

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18H02231
研究課題名(和文) 倒木更新におけるコケ植物 - シアノバクテリア - 菌根菌共生系の窒素供給機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of nitrogen supply to conifer seedlings from the symbiotic system of feathermoss, cyanobacteria, and mycorrhizal fungi in the regeneration on fallen logs

研究代表者
松下 範久 (Matsushita, Norihisa)
東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00282567
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：北方林や亜高山帯林では、倒木上のコケ植物群落は針葉樹の主要な更新サイトの1つである。この群落に優占するイワダレゴケやタチハイゴケには窒素固定能をもつシアノバクテリアが着生(共生)しており、この共生が針葉樹実生への窒素供給に重要な役割を担っていると推測される。本研究では、倒木上におけるコケ植物とシアノバクテリアとの共生と窒素固定の実態を把握することを目的として、倒木上のコケ植物群落内におけるシアノバクテリアの空間分布と窒素固定速度、イワダレゴケへのシアノバクテリアの着生やシアノバクテリアの窒素固定速度に影響を及ぼす環境要因、イワダレゴケに着生するシアノバクテリアの群集構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では森林の更新や物質循環に関する多くの研究が行われてきたが、コケ植物に着生するシアノバクテリアの窒素固定については全く着目されてこなかった。本研究では、コケ植物上におけるシアノバクテリアの詳細な空間分布の解明や新たなシアノバクテリア系統の発見など、国際的にも新規性の高い成果を得ることができた。一方、北方林は、陸上生態系の中でも気候変動の影響を受けやすい場所と推測されている。シアノバクテリアによる窒素固定量は、北方林への窒素供給量の半分以上を占めると推測されていることから、本研究の成果は、今後の気候変動が北方林の更新や物質循環に与える影響を評価するうえでも重要な知見になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In boreal and subalpine forests, feathermoss communities develop on fallen logs are one of the main regeneration sites for conifers. The dominant bryophytes in the communities, such as *Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*, are colonized by nitrogen-fixing cyanobacteria, suggesting that the feathermoss-cyanobacteria symbiosis plays an important role in supplying nitrogen to conifer seedling on fallen logs. To understand the symbiosis between feathermosses and cyanobacteria and nitrogen fixation by cyanobacteria on fallen logs, we clarified (1) spatial distribution and nitrogen fixation rate of cyanobacteria in feathermoss communities on fallen logs, (2) environmental factors affecting cyanobacterial colonization on *H. splendens* and nitrogen fixation rate of cyanobacteria, (3) community structure of cyanobacteria colonizing *H. splendens*.

研究分野：森林科学

キーワード：共生 窒素固定 倒木更新 亜高山帯林 北方林 シアノバクテリア イワダレゴケ タチハイゴケ

1. 研究開始当初の背景

北半球の亜寒帯域にはマツ科樹木の優占する北方林が広がっており、日本の亜高山帯林はその一端をなす。北方林は、世界の森林面積の約 1/4 を占め、その面積と森林資源量の規模から、地球温暖化防止や生物多様性保全の鍵となる重要な生態系の 1 つである。

日本の亜高山帯林のコケ群落では、イワダレゴケ (*Hylocomium splendens*) やタチハイゴケ (*Pleurozium schreberi*) などの欧米の北方林と共通するコケ植物種が優占する。北方林では、この 2 種の茎葉体に窒素固定能をもつシアノバクテリアが着生しており (DeLuca et al. 2002, Nature), シアノバクテリアが空中窒素を固定してコケ植物に供給することが分かっている (Bay et al. 2013, New Phytol.)。しかもその固定量は、林内に供給される窒素量の半分以上を占める (DeLuca et al. 2002; Rousk et al. 2013 Front Microbiol など)。

一方、マツ科樹木の根には菌根菌が共生しており、成長に必要な窒素の大部分が菌根菌から供給される。また、室内実験では、タチハイゴケからコントルタマツ (*Pinus contorta*) の実生へ、両者を繋ぐ菌根菌の菌糸を通じて炭素とリンが転流したとの報告がある (Carleton & Read 1991, Can J Bot)。したがって、コケ群落内では、菌根菌の菌糸を経由してコケ植物から実生に窒素が供給されている可能性が考えられる。

