

人工林群状伐採地に植栽された広葉樹の地下部微生物群集

Belowground microbial community of planted broad-leaved saplings after patchy clearcutting cypress plantation

田中 恵*1

Megumi TANAKA*1

* 1 東京農業大学地域環境科学部

Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture

要旨：ヒノキ人工林を群状伐採後に植栽した広葉樹について、近傍成木からの感染がない状況下での菌根菌感染状態及び根圏バクテリア相を調べた。調査は静岡県富士宮市の東京農業大学富士農場試験林で行った。植栽木のうち、クマシデ全木及びミズナラの一部から細根を採取し、あわせて地上部の成長量を測定した。微生物のうち、外生菌根菌は細根から抽出した DNA を用いて ITS 領域から種を推定した。根圏バクテリアについては希釈平板法によりコロニーを釣り上げた後、16S rRNA 領域から種推定を行った。その結果、クマシデ、ミズナラとも共生する菌根菌群集は、樹種ごと、植栽位置ごとに異なり、ほぼ独立している傾向がみられた。また、風による孢子散布を行わない地下生菌による感染が散発的にみられたことから、植栽地においては動物による菌根菌の孢子散布の可能性が考えられた。菌根形成と地上部成長の関係をみたところ、地上部成長の極端に小さい個体は菌根形成がみられず、菌根菌感染が植栽木においても重要な成長因子となっていることが考えられた。また、菌根と非菌根では根圏バクテリア相が異なっていることが明らかになった。

キーワード：クマシデ・ミズナラ・外生菌根菌・根圏バクテリア・針広混交林

Abstract: I researched broad-leaved saplings planted after patchy clearcutting, and their ectomycorrhizal (ECM) fungal and rhizosphere bacterial communities under no infected ECM mycelia nearby mature trees were examined. The study was conducted in cypress plantation at Tokyo University of Agriculture Fuji farm, Fujinomiya, Shizuoka Prefecture. One root system from all of *Carpinus japonica*, and selected *Quercus crispula* were collected, and measured aboveground growth of each individuals. ECM fungi were identified species using ITS regions sequencing from extracted mycorrhizal root tip DNA. Rhizosphere bacteria were picked up colonies by dilution plate methods and identified using 16S rRNA regions sequencing. Both of species had different ECM fungal communities for each planted positions, respectively. In addition, ECM infection by truffles was observed sporadically, it was considered the possibility of ECM fungal spore contribution by animal dispersal. Saplings of hornbeam which have no mycorrhizal formation were extremely poor aboveground growth. Results showed that ECM fungal infection has become an important growth factor also in planted deciduous saplings. Further, rhizosphere bacterial communities of mycorrhizal roots were differently from non-mycorrhizal roots.

Key-word: *Carpinus japonica*, *Quercus crispula*, ectomycorrhizal fungi, rhizosphere bacteria, mixed coniferous-deciduous forest

I はじめに

針葉樹人工林の針広混交林化や広葉樹林化は、森林の多様で健全な発達のための手段であり、機能面では森林の公益的機能を発揮させるものとして期待されている

(7, 11)。その手法は針葉樹一斉人工林を帯状・群状に伐採し、跡地に広葉樹を天然更新させるものが一般的である。しかしながら、スギやヒノキといった樹種で構成されている人工林伐採跡地に広葉樹を更新あるいは植

栽する際に、問題となるのが菌根菌の種類の違いである。

菌根とは、樹木を宿主とする共生系の一形態であり、樹木は菌根菌と共生することにより環境適応性を高めている。スギやヒノキにはアーバスキュラー菌根菌が共生しているのに対して、ブナ科やカバノキ科などの主要広葉樹は普遍的に外生菌根菌と共生関係を結んでいる。野外環境においては樹体に含まれる窒素やリンのほぼ

100%が菌根菌によって吸収されたものである(8)。このように、外生菌根性の樹種にとって外生菌根菌の存在は非常に重要であり、菌根共生ができない個体は生き残ることが難しい。

スギやヒノキが長期間生育している林地に、感染可能な外生菌根菌が十分に存在しているか調べた研究例は多くない。ヒノキ林分に自生するブナ科実生を調べた例では、外生菌根菌は潜在するが、種多様性が低下している可能性がある(4)とされている。また、林内における外生菌根性実生の菌根菌感染源は根外菌糸による影響が大きく、近傍成木から離れたところでの発芽は菌根形成に不利であるとされている(2)。そこで、本研究はヒノキ人工林を群状伐採後に植栽された広葉樹について、その地下部微生物群集を調べた。まず、植栽地全体について、外生菌根性樹種の菌根菌相を調べ、近傍成木からの感染がない状態でどのような菌根菌種が存在するかを調べた。次に、菌根形成と地上部成長との関係を調べるとともに、樹木に影響を及ぼす他の地下部微生物として根圏バクテリアの影響も考えられる(1, 9)ことから、菌根形成と根圏バクテリア相との関係についてもあわせて調べた。

