

博士論文

根系スケールにおける外生菌根と根外菌糸体の動態

吉田 尚広

目次

1 章	序論	1
2 章	根系内における外生菌根菌の詳細分布	6
2-1.	露岩上に更新したコメツガ稚樹における詳細な菌根分布	7
2-2.	コメツガ・シラビソにおける外生菌根と土壤中の感染源の詳細分布	24
3 章	根外菌糸体による菌根形成に菌糸体量と宿主からの炭素供給が及ぼす影響 ..	41
4 章	埋土菌糸体の菌根形成能力	55
5 章	土壤中の不均一な窒素条件における菌根菌の動態と根の可塑性	64
5-1.	土壌への窒素添加に対する菌根菌の動態	65
5-2.	異なる窒素条件に対する樹木の根の可塑性と菌根菌の動態	73
6 章	総合考察	87
謝辞	94
引用文献	95

1 章 序論

外生菌根菌とは

ほとんど全ての陸上植物は、根に菌根菌と呼ばれる菌類が共生し、菌根を形成している (Jeffries and Dodd 1991, Molina et al. 1992) . 菌根は、細根表面を菌糸が覆う菌鞘の形成の有無、根の細胞内への菌糸の侵入の有無、皮層の細胞間隙に侵入した菌糸が個々の細胞を包み込む菌糸組織であるハルティヒネットの形成の有無といった構造の違いや、感染する植物種の違いによって、7 種類に大別される (Smith and Read 2008) . このうち、菌鞘とハルティヒネットの2つの構造をもつものは、外生菌根 (ectomycorrhiza, 以下菌根) と呼ばれる. 外生菌根を形成する植物の多くは木本植物であり、北半球の温帯以北における主要な森林構成樹種であるマツ科、カバノキ科、ブナ科、ヤナギ科や、熱帯林に生育するフタバガキ科、南半球に生育するフトモモ科などが、外生菌根菌 (以下菌根菌) の宿主樹木として知られている (Alexander and Högborg 1986, Agerer 1987-1998, Lee et al 1997, Smith and Read 2008) .

菌根菌は、宿主樹木から光合成産物の供給を受ける代わりに、菌根から伸ばした根外菌糸体により水や無機養分を吸収して宿主樹木に供給し、樹木の成長を促進する (Smith and Read 2008) . このような菌根菌の共生機能は菌種によって大きく異なるため (e.g. Nara 2006) , 森林において、樹木の成長や物質循環に菌根共生が果たす役割を考える上で、どのような菌根菌種がどのように森林で繁殖しているかを明らかにすることが重要である.

林内での菌根菌の多様性と空間分布

菌根菌は、世界に約 20,000 種が存在すると推定されており (Rinaidi et al. 2008, Tedersoo et al. 2012) , 実際の森林では、様々な菌種が樹木と共生して菌根を形成しており、1 本の樹木根系には複数種の菌根菌が菌根を形成する (Molina et al. 1992) . また、ダグラスモミ (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) は、2000 種の菌根菌が共生する可能性があるとの推定もされている (Trappe 1977) . さらに、地上に発生する子実体の種組成の調査 (Dahlberg 2001, Richard et al. 2004) や、土壌中の菌根の菌種構成の調査 (Yamada and

Katsuya 1996; Zhou and Hogetsu 2002; Rosling et al. 2003; Lian et al. 2006; Ishida et al. 2007; Pickles et al. 2010, 2012) に基づいて、地下部における菌根菌の群集構造を解析する多くの研究が行われてきた。これらの研究により、森林の地下部では多くの菌根菌種が共存することが示されている。

このように多様な菌根菌種が、森林の地下部にどのように分布しているのかについても、解析が行われてきた。Lilleskov et al. (2004) は、過去の研究データをもとに菌根菌の空間分布を解析し、主要な菌種の多くが 3 m 以内のパッチ状に分布することを示した。Pickles et al. (2010, 2012) は、1 m ごとに採取した土壌中の菌根菌種の分布解析によって、数種の菌根が 1~数 m の範囲でクラスターを形成することを明らかにした。さらに、いくつかの菌根菌種において、同一ジェネットの子実体 (Dahlberg and Stenlid 1994; Zhou et al. 1999, 2000; Bergemann and Miller 2002) や菌根 (Zhou et al. 2001) も、パッチ状に分布することが示されている。

さらに、センチメートルスケールにおいても、菌根菌の群集構造の解析が行われている。Tedersoo et al. (2003) は、5 cm スケールで菌種の相対量が大きく変動し、50 cm スケールで種構成が全く違うものになることを示した。Genny et al. (2006) は、 $20 \times 20 \times 2$ cm の土壌を $2 \times 2 \times 2$ cm のブロックに分けて、各ブロック内の菌根と根外菌糸体の種構成を調べ、菌根で検出された 7 種の分布が根外菌糸体の分布と一致していないことを示した。Zhou and Hogetsu (2002) は、ハナイグチ (*Suillus grevillea* (Klotz.) Sing.) の子実体直下の土壌を 10 cm の格子で区切って、各格子内の菌根菌群集を調べ、 1 m^2 の範囲に 30 種以上の菌根菌がモザイク状に分布することを示した。以上の結果は、森林の地下部で共存している菌根菌種が、それぞれ非常に小さな範囲しか占有していないことを示している。

このように、非常に狭い範囲に多種の菌根菌が共存していることから、樹木の根系内においても、複数種の菌根菌が相互作用しながら分布していると考えられる。しかし、既往の研究は、いずれも土壌ブロック中の菌根菌の調査から菌根菌の分布を推定したものであるため、実際の根系内における菌根菌の詳細な分布は不明である。根系内における菌根菌群集の構造や種間関係を明らかにするためには、根の空間分布と菌根菌の分布とを、より詳細なスケールで同時に調べる必要があると考えられる。また、菌根菌は、土壌中に菌糸を伸長させて新たな菌根を作ることから、菌根菌の分布拡大様式を解明するためには、各菌種の菌根と根外菌糸体の分布を比較することも必要である。しかし、

土壌中における樹木の根系や菌根菌の菌糸体の分布を正確に把握することは難しいため、菌根菌の詳細な分布には不明な点が多い。

菌根菌の感染源

菌根菌が宿主樹木と共生するためには、まず樹木の根に感染し、菌根を形成しなければならない。森林の土壌中に存在する菌根菌の感染源には、主に孢子、菌核、根外菌糸体がある。森林火災などの強度の攪乱が起きたあとの森林の回復過程では、土壌中で長期間休眠していた孢子（埋土孢子）による感染がおこる（Izzo et al. 2006, Nara 2009, Peay et al. 2009）。また、*Cenococcum geophilum* Fr.に代表される一部の菌根菌が形成する菌核は、タンパク質、脂質、炭水化物が豊富で、数年間の休眠後であっても発芽して感染することができる（岡部 2000）。一方、成熟した森林においては、実生の菌根菌群集は、近隣の成木の菌根菌群集と相関がある（Cline et al. 2005）。このことは、成木に感染している菌根菌が土壌中に根外菌糸体を伸長させ、成木の周辺に定着した実生に菌根を形成することを示唆している。この他にも、土壌の攪乱により根系から切断された菌根や、断片化した根外菌糸体も感染源として機能する。

このように、土壌中には様々な感染源が存在するが、それらが実際にどの程度機能しているかを検証することは難しい。菌根菌は、宿主樹木の成長とともに遷移していくことが知られており、遷移初期に定着する菌根菌（初期定着菌, early-stage fungi）では孢子が、樹木の成長とともに現れる菌根菌（後期定着菌, late-stage fungi）では根外菌糸体が、菌根形成の感染源として重要であると考えられている（Deacon and Fleming 1992）。しかし、土壌中の感染源が、菌根形成にどの程度寄与しているのかについては、実験的な検証はほとんどされておらず、不明な点が多い。

樹木—菌根菌間の物質転流と相互作用

菌根菌の根外菌糸体は、菌根形成のための感染源としての機能だけでなく、土壌中の養分を吸収して宿主に転流するという、共生機能の根幹を担う構造でもある（Smith and Read 2008）。Rousseau et al. (1994) は、コツブタケ属菌（*Pisolithus* sp.）を接種したテーダマツ（*Pinus taeda* L.）においては、土壌中の吸収器官全体に占める根外菌糸体の割

合は、乾重では 5 % にすぎないが、表面積では 75 %、長さでは 99 % を占めることを明らかにした。このことは、樹木が養水分吸収の大部分を菌根菌に依存することを示している。特に、菌根菌と共生する樹木（菌根性樹木）が優占する北半球の北方林や温帯林の多くでは、窒素利用性の低下によって樹木の成長が制限されるため、これらの森林においては、窒素の獲得能力が樹木の生産性を決定する最も重要な要因となっている（Smith and Read 2008）。菌根菌は、純粹培養条件下において、無機態窒素（Javelle et al 2003）やアミノ酸などの有機態窒素（Abuzindah and Read 1988, Anderson et al. 1999）を吸収し、代謝に利用することができる。しかし、菌根菌から樹木への窒素の受け渡しについては、徐々に明らかにされているものの（Chalot et al. 2002）、不明な点が多く残されている。

一方で、樹木は菌根菌に対して多くの炭素を供給しており、菌根菌は樹木の純生産量の約 15 % を消費していると推定されている（Vogt et al. 1982）。樹木にとって菌根共生のコストは非常に高く、菌根菌なしでも根から十分に養分吸収が可能な条件下では、菌根菌の接種により成長率が 20 % 程度低下することが示されている（Nylund and Wallander 1989）。また、放射性同位体である ^{14}C を用いたトレーサー実験により、宿主の光合成によって固定された炭素は、1 日以内に菌根菌の根外菌糸体まで転流することが示されている（Wu et al. 2002, 2012）。このことは、樹木の光合成によって固定された炭素は速やかに菌根へと受け渡されることを示している。

このように、菌根菌が吸収した土壤中の養分と植物の光合成産物が活発に交換されていることが示されているが、樹木の根系には共生効果の異なる多種の菌根菌が共存していることから、これらの物質の転流量は、菌種間で異なると考えられる。根系内に共存する菌根菌同士の直接的・間接的な種間相互作用は、これらの物質の転流量による影響を受けると考えられるが、菌根菌と植物の共生関係がどのように制御されているのかについては不明な点が多い。菌根菌が共生関係を制御すると仮定すると、他の菌根菌種との競争に勝つために多くの投資をした種が優占して菌根を形成することになるが、このような種は宿主植物への養分供給に対する投資が減るため共生効果が低くなり、共生関係が成り立たなくなる可能性がある（Sachs and Simms 2006）。逆に、植物が共生関係を制御すると仮定すると、他種との競争よりも植物への養分供給に多くの投資をする菌種に対して、植物が優先的に光合成産物を供給することで、最も共生効果の高い種が優占すると考えられる（Kennedy 2010）。これらの 2 つの仮説に関する議論はいまだ決着が

つけられていない。

本研究の目的および本論文の構成

本研究では、1本の樹木の根系に共存する多種の菌根菌のセンチメートルスケール(根系スケール)における菌根菌の群集構造と分布様式を解明することを目的として、野外調査および根箱実験系を用いた室内実験を行い、①根系内における菌根および土壌中の感染源の詳細な分布、②菌根形成に土壌中の根外菌糸体量と宿主からの炭素供給が及ぼす影響、③炭素供給を失った根外菌糸体の土壌中における生存能力、④異なる土壌養分環境に対する菌根菌と樹木の反応を明らかにした。

第2章では、露岩上に更新したコメツガとシラビソを用いて、平面状に分布する根系内において菌根菌がどのように分布するのかを調べた。さらに、菌根と土壌中の菌根菌の空間分布を同時に調べた。第3章では、第2章で得られた結果をもとに、菌根形成には土壌中の根外菌糸体量と宿主からの炭素供給の有無が重要であるという仮説を立て、これらが菌根形成に与える影響を根箱実験系によって検証した。第4章では、宿主から切り離されて光合成産物が供給されなくなった根外菌糸体が、どの程度の期間、土壌中で菌根形成能力を維持できるのかを検討した。第5章では、1本の樹木を不均一な土壌窒素条件で栽培し、菌根菌と樹木の反応がどのように変化するのかを検討した。そして第6章では、本研究で得られた結果を総合し、根系スケールにおける菌根菌の群集構造と分布様式を考察した。

2 章 根系内における外生菌根菌の詳細分布

はじめに

森林の地下部には非常に多くの菌根菌種が共存しており、様々なスケールでパッチ状またはモザイク状に分布している (Dahlberg and Stenlid 1994; Zhou et al. 1999, 2000, 2001; Bergemann and Miller 2002; Zhou and Hogetsu 2002; Tedersoo et al. 2003; Lilleskov et al. 2004; Genny et al. 2006; Pickles et al. 2010, 2012). このような菌根菌の分布は、菌根菌の感染様式や種間相互作用を反映していると考えられている (Kennedy 2010). そこで本章では、根系スケールにおける菌根菌の感染様式や種間相互作用を推測するために、根系内における菌根菌の詳細分布を明らかにした.

亜高山帯針葉樹林に生育するコメツガ (*Tsuga diversifolia* (Maxim.) Mast.) とシラビソ (*Abies veitchii* Lindl.) は、日本の固有種であり (Farjon 1990), 林床土壌だけでなく、倒木上や露岩上などのサイトでも更新する樹種である. このうち露岩上に更新した稚樹は、厚さ数 cm のリターとコケ類からなる基質中に根を伸長させて生育しているため、その根系がほぼ二次元 (平面状) に分布している. このような稚樹は、根系を破壊せず、基質ごと採集して持ち帰ることができるため、実験室内で根系の位置を詳細に記録しながら菌根を採取することが可能である. そのため、本章では、露岩上に生育するコメツガとシラビソの根系を調査対象とした. 第1節では、露岩上に更新したコメツガ稚樹の根系の根端を全て採取して、詳細な菌根分布を調べた. 第2節では、根系内の菌根分布と土壌中の感染源の分布が対応しているかどうかを、コメツガおよびシラビソの根系において調査した.

なお、第1節の内容の一部は、Yoshida et al. (2014) にて発表した.

2-1. 露岩上に更新したコメツガ稚樹における詳細な菌根分布

材料と方法

調査地

長野県南佐久郡南牧村の八ヶ岳国有林73林班れ小班内の南向き斜面(北緯35° 60.0', 東経138° 24.2', 標高約1800 m)で調査を行った(図2-1). 調査地の土壌は湿性ポドゾルであり, 林床は広くコケ類に覆われていた. 調査地付近の森林は, 80~90年前に大規模な択伐が行われた後に天然更新したもので(滑川ら1960), 高木層と亜高木層にはシラビソが優占しており, コメツガの小径木とダケカンバの大径木が点在していた. 低木層にはコメツガの小径木が稀に見られるほかは植物が生育しておらず, 草本層にはコメツガ稚樹が優占しており, シラビソ稚樹も少数生育していた.

コメツガ稚樹の採集

2010年8月4日に, 約10年生のコメツガ稚樹3本(T1, T2, T3)を, それぞれ異なる露岩上から採集した. この際, 根系の形ができるだけ崩れないように, 稚樹の根系を周りの基質ごと剥がし取って持ち帰った(図2-2a). T1とT2, T1とT3, T2とT3の距離は, それぞれ61 m, 78 m, 20 mであった.

持ち帰った稚樹は, 長さ5 cmの釘を5 cm角の格子状に刺した木板に固定し, 根系が動かないように注意しながら基質を取り除いた(図2-2a, b). 根系全体の写真を撮影し, さらにスキャナーを用いて根系の画像を保存した後, 根端の位置を記録しながら実体顕微鏡下で全ての根端を採取した. 採取した根端は, 直径2 mmのジルコニアビーズ7個とともに2 mlのマイクロチューブに入れた後, チューブごとシリカゲルを入れたチャック付きポリエチレン袋に入れて, DNAを抽出するまで室温で保存した.

PCR増幅とT-RFLP解析

各菌根から, 改良CTAB法(Lian et al. 2001)によってDNAを抽出した. 乾燥させた各菌根を, 粉碎機(Micro Smash MS-100, TOMY Seiko, Tokyo, Japan)を用いて3,500 rpmで2分間粉碎した後, 2×CTAB溶液[2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 0.125% DTT]を500 µl加えて, さらに3,500 rpmで1分間攪拌

した．65 °C で 1 時間保温した後に，等量の CIA（クロロホルム：イソアミルアルコール＝24：1 の混合液）を添加して混和させ，24 °C，18,800×g で 10 分間遠心した．上層を等量の 450 µl の 2-プロパノールと混合した後に，4 °C，18,800×g で 10 分間遠心し，沈殿した DNA を 80 %エタノールで洗浄した．得られた DNA を 50 µl の Tris-EDTA (TE) 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)，1 mM EDTA (pH 8.0)] に溶解させ，PCR 反応のテンプレートとした．抽出した DNA は，実験に使用するまで-30 °C 下で保存した．

5'末端を IRD-700 で蛍光標識した ITS1F プライマー (Gardes and Bruns 1993) と，5'末端を IRD-800 で蛍光標識した ITS4 プライマー (White et al. 1990)，および非蛍光標識の両プライマーを用いて，rDNA-ITS 領域の PCR 増幅を行った．PCR 反応液 (5.55 µl) の組成は，1× NH₄ reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM 各 dNTP, 0.05 U BIOTAQ DNA polymerase (Bioline, London, UK), 0.2 µM 各非蛍光標識プライマー，0.02 µM 各蛍光標識プライマー，テンプレート DNA 0.55 µl とした．PCR 反応は，94 °C・2 分の熱変性の後，94 °C・30 秒，54 °C・30 秒，72 °C・90 秒の 3 過程を 30 サイクル行い，さらに 72 °C・10 分の伸長反応を行った．得られた PCR 産物 2.0 µl に制限酵素 *Hae*III または *Hpy*CH₄IV (New England BioLabs, Beverly, USA) を 1.5 U 添加して，37 °C 下で 2 時間保温した．それぞれの制限酵素処理後の溶液に等量の TE 緩衝液と 4 倍量の Loading dye [0.01 % New Fuchsin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), 10 mM EDTA (pH 8.0), 90 %脱イオンホルムアミド] を添加した後，94 °C で 5 分間保温して DNA を熱変性させた．熱変性させた DNA 断片を，6 % Long Ranger sequencing gel (Lonza, Basel, Switzerland) を用いて LI-COR 4300 DNA sequencer (LI-COR Biosciences, NE, USA) で電気泳動した．得られた泳動像から 4 つの末端標識制限酵素断片長 (Terminal Restriction Fragment Length) を，Kodak ID v.3.6.1 (Kodak, NY, USA) を用いて決定した．4 つの断片長が一致したものを同一の菌根菌タイプとしてまとめた．

菌根菌種の推定

T-RFLP 解析によってタイプ分けした各菌根菌タイプから，電気泳動像が鮮明であった DNA 抽出液を 1 つ選び，それをテンプレートとして，ITS1F/ITS4 プライマー対を用いて PCR 増幅した．PCR 反応液 (10µl) は，1× NH₄ reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM 各 dNTP, 0.05 U BIOTAQ DNA polymerase, 0.2 µM 各プライマー，テンプレート DNA 2.0 µl とした．PCR 反応は，94 °C・2 分の熱変性の後，94 °C・30 秒，54 °C・

30 秒, 72 °C・60 秒を 30 サイクル行い, さらに 72 °C・10 分の伸長反応を行った.

得られた PCR 産物を, TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2.1 を用いて, pT7 Blue T-Vector (Novagen, WI, USA) にライゲーションした後, プラスミド DNA を大腸菌 JM109 Competent Cells (Takara Bio, Shiga, Japan) に形質転換させた. ベクターライゲーションと形質転換の操作は付属のプロトコールにしたがった. 形質転換した大腸菌からプラスミド DNA を抽出した後, U19 プライマーおよび M13R プライマーを用いてインサート DNA を含む領域を PCR 増幅した. 増幅産物を ExoSAP-IT (USB, OH, USA) によって精製した後, ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した. 得られた ITS 領域の塩基配列は DDBJ に登録した (表 2-2) .

各菌根菌タイプの塩基配列は, UNITE データベース (Köljalg et al. 2005) および International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) に登録されている塩基配列を用いて相同性検索を行った. データベースの塩基配列の中に, 検索に用いた菌根菌タイプの塩基配列との相同性が 97%以上一致した配列があった場合は, それらの配列の中で最も相同性が高かった菌種を, 検索に用いた菌根菌タイプの菌種と推定した. 97 %以上一致する塩基配列がなかった場合は, 検索に用いた菌根菌タイプの塩基配列と, 相同性の高かった菌種のデータベース登録塩基配列とを合わせてアライメントした後, 近隣結合法により系統樹を作成した. そして, 対象とした菌根菌タイプと同一クレードに含まれたデータベースの菌種に基づき, その菌根菌タイプの属, 科, または目を推定した. 塩基配列のアライメントおよび系統樹の作成は, MEGA version 5.10 (Tamura et al. 2011) を用いて行った.

菌根分布図の作成と統計解析

Adobe Illustrator CS 5 (Adobe systems, CA, USA) を用いて根系の写真とスキャン画像から根をトレースし, 根系図を作成した. さらに, この根系図の各根端に, 推定された菌種ごとに異なる色の点を打ち, 菌根分布図を作成した (図 2-3) . この分布図から得た各菌根の XY 座標を, 統計解析に用いた. T1 の根系の一部では, 根と土が複雑に絡み合っていたため (図 2-3a のピンクの実線で囲われた部分) , 根端の正確な位置を記録できなかった. そのため, この部分は統計解析から除外した.

各稚樹の根系内において, 同種の菌根がクラスターを形成しているかどうかを, R (<http://www.r-project.org/>) のプログラム (Shiraishi et al. 2011) を用いて解析した. この

プログラムでは、まず、各根系から実際に得られた各菌種の菌根数をもとにした母集団を仮定し、母集団から各根端の位置へ無作為に菌種をあてはめた仮想分布を作成した。次に、各根端を中心とする半径 10 mm ごとの同心円を設定し、中心部の円および前後の同心円に囲まれたドーナツ状の部分を、それぞれ 1 つの距離階級とした。実際の分布と仮想分布について、距離階級 α における種 A のクラスター指数 (CI) を以下の式により計算した。

$$CI = \frac{A \text{ の菌根を中心とした } \alpha \text{ 内の } A \text{ の菌根数}}{A \text{ の菌根を中心とした } \alpha \text{ 内の総菌根数}} - \frac{A \text{ 以外の菌根を中心とした } \alpha \text{ 内の } A \text{ の菌根数}}{A \text{ 以外の菌根を中心とした } \alpha \text{ 内の総菌根数}}$$

実際の分布の CI と仮想分布の CI を比較して、仮想分布の値が大きければ 1、等しければ 0.5 をスコアとしてカウントした。仮想分布の作成を 100,000 回行い、スコアが 5,000 以下だった場合に、距離階級 α において種 A が有意に集中しているとみなした。

結果

菌根菌の種構成

3 本の稚樹の根系から合計 1171 個の根端を採取し、そのうちの 887 個において ITS 領域が増幅された。ITS 領域が増幅された根端を菌根とみなすと、各稚樹の菌根形成率は、T1 では 92.1 %、T2 では 75.7 %、T3 では 71.4 %であった (表 2-1)。T-RFLP 解析の結果、これらの菌根は 41 タイプに分けられた。このうち 2 タイプが *Cenococcum geophilum* と推定され、他の 39 タイプはそれぞれ異なる菌種と推定された (表 2-2)。これらの 40 菌種のうちで最も優占していた菌種は *Piloderma* sp. 2 であり、菌根全体の 39.6 %を占めていた。次に多かったのは *Helotiales* sp. 2 と *C. geophilum* であり、それぞれ 8.6 %と 7.2 %であった。

菌根菌の群集構造と優占種は稚樹間で大きく異なっており、40 菌種のうち、35 菌種は 1 本の稚樹のみから検出された (表 2-2)。T1 の根系からは、16 種の菌根菌が検出された。*Russula* sp. 1 の菌根が最も多く、次に菌根の多い順から *Piloderma* sp. 2, *C. geophilum*, *Tomentella* sp. 1 となった。これらの 4 種の菌根はそれぞれ T1 の総菌根数の 24.6, 16.0, 13.3, 10.7 %を占めていた。T2 の根系からは、10 種の菌根菌が検出された。*Lactarius* sp., *Piloderma* sp. 2, *C. geophilum*, *Russula* sp. 3 の菌根が多く、それぞれ 35.8,

32.1, 11.1, 9.3 %を占めていた。T3 の根系は3本の稚樹の中で最も大きく（図 2-3）, 総根端数と菌根数も最も多かった。T3 の根系からは、21 種の菌根菌が検出された。

Piloderma sp. 2 の菌根が最も多く、総菌根の 50.0 %を占めていた。また、*Helotiales* sp. 2, *Tylospora* sp. 4, *Helotiales* sp. 1, *C. geophilum*, *Tylospora* sp. 2 が 20 根端以上から検出され、それぞれ総菌根数の 14.2, 10.6, 4.8, 3.9, 3.9 %を占めていた。

コメツガ根系における各菌種の分布

T1 の根系内では、菌根数の多かった4種のうち、*Piloderma* sp. 2, と *C. geophilum* が単独のクラスターを形成していた（図 2-3a）。両種はそれぞれ 0–30 mm, 10–20 mm の距離階級で有意に集中分布していた（表 2-3）。*Russula* sp. 1 は小さなクラスターを形成していたが、小さな距離階級での集中分布は有意ではなく、60–70 mm の距離階級で有意に集中分布していた（表 2-3）。*Tomentella* sp. 1 は、明確なクラスターを形成せずに分布しており（図 2-3a）、有意に集中分布する距離階級はなかった（表 2-3）。これらの4種の分布は互いに排他的ではなく、境界部は重なり合うか混ざり合っていた。10 根端以下にしか感染していないマイナーな種の菌根は集中している傾向があり、狭い範囲に多種の菌根が分布する場所が根系内の3箇所で見られた（図 2-1a の青破線部）。

T2 の根系では、菌根数の多かった *Lactarius* sp., *Piloderma* sp. 2, *Russula* sp. 3, *C. geophilum* の4種が、それぞれ数 cm の範囲で明瞭なクラスターを形成しており（図 2-3b）、それぞれ 0–50, 0–40, 0–50, 0–10 mm の距離階級で有意に集中分布していた（表 2-3）。また、*C. geophilum* は、120–150 mm の距離階級でも有意に集中分布していた（表 2-3）。各菌種のクラスターの境界は比較的是っきりしていた。10 根端以下にしか感染していないマイナーな種の菌根は、T1 と同様に集中分布する傾向があった（図 2-3b の青破線部）。

T3 の根系では、*Piloderma* sp. 2 が根系全体に分布しており、*C. geophilum*, *Tylospora* sp. 2, *Tylospora* sp. 4, *Helotiales* sp. 1, *Helotiales* sp. 2 が小さなクラスターを形成していた（図 2-3c）。*Piloderma* sp. 2 は 0–10, 20–30, 50–60, 80–90, 240–250 mm の距離階級で、*C. geophilum* が 0–40, 180–220 mm で、*Tylospora* sp. 2 が 0–20, 50–60, 160–170, 210–250 mm で、*Tylospora* sp. 4 が 0–40 mm で、*Helotiales* sp. 1 が 0–10, 40–60, 80–100, 120–140 mm で、*Helotiales* sp. 2 が 0–30, 160–170, 240–250 mm で、それぞれ有意に集中分布していた。各菌種のクラスターの多くは、互いに重なり合っていた（図 2-3c）。20 根端以

下にしか感染していなかったマイナーな種の菌根は、T1 と T2 の根系と同様に、数か所に集中分布する傾向が見られた（図 2-3c の青破線部）。

考察

本節の調査では、3 本のコメツガ稚樹から採取した 871 個の菌根から、40 種の菌根菌が検出された。菌根菌の種構成と優占種は、稚樹ごとに大きく異なっており、40 菌種のうちの *Piloderma* sp. 2 と *C. geophilum* 以外の種は、1 本または 2 本の稚樹のみから検出された。この結果は、数十 cm 程度で種構成が変化したという過去の報告（Tedersoo et al. 2003）と一致する。稚樹を採集した各露岩の非生物的環境は似ていると推測されるので、稚樹間での種構成や優占種の違いは生物的要因によると推測される。例えば、土壌中に存在する多様な菌根菌種の中から、それぞれの根系に偶然侵入した感染源が菌根を形成したことが考えられる。

Piloderma sp. 2 は全ての稚樹から検出され、総菌根数の 39.6 % を占めていた。*Piloderma* 属菌は、冷温帯林や北方林に広く分布する菌根菌で（Arocena et al. 2001）、宿主範囲が広く、針葉樹の様々な樹種に菌根を形成する（Erland and Tylor 1999）。また、*Piloderma* 属菌の菌根は、リターやコケ類の下に酸性の腐植内でよく見られる（Arocena et al. 2001, Erland and Tylor 1999）。本研究の調査地の土壌は湿性ポドゾルであり、リターとコケ類からなる露岩上の基質は酸性である。菌根菌の種構成は基質の化学性の影響を受けるため（Conn and Dighton 2000）、*Piloderma* sp. 2 の優占には基質の pH が影響しているのかもしれない。

本節の結果から、コメツガの根系において、同種の菌根菌が感染した根端は、数 cm の範囲でパッチ状に分布する傾向があることが示された（表 2-2、図 2-3）。このような菌根の小さなクラスターは、同一クローンの拡大と感染により形成されるのかもしれない。すなわち、クラスターの形成は、偶然 1 つの根端に、ある 1 種の菌根菌が感染することから始まり、次にこの菌根から新たな根外菌糸体が伸長して、近くにある未感染の根端に感染して新たな菌根を形成する。さらに、新しく形成された菌根からの根外菌糸体の伸長と新たな根端への感染のプロセスを繰り返すことで、同種の菌根のクラスターが形成されるという形成過程である。

コメツガの根系内における各菌種のクラスターは、比較的小さかった。上述のプロセスにより形成されたクラスターのサイズは、同様に形成された近くのクラスターとの相互作用によって決まると思われる。各菌種のクラスターの境界においては、互いに排他的に分布する場合と、分布が重なり合う場合があった。例えば、T2 の根系においては、*Lactarius* sp., *Piloderma* sp. 2, *Russula* sp. 3 の菌根のクラスターが、種ごとに比較的はつきりと分かれており、互いに排他的であるように見えた。また、*C. geophilum* の菌根も、クラスターの端に他種とは排他的に存在していた。菌根菌のいくつかの種では、種間の不和合性が知られている (Dahlberg 1999)。T2 の根系にクラスターを形成していた菌種でも、種間の不和合性によりクラスター同士が排他的に分布するようになったのかもしれない。一方で、T1 の根系においては、*Amphinema* sp., *Russula* sp. 1, *Tomentella* sp. 1 のクラスターが互いに重なり合っていたことから、これらの菌種は明確な不和合性を示さないのかもしれない。

森林の土壌中には、非常に多種の菌根菌が存在する (Molina et al. 1992, Ishida et al. 2007, Smith and Read 2008)。このような土壌中において、上述した過程によって菌根のクラスターが形成されるためには、クラスターを形成している菌種が、土壌中の他種よりも、新たな根端に対して優位に感染できなければならない。Kennedy et al. (2009) は、*Rhizopogon* 属 2 種の胞子を 3 ヶ月間の間隔を開けてビショップマツ (*Pinus muricata* D. Don) の実生に接種すると、先に接種した菌種が必ず優占することを明らかにし、菌根菌の未感染の根端をめぐる種間競争において、先住効果 (priority effect) が存在することを示した。本章で調査したコメツガの根系においても、最初に根端に感染した 1 種が先住効果によって優占して菌根を形成することにより、菌根のクラスターが形成された可能性がある。このような微小スケールにおける先住効果を説明する仮説として、①最初に感染した菌種の根外菌糸体、すなわち菌根から新たに伸長した根外菌糸体は、土壌中の他の感染源よりも感染能力が高い、または、②菌根の周りには感染源となる菌糸体量も増えるため、他種よりも優位に新たな根端へ感染できることが考えられる。これらの 2 つの仮説について、次節以降で野外調査や室内実験により検証する。

一方で、感染頻度の低いマイナーな種の菌根は、根系の一部に集中し、その部分の種多様性が高くなっていた (図 2-3 の破線部)。この場所には先住効果がなく、土壌中の胞子や菌糸断片による感染が起きていると考えられる。先住効果は、感染能力が高いもしくは菌糸体量の多い根外菌糸体が未感染の根端の方へ伸長することで起こると推測

されるため、この場所では菌根から伸びた根外菌糸体が到達する前に、土壌中の胞子や菌糸断片による感染が頻繁に起きたのかもしれない。

(a)



(b)



図 2-1. 調査地の様子. (a) : 林内の様子, (b) : 露岩上に更新したコメツガの稚樹.

