

ISBN:978-4-909941-07-7

高級菌根性きのこ栽培技術の開発ー マツタケ・トリュフの栽培化に向けて



国立研究開発法人森林研究・整備機構
森林総合研究所
第4期中長期計画成果 (育種・生物機能-4)

はじめに

マツタケは我が国において最も高価なキノコです。また、トリュフもまた西洋料理に欠かせない高級食材となるキノコです。これらのキノコは、生きた樹木の根から養分を得て育つ菌根菌という菌類の一種です。そのため、シイタケやナメコなど、落ち葉や倒木などを腐らせて生育してキノコを発生させる菌とは異なり、人工栽培は容易ではなく、国内において、これまで科学的に検証された林地での栽培の成功例はありません。

これらのキノコの栽培方法が確立されれば、農山村地域に新たな市場を生むことから、栽培技術の開発に向けての取り組みは重要です。国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所は、農林水産省農林水産技術会議事務局委託プロジェクト「森林資源を最適利用するための技術開発」課題「高級菌根性きのこ栽培技術の開発」（平成27年度～令和元年度）において、5大学および8公設試験研究機関との共同で、マツタケおよび国産トリュフの人工栽培技術の開発に向けての研究に取り組んできました。

マツタケ人工栽培技術の開発については、シロ*や子実体の形成が容易な栽培有望株の選抜、シロの活性化や子実体の形成促進等の栽培技術の開発を、国産トリュフについては、感染苗木の作出や植栽、施肥による増殖技術の開発を目標としました。

その結果、マツタケについては、マツタケ菌根形成苗を大型化するとともに、バカマツタケについては、林地接種によって、キノコを発生させることができました。さらに、トリュフについては、国産のトリュフの名前を確定させた上で、菌根形成苗の野外植栽によるトリュフ菌を定着させることができました。これらを中心に、今回の研究で得られた成果について、パンフレットとして取りまとめました。

これらの成果を基にして、経済的価値の高い食用キノコの栽培化が進むことを期待します。

*シローマツタケ菌が樹木からの栄養分を獲得して土壤中を拡がる菌糸の塊。秋になるとその拡大方向の先端に近い部位から地上にきのこを発生させます。

国立研究開発法人森林研究・整備機構
森林総合研究所 研究ディレクター
山中高史



目次

1. 本プロジェクトの目的と課題構成	2
2. マツタケのシロの姿を知る	3
2-1. シロの状態を測る	森林総合研究所 山口宗義
2-2. シロのメタボローム解析、プロテオーム解析	森林総合研究所 下川知子・澁谷源
3. マツタケ菌根形成苗を作る	7
3-1. マツタケ有望菌株の選抜	森林総合研究所 村田仁・市原優
3-2. マツタケ菌株の長期保存	森林総合研究所 小長谷啓介
3-3. 無菌実生苗や取り木苗によるシロ拡大促進	茨城県林業技術センター 小林久泰
3-4. 北海道のマツでマツタケ菌根形成苗をつくる	北海道立総合研究機構 宜寿次盛生・東智則 北海道大学 玉井裕
3-5. 菌根形成苗の大型化	東京大学 松下範久 信州大学 山田明義
3-6. 自然感染による菌根形成苗の作出	長野県林業総合センター 古川仁・片桐一弘・増野和彦 信州大学 山田明義
4. 野外でマツタケのシロを作る	18
4-1. 環境改善によるシロ活性化技術開発	岩手県林業技術センター 成松眞樹 森林総合研究所 山口宗義
4-2. シロ形成のためマツの根を増やす	京都府農林業技術センター 藤田徹 森林総合研究所 山口宗義
4-3. 林地接種によるバカマツタケの子実体発生	奈良県森林技術センター 河合昌孝・今治安弥
5. 国産トリュフ栽培を目指す	25
5-1. 日本のトリュフ	森林総合研究所 木下晃彦
5-2. トリュフの育つところ	森林総合研究所 古澤仁美
5-3. トリュフ菌根形成苗作り植える	森林総合研究所 仲野翔太 山梨県森林総合研究所 柴田尚
5-4. 野外で菌根形成させる	森林総合研究所 野口享太郎
5-5. トリュフの菌株を識別する	森林総合研究所 中村慎崇・木下晃彦
6. よりよく知るために	32

1. 本プロジェクトの目的と課題構成

高級食材のマツタケやトリュフは、生きた樹木の根から養分を得て生育し子実体（きのこ）を発生させます。マツタケ発生には土壤中を拡がる菌糸塊（シロ）の発達ですが、これまでシロの発達を制御できず、栽培技術は確立されていません。トリュフも、ヨーロッパにて一部の種は人工栽培されていますが、国産種についてはまだ栽培技術は確立していません。

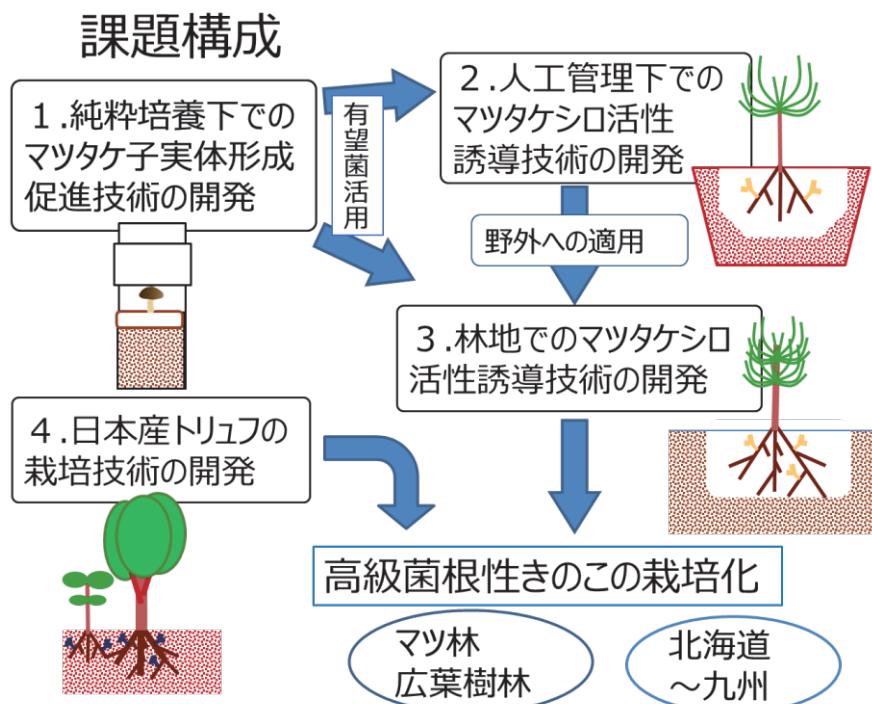
近年、マツタケに関して、無菌条件下でマツタケ菌を感染させたアカマツによる土壤中でのシロ形成、遺伝情報によるマツタケ菌定量法開発やシロ発達様式解明など、人工栽培技術の開発に向けた知見が得られてきています。一方、トリュフについては、日本にも食用として有望な種が存在することが明らかになっています。

経済的価値の高い特用林産物のマツタケやトリュフの人工栽培技術は森林域に新たな経済的価値を生むため、その開発に向けた取組が求められています。

このため、本研究では、

1. 純粋培養下でのマツタケ子実体形成促進技術の開発
2. 人工管理下でのマツタケシロ活性誘導技術の開発
3. 林地でのマツタケシロ活性誘導技術の開発
4. 日本産トリュフの栽培技術の開発

により、マツタケについて、人工的な管理下での栽培技術を新たに開発し、トリュフについて、国産種の林地栽培技術を新たに開発することを目標として研究を進めてきました。



2. マツタケのシロの姿を知る

マツタケは、土壌中に菌糸を広げて、その地上にキノコを発生させます。この土壌中を広がる菌糸の塊を「シロ」と言います。野外でマツタケを発生させるには、まずシロを形成させて発達させる手法を開発しなければいけません。そのために、まず、自然条件下でのシロの形状や、その発達の様式や機構を明らかにする必要があります。

シロは、アカマツなどの根に菌根を形成した後、同心円状に広がっていくことが、キノコの発生地点の記録から明らかになっていますが、シロにおけるマツタケ菌や共生するマツの根の分布は、土壌中でこれらを他種と識別することができず、これまで明らかにすることができませんでした。

また、分離菌株とマツ苗とによって作出したシロ付きマツタケ菌根形成苗（「3. マツタケ菌根形成苗を作る」参照）を野外に移植しても、数年のうちに、シロが消失してしまうことから、野外のシロには、分離菌株より形成されたシロ菌糸体にはない特徴を有することが考えられます。

以上のことから、ここでは、自然状態のシロの発達様式を明らかにするため、マツタケ菌やアカマツ根を種特異的に識別してシロにおける分布を明らかにし、シロの特性を、代謝物質の多様性の点について、メタボローム解析を実施して、明らかにすることとしました。

