

【論文】

セルトレイを用いたクロマツ菌根苗の簡便な作製方法

松浦 崇遠・佐々木 史

A simple method for preparing mycorrhizal seedlings of Japanese black pine with plug tray

Takato MATSUURA, Fumito SASAKI

クロマツの根系と共生する菌根菌の種や系統による機能の違いを調査するため、目的とする菌株のみを感染させたクロマツ苗を簡便に作製する方法について検討した。ショウロまたはアマタケの菌糸を蔓延させたパーライトを調製し、ロックウールブロックに挟み込むようにして、育苗用のセルトレイに積層した。クロマツの種子は上層のロックウールに蒔き付け、種子の発芽が阻害されないよう工夫した。セルトレイを蓋付きの給水用トレイに収納し、隙間をパラフィンフィルムで密封して雑菌の感染を防ぎながら、23°Cの恒温下で約5か月間養成した。その結果、接種した全ての苗木には細根に菌糸の伸展が観察されたが、菌鞘の形成には系統間に大きなばらつきが認められた。一方、接種していない苗木では、菌糸は確認されなかった。本研究において考案した方法は、無菌状態でない実験室内でも外部からの汚染を防いで、特定の菌株のみを接種することが可能であり、菌根苗を材料とする試験に適していると思われた。

キーワード：菌根菌・セルトレイ・クロマツ・ショウロ・アマタケ

1. はじめに

富山県の海岸にはクロマツ (*Pinus thunbergii*) が植栽されることが多く、沿岸部の保安林は後背の宅地や農耕地を飛砂や潮風から守る重要な役割を果たしている。しかしながら、砂質に富む土壤は保水性や保肥性に劣る他、干害や塩害、潮害にも晒されやすく、さらにはマツ材線虫病に起因する枯損被害が頻発しているなど、樹勢の衰退による防災機能の低下が懸念されている。県内では人工海岸の割合が高く、海岸林は砂地のみならず、汀線の後背に盛り土して造成されていることも多い。そのため、クロマツ林の再生には、造林地の環境に因らず、活着や成長に優れた苗木を、効率的に生産する技術が求められる。

植物の根系に共生する菌根菌は、貧栄養の土壤中において、窒素やリン酸の吸収を担い、植物の活着や成長を促すことが知られている。クロマツを含む多くのマツ類は外菌根性

樹種であり (Wang and Qiu 2006) , 菌根菌が十分に定着すると、細根は菌鞘と呼ばれる構造物に覆われる (松田・小長谷 2022) 。土壤からの養水分の吸収は菌根菌を介して行われ、菌根菌との共生は宿主の成長促進や環境ストレスへの耐性向上に役立つと考えられている。菌根菌を人工的に接種し、苗木の菌根形成を助けることは、植栽後の活着や初期成長を増進させる効果が期待できる。

クロマツ (およびアカマツ) の苗木と菌根菌との共生がもたらす作用に関しては、苗木の生育において優位な傾向が得られた複数の事例が報告されている一方 (Oh and Park 1990; 能勢 1992; 岡部ら 1994; 村山 2004) , 明瞭な効果が見出されなかった事例もある (明間 2004) 。また、共生がもたらす作用は菌種によって一様でなく (Nakashima *et al.* 2016) , 特定の菌種との組み合わせが高い効

果を発揮する可能性も指摘されている（松田・小長谷 2022）。これらの研究では、菌根菌を人工的に接種する、様々な方法も考案されているが（赤間 1993；平佐 1995；明間ら 2001；玉田・更級 2007），試験的には特定の菌種を発芽の段階から、効率的に感染させる方法が望ましく、かつ苗木生産の現場にも応用できる技術が求められる。

そこで、本研究では実験室内でも苗木の養成が可能であり、野菜や花卉の栽培に広く使われているセルトレイを用いて、目的とする菌株のみを感染させたクロマツ苗を作製する方法について検討した。

2. 材料および方法

2.1 種子の発芽検定

供試したクロマツ種子（2016年に射水市内において採取、約5°Cで保存）の発芽率を、以下の方法にしたがって算出した。

濾紙を敷き、予め乾熱滅菌（180°C、2時間）したシャーレに、浸漬・殺菌処理した種子を1枚当たり100粒ずつ蒔き付け、オートクレーブ滅菌（121°C、15分）した蒸留水を注入した。シャーレの隙間をパラフィルムで密封し、23°Cに設定した人工気象器内において、約6週間養成した。

播種から概ね1週間ごとにシャーレの蓋を開けて、種子の様子を観察した。種子鞘が裂開して幼根が確認できる状態を、発芽と判定した。また、一部の種子には、表面にカビの付着が認められた。これらの種子は個数をカウントした上で、シャーレから取り除いた。