北方林や亜高山帯林では、コケ植物に覆われた倒木上にマツ科樹木の実生が定着する「倒木更新」が多く見られる。そのため、北方林や亜高山帯林の生態系を完全に理解するためには、倒木更新のメカニズムの解明が重要である。既往研究では、実生の定着がコケ植物に覆われた倒木上で促進される理由として、種子がコケ植物により捕捉されること (Christy & Mack 1984, J Ecol など)、ササ類や草本類による被圧から回避できること (Lusk & Kelly 2003, New Phytol など)、地表に生育する病原菌から回避できること (Cheng & Igarashi 1987, Res Bull Coll Exp For Hokkaido Univ など) などが指摘されている。これらに加えて、私たちは、コケ植物から実生に菌根菌の菌糸を経由して窒素が供給されることも大きな理由の 1 つではないかと推測しているが、実証には至っていない。

2. 研究の目的

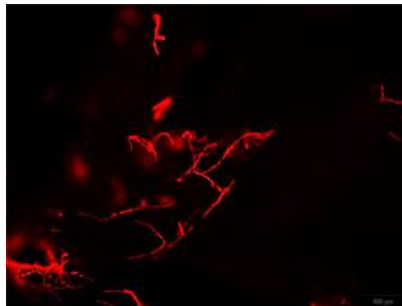
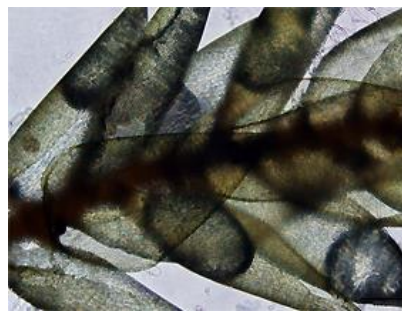
本研究では、倒木更新におけるコケ植物-シアノバクテリア-菌根菌共生系の役割を明らかにするために、コケ植物とシアノバクテリアの共生による窒素固定の実体を把握することを目的とした。具体的には、(1) コケ植物群落内におけるシアノバクテリアの空間分布と窒素固定速度、(2) コケ植物へのシアノバクテリアの着生と窒素固定速度に及ぼす環境要因の影響、(3) コケ植物に着生するシアノバクテリアの群集組成、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) コケ植物群落内におけるシアノバクテリアの空間分布と窒素固定速度

① 亜高山帯針葉樹林に生育するコケ植物へのシアノバクテリアの着生と窒素固定

東京大学大学院農学生命科学研究科附属秩父演習林 (埼玉県秩父市; 以下、秩父演習林) において、針葉樹実生が定着していた 12 本の倒木上のコケ植物群落を対象として、群落を構成する蘚類と苔類の種を記録した。また、山梨県の県有林 (山梨県鳴沢村、標高約 2000 m; 以下、富士山試験地) において、1 m×1 m のプロットを 10 個設置し、各プロット内に含まれる蘚類と苔類の種を記録した。さらに、倒木上やプロット内で優占していた蘚類の種について、茎葉体へのシアノバクテリアの着生の有無を蛍光実体顕微鏡下での観察により確認し (図-1)、シアノバクテリアの着生が確認された種については、アセチレン還元法により窒素固定速度を測定した。



② イワダレゴケ群落内のシアノバクテリアの空間分布

秩父演習林内の雁坂登山道だるま坂付近のコメツガ林 (だるま坂試験地、標高約 2000 m) において、2 本の倒木上からコメツガまたはシラビソ実生を含むイワダレゴケ群落 (約 20 cm×20 cm) を 1 つずつ採取した (群落 A と B)。採取した群落を実験室に持ち帰り、位置を記録しながら茎葉体を葉齢ごとに刈り取った後、蛍光実体顕微鏡下で茎葉体を観察して、シアノバクテリアのコロニー着生量を 0~5 の 6 段階で記録した (以下、着生レベル)。また、茎葉体の面積と葉齢ごとの乾重、クロロフィル量を測定した。なお、イワダレゴケの

図-1. タチハイゴケの光学顕微鏡 (上) と蛍光顕微鏡 (下) の観察像。蛍光顕微鏡下で赤色の線状に見えるものがタチハイゴケに着生したシアノバクテリア。

シュートは多年生で、毎年、先端部に新たな茎葉体を展開して階段状の形態をなすため、葉齢を容易に判別することができる(図-2)。



図-2. イワダレゴケのシュート。毎年、シュートの先端部に新たな茎葉体を展開するため、階段状の形態になる。この写真では、左上が採集年、中が採集年の1年前、右下が採集年の2年前に展開した茎葉体。

