

ハンノキ属樹種稚苗の根粒形成と生育状況[†]

袴田哲司¹⁾・山本茂弘¹⁾

¹⁾ 農林技術研究所森林・林業研究センター

Nodulation and Growth of Young Seedlings, *Alnus* spp.

Tetsuji Hakamata¹⁾ and Shigehiro Yamamoto¹⁾

¹⁾ Forestry and Forest Products Research Center / Shizuoka Res. Inst. of Agric. and For.

Abstract

Nodulation and growth of young seedlings were investigated, in near-threatened trees, *Alnus trabeculosa* and soil saving trees, *A. hirsuta* var. *sibirica*. Nodulose young seedlings of *A. trabeculosa* were observed after application of root nodules and/or root chips from mature trees on the roots of young seedlings, especially, nodulose seedlings were increased applied with root nodules and root chips. Root length of these young seedlings were shorter than non-nodulose seedlings, but the number of leaves and chlorometer readings were higher than that of non-nodulose seedlings. Nodules were recognized in young seedlings of *A. hirsuta*, var. *sibirica* applied with suspension of crushed nodules of *A. trabeculosa*. Moreover, the number of leaves, length of leaf and chlorometer readings were improved on seedlings treated with a water solution of potassium phosphate and crushed nodules. Fungus that forms nodules on the roots of *A. trabeculosa* have the properties of *Frankia* spp., because this fungus could form nodules on the roots of *A. hirsuta* var. *sibirica*.

キーワード：根粒, サクラバハンノキ, フランキア, ヤマハンノキ

I 緒 言

カバノキ科ハンノキ属の樹種であるサクラバハンノキ (*Alnus trabeculosa*) は、日当たりの良い湿地に自生する成長が早い樹木で、日本では岩手県から宮崎県にかけて分布している^{3,4)}。静岡県では、浜松市、磐田市、湖西市などの県西部に点在し⁹⁾、開発行為などによる個体数の減少が指摘されており、県版レッドデータブックで準絶滅危惧種（存続基盤が脆弱な種）に指定されている⁸⁾。これらを保全する場合、自生地の個体保護や環境改善などの対策が有効だと考えられるが、個体数の減少が著しい場合には、活力ある苗木を育成し、現地に植栽することも必要である。

ハンノキ属の樹木は、いわゆる肥料木として活用され、

瘠悪地での地力増強に役立っている。これらの樹木の根系には根粒が形成され、それによって大気中の窒素を固定することが可能になるため、樹体の成長が旺盛になる¹²⁾。しかし、サクラバハンノキは生息地が限られ個体数が少ないことから研究事例が少なく、ハンノキ属の樹種であるにもかかわらず、根粒の形成が樹体の成長に及ぼす影響についてほとんど明らかになっていない。

一方、サクラバハンノキに根粒を形成させる菌類の分離や同定についても報告がない。根粒菌の中には、ある植物から採取したものを他の植物に接種することが可能な場合があり⁷⁾、実用的な見地からは、このような交互接種による根粒菌の群分けは有用とされている¹¹⁾。したがって、サクラバハンノキに根粒を形成させる菌類が、他のハンノキ属樹種にも根粒を形成させることが可能で

[†] 本報告の一部は第 119 回日本森林学会（府中市）で口頭発表した。

あれば、それをある程度推定できると考えられる。また、植物の成長には窒素、リン酸、カリウムの三要素が重要であるが、リン酸やカリウムの有無と根粒形成の有無を組合せて生育状況を調査すれば、根粒に窒素固定能力があることも類推できる。

本研究では良好な苗木育成につなげるため、サクラバハノキの稚苗に根粒を形成させることを試み、根粒が形成された個体と形成されなかった個体の成長状況を調査した。また、根粒を形成させる菌類を推定するため、治山用の樹種として活用されているヤマハノキ (*Alnus hirsuta* var. *sibirica*) 稚苗にサクラバハノキの根粒粉末物を処理し、合わせてリン酸カリウムを添加した場合の稚苗の生育の状況についても調査したので、それらについて報告する。