(a)



(b)



図 2-2. 露岩上から採取したコメツガ稚樹.

(a): 基質を取り除く前, (b): 基質を取り除いた後.

表 2-1. 各種樹の総根端数，菌根数，菌根形成率.

稚樹番号	総根端数	菌根数	菌根形成率 (%)
T1	203	187	92.1
T2	214	162	75.7
T3	754	538	71.4

表 2-2. 得られた菌根菌種.

菌根菌種	菌根数			制限断片長 (bp) ^a				BLAST検索結果 ^c					
				Hae III		HpyCH4 IV		Access No. ^b	Score	e-value	Access No.	Identities	Species
	ITS1F	ITS4	ITS1F	ITS4									
子囊菌門													
<i>Cenococcum geophilum</i>	2	9	17	161	88	367	175	AB828007	1840	0.0	DQ179119	980/996 (98%)	<i>Cenococcum geophilum</i>
<i>Cenococcum geophilum</i>	23	9	4	161	88	169	175	AB828008	1842	0.0	JX145390	1006/1029 (97%)	<i>Cenococcum geophilum</i>
<i>Melinomyces</i> sp. 1	14	0	0	154	159	607	607	AB828009	1195	0.0	GU998787	606/607 (99%)	uncultured <i>Melinomyces</i> [<i>Melinomyces variabilis</i>]
<i>Ascomycota</i> sp.	0	0	6	75	434	112	403	AB828010	934	0.0	FJ152543	502/507 (99%)	uncultured <i>Pezizomycotina</i> [<i>Archaeorhizomyces</i>]
<i>Helotiales</i> sp. 1	0	0	26	109	158	410	533	AB828011	1332	0.0	FJ475724	841/892 (94%)	uncultured <i>Sordariomycetes</i>
<i>Helotiales</i> sp. 2	0	0	76	163	158	616	616	AB828012	1110	0.0	AB211249	604/616 (98%)	uncultured ectomycorrhizal fungus
担子菌門													
<i>Amphinema</i> sp.	17	0	0	92	467	104	511	AB828013	531	e-151	UDB001719	397/436 (91%)	<i>Amphinema</i> sp.
<i>Clavulina</i> sp. 1	0	0	2	263	129	237	493	AB828014	926	0.0	UDB001121	626/672 (93%)	<i>Clavulina cristata</i>
<i>Clavulina</i> sp. 2	0	0	2	508	54	718	718	AB828015	1199	0.0	EU669209	646/654 (98%)	<i>Clavulina castaneipes</i>
<i>Clavulinaceae</i> sp. 1	0	0	5	452	134	432	507	AB828016	484	e-135	DQ497944	386/424 (91%)	uncultured <i>Clavulinaceae</i>
<i>Cortinarius</i> sp. 1	5	0	0	280	438	606	112	AB828017	1279	0.0	UDB002218	663/669 (99%)	<i>Cortinarius anomalus</i>
<i>Cortinarius</i> sp. 2	0	3	0	160	191	632	632	AB828018	1108	0.0	UDB015918	565/567 (99%)	<i>Cortinarius casimiri</i>
<i>Cortinarius</i> sp. 3	0	6	0	453	194	647	647	AB828019	979	0.0	UDB000068	597/628 (95%)	<i>Cortinarius sertipes</i>
<i>Cortinarius</i> sp. 4	0	1	0	444	183	627	627	AB828020	1174	0.0	UDB002440	605/608 (99%)	<i>Cortinarius</i> sp.
<i>Cortinarius</i> sp. 5	1	0	0	231	442	609	113	AB828021	1318	0.0	UDB002210	680/685 (99%)	<i>Cortinarius croceonius</i>
<i>Cortinarius</i> sp. 6	0	0	5	439	192	631	631	AB828022	1094	0.0	UDB002161	587/596 (98%)	<i>Cortinarius diasenospermus</i>
<i>Cortinarius</i> sp. 7	0	0	12	443	195	638	638	AB828023	1063	0.0	UDB001453	606/625 (96%)	<i>Cortinarius rubrovioleipes</i>
<i>Inocybe</i> sp. 1	0	0	1	89	529	618	618	AB828024	662	0.0	UDB000766	401/419 (95%)	<i>Inocybe petiginosa</i>
<i>Laccaria</i> sp. 1	3	0	0	730	730	730	730	AB828025	1368	0.0	UDB001466	694/696 (99%)	<i>Laccaria laccata</i>
<i>Laccaria</i> sp. 2	2	0	0	718	718	718	718	AB828026	1189	0.0	UDB017611	668/687 (97%)	<i>Laccaria laccata</i>
<i>Lactarius</i> sp.	0	58	0	487	246	334	110	AB828027	1187	0.0	UDB003330	721/760 (94%)	<i>Lactarius fulvissimus</i>
<i>Paxillus</i> sp.	0	0	2	133	157	157	150	AB828028	1384	0.0	UDB001205	721/728 (99%)	<i>Paxillus involutus</i>
<i>Piloderma</i> sp. 1	0	4	7	97	501	180	124	AB828029	686	0.0	UDB001744	600/668 (89%)	<i>Piloderma lanatum</i>
<i>Piloderma</i> sp. 2	30	52	269	97	203	540	140	AB828030	932	0.0	UDB001750	580/610 (95%)	<i>Piloderma sphaerosporum</i>
<i>Russula</i> sp. 1	46	0	0	492	208	219	129	AB828031	1332	0.0	EU597082	682/684 (99%)	<i>Russula crassotunicata</i>
<i>Russula</i> sp. 2	9	0	0	174	87	207	139	AB828032	1023	0.0	UDB000894	675/718 (94%)	<i>Russula livescens</i>
<i>Russula</i> sp. 3	0	15	7	746	746	190	176	AB828033	1265	0.0	UDB015068	656/662 (99%)	<i>Russula xerampelina</i>
<i>Russula</i> sp. 4	0	0	3	735	735	202	187	AB828034	1294	0.0	UDB016009	678/685 (98%)	<i>Russula ochroleuca</i>

表 2-2. 続き.

菌根菌種	菌根数				制限断片長 (bp) ^a				BLAST検索結果 ^c					
					Hae III				Access No. ^b	Score	e-value	Access No.	Identities	Species
	T1	T2	T3	T4	ITS1F	ITS4	ITS1F	ITS4						
<i>Sebacina</i> sp. 1	0	0	2		151	110	659	659	AB828035	773	0.0	UDB000773	585/636 (91%)	<i>Sebacina</i> sp.
<i>Thelephoraceae</i> sp. 1	5	0	0		481	223	111	61	AB828036	1302	0.0	UDB016649	678/685 (98%)	<i>Thelephora albomarginata</i>
<i>Thelephoraceae</i> sp. 2	3	0	0		179	221	613	61	AB828037	912	0.0	UDB016649	633/687 (92%)	<i>Thelephora albomarginata</i>
<i>Tomentella</i> sp. 1	20	0	0		169	223	645	61	AB828038	1243	0.0	UDB016370	655/663 (98%)	<i>Tomentella lapida</i>
<i>Tomentella</i> sp. 2	0	3	0		96	610	614	61	AB828039	1235	0.0	UDB016369	655/663 (98%)	<i>Tomentella terrestris</i>
<i>Tomentella</i> sp. 3	0	0	1		96	221	202	503	AB828040	1189	0.0	UDB003302	624/632 (98%)	<i>Tomentella stuposa</i>
<i>Tomentella</i> sp. 4	0	0	2		483	221	613	61	AB828041	886	0.0	UDB016493	603/651 (92%)	<i>Tomentella coerulea</i>
<i>Tomentella</i> sp. 5	0	0	11		96	609	206	61	AB828042	1076	0.0	UDB016369	636/663 (95%)	<i>Tomentella terrestris</i>
<i>Tricholoma</i> sp.	3	0	0		97	143	733	733	AB828043	1340	0.0	UDB011652	713/724 (98%)	<i>Tricholoma virgatum</i>
<i>Tylospora</i> sp. 1	1	0	0		98	139	235	120	AB828044	1037	0.0	UDB002469	631/656 (96%)	<i>Tylospora asterophora</i>
<i>Tylospora</i> sp. 2	0	2	21		96	487	643	643	AB828045	1144	0.0	UDB002468	595/599 (99%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 3	3	0	0		98	480	111	62	AB828046	442	e-124	UDB002468	281/299 (93%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 4	0	0	57		98	480	514	120	AB828046	971	0.0	UDB002468	575/598 (96%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>

a : T-RFLP 解析で得られたバンドサイズ, b : DDBJ に登録した配列の Accession Number, c : 相同性検索で最も類似していた配列.

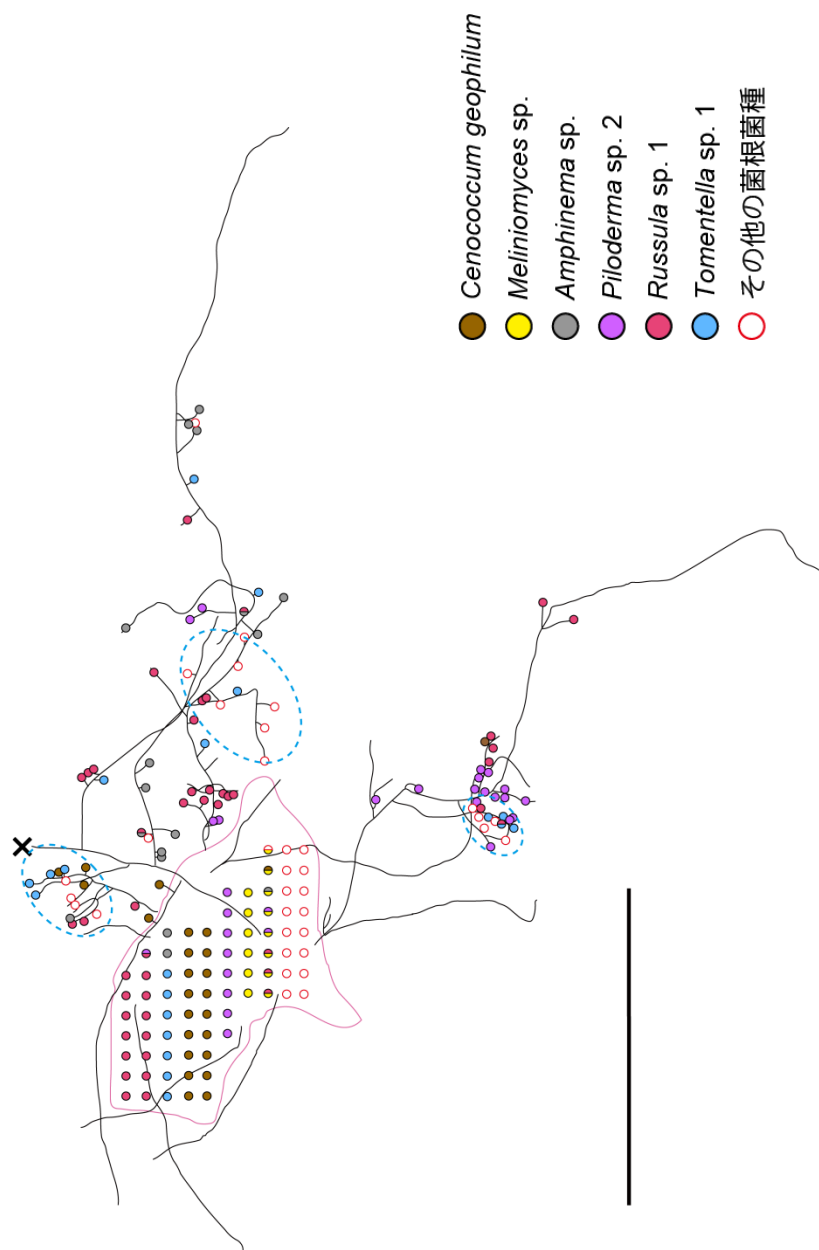


図 2-3a. T1 の根系における菌根の空間分布. 図中の×は地上部の位置, 黒い線は根, ●は採取した菌根の位置と菌種を示す. Bar = 5 cm. ピンクの実線で囲われた部分は, 菌根の位置を正確に把握できなかったため, 統計解析からは除外した. 青の破線は種多様性が高い位置を示す.

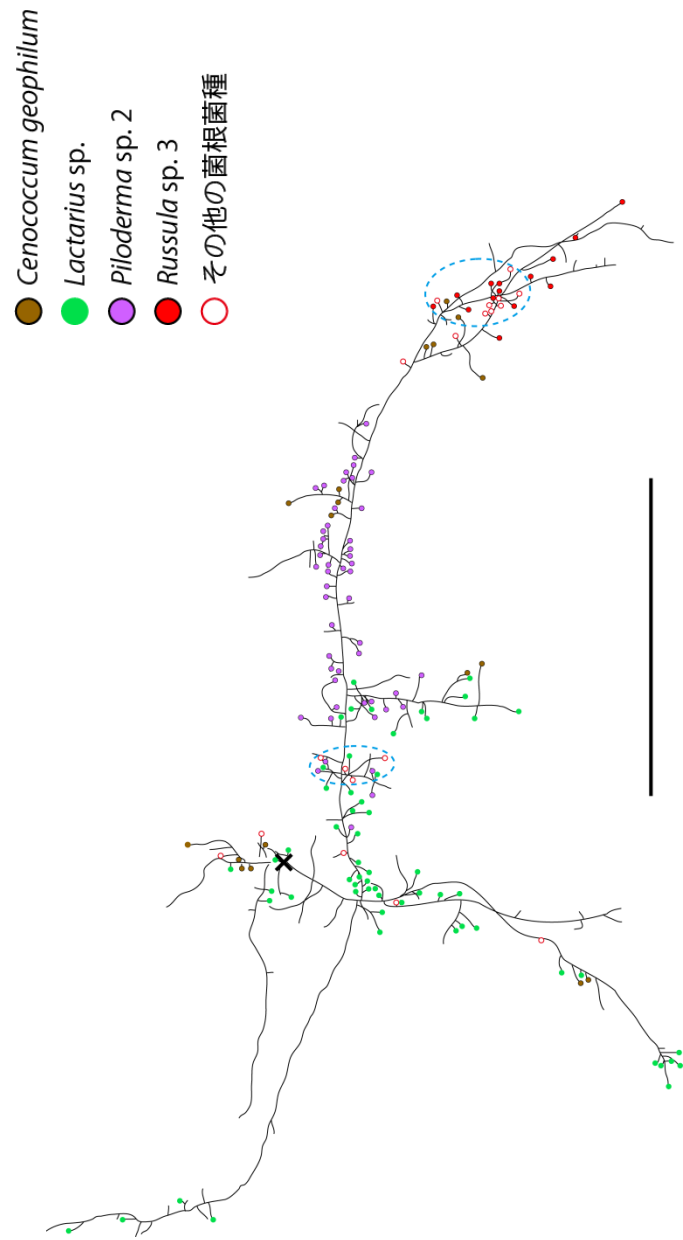


図 2-3b. T2 の根系における菌根の空間分布. 図中の×は地上部の位置, 黒い線は根, ●は採取した菌根の位置と菌種を示す. Bar = 5 cm. 青の破線は種多様性が高い位置を示す.

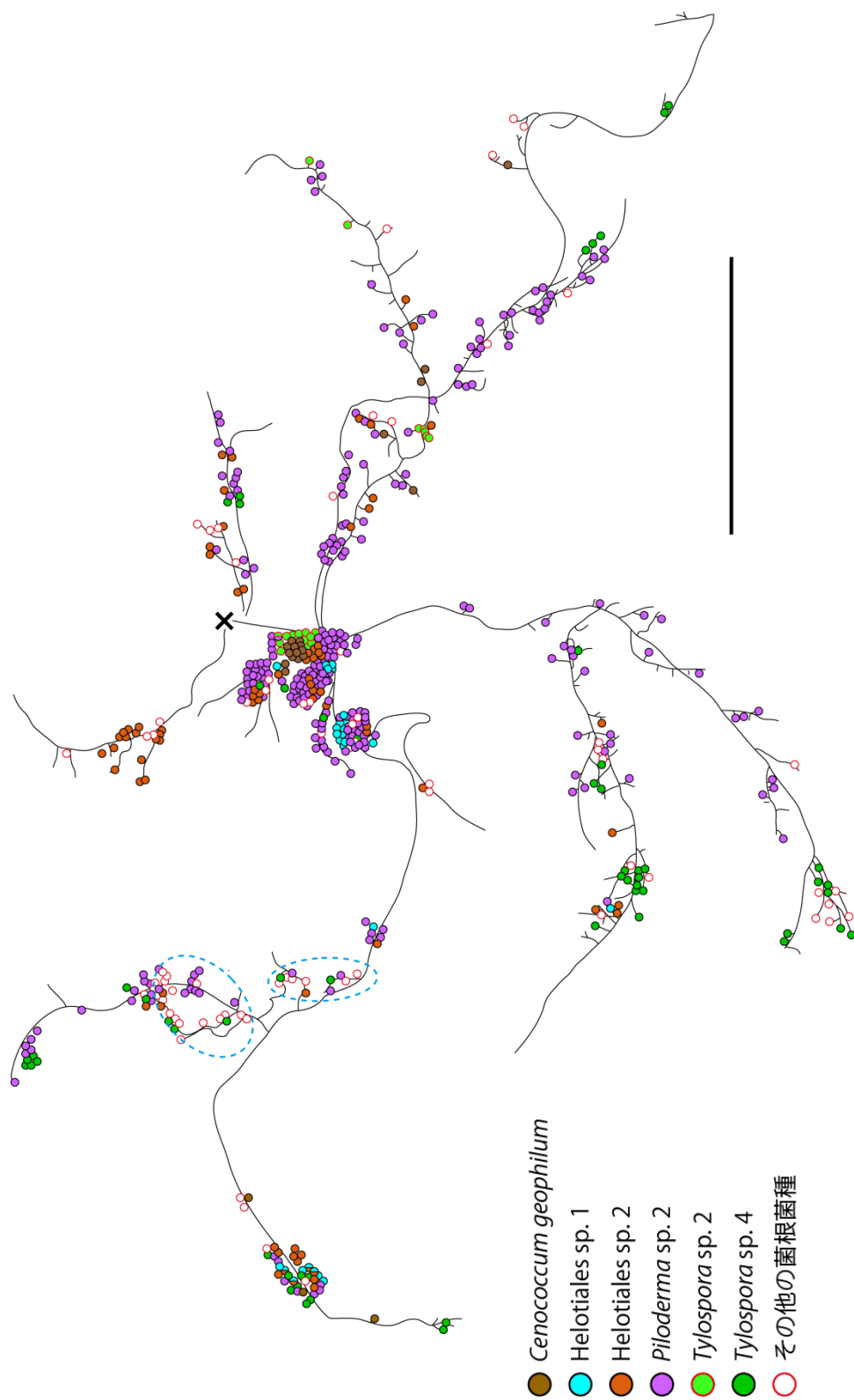


図 2-3c. T3 の根系における菌根の空間分布. 図中の×は地上部の位置, 黒い線は根, ●は採取した菌根の位置と菌種を示す. Bar = 5 cm.
 青の破線は種多様性が高い位置を示す.

表 2-3. 各種樹の菌根分布のクラスター解析.

距離階級 (mm) ^a	T1					T2					T3				
	菌根菌種					菌根菌種					菌根菌種				
	<i>C. geophilum</i>	<i>Amphinem a</i> sp.	<i>Piloderma</i> sp. 2	<i>Russula</i> sp. 1	<i>Tomentella</i> sp. 1	<i>C. geophilum</i>	<i>Lactarius</i> sp.	<i>Piloderma</i> sp. 2	<i>Russula</i> sp. 3	<i>C. geophilum</i>	<i>Helotiales</i> sp. 1	<i>Helotiales</i> sp. 2	<i>Piloderma</i> sp. 2	<i>Tylospora</i> sp. 2	<i>Tylospora</i> sp. 4
0-10	0.316	0.010*	0.000*	0.287	0.290	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
10-20	0.025*	0.123	0.001*	0.761	0.496	0.313	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.118	0.049*	0.057	0.003*	0.004*
20-30	0.284	0.791	0.003*	0.467	0.894	0.774	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.745	0.004*	0.000*	0.557	0.000*
30-40	0.887	0.227	0.850	0.135	0.346	0.914	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.484	0.105	0.735	0.320	0.000*
40-50	0.931	0.886	0.858	0.961	0.371	0.957	0.001*	0.715	0.000*	0.987	0.000*	0.999	0.999	0.215	0.433
50-60	0.374	0.996	0.996	0.884	0.443	0.460	0.107	0.307	0.613	0.997	0.000*	0.115	0.005*	0.014*	0.219
60-70	0.528	0.997	1.000	0.038*	0.924	0.983	1.000	1.000	0.946	1.000	0.152	0.402	0.345	0.511	0.886
70-80	0.775	0.888	1.000	0.294	0.637	0.569	0.988	1.000	0.989	1.000	0.161	0.529	0.923	0.357	0.996
80-90	0.897	0.524	0.997	0.066	0.267	0.975	0.999	1.000	0.997	0.999	0.015*	0.600	0.025*	0.896	0.951
90-100	0.504	0.219	0.959	0.924	0.977	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	0.007*	0.863	0.998	1.000	0.866
100-110						0.695	1.000	1.000	1.000	1.000	0.348	0.365	0.875	1.000	0.996
110-120						0.218	1.000	1.000	1.000	1.000	0.108	0.962	0.920	1.000	0.768
120-130						0.003*	1.000	1.000	1.000	1.000	0.049*	0.998	1.000	1.000	0.971
130-140						0.005*	0.994	1.000	1.000	1.000	0.010*	0.752	0.893	1.000	1.000
140-150						0.015*	0.968	0.996	0.993	0.998	0.170	0.926	0.998	1.000	0.773
150-160										0.937	0.990	0.972	0.995	0.800	0.864
160-170										0.988	0.779	0.040*	0.921	0.002*	0.968
170-180										0.096	0.829	0.557	0.993	0.267	0.976
180-190										0.000*	0.291	0.982	0.653	0.466	0.590
190-200										0.000*	0.264	0.996	0.857	0.484	0.988
200-210										0.000*	0.914	0.993	0.999	0.420	1.000
210-220										0.000*	0.925	1.000	0.826	0.000*	0.951
220-230										0.068	0.323	0.942	0.788	0.005*	1.000
230-240										0.181	0.707	0.442	0.670	0.000*	1.000
240-250										0.989	0.988	0.038*	0.003*	0.001*	0.615

表内の数字は仮想分布のクラスター指数が実際の分布よりも大きくなる確率を示す.

*は $P < 0.05$ (実際の分布においてその種が有意に集中すること) を示す.

a: 各菌種が有意に集中しているかどうかは, 各菌種の菌根からの距離階級ごとに解析した.

2-2. コメツガ・シラビソにおける外生菌根と土壌中の感染源の詳細分布

材料と方法

菌根と土壌の採取

試料の採集は、2-1 と同じ調査地で行った。2012 年 8 月 8 日に、コメツガとシラビソが生育していた 4 つの露岩上から、約 20 cm × 20 cm × 厚さ 5 cm のリターとコケ類からなる基質を、根系の形ができるだけ崩れないように採集して実験室に持ち帰った（図 2-4）。2012 年 9 月 4 日にも、別の 2 つの露岩上から同様に基質を採集して持ち帰った。採集した各試料から、スキャナーを用いて露岩側の基質全体の画像を得た後、土壌と菌根を採取するまで 4 °C の冷蔵庫で保存した。

各試料から、平面状に広がる根系の一部を 1 箇所選び、その根系周辺の基質を 1 cm 角の格子に区切った（図 2-5）。各区画から土壌を 0.2 g 採取して、1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、DNA の抽出を行うまで -20 °C で保存した。さらに、各区画と根系の位置を記録した後に根系を水道水で丁寧に洗浄し、スキャナーを用いて根系の画像を保存した。実体顕微鏡下で各根系内の根端の位置を記録しながら、全ての根端を採取し、2-1 と同じ方法により、DNA 抽出を行うまで保存した。

菌根および根外菌糸体の菌種菌種の推定

菌根からの DNA 抽出、T-RFLP 解析および塩基配列の決定は、2-1 と同じ方法で行った。土壌からの DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて行なった。抽出の手順は付属のプロトコールにしたがった。抽出した DNA を滅菌水で 40 倍に希釈したものをテンプレートとして、ITS1F/ITS4 プライマー対を用いて rDNA-ITS 領域を PCR 増幅した。得られた PCR 産物をインサート DNA として、2-1 と同じ方法でサブクロニングを行った。土壌区画あたり 10 個の形質転換した大腸菌コロニーを採取し、2-1 と同じ方法で ITS 領域の塩基配列を決定した。

得られた塩基配列は、CD-HIT Suite (Huang et al. 2010) を用いて、97 % 以上一致する配列を同じグループとした。各グループから代表配列を 1 つ選び、2-1 と同じ方法で属、科、目の推定を行なった。土壌のみから検出されたグループについては、属の推定がで

きて、かつその属が Tedersoo et al. (2010) において菌根菌と推定された属であった場合は、菌根菌とした。それ以外のグループは、その他の菌類とした。

樹種の推定

採取した根系の樹種を推定するために、*rbcLa*-F プライマー (Levin et al. 2003) と、*rbcLa*-R プライマー (Kress et al. 2009) を用いて、葉緑体 DNA の *rbcL* 領域の PCR 増幅を行なった。PCR 反応液 (10 μ l) の組成は、1 \times NH₄ reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM 各 dNTP, 0.05 U BIOTAQ DNA polymerase (Bioline, London, UK), 0.5 μ M 各プライマー, テンプレート DNA 1.0 μ l とした。PCR 反応は、95 $^{\circ}$ C \cdot 4 分の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒, 55 $^{\circ}$ C \cdot 60 秒, 72 $^{\circ}$ C \cdot 60 秒の 3 過程を 40 サイクル行い、さらに 72 $^{\circ}$ C \cdot 10 分の伸長反応を行った。増幅産物を ExoSAP-IT によって精製した後、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。各根端の塩基配列は、INSDC に登録されている塩基配列を用いて相同性検索を行い、モミ属と最も相同性が高かった場合はシラビソ、ツガ属と最も相同性が高かった場合はコメツガと推定した。

菌根分布図と根外菌糸体分布図の作成

2-1 と同じ方法により、根系図と菌根分布図を作成した。さらに、この根系図の各根端に、推定された菌種ごとに異なる色の点を打ち、菌根分布図を作成した。また、各土壌区画内の出現菌種数から円グラフを作成し、根外菌糸体分布図を作成した (図 2-5)。

結果

菌根菌の種構成

調査した 6 つの根系 (根系 A~F) のうち、根系 A~根系 D はツガ属、根系 E と根系 F はモミ属と推定された。

根系 A~F から、合計 314 個の菌根が得られた。T-RFLP 解析の結果、これらの菌根は 24 タイプに分けられ、さらに塩基配列の比較から、各タイプが異なる菌種と推定された (表 2-4)。これらの種のうち、*Sebacina* sp. 11 の菌根数が最も多かったが、根系 F でのみ検出され、他の根系では検出されなかった。次に多かったのは *Piloderma* sp. 2 で

あり、4つの根系で検出された。*Piloderma* sp. 2 の塩基配列は、2-1 で調査したコメツガの根系で最も優占していた *Piloderma* sp. 2 の塩基配列と 99 %一致したことから、両者は同種であると推定された。他に複数の根系で検出された菌種は、*Helotiales* sp. 3, *Meliniomyces* sp. 2, *Rhizoscyphus* sp., *Tylospora* sp. 10 であり、残りの 19 種はいずれも 1 つの根系のみから検出された。

各区画の土壌から 1〜7 種の菌根菌が検出され、合計 114 区画から 66 種の菌根菌が検出された（表 2-5, 図 2-5）。菌根菌と推定されなかった菌種（その他の菌類）は少なく、全体の 7.3 %であった。検出された菌根菌のうちの 15 種は、菌根からも検出された菌種であった。検出数が 10 以上であったのは 12 種であり、残りの 54 種はまれにしか検出されなかった。最も検出数が多かったのは、菌根からは検出されなかった *Inocybe* sp. 3 であり、4 つの根系で検出され、このうち 3 つの根系の土壌で最も多く検出された。次に検出数が多かったのは、菌根数が 2 番目に多かった *Piloderma* sp. 2 であり、菌根が検出された 4 つの根系から検出された。3 番目に検出数が多かったのは、菌根からは検出されなかった *Inocybe* sp. 2 であり、2 つの根系から検出された。菌根数が最も多かった *Sebacina* sp. 11 は、菌根が検出された根系 F の土壌中でのみ検出された。

根系および周辺土壌における各菌種の分布

根系 A では、*Tylospora* sp. 7 と *Piloderma* sp. 2 の菌根が、それぞれ集中して分布しており、それぞれ 3 区画と 7 区画から採取された（図 2-5a）。両種は、18 区画の土壌のうち、それぞれの種の菌根が採取された区画またはその周辺を含む 15 区画と 16 区画からも検出された。*C. geophilum* は、3 区画の菌根と、それらとは別の 1 区画の土壌から検出された。*Meliniomyces* sp. 2 と *Rhizoscyphus* sp. は菌根のみから検出され、土壌からは検出されなかった。土壌からは 19 種の菌根菌が検出され、*Tylospora* sp. 7, *Piloderma* sp. 2, *C. geophilum* を除く 16 種は土壌のみから検出された。

根系 B では、*Sebacina* sp. 6 の菌根が 2 ヶ所に集中して分布していた（図 2-5b）。*Sebacina* sp. 6 は、20 区画の土壌のうち、菌根が採取された 3 区画を含む 14 区画からも検出された。*Inocybe* sp. 2 は、全区画の土壌から最も多く検出されたが、菌根からは検出されなかった。土壌からは 15 種の菌根菌が検出され、そのうちの 12 種は土壌のみから検出された。

根系 C では, *Piloderma* sp. 2 の菌根が根系全体に分布しており, 20 区画の土壌のうち, 菌根が採取された 8 区画を含む 19 区画から検出された (図 2-5c) . *Meliniomyces* sp. 2 と *Rhizoscyphus* sp. の菌根も採取されたが, 根系 A と同様に, 両種は土壌からは検出されなかった. また, *Membanomyces* sp. も, 根系の 1 ヶ所に菌根が集中して分布していたが, 土壌からは検出されなかった. 一方, *Inocybe* sp. 3 は, 全区画の土壌から検出されたが, 菌根からは検出されなかった. 土壌からは 11 種が検出され, そのうちの 10 種は土壌のみから検出された.

