

富士青木ヶ原樹海の林床に存在する微生物密度の季節変化

田中恵・瀨口顕寛・上原巖・菅原泉・佐藤明 (東京農大)

要旨: コケが表面を覆って形成されるコケ型林床は他の林床よりも種子の発芽率が優れていると一般に言われている。理由として、コケ表面には種子の発芽に悪影響を及ぼす微生物が少ない、あるいはコケが水分を保持し種子の乾燥を防ぐことで発芽しやすいなどが考えられているが、確定的なことは明らかになっていない。そこで、本研究は富士青木ヶ原樹海のコケ型林床とリター林床に表面殺菌した種子を置床し、種子に付着した菌類とバクテリアの密度に季節変化があるかを検討した。その結果、元の土壌自体に含まれる菌類およびバクテリアの密度は、いずれも夏期に採取した方が冬期に採取したものより有意に大きくなった。しかし、リターに置床した種子に付着した菌類は冬期に採取した方が有意に大きく、土壌の場合とは異なる結果になった。また、コケでは季節間で有意な差は見られなかった。

キーワード: 土壌微生物, 季節変化, コケ型林床, 青木ヶ原樹海

Abstract: Commonly, seed germination rate of moss-type forest floor is better than other forest floor. It was considered that the surface on the moss have fewer microorganisms adverse effect of germination, or moss-type floor is easy to germinate seeds to prevent the drying to retain moisture. However, the mechanism and function is unclear. Whether there is a seasonal variation in the density of bacteria and fungi, we counted the number of colonies collected from seeds that put into the moss or litter forest floor. As a result, the density of the bacteria and fungi that are included in the original soil itself, the summer samples were significantly greater than the winter samples. On the other hand, the number of fungal colonies collected from seeds in winter samples was significantly greater than summer samples by litter floor. There were no significant differences between seasons in the moss-type floor.

Keywords: soil microorganism, seasonal change, moss-type forest floor, Aokigahara-jukai

I はじめに

林床には落葉や落枝が腐植して出来たリターや鉱物質などの様々な成分が混在しており、自然落下種子から発芽した実生が成長できるか否かは林床の条件、すなわち気候等の環境要因、動物による捕食、菌類やバクテリアから受ける影響等の生物要因によって変わってくる。生物要因の一つとして、北海道では暗色雪腐病菌などが林床に落ちた種子を腐朽させ、更新を阻害することが報告されている(3)。

林床の中には、コケが表面を覆って形成されるものがあり、一般に他の林床よりも種子の発芽率が優れていると言われている(5)。また、コケが表面を覆っているコケ型の林床では前生稚樹が他の例えばカニコウモリ型やササ型の林床よりも優れていると言われている(4)。その理由として、コケ表面には種子の発芽に悪影響を及ぼすような微生物が少ないことが考えられている。先述した暗色雪腐病が発生している地域では、倒木上に生えたコケの上で、多くの種子が腐朽することなく生存し更新が進む倒木更新が報告されている(2)。他にも、コケが水分を保持し種子の乾燥を防ぐことで発芽が容易になることなどが考えられているが、確定的なことは明らかになっていない。

そこで、本研究は富士青木ヶ原樹海のコケ型林床と

リター林床に表面殺菌した種子を置床し、種子に付着した菌類とバクテリアのうち、培養できるものについてその密度及び種組成に季節的な変化があるかについて検討した。

II 調査地

調査地は山梨県南都留郡富士河口湖町の竜宮洞穴付近の青木ヶ原樹海(N35°29', E138°40')である。林内は地表面に溶岩が数多く露出しており、土壌は未発達で蓄積した葉、リターとその腐植からなり、層構造はほとんど発達していない。年平均気温は 10.5°C、年降水量は 1537.9mm で 2 月から 3 月にかけては降雪があるが、最大でも積雪深は 30cm 前後である。

サンプル採取は富士河口湖町の 436-1 林班の天然下種更新林で行った。主要な林冠はモミ、ツガ、ヒノキ、ヒメコマツ、落葉樹ではコナラ、ミズナラ、ミズメ、コシアブラがあり、針葉樹と広葉樹の割合は 6:4 程度であった。亜高木層はコハウチワカエデ、ウリカエデ、リョウブ、アカシデ、アオハダ、ソヨゴであった。幼木としてモミ、ツガ、ネジキ、コハウチワカエデ、コシアブラが生息している。地表を覆う主要なコケはオオスギゴケ(*Brachythecium plumosum*)、ハイヒモゴケ(*Meteorium subpolytrichum*)、およびハネヒツジゴケ