発芽率は、シャーレごとに蒔き付けた既定の100個を母数として、期間中に発芽した種子の個数を百分率に換算し、それぞれの枚数分を平均して求めた。

後述する菌根苗の養成試験を2回に分けて

行ったことから、種子の発芽検定も時期を変えて2回実施した。各々の検定の、その他の具体的な条件は、表-1のとおりである。

種子の発芽率について、Fisherの正確確率検定を用いて系統間の多重比較を行い、有意差（ $p < 0.05$ ）の有無を判定した。また、同方法における有意水準の補正には、Hochberg法を用いた。統計解析プログラムには、R 4.2.2（R Development Core Team 2022）を使用した。

2.2 菌根菌資材の作製

ショウロ（*Rhizopogon roseolus*）もしくはショウロとアマタケ（*Suillus bovinus*）の複数系統（2015年に氷見市内において採取した菌株を、分離培養したもの）を、2%モルト寒天平板培地で1か月程度培養した。予めオートクレーブ滅菌（121°C、1時間）したパーライトをきこの栽培袋に入れ、2%モルト液体培地を含浸させた。袋詰めしたパーライトに各系統を接種し、シーラーで袋上部の開口部を密封した後、約24°Cで1~2か月間暗培養し、全体に菌糸が蔓延したものを、苗木に接種するための菌根菌資材として用いた。

2.3 セルトレイを用いた菌根苗の養成

育苗用セルトレイ（38×38×41mm/セル、東海化成社製）を、蓋付きの給水用トレイ（270×270×60mm、サカタのタネ社製）に収納が可能な、5×5個（計25個）のセルのサイズに裁断した。切り分けた育苗用セルトレイと給水用トレイのセットを、接種菌の各系統に対照を加えた個数分用意し、各トレイの表面に70%エタノールを噴霧した後、滅菌室内で乾燥させた。

オートクレーブ滅菌（121°C、1時間）したロックウールブロック（31×31×32mm/セル、日本ロックウール社製）と、前項のとおり作製した接種用のパーライトを、2種類の異なる

表-1 クロマツ種子の発芽検定の諸条件

検定期間	種子の採取年月	種子の個数	種子の浸漬処理	種子の殺菌処理
2017/1/16~2/28	2016/11	1,000個 (100×10個)	静水、 1日間	チウラム（30%）・チオファネート メチル（50%）200倍液、30分間
2018/11/26~2019/1/10	2016/11	500個 (100×5個)	静水、 3日間	エタノール（70%）、3分間 過酸化水素水（30%）、20分間 滅菌した蒸留水で洗浄

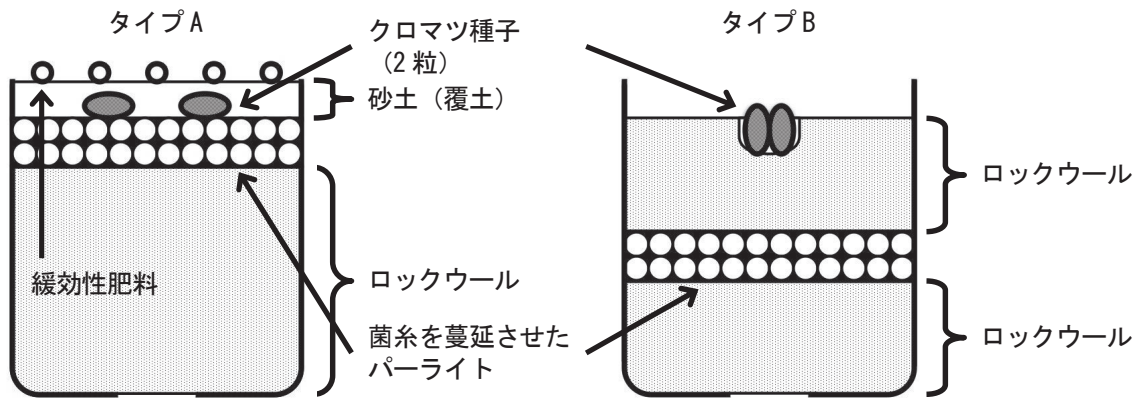


図-1 セル内における種子と培土の積層形態を示す模式図

る形態によって配置した (図-1)。

模式図のタイプ A では、原形のロックウールブロックをそのままセル内に詰め、その上に厚さ 1cm 程度のパーライトを積層した。セルごとに、浸漬・殺菌処理した種子 2 粒をパーライト層の上に蒔き付け、予めオートクレーブ滅菌 (121°C, 1 時間) した砂土 (芝の目土, 5ml/セル) を振り掛けて被覆した。さらに、固形の緩効性肥料 (ハイコントロール オール 10-100, 0.2g/セル) を表面に散粒して、菌根菌への感染が成立した後の、苗木の成長に備えた。

