

バカマツタケの林地栽培技術の開発 —野外等におけるシロ形成の評価手法—*1

今治安弥*2・河合昌孝*3・山口宗義*4

マツタケの近縁種であるバカマツタケの林地栽培技術の開発を目的として、林地内に人工的に接種した箇所とその周辺において土壤中のバカマツタケを特定し、菌糸体量を定量する手法を開発した。バカマツタケのシロから採取した試料は、種特異的なプライマーを用いて他種のキノコと識別できることが判明した。また、バカマツタケと土壤の混合試料をもとに作成した検量線には直線性が確認され、試験地の土壤中にあるバカマツタケの菌糸体量を特異的かつ定量的に計測することが可能になった。本手法は野外等の林地接種試験におけるバカマツタケ菌の定着やシロ形成を評価する上で有効であると考えられた。

1. はじめに

バカマツタケは、マツタケの近縁種で、子実体の形態や特有の香りがマツタケに似ている食用きのこの一つとして知られている¹⁾。日本では、北海道²⁾、本州^{1,3)}、九州^{4,5)}に至る広い範囲に分布しているが、マツタケが主にアカマツなどのマツ科の森林に発生するのに対し、バカマツタケはミズナラ^{2,3)}、コナラ²⁻⁴⁾などのブナ科の落葉広葉樹林や、スタジイ^{4,6,7)}、マテバシイ⁵⁻⁷⁾、コジイ⁴⁾、ウバメガシ^{5,8)}、アラカシ^{4,5)}などのブナ科常緑広葉樹林に発生する。

これまで、バカマツタケの生態については、菌糸体コロニーの分布形態や、菌糸体の生育に適した環境条件、炭素源・窒素源の利用能力、無菌条件下での菌根形成能力が明らかにされてきた⁹⁻¹¹⁾。さらに、人工栽培の技術開発を目的に、バカマツタケを林地へ接種する試験を実施したところ、菌糸の塊であるシロが形成され、子実体が発生し、これまで難しいとされてきた栽培の可能性が大きく進展した^{12,13)}。しかしながら、2020年時点で試験地においてシロが形成された3箇所のうち、子実体が発生したのは1箇所であり、林地での安定的な子実体の発生には至っていない。したがって、林地接種試験を通して、さらに確実な栽培技術となるようバカマツタケの土壤中でのシロの拡大過程を明らかにしていくことが求められる。

バカマツタケの菌根および菌糸体は地表面近くにまとまって存在し、子実体は白い菌糸体の塊の上に発生する^{7,9)}。また、シロは他の菌根性きのこのように必ずしも

同心円状に分布せず、不規則な弧状に分布していることが多い^{6,9,14)}。一方、野外の土壤中には他の菌根菌や菌糸体が多く存在している。そのため、菌根の形態およびバカマツタケに特有の厚壁胞子の観察方法だけでは、バカマツタケ菌の存在を把握するには不十分であり、試験地において接種した箇所のバカマツタケの定着・拡大状況を確認することには限界がある^{6,14)}。したがって、バカマツタケの菌糸の定着およびシロ形成を把握するためには、高い精度でバカマツタケを特定し¹⁵⁾、かつ定量可能な解析手法が求められる。また、接種箇所から一定量の試料を採取することは、定着しつつある菌糸体に少なからず損傷を与えることになるため、最小限の試料採取で評価する方法が望ましい。マツタケの先行研究では林地からの試料採取量が1g程度で土壤中のマツタケ菌糸体の特異的かつ定量的に計測する方法がすでに開発されている^{16,17)}。この土壤中における菌糸体の定量方法をバカマツタケに応用することができれば、接種箇所を大きく攪乱することなく、接種後の菌糸体の初期の発達段階から定着状況、およびシロの形成を評価する上で役に立つと考えられる。

そこで、本研究ではバカマツタケの林地接種地において菌糸体の定着やシロの形成状態を評価する方法の一つとして、土壤中におけるバカマツタケ菌糸体の同定および定量法について検討した。

