

# マツタケ (*Tricholoma matsutake* Sing.) の人工培養 (第1報)

## (マツタケ子実体からの菌糸の分離と培養)

河邊誠一郎・田所美穂\* (旧姓黒田)・星野卓二・浜田博喜

岡山理科大学理学部基礎理学科

\*三重県多気郡明星小学校

(昭和61年9月30日 受理)

### 緒言

マツタケは担子菌類のマツタケ目, シメジ科, キシメジ属に属し, 活物寄生菌として, 主に赤松の根に寄生し, そこに菌根を形成しつつ栄養を求め生活している。この菌根は根の先端, 細根部に形成され, 根の成長と共に菌根の活生部位も移動する。その為, 寄生樹を中心に年々同心円状の菌根部分 (一般に“シロ”と呼ばれる。また茸輪— fairy ring とも呼ばれる) を前進させ, この輪状の部分からのみ松茸 (キノコまたは子実体— fruiting body) を発生させる。

活物寄生, しかも赤松を中心に針葉樹の細根部にのみ寄生して生活するキノコであるが故か, その菌糸体は, 他のキノコ類に比較し, 長寿命は示すもののその菌体の生育適応能力は非常に弱い (生育可能温度 5~28°C, 同 pH 3~6.5)。

また繁殖速度も宿主の成長に合わせるごとく遅い。更に子実体から産出される胞子の繁殖能力も非常に弱い。

マツタケの菌体は, その宿主の状態だけでなく, 環境, 気候, 土壌などあらゆる微妙な条件が揃ってはじめて生育をはじめ。足利の昔から, マツタケの収穫量は少なかったようで, 貴重品扱いされてきたが, 近年の石油文明に伴う山の環境の悪化により, その生産量は激減, 今や庶民には高嶺の花になってしまった。この最大の原因に, 人が山の手入れをしなくなったが為に, 良好な状態のマツタケの“シロ”の絶対量が減ったことが挙げられている。これに対し, 人工的に新しいシロをつくることができれば, 必然的に生産量は増える。こういう試みは, 江戸時代から行われてきたが, 近年まで確実な成功例は報告されていなかった。

マツタケの人工増殖の方法には, 大きく分けて次の2通りが考えられる。即ち(1), 従来通り赤松の苗木または細根にマツタケ菌糸を寄生させ, 野外で増殖させる方法, (2), 人工

容器，培地中で無菌的にマツタケ菌糸のみを増殖させる方法である。(1)については1983年になって，広島県立林業試験場の枯木らがマツタケ菌の人工感染苗を松林に移植したものに子実体(マツタケ)を初めて発生させることに成功<sup>1,2)</sup>している。しかし無菌的に赤松を種子発芽させ，それに菌を感染させた後6年経過後にやっと1本。その後の山の手入れ等の難問も含め量産には課題が多い。(2)については，これまで浜田(京大農)，小川(農林省)，をはじめ田添，富永(広島農短)，西門(大原農研)，岩村，白石(岡大農)，小原(同志社)，衣川(大阪府大)，山田(兵庫教育)，川合(農林省)，広本，三村(農林省)，稲葉(近大農)，越島(京大農)など，多くの研究者達によりあらゆる方面から研究され，人工培養に関する多くの知見が報告<sup>3-21)</sup>されている。しかし，再現性に欠ける点も多く，またマツタケ菌糸の短期大量増殖にも良い結果が得られておらず，未だ子実体形成に至っていない。菌体の生長が極めて遅く，ひ弱な性質に加え，今日のマツタケ入手難(kg当り2~10万円)も原因し，マツタケの研究を手掛ける研究者は減る一方である。そんな中で我々は岡山大学名誉教授，白石の研究<sup>11,22)</sup>を引き継ぎ，菌糸体の大量増殖，子実体の発生機構の解明に取り組んでいる。今回これまで検討した様々な問題のうち，マツタケ菌糸の分離と増殖に関するいくつかの知見に関し報告する。