模式図のタイプ B では、原形のロックウールブロックを等分し、その間に厚さ 1cm 程度のパーライトを挟み込むように積層した。浸漬・殺菌処理した種子 2 粒は、ロックウール表面の、既製の窪みに埋め込んだ。なお、このタイプでは、根が菌根菌に接触する前に、肥培が菌根化を阻害する可能性を考慮して、肥料は施用しなかった。

何れのタイプにおいても、育苗用セルトレイと給水用トレイのセットを単位として各々の系統を割り当て、同一のトレイセット

に複数の系統が混入しないようにした。また、それぞれ滅菌済みの、蒸留水を含浸させたパーライトを用意し、同様の形態で作製したものを、菌を接種していない対照として用いた。

それぞれのタイプに共通して、給水用トレイの底面には、予めオートクレーブ滅菌 (121°C, 1 時間) したペーパータオルを敷き、同じく滅菌 (121°C, 15 分) した蒸留水を注いで、十分に湿らせた。播種した育苗用セルトレイを給水トレイに収納し (写真-1), 透明色の蓋を被せ、給水トレイと蓋の隙間にはパラフィンフィルム (Parafilm M, Pechiney

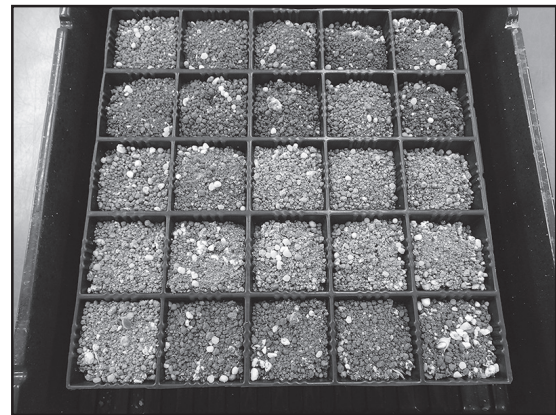


写真-1 給水トレイに収めた育苗用トレイ

表-2 クロマツ菌根苗の養成試験の諸条件

培土の積層形態	養成期間	菌種と系統数	セルの個数	種子の浸漬処理	種子の殺菌処理	人工気象器内の育苗条件
タイプ A	2017/ 6/23 ~ 10/10	ショウロ: 10系統 対照	各25個	静水, 1日間	エタノール (70%), 3分間 次亜塩素酸ナトリウム (10%), 10分間 滅菌した蒸留水で洗浄	23°C, 3,000lux (12時間/12時間) 緩効性肥料を施用 トレイと蓋を密封
タイプ B	2018/11/13 ~2019/ 4/15	ショウロ: 11系統 アマタケ: 2系統 対照	各25個	静水, 3日間	エタノール (70%), 3分間 過酸化水素水 (30%), 20分間 滅菌した蒸留水で洗浄	23°C, 3,000lux (12時間/12時間) トレイと蓋を密封

表-3 菌根形成能力の評価方法

区分	根の状態
I	菌糸なし
II	菌糸あり・菌鞘なし
III	菌鞘あり：細根端の 0~50%未満
IV	“：細根端の 50~80%未満
V	“：細根端の 80~100%

Plastic Packaging 社製) を巻き付けて密封した。23°C, 3, 000lux・12 時間/12 時間周期に設定した人工気象器内において、タイプ A では約 3 か月半、タイプ B では約 5 か月間養成した(表-2)。また、これらの期間中には、人工気象器内の場所による影響を少なくするため、トレイセットの配置を定期的に入れ替えた。

育苗期間中には適宜滅菌した蒸留水で灌水を行いながら、苗木の生育状況を観察した。このとき、種子や覆土から胚軸が立ち上がった状態を確認して、苗木が発生したと見なした。セルごとに蒔き付けた 2 粒の種子から、2 本の苗木が発生した場合には、競合により互いの成長が抑制される可能性を考慮して、劣勢の一方を、ピンセットを使用して間引きした。種子や苗木の表面にカビが蔓延した場合には、周辺への感染を防ぐため、当該セルの種子や苗木をロックウールごと除去した。萎凋・枯死した苗木も病害に罹患した恐れがあるため、同様に除去した。なお、これらの作業は全て、クリーンベンチ内で行った。

