

## 外生菌根菌の菌糸生長促進物質の探索

足立 亜衣, 加瀬谷泰介

### Searching of signal molecules inducing hyphal growth of ectomycorrhizal basidiomycetes

Ai Adachi and Taisuke Kasetani

The effects of host plants (*Pinus densiflora*, *Quercus* spp.) on hyphal growth of *Boletus reticulatus*, *Boletellus elatus* and *Lyophyllum shimeji* were investigated by assays on liquid and agar medium added some host plants root extracts. As a result, their hyphal mass increased greater and hyphal layer grew thicker than control. Especially, the effects on *L. shimeji* were the most significant among the three ectomycorrhizal fungi. Furthermore, when *Bolete. elatus* and *L. shimeji* were co-cultured with young seedlings of the host plants, respectively, they showed faster hyphal elongation than control and their colonies also expanded toward the seedlings.

These results suggest that host plants contain certain signaling molecules affecting the hyphal growth (mass, elongation and direction) of ectomycorrhizal fungi, the two strains of Boletaceae and a strain of *L. shimeji*.

**Key words:** ectomycorrhizal fungi, root extract, signal molecule, hyphal growth, host plant, Boletaceae, *Boletellus elatus*, *Boletus reticulatus*, *Lyophyllum shimeji*

#### 緒言

高級食材として著名なマツタケ [*Tricholoma matsutake* (S.Ito et S. Imai) Singer] やポルチーニを代表とする外生菌根性担子菌類 (以下, 外生菌根菌) は, 木本植物を宿主とした共生を営んでいることから, 未だ確固とした栽培技術が確立していない。このため, 現在販売されているものは, 自然界から採集されているものであり, その量は年・季節変動を余儀なくされる。また, その価格も人工栽培されたきのこに比べ非常に高くなっている。この状況を改善すべく, 現在, 外生菌根菌の栽培技術の確立を目的に研究を行っている。

外生菌根菌の栽培を行う上で問題とされるのが, その多くが人工培地上での生育が極めて遅く, 子実体形成に必要な菌体量を得るのが難しいことである。

菌根菌に関する研究は, その宿主植物との相互作用の解明を目的に古くから行われている<sup>1)-8)</sup>。このうち外生菌根菌においては, これまでに宿主植物の根滲出液によって菌体量が増加することや, 胞子発芽が誘導されるなどの報告がある。近年ではコツブタケ [*Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert] において, 宿主植物の根滲出液に含まれる Rutin がその菌糸伸長を促進することも報告されている。そこで, このような宿主植物由来の物質 (シグナル分子) を培地に添加することで, 外生菌根菌の効率的な培養を可能にすることが考えられた。しかし, 両者の相互作用に関

しては現在でも未解明な点が多く, また, 菌糸生長を促進するような物質の報告は少ない。

以上を踏まえ, 菌糸生長に対する宿主由来のシグナル分子を外生菌根菌の大量培養に利用することを目的に, 宿主植物-外生菌根菌間で働くシグナル分子の探索を行うこととした。

本報では, 宿主植物が外生菌根菌の菌糸生育に及ぼす作用について報告する。

#### 実験方法

##### 1. 材料

###### 1-1. 供試菌

以下の各試験に, 表1に示す外生菌根菌3種を用いた。これらの菌株は, 自然界から採集した子実体より組織もしくは胞子分離を行い, その菌糸を得た。種は形態の特徴および分離菌糸より得た rDNA の ITS 配列を DNA Data Bank of Japan (DDBJ) / European Molecular Biology Laboratory (EMBL) / GenBank の BLAST で相同性検索し, 同定した。

###### 1-2. 植物体試料

表2に示す堅果 (ドングリ) または種子, 植物体を購入し, 以下の各試験に用いた。根は, 植物体より切断し, 水道水で養土を取り除き, 超純水ですすいだ。洗浄後, 細

表1 供試した外生菌根菌

菌株番号 (TIFT-M-no.)	科	種	和名	発生環境 (樹種)	採集地
13	Boletaceae	<i>Boletellus elatus</i> Nagas.	アシナガイグチ	ブナ科広葉樹	兵庫県宝塚市
10	do.	<i>Boletus reticulatus</i> Schaeff.	ヤマドリタケモドキ	ブナ科広葉樹	兵庫県宝塚市
25	Lyophyllaceae	<i>Lyophyllum shimeji</i> (Kawam.) Hongo	ホンシメジ	アカマツ近辺	兵庫県宝塚市

表2 供試した宿主植物試料

科	種	和名	購入先	
			堅果/種子	植物体
Fagaceae	<i>Quercus acutissima</i> Carruth.	クヌギ	独立行政法人森林総合研究所 林木育種センター	-
do.	<i>Quercus glauca</i> Thunb.	アラカシ	大阪府吹田市 (採取)	-
do.	<i>Quercus serrata</i> Thunb.	コナラ	独立行政法人森林総合研究所 林木育種センター	株式会社国華園
do.	<i>Lithocarpus edulis</i> Nakai	マテバシイ	-	有限会社エーアンドエフ
Pinaceae	<i>Pinus densiflora</i> Siebold & Zucc.	アカマツ	独立行政法人森林総合研究所 林木育種センター	独立行政法人森林総合研究所 林木育種センター 有限会社エーアンドエフ