## 実験方法

### 1. 試料および培地

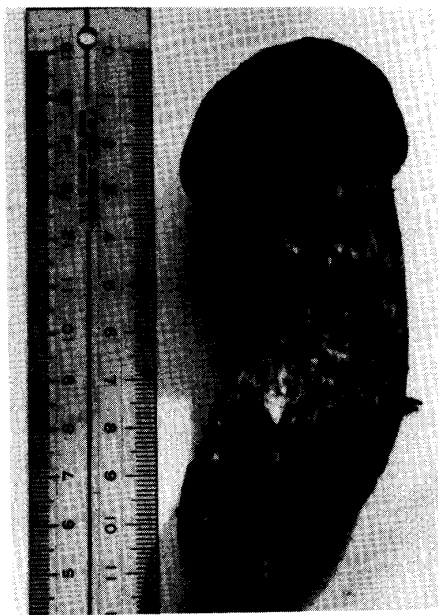


写真1 菌糸分離に使用したマツタケ子実体(つぼみ)  
広島県御調産

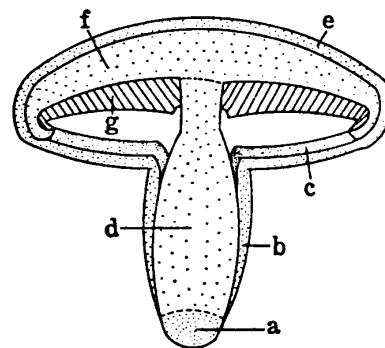


図1 マツタケ子実体の縦断模式図  
a: いしづき, b: 茎の外皮膜  
c: 内皮膜, d: 茎の内部組織  
e: 傘の外皮膜, f: 傘の内部組織  
g: ヒダ。

- a). 菌体分離用子実体：広島県御調産の未開傘マツタケ (ツボミ) (写真1) のヒダ部分 (図1) を使用した。
- b). 培養培地：浜田培地を中心に、合成培地 I, II, 改良GP培地 (表1) を使用した。

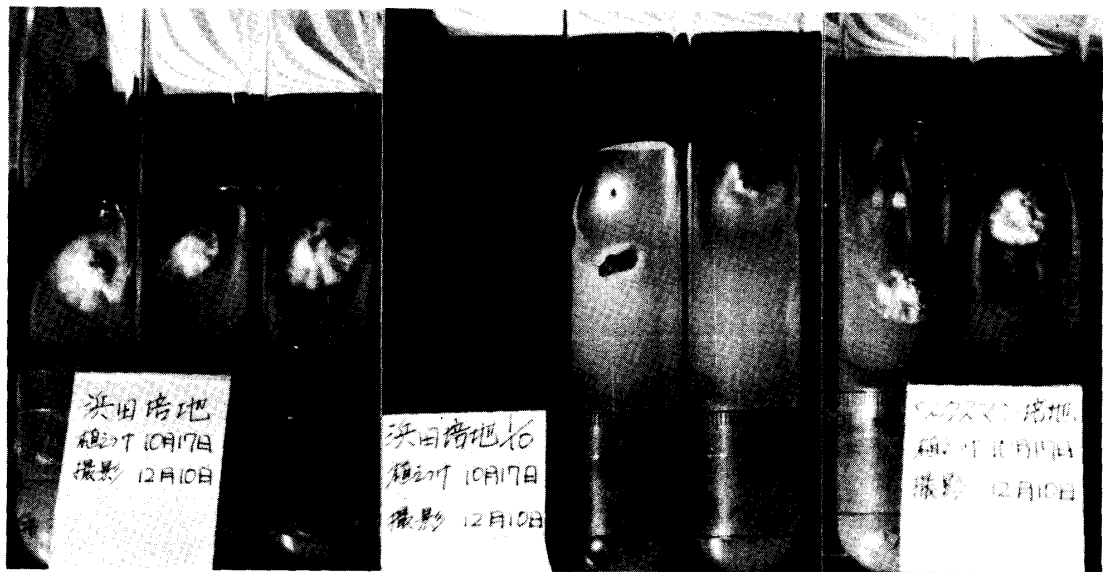
表1 培地組成

浜田培地	改良GP培地	合成培地 (I)	合成培地 (II)	ワックスマン培地
グルコース 20g 乾燥酵母 5g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g	グルコース 20g イーストエキス 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g	グルコース 20g 乾燥酵母 5g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g	グルコース 20g 乾燥酵母 5g	グルコース 10g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1g
————— —————	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g ポリペプトン 5mg	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.1g ポリペプトン 3g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g ポリペプトン 5g
—————	塩酸チアミン 1mg	塩酸チアミン 50mg 麦芽エキス 1g	クエン酸鉄 1g ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 8mg MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 8mg CaCl <sub>2</sub> 55mg CoCl <sub>2</sub> 5mg	—————

