

アカマツ実生を用いた外生菌根形成実験系における施肥回数と灌水頻度との関係

田中恵¹・小澤光¹・荒谷昌輝¹・明間民央²

1 東京農業大学地域環境科学部

2 森林総合研究所きのこ・森林微生物研究領域

要旨：樹木と共生する菌根菌の共生効果を測定するためには、他の環境要因、特に生物的要因によるコンタミネーションをできるだけ排除した上で、確実に菌根合成が行われる安定した実験系の構築が必要である。このような実験系では有機物を含まない滅菌土壌を用い、滅菌水などを適宜灌水し育成するのが一般的である。しかしながら、菌根菌が樹木に及ぼす成長促進効果は主に土壌中の養水分吸収の向上によりもたらされることから、土壌中の含水状態や施肥の効果は菌根自体の発達にも影響を及ぼすものと考えられる。本研究では、宿主樹木としてアカマツ、菌根菌としてコツブタケ菌株を用い、施肥の回数と灌水頻度を組み合わせた実験を行い、実生の菌根共生及び成長に及ぼす影響について観察した。その結果、灌水頻度を下げた処理区では菌根形成率が増加し、それに伴いTR比も増加した。

キーワード：菌根合成、コツブタケ、アカマツ、土壌養水分、水ポテンシャル

Effect of the frequency of fertilization and irrigation in the experimental system of ectomycorrhiza formation using pine seedlings

Megumi TANAKA¹, Hikaru OZAWA¹, Shoki ARATANI¹, Tamio AKEMA²

1 Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture

2 Forestry and Forest Products Research Institute

Abstract: Measuring the symbiotic effects of mycorrhizal fungi on the host trees, it is necessary to construct a stable experimental system in which mycorrhizal synthesis can take place reliably, while eliminating contamination by other environmental factors, especially biological factors, as much feasible. In such an experimental system, it is common to use sterilized soil that does not contain organic matter and to irrigate the soil with sterilized water. However, since the growth-promoting effect of mycorrhizal fungi on host trees is mainly due to the improvement of nutrient absorption in the soil, the effect of soil moisture content and fertilization is considered to have an influence. In this study, the effects of mycorrhizal formation and growth of seedlings were observed by combining the frequency of irrigation and fertilization using Japanese red pine as the host tree and *Pisolithus* strain as inoculation. As a result, mycorrhizal formation rate increased in the treatment with low irrigation frequency, and the TR ratio increased accordingly.

Key-word: Mycorrhizal formation, *Pisolithus*, *Pinus densiflora*, Soil condition, Soil water potential

I はじめに

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。マツ科やブナ科、カバノキ科などの樹種は普遍的に外生菌根菌と共生関係を結んでいる。外生菌根菌へは樹木の光合成産物の約2割が供給され(5)、外生菌根菌からは土壌養分が受け渡される。また、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(4)。外生菌根性の樹種にとって共生相手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できない。

樹木と共生する菌根菌の共生効果を測定するためには、他の環境要因、特に生物的要因によるコンタミネーションをできるだけ排除した上で、確実に菌根合成が行われる安定した実験系の構築が必要である。このような実験系では有機物を含まない培養土を滅菌した土壌を用い、滅菌水などを適宜灌水し育成するのが一般的である(3)。しかしながら、菌根菌が樹木に及ぼす成長促進効果は主に土壌中の養水分吸収の向上によりもたらされる(4)ことから、土壌中の含水状態や施肥の効果は影響を及ぼ

すものと考えられる。そこで本研究では、宿主樹木としてアカマツ (*Pinus densiflora*)、菌根菌としてコツブタケ (*Pisolithus* sp.) 菌株を用い、施肥の回数と灌水頻度を組み合わせた実験を行い、実生の菌根共生及び成長に及ぼす影響について観察した。

II 材料と方法

1. 供試材料 アカマツ実生は種子（長野県産）を中性洗剤および1%次亜塩素酸ナトリウムで10分間表面殺菌し、水道水ですすいだものを滅菌土壌に播種し、2か月室内で育成したものをを用いた。滅菌土壌は芝の目土、黒土、川砂を2:1:1（体積比）で混合後、オートクレーブ滅菌し、以降すべての実験においてこれを滅菌土壌として用いた。外生菌根菌はコツブタケ培養菌株を1/2 MMN 培地で1か月間前培養（暗所、20°C）したものを接種減として用いた。