根部を切断し、抽出用の試料とした。

## 2. 方法

### 2-1. 植物根抽出液添加試験法

#### 2-1-1. 植物根の抽出

植物細根 約 2.0 g を細断し、液体窒素により凍結させ、乳鉢と乳棒で粉碎後、100 ml の滅菌水を数回に分けて加え、さらに磨砕した。その後、遠心分離 [10,000 rpm (ローター: 半径: max. 11.65 cm, 傾き: 35°), 5 min] し、その上清をメンブランフィルター [孔径 0.45 μm, 0.2 μm; 東洋濾紙(株)製] で 2 回に分けて濾過除菌し、粗抽出液とした。

#### 2-1-2. 根抽出液添加液体培地での培養

MMN 液体培地 10 ml [Modified Melin-Norkrans; 0.5% (w/v) malt extracts; 1.0% (w/v) glucose; 0.035% (w/v) ammonium tartrate; 0.05% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.015% (w/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.0025% (w/v) NaCl; 0.12% (v/v) 0.1% solution of FeCl<sub>3</sub>; 0.001% (w/v) thiamin hydrochloride; pH 5.4] の入った 100 ml 容の三角フラスコに根抽出液を 5,000 μl 添加 (対照区: 滅菌水 5,000 μl) し、そこへ菌糸体 disk (直径 5 mm) を 5 個接種し、静置培養した (25°C, 暗黒下)。培養期間は、*Bolete. elatus*, *Boletu. reticulatus* は 8 週間、*L. shimeji* は 4 週間培養した。

なお、malt extracts は Difco, その他の試薬は和光純薬工業(株)より購入した。

#### 2-1-3. 菌糸体重量の測定

蓋付き遠沈管に濾紙 (WhatmanTM, 厚さ 0.21 mm, 粒子保持能 8 μm, 直径 90 mm) を入れ、乾熱滅菌器 [SH42; ヤマト科学(株)] で乾燥させた (60°C, 24 時間)。その後、電子天秤で重量を測定し、風袋重量を得た。遠沈管よ

り濾紙を取り出し、2-1-2. で一定期間培養した培養液を濾過し、菌体を回収した。その後、菌体ごと濾紙を遠沈管へ戻し、乾熱滅菌器で乾燥させた (60°C, 24 時間)。乾燥後、電子天秤で重量を測定し、風袋重量を差し引いた値を菌体重量とした。

#### 2-1-4. 抽出液添加寒天培地での培養

MMN 寒天培地 10 ml (組成; 方法 2-1-2. 参照, 1.5% Agar) の入った 4 分画シャーレに、対照区には滅菌水 5,000 μl, 処理区には根抽出液をそれぞれ 50 μl, 500 μl, 5,000 μl 添加した。各培地の最終濃度は、滅菌水を添加し、等しくなるよう調整した。シャーレの中心に *L. shimeji* の disk (直径 5 mm) を接種し 3 週間静置培養した (25°C, 暗黒下)。シャーレに接種源を中心に垂直に交わる直線を引き、接種源から直線と菌糸先端の交点までを一週間ごとに測定した。

#### 2-1-5. 菌糸厚の測定

2-1-4. の対照区および 5,000 μl 添加区の菌層の一部を、接種源から約 1.0 cm 離れた箇所で寒天培地ごと切り出し、実体顕微鏡 [STZ-168-BL; (株)島津理化] を用いて、その菌糸層の厚みを測定した。

#### 2-1-6. 根抽出液の糖度測定

茶・低糖飲料濃度計 (RX-DD7α-Tea; ATAGO®) を用いて、抽出液中に含まれる糖類の含量 (Brix.) を簡易測定した。

#### 2-1-7. 根抽出液中に存在する金属元素の測定

ICP 発光分光分析法 [Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; マルチチャンネル型; ICPE-9000; (株)島津製作所] を用いた多元素同時測定によ

る根抽出液に含まれる金属元素の定量を行った。測定対象は、きのこの生育に大きく影響するといわれる K, P, Fe をはじめ、その他 Ca, Cu, Mg, Mn, Na, S, Zn の計 10 種の元素とした。

分析条件は表 3 に示した。また、定量は濃度既知の元素標準液を用いた検量線法により行った。

表 3 ICP 測定条件

高周波パワー	1.2 kW
プラズマガス (Ar)	10 L/min
補助ガス (Ar)	0.6 L/min
キャリアガス (Ar)	0.7 L/min
露光時間	30 秒
内部標準	Y

## 2-2. 宿主植物との二員培養法

### 2-2-1. 種子の表面殺菌

ブナ科植物：あらかじめ外皮を剥いておいた堅果を 70% エタノール (50 ml), 滅菌溶液 [50 ml, 次亜塩素酸ナトリウム水溶液:有効塩素濃度 0.05% (v/v) 以上, 1.0% (v/v) polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween® 20)] の順にそれぞれ 8 分間浸し、表面殺菌した。その後、滅菌水で 3 回洗浄し、子葉を少量残した状態で胚を切り出し、MS [Murashige and Skoog Plant Salt Mixture; 1.0% (w/v) glucose; 1.0% (w/v) Agar; pH 5.5] 培地上で培養した (25°C, 暗黒下)。