II 材料及び方法

1. サクラバハノキ稚苗への根粒、根片の処理

静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター構内に植栽されている3本のサクラバハノキ成木を種子や根粒、根片の採取母樹とした。これらの成木は、静岡県浜松市に自生する個体から採種、播種した実生苗を育成したものである。

母樹から得られた種子を滅菌した播種専用土に播種し、長さ1cm未満の発芽した芽生えを容量45mLのガラス培養ビンに詰めた細粒鹿沼土約12mLに1本ずつ植栽した。培養ビン内の鹿沼土は、事前に脱塩水10mLを加え、オートクレーブ滅菌(120°C・30min)しておいた。植栽の7日後に、前述のサクラバハノキ成木の根系から、根粒および根片を採取し、直径約1mmの根粒の裂片5個や長さ約3mmの根片3本を各ガラス培養ビン内の芽生えの根元に埋め込んだ。試験区は、根粒+根片区、根粒区、根片区、無処理区とし、各区の供試数は23とした。培養ビンにはラップを掛け、適宜滅菌脱塩水を添加し、室温(21.6~35.7°C)、 $27\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の蛍光灯照明で12h、照明なしで12hの条件で実験室内の培養棚で育成した。124日後にガラス培養ビンから稚苗を取り出し、生存と枯死した個体数、根粒形成の有無を確認した後、苗高、根長、葉数、最も大きい葉の長さを測定した。また、葉を葉緑素計(SPAD-502, MINOLTA)で測定し、当機器特有の数値(SPAD値)で評価した。

測定後に、これらの稚苗を72穴のセルトレイへ移植した。その際の用土は、赤玉土:ピートモス:パーミキュライトを3:1:1(容積比)に混合し、オートクレーブ滅菌(120°C・2h)したものとした。これらを、前述と同

様の培養棚で育成し、適宜滅菌脱塩水を灌水した。92日後に稚苗の生存と枯死の個体数、組織の壊死や黄化が認められない正常な葉の枚数を測定した。

2. ヤマハノキ稚苗への根粒とリン酸カリの処理

山林で採種したヤマハノキ種子をシャーレ内の湿らせた濾紙上で発芽させ、サクラバハノキ稚苗の場合と同様に芽生えをガラス培養ビン内の鹿沼土に植栽した。これらの稚苗に根粒粉末懸濁液0.5mLやリン酸カリウム水溶液0.07mLを処理した。根粒粉末懸濁液は、前述のサクラバハノキ成木から根粒を採取し、液体窒素中で粉砕した後、脱塩水を注いで0.1g/1mLの濃度に調製した。リン酸カリウム水溶液は脱塩水1mL中にリン酸水素二カリウム3gとリン酸二水素カリウム2gを溶解させたものとした。試験区は、根粒+リン酸カリウム区、根粒区、リン酸カリウム区、無処理区とし、それぞれの供試数は25とした。24°C、 $126\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で16h、暗黒で8hに設定したインキュベータ内で育成し、72日後に、生存と枯死した個体の数、根粒形成の有無、苗高、根長、葉数、最も大きい3枚の葉の長さおよびSPAD値を測定した。

III 結果

1. サクラバハノキ稚苗の根粒形成と生育状況

ガラス培養ビン内で124日間育苗したサクラバハノキ稚苗は、各試験区23個体中、2~4個体枯死した。根粒の形成が認められた個体(以下、根粒形成稚苗)数は、根粒+根片区17個体、根粒区12個体、根片区13個体で、無処理区では、生存したすべての稚苗が根粒の形成が確認できない個体(以下、根粒非形成稚苗)だった(表1)。形成された根粒は(図1)、ヤマハノキに形成される根粒と形態が似ていた^{13,14)}。苗高は、根粒+根片区、根粒区、根片区間で有意差はなかったが、根片区が平均2.0cmで無処理区よりも有意に低かった。根片区の根長は、平均4.1cmで無処理区よりも有意に短かった。葉数は、根粒+根片区の平均が5.8枚で無処理区と比較して有意に多く、SPAD値は、根粒+根片区と根片区で無処理区よりも有意に大きな数値であったが、無処理区を除いた3試験区間では差がなかった。葉長は、4試験区間で差がなかった。

