

<博士論文>

富士山火山荒原における外生菌根
菌の一次遷移系列と外生菌根共生
による植生遷移促進機能

Primary successional sere of ectomycorrhizal fungi and facilitation of
vegetation succession by ectomycorrhizal symbioses in a volcanic desert
on Mount Fuji.

奈良 一秀

Kazuhide Nara

平成15年12月

December, 2003

目 次

論文の内容の要旨	7
第1章 序論	
一次遷移	13
菌根共生のタイプから見た一次遷移	13
外生菌根共生とは	14
一次遷移過程における外生菌根共生	17
第2章 富士山の一次遷移初期過程における外生菌根性子実体群集の構造と遷移	
はじめに	19
材料と方法	
調査地	20
植生調査	22
子実体調査	22
ミヤマヤナギの解析	23
統計	24
結果	
宿主植物	24
外生菌根性子実体	26
子実体のパッチ内空間分布	27
宿主植物の成長に伴う外生菌根性子実体の遷移	31
宿主の生育状況と関係した外生菌根性子実体発生量	34
考察	
一次遷移初期過程における外生菌根性子実体の群集構造	36
外生菌根性子実体の一次遷移系列	39
一次遷移初期過程における外生菌根性子実体の生産量	40
第3章 富士山の一次遷移初期過程における地下部外生菌根群集の構造と遷移	
はじめに	43
材料と方法	
調査地	44
分子生物学的手法による菌種同定に使用した子実体	44
解析に用いた外生菌根	45
DNA解析	46
地下部外生菌根菌の同定	47
ITS塩基配列の解析	47
地下部外生菌根菌群集の定量的解析	47

統計解析	48
結果	
子実体 D N A の ITS 断片長の種内変異と種間変異	48
地下部外生菌根菌の同定	48
地下部外生菌根菌の遷移	51
地下部外生菌根菌の空間分布	53
不健全な宿主に共生する地下部外生菌根菌	54
地下部外生菌根菌の群集構造とその発達	54
子実体群集と地下部外生菌根菌群集の対応	56
考察	
地下部外生菌根群集の解析に関する方法論	57
地下部外生菌根菌と子実体の群集構造	58
地下部から見た外生菌根菌の一次遷移	59
第 4 章 富士山火山荒原のミヤマヤナギ成木に共生する外生菌根菌が木本植物実生の菌根形成と生育に及ぼす影響	
はじめに	63
材料と方法	
ミヤマヤナギ当年生実生の植栽実験	64
3 種の木本植物当年生実生の混植実験	65
植栽実生の解析	65
実生に感染した外生菌根菌の同定	65
統計	66
結果	
ミヤマヤナギ実生の生育に及ぼすミヤマヤナギ成木の影響	66
単一植栽したミヤマヤナギ当年生実生に共生する外生菌根菌群集	67
木本植物 3 種の実生混植実験におけるミヤマヤナギ成木の影響	70
混植実験で各種実生に見られた外生菌根菌	70
考察	
ミヤマヤナギ当年生実生の外生菌根形成	71
外生菌根形成に伴うミヤマヤナギ実生の成長促進	72
後遷移樹種実生の菌根形成とその意味するもの	73
一次遷移の初期過程における植物間の facilitation と外生菌根菌	75
第 5 章 富士山火山荒原の先駆木本植物ミヤマヤナギに対する外生菌根菌の宿主特異性 ー様々な植生遷移段階から分離した多様な菌株を用いてー	
はじめに	77
材料と方法	

子実体等の採集	78
外生菌根菌の分離	78
接種実験用の植物	79
ミヤマヤナギへの外生菌根菌接種	79
結果	
収集した外生菌根菌の培養菌株	79
ミヤマヤナギとの親和性	79
子実体の形成	84
考察	
外生菌根菌の分離	84
多種多様な外生菌根菌の培養菌株	86
外生菌根菌の宿主特異性	87
子実体形成の菌種間差異	88
第6章 根外菌系体による外生菌根菌の感染が富士山火山荒原のミヤマヤナギ実生におよぼす影響とその菌種特性	
はじめに	91
材料と方法	
感染源となる菌根苗の作出	93
ミヤマヤナギ実生への根外菌系体による菌根菌接種	93
富士山火山荒原への植栽	93
実生の解析	93
統計解析	95
結果	
ミヤマヤナギ実生の生存率と冬芽	95
ミヤマヤナギ実生の菌根形成	95
ミヤマヤナギ実生の乾重成長	95
ミヤマヤナギ実生の窒素含量	98
ミヤマヤナギ実生のリン含量	99
無母苗区のミヤマヤナギ当年生実生	100
種子の養分含量	100
考察	
外生菌根菌の根外菌系体による実生への感染	100
根外菌系体の感染による実生への成長促進機能	101
フィールドにおける外生菌根共生の機能と菌種特性	102
第7章 総合考察	

一次遷移地における胞子による外生菌根菌の感染	105
一次遷移地における根外菌系体による外生菌根菌の感染	106
外生菌根菌の一次遷移	107
外生菌根菌の群集構造を決定する要因	110
一次遷移地というフィールドにおける植物の生育と外生菌根菌	111
植生回復や遷移に及ぼす外生菌根共生の重要性	113
謝辞	115
引用文献	117

論文の内容の要旨

論文題目：富士山火山荒原における外生菌根菌の一次遷移系列と
外生菌根共生による植生遷移促進機能

氏名： 奈良一秀

ほとんど全ての植物の根には菌類が共生し、菌根が形成されている。こうした植物と菌根菌の共生関係は相利共生関係であり、菌根菌は土壌中から吸収した養水分を植物に供給し、植物は光合成で生産した炭水化物を菌根菌に供給する。土壌中に伸びた菌根菌の菌糸（根外菌糸体）は植物の根よりもはるかに細くて長く、養分吸収能力に優れるため、菌根菌に感染した植物は十分な養分を獲得することができ、成長が著しく促進される。菌根にはいくつかのタイプがあるが、マツ科やブナ科などの極相林を構成する主要な樹木の根に見られるのは外生菌根である。このタイプの菌根を形成する外生菌根菌の多くは、いわゆるキノコを形成する担子菌や子囊菌である。外生菌根共生は、極相林に限られるものではなく、一次遷移の初期過程から始まって、あらゆる植生遷移段階で見られる。しかし、外生菌根菌がどのような遷移をし、実際のフィールドでどのような働きをしているのかについてはほとんど分かっていない。そこで本研究では、植生回復の重要な段階である一次遷移の初期において、外生菌根菌の群集構造とその遷移様式、木本植物実生の定着に及ぼす外生菌根菌の影響を解析し、外生菌根共生が森林形成に果たす役割を検討した。

富士山の南東斜面は1707年の宝永山の噴火によって全ての植生が破壊された。現在、標高1500～1600m付近では、イタドリが起点となった植生パッチが島状に点在するが、総植生被度は5%程度であり、地表の大半はスコリアの裸地である。この一次遷移の初期過程にある火山荒原を本研究の調査地とした。

本研究では、はじめに、調査地に設定した5.5haの方形区内に存在する菌根菌の群集構造を、地上部に発生する子実体（キノコ）と地下部の外生菌根（以下、菌根）との両面から解析を行った。第2章では、ほぼ毎週の頻度で2年間にわたりキノコ調査を行った。その結果、23種11,450本の菌根性キノコを確認した。そのキノコのほとんどはミヤマヤナギを宿主として発生したものであった。ミヤマヤナギは富士山の3000m近い高山帯にも分布する矮性ヤナギである。この火山荒原のミヤマヤナギは、光環境や水分環境の良い植生パッチ縁部にまず定着し、地を這うようにして年々その被覆面積を拡大する。その面積が0.5

要旨

m²以下の定着後間もないミヤマヤナギに見られた菌種は、クロトマヤタケ、キツネタケ、ウラムラサキの3種のみであった(図1)。これらの菌種を、菌根菌の遷移系列で最初に出現する“first-stage fungi”と定義した。更に成長したミヤマヤナギ(>0.5 m²)からは、これらの3種に加えてハマニセショウロとギンコタケの2種が出現するようになった。この2種を“second-stage fungi”と定義した。より大きくなったミヤマヤナギには、“late-stage fungi”と定義したワカフサタケ属(>1.2 m²)やフウセンタケ属(>2.1 m²)、ベニタケ属(>2.4 m²)が見られるようになった。そして、いずれの菌種の子実体発生量もミヤマヤナギの成長とともに単調増加することを明らかにした。

第3章では、各菌種の種内変異と種間差を考慮した精密なDNA解析の方法を用いて、地下部の菌根菌群集構造を調べた。16のミヤマヤナギから72の土壌サンプル(10x10x10 cm)を採取し、14,400の根端を解析した。全部で21種の菌根菌がミヤマヤナギの菌根から同定され、その内12種はキノコとして発生した菌種であった。地下部菌根の約9割はキノコ発生菌種によって占められていた。ミヤマヤナギの成長に伴い、first-stage fungiにsecond-stage fungiとlate-stage fungiが順次加わっていくという、地上部の菌根性キノコで見られた一次遷移系列が、地下部の菌根菌群集でも見られた。小サイズ(0.5 m²以下)、中サイズ(2~10 m²)、大サイズ(45 m²以上)のミヤマヤナギ縁部から採取した1土壌サンプルあたりの菌根菌の種数は、それぞれ1.4 ± 0.1、2.6 ± 0.3、3.3 ± 0.4であった。また、大サイズミヤマヤナギのパッチの外ではハマニセショウロやギンコタケが優占種であり、1土壌サンプルあたりの菌種数も1.9 ± 0.3と少なかったが、パッチ内部では1土壌サンプルあたりの菌種数も3.7 ± 0.4と多く、late-stage fungiやキノコを形成しないイボタケ科の菌種など、多様な菌種が見られた。

このような2、3章の結果から、これまで詳細が知られていなかった菌根性キノコ及び地下部菌根菌の一次遷移系列とその特徴を明示した。また、1土壌サンプルあたりの菌根菌の種数もミヤマヤナギの成長とともに増加することや、土壌の発達したパッチ内部での菌根菌が多様であることを明らかにし、植生発達に伴う土壌環境の多様化が菌根菌の一次遷移に大きく関与している可能性を示した。

次に、一部のミヤマヤナギ成木の近傍でミヤマヤナギの実生が多数見られることに着目し、成木が実生の定着を促進する機構への菌根菌の関与について調べた。第4章では、菌根を形成していないミヤマヤナ

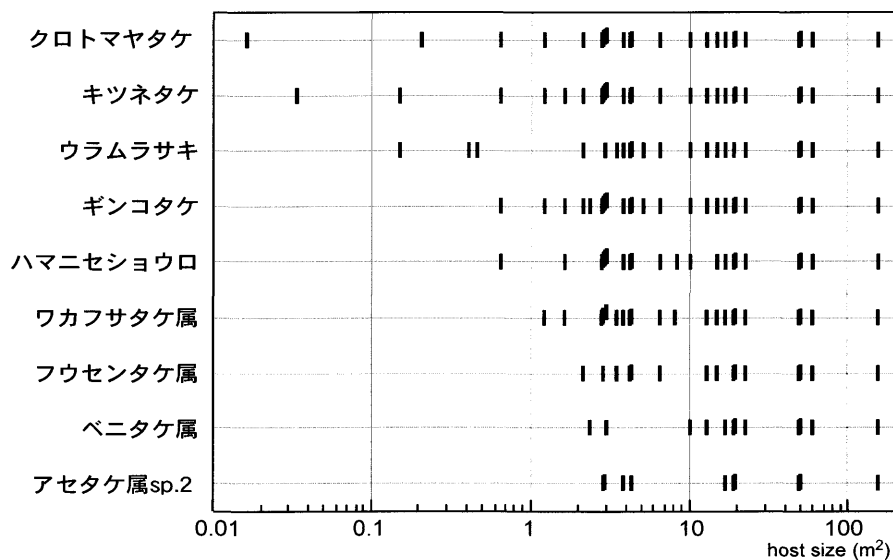


図1 富士山火山荒原における宿主の成長に伴う外生菌根性キノコの一次遷移
それぞれのマークは各菌根菌の子実体(キノコ)が発生したミヤマヤナギの被覆面積を示す。

ギ当年生実生を、富士山火山荒原の4つの異なるタイプの場所（裸地、ミヤマヤナギ成木の無い植生パッチ縁部、不健全なミヤマヤナギ成木の縁部、健全なミヤマヤナギ成木の縁部）に植栽し、実生の成長や感染した菌根菌などについて調べた。裸地やミヤマヤナギ成木の無いパッチに植栽した場合、ほとんどの実生は菌根を形成しなかった。これに対して不健全なミヤマヤナギ成木の近傍では16本中10本に、健全なミヤマヤナギ成木の近傍では17本全てに菌根の形成が見られた。地上部に含まれる窒素やリンの量も、健全なミヤマヤナギ成木の近傍で最も高く、成長も有意に良かった（表1）。健全なミヤマヤナギ成木の近傍で当年生実生に感染した菌根菌は、ウラムラサキ、クロトマヤタケ、ハマニセシヨウロの3種が優占していた（表2）。これらの菌種は全て、健全なミヤマヤナギ成木の菌根に見られた主要菌種であった。これに対して、不健全なミヤマヤナギ成木近傍の実生ではクロトマヤタケとハマニセシヨウロが優占していたものの、この2種の菌根菌は不健全なミヤマヤナギ成木に全く見られなかった菌種であった。こうした結果は、共生する菌根菌が介在することによって、ミヤマヤナギ成木がミヤマヤナギ当年生実生の成長を促進していること、成木の健全度によって実生への菌根菌の感染様式が異なることを示すものである。これまで、環境条件の悪い場所では先に定着した植物が後続植物の侵入を促進することが数多く報告されているが、菌根菌が介在する仕組みを示したのは本研究が初めてである。

さらに第4章では、富士山火山荒原の植生遷移でミヤマヤナギの後に出現するカラマツとダケカンバについて、当年生実生の菌根形成などを調べた。ミヤマヤナギ成木が存在する植生パッチと存在しない植生パッチに、ミヤマヤナギ、カラマツ、ダケカンバの当年生実生を混植した。その結果、ミヤマヤナギ同様に、カラマツとダケカンバ実生の菌根形成はミヤマヤナギ成木の近傍で明らかに促進されていた。感染した菌根組成には3樹種間で差異があったが、いずれの実生の菌根もミヤマヤナギ成木に見られた菌種によって形成されたものであった。このことから、ミヤマヤナギ成木に共生する菌根菌が後遷移樹木の菌根形成を促進することが明らかにされ、植生遷移のつなぎ役として菌根菌が機能する可能性を示した。

第5章では、富士山の様々な遷移段階にある森林を中心として、多種多様な菌根菌の単離を行い、ミヤ

表1 既に定着したミヤマヤナギ成木が当年生実生の菌根形成と生育に及ぼす促進作用

Transplanted sites	Number of seedlings (ECM / total)	Number of ECM root tips*	Shoot dry weight* (mg/seedling)	Shoot N amount* (μg/seedling)	Shoot P amount* (μg/seedling)
裸地	0 / 14	0.0 ± 0.0 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	10.8 ± 1.0 ^a	4.6 ± 0.4 ^a
ヤナギ無しパッチ	1 / 17	0.2 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	11.0 ± 1.2 ^a	4.5 ± 0.3 ^a
不健全ヤナギの近傍	10 / 16	9.3 ± 2.5 ^b	1.1 ± 0.2 ^a	20.4 ± 3.7 ^b	4.7 ± 0.4 ^a
健全ヤナギの近傍	17 / 17	25.5 ± 2.9 ^c	2.2 ± 0.3 ^b	27.7 ± 1.6 ^b	6.4 ± 0.5 ^b

*平均値 ± 標準誤差。同じ列内で異なるアルファベットは統計的に有意な差を表す (Tukey's HSD test, $P < 0.05$)。ECM; ectomycorrhizal (外生菌根の)

表2 ミヤマヤナギ成木と隣接して植栽したミヤマヤナギ当年生実生の地下部菌根菌組成

Seedlings	Relative abundance of ECM fungi (% ECM tips)*							Total (examined) ECM tips
	Il	La	Sb	Lm	Th	Ll	Others	
Transplanted sites								
裸地	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0
ヤナギ無しパッチ	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3
不健全ヤナギの近傍	53.6	3.1	41.9	0.0	0.0	1.4	0.0	148
健全ヤナギの近傍	37.2	43.9	13.8	3.8	1.4	0.0	0.0	434
Established willow shrubs								
不健全な成木ヤナギ	0.0	5.0	0.0	28.2	10.3	33.4	23.1	1,016
健全な成木ヤナギ	28.7	17.5	15.0	27.2	1.9	7.0	2.9	1,390

*Il; クロトマヤタケ、La; ウラムラサキ、Sb; ハマニセシヨウロ、Lm; ギンコタケ、Th; イボタケ科、Ll; キツネタケ

要旨

マヤナギに対する宿主特異性を調べた。その結果、数多くの学術的に貴重な菌種を含む105種130菌株を収集することができた。このうち78菌株をミヤマヤナギへの接種に用い、そのうち36菌株で菌根の形成が見られた。また、ほとんどの菌種で見られなかった *in vitro* での子実体形成が、3種の first-stage fungi 全てで見られたことから、子実体形成の容易さが一次遷移地に最初に定着する菌根菌としての一つの必要条件であると考えられた。

第6章では、調査地から単離した菌根菌11種をミヤマヤナギに接種し、それぞれの菌種の1年生菌根苗をまず作成した。その菌根苗の周りにミヤマヤナギの種子を播種し、菌根苗から伸びる根外菌糸体によって当年生実生に菌根菌を感染させる実験を現地で行った。その結果、根外菌糸体によって感染を試みた全ての実生に当該菌種の菌根が形成され、孢子感染による当該菌種以外の菌根形成は見られなかった。用いた11菌種は、富士山火山荒原のミヤマヤナギ成木に見られた地下部菌根菌群集の84%を占め(第3章)、単一植栽実験でミヤマヤナギ実生に自然感染した菌根菌群集の99%に達する(第4章)。このように、優占する菌種の全てが根外菌糸体によって実生へ感染することが明らかとなった。また、各種菌根菌が感染した実生のほとんどは、対照区の実生より多くの窒素やリンを含有し、成長も良かった(図2)。こうした実生への菌根菌感染の効果は、菌種によって大きく異なり、窒素吸収量では最大で8.2倍(平均値比)の菌種間差があった。また、実生の窒素吸収量は実生の成長と強い相関があったため($R=0.935$, $P<0.001$)、感染実生の乾重にも菌種間差が見られ、その差は最大で4.1倍に達した(図2)。このような結果から、富士山火山荒原のミヤマヤナギ成木に共生する外生菌根菌が、根外菌糸体によって隣接する実生に感染し、実生の窒素吸収を増大させることによってその成長を促進させるという機構を解明した。さらに、こうした菌根共生の機能には大きな菌種間差があることを明らかにし、感染する菌根菌の菌種特性が富士山火山荒原のミヤマヤナギ実生の定着を左右する大きな要因となることを示した。

以上の結果を統合して、第7章では一次遷移過程における外生菌根菌の遷移と機能について新たなモデルを提唱し、外生菌根共生の機能が植生回復や植生遷移に決定的な影響を及ぼしうることを示した。

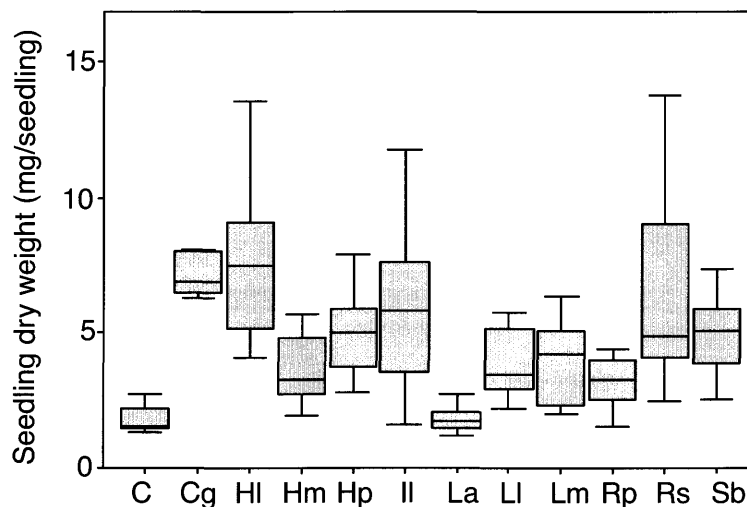


図2 外生菌根菌の根外菌糸体による感染がミヤマヤナギ当年生実生の成長に及ぼす影響

C; 対照区, Cg; *Cenococcum geophilum*, HI; *Hebeloma leucosarx*, Hm; ワカフサタケ, Hp; *Hebeloma pusillum*, II; クロトマヤタケ, La; ウラムラサキ, LI; キツネタケ, Lm; ギンコタケ, Rp; ニセクサハツ, Rs; キチャハツ, Sb; ハマニセショウロ

要旨

第1章 序論

一次遷移

ある場所に存在する生物群集が時間の経過に伴って別の群集へと置き換わっていく現象は「遷移 (succession)」と呼ばれ、植物生態の分野を中心に研究が行われてきた (e.g. Walker & del Moral 2003)。遷移は、全くの裸地、すなわち基質中に生物やその残存物をほとんど含まない場所から始まる一次遷移と、基質中にある程度の生物を含んだ場所から始まる二次遷移とに分けることができる。また、全く土壌が形成されていないか、多少なりとも土壌が形成されているかによって一次遷移と二次遷移が区別されることも多い。具体的には、噴火跡地などは一次遷移に、山火事跡地は二次遷移となることが多い。しかし、火山噴出物の量が少なく元の生物種が残存する場合や、山火事後の保水力低下によって土壌流出が激しい場合など、その攪乱の程度によっては明確な区別が難しい場合もある (露崎 2001)。いずれにせよ、現存する全ての陸上生態系は、その起源までさかのぼって考えれば、必ず一次遷移過程を経過しているといえる。

一次遷移系列の初期では、土壌が発達していないため、植物の利用できる養分、とくに窒素が非常に限られる。裸地であるため、環境条件も厳しいことが多い。こうした生育環境に耐えうる植物が、先駆植物として最初に定着する。母材の風化や先駆植物の作用などによって、徐々に土壌が発達し、生育環境が変化すると、それに適応した植物種が出現する。そして、極相と呼ばれる安定した植物群落へと徐々に移り変わる。湿潤な環境であれば、極相の多くは森林であり、極相林とも呼ばれる。

極相林などの安定した森林は、治水機能や空気浄化作用、レクリエーションの場、農耕地への養分供給などの人間社会に対する重要な公益的機能を持つほか、多くの生物の生息場所としても重要である。このような森林が自然災害や人間活動によって破壊され、裸地化した荒廃地が各地で増加しており、深刻な環境問題が頻発している。このため、裸地化した荒廃地の植生回復は今日の重要な課題である。全くの裸地から始まる自然の植生回復過程から得られる知見は、こうした課題の解決に必要とされている。また、植物群落の最初の形成過程を知ることは、人間の知的興味をそそる課題でもある。こうした様々な動機から、世界各地の一次遷移過程における植生回復過程がいろいろな観点から研究されてきた。しかし、植物の一次遷移に関する研究で、地下部の根に共生する菌類に目が向けられることはほとんどなかった。

菌根共生のタイプから見た一次遷移

ほとんど全ての陸上植物の根には菌類が共生し、菌根と呼ばれる構造が形成されている。菌根にはいくつかのタイプが存在するが、主要なタイプとして、Arbuscular 菌根と外生菌根 (ectomycorrhiza) がある。Arbuscular 菌根は、接合菌類に属する Glomus 目の 5 科 8 属の菌類によって形成される。宿主植物は、コケ植物からシダ植物、裸子植物、被子植物まで、陸上植物の約 9 割の種が含まれるとされ、草原や農耕地では優占する菌根タイプである (Smith & Read 1997)。一方、外生菌根は、テングタケ科、フウセンタケ科、イグ

子科、ベニタケ科、ツチグリ科、ニセシヨウロ科、シヨウロ科などの多くの担子菌類から、ツチダンゴキン科やセイヨウシヨウロタケ科などの子囊菌と一部の接合菌類まで、多種多様な菌類によって形成される (Smith & Read 1997)。全世界で少なくとも 6000 種の外生菌根菌が存在する言われているが (Molina *et al.* 1992)、菌類分類体系の未熟さ、未同定菌や子実体を作らない外生菌根菌の多様さを考えると、この数字は1桁は増えるものと思われる。宿主植物には、カバノキ科、ブナ科、マツ科、ヤナギ科などの温帯林の主要樹種が含まれる (Smith & Read 1997)。また、熱帯林の主要な樹木であるフタバガキ科やフトモモ科なども外生菌根を形成することが知られている (Alexander & Högborg 1986, Lee & Lim 1989, 奈良 1998, Nara *et al.* 1999a, b)。