アカマツ：種子を 70% エタノール (50 ml), 滅菌溶液 (50 ml) の順にそれぞれ 3 分間浸し、表面殺菌した。その後、滅菌水 (50 ml) で 3 回洗浄し、素寒天 [1.0% (w/v) agar] 培地上で培養した (25°C, 暗黒下)。

### 2-2-2. 二員培養および菌糸伸長測定方法

根が 2.0 ~ 3.0 cm 生育した後、稚苗を新しい MS 培地へと植え換えた。この根から約 2.0 cm 離れた箇所に菌根菌の菌糸体 disk (直径 5.0 mm) を接種し (対照区: MS 培地に菌糸体 disk のみ) 二員培養を行った。シャーレの底面に接種源を中心に垂直に交わる直線を引き、接種源から直線と菌糸先端の交点までを一週間ごとに測定した。

## 結果

### 1. 根抽出液が菌根菌生育に与える影響

#### 1-1. 根抽出液添加液体培地を用いた菌根菌の生育評価

各処理区の菌根菌生育評価を行った結果、アカマツ及びコナラ区において対照区に比べ処理区の菌体量が増加する傾向が確認された (図 1-a, b)。各区における菌根菌の増幅率は、アカマツ区: *Bolete. elatus*; 1.16 倍, *Boletu. reticulatus*; 1.09 倍, *L. shimeji*; 1.29 倍, コナラ区 *Bolete. elatus*; 1.25 倍, *Boletu. reticulatus*; 1.13 倍, *L. shimeji*; 1.28 倍であった。

一方、マテバシイ区では、*Boletu. reticulatus* および *L. shimeji* で多少の菌体量の増加はあったものの極めて小さく、また、*Bolete. elatus* においてはやや低い値を示した (図 1-c)。

#### 1-2. 根抽出液添加寒天培地を用いた菌根菌の生育評価

根抽出液添加液体培地の試験において、菌体量の増加が確認できたアカマツおよびコナラの根抽出液を MMN 寒天培地へ添加し (対照区: 0 µl, 処理区: 50 µl, 500 µl, 5,000 µl), *L. shimeji* の培養試験を行った。

その結果、どの処理区も菌糸伸長は同程度であったが、根抽出液を 5,000 µl 添加した培地において、菌糸層が厚く積層する傾向を確認した (図 2-a, b)。

そこで、寒天培地ごと菌糸を切り出し、その菌糸層の厚みを測定したところ、5,000 µl 処理区では、アカマツ区で約 290 µm, コナラ区で 190 µm, 対照区に比べてより厚くなっていることが示された (図 3)。

#### 1-3. 根抽出液の糖度測定

アカマツおよびコナラの根抽出液を測定した結果、各 Brix 値はアカマツ 0.08%, コナラ 0.11% であった (表 4)。濃度計による測定では、試料に糖類以外の溶存固形物が含まれている場合にそれらの影響を受けるため、正確な糖度を求めることは難しいが、各抽出液中に存在する糖類が、これらの数値以下の低い濃度であるとは推察できる。

#### 1-4. 根抽出液中に存在する金属元素測定

測定の結果、生育評価の培養基である MMN 培地中に含まれる金属元素と共通する Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S は、いずれも培地の含有量より明らかに低い値を示した (表 5)。

また、それ以外の Cu, Mn および Zn に関しては、1.0 ppm 以下と極微量であった。

## 2. 宿主植物との二員培養が菌根菌生育に与える影響

菌糸伸長測定を行った結果、宿主植物の稚苗 (クヌギ, アラカシ, アカマツ) と二員培養することで *L. shimeji* および *Bolete. elatus* の菌糸伸長速度が、対照区に比べ、それぞれ 1.41 ~ 1.69 倍, 1.13 ~ 1.52 倍と速くなる傾向が確認できた (図 4-a, b)。またその効果は、*L. shimeji* ではアカマツ, 次いでクヌギ, アラカシ, *Bolete. elatus* ではクヌギ, 次いでアラカシ, アカマツの順で強く現れた。

