

トリュフ栽培に適した森林環境に関する研究

山梨県森林総合研究所 ○林耕太・戸沢一宏

研究期間:R3-5

背景

- ◆ 山梨県には黒トリュフの1種 *Tuber himalayense* が自生。高付加価値な特用林産物として活用が期待。
- ◆ トリュフ属の菌はマツタケと同じ絶対寄生菌（木の根に外生菌根を作って栄養をやりとり）
⇒ トリュフ菌を感染させた苗木の圃場栽培が有望。
- ◆ 既往研究※でトリュフ菌を感染させた苗木の作出に成功。
- ◆ しかし、圃場に植栽後の栽培手法は未確立。
栽培期間は欧州の事例で4-12年と長期間必要。
⇒ 栽培手法確立には土中のトリュフ菌の状態を知る必要。

【研究目的】 栽培手法確立にむけて、

- ① 植栽後のトリュフ菌の状態を把握する**手法の確立**
- ② 県内に植栽した株の**感染程度**とその**動態**を把握

※農林水産省委託プロジェクト研究「高級菌根性きのこ栽培技術の開発」H27～R1



写真1. 自生する黒トリュフ



写真2. 外生菌根

まとめ

- ◆ 土中のトリュフ菌の状態をDNA量を定量することで把握する手法を確立。
- ◆ 植栽木の一部では、トリュフ菌が高密度で維持されており、定着に成功している様子。
- ◆ 植栽後数年でトリュフ菌の密度が高い状態に遷移し、感染状況が改善する場合がある。
- ◆ しかし、ほとんどの植栽木では菌の密度に大きな時間変化なし
⇒ 感染状況の改善は稀で、初期の定着成功が大切。
⇒ トリュフ菌が良くついた質の良い感染苗が成功の良否を分けることが示唆。

