

カバノキ属樹種における根片埋設処理による外生菌根の形成と成長

袴田哲司・山田晋也・山本茂弘

農林技術研究所 森林・林業研究センター

Formation of Ectomycorrhiza and Growth of Young Seedlings, *Betula* spp.

Embedded with Root Tip Inoculum

Tetsuji Hakamata, Shinya Yamada and Shigehiro Yamamoto

Forestry and Forest Products Research Center / Shizuoka Res. Inst. of Agri. and For.

Abstract

To clarify the effect of ectomycorrhiza on growth of *Betula* spp., young seedlings of *B. grossa* and *B. globispica* were embedded with the root tip of bearing *B. grossa* formed with ectomycorrhiza. At 5 months after application, black ectomycorrhiza, which was morphologically regarded as *Cenococcum geophilum*, were formed in 74% and 52% of young seedlings of *B. grossa* and *B. globispica*, respectively. These seedlings were replanted in a cell tray and growth was investigated at 5, 12 and 25 months after. In *B. grossa*, mean height and diameter at ground level at 25 months after replanting were significantly greater for ectomycorrhiza formed seedlings than for ectomycorrhiza non-formed seedlings, and average number of leaves on ectomycorrhiza formed seedlings at 12 and 25 months after replanting was also significantly higher than that of ectomycorrhiza non-formed seedlings. Similarly in *B. globispica*, mean height and diameter at ground level at 25 months after replanting were significantly greater for ectomycorrhiza formed seedlings than for ectomycorrhiza non-formed ones, and average number of leaves of ectomycorrhiza formed seedlings at 5, 12 and 25 months after replanting were significantly higher than that of ectomycorrhiza non-formed seedlings.

キーワード：ジゾウカンバ, *Cenococcum geophilum*, 苗高, 根元径, 葉数, ミズメ

I 緒 言

カバノキ科カバノキ属の日本産樹種の中で、最も温暖な地域に自生するミズメ (*Betula grossa*) は⁶⁾、建築材や器具材に使われる重要な有用広葉樹である。そのため、静岡県では育苗技術の開発に取り組み、組織培養による効率的な増殖手法を確立した⁵⁾。これによってクローンの大量増殖が可能になり、それらを馴化した後の成長も調査されている¹⁰⁾。一方、静岡県が全国分布の南限であり、関東山地を中心としたブナクラス域に自生するジゾウカンバ (*Betula globispica*) もカバノキ属の樹種であり^{7,13)}、静岡県と長野県で絶滅危惧Ⅱ類に指定されている。そのため、増殖手法が検討され、実生繁殖以外に組織培養による個体再生と馴化が可能であることが明らかになった¹⁵⁾。今後、絶滅危惧種の保全対策として、自生地またはそれ以外の場所に植栽

が不可欠であると判断された場合、活着を確実にし良好な成長を保つための技術的な対応が必要である。

カバノキ科の樹種は、マツ科やブナ科、フタバガキ科の樹種と同様に、外生菌根が形成されることによって樹木の成長が促進される場合がある^{4,8)}。外生菌根菌は、樹木から光合成産物のエネルギー(炭素源)などを享受する一方、土壌中の養分や水分を樹木に供給し、乾燥や土壌病害から根系を守るなどの役割を担っている¹¹⁾。日本のカバノキ属樹種において、ミズメやシラカンバ、ジゾウカンバでは外生菌根の形成による成長促進効果が実験的には報告されており^{1,2,3,9)}、これらの苗を林地に植栽した場合に活着率や成長の向上が期待される。そのため、培養菌糸体や孢子、外生菌根を含む腐植層などの土壌、すでに菌根が形成されている苗などを接種源として^{8,12,14)}、菌根の形成を促すことが必要である。しかし、培養が不可能である場合や、子実体が形成されないため孢子を得

