

ハナイグチとシロヌメリイグチの培養性質

村 田 義 一*

Cultural characteristics of
Suilla grevillei and
S. laricinus
Yoshikazu MURATA*

要 旨

ハナイグチとシロヌメリイグチの菌糸成長に最適なC - N比の範囲は、菌株によって、80 以下、40 以下、40 に分かれた。全供試菌株に共通した最適C - N比は40であった。

単糖類や寡糖類では、グルコース、マンノース、トレハロースがハナイグチの菌糸成長によく利用された。そのほか、フルクトースやセロピオースを利用できる菌株もあった。一方、シロヌメリイグチでは、これら以外に、マルトースがよく利用された。多糖類では、ハナイグチはイヌリン、デンプン、グリコーゲンをほとんど利用しなかった。これに反し、シロヌメリイグチはデンプンやグリコーゲンを単独でも炭素源として利用できそうであった。それらに少量のグルコースを添加したとき、無添加やグルコース単独のときに比べ、菌糸成長は明らかに旺盛であった。リグニン、セルロース、ガラクトロン酸はハナイグチやシロヌメリイグチに利用されなかった。

ハナイグチやシロヌメリイグチの菌糸成長に適した窒素源は、アンモニア態窒素化合物、尿素、アミノ酸の一部とそれらのアミド、蛋白質関連物質のペプトンやカザミノ酸であった。硝酸態窒素化合物は多少利用される程度であった。アミノ酸類では、アラニン、セリン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニンが一般によく利用された。菌株によっては、これらのアミノ酸類の多くはアンモニア態窒素化合物よりも有効な窒素源と考えられ、なかには、単独でも、カザミノ酸よりも菌糸成長に有効なものがあつた。

ハナイグチやシロヌメリイグチの菌糸成長適温は、どの菌株でも、20～25 の範囲にあつた。

ハナイグチは初期pHが5ないし6未満のかなり広範なpH域で、菌糸成長が非常に旺盛であつた。pH6以上では菌糸成長は急激に悪化し、アルカリ側ではほとんど成長しなかった。一方、シロヌメリイグチのpHに対する反応は菌株によって異なり、ハナイグチのような一定の傾向が認められなかった。

ハナイグチやシロヌメリイグチは、チアミンによって菌糸成長が非常に促進された。その最低有効濃度は25～50 μ g/ℓであつた。ビオチン、葉酸、ニコチン酸は一部の菌株では有効であつた。塩酸ピリドキシン、パントテン酸などのビタミン類は、菌糸成長に効果がなかつた。

風乾したカラマツ葉のアルコール抽出液は、ハナイグチやシロヌメリイグチの菌糸成長を著しく促進した。その効果は0.7～1.4% (v/v) の低濃度でも顕著であつた。

ハナイグチやシロヌメリイグチの培養性質は、菌株によってかなり異なつた。このことは一般的な種

* 北海道立林業試験場 Hokkaido Forestry Research Institute, Bibai, Hokkaido 079 - 01

内変異を意味していた。種間では、後者はマルトースをよく利用し、デンプンやグリコーゲンの分解能が高いと思われる点で、前者と生理的性質が異なった。なお、供試菌株のなかには、カラマツに外生菌根をつくりにくいものが含まれていたが、それらの特徴は、アミノ酸類を単独ではあまり利用できないことにあった。

はじめに

ハナイグチ *Suillus grevillei* とシロヌメリイグチ *S. laricims* は、カラマツによく発達した外生菌根をつくる(村田 1991)。それらのうち、シロヌメリイグチの子実体は数年生の若いカラマツ人工林で見られ、ときには、カラマツの苗畑に発生することもある。一方、ハナイグチはもう少し樹齢の高いカラマツ林に発生するのが普通である。これら両者の菌根を形態的に識別するのは難しい(SAMSON and FORTIN 1988)が、このような子実体の発生状況から判断すると、シロヌメリイグチはカラマツの先駆的な菌根菌と推測される。

ハナイグチとシロヌメリイグチのこのような生態的特徴は、両者の生理的性質に依存したものでどうかよく分かっていない。ハナイグチの生理的性質は、外生菌根菌の一例として、MELN(1925)以来、多くの研究者によって他の菌根菌と比較されてきた。しかし、シロヌメリイグチの生理的性質は、現在まで、ほとんど調べられていない。したがって、ハナイグチとシロヌメリイグチの生理的性質を比較検討した報告はみあたらない。両者の菌根を正確に認識し、それらの生態的意義を明らかにするためにも、なお一層、生理的知見の蓄積が望まれている。

ハナイグチやシロヌメリイグチは、菌株によって菌根形成量が非常に異なることが分かっている(村田 1991)。保存期間や寄主が同じ場合でも、供試菌株の採集地が数十 km 離れているだけでこのような違いが生じた(村田 1991)。LAIHO(1970)やMARX(1981)は、ヒダハタケ *Paxill involutus* やコツブタケ *Pisolithus tinctorius* でも、同様の現象を報告している。今のところ、このような違いが供試菌株の生理的性質に基づくものかどうか検討されていない。

本稿では、ハナイグチとシロヌメリイグチの生理的性質を比較検討し、それらの知見をとおり、シロヌメリイグチがカラマツの先駆的な菌根菌として定着しうる可能性を考察した。また、それらの菌根菌による菌根形成の難易が、種内の生理的性質の違いを反映したものかどうか議論した。

材料と方法

本稿では、菌根菌接種試験(村田 1991)のときのハナイグチ 3 菌株とシロヌメリイグチ 2 菌株を用い、一連の培養性質を調査した。供試菌株の不足を補うため、必要に応じ、道内各地で採集したその他の菌株も併用した。これらの菌株は、供試時まで、村田(1991)と同様にして保存した。培養性質の調査に先立ち、保存菌株は B - 2 寒天培地(村田 1991)で前もって培養し、それらの菌叢先端部から直径 0.6cm の寒天板を接種源として採取した。下記の培養は、特に明記した場合を除き、100ml の三角フラスコに分注した 10ml の B - 3 液(村田 1991)で行った。チアミンは別途無菌的に添加した。pH 試験とカラマツ風乾葉抽出液の効果検定のときを除き、1.2 気圧 10 分のオートクレーブ滅菌後の pH は 5.4 ~ 5.8 であった。培養期間は 20 日、温度試験以外の培養温度は 25 とした。培養終了後、接種源由来の寒天板を含む菌体は、吸引漏斗上で蒸留水で洗浄し、前もって乾燥重量を秤量したアルミ箔を用いて、90 あるいは 105 で 24 時間乾燥した。菌糸成長量は、この乾物重量から、別途秤量した接種源と同一内容の寒天板の乾物重量を差し引いた値で示した。反復数は 6 ~ 8 とした。なお、有意差の検定は t 検定あるいは分散分析によって行った。特に明記した場合を除き、有意水準は $p < 0.05$ とした。

菌系成長に最適な C - N 比（以下，最適 C - N 比という）は，B - 3 液のグルコース量を 0.1% C，0.2% C，0.4% C に変更し，0.00125% N ~ 0.04% N のりん酸水素ニアンモニウムと組み合わせた培養液で調査した。所定の培養後の pH は菌系成長の旺盛な区ほど低下し，供試菌株で若干異なったが，2.3 ~ 2.8 に達した。このため，一部の菌株では，50mM の MES（2 - モルホリノエタンスルホン酸）を添加して再検討したが，培養終了時の pH は最低で 2.9 まで低下し，培養中の pH を完全に制御することはできなかった。

