

非滅菌環境下におけるマツタケとアカマツの菌根合成

進藤克実*¹・松下範久*¹

Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* with *Pinus densiflora* under non-sterile conditions.

Katsumi SHINDO*¹ and Norihisa MATSUSHITA*¹

はじめに

マツタケ (*Tricholoma matsutake* (S. ITO et IMAI) Sing.) はキシメジ科に属する担子菌類で、日本では古くから最も好まれてきた食用菌であり、現在では高価なきのことして世界的に知られている (HOSFORD *et al.* 1997, HALL *et al.* 2003, SUZUKI 2006)。マツタケの国内生産量は、1941年には年間12,000トン以上あったが、1950年代から減少の一途をたどった(小野寺・鈴木 1998)。林野庁の森林・林業統計要覧によると、2001年以降は2004年を除き100トン以下にまで生産量が減少し、2007年の生産量は51トンであった。一方、2007年のマツタケの輸入量は1,554トンであり、国内消費量のおよそ97%が輸入でまかなわれている。マツタケの国内生産量が減少した原因として、マツタケの主要な生育場所であるアカマツ林の衰退や老齢化、施業の減少による土壌の富栄養化など、アカマツ林の環境がマツタケの生育に適さなくなったことが挙げられている (WANG *et al.* 1997)。

マツタケを増産するために、除伐や地掻きといった施業によるマツタケ増産法の検討 (伊藤・小川 1979) や、アカマツ林への胞子や培養菌糸の接種 (まつたけ増産のてびき編集委員会 2005) などの方法が検討されてきたが、いまだに有効な方法は確立されていない。近年、培養菌糸を接種した宿主植物の苗を室内で栽培することにより、外生菌根菌であるアンズタケ (DANELL 1997) や、アカハツ (YAMADA *et al.* 2001)、ショウロ (YAMADA *et al.* 2001)、ホンシメジ (KAWAI 1997)、*Lactarius deliciosus* (GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2000a) の子実体を人工的に形成させることに成功している。マツタケの人工栽培においても、このような感染苗を利用する方法が有効であると考えられる。

これまでに、マツタケ菌感染苗の作製方法として、野外のマツタケのシロ (菌糸と菌根の集合体) へアカマツの苗木を直接植えつけマツタケ菌感染苗を作製する方法 (枯木・川上 1985) や、滅菌した土壌や滅菌した人工基質を用いることにより、滅菌環境下においてアカマツ実生にマツタケの菌根を合成させる方法 (GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2000b, VAARIO *et al.* 2000, YAMADA *et al.* 1999) が報告されている。前者の方法では、感染苗をマツタケの未発生林へ移植することで、1例だけではあるが子実体発生が確認されている (枯木・川上 1985)。しかし、この方法は菌根形成苗の作出の際にシロを損傷してしまうため、限られた数しかない野外のシロを用いて大量の感染苗を得ることは困難である。また、マツタケの子実体を1本発生させるためには乾重で

*¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科

*¹ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

約 100g の菌糸体が必要であると考えられており (鈴木 2005), そうした多量の菌糸を賄うためには, 宿主の大型化や, 長期間にわたる栽培が必要となると考えられる。後者の方法では, こうした条件を考えたときに, 長期間減菌状態を維持しなくてはならず, あまり実際的ではない。今後, それぞれの方法を出発点として, 有効かつ実際的な感染苗作製法を確立する必要がある。

本研究では, マツタケ菌感染苗作製に際して, 比較的初期の段階から非減菌環境で感染苗を育成すること, 加えて, できるだけサイズの大きな苗から菌根苗を作製することを目的として, そのための方法の検討を行った。

材料と方法

接種源の作製

実験には, 長野県伊那市のアカマツ林に発生したマツタケ子実体より分離された T2 菌株 (GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2002) を用いた。供試菌株を太田平板培地 (OHTA 1990) で 23℃, 暗黒下で培養した後, 菌糸体を 5~10mm 角に培地ごと切り取った。切り取った菌糸体 20 片を 100ml 容三角フラスコ中の 10ml の液体培地 (GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2000a) に接種し, 4 週間静置培養した。培養した菌糸体を 10mM MES 溶液 (pH 5.1) で洗浄した後, 1cm 四方に切ったものを接種源とした。

