

日本産ハルシメジ類の菌根の形態及び生態とその利用に関する研究

誌名	茨城県林業技術センター研究報告
ISSN	13442090
著者名	小林,久泰
発行元	茨城県林業技術センター
巻/号	27号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1-39
発行年月	2007年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



N D C 分類
657.8

ISSN 1344-2090

茨城県林業技術センター 研 究 報 告

No. 27

茨城県林業技術センター

茨 城 ・ 那 珂

2007・3



茨城県林業技術センター研究報告 第 27 号 (2007 年 3 月)

目 次

日本産ハルシメジ類の菌根の形態及び生態とその利用に関する研究 ……………	小 林 久 泰 ……………	1
--------------------------------------	---------------	---

BULLETIN OF THE IBARAKI PREFECTURAL FORESTRY RESEARCH INSTITUTE

No.27 March 2007

CONTENTS

(With an English summary)

KOBAYASHI, Hisayasu:

Studies on entolomatoid fungi associated with rosaceous and ulmaceous plants in Japan
and their utilization. 1

日本産ハルシメジ類の菌根の形態及び生態と その利用に関する研究

小 林 久 泰*

KOBAYASHI Hisayasu : Studies on entolomatoid fungi associated with rosaceous and
ulmaceous plants in Japan and their utilization.

目 次

第1章 序 論	3
第2章 日本産ハルシメジ類の分類学的検討	4
1. 目 的	4
2. 材料と方法	5
3. 結 果	5
4. 考 察	12
第3章 ハルシメジ類の菌根の形態	15
第1節 菌根形態の再検討	15
1. 目 的	15
2. 材料と方法	16
3. 結 果	17
a. 菌根の外部形態	17
b. 菌根の内部形態	17
4. 考 察	17
第2節 菌根の微細構造	20
1. 目 的	20
2. 材料と方法	20
3. 結 果	20
a. 根の細胞の形態的特徴	20
b. 菌糸細胞の形態的特徴	20
c. 菌糸細胞間隙	24
d. 根の細胞と菌糸細胞の境界領域	24
4. 考 察	24
第3節 考 察	25

*きのこ特産部・技師

第4章 ハルシメジ類の菌根の季節消長	25
1. 目 的	25
2. 調査地, 調査期間, 調査方法	26
3. 結 果	26
4. 考 察	27
第5章 ハルシメジ類のウメ菌根苗の育成	27
第1節 子実体発生地付近に生じた実生苗の菌根形成状況	29
1. 目 的	29
2. 材料と方法	29
3. 結 果	29
4. 考 察	29
第2節 菌根形成した実生苗の移植	29
1. 目 的	29
2. 材料と方法	29
3. 結 果	30
4. 考 察	30
第3節 子実体粉碎液散布による菌根苗作出技術の検討	30
1. 目 的	30
2. 材料と方法	30
3. 結 果	31
4. 考 察	31
第4節 考 察	31
第6章 総合考察	32
摘 要	34
謝 辞	35
引用文献	36
Summary	39

第1章 序 論

菌根性きのこの1群であるハルシメジ類は担子菌門単室担子菌綱ハラタケ目イッポンシメジ科イッポンシメジ属に属する食用菌類である（今関・本郷 1987）。他菌種の発生が少ない春に、他菌種が発見されることがまれな、バラ科植物が生育する場所の地上に発生し、発生時期になると、自然に発生したきのこが直売所などで販売されている。それ故、同菌群の栽培化に成功すれば、中山間地域の産業振興に役立つものと考えられる。

ハルシメジ類の存在は古くから各地で認識されてきた。最も古い記述では、17世紀初頭のヨーロッパで、サクラ属植物が生育する場所近くの地上に、春に発生するきのこについて記録されている（Clusius 1601）。それ以来、特にヨーロッパ各地において、バラ科植物と共生しているイッポンシメジ属菌が記録され、分類学的研究が進められてきた（Romagnesi 1947, Noordeloos 1981, Moser 1983, Bon 1987, Noordeloos 1992）。現在、ヨーロッパでは、バラ科植物の下に発生する種として、*Entoloma clypeatum* (L.) P. Kumm. の他に3種が知られ、またニレ科植物の下に発生する種が2種知られている（Noordeloos 1992）。Noordeloos (1981) はバラ科やニレ科と関係のあるイッポンシメジ属菌について分類学的検討を行い、section Nolanidea という節に含めることを提唱した。

ヨーロッパ以外の地域では、北アメリカで *E. clypeatum* (L.) P. Kumm. f. *hybridum* (Romagn.) Noordel. が秋にリンゴ樹下に発生すると報告されている（Largent 1994）。また、中国では *E. clypeatum* が、アンズ樹下に夏から秋にかけて発生すると報告されている（卯 2000）。

日本では、ハルシメジ類として、これまでに *E. clypeatum* の一種が記載され、リンゴ、ナシ、ノイバラ、ウメ、モモ、ヤマザクラ等、多くのバラ科植物樹下の地上で発生することが知られている（今関・本郷 1987）。しかし、ニレ科植物樹下の地上に発生したという報告はなく、この分類群の共生相手の範囲は十分に理解されているとはいえない。また、ハルシメジと呼ばれるきのこの中に形態的に異なるタイプのものが複数存在することが指摘されている（本郷 2001）。しかし、これらについては未だ分類学的に検討されていない。

ハルシメジ類は菌根性きのこで、菌鞘を形成することから、既知の基本型のうち、内外生菌根を形成するという見解（廣江・橋本 1940）と外生菌根を形成するという見解（Becker 1956, Trappe 1962, Andruszewska and Dominik 1971, Molina et al. 1992）が示されてきた。しかし、記載や図を見る限り、彼らの報告はハルティヒネットの観察や根組織全体の観察が不十分であった。近年、Agerer and Waller (1993) は、*Entoloma saepium* (Noulet & Dass.) Richon & Roze がバラ属の一種 *Rosa* sp. とヨーロッパスモモ *Prunus domestica* L. を宿主として形成した菌根について詳細な光学顕微鏡観察を行った結果、皮層細胞間にハルティヒネットが形成されず、根の先端部の根冠細胞、分裂組織及び皮層細胞が“破壊”され、そこに菌糸が侵入するという非常に独特な形態の菌根であることを発見した。しかし、ハルシメジ類全般に同じような形態をとるかどうかは不明であり、また、光学顕微鏡以外の観察は行われておらず、宿主植物との間にどのような関係が生じているか等については全く明らかになっていない。

これまでにハルシメジ類の栽培化に向けた基礎研究は廣江・橋本 (1940) によって行われたのみである。彼らは梨園で採集した子実体や菌根の形態を観察し、担子胞子射出温度、担子胞子発芽能力、菌糸の培

養条件を検討している。これらは菌根をつくらせる以前の菌の生理的特性に含まれるものであり、ハルシメジ類の栽培化を目指した場合、菌と植物を接触させ、菌根形成を誘導することが第一義的に重要であると考えられ、そのための研究を行う必要がある。しかし、ハルシメジ類の菌根に関して、形態学的研究以外は、人工的な菌根合成も含め、報告例が全くない。

以上のことからハルシメジ類の栽培技術を確立するためには、最初に日本産の種類について分類学的な再検討を行い、個々の種と宿主との関係を明らかにする必要がある。次に、ハルシメジ類の菌根がいかなる形態を持ち、それがこの群において一般的なものであるか否か、植物に対して、より寄生的、あるいはより共生的であるのかを検討する必要がある。そのためには、光学顕微鏡に加え、透過型電子顕微鏡による菌根内の細胞の状態、分布等を詳細に検討してみる必要がある。また、野外における菌根の消長と季節の関係を詳細に観察する必要がある。その上で、菌根合成の条件を検討することにより、ハルシメジ類の栽培化への第一歩を踏み出せると考える。

そこで、本研究では、日本産ハルシメジ類の栽培技術の開発を目的に、次のような研究を行った。第2章では、日本産ハルシメジ類の分類学的位置と宿主範囲について検討した (Kobayashi and Yamada 2003, Kobayashi et al. 2003)。第3章では、菌根の形態的特徴について光学顕微鏡観察によって再検討するとともに、透過型電子顕微鏡を用いてさらに詳細に観察し、細胞の生死等から菌と宿主の関係を考察した (Kobayashi and Hatano 2001)。第4章では、日本産ハルシメジ類の菌根の季節消長について検討した。第5章では、ハルシメジ類の菌根を形成した苗の作出法について検討した。第6章では、第2章から第5章までに得られた情報を基に、ハルシメジ類という菌根性きのこの特徴を総合的に考察し、最後にその栽培技術開発に向けた展望を考察する。なお本論文は2005年2月に筑波大学大学院生命環境科学研究科に提出した学位論文を基に加筆訂正したものである。

第2章 日本産ハルシメジ類の分類学的検討

1. 目 的

最近まで日本産ハルシメジ類としては、バラ科植物が生育する場所周辺の地上に発生する *Entoloma clypeatum* (L.) P. Kumm. 1種のみが知られているにすぎなかった (今関・本郷 1987)。ウメ、モモが生育する場所周辺の地上に発生する子実体と、サクラ、ノイバラ、ズミが生育する場所周辺の地上に発生する子実体が異なるタイプであるという指摘もあったが (本郷 2001)、分類学的検討は十分には行われてこなかった。一方、ヨーロッパにおいては、Romagnesi (1947), Noordeloos (1981), Moser (1983), Bon (1987), Noordeloos (1992) らによって研究が進められ、ハルシメジ類は section *Nolanidea* という節にまとめられた。この中で、バラ科植物が生育する場所周辺の地上に発生する種として、*E. clypeatum* 以外に3種、さらにニレ科植物が生育する場所周辺の地上に発生する種が2種認められている (Noordeloos 1981)。しかし、日本ではニレ科樹木が生育する場所周辺の地上に発生する種類について、報告されていない。

ヨーロッパにおける一連の研究過程で、ハルシメジ類の個々の種を判別するためには、グアヤクチンキによる呈色反応試験が必要であることが明らかにされた (Noordeloos 1981)。グアヤクチンキによる

呈色反応試験はポリフェノールオキシダーゼを検出するもので、褐色の試薬が青く変色すれば、陽性、すなわちポリフェノールオキシダーゼが存在することを表しており、色に変色しなければ陰性を表している (Singer 1986)。ただし、この呈色反応試験は新鮮な子実体を用いた時にのみ正確な反応が得られるとされる (Singer 1986)。Noordeloos (1981) の検索表によれば、イッポンシメジ属の大半の種はグアヤクチンキ陽性であるが、ハルシメジ類の一部の菌には陰性であるものが知られている (表-1)。ヨーロッパにおいて、このようにハルシメジ類の種を判別するためには、グアヤクチンキによる呈色反応試験が必要であることが明らかにされたが、日本産の種類について、同定の際にこの呈色反応試験が行われたという記録はない。日本産ハルシメジ類の菌根の構造と生態を研究するためには、材料の正確な同定が第一に必要である。そこで、野外で採集したハルシメジ類の子実体に基づき、グアヤクチンキ呈色反応を含めて再検討を行った。

2. 材料と方法

日本各地のきのこ同好会からの情報を整理した結果、日本では 14 都道府県 32 地点 (表-2) で 17 種の植物が生育する場所周辺の地上に、毎年 3 月から 7 月にかけてハルシメジ類の子実体が発生することが明らかになった。これらの発生情報を参考に、発生が確認された地点で小林が直接採取を試みた。また、遠隔地については、採取を依頼した。後者の場合、採取品を冷蔵輸送してもらうことにより、劣化を防いだ。その結果、表-2 に示した宿主植物の中で、ソメイヨシノ以外の宿主植物の近傍でハルシメジ類の新鮮な子実体を採集することができた (表-3)。

このようにして得た新鮮な状態の子実体に基づいて、形態観察を行った。同時に、グアヤクチンキによる呈色反応試験を以下のように行った。グアヤクチンキは Moser (1983) の処方にに基づき、毎年 2 ～ 3 月に 1 g のグアヤク脂を 5 g の 70 ～ 80 % エタノールに溶かして作製し、冷暗所に保存しながら 1 年間試験に用いた。1 箇所では採取された子実体から、2 本以上を選び、素手か清浄なナイフを用いて縦に裂き、内部の組織を露出させた。スポイト、又はパスツールピペットを用いて、組織にグアヤクチンキを滴下し、1 ～ 2 時間程度反応を観察した。

これらの結果をもとに Noordeloos (1981), Largent (1994) の検索表や記載を参考に、採取品の同定を試みた。

3. 結 果

子実体の形態観察と呈色反応試験の結果を表-4 に示す。ノイバラが生育する場所周辺の地上から採集した子実体は呈色反応で陽性を示し、小型 (傘の径 12 ～ 70mm) で、全体的に暗褐色、中空の柄をもつ等の形態的特徴から、*Entoloma clypeatum* (L.) P. Kumm. f. *hybridum* (Romagn.) Noordel. と同定した。また、ウメ、モモが生育する場所周辺の地上に発生し、同所的に生育していたクサイチゴにも菌根を形成していた種の子実体はグアヤクチンキで速やかに青色に変色した。このグループの菌は変色が短時間でおこること、子実体が大型 (傘の径 20 ～ 100mm) で、薄褐色で、肉に変色性がある点などの形態的特徴から、*Entoloma saepium* (Noulet & Dass.) Richon & Roze であると同定した。

表－ 1. ハルシメジ類 (*Entoloma* 属 Nolanidea 節) の検索表*

1. 傘は暗灰褐色, またはセピア色で吸湿性が強い; 柄は白色から灰色 ----- 2
1. 傘は薄色: 灰色, 黄色, または褐色を帯びた白色; 吸湿性はない; 柄は白色で, 黄色を帯びることはあるが, 灰色がかかることはまれ ----- 5
2. 柄上部の肉はグアヤクチンキに正の反応を示す; 傘の表面は無毛で, 乾いたときにはつやが出る; 柄は中空で壊れやすい ----- 3
2. 柄上部の肉はグアヤクチンキに負の反応を示す; 傘の表面は, 特に中央の部分ではフェルト状で, 特に乾いたときにしわになって, 破れてかさぶた状になる; 柄は中実 ----- 4
3. 柄は幼菌の時から中空; 傘と柄の肉はもろい; 傘に径の 1/3 ~ 1/2 まで条線が現れる; ニレ樹下の林地 ----- *E. aprile* (Britz.) Sacc.
3. 柄は空隙の狭い中空で, 特に傘中央部はより肉質; 傘には湿ったときにわずかに条線が現れるか, または条線は現れない: 様々なバラ科植物の下に発生 -----
----- *E. clypeatum* (L.) P. Kumm. f. *hybridum* (Romagn.) Noordel.
4. 柄は白色で, 時に中央部で灰色や灰褐色を帯び, 条線は不明瞭, または明瞭でも条線のきめは細かい; 担子器にかすがい連結がある ----- *E. clypeatum* (L.) P. Kumm.
4. 柄は暗灰褐色で, きめの粗い条線が縦方向に延びる; 担子器にかすがい連結はない -----
----- *E. clypeatum* (L.) P. Kumm. var. *defibulatum* Noordel.
5. 傘は輝白色で, 雨に濡れたときにピンク色に色づく; 虫食い時, 色は急激には変化しないが, 非常にゆっくりと黄色みがかかる ----- *E. niphoides* (Romagn.) P. D. Orton
5. 傘は幼菌時のみ白色, 後に明瞭に色づく; 薄灰色, 薄黄色, 薄褐色, 薄オリーブ色 ----- 6
6. 傘に吸湿性はなく, 少なくとも幼菌時は早落性のベールに覆われ, 成菌でしばしば, 平滑で光沢のある灰色もしくは灰褐色の背景に, 銀色の蜘蛛の巣状の模様が形成される; 胞子は大型で球形に近く, $10.4 \sim 12.7 (\sim 14) \times 10 \sim 12 \mu\text{m}$, Q (胞子の縦横比) = $1.0 \sim 1.1$; 春早い時期にニレ樹下に現れる -----
----- *E. saundersii* (Fr.) Sacc.
6. 傘は弱い明らかに吸湿性を有し, ベールはない; 胞子はより細長く, 縦横の径は異なる; バラ科植物の樹下に現れる ----- 7
7. 柄上部の肉はグアヤクチンキに負の反応を示す; 肉は白色で, 虫食い穴などの傷の部分は変色しない; 傘の縁は湿ったときに明瞭な条線が現れる; リンゴ, サンザシ樹下 ----- 8
7. 柄上部の肉はグアヤクチンキに正の反応を示す; 肉は白色で, 虫などの傷の部分は赤みがかった黄色に変色する; 傘は薄色で, しばしば赤黄色みを帯びる; *Prunus spinosa* の雑木林だけでなく, リンゴ, ナシ, サクラ属植物の生える果樹園, 公園にも多い. サンザシ樹下にはまれ. -----
----- *E. saepium* (Noulet & Dass.) Richon & Roze
8. ひだはやや密で薄く, 直生から湾生, 薄灰色または白色で後にピンク色に変わる; 柄は白色から灰色. -----
----- *E. clypeatum* (L.) P. Kumm. f. *pallidogriseum* Noordel.
8. ひだは疎で厚く, 直生から垂生, 初めは黄色で後にピンク色に変わる; 柄は初め白色ですぐにひだのよう黄色に変わる ----- *E. clypeatum* (L.) P. Kumm. f. *xanthophyllum* Noordel.

