

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K19288

研究課題名（和文）菌根菌系 - 細根間の同位体分別に基づく樹木の窒素吸収における菌根菌依存度の推定

研究課題名（英文）Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to N uptake by Japanese cypress estimated from isotope measurements

研究代表者

松尾 奈緒子（MATSUO, Naoko）

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：00423012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：樹木の窒素源は葉や根などの窒素安定同位体比を土壤中の各窒素プールのそれと比較することで推定されてきたが、両者の関係は根に関連する菌根菌の影響を受けることが指摘されている。本研究では、滋賀県のヒノキ林で採取したヒノキの細根を感染源としてアーバスキュラー菌根菌（AM菌）を感染させて栽培したトウモロコシ苗と感染させずに栽培したトウモロコシ苗の窒素安定同位体比の差から、AM菌に関連した同位体効果を推定した。また、同ヒノキ林において観測した葉や細根、土壌水中アンモニア態窒素、硝酸態窒素の窒素安定同位体比に同位体混合モデルを適用し、ヒノキの窒素源としてのアンモニア態窒素と硝酸態窒素の寄与率を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、窒素沈着量の増加が日本のスギ林やヒノキ林の窒素循環に影響を及ぼしていることが報告されており、それらの今後の変化を予測するためにヒノキやスギの窒素利用を明らかにすることが求められている。自然条件下での樹木の窒素源を推定する手法として、窒素安定同位体天然存在比を用いる手法が期待されている。この手法を用いる際に菌根菌の影響を考慮する必要があることが指摘されてきたものの、スギやヒノキに関連するアーバスキュラー菌根菌に関しては情報が極めて少なかった。本研究により、アーバスキュラー菌の影響を考慮したうえでヒノキの窒素吸収源を推定することが可能になった。

研究成果の概要（英文）：Nitrogen sources by trees have been estimated by comparing stable nitrogen isotope ratios of leaves and roots with those of each nitrogen pool in soil. However, it has been pointed out that the relationship between them is affected by mycorrhizal fungi. Therefore, we estimated the isotope effects related to AM fungi from the difference in nitrogen isotope ratios between maize seedlings grown with and without arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, which were infected from the fine roots of Japanese cypress growing in a forest in Shiga Prefecture, Japan. We also applied an isotope mixing model to the nitrogen isotope ratios of leaves, fine roots, and ammonium and nitrate in the soil water observed in the same forest to estimate the contribution of ammonium and nitrate as nitrogen sources in Japanese cypress trees.

研究分野：森林水文学

キーワード：窒素安定同位体比 アーバスキュラー菌根菌 ヒノキ 同位体効果 アンモニア態窒素 硝酸態窒素

1. 研究開始当初の背景

樹木の生育には窒素が必要不可欠である。生態系の健全性に配慮した森林の管理・利用のためには、樹木による窒素の吸収・同化を含めた樹木 - 土壌間の窒素循環の十分な理解が求められる。森林生態系における樹木の窒素源は落葉落枝などが微生物によって分解されて生成したアミノ酸やアンモニウムイオン (NH_4^+)、それが硝化されて生成した硝酸イオン (NO_3^-) である。温度や水分などの環境条件や大気降下物量が変化すると森林土壌中の各窒素源の存在比率は変化し、かつ樹木の硝酸還元能力にも差があるため、樹木が利用する窒素の形態は樹種間や個体間で異なる。

こうした樹木の窒素利用様式の解明のため、古くから施肥実験や窒素安定同位体標識実験、異なる窒素濃度下の硝酸還元酵素活性測定など窒素付加型の研究が行われてきた。しかしながら、実際の森林では樹木の利用可能な窒素量には限りがあり、従来の窒素付加型アプローチでは自然条件下の樹木の窒素利用様式の把握は困難であった。

