

# 博 士 論 文

キノコとキノコ食性動物の匂いコミュニケーション  
—特にキノコ食性ナメクジとの関係—

金沢大学大学院自然科学研究科  
自然システム学専攻  
生態学研究室

学 籍 番 号	1624062002
氏 名	北林 慶子
主任指導教員氏名	都野 展子
提 出 年 月	平成 31 年 1 月 9 日

# 目次

<b>1 章 序論</b>	<b>1</b>
<b>2 章 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査</b>	<b>6</b>
2.1 はじめに	6
2.2 材料と方法	6
2.2.1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査	6
2.2.2 ヤマナメクジのアマニチン毒耐性評価	7
2.3 結果	9
2.3.1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査	9
2.3.2 ヤマナメクジのアマニチン毒耐性評価	9
2.4 考察	10
2.4.1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性	10
2.4.2 ヤマナメクジのアマニチン毒耐性評価	10
<b>3 章 ヤマナメクジのキノコ孢子散布能力の検証</b>	<b>12</b>
3.1 はじめに	12
3.2 材料と方法	12
3.2.1 調査地	12
3.2.2 ヤマナメクジの生息場所の調査	13
3.2.3 ヤマナメクジの排泄物の観察	13
3.2.4 アンプリコンシーケンスによるヤマナメクジの排泄物の菌相解析	14
3.2.5 ヤマナメクジが1日に排泄する孢子量と孢子体内滞留時間	15
3.2.6 ヤマナメクジに排泄された孢子の発芽実験	16
3.2.7 林床でのヤマナメクジの移動距離と移動パターンの調査	17
3.3 結果	18

3.3.1 ヤマナメクジの生息場所.....	18
3.3.2 排泄物の観察 .....	18
3.3.3 アンプリコンシーケンスによるヤマナメクジの排泄物中の菌相解析.....	18
3.3.4 ヤマナメクジが1日に排泄する孢子量と孢子体内滞留時間 .....	19
3.3.5 ヤマナメクジに排泄された孢子の発芽実験 .....	19
3.3.6 林床でのヤマナメクジの移動距離と移動パターンの調査 .....	20
<b>3.4 考察 .....</b>	<b>21</b>
3.4.1 ヤマナメクジに排泄された孢子の発芽力 .....	21
3.4.2 孢子散布者としてのヤマナメクジ .....	22
<b>4 章 ヤマナメクジとショウジョウバエ 3 種に忌避効果のある匂い成分の同定</b>	<b>24</b>
<b>4.1 はじめに.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 材料と方法 .....</b>	<b>24</b>
4.2.1 キノコの匂い成分分析 .....	24
4.2.2 匂い成分に対するヤマナメクジの反応の観察.....	26
4.2.3 匂い成分に対するショウジョウバエ 3 種の反応の観察.....	27
<b>4.3 結果 .....</b>	<b>28</b>
4.3.1 キノコの匂い成分分析 .....	28
4.3.2 匂い成分に対するヤマナメクジの反応の観察.....	29
4.3.3 匂い成分に対するショウジョウバエ 3 種の反応の観察.....	30
<b>4.4 考察 .....</b>	<b>32</b>
4.4.1 腐敗期に生産される Dimethyl trisulfide.....	32
4.4.2 アケボノドクツルタケの匂いと動物の関係 .....	32
4.4.3 ショウジョウバエ 3 種間のキノコの匂い成分に対する反応の違い .....	34
<b>謝辞 .....</b>	<b>36</b>

引用文献..... 37

要旨 ..... 43

図表..... 47



## 1 章 序論

真菌類は担子菌門(Basidiomycetes)、子囊菌門(Ascomycetes)、接合菌門(Zygomycota)、ツボカビ門(Chytridiomycota)および不完全菌類からなり、森林生態系内で分解者として重要な役目を担う。いわゆるキノコとは、真菌類のなかでも大型菌類(Macrofungi)である担子菌門と一部の子囊菌門が形成する(Kirk et al. 2008)、肉眼で識別できるほど大型の繁殖器官=子実体のことを指す。

キノコは多様な色や形態また二次代謝産物を持つと共に、様々な匂い物質を生産する。キノコの匂いは多様であることが知られており、例えば、高級食材であるマツタケ *Tricholoma matsutake* はマツタケオール(1-octen-3-ol)と呼ばれる成分を主に多く含み(Ohta 1983; Terashita et al. 1991)、日本人の食欲を刺激する。一方で、スッポンタケ科 Phallaceae のキノコはグレバと呼ばれる孢子形成部から Dimethyl disulfide と Dimethyl trisulfide といった腐った果実のような刺激臭を放っている(Borg-Karlson et al. 1994)。また、*Clitocybe odora*、*C. fragrans*、*Hebeloma crustuliniforme*、*Lepista nuda*、*Tricholoma fracticum* および *T. terreum* のキノコ 6 種の匂い成分を分析した研究では、全部で 46 種の成分が検出され、それらは全キノコ種に共通する成分と各種に固有の成分に分けられた(Malheiro et al. 2013)。

このように、キノコは様々な匂いを生産するが、匂いの生態学的意義は一部の種を除けば明らかにされていない。一方で他の生物では、匂いを繁殖戦略のひとつとして利用することが知られている。たとえば多くの植物の花は匂いを利用して送粉者や捕食者を誘引または忌避させている(Ikeda et al. 1993)。そのため、同様に菌類の“花”であるキノコも、孢子散布や被食防御に匂いを利用していると考えられる。実際、スッポンタケ科のツマミタケ *Lysurus moskii* は孢子形成部から Butanoic acid や P-cresol および Phenol を生産し、腐食性双翅目の *Musca sorben* や *Parasarcophaga albiceps* を誘引して、孢子を摂食させることで

胞子を散布する(Chen et al. 2014)。一方、1-octen3-ol を主成分とするマツタケには他のキノコに比べてトビムシ *Collembora* が少なく、Sawahata et al. (2008) が 1-octen3-ol のトビムシに対する忌避効果について調べたところ、濃度が 0.01ppm より高くなるとトビムシは忌避行動を示した。このように、キノコの匂いは特定の動物に対して、行動を制御するシグナルとして働くコミュニケーションツールになりうる。

また、キノコの匂いは経時的に変化する特徴をもつが、これもキノコの匂いが生態学的な機能を持つことを示唆している。キノコの成長段階は、胞子生産期（幼菌）～胞子散布期（成菌）～老廃期（老菌）と明確に区別できる。Pudil et al. (2014) は、スッポンタケ *Phallus impudicus* で、特徴的な強い悪臭である Dimethyl oligosulfides が胞子生産期（幼菌）では検出されないが、胞子散布期（成菌）以降含有量が増加し、成熟段階で匂いが変化していることを報告している。つまりキノコは、胞子散布の能力に応じて、経時的に匂いの種類や量を変化している。この特徴は、もしキノコが匂いを胞子の動物散布や被食防御に利用しているならば、対象とする動物種や利用する時期を操作するのに適しているといえる。

さらに匂いは、訪菌動物の多くを占める視覚の乏しい夜行性動物にも有効であり、この点もキノコが匂いを生態学的に利用するのに適している。また、毒のように対象者を殺すことがないため、抵抗性や非感受性を獲得させにくく、長期間の忌避効果が期待できるという特徴をもつ。

以上のように、匂いはキノコにとって有効なコミュニケーションツールになりえると考えられる。キノコは、これら特徴を持つ匂いを警告や報酬のシグナルとして利用し、被食防御や胞子散布を行っているかもしれない。しかし、これまでにキノコの匂いの利用したコミュニケーションが、キノコの広い分類群で行われているのかは不明である。その理由としては、多くの菌類の匂い成分

や、その経時的変化が明らかにされていないことや、キノコに集まる菌食性動物が経時変化するために網羅的に捕獲することが困難であることに加え、それら菌食性動物には未記載種が多く含まれることが挙げられる。このため、コミュニケーションに利用されている匂い成分の同定、また匂いの作用対象である動物種の匂い成分に対する反応を、野外や実験室で解析することは困難であったと考えられる。

そこで本研究は、匂いの生態学的意義を明らかにするために、以下の3つの観点からキノコの匂いを用いた動物とのコミュニケーションについて調べることにした。すなわち (1) さまざまな分類群のキノコの匂いに対する特定の動物の反応 (2) 菌食性動物の孢子散布能力 (3) 菌食性動物が忌避・誘引反応を示すキノコの匂い成分、の3点である。

これらの調査・実験を行うには、匂い成分の作用対象である特定の菌食性動物が必要となる。そこで本研究は、実験動物として、(i) 菌食性動物の優占種でさまざまな分類群のキノコを摂食し、(ii) 嗅覚が優れている、という特徴をもつヤマナメクジ *Meghimatium fruhstorferi* とショウジョウバエ3種 *Drosophila melanogaster*, *D. anguralis*, *D. busckii* に注目した。

ヤマナメクジは日本では本州、四国、九州に分布しており、成体は13~16cmにも及ぶ大型のナメクジの一種で(東 1998)、多様なキノコを好む菌食性動物である(西 2015)。日本以外でも大型種のナメクジはさまざまな分類群のキノコを餌資源としていることが観察されている(Buller 1922; Keller and Snell 2002)。これまでのナメクジとキノコの匂いについての研究では、バナナナメクジと呼ばれる *Ariolimax columbianus* はヒカゲウラベニタケ *Clitopilus prunulus* に含まれる 1-octen-3-ol を忌避することや(Wood and Largent 2001)、同属の *C. flaccida* に含まれる 5-(chloromethyl)-3-methyl-2 (5H)-furanone を忌避することがわかっている(Wood et al. 2004)。ただし、孢子散布能力については、これまで数種類の大

型のナメクジについて、植物種子の散布者と捕食者としての可能性(Gervais et al. 1998; Turke et al. 2010; Kollmann and Bassin 2001) や、コケの繁殖体を散布し、基質への定着に貢献していることが (Kimmer and Young 1995) 報告されているが、キノコの担子胞子の散布能力については不明確である。そのため、キノコの匂いを利用した繁殖戦略について理解するには、本研究でヤマナメクジの胞子散布能力について明らかにする必要がある。

もう一つの実験動物である、菌食性のショウジョウバエ科(Drosophilidae)は林内で点在するキノコを利用する昆虫のなかでも、最も優占しており、幼虫から成虫までキノコを産卵場所や餌資源として利用している(Hackman and Meinander 1979; Toda et al. 1999; Takahashi et al. 2005 ; 北林ら 2016; Kobayashi et al. 2017)。ショウジョウバエ科の一部はキノコの胞子散布者として知られており、コフキサルノコシカケ *Ganoderma australe* の胞子は双翅目類成虫の消化管を通過することで、胞子表面を覆う物質が消化され、胞子本体は破壊されずに排出されることが報告されている(Tuno 1999)。また、短命な子実体を形成するキヌガサタケ(*Phallus indusiatus*)やツマミタケ (*Lysurus mokusin*) の胞子は、双翅目成虫の消化管を通過後も発芽能力を失わないことが報告されており、胞子散布者として捉えられている(Tuno 1998; Chen, 2014)。

本研究では、ヤマナメクジの菌種に対する嗜好性および胞子散布能力を調べるとともに、およびキノコとヤマナメクジ・ショウジョウバエ間の匂いコミュニケーションの調査を行った。動物種を制限することで、多様な分類群のキノコについて忌避・誘引効果を調査することができ、多種の菌類間で匂い成分の利用方法を比較することが初めて可能になる。その後、キノコから検出した成分を用いて、ヤマナメクジとショウジョウバエ3種に対するキノコの匂いの反応を調べることで、忌避または誘引する成分を特定することができる。また、ヤマナメクジによるキノコの胞子散布能力の検証をすることにより、キノコの

匂いの生態学的機能について議論することが可能になる。このように本研究では、特定の動物種を用いることで、キノコの匂いを用いた動物とのコミュニケーションについて実験的にアプローチし、キノコ匂いの生態学的意義、とくにキノコの匂いを利用した繁殖戦略を明らかにすることを目指す。

## 2 章 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査

### 2.1 はじめに

ヤマナメクジはキノコを摂食する菌食性動物であることが知られているが(西 2015)、多くは観察報告で学术论文での報告はなく、ヤマナメクジがどのような菌類を好み、また嫌うのかについてはわかっていない。そこで、本章ではヤマナメクジを忌避または誘引する菌種や生態学的グループを明らかにすることを目的に、ヤマナメクジの菌種に対する嗜好性の調査を行った。

また、ヤマナメクジのアマニチン毒耐性の評価を行った。アマニチン毒はテングタケ科 *Amanitaceae* のキノコの多くに含まれ、タンパク質の合成に必要な mRNA の合成反応を阻害する毒素であり(Novello et al. 1970)、ヒトは 0.1mg/kg で半数が致死に至る(牛山 2009)。仮に、ヤマナメクジが毒耐性を持たなかった場合、アマニチン毒を含む菌種を忌避する可能性が考えられる。しかし、これまでナメクジを対象にアマニチン毒耐性は調べられていないため、今回毒耐性の評価を行った。

### 2.2 材料と方法

#### 2.2.1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査

2016～2017 年 6-7 月に金沢大学敷地内のアベマキ、コナラが優占する森林でヤマナメクジと子実体を採集した。ナメクジの種同定は、形態的特徴から『原色日本陸産貝類図鑑(東 1982)』に従い、同定が困難な個体については専門家に同定を依頼した。子実体の種同定は『新版北陸きのこ図鑑(池田 2013)』と『山溪カラー名鑑日本のきのこ(今関ら 2011)』に従って行った。ただし、アケボノドクツルタケ *Amanita pallidorozea* は DNA 解析によって種同定した。子実体の成熟段階の区別は、傘が開き切っていないものを幼菌、傘が開いて胞子散布時期のものを成菌、傘が反り返り痛みはじめているものを老菌とした。ま

た、今回実験に用いたキノコは生態学的なグループとして、外生菌根菌と木材腐朽菌・リター分解菌の2つのグループに分けた。外生菌根菌とは、ブナ *Fagus crenata* やミズナラ *Quercus crispula* などの生きた樹木の根に菌根と呼ばれる組織を形成して、物質交換を行い樹木と共生関係を持つ。木材腐朽菌やリター分解菌は倒木や落ち葉を基質として分解し吸収する菌類グループである。

採集したヤマナメクジは、同日のうちに、水で湿らせた水苔を敷いたプラスチックカップの中に入れ、22℃恒温長日条件(14 時間明期：10 時間暗期)で飼育した。実験の3日前からは餌(ニンジンや市販のエノキ)を与えず、適宜霧吹きで水分のみを与えることで絶食させた。嗜好性実験の際には、25℃の実験室内で、プラスチックバット(横 25 cm×縦 35 cm×高さ 5 cm) 内に絶食させたヤマナメクジ5匹を横一列に置き、野外で採集した子実体をヤマナメクジから 15 cm 離して設置した(Fig. 1)。

ヤマナメクジの摂食行動は、目視による観察と同時に、コンパクトデジタルカメラ(WG-20, RICOH)を用いた 15 分間 1 分間隔のインターバル撮影により記録した。15 分後、子実体を一度も摂食しなかった個体数より、非摂食率(= 摂食しなかった個体数 / 全個体数)を求めた。試験に用いた菌種とナメクジの個体数は Table 1 に示した。

### 2.2.2 ヤマナメクジのアマニチン毒耐性評価

ヤマナメクジのアマニチン毒耐性の評価は以下の手順で行った。まず、コントロールとして、成体のヤマナメクジ5個体に滅菌水 20  $\mu$ l を実験用注射器(31G, 13 mm)で、ヤマナメクジの背側に 30 度の角度で注入し(Aguiar and Wink 2005)、1 週間後に全個体が生存することを確認した。購入した  $\alpha$ -アマニチン(C39H54N10O14S, MW: 918.97, 和光純薬, 現富士フイルム和光純薬)をミリQ水に溶解させて作成した、アマニチン濃度 1000  $\mu$ g/ $\mu$ l, 100  $\mu$ g/ $\mu$ l, 10  $\mu$ g/ $\mu$ l

の水溶液 20  $\mu$ l をヤマナメクジに各濃度 4 匹ずつ(10 ppm のみ 3 匹)注射し、生死を毎日一度一週間にわたり観察した。



## 2.3 結果

### 2.3.1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査

子実体全 7 目 14 科 19 属 43 種を用いてヤマナメクジの嗜好性を調査した。全子実体に対する平均非摂食率は 36.15 (SE±4.3) %だった (Table 1, Fig. 2)。

全子実体のうち、外生菌根菌のアケボノドクツルタケの幼菌(N=3)と成菌(N=5)とニセクロハツ(*Russula subnigricans*)の成菌(N=2)のみが、100%の非摂食率を示した。ヤマナメクジの行動を観察すると、すべての個体は、2 種の子実体に接近はするものの、至近距離で触覚を出し入れするのみであり、摂食することなく引き返し、明らかな忌避行動を示した(Fig. 3)。一方、木材腐朽菌・リター分解菌では 100%摂食されなかった菌種はなかった。木材腐朽菌・リター分解菌で比較的、非摂食率の高かったカワウソタケ (非摂食率 80%) やカワラタケ幼菌 (非摂食率 60%) に対して、ヤマナメクジは 15 分間では子実体に気がついていない個体が多く、子実体を近づけると摂食しはじめ、忌避行動は見られなかった。

同種で成菌と幼菌の間の非摂食率を比較すると(カイ二乗検定)、アケボノドクツルタケ(P=1)とシロウロコツルタケ(*Amanita clarisquamosa*) (P = 0.653), ヘビキノコモドキ (*A. spissacea*) (P= 0.639), カバイロツルタケ(*A. fulva*) (P=1), カワラタケ(*Trametes versicolor*) (P= 0.068)となり、カワラタケ以外非摂食率に成菌と幼菌間での差は認められなかった。カワラタケは、幼菌が成菌よりも忌避される傾向をみせたが、前述したように忌避というよりむしろキノコの存在に気がつかず摂食に至らなかったと考えられた。

### 2.3.2 ヤマナメクジのアマニチン毒耐性評価

アマニチンをヤマナメクジに体腔注射し 1 週間後、1000µg/µl(N=4), 100µg/µl (N=4), 10µg/µl (N=3)すべての濃度で全個体の生存を確認した。また、1 週間の

間、食欲や行動に異常は見られなかった。

## 2.4 考察

### 2.4.1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性

ヤマナメクジは外生菌根菌のアケボノドクツルタケとニセクロハツに一度近づいていったにも関わらず、摂食することなく、忌避していた。このことから、この2種はヤマナメクジに忌避効果のある匂い成分を生産している可能性が考えられる。またその匂いには誘引効果のあるもの(接近した事実から)と忌避効果をもつ匂い(調べた挙句摂食しなかった)の混合したものではないかと予想された。

### 2.4.2 ヤマナメクジのアマニチン毒耐性評価

今回の実験で、ヤマナメクジは最大濃度  $1000\mu\text{g}/\mu\text{l}$  のアマニチン水溶液を体腔に注射されても、100%生存していた。ヒトがアマニチンを経口摂取した際の  $\text{LD}_{50}$  (50%が死亡する量)は  $0.1\text{mg}/\text{kg}$  である(牛山 2009)。ヤマナメクジがヒトと同じ耐性をもつとして、 $\text{LD}_{50}$  をヤマナメクジの体重を  $10\text{g}$  として見積もると、 $0.1\text{mg} \times 10/1000 = 0.001\text{mg} = 1\mu\text{g}$  である。しかしながらヤマナメクジは  $1000\mu\text{g}/\mu\text{l}$  を  $20\mu\text{l}$  与えても生存可能であり、半数のヒトが死亡する2万倍の濃度に耐性があることがわかった。前の嗜好性の調査で、ヤマナメクジが忌避した1種のアケボノドクツルタケはテングタケ属でアマニチン毒を含んでいる。よって、ヤマナメクジはアマニチン毒にヒトよりも相当高い耐性を持ち、アケボノドクツルタケのアマニチン毒感受性のためにキノコを忌避するという仮説は成立しないことがわかった。また、ヤマナメクジは摂食によらず、嗅覚でキノコを忌避することがわかった。ではなぜ、ヤマナメクジはアケボノドクツルタケを忌避したのだろうか？考えられうることは、アケボノドクツルタケがヤ

マナメクジに毒性のある他の何か（キノコや植物?）に擬態して、ヤマナメクジからの被食を防御している可能性がある。ラン科のドラクラ属の一部は唇弁をキノコのひだに擬態し、さらには共通の匂い成分を生産して、送粉者であるシヨウジョウバエを誘引する(Kaiser 2006; Policha et al. 2016)。また、植物病原菌のサビキン目の *Puccinia arrhenatheri* はセイヨウメギ *Berberis vulgaris* の花に形と匂いを擬態して媒介者である昆虫を誘引する例が報告されている(Naef et al. 2002)。このように、菌類と植物の分類群を超えた擬態や模倣による繁殖戦略はいくつかの種で行われていることから、現時点では仮説であるが、アケボノドクツルタケも同様に、他種の匂いの擬態をして被食防御に利用しているのかもしれない。