これらの結果は、人工的にシロ形成を誘導させるための様々な手法を、キノコの発生よりも早い段階で評価するのに役立ちます。



マツタケのシロ。白色のマツタケ菌糸とともにアカマツの細根が発達しています。

2. マツタケのシロの姿を知る

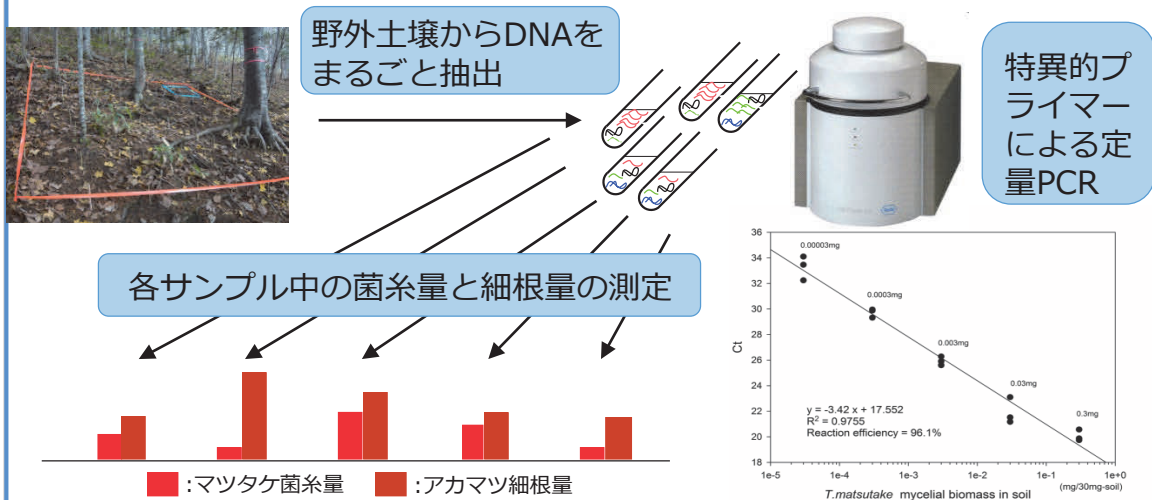
2-1. シロの状態を測る

マツタケは土壌中を拡がるシロから発生します。そのため、シロを構成するマツタケ菌糸とアカマツ根の分布を詳細に把握することが必要です。そこで、土壌中のマツタケ菌糸とアカマツ根を他の種と識別して定量する方法を開発しました。この手法を用いて、シロ中およびその周辺のマツタケ菌やアカマツ根の分布状況を二次元的に把握することができました。

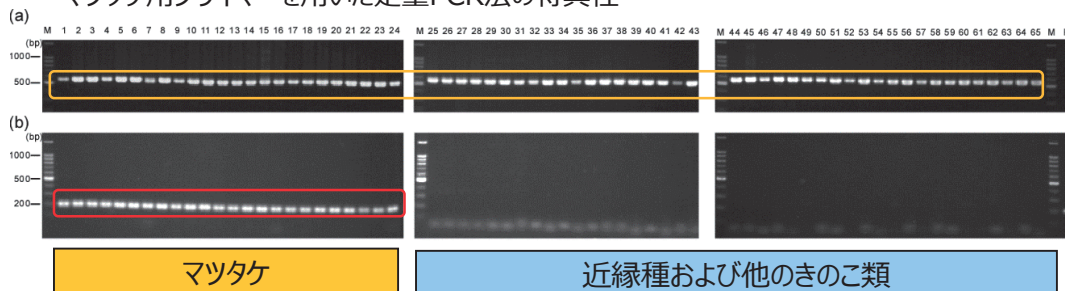
1. 土壌中のマツタケ菌糸とアカマツ根を特異的かつ定量的に計測する手法を開発しました。
2. マツタケ菌糸とアカマツ根の分布をシロ拡大方向の断面の深さ別に、またはシロの面的な広がりでも明らかにしました。

マツタケ菌糸とアカマツ根の定量

多様な生物が生育する土壌中でマツタケおよびアカマツと、それ以外の生物を区別する手法として、マツタケやアカマツに特有のDNA配列を用います。土壌の総DNAからマツタケやアカマツに由来するDNAを区別して定量する手法として定量PCR法を用い、マツタケやアカマツのDNAを特異的かつ定量的に増幅するプライマーを開発しました。本方法による分析に必要な土壌量は、乾燥重量1g程度です。

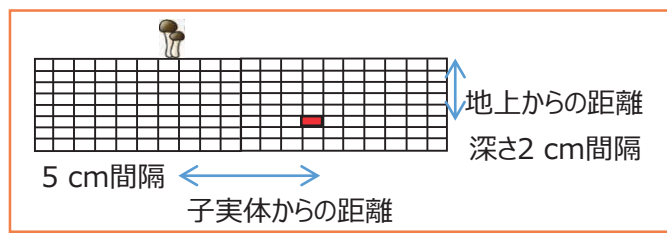


マツタケ用プライマーを用いた定量PCR法の特異性

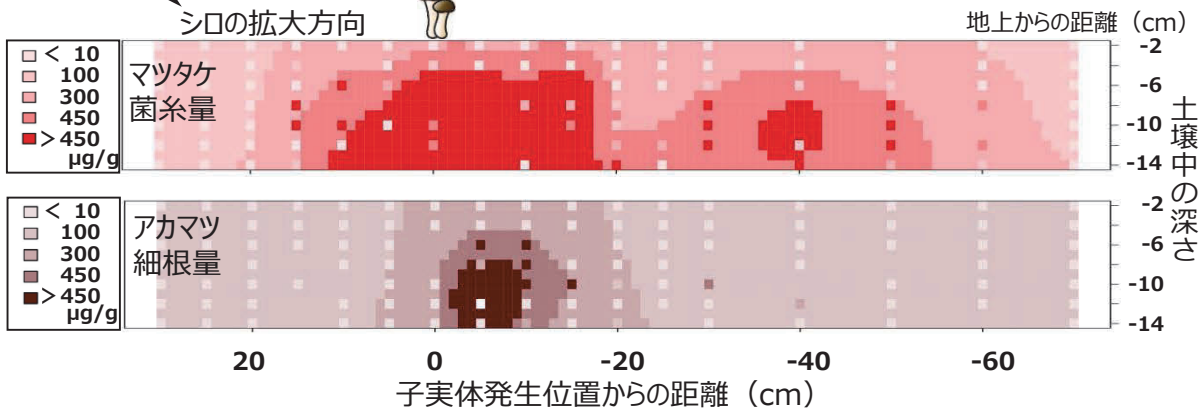


上：土壌から抽出された総DNA、下：特異的プライマーを用いたマツタケDNA

シロ拡大方向の土壌深さ別のマツタケやアカマツの分布

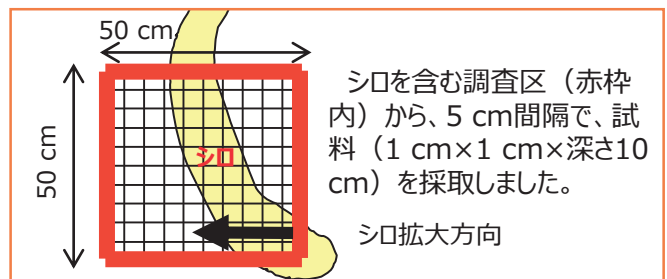


子実体が発生する時期のシロ土壌を採取して、各土壌に含まれるマツタケ菌糸量およびアカマツ細根量を定量PCR法で分析し、土壌中の分布状況を評価しました。

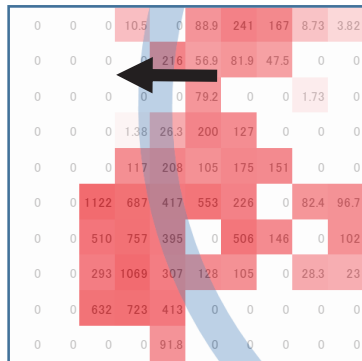


子実体直下を中心にマツタケ菌糸とアカマツ細根が集中して分布しています。

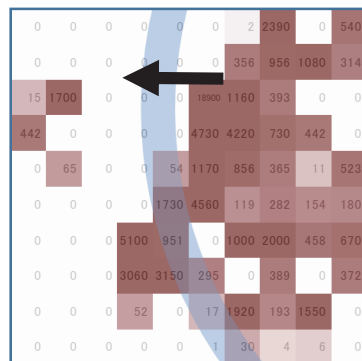
シロにおけるマツタケ・アカマツの二次元分布



シロを含む調査区にて土壌を採取して、定量PCR法で分析し、土壌中の水平分布状況を解析しました。



マツタケ菌糸量分布 (μg-乾燥菌糸/g乾燥土壌)



アカマツ根量分布 (μg-乾燥根/g乾燥土壌)

マツタケの発生地点 (青色) のやや外側にマツタケおよびアカマツが集中して分布していましたが、その内側にも、多い地点が認められました。

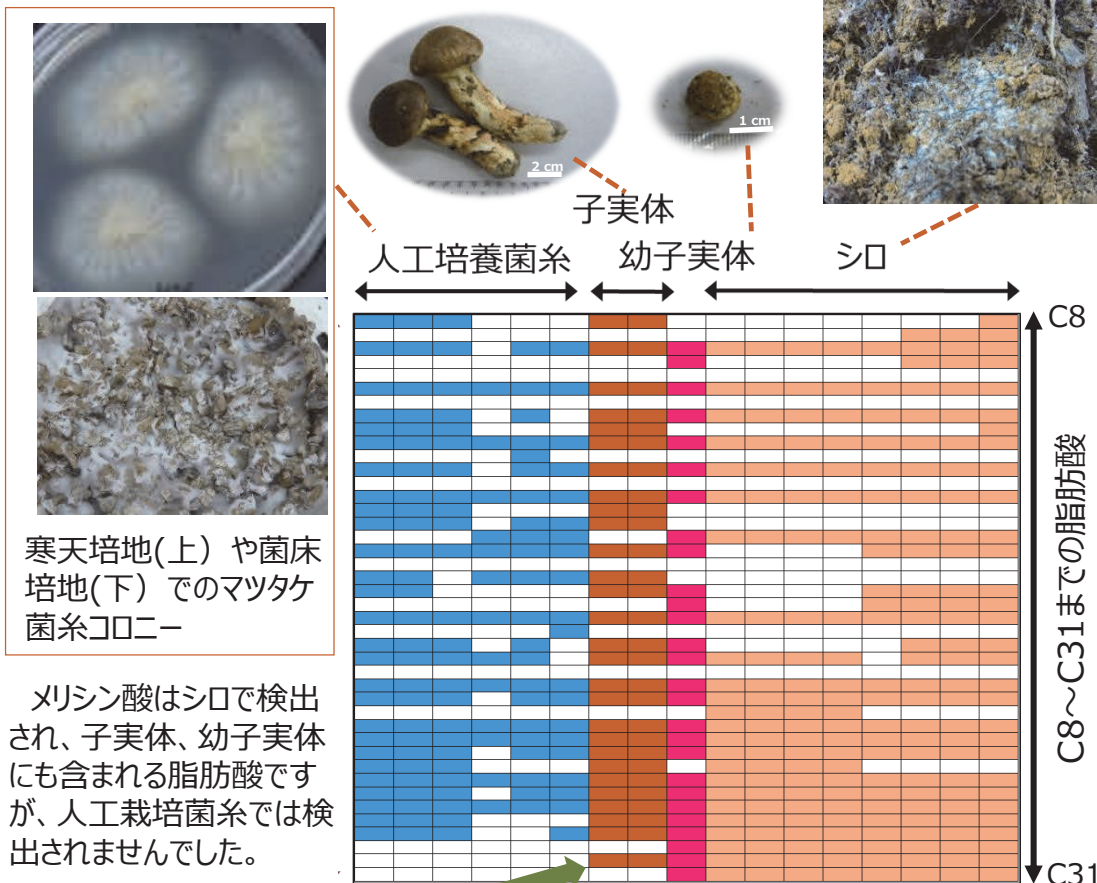
2. マツタケのシロの姿を知る

2-2. シロのメタボローム解析、プロテオーム解析

人工的な栽培条件下でマツタケの子実体を形成させるためには、マツタケシロの特徴を明らかにしていくことが重要です。マツタケの子実体が発生する野外のマツタケシロでは、どのような物質が含まれているのか解析を行い、特徴となる物質を明らかにしました。