(*Brachythecium plumosum*)である。

III 調査方法

1. サンプルング 冬期のサンプルは2011年2月18日、夏期のサンプルは2011年9月19日に行った。オートクレーブ滅菌した採土管を用い、コケ12サンプル、リター12サンプルを採取した。採土管を直接、林床に刺しサンプルを得た。コケの直下は溶岩であるため、採土管の縁でコケを押し切るようにしてコケだけを採取した。元の土壤に存在する微生物密度を把握するため、直近の土壤も別に12サンプル採取した。

2. 希釈平板法 採取した各サンプルから希釈平板法を用いて菌類とバクテリアを計数した。菌にはPDA培地に抗生物質としてテトラサイクリン(20ppm)を添加したもの、バクテリアにはYG培地を用いた。作業はサンプルング当日に行った。

種子に付着する微生物の計数には30%過酸化水素水で30分間表面殺菌したクロマツ種子(以下種子)を用いた。採土管内の各サンプルに種子を5粒置床し、暗黒下16°Cに保持し、6日目に回収した。種子は滅菌水1mLに入れ、よくボルテックスしたものを1次希釈液とした。10%ずつ希釈し得られる分散液を3次希釈まで作成し、希釈液を各培地に100 μ Lずつ塗布し暗黒下約20°Cで培養した。また、種子に元々付着・内生する、あるいは実験中に付着する微生物が結果に及ぼす影響を排除するために、表面殺菌後の種子を滅菌シャーレに入れ、他のサンプルと同じ環境下に置いた後、同様に1次から3次まで培養した。

土壤サンプルは0.5gを1mLの滅菌水に分散させたものを1次希釈液とし、10%ずつ希釈し得られる分散液を6次希釈まで作成した。希釈液を各培地に100 μ Lずつ塗布し暗黒下約20°Cで培養した。作業途中でのコンタミネーションの有無を確認するために、上記の作業を滅菌水のみでも行った。

3. 種推定 培養して得られた菌およびバクテリアはそれぞれの種を推定するために分離作業を行った。分離株は種子表面由来は3次希釈、土壤由来は5次希釈を用いた。各シャーレに出現したコロニーからランダムに単独のコロニーを選び、滅菌した爪楊枝ですくい取り、再び同種の新しい培地に移し培養した。分離作業は複数回行った。菌類はITS領域(ITS1+5.8S+ITS2)、バクテリアは16S rRNAのパーシャルシーケンス(平均716bp)を行い、NCBIのBLAST検索を用いて種の推定を行った。種で分けられない場合は属レベルの推定を行った。

IV 結果及び考察

1. 微生物物密度 図-1に土壤サンプルの微生物数を示す。菌類、バクテリアのいずれも夏期に採取した方が冬期に採取したものより有意にコロニー数が増加し($n=12, p<0.01$)、採取した季節によって土壤の微生物数は異なる傾向が示された。

図-2に種子に付着した菌数を示す。リター由来のコロニー数は冬期に採取した方が夏期に採取したものより有意にコロニー数が増加した($n=6-8, p<0.05$)。また、コケ由来の菌数もリター由来と同様に冬期に採取した方が夏期に採取したものより増加傾向を見せ、いずれの結果も土壤サンプルの場合とは異なる結果となった。林床タイプ間では夏期にはリター由来よりコケ由来の方が菌数が増える傾向が見られたが冬期は林床タイプによる違いはなかった。

図-3に種子に付着したバクテリア数を示す。リター由来のコロニー数は菌と同様に冬期に採取した方が夏期に採取したものよりコロニー数が増加傾向を見せた。一方、コケ由来のコロニー数は夏期に採取したサンプルにおいてコロニーが増殖しすぎたため計数が不可能なものが多かった。このため傾向としてはリター由来とは異なり、夏期に採取したものの方が増加していることが考えられるが、季節間および林床タイプ間による明確な差はわからなかった。

