

短報 ショウロ栽培系統の選抜試験

－予備的な培養試験，系統解析および接種試験から得られた知見－

富川 康之・宮崎 恵子・古賀 美紗都

島根県中山間地域研究センター研究報告第19号別刷

令和5年12月

ショウロ栽培系統の選抜試験

— 予備的な培養試験，系統解析および接種試験から得られた知見 —

富川 康之・宮崎 恵子・古賀 美紗都*

Examination of Strain Selection for *Rhizopogon roseolus* Cultivation
— Findings Obtained from Preliminary Examination
Comprising Culture Tests, Phylogenetic Analysis, and Inoculation Tests —

TOMIKAWA Yasuyuki, MIYAZAKI Keiko and KOGA Misato*

要 旨

当センターのほ場に発生したショウロ子実体に由来する 113 菌株のうち，菌糸伸長速度が比較的速かった菌株は 1.5 mm/日以上で，比較的遅かった菌株とは 3 倍以上の差を認めた。この 113 菌株を供試した AFLP 解析の結果から推測すると，ほ場に発生した子実体は複数の遺伝的集団からなる多様性が示された。菌糸伸長速度が比較的速かった菌株は，系統樹に示されたクラスターのうちの一つに集中する傾向を認めた。ショウロ菌をクロマツへ接種する条件を検討するため，管理スケジュールを変えた 4 試験区を設けて，14 菌株を供試した結果，5 月下旬に播種，11 月下旬に移植と同時に接種，翌年 6 月下旬に観察する試験区が最も菌根形成率が高かった。

キーワード：ショウロ，クロマツ，菌糸伸長，AFLP 解析，菌根

I はじめに

ショウロ (*Rhizopogon roseolus*) は主に海岸防風クロマツ林に発生するきのこで，沿岸地域では春季と秋季に旬の食材として喫食されてきた。子実体には特有の芳香があり，形はトリュフ (*Tuber* spp.) に似た類球形で‘和製トリュフ’とも称されている。しかし，近年は発生地の縮小にともなって収穫量が減少し，このため国内ではマツタケ (*Tricholoma matsutake*) に次ぐ高単価で扱われており，人工栽培技術の確立が期待されている (富川，2010)。

ショウロはマツ科樹種と共生し，根に形成される菌根を介して養分の受け渡しをしているため (中島ら，2018)，栽培するにはショウロ菌を宿主

樹木へ効率的に感染させる技術が求められる (藤原，2021；松浦・佐々木，2023；霜村，2019)。著者らは，クロマツ (*Pinus thunbergii*) への孢子接種によって，ショウロ菌の感染率を接種後 2 か月で 100%にする条件を報告した (富川ら，2021)。しかし，この方法では複数の系統を同時に育成することになり，これは単一系統が純粋培養される一般的なきのこ生産とは対照的であり，生産を不安定にしている要因の一つと考えられる。

子実体発生を短期間に集中させ，収穫量を安定させるためには，栽培適性に優れた 1 系統の使用が望ましい。このためには系統選抜が必要であり，その一環として当センターが保有している菌株の一部を使用した培養試験，系統解析および接種試

*元島根県中山間地域研究センター (元島根大学総合科学研究支援センター客員研究員)

験を予備的に行った。本報告は、これらの試験結果から、今後の系統選抜に資するいくつかの知見を記述する。なお、本報告の一部は日本きのこ学会第21回大会で口頭発表した（宮崎ら，2017）。