アカマツ実生苗の作製

市販のアカマツ種子を蒸留水中に 1 日浸漬した後, 30% 過酸化水素水に 15 分間浸漬して表面殺菌した。殺菌した種子を滅菌蒸留水で 2 回洗浄した後に, 0.2% グルコース寒天培地上に播種し, 23℃, 白色蛍光灯 ($150 \mu \text{mols}^{-1} \text{m}^{-2}$) 下で 11 日間栽培した。栽培中に雑菌の混入は認められなかった。得られた実生苗を, 開放型の育苗箱 (rootraiser, Ronaash 社) 中の 100ml の培土に 1 本ずつ移植した。培土はパーライトとパーミキュライトを等容量混合した後に, 121℃, 60 分間オートクレーブしたものをを用いた。移植した実生苗は, 23℃, $110 \mu \text{mols}^{-1} \text{m}^{-2}$ (波長 400~700nm, 明期 16 時間, 暗期 8 時間) の非減菌環境下のグロースチャンパー内で栽培した。実生苗には, 移植後 3 週間は毎日蒸留水を 5ml 与え, その後は週に 1 回, NYLUND and WALLANDER (1989) の A + B 液の 1000 倍希釈液 (Pine Solution, 以下 PS) を 6ml と, 週に 3 回蒸留水を 6ml 与えて 3 ヶ月間栽培し, 接種実験に供した。

取り木苗の作製

東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無試験地 (以下, 田無試験地) の第一苗畑に植栽された 9 年生アカマツに対して, KAWAI (1997) の方法に従い空中取り木処理を行った。1 年生の部位を 15~20cm の幅に渡って摘葉し, 摘葉部の中心付近を約 3cm 幅に環状剥皮した。剥皮部上部の樹皮に, 0.5% IBA 粉剤 (オキシベロン, 塩野義製薬社) と 10 倍量の脱水ラノリンとを混合したものを塗布した。水道水を含ませたミズゴケで剥皮部分を包み, その上からポリエチレンシートを巻きつけて覆い, 両端をビニール紐で結んで固定した。さらに遮光のため, ポリエチレンシートの上からアルミ箔で覆った。処理 4 ヶ月~5 ヶ月後に, 発根のみられた処理枝を剥皮部分の下で切断し, 得られた取り木苗を 2.7L 容のポット (WM コンテナ, Thermoflan 社) に移植し, 20℃, 自然光, 非減菌環境下のガラス室内で 3 ヶ月間栽培した後, 接種実験に供した。

移植した苗には、毎日水道水を十分に与えた。

培土の調整

菌根合成に与える培土の影響を調べるため、表-1に示した4種類の混合培土を用いた。弥生土および加計土は3mmの篩を通し、60℃で24時間乾燥させた。パーライトは1mmの篩にかけ、粉末部分を取り除いて使用した。アカマツ樹皮は田無試験地に植栽されたアカマツ成木から採取し、フードミル(HL-2053, Philips社)で20秒粉碎した。これらの材料を表-1に示した割合で混合し、蒸留水を15%(w/v)加えた後に、121℃、60分間オートクレーブしたものを培土とした。

接種

実生苗の根を蒸留水で洗浄した後、根の3～4カ所に接種源を1個ずつ木綿糸で縛り付けて固定した。その後、滅菌した4種類の培土とともにroottrainerに植え戻した。接種は、各培土につき3本ずつの実生苗に対して行い、対照の非接種苗はP培土のみ作製した。接種した苗は、23℃、 $110 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ (波長400~700nm, 明期16時間, 暗期8時間)の非滅菌環境下のグロースチャンバー内で栽培し、毎週23mlの蒸留水を4日に分けて与えた。

取り木苗には、苗当たり100ml容三角フラスコ1本分の量の培養菌糸を苗1本分への接種源とし、実生苗と同様の方法で接種を行った。10本の苗の根に接種した後、苗を滅菌したB培土を入れたポットに苗を植え戻し、20℃、自然光下のガラス室内で栽培した。接種後の苗には、週に1回PSを60mlと、週に2回水道水を60ml与えた。