II 調査方法

1. 植栽地全体の菌根菌群集 調査は静岡県富士宮市の東京農業大学富士農場試験林(N 35°39'27"、E 138°57'15")で行った。試験区は45年生ヒノキ人工林を30m×30mに群状伐採した後、広葉樹を1m間隔でモザイク状に植栽し7年以上が経過している(図-1)。植栽木は定期的に除伐が行われ、試験区外周は鹿柵で囲われている。また、周囲は約50年生のヒノキ人工林に広く囲まれており、近傍に外生菌根性成木はなく根外菌糸による感染はないとみられる。植栽樹種はクマシデ(*Carpinus japonica*)、ミズナラ(*Quercus crispula*)、フサザクラ(*Euptelea polyandra*)、イタヤカエデ(*Acer pictum*)、チドリノキ(*A. carpinifolium*)、コハウチワカエデ(*A. sieboldianum*)、ウツギ(*Deutzia crenata*)、ガマズミ(*Viburnum dilatatum*)の8種で、うちクマシデ、ミズナラが外生菌根性樹種である。クマシデは植栽された全木(27個体)、ミズナラはクマシデと隣接して植栽された個体を中心に14個体を選び、土壌ごと細根を採取した。採取した細根は実体顕微鏡下で形態的分類を行ったのち、ITS領域(ITS1+5.8S+ITS2)のシークエンスを行い、NCBIのBLAST検索を用いて種あるいは属レベルの推定を行った。調査は2015年9月23日に行った。

2. 菌根形成と地上部成長・根圏バクテリア相との

関係 試験区の植栽位置の異なる3ヶ所からクマシデ7本を選び、土壌ごと細根を採取した。実体顕微鏡下で土壌粒子を取り除き、同所に存在する根端を8根端採取し、滅菌水1mLを入れたマイクロチューブ内でボルテックスし洗浄した。洗浄を5回繰り返した後、3根端はDNA抽出に用いITS領域のシークエンスにより菌根菌種を決定した。残り5根端は根圏バクテリアの分離培養に用いた。根端を滅菌水1mL中で磨砕したものを1次希釈とし、10%ずつ希釈し得られる分散液を4次希釈まで作成し、YG培地にシャーレ1枚あたり100μLずつ塗布し暗黒下26°Cで培養した。出現したバクテリアはサンプルごとに10コロニーをランダムに選び16S rRNAのシークエンス(平均954bp)を行い、種あるいは属レベルの推定を行った。調査は2016年8月16日に行った。

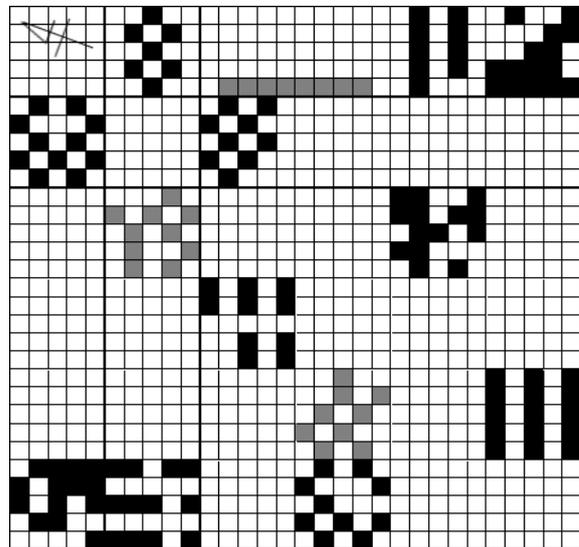


図-1. 試験区の外生菌根性樹種植栽配置(30×30m) 1マス1m 左上が入口 灰:クマシデ 黒:ミズナラ

Fig. 1 Position diagram of the planted ectomycorrhizal saplings (30×30 m) grey: *C. japonica* black: *Q. crispula*

III 結果と考察

1. 植栽地全体の菌根菌群集 クマシデ、ミズナラの各樹種について検出された菌根菌の属数を表-1に示す。クマシデは14属、ミズナラは11属検出された。このうちクマシデではキツネタケ属(*Laccaria*)が27個体中8個体、ラシャタケ属(*Tomentella*)が11個体と優占していた。また、入口(図-1左上)近辺のクマシデにはキツネタケ属やアセタケ属(*Inocybe*)、奥に位置するものにはベニタケ属(*Russula*)が見られるなど、植栽位置によって異なる菌根菌群集が存在することがわかった。外生菌根菌種は共生する樹種の植生遷移の進行に

