

平成 22 年 4 月 16 日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19688008
 研究課題名（和文） 海岸クロマツ林における外生菌群集の遷移機構と実生更新に果たす菌根機能の解明
 研究課題名（英文） Succession of ectomycorrhizal communities and mycorrhizal functioning for regeneration of pine seedlings in coastal pine forests.
 研究代表者
 松田 陽介 （MATSUDA YOSUKE）
 三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
 研究者番号：30324552

研究成果の概要（和文）：我が国の海岸林はマツ材線虫病により枯損衰退しており，防災上，景観上の機能の劣化が懸念される．海岸林の維持促進を効率的な実生植栽により達成させるための基礎として，クロマツに共生する外生菌根群集を菌根の形態的，遺伝的に調べた．その結果，海岸地域は内地に比べて外生菌根菌の種数が少ない傾向にあり，不完全菌類 *Cenococcum geophilum* により寡占される単純な群集構造であることが示唆された．

研究成果の概要（英文）：Japanese coastal pine forests have been suffering from pine wilt disease, and thus both disaster preventional and scenery functions might be declining. For the continuity and maintenance of coastal forests by way of pine seedling planting with bio-resources of symbiotic fungi, the project was carried out ectomycorrhizal community in the forests with morphological and genetic methods. Species diversity of ectomycorrhizal fungi was less than that from inland forest ecosystems. Imperfect fungi, *Cenococcum geophilum* was dominated as ectomycorrhizal roots of pine trees in all of study sites. These result indicated that ectomycorrhizal fungal community is simpler than inland forests.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	7,400,000	2,220,000	9,620,000

研究分野：森林保護・森林微生物・菌根生態

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：*Cenococcum geophilum*・外生菌根菌・群集構造・Internal transcribed spacer 領域・RFLP 解析・遷移・垂直分布

1. 研究開始当初の背景

日本の海岸や山林におけるマツ枯れ被害（マツ材線虫病）は現在も深刻な状況にある．中でも海岸マツ林は，風害，塩害などから居住

地や農地を保護する防災機能や，白砂青松と謳われる沿岸地域の景観林として機能を担うことから，その維持，再生は極めて緊急性の高い課題である．本被害に対する防除，再

生の研究が実施されてきたが、材線虫抵抗性実生の植栽以外にも海岸部の過酷な生育環境下で実生の生残を向上させるような技術開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、材線虫病による枯損跡地においてクロマツ実生の植栽の際に生残を促進する菌を選抜するための知識基盤として、海岸マツ林における菌根菌群集を明らかにすることである。そのため、外生菌根菌の時空間分布とその遷移に関する調査を菌根の形態的、分子生物学的な識別を通して実施した。具体的には

- (1) 菌根菌の垂直分布
 - (2) 地理的に異なる林分の菌根菌群集
 - (3) 樹齢の異なる林分の菌根菌群集
- である。

3. 研究の方法

(1) 菌根菌の垂直分布

調査地は三重県津市の町屋海岸のクロマツ林に設定した。砂地において単木的に生育するクロマツ成木 5 本 (胸高直径: 25.6-35.0cm) を調査木として選定し、それぞれ A, B, C, D, E プロットとした。2006 年 12 月 2 日に各調査木の樹幹から 160 cm 離れた海側の地点において土壌断面を作成し、4 段階の土壌深; 0-15 cm, 30-45 cm, 60-75 cm, 90-105 cm から 1500cm³ の土壌ブロックを採取した。各土壌ブロック 200 ml からクロマツ根系を抽出し、細根部分を実体顕微鏡下で観察した。細根は外観から非菌根と菌根に大別し、後者はさらに菌根の色や Ingleby et al. (1990) に従う光学顕微鏡を用いた形態類別により菌根タイプに大別した。各菌根タイプの一部は 3 種類の制限酵素 (*Alu I*, *Hinf I*, *Afa I*) による核 rDNA の Internal transcribed spacer (ITS) 領域の RFLP 解析を行うため、-20 °C で保存した。

(2) 地理的に異なる林分の菌根菌群集

調査は、三重県紀宝町と石川県能美市の海岸クロマツ林で行ない、10 × 10 m の方形プロットを各 1 ヶ所設定した。紀宝町のプロット内に生育するクロマツ成木の胸高直径は 11.4 ± 5.4 cm (*n* = 19, SD), 土壌含水率は 2.19 ± 0.18 % (*n* = 5, SD) であった。山口町のプロットにおけるクロマツの胸高直径は 13.9 ± 36.1 cm (*n* = 14, SD), 土壌含水率は 5.97 ± 1.55 % (*n* = 5, SD) であった。土壌採取は、プロット内の各成木から 30 cm 離れた地点で土壌コア (φ3 cm × 30 cm) を 1 個採取するとともに、無作為に土壌コアを採取して、計 30 個の土壌サンプルを得た。採取した土壌からクロマツ細根をすべて回収した。顕微

