

マツタケ菌感染苗木による林地でのシロ定着技術の開発

古川 仁・片桐一弘・増野和彦・山田明義*¹・河合昌孝*²・小林久泰*³・山中高史*⁴

マツタケ菌に感染させた苗木を林地植栽することで、シロが新たに定着する技術開発を目指した。方法は次の3通り、①自然状態で既に感染した苗木を移植、②既存のシロに苗木を植栽することで感染苗木を作製し、新たな林地へ移植、③実験室レベルで菌根合成苗を作製、作製した苗木を林地植栽。この結果、①の方法では樹高約50cmのツガをシロごと大型植木鉢へ移植したが、シロ定着には至らなかった。②の方法では取り木が比較的感染しやすい傾向がみられたが、再移植先でのシロ定着には至らなかった。③の方法では、菌根合成苗根系から、林地植栽3年7か月経過後にもマツタケ菌が検出された。また、菌根合成苗のシロ直径は20cm以上とするものが作出でき、特に③の方法が今後の技術展開に有望であると結論した。

キーワード：マツタケ、感染苗木、シロ、取り木、菌根合成

目次

- 1 緒言
- 2 自然感染苗の移植によるシロ定着
 - 2.1 目的
 - 2.2 方法
 - 2.3 結果
 - 2.3.1 アカマツ幼苗
 - 2.3.2 ツガ移植（シロ移植）
 - 2.4 考察
 - 2.4.1 アカマツ幼苗
 - 2.4.2 ツガ移植（シロ移植）
- 3 未感染苗のシロ周辺植栽による感染苗作製
 - 3.1 目的
 - 3.2 方法
 - 3.2.1 松本市試験地
 - (1) 根系処理技術の検討
 - (2) 根系処理苗等のシロ周辺植栽
 - 3.2.2 塩尻市本山試験地
 - 3.2.3 松川町C,D 試験地
 - 3.3 結果
 - 3.3.1 松本市試験地
 - (1) 根系処理技術の検討
 - (2) 根系処理苗等のシロ周辺植栽
 - 3.3.2 塩尻市本山試験地
 - 3.3.3 松川町C,D 試験地
 - 3.4 考察
 - 3.4.1 松本市試験地
 - (1) 根系処理技術の検討
 - (2) 根系処理苗等のシロ周辺植栽
 - 3.4.2 塩尻市本山試験地
 - 3.4.3 松川町C,D 試験地
- 4 菌根合成苗による林地でのシロ定着

- 4.1 目的
- 4.2 方法
 - 4.2.1 菌根合成苗による林地でのシロ定着
 - (1) 菌根合成苗
 - (2) 林地植栽
 - 4.2.2 菌根合成苗のシロ大型化
 - (1) 菌株
 - (2) 培地
 - (3) 菌根合成
 - (4) シロ大型化に向けた苗移植
- 4.3 結果と考察
 - 4.3.1 菌根合成苗による林地でのシロ定着
 - 4.3.2 菌根合成苗のシロ大型化
- 総合考察
- 謝辞
- 引用文献

1 緒言

マツタケ (*Tricholoma matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer.) は日本国内において古くから秋の味覚として親しまれるきのこの一種である。古くは日本書紀¹⁾にも記載され、日本の伝統的食文化の一つとして定着している。分布は日本国内のみならず、朝鮮半島、台湾、中国大陸、スカンジナビア半島などに生育することが知られ、国内ではアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)、ツガ (*Tsuga sieboldii* Carréire)、コメツガ (*Tsuga diversifolia* (Maxim.) Masters)などを宿主とする菌根性きのこである²⁾。土壌中ではこれら宿主と外生菌根を形成し、一般にシロと呼ばれる、発達させた菌糸塊から子実体(きのこ)を発生させる。ただし子実体発生は降水量や温度の影響を強く受け

*1 信州大学 *2 奈良県林業技術センター *3 茨城県林業技術センター *4 森林研究・整備機構 森林総合研究所

るため^(2, 14, 15, 18-20, 24, 26)、豊凶の差が大きく、人工栽培技術の確立が求められるが成功例はない³²⁾。

このため採取は山林で生育したものに限られるが、1940年代前半には全国で12,000トンの生産量があったが、近年は数十トンまで激減し³²⁾、2020年には国際自然保護連合(IUCN)が準絶滅危惧種としてレッドリスト⁶⁾に登載した。激減した主な原因は松くい虫の被害拡大によるアカマツ林の減少と、マツタケ発生林の環境がマツタケに不適な環境となったこと、具体的には森林空間内の過密化による通風・日射不足や、林床への落葉、落枝の堆積により、マツタケ菌と競合する菌類が増加したことである^{20, 21, 24)}。

このためマツタケ増産に向けて林内環境の改善を図る技術が過去から検討され、実践されている^{3, 7, 8, 10, 20-22, 24, 27, 28)}。但し、これら技術の多くはマツタケ生産現場における経験に頼る点も多く、この技術に対する科学的検証は必ずしも十分とは言えない。また、林地での増殖には、増産を目指す林地への孢子到達と発芽、さらに菌糸体増殖によって菌糸体の集合体であるシロが形成されることが前提である。但し、マツタケ孢子の発芽率は非常に低く^{23, 24)}、またその後も菌糸体増殖、シロ形成には一定の時間と成長に適した環境が必要である。さらに近年はマツタケ山自体が減少傾向であることから、待つべく孢子すら到達しない可能性がある。このため一層人為的な操作を加えた栽培技術の確立が重要である。

本研究は、林地においてマツタケ発生を目指す第1段階である、シロの定着技術の開発を目的に、次の3通りの方法に取り組んだ。第一は、「自然感染苗の移植によるシロ定着」、第二は「未感染苗のシロ周辺植栽による感染苗作製」、第三は「菌根合成苗による林地でのシロ定着」である。

なお、本報告で扱う「シロ」とは、マツタケ菌糸体の集合体であり、容易に物理的破壊が困難な、塊状になったものとする。

本研究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「高級菌根性きのこ栽培技術の開発(2015~2019)」及び、県単課題「無菌感染苗木法を利用したマツタケ増殖技術の開発(2015~2019)」の一部として実施した。

2 自然感染苗の移植によるシロ定着

2.1 目的

ここで扱う「自然感染苗」とは、林内の自然条件

下において、人為操作を経ずにマツタケと菌根を形成したアカマツ等苗木とする。

この自然感染苗の移植は、過去にはシロ移植²⁰⁾と呼ばれ複数の実践例がある。なかには移植後、子実体発生に至った報告²⁵⁾もあるが、再現例はない。

また、マツタケはアカマツなど宿主と菌根を通じた栄養等の交換により生育しているため、子実体発生に至らなくとも、宿主(自然感染苗)に感染している状況は十分考えられる。そこでまず、自然感染苗を探索し、発見した場合には苗移植を行い、その後の感染状態を確認しながら、シロの拡大の可能性についての検討を目的とする。

2.2 方法

自然感染苗の探索は、マツタケ関係者からの情報収集、そして林地踏査によった。

シロ形成が目視で確認された苗木は、表層土壌とともに250ml容量のポリカーボネート製容器(ナルゲン社製 以下、「PCボトル」とする)、および直系82cmの素焼鉢へ移植した。

なお、シロは菌糸体の一部、又は菌根のDNA解析により、マツタケ菌の判定を行った。なお、DNA解析は、rDNA IGS2領域を増幅した試料により、既知の培養株(菌株名称「84」)との相同性比較により、判定した。

2.3 結果

2.3.1 アカマツ幼苗

探索、DNA解析の結果、松本市試験地(図-1、表-1)から採取したアカマツ幼苗7本がマツタケ菌のシロを形成していた。これらは250ml容量のPCボトルに移植し、その後経過を観察したがシロ拡大の傾向は確認できなかった。