菌根の観察とDNA解析

マツタケ菌糸体接種後の実生苗を、接種1, 2, 3ヵ月後に各培土につき1本採取した。また、取り木苗は、接種10週間後に6本、20週間後に4本を採取した。採取した苗の接種部付近の根を実体顕微鏡下で観察し、GILL and SUZUKI (2000)によるマツタケ菌根の形態的特徴の記述に従い、マツタケ菌根の形成の有無を記録した。マツタケ菌根を採取し、菌根の発達状況を確認するために、ハルティヒネットの観察を行った。また、形成された菌根がマツタケのものであることを確認するためにDNA解析を行った。ハルティヒネットの観察では、各苗につき4～47個のマツタケ菌根を採取し、70%エタノールに浸漬して保存した。GILL and SUZUKI (2000)の方法に従って細根の染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

表-1 アカマツ-マツタケ菌根合成に使用した培土の組成
Table 1. Compositions of substrates used for mycorrhizal synthesis of *Pinus densiflora* / *Tricholoma matsutake*

種類	組成	体積比
P培土	パーライト:パーミキュライト	1:1
B培土	パーライト:パーミキュライト:アカマツ樹皮粉末	5:5:1
C培土	弥生土*:パーミキュライト:アカマツ樹皮粉末	5:5:1
F培土	加計土**:パーミキュライト:アカマツ樹皮粉末	5:5:1

* 弥生土:東京大学弥生キャンパス構内(東京都文京区)のマテバシイの下から採取した。

** 加計土:広島県安芸太田町のアカマツ林で採取した。

* Soil was collected from Yayoi campus, The University of Tokyo (Bunkyo-ku, Tokyo).

** Soil was collected from *Pinus densiflora* forest at Akiota-cho, Hiroshima Prefecture.

DNA解析では、各苗につき1~5個のマツタケ菌根を採取して凍結乾燥した後に、各苗の菌根をひとまとめにして、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社)を用いてDNAを抽出し、PCRのテンプレートとした。対照として、マツタケ培養菌糸からも同キットを用いてDNAを抽出した。rDNA-ITS領域のプライマー対(ITS1とITS4)(WHITE *et al.* 1990)とマツタケ特異的のプライマー対(TmFとTmR)(KIKUCHI *et al.* 2000)を用いたnested-PCR法により、DNAを増幅した。PCRの条件は、GUERIN-LAGUETTE *et al.* (2005)にしたがった。ネガティブコントロールとして、蒸留水をサンプルに含めた。PCRによるDNA増幅の有無と増幅産物の分子サイズを確認するために、1.5%アガロースゲルを用いて0.5×Tris-ホウ酸-EDTA緩衝液中でPCR産物の電気泳動を行った。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液(1μg/ml)中で30分間染色し、EDAS 290システム(Kodak社)を用いて泳動像を観察後、撮影した。

結 果

実生苗を用いた菌根合成

P培土では、接種1ヵ月後および3ヵ月後に採取した個体の接種部付近において、マツタケ菌根が観察された(図-1A)。また、C培土では接種1, 2, 3ヵ月後に採取した個体において、B培土およびF培土では接種1ヵ月後および2ヵ月後に採取した個体において、マツタケ菌根が観察された。これらの菌根は、棒状のものからホウキ状に分枝しているものまでであった。菌根の先端部はクリーム色から明るい褐色で、基部は暗褐色であった。菌根の中程にくびれがあり、ここを境に色調が異なっていた。また、一部の菌根では、根外菌糸体と見られる白色の菌糸が表面に付着していた(図-1Aの矢印)。しかし、培土中ではマツタケのものと思われる白色の菌糸が接種部付近にわずかに見られたほかは、マツタケの菌糸は観察されなかった。一方、マツタケ菌根と異なる形態的特徴を持つ菌根は、いずれの培土においても観察されなかった。

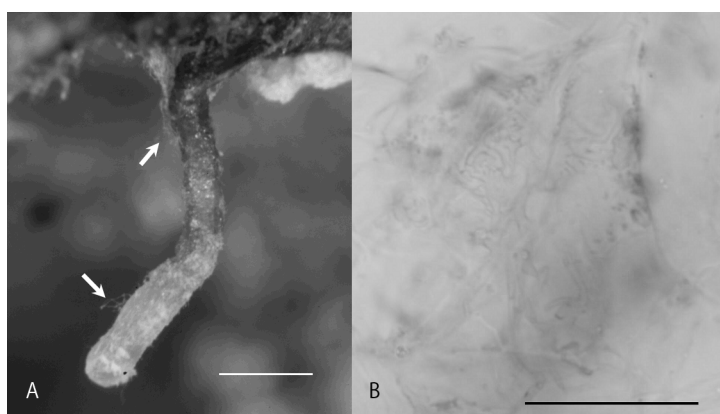


図-1 A. マツタケ菌接種1ヶ月後に、アカマツ実生苗に形成されたマツタケ菌根。P培土。矢印は、菌根表面に付着する根外菌糸体。バー、0.5mm B. マツタケ菌接種2ヶ月後に、アカマツ実生苗の菌根中に観察されたハルティヒネット。F培土。バー、20μm