なお、本研究は、農林水産技術会議の委託プロジェクト研究「高級菌根性きのこの栽培技術の開発」（平成27年度～令和元年度）の一部として実施したものである。

*1 本研究の一部は日本菌学会第62回大会（長野）及び日本森林学会第131回大会において発表した。

*2 元 奈良県森林技術センター

*3 現 奈良県 水循環・森林・景観環境部 フォレスタア카데미

*4 国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所

2. 材料と方法

2.1 土壌サンプリング地の概要

奈良県南部地域においてバカマツタケの林地接種を行った標高 800m のコナラ林から土壌のサンプリングを行った。このコナラ林は元来薪炭林として維持されてきた森林であり、萌芽更新してから 20 年以上が経過し、直径約 15cm、樹高約 12m のコナラで構成されている。林地接種試験地付近の気象観測地点における気象データでは、年平均気温は 11.1°C、年間降水量は 2003mm である。試験地は、尾根に近い山腹上部の傾斜度約 20°の平衡斜面で、林床にはコナラ実生の他に、モチツツジ、コウヤボウキ、コバノガマズミ、スノキ、ネジキなどの低木が生えている。

この林地接種試験地では、2016 年までにバカマツタケの菌糸がウバメガシの取り木苗とともに約 50 箇所接種されている。それらの接種方法は複数あるが、代表的な方法はバカマツタケの菌糸を塊になるように寒天培地上で培養し、栄養分のある寒天培地と切り離した上で、菌の塊だけをまだ菌根が形成されていない取り木苗の根に合着させて林地に接種するものである^{12,13)}。このうち、2016 年に接種した 1 箇所よりシロが形成され、2017 年に 1 本の子実体が発生した¹³⁾。

2.2 リアルタイム PCR によるバカマツタケの検出

子実体が発生したシロから、2017 年 10 月 26 日に試料として約 5g の土壌を採取した。また、試験地内に発生していた他種きのこのクリタケ、ショウゲンジ、ハツタケ、オキナクサハツ、近縁種のマツタケとニセマツタケの培養菌糸体、およびポジティブコントロールとしてバカマツタケの培養菌糸体を用いた。培養菌糸体は奈良県森林技術センターで保有している各種の菌株を約 20°C、相対湿度約 60%の培養条件下で寒天培地上に接種して菌糸を伸長させ、約 2 ヶ月間液体培地で培養した後、再度液体培地に植え継いで培養したものをを用いた。シロを含む土壌、他種きのこ、培養菌糸体の各試料を凍結乾燥させた後、ホモジナイザーで粉碎し、QIAGEN DNeasy Plant mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。DNA 抽出した試料について、バカマツタケに特異的なプライマー¹⁸⁾ (表 1) を用いて PCR を行い、融解曲線を作成した。また、増幅した PCR 産物は Mupid (Mupid、アガロース濃度 2%) による電気泳動後、UV 照射下でゲルを撮影し、増幅断片長の確認を行った。PCR には、Applied Biosystems Step one plus (Life Technologies 社) のリアルタイム PCR システムを使用した。PCR の方法はインターカレーター法 (SYBR 法) を用いた。PCR の条件および反応液組成は、図 1 のとおりである。

表 1 リアルタイム PCR に用いたバカマツタケ種特異的プライマー

プライマー名	配列 (5'to 3')	想定サイズ(bp)
Tb	TGTTTGTAGACTTGGGTAAGG	563
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	636