*Noordeloos (1981) を基に作成. ハルシメジ類の判別におけるグアヤクチンキによる呈色反応試験の重要性を示すため, 呈色反応試験の部分を下線で示す.

表－ 2. ハルシメジの発生地とその宿主

発生地の市町村名	宿主	発生地の市町村名	宿主
北海道苫小牧市	ナナカマド	神奈川県川崎市多摩区	ソメイヨシノ
北海道苫小牧市	オオヤマザクラ	新潟県鹿瀬町	リンゴ
北海道苫小牧市	ハルニレ	長野県南箕輪村	カスミザクラ
岩手県盛岡市	モモ	長野県南牧村	ズミ
茨城県大子町	リンゴ	滋賀県大津市	ウメ
茨城県高萩市	ウメ	京都府京都市上京区	ウメ
茨城県大宮町	ウメ	京都府京都市伏見区	ノイバラ
茨城県常北町	ウメ	京都府京都市左京区	ウメ
茨城県那珂町	オオシマザクラ	京都府宇治田原町	ウメ, クサイチゴ
茨城県那珂町	ウメ	京都府長岡京市	ウメ
茨城県那珂町	トキワサンザシ	奈良県月ヶ瀬村	ウメ
茨城県莚崎町	ウメ	兵庫県御津町	ウメ
埼玉県蓮田市	ニホンナシ	鳥取県八東町	ニホンナシ
埼玉県蓮田市	ケヤキ	熊本県熊本市	ノイバラ
東京都調布市	ヤマブキ	熊本県御船町	ノイバラ
東京都稲城市	ヤマザクラ	熊本県人吉市	ウメ

表－ 3. 供試標本

標本番号	採集年月日	採 集 者	採集場所の市町村名	宿主
EN-1	1993. 4. 3	小林 久泰	熊本県御船町	ノイバラ, キイチゴ属
EN-2	1993. 7. 23	小林 久泰	京都府宇治田原町	ウメ
EN-3	1994. 5. 14	小林 久泰	長野県南箕輪村	カスミザクラ
EN-4	1994. 6. 10	榊原 悟	岩手県紫波町	モモ
EN-5	1995. 4. 2	小林 久泰	京都府京都市伏見区	ノイバラ
EN-6	1995. 4. 5	小林 久泰	京都府京都市伏見区	ノイバラ
EN-7	1995. 4. 6	小林 久泰	京都府京都市伏見区	ノイバラ
EN-8	1995. 4. 11	小林 久泰	京都府京都市伏見区	ノイバラ
EN-9	1995. 4. 17	小林 久泰	京都府京都市伏見区	ノイバラ
EN-10	1995. 4. 29	小林 久泰	京都府京都市左京区	ウメ
EN-11	1995. 5. 2	小林 久泰	京都府長岡京市	ウメ
EN-12	1995. 5. 4	小林 久泰	京都府宇治田原町	ウメ
EN-13	1995. 5. 8	小林 久泰	京都府宇治田原町	ウメ
EN-14	1996. 3. 16	小林 久泰	熊本県熊本市	ノイバラ
EN-15	1996. 4. 7	小林 久泰	熊本県熊本市	ノイバラ
EN-16	1996. 4. 14	小林 久泰	熊本県人吉市	ウメ
EN-17	1996. 5. 2	小林 久泰	滋賀県大津市	ウメ

表－3. 供試標本（続き）

標本番号	採集年月日	採 集 者	採集場所の市町村名	宿主
EN-18	1996.5.4	小林 久泰	京都府宇治田原町	ウメ、クサイチゴ
EN-19	1996.5.11	小林 久泰	京都府京都市上京区	ウメ
EN-20	1996.5.14	小林 久泰	京都府京都市左京区	ウメ
EN-21	1996.5.24	小林 久泰	新潟県鹿瀬町	リンゴ
EN-22	1996.5.24	小林 久泰	兵庫県御津町	ウメ
EN-23	1997.4.16	小林 久泰	東京都稲城市	ヤマザクラ
EN-24	1997.5.7	小林 久泰	鳥取県八東町	ニホンナシ
EN-25	1997.5.10	小林 久泰	京都府京都市上京区	ウメ
EN-26	1997.5.15	小林 久泰	新潟県鹿瀬町	リンゴ
EN-27	1998.4.26	小林 久泰	埼玉県蓮田市	ニホンナシ
EN-28	1998.4.26	小林 久泰	埼玉県蓮田市	ケヤキ
EN-29	1998.5.16	小林 久泰	長野県南牧村	ズミ
EN-30	1999.4.13	小林 久泰	茨城県那珂町	オオシマザクラ
EN-31	1999.4.25	小林 久泰	京都府京都市上京区	ウメ
EN-32	1999.4.26	山田 明義	茨城県那珂町	ウメ
EN-33	1999.5.8	小林 久泰	奈良県月ヶ瀬村	ウメ
EN-34	2001.5.3	小林 久泰	新潟県鹿瀬町	リンゴ
EN-35	2002.4.2	小林 久泰	茨城県那珂町	オオシマザクラ
EN-36	2002.4.2	小林 久泰	茨城県那珂町	トキワサンザシ
EN-37	2002.4.17	所 美津江	茨城県大宮町	ウメ
EN-38	2002.4.17	河又 博	茨城県茅崎町	ウメ
EN-39	2002.4.17	川又三四郎	茨城県常北町	ウメ
EN-40	2003.4.6	小林 久泰	茨城県那珂町	トキワサンザシ
EN-41	2003.4.18	小林 久泰	茨城県那珂町	オオシマザクラ
EN-42	2003.5.6	小林 久泰	茨城県那珂町	ウメ
EN-43	2003.5.14	横堀 誠, 細田 浩司	茨城県高萩市	ウメ
EN-44	2003.6.2	小林 久泰	北海道苫小牧市	ナナカマド
EN-45	2003.6.2	小林 久泰	北海道苫小牧市	ナナカマド
EN-46	2003.6.2	小林 久泰	北海道苫小牧市	ナナカマド
EN-47	2003.6.2	小林 久泰	北海道苫小牧市	ナナカマド
EN-48	2003.6.2	小林 久泰	北海道苫小牧市	オオヤマザクラ
EN-49	2003.6.2	小林 久泰	北海道苫小牧市	オオヤマザクラ
EN-50	2003.6.2	小林 久泰	北海道苫小牧市	ハルニレ
EN-51	2004.5.22	小林 久泰	茨城県大子町	リンゴ
EN-52	2004.6.12	小林 久泰	東京都調布市	ヤマブキ

表－4. 観察したハルシメジ類の特徴の比較

標本番号 (EN)	グアヤクチンキ反応*	形態的特徴	種名
1, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15	+	小型, 全体的に暗褐色, 柄は中空	<i>Entoloma clypeatum</i> f. <i>hybridum</i>
2, 4, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 42, 43,	++	大型, 薄褐色, 肉が赤く変色, 柄は中実	<i>Entoloma saepium</i>
3	+	中型, 全体的にネズミ色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 1
21, 24, 26, 27, 29, 34, 51	+／－	小型で芳香あり, 全体的に明褐色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 2
23	+	小型, 全体的に暗褐色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 3
28	+	小型, 全体的にネズミ色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 4
30, 35, 41	+	肉が黄色く変色, 独特の芳香臭, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 5
36, 40	+	小型, 傘にかすり模様, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 6
44, 45, 46, 47	+	小型から中型, 全体的に明褐色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 7
48, 49	+	中型から大型, ネズミ色から暗褐色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 8
50	+	大型, 全体的に暗褐色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 9
52	+	小型, 全体的にネズミ色, 柄は中実	<i>Entoloma</i> sp. 10

* グアヤクチンキ反応の評価については以下の通りである。

++ : 素早く反応

+ : 反応

+／－: 反応が一定せず, 反応しても虫食いの部分のみゆっくりと反応

以上の2種以外は既知種の記載と完全には一致せず, 10タイプに区別できたが, 同定には至らなかった(表－4)。例えば, リンゴ, ズミ, ニホンナシ由来の標本では, 虫食いの部分だけが, 1時間以上経過してから青変したり, 同じ場所で採集した検体であっても子実体によっては反応しなかったりしたものが存在した(*Entoloma* sp. 2)。また, サクラ属に属する残りの標本については, オオシマザクラ由来の標本は肉が黄色く変色し, 独特の芳香臭があり(*Entoloma* sp. 5), オオヤマザクラ由来の標本は *E. saepium* と同じく大型であるが暗褐色であった(*Entoloma* sp. 8)。

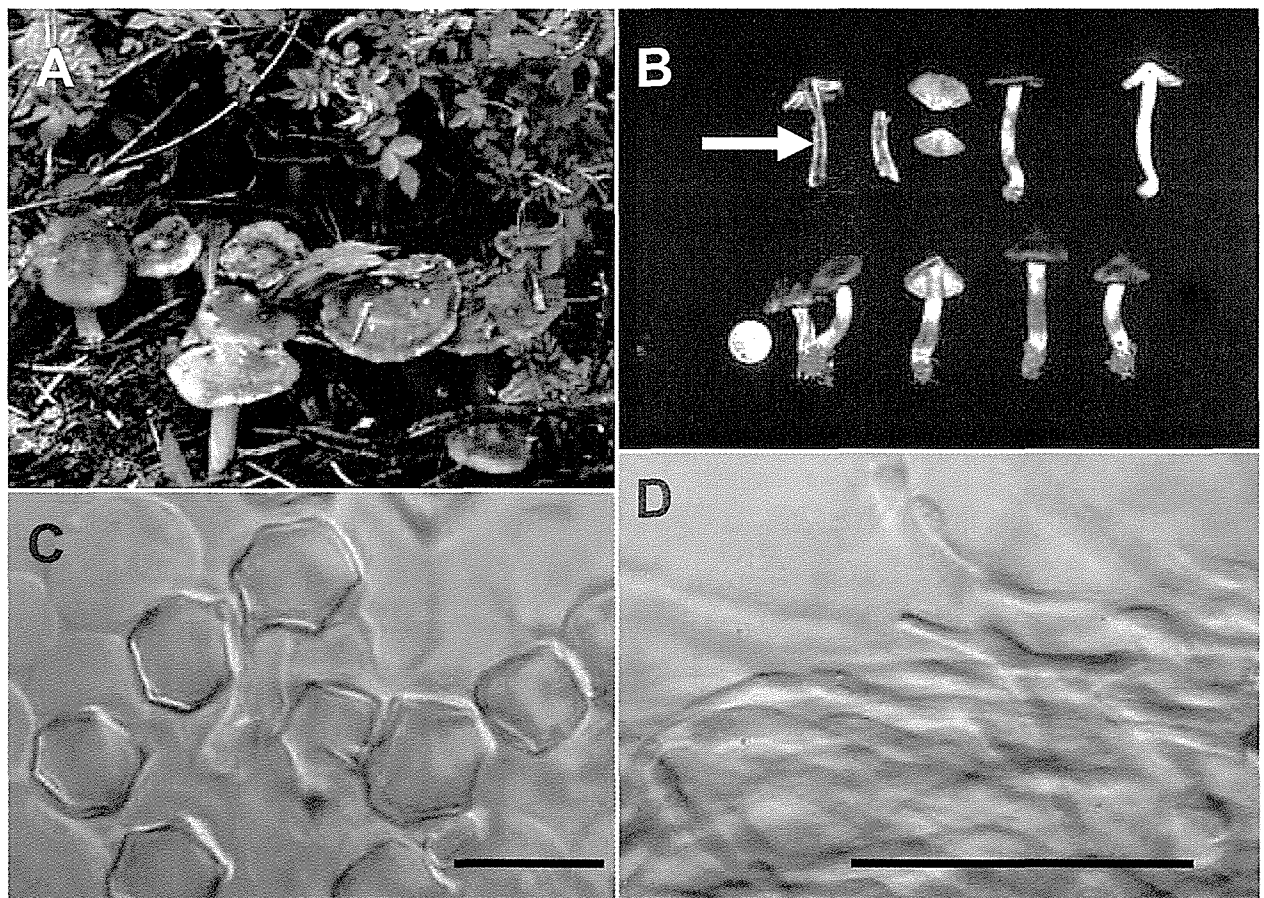
今回種として確認できた *E. clypeatum* f. *hybridum* と *E. saepium* の記載は以下の通りである。記載文中の色の記載については Kornerup and Wanscher (1978) に従った。

Entoloma clypeatum (L.) P. Kumm. f. *hybridum* (Romagn.) Noordel., Persoonia 11: 173, 1981. (図－1, A～D, 図－2, A～E)

傘は直径 12 ～ 70mm, 円錐形, 後にまんじゅう形から中高の平らに展開する. 吸湿性が顕著で, 乾燥時は褐色 (6 ～ 7E4 ～ 6), 湿時は暗褐色 (6F4 ～ 6) を呈する. 傘の表面は繊維状でわずかに粘性がある. ひだはややしわがより, 上生で, 縁はノコギリの歯状, 灰色がかったオレンジ (5B3) であるが後に灰色がかった赤色から褐色がかったオレンジ (6A ～ B3) に変色する. 柄は長さが最大で約 110mm, 直径が 5 ～ 10mm で, 直立し, 上部に向かってやや細まり, 中空で粘性はない. 若いうちは白色, 後に褐色がかったオレンジ色に変化する (5 ～ 6B3 ～ 4). 傘や柄の肉はうすく, 粉臭があり, グアヤクチンキをつけると明瞭に青変する.

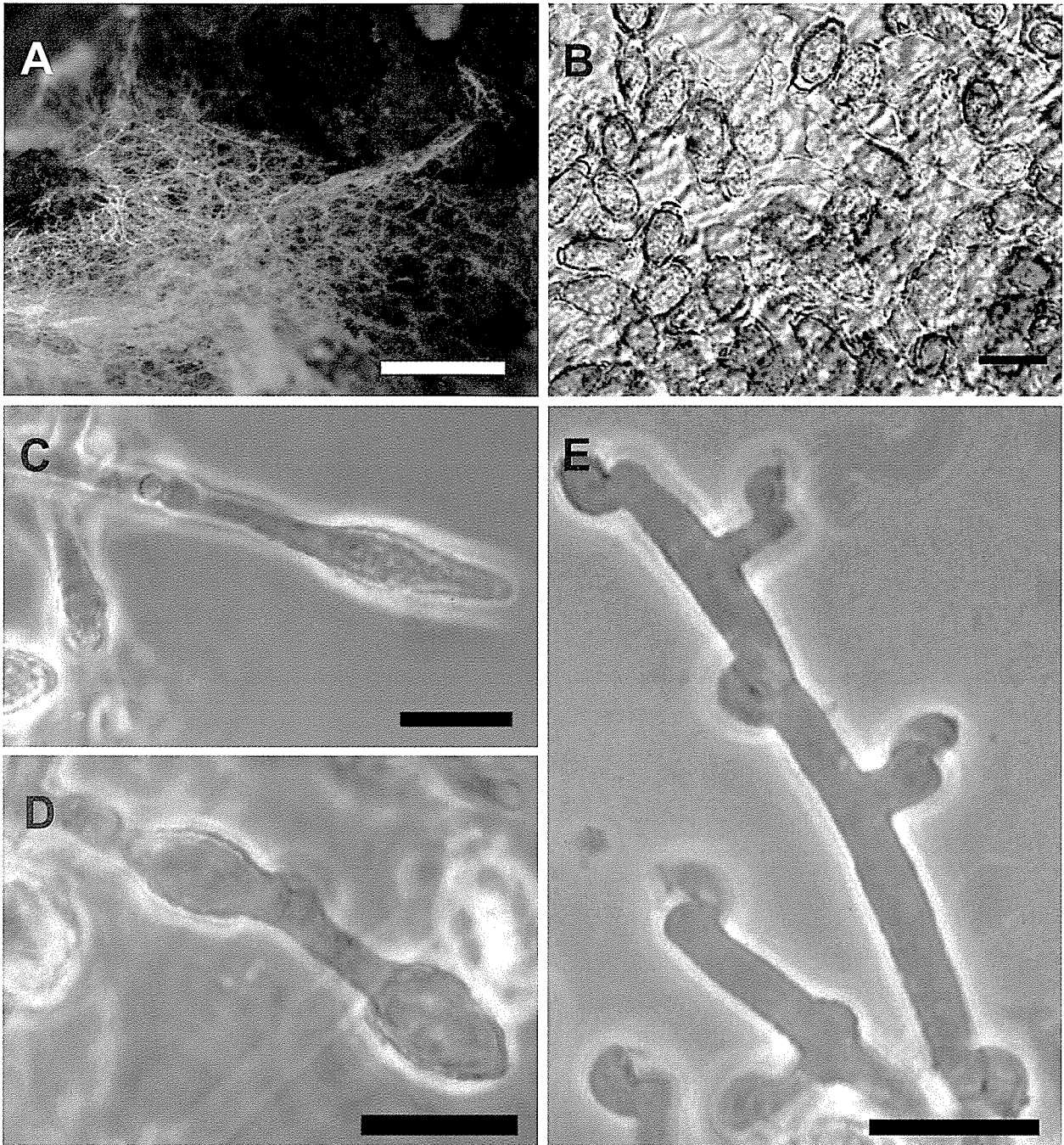
担子器は 4 孢子性で基部にかすがい連結がある. 担子孢子は横から見ると 5 ～ 7 角形で, $9.0 \sim 11.0 \times 7.5 \sim 11.0 \mu\text{m}$. ひだの縁にシスチジアはない. 傘表皮はイクソキュウティスで直径 2 ～ 8 μm のかすがい連結を有する菌糸で構成される. 菌糸には褐色の液状の色素が細胞内に充満している.