A・B それぞれのタイプに基づいて実施した試験の、その他の具体的な条件は、表-2 のとおりである。

2.4 苗木の成長と菌根形成の評価

育苗期間の期末において生存していた全ての苗木をセルトレイから取り出し、根に絡み付いたロックウールやペーパータオルを丁寧に取り除いてから、苗木のサイズを調査した。苗高は地際から芯の先端までの長さを、根長は地際から最も長い根端までの長さを、それぞれミリ単位で測定した。さらに、根を 2 枚のガラス板で挟み込み展延させた後、細根全体を実体顕微鏡下で観察し、菌糸の有無や菌鞘が形成された細根端の割合(表-3)に基づいて、菌根化の程度を評価した。

表-4 各トレイセットの発芽率と得苗木本数(タイプ A)

菌種	系統名	苗木の発生率 (%)	罹患した苗木の本数	得苗木本数
シウロ	Rr-01	0 ^a	0	0
“	Rr-02	46 ^{cd}	21	1
“	Rr-03	4 ^{ab}	1	0
“	Rr-04	20 ^{bc}	3	6
“	Rr-05	22 ^{bcd}	3	6
“	Rr-06	50 ^{cd}	25	0
“	Rr-07	42 ^{cd}	11	9
“	Rr-08	2 ^{ab}	0	1
“	Rr-09	68 ^d	33	1
“	Rr-10	38 ^{cd}	15	3
対照	Ct	66 ^d	7	18

表中のアルファベットは、共通する文字を含まない系統間の、苗木の発生率に有意な差(Fisher's Exact Test, $p < 0.05$)があることを示す。

苗高と根長については Steel-Dwass の方法を、菌根形成の区分については Fisher の正確確率検定を用いて系統間の多重比較を行い、有意差 ($p < 0.05$) の有無を判定した。統計解析プログラムには、R 4.2.2 (R Development Core Team 2022) を使用した。

3. 結果および考察

3.1 種子の発芽検定

クロマツ種子の発芽率は、採取から間もない 1 回目の検定では 95.8%を示した。また、2 回目の検定でも 90.0%を示し、養成試験において播種した何れの時点においても、高い発芽能力を有していたことがわかった。クロマツ種子の発芽率は一般的に高く、また低温下では数年間貯蔵してもあまり低下しないことが報告されている(中山・小林 1981)。したがって、前述の結果は、本研究で使用した種子が、良好な状態で保存されていたことを示している。

3.2 セルトレイを用いた菌根苗の養成

タイプ A の試験において、間引きやカビの発生によって除去したものを含めた苗木の発生率と、罹患した苗木の本数、除去後の得苗木数を、表-4 に示す。各系統の発生率は 0~68%の範囲でばらつき、菌種が同じシウロであっても顕著な差が認められた。他方、対照の発生率は 66%と、シウロの系統のうち

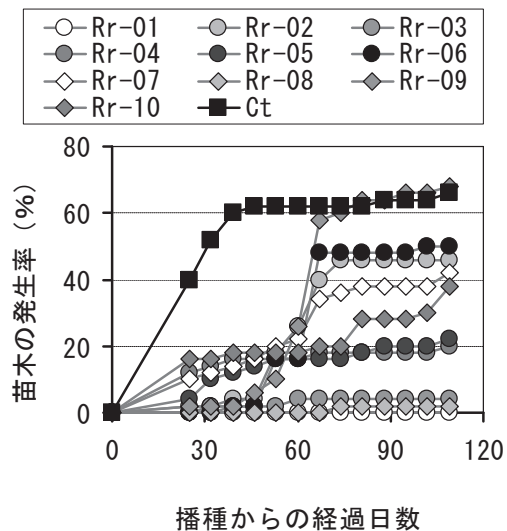


図-2 系統ごとの苗木の発生率の推移

凡例の記号は系統名を表し、表-4 に対応。苗木の発生率には、同一セル内で間引いた個体や、萎凋や病害が発生して取り除いた個体を含む。

表-5 各トレイセットの得苗木本数 (タイプB)

菌種	系統名	得苗木本数
シヨウロ	Rr-01	24
"	Rr-02	25
"	Rr-03	25
"	Rr-04	25
"	Rr-05	25
"	Rr-06	25
"	Rr-07	25
"	Rr-08	25
"	Rr-09	24
"	Rr-10	24
"	Rr-11	25
アマタケ	Sb-01	24
"	Sb-02	25
対照	Ct	21

最も高いものとはほぼ同等であった。また、シヨウロの系統のうち半数では、苗木の発生が対照よりも1か月くらい遅れており(図-2)、トレイ内での生育が阻害されたと考えられた。

発芽しなかった種子の一部を取り出したところ、内部は充実していたが、胚乳は変色・軟化していた(写真-2)。植物の根系に共生する外菌根菌の中には、酸化酵素を有し、弱いながらも腐生性を呈するものがある(水谷 2008)。シヨウロの腐生性に関しては明



