

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07512

研究課題名(和文) 海岸林・山林復旧を目的とした耐塩性および強増殖性ショウロ菌の開発

研究課題名(英文) Development of Rhizogon roseolus strains showing salt tolerance and vigorous mycelial growth characteristics in order to reconstruct coastal and forest regions

研究代表者

霜村 典宏 (Shimomura, Norihiro)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00250093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ショウロの胞子発芽率は、5倍希釈MMN寒天培地と断面がベージュ色の子実体由来の胞子を用いることで向上した。胞子懸濁液をethylmethanesulfonateで処理することで、耐塩性ホモカリオンを分離できた。また、それらを交配することで、耐塩性ヘテロカリオンを作出でき、さらに耐塩性と強増殖性を具備した菌株の選抜した。塩感受性菌株を接種したクロマツより、耐塩性菌株を感染させたクロマツにおける塩ストレス耐性が高かった。また、クロマツにショウロ菌を感染させることにより、クロマツにおけるナトリウム含有量が増大し、菌根形成によるナトリウム取込の阻害効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Basidiospore germination rate of Rhizogone roseolus was improved by using 1/5-diluted MMN agar media and fruiting bodies with beige-colored section. Salt-tolerant homokaryotic strains were isolated from the basidiospore suspension treated with ethylmethanesulfonate. Salt-tolerant heterokaryotic strains were obtained by crossing between the salt-tolerant homokaryotic strains. We have selected the strains showing two useful characteristics, i.e. salt tolerance and vigorous mycelial growth. Pinus thunbergii seedlings inoculated with the salt-tolerant strain of *R. roseolus* were tolerant against salt stress, unlike the *P. thunbergii* seedlings inoculated with the salt-sensitive one. The sodium content in *P. thunbergii* seedlings inoculated with *R. roseolus* was greater than that in *P. thunbergii* seedlings inoculated without *R. roseolus*, indicating that the ectomycorrhizas formed by *R. roseolus* did not inhibit sodium uptake in the host *P. thunbergii* seedlings.

研究分野：きのこ栽培学

キーワード：ショウロ 外生菌根菌 担子胞子発芽 突然変異 塩ストレス耐性 ナトリウム取込み

1. 研究開始当初の背景

海岸線では、風砂、流砂、塩害などから農地と集落を守るために、または津波被害を緩和するなどの海岸防災林として、クロマツ *Pinus thunbergii* が多く植栽されている。クロマツは耐乾性および耐塩性植樹として知られているが、近年枯死が顕著化している。その原因として、海水や潮風による塩害も一因となっている。また、東日本大震災では、東北地方沿岸部に津波の被害を受け、海水によって発生した塩害で樹木の枯死が顕在化してきている。このような状況から、海岸線のような塩類集積地において、耐塩性を強化した植栽技術の開発による「植林による再生事業」やそれを利用した「海岸防災林の再生」が望まれている。

一方、クロマツ林ではショウロ *Rhizopogon roseolus* などの食用きのこが発生する。ショウロ菌はクロマツの根に感染して共生する外生菌根菌であるが、その子実体の発生量は年々減少し、現在では殆ど採取できない。また、ショウロは珍味であることから、高額で取引される高級食材となっている。そこで、本きのこを人工栽培することを目的に、菌根形成力が高い菌株を選抜し、その菌株を液体培地で培養した後に粉碎して、それを自然条件下でクロマツ実生に人工感染される有効な方法が開発されている。さらに、本方法でショウロ菌感染クロマツ苗木を育成し、それを維持管理することでショウロ子実体を生産できることも突き止められている。

このように、ショウロの食用としての高級性・経済性から人工栽培に向けた研究が進められている一方で、外生菌根菌の宿主樹木へのストレス耐性付与効果の機能を活用した、海岸林維持・再生に利用する研究も展開されている。中でも、ショウロ耐塩性菌株の育成に関する研究も精力的に進められてきたが、本きのこにおける効率的ホモカリオン分離技術、それを用いた交雑育種技術、さらには突然変異技術等が十分に確立されていないことから、得られる耐塩性菌株数が限られていた。また、本きのこの生息環境である土壌内における耐塩性や増殖力が評価されていないことから海岸林の維持・再生に活用できる実用的な技術としては確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究課題においては、ショウロの担子孢子発芽率を向上させ大量のホモカリオンを分離できるようにすること、突然変異誘発技術を開発して耐塩性菌株を作出すること、土壌内において旺盛に増殖する耐塩性および強増殖性ショウロ菌株を選抜すること、そして、選抜菌株を宿主樹木に共生させて塩ストレス耐性付与効果を評価すること、を目的とした。そして、耐塩性および強増殖性ショウロ菌を感染させ、ストレス耐性を付与したクロマツ苗木を提案することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