③イワダレゴケ茎葉体の齢と窒素固定速度

だるま坂試験地内の倒木10本、秩父演習林内の樺小屋周辺のコメツガ林(樺小屋試験地、標高約1800m)内の倒木10本、同突出岬の針広混交林(突出岬試験地、標高約1680m)内の倒木5本を対象として、倒木上のイワダレゴケを採取した。当年～5年葉の窒素固定速度を葉齢ごとに測定した後、すべての茎葉体におけるシアノバクテリアの着生レベルを記録した。

(2) シアノバクテリアの着生と窒素固定速度に及ぼす環境要因の影響

①イワダレゴケへのシアノバクテリア着生量の標高間差

だるま坂試験地、樺小屋試験地、突出岬試験地において、5本の倒木上からイワダレゴケを5シュートずつ採取し、葉齢ごとのシアノバクテリアの着生レベルを記録した後、茎葉体の面積を測定した。

②イワダレゴケの窒素固定速度とシアノバクテリアの着生量に影響を与える環境要因

樺小屋試験地内の19本の倒木上からイワダレゴケを採取した。採取の際に、採取場所の環境条件として以下を測定・記録した：採取地点の光条件として開空度；採取地点の水分条件として、採取地点の地表面からの高さ、倒木の接地／浮きの別、倒木の端／中央の別。採取したイワダレゴケの当年葉～3年葉の窒素固定速度を測定し、シアノバクテリアの着生レベルを記録した。さらに、茎葉体の全窒素濃度とリン酸濃度を測定した。窒素固定速度と着生レベルと応答変数とし、全窒素濃度、リン酸濃度、各環境条件を説明変数として、一般化線形モデルによる回帰分析と逸脱度分析を葉齢ごとに行った。

(3) シアノバクテリアの群集組成

①イワダレゴケに着生するシアノバクテリアの群集組成

(1) -③で採取したサンプルのうち、窒素固定速度の大きかった11地点・55サンプルを選び、茎葉体からDNAを抽出した。窒素固定細菌のニトロゲナーゼ還元酵素遺伝子 *nifH* 領域についてアンプリコンシーケンス解析を行い、得られた塩基配列を97%相同性閾値によりOTU(操作的分類単位)に分類して系統解析を行った。さらに、OTUの存在比に基づいて群集解析を行った。

②イワダレゴケ茎葉体に着生するシアノバクテリアの分離と分離菌株の種同定

(1) -③で採取したイワダレゴケの茎葉体から、シアノバクテリアが着生した部位を切り取り、滅菌水で洗浄した後滅菌水中で粉砕した。粉砕した液をシアノバクテリア用平板培地に接種して培養した後、出現したコロニーの一部を液体培地に接種して振とう培養した。得られた1菌株について、16S rDNA領域の塩基配列を決定して菌種を同定するとともに、*nifH*領域の塩基配列を決定して(3) -①で検出されたOTUの塩基配列と比較した。さらに、この菌株について、窒素固定速度を測定した。

4. 研究成果

(1) コケ植物群落内におけるシアノバクテリアの空間分布と窒素固定速度

①亜高山帯針葉樹林に生育するコケ植物へのシアノバクテリアの着生と窒素固定

秩父演習林の倒木上のコケ植物群落では蘚類7種と苔類4種が、富士山試験地のプロット内のコケ植物群落では蘚類8種と苔類3種が確認された。これらの種のうち、イワダレゴケ、タチハイゴケ、チシマシッポゴケ (*Dicranum majus*)、フジノマンネングサ (*Pleuroziopsis ruthenica*)、ミヤマクサゴケ (*Heterophyllum affine*) の5種において、シアノバクテリアの着生と窒素固定が確認された。

②イワダレゴケ群落内のシアノバクテリアの空間分布

群落Aの実生の根は、周囲の木本植物から伸びた根が多く存在する腐植層(図-3)に到達しており、外生菌根が形成されていた。一方、群落Bの実生の根はリター層にとどまっており、外生菌根は見られなかった。これらのことから、倒木上のイワダレゴケ群落では、根系が腐植層に達した針葉樹実生は外生菌根を通じて基質中の養分を利用しているが、根系がリター層にとどまっている間は、イワダレゴケおよび着生シアノバクテリアから漏出する養分を利用している可能性が考えられた。

