

倒木上のエゾマツ定着初期における根圏微生物相

森林資源科学講座 森林資源生物学分野

田中香織

<はじめに>

エゾマツ(*Picea jezoensis* Carr.)の天然更新には種々の菌類が関与していることが知られている。特に更新が倒木などのような特殊な立地に限られることは、更新阻害要因である病害菌が倒木上には少ないからであると考えられている。一方で、樹木の根圏には共生微生物をはじめとする様々な微生物が存在する。近年、根圏における植物の根とこれらの微生物の複合的な関わり合いは、更新の成立に関わる要因として大きな関心が寄せられている。既往の研究からは、倒木更新稚樹において外生菌根菌による菌根共生が報告されているが、その他の根圏微生物の関与については知見が不足している。そこで本研究では、倒木上のエゾマツ定着初期における根圏に生息する外生菌根菌、窒素固定菌、木材腐朽菌に着目し、その性状を明らかにすることを目的として、エゾマツ根系における微生物の観察と分離を行なった。

<材料と方法>

エゾマツの採取は支笏湖畔南西部に位置するエゾマツ人工林内の倒木上に生育する個体を対象とした。倒木には当年生～6年生の個体が豊富に生育しており、腐朽の種類は白色腐朽であった。また、倒木は周辺林床の土壌と比較すると、リンをはじめとする可養性養分に乏しく、C/Nは84で林床土壌の3.5倍であった。

外生菌根菌の探索:10月採取の当～1年生個体を用い、顕微鏡観察により外生菌根(以下菌根)の形成を確認し、樹齢毎に全根端数と菌根形成根端数を計測することで菌根形成率を求めた。また、8月採取の1～6年生個体の菌根を用い、表面殺菌法により菌根形成根端から菌根菌の分離を試みた。分離用培地は太田培地を用い、分離菌株の白色腐朽能を調べる際は0.01%グアヤコール入りPDA培地を用いた。培養は室温、暗黒下で行なった。同定のために、倒木とその周辺林床における菌根性菌類の子実体の発生調査を行なった。また、菌根形成根端と分離菌株について顕微鏡観察を行なうとともに、ITS1およびITS4プライマーを用いてPCR増幅し、制限酵素HhaとHinfを用いたRFLPによるタイプ分けの後、5.8S rDNAおよびITS領域のシーケンシングを行なった。

窒素固定菌の探索:8月採取の当～4年生個体の根を滅菌水で十分に洗浄して無窒素培地に穿刺した後、穿刺跡周辺に発生したコロニーを釣菌し、粉末酵母エキス入り無窒素平面培地において画線培養をくり返し、バクテリア株の単離、純化を行なった。培養は20℃、暗黒下で行なった。単離株については形態観察、穿刺培養、グラム染色、孢子染色により性状を検討した。

木材腐朽菌の探索:7月採取の1～4年生個体の根を滅菌水で十分に洗浄して0.01%グアヤコール入りPDA培地に接種した。出現したバーベンダム反応陽性の糸状菌コロニーをPDA培地に植え継ぎ、木材腐朽菌の分離を行なった。

<結果と考察>

外生菌根菌:当年生では菌根を形成していない個体もあったが、多くの個体が60%以上の形成率であった。1年生以上では、平均形成率が70%を上回った。よって、定着初期において菌根共生は普通に見られる現象であると考えられた。ランダムに抽出した14の菌根形成根端において、単一根端からのターゲットDNAの増幅に成功し、それぞれについてRFLPを行なった結果、3種のバンドパ