Kikuchi et al. (2007)¹⁸⁾

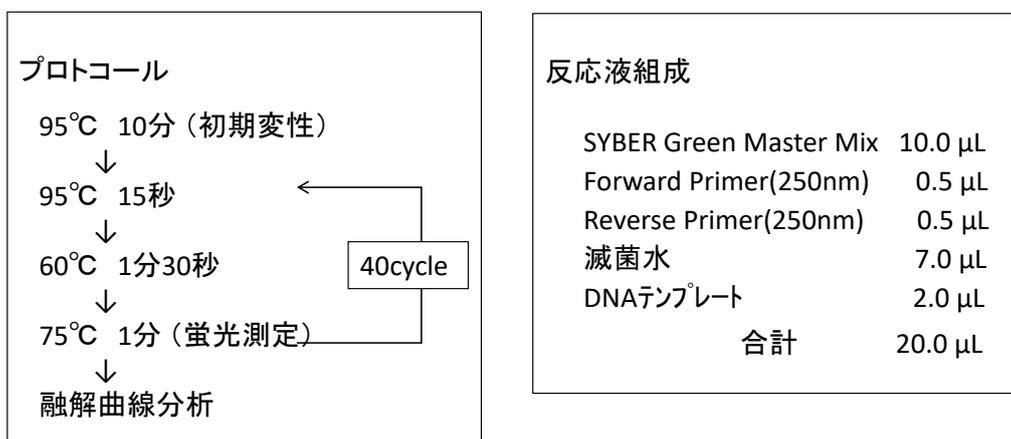


図 1 リアルタイム PCR プロトコールおよび反応液組成

2.3 リアルタイムPCRによるバカマツタケ菌糸体の定量

2.3.1 土壌標準試料および検量線の作成

土壌中のバカマツタケ菌糸体定量の検量線を作成するために、2018年8月に乾燥菌糸体と土壌を混合した標準検体を作製した。バカマツタケの菌糸体は液体培養しておいたものを、吸引ろ過によって液体を除去し、滅菌水で洗浄して凍結乾燥させた後、粉砕機を用いて粉砕した。混合する土壌は林地接種試験地周辺から採取し、凍結乾燥させてから粉砕機で粉砕して用いた。なお、バカマツタケの濃度勾配は土壌 30mg 中にバカマツタケ菌糸体が 0.3mg から 3ng になるように設定したが、3mg 以下の微量のバカマツタケの菌糸体を正確に秤取るのが難しいため、バカマツタケ特異的プライマーでは増幅しないと確認されているウスヒラタケの菌糸体を用いて希釈したものをを用いた¹⁶⁾。粉砕した土壌と所定の濃度になるように希釈したバカマツタケ菌糸体を混ぜ合わせて標準検体を作製した。作製した標準検体から CTAB 法によって DNA を抽出し、バカマツタケ特異的プライマー¹⁸⁾ (表 1) を用いて定量 PCR を行い、検量線を作成した。PCR の機器および条件は、2.2 のバカマツタケの検出の実験と同様である。得られた回帰直線をもとに絶対定量が可能な範囲である検出限界を確認し、実験精度について評価した。

また、定量実験ごとの検量線の作成を簡略化するために、特異的プライマーによるバカマツタケの PCR 増幅断片が挿入されているプラスミド DNA (増幅断片のコピー数が 10 個から 10,000,000 個) の試料についても、上記の標準検体とともに定量 PCR を行い、検量線を作成した。そして、土壌標準試料の菌糸体量と DNA コピー数の関係を算出した。

2.3.2 野外試料の定量

検量線を用いて定量する試料として、2018 年および 2019 年の秋に試験地で形成されたシロから発生した子実体の発生位置を基準に、同一のシロ内において、2019 年 9 月に中央部分と下部および子実体直下部分から約 5g ずつ試料を採取した (図 2)。各試料を凍結乾燥してから、粉砕機を用いて粉砕した。各粉砕試料を 30mg ずつ秤取り、CTAB 法によって DNA を抽出後、プラスミド DNA とともに定量 PCR を実施した。PCR の機器および条件は、2.2 のバカマツタケの検出の実験と同様である。プラスミド DNA (10 個から 10,000,000 個までの DNA コピー数) の検量線を用いて、各試料に含まれる菌糸体の DNA コピー数を算出した。次に、土壌標準試料の菌糸体量と DNA コピー数の検量線の関係から採取した試料の菌糸体量を算出した¹⁵⁾。