根系 D では, *Sebacina* sp. 2 の菌根が根系全体に分布しており, 18 区画の土壌のうちの 12 区画から検出された (図 2-5d) . また, *Clavulinaceae* sp. 2, *Piloderma* sp. 2, *Sebacina* sp. 2, *Tomentella* sp. 7, *Tylospora* sp. 10, *Tylospora* sp. 19 は, 菌根と土壌の両方から検出された. これらの種では, 菌根が採取された区画と, 土壌から検出された区画とが一致しないことが多かった. *Inocybe* sp. 3 は, 根系 C と同様に全区画の土壌から検出されたが, 菌根からは検出されなかった. 土壌から 18 種が検出され, そのうちの 12 種は土壌のみから検出された.

根系 E では, *Rhizoscyphus* sp. や *Hydnotrya* sp. が多くの菌根から検出されたが, 土壌からは検出されなかった (図 2-5e) . *Piloderma* sp. 2 と *Tylospora* sp. 10 は菌根数が少なく, それぞれ 2 区画から菌根が採取されたのみであった. しかし, 土壌からは, 20 区画のうち, それぞれ菌根が採取された区画を含む 16 区画と 8 区画から検出された. *Inocybe* sp. 3 は, 18 区画の土壌から最も多く検出されたが, 菌根からは検出されなかった. 土壌からは 23 種の菌根菌が検出され, そのうちの 21 種は土壌のみから検出された.

根系 F では, *Sebacina* sp. 11 が多くの菌根から検出され, 土壌からも全ての区画から最も多く検出された (図 2-5f) . *Cortinarius* sp. 13 は 1 ヶ所に集中して分布していたが, 土壌からはほとんど検出されず, 菌根が採取された区画の隣の区画からのみ検出された. *Paxillus* sp. は 2 ヶ所に集中して分布していたが, 土壌からは検出されなかった. 土壌からは 9 種の菌根菌が検出され, そのうちの 5 種は土壌のみから検出された.

考察

6つの露岩上の根系から、24種の菌根菌が検出された。これらのうち、複数の露岩上から検出された種は6種のみであり、根系ごとに菌根菌の種組成が大きく異なっていた。また、菌根を採取した根系周辺の土壌からは、66種の菌根菌が検出された。これらのうち、複数の露岩上から検出された種は20種であり、菌根と同様に、根系ごとに菌根菌の種組成が大きく異なっていた。この結果は、前節の調査において、異なる露岩から採集した稚樹の根系ごとに菌根菌の種組成と優占種が大きく異なっていた結果と一致しており、前節の考察を支持するものである。

検出された菌根菌のうち、根系Aおよび根系Cの菌根では、*Piloderma* sp. 2（前節の*Piloderma* sp. 2と同種）が優占しており、根系Dおよび根系Eからも検出された。*Piloderma* sp. 2の菌根数は総菌根数の14.3%を占めており、土壌においても50.0%の区画から検出され、総検出数の17.4%を占めていた。本種は前節においても優占していたことから、本調査地の露岩上は、本種の生育に適した環境であると推測される。

根系A、根系C、根系Fでは、菌根で最も多く検出された*Piloderma* sp. 2または*Sebacina* sp. 11が、土壌からも最も多く検出された。このことは、菌根において優占している種は土壌中に多くの根外菌糸体を発達させていることを示唆している。一方で、根系B、根系D、根系Eでは、菌根からは検出されなかった*Inocybe* sp. 2と*Inocybe* sp. 3が土壌から最も多く検出された。両種は4つの露岩上の78区画中76区画で検出されたが、いずれの種も菌根からは全く検出されなかった。また、前節の菌根の種組成の調査でも、本調査で土壌中から検出された*Inocybe* 属菌は検出されておらず、他種の*Inocybe* 属菌が871個の菌根の中の1根端から検出されたのみであった。このように、菌根からはほとんど検出されない*Inocybe* 属菌が、土壌から多数検出された理由は不明であるが、露岩の周囲にはシラビソ成木が生育しているため、*Inocybe* 属菌がシラビソ成木に菌根を形成し、そこから伸びた根外菌糸体が検出された可能性がある。また、一度形成された菌根が別の種に入れ替わる場合があること（Smith and Read 2008）や、子実体形成後に菌根が枯死すること（Guidot et al. 2001, Zhou et al. 2001, Zhou and Hogetsu 2002）が報告されている。本節で検出された*Inocybe* 属菌も、菌根が枯死または入れ替わることで菌根からは検出されず、土壌中に残っていた根外菌糸体のみが検出されたのかもしれない。

土壌中の菌根菌種の解析では、調査した 114 区画のうち、根系 E の 1 区画と根系 F の 8 区画を除いたほとんど全ての区画において、1 区画内から複数種の菌根菌が検出され、1 種の菌根菌の根外菌糸体のみが土壌を占有している場所はほとんどなかった。また、*Sebacina* sp. 11 が菌根で優占していた根系 F では、土壌中でも同種が優占していたが、一方で、*Piloderma* sp. 2, *Tylospora* sp. 7, *Sebacina* sp. 2, *Sebacina* sp. 6 の菌根が集中分布していたり、根系全体に分布していたりした根系では、菌根の直下や周辺の土壌から同種の菌根菌が検出されると同時に、他種の菌根菌も検出された。これらのことは、今回検出された菌種の多くは、菌根の周辺土壌を排他的に占有していなかったことを示している。前節において、菌根のクラスターを形成している菌種が、土壌中に存在する他種の感染源よりも優位に新たな根端に感染できる理由として、①菌根から新たに伸長した根外菌糸体は、土壌中の他の感染源よりも感染能力が高い、②菌根の周りには感染源となる根外菌糸体量が増える、という 2 つの仮説を挙げた。本節の調査により、根系周辺の土壌には、様々な菌種の菌根菌が存在することが明らかにされた。このことは、コメツガの根系に菌根のクラスターを形成していた菌根菌は、未感染の根端への感染をめぐる種間競争に勝利したことを示している。つまり仮説①を支持する結果である。また、根系 A, 根系 C, 根系 F では、菌根において優占している種は土壌中に多くの根外菌糸体を発達させていることが示唆された一方で、根系 B, 根系 D, 根系 E では、菌根を形成していない種が土壌中から多く検出され、仮説②についての明確な傾向は見られなかった。これら 2 つの仮説について、次章の室内実験でさらに検証する。



図 2-4. 露岩上に更新したコメツガ. 岩が露出している部分の基質を採集した.

表 2-4. 各根系から検出された菌根菌種.

菌根菌種	コメツガ				シラビソ	
	根系A	根系B	根系C	根系D	根系E	根系F
子嚢菌門						
<i>Cenococcum geophilum</i>	3	0	0	0	0	1
<i>Helotiales</i> sp. 3	0	2	2	4	1	0
<i>Hydnотrya</i> sp.	0	0	0	0	6	0
<i>Meliniomyces</i> sp. 2	1	0	6	0	0	0
<i>Phialocephala</i> sp.	0	0	0	0	0	10
<i>Rhizoscyphus</i> sp.	3	0	1	0	11	0
担子菌門						
<i>Clavulina</i> sp. 3	0	1	0	0	0	0
<i>Clavulinaceae</i> sp. 2	0	0	0	3	0	0
<i>Cortinarius</i> sp. 11	0	2	0	0	0	0
<i>Cortinarius</i> sp. 13	0	0	0	0	0	28
<i>Hydnum</i> sp.	0	0	0	0	0	6
<i>Membranomyces</i> sp.	0	0	5	0	0	0
<i>Paxillus</i> sp.	0	0	0	0	0	11
<i>Piloderma</i> sp. 2	14	0	17	10	4	0
<i>Pseudotomentella</i> sp.	0	0	0	1	0	0
<i>Russula</i> sp. 6	0	1	0	0	0	0
<i>Sebacina</i> sp. 2	0	0	0	41	0	0
<i>Sebacina</i> sp. 6	0	6	0	0	0	0
<i>Sebacina</i> sp. 11	0	0	0	0	0	89
<i>Sebacina</i> sp. 12	0	0	0	0	0	1
<i>Tomentella</i> sp. 7	0	0	0	2	0	0
<i>Tylospora</i> sp. 7	10	0	0	0	0	0
<i>Tylospora</i> sp. 10	0	0	0	1	3	0
<i>Tylospora</i> sp. 19	0	0	0	7	0	0

表 2-5. 続き.

菌根菌種	土壌からのDDNA検出数 ^a						BLAST検索結果 ^b				
	コマツガ			シラビソ			Score	e-value	Access No.	Identities	Species
	根系A	根系B	根系C	根系D	根系E	根系F					
<i>Sebacina</i> sp. 4	0	0	0	1	0	0	767	0.0	AJ534910	393/395 (99%)	<i>Sebacina</i> sp. W53
<i>Sebacina</i> sp. 5	0	0	0	0	2	0	791	0.0	AJ534910	399/399 (100%)	<i>Sebacina</i> sp. W53
<i>Sebacina</i> sp. 6*	0	26	0	0	0	0	829	0.0	UDB016419	553/594 (93%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 7	0	7	0	0	0	0	601	e-172	UDB016419	375/399 (93%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 8	0	1	0	0	0	0	609	e-174	UDB016419	375/398 (94%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 9	0	0	0	0	0	2	571	e-163	UDB016419	369/396 (93%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 10	0	0	0	0	0	4	640	0.0	UDB016419	531/595 (89%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 11*	0	0	0	0	0	120	803	0.0	UDB016419	548/593 (92%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 12*	0	0	0	0	0	7	969	0.0	UDB016422	569/592 (96%)	<i>Sebacina dimitica</i>
<i>Sebacina</i> sp. 13	0	0	0	0	0	1	589	e-168	UDB016419	373/397 (93%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 14	0	0	0	0	0	1	537	e-153	UDB016419	367/399 (91%)	<i>Sebacina epigaea</i>
<i>Sebacina</i> sp. 15	0	0	0	0	1	0	729	0.0	AB848613	406/407 (99%)	<i>Sebacina</i> sp. YM251
<i>Tomentella</i> sp. 6	1	0	0	0	0	0	1045	0.0	UDB011638	627/659 (95%)	<i>Tomentella terrestris</i>
<i>Tomentella</i> sp. 7*	0	0	2	3	4	0	1049	0.0	UDB016188	613/637 (96%)	<i>Tomentella fuscocinerea</i>
<i>Tomentella</i> sp. 8	0	0	0	1	0	0	811	0.0	UDB016491	473/493 (95%)	<i>Tomentella cinereoumbrina</i>
<i>Tomentella</i> sp. 9	0	0	0	1	0	0	844	0.0	UDB016491	509/534 (95%)	<i>Tomentella cinereoumbrina</i>
<i>Tomentella</i> sp. 10	0	0	1	1	0	0	577	e-164	UDB016173	357/375 (95%)	<i>Tomentella fuscocinerea</i>
<i>Tomentella</i> sp. 11	0	0	1	0	0	0	793	0.0	UDB003302	415/420 (98%)	<i>Tomentella stuposa</i>
<i>Tomentella</i> sp. 12	0	0	0	0	2	0	696	0.0	UDB003305	560/623 (89%)	<i>Tomentella</i> sp.
<i>Tricholoma</i> sp. 2	5	0	0	0	0	0	977	0.0	UDB011595	633/667 (94%)	<i>Tricholoma viridilutescens</i>
<i>Tricholoma</i> sp. 3	1	0	0	0	0	0	634	0.0	UDB011595	412/437 (94%)	<i>Tricholoma viridilutescens</i>
<i>Tylospora</i> sp. 5	26	1	0	0	0	0	955	0.0	UDB002468	557/578 (96%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 6	3	0	0	0	0	0	624	e-179	UDB002468	376/395 (95%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 7*	55	2	0	0	0	0	450	e-126	UDB002468	282/299 (94%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 8	2	0	0	0	0	0	749	0.0	UDB002468	458/482 (95%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 9	3	0	0	0	4	0	755	0.0	UDB002468	390/393 (99%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 10*	0	1	5	11	9	0	979	0.0	UDB002468	563/581 (96%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>

表 2-5. 続き.

菌根菌種	土壌からのDNA検出数 ^a						BLAST検索結果 ^b				
	コマツガ			シラビソ			Score	e-value	Access No.	Identities	Species
	根系A	根系B	根系C	根系D	根系E	根系F					
<i>Tylospora</i> sp. 11	0	0	1	0	1	0	749	0.0	UDB002468	390/394 (98%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 12	2	0	0	0	0	0	642	0.0	UDB002468	380/396 (95%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 13	1	0	0	0	0	0	563	e-160	UDB002468	370/396 (93%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 14	0	2	0	0	0	0	599	e-171	UDB002468	374/394 (94%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 15	0	2	0	0	0	0	583	e-166	UDB002468	335/346 (96%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 16	1	0	0	0	0	0	904	0.0	UDB002468	552/579 (95%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 17	0	0	0	1	0	0	805	0.0	UDB002468	431/437 (98%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 18	0	0	0	2	1	0	787	0.0	UDB002468	432/443 (97%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
<i>Tylospora</i> sp. 19*	0	0	0	16	1	0	1126	0.0	UDB002469	611/620 (98%)	<i>Tylospora asterophora</i>
<i>Tylospora</i> sp. 20	0	0	1	0	1	0	761	0.0	UDB016384	393/396 (99%)	<i>Tylospora asterophora</i>
<i>Tylospora</i> sp. 21	0	0	0	0	1	0	674	0.0	UDB002469	380/388 (97%)	<i>Tylospora asterophora</i>
<i>Tylospora</i> sp. 22	0	0	0	2	0	0	652	0.0	UDB002469	374/385 (97%)	<i>Tylospora asterophora</i>
<i>Tylospora</i> sp. 23	0	0	0	0	2	0	730	0.0	UDB002469	391/396 (98%)	<i>Tylospora asterophora</i>
<i>Tylospora</i> sp. 24	0	0	0	1	2	0	650	0.0	JQ712008	359/368 (97%)	<i>Tylospora fibrillosa</i>
その他の菌類	9	5	7	10	14	38					

a : 各菌根菌種が検出された大腸菌コロニーの数, b : 相同性検索で最も類似していた配列.

*は菌根からも検出された菌根菌種を示す. 菌根菌と推定できなかった菌種は, その他の菌類とした.

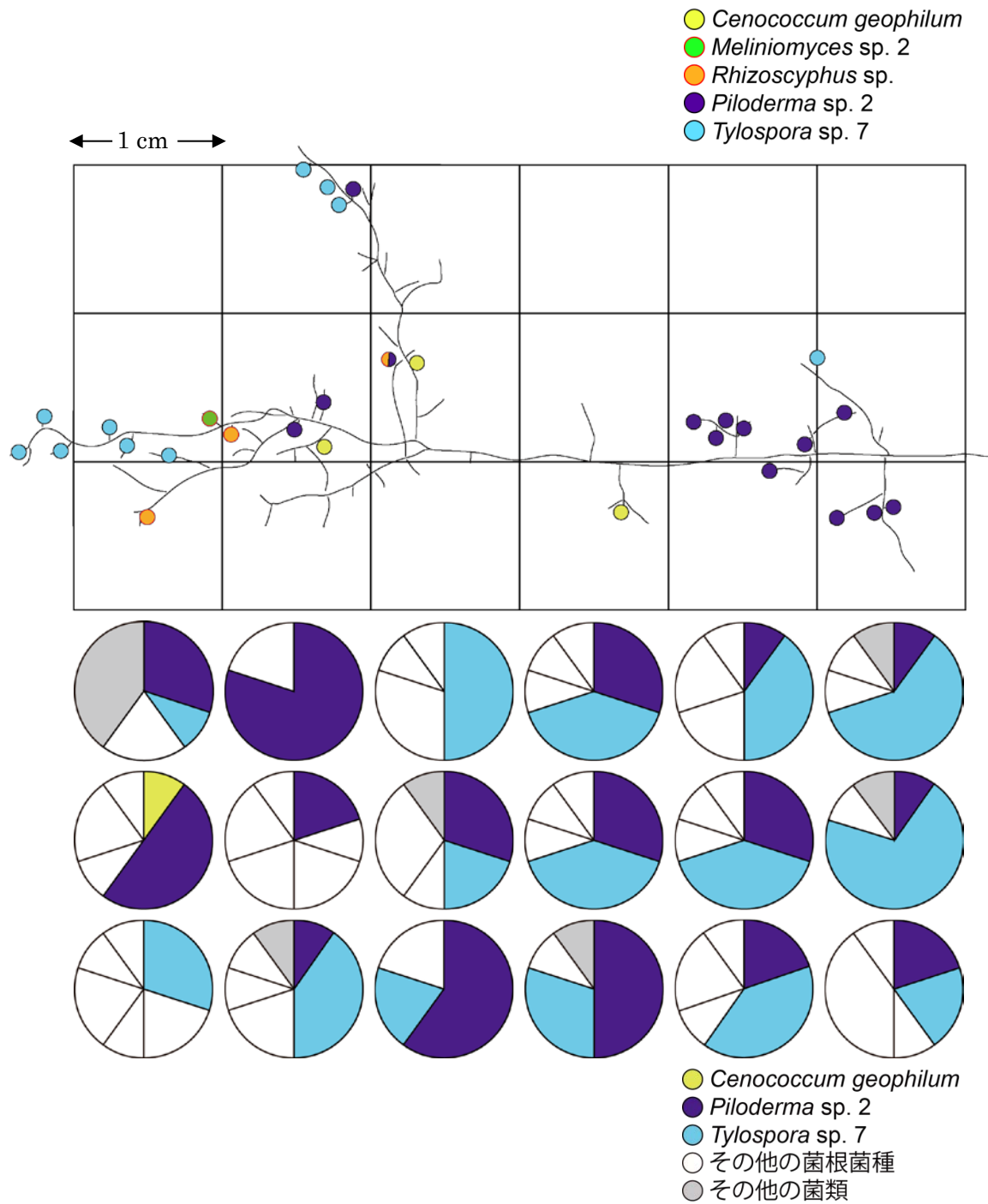


図 2-5a. 根系 A における菌根分布（上）と土壌中の根外菌糸体の菌種分布（下）

菌根分布の図中の●は菌根を採取した位置と種を示す。格子の位置と円グラフの位置が対応しており、土壌を採取した区画を示す。円グラフは、各区画の土壌 DNA から得た 10 個のクローンの菌種構成で、円グラフにおいて色がついていない菌根菌種は、菌根から出現しなかった菌種を示す。

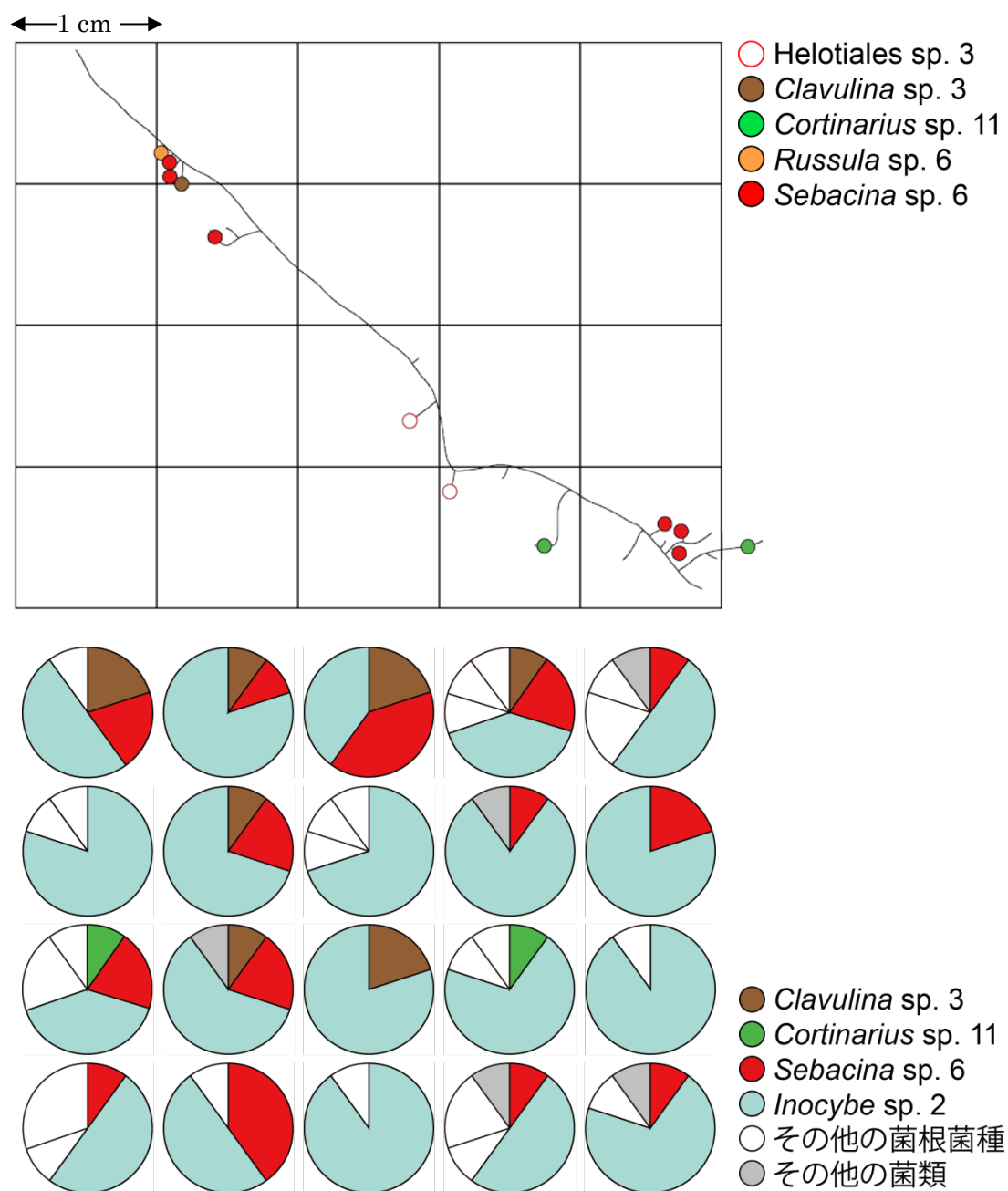


図 2-5b. 根系 B における菌根分布（上）と土壤中の根外菌糸体の菌種分布（下）

図の構成は図 2-3a. と同様.

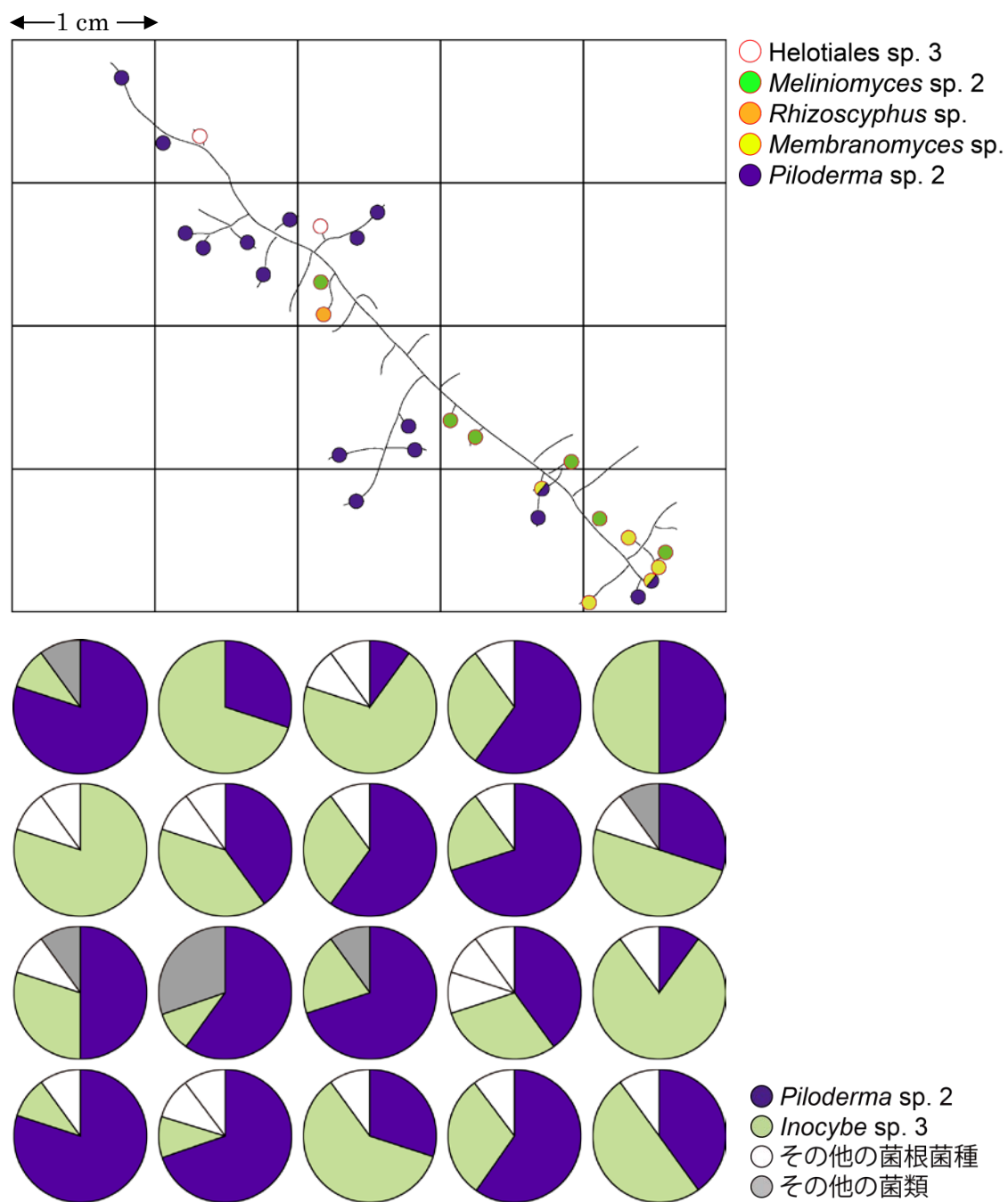


図 2-5c. 根系 C における菌根分布（上）と土壤中の根外菌糸体の菌種分布（下）

図の構成は図 2-3a.と同様.

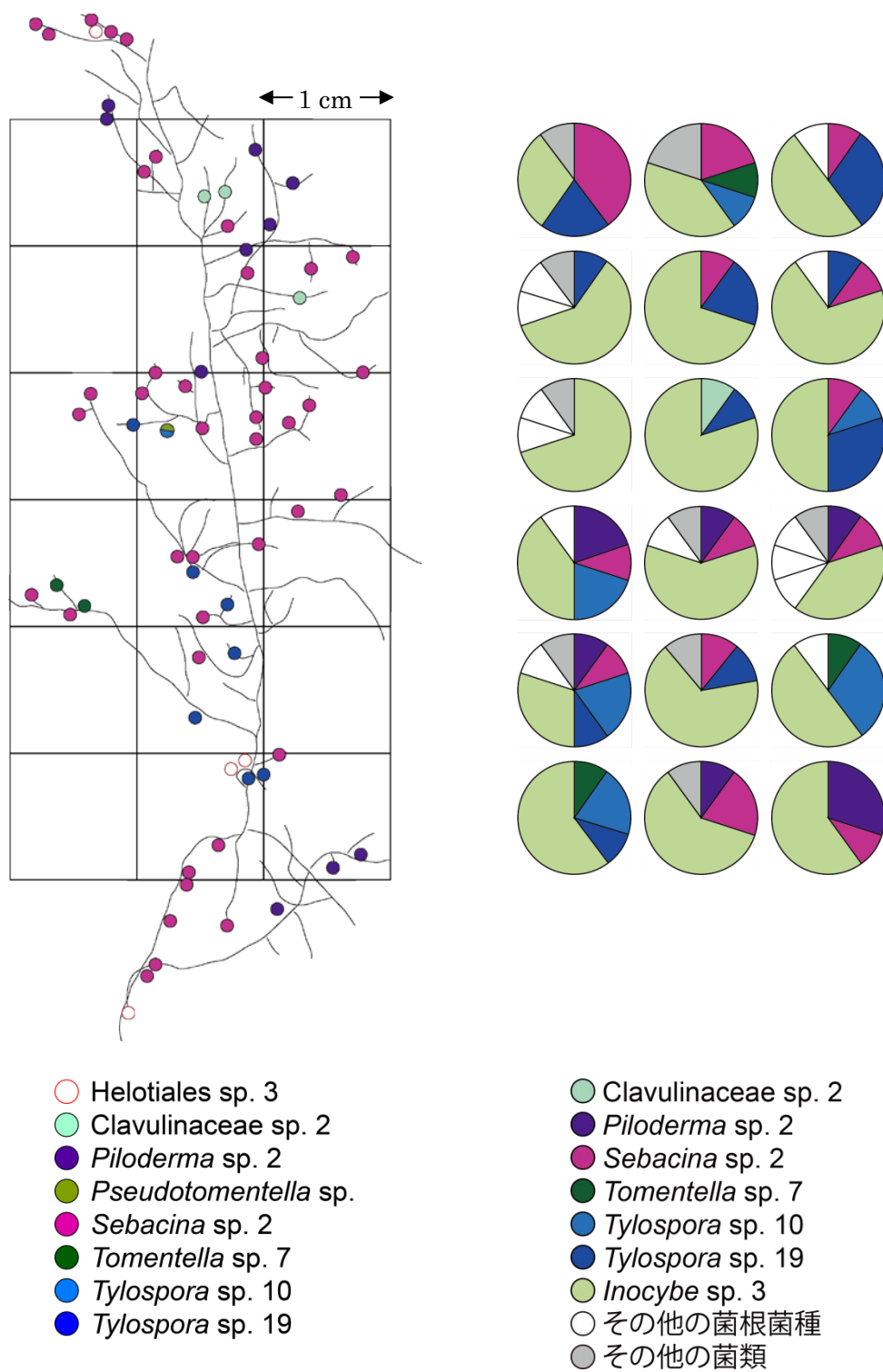


図 2-5d. 根系 D における菌根分布（左）と土壤中の根外菌糸体の菌種分布（右）

図の構成は図 2-3a.と同様.