写真-2 発芽しなかった種子の内部

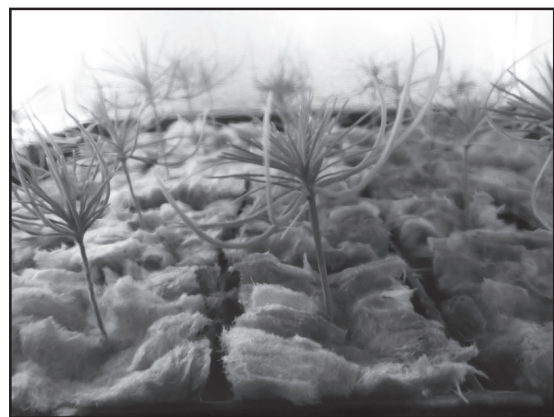


写真-3 セルトレイで養成した苗木の様子

らかでないが、種子もしくは発芽直後の幼根が菌に侵されることによって、以降の生育が阻害された可能性が考えられた。その場合、系統間の発生率の差は、系統ごとの腐生性の違いに起因すると想定された。したがって、タイプAの方法は、菌根菌資材の配置に問題があることが示唆された。

タイプBの試験では、蒔き付けた大半の種子が発芽したため、苗木が展葉し始めた2か月後に間引きした。但し、間引きした苗木の本数を記録しなかったため、系統ごとの発生率は不明である。そこで、間引き・除去後の得苗木本数のみを、表-5に示す。接種群の系統の平均得苗木本数は24.7本であり、ほぼ全てのセルで苗木を養成することができたが(写真-3)、対照の得苗木本数は21本とやや少なかった。2回目の発芽検定から得られた発芽率(90.0%)に基づき、25個のセルのうち、同一セルに1本以上の苗木が発生する期待値

を、苗木が発生したセルの個数と出現確率の全ての組み合わせから求めたところ、24.8本と算出され、前述の平均得苗本数とよく一致した。したがって、苗木の発生率は種子の発芽率とほぼ等しく、発芽したほぼ全ての種子が苗木に成長したと推定され、菌根菌資材の配置に関しては、タイプBの方法がタイプAよりも優れていることがわかった。一方、対照の得苗本数に相当する苗木の発生率は60%と見積もられ、タイプAのそれとあまり変わらなかった。

タイプBでは、厚さ約1.5cmのロックウールがパーライトの上に乗って、種子と菌根菌資材を隔てており、この程度の間隔を設ければ、種子の発芽には影響がないと考えられた。

筆者らが過去に菌根苗の作製を試みた際には、発生した苗木を一旦掘り取ってから菌根菌を接種し、培土に埋め直す方法を行ったため(松浦・佐々木 未発表)雑菌に曝されやすく、接種から2~3週間後にはカビが蔓延し、苗木の生育が妨げられた。本研究では発芽の段階から菌根菌資材を配置したため、掘り取りの工程を省くことができた。結果として、タイプAの試験では、播種および接種から2か月近くが経過したところでカビが広がり、発生した苗木の73%が萎凋・枯死したものの、残余の27%は約3か月半にわたって生存した(表-4)。タイプBの試験では、間引き後に残った苗木は、カビの発生がほとんど見られないまま、約5か月間生存した(表-5)。なお、種子の浸漬および殺菌処理の条件にはタイプ間で異なる点があるものの、タイプAでは、カビは播種からかなり遅れて発生しており、関連性は低いと見なされた。

3.3 苗木の成長と菌根形成の評価

タイプAの試験では、一部の系統において苗木の発生率が低く、十分な本数が得られなかったため(表-4)、期末時に苗木を6本以上確保することができた3系統(「Rt-04」・「Rt-05」・「Rt-07」)と対照の苗木を抽出して、多重比較を試みた。その結果、苗高と根長の双方に関して、系統間に有意な差は検出されなかった(表-6)。なお、給水トレイ

表-6 菌種および系統ごとの苗高と根長(タイプA)

菌種	系統名	苗高(cm)	根長(cm)
ショウロ	Rr-04	4.7 ^a	15.2 ^a
"	Rr-05	4.7 ^a	9.4 ^a
"	Rr-07	4.5 ^a	9.2 ^a
対照	Ct	4.6 ^a	7.8 ^a

表中のアルファベットは、共通する文字を含まない系統間に有意な差(Steel-Dwass Test, $p < 0.05$)があることを示す。

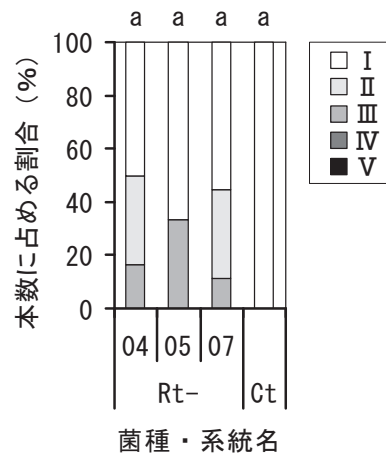


図-3 系統ごとの菌根形成の区分(タイプA)