土中のトリュフ菌を定量する手法の開発



増幅曲線からDNA量を定量

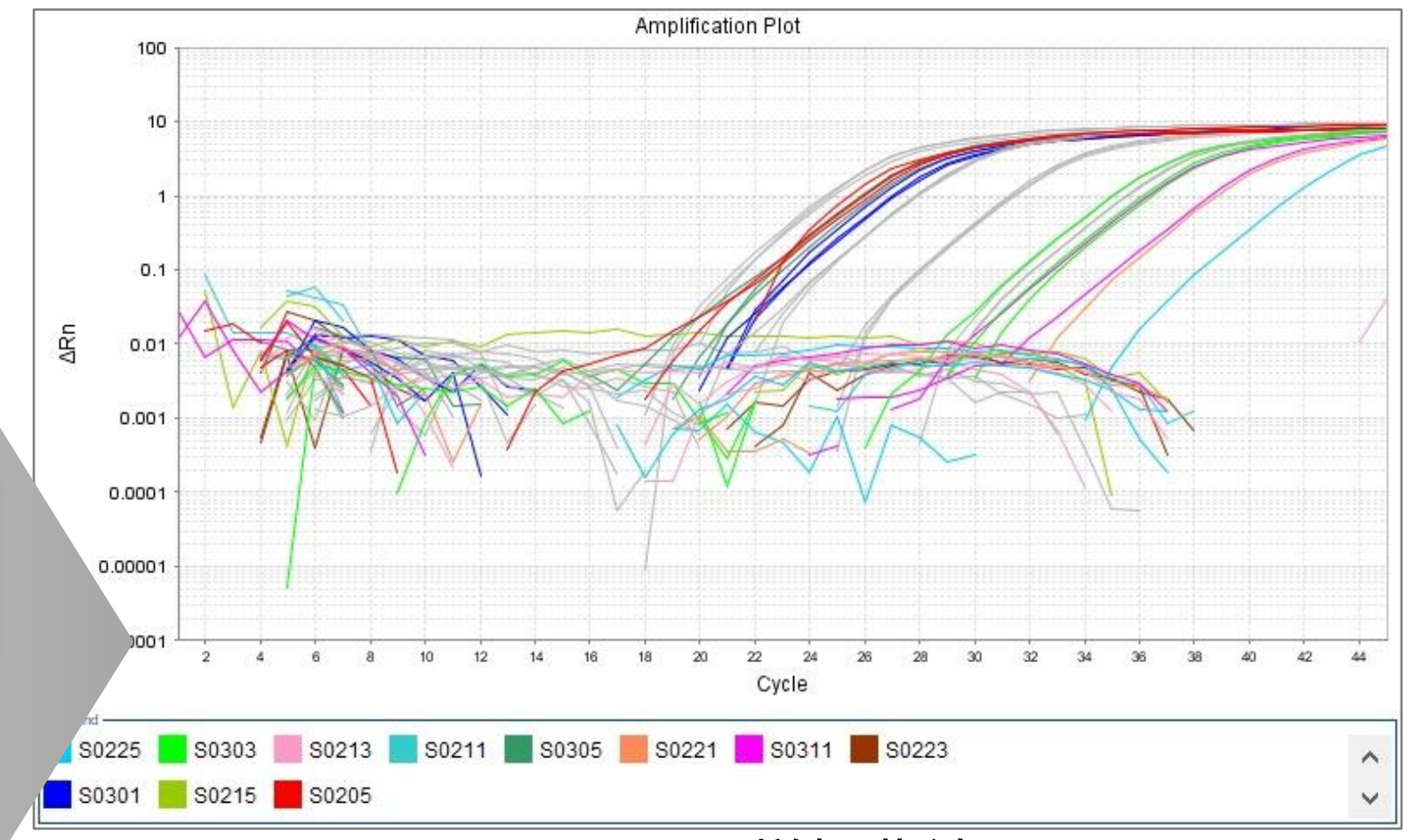


図2. リアルタイムPCRによる増幅曲線

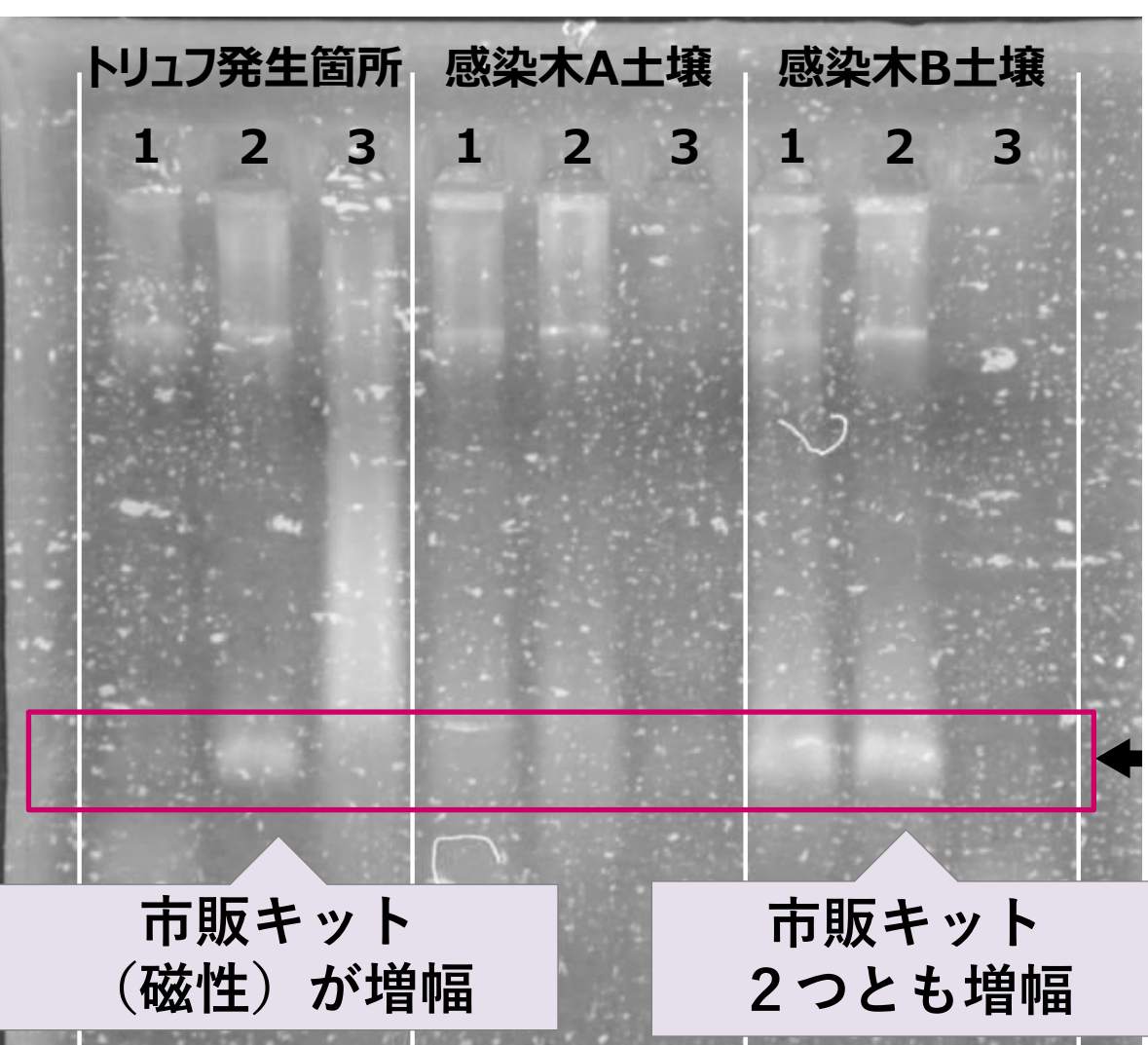


図1. 各抽出方法によるDNA増幅の比較。トリュフ特異プライマーによるPCR増幅産物を電気泳動した結果

①DNA抽出法の確立

- きれいなDNA抽出
- リン酸基吸着回避
- 阻害物質克服