### 3 章 ヤマナメクジのキノコ孢子散布能力の検証

#### 3.1 はじめに

本章では、ヤマナメクジのキノコ孢子散布能力を検証するために、以下 6 つの調査を行った。はじめに、調査地でヤマナメクジを捕獲すると同時に、生息場所の調査をした。次に、キノコの孢子を摂食しているのか調べるために、捕獲したヤマナメクジの排泄物の内容物を観察して、孢子摂食の有無を調べた。そして、ヤマナメクジが摂食している菌類を明らかにするために、アンプリコンシーケンスにより排泄物中の菌相を解析した。ヤマナメクジの排泄物中の孢子についての調査では、ヤマナメクジが 1 日に排泄する推定孢子量と体内滞留時間の測定と、ヤマナメクジの消化管を通過することが孢子に与える影響を明らかにするために、発芽実験を行った。最後に、ヤマナメクジが孢子を散布するのに可能な距離と散布場所を予測するために、林床で移動距離の測定と移動場所の記録を行った。

#### 3.2 材料と方法

##### 3.2.1 調査地

調査は石川県金沢市角間町の金沢大学キャンパス内の里山ゾーン（北緯 36°32' 東経 136°42'）で行った。石川県金沢市は日本海側に位置し、日本海気候である。気象庁のデータによると、調査期間 2016 年から 2018 年の 5 月から 11 月までの金沢市の平均気温は 21.3 °C (2016)、20.6 °C (2017)、21.5 °C (2018) と大きな変化はなかった。降水量は、2016 年は 1355mm で最も少なく、2018

年に 1576.5mm で、2017 年が 1710mm で最大であった。

調査地の標高は 50~160m で総面積は約 74ha である。植生はアベマキ *Quercus variabilis* とコナラ *Quercus serrata* が優占する二次林と、モウソウチク *Phyllostachys edulis* 林で成る。林床にはチマキザサ *Sasa palmate* やクマザサ *Sasa veitchii* が繁茂して林床が覆われている地点が多い。調査ルート全体にアベマキかコナラの倒木が点在しており、カワラタケ *Trametes versicolor*、ハカワラタケ *Trichaptum biforme*、ツヤウチワタケ *Microporus vernicipes*、クジラタケ *Trametes orientalis* などの木材腐朽菌子実体が発生している。外生菌根菌の子実体では 6 月から 10 月下旬にかけてニガイグチ属 *Tylopilus*、ベニタケ属 *Russula*、テングタケ属 *Amanita* が優占して発生する。

### 3.2.2 ヤマナメクジの生息場所の調査

調査は 2016 年の 5 月~9 月、2017 年 6 月~10 月、2018 年の 6~7 月に行った。ヤマナメクジの種同定は東 (1982) に従い専門家に確認を依頼した (謝辞参照)。発見したヤマナメクジの生息場所は“地上：地上のキノコを摂食していたもの”、“地面：地面を這っていたもの”、“倒木：倒木にいたもの”、“樹上：樹上にいたもの”の 4 つに分類し、日付とともに記録した。ヤマナメクジの幼体・成体の区別は、体長 10cm 以下の個体を幼体、10cm 以上の個体を成体と定義して記録した。

### 3.2.3 ヤマナメクジの排泄物の観察

野外で捕獲したヤマナメクジを水で湿らせた水苔を入れたプラスチックケース(350cc)に 1 個体ずつ入れ、22℃恒温室内で飼育した。実験で使用するヤマナメクジは 3 日間絶食させ、24 時間ごとに排泄物を採集した。採集した排泄物の内容物を生物顕微鏡(ICC50HD, Leica)で観察し、顕微鏡に付属する撮影機で写

真撮影を行った。排泄物中に担子孢子様の形態のものが確認できたヤマナメクジの個体数を数え、孢子摂食率を求めた。

#### 3.2.4 アンプリコンシーケンスによるヤマナメクジの排泄物の菌相解析

ヤマナメクジの糞中に存在する菌種を明らかにするために、株式会社生物技研にアンプリコンシーケンス解析を委託した。

野外で2017年9月25, 27, 28日, 10月3, 16, 20日に採集したヤマナメクジ8個体を個別にプラスチックカップに入れ、22℃恒温室内で保管した。24時間後、排泄された糞サンプルを1.5mlチューブに2gずつ採集し冷凍庫-30℃で保存した。糞サンプルはVD-250R Freeze Dryer (TAITEC)で凍結乾燥し、Shake Master Neo (bms)を用いて凍結乾燥したサンプルを粉砕した。MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio)を用いて粉砕サンプルからDNAを抽出した。PCR阻害物質の除去はOne Step PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて行った。その後、Synergy H1 (Bio Tek) とQuanti Fluor® dsDNA System (Promega)を用いて、サンプルのDNA溶液の濃度を測定した。ライブラリーの作製は2 step trail PCR法を用いた。1<sup>st</sup> PCRのPCR反応液には、0.5ng/μl DNAテンプレート2.0μl、10X Buffer 1.0μl、2.5M dNTP mixture 0.8μl、10μM Forward Primer 0.5μl、10μM Reverse Primer 0.5μl、5U/μl ExTaq (Takara) 0.1μl、DDW 5.1μlを用いた。

プライマーは1<sup>st</sup>\_ITS1-F\_KYO1と1<sup>st</sup>\_ITS2\_KYO2を使用した(Toju et al. 2012)。PCR反応条件は94℃2分→(94℃30秒, 60℃30秒, 72℃60秒)35サイクル→72℃5分で行った。

2<sup>nd</sup>PCRのPCR反応液はMax 5ng/μl PCR産物 2.0μl、10X Buffer 1.0μl、2.5M dNTP Mixture 0.8μl、10μM Forward Primer 0.5μl、10μM Reverse Primer 0.5μl、5U/μl ExTaq (Takara) 0.1μl、DDW 5.1μlを用いた。PCR反応条件は94℃2分→(94℃30秒, 60℃30秒, 72℃60秒)12サイクル→72℃5分で行った。プライマーは2<sup>nd</sup>-Fと2<sup>nd</sup>-R

を使用した。その後、Fragment AnalyzerとDNA915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies)を用いて、作製したライブラリーの品質確認をした。シーケンシング解析はMiSeq Genome Sequencer (Illumina, CA, USA)を用いて2x300bpの条件で行った。得られたシーケンスデータは、Fastx toolkitのfastq\_barcode\_splitterによって、配列の読み始めが使用プライマーと完全一致する配列のみを抽出し、抽出配列のプライマー配列部分は削除した。その後、sickle toolsを用いてクオリティー値が20未満の配列を取り除き、40塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。リードのマージについては、ペアエンドマージスクリプトFLASHを用いて、マージ後の断片長320塩基、リードの断片長280塩基、最低オーバーラップ長10塩基でマージした。マージできなかった配列を抽出し、両鎖とも3'側50塩基を削除し、再度マージを行った。同様の作業をさらに2回行った。計4回のマージの作業で得られたリードを統合し、以降の解析を行った。キメラチェックは、全てのフィルタリングを通った配列に対して usearchのuchimeアルゴリズムを適応して行った。データベースはUNITEの97% OTUとし、キメラと判断されなかった全配列を抽出した。OTU作成と系統推定はQiimeのワークフロースクリプトを用いて、リファレンス無し、パラメーターはすべてデフォルトの条件で行った。検出したOTUのうち配列数10以下のものは除外し、担子菌門、子囊菌門、その他の分類群ごとに分けた。

### 3.2.5 ヤマナメクジが1日に排泄する孢子量と孢子体内滞留時間

ヤマナメクジを湿らせた水苔が入ったプラスチックケースに1個体ずつ入れ、22℃恒温室内で3日間絶食させた。次に、ヤマナメクジに乾燥したイグチのカサを1時間与えて摂食を許した後に除去し、排泄が停止するまで24時間ごとに排泄物を回収した。回収した排泄物は1日ごとに総重量 A (mg) として記録した。1日ごとの総重量 A (mg)のうち1 mgを水で懸濁し、排泄物1 mgに含まれ

る孢子量 B (個/mg) を血球計算盤で計測した。この値を用いて 1 日に排泄する孢子量 N(個) の推定値を  $N = A \times B$  で求めた。

### 3.2.6 ヤマナメクジに排泄された孢子の発芽実験

孢子形成しているヒラタケ *Pleurotus ostreatus* (N=2)、トキイロヒラタケ *Pleurotus djamor* (N=2)、ヒロハチャツムタケ *Gymnopilus* sp. (N=4)、ナラタケモドキ *Armillaria tabescens* (N=4) の 4 種を野外で採集した。キノコの種同定は Hongou (2007) に従った。3 日以上絶食させたヤマナメクジに 1 種ずつキノコを与えた。排泄から 2 時間以内の排泄物を滅菌水で懸濁し、孢子濃度  $10^5$ – $10^6$ /ml に調節した孢子懸濁液を作成した。培地には、子嚢菌の発生を抑えるためにペノミル（殺菌剤）10 mg/l とクロラムフェニコール（抗生物質）100 mg/l を添加した 2% 素寒天培地をシャーレ (90mm×20mm) 上に作成したものを用いた。孢子懸濁液を培地に 10  $\mu$ l 滴下し、コンラージ棒で広げたあと、密封して恒温室 (24℃, 明期 15h, 暗期 9h) で培養した。コントロール区には、ヤマナメクジに与えたものと同一個体のキノコの一部を、薬包紙の上に静置して採集した孢子から作成した孢子懸濁液 ( $10^5$ – $10^6$ /ml) を散布した。発芽率の測定には、サンプルごとにランダムに 200 個の孢子を観察し、そのうちの発芽管が伸びている孢子数を数えた。また、観察は孢子懸濁液の接種時 (0 時間)、および接種から 24 時間ごとに行い、最長 3 日間観察した。排泄物中には多量のバクテリアや有機物が混入しているため、長期間培養は困難であった。各種ごとに試験区とコントロール区の平均発芽率を算出した。ヒロハチャツムタケとナラタケモドキの発芽率については、t 検定によりコントロール区の発芽率と比較した (Microsoft Excel for Mac 2011 v.14.7.7, Microsoft Co., Redmond)。



### 3.2.7 林床でのヤマナメクジの移動距離と移動パターンの調査

コナラが優占する落葉広葉樹林の林床でヤマナメクジの移動力を測定した。調査は全3回、ヤマナメクジ計15個体のデータをとった。2017年11月13日と14日は12時30分から17時30分まで、11月28日は10時35分から15時35分を実施し、いずれも気温13℃–15℃、天気は曇りであった。立ち木のコナラをスタート地点として、直径10–20cm、長さ30–50cmのコナラの倒木を放射状に約1m間隔で22本設置した。体表の模様で個体識別したヤマナメクジ5個体をスタート地点に放ち、30分ごとにヤマナメクジの移動地点の記録と移動距離の測定を10回、計5時間行った。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 ヤマナメクジの生息場所

調査期間中で全 113 個体の生息場所を確認し、うち成体が 72 個体、幼体が 41 個体であった。生息場所は倒木(68%, N=77)が最も多く、続いて子実体(20%, N=22), 樹上(7%, N=8), 地上(5%, N=6)の順であった(Table 2)。子実体と地上から見つかった個体はすべて成体であった。倒木では成体 49.4%(N=38), 幼体 50.6%(N=39)と半数ずつ見つかり、樹上では成体 75%(N=6), 幼体 25%(N=2)であった (Fig. 4)。成体はすべての場所に生息していたのに対し、幼体は樹上か倒木のみでしか捕獲されなかった。

#### 3.3.2 排泄物の観察

調査地で捕獲した個体から 34 個体の排泄物を対象に内容物を観察した。そのうち、73.5% (25 個体)で担子菌類の孢子形態のものが観察された(Fig. 5)。また、同一個体の排泄物の中から、異なる形状の孢子が複数見られた。観察された孢子のなかには発芽管を伸ばしているものもあった。孢子の他には、酵母形態のものや、菌糸やシダ、苔類の破片、分生子形態のものや線虫など様々なものが観察された。

#### 3.3.3 アンプリコンシーケンスによるヤマナメクジの排泄物中の菌相解析

野外で採集したヤマナメクジ 8 個体の糞中の菌相を解析した結果、合計 288,630 OTU 配列を検出した。そのうち、52.5%が Ascomycota (子囊菌門)、46.1%が Basidiomycota (担子菌門)、と約半数ずつで、残りは Chytridiomycota (ツボカビ門) 0.1%, Mortierellomycota 0.2%, Mucoromycota (ケカビ亜門) 0.1%, その他 0.9%であった(Table 3)。本研究で対象とする担子菌門の菌相は、全 169,410 OTU

配列で 18 目のグループが検出された(Table 4)。担子菌門全体の 66.1%が Agaricales (ハラタケ目) で、29.7%が Trichosporonales 酵母類を多く含むグループ、次に Hymenochaetales の木材腐朽菌を多く含むグループが上位 3 グループであった。菌類の生態学的グループ別に見ると、検出した担子菌 18 目のうち、6 目 Hymenochaetales、Tremellales、Trechisporales、Polyporales、Filobasidiales、Tremellales が木材腐朽菌と最も多く、次に酵母を多く含むグループが 3 目 Trichosporonales、Sporidiobolales、Cystofilobasidiales と植物病原菌を含むグループ 3 目 Tritirachiomycetes、Exobasidiales、Agaricostilbomycetes、そして菌根菌が 2 目 Russulales (ベニタケ目)、Thelephorales (イボタケ目)であった(Fig. 6)。最も優占した目の Agaricales は Armillaria (ナラタケ属) が 35.7%、次に Gymnopilus (チャツムタケ属)が 29.8%で、ほとんどが枯木や生木に発生する腐生菌であった。ただし、今回解析した 8 個体を捕獲した時期は腐生菌が最も優占している時期であったため、腐生菌の検出率が高かった可能性も考えられる。

### 3.3.4 ヤマナメクジが 1 日に排泄する孢子量と孢子体内滞留時間

全 13 個体のヤマナメクジを用いて調査を行った。絶食開始から、排泄物中に孢子が存在した期間は最長 7 日、最短 2 日、平均 4.23 (SE±0.46) 日であった。1 日の平均排泄孢子数の推定値は、1 日目に 104,022,728.3 (SE±42,392,111.89)個で最も多く、6 日目が 21,501(SE±13,081.48)個で最も少なかった。また、孢子の排泄が確認された最終日の 7 日目は 51,501(SE±32526.91)個の孢子を排泄していた (Fig. 7)。

### 3.3.5 ヤマナメクジに排泄された孢子の発芽実験

排泄物中の孢子とコントロール孢子の発芽率を比較すると、すべての種の孢子でコントロールよりも高い発芽率を示していた(Table 5, Fig. 8)。特に、ヒロ

ハチャツムタケ培養 24 時間目 4.13% (SE±1.04) (t 検定 : P=0.041)とナラタケモドキ培養 0 時間目 3.75% (SE±0.67)(P=0.017) では、コントロールと比較し統計学的に有意な差をみとめた。また、培地に接種して培養する前である 0 時間でも、ヒラタケ 7.5% (SE±1.41), トキイロヒラタケ 4.3% (SE±0.53), ナラタケモドキ 3.75% (SE±0.67) の発芽率を示しており、糞中ですでに発芽していることを示していた。

### 3.3.6 林床でのヤマナメクジの移動距離と移動パターンの調査

全 3 回の実験によって、15 個体の移動距離と到達倒木数を調べた。5 時間の移動距離は最大 10.35m で、3m 未満移動した個体は 5 個体、3m 以上移動した個体数は 10 個体であった(Fig. 9)。移動が 3m 未満のグループの平均移動距離は 0.95m(SE±0.21)で、3m 以上移動したグループの平均移動距離は 6.35m(SE±0.64)であった(Table 6)。

ヤマナメクジが移動中に到達した倒木の本数については、移動が 3m 未満のグループの平均本数は 0.2 本(SE±0.18)で、3m 以上移動したグループで 2 本(SE±0.49)であった (Table 6, Fig. 10)。

### 3.4 考察

#### 3.4.1 ヤマナメクジに排泄された胞子の発芽力

ヤマナメクジが排泄した胞子は、ヤマナメクジの消化管通過後も破壊されることなく発芽能力を保っていた。発芽率は培養から 24 時間以降はコントロールよりも高く、また排泄物中の胞子のなかには培養前にすでに発芽しているもの（約 7%）もあった。これまでの陸産貝類による種子の被食散布についての研究では、いずれも発芽能力が保たれていることが報告されている(Gervais et al. 1998; Türke et al. 2010; Calvino-Cancela and Rubido-Bara 2012; Blattmann et al. 2013)。一方、発芽率については、コントロールと同程度か、多少高いが大きな差はない(Gervais et al. 1998; Türke et al. 2010; Calvino-Cancela and Rubido-Bara 2012)か、低く(Gervais et al. 1998; Blattmann et al. 2013)、培養前に発芽している報告例はない。しかし、これまでの研究は、植物種子を対象にしており、種子と担子胞子では大きさや細胞壁の厚さが異なるため、消化酵素などによる影響が異なる可能性はある。また、Boch ら（2013）は、大型のナメクジ 3 種 *Arion rufus*, *A. vulfaris*, *Limax cinereoniger* の消化管を通過したコケ類やシダ類の胞子の発芽率は、ナメクジ種間で大きく異なることを報告している。これらのことから、本研究によるヤマナメクジの消化管通過が担子胞子へ与えた影響は、これまでの研究結果とは異なっている可能性がある。

担子胞子の発芽が促進された理由について、植物の種子は、動物の消化管通過によって種皮が物理的や化学的に傷つき、水や気体に対する種皮の浸透性を高めることで実生の発生を促進することが知られる(Travest et al. 2008)。担子胞子においても、ヤマナメクジ消化管内の消化酵素などの影響が発芽促進作用をもたらした可能性が考えられる。また、担子菌類の一部の外生菌根菌の胞子は高濃度でないと（最低  $10^3 \sim 10^7$ /苗）コロニー形成をしないことも報告されてい

る(Rincon et al. 2001) ため、消化管内で孢子密度が高まったことが発芽促進作用をもたらした可能性が考えられる。

### 3.4.2 孢子散布者としてのヤマナメクジ

ヤマナメクジの移動距離について、本研究で行った移動実験では日中 5 時間で全個体の平均は 4.55m、活発な個体は平均 6.35m、不活発な個体でも平均 0.95 m 移動した。ドイツの森林内で *Arion* 属 60 匹を再捕獲法で移動距離を調査した研究では、15 時間で平均 4.4m (最短 0m、最長 14.6m) 移動しており(Türke et al. 2010)、本研究より短距離であったが、ナメクジを放った地点と再捕獲地点との距離の測定だけを行っているため、移動距離を過小評価している可能性がある。また、イギリスで行われた *A. lusitanicus* の行動範囲を調べたところ、個体群密度が低いと 45.4 m<sup>2</sup>で、高いと 12.4 m<sup>2</sup>であると報告されている(Grimm and Paill 2001)。他の菌食性動物の孢子散布距離についての報告では、ショウジョウバエ科 *Drosophilidae* の散布距離は推定半径 25m で(Halbwachs and Bässler 2015)、風に乗ると数百 km 程度を分散すると考えられている(Johnson 1969)。また、センチコガネ科の一種は、最も活動的な時間帯では 6 時間で 300m も移動することが知られている(Plewińska 2007)。これらの動物と移動距離を比較しても、ヤマナメクジの孢子散布距離は乏しく、長距離散布に貢献しているとは考えにくい。

では、ヤマナメクジの生息環境に注目して孢子散布者としての利点について考える。本研究で調査したヤマナメクジの生息場所は、木材腐朽菌が付着している“倒木上”が最も多く、調査した 7 割の個体が野外で担子孢子を摂食しており、実際に排泄物中の菌相解析では木材腐朽菌や材上生の腐生菌が最も優占していた。このことから、ヤマナメクジと材上生の担子菌類の生息環境は一致しており、ヤマナメクジはそれらキノコを主な餌資源として利用していると考えられる。またヤマナメクジの移動パターンは不活発な個体は、枯れ葉の下や木

の根本、倒木の下などをシェルターにして潜り込んでおり、活発な個体も点在させた倒木を渡り歩くように、倒木間を移動していた。1日の平均排泄胞子量は最大 104,022,728.3 (SE±42392111.89)個、最小でも 21501(SE±13081.48)個の胞子を平均で約4日、最長7日に及んで排泄し続けていた。これらの結果から、ヤマナメクジはすみかとする倒木や木の根元に、発芽力を保持または促進した胞子を含んだ糞を大量に排泄すると考えられる。材上の担子菌類が新たな環境でキノコを形成するためには、風や動物によって胞子散布され、倒木など林内に点在する資源に複数の胞子が到達し、発芽した一次菌糸同士が融合する必要がある。一般的に、胞子散布は風によって大量に飛ばされているとされているが、実際には胞子の95%は子実体の半径1m以内に落下している(Galante et al. 2011)。長距離風散布された場合、胞子密度は距離に逆比例して低くなるため、着地場所で融合可能な同種の遺伝的異型胞子と出会う確率は低い。その点において、生息環境が一致しているヤマナメクジは、移動距離が小さくとも、材上生の担子菌類の胞子を発芽可能(もしくは促進した)な状態で、適切な環境へ高確率で運ぶことができる。材上生の担子菌類に適した胞子散布者としての潜在的能力があると考えられる。

