

## 速報

## 石灰質土壤に植栽されたカシ2種の外生菌根菌の接種効果\*1

香山雅純\*2 · 山中高史\*3 · 青木菜保子\*2

香山雅純・山中高史・青木菜保子：石灰質土壤に植栽されたカシ2種の外生菌根菌の接種効果 九州森林研究64：46-49, 2011 石灰石鉱山における緑化技術に応用する目的で、石灰石鉱山内で採取した石灰質土壤にウラジログシとアラカシの実生をポットに植栽し、成長を検討した。植栽に際し、ウラジログシとアラカシの実生の根系には外生菌根菌であるツチグリもしくはニセショウロを接種し、接種しない実生も併せて用意した。半年間育成した結果、ツチグリを接種した実生はウラジログシ・アラカシとも乾重量が大きく増加したのに対し、ニセショウロ接種と非接種の実生は乾重量はあまり増加しなかった。ツチグリを接種した実生は、石灰質土壤では不溶化しているリンが植物体中で高く、ツチグリを接種した実生が大きく成長できたのは外生菌根菌のはたらきによってリンの吸収が促進されていたためと推察される。

キーワード：カシ、石灰岩、外生菌根菌、光合成速度、養分動態

## I. はじめに

九州地方では、石灰岩が露出する地域が多く存在する（日本の地質九州地方編集委員会, 1992）。そして、石灰岩が露出する地域には、石灰石を採掘している鉱山も存在する（日本の地質九州地方編集委員会, 1992）。石灰石の鉱山では、採掘の終わった跡地には緑化が義務づけられているが、植生の自然回復は望めない環境である（漆原, 1996）。そのため、石灰石の採石跡地の緑化は人工的に行う必要がある。また、緑化に用いる樹種はできるだけ採石跡地の植生に近い種を選ぶ必要がある（漆原, 1996）。

石灰石鉱山にて緑化が進まない原因として、養分の問題が挙げられる。石灰質土壤は、多量に含まれるカルシウムの影響によってpHが高く、その影響で鉄やマンガン等の微量元素の吸収が抑制される（Tyler, 1996）。また、リンがカルシウムと強固に結合しており、そのままでは植物に吸収できない（Marchner, 1995）。そのため、石灰岩地帯の植生は通常地域と比較して構成種が異なる（山中, 1966）。石灰岩地帯に分布する樹木としては、アラカシやウラジログシが報告されている。アラカシは標高の低い石灰岩地帯の主要樹種である（山中, 1966）。ウラジログシは標高の高い石灰岩地帯に分布している（山中, 1966）。このことから、アラカシやウラジログシは石灰岩地帯の採石跡地における緑化樹として妥当であると期待できる。

アラカシやウラジログシに含まれるブナ科の樹木の根系は、外生菌根菌との共生関係を確立している（二井・肘井, 2000）。外生菌根菌は樹木に対して養分や水分、特にリンや窒素の吸収を促進し（Smith and Read, 2008）、結果として樹木の成長は促進される。特に、石灰岩地帯では、外生菌根菌が分泌する有機酸が不溶化しているリンを溶かし（Wallander, 2000）、植物に吸収さ

せる効果も期待される。しかし、石灰岩地帯のような高pH環境では、外生菌根菌の感染率が変化することも報告されていることから（Van der Heijden and Kuyper, 2001）、カシ類が石灰質土壤で外生菌根菌との共生関係を維持できるかは不明である。

本研究は、外生菌根菌の接種技術を石灰石鉱山の緑化技術として応用することを目的として、石灰質土壤において、外生菌根菌を接種したカシが順調に生育できるかを検証した。

## II. 材料と方法

本研究は、森林総合研究所九州支所内に設けられた自然光型ファイトロン内で実施した。対照樹種としては、石灰岩地帯において分布が確認されているウラジログシとアラカシを対象とした。ウラジログシの種子は鹿児島県伊佐市内の照葉樹林、アラカシの種子は熊本県球磨郡球磨村内の照葉樹林にて採取した。これらの種子は2008年6月から発芽させた。また、熊本県球磨郡球磨村内の照葉樹林にてツチグリとニセショウロの子実体を採取し、単離、培養した。そして、培養したツチグリとニセショウロの菌体を攪拌して得られた断片液を、ウラジログシとアラカシの実生の根系にかけて接種を行った。なお、接種を行わない実生も準備した。これらの実生は、それぞれ20個体を赤玉土とパーライトを混合した培養土に約10ヶ月間育成した。

その後、実生は大分県津久見市にて採取、滅菌した石灰質土壤を詰めたポット（直径16cm、高さ30cm、容積3.7L）へ2009年5月にそれぞれ10個体ずつ移植し、2ヶ所のファイトロンで育成した。なお、残った実生10個体は移植せずに実験開始時にサンプリングした。まず、実生を葉、幹・枝、根ごとに分け、根は脱イオン水を用いて洗浄した。外生菌根菌を接種した実生は、

\*1 Kayama, M., Yamanaka, T. and Aoki, N.: Inoculative effects of ectomycorrhizae on the growth of two *Quercus* seedlings planted on calcareous soil.