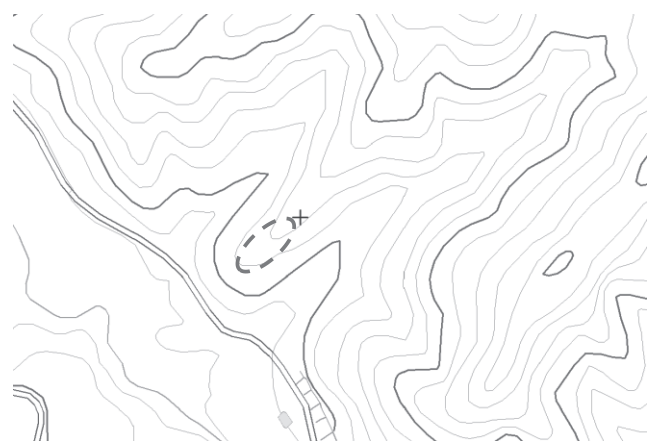


図-1 松本市試験地(破線)概略図

表-1 試験地の概況

試験地名	場所	標高(m)	地形	林況
松本市	松本市取出	710	尾根	アカマツ若齢一斉林
塩尻市	塩尻市本山	1,100	尾根	アカマツ若齢一斉林
松川町B	下伊那郡松川町生田	750	山頂	アカマツ壮齢林 中下層にツガ等混交
松川町C	下伊那郡松川町生田	730	尾根	アカマツ壮齢一斉林
松川町D	下伊那郡松川町生田	730	尾根直下	アカマツ壮齢一斉林



写真-1 シロ（楕円内）を形成するアカマツ幼苗
(スケールバーは7cm)

なお、松本市試験地は尾根部に位置し、土壌は第三紀泥岩の堆積岩を母材とする未熟土で、石礫が多い表層土を5,6cm掘ると基岩に達する。林況は1987年の山林火災後に天然下種更新により生育したアカマツが主体であるが、周辺ではマツノザイセンチュウ病によるマツ枯損が拡大中で、2015年以降は試験地内でもマツ枯損が発生している。

2.3.2 ツガ移植（シロ移植）

下伊那郡松川町にある松川町B試験地(図-2, 表-1)では、試験地管理人から、毎年子実体が発生するシロ上に、マツタケ菌に感染していると思われる樹高約50cmのツガの情報を得た。ツガ苗の周辺土壌を掘ったところ、苗直下及び周辺に最低直系1m程度のシロが広がっていることを確認した。掘り採ったツガ苗を、周辺の土壌及びシロと共に素焼き鉢へ移植し、林業総合センターへ運搬して、ガラス室内で生育させた(写真-2)。なお、これらシロ及びツガ苗根系に形成していた菌根は、DNA解析の結果マツタケ菌と判定した。なお、ツガ苗の植木鉢への

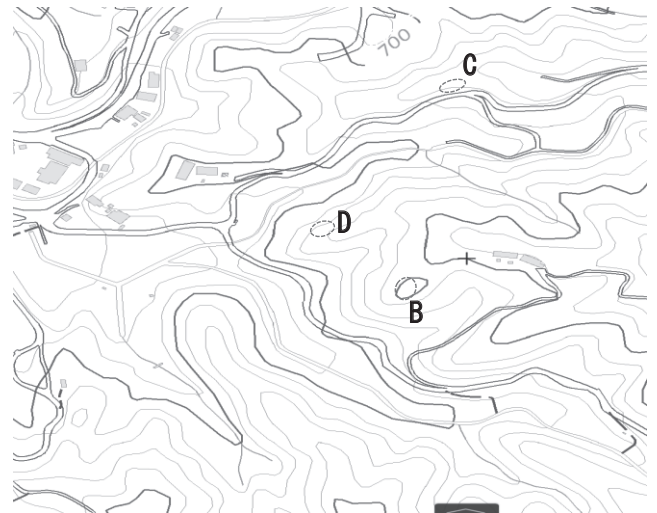


図-2 松川町B, C, D試験地(破線)概略図

移植は2018年7月に実施し、その後に苗を育成させたガラス室内は、室温20℃に恒温設定し、定期的に純水を灌水した。また約3か月おきにツガ根元の菌根を採取し、DNA解析により感染が継続しているかを確認した。その結果、2019年1月の調査を最後にマツタケ菌は検出されなくなった。また、移植直後はシロ独特の芳香²⁴⁾が、ガラス室内で強く感じられたが、時間経過とともにこの香りは弱まり、移植半年経過後には、ほとんど感じられなかった。

植木鉢に移植したツガ周辺においてはマツタケ菌の感染を期待し、アカマツ幼苗3本をツガ移植と同時に植栽した。さらに2019年5月には土壌表面



写真-2 大型鉢に移植したツガ苗木

を5 cmメッシュに区画し、区画先にアカマツ種子181粒を播種、116本の幼苗が成長(写真-3)した。ただし、2019年12月までに、移植した3本のアカマツ幼苗及び、播種由来のアカマツ幼苗にマツタケ菌の感染は確認できなかった。

2.4 考察

2.4.1 アカマツ幼苗

探索の結果、苗長7 cm程度の幼苗でも地下部にシロが確認された。幼苗はその形態から発芽して数年程度と思われたが、幼苗に付着していたシロが幼苗のみと共生するシロか、または他の宿主も共生していたかは確認できなかった。また、幼苗にシロが形成すると菌糸体に包まれた根の部分が褐変し、その後枯死するとの報告²⁴⁾もあるが、褐変は確認できなかった。

この幼苗段階でもシロを有するという事実は、今後のシロ発達に関する技術開発に有効な知見と考えられる。

2.4.2 ツガ移植(シロ移植)

マツタケ菌の確認は、植木鉢への移植後5か月が最後となったが、ツガ苗木には外観上の衰弱は見られなかった。一方、当初ツガ苗が生育していた松川町B試験地の掘り取り跡地周辺には、2019年及び2020年に子実体が発生した。これら子実体はシロ移植時点で、林地に残ったシロに由来すると考えたが、ツガ移植後子実体発生が2年続いたことから、共生関係を構築する宿主は移植したツガ以外に存在していると考えられる。このことから今回ツガと同時にシロ移植を行ったが、シロの大半は林地に残った他の宿主との共生が主体であった可能性がある。このため鉢内のシロは移植後に衰弱し、5か月で感染が確認できなくなったものと考えられる。このシロ衰弱により、ツガ移植と同時に植栽したアカマツ苗3本には鉢内での感染がなく、また2019年

表-2 苗木根系の処理方法

処理名称	地下部の処理方法
1. 強度洗浄	①たわしを使い、地下部に付着する土等を除去
	②地際から10cm程度で地下部全てを切断
	③φ2mm程度以下の毛根、細根全て除去
2. 従来方式	①たわしを使い、地下部に付着する土等を除去
	②地際から10cm程度で地下部全てを切断
	③全ての雑菌根を除去
3. 弱洗浄	①たわしで軽く地下部に付着する土等を除去
	②地際から10cm程度で地下部全てを切断
	③全ての雑菌根を除去
4. 簡易式	①流水で軽く洗浄
	②地際から10cm程度で地下部全てを切断

表-3 苗木樹勢観察の指標

基準値	苗状態	判断指標
5	生育良好	葉に褐変が一切なく、樹勢が強い
4	僅か褐変あり	わずかに葉に褐変があるが、樹勢は強い
3	樹勢やや弱い	葉の褐変が全体の半分程度ある
2	衰弱目立つ	葉の褐変がかなりあり、苗の衰弱が目立つ
1	枯死	枯死