## 4 章 ヤマナメクジとショウジョウバエ 3 種に忌避効果のある匂い成分の同定

### 4.1 はじめに

1 章においてヤマナメクジはアケボノドクツルタケの匂いを忌避することがわかったことから、本章では、アケボノドクツルタケの匂いの利用について明らかにするために、アケボノドクツルタケが生産する匂いからヤマナメクジ、さらにはショウジョウバエ 3 種に忌避効果のある成分の同定を行った。

以下 5 つの調査と実験を行った。はじめに、ヤマナメクジに忌避効果のある成分候補を選出するため、ヤマナメクジの忌避するアケボノドクツルタケと忌避しない他種の匂い成分の比較を行った。次に、選出した匂い成分候補を用いてヤマナメクジの反応の観察を行い、忌避効果のある成分を特定した。また、同じく匂い成分候補を用いて、ショウジョウバエ 3 種の反応の観察を行い、ショウジョウバエ 3 種に忌避効果のある成分の特定と、ハエ 3 種間の反応の比較をした。

### 4.2 材料と方法

#### 4.2.1 キノコの匂い成分分析

アケボノドクツルタケと他種のキノコの匂い成分を比較して、忌避効果のある匂い成分候補を選出するために、野外で採集した子実体の匂い成分分析を行った。2016 年~2018 年の 7 月~10 月に石川県金沢市金沢大学角間キャンパス周辺と石川県能美市の金沢大学辰口共同研修センター周辺で子実体を採集した。



子実体の同定方法と成熟段階の区別は3章に記した。子実体からの匂い成分の捕集は、孢子散布期と腐敗期の匂いをとるために以下の2つの方法で行った。

1つ目の方法は、組織に傷が付き腐敗が進んでくる腐敗期の匂いをとるために野外で採集した子実体のカサ3gの破片を付属のガラス瓶MT Extract Cup (Mono Trap Trial Kit for SE, ジーエルサイエンス社, 東京) に詰め、その中にMT Holder (Mono Trap Trial Kit for SE) を用いてカーボンチップ MonoTrap DCC18 (Mono Trap Trial Kit for SE) を1枚設置し、22℃恒温室内で24～72時間静置した。2

つ目の方法は、子実体が新鮮で孢子生産期の匂いをとるために、子実体全体をプラスチック容器もしくはガラス瓶(500 ml)に入れ、その中にカーボンチップ MonoTrap DCC18 (Mono Trap Trial Kit for SE) を設置し、22℃恒温室内で24時間静置した。上記2つのどちらかの方法で匂い成分を捕集後、溶媒となるアセ

トン 500  $\mu$ l にカーボンチップを浸して超音波洗浄機に10分間かけ、カーボンチップに吸着した匂い成分をアセトンに溶出させた。匂い成分の溶出したアセトン試料は、GC/MS用バイアル1.5 ml (SHIMADZU, 京都)に全量移し、ガスクロマトグラフ質量分析計に供した。GC/MSの分析条件は以下のとおりである。

GC/MS: GCMS-QP2010 SE (SHIMADZU, 京都)、カラム: DB-5MS, 30m $\times$ 0.25mm i.d. $\times$ 0.25 $\mu$ m (Agilent technologies, USA)、カラム温度: 40℃で5分保持した後、

4℃/min で40℃から250℃まで昇温し、その後5分間保時、気化室温度: 250℃、

注入モード: スプリット(スプリット比 10.1)、キャリアーガス: He、カラム流量 1.62ml/min。質量分析は電子イオン化法(EI法)でイオン化し、Mass/charge (m/z)

スキャン範囲は 25-450 とした。70ev の電子照射により生成されたマススペクトルを、GC/MSに付属の(NIST11)ライブラリーに登録のスペクトルと比較して、

成分同定を行った。また標準物質 Standard Mixture of n-Paraffins (TCI) C7-C11, C12-C16, C17-20 の保持時間を用いて計算した GC/MS 測定データの保持指標

(Kovats Retention Index) を NIST データベースと比較することによっても成分

を同定した。

菌種・成熟段階・捕集方法ごとの検出した匂い成分の組成についての階層型クラスター分析には、JMP ver. 14.1(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

また、ヤマナメクジがキノコのどの匂い成分に忌避反応を示すのか調べるために、GC/MS で検出された匂い成分から、ヤマナメクジに忌避効果のある成分候補を子実体（破片）と子実体（全体）の 2 群からそれぞれ選出した。

#### 4.2.2 匂い成分に対するヤマナメクジの反応の観察

子実体（破片）と子実体（全体）の 2 群からそれぞれ選出したヤマナメクジに忌避効果のある成分候補成分を用いて、バイオアッセイ試験を行った。実験室内 25℃で、プラスチックバット(横 25 cm×縦 35 cm×高さ 5 cm)内に透明なビニールチューブ(経 3cm, 長さ 15 cm)を置き、左端をスタート地点とし、ヤマナメクジ 1 匹をスタート地点に置いた。ヤマナメクジがビニールチューブの中間地点(7.5 cm)に移動したら、チューブの右端のゴール地点に各濃度に調節した各試薬を 500 µl 染み込ませた脱脂綿を設置した。ヤマナメクジの体全体がゴールから出たら、忌避効果なし、スタート地点に引き返したら、忌避効果ありと判断した。実験は試薬を設置してから 10 分で打ち切り、それまでにどちらの端にも達さなかった個体はもう一度施行を繰り返し、ナメクジがチューブのどちらかの端に達するまで行った。室内温度は 25℃, 各試薬につき 10 匹ずつ試験した。試薬は各匂い成分の試薬を単体、またはそれら複数種の匂い成分を同量ずつ組み合わせたものを流動パラフィンで 1 µl/ml に調節した。子実体（全体）群については、各匂いの効果を評価するために、目的変数を忌避の有無、説明変数を匂いの組み合わせとしてロジスティック回帰分析を JMP ver. 14.1(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA,) を用いて行った。

また、Dimethyl trisulfide のみ、1µl/ml、0.1µl/ml、1µl/ml、10µl/ml の 4 段階の

濃度で試験した。

#### 4.2.3 匂い成分に対するショウジョウバエ 3 種の反応の観察

前回の実験で用いた、忌避候補成分に対するショウジョウバエ 3 種の反応を観察するために以下のバイオアッセイ試験を行った。ショウジョウバエは果実食性の *Drosophila melanogaster* (CS)、バクテリア食性の *D. busckii* (MIT1)、菌食性の *D. anguralis* (FK05-14) の 3 種を用いた。室温 22-25℃の実験室内で径 2 cm、長さ 15 cm の透明のチューブの中に各種ショウジョウバエを 10 匹もしくは 20 匹入れ、両端に脱脂綿を貼り、流動パラフィンで 1 µl/ml に調節した試薬 500 µl と、コントロールとして流動パラフィン 500 µl を片側ずつに染み込ませた(Fig. 11)。このチューブを 5 分間静置した後、センターラインに対して試薬側とパラフィン側にいる個体数をそれぞれ測定した。その後チューブを振ってハエを拡散させ、再び 5 分間後に個体数を測定した。この試行を 3 回繰り返し、試薬側とパラフィン側の平均個体数を求め、以下の式で **Attractive score** を算出した。
$$\text{Attractive score} = (\text{試薬側の平均個体数} - \text{コントロール側の平均個体数}) \div \text{全体の個体数}$$

3 種類のハエの **Attractive score** を種間で比較するために、各匂い成分ごとに 3 回の試行の各スコアを用いてボンフェローニの多重比較検定を行った。解析には統計ソフト R ver. 3.4.3 (R Core Team, 2016) を用いた。

また、3 種類のハエそれぞれについて各匂い成分に忌避・誘引した個体数をコントロールと比較するために、3 回の試行で得た個体数をプールし、カイ二乗検定を行った(Microsoft Excel for Mac 2011 v.14.7.7, Microsoft Co., Redmond)。

## 4.3 結果

### 4.3.1 キノコの匂い成分分析

全 4 目 8 科 11 属 22 種の子実体の分析を行い(Table 7)、種・成熟度・捕集方法別に 48 試料から 65 種の匂い成分を検出した(Table 8-1, 8-2)。全 48 試料の半数以上から共通して検出された匂い成分として、1-pentanol (26 試料)と 2-methyl-1-butanol (22 試料)、3-octanone (17 試料)、1,2-dichloro-benzene (14 試料)を見出した。

各キノコに含まれる匂い成分の組成によって分類するために、菌種-成熟段階-捕集方法ごとの匂い成分組成でクラスター解析をした結果、アケボノドクツルタケ-幼菌-破片、アケボノドクツルタケ-成菌-破片、ヘビキノコモドキ-成菌-破片、タマゴタケ-成菌-破片が最も近いグループに属していた(Table 9, Fig. 12)。そして、これらアケボノドクツルタケ-幼・成-破片とタマゴタケ-成-破片および、ヘビキノコモドキ-幼・成-破片の、いずれも破片から捕臭した試料のみから、Sulfide を含んだ有機硫黄化合物でいわゆる腐敗臭とされる成分が検出された。

ヤマナメクジに忌避効果のある成分を特定するために、実験 2 の嗜好性調査で 100%の忌避率を示したアケボノドクツルタケから検出された匂い成分から、忌避成分候補を子実体の捕集方法ごとに選出した。アケボノドクツルタケ子実体の破片(腐敗期)から検出した匂い成分からは、1-pentanol、Phenylethyl alcohol、および Dimethyl trisulfide の 3 つを選出した(Table 10)。1-pentanol は広い分類群の菌類に含まれる成分で *Aspergillus* や *Penicilium* にも含まれる(Matysik et al. 2009)。Phenylethyl alcohol はバラの芳香剤の原料に使用される成分で、アケボノドクツルタケから香る特有の匂いに似ている匂いであったため、選出した。Dimethyl trisulfide は強い刺激臭があり、セイヨウショウロやスッポンタケにも

含まれる匂いで、上述した通りアケボノドクツルタケと他2種からしか検出されなかった(Pelusio et al. 1995)。アケボノドクツルタケ子実体全体(孢子散布期)から検出した匂い成分からは、1-pentanol、3-octanone、2-Propyl-1-pentanol、および Ethyl butyrate の4つを選出した(Table 11)。3-octanone も 1-pentanol と同様に *Penicillium* や *Aspergillus* などカビから産出される成分である(Wilkins and Scholl 1989; Wilkins et al. 2000)。2-Propyl-1-pentanol と Ethyl butyrate は、今回の解析でアケボノドクツルタケのみから検出された成分であり、今回調査した他の菌種のキノコからは検出されなかった。Ethyl butyrate は果実臭様な香りで食品香料に用いられる。

#### 4.3.2 匂い成分に対するヤマナメクジの反応の観察

まず腐敗期の匂いである子実体(破片)群の忌避成分候補を用いてバイオアッセイを行った。ヤマナメクジは複数の匂い成分の組み合わせに対して忌避反応を示している可能性もあるため、バイオアッセイには単一の匂い成分だけでなく、複数の匂い成分を組み合わせた試料も用いた。その結果、Dimethyl trisulfide を含んだ組み合わせの試料、および Dimethyl trisulfide 単体の試料に対して 100%(N=10)の忌避率を示した(Fig. 13)。一方、Dimethyl trisulfide が混ざっていない組み合わせの試料では忌避率は 0 (SE±0) %であった。ヤマナメクジの行動を観察すると、すべての(N=40)ヤマナメクジは Dimethyl trisulfide を含む試薬に接近するものの、至近距離で触覚を出し入れした後、引き返す行動を示した(Fig. 14)。

ヤマナメクジの Dimethyl trisulfide に対する忌避反応が、Dimethyl trisulfide の濃度に依存して変化するか確認するために、0.001  $\mu\text{l/ml}$ ~1  $\mu\text{l/ml}$  まで 10 倍で濃度勾配をつけた Dimethyl trisulfide に対する反応は、0.1 $\mu\text{l/ml}$  と 1 $\mu\text{l/ml}$  では 100%の忌避率を示したが、0.01 $\mu\text{l/ml}$ 、0.001 $\mu\text{l/ml}$  では 20%、0%の忌避率であった(Fig.

15)。

次に、胞子散布期の匂いである子実体（全体）群の忌避候補成分でのバイオアッセイの結果、各匂い成分単体では忌避率は30%以下と低かったが、複数種の匂いと組み合わせると忌避率が高くなる傾向にあった。1-pentanol は単体であると忌避率0%に対して、1-pentanol と 2-Propyl-1-pentanol の組み合わせでは忌避率90%と最も高くなった (Fig. 16)。各匂い成分の忌避効果をロジスティック回帰分析した結果、1-Pentanol ( $P<0.0001$ ), Ethyl butyrate ( $P=0.0068$ )、2-Propyl-1-pentanol ( $P=0.0023$ ) に忌避効果があり、3-Octanone + 2-propyl-1-pentanol ( $P=0.031$ )や、3-Octanone + Ethyl butyrate + 2-propyl-1-pentanol ( $P=0.0228$ )と他の匂いとの組み合わせで相乗効果を示すことがわかった (Table 12)。

#### 4.3.3 匂い成分に対するショウジョウバエ3種の反応の観察

腐敗期の匂いである子実体（破片）群の匂い成分を用いた結果では、*D. anguralis* と *D. busckii* はすべての匂いに対してコントロールと同程度の忌避率を示し、(カイ二乗検定;  $P>0.05$ )、誘引や忌避の反応はみられなかった (Table 13, Fig. 17)。一方、*D. melanogaster* は 1-pentanol + Dimethyl trisulfide (カイ二乗検定;  $P<0.005$ ) と 1-pentanol + Phenethyl alcohol ( $P<0.001$ ) および、1-pentanol + Dimethyl trisulfide + Phenethyl alcohol ( $P<0.001$ ) の 1-pentanol とその他成分を2つ以上の組み合わせた匂いに対して、コントロールに比べ有意に忌避率が高かった。ショウジョウバエ3種間の Attractive score を比較すると、*D. melanogaster* はそれぞれ *D. anguralis* と *D. busckii* と比較して、1-pentanol + Phenethyl alcohol と 1-pentanol + Dimethyl trisulfide + Phenethyl alcohol の組み合わせで有意な差を示した (ボンフェローニ多重比較; 1-pentanol + Phenethyl alcohol,  $\times D. anguralis$ ,  $P=0.03$ ,  $\times D. busckii$ ,  $P=0.025$ ; 1-pentanol + Dimethyl trisulfide + Phenethyl alcohol,  $\times D. anguralis$ ,

P=0.001, ×*D. busckii*, P=0.002)(Fig. 17)。

胞子散布期の匂いである子実体（全体）群の匂い成分を用いた結果でも *D. anguralis* と *D. busckii* はすべての匂いに対してコントロールと有意な差は示さず(カイ二乗検定 ; P>0.05)、誘引や忌避の反応はなかった(Table 14, Fig. 18)。一方、*D. melanogaster* は 3-octanone (P<0.001), 2-propyl-1-pentanol (P<0.001), Ethyl butyrate (P<0.001), 1-pentanol + 3-octanone (P<0.001), 1-pentanol + 2-propyl-1-pentanol (P<0.001), 1-pentanol + Ethyl butyrate (P<0.001)において、コントロールに比べて有意に忌避反応を示しており、1-pentanol 以外の 3 つの匂い成分は単体で、1-pentanol は他の匂いとの 2 つの組み合わせで忌避効果があることがわかった。ショウジョウバエ 3 種間の Attractive score を比較すると、*D. melanogaster* は 3-Octanone で *D. anguralis* と *D. busckii* と有意な差を示し、Ethyl butyrate と Ethyl butyrate+1-pentanol の組み合わせで *D. anguralis* より有意な差を示した (ボンフェローニ多重比較 ; 3-Octanone, ×*D. anguralis*, P=0.001, ×*D. busckii*, P=0.004 ; Ethyl butyrate, ×*D. anguralis*, P=0.050 ; Ethyl butyrate+1-pentanol, ×*D. anguralis*, P=0.013)。

## 4.4 考察

### 4.4.1 腐敗期に生産される Dimethyl trisulfide

匂い成分を用いたヤマナメクジの反応の観察により、ヤマナメクジは Dimethyl trisulfide が含まれる試薬すべてを忌避した。Dimethyl trisulfide は菌類ではスッポンタケ属の *Clathrus archeri* (Johnson and Jurgens 2010) やスッポンタケ *Phallus impudicus* (Borg-Kalson et al. 1994; Pudil et al. 2014)、植物ではコンニャク属のショクダイオオコンニャク *Amorphophallus titanum* (Shirasu et al. 2010)などに含まれ、糞虫や腐食性動物が誘引される匂いであることがわかっている。今回の分析で、Dimethyl trisulfide はアケボノドクツルタケ-幼・成-破片とタマゴタケ-成-破片および、ヘビキノコモドキ-幼・成-破片のいずれも、腐敗期の匂いである破片から捕臭した試料のみから検出され、孢子散布期には検出されなかった。このことから、これら 3 菌種は腐敗期になると、Dimethyl trisulfide を生産し、経時的に匂いに変化していることがわかった。ヤマナメクジは、主に新鮮な状態のキノコを好むため、Dimethyl trisulfide を腐敗臭として認識し、忌避したのだと考えられる。

### 4.4.2 アケボノドクツルタケの匂いと動物の関係

本研究結果から、アケボノドクツルタケの匂いと動物の関係について考える。ヤマナメクジの嗜好性の調査結果では、ヤマナメクジは幼菌と成菌のアケボノドクツルタケは摂食しなかった。そして、孢子生産期～散布期のアケボノドクツルタケから検出された匂い成分である 1-pentanol と Ethyl butyrate および 2-propyl-1-pentanol はヤマナメクジに忌避効果があることがわかった。また、腐敗期に生産する Dimethyl trisulfide もヤマナメクジに高い忌避効果を示した。ヤマナメクジは、アケボノドクツルタケが孢子生産期から散布期に生産する 3 種



の匂い成分(1-pentanol, Ethyl butyrate, 2-propyl-1-pentanol)と、腐敗期に生産する Dimethyl trisulfide に忌避しており、アケボノドクツルタケすべての成長段階で忌避することがわかった。

また、これらの結果から、仮説としてアケボノドクツルタケは匂いを経時的に変化させ、被食防御や散布に利用している可能性が考えられる。まず、被食防御について、孢子散布に重要な期間にヤマナメクジが忌避する匂いを生産するのは、ヤマナメクジがアケボノドクツルタケの孢子散布に適さない動物であるために、被食防御をしている可能性がある。なぜなら、アケボノドクツルタケは外生菌根菌であるため、新たな子実体を形成するためには、宿主樹木の根に菌根を形成する必要がある。そのためには、子実体から散布された孢子が発芽した後、土壤中の宿主樹木の細根に感染しなくてはならない。しかし、ヤマナメクジは主に倒木や樹上で生息しているため、外生菌根菌の孢子が土壤中まで成長するには、距離も長く障害物も多いといった、外生菌根菌の孢子の生育には適さない環境へ運ぶ可能性が高い。その上、ヤマナメクジは菌食節足動物に比べて体サイズが大きく 1 個体の子実層を食べ尽くす場合もある。これらのことから、ヤマナメクジは外生菌根菌であるアケボノドクツルタケにとっては適切ではない散布者である可能性がある。よって、ヤマナメクジからの被食を防御している可能性が合理的に考えられうる。

また、孢子散布について、アケボノドクツルタケは散布能力を失った腐敗期に Dimethyl trisulfide で腐食性動物を誘引して残留した孢子を散布している可能性が考えられる。上述したように、Dimethyl trisulfide は他の動物散布性の植物やキノコに含まれており、腐食性動物を誘引する効果を持つ(Borg-Kalson et al. 1994; Johnson and Jurgens 2010; Shirasu et al. 2010; Pudil et al. 2014)。実際に、定量データは得られていないが、アケボノドクツルタケを幼菌から腐敗するまでデジタルカメラでインターバル撮影による観察を行ったところ、腐敗するとオ

オセンチコガネ *Geotrupes auratus auratus* が訪れ、摂食しているのが観察された (Fig. 19)。つまり、腐食性のオオセンチコガネは Dimethyl trisulfide によって誘引されたと考えられる。これまでセンチコガネ科 Geotrupidae による孢子散布について、Houston and Bougher (2010) は一部の種の排泄された孢子は破壊されているが、地下性の外生菌根菌の孢子や菌糸を摂食しており、潜在的な孢子散布者である可能性について述べている。

これらのことから、アケボノドクツルタケは孢子散布期にはヤマナメクジからの被食防御に、腐敗期には腐食性動物による孢子散布に、経時的に変化する匂いを利用している繁殖戦略を持つことが仮説として考えられた。この仮説を明らかにするには、ヤマナメクジが排泄した外生菌根菌孢子の菌根形成能力の評価や、腐食性動物による孢子散布能力の調査など、さらなる追加実験が必要となる。