ターンが得られた(タイプ ~)。各タイプの出現頻度は : : = 50:36:14 であり、最も高頻度に検出されたタイプ は、5.8S rDNA および ITS 領域の一部をシーケンシングした結果、*Amphinema sp.*と同定された。各タイプの菌根は、外観からの判別は困難だが、*Amphinema sp.*とタイプ に関して顕微鏡下で詳細な観察を行なうことで判別可能だった(Table 1)。さらに、単離された *Amphinema sp.*は、バーベナム反応陰性であったことから白色腐朽能を有さないと考えられた。本菌はコウヤクダケ科ワタゲカワタケ属の一種であり、亜高山帯における粗腐植質や鉱物質土壌に分布し、トウヒ属と菌根共生することが報告されている。生態的特性や植物に与える影響を知る上で、今後、分離菌株の培養特性ならびに性状の検討や植物に対する接種試験を行なうことが有効な手立てとなるだろう。また、子実体発生調査からは、11 属 32 種の菌根菌が全て周辺林床から発見された。このことは林床に比べて倒木に生息する菌根菌の種数は限られていることを示唆する。

窒素固定菌: 21 試料中 20 試料から細菌のコロニー増殖が認められ、画線培養による純化を繰り返した結果、13 系統の単離株 A ~ M が得られた(Table 2)。単離に用いた試料は全て菌根を形成しており、根圏には菌根菌と共に複数種の窒素固定菌が存在していることがわかった。このことは窒素源の少ない立地において窒素固定菌が固定した窒素をエゾマツあるいは菌根菌が利用している可能性を示唆する。

木材腐朽菌: 20 試料中全試料から糸状菌のコロニーが出現した。その中でバーベナム反応陽性を示したコロニーを分離し、6 系統の分離株 W1 ~ W6 が得られた(Table 3)。単離に用いた試料は全て菌根を形成していたが、PCR-RFLP の結果、分離菌株は菌根菌とは異なることが確認された。よって、根圏には菌根菌と共に複数種の白色腐朽能を持つ木材腐朽菌が生息していることがわかった。このことは菌根菌と木材腐朽菌が共存可能であることを示唆する。

Table 1. Characteristics of ectomycorrhiza

Characteristics of ectomycorrhiza	<i>Amphinema sp.</i> (Type)	Type
1. Color of ECM	yellowish brown ~ pachily white	reddish brown ~ yellowish brown
2. Form	single/branch	single/branch
3. Size of main axis		
·length(mm)	< 6	< 4
·diameter(mm)	< 0.3	< 0.3
4. Emanating hypha		
·frequency(°)	± ~ ++	± ~ ++
·diameter(μ m)	2.7 ~ 4.4	1.7 ~ 3.0
·clamp connection	yes	yes
·texture of surface	finely verrucose	finely verrucose
5. Mantle		
·thickness(μ m)	5 ~ 16	4 ~ 14
·plane view(°)	net synenchyma	net synenchyma
6. Mycelial strand	±	-
7. Chemical character	bright yellow in 10% KOH	lilac in 0.1% Toluidine blue

(*) - : no ± : rare + : frequent but not abundant ++ : abundant

(**) Terminology based on Identification of ectomycorrhizas 1990

Table 2. Characteristics of N₂-fixing bacteria isolated from rhizosphere.

type	shape	size(μ m)	motility	oxygen requierment	gram stain	spore formation
A	SR	<1	-	F	+ / -	-
B	SR	1	-	F	-	-
C	R	1	-	F	-	-
D	LR	1~3	-	F	-	-
E	LR	1.5~4	++	F	+	-
F	R	1	+	F	-	-
G	R	1.5~6	+	F	-	-
H	R	1	-	F	+	-
I	SR	1	-	F	+	-
J	C	<1	-	F	+	-
K	R	1	+	F	+	-
L	R	1~10	+	F	+	-
M	S	6~10	+	M	-	-

Note: SR: Short Rod LR: Long Rod R: Rod C: Cocci S: Spirilla

F: Facultative anaerobe M: Microaerobe

Table3 Characteristics of white rot fungi isolated from rhizosphere

name	color of colony	grow speed (cm/month)	bavendamn reaction	RFLP pattern
W1	green	1.7	+	c
W2	white ~ pale yellow	2.4	++	b
W3	greenish yellow	3.2	+	b
W4	greenish yellow	3.2	±	a
W5	green	1.3	+	d
W6	white	2.0	++	a