II 培養試験と系統解析

1. 菌株作製

本県の苗木生産者が管理されているクロマツ播種床で、地表に発生した類球形の子実体を採取して、形態的特徴からショウロと同定した。また、rDNA-ITS領域の塩基配列をショウロのDNAデータベースと照合して99%以上の相同性を確認した。この生産者の播種床から掘上げられた幼苗を譲り受け、当センターの育苗ほ場で1年間育成した後、センター内に設けたショウロ栽培試験ほ場へ定植した（写真1）。また、苗を掘上げた育苗ほ場では一部の区画をクロマツ播種床とし、得られた苗を播種の翌年と翌々年に試験ほ場へ定植した。試験ほ場での子実体発生は最大9年間継続し、育苗ほ場のうち試験に使用しなかった苗を残した範囲からは2年間の発生を認めた。これらの子実体から定期的に組織分離をして300菌株を作製した（浜田氏寒天培地）。

2. 菌糸伸長量調査

収穫を開始してから最初の5年間に作製した113菌株を供試した。シャーレにPDA培地を調製して各菌株を予備培養し、コロニーの先端からコルク



写真1. 試験ほ場へのクロマツ定植

ボーラーを使用して菌糸片をとり、PDA培地で培養した（24℃，暗所）。定期的に半径方向への菌糸伸長量を測定して、1日当たりの菌糸伸長速度を算出した（4反復）。

3. AFLP解析

菌糸伸長量を調査した113菌株を解析サンプルとして、DNeasy Plant Mini KitでDNAを抽出した。解析方法は以下のとおりOkuda et al. (2013)に準じた。制限酵素（EcoRI, MseI）で処理したDNAをプライマーE+0（5'-GACTGCGTACCAATTC-3'）とM+0（5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'）を使用してPCR増幅した。続いて、プライマーに2塩基を加えた3通りのプライマーペア（E+AC/M+CA, E+AC/M+CC, E+CA/M+CA）で選択増幅した。増幅産物をジェネティックアナライザーで検出し、Peak Scannerで断片サイズごとに波形の有無を確認した。得られたAFLPパターンから、AFLP SURVで菌株間の遺伝的距離を算出した。

4. 結果

菌株ごとの菌糸伸長速度を速さ順に示した（図1）。各菌株の平均は0.91 mm/日、中央値は0.89 mm/日であった。菌糸伸長速度が比較的速かった菌株は1.5 mm/日以上であったが、一方で伸長速度が0.5 mm/日以下の菌株もあり、これらの差は3倍以上

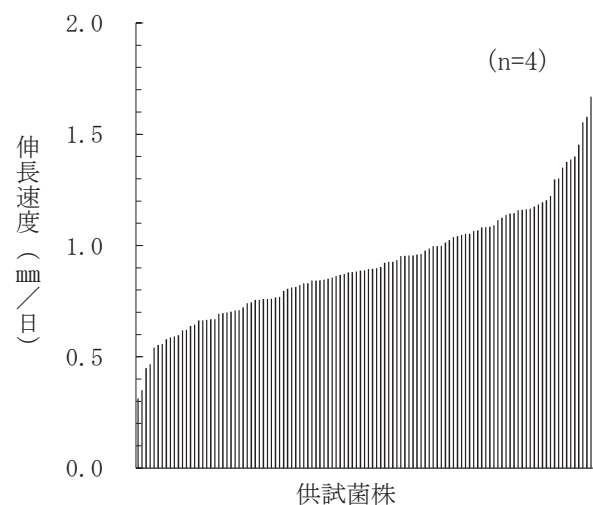


図1. 菌株ごとの菌糸伸長速度

上であった。大半の菌株は 0.5~1.2 mm/日の範囲にあり、この範囲では伸長速度の増加量は小さく、ほぼ一定であった。1.3 mm/日以上、10 菌株は突出して速く、0.5 mm/日以下の 4 菌株は他に比べて明らかに遅く、これらは菌株間の伸長速度に比較的大きな差を認めた。

菌株間の遺伝的距離にもとづくクラスター解析 (UPGMA 法) によって系統樹を作成した (図 2)。大半の菌株はクラスター A (20 菌株) と B (90 菌株) に大別され、これらから外れたのは 3 菌株であった。クラスター A と B には、それぞれを構成する遺伝的に類似したいくつかの集団を認めた (a~t)。また、これらの集団から外れた菌株もみられ、ほ場には多様な遺伝的関係のある複数の系統が分布している可能性が示唆された。