#### 4.4.3 ショウジョウバエ 3 種間のキノコの匂い成分に対する反応の違い

本研究では食性の異なる 3 種のショウジョウバエを用いて、キノコの匂い成分に対する反応を観察した結果、同じ *Drosophila* 属であるにも関わらず、顕著に匂いに対する反応が異なっていた。主に森林内に生息し、菌食性である *D. anguralis* と、バクテリア食である *D. busckii* は、すべての匂いに対して、忌避も誘引も反応を示さなかった。一方で、人家周辺によく見られる果実食性の *D. melanogaster* は 1-pentanol と Dimethyl trisulfide、Phenethyl alcohol、3-octanone、2-propyl-1-pentanol、Ethyl butyrate との 2 つ組み合わせたものと、3-octanone と 2-propyl-1-pentanol および Ethyl butyrate の単体において忌避反応を示した。本研究ではショウジョウバエ種ごとに匂いに対する感受性が異なることが明らかになった。

この感受性の違いについて、1 つの仮説が考えられる。各ショウジョウバエ

種の生態に注目すると、主に森林内のキノコや腐敗物を餌や産卵場所としている *D. anguralis* と *D. busckii* と、主に人の生活圏内で果実等を利用する *D. melanogaster* に区別することができる。*D. anguralis* と *D. busckii* が生息する森林ではキノコや腐敗物は貴重な栄養資源であり、それらを利用せざるを得ない環境である。そのため、*D. anguralis* と *D. busckii* はキノコや腐敗物を利用することで、世代交代を通して毒やバクテリアに対する耐性を獲得したことから、今回実験に使用したキノコの匂い成分に反応しなかったと考えられる。一方、*D. melanogaster* は、キノコやカビなど真菌類は利用せず、むしろ幼虫の生育時に培地にカビによる感染があると生育状態が悪くなる。そのため、*Aspergillus* や *Penicilium* にも含まれる 1-pentanol (Matysik et al. 2009) や、アケボノドクツルタケから検出された匂いに対して、忌避反応を示したのだと考えられる。つまり、同属であっても種ごとの幼虫段階の生態によって匂いに対する感受性が異なる可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究を取り組むにあたって、指導して下さった方々に深く感謝申し上げます。指導教員の都野展子准教授(金沢大学自然科学研究科生態学研究室)には、日頃からご指導いただいたとともに、科学に対して真剣に正直に取り組む姿勢、フィールド研究の楽しさについて身をもって学ばせていただきました。大河原恭介准教授(金沢大学自然科学研究科生態学研究室)、西川潮准教授(同)にはセミナー発表の折々に貴重なコメントを頂戴しました。北村俊平准教授(石川県立大学環境科学科植物生態学研究室)は、陸産貝類の散布について貴重な情報をくださったとともに、度々飼育しているヤマナメクジを分けて頂き、大変助かりました。西脇ゆり特任助教(男女共同参画キャリアデザインラボラトリー)にはガスクロマトグラフィー質量分析計での匂い分析について、ご指導いただき、新しい視点から研究に取り組むことができました。宇高寛子助教(京都大学理学研究科動物学研究室)にはヤマナメクジの同定とナメクジに関する貴重な情報を提供していただきました。研究を始めた当初、保坂健太郎先生(国立科学博物館植物研究部)には、調査に同行させていただき、キノコの採集や同定方法の基礎を教わり、学会のたびに貴重なコメントをいただきました。これまで7年間の研究生活では多くの先生方のご助言や、温かい言葉に支えられました。深く感謝致します。また、常日頃の議論や会話に付き合って下さった生態学研究室の先輩、後輩の方々に感謝いたします。研究室生活を楽しく送ることができました。

最後に、これまで反対せずに好きな道を歩ませてくださった父北林辰哉、母淳子、あたたかく見守り援助して下さった祖父高柳悦郎、祖母高柳由紀子、北林美津子、義父谷村一、義母谷村富士子、また共に学生でありながらもいつも励まし支えてくれた夫谷村純に深く感謝致します。

## 引用文献

- Aguiar R, Wink M, 2005. How do slugs cope with toxic alkaloids? *Chemoecology* 15 (3), 167–177.
- Blattmann T, Boch S, Türke M, Knop E, 2013. Gastropod seed dispersal: an invasive slug destroys far more seeds in its gut than native gastropods. *PLoS ONE* 8 (9), e75243.
- Boch S, Berlinger M, Fischer M, Knop E, Nentwig W, Türke M, Prati D, 2013. Fern and bryophyte endozoochory by slugs. *Oecologia* 172 (3), 817–822.
- Borg-Karlson A-K, Englund FO, Unelius CR, 1994. Dimethyl oligosulphides, major volatiles released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus*. *Phytochemistry* 35 (2), 321–323.
- Buller AHR, 1922. *Researches on fungi* vol. 2.
- Calvino-Cancela M, Rubido-Bará M, 2012. Effects of seed passage through slugs on germination. *Plant Ecology* 213 (4), 663–673.
- Chen G, Zhang RR, Liu Y, Sun WB, 2014. Spore dispersal of fetid *Lysurus mokusin* by feces of mycophagous insects. *Journal of Chemical Ecology* 40 (8), 893–899.
- Galante T, Horton T, Swaney D, 2011. 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. *Mycologia* 103 (6), 1175–1183.
- Gervais JA, Traveset A, Willson MF, 1998. The potential for seed dispersal by the banana slug (*Ariolimax columbianus*). *The American midland naturalist* 140 (1), 103-110.

- Grimm B, Paill W, 2001. Spatial distribution and home-range of the pest slug *Arion lusitanicus* (Mollusca: Pulmonata). *Acta Oecologica* 22 (4), 219–227.
- Hackman W, Meinander M, 1979. Diptera feeding as larvae on macrofungi in Finland. *Annales Zoologici Fennici* 16, 50–83.
- Halbwachs H, Bässler C, 2015. Gone with the wind—a review on basidiospores of lamellate agarics. *Mycosphere* 6 (1), 78–112.
- Houston TF, Bougher NL, 2010. Records of hypogeous mycorrhizal fungi in the diet of some Western Australian bolboceratine beetles (Coleoptera: Geotrupidae, Bolboceratinae). *Australian Journal of Entomology* 49 (1), 49–55.
- Ikeda T, Ohya E, Makihara H, Nakashima T, Saitoh A, Tate K, Kojima K, 1993. Olfactory responses of *Anaglyptus subfasciatus* Pic and *Demonax transilis* Bates (Coleoptera: Cerambycidae) to flower scents. *Journal of the Japanese Forestry Society* 75 (2), 108–112.
- Johnson CG, 1969. Migration and dispersal of insects by flight. Methuen And Co. Ltd.; London.
- Johnson S, Jürgens A, 2010. Convergent evolution of carrion and faecal scent mimicry in fly-pollinated angiosperm flowers and a stinkhorn fungus. *South African Journal of Botany* 76 (4), 796–807.
- Kaiser R, 2006. Flowers and fungi use scents to mimic each other. *Science* 311 (5762), 806–807.
- Keller HW, Snell KL, 2002. Feeding activities of slugs on Myxomycetes and macrofungi. *Mycologia* 94 (5), 757–760.

- Kimmerer RW, Young CC, 1995. The role of slugs in dispersal of the asexual propagules of *Dicranum flagellare*. *Bryologist* 98 (1), 149–153.
- Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J, 2008. Dictionary of the Fungi CAB international, UK.
- Kobayashi M, Kitabayashi K, Tuno N, 2017. Spore dissemination by mycophagous adult drosophilids. *Ecological Research* 32 (4), 621–626.
- Kollmann J, Bassin S, 2001. Effects of management on seed predation in wildflower strips in northern Switzerland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 83 (3), 285–296.
- Malheiro R, de Pinho PG, Soares S, da Silva Ferreira AC, Baptista P, 2013. Volatile biomarkers for wild mushrooms species discrimination. *Food Research International* 54 (1), 186–194.
- Matysik S, Herbarth O, Mueller A, 2009. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents. *Chemosphere* 76 (1), 114–119.
- Naef A, Roy BA, Kaiser R, Honegger R, 2002. Insect-mediated reproduction of systemic infections by *Puccinia arrhenatheri* on *Berberis vulgaris*. *New Phytologist* 154 (3), 717–730.
- Novello F, Fiume L, Stirpe F, 1970. Inhibition by  $\alpha$ -amanitin of ribonucleic acid polymerase solubilized from rat liver nuclei. *Biochemical Journal* 116 (2), 177–180.
- Ohta A, 1983. Quantitative analysis of odorous compounds in the fruit bodies of *Tricholoma matsutake*. *Transactions of the Mycological Society of Japan (Japan)* 24, 185–190.

- Pelusio F, Nilsson T, Montanarella L, Tilio R, Larsen B, Facchetti S, Madsen J, 1995. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile organic sulfur compounds in black and white truffle aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (8), 2138–2143.
- Plewińska B, 2007. The effect of food odour on food preference, activity and density of dung beetle *Geotrupes stercorosus* (Scriba, 1971) in a mixed coniferous forest. *Polish Journal of Ecology* 55 (3), 495–509.
- Policha T, Davis A, Barnadas M, Dentinger B, Raguso RA, Roy BA, 2016. Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking *Dracula* orchids using realistic three-dimensional printed flowers. *New Phytologist* 210 (3), 1058–1071.
- Pudil F, Uvira R, Janda V, 2014. Volatile compounds in stinkhorn (*Phallus impudicus* L. ex Pers.) at different stages of growth. *European Scientific Journal*, ESJ 10 (9), 163–169.
- Rincón A, Alvarez IF, Pera J, 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11 (6), 265–271.
- Sawahata T, Shimano S, Suzuki M, 2008. *Tricholoma matsutake* 1-Oen-3-ol and methyl cinnamate repel mycophagous *Proisotoma minuta* (Collembola: Insecta). *Mycorrhiza* 18 (2), 111–114.
- Shirasu M, Fujioka K, Kakishima S, Nagai S, Tomizawa Y, Tsukaya H, Murata J, Manome Y, Touhara K, 2010. Chemical identity of a rotting animal-like odor emitted from the inflorescence of the titan arum (*Amorphophallus titanum*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74 (12), 2550–2554.



- Takahashi KH, Tuno N, Kagaya T, 2005. Abundance of mycophagous arthropods present on different species of fungi in relation to resource abundance at different spatial scales. *European Journal of Entomology* 102 (1), 39–46.
- Terashita T, 1991. Effect of low-temperature treatment on the production of 1-octen-3-ol by the vegetative mycelia of *Tricholoma matsutake*. *Trans Mycol Soc Jpn* 32, 477–484.
- Toda MJ, Kimura MT, Tuno N, 1999. Coexistence mechanisms of mycophagous drosophilids on multispecies fungal hosts: aggregation and resource partitioning. *Journal of Animal Ecology* 68 (4), 794–803.
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H, 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE* 7 (7), e40863.
- Traveset A, Rodríguez-Pérez J, Pías B, 2008. Seed trait changes in dispersers' guts and consequences for germination and seedling growth. *Ecology* 89 (1), 95–106.
- Tuno N, 1998. Spore dispersal of Dictyophora fungi (Phallaceae) by flies. *Ecological Research* 13 (1), 7–15.
- Tuno N, 1999. Insect feeding on spores of a bracket fungus, *Elfvingia applanata* (Pers.) Karst. (Ganodermataceae, Aphyllophorales). *Ecological Research* 14 (2), 97–103.
- Türke M, Heinze E, Andreas K, Svendsen SM, Gossner MM, Weisser WW, 2010. Seed consumption and dispersal of ant-dispersed plants by slugs. *Oecologia* 163 (3), 681–693.
- Wilkins C, Scholl S, 1989. Volatile metabolites of some barley storage molds. *International Journal of Food Microbiology* 8 (1), 11–17.

- Wilkins K, Larsen K, Simkus M, 2000. Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media. *Chemosphere* 41 (3), 437–446.
- Wood WF AC, Largent DL, 2001. 1-Octen-3-ol, a banana slug antifeedant from mushrooms. . *Biochemical Systematics and Ecology* 29 531–533.
- 牛山博文, 2009. 自然毒による食中毒. *日本調理科学会誌* 42 (4), 255-259.
- 今関六也, 大谷吉雄, 本郷次雄, 保坂健太郎, 細矢剛, 長澤栄史. 2011. 増補改訂新版 山溪カラー名鑑 日本のきのこ. 山と溪谷社, 東京.
- 西浩孝, 2015. カタツムリハンドブック. 文一総合出版, 東京.
- 池田良幸, 2013. 新版北陸のきのこ図鑑. 橋本確文堂, 石川.
- 東正雄, 1995. 原色日本陸産貝類図鑑. 保育社.
- 北林慶子, 都野展子, 保坂健太郎, 矢口行雄, 2016. 菌食性双翅目幼虫の消化管内担子菌胞子. *日本菌学会会報* 57 (1), 69-76.
- 本郷次雄, 2006. 新装版山溪フィールドブックス7 きのこ. 山と溪谷社, 東京.

## 要旨

キノコは様々な匂いを生産するが、その生態学的意義は明らかにされていない。植物は匂いを利用して送粉者や捕食者を忌避・誘引させており、同様に菌類の“花”であるキノコも、動物散布や被食防御に匂いを利用していると考えられる。しかし、ほとんどの菌類の匂い成分や、その経時変化、またキノコの匂いと動物に対する反応については十分に研究されていなかった。そこで本研究では、キノコの匂いを用いた動物とのコミュニケーションを調べることで、キノコの匂いの生態学的な機能を明らかにし、菌類の孢子散布戦略の理解を深めることを目的とした。キノコの匂いの生態学的意義を明らかにするには、(1) 菌食性動物の孢子散布能力 (2) 広い分類群のキノコの匂い成分に対する、菌食性動物の反応 (3) 菌食性動物が忌避・誘引反応を示す、キノコの匂い成分、の3点を調べる必要がある。そこで、本研究は菌食性動物として、ヤマナメクジとショウジョウバエに注目した。本研究ではこれら2種を実験動物に用いることで、これまで実験が困難だった、忌避・誘引する菌種の同定や匂い成分の検出、さらに個々の菌類の匂い成分の菌食性動物に対する効果について、多種の菌類間で比較することを可能にした。

まず、ヤマナメクジの孢子散布能力を検証した。ヤマナメクジの生息場所を調査すると、全113個体の捕獲場所は倒木が68%で最も多く(77個体)、続いて子実体20%(22個体)、樹上7%(8個体)、地上5%(6個体)の順であった。次に、ヤマナメクジの摂食物と孢子の摂食の有無を調べるために、捕獲した個体34個体の排泄物を観察したところ、73.5%(25個体)で担子菌類の孢子が観察された。それから、ヤマナメクジが摂食している菌類種を明らかにするために、野外で採集したヤマナメクジ8個体の排泄物中の菌相を解析した結果、計288,630 OTU 配列を検出した。そのうち、54.9%が子囊菌門、43.4%が担子菌門、

と約半数ずつであった。担子菌門の菌相は、66.1%がハラタケ目の腐生菌で、29.7%が Trichosporonales、次に Hymenochaetales の木材腐朽菌が上位で検出した担子菌 18 目のうち、6 目が木材腐朽菌と最も多かった。次に、排泄した孢子について、排泄する孢子量と体内滞留期間を調べたところ、ヤマナメクジの孢子排泄期間は、最長 7 日、最短 2 日、平均 4.23 日であった。1 日の平均排泄孢子数の推定値は、1 日目に最大 104022728.3 個、6 日目に最小 21501 個であり、7 日目には 51501 個と推定された。発芽実験により、排泄物中の孢子とコントロール孢子の発芽率を比較すると、すべての菌種の孢子でコントロールよりも高いか同程度の発芽率を示していた。また孢子は、培地での培養前の排泄物中でも、ヒラタケ 7.5%、トキイロヒラタケ 4.3%、ナラタケモドキ 3.75%の発芽率を示していた。最後に、林床でのヤマナメクジの移動距離と移動パターンを調査した。5 時間の移動距離は最大 10.35m で、移動距離 3m 未満の個体は 5 個体、3m 以上の個体数は 10 個体であった。また、ヤマナメクジが移動中に到達した倒木の本数は、3m 未満移動したグループの平均本数は 0.2 本で、3m 以上移動したグループは 2 本で、活発な個体は複数の倒木を渡り歩く様子が観察された。以上のヤマナメクジの孢子散布能力に関する調査から、ヤマナメクジは多くの材上生のキノコの孢子を摂食し、数万～数千個の孢子を平均 4 日間排泄し続けており、主に、倒木上を好んで生息することがわかった。また、排泄した孢子は発芽力を保持（または促進）していた。これら結果から、ヤマナメクジは他の孢子散布動物に比べて移動力が乏しいものの、発芽能力を保持した状態の孢子を、主に材上生のキノコの生息環境に適した倒木に運搬する確率が高いと考えられる。また、実際にヤマナメクジは木材腐朽菌を最も摂食していたことから、ヤマナメクジは材上生の腐生菌や木材腐朽菌に適した孢子散布者としての潜在能力を有することが示唆された。

続いて、ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性を調査するため、キノコ

の子実体全 7 目 14 科 19 属 43 種を用いた嗜好性実験を行った。その結果、ヤマナメクジは外生菌根菌であるアケボノドクツルタケとニセクロハツのみに、100%の忌避率を示した。一方、木材腐朽菌とリター分解菌には忌避反応を示さなかった。次に、ヤマナメクジがアケボノドクツルタケに含まれるアマニチン毒を忌避した可能性を検証するために、アマニチン毒耐性の評価を行った。その結果、1000 $\mu$ g/ $\mu$ l、100 $\mu$ g/ $\mu$ l、10 $\mu$ g/ $\mu$ l すべての濃度で全個体が生存しており、ヤマナメクジは高いアマニチン毒耐性があることがわかった。これらのことから、ヤマナメクジはアケボノドクツルタケの匂いを忌避したと考えられる。

次に、嗜好性実験でヤマナメクジが 100%忌避した、アケボノドクツルタケの匂いの利用について明らかにするために、アケボノドクツルタケが生産する匂いからヤマナメクジとショウジョウバエ 3 種に忌避効果のある成分の同定を行った。まず、アケボノドクツルタケに含まれる忌避効果のある匂い成分を検出するため、野外で採集した子実体の匂い成分分析を行った。全 4 目 8 科 11 属 22 種の子実体の分析の結果、種・成熟度・捕集方法別に 48 試料から 65 種の匂い成分が検出された。これらのうち、アケボノドクツルタケから検出された匂い成分から、忌避効果のある匂い成分候補を 6 種選出した。これら選出した匂い成分を試料に用いて、ヤマナメクジの反応の観察を行った。その結果、アケボノドクツルタケの腐敗期に産生される Dimethyl trisulfide (DMTS) を含む試料に対して 100%の忌避率を示した。また、アケボノドクツルタケの孢子散布期に生産する成分である 1-Pentanol、Ethyl butyrate、2-Propyl-1-pentanol に対しては忌避効果を示した。これらの結果から、アケボノドクツルタケは、孢子生産期～散布期には 1-Pentanol、Ethyl butyrate、2-Propyl-1-pentanol、そして腐敗期には DMTS を用いて、ヤマナメクジによる被食を回避している可能性が示唆された。

次に、ショウジョウバエ 3 種の菌食性 *D. anguraris*、バクテリア食性 *D. busckii*、

果実食性 *D. melanogaster* の匂い成分に対する反応を観察した。その結果、*D. anguralis* と *D. busckii* ではすべての匂いで誘引や忌避の反応はみられなかった。一方、*D. melanogaster* は 1-pentanol とその他成分を 2 つ以上の組み合わせと、3-octanone、2-propyl-1-pentanol、Ethyl butyrate に対して、忌避反応が認められた。以上で観察された *D. melanogaster* と *D. anguralis*、*D. busckii* 2 種の反応の違いは、種ごとの食性や幼虫の生息環境の違いを反映している可能性があることが示唆された。

本研究では、ヤマナメクジは木材腐朽菌と生息地を共有し、孢子散布に貢献していること、外生菌根菌のアケボノドクツルタケが生産する 5 種の匂い成分がヤマナメクジを忌避させていること、ショウジョウバエ 3 種間で匂い成分に対する感受性がことなること、以上のことが明らかになった。

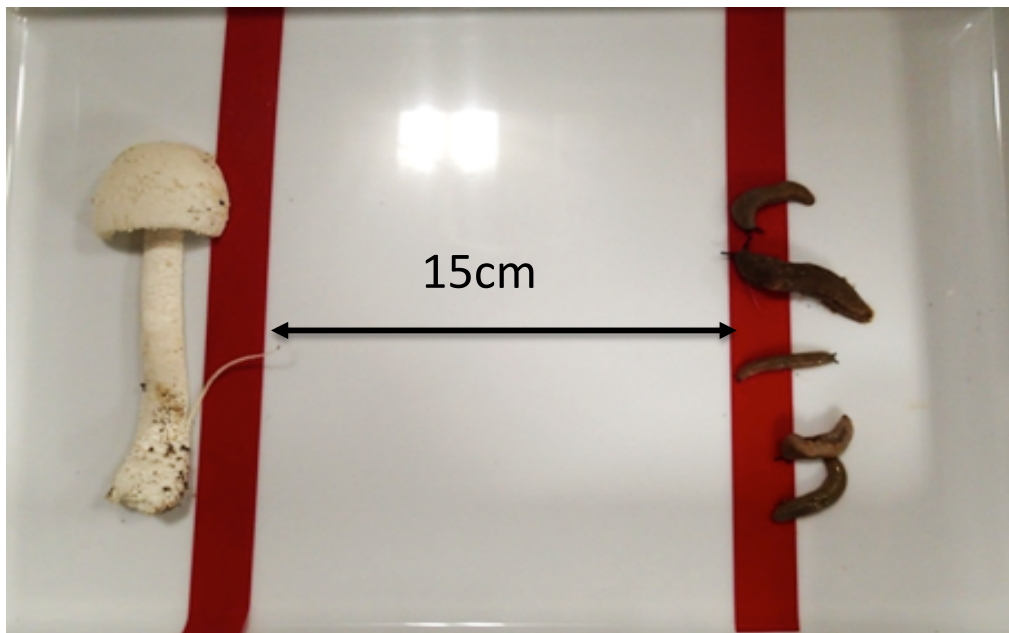


Fig.1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査

- ① バット上に野外で採集したキノコと3日以上絶食させたヤマナメクジ5匹を15cm離して置き、15分間行動を観察した.
- ② 摂食しなかったヤマナメクジの個体数の割合を忌避率として算出した.