根粒形成稚苗と根粒非形成稚苗を観察すると明らかな違いが認められたため(図2)、すべての試験区の生存個体を根粒形成稚苗42個体と根粒非形成稚苗39個体に分けて比較した(表2)。平均苗高はそれぞれ2.1cmと2.2cmで有意差が認められなかったが、根粒形成稚苗の根

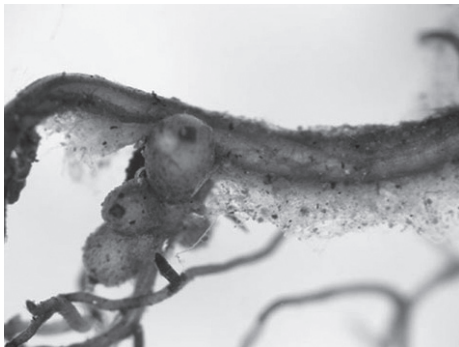


図1 サクラバハンノキ稚苗に形成された根粒

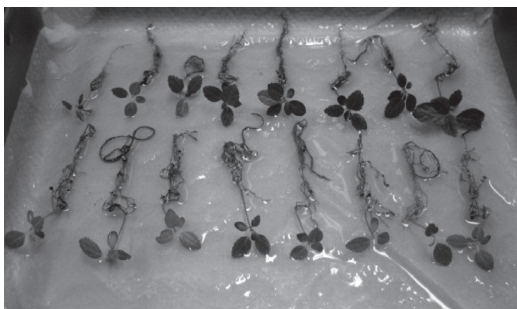


図2 サクラバハンノキの根粒形成稚苗（上段）と根粒非形成稚苗（下段）

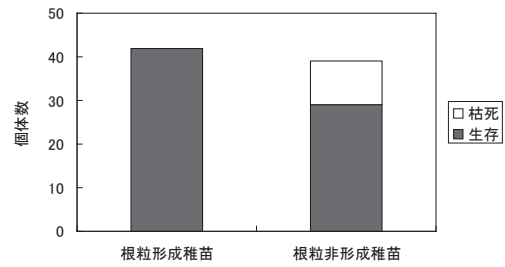


図3 セルトレイに移植92日後のサクラバハンノキ稚苗の生存・枯死

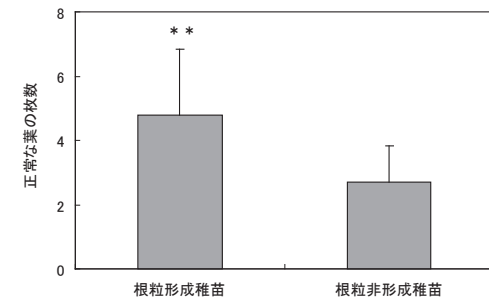


図4 セルトレイに移植92日後のサクラバハンノキ稚苗の正常な葉の枚数

エラーバーは標準偏差を示す。 ** Student の t 検定により、根粒非形成稚苗と比較して1%水準で有意差あり。組織の壊死や葉の黄化が認められない葉を測定した。

長は、平均 4.5cm で、根粒非形成稚苗の平均 5.1cm と比較して有意に短かった。葉数は、根粒形成稚苗の平均が 6.0 枚で、根粒非形成稚苗の平均 3.8 枚よりも有意に多く、SPAD 値は、根粒形成稚苗で平均 SPAD 値 28.3 を示し、根粒非形成稚苗の平均値 12.2 に対して 2 倍以上の有意に高い数値を示した。葉長は両者で差がなかった。

