

マツタケ子実体発生におよぼす核酸関連物質の効果

大賀, 祥治
九州大学大学院農学研究院

具, 昌徳
忠北大学校農科大学山林科学部

金, 載水[他]
忠北大学校農科大学山林科学部

<https://doi.org/10.15017/14836>

出版情報：九州大学農学部演習林報告. 83, pp.43-52, 2002-03-27. 九州大学農学部附属演習林
バージョン：
権利関係：

論文

マツタケ子実体発生におよぼす核酸関連物質の効果*

大賀 祥治¹・具 昌徳²・金 載水²・趙 南爽²・
眞許 勝弘³・寺下 隆夫⁴・森永 力⁵・堀越 孝雄⁶・
江口 文陽⁷・北本 豊⁸

抄 録

マツタケ発生林において、シロが形成されている林床に核酸関連物質の水溶液を散布し、細根部の菌体量および子実体発生に関して検討した。核酸関連物質として木材キシロースを主糖源に培養したトルラ酵母から抽出したリボ核酸(RNA-M)と、それを酵素処理した5'-ヌクレオチドの混合物(RNA-Nt)を取り上げた。これら40gを蒸留水4,000mlに溶解させ、林地に設けた4m²の試験区に直接散布した。細根部の菌体量を把握

* OHGA, S., KOO, C.-D., KIM, J.-S., CHO, N.-S., MAMOTO, K., TERASHITA, T., MORI-NAGA, T., HORIKOSHI, T., EGUCHI, F. and KITAMOTO, Y.: Utilization of Nucleic Acid Compounds for Fruiting of *Tricholoma matsutake*

¹ 九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門森林生態圏管理学講座, 〒811-2415 福岡県粕屋郡篠栗町津波黒394

Division of Forest Ecosphere Sciences and Management, Department of Forest and Forest Products Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Sasaguri, Fukuoka 811-2415, Japan

² 忠北大学校農科大学山林科学部, 〒361-763 韓国清州市開新洞山48

School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

³ 日本製紙株式会社DP・化成品事業本部, 〒100-0006 東京都千代田区有楽町1-12-1

Nippon Paper Industries Co. Ltd., Yurakucho 1-12-1, Tokyo 100-0006, Japan

⁴ 近畿大学農学部食品栄養学科, 〒631-8505 奈良市中町3327-204

Department of Food Nutrition, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631-8505, Japan

⁵ 広島県立大学生物資源学部生物資源開発学科, 〒727-0023 広島県庄原市七塚町562

Department of Bioresource Development, Hiroshima Prefectural University, Shobara 727-0023, Japan

⁶ 広島大学総合科学部自然環境研究講座, 〒739-8521 東広島市鏡山1-7-1

Department of Environmental Sciences, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, Higashihiroshima 739-8521, Japan

⁷ 高崎健康福祉大学健康栄養学科, 〒370-0033 高崎市中大類町37-1

Department of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare, Takasaki 370-0033, Japan

⁸ 鳥取大学農学部応用生命科学講座, 〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-0945, Japan

! 本稿の一部は、2001年度日本菌学会西日本支部大会(2001.11.17:九州大学農学部附属演習林)で発表した。

する手法として、キチン、エルゴステロール、リン脂質の定量が有効であった。散布区では細根部でこれらの指標成分が増加したことから、菌体量が高まったものと思われた。散布してから1ヶ月後に子実体発生が始まり、14日間の子実体発生期間で、散布区での発生量はRNA-Mで230 g (9個), RNA-Ntで210 g (7個), 対照区は0-60 g (0-2個)であった。マツタケ発生林で核酸関連物質を散布することによりマツタケ子実体の発生促進効果を認めた。