Fig. 1. A. Ectomycorrhiza formation of *Tricholoma matsutake* on a lateral root of a *P. densiflora* seedling. Arrow, extraradicle mycelium. Bar = 0.5mm. B. Hartig net observed within a *P. densiflora* mycorrhiza. Bar = 20 μm.

これらのマツタケ菌根について、ハルティヒネットの観察とDNA解析を行った。P培土では、接種3ヵ月後に採取した個体の根において、25根端中2根端でハルティヒネットが観察された。B培土では、接種2ヵ月後に採取した個体において、47根端中2根端でハルティヒネットが観察された。C培土では、接種3ヵ月後に採取した個体において、23根端中1根端でハルティヒネットが観察された。F培土では、接種1ヵ月後および2ヵ月後に採取した個体で、それぞれ36根端中1根端、15根端中2根端でハルティヒネットが観察された(図-1B)。一方、P培土では1ヵ月後、C培土においては1ヵ月後、2ヵ月後、B培土では1ヵ月後に採取した個体においてもマツタケ菌根が観察されたが、これらの菌根中にはハルティヒネットは確認できなかった。

接種1ヵ月後および3ヵ月後に採取したマツタケ菌根について、DNA解析を行った。その結果、対照としたT2菌株の培養菌糸と同一分子サイズのDNAが増幅された(図-2)。一方、マツタケ接種前の実生苗やマツタケ非接種の対照苗から採取した細根、ネガティブコントロールでは、DNAの増幅はみられなかった。

取り木苗を用いた菌根合成

接種10週間後に採取した6本の苗のうちの2本と、20週後に採取した4本の苗のうちの1本の苗で、マツタケ菌根が観察された。マツタケ菌根が観察された苗のうち、接種10週後の1本の苗のマツタケ菌根と20週後の苗のマツタケ菌根ではハルティヒネットが観察された(図-3)が、接種10週後の1本の苗のマツタケ菌根ではハルティヒネットが認められなかった。また、形成されたマツタケ菌根のDNA解析を行ったところ、3本すべてにおいて、マツタケに特異的なDNAの増幅がみられた。一方、いずれの苗木においても、マツタケ以外の形態的特徴を持つ菌根は観察されなかった。

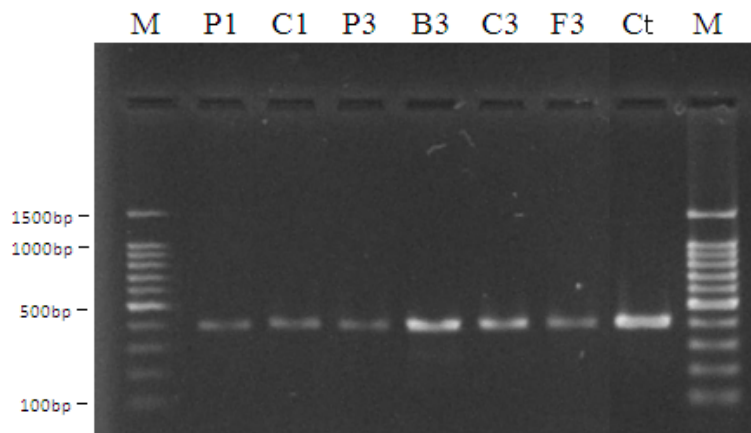


図-2 マツタケ菌を接種したアカマツ実生苗の菌根から抽出したDNAのnested-PCR法による増幅結果。P, B, C, Fは、菌根合成に用いた培土の種類。数字は、接種後の月数。Ct, マツタケの培養菌糸(対照); M, 100 bpサイズマーカー。

Fig. 2. Nested PCR on DNA extracts from *Pinus densiflora* roots putatively colonized by *Tricholoma matsutake* 1 or 3 months after inoculation. P, B, C, and F; substrates for mycorrhizal synthesis, followed by numbers that shows incubation periods after inoculation. Ct: DNA extracts of pure *T. matsutake* culture (positive control). M: 100bp size markers.