菌糸伸長速度 (図 1) が速かった上位 5 菌株 (1.4 mm/日以上) のうち、最も速かった菌株と 3~5 番目に速かった菌株の計 4 サンプルはクラスター A を構成する菌株であった。また、これらの菌株と遺伝的距離が近かった 4 菌株は伸長速度が 1.0 mm/日以上であり、クラスター A は菌糸伸長速度が比較的速い菌株で構成されていた。

III 接種試験

1. 接種源作製

当センターで作製した 300 菌株のうち、系統解析の結果とほ場の平面図にプロットした子実体発生位置が異なることから判断して、遺伝的距離が比較的離れている菌株を一次選抜した。続いて、菌糸伸長速度が比較的速い菌株と遅い菌株が含まれるようにして 11 菌株を選抜した。また、県内の海岸砂丘クロマツ林で採取した子実体由来の 2 菌株、滋賀県森林センターから譲渡された 1 菌株 (泉津, 2012) を加えた計 14 菌株を供試した。

水道水に浮かんだ日向土 (小粒) を 105℃で恒量にして、PGY 液体培地 (glucose 20 g, peptone 5 g, yeast extract 2 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ 1 g, water 1,000ml) で煮沸した。液体培地を含侵させた日向土 75ml を 200ml 広口フラスコに入れ、これに液体培地 20ml を加えて高圧蒸気滅菌 (121

