

Pseudomonas fluorescens の添加がアカマツと
キツネタケの *in vitro* 共存培養系に及ぼす影響
——MHB 研究法確立のためのモデル実験系構築の試み——

田中 恵*¹・井出雄二*¹

Effect of *Pseudomonas fluorescens* on *in vitro* *Pinus densiflora*
and *Laccaria laccata* Co-culture System

—Approaches for establishment of a model system for MHB research—

Megumi TANAKA*¹ and Yuji IDE*¹

1. はじめに

外生菌根は樹木の生育に大きな影響を与えるものとして注目され、外生菌根植物の成長と炭素収支、窒素源やリンなど土壤中の養分の効率的な吸収、菌根形成過程の観察など多方面からの研究が行われている (SMITH and READ, 1997)。通常、樹木に対する菌根の作用は、菌根を保有している個体と保有していない個体との比較によって調べられる。しかし、その作用は単に樹木と菌根菌との関係だけで説明されるわけではなく、他の生物的、非生物的要因と複雑に関係していると考えられる (SMITH and READ, 1997)。

GARBAYE (1994) は、菌根周辺 (菌根圏) には細菌または他の微生物と外生菌根菌ならびに宿主植物との複雑な相互作用系が形成されていると考え、菌根形成を促進する細菌群集を mycorrhization helper bacteria (MHB) と呼ぶことを提案した。MHB の持つ機能として、根の外的感受性や根と菌の間の認識、菌糸の成長、根圏土壌の改良などに及ぼす影響があるという仮説がある (GARBAYE, 1994) が、はっきりしたことは分かっていない。近年、MHB について、細菌の接種の影響や菌根菌に対する選択性 (DUPONNOIS and GARBAYE, 1991, DUPONNOIS *et al.*, 1993)、菌根菌の菌糸成長に対する影響 (GARBAYE and DUPONNOIS, 1992) や、菌根形成に及ぼす影響 (GARBAYE and BOWEN, 1989) などが調べられている。しかし、これらの実験は、苗畑や温室、実験室環境内の開放条件下で滅菌土壌を用いて行われており、他の微生物が容易に入り込む条件でなされたため、無菌実験とは言えない。

MHB の機能を考究するためには、MHB と菌根菌ならびに宿主植物の 3 者の関係を明らかにする必要があり、このためには他の不確定な生物的要因を排除した *in vitro* における操作実験が不可欠と考えられる。しかし、このような実験は BRULÉ *et al.* (2001) が栄養条件の異なる寒天培地上において、外生菌根から分離された細菌が外生菌根菌の菌糸成長に及ぼす影響を調べた報告以外にない。

*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.

近年、筆者らは、*in vitro*における菌根合成について、樹木の成長に適しかつ菌根合成が可能なFH培地を開発し(VAARIO *et al.*, 1999)、観察が容易で操作性の良い菌根合成技術を確立した(田中ら, 2001)。

本研究では、これらを応用した*in vitro*におけるMHB研究法を確立するため、アカマツ(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)とその外生菌根菌であるキツネタケ(*Laccaria laccata* (Scop.: Fr.) Berk. et Br.)の共存培養系に*Pseudomonas fluorescens*を組み込んだモデル実験を行い、*P. fluorescens*の添加がアカマツ芽生えおよびキツネタケに及ぼす影響を観察した。*P. fluorescens*にはMHBとしての働きを持つ菌株が存在することが知られており(POOLE *et al.*, 2001)、今後のMHB研究法確立のためには、宿主植物、外生菌根菌と同時に本種を培養することが可能な同時培養系を構築することが必要であると考えられる。

2. 材料と方法

2.1 供試菌株と供試培地

実験には、キツネタケ1菌株、アカマツとの菌根合成によく用いられるコツブタケ(*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch)1菌株、*P. fluorescens* IID 5115株を用いた。

キツネタケおよびコツブタケは、ショ糖をブドウ糖に置き換えたMMN平板培地(以下単にMMN培地)(MARX, 1969)を用いて、暗黒下、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ において4~5週間ごとに継代培養した。培養7日目の栄養菌糸を、コルクボーラーを用いて培地ごと直径6mmの大きさに切り取り、接種源とした。*P. fluorescens*はKB培地(KING *et al.*, 1954)を用いて、暗黒下、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ において2週間ごとに継代培養した。実験には培養7日目のものを用いた。