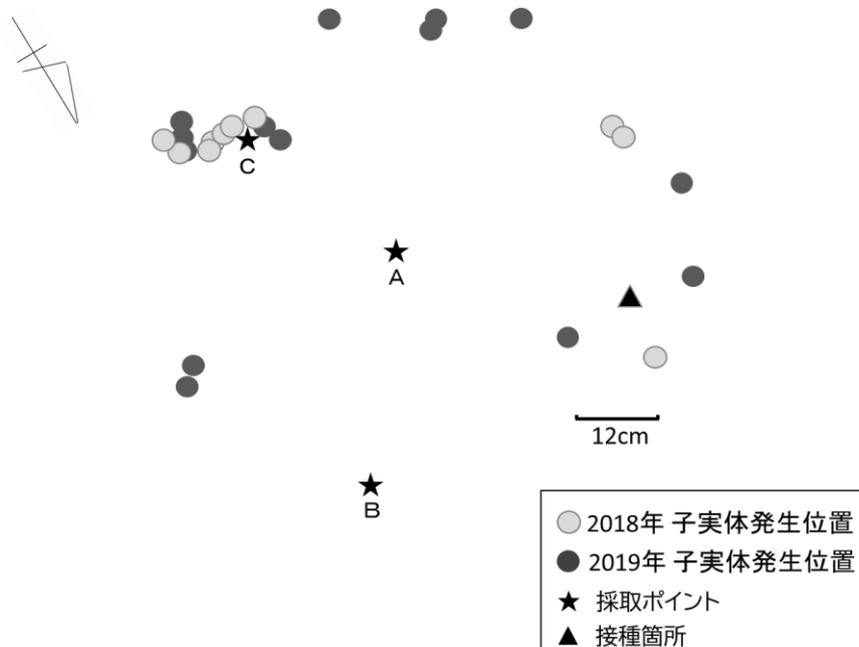


図2 バカマツタケのシロにおける子実体発生位置および試料採取ポイント (A:中央, B:下部, C:子実体直下)

3. 結果と考察

バカマツタケに特異的なプライマーを用いた PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動により解析したところ、バカマツタケの増幅産物はプライマーから想定されるサイズ (540bp) の断片が認められ、一方、比較に用いた別のきのこでは 540bp 長の増幅産物はなかった。また、全ての増幅産物で 100bp 長以下の非特異的断片が確認された (図 3)。PCR 増幅産物の融解曲線解析では、融解温度 (以下、 T_m 値という) が 82°C 付近で目的とするバカマツタケの培養菌糸体と採取したシロ DNA 由来の増幅産物が融解のピークに達しているのに対し、マツタケ近縁種を含む他種の特異的増幅産物は T_m 値 70°C 付近で融解していた (図 4)。以上の 2 つの PCR 増幅産物の解析結果から、バカマツタケと他種きのこは最適化された PCR 条件で明瞭に区別することができた。

PCR ではプライマー同士が融合するなどして非特異的増幅 (プライマーダイマー) が起こり、特にプライマーと相溶性がない鋳型 DNA 存在下ではしばしば発生する。本実験においては非特異的増幅産物の存在も認識しているなか (図 3、図 4)、目的とするバカマツタケの増幅産物だけを特異的に測定できる PCR 条件をみいだした。その結果、リアルタイム PCR の増幅曲線では、供試したバカマツタケの菌糸およびシロにおいて明瞭な検出が認められた (図 5)。本方法の PCR 条件は、増幅サイクルにおける増幅産物の検出温度を 75°C に設定しているが (図 1)、 75°C 下では他種きのこの非特異的増幅産物はすでに融解しており、PCR のサイクルに 75°C の蛍光強度測定ステップを追加設定することでバカマツタケの増幅産物だけを検出できるようになる。このように PCR 条件を最適化した上でリアルタイム PCR を用いれば、より迅速に高い精度で検出・定量結果が得られる。また、断片長で分離確認する手段としての PCR 産物の電気泳動の確認が省略できる。

次に、バカマツタケ菌糸体と土壌の各混合試料 30mg から DNA を抽出してリアルタイム PCR を行い、 C_t 値 (遺伝子増幅が一定量に達した時のサイクル数) を比較した。各試料の土壌中のバカマツタケの菌糸体量と C_t 値の関係について回帰直線を算出したところ、決定係数が $R^2=0.98$ と極めて高く、強い直線性が認められた (図 6 A)。また、菌糸体量が 0.3mg から 0.000003mg までの範囲で増幅が認められ、本手法によって検出できる菌糸体量の限界値は 3ng であることが明らかになった。これは土壌 1g 中の $0.1\mu\text{g}$ に相当する。プラスミドの各 DNA コ

ピー数と C_t 値の関係についても、決定係数 $R^2=0.99$ と強い相関関係が認められ (図 6 B)、定量 PCR の検量線として有効であることを確認した。したがって、バカマツタケの菌糸体のごく少量であっても、本実験方法を用いればその菌糸体量を特異的かつ定量的に計測できることが示された。また、本方法は、定量に土壌標準試料とプラスミド DNA の関係式を用いるため、実験ごとに土壌標準試料を調製する必要がなく、プラスミド DNA の調整だけで定量できるという利点もある。