寒天 15g, 蒸溜水1000mL pH. 5.5 (ワックスマン培地のみ 5.0)

2. 培養条件

- a). 菌体分離：採取後1~2日以内の未開傘マツタケを70%エタノールで表面消毒した後、そのひだ部分を5mm角に切り取り所定の方法で各種培地に植え付けた。
- b). 培養条件：培養は25°C, 暗所下, 寒天固体培地で行なった。培地の pHは5.5 (一部5.0) に調製した。



浜田培地

1/10 希釈浜田培地

ワックスマン培地

写真2 マツタケ子実体 (ヒダ部分) からの菌糸分離

- c). 菌糸成長測定：2 mmの同心円を描いたB 5 東洋沓紙を寒天培地上にのせる．あらかじめ浜田培地で培養，増殖させたマツタケの菌体を4 mm径のコルクボーラーで切り，沓紙の中心部分にのせ，一定期間ごとに菌体の成長距離を測定した．（写真2）

### 3. 菌体染色と顕微鏡観察

HCl-ギムザ法<sup>23)</sup>により核の染色を行ない顕微鏡（オリンパスBH-2）下で観察した．

#### 実験結果および考察

##### 1. 菌体分離

純粋培養菌体の分離には次の3方法，①．孢子からの分離，②．子実体組織を切り取り分離培養，③．菌根から分離，が挙げられ，各々について検討した．その結果①の方法ではある程度の開傘マツタケが必要で，寄生蠅などによる汚染の確率が高くまた孢子の生命力も弱く，少ない試料数による実験でもあり，良好な無菌孢子が得られなかった．③の方法も土壌中の菌根（赤松細根寄生菌）を使用するため，既に数多くの雑菌に染汚されており，繁殖力の弱いマツタケ菌糸のみを純粋培養することは出来なかった．

そこで②の方法を中心に菌糸体の分離を試みた．浜田<sup>3)</sup> 広本<sup>18)</sup>らは，分離培地として $\frac{1}{10}$ 希釈の浜田培地，または生松葉の煎汁培地などが最も適しており，他に $\frac{1}{4}$ 量の土壌浸出液を加えた合成培地やビタミンB<sub>1</sub>添加合成培地なども良いとの報告をしている．そこで我々は，それらの報告を参考に，次の11種の培地を用い分離培養を試みた．1)浜田培地，2) $\frac{1}{10}$ 希釈浜田培地，3)ワックスマン合成培地，4)ワックスマン培地+イーストエキス（500mg）添加培地，5) $\frac{1}{10}$ 希釈ワックスマン培地+土壌浸出液（500ml）（アカマツ土壌1 kg/l蒸溜水，1時間煮沸し口過），6) $\frac{1}{10}$ 希釈ワックスマン培地+松葉浸出液（500ml）（赤松の葉30g/500ml蒸溜水，40分煮沸し口過），7)~8) $\frac{1}{10}$ 希釈浜田培地+同土壌浸出液（250ml，500ml）添加，9)~11) グルコース液（0g，1g，10g）+赤松葉浸出液（同1l）添加培地．

その結果，写真2に示したように，浜田培地， $\frac{1}{10}$ 希釈浜田培地，ワックスマン培地の順に発育良好で純粋なマツタケ菌糸体を分離することに成功した．土壌及び松葉浸出液添加培地では，菌糸の分離はできなかった．これらは，本実験に使用した子実体（つぼみ）は汚染度，寄生度が低く富栄養培地下でも他の雑菌に影響されず菌糸の生育ができたこと，一方，浸出物の煮沸が有効な成分の失活につながり更にタンニンなどの成分による阻害がおきたことなどが考えられ，煮沸方法や時間，添加物量の検討が必要と考えられる．分離に成功した3培地のうち，浜田培地からは白色菌体が，ワックスマン培地からは褐色菌体が得られた．後の増殖培養の実験よりワックスマン培地にイーストエキスを添加すると，よ