培地は菌根合成用のFH培地を用いた。FH培地は、樹木組織培養用のSH培地(SCHENK and HILDEBRANDT, 1972)を改変したもので、1lあたりの組成は、 KNO_3 2,500 mg, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 300 mg, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 400 mg, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 mg, Na_2EDTA 20 mg, H_3BO_3 0.5 mg, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg, $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01mg, KI 0.1 mg, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg, ミオイノシトール 100 mg, 塩酸チアミン 5 mg, ニコチン酸 5 mg, 塩酸ピリドキシン 0.5 mg, ブドウ糖 1 g, 寒天 15 gである(VAARIO *et al.*, 1999)。

FH培地を 121°C 、20分間滅菌した後、直径9cmの滅菌シャーレに20mlずつ分注してFH平板培地を調製した。また、FH培地から寒天を除いたものを50ml容三角フラスコに10ml入れ、 121°C 、20分間滅菌してFH液体培地を調製した。培養を行う際には、各シャーレおよびフラスコは、パラフィルムで封をした。

2.2 FH培地のキツネタケ培養への適用性の検討

FH培地から $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と Na_2EDTA を除いた平板培地の中央にキツネタケまたはコツブタケの接種源1つを置き $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、暗黒下において培養した。対照としてMMN培地でも同様に培養した。培養1週目、2週目、3週目の菌叢の直径を測定した。供試数はそれぞれ8とした。

2.3 キツネタケ栄養菌糸の成長に対する蛍光性シュードモナスの影響

*P. fluorescens*を白金耳(径1mm)でKB培地からかき取り、その3かき分を滅菌水3mlに

分散させた (以下 *P. fluorescens* 懸濁液)。FH 培地から $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と Na_2EDTA を除き、新たに FeEDTA を 20 mg/l 加えた FH 平板培地中央にキツネタケ接種源 1 個を置き、*P. fluorescens* 懸濁液を接種源から 1 cm 離して環状に添加した (LP 区)。添加量はシャーレ 1 枚につき 0.1 ml とした。接種源のみを置いたものを対照とした (L 区)。25±2°C、暗黒下で培養し、培養 1 週目、4 週目、8 週目の菌叢の直径を測定した。供試数はそれぞれ 12 とした。

P. fluorescens を寒天を入れない KB 液体培地に接種し、25±2°C、暗黒下で 48 時間静置培養した。*P. fluorescens* を含んだ培養液をそのまま (以下液体培養)、あるいはシリンジフィルター (0.2 μm) でろ過したもの (以下ろ液) を FH 平板培地表面全体に 0.1 ml ずつ塗布した後、中央にキツネタケ接種源 1 個を置き培養した。対照として *P. fluorescens* を培養していない新鮮な KB 液体培地を同様に塗布し、接種源を置いた。培養 1 週目と 2 週目の菌叢直径を測定した。供試数はそれぞれ 8 とした。

FH 液体培地にキツネタケ接種源 1 個を入れ、液体培養、ろ液あるいは KB 液体培地のいずれかを 0.1 ml 添加し培養した。供試数はそれぞれ 3 とした。培養 4 週目にろ紙を用いて栄養菌糸をろ過し、100°C で 90 分間乾燥させ、重量を測定した。