られない種も多い。接種源とした土壤中の養分を樹木が吸収し、菌根形成の効果が不明瞭になることや、接種源とする苗の量的な確保と大きさの点で制約を受ける場合もある。そのため、同属樹種の小根片を土壌へ埋設することがジゾウカンバで試みられ、その結果、菌根の形成と葉数の増大が確認された¹⁾。しかし、他の樹種でも応用が可能であるかは明らかでなく、菌根の形成状況や苗の成長促進効果についても知見を集積することが必要である。

そこで、すでに菌根が形成されているミズメ成木の根片を接種源として土壌への埋め込みを行い¹⁾、ミズメ稚苗の外生菌根の形成状況と成長に及ぼす影響を調査した。また、既報と同様にジゾウカンバ稚苗へも根片処理を行い、異なる育苗条件での効果を明らかにした。

II 材料及び方法

2007年10月に川根本町で採種したミズメと静岡市葵区で採取したジゾウカンバの種子をシャーレ内の湿らせたろ紙上で発芽させ、芽生えを培養ビン内のオートクレーブ滅菌(121℃, 20分)した鹿沼土で育苗し、供試稚苗とした。2008年1月中旬に、静岡県農林技術研究所森林・林業研究センターの第二苗畑に植栽されているミズメの根を土壌のA層から採取し、表面に付着した土壌を洗い流した。これらの根には、形態的な特徴から少なくとも4種類の外生菌根(黒色、白色平滑、白色絹糸状、褐色棍棒状)が形成されていた。これらから、生重量約0.005g、長さ6~9mmの根片を切り取り、培養ビン内の稚苗の根元に2片埋め込み、24℃、9300Lxの蛍光灯照明16h、照明なし18hの条件でインキュベータ内で育苗した。ミズメ稚苗の供試数は根片処理区と無処理区でそれぞれ23個体、ジゾウカンバ稚苗はそれぞれ25個体とした。約3ヶ月後(2008年4月下旬)に稚苗を培養ビンから取出し、優占的であった黒色の菌根の形成状況を実体顕微鏡で観察し、菌根が形成された個体数と形成されていない個体数を調査した。なお、稚苗には褐色棍棒状の菌根も認められたが、ミズメで1個体、ジゾウカンバで2個体のみであり、優占度もわずかであったため考慮しなかった。この結果に基づいて、根片処理・菌根形成区、根片処理・菌根非形成区、無処理・菌根非形成区の3つの試験区を新たに設定した。ミズメでは、それぞれ17個体、6個体、23個体に、ジゾウカンバでは、それぞれ13個体、12個体、25個体になった。赤玉土(2~5mm)、パーミキュライト、ピートモス(pH未調整)を3:1:1の容積比で混合した用土に水道水を含ませた後、オートクレーブで滅菌し(121℃, 2時間)、これを用いて1穴当たりの容量110mlの25穴

セルトレイに稚苗を植栽した。植栽後は約50%遮光下の温室内でミスト灌水により管理し、セルトレイに植栽した約5ヶ月後(2008年9月中旬)と約12ヶ月後(2009年4月下旬)および約25ヶ月後(2010年5月下旬)に、生存と枯死の個体数、葉数、苗高を調査した。根元径は12ヶ月後と25ヶ月後にデジタルノギスで測定した。

生存・枯死個体数については χ^2 検定を行い、葉数、苗高、根元径については、Scheffeの多重比較検定を行った。有意差の認められなかった項目は、データを表示しなかった。