炭素源資化性を調査するため，B - 3 液のグルコースと当量の炭素量を含む各種炭水化物を供試した。供試グルコースは，その 10 g に蒸留水を加えて 100ml とし，口径 0.2 μ m のメンブランフィルターで濾過滅菌して原液とした。上記グルコースと当量の炭素量を含むその他の単糖類，二糖類，三糖類なども，上記と同様にして原液を作製した。B - 3 液からグルコースとチアミンを除き，蒸留水を 900ml に変更した基本培養液 9 ml を滅菌後，上述の原液 1 ml を無菌的に添加した。これらの培養液は 0.4% C の炭素源を含み，C - N 比は 40 になる。イヌリン，デンプン，グリコーゲン，リグニン，セルロースなどの多糖類は，90mg をもって，上記原液 1 ml 中のグルコースと当量の炭素量とみなした。0.04% C の start glucose（NORKRAN 1950）を併用した区では，供試多糖類と合計して 0.4% C になるようにした。これらの多糖類は，上記基本培養液からさらにりん酸水素ニアンモニウムを除外した塩類液 9 ml を加え，イヌリンとデンプン（DIFCO 社製）は加熱溶解後，オートクレーブした。その後，別途濾過滅菌したりん酸水素ニアンモニウムの原液（下記窒素源資化性の項参照）1 ml を無菌的に添加し，0.01% N の窒素源とした。なお，リグニンとセルロースとしては，リグニンスルホン酸ナトリウムおよびカルボキシメチルセルロースナトリウムを用いた。以降，これらは単にリグニンあるいはセルロースと呼ぶ。

- D - ガラクツロン酸一水和物（以下，ガラクトン酸という）は，0.4% C 相当量を上記多糖類のときと同様にして供試した。start glucose との併用区でも同様である。なお，本実験では pH 緩衝液を使用しなかったため，培養終了時の pH は最低で 2.4 に低下していた。

B - 3 液のりん酸水素ニアンモニウムと当量の窒素量を含む各種窒素化合物を用い，窒素源としての有効性を調査した。りん酸水素ニアンモニウムは 0.4715 g を蒸留水に溶かし pH を 5.7 に調整後 100ml とし，メンブランフィルターで濾過滅菌して原液とした。当量の窒素量を含むその他の窒素化合物でも同様とした。B - 3 液からりん酸水素ニアンモニウムとチアミンを除外し，蒸留水を 900ml に変更した基本培養液 9 ml を滅菌後，上記原液 1 ml を無菌的に添加した。これらの培養液では，アミノ酸など炭素を含む窒素化合物の炭素量を考慮しなかったが，それらの炭素量を除くと，C - N 比は 40 になる。菌株と供試窒素化合物によって多少異なったが，pH 緩衝液を使用しなかったため，培養後の pH は最低で 2.4 に低下した。アンモニア態窒素化合物に比べ，アミノ酸類では pH はそれほど低下しなかった。なお，供試したアミノ酸類はすべて L 形とし，ペプトンは OXOID 社製の中性細菌学用，カザミノ酸は DIFCO 社製のものを使用した。

最適初期 pH は，B - 3 液のりん酸二水素カリウムの半量をりん酸水素ニカリウムに変更し，滅菌後 pH を 3.2 ~ 7.7 に調整した培養液で調査した。培養後の pH については，該当箇所考察した。なお，培養開始時の pH のうち，菌系成長が最大であったものを，以降，最適初期 pH という。

ビタミン類の要求性は，チアミンを除外した B - 3 液に，各種ビタミン類 100 μ g / ml 相当量を別途無菌的に添加して調査した。チアミン要求性だけは，それ以下の濃度区でも検討した。接種源は，飢餓操作を行わなかった。

カラマツ風乾葉抽出液は，村田（1991）と同様にして作製した。ただし，pH は 4.9 とした。B - 3 液の蒸留水を 900ml，滅菌前 pH を 4.9 に変更し，その 9 ml を滅菌後，所定濃度の希釈液 1 ml を無菌的

に添加し，原液 0～56ml/l の濃度とした。培養開始時のそれらの pH は 4.7～4.8 であった。pH 緩衝液を使用しなかったので，培養終了時点の pH は 2.4～2.8 に低下していた。

結果と考察

1. 最適 C - N 比

最適 C - N 比は菌株によって若干異なり，ハナイグチ下川 1 - 3 株と美唄 - 4 株，フロヌメリイグチ美唄 - 1 株では 80 以下，シロヌメリイグチ栗山 4 - 1 - a 株では 40 以下，ハナイグチ新得 - 3 株では 40 であった（図 - 1）。このような傾向は，炭素源のグルコース濃度を 0.5% や 0.25% に変更したときも変わらなかった。なお，50mM の MES を添加したときも傾向は同じであった。

川合ら（1976a）によると，マツタケ *Tricholoma matsutake* の栄養成長期の最適 C - N 比は，基準とする窒素源濃度に影響されるものの，一般的には 20 とみなして支障はない。また，エノキタケ *Flammulina velutipes* では同じく 85～90（脇田 1954），シイタケ *Lentinus edodes* では 34（安藤 1972）とされ，ハナイグチとシロヌメリイグチの供試菌株で得られた最適 C - N 比は，これらのきのこ類と類似した範囲にあることを示していた。なお，供試 5 菌株に共通した最適 C - N 比は 40 であったので，以下の実験では，特に明記した場合を除き，C - N 比は 40 に調整した。

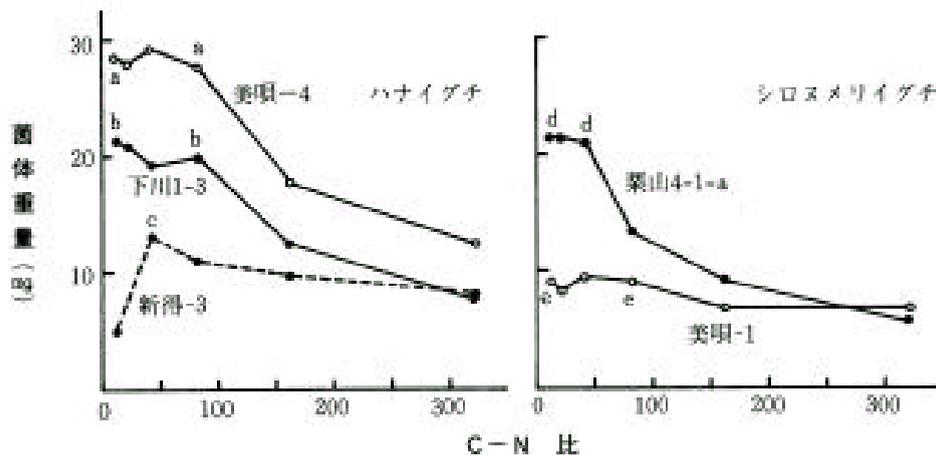
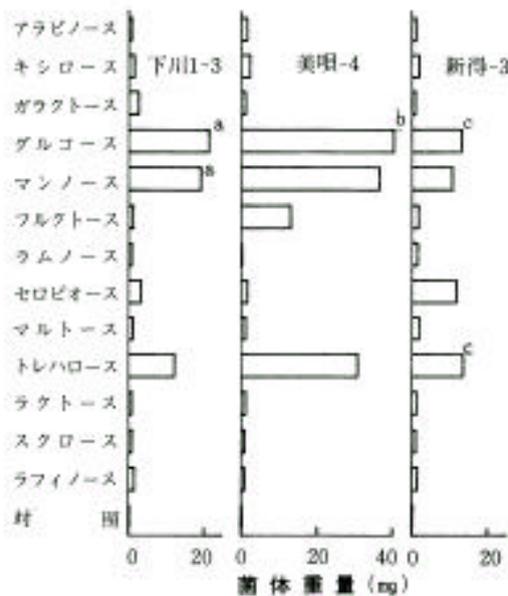