写真3 マツタケ培養菌糸体拡大(約2倍)写真  
培地: 浜田培地

り成長が速くなり、菌体も白色になったことから、イーストエキス中に含まれるビタミン、アミノ酸などの天然有機成分が、色と成育に影響を与えているものと考えられる。浜田寒天培地上で培養した菌糸体(約180日培養100ml 三角フラスコ中)の様子を写真3で示した。菌糸体(コロニー)は中心部がもり上がり、ブラシ状に菌糸が立ち、菌糸の枝分かれがはげしい。周辺部はつやのある半透明密な状態の菌糸の成長が見られシワが寄っている。このほか、傘の上部、軸部分(図1)からの分離も可能であるが、それらの部位は菌糸の成長開始が極端に遅かったり、蠅(フタオビショウジョウバエ)の寄生が見られ雑菌汚染の率も高く、更にイシヅキ(根際部分)からは、100%近いモルティエレラ菌が発生するなど、検討は行なったが、いずれも成功しなかった。

## 2. 分離菌体の顕微鏡による確認

分離培養できた菌体は条件により主菌糸、側菌糸、つる状菌糸、空中菌糸、貯蔵菌糸、菌糸束など様々な形態を示し、分離に成功したか否かの確認は容易ではない。

我々は次に挙げた5つの特徴、1)遅い成長速度、2)つやのある菌体コロニー、3)菌体の菌ざわり、4)菌体の匂いと味、5)顕微鏡による子実体組織(菌子束)中の菌糸との比較(菌糸の状態、2核菌糸の確認)を検討し、いずれの点にも当てはまることから、マツタケ菌糸であることを確認した。HCl-ギムザ法<sup>23)</sup>により菌糸を染色した後、600~1500倍での顕微鏡観察を行ない、その様子を写真4に示した。

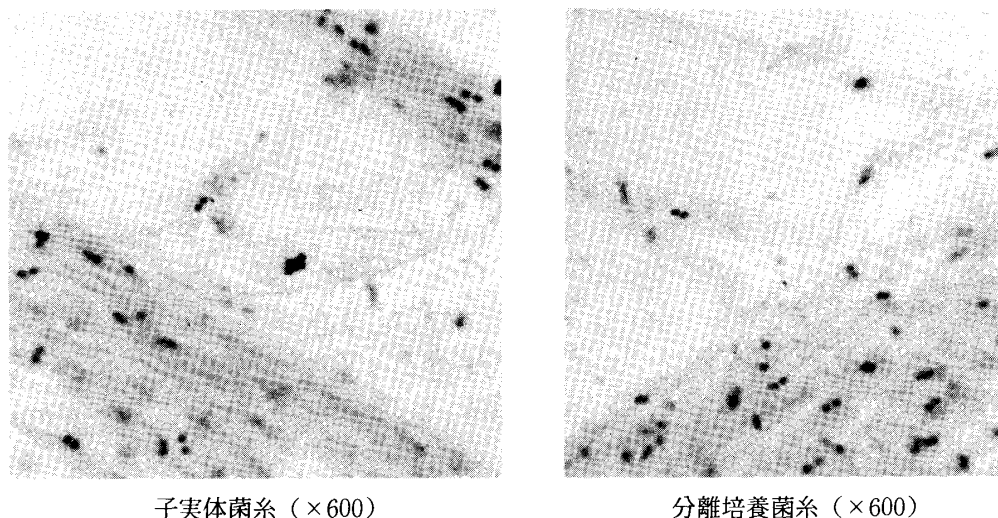


写真4 顕微鏡で見た菌糸 (HCl-ギムザ法にて核染色)

### 3. 培地組成による菌体成長の比較

マツタケの人工培養の研究における最終目標は、フラスコ中での子実体の発生であるが、その為にはその母体となるべき菌糸体の早期大量増殖が不可欠である。これまで報告されている培養マツタケ菌糸の成長速度は1 mm伸びるのに2~4日を要するとされ、非常に遅いのが現状である（この性質がマツタケ菌のマツタケ菌たる所以であるが）。そこで菌糸体の成長を促進させるのに有効な成分の検討を行なった。基本培地には浜田培地を用い、他組織培養に際し効果が認められる天然栄養素、ココナツウォーターをはじめ、カゼイン水解物、アミノ酸などの効果をみると共に、白石ら<sup>11)</sup>がマツタケ子実体を分析した際に異常に多く検出された銀イオンの有効性も検討した。