Table 1 ヤマナメクジのキノコ菌種に対する嗜好性の調査

目	科	属	種	Fungal species	Development stages	生態学的グループ	非摂食率(%)	ナメクジ個体数 (1試験5匹ずつ)	使用したキノコの数			
ハラタケ目	テングタケ科	テングタケ属	アケボノドクツルタケ	<i>Amanita pallidorosea</i>	mature	外生菌根菌	100	25	5			
			アケボノドクツルタケ(幼)	<i>Amanita pallidorosea</i>	immature	外生菌根菌	100	15	3			
			ドクツルタケ	<i>Amanita virosa</i>	mature	外生菌根菌	90	10	2			
			テングタケダマシ	<i>Amanita sychnopyraxis</i>	mature	外生菌根菌	80	10	2			
			シロテングタケ	<i>Amanita neoovoidea</i>	mature	外生菌根菌	70	10	2			
			テングタケ	<i>Amanita pantherina</i>	mature	外生菌根菌	70	10	2			
			クサミノシロテングタケ	<i>Amanita sp.</i>	mature	外生菌根菌	60	10	2			
			シロオニタケ	<i>Amanita virgineoides</i>	immature	外生菌根菌	60	10	2			
			シロウロコツルタケ	<i>Amanita clarisquamosa</i>	mature	外生菌根菌	60	10	2			
			シロウロコツルタケ(幼)	<i>Amanita clarisquamosa</i>	immature	外生菌根菌	50	10	2			
			ヘビキノコモドキ	<i>Amanita spissacea</i>	mature	外生菌根菌	40	10	2			
			ヘビキノコモドキ(幼)	<i>Amanita spissacea</i>	immature	外生菌根菌	30	10	2			
			コテングタケモドキ	<i>Amanita pseudoporphyraria</i>	mature	外生菌根菌	35	10	2			
			ツルタケ	<i>Amanita vaginata</i>	mature	外生菌根菌	40	10	2			
			タマゴタケ	<i>Amanita caesareoides</i>	mature	外生菌根菌	10	10	2			
			タマゴテングタケモドキ	<i>Amanita longistriata</i>	mature	外生菌根菌	0	10	2			
			カバイロツルタケ	<i>Amanita fulva</i>	mature	外生菌根菌	0	10	2			
			カバイロツルタケ(幼)	<i>Amanita fulva</i>	immature	外生菌根菌	0	10	2			
			イグチ目	フウセンタケ科	フウセンタケ属	カワムラフウセンタケ	<i>Cortinarius purpurascens</i>	mature	外生菌根菌	40	10	2
				ヒドナンギウム科	キツネタケ属	カレバキツネタケ	<i>Laccaria vinaceoavellanea</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2
				タマバリタケ科	ナラタケ属	ナラタケモドキ	<i>Armillaria tabescens</i>	mature	木材腐朽菌	10	10	2
				ヒラタケ科	ヒラタケ属	ヒラタケ	<i>Pleurotus ostreatus</i>	mature	木材腐朽菌	10	10	2
				キシメジ科	ハイイロシメジ属	ドクササコ	<i>Paralepistopsis acromelalga</i>	mature	リター分解菌	30	10	2
イグチ科	ニガイグチ属	ウススキニガイグチ		<i>Tylophilus alkalixanthus</i>	immature	外生菌根菌	70	10	2			
		オクヤマニガイグチ		<i>Tylophilus rigens</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2			
		チャニガイグチ		<i>Tylophilus ferrugineus</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2			
		クリイロニガイグチ		<i>Tylophilus castanoides</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2			
		キニガイグチ		<i>Tylophilus ballouii</i>	mature	外生菌根菌	0	10	2			
ベニタケ目		オニイグチ属	オニイグチモドキ	<i>Strobilomyces confusus</i>	mature	外生菌根菌	60	10	2			
		キクバナイグチ属	キクバナイグチ	<i>Boletellus floriformis</i>	mature	外生菌根菌	40	10	2			
		ヤマイグチ属	アケボノアワタケ	<i>Leccinum chromapes</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2			
		イグチ属	アワタケ	<i>Boletus subtomentosus</i>	mature	外生菌根菌	0	10	2			
			ヒメアワタケ	<i>Xerocomus parvulus</i>	mature	外生菌根菌	0	10	2			
		イチョウタケ科	イチョウタケ属	ニワタケ	<i>Tapinella atrotomentosa</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2		
		ショウロ科	ショウロ属	ショウロ	<i>Rhizopogon roseolus</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2		
		ベニタケ科	ベニタケ属	ニセクロハツ	<i>Russula subnigricans</i>	mature	外生菌根菌	100	10	2		
			ヤブレベニタケ	<i>Russula xerampelina</i>	mature	外生菌根菌	0	10	2			
			チチタケ属	アオゾメツチカブリ	<i>Lactarius glaucescens</i>	mature	外生菌根菌	40	10	2		
アンズタケ目			チチタケ	<i>Lactarius volemus</i>	mature	外生菌根菌	40	10	2			
	アンズタケ科	アンズタケ属	アンズタケ	<i>Cantharellus cibarius</i>	mature	外生菌根菌	20	10	2			
	イボタケ目	イボタケ科	イボタケ属	ボタンイボタケ	<i>Thelephora aurantiotincta</i>	mature	外生菌根菌	0	10	2		
	タバウロコタケ目	タバウロコタケ科	カワウソタケ属	カワウソタケ	<i>Inonotus mikadoi</i>	mature	木材腐朽菌	80	10	2		
	タマチョレイタケ目	タマチョレイタケ科	カワラタケ属	カワラタケ	<i>Trametes versicolor</i>	mature	木材腐朽菌	20	10	2		
			カワラタケ(幼)	<i>Trametes versicolor</i>	immature	木材腐朽菌	60	10	2			
		ウチワタケ属	ツヤウチワタケ	<i>Microporus vernicipes</i>	mature	木材腐朽菌	20	10	2			
			クジラタケ	<i>Trametes orientaris</i>	mature	木材腐朽菌	30	10	2			
		シハイタケ属	ハカワラタケ	<i>Trichaptum biforme</i>	mature	木材腐朽菌	20	10	2			
		ニクウチワタケ属	ニクウチワタケ	<i>Abortiporus biennis</i>	mature	木材腐朽菌	10	10	2			
平均							36.14583333					
誤差							4.299924705					

平均 36.14583333

誤差 4.299924705







Fig. 3 嗜好性実験結果

ヤマナメクジがアケボノドクツルタケを忌避している様子

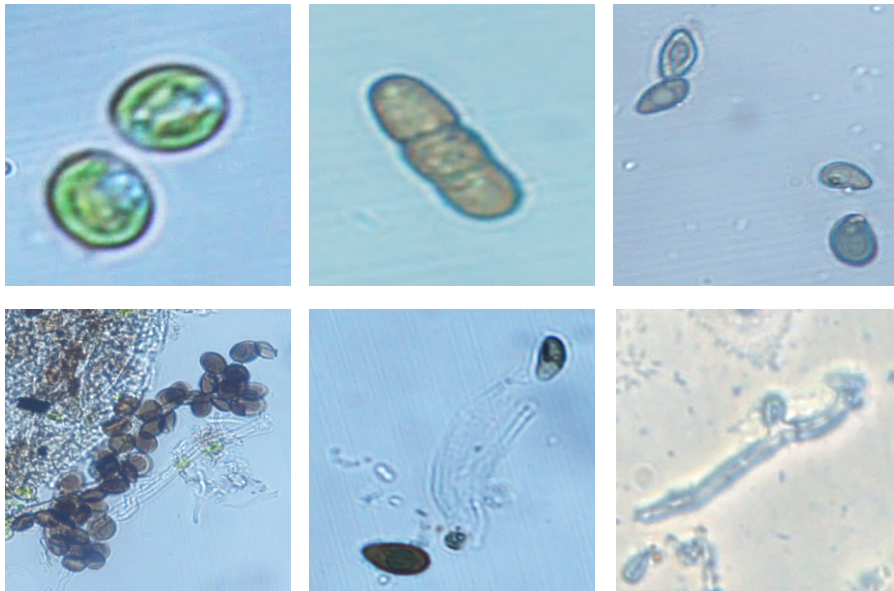
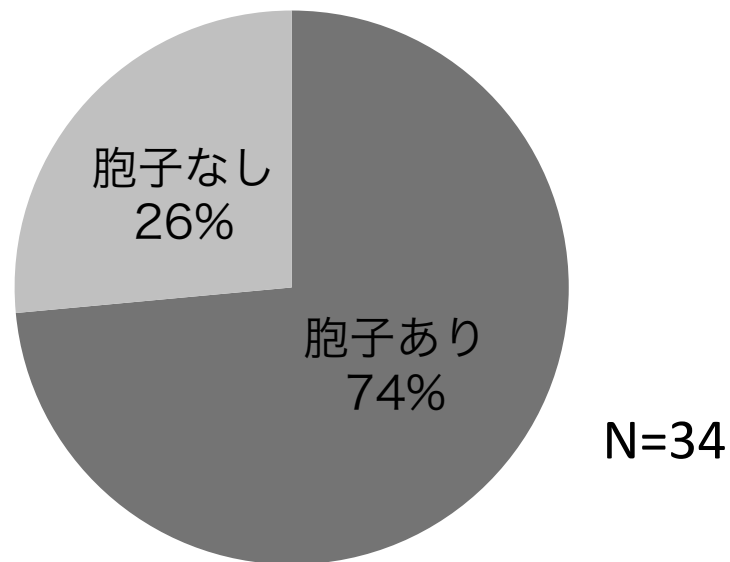
Table 2 ヤマナメクジの生息場所別（倒木、子実体、地上、樹上）の個体数(Adult, Young別)

Year	Dead wood		Fruit body		Ground		Tree		Total
	Adult	Young	Adult	Young	Adult	Young	Adult	Young	
2016	25	23	10	0	4	0	0	0	62
2017	9	13	9	0	2	0	3	1	37
2018	4	3	3	0	0	0	3	1	14
Total	38	39	22	0	6	0	6	2	113



Fig. 4 捕獲したヤマナメクジの生息場所ごとの成体と幼体の割合.  
総捕獲個体数113個体, 成体(■), 幼体(■)を示す.

## 排泄物中に孢子を発見した割合



排泄物中で発見した孢子形態のもの

Fig. 5 捕獲したヤマナメクジの排泄物中の内容物の観察結果

Table. 3 ヤマナメクジ8個体の排泄物中の菌類相(全OTU配列数 288,630)

[illegible]

Table. 4 ヤマナメケジ排泄物中の担子菌類相(OUT配列数10未満は除外)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Total	Rate(%)	slug-1	slug-2	slug-3	slug-4	slug-5	slug-6	slug-7	slug-8				
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae	Disciseda	Disciseda candida	29	0.02	0	0	0	0	0	29	0	0				
			Leucoagaricus	Leucoagaricus croceobasis	21	0.01	9	10	2	0	0	0	0	0					
		Inocybaceae	Simocybe	Simocybe sumptuosa	778	0.46	3	0	0	0	775	0	0	0	0	0			
			Crepidotus	Crepidotus crocophyllus	22	0.01	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0		
		Hymenochaetales	Physalaciaceae	Armillaria	Armillaria socialis	60553	35.72	19772	3421	30933	6427	0	0	0	0	0	0		
			Pluteaceae	Pluteus	Pluteus cervinus	12	0.01	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0		
			Strophariaceae	Gymnopilus	Gymnopilus patriae	50520	29.80	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0		
			Hymenochaetales	Trichaptum	Trichaptum biforme	619	0.37	0	0	0	0	0	0	0	0	619	0	0	
				Trichaptum	Trichaptum abietinum	4250	2.51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4250	0	0
			Hymenochaetaceae	Inonotus	unidentified	15	0.01	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Phallales	Schizoporaceae	Hyphodontia	Hyphodontia pallidula	11	0.01	0	0	0	0	0	0	11	0	0			
			Phallaceae	Phallus	unidentified	10	0.01	7	0	0	0	0	0	3	0	0	0		
		Polyporales	Ganodermataceae	Ganoderma	Ganoderma adpersum	46	0.03	0	0	0	0	0	2	11	0	33	0		
			Meruliaceae	Phlebia	unidentified	13	0.01	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Phanerochaetaceae	Phanerochaete	unidentified	10	0.01	0	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
		Polyporaceae	Ceriporia	Ceriporia lacerata	100	0.06	0	0	0	0	0	0	7	20	73	0	0		
		Russulales	Lachnocladiaceae	Perenniporia	Perenniporia koreana	27	0.02	9	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	
			Stereaceae	Scytinostroma	unidentified	23	0.01	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	
		Trechisporales	Stereum	Stereum hirsutum	173	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0	173	0	0	0	
			Trechispora	unidentified	578	0.34	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	
		Telephorales	Telephoraceae	Tomentella	Tomentella papuae	47	0.03	0	0	0	47	0	0	0	0	0	0		
			Chionosphaeraceae	Kurtzmanomyces	Kurtzmanomyces insolitus	73	0.04	0	0	0	0	0	0	58	0	15	0	0	
		Agaricostilbomycetes	Atractiellales	Leucogloea	unidentified	64	0.04	24	5	12	0	0	0	23	0	0	0	0	
			Agaricostilbomycetes	Cystobasidiopsis	Cystobasidiopsis lactophilus	11	0.01	0	0	0	0	0	0	4	0	7	0	0	
		Exobasidiales	Exobasidiaceae	Exobasidium	unidentified	18	0.01	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	
			Sporidiobolales	Ballistosporomyces	Ballistosporomyces xanthus	44	0.03	0	0	0	0	0	0	44	0	0	0	0	
		Ustilaginomycotina	Tremellomycetes	Malasseziaceae	Sporobolomyces	unidentified	135	0.08	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	
					Rhodotorula	Rhodotorula cycloclastica	67	0.04	0	0	0	0	20	0	47	0	0	0	0
				Filobasidiales	Malassezia	Malassezia restricta	57	0.03	20	33	0	0	4	0	0	0	0	0	
					Piskurozyma	Piskurozyma cylindrica	66	0.04	56	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Cystoflobasidiales	Cystoflobasidiaceae	Guehomyces	Guehomyces pullulans	52	0.03	0	0	0	7	31	0	14	0	0	0		
			Phaeotremellaceae	Phaeotremella	unidentified	48	0.03	33	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Trichosporonales	Trichosporonaceae	Vanrija	Vanrija humicola	49038	28.93	19914	17901	10255	919	0	0	0	0	49	0	0	
				Trichosporon	unidentified	1211	0.71	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				Tremellales	Trichosporon	Trichosporon vanderwaltii	16	0.01	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	
					Saitozyma	Saitozyma podzolica	438	0.26	161	210	51	0	0	0	16	0	0	0	0
					Trichosporon	Trichosporon vanderwaltii	16	0.01	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	
					Saitozyma	Saitozyma podzolica	438	0.26	161	210	51	0	0	0	16	0	0	0	0
					Papiliotrema	Papiliotrema flavescens	10	0.01	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
					Cryptococcus	unidentified	154	0.09	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tritirachiomycetes	Tremellales	Kockovaella	Kockovaella barringtoniae	11	0.01	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0		
			Tritirachiomycetes	Tritirachium	20	0.01	19	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
					Total	169410	99.94	40046	21633	41312	7450	843	147	5238	177				

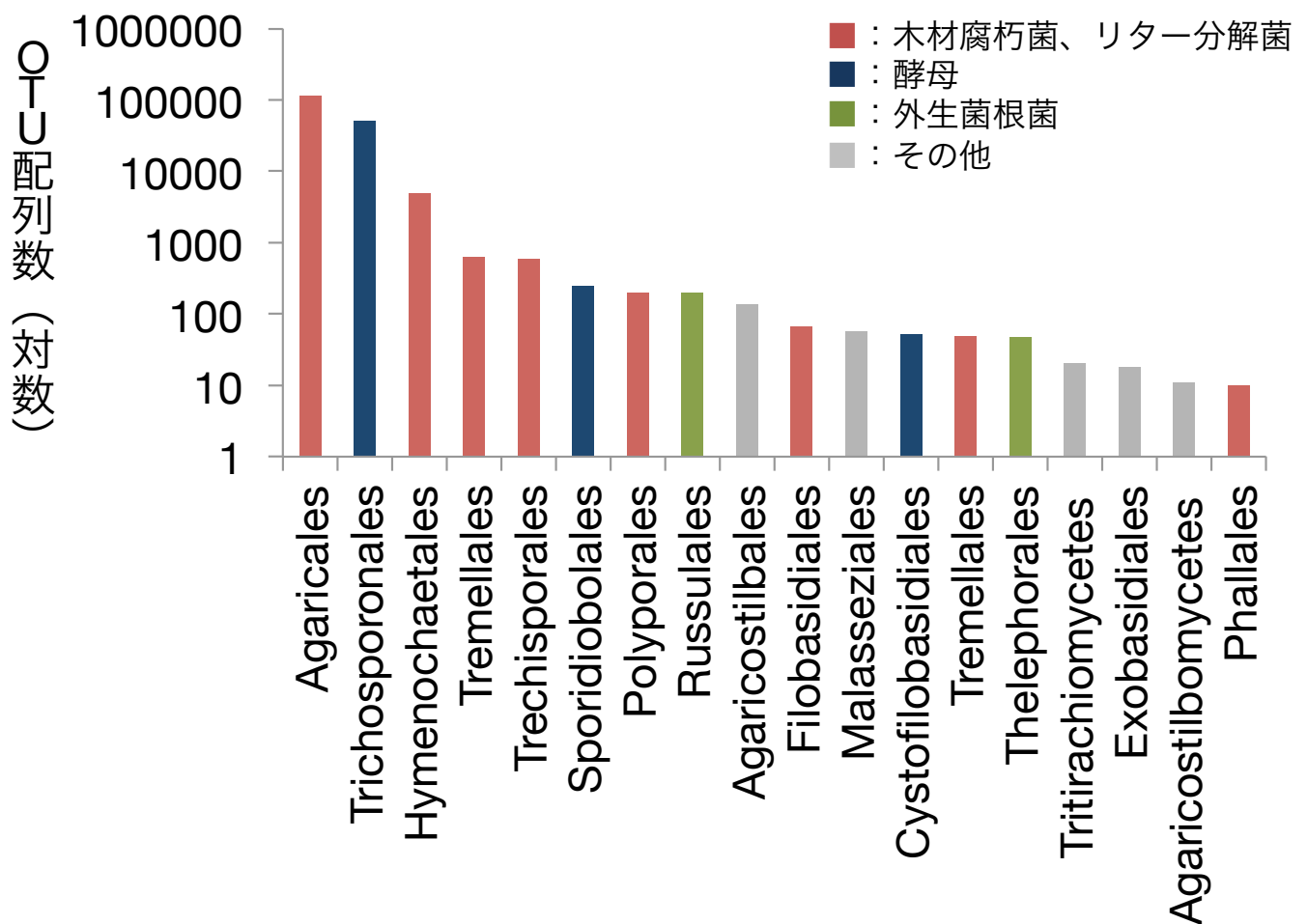


Fig. 6 ヤマナメクジ排泄物中の担子菌相(目レベル)

各分類群ごとの生態を木材腐朽菌, リター分解菌(■), 酵母(■), 外生菌根菌(■), その他(■)と示す.