さらに、菌根菌の菌糸伸長の動向を経過観察した結果、上記の効果が確認された 2 菌株において、菌糸が稚苗へ向かって伸びる傾向も確認できた (図 5)。

*Boletu. reticulatus* においては、MS 培地への適性が低かったためか、生育不良によりその効果の有無を判断できなかった。

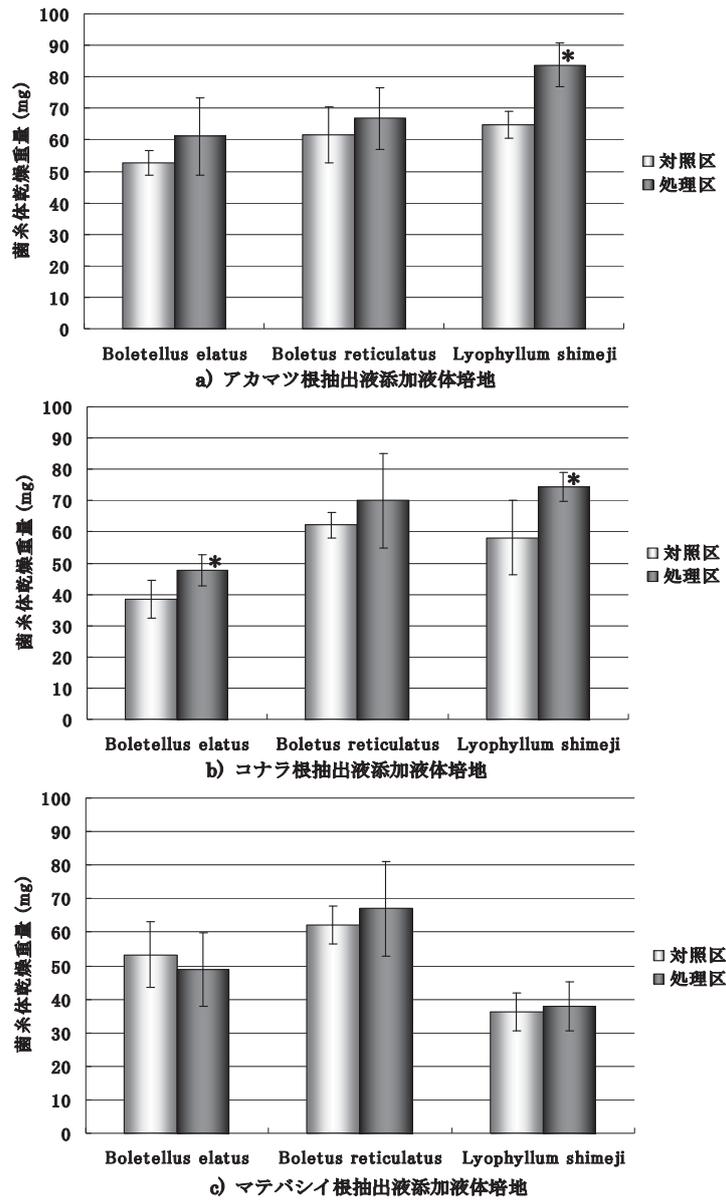


図1 各根抽出液添加液体培地での生育評価

\* : P<0.01, n=3

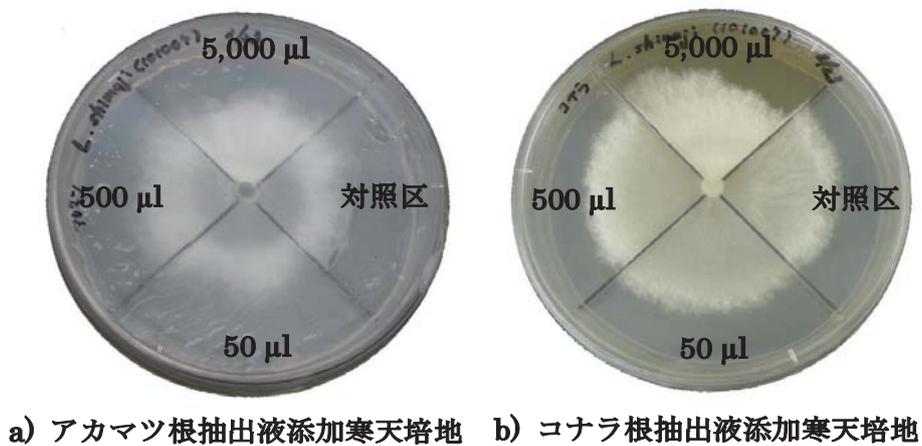


図2 根抽出液が *Lyophyllum shimeji* の菌糸生育に与える影響

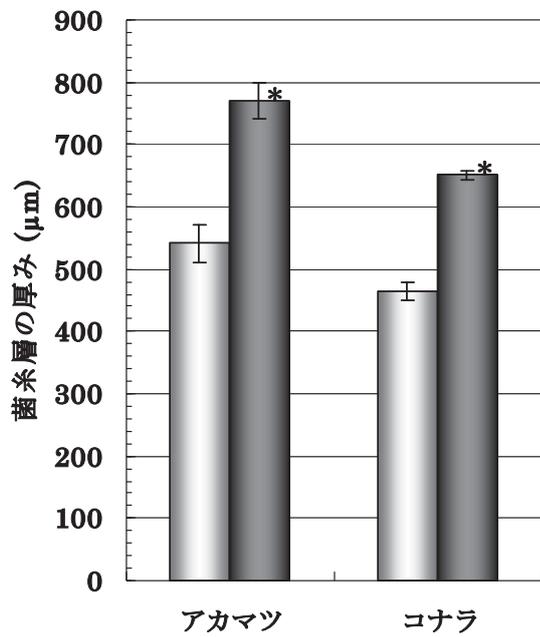


図3 根抽出液による *Lyophyllum shimeji* の菌糸層の厚みの変化

□ : 対照区    ■ : 5,000 μl 区  
\* : P<0.0, n=6

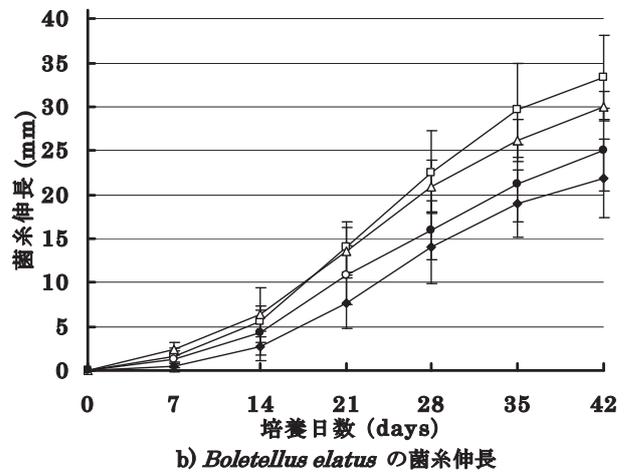
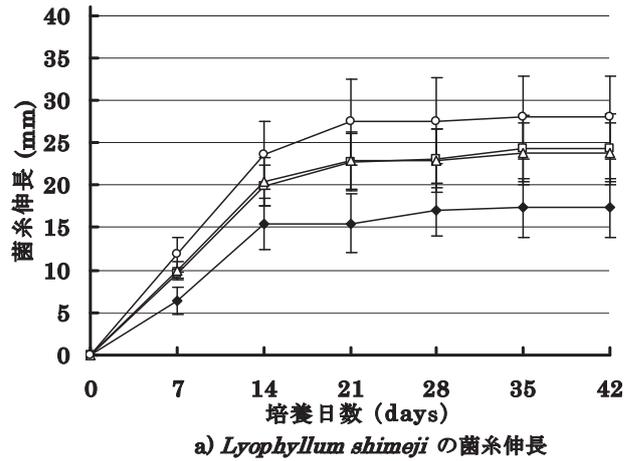


図4 外生菌根菌の菌糸生育に対する宿主植物の影響

◆ : 対照区、● : アカマツ、▲ : アラカシ、■ : クスギ  
白抜き : p<0.01, n=3

表4 根抽出液の糖類測定結果 (n=3)

	アカマツ	コナラ
<b>Brix 値 (±S.D.)</b>	0.08% (0.01)	0.11% (0.00)

表5 ICP 分析結果 (n=4)

元素	ICP分析 [ppm (±S.D.)]		
	MMN	アカマツ	コナラ
<b>Ca</b>	16.23 (1.83)	2.52 (0.43)	6.33 (1.11)