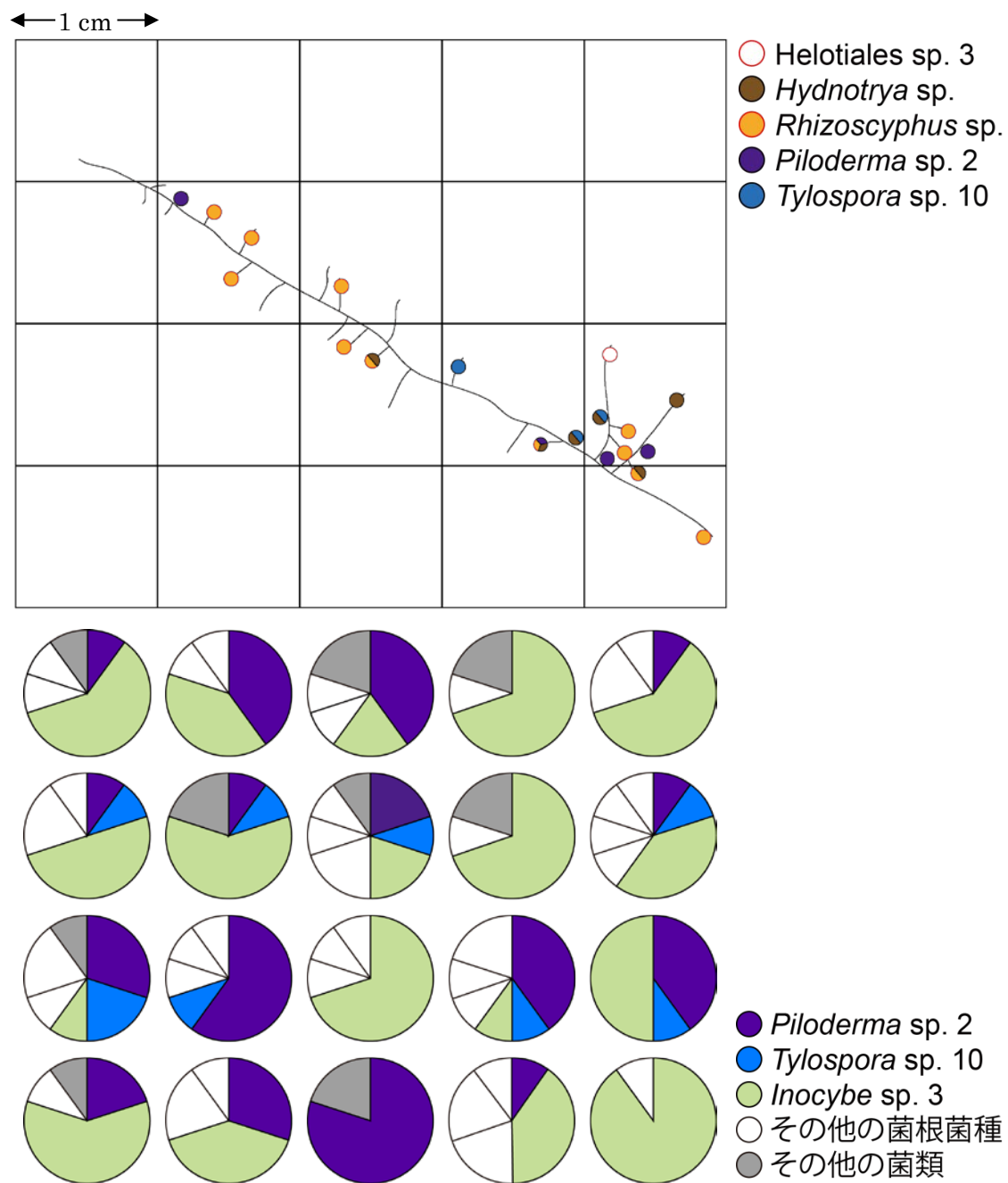


図 2-5e. 根系 E における菌根分布（上）と土壌中の根外菌糸体の菌種分布（下）

図の構成は図 2-3a. と同様.

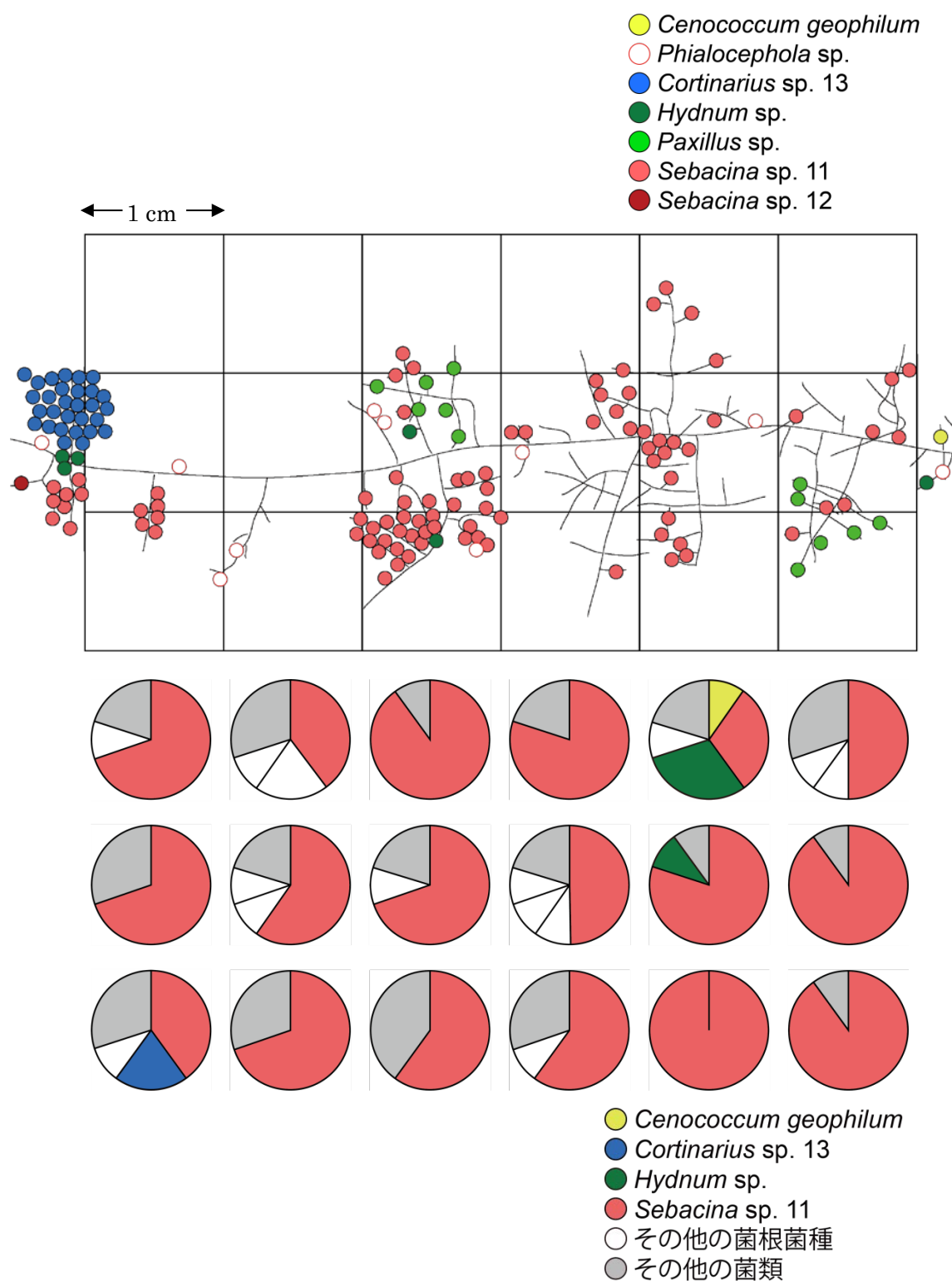


図 2-5f. 根系 F における菌根分布（上）と土壌中の根外菌糸体の菌種分布（下）
図の構成は図 2-3a.と同様.

3 章 根外菌糸体による菌根形成に菌糸体量と宿主からの炭素供給が及ぼす影響

はじめに

2 章では、根端スケールにおいて、各菌種の菌根が集中して分布する傾向があることを明らかにした。さらに、菌根周辺の土壤中に存在する菌根菌の種構成を調査した結果から、各菌種の菌根が集中分布する傾向になるのは、クラスターを形成している菌種が、土壤中の他種の感染源よりも優位に新たな根端に感染しているためであると考えられた。菌根菌は、根端と接触する機会が多いほど菌根が形成されやすいと推測されるため、菌根の周りに根外菌糸体が多いことが、クラスターを形成している菌種が優位に感染できる理由の 1 つと考えられる。また、もう 1 つの理由として、菌根から新たに伸長した根外菌糸体の菌根形成能力が、土壤中の他の感染源よりも高いことが考えられる。菌根菌は、宿主から供給される炭素源を利用して根外菌糸体を伸長させること（寺本 2012）や、根外菌糸体を宿主から切り離すと、24 時間以内に菌糸体の呼吸速度が 50 % 以下になること（Söderström and Read 1987）が報告されている。したがって、宿主からの炭素供給が、根外菌糸体の菌根形成能力に影響していると考えられる。

本章では、根箱実験系を用いて、土壤中の根外菌糸体量と宿主から根外菌糸体への炭素供給が、新たな菌根形成に及ぼす影響を検証した。菌根から新たに伸長した根外菌糸体による菌根形成について検証するために、土壤中に伸長させた根外菌糸体の先端部に無菌根の根を接触させた直後に形成される菌根数について、処理区間での比較を行なった。

2 章で調査したコメツガとシラビソは種子の発芽率が低く、成長も遅いため、本章以降の研究では、コメツガやシラビソと同じマツ科に属するクロマツ（*Pinus thunbergii* Parl.）を宿主として用いた。クロマツは、種子の発芽率が高く、成長が速いため、短期間で大量の実生苗を揃えることが可能である。また、日本の代表的な菌根性樹木であり、これまでに菌根菌に関する多くの研究で用いられているため（Maehara et al. 1993, Taniguchi et al. 2008, Kataoka et al. 2009, Wu et al. 2012, Sawada et al. 2014）、実験結果の比較も容易である。一方、接種に用いる菌根菌には、クロマツに菌根を形成することが確認されているコツブタケ属菌（*Pisolithus* sp.）とキツネタケ属の 1 種であるウラムラサ

キ (*Laccaria amethystina* (Huds.) Cooke) を用いた。コツブタケ属菌およびキツネタケ属菌は、宿主範囲が広く、汎世界的に分布しており、*in vitro* での培養が容易であり、樹木の成長促進効果が高いといった特長を持つ (Chambers and Cairney 1999, Kropp and Mueller 1999)。そのため、多くの接種実験で用いられており、本研究で用いた菌株も、Teramoto et al. (2012) や Wu et al. (2012) で使用されている。

材料と方法

接種源の作製

実験には、東京大学大学院新領域創成科学研究科の奈良一秀博士から分譲していただいたコツブタケ属菌の 1 菌株 (PS) と、ウラムラサキの 1 菌株 (La) を用いた。各菌株を MMN 平板培地 (Marx 1969) 上において、23 °C で 4 週間培養した。培養菌叢の一部をセロファン膜 (セロファンメンブレン, Bio-Rad, CA, USA) をのせた MMN 平板培地上に移植して、23 °C で 4 週間培養した。セロファン膜上に伸長した菌糸体を 5 mm 角に切り取って接種源とした。

クロマツ苗の栽培

121 °C で 90 分間オートクレーブ滅菌した無肥料の芝の目土 (pH 5.8–6.0) をプランターに入れ、クロマツの種子を播いた。クロマツの種子は、播種前に 23 °C 下で蒸留水に一晩浸した。播種したクロマツを、人工気象室内 (16h 明: PAR=200–250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 25 °C / 8h 暗, 23 °C) で 2 ヶ月間栽培し、無菌根のクロマツ苗 (以下無菌根苗) を作製した。

外生菌根苗の栽培

Teramoto et al. (2012) の方法にしたがって、各菌株を無菌根苗に接種した。東京大学附属小石川樹木園から採集した褐色森林土 (pH 5.3) と芝の目土を体積比 1:1 で混合した後、121 °C で 90 分間オートクレーブ滅菌して培養土とした。透明の亚克力製の箱 (横 14 cm × 縦 20.5 cm × 厚さ 1.5 cm, 以下根箱) に培養土を詰めた後、無菌根苗を 2 本移植し、さらに根に接触するように各菌株の接種源を置いた。根箱をアルミホイルで覆って遮光し、人工気象室内で 1 ヶ月間栽培して各菌株の感染苗 (親苗) を作製した。

新たに培養土を詰めた根箱に親苗を 1 本移植し、その両脇に無菌根苗を 1 本ずつ移植して 2 ヶ月間栽培し、新たな感染苗を作製した。この新たな感染苗を、以後の根箱実験系に用いる菌根苗とした。

根箱実験系の作成

各菌株の菌根苗を掘り取り、地下部を目開き 20 μm メッシュバッグ（横 8 cm \times 縦 15 cm）に入れた。メッシュバッグに入れた菌根苗を、培養土を詰めた新たな根箱の左端に移植した後、根箱をアルミホイルで覆って遮光して人工気象室内で栽培して、土壤中に根外菌糸体を伸長させた。菌根から伸びた新たな根外菌糸体による菌根形成を検証するために、PS を接種した菌根苗（PS 苗）は 20 日間（根外菌糸体の先端が根箱右端に到達する直前）または 30 日間（根外菌糸体が根箱全体に広がる程度）栽培した。La を接種した菌根苗（La 苗）は、La の根外菌糸体の伸長速度が PS よりも遅かったため、根外菌糸体の見た目が同程度になるように、30 日間または 40 日間栽培した。栽培後の根箱を、菌根苗をメッシュバッグから抜き取った除去区、菌根苗の地上部を遮光した遮光区、そのまま菌根苗の栽培を続ける対照区の 3 つに分けてそれぞれの処理をした後、各根箱の右端から 2 cm の位置に 2 ヶ月生の無菌根苗を移植した（図 3-1, 3-2）。各処理の反復数は、PS 苗は 14, La 苗は 15 とした。人工気象室内で 10 日間栽培した後、移植した無菌根苗を回収して実体顕微鏡下で菌根数を計測し、菌根形成率を測定した。

根外菌糸体量の測定に用いる培養土の回収

無菌根苗を移植した場所の根外菌糸体量を測定するために、上記と同様の根箱を作成した。反復数は、PS 苗の 30 日間栽培のみ 16 とし、他は 10 とした。各栽培期間の終了後に、根箱の右側から、横 5 cm \times 縦 15 cm の培養土を回収した（図 3-1）。回収した培養土は、 -20°C で 8 時間以上凍結した後に、凍結乾燥した。乾燥した培養土を、ミキサミル（MM 400, Verder Scientific, Haan, Germany）を用いて 30 s^{-1} , 60 秒間粉碎した後、根外菌糸体量の測定に用いるまで -20°C 下で保存した。

基準試料の調製

Hortal et al. (2008) を参考にして、滅菌培養土に既知量の菌糸体を添加した基準試料

を作成した。25 ml の MMN 液体培地を 100 ml 容三角フラスコに入れ、シリコセンをした後に 121 °C, 15 分間オートクレーブ滅菌した。MMN 平板培地で 4 週間培養した各菌株の培養菌糸体を、MMN 液体培地に接種し、25 °C, 暗黒下で 4 週間培養した。培養した菌糸体を、蒸留水で洗浄した後、培養土と同様の方法で凍結乾燥した。根箱の作製に用いた滅菌培養土も、同様に凍結乾燥した。乾燥培養土 4.90 g に乾燥菌糸 0.10 g を添加した後、ミキサーミルで 30 s⁻¹, 60 秒間粉碎して、菌糸体量測定の基準試料とした。基準試料は、測定に用いるまで -20 °C 下で保存した。

リアルタイム PCR に用いる特異的プライマーの設計

根外菌糸体量の測定は、リアルタイム PCR 法によって行った。リアルタイム PCR に用いる各菌株の特異的プライマーは、Primer3 (Untergasser et al. 2012) を用いて、PS および La の rDNA-ITS 領域の塩基配列と、UNITE データベース (Köljalg et al. 2005) に登録されているコツブタケ属菌とウラムラサキの rDNA-ITS 領域の塩基配列から設計した。PS 用のプライマーは 5 ペア, La 用のプライマーは 3 ペア設計し、International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) に登録されている塩基配列を用いて相同性検索を行い、特異性を確認した。さらに、各プライマー対と、各菌株の培養菌糸から抽出した DNA を用いて、希釈系列の定量性と、互いの菌株が増幅しないことを確認し、最も適したプライマー対を選択した。同時に、PCR 条件の最適化も行なった。

根外菌糸体量の測定

粉碎したサンプル土および基準試料 0.10 g から、ISOIL for Beads Beating (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて DNA の抽出を行った。抽出方法は、付属のプロトコールにしたがった。ただし、Hoshino and Matsumoto (2004, 2005) を参考にして、Lysis solution BB を 65°C に温めた後、950 µl あたり 20 mg のスキムミルクを添加したものを、Lysis Solution BB の代わりに用いた。

リアルタイム PCR は、設計したプライマー対を用いて、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System によって行なった。PS には PS05f (5'-CCGAAGCCCTTCGTTTTTAC-3') と PS05r (5'-ATGCGAGTCAGAGACGAAAC-3') , La には La01f (5'-TTAGGCTTGGATGTGGGAGTTGCG-3') と La01r (5'-AAGCTGTTACATCCACGG-3') のプライマー対を用いた。PCR 反応液 (20 µl) の組成は、1× THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (TOYOBO, Osaka,

Japan) , 0.3 μ M 各プライマー, テンプレート DNA 1.0 μ l とした. 基準試料から抽出した DNA を 10 倍ずつ希釈した希釈系列を作製し, 希釈系列のリアルタイム PCR により得られた Ct 値を用いて検量線を作成した. さらに, 各サンプル土の Ct 値を検量線にあてはめて根外菌糸体量を決定した.

統計解析

各菌株の異なる栽培期間における土壌中の根外菌糸体量は, Welch の t 検定によって解析した. 各処理区における菌根数は, 二元配置分散分析によって解析し, 主効果が有意であれば Tukey HSD 法による多重比較を行った.

結果

異なる栽培期間における培養土中の根外菌糸体量

培養土中の根外菌糸体量の平均値は, PS では, 栽培期間 30 日が栽培期間 20 日の約 4 倍, La では, 栽培期間 40 日が栽培期間 30 日の約 6 倍であり, どちらの菌株も栽培期間が長くなると土壌中の根外菌糸体量が有意に増加した (図 3-3) .

各処理区における菌根数および菌根形成率

PS の各処理区における菌根形成率は両栽培期間とも, 対照区で最も高く, どちらの栽培期間でも菌根形成率はほとんど変わらなかった (図 3-4a) . 菌根数も同様に, 両栽培期間とも, 対照区で最も多かった (図 3-5a) . 遮光区では栽培期間 30 日の方が 20 日より菌根数が多かったが, 対照区と除去区ではどちらの栽培期間でも菌根数はほとんど変わらなかった. 二元配置分散分析の結果, 菌根苗への処理のみが有意に影響していた (表 3-1) . 各処理間の多重比較の結果, 対照区の菌根数が, 遮光区と除去区よりも有意に多く, 遮光区と除去区の間では有意差はなかった (図 3-6a) .

La の各処理区における菌根形成率と菌根数は, PS ほど明確な差はなかったが, 除去区の菌根形成率が対照区よりも低く (図 3-4b) , 菌根数も同様に, 対照区より少なかった (図 3-5b) . 全ての処理区において, 栽培期間 40 日の方が 30 日より菌根形成率と菌根数が増加する傾向が見られた. 二元配置分散分析の結果, 菌根苗への処理と栽培期

間が有意に影響していたが、交互作用はなかった（表 3-2）。各処理間の多重比較を行った結果、対照区の菌根数が除去区よりも有意に多かったが、対照区と遮光区、遮光区と除去区の間では有意差はなかった（図 3-6b）。

考察

PS と La とともに、栽培期間の長い方が、培養土中の根外菌糸体量が有意に増加した。そのため、本研究では、栽培期間が菌根形成に及ぼした影響を、土壌中の根外菌糸体量が菌根形成に及ぼした影響とみなした。また、ユーカリ属樹木 (*Eucalyptus* sp.) の菌根形成では、新しい細根に菌糸が接触した後、1~2 日で菌糸が根の表皮へ侵入し、7 日程度で菌鞘が発達してハルティヒネットの形成が完了する (Smith and Read 2008)。他の樹種と菌根菌の間でも、同程度の時間で菌根が形成されると推測される。そのため本研究では、土壌中に伸長させた根外菌糸体は無菌根のクロマツ根系を接触させた後、10 日間で形成される菌根数を比較することで、根外菌糸体の菌根形成能力を評価した。

La においては、栽培期間の長い方が、菌根形成率が高く、菌根数も有意に多かった。このことは、根外菌糸体量の多い方が、形成される菌根数が多くなることを示している。一方、PS においては、栽培期間の間で菌根形成率はほとんど変化がなく、菌根数にも有意差がなかった。PS の対照区では、栽培期間 20 日で菌根形成率が約 85 % であり、無菌根の根端がほとんど無かった。したがって、栽培期間 20 日の根外菌糸体量が、根系全体に PS の菌根を形成するために十分であったため、栽培期間 30 日で根外菌糸体量が増えても、菌根数が増えなかったと考えられる。以上のことから、根外菌糸体量と菌根形成数との関係は、菌糸体量の増加により菌根形成数が増加するものの、ある程度の菌糸体量まで増加すると菌根形成数の増加は頭打ちになり、それ以上は菌糸体量が増加しても菌根形成数は変化しないと推測される。

PS と La のどちらにおいても、菌根苗の除去により菌根数が有意に減少した。このことは、宿主から供給される光合成産物を失うことにより、両種の菌根形成能力が速やかに低下することを示している。また、PS においては、遮光区の菌根数も対照区より有意に少なかった。このことは、PS の菌根形成には、直近の光合成により同化された炭素が主に利用されることを示唆している。本研究と同じクロマツ実生苗と PS を利用し

た根箱実験において、クロマツが光合成により取り込んだ炭素が、1日以内に根外菌糸体に転流し、さらに3日以内に転流が終了することが示されている（Wu et al. 2012）。本研究においては、宿主の除去や宿主の地上部の遮光によって、宿主から根外菌糸体への光合成産物の転流が無くなったことで、菌根形成に利用する炭素が不足したため、PSの菌根数が対照区よりも除去区や遮光区で減少したと考えられる。一方、Laにおいては、遮光区と対照区の菌根数に有意差はなかった。また、Laの対照区と除去区との菌根数の差は、PSの対照区と除去区との差ほど大きくなかった。このことから、Laでは遮光直前に同化された炭素が遮光後も地下部に転流して菌根形成に利用されることで、対照区との間に菌根数の差がなかったと推測された。

以上のように、本研究の結果から、土壌中の根外菌糸体量が多いほど、形成される菌根数も多くなることが示唆された。また、宿主からの光合成産物の供給の有無が、菌根形成に大きく影響していることが示唆された。このことは、2章で提案した仮説を支持している。つまり、菌根を形成した菌は、宿主から光合成産物の供給を受けることで新たな根外菌糸体の量を増やすとともに、根端への感染能力も増大するため、周囲の根端に優位に菌根を形成することが可能になると考えられる。

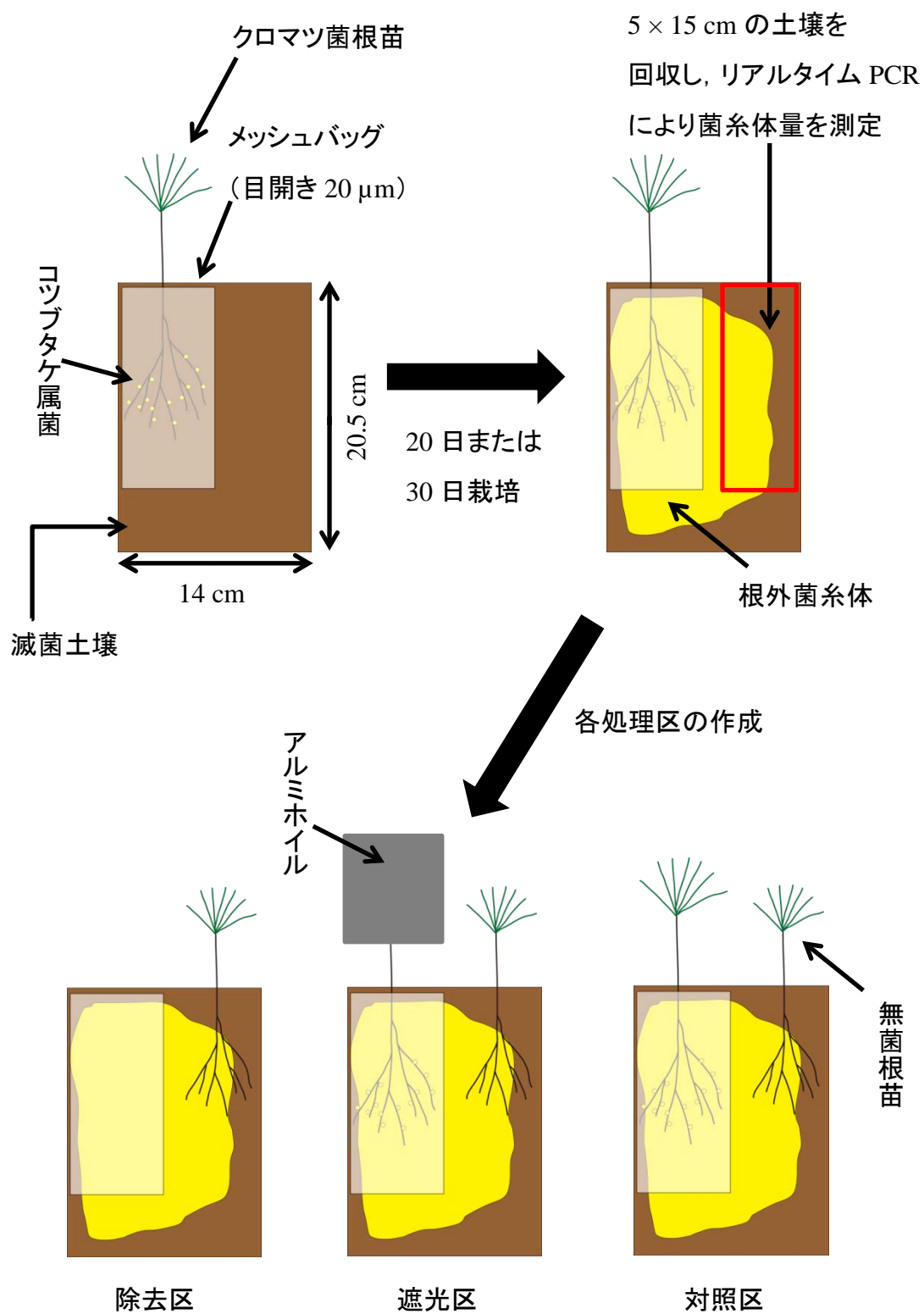


図 3-1. PS の菌根苗を用いた根箱実験系作製の模式図. La の菌根苗においても同様の方法で実験系を作成した.



図 3-2. PS の菌根苗を用いた各根箱実験系の様子（無菌根苗の移植 10 日後）.
(a) : 除去区, (b) : 遮光区, (c) : 対照区. Bar = 5 cm.