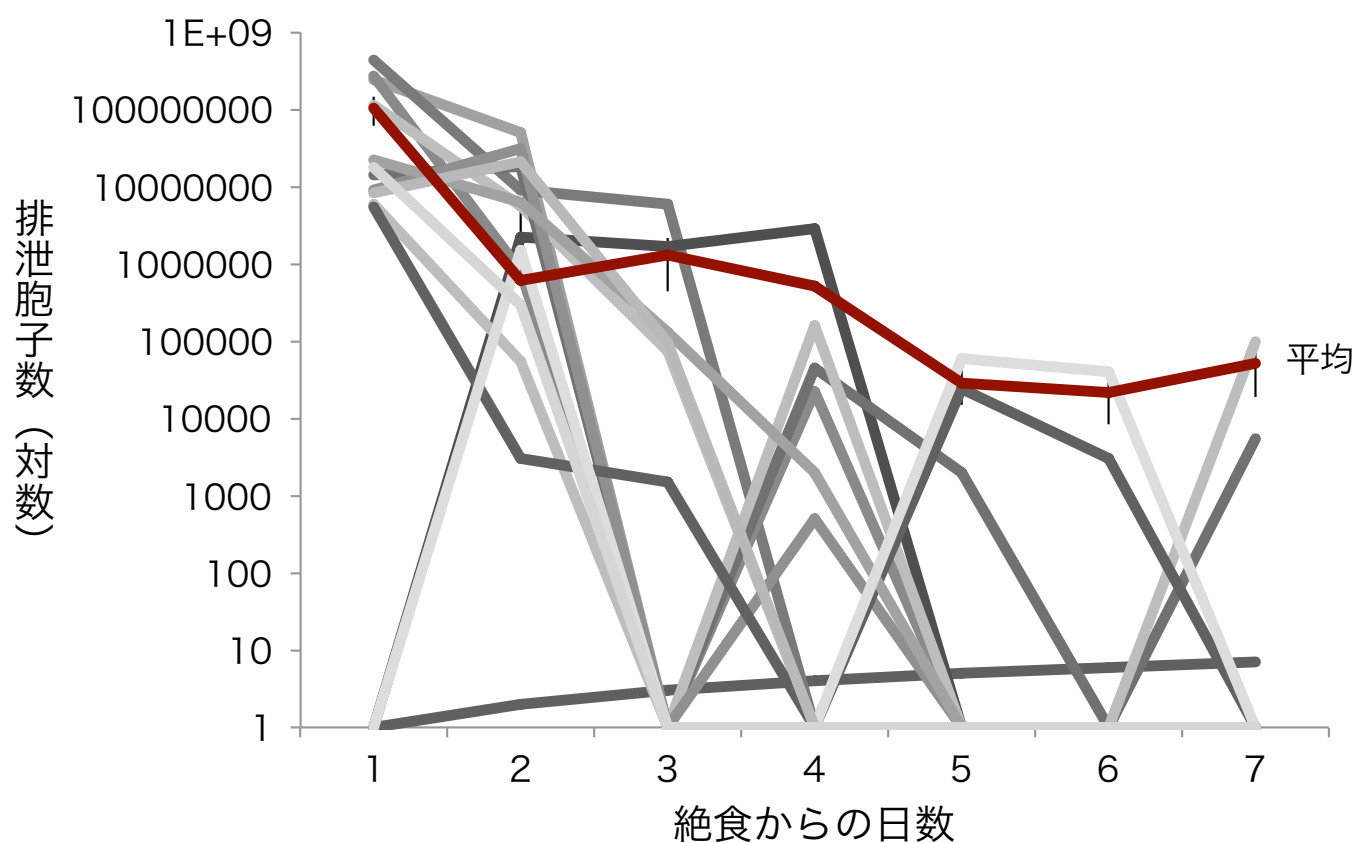


Fig. 7 ヤマナメクジが1日に排泄する孢子量(推定)と体内滞留時間  
 1日目に最大104,022,728.3(SE±42,392,111.89)個、  
 6日目に最小21,501(SE±13,081.48) 個、  
 7日目は51,501(SE±32,526.91)個の孢子を排泄した.

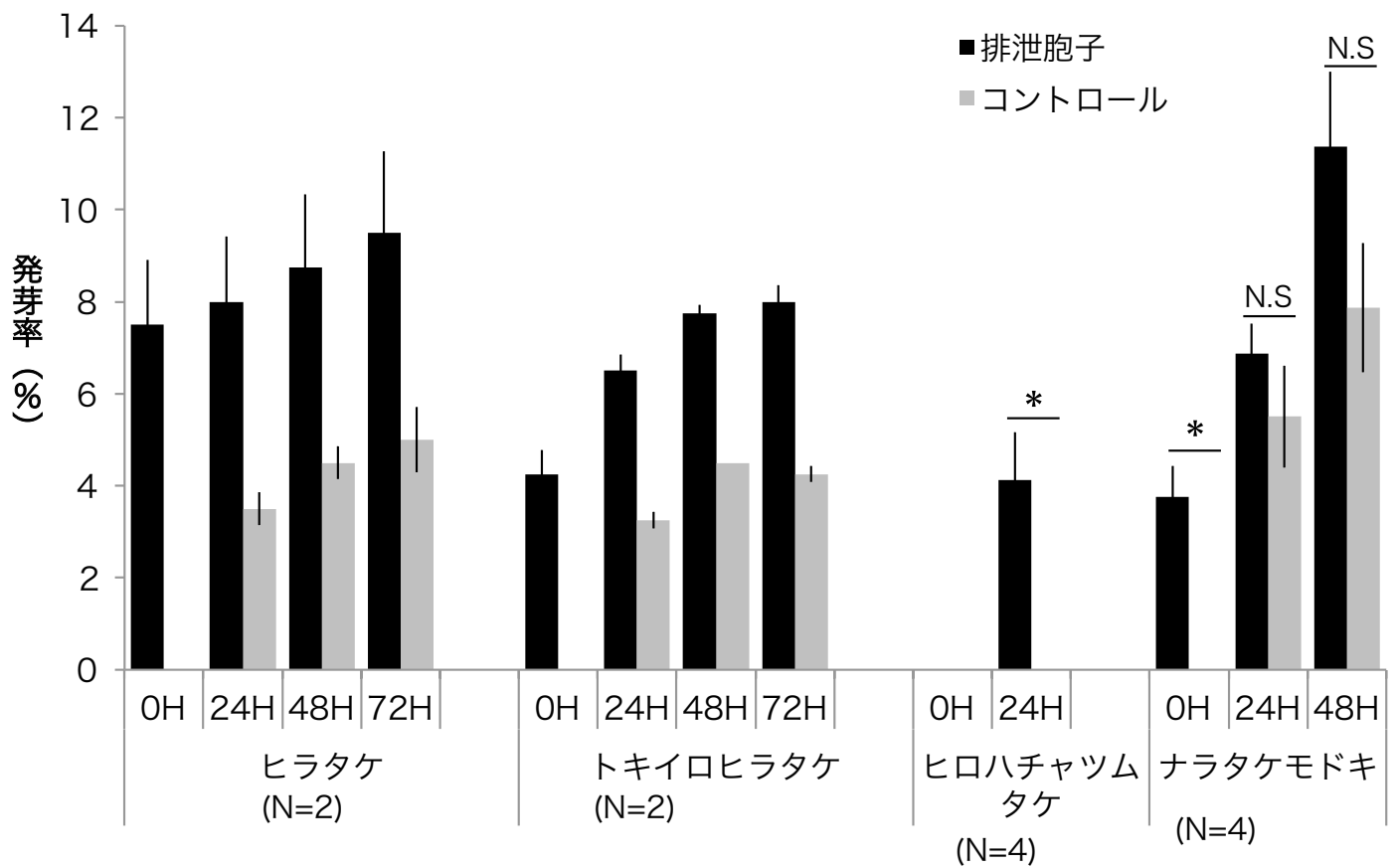


Fig. 8 発芽実験結果

ランダムに孢子200個を数えたうち、発芽している孢子を記録した。

N=4のヒロハチャツムタケとナラタケモドキはt検定でコントロールとの比較を行った。\* =  $P < 0.05$ .

排泄孢子(■), コントロール孢子(■) を示す.

Table. 5 排泄された胞子の発芽実験

1サンプルごとにランダムに胞子200個を数えたうち、発芽している胞子を記録した

N=4のヒロハチャツムタケとナラタケモドキはt検定でコントロールとの比較を行った。\* =  $P < 0.05$ 

菌種	処理区	N (サンプル数)	発芽率±誤差 (1サンプルの計測胞子数=200)						
			0H	P値 (t検定)	24H	P値 (t検定)	48H	P値 (t検定)	72H
ヒラタケ	排泄胞子	2	7.5±1.41	–	8.0±1.41	–	8.75±1.59	–	9.5±1.77
	コントロール	2	0.00	–	5.25±0.53	–	7.0±0.35	–	7.75±0.88
トキイロヒラタケ	排泄胞子	2	4.3±0.53	–	6.5±0.35	–	7.8±0.17	–	8.0±0.35
	コントロール	2	0	–	3.3±0.17	–	4.55±0	–	4.3±0.17
ヒロハチャツムタケ	排泄胞子	4	0	–	4.13±1.04	0.041*	–	–	–
	コントロール	4	0	–	0		–	–	–
ナラタケモドキ	排泄胞子	4	3.75±0.67	0.017*	6.88±0.65	0.37	11.38±1.61	0.21	–
	コントロール	4	0		5.50±1.1		7.88±1.41		–

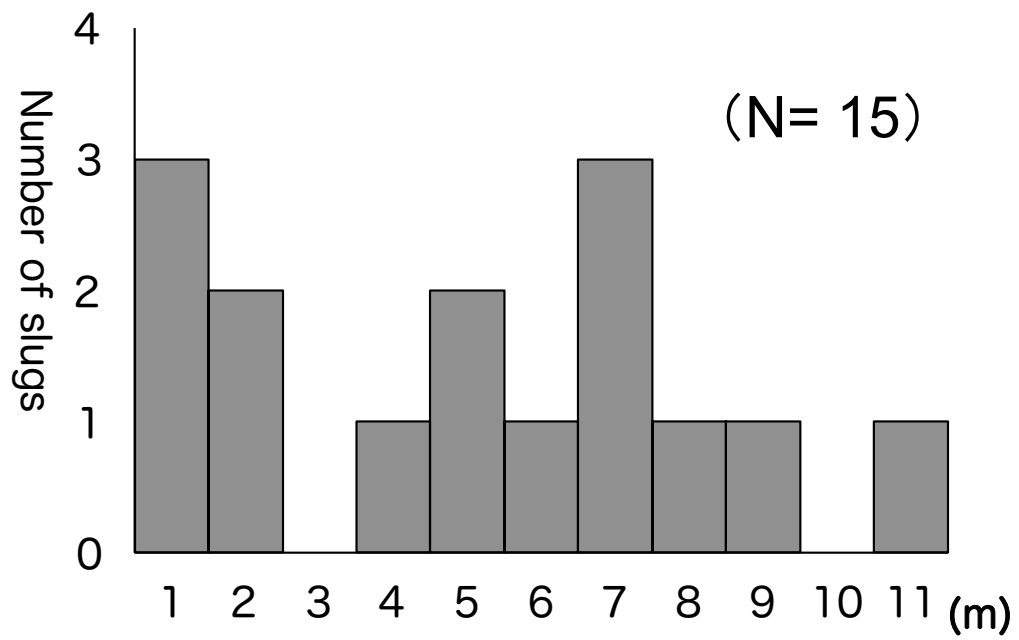


Fig. 9 ヤマナメクジの移動距離の頻度分布

Table.6 ヤマナメクジの移動距離と到達した倒木の本数

	N	平均移動距離 (m)	±SE	平均 倒木本数	±SE
全個体	15	4.55	0.790	1.4	0.398
3m以上移動した個体	10	6.35	0.640	2	0.490
3m未満の個体	5	0.95	0.210	0.2	0.179

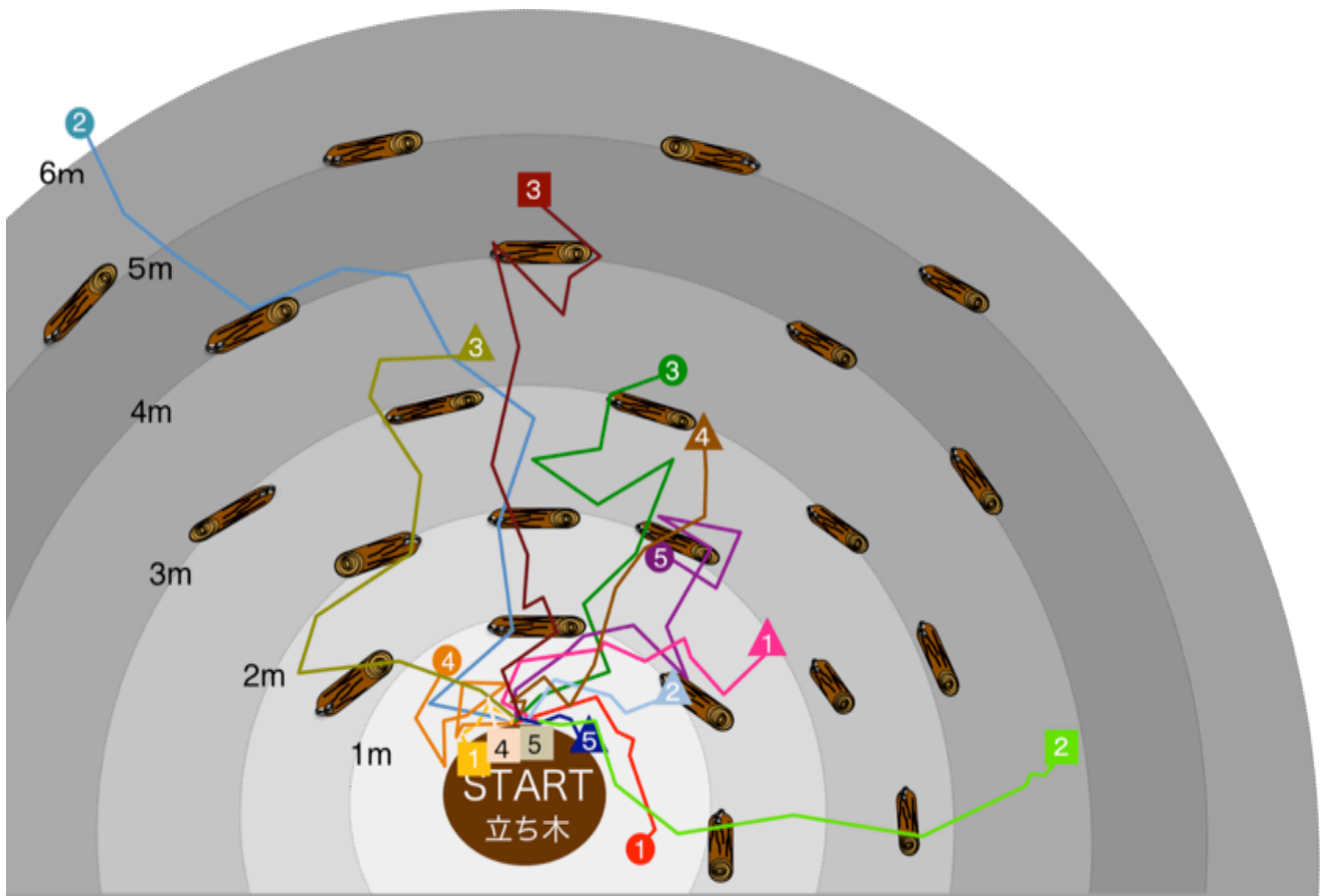


Fig. 10 ヤマナメクジの移動範囲の模式図

ヤマナメクジ（各番号）がスタート地点から5時間で移動した経路を示した.

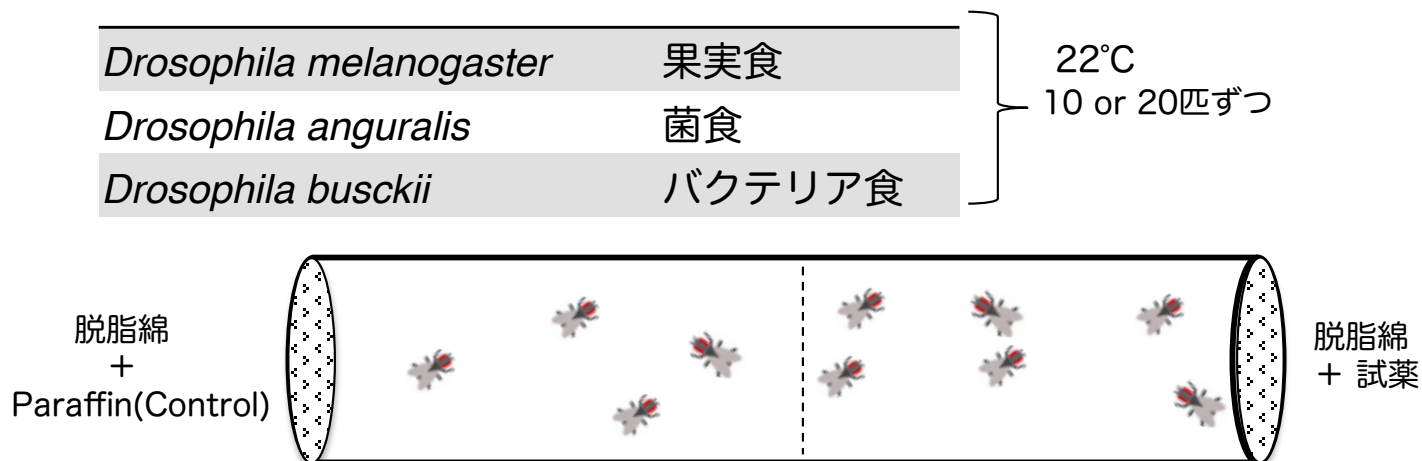


Fig. 11 匂い成分に対するショウジョウバエ3種の反応の観察の方法

- ① 15cmの透明のチューブの両端に脱脂綿を貼り、片方ずつに1μl/mlの試薬とParaffinを500μl染み込ませる。
- ② チューブの中に各種ショウジョウバエを10 or 20匹入れ、5分後、センターラインから左右の個体数を数える
- ③ チューブを振り、ハエを拡散させ、再び5分間後の個体数を数える
- ④ 以上の観察を3回繰り返し、試薬側とControl側の平均個体数を求め、以下の式でAttractive scoreを算出して比較した。

$$\text{Attractive Score} = \frac{\text{試薬側の平均個体数} - \text{Control側平均個体数}}{\text{全体の個体数}}$$

Table. 7 匂い成分分析したキノコ種リスト

目	科	属	種	成長段階	捕臭部分	子実体数
ハラタケ目	テングタケ科	テングタケ属	アケボノクツルタケ	幼	破片	2
					全体	2
				成	破片	14
					全体	4
			ヘビキノコモドキ	幼	破片	2
					全体	1
				成	破片	2
					全体	4
			シロオニタケ	幼	破片	3
					全体	2
				成	破片	1
					全体	3
			タマゴタケ	老	全体	2
			フクロツルタケ	幼	破片	1
				成	破片	1
			コテングタケモドキ	幼	全体	1
				成	破片	1
					全体	1
			カバイロツルタケ	成	破片	3
					全体	1
	ナヨタケ科	ヒトヨタケ属	ヒトヨタケ	成	破片	1
	ヒラタケ科	ヒラタケ属	ヒラタケ	成	破片	1
	キシメジ科	イチョウタケ属	ニワタケ	成	全体	1
	モエギタケ科	チャツムタケ属	オオワライタケ	成	破片	1
					全体	1
イグチ目	イグチ科	ニガイグチ属	アケボノアワタケ	幼	破片	1
				成	破片	1
				老	破片	1
			ウスキニガイグチ	成	破片	1
			ブドウブガイグチ	成	全体	1
		イグチ属	クロアザアワタケ	成	破片	1
		ヌメリイグチ属	チチアワタケ	成	破片	1
		キクバナイグチ属	キクバナイグチ	老	破片	1
ベニタケ目	ベニタケ科	ベニタケ属	ヒビワレシロハツ	幼	破片	1
			クサハツ	成	破片	1
			クロハツ	幼	破片	1
			ニオイコベニタケ	幼	破片	1
				成	破片	1
タマチヨレイタケ目	サルノコシカケ科	カワラタケ属	カワラタケ	成	全体	1
合計						71



Table 8-1. テングタケ属のキノコから検出した匂い成分組成

幼: 幼菌, 成: 成菌, 老: 老菌, 塗りつぶし(■)が検出した成分を示す

匂い成分名	テングタケ目																								合計				
	アケボノドクツルタケ				ヘビキノコモドキ				シロオニタケ				フクロツルタケ				コテングタケモドキ				タマゴタケ					カバイロツルタケ			
	破片		全体		破片		全体		破片		全体		破片		破片		全体		破片		全体		破片			全体			
	幼	成	幼	成	幼	成	幼	成	幼	成	成	幼	老	幼	成	成	幼	成	成	成	成	成	成	成		成			
1 1-Pentanol	■	1	0	1	1	1	0	■	1	1	1	1	0	■	1	1	1	1	0	0	■	1	0	0	0	14			
2 2-methyl-1-Butanol	■	1	0	0	1	1	0	0	■	1	1	1	0	■	1	0	1	1	0	0	0	0	0	■	1	11			
3 3-methyl-1-Butanol	0	■	0	0	1	0	0	0	■	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3			
4 2,3-Butanediol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
5 Phenylethyl Alcohol	0	■	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	1	0	0	0	0	0	■	1	5			
6 Orcinol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
7 2-Propyl-1-pentanol	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
8 4-methyl-Phenol	■	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
9 2-methyl-3-Penten-1-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
10 4-Pentenyl alcohol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
11 3-Pentanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	0	0	0	0	0	0	0	1			
12 4-Penten-1-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	0	■	0	■	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3			
13 Benzyl alcohol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
14 1-Butanol	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
15 2-methyl-1-Pentanol	■	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
16 3-Octanol	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
17 1-Octen-3-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	0	0	■	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
18 Linalol	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
19 3-Octanone	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	11			
20 2-Pentanone	0	■	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
21 1,3-Octadiene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4			
22 1,2-Benzene	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
23 1,2-dichloro-benzene	■	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	12			
24 1,4-dichloro-Benzene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
25 Indole	■	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6			
26 D-Limonene	0	0	0	0	0	0	0	0	■	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3			
27 Benzoic acid	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
28 Dimethyl trisulfide	■	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5			
29 Dimethyl tetrasulfide	■	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4			
30 Dimethyl disulfide	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3			
31 Dimethyl pentasulfide	■	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3			
32 Cyclic octaatomic sulfur	■	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
33 Sulfurous acid, dipentyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
34 Guaia-3,9-diene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
35 1-Undecene	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5			
36 Cyclooctene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1			
37 Hexadecane	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
38 Tetradecane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
39 .alpha.-Murolene	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
40 .gamma.-Murolene	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
41 Styrene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4			
42 Benzaldehyde	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	3			
43 2-Butene ozonide	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
44 Ethyl butyrate	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3			
45 Butyric anhydride	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
46 Copaene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
47 Formic acid, hexyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
48 Dimethyl-diazene	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
49 3-methyl-1-butanol acetate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
50 3-ethyl-2,2-dimethyl-pentane	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
51 3-methyl-butanoic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
52 3-methyl-Octane	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
53 trans-calamenene	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
54 Tridecyl trifluoroacetate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1			
55 2-methyl- Propanoic acid ethyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
56 2,2-Dichloroethyl methyl ether	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
57 Phenol	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
58 Octyl cyclopropane	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
59 3,7-dimethyl-1,6-Octadien-3-ol	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
60 Tetramethyl pyrazine	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					