鏡観察にもとづき外生菌根の形態タイプ分けをしてから、ITS 領域の *Alu I* と *Hinf I* による RFLP 解析を行った。ただし、*Cenococcum geophilum* 菌根は顕微鏡観察のみで同定を行った。識別された RFLP タイプにもとづき外生菌根菌種の多様性を Sobs, Simpson 指数 (1/D) などにより算出した。

(3) 樹齢の異なる林分の菌根菌群集

調査地は、三重県津市栗真町屋町の海岸クロマツ林に設置した。本クロマツ林は、南北に約 800 m, 東西に約 50 m にわたり分布しており、汀線より約 20 m の所に位置している。2008 年 7 月に樹高の異なる 3 林分 (約 5 年生, 約 8 年生, 約 11 年生) を各 3 か所, 合計 9 か所設置した。各林分から土壌サンプラー (φ3 cm × 30 cm) を用いて土壌を 5 サンプルずつ採取した。採取時の含水率は 0.9 % から 3.1 % であった。土壌はクーラーボックスに入れて実験室に持ち帰り、4 °C で保存した。採取した土壌は、2 mm, 1 mm の篩を用いて洗い流し、クロマツの根系もしくは細根を丹念に回収した。その後、クロマツ根端の顕微鏡観察を行い、菌根であったものは菌根の形態類別を行った。また、*C. geophilum* は顕微鏡観察にもとづき同定した。形態類別された菌根は ITS 領域の RFLP 解析を制限酵素 (*Alu I*, *Hinf I*) で行った。

4. 研究の成果

(1) 菌根菌の垂直分布

形態類別に供試した細根は 1388 根端で、そのうち菌根は 1351 根端であった。土壌深度が増すにつれて、細根数は減少傾向にあったが、菌根の形成率はいずれも高く、30cm 以下では 100% であった (図 1)。

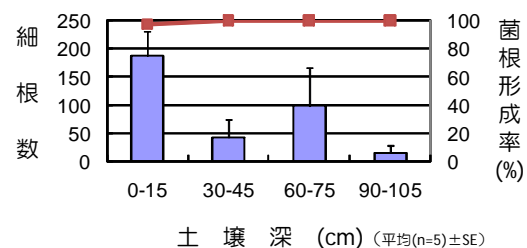


図 1. 異なる土壌深度におけるクロマツの細根数と外生菌根形成率。

外生菌根形成率 (%) = 外生菌根数 / 細根数 × 100.

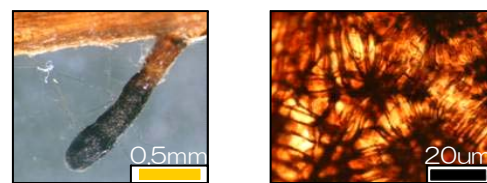


写真 1. *Cenococcum geophilum* 菌根の外観 (右) と光学顕微鏡観察による菌鞘表面構造 (左)

顕微鏡と RFLP 解析によりクロマツ細根に形成された菌根は7タイプに類別された。そのうちタイプ7はその形態的特徴から *C. geophilum* と同定した(写真1)。この *C. geophilum* 菌根は、クロマツ細根が分布しなかった場所以外の全てのサンプルで出現し、その菌根数は観察した菌根数の74.8%であった。このことから、海岸クロマツ林の表層土壌において *C. geophilum* は優占する菌根菌である可能性が示唆された。

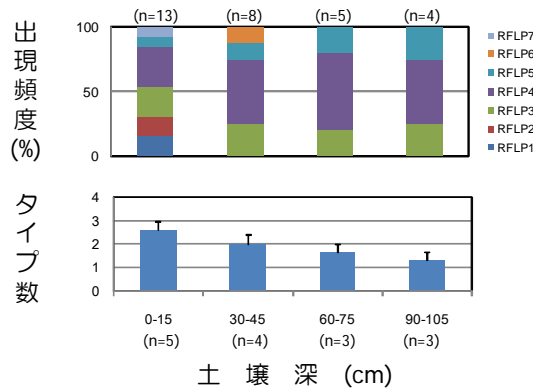


図2. 異なる土壌深度において検出された RFLP タイプの出現頻度(上)とそのタイプ数(下)。

いずれの土壌深度からも *C. geophilum* 菌根, RFLP タイプ1, 3が検出された(図2)。表層の0-15cmから最下層の90-105cmにかけて、RFLP タイプは減少傾向を示し、タイプ組成が単調になる傾向にあった。このことから生息する菌根菌の多様性は表層で高いものと推察された。