<b>Cu</b>	-	0.01 (0.00)	0.05 (0.03)
<b>Fe</b>	2.99 (0.88)	0.03 (0.00)	0.29 (0.05)
<b>K</b>	125.60 (26.87)	12.42 (0.56)	34.73 (3.81)
<b>Mg</b>	13.94 (1.56)	1.86 (0.55)	6.15 (0.77)
<b>Mn</b>	-	0.08 (0.04)	0.09 (0.00)
<b>Na</b>	13.54 (0.19)	7.52 (2.41)	11.05 (4.43)
<b>P</b>	126.90 (26.1)	9.38 (1.37)	19.73 (1.45)
<b>S</b>	10.70(2.80)	3.94 (0.52)	3.62 (0.78)
<b>Zn</b>	-	0.20 (0.16)	0.71(0.40)

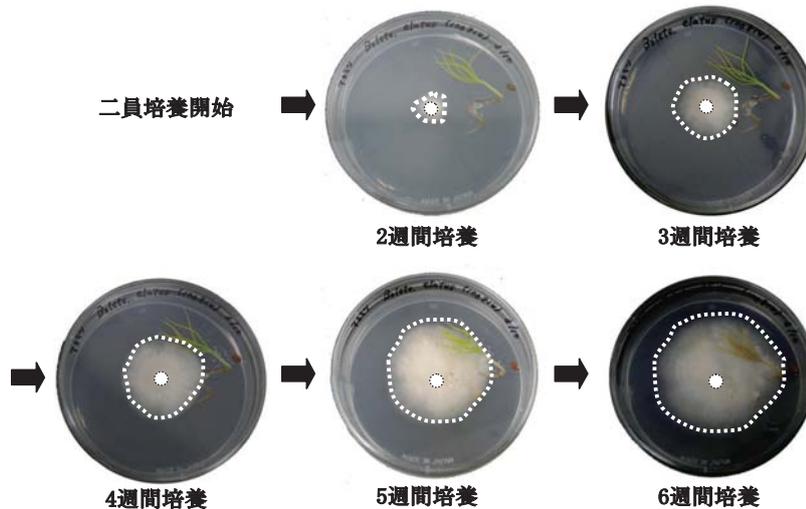


図5 *Boletellus elatus* の菌糸伸長の動向

稚苗：アカマツ

## 考察

### 1. 根抽出液が菌根菌生育に与える影響

液体培地へアカマツおよびコナラ根抽出液を 5,000  $\mu$ l 添加することによって、*L. shimeji* および *Boletu. reticulatus*, *Bolete. elatus* の菌体量が対照区に比べ、増加する傾向を確認した (図 1-a, b). 中でも *L. shimeji* における菌体量の増加は最も顕著であり、根抽出液添加寒天培地での生育試験でも、その菌糸層が対照区に比べ、いずれの根抽出液においても厚くなることが明らかであった (図 2-a, b, 図 3).