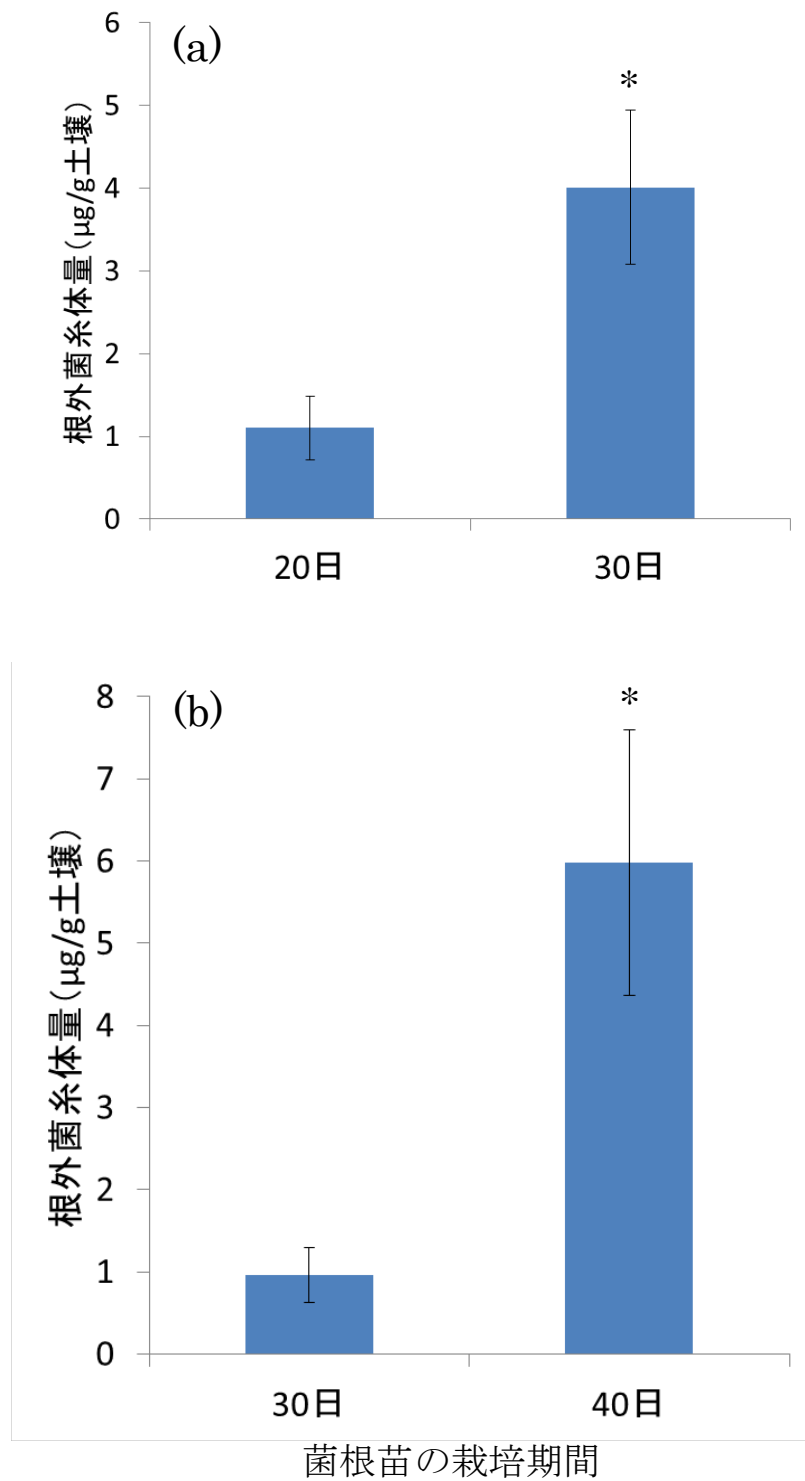


図 3-3. 各栽培期間後の培養土中の根外菌糸体量 (平均値 \pm 標準誤差).

(a) : PS (n=10, 16), (b) : La (n=10).

*は有意差があることを示す (welch t-test, $p < 0.05$).

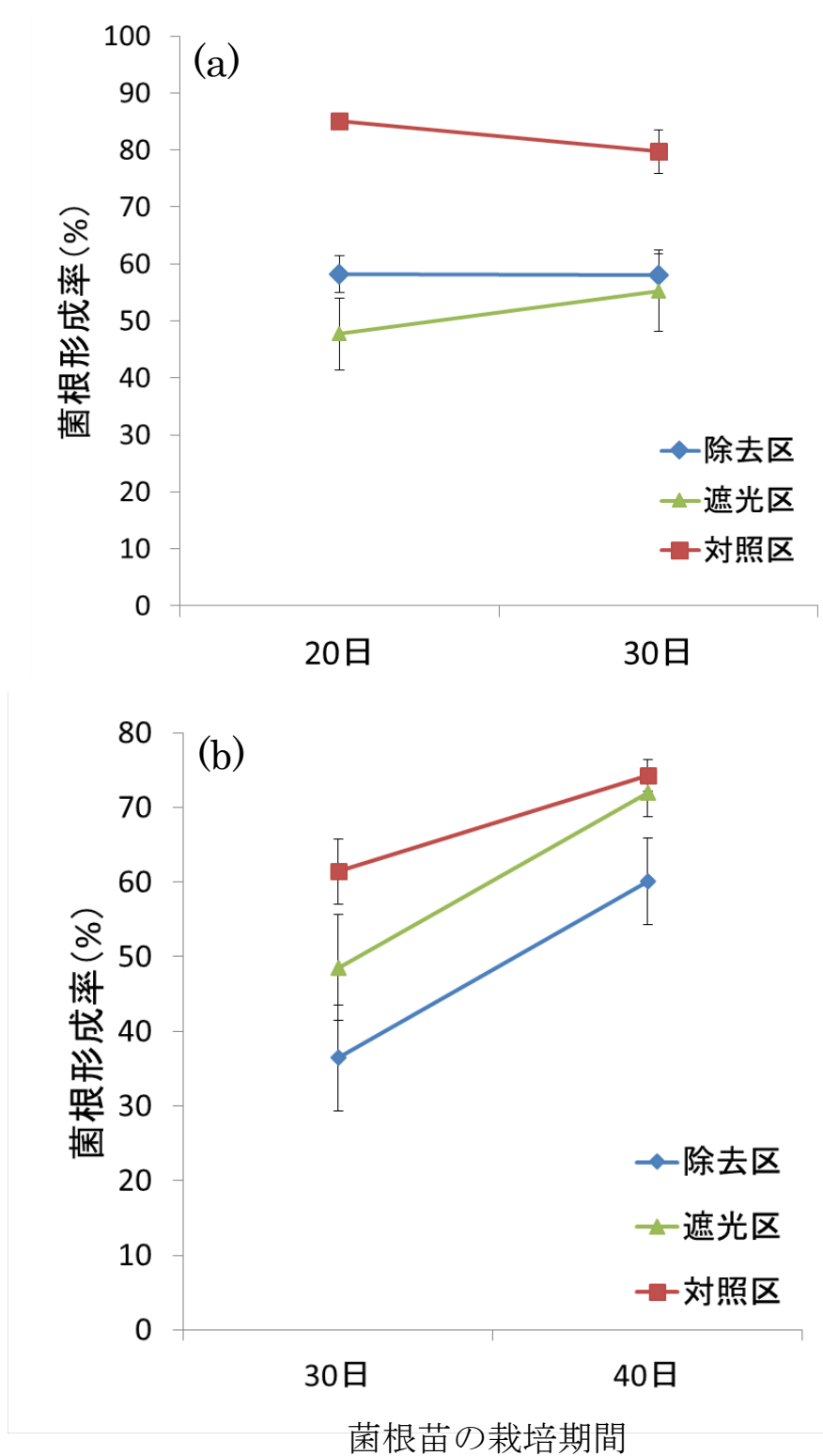


図 3-4. 各処理区における菌根形成率(平均値±標準誤差).

(a) : PS (n=14), (b) : La (n=15).

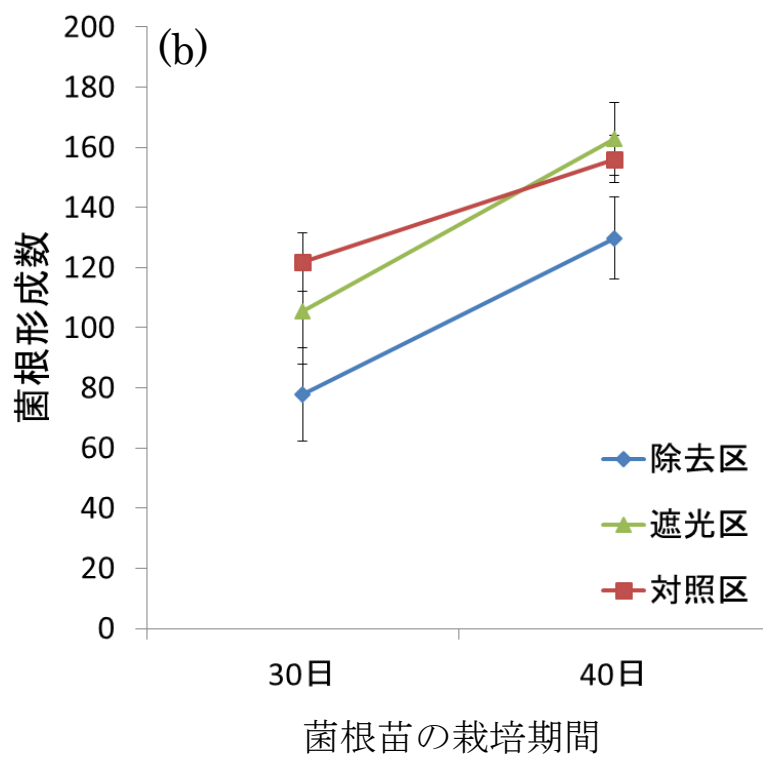
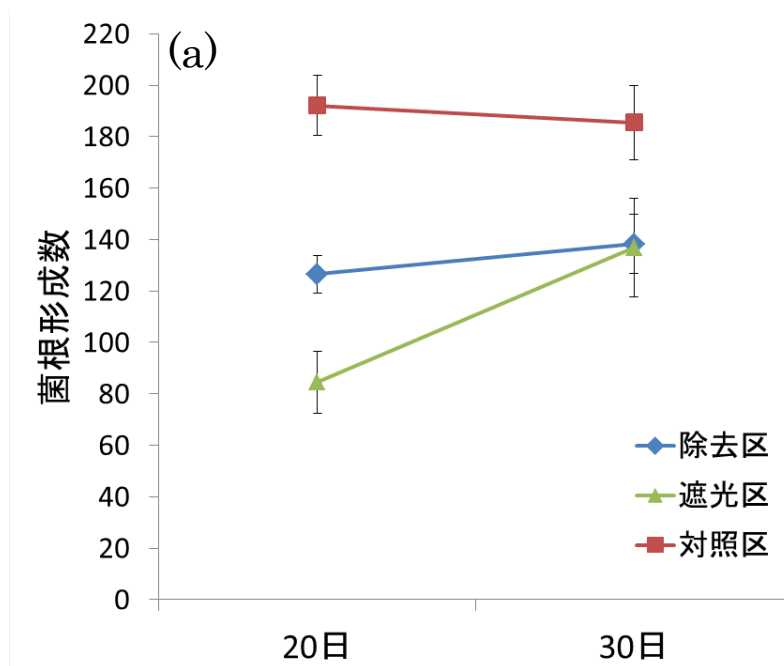


図 3-5. 各処理区における菌根数 (平均値±標準誤差).
(a) : PS (n=14), (b) : La (n=15).

表 3-1. PS の各処理区における菌根数の二元配置分散分析の結果.

要因	自由度	平方和	平均平方	F値	P値
処理	2	93698	46849	18.913	2.01E-07 ***
栽培日数	1	8380	8380	3.383	0.0697
処理*栽培日数	2	13936	6968	2.813	0.0661
残差	78	193214	2477		

表 3-2. La の各処理区における菌根数の二元配置分散分析の結果.

要因	自由度	平方和	平均平方	F値	P値
処理	2	21845	10923	4.202	0.0182 *
栽培日数	1	51696	51696	19.888	2.52E-05 ***
処理*栽培日数	2	2216	1108	0.426	0.6543
残差	84	218342	2599		

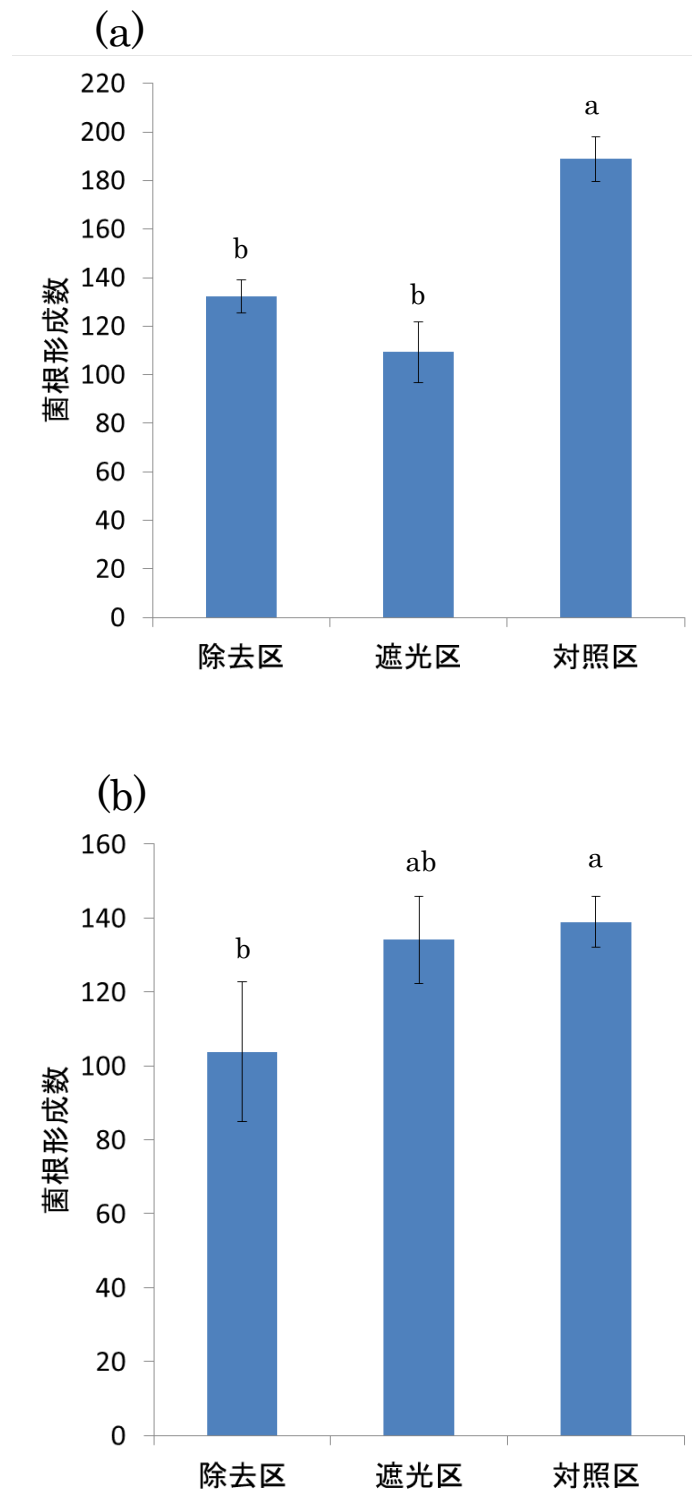


図 3-6. 各処理区間での多重比較 (平均値 ± 標準誤差). (a): PS (n=28), (b): La (n=30). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Tukey HSD, $p < 0.05$).

4 章 埋土菌糸体の菌根形成能力

はじめに

3 章の結果から、根外菌糸体の根端への感染には、宿主からの根外菌糸体への炭素供給の有無が大きく影響することが示された。一方で、宿主から根外菌糸体への炭素供給が絶たれても、菌根が形成された。実際の森林においては、土壤動物の摂食や活動による根外菌糸体の切断、植食性動物による根の摂食、宿主の根の枯死などによって、宿主からの炭素供給を失って断片化した根外菌糸体（埋土菌糸体）が常に存在していると考えられる。また、2 章の結果から、根系の一部では多種の菌根菌がモザイク状に分布しており、この場所では新たな根外菌糸体による感染ではなく、土壤中の孢子や菌核、埋土菌糸体による菌根形成が起きていることが示唆された。孢子や菌核は、土壤中で長期間休眠することができ（岡部 2000, Nara 2009）、干ばつや山火事などの大規模な攪乱の後に主要な感染源として機能することが示されている（Izzo et al. 2006, Peay et al. 2009）。埋土菌糸体も、孢子や菌核と同様に、新たな菌根形成の感染源として機能している可能性があるが、実際に埋土菌糸体がどの程度の期間生存し、菌根形成に寄与しているかは不明である。そこで本章では、埋土菌糸体が菌根形成能力をどの程度維持できるのかを、根箱実験系で検証した。

材料と方法

根箱実験系の作成

3 章と同じ方法で作成した PS と La の菌根苗を掘り取り、地下部を目開き 20 μm メッシュバッグ（横 8 cm \times 縦 15 cm）に入れた。メッシュバッグに入れた菌根苗を、培養土を詰めた新たな根箱の左端に移植した後、根箱をアルミホイルで覆って遮光して人工気象室内で栽培した。PS の菌根苗は 30 日間、La の菌根苗は 40 日間栽培して、土壤中に根外菌糸体を伸長させた後、以下の 4 つの処理区に分けた：①菌根苗を全て除去した除去区、②菌根苗を地際部で切断して地上部を除去した切断区、③菌根苗を全て除去したのち、根箱内の培養土をトレーに全て取り出し、藁さじを用いて塊状の培養土を細か

く潰してからよく混合して根箱に戻した攪乱区, ④菌根苗の栽培をそのまま続けた対照区. 各処理区の反復数は 6 とした. 各処理を行った後, 1 ヶ月, 2 ヶ月または 3 ヶ月間, 全ての処理区に対して水道水を週 1 回与えながら人工気象室内で培養した. 処理直後 (0 ヶ月) と各栽培期間終了後に, 各根箱の右端から 2 cm の位置に 2 ヶ月生の無菌根苗を移植した. また, 根外菌糸体量を測定するため, 根箱の左下の横 6 cm × 縦 4 cm の範囲の培養土を回収し, 代わりに滅菌した培養土を充填した (図 4-1). 人工気象室内で 30 日間栽培した後, 移植した無菌根苗を回収して菌根数を実体顕微鏡下で計測した.

根外菌糸体量の測定と統計処理

回収した培養土中の根外菌糸体量を, 3 章と同じ方法で測定した. 各処理区における培養土中の根外菌糸体量と, 移植した無菌根苗に形成された菌根数は, Tukey HSD 法による多重比較によって解析した.

結果

菌根数

PS の対照区においては, 全ての期間で菌根が形成されたが, 処理期間が長くなるにつれて, 菌根数は減少した (表 4-1). 除去区と切断区においては, 処理後 0 ヶ月と 1 ヶ月との間に有意な差はなく, 両期間とも, 対照区との間にも有意な差はなかった. 処理後 2 ヶ月でも菌根は形成されたが, 菌根数は, 処理後 0 ヶ月および 1 ヶ月よりも有意に減少した. 処理後 3 ヶ月には, 両処理区ともに菌根が形成されなかった. 一方, 攪乱区においては, 処理後 0 ヶ月と 1 ヶ月ともに, 他の 3 処理区に比べて有意に菌根数が少なかった. また, 処理後 2 ヶ月と 3 ヶ月では, 菌根が形成されなかった.

La の対照区においては, PS と同様に, 全ての期間で菌根が形成され, 処理期間が長くなるにつれて菌根数は減少した (表 4-2). 除去区と切断区においても, PS と同様に, 処理後 2 ヶ月まで菌根が形成された. 一方, PS とは異なり, 処理後 2 ヶ月の菌根数は, 処理後 0 ヶ月や 1 ヶ月の菌根数と有意な差がなく, 処理期間に応じた菌根数の減少は見られなかった. 処理後 3 ヶ月では PS と同様に, 菌根が形成されなかった. 攪乱区においては, PS と同様, 処理後 0 ヶ月では他の 3 処理区に比べて有意に菌根数が少なかった.

たが、処理後 1 ヶ月では他の処理区と同程度の数の菌根が形成され、他の 3 処理区の菌根数との間に有意な差はなかった。処理後 2 ヶ月と 3 ヶ月では、PS と同様に菌根が形成されなかった。

根外菌糸体量

PS の対照区においては、栽培期間が長くなるにつれて根外菌糸体量は増加する傾向があり、処理後 3 ヶ月の根外菌糸体量は 0 ヶ月よりも有意に多かった（表 4-3）。対照区以外の 3 処理区においては、処理後 1 ヶ月以降の根外菌糸体量は、処理後 0 ヶ月よりも大きく減少する傾向が見られ、処理後 3 ヶ月では 3 処理区ともに $0.1 \mu\text{g/g}$ 土壌以下となった。また、処理後 0 ヶ月では対照区と他の 3 処理区の間に根外菌糸体量の有意な差はなかったが、他の期間では対照区よりも他の 3 処理区の方が有意に少なかった。

La の対照区においては、PS と同様に、栽培期間が長くなるにつれて根外菌糸体量は有意に増加した（表 4-4）。特に、処理後 3 ヶ月の根外菌糸体量は、PS に比べて非常に多かった。対照区以外の 3 処理区においては、処理後 0 ヶ月では PS と同様に、対照区と有意な差はなかった。一方で、除去区と切断区では、PS とは異なり、処理後 1 ヶ月以降でも根外菌糸体量が大きく減少する傾向は見られなかった。攪乱区においては、処理後の期間が長くなるにつれて根外菌糸体量が減少する傾向は見られたが、減少速度は PS よりも遅かった。

考察

いずれの菌株においても、除去区と切断区においては処理後 3 ヶ月では全く菌根が形成されなかったが、処理後 2 ヶ月まで菌根が形成された。また、攪乱区においては、処理後 2 ヶ月以降では全く菌根が形成されなかったが、処理後 1 ヶ月まで菌根が形成された。このことは、いずれの菌株も、土壌が攪乱されず、断片化していない根外菌糸体は、2~3 ヶ月程度は菌根形成能力を維持できること、土壌が攪乱されて断片化した根外菌糸体は、1~2 ヶ月程度は菌根形成能力を維持できることを示している。つまり、2 章で観察された、感染頻度の低い菌種のモザイク状分布は、このような埋土菌糸体による菌根形成が起こることで形成される可能性があると考えられる。

対照区においては全ての期間で菌根が形成されたが、栽培期間が長くなるにつれて、菌根数は減少した。一方、土壌中の菌糸体量は、栽培期間が長くなるほど増加した。対照区では、新たな根外菌糸体が伸長するとともに、土壌中に古い根外菌糸体が蓄積されていくことで根外菌糸体量が増加すると考えられる。一般的に、菌糸は先端部で活発に代謝を行っており、古い菌糸は物質の貯蔵場所となる (Jennings and Lysek 1999)。したがって、菌根菌の古い根外菌糸体も、貯蔵場所としてのみ機能し、菌根形成にはほとんど寄与していないと考えられる。そのため、古い根外菌糸体が蓄積して根外菌糸体量が増加しても、菌根数が増加しなかったと考えられる。また、対照区では菌根苗が土壌中の養分を吸収して成長するため、栽培期間が長くなると根箱内の土壌に含まれる養分が枯渇してくると推測される。そのため、菌根苗の光合成速度が低下して、根外菌糸体への炭素転流が減った結果、無菌根苗の菌根数が減少したのかもしれない。さらに、対照区では栽培期間が長くなるほど菌根苗が大きくなるため、移植した無菌根苗とのサイズ差が次第に大きくなった (図 4-2)。アーバスキュラー菌根菌において、同一の菌糸ネットワーク (common mycorrhizal network) 内にサイズ差のある複数の宿主個体が存在すると、菌根菌は、炭素供給量が多い、サイズの大きな個体に優先的に養分を供給することが示唆されている (Nakano-Hylander and Olsson 2007, Pietikäinen and Kytöviita 2007, Merrild et al. 2013)。本研究においても、菌根菌が菌根苗に優先的に菌根を形成して養分を供給するようになり、無菌根苗の菌根数が減少したのかもしれない。

PS においては、除去区と切断区の根外菌糸体量が、処理後 1 ヶ月で対照区と比べて大きく減少し、その後も減少する傾向が見られた。しかし、これらの処理区では、処理後 2 ヶ月まで菌根が形成され、菌根数は対照区と有意な差はなかった。これらのことは、PS では、宿主から根外菌糸体への炭素供給が無くなることで、根外菌糸体量は急激に減少するものの、2 ヶ月間は生存して菌根の感染源として機能できることを示している。一方、攪乱区においては、処理後の根外菌糸体量の減少が除去区や切断区よりも早かった。また、菌根数は処理直後から対照区よりも有意に少なくなり、処理後 2 ヶ月では菌根が形成されなかった。したがって、PS の根外菌糸体は攪乱に弱く、宿主からの炭素供給が無くなった根外菌糸体が断片化されると、短期間で死滅してしまうと推測される。トリュフの 1 種である *Tuber aestivum* Vittad. について、乾燥処理した土壌と未処理の土壌の根外菌糸体量をリアルタイム PCR 法によって定量した結果、両者の菌糸体量には有意な差がなかった (Gryndler et al. 2013)。その理由として、Gryndler et al. (2013) は、

未処理の土壌をふるいにかけてことで、菌糸が断片化して死滅したかもしれないと推測している。除去区と切断区においては、根外菌糸体が攪乱されなかったことで菌糸が生き残っており、処理後 2 ヶ月までは菌根を再び形成できたと考えられる。

La の除去区と切断区においては、処理後の時間経過と根外菌糸体量の変化の間に明瞭な関係が見られなかった。また、両処理区ともに菌根数が処理後 2 ヶ月まで減少しなかった。これらのことは、La では、宿主から根外菌糸体への炭素供給が無くなっても、2 ヶ月程度は根外菌糸体があまり減少せず、菌根の感染源として機能できることを示している。処理後 3 ヶ月では、根外菌糸体量はあまり変化しなかったが、菌根は形成されなかった。これは、根外菌糸体の菌根形成能力が失われたか、死滅した菌糸の DNA が土壌中に蓄積していたと考えられる。いずれにしても、La の根外菌糸体は、宿主からの炭素供給が無くなってから 3 ヶ月が経過すると、菌根の感染源として機能しなくなると考えられる。一方、攪乱区においては、処理直後の菌根数は他の処理区よりも有意に少なかったが、処理後 1 ヶ月の菌根数は他の処理区と同程度にまで増加した。根外菌糸体量は、処理後の時間経過に伴って減少する傾向が見られ、処理後 2 ヶ月では菌根が形成されなかったことから、菌糸が土壌中で腐生的に増殖したために菌根数が増加したとは考えにくい。しかし、PS よりも、処理後 1 ヶ月の根外菌糸体量が減少しなかったことから、少なくとも攪乱に対する根外菌糸体の耐性が PS よりも高いと推測される。

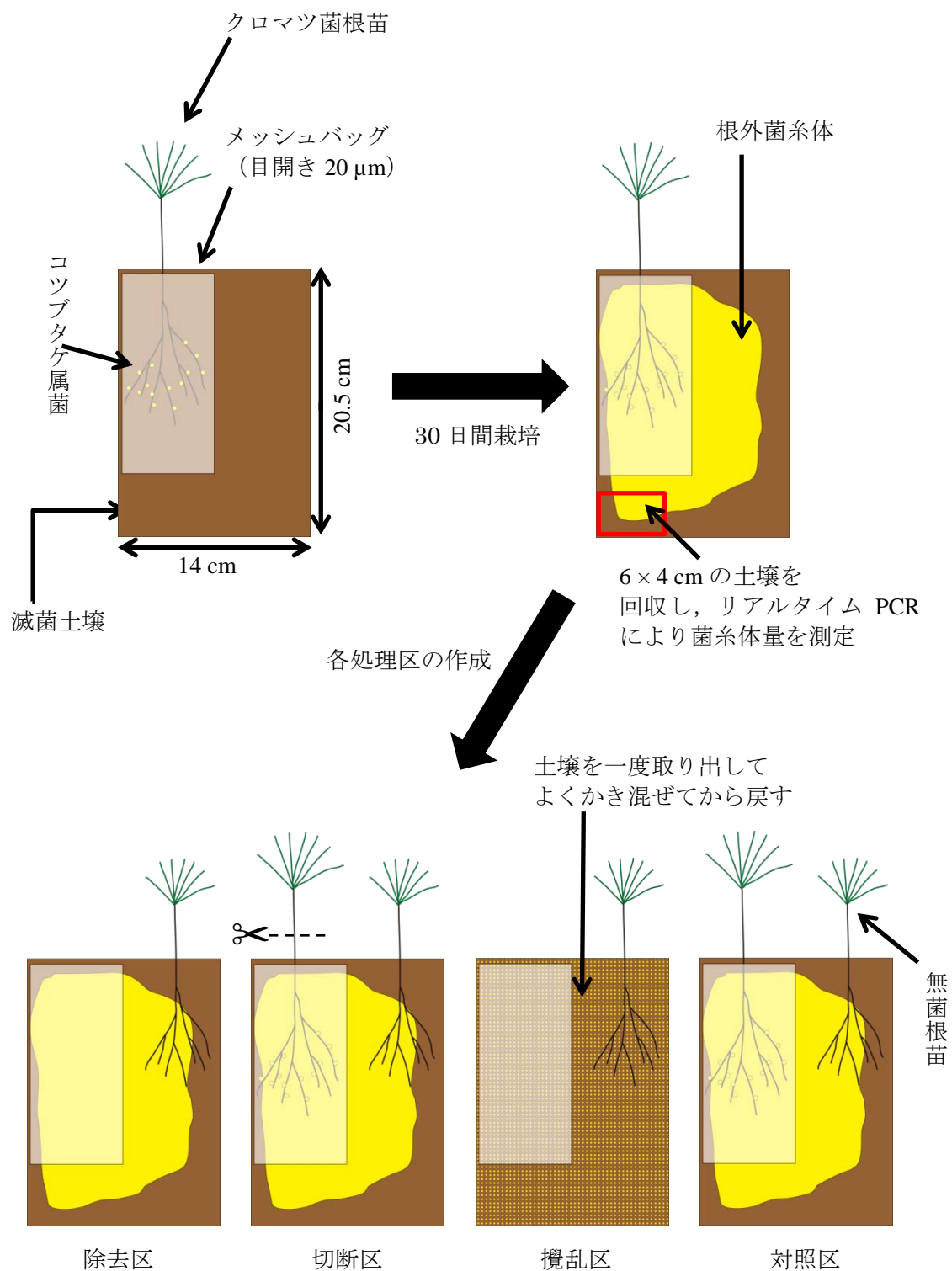


図 4-1. PS の菌根苗を用いた根箱実験系作成の模式図. La の菌根苗においても同様の方法で実験系を作成した.

