

容器内混合培養法によるマツタケ菌根合成苗の育成

衛 藤 慎 也

衛藤慎也：容器内混合培養法によるマツタケ菌根合成苗の育成，広島県林技セ研報31：21～25，1998。マツタケ菌根合成苗を育成するため，PGY液体培地を浸したパーミキュライトを培地とする植物培養用フラスコ内でマツタケ菌糸体とアカマツ苗を混合培養した。高濃度の鉄を添加したPGY培地を用いることにより，マツタケの菌糸成長及び菌根形成が促進された。また，フラスコの蓋にフィルター付きアルミ箔を使用することによりマツタケの菌糸成長が改善された。これらの結果をもとに，恒温ガラス温室でマツタケ菌根合成苗を大量に育成することができた。

[キーワード]

マツタケ，アカマツ苗，菌根合成，鉄

1. はじめに

マツタケ菌根合成苗の量産化を目的として，既に報告した作成方法¹⁾について再検討した。その結果，アカマツ無菌苗を育成した後マツタケ菌とアカマツ苗を混合培養して菌根合成苗を作成するのではなく，土壌培地で最初から混合培養して作成することなどの技術的改良を行うとともに，恒温ガラス温室での大量作成を試みた。

2 材料と方法

2.1 材料

マツタケ (*Tricholoma matsutake* (S.Ito et Imai) Singer) の菌株は，広島県立林業技術センターで保存している広島県内で採取した2菌株 (Tm-H001, Tm-H501) を用いた。

アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb.et Zucc.) の種子は，広島県立林業技術センター構内に生育しているアカマツから採取し，冷蔵保存 (1年以内) しているものを用いた。

2.2 マツタケ菌根合成苗の作成

2.2.1 マツタケ菌糸体の培養

保存菌株の一部を，滅菌シャーレで作成した浜田寒天平板培地²⁾ (グルコース20g，乾燥酵母5g，寒天15g，水道水1ℓ，pH5.0) の中央に接種して，23℃，暗黒下で80日間拡大培養した。つぎに，前記の培地から寒天をぬいた液体培地4mlを径25mmの培養用試験管に注入し，シリコンゴム製の通気栓で栓をして121℃で15分間高圧

滅菌した後，拡大培養した菌糸体からコルクボーラーで径5mmの菌糸体片を切り出して接種し，23℃，暗黒下で60日間培養して増殖した菌糸体をアカマツ苗との混合培養に用いた。

2.2.2 マツタケ菌とアカマツ苗の混合培養

混合培養はパーミキュライトに液体培地を加えた土壌培地で行った。液体培地には，アカマツの苗に害を及ぼす乾燥酵母³⁾を含まず，作成が容易でマツタケ菌糸の成長が良好な半合成培地 (グルコース2%，イーストエキス0.2%，ポリペプトン0.2%，MgSO₄·7H₂O 0.05%，KH₂PO₄ 0.05%，クエン酸鉄0.01%，pH5.0) を用いた。

まず，300ml容植物培養用フラスコにパーミキュライト70mlと液体培地60mlを入れ，フィルター付アルミ箔で蓋をして121℃で15分間高圧滅菌し土壌培地を作成した。このフラスコに，試験管内で増殖したマツタケ菌糸体 (径23mm，厚さ1mm) をピンセットで細かく切断して植え付けた後，70%アルコールで1分間，さらに7.5%過酸化水素水で20分間殺菌処理をしたアカマツ種子を2粒植え付け，人工気象器 (23℃，12時間明-12時間暗，約5,000lux) で90日間混合培養を行った。

2.2.3 混合培養に用いた液体培地の検討

混合培養に用いた液体培地は，ペプトン・酵母エキス・ブドウ糖培地 (PGY培地) に，鉄の量が太田の合成培地⁴⁾に含まれる量とほぼ同量のクエン酸鉄を添加したものである。鉄添加効果について，マツタケの菌糸成長及び混合培養の結果を比較した。

まず，液体培地10mlを100ml容三角フラスコに注入し

高圧滅菌した後、寒天培地上で拡大培養した菌糸体から径5mmの菌糸体片を切り出しこれに接種し、23℃で40日間培養し菌糸体の乾燥重量を測定して菌糸成長量を比較した。混合培養の結果については、フラスコ内の土壤培地上部表面における菌糸の蔓延速度及び合成された菌根の状況を比較した。