地下の菌糸体はピンク色を呈することがあり, 色はピンク色, 大きさは $12 \sim 16 \times 5 \sim 7 \mu\text{m}$, 形態は楕円形, 表面は粗面で厚壁, 両端に襟状の構造物を有する厚壁孢子が多数観察された. 一部のかすがい連結を有する菌糸先端部では未熟な厚壁孢子と思われるような透明で粗面の膨らんだ構造が認められた. 未熟な厚壁孢子と思われる膨らみが 2 つかかすがい連結でつながったような構造も認められた. また, 別の菌糸先端部ではかすがい連結の部分で切れたような構造が認められた.



図－1. *Entoloma clypeatum* f. *hybridum*

- A. 新鮮な子実体. B. 少し古い子実体. 矢印はグアヤクチンキ呈色反応試験結果を示す. C. 孢子. バーは 10 μm .
D. 傘表皮. バーは 50 μm .



図－ 2. *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* の厚壁孢子

- A. ピンク色を呈した菌糸束. バーは 1 mm. B. 厚壁孢子. バーは 10 μ m. C. 未熟な厚壁孢子. バーは 10 μ m.
D. 数珠状につながった 2 つの未熟な厚壁孢子. バーは 10 μ m. E. かすがい連結の所で切れた菌糸末端. バーは 10 μ m.

供試標本： OSA-MY 5000, 熊本県熊本市ノイバラ群落内, 1996 年 4 月 7 日, 小林久泰採集； OSA-MY 5004, 京都府京都市ノイバラ群落内, 1995 年 4 月 11 日, 小林久泰採集.

Entoloma saepium (Noulet & Dass.) Richon & Roze, Fl. Champ. Com. Vén.92. 1880. (図－ 3, A ～ D)

傘は直径 20 ～ 100mm で, まんじゅう形, 後に中高の平らに展開する. 傘の縁ははじめ内側に巻込んで
いるが, 後には反り返る. 吸湿性は弱く, 乾燥時には褐色 (5 D ～ E3 ～ 4) である. 傘の表面は繊維

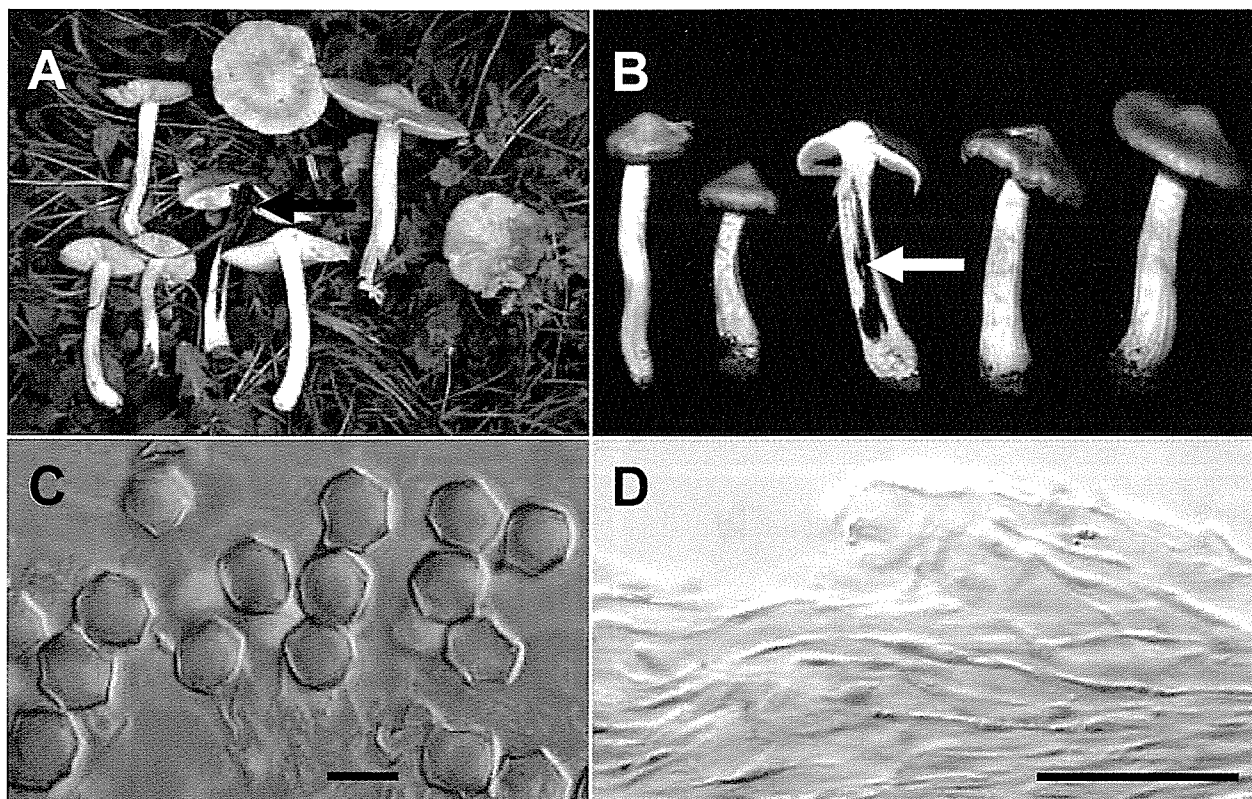


図-3. *Entoloma saepium*

A. 新鮮な子実体。矢印はグアヤクチンキ呈色反応試験結果を示す。B. 少し古い子実体。矢印はグアヤクチンキ呈色反応試験結果を示す。C. 胞子。バーは 10 μm 。D. 傘表皮。バーは 50 μm 。

状でわずかに粘性があり、古くなると裂開し、内部の肉が現れる。ひだはややしわがより、上生で、縁はノコギリの歯状、白色、後に肉色（6A ~ B3）に変化する。柄は長さが最長で約 100mm、直径は 7 ~ 17mm で、直立し、上部に向かって細まり、中実で粘性はない。若いうちは白色、後に淡灰黄色（4A ~ B3）に変化する。傘や柄の肉は厚く、粉臭があり、白色、傷をつけると赤味を帯びる。グアヤクチンキをつけるとすぐ青変する。

担子器は 4 孢子性で基部にかすがい連結がある。担子胞子は横から見ると 5-7 角形で、8.5 ~ 11.0 x 6.5 ~ 8.5 μm 。ひだの縁にシスチジアはない。傘表皮はイクソキウティスで直径 3 ~ 10 μm のかすがい連結を有する菌糸で構成される。菌糸には褐色の液状の色素が細胞内に充満している。

地下部の菌糸体がピンク色を帯びることはなく、厚壁孢子形成は観察されなかった。

供試標本：OSA-MY 5001, 茨城県那珂郡那珂町梅林, 1999 年 4 月 29 日, 山田明義採集；OSA-MY 5002, 京都府京都市内梅林, 1995 年 4 月 25 日, 小林久泰採集；OSA-MY 5003, 京都府長岡京市梅林, 1995 年 5 月 2 日小林久泰採集。

4. 考 察

今回の調査で、17 種類の植物の樹下でハルシメジ類の子実体を認めることができた(表- 5)。日本では、ほとんどの果樹栽培において、樹体調節、果実品質向上、病虫害抵抗性等の栽培上の要求から台木が用いられている(河瀬 1995)。台木には、しばしば栽培種と異なる近縁種が用いられ(河瀬 1995)、このとき根は地上部で同定されたものと異なる種に由来することになる。今回調査した栽培果樹種(ウメ、モモ、

リンゴ、ニホンナシ) についても、同属の別種が台木として実用化されている(河瀬 1995)。今回ハルシメジ類が共生している植物について、台木の植物種は同定できなかったが、属レベルの分類群として次のような新知見を得ることができた。ニレ科植物のケヤキ属、バラ科植物ではヤマブキ属、トキワサンザシ属の植物がハルシメジ類の宿主であることを初めて確認した。また、これまで日本産ハルシメジ類の宿主植物として、バラ科のサクラ属、バラ属、キイチゴ属、リンゴ属、ナシ属の植物が知られていたが(今関・本郷 1987)、今回の調査で、新たに日本でもバラ科植物のナナカマド属、ニレ科植物のニレ属の植物がハルシメジ類の宿主であることが確認できた。

これら 17 種類の宿主植物下で採集された日本産ハルシメジ類の中で、種が同定できたのは *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* と *E. saepium* の 2 種だけで、他に既知の菌種とは特徴が一致しない 10 タイプの菌が発生することが明らかになった。既知種に該当しなかった子実体は未記載種である可能性が高い。しかし、標本数が十分とはいえないので、今後十分な数の標本を収集し、検討する必要がある。

日本産 *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* と *E. saepium* の識別点について、表－6 に示した。前者は暗褐色の子実体で、グアヤク試薬に対する反応が若干遅く、傷をつけても肉は赤く変色しない点で特徴

表－ 5. 日本でハルシメジ類の発生が確認できた宿主植物

科名	属名	和名(学名) ***
バラ科 (Rosaceae)	サクラ属 (<i>Prunus</i>)	ウメ (<i>P. mume</i>)
		モモ (<i>P. persica</i>)
		ソメイヨシノ (<i>P. yedoensis</i>)
		オオシマザクラ (<i>P. speciosa</i>)
		オオヤマザクラ (<i>P. sargentii</i>)
		カスミザクラ (<i>P. verecunda</i>)
		ヤマザクラ (<i>P. jamazakura</i>)
		ヤマブキ属 (<i>Kerria</i>) *
	バラ属 (<i>Rosa</i>)	ヤマブキ (<i>K. japonica</i>)
		ノイバラ (<i>R. multiflora</i>)
	キイチゴ属 (<i>Rubus</i>)	クサイチゴ (<i>R. hirsutus</i>)
		トキワサンザシ属 (<i>Pyracantha</i>) *
	ナナカマド属 (<i>Sorbus</i>) **	トキワサンザシ (<i>P. coccinea</i>)
		ナナカマド (<i>S. commixta</i>)
ニレ科 (Ulmaceae)	リンゴ属 (<i>Malus</i>)	ズミ (<i>M. toringo</i>)
		リンゴ (<i>M. domestica</i>)
	ナシ属 (<i>Pyrus</i>)	ニホンナシ (<i>P. pyrifolia</i> var. <i>culta</i>)
		ニレ属 (<i>Ulmus</i>) **
	ケヤキ属 (<i>Zelkova</i>) *	ハルニレ (<i>U. davidiana</i> var. <i>japonica</i>)
		ケヤキ (<i>Z. serrata</i>)

* 本研究により世界的に新たに宿主植物として確認された属。

** 本研究により日本産の種類でも宿主植物として確認された属。

*** 植物の学名は佐竹ら(1989)による。

付けられるのに対し、後者は比較的薄い灰褐色をした子実体で、傷つけた時に赤く変色する点とグアヤクチンキに強く正の反応を示すことによって特徴付けられる。さらに、日本産の標本に関しては、前者がウメの木の下でしばしば採集されているのに対して、後者は今のところノイバラ群落の中でのみ発見されており、宿主の違いも区別点となる可能性がある。

表－ 6. *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* と *E. saepium* の子実体の識別点

特徴	<i>E. clypeatum</i> f. <i>hybridum</i>	<i>E. saepium</i>
大きさ	やや小型（傘の径 12 ～ 70 mm）	大型（傘の径 20 ～ 100 mm）
傘の色	暗褐色	はじめ薄褐色、のち褐色
グアヤク反応	変色	即変色
肉の変色性	無	有 (過熟,あるいは虫食い箇所が赤褐色を帯びる)
宿主植物	ノイバラ	ウメ, モモ
厚壁孢子	有	無
発生時期	3 月下旬～ 4 月中旬	4 月下旬～ 6 月上旬

また, *E. clypeatum* f. *hybridum* において, 地下部の菌糸体でピンク色の厚壁孢子形成を確認した。厚壁孢子はその形態的特徴から, かすがい連結を有する菌糸が膨らみながら厚壁化し, かすがい連結の部分で分節して形成されたものと考えられる。今回の知見はイッポンシメジ属のきのこが形成する菌根から厚壁孢子を初めて記録したものである。様々な担子菌類が培養基中に, またはきのこの上に厚壁孢子を作ることが知られている (Hughes 1985)。近年では, 外生菌根菌での厚壁孢子形成がツチダンゴ科 Elaphomycetaceae, フウセンタケ科 Cortinariaceae, オウギタケ科 Gomphidiaceae, イボタケ科 Thelephoraceae (Agerer 1995), イグチ科 Boletaceae (Eberhart and Luoma 1996) そして, キシメジ科 Tricholomataceae (島 菌 1979, Terashima et al. 1993, Lefevre and Mueller 1998, Gill et al. 1999, Yamada et al. 1999) の菌種で報告されてきた。イッポンシメジ科菌では, ムツノウラベニタケ属 *Rhodocybe* の未記載種の分離株が寒天培地上で本報告と類似した厚壁孢子を形成することが知られている (Baroni and Carey 1994)。ただし, かすがい連結は担子菌類に普遍的に見られる構造でもあり, 今回観察された厚壁孢子が *E. clypeatum* f. *hybridum* の無性世代であると断定できなかった。

日本において, 薄褐色の子実体を有するコイッポンシメジ *Entoloma prunuloides* (Fr.) Quél. がウメの樹下から川村 (1954) によって報告されているが, 同種は欧米においては秋にカシ林や草地で発生する種である (Noordeloos 1981; Largent 1994)。また, 同種は孢子の大きさが他のイッポンシメジ属菌に比べ, 著しく小さいことで知られている [$6.8 \sim 8.0$ (~ 8.6) $\times 6.4 \sim 8.0$ μm , Noordeloos (1981); $6.4 \sim 8.6 \times 5.1 \sim 7.0$ μm , Largent (1994)]。しかし, 川村の記載では $8 \sim 10 \times 8$ μm と欧米のそれに比べて明らかに大きい。ウメの樹下で報告されている点, 子実体が明褐色である点, 孢子の大きさを考慮すると, *E. prunuloides sensu* Kawamura は *E. saepium* の可能性が高い。しかし, 川村 (1954) に相当する標本は現存しないので, 詳細な分類学的検討は現段階では難しい (Doi 2002)。

第3章 ハルシメジ類の菌根の形態

様々な分類群の菌が植物の根と共生し、菌根を形成することが知られる。菌根は形態的に、菌鞘形成の有無、菌糸の皮層細胞間におけるハルティヒネット形成の有無、植物細胞内定着の有無、そして定着した菌糸の形態で、7つの基本型、すなわち、アーバスキュラー菌根、外生菌根、内外生菌根、イチヤクソウ型菌根、シャクジョウソウ型菌根、ツツジ型菌根、ラン型菌根に区別される (Smith and Read 1997, 堀越・二井 2003)。これら基本型で形成する植物と菌の分類群が限定されていることも知られており、菌根性きのこは主に外生菌根を形成することが知られている (Smith and Read 1997, 堀越・二井 2003)。外生菌根は菌糸が (1) 細根の表面を覆い、菌鞘を形成すること、(2) 皮層細胞の間に侵入して、ハルティヒネットを形成する点で特徴づけられる (Smith and Read 1997, 堀越・二井 2003)。