写真-3 播種後成長するアカマツ幼苗

5月の播種時には、既にシロが極度に衰弱していたことから感染に至らなかったと考えた。

3 未感染苗のシロ周辺植栽による感染苗作製

3.1 目的

アカマツ苗を既存のシロに植え付けることでマツタケ菌に感染させ、感染させたアカマツ苗を移植する方法は1980年前後に各地で研究がなされた^{7, 9, 10, 12, 18, 20-24, 27, 28)}。枯木らは、この方法で作製した感染苗を20年生前後のマツタケ未発生林に移植し、アカマツ成木へ感染した後、子実体発生がみられたと報告している¹²⁾。ただし、その後子実体発生に至った再現例はない。長野県でも同様の手法での検証¹⁸⁾を行ったが、苗木のシロでの感染率は8割程度以上と高かったが、供試本数は50本弱と少数であったため、今回大量苗木による再検証を試みた。また容易に感染が可能となる未感染苗木の根系処理技術から、シロでの感染についての検証を合わせて試みた。

3.2 方法

3.2.1 松本市試験地

(1) 根系処理技術の検討

山引き、購入によって収集したアカマツ(128本)、山引きにより収集したゴヨウマツ(*Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. 64本)をマツタケ菌に感染しやすいよう、既に根系に付着した菌根を除去

した。除去の方法は表-2 に示す4通りの根系処理とした。これらは、処理名称に示す数値が大きくなるほど根系へのダメージは少ないが、雑菌根が除去されずに残り、数値が少なくなるほど根系へのダメージは大きく、確実に雑菌根が除去されると想定した。また、「2. 従来方式」とは1980年代に行われた手法^(12,18)を再現したものである。処理済苗木は殺菌済みの鹿沼土を入れたプランターで約6か月間仮植し、苗木の生育状況を表-3に基づいて調査、数値化し、統計処理を(株)社会情報サービス製エクセル統計 (Bellcurve for Excel) Ver. 3.21により行った。

なお、山引きのアカマツは塩尻市内で自生していた3年生程度の苗木で、購入苗木は松本市内の苗畑で育成した3年生苗木である。ゴヨウマツは下伊那郡豊丘村のマツタケ山林床に自生していたもので、今後のマツタケ山拡大の可能性を検討する基礎資料とするため供試した。

(2) 根系処理苗等のシロ周辺植栽

根系処理苗はプランターで仮植中に枯死、衰弱したものを除き、127本を松本市試験地のシロ進行方向前方の「シロ前」²²⁾に植栽した。また、奈良県林業技術センターで作製した取り木¹³⁾14本は「シロ上」²²⁾に植栽した。

植栽後は樹勢が良好な一部苗木に対し、不定期に地下部の菌根調査を実施した。調査は苗木周辺の一部土壌を除去しながら根系を観察、根系にマツタケと思われる菌根が存在した場合には切り取り、DNA解析を行った。

3.2.2 塩尻市本山試験地

3.2.1 同様の根系処理を行った苗畑由来のアカマツ苗木187本を塩尻市本山試験地(図-3、表-1)のシロ上に植栽した。なお、苗は全て苗畑由来の3年生アカマツ苗木とした。また3.2.1(2)と同様の取り木16本もシロ上に植栽した。

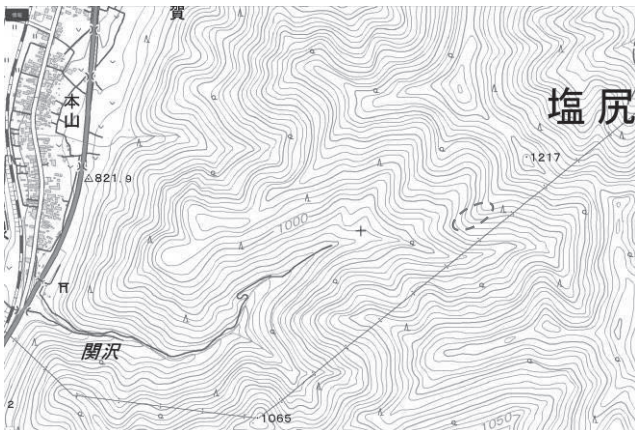


図-3 塩尻市本山試験地(破線)概略図

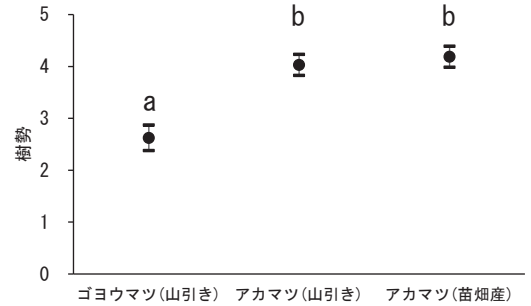


図-4 樹種等の差異による根系処理後の苗木樹勢

異なるアルファベットは有意差あり (p<0.001)を示す

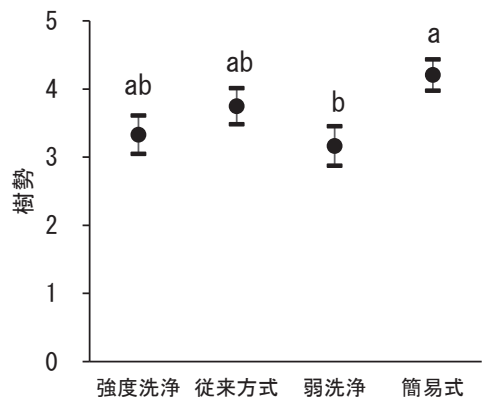


図-5 根系処理の差異による処理後の苗木樹勢

異なるアルファベットは有意差あり (p<0.05)を示す

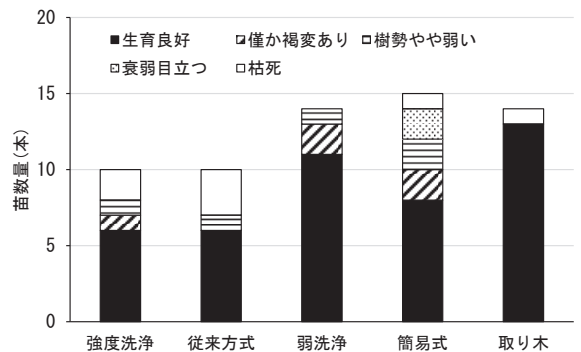


図-6 松本試験地植栽後の苗木樹勢

(植栽231日後)

3.2.3 松川町C, D試験地

3.2.1 同様の根系処理を行った苗畑由来の3年生アカマツ苗木を松川町C試験地に80本、松川町D試験地に40本をそれぞれシロ上に植栽した(図-2、表-1)。また3.2.1(2)と同様の取り木を松川町C試験地、および松川町D試験地にそれぞれ10

ID-No.	2016年		2017年		2018年		2019年	
	10/25	4/26	10/20	5/11	6/8	11/14	8/1	12/16
1	3-1	植栽	+	枯死				
2	3-2	植栽	+	移植	-			
3	3-3	植栽						
4	3-4	植栽	枯死					
5	3-5	植栽						
6	5-1	植栽		+				
7	5-2	植栽		+				
8	5-3	植栽					+	
9	5-4	植栽						
10	5-5	植栽						
11	5-6	植栽						
12	5-7	植栽					枯死	
13	5-8	植栽					枯死	
14	5-9	植栽	枯死					