図中の系統名は表-6に対応。苗木の得苗本数が比較的多かった($n \geq 6$)系統を抽出。表中のアルファベットは、共通する文字を含まない系統間の、菌根形成の何れかの区分に有意な差(Fisher's Exact Test, $p < 0.05$)があることを示す。

に収めたセルトレイの上縁から、被せた蓋の内面までの高さは約6.5cmであり、苗木の地上部の成長には空間に多少の余裕がある状態であった。地下部に関しては、根の大部分はセル内に収まっており、底穴からはみ出したのはわずかであった。

また、細根における菌根菌の感染状況を調べたところ、接種群にのみ菌糸体が観察されたものの、その割合は50%以下にとどまり、菌根形成の区分に関しても有意な差は検出されなかった(図-3)。これらの要因には、解析に供した苗木の本数が少なかったことに加え、発芽が遅れたため(図-2)、根の成長も遅れ(表-6)、さらには育苗期間がやや短く、菌糸の伸展や菌鞘の形成があまり進まなかったと考えられた。

表-7 菌種および系統ごとの苗高と根長 (タイプB)

菌種	系統名	苗高 (cm)	根長 (cm)
ショウロ	Rr-01	3.9 ^a	26.8 ^{ab}
"	Rr-02	3.8 ^a	23.1 ^{ab}
"	Rr-03	3.8 ^a	24.2 ^{ab}
"	Rr-04	3.8 ^a	17.8 ^a
"	Rr-05	3.6 ^a	25.3 ^b
"	Rr-06	3.5 ^a	26.7 ^b
"	Rr-07	3.6 ^a	23.4 ^{ab}
"	Rr-08	3.6 ^a	24.9 ^{ab}
"	Rr-09	3.7 ^a	25.1 ^{ab}
"	Rr-10	3.7 ^a	22.6 ^{ab}
"	Rr-11	3.8 ^a	23.2 ^{ab}
アマタケ	Sb-01	3.6 ^a	26.6 ^{ab}
"	Sb-02	3.5 ^a	27.0 ^b
対照	Ct	4.0 ^a	29.5 ^b

表中のアルファベットは、共通する文字を含まない系統間に有意な差 (Steel-Dwass Test, $p < 0.05$) があることを示す。

リンや窒素などの養分が豊富な条件では、菌根形成が抑制されることが知られている (Ruehle and Wells 1984 ; Newton and Pigott 1991)。外菌根の菌株を接種したパーライトにはモルト液体培地が添加されていた他、タイプAでは固形の肥料も施用されており、これらに含まれる成分によって根系が発達せず、菌根化が妨げられた可能性も考えられた。この点からも、タイプAの方法は、菌根菌資材の配置や肥料の施用に問題があることが示唆された。

もう一方のタイプBでは、全ての系統および対照において十分な本数が得られたため (表-5)、多重比較においても全ての系統および対照の苗木を解析の対象とすることができた。その結果、苗高に関しては系統間に有意な差は検出されなかった (表-7)。苗高はタイプAのそれよりも全体的に小さく、地上部の成長には空間にまだ余裕がある状態であった。根長に関しては、一部の系統間に違いが認められた (表-7)。なお、対照ではパーライトに菌根菌やモルト液体培地を添加していなかったにもかかわらず、苗高と根長は最も大きくなり、それぞれが苗木の成長を促す効果は見出されなかった。根長はタイプAのそれよりも大きく、根のかなりの部分

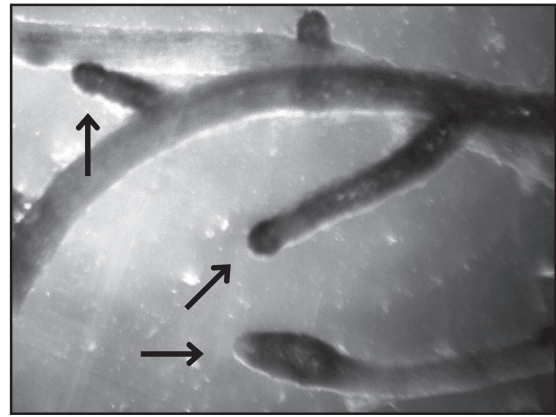


写真-4 細根端に形成されたアマタケの菌鞘 (矢印)