よって変化する傾向がある (5, 10) が、本試験区においては、植栽された位置により菌根菌相が異なることがわかった。また、ミズナラにおいても同様の傾向が見られたが、隣接するクマシデと同じ菌根菌を共有することはなかった。混交林における研究例では、セイヨウシデ (*C. betulus*) の成木は同所に存在する他樹種と同じ菌根菌種を共有することが多い (3) とされているが、植栽 10 年未満の稚樹が隣接する本試験区ではそのような傾向は見られず、菌根菌群集は、樹種ごと、植栽位置ごとにほぼ独立している傾向がみられた。

表一 1. 外生菌根性樹種の胸高直径及び推定菌根菌種
Table 1 DBH ranges of ectomycorrhizal tree species, and identified ECM fungal species

Host species	<i>C. japonica</i>	<i>Q. crispula</i>
Number of trees examined	27	14
Range of DBH (cm)	1.0-4.2	1.1-5.0
Number of morphotypes	68	38
Number of Genera	14	11
Genus name	<i>Cortinarius</i> <i>Inocybe</i> <i>Laccaria</i> <i>Lactarius</i> <i>Melanogaster</i> <i>Naucoria</i> <i>Paxillus</i> <i>Russula</i> <i>Sebacina</i> <i>Sebacinaceae</i> <i>Thelephora</i> <i>Thelephoraceae</i> <i>Tomentella</i> <i>Xerocomus</i>	<i>Clavulina</i> <i>Inocybe</i> <i>Laccaria</i> <i>Lactarius</i> <i>Melanogaster</i> <i>Russula</i> <i>Scleroderma</i> <i>Sebacina</i> <i>Thelephoraceae</i> <i>Tomentella</i> <i>Xerocomus</i>

また、両樹種共に孢子散布を動物によって行う地下生菌 (アカダマタケ属 *Melanogaster*) による感染が入口付近を中心に散発的にみられた。クマシデでは4個体、ミズナラでは2個体において検出され、そのうち5個体は入口近くに見られた。この付近の林床にはウサギの糞が多く確認されている他、周辺林内でもタヌキやアナグマなどの動物がしばしば観察されていることから、本調査地のアカダマタケ属菌根菌感染は入口付近から侵入した動物による孢子散布が影響していることが考えられる。

2. 菌根形成と地上部成長・根圏バクテリア相との関係 菌根形成別のクマシデ胸高直径成長量を図-2に示す。地上部成長の極端に小さい個体は菌根がみられず、感染する菌根菌の種類に関わらず、菌根形成が野外の植栽木においても重要な成長因子となっていることが

伺えた。

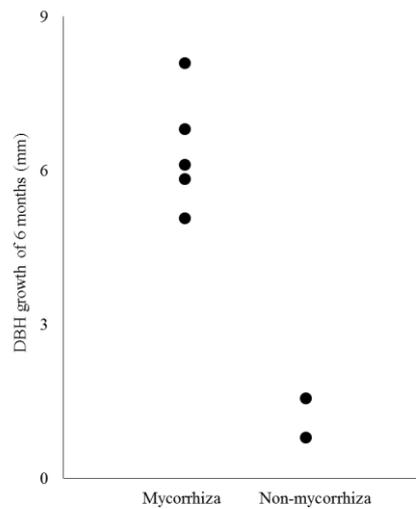


図-2. 菌根形成別のクマシデ胸高直径成長量(6ヶ月)
Fig. 2 DBH growth of *C. japonica* (6 months)

BLAST 結果から得られたクマシデ根圏バクテリア群集について、主成分分析による対応関係を図-3に示す。菌根菌の種類に関わらず、菌根から分離した根圏バクテリアはまとまったグループを形成し、古い菌根あるいは菌根を形成しない根圏バクテリアとは異なる群集構造を持つことがわかった。このバクテリア組成について、菌根と古い菌根/菌根なしにグループ分けしたものを図-4に示す。いずれのグループも *Burkholderia* 属が優占していたが、古い菌根/菌根なしでは *Bacillus* 属が占める比率が多くなり、このことが群集構造の違いに影響していると考えられた。マツ類の外生菌根圏に *Burkholderia* 属が存在することは知られている (6) が、本研究においてクマシデの外生菌根圏にも存在することがはじめて明らかになった。さらに、菌根の新鮮さによってバクテリア相が異なっていることから、古い菌根に多く見られる *Bacillus* 属バクテリアは菌根の分解過程に関わっている可能性が示唆された。

IV まとめ

植栽されたクマシデ、ミズナラの菌根菌群集は、植栽位置ごとにほぼ独立している傾向がみられた。植栽木同士の根外菌糸による地下部共生ネットワークは未発達、もしくは発達途上にあることが考えられる。また、地下生菌による感染が散発的にみられることから、植栽地においては動物による菌根菌の孢子散布の可能性が考えられた。また、地上部成長の小さい個体は菌根がみられず、菌根形成が植栽木においても重要な成長因子となっ