キーワード：マツタケ, 子実体, アカマツ林, 核酸関連物質

1. はじめに

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) は外生菌根菌であり、その生育にはアカマツの細根が不可欠となっている。通常アカマツが宿主であるが、クロマツ、ハイマツ、ツガ、コメツガ、トドマツ、アカエゾマツ等他のマツ科の樹木とも菌根を作る。外生菌根を着生できる宿主としては針葉樹ではマツ科、広葉樹ではブナ、カバノキ、ヤナギ科が知られている。マツタケの宿主であるアカマツは菌糸が細根部に着生することにより、根が保護されると同時に水分吸収能が高められる。またマツタケはアカマツの細根部から生育に必要な養分を供給されている。両者の共生関係が成立したアカマツ林において、温度や降水等の環境因子が整ってマツタケ子実体が発生する。ところがアカマツ林の衰退により、マツタケの生産量が激減してきた。我が国では、昭和初期には年間平均6,000から7,000トンが産出され、昭和16年(1941)にはピークの12,000トンが記録されている。以後減少傾向をたどり昭和33年(1958)の4,700トン以降激減している。平成10年度(1998)は247トンにとどまった(林野庁, 2000)。マツタケ発生量の減少は主にアカマツ林床の富栄養化による環境悪化、そしてマツクイムシの被害によるアカマツの枯れが主因と思われる。

マツタケに関する研究は、野外(浜田, 1974; 小川, 1984; 1987; 富永・米山, 1987; 小川・伊藤, 1989; 長野県林業総合センター, 1997; 衛藤・谷口, 2000; 加計ら, 2000)および室内(Dunstan *et al.*, 2000; Warwick *et al.*, 2000)の両面からの試験が行われてきた。野外試験では主としてシロの状態、宿主であるアカマツや他の灌木類の植生、気温や降水量等の環境因子が検討されている。室内試験ではマツタケ菌の生理や分子生物学的な事項が検討されている。アカマツ林での担子菌の発生に関しては、電気インパルスを加えるとキツネタケ (*Laccaria laccata*) の発生量と発生分布が著しい影響を受けることが明らかになった(Ohga and Iida, 2001)。

マツタケの生産量を復活させるには、アカマツ林の整備と環境因子の解明、さらに菌糸蔓延や子実体発生に関する品種間差異の検討が重要である。この中で種々の添加物を作用させ積極的に子実体を発生させる試みが注目されている。ここでは、シイタケ (*Lentinula edodes*) で効果が認められている核酸関連物質(大賀, 1988)から数種取り上げ、実際のマツタケ発生林において子実体発生におよぼす効果を検討した。

2. 実験方法

2.1. 試験地

試験は2000年8月から10月にかけて、韓国忠清北道槐山郡双谷溪谷のマツタケ発生林で行った。試験地は図1に示すように、30-40年生のアカマツが主でミズナラと数種の灌木で構成された林分である。花崗岩土質で腐植層のA₀層が薄く、表土を剥ぎ取ると密なシロが観察された。図2に示すように代表的なマツタケのシロを選定し(100m²)、図3のように25のプロット(2×2m)に分割した。そのうちの2区画に2種類の核酸関連物質をそれぞれ散布した。



Fig. 1. Forest of growing *Tricholoma matsutake*.

図1 マツタケ発生林



Fig. 2. Experimental plots of *Tricholoma matsutake* for nucleic acid compounds addition.

図2 試験地

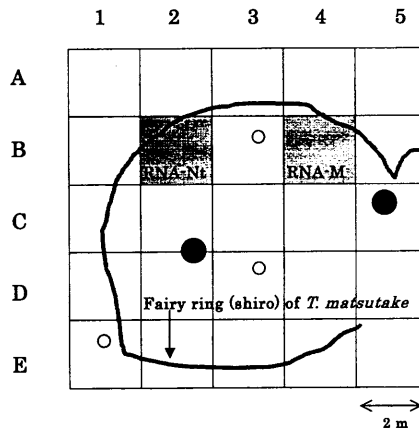


Fig. 3. Design of the test plots. RNA-Nt: B-2, RNA-M: B-4. Nucleic acid compounds of 1.0% water solution (4,000 ml) were sprayed directly to the ground surface of the plots (4 m²) on Aug. 31. Hatched circle: *Pinus densiflora*, Open circle: *Quercus mongolica*.