そこで、樹木の葉など有機物中の窒素安定同位体天然存在比が土壌中の窒素源のそれを反映していると仮定して自然条件下の樹木の窒素吸収源を推定する手法が考案された。この手法は土壌中の各窒素源が異なる窒素安定同位体比を持つことと、樹木が窒素を吸収同化する際には同位体分別が起こらないことを前提としている。ところが、申請者らが滋賀県大津市のヒノキ人工林において予備観測を行った結果、ヒノキの窒素吸収同化の際に同位体分別が起きている可能性があること、その分別にヒノキの根に関連する菌根菌が関与している可能性があることが示唆された。

2. 研究の目的

菌根菌は樹木の根に感染して光合成産物を得る一方、根外に伸ばした菌糸で養分や水分を吸収して樹木に与える共生関係にあるとされ、樹木 - 土壌間の窒素循環をつなぐ重要なピースである。しかしながら、樹木と比べてバイオマスが小さいため、窒素循環の研究では無視されることが多かった。また、温帯林における菌根菌についての生態学的研究はブナ科やマツ科などと関連する外生菌根菌 (以下、EC 菌) を対象としたものが大半を占め、日本の森林面積の 30% を占める人工林の代表的樹種であるヒノキやスギに関連するアーバスキュラー菌根菌 (以下、AM 菌) についての情報はきわめて少ない。近年、窒素沈着量の増加が日本のスギ林やヒノキ林の窒素循環に影響を及ぼしていることが報告されており、それらの今後の変化を予測するためにヒノキやスギの窒素利用を明らかにすることが急務となっていた。

そこで本研究では、窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を利用してヒノキの窒素源を推定する際に必要となる AM 菌に関連した同位体効果を把握し、それを考慮してヒノキの窒素利用様式を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) トウモロコシ栽培実験によるヒノキ細根由来の AM 菌に関連した同位体効果の推定

滅菌済川砂を充填した 20 個のポットにモデル植物としてトウモロコシの種子と滋賀県大津市のヒノキ人工林において採取したヒノキの細根を一緒に入れて栽培することで、トウモロコシにヒノキ由来の AM 菌を感染させる処理を行った (以下、AM+)。また、ヒノ

キの細根を入れていない20個のポットでもトウモロコシを同様に栽培し、AM菌非感染区とした(以下、AM-)。AM+、AM-の各10ポットに窒素肥料($\text{NH}_4\text{-}\delta^{15}\text{N} = -1.6\text{‰}$ 、 $\text{NO}_3\text{-}\delta^{15}\text{N} = -1.8\text{‰}$)を84 mg N/回ずつ施与して高窒素区(以下、N+)とし、各10ポットには28 mg N/回ずつ施与して低窒素区(以下、N-)とした。いずれも結実まで約80日間栽培した後、収穫した個体を器官ごとに分解して乾燥重量、N濃度、 $\delta^{15}\text{N}$ を計測し、各器官の $\delta^{15}\text{N}$ を器官あたりの窒素含有量で加重平均して個体全体の $\delta^{15}\text{N}$ (以下、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{entireplant}}$)を算出した。N+、N-それぞれについて、AM+の $\delta^{15}\text{N}_{\text{entireplant}}$ とAM-の $\delta^{15}\text{N}_{\text{entireplant}}$ の差を算出し、この値をAM菌に関連した同位体効果(ϵ_{AM})とした。

2) ヒノキ人工林におけるAM菌に関連した同位体効果を考慮した窒素吸収源の推定

2-1) ヒノキ人工林における土壌中無機態窒素、細根、葉、AM菌菌糸の窒素安定同位体比の測定

1)の細根を採取した滋賀県大津市のヒノキ人工林の斜面上部と下部において、土壌中にイオン交換樹脂膜つきプローブ(Plant Root Simulator (PRS®) probes, Western Ag, Canada)を3か月間埋設して土壌水中の NH_4^+ と NO_3^- を吸着させ、回収後に抽出して拡散法(NH_4^+)と脱窒菌法を用いて $\delta^{15}\text{N}$ を測定した。また、抽出液中の NH_4^+ と NO_3^- の濃度からイオン交換樹脂膜への単位面積あたりの吸着速度を算出し、これを土壌からヒノキの根への NH_4^+ 、 NO_3^- 供給速度とみなした。