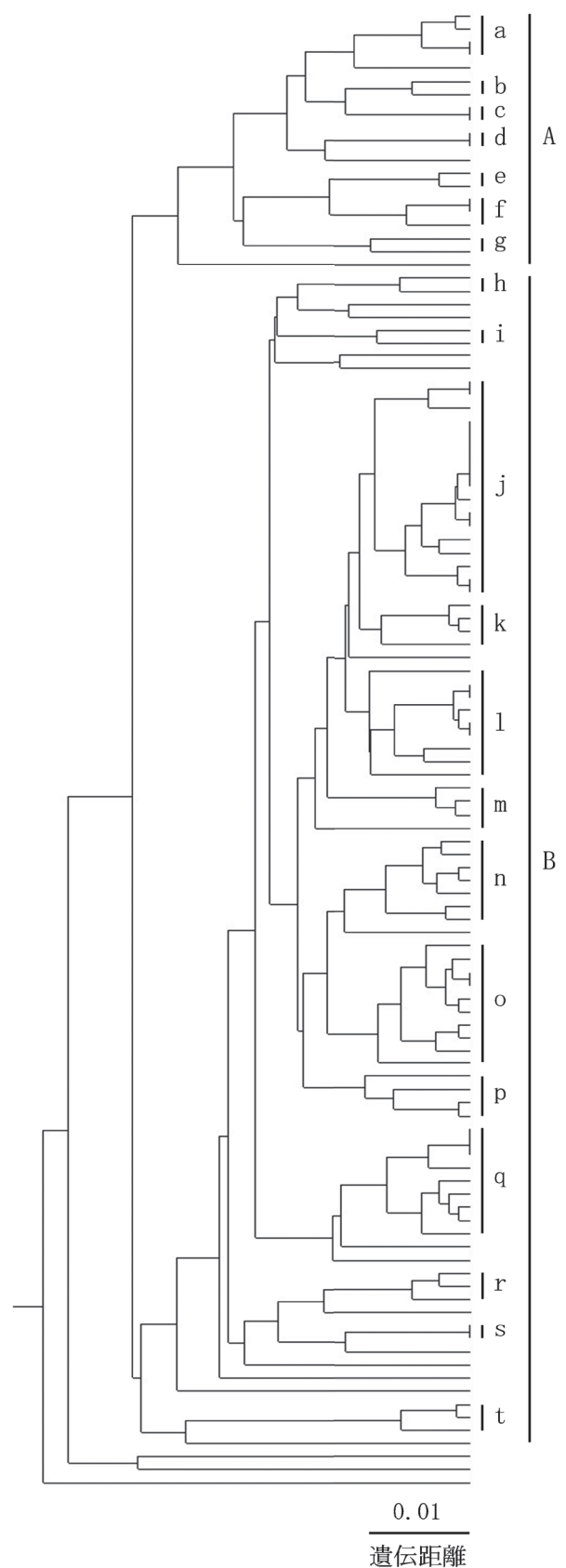


図 2. ほ場に発生した子実体の遺伝的関係 (UPGMA 法)

℃, 1 時間) した。この土壌培地で各供試菌を培養して (22℃, 40 日) 接種源とした (写真 2)。

2. クロマツの管理

林業用苗木生産資材のマルチキャビティコンテナ (以下, 「コンテナ」と略記) でクロマツを育成した。播種に使用したコンテナはキャビティ容量が 150ml で, 培土はココピートオールド, 元肥にハイコントロール 085-180 を 1 キャビティ当たり 2.5 g 施用した。キャビティの内壁に沿って外径 8 mm のプラスチックチューブを深さの 2/3 程度差込み, ショウロ菌の接種時にはチューブを引き抜い



写真 2. ショウロ菌土壌接種源

て接種孔とした。また, キャビティ容量が 300ml のコンテナへクロマツを移植して, 移植と同時に接種する試験区を設けた。マツ種子は県森林整備課が管理している母樹のうち 1 系統を用いて, 播種後のコンテナは屋外で管理した (富川ら, 2021)。

3. 感染率調査

クロマツの播種と移植, ショウロ菌接種, 菌根観察の時期を変えた 4 試験区を設け (表 1), 菌株ごとにクロマツ 4 本へ接種した。試験区 1 と試験区 2 は上述した接種孔へショウロ菌が蔓延した日向土培地を 4~5 粒埋め込み, 接種孔の上部はココピートオールドで埋め戻した。移植と同時に接種した試験区 3 と試験区 4 は, キャビティの内壁と根鉢の間へ日向土接種源 4~5 粒を深さ 1/2 あたりに押し込み, キャビティの隙間は鹿沼土 (細粒) で埋め戻した。

コンテナから抜き取ったクロマツは, 根鉢を解しながら水洗して培土を除き, 実体顕微鏡で根系を観察した。細根が分岐していること, 細根の先端が菌糸に覆われて綿棒状に膨らんでいることを菌根の基準とし (富川ら, 2021), 菌根を認めたクロマツをショウロ菌感染と判定した。一部の感染クロマツからは, 1 個体当たり 10 個/本の菌根を根

表 1 クロマツ播種, ショウロ菌接種および菌根観察の時期と管理日数

	2 月	5 月	7 月	10 月	11 月	2 月	6 月	播種～ 接種	接種～ 観察	播種～ 観察
試験区 1 実施日	播種 18 日	接種 16 日	観察 27 日					87 日間	72 日間	159 日間
試験区 2 実施日		播種 26 日	接種 21 日	観察 21 日				56 日間	92 日間	148 日間
試験区 3 実施日		播種 26 日			移植 接種 30 日		観察 23 日	188 日間	205 日間	393 日間
試験区 4 実施日		播種 26 日				移植 接種 5 日	観察 23 日	255 日間	138 日間	393 日間

から切り離し、根の組織ごと凍結乾燥して DNA 解析サンプルとした。DNeasy Plant Mini Kit で抽出した DNA を鋳型にして、ショウロ特異的 rDNA-ITS プライマーと SSR 座位特異的プライマー (RrosID-1~4) によって PCR 増幅した (奥田ら, 2014)。