図3 試験区画 (RNA-Nt: B-2, RNA-M: B-4)。核酸関連物質の1.0%水溶液4,000 mlを試験区4 m²に直接散布した。実施日は8月31日。図中の黒丸はアカマツで白丸はミズナラ。

2.2. 核酸関連物質の散布

核酸関連物質は日本製紙株式会社江津工場で調製された、リボ核酸 (RNA-M) とそれを酵素分解した 5'-ヌクレオチドの混合物 (RNA-Nt) である (図 4)。RNA-M は木材キシロースを主糖源とし、窒素としてアンモニア、燐としてリン酸アンモニウムを添加し、好氣的に連続培養したトルラ酵母を遠心分離、水で洗浄した。得られた酵母分散液を熱水抽出して、抽出残渣の酵母を遠心分離で除去した。抽出液を酸で pH 2 以下にして高分子 RNA を析出させた。沈殿した高分子 RNA を遠心分離して、水洗し噴霧乾燥した。RNA-Nt は高分子 RNA を水に溶解し、5'-ホスフォジエステラーゼを添加して 50-60°C で加水分解した。得られたヌクレオチド液に等重量のデキストリンを賦形剤として添加溶解して噴霧乾燥した。RNA-M と RNA-Nt の成分は表 1 に示すとおりである。

各々 40 g を蒸留水 4,000 ml に溶解し、1 区画に直接散布した (図 3 に示すように、RNA-M は B-4 区、RNA-Nt は B-2 区)。散布は 2000 年 8 月 31 日に行った。

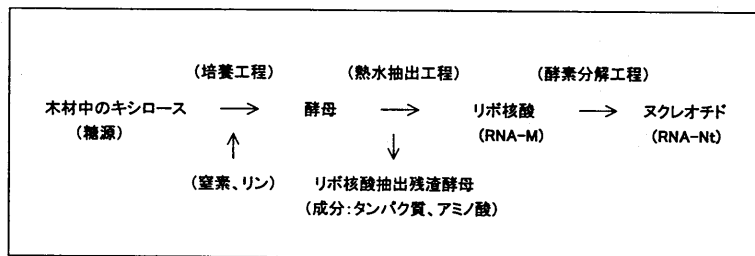


Fig. 4. Manufacturing process of nucleic acid compounds.

図 4 核酸関連物質の調製工程

表 1 リボ核酸 (RNA-M) およびヌクレオチド (RNA-Nt) の構成成分

Table 1 Component of RNA-M and RNA-Nt

RNA-M		RNA-Nt	
高分子リボ核酸	81.7	アデニル酸	11.6
リグニン・タンパク質	10.7	グアニル酸	14.3
水分	7.6	シチジル酸	13.0
		ウリジル酸	11.9
		デキストリン	47.7
		水分	1.5

2.3. 細根の分析

細根部の菌体量を把握するために、図 5 に示すようなシロから細根部を 9 月 9, 20, 31 日に採集した。RNA-M (B-2), RNA-Nt (B-4), 対照区 (B-1 および B-5) より分析試料を採取した。シロの攪乱を最小限にとどめて深さ 10 cm までの部分を、それぞれ 10 個の細根部を採取し、5°C で保存した。分析用の細根部は、流水で土壌や腐食層を取り除き調製した (Ohga and Wood, 2000)。各試料のキチン、エルゴステロール、リン脂質の含有

量を定量した。キチンはキチン塩酸化加水分解後のグルコサミンをMBTH比色法により測定した (Braid and Line, 1981)。エルゴステロールはエタノール-メタノール抽出物をケン化後、HPLC分析を行った (Seitz *et al.*, 1979)。リン脂質はクロロホルム-メタノール抽出物について、モリブデン比色法により測定した (Bligh and Dyer, 1959; Dittmer and Wells, 1969)。

なお、これらの3成分とマツタケ菌体量の相関を知るために、あらかじめMMN培地で生育したマツタケ菌糸を用いて分析を行った (Ohga and Wood, 2000)。

2.4. 子実体発生

9月20日から10月3日の14日間にわたって、毎日試験区での子実体発生量を測定した。子実体は図6に示すように、菌傘が開き始めた時点(中つぼみ)を目安にして採取し、発生個数と生重量を記録した。



Fig. 5. Mycelial colony (shiro) of *Tricholoma matsutake*.

図5 マツタケのシロ



Fig. 6. Fruit body of *Tricholoma matsutake*.

