

容器内でのクロマツ, クヌギへの共生菌の接種による二員培養

石井克明*・岩瀬剛二**・小谷圭司*・小川 真**

*森林総合研究所

(〒305 茨城県稲敷郡茎崎町松の里1)

**関西総合環境センター

(〒530 大阪府大阪市北区中崎西2丁目3番39号)

(1992年9月19日受付)

(1993年1月8日受理)

樹木への菌根菌の共生は、植物の育成にとって重要である。組織培養は、一般に、無菌的状态で行われるが、健全な植物の育成には、優良で適合した共生菌の接種が効果的であると思われる。また、子実体が有用なきのこの類の共生菌では、きのこ生産の可能性をもった、新しい菌株接種、共生化の方法として、*in vitro* 接種は試みる価値がある。

これまで、外生菌根菌を *in vitro* の植物体に接種した例として、ユーカリ¹⁾、ポプラ²⁾があり、それぞれ菌株と植物の一定の組み合わせで、mantle や Hartig net の形成に成功している。

アカマツとマツタケ菌についても、二員培養法による

相互作用の解析が行われた³⁾。

本報では、成熟胚より不定芽を導いて増殖したクロマツと、成木腋芽より増殖したクヌギの *in vitro* 植物体を用いて、マツタケモドキ、モロッコマツタケ、ショウロ、ホンシメジ、ハツタケの各菌を接種して、二員培養を行い、植物体、接種菌両者の育成の様子を調べた。

【材料および方法】 クロマツは、関東林木育種場内の精英樹採種園産の種子胚を用いて、マイクロ増殖したもの⁴⁾を、クヌギは、茨城県稲敷郡茎崎町の雑木林より採取した小丸太を水挿しして伸長させた枝条の腋芽から増殖した植物体を用いた^{5,6)}。それぞれ発根した植物体は、パーライトかバーミキュライトを培地としたフラスコ内に

Table 1. Effects of fungi inoculation to Japanese black pine(perlite medium) *1.

Fungi species*2	No. of plantlets	Height (mm) ±sd*3	
		1 month	2 months
Morocco matsutake (<i>Tricholoma caligatum</i>)	11	87.8±13.6	89.7±14.2
Matsutakemodoki No. 16 (<i>Tricholoma robustum</i>)	12	75.3±22.7	75.7±24.2
Matsutakemodoki No. 56 (<i>Tricholoma robustum</i>)	12	69.3±18.8	70.2±19.3
Honshimeji (<i>Lyophyllum shimeji</i>)	3	81.7±14.2	82.0±15.7
Control	6	80.8±13.0	81.3±13.2

*1Medium; 100 ml perlite, 60 ml water in 300 ml flask.

*2Inoculation method; 5 mm×5 mm cubic agar with fungi was attached to the roots.

*3sd; standard deviation.

Table 2. Effects of fungi inoculation to Japanese black pine (vermiculite medium)*¹.

Fungi species* ²	No. of plantlets	Height (mm) \pm sd* ³	
		1 month	2 months
Morocco matsutake (<i>Tricholoma caligatum</i>)	9	84.1 \pm 16.0	86.0 \pm 15.5
Matsutakemodoki No. 16 (<i>Tricholoma robustum</i>)	7	76.9 \pm 18.9	78.7 \pm 18.1
Matsutakemodoki No. 56 (<i>Tricholoma robustum</i>)	7	69.4 \pm 31.8	68.3 \pm 33.4
Control	9	70.3 \pm 18.3	74.8 \pm 18.4

*¹Medium ; 100 ml vermiculite, 60 ml water in 300 ml flask.

*²Inoculation method ; 5 mm \times 5 mm cubic agar with fungi was attached to the roots.

*³sd ; standard deviation.