図 1 ハナイグチとシロヌメリイグチの最適 C - N 比
(a,b,c,d,e : 同一文字間の測定値は有意差なし)

2. 炭素源

単糖類や寡糖類では，グルコース，マンノース，トレハロースがハナイグチの菌糸成長によく利用され，菌株によっては，フルクトースやセロピオースを利用できるものもあった（図 - 2）。しかし，マルトースやスクロースは利用されなかった。どの菌株にも共通した最適炭素源はグルコースであった。一方，シロヌメリイグチではマルトースもよく利用され，グルコース，マンノース，セロピオース，トレハロースとともに，菌糸成長のための主要な炭素源になっていた（図 - 3）。このような傾向は，別の多くの菌株でも認められた。したがって，ハナイグチとシロヌメリイグチの生理的性質の大きな違いは，マルトースの利用能の違いにあると考えられた。なお，これらの糖類以外では，シロヌメリイグチはフルクトースを多少利用したが，スクロースは全く利用しなかった。シロヌメリイグチの供試菌株に共通した最適炭素源はトレハロースであったが，グルコースでの菌糸成長も非常に旺盛であった。ハナイグチやシロヌメリイグチの利用するこれらの単糖類や寡糖類は，多くの外生菌根菌と共通するもので



各種炭素源によるハナイグチの菌系生長

(a,b,c:最適炭素源,同一文字の測定値は有意差なし)

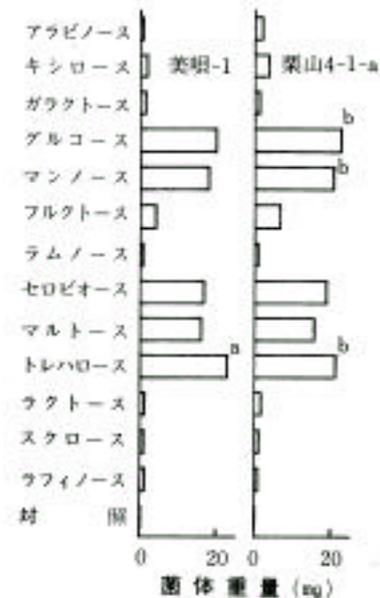


図 3 各種炭素源によるシロヌメリイグチの菌系成長

(a,b:最適炭素源,同一文字の測定値は有意差なし)

あった (PALMER and HACSKAYLO 1970)。

これらの結果から判断すると、樹木の根圏に分泌されるアラビノース、キシロース、ガラクトース、グルコース、フルクトース、ラムノース、マルトース、スクロース、ラフィノース (BOWEN and THELOROU 1973) のうち、ハナイグチ下川 1 - 3 株と新得 - 3 株は実質的にグルコースに依存して根圏で生育し、ハナイグチ美唄 - 4 株はグルコースのほかにフルクトースも利用できるものと思われる (図 - 2)。根圏に分泌される主要な糖類であるフルクトースの利用能の違いは、これらの菌株の根圏での繁殖状況の違いを示唆している。川合ら (1976a) によると、マツタケの菌系成長はグルコースとフルクトースの混合比に影響され、両者を単独で与えたときに比べ、フルクトースの混合比が高いときの方が菌系成長はむしろ旺盛であった。本稿では、グルコースとフルクトースを混合したときの菌系成長を調査しなかったが、ハナイグチ美唄 - 4 株は、根圏のグルコースとフルクトースの混合液を利用して、本実験の傾向よりももっと旺盛に繁殖している可能性がある。このような可能性は、シロヌメリイグチの供試 2 菌株でも示唆される (図 - 3)。

シロヌメリイグチは、これら 2 つの単糖類以外にマルトースをよく利用し、もし根圏にマルトースが分泌されておれば、それによっても旺盛な生育が可能と思われる。外生菌根菌の生理生態的な大きな特徴は、根圏のわずかな数種の低分子の糖類だけしか利用できないことにある (HARLEY and SMITH 1983)。このような限られた糖類への依存性を考慮すると、シロヌメリイグチは樹木由来の糖類の選択範囲が広いため、ハナイグチよりも広い生理的条件下で根圏に生育することができるものと思われる。このため、結果的には、そこに先駆的に定着することにつながるものと推測される。なお、シロヌメリイグチが発生するよりも若いカラマツ林では、TRAPPE (1962) のリストにある菌根菌はどれも観察されていない。

ハナイグチの供試 3 菌株はイヌリン、デンプン、グリコーゲンをほとんど菌系成長に利用せず、それらに少量のグルコースを添加したときだけ、デンプンとグリコーゲンを多少利用できるような傾向を示した (図 - 4)。

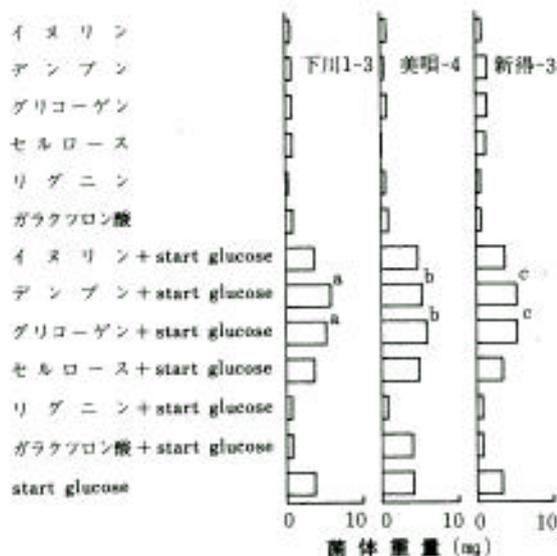


図 4 各種多糖類によるハナイグチ菌系成長

(a,b,c : start glucose より成長良好なもの)

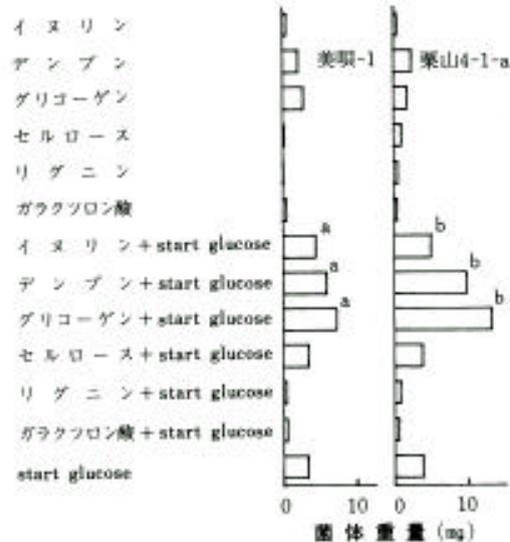


図 5 各種多糖類によるシロヌメリイグチの菌系成長

(a,b : start glucose より成長良好なもの)