2. 実験方法 培養容器には1号角シャーレ（230×80×14.5 mm）の短辺側上部を切り取ったものを用いた。1シャーレにつき270±5 gに計測した滅菌土壌を入れ、平らにならし、無菌播種したアカマツ実生を胚軸より上部が短辺側の穴から出るように置いた。前培養したコツブタケは1シャーレにつき約32 cm²を培地ごと幼根に貼り付けて接種した。菌根菌を接種しない処理には同量の1/2 MMN 培地のみを幼根に貼り付け、対照区とした。接種後のシャーレは蓋と本体を針金で2か所固定し、土壌部分を覆うようにアルミホイルで遮光し、室内の培養棚（25±5°C、蛍光灯補光）で6か月間育成し、その間に下記の処理をそれぞれ行った。

施肥回数処理実験では、1/10 Hoagland 水耕液を0, 1, 2, 3, 4回の5段階に分け施肥を行った。施肥処理は月に1回とし、1回処理は5月、2回処理は5, 6月、3回処理区は5-7月、4回処理区は5-8月、いずれも当月の20日前後に1シャーレにつき30 ml与えた。施肥以外に10日に1回灌水（純水30 ml/シャーレ）を行った。供試実生数は各処理区15本とした。

灌水頻度処理実験では、8日、12日、16日ごとに1回、1シャーレにつき純水を50 ml与え、それ以外の処理は行わなかった。供試実生数は各処理区10本、8日に1回の灌水区のみ20本とした

3. 測定項目 育成した実生は掘り取り、根系を洗浄後、実体顕微鏡下で観察しながら菌根、非菌根をそれぞれカウントし、菌根形成率（菌根数 / 総根端数×100）を算出した。また、地上部および地下部の乾燥重量、施肥回数処理実験では加えて地上部長および地下部長を計測した。

灌水頻度処理実験においてはさらに、土壌の含水状態を経時的に測定するため、同重量の滅菌土壌のみを充填したシャーレを複数枚用意し、育成開始直後から育成終了までの8日、12日、16日の灌水頻度ごとの土壌含水比を測定した。また、加圧板法を用いこの滅菌土壌の水ポテンシャルを測定した。

III 結果と考察

1. 施肥回数処理実験 菌根菌を接種した実生はすべて菌根を形成していたため、菌根菌接種を以降菌根あり、対照区を菌根なしとする。施肥回数処理ごとの菌根形成率とTR比を表-1に示す。施肥回数ごとにみると1, 2, 3回処理区でいずれも30%前後とやや高い菌根形成率であったものの、全体的にみるとあまり高い形成率ではなかった。TR比は菌根形成なしでは施肥回数が2回を超えると高くなる傾向が見られた。一方菌根ありでは、施肥回数の違いによる傾向は見られないことから、このTR比の変化は菌根菌接種よりも施肥の回数による効果であることが伺えた。

地上部、地下部ごとの乾燥重量を図-1に示す。地上部は3回施肥で菌根ありの乾重が有意に大きくなった。また0, 2回施肥でも菌根ありの乾重が大きくなる傾向が見られたが、施肥回数による明確な差は見られなかった。一方地下部については、0, 3回施肥で菌根ありの乾重が大きくなる傾向は見られたが、地上部同様に施肥の回数による影響は見られなかった。

地上部長、地下部長を図-2に示す。地上部長はいずれの施肥回数も菌根ありの方が菌根なしよりも長くなり、2, 3回施肥では有意に長くなった。これに対して地下部長はいずれも菌根ありの方が菌根なしよりも短くなり、2回施肥では有意に短くなった。また、施肥の回数に伴い、菌根なしの地下部長が長くなる傾向がみられた。

これらのことから、施肥回数処理実験では、菌根菌を接種した実生では菌根形成による地上部長への効果は一部で見られたが、施肥回数との明確な関係は明らかにならなかった。一方、菌根菌を接種しない実生では施肥によるTR比および地下部長の変化が見られたことから、本研究における施肥回数処理は菌根なし実生の成長においては影響を及ぼしていることが示唆され、この理由として、施肥の効果が菌根菌接種の効果を上回っている可能性が考えられた(2)。

2. 灌水頻度処理実験 菌根菌を接種した実生は施肥回数処理と同様にすべて菌根を形成していた。灌水頻度処理ごとの菌根形成率とTR比を表-2に示す。菌根形成率は灌水頻度が下がるにつれて高くなり、8日に1回で

は 58.7%であったのに対し、16 日に 1 回では 80.1%と最大の形成率を示した。TR 比は灌水頻度が下がるにつれ菌根ありの TR 比が高くなり、16 日に 1 回では 4.36 になった。こうした傾向は菌根なしの処理区では見られないことから TR 比の増加は菌根菌接種および菌根形成の効果であることが考えられる。また、灌水頻度を下げることにより菌根形成率が上がることから土壌が乾燥することが菌根形成にプラスの影響を与えることが示唆された。