しかし、ハルシメジ類の場合、形成する菌根型に関しては異なる複数の見解が示されてきた。すなわち、内外生菌根を形成するという見解 (廣江・橋本 1940) と外生菌根を形成するという見解 (Becker 1956, Trappe 1962, Andruszewska and Dominik 1971, Molina et al. 1992) が提示されてきた。近年に至り、Agerer and Waller (1993) は、*Entoloma saepium* がバラ属の1種 *Rosa* sp. とヨーロッパスモモ *Prunus domestica* を宿主として形成した菌根について詳細な光学顕微鏡観察を行った結果、皮層細胞間にハルティヒネットが形成されず、根の先端部の根冠細胞、分裂組織及び皮層細胞が“破壊”され、そこに菌糸が侵入するという非常に独特な形態の菌根であることを発見した。しかし、ハルシメジ類全般に同じような形態をとるかどうかは不明であり、また、光学顕微鏡以外の観察は行われておらず、宿主植物との間にどのような関係が生じているか等については全く明らかになっていない。

一方、光学顕微鏡による観察に加え、菌根共生における菌と植物の関係を調べる方法の一つとして、透過型電子顕微鏡を用いた微細構造の観察が注目されてきた。これまで透過型電子顕微鏡を用いて、様々な菌根について研究が行われ、菌根を構成する菌糸細胞や根の細胞における細胞内小器官の分布や膜構造の変化などが明らかにされてきた (Scannerini and Bofante-Fasolo 1983, Kottke and Oberwinkler 1986, Bonfante-Fasolo and Scannerini 1992)。しかし、ハルシメジ類とバラ科植物との間に形成される菌根については、非常に特徴的な形態であることが示されたにもかかわらず、微細構造の解析がまだ行われていない。

そこで本章では、ハルシメジ類の菌根の形態的特徴を明らかにすることを目的に行った研究について述べる。すなわち、第1節において日本産ハルシメジ類が第2章で確認した宿主植物全てに由来する菌根について光学顕微鏡観察を行い、菌根の形態を再検討した結果を報告する。そして、第2節では *E. clypeatum* f. *hybridum* がノイバラ *Rosa multiflora* Thunb. の根に形成した菌根について超薄切片法により透過型電子顕微鏡による観察を試みた結果を報告する。

第1節 菌根形態の再検討

1. 目的

前述のように、ハルシメジの場合、形成する菌根の形態について異なる複数の見解が示されてきたが、Agerer and Waller (1993) により、*E. saepium* が形成した菌根について、非常に独特な形態の菌根で

あることが発見された。しかし、観察された植物は、バラ属の 1 種とヨーロッパスモモの 2 種のみであり、他のバラ科植物やニレ科植物の菌根タイプは不明のままである。そこで、日本産ハルシメジ類が形成する菌根について、様々な属の宿主植物で、光学顕微鏡による観察を行った。

2. 材料と方法

光学顕微鏡観察に供した材料の採集データを表 7 に示す。第 2 章で述べた子実体の採取と同様に、

表 7. 供試菌根試料

採集年月日	採集者	採集場所	菌名	宿主植物名
1993. 4. 3	小林 久泰	熊本県御船町	<i>Entoloma clypeatum</i> f. <i>hybridum</i>	ノイバラ, キイチゴ属
1994. 5. 14	小林 久泰	長野県南箕輪村	<i>Entoloma</i> sp. 1	カスミザクラ
1995. 4. 2	小林 久泰	京都府京都市伏見区	<i>E. clypeatum</i> f. <i>hybridum</i>	ノイバラ
1995. 5. 8	小林 久泰	京都府宇治田原町	<i>E. saepium</i>	ウメ
1996. 3. 16	小林 久泰	熊本県熊本市	<i>E. clypeatum</i> f. <i>hybridum</i>	ノイバラ
1996. 4. 7	小林 久泰	熊本県熊本市	<i>E. clypeatum</i> f. <i>hybridum</i>	ノイバラ
1996. 5. 24	小林 久泰	新潟県鹿瀬町	<i>Entoloma</i> sp. 2	リンゴ
1997. 4. 16	小林 久泰	東京都稲城市	<i>Entoloma</i> sp. 3	ヤマザクラ
1997. 5. 7	小林 久泰	鳥取県八東町	<i>Entoloma</i> sp. 2	ニホンナシ
1998. 3. 25	小林 久泰	熊本県熊本市	<i>E. clypeatum</i> f. <i>hybridum</i>	ノイバラ
1998. 4. 22*	菊地 栄子	神奈川県川崎市多摩区	<i>Entoloma</i> sp.	ソメイヨシノ
1998. 4. 26	小林 久泰	埼玉県蓮田市	<i>Entoloma</i> sp. 4	ケヤキ
1999. 5. 16	小林 久泰	長野県南牧村	<i>Entoloma</i> sp. 2	ズミ
1999. 5. 23	小林 久泰	長野県南牧村	<i>Entoloma</i> sp. 2	ズミ
2002. 4. 2	小林 久泰	茨城県那珂町	<i>Entoloma</i> sp. 5	オオシマザクラ
2002. 4. 25	小林 久泰	茨城県那珂町	<i>Entoloma</i> sp. 6	トキワサンザシ
2003. 6. 2	小林 久泰	北海道苫小牧市	<i>Entoloma</i> sp. 7	ナナカマド
2003. 6. 2	小林 久泰	北海道苫小牧市	<i>Entoloma</i> sp. 8	エゾヤマザクラ
2003. 6. 2	小林 久泰	北海道苫小牧市	<i>Entoloma</i> sp. 9	ハルニレ
2004. 5. 22	小林 久泰	茨城県大子町	<i>Entoloma</i> sp. 2	リンゴ
2004. 6. 12	小林 久泰	東京都調布市	<i>Entoloma</i> sp. 10	ヤマブキ

*1998 年 4 月 22 日に菊地栄子氏によって採集された試料は、子実体の状態が悪く、菌種は同定できなかった。

菌根も小林が直接採取を試みるとともに、遠隔地については採取を依頼した。直接採取の場合、菌根の採取は Agerer (1986) を参照し、次のように行った。発生したハルシメジ類の子実体と、子実体直下の土壌を植物の根が含まれているのを確認しながら採取し、室内へ持ち帰った。土壌を採取する時、子実体の柄の上部と傘を切り放し、土壌中の菌糸束と子実体が分離するのを防いだ。

宿主植物根の同定は第 2 章の考察で述べたように、台木の問題があるが、便宜的に以下のように行った。予め子実体の発生地付近の木本植物について、地上部とのつながっている植物の側根を採取した。そして、種の確認できた側根と菌根につながる側根を比較した。

遠隔地の場合、前述のように子実体上部、子実体下部とつながった土壌塊、周囲の宿主植物の側根を採取直後に冷蔵輸送してもらった。

採取した土壌を流水で洗い流し、菌根を取り出し、さらに菌根表面の砂粒を面相筆、ピンセットで慎重に除去した。菌根はハルシメジ類の子実体と菌糸束を介してつながっているもののみを集めた。菌根の外部形態は実体顕微鏡 OLYMPUS SZ-11 で観察した。外部形態観察後、試料はホルマリン酢酸液 (Agerer 1986) か 80 % エタノールにより液浸標本を作成した。光学顕微鏡観察は新鮮な試料か液浸標本を用いて行った。検鏡用プレパラートは、同じ実体顕微鏡下で 80 % エタノールで刃先を洗浄した炭素鋼の剃刀刃を用い、徒手切片を作成した薄片を、ラクトフェノールあるいはラクトグリセロール (Moser 1983) で封入して、カバーガラスの周囲をネイルエナメルで封じて作製した。検鏡は光学顕微鏡 LAICA DMRBE を用い、100 ～ 1000 倍の倍率で行った。

3. 結 果

a. 菌根の外部形態

観察された菌根の実体顕微鏡写真の一部を図 4, A ～ F に示す。いずれの試料も子実体直下の菌糸束は、バラ科またはニレ科植物の根系に形成された菌根に繋がっていた。菌根は菌鞘を形成してフェルト状の外観を呈し、棍棒形でしばしば先端部がふくらんでいた。

b. 菌根の内部形態

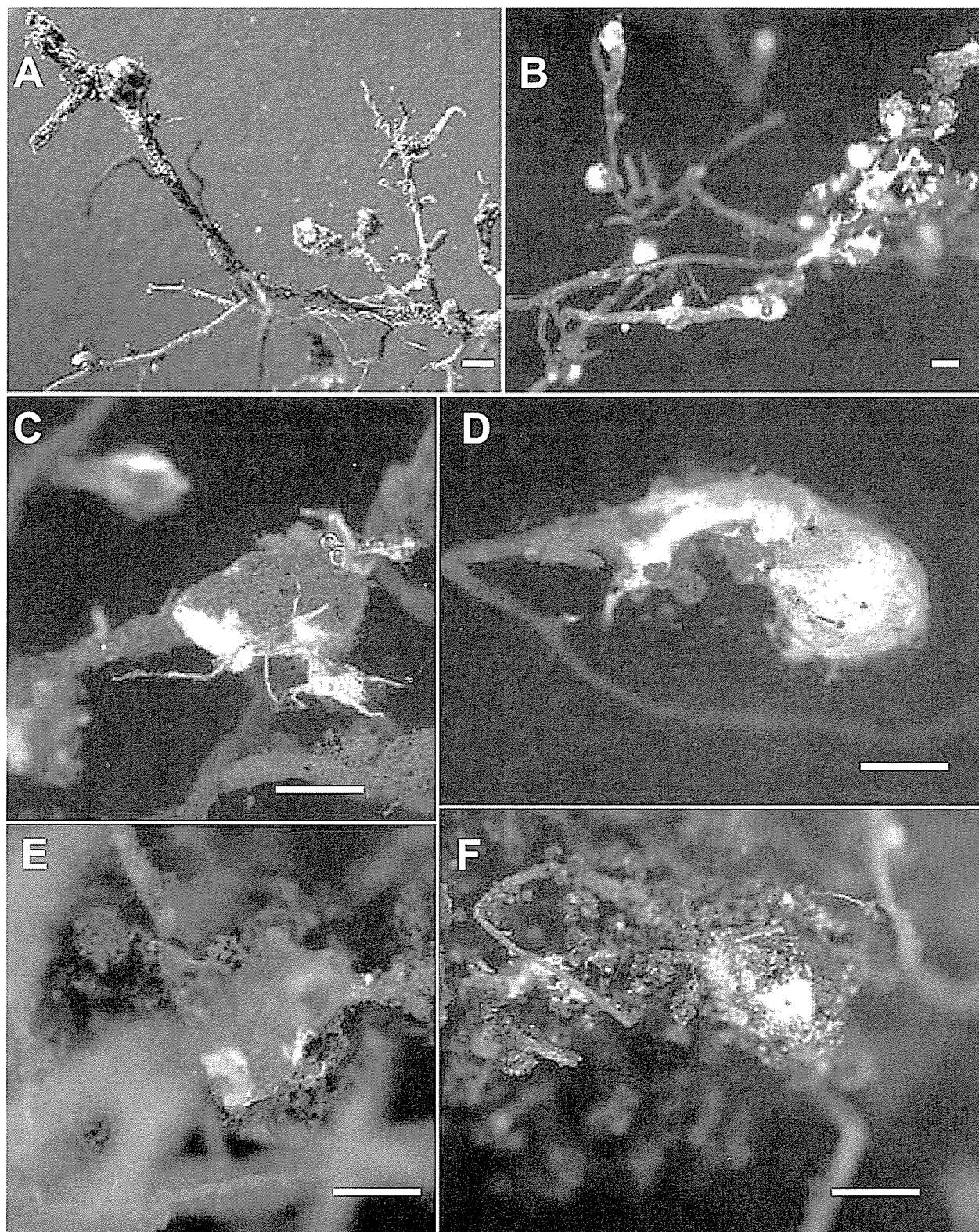
菌根縦断面の光学顕微鏡写真の一部を図 5, A ～ G に示す。いずれの試料でも先端部で、植物側の根冠細胞、分裂細胞及び皮層細胞は崩壊していて、それらの細胞があったと思われる領域 (*) を菌糸細胞が占めていた。菌根の基部では皮層細胞が観察されたが、ハルティヒネットは形成されていなかった。菌根基部で菌糸細胞に接している根の表皮から連なって、菌根の先端近くで収束するように、根の表皮の残余物と思われる黒い不定形の構造が帯状に分布していた。

菌鞘は厚く、最大 200 μ m に達し、外層と内層の 2 層に区別された。菌鞘外層を構成する菌糸は直径 2 ～ 5 μ m で、かすがい連結はなく、菌糸組織状に配列していた。菌鞘内層を構成する菌糸は直径 7 ～ 14 μ m で、かすがい連結はなく、根に対し垂直に、偽柔組織状に配列していた。根の組織を破壊したところに進入した菌糸は先端部が 2, 3 本に分枝し、中心柱に対し垂直に偽柔組織状に配列していた。

分枝した菌糸の先端は直径 2 ～ 4 μ m であった。根の先端に近い部分の菌糸は少し波打った形状になっていた。

4. 考 察

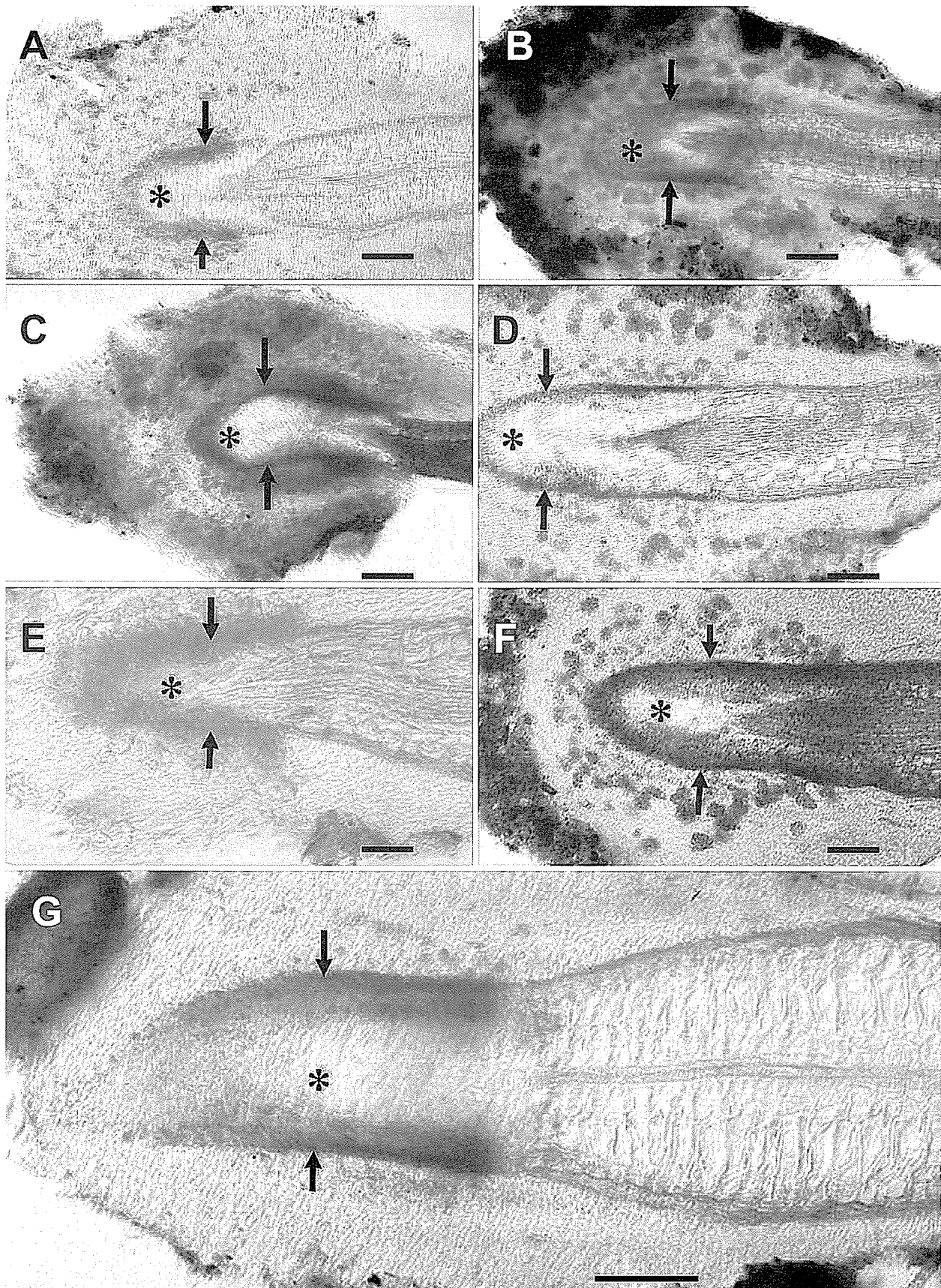
根先端部で植物側の組織が全て崩壊し、代わりに菌糸が占めているという本研究の観察結果は、



