

異なる樹種の落葉の混合とその分解に関わる菌類群集

Fungal communities associated with the decomposition of mixture leaf litter of
Cryptomeria japonica and *Quercus serrata*湊上拓朗*¹・上原巖*²・田中恵*²Takuro FUCHIGAMI*¹, Iwao UEHARA*², Megumi TANAKA*²

*1 東京農業大学大学院 農学研究科 林学専攻

Department of Forest Science, Graduate school of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*2 東京農業大学 地域環境科学部 森林総合科学科

Department of Forest Science, Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture

要旨：落葉の分解速度はその樹種による葉の形、物理及び化学組成、含有成分量などが違うことによって異なっており、これらの違いが落葉の分解に関わる菌類の種組成にも影響を与えていると考えられる。そこで本研究では、異なる樹種の落葉の混合が菌類群集に及ぼす影響を経時的に調べるため、スギとコナラの落葉を混合し、リターバッグに入れて林床に設置した。設置したリターバッグを経時的に回収し、落葉の重量を計測、同時に落葉内からの菌類の分離と同定を行った。また、落葉から菌類を分離する際は表面殺菌を行い、菌類の分離を行った。その結果、スギとコナラどちらの落葉からも分離された菌類のほとんどがクロイボタケ綱かフンタマカビ綱に含まれ、特にクロサイワイタケ科に属するものが優占して分離された。また、*Nemania* 属菌は落葉前から林床設置 10 ヶ月後まで続けて分離された。

キーワード：落葉分解、内生菌、クロサイワイタケ科

Abstract: The decomposition rate of leaf litter is different for each tree species due to the difference in leaf shape, physical and chemical composition, and content of ingredients. The species composition of the fungus related to the decomposition of leaf litter is supposed to be affected by these differences. In this study, the influence of mixing effect of leaf litter of different tree species on fungal community was investigated every month. Enclosed leaf litter of *Cryptomeria japonica* and *Quercus serrata* in a litter bag and set on forest floor. They were collected at regular intervals and the weight of leaf litter in them was measured. Furthermore, collected leaf litter was surface sterilized and then used for isolation of fungi. As a result, most of the fungi isolated from both *C. japonica* and *Q. serrata* leaf litter belonged to Sordariomycetes or Dothideomycetes. In particular, fungi belonging to Xylariaceae dominated. In addition, isolated *Nemania* sp. was detected continuously live leaves and until 10 months after set on forest floor.

Key-word: decomposition of leaf litter, Endophytes, Xylariaceae

I はじめに

落葉・落枝などのリターの分解は、森林生態系内の物質循環にとって重要な過程の一つである。リターは土壤動物や土壤微生物の働きによって分解され、土壤有機物の生成の材料となり、植物にとっての必須元素などの養分の供給源にもなっている(1)。リターの分解速度は樹種によって異なっており、これは樹種によって葉の形、物理的組成、化学的組成、成分量が異なることから生じていると考えられている。樹種毎の落葉の分解速度の違いに着目し、複数樹種の落葉を混合して分解速度の変化を

調査した先行研究は行われてきてはいるが(2)、分解速度を向上、低下させる効果があるなどの結果は明確に得られていない。

一方、分解速度の違いを与える要因の一つとして、葉が含有する窒素の成分量の違いが、分解者である菌類の密度と種組成およびそれに伴う分解速度に影響を与えていることが示唆されている(1)。分解に関わる生物の中でも菌類などの微生物の一部は、樹木の落葉前から葉面・葉内にすみついており、分解に初期から関与できることが考えられる。

これらのことから本研究では、複数樹種の落葉の混合が分解過程へ与える影響について特に菌類群集に着目し調査した。

II 材料と方法

1. 調査地 東京都青梅市内の市有林(青梅の森)の広葉樹二次林(北緯 35° 48' 07" , 東経 139° 15' 29" 標高 253m 周辺)にて行った(図一 1)。植生はコナラ(*Quercus serrata*)が優占しており、スギ(*Cryptomeria japonica*)やヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)の人工林とモザイク状に入り混じっている。また、尾根部を中心としてアカマツ(*Pinus densiflora*)が点在している。本調査では、コナラが優占しており同林分内にスギが存在している場所を 3 カ所を調査プロットとした。



図一 1. 調査地(枠内は調査プロット地点を示す)