地上部、地下部ごとの乾燥重量を図-3 に示す。地上部乾重は菌根ありの方が大きい傾向が見られたが、灌水頻度による違いは見られなかった。地下部については、菌根形成率の高い 12 日、16 日に 1 回の灌水処理区で乾重が小さくなった。これは菌根を形成することにより、光合成産物の投資先が細根から菌根と菌糸へと切り替わったことを示すと考えられる。

灌水頻度別の土壌含水比測定結果を図-4 に示す。8 日に 1 回の灌水頻度では土壌含水比は育成期間中、常に 45%を超えていることがわかった。12 日に 1 回の灌水頻度では育成開始直後は 45%以上だったものが、育成終了間際には 40%以下にまで低下していた。さらに 16 日に 1 回の灌水頻度では育成開始直後から 40%を割り込み、育成期間中は 30%程度で推移していたことがわかった。育成終了時の土壌含水比はそれぞれ 8 日に 1 回が 46%、12 日に 1 回が 34%、16 日に 1 回が 31%であった。

加圧板法による土壌水分特性曲線とそれを用いて推定した灌水頻度別の土壌水ポテンシャルの推移を図-5 と図-6 に示す。本研究で用いた滅菌土壌の水ポテンシャルは 8 日に 1 回の灌水頻度ではほぼ 0 kPa であったのに対して、12 日に 1 回では実験期間中に低下する傾向が見られ、16 日に 1 回では期間を通じて明らかに低かった。このことから、灌水頻度を下げると土壌水ポテンシャルが低下し、特に 16 日に 1 回の灌水ではしばしば図-6 に水平線で示した毛管連絡切断含水量 (I) に近い状態になることが明らかになった。

以上のことから、灌水頻度処理実験では、灌水頻度を下げることにより、菌根形成率が増加し、そのことによる TR 比の増加が認められた。この実験系では 16 日に 1 回程度の灌水頻度により土壌含水比が育成期間中 30%台で推移したことが菌根形成に大きな影響を与えたと考えられる。また、菌根菌を接種したことによる地上部の成長促進効果は一部観察されたものの、灌水頻度との明確な関係は明らかにならなかった。育成期間が 6 ヶ月間と比較的短期間であったため、菌根形成のする / しないは観察可能ではある (6) もの、菌根共生効果の測定には短いことが考えられたため、今後は中長期にわたって

土壌の養水分条件を測定する実験を行う必要があることが考えられる。

表-1. 施肥回数別菌根形成率および TR 比

Table 1 Mycorrhizal formation rate and TR ratio by frequency of fertilization

frequency of fertilization		0	1	2	3	4
mycorrhizal formation (%)	mycorrhizas	22.06	32.96	31.59	29.99	23.58
	non-mycorrhizas	0	0	0	0	0
T/R	mycorrhizas	3.08	2.06	2.97	1.95	3.08
	non-mycorrhizas	2.61	2.20	1.65	2.04	3.03

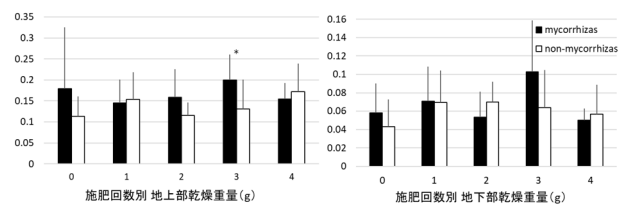


図-1. 施肥回数別実生乾重 (平均 g ± 標準偏差)

左 : 地上部 右 : 地下部 * $p < 0.05$ (Mann-Whitney U-test)

Fig. 1 Dry weight of seedlings by frequency of fertilization (mean ± SD)

Left : Aboveground Right : Belowground

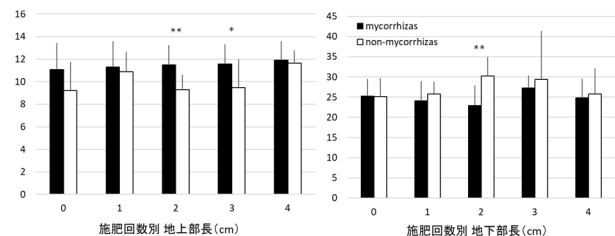


図-2. 施肥回数別実生長 (平均 mm ± 標準偏差)

左 : 地上部 右 : 地下部

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

Fig. 2 Length of seedlings by frequency of fertilization (mean ± SD)