一方、シロヌメリイグチの2菌株は、デンプンとグリコーゲンを単独の炭素源として利用可能なような傾向を示し、それらに少量のグルコースを添加すると、無添加やグルコース単独のときに比べ、菌系成長は非常に旺盛になった(図-5)。イヌリンに start glucose を加えたときもほぼ同様であった。この傾向はグリコーゲンで特に著しく、供試材料にグルコースが若干含まれていたとしても、それに依存したとは考えにくいほど菌系成長が旺盛であった。これらの特徴は、ハナイグチとは明らかに異なっていた。したがって、ハナイグチに比べ、シロヌメリイグチはアミラーゼ類あるいは α -グルコシダーゼの酵素活性が高いものと考えられた。なお、樹木由来の炭水化物の貯蔵形態であるグリコーゲンは、よく発達した外生菌根のハルティヒ網状体や、根の表皮に近い菌套の菌糸中に多量に含まれていることが観察されている(MARKS and FOSTER 1973)。このようなグリコーゲンを代謝しやすいシロヌメリイグチは、前述した根圏のみならず、外生菌根の根面でも生育しやすい性質をもつものと考えられる。

ハナイグチやシロヌメリイグチは、リグニン、セルロース、ガラクツロン酸を単独で炭素源として利用しなかった(図-4,5)。それらに少量のグルコースを添加したときも、リグニンでは菌系成長が全く認められなかった。セルロースでは、グルコースを添加しても利用されるような兆候はなかった。start glucose を添加したときも、菌根菌はセルロースを利用しないことがNORKRANS(1950)によって報告されている。少量のグルコースを添加したガラクツロン酸では、ハナイグチ美唄-4株以外は菌系成長が認められず、例外的なハナイグチ美唄-4株でも、ガラクツロン酸を利用するような兆候を示さなかった。ガラクツロン酸の重合体であるペクチンは、ハナイグチを含む外生菌根菌に容易に利用されるという報告(PALMER and HACSKAYLO 1970, LAMB 1974)と、利用されないという報告(LINDEBERG and LINDEBERG 1977)がある。外生菌根菌が寄主の皮層部の細胞間隙へ侵入してハルティヒ網状体を形成するとき、中葉のペクチン様物質が分解されると思われることから、LINDEBERG and LINDEBERG(1977)も外生菌根菌がペクチン分解酵素をもっているという考えを否定してはいない。彼らは、それは菌糸の先端付近の細胞に極在しているのではないかと推測している。本実験で供試した外生菌根菌がセルロースやペクチンなどの分解酵素をもっているかどうかは、培養技術上の多くの問題点のため(HARLEY and SMITH 1983)、ここではこれ以上詳しく議論することが

できない。なお、本実験ではpH緩衝液を使用しなかったが、GILTRAP and LEWIS（1981）の報告から判断すると、りん酸緩衝液を使用したときよりも悪影響は少なかったものと考えられる。

ハナイグチ新得 - 3株やシロヌメリイグチ栗山4 - 1 - a株は、カラマツ芽ばえに外生菌根をつくりにくい菌株であった（村田 1991）。しかし、これらの菌株の炭素源資化性は、外生菌根をつくりやすい同一種の他の菌株と基本的に変わらなかった。すなわち、上記2菌株はセルロースやペクチン様物質を分解するとはいえず、NORKANS（1950）やLINDEBRG and LINDEBRG（1977）の対比した腐生菌と同じような性質をもつものではなかった。

3. 窒素源

ハナイグチとシロヌメリイグチが菌系成長に利用する窒素化合物は、基本的にあまり変わらなかった。供試窒素化合物のうち、よく利用されたものは、アンモニア態窒素化合物、尿素、アミノ酸の一部とそれらのアミド、蛋白質関連物質のペプトンとカザミノ酸であった（図 - 6, 7）。硝酸態窒素化合物は、ハナイグチ美唄 - 4株で利用されるのが目立ったぐらいであった。このような一般的な特徴は、多くの外生菌根菌と共通するものであった（LUNDEBERG 1970, LAIHO 1970）。アミノ酸やアミドでは、アラニン、セリン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニンなどが一般によく利用された。カラマツに外生菌根を形成しやすい系統のハナイグチやシロヌメリイグチにとっては、これらのアミノ酸類の多くは、アンモニア態窒素化合物よりも有効な窒素源と考えられ、なかには、供試窒素源の中で最大の菌系成長を示したものもあった。例えば、菌根形成能力の高いハナイグチ下川

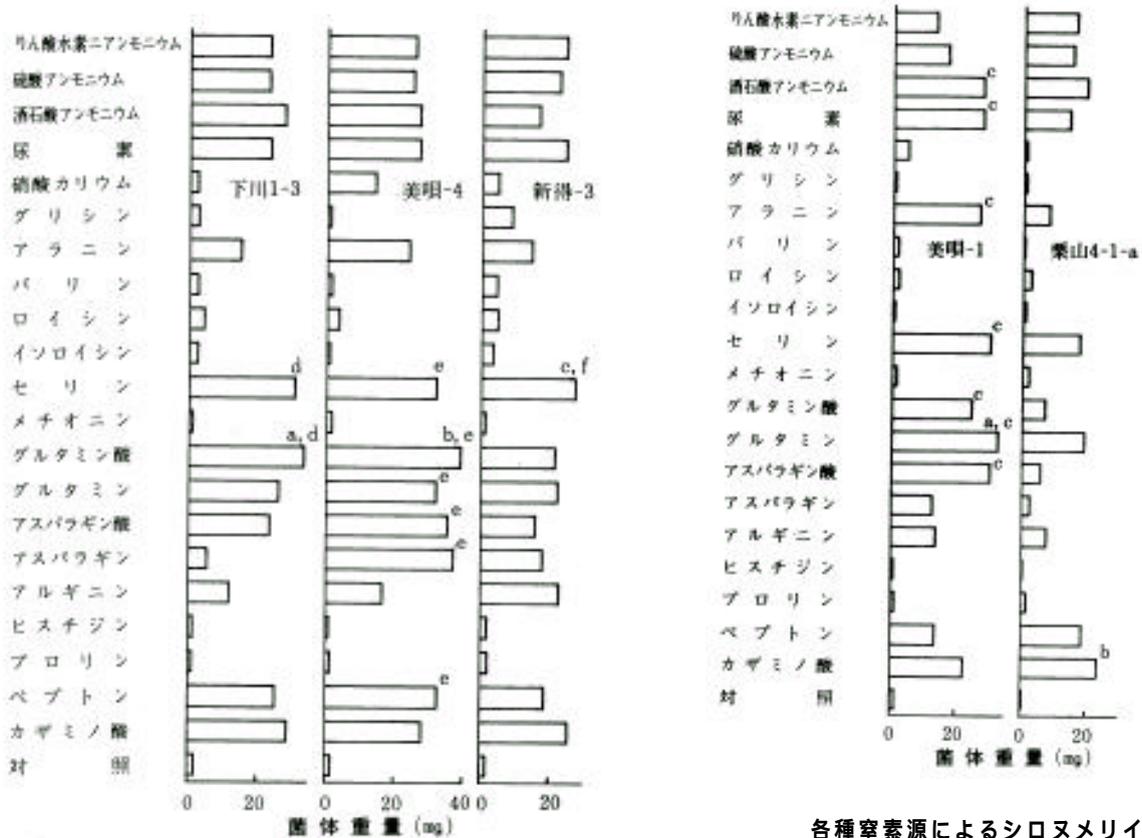


図 - 6 各種窒素源によるハナイグチの菌系成長 図 - 7

(a,b,c : 最適窒素源, d,e,f : カザミノ酸より成長良好なもの)

