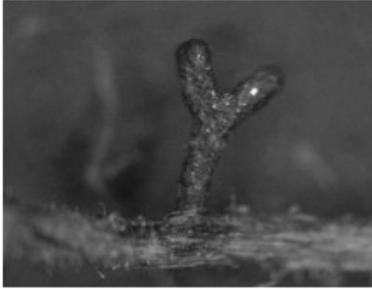
次に、菌根形成を確認したアカマツ感染苗を素焼き鉢とスチロールねじ瓶に移植し、ガラス温室内で順化处理を行い、1年後にDNAによるマツタケ菌根生存の確認を行った。その結果、素焼き鉢の個体で菌根が維持されていることが確認できた。

## 2. 各マツタケ種菌の掘り取り調査

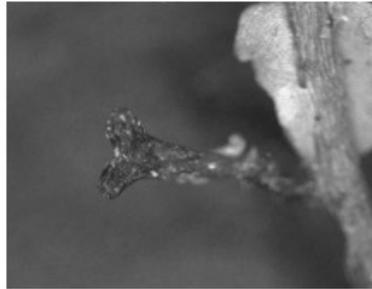
山本試験地に移植したマツタケ感染苗を移植半年後にDNAによるマツタケ菌の確認を行ったが、マツタケ菌は確認できなかった。試験地移植の際は、菌根が見られたが、半年後に掘採った時は、菌根が消失し、根の表皮が剥がれ落ちていた（写真 - 9）。また、順化处理後、温室内で育成管理していた個体も2年後には、根系からマツタケ菌が消失し、マツタケ以外の菌根に入れ替わっていた。

一方、菌糸体種菌および孢子散布箇所掘り取り調査では、全ての試験地で菌根形成が認められた。菌根の形状を示した顕微鏡写真を写真 - 9に示す。様々な形態の菌根形状が見られたが、特に西仙北2009年春期や西仙北2008年孢子散布箇所の菌根の形状は、マツタケの菌根に似ていた。そこで、全ての菌根についてDNAによるマツタケ菌の確認を行ったが、マツタケ菌は検出されなかつ

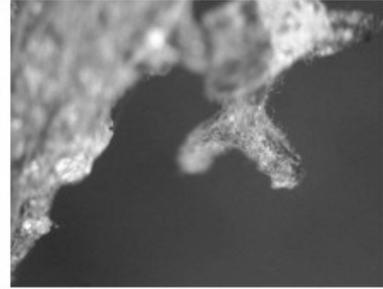
た。現在、引き続き接種箇所のきのこ相の調査を行っており、数年後に再度掘り取り、分子生物学手法により種の同定を行う予定である。