Left : Aboveground Right : Belowground

表-2. 灌水頻度別菌根形成率および TR 比

Table 2 Mycorrhizal formation rate and TR ratio by frequency of irrigation

frequency of irrigation		8 days	12 days	16 days
mycorrhizal formation (%)	mycorrhizas	58.71	74.53	80.14
	non-mycorrhizas	0	0	0
T/R	mycorrhizas	1.76	3.29	4.36
	non-mycorrhizas	1.79	2.01	1.86

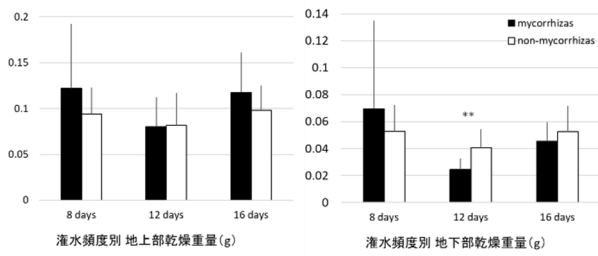


図-3. 灌水頻度別実生乾重 (平均 g±標準偏差)

左: 地上部 右: 地下部

** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test)

Fig. 3 Dry weight of seedlings by frequency of irrigation (mean ± SD)

Left : Aboveground Right : Belowground

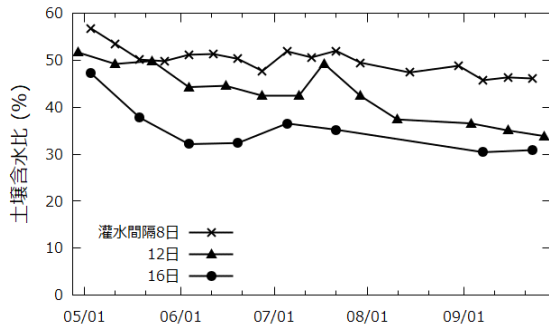


図-4. 灌水頻度別の土壌含水比 (%)

Fig. 4 Soil water content by frequency of irrigation (%)

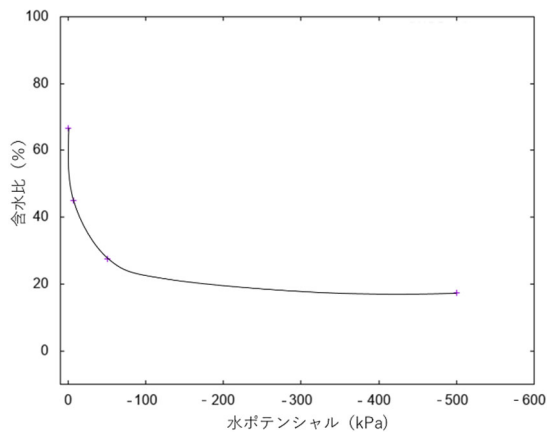


図-5. 滅菌土壌の水分特性曲線

Fig. 5 Water retention curve of sterilized soil

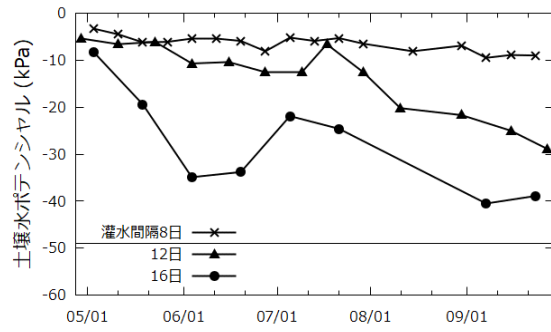


図-6. 土壌水ポテンシャルの推移

Fig. 6 Soil water potential in each watering schedule during the experiment.

引用文献

- (1) 犬伏和之・白鳥豊 (2020) 改訂土壌学概論. 朝倉書店, 48-50
- (2) Khalsa PD, Sigler L, Chakravarty P, Dancik BP, ERICKSON L, Mc Curdy D (2001) Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare-root nursery conifer seedlings. *New Forests* 22: 179-197.
- (3) 岡部宏秋 (1997) 森づくりと菌根菌. 林業科学技術振興所, 110pp
- (4) Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. Academic Press, 787pp
- (5) Wu B, Nara K, Hogetsu T (2001) Can ¹⁴C-labeled photosynthetic products move between *Pinus densiflora* seedlings linked by ectomycorrhizal mycelia? *New Phytologist* 149: 137-146
- (6) Yamada A, Maeda K, Ohmasa M (1999) Ectomycorrhizal formation of *Tricholoma matsutake* isolates on seedlings of *Pinus densiflora* in vitro. *Mycoscience* 40: 455-463