子実体が発生したシロにおける菌糸体量について上記の定量方法によって計測した結果を図 7 に示す。採取箇所が 3 点と少ないため今回の実験結果からシロの分布状況を正確に把握することは難しいが、採取ポイントによってバカマツタケ菌糸体量は大きく異なっており、その菌糸体量の差は菌糸体の分布状況を反映していると考えられる。すなわち、バカマツタケの菌糸体量は、子実体発生がなく菌糸体ほとんど分布していないと考えられる中央部分は少なく、菌糸体が白く厚い層になっている子実体直下で最も多くなった。採取した年とその前の年のシロ内の子実体の発生は上部に集中しており (図 2)、上部では特に菌糸体がまとまって発達していたものと推察される。マツタケのシロをリアルタイム PCR により定量した研究においても、子実体直下で菌糸体量が最も多くなることが報告されている¹⁶⁾。しかし、マツタケのシロの菌糸体は、子実体が発生する箇所と同じく環状に多く分布しているが、バカマツタケの菌糸体量がシロの上部と下部で顕著な差があったことから、必ずしも環状でなく、かなり浅い土壌に菌糸層を形成するために偏った菌糸体の分布状態をとる傾向^{6,9)}が、菌糸体量の定量結果からも支持された。

本方法により林地のバカマツタケ菌糸体量を客観的に評価、定量する一つの手法が確立された。野外におけるシロの発達状況をより詳細に正確に確認するには、土壌中の環境条件と菌糸体量の季節的変動などの関係を細やかな調査によって解析し、シロの動態を把握することが重要になると考えられる^{19,20)}。今後は、試料採取ポイントを増やして本方法で定量 PCR を実施することで、林地接種試験のより詳細なシロの分布状況や動態を分析することができると期待される。ただし、本方法で標準試料を作製する際に用いた人工的に培養した菌糸体との比較による定量であり、林地に存在する土壌中の自然な状態の菌糸体そのものではないことに留意しなければならない。

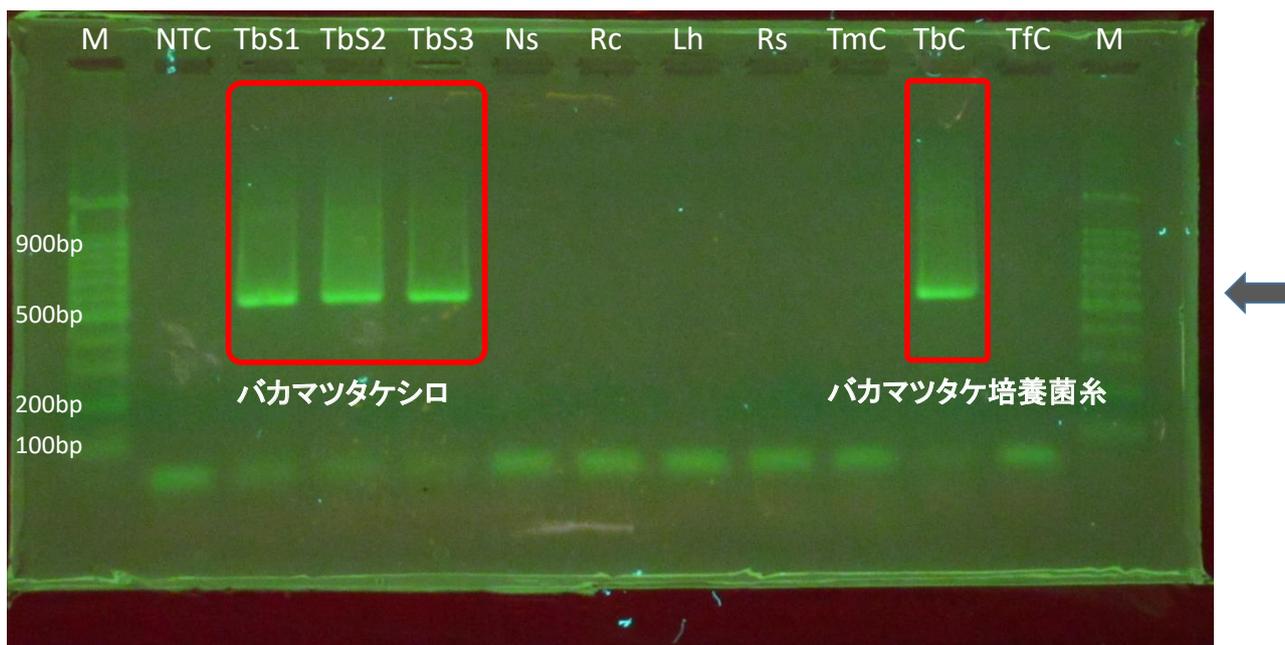


図3 リアルタイムPCR産物の電気泳動

M: サイズマーカー、NTC: ネガティブコントロール、Tbs1~3: バカマツタケシロ、Ns: クリタケ、Rc: ショウゲンジ、Lh: ハツタケ、Rs: オキナクサハツ、Tmc: マツタケ培養菌糸、Tbc: バカマツタケ培養菌糸、Tfc: ニセマツタケ培養菌糸