2006年 秋期



2008年 秋期  
西仙北試験地



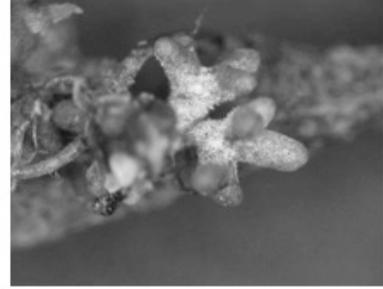
2009年 春期



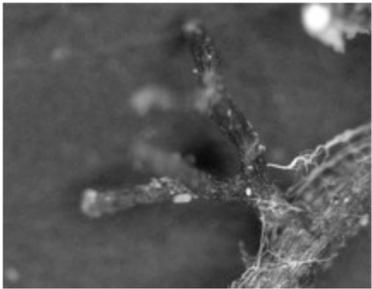
2006年 秋期



2008年 秋期  
雄物川試験地



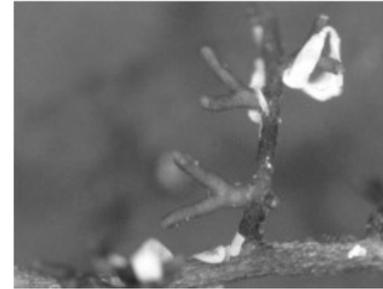
2009年 春期



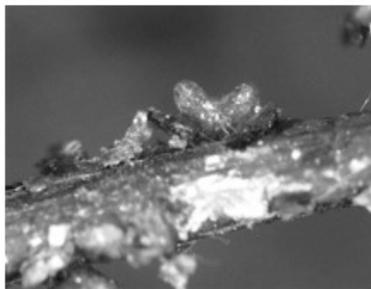
2007年 秋期



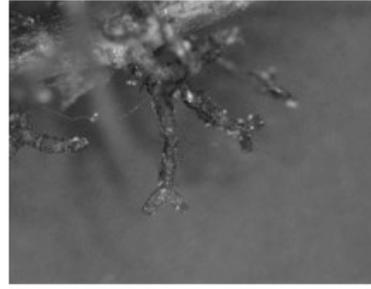
2008年 春期  
山本試験地



2009年 春期



2008年 秋期  
胞子散布(西仙北試験地)



2008年 春期  
菌感染苗(山本試験地)

## 写真 - 9 菌根の形成状況

マツタケ感染苗によるシロの形成では、広島県で成功した例があるが再現性が乏しく、それ以降成功した事例はない(枯木・川上,1985)。感染苗をアカマツ林に移植すると順化に成功しても、多くの場合、根の表面が剥がれるとともに、やがてマツタケ菌根も消失してしまうことが知られている(鈴木, 2005)。本試験でも同様な結果に至ったが、移植先である山本試験地は、環境整備や菌糸体埋設効果により菌類相がマツタケ発生指標のきのこ相に推移してきたため移植を試みた。自然環境にある試験地では半年後、温室内でも順化处理2年後にはマツタケ相が消失することから、現方法での感染苗を用いたマツタケ発生には、改善の余地がある。例えば、1箇所に1本単独で植栽しているため、周囲のマツタケ以外の菌類に襲われやすく、菌根が他の外性菌根に入れ替わり易い。また、培養菌糸体をアカマツ林地のアカマツ細根に接種しても感染に成功した例はない。そこで、数本の苗を固めて1箇所に植栽し、根系への外敵進入を抑制するなどの工夫が必要と考えられる。また、感染させるマツタケ菌も1系統ではなく、1本の苗に数系統のマツタケ菌を感染させ、あらかじめ抵抗性を付与しておくことも必要であろう。

同様に培養菌糸体についても、培地組成の改善や埋設菌糸体数を増やし外敵からの侵入を防御するなどの工夫も必要である。今回、菌糸体の保護材料として雨樋用の塩ビパイプや種苗育成用のポットを用いたが、その効果の程度は確認できなかった。また、同一箇所に数系統のマツタケ菌糸体を埋設するなど、今後検討していかなければならない課題は多いが、この点について現在、試験中である。

### 3. きのこと相調査

各試験地内における10年間のキノコ相調査を行ってきた(阿部・菅原, 2007, 2008)が、そのキノコ発生状況についてそれぞれ表-8, 9, 10に示す。観察されたキノコの発生種数は、「西仙北」12科13属29種、「雄物川」8科11属24種、「山本」4科4属6種で、「西仙北」の数種を除き、ほとんどが菌根性キノコであった。発生キノコの種類および本数については、年次経過にしたがって変動しながら推移し、調査年次の最終年あたりでは、3試験地ともに主な発生キノコ種は2~3種に減少し、発生本数も発生ピーク時の10%前後に減少した。

表-8 発生キノコの種類と発生本数の推移(西仙北)