Fig.1 Research site

2. 調査項目

2. 1 リターの重量変化の測定 リターバッグ法を用い、リターの重量変化を測定した。使用した葉リターは、スギとコナラの 2 種を使用した。両樹種の落葉を林床から採取し、風乾させて重量を調整し、15×15cm, 1 mm メッシュのポリエステル製のリターバッグに落葉を封入した。封入する落葉は、スギとコナラ 1.5g ずつで合計 3g (±0.05) 封入した。同時に、コントロールとしてスギのみとコナラのみをリターバッグに封入したものもそれぞれ 3g (±0.05) で作成した。これら 3 種類のリターバッグを各 60 袋ずつ作成し、3ヶ所のプロットにそれぞれ 20 袋ずつ設置した(図一 2)。リターバッグは A₀ 層を取り除いた林床にピンで固定して雨風での損失が無いようにした。各プロットから 1ヶ月毎に 3種類のリターバッグを林床から 1袋ずつ回収して持ち帰り、研究室内で開封して中のリターを絶乾状態にしたのち、重量の

測定を行った。回収は設置 1ヶ月から 12ヶ月後まで行った。



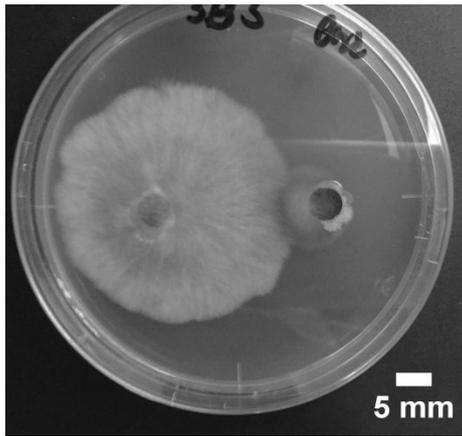
図一 2. 林床に設置したリターバッグ

Fig.2 Litter bag set on forest floor

2. 2 生葉からの葉内生菌の分離と同定 落葉前に潜在的にどのような菌類が存在していたかを把握するために、調査地内の各プロットから落葉前の生葉をスギ、コナラ共に 1 枚採取し、葉内生菌の分離と同定を行った(すなわち、スギ、コナラとも分離同定実験の繰り返しは 3 である)。葉の採取にあたっては見かけ上健全であり、病徴が見られていないものを選んだ。

コナラについて、葉 1 枚につき葉片 2 枚を滅菌済み直径 7mm のコルクボーラーを用いて葉の中央部より主脈を避けて葉片を打ち抜いて用いた。スギについては、葉 1 枚につき長さ 1cm ほどに 2 つ切り取り、小葉の先端も 2mm ほど切り戻し、小葉内からも内生菌が培地上に接するようにした。切り出した葉片は松田ら(4)の手法を参考に 70% エタノール 30 秒、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 2.5 %) 3 分で表面殺菌を行った。表面殺菌後、滅菌水で 2 回洗浄し、滅菌ろ紙上で水気を取った。各葉につき 1 つの平板培地を使用し、この 2 葉片を培地上に静置し、25 °C 暗条件下で 2 ヶ月間培養した。葉片から多くの種類の菌類を出現させるために培地には LCA 培地(6) (グルコース 1g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, KCl 0.2 g, NaNO₃ 2g, 酵母エキス 0.2 g, 寒天 13 g, 純水 1, 000 ml)を用いて菌類の培養をした。

培養期間中は平板を 6~9 日おきに観察し、平板上に出現した菌糸(図一 3)あるいは孢子を別の LCA 培地上に移した。分離された菌類は、DNA 解析による分類と菌叢形態による分類を行った。DNA 解析は ITS 領域についてシーケンスを行い BLAST 検索にかけて菌類の同定を行った。



図—3. 表面殺菌後の葉片から出た菌糸

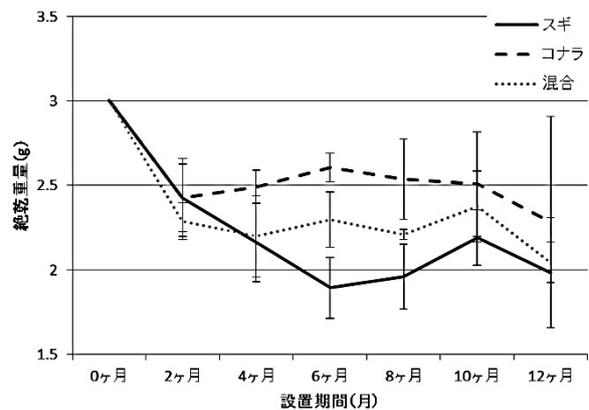
Fig.3 Hyphae from leaf pieces after surface sterilization