III 結 果

ミズメ稚苗の根片処理区では、23個体中17個体に黒色の菌根が形成されていた(表1, 図1)。黒色の菌根は、形態から不完全菌類である*Cenococcum geophilum*であると推定した。しかし、無処理区ではすべての個体で菌根は全く形成されていなかった。これらの苗はセルトレイへの植栽後に枯死する個体も認められ、生存個体数は減少したが、各経過月での生存・枯死個体数は試験区間に有意差が認められなかった。葉数では、植栽の5ヶ月後から試験区間に有意差が認められ、12ヶ月後と25ヶ月後では根片処理・菌根形成区での平均葉数がそれぞれ1.6枚、3.2枚で、根片処理・菌根非形成区、無処理・菌根非形成区を有意に上回っていた(図2)。なお、根片処理・菌根非形成区と無処理・菌根非形成区で平均葉数が1.0枚を下回ることがあったが、これは主軸が生存しているにもかかわらず、葉が着生してない個体が多かったためである。植栽の12ヶ月後までは3つの試験区間での平均苗高と平均根元径で有意差は認められなかった。しかし、25ヶ月後では根片処理・菌根形成区の平均苗高が3.6cm、平均根元径が0.72mmとなり、それぞれ根片処理・菌根非形成区とは有意差が認められなかったものの、無処理・菌根非形成区よりも有意に大きかった(図3, 4)。

ジゾウカンバ稚苗でも、無処理区の個体にはすべて菌根は形成されていなかったが、根片処理区では供試した半数以上の13個体に菌根が形成されていた(表1, 図1)。植栽の5ヶ月後までは、3つの試験区それぞれで生存個体数に変化はなかった。12ヶ月後と25ヶ月後でも根片処理・菌根形成区での生存個体は減少しなかったが、根片処理・菌根非形成区と無処理・菌根非形成区では生存個体数が減少した。しかし、生存・枯死個体数に有意差は認められなかった。平均葉数は、植栽の5ヶ月後、12ヶ月後、25ヶ月後のいずれにおいても根片処理・菌根形成区では1.6枚以上で、根片処理・菌根非形成区と無処理・菌根非形成区のそれぞれ0.7枚以下と比較して有意に多かった

(図5). 移植の5ヶ月後では、平均苗高と平均根元径のそれぞれにおいて、3つの試験区間で有意差が認められなかった。移植の12ヶ月後においても、3つの試験区間の平均苗高は2.7~3.7cmの範囲で有意差は認められなかったが、根片処理・菌根形成区の平均根元径は0.74mm

で、根片処理・菌根非形成区の0.60mmとは有意差が認められた。25ヶ月後の根片処理・菌根形成区の平均苗高と平均根元径はそれぞれ3.8cm、0.92mmで根片処理・菌根非形成区と無処理・菌根非形成区よりも有意に大きかった(図6,7)。

表1 ミズメおよびジゾウカンバ稚苗の菌根形成苗数

樹種	処理区	菌根形成苗数	菌根非形成苗数
ミズメ	根片処理	17	6
	無処理	0	23
ジゾウカンバ	根片処理	13	12
	無処理	0	25

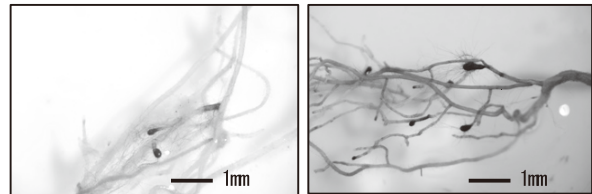


図1 根系に形成された黒色の菌根 (左: ミズメ 右: ジゾウカンバ)