このような2つの主要な菌根タイプが、一次遷移過程でどのような出現パターンを示すかについて、一つのモデルが提起されている (Smith & Read 1997)。そのモデルでは、まず菌根を形成しなくても生育できる非菌根依存性の植物が侵入する。やがて Arbuscular 菌根菌の孢子が動物や風によって運ばれると、Arbuscular 菌根菌依存性の多くの草本植物が侵入可能となり、遷移が加速される。そして、土壤に有機質が蓄積し、養分の大部分が有機質として存在するようになると、そうした土壤環境に適した外生菌根菌が優占する。つまり、このモデルによると外生菌根菌が出現するのはかなり遷移が進んだ段階ということになる。しかし現実には、外生菌根性の木本植物の実生が、有機質の蓄積が全くない氷河後退地の遷移初期段階から出現するのに加え (e.g. Helm & Allen 1995)、噴火跡地の裸地に最初に定着することも多い (Titus & Tsuyuzaki 2003)。つまり、菌根タイプの遷移モデルの真偽はともかく、外生菌根共生は一次遷移の極めて初期の段階から、遷移の最終段階に当たる極相林に至るまで連続的に見られるのである。

外生菌根共生とは

外生菌根共生は 20 世紀の中頃から多くの研究が行われるようになったものの、まだ一般にはそれほど知られていない。外生菌根共生の概要を知ることは、本研究を理解する上で必要であると思われるので、これまでに得られている基礎的な知見を簡単に説明しておく。

細根表面を覆う厚い菌糸組織 (菌鞘) と、根の皮層間隙に侵入し表皮細胞や皮層細胞を個々に包み込む菌糸組織 (ハルティヒネット) という2つの構造は、外生菌根を定義づける構造であり、どの外生菌根にも必ず見られる (図 1-1)。

多くの外生菌根では、菌根表面から無数の菌糸や菌糸束が土壤中に伸びている。菌根から伸びる菌糸 (根外菌糸体) は、植物の根毛よりもはるかに細く長いので、土壤中のより小さな隙間や、根から離れた土壤中の養水分にアクセスすることが可能である。*Pinus taeda* - *Pisolithus* 菌共生系による試算では、養分吸収ができる部位全体に占める根外菌糸体の割合は、バイオマスで 5% に過ぎないが、表面積では 75%、長さでは 99% に達する (Rousseau *et al.* 1994)。また、根外菌糸体は、酵素や有機酸などを分泌することによって、植物自身では利用できない窒素やリンの有機態化合物および難溶性無機化合物を分解、吸収利用することができることも云われている (e.g. Abuzinadah & Read 1986, Lapeyrie *et al.* 1987, 1991)。そして、根外菌糸体が吸収した養分の一部はハルティヒネットへと運ばれ、菌細胞から植物細胞へと受け渡される (図 1-2)。こうした菌から植物へ

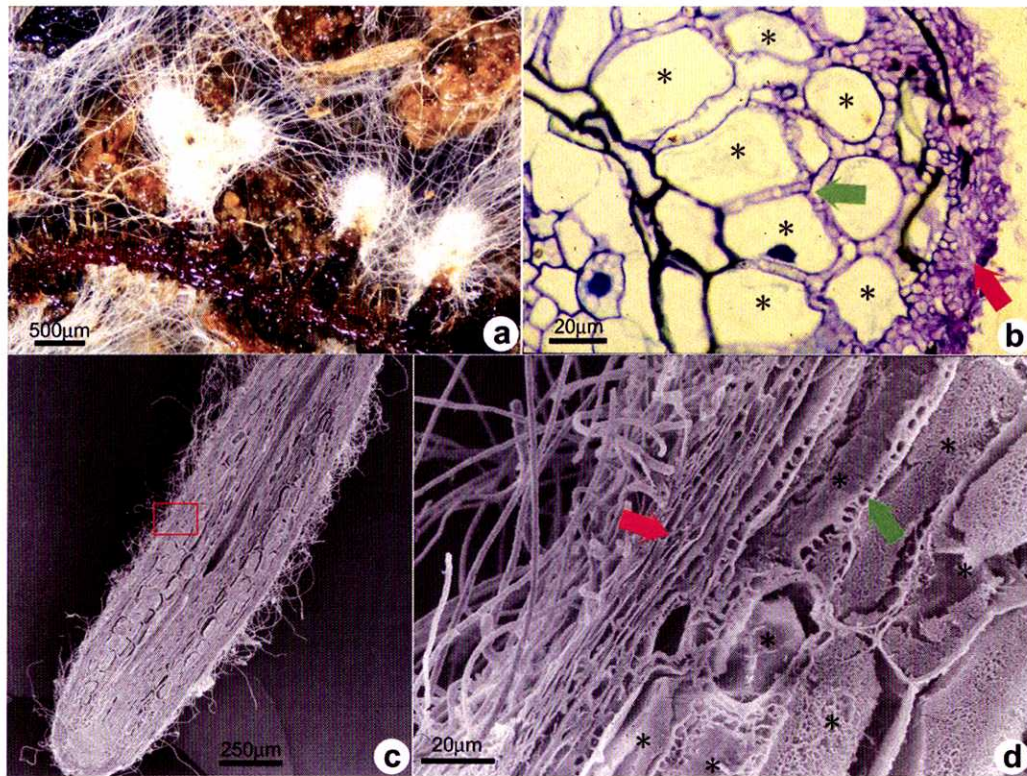


図 1-1. Structure of ectomycorrhizal roots.

a: アカマツ、b: カラマツ (横断面)、c: モミ (縦断面)、d: c 図の赤四角部分を拡大
 矢印赤は菌鞘、矢印緑はハルティヒネット、*は宿主根の皮層細胞を示す。a 図の菌根表面から無数に伸びる菌糸は根外菌糸体。一部、奈良ら(1992)より引用。

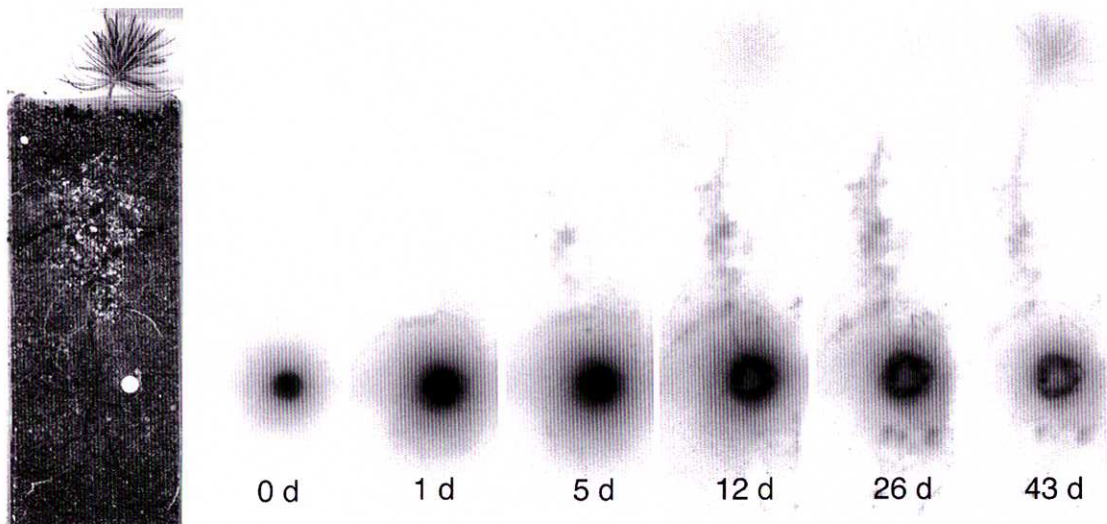


図 1-2. Uptake, translocation, and transfer of phosphorus in an ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus densflora* and *Pisolithus* sp.

一番左の写真はアカマツにコツブタケを接種したもの。根外菌糸体の発達する白丸の部分に放射性リン酸 (^{32}P) を添加し、その後の ^{32}P 分布を経時的に調べたもの。12 日目には既に地上部への移動が見られる。奈良&宝月(1998)より引用。

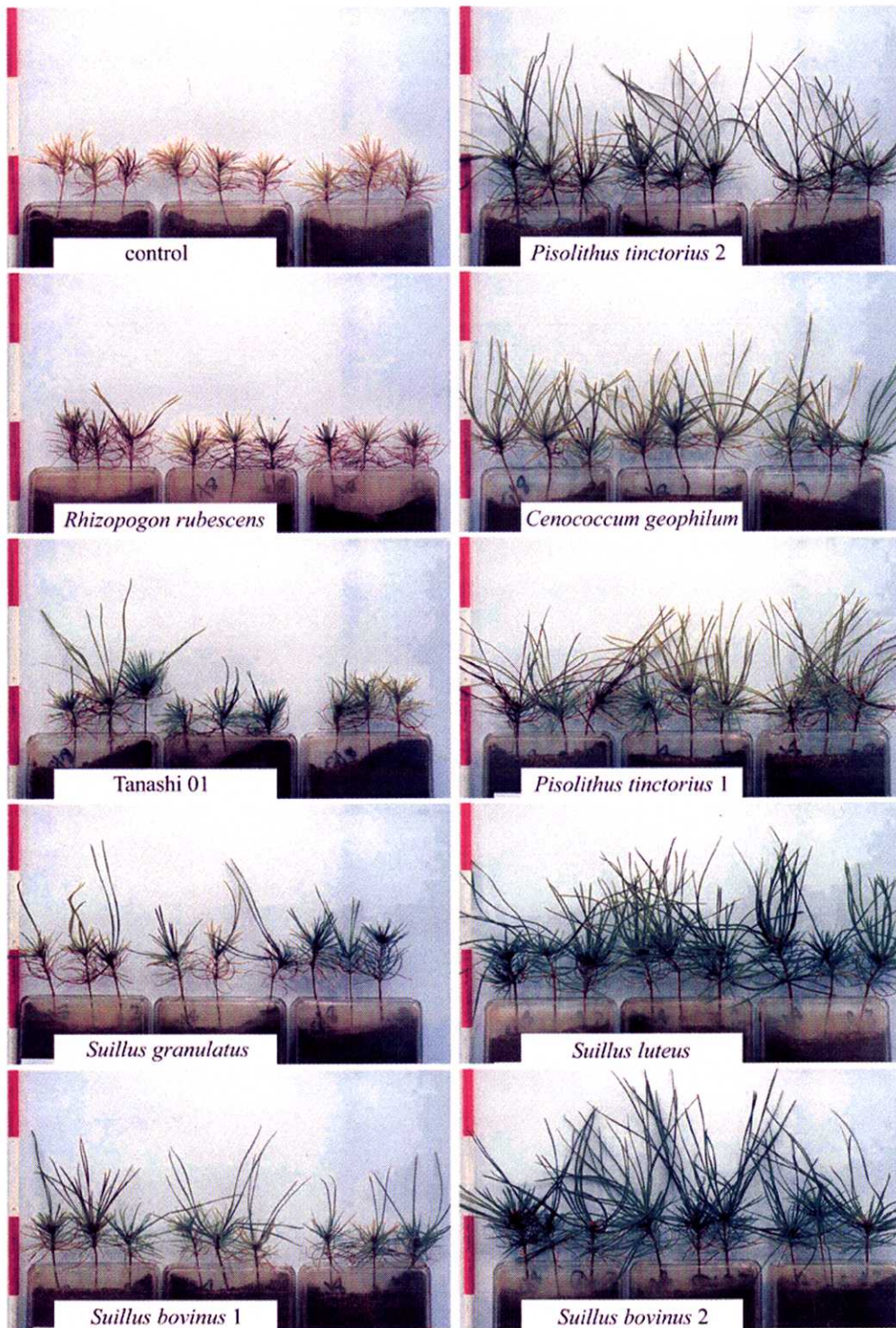


図 1-3. Enhanced growth of *Pinus densiflora* by ectomycorrhizal fungi and its difference between fungal species.

いずれも接種から 6 ヶ月後の様子。Nara *et al.* (2000)より引用。

注：ここで用いた *Pisolithus tinctorius* は Martin *et al.* (2002)の系統樹内の、*Pisolithus* sp.4 に当たる (Kanchanaprayudh *et al.* 2003)。

の養分供給によって、外生菌根菌と共生した植物の成長は著しく促進される (図 1-3)。

一方、十分な光合成ができるようになった植物では生産した炭水化物の一部が根に運ばれる。そして、ハルティヒネットでの養分の動きとは逆方向に、植物から菌根菌へと炭水化物が受け渡される (Finlay & Read 1986a, Nara *et al.* 2000, 奈良ら 2001, Wu *et al.* 2001, 2002,)。外生菌根菌は、十分なエネルギー源を得て、さらに根外菌糸体を広げたり、土壤中から活発に養分の吸収をすることができるようになる (Leak *et al.* 2001)。また、植物からの炭水化物の供給は、子実体を形成して菌根菌の生活環を完結させる上でも必要不可欠なものである (Last *et al.* 1979, Lamhamedi *et al.* 1994)。

一次遷移過程における外生菌根共生

一部の菌と植物の組み合わせによって明らかにされてきた外生菌根の相利共生機能は、一次遷移の初期過程における植物の生育にも大きな影響を与えている可能性がある。しかし、一次遷移初期過程における外生菌根共生の研究は極めて貧弱な状況で、どのような種の外生菌根菌がどれくらい存在しているのかすら示された例がない。接種実験によって宿主への成長促進作用には大きな種間差が認められることから (Smith & Read 1997, Nara *et al.* 2000; 図 1-3)、一次遷移の初期過程においても、多数の菌種が植物の生育や群落形成にそれぞれ異なる影響を及ぼしていると考えられる。しかし、一次遷移過程下にある実際のフィールドでの個々の外生菌根菌の役割や機能については全く不明である。

そこで本研究では、富士山火山荒原をフィールドにして、一次遷移初期過程における外生菌根菌群集の特徴と、植物群落の成立に果たす外生菌根共生の機能を検証することを目的とした。まず第2章では、菌根性子実体の詳細な調査により、外生菌根菌の群集構造とその一次遷移過程、宿主の生育状況と菌根性子実体の生産量の関係を調べた。第3章では、土壌サンプリングによる地下部菌根菌群集の構造と遷移過程を解析し、さらに、地上部の子実体群集構造との比較を行った。第4章では、一次遷移初期過程で見られる木本植物3種の実生をフィールドに植栽する実験を行い、既に成立したミヤマヤナギに共生する外生菌根菌群集が、植栽実生の菌根形成と成長に及ぼす影響を検討した。第5章では、富士山の様々な遷移段階にある森林を中心に、多種多様な外生菌根菌を収集・分離し、接種実験により、それぞれの菌のミヤマヤナギへの宿主特異性を調べた。第6章では、一次遷移初期過程で見られた大部分の菌を用いて根外菌糸体による感染試験を現地で行い、実際のフィールド条件における根外菌糸体の感染性と、実生への成長促進作用の菌種特性を解析した。そして第7章では、得られた結果を総合的に検討し、富士山の一次遷移初期過程における外生菌根菌群集の発達過程のモデルを提唱するとともに、植生回復に及ぼす外生菌根共生の重要性について考察した。

第一章 序章

第2章 富士山の一次遷移初期過程における外生菌根性子実体群集の構造と遷移

はじめに

植生遷移という概念は陸上生態学の最も重要な概念の一つであり、様々なアプローチによる研究が世界各地で行われてきた。しかし、ごく最近に至るまで、そうした研究のほとんどは菌根菌の存在を考慮してこなかった。ほとんどの陸上植物は菌根菌と共生している。そして、植物の養水分吸収における菌根菌の重要性が次第に明らかになるにつれ、植生遷移に及ぼす菌根菌の影響が調べられ始めた (Miller 1979, Reeves *et al.* 1979)。その多くはArbuscular 菌根菌と草本植物を対象にしたものであり、研究の蓄積とともに次のような一つのモデルが提唱されるようになった。つまり、一次遷移の初期では、まず非菌依存性の植物が侵入し、その後、Arbuscular 菌根の形成が可能な植物が侵入する。そして、養水分の吸収を促進するArbuscular 菌根菌が定着することによって、より菌依存性の高い植物が侵入し、植物群集は多様化し、遷移が加速されるというものである (Allen & Allen 1984)。

外生菌根性の植物は、熱帯から寒帯にかけての多くの極相林で優占するだけでなく、一次遷移の初期過程から既に見られることが多い (Allen *et al.* 1992, Helm & Allen 1995)。一次遷移の初期過程では土壌中のNやPが非常に限られるため、養水分の吸収を促進する外生菌根菌との共生は、植物の生存や成長にとって非常に有利に働くものと考えられている。しかし、一次遷移の初期過程における外生菌根菌の研究は、一部の記載的な研究 (Helm *et al.* 1996, Jumpponen *et al.* 1999, 2002) を除いてほとんど行われておらず、未だに不明な点が多い。

外生菌根菌は非常に多様であり、それぞれの菌は宿主域も違えば機能も異なる。つまり、あるフィールドにおける外生菌根菌の機能を理解しようとした場合、そこにどのような菌が存在して、どのような群集構造をとっているのかを知ることが重要である。外生菌根菌の多くは子実体 (いわゆるキノコ) を形成することから、キノコ調査によって外生菌根菌群集を記載する研究が多数行われてきた (e.g. Mason *et al.* 1982, 奈良ら 1992, Matsuda & Hijii 1998)。一次遷移の初期過程における外生菌根性子実体については、研究例は極めて限られるが、いくつかの記載を見ることができる。Allen *et al.* (1992) は、セントヘレンズ噴火の数年後には外生菌根樹種の定着が見られたが、菌根性キノコの発生は噴火後10年間見られなかったと述べている。また、火山荒原とは別のタイプの一次遷移地であるが、後退するExit氷河の跡地における一次遷移初期過程では、*Inocybe* (アセタケ属)、*Laccaria* (キツネタケ属) や *Hebeloma* (ワカフサタケ属) のキノコがヤナギ科樹木と共生して発生したと記されている (Helm *et al.* 1996)。同様に、Lyman氷河では13種の子実体が記載されている (Jumpponen *et al.* 1999, 2002)。残念ながら、こうした記載は不定期に行われた数少ない調査に基づくもので、外生菌根性子実体の発生量に関する定量的なデータは全く無い。一次遷移の初期過程における、外生菌根性子実体の群集構造について正確に知るためには、より詳細な調査に基づく、定量的な記載が必要不可欠

であると考えられる。

外生菌根性子実体は、宿主樹木の成長とともに遷移していくことが知られている。つまり、“early-stage fungi”とよばれる菌種の子実体が最初に見られ、その後“late-stage fungi”と定義される菌種に置き換えられていくというものである。このモデルは、二次遷移地に植栽した*Betula*, *Picea*, *Pinus*などの樹木の成長とともに子実体組成が変化することから導き出されたものであり、有機物や窒素の蓄積といった土壌発達と深い関係があると考えられている (Mason *et al.* 1982, 1983, Deacon *et al.* 1983, Fleming *et al.* 1984, Last *et al.* 1984, Dighton *et al.* 1986)。土壌の全く発達していない一次遷移の初期過程での菌根菌の遷移は、上述したモデルとは全く異なることも考えられるが、その真相は明らかにされていない。

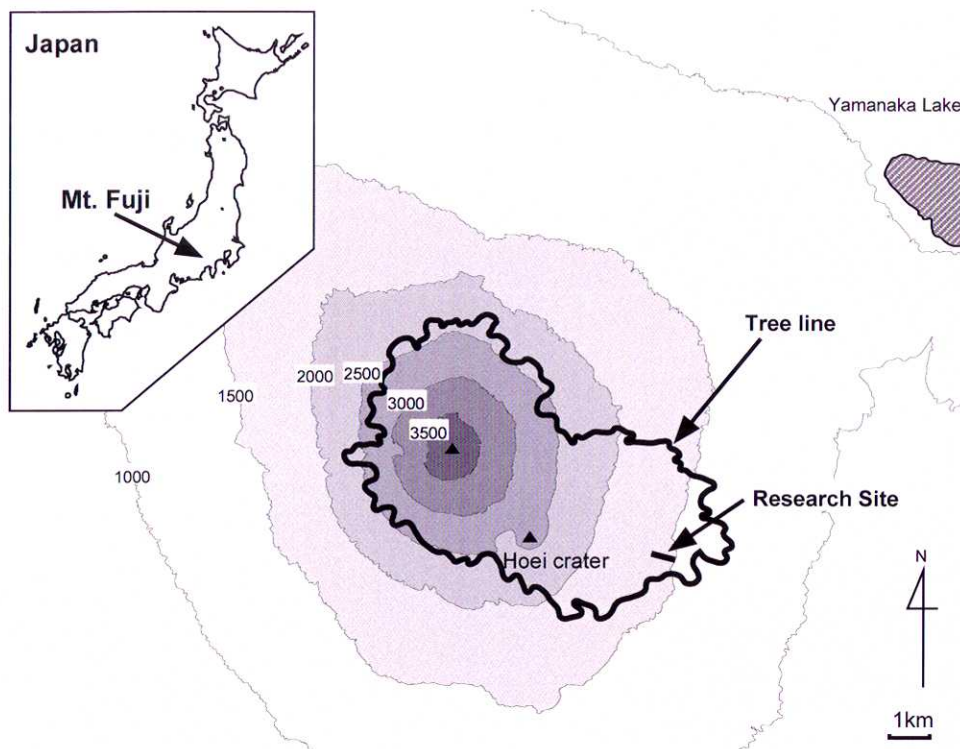
一方、子実体発生量と宿主の成長との関係には、いくつかの興味深い研究があり、野外における菌根菌-樹木共生系の関係の理解に示唆を与えている。Last *et al.* (1979) は、*Betula*の摘葉によって菌根性子実体の発生が著しく減少することなどから、子実体の形成にはその時点での光合成産物の供給が必要不可欠であることを示した。また、Högberg *et al.* (2001) は、林地での樹皮剥離によって光合成産物の地下への転流を止める実験を行い、腐生菌の子実体に比べて菌根性子実体の発生が著しく減少することや、菌根菌への多量の光合成産物の転流について報告している。一次遷移の初期過程における菌根性子実体の発生量と宿主植物の生理活性の関係についてはこれまで調べられていないが、この関係を調べることで、植生遷移の初期段階における菌根共生の果たす役割を推し量る重要な情報が得られるものと考えられる。

以上のような考えのもと、本章では、富士山南東斜面の一次遷移初期過程において、詳細な子実体調査に基づく外生菌根菌群集の構造、宿主の成長に伴う外生菌根菌の遷移様式、宿主樹木の生育状況と子実体発生量との関係を調べた。

材料と方法

調査地

富士山は、日本で最も高く、最も有名で、そして日本の象徴ともされる火山である。最も新しい1707年の宝永の大噴火では、火口の東側一体の植生が壊滅し、スコリアと呼ばれる火山性噴出物が10mもの厚さに至るまで降り積もった。植生は徐々に回復しているが、他の斜面で海拔2500m付近に見られる森林限界は、南東斜面では未だに1300m付近に下がったままである (図2-1)。この火山荒原上の標高1500~1600mにかけて、斜面方向550m幅100mの大きさの方形区を設置した (35°20' N, 138°48' E)。この地域では、植生は島状 (パッチ状) に分布しており (図2-2)、方形区内の縦植生被度は5%程度である。植生遷移の過程については、高木・丸田 (1992) や増沢 (1997) などに詳しく記載されている。まず、裸地にイタドリ、オンタデ、フジアザミ、フジハタザオなどが定着する。その中でもイタドリは地下茎によって年々放射状に被覆面積を拡大し、直径10mを越えるような大きな植生パッチに発達する。スコリアは非常に動きやすく、ほとんどの植物が定着困難な環境であるが、イタドリによってスコリアが安定化されたパッチの内部にはノコンギク、カリヤスモドキ、ヒメノガリヤスといった多くの多年生草本が侵入することができる。



☒ 2-1. Location of the research site established in an area of early primary succession on Mt. Fuji, Japan.



☒ 2-2. Vegetation islands (patches) in a volcanic desert on Mt. Fuji, Japan.