図－ 4. 様々な植物樹下で観察されたハルシメジ類の菌根

A. ヤマブキ, B. ニホンナシ, C. リンゴ, D. ノイバラ, E. ウメ, F. カスミザクラ. バーは1mm.

Agerer and Waller (1993) が *Entoloma saepium* とバラ属の1種及びヨーロッパスモモで行った観察結果とほぼ一致し、両者は同じタイプの菌根と考えられる。また、この種の菌根はハルシメジ類が共生したバラ科植物だけでなくニレ科植物の根でも形成されおり、宿主に関わらずハルシメジ類の菌糸が形成す



図ー 5. 様々な植物樹下で観察されたハルシメジ類の菌根の縦断切片

A. ウメ, B. ナナカマド, C. リンゴ, D. オオシマザクラ, E. ヤマブキ, F. エゾヤマザクラ, G. ケヤキ, *印は根組織が崩壊した所を示す, 矢印は表皮の残余物を示す, バーは 100 μm .

る特徴的な菌根であることが明らかになった。このことから、根の先端部の組織が崩壊し、それらの領域に菌糸が侵入するタイプの菌根を新しい菌根の基本型と認め、ハルシメジ型菌根を呼ぶことを提唱する。

第2節 菌根の微細構造

1. 目的

ハルシメジ類は第1節で明らかにしたように、特徴的な形態的特徴を有するハルシメジ型菌根を形成するが、菌根を構成する菌糸や根の細胞について、超薄切片法による電子顕微鏡観察は行われていない。本節では、電子顕微鏡観察によって、その細胞内構造を明らかにすることで、菌糸や根の細胞の挙動を推定し、その関係を考察する。

2. 材料と方法

電子顕微鏡観察のための菌根は1994年4月14日に京都市伏見区宇治川河川敷のノイバラ付近の地上に発生した *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* の下の土壌より採取した。菌根の採取、及び菌と植物の同定は第1節と同様に行った。

洗い出した菌根を5% グルタルアルデヒド・リン酸緩衝水溶液 (pH 7.4) 中で減圧脱気後、4℃で12時間、前固定した。それをリン酸緩衝水溶液で2時間洗浄し、1% 四酸化オスミウム・リン酸緩衝水溶液で、4℃で12時間、後固定した。固定の終わった試料を水洗後、10 mg/ml 酢酸ウラニウム水溶液内で、4℃で2時間電子染色した。それらを水洗後、20%, 40%, 60%, 80%, 100% アセトンに順次浸して脱水し、Spurr 樹脂 (Spurr 1969) に包埋した。

Spurr 樹脂に包埋した菌根をウルトラミクロトーム (Reichert-Nissei Ultracut N) を用いて厚さ 50 ~ 150 nm の超薄切片を作成し、3% クエン酸鉛水溶液で10分間電子染色をした後、日立 H-7000 形電子顕微鏡 (75kV) で観察を行った。電子顕微鏡写真の撮影には富士電子顕微鏡フィルム FG を用いた。

3. 結果

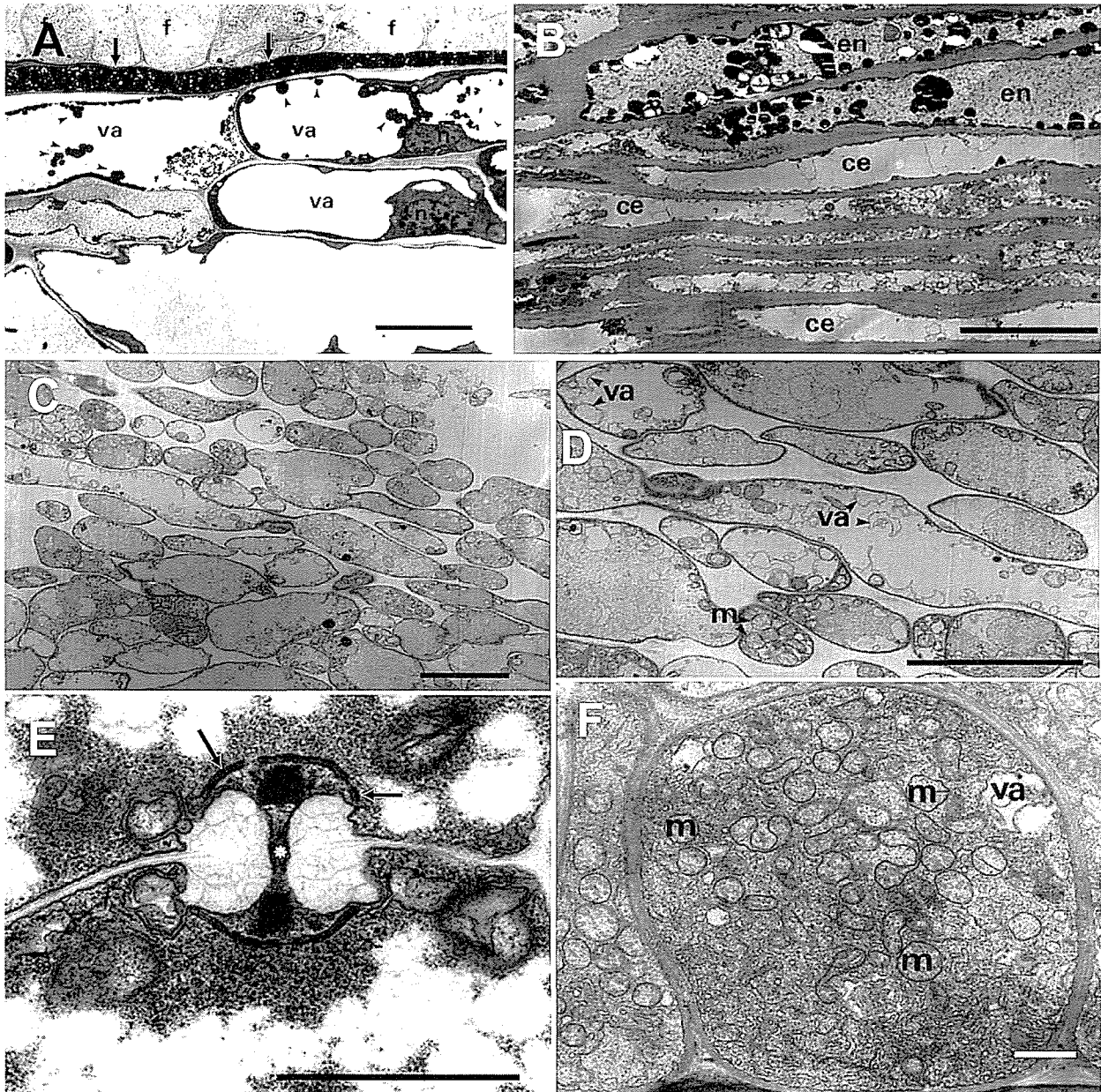
a. 根の細胞の形態的特徴

根の皮層細胞 (図-6, A) では、液胞が細胞の大部分を占めていた。根の表面より1~2層の皮層細胞内では、電子密度の高い顆粒状物質が高密度に蓄積していた。根の表面より3~4層の皮層細胞内では、電子密度の高い顆粒状物質がおもに細胞の周縁部に蓄積していた。内皮細胞 (図6, B) では液胞内に電子密度の高い顆粒状の物質が散在していた。

b. 菌糸細胞の形態的特徴

菌根各部の菌糸細胞は断面の大きさや形態によって、以下の4つに大別できた。

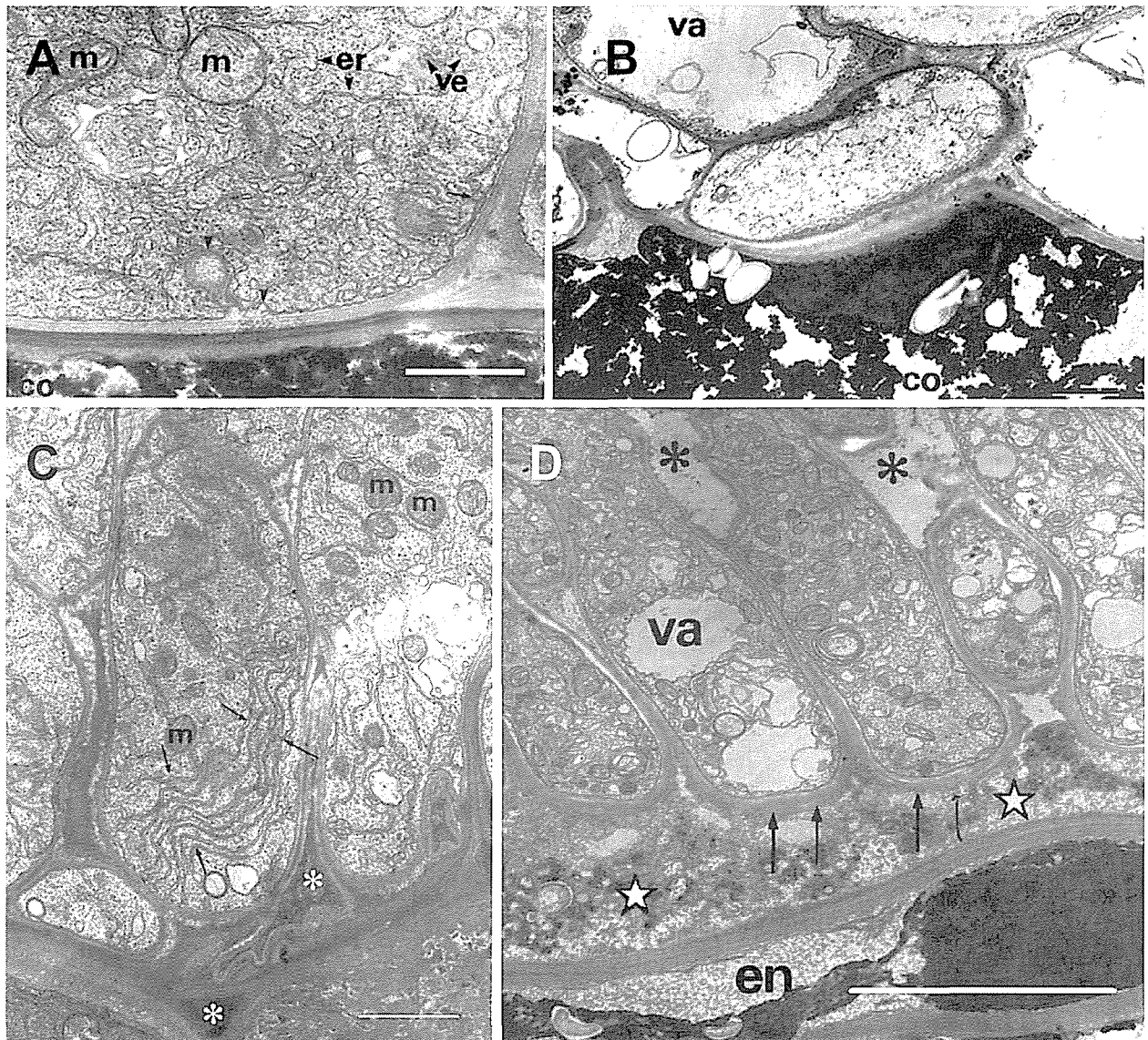
1) 菌鞘外層の菌糸細胞 (図-6, C) は直径2~5 μm で、その断面はどの方向で切っても一部が必ず細長く切れ、しばしば菌糸隔壁が観察された (以下これを菌糸細胞 (I) と呼ぶ)。菌糸細胞 (I) では (図-6, D), 原形質に富むもの、内部にいくつもの小さな液胞様の構造を持つもの、そして細胞中央部に大きな液胞が占めるものが観察された。菌糸隔壁の中央部では孔が開いていた (図6, E, *印)。孔の周囲の隔壁は肥厚していた。孔の口の部分では電子密度の高い粒状の構造が観察された。隔壁孔を覆うように、孔の空いた膜状のパレンテソーム (図-6, E, 矢印) が存在したことから、DP-4 型ドリポア-パレンテソーム構造 (中井 1986) であることが確認できた。



図－ 6. 菌根各部の超薄切片像 (1)

- A. 菌根基部の皮層細胞. 矢印は、電子密度の高い顆粒状の物質が高密度に蓄積した皮層細胞を示す. 矢じり印は、皮層細胞の液胞に蓄積した電子密度の高い顆粒状物質を示す. f は菌糸細胞, va は液胞を示す. バーは 10 μ m.
- B. 菌根先端部の内皮細胞と中心柱細胞. en は内皮細胞, ce は中心柱細胞を示す. バーは 10 μ m.
- C. 菌鞘外層の菌糸細胞 (I). バーは 10 μ m.
- D. 図－ 6, C の一部分の拡大像. va は液胞, m はミトコンドリアを示す. バーは 10 μ m.
- E. 菌糸細胞 (I) のドリポア - パレテソーム構造. *印は隔壁孔を示す. 矢印はパレンテソームを示す. バーは 1 μ m.
- F. 菌糸細胞 (II). va は液胞, m はミトコンドリアを示す. バーは 1 μ m.

2) 根に接する菌鞘内層に存在する菌糸細胞は直径 7 ～ 14 μ m で, 中心柱を中心として放射状に配列していた (以下これを菌糸細胞 (II) と呼ぶ). 菌糸細胞 (II) では (図－ 6, F), 細胞内小器官に富んだ細胞質が観察された. 円形, 楕円形, またはアレイ形の断面をしたミトコンドリアが多数見られ, その内

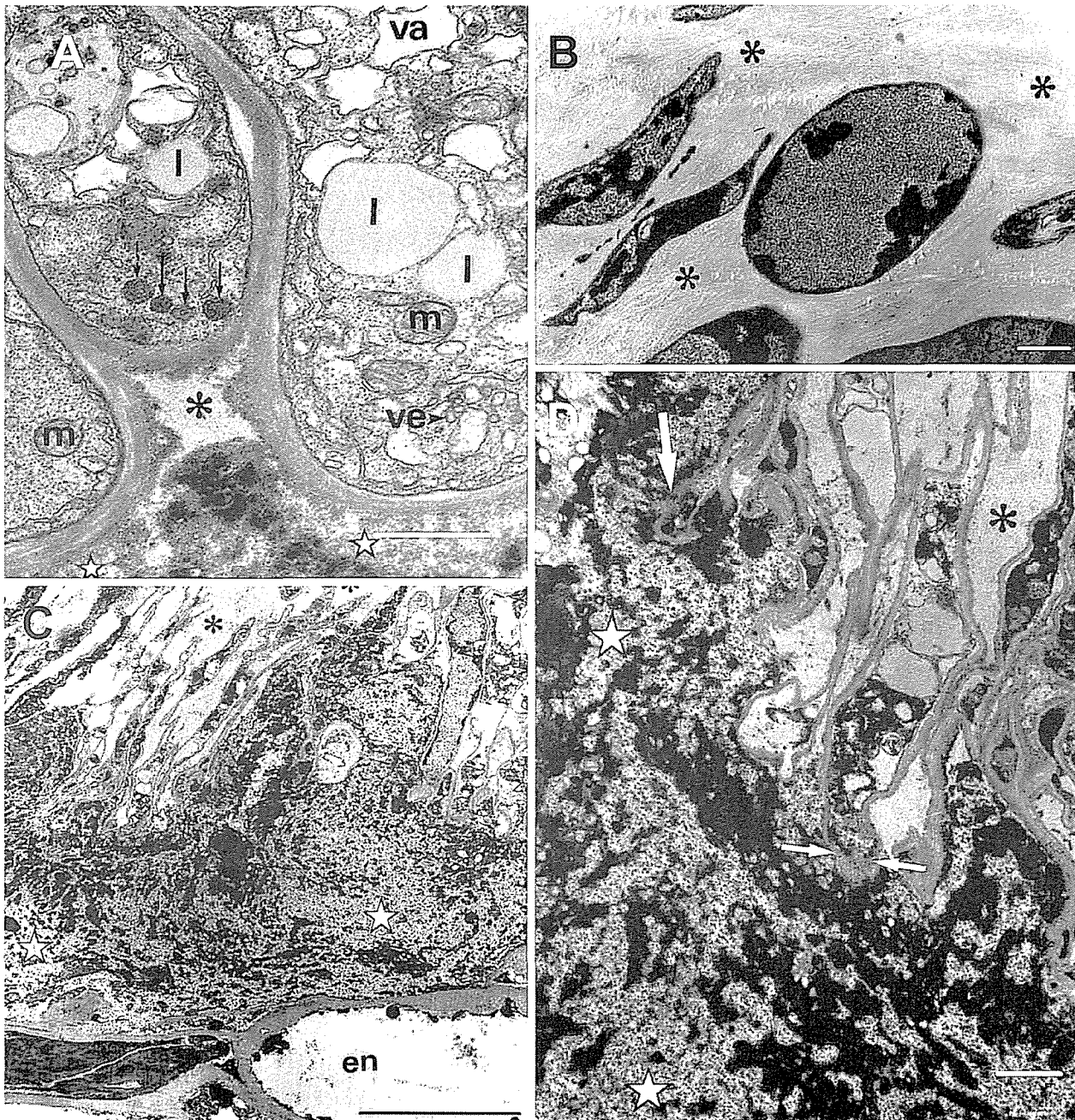


図一 7. 菌根各部の超薄切片像 (2)