これらの結果は、根抽出液中に菌根菌生育を促進させる何らかの物質が存在することを示唆した。外生菌根菌に対する宿主植物の根抽出液や滲出液のこのような効果は、これまでにいくつか報告はあるものの、その作用物質を特定した報告は少ない。

今回、作用を示した物質として、根抽出液中の糖類、金属イオン、植物ホルモン、植物の二次代謝産物等が考えられた。

効果を示した根抽出液中に存在する糖類については、その濃度を糖度計で測定した結果、各 Brix 値は平均してコナラ 0.11%、アカマツ 0.08% であり (表 4)、いずれも低い値を示した。そのため、菌体量の増加が根抽出液に含まれる糖類によるものとは考えにくい。

金属イオンについては、これまでに外生菌根菌 *T. matsutake* の菌糸生育において  $Fe^{3+}$  や  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  などの影響が報告されている<sup>9)</sup>。これら金属イオンは、*T. matsutake* の菌糸生長に大きく作用し、これらの存在下で生育させた菌糸体量は、欠乏させた環境下で生育させたものに比べ、明らかに良いと言われている。そこで、ICP 分光分析装置を用いて根抽出液中に存在する金属元素の種類および量を測定した。

その結果、根抽出液中に存在する金属元素 (Ca, Fe, K,

Mg, Na, P, S) は、いずれも、培養基である MMN 培地中に含まれる値より顕著に低い値を示した (表 5)。また、その他の Cu, Mn, Zn も、いずれも 1.0 ppm にも満たない含有量であることが示された。そのため、根抽出液を MMN 培地へ添加したとしても、各金属イオン濃度の増幅量は極めて小さく、菌糸生育に大きく影響するとは考えにくい。また、今回対象としたもの以外の金属イオンの影響は否定できないが、水抽出物であることから、存在したとしてもその量は極微量であると予想される。そのため、他の金属イオンが影響しているとも考えにくい。以上のことから、根抽出液中に含まれる金属イオンが今回の生育促進に関与している可能性は低いと推察する。

次に植物ホルモンについてであるが、これまでにきのこの菌糸生育に対していくつかの植物ホルモンが作用を示した報告がある。外生菌根菌における報告では、Zeatin が *Pisolithus* 属菌の菌糸形態に作用することや<sup>6)</sup>、強い効果ではないもののインドール-3-酢酸 (IAA) や 1-ナフタレン酢酸 (NAA) が *T. matsutake* に対して生育促進効果を示すことが報告されている<sup>9)</sup>。しかしながら、作成した根抽出液の LC/MS 分析結果からは、そのような植物ホルモンは確認できなかった (データ非表示)。そのため、これらが関与している可能性も低いと考える。

植物の二次代謝産物が微生物にもたらす効果は、これまでに多数報告がある。その中でも、作用物質として多く報告があるのがフラボノイド類である。フラボノイド類は、植物組織全体の細胞、主に液胞に存在する化合物で、C6-C3-C6 の基本構造を持つものである。これらは植物が生存していくうえで重要な役割を多く担っており、現在わかっているものでは植物自身の紫外線防御、受粉媒介者の誘因 (認識)、花粉管の発芽促進、そして植物-微生物間の相互作用を担うシグナル分子としての機能等が挙げられる<sup>10)-11)</sup>。

このシグナル分子の作用としては、植物-植物病原菌においては *Aphanomyces euteiches* の遊走子がエンドウの根分泌物中に含まれる Prunetin (およびその誘導体) によって誘引されることや<sup>12)-13)</sup>、植物-根粒細菌においては Luterin, Hesperetin, Daidzein 等の多くのフラボノイド類が根粒細菌の *nod* 遺伝子 (nodulation genes) の発現を活性化させるなどの報告がある<sup>14)-18)</sup>。さらに植物-菌根菌における報告も多く、特にアーバスキュラー菌根菌においては Biochanin A をはじめ、多数のフラボノイド類による胞子発芽や菌糸伸長促進効果が報告されている<sup>19)-21)</sup>。

本研究対象である外生菌根菌においても、Melin<sup>1)</sup> はじめ、古くからその宿主植物との相互作用について研究されており、これまでにユーカリ属の植物 (*Eucalyptus* sp.) が生産する Rutin が *P. arhizus* や *Suillus bovinus* (Pers.) Roussel の菌糸伸長を促進する効果を有することが報告されている<sup>5)-6)</sup>。さらに、*S. bovinus* においては、Hesperidin や Genisteine をはじめとする7種のフラボノイド類がその胞子発芽を刺激するという報告もある<sup>22)</sup>。以上のことから、今回の作用物質もフラボノイド類である可能性が高いと考える。今後は、二次代謝産物を中心に作用物質の探索を行っていく。