1. シロで検出される物質数は、マツタケが発生する時期に増加しており、キノコの発生のため活発な代謝活動が行われていることが考えられました。
2. 子実体直下のシロでは、シグナル伝達や転写発現制御に関するタンパク質が多く検出されました。
3. マツタケのシロと培養菌糸とでは、脂肪酸の組成に違いが認められました。

人工栽培菌糸に不足する成分



メリシン酸
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}\text{COOH}$

人工栽培には、野外の自然条件のシロにて検出された、メリシン酸やそれよりも炭素数の高い脂肪酸が存在するような培養条件を整える必要があると考えられます。

3. マツタケ菌根形成苗を作る

マツタケは、生きたマツなどの樹木の根に菌根を形成して栄養分を獲得して生育します。マツタケ菌の生育様式の解明に向けて、マツタケ菌をマツ苗に接種して、菌根の形成や樹木成長への影響が調べられてきました。この研究の中で、無菌条件でマツタケ菌のシロを形成させることができました。この、シロ付きマツタケ菌根形成苗を野外植栽して、シロを拡大していくことが試みられてきました。しかしながら、植栽後数年のうちに、シロは消失してしまい、野外でのシロの定着や拡大には成功していません。

この理由としては、植栽地の生育環境（土壌の温度や湿度、日照など）が、マツ苗やシロ菌糸の生育に適しておらず、また、植栽地の土壌に生育する菌根菌を始めとする様々な微生物の生育を制御できなかったことが考えられます。そこで、温室や実験室内などの環境条件を制御し、殺菌した土壌を用いて、詳細なマツタケシロ形成誘導条件を明らかにすることに取り組みました。

ここでは、まず菌根形成苗作出に適した菌株の選抜について紹介し、次に無菌条件で形成されたマツタケ菌根形成苗において形成されたシロを拡大させるための試みを紹介します。一方、アカマツ以外の林で、マツタケが発生する北海道での、マツタケ菌根形成苗の作出の試みを紹介します。



ガラス温室におけるマツタケ菌根形成苗の大型鉢での育成

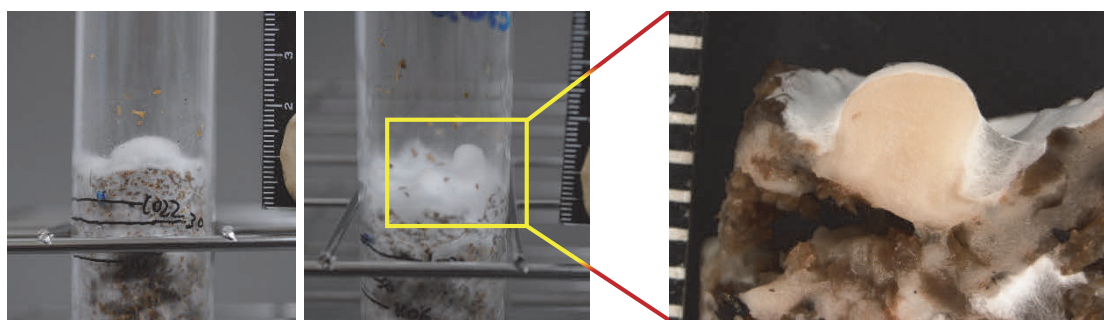
3. マツタケ菌根形成苗を作る

3-1. マツタケ有望菌株の選抜

マツタケ菌株には、様々な性質をもつものが存在します。ここでは、菌根形成苗作出だけでなく、菌床栽培に適用するため、野外に発生した子実体から分離した菌株をから、子実体形成能を有する菌株を選抜するほか、ガンマ線照射をマツタケに対して行い、栽培に有効な変異体の作出に取り組みました。その結果、野生菌株130株のうち、20菌株で菌糸の集合や菌糸塊の形成が見られた。また、ガンマ線照射により、元のマツタケ菌糸とは、培地上での菌叢が野生株と異なり、セルロースやアミロースの誘導体を効率良く分解するものなどを得ることができました。

1. 子実体から分離した野生株には、菌糸の集合や菌糸塊の形成が見られるものがありました。
2. ガンマ線照射により、野生株があまり分解しないセルロースやアミロースの誘導体を効率良く分解する変異株を得ることができました。

マツタケ野生菌株130株を培養すると、20菌株で菌糸の集合や菌糸塊の形成が見られました。



押麦培地を入れた試験管に形成された毛玉状菌糸塊

菌糸塊の断面

	野生株	変異株
菌叢		
分解酵素活性		
	色素結合した顆粒状セルロースは分解されていません。	顆粒状セルロースが分解されました。
		変異株が形成した菌床。組織分化した突起物(矢印、a)を伴います。

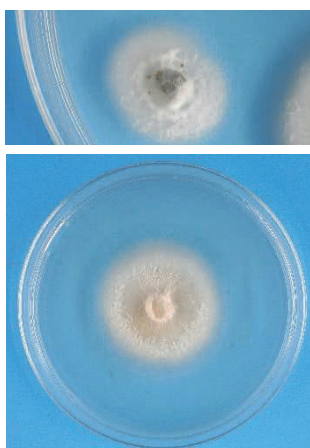
3. マツタケ菌根形成苗を作る

3-2. マツタケ菌株の長期保存

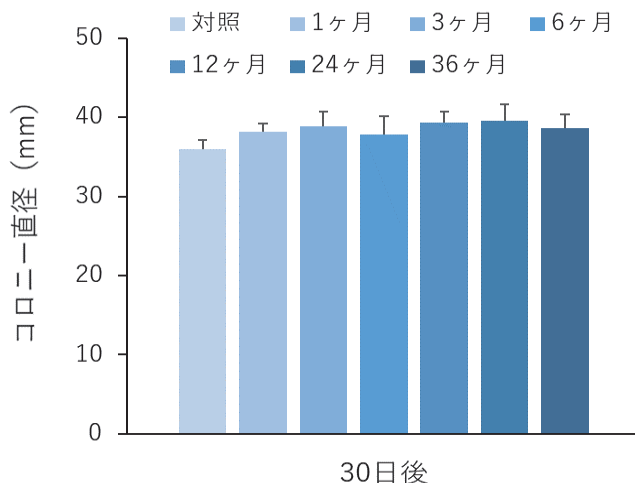
きのこ栽培に有望とされる菌株が得られた場合、その菌株の優れた性質を長期間できるだけ損なわずに安定的に保存する必要があります。そこで私たちはマツタケを対象に液体窒素による凍結保存を行い、保存処理後に再生したマツタケ菌の成長や菌根の形成能力に変化が無いかが調べました。その結果、最長36ヶ月凍結保存した後でも、菌根形成能力が維持されていることがわかりました。

1. 凍結保存したマツタケ菌糸の再伸長を確認し、菌糸伸長量は最長36ヶ月間凍結保存した後でも、保存処理前と変わらないことを確認しました。
2. 凍結保存したマツタケ菌はアカマツ苗の根に菌根を形成しました。

菌糸の伸長

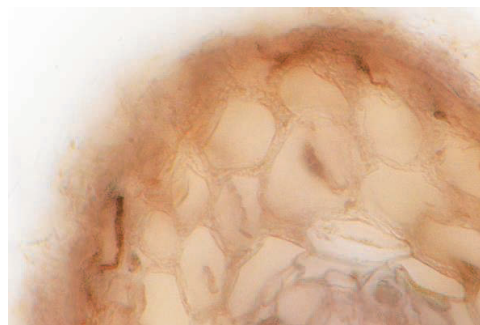


保存処理後に再生するマツタケ菌



保存処理後に再生したマツタケ菌の菌糸伸長 (菌コロニーの直径)

菌根の形成能力



再生したマツタケ菌が作る菌根 (左：外観、右：横断面の様子)

3. マツタケ菌根形成苗を作る

3-3. 無菌実生苗や取り木苗によるシロ拡大促進

無菌条件下においてマツタケの菌根をアカマツなどの植物の根に形成させ、シロのような構造物を作ることにこれまでに成功しましたが、それを、野外に植栽して、シロを拡大させることは困難でした。そこで、苗の周囲に無菌苗や取り木苗を植えた結果、シロを以前よりも大きく拡大させることができました。

- 1.クリーンルーム内で無菌のアカマツ実生苗と共に植え付けた菌根苗のシロは外部に拡大しました。
- 2.温室内で植木鉢にてシロ付きマツタケ菌根形成苗の周囲に、無菌実生苗や取り木苗を植えたところ、周囲の苗にもマツタケ菌根が形成されました。
- 3.温室内で無菌実生苗と共に植え付けたマツタケ菌根形成苗のシロは、マツタケ以外の菌根菌により菌根を形成する可能性のある根を切り落とすことで、外部に拡大しました。