\*2 森林総合研究所九州支所 Kyushu Res. Center, For. & Forest Prod. Res. Inst., Kumamoto 860-0862

\*3 森林総合研究所 For. & Forest Prod. Res. Inst., Tsukuba 305-8687

表-1. 石灰質土壌の土壌分析結果 (n=5)

pH	C	N	P
	(g kg <sup>-1</sup> )		(mg 100g <sup>-1</sup> )
7.03	47.0	1.98	27.5
	Ca	Mg	K
	(mg 100g <sup>-1</sup> )		
	260	6.23	2.59

表-2. 異なる菌種を接種したカシ実生の実験前と実験後の各器官の乾重量 (g, n=10)

樹種	処理	葉	幹・枝	根	
ウラジロガシ	実験前	As	0.69 a	0.36 a	1.18 a
		Sc	0.65 ab	0.38 a	1.18 a
		Co	0.51 b	0.32 a	1.10 a
ウラジロガシ	実験後	As	3.52 a	3.55 a	7.59 a
		Sc	0.75 b	0.81 b	2.14 b
		Co	0.27 b	0.31 b	1.14 b
アラカシ	実験前	As	0.36 a	0.14 a	0.69 a
		Sc	0.27 ab	0.16 a	0.69 a
		Co	0.24 b	0.12 a	0.55 a
アラカシ	実験後	As	2.72 a	1.37 a	4.56 a
		Sc	0.82 b	0.58 b	1.72 b
		Co	0.16 b	0.17 b	0.66 b

各処理区のアルファベットはAs-ツチグリ, Sc-ニセショウロ, Co-非接種を示す。以下の表も同様である。また, 各値の同じアルファベットを含む値間には5%水準で統計的に有意差がないことを示している。以下の表も同様である。

洗浄後に感染状況を実体顕微鏡を用いて観察した。実生の根系を5本以上, 細根数にして300本以上を採取し, トリパンプルーを用いて染色した。次に, 採取した根系のすべての細根において感染の有無を観察した。そして, 外生菌根菌の感染率を全細根数に対する感染した細根数として算出した。その後, 実生は60℃で4日間乾燥させた後, 各器官の乾重量を測定した。

ファイトトン内の温度は夏期の昼間は30℃, 夜間は25℃に, それ以外の季節の昼間は25℃, 夜間は20℃に設定した。湿度は75%で一定に保ち, 1日に1回脱イオン水を灌水した。そして, 2009年10月末まで実生を育成した。また2009年10月には, 光合成速度と気孔コンダクタンスを, 開放系の赤外線ガス分析計(LI-6400, Li-Cor, USA)を用いて温度は25℃, CO<sub>2</sub>濃度は370 ppmに設定して測定した。

実験終了後は, 実験開始時と同様の手法で実生のサンプリングを行い, 外生菌根菌の感染状況を実体顕微鏡を用いて観察した。そして, 乾燥させた後に, 各器官の乾重量を測定した。その後, 葉と直径1mm以下の細根を粉砕し, CNコーダー(MT-600, ヤナコ分析工業)を用いて窒素含有率を測定した。残ったサンプルは, 硝酸-塩酸-過酸化水素法(植物栄養実験法編集委員会, 1990)にて湿式灰化を行った。そして, リンはモリブデンブルー法(土壤環境分析法編集委員会, 1997)にて分光光度計(UV-2500 PC, 島津)を用いて分析した。カルシウムは原子吸光光度計(Z-2310, 日立)を用いて分析した。

乾重量, 光合成速度, 気孔コンダクタンス, 各種元素濃度の平均値は, Tukey testを用いてツチグリ接種区, ニセショウロ接種区, 非接種区の間で多変量の有意差検定を行った。

なお, 実験に用いた石灰質土壌の分析も併せて行った。まず,

表-3. 異なる菌種を接種したカシ実生の実験前と実験後の外生菌根菌の感染率 (% , n=10)

樹種	菌種	実験前	実験後
ウラジロガシ	As	84.7	35.3
	Sc	55.1	15.7
アラカシ	As	70.3	34.4
	Sc	41.8	14.8

Asの感染率は実験前・実験後とも有意にScより高い(t検定, P<0.01)。またCoの感染率は両樹種とも1%以下である。

表-4. 異なる菌種を接種したカシ実生の光飽和時における最大光合成速度 (Psat, μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) と, 気孔コンダクタンス (gs, mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)