形態的に *Cenococcum geophilum* であると推定した。

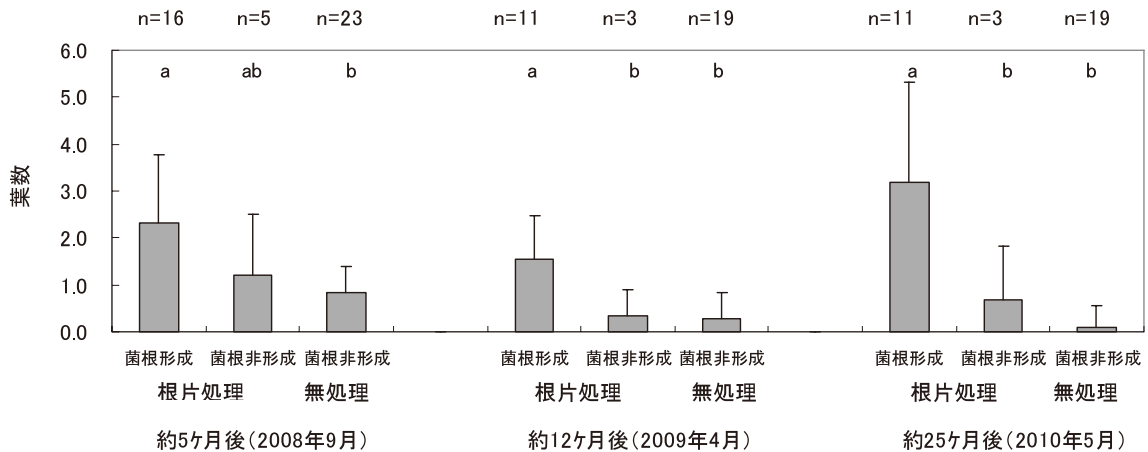


図2 セルトレイへ植栽の約5ヶ月後、12ヶ月後、25ヶ月後におけるミズメ稚苗の葉数

エラーバーは標準偏差を示す。経過月ごとに異なる符号には5%水準で有意差あり (Scheffeの多重比較検定)。

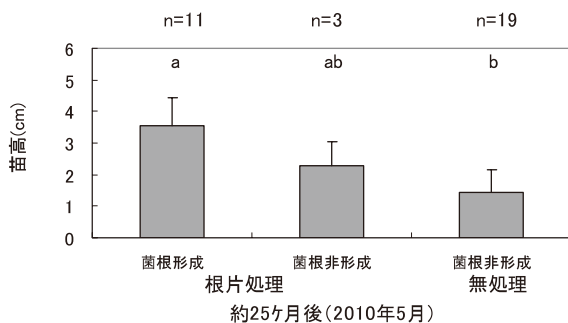


図3 セルトレイへ植栽の約25ヶ月後におけるミズメ稚苗の苗高

エラーバーは標準偏差を示す。異なる符号には5%水準で有意差あり (Scheffeの多重比較検定)。

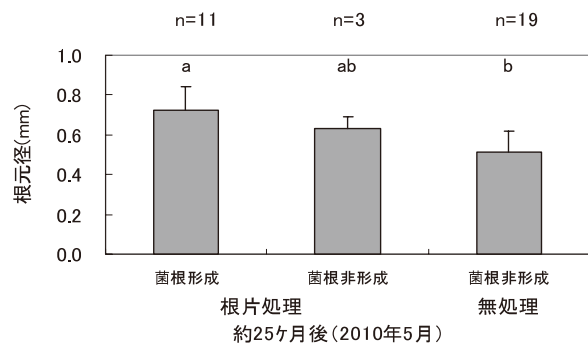


図4 セルトレイへ植栽の約25ヶ月後におけるミズメ稚苗の根元径

エラーバーは標準偏差を示す。異なる符号には5%水準で有意差あり (Scheffeの多重比較検定)。

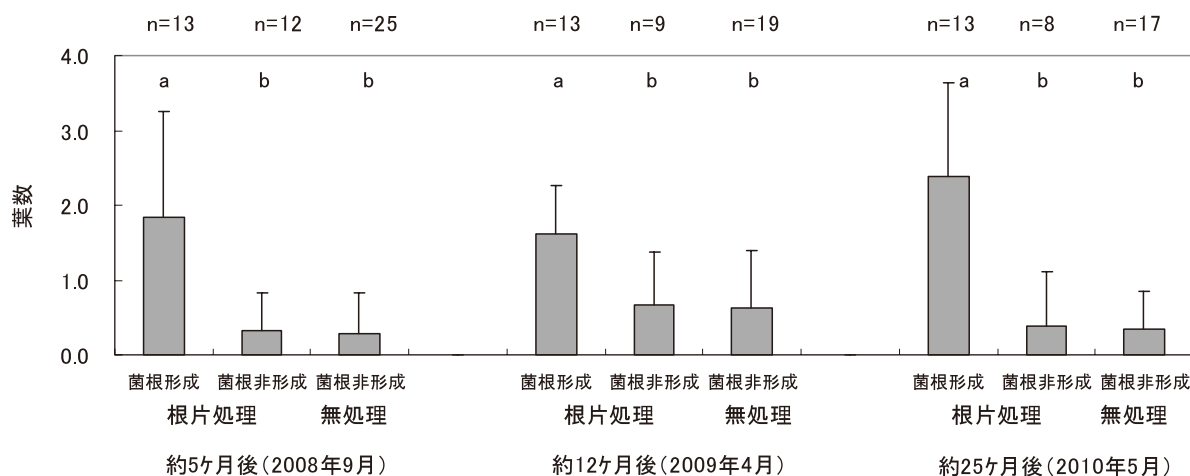


図5 セルトレイへ植栽の約5ヶ月後、12ヶ月後、25ヶ月後におけるミズメ稚苗の葉数

エラーバーは標準偏差を示す。経過月ごとに異なる符号には5%水準で有意差あり (Scheffeの多重比較検定)。

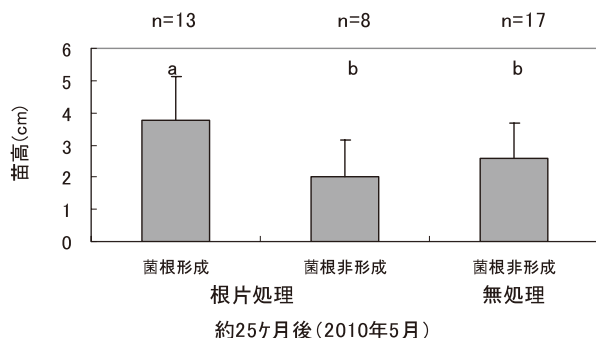


図6 セルトレイへ植栽の約25ヶ月後におけるジゾウカンバ稚苗の苗高