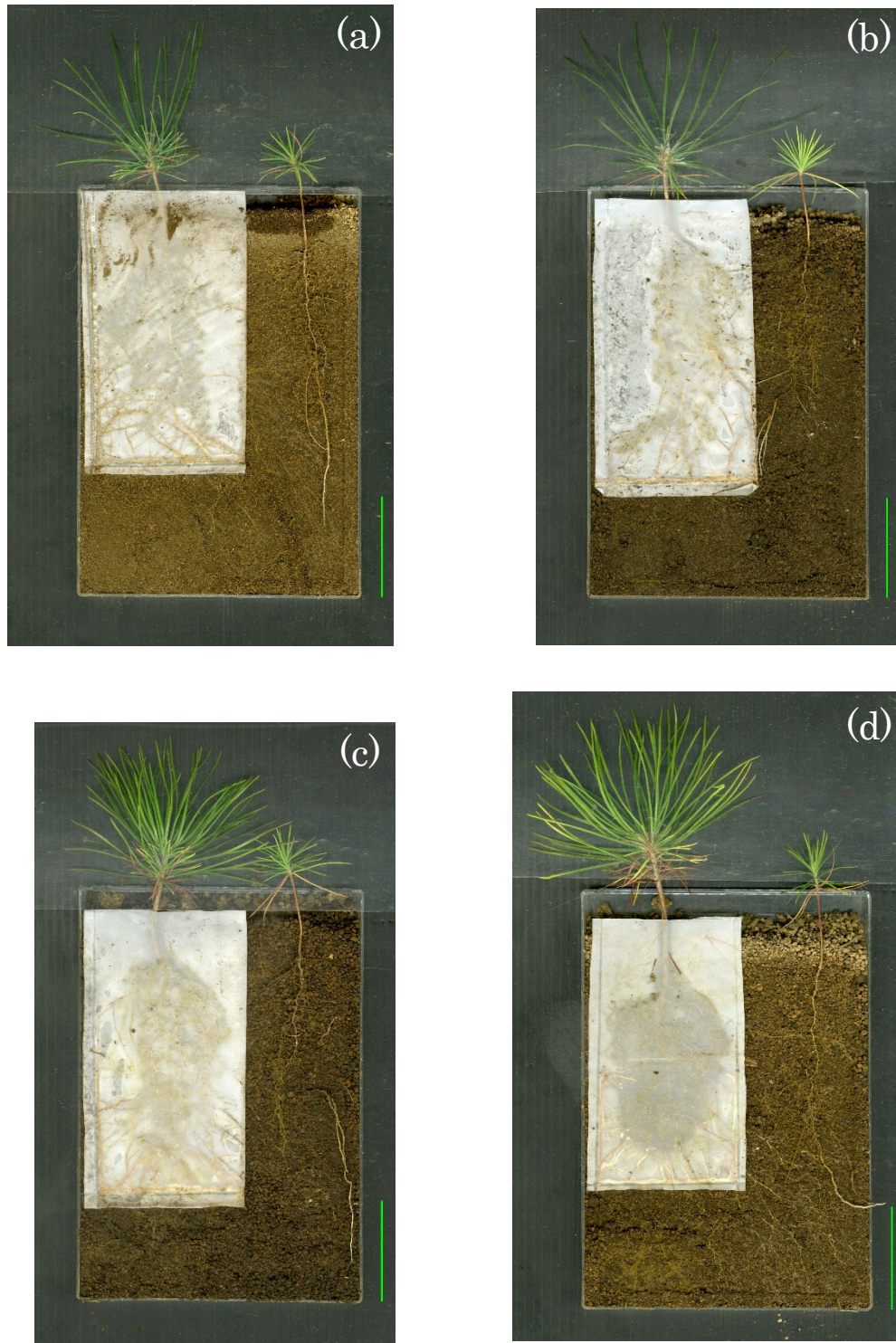


図3-2. PSの菌根苗を用いた根箱実験系の対照区の様子(無菌根苗の移植30日後).
 (a): 処理後0ヶ月, (b): 処理後1ヶ月, (c): 処理後2ヶ月, (d): 処理後3ヶ月.
 Bar = 5 cm.

表 4-1. PS の各処理区における菌根数（平均値±標準誤差，n=6）.

異なるアルファベットは有意差があることを示す（Tukey HSD, $p < 0.05$ ）.

	0ヶ月	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
除去区	315±27.6a	318±16.1a	183±41.4bcd	0±0f
切断区	346±37.2a	286±37.0ab	54.5±38.1ef	0±0f
攪乱区	41.3±20.1ef	9.83±9.83ef	0±0f	0±0f
対照区	244±26.0abc	234±38.3abc	137±16.4cde	104±24.9def

表 4-2. La の各処理区における菌根数（平均値±標準誤差，n=6）.

異なるアルファベットは有意差があることを示す（Tukey HSD, $p < 0.05$ ）.

	0ヶ月	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
除去区	210±20.9ab	261±32.6a	248±25.0a	0±0d
切断区	220±14.2ab	243±38.8ab	230±28.7ab	0±0d
攪乱区	63.0±17.1cd	213±31.0ab	0±0d	0±0d
対照区	265±24.6a	169±16.2ab	138±16.9bc	59.8±3.13cd

表 4-3. PS の各処理区における土壌中の根外菌糸体量 (平均値±標準誤差, n=6, µg/g 土壌). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Tukey HSD, $p < 0.05$).

	0ヶ月	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
除去区	12.1±3.66bc	2.14±0.581c	0.408±0.173c	0.00590±0.00273c
切断区	9.48±1.76bc	2.70±1.03c	0.263±0.145c	0.0138±0.00510c
攪乱区	21.3±6.22ab	0.784±0.0778c	0.0302±0.00897c	0.00224±0.00110c
対照区	13.4±2.89bc	18.5±3.55ab	20.3±3.09ab	30.6±7.86a

表 4-4. La の各処理区における土壌中の根外菌糸体量 (平均値±標準誤差, n=6, µg/g 土壌). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Tukey HSD, $p < 0.05$).

	0ヶ月	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月
除去区	7.67±2.41c	16.9±3.99c	4.25±0.585c	11.0±5.62c
切断区	9.62±2.15c	20.6±4.79bc	8.68±3.81c	11.9±4.25c
攪乱区	17.0±4.24c	6.75±1.36c	1.25±0.896c	0.136±0.0452c
対照区	12.2±4.24c	52.8±7.52b	30.9±4.39bc	163±22.8a

5 章 土壤中の不均一な窒素条件における菌根菌の動態と根の可塑性

はじめに

土壤中における養分の分布は、植物による吸収、土壤への吸着、雨水による流出などによって不均一になる。土壤養分の不均一性に対して、植物は表現型の可塑性によって根の形態を変化させ、養分の多い場所において側根の発生と伸長を促進することが知られている (Hodge 2004)。菌根菌と共生する植物は、養分吸収の大半を菌根菌に依存するため (Smith and Read 2008)、土壤中の不均一性に対する根の表現型の可塑性は、菌根菌の影響を受けると考えられる。しかし、草本類の根における表現型の可塑性については多くの研究が行われてきたが、菌根菌との共生は考慮されてこなかった (Hodge 2004)。

窒素は植物の必須元素の 1 つであり、菌根菌が共生する樹木が優占している亜寒帯林や温帯林では、土壤中の CN 比が高く、窒素が欠乏しているため、土壤中の窒素は主に菌根菌を通じて吸収される (Read 1993, 菊地 2000)。このため、森林内における樹木の成長や物質転流に菌根菌が果たす役割を考える上で、異なる窒素条件に対する樹木と菌根菌の反応を明らかにすることが重要である。これまでに、土壤中の窒素欠乏や窒素施肥が植物と菌根菌に及ぼす影響については、林分レベルで多くの研究が行われてきたが (Näsholm et al. 2013, Wallander and Ekblad 2015)、根系スケールの不均一な窒素条件に対する樹木と菌根菌の反応については不明な点が多い。

本章では、土壤中の窒素量や窒素の不均一性に対して、菌根の形成と根外菌糸体の成長、および根の表現型がどのように変化するのかを明らかにすることを目的とした。第 1 節では、菌根の形成と根外菌糸体の成長に対する窒素添加の影響を把握した。第 2 節では、根分けしたクロマツ菌根苗を用いて、不均一な窒素濃度が根外菌糸体の成長や根系の成長に及ぼす影響を調査した。

5-1. 土壌への窒素添加に対する菌根菌の動態

材料と方法

根箱実験系の作成

3章の方法により PS を感染させた 2.5 ヶ月生のクロマツ菌根苗を、滅菌した芝の目土を詰めた根箱に移植した後、根箱をアルミホイルで遮光して人工気象室内で栽培した。根箱を 10 個ずつ、3 つの処理区（N-区、N+区、N++区）に分け、それぞれの処理区の根箱に窒素濃度を 0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM に調製した改変ホーグランド液（Gloser et al. 2009, 表 5-1）を 80 ml/週与えて 8 週間栽培した後、菌根苗と土壌を回収した。菌根苗は、地上部、根、菌根の各部位に切り分け、それぞれを -20 °C で 8 時間以上凍結した後、凍結乾燥した。各部位の乾重を測定した後、ミキサーミルで粉碎し、元素分析計（SUMIGRAPH NCH-22, Sumika Chemical Analysis Service, Osaka, Japan）を用いて、各部位の窒素濃度を測定した。回収した土壌の根外菌糸体量は、3章と同じ方法で測定した。

統計解析

各部位の乾燥重量は、Tukey HSD 法による多重比較を行った、窒素濃度、窒素含有量、土壌中の根外菌糸体量は Steel-Dwass 法による多重比較を行った。解析には R (<https://www.r-project.org/>) を用いた。

結果

菌根苗の乾重

菌根苗の地上部、根、菌根のいずれの部位においても、N+区および N++区の乾重は N-区よりも有意に多かった（図 5-1）。またいずれの部位においても、N++区の乾重は N+区よりも多かったが、有意な差はなかった。菌根苗全体の乾重においても、同様の傾向が見られた。

菌根苗の窒素濃度および窒素含有量

菌根苗各部位の窒素濃度の平均は、全ての処理区において菌根で最も高く、地上部で最も低かった（図 5-2）。窒素含有量の平均は、地上部で最も高く、菌根と根では同程度だった（図 5-3）。全ての部位において、窒素添加量が多いほど、窒素濃度および窒素含有量が多くなる傾向が見られ、地上部と根の窒素濃度と窒素含有量は、全ての処理区間で有意差が見られた。菌根においては、N+区と N++区の窒素濃度と窒素含有量が、N-区よりも有意に多かった。N+区と N++区の間では、窒素濃度と窒素含有量に有意な差はなかった。

土壌中の根外菌糸体量

土壌中の根外菌糸体量は、N+区で最も多く、N++区との間で有意な差が見られた（図 5-4）。N-区と N+区、N-区と N++区の間では根外菌糸体量に有意な差はなかった。

考察

土壌への窒素添加によって、全ての部位で窒素濃度および窒素含有量が増加したことから、添加した窒素量は菌根苗の成長にとって十分な量であると考えられる。回収した土壌の窒素濃度を測定した結果（データは未掲載）、全ての処理区の土壌で 0.10～0.13 % であったことから、添加した窒素のほとんどが菌根菌または植物に利用されたと考えられる。

最も高濃度の窒素を与えた N++区の根外菌糸体量は、全く窒素を与えていない N-区と同程度だった。このことは、土壌中の窒素濃度が上昇すると、菌根菌の根外菌糸体量が減少することを示している。一方で、菌根の乾重は増加する傾向が見られたことから、N++区においては、菌根菌は土壌中に根外菌糸体を伸長させず、菌根形成にリソースを割いたと考えられる。多くの研究において、土壌中に過剰な窒素が存在すると、菌根（Wallenda and Kottke 1998, Peter et al. 2001, Lilleskov et al. 2002, Lilleskov et al. 2011）および根外菌糸体（Wallander and Nylund 1992, Arnebrant 1994, Nilsson and Wallander 2003, Hendricks et al. 2006, Parrent and Vilgalys 2007, Kjølner et al. 2012）のバイオマスは減少することが示されている。本実験の結果から、土壌中の窒素濃度が増加すると、まず根外

菌糸体量が減少し、さらに窒素濃度が増加すると菌根も減少すると推測される。本実験に用いた PS が含まれる *Pisolithus* 属には、遷移初期や荒廃地などの土壌養分が少ない環境に適応できる種が多く含まれており (Chambers and Cairney 1999) , 根外菌糸体の探查型 (exploration type; Agerer 2001, 2006) は長距離型 (long distance type) である。長距離型の菌根菌は、養分探索のために土壌中に根外菌糸体を発達させるが、土壌中の窒素濃度が高くなると、土壌中に根外菌糸体を遠くまで伸長させる必要がなくなり、宿主から炭素を得るためのインターフェースである菌根のバイオマスを増加させるのかもしれない。

いずれの処理区においても、菌根苗の地上部と根の窒素濃度は同程度であったが、菌根の窒素濃度はこれらの部位よりも高かった。また、菌根の乾重は地上部の約 1/4、根の約 1/2 であるのに対し、窒素含有量は地上部の約 1/2、根と同程度であった。このことは、根外菌糸体により吸収された窒素の一部が菌根に蓄積していることを示している。ハルティヒネットを介して菌根菌から植物に渡された窒素は速やかに転流して根や地上部の成長に用いられるため、根外菌糸体から運ばれた窒素の一部は植物へは渡されず、菌根菌の菌鞘またはハルティヒネットに蓄積していると推測される。アーバスキュラー菌根菌に、安定同位体 ^{15}N でラベルしたアンモニア態窒素または硝酸態窒素で与えると、アーバスキュラー菌根菌は硝酸態窒素とアンモニア態窒素の両方を吸収するが、アンモニア態窒素のみが宿主へ転流し、硝酸態窒素は自ら利用するのみで、ほとんど転流しないことが報告されている (Tanaka and Yano 2005) 。外生菌根菌における硝酸態窒素の輸送機構は解明されていないが、硝酸態窒素を窒素源として与えた場合、菌根の菌鞘とハルティヒネットに硝酸塩トランスポーターの発現が増加することから、菌根まで硝酸態窒素が輸送されると推測されている (Guescini et al. 2003, Montanini et al. 2006) 。本研究においても、添加した硝酸アンモニウムのうち、硝酸態窒素は菌鞘とハルティヒネットに輸送された後、植物へ転流されずに蓄積した可能性がある。このことが、菌根の窒素濃度が菌根苗の地上部や根よりも高かった理由かもしれない。

表 5-1. 改変ホーグランド液の組成

物質名	濃度
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 mM
K_2SO_4	2 mM
KH_2PO_4	1.9 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.7 mM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.5 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.5 μM
H_3BO_4	200 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 μM
FeNa-EDTA	405 μM
NH_4NO_3	0 or 1.25 or 2.5 mM

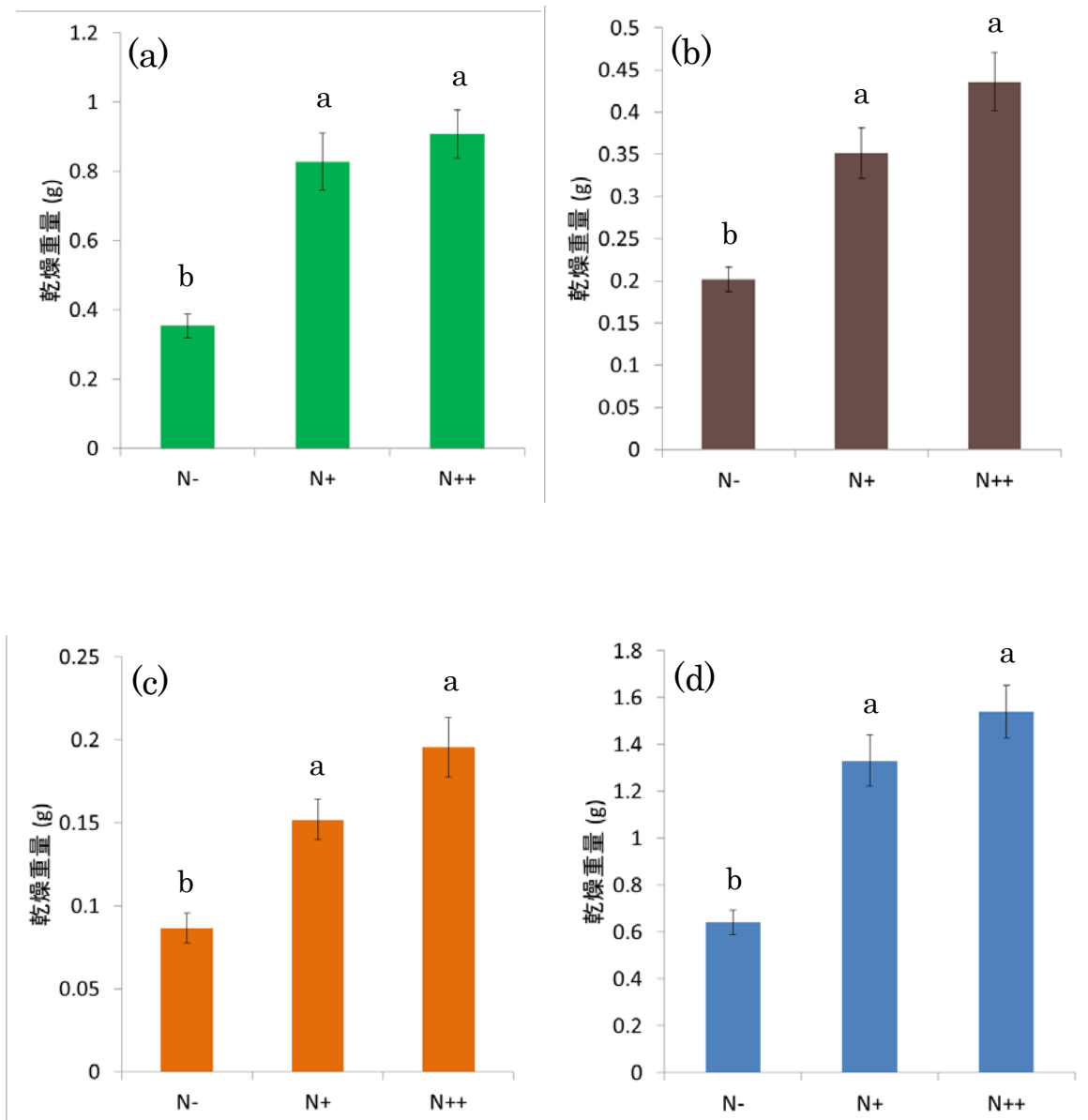


図 5-1. 菌根苗の各部位の乾燥重量. (a) : 地上部, (b) : 根, (c) : 菌根, (d) : 全体. 誤差範囲は標準誤差を示す (n=10). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Tukey HSD, $p < 0.05$). 横軸は各処理区を示す.

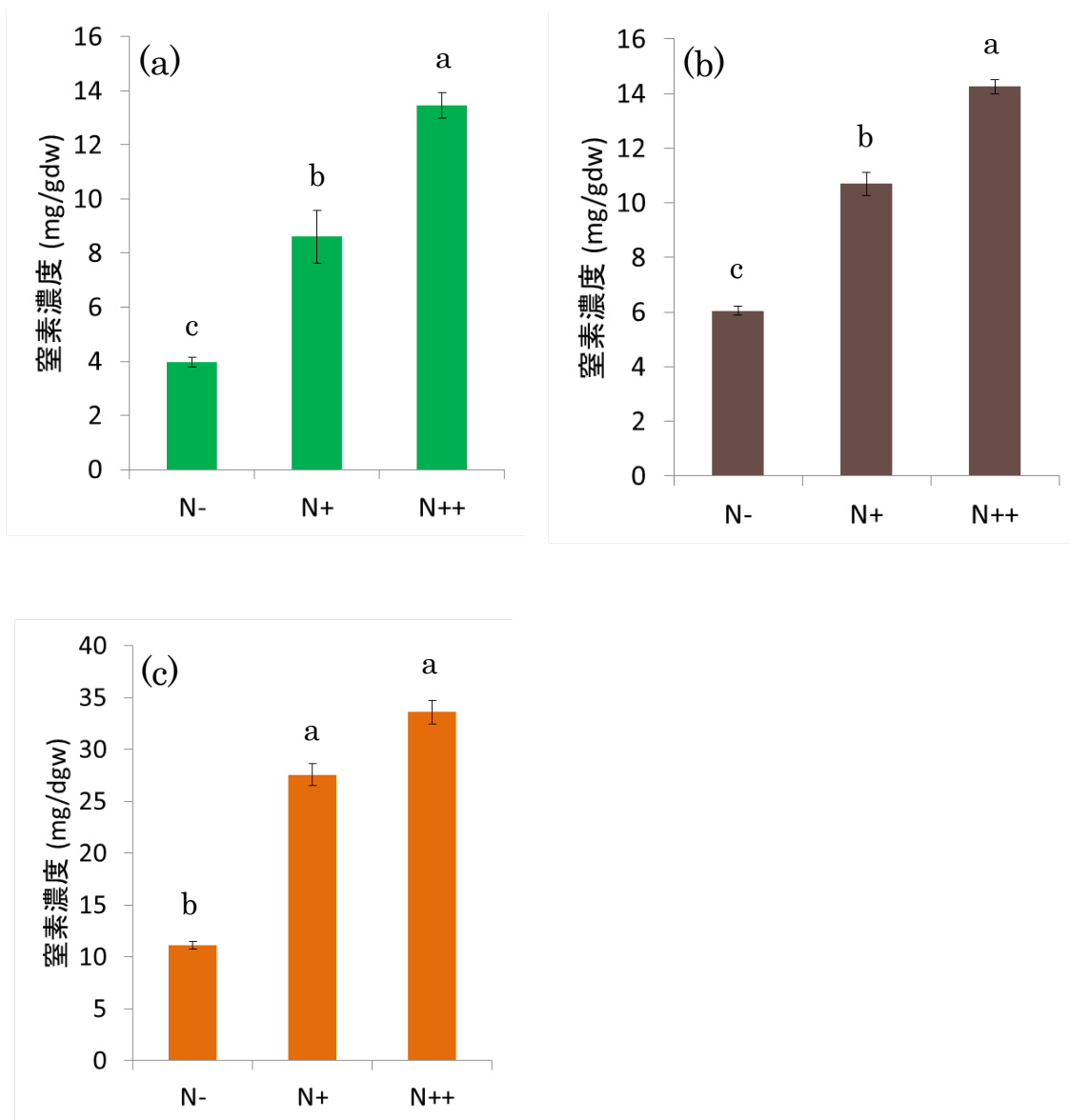


図 5-2. 各部位の窒素濃度. (a) : 地上部, (b) : 根, (c) : 菌根.

誤差範囲は標準誤差を示す (n=10). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Steel-Dwass, $p < 0.05$). 横軸は各処理区を示す.

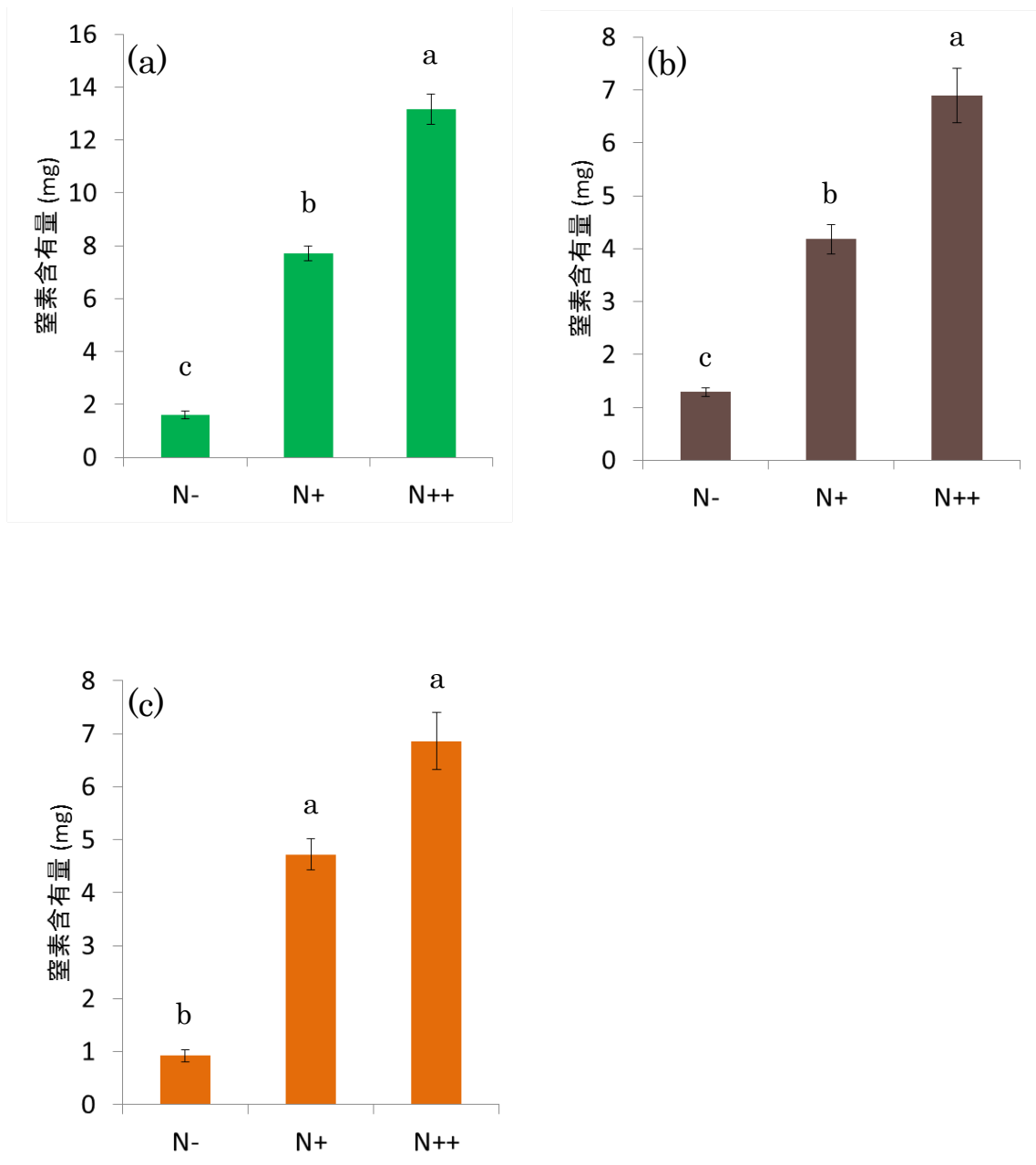


図 5-3. 各部位の窒素含有量. a : 地上部, b : 根, c : 菌根.

誤差範囲は標準誤差を示す (n=10). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Steel-Dwass, $p < 0.05$). 横軸は各処理区を示す.

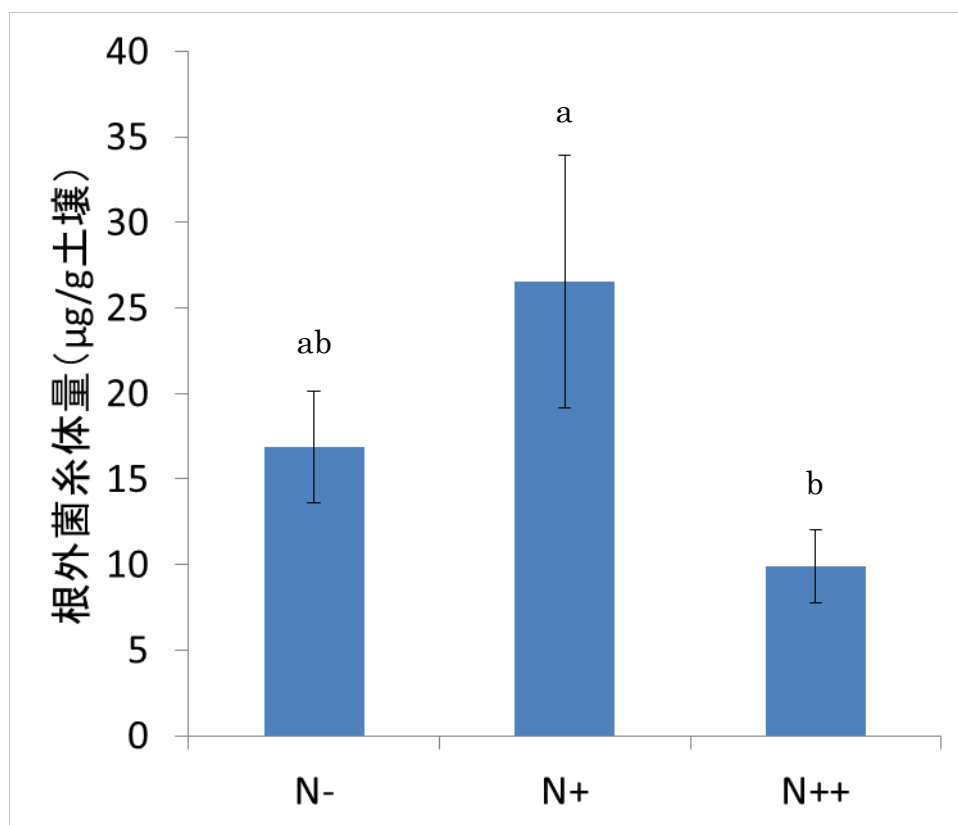


図 5-4. 各処理区における土壌中の根外菌糸体量.

誤差範囲は標準誤差を示す ($n=10$). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Steel-Dwass, $p < 0.05$). 横軸は各処理区を示す.