クリーンルーム環境でのシロ拡大

マツタケ菌根形成苗と、その周囲にアカマツの取り木苗や実生苗を植栽した植木鉢をクリーンルーム環境に静置しました。植栽半年後には、シロ拡大が認められました。



- 左：クリーンルーム環境にて栽培中のアカマツ苗
中：無菌実生苗（黒矢印）と寄せ植えたマツタケ菌根形成苗（白矢印）
右：外部に拡大したシロ

植木鉢内でのマツタケシロの拡大

温室内で、マツタケ菌根形成苗を、アカマツ取り木苗やアカマツ無菌実生苗とともに植えると、半年から1年半後に、取り木苗や無菌実生苗でのマツタケ菌根の形成が認められました。元のマツタケ菌根形成苗のシロは消失しましたが、無菌実生苗と接触した部分では、シロが外部に拡大していました。



左：アカマツ無菌実生苗と寄せ植えたマツタケ菌根形成苗
中：マツタケのシロが形成された無菌実生苗
右：無菌実生苗に形成されたシロ

根切りによるシロ拡大の促進

マツタケ菌根形成苗を滅菌土壌への再移植する際に、ポット壁面に伸びた根を切断（根切り）をすると、他の菌根菌による菌根形成が低減し、シロの拡大は促進されました。



左：根切りを行わなかった場合、わずかに拡大したシロ（点線円内）
右：根切りを実施した場合、拡大したシロ（実線円内）

3. マツタケ菌根形成苗を作る

3-4. 北海道のマツでマツタケ菌根形成苗をつくる

北海道でのマツタケの林地栽培を目指して、北方系樹種であるアカエゾマツを用いて、積雪期のある寒冷地でも野外林地への移植が可能となるようなマツタケ菌根形成苗の育成技術を開発しました。

1. 北海道のマツタケは、北方系樹種であるマツ属のハイマツやトウヒ属のアカエゾマツ、モミ属のトドマツなどマツ科樹木の林にて発生します。
2. 北方系樹種は成長が極端に遅いため、成長の良いアカマツのように菌根形成苗を作製することが困難でした。
3. 調節環境下で、他の菌根菌を除去する苗の育成技術と培地を改良しマツタケの活性を高めた接種源を用いることで、北方系樹種でもマツタケ菌根形成苗を作製しました。

北海道のマツタケと共生する北方系マツ類

▲アカマツ（マツ科マツ属）
北海道南部でも天然林化しているがマツタケ発生の報告はありません。

◎ハイマツ（マツ科マツ属）
日本は分布の南限に当たります。

◎アカエゾマツ（マツ科トウヒ属）
エゾマツと分布域が重なるが、より条件の厳しい場所で優占します。

◎トドマツ（マツ科モミ属）
北海道のほぼ全土に分布します。



ハイマツ林と採取されたマツタケ

成長の遅い北方系樹種

北方系針葉樹（トドマツやアカエゾマツ）の苗を現場に植栽させる大きさにするには通常6年以上必要です。

長日処理等を施したコンテナ苗で北方系樹種のエゾマツを4年で育成できるという報告を参考に、調節環境下でアカエゾマツを育成しました。



播種して5箇月半経過したアカエゾマツ苗木
左：未処理
右：水耕長日処理

北方系樹種でマツタケ菌根形成苗を作製する

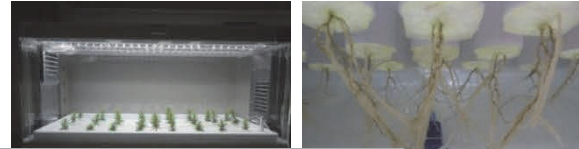
北方系樹種を用いて比較的短期間にマツタケ菌根形成苗を作製する方法を開発しました。

「マツタケ菌根苗の作製方法※」

※道総研林産試&北大共同で特許出願中（特開2019-13185）

① 苗の前処理

調節環境下、水耕栽培での生育促進

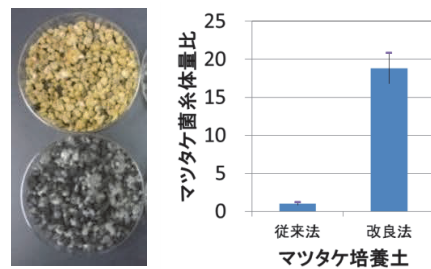


① 雑菌がほとんど無い苗の育成

② 高活性マツタケ菌接種源の調製

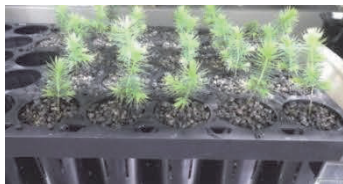
木炭添加でマツタケ菌糸成長促進

③ コンテナ植栽、マツタケ菌接種、苗の育成



従来法で培養した菌糸体量を1としました。

④ マツタケ菌糸が増殖した「菌根苗」

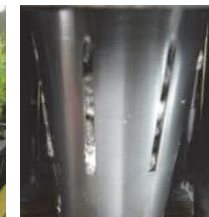


③ コンテナ植栽 & 接種

3ヶ月



④ マツタケ菌根苗



② 高活性マツタケ菌接種源の調製

コンテナのスリットから、菌糸の繁殖を確認
⇒ 菌根形成 ⇒ DNAでマツタケと確認

野外で育成した大型苗の利用

野外の苗畑で育成した「山出しサイズ*」前後の苗へのマツタケ菌根形成も可能です。

* 山出しサイズ：2号苗は高さ20cm以上、根元径4mm以上



① 雑菌がほとんど無い苗の育成

菌根を除去する等、根系を処理してから水耕を行います。



③ 大型ポットへ植栽 & 接種

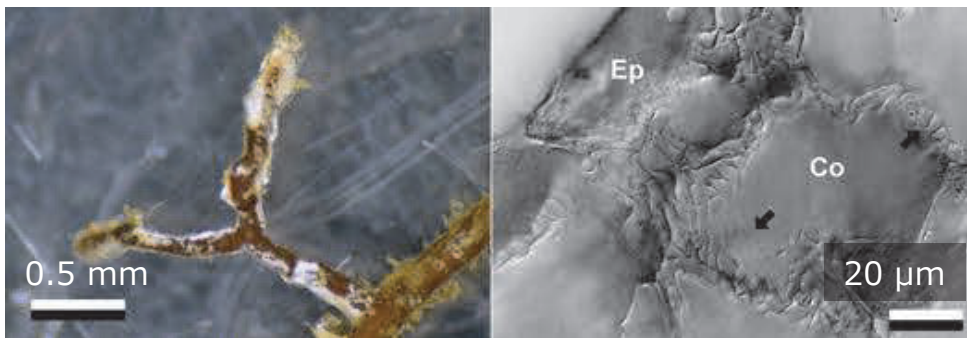
3. マツタケ菌根形成苗を作る

3-5. 菌根形成苗の大型化

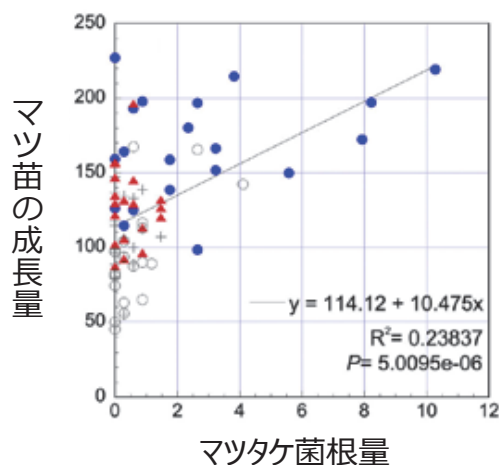
マツタケ培養菌糸体をアカマツ無菌実生に接種すると、根系には外生菌根が形成されます。この基本操作をもとにマツタケ菌根形成苗を作出できますが、野外移植に適した大型苗の作出は困難でした。この菌根形成苗の作出過程を多角的に検証することで、菌根形成苗を大型化しシロを形成させることができました。

1. アカマツ無菌実生にマツタケ培養菌糸体を接種し小型の菌根形成苗を効率的に作出できました。
2. 小型の菌根形成苗を段階的に大型容器へ移植・順化させ、苗の大型化を図るとともに、シロも大きく発達させることができました。
3. 大型化した菌根形成苗を温室や野外の条件下に植栽し、シロの野外定着試験に取り組むことが可能となりました。