がセルの底穴からはみ出して、ペーパータオルの内部まで伸展していた。

苗木の根はセルの外側へ長く伸びていたにもかかわらず、ほとんどの細根はセルの内部で発生していた。細根における菌根菌の感染状況を調べたところ、接種群ではショウロとアマタケの何れの系統においても、全ての苗木の細根から菌糸が見つかった。細根端には菌鞘もしばしば観察されたが (写真-4)、系統ごとの区分には大きなばらつきが認められた (図-4)。ショウロの「Rt-01」では区分Ⅲの割合が最も高く、苗木の54%が「菌鞘あり」に該当した。アマタケの「Sb-01」では系統内での区分にばらつきが認められたものの、苗木の25%が、菌鞘の形成が細根端の50%以上を占める区分Ⅳや区分Ⅴに該当した。したがって、これら2系統は他の系統よりも菌根形成能力に優れていると判断された。一方、ショウロの「Rt-07」や「Rt-08」では菌鞘は全く観察されず、菌根苗の作製には不適であることが示唆された。また、対照からは菌糸体は一切観察されず、セル内は菌根菌から隔離された状態が維持されていた。

タイプBの試験において、接種から2か月後に間引きした苗木の一部を掘り取って調べたところ、細根には菌鞘が見られなかった。タイプAの試験では、系統によって苗木の発生が1か月くらい遅れた点を加味しても、3か月程度の育苗期間では、菌根形成能力を判断するには十分とは言えず、タイプBの5か

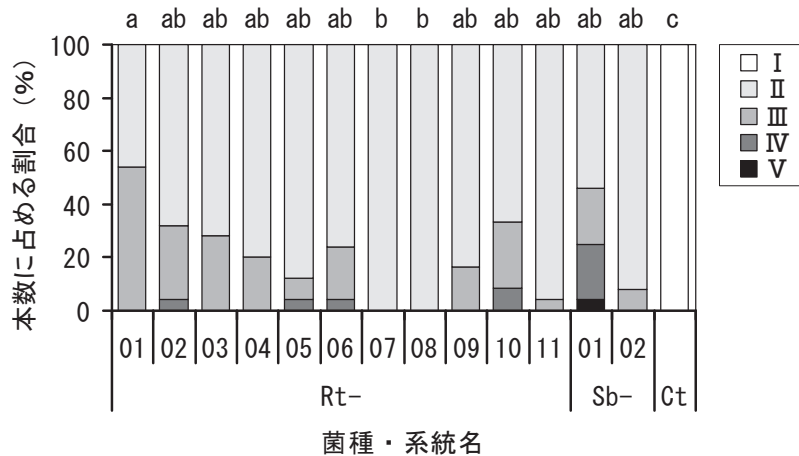


図-4 系統ごとの菌根形成の区分 (タイプ B)

図中の系統名は表-7 に対応。アルファベットは、共通する文字を含まない系統間の、菌根形成の何れかの区分に有意な差 (Fisher's Exact Test, $p < 0.05$) があることを示す。

月程度を必要とすることが明らかとなった。

本研究の結果を、同じくクロマツの菌根苗作製を試みた先行研究と比較すると、三角フラスコを使用した事例では、ショウロやアマタケを接種し、4 か月間養成した苗木の 40~54% に細根端の菌根化が確認された (赤間 1993)。培養瓶を使用した事例では、ショウロを接種し、3 か月間養成した苗木の細根に菌糸束の形成が認められたものの、期間中に苗木の半数が枯死した (平佐 1995)。育苗用セルトレイを用いた本研究の方法は、苗木 1 本ごとの管理がしやすく、かつ給水トレイと合わせても比較的安価に入手できる。また、菌根化に要する期間には、過去の事例と照らし合わせて大きな隔たりがなく、育苗期間中の雑菌の感染を防ぐ効果も確かめられた。

苗木の発生率が低下する要因には、照度の不足、通気性の不良、培土基材の不適合が指摘されているが (平佐 1995)、本研究では給水トレイの材質とサイズ、ロックウールやパーライトの基材から、照度や通気性、培土の適性に関連する問題は出現しておらず、これらの資材は菌根苗の作製に際して有用であると考えられた。

4. おわりに

本研究の方法は、無菌条件下にない通常の実験室内でも、外部からの雑菌の侵入や汚染を防いで、目的とする特定の菌種や系統のみを接種することが可能であり、系統間の菌根形成の評価や、苗木と菌根菌との共生による効果の測定など、菌根苗を材料とする試験に適していると考えられた。

育苗用セルトレイを用いた方法は、厳密な管理を必要としない半開放化の条件でも、特定の菌根菌を接種した苗木を作製できると期待される。また、本研究で採用した培土の積層構造は、プランタでの栽培にも適応できる。菌根菌資材を播種床に施用する場合には、土壌の内部にすき込むなどして、種子もしくは発芽直後の幼根が、資材に直接触れないよう配慮するべきであると考えられた。