シアノバクテリアが着生していた茎葉体は、1年古い葉齢のシアノバクテリアが着生していた茎葉体に隣接しており、両者の重なりが小さい傾向が見られた。シアノバクテリアの着生率

は、面積当たりのクロロフィル量が最大であった当年葉で低く、2年葉で最大となり、3年葉以降で減少した。シアノバクテリアの窒素還元酵素は酸素により不可逆的に失活するため (Rai et al. 2000), 光合成による酸素の生成は、窒素固定能をもつシアノバクテリアの着性を阻害すると考えられる。当年~1年葉で2年葉より着生が少なかったことから、イワダレゴケの光合成によるシアノバクテリアの着生阻害の可能性が示唆された。

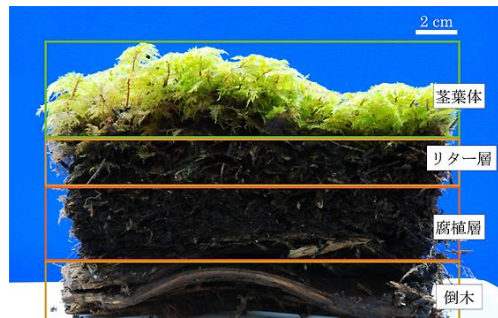


図-3. 倒木上のイワダレゴケ群落の横断面

③イワダレゴケ茎葉体の齢と窒素固定速度

茎葉体乾重あたりの窒素固定速度とシアノバクテリアの平均着生レベルは、どちらも当年葉で低く、1年葉で最大となり、以降は茎葉体が古くなるほど減少した。窒素固定速度は、着生レベルの増加に伴って増加した。窒素固定速度は、1, 2年葉で4, 5年葉に比べて有意に大きかった。着生レベルは、当年葉と5年葉が1~3年葉に比べて有意に低く、4年葉は1, 2年葉に比べて有意に低かった。

(2) シアノバクテリアの着生と窒素固定速度に及ぼす環境要因の影響

①イワダレゴケへのシアノバクテリア着生量の標高間差

茎葉体の面積は、3試験地のいずれも2年葉で最大であった。また、樺小屋と突出峠では3年葉から面積が急激に減少したが、だるま坂では1年葉から4年葉にかけての差は小さかった。これらのことから、高標高ではイワダレゴケの葉寿命が長くなり、枯死した茎葉体の分解速度が遅くなることが示唆された。

シアノバクテリアが着生していた茎葉体の割合は、3試験地のいずれも1年葉は当年葉に比べて著しく高く、最大となる葉齢は標高が低くなるほど若かった。また、着生レベルが高い(着生レベル3以上)茎葉体の割合は、当年葉~6年葉のいずれも、標高の最も低い突出峠で最も高かった。

②イワダレゴケの窒素固定速度とシアノバクテリアの着生量に影響を与える環境要因

統計解析の結果、窒素固定速度の違いは、当年葉では全窒素濃度、1年葉では全窒素濃度と倒木の接地/浮き、2年葉では全窒素濃度とリン酸濃度と開空度によって有意に説明され、3年葉ではいずれの環境要因によっても有意に説明されなかった。着生レベルは、当年葉では全窒素濃度とリン酸濃度と倒木の接地/浮き、1~2年葉では全窒素濃度、3年葉では開空度によって有意に説明された。これらの結果から、イワダレゴケへのシアノバクテリアの着生や窒素固定速度は、主に茎葉体の全窒素濃度による影響を受け、イワダレゴケ群落の窒素要求量に応答して増加すると考えられた。また、葉齢によって、茎葉体のリン酸濃度や光・水分条件がシアノバクテリアの定着や窒素固定の制限要因になると推測された。