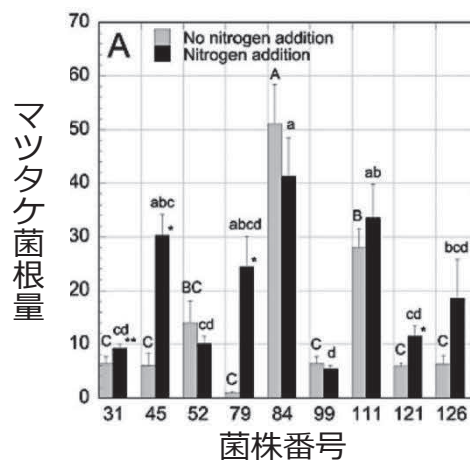
マツタケは外生菌根菌（共生菌）



アカマツ無菌実生に形成されたマツタケ外生菌根の外観（左）と断面（右） Ep、表皮細胞；Co、皮層細胞；矢印、マツタケ菌糸。

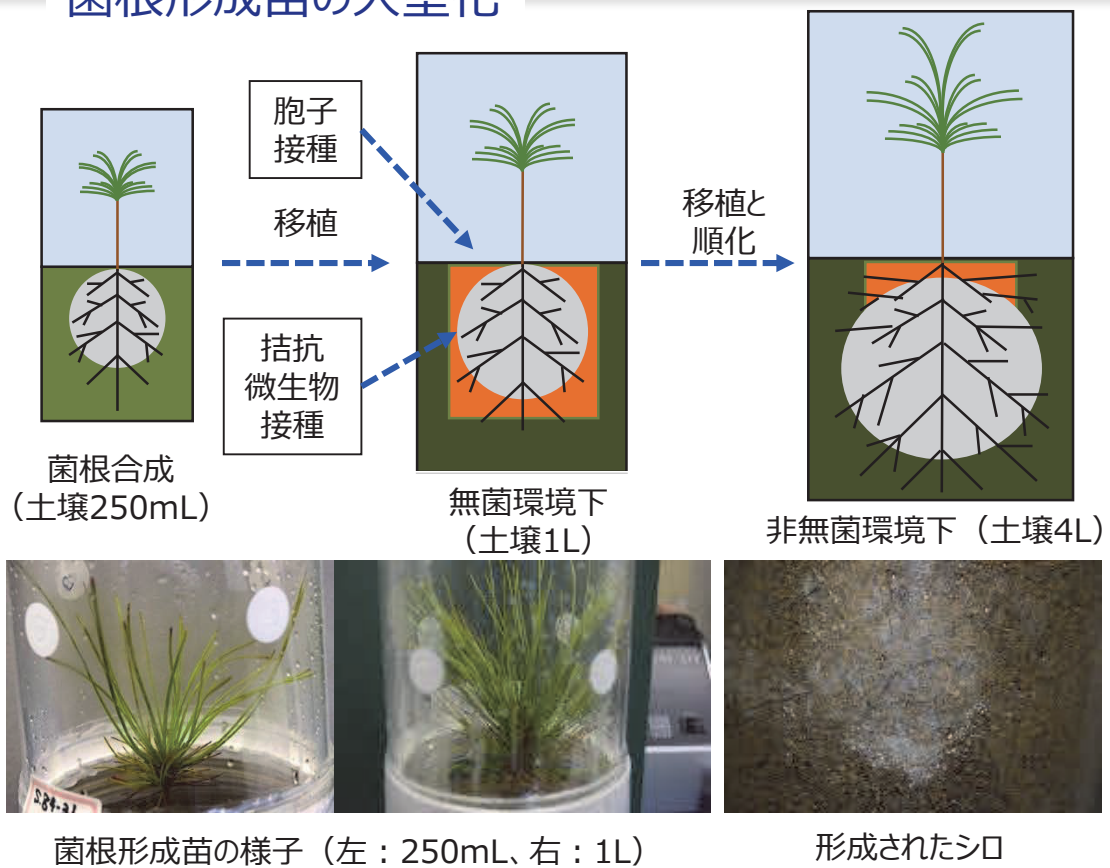


マツ苗の成長量とマツタケ菌根量は総じて正の相関を示しました。



1本の子実体から孢子分離した姉妹株間でも菌根形成能は大きく異なります。

菌根形成苗の大型化



大型化した菌根形成苗の野外植栽試験



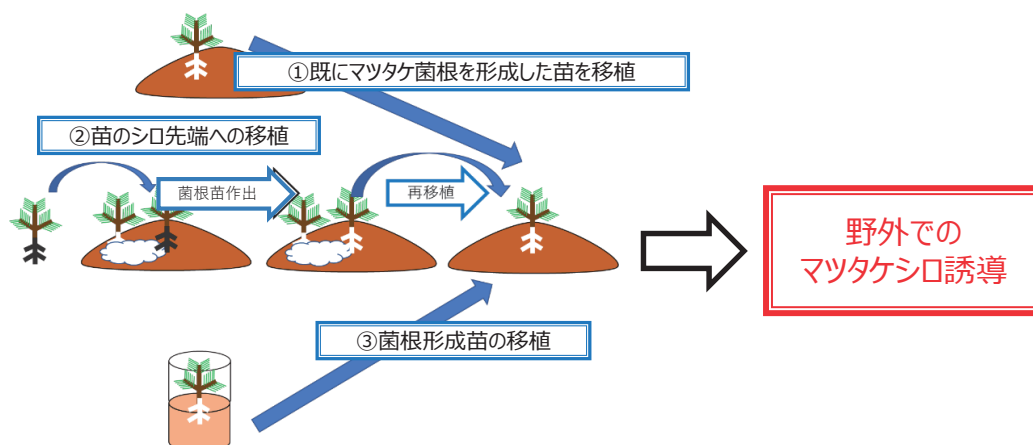
3. マツタケ菌根形成苗を作る

3-6. 自然感染による菌根形成苗の作出

アカマツ苗へマツタケ菌根を形成させる方法には、林地にて拡大するシロの外側に苗を植えて、シロの拡大とともにマツタケ菌が苗に接触して菌根を形成させる方法があります。この方法により、林地栽培にて、マツタケが発生しています。但し、この方法について科学的検証がなされずに現在に至っております。ここでは野外でのマツタケ菌根形成苗を作出する方法を検討しました。

1. マツタケ菌根形成苗は移植先でも引き続き菌根を形成していました。
2. 既存のシロ上にアカマツ苗を植栽した場合、その苗木にマツタケ菌根が形成されました。
3. シロ上で自然感染させた苗の再移植には十分な苗の準備や、植栽からシロが広がるまでの期間が必要です。

シロ苗作出方法



- ① マツタケの自然感染により菌根を形成した苗。
- ② アカマツ苗木をマツタケシロ上に植栽して作出したマツタケ菌根形成苗。この苗の移植により、国内では広島県で唯一子実体の発生に至っています。
- ③ 室内環境下で人為的に作出した菌根形成苗（3-5.参照）。

① 既にマツタケ菌根を形成した苗を移植



アカマツ幼苗でもシロを形成しているものもありました。また比較的大型（樹高50cm）のマツタケ菌根形成ツガ苗を植木鉢（直径82cm）に移植したところ、移植6か月後にもツガ根系からマツタケ菌根の存在がDNA解析により確認することができました。

左：シロを形成しているアカマツ幼苗
右：植木鉢にシロごと移植したツガ苗

② 苗のシロ先端への移植

ア マツタケ菌根形成に用いる苗の準備

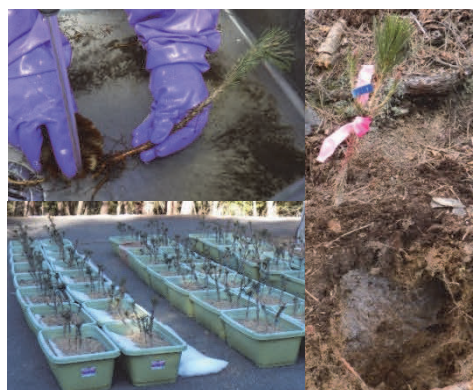
・苗畑で育てた苗を用いますが、その根系には、様々な種の菌根が付着しているので、たわしを用いてこれらを除去します。菌根が付着していない細根は残す必要があります。植栽後の蒸散を軽減するため葉の長さを半分程度に切断します。

イ 苗の仮植とシロ上植栽

・苗はポットに入れた滅菌土壌に植栽し、菌根化していない細根を形成させます。

・苗をマツタケ山のシロ上に根系が接触するように植栽すると早く1年程度でマツタケ菌根が見られます。

・マツタケ菌根形成苗を再移植しますが、移植前にマツタケ菌根の量を増やしておく必要があります。



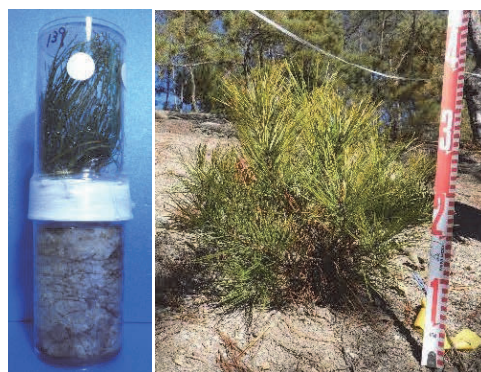
左上：たわしを用いた菌根の除去
左下：根系洗浄済み苗の仮植
右：シロ上への苗植栽

③ 菌根形成苗の移植

・菌根形成苗はボトルから取り出しそのままアカマツ林に移植します。

・マツタケ菌は環境条件による影響を強く受けるので、マツタケが発生するアカマツ林への移植が適していません。ただし、既存のシロ内、シロ先端、シロから、20cm離れた地点へ植えた苗の生育に差異はみられませんでした。

・移植後最長で2年6か月マツタケ菌根が生存していることがDNA解析により確認されました。



左：ポット内で生育する菌根形成苗
右：アカマツ林へ移植した菌根形成苗
(移植2年6か月後)

現段階で時間的に早くシロが誘導される可能性が高い方法です。

4. 野外でマツタケのシロを作る

野外でのマツタケの人工栽培には、アカマツなどの宿主となる樹種の林を管理して、マツタケの生育に適した状態にすることが重要です。このようなマツ林の管理は、それ自体、マツタケの発生量を維持向上させることが知られてきました。

ここでは、林内の表層土壌の温度を変えたり、土壌の腐植層を除去したり、様々な種類に変えなどの環境改善を行うほか、表層土壌にマツタケ根を集め、それによるマツタケ菌糸量への影響を調べました。



上：長野県のアカマツ林内のマツタケ発生地

下左：林地にプラスチックシートを敷いて、アカマツ細根の形成を誘導する。

下右：地表の腐植を除去して、マツタケシロの発達への影響を調べる。

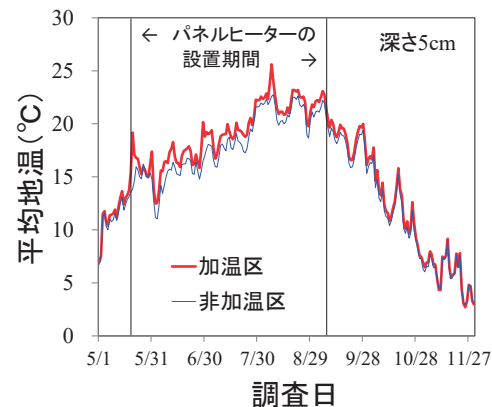
4. 野外でマツタケのシロを作る

4-1. 環境改善によるシロ活性化技術開発

マツタケのシロ形成を成功させるには、マツタケ菌糸やマツタケ菌根形成苗などを設置した後、そこから周囲への菌糸伸長に適した条件を明らかにする必要があります。そこで、マツタケ発生林内の既存のシロの直上と周囲で、被覆や土壌置換を行うことにより、アカマツ林におけるシロの拡大に適した条件を明らかにしました。