Table8-2. キノコから検出した匂い成分組成(テングタケ属以外)

幼: 幼菌, 成: 成菌, 老: 老菌, 塗りつぶし(■)が検出した成分を示す

匂い成分名	ニガイグチ属			イグチ属		ヌメリイグチ属		キクバナイグチ属		ベニタケ属			ヒトヨタケ属		ヒラタケ属		イチヨウタケ属		チャツムタケ属		カワラタケ属	
	アケボノアワタケ			ウドウニガイグチ		クロアザアワタケ		チチアワタケ		ヒビワレシロハツ			ニオイコベニタケ		ヒラタケ		ニワタケ		オオワライタケ		カワラタケ	
	破片			破片		破片		破片		破片			破片		破片		全体		破片		全体	
	幼	成	老	成	成	成	成	老	成	幼	成	幼	幼	成	成	成	成	成	成	成	成	
1 1-Pentanol	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	14
2 2-methyl-1-Butanol	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	13
3 3-methyl-1-Butanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 2,3-Butanediol	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
5 Phenylethyl Alcohol	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
6 Orcinol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
7 2-Propyl-1-pentanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8 4-methyl-Phenol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 2-methyl-3-Penten-1-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 4-Pentenyl alcohol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11 3-Pentanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
12 4-Penten-1-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13 Benzyl alcohol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14 1-Butanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 2-methyl-1-Pentanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 3-Octanol	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0
17 1-Octen-3-ol	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
18 Linalol	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
19 3-Octanone	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	6	0
20 2-Pentanone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
21 1,3-Octadiene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22 1,2-Benzene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23 1,2-dichloro-benzene	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0
24 1,4-dichloro-Benzene	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
25 Indole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26 D-Limonene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27 Benzoic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28 Dimethyl trisulfide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29 Dimethyl tetrasulfide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 Dimethyl disulfide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31 Dimethyl pentasulfide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32 Cyclic octaatomic sulfur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
33 Sulfurous acid, dipentyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34 Guaia-3,9-diene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
35 1-Undecene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36 Cyclooctene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37 Hexadecane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38 Tetradecane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
39 .alpha.-Murolene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 .gamma.-Murolene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41 Styrene	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
42 Benzaldehyde	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
43 2-Butene ozonide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44 Ethyl butyrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45 Butyric anhydride	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46 Copaene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47 Formic acid, hexyl ester	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
48 Dimethyl-diazene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49 3-methyl-1-butanol acetate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 3-ethyl-2,2-dimethyl-pentane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51 3-methyl-butanoic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52 3-methyl-Octane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53 trans-calamenene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54 Tridecyl trifluoroacetate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55 2-methyl- Propanoic acid ethyl ester	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
56 2,2-Dichloroethyl methyl ether	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57 Phenol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
58 Octyl cyclopropane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59 3,7-dimethyl-1,6-Octadien-3-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60 Tetramethyl pyrazine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61 Longifolene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62 1-ethylbutyl hydroperoxide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63 3-chloro- 2-Butanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64 Isovelleral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
65 3-methylbutyl ester Butanoic acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
合計	2	4	2	6	3	4	3	9	3	4	7	2	3	3	4	3	1	3	2	6		

Table 9 クラスタ解析で使用する菌種-成熟度-捕臭法の対応表  
Y: 幼菌, M: 成菌, O: 老菌, P: 破片, W: 全体

菌種-成熟度-捕臭方法	クラスタ表記
アケボノドクツルタケ-幼-破片	A. pallidorozea -Y-P
アケボノドクツルタケ-成-破片	A. pallidorozea -M-P
アケボノドクツルタケ-幼-全体	A. pallidorozea -Y-W
アケボノドクツルタケ-成-全体	A. pallidorozea -M-P
ヘビキノコモドキ-幼-破片	A. spissacea-Y-P
ヘビキノコモドキ-成-破片	A. spissacea-M-P
ヘビキノコモドキ-幼-全体	A. spissacea-Y-W
ヘビキノコモドキ-成-全体	A. spissacea-M-W
シロオニタケ-幼-破片	A. virgineoides-Y-P
シロオニタケ-成-破片	A. virgineoides-M-P
シロオニタケ-幼-全体	A. virgineoides-Y-W
シロオニタケ-成-全体	A. virgineoides-M-W
シロオニタケ-老-全体	A. virgineoides-O-W
フクロツルタケ-幼-破片	A. volvata-Y-P
フクロツルタケ-成-破片	A. volvata-M-P
コテングタケモドキ-成-破片	A. pseudoporphyrina-M-P
コテングタケモドキ-幼-全体	A. pseudoporphyrina-Y-W
コテングタケモドキ-成-全体	A. pseudoporphyrina-M-W
タマゴタケ-成菌-破片	A. caesareoides-M-P
タマゴタケ-成菌-全体	A. caesareoides-M-W
カバイロツルタケ-成菌-破片	A. fulva-M-P
アケボノアワタケ-幼-破片	Le. chromapes-Y-P
アケボノアワタケ-成-破片	Le. chromapes-M-P
アケボノアワタケ-老-破片	Le. chromapes-O-P
ウスキニガイグチ-成-破片	Ty. alkalixanthus-M-P
ブドウニガイグチ-成-全体	Ty. vinosobrunneus-M-W
クロアザアワタケ-成-破片	B. nigromaculatus-M-P
チチアワタケ-成-破片	S. granulatus-M-P
キクバナイグチ-老-破片	B. floriformis-O-P
ヒビワレシロハツ-幼-破片	R. alboareolata-Y-P
クサハツ-成-破片	R. foetens-M-P
クロハツ-幼-破片	R. nigricans-Y-P
ニオイコベニタケ-幼-破片	R. bella-Y-P
ニオイコベニタケ-成-破片	R. bella-M-P
ヒトヨタケ-成-破片	C. atramentaria-M-P
ヒラタケ-成-破片	P. ostreatus-M-P
ニワタケ-成-全体	T. atrotomentosa-M-P
オオワライタケ-成-破片	G. junonius-M-P
オオワライタケ-成-全体	G. junonius-M-W
カワラタケ-成-全体	T. versicolor-M-W

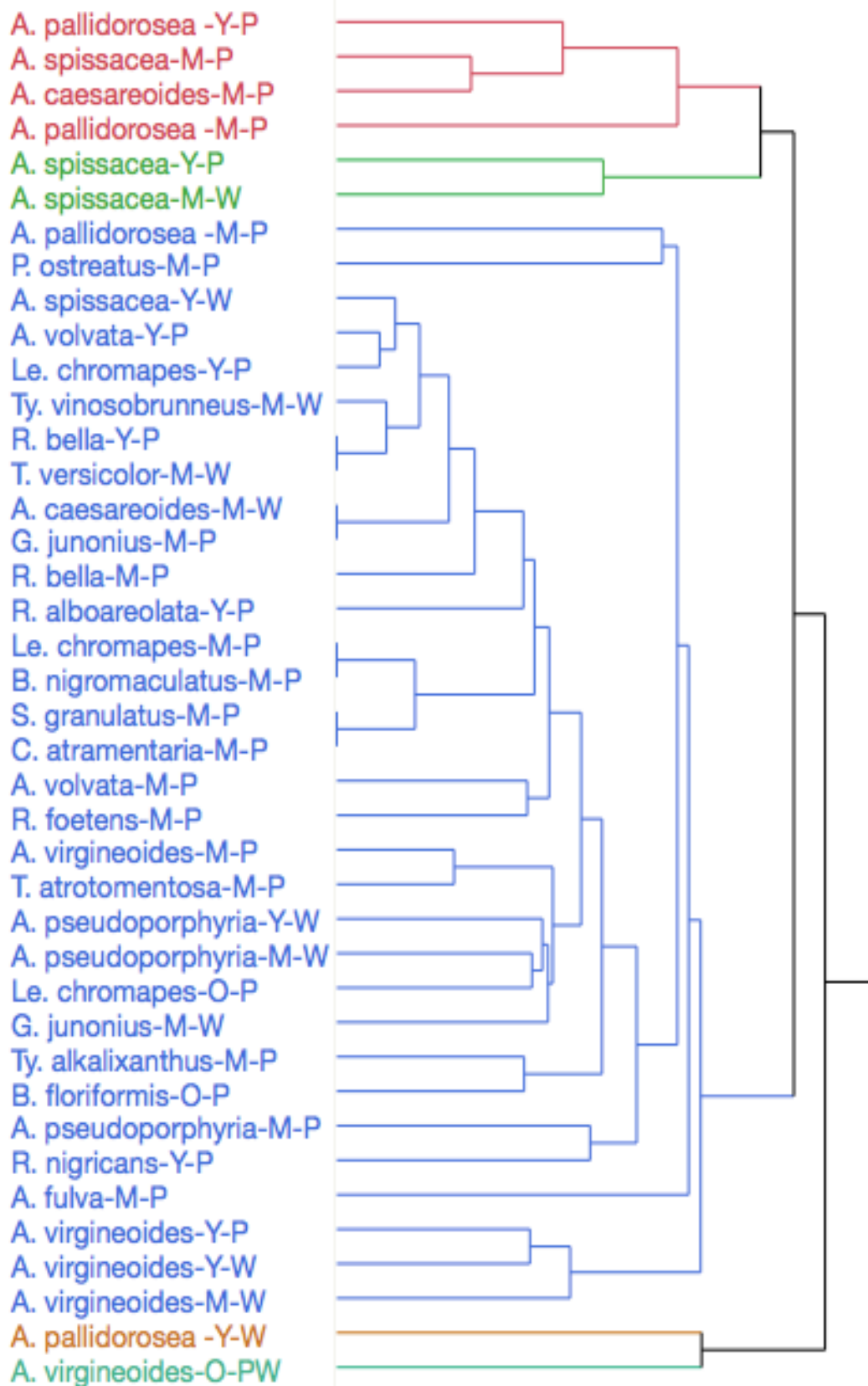


Fig. 12 菌種-成熟段階-捕集方法ごとの匂い成分組成での  
クラスター解析結果

Table 10. アケボノドクツルタケ(破片)から検出された匂い成分

匂い成分名	匂い成分分類	テングタケ属												ニガイグチ属				イグチ属		ヌメリイグチ属		キクバナイグチ属		ベニタケ属					ヒトヨタケ属		ヒラタケ属		チャツムタケ属		合計																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
		アケボノドクツルタ				ヘビキノコモドキ				タマゴタケ				シロオニタケ				フクロツルタケ				コテングタケモドキ				カバイロツルタケ				アケボノアワタケ				ウススキニガイグチ				クロアザアワタケ		チチアワタケ		キクバナイグチ		ヒビワレシロハツ					クロハツ		クサハツ		ニオイコベニタケ		ヒトヨタケ		ヒラタケ		オオワライタケ																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		破片		

Table 11. アケボノドクツルタケ子実体(全体)から検出された匂い成分

匂い成分名		匂い成分分類		テングタケ属										ニガイグチ属	イチヨウタケ属	チャツムタケ属	カワラタケ属	合計
				アケボノドクツル	ヘビキノコモドキ	シロオニタケ	コテングタケモド				タマゴタケ	ブドウブガイグチ	ニワタケ	オオワライタケ	カワラタケ			
							全体	全体	全体	全体	全体							
																幼	成	
1 1-Pentanol	アルコール	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	6		
2 Phenylethyl Alcohol	アルコール	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
3 2-Propyl-1-pentanol	アルコール	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
4 1-Butanol	アルコール	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
5 Linalol	アルコール	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
6 3-Octanone	カルボニル基	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	10		
7 1,2-dichloro-benzene	芳香族	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	9		
8 Benzoic acid	芳香族	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
9 1-Undecene	炭化水素	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5		
10 .alpha.-Muurolene	テルペン	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2		
11 .gamma.-Muurolene	テルペン	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2		
12 Ethyl butyrate	エステル基	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2		
13 trans-calamenene		1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2		
14 Octyl cyclopropane		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
15 3,7-dimethyl 1,6-Octadien-3-ol		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
合計		10	8	1	4	4	2	5	2	2	1	2	2	1	1	45		