この斜面の1400m付近で計測された気象データによると、年平均気温は8.6°C、最低月平均気温は1月の-1.9°C、最高月平均気温は8月の19.1°Cである (Tateno & Hirose 1987)。この付近の降水量は非常に多く、平均で4,854mmに達し、河口湖での1,650mmのおよそ3倍にあたる (Ohsawa 1984)。地表面は乾燥しやすいものの、このような豊富な降水量と毛管水上昇のないスコリアによって、地表から5cm以下の深さでは常に十分な水分が保持されている (高木・丸田 1992)。裸地に比べパッチ内部の土壌養分は多い。特にNについては、パッチの発達にともなって総量が増加するだけでなく、微生物活性の上昇と存在する植物の窒素利用のバランスによって、窒素形態も著しく変化することが知られている (Hirose & Tateno 1984)。

植生調査

レーザー距離計 (Criterion 400, Laser Technology Inc., Colorado, USA) を用いて、方形区内に存在する直径50cm以上の植生パッチの位置図を作成した。これらの植生パッチの間には、オンタデなどを中心とする小さいパッチが多数点在しているが、予備調査によって外生菌根共生が見られないことや、総植生被度に占める割合が小さいことなどから、これらの小さな植生パッチは本研究の対象から除外した。対象とした植生パッチ全てに番号を付け、それぞれのパッチに含まれる植物種、相対被度を2000年の8月に調査した。外生菌根菌の宿主となる植物を特定するため、菌根性キノコの発生したパッチと発生しなかったパッチの植生を比較した。また、菌根性キノコの発生の見られたパッチで高頻度に見られた植物10種を対象にして、各植物種の根系をそれぞれ5箇所からサンプリングし、外生菌根形成率を調べた。

子実体調査

2000年と2001年の6月から11月にかけて、ほぼ毎週、計34回の子実体調査をおこなった。なお、菌根性キノコの発生はこの時期に限られている。それぞれの調査は、方形区全てをくまなく調べるため、1日から3日を要した。菌根性キノコの発生があれば、二重計測を避けるため、小旗で標識を行い、発生位置を記録した。ほとんど全ての外生菌根性子実体は植生パッチの内部とその周辺で見られ、それぞれの菌種の年発生量の合計を各パッチごとに計算した。

菌種の同定のため、子実体の外形的特徴を記載するとともに、凍結乾燥機 (FDU-540, EYELA, Tokyo, Japan) を用いて乾燥標本を作製した。胞子などの微細構造の観察は Breitenbach & Kränzlin (1991) の方法に従って行った。学名の記載方法などは Hansen & Kundsén (1992, 1997) に従った。日本の高山性ヤナギ下に見られるキノコの記載はほとんどないため、種の同定にあたっては以下の文献を参考にした。 *Cortinarius* (Brandrud *et al.*, 1990-1998), *Hebeloma* (Breitenbach & Kränzlin, 2000), *Inocybe* (Stangl, 1989), *Laccaria* (Mueller, 1992), *Russula* (Sarnari, 1998), *Scleroderma* (Guzman, 1970), *Leccinum* (Lannoy & Estades, 1995)。また、イッポンシメジ科 (Entolomataceae) に属する菌種については、外生菌根性かどうか不明確であることに加え、明らかに腐生性と見られるものが多かったため、本研究からは除外した。

各菌種の本一本あたりの乾燥重量平均は、20本の成熟した子実体を用いて計算した。調

査地全体での発生量が20本に満たない場合は、成熟した子実体全てを用いた。得られた数値は、子実体発生量の解析に用いた。

ミヤマヤナギの解析

ミヤマヤナギ (*Salix reinii*) は高山性の矮性ヤナギで、富士山では3000m近い高山帯まで分布している。方形区内にも、さまざまな大きさのミヤマヤナギが分布しており、その被覆面積は発達段階を示す指標となる。そこで、ミヤマヤナギの存在するそれぞれのパッチの上空7mから写真撮影を行い、ミヤマヤナギの被覆面積をデジタルプランメーターで計測した (図2-3)。本研究では、この被覆面積を宿主サイズと定義した。また、撮影した植生パッチの写真は子実体発生位置のプロットにも使用した

子実体発生量と宿主生育状況の関係を調べるため、同程度のサイズのミヤマヤナギを含む9つの植生パッチを選んだ。それぞれのパッチに含まれるミヤマヤナギの総葉量は、2000年の10月にミヤマヤナギ被覆の中心付近から20×20cmの刈り取りサンプリングを

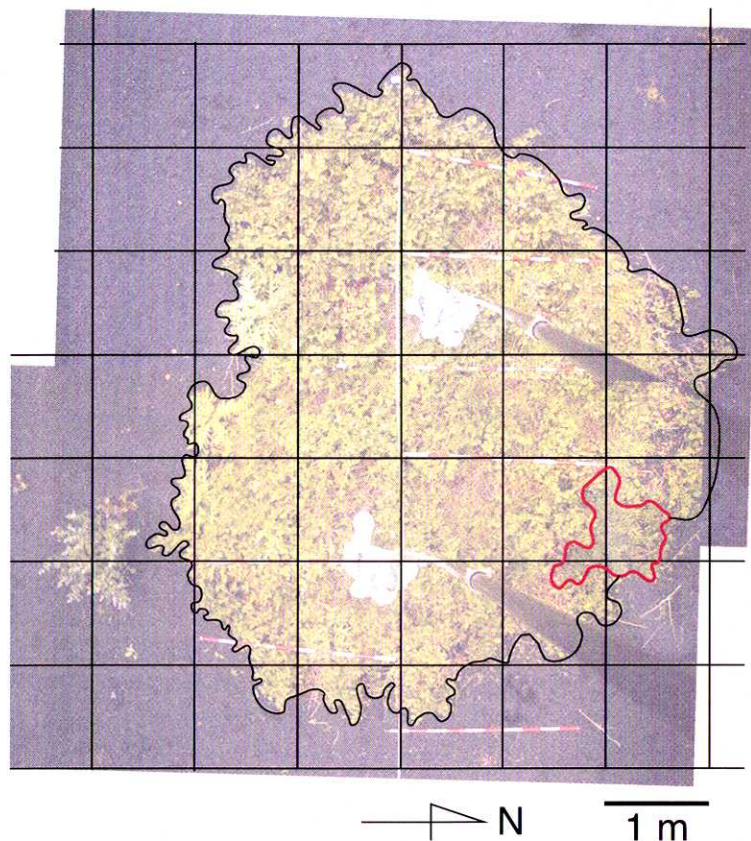


図2-3. An aerial photograph of a vegetation patch in a volcanic desert on Mt. Fuji.

The area enclosed by the red line indicates the coverage of *Salix reinii*.

行って推定した。また、2000年の11月に各パッチからミヤマヤナギの当年枝を5本ずつサンプリングし、当年枝長と冬芽数を記録した。また、2000年の8月の晴天日に、各パッチからミヤマヤナギの成熟した林冠葉を5枚選んで、携帯型光合成蒸散測定装置 (LI-6400, Licor Inc., Lincoln, Nebraska) を用いて、一定条件下での光合成速度 (25 °C, 400 ppm CO₂, 1500 μmol m⁻² s⁻¹ light intensity with a red and blue LED combination) を測定した。また、光合成測定に用いた葉については、葉面積と乾燥重量を計測した後、硫酸と過酸化水素で湿式灰化を行い、N濃度をインドフェノールブルー法で、P濃度をアスコルビン酸還元モリブデンブルー法によって測定した。2000年の11月に、それぞれのパッチのミヤマヤナギ下から10x10x10cmの土壌ブロックを、縁部から3つ、内部から3つの計6つ採取した。それぞれの土壌サンプルから200個の根端をランダムサンプリングした後、菌根形成率を実体顕微鏡下で測定した。

統計

全ての統計解析はSPSS11.0 ウィンドウズ用ソフトウェアパッケージ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を用いて行った。グラフ中の回帰直線は、最小二乗法による計算によってあてはめた。当年枝長や冬芽数、光合成、葉内N、P量、菌根形成率等の宿主の生育状況に関するデータは平均値±標準誤差で表示した。こうしたデータに関して、選択した9パッチ間の統計的な有意差は、一元配置分散分析とTukeyの多重比較法を用いてテストした。子実体発生量と宿主データとの関係については、Spearmanの順位相関係数を用いて評価した。

結果

宿主植物

植生調査の結果から、全部で19種の草本植物と8種の木本植物が159のパッチから確認できた (Table 2-1)。イタドリ (*P. cuspidatum*) とオンタデ (*P. weyrichii* var. *alpinum*) はそれぞれ155と104パッチに出現した。バラ科やカヤツリグサ科に属する植物も多くのパッチに出現している。タデ科、バラ科、カヤツリグサ科に属する草本植物の中には外生菌根を形成するとされる植物が、高山帯や極地方からいくつか報告されている (Massicotte *et al.*, 1998)。しかし、富士山で見られたこれらの科に属する植物はいずれも外生菌根を形成していなかった (Table 2-1)。木本植物の出現頻度は少なかったが、ミヤマヤナギ (*S. reini*) とシモツケ (*Spiraea japonica* var. *alpina*) は比較的多く、それぞれ37と30のパッチに出現した。

2年間の子実体調査の結果、外生菌根性キノコは159の植生パッチのうち38パッチから発生した (図 2-4)。菌根性キノコの発生したパッチとそうでないパッチに分けて、出現する植物種を比較してみたところ、いくつかの明確な違いが見られた。ミヤマヤナギの含まれる37のパッチ全てから菌根性キノコの発生が見られたが、菌根性キノコの発生しなかったパッチにはミヤマヤナギが全く見られなかった。菌根性キノコの発生した38パッチの内、ミヤマヤナギを含まなかった唯一のパッチにはバッコヤナギ (*Salix bakko*) が分布していた。菌根性キノコの発生が見られたパッチの主要な植物10種の根系を調べたところ、ミヤマヤナギには多くの外生菌根が見られたが、その他の植物の根には全く

表 2-1. Plant communities in sporocarp-producing and non-producing patches on the volcanic desert of Mt. Fuji.

species	sporocarp producing patches (/38)	sporocarp non-producing patches (/121)	total (/159)
Woody species			
<i>Salix reinii</i> *	37	0	37
<i>Spiraea japonica</i> *	17	13	30
<i>Rosa fujisanensis</i>	7	1	8
<i>Betula ermanii</i>	4	0	4
<i>Larix kaempferi</i>	3	0	3
<i>Ligustrum obtusifolium</i>	1	1	2
<i>Salix bakko</i>	1	0	1
<i>Weigela decora</i>	1	0	1
Herbaceous species			
<i>Polygonum cuspidatum</i> *	34	121	155
<i>Cirsium purpuratum</i> *	31	89	120
<i>Arabis serrata</i> *	30	83	113
<i>Polygonum weyrichii</i> var. <i>alpinum</i> *	24	80	104
<i>Campanula punctata</i> var. <i>hondoensis</i>	32	62	94
<i>Calamagrostis hakonensis</i> *	29	59	88
<i>Picris hieracioides</i> ssp. <i>japonica</i>	24	60	84
<i>Artemisia princeps</i>	29	54	83
<i>Miscanthus oligostachyus</i> *	30	52	82
<i>Aster ageratoides</i> ssp. <i>ovatus</i> *	30	35	65
<i>Clematis stans</i> *	22	20	42
<i>Anaphalis margaritacea</i>	18	16	34
<i>Senecio nemorensis</i>	15	18	33
<i>Angelica hakonensis</i>	11	17	28
<i>Hedysarum vicioides</i>	16	6	22
<i>Carex doenitzii</i>	8	6	14
<i>Fragaria nipponica</i>	1	1	2
<i>Artemisia pedunculosa</i>	0	1	1
<i>Cirsium effusum</i>	0	1	1

Each figure indicates the number of patches in which each species appeared.

* indicates the 10 predominant species in sporocarp-producing patches; five root systems of each were investigated for mycorrhizal formation.

外生菌根の形成が見られなかった。

それぞれのパッチのミヤマヤナギサイズは大きく異なり、被覆面積が0.016m²の数年生の幼木から、50 m²を越える大きなブッシュまで存在した。ミヤマヤナギは、一次遷移初期過程にある本調査地での最も主要な外生菌根菌宿主植物であるが、その総面積は502m²であり、方形区全体の1%にも満たない。

ミヤマヤナギの後から侵入する遷移樹木であるダケカンバとカラマツも、外生菌根樹

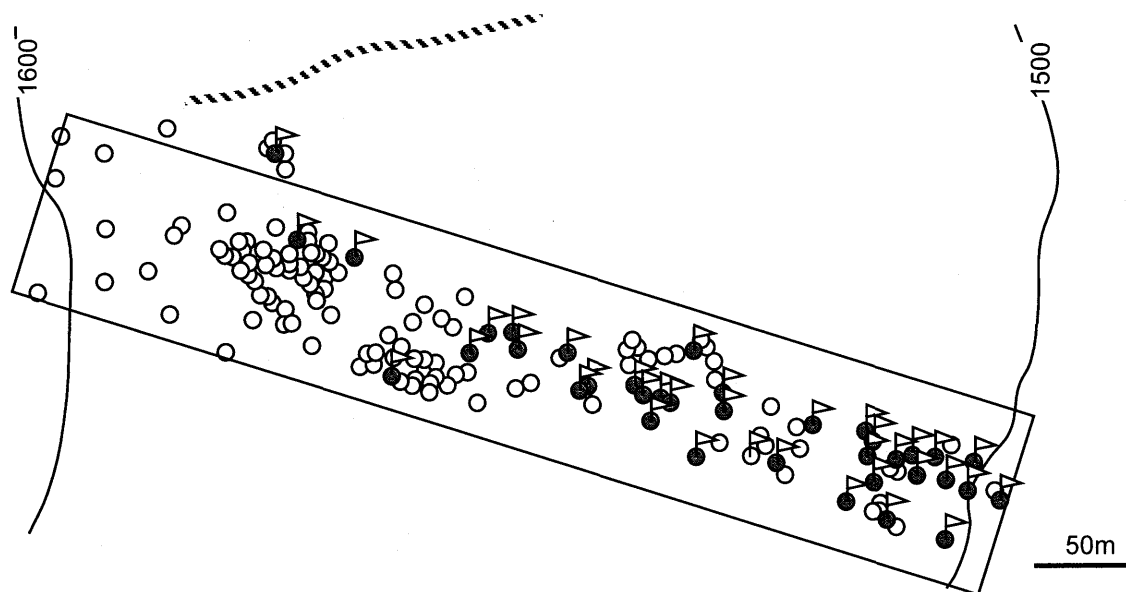


図 2-4. The spatial distribution of vegetation patches in the quadrat with reference to ectomycorrhizal symbionts.

Each circle represents a vegetation patch. Closed circles indicate vegetation patches containing *S. reinii*. The patches in which ectomycorrhizal sporocarps were recorded in 2000 or 2001 are flagged. The occurrence of ectomycorrhizal sporocarps completely coincides with the presence of *S. reinii* in vegetation patches with one exception.

種であり、それぞれ4つと3つのパッチに見られた。しかし、そのサイズは小さく、いずれもミヤマヤナギを伴っていた。ダケカンバとカラマツの総被覆面積は、 0.77m^2 と 0.85m^2 であり、合わせてもミヤマヤナギの約0.3%であった。

外生菌根性子実体

調査地に発生した子実体の種組成を見ると、フウセンタケ科 (Cortinariaceae) の種数が最も多く、12種が発生した (図 2-5, 表 2-2)。属ではアセタケ属 (*Inocybe*) の種数が最も多く、極めて発生量の低いものも含めると7種が見られた。ワカフサタケ属 (*Hebeloma*)、キツネタケ属 (*Laccaria*)、ベニタケ属 (*Russula*) は、いずれも3種が含まれ、アセタケ属に次いで種数の多い属であった。ヤマイグチ属 (*Leccinum*) はミヤマヤナギに囲まれたダケカンバ樹下から発生した。

キツネタケ (*Laccaria laccata*) の発生量が最も多く、2000年には3,955本、2001年には762本が発生した (表 2-2)。この発生本数は、それぞれの年度の菌根性キノコ総本数の43%と34%に相当する。ごく少数のキツネタケ子実体は調査期間を通して観察されたが、明らかな発生のピークが夏のごく限られた期間に見られた。2000年の例を見ると、8月19日に行った1回の調査で観察されたキツネタケの本数は、年総発生本数の90%以上にもなった (図 2-6g)。キツネタケと同様に、他のキツネタケ属菌であるウラムラサキ (*Laccaria amethystina*) とギンコタケ (*Laccaria murina*) の発生量も多く、発生のピークは夏の短期間に限定されていた (図 2-6f, h)。フウセンタケ属 (*Cortinarius*) 菌とワカフサタケ属菌も発生量が多く、主要な構成要素であったが、その発生のピークは秋の遅い時期であった (図 2-6b, c)。クロトマヤタケ (*Inocybe lacera*) とハマニセシヨウロ (*Scleroderma bovista*)

表 2-2. Ectomycorrhizal sporocarps recorded during early primary succession on Mount Fuji.

Species	2000			2001		
	Num	Patch	DW(g)	Num	Patch	DW(g)
<i>Boletus pulverulentus</i> Opat.	1	1	0.58	0	0	0
<i>Boletus</i> cf. <i>rubellus</i> Krombh.	18	6	18.99	10	2	10.55
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	5	1	0.26	0	0	0
<i>Cortinarius alboviolaceus</i> (Pers.: Fr.) Fr.	4	1	0.64	0	0	0
<i>Cortinarius decipiens</i> (Pers.: Fr.) Fr.	472	14	18.36	15	4	0.58
<i>Hebeloma leucosarx</i> Orton	27	2	14.87	15	3	8.26
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers.) Quél.	1265	20	171.18	42	10	5.68
<i>Hebeloma pusillum</i> Lange	23	4	1.95	7	1	0.59
<i>Inocybe acuta</i> Boud.	1	1	0.23	0	0	0
<i>Inocybe calospora</i> Quél.	*	*	*	60	1	1.72
<i>Inocybe dulcamara</i> (Pers.) Kumm.	95	1	31.84	41	1	13.74
<i>Inocybe fastigiata</i> (Schaeff.) Quél.	0	0	0	1	1	0.14
<i>Inocybe lacera</i> (Fr.) Kumm	435	25	14.49	171	16	5.69
<i>Inocybe</i> sp. 1	*	*	*	10	1	0.15
<i>Inocybe</i> sp. 2	31	8	0.74	28	4	0.67
<i>Laccaria amethystina</i> Cooke	1214	21	125.91	412	13	42.73
<i>Laccaria laccata</i> (Scop.: Fr.) Berk. & Br.	3955	25	123.81	762	19	23.85
<i>Laccaria murina</i> Imai	535	28	13.41	56	9	1.40
<i>Leccinum scabrum</i> (Bull.: Fr.) S.F. Gray	2	1	5.95	0	0	0
<i>Russula norvegica</i> Reid	24	5	5.01	0	0	0
<i>Russula pectinatoides</i> Peck	18	6	27.09	11	4	16.55
<i>Russula sororia</i> (Fr.) Romell	14	6	8.67	0	0	0
<i>Scleroderma bovista</i> Fr.	1063	22	2504.97	607	22	1430.40
Total	9202	38	3088.93	2248	31	1562.72

**Inocybe calospora* and *Inocybe* sp.1 were not distinguished from *I. lacera* in 2000.

Each figure in the "Num" and "DW" columns indicates the total number and the total dry weight, respectively, of sporocarps of each species in the quadrat. Each figure in the "Patch" columns indicates the total number of patches in which each species was recorded.

も、発生量の多い菌種であったが、それほど顕著な発生ピークはなく、6月から11月まで一定量以上の発生が継続する傾向にあった (図 2-6d, j)。

菌根性キノコの発生量を乾燥重量で示すと、2000年が3,089gで2001年が1,563gであった (表 2-2)。特にハマニセシウロの占める比重が大きく、2000年に2,505g、2001年に1,430gの発生量があった。この乾重量は、全ての菌根性キノコの乾重合計の81% (2000年) と92% (2001年) にあたる。重量で比較すると、他の菌種の占める割合はいずれも小さかった。

子実体のパッチ内空間分布

方形区全体で見た場合、外生菌根性子実体の発生はミヤマヤナギのある植生パッチに限られていたが、各パッチ内で見た場合、ミヤマヤナギの分布域に限らず、パッチ内全域から子実体の発生が見られた (図 2-7)。調査方形区外でミヤマヤナギから離れて子実



図2-5 Ectomycorrhizal sporocarps observed in the research quadrat.

- a: *Inocybe lacera* (クロトマヤタケ)
- b: *Inocybe calospora* (アシボソトマヤタケ)
- c: *Inocybe* sp. 1
- d: *Inocybe fastigiata* (オオキヌハダトマヤタケ)
- e: *Inocybe acuta*
- f: *Inocybe* sp. 2
- g: *Inocybe dulcamara* (ザラツキキトマヤタケ)
- h: *Laccaria amethystina* (ウラムラサキ)
- i: *Laccaria laccata* (キツネタケ)
- j: *Laccaria murina* (ギンコタケ)
- k: *Hebeloma mesophaeum* (ワカフサタケ)
- l: *Hebeloma leucosarx*
- m: *Hebeloma pusillum*

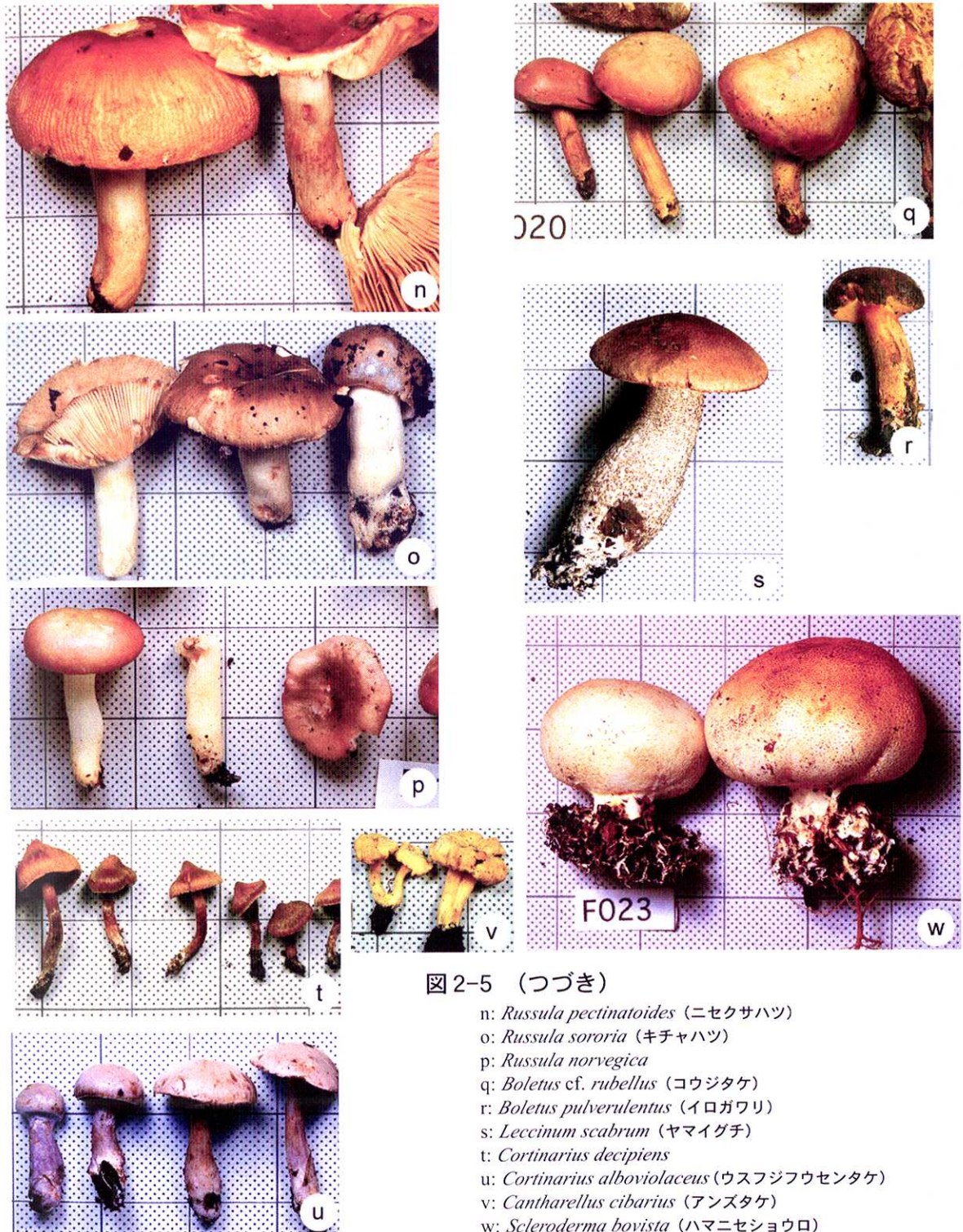


図2-5 (つづき)