子実体

鳥取大学乾燥地研究センター構内のクロマツ林でショウロ子実体を採取して実験に用いた。担子孢子を採取するために、子実体断面の色が、白色、ベージュ色および茶褐色にいたるまで成熟段階が異なる子実体を選択して用いた。

担子孢子的採取と発芽試験

採取した子実体組織 (5×5 mm) を滅菌蒸留水の中で攪拌させ、担子孢子懸濁液を作製した。MMN 寒天平板培地に担子孢子懸濁液 100 μL ずつを塗布した後、25°C の暗黒下で培養した。培養後、発芽様式やコロニー出現数を算出した。

(2) 交配によるヘテロカリオン (二次菌糸体) の育成

ショウロのヘテロカリオン (二次菌糸体) はホモカリオン (担子孢子由来一次菌糸体) 同士を交配させることで作出した。それぞれ異なるホモカリオンを有する寒天片 (2×2 mm) 同士を寒天平板培地に 1 mm 程離して接種し、25°C の暗黒下で培養した。約 2 週間培養した後、コロニー周辺の菌糸体を分離し、ショウロ用に開発したクランプ検定培地に接種し、クランプ形成能力を調査した。クランプが形成された菌糸体をヘテロカリオンとして実験に用いた。

(3) 菌株の選抜

得られた菌株の耐塩性や増殖性を寒天培地および砂土壌基質における菌糸体生育能力を計測することで評価し、耐塩性および強増殖性菌株を選抜した。寒天培地における試験では、予め平板寒天培地で培養した菌糸体のコロニーをコルクボーラーで打ち抜き、検定する平板寒天培地の中央部に接種した後、25°C 暗黒下で 20 日間培養した後、菌糸体コロニー直径を計測することで生育量を調査した。砂土壌基質を用いた試験では、培地成分を 1/5 に希釈した MMN 液体培地を洗浄後乾燥させた砂に添加した砂土壌基質を用いた。両切り試験管に充填した砂土壌基質にショウロ菌糸体片を接種して、25°C 暗黒下で 60 日間培養した。培養後菌糸体の生育量を計測することで、砂土壌基質における耐塩性と増殖性を評価した。

(4) 外生菌根形成による宿主クロマツへのストレス耐性付与効果の評価

宿主クロマツ実生をハイポネックス含有パーミキュライト土壌基質で育成し、菌糸体粉碎液を接種し、ショウロ菌感染クロマツ実生を育成した。育成したクロマツ実生に乾燥ストレスや塩ストレスを与えた後、クロマツ実生の生育状況を調査した。さらに、クロマツ実生におけるナトリウム元素の含有量については原子吸光光度法で調査した。

4. 研究成果

(1) ショウロの担子孢子発芽を誘導する最適条件の確定

ショウロのホモカリオンを分離する為には、減数分裂を経由して、単相となった担子孢子を生かして再生したホモカリオン（一次菌糸）を分離することが求められる。しかしながら、合成培地における担子孢子的発芽率は極めて低いことから、ホモカリオンの分離が難しいのが現状である。図1に寒天平板培地におけるショウロ担子孢子的発芽様式を示す。図1Aは未発芽孢子を示す。発芽に伴い孢子側面から突起が出現した後(図1B)、肥大化した(図1C1および図1C2)。以上の突起形成や肥大化まではおよそ30%の担子孢子で認められた。しかし、図1D1および図1D2に示すような、発芽管が形成され分岐した菌糸体の形成の頻度は1%以下であった。そこで、ショウロの担子孢子発芽を誘導する最適条件を確定する実験をした。試験には、MMN培地をベースにその組成を改変した5種類の寒天培地における担子孢子的発芽試験を実施した。その結果、蒸留水で培地成分を1/5に希釈したMMN寒天培地が最適であることが判明した(図2)。

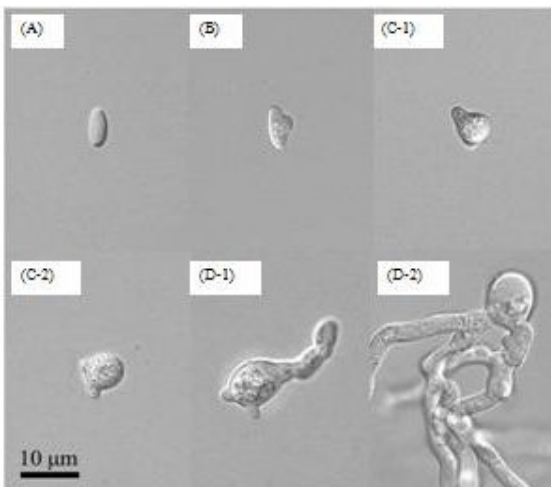


図1. ショウロ担子孢子的発芽様式
(A):発芽前の孢子。(B)孢子側面から突起の出現。
(C):孢子から発芽管の伸長。(D):分岐する菌糸体。
Bar= 10 μm.