2.4 アカマツ-キツネタケ共存培養系への蛍光性シュードモナス添加が芽生えの側根形成および菌叢の直径成長に及ぼす影響

200×90×10 mm の角シャーレに 80 ml の FH 培地を入れ斜面培地を調製した。斜面培地表面にろ紙 1 枚を置き、培地から生じる水分を吸収するための綿栓 (10×径 5 mm) 3 個を下部に置いた。東京大学千葉演習林産アカマツ種子 (1998 年 10 月採種) を、30% 過酸化水素水に 30 分浸漬させ、風乾後、滅菌水を入れた試験管内のペーパーブリッジ上に置き発芽させた。まきつけ 4~5 週間後の、主根に未だ側根が形成されていない芽生えをろ紙上に 3 本横たえ、主根から 1~1.5 cm 離れた所にキツネタケの接種源 3 個を置いた。*P. fluorescens* 懸濁液を芽生え 1 本につき 0.1 ml ずつ主根に沿うように添加した (PLP 区)。シャーレはパラフィルムで封をした後、根系部分を遮光のためアルミホイルで覆いプラスチック製の箱に縦に並べた。培養は 25±2°C、3,000 lux の蛍光灯照明、16 時間日長下で行った。同様の方法で、*P. fluorescens* 懸濁液を接種しないアカマツ+キツネタケ区 (PL 区)、キツネタケを接種しないアカマツ+分散 PF 株区 (PP 区)、またアカマツのみの対照区 (P 区) を設けた。P 区では *P. fluorescens* 懸濁液と同量の滅菌水を添加した。培養 1 週目、4 週目、8 週目に、アカマツ芽生えの側根形成数とキツネタケの菌叢直径を測定した。供試数は PLP 区、PL 区がそれぞれ 9、PP 区、P 区がそれぞれ 15 とした。

3. 結 果

3.1 FH 培地のキツネタケ培養への適用性の検討

FH 培地と MMN 培地で培養したキツネタケとコツブタケの菌叢の直径成長を図-1 に示す。t 検定によると、両種とも MMN 培地で培養したものより FH 培地で培養した方がいずれの培養期間においても、有意に菌叢直径が大きかった。

キツネタケを FH 培地で培養した時の菌叢直径は、MMN 培地の場合に比べて、培養 1 週目でほぼ 2 倍、2 週目でほぼ 3 倍であった。また MMN 培地での培養では培養 3 週目で直径成長が止まったのに対して、FH 培地で培養した栄養菌糸は薄く広がり、成長が止まることなく持続した。

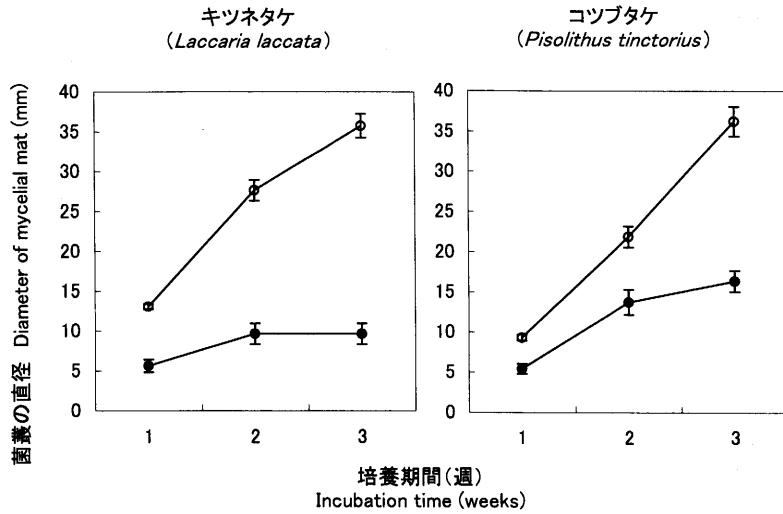


図-1 FH培地(○)とMMN培地(●)で培養したキノコタケとコツブタケの菌叢直径成長の推移(平均値±標準偏差(mm))

Fig. 1. Mycelial growth of *P. tinctorius* and *L. laccata* cultivated on FH (○) and MMN (●) medium (Mean value±SD (mm)).

*t*検定の結果、いずれの菌においても培地間には5%水準で有意な差が認められた
There was significant difference between the two media at 5% level by *t*-test.

コツブタケについても、FH培地の場合MMN培地に比べ菌叢直径が大きく、培養3週目ではほぼ2倍であった。

3.2 キノコタケ栄養菌糸の成長に対する蛍光性シュードモナスの影響

P. fluorescens 懸濁液を添加した培地を用いて培養したキノコタケ菌叢の直径を表-1に示す。*t*検定の結果、培養1週目では処理区間に有意差は認められなかったが、培養4週目ではLP区の方がL区よりも菌叢直径が有意に小さかった。

P. fluorescens の液体培養を添加した培地を用いて培養したキノコタケ菌叢の直径を表-2に示

表-1 *P. fluorescens* 懸濁液添加の有無によるキノコタケ菌叢の直径成長
Table 1. Diameter of *L. laccata* mycelial mat by the addition of *P. fluorescens* suspension.