- 安定した抽出

磁性吸着による抽出方法が適することを確認。

②プライマーの設計

- NCBIに登録されたトリュフ属菌の塩基配列を基に設計
- 種特異的
- 短い領域増幅
- 偽増幅（プライマーダイマー）の起きない配列

設計したプライマーのうち、7つで有効性を確認。

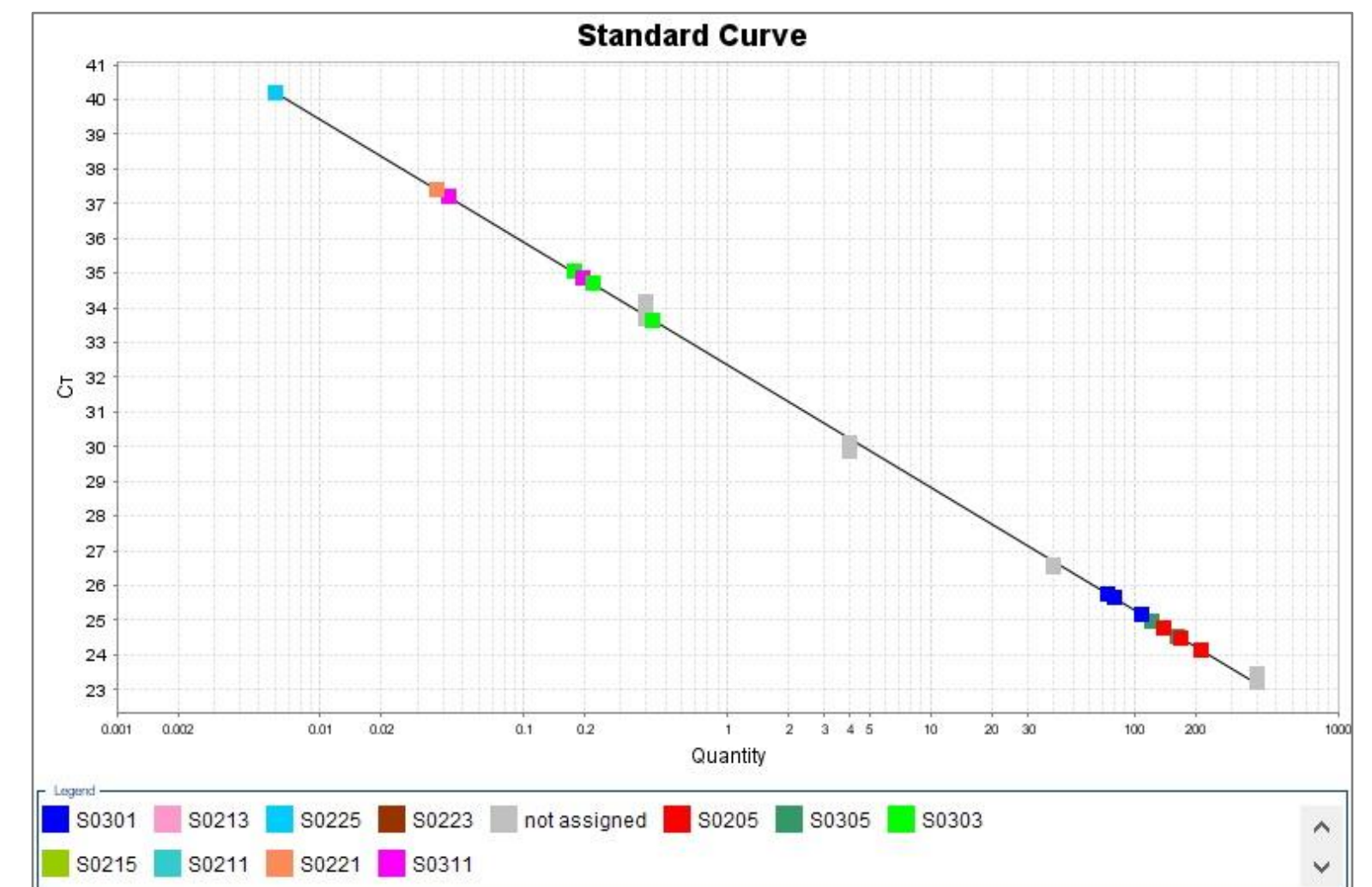


図3. 検量線から各サンプルのDNA量を定量

植栽木のトリュフ菌の動態

- ◆ 2つの植栽木（北杜）で研究期間を通して高い菌量を維持。