4. 結果

試験区ごとに、クロマツ 56 本 (14 菌株×4 本) に対するショウロ菌感染クロマツの本数割合を図 3 に示した。播種から菌根観察までの管理期間が約 5 か月間の試験区 1 と試験区 2 は、いずれの菌株とも菌根の形成は認められなかった。管理期間が約 1 年 1 か月の試験区 3 と試験区 4 は菌根形成が観察され (写真 3)、それぞれの感染率は 82% と 54% であった。

試験区 3 と試験区 4 について、菌株ごとのクロマツ感染本数を図 4 に示した。接種菌 No. 5 と No. 7 は試験区 4 の方が多く、また No. 8 と No. 12 は同数であったが、この他の 10 菌株は試験区 3 の方が多かった。試験区 3 はいずれの菌株とも感染は 2 本以上であったが、試験区 4 は感染が 2 本未満となる菌株を認めた。

rDNA-ITS プライマーと 4 種類の SSR プライマーによって得られた DNA 増幅産物の電気泳動像を写真 4 に示した。各プライマーにおいてみられる DNA バンドのサイズは奥田ら (2014) の泳動パターンと一致し、解析サンプルはショウロによる菌根と判定した。

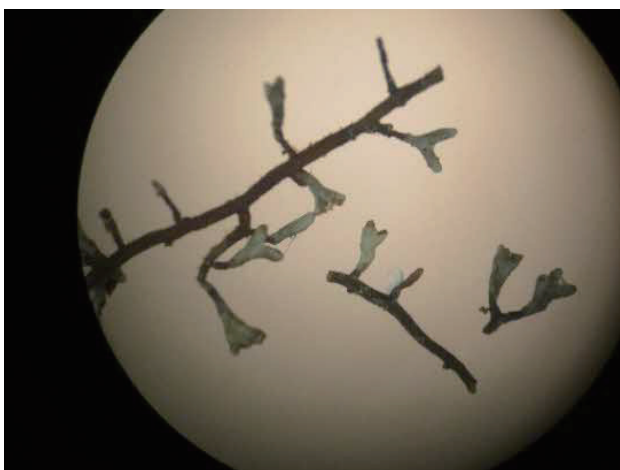


写真 3. 菌根の実体顕微鏡観察

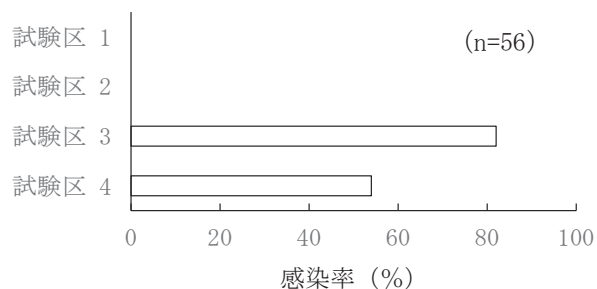


図 3. 各試験区の感染クロマツ本数割合

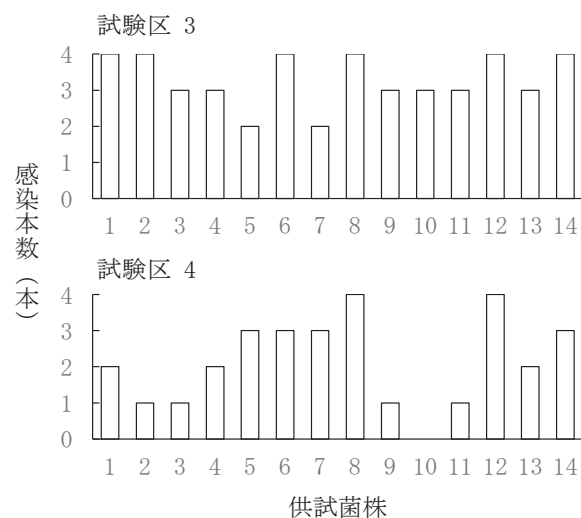


図 4. 供試菌株ごとのクロマツ感染本数

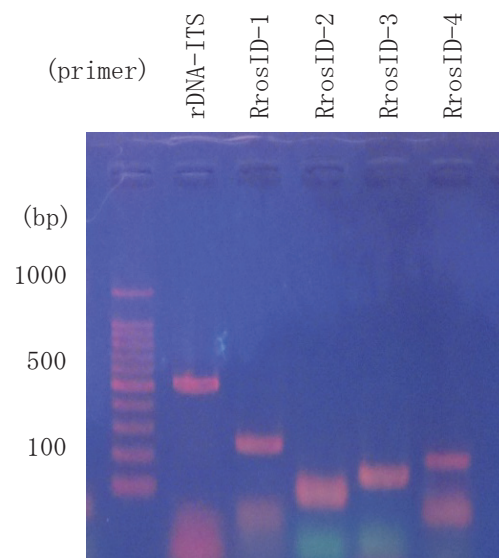


写真 4. 菌根由来 DNA 断片の電気泳動像

IV 考察

ショウロ栽培系統を選抜するための予備試験として、保有菌株を用いた培養試験を行った結果、供試菌の菌糸伸長速度には大きなばらつきがみられた。菌糸生長量と菌根形成率や子実体収量との関係は明らかにされていないが、土壌中で速やかに菌糸が蔓延することは優れた栽培特性の一つと考えられる。菌糸生長に関する特性は菌株の保存や拡大培養をしても損なわれまいと考えられ（玉田，2004），系統選抜の早い時点で培養試験を行って、特性を把握しておくことは有効と考える。