5. 謝辞

富山県民福祉公園新港の森管理事務所の鶴 克己所長 (当時) には、クロマツ種子の採取に当たり、便宜を図っていただいた。森林研究所の斎藤真己博士には、セルトレイの利用を始め、苗木の養成に関する貴重な御助言や御指導を賜った。同じく岡山侑子博士には、本論文の執筆に際して的確な御指摘を賜った。また、森林研究所の諸氏には、調査や

結果のとりまとめに御協力いただいた。ここに記して、厚く感謝申し上げます。

引用文献

- 赤間慶子 (1993) マツ無菌苗に対する外生菌根菌の接種. 日林関東支論 44 : 101-102
- 明間民央 (2004) 雲仙普賢岳火砕流跡地に移植したアカマツ実生苗の生存と菌根菌接種の影響. 九州森林研究 57 : 261-262
- 明間民央・根田 仁・宮崎和弘 (2001) 菌根性食用きのこシヨウロの共生栽培に向けた感染苗・作成技術の開発, 森林総合研究所研究成果選集 : 34-35
- 平佐隆文 (1995) シヨウロ土壌培養菌糸体接種によるクロマツ苗の菌根合成. 島根県林技研報 46 : 53-56
- 松田陽介・小長谷啓介 (2022) 外生菌根菌を通して海岸林の再生を考える (菌根の世界第4刷. 齋藤雅典 編著) : 104-139. 築地書館
- 水谷和人 (2008) シメジ属の菌根性キノコ 3種の菌糸培養特性. 岐阜県森林研報 37 : 33-36
- 村山保裕 (2004) 木炭, 外生菌根菌資材施用によるクロマツ苗木の活着と成長. 静岡県林技研報 32 : 19-24
- Nakashima H, Eguchi N, Uesugi T, Yamashita N, Matsuda Y (2016) Effect of ectomycorrhizal composition on survival and growth of *Pinus thunbergii* seedlings varying in resistance to the pine wilt nematode. *Trees* 30 : 475-481
- 中山 学・小林義雄 (1981) マツ属 *Pinus* Linn. (日本の樹木種子 針葉樹編) : 65-76. 林木育種協会
- 能勢育夫 (1992) クロマツ稚苗の生長に及ぼすシヨウロと活性炭の効果. 石川県林試研報 23 : 31-34
- Newton AC, Pigott CD (1991) Mineral nutrition and mycorrhizal infection of seedlings oak and birch. *New Phytol* 117 : 45-52
- Oh KI, Park WS (1990) Growth and Mycorrhizal Formation of *Pinus thunbergii* Seedlings Grown in Growth Chamber. *J Korean For Soc* 79 : 316-321
- 岡部宏秋・江崎次夫・丸本卓哉・早川誠而・赤間慶子 (1994) 共生微生物の植生回復技術への適用 (I) 外生菌根菌の活用. 森林立地 36 : 55-63
- R Development Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing. The R Foundation, <https://www.r-project.org/> (参照 : 2023年1月6日)
- Ruehle JL, Wells CG (1984) Development of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on container-grown pine seedlings as affected by fertility. *For Sci* 30 : 1010-1016
- 玉田克志・更級彰史 (2007) シヨウロ子実体形成試験及びその菌根合成によるマツ材線虫病発病抑制効果. 東北森林科学誌 12 : 81-84
- Wang B, Qiu Y-L (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16 : 299-363

Summary

In this study with a view to examine the function of mycorrhizal fungi species or strains which lived in a symbiotic relationship with the root of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*), we investigated the convenient method to synthesize pine seedlings inoculated with a target strain. In this method, first the perlite medium which were spread with mycelium of two indigenous ectomycorrhizal fungi strains (*Rhizopogon roseolus* and *Suillus bovinus*) were sandwiched by upper and lower layers of rock wool in plug trays. Pine seeds were put on the upper layers of rock wool to successfully avoid obstruction to the germination. Secondly plug trays with pine seeds were housed in the water supply vessels with lid, and then pine seedlings were cultivated at the constant temperature of 23°C for about five months while sealing gaps between the vessel and the lid by paraffin film and preventing the other fungal contamination from outside. As a result, it was observed that the hyphae elongated on the rootlets of all seedlings inoculated with each fungi strain, and the formation of fungal mantle had large variation among these strains. On the other hand, the hypha was not found on the rootlets of the seedlings not inoculated. It was indicated that the method devised by this study enabled to inoculate a specified strain preventing the contamination of fungi in the non-sterilized laboratory, and was adequate for an examination using mycorrhizal seedlings for material.

Keywords: mycorrhizal fungi, plug tray, *Pinus thunbergii*, *Rhizopogon roseolus*, *Suillus bovinus*