

ハルシメジの菌根合成および分子系統解析

堀米由夏(信大院農)・村田仁(森林総研)・横田智(森林総研)・丸山毅(森林総研)・山田明義(信大院農)

担子菌イッポンシメジ科イッポンシメジ属のハルシメジ類 (*Entoloma* spp.) は、主に 4-5 月にリンゴ、サクラ、ナシといったバラ科植物やニレ科植物の樹下で子実体を発生させることが知られる。子実体の形態、グアヤクチンキに対する呈色反応、発生時期、宿主植物の違いから、日本国内には複数種のハルシメジ類が存在すると示唆されるが、その分類は十分に行われていない。また、*in vitro* における菌根合成の事例も知られていない。本研究では、ハルシメジ類の菌根合成ならびに分子系統解析を行い、ハルシメジ類の生理生態学的特性を明らかにすることを目的とした。

2013 年 5 月 16 日に信州大学農学部構内で採集された *E. sepium* と推定されるハルシメジ (推定宿主:ソメイヨシノ) より分離された菌株を用い、オオシマザクラのクローン苗を宿主とした菌根合成を行った。MNC 寒天培地上で前培養した供試菌株から菌糸体片(5mm×5mm)を切り出し、MNC 液体培地に接種して 1 ヶ月間培養した。液体培養した菌糸体を 250mL 容ポリカーボネート製ポットに作成した MNC 寒天斜面培地上に 5 片接種し、1 ヶ月間培養した。伊那山地で採取した風化花崗岩質 B 層土壌または信大農学部構内の A 層土壌をオートクレーブ滅菌し、一晩放冷した後、上記のポットに詰めた。さらに、ポット当たり 5 片の液体培養菌糸体片を接種するとともに、オオシマザクラのクローン苗 1 本を無菌的に植え付けた。なお、土壌の相対含水率は MNC 液体培地で 75%に調製した。培養は、20°C、24 時間明期(光量子密度 140 μ M/m²s)で行い、1 ヶ月ごとに滅菌水を無菌的に灌水した。反復 (ポット数) は、5 とした。苗の植え付けから 83 日の時点で、A 層土壌を用いた系でオオシマザクラの細根への菌糸体の定着が観察された。

1999 年から 2014 年にかけて日本全国より採集されたハルシメジ類子実体 54 標本を用い、DNA 解析を行った。それぞれの子実体標本のヒダより CTAB 法にて DNA を抽出し、プライマーペア ITS1-F/LR5F および ITS1-F/LBW を用いて ITS1、ITS2 領域を PCR 増幅し、プライマー ITS1、ITS4 を用いてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた配列情報より系統樹を作成するとともに、子実体形態やグアヤクチンキによる呈色反応との関係を調査した。