

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

(冷凍保存した子実体胞子の散布と感染苗ポットへの播種によるトリュフ感染苗の作出)

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森林総合研究所を中心に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、黒トリュフ感染苗）の状態での保存および増殖が不可欠である。本研究では、黒トリュフ栽培化に関する研究に供するため、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。

昨年度に実施した異なる温度で保存した冷凍黒トリュフを利用したコナラ苗へ胞子散布による黒トリュフ感染苗の作出、および黒トリュフが感染したコナラ苗のポットへの播種による感染苗の作出について、菌根DNAによる同定結果を報告する。

■ 内容

(1) 冷凍黒トリュフ胞子懸濁液散布による感染苗の作出

2023年10月採取の黒トリュフ子実体を4分割し、4℃、-18℃、-30℃、-80℃で保存して試験に用いた。子実体を常温に戻した後、外皮（外側の皮）を削り取った子実体を細かく切って、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胞子懸濁液を作成した。

2023年12月に、あらかじめ無菌状態で育成していたコナラ苗木36本（トリュフの保存温度別に各9本）に胞子懸濁液を散布し、無菌室で育成した。胞子懸濁液はあらかじめトーマ血球計算盤で胞子数を測定し、 1×10^6 個/mlの濃度になるように滅菌水を加えて調整した。

(2) 菌根の確認及び採取

2025年7月に各苗木の根を2カ所から採取し、実体顕微鏡と光学顕微鏡で観察して菌根の形成を確認した。確認した菌根は-80℃で冷凍し、DNA抽出用試料とした。

(3) 特異的プライマーを用いた簡易判定

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の塩基配列から黒トリュフ2種に特異的な塩基配列を決定し、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（以下、黒トリュフ特異的プライマー）。この黒トリュフ特異的プライマー（Tuber）を用いてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動バンドの有無で黒トリュフ感染を判定した。また、併せて植物特異的プライマー（Plant）においてもPCRと電気泳動バンドの確認を行い、黒トリュフ特異的プライマ

一および植物特異的プライマーの両方でバンドが出なかった場合は DNA 抽出ができていないと判断し、PCR 阻害物質濃度を下げるために DNA 抽出試料の希釈率を上げて再判定した。

■ 成 果

育成中に枯死した 1 本を除く全ての苗で黒トリュフ感染を確認した (図 1、図 2)。

3 ヶ月間冷凍保存した黒トリュフを用いて感染苗作出が可能であることが分かった。これにより、発生地で採取した黒トリュフ子実体を冷凍保存でストックし感染苗作出に使用することができるようになった。

■今後の課題

黒トリュフ胞子が 3 ヶ月以上の冷凍に耐えられるかどうか検証する必要がある。現在、冷凍期間 2 年以上の黒トリュフ子実体を用いて同様の試験を実施中である。冷凍子実体を用いた黒トリュフ感染苗の作出および黒トリュフ感染苗のポットにコナラ等を播種する方法で黒トリュフ感染苗の作出を継続し、令和 8 年度から開始される黒トリュフ発生試験の充実を図っていく。

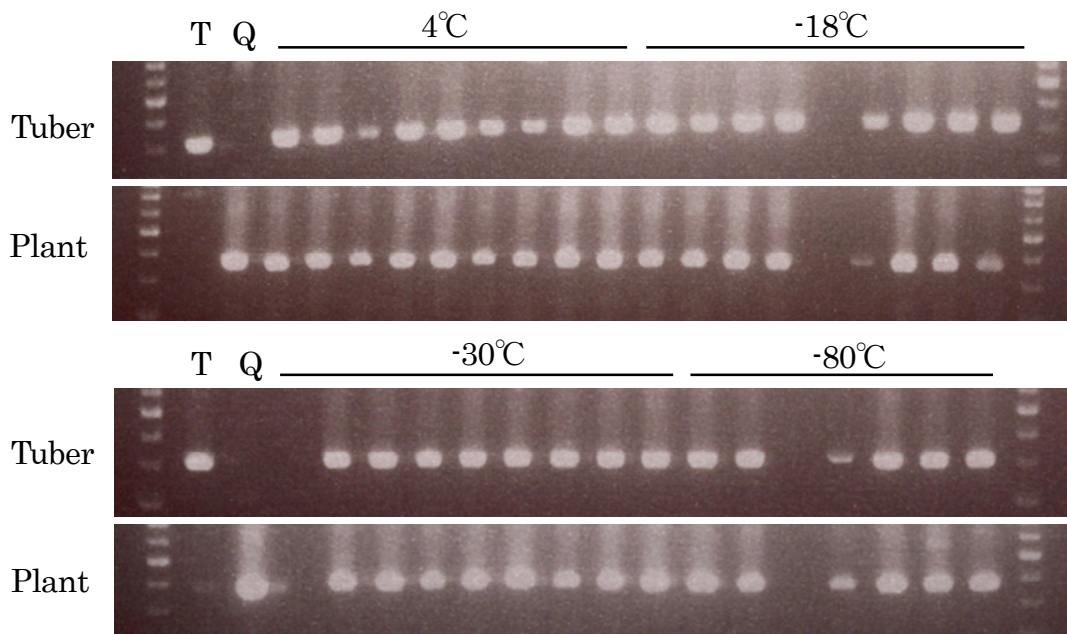


図 1 電気泳動ゲル写真

T は黒トリュフ子実体の DNA、Q は菌根を形成していないコナラ細根の DNA を示す

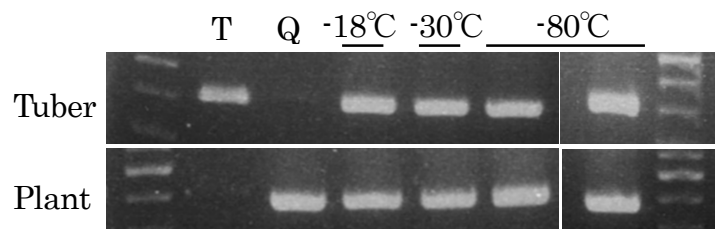


図 2 電気泳動ゲル写真 (再判定)

* 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>