科名	種名(和名)	機能※	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	計
ヌメリガサ科	フユヤマタケ	M				1	29						30
キシメジ科	マツタケモドキ?	M			1								1
テングタケ科	テングタケ	M			1								1
	コタマゴテングタケ?	M	2		1	1			5	1	1		11
	クロコタマゴテングタケ?	M					3						3
	ヘビキノコモドキ	M									1		1
	カバイロツルタケ	M			3	6	4		2		2	1	18
	テングタケ属	M						2		1			2
ヒトヨタケ科	ナヨタケ属	S	23										23
フウセンタケ科	フウセンタケ属	M			1								1
	フウセンタケ属	M				1						1	2
イッポンシメジ科	アカイボカサタケ	S			9		25						34
オウギタケ科	オウギタケ	M	9		1	2	1	3	7	1	2	2	28
	クギタケ	M				1	1				1	1	4
ヌメリイグチ科	アマタケ	M	50		1	19	3	3	114	1	1	3	195
イグチ科	イグチ科	M	2										2
	イグチ科	M					1						1
	イグチ科	M					1						1
	イグチ科	M					1						1
ベニタケ科	ドクベニタケ	M				1							1
	カワリハツ	M				1							1
	ベニタケ属	M	1										1
	ベニタケ属	M							1				1
	シロハツ	M								1			1
	クサハツ	M									1		1
	アカハツ	M							1				1
	キカラハツタケ	M				10	13	2	8				33
アンズタケ科	トキロラッパタケ	M			45	6							51
ハリタケ科	カノシタ	S			2	15							17
子実体本数合計			87	0	65	64	82	10	138	5	9	8	468
種数合計			6	0	10	12	11	4	7	5	7	5	29

11科13属29種

※M: 菌根性, S: 腐生性 : 林床整備実施年

「西仙北」では、腐生菌であるカノシタやナヨタケ属そしてA0層に生息するトキイロラッパタケ、アカイボカサタケ、キカラハツタケが2005年あたりまで局所的に群生していたが、単発発生だけで、それらが次第に消失したことは、腐植層除去施業により土壌環境が改善されたことを示している。一方、アマタケが、ほぼ2年おきに発生箇所を変動しながら群生発生し、それと付随する形で発生したオウギタケとともに、ほぼ調査期間を通して観察された(図-4)。アマタケについては、発生環境の幅がかなり広い傾向にあるが、若いアカマツ林や、マツタケ林の優占種である(枯木, 1974)ことから、アマタケの発生が多いということはマツタケ発生環境に近い状態にあるものと考えられる。他の2試験地で多く発生したヌメリイグチ、キシメジ、ハツタケは「西仙北」ではみられなかった。

表 - 9 発生キノコの種類と発生本数の推移(雄物川)

科名	種名(和名)	機能※	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	計
キシメジ科	キシメジ	M	3		7	13	28	1	9	1	2		64
	カキシメジ	M							1	1	1		3
テングタケ科	テングタケ	M			1								1
	コタマゴテングタケ?	M				1							1
	コテングタケモドキ	M		1	1				2	1			5
ハラタケ科	ハラタケ属	S	1										1
フウセンタケ科	フウセンタケ属	M	1			16	15						31
	フウセンタケ属	M			1	3							4
	フウセンタケ属	M					3						3
	ササタケ属	M			3								3
オウギタケ科	クギタケ	M		2	1				1				4
ヌメリイグチ科	アマタケ	M	3	2	1	2							8
	ヌメリイグチ	M	1		4	5		12	20	8	4		54
	チチアワタケ	M							4		1	1	6
イグチ科	オオクロニガイグチ	M	4			1							5
	ミドリニガイグチ?	M				1							1
	ニガイグチモドキ?	M						1					1
	イグチ科	M			1								1
ベニタケ科	ニオイコベニタケ	M		1	1	2	20		6	2	14		46
	アイタケ	M					3						3
	ハツタケ	M	3	2	3	10			1				19
	アカハツ	M				3							3
	カワリハツ	M							4				4
	ベニタケ属	M	5				1						6
子実体本数合計			21	8	24	57	70	14	48	13	20	1	277
種数合計			8	5	11	11	6	3	9	5	5	1	24

8科11属24種

※M: 菌根性, S: 腐生性

: 林床整備実施年

表 - 10 発生したキノコの種類と発生本数の推移(山本)