5-2. 異なる窒素条件に対する樹木の根の可塑性と菌根菌の動態

材料と方法

クロマツ分根苗の作成

蓋付ポリカーボネート製ケース (368 × 184 × 171 mm) に滅菌した芝の目土 2.8 L を入れ、3 章と同じ方法で作成した PS の菌根苗 2 本を移植した。さらに、蒸留水で 4000 倍に希釈したハイポネックス (Hyponex Japan, Osaka, Japan) を 800 ml 添加して挿し床を作成した。ケースの蓋には通気のために直径 1 cm の穴を 20 個開け、メンブレンシール (MilliSeal, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を貼った。2 ヶ月生のクロマツ無菌根苗を地際部で切って根を除去し、挿し穂とした。挿し穂の切り口を水道水に 1 時間浸した後、切り口をオキシベロン液剤 (0.4 % インドール酪酸溶液, Bayer Cropscience, Tokyo, Japan) に 1 分間浸漬した。挿し穂を挿し床に 20 本挿した後、蓋をして人工気象室内で 3 ヶ月間栽培した (図 5-5, 5-6)。4 本以上の根がほぼ均等に発根した菌根苗 (以下分根苗) を分根培養系の作成に用いた。根の本数が奇数だった場合は、1 本を切除した。

分根培養系の作成

2 枚の根箱の身をシリコーン樹脂 (バスコーク N 透明, Cemedine, Tokyo, Japan) で貼り合わせ、根分け根箱を作成した後、根箱の中に滅菌した芝の目土を入れた。分根苗の根系を、同じ本数になるように左右に分け、それぞれの根系を 2 枚の根箱に分けて入れながら、分根苗を移植した (分根培養系, 図 5-7)。地表に露出した根の表面には、乾燥を防ぐためにワセリンを塗り、根箱をアルミホイルで覆って遮光した後、人工気象室内で栽培した。分根苗を移植した根箱を 10 個ずつ 3 つの処理区に分け、窒素濃度を 0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM に調製した改変ホーグランド液 (表 5-1) を、表 5-2 の組み合わせで、左右の根系のそれぞれに 80 ml/週与えた。3 ヶ月後に菌根苗と土壌を回収し、菌根苗は地上部と地下部を切り分けた後、80 °C で 48 時間乾燥させた (図 5-8)。各部位の乾重を測定した後、ミキサーミルで粉碎し、元素分析計を用いて各部位の窒素濃度を測定した。回収した土壌の根外菌糸体量は、3 章と同じ方法で測定した。

統計解析

各部位の乾燥重量は、Tukey HSD 法による多重比較を行い、窒素濃度、窒素含有量、土壌中の根外菌糸体量は、Steel-Dwass 法による多重比較を行った。解析には R (<https://www.r-project.org/>) を用いた。

結果

分根苗の乾重

分根苗全体の乾重と地上部の乾重は、N++/N-区と N+/N+区は N-/N-区よりも有意に多く、N++/N-区と N+/N+区との間では有意差はなかった (図 5-9a, b)。部分根系の乾重は、N-/N-区、N++/N-区の N-側、N+/N+区、N++/N-区の N++側の順に多くなった (図 5-9c)。N++/N-区の N++側の部分根系の乾重は、他の全ての処理区の部分根系の乾重よりも有意に多かった。他の部分根系の間には、乾重の有意な差はなかった。地上部と部分根系の TR 比は、N++/N-区の N++側、N-/N-区、N+/N+区、N++/N-区の N-側の順に大きくなった (図 5-10)。

分根苗の窒素濃度および窒素含有量

分根苗各部位の窒素濃度および窒素含有量は、乾重と同様の傾向であった。地上部の窒素濃度は、N++/N-区と N+/N+区は N-/N-区よりも有意に高く、N++/N-区と N+/N+区との間では有意差はなかった (図 5-11a)。部分根系の窒素濃度は、N-/N-区、N++/N-区の N-側、N+/N+区、N++/N-区の N++側の順に高くなった (図 5-11b)。N++/N-区の N++側の窒素濃度は、他の全ての処理区よりも有意に高かった。N++/N-区の N-側と N-/N-区との間で有意差はなく、N+/N+区の部分根系の窒素濃度は両者よりも有意に高かった。窒素含有量は、窒素濃度と同じ傾向であった (図 5-12)。

根外菌糸体量

各処理区の土壌中の根外菌糸体量は、N+/N+区で最も多くなった。N++/N-区の N++

側では、N+/N+区よりも根外菌糸体量が有意に少なく、N-側と同程度であった。N++/N-区のN-側の根外菌糸体量は、N-/N-区よりも有意に少なかった（図 5-13）。

考察

各窒素濃度における地上部の乾重、窒素濃度、窒素含有量、根外菌糸体量は 5-1 の結果と同様の傾向であった。また、地下部全体の乾重（部分根系の乾重の合計）も同様の傾向であった。共生系全体に添加した窒素量が同じである N++/N-処理区と N+/N+処理区において、地上部および地下部全体の乾重に差が無かったことから、窒素分布が不均一な土壌においても、全体として得られる窒素量が等しければ、植物の成長に影響はないと考えられる。

N++/N-区のN++側の部分根系の乾重は、N-側の部分根系およびN+/N+区の部分根系よりも有意に多かった。また、N-側の部分根系の乾重はN+/N+区の部分根系よりも少なく、N-/N-区の部分根系との有意差はなかった。このことは、N++/N-区において、植物の光合成産物がN-側の部分根系にはあまり分配されず、N++側の部分根系に多く分配されていることを示している。つまり、外生菌根性樹木においても草本類と同様に根の表現型の可塑性があり、窒素を得られない根系はほとんど成長させず、窒素をより多く得られる根系を優先的に成長させると考えられる。

N++/N-区において、地上部の窒素濃度および窒素含有量はN+/N+区と差が見られなかったのに対し、N++/N-区のN++側の部分根系ではN-側、N+/N+区、N-/N-区の部分根系よりも有意に増加した。このことから、N++側の部分根系から吸収された窒素は、N+/N+区全体で得られた窒素と同程度の量が地上部に転流するが、植物の成長に寄与しないN-側の部分根系にはほとんど転流しないと考えられる。

土壌中に養分の豊富なパッチが存在する場合、アーバスキュラー菌根菌（Hodge et al. 2001）や外生菌根菌（Bending and Read 1995）は、養分パッチ内で根外菌糸体を発達させる。菌根菌が根外菌糸体を養分パッチへ伸長させる炭素コスト（Fitter 1991）および窒素コスト（Pregitzer et al. 1997）は、同じ長さの根を伸長させるコストよりも低い。また、宿主からの炭素供給を受けた根外菌糸体は、土壌中の他の微生物との競争にも強い（Hodge 2004）。したがって、宿主植物にとっては、養分パッチまで根を伸ばすよりも、共生する菌根菌に炭素を供給して根外菌糸体を伸長させる方が有利であると考えられ

る (Hodge 2004). そのため、菌根菌が感染している場合には、養分パッチに伸長した根外菌糸体によってパッチ内の養分が植物へ速やかに転流され、根の選択的な成長が抑制されると考えられている (Tibbett 2000). これらの研究においては、根系全体に1種の菌根菌が共生しているため、菌根菌が養分パッチ内から吸収した養分が、根外菌糸体を通して根系全体に比較的均一に渡されたと考えられる. 本研究においては、左右の部分根系が独立しており、N++/N-区のN-側の部分根系は根外菌糸体を通した窒素の吸収ができなかった. そのため、窒素の得られる根系を選択的に成長させる根の表現型の可塑性が発現したと推測される.

土壌中の根外菌糸体量はN+/N+区で最も多く、N++/N-区のN++側ではN-側と同程度であった. N++側では根の発達にともなって多くの菌根が形成されていたことから(図5-8)、5-1と同様に、土壌中に根外菌糸体を成長させず、菌根形成にリソースを割いたと考えられる. 一方、N++/N-区のN-側の根外菌糸体量は、N-/N-区よりも有意に少なかった. また、N++/N-区の地上部とN-側の部分根系のTR比は、N-/N-区の地上部と部分根系のTR比よりも大きかった. これは、N-/N-区では、菌根苗が窒素を得るために地下部への炭素分配がN++/N-のN-側よりも多くなり、それにより菌根菌への炭素供給量も多くなったため、根外菌糸体量がN++/N-区のN-側よりも多くなったと推測される.

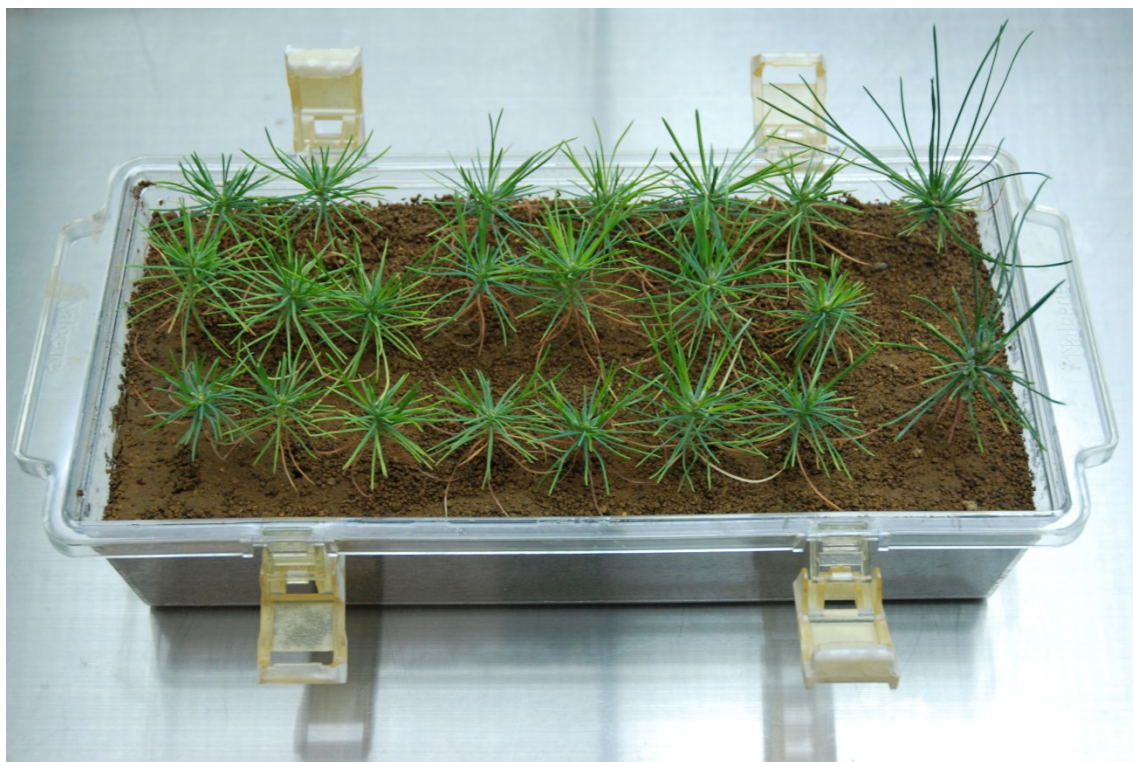


図 5-5. クロマツ分根苗の作成の様子（挿し木 3 ヶ月後）.
右端の 2 本は、挿し木と同時に移植した PS の菌根苗.



図 5-6. 挿し木 3 ヶ月後のクロマツ分根苗.
根には PS の菌根が形成されている. Bar = 5 cm.



図 5-7. 作成した分根培養系の様子. Bar = 5 cm.

表 5-2. 各処理区に添加した改変ホーグランド液の窒素濃度

処理区	溶液の窒素濃度	
	左根系	右根系
N++/N-	5 mM	0 mM
N+/N+	2.5 mM	2.5 mM
N-/N-	0 mM	0 mM



図 5-8. 回収した分根苗の様子.

(a) : N-/N-区, (b) : N+/N+区, (c) : N++/N-区.

Bar = 5 cm.

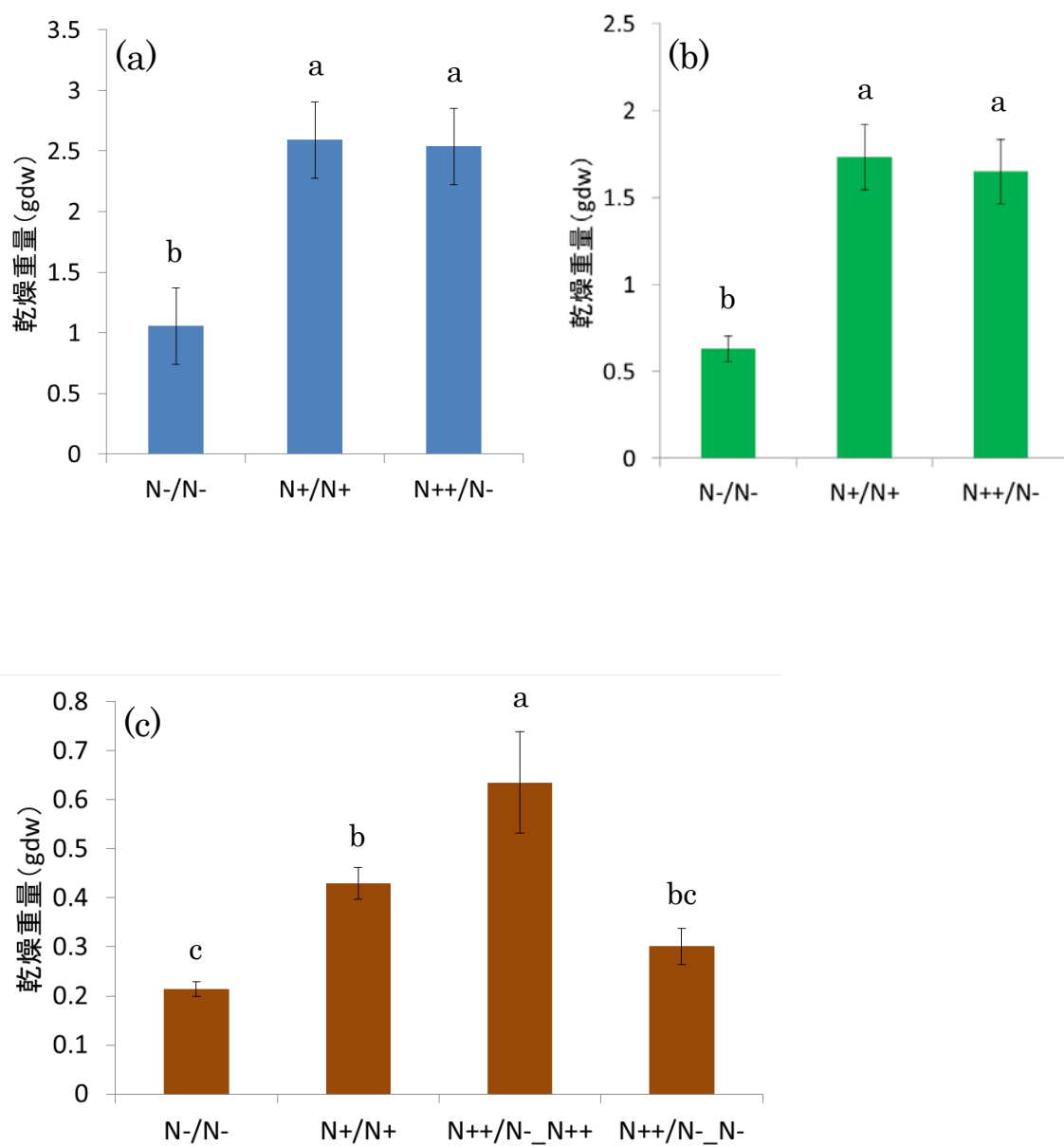


図 5-9. 分根苗各部位の乾燥重量. (a) : 全体 (n=10), (b) : 地上部 (n=10), (c) : 地下部 (n=20, 20, 10, 10).

誤差範囲は標準誤差を示す. 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Tukey HSD, $p < 0.05$).

横軸は各処理区を示す. N++/N-_N++は, N++/N-区の N++側の部分根系,

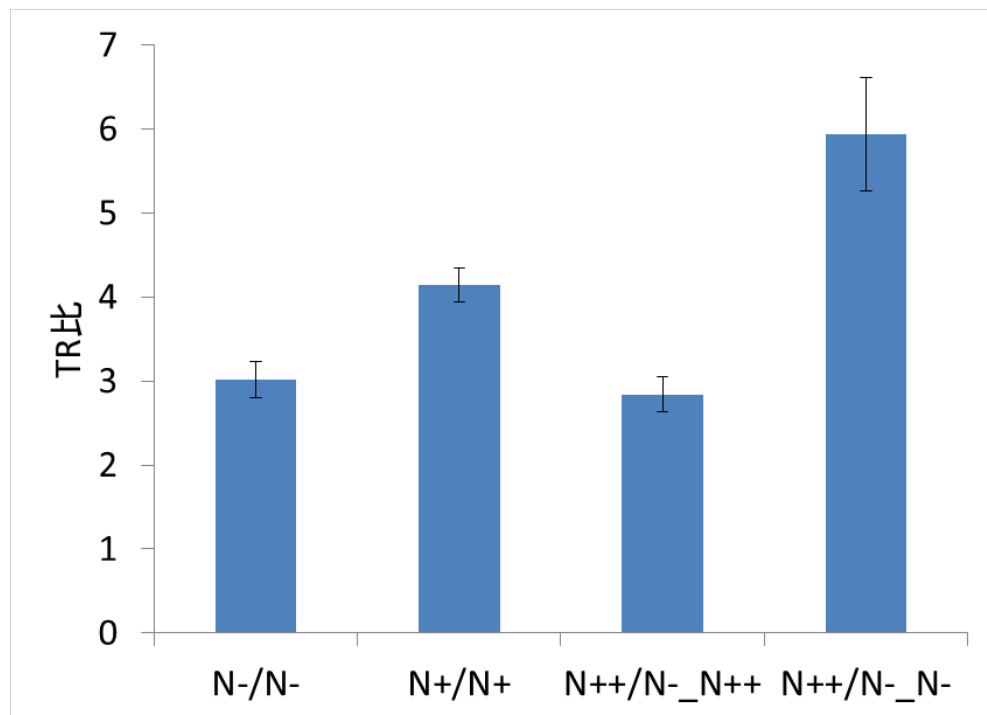


図 5-10. 各処理区の TR 比 (n=20, 20, 10, 10). 誤差範囲は標準誤差を示す. 横軸は図 5-9. と同様.

TR 比は, 各部分根系と地上部の乾重を用いて計算した.

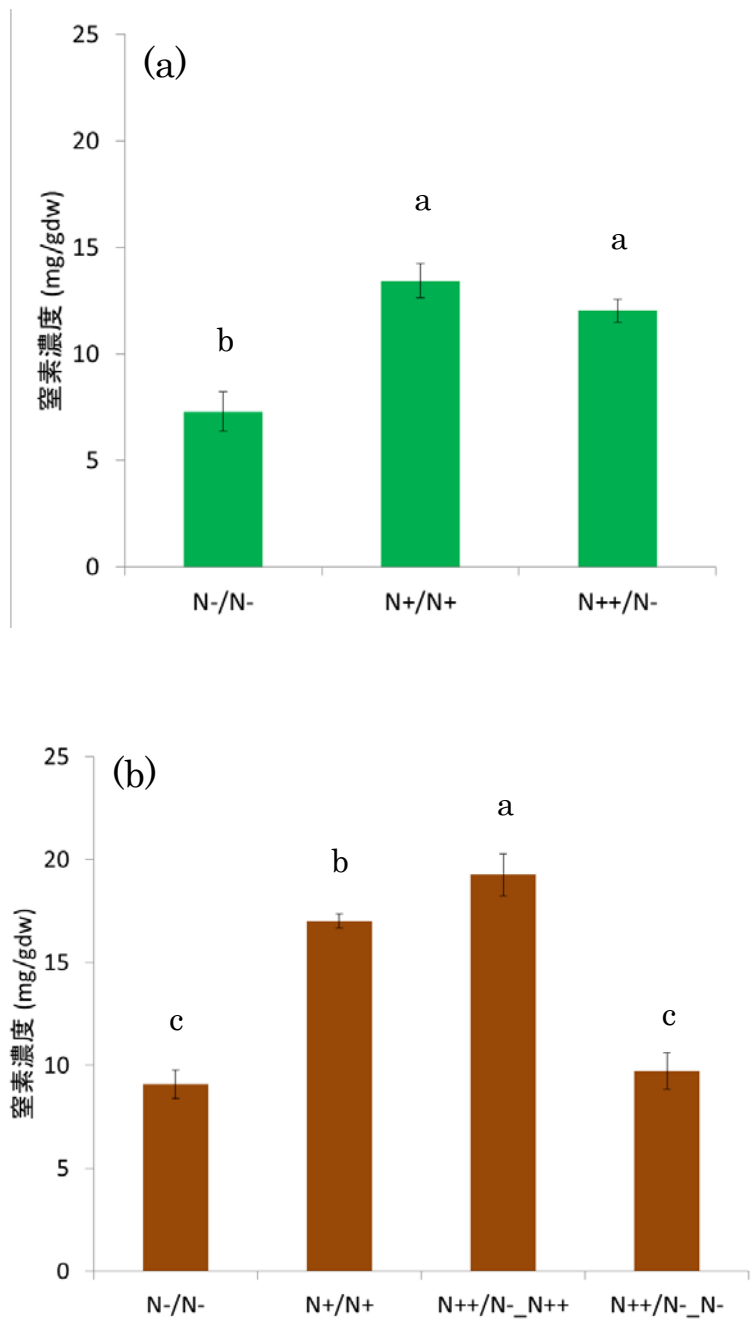


図 5-11. 分根苗各部位の窒素濃度. (a): 地上部 (n=10), (b): 地下部 (n=20, 20, 10, 10). 誤差範囲は標準誤差を示す. 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Steel-Dwass, $p < 0.05$).

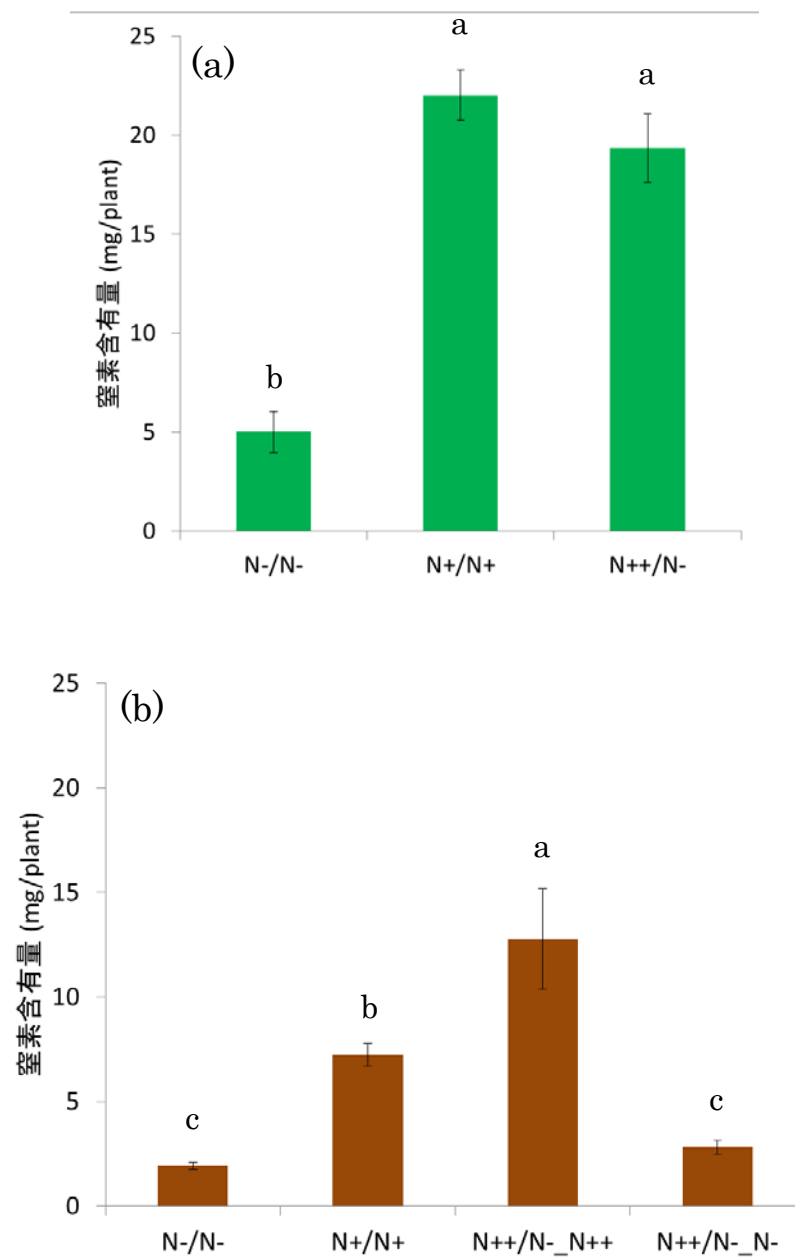


図 5-12. 分根苗各部位の窒素含有量. (a) : 地上部 (n=10), (b) : 地下部 (n=20, 20, 10, 10). 誤差範囲は標準誤差を示す. 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Steel-Dwass, $p < 0.05$). 横軸は図 5-9.と同様.

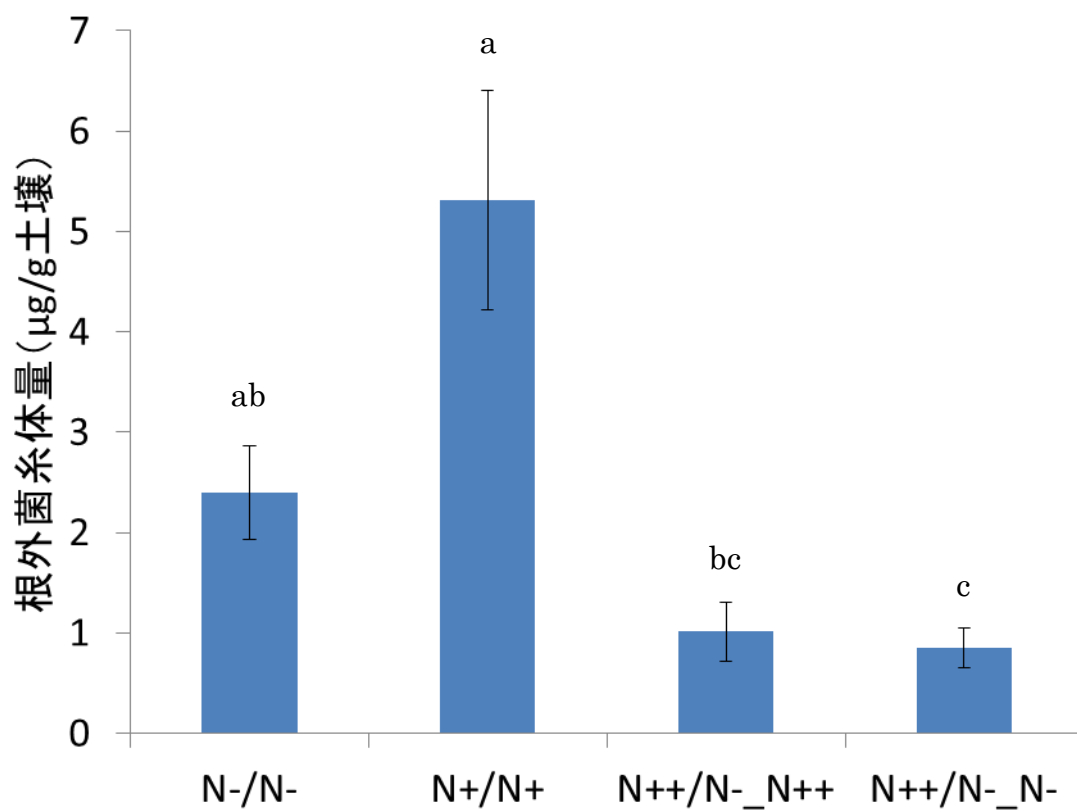


図 5-13. 各処理区における土壌中の根外菌糸体量.

誤差範囲は標準誤差を示す (n=20, 20, 10, 10). 異なるアルファベットは有意差があることを示す (Steel-Dwass, $p < 0.05$). 横軸は図 5-9.と同様.

6 章 総合考察

本章では、2 章から 5 章の研究から得られた知見をもとに、根系スケールにおける菌根菌の群集構造と分布様式、宿主樹木による根系内の菌根菌群集の制御について考察する。

根系スケールにおける菌根菌の群集構造

本研究では、八ヶ岳の亜高山帯針葉樹林において、3 つの露岩上からコメツガの稚樹を 1 本ずつ採集して、それぞれの根系内のすべての菌根について、感染している菌種を同定した (2 章 1 節)。また、同じ林分において、6 つの露岩上の 3 cm × 6 cm または 4 cm × 5 cm の範囲内からコメツガまたはシラビソの根系を採取して、それぞれの根系内のすべての菌根について、感染している菌種を同定した (2 章 2 節)。その結果、前者では 40 種、後者では 24 種の菌根菌が検出され、どちらも露岩ごとに菌根菌の種構成や優占種が大きく異なっていた。この結果は、数十 cm 程度離れただけでも、菌根菌の種構成が異なっていたとする過去の研究結果 (Tedersoo et al. 2003) と一致するものである。一方、菌根を採取した根系周辺の土壌についても、菌根菌の種構成を調査した結果、菌根よりも多い 66 種の菌根菌が検出され、菌根と同様に、露岩ごとに菌根菌の種構成や優占種が大きく異なっていた (2 章 2 節)。本研究において、稚樹や根を採集した露岩は、いずれもリターとコケ類からなる基質に被われており、地温、土壌 pH、土壌養分といった非生物的環境は似ていると推測される。そのため、露岩間での菌根菌の種構成や優占種の違いは、生物的要因によると推測される。その生物的要因の 1 つとして、狭い範囲における菌根菌同士の競争 (e.g. Wu et al. 1999, Kennedy and Bruns 2005, Hortal et al. 2008) が考えられる。さらに、生育環境や樹齢に大きな差がない同一樹種において、宿主の個体ごとに菌根菌の群集構造が大きく異なっていたことは、それぞれの露岩において先住効果による根端獲得競争が存在したことを示唆している。これまでに、菌根菌の種間競争において先住効果が存在することは、胞子の接種試験により確認されている (Kennedy et al. 2009)。また、アーバスキュラー菌根菌においても、接種試験により、先住効果の存在を示唆する結果が得られている (Werner and Kiers 2015)。実際の土壌中では、樹木の根は根外菌糸体の菌糸ネットワーク (common mycelial network, CMN) に

よっても菌根を形成する。土壌中に存在する様々な菌根菌の感染源が、菌根形成に対してそれぞれどの程度寄与しているかについてはほとんど明らかにされていない。しかし、CMN は既に存在している宿主植物から炭素供給を受けており、胞子よりも新たな根系への感染がしやすいため、CMN による先住効果は胞子による先住効果よりも強いと予想されている (Johnson 2015)。本研究は、実際に森林に生育する樹木の根系においても、菌根菌の先住効果が存在する可能性を初めて示したものである。一方で、本研究で示唆された先住効果が胞子由来なのか CMN 由来なのかは不明である。今後、両者の菌根形成に対する相対的な寄与を実験的に明らかにすることが必要である。

本研究の結果は、ある瞬間における菌根菌の群集構造を調べたものである。菌根菌の群集構造は、時間経過によって大きく変化することが示されている (e.g. Izzo et al. 2005, Pickles et al. 2010)。また、時間経過に伴い、土壌 pH や土壌養分といった非生物的環境要因が変化することによって、菌根菌同士の競争関係も変化する (Erland and Finlay 1992, Erland and Tylor 2002, Mahmood 2003)。そのため、根系内における菌根菌群集も、先住効果によって最初に定着する菌種が決定し、その後の時間経過とともに非生物的環境要因の変化が起こると、各菌種の相対的な競争能力が変化することで根系内でせめぎ合って共存していると考えられる。また、樹木の細根は数ヶ月～数年でターンオーバーしていると考えられている (Gaul et al. 2009, Finér et al. 2011)。菌根が枯死した後に別の菌種が新たに菌根を形成することで、頻繁に菌種の入れ替わりが起きているのかもしれない。今後、時間経過に伴う根系スケールでの菌根菌群集の変化についても、明らかにする必要があるだろう。

根系スケールにおける菌根菌の分布様式

コメツガ稚樹の根系に優占していた数種の菌根菌は、数 cm 程度の小さなパッチ状に分布する傾向が見られた (2 章 1 節)。これまでに、数種の菌根菌において、同一のジェネットが数十 cm～数 m のパッチ状に分布することが示されていることから (e.g. Zhou et al. 1999, 2000, 2001; Guidot et al. 2001; Bergemann and Miller 2002; Hirose et al. 2004; Wadud et al. 2014)、根系スケールで見られた個々のパッチ内の菌根菌は、それぞれ 1 つのジェネットであると推測される。もし、この推測が正しければ、新たな菌根が

形成されると、その根端から新たな根外菌糸体が周囲に伸長し、近くにある未感染の根端に感染することで、同一クローンによるクラスターが形成されることが考えられる。

コメツガやシラビソの根系周辺の土壌を 1 cm×1 cm の格子に区切り、各格子内の土壌に存在する菌根菌の種構成を調査した結果、9 割以上の格子において、1 つの格子内から複数種の菌根菌が検出された（2 章 2 節）。また、菌根が採取された格子と、土壌からその菌種が検出された格子が一致しなかったことが多く、露岩によっては、菌根からは全く検出されなかった菌種が、土壌から高頻度で検出された（2 章 2 節）。このような状況において、同一種からなる菌根のクラスターを形成することができたことは、その菌根菌が、未感染の根端への感染をめぐる種間競争に勝利したことを示している。未感染の根端へ優先して感染するためには、新たに形成された菌根の周囲に、次の根端への感染源となる根外菌糸体量が増えるか、または、菌根を形成して宿主からの炭素供給を受けることで、根外菌糸体の菌根形成能力が高まると考えられた。根箱実験系を用いて、これらの 2 要因が菌根の初期感染に与える影響を与える影響を調べた結果、根外菌糸体による菌根形成能力は、根外菌糸体が菌根から切り離される、つまり宿主から根外菌糸体への炭素供給が遮断されることで大きく低下した（3 章）。このことは、宿主からの炭素供給の有無が、菌根形成に大きく影響していることを示している。宿主地上部に取り込まれた $^{14}\text{CO}_2$ は、1 日以内に根外菌糸体まで転流し、3 日以内に菌根菌への転流が完了することが示されている（Wu et al. 2002, 2012）。さらに、子実体に対しても直近の光合成産物が転流し、子実体の成長に利用されていることが示唆されている（Lamhamedi et al. 1994, Teramoto et al. 2012）。本研究の結果から、菌根形成においても、直近の光合成産物が利用されていることが推測された。つまり、菌根を形成した菌は、宿主から光合成産物の供給を受けることで根外菌糸体量を増やすとともに、根端への感染能力も増大するため、周囲の根端に優位に菌根を形成することでパッチ状の分布が形成されることが考えられる。

一方、コメツガ稚樹の根系においては、根端への感染頻度の低い菌種も多数検出された（2 章 1 節）。これらの菌種は、根系の一部に集中していたため、その部分の種多様性が高くなる傾向が見られた。このような部分では、菌根から伸びた根外菌糸体による感染ではなく、土壌中の孢子や菌糸断片による感染が起きていたと考えられる。本研究において、宿主からの炭素供給を失った根外菌糸体（埋土菌糸体）の菌根形成能力を調べた結果、土壌が攪乱されなければ根外菌糸体の菌根形成能力が 2 ヶ月間維持された（4

章). また, 土壌が攪乱されても, 埋土菌糸体の分解が促進されて菌根形成能力が低下した状態でも, 1 ヶ月間は菌根形成能力が維持された. 一方で, 宿主からの炭素供給を失った後の時間経過と, 根外菌糸体量や菌根数の減少との対応関係が, コツブタケ属菌の菌株 (PS) とウラムラサキの菌株 (La) の間で異なった (4 章). これは, 炭素供給の停止や土壌の攪乱に対する耐性が, 菌種によって異なることを示唆している. 一般的に, 菌類は, 余剰の糖をグリコーゲンや脂質として細胞内に貯蔵することが可能である (小野 2014). 本研究で用いた 2 種のうち, 炭素供給の停止や土壌の攪乱に対する耐性が高いと推測されたウラムラサキは, 脂肪酸や脂質を炭素源として利用できる (Hattori et al. 2003). ウラムラサキのような, 耐性が高い菌種は, 環境が悪化した際に, 細胞内に貯蔵した炭素源を利用して生存が可能なのかもしれない. また, 3 章において, PS で見られた遮光による菌根数への影響が, La では見られなかったことも, 炭素の貯蔵能力の違いが関係しているのかもしれない.