(3) シアノバクテリアの群集組成

①イワダレゴケに着生するシアノバクテリアの群集組成

系統解析の結果、北方林において報告されている5つのクラスター (Ininbergs et al. 2011, New Phytol) のうち、*Nostoc* 属クラスター I, *Stigonema* 属クラスター, *nifH* 2 クラスターに属する OTU が確認された。さらに、*nifH* 2 クラスターに属する OTU の中には、海外産の OTU を含まず、秩父山地に由来する OTU のみで形成された J1 サブクラスターと、富士山試験地の既知の OTU と秩父山地に由来する OTU のみで形成された J2 サブクラスターの存在が確認された。これら2つの日本産サブクラスターに属する OTU は、調査した11地点中の10地点で優占していた。

群集解析により、シアノバクテリア群集は、試験地間や採取地点間により有意に異なり、葉齢と全窒素濃度は有意に影響していなかった。また、倒木が接地しているか浮いているかで群集組成が有意に異なっていたことから、倒木上のシアノバクテリア群集は地面からのシアノバクテリアの感染の影響を受けている可能性が示唆された。

②イワダレゴケ茎葉体に着生するシアノバクテリアの分離と分離菌株の種同定

分離菌株は、16S rDNA の塩基配列の相同性検索の結果から *Nostoc* 属菌と同定され、*nifH* 領域の塩基配列の比較から (3)・①で検出された *Nostoc* 属クラスター I に属する OTU と同定された。さらに、この菌株は窒素固定能を有することが確認された。この OTU は、樺小屋試験地と突出峠試験地の複数の倒木上のイワダレゴケから検出され、特に突出峠の1本の倒木上では最も優占していた OTU であった。今後、本研究の方法により多くのシアノバクテリア株を分離することで、コケ植物に着生するシアノバクテリアの種間や系統間における窒素固定能や環境応答の違いについて、正確な把握が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 岩切 鮎佳, 坂上 大翼, 松下 範久, 福田 健二	4. 巻 24
2. 論文標題 北海道の針葉樹苗畑における暗色雪腐病菌 (<i>Racodium therryanum</i>) のジェネット分布	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 樹木医学研究	6. 最初と最後の頁 153 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18938/treeforesthealth.24.3_153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwakiri A, Sakaue D, Matsushita N, Fukuda K	4. 巻 51
2. 論文標題 New microsatellite markers for the population studies of <i>Racodium therryanum</i> , a causal agent of snow blight in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Forest Pathology	6. 最初と最後の頁 e12666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/efp.12666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwakiri A, Matsushita N, Fukuda K	4. 巻 62
2. 論文標題 Snow mold fungus <i>Racodium therryanum</i> is phylogenetically <i>Herpotrichia juniperi</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 406 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.47371/mycosci.2021.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩切鮎佳, 坂上大翼, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 アカエゾマツの苗床における暗色雪腐病菌のジェネット分布
3. 学会等名 樹木医学会第23回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩切鮎佳, 坂上大翼, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 暗色雪腐病菌の苗畑と造林地における遺伝構造の比較
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwakiri A, Matsushita N, Fukuda K
2. 発表標題 Population structure and genetic recombination of <i>Racodium therryanum</i> revealed by new microsatellite markers
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩切鮎佳, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 エゾマツの発芽を阻害する菌害の検討
3. 学会等名 樹木医学会第24回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwakiri A, Matsushita N, Fukuda K
2. 発表標題 Fungi isolated from non-germinated seeds of <i>Picea jezoensis</i>
3. 学会等名 The 10th International Conference of Clinical Plant Science 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原巳美子, 久保光, 中村俊彦, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 亜高山帯林の倒木上イワダレゴケ群落における共生シアノバクテリアの分布
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩切鮎佳, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 暗色雪腐病菌 <i>Racodium therryanum</i> と <i>Herpotrichia juniperi</i> の系統関係
3. 学会等名 樹木医学会第25回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原巳美子, 中村俊彦, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 イワダレゴケ茎葉体のシアノバクテリア着生及び窒素固定量の齡別傾向
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩切鮎佳, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 天然林における暗色雪腐病菌の集団遺伝構造
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福田 健二 (Fukuda Kenji) (30208954)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	
研究分担者	練 春蘭 (Lian Chunlan) (40376695)	東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授 (12601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原 巳美子 (Hara Mimiko)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・大学院生 (12601)	
研究協力者	岩切 鮎佳 (Iwakiri Ayuka)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・大学院生 (12601)	
研究協力者	久保田 将之 (Kubota Masayuki)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・大学院生 (12601)	
研究協力者	中村 俊彦 (Nakamura Toshihiko)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・研究支援員 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------