科名	種名(和名)	機能	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	計
キシメジ科	キシメジ	M					5	2	10	21	10	13	48
	カキシメジ	M	168	36	66	3							273
オウギタケ科	オウギタケ	M									1		1
ヌメリイグチ科	ヌメリイグチ	M		5							5		10
	チチアワタケ	M								2			2
ベニタケ科	ハツタケ	M	1	7		9	4	10	1		1		33
子実体本数合計			169	48	66	13	9	12	11	23	17	13	381
種数合計			2	3	1	3	2	2	2	2	4	1	6

4科4属6種

※M: 菌根性

: 林床整備実施年

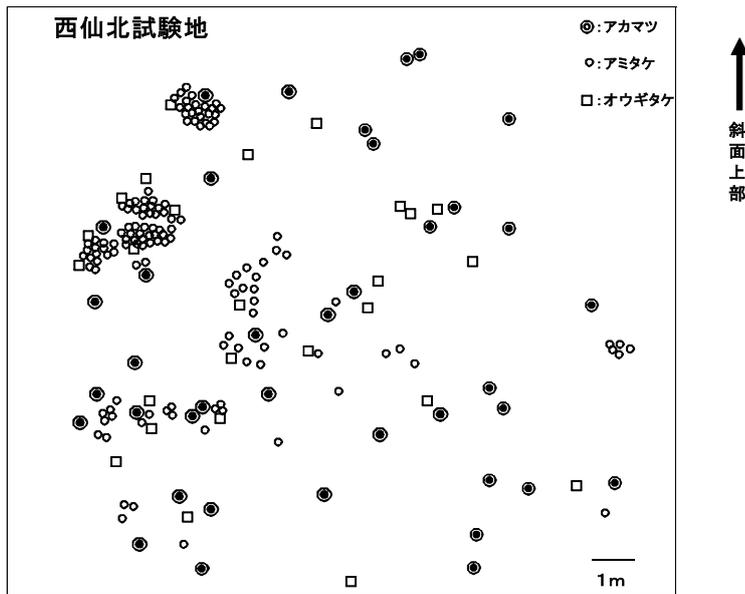


図 - 4 アミタケおよびオウギタケの発生位置(西仙北)

次に、「雄物川」では、フウセンタケ属の一種が2004年から2005年にかけて局所的に群生発生したが、2006年以降はほとんどみられなくなった。フウセンタケ属の多くは落葉が厚くやや湿った肥沃なところを好むとされる(小川, 1978)ことから、この場合も腐植層除去施業が土壤環境に大きく影響していると考えられた。また、2003年から2005年にかけてキシメジの発生が多くみられたが、2006年以降減少傾向となり、それに代わってヌメリイグチが発生本数、発生位置ともに漸増、拡大傾向を示した(図 - 5)。ヌメリイグチは落葉のない裸地や若い林分に多く発生し、アカマツとの菌根は硬質土壌の中に広くまばらに分散するとされている(小川, 1978)。このようなキノコの発生動態から、藤田(藤田, 1989)のアカマツ林区分によると「雄物川」は「若齢林 - 壮齢林」となり、実際の林齢は40年代に達してはいるものの、腐植層除去施業によって林地の土壤条件やアカマツの根がマツタケ発生に好適環境になりつつあることを示している。