2. 3 落葉からの菌類の分離と同定 落葉の分解過程における菌類群集の構造を把握するために、2. 1で持ち帰った各リターバッグ(スギのみ、コナラのみ、混合の3種をそれぞれ1袋ずつ)の中から、落葉を各樹種ランダムに1枚ずつ選び(混合させて封入したリターバッグからはスギとコナラ両方)、菌類の分離に供試した(すなわち本実験も繰り返すは3である)落葉からの菌類の分離と同定は設置1, 2, 4, 6, 8, 10, 12ヶ月後のリターバッグについて行った。落葉からの各樹種の葉片の作成については2. 2と同じ方法でスギのみ、コナラのみ、混合されたスギ、混合されたコナラの各4種の葉片を作成した。落葉からの菌類の分離については、各葉片を表面殺菌の殺菌条件として畑ら(2)の手法を参考に70%エタノール1分、15%過酸化水素水1分、70%エタノール1分で表面殺菌を行い、表面殺菌後、滅菌水で2回洗浄し、滅菌ろ紙上で水気を取り平板培地上に静置した。各4種とも2. 2と同様に葉1枚につき作成した2葉片を1平板培地(LCA培地)に静置し、25℃暗条件下で2ヶ月間菌類の培養をし、同定を行った。

III 結果と考察

3. 1 リターの重量変化の測定 3種類のリターバッグ内の平均絶乾重量を図—4に示す(菌類の分離同定を行った月の絶乾重量を図示した)。1ヶ月ごとの重量の変動を見ると、3種類とも減少だけでなく、時には重量の増加が見られたが、緩やかではあるものの最終的には確かな重量の減少が確認できた。コナラ(点線)のみのは、特に重量の増減が大きく確認され、重量の減少は2種に比べて緩やかなものとなった。混合(実線)させたものは、他の2種の間を推移しており、コナラ単独のものよりも重量が減少することが確認された。

一部のサンプルについて、前回収時よりも重量が増加した原因として、リター表面に土壌が張り付いていたことが考えられる。これは設置したリターバッグ内に雨滴とともに土砂が入り、水分は蒸発し、土壌のみがリターに貼りついたためであると考えられる。特にコナラへの土壌の貼りつきが多く確認された。リターバッグ法での重量の変動は、土壌附着による問題があったものの、確実に重量の減少は見られた。また、落葉を混合させた場合は、コナラ単独のものに比べ減少しており、コナラに比べ立体的な構造をしているスギを混在させたことによって、土壌に対してコナラの面的な接触を軽減する効果や、コナラの碎片化を促進する効果があった可能性も考えられた。しかし、混合のものは1:1の比率でスギとコナラを封入したものであり、今回の調査だけでは、一概に混合による分解促進の効果とは言い切れない結果となった。



図—4. リターの重量変化

Fig.4 Change of litter bag weight

3. 2 生葉からの葉内生菌の分離と同定 6科8属の菌類が同定された。また種まで同定できたのは5種であった(表—1)。コナラ葉片からはクロサイワイタケ科に属する菌類が多く分離された。それに対してスギ葉片からは *Phyllosticta cryptomeriae* が顕著に分離され、他の菌類の出現種数が少なかった。

表一．分離された内生菌

Table 1 Endophytes isolated from live leaf

スギ	コナラ
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	<i>Muscodor fengyangensis</i>
<i>Phyllosticta cryptomeriae</i>	<i>Ochroconis macrozambiae</i>
<i>Microdiplodia</i> sp.	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>
<i>Nemania</i> sp.1	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Arthrimum</i> sp.
<i>Xylariales</i> sp.1	<i>Hypoxylon</i> sp.
	<i>Nemania</i> sp.2
	<i>Pezicula</i> sp.
	<i>Xylariales</i> sp.2