考 察

非滅菌環境下において、マツタケの培養菌糸をアカマツ実生苗と取り木苗へ接種した結果、実生苗では接種後1ヵ月から3ヵ月、取り木苗では接種10週および20週後の観察で、それぞれ接種部付近にマツタケ菌根の形態的特徴を持った菌根の形成が認められた。さらに、マツタケ特異的プライマーを用いたDNA解析により、これらの菌根がマツタケのものであることが確認された。したがって、今回の接種方法では、実生では1ヵ月、取り木苗では10週間未満の期間で、菌根が形成されていたと推測される。本研究で観察されたマツタケの菌根は、実生苗と取り木苗ともに色調が明るく、根外菌糸体がはっきり観察されるといった特徴があった。これは、GILL and SUZUKI (2000)によるマツタケ菌根の形態的特徴に基づいたタイプ分けに従うと、タイプ1からタイプ2に相当する発達途上にある若い菌根である。接種1ヵ月後または2ヵ月後に採取したマツタケ菌根では、ハルティヒネットが観察されない場合があったが、これらの菌根ではハルティヒネットがまだ発達していなかったものと推測される。

実生苗への接種実験では、すべての培土で菌根が形成され、菌根の形成量には培土間で大きな違いがみられなかった。無菌環境下においては、本研究で培土に用いた材料のうち、弥生土はマツタケの菌糸成長に好適であり (GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2003)、アカマツ樹皮はマツタケが菌糸成長に利用できる (VAARIO *et al.* 2002) ことが報告されている。また、加計土は、マツタケ子実体が発生するアカマツ林下から採取したものである。しかし、本研究の結果から、非滅菌環境下においては、これらの材料はマツタケの菌根形成を促進する大きな効果はないと推測される。本研究では、各培土について供試したアカマツが3本ずつと少数であったため、培土の差異が菌根の形成と発達に及ぼす影響については、更なる研究を要する。

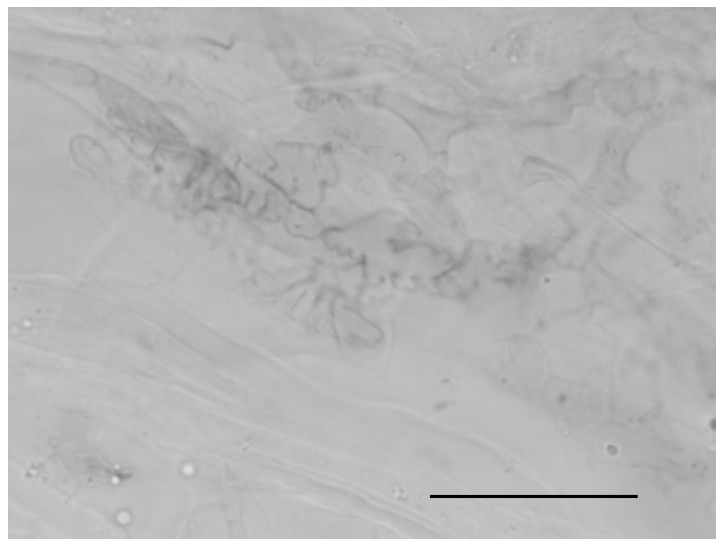


図-3 マツタケ菌接種10週後のアカマツ取り木苗の細根中に形成されたハルティヒネット。
バー、20 μ m

Fig. 3. Hartig net observed in a lateral root of an air-layered *Pinus densiflora* sapling 10 weeks after inoculation of *Tricholoma matsutake*. Bar = 20 μ m.