- n: *Russula pectinatoides* (ニセクサハツ)
- o: *Russula sororia* (キチャハツ)
- p: *Russula norvegica*
- q: *Boletus* cf. *rubellus* (コウジタケ)
- r: *Boletus pulverulentus* (イロガワリ)
- s: *Leccinum scabrum* (ヤマイグチ)
- t: *Cortinarius decipiens*
- u: *Cortinarius alboviolaceus* (ウスフジフウセンタケ)
- v: *Cantharellus cibarius* (アンズタケ)
- w: *Scleroderma bovista* (ハマニセショウロ)

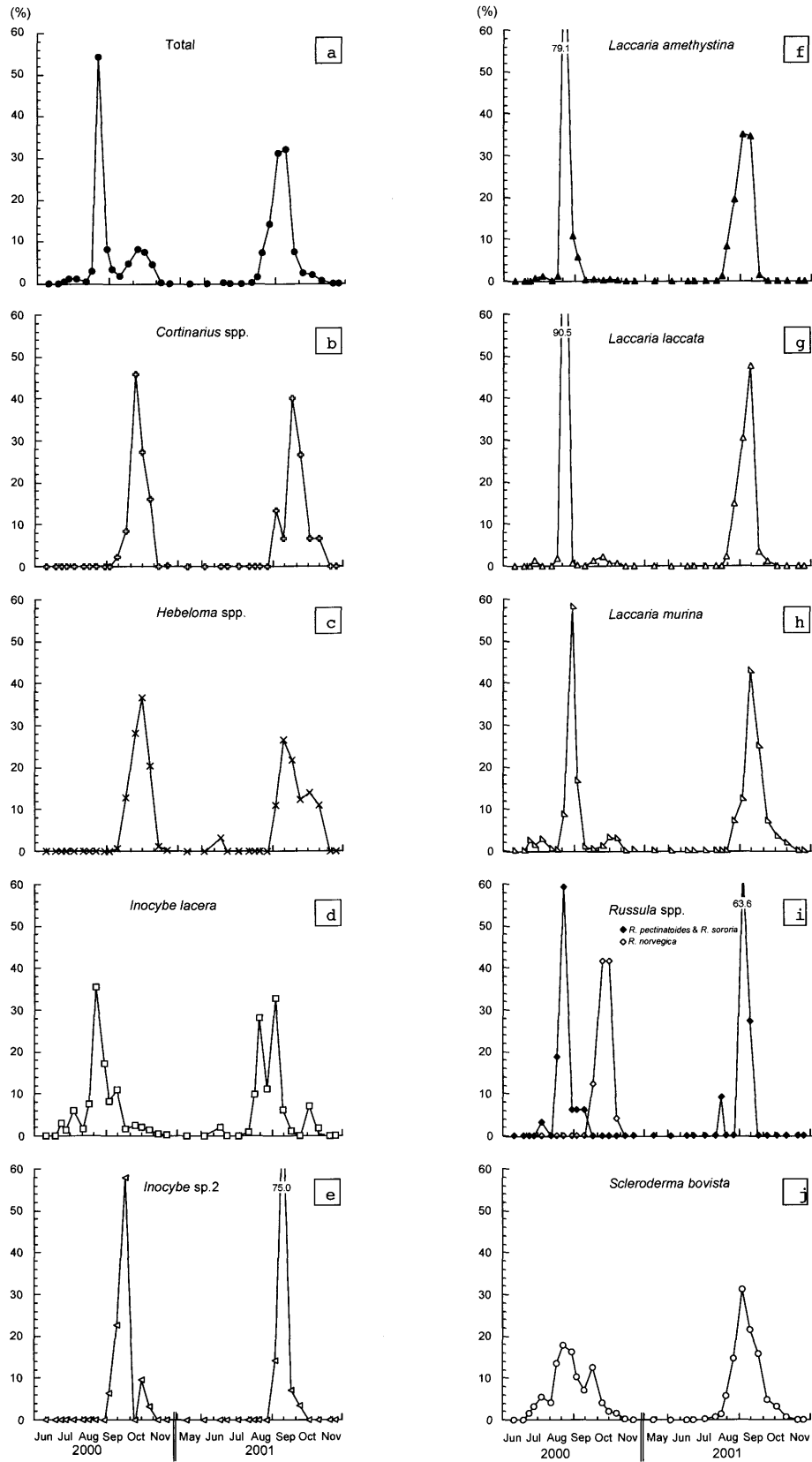


図 2-6. The seasonality of ectomycorrhizal sporocarp production.

Y axes show the proportion of sporocarps at each survey to the number of sporocarps each year. *Cortinarius* spp. include *C. decipiens* and *C. alboviolaceus*; the latter were only observed in 2000 as a minor constituent. *Inocybe lacera* includes a small number of *I. calospora* and *Inocybe* sp.2 in 2000. *Hebeloma* spp. include *H. leucosarx*, *H. mesophaeum* and *H. pusillum*.

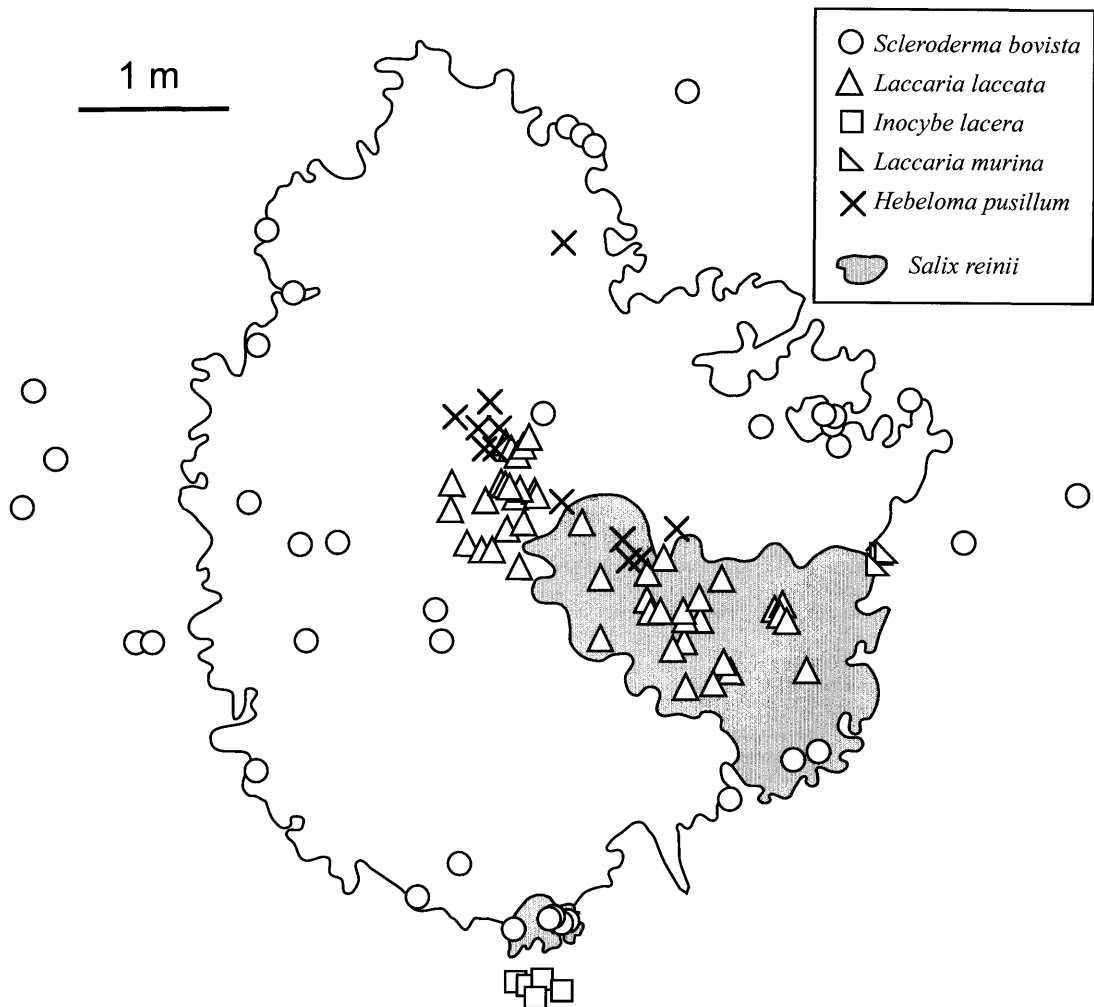


図 2-7. Spatial distribution of ectomycorrhizal sporocarps in a vegetation patch in a volcanic desert on Mt. Fuji.

体の発生した場所を掘ってみると、いずれの場合もミヤマヤナギの根系が伸びてきている。調べた限りでは、ミヤマヤナギ樹冠から最大9m離れた場所まで根が伸びているのを確認した。

パッチ内の子実体発生は、菌種によって特徴的な空間分布を示した。ハマニセショウロやクロトマヤタケ、ギンコタケは、ほとんどの場合パッチの縁上とその外側に発生したのに対し、ワカフサタケ属やフウセンタケ属、ベニタケ属の子実体は、パッチの内部にのみ見られた。キツネタケやウラムラサキは、パッチの縁にも見られたが、その大部分はパッチ内部で発生した。

宿主植物の成長に伴う外生菌根性子実体の遷移

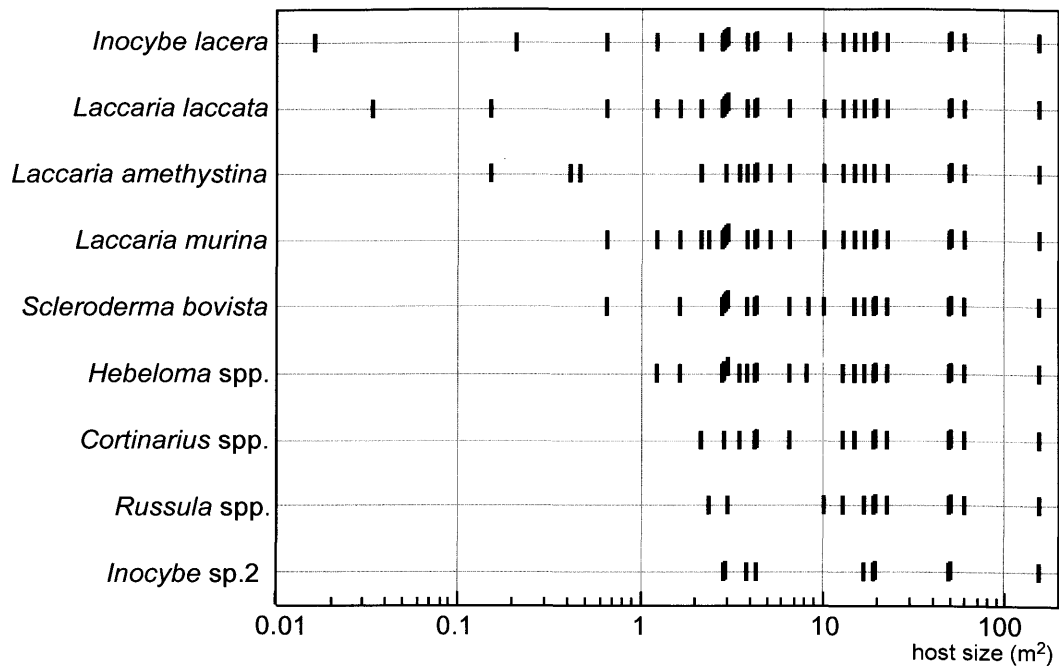


図2-8. The recruitment of ectomycorrhizal fungal species with host size enlargement.

Each mark represents sporocarp occurrence in relation to the associated host size. Only major fungal species are shown. The X axis, shown logarithmically, indicates the area covered by *S. reinii* in each vegetation patch.

宿主であるミヤマヤナギのサイズ成長に伴って、外生菌根性の子実体組成は顕著に変化した (図2-8)。パッチ内のミヤマヤナギサイズ (被覆面積) が0.5 m²より小さい6パッチに発生が見られた菌根性キノコは、クロトマヤタケ、キツネタケ、ウラムラサキのいずれか1種または2種のみであった。すなわち、ミヤマヤナギの定着後最初に見られる first-stage fungiはこの3種であった。これらの3種の first-stage fungiの子実体発生量は、ヤナギサイズの増加に伴って単調増加していた (図2-9a, b, c)。

ハマニセシヨウロとギンコタケは、ミヤマヤナギのサイズが0.6 m²を越えるようになって初めて観察された (図2-8)。これら2種の発生するパッチでは、first-stage fungiの子実体も併せて出現した。つまり、この2種の菌は first-stage fungiの後に侵入した second-stage fungiであることが示唆された。この2種の子実体発生量も、ヤナギサイズの増加とともに単調増加した (図2-9d, e)。

更にミヤマヤナギが成長し、大きなサイズとなったパッチからは、ワカフサタケ属 (1.2 m²以上) やフウセンタケ属 (2.1 m²以上)、ベニタケ属 (2.4 m²以上) の子実体が発生した (図2-8)。これらの子実体が発生するパッチには、first-stage fungiと second-stage fungiの子実体もみられた。このことから、ワカフサタケ属やフウセンタケ属、ベニタケ属は、一次遷移の初期過程にあるこの火山荒原の菌根菌遷移系列において、late-stage fungiであることが示唆された。これらの子実体発生量も、ミヤマヤナギのサイズとともに増加した (図2-9f, g, h)。

以上のように、宿主の成長に従って、最初は単純であった菌根菌群集に新たな菌種が

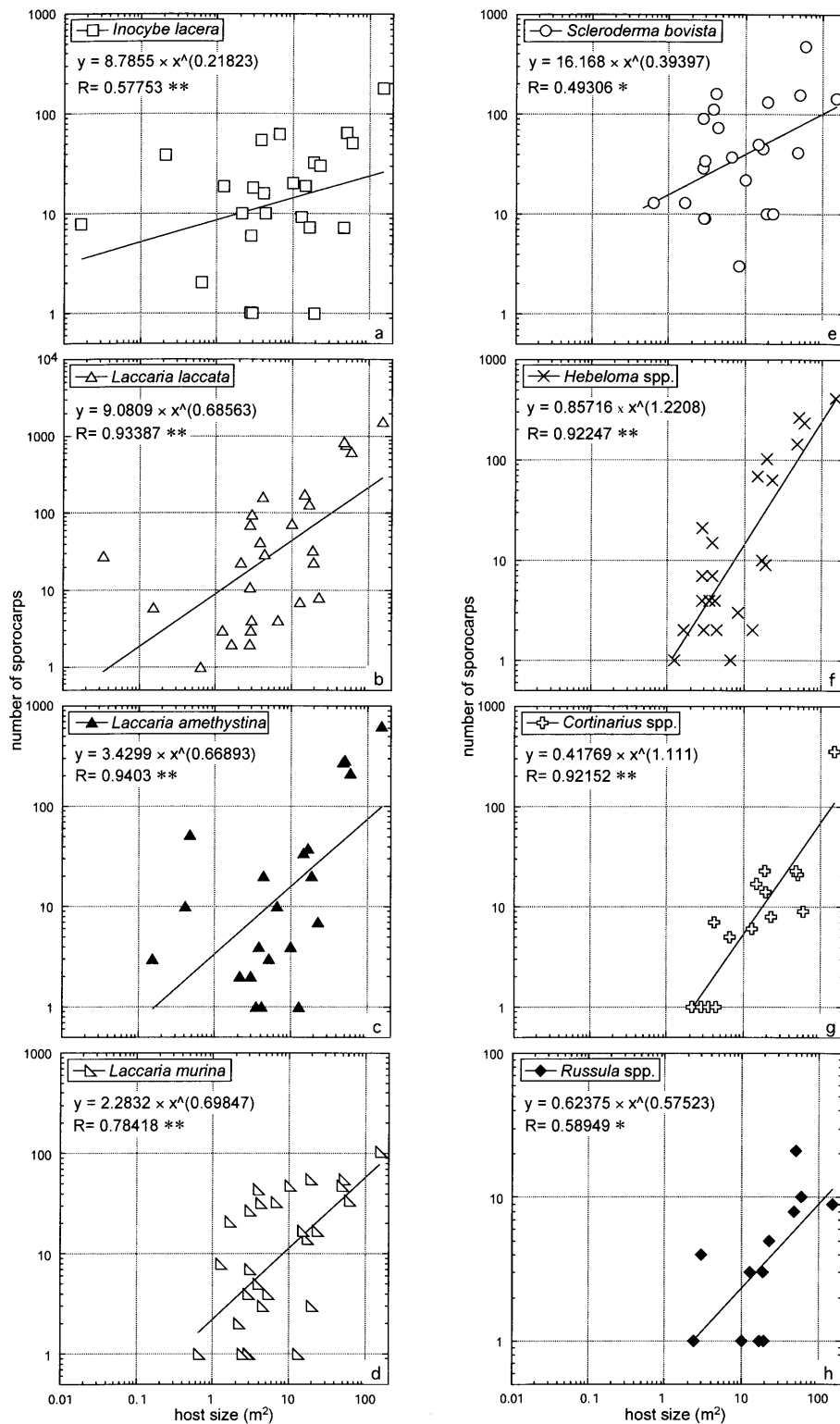


Fig 2-9. The number of sporocarps of each ectomycorrhizal fungal taxon in relation to host size.

The X axis, shown logarithmically, indicates the area covered by *S. reinii* in each vegetation patch. The Y axis represents the total number of sporocarps on each species recorded in each vegetation patch in 2000 and 2001. The R values followed by * and ** indicate significant correlation at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

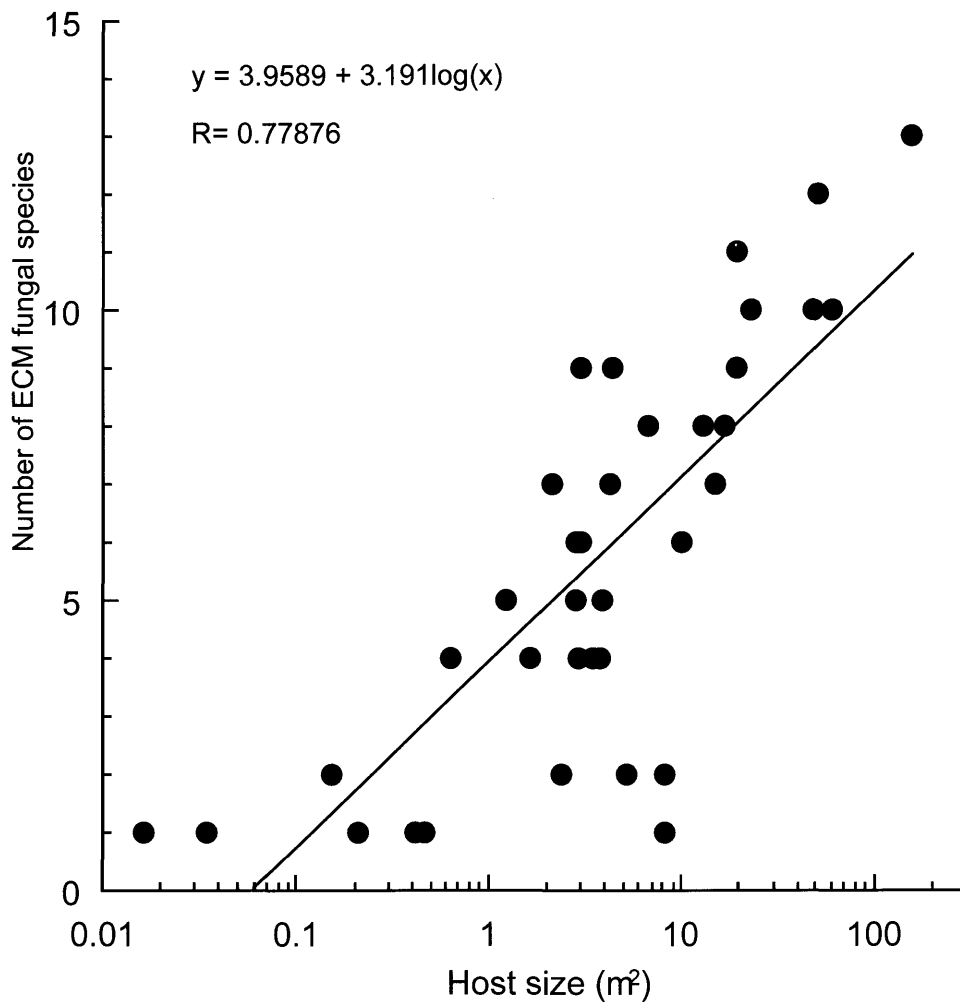


図2-10. The number of ectomycorrhizal species in relation to the associated host size. The X axis, shown logarithmically, indicates the area covered by *S. reirii* in each vegetation patch. The Y axis represents the number of confirmed ectomycorrhizal species in each vegetation patch in 2000 and 2001. The correlation is statistically significant ($P < 0.01$).

次々と加わることにより、菌根菌の種数は増加した（図2-10）。もっとも大きいミヤマヤナギからは13種の外生菌根菌の子実体が見られた。

宿主の生育状況と関係した外生菌根性子実体発生量

一つの植生パッチあたりの外生菌根菌子実体発生重量は、2年間の合計で0.27g～1,208g (dry weight)であった。方形区内の全ての宿主を見た場合、ホストサイズと子実体重量の間には、有意な正の相関が見られた（図2-11）。しかし、中サイズ（2 - 10 m² in coverage）のミヤマヤナギの菌根性子実体生産量には大きなばらつきがあり、発生量が50gを越える生産的な宿主が多かったものの、発生量が1gにも満たない非常に非生産的な宿主も含まれていた。

こうした中サイズクラスで見られた子実体発生量の大きな差異の原因を明らかにするため、9つのパッチを選んで詳しく調査した。選んだ9つの中サイズクラスのミヤマヤナギの菌根性子実体生産量（2000年）は0.41g～264gであった。

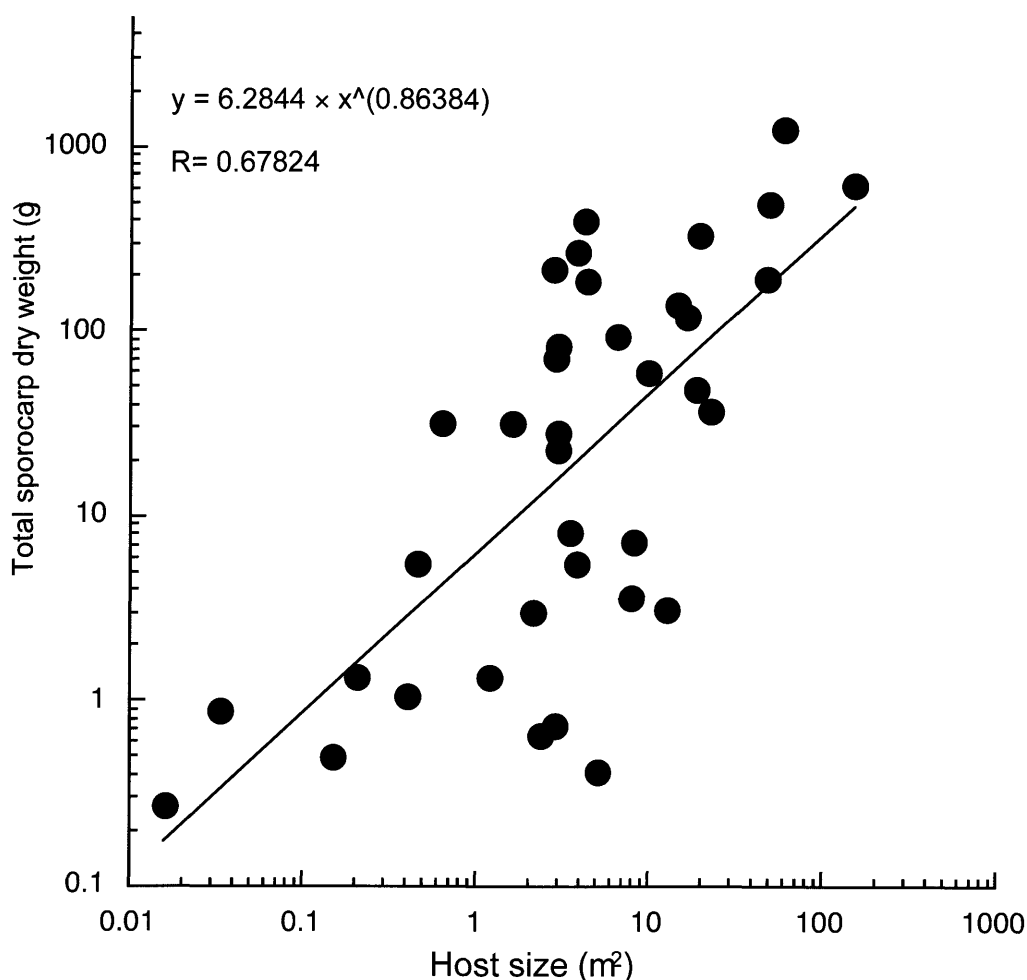


図2-11. The biomass production of ectomycorrhizal sporocarps in relation to associated host size.