各種窒素源によるシロヌメリイグチの菌系成長

(a, b : 最適窒素源, c : カザミノ酸より成長良好なもの)

1 - 3 株と美唄 - 4 株，シロヌメリイグチ美唄 - 1 株（村田 1991）では，グルタミン酸やそのアミドが最適窒素源であった（図 - 6, 7）。ビダハタケでも，グルタミン酸やアルギニンは，アンモニア態窒素化合物よりも有効な窒素源とされている（LAIHO 1970）。なお，これらのアミノ酸類は窒素源としてでなく，炭素源として利用された可能性もある（PERLMAN 1965）。しかし，供試菌株では，グルタミン酸，グルタミン，アスパラギン酸，アラニンなどが炭素源としてわずかに利用される兆候を示したにすぎず，ハナイグチやシロヌメリイグチにとっては，これらのアミノ酸類は，実質的に，窒素源としての価値しかないものと考えられた。

上述のアミノ酸類のうち，ハナイグチ下川 1 - 3 株ではアスパラギンがあまり利用されず（図 - 6），シロヌメリイグチ栗山 4 - 1 - a 株では，そのほか，アスパラギン酸やグルタミン酸の利用もよくなかった（図 - 7）。菌株によるこのような違いは，LUNDEBERG（1970）によっても指摘されている。外生菌根菌の利用するアミノ酸類は，もちろん，種によっても若干異なることがある。例えば，ハナイグチやシロヌメリイグチとマツタケ（川合ら 1976a）とでは，アラニン，アスパラギン，バリンなどの利用程度に違いがあった。

図 - 6, 7 で供試したアミノ酸やアミドのうち，ビスチジンを除くすべてのものは樹木の根圏に分泌されている（BOWEN and THEODOROU 1973）。*Pinus radiata*（BOWEN 1969）や *Acer saccharum*（SMITH 1970）の根圏に比較的少量に分泌されているグリシンやロイシンよりも，分泌量の非常に少ないといわれるアルギニンの方が供試ハナイグチやシロヌメリイグチに有効であったことから判断すると，心ずしも根圏に分泌されるアミノ酸類の総量がそれらの菌糸成長を左右するとは考えにくい。もしアミノ酸混液として利用されているのであれば，根圏に比較的少量に分泌されるアミノ酸類のうち，グルタミン，アスパラギン，グルタミン酸，セリン，アスパラギン酸，アラニンなどの含有率が，そこに生育するハナイグチやシロヌメリイグチの成長に影響するものと思われる。しかし，これらのアミノ酸類のなかには，単独でも，アミノ酸混合物であるカザミノ酸よりも菌糸成長を促進するものがあつた。また，グルタミン酸を単独で外生菌根に与えたときも（MELIN and NILSSON 1953），外生菌根の窒素同化作用の中心的な役割を担うグルタミンやグルタミン酸の一連の代謝（FRANCE and REID 1983, CHALOT et al. 1991）は，菌体中で順調に進展することが示唆されている。これらの報告から判断しても，上記のアミノ酸類の多くは，単独でも，ハナイグチやシロヌメリイグチの菌糸成長と菌根共生に重要な役割を果たしているものと考えられる。

ハナイグチ新得 3 株やシロヌメリイグチ栗山 4 - 1 - a 株は，その他の菌株に比べ，これらのアミノ酸類を単独ではあまり利用できなかった（図 6, 7）。前者では，カザミノ酸よりも有効なアミノ酸類はセリンだけであつた。後者ではこの傾向はさらに著しく，カザミノ酸よりも有効なアミノ酸類は河もなかつた。ハナイグチの他の 2 菌株がセリン，グルタミン酸，あるいは，そのほか，グルタミン，アスパラギン酸，アスパラギンなどのアミノ酸類をカザミノ酸以上に利用でき（図 - 6），シロヌメリイグチ美唄 - 1 株も，アラニン，セリン，グルタミン酸，グルタミン，アスパラギン酸などを同様に利用できる（図 - 7）のと違いは明白であつた。ハナイグチ新得 - 3 株やシロヌメリイグチ栗山 4 - 1 - a 味で菌根形成が悪かつた（村田 1991）原因は，外生菌根の窒素代謝に重要なアミノ酸類（CHALOT et al. 1991）の代謝能力が低いことにあるのかもしれない。

4. 菌糸成長適温

ハナイグチとシロヌメリイグチの菌糸成長適温は菌株によって若干異なつたが，全体的には，20 から 25 の間にあつた（図 - 8）。この温度帯のなかで，シロヌメリイグチ美唄 - 1 株はやや低温側を適温とし，ハナイグチ美唄 - 4 株はやや高温側を適温とした。30 ではどの菌株も菌糸成長が非常に悪く，

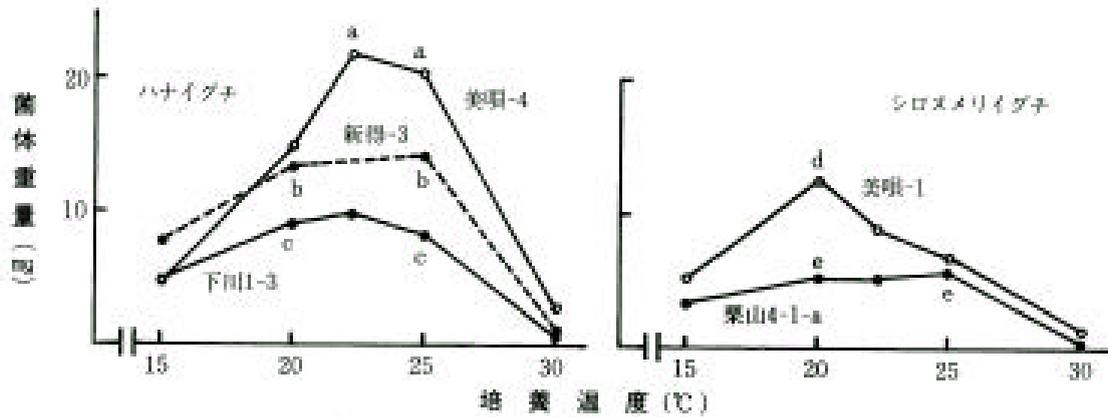


図 8 ハナイグチとシロヌメリイグチの菌糸成長適温
(a,b,c,d,e : 同一文字間の測定値は有意差なし)