野外においては, 土壌動物の活動, 菌食者による摂食, 根食性昆虫による根の摂食などによって, 根外菌糸体が宿主から分断されることが起こっていると推測される. このような埋土菌糸体は, 宿主から炭素供給を受けている根外菌糸体よりも菌根形成能力が低くなることから (3 章), 同一種による菌根クラスターが形成されている場所では感染しにくく, 菌根から伸びた根外菌糸体が到達していない場所で感染しやすくなると考えられる. そのため, 根系内における感染頻度の低い菌根菌種は根系の一部に集中し, モザイク状の分布を形成していたと考えられる. 菌根菌の種間には強い競争があるにもかかわらず, 菌根菌群集の種多様性は高く維持されている. これは, 多種の菌根菌の共存を促進するメカニズムが存在するためと考えられている (Bruns 1995, Horton et al. 1998, Baar et al. 1999, Taylor and Bruns 1999, Peay et al. 2007, Bruns et al. 2009, Kennedy 2010). 本研究で示された埋土菌糸体による低頻度の菌根形成は, 菌根菌の多様性の高さを維持する 1 つのシステムとして機能している可能性もある. 一方, 本研究における埋土菌糸体の菌根形成能力の調査は根箱実験系のみで行っており, 他種の菌根菌, 腐生菌, 菌寄生菌, 土壌細菌などとの相互作用を考慮していない. そのため, 森林の土壌環境よりも, 菌根菌の生存にとって有利な環境であると考えられる. 今後, 野外実験によって, 埋土菌糸体が実際にどの程度菌根形成に寄与しているのかを検証する必要があるだろう.

また, 本研究の野外調査では, 露岩上に更新したコメツガとシラビソを用いており,

有機物層に存在する菌根菌の水平分布のみを解析した。しかし、林床で更新する多くの樹種は、垂直方向にも根を伸長させるため、垂直分布も考慮する必要がある。Beiker et al. (2012) は、同所的に共存する *Rhizopogon vesiculosus* A.H. Sm. と *R. vinicolor* A.H. Sm. の空間分布を調べ、水平方向で見ると両者の分布が重なり合っているが、垂直方向で見ると、前者は有機物層に多く、後者は鉱質土層に分布することを示した。また、*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. (マツタケ) の菌根と根外菌糸体の集合であるシロは、主に鉱質土層に形成されることが知られている (小川 1975)。このような土壌層による分布の違いは、共存する他の菌根菌との競争によると考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多い。今後、水平分布と垂直分布を同時に調査することで、菌根菌の三次元的な空間分布を明らかにすることが必要である。

宿主樹木による根系内の菌根菌群集の制御

根分けしたクロマツ菌根苗を、不均一な土壌窒素環境下で栽培した結果、部分根系から得られる窒素量に応じて、樹木から部分根系への炭素および窒素の分配に勾配が生じた (5 章)。このことは、宿主樹木が、菌根菌から得られる養分量に応じて、根系に対する投資を選択的に変化させることを示唆している。草本類においては、土壌養分環境の良い場所で側根を発達させて吸収量を増加させるという根の表現型の可塑性が、生育にとって重要であることが示されている (Hodge 2004)。本研究によって、外生菌根性樹木においても、土壌養分環境に応じて根の表現型の可塑性を示すことが明らかとなった。菌根性植物においては、土壌中に養分の豊富なパッチが存在する場合、菌根菌が養分パッチ内で菌糸を発達させることが示されている (Bending and Read 1995, Hodge et al. 2001)。その結果、菌根菌は、パッチ内の養分を宿主植物へ速やかに転流するため、菌根菌が感染した植物では、根の選択的な成長は抑制されと考えられている (Tibbett 2000)。本研究では窒素の多い根系と少ない根系が完全に分離されていたために、野外における実際の反応よりも過剰な反応を示した可能性は否定できない。一方で、野外においては、1本の樹木の根系内に多様な菌根菌種が共存しており、パッチ状またはモザイク状に分布している (2 章)。もし、宿主に対する養分供給量が大きく異なる菌種が異なる根系に菌根を形成した場合、各根系から得られる養分量が大きく異なると考えられる。そのような状況下では、宿主植物が、根系から得られる養分量に対して、炭素の

分配量を変化させている可能性がある。これらについては、1本の樹木に複数種の菌根菌を感染させた実験系によって検証する必要があるだろう。

菌根菌から得られる窒素量に応じて、宿主植物が地下部への炭素転流量を変化させると仮定すると、菌根菌に対する炭素転流も同様に制御している可能性がある。アーバスキュラー菌根菌においては、リンを得るための炭素コストが高い菌種よりも、炭素コストが低い菌種に対して、宿主植物が優先的に光合成産物を与えることが示されている (Bever et al. 2009, Kiers et al. 2011)。本研究の根分け実験では、左右の根系に同一の菌株を接種したが、土壌中の窒素濃度を左右で変えることによって、菌根菌による窒素吸収促進効果の違いを疑似的に再現した。5章2節の本研究の N_{++}/N_{-} -処理区において、 N_{++} 側の部分根系へ優先的に分配された光合成産物が、菌根菌にも多く分配されたかどうかは不明であるが、樹木と外生菌根菌との間にも、アーバスキュラー菌根菌で見られた関係があるかもしれない。共生効果の高い菌に優先的に光合成産物を転流することは、共生効果の低い菌の増殖を抑え、共生関係を安定化させることができる (Zheng et al. 2014)。外生菌根菌の宿主に対する共生効果は菌種によって大きく異なるため、樹木は共生効果の低い菌を抑制し、共生効果の高い菌に多くの炭素を分配しているのかもしれない。

根系スケールにおける外生菌根と根外菌糸体の動態

本研究の結果から、根系スケールでは、以下のプロセスにより、菌根の形成や根外菌糸体の伸長が行われていると推測される。

1. 土壌中に存在する多種の菌根菌の感染源（孢子、菌核、菌糸断片）から 1 菌種の菌根が形成される
2. 形成された菌根から新たな根外菌糸体が伸長し、近くの根端に優先的に感染する
3. 菌根の形成と根外菌糸体の伸長を繰り返しながら、同一種からなる菌根のクラスターを形成する
4. 1～3 による菌根クラスターが、根系内に複数形成される
5. それぞれの菌根菌から得られる養分量に応じて、宿主樹木が菌根菌への炭素分配を制御する

6. 宿主樹木への寄与が小さい菌種の拡大が抑制され、寄与の大きい菌種が分布域を拡大する
7. 各菌種が1～数 cm 程度のパッチ状に分布する

植物は、実生の定着や成長、他の植物との競争など、様々な点で菌根菌と密接な関係を持つことが多くの研究で示されてきた。しかし、地下部における菌根や根外菌糸体の動態を把握することは難しいため、菌根菌の共生機能や生態には、不明な点が多かった。本研究により、根系スケールにおける菌根菌の詳細な動態を解明するための、生態学的、生理学的な知見を示せたものとする。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科の松下範久准教授には、サンプリングから実験手法、論文の執筆まで細部にわたってご指導いただいた。宝月岱造名誉教授には、論文のアイデア、校閲など数多くの鋭いご指摘と温かい励ましをいただいた。福田健二教授には、論文の内容や解析の手法について、多くのアドバイスをいただくとともに、論文の審査および校閲をしていただいた。呉炳雲助教には、実験系の考案や作成手法に関して多くのご助言とご協力をいただいた。

同大学院新領域創成科学研究科の奈良一秀准教授には、貴重な実験材料である外生菌根菌の菌糸体を提供していただくとともに、論文の審査および校閲をしていただき、菌根菌のスペシャリストとして多くの鋭いご指摘をいただいた。同大学院農学生命科学研究科の益守眞也講師には、窒素含有量の測定方法をご指導いただくとともに、論文の審査および校閲をしていただいた。同研究科の丹下健教授には、論文の審査および校閲をしていただいた。国立研究開発法人森林総合研究所多摩森林科学園の岩本宏二郎氏には、調査地をご提供していただき、サンプリングにご協力いただいた。Division of Forest Insect Pests and Diseases, Korea Forest Research Institute の孫貞阿氏には、サンプリングにご協力いただき、実験手法についてご助言をいただいた。また、森林植物学研究室の方々には、日頃の研究生活から実験の補助まで、さまざまな支援をいただいた。

以上の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Abuzinadah RA, Read DJ (1988) Amino acids as nitrogen sources for ectomycorrhizal fungi: utilization of individual amino acids. *Trans Br Mycol Soc* 91: 473–479
- Agerer R (1987–1998) *Colour atlas of ectomycorrhizae*. 1st–11th edn. Einhorn.
- Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107–114
- Agerer R (2006) Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 5: 67–107
- Alexander IJ, Högborg P (1986) Ectomycorrhizas of tropical angiospermous trees. *New Phytol* 102: 541–549
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG (1999) Intra- and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. *Mycol Res* 103: 1579–1587
- Arnebrant K (1994) Nitrogen amendments reduce the growth of extramatrical ectomycorrhizal mycelium. *Mycorrhiza* 5: 7–15
- Arocena JM, Glowa KR, Massicotte HB (2001) Calcium-rich hypha encrustations on *Piloderma*. *Mycorrhiza* 10: 209–215
- Baar J, Horton TR, Kretzer AM, Bruns TD (1999) Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytol* 143: 409–418.
- Beiler KJ, Simard SW, Lemay V, Durall DM (2012) Vertical partitioning between sister species of *Rhizopogon* fungi on mesic and xeric sites in an interior Douglas-fir forest. *Mol Ecol* 21: 6163–6174
- Bending GD, Read DJ (1995) The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytol* 130: 401–409.
- Bergemann SE, Miller SL (2002) Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytol* 156: 313–320

- Bever JD, Richardson SC, Lawrence BM, Holmes J, Watson M (2009) Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecol Lett* 12: 13–21
- Bruns TD (1995) Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 170: 63–73
- Bruns TD, Peay K, Boynton P, Grubisha L, Hynson N, Nguyen N, Rosenstock N (2009) Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first four years of a 99-year spore burial experiment. *New Phytol* 181: 463–470
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D, Botton B (2002) An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant Soil* 244: 165–175
- Chambers SM, Cairney JWG (1999) *Pisolithus*. In: Cairney JWG, Chambers SM, eds. *Ectomycorrhizal fungi key genera in profile*. Springer, pp. 1–31
- Cline ET, Ammirati JF, Edmonds RL (2005) Does proximity to mature trees influence ectomycorrhizal fungus communities of Douglas-fir seedlings? *New Phytol* 166: 993–1009
- Conn C, Dighton J (2000) Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 32: 489–496
- Dahlberg A (1999) Somatic incompatibility in ectomycorrhizas. In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. 2nd ed. Springer, pp 110–132
- Dahlberg A (2001) Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytol* 150: 555–562
- Dahlberg A, Stenlid J (1994) Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus hovinus* (L.: Fr.) Roussel revealed by somatic incompatibility. *New Phytol* 128: 225–234
- Deacon JW, Fleming LV (1992) Interactions of ectomycorrhizal fungi. In: Allen MF, eds. *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, pp. 249–354
- Erland S, Finlay R (1992) Effects of temperature and incubation time on the ability of three ectomycorrhizal fungi to colonize *Pinus sylvestris* roots. *Mycol Res* 96: 270–272
- Erland S, Taylor AFS (1999) Resupinate ectomycorrhizal fungal genera. In: Cairney JWG, Chambers SM, eds. *Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile*. Springer, pp. 287–309

- Erland S, Taylor AFS (2002) Diversity of ecto-mycorrhizal fungal communities in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden MGA, Sanders IR, eds. Mycorrhizal ecology. Springer, pp. 163–200
- Farjon A (1990) Pinaceae – drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books.
- Finér L, Ohashi M, Noguchi K, Hirano Y (2011) Fine root production and turnover in forest ecosystems in relation to stand and environmental characteristics. For Ecol Manage 262: 2008–2023
- Fitter AH (1991) Costs and benefits of mycorrhizas: implications for functioning under natural conditions. Experientia 47: 350–355
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol 2: 113–118
- Gaul D, Hertel D, Leuschner C (2009) Estimating fine root longevity in a temperate Norway spruce forest using three independent methods. Funct Plant Biol 36: 11–19
- Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ (2006) Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. New Phytol 170: 381–390
- Gloser V, Sedláček P, Gloser J (2009) Consequences of nitrogen deficiency induced by low external N concentration and by patchy N supply in *Picea abies* and *Thuja occidentalis*. Trees 23: 1–9
- Gryndler M, Trilčová J, Hršelová H, Streiblová E, Gryndlerová H, Jansa J (2013) *Tuber aestivum* Vittad. mycelium quantified: advantages and limitations of a qPCR approach. Mycorrhiza 23: 341–348
- Guescini M, Pierleoni R, Palma F, Zeppa S, Vallorani L, Potenza L, Sacconi C, Giomaro G, Stocchi V (2003) Characterization of the *Tuber borchii* nitrate reductase gene and its role in ectomycorrhizae. Mol Genet Genomics 269: 807–816
- Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R (2001) Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. Mol Ecol 10: 1121–1131

- Hattori T, Ohta A, Itaya M, Shimada M (2003) The ability of ectomycorrhizal fungi to utilize fatty acids and a lipid as a carbon source for mycelial growth. *Can J Bot* 81: 1285–1292
- Hendricks JJ, Mitchell RJ, Kuehn KA, Pecot SD, Sims SE (2006) Measuring external mycelia production of ectomycorrhizal fungi in the field: the soil matrix matters. *New Phytol* 171: 179–186
- Hirose D, Kikuchi J, Kanzaki N, Futai K (2004) Genet distribution of sporocarps and ectomycorrhizas of *Suillus pictus* in a Japanese white pine plantation. *New Phytol* 164: 527–541
- Hodge A (2004) The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol* 162: 9–24
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297–299
- Hortal S, Pera J, Parlade J (2008) Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 18: 69–77
- Horton TR, Cazares E, Bruns TD (1998) Ectomycorrhizal, vesicular–arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first five months of growth after wildfire. *Mycorrhiza* 8: 11–18
- Hoshino YT, Matsumoto N (2004) An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly absorb DNA. *Microbes Environ* 19: 13–19
- Hoshino YT, Matsumoto N (2005) Skim milk drastically improves the efficacy of DNA extraction from andisol, a volcanic ash soil. *JARQ* 39: 247–252
- Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, Li W (2010) CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26: 680–682
- Ishida TA, Nara K, Hogetsu T (2007) Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytol* 174: 430–440
- Izzo A, Agbowo J, Bruns TD (2005) Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed conifer forest. *New phytol* 166: 619–630

- Izzo A, Canright M, Bruns TD (2006) The effects of heat treatments on ectomycorrhizal resistant propagules and their ability to colonize bioassay seedlings. *Mycol Res* 110: 196–202
- Javelle A, Morel M, Rodríguez-Pastrana BR, Botton B, André B, Marini AM, Brun A Chalot M (2003) Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mol Microbiol* 47: 411–430
- Jeffries P, Dodd JC (1991) The use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. In: Arora DK, Rai B, Mukerji KG, Knudson GR, eds. *Handbook of applied mycology vol. I. Soil and plants*. Marcel Dekker, pp. 155–186
- Jennings DH, Lysek G (1999) *Fungal biology. Understanding the fungal lifestyle*, 2nd eds. Bios Scientific Publishers.
- Johnson D (2015) Priorities for research on priority effects. *New Phytol* 205: 1375–1377
- Kataoka R, Siddiqui ZA, Taniguchi T, Futai K (2009) Quantification of *Wautersia* [*Ralstonia*] *basilensis* in the mycorrhizosphere of *Pinus thunbergii* Parl. and its effect on mycorrhizal formation. *Soil Biol Biochem* 41: 2147–2152
- Kennedy P (2010) Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytol* 187: 895–910
- Kennedy PG, Bruns TD (2005) Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytol* 166: 631–638
- Kennedy PG, Peay KG, Bruns TD (2009) Root tip competition among ectomycorrhizal fungi: are priority effects a rule or an exception? *Ecology* 90: 2098–2107
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuyse P, Jansa J, Bücking H (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880–882
- 菊地淳一 (2000) 樹木の成長と菌根. 二井一禎, 肘井直樹編著, 森林微生物生態学. 朝倉書店, pp. 57–66

- Kjøller R, Nilsson LO, Hansen K, Schmidt IK, Vesterdal L, Gundersen P (2012) Dramatic changes in ectomycorrhizal community composition, root tip abundance and mycelial production along a stand-scale nitrogen deposition gradient. *New Phytol* 194: 278–286
- Kõljalg U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjøller R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vrålstad T, Ursing BM (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* 166: 1063–1068
- Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, Swenson NG, Perez R, Sanjur O, Bermingham E (2009) Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18621–18626.
- Kropp BR, Mueller GM (1999) *Laccaria*. In: Cairney JWG, Chambers SM, eds. *Ectomycorrhizal fungi key genera in profile*. Springer, pp. 65–88
- Lamhamedi MS, Godbout C, Fortin JA (1994) Dependence of *Laccaria bicolor* basidiome development on current photosynthesis of *Pinus strobus* seedlings. *Can J For Res* 24: 1797–1804
- Lee LS, Alexander IJ, Watling R (1997) Ectomycorrhizas and putative ectomycorrhizal fungi of *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae). *Mycorrhiza* 7: 63–81
- Levin RA, Wagner WL, Hoch PC, Nepokroeff M, Pires JC, Zimmer EA, Sytsma KJ (2003) Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *Am J Bot* 90: 107–115
- Lian C, Miwa M, Hogetsu T (2001) Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87: 88–98
- Lian C, Narimatsu M, Nara K, Hogetsu T (2006) *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytol* 171: 825–836
- Lilleskov EA, Bruns TD, Horton TR, Taylor DL, Grogan P (2004) Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiol Ecol* 49: 319–332
- Lilleskov EA, Fahey TJ, Horton TR, Lovett GM (2002) Belowground ectomycorrhizal fungal

- community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83: 104–115
- Lilleskov EA, Hobbie EA Horton TR (2011) Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. *Fungal Ecol* 4: 174–183
- Maehara N, Kikuchi J, Futai K (1993) Mycorrhizae of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*): protection of seedlings from acid mist and effect of acid mist on mycorrhiza formation. *Can J Bot* 71: 1562–1567
- Mahmood S (2003) Colonisation of spruce roots by two interacting ectomycorrhizal fungi in wood ash amended substrates. *FEMS Microbiol Lett* 221: 881–887
- Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol* 59: 153–163
- Merrild MP, Ambus P, Rosendahl S, Jakobsen I (2013) Common arbuscular mycorrhizal networks amplify competition for phosphorus between seedlings and established plants. *New Phytol* 200: 229–240
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF, eds. *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, pp. 249–354
- Montanini B, Viscomi AR, Bolchi A, Martin Y, Siverio JM, Balestrini R, Bonfante P, Ottonello S (2006) Functional properties and differential mode of regulation of the nitrate transporter from a plant symbiotic ascomycete. *Biochem J* 394: 125–134
- Nakano-Hylander A, Olsson PA (2007) Carbon allocation in mycelia of arbuscular mycorrhizal fungi during colonisation of plant seedlings. *Soil Biol Biochem* 39: 1450–1458
- 滑川良一, 渡辺録郎, 原寿男 (1960) ハケ岳天然生幼齡林の保育について. *林試研報* 123: 93–102
- Nara K (2006) Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytol* 169: 169–178
- Nara K (2009) Spores of ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytol* 181: 245–248

- Näsholm T, Högborg P, Franklin O, Metcalfe D, Keel SG, Campbell C, Hurry V, Linder S, Högborg MN (2013) Are ectomycorrhizal fungi alleviating or aggravating nitrogen limitation of tree growth in boreal forests? *New Phytol* 198: 214–221
- Nilsson LO, Wallander H (2003) Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce forest was reduced in response to nitrogen fertilization. *New Phytol* 158: 409–416
- Nylund JE, Wallander H (1989) Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytol* 112: 389–398
- 小川真 (1975) アカマツ林における菌根菌, マツタケの微生物生態学的研究 I. マツタケのシロ. *林試研報* 272: 79–121
- 岡部宏秋 (2000) 植物根系を利用する共生戦略. 二井一禎, 肘井直樹編著, 森林微生物生態学. 朝倉書店, 東京. pp. 41–54
- 小野義隆 (2014) 成長, 生殖と環境要因. 柿嶋眞, 徳増征二編著. 菌類の生物学: 分類・系統・生態・環境・利用. 共立出版, pp. 90–101
- Parrent JL, Vilgalys R (2007) Biomass and compositional responses of ectomycorrhizal fungal hyphae to elevated CO₂ and nitrogen fertilization. *New Phytol* 176: 164–174
- Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SE, Garbelotto M (2007) A strong species–area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecol Lett* 10: 470–480
- Peay KG, Garbelotto M, Bruns TD (2009) Spore heat resistance plays an important role in disturbance-mediated assemblage shift of ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus muricata* seedlings. *J Ecol* 97: 537–547
- Peter M, Ayer F, Egli S (2001) Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytol* 149: 311–325
- Pickles BJ, Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ (2012) Spatial analysis of ectomycorrhizal fungi reveals that root tip communities are structured by competitive interactions. *Mol Ecol* 21: 5110–5123
- Pickles BJ, Genney DR, Potts JM, Lennon JJ, Anderson IC, Alexander IJ (2010) Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytol* 186: 755–768

- Pietikäinen A, Kytöviita MM (2007) Defoliation changes mycorrhizal benefit and competitive interactions between seedlings and adult plants. *J Ecol* 95: 639–647
- Pregitzer KS, Kubiske ME, Yu CK, Hendrick RL (1997) Relationships among root branch order, carbon, and nitrogen in four temperate species. *Oecologia* 111: 302–308.
- Read DJ (1993) Mycorrhiza in plant communities. *Adv Plant Pathol* 9: 1–32
- Richard F, Moreau PA, Selosse MA, Gardes M (2004) Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Can J Bot* 82: 1711–1729
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Divers* 33: 1–45
- Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, Larsson KH, Kuyper TW, Taylor AFS, Finlay RD (2003) Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytol* 159: 775–783
- Rousseau JVD, Sylvia DM, Fox AJ (1994) Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol* 128: 639–644
- Sachs J, Simms E (2006) Pathways to mutualism breakdown. *Trends Ecol Evol* 21: 585–592
- Sawada K, Wan J, Oda K, Nakano S, Aimi T, Shimomura N (2014) Variability in nucleus number in basidiospore isolates of *Rhizopogon roseolus* and their ability to form ectomycorrhizas with host pine roots. *Mycol Progress* 13: 745–751
- Shiraishi A, Komatsu M, Matsushita N, Hogetsu T (2011) Genetic diversity and spatial distribution of rhizobial bacteria nodulating on black locust (*Robinia pseudoacacia*) rhizospheres. *Soil Sci Plant Nutr* 57: 765–774
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press.
- Söderström B, Read DJ (1987) Respiratory activity of intact and excised ectomycorrhizal mycelial systems growing in unsterilized soil. *Soil Biol Biochem* 19: 231–236
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739
- Tanaka Y, Yano K (2005) Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant Cell Environ* 28: 1247–1254

- Taniguchi T, Kataoka R, Futai K (2008) Plant growth and nutrition in pine (*Pinus thunbergii*) seedlings and dehydrogenase and phosphatase activity of ectomycorrhizal root tips inoculated with seven individual ectomycorrhizal fungal species at high and low nitrogen conditions. *Soil Biol Biochem* 40: 1235–1243
- Taylor DL, Bruns TD (1999) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol Ecol* 8: 1837–1850
- Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjølner R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG Pölme S, Ryberg M, Smith ME, Kõljalg U (2012) Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 21: 4160–4170
- Tedersoo L, Kõljalg U, Hallenberg N, Larrsson KH (2003) Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytol* 159: 153–165
- Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263
- 寺本宗正 (2012) 経時的オートラジオグラフィを用いた外生菌根共生系における炭素転流の解析. 東京大学博士学位論文, 甲 28068 号.
- Teramoto M, Wu B, Hogetsu T (2012) Transfer of ^{14}C -photosynthate to the sporocarp of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystina*. *Mycorrhiza* 22: 219–225
- Tibbett M (2000) Roots, foraging and the exploitation of soil nutrient patches: the role of mycorrhizal symbiosis. *Funct Ecol* 14: 397–399.
- Trappe JM (1977) Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann Rev Phytopathol* 15: 203–222
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115
- Vogt KA, Grier CC, Meier CE, Edmonds RL (1982) Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystems in western Washington. *Ecology* 63: 370–380
- Wadud MA, Nara K, Lian C, Ishida TA, Hogetsu T (2014) Genet dynamics and ecological

- functions of the pioneer ectomycorrhizal fungi *Laccaria amethystina* and *Laccaria laccata* in a volcanic desert on Mount Fuji. *Mycorrhiza* 24: 551–563
- Wallander H, Ekblad A (2015) The importance of ectomycorrhizal networks for nutrient retention and carbon sequestration in forest ecosystems. In: Horton TR ed. *Mycorrhizal networks*, Springer, pp. 69–90
- Wallander H, Nylund JE (1992) Effects of excess nitrogen and phosphorus starvation on the extramatrical mycelium of ectomycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. *New Phytol* 120: 495–503
- Wallenda T, Kottke I (1998) Nitrogen deposition and ectomycorrhizas. *New Phytol* 139: 169–187
- Werner GDA, Kiers ET (2015) Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytol* 205: 1515–1524
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JT (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic Press, pp. 315–322
- Wu B, Maruyama H, Teramoto M, Hogetsu T (2012) Structural and functional interactions between extraradical mycelia of ectomycorrhizal *Pisolithus* isolates. *New Phytol* 194: 1070–1078
- Wu B, Nara K, Hogetsu T (1999) Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 9: 151–159
- Wu B, Nara K, Hogetsu T (2002) Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia. *Mycorrhiza* 12: 83–88
- Yamada A, Katsuya K (1996) Morphological classification of ectomycorrhizas of *Pinus densiflora*. *Mycoscience* 37: 145–155
- Yoshida N, Son JA, Matsushita N, Iwamoto K, Hogetsu T (2014) Fine-scale distribution of ectomycorrhizal fungi colonizing *Tsuga diversifolia* seedlings growing on rocks in a subalpine *Abies veitchii* forest. *Mycorrhiza* 24: 247–257
- Zheng C, Ji B, Zhang J, Zhang F, Bever JD (2014) Shading decreases plant carbon preferential allocation towards the most beneficial mycorrhizal mutualist. *New Phytol* 205: 361–368

- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T (1999) Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytol* 144: 55–63
- Zhou Z, Hogetsu T (2002) Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocarps in a *Larix kaempferi* forest. *New Phytol* 154: 529–539
- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T (2000) Genet distribution of ectomycorrhizal fungus *Suillus grevillei* populations in two *Larix kaempferi* stands over two years. *J Plant Res* 113: 365–274
- Zhou Z, Miwa M, Matsuda Y, Hogetsu T (2001) Spatial distribution of the subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei* genets. *J Plant Res* 114: 179–185