図-7 松本市試験地植栽後の取り木の生育状況

→は生育していることを示す。+はDNA解析により、根系にある菌根からマツタケ菌の検出の有無を示す。無印は試料採取を行わなかった。

本ずつシロ上に植栽した。

3.3 結果

3.3.1 松本市試験地

(1) 根系処理技術の検討

根系処理は2016年4月25,26日に行い、処理を行った苗木は速やかにプランター内に植栽した。半年後の10月17日に苗木の生育状況調査を表-3に基づき行い、数値化した。その数値をもとに二元配置分散分析 (Tukey) を行った結果を図-4,5に示した。

(2) 根系処理苗等のシロ周辺植栽

松本市試験地への根系処理苗及び取り木の植栽は2016年10月25日に行った。植栽半年後の2017年6月13日には、表-2に従い生育状況調査を行い、根系処理方法別および取り木の樹勢観察結果を図-6に示した。なお、他試験地との比較を可能とするため、図-6は苗畑由来のアカマツ苗のみとし、これらアカマツ苗 (取り木を除く) は51本植栽したが、調査時には2本が消失していた。

植栽3年経過までの調査の結果、根系処理苗に感染を確認したものはなかった。

一方、取り木の林地植栽後の生育状況を植栽した14本すべてについて図-7に示した。林地植栽1年となる2017年10月20日の調査において2本の取り木に感染が確認された。うち1本は翌春5

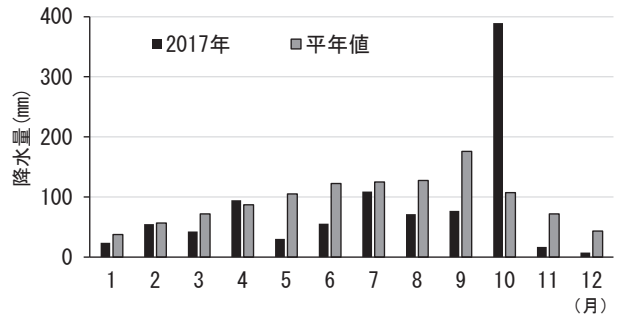


図-8 2017年塩尻市における月別降水量 (塩尻市宗賀支所)

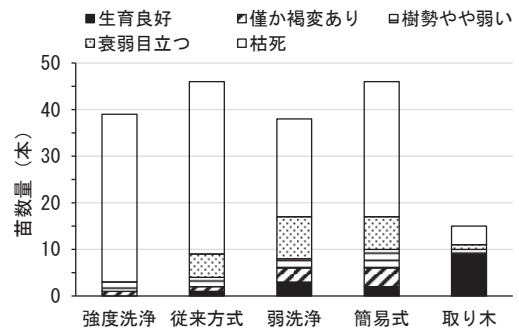


図-9 塩尻市本山試験地植栽後の苗木樹勢 (植栽73日後) *取り木は74日後

月に枯死が確認されるが、残りの1本を2018年6月8日にシロが確認されていない場所へ移植した。しかし、その後移植先で菌糸体の拡大には至っていない。

3.3.2 塩尻市本山試験地

植栽した苗木の根系処理は192本に対して2017年2月2,3日に行った。192本はプランターに仮植後、同年4月17日に塩尻市本山試験地のシロ上に植栽した。なお植栽本数は、仮植時に枯死または極度に衰弱した苗5本を除いた187本とし、取り木は翌日の4月18日に16本をシロ上に植栽した。植栽後は降水が極端に少なく、この状態は6月までつ

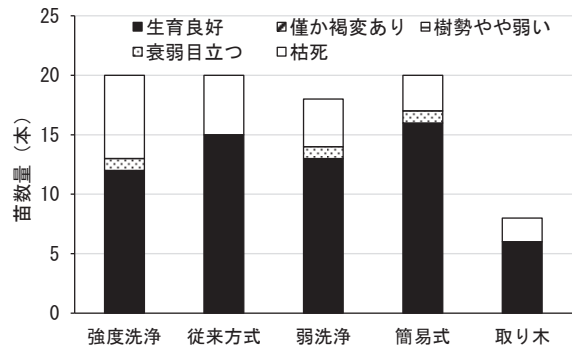


図-10 松川町C試験地植栽後の苗木樹勢 (植栽116日後)

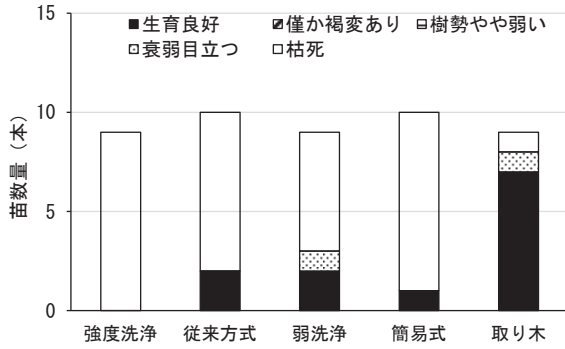


図-11 松川町D試験地植栽後の苗木樹勢 (植栽116日後)

づいた。ちなみに試験地から約3km離れた塩尻市宗賀支所での降水量観測結果を図-8に示す。なお、当支所での観測結果は2008年6月以降が公表²⁹⁾されていることから、平年値は2009年から2016年の平均とした。

図-9は2017年6月29日における苗木の生育状況調査結果を示す。

3.3.3 松川町C, D試験地

アカマツ苗の根系処理は2018年2月13, 14日に行い200本を作製した。苗は作製後すみやかにプランターに仮植し同年4月23日に松川町C, D試験地のシロ上へ120本植栽した。植栽した苗木はプランターで樹勢が良好であったもののみを選抜した。また取り木も松川町C試験地及びD試験地のシロ上にそれぞれ10本を4月23日に植栽した。その後6月に苗の様子を確認したが、特に松川町C試験地での枯死が目立った。植栽116日後の8月17日に苗木の樹勢調査を行い、その結果を図-10, 11に示す。

3.4 考察

3.4.1 松本市試験地

(1) 根系処理技術の検討

図-4によると、アカマツ(山引き、苗畑産)に対してゴヨウマツ(山引き)の樹勢が有意に低くなっている。このことから、ゴヨウマツは根系処理により、ダメージを受けやすいと考えられた。つぎに図-5によると、弱洗浄が簡易式に対して有意に樹勢が低くなっている。この原因については不明であるが、他の3種の根系処理には有意差がないことから、特に根系処理による仮植段階での苗木へのダメージはないと考えた。

さらに林地へ植栽231日後の苗木の樹勢を調査した基準値(表-3)の平均値を表-4に示した。植栽後、一部苗木は動物によると思われる物理的加

表-4 松本試験地植栽後の苗木樹勢の平均値 (植栽231日後)

		強度洗浄	従来方式	弱洗浄	簡易式
		ゴヨウマツ(山引き)	樹勢 3.0	3.5	5.0
	調査苗数	4	8	3	9
アカマツ(山引き)	樹勢	2.4	3.7	3.2	3.8
	調査苗数	18	11	6	19
アカマツ(苗畑産)	樹勢	4.0	3.9	4.8	4.2
	調査苗数	11	13	16	19

害を受け、識別ラベルの損傷や、苗木そのものの消失があった。これら消失により試料数に大きく偏りが生じたため、表-4は参考値としての扱いとするが、アカマツ(山引き)は強度洗浄ほど樹勢が弱まる傾向が僅かにあり、これに対して同じアカマツでも苗畑産にはこの傾向がみられない。これは人為的に管理育成された苗畑由来の苗木の方が強度な根系処理にも耐えうる可能性が考えられた。実際苗木の形状は、山引き苗と比較して苗畑産の方が根元径は太く、葉色も濃いものが大半であった。これ以外の点では一定の傾向はみられず、林地植栽段階においても、仮植段階と同様、根系処理方法による樹勢の差異はほとんど生じないと言えた。