- 1.シロが存在する林地表面に簡易型温室（オープントップチャンバー：OTC）やパネルヒーターを設置したところ、シロの地温が上昇しました。
- 2.マツタケ菌糸が検出された範囲は加温区の方が非加温区より広く、加温がシロの拡大に有効でした。
- 3.シロの進行方向の土を軽石砂に入れ替えた場合、マツタケの菌糸はより外部まで拡がりました。

シロの加温でマツタケの菌糸が広範囲で検出

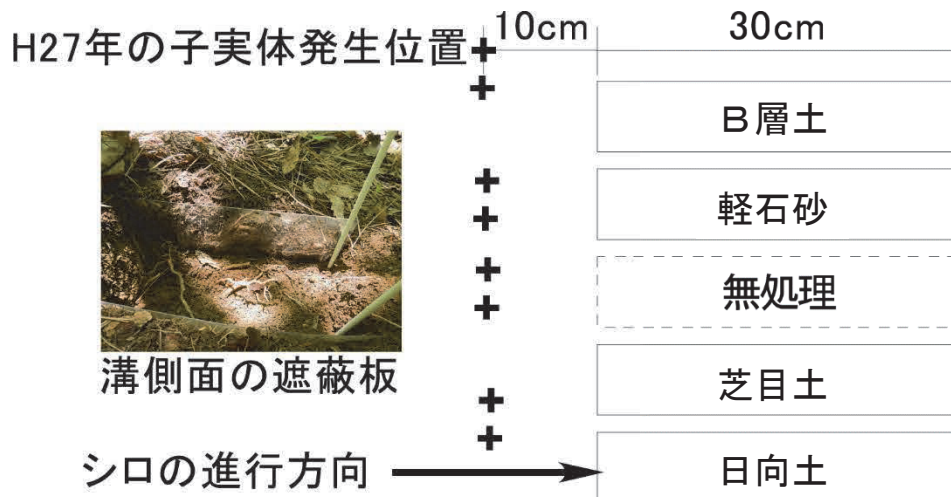


OTCとパネルヒーター（太陽光発電から給電、9月上旬まで）を併用してシロ（3ヶ所）を加温した結果、加温区の地温は5~11の各月で非加温区を上回り、その差は6月が最大でした。

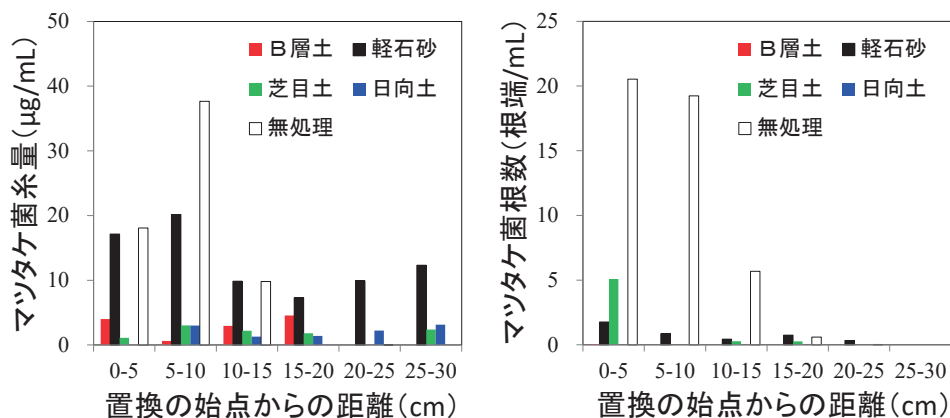
調査月	マツタケ(DNA)の検出点数 (平均値±標準偏差)			
	加温区		非加温区	
4	7.3	± 2.3	4.6	± 3.7
6	9.0	± 2.0	4.0	± 2.6
7	4.3	± 4.1	6.6	± 2.5
10	10.3	± 2.5	3.6	± 5.5
平均	7.7	± 0.9	4.7	± 1.4
7月から10月の増加率	2.3		0.5	

各シロで16点の土を採り、マツタケ菌糸量を定量PCR法（2-1.参照）で計測すると、マツタケが検出された点数は、加温区が非加温区を上回っていました。

軽石砂で菌糸が伸びる



- ・5か所のシロで、前年のマツタケ発生位置から拡大方向に10cm先を起点に、長さ30cmで深さ10cmまで除去し、滅菌済みの4種の土壤資材を充填しました。
- ・充填した場所の側面にプラスチック板を入れ、側面から菌糸が侵入しないようにしました。
- ・処理2年後に資材中のマツタケの菌糸量（定量PCR）とマツタケ菌が感染した根端数を実体顕微鏡を用いて測定しました。



- ・菌糸量は、4種の土壤資材の中では軽石砂で多い傾向にありました。
- ・マツタケ菌根は無処理が多かったが、軽石砂や芝目土でも形成されていました。
- ・軽石砂は、菌糸が菌根よりも前方で検出されました。

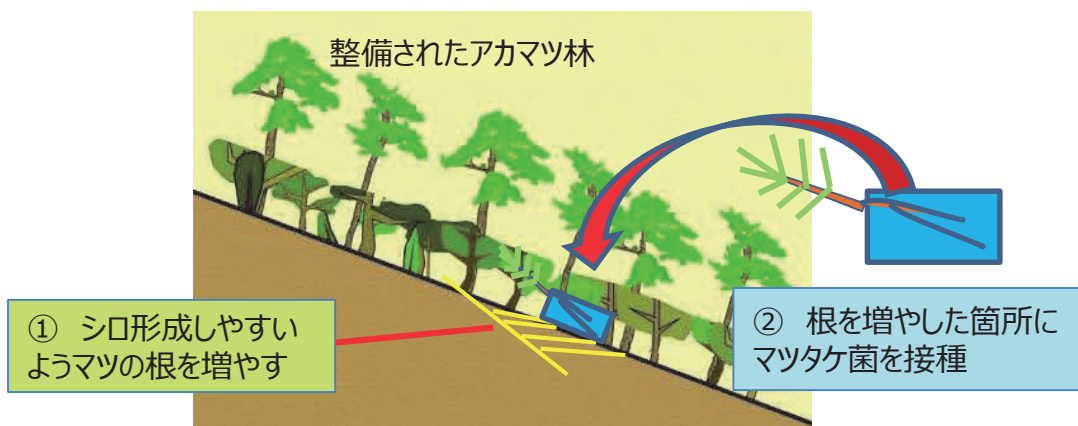
4. 野外でマツタケのシロを作る

4-2. シロ形成のためマツの根を増やす

マツタケのシロ形成には、マツタケ菌の栄養分を供給する宿主であるマツの根が必要です。シロが最初に形成されるのは地表付近とされることから、地表に多数のマツの根を誘導し、シロ形成しやすい場所を整備する方法を検討しました。

1. アカマツ林内の地表を建築用不織布で覆い土のうなどで重しをする（被覆処理）と、マツの根（白根）が、不織布に接した部位に伸長しました。
2. 被覆処理は3～7月のどの時期に行っても根の伸長への効果がありました。地上に誘導した白根の数が最大になるのは、被覆処理をした翌年の4月でした。

マツの根の誘導によるシロ形成の試み



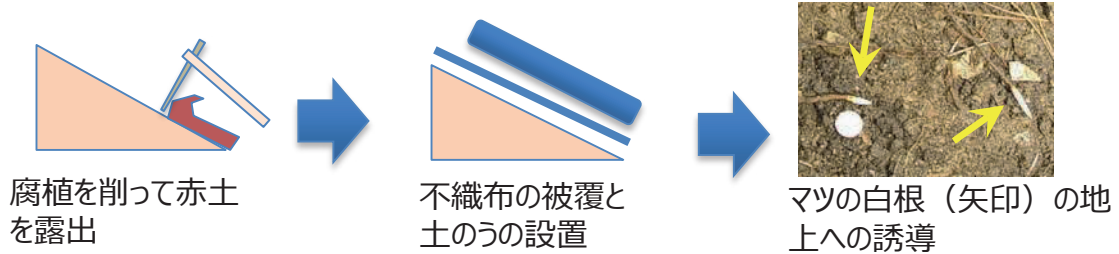
増やすのはマツの白根

マツタケは新しい根に感染し菌根を作ります。菌根を多量に作るため、成長中の先端の白い根（白根）を増やします。



被覆処理による白根の地表への誘導

不織布などのシートで地面を被覆するとマツの白根を地上に誘導できます。効果の安定している「建築用不織布で被覆し土のうにて重しをする（被覆処理）」方法について、処理や利用の適期を検討しました。

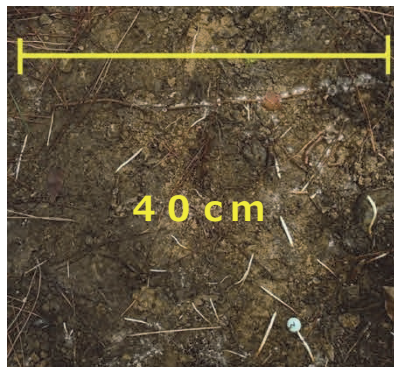


白根の形成が多いのは被覆処理を開始した翌年の4月

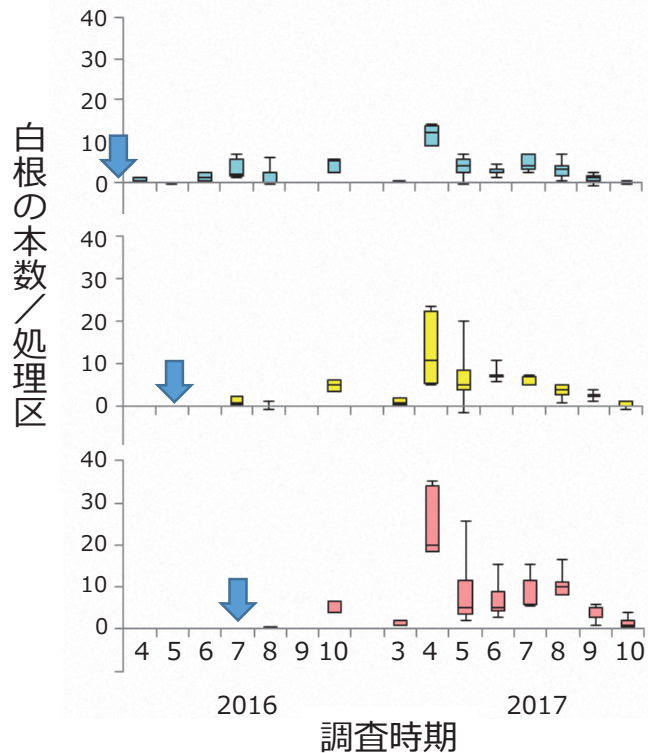
2016年3月、5月または7月にアカマツ林地表を被覆処理して地表での白根形成の影響を調べました。