The X axis, shown logarithmically, indicates the area covered by *S. reinii* in each patch. The Y axis, shown logarithmically, represents the total ectomycorrhizal sporocarp biomass produced in each vegetation patch in 2000 and 2001. The correlation is statistically significant ($P < 0.01$).

選んだ9パッチの中では、宿主のサイズ（被覆面積）と子実体生産量の間には有意な相関が見られなかった（表2-3）。また、菌根性子実体について非生産的なホストの根系も高い菌根形成率を示しており、生産的なホストと非生産的なホストの菌根形成率に有意な差はなかった。

菌根性子実体に関して最も生産的であったミヤマヤナギ（No.84パッチ）は2000年に264gの菌根性子実体を生産したが、この生産量はこのミヤマヤナギの全葉量の19%（乾重比較）に相当する量であった。No.120とNo.61のパッチも、宿主葉量の9%と8%に相当する量の菌根性キノコがそれぞれ発生した。これに対して、最も非生産的であったミヤマヤナギからは0.41g、すなわち宿主全葉量の0.1%に相当する量しか菌根性キノコが発生しなかった。この葉量と子実体生産量との比率は、最も大きいものと小さいもので140倍の開きがあった。

宿主の全葉量、当年枝長、当年枝上の冬芽数は、子実体発生量と有意な相関が見られ

表 2-3. Ectomycorrhizal sporocarp production in relation to various host growth parameters.

Patch No.	Sporocarp biomass (g)	Host size (m ²)	Leaf biomass (kg/patch)	Photosynthesis (x 10 ⁻³ μmol CO ₂ /s/g leaf DW)	Current year shoot (CYS) (cm)	Winter bud Number (/CYS)	Leaf N concentration (%)	Leaf P concentration (%)	Mycorrhizal formation (% root tips)	Mycorrhizal sporocarps in 2000
84	264.06	4.39	1.39	217 ± 9 a	24.5 ± 2.6 a	20.4 ± 2.3 a	2.9 ± 0.1 a	0.19 ± 0.01 ab	67.8 ± 4.8 a	Sb(109) L(192) I(15) H(4) C(7)
61	142.72	3.87	1.82	176 ± 10 ab	27.7 ± 1.2 a	18.2 ± 0.7 a	2.5 ± 0.2 abc	0.20 ± 0.02 a	73.2 ± 4.9 a	Sb(60) L(10) H(7)
120	92.15	4.31	1.04	196 ± 13 ab	11.4 ± 0.6 bc	10.4 ± 0.8 bc	2.7 ± 0.2 ab	0.16 ± 0.00 abc	67.2 ± 6.0 a	Sb(36) L(16) I(1) C(1)
136	43.53	10.30	4.32	158 ± 5 bc	14.2 ± 0.6 b	14.6 ± 1.0 ab	2.5 ± 0.1 abc	0.15 ± 0.01 bcd	54.1 ± 8.0 ab	Sb(16) L(120) I(19) R(1)
104	8.24	2.79	0.48	106 ± 2 d	6.1 ± 0.7 cd	6.8 ± 1.0 cd	2.0 ± 0.1 d	0.11 ± 0.00 cd	42.0 ± 10.9 ab	Sb(3) L(4) B(1)
113	8.03	3.45	0.60	91 ± 11 d	6.5 ± 1.1 cd	5.8 ± 0.6 cd	1.8 ± 0.1 d	0.11 ± 0.00 cd	59.3 ± 8.7 ab	L(1) H(4) B(7)
111	0.64	3.15	0.07	109 ± 13 cd	5.0 ± 0.9 cd	7.6 ± 1.1 cd	2.1 ± 0.1 bc	0.12 ± 0.01 cd	59.4 ± 2.6 ab	L(1) I(1) H(4) C(1)
112	0.64	2.63	0.04	90 ± 7 d	2.7 ± 0.4 d	4.2 ± 0.4 d	2.0 ± 0.1 d	0.12 ± 0.00 cd	54.1 ± 6.8 ab	L(1) R(1)
143	0.41	8.67	0.30	82 ± 6 d	3.0 ± 0.5 d	3.2 ± 0.8 d	2.0 ± 0.1 d	0.10 ± 0.01 d	28.7 ± 6.4 b	H(3)
r _s		0.301	0.812*	0.912*	0.921*	0.912*	0.689	0.833*	0.735	

Each figure in columns 5 through 10 indicates a mean ± s.e.m. Figures followed by different letters within a column are statistically different by Tukey's HSD test (P < 0.01).

r_s is the Spearman's rank correlation coefficient paired with sporocarp biomass. * indicates a significant correlation at P < 0.01.

Abbreviations for the mycorrhizal fungi are as follows: B; *Boletus cf. rubellus*, C; *Cortinarius* spp., H; *Hebeloma* spp., I; *Inocybe* spp., L; *Laccaria* spp., R; *Russula* spp., Sb; *Scleroderma bovista*.

た (表 2-3, P < 0.01)。

ミヤマヤナギの葉内N濃度は 1.8 ± 0.1% から 2.9 ± 0.1% の範囲にあり、菌根性子実体の生産量が多かったミヤマヤナギほど高く、生産量の低いものほど低いという傾向が見られた (表 2-3)。葉内P濃度については、0.10 ± 0.01% から 0.20 ± 0.02% の範囲にあり、N同様に菌根性子実体の生産量が多かったミヤマヤナギほど高かった (表 2-3)。

ミヤマヤナギの光合成速度は 0.082 ± 0.006 ~ 0.217 ± 0.009 μmol CO₂ s⁻¹ g⁻¹ leaf dry weight であり、子実体生産量の多かった宿主ほど大きな値を示した (表 2-3)。それに加え、子実体生産量と宿主の光合成速度との間には、高い相関が見られた (表 2-3)。

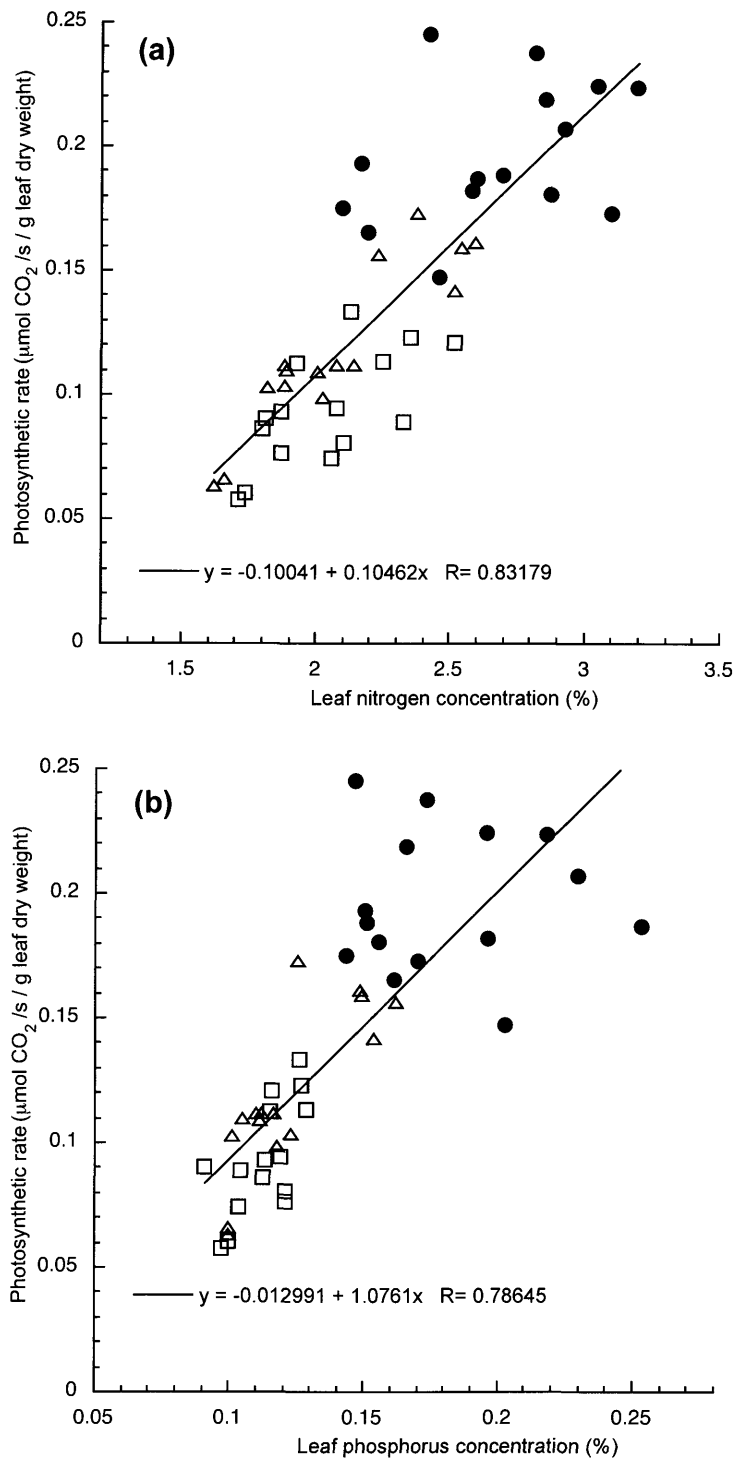
ミヤマヤナギのそれぞれの葉の光合成速度と葉内N濃度の相関関係を図 2-12a に示した。葉内N濃度の増加とともに光合成速度は線形的に増加し、その相関関係は統計的に有意であった。また、葉内P濃度と光合成の関係を見ても、同様な正の相関関係が認められた (図 2-12b)。

子実体生産量の多いパッチとそうでないパッチを比べると、菌種組成にも明らかな違いが認められた (表 2-3)。例えば、ハマニセショウロは子実体生産性の高いパッチにのみ見られた。一方、生産性の低いパッチでは子実体の総数が少ないものの、ワカフサタケが比較的高頻度に見られた。

考察

一次遷移初期過程における外生菌根性子実体の群集構造

富士山の一次遷移初期過程にあるこの試験地では、高山矮性ヤナギであるミヤマヤナギが外生菌根菌の宿主として圧倒的に優占していた。ミヤマヤナギは、富士山の他の斜面では 3000m 近くまで分布しているが、この南東斜面の火山荒原では方形区を設置した 1600m より上には見られない。大規模な攪乱によって裸地が形成



2-12. The relationships between photosynthetic rate and the concentration of leaf nitrogen (a) and phosphorus (b) of *S. reinii* with reference to the production of associated ectomycorrhizal sporocarps.

Closed circles indicate leaves collected from patches in which ectomycorrhizal sporocarp production was relatively high, open triangles indicate those from patches with middle productivity, and open squares indicate those from unproductive patches. The R values in (a) and (b) indicate statistically significant correlation ($P < 0.01$).

されると、より標高の高い位置に見られる種が先駆植物として侵入することが知られている (Odum 1971)。この試験地で優占する多くの植物は、ミヤマヤナギ同様に高い標高に見られる種である。

宿主植物としては、ミヤマヤナギ以外にもカラマツとダケカンバが見られた。しかし、ミヤマヤナギに比べてその被覆面積は圧倒的に小さく、両方の樹種を合わせても方形区の0.003%であり、ミヤマヤナギの300分の1にも満たない。つまり、発生した子実体のほとんどはミヤマヤナギによって生産されたものであるといえる。

子実体調査によって外生菌根菌群集構造を正確に推定しようとした場合、少なくとも毎週調査を行うことが必要であると考えられている (Vogt *et al.* 1992)。本研究でも、ほとんどの菌種は明確な季節性を持っており、たった一回の調査で得られた子実体はその種の年生産量のほとんどを占めることが多かった。また、長期間の子実体調査も群集構造の正確な推定には必要であるといわれている (Vogt *et al.* 1992)。しかし、これについては気象条件によって大きく左右されるものと思われる。本試験地は降水量が多いため、子実体の形成にとって好条件であるといえる。事実、2年間の調査であったが、2年目で見られた2248本の子実体のうち2247本は1年目に記録された種であった。つまり、2年でもこの場所の菌根菌子実体群集を推定する上で十分であると考えることができる。

一次遷移の初期状態にある場所は、アクセスが難しいことが多い上、子実体の発生量も著しく少ないと考えられてきたため、菌類生態学者の調査対象となることはほとんどなかった。数少ない調査に基づく記載的な研究は氷河跡地で行われているが (Jumpponen *et al.* 1999, 2002)、定量的な研究はこれまでに例がない。今回得られた定量的な子実体発生量のデータはそれ自体で非常に価値のあるものといえる。

フウセンタケ属やワカフサタケ属、アセタケ属、キツネタケ属、ベニタケ属といった外生菌根菌は、高山帯や極地方の矮性ヤナギ群集で優占する菌類である (Graf 1994, Gardes & Dahlberg 1996)。また、これらの属は、ヨーロッパに広く分布する *Salix repens* の林でも優占することが知られている (van der Heijden *et al.* 1999)。今回の調査でもこれらの属に属する子実体が多数見られたことから、ヤナギ属樹木の外生菌根菌群集には少なからず類似性があるものと思われる。一方、ハマニセシヨウロはこうした他のヤナギからはほとんど記録されていないが、今回の調査では全外生菌根性キノコの本数比で14.6%、重量比で84.6%を占めていた。通常、ニセシヨウロ属 (*Scleroderma*) の子実体は攪乱地や未熟な土壌で見られる (Ingreby *et al.* 1985)。富士山火山荒原でのハマニセシヨウロの優占は、一次遷移の初期過程という環境が影響しているものと考えられる。

本章では、子実体発生をもとに一次遷移初期過程での外生菌根菌群集構造を推定した。子実体の存在は地下にある外生菌根の存在を証明するものであるが、その逆は必ずしも真ではない。これまでに多くの森林で調べられてきた例では、地上部の子実体群集と地下部の菌根群集との間には大きな差があることが分かっている (e.g. Horton & Bruns 2001)。確かにこの章で得られた外生菌根菌群集は地下部の群集構造を直接反映するものではないかもしれない。しかし、地下部の外生菌根菌を同定するためには、子実体と菌根とのDNA比較が必要不可欠である。つまり、得られた子実体群集のデータとそのサンプルは、地下部の菌根菌群集を調べる上でも、重要な手がかりとなるものと考えられる (第3章)。

外生菌根性子実体の一次遷移系列

外生菌根性キノコは、植生パッチの内部と、パッチ周辺の狭い範囲にのみ発生した。植生パッチは火山荒原上に疎らに点在しており、空間的に互いに隔てられている。つまり、発生した個々の菌根性キノコの宿主個体を簡単に特定できるという、通常の森林では見られない独特な環境にある。本研究の調査地では、外生菌根菌の宿主として、ミヤマヤナギが圧倒的に優占していた。ミヤマヤナギは植生パッチの一部に定着した後、匍匐形の成長型を示し、年々被覆面積を拡大していく (Lian *et al.* 2003)。つまり、ミヤマヤナギの被覆面積は、その発達段階を示す指標であると同時に、最初の定着からどれくらい経過しているかを示す指標であるとも考えることができる。いずれにせよ、調査地のこうした特殊な条件によって、単一宿主の成長段階に伴う外生菌根菌の遷移について新たな知見が得られた。

本研究によって富士山火山荒原の外生菌根性子実体は次のような遷移系列をたどることが明らかにされた。ミヤマヤナギの定着直後は、first-stage fungi (クロトマヤタケ、キツネタケ、ウラムラサキ) のいずれかの種が発生する。ミヤマヤナギの成長とともに first-stage fungi の子実体は1種から複数種になり、やがて second-stage fungi (ハマニセシヨウロ、ギンコタケ) が新しく加わる。更に大きくなったヤナギからは late-stage fungi (ワカフサタケ属、フウセンタケ属、ベニタケ属など) の子実体も出現するようになる。子実体の空間分布を見ると、second-stage fungi はパッチの周辺から外側に多く見られ、late-stage fungi はパッチの内部にしか見られない。パッチの内部はリターの堆積が見られ、土壌中の有機物やNがパッチ外部に比べて多くなることが知られている (Tateno & Hirose 1987)。外生菌根菌の子実体遷移は、ミヤマヤナギの成長に伴って起こる土壌の発達や土壌条件の多様化によって進行するものと考えられる。

小さなミヤマヤナギに second-stage fungi や late-stage fungi が見られないことは、ここで示した外生菌根性子実体の遷移によって説明することができる。しかし、小さなミヤマヤナギの総面積は大きいサイズのミヤマヤナギに比べて著しく小さいために、発生量の比較的少ない後遷移菌が見られなかった可能性を考える必要がある。そこで帰無仮説「それぞれの菌は宿主のサイズとは関係なく空間的に均一に分布している。」をたてて、それを検定してみた。この仮説に基づくと、ある菌の一つの子実体が小さい宿主 (その菌種が出現した最も小さい宿主より小さい宿主) に見られない確率は $(1 - A_s/A_T)^N$ で表すことができる (A_s は小さい宿主の被覆面積合計、 A_T は全部の宿主の被覆面積合計)。その菌種の試験地全体での発生量を N とすると、 N すべてが小さい宿主のいずれにも出現しない確率は次の式で表すことができる。

$$P_{\text{species}} = (1 - A_s/A_T)^N$$

$P_{L. murina}$ (0.22) と $P_{Russula \text{ spp.}}$ (0.39) は 0.05 より高いが、 $P_{Cortinarius \text{ spp.}}$ 、 $P_{Hebeloma \text{ spp.}}$ と $P_{S. bovista}$ はそれぞれ 0.0090, 0.0048 と 0.014 であり、いずれも 0.05 より低く 0.05% の危険率で帰無仮説を棄却できる。つまり、少なくともフウセンタケ属やワカフサタケ属、ハマニセシヨウロが小さいパッチで見られないのは、単にサンプリング面積が小さいからというわけではないと考えられる。

また、それぞれの菌種 (あるいは分類群) の子実体発生量は、ミヤマヤナギの成長に伴って減少することはなく、単調に増加した。図 2-9 に示したいずれの菌においても、ミ

ヤマヤナギのサイズと子実体の発生量の相関関係は有意であった ($P < 0.05$)。この図の回帰直線が $y = 1$ の直線と交わる x の値は、それぞれの菌の子実体が最初に現れることが予想される宿主サイズ (A_E) と考えることができる。この値を各菌の遷移系列順に見てみると、クロトマヤタケが 0.000 m^2 、キツネタケが 0.040 m^2 、ウラムラサキが 0.158 m^2 、ギンコタケが 0.307 m^2 、ハマニセシヨウロが 0.001 m^2 、ワカフサタケ属菌が 1.135 m^2 、フウセンタケ属菌が 2.194 m^2 、ベニタケ属菌が 2.272 m^2 であった。つまり、ハマニセシヨウロを除くと、second-stagi fungi は first-stage fungi よりも A_E が大きく、この両方よりも late-stage fungi の A_E が大きい値であり、 A_E は遷移系列順であることが分かる。こうした A_E による解析からも、上述した外生菌根菌の遷移モデルの正当性が裏付けられたものと考えられる。

一次遷移の初期で見られた外生菌根性子実体の遷移過程では、後から新しい菌が加わることによって菌種が増加していくのみで、前に定着した菌が新しい菌へと置き換わりすることはなかった。それどころか、主要な菌種のいずれの子実体も、ミヤマヤナギのサイズ成長に伴って、単調に増加する傾向が見られた。二次遷移地における菌根性キノコの遷移に関する研究では、前に定着した菌の子実体発生が減少したり無くなることにより、新しい菌種に置き換わることが多数報告されており (e.g. Last *et al.* 1984)、外生菌根菌の遷移モデルとして多くの支持を得てきた。一方、一次遷移過程における外生菌根菌の遷移については定量的な研究例が他に無いものの、菌種の置き換わりが見られないことは Jumpponen *et al.* (2002) も言及している。二次遷移地における菌の置き換わりがどのような機構で起こるのかは明らかではないが、外生菌根菌同士の競合が要因として考えられる (Wu *et al.* 1999)。一次遷移の初期過程では、広大な火山荒原の多くの部分は植物が定着していない菌根菌未開の地である上、外からの胞子供給も限られていることもあり、外生菌根菌同士の競合がそれほど厳しいものではないのであろう。

一次遷移初期過程における外生菌根性子実体の生産量

2000年における単位宿主面積あたりの菌根性キノコ生産量は乾重で 61.5 kg/ha であった。この数字を最も生産性の高いミヤマヤナギのみで計算すると 633 kg/ha になる。一次遷移の初期過程において、子実体生産量を調べた例は他に無く、本研究のこうした数値と比較することができない。しかし、高山性の矮性ヤナギの菌根性キノコ生産量は、 $0.004 - 0.021 \text{ kg/ha}$ と報告されており (Senn-Irlet 1993)、本研究で得られた値より遙かに小さい。菌根性キノコの実産量については、矮性ヤナギとは比較にならないほど大きな宿主バイオマスをもつ温帯林において、豊富な研究例がある。菌根性キノコの年生産量は、Scots pine 林で $0.014 - 6.8 \text{ kg/ha}$ 、トウヒ林で $0.02 - 15 \text{ kg/ha}$ 、Pacific silver fir 林で $23 - 24 \text{ kg/ha}$ と記録されている (Vogt *et al.* 1992)。本研究で得られた一次遷移初期過程における菌根性子実体の生産量は、こうした温帯林と比べても非常に多いことが分かる。この要因として、年間 $5,000 \text{ mm}$ 近い降水量、通気性と保湿性に富むスコリア基質、有機質が少ないことによる腐生菌との少ない競合などが考えられる。また、林地への窒素添加試験などによって細根量が減少すること (Kårén & Nylund 1997)、多くの菌根菌の子実体発生量が減少することなども明らかにされている (e.g. Peter *et al.* 2001)。このことから、一次遷移初期での極めて貧栄養な土壌において、宿主がより多くの光合成産物を地下部に転流す

ることにより豊富な菌根性子実体発生に繋がった可能性がある。

火山荒原の一次遷移初期では、外部からの菌根性胞子の供給が少ないばかりか (Allen *et al.* 1992)、林地から運ばれる胞子には過酷な環境に耐えられない菌種や先駆植物に感染しない菌種が多く含まれるであろう。一次遷移初期の環境に適応し先駆植物にも親和性がある菌種が現地でこれだけ大量の子実体を生産することは、この場所への胞子供給とそれに続く菌根形成に大きな影響を及ぼすものと考えられる。

子実体の生産とホストの生育状態を詳しく調べた9つのパッチの中で最も子実体生産量の多かった宿主は、264 g (dry weight) の菌根性キノコを生産した。これは、この宿主の総葉量の19%に相当する。葉量と子実体発生量の関係が調べられた例は少ないが、23年生と180年生の *Abies amabilis* 林では葉量の0.2%と0.1%にあたる量の子実体が発生しており (Vogt *et al.* 1982)、19%よりも遙かに小さい。しかし、地下部の菌糸や外生菌根の菌鞘など菌バイオマス量は子実体よりも遙かに大きいのに加え、その回転率も高いことから (Fogel & Hunt 1979, Vogt *et al.* 1982)、外生菌根菌がそうした森林の炭素や養分循環に占める割合は大きいと考えられている (Vogt *et al.* 1982)。本研究によって明らかにされた一次遷移初期での高い子実体生産量は、この生態系の中での物質循環にしろめる外生菌根菌の比率が考えられてきた以上に大きなものであることを示唆する。

宿主の単位葉量あたりの光合成速度と外生菌根菌の子実体生産量とは、非常に高い相関を示した。これまでに、*in vitro* でのウラムラサキの子実体発生は、子実体形成時点の宿主の光合成産物に依存しており、宿主を摘葉すると子実体の発達が直ちに停止することが知られている (Lamhamedi *et al.* 1994)。また、フィールドにおいても、宿主の摘葉や樹皮剥離試験によって地下部への炭水化物の転流を遮断すると、菌根性子実体の発生が著しく減少することが示されている (Last *et al.* 1979, Högberg *et al.* 2001)。今回得られた結果は、一次遷移の初期においても、菌根性子実体の発生は宿主の光合成活性によって決定されることを示していると考えられる。

