

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658131

研究課題名(和文)分根培養系によるマツタケの人工シロ形成手法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a method for synthesizing artificial Shiro of Tricholoma matsutake using split-root system

研究代表者

松下 範久 (MATSUSHITA, Norihisa)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00282567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：マツタケを人工栽培するためには、「シロ」と呼ばれる外生菌根と菌糸の集合体を形成させる必要がある。本研究では、アカマツの分根培養系を用いた新たなシロの形成手法の確立に挑戦した。分根培養系を効率良く作成するために、挿し穂の週齢と挿し床の水分条件を検討し、挿し木の最適条件を決定した。また、分根培養系への菌根菌の接種方法を確立した。これらの方法により、同一宿主の根系に、マツタケと他の菌根菌を同時に生育させることが可能になった。この分根培養系は、今後、外生菌根共生の実態を解明する上でも有効な手法になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To produce fruiting bodies of Tricholoma matsutake under controlled conditions, it is necessary to develop Shiro which is compact mass of mycelia and mycorrhizae of T. matsutake. In this study, we tried to establish a method for synthesizing artificial Shiro using split-root system. We examined the moisture condition of the seedbed and the age of seedlings to be used for cuttings, and determined the optimal condition for obtaining the cuttings of Japanese red pine and Japanese black pine. In addition, we established the inoculation method of ectomycorrhizal fungi for the split-root system. It was possible to investigate the translocation of nitrogen from mycorrhizal root systems to nonmycorrhizal root systems using the split-root system of Japanese red pine. Therefore, we considered that the split-root system established in this study to be very effective in studying the ectomycorrhizal symbiosis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：マツタケ シロ 外生菌根菌 分根 共生 アカマツ

1. 研究開始当初の背景

マツタケは、生きたマツ科樹木の根に共生して菌根を形成し、さらに「シロ」と呼ばれる外生菌根と菌糸の集合体を発達させた後に子実体を形成する。そのため、この過程を自由に制御できれば、マツタケの人工栽培が可能になると考えられる。申請者らは、これまでにアカマツの苗木や成木にマツタケ菌根を形成させる方法を確立し、小さなシロの形成にも成功した。一般的な菌根共生系では、菌根が形成されると宿主の成長が促進され、宿主から菌根への光合成産物の転流量が増加する。その結果、菌根や土壌中の菌糸体バイオマスが増加して、子実体が形成される。これに対してマツタケを接種したアカマツでは、菌根が形成されても宿主の成長はあまり促進されず、シロも発達しない。また、宿主の成長を促進するために窒素肥料を与えると、菌根菌の成長が抑制されることが知られている。したがって、マツタケのシロを発達させるためには、施肥以外の方法により、マツタケに感染したアカマツの成長を促進させる必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、「マツタケ菌根苗に別種の菌根菌を接種して宿主の成長を促進させることにより、マツタケのシロを形成・発達させる」という新たな方法の確立に挑戦した。具体的には、1本のアカマツの根系に、2種の菌根菌が互いに接触することなく菌根を形成できる「分根培養系(split-root system)」の構築方法を確立すること、構築した分根培養系に菌根菌を接種し、アカマツの成長や養分吸収に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分根培養系に適した苗木を得るための挿し木条件の検討

表面殺菌したアカマツ種子を滅菌土を入れたプランターに播き、自然光室で栽培した。播種後2, 4, 8, 12週間栽培した実生苗を地際部で切り取り、切り口をインドール酪酸溶液に浸漬したものを挿し穂とした。蓋付きの透明ポリカーボネート製ケース内に滅菌培養土を2.8L入れ、水を400ml, 800ml、または1200ml添加して挿し床を作成した。播種後の栽培日数ごとに、各水分量の挿し床を4つずつ作成し、それぞれに挿し穂を20本挿した。25℃, 16時間明/8時間暗の光条件下で3ヶ月間栽培した後、各苗の発根数と発根位置、根長を計測した。また、同様の方法を用いてクロマツの挿し木苗が得られるのかについても調査した。