2.3 マツタケ菌根合成苗の大量作成

高さ60cm、幅80cm、長さ3mの鉄製の棚を8台備えた面積64.8m²の恒温ガラス温室(23±1℃)で90日間混合培養を行い、マツタケ菌根合成苗の大量作成を試みた。

3 結果と考察

3.1 マツタケ菌根合成苗の作成

太田⁹⁾は高濃度の鉄の添加を特徴の一つとする菌根菌培養のための新しい合成培地を提唱した。図1のとおりPGY培地のような一般的な培地においても高濃度の鉄の添加によりマツタケの菌糸成長が促進された。

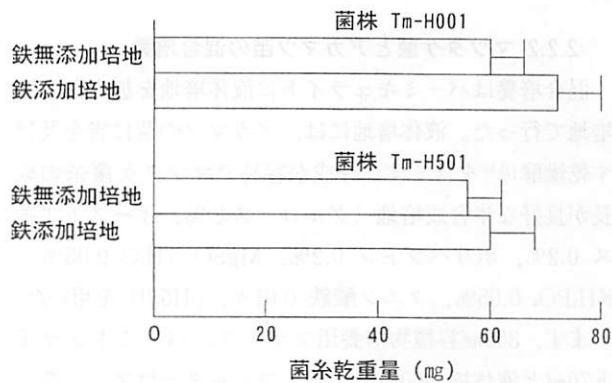


図1 マツタケ菌糸成長量の比較 (1試験区15本の平均)

混合培養の結果を表1、写真1及び写真2に示した。マツタケの菌糸の蔓延速度は鉄を添加した培地の方が速かったが、培養90日目には両者とも完全に菌糸が蔓延しており、その状況に関して差は見られなかった。また、雑菌が混入したフラスコ及び種子が発芽しなかったフラスコ以外は、マツタケ菌のアカマツ苗への感染が認められた。鉄を添加した培地、無添加の培地とも感染率は高く差はなかったが、菌根化の度合いに違いが見られた。天然の菌根に特徴的な感染部分が黒化した菌根は、鉄を添加した培地ではほとんどのフラスコに見られたが、無添加の培地ではあまり見られなかった。感染部分の根の切片を鏡検すると、黒化したものでは根の皮層部の細胞

間隙への菌糸の侵入が全て認められたのに対し、黒化していないものでは、菌糸が根の皮層部の細胞間隙へ侵入しているものや菌糸が根の表面に付いているだけのものなど菌根化の程度が様々であった。培地への鉄の添加は菌糸の成長だけでなく菌根の合成も促進した。

表1 混合培養の結果

| 菌株 | 培地の種類 | 培養数 | 感染確認数 (フラスコ) | 黒色菌根確認数 (フラスコ) | 菌糸蔓延日数 (日) |
|---------|-------|-----|-----------------|-------------------|---------------|
| Tm-H001 | 鉄無添加 | 60 | 54 | 5 | 58~63 |
| | 鉄添加 | 60 | 56 | 47 | 53~57 |
| Tm-H501 | 鉄無添加 | 60 | 55 | 7 | 64~68 |
| | 鉄添加 | 60 | 55 | 50 | 58~63 |

※感染及び黒色菌根は少しでも確認できれば確認とした。



写真1 混合培養が完了した状況

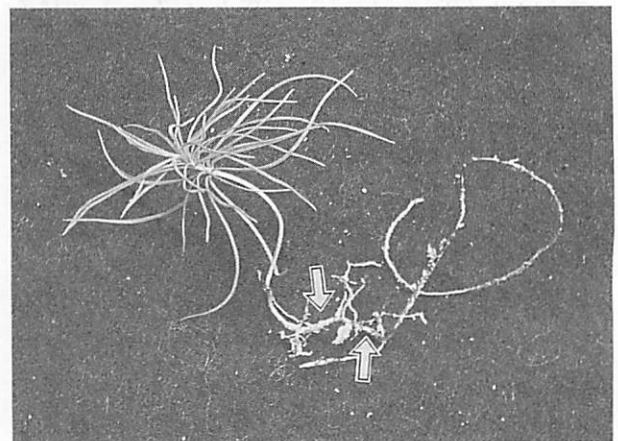


写真2 容器から取り出したマツタケ菌根合成苗 (矢印：黒色菌根部分)