3.3 落葉からの菌類の分離と同定 葉片からの菌類を分類した結果，15科21属の菌類が同定された。また種まで同定できたのは15種であった。スギ，コナラ落葉共にほとんどがクロイボタケ綱，フンタマカビ綱に属していた。また分解初期，林床設置から6ヶ月後，12ヶ月後の菌類組成を見ると，スギ生葉では優占的に *Phyllosticta cryptomeriae* が分離されたが，林床設置6ヶ月後から混合，スギのみ共に分離されることが減り，クロサイワイタケ科に属する菌類が分離された(表一2，表一3)。中でも，*Nemania* 属菌はコナラとスギ両樹種の生葉から分離されており，林床設置後も多く分離され，コナラのみものからは，生葉と林床設置10ヶ月後まで続けて落葉から分離された。また同定された15種中10種がクロサイワイタケ目に属しており，クロサイワイタケ科と *Pestalotiopsis* 属菌が多数分離された。

表一2．落葉から分離された菌類

Table 2 Fungi isolated from litter

	スギ	コナラ
1ヶ月後	<i>Nemania</i> sp.1	<i>Nemania</i> sp.2
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.1	<i>Nigrospora sphaerica</i>
	<i>Phyllosticta cryptomeriae</i>	<i>Pezicula</i> sp.1
	<i>Xylaria</i> sp.1	<i>Phyllosticta cryptomeriae</i>
		<i>Trichoderma</i> sp.
6ヶ月後	<i>Massarina</i> sp.	<i>Nemania</i> sp.6
	<i>Nemania</i> sp.5	<i>Trichoderma</i> sp.3
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.3	<i>Xylaria</i> sp.4
	<i>Trichoderma</i> sp.2	
	<i>Xylaria</i> sp.3	
12ヶ月後	<i>Nemania</i> sp.10	<i>Clavulina nigricans</i>
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.5	<i>Nemania</i> sp.11
	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>
	<i>Pezicula</i> sp.2	<i>Pezicula</i> sp.3
	<i>Phyllosticta cryptomeriae</i>	<i>Xylaria</i> sp.6

表一3．混合させた落葉から分離された菌類

Table 3 Fungi isolated from mixed litter

	スギ	コナラ
1ヶ月後	<i>Chaetomium brasiliense</i>	<i>Hypoxylon</i> sp.
	<i>Nemania</i> sp.3	<i>Nemania</i> sp.4
	<i>Phyllosticta cryptomeriae</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>
	<i>Xylaria</i> sp.2	<i>Pestalotiopsis</i> sp.2
		<i>Trichoderma</i> sp.1
6ヶ月後	<i>Nemania</i> sp.7	<i>Nemania</i> sp.8
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.4	<i>Nemania</i> sp.9
	<i>Pholiota multicingulata</i>	<i>Xylaria</i> sp.5
12ヶ月後	<i>Muscodor fengyangensis</i>	<i>Nemania</i> sp.13
	<i>Nemania</i> sp.12	<i>Nemania</i> sp.9
	<i>Pholiota multicingulata</i>	<i>Ochroconis macrozambiae</i>
	<i>Phyllosticta cryptomeriae</i>	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>
	<i>Xylaria</i> sp.7	<i>Trichoderma</i> sp.4
		<i>Xylaria</i> sp.8

IV まとめ

今回の調査で多く分離されたクロサイワイタケ科の菌類の中には，リグニン分解能力を有しているものがあり(6)，落葉分解の過程において重要な存在であると考えられる。特に，内生菌としても分離され，分解初期から12ヶ月後までも継続して分離された *Nemania* 属菌もクロサイワイタケ科に属しており，リグニン分解能を有している可能性が考えられる。今後，この *Nemania* 属菌の分解能力について試験し，この長期的な潜伏期間との関係性や，リターの重量減少との関連を調べていくことが必要であると考えられる。

引用文献

- (1) BERG, B. and McCLAUGHERTY, C. (2004) 森林生態系の落葉分解と腐植の形成:285 シュプリンガー・ジャパン 東京
- (2) 畑邦彦・平田令子・曾根晃一 (2008) マツ死葉における表面殺菌法の検討. 九州森林研究 61 : 31-33
- (3) 河原輝彦 (1975) リター分解について II. 2種類の落葉混合が分解速度に及ぼす影響. 日本生態学会誌 25(2) : 71-76
- (4) 松田陽介・伊藤由佳・伊藤信一郎 (2010) コナラの異なる展葉期における葉内生菌の感染様式. 樹木医学研究 14(4) : 165-173
- (5) 大園享司 (2007) 冷温帯林における落葉の分解過程と菌類群集. 日本生態学会誌 57 : 304-318
- (6) 大園享司・武田博清 (1999) ブナ落葉の分解に関する菌類相調査—培養法の検討—. 森林応用研究 8:103-108