図6 マツタケ子実体

3. 結果および考察

3.1. 細根の菌体量

図7に示すようにマツタケ菌体量とキチン、エルゴステロール、リン脂質の各指標成分の含有量とは高い相関関係が認められた。マツタケ菌ではこれらの成分を定量することにより、マツタケの菌体量が把握できることが分った。同様の結果がカラマツを宿主とする菌根菌であるハナイグチ (*Suillus grevillei*) で明らかにされている (Ohga and Wood, 2000)。これらの指標成分は他の菌根菌でも、菌体量を把握するために適した方法とされている (Salmanowicz and Nylund, 1988; Johnson and McGill, 1990; Ekblad *et al.*, 1998)。

図8に各指標成分の推移を示す。キチン、エルゴステロール、リン脂質共にRNA-MやRNA-Ntを散布することにより細根中の含有量が高くなった。特に散布後9日目で増加がみられ、いずれの指標成分でもこの時期に極大値を示した。

図7で求めた回帰式を用いて、図8での結果に基づき菌体量を算出した。[グルコサミン ($y = 0.058x - 0.3902$), エルゴステロール ($y = 0.0029x - 0.0414$), リン脂質 ($y = 0.0019x + 0.0142$) y : 各々の成分 (mg), x : 乾燥菌体量 (mg)]。結果を図9に示すが、RNA-Mの散布時での菌体量は91 mg/g dry root (乾燥細根あたり9.1%)であったが、9

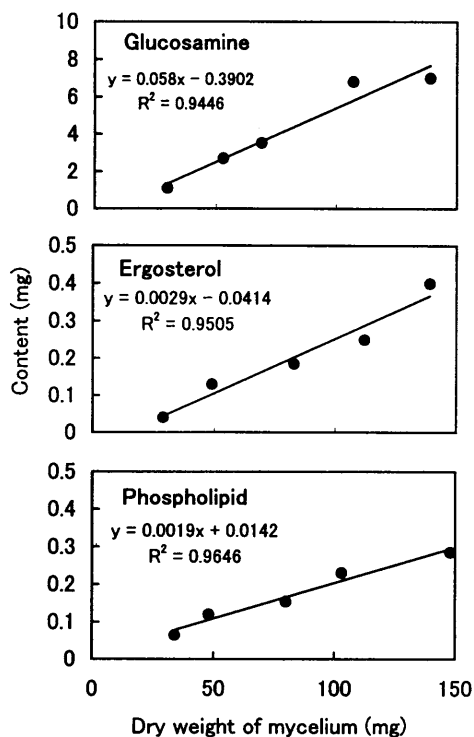


Fig. 7. Relationship between the indicator components and fungal biomass of *Tricholoma matsutake*.

図7 指標成分とマツタケ菌体量の相関

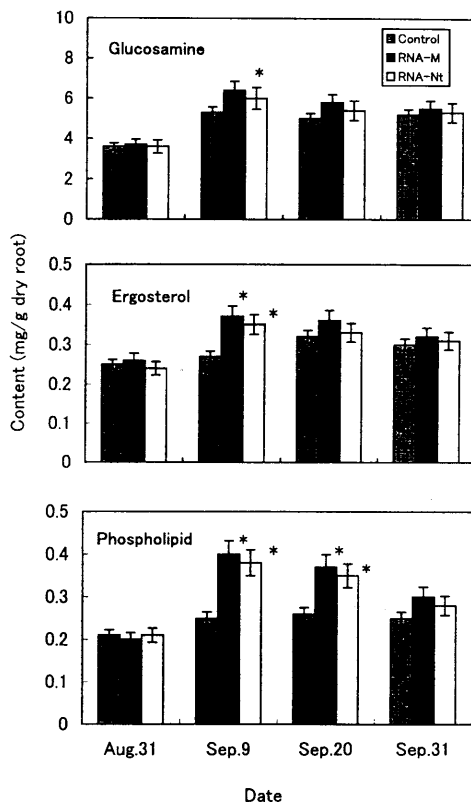


Fig. 8. Content of the indicator components of *Tricholoma matsutake* fine roots (RNA-M addition plot). Error bars indicate standard deviations ($n = 10$). Asterisks indicate significant differences at $p < 0.05$.

図8 細根部の指標成分含有量。10検体で、星印は5%水準の危険率で有意差。

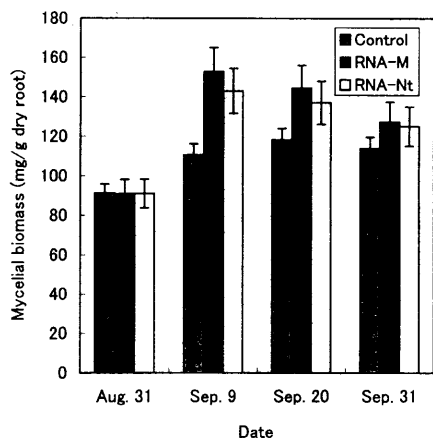


Fig. 9. Fungal biomass of *Tricholoma matsutake* fine roots in the experimental plots. Error bars indicate standard deviations ($n = 30$). Asterisks indicate significant differences at $p < 0.05$.