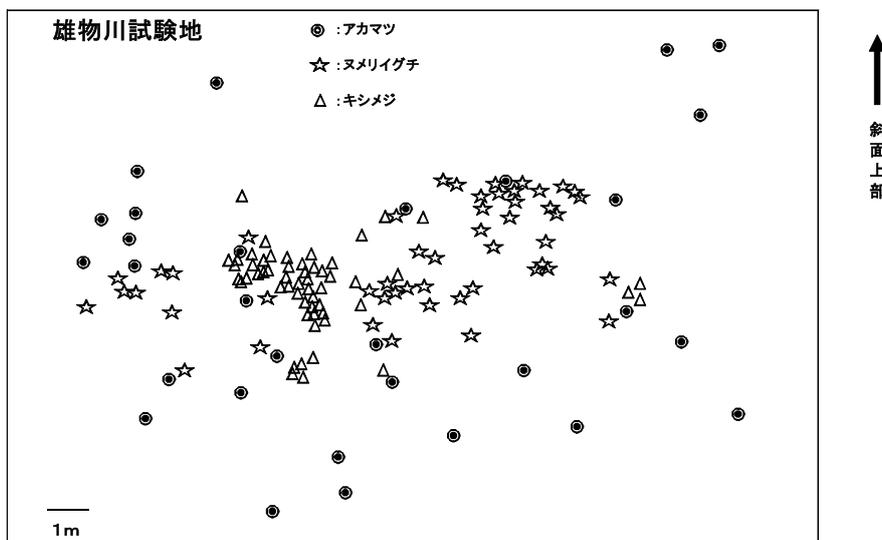


図 - 5 ヌメリイグチおよびキシメジの発生位置(雄物川)

「山本」は、若齢林でA 0層が極めて少ないことから、その特徴を示すように試験地全域にハツタケの発生がみられたが、2007年より発生本数が少なくなっている。また、発生キノコの種数は調査期間を通して1種～4種と少数で推移した。一方、2001年から2003年まで群生発生したカキシメジが漸減しながら2005年には消失し、2005年からはカキシメジの発生していた箇所にキシメジの発生がみられるようになった(図 - 6)。また、発生本数は少ないものの、2008年からチチアワタケやヌメリイグチがみられるようになった。これらのキノコはいずれも乏しい栄養しかない土壌でよく広がる菌根菌とされている(小川, 1978)。このようなキノコ相の変化については、カキシメジ発生箇所を含む林床へのマツタケ菌糸体埋設処理が、アカマツの根や土壌菌根相に何らかの影響を及ぼしていると考えられた。

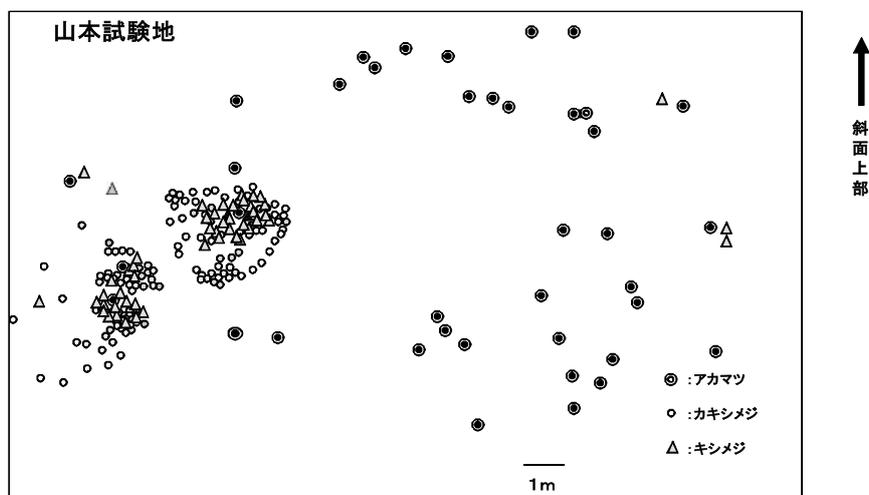


図 - 6 カキシメジおよびキシメジの発生位置(山本)

相良は林齢の異なるアカマツ林のキノコ相を比較し若齢林と老齢林とで種構成が著しく異なることを認めた(相良, 1964)。藤田も林齢の異なるアカマツ林におけるキノコ類の出現頻度からキノコ発生種を7つのグループ分けをした(藤田, 1989)。また、衣川はマツタケ発生林の5年間の高等菌類を記録している(衣川, 1964)。このようにアカマツ林内のキノコ相の相違が林齢によって異なり、マツタケ発生林のキノコ相に何らかの特徴があることは推測されている。伊藤らはアカマツ林のマツタケ発生適地の指標キノコとしてアマタケやヌメリイグチあるいはキシメジなどをあげている(伊藤・岩瀬, 1997)が、本研究では、10年間にわたる3試験地のキノコ相調査結果において、アマタケやヌメリイグチおよびキシメジが各試験地の優占種に推移してきたことから、これまで実施してきた腐植層除去や菌糸体埋設などの林地攪乱処理により、土壌条件やアカマツの根などに対する環境改善効果があったと考えている。