(2009年10月, n=10)			
樹種	菌種	Psat	gs
ウラジロガシ	As	5.66 a	92 a
	Sc	2.92 b	26 b
	Co	2.52 b	19 b
アラカシ	As	6.93 a	134 a
	Sc	4.87 b	53 b
	Co	3.43 b	49 b

土壌のpHを測定し(HM-25 R, 東亜DKK), 105℃で24時間乾燥させた。そして, 炭素と窒素の含有率をCNコーダーを用いて測定した。リンはブレイ第二法(土壤環境分析法編集委員会, 1997)で抽出後に, 分光光度計を用いて分析した。カルシウム, カリウム, マグネシウムは1M酢酸アンモニウムを用いて抽出した後に原子吸光光度計を用いて分析した。

### III. 結果

土壌分析結果から, 土壌pHは平均7.03と弱アルカリ性を示した(表-1)。Ca濃度とP濃度は高い値を示した。

実験前のカシ実生の乾重量は, 非接種の実生の葉がウラジロガシ, アラカシともツチグリ接種区より有意に軽かった以外は, 処理区間の差はなかった(表-2)。実験後のカシ実生の乾重量はウラジロガシ, アラカシともツチグリを接種した実生では大きく増加した(表-2)。一方, ニセショウロを接種した実生は両樹種ともあまり大きく成長できず, ツチグリを接種した個体より有意に乾重量は軽かった。非接種の個体はほとんど成長することすらできず, 葉の乾重量は多くの葉が落葉した結果, 実験前より軽くなった。

外生菌根菌の感染率は, 実験前においてはツチグリを接種した実生で70%以上, ニセショウロを接種した実生で40%以上であったが, 実験終了時には半分以下に低下した(表-3)。特にニセショウロを接種した実生では約15%と大きく低下した。

光飽和時における最大光合成速度(Psat)は, ウラジロガシ, アラカシともツチグリを接種した個体が高かった(表-4)。気孔コンダクタンスの値(gs)も, ツチグリを接種した個体が高く, 気孔がよく開いていた(表-4)。

葉内の窒素濃度は, アラカシでは差が見られなかったが, ウラジロガシではツチグリを接種した実生において, 非接種の実生より有意に低かった(表-5)。しかし, 細根中の窒素濃度は, ツチグリを接種したウラジロガシ実生で有意に高かった。細根中の

表-5. 異なる菌種を接種したカシ実生の実験後の葉と細根の元素濃度 ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ,  $n=10$ )

樹種	部位	菌種	N	P	Ca
ウラジログアシ	葉	As	746 b	66 a	458 a
		Sc	940 ab	40 b	362 b
		Co	1065 a	36 b	381 b
ウラジログアシ	細根	As	752 a	126 a	372 a
		Sc	537 b	36 b	352 a
		Co	527 b	35 b	381 a
アラカシ	葉	As	818 a	48 a	617 a
		Sc	807 a	43 a	475 b
		Co	668 a	38 a	473 b
アラカシ	細根	As	516 a	70 a	370 a
		Sc	490 a	52 b	359 a
		Co	498 a	33 c	406 a

リン濃度は、両樹種ともツチグリを接種した実生で有意に高かった。さらに、ウラジログアシはツチグリを接種した実生の葉内のリン濃度も有意に高かった。カルシウム濃度は葉内、細根内とも高い濃度を示した。特に、葉内のカルシウム濃度は両樹種ともツチグリを接種した実生で有意に高かった。細根内のカルシウム濃度は有意な傾向を示さなかった (表-5)。

#### IV. 考 察

本研究の結果から、ツチグリを接種した実生はウラジログアシ、アラカシとも大きく成長し (表-2)、石灰質土壌においても成長促進効果を確認できた。ツチグリは、貧栄養な酸性土壌に植栽した場合でも67%と高い感染率を維持し、実生は大きく成長した (香山・山中, 2010)。このことから、ツチグリは土壌 pH に対する順化能力が高いと推察される。一方、ニセシヨウロを接種した実生は大きく成長できなかった。その原因は外生菌根菌の感染率の低下であると考えられる。ニセシヨウロを接種した実生は感染率が約15%と大きく低下した (表-3)。ニセシヨウロを貧栄養な酸性土壌に植栽した場合は、59%と感染率は高くなった (香山・山中, 2010)。このことから、ニセシヨウロは pH の低い土壌環境には順化できるが、pH が高い環境では順化できない外生菌根菌であると考えられる。