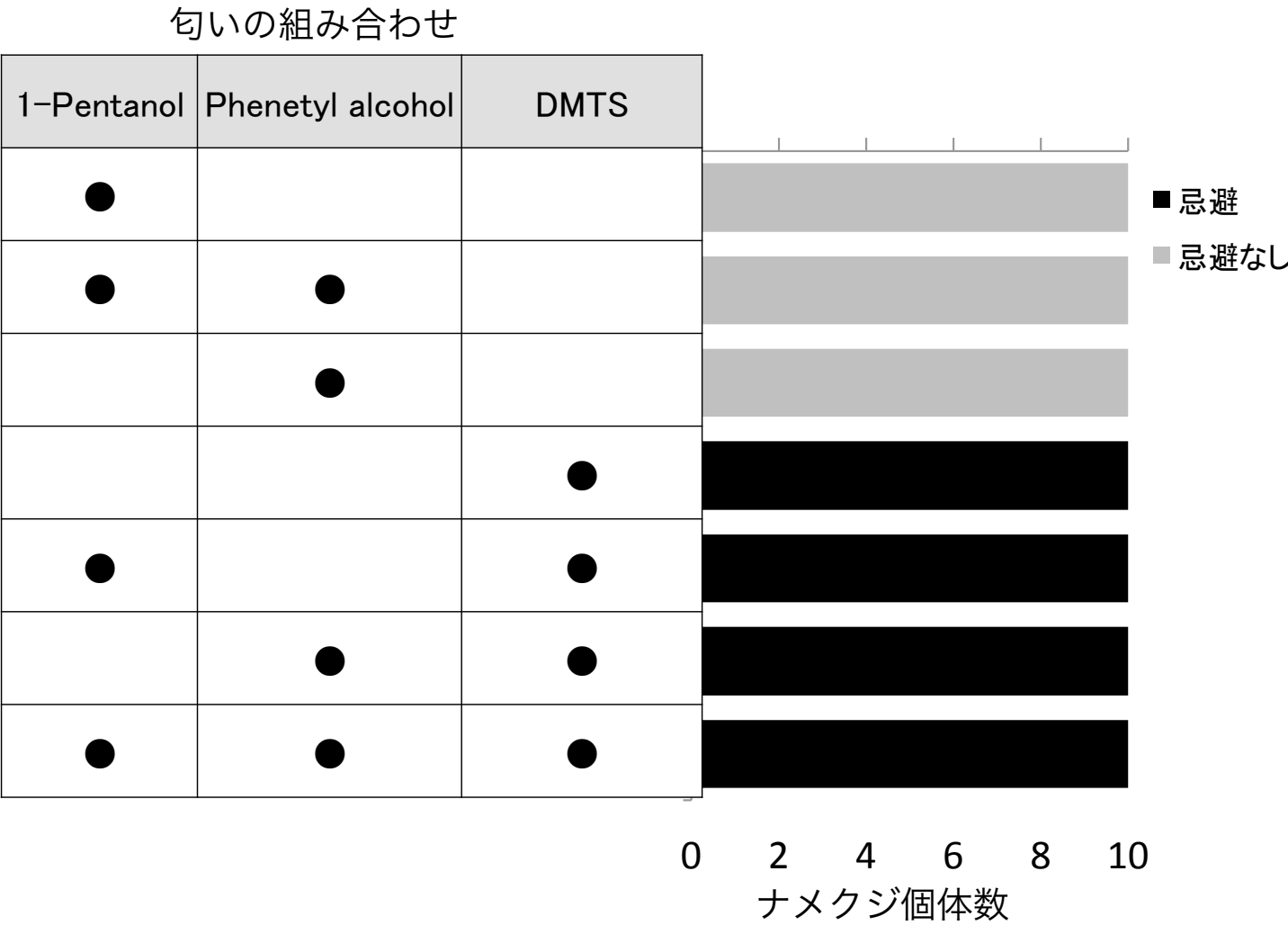


Fig. 13 アケボノドクツルタケ（破片）から選出した忌避成分候補を用いたヤマナメクジの反応の観察結果

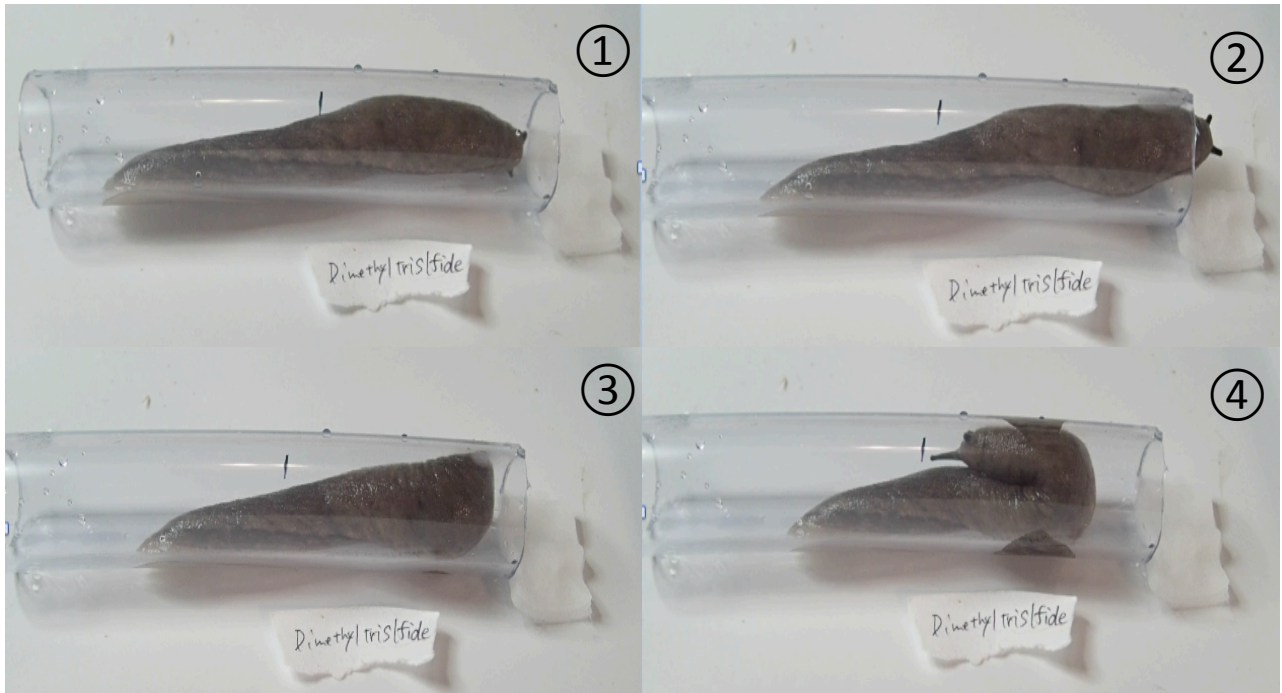


Fig. 14 ヤマナメクジがDimethyl trisulfideを  
忌避している様子



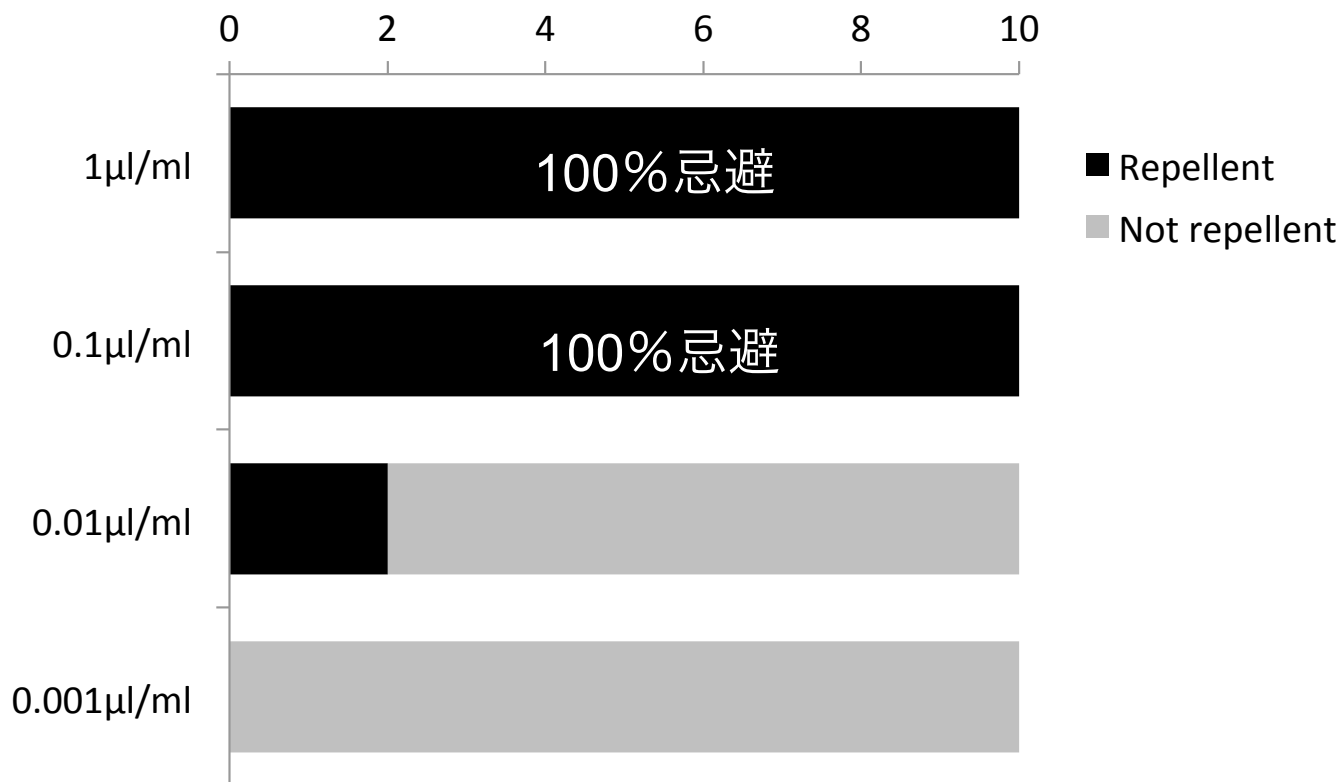


Fig. 15 濃度別のDimethyl trisulfideに対する  
ヤマナメクジの反応の観察結果

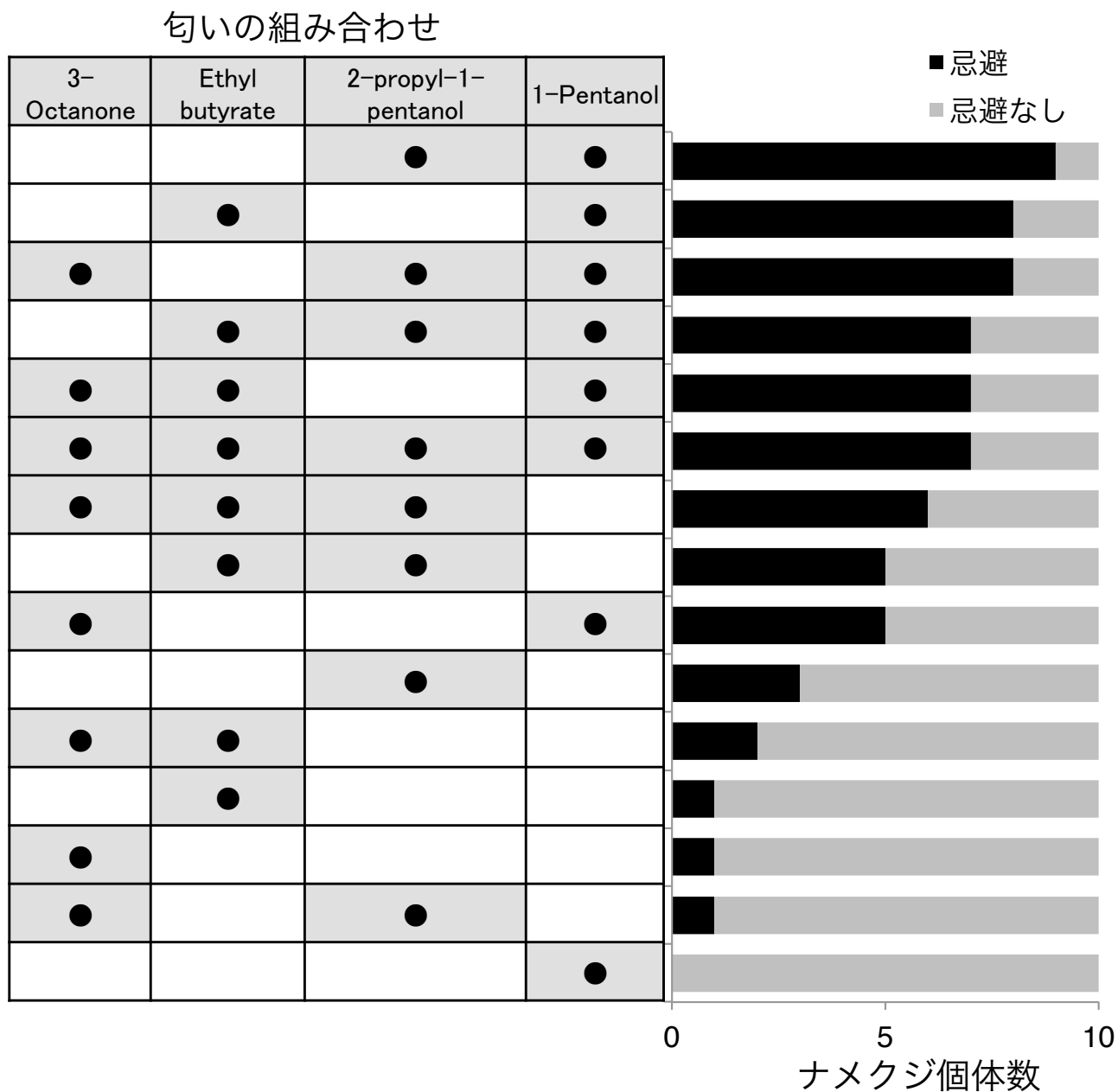
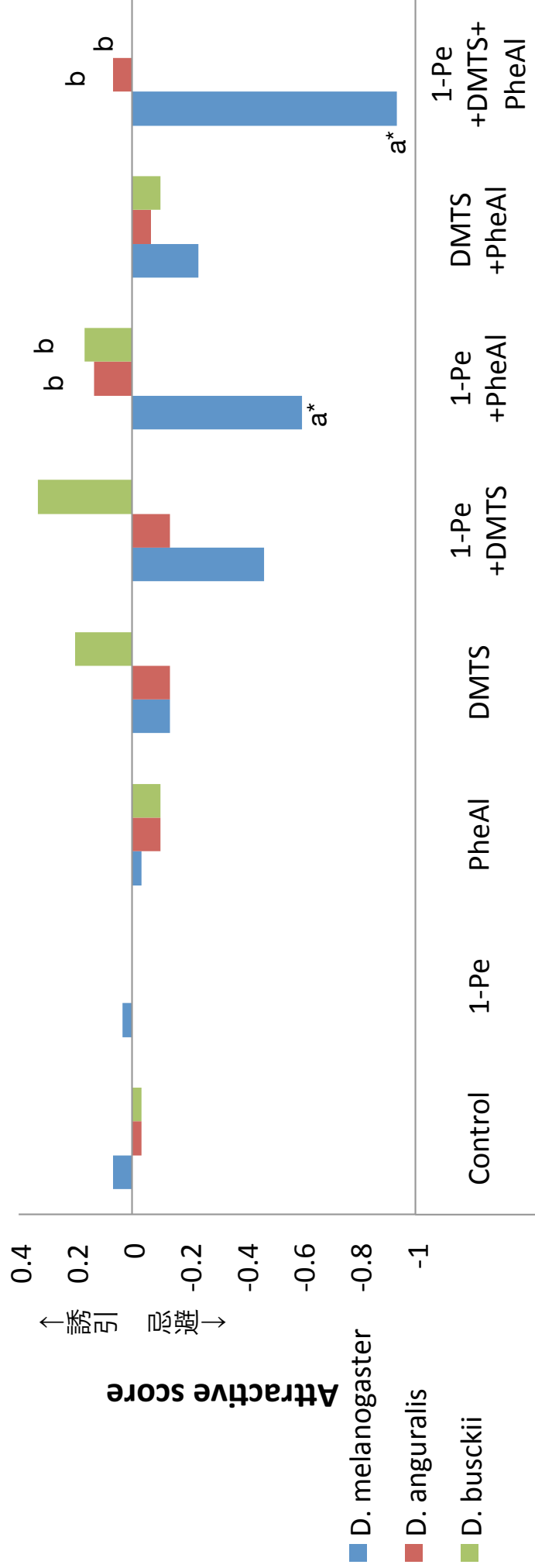


Fig. 16 アケボノドクツルタケ（全体）から選出した忌避成分候補を用いたヤマナメクジの反応の観察結果

Table 12

アケボノドクツルタケ(全体)から選出した忌避成分候補の反応の観察結果を用いて、各匂いの効果を評価するために、目的変数を忌避の有無、説明変数を匂いの組み合わせとしてロジスティック回帰分析をした結果 (JMP ver. 14.1)

匂い成分	パラメータ数	自由度	p値(Prob>ChiSq)
1-Pentanol	1	1	<.0001
3-Octanone	1	1	0.1353
Ethyl butyrate	1	1	0.0068
2-propyl-1-pentanol	1	1	0.0023
1-Pentanol*3-Octanone	1	1	0.7434
1-Pentanol*Ethyl butyrate	1	1	0.3287
1-Pentanol*2-propyl-1-pentanol	1	1	0.5758
3-Octanone*Ethyl butyrate	1	1	0.1859
3-Octanone*2-propyl-1-pentanol	1	1	0.031
Ethyl butyrate*2-propyl-1-pentanol	1	1	0.0544
1-Pentanol*3-Octanone*Ethyl butyrate	1	1	0.6756
1-Pentanol*3-Octanone*2-propyl-1-pentanol	1	1	0.6581
1-Pentanol*Ethyl butyrate*2-propyl-1-pentanol	1	1	0.1674
3-Octanone*Ethyl butyrate*2-propyl-1-pentanol	1	1	0.0228
1-Pentanol*3-Octanone*Ethyl butyrate*2-propyl-1-pentanol	1	0	.



シヨウジョウバエ種の組み合わせ									
Bonferroni test (* = P<0.05)									
<i>D. anguralis</i> × <i>D. busckii</i>	1.000	1.000	1.0000	0.4300	0.4500	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
<i>D. anguras</i> × <i>D. melanogaster</i>	1.000	1.000	1.0000	1.0000	0.8500	0.0300*	1.0000	0.0011*	0.0011*
<i>D. busckii</i> × <i>D. melanogaster</i>	1.000	1.000	1.0000	0.4300	0.0900	0.0250*	1.0000	0.0016*	0.0016*

Fig.17 アケボノドクツルタケ（破片）から選出した忌避匂い成分候補に対するシヨウジョウバエ3種の反応の観察

各匂い成分ごとに3回の試行の各スコアを用いてハエ3種間でボンフェローニの多重比較検定を行った。

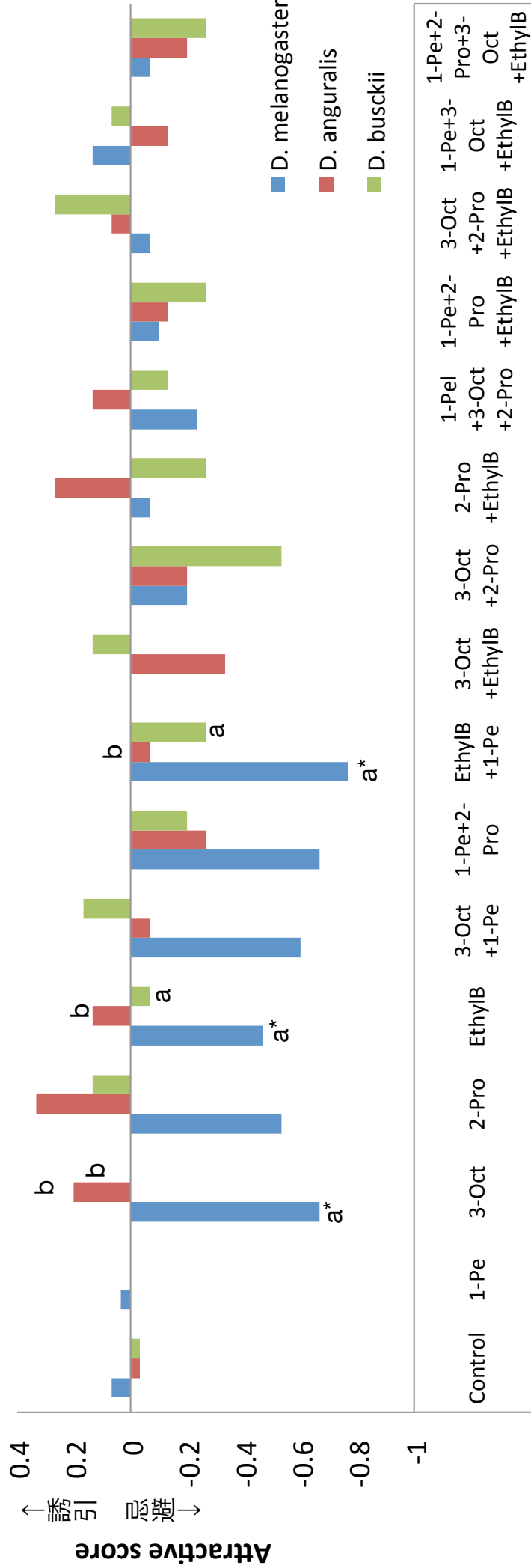
\* = P < 0.05; a,b:ボンフェローニの多重比較検定で有意差があった組み合わせは異なる記号を表記した。記号がない匂いは有意差がなかった。

Table 13 アケボノドクツルタケ(破片)の忌避匂い成分候補に対するショウジョウバエ3種の反応の観察結果  
3種類のハエそれぞれの、各匂い成分に忌避・誘引した個体数をコントロールと比較するために、3回の試行  
で得た個体数をプールし、カイニ乗検定を行った。

<i>D. melanogaster</i>	N	Paraffn側	試薬側	P値( $\chi^2$ test)
Control	60	28	32	–
1-Pe	60	29	31	0.8550
PheAl	60	31	29	0.5838
DMTS	60	34	26	0.2731
1-Pe+DMTS	60	44	16	0.0029
1-Pe+PheAl	60	48	12	0.0002
DMTS+PheAl	60	37	23	0.0992
1-Pe+DMTS+ PheAl	60	58	2	0.0000

<i>D. anguralis</i>	N	Paraffn側	試薬側	P値( $\chi^2$ test)
Control	60	31	29	–
1-Pe	60	30	30	0.8551
PheAl	60	33	27	0.7144
DMTS	60	34	26	0.5826
1-Pe+DMTS	30	17	13	0.6540
1-Pe+PheAl	30	13	17	0.4559
DMTS+PheAl	30	16	14	0.8814
1-Pe+DMTS+ PheAl	30	14	16	0.6547

<i>D. busckii</i>	N	Paraffn側	試薬側	P値( $\chi^2$ test)
Control	30	16	14	–
1-Pe	60	30	30	0.7655
PheAl	60	33	27	0.8810
DMTS	30	12	18	0.3006
1-Pe+DMTS	30	10	20	0.1180
1-Pe+PheAl	60	25	35	0.2948
DMTS+PheAl	60	33	27	0.8810
1-Pe+DMTS+ PheAl	60	30	30	0.7655



ハ工種		Bonferroni test (* = P<0.05)												
<i>D. anguralis</i> × <i>D. busckii</i>	1.000	1.000	0.428	1.000	0.950	1.000	1.000	1.000	0.744	0.820	0.180	0.190	1.000	1.000
	1.000	1.000	<b>0.001*</b>	0.170	<b>0.050*</b>	0.261	0.310	<b>0.013*</b>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>D. anguralis</i> × <i>D. melanogaster</i>	1.000	1.000	<b>0.004*</b>	0.350	0.210	0.078	0.200	0.056	1.000	1.000	0.410	1.000	1.000	1.000
	1.000	1.000	<b>0.004*</b>	0.350	0.210	0.078	0.200	0.056	1.000	1.000	0.410	1.000	1.000	1.000

Fig.18 アケボノドクツルタケ（全体）から選出した忌避匂い成分候補に対する  
 ショウジョウバエ3種の反応の観察

各匂い成分ごとに3回の試行の各スコアを用いてハエ3種間でボンフェローニの多重比較検定を行なった。  
 \* = P < 0.05; a,b:ボンフェローニの多重比較検定で有意差があった組み合わせは異なる記号を表記した. 記号がない匂いは有意差がなかった.

Table 14 アケボノクツルタケ(全体)の忌避匂い成分候補に対するショウジョウバエ3種の反応の観察結果

3種類のハエそれぞれの、各匂い成分に忌避・誘引した個体数をコントロールと比較するために、3回の試行で得た個体数をプールし、カイニ乗検定を行った。

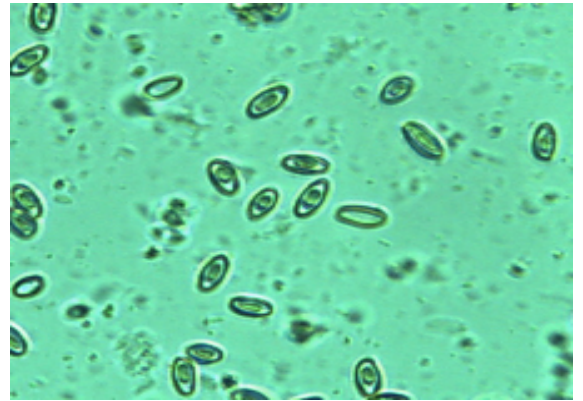
<i>D. melanogaster</i>	N	Paraffn側	試薬側	P値( $\chi^2$ test)
Control	60	28	32	–
1-Pe	60	29	31	0.8550
3-Oct	60	50	10	0.0000
2-Pro	60	46	14	0.0007
EthylB	60	44	16	0.0029
3-Oct+1-Pe	60	48	12	0.0002
1-Pe+2-Pro	60	50	10	0.0000
EthylB+1-Pe	60	53	7	0.0000
3-Oct+EthylB	60	30	30	0.7148
3-Oct+2-Pro	60	36	24	0.1432
2-Pro+EthylB	60	32	28	0.4652
1-Pe+3-Oct+2-Pro	60	37	23	0.0992
1-Pe+2-Pro+EthylB	60	33	27	0.3612
3-Oct+2-Pro+EthylB	60	32	28	0.4652
1-Pe+3-Oct+EthylB	60	28	32	1.0000
1-Pe+2-Pro+3-Oct+EthylB	60	31	29	0.5838

<i>D. busckii</i>	N	Paraffn側	試薬側	P値( $\chi^2$ test)
Control	30	16	14	–
1-Pe	60	30	30	0.7655
3-Oct	60	30	30	0.7655
2-Pro	30	13	17	0.4383
EthylB	30	16	14	1.0000
3-Oct+1-Pe	60	25	35	0.2948
1-Pe+2-Pro	30	18	12	0.6023
EthylB+1-Pe	30	19	11	0.4321
3-Oct+EthylB	30	13	17	0.7952
3-Oct+2-Pro	30	23	7	0.4321
2-Pro+EthylB	30	19	11	0.4321
1-Pe+3-Oct+2-Pro	30	17	13	0.4383
1-Pe+2-Pro+EthylB	30	19	11	0.0581
3-Oct+2-Pro+EthylB	30	11	19	0.1945
1-Pe+3-Oct+EthylB	30	14	16	0.6056
1-Pe+2-Pro+3-Oct+EthylB	30	19	11	0.4321

<i>D. angurialis</i>	N	Paraffn側	試薬側	P値( $\chi^2$ test)
Control	60	31	29	–
1-Pe	60	30	30	0.8551
3-Oct	30	12	18	0.2962
2-Pro	30	10	20	0.0997
EthylB	30	13	17	0.4559
3-Oct+1-Pe	30	16	14	0.8814
1-Pe+2-Pro	30	19	11	0.2937
EthylB+1-Pe	30	16	14	0.8814
3-Oct+EthylB	30	20	10	0.1758
3-Oct+2-Pro	30	18	12	0.4543
2-Pro+EthylB	30	13	17	0.4559
1-Pe+3-Oct+2-Pro	30	13	17	0.4559
1-Pe+2-Pro+EthylB	30	17	13	0.6540
3-Oct+2-Pro+EthylB	30	14	16	0.6547
1-Pe+3-Oct+EthylB	30	17	13	0.6540
1-Pe+2-Pro+3-Oct+EthylB	30	18	12	0.4543



排泄した担子胞子は破壊  
されていない

Fig.19 腐敗期のアケボノドクツルタケにセンチコガネ  
が訪れている  
2018年10月22日撮影