(2) 地理的に異なる林分の菌根菌群集
紀宝町のプロットでは、回収されたクロマツ細根は3684根端であり、全てが外生菌根化していた。それらは18タイプに識別され、外生菌根数が多かったのは RFLP タイプ1(31.9%), *C. geophilum* (25.4%), RFLP タイプ4(9.4%)であった(図3)。出現頻度が高かったのは *C. geophilum* (90.0%), RFLP タイプ1(40.0%), RFLP タイプ4, 12(20.0%)であった。SobsによるRFLPタイプ数は19.0タイプ、Simpson指数は4.9と推定された。

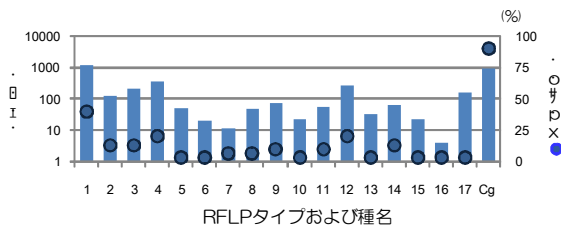


図3. 三重県紀宝町の海岸クロマツ林分から採取した外生菌根の RFLP タイプとその出現頻度。

能美市のプロットからクロマツ細根は2947根端であり、外生菌根形成率は99.9%であった。それらは16タイプに識別され、外生菌根数は *C. geophilum* (69.5%), RFLP タイプ5(11.7%), RFLP タイプ3(5.4%)の順に高かった(図4)。出現頻度が高かったのは *C. geophilum* (96.7%), RFLP タイプ5(40.0%), RFLP タイプ3(13.3%)であった。SobsによるRFLPタイプ数は16.2タイプと推定され、Simpson指数は1.9であった。

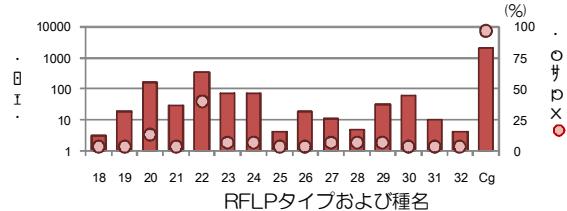


図4. 石川県能美市の海岸クロマツ林分から採取した外生菌根の RFLP タイプとその出現頻度。

海岸クロマツ林の0.01 haプロットにおいて外生菌根は、両プロットから18, 16タイプに識別され、20種程度の外生菌根菌が生息すると考えられた。その中で *C. geophilum* は両プロットで外生菌根数、出現頻度ともに優占していたことから、土壌中で優占する菌種の1つと考えられた。RFLPタイプの出現頻度分布は調査地間で類似しており、Simpson指数の値も考慮すると海岸クロマツ林に生息する外生菌根菌の群集構造は単純なものであると推察された。

(3) 樹齢の異なる林分の菌根菌群集
各林分から採取したクロマツ根端は、578から1263根端であり、合計9312根端を検鏡した。そのうち、91.2%から100%の根端が菌根化していた。菌根はその色から白系、茶系、黒系の3色に大別された。黒系菌根の菌鞘表面構造は net synenchyma であり、そのすべてが *C. geophilum* であった。5年生林分では白系菌根が48%を占めていたが、8, 11年生林分では *C. geophilum* がそれぞれ72%, 56%を占めていた(図5)。

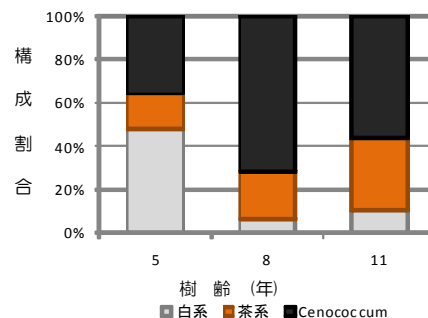


図5. 異なる樹齢のクロマツ林分におけるクロマツ外生菌根に占める色別菌根の割合。

クロマツ菌根は形態観察と RFLP 解析により 49 タイプに識別された。そのうち、*C. geophilum* が 89% (40/45) の土壌コアから検出され、樹齢によらずもっとも優占する種と考えられた。しかしながら、各樹齢で出現したタイプを比較すると、5, 8, 11 年生と加齢につれて、そのタイプ構成が異なる傾向にあった (図 6)。このことは、林分の樹齢とともに定着する菌種が変化することを示唆する。