マツタケの人工栽培は、①マツの根にマツタケ菌を感染させて菌根を形成させ、②シロを発達させ、③子実体を発生させる、という3つのステップにより可能になると考えられている（鈴木2005）。このうち、①のステップについては、既に、滅菌環境下における実生苗を用いたマツタケ菌根の合成法（GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2000b; VAARIO *et al.* 2000; YAMADA *et al.* 1999）が確立されている。その後、非滅菌環境下におけるアカマツ成木を用いたマツタケ菌根の合成法（GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2005）が確立され、加えて本研究により、アカマツの実生苗や取り木苗からも、非滅菌環境下においてマツタケ菌感染苗を作製することが可能になった。従って、①のステップについては、アカマツの実生苗から成木まで、樹齢に関わらず非滅菌環境下でマツタケ菌根を形成させる手法が確立されたといえる。特に、取り木苗を用いた方法は、1年生枝から苗を作製するために、野外へ移植可能な大型のマツタケ菌感染苗を、実生から育成する場合に比べて、1年以上期間を短縮して作製することができ、マツタケの人工栽培を行う上で非常に有効な手法になることが考えられる。また、例えば、母樹にマツ材線虫病抵抗性の個体を用いることにより、マツ材線虫病抵抗性を有するマツタケ菌感染苗を作出することが可能になるなどの応用も考えられる。なお、本研究では培土に滅菌土を使用するなど、実際の野外の環境とは大きく異なる。今後、こうした環境条件の違いによる影響の解明や、野外の環境へ適用するための研究が必要である。

マツタケ人工栽培における②のステップについて、滅菌環境下では、マツタケ菌根の合成に加えて、シロに類似した状態をつくることに成功している（GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2003, YAMADA *et al.* 2006）。一方、野外では、無菌環境下で作出したマツタケ菌根苗の林地への移植（山田・小林2008）や、林地での成木へのマツタケ菌の接種（GUERIN-LAGUETTE *et al.* 2005）が試みられているものの、シロを形成させることには成功していない。本研究でも、マツタケ菌根の周辺部に根外菌糸体は観察されたものの、シロの形成は認められなかった。マツタケの人工栽培方法を確立するためには、非滅菌環境下において、作製した感染苗からシロを形成・拡大させるための条件を明らかにする必要がある。

謝 辞

本研究にあたり、森林総合研究所の鈴木和夫博士と、New Zealand Institute for Crop and Food ResearchのAlexis Guerin-Laguette博士に、実験についてご助言をいただいた。東京大学大学院農学生命科学研究科森林科学専攻の宝月岱造教授には、本論文をまとめるにあたってご助言をいただいた。ここに厚くお礼申し上げる。

要 旨

非滅菌環境下において、アカマツの実生苗、および空中取り木法により得た苗木にマツタケ培養菌糸を接種し、菌根合成を試みた。実生苗および取り木苗のいずれにおいても、マツタケ菌糸を接種した部位にマツタケ菌根の形態的特徴を持つ細根が観察された。それらの細根中にはハルティヒネットが観察され、また、マツタケ特異的プライマーによるDNAの増幅がみられた。これらの結果から、非滅菌環境下において、マツタケとアカマツの菌根合成に成功したと考えられた。