セルトレイに移植した 92 日後に、根粒形成稚苗 42 個体で枯死したものはなかったが、根粒非形成稚苗では、39 個体中 10 個体が枯死した (図 3)。正常な葉の枚数でも両者に有意差が認められ、それぞれの平均は 4.8 枚、2.7 枚であった (図 4)。

2. ヤマハンノキ稚苗の根粒形成と生育状況

ガラス培養ビン内で 72 日間育苗したヤマハンノキの稚苗で、各試験区 25 個体中、枯死したものは根粒+リン酸カリウム区と無処理区でそれぞれ 1 個体だけであった。根粒形成稚苗数は、根粒+リン酸カリウム処理区 21 個体、根粒処理区 17 個体であったが、リン酸カリウム区と無処理区では、生存した個体に根粒の形成は確認されなかった (表 3)。苗高は各試験区間で差は認められなかったが、根長は根粒+リン酸カリウム区で他の 3 試験区よりも有意に短かった。これに対し、葉数、葉長、

表 1 根粒、根片を処理したサクラバハンノキ稚苗の生育状況

試験区 ＼調査項目	根粒形成 稚苗数	根粒非形成 稚苗数	苗高 (cm)	根長 (cm)	葉数	葉長 ³⁾ (mm)	SPAD 値 (葉緑素計数値)
根粒+根片	17	4	2.1±0.4 ^{1)ab2)}	4.5±1.0 ^{ab}	5.8±2.2 ^b	17.4±2.8 ^a	26.9±8.8 ^b
根粒	12	9	2.2±0.4 ^{ab}	5.3±1.2 ^b	5.2±1.9 ^{ab}	16.3±1.8 ^a	20.4±10.4 ^{ab}
根片	13	6	2.0±0.3 ^a	4.1±0.9 ^a	4.8±1.8 ^{ab}	17.1±2.1 ^a	21.4±10.1 ^b
無処理	0	20	2.3±0.3 ^b	5.3±0.9 ^b	4.0±1.0 ^a	16.9±2.1 ^a	13.2±4.7 ^a

1) 平均値±標準偏差。枯死個体は測定しなかった。
 2) Scheffe の多重比較検定により、同符号間には 5% の危険率で有意差なし。
 3) 各稚苗の最も大きい葉の長径を計測した。

表2 サクラバハノキにおける根粒形成稚苗, 根粒非形成稚苗の生育状況

稚苗\調査項目	個体数	苗高 (cm)	根長 (cm)	葉数	葉長 (mm)	SPAD 値 (葉緑素計数値)
根粒形成稚苗	42	2.1 ± 0.4 ¹⁾	4.5 ± 1.1	6.0 ± 1.8	17.2 ± 2.3	28.3 ± 6.9
根粒非形成稚苗	39	2.2 ± 0.4	5.1 ± 1.1	3.8 ± 1.2	16.5 ± 2.1	12.2 ± 4.3
有意性 ²⁾		ns	*	**	ns	**

1) 平均値±標準偏差。枯死個体は測定しなかった。

2) Mann-Whitney のU検定により, **は1%, *は5%の危険率で有意差あり。nsは有意差なし。

SPAD 値は, 根粒+リン酸カリウム区で他の3試験区に比べて有意に大きかった。

根粒形成稚苗について, 根粒+リン酸カリ区と根粒区で比較すると, 明らかな違いが認められたため(図5), 両試験区における根粒形成稚苗について比較を行った(表4)。苗高では有意差が認められなかったものの, 根長では根粒+リン酸カリウム区で有意に短かった。しかし, 葉数, 葉長では, 根粒+リン酸カリ区で有意に大きい値であった。SPAD 値も根粒+リン酸カリウム区で有意に大きかった。