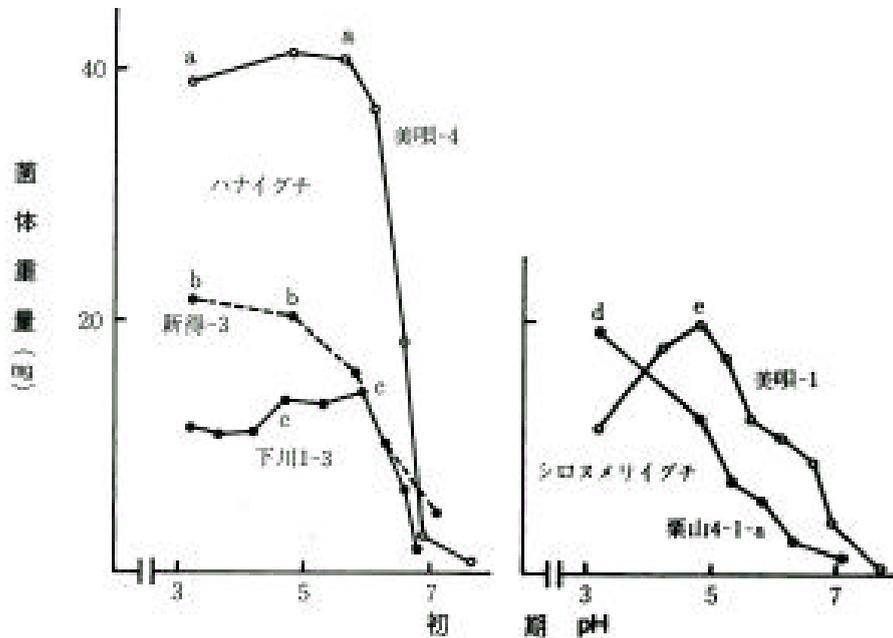


図 9 ハナイグチとシロヌメリイグチの最適初期 pH
(a,b,c,d,e : 同一文字間の測定値は有意差なし)

高温より、むしろ低めの温度の方が菌糸成長は活発であった。シロヌメリイグチ美唄 - 1 株では、5 でも菌糸成長が認められた。菌糸の致死温度はそれほど高くなく、シロヌメリイグチ美唄 - 1 株では 32 であった。このような傾向は、マツタケ (浜田 1953) よりも少し温度範囲が広いことを示していた。ちなみに、マツタケの菌糸生育温度は 7 付近から 28 まで、菌糸成長適温は 20~23、致死温度は 30 とされている。

5 最適初期 pH

ハナイグチ美唄 - 4 株は、初期 pH が 3.2~5.6 のとき菌糸成長が最大であった (図 - 9)。初期 pH が 6.1 をこえると菌糸成長は急激に悪化し、アルカリ側ではほとんど成長しなかった。ハナイグチ下川 1 - 3 株でも、初期 pH が 4.7~5.9 のとき菌糸成長は最大であった。初期 pH がこれより低くて 3.2 のときでも、菌糸成長はそれほど衰えなかった。しかし、ハナイグチ美唄 - 4 株と同様、pH 6.3 をこえると菌糸成長は極端に悪化した。ハナイグチ新得 - 3 株でも似たような傾向が認められたが、最大の菌糸成

長は初期 pH4.8 以下のときであった。これら 3 菌株の特徴から判断すると、ハナイグチは、pH 5 ないし 6 未満のかなり広範な pH 域で旺盛な成長をするものと考えられた。一方、シロヌメリイグチ美唄 - 1 株は、初期 pH が 4.8 のとき菌糸成長が最大で、それより酸性やアルカリ性が強くなると菌糸成長は急速に衰えた。初期 pH が 3.2 や 6.1 の区では、最大成長量の約半分の菌糸成長しか示さなかった。このような傾向は、マツタケ（最適 pH5.1）の場合とよく似ていた（OHTA 1990）。なお、シロヌメリイグチ栗山 4 - 1 - a 株では、初期 pH が 3.2 のとき菌糸成長は最大であった。それ以上の pH 域では菌糸成長は急激に悪化した。OHATA（1990）によると、シヨウロ *Rhizopogon rubescens* がよく似た反応を示した。シロヌメリイグチのこれら 2 菌株での pH の影響の違いは、河に起因しているのかよく分からない。しかし、上記 2 菌株以外のシロヌメリイグチのなかに、ハナイグチの供試 3 菌株と類似した反応を示すものが含まれていた（未発表）ことから判断すると、シロヌメリイグチの pH に対する反応は種内変異に富んでいるものと考えられた。異なった pH 条件に適応しうるシロヌメリイグチのこのような種内変異は、シロヌメリイグチの先駆性を確実にする一つの要因になっているかもしれない。

アンモニア態窒素化合物を窒素源にしたとき、有機酸の生成に伴って、培養液の pH は急激に低下する。これを避けるため、一般にりん酸緩衝液が用いられるが、外生菌根菌の場合、高濃度のときは菌糸成長が強く抑制される（JAYKO et al. 1962, GILTRAP and LEWIS 1981）。このため、GILTRAP and LEWIS（1981）は、りん酸緩衝液の代わりに、MES（2 モルホリノエタンスルホン酸）の使用を勧めた。本稿でも MES の使用を試みたが、pH の低いときにはあまり緩衝能がないため、本実験は MES などの緩衝液を添加しないで行った。したがって、本実験では、全培養期間中の pH は制御されておらず、培養開始時の pH が 6 未満の区では、培養終了時の pH は 2.3 ~ 2.7 に低下していた。一方、初期 pH が 6.1 ~ 6.6 の区でも、培養終了時の pH は 3 前後であった。すなわち、ハナイグチ美唄 - 4 株や下川 1 - 3 株で、初期 pH が 6.1 ~ 6.3 をこえると菌糸成長が急激に悪化したのは、培養期間中の pH の低下が原因とは考えにくい。これらの菌株では、pH が低いことよりも、少なくとも培養初期の pH の高いことが、菌糸成長を抑制した要因と思われる。ハナイグチのこのような特徴は、ハタケシメジ *Lyophyllum decastes*（本内ら 1981）やホンシメジ *L. smimeji*（伊藤 1940, OHATA 1990）とは異なるものである。

ハナイグチの最適 pH 域は、かなり酸性側にかたよっていた。このような特徴は、カラマツ根圏にも多量に分泌されていると思われ、かつ、外生菌根の窒素代謝に重要なアミノ酸、グルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸の利用にはむしろ好都合な性質である。カラマツに外生菌根をつくりやすいハナイグチ下川 1 - 3 株と美唄 - 4 株（村田 1991）が、グルタミン酸を最適窒素源とした（図 - 6）のは、このような性質に基づいた適応かもしれない。また、上記 2 者に比べ、低い pH 域ではあまり成長しなかったシロヌメリイグチ美唄 - 1 株が、中性アミノ酸類に含められるグルタミンを最適窒素源とした（図 - 7）のも同様の現象と思われる。

なお、本実験では pH 緩衝液を使用しなかったため、菌糸成長の旺盛なときほど培養液の pH は低下した。しかし、供試したハナイグチやシロヌメリイグチのほとんどの菌株は、強酸性の pH 域でも旺盛な成長を示した。したがって、本実験では、培養中の pH の低下が結果にそれほど悪影響を与えたとは思えない。

6. ビタミン類やその他の菌糸成長促進物質

チアミン、ビオチン、葉酸、ニコチン酸、塩酸ピリドキシン、パントテン酸の 6 種のビタミン類による菌糸成長促進効果を調べたところ、ハナイグチやシロヌメリイグチの全供試菌株に有効なものは、スチアミンだけであった（表 - 1）。その効果は、シロヌメリイグチ美唄 - 1 株を除くと、非常に著しかった。ビオチン、葉酸、ニコチン酸は供試菌株ごとに若干影響が異なり、供試濃度で有効菌株、無効な

表 1 各種ビタミン類によるハナイグチとシロヌメリイグチの菌糸成長(mg)