処理区 Treatment	培養期間(週) Incubation time (weeks)	
	1	4
LP区	12.22±0.97 ^a	29.71±2.75 ^a
L区	13.42±1.62 ^a	34.50±1.78 ^b

平均値±標準偏差(mm) Mean value±SD (mm)

LP区は *P. fluorescens* 添加区, L区は対照区(キノコタケのみ)を示す

LP: *P. fluorescens* suspension addition, L: control (*L. laccata* only)

*t*検定の結果異なるアルファベットの処理区間には5%水準で有意な差が認められた

For each date, different letters show values significantly different according to Student's *t*-test at $P < 0.05$.

表-2 *P. fluorescens* 培養液添加条件の違いによるキツネタケ菌叢の直径成長
Table 2. Diameter of *L. laccata* mycelial mat by the addition of different solution.

添加液の種類 Treatment	培養期間 (週) Incubation time (weeks)	
	1	2
液体培養 Liquid culture	7.0 ± 0.76 ^a	10.75 ± 1.58 ^a
培養ろ液 Filtered culture solution	14.50 ± 0.76 ^b	18.17 ± 0.98 ^b
KB 液体培地 (対照区) Control	11.13 ± 1.25 ^c	18.17 ± 2.48 ^b

平均値 ± 標準偏差 (mm) Mean value ± SD (mm)

異なるアルファベットは 5% 水準で有意な差を示す (Tukey 法)

For each date, different letters show values significantly different for $P < 0.05$ (ANOVA Tukey HSD-test).

表-3 *P. fluorescens* 培養液添加条件の違いによるキツネタケ菌叢の乾燥重量
Table 3. Dry weight of *L. laccata* mycelial mat by the addition of different solution.

添加液の種類 Treatment	乾燥重量* Dry weight
液体培養 Liquid culture	4.5 ± 0.3 ^{n.s.}
培養ろ液 Filtered culture solution	5.3 ± 0.5 ^{n.s.}
KB 液体培地 (対照区) Control	5.0 ± 0.4 ^{n.s.}

* 培養 4 週目の平均値 ± 標準偏差 (mg)

Mean value ± SD (mg) after 4 week of incubation.

n.s.: 有意差なし not significant.

す。分散分析の結果、培養 1 週目、2 週目とも処理区間に 5% 水準で有意な差が認められた。1 週目では Tukey 法による多重比較によると、液体培養添加区とろ液添加区の間に有意な差が認められ、ろ液を添加した場合に菌叢直径が最も大きかった。また、液体培養を添加した区は新鮮培地を添加した対照区よりも明らかに直径成長が小さかった。また、培養 2 週目ではろ液を添加した区と対照区の直径成長に差は認められなかったが、この両区と液体培養添加区との差は有意であった。

液体培地で 4 週間培養したキツネタケ栄養菌糸の乾燥重量を表-3 に示す。処理区間の乾重成長の傾向は直径成長と同様にろ液添加区が最も大きく、液体培養添加区は対照区よりも小さかった。しかし、分散分析の結果、処理区間に有意差は認められなかった。

3.3 アカマツ-キツネタケ共存培養系への蛍光性シュードモナス添加が芽生えの側根形成および菌叢の直径成長に及ぼす影響

アカマツ芽生えの側根形成数を図-2 に示す。培養 1 週目の側根形成数は、PLP 区で最も多かったが、分散分析の結果、各処理区間に有意な差は見られなかった。培養 4 週目および 8 週目では PL 区、PLP 区、PP 区の順に形成数が多く、分散分析の結果 5% 水準で処理区間に有意な差が見られた。Tukey 法による比較では培養 4 週目で P 区および PP 区と PL 区、8 週目で P 区と PL 区で 5% 水準で有意な差が見られた。PLP 区は PL 区よりも側根の形成数は少なかったがその差は有意ではなかった。また、培養 4 週目から 8 週目にかけて形成数の増加率が PL 区よりも大きくなる傾向が見られた。