その結果を図2, 図3, 図4に示した。低濃度のココナツウォーター, カゼイン水解物, チアミンの添加, および合成培地Ⅱでは基本培地と同等もしくは、或程度の効果が見られる。一方, 培地Ⅰ中, 10m以上のココナツウォーター, 3 mg以上のグリシン, 有機銀(酢酸銀, プロテイン銀)の添加により伸長速度は著しく低下している。ここに示した以外に, マツタケの培養に効果があると考えられる赤松の根およびその抽出物, 各種ホルモン, ビタミン, アミノ酸, 無機塩類等, 様々な添加物についても検討しているが, これまでの所, 浜田培地を著しく上回る結果は得られていない。本実験は, 一般の菌糸の成長状態をもとに, 平面方向の成長のみを考えて行なったものである。ところが写真6に示すように, 合成培地, 改良GP培地, 銀イオン添加培地でのマツタケ菌糸体の状態は, 単なる平面方向への伸長成長だけでなく, 立体的にも成長していることが判明し, これら添加物が必ずしも成長を阻害しているわけではないと考えられた。むしろ子実体発生時には, このような物質は菌糸体を集束させ, 子実体原基を形成させ, マツタケ子実体へと成長さ

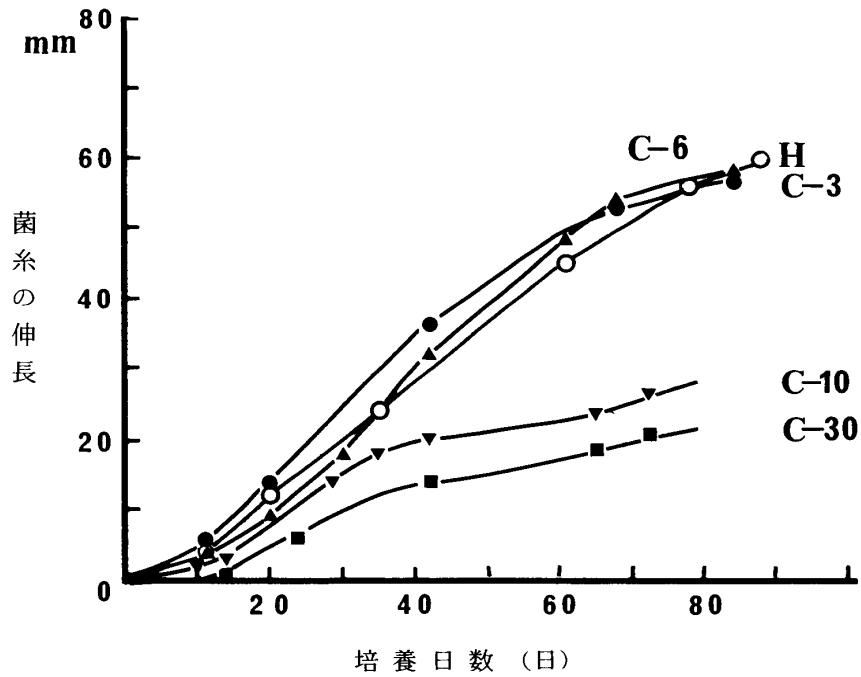


図2 マツタケ菌糸の伸長に及ぼすココナツウォーターの影響 (I)  
 基本培地: 浜田培地 (H)  
 C-3: 浜田培地にココナツウォーター 3ml/l 添加培地