どの時期に被覆を始めても地上に根が誘導できました。

地表に形成された白根数は被覆を始めた翌年の4月に最多でした。



被覆処理の翌年4月の白根形成状況



処理区（40cm×40cm）あたりの白根数の推移（南丹市試験地）
被覆処理を開始した月を ↓ で示しました。

4. 野外でマツタケのシロを作る

4-3. 林地接種によるバカマツタケの子実体発生

バカマツタケはマツタケと同じ、キシメジ科キシメジ属のきのこで、マツタケに色・形などが非常に似ているマツタケの近縁種です。匂いもマツタケに似ていて、マツタケよりも強く香ります。バカマツタケの培養菌糸をウバメガシの苗木の根に接着させて林地に植えたところ、バカマツタケの子実体が発生しました。

1. マツタケはマツ科植物と共生しますが、バカマツタケはブナ科の林に発生します。
2. 菌根がない宿主苗とバカマツタケの培養菌糸体を一体化して林地に接種する方法を開発しました。
3. 接種した箇所の一部からバカマツタケの菌糸が検出され、きのこの発生も見られました。

バカマツタケはどんなきのこ



シイ林



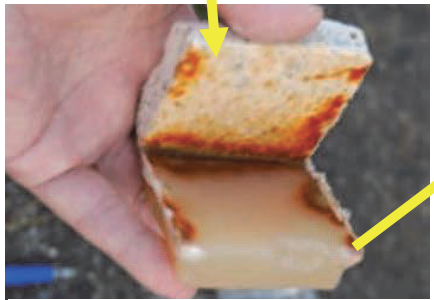
アラカシ林に発生したバカマツタケ



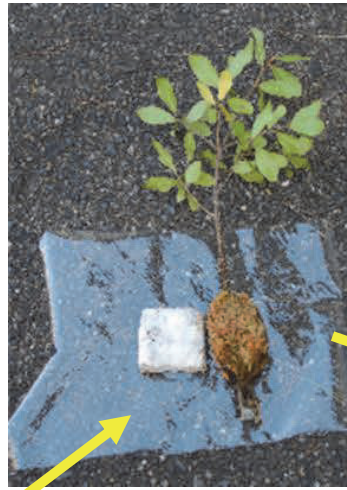
ミズナラ林

マツタケは、アカマツやツガ、トウヒなどのマツ科の樹木と共生してきのこを作りますが、バカマツタケはコナラ、ミズナラ、シイ、カシ類などのブナ科の樹木と共生してきのこを発生させます。

バカマツタケ菌と樹木苗とを一体化させて林地接種



寒天培地と菌糸塊を分けます。



セロハンを用いて苗と菌糸塊を一体化させます。

林地植栽

接種箇所よりきのこが発生



接種箇所にできたシロ状の構造



シロ状構造で見られた厚壁孢子（厚壁孢子はバカマツタケで特徴的にみられます）



形成されたシロと発生したバカマツタケ子実体

5. 国産トリュフ栽培を目指す

トリュフは球状から塊状をしたキノコです。高級食材として知られ、日本にも西洋料理のお店などで見ることができますが、これらは全てヨーロッパや中国などから輸入されたものです。ヨーロッパなどでは、一部のトリュフが人工栽培されています。これは、トリュフ菌が感染した苗を野外に植栽すると、菌が土壌中を拡がり、きのこが発生するというものです。これは、トリュフが、樹木の生きた根に菌根を形成して、樹木の光合成産物を利用して生育する菌根菌であるためです。

日本にもトリュフが存在することは知られていましたが、名前もきちんと付いていない状況でした。そこで、国産トリュフの人工栽培技術の開発に向けては、まず、食用として有望な国産トリュフの種を確定しました。次に、トリュフの発生環境を明らかにしました。また、国産トリュフ菌根形成苗を作出するため、どのような種類の樹木がトリュフ菌の菌根形成苗を作出するのに適しているのか調べました。これら作出したトリュフ菌苗を実験圃場に植えたところ、1年後にトリュフ菌の定着を確認することができました。



上左：ホンセイヨウショウロ

上右：コナラの根に形成されたアジアカロセイヨウショウロ菌根

下：圃場に植栽したトリュフ菌根形成苗

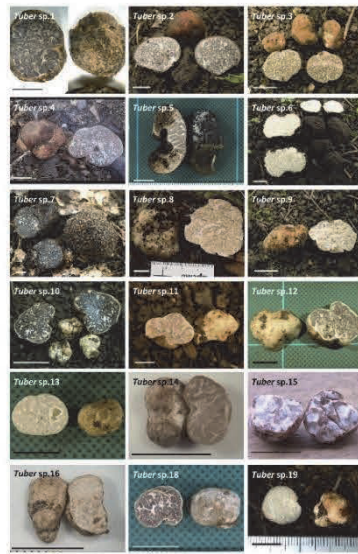
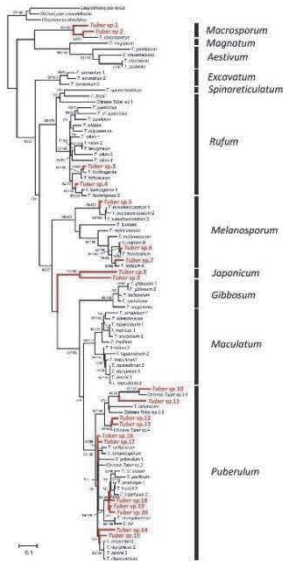
5. 国産トリュフ栽培を目指す

5-1. 日本のトリュフ

世界三大珍味の一つとして知られるトリュフ。ヨーロッパでしか発生しないと思われてきましたが、実は日本にも多種多様なトリュフが発生します。私たちは国産トリュフの栽培化を目指し、大型で発生量が多く、香りの強いトリュフを食材として有望なものとして、種を確定しました。

- 1.トリュフ（セイヨウショウロ属）は生きている植物の根に菌根を形成し、生活に必要な養分を植物から供給して暮らす菌根菌です。トリュフの子実体は球状から塊状をしており、地中に形成されます。
- 2.遺伝的に20タイプに分類されてきた国産トリュフのうち、食材として有望な3種について、種を確定し、名前を付けました。

日本のトリュフの多様性



セイヨウショウロ属は全世界で180種以上存在するといわれ、欧州で32種以上、北米で約20種、中国では約80種がこれまで記載されています。

日本には遺伝的に20タイプに分類できるトリュフが見つっています。国土面積が狭いながらも、これほど多様なトリュフが発生する理由は、宿主である森林樹種が多様なためと考えられます。

食材として有望な日本のトリュフ



ホンセイヨウショウロ
Tuber japonicum



アジアクロセイヨウショウロ
T. himalayense



イボセイヨウショウロ
T. longispinosum

5. 国産トリュフ栽培を目指す

5-2. トリュフの育つところ

トリュフが育つところは、どのような場所なのでしょう？トリュフの生育する土壌条件を明らかにすることは、トリュフの人工栽培を進めるためにも、とても重要です。そこで黒トリュフ（アジアクロセイヨウショウロ：*Tuber himalayense*）と白トリュフ（ホンセイヨウショウロ：*T. japonicum*）の生息する土壌の特徴を明らかにしました。

1. 調べたトリュフ2種は、幅広い気象条件、土壌条件に生息します。
2. アジアクロセイヨウショウロは中性から弱アルカリ性でカルシウムなどの養分が比較的多い土壌を好む傾向がありました。
3. ホンセイヨウショウロは弱酸性で養分が比較的乏しい土壌を好む傾向にありました。

トリュフはいろいろなところで育つ

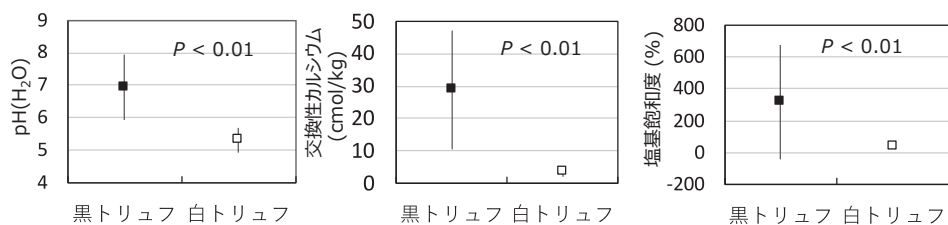
調査した9カ所の生息地では、年降水量は1146～1575mm、年平均気温は10.9～15.9℃の範囲にあります*。また標高も25～900mと幅広いです。

- アジアクロセイヨウショウロ調査地
- ホンセイヨウショウロ調査地



*各生息地に最も近い気象観測地点の平年値を引用
<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index>

種によって異なる土壌の特徴



*図中のバーは標準偏差を示す

トリュフが育つ土壌のpHや養分量は、アジアクロセイヨウショウロとホンセイヨウショウロとは異なることがわかりました。

5. 国産トリュフ栽培を目指す

5-3. トリュフ菌根形成苗作り植える

トリュフは、樹木の根を介して得た養分を利用して土壤中を拡がり、地表近くにきのこを形成する外生菌根菌です。そのため、トリュフの栽培は樹木苗の根にトリュフ菌の菌根を形成させて、その苗木を野外で育てることにより行われます。ここでは、食用として有望な黒トリュフ（アジアクロセイヨウショウロ：*Tuber himalayense*）と白トリュフ（ホンセイヨウショウロ：*T. japonicum*）を対象に、トリュフ菌根形成苗を作出し、野外に植栽しました。