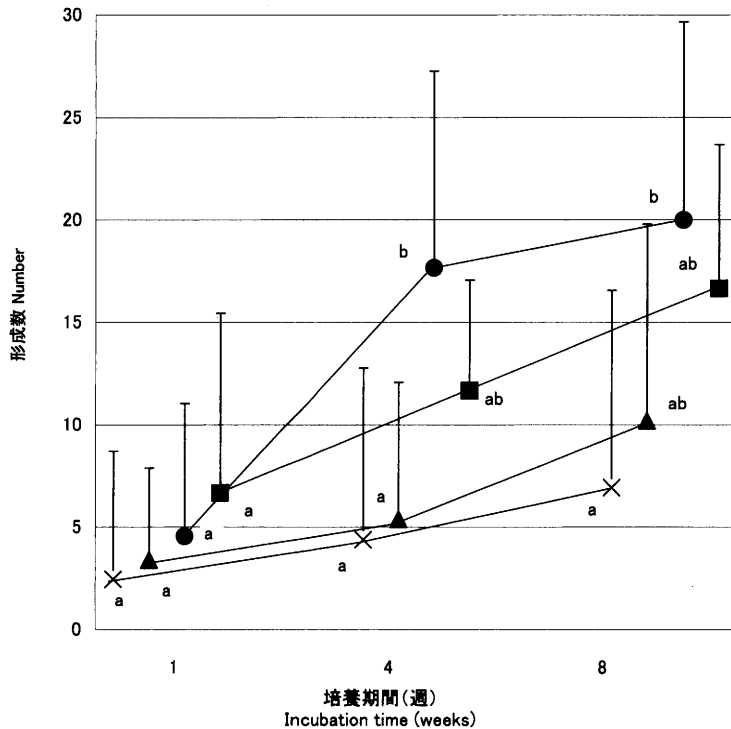


図-2 異なる接種条件で培養したアカマツの側根形成数の推移 (平均値±標準偏差)

■, アカマツ+キツネタケ+*P. fluorescens* 懸濁液添加区 (PLP); ●, アカマツ+キツネタケ区 (PL); ▲, アカマツ+*P.fluorescens* 懸濁液添加区 (PP); ×, 対照区 (アカマツのみ+P)

Fig. 2. Number of lateral root formed in different co-culture system (Mean value±SD).

■, *P. densiflora*-*L. laccata*-*P. fluorescens* (PLP); ●, *P. densiflora*-*L. laccata* (PL); ▲, *P. densiflora*-*P. fluorescens* (PP); ×, control (*P. densiflora* only, P)

異なるアルファベットは5%水準で有意な差を示す (Tukey 法)

For each date, different letters show values significantly different for $P < 0.05$ (ANOVA Tukey HSD-test).

表-4 アカマツ-キツネタケ共存培養系におけるキツネタケの菌叢直径成長

Table 4. Diameter of *L. laccata* mycelial mat in *P. densiflora*-*L. laccata* co-culturer system.

処理区 Treatment	培養期間(週) Incubation time (weeks)	
	1	4
PLP 区	5.63±0.74	34.0±2.14
PL 区	7.42±0.67	38.3±1.30

平均値±標準偏差 (mm) Mean value±SD (mm)

PLP 区はアカマツ+キツネタケ+*P. fluorescens* 懸濁液添加区, PL 区はアカマツ+キツネタケ区を示す

PLP: *P. densiflora*-*L. laccata*-*P. fluorescens*, PL: *P.densiflora*-*L. laccata*

t 検定の結果各処理区間には5%水準で有意な差が認められた

For each date, values significantly different according to Student's *t*-test at $P < 0.05$.

接種源としたキツネタケの菌叢の直径成長を表-4 に示す。アカマツと同時に培養したキツネタケ栄養菌糸の菌叢直径は、*t* 検定の結果、培養1週目、4週目とも *P. fluorescens* 懸濁液を添加した区の方が添加しなかった区よりも有意に直径成長が小さかった。