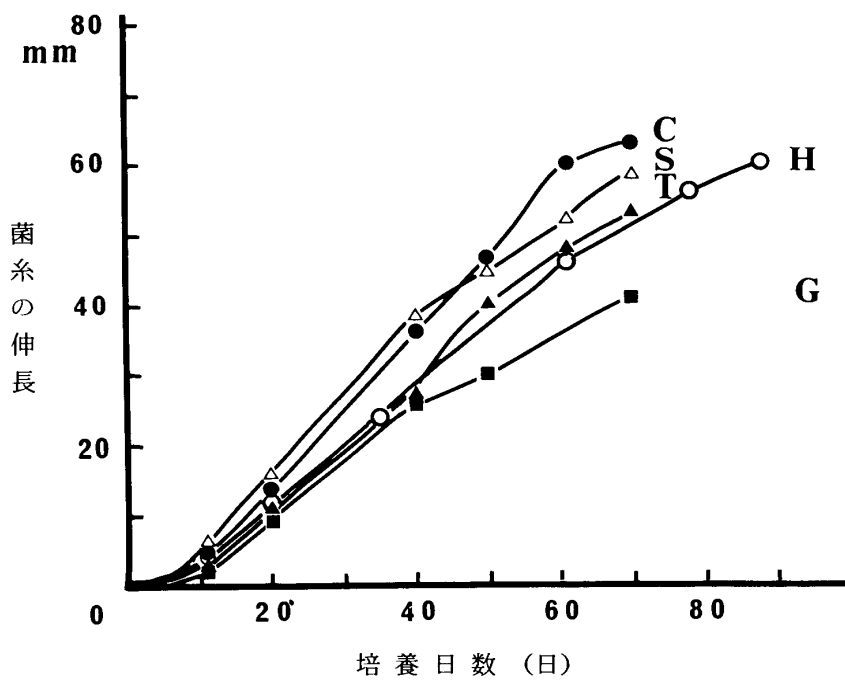


図3 マツタケ菌糸の伸長に及ぼす培地の影響 (II)  
 H: 浜田培地, S: 合成培地 II, C: カゼイン水解物 1g/l 添加浜田培地,  
 T: 塩酸チアミン 0.1mg/l 添加浜田培地, G: グリシン 3mg/l 添加浜田培地

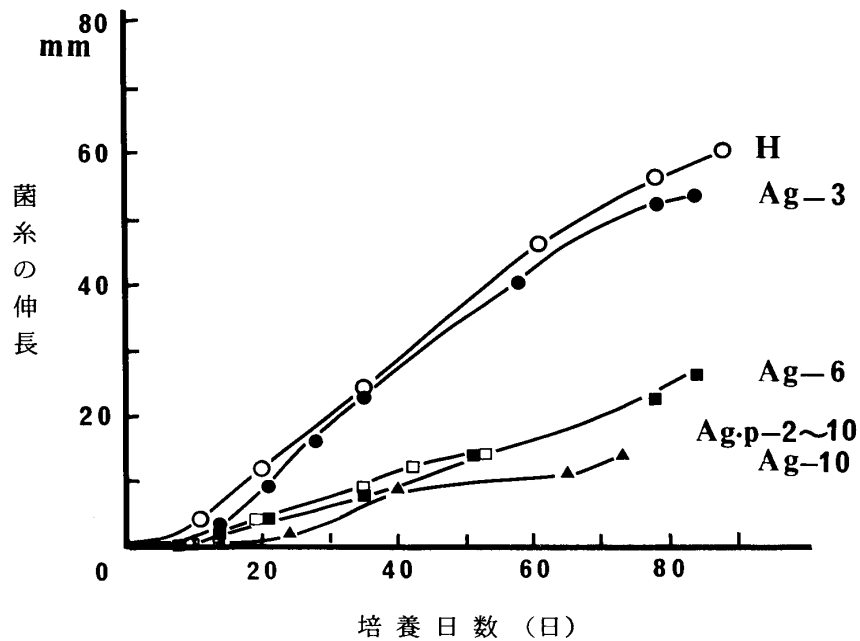


図4 マツタケ菌糸の伸長に及ぼす有機銀の影響 (Ⅲ)