キーワード： 外生菌根・共生・マツタケ・アカマツ・接種

引用文献

- DANELL, E. (1997) Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385: 303.
- HOSFORD, D., PILZ, D., MOLINA, R., and AMARANTHUS, M. (1997) Ecology and management of the commercially harvested American matsutake mushroom. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-412.
- GILL, W. M. and SUZUKI, K. (2000) The external morphological characterization of *Tricholoma matsutake* infection of host *Pinus densiflora* lateral roots. *J. For. Res.* 5: 99-102.
- GUERIN-LAGUETTE, A., PLASSARD, C., and MOUSAIN, D. (2000a) Effects of conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can. J. Microbiol.* 46: 790-799.
- GUERIN-LAGUETTE, A., MATSUSHITA, N., LAPEYRIE, F., SHINDO K., and SUZUKI, K. (2005) Successful inoculation of mature pine with *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15: 301-305.
- GUERIN-LAGUETTE, A., MATSUSHITA, N., KIKUCHI, K., IWASE, K., LAPEYRIE, F., and SUZUKI, K. (2002) Identification of a prevalent *Tricholoma matsutake* ribotype in Japan by rDNA IGS1 spacer characterization. *Mycol. Res.* 106: 435-443.
- GUERIN-LAGUETTE, A., VAARIO, L. M., GILL, W. M., LAPEYRIE, F., MATSUSHITA, N., and SUZUKI, K. (2000b) Rapid in vitro ectomycorrhizal infection on *Pinus densiflora* roots by *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience* 41: 389-393.
- GUERIN-LAGUETTE, A., VAARIO, L. M., MATSUSHITA, N., SHINDO, K., SUZUKI, K., and LAPEYRIE, F. (2003) Growth Stimulation of Shiro-like, mycorrhiza forming, mycelium of *Tricholoma matsutake* on solid substrates by non-ionic surfactants or vegetative oil. *Mycol. Prog.* 2: 37-44.
- HALL, I. R., STEPHENSON, S. L., BUCHANAN, P. K., WANG, Y., COLE, A. L. J. (2003) Edible and poisonous mushrooms of the world. 371pp, Timber Press, Portland and Cambridge.
- 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* 61:163-173.
- 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.
- KAWAI, M. (1997) Artificial ectomycorrhiza formation on roots of air-layered *Pinus densiflora* saplings by inoculation with *Lyophyllum shimeji*. *Mycologia* 89: 228-232.
- KIKUCHI, K., MATSUSHITA, N., GUERIN-LAGUETTE, A., OHTA, A., and SUZUKI, K. (2000) Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. *Mycol. Res.* 104:1427-1430.
- まつたけ増産のてびき編集委員会 (2005) つくるマツタケへーまつたけ増産のてびき 改訂Ⅲ版一. 92pp. 長野県特用林産振興会, 長野.
- NYLUND, J. E. and WALLANDER, H. (1989) Effect of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytol.* 112: 389-398.
- OHTA, A. (1990) A new medium for mycelial growth of mycorrhizal fungi. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 31: 323-334.
- 小野寺有子・鈴木和夫 (1998) マツタケ山の変遷 - 長野県上伊那地方を事例として -. *森林文化研究* 19: 123-136.
- 鈴木和夫 (2005) 外生菌根共生系の生理生態とマツタケのパズル. *日林誌* 87: 90-102.
- SUZUKI, K. (2006) The significance of mycorrhizae in forest ecosystems. In *Plantation and technology in tropical forest science*. Suzuki, K., Ishii, K., Sakurai, S., Sasaki, S. (eds.), Springer, Tokyo, 41-52.
- VAARIO, L. M., GUERIN-LAGUETTE, A., GILL, W. M., LAPEYRIE, F., and SUZUKI, K. (2000) Only two weeks are required for *Tricholoma matsutake* to differentiate ectomycorrhizal Hartig net structures in roots of *Pinus densiflora* seedlings cultivated on artificial substrate. *J. For. Res.* 5: 293-297.
- VAARIO, L. M., GUERIN-LAGUETTE, A., MATSUSHITA, N., SUZUKI, K., and LAPEYRIE, F. (2002) Saprobic potential of *Tricholoma matsutake*: growth over pine bark treated with surfactants. *Mycorrhiza* 12: 1-5.
- WANG, Y., HALL, I. R., and EVANS, L. A. (1997) Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 1. *Tricholoma matsutake* and related fungi. *Econ. Bot.* 51: 311-327.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., and TAYLOR, J. (1990) PCR Protocols. Academic Press 315-322.
- 山田明義・小林久泰 (2008) マツタケ人工栽培の展望. *森林科学* 53:41-42.

- 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.
- YAMADA, A., OGURA, T., and OHMASA, M. (2001) Cultivation of mushrooms of edible mycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* 11: 59-66.
- YAMADA, A., MAEDA, K., KOBAYASHI, H., and MURATA, H. (2006) Ectomycorrhizal symbiosis in vitro between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring 'shiro'. *Mycorrhiza* 16: 111-116.

(2008年8月29日受付)

(2008年11月17日受理)

Summary

Cultured mycelia of *Tricholoma matsutake* were inoculated into seedlings and air-layered saplings of *Pinus densiflora* under non-sterile conditions for mycorrhizal synthesis. After inoculation, pine seedlings and air-layered saplings formed lateral fine roots that resembled *T. matsutake* mycorrhizae around the inocula. A Hartig net was observed in these lateral fine roots, and colonization of *T. matsutake* was confirmed by nested-PCR using *T. matsutake* specific primers. These results suggest that mycorrhizae of *T. matsutake* were successfully synthesized on seedlings and air-layered saplings of *P. densiflora* under non-sterile conditions.

Key words: Ectomycorrhiza, Symbiosis, *Tricholoma matsutake*, *Pinus densiflora*, Inoculation