## 2. 宿主植物との二員培養が菌根菌生育に与える影響

菌糸伸長測定を行った結果、宿主植物の稚苗 (クヌギ、アラカシ、アカマツ) と二員培養することで *L. shimeji* および *Bolete. elatus* の菌糸伸長速度が、対照区に比べ速くなる傾向が確認できた (図4-a, b)。菌根菌に対する宿主植物の効果は、*L. shimeji* では、アカマツ、次いでクヌギ、アラカシ、*Bolete. elatus* では、クヌギ、次いでアラカシ、アカマツの順で強く現れた。このことは、本試験で用いた *L. shimeji* がブナ科植物よりもアカマツを、*Bolete. elatus* がアカマツよりもブナ科植物を宿主植物として好むことを推察させた。実際に、使用した *L. shimeji* は、ブナ科広葉樹が優占する中に散在するアカマツの近辺で、*Bolete. elatus* はブナ科広葉樹のみの森で採取したものであり、上記推察が支持される (表1)。

また、菌根菌の菌糸伸長の動向を経過観察した結果、上記の効果が確認された2菌株において、菌糸が稚苗へ向かって伸びる傾向も確認できた (図5)。

以上の結果から、宿主植物は菌根菌の菌糸伸長、さらには菌糸誘導 (もしくは宿主認識) を促すシグナル分子を生産していることが示唆された。

現在、このような作用を示す物質は、根抽出液中に含まれる様々な水溶性物質、あるいは根が放出する揮発性物質ではないかと考えている。

水溶性物質に関しては、考察1に記載したような物質が挙げられる。一方、植物が生産する揮発性物質に関しては、植物間、植物-微生物間、植物-動物間等において様々な作用を示す物が存在することが知られている<sup>23)-24)</sup>。その作用としては、他生物からの自己防御や昆虫などに対する誘引等が挙げられる。

近年の報告では、*Paspalum notatum* Flügge (バヒアグラス) や *Vulpia myuros* (L.) C.C.Gmel (ナギナタガヤ)、*Vulpia megalura* (Nutt.) Rydb. (オオナギナタガヤ) が生産する nonanol や 2-ethyl-1-hexanol をはじめとする15種の揮発性成分が土壌性病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lactucae*, *Rhizoctoria solani* および *Rosellina necatrix* の生育を抑制することが報告されている<sup>25)</sup>。さらに、同定された揮発性成分の内いくつかは、*Bacillus subtilis* や *Pseudomonas stutzeri* など、植物自身にとって有益な細菌の生育を促進する効果も示した<sup>25)</sup>。

宿主植物-外生菌根菌間においては、宿主植物由来の揮発性成分、主にテルペン類やセスキテルペン類による *Boletus variegatus* Schaeff. や *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. の菌糸生長阻害が報告されている。また、宿主植物から検出される揮発性成分が菌根共生前後でその種類および量が異なる報告もあり、揮発性成分が菌根形成において重要な役割を担っている可能性は大きいと言われている<sup>26)-27)</sup>。

現段階では、二員培養試験で効果を示した物質が、水溶性物質であるのか揮発性物質であるのか、両物質によるものなのか判断することはできない。今後、これら両物質を視野に入れて作用物質の探索を行っていく。

## まとめ

宿主植物アカマツおよびコナラの根抽出液を添加した液体培地において、外生菌根菌 *L. shimeji* および *Bolete. elatus*, *Boletu. reticulatus* の菌体量の増加が確認された。これらを寒天培地へ添加し、先行試験で顕著に効果が現れた *L. shimeji* を培養した結果、菌糸の伸長速度に変化はなかったものの、菌糸層が対照区のものより厚くなる傾向が見られた。そのため、これらの根抽出液中には外生菌根菌の菌糸体量を増加させる菌糸生長促進物質が含まれていることが示唆された。

また、*L. shimeji* および *Bolete. elatus* については、宿主植物の稚苗と二員培養することで、その菌糸の伸長速度が速まる傾向や、菌糸が稚苗へ向かって伸びる (宿主植物に誘導される) 現象が確認できた。この結果は、宿主植物がこの様な作用を持つ物質を放出していることを示した。

本研究の結果は、宿主植物が菌糸生長促進物質や、菌糸伸長促進物質、そして宿主認識物質 (または菌糸誘導物質) といった外生菌根菌と共生関係を確立するのに資するシグナル分子を生産している可能性を示唆し、これまでに提唱されてきた宿主植物-外生菌根菌間の相互作用に関する考えを支持した。

## 引用文献

- 1) Melin, E., Some effects of forest tree roots on mycorrhizal basidiomycetes. In: Symbiotic Associations, *Proceedings of the 13th Symposium of the Society of General Microbiology*,