本試験では、ショウロ菌の培養に菌根菌用の各種合成培地（赤間ら，2008）を使用せずに、腐朽菌用として広く用いられている PDA 培地を使用した。すべての供試菌を培養することができた。今後、菌株数を増やして試験を行う際に、市販試薬から容易に調製できる簡便な方法として利用できると考える。

AFLP プロファイルにもとづく推定ではあるが、当センターのほ場には遺伝的に多様な複数のショウロ系統が分布していると考えられた。このことは、菌糸伸長速度のばらつきからも推測される。このように遺伝的な多様性が維持される理由として、ショウロは地中に子実体を形成し、胞子は子実体の近くにとどまることが多く、自家交配や近接する別の個体との交配によって、狭い範囲で交配個体の新規分布が繰り返されるためと考えられる。ほ場では自生地に比べて多くのショウロ子実体を容易に見つけることができ（富川，2006），加えて多様な菌株が得られるのであれば貴重な採取地と考えられる。

菌糸伸長速度が比較的速かった菌株が遺伝的に近い関係にあったことに注目した。すでに得られている子実体の発生時期と重量に関するデータや、これから詳細を確かめる菌根形成率についても菌株間に近縁関係がないかを解析して、系統選抜における遺伝的手法として応用できないか検討したい。

野外でショウロ菌の土壌接種源をクロマツ根系に接種するための手順と、菌根形成を観察するた

めの 2 通りの試験スケジュールが確認できた。これらは、ショウロ感染クロマツ苗を生産する際の参考になるため、実用面においても有益な情報である。菌根形成を認めた 2 試験区は播種から観察までが 1 年以上と長期に及ぶため、感染がショウロ菌であったことの確認が必要であったが、根の組織を含めた菌根由来サンプルの DNA 解析手法（奥田ら，2014）が実証できた。

今後は、プロトプラスト作出（玉田，2004）や変異株誘導（Gao et al., 2017）によって得られる菌株を比較し、接種試験では菌株当たりのクロマツ本数を増やして系統選抜する計画である。このためには迅速な評価が必要となり、実験室内での試験（松浦・佐々木，2023；霜村，2019）やクロマツ根系の成長を促す管理（藤原，2021）を参考にしたい。さらに、クロマツ根量当たりの菌根形成数によって感染程度を定量化できれば、より精度の高い選抜ができると考える。また、ショウロの胞子接種試験では感染後のクロマツ根鉢に本種の子実体を認めており（富川ら，2021），子実体形成の程度を選抜条件にすることや、交雑育種（Nakano et al., 2015）を検討している。