エラーバーは標準偏差を示す。異なる符号には5%水準で有意差あり (Scheffeの多重比較検定)。

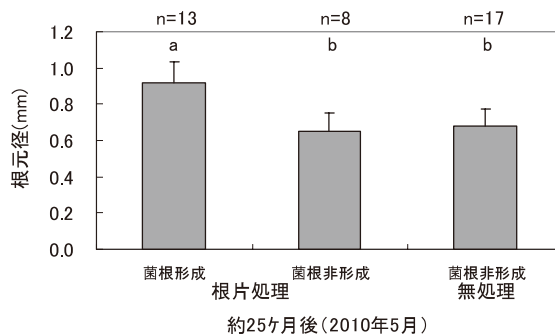


図7 セルトレイへ植栽の約25ヶ月後におけるジゾウカンバ稚苗の根元径

エラーバーは標準偏差を示す。異なる符号には5%水準で有意差あり (Scheffeの多重比較検定)。

IV 考 察

樹木の根に菌根を人工的に形成させる方法として、すでに菌根が形成されている苗木の植栽が行われている⁸⁾。これを簡便化した方法で、すでに菌根が形成されている同属樹種の根片を苗木の根元の土壌へ埋設することも一つの手法になることが明らか⁹⁾にされた。本研究でも、ミズメ成木の根片埋設で、ミズメ苗では74%、ジゾウカンバ苗では52%の個体に黒色の菌根を形成させることが確認できた。本法は、すでに菌根が形成されている1本の苗や成木からさらに多くの接種源を得ることができ、接種の効率化を図るうえで有効であると考えられた。今回のように小さい根片を埋設するだけでも供試個体数の半数以上に菌根が形成されているため、培養ビン中へ埋設

するミズメ根片の量を増大させるなどの工夫により、さらに菌根形成個体数の割合を高めることが可能であろう。ただし、接種源とした植栽されているミズメの根には白色平滑、白色絹糸状、褐色棍棒状の菌根も認められたが、これらのうち褐色棍棒状の菌根のみが少しの稚苗に形成されただけであったため、応用できる菌種には限りがあると考えられた。