図9 細根部のマツタケ菌体量。30検体で、星印は5%水準の危険率で有意差。

日後には15.3%に急増している。20日後で14.4%，31日後では12.7%となった。RNA-Ntについても菌体量増加について同様の効果が表れ，9日後に14.3%，20日後に13.7%，31日後に12.5%となった。一方対照区では，それほど菌体量の増加はみられず，11.0-11.8%の増加にとどまった。従ってRNA-MやRNA-Ntを散布したことが細根部の菌体量増加に直接影響しているものと思われる。

3.2. 子実体発生量

図10に試験地の温度および林床を示す。マツタケの子実体発生は最低気温が15℃位になる頃始まるとされているが，9月20日頃から本格的な発生がみられた。林床の含水率は，菌糸が蔓延しているシロの部分で特徴がみられた。つまり，降雨があると通常の林分では急激な含水率の増加がみられるが，シロではそれほど大きな変化はみられなかった。これ

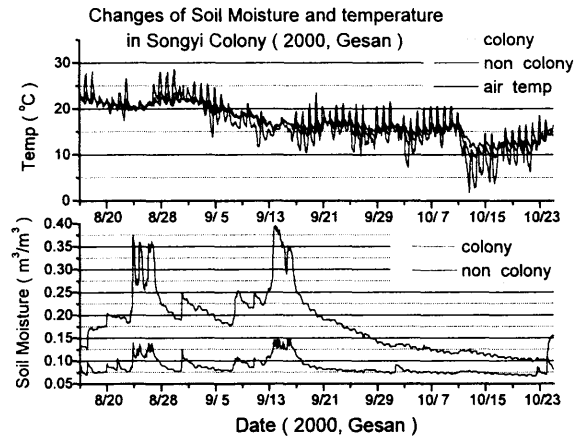


Fig. 10. Diagram of temperature and soil moisture content in the experimental plots.

図10 試験地の温度および林床の含水率

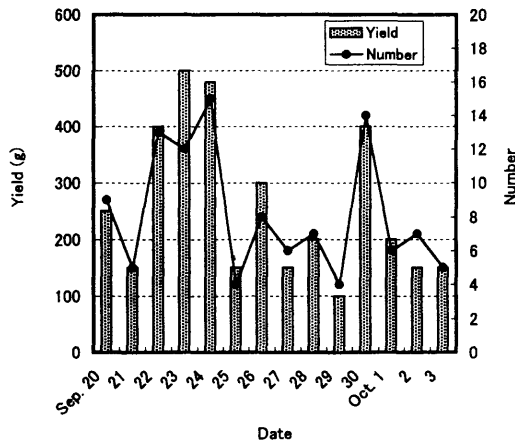


Fig. 11. Yield and number of *Tricholoma matsutake* fruit body in the forest (1 ha). Fruit bodies were harvested during Sep. 20 to Oct. 3.

図11 アカマツ林での子実体の総発生量 (1ha) . 測定期間は9月20日から10月3日.

はマツタケ菌による緩衝作用が主因と考えられる。マツタケ菌が蔓延したシロの方が低い含水率を保っていた。

試験地での典型的なマツタケ子実体の形質を図6に示す。このような生育段階で子実体を採取して計測した。図11に双谷溪谷における本試験地周辺での、1 haあたりのマツタケ子実体発生量を示す。9月20日から10月3日までの14日間で総発生量は3,580 g (115個)であった。2000年は9月23日に発生量のピークがみられる。これは平均的な収穫量で、本試験地の地位や、試験年の気象環境が適当であったことを示している。

図12のように、RNA-M (B-4) とRNA-Nt (B-2) を散布した区ではマツタケ子実体の発生量が大きく増加した。RNA-Mで230 g (9個)、RNA-Ntで210 g (7個)、対照区は0-60 g (0-2個)であった。明らかに核酸関連物質のRNA-MとRNA-Ntが効果を示しているものと思われる。RNA-Mの方がRNA-Ntに比べてわずかにプラス効果が高くなっており、リボ核酸の方が5'-ヌクレオチドの混合物よりも効果が高いようである。高分子の状態では菌糸に投与されて菌体で分解された方が、分解物を直接添加されるよりも子実体発生に強い影響を及ぼしているようである。