基本培地：浜田培地 (H)，

Ag-3：浜田培地に酢酸銀 3mg/l 添加培地

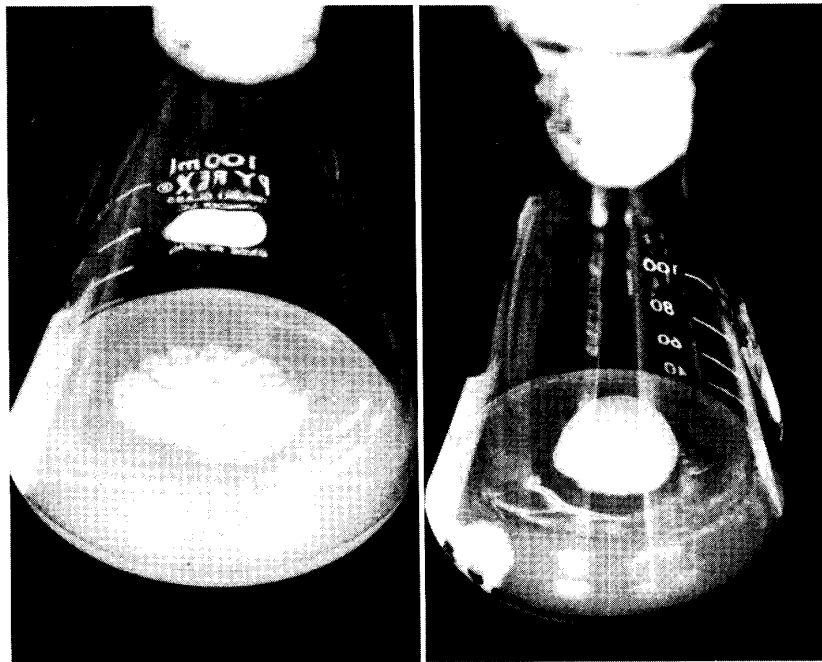
Ag-p-2：浜田培地にプロテイン銀 2mg/l 添加培地



写真5 同心円沓紙上での菌糸の成長測定

せるうえで重要成分となる可能性も考えられた。この傾向が見られた培地のうちの合成培地 I に関し、その因子を検討した。浜田培地に麦芽エキス、硫酸アンモニウム、ポリペプトン、塩酸チアミンを加えた培地 (合成培地 I—表 I) でのマツタケ菌糸体の形状は、写真 7—a に示すように、横だけでなく、縦方向の伸びも著しい。この培地より、ポリペプトン、塩酸チアミンを抜いた場合も (写真 7—b, 7—c) 同様に縦方向の伸長が認めら

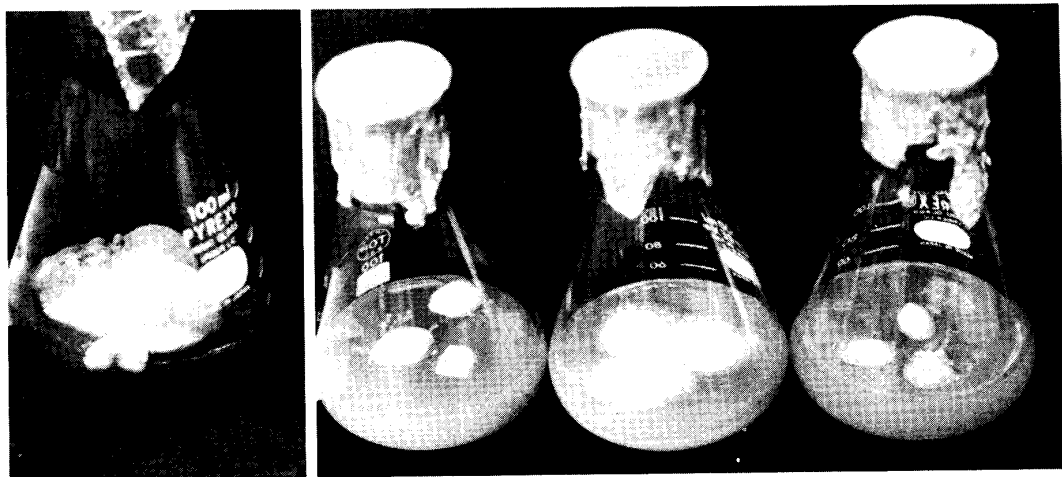




浜田培地

改良GP培地

写真6 マツタケ培養菌糸体の形状 (I)



合成培地 I (a)

ポリペプトン欠 a 培地(b)

浜田培地

塩酸チアミン欠 a 培地(c)

写真7 マツタケ培養菌糸体の形状 (II)