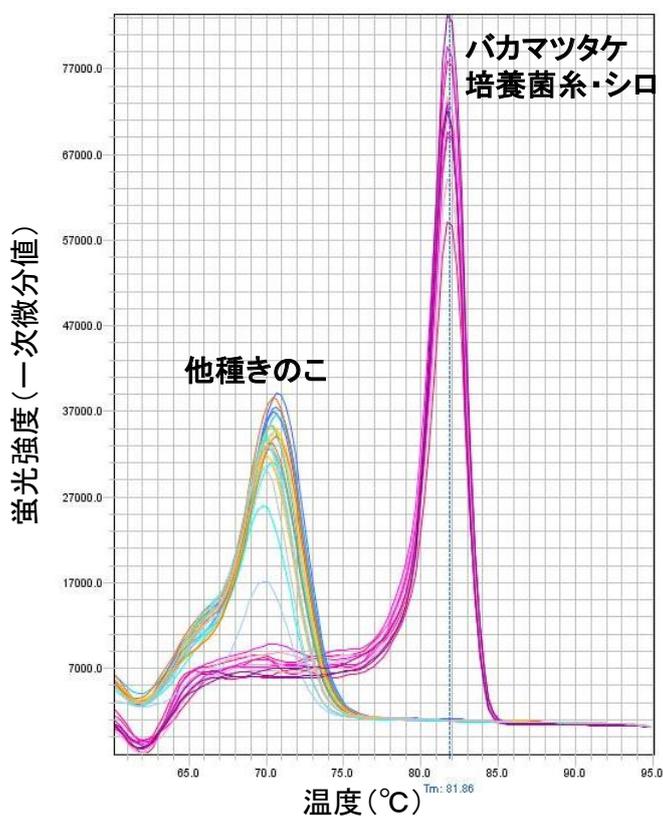


図4 リアルタイムPCR融解曲線

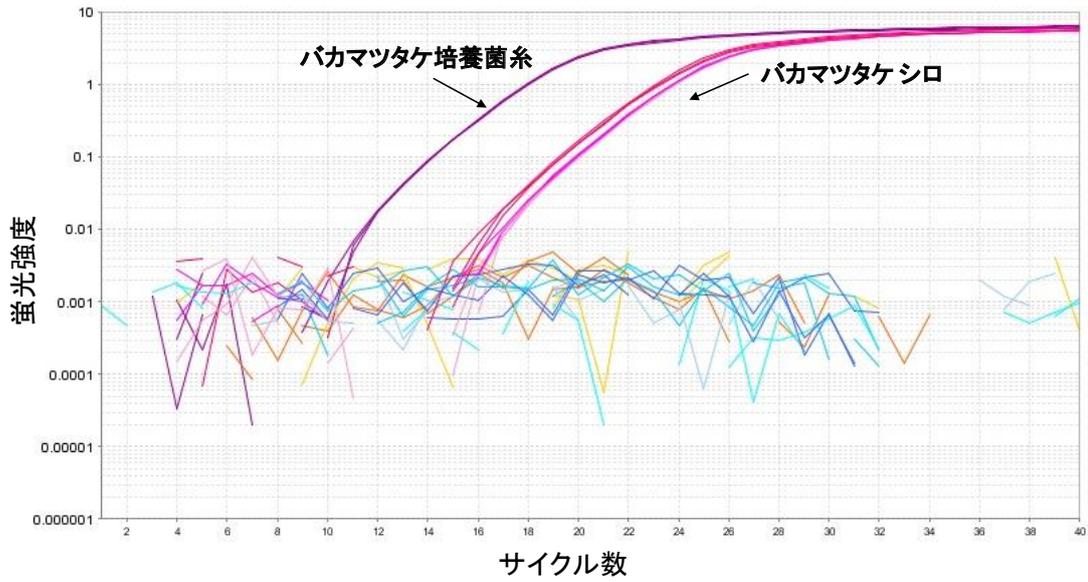