なお、作業途中のコンタミおよび、種子に元々付着・内生している菌類、バクテリアはいずれも確認されなかった。

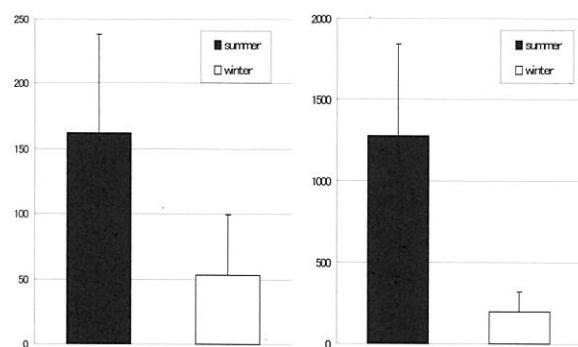


図-1. 土壤の微生物数(3次希釈)

左: 菌 右: バクテリア

Fig. 1 Number of colonies from soil (3rd dilution)

Left: Fungi, Right: Bacteria

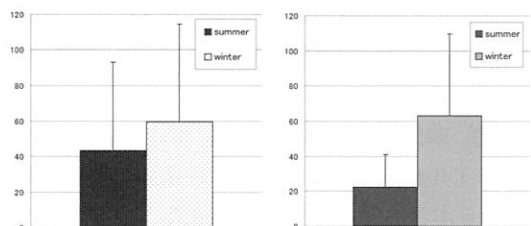


図-2. 種子に付着した菌数 (1次希釈)

左: コケ由来 右: リター由来

Fig. 2 Number of fungal colonies from seeds (1st dilution)

Left : Moss-type floor, Right : Litter

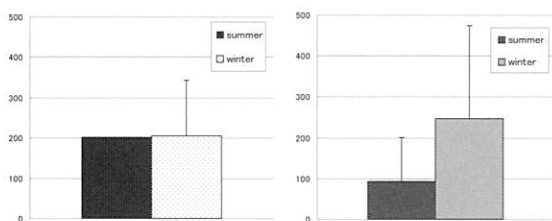


図-3. 種子に付着した細菌数 (1次希釈)

左: コケ由来 右: リター由来

Fig. 3 Number of bacterial colonies from seeds (1st dilution)

Left : Moss-type floor, Right : Litter

2. 微生物の種推定 菌類 30 コロニー, バクテリア 56 コロニーの計 86 サンプルを分離し, その内シーケンスによって菌類 22 サンプル, バクテリア 48 サンプルを推定した。表-1 に推定された菌類の属名とその出現数を示す。

表-1. 推定された菌種と出現数

Table 1 Fungal genus and number of occurrence

genus	summer			winter		
	moss	litter	soil	moss	litter	soil
<i>Clavaria</i>	1	6	2	1	2	1
<i>Tremella</i>					1	
<i>Sporobolomyces</i>		1	1		1	
<i>Mortierella</i>					1	2
<i>Umbelopsis</i>		1		1		

種子に付着したものにおいても土壌においても最も多いものは *Clavaria* 属であった。*Clavaria* は担子菌の 1 種でソウメンタケのような細長く棍棒状の子実体を形成する菌類である。夏期冬期のいずれにも出現し, 種子に付着したものではコケおよびリター由来のいずれでも観察されたことから, この調査地に普遍的に存在する菌類であると考えられる。同様に担子菌の *Tremella*

(シロキクラゲ) 属菌も冬期のリター由来に観察された。この属に含まれる代表的なシロキクラゲは春から秋にかけて, 広葉樹倒木や枯枝に発生するため, 同様に調査地内で腐生菌として存在していると考えられる。他に, 担子菌門に属する酵母である *Sporobolomyces* 属や, 担子菌門以外には接合菌で主として土壌に生息する *Mortierella* 属, *Umbelopsis* 属が検出された。*Clavaria* 属菌以外はいずれの菌種も出現数が少なく, 特定の傾向を見出すことは出来なかった。

バクテリアでは最も多く推定されたのは, ベータプロテオバクテリア綱に属するものであった (図-2)。このうち *Burkholderia* 属は出現したベータプロテオバクテリアの 94% を占め, 全体からみても 67% と優占していることが明らかとなった。他にはガンマプロテオバクテリア綱, アルファプロテオバクテリア綱などプロテオバクテリア門に属するもの, 放線菌や *Bacillus* 属などが観察された。*Burkholderia* 属には土壌鉱物の風化を促進し, 特にマツの成長を促進させる種があることが明らかになっている (1)。また, アカマツの外生菌根圏に存在するバクテリアとして優占していることから土壌以外の根圏にも存在することが明らかになっている (6)。