本試験でミズメおよびジゾウカンバの稚苗の根系に形成された菌根は *Cenococcum geophilum* の共生によるものと推察されたが、この菌種は子実体を形成しないものの、菌根が黒色であることや菌鞘の構造的な特色があることから、形態により種が判別できる¹⁰⁾。また、接種源としたミズメ成木の根片に形成されていた黒色の外生菌根

から菌糸体が MMN 寒天培地へ分離されたこと、さらに同液体培地で培養した菌糸体の DNA 分析により、*C. geophilum* であると判別されたことから (袴田ら, 未発表), この外生菌根は *C. geophilum* である可能性が高い。

外生菌根の形成によるカバノキ属樹木の成長促進については、シラカンバで根に優占する外生菌根菌が実生苗の成長を促進すること、菌根形成率が高いミズメ苗で成長が促進されたことが報告されている^{2,3,9}。また、*C. geophilum* であると推察された黒色の菌根が形成されたジゾウカンバでは、菌根が形成されなかった個体よりも葉数が有意に増大することも明らかにされている¹⁾。本研究では、これらと同様に有用広葉樹のミズメでは黒色の外生菌根が形成された個体で葉数が増える結果が得られ、ジゾウカンバでは葉数の増大を再確認できた。また、両樹種ともに移植の 25 ヶ月後には菌根が形成された個体の苗高と根元径が、形成されなかった個体よりも有意に上回り、5 ヶ月後と 12 ヶ月後では明瞭ではなかった成長促進効果が、育苗期間が長くなることにより明確に表れた。

今回の試験では、赤玉土、ピートモス、パーミキュライトを混合した用土で育苗しており、培養土を混合していないため用土中の養分は既報の試験よりも少ないと考えられる¹⁾。そのため、両樹種で稚苗の成長が悪く、主軸が生存しているにもかかわらず葉が着生していない個体もあった。特に、菌根が形成されなかった苗では 1 個体あたりの平均葉数が 1.0 以下の場合もあり、この傾向が顕著であった。このような有機物が少なく養分が乏しいと考えられる土壌条件でも、外生菌根が形成されたミズメやジゾウカンバでは葉数、苗高、根元径が有意に大きくなることが明らかになったが、ミズメの正常な生育には菌根の形成が不可欠であるとも言われており⁹⁾、これを支持する結果であると考えられた。土壌中の養分量が樹木の成長に対する菌根菌の効果に影響を与えることは広く知られており、土壌養分量の違いによるさらなる検証は必要である。一方、根片を埋設処理しても菌根が形成されなかった稚苗では葉数、苗高、根元径のいずれにおいても、無処理・菌根形成区と有意差がなかったため、根片を埋設することによる他の影響、例えば、根片の成分や根圏に生息する他の微生物などの影響は少ないと思われる。

一般に、外生菌根の形成により、リン酸や窒素の吸収が増大するといわれている⁴⁾。今回は稚苗が小さく分析に必要なサンプルが量的に確保できなかったが、さらに成長させた時点で、苗木の成分を分析すれば菌根菌の役割が明確になると思われる。なお、*C. geophilum* は分離培養が可能であり、MMN 培地や FH 培地での増殖が可

能であるため、無菌的に育成している宿主植物に本菌のみを接種することも興味深い。ミズメの組織培養苗に分離した菌根菌を接種した場合、菌根の形成が認められなかった例もあるが⁹⁾、異なる菌種や培養条件によっては、菌根が形成される可能性もあるため、ミズメやジゾウカンバの組織培養中に *C. geophilum* を接種して、菌根の形成や苗の成長を調査すれば、より詳細な効果を解明できると思われる。