斜面上部と下部に生育するヒノキ各3個体から直径2mm以内の細根および当年葉を採取し、 $\delta^{15}\text{N}$ を測定した。また、採取した細根を一次根と二次根に分類し、それぞれの細胞を顕微鏡観察してAM菌構造物(樹枝状体もしくは菌糸コイル)の有無を確認した。観察細胞数に対するAM菌構造物が存在する細胞数の割合を算出し、AM菌感染率とした。

さらに、斜面上部と下部において、土壌中に菌糸(直径2 μm)は侵入できるが細根(直径2mm)は侵入できないメッシュバッグ(目開45 μm)にガラス粒を充填したものを3ヶ月間埋設し、回収後に菌糸を取り出して $\delta^{15}\text{N}$ を測定した。

2-2) SIARモデルを用いたヒノキの窒素源の推定

得られた $\delta^{15}\text{N}$ を利用して、ベイズ統計学的手法により同位体比や同位体効果の不確実性を考慮して混合物内の供給源の寄与率を推定する同位体混合モデル(SIARモデル、cran.r-project.org/web/packages/siar/index.html、Parnell et al. 2010)を用いてヒノキの窒素源の推定を行った。SIARモデルにおいて、AM菌に関連した同位体効果(ϵ_{AM})が NH_4^+ と NO_3^- の両方に対して生じるものと仮定し、 ϵ_{AM} として本研究による推定値(+0.17 ‰)、文献値(-2.0 ‰)を用いる場合と同位体効果を考慮しない場合(0.0 ‰)について、ヒノキの葉、細根それぞれに対する窒素源としての NH_4^+ と NO_3^- の寄与率を推定した。

4. 研究成果

1) トウモロコシ栽培実験により推定されたヒノキ細根由来のAM菌に関連した同位体効果

$\delta^{15}\text{N}_{\text{entireplant}}$ はN+AM+、N+AM-ではそれぞれ $-2.3 \pm 0.3\text{‰}$ (n=5)、 $-2.2 \pm 0.3\text{‰}$ (n=6)であり、N-AM+、N-AM-ではそれぞれ $-1.9 \pm 0.2\text{‰}$ (n=7)、 $-2.1 \pm 0.2\text{‰}$ (n=5)であった。いずれの土壌窒素条件においても $\delta^{15}\text{N}_{\text{entireplant}}$ はAM+とAM-の間で有意差がなかった(Mann-Whitney U検定、 $p > 0.05$)。N+とN-それぞれの土壌窒素条件におけるAM+の $\delta^{15}\text{N}_{\text{entireplant}}$ とAM-の $\delta^{15}\text{N}_{\text{entireplant}}$ との差から推定した ϵ_{AM} は、N+では -0.06‰ 、N-では $+0.17\text{‰}$ であった。これらの値は、同所に生育するAM菌関連植物の $\delta^{15}\text{N}$ と非関連植物の $\delta^{15}\text{N}$ の差から推定された ϵ_{AM} の文献値(世界平均： -2.0‰ 、ツンドラ植物： -5.0‰)よりも小さかった。

2-1) ヒノキ人工林における土壌中無機態窒素、細根、葉、AM 菌菌糸の窒素安定同位体比

一次根と二次根における AM 菌感染率は斜面上部ではそれぞれ $22.7 \pm 3.1\%$ ($n=3$) および $24.5 \pm 2.1\%$ ($n=3$)、斜面下部では $26.0 \pm 1.8\%$ ($n=3$) および $6.0 \pm 4.1\%$ ($n=3$) であり、一次根と二次根の間、斜面上部と下部の間のいずれにおいても有意差はなかった。