光合成活性の低い宿主と高い宿主とでは、宿主の子実体発生量だけでなく、発生する子実体の種構成が大きく異なっていた。このことは、宿主の光合成活性が、共生する外生菌根菌の群集構造に大きな影響を及ぼすことを意味するのかもしれない。例えば、ハマニセショウロは光合成活性の高い宿主では優占種としてみられたが、光合成活性の低い宿主からはほとんど発生しなかった。ハマニセショウロの発生する場所は、主にパッチの周辺部やその外側であり、リターが無く土壤中の有機質が極めて少ない場所であることから、腐生的な炭水化物の利用はほとんど無いものと考えられる。また、ハマニセショウロの子実体は他の子実体に比べて一個あたりの重量が大きく (乾重比でキツネタケの75倍)、子実体形成には大量の光合成産物を必要とする。つまり、光合成活性の低い宿主でハマニセショウロが見られないのは、子実体形成に必要な大量の光合成産物を十分供給できなかったためであると考えられる。これに対し、光合成活性の低かった宿主では、子実体の数が少ないものの、ワカフサタケやコウジタケ (*Boletus cf. rubellus*) が優占していた。こうした菌はパッチ内部の比較的腐植に富む場所から発生することから、宿主から供給される光合成産物以外の炭水化物を利用できるのかもしれない。

宿主の光合成活性は葉内N、P濃度の増加とともに上昇し、光合成と葉内養分濃度の間には高い相関が見られた。豊富な降水量、温暖な気候、十分な日射量といったこの場

第二章 菌根性キノコの一次遷移

所の気象条件を考えると、植物体のN、P状態が光合成活性を決定する主要な要因であることが推測できる。そして高いN、P濃度を持つ葉は、いずれも菌根性子実体の発生量が多かった宿主から採取したものであった。こうした結果から考えると、外生菌根菌からの養分供給は宿主の高い光合成を維持する上で必要であり、また逆に、宿主からの十分な光合成産物の供給が外生菌根菌の活動に必要であると言えよう。こうした菌根菌と宿主の間のやりとりの「大きさ」が互いの活性を決める要因となり、その結果、子実体生産「量」という一つの表現型として具象化したのであろう。

第3章 富士山の一次遷移初期過程における地下部外生菌根菌群集の構造と遷移

はじめに

外生菌根菌の遷移については、主に二次遷移地において研究されてきた。山火事跡地などの二次遷移地では、攪乱前に定着していた菌の孢子バンクや残存する菌根、あるいは焼け残った植物に共生する菌根菌菌糸などによって攪乱後の菌根形成が始まること示されている (Baar *et al.* 1999, Taylor & Bruns 1999, Grogan *et al.* 2000)。一方、そのような感染源は一次遷移の初期過程では存在しない。そのため、一次遷移地における外生菌根菌の群集構造やその遷移過程は、二次遷移地とは全く異なることが考えられる。残念ながら、一次遷移初期過程における外生菌根菌の群集構造や遷移過程については、研究例が少なく、ほとんど何も分かっていなかった。

富士山の南東斜面は、1707年の宝永大噴火の影響で、現在も一次遷移の初期過程にある火山荒原が広がる。前章で示したように、この場所で外生菌根菌の子実体調査を行い、2年間で23種11,450本の菌根性子実体の発生を記録した。そのほとんど全てはミヤマヤナギと共生して発生したものであり、ミヤマヤナギの成長段階にしたがって明確な遷移パターンが見られた。ミヤマヤナギの定着初期にはクロトマヤタケ、キツネタケ、ウラムラサキといった3種のfirst-stage fungiのいずれかが共生する。ミヤマヤナギの成長とともに、first-stage fungi同士が組合わさったり、second-stage fungiであるギンコタケやハマニセショウロが新たに加わる。さらにミヤマヤナギが大きく発達すると、ワカフサタケ属やフウセンタケ属、ベニタケ属などのlate-stage fungiが出現するようになる。こうした子実体調査によって、一次遷移の初期過程における菌根菌群集を初めて定量的に示すとともに、その遷移過程を明らかにしたが、この場所での地下部菌根菌群集に関する知見は得られていない。

すでに何人かの研究者が一次遷移初期過程における地下部菌根菌群集を対象にして研究を行っている。Helm *et al.* (1996) は、氷河跡地の植生遷移段階に沿って地下部菌根菌群集を調べている。その結果、遷移段階によって先駆樹種実生の菌根形態タイプが異なることが示されている。より破壊的な攪乱である大規模噴火は広大な面積の火山荒原を作出する。Allen *et al.* (1992) は、セントヘレンズ山の噴火から数年後に、いくつかの外生菌根樹種が定着して菌根を形成していると記載している。また、Yang *et al.* (1998) は、駒ヶ岳のカラマツの菌根形態をいくつかの遷移段階で調べている。この場所のカラマツは、既に定着したヤナギ類を追いやるようにして侵入する樹種であるため、外生菌根菌の一次遷移最初の段階が調べられたわけではないが、カラマツの外生菌根形成と菌根形態タイプ組成はリターの蓄積や火山灰の厚さ、噴出物の粒径といった土壌条件によって影響されることが示されている。

こうした一次遷移地の地下部菌根菌群集に関するこれまでの研究は全て、菌根の形態に基づいて行われたものである。確かに詳細な菌根形態観察は、菌の種をある程度区別

できる。しかし、菌根の形態分類は土壤条件や菌根の発達段階、あるいは観察者の熟練度によって大きく左右される。さらに、一つの形態タイプには何種もの近縁種が含まれることも多いのに加え、形態による「区別」だけでは種の「同定」がほとんどの場合できない。そのため、菌根形態タイプに基づく研究においては、ほとんどの菌種は未同定菌として記載されるにとどまっている。

近年の分子生物学的手法の発展により、地下部菌根の菌種を同定するのにも様々な分子同定手法が使われるようになった。中でも、核リボゾーム DNA の ITS (internal transcribed spacer) 領域を用いた制限断片長多型解析 (RFLP) は最もよく使われる (e.g. Horton & Bruns 2001)。また、更に最近では、DNA シーケンサーを用いた電気泳導による ITS 末端断片の RFLP (ITS terminal RFLP) が菌種同定に使われるようになった (Dickie *et al.* 2002, Zhou & Hogetsu 2002)。一方、ITS 領域にはかなりの種内変異があることが多くの種で示されている (Kårén *et al.* 1997)。これは、ITS 領域を用いて菌種を同定しようとした場合、各調査地における外生菌根菌の種内変異を考慮する必要があることを意味する。しかし、このようなアプローチは地下部菌根菌群集の研究においてほとんど行われてこなかった。

本章では、富士山火山荒原における地下部外生菌根菌の群集構造とその一次遷移過程を調べた。菌種の同定には、出現した全ての菌種の種内変異をも考慮し、これまでの分子生物学的手法をさらに発展させた。ミヤマヤナギの発達段階に伴う地下部外生菌根菌の遷移系列、パッチ内の空間的位置や宿主の生育状態による地下部菌根菌群集の違いについて解析した。また、前章で示した子実体の群集構造との対比も行った。

材料と方法

調査地

調査地は前章と同じである。ミヤマヤナギがほぼ唯一の外生菌根菌宿主であり、様々なサイズの個体が点在する。また、林冠葉の大部分に褐変部位の見られる「不健全」なミヤマヤナギも存在する。こうした不健全なミヤマヤナギでは、光合成活性や葉内養分濃度などが低い (第2章)。

分子生物学的手法による菌種同定に利用した子実体

地中の外生菌根菌を分子生物学的手法により正確に同定するには、対象とした場所に存在する全ての外生菌根菌の種内変異と種間変異を把握しておく必要がある。そこで、それぞれの菌種について、別々の植生パッチから採取した子実体をできるだけ多く用いて、ITS 領域の2つの断片長を調べた。方形区内に発生した *Agaricus*, *Camarophyllus*, *Coprinus*, *Cystoderma*, *Entoloma*, *Galerina*, *Hygrocybe*, *Lycoperdon*, *Marasmius*, *Melanoleuca*, *Mycena*, *Omphalina* に属する非菌根性の子実体 16 種も同様な解析を行った。解析に使った子実体は、凍結乾燥機 (FDU-540, EYELA, Tokyo, Japan) を用いて真空乾燥させ、使用直前までシリカゲルを入れたビニール袋に入れ室温で保管した。DNA 抽出用に、それぞれの乾燥子実体から小さな組織片 (約 1 mm³) を切り出し、φ 5mm のジルコニアボール 1 個とともに 2ml のマイクロチューブに入れた。合計で、39 種 255 個体の子実体を解析に用いた。

解析に用いた外生菌根

2001年の11月に、小サイズ (<0.5 m²) のミヤマヤナギ4個体、中サイズ (2 - 10 m²) のミヤマヤナギ4個体、大サイズ (>45 m²) のミヤマヤナギ4個体を選び、それぞれの宿主の縁部から3箇所ずつ、土壌ブロック (10×10×10 cm) をサンプリングした (図3-1)。パッチ内の空間分布の違いによる外生菌根菌群集の違いを見るため、それぞれの大サイズ宿主の内部 (縁から1m以上内側) と外部 (縁から1m以上外側) から、3箇所ずつ土壌ブロックを採取した (図3-1)。また、これらとは別に中サイズのミヤマヤナギで不健全な (大部分の葉に褐変部位が見られる) 4個体を選び、それぞれの個体の縁部から3箇所ずつ土壌ブロックを採取した。

土壌サンプルに含まれている全ての根を注意深く水道水で洗って、スコリアや腐植を取り除いた。ミヤマヤナギ以外の根は全て排除した。それぞれの末端根 (以下、細根) が互いにばらばらになるように主根から切り離し、5mmのメッシュを敷いたスチロール箱に広げた。ランダムにメッシュを選択し、そこに含まれる細根を拾い上げるにより、それぞれの土壌サンプルから200の細根を無作為抽出した。実体顕微鏡下で観察し、抽出サンプルの菌根形成率を調べた。それぞれの外生菌根は、Agerer *et al.* (1987-97) らの方法に従い、表面の色、肌合い、菌糸や菌糸束などによって10の形態タイプに区分した (図3-2)。それぞれの土壌サンプル中のそれぞれの形態タイプから10個の菌根を選び、DNA解析の反復とした。個々の菌根を、φ5mmのジルコニアボール1個とともに、2ml

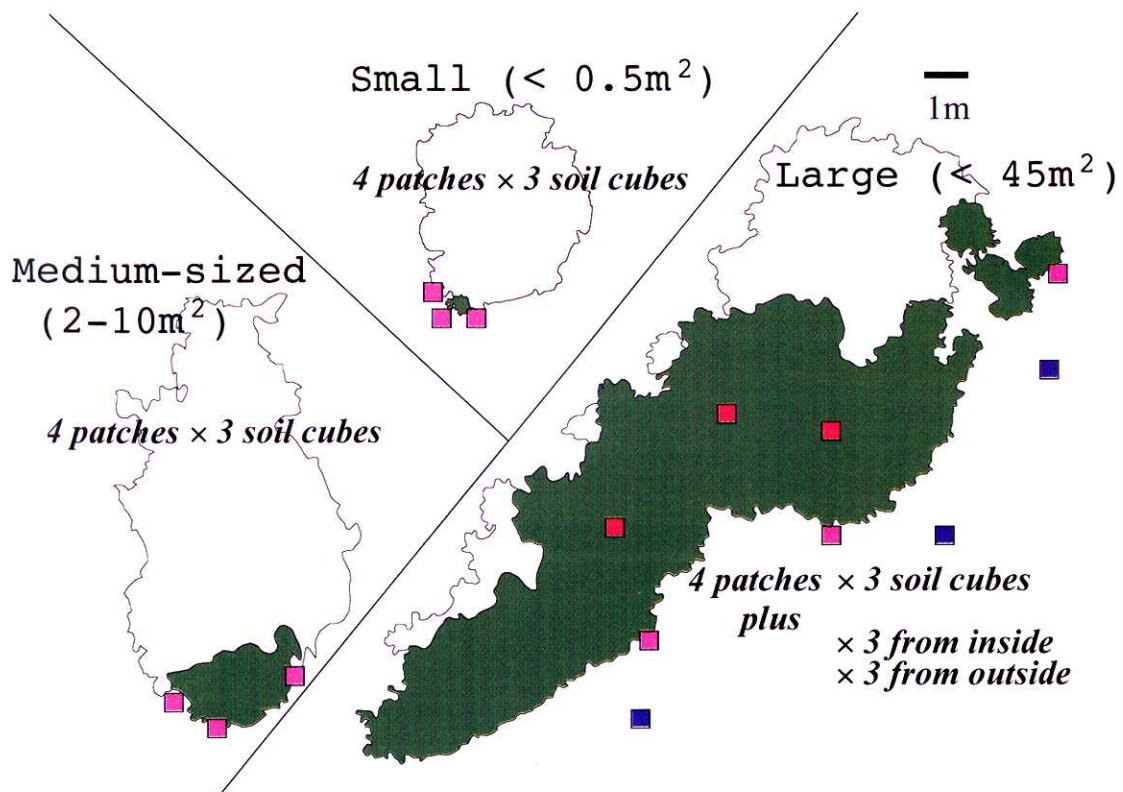


図3-1. Examples of soil sampling positions from vegetation patches in a volcanic desert on Mt. Fuji.

緑色の部分はミヤマヤナギの被覆部分を表す。

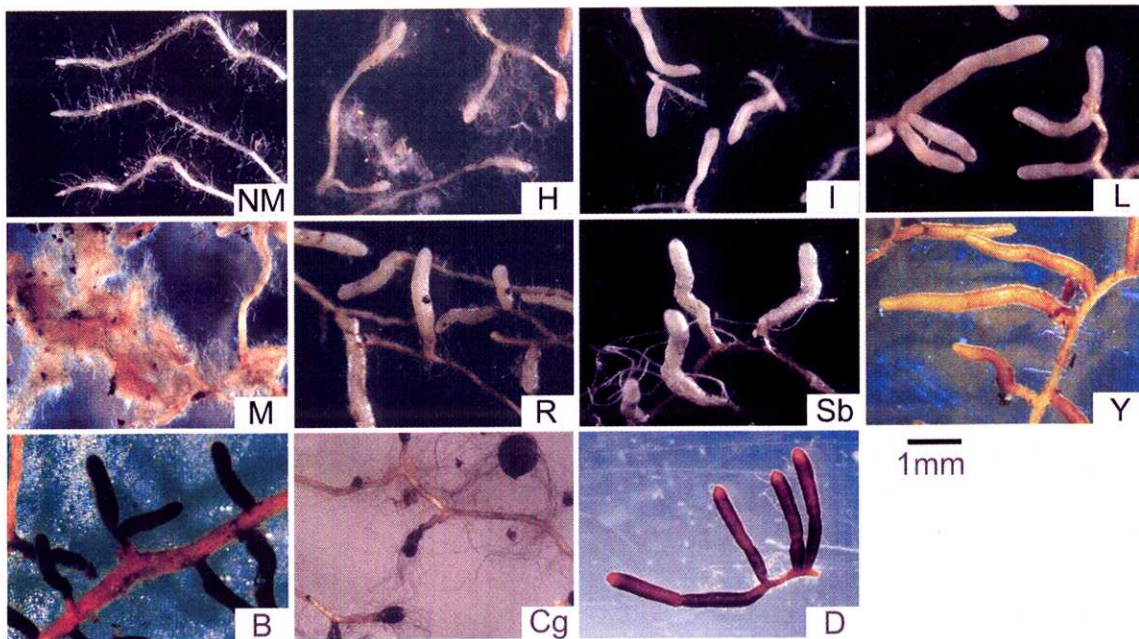


図 3-2. Morphotypes of ectomycorrhizae formed on *Salix reinii* during early primary succession.

NM indicates non-mycorrhizal root tips. The ten other ectomycorrhizal morphotypes were classified using morphological characters, including surface texture, color, emanating hyphae, and rhizomorph.

のマイクロチューブに入れ、真空乾燥後、DNA 抽出に供した。一つの形態タイプ中の菌根数が10に満たない場合は、全ての菌根を反復として使った。全部で72の土壤サンプルから14,400の細根を顕微鏡下で調べ、1,242菌根のDNA解析を行った。

DNA解析

それぞれの2.0mlマイクロチューブ中のサンプルは、粉碎器 (FastPrep, Funakoshi Co., Tokyo, Japan) で20秒間処理し、粉末化した。350 μ lのCTAB溶液 (2% cetyltrimethylammonium bromide, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 0.5% β -mercaptoethanol) をチューブに加え、再び20秒間粉碎器で攪拌した。アルミブロックヒーターを用いて65°Cで1時間インキュベートした後、350 μ lのクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) を加えて攪拌した。遠心分離後 (20,000g, 7 min., room temperature)、上澄みを新しい1.5mlのマイクロチューブに移した。上澄みとほぼ同量のイソプロピルアルコールを加え、-30°Cで15分間静置した後、遠心した (3,300g, 15 min., 4°C)。沈殿したDNAペレットを、80%エタノールで洗浄した後、乾燥させた。それぞれのDNAペレットを100 μ lのTEバッファーに溶解させ、使用までの期間、-30°Cで保管した。

PCR増幅にはAmpliTaq Gold (Applied Biosystems, CA, USA) を利用した。一つ目のITS領域の断片長解析 (ITS_{3,4}) には、まずITS3とITS4プライマー (White *et al.* 1990, Gardes & Bruns 1993) を用いてPCR増幅を行った。アニーリング温度は51°C、ITS4プライマーにはTexas Red標識したものをを用いた。PCR産物をTEバッファーで15倍希釈し、断片長

サイズ解析に用いた。二つ目の ITS 領域の断片長解析 (ITS_{IF-HinI}) には、まず鑄型 DNA を ITS4 プライマーと Texas Red 標識した ITS1F プライマーで PCR 増幅した (Ta=51°C)。PCR 産物 2 μ l を 8 μ l の HinI (1061A, Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 制限酵素溶液で切断した (37°C、8 時間)。制限断片は TE バッファーで 2 倍希釈し、断片長サイズ解析に用いた。

上述した 2 つの希釈液は、ローディングダイと混合し熱変性させた後、DNA シーケンサー (SQ-5500E, Hitachi Electronics Engineering Co., Tokyo, Japan) による電気泳導によって断片長を推定した。シーケンサーゲル上では 12 レーン毎に DNA サイズスタンダード (RPN2446, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England) を泳導した。各断片長は、FRAGLYS 3.0 software (Hitachi Electronics Engineering Co.) を用いて、DNA サイズスタンダードと比較することにより推定した。

地下部外生菌根菌の同定

地中の外生菌根の菌種を同定するため、菌根から抽出した DNA と子実体から抽出した DNA について、上述した 2 つの ITS 断片長を比較した。ある菌根から抽出した DNA の ITS₃₋₄ と ITS_{IF-HinI} の両方ともが、子実体の DNA 断片長解析で得られたある菌種の種内変異の範囲内であれば、同一の菌種であると同定した。

どの菌種の子実体 DNA と一致しなかった場合は、菌根 DNA の ITS 断片長の組み合わせでグループ分けし、各グループから 2, 3 のサンプルを選んで、ITS 領域の塩基配列を決定した。得られた配列を FASTA ホモロジー検索によって DDBJ/EMBL/GenBank 塩基配列データベースに登録された配列と比較し、高い相同性を示したものから菌種の推定を行った。菌根の形態的特徴についても、菌種同定の補助とした。

ITS 塩基配列の解析

ITS1 プライマーと ITS4 プライマーによって鑄型 DNA を PCR 増幅した後、pT7Blue Perfectly Blunt Cloning Kits (Novagen Inc., WI, USA) を用いてサブクローニングを行った。トランスフォーメーションさせた培養細胞を 1.5ml のマイクロチューブ中で、50 μ l の滅菌蒸留水に懸濁させ、沸騰水中で 5 分間加熱してプラスミド DNA を抽出した。プラスミド DNA を M13F と M13R プライマー (RPN 2337 and RPN 2338, Amersham International plc., Buckinghamshire, England) によって PCR 増幅した。アガロースゲルで目的のインサートをスクリーニングし、Thermo Sequenase Pre-mixed Cycle Sequencing Kits (RPN 2444, Amersham International plc.) と Texas Red 標識した M13F プライマー、T7 プライマーを用いてシーケンス反応を行った。DNA シーケンサーによって塩基配列を解析し、得られた全 ITS 領域の塩基配列を DDBJ に登録した。

地下部外生菌根菌群集の定量的解析

各土壌サンプル中の各菌根形態タイプにおいて、DNA 解析した 10 反復中の菌種の比率と、その菌根形態タイプ中に含まれる総菌根数を掛けることにより、各菌の菌根数を計算した。同じ菌種の菌根数を各土壌サンプル内で合計した。各菌の相対数量は、調べた全菌根中に占める比率とし、各土壌サンプル毎に決定した。一つの宿主から採取した 3 つの土壌サンプル中の同一菌種の相対数量を平均し、宿主毎の各菌の相対数量を求めた。宿

主カテゴリー（サイズクラスと空間位置、健全度）毎の各菌の相対数量は、各カテゴリーに含まれる12の土壤サンプルから求めた同一菌種の相対数量の平均値とした。種の豊かさ（species richness）は各土壤サンプル、宿主、カテゴリーに含まれる種数によって評価した。

統計解析

全ての統計解析は、SPSS 11.5 for Windows を用いて行った。菌根形成率を各宿主カテゴリー間で比較するため、95%の有意確率で一元配置分散分析とTukeyの多重比較を行った。同様な解析によって、3つの宿主サイズクラス（大、中、小）と3つの空間的位置（パッチ内部、縁部、パッチ外部）の菌種の豊かさの比較を行った。

宿主カテゴリー間で外生菌根菌の相対数量組成に違いがあるかどうかを検討するため、3つのクロス集計表を作成した。3つのサイズクラスを行に、出現した菌種を列に配置し、それぞれのセルに各菌の宿主カテゴリー毎の相対数量を入れた。また、3つの空間的位置と2つの宿主健全度を行に配列したクロス集計表も同様に作成した。作成したクロス集計表の行と列の独立性を検定するため、Pearsonのカイニ乗正確有意確率を、10,000回のモンテカルロサンプリングによる99%信頼区間によって推定した（Mehta & Patel 1996）。

結果

子実体DNAのITS断片長の種内変異と種間変異

ミヤマヤナギに共生する外生菌根性子実体の中で、アンズタケのDNAサンプルはPCR増幅しなかった。その他の菌種では全てPCR増幅することができ、ITS₃₋₄とITS_{1F-Hinfl}のいずれの断片長解析においても、通常、一つの個体から一つの明瞭なバンドを得ることができた（表3-1）。しかし、ITS₃₋₄断片長解析において、ワカフサタケやハマニセシヨウロなど6つの菌種では、数塩基違いの2つのバンドが一つの子実体から検出されることも多かった（表3-1）。ITS_{1F-Hinfl}断片長解析においても、ハマニセシヨウロと*Inocybe fastigiata*の2種において、こうしたダブルバンドが見られた。こうしたダブルバンドは、常に再現性があり、種の区別には影響を及ぼさなかった。

表3-1に示したITS断片長は、DNAサイズスタンダードとのシーケンサーゲル上での泳動速度の違いによって推定したものであり、実際にシーケンスによって得られる塩基配列のデータとは数塩基の違いがある場合もあった。

解析した全ての種をあわせると、ITS₃₋₄断片長は367～673 bp、ITS_{1F-Hinfl}断片長は159～424 bpの範囲であった。多くの種でITS断片長に種内変異があったが、大部分は数塩基以内の小さな変異であった（表3-1）。

断片長の種間変異は種内変異より大きいことが多かった。しかし、ITS₃₋₄とITS_{1F-Hinfl}のいずれか一方の断片長解析だけでは、全ての種を区別するには不十分であった（表3-1）。例えば、ワカフサタケ属の3種とウラムラサキはITS₃₋₄またはITS_{1F-Hinfl}単独では区別できなかった。ITS₃₋₄とITS_{1F-Hinfl}の両方の解析を組み合わせることで、全ての菌種が区別できた。菌種の区別は、16種の腐生菌を含めても可能であった。

地下部外生菌根菌の同定

表 3-1. Intra- and interspecific variation in the lengths of two ITS fragments for ectomycorrhizal fungi that appeared during early primary succession on Mt. Fuji.