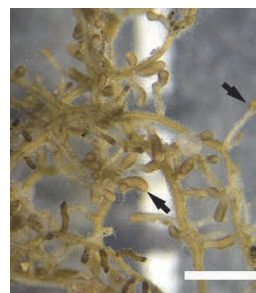
1. 国産トリュフはクリ、ナラ、カシ、シデ、シナノキ、マツなどの林で発生します。そこで、これらの樹木をトリュフ菌を感染させる苗としました。
2. 従来の方法に倣って、トリュフ菌根形成苗を作るときの接種源にはトリュフ胞子を用いました。
3. トリュフ菌根形成苗を作るときや、それらを野外に植栽するときには、土壌のpH条件や樹種を考慮する必要があります。

接種源



トリュフの皮（左、矢印）を除去して、滅菌水とともに乳鉢ですりつぶし（中）、胞子懸濁液（右）を作ります。右図でのスケールは、0.05 mm。

トリュフ菌を感染させた苗



スケールは、2.5 mm

胞子懸濁液を苗木に接種して、菌根を（右、矢印）を形成させます。

トリュフ菌を感染させた苗の植栽



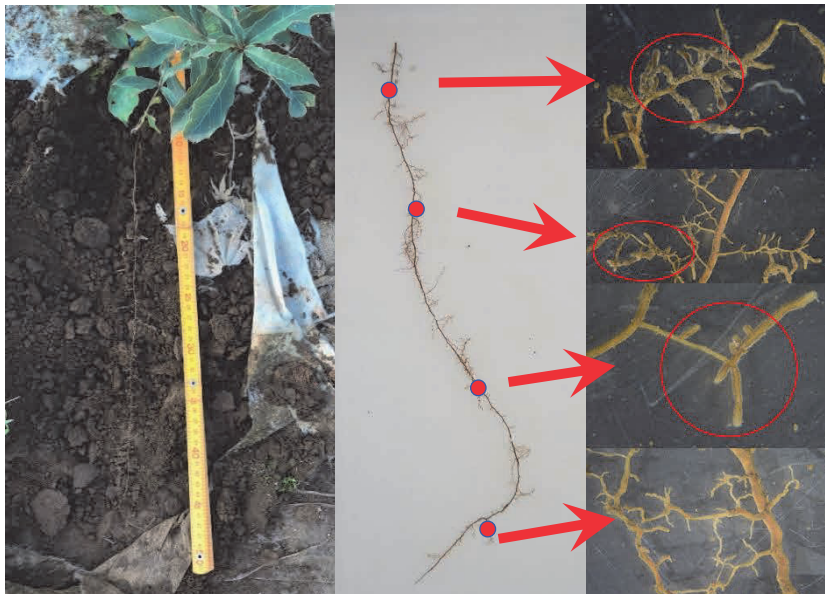
苗木の生育に適した日当たりの良い場所を、耕うん等により、雑草などを除去し、トリュフ菌根形成苗を植栽しました。



用いる種の特성에応じて、石灰などを施肥して、土壌のpH値を調整します。

トリュフ菌の定着を確認

トリュフ菌（ホンセイヨウショウロ）を感染させたコナラ苗を植栽した1年後、コナラ苗から広がる根系にトリュフの菌根（赤線で囲んだ部分）が形成されていました。



5. 国産トリュフ栽培を目指す

5-4. 野外で菌根形成させる

ヨーロッパなどで行われているトリュフの人工栽培は、通常、トリュフ菌根形成苗を野外で栽培する方法です。一方、天然のトリュフ産地では、成木の根にもトリュフ菌の菌根は形成されています。もし、栽培したいトリュフ菌の菌根を人為的に成木に形成させることができれば、既存の森林を利用して人工栽培を行える可能性があります。そこで本研究では、宿主となるブナ科の成木に国産の黒トリュフ（アジアクロセイヨウショウロ：*Tuber himalayense*）を感染させる技術の開発に取り組みました。

1. アジアクロセイヨウショウロの宿主範囲は広く、ブナ科、カバノキ科、マツ科などの樹木に菌根を形成することが知られています。
2. アジアクロセイヨウショウロは、日本で一般的に見られる土壌と比べるとpHの高い環境を好むことから、接種する際に石灰肥料による土壌pHの調整を行いました。
3. 菌根形成感染苗（コナラ）、孢子懸濁液、発生地土壌をクリおよびクヌギの成木に接種した結果、これらの成木にアジアクロセイヨウショウロの菌根が形成されたことを確認しました。

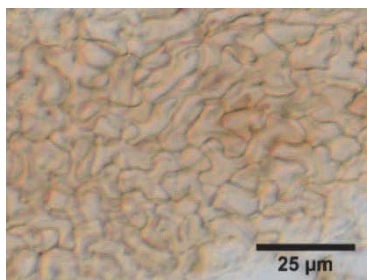
接種の方法

1. 宿主成木の根元付近に深さ10cm、20cm四方程度の穴を掘ります。
2. 競合菌を減らすために細根を除去します。
3. 石灰肥料を加えた土で埋め戻します。
4. 接種源を接種します。



菌根形成苗を接種源とした例

成木への接種により形成された黒トリュフ菌根



クリ成木への接種により形成されたアジアクロセイヨウショウロの菌根（左）とその菌鞘構造（右）

5. 国産トリュフ栽培を目指す

5-5. トリュフの菌株を識別する

農作物等の栽培や収穫後の流過程において、品質管理は非常に重要な課題です。トリュフ栽培では由来の明らかな菌株から作出した苗を、屋外の自然環境下で育て、発生した子実体を収穫するため、その間の混入や取違いなどさまざまなリスクを伴うことが予想されます。接種菌の管理を適切に行うためには、見た目では区別できない接種源と子実体の遺伝的な異同を識別する技術の開発が必要です。

1. 日本産黒トリュフ（アジアクロセイヨウショウロ）の菌株識別のための分子マーカーを開発しました。
2. 開発した分子マーカーをもちいて、日本各地から採集した黒トリュフの菌株識別に成功しました。
3. 日本産白トリュフ（ホンセイヨウショウロ）でも、同様の分子マーカーを開発しています。

菌株を区別するための分子マーカー

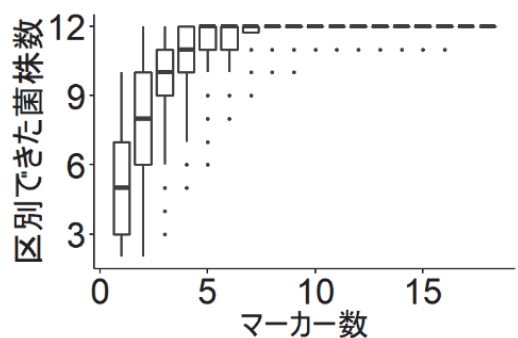
単純反復配列と呼ばれるDNAの塩基配列は、警察の科学捜査でも使われ、親子間など近縁者どうしを区別する分子マーカーとして適しています。トリュフにおいてもこの配列を複数箇所にわたって調べることで菌株を区別することができます。

菌株A（繰り返し数 5）	AGTCAAT	GTA	GTA	GTA	GTA	GTA	CCAGTTATA…
菌株B（繰り返し数 3）	AGTCAAT	GTA	GTA	GTA	CCAGTTATA…		
菌株C（繰り返し数 6）	AGTCAAT	GTA	GTA	GTA	GTA	GTA	CCAGTTATA…

単純反復配列（ここでは「GTA」青色の部分）の繰り返し回数は、菌株間で異なる場合があります。

トリュフの菌株の識別

国内7か所から採集した15個のトリュフを使って菌株の区別を試みました。その結果、開発した19個のマーカーのうち7-8個を用いればこれらの菌株をほぼ区別することができました。



用いたマーカー数と区別できた菌株数

6. よりよく知るために

参考文献

○概要

第10回食用菌根性きのこに関する国際ワークショップ講演要旨集. 長野県諏訪市. 2019年10月.

Yamanaka et al. (2020) *Mycoscience* (印刷中).

○マツタケのシロの姿を知る

Yamaguchi et al. (2016) *Mycorrhiza* 26, 847–861.

○マツタケ菌根形成苗を作る

Murata et al. (2018) *Mycorrhiza* 28, 171–177.

Murata et al. (2019) *Botany* 97, 463–474.

Shimokawa et al. (2017) *Mycoscience* 58, 432–437.

Yamada et al. (2006) *Mycorrhiza* 16, 111–116.

小林ら (2007). *日本きのこ学会誌* 15, 151–155.

宜寿次ら. 特開2019-13185.

Saito et al. (2018) *Mycoscience* 59, 89–97.

Yamada et al. (2019) *Mycoscience* 60, 102–109.

Horimai et al. (2020) *Fungal Ecology* (印刷中).

○野外でマツタケのシロを作る

成松・山口 (2018) 岩手県林業技術センター研究報告 26, 11–19.

河合昌孝、特願2018-007201.

成松ら (2020) 岩手県林業技術センター研究報告 (印刷中).

○国産トリュフ栽培を目指す

古澤ら (2020) 森林総合研究所研究報告 (印刷中).

Kinoshita et al. (2016) *Mycoscience* 57, 366–373.

Kinoshita et al. (2018) *PLOS ONE* 13, e0193745.

Kinoshita et al. (2018) *Mycorrhiza* 28, 679–690.

Nakano et al. (2020) *Mycoscience* (印刷中).

Shimokawa et al. (2020) *Food Science & Nutrition* (印刷中).



高級菌根性きのこ栽培技術の開発—マツタケ・トリュフの栽培化に向けて
編集・発行 国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所
〒305-8687 茨城県つくば市松の里1番地
発行日 2020年（令和2年）2月1日
お問い合わせ先 広報普及科編集刊行係
電話 029-829-8373
E-mail: kanko@ffpri.affrc.go.jp

※本誌掲載内容の無断転載を禁じます。