- A. 図一 6, F の細胞壁周辺部の拡大像。矢印は原形質膜に接している小胞を示す。矢じり印は原形質膜に凹凸を持つ部分を示す。co は皮層細胞, er は小胞体, m はミトコンドリア, ve は小胞を示す。バーは 1 μm 。
- B. 最も根元に近い部分に存在する菌糸細胞 (II)。co は皮層細胞, va は液胞を示す。バーは 1 μm 。
- C. 菌根の基部の方に存在する菌糸細胞 (III)。矢印は層状に並ぶ小胞体を示す。*印は根の細胞と菌糸細胞の境界領域に存在する電子密度の高い物質を示す。m はミトコンドリアを示す。バーは 1 μm 。
- D. 菌根の先端の方に存在する不定形の菌糸細胞 (III)。矢印は根に接する部分の厚くなった菌糸細胞壁を示す。*印は菌糸細胞の細胞間隙に存在する繊維状物質を示す。☆印は根の細胞と菌糸細胞の境界領域に存在する不定形物質を示す。en は内皮細胞を, va は液胞を示す。バーは 5 μm 。

部には多数のクリステが観察された。細胞質全体にわたって、多数の小胞体や小胞が観察された。一部で原形質膜と接しているように見える小胞 (図一 7, A, 矢印) も観察された。原形質膜には凹凸が見られた (図一 7, A, 矢じり)。液胞は菌糸細胞 (I) と比べて小さかった。菌根基部に最も近い部分の菌糸細胞では、液胞が発達しているものが観察された (図 7, B)。

3) 表皮残余物より内部に存在する菌糸細胞は直径 2 ~ 4 μm で、中心柱に直角の方向に放射状に配列



図－ 8．菌根各部の超薄切片像 (3)

- A. 図－ 7, D の一部分の拡大像. 矢印は電子密度の高い顆粒状物質を含む小胞を示す. *は菌糸細胞の細胞間隙に存在する繊維状物質を示す. ☆は根の細胞と菌糸細胞の境界領域に存在する不定形物質を示す. m はミトコンドリア, l は脂質を含む小胞, va は液胞, ve は小胞を示す. バーは 1 μ m.
- B. 菌糸細胞 (IV). *は菌糸細胞の細胞間隙に存在する繊維状物質を示す. バーは 1 μ m.
- C. 内皮細胞と菌糸細胞 (IV) との境界領域. *は菌糸細胞の細胞間隙に存在する繊維状物質を示す. ☆印は根の細胞と菌糸細胞の境界領域に存在する不定形物質を示す. en は内皮細胞を示す. バーは 10 μ m.
- D. 不定形の物質の周辺部. 矢印は菌糸細胞の細胞壁の一部が不連続となった部分を示す. *は菌糸細胞の細胞間隙に存在する繊維状物質を示す. ☆印は根の細胞と菌糸細胞の境界領域に存在する不定形物質を示す. バーは 1 μ m.

していた（以下これを菌糸細胞（III）と呼ぶ）。菌根基部に近い領域にある菌糸細胞（III）では、2～10数層の層状構造をなす小胞体が観察された（図－7, C, 矢印の間）。小胞体の端は少しふくれていた。菌根の先端部に近い部分の菌糸細胞（III）は断面の形態に円みを帯びなくなっていた（図－7, D）。内皮細胞に接する菌糸細胞（III）では、根に近い部分の細胞壁が他の部分に比べて厚くなっていた（図－7, D, 矢印）。原形質中には、球形及び楕円形の断面をしたミトコンドリアが散在していた。この領域の細胞に特異的な2種類の小胞が観察された（図－8, A）。それらは、電子密度の高い物質を含む直径 0.12～0.33 μm の小胞と、脂質様の物質を含むと思われる直径 1.2～1.6 μm の小胞である。

4) 表皮残余物より内側で、菌糸細胞（III）よりも先端部に存在する菌糸細胞は、その断面が楕円形から不定形で、中心柱を囲むように配列しており（図－8, B, 以下これを菌糸細胞（IV）と呼ぶ）、はっきりした細胞内小器官は見られず、顆粒状、または不定形の電子密度の異なる物質がモザイク状に存在していた。

c. 菌糸細胞間隙

菌糸細胞間隙は菌糸細胞（I）、（III）、（IV）で顕著に認められた（図－6, C, 図－7, C, D, 図－8, A, B, C）。菌糸細胞（III）、（IV）の細胞間隙では（図－7, D, 図－8, A, B, C）、電子密度の低い繊維状の物質が存在していた。

d. 根の細胞と菌糸細胞の境界領域

根の細胞と菌糸細胞の境界領域の超薄切片像は菌根の部位により異なっていた。菌糸細胞（II）、（III）と根の細胞の細胞壁が不明瞭になり、外生菌根において観察される典型的な involving layer (Duddridge and Read 1984) が形成されることはなかった（図－7, A, B, C）。菌根の基部では（図－7, A, B）、菌糸細胞（II）と皮層細胞がほとんど密着していた。菌根の基部に近い菌糸細胞（III）と内皮細胞の境界領域では（図－7, C, *印）、電子密度の高い物質が観察された。菌根の先端部に近い菌糸細胞（III）及び菌糸細胞（IV）と内皮細胞の境界領域では（図－7, D, 図－8, A, C, D, ☆印）、様々な電子密度の物質が班状に分布しているのが観察された。これらの物質に接する菌糸細胞（IV）の細胞壁の一部が不連続になり、菌糸細胞の中身が様々な電子密度の物質と連続したような像が観察された（図－8, D, 矢印）。

4. 考 察

菌糸細胞（II）、（III）は菌鞘外層に存在し大きな液胞を有する菌糸細胞（I）と異なる形態的特徴を示した。菌糸細胞（II）、（III）は細胞内に多数のミトコンドリアや小胞体を含んでいたもので、細胞内でエネルギー生産及びタンパク生産が活発に行われていると推察される。先行研究により、外生菌根においても、菌鞘がいくつかの層に区別でき、外側の層の細胞では液胞が発達するが、根に接する内側の層の細胞はより多様な細胞内小器官が観察されるという傾向が既に報告されている (Strullu 1979, Kottke and Oberwinkler 1986, Bonfante-Fasolo and Scannerini 1992)。今回の観察結果から、ハルシメジ類の菌鞘を構成する菌糸の細胞内構造は全体として外生菌根に類似しているといえる。

菌根内の皮層細胞の中で、菌に接しているものは細胞内に電子密度の高い顆粒状の物質を蓄積していて、おそらく先端部から崩壊していくものと考えられる。先に述べたように、皮層細胞に接する菌糸細胞（II）群の中で、活発なエネルギー生産が行われていると考えられる細胞は、崩壊した皮層細胞から栄養を得ているものと推察される。これに対し、構造的に似ている外生菌根の場合、菌糸に接する皮層細胞

胞に顆粒状物質が蓄積されるという報告はない。従って、こうした形態的特徴はハルシメジ型菌根に特徴的であるといえる。

Agerer and Waller (1993) の模式図には、菌根内で中心柱の先端の部分に根の細胞の残余物が描かれている。今回の電子顕微鏡観察によると、*E. clypeatum* f. *hybridum* の菌根の先端部の電子密度の異なる物質が班状に分布する領域には、根の細胞残余物に加え、菌糸細胞の残余物が含まれていた。菌糸細胞(III)では、一つの細胞内に様々な大きさの液胞や小胞が観察できた。小胞や小さな液胞の融合によって物質輸送に関与するより大きな液胞を形成したり、細胞壁へと融合することにより、菌糸伸長に関与しているものと考えられる。また、先端部に近い菌糸細胞(III)に独特の構造をとる小胞が存在していることは、この領域の菌糸細胞(III)が菌糸細胞(I)、(II)及び基部に近い菌糸細胞(III)と異なる代謝を行っている可能性を示唆している。菌糸細胞(IV)では細胞内小器官が観察されないことから、細胞としての活性が存在しない可能性がある。以上のことから、ハルシメジ型菌根では、通常の外生菌根とは異なり、根の細胞だけが崩壊するのではなく、侵入した菌糸もまた中心柱の周囲で崩壊していると推察される。

第3節 考 察

光学顕微鏡観察の結果、Agerer and Waller (1993) が *Entoloma saepium* で明らかにした、根の先端部の組織が崩壊し、そこに菌糸が進入した特異的構造がハルシメジ類に広く認められることが明らかになった。この構造により、ハルシメジ類が破壊された根組織より栄養を得て、植物に対して寄生的に振る舞っていると示唆される。さらに、*E. clypeatum* f. *hybridum* の菌根の電子顕微鏡観察結果は、破壊された根組織の中に侵入した菌糸細胞自体もすみやかに崩壊することを示唆している。さらに、先端部の中心柱の周囲には植物の皮層細胞が存在せず、代わりに存在する菌糸細胞も細胞内小器官を欠いているので、菌根内部で菌と植物が共生しているという証拠は明瞭でなかった。このことから、両者が共生するのは菌糸が皮層細胞に侵入を開始し始めたごく短期間のみで、その後、菌は植物に対して寄生的に作用し、皮層細胞を破壊しながら中心柱まで達すると菌糸自体も活性を失うものと解釈できる。ハルシメジ類が植物に感染しても樹勢が弱ることはないのは、寄生的な振る舞いを行う期間がごく短いことと相関している可能性が高い。こうした推論を裏付けるには、実際に野外における菌根のフェノロジーを調べる必要がある。

第4章 ハルシメジ類の菌根の季節消長

1. 目 的

前章において、ハルシメジ類が形態的に他のタイプと全く異なる独特のハルシメジ型菌根を形成することを明らかにした。すなわち、ハルシメジ型菌根は、形態的に菌糸が破壊的に根の中心柱周囲まで侵入し、その後崩壊するという特徴を有する。この形態観察の結果から、ハルシメジ類の菌根は形成されても短期間で崩壊すると予想される。菌根性きのこの人為的な発生には、目的とする菌種を宿主植物に接種して、人為的に菌根を作らせ、菌根苗を育成する必要がある(Yamada et al. 2001a)。しかし、菌根は植物の根に周年同じように存在するわけではなく、季節的に質量とも変化することが知られている(小

川 1975)。それ故、野外に存在する菌根の季節消長を明らかにすることは、菌根苗に接種した菌を維持するための重要な基礎情報となる。しかし、ハルシメジ型菌根の場合、前述の通り、形成された菌根は短期間で崩壊すると予測できるが、野外に存在する菌根の動態について、全く研究されていない。そこで、本章では京都府宇治田原町湯屋谷の梅林でハルシメジ型菌根の季節消長について検討する。

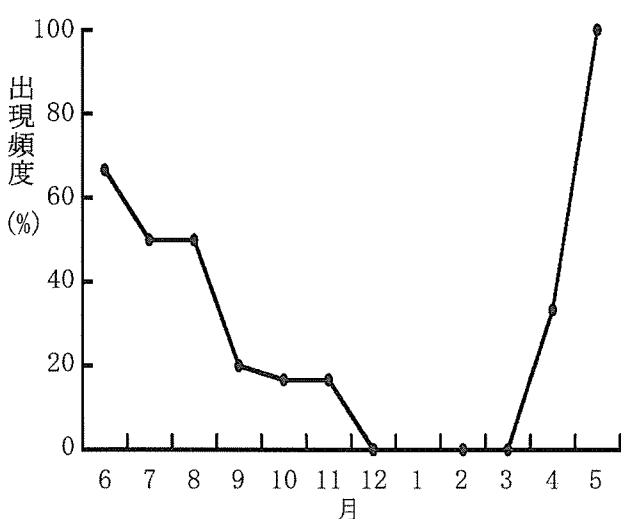
2. 調査地、調査期間及び調査方法

調査地は京都府綴喜郡宇治田原町湯屋谷梅林である。梅林で 1993 年 5 月に *Entoloma saepium* の発生地を 130 地点記録し、同年 6 月から翌年（1994 年）5 月まで、1995 年 1 月を除く毎月 1 回、調査地で子実体発生を確認しながら、それらの地点から 6 カ所を任意に選び、縦 5cm、横 5cm、深さ 15cm の土壌ブロックを掘り取り、そのまま持ち帰った。流水中でピンセットや刷毛などを用いて根系を洗い出し、実体顕微鏡で根の形態を観察して菌根の有無を記録した。そして、全 6 サンプルの中で菌根サンプルの出現頻度を求めた。

3. 結 果

月ごとのサンプルからの菌根の出現頻度を図－9 に示す。子実体発生は 1993 年 6 月と 1994 年 5 月に認められた。子実体発生が認められる 6 月には、67%（4/6）から菌根が確認されたが、菌根の出現頻度は子実体が発生しなくなると徐々に低下し、1993 年 12 月、1994 年 2 月、3 月にはサンプルから菌根を発見できなかった。1994 年 4 月に再び確認され、子実体発生が認められた 5 月にはその頻度が 100% になった。

菌根の形態的特徴について、観察した月毎で違いが認められた。すなわち、子実体の 1993 年 6 月に発見した菌根は固く、ピンセットでつまんでも、容易に構造が崩れることなく、植物根との分離は困難であった。発生時期を過ぎると、菌根はピンセットでつまむと崩れたり、菌根周囲の土を刷毛で取ろうとすると、菌鞘全体がはがってしまう傾向が顕著になり、急速に衰退していると推測できた（図－10）。1994 年 4、5 月に観察された菌根は 1993 年 6 月と同様、固く、健全な特徴を持つものであった。



図－9. *Entoloma saepium* がウメの根に形成する菌根の月毎の出現頻度



図－10. 7月に観察された古い菌根

菌鞘がもろくなり、ハケで砂粒の除去を試みたとき、菌鞘も根端部より分離する。矢印は根端部のやや根元の部分にのみ残った菌鞘を示す。

4. 考 察

本調査の結果は、*E. saepium* の菌根はきのこの発生前後に徐々に崩壊を始め、秋までにほぼ消失してしまうことを示している。また翌春、子実体発生直前に健全な菌根が再び出現することも確認された。すなわち、ハルシメジ型菌根は1年中観察される永続的なものでない可能性が示唆された。前章の考察で、ハルシメジ類の菌糸は形態的に、根に対し寄生的に振る舞っていると考えられるが、すぐに崩壊し、その関係は長期間続かないであろうと述べた。本調査の結果は、形態的な側面に加え、菌根の季節消長のパターンからも、寄生的な振る舞いが永続的でない可能性を強く示唆したものとする。

また、*E. saepium* の子実体発生と菌根の出現頻度の季節変動は連動しており、菌根は子実体発生前後に顕著に発達するといえる。マツタケは秋に多く子実体を発生させる菌根性きのこである。同菌は4月に活性菌根帯を作り、その中で6月から8月に菌根が増え、子実体が発生した後の10月に活性菌根帯が減少することが知られている（小川 1975）が、菌根そのものは1年中観察され、1年を通して菌根からマツタケの菌糸を分離することも可能である（Yamada et al. 2001b）。このように、子実体発生前に菌根が顕著になる点で、ハルシメジ類はマツタケと同じ菌根の季節消長を示したが、菌根がほとんど確認できない時期が存在する点で大きく異なる。

本調査では菌根の季節消長を調査するために、子実体発生が記録された直下の土壌を少量採取する研究手法が考案され、初めて用いられた。従来の調査法は、子実体の発生地において、1年かけて土壌断面を作成しながら、菌根の生育状況を記載するものが主であった（小川 1975）。この手法は、全て掘り起こし、菌根を含め、土壌構造を破壊してしまうため、調査地から子実体が観察されなくなった（小川 1978）。本調査では、1年間菌根観察を行った後に、*E. saepium* の子実体を再び試験地内で確認することができた。このことは、本調査法が従来の調査法よりも、土壌の攪乱程度が小さく、*E. saepium* に関しては少なくとも翌年子実体発生を行える程度の土壌攪乱ですみ、菌根の動態を推定できる有益な調査法であったことを示している。この方法は今後の菌根調査の方向を示したものとする。

これらの野外での調査結果は、菌根苗作出試験におけるハルシメジ型菌根の評価を行う上で重要な示唆を与える。すなわち、菌根は子実体発生前後に顕著になるので、子実体発生時期に評価を試みないと、定着の有無を正確に評価できないものと考えられる。

第5章 ハルシメジ類のウメ菌根苗の育成

菌根性きのこの栽培化にあたっては、菌根苗を育成することが有効である（Yamada et al. 2001a）。菌根性きのこの仲間には、ショウロのように、子実体粉碎液の散布で菌根苗の育成が可能であり、子実体形成まで確認されているものがある（小川 1992）。子実体粉碎液のような無菌でない天然の接種源を用いることが可能であれば、クリーンルームやクリーンベンチのような大規模施設を用いずに低コストで菌根苗を育成することが可能で、多くの菌根性きのこ栽培の普及が可能になるものと思われる。

ハルシメジ類は独特のタイプ、ハルシメジ型菌根を子実体発生の2ヵ月前頃から形成し、きのこ発生直後に徐々に消失することが明らかになった（第3、4章）。そこで、本章ではハルシメジ菌根苗の非無菌的な作出法を開発することを目指し、次の3つの研究を行った。すなわち、1) *Entoloma saepium* の

子実体発生地近くで自然発芽したウメの実生苗を調査し、子実体から伸びた菌糸体と実生苗との間にハルシメジ型菌根を形成しているか否かを調査した（第1節）。その結果、実生苗の段階で菌根形成が確認されたので、2) 菌根が形成されていた実生苗を他所に移植して、翌年再び菌根が形成されるか否かを調査した（第2節）。また、3) ハルシメジ型菌根を形成していない実生苗に子実体粉碎液を散布し、菌根苗を作出できるか否かの実験を行った（第3節）。



図ー 11. ウメ実生苗に形成された *Entoloma saepium* の菌根

- A. ウメ実生苗（矢印）の横に発生した *E. saepium*.
- B. きのか近くのウメ実生苗の根系、目盛は 1 mm.
- C. 図 5-1, B の四角部分の拡大写真、矢印は菌根を示す、目盛は 1 mm.