れた。これらの結果をもとに、平面伸長の傾向が著しい浜田培地と、縦方向の成長傾向もある各々の培地組成との違いを表 I に纏め比較した。その相違は、 $MgSO_4$ 、 $NH_4NO_3$ 、 $AgNO_3$ の存在、またはそれらと酵母エキス (麦芽エキス) との相剰効果的働きが考えられ、さらに添加による濃度変化、pH変化なども考えられた。いずれにせよ、無機塩類のもと、微妙なバランスの変化による形状の変化が考えられた。本実験では、こ

れ以外の条件下での成長培養は良い結果が得られなかったが、更に様々な添加物による効果や相剋および拮抗作用、物理的要因などについても検討中である。

この他、様々な担体（支持体）の効果、赤松カルスへの菌糸の寄生、液体培地中での成長測定と子実体発生などに関する検討も行なっている。

本研究は、恩師白石正英岡山大学名誉教授の研究を引き継いだものである。研究に際して適切な御指導、御助言をいただき厚く御礼申し上げます。また本研究の一部を担当してくれた高杉（旧姓猪木）康子、川西（旧姓小江）薫、吉川恵司、柳井佐智子、大石敏行君に感謝致します。

#### 文 献

- 1) 枯木熊人：朝日新聞 10月22日（1983）.
- 2) 枯木熊人：採集と飼育，**47**（10），431（1985）.
- 3) 浜田稔：植雑，**63**，40（1950）.
- 4) 浜田稔：日菌報，**16**，406（1975）.
- 5) 浜田稔，小原弘之：マツタケ（農山漁村文化協会）（1978）.
- 6) 小川真：マツタケの生物学（築徹書館）（1984）.
- 7) 小川真：日菌報，**17**，492（1976）.
- 8) Ogawa, M.: Mori, **2**（B），**6**（1976）.
- 9) 富永保人：マツタケ栽培の実際（養賢堂）（1980）.
- 10) 西門義一：大原農研報告，**8**，443（1936）.
- 11) 白石正英：岡山大学卒業研究論文（1970～ ）.
- 12) 小原弘之：醗酵と工業，**34**，751（1976）.
- 13) 小原弘之：遺伝，**34**（11），31（1980）.
- 14) Ohara, H. and Hamada, M.: Nature, **213**，528（1967）.
- 15) 衣川堅二郎：大阪府大紀要，農学，生物学 **14**，27（1963）.
- 16) 山田卓三：第9回植物組織培養シンポジウム大会要旨 p47（1985）.
- 17) 川合正允：日菌報，**17**，168（1976）.
- 18) 広本一由：日菌報，**16**，198（1975）.
- 19) 三村鐘三郎：日山林会報，**312**，1（1908）.
- 20) 稲葉和功：日本木材学会陳韓婁旨 p291（1986）.
- 21) 越島哲夫：醸協，**72**（12），851（1986）.
- 22) 白石正英，河邊誠一郎：食品照射，**11**（2），1（1976）.
- 23) Jacobson, W. and Webb, M.: Exp. Cell Res., **3**，163（1952）.

Artificial Culture of *Tricholoma matsutake* ( I )

— Isolation and Culture of Hyphae from *Tricholoma matsutake* Fruiting Body —

Seiichiro KAWABE, Miho TADOKORO\*,  
Takuji HOSINO and Hiroki HAMADA

*Department of Fundamental Natural Science, Okayama University  
of Science, Ridai-cho 1-1, Okayama 700, Japan*

\* *Myojyo Primary School, Meiwa-cho, Taki-gun, Mie 515, Japan*

(Received September 30, 1986)

*Tricholoma matsutake* is one of the parasitic fungi which weakly grow not only on the artificial culture media, but on the field. The isolation of *Tricholoma matsutake* hyphae and the culture of the hyphae were investigated in a test tube.

We have been able to isolate hyphae using explants from gills of unspread cap of *Tricholoma matsutake* fruiting bodys. For the isolation of hyphae, it was concluded that the best medium was Hamada medium, the next one was 1/10 conc. Hamada medium and the third one was Waxman medium. Hamada medium has been mainly used for the culture medium because the better growthes of hyphae (60 mm/90 day) were achieved. The growth (elongation) rates of the hyphae were scarcely regarded as significant by the various additions. While, the forme of the mycelia were regarded as significant by the additions of inorganic salts and metal ions.