なお、物理的加害を受けた苗木の植栽位置は特定の場所に集中し、また引き抜かれ近隣に放置された苗木には動物によると思われる切断痕が残されていたことから加害は動物によるものが大半と判断した。

(2) 根系処理苗等のシロ周辺植栽

(ア) 苗の活着

図-6に植栽231日後の苗の生育状況を示すが、根系処理苗は根系処理方法による一定の傾向はなく、また生育が良好なものは6~8割弱と取り木に比べ低い。これは今回の植栽地が2.3.1に示す通り苗の植栽には過酷な環境であるが、取り木はその構造上、新根が水苔にまかれているため、ある程度保水力があり、結果として生育良好なものが多く残ったと考えられる。マツタケの適地は土壌含水率が低い有機質の少ない土壌、また地形は尾根、山頂など^(7, 8, 10, 11, 20-22, 24, 27, 28)とされており、このような場所への苗植栽に取り木は適していると言える。

(イ) マツタケ菌感染

根系処理を行った苗木に、マツタケ菌根を形成したものは2019年12月現在確認できなかった。試験地内では2015年以降、マツノザイセンチュウ病によるマツ枯損が発生、その後2017年からは急

激に被害木が急増し、シロの衰退も急速に進行していることが一部シロ掘り取り調査から判明している。このシロの衰退により、根系処理を行った苗木の感染がなかったと考えられる。

これに対し取り木は感染確認されたものが複数あった(図-7)。ただし、取り木を植えた直下のシロも2019年12月時点ではほとんど消滅しており、植栽後の比較的早い時期に感染したと考えられる。シロ前とシロ上と、植栽位置が根系処理苗と取り木で異なるため両者の比較はできないが、取り木は発根時から新根が水苔にまかれ保護されているため、この構造が感染に有利に働いた可能性が考えられる。

3.4.2 塩尻市本山試験地

図-9に示す通り、林地植栽後2か月程度で大半の苗木が枯死または強度の衰弱となった。これは試験地が植栽直後から平年を大きく下回る少雨に見舞われたこと(図-8)が原因と考えられる。2017年5月の降水量は平年の3割以下、また6月も5割以下と異常に少なかった。ただし、このような環境下でも取り木は15本植栽した内9本が正常な状態として生育している点は、前述の松本市試験地の結果同様、取り木の構造によって乾燥に耐えることができたと考えた。

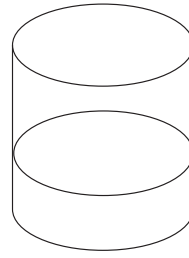
3.4.3 松川町C, D試験地

図-10, 11に示す通り松川町D試験地での枯死が目立った。近隣の松川町C試験地と比較しても明らかに枯死が多いことから、気象条件による枯死とは考えにくく、植栽方法に問題があった可能性もあり、今後の課題としたい。また両試験地とも取り木は比較的生育が良好なものが多く、やはり水苔による保水効果が考えられる。また、現時点で地下部を掘り採っての調査は未実施であるが、両試験地とも植栽した苗木周辺で子実体発生が継続していることから、シロの活性度は高く、苗木に感染している可能性も考えられ、今後も引き続き継続調査を行う予定である。

4 菌根合成苗による林地でのシロ定着

4.1 目的

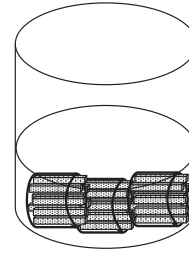
本稿「2 自然感染苗の移植によるシロ定着」、「3 未感染苗のシロ周辺植栽による感染苗作製」に示した方法は、自然環境で活性度が高いシロの存在が必須である。但し、近年のマツノサイセンチュウ病によるマツ枯損の拡大は急速で、苗の感染に用いるシロが今後容易に確保できない可能性もある。そこで、Yamadaら³¹⁾、小林ら¹⁶⁾によって開



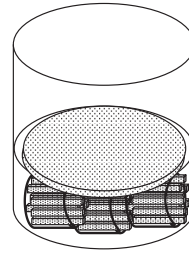
①1.2LPC ボトルにMNC 液体培地を400 ml分注



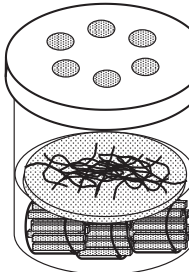
②約5 cmに切断した割り箸16~19本を20 ml ビーカーに入れる (A)



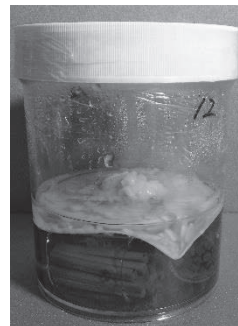
③ (A) を3個用意し、MNC 液体培地中へ横倒しで入れる



④φ110mm ろ紙 (No. 2) 2枚を重ね、液体培地上に浮かべる



⑤接種後、6か所空気穴を設けた蓋をし、二次培養



⑥接種直後の様子

図-12 二次培養の概略と接種直後の様子

発された、実験室レベルで菌根合成を行った感染苗を林地に植栽、さらにシロ定着を目指す技術の

開発を目的とした。また、林地植栽後の苗生存率を高めるためには極力大型のシロを有する苗作製が必要と考え、短期間で大型シロを有する苗作製技術の開発も目的とした。

4.2 方法

4.2.1 菌根合成苗による林地でのシロ定着

(1) 菌根合成苗

作製方法は小林ら¹⁶⁾に準じ、材料、育苗環境等は下記に示す。

(ア) 菌株

信州大学から譲渡された AT740、及び松本市試験地で 2012 年 10 月に発生した子実体から分離した SI001 を用いた。

(イ) アカマツ種子

長野県中箕輪採種園にある松くい虫抵抗性母樹「白石 10 号」の種子を用いた。

(ウ) 土壌

松本市試験地の表層土（未熟土）で、4.0mm メッシュの篩を通過したものを高圧蒸気滅菌（120℃, 60 分）したものを用いた。

(エ) 育苗容器

容量 250 ml の PC ボトルを上下に 2 個、開口部同士で連結したものとした。下部は土壌を入れて苗根系を育成する部分、上部は苗茎葉部を被覆する蓋の部分とした。なお、上部にはミリシール（ミリポア社製）を貼り付けた空気穴（直径 5 mm）4 カ所を設けた。また、苗の成長に伴い、同様の容量 10 の PC ボトルも使用した。

(オ) 育苗環境

室温約 22℃ に恒温設定し、白色 LED により 24 時間照射した育苗室とした。照度は苗直上で約 7,000 lux（光量子束密度：約 110 μmol/m²）とした。

(カ) 共同研究者作製苗木

上記と同様の方法により、信州大学、茨城県林業技術センターが作製し、接種源をそれぞれ「84」、「AT638」とする菌根合成苗も試験に用いた。

(2) 林地植栽

図-1、表-1 に示す松本市試験地とした。

4.2.2 菌根合成苗のシロ大型化

(1) 菌株

使用した菌株は以下の 4 菌株である。

(SI001)

4.2.1 と同じ。

(SI002, SI003)

松本市試験地で 2013 年 10 月に発生した子実体 2 本からそれぞれ分離した菌株。

(SA001)

佐久市内で 2012 年 10 月発生した子実体から分離した菌株。

(2) 培地

古川らは MNC 液体培地に、シラカバ材を添加すると、マツタケ菌糸体の迅速な大型化がみられたと報告している⁴⁾。この報告と同様の培地を用いた。

(一次培養)

一次培養には、MNC 液体培地を用いた。この液体培地は 1,000 ml 三角フラスコに 100 ml ずつ分注し、シリコセン（C-55）で蓋をし、高圧蒸気滅菌（121℃ 20 分）処理を行った。液体培地は放冷後、MNC 寒天培地上で継代培養していた接種源をコルクボーラー（φ4.0mm）で 40 片切り取り接種した。接種後は 20℃ 恒温の暗所環境で培養した。