表-2 に推定されたバクテリアの属名とその出現数を示す。いずれのサンプルも *Burkholderia* 属が優占していた。種子に付着したものではコケ由来, リター由来のいずれも夏期の方が冬期よりも多くの種類が観察された。林床タイプ間ではコケの方がリターよりも多くの種が出現する傾向が見られた。一方, 土壌由来においても *Burkholderia* 属以外のバクテリアはいずれの季節も 1 種しか観察されなかった。これらのことから, この調査地における培養可能なバクテリアは全般的に *Burkholderia* 属が優占しているながらも, 林床タイプによって種子に付着するバクテリアの種組成は異なる結果を示すことが示唆された。

本研究では, 林床に存在する培養可能な微生物は, 季節によって異なる密度で存在することが明らかになった。また微生物のうち, 菌類については明確な関係はわからなかったが, バクテリアについては, *Burkholderia* 属が優占すること, 種組成は元の土壌よりも種子に付着したものの方が多様になることが示された。種組成については, 林床タイプ間でも異なり, コケ型林床の方がリター林床よりもより複雑である可能性がある。今後は, 実際に置床した種子を用いた林床タイプごとの発芽率を調べ, 微生物の密度・種類との関係を明らかにしていくことが求められる。

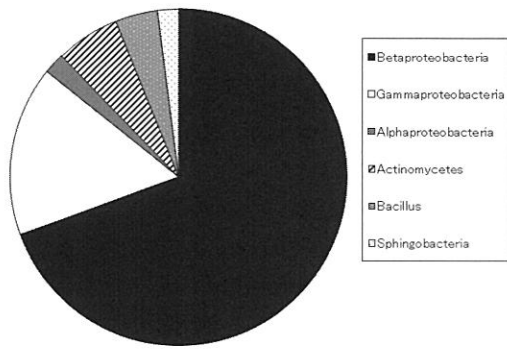


図-4. バクテリアの綱レベルでの出現頻度
Fig. 4 Bacterial frequency (class level)

occurrence of conifer seedlings and saplings in boreal and subalpine old-growth forests in Japan. *Ecological Research* **18**: pp.267-277

- (6) 田中恵, 奈良一秀 (2008) 野外における菌根圏バクテリアの群集構造：樹種および菌種の影響, 第119回日本森林学会大会学術講演集, J21

表-2. 季節ごとの推定されたバクテリア種と出現数

Table 2 Bacterial genus and number of occurrence

genus	summer			winter		
	moss	litter	soil	moss	litter	soil
<i>Burkholderia</i>	6	5	5	3	7	5
<i>Bacillus</i>						2
<i>Caulobacter</i>			1			
<i>Duganella</i>	1					
<i>Enterobacter</i>				1		
<i>Erwinia</i>	2					
<i>Fronohabitans</i>	1	1		2		
<i>Kluyvera</i>	1					
<i>Luteibacter</i>				2		
<i>Mucilaginibacter</i>		1				
<i>Pandoraea</i>	1					
<i>Rahnella</i>		1				
total	12	8	6	8	7	7

V 参考文献

- (1) CHRISTOPHE CALVARUSO, MARIE-PIERRE TURPAULT, PASCALE FREY-KLETT (2006) Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(2): pp.1258-1266
- (2) 市原優 (2010) 天然更新に関与する樹病害, 山林, **11**: pp.54-55
- (3) 市原優, 杉田久志, 升屋勇人, 窪野高德, 小林元, 飯田滋生 (2007) 天然林におけるトドマツ、エゾマツ、アカエゾマツの種子腐敗に関与する菌類, 第118回日本森林学会大会学術講演集, P2i19
- (4) 草下正夫 (1960) 亜高山地帯の造林技術, 創文, pp.148-152
- (5) YOSHIKO NARUKAWA, SHIGEO IIDA, HIROYUKI TANOUCHI, SHIN ABE, SHIN-ICHI YAMAMOTO (2003) State of fallen logs and the