また、アルミ箔のフィルターの有無についても比較試験を行った(表2)。フィルターの付いたアルミ箔を使用することによりマツタケの菌糸成長が改善されたが、マツ苗の成長は逆にやや抑制される傾向にあった。これは、マツタケは寄生的性質を残した例外的な菌根性きのこであると考えられている⁷⁾ことから、感染の促進を反映したものではないかと思われる。

表2 フィルター付きアルミ箔の効果

| フィルターの有無 | 培養数 (フラスコ) | 菌糸蔓延日数 (日) | アカマツ苗の大きさ 苗高(mm) | 基径(mm) |
|----------|---------------|---------------|---------------------|---------|
| 無 | 60 | 68~76 | 70±5 | 0.7±0.1 |
| 有 | 60 | 53~57 | 65±7 | 0.6±0.1 |

※菌株はTm-H001, 培地は鉄添加培地を使用。

図2に混合培養までの過程を示した。既報⁷⁾では、土壌培地で最初から混合培養した場合マツタケの菌糸成長が遅くアカマツ苗に感染しにくいとの理由から、フラスコでアカマツ無菌苗を作成した後、別のフラスコを用いて反応面積の広い液体培地で混合培養する方法を開発した。しかし、培地の改善及びフィルター付きアルミ箔の導入とともに、土壌培地をできるだけ浅くすること、一旦液体培地で増殖させたマツタケ菌糸を混合培養に用いることなどの工夫により、土壌培地で最初から混合培養

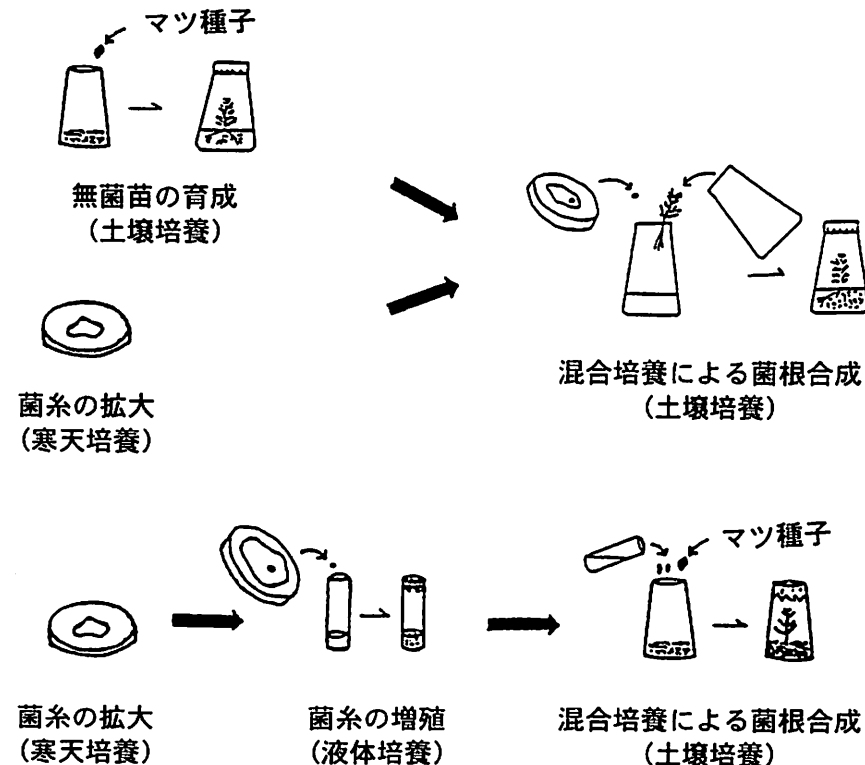


図2 混合培養までの過程(上:既法での方法、下:改良した方法)

してマツタケ菌根合成苗を作成することが可能となった。

3.2 マツタケ菌根合成苗の大量作成

2菌株を使用した一度に600本のフラスコによる混合培養試験において、高い割合でマツタケ菌根合成苗を作成することができた(表3)。温室は培養庫に比べて雑菌混入率が高まることが予想された。そこで、アルミ箔をセロテープで完全にフラスコに密着して培養することと、使用前に温室内をよく掃除することによって雑菌混入率を低く抑えることができた。

表3 菌根合成苗の大量作成

| 菌株 | 培養数 (フラスコ) | 感染確認数 (フラスコ) |
|---------|---------------|-----------------|
| Tm-H001 | 300 | 276 |
| Tm-H501 | 300 | 285 |