(二次培養)

二次培養は、図-12 に示す培地、器具等によって行った。まず、容量 10 の PC ボトルに MNC 液体培地を 400 ml 分注、国産シラカバのみで作製した割り箸（ホクト製箸製）を 5 cm 程度に切断、16～19 本（総乾燥重量 28.9g）を 20 ml ガラス製ビーカーにいれ、液体培地内に横倒しとした。さらに同様のガラス製ビーカー 2 個も液体培地内に入れた。最後にろ紙（ADVANTEC 製 No.2 φ110mm）2 枚を重ね液体培地上に浮かせた。ろ紙上には、一次培養を終え、メスで細断した菌糸体を接種した。接種後は φ5mm の穴を 6 個あけ、ミリシールを貼った容器に付属する蓋をして 20℃ 恒温の暗所環境で培養を行った。

(3) 菌根合成

10 容量の PC ボトル 1/3 程度に殺菌済み土壌をいれ、その上に 2 次培養を終えた菌糸塊を入れた。なお、菌糸塊は二次培養中にろ紙が付着することがあり、接種時容易にろ紙を除去できない場合は、ろ紙ごと接種した。接種後土壌を容器上部までいれ、小林らの方法¹⁶⁾で無菌を確認した発芽直後のアカマツ種子を 1 粒播種した。そして 4.2.1 と同様に PC ボトル上部を取り付け育苗した。育苗環境は 4.2.1 と同じ。

(4) シロ大型化に向けた苗移植

育苗ののち、苗は下記の大型容器に移植した。

(ア) 大型容器及び土壌

(10 号素焼き鉢)

表-5 既存シロに対する植栽位置別
菌根合成苗植栽本数 (松本市試験地)

菌根合成苗 (菌株)	植栽時期	植栽本数				計
		シロ外	シロ先端 20cm外	シロ先端	シロ内側	
AT740	春植え	-	-	1/1	-	1/1
	秋植え	1/4	1/3	2/3	0/1	4/11
SI001	春植え	-	1/1	-	-	1/1
	秋植え	3/4	1/4	-	-	4/8
84	春植え	-	1/1	-	1/1	2/2
	秋植え	-	-	-	-	-
AT638	春植え	-	-	1/1	-	1/1
	秋植え	-	4/6	2/2	6/7	12/15
合計	春植え	-	2/2	2/2	1/1	1/5
	秋植え	4/8	6/13	4/5	6/8	20/34

○表中数値は (2017年10月生存苗木数) / (2016年植栽本数)
○ *内1本からマツタケ菌根が検出(2016年10月)

10号素焼き鉢に松本市試験地土壌をほぼ上端まで詰め、高圧蒸気滅菌処理を行ったもの。

(17号プラ容器)

用いた容器はポリプロピレン製のクラフトポット35型(アップルウェア製)、容器底に大粒のひゅうが土(ひゅうが土販売株)を6ℓ、中段に中粒ひゅうが土を4ℓ、上段に小粒と細粒を1:1に混合したひゅうが土を15ℓ入れ、高圧蒸気滅菌(120℃, 60分)処理を行った。

(20号素焼き鉢)

鉢底に大粒ひゅうが土を12ℓ、中段に中粒ひゅうが土を19.2ℓ、上段に小粒と細粒を1:1に混合したひゅうが土を6.5ℓ入れ、高圧蒸気滅菌処理を行った。

(イ) 苗移植

小林らは菌根合成苗のシロ拡大には、マツタケ以外の菌根菌の混入がない環境と、無菌実生苗を菌根合成苗周囲に植栽することが有効と報告¹⁷⁾している。この報告を参考に以下の通り苗移植を行った。10号素焼き鉢は2個用意し、それぞれ1本ずつ菌根合成苗を移植した。同様に17号プラ容器も2個用意し、各1本菌根合成苗を移植した。20号鉢は1個用意し、菌根合成苗3本を等間隔に移植した。

なお移植時、PCボトル下方に伸びた、菌根形成の確認できないとぐろ状の根系は、ハサミで切り取った。また、シロには各1錠エビオス錠(アサヒグループ食品製)を埋め込んだ。

移植後苗周辺には滅菌したアカマツ種子を各苗5粒ずつ播種した。

(ウ) 育苗環境

4.2.1 (1) (オ)と同じ環境とし、土壌表面に乾燥がみられた段階で高圧蒸気滅菌(121℃, 20分)後十分に放冷した純水を表面灌水した。

4.3 結果と考察

4.3.1 菌根合成苗による林地でのシロ定着

室内環境で概ね2年程度生育させ、作製した菌根合成苗39本(内長野県作製21本, 信州大学作製2本, 茨城県作製16本)を2016年5月(以下「春植え」とする), 10月(以下「秋植え」とする)に松本市試験地に植栽した。また既存のシロ位置に対する植栽本数は表-5のとおりである。

これら植栽した苗木39本はその後枯死するものもあり、2019年12月時点では植栽時の半分以下である18本のみが生存している。図-13に生存数の変化について示すが、春植えは枯死が1本もなく、秋植えが数量を徐々に減少させている。枯死の原因は、一部苗木にはウサギと思われる折損痕があったことから、動物による獣害、そして高温、乾燥などによる気象要因が原因と考えられた。図-14は研究期間中(2015~2019年)最高気温を記録した、2018年の松本市試験地における地上高10cmでの気温測定結果である。当試験地は若齢アカマツ一斉林であるため日射の大半が林地表面

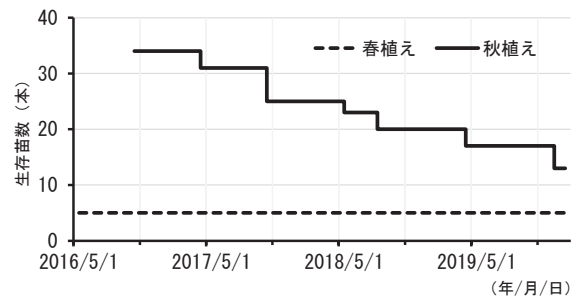


図-13 林地植栽後の菌根合成苗生存数の変化
(松本市試験地)

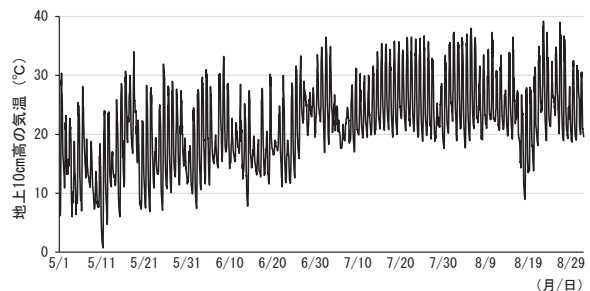


図-14 松本市試験地における初夏から
晩夏における気温変動(2018年)

層まで直達する。また表層土は未熟土で、有機質がほとんどなく、大半が石礫であることから日中は高温となり、夜間は放熱により日較差が非常に大きく、植物の生育にとっては非常に過酷な環境である。このような環境により、植栽苗木の半分以上が枯死したものと考えられる。なお、春植え苗木に枯死がない原因は解明できなかった。

また、苗木の植栽位置と既存のシロ位置の関係によって、どちらかまたは双方のシロに忌避反応が生じ、苗木へのダメージも考えたが、表-5に示す苗木の枯損状況と既存シロの位置関係を見る限り、関連はないと思われる⁵⁾。