ヒノキ周辺の土壌中に埋設したイオン交換樹脂膜へのイオン吸着速度から推定した土壌から根への NH_4^+ と NO_3^- の供給速度は、斜面上部、下部ともに夏季の方が冬季よりも大きく、夏季においては斜面上部の方が下部よりも小さかった。また、夏季と冬季のいずれも土壌から根への NO_3^- 供給速度は NH_4^+ 供給速度よりも大きかった。

夏季、冬季のいずれも土壌水中の NH_4^+ の $\delta^{15}\text{N}$ よりも土壌全窒素 (有機態窒素が大半を占める) の $\delta^{15}\text{N}$ の方が低く、土壌水中の NO_3^- の $\delta^{15}\text{N}$ はさらに低かった。これに対し、ヒノキの細根や葉の $\delta^{15}\text{N}$ は土壌中の NH_4^+ の $\delta^{15}\text{N}$ よりも NO_3^- の $\delta^{15}\text{N}$ に近い値であり、AM 菌菌糸の $\delta^{15}\text{N}$ は細根のそれよりも高く、 NH_4^+ の $\delta^{15}\text{N}$ により近い値であった。

2-2) SIAR モデルを用いて推定した AM 菌に関連した同位体効果を考慮したヒノキの窒素源

斜面上部と下部では同様の結果が得られたため、本報告書では斜面下部の結果のみを示す。AM 菌に関連した同位体効果 (ϵ_{AM}) として $+0.17\%$ 、 0.0% を用いた場合の葉の窒素源としての寄与率は $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 20\% : 80\%$ 、細根の窒素源としての寄与率は $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 50\% : 50\%$ であった。なお、 ϵ_{AM} として -2.0% を用いた場合には、葉と細根ともに NH_4^+ の寄与率が約 20% 高く推定された。葉の窒素源としての NO_3^- の割合が 60~80% を超えること、樹木において窒素の大半は葉に配分されること、本調査地では土壌から根への NO_3^- 供給速度の方が NH_4^+ 供給速度よりも大きかったことから、本調査地のヒノキの主要な窒素源は硝酸態窒素であることが示唆された。また、葉よりも細根の方が NH_4^+ の寄与率が有意に高かった (Mann-Whitney の U 検定、 $p < 0.05$)。 NH_4^+ は細胞内で高濃度になると毒性があるため土壌から吸収した NH_4^+ の大部分は根でアミノ酸に同化されてから根の成長や地上部への転流に分配されるとの報告があることから、本調査地のヒノキの主要な窒素源は硝酸態窒素である一方で、葉よりも細根においてアンモニア態窒素の寄与率が高くなったと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本昌也, 松尾奈緒子, 山川大輔, 松田陽介
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌共生・非共生のトウモロコシ苗の窒素安定同位体比分布の比較
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤充宏, 松尾奈緒子, 松田陽介, 木庭啓介, 福島慶太郎, 勝山正則, 小杉緑子, 徳地直子
2. 発表標題 窒素安定同位体比を用いた温帯針葉樹ヒノキ苗の窒素利用の解明 ポット栽培が土壌窒素プロセスとヒノキ苗の窒素利用に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生態学会第67回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中穂, 松尾奈緒子, 松田陽介, 木庭啓介, 福島慶太郎, 小杉緑子, 勝山正則, 徳地直子
2. 発表標題 上賀茂試験地土壌を用いて栽培したヒノキ苗の窒素吸収にアーバスキュラー菌根菌が及ぼす影響
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山川大輔, 松尾奈緒子, 松田陽介, 木庭啓介
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌が宿主植物の窒素安定同位体分布に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田菜月、松尾奈緒子、松田陽介
2. 発表標題 アーバスキュラー菌根菌がヒノキ苗の窒素安定同位体比に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018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	松田 陽介 (MATSUDA Yosuke) (30324552)	三重大学・生物資源学研究所・教授 (14101)	

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
---------	---------