移した。

接種菌は、ブドウ糖と酵母抽出物で純粋培養したモロッコマツタケ、マツタケモドキ、ホンシメジ、ショウロ、ハツタケを用いた。接種方法は、寒天平面培養した菌付き寒天を5 mm角のブロックに切り分け、植物体の根に接触させる方法と、液体培養した菌体をポリトロンで粉碎したものを植物体の根に附着させる方法をとった。

二員培養は、3000 lux, 16時間日長, 25°C 恒温下で行った。

【結果および考察】 養分を含まないパーライトかパーミキュライトと水だけの培地に移植したクロマツへの各種共生菌の接種の効果を **Table 1** および **2** に示した。2箇月の二員培養によって、パーミキュライト培地でマツタケモドキ No. 56 を接種した場合以外は、それぞれ若干の苗高の伸長がみられた。しかし、対照と比べて、特に苗木の伸長に効果があったわけではなく、また、パーライトとパーミキュライトについても差がなかった。一般に、培地に養分が無い方が、共生菌が培地の栄養分に依存した成長をせず植物に共生し易いと思われる。しかし、本実験では、根の共生菌による被覆はみられなかった。これは、菌付き寒天ブロックによる接種方法では、菌体と植物体との接触が十分でないことが原因と思われた。

クスギへのホンシメジ菌の接種では、対照では、2箇月後に養分欠損によると思われる成育阻害や、苗木の萎縮から苗高が減少したが、共生菌を接種した場合は、苗高を維持した。だが、植物体の根の共生菌による被覆は観察されなかった (**Table 3**)。

これらのクロマツとクスギの二員培養を9箇月間続けたが、子実体の発生はなかった。

つぎに、クロマツとクスギへの共生菌接種での培地の

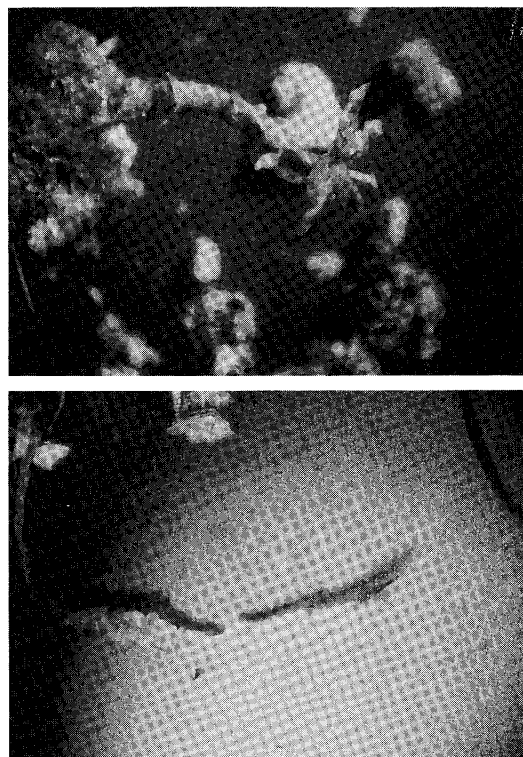


Fig. 1 Mantle formation around the root of Japanese black pine cultured *in vitro*.

Upper : Shouro

Lower : Hatsutake

違いについて、水、0.1%ブドウ糖と0.02%酵母抽出物(GYP)、0.1%ハイポネックスの3者を比較した。クロマツにショウロかハツタケを接種した場合、**Table 4** に示すように、二員培養5箇月後の苗高でみると0.1%ハイポネックス含有の培地で最も植物体の伸長に効

Table 3. Effects of fungi inoculation to Japanese red oak (vermiculite medium) *¹.

Fungi species* ²	No. of plantlets	Height (mm) \pm sd* ³	
		1 month	2 months
Honshimeji (<i>Lycophyllum shimeji</i>)	14	39.9 \pm 19.1	41.7 \pm 18.6
Control	5	46.4 \pm 15.0	39.6 \pm 10.6

*¹Medium; 100 ml vermiculite, 60 ml water in 300 ml flask.

*²Inoculation method; 5 mm \times 5 mm cubic agar with fungi was attached to the roots.

*³sd; standard deviation.

Table 4. Effects of different nutrients on fungi inoculation to Japanese black pine (vermiculite medium) *¹.

Fungi species* ²	Nutrients	No. of plantlets	No. of surviving	After 5 months
				Height (mm) \pm sd* ³
Shouro (<i>Rhizopogon rubescens</i>)	Water	7	6	53.2 \pm 23.7
	{ 0.1 % Glucose 0.02% Yeast extracts	7	7	63.5 \pm 12.7
		0.1 % Hyponex	7	7
Hatsutake (<i>Lactarius hatsudake</i>)	Water	3	3	67.0 \pm 18.4
	{ 0.1 % Glucose 0.02% Yeast extracts	3	3	65.0 \pm 10.0
		0.1 % Hyponex	3	3

*¹Medium; 100 ml vermiculite, 60 ml water in 300 ml flask.