また、ツチグリを接種した実生は、高い光合成速度を示した (表-4)。一般的に、光合成速度は葉内窒素濃度と正の相関を示すが (Evans, 1989)、ツチグリを接種した実生の葉内の窒素濃度は両樹種とも高くなかった (表-5)。このことから、ツチグリを接種した実生の高い光合成能力は、葉内窒素濃度からは説明できない。一方、ツチグリを接種した実生は高い気孔コンダクタンスを示しており (表-4)、これが高い光合成能力につながったと推察される。外生菌根の形成は、養分だけでなく、水分の吸収機能も向上させる (Smith and Read, 2008)。ツチグリを接種した実生の光飽和時において、気孔を閉鎖されることなく高いコンダクタンスを示したのは、ツチグリの菌根形成によって水分吸収機能が向上しているためと推察される。

養分に関しては、細根中のリン濃度がツチグリを接種した実生において高かった (表-5)。このことから、ツチグリを接種した実生は、有機酸等の放出によって不溶化しているリンを溶出し、

それを実生が吸収したことによってリン濃度が高くなったと推察される。また、ウラジログアシは細根中の窒素濃度もツチグリを接種した実生で高かった。ツチグリを接種したウラジログアシとアラカシを比較すると、ウラジログアシの方が成長が良かった。その原因として、ウラジログアシの細根では窒素やリンをより多く吸収できていることが、良好な成長につながっていると推察される。葉内の窒素濃度があまり処理区間で差がない原因としては、カシの葉を落葉させる際に窒素を回収し、新しい葉に転流させていることも考えられる (Hikosaka, 2005)。非接種のカシでは多くの落葉が観察されたが、古い葉を落とし、新しい葉に窒素を転流させ、結果として高い窒素濃度を維持できたと推察される。

一方、植物体中のカルシウム濃度は、大きく成長したツチグリを接種した実生において、葉内の濃度が特に高かった。このことから、ウラジログアシとアラカシはカルシウムの蓄積に対して耐性があると考えられる。一般的に、植物には嫌石灰植物と好石灰植物が存在し、嫌石灰植物は感受性の高い種ではカルシウムを  $70 \mu\text{mol g}^{-1}$  以上蓄積できないのに対し、好石灰植物は  $675 \mu\text{mol g}^{-1}$  カルシウムを蓄積しても成長は低下しない (White and Broadley, 2003)。カルシウムの蓄積から判断すると、ウラジログアシとアラカシは嫌石灰植物と好石灰植物の中間的な性質を持つと考えられる。

本研究結果より、ツチグリを接種したウラジログアシとアラカシは石灰質土壌に順化し、成長が促進された。このことから、カシ類実生に対するツチグリの接種技術は、石灰石鉱山の緑化に役立つことが期待される。今後は、ツチグリを接種したカシ類の実生を実際の石灰石の採石跡地に植栽し、成長を検討する予定である。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、石灰石鉱山を所有する大分県津久見市の (株) 戸高鉱業社の方々の全面的な協力を頂き、土壌の採取に尽力して頂いた。分析に際し、鳩村佳美氏と國領妙子氏に分析の補助をして頂いた。ここに感謝の意を表す。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金「石灰岩地帯に生育する樹木の生理特性と採石跡地の緑化技術への応用」(課題番号: 20780124) によって実施した。

#### 引用文献

- 土壌環境分析法編集委員会 (1997) 土壌環境分析法. 博友社, 東京.
- Evans, J. R. (1989) *Oecologia* 78 : 9-19.
- 二井一禎・肘井直樹 (2000) 森林微生物生態学. 朝倉書店, 東京.
- Hikosaka, K. (2005) *Ann. Bot.* 95 : 521-533.
- 香山雅純ほか (2007) 九州森林研究 60 : 75-78.
- 香山雅純・山中高史 (2010) 森林総合研究所九州支所年報 22 : 10-11.
- 日本の地質九州地方編集委員会 (1992) 日本の地質9, 九州地方. 共立出版, 東京.
- Marschner H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*, 2 ed.

- Academic Press, London.
- Smith, S. E. and Read, D. J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. 3 ed. Academic Press, San Diego.
- 植物栄養実験法編集委員会 (1990) 植物栄養実験法. 博友社, 東京.
- Tyler, G. (1996) *Ann. Bot.* 77 : 649-656.
- 漆原和子 (1996) カルスト その環境と人々の関わり. 大明堂, 東京.
- Van der Heijden, E. W. and Kuyper, Th. W. (2001) *Plant Soil* 228 : 275-290.
- Wallander, H. (2000) *Plant Soil* 218 : 249-256.
- White, P. J. and Broadley, M. R. (2003) *Ann. Bot.* 92 : 487-511
- 山中二男 (1966) 高知大学学術研究報告 15 : 1-9.  
(2010年10月7日受付; 2011年1月12日受理)