第 1 節 子実体発生地付近に生じた実生苗の菌根形成状況

1. 目 的

梅林内において、*Entoloma saepium* の子実体発生地の周囲で、自然発芽した樹高 20 ～ 30cm のウメ実生苗（樹令不明）を多数発見した（図－11, A）. この実生苗に菌根が形成されているのであれば、実生苗を菌根苗として利用可能であると考えられるので、実生苗における菌根の形成状況を調査した.

2. 材料と方法

2003 年 5 月 7 日に茨城県那珂郡那珂町の茨城県林業技術センター構内の梅林内において、*E. saepium* の子実体発生地の周囲で発見された、自然発芽した樹高 20 ～ 30cm のウメ実生苗のうち 10 本を、ステンレス製山菜掘り用具を用いて、縦横 10cm 四方、深さ 15cm 程度の土壌ブロックで掘り取り、ブロック断面に白色の菌糸束を確認した後に土壌を崩し、実体顕微鏡下で *E. saepium* との菌根形成の有無を調査した. 対照として、*E. saepium* が認められない場所のウメ実生苗も同様の手法で掘りとり、菌糸束と菌根の有無を調査した. 菌根が確認された場合、第 3 章第 1 節と同様の方法で、プレパラートを作製し、光学顕微鏡観察を行った.

3. 結 果

子実体発生地から掘り取った全てのウメ実生苗で白色の菌糸束とそれに繋がる *E. saepium* の菌根が認められた（図－11, B, C）. それらについて、光学顕微鏡観察を行った結果、根の先端部の組織が消失しており、形成されていた菌根は成木の根系で観察される菌根と全く同じハルシメジ型菌根であることがわかった. 一方、対照として *E. saepium* が認められなかった場所から掘り取ったウメ実生苗から、菌糸束やハルシメジ型菌根は発見できなかった.

ハルシメジ型菌根を有していた実生苗は、有していない実生苗と比較して、葉の萎縮などの病徴は全く認められなかった.

4. 考 察

本調査の結果から、*E. saepium* がウメ実生苗においても、成木時と同様にハルシメジ型菌根を形成しうることが明らかとなった. また、菌が感染した実生苗に病徴が見られなかったことから、ハルシメジ型菌根は根の先端部の組織が破壊される特徴を有しているが、その菌の活動は実生苗の生存に影響を及ぼさないものと考えられる. 従って、子実体発生地域において播種を行い、実生苗を得れば、それらの大半に菌根が形成される可能性があると考えられる.

第 2 節 菌根形成した実生苗の移植

1. 目 的

第 1 節で、*E. saepium* の子実体が発生している場所に生育しているウメの実生苗には、菌根が形成されていることが明らかになった. しかし、この実生苗を菌根苗として利用するためには、菌根を付着させたまま移植し、新たに子実体を発生させようとする場所にも菌根を定着させる必要がある. そこで、菌根がついている実生苗を移植し、移植後も菌根が形成されているか否かを検証することにした.

2. 材料と方法

第 1 節と同じ、2003 年 5 月 7 日に茨城県林業技術センター構内の梅林内に発生したハルシメジの近く

の実生苗について、菌根の有無を確認し、菌根がついているもののみ 10 本掘りとった。この時に、第 4 章で示したように、ハルシメジ型菌根は春以降衰退することを考慮し、土壌を完全に振り落とすことなく菌糸束で塊状になっている土壌はそのままにした。プラスチック製植木鉢の底に鹿沼土を敷き、その上に 1 本ずつ実生苗を入れた。土壌はセンター構内のアカマツ・コナラ林の褐色森林土を用いた。このように作製した鉢植を茨城県林業技術センター構内サクラ樹下の日陰に鉢ごと埋設した。これらの苗木について、夏季に鉢内に生えてきた雑草を除去したが、施肥や農薬散布は行わなかった。それらを 2004 年 5 月 12 日に、鉢より根系を取り出し、菌根の有無を調査した。

3. 結 果

調査した結果、*E. saepium* の菌根は観察した 10 鉢中、9 鉢で観察された。

4. 考 察

ハルシメジ型菌根が春以降急速に衰退することは第 4 章で示した。今回の結果は春に菌根が認められた実生苗を他所に移植した場合、1 年後においても大半が菌根を形成することを示している。データ収集は移植後 1 年後にのみ行ったので、前年の菌根の一部が根上に生息し続け、再度菌根を形成するのか、移植時の菌根は消失し、他の散布体、例えば、厚壁孢子などが生き残り、改めて菌根が形成されたのかは、確定できなかった。しかし、第 5 章第 1 節で示したように、集約的に菌根苗を作り、それを別の場所に移植するような菌根苗生産法がかなり有効な方法であることを示唆させる結果と考える。今後は菌根が確認された実生苗をほ場に移植し、ハルシメジの子実体が発生するか否かを追跡する必要がある。

第 3 節 子実体粉碎液散布による菌根苗作出技術の検討

1. 目 的

第 1 節、第 2 節において、子実体発生地周囲の実生苗を利用する技術を検討した。しかし、この技術はきのこの発生地を確実に把握する必要がある。すなわち、全く子実体の発生しない場所では利用できない、という欠点がある。このような子実体が発生しない場所では、別の接種源を投入することでこの問題を解消することができると思われる。例えば、菌根性きのこの 1 種、ショウロの場合、全く子実体が発生しないクロマツ植林地に、子実体粉碎液を散布することにより、子実体を発生させることに成功している（小川 1992）。そこで、この手法がハルシメジ類にも応用可能か、検討を試みた。

2. 材料と方法

Entoloma saepium の子実体から 5m 以上離れた場所に生じたウメの実生苗 40 本を 2003 年 4 月 24 日に茨城県林業技術センター構内の梅林より土壌ごと掘りとり、土壌を崩し、菌根が形成されていないことを確認した後、鹿沼土を敷いたプラスチック製植木鉢に移植した。土壌はバラ科植物やニレ科植物の生育していない茨城県林業技術センター構内のアカマツ・コナラ林から採集した褐色森林土壌を用いた。40 鉢のうち、20 鉢はセンター構内の日当たりの良いところ（日向区）に埋設し、残り 20 鉢はセンター構内のサクラ樹下の日陰に埋設した（日陰区）。

各地点 10 鉢ずつ、合計 20 鉢について 2003 年 5 月 7 日に子実体粉碎液を散布した。粉碎液は茨城県林業技術センター構内のウメ樹下より 2003 年 5 月 1 日、6 日に採集した合計 15 本、146 g の *Entoloma saepium* を水道水とともにミキサーで粉碎し、全量が 400ml になるよう調製した。散布量は 1 鉢につき

20mlとした。粉碎液を鉢内のウメの根に確実に到達させるため、プラスチック製スポイトを用いて、鉢内に粉碎液を注入した。残り 20 鉢は対照区とし、子実体粉碎液を散布しなかった。これらの苗木について、夏季に鉢内に生えてきた雑草を除去したが、施肥や農薬散布は行わなかった。

子実体粉碎液散布 1 年後の 2004 年 5 月 11 ～ 12 日に苗木を鉢より取りだし、菌根の有無を調べた。粉碎液散布の効果を明らかにするため、得られたデータについて、StatView ver. 4.5 for Macintosh を用いて、カイ 2 乗検定を行った。

3. 結 果

実験区画ごとに菌根苗の作出率を表－8 に示す。日向区では処理区、対照区いずれも菌根が形成されていなかった。日陰区では、処理区において 2 鉢で菌根が確認されたが、対照区では全く認められなかった。カイ 2 乗検定の結果、粉碎液の散布と菌根の有無との間の p 値は 0.136（自由度は 1）となり、粉碎液の散布と菌根の有無の間に、独立性に関する帰無仮説は棄却されなかった。

表－ 8. 菌根苗の作出率

区画		調査数	菌根形成苗数
位置	処理		
日向	処理	10	0
日向	対照	10	0
日陰	処理	10	2
日陰	対照	10	0

4. 考 察

今回の実験結果は *E. saepium* 子実体粉碎液散布により、ウメ菌根苗を作出できる可能性があることを示している。実験に用いた苗木がハルシメジ類に関して非感染である可能性が極めて高かったので、本試験結果はハルシメジ類の菌根合成に成功した初めての記録といえる。しかし、成功率は必ずしも高いものとはいえず、粉碎液の散布と菌根形成との間の独立性は統計的に棄却されなかった。粉碎液の濃度、散布時期等、今後他の要因についてもさらに検討する必要がある。

また、日向区では、菌根が形成できた実生苗が皆無であったのに対し、日陰区では 10 鉢中 2 鉢作出できた。このことは、実生苗の栽培環境が菌根形成に影響する可能性を示唆しており、菌根苗の作出に際しては、直射日光が地面にあたらず、ある程度の木陰のもとで苗を育てることが有効である可能性が示された。

第 4 節 考 察

以上の一連の調査、実験の結果、ハルシメジ類の一種 *Entoloma saepium* が自然発芽したウメにハルシメジ型菌根を形成し、周囲へと分布を広げていることが明らかになった（第 1 節）。菌根形成に至った実生苗はその状態でウメのない場所に移動しても、1 年後に大半が再び菌根形成することがわかった（第 2 節）。さらに、菌根を形成していない実生苗に子実体粉碎液を散布することにより、低頻度であったが、

子実体粉碎液散布により世界で初めてハルシメジ型菌根を作らせること、すなわち、あらたな菌根苗の作出に成功した（第3節）。

これらの結果、特に第3節で示したように非無菌的な接種方法で菌根形成に成功したことは、*E. saepium* が菌根性きのこの中では栽培化にあたって取り扱いの容易な種の中に入る可能性を示唆している。しかし、一旦定着した菌根は高い確率で翌年も再生されるが、菌根を形成していない苗に子実体粉碎液散布により、あらたな菌根苗が作出できる確率は高くなかった。今後は菌根苗の確立に適した諸条件を検討し、菌根苗が高率で作出できるようにする必要があると考える。また、子実体粉碎液の散布に加え、新たな菌根苗作りの手法として、菌根苗そのものや、地下部の菌根のみを接種源とする方法を検討する必要がある。また、既に育成期が終わり、収穫期に達している果樹園において、子実体粉碎液を散布して、菌根形成の様子を調査することも、菌根苗作出のための新たな方策を探るために有益であろう。

第6章 総合考察

これまでの2～5章で、日本産ハルシメジ類の分類と菌根共生、その利用法について述べてきた。ハルシメジ類は有用な食用きのこであるが、栽培化を目的とした基礎的研究はほとんど行われてこなかった。今回の研究により、日本産ハルシメジ類は1種ではないこと（第2章）、子実体の下には独特のハルシメジ型菌根が存在すること（第3章）、菌根は子実体が発生する前後に認められること（第4章）、菌根をつけた実生（菌根苗）が子実体の側に普通に存在し、その菌根苗が移植可能であり、また子実体粉碎液も菌根苗作りに有効である可能性（第5章）が明らかになった。

第2章と第3章で明らかにしたように、ハルシメジ類は、様々なバラ科植物やニレ科植物樹下に発生する。共生相手の植物には、果樹（ウメ、ナシ、リンゴ等）や公園の緑化木（ケヤキ、サクラ類、ナナカマド等）が含まれる。苗木を生産する際、第5章第3節で明らかにしたようにきのこ粉碎液の施与などで、集約的に菌根苗を生産することができれば、特に果樹に感染するハルシメジの場合、宿主の果物を栽培する一方で、ハルシメジ類の栽培も可能になるような、複合経営を目的とした付加価値の高い苗木作りが可能と考えられる。また、ハルシメジ類が感染した緑化木を公園に植栽できれば、食用きのこを採集できる公園ということで、その公園に付加価値を与えることもできる。

また、第2章で明らかにしたように、ハルシメジ類には多様な種類が存在する可能性がある。現在まで、日本ではハルシメジ類でのきのこ中毒の報告はない。ヨーロッパで有毒きのこの可能性が指摘されている *Entoloma niphoides*（全体が白色の種類で、ニレ科植物樹下に発生する；Noordeloos 1992）は今回の調査で確認されず、今までに日本で発見・確認されたという報告もない。しかし、これらの知見は今後、食に不適、あるいは毒きのこの種類が現れないことを保証するものではない。それ故、きのこ栽培研究に向けて、生物学的位置づけを明らかにすると共に、その菌の食資源としての利用状況も今後さらに調査検討する必要がある。

ハルシメジ類が菌根性きのこであることを証明するために、その菌根の形成状況を明らかにする必要がある。ハルシメジ類の菌根研究は1940年代より様々な研究者より行われ、1) 外生菌根、2) 内外生菌根、3) 根の先端部の組織が崩壊し、その領域に菌糸が侵入した菌根、という、3つの異なった見解が

出されていた（第3章参照）。今回、16種類のバラ科植物とニレ科植物に形成された菌根の光学顕微鏡観察により、3)の独特のタイプがいずれの植物の菌根からも観察され、この種のタイプの菌根はハルシメジ類が特定の植物種とだけ形成する特殊なものではなく、ハルシメジ類の菌根に広範に認められることが明らかになった（第3章第1節）。そこで、これをハルシメジ型菌根と命名することにした（第3章第1節）。さらに、電子顕微鏡観察により、根に破壊的に侵入した菌糸が根の中心柱周囲で崩壊していることが明らかになり、菌根が短期間で消失する可能性を形態的に示すことができた（第3章第2節）。この可能性は菌根が子実体発生前後に顕著に出現するという、季節消長の調査結果によっても支持された（第4章）。

ハルシメジ類は独特のハルシメジ型菌根を作る菌根性きのこであるので、その栽培化にあたっては菌根苗の育成が有効であると考えられるが（Yamada et al. 2001a）、今まで菌根苗の作出や利用は試みられておらず、本研究において初めて検討された。その結果、特に子実体発生地近くの苗木には、既に菌根が形成されており（第5章1節）、苗木を移植しても高確率で生き残っている（第5章第2節）、小規模な栽培にはこの苗木を菌根苗として利用することが有効であると考えられる。また、苗木が近くで見つからない場合、子実体粉碎液の利用も有効である可能性が考えられる（第5章第3節）。菌のついた実生苗や子実体粉碎液を利用する手法はいずれもクリーンベンチを利用した無菌操作のような熟練を要する技術ではなく、非無菌的に大規模な既存のきのこ栽培施設を用いずに行うことが可能である。それ故、今まできのこ栽培には取り組んでいないが、前述のようなハルシメジ類の宿主となる樹種を栽培している農林家が副産物として栽培することが可能で、実用的な技術開発の方向性を本研究が示せたといえる。また、ハルシメジ類はそのような農林家が取り組みやすい菌種であると考えられる。ただし、子実体粉碎液を用いた場合、菌根苗が作出できる確率は低く、今後菌根苗を安定的に生産するには、さらなる研究が必要である。