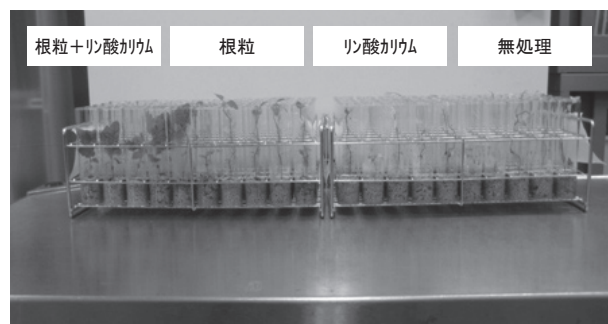


図5 サクラバハノキ成木の根粒, リン酸カリウム水溶液を処理したヤマハノキ稚苗

表3 サクラバハノキ成木の根粒, リン酸カリウム水溶液を処理したヤマハノキにおける稚苗の生育状況

試験区 \調査項目	根粒形成 稚苗数	根粒非形 成稚苗数	苗高 (cm)	根長 (cm)	葉数	葉長 (mm)	SPAD 値 (葉緑素計数値)
根粒+リン酸カリウム	21	3	5.4 ± 1.5 ^{1) a 2)}	3.8 ± 0.9 ^b	7.5 ± 2.0 ^b	17.9 ± 9.3 ^b	22.6 ± 9.7 ^c
根粒	17	8	5.3 ± 2.4 ^a	5.0 ± 2.2 ^a	6.1 ± 1.4 ^a	11.5 ± 3.1 ^a	14.9 ± 9.1 ^b
リン酸カリウム	0	25	5.1 ± 2.6 ^a	5.7 ± 1.2 ^a	5.0 ± 1.4 ^a	11.5 ± 3.2 ^a	7.4 ± 2.2 ^a
無処理	0	24	5.3 ± 2.7 ^a	5.7 ± 1.2 ^a	5.2 ± 1.0 ^a	11.3 ± 2.7 ^a	11.3 ± 4.4 ^{ab}

1) 平均値±標準偏差。枯死個体は測定しなかった。

2) Scheffe の多重比較検定により, 同符号間には5%の危険率で有意差なし。

3) 各稚苗の最も大きい3枚の葉の長径を計測した。

表4 根粒, リン酸カリウムを処理したヤマハノキにおける根粒形成稚苗の生育状況

試験区 \調査項目	根粒形成 稚苗数	苗高 (cm)	根長 (cm)	葉数	葉長 (mm)	SPAD 値 (葉緑素計数値)
根粒+リン酸カリウム	21	5.4 ± 1.6 ¹⁾	3.8 ± 0.9	8.0 ± 1.8	19.6 ± 8.6	24.6 ± 7.4
根粒	17	4.9 ± 2.7	5.0 ± 2.1	6.1 ± 1.6	12.2 ± 3.3	19.5 ± 6.3
有意性 ²⁾		ns	*	**	**	*

1) 平均値±標準偏差。

2) Mann-Whitney のU検定により, **は1%, *は5%の危険率で有意差あり。nsは有意差なし。

IV 考 察

ハンノキ属樹種に根粒を形成させる場合、養液栽培したオオバヤシャブシでは、根粒磨砕液を接種した4か月後には根粒が形成され²⁾、ヤマハンノキの無根粒苗では、根粒からの分離菌を接種した5か月後には根粒が形成される¹³⁾。サクラバハンノキ稚苗においても、根元に成木から採取した根粒裂片およびその周辺の根片を埋め込んで、約4か月後に根粒の形成が認められ、他の樹種と同じ程度の期間で根粒形成は可能であった。裂片の内部には根粒を形成させる菌類が存在するが¹⁾、根片を処理した場合でも稚苗には根粒が形成されたため、その表面にも同様の菌類が存在していると考えられる。そのため、根粒と根片を合わせて処理した場合には菌量が多くなり根粒形成稚苗数が多くなったと推察された。

サクラバハンノキの根粒形成稚苗では、根粒非形成稚苗よりも根長は有意に短かった。菌根菌と植物の共生において光合成産物の奪い合いが生じて生育が抑制される例が知られているが¹⁰⁾、同様にサクラバハンノキでも菌類と植物で光合成産物を奪い合っていることは考えられる。また、側根が変形して根粒が形成される場合に¹⁾、光合成産物が消費されている可能性もある。