*²Inoculation method; dipping the roots in the blended liquid culture of fungi.

*³sd; standard deviation.

Table 5. Effects of different nutrients on fungi inoculation to Japanese red oak (vermiculite medium) *¹.

Fungi species* ²	Nutrients	No. of plantlets	No. of surviving	After 5 months
				Height (mm) \pm sd* ³
Honshimeji (<i>Lycophyllum shimeji</i>)	Water	10	1	21.7 \pm 8.7
	{ 0.1 % Glucose 0.02% Yeast extracts	10	4	32.9 \pm 18.6
		0.1 % Hyponex	10	3

*¹Medium; 100 ml vermiculite, 60 ml water in 300 ml flask.

*²Inoculation method; dipping the roots in the blended liquid culture of fungi.

*³sd; standard deviation.

果があった。そして、クロマツ-ショウロの二員培養ではすべての培地で、クロマツ-ハツタケの二員培養では、GYP 培地とハイポネックス培地の場合に、植物体の根が共生菌に被覆されていた (Fig. 1)。

クヌギへホンシメジを接種して二員培養した場合は、

Table 5 に示すように、バーミキュライトに水だけの培地では、5 箇月後の生存率が 10 本中 1 本だったが、GYP とハイポネックス培地では、それぞれ 4 本、3 本だった。苗高については、クロマツと同様にハイポネックス培地が最も優れていた。

