

## 地域に産する黒トリュフの感染苗作出技術に関する研究

(冷凍保存子実体を用いた感染苗作出)

森林経営課：和食敦子、渡辺直史

### ■ 目 的

2017年に馬路村内で黒トリュフ2種（イボセイヨウショウロ、アジアクロセイヨウショウロ）が確認された。トリュフは高級食材として扱われる食用きのこの一つで、国内で消費されているトリュフの多くは海外産である。トリュフの仲間（セイヨウショウロ属）は日本各地で発見されており、国産トリュフの栽培化に向けて研究が行われている。

栽培化に向けた試験を行うためには菌株を保有する必要があるが、トリュフは樹木の根を菌糸で覆い共生して生活する菌根菌の一種であるため、菌糸など菌体のみでの保存は難しいとされている。このため、トリュフが根に感染している苗（以下、トリュフ感染苗）の状態での保存および増殖が不可欠である。本研究では、高知県内で黒トリュフを栽培するための研究に供するため、トリュフ感染苗を作出することおよびその技術を確立することを目的とする。

今回は、冷凍保存をしていたトリュフを利用してコナラ、ウラジログシ、シデ類苗への孢子散布によるトリュフ感染苗の作出を試みた結果を報告する。

### ■ 内 容

#### 1) 実験に使用したトリュフ

2021年10月に採取して $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存しておいたトリュフ（イボセイヨウショウロ）を使用した（写真1）。トリュフを常温に戻した後、トリュフ子実体の外皮（外側の皮）を削って取り除いて細かく切り、乳鉢の中で滅菌水とともに乳棒ですりつぶした。これを滅菌水に入れ孢子懸濁液を作成した。

#### 2) ポット苗への孢子懸濁液散布

2022年10月に、あらかじめ無菌状態で育成していた苗木（ウラジログシ2ポット、シデ類2ポット）の培土表面に孢子懸濁液を散布し、無菌室で育成した。さらに、2023年7月に無菌状態で育成していたコナラ苗6ポットに孢子懸濁液を散布し、無菌室で育成した。

#### 3) 菌根の識別

孢子散布の4ヶ月後に根を実体顕微鏡と光学顕微鏡で観察し菌根の形成を確認した。形成された菌根のDNAを次の方法で識別し形成された菌根がトリュフのものであるか判定を行った。

Kinoshita et al.(2018)\*で解析された高知県産のイボセイヨウショウロとアジアクロセイヨウショウロ、当センターで解析した黒トリュフ子実体、イボタケの一種、カビの一種の塩基配列を比較して黒トリュフ2種に特異的な塩基配列を決定した。この配列をもとに22~23量体のフォワードプライマーおよびリバースプライマーを設計した。この作成したプライマー（以下、特異的プライマー）とITSプライマーを組み合わせる菌根の識別に用いた。

\* Akihiko Kinoshita(Kazuhide Nara, Hiromi Sasaki, Bang Feng, Keisuke Obase, Zhu L. Yang, Takashi Yamanaka),2018, Using mating-type loci to improve taxonomy of the *Tuber indicum* complex, and discovery of a new species, *T. longispinosum*,PLOS ONE,<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193745>

## ■ 成 果

孢子懸濁液を散布した苗木全てで菌根の形成が確認された（写真2～4）。確認した苗の菌根からDNAを抽出し、特異的プライマーを用いてPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）で増幅した。PCRで得られたDNAで電気泳動を行った結果、すべての苗でバンドを確認した。特異的プライマーで増幅できるのは黒トリュフ2種が持つ特異的なDNAだけであるため、バンドを確認した苗は黒トリュフが感染していると判断した。確認のため、このうちウラジロガシ2ポットの菌根DNAのITS領域の塩基配列を調べた結果、イボセイヨウショウロと一致した。このことから、①一般的に感染苗作出には採取直後の黒トリュフ子実体を用いられているが、冷凍保存した黒トリュフ子実体を用いても感染苗作出が可能であること、②特異的プライマーを使用してPCRで増幅したDNAを電気泳動し、バンドの有無を確認するだけの簡易な検査で黒トリュフ感染苗の識別が可能であることが分かった。

## ■今後の計画

黒トリュフ子実体の冷凍保存最適温度を探るため、黒トリュフ子実体を異なる温度で保存し、それらの孢子散布後の菌根形成率を調べる。



写真1 実験に使用したトリュフ



写真2 ウラジロガシの菌根



写真3 シデ類の菌根



写真4 コナラの菌根