4. 考 察

4.1 FH 培地のキツネタケ培養への適用性の検討

FH 培地におけるキツネタケの栄養菌糸の直径成長は、これまでに FH 培地を用いた *in vitro* での菌根合成が成功しているコブツタケ (田中ら, 2001) と同じく良好であった。一方、外生菌根菌の培養に広く用いられている MMN 培地は、キツネタケ栄養菌糸の菌叢直径成長には適していないことが伺えた。また、コブツタケ栄養菌糸についても、FH 培地で培養した方が MMN 培地で培養するよりも菌叢の直径成長が大きかった。これら両種と同じく外生菌根菌である *Cenococcum geophilum* の培養に際しても FH 培地は MMN 培地より優れており、かつ菌根合成に適した培地であることがわかっている (VAARIO *et al.*, 2000)。これらのことから FH 培地はキツネタケの培養に適した培地であり、アカマツ-キツネタケの共存培養に適用可能と判断された。

4.2 キツネタケの栄養菌糸成長およびアカマツの側根形成に対する蛍光性シュードモナスの影響

P. fluorescens 懸濁液あるいは液体培養を添加して、FH 培地上でキツネタケの栄養菌糸と *P. fluorescens* を同時に培養した場合、キツネタケの菌叢直径成長が有意に減退した。したがって、本研究で用いた *P. fluorescens* は、キツネタケの栄養菌糸成長を阻害すると考えられた。しかし、その作用機作については本研究からは明らかにすることができなかった。

P. fluorescens 液体培養をろ過して添加した場合、培養1週目で、菌叢の直径成長を促す働きが認められた。ろ液には *P. fluorescens* は含まれていないことから、ろ液の促進的効果は培養液中に存在する *P. fluorescens* が産生したなんらかの物質の影響と考えられた。しかし、培養2週目ではろ液添加区と対照区との間で菌叢直径に差がなくなった (表-2)。原因として、この物質の影響が比較的早期に消失する、もしくは培地表面に添加したろ液が培地中に拡散し、濃度が低くなったことが推測された。*P. fluorescens* は、鉄欠乏下においてシデロフォアと呼ばれる鉄キレート物質を生産する (KLOPPER *et al.*, 1980)。この物質は有害根圏細菌や病原菌の鉄の利用を制限し、作物の生育を促進したり土壌病害を軽減する効果を持つことが明らかにされている (KLOPPER *et al.*, 1980)。本実験においても *P. fluorescens* がシデロフォアを産生し、菌による培地中の鉄の利用環境が改善されたことにより、栄養菌糸の成長を促進した可能性が考えられるが、この点については今後詳細な検討が必要である。

アカマツ-キツネタケ共存培養系において、*P. fluorescens* 懸濁液をアカマツに添加した区 (PP 区) では、対照区 (P 区) と比べて側根形成は促進されなかった。一方キツネタケ接種区 (PL 区) では P 区と比べて側根形成数が培養4週目、8週目で有意に多かった。しかし、キツネタケ接種区に *P. fluorescens* 懸濁液を添加し (PLP 区)、PL 区と比較した場合、培養4週目、8週目で側根形成数が5%水準では有意でなかったものの少ない傾向があった。キツネタケの菌叢直径成長は、*P. fluorescens* 懸濁液の添加によって、アカマツの有無に関わらず減少する傾向がみられた (表-1, 4) ことから、*P. fluorescens* 懸濁液の添加はキツネタケの菌叢直径成長を阻害し、結果と

表-5 アカマツ、キツネタケ、*P. fluorescens* の間の示唆される関係
 Table 5. Suggestive interaction of *P. densiflora*, *L. laccata*, and *P. fluorescens*.

相互関係 Interaction	影響 Effect
<i>P. fluorescens</i> →キツネタケ	菌糸成長を阻害
<i>P. fluorescens</i> 培養ろ液→キツネタケ	菌糸成長を一時的に促進
<i>P. fluorescens</i> →アカマツ	側根形成に影響しない
キツネタケ→アカマツ	側根形成を促進
<i>P. fluorescens</i> →キツネタケ→アカマツ	菌糸成長を阻害→側根形成を抑制

して、アカマツの側根形成が抑えられた可能性がある。外生菌根形成においては、菌根菌の存在下でまず側根の形成が促進され、次いで菌糸が側根を取り巻き、外側を菌鞘が覆い、根の細胞間隙にハルティヒネットが形成されるという過程を経て菌根になる (ROBERTSON, 1954, MASSICOTTE *et al.*, 1987)。コツブタケの接種はアカマツの側根形成を促進し、菌根を形成させる (田中ら, 2001) が、キツネタケの接種もコツブタケと同様にアカマツ側根の形成を促進したものと思われる。

