

# 三重県の人工林に生育するヒノキ細根におけるアーバスキュラー菌根菌の感染

喜多晃平（三重大生資）・松田陽介（三重大院生資）

人工林に生育するヒノキの細根におけるアーバスキュラー菌根（AM）菌の定着状況を明らかにするため、本菌の感染率を形態観察に基づいて調べた。14, 59, 91 年生の 3 林分において、土壌断面を 1 地点で作成し、10 cm 間隔で表層から 60 cm まで土壌ブロックを採取した。各ブロックに含まれるヒノキ細根、合計 10 cm/ブロックを顕微鏡観察に用いた。合計 46,355 細胞を観察し、全ブロックにおいて、ヒノキ細胞内にアラム型、パリス型の AM 菌根が観察された。本菌の感染率（33.2~42.8%）は林分間で有意差は認められず、全ての林分でパリス型菌根が優占していた。以上より、ヒノキ細根には AM 菌が恒常的に関わり、パリス型菌根を形成している割合が高いと推察された。

キーワード：アーバスキュラー菌根、感染率、顕微鏡観察、パリス型

## I はじめに

森林生態系における天然生林、二次林、人工林を構成する樹種の細根には菌根菌と呼ばれる土壌菌類が定着している (8)。そのうち、人工林のスギやヒノキにはアーバスキュラー菌根菌（以下、AM 菌）の関与が知られている (6, 12)。AM 菌は多様な生態系に生息する多種多様な陸上植物と関わっており (4)、植物の生育や群落形成に影響を及ぼす (3)。

日本と台湾に分布するヒノキや我が国の固有種のスギは主要な造林樹種であり (11)、AM 菌の定着が宿主樹木の生育を促進する可能性がある。ヒノキとスギの細根には AM 菌が感染しており、宿主細胞内で形態的にアラム (Arum) 型かパリス (Paris) 型の 2 種類の AM 菌根を形成させる (1, 12)。前者は宿主の細胞間隙を伸長する菌糸がその細胞内に侵入し、微細に分岐して樹枝状構造を形成する型である。後者は宿主細胞内を貫く菌糸が宿主細胞内でコイル状の菌糸体もしくはそこから樹枝状構造を形成する型である (10)。ヒノキへの AM 菌の感染は実験的に調べているが (2, 5)、自然条件下でどの程度関わっているのか不明である。そこで本研究では、人工林に生育するヒノキ細根における AM 菌の定着状況を明らかにするため、本菌の感染率を形態観察にもとづいて調査した。

## II 材料と方法

1. 調査地概況 調査地は三重県伊勢市内に位置するヒノキ人工林で、相互に最大 1.4 km 離れた 14, 59, 91 年生の 3 林分である。いずれの林分も褐色森林土に分類され、林床にはシダ植物が繁茂していた。調査地から 10 km 離れた気象台アメダス小俣観測所で計測された 2015 年の年平均気温は 15.9 °C、年間降水量は 1,838.5 mm であった。

2. 試料の採取 2015 年 12 月 8 日に、各林分内の 1 地点で深さ 60 cm の土壌断面を作成し、10 cm 間隔で 10 cm×10 cm×10 cm の土壌ブロックを採取した。採取した土壌はクーラーボックスに入れて、大学に持ち帰った。各土壌ブロックから土壌 300 ml を 2 mm, 1 mm の順に上から重ねた篩の上に移し、水道水で土壌を洗い流した。篩に残存した

根系をピンセットでトレイに移し、肉眼でヒノキ根系を選別した。各土壌ブロック、異なる部位の 3 根系以上を AM 菌の観察に用いた。

3. AM 菌の観察 ヒノキ根系に付着する土壌粒子は、小型超音波洗浄機 (vc-1 AS ONE CORPORATION) でさらに除去した。洗浄した根端部分で直径 2 mm 以下の細根を 5 mm 長に細断し、合計 10 cm 長を顕微鏡観察に用いた。細断した試料を PFA 容器 (PF-90, マルエム) に入れ、10% (W/V) 水酸化カリウム水溶液に浸漬し、121 °C、15 分間の加熱処理を脱色されるまで 3~4 回行った (7)。その後、試料を 1.5 ml チューブに入れ、0.05% トリパンブルー染色液を加えものを 90 °C で 20 分間以上加熱処理をして菌体の染色を行った。余分な染料を落としてから、各ブロックにつきスライドガラス 3 枚に細根をのせて、内皮以内の中心柱を取り除いてからカバーガラスをかぶせた。

細根細胞内における AM 菌の菌体構造の有無の観察は、光学顕微鏡 (BX51, OLYMPUS, 最大 400 倍) 下でラインインターセクション法にしたがって行った (9)。接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 20 倍の倍率で観察を行い、細根が観察された 1 視野を 1 観測点として、細根細胞数、その内部における菌体構造の有無を記録した。菌体構造は AM 菌由来の菌糸コイル、樹枝状体、AM 菌以外の糸状菌類の構造物に大別した。1 スライドあたり 8~18 観測点を対象として、1,000 細胞以上になるまで実施した。その後、各土壌ブロックにおける AM 菌の感染率は、総細胞数に対する菌糸コイルと樹枝状体の細胞数として算出した；AM 菌感染率 (%) = ((菌糸コイルが観察された細胞数) + (樹枝状体が観察された細胞数)) / 総観察細胞数 × 100。