V 摘 要

カバノキ科樹種の根系に形成された外生菌根が稚苗の成長に及ぼす影響を明らかにするため、ミズメとジゾウカンバの実生苗の根元に、外生菌根が形成されているミズメ成木の根片を埋設処理し、菌根の共生状況を調査した。ミズメでは 74% の個体に、ジゾウカンバでは 52% の個体に黒色の外生菌根を形成させることが可能であった。ミズメとジゾウカンバの稚苗の根系に優占的に形成された外生菌根は、形態から *C. geophilum* であると推察された。

これらの稚苗を、根片処理・菌根形成区、根片処理・菌根非形成区、無処理・菌根非形成区の 3 区に分けて、赤玉土、パーミキュライト、ピートモスを 3:1:1 に混合した用土に植栽し、成長を調査した。ミズメでは、移植の 12 ヶ月後と 25 ヶ月後の根片処理・菌根形成区の平均葉数が根片処理・菌根非形成区、無処理・菌根非形成区を有意に上回り、25 ヶ月後の根片処理・菌根形成区の平均苗高と平均根元径も有意に大きかった。ジゾウカンバでは、植栽の 5 ヶ月後、12 ヶ月後、25 ヶ月後における根片処理・菌根形成区の葉数が根片処理・菌根非形成区と無処理・菌根非形成区を有意に上回り、25 ヶ月後には平均苗高と平均根元径でも有意に大きかった。

引 用 文 献

- 1) 袴田哲司・山田晋也・片井秀幸・山本茂弘(2010) : 外生菌根を形成したジゾウカンバ実生苗の成長. 中森研 58, 17~18.
- 2) Hashimoto, Y. and Hyakumachi, M. (2001) : Effects of isolates of ectomycorrhizal fungi and endophytic *Mycelium radialis atrovirens* that were dominant in soil from disturbed sites on growth of *Betula platyphylla* var. *japonica* seedlings. Ecol. Res. 16, 117~125.
- 3) 橋本 靖(2003) : シラカンバに定着する外生菌根菌の生態とその役割に関する研究. 日菌報 44, 67~74.

- 4) 宝月岱造(2002) : 樹木の生長を助ける外生菌根菌. 植調 36, 213~220.
- 5) Ide, Y. (1987) : *In vitro* Clonal Propagation of mature Japanese cherry birch. J. Jpn. For. Soc. 69, Vol.4, 161~163.
- 6) 石谷憲男 (1964) : ミズメ. 原色日本林業樹木図鑑, 地球出版, 東京, 70~71.
- 7) 伊藤孝司 (1989) : カバノキ科. 日本の野生植物 木本 I, 平凡社, 東京, 52~65.
- 8) 菊地淳一(1999) : 森林生態系における外生菌根の生態と応用. 日生態誌 49, 133~138.
- 9) 駒田 旦・今岡 貢・牛木千恵・山本広基(1994) : 外生菌根菌による広葉樹(ミズメ)の生育促進. 土と微生物 44, 33~42.
- 10) 近藤 晃・山本徳子(1995) : ミズメ組織培養苗の初期成長と形態. 日林中支論 43, 111~112.
- 11) 松田陽介・伊藤進一郎(2005) : 森林における外生菌根のはたらき. 森林科学 45, 32~39.
- 12) Mori, S. and Marjenah (1994) : Effect of charcoaled rice husks on the growth of *Dipterocarpaceae* seedlings in East Kalimantan with special reference to ectomycorrhiza formation. J. Jpn. For. Soc. 76, 462~464.
- 13) 社団法人日本林業技術協会(1968) : 原色日本林業樹木図鑑. 第2巻, 地球出版, 東京, 265pp.
- 14) Smith, S. E. and Read, D. J. (2008) : Arbuscular mycorrhizas. Mycorrhizal symbiosis. 3rd edition. Academic Press, 11~187.
- 15) 山本茂弘・山田晋也・片井秀幸・袴田哲司(2008) : 冬芽培養によるジゾウカンバ幼植物体の再生 静岡県農林技研報 1, 71-78.