Species	Genets	ITS _{3,4} (bp)	ITS _{1F-HinfI} (bp)	Acc. No.
Sporocarps				
<i>Boletus</i> cf. <i>rubellus</i> Krombh. ^a	8	671 - 673	269 - 273	
<i>Boletus pulverulentus</i> Opat.	1	453	368	
<i>Cortinarius alboviolaceus</i> (Pers.: Fr.) Fr.	3	384	399	
<i>Cortinarius decipiens</i> (Pers.: Fr.) Fr. ^a	18	367 - 372	321 - 323	
<i>Hebeloma leucosarx</i> Orton ^a	14	402 - 403*	397	
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers.) Quél. ^a	21	400 - 403*	401 - 403	
<i>Hebeloma pusillum</i> Lange	4	396 - 400*	397 - 399	
<i>Inocybe acuta</i> Boud.	1	394	161	
<i>Inocybe calospora</i> Quél.	5	375 - 376*	368	
<i>Inocybe dulcamara</i> (Pers.) Kumm. ^a	6	402 - 403	424	
<i>Inocybe lacera</i> (Fr.) Kumm. ^a	20	395 - 396	384 - 386	
<i>Inocybe fastigiata</i> (Schaeff.) Quél.	1	370	395 - 397*	
<i>Inocybe</i> sp. 1	6	368	159	
<i>Inocybe</i> sp. 2 ^a	12	386	400	
<i>Laccaria amethystina</i> Cooke ^a	20	399 - 404*	385 - 386	
<i>Laccaria laccata</i> (Scop.: Fr.) Berk. & Br. ^a	19	393 - 394	389 - 391	
<i>Laccaria murina</i> Imai ^a	22	393	386 - 387	
<i>Russula norvegica</i> Reid	10	448	351 - 353	
<i>Russula pectinatoides</i> Peck	5	415	372 - 373	
<i>Russula sororia</i> (Fr.) Romell ^a	8	413	373 - 374	
<i>Scleroderma bovista</i> Fr. ^a	20	431 - 436*	285 - 287*	
Species only found underground				
<i>Cenococcum geophilum</i> (>99%)		332 - 334	not amplified	AB089815
<i>Laccaria</i> sp. (>90%)		380 - 381	349 - 351	AB096868
Pezizales sp. (>90%)		354	368	AB096869
<i>Sebacina</i> sp. (>85%)		386	327	AB096870
Thelephoraceae sp. (>95%)		407 - 410	360 - 365	AB089959
<i>Tomentella</i> sp.1 (>95%)		410 - 411	356 - 358	AB089960
<i>Tomentella</i> sp.2 (>90%)		407 - 408	180 - 182	AB096871
Unidentified D morphotype sp. 1		343 - 345	177 - 178	AB089817
Unidentified I morphotype sp. 1		381	182	AB096872

The genets column contains the number of examined sporocarps that were collected from different vegetation patches, belonging to different genets. Column ITS_{3,4} gives the lengths of the PCR products amplified by primers ITS3 and ITS4. Column ITS_{1F-HinfI} lists the terminal (ITS1F side) restriction fragment lengths of the PCR products amplified by primers ITS1F and ITS4. Sequences, including the complete ITS regions of the species found only underground, are available in the DDBJ/EMBL/GenBank database and the Accession Numbers are listed. Their similarities with known species in close matches are shown in parentheses following the species name.

^a indicates the species that were found in both the sporocarp and ectomycorrhizal communities.

* Two bands that differ in size by a few base pairs were detected from individual sporocarps in some cases.

72の土壤サンプルから採取した14,400の根端全体で、外生菌根形成率は59.2%であった。

子実体と菌根のDNAのITS断片長比較によって、外生菌根形態タイプHはワカフサタケ属菌、形態タイプIはクロトマヤタケ、形態タイプLはキツネタケ属菌、形態タイプSbはハマニセシヨウロによって形成された外生菌根であることがほとんどであった(図3-2)。しかし、いくつかの土壤サンプルでは、これらの形態タイプの菌根であっても、いずれの子実体とも一致しない菌種を含んでいることもあった。さらに、複数種のワカフサタケ属菌がHタイプに含まれていることや、複数種のキツネタケ属菌がLタイプに含まれていることが多かった(図3-3)。形態タイプLにクロトマヤタケが混入していることもあった。これらの結果、一つの菌根形態タイプ中に含まれる菌種やその相対数量は土壤サンプル毎に大きな違いが見られた。

形態タイプB、Cg、D、Yに属するほとんどの菌根は、子実体として発生したいずれの

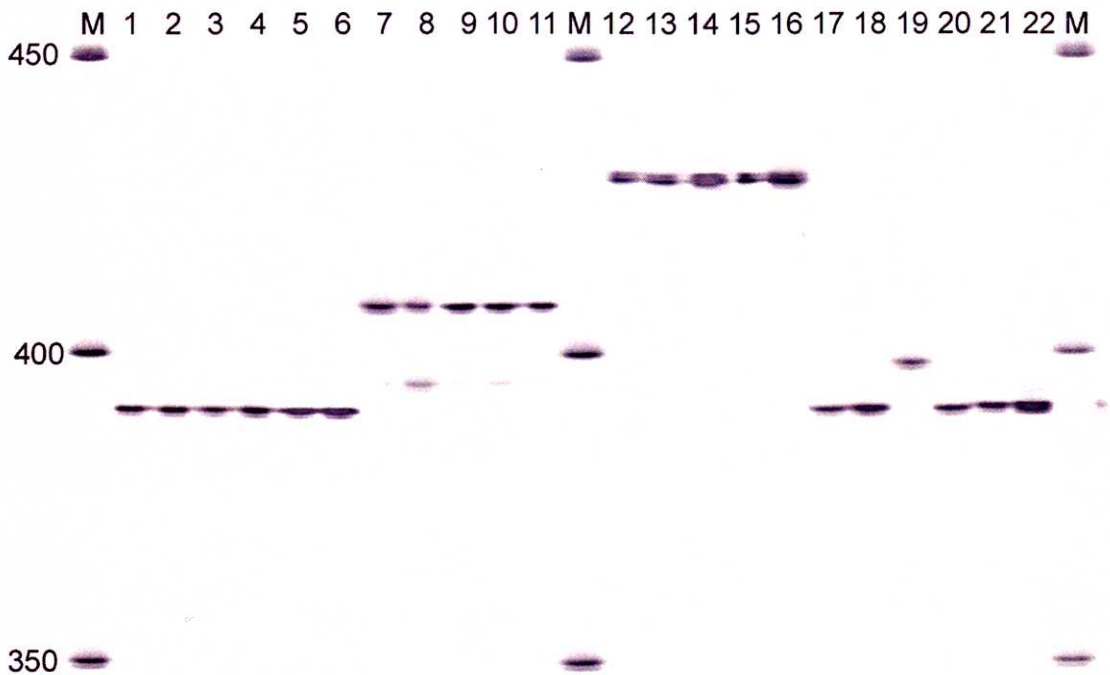


図3-3. DNA sequencer gel electrophoresis of ectomycorrhizal ITS-PCR-products amplified by primers ITS3 and ITS 4.

M, molecular size standard; lanes 1-6, L morphotype (*Laccaria laccata*); lanes 7-11, B morphotype (*Tomentella* sp. 1); lanes 12-16, Sb morphotype (*Scleroderma bovista*); lanes 17-22, L morphotype (*L. laccata* in lanes 17, 18, 20-22, and *Laccaria amethystina* in lane 19)

菌種ともDNAタイプが一致しなかった。これらの菌根はITS断片長の組み合わせによって、9つの異なるグループとして分けることができた(表3-1)。それぞれのグループ内には、多くの子実体で見られたような数塩基のグループ内変異が見られた。その中の一つのグループは、菌根の形態的特徴に加え、塩基配列データベースに登録された多くの*Cenococcum geophilum*の配列と99%以上の高い相同性を示したことから、*C. geophilum*であると同定した。その他の6つのグループも、データベースに登録された他の菌と高い相同性(いずれも85%以上)を示したことから、最も高い相同性を示した菌種の同属菌であると同定した(表3-1)。残りの2つのグループは、データベース上に相同性の高いものが見られなかったことから、Iタイプ未同定菌(UN-I1)とDタイプ未同定菌(UN-D1)と定義した。

全部で21の菌種がミヤマヤナギの外生菌根から同定された。その内、子実体として記録されたものは12種であった。検出された種数が、実際に存在している種数とどれくらい異なるかを評価するため、X軸に調べた菌根数をランダムに配置し、Y軸に検出した菌種の積算数を、各宿主カテゴリー毎にプロットしてみた(図3-4)。いずれの宿主カテゴリーにおいても、調べた菌根数の増加とともに積算種数は横ばいとなった。各宿主の縁部から採取したサンプルを比べると、小サイズの宿主からは5種、中サイズの宿主からは8種、大サイズの宿主からは13種の外生菌根菌が検出できた。大サイズの宿主の外部からは7種、内部からは16種が確認できた。不健全な宿主の縁部からは13種が見つかった。

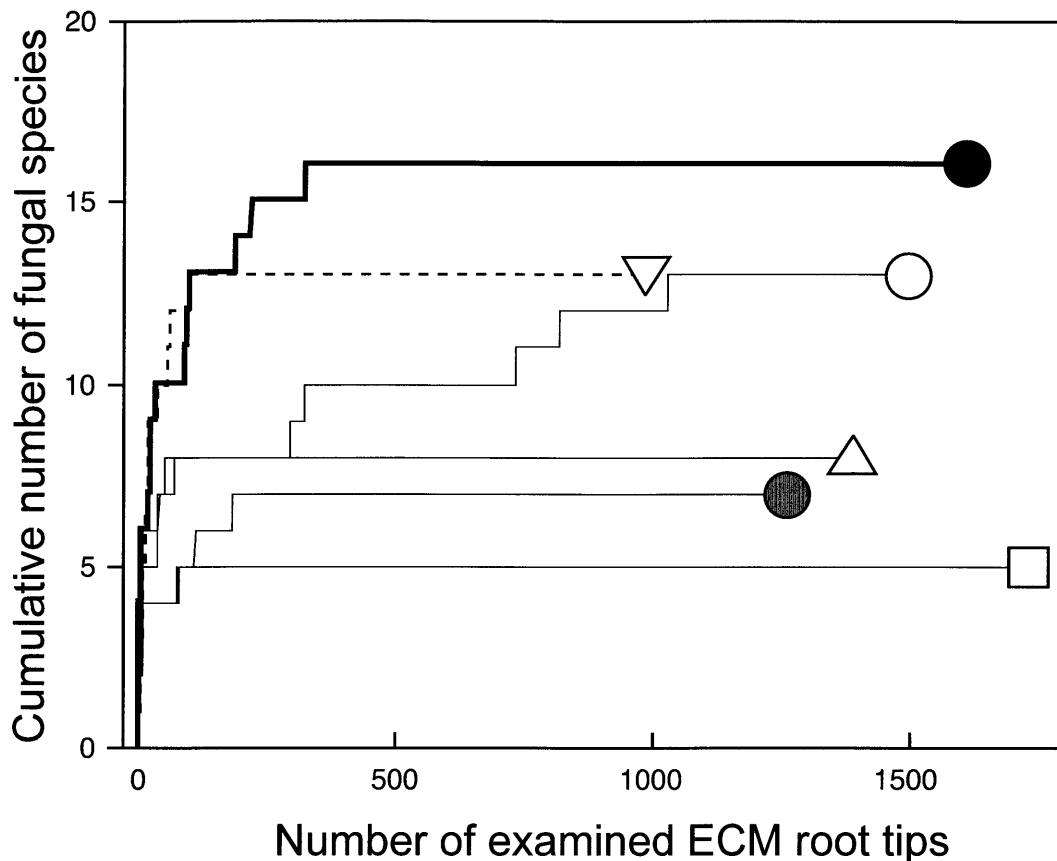


図 3-4. Number of detected fungal species in relation to the number of examined ectomycorrhizal (ECM) root tips in each of the six sampling categories during early primary succession on Mt Fuji.

Root tips were sampled from the periphery positions of small (<0.5 m² in coverage area, square), middle-sized (2 - 10 m², triangles), and large (>45 m², white circles) host *Salix reinii*. We also sampled root tips from the inside positions (black circle) and outside positions (gray circle) of the large hosts. There were unhealthy hosts in the middle-sized host class, and we collected the samples from the periphery positions of the unhealthy hosts (inverted triangle). Each sampling category contained twelve sampling positions from four individual hosts, and 200 root tips were sampled from each position.

Examined ECM root tips in each category were randomly arranged on the X-axis. The Y-axis indicates the cumulative number of fungal species detected.

た。

調べた外生菌根の 88% は、方形区内に子実体として発生した菌種によって占められていた。この数字は、小サイズ (99%)、中サイズ (98%)、大サイズの外部 (99%) で高く、不健全 (75%)、大サイズの縁部 (82%)、大サイズの内部 (80%) で低かった。

地下部外生菌根菌の遷移

定着から間もない小サイズのミヤマヤナギに共生する地下部の外生菌根菌群集は単純で、クロトマヤタケ、キツネタケ、ウラムラサキのいずれか 1 種が優占していた (図 3-5a)。この 3 種の菌を、富士山火山荒原における地下部外生菌根菌の一次遷移系列における first-stage fungi と定義した。

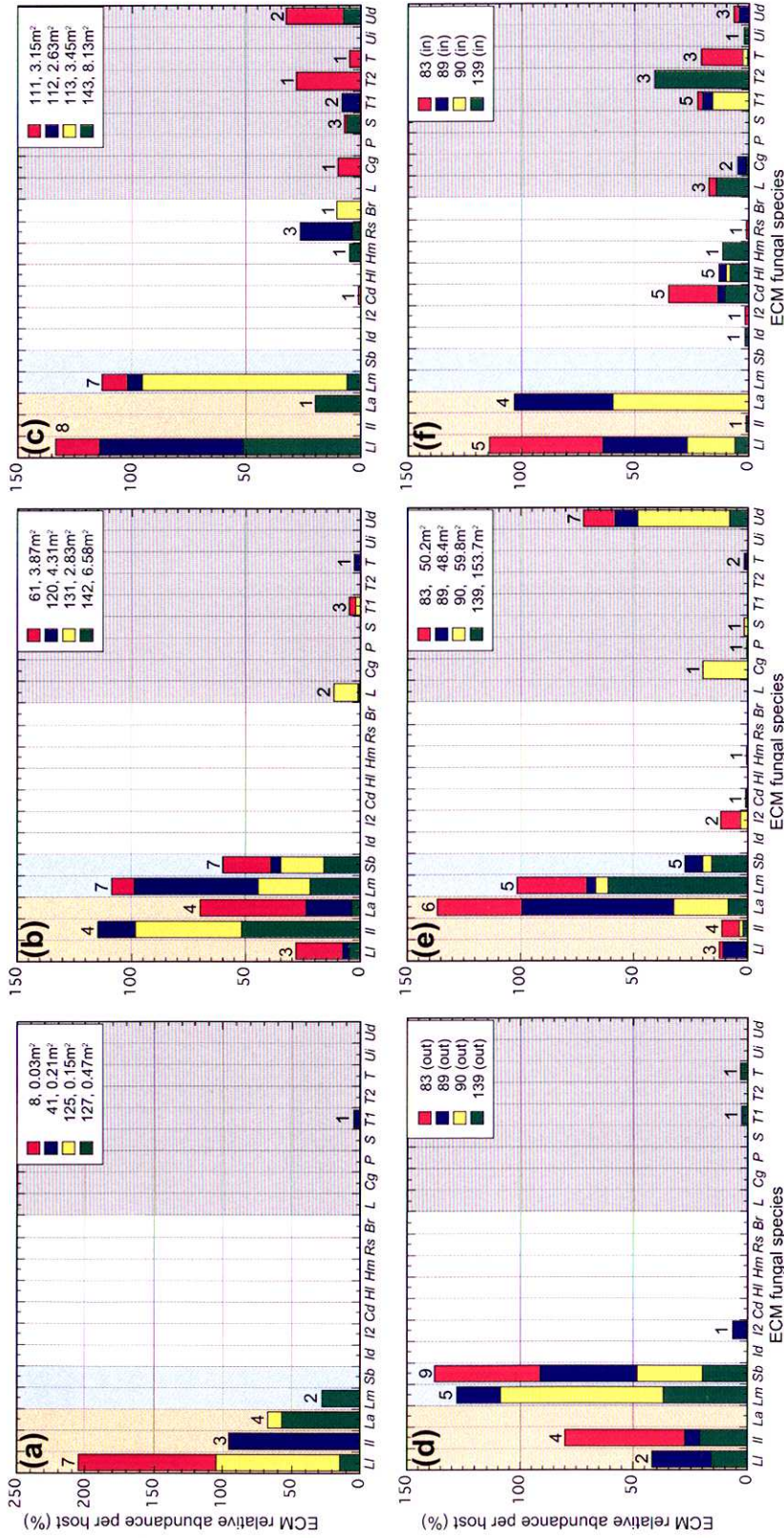


図 3-5. The underground ectomycorrhizal (ECM) fungus community in relation to the developmental stages of *Salix reinii*, the growth activity of the host, and the spatial position within a vegetation patch.

The figures show the fungal composition at the periphery of (a) small, (b) middle-sized, and (c) unhealthy middle-sized hosts, and (d) outside, (e) on the periphery, and (f) inside large hosts. The host coverage area in each vegetation patch is shown after the patch number. The four hosts investigated in each category are illustrated in different colours in each figure: red, blue, yellow, and green. The figures on the bars give the number of soil samples containing each fungus out of the 12 soil samples in each sampling category. Abbreviations of the ECM fungal species on the X-axes are *Laccaria laccata*, *L. laccaria laccata*, *L. Laccaria amethystina*, *Lm*, *Laccaria murina*, *Sb*, *Scleroderma bovista*, *Id*, *Inocybe dulcamara*, *I2*, *Inocybe* sp.2, *Corintharius decipiens*, *Hl*, *Hebeloma leucosarx*, *Hm*, *Hebeloma mesophaeum*, *Rs*, *Russula sororia*, *Br*, *Boletus cf. rubellus*, *L*, *Laccaria* sp.; *Cg*, *Cenococcium geophilum*; *P*, *Pezizales* sp.; *S*, *Sebacina* sp.; *T1*, *Tomentella* sp.1; *T2*, *Tomentella* sp.2; *T*, *Thelephoraceae* sp.; *Ui*, Unidentified *U* morphotype sp.1; *Ud*, Unidentified *U* morphotype sp.1. The Y-axes indicate the relative ECM abundance for a host. The bars on orange, pale blue, and white backgrounds indicate first-, second-, and late-stage fungi, respectively, in the sero of ECM fungal succession. The bars on gray backgrounds indicate species whose sporocarps have not been confirmed in weekly sporocarp surveys conducted over two years.

表 3-2. Ectomycorrhizal (ECM) colonization and the number of ECM species associated with different sizes of the host *Salix reinii*, different growth activities of the host, and different spatial positions within the large hosts during early primary succession.

Category*	Percentage of ECM colonization (n=12)	Number of ECM fungal species		
		/ soil sample (n=12)	/ host (n=4)	/ category
small, periphery	72.5 ± 6.2 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.4 ^a	5
middle-sized, periphery	57.8 ± 6.7 ^{ab}	2.6 ± 0.3 ^b	5.5 ± 0.3 ^b	8
large, periphery	62.5 ± 3.9 ^{ab}	3.3 ± 0.4 ^{ba}	7.8 ± 0.8 ^{ct}	13
large, outside	52.4 ± 6.2 ^{ab}	1.9 ± 0.3 ^B	3.8 ± 1.0 ^t	7
large, inside	67.1 ± 4.8 ^{ab}	3.7 ± 0.5 ^A	7.8 ± 1.3 ^t	16
unhealthy, periphery	42.4 ± 7.3 ^b	2.7 ± 0.3 ^{ns}	5.5 ± 1.2 ^{ns}	13

Except for the last column, the figures show the mean ± S.E.M. Figures followed by different letters in the column for the percentage of ECM colonization indicate a significant difference by Tukey's HSD test ($P < 0.05$). Figures followed by different lower-case letters in the columns for number of ECM fungal species per soil sample and per host, indicate a significant difference among the three host size classes (small, middle, large), and figures followed by different capital letters indicate a significant difference among the three spatial positions (outside, periphery, inside) for large hosts by Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

* We collected three soil samples from the periphery of each of four small hosts (<0.5 m² in coverage area), four middle-sized hosts (2 - 10 m²), and four large hosts (>45 m²). For each large host, three soil samples from inside positions and three from outside positions were collected. There were unhealthy hosts in the middle-sized host class, and we collected three soil samples from the periphery of each of the four unhealthy hosts.

^t The number of ECM fungal species per host was significantly different among the three spatial positions by ANOVA ($P = 0.034$), but was not separable using Tukey's HSD test.

^{ns} Figures for ECM fungal species from unhealthy middle-sized hosts, per soil sample and per host, were not significantly different from the figures from normally growing middle-sized hosts by the *t*-test ($P > 0.05$).

中サイズの宿主においても、first-stage fungiは地下部の外生菌根菌群集の主要な構成要素として出現した (図 3-5b)。これらの菌に加え、ハマニセシヨウロとギンコタケが全ての中サイズ宿主から検出され、12の土壤サンプル中7つにこの2種の菌根が含まれていた。この2種の菌は first-stage fungiの後に侵入する second-stage fungiと定義した。

更に大きく成長したミヤマヤナギの縁部では、first-stage fungiと second-stage fungiに加えて、更に多くの菌種が見られた (図 3-5e)。その中でも UN-D1は4つ全ての宿主から検出され、12の土壤サンプル中7つの中にこの菌種の菌根が見られた。*Inocybe* sp.2、*C. geophilum*、フウセンタケ属菌、ワカフサタケ属菌なども出現した。

ミヤマヤナギの成長とともに新しい菌がどんどん加わることにより、地下部の外生菌根菌の種組成には宿主サイズ間で有意差が認められた ($P < 0.001$, Pearsonの正確有意確率検定)。中サイズと大サイズの宿主縁部から採取した1土壤サンプル中に含まれる外生菌根菌の種数は、それぞれ 2.6 ± 0.3 と 3.3 ± 0.4 であり、小サイズの宿主縁部から採取した1土壤サンプルあたりの菌種数 (1.4 ± 0.1) よりも有意に大きな値を示した (表 3-2、 $P < 0.05$)。一つの宿主あたりの外生菌根菌種数も、小さいサイズ (2.0 ± 0.4) から中サイズ (5.5 ± 0.3)、大サイズ (7.8 ± 0.8) へと有意に増加した (表 3-2、 $P < 0.05$)。

地下部外生菌根菌の空間分布

大サイズのミヤマヤナギ樹冠から1m以上外側の裸地 (外部) と、同じミヤマヤナギの樹冠の縁から1m以上内側 (内部) の菌根菌群集を比較した (図 3-5d, f)。外部では、ハマニセシヨウロが最も優占する菌種であり、12の土壤サンプル中9つにこの菌種の菌根が含まれていた。その内4つの土壤サンプルでは、ハマニセシヨウロ以外の菌種は見られ

なかった。ハマニセシヨウロ菌根の相対数量は、内部 ($0.0 \pm 0.0\%$) よりも外部 ($46.6 \pm 12.3\%$) の方が有意に高かった (t -test, $P < 0.001$)。ギンコタケは、外部の4つの土壌サンプル中に検出できたが、内部からは全く見られなかった。この菌の相対数量も、内部 ($0.0 \pm 0.0\%$) よりも外部 ($24.5 \pm 9.9\%$) の方が有意に高かった (t -test, $P < 0.021$)。こうした外部を好む菌種とは対照的に、*Cortinarius decipiens* やワカフサタケ属は外部では全く見られなかったのに対し、内部ではそれぞれ5つの土壌サンプル中に見られた。ワカフサタケ属菌の外部と内部の相対数量差は統計的に有意ではなかったが ($P = 0.092 > 0.05$)、*C. decipiens* の内部 ($9.0 \pm 3.6\%$) と外部 ($0.0 \pm 0.0\%$) の相対数量差は統計的に有意であった (t -test, $P < 0.019$)。Tomentella属を含むイボタケ科の菌種も外部よりも内部に高い頻度で見られた。外部から採取した12の土壌サンプルの内、11の土壌サンプルはイボタケ科のいずれかの種を含んでおり、その合計相対数量は外部 ($1.7 \pm 1.2\%$) よりも内部 ($20.5 \pm 7.3\%$) の方が有意に高い値を示した (t -test, $P < 0.018$)。このような各菌種の空間的な棲み分けにより、外生菌根菌の種組成は外部、内部、縁部の3つの空間的な場所で有意に異なっていた ($P < 0.001$, Pearsonの正確有意確率検定)。