ていることが考えられた。さらに菌根と非菌根では根圏バクテリア相が異なっていることが明らかになった。

謝辞

地上部成長量の測定は東京農業大学地域環境科学部森林総合科学科学生の芦立光さん、芳井明子さんにご協力いただいた。本研究はJSPS 科研費 15K07486 の助成を受けて行われた。

引用文献

- (1) FREY-KLETT, P., GARBAYE, J. and TARKKA, M. (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* **176**: 22-36
- (2) ISHIDA, T.A., NARA, K. and HOGETSU, T. (2007) Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytol.* **174**: 430-440
- (3) LANG, C., SEVEN, J. and POLLE, A. (2011) Host preferences and differential contributions of deciduous tree species shape mycorrhizal species richness in a mixed Central European forest. *Mycorrhiza* **21**: 297-308
- (4) MATSUDA, Y., TAKANO, Y., SHIMADA, M., YAMANAKA, T., and ITO, S. (2013) Distribution of ectomycorrhizal fungi in a *Chamaecyparis obtusa* stand at different distances from a mature *Quercus serrata* tree. *Mycoscience* **54**(4): 260-264
- (5) NARA, K. (2015) The role of ectomycorrhizal networks in seedling establishment and primary succession. *Mycorrhizal Networks* (HORTON, T.R., ed.) pp.177-201. Springer, Dordrecht, the Netherlands
- (6) NGUYEN, N.H. and BRUNS, T.D. (2015) The microbiome of *Pinus muricata* ectomycorrhizae: community assemblages, fungal species effects, and *Burkholderia* as important bacteria in multipartnered symbioses. *Microb. Ecol.* **69**: 914-921
- (7) 清和研二 (2013) スギ人工林における種多様性回復の階梯—境界効果と間伐効果の組み合わせから効果的な施業方法を考える—。 *日本生態学会誌* **63**: 251-260
- (8) SMITH, S. E. and READ, D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. Academic Press, London, UK
- (9) TANAKA, M. and NARA, K. (2009) Phylogenetic diversity of non-nodulating *Rhizobium* associated with pine ectomycorrhizae. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 329-343
- (10) TANAKA, M. and NARA, K. (2015) Bacterial communities associated with ectomycorrhizal root of pioneer

dwarf willow in a primary successional volcanic desert. 8th International Conference on Mycorrhiza. PS1-61

(11) 田内裕之 (2010) 人工林を広葉樹林にする—誘導する意義とその可能性—。 *森林科学* **56**: 2

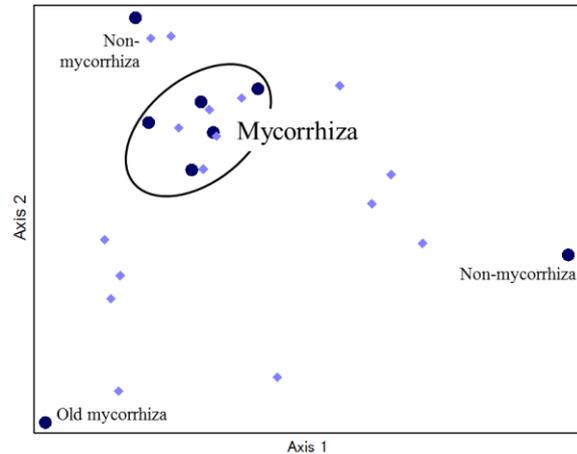


図-3. PCA (主成分分析) を用いたクマシデ根圏バクテリアの対応関係

Fig. 3 PCA plot for rhizosphere bacterial communities isolated from *C. japonica*

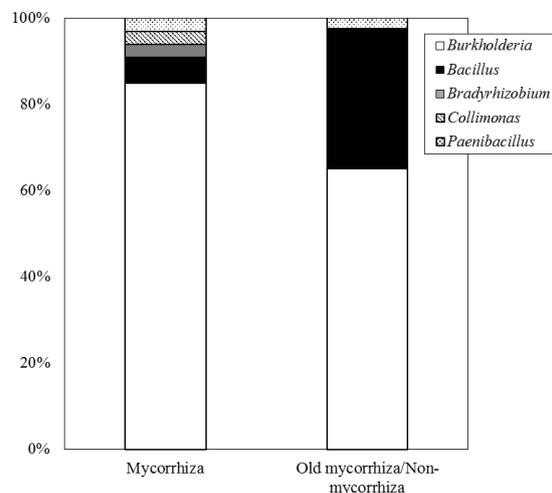


図-4. クマシデ根圏バクテリアの組成

Fig. 4 Rhizosphere bacterial frequency isolated from *C. japonica*