(2) 菌根菌の接種方法の検討

2枚の角形シャーレの身を貼り合わせて作成した根分け根箱に滅菌培養土を入れ、その中にアカマツ挿し木苗を、根系を2つに分け

て移植した。片側の根系にウラムラサキまたはコツブタケの培養菌糸体を接種、または菌根苗を根箱内に移植した後、人工気象室で栽培した。

(3) アカマツ - 菌根共生系へ施肥が与える影響

(2)の方法で作成した根箱に滅菌培養土を入れ、その中にアカマツ挿し木苗を、根系を均等に分けて移植した。片側の根系にウラムラサキの培養菌糸体を接種した後、人工気象室で栽培した。窒素濃度の異なる改変ホーグランド溶液(MH溶液)を表1の条件で、週に2回、40mlずつ添加した。各処理区の反復は10とした。栽培90日後に苗木を回収し、菌根形成率、地上部と地下部の乾重、地上部と地下部の窒素の含有量を測定し、共生系内における窒素の吸収と転流を推定した。

表 1. 各処理区に添加した改変ホーグランド溶液(MH溶液)の窒素濃度

処理区表記	溶液の窒素濃度 (mM)	
	ウラムラサキ 接種根系	無接種 根系
m0/0	0	0
m0/N	0	0.5
mN/0	0.5	0
mN/N	0.5	0.5
mNN/0	5.0	0
m0/NN	0	5.0
mNN/NN	5.0	5.0

4. 研究成果

(1) 分根培養系に適した苗木を得るための挿し木条件の検討

根分けに適した挿し木苗(図1)は、播種後4, 8, 12週間栽培した実生苗を、水を400mlまたは800ml添加した培養土に挿した区で多く得られた。しかし、水を400ml添加した培養土では、葉が変色した苗が多かった。分根培養系を効率的に生産するためには、播種からの日数が短い方が良いため、播種4週間後の実生苗から得た挿し穂を、水を800ml添加した培養土に挿すのが良いと考えられた。また、同じ方法を用いて、クロマツの挿し木苗を効率良く作成することができた。

(2) 菌根菌の接種方法の検討

作成したアカマツ分根培養系(図2)の片側の根系にウラムラサキの培養菌糸体を接種した結果、接種した側の根系にはウラムラサキの菌根が形成され、反対側の根系にはウラムラサキの菌根や菌糸は観察されなかった。このことから、本培養系により、根分けをした根系間での菌糸の移動(コンタミネーション)が起こらない状態で、外生菌根共生系を維持できることが分かった。同様にコツブタケの培養菌糸体を接種した結果、菌根が形成されない根箱や、少数の菌根しか形成されない根箱が多かった。一方、コツブタケが

感染したアカマツ実生苗を分根培養系の片側の根箱に移植した結果、コツブタケの外生菌根が根系全体に形成された。このことから、菌種によって、接種方法を変える必要があることが分かった。



図 1. 挿し木により多数の根が発生したアカマツ。この苗木を用いることで、図 2 のような分根培養系をアカマツで作成することが可能となった。



図 2. アカマツ分根培養系の様子。2 枚の角形シャーレを貼り合わせた根箱に滅菌培養土を入れ、その中にアカマツ挿し木苗を移植した。

(3) アカマツ - 菌根共生系へ施肥が与える影響

菌根形成率と宿主の成長量

菌根形成率は、いずれの処理区においても 90%以上であり、処理区間で有意な差はなかった。m0/0 処理区と比較して、地上部の成長量は mN/N 区、m0/NN 区、mNN/0 区、mNN/NN 区で、地下部の成長量は mNN/NN で、総成長量は、mNN/0 区と mNN/NN 区で有意に大きかった(図 3)。これらの結果は、

ウラムラサキがアカマツの窒素吸収に大きく寄与していることを示している。

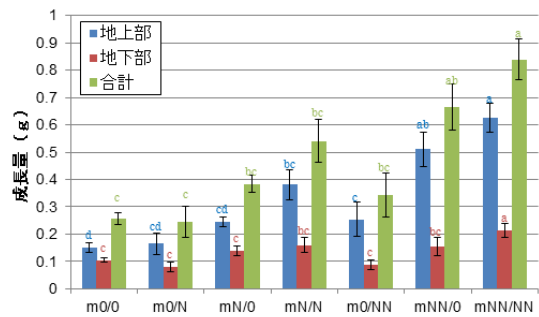


図 3. 各処理区で栽培したアカマツの地上部と地下部の成長量とその合計の成長量(平均値±SE, n=9, 6, 7, 6, 6, 5, 10)。異なるアルファベットは、Tukey HSD 検定で有意な差があることを示す (P<0.05)。