稚苗の地上部では、SPAD値は根粒形成稚苗で有意に高かった。葉色の測定に用いた葉緑素計 SPAD-502 は、葉緑素量を測定できる機種であり、光合成能力の簡便な指標として適用するとされている⁵⁾。また、根粒形成稚苗は観察でも葉が濃い緑色を呈していることから(図3)、クロロフィル濃度が高いことは明らかである。根粒形成稚苗は葉数も有意に多く、光合成能力が高くなると推察され、稚苗の良好な生育が期待できる。

サクラバハンノキ稚苗を培養ビンからとり出し、セルトレイに移植した92日後において、根粒形成稚苗のすべてが生存したことから、根粒が形成され地上部の生育が良好な個体は活着率に優れることが示唆された。それに対し、根粒非形成稚苗では、移植後に葉の壊死や黄化が目立ち、枯死する個体も出現したことから、屋外へ植栽した場合にも活着性に問題があるといえる。

サクラバハンノキでは、根粒形成が確認された個体は無処理区を除いた3試験区で52～74%であった。準絶滅危惧種であるため、成長が旺盛な苗木の確保には、さらに根粒の形成率を高める方法が必要である。一般に根粒菌は根粒の組織内部に胞子嚢が形成され、これを取り出すことが有効であると考えられる。根粒を粉砕して接種する方法もあるため¹³⁾、ヤマハンノキの試験で行っ

たように根粒を液体窒素で凍結させて粉砕した懸濁液を処理する方法も検討したい。

本研究では、サクラバハンノキに根粒を形成させる菌類がヤマハンノキ稚苗にも根粒を形成させることが可能であり、その稚苗では地上部の生育が良好になることが確認された。ハンノキ属、ヤマモモ属、グミ属、ドクウツギ属などの樹種と共生し、根粒を形成する菌類は放線菌の一種フランキア (*Frankia* spp.) とされている⁷⁾。これらの植物は放線菌根性植物といわれており^{1,14)}、フランキアとの共生状態において空气中の窒素を固定する能力がある⁶⁾。サクラバハンノキもハンノキ属の樹種であるため、根粒を形成させる菌はフランキアであると推定できるが、ヤマモモ、ヤマハンノキ、オオバヤシャブシ、ナワシログミ、トキワギョリュウの根粒からフランキアの分離が報告されているものの¹⁴⁾、サクラバハンノキからフランキアの分離は報告されていない。しかし、オオバヤシャブシから分離されたフランキアを接種すると、ヤマハンノキに根粒が形成されるように²⁾、サクラバハンノキから得られた根粒粉砕物懸濁液の処理によりヤマハンノキの稚苗に根粒が形成された。また、サクラバハンノキ稚苗の根粒の形態がフランキアとの共生により形成されたヤマハンノキの根粒と非常に似ていたことなどを考慮すると^{13,14)}、サクラバハンノキに根粒を形成させる菌類はフランキアである可能性がある。正確な同定には生化学的な性質や遺伝子解析を行う必要があり、ヤマハンノキに根粒を形成させる菌類がサクラバハンノキに根粒を形成させることが可能であるかを今後確認することも望まれる。

植物の必須元素のうち、三要素である窒素、リン酸、カリウムは特に重要であるが、このうちハンノキ属の樹木では根粒形成により大気中の窒素を利用できるので、残るリン酸とカリウムを添加すれば成長促進が期待できる。また、リン酸の施肥が、根粒形成と生育増大に効果があることが知られている¹²⁾。そのため、ヤマハンノキ稚苗で、根粒粉砕物懸濁液の処理と同時にリン酸カリウム水溶液の添加を試みたところ、根粒形成稚苗数が増加し、葉数、葉長、SPAD値で有意な効果が認められた。根粒粉砕物を処理しないでリン酸カリウム水溶液のみを施用した場合は、すべての項目で無処理区と有意差がないため、根粒形成により窒素固定が行われていると考えられる稚苗にリン酸カリウムが加われば成長促進効果は大きくなることが明らかになった。