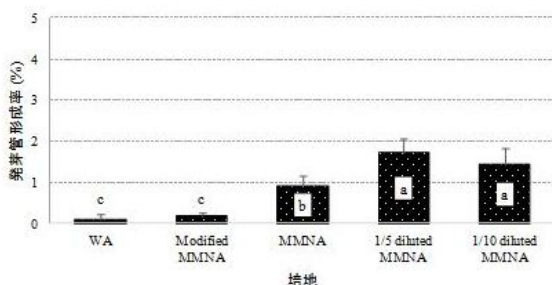


図2. ショウロ担子孢子的発芽管形成に及ぼす培地の影響

次に、子実体断面色を基準に成熟段階が異なる子実体から採取した担子孢子的発芽能力を調査した。図3にショウロ子実体の成熟に伴う子実体断面色の変化を示す。これらの子実体から担子孢子を取り出して、発芽能力を調査した結果、断面色がベージュ色の子実体由来の担子孢子的発芽率が最も高いことが判明した(図4)。また、採取した担子孢子は滅菌水に懸濁した状態で冷蔵保存しても高い発芽率が維持されることが判明した。次に、担子孢子発芽環境を確定できたので、NaClを含んだ培地で発芽させることで、耐塩性の発芽菌糸体の分離を試みた。しかし、再生できる菌糸体は極めて少なかったが、ショウロ子実体の中に存在する細菌を培地に塗布することで発芽菌糸体の分離数が飛躍的に増大することを発見した。

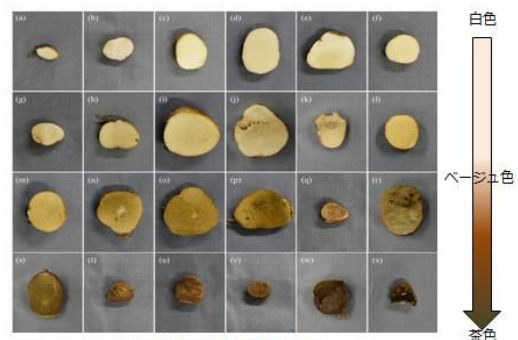


図3. ショウロ子実体の成熟に伴う子実体断面色の変化

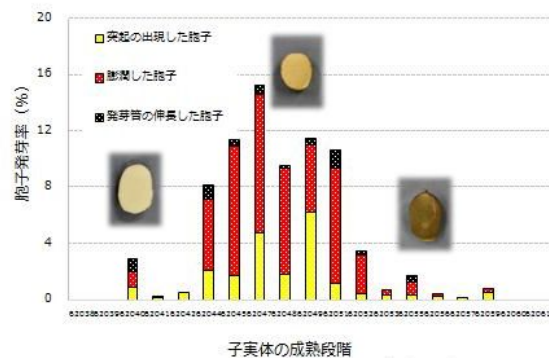


図4. ショウロ子実体の成熟と担子孢子的発芽率の関係

(2) 耐塩性および強増殖性菌株の分離

突然変異誘発剤の処理方法の確定

担子孢子的発芽条件を確定できたので、突然変異誘発剤として広く用いられている ethylmethanesulfonate (EMS) を用いて変異菌株の分離を試みた。まず、EMSの処理濃度について調査したところ、20 mg/mLの濃度で担子孢子懸濁液を5時間処理することが適正であることが判明した。

耐塩性菌株の分離

EMSを処理したショウロ担子孢子由来ホモカリオンの中から、300 mM NaCl含有寒天培地で旺盛に成長した耐塩性ホモカリオン

5 菌株を分離した．さらに耐塩性ホモカリオンを交配することでヘテロカリオンを作出し，塩ストレス耐性を評価した結果，8 菌株の耐塩性ヘテロカリオンを選抜できた．さらに，2 菌株の塩感受性ヘテロカリオンも選抜できた．図 5 に作出した耐塩性シウロ菌株，および，塩感受性シウロ菌株の NaCl に対する反応性の違いを示す．