また、独特のハルシメジ型菌根を形成するハルシメジ類の菌根苗作出にあたっては、他の菌根性きのこの菌根苗とは違う点を考慮する必要がある。ハルシメジ型菌根は子実体発生時期前後以外かなり衰退してしまうため、菌根の定着状況を把握することが困難である。菌根性きのこを理解するには、菌根そのものを実際に調査する事が必須であるので、ハルシメジ類に関しては菌根の観察時期には注意する必要がある。

以上の成果は主にハルシメジ類の2種、*Entoloma clypeatum* f. *hybridum* と *E. saepium* を用いて得られた成果で、特に *E. saepium* に関して初めて菌根合成に成功し、菌根苗の作出に道を開いた。これは、同菌の栽培化に向けた重要な知見であるといえる。この研究により、Yamada et al. (2001a) が示した菌根性きのこの子実体発生へのプロセスのうち、菌根合成とその順化の段階にまで到達することができた。今後はこれまでの成果をふまえ、子実体発生まで含めた総合的な管理技術の開発へと進むことができると考える。菌根苗は腐生菌でいえば種菌、種駒に相当し、子実体を発生させるためには、苗を植え付けた後、周囲の宿主植物に菌根を感染させながら、菌糸体を増殖させる必要がある。マツタケの場合、アカマツ林について下草刈りや灌木の除伐等による林内環境整備を行うことにより、子実体発生量を増加させたり、シロの数を増やしたりできることが知られている（吉村 2004）。苗木に感染したハルシメジ類を増殖させ、子実体発生を誘導するためには、マツタケ同様の下層植生の管理等が要求されるものと予想される。今後この指針作りのためには様々な管理区を設定し、発生予定地の環境変化をモニタリン

グしながら子実体発生を待つことになる。そのデータに基づいて、子実体発生と気象学的要因との関連について、さらなる詳細な解析が必要であろう。

摘 要

中山間地域の産業振興のために、食用菌根性きのこハルシメジ類の栽培化を目指し、日本産種の共生相手の範囲、分類学的検討、菌根のタイプとその構造、自然界における生態を明らかにし、その結果を基に菌根苗を育成する方法について研究を行い、以下のような成果が得られた。

- 1) ハルシメジ類の野外における子実体発生調査を行い、この菌群がバラ科、ニレ科の 17 樹種と共生関係にあることを確認した。そのうちバラ科のトキワサンザシ属、ヤマブキ属及びニレ科のケヤキ属がハルシメジ類の共生相手であることは新知見である。
- 2) 日本でハルシメジと呼ばれる菌は *Entoloma* 属の未記載種を含む複数種を総称していることが明らかになった。そして、ウメ、モモと菌根を形成する *Entoloma saepium* (Noudlet & Dass.) Richon & Roze, ノイバラと菌根形成する *E. clypeatum* (L.) P. Kumm. f. *hybridum* (Romagn.) Noordel. を日本新産種として記載、報告した。
- 3) 実体顕微鏡による観察で、宿主植物の根の先端部をハルシメジ類の菌糸が覆い球状の構造を形成しているのが確認された。薄切片を作成し光学顕微鏡で観察したところ、根の先端部において根冠、頂端分裂組織、皮層の一部が破壊され、そこに菌糸が進入していることが確認された。こうした構造は既知の菌根タイプでは知られていないものであること、今回の研究で扱ったハルシメジ類の菌根全てに共通した構造であったことから、未記載の菌根タイプと考え、この型の菌根にハルシメジ型菌根という新称を提案した。
- 4) *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* とノイバラの菌根を電子顕微鏡で観察した結果、皮層細胞に接する菌糸では多数のミトコンドリアや小胞体が観察されたのに対し、先端部組織に進入した菌糸では細胞内小器官が観察されず、中心柱の周囲では崩壊していることが明らかになった。これは菌糸と根が長期間共生関係を維持する通常の菌根では観察できない構造であり、ハルシメジ型菌根が仮に共生的であってもその期間は短いことを示唆していると考えられる。
- 5) *E. saepium* の菌根の季節消長について調査した結果、菌根は特に子実体発生の直前直後に顕著に見られることを明らかにした。
- 6) *E. saepium* の子実体周囲のウメ実生苗に菌根が形成されていること、その実生苗を移植した場合、菌根が翌年も根付いていること、子実体粉碎液を接種することで、低頻度ながら菌根苗が新たに形成されることを明らかにした。

以上の結果から、個々のプロセスでまだまだ問題点も存在するが、日本産ハルシメジ類の栽培化に向けて、菌根苗作りまでの大まかなガイドラインを描くことができた。今後は菌根苗の子実体発生を目指した管理技術を確立する必要がある。

謝 辞

本稿を作成するにあたり、終始ご協力いただきました茨城県林業技術センター長河合良一氏、同首席専門技術指導員横堀誠博士、同研究調整監兼育林部長益子義明氏、同きのこ特産部長小倉健夫氏他、林業技術センターの職員の皆様に厚く御礼申し上げます。また、本研究は筑波大学に提出した学位論文が元となっておりますが、学位論文とりまとめに際し御指導いただきました、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授柿嶋真博士、同教授徳増征二博士、同教授弦間洋博士、同助教授山岡裕一博士に深く感謝いたします。

研究全般にわたって、滋賀大学教育学部教授横山和正氏、京都大学名誉教授相良直彦博士、信州大学農学部助教授山田明義博士、鳥取大学農学部教授岩瀬剛二博士、東京医科歯科大学教養部助手金城典子博士から有益な助言を頂戴することができました。試料収集にあたっては、長岡技術科学大学教授宮内信之助博士、郡山女子大学教授広井勝博士、森林総合研究所きのこ・微生物研究領域主任研究員明間民央氏をはじめとする多くの研究者の皆様、北海道きのこの会、盛岡うえっこの会、神奈川きのこの会、千葉菌類談話会、関西菌類談話会、幼菌の会、熊本きのこ会をはじめとする全国各地のきのこ同好会に所属されている多数のアマチュアきのこ愛好家の皆様にご協力をいただきました。また、これらの方々とのネットワークづくりにあたって、京都大学大学院農学研究科助教授田中千尋博士が管理されている幼菌の会メーリングリストを利用させていただきました。*Entoloma clypeatum* f. *hybridum* と *E. saepium* を記載するにあたり、神奈川県立生命の星・地球博物館学芸員出川洋介博士にご協力いただきました。標本の保管にあたり、大阪市立自然史博物館学芸員佐久間大輔氏にご協力いただきました。電子顕微鏡観察を行うにあたり、京都大学大学院人間・環境学研究科助手幡野恭子博士にご協力いただきました。調査地の地主、管理者の皆様には、格別のご配慮を賜りました。以上の皆様に深くお礼申し上げます。

引用文献

- Agerer R. 1986. Studies on ectomycorrhizae. II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon* 26: 473-492.
- Agerer R. 1995. Anatomical characteristics of ectomycorrhizae: an attempt towards a natural classification. In: *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology* (ed. by Varma A. K. and Hock B.) , pp 685-734. Springer Verlag, Berlin.
- Agerer R. and Waller K. 1993. Mycorrhizae of *Entoloma saepium*: parasitism or symbiosis? *Mycorrhiza* 3: 145-154.
- Andruszewska A. and Dominik, T. 1971. [Mycorrhiza of *Prunus cerasus* L. x *Rhodophyllus clypeatus* (Bull. ex Fr.) Quél.] (In Polish.) *Zeszyty Nauk. Wyzsz. Szkoly Roln. Szczecin.* 37: 3-14.
- Baroni T. J. and Carey P. 1994. An undescribed anamorph of undescribed species of *Rhodocybe* (Agaricales, Entolomataceae) . 5th Intl. Mycol. Congr., Vancouver, Canada, August 14-21, p.10.
- Becker G. 1956. Observation sur l'écologie des champignons supérieurs. *Ann. Sci. Univ. Besançon Bot.* 7: 15-128.
- Bon M. 1987. The mushrooms and toadstools of Britain and North-western Europe. Domino Books, Jersey.
- Bonfante-Fasolo P. and Scannerini S. 1992. The cellular basis of plant-fungus interchanges in mycorrhizal associations. In: *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process* (ed. by Allen, M. F.) , pp. 65-101. Chapman & Hall, New York.
- Clucius C. 1601. Fungorum in Pannoniis observatorum brevis hystoria. In *Faksumila codex Clusii* (1983) . Akademiai Kiado, Budapest.
- Doi Y. 2002. Past and present conditions of the Mycological Herbarium in the National Science Museum, Tokyo (TNS) . *Nat. Sci. Mus. Monographs.* 22: 59-75.
- Duddridge J. A. and D. J. Read. 1984. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. II. Ectomycorrhizal development on pine in vitro. *New. Phytol.* 96:575-582.
- Eberhart J. and Luoma D. 1996. Description Code 9. *Truncocolumella citrina* Zeller + *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. In: *Concise descriptions of north American ectomycorrhizae* (ed. by Goodman D. M., Durall D. M., Trofymow J. A. and Berch S. M.) , Mycologue Publications, and the Canada-BC Forest Resource Development Agreement, Pacific Forestry Centre, Victoria.
- 13) Gill W.M., Lapeyrie F., Gomi T. and Suzuki K. 1999. *Tricholoma matsutake* - an assessment of *in situ* and *in vitro* infection by observing cleared and stained whole roots. *Mycorrhiza* 9: 227-231.
- 廣江勇, 橋本一廣. 1940. 新市場用茸「シメヂモドキ」ノ研究(食用茸類人工栽培ノ基礎的研究第 XIX 報). *鳥取農學會報* 6: 297-308.
- 本郷次雄監修. 2001. カラー版 きのこと図鑑. 家の光協会, 東京.
- 堀越孝雄, 二井一禎編著. 2003. 土壤微生物生態学. 朝倉書店, 東京.

- Hughes S. J. 1985. The term chlamydospore. In: Filamentous microorganisms: biomedical aspects (ed. by Arai T.) , pp. 1-20. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- 今関六也, 本郷次雄. 1987. 原色日本新菌類図鑑 (I). 保育社, 大阪.
- 川村清一. 1954. 原色日本菌類図鑑 第五卷. 風間書房, 東京.
- 河瀬憲次編著. 1995. 果樹台木の特性と利用. 農文協, 東京.
- Kobayashi H. and Hatano K. 2001. A morphological study of the mycorrhiza of *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* on *Rosa multiflora*. Mycoscience 42: 83-90.
- Kobayashi H. and Yamada A. 2003. Chlamydospore formation of *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* on mycorrhizas and rhizomorphs associated with *Rosa multiflora*. Mycoscience 44: 61-62.
- Kobayashi H., Degawa Y. and Yamada A. 2003. Two new records of entolomatoid fungi associated with rosaceous plants from Japan. Mycoscience 44: 331-333.
- Kornerup A. and Wanscher J. H. 1978. Methuen handbook of colour, 3rd ed. Methuen & Co., London.
- Kottke I. and Oberwinkler F. 1986. Mycorrhiza of forest trees - structure and function. Trees 1: 1-24.
- Largent D. L. 1994. Entolomatoid fungi of the Western United States and Alaska. Mad River Press, Eureka.
- Lefevre C. and Müller W. 1998. Description Code 18. *Tricoloma magnivelare* (Peck) Redhead + *Pinus contorta* Dougl. var. *latifolia* Engelm. In: Concise descriptions of north American ectomycorrhizae (ed. by Goodman D. M., Durall D.M., Trofymow J. A. and Berch S.M.) , Mycologue Publications, and the Canada-BC Forest Resource Development Agreement, Pacific Forestry Centre, Victoria.
- 卯晓岚主编. 2000. 中国大型真菌. 河南科学技术出版, 郑州.
- Molina R., Massicotte H. B. and Trappe J. M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. In: Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process (ed. by Allen M. F.) , pp. 357-423, Chapman & Hall, New York.
- Moser M. 1983. Key to Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales) . Roger Phillips, London.
- 中井幸隆. 1986. シイタケ菌に関する細胞学的研究. 菌蕈研究所研究報告 24: 1-202.
- Noordeloos M. E. 1981. *Entoloma* subgenera *Entoloma* and *Allocybe* in Netherlands and adjacent regions with a reconnaissance of their remaining taxa in Europe. Persoonia 11 (2) :153-256.
- Noordeloos M. E. 1992. *Entoloma* s.l., Funghi Europaei, vol. 5. Giovanna Biella, Saronno.
- 小川眞. 1975. アカマツ林における菌根菌・マツタケの微生物生態学的研究 I・マツタケのシロ. 林試研報 272: 79-121.
- 小川眞. 1978. マツタケの生物学. 築地書館, 東京.

- 小川眞. 1992. 林業改良普及双書 No. 110 野生きのこの作り方. 全国林業改良普及協会, 東京.
- Romagnesi H. 1947. Les Entolomes printaniers. Bull. Soc. Mycol. Fr. 63: 187-202.
- 佐竹義輔, 原寛, 亘理俊次, 富成忠夫編. 1989. 日本の野性植物 木本 I. 平凡社, 東京.
- Scannerini S. and Bonfante-Fasolo P. 1983. Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. Can. J. Bot. 61: 917-943.
- 島菌平雄. 1979. マツタケ, ニセマツタケ, 及びバカマツタケの寒天培地上におけるコロニー形態の比較. 日菌報 20: 176-184.
- Singer R. 1986. The Agaricales in modern taxonomy, 4th ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Smith S. E. and Read D. 1997. Mycorrhizal Symbiosis, 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Spurr A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.
- Strullu D. G. 1979. Ultrastructure et répartition spatiale du manteau fongique des ectomycorhizes. Can. J. Bot. 57: 2319-2324.
- Terashima Y., Tomiya K., Takahashi M. and Iwai H. 1993. Distribution and characteristics of shiros of *Tricholoma bakamatsutake* in a mixed forest of *Pasania edulis* and *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*. Trans. Mycol. Soc. Japan 34: 229-238.
- Trappe J. M. 1962. Fungal associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot. Rev. 28: 538-606.
- Yamada A., Maeda K. and Ohmasa M. 1999. Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* *in vitro*. Mycoscience 40: 455-463.
- Yamada A., Ogura, T., and Ohmasa, M. 2001a. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formations in open pot culture. Mycorrhiza 11: 59-66.
- Yamada A., Ogura, T., Degawa, Y., and Ohmasa, M. 2001b. Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* cultures from field-collected ectomycorrhizas. Mycoscience 42: 43-50.
- 吉村文彦. 2004. ここまで来た まつたけ栽培. トロント, 東京.

STUDIES ON ENTOLOMATOID FUNGI ASSOCIATED WITH ROSACEOUS AND ULMACEOUS PLANTS IN JAPAN AND THEIR UTILIZATION.

Hisayasu KOBAYASHI

Summary

Entolomatoid fungi associated with rosaceous and ulmaceous plants are known as edible mushrooms in Japan. In this paper, the author studied their host preference, taxonomy, mycorrhizal status and practical cultivation techniques with mycorrhizal seedlings as follows.

1) Field survey showed 17 plant species belonging to Rosaceae and Ulmaceae were hosts of the mushrooms. Among them, *Pyracantha*, *Kerria* (Rosaceae) , and *Zelkova* (Ulmaceae) were newly reported as host plant's genera in this paper.

2) A morphological study demonstrated that the mushrooms so-called as "Harushimeji" consisted of at least twelve types. *Entoloma saepium* and *E. clypeatum* f. *hybridum* in the types were newly recorded from Japan.

3) Stereoscopic microscopy of the mycorrhizas revealed that the fungal hyphae covered with root tips and formed unbranched mycorrhizas. Light microscopy revealed that root cap, apical meristem and cortex were disappeared and replaced by the fungal hyphae. Based on these results, it is proposed that they belong to a new type of mycorrhiza.

4) Transmission electron microscopy of the mycorrhizas suggested the destructive infection of the fungal hyphae to the root cells and their collapse near the tip of stele.

5) Mycorrhizas were observed notably in fruiting season of the mushrooms.

6) Availability of seedlings of host plants close to fruiting bodies and suspension of blended fruiting bodies were examined to cultivate the mushrooms with mycorrhizal seedlings. Seedlings of host plants close to mushroom formed this type of mycorrhiza. One year after transplanting, and their mycorrhizas were observed in the root system, suggesting their potential availability to the mushroom cultivation. One year after pouring suspension, mycorrhizas were formed on roots of 20 % inoculated plants in the shade but there was no statistical significance.

平成 19 年 3 月 1 日印刷

平成 19 年 3 月 3 日発行

茨城県林業技術センター研究報告No.27

発行者 茨城県林業技術センター

〒311-0122 茨城県那珂市戸 4,692

電話 029 (298) 0257

FAX. 029 (295) 1325

印刷所 有限会社 双葉印刷

〒310-0122 水戸市見川町 2500-7