ビタミン類	菌株	ハナイグチ			シロヌメリイグチ		
		下川 1 3	美唄 4	新得 3	美唄 1	栗山 4 1 a	
チアミン	アミノン	19.2**	20.6**	17.1*	5.9*	19.7**	
ビオチン	オチン		3.4*	8.0	4.9	6.3**	
葉酸	チン酸		4.8*	7.8	3.1**	6.0**	
ニコチン酸	コチン酸		4.7*	7.2	5.3	5.7**	
塩酸ピリドキシン	ピリドキシン		4.5	8.4	4.6	5.8	
D パントテン酸ナトリウム	パントテン酸ナトリウム		3.8	8.6	5.1	5.1	
対照	照	4.0	4.0	7.7	5.1	5.2	

(* : 対照に対し 5% で有意 . ** : 同じく 1% で有意)

菌株,あるいはやや阻害的な影響を示す菌株に分かれた。このような微妙な影響の違いは,菌株によってビタミンの要求程度が異なるために生じたとも考えられるが,川合ら(1976b)のような飢餓操作を行わなかったことも一因と思われる。なお,塩酸ピリドキシンやパントテン酸は,ハナイグチやシロヌメリイグチの菌糸成長に効果がなかった。

シロヌメリイグチ美唄 - 1 株では, 100 $\mu\text{g}/\%$ のチアミンを添加したとき, その他の菌株に比べ, 菌糸成長がそれほど促進されなかった。

そこで, 上記の菌株はもともとチアミン要求性が低いのか, あるいは供試濃度の影響なのか検討した(図 - 10)

ハナイグチの 3 菌株とシロヌメリイグチ栗山 4 - 1 - a 株は, 25 ~ 50 $\mu\text{g}/\%$ 以上のチアミンを添加したとき菌糸成長が著しく促進されたが, シロヌメリイグチ美唄 - 1 株では, 25 ~ 50 $\mu\text{g}/\%$ のチアミン添加によって菌糸成長は最大になった。その成長量は無添加時の 2 倍以上であった。したがって, シロヌメリイグチ美唄 - 1 株でもチアミン要求性が低いわけではなく, 高濃度のチアミンで成長阻害が起こるものと考えられた。なお, 供試菌株以外のシロヌメリイグチでは, 少なくとも 100 $\mu\text{g}/\%$ のチアミンで, このような成長阻害は認められなかった。ビタミン類の濃度によるこのような効果の違いは, 多くの菌類やそれらの菌株間でしばしば認められており (GARRAWAY and EVANS 1984), マツタケでは, チアミン, ニコチン酸, 葉酸は比較的高濃度で菌糸成長に効果があり, ビオチンは比較的低濃度で有効であった(川合ら 1976b)。また, アミタケ *S. bovinus* の菌糸成長に有効であったビオチン, チアミン, ニコチン酸, 塩酸ピリドキシンでも, 濃度によって効果が異なった (OHATA 1990)。ハナイグチやシロヌメリイグチに対するチアミンの有効濃度は, これらの報告よりかなり低めであった。

ハナイグチやシロヌメリイグチのその他の菌糸成長促進物質を探索したところ, 広本 (1960) に類似

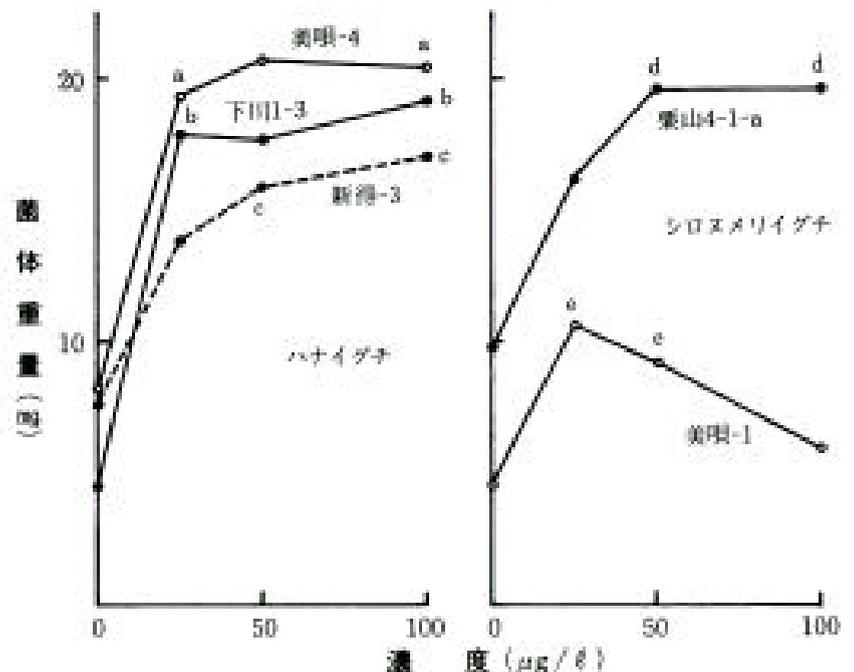


図 10 各種濃度のチアミンによるハナイグチとシロヌメリイグチの菌糸成長

(a,b,c,d,e : 同一文字間の測定値は有意差なし)

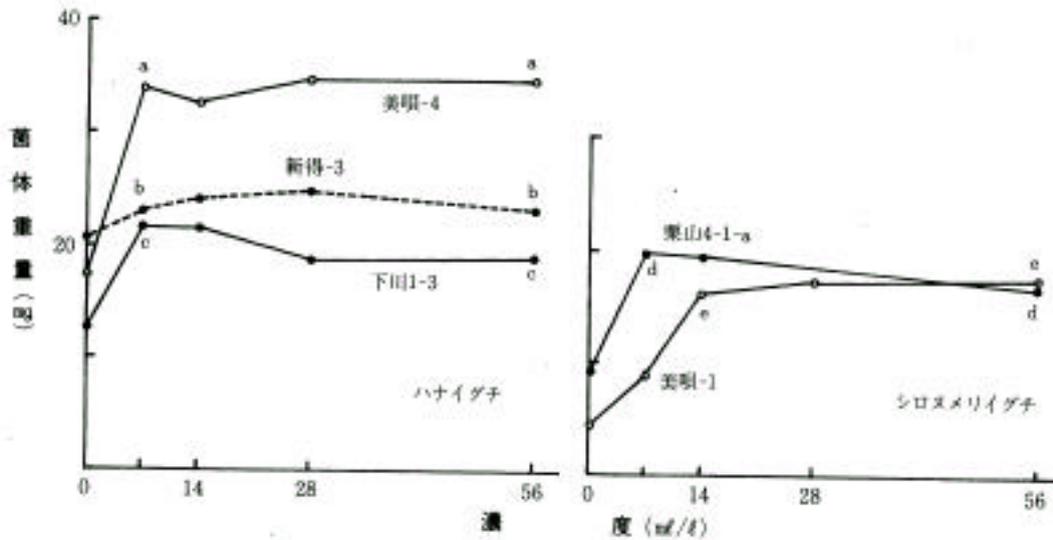


図 11 カラマツ風乾葉抽出液によるハナイグチとシロヌメリイグチの菌系成長の促進
(a,b,c,d,e: 同一文字間の測定値し有意差はなし)