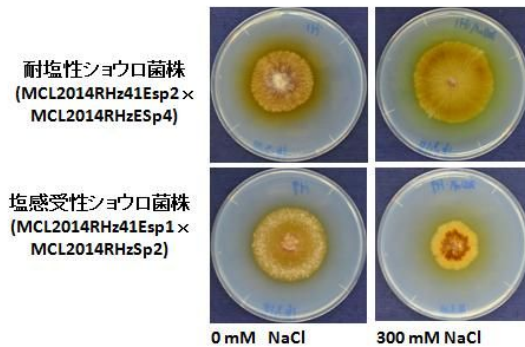


図 5．寒天平板培地におけるシウロ菌株の耐塩性差異

砂土壌基質における耐塩性の評価

様々な土壌を用いてシウロ菌株の増殖力を評価した．その結果，シウロ菌株の増殖力評価には砂土壌基質を用いるのが有効であることが判明した．砂土壌基質と寒天培地における菌糸体生育速度を比較した結果，耐塩性シウロ菌株は人工海水を含む砂土壌基質で旺盛に生育したが，塩感受性シウロ菌株は生育が完全に抑制された（図 6）．また，砂土壌基質における菌糸生育と寒天培地における菌糸生育の間では高い正の相関が認められた．本砂土壌基質を用いて耐塩性と増殖性を調査した結果，耐塩性および強増殖性の両特性を具備したシウロ菌株を選抜できた．

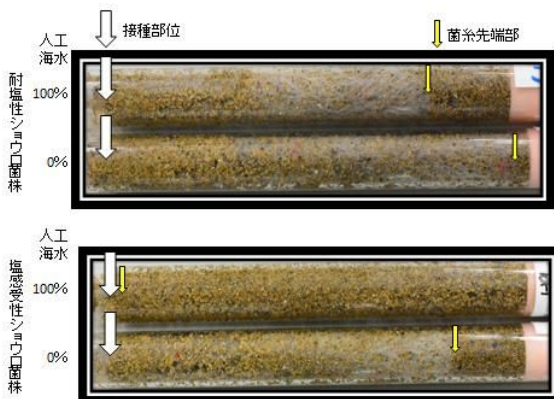


図 6．砂土壌基質におけるシウロ菌株の耐塩性差異

(3) 宿主クロマツ実生のストレス耐性に及ぼすシウロ菌感染の影響評価

シウロ菌感染クロマツ実生の乾燥および塩ストレスに対する反応性を評価した．その結果，シウロ菌を接種していないクロマツ実生に乾燥ストレスを与えると枯死したが，シウロ菌を接種した実生の枯死は認められなかった．塩ストレス試験においては，シウロ菌を接種していないクロマツ実生と塩感受性菌株を接種したクロマツ実生は全て黄化したが，耐塩性菌株を接種したクロマツ実生では，約半分が緑色葉を保持していた（表 1）．以上の結果から，宿主クロマツ実生に塩ストレス耐性を付与するためには耐塩性菌株を用いることが有効であることが示唆された．

表 1．宿主クロマツ実生への耐塩性付与効果のシウロ菌株間差異

接種したシウロ菌株	黄化実生発生率 (%)
未接種	100.0
耐塩性菌株	55.6
塩感受性菌株	100.0

次に，宿主クロマツ実生のナトリウム取込みに及ぼすシウロ菌感染の影響について調査した．塩ストレスを与えていない条件下においては，シウロ菌を接種したクロマツ実生のナトリウム含有量が，シウロ菌を接種していない実生と比較して著しく高く，シウロ菌感染によりナトリウム吸収が促進された．また，塩ストレス条件下では，シウロ菌感染の有無，および，感受性菌株接種実生と耐塩性菌株接種実生との間の有意差は認められず，シウロ菌の塩に対する反応性とナトリウム取込みとの関連性は少ないと思われた．

今日まで，ヒダハタケ菌とセイヨウハコヤナギの外生菌根共生系においては，外生菌根の菌鞘がナトリウム吸収を阻害し，その結果耐塩性が付与されると報告されている．しかし，シウロ菌とクロマツ実生を用いた今回の試験結果は，共生することで反対にナトリウム吸収が促進された．従って，外生菌根菌の宿主樹木への塩ストレス耐性付与の機構は，共生する外生菌根菌と宿主樹木の組合せでそれぞれ異なると思われた．