4 マツタケ菌根合成苗の植え付けについて

樹木の苗に菌根菌を感染させてこれを植え付ける感染苗法は、樹木の成長を促進しそれに伴って自らも成長する菌根菌の共生菌としての性質を利用したもので、乾燥地や荒廃地の緑化などでよく活用されており、世界三大珍味の一つとして有名な菌根性きのこであるトリフもこの方法で栽培化されている⁹⁾。

しかし、マツタケはこのような性質がなく、前述のように寄生的性質を残した菌根性きのこであると考えられていることから、感染苗法による栽培化は容易ではない。天然のシロを利用してマツタケ菌が感染した苗を作り、これを移植してシロ形成に成功した当所での全国で唯一の事例¹⁰⁾においても、植え付けた苗の根の伸長とともに菌が広がってシロが形成されたのではなく、林地の根に菌が二次感染してシロが形成されたことや、植え付け後の苗の生育が非常に悪かったことを確認している。また、より大きな苗による効果を期待して、若木に菌を感染させて移植する試み^{11),12)}が行われ、一部で二次感染が確認されてい

るが、シロへの発展は報告されていない。このように、マツタケ栽培における感染苗法は難しいものではあるが、感染苗を育ててシロの形成を期待するのではなく、菌が林地の成木の根に感染するまで苗によってできる限り菌を長期間生存させることを期待して取り組まれている。

以上から、作成したマツタケ菌根合成苗は、培養菌糸を林地に接種する一手法として、フラスコ内に蔓延したマツタケの培養菌糸とともに、フラスコ数本分をまとめて林地に植え付けるのが適切と思われる。つまり、培養菌糸そのものは林地の土壌中の害菌に侵され死滅しやすいが、苗に感染した部分は土壌中の害菌に強く、また植え付ける量を多くするほど、土壌中での菌糸の生存率や菌糸が成木の根に感染する可能性は高まると考えられる。そこで、マツタケ発生環境整備施業が行われ林況が安定しているアカマツ林で、フラスコ5本分を線状にまとめて植え付ける試験を現在実施している(写真3)。



写真3 マツタケ菌根合成苗の植え付け

5 参考文献

- 1) 衛藤慎也(1990) 菌根合成によるマツタケ菌感染苗の育成. 広島県林試研報, 24, 1~6.
- 2) Hall, Ian R. and Brown, G. (1989) The Black Truffle. Ministry Agriculture and Fisheries. Wellington.
- 3) 浜田 稔(1950) 日本マツタケの生理生態的研究. 植物学雑誌, 63, 40~41.
- 4) 石川県林業試験場(1989) 昭和62年度業務報告. 31 pp.
- 5) 枯木熊人・川上嘉章(1985) マツタケ菌感染苗によるシロの人工形成. 広島県林試研報, 20, 13~23.
- 6) 京都府林業試験場(1990) 昭和63年度業務年報. 33~34.

- 7) Ogawa, M. (1985) Ecological characters of ectomycorrhizal fungi and their mycorrhizae. Jpn. Agric. Res. Q. 18: 305~314.
- 8) Ohta, A. (1990) A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. Trans. Mycol. Soc. Japan 31: 323~334.
- 9) 鶴来外茂樹(1977) マツタケの菌付苗, 樹の育成. 石川県林試研報, 7, 87~97.
- 10) 横山了爾・山田卓三(1987) マツタケ菌とマツの器内培養. 日菌報, 28, 331~338.



Cultivation of the pine seedlings formed
ectomycorrhizae with *Tricholoma matsutake*
in plant culture flasks

ETO Shinya

Summary

For the cultivation of the pine seedlings formed ectomycorrhizae with *Tricholoma matsutake* (S.Ito et Imai) Singer, the seedlings of *Pinus densiflora* Sieb.et Zucc. were cultured together with the mycelia of *T. matsutake* in plant culture flasks which contained the vermiculite saturated with PGY liquid medium. The mycelial growth of *T. matsutake* and the ectomycorrhizal synthesis between *P. densiflora* and *T. matsutake* were promoted by the addition of iron at a high concentration in PGY liquid medium. The mycelial growth of *T. matsutake* was bettered by the use of aluminium foils with a filter as the caps of the flasks. The mass mixed cultures were successful in an air-conditioned greenhouse by applying these results.

[Key words]

Tricholoma matsutake, seedlings of *Pinus densiflora*, ectomycorrhizal synthesis, iron