図5 リアルタイムPCR増幅曲線

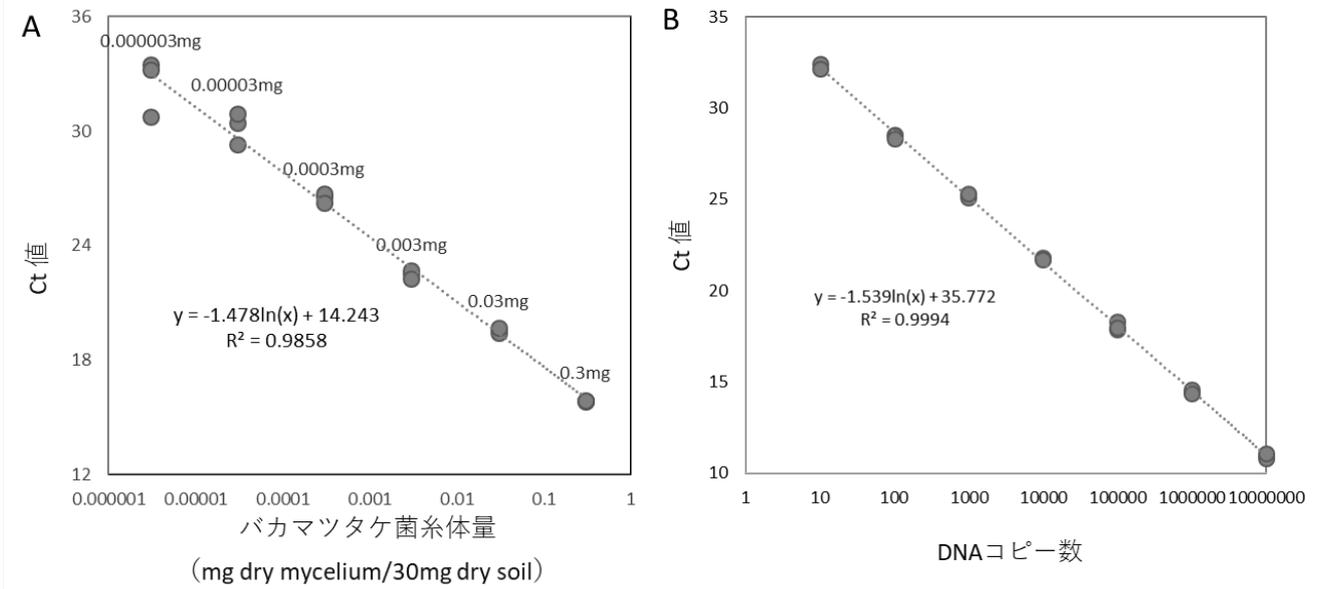


図6 バカマツタケ菌糸体量とCt値の関係 (A)およびDNAコピー数とCt値の関係 (B)