共生系内での光合成産物と窒素の転流

地下部の成長量を部分根系間で比べると mNN/0 区と mNN/NN 区では、菌根菌接種側の部分根系の方が、無接種側よりも有意に大きかった(図 4)。したがって、アカマツは、光合成産物を菌根菌が存在する根系へ優先

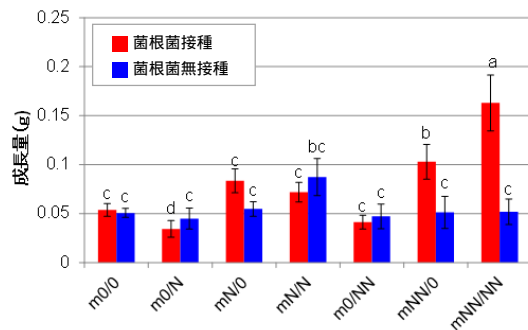


図 4. 各処理区で栽培したアカマツの各部分根系の成長量(平均値±SE, n=9, 6, 7, 6, 6, 5, 10)。異なるアルファベットは、Fisher's LSD 検定で有意な差があることを示す (P<0.05)。

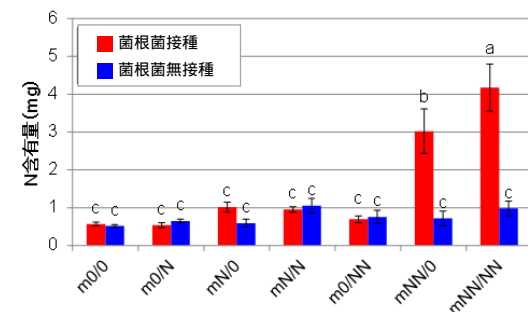


図 5. 各処理区で栽培したアカマツの各部分根系の窒素含有量(平均値±SE, n=9, 6, 7, 6, 6, 5, 10)。異なるアルファベットは、Fisher's LSD 検定で有意な差があることを示す (P<0.05)。

的に転流すると推測される。また、窒素含有量は、mNN/0区とmNN/NN区では、菌根接種側の部分根系の方が無接種側の部分根系よりも有意に多かった(図5)。これらの区の無接種側の部分根系の窒素含有量は、対照のm0/0区と有意な差がなかった。これらのことから、菌根が存在する根系から吸収した窒素は、菌根が存在しない根系へは転流されないと推測される。

(4) まとめ

本研究により確立されたアカマツ分根培養系を用いることにより、同一宿主の根系に、マツタケと他の菌根菌を互いに接触させることなく同時に生育させることが可能になった。今後は、他種の菌根菌による宿主成長促進効果を利用したマツタケのシロ形成手法について研究を進める予定である。また、この分根培養系を用いることにより、1本の宿主を介した菌根菌間の相互作用や、複数の菌根菌が感染した共生系内の養分転流などを明らかにすることができると考えられる。したがって、本研究により確立された分根培養系は、今後、外生菌根共生の実態を解明する上でも有効な手法になるであろう。

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)

[学会発表](計 3件)

棗 悠紀・松下範久. アカマツ挿し木分根培養系における窒素転流への施肥および外生菌根菌接種の影響. 第125回日本森林学会大会. 2014年3月28日~3月30日. 大宮ソニックシティ(埼玉県).

松下範久. マツタケ外生菌根共生系の生態. 第1回マツタケ講演会. 2013年6月29日. 徳島大学(徳島県).

松下範久・小松隆平・竹内嘉江・宝月岱造. マツタケのシロの拡大に伴う外生菌根菌相および土壌菌類相の変化. 第124回日本森林学会大会. 2013年3月25日~28日. 岩手大学(岩手県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 範久 (MATSUSHITA, Norihisa)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授
研究者番号：00282567

(2) 連携研究者

呉 炳雲 (WU, Bingyun)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
助教

研究者番号：10396814

(3) 研究協力者

棗 悠紀 (NATSUME, Yuuki)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
修士2年

吉田 尚広 (YOSHIDA, Naohiro)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
博士1年