以上、FH 培地を用いた *in vitro* の実験系を用いることにより、アカマツ、キツネタケ、*P. fluorescens* の3者の関係を観察することが出来た (表-5)。特に *P. fluorescens* の培養ろ液についてはキツネタケ菌叢成長に促進的な効果があることがわかった。今後、それぞれの事象についてさらに詳細な研究を進める必要がある。しかし、本研究で用いた *P. fluorescens* は、水槽のろ過器から分離された株であり、根圏から分離された株ではないため、根圏由来の株と菌根圏における働きが同じであるかは不明である。今後は、菌根菌から分離した細菌を供試することにより、MHB が菌根形成やその働きに与える影響を明らかにしてゆく予定である。

謝 辞

本研究を行うにあたって、東京大学千葉演習林からアカマツの種子、東京大学森林植物学研究室からキツネタケ、コツブタケの菌株、東京大学医科学研究所から *P. fluorescens* IID 5115 株をそれぞれ分譲していただいた。厚く御礼申し上げる。

要 旨

In vitro における mycorrhization helper bacteria (MHB) の機能解明に関する研究手法を確立するため、アカマツとキツネタケの共存培養系に蛍光性シュードモナスを組み込んだモデル実験系の構築を試み、細菌の添加がアカマツおよびキツネタケに及ぼす影響を観察した。キツネタケの培養に FH 培地が適用可能であることを確認した上で、キツネタケ栄養菌糸の成長に対する *Pseudomonas fluorescens* の影響を検討した。滅菌水に分散させた *P. fluorescens* を塗布した培地でキツネタケを培養した場合、キツネタケ菌叢の直径成長が有意に減少した。また、*P. fluorescens* の液体培養を添加した培地においても、キツネタケ菌叢の直径成長は抑制された。一方、*P. fluorescens* 培養液をろ過して添加した培地においては、キツネタケ菌叢の直径成長が促進された。これは *P. fluorescens* が産生した物質の影響と考えられた。アカマツとキツネタケの共存培養系に、*P. fluorescens* を添加した場合、キツネタケのみを接種した場合に比べてアカマツの側根数が減少する傾向が見られた。*P. fluorescens* の添加がキツネタケ栄養菌糸の成長を阻害し、アカ

マツの側根形成を抑えた可能性が考えられた。

キーワード: 外生菌根, キツネタケ, *Pseudomonas fluorescens*, *in vitro*, mycorrhization helper bacteria (MHB)

引用文献

- BRULÉ, C., FREY-KLETT, P., PIERRAT, J. C., COURRIER, S., GÉRARD, F., LEMOINE, M. C., ROUSSELET, J. L., SOMMER, G. and GARBAYE, J. (2001) Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil. Biol. Biochem.* **33**: 1683–1694.
- DUPONNOIS, R. and GARBAYE, J. (1991) Effect of dual inoculation of Douglas fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in two bare-root forest nurseries. *Plant Soil* **138**: 169–176.
- DUPONNOIS, R., GARBAYE, J., BOUCHARD, D. and CHURIN, J. L. (1993) The fungus-specificity of mycorrhization helper bacteria (MHBs) used as an alternative to soil fumigation for ectomycorrhizal inoculation of bare-root Douglas-fir planting stocks with *Laccaria laccata*. *Plant Soil* **157**: 257–262.
- GARBAYE, J. (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **128**: 197–210.
- GARBAYE, J. and BOWEN, G. D. (1989) Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytol.* **112**: 383–388.
- GARBAYE, J. and DUPONNOIS, R. (1992) Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziesii*-*Laccaria laccata* symbiosis. *Symbiosis* **14**: 335–344.
- KING, E. O., WARD, M. K. and RANEY, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 301–307.
- KLOEPPER, J. W., LEONG, J., TEINTZE, M. and SCHROTH, M. N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**: 885–886.
- MARX, D. H. (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* **59**: 153–163.
- MASSICOTTE, H. B., PETERSON, R. L. and ASHFORD, A. E. (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and scanning electron microscopy. *Can. J. Bot.* **65**: 1927–1939.
- POOLE, E. J., BENDING, G. D., WHIPPS, J. M. and READ, D. J. (2001) Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytol.* **151**: 743–751.
- ROBERTSON, N. F. (1954) Studies on the mycorrhiza of *Pinus sylvestris* I. The pattern of development of mycorrhizal roots and its significance for experimental studies. *New Phytol.* **53**: 253–283.
- SCHENK, R. U. and HILDEBRANDT, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* **50**: 199–204.
- SMITH, S. E. and READ, D. J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis* (2nd ed.). 605 pp, Academic Press, San Diego.
- 田中 恵・ワーリオ緑敏・井出雄二 (2001) アカマツ芽生えとコツブタケ菌糸の共存培養系における効率的菌根合成のための培養法の開発, *日林誌* **83**: 238–241.
- VAARIO, L.-M., TANAKA, M., IDE, Y., GILL, W. M. and SUZUKI, K. (1999) *In vitro* ectomycorrhiza formation between *Abies firma* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* **9**: 177–183.
- VAARIO, L.-M., GILL, W. M., TANAKA, M., IDE, Y. and SUZUKI, K. (2000) Aseptic ectomycorrhizal synthesis between *Abies firma* and *Cenococcum geophilum* in artificial culture. *Mycoscience* **41**: 395–399.
(2003年12月25日受付)
(2004年5月7日受理)