木材成分由来で担子菌に対して効果を示した例として、亜硫酸パルプ廃液成分から調製したスルホン化多糖が報告されている(稲葉ら, 1984)。本成分はマツタケ菌に対しても高い生育促進効果を示している。ここで用いた核酸関連物質のRNA-MとRNA-Ntは木材腐朽菌のシイタケをはじめとした栽培キノコであるナメコ (*Pholiota nameko*)、マイタケ (*Glifola frondosa*)、ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*)、エリンギ (*Pleurotus eryngii*) で菌糸蔓延促進効果が認められており(大賀ら, 2002)、現在、栽培的規模で子実体発生試験を実施中である。やはり、RNA-Mの方がRNA-Ntよりも高いプラス効果を示している。

マツタケは未だに再現性のある人工栽培の報告はみられないが、同じ菌根菌に属するホンシメジ (*Lyophyllum shimeji*) は栽培化の可能性が報告されている(太田, 1998)。栽培が可能な菌根菌が数種存在し、同種のもので菌株によってより栽培がたやすいものがあると考えられる。マツタケの場合でも、菌糸蔓延や子実体発生には品種間によってかな

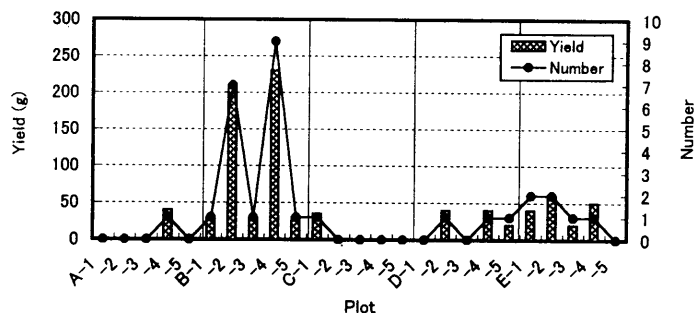


Fig. 12. Effect of nucleic acid compounds for fruiting of *Tricholoma matsutake*. (4m², RNA-Nt: B-2, RNA-M: B-4). Fruit bodies were harvested during Sep. 20 to Oct. 3. Plot initials are same as in Fig. 3.

図12 マツタケ子実体発生におよぼす核酸関連物質の影響 (4 m², RNA-Nt: B-2, RNA-M: B-4) . 測定期間は9月20日から10月3日. 試験区の記号は図3と同様.

りの差異があるものと思われる。子実体発生が比較的容易な品種を見出し、核酸関連物質をマツタケ発生林の林床に直接散布することにより、良好な子実体発生が期待できる。今後は試験地の規模を拡大して、核酸関連物質の種類や添加量、添加方法を検討し、環境因子を考慮にいれた検討が必要である。

謝 辞

マツタケ子実体の発生量測定に際しては、韓国忠清北道の槐山森林組合の方々に多大な援助を受けたことを感謝します。特に子実体発生量測定期間の14日間は、盗伐防止のため24時間体制で試験地を含むアカマツ林を監視していただきました。韓国忠北大学の学生には、野外試験で協力していただいたことを感謝します。マツタケの生理および生態について種々ご助言いただき、韓国内での多くのマツタケ発生林をご案内いただいた、韓国教員大学校植物学講座李 相宣教授ならびに金 敦風博士、太田科学高校教諭の鄭 興采博士に感謝します。