1土壌サンプル中に含まれる外生菌根菌の種数は、外部 (1.9 ± 0.3) よりも、縁部 (3.3 ± 0.4) や内部 (3.7 ± 0.5) で有意に多かった (Tukeyの多重比較, $P < 0.05$ 、表3-2)。一つの宿主あたりの種数も、外部 (3.8 ± 1.0) より、内部 (7.8 ± 1.3) や縁部 (7.8 ± 0.8) の方が多く、3つの場所による差は統計的に有意であった (ANOVA, $P < 0.034$ 、表3-2)。

不健全な宿主に共生する地下部外生菌根菌

不健全なミヤマヤナギから合計13種の外生菌根菌が同定された。その中でも、キツネタケとギンコタケの出現する頻度が高く、全12土壌サンプル中、それぞれ8つと7つにその菌根が見られた。この2種の相対数量も高く、最も主要な構成要素であった。いわゆるキノコを形成しない菌類 (*C. geophilum*, *Sebacina* sp. やイボタケ科) とUN-D1の相対数量の合計は、健全なミヤマヤナギ ($1.7 \pm 0.9\%$) に比べて、不健全なミヤマヤナギ ($31.4 \pm 9.1\%$) で有意に高かった (t -test, $P < 0.024$)。これとは対照的に、ハマニセシヨウロやクロトマヤタケは、健全なミヤマヤナギからは高い頻度で出現したものの、不健全なミヤマヤナギからは全く検出されなかった。不健全なミヤマヤナギにおけるこの2種の相対数量 (1土壌サンプルあたり) はともに $0.0 \pm 0.0\%$ であり、健全なミヤマヤナギのハマニセシヨウロ ($19.7 \pm 8.6\%$, t -test, $P < 0.033$) とクロトマヤタケ ($25.0 \pm 11.2\%$, $P < 0.036$) の相対数量より有意に低かった。不健全なミヤマヤナギの外生菌根菌の種数は、1土壌サンプルあたりで 2.7 ± 0.3 、1宿主あたり 5.5 ± 1.2 であり、健全なミヤマヤナギで見られた種数と有意差はなかった。

地下部外生菌根菌の群集構造とその発達

異なるサイズクラスに見られた地下部外生菌根菌の群集構造を順位-相対数量図 (rank-abundance diagram) によって示した (図3-6a)。小サイズのミヤマヤナギでは最も上位菌の占める相対数量が特に高かった。ミヤマヤナギの成長とともに種数が増加し、上位菌の相対数量に占める割合が低下すると同時に、下位全体の占める割合が相対的に増加した。このように、宿主の縁部だけを比較しても、地下部外生菌根菌群集構造は宿主の成

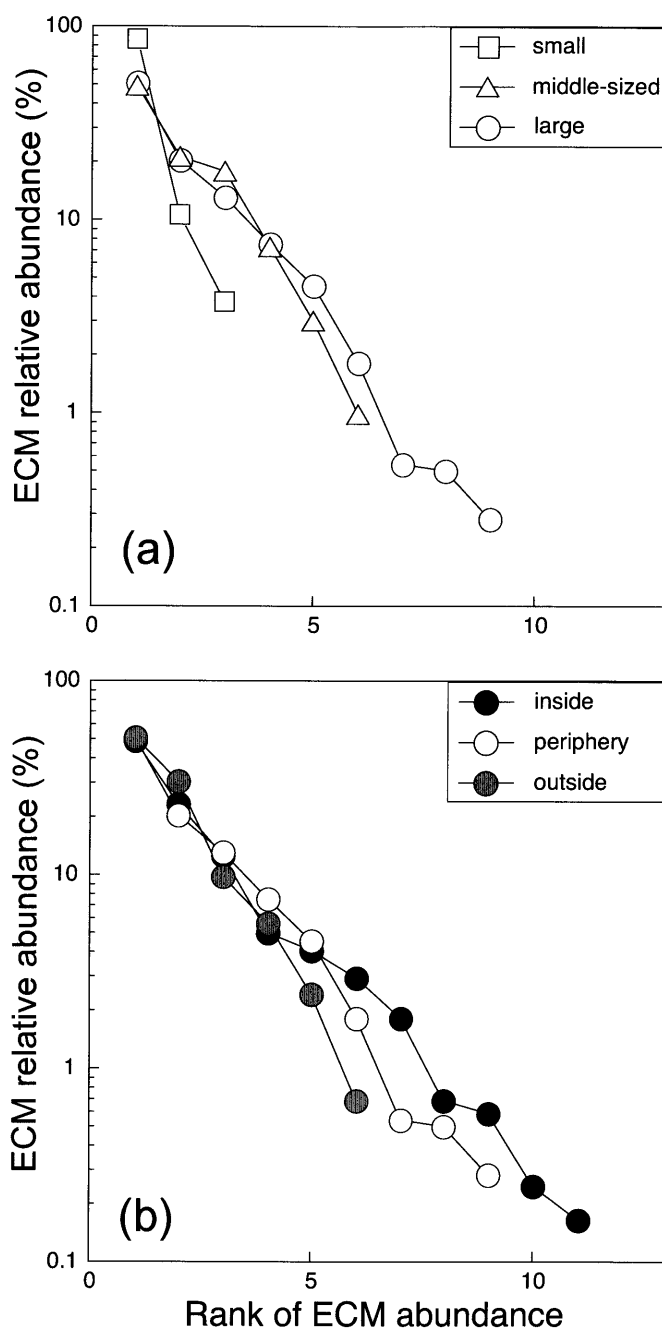


图 3-6. 比较不同宿主 *Salix reinii* 的不同大小类群 (a) 和不同空间位置 (b) 的地下外生菌根群落结构。

(a) 比较不同大小类群的宿主 (*Salix reinii*) 的地下外生菌根群落结构。比较了小型 (<0.5 m² 覆盖面积)、中型 (2 - 10 m²) 和大型 (>45 m²) 宿主的地下外生菌根群落。

(b) 比较大型宿主的地下外生菌根群落结构。比较了宿主覆盖面积内部 (>1 m 内部)、边缘和外部 (>1 m 外部) 的地下外生菌根群落。

在单个宿主中，将 ECM 相对丰度按秩次排列，然后将同一秩次的丰度在四个宿主内进行平均。将每个秩次的平均丰度 (Y 轴，对数刻度) 按秩次 (X 轴，秩次顺序) 在每次采样类别中绘制。

長とともに変化した。さらに、大サイズのミヤマヤナギの異なる空間的位置で地下部外生菌根菌群集を比べても、顕著な違いが見られた (図3-6b)。宿主外部では少数の上位菌が大きな相対数量を占めていたのに対し、宿主内部では下位種の数と相対数量が増加した。つまり、宿主内部の方向へ行くに従い、全ての順位の菌が同じ相対数量を持つような方向へと群集構造が変化する傾向が見られた。

子実体群集と地下部外生菌根菌群集の対応

個々の宿主における地下部外生菌根菌群集および菌根性子実体群集を構成する菌種とその相対数量順位を表3-3に示した。小サイズの宿主においては、地下部の外生菌根菌群集の相対数量で最上位にランクされた菌種は、子実体の相対本数で最上位にランクされた菌種とすべて同一種であった。他のサイズクラスの宿主でも、地下部で最上位にランクされた菌種は、いずれも子実体群集の上位5つの菌種の中に含まれていた。逆に、子実体本数の最上位にランクされた菌種は、一つの例外を除いて、地下部の菌根菌群集でも

表3-3. Species composition in the sporocarp and underground ectomycorrhizal (ECM) communities associated with individual hosts, *Salix reinii*, in an early successional volcanic desert.

Patch No.	Host size (m ²)	Sporocarp abundance rank*					ECM abundance rank†				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
small hosts											
8	0.03	LI					LI				
125	0.15	LI	La				LI	La			
41	0.21	II					II	T1			
127	0.47	La					La	Lm	LI		
middle-sized hosts											
131	2.83	Sb	LI	Hp	II	Lm	II	Lm	Sb	L	T1
61	3.87	Sb	LI	Hm	Lm	La	La	Sb	LI	Lm	T1
120	4.31	Sb	LI	La	II	Lm	Lm	La	II	Sb	LI
142	6.58	II	Sb	Lm	La	I2	II	Lm	Sb	LI	La
large hosts											
89	48.45	LI	La	Hm	Lm	Sb	La	LI	Sb	Lm	Ud
83	50.23	LI	La	Hm	Sb	II	II	LI	Sb	La	Lm
90	59.84	LI	Sb	Hm	La	II	La	Lm	Ud	Sb	LI
139	153.73	LI	La	Hm	Cd	Sb	Lm	T2	Sb	II	LI

Abbreviations of the ECM fungal species are Cd, *Cortinarius decipiens*; Hm, *Hebeloma mesophaeum*; Hp, *Hebeloma pusillum*; II, *Inocybe lacera*; I2, *Inocybe* sp.2; L, *Laccaria* sp.; La, *Laccaria amethystina*; LI, *Laccaria laccata*; Lm, *Laccaria murina*; Sb, *Scleroderma bovista*; T1, *Tomentella* sp.1; Ud, Unidentified D morphotype sp.1.

* The data for the number of sporocarps were from our prior study (Section 2).

† The ECM abundance rank was based on the relative abundance of ECM root tips in three soil samples collected from each of the small and middle-sized hosts, and in twelve soil samples collected from each large host.

上位5つの菌種の中に含まれていた。

考察

地下部外生菌根菌群集の解析に関する方法論

地下部外生菌根菌の群集構造に関する研究では、サンプリングのデザインや方法が結果に大きく影響する (Taylor 2002)。一般的によく用いられるのは、小さい径のコアサンプリングを林分からランダムに採取し、各コアの中にある菌根を全て調べる方法である (Horton & Bruns 2001)。この方法を用いると、林分間や処理区間、あるいは同じ林分でも、各コアの中にある外生菌根の総量に大きなばらつきが生じる。Taylor (2002) は、特にサンプリング数が十分でない場合に、こうしたサンプル間の菌根総量のばらつきの大きさは、外生菌根菌の種の豊かさや群集構造を間違えて理解することに繋がると指摘している。つまり、一つのサンプリングポイントに、ある菌種の菌根が偶然密集していた場合、その菌種の相対数量を過大評価してしまうことになるのである。そして、原則的には各サンプリング地点から同じ数の菌根、究極的にはただ1つの菌根をサンプリングしながら、全体として十分な数の菌根をサンプリングするのが理想的であるとしている。本研究では、各サンプリング地点から採取した土壤サンプル中から、一定数 (200個) の細根を無作為抽出することにより、各土壤サンプル間の菌根総量のばらつきを減らした。このようなサンプリング方法を用いることは、土壌や植生の非常に不均質な一次遷移の初期過程にある調査地において、外生菌根菌の群集構造を正確に捉える上で必要不可欠であると考えられる。さらに、調べた菌根数の増加とともに検出できた積算種数は完全に横ばいとなっていたことから、この場所に存在する菌種の大部分を検出する上で十分な量の菌根を調べたことが明らかである。知る限りにおいて、十分なサンプル量によってその場所に存在するほとんどの菌種を同定した例はこれまでになく (Horton & Bruns 2001)、今後の菌根菌群集に関する研究の一つの方向性を示すことができたと考えられる。

地下部の外生菌根菌の種を形態観察のみで同定することは通常不可能である。そこで様々な分子生物学的手法を用いた菌種の同定が行われるようになってきた。なかでも、ITS領域は種間によって変異が大きく、種内の変異が小さいと考えられており、そのPCR-RFLPを利用した同定方法が最も広く用いられている (Gardes & Bruns 1996, Dahlberg *et al.* 1997, Kårén & Nylund 1997, Pritsch *et al.* 1997, Jonsson *et al.* 1999a, b, Horton & Bruns 2001)。近年 ITS-terminal RFLP 法が細菌や藻類の群集構造解析のために開発され (Liu *et al.* 1997, Moeseneder *et al.* 1999)、外生菌根菌の群集構造解析にも効果的に応用されている (Dickie *et al.* 2002, Zhou & Hogetsu 2002)。この方法は、シーケンサを使った電気泳導を行うために1bpの差も検出でき、RFLPでよく用いられるアガロースゲルよりも遙かに解像力が高い。しかし、Zhou & Hogetsu (2002) の研究では、複数の菌根を混ぜたサンプルを使っており、ITS-terminal RFLP 解析で一つのレーンから複数のバンドが出現するため、正確な相対数量の把握ができなかった。そこで本研究では、個々の菌根を別々に解析することにより、1つのサンプルから原則的に1本のバンドが得られるように改良した。これによって、各菌種の相対数量が正確に捉えられるようになった。さらに、雑菌などのDNAが混入したサンプルも除くことが可能となったほか、バンドの濃度差による読みとりミスも減らすことができると考えられる。このような改良は、純粋なサンプルが得

られないフィールドサンプルを解析する上では必要不可欠である。

このような技術的な改良とは別に、調査地に豊富に発生する子実体を用いて、ITS領域の2つの異なるDNA断片長について、種内変異と種間変異を網羅的に調べることにより、地下部の菌根菌同定の精度を向上させた。既に、Kårén *et al.* (1997) によって、多くの菌種でITS領域に種内変異があることが明らかにされているにもかかわらず、地下部の菌根菌同定に種内変異が考慮されることはほとんどなかった。もしある調査地の菌種同定に種内変異を考慮しないITS-RFLPが用いられるとしたら、種内変異を別種として同定してしまうことに繋がり、菌根菌種数を過大評価してしまう可能性がある。ある調査地内の種内変異を把握するためには、その調査地に存在する十分な数のジェネット（同一種内で遺伝的に異なる個体）を調べる必要がある。本研究の調査地では、それぞれの植生パッチは海に浮かぶ島のように物理的に隔離されているため、外生菌根菌は菌糸伸長によって一つの植生パッチから別の植生パッチに生育域を広げることができない。それゆえ、別々の植生パッチに発生した子実体は異なるジェネットに属することを意味する。実際に、今回の研究に用いたハマニセショウロは、ISSR マーカーと SSR マーカーを用いたジェネット解析により、全て異なるジェネットであることが分かっている。調査地内の異なる植生パッチに発生した子実体をできるだけ多く用いていくつかのプライマーセットと制限酵素をテストした結果、ITS₃₋₄ と ITS_{1F-HinfI} の組み合わせによって子実体を形成した全ての菌種を区別できることを明らかにした。このように種内変異と種間変異を注意深く検証し、使用するプライマーセットと制限酵素を選択したことにより、地下部菌根菌の同定の精度は著しく高められたものと考えられる。

地下部外生菌根菌と子実体の群集構造

これまで、分子生物学的手法を用いた地下部外生菌根菌の群集構造解析によって、30年生の Norway spruce 林における 2,352 cm² の実際に掘り取ったサンプリング面積から外生菌根菌が21種、35年生 Bishop pine 林の 2,418 cm² からは少なくとも20種、100年生 Ponderosa pine 林の 924 cm² からは50種以上、350～400年生 Red fir 林の 664 cm² からは80種の菌が検出されている (Horton & Bruns 2001)。こうした林分では、更にサンプリングの数を増やすことで検出できる種数はどんどん増加するため、実際に生息する外生菌根菌は上述した種数より遙かに多いものと考えられる (Taylor 2002)。一方、本研究では、7,200 cm² のサンプリング面積（方形区内に存在する全宿主面積の0.14%に相当）から21種の菌を検出した。しかも、調べた菌根数の増加に伴う検出菌種の積算数は完全に横ばいとなっており、調査地にあるほとんど全ての菌種を検出したものと考えられる。地下部外生菌根菌の種数については、一次遷移の初期過程での比較できる研究例は他に無いが、発達した森林に比べて大幅に少ないものと示唆される。

富士山火山荒原の一次遷移初期では、地下部の外生菌根全体の88%が子実体として記録されている菌種によって形成されていた。一次遷移の初期では、その土壤中に感染源となるものが存在しないため、外部からの胞子供給が最初の菌根形成に必要不可欠である (Allen *et al.* 1992, Cázares & Trappe 1994)。子実体を容易に形成できる菌種は、胞子散布能力に優れ、こうした場所での定着とその後の生息域拡大において優位に立つものと考えられる。

第2章の外生菌根性子実体に関する2年間の調査結果では、23種が確認され、クロトマヤタケ、キツネタケ、ウラムラサキ、ギンコタケ、ハマニセシヨウロ等が子実体発生量の多い菌種であった。こうした子実体発生量の豊富な菌種の全てが地下部の菌根菌群集でも主要な構成要素であった。一方、子実体発生量の極めて少なかった10種は、地下部の調査では検出できなかった。これは、子実体の分布と同様に、こうした菌種の菌根が極めて限られた地点にのみ分布しているため、サンプリングされなかったためであると考えられる。また、子実体としては記録されなかったが地下部の菌根には検出された菌種のほとんどは、*Tomentella* spp. や *C. geophilum*、*Sebacina* sp. といった、いわゆるキノコを形成しない菌種であった。こうした結果から、本調査地に存在する外生菌根菌でキノコを形成できる菌種のほとんどは、実際にキノコを形成したものと考えられる。既に第2章で考察したように、子実体発生に適した環境条件にあるこの場所の外生菌根性キノコの発生量は驚くほど多い。地上部と地下部の外生菌根菌群集の構成種がよく一致した理由の一つには、こうした子実体発生に適した条件であったことが挙げられるのではなからうか。

しかし、各菌種の相対数量順位は、地上部と地下部で若干の違いが見られた。これは、子実体を形成するのに必要な菌根数や、子実体形成機構そのものが菌種によって異なることに起因すると考えられる。また、子実体と菌根のサンプリング方法が全く異なるために（子実体は調査地の全面積から経時的にサンプリングしたが、菌根は不均質な調査地のごく一部の場所からある一時点のみのサンプリング）、比較そのものが不適当であるのかもしれない。しかし、林地で調べられた例では、地上部と地下部の構成種や相対数量がより大きく異なることが一般的である (Gardes & Bruns 1996, Dahlberg *et al.* 1997, Kårén & Nylund 1997, Pritsch *et al.* 1997, Jonsson *et al.* 1999a, b, Horton & Bruns 2001)。

林地においては、いわゆるキノコを形成しない菌種である *C. geophilum*、*Sebacina*、*Tomentella* などが、しばしば地下部の菌根菌群集で優占し、地上部の子実体群集との不一致を引き起こす要因となっている (Gardes & Bruns 1996, Dahlberg *et al.* 1997, Peter *et al.* 2001)。こうしたキノコ非形成種 (non-mushroom fungi) や目立たないキノコ形成種 (inconspicuous -mushroom fungi) は、今回調査した地下部菌根菌群集でも出現している。その相対数量の合計は、小サイズ宿主で1%、中サイズ宿主で2%、大サイズ宿主の外部で1%と低く、不健全な中サイズ宿主で25%、大サイズ宿主の内部で20%、縁部で18%と高い値を示した。つまり、宿主のサイズ成長や土壌発達とともに、キノコを形成しない菌種が増加していることが明らかになったが、その相対数量は林地での値と比べるとまだ低い (Gardes & Bruns 1996, Dahlberg *et al.* 1997, Peter *et al.* 2001)。こうしたことから、一次遷移の初期ではよく一致していた子実体群集と地下部菌根菌群集は、植生の発達とともに非キノコ種の増加により、徐々に乖離していくようになると考えられる。

地下部から見た外生菌根菌の一次遷移

新しい植生パッチに新規に定着したミヤマナギに最初に感染する外生菌根菌は、3つの first-stage fungi (クロトマヤタケ、キツネタケ、ウラムラサキ) のいずれかであった。その後、宿主の成長とともに複数の first-stage fungi が組合わさるようになるとともに、second-stage fungi (ギンコタケ、ハマニセシヨウロ) が出現するようになる。ワカフサタ

ケ属やフウセンタケ属、イボタケ科の菌根菌は、更に宿主が大きくなってはじめて見られるようになる late-stage fungi であった。こうした late-stage fungi は、この調査地において最も発達した土壌が存在する大サイズ宿主の内側によく見られた。こうした地下部外生菌根菌の遷移は、子実体で見られたものと（第2章）、種、出現順序、空間分布などの点で非常に類似していた。

二次遷移地における子実体の研究から、外生菌根菌の遷移には、いち早く定着した菌種の数量が徐々に減少し、やがては消えてしまうことが多数報告されている (e.g., Last *et al.* 1984)。富士山火山荒原における地下部菌根菌の遷移過程では、宿主の成長とともに first-stage fungi の菌根が消えることはなかったものの、宿主被覆の縁部でその相対菌根数が減少した。例えば、キツネタケの相対菌根数は宿主が小さいときは多く、宿主が大きくなるに従って縁部で大きく減少した (図 3-5)。しかし、宿主の成長とともに、縁部そのものの面積が増大するとともに、宿主の内部や外部といった別の場所では、高い相対菌根数を示していた。こうした結果から、いずれの主要な菌種においても、菌根の絶対量は減少しておらず、宿主の成長とともに単調増加しているものと推定できる。興味深いことに、宿主の成長に伴う各菌種の絶対数量の単調増加は子実体の発生量でも見られた (第2章)。

宿主の成長とともに新しい外生菌根菌が加わることにより、1宿主あたりの検出できた外生菌根菌の種の数は著しく増加した。いずれのサイズクラスの宿主からも同じ数の土壌サンプルを採取しているものの、小さい宿主ではサンプル間の距離が短い。そのため、一続きの同じ外生菌根菌群集から複数サンプリングしたために、小さい宿主の菌種が少なくなったとも考えられる。しかし、宿主の成長にともなって1土壌サンプルあたりに含まれる外生菌根菌の種数も有意に増加していたことから、外生菌根菌の種数の増加は、宿主のサイズ成長に伴う全体としての多様化とは別に、一定の少量な土壌の中でも起こっていることが明らかにされた。

同じ大サイズの宿主の外部よりも内部に多くの外生菌根菌が検出できたことから、外生菌根菌の種数を決定する重要な要因が見えてくる。宿主の内部では、リターが蓄積し、土壌中の有機物や窒素の量が増えることが、ほぼ同じ場所での研究によって明らかにされている (Tateno & Hirose 1987)。また、リターのタイプや土壌の質は外生菌根菌群集に大きく影響することが知られている (e.g. Conn & Dighton 2000)。一次遷移の初期過程では、土壌の発達というものが、late-stage fungi をはじめとする多くの菌根菌の定着に必要であり、外生菌根菌の種数が増加するための前提になるものと考えられた。

生物群集の構造は順位-相対数量図によって解析されることが多い (Tokeshi 1993)。同じ方法が外生菌根菌の群集構造に関する研究でも有効に使われてきた (Visser 1995, Jonsson *et al.* 1999a, Horton & Bruns 2001)。Visser (1995) は山火事跡地に更新した異なる樹齢の Jack pine 林において、外生菌根の形態タイプによる群集構造解析を行っている。その研究の中で、6年生の実生に共生する外生菌根は数タイプの菌根によって優占されており、順位-相対数量曲線のパターンは等比級数モデル (geometric series model) に合致するが、41年生、65年生、122年生の林分では形態タイプの数が飛躍的に増え、対数正規モデル (log-normal model) によく当てはまることが示されている。本研究でも、宿主植生の発達とともに、順位-相対数量曲線は等比級数タイプから対数正規タイプへと変

化する傾向にあった。より多くの研究例がある植物群集の発達における群集構造の変化でも、同様な順位-相対数量曲線の変化が多数報告されている (Tokeshi 1993)。つまり、一次遷移の初期過程における外生菌根菌の群集構造は、宿主の成長とともに発達すること、また宿主の外部より内部でより発達することが示されたものと考えられる。

同程度のサイズのみヤマヤナギでも、健全なものと不健全なものを比べると、外生菌根菌群集は著しく異なっていた。第2章で示したように、不健全な宿主では葉量が極端に少なく、光合成活性も低い。このことから、宿主からの光合成産物の供給が十分でないこと、クロトマヤタケやハマニセショウロの定着を妨げると同時に、*Thelephoraceae* や *C. geophilum* などのキノコを形成しない菌種の定着を促進する可能性がある。また逆に、共生する外生菌根菌の種によって宿主の生育が決定されることを示唆するのかもしれない。

この章では、富士山火山荒原における外生菌根菌の地下部の一次遷移パターンを、出現順序、種数、相対数量、群集構造などの視点から明示した。また、地下部の遷移パターンを子実体の遷移パターンとも比較検討し、高い類似性があることを示した。さらに、不健全な宿主でみられた地下部外生菌根菌群集は、通常の遷移パターンから大きく逸脱していることを示した。このような地下部外生菌根菌の一次遷移過程とその特徴が詳細に明らかにされたのは初めてであり、第2章で明らかにされた外生菌根性子実体の遷移とともに、「外生菌根菌の一次遷移モデル」を新たに確立できたものとする。