表-6には菌根合成苗のマツタケ菌の有無について示した。無作為に抽出した苗木根系部を掘り採り、菌根の有無を観察の上DNA解析した結果、春植え及び秋植え共に4割から8割程度の検出率でマツタケ菌が確認され、植栽時のシロがそのまま持続されている可能性と、現在はマツノザイセン



写真-6 PC ボトル（内径 111mm）とほぼ同じ大きさまで成長したシロ（W1711）

表-6 菌根合成苗植栽 3 年以上経過時の生存数とマツタケ菌検出苗木数

植栽 年月	苗数	マツタケ菌調査（2019年12月）	
		生存苗数	検出苗数/調査苗数
2016年5月	5	5	2/5
2016年10月	34	13	5/6

チュウ病により壊滅的ダメージを受けた既存のシロが苗木に感染することで延命している両方の可能性が考えられた。また、仮に春植え苗から検出されたシロの由来が菌根合成苗由来であれば、林地植栽後3年7か月間シロが定着していた可能性があり、この点の確認も含め今後引き続き調査を継続したい。

4.3.2 菌根合成苗のシロ大型化

2015年10月15日、1,000ml三角フラスコ40本を用いて一次培養を開始した。その後乾燥によって液体培地量が減少したため、2016年1月15日には各試料100mlずつMNC液体培地を追加した。また、乾燥防止のため、シリコセン上部にアルミホイルをかけた。

2016年6月2日には大半の菌糸体は三角フラスコの底面とほぼ同じ直径12cm程度に成長した。生育が良好な28試料をクリーンベンチ内でそれぞれφ150mmガラスシャーレに取り出し、メスで細断し、二次培養の培地へ接種した。二次培養開始40日程度で全ての試料で著しい菌糸体の増殖がみられ、この増殖は液体培地に沈んでいる部分よりも、空気に触れている部分ほど活発な傾向がみら



写真-4 二次培養 75 日目の増殖する菌糸体 (W22 S1002 容器内径は 111mm)

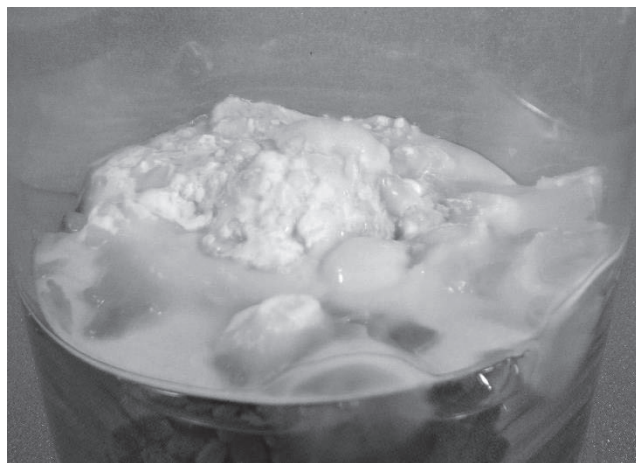


写真-5 二次培養 279 日目の菌糸体 (W1712 SA001 容器内径は 111mm)



写真-7 樹勢に活力がある(右) W1716 及び活力がやや劣る(左) W1711 (大型容器移植 293 日)

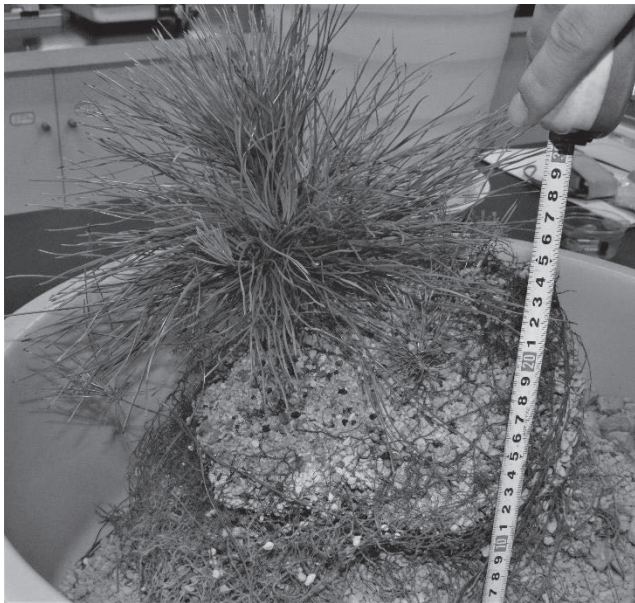


写真-8 大型化したシロ(W1716 大型容器移植 293 日)

れた。この増殖はその後も続き、2016年8月16日(二次培養期間75日)に目視観察の結果、特に菌糸体の増殖が顕著であるW1(AT740), W14

(SA001), W17(SI001), W22(SI002)の4試料の菌糸体(写真-4)で菌根合成処理を行った。残りの試料(写真-5)は2017年3月8日(二次培養期間279日)まで二次培養をつづけ、菌根合成処理を行った。

これら菌根合成処理を行った試料は苗、地下部の様子を容器外面から観察しながら、必要に応じて滅菌水を灌水し、育苗した。2019年2月20日には、苗及びシロの生育をPCボトル外面から観察し、両者の生育が特に良好な7試料を選抜、10号素焼鉢にW1728(SI003), W1729(SI003)を各1本ずつ、17号プラ容器にはW1711(SA001), W1716(SI001)を各1本ずつ、20号素焼鉢にはW1

(AT740), W1724(SI002), W1726(SI003)を移植した。なお、移植した全ての苗はPCボトルの隅までシロが形成され、直径は約11cmになっていた(写真-6)。

これら移植苗の地上部はその後も良好に生育し、周囲に播種した種子からも順調にアカマツ幼苗が生育した。その後葉色の緑色が濃く、樹勢に活力がみられたW1716と、活力が弱かったW1711

(写真-7)の地下部の観察を行ったところ、W1716は移植時ほぼ直径10cm程度であったシロが、長径27cm、短径20cm高さは3~7cmに成長(写真-8)していた。また、周囲に播種したアカマツ幼苗

にもシロが形成され、幼苗自身の葉色も濃く、活力がみられた(写真-9)。一方、W1711のシロは移植時とほぼ同じ直径10cm程度であった。なお、両者の苗木及びシロ拡大の差の原因は今後の課題と

したいが、シロが順調に拡大している苗木は地上部の生育も良好であり、確認が容易ではない地下部のシロの生育確認には、苗木地上部の生育状況が指標となると思われる。また、写真-9の幼苗先端部にみられる極端に長く成長した葉の存在も、活性化しているシロの指標となる可能性が見受け

られた。

今回の結果は小林の報告¹⁷⁾同様、苗周囲への播種により、菌糸体が新たに発根する根と菌根を形成することで、シロ拡大を誘導していると考えられた。

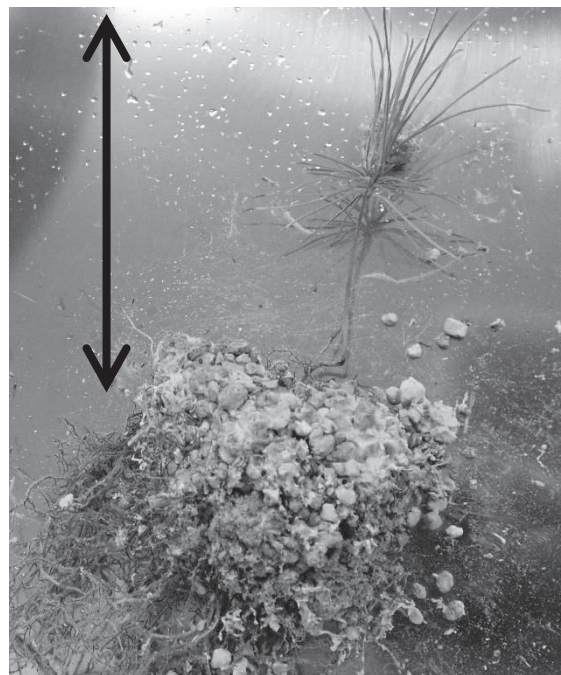


写真-9 W1716 周囲で生育していたシロを有するアカマツ幼苗(スケールバーは10cm)