- edited by P.S. Nutman and B. Mosse, Cambridge University Press, Cambridge, pp.124-145 (1963)
- 2) Fries, N., Serck-Hanssen, K., Dimberg, L.H. and Theander, O., Abietic acid, and activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Exp. Mycol.*, **11**, pp.360-363 (1987)
  - 3) Fries, N., Specific effects of diterpene resin acids on spore germination of ectomycorrhizal basidiomycetes, *Experientia*, **44**, pp.1027-1030 (1988)
  - 4) Horan, D.P. and Chilvers, G.A., Chemotropism-the key to ectomycorrhizal formation?, *New Phytologist*, **116**, pp.297-301 (1990)
  - 5) Lagrange, H., Jay-Allgmand, C. and Lapeyrie, F., Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations, *New Phytologist*, **149**, pp.349-355 (2001)
  - 6) Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C. and Lapeyrie, F., Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes, *New Phytologist*, **151**, pp.145-154 (2001)
  - 7) Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R. and Bécard, G., The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13**, pp.693-698 (2000)
  - 8) Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H., Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, *Nature*, **435**, pp.824-827 (2005)
  - 9) Kawai, M. and Terada, O., Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. II Effects of vitamins, nucleic acid relating substances, phytohormones and metal ions in media on the vegetative growth of *T. matsutake*, *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, **17**, pp.168-174 (1976)
  - 10) Ylstra, B., Touraev, A., Maria, R., Moreno, B., Stöger, E., Tunen, A. J. V., Vicente, O., Mol, J.N.M. and Heberle-Bors, E., Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen, *Plant Physiol.*, **100**, pp.902-907 (1992)
  - 11) 津志田藤二郎, 第一章. 1-1. フラボノイド概論, フラボノイドの医学, 吉川敏一 (編集), 講談社 (東京), pp.1-6 (1998)
  - 12) Yokosawa, R., Kuninaga, S. and Sekizaki, H., *Aphanomyces euteiches* Zoospore Attractant Isolated from Pea Root; Prunetin, *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **52**, pp.809-816 (1986)
  - 13) Sekizaki, H. and Yokosawa, R., Studies on Zoospore-Attracting Activity. I. Synthesis of isoflavones and Their Attracting Activity to *Aphanomyces euteiches* Zoospore, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, pp.4876-4880 (1988).
  - 14) Peters, N.K., Frost, J.W. and Long, S.R., A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes, *Science* (New York, N.Y.), **233**, pp.977-980 (1986).
  - 15) Kossalak, R.M., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H.E., and Appelbaum, E.R., Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, pp.7428-7432 (1987).
  - 16) Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Brussel, A.A.N.V., Okker, R.J.H. and Lugtenberg, B.J.J., Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones, *J. Bacteriol.*, **169**, pp.198-204 (1987).
  - 17) Long, S.R., *Rhizobium* Symbiosis: Nod Factors in Perspective, *Plant Cell*, **8**, pp.1885-1898 (1996).
  - 18) Geurts, R. and Bisseling, T., *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling, *Plant Cell*, pp.S239-S249 (2002).
  - 19) Nair, M.G., Safir, G.R. and Siqueira, J.O., Isolation and Identification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza-Stimulatory Compounds from Clover (*Trifolium repens*) Roots, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, pp.434-439 (1991).
  - 20) Bécard, G., Douds, D.D. and Pfeffer, P.E., Extensive In Vitro Hyphal Growth of Versicular-Arbuscular mycorrhizal Fungi in the Presence of CO<sub>2</sub> and Flavonols, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, pp.821-825 (1992).
  - 21) Vierfeiling, H., Bago, B., Albrecht, C., Poukin, M.-J. and Piché, Y., Flavonoid and Arbuscular-mycorrhizal fungi, *Flavonoids in the Lining System*, edited by Manthey and Buslig, Plenum Press, New York, pp.9-33 (1998).
  - 22) Kikuchi, K., Matsushita, N., Suzuki, K. and Hogetsu, T., Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*, *Mycorrhiza*, **17**, pp.563-570 (2007).
  - 23) 西村弘行, 植物の香り成分と生理活性, *化学と生物*, **42**, pp.538-545 (2004).
  - 24) Wenke, K., Kai, M. and Piechulla, B., Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms, *Planta*, **231**, pp.499-506 (2010).
  - 25) Yu, D., Toda, Y., Kuwada, K., Cruz, A.F. and Ishii, T., Effect of Volatile Compounds in Shoots and Leaves of Bahiagrass, *Vulpia myuros* and *Vulpia megalura* on the Growth of Several Kinds of Soil-borne Plant Pathogens and Beneficial Microorganisms, *Journal of Japanese society of Agricultural Technology Management*, **16**, pp.29-35 (2009).

- 
- 26) Melin, E. and Krupa, S., Studies on ectomycorrhizae of pine. II. Growth inhibition of mycorrhizal fungi by volatile organic constituents of *Pinus silvestris* (Scots Pine) roots, *Physiol Plant.*, **25**, pp.337-340 (1971).
- 27) Menotta, M., Giacchini, A.M., Amicucci, A., Buffalini, M., Sisti, D. and Stocchi, V., Headspace solid-phase microextraction with gas chromatography and mass spectrometry in the investigation of volatile organic compounds in an ectomycorrhizae synthesis system, *Rapid comm. Mass Spectrom.*, **18**, pp.206-210 (2004).