Summary

In order to establish an investigative method of studying the bacteria promoting ectomycorrhizal formation, an *in vitro* model experiment was conducted. The applicability of FH culture medium to the cultivation of *Laccaria laccata* has been confirmed, and the effect of *Pseudomonas fluorescence* on the growth of *L. laccata* was discussed. Growth of *L. laccata* mycelium showed a significant decrease when *P. fluorescence* suspension in sterilized water was applied to the surface of the culture medium during cultivation. Also, the mycelial growth was suppressed by the addition of a *P. fluorescence* liquid culture. On the other hand, mycelial growth was promoted when filtered *P. fluorescence* culture solution was added, which signifies the effect of certain substances in the filtrate produced by *P. fluorescence*. Inoculation of *L. laccata* was found to promote lateral root formation of *Pinus densiflora*. However, in comparison with the inoculation of *L. laccata* only, the inoculation of *L. laccata* with *P. fluorescence* suspension resulted in a decline in the number of lateral roots. The addition of *P. fluorescence* seems to inhibit the growth of the mycelium and causes suppression in the lateral root formation of *P. densiflora*.

Key words: ectomycorrhiza, *Laccaria laccata*, *Pseudomonas fluorescens*, *in vitro*, mycorrhization helper bacteria (MHB)

Copper Distribution around the Mine Waste Deposit in Arboricultural Research Institute

Shoko INABA, Hiroshi KUBOTA, Yoko SAITO and Chisato TAKENAKA

Copper mine waste deposited in Arboricultural Research Institute may cause some environmental pollution, but this has not yet been clarified. Stream water, soil, and plant samples were collected on and around mine waste deposits to investigate their copper content. Soil samples contained quite high concentrations of copper, as much as 1,050 mg/kg, showing that soils have been contaminated by copper. Copper was rarely detected in stream water, which suggested that copper pollution in stream water is not serious at present. Vegetation on the deposit site was very sparse, but copper concentrations of most plant leaf samples were within normal levels.

Effect of *Pseudomonas fluorescens* on *in vitro* *Pinus densiflora* and *Laccaria laccata* Co-culture System —Approaches for establishment of a model system for MHB research—

Megumi TANAKA and Yuji IDE

In order to establish an investigative method of studying the bacteria promoting ectomycorrhizal formation, an *in vitro* model experiment was conducted. Mycelial growth of *Laccaria laccata* showed a significant decrease when a *Pseudomonas fluorescens* suspension or the addition of *P. fluorescens* liquid culture was applied to the surface of the culture medium during cultivation. On the other hand, the mycelial growth was promoted when filtered *P. fluorescens* culture solution was added, which signifies the effect of certain substances in the filtrate produced by *P. fluorescens*. Addition of *P. fluorescens* seems to inhibit the growth of mycelium and causes suppression in the lateral root formation of *Pinus densiflora*.