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

S.Nakano, Q.Gao, T.Aimi and N.Shimomura: Improvement of basidiospore germination and mycelial growth of the ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon rosolus* in axenic conditions. Mushroom Science and

Biotechnology, 査読有, 25 (3): 94-99(2017)
Q.Gao, S.Nakano, T.Aimi and N.Shimomura:
Comparison of salt tolerance of
ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon*
roseolus in soil and on agar. Mushroom
Science and Biotechnology, 査読有, 25 (1):
17-22 (2017)
Q.Gao, S.Nakano, T.Aimi and N.Shimomura:
Isolation of halophilic strains induced by
ethyl methanesulfonate in *Rhizopogon*
roseolus. Mushroom Science and
Biotechnology, 査読有, 24 (4): 182-186
(2017)
S.Nakano, Q.Gao, T.Aimi and N.Shimomura:
Rhizopogon roseolus basidiospore
germination decreases as the fruiting bodies
mature and the spore wall becomes more
complex. Botany, 査読有, 94(4): 311-320
(2016) doi.org/10.1139/cjb-2015-0198
S.Nakano, K.Sawada, Q.Gao, T.Aimi and
N.Shimomura: Production of a salt-tolerant
strain by cross-breeding in the
ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon*
roseolus (= *R. rubescens*). Mushroom Science
and Biotechnology, 査読有, 23 (2): 75-79
(2015) doi.org/10.24465/msb.23.2_75

[学会発表](計 9 件)

Y.Onda, S.Nakano, R.Hiraoka, Q.Gao, T.Aimi
and N.Shimomura: Stimulatory effect of
Burkholderia bacteria on basidiospore
germination and mycelial growth of the
ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon*
roseolus. International Symposium on
Agricultural, Food, Environmental and Life
Sciences in Asia, 2017 (AFELiSA2017),
(Fukuoka, Japan) 2017.11
音田由紀子・仲野翔太・高琪・會見忠則・
霜村典宏: *Burkholderia* 属細菌によるシヨ
ウロ担子胞子の発芽と菌糸成長の促進効
果 . 日本きのこ学会 第 21 回大会(宮崎)
2017.09.
N.Shimomura, S.Nakano, Q.Gao and T.Aimi:
Production of a salt-tolerant *Rhizopogon*
roseolus strain and its effect on pine-seedling
hosts. The Third Myanmar-Japan Symposium,
(Patheingyi, Myanmar) 2016.12.
仲野翔太・高琪・會見忠則・霜村典宏: 菌
根性食用きのこシヨウロにおける胞子発
芽培地の探索 . 2016 年度 菌根研究大会
JCOM2016 (千葉) 2016.12.
Q.Gao, S.Nakano, T.Aimi and N.Shimomura:
Analysis of mycelial growth of
ectomycorrhizal fungi *Rhizopogon roseolus* in
sandy soil. International Symposium on
Agricultural, Food, Environmental and Life
Sciences in Asia, 2016 (AFELiSA2016),
(Daejeon, Korea) 2016.11
仲野翔太・高琪・會見忠則・霜村典宏: シ
ヨウロ子実体の成熟に伴う胞子発芽能力

と胞子壁構造の変動 . 日本きのこ学会 第
20 回大会(静岡) 2016.09.
音田由紀子・仲野翔太・平岡吏佳子・高琪・
會見忠則・霜村典宏: 塩ストレス条件下で
シヨウロ担子胞子の発芽を促進する細菌
の探索 . 日本きのこ学会 第 20 回大会(静
岡) 2016.09.

Q.Gao, S.Nakano, T.Aimi and N.Shimomura:
Induction of salt tolerance in *Rhizopogon*
roseolus by ethyl methanesulfonate. 19th
Congress of the International Society for
Mushroom Science (Amsterdam,
Netherlands) 2016.06.
N.Shimomura, S.Nakano, Q.Gao and T.Aimi:
Establishment of a crossbreeding system for
the ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon*
roseolus. 19th Congress of the International
Society for Mushroom Science (Amsterdam,
Netherlands) 2016.06.

[図書](計 1 件)

霜村典宏: きのこの生理機能と応用開発の
展望, ISBN978-4-907002-66-4, 基礎編,
第 4 章 農林資源としてのきのこの新技
術, 第 5 節 菌根菌資源の可能性, p p .
151-157, 江口文陽監修, S&T 出版株式会
社, 東京 . 2017.09 .

[その他]

ホームページ等
<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/nshimo/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

霜村 典宏 (SHIMOMURA, Norihiro)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号 : 00250093