#### IV. おわりに

本研究では、アカマツ林におけるマツタケの子実体発生まで至らなかったが、現在、培地組成の改良をすすめて土壌培地での効率的な菌糸体増殖に目処がついたことから、今後も引き続き、新たな試験地の造成を含め、より大量の菌糸体接種などこれまで以上の林地攪乱処理を行っ

て、マツタケ子実体の発生に向けて取り組むことにしている。

### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、試験地提供等でご協力を頂いた小松道夫氏、近藤敬子氏および横手市雄物川地域局に厚く感謝を申し上げます。

### 引用文献

- 阿部実(2003) 林床活用による菌根性きのこの栽培開発, 秋田県森技研報10:11-21
- 阿部実・菅原冬樹(2007) 林床整備を行ったアカマツ林におけるキノコ相の推移, 東北森林科学会第12回大会講演要旨集:55
- 阿部実・菅原冬樹(2008) 林床整備を行ったアカマツ林におけるキノコ相の推移—発生キノコの位置—, 東北森林科学会第13回大会講演要旨集:32
- Abo EL-Nil, M.M. and Milton,W.(1982) Method for asexual reproduction of coniferous trees, United States Patent No.4353186
- Guerin-Laguette A, Vaario L, Gill W.M,Lapeyrie F,Matsushita N, and Suzuki K,(2000) Rapid in vitro ectomycorrhizal infection on Pinus densiflora roots by *Tricholoma matsutake*. Mycoscience41:389-393
- 藤田博美(1989)アカマツ林に発生する高等菌類の遷移, 日菌報30:125-147
- 藤田博美(1992)“ホンシメジ”きのこ増殖と育種, 最新バイオテクノロジー全書編集委員編, 農業図書, 東京:300-307
- 石井克明ら(1993) 容器内でのクロマツ、クヌギへの共生菌の接種による二員培養, 植物組織培養10(1):84-88
- 伊藤武・岩瀬剛二(1997) マツタケ, 農山漁村文化協会, 東京, 181pp
- 枯木熊人(1974)マツタケのイヤ地回復施業試験, 広島県林試研報9:97-104
- 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, 広島県林試研報20:13-23
- Kikuchi K, Matsushita N, Guerin-Laguette A, Ohta A, and Suzuki K,(2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. Mycol.Res.104(12):1427-1430
- 衣川堅二郎(1964)マツタケ発生林の環境, 日菌報5:16-27
- Murata H, Ohta A, Yamada A, Narimatsu M, and Futamura N,(2005) Genetic mosaics in the massive persisting rhizosphere colony “shiro” of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* . Mycorrhiza:505-512
- 小川真(1978)マツタケの生物学, 築地書館, 東京, 326pp
- 太田明(1986)マツタケの担子胞子の発芽 (I) 担子胞子の膨潤と発芽に対する有機酸の効果, 日菌報27:167-173
- 相良直彦(1964)アカマツ林に発生するキノコ類の菌類社会学的研究, マツタケ—研究と増産:65-83
- 菅原冬樹・田中修(1999)マツタケ菌糸の大量増殖, 日本菌学会第43回講演要旨集:55
- 鈴木和夫(2005) 外性菌根共生系の生理生態とマツタケのパズル, J.Jpn.For.Sci.87(1):90-102
- Yamada A, Maeda K, Ohmasa M,(1999) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of Pinus densiflora in vitro. Mycoscience40:455-463

横山良爾・山田卓三(1987) マツタケ菌とマツの器内培養, *Trans.mycol.Soc.Japan*28:331-338