## III 結果と考察

今回の観察で合計 46,355 細胞の検鏡を行った。いずれの土壌ブロックにおいても、細胞内にはアラム型、パリス型の AM 菌根が観察された (図-1)。そのため AM 菌は、恒常的にヒノキ細根に関わっているものと推察された。AM 菌に特徴的な構造物以外には、それらの嚢状体や菌

糸, さらには AM 菌以外の内生菌類も観察された (データ示さず)。内生菌類の菌糸や構造物はメラニン様の沈着があるため暗茶色系を呈しており, トリパンプルー染色をした場合の AM 菌による青系の呈色状況とは明瞭に異なった。

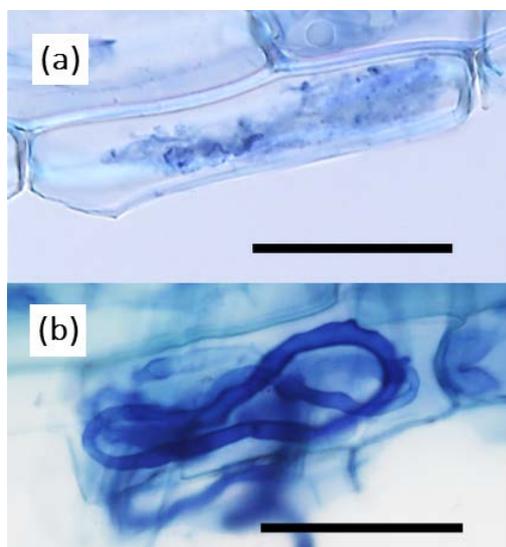


図-1. ヒノキ細根で観察されたアラム型 (a) とパリス型 (b) のアーバスキュラー菌根  
バーは 50  $\mu\text{m}$ .

14, 59, 91 年生林分における AM 菌感染率は, それぞれ  $36.6 \pm 12.9$ ,  $33.2 \pm 18.0$ ,  $42.8 \pm 3.2\%$  であり (平均値 $\pm$ SD,  $n=5$ ), 林分間で有意差は認められなかった (1 way ANOVA,  $df=2$ ,  $F=0.72$ ,  $p=0.51$ )。そのため, 樹齢が AM 菌の感染程度に及ぼす影響は低いものと考えられた。ヒノキ天然林において, 実験的に有機物層や無機物層を基質として充填させたイングロースコア法で検出されたヒノキ細根では, AM 菌の感染率は 30~40% 程度であった (2, 5)。本研究で示された AM 菌感染率は過去の知見と類似しており, これらの結果はヒノキ細根の 1/3 から半分程度には AM 菌が定着していることを示唆する。

AM 菌根が形成された細胞におけるアラム型とパリス型の検出割合は林分間で有意差はなく ( $\chi^2 = 5.49$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.48$ ), 14 年生でそれぞれ 0.8%, 35.9%, 59 年生で 0.9%, 32.3%, 91 年生で 0.93%, 41.9% と全ての林分でパリス型が優占していた。AM 性植物では, アラム型かパリス型のいずれかの菌根型が卓越しており, 木本植物では後者の菌根が多く観察されている (1)。本研究でも, パリス型の検出割合が高く, 従前の知見を支持していたが, 今回はアラム型とパリス型の両型の菌根が同時に形成される事例を明示した。異なる型の菌根が形成される要因やその意義は不明であるが, 今後, その規定因子を探っていく必要がある。

本研究において, ヒノキ細根には AM 菌が定着しており, 主にパリス型菌根が形成されることを明らかにした。今後は様々な地域, 生育環境におけるヒノキ林分を対象

に調査を進める必要がある。

謝辞 本研究の遂行に際して, 研究費の一部は科研費 (25304026, 15H04519) による。

#### 引用文献

- (1) Dickson S, Smith FA, Smith SE (2007) Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza* 17: 375–393
- (2) Fujimaki R, McGonigle TP, Takeda H (2005) Soil microhabitat effects on fine roots of *Chamaecyparis obtusa* Endl.: a field experiment using root ingrowth cores. *Plant Soil* 266: 325–332
- (3) van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69–72
- (4) van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol* 205: 1406–1423
- (5) Hishi T, Fujimaki R, McGonigle TP, Takeda H (2008) Relationships among fine roots, fungal hyphae and soil microarthropods among different soil microhabitats in a temperate coniferous forest of *Chamaecyparis obtusa*. *Eur J Soil Biol* 44: 473–477
- (6) Hishi T, Tateno R, Fukushima K, Fujimaki R, Itoh M, Tokuchi N (2016) Changes in the anatomy, morphology and mycorrhizal infection of fine root systems of *Cryptomeria japonica* in relation to stand ageing. *Tree Physiol*, doi: 10.1093/treephys/tpw076
- (7) Matsuda Y, Murahashi F, Kimoto M, Nakanishi K, Ito S (2005) Arbuscular mycorrhizas on *Athyrium yokoscense* and *A. niponicum* grown at a lead-contaminated site. *Mycoscience* 46: 261–264
- (8) 松田陽介・伊藤進一郎 (2005) 森林生態系における外生菌根共生. *森林科学* 45: 32–39
- (9) McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method which gives objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115: 495–501
- (10) Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis* 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press
- (11) 鈴木和夫・福田健二 (2012) 図説日本の樹木. 朝倉書店
- (12) Yamato M, Iwasaki M (2002) Morphological types of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of understory plants in Japanese deciduous broadleaved forests. *Mycorrhiza* 12: 291–296