V 謝辞

ショウロの DNA 解析手法についてご指導いただいた元鳥取大学農学部の松本晃幸教授、並びに菌蕈研究所の奥田康仁主任研究員には心から感謝の意を表します。また、本試験を実施するにあたり、ショウロ菌株、ショウロ感染クロマツ苗およびクロマツ種子を快く提供していただいた、元滋賀県森林センターの太田明氏、島根県林業種苗協同組合に加入されている苗木生産者および島根県農林水産部森林整備課に、この場をかりてお礼を申し上げます。

引用文献

- 赤間慶子・岡部宏秋・山中高史（2008）様々な培地上における外生菌根菌の成長様式。森林総研報 7（4）：165-181。
泉津弘佑（2012）日本産ショウロ「子実体過剰形

- 成株」の分子遺伝学的解析. 科学研究費助成事業. 2010年度実績報告書. <https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-22880017/228800172010jisseki/> (2014年ダウンロード).
- 藤原直哉 (2021) 菌根性きのこのコンテナ感染苗育成技術の開発. 岡山森林研報 36 : 1-7.
- 松浦崇遠・佐々木史 (2023) セルトレイを用いたクロマツ菌根苗の簡便な作製方法. 富山森林研報 15 : 12-21.
- 宮崎恵子・富川康之・古賀美紗都・陶山大志 (2017) クロマツコンテナ苗へのショウロ接種方法の検討. 日本きのこ学会第21回大会講演要旨集 : 63.
- 中島寛文・栗田悟・松田陽介・肘井直樹 (2018) 異なる菌根性子実体が優占した海岸土壌で育てたクロマツ実生の初期成長と菌根形成状況. 中部森林研究 66 : 49-50.
- 奥田康仁・舩戸知聖・霜村典宏・松本晃幸 (2014) 外生菌根菌ショウロの検出用特異的 rDNA-ITS および SSR プライマーの開発. 日菌報 55 : 29-34.
- Qi Gao, Shota Nakano, Tadanori Aimi and Norihiro Shimomura (2017) Isolation of halophilic strains induced by ethyl methanesulfonate in *Rhizopogon roseolus*. Mushroom Science and Biotechnology. 24 (4) : 182-186.
- 霜村典宏 (2019) 外生菌根菌ショウロの人工栽培に関する研究. 日本きのこ学会誌 26 (4) : 148-155.
- Shota Nakano, Kiyomi Sawada, Qi Gao, Tadanori Aimi and Norihiro Shimomura (2015) Production of a salt tolerant strain by cross-breeding in the ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon roseolus* (= *R. rubescens*). Mushroom Science and Biotechnology. 23 (2) : 75-79.
- 玉田克志 (2004) ショウロ子実体組織から分離した菌糸体の特性. 東北森林科学会誌 9 (1) : 30-33.
- 富川康之 (2006) 子実体懸濁液散布によるクロマツ苗畑でのショウロ栽培. 島根中山間セ研報 2 : 43-49.
- 富川康之 (2010) ショウロ. (地域食材大百科 4. 農文協編) : 374-376.
- 富川康之・宮崎恵子・陶山大志 (2021) 胞子接種によるクロマツへのショウロ菌感染条件—マルチキャビティコンテナでの育苗における培地基材の検討—. 島根中山間セ研報 17 : 11-19.
- Yasuhito Okuda, Norihiro Shimomura, Chisato Funato, Eiji Nagasawa and Teruyuki Matsumoto (2013) Genetic variation among natural isolates of the ectomycorrhizal hypogeous fungus, *Rhizopogon roseolus* from Japanese pine forests inferred using AFLP markers. Mycoscience. 54 : 13-18.