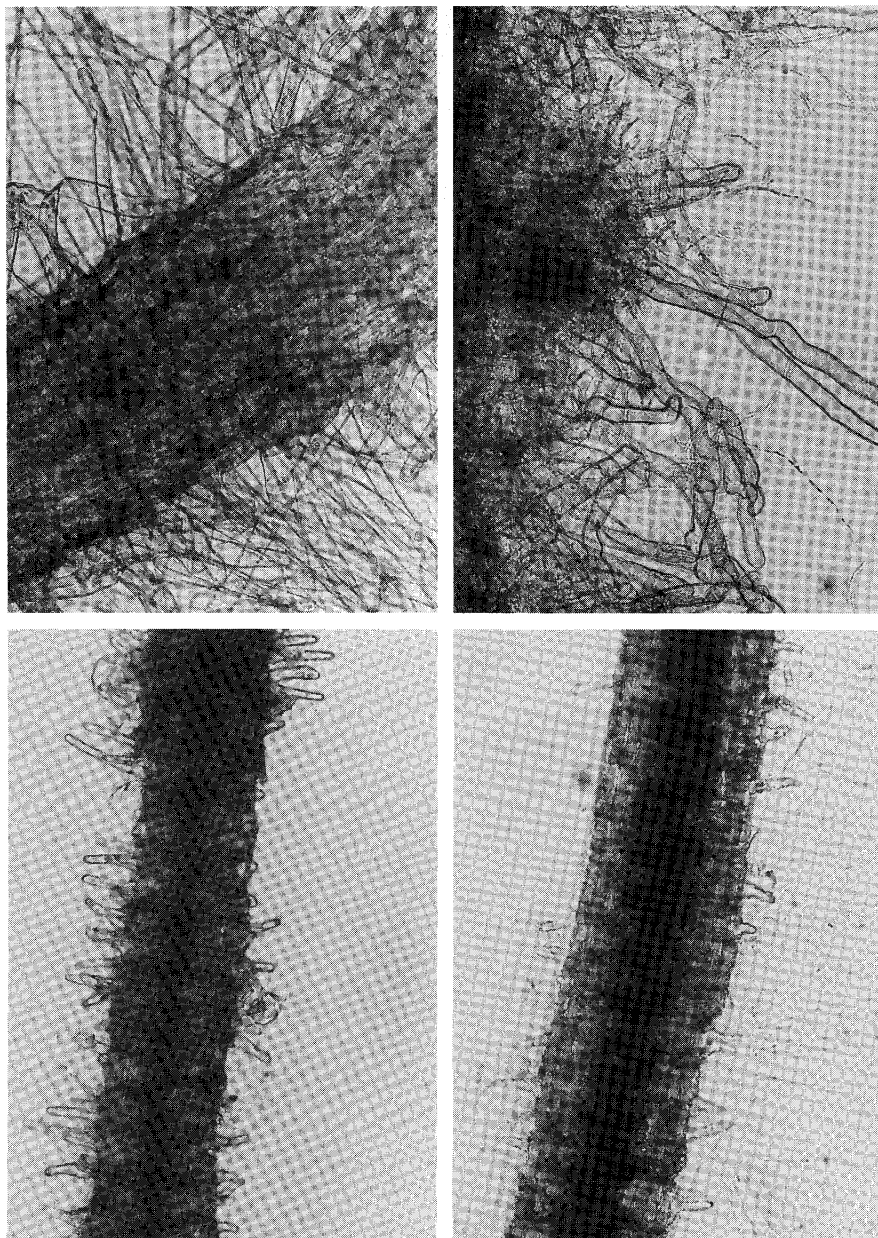


Fig. 2 Different structure of root system at inoculated or uninoculated plantlets cultured *in vitro* ($\times 200$).
 Upper left : Uninoculated roots of Japanese black pine
 Upper right : Inoculated roots of Japanese black pine with Shouro
 Lower left : Uninoculated roots of Japanese red oak
 Lower right : Inoculated roots of Japanese red oak with Honshimeji

クヌギ-ホンシメジの二員培養では、GYP 培地を用いた時に、植物の根の回りを共生菌が被覆した。二員培養5箇月での共生菌の子実体形成はみられなかった。

以上より、*in vitro* で植物体に共生菌を感染させる場合、

- 1) 一般に全く養分の無い培地では難しい。
- 2) 全く養分の無い培地でも、クロマツ-ショウロの

二員培養の場合のように培養条件によっては共生状態になる。

- 3) 接種方法は、寒天培地ブロックよりも液体培養破砕液を用いる方が優れている。
- 4) 共生菌の存在よりも培地成分の方が植物の成長には影響が大きい。

と推察された。

共生菌の付着状態を顕微鏡で観察すると、クロマツ、クヌギとも共生菌が被覆すると、外見上、植物体の短い根毛数が減少した(Fig. 2)。これは、水分や養分の吸収を共生菌が代替しているためかもしれない。

共生したと思われたクロマツ-ショウロ、クロマツ-ハツタケ、クヌギ-ホンシメジの組み合わせをパーミキュライトに移植して順化させた。4箇月後、植物体が順化して存在していたのは、クロマツ-ショウロで4本中3本、クロマツ-ハツタケで2本中1本のみであった。パーミキュライトからの子実体の発生は観察されなかった。

文 献

- 1) Tonkin, C. M., N. Malajczuk, J. A. McComb, 1989. *New Phytol.*, **111** : 209-214.
- 2) Heslin, M. C., G. C. Douglas, 1986. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **86** : 117-122.
- 3) 横山了爾, 山田卓三, 1985. 第9回植物組織培養シンポジウム大会講演要旨集, p. 47.
- 4) Ishii, K., 1988. *J. Jpn. For. Soc.*, **70** : 278-282.
- 5) 伊東祐道, 松尾文昭, 1988. 39回日林関西支講 p. 229-232.
- 6) 佐藤 亨, 1988. 林業試験場場報, **288** : 2-3.

Summary

Inoculation of Symbiotic Mushroom Fungi to *in vitro* Cultured Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii*) and Japanese Red Oak (*Quercus acutissima*)

Katsuaki ISHII*, Kohji IWASE**, Kenji ODANI* and Makoto OGAWA**

*Forestry and Forest Products Research Institute, P. O. Box 16, Tsukuba Norin Kenkyudanchi
Naikyoku, Ibaraki, 305 Japan

**Kansai Environmental Engineering Center, 3-39, Nakazaki-Nishi, 2-chome, Kita-ku,
Osaka, 530 Japan

Several symbiotic mushroom fungi (*Tricholoma caligatum*, *Tricholoma robustum*, *Lyophyllum shimeji*, *Rhizopogon rubescens* and *Lactarius hatsudake*) were inoculated to *in vitro* cultured trees, Japanese black pine and Japanese red oak. The inoculation method was crucial for covering of fungi over the root of *in vitro* plantlets. Dipping the root in the blended liquid culture of fungi was better than setting the agar block of fungi culture on the root. We found the mantle formation of *Rhizopogon rubescens* and *Lactarius hatsudake* around the roots of Japanese black pine and *Lyophyllum shimeji* around those of Japanese red oak *in vitro*.