以上の結果から、準絶滅危惧種サクラバハンノキと治山用樹種ヤマハンノキの良好な苗木生産をするためには、根に根粒を形成させて地上部の生育を促進させるこ

とが有効であり、リン酸カリウムを施用することでさらに生育が良好になると考えられた。

V 摘 要

準絶滅危惧種サクラバハンノキと治山用樹種ヤマハンノキの良好な苗木生産をするため、稚苗への根粒を形成させる方法を検討するとともにその生育状況を調査したところ、以下のことが明らかになった。

サクラバハンノキ成木から採取した根粒の裂片や根片をサクラバハンノキ稚苗の根元に埋め込み処理したところ、根粒形成稚苗が確認され、根粒と根片を合わせて処理した場合にその個体数が多くなった。根粒形成稚苗は、根粒非形成稚苗と比較して、根長は短かったが、苗高と葉長は同程度であり、葉数が多かった。また葉緑素計の数値も高かった。

サクラバハンノキ成木から採取した根粒粉砕物の懸濁液をヤマハンノキ稚苗の根元に処理したところ、根粒形成稚苗が確認された。それに加えてリン酸カリウム水溶液を処理すると、葉数、葉長、葉緑素計数値が大きくなった。

サクラバハンノキの根粒を処理したヤマハンノキに根粒が形成されたことから、これらの菌類はフランキアである可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 1) 浅沼修一 (1992) : 非マメ科根粒菌, 茎粒細菌の計数と分離. 新編土壌微生物実験法 土壌微生物研究会編, 養賢堂, 東京, 283 ~ 296.
- 2) 福本 勉・石沢謙哉・武藤直紀 (1992) : 試験管内

- 養液栽培法による窒素固定菌フランキアの純粋分離と根粒形成. 土肥誌 63, Vol. 3, 325 ~ 331.
- 3) 宮本尚子 (2004) : サクラバハンノキ (*Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz.) の保全に関する遺伝・生態学的研究. 林育研報 20, 19 ~ 82.
 - 4) 中尾登志雄・黒木嘉久 (1997) : 絶滅危急種ノカイドウとサクラバハンノキの増殖と成長. 日林論 108, 241 ~ 242.
 - 5) 及川夕子・蒔田明史・黒坂 登 (2004) : 簡便な樹勢モニタリング手法の開発. 115 回日林学講, 419.
 - 6) 櫻井克年 (2004) : 共生菌類. 樹木生理生態学, 朝倉書店, 東京, 226 ~ 234.
 - 7) 笹川英夫 (1989) : 生物窒素固定研究における細菌の成果 (11) 非マメ科植物の窒素固定. 農業と園芸 64, Vol. 4, 90 ~ 98.
 - 8) 静岡県自然環境調査委員会 (2004) : まもりたい静岡県の野生生物 植物編, 羽衣出版, 静岡, 238.
 - 9) 杉本順一 (1984) : 静岡県植物誌. 第一法規出版, 東京, 129
 - 10) 鈴木達彦 (1987) VA 菌根に関する諸問題 [8]. 農業及び園芸 62 : 701-704.
 - 11) 鈴木達彦 (1991) : 窒素固定作用. 最新土壌・肥料・植物栄養事典, 博友社, 東京, 106 ~ 110.
 - 12) 植村誠次 (1965) : 肥料木と地力の増強. 造林ハンドブック, 養賢堂, 東京, 143 ~ 150.
 - 13) 山中高史・岡部宏秋 (1995) : ヤマハンノキの根粒から分離されたフランキア菌. 日林誌 77, Vol. 3, 269 ~ 271.
 - 14) 山中高史・岡部宏秋 (2008) : わが国に生育する放線菌根性植物とフランキア菌. 森林総合研究所研報, Vol. 7, No. 1, 67 ~ 80.