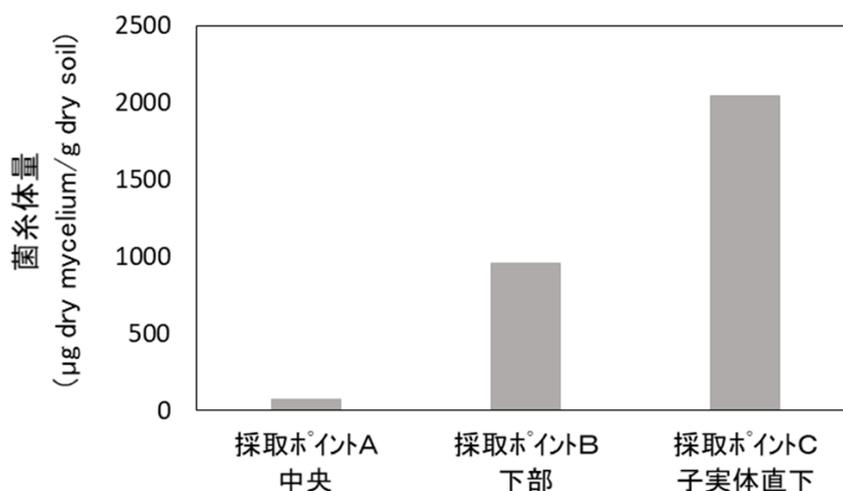


図7 子実体が発生したシロの各試料採取ポイント (A, B, C) におけるバカマツタケ菌糸体量
試料採取ポイントは図2参照

謝辞

本研究にあたり、ご助言をいただいた関係各位に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Hongo, T. : Notes on Japanese Larger fungi (21) . Journ. Jap. Bot. 49, 294-305 (1974)
- 2) 伊藤原作：ナラの萌芽林に生ずるマツタケ近縁の食用菌の一種について. 第71回日本林学会大会講演集. 384-386 (1961)
- 3) 小原弘之：アンケート法によるマツタケ近縁種の分布調査例. 日本林学会誌. 19, 79-86 (1978)
- 4) 島菌平雄, 緒方吉箕, 安永敏雄, 川口秀義：宮崎県下の広葉樹林で発生するニセマツタケおよびバカマツタケについて. 日本菌学会誌. 20, 185-194 (1979)
- 5) 小原弘之：バカマツタケ再考. 日本菌学会誌. 19, 469-472 (1978)
- 6) Terashima Y, Tomita K, Takahashi M, Iwai H : Distribution and characteristics of shiros of *Tricholoma bakamatsutake* in a mixed forest of *Pasania edulis* and *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*. Trans. Mycol. Soc. Japan 34, 229-238 (1993)
- 7) Terashima Y, Tomita K, Takahashi M, Iwai H : Distribution and external morphology of mycorrhizal roots at shiros of *Tricholoma bakamatsutake* in a mixed forest of *Pasania edulis* and *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*. Trans. Mycol. Soc. Japan 34, 495-505 (1993)
- 8) 城戸杉生：ウバメガシ林を主としたバカマツタケの生態. 和歌山県林業試験場研究報告. 4, 1-9 (1993)
- 9) 小川真, 小原弘之：マツタケとその近縁種における“シロ”の微生物生態学的研究Ⅷ ミズナラ, コナラ林のバカマツタケ. 日本菌学会誌. 19, 391-405 (1978)
- 10) Terashima Y : Carbon and nitrogen utilization and acid production by mycelia of the ectmycorrhizal fungus *Tricholima bakamatsutake* in vitro. Mycoscience 40, 51-56 (1999)
- 11) Yamanaka T, Ota Y, Konno M, Kawai M, Ohta A, Neda H, : The host ranges of conifer-associated *Tricholoma matsutake*, Fagaceae-associated *T. bakamatsutake* and *T. fulvocastaneum* are wider in vitro than in nature . Mycologia 106, 397-406 (2014)
- 12) 河合昌孝. 奈良県：菌根性茸類の種菌調整方法及び接種方法 特許第6558711号. 2019-7-26.
- 13) 河合昌孝：奈良県における菌根性きのこの栽培研究について：ホンシメジ・バカマツタケの栽培について. 森林科学. 86, 30-33 (2019)

- 14) 寺嶋芳江：シイ林におけるバカマツタケの生態. *きのこの科学*. 3, 101-108 (1996)
- 15) Terashima Y, Nakai T : Identification of the DNAs of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake* using specific oligonucleotide probes and PCR primers. *Mycoscience* 37, 371-375 (1996)
- 16) Yamaguchi M, Narimatsu M, Fujita T, Kawai M, Kobayashi H, Ohta A, Yamanaka T, Matsushita N, Neda H, Shimokawa T, Murata H : A qPCR assay that specifically quantifies *Tricholoma matsutake* biomass in natural soil. *Mycorrhiza* 26, 847-861 (2016)
- 17) 山口宗義：マツタケ菌の検出およびプライマーセット, およびマツタケ菌の検出方法ならびにマツタケ菌の定量方法 特許第 5227600 号. 2013-3-22.
- 18) Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K : Discrimination of *Tricholoma* species by species-specific ITS primers. *Mycoscience* 48, 316-320 (2007)
- 19) 星川圭介：コナラ林分におけるバカマツタケ子実体の形成条件. *富山県立大学紀要*. 31, 51-56 (2021)
- 20) Yamada A : Cultivation studies of edible ectomycorrhizal mushrooms: successful establishment of ectomycorrhizal associations in vitro and efficient production of fruiting bodies. *Mycoscience* 63, 235-246 (2022)

(2023年4月20日 受理)