した針葉抽出液の効果が大きかった。菌系成長の悪いシロヌメリイグチ美唄 - 1 株で、カラマツの根の皮層部の水抽出液，カラマツの根圏土壌の水抽出液などの効果を調べたが，どれも菌系成長に有効ではなかった。しかし，カラマツ風乾葉のアルコール抽出液には著しい効果があった。そこで，ハナイグチとシロヌメリイグチの全供試菌株で確かめたところ，図 - 11 のように 培養液 1000ml 当たり 7~14ml を添加しただけで非常に有効なことが分かった。広本 (1960) によると，マツ葉の抽出液ではチアミンの効果が発現しなかった。しかし，シロヌメリイグチ美唄 - 1 株では，カラマツ風乾葉の抽出液を添加したときにもチアミンの効果があり，やや高濃度のチアミンで認められた菌系成長の減退 (図 - 10) も回復の兆しをみせていた。カラマツ風乾葉の抽出液に含まれた有効成分は不明であるが，それはチアミンと相乗効果を示すものと考えられる。

おわりに

ハナイグチやシロヌメリイグチはカラマツの菌根菌として重要である (村田 1991)。それらは，カラマツが植栽されて数十年の間に，北海道に完全に定着したかにみえる。その最初のきっかけは，本州から移入された苗木の菌根によって，北海道へ持ち込まれたことにある。その後，北海道でカラマツの苗木が養成されるにいたり，それらの苗木とともに，北海道各地へ伝播したものと考えられる。このような伝播経路を考慮すると，北海道では，本州から導入された，遺伝的形質の異なったさまざまなハナイグチやシロヌメリイグチが，自然淘汰されてきたものと推測される。このようなハナイグチやシロヌメリイグチが北海道で生育できたのは，それらがカラマツの根圏で繁殖し，菌根をつくり得たからにほかならない。しかし，自然淘汰の歴史は必ずしも長くはない。現在でも，それらの菌根の質や量が十分であるという保証はない。本稿では，このよう々北海道のハナイグチとシロヌメリイグチの生理的性質を比較検討し，根圏に分泌されていると思われる糖類やアミノ酸類を中心に，それらの利用状況が種や菌株によってどのように異なるか考察した。その結果，若いカラマツの根圏で繁殖し，菌根をつくりやすい種や菌株には，それなりの生理的な根拠があることが判明した。これらの種や菌株が若いカラマツに菌根をつくり，北海道で増殖することは，自然の理にかなったものと考えられる。自然界に適應しや

い生理的性質をもったこのような系統を活用し、カラマツの菌根形成をより一層スムーズに進めることが今後の課題と思われる。

文 献

- 安藤正武 1972 シイタケ子実体の発生条件(1). 日林誌 54: 311 - 314
- BOWEN, G. D. 1969 Nutrient status effects on loss of amides and amino acids from pine roots. Plant Soil 30: 139 - 144
- and THEODOROU, C. 1973 Growth of ectomycorrhizal fungi around seeds and roots. In Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology (ed by MARKS, G. C. and KOZLOWSKI, T. T.), 107-150, Acad. Press, New York and London
- CHALOT, M., STEWART, G. R., BRUN, A. and MARTIN, F. 1991 Ammonium assimilation by *spruce Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. New Phytol. 119: 541 - 550
- FRANCE, R. C. and REID, C. P. P. 1983 interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. Can. J. Bot. 61: 64 - 98
- GARRAWAY, M. O. and EVNS, R. C. 1984 Fungal nutrition and physiology. 401pp, John Wiley & Sons, New York
- GAILTRAP, N. J. and L. wls, D. H. 1981 Inhibition of growth of ectomycorrhizal fungi in culture by phosphate. New Phytol. 87: 669 - 675
- 浜田稔 1953 マツタケ. 自然 8: 56 - 64
- HARLRY, Frs, J. L. and SMITH, S. E. 1983 Mycorrhizal symbiosis. 83pp, Acad. Press, New York and London
- 広木一由 1960 マツタケ菌の純粋分離と培養 植雑 73: 326 - 333
- 伊藤一雄 1940 シメジに関する研究 第1報 形態・担子胞子の発芽並びに培養上の性質. 日林誌 22: 319 - 336
- JAYKO, L. G., BAKER, T. I., STUBBERFIELD, R. D. and ANDERSON, R. F. 1962 Nutrition and etabolic products of *Lactarius* species. Can. J. Microbiol. 8: 361 - 371
- 川合正允・阿部重雄 1976a まつたけの培養に関する研究 第1報 まつたけの栄養成長におよぼすC源およびN源の影響. 日菌報 17: 159 - 167
- ・寺田治 1976b ———— 第2報 まつたけの栄養成長におよぼすビタミン類, 核酸関連物質, 植物ホルモン類および金属イオンの影響. 日菌報 17: 168 - 174
- 木内信行・七宮清 1981 ハタケシメジの培養に関する研究(予報) ハタケシメジ菌系の培養上における2, 3の生理的性質. 神奈川県林試研報 7: 69 - 84
- LAHO, O. 1970 *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. Acta For. Fenn. 106: 1 - 65
- LAMB, R. J. 1974 Effect of D-glucose on utilization of simple carbon sources by ectomycorrhizal fungi. Trans. Br. mycol. Soc. 63: 295 - 306
- LINDBERG, G. and LINDBERG, M. 1977 Pectinolytic ability of some mycorrhizal and saprophytic hymenomycetes. Arch. Microbiol. 115: 9 - 12
- LUNDEBERG, G. 1970 Utilization of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. Stud. For. Suec. 79: 1 - 95

- MARKS, G. C., and FOSTER, R. C. 1973 Structure, morphogenesis, and ultrastructure of ectomycorrhizae. In *Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology* (ed. by MARKS, G. C. and KOZLOWSKI, T. T.), 1-41, Acad. Press, New York and London
- MARX, D. H. 1981 Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by sources, age and reisolation. *Can. J. For. Res.* 11: 168-174
- MELIN, E. 1925 Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorrhizae. Eine ökologische physiologische Studie. 152pp, Fischer, Jena
- and NILSSON, H. 1953 Transfer of labelled nitrogen from glutamic acid to pine seedlings through the mycelium of *Bioetis variegatus* (Sw.) Fr. *Nature (London)* 171: 134
- 村田義一 1991 カラマツ芽ばえの菌根形成と成長. 北林試研報 29: 1-13
- NORKRANS, B. 1950 Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. *Symb. Bot. Upsal.* 11: 1-126
- OHTA, A. 1990 A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 31: 323-334
- PALMER, J. G. and HACSKAYLO, E. 1970 Ectomycorrhiza fungi in pure culture I Growth on single carbon sources. *Physiol. Plant.* 23: 1187-1197
- PERLMAN, D. 1965 The chemical environment for fungal growth 2: Carbon sources. In *The fungi*, vol. 1 (ed. by AINSWIRTH, G. C. and Sussix, A. S.), 479-490, Acad. Press, New York and London
- SAMSON, J. and FORTIN, J. A. 1988 Structural characterization of *Fucobtinie* and *Suillus* ectomycorrhizae synthesized in *Larix laricina*. *Mycologia* 80: 382-392
- SMITH, W. H. 1970 Root exudates of seedling and mature sugar maple. *Phytopathology* 60: 701-703
- TRAPPE, J. M. 1962 Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28: 538-606
- 脇田正二 1954 えのきだけの生化学的研究(第2報) 培地の Sucrose / NaNO₃ ratio が菌糸体の生育及び発芽に及ぼす影響. 農化誌 28: 577-580