引用文献

- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959):** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917
- Braid, G. H. and Line, M. A. (1981):** A sensitive chitin assay for the estimation of fungal biomass in hardwoods. *Holzforchung* **35**: 10-15
- Dittmer, J. C. and Wells, M. (1969):** Qualitative and quantitative analysis of lipids and lipid components. *Methods Enzymol.* **14**: 482-530
- Dunstan, W. A., Dell, B., Malajczuk, N. and Iwase, K. (2000):** Detection of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* and some related species with specific ITS primers. *Mycoscience* **41**: 33-38
- Ekblad, A., Wallander, H. and Nasholm, T. (1998):** Chitin and ergosterol combined to measure total and living biomass in ectomycorrhizae. *New Phytol.* **138**: 143-149
- 衛藤慎也・谷口 實 (2000) : 殺菌剤を利用したマツタケの林地接種源の開発. 日本応用きのこ学会誌 **8**: 197-202
- 浜田 稔 (1974) : マツタケ日記. 浜田稔先生定年退官記念事業会, 京都
- 稲葉和功・飯塚義富・越島哲夫 (1984) : 食用きのこ菌糸の生育促進に及ぼすスルホン化多糖の置換度ならびに分子量の影響. 木材誌 **30**: 251-257
- Johnson, B. N. and McGill, W. B. (1990):** Comparison of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedling response to inoculation. *Can. J. For. Res.* **20**: 1125-1131
- 加計康晴・松下範久・鈴木和夫 (2000) : アカマツ林の外生菌根菌に及ぼす施業の影響. 東大演報, **104**: 147-156
- 長野県林業総合センター (1997) : まつたけ増産のでびき. 長野県まつたけ生産振興協議会, 長野
- 小川 真 (1978) : マツタケの生物学. 築地書館, 東京
- 小川 真 (1984) : マツタケの話. 築地書館, 東京
- 小川 真・伊藤 武 (1989) : マツタケは栽培できるか. 全国林業改良普及協会, 東京
- 大賀祥治 (1988) : きのこ栽培に関する資源学的研究 (第7報) ネギ煎汁のシイタケ菌生育促進活性と核

酸関連物質. 木材誌 **34**: 745-752

大賀祥治・眞許勝弘・江口文陽 (2002) : 食用きのこの菌糸成長に及ぼす核酸関連物質の影響. 日本応用きのこ学会誌 投稿中

Ohga, S. and Wood, D. A. (2000): Efficacy of ectomycorrhizal basidiomycetes on Japanese larch seedlings assessed by ergosterol assay. *Mycologia* **92**: 394-398

Ohga, S. and Iida, S. (2001): Effect of electric impulse on sporocarp formation of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in Japanese red pine plantation. *J. For. Res.* **6**: 37-41

太田 明 (1998) : ホンシメジの実用栽培のための栽培条件. 日菌報 **39**: 13-20

林野庁 (2000) : 林業統計要覧. 2000年版, 東京

Salmanowicz, B. and Nylund, J. E. (1988): High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhizal infection in Scots pine. *Eur. J. For. Pathol.* **18**: 291-298

Seitz, L. M., Sauer, D. B., Burroughs, R., Mohr, H. E. and Hubbard, J. D. (1979): Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* **69**: 1202-1203

富永保人・米山 穂 (1987) : マツタケ栽培の実際. 養賢堂, 東京

Warwick, M. G., Guerin-Laguet, A., Lapeyrie, F. and Suzuki, K (2000): Matsutake-morphological evidence of ectomycorrhiza formation between *Tricholoma matsutake* and host roots in a pure *Pinus densiflora* forest stand. *New Phytol.* **147**: 381-388

(2001年11月16日受付; 2002年1月31日受理)

Summary

Ribonucleic acid (RNA-M) and 5' nucleotide mixture (RNA-Nt) were added to the mycelial colony (shiro) of *Tricholoma matsutake* prior to fruiting stage. Forty g ribonucleic acid derivatives was dissolved in 4,000 ml distilled water, and sprayed directly to 4 m² surface ground of the pine forest. Glucosamine, ergosterol and phospholipid were useful indicators to determine the fungal biomass in the fine roots. These indicator components in the fine roots increased after RNA-M and RNA-Nt addition, and then revealed obviously higher levels compare with non-addition control plots. Addition of these compounds resulted to mycelial biomass increment judging from 3 indicator responses. Fruit body formation occurred around 30 days after addition of RNA-M and RNA-Nt. Total amount of fruit body was 230 g (9 fruit bodies) (RNA-M) and 210 g (7 fruit bodies) (RNA-Nt) during 14 days observation period. In contrast, yield of control plots were 0-60 g (0-2 fruit bodies) in the experimental area. Yield and number of *T. matsutake* resulted increment with the addition of nucleic acid related compounds.

Key words: *Tricholoma matsutake*, Fruit body, Pine forest, Nucleic acid related compounds