- ◆ 1株（北杜）は途中で菌密度が高密度に遷移。

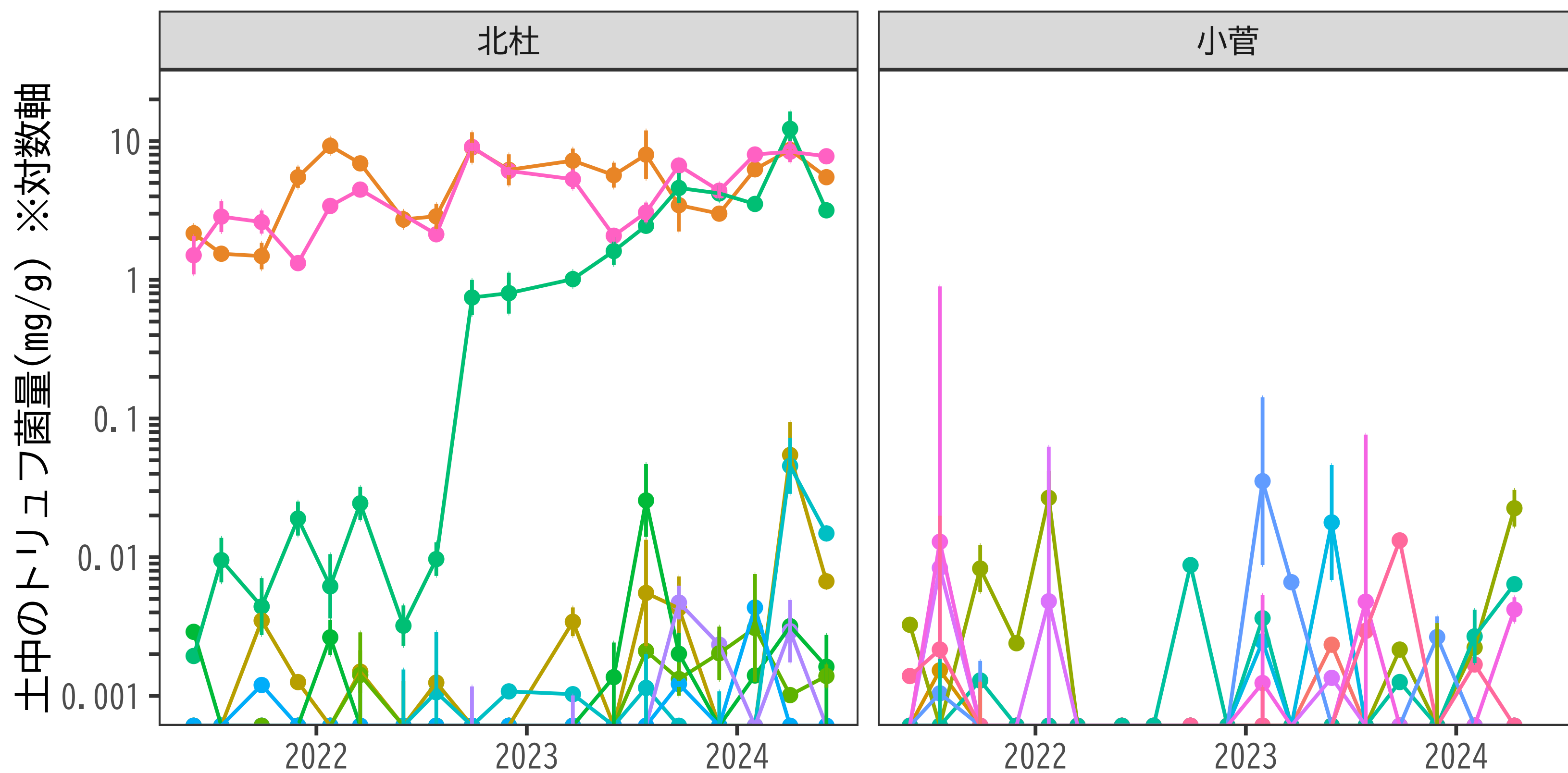


図4. 各植栽木の株元のトリュフ菌DNAの定量結果の推移。Y軸上の点はDNA量が0.001mg/g以下で定量限界を下回ったものを表す。

植栽木のトリュフ菌定着状況

- ◆ 北杜の植栽地では30本中9本の植栽木に高密度でトリュフ菌が定着していることを確認。

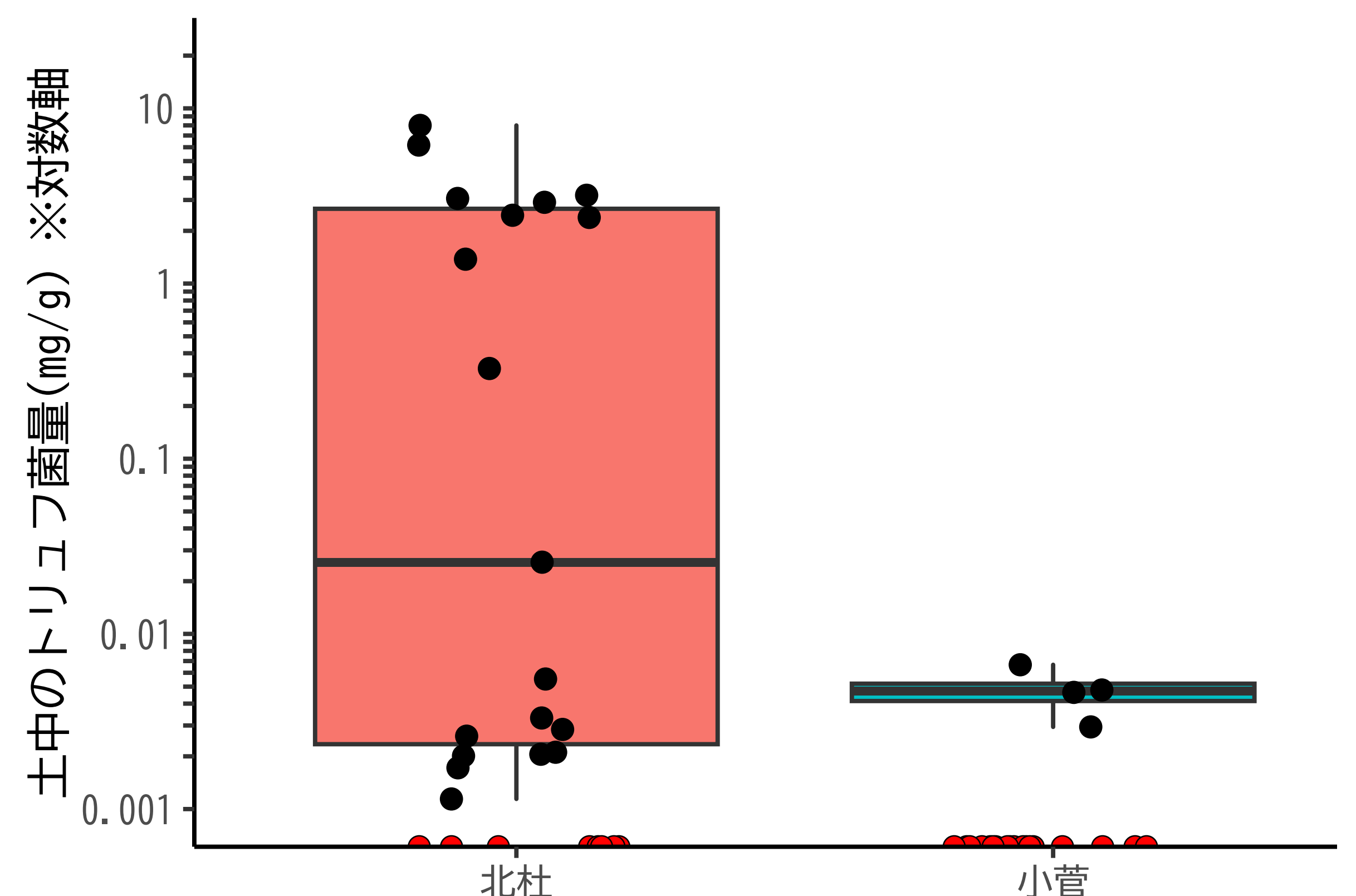


図5. 各植栽木の株元のトリュフ菌DNAの定量結果の推移。Y軸上の点はDNA量が0.001mg/g以下で定量限界を下回ったものを表す。

方法：圃場植栽と土壌採取

- ◆ 感染苗の植栽
北杜2018年30本、小菅2020年25本
- ◆ 2021年5月-2024年5月の間、2ヵ月毎に各植栽地9本の株元から土壌採取
- ◆ 2023年7月に全植栽木の土壌を採取
- ◆ 土壌は株元から4方向20cmの位置で採土管を用いて採取し、混合。
- ◆ 2mmメッシュで篩分けし、細根除去
- ◆ 篩下の土壌0.5 gをから磁性吸着によるDNA抽出キットを用いてDNA抽出。
- ◆ StepOne™ (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Inc.)により、SYBER® Greenによる蛍光を用いたリアルタイムPCR法で菌量を定量。
- ◆ 定量したDNA量は含水率を用いて乾燥土壌1gに対する菌量として算出



写真3. トリュフ菌を感染させた苗木



写真4. 植栽地の様子