なお、今回は地下部観察を行った苗木と素焼鉢に移植した苗木はその後経過観察中であるが、苗地上部の樹勢に活力がみられ、シロの拡大が進行中である可能性が高い。今後この方法で作製した苗木の林地植栽を進め、林地でのシロ定着、シロ拡大に期待したい。

総合考察

3通りの方法により林地でのシロ定着を目指したが、マツタケ山自体の減少が喫緊の課題である現状において、新たなシロ定着、そして拡大を目指す手法としては「菌根合成苗による林地でのシロ定着」が最良と考えられた。さらに、この手法によるシロ定着の加速化には、室内環境で作出した大型シロの活用が有効と思われた。ただし、この手法には一定の設備、技術、時間を要することから、これらの点の改善を図りつつ、普及につなげることが重要である。

次善としては、「未感染苗のシロ周辺植栽による感染苗作製」が、比較的簡易な器具等での苗木作製ができるため普及の可能性があると考えた。しかし、今回の結果では、小出らが達成させた感染率8割程度以上¹⁸⁾には全く及ばなかった。これは今回植栽した試験地の環境条件が過酷であったことによるとも考えられる。ただし、このような過酷な場所でも取り木が比較的好成績であったことは、この方法における取り木の活用の有効性を示す一定の成果であった。

最後に「自然感染苗の移植によるシロ定着」においては、移植した苗木のシロ定着を確認することができなかったが、幼苗にも作出されたシロがみられた点は、今後の研究推進に重要な知見であったと考えている。

謝辞

本研究の実施に際しては、小椋吉範氏、松本市役所には試験地設定のご協力をいただき、さらに小椋吉範氏には貴重な苗木もご提供をいただいたこと、ここに厚く御礼申し上げます。また、藤森彰治氏からもマツタケ子実体、幼苗の提供と調査にご協力いただき心より御礼申し上げます。

PCR操作、DNA解析に関しては信州大学応用真菌学研究室の立石悠氏、三澤碩希氏、高橋翔氏、鈴木健太郎氏には分析から実験操作指導と多大なるご援助をいただいたこと感謝申し上げます。

さらに現地調査は松本地方事務所(現松本地域振

興局)林務課、および下伊那地方事務所(現南信州地域振興局)林務課のご尽力により成し得た点感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 有岡利幸(1997) 松茸(まつたけ), 法政大学出版局, 5-10, 東京
- 2) 衛藤慎也・田辺紘毅・坂田勉・川上嘉章・山本忠義・枯木熊人・板橋正人(1999) 甲山試験地における30年間のマツタケ発生に関する調査結果, 広島県林技セ研報 31, 45-55
- 3) 藤原儀兵衛(2011) 藤原儀兵衛 マツタケ山づくりのすべて 生産技術全公開, 190pp, 全国林業改良普及協会, 東京
- 4) 古川仁・増野和彦・山田明義(2015) 木質材添加培地によるマツタケ菌の生育, 第126回日本森林学会大会学術講演集, p. 187
- 5) 古川仁・小林久泰・山田明義・片桐一弘・山中高史(2018) マツタケ山シロ上への菌根合成苗の移植, 日本きのこ学会 第22回大会講演要旨集, p. 65
- 6) International Union for Conservation of Nature(2020) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3 <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T76267712A177054645.en>
- 7) 伊藤武, 梅原武夫(1975) 試験研究解説シリーズ No.3 マツタケ(そのII), 12pp, 京都府林業試験場, 京都
- 8) 伊藤武・小川真(1979) マツタケ菌の増殖法(II) 林内植生の手入れとマツタケのシロの増加, 日林誌 61(5), 163-173
- 9) 伊藤武(1980) マツタケ菌感染苗木の育成技術の開発 [II], 昭和55年度京都府林業試験報, 41-47
- 10) 伊藤武, 小林藤雄, 藤田博美, 藤田徹(1988) 試験研究解説シリーズ No.6 マツタケ, 28pp, 京都府林業試験場, 京都
- 11) 金行幾太郎(1960) マツタケの増産について, 林業技術 225, 33-35
- 12) 枯木熊人・川上嘉章(1985) マツタケ菌感染苗によるシロの人工形成, 広島県林試研報 20, 13-23
- 13) 河合昌孝(1998) 菌根菌栽培—林地から施設まで—: 取り木を利用したホンシメジの栽培, 日菌報 39, 117-120
- 14) 川上嘉章(1990) マツタケ発生量に影響を及ぼ

- す要因 (I), 広島県林試研報 24, 7-20
- 15) 衣川堅二郎(1963) マツタケの発生に関する生態学的研究 -生長曲線とその解析-, 大阪府大紀要 Vol. 14, 27-60
- 16) 小林久泰・綿引健夫・倉持眞寿美・小野瀬究明・山田明義(2007) 大型培養容器によるマツタケのシロ様構造を有するマツ菌根苗の生産, 日本きのこ学会誌 Vol. 15(3), 151-155
- 17) 小林久泰・金田一美有・市村よし子・山中高史(2019) 無菌実生苗と植木鉢に寄せ植えたマツタケ菌根苗のシロ拡大, 日本きのこ学会 第23回大会講演要旨集, p. 54
- 18) 小出博志・一ノ瀬幸久・増野和彦(1992) 人工による菌根性きのこ類のシロ造成法に関する試験, 長野県林総セ研報 6, 41-59
- 19) 小出博志・増野和彦(2002) 菌根性きのこ類の人工栽培技術の開発, 長野県林総セ研報 16, 43-52
- 20) マツタケ研究懇話会編(1983) マツタケ山のつくり方, 163pp, 創文, 東京
- 21) まつたけ増産のてびき編集委員会(1987) まつたけ増産のてびき, 77pp, 長野県まつたけ生産振興協議会, 長野
- 22) まつたけ増産のてびき (改訂IV版) 編集委員会(2016), 101pp, 長野県特用林産振興会, 長野
- 23) 小川真・梅原武夫・紺谷修治・山路木曾男(1978) マツタケ菌の増殖法 (I) マツタケ感染苗の育成法, 日林誌 60(4), 119-128
- 24) 小川真(1978) マツタケの生物学, 327pp, 築地書館, 東京
- 25) 岡沢主計(1978) 盆栽にマツタケの発生, 日菌報 19, 87-89
- 26) 大森久夫(1997) 岩手県におけるマツタケの発生と気象的要因, 岩手林技セ研報 7, 67-72
- 27) 太田明(1981) 技術指針 マツタケ増産のてびき, 66pp, 滋賀県農林部農林課, 滋賀
- 28) 島根県林業技術センター(1994) 技術指針 マツタケ山づくり施業の手引き, 63pp, 島根県農林水産部林政課, 島根
- 29) 塩尻市(2020) 塩尻市の気象情報 塩尻市 気象データ
<https://www.city.shiojiri.lg.jp/iza/bohan/bosaijoho/kisho/index.html>
- 30) Yamada, A., Katsuya, K(1995) Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and ectomycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings, *Mycoscience*, 36, 315-323
- 31) Yamada, A. Maeda, K. and Ohmasa, M. (1999) Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* in vitro, *Mycoscience*, 40, 455-463
- 32) 山中高史(2012) マツタケ人工栽培技術開発に向けた研究, 森林総研研報 Vol. 11(3) 424, 85-95