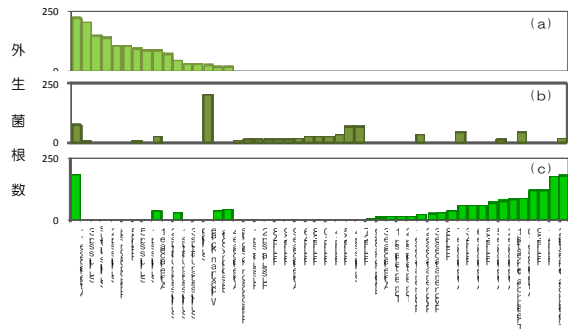


図 6. 5 年生(a), 8 年生(b), 11 年生(c)のクロマツ林分から検出された外生菌根菌。

Cenococcum geophilum のデータは含まず。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

1. 竹内裕也・松田陽介・伊藤進一郎 (2010) 東海地方の海岸クロマツ林における *Cenococcum geophilum* の出現割合. 中部森林研究 58:19-20. 査読有.
2. Matsuda Y, Noguchi Y, Ito S (2009) Ectomycorrhizal fungal community of naturally regenerated *Pinus thunbergii* seedlings in a coastal pine forest. Journal of Forest Research 14:335-341. 査読有.
3. Matsuda Y, Hayakawa N, Ito S (2009) Local and microscale distributions of *Cenococcum geophilum* in soils of coastal pine forests. Fungal Ecology 2:31-35. 査読有.
4. Matsuda Y, Amiya A, Ito S (2009) Colonization patterns of mycorrhizal fungi associated with two rare orchids, *Cephalanthera falcata* and *C. erecta*. Ecological Research 24:1023-1031. 査読有.
5. 松田陽介 (2009) ICOM6 参加記 ー地球の裏側にー. 菌学会ニュースレター 2009-4:1-4. 査読無.
6. 松田陽介 (2008) 海岸林生態系を支える菌根菌. 森林技術 79:7-14. 査読無.
7. 松田陽介 (2007) モミに形成される外生菌根の群集構造と菌根共生系を用いた環境修復技術に関する基礎的研究. 日本菌学会会報 48: 32-41. 査読有.
8. 松田陽介 (2007) 「樹木根-菌根」合同研

究集会から ー根も葉もある話を目指してー. 森林技術 78:13-15. 査読無.

[学会発表] (計 41 件)

1. 松田陽介・竹内裕也・伊藤進一郎(2010) 中部地方における海岸クロマツ林の外生菌根群集. 第 121 回日本森林学会大会. 筑波大学, 2010 年 4 月 3 日.
2. Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito S. (2009) Seasonal changes and associating fungi of *Pyrola japonica* mycorrhizas growing under different light environment. Sixth International Conference on Mycorrhiza (ICOM6). Belo Horizonte, Brazil, Aug 10, 2009.
3. 松田陽介・久保田菜未・伊藤進一郎 (2009) 樹齢の異なる海岸クロマツ林分における外生菌根群集. 第 120 回日本森林学会. 京都大学, 2009 年 3 月 27 日.
4. 松田陽介 (2008) 菌糸で繋がれる森の植物ー菌根菌ネットワークの実態を探るー. 日本菌学会第 52 回大会, 三重大学, 2008 年 6 月 1 日.
5. 松田陽介・松田遥平・中西健一・伊藤進一郎 (2008) 中部地方の太平洋側、日本海側における海岸クロマツ林の外生菌根群集. 第 119 回日本森林学会. 東京農工大, 2008 年 3 月 28 日.
6. Matsuda Y (2007) Vertical distribution of ectomycorrhizas and fungal inocula in isolated trees at a coastal pine forest. Fourth international symposium on dynamics of physiological processes in roots of woody plants. 17th September 2007, Bangor, UK.
7. 松田遥平・松田陽介・中西健一・伊藤進一郎 (2007) 海岸クロマツ林の表層土壌におけるクロマツ成木に形成された外生菌根の群集構造. 第 118 回日本森林学会. 九州大, 2007 年 4 月 3 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.bio.mie-u.ac.jp/junkan/busshitsu/lab2/indexj.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 陽介 (MATSUDA YOSUKE)

三重大学・大学院生物資源学研究所
准教授

研究者番号：30324552

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし