

DNAで土壌中のマツタケ菌を探す

利用部 微生物グループ 宜寿次盛生

■マツタケの発生地を探したい

北海道のマツタケは、ハイマツやアカエゾマツ、トドマツなど幅広い宿主植物と共生しています。マツタケの林地栽培を目指すにはマツタケの生育に適した環境条件の把握が必要ですが、北海道のマツタケ発生林は調査例が限られており¹⁾、本州のアカマツ林のように環境条件が把握されていません。環境条件把握のためには、より多くの林分を調査することが必要です。

これまでマツタケの発生地は、その子実体の発生によって確認されてきましたが、その機会は年に一度あるかないかです。マツタケ子実体が発生する土壌中にはマツタケのシロ（活性菌根帯）が存在していますが、その確認は容易ではありません²⁾。そのため、子実体が発生しない、または確認できない状況が続くと、土壌中にマツタケのシロが存在している、無いものと判断してしまいます。逆に、土壌中に存在するマツタケのシロを簡便に検出できれば、マツタケ子実体が発生していない時期でも調査が可能となります。

■マツタケのDNA

生物は、細胞内にあるDNA（デオキシリボ核酸）に刻まれた遺伝情報（塩基配列）に基づいてタンパク質を合成し、生命を維持しています。DNAの塩基配列は個体によって少しずつ異なり、種によって特徴的な違いがあることが分かっています。

DNA塩基配列の一部、「ITS領域」と呼ばれる部分は、一般に種内変異が小さくDNA上に多くのコピーがあるため種レベルの同定に有効だと言われています。マツタケについても、ITS領域をターゲットにして近縁種と識別できるDNAマーカー（マツタケ特異的プライマー）が開発されています³⁾。DNAを利用してマツタケを検出し同定する手法ではPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）という方法を用います。これはDNAを合成する酵素と、「プライマー」と呼ばれる短い人工合成DNA断片を用いて、ごく少量のサンプルDNAから目的とするDNA領域を大量に増幅する技術です。PCR法の詳細については参考資料⁴⁾をご覧ください。

一方、他の研究グループによって「レトロラン

スポゾン」という遺伝子に着目したマツタケ特異的プライマー⁵⁾が開発され、さらに別の研究者は、マツタケDNAを定量する目的で「マンガンパーオキシダーゼコード領域」に着目したマツタケ特異的プライマーを開発しています⁶⁾。

■土壌からのマツタケ菌の検出

これまでに提案されている前記マツタケ特異的プライマーを用いて、シロ内外の土壌から実際にマツタケ菌を検出できるのかを検討しました。

試験は、過去に道立林業試験場がマツタケ発生に係る調査および試験を行ったトドマツ林に設定した試験地¹⁾のマツタケシロを活用しました。このシロではマツタケ子実体の発生が継続的に確認されていましたが近年は子実体の発生確認を行っていません。シロは同心円状に外側に拡大していくので、当時の資料を基にシロ中心部および現在のシロ周縁部を推測し、表土を掻き取り目視でシロを確認しました。直径5cmのコアサンプラーを用いて深さ20cmまで5cmごとの土壌試料を、図1および図2に示すように活性菌根帯を基準としてシロ内外4カ所から採取しました。

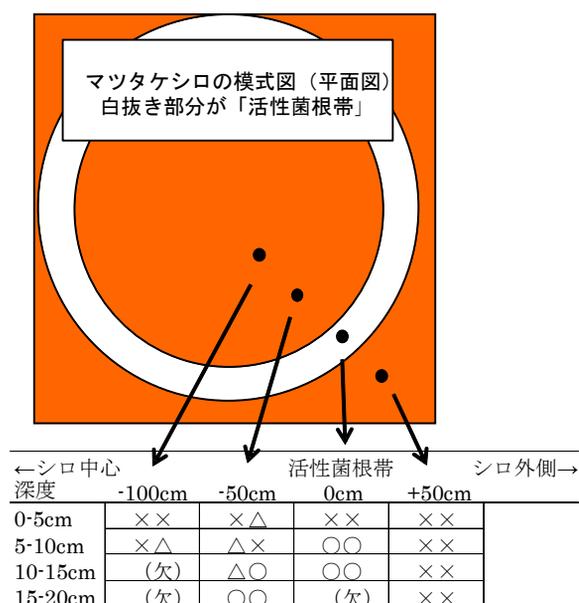


図1 土壌試料の採取箇所およびマツタケ検出結果各セルは、左が1回目、右が2回目の結果。

○：明瞭なバンド有り，△：不明瞭なバンド有り
×：バンド無し，（欠）：コアサンプル無し



図2 コアサンプラー（左）と
土壌試料採取の様子（右）

左写真：大起理化工業（株）のHPより

<https://www.daiki.co.jp/othersoilsampler.html>

土壌中に存在するDNAを抽出するには、腐植物質などの夾雑物が一緒に抽出されたり、土壌にDNAが吸着されたりするなどいろいろ難しさがあります。そこで、市販の土壌DNA抽出専用のキットを使ってDNAを抽出し、前述のマツタケ特異的プライマーを用いてPCRの条件を検討しました。しかし、検出感度が悪くて再現性が低かったり、目的とするバンド以外のバンドがたくさん検出されたりするなど、いろいろ問題がありました。最終的には上記のITS領域から開発されたプライマーを用いた改良法⁷⁾で再現良く検出することが出来ました（図3）。これはnested PCR法と呼ばれ、最初にITS領域共通のプライマーを使用してPCRを行い、その増やしたDNAをマツタケ特異的プライマーで再度増やす方法です。その方法を用いたPCR後のDNAを電気泳動してバンドの有無および位置を確認しました。その結果、図1に示すように、シロの外側土壌からはマツタケ菌は検出されませんでした。活性菌根帯を含むシロ内側の広範囲でマツタケ菌を検出することが出来ました。

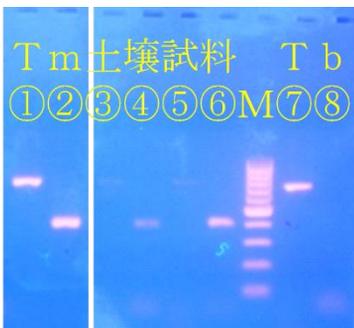
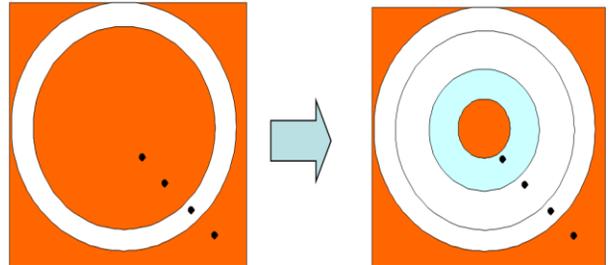


図3 土壌抽出DNAをPCR増幅後の電気泳動像
奇数レーン：1st PCR産物、偶数レーン：2nd PCR産物
Tm（対照）：マツタケ培養菌系から抽出したDNA
Tb（対照）：バカマツタケ培養菌系から抽出したDNA
M：サイズマーカー

■おわりに

今回の結果から、森林におけるマツタケ菌の検出

可能範囲が大きく広がる可能性があります。今回の調査地では図4に示したように、既にマツタケのシロが存在していることが分かっている表土を掻き取り、目視でシロ（活性菌根帯）を確認しました。しかし、このような方法は作業量が膨大なだけでなく、未知の調査地の場合にはマツタケのシロなのか別の菌のものなのか判断できません。



表土を除去して、目視で検出できるシロ（活性菌根帯）

コアサンプラーで採取した土壌から、DNAで検出できるシロ

図4 DNAを指標に土壌中のマツタケを探す

一方、DNAを用いた方法は土壌試料を持ち帰り検出するため、その場では結果が出ないというデメリットがあります。マツタケ菌の存在を確実に判断出来ず。さらに今回、シロ（活性菌根帯）の内側でもマツタケ菌が検出できたことから、未知の調査地で実施する際にはヒットする確率が高いと考えられます。

今後は、シロの調査数を増やしてより精度を高め、従来の目視によるシロ分布調査と組み合わせることで調査地におけるマツタケ菌検出方法を確立したいと考えています。

■参考文献

- 1) 村田義一ら：北海道林業試験場研究報告，第38号，1-22（2001）。
- 2) 宜寿次盛生：林産試だより2010年10月号4-5。
<http://www.fpri.hro.or.jp/dayori/1010/2.htm>
- 3) Kikuchi K et.al. ; Mycol. Res. 104 (12), 1427-1430 (2000).
- 4) 森満範：林産試だより2010年1月号4-6。
<http://www.fpri.hro.or.jp/dayori/1001/3.htm>
- 5) Murata H, Yamada A ; Mycoscience, 40, 531-534 (1999).
- 6) 山口宗義：特開2009-183202号，日本国特許庁（2009）。
- 7) 進藤克実，松下範久：東大農演習林報告，120，1-9（2009）。