

カラマツ芽ばえの菌根形成と成長

村 田 義 一*

In vitro mycorrhizal synthesis on Japanese larch
(*Larix leptolepis* GORDON) seedlings and their growth

Yoshikazu MURATA*

要 旨

ハナイグチとシロヌメリイグチによるカラマツの菌根形成を試験管内の接種試験によって確認するとともに、苗齢 60 日の芽ばえを用い、菌根形成に伴う苗木形質の向上について検討した。

ハナイグチの 2 菌株、シロヌメリイグチの 1 菌株をそれぞれ接種すると、カラマツに良く発達した外生菌根が形成された。それらの菌根は形態的にほとんど違いがなかった。

ハナイグチの菌根は接種菌量が多いほど形成されやすかった。オートクレーブ滅菌した林地土壌では、培養期間中に、良く発達したシロヌメリイグチの菌根は形成されなかった。しかし、B - 2 液などを添加すると菌根形成は順調に進行し、B - 2 液にカラマツ風乾葉の抽出液を添加した栄養区で菌根形成は特に良好であった。ハイポネックスの希釈液は、カラマツ風乾葉の抽出液を加えた B - 2 液や B - 3 液に比べ、ハナイグチやシロヌメリイグチの菌根形成にあまり有効ではなかった。この傾向は、シロヌメリイグチの菌根形成について特に顕著であった。3 者の栄養区で比較すると、ハナイグチやシロヌメリイグチの菌根形成は、カラマツ風乾葉の抽出液を加えた B - 3 液を添加したとき最も旺盛であった。なお、試験管開口部をアルミ箔で封じた場合に比べ、一時期アルミ箔を除去してやや乾燥ぎみにカラマツを育てたときの方が、ハナイグチの菌根形成は促進された。シロヌメリイグチの菌根形成は、グルタミン酸を窒素源にしたときも、無機態窒素化合物のときに比べてあまり劣らないように思われた。ハナイグチやシロヌメリイグチの菌根形成は菌株によって非常に異なった。

ハナイグチとシロヌメリイグチの菌根形成の効果は、カラマツの芽ばえの発根促進と葉の総重量の増加に顕著に現れていた。親和性が高いと考えられる菌株の場合は、苗長、地下部の長さ、着葉数なども増加した。これらの効果は、接種菌量、培養方法、栄養条件などで非常に異なった。本稿の一連の接種試験では、接種菌量が多く、カラマツ風乾葉の抽出液を添加した B - 3 液を栄養源として、やや乾燥ぎみにカラマツを育てたとき、菌根形成が最も旺盛になり、それに伴って上記の苗木形質が最も向上するものと思われた。

はじめに

ハナイグチ *Suillus grevillei* (KLOTZ .) SING . やシロヌメリイグチ *S. laricinus* (BERK .) O . KUNTZE がカラマツ属の樹木に外生菌根をつくることは、MELIN (1922 , 1925) , GRAND (1968) , MOLINA and TRAPPE (1982) , SAMSON and FORTIN (1988) らの接種試験で明らかである。それらの子実体はカラマ

*北海道立林業試験場 Hokkaido Forestry Research Institute , Bibai , Hokkaido 079 - 01

ツ林以外では確認されず、長い間、それらはカラマツ属の樹木に特異的な菌根菌であると考えられてきた。しかし、GRAND (1968) や MOLINA and TRAPPE (1982) の接種試験によると、それらはグラスファー *Pseudotsuga menziesii* にも良く発達した外生菌根をつくり、現在では、カラマツとグラスファーの両者に共生する可能性が示唆されている。ハナイグチやシロヌメリイグチがグラスファーを寄主にするとしても、ヒダハタケ *Paxillus involutus*, コツブタケ *Pisolithus tinctorius*, キツネタケ *Laccaria laccata* などの菌根菌に比べて、それらの寄主範囲は非常に狭い (MOLINA and TRAPPE 1982)。したがって、それらが寄主特異的な菌根菌である (MELIN 1922) という考えは依然として間違えない。

ハナイグチやシロヌメリイグチはカラマツ林でごく普通に見られる良く知られたきのこであるうえ、植栽されたカラマツの外生菌根から高頻度で分離され (田村 1974), 接種すると、カラマツ属の樹木に良く発達した外生菌根を容易に形成する。それにもかかわらず、それらの菌根苗木の成長はほとんど調べられてこなかった (田村 1975)。本稿では、ハナイグチとシロヌメリイグチの一連の接種試験を行ない、菌根形成をとおして、カラマツ *Larix leptolepis* GORDON の芽ばえの成長やその他の苗木形質がどのように向上するか検討した。そして、特に、培養方法、栄養条件、菌株によるそれらの違いについて議論した。

材料と方法

本実験で供試した土壌は、1986年7月以降数回にわたって新得町西こ線のグイマツ雑種 F₁ 見本林の表層土から採取した黒色土である。供試土壌は風乾後、直径 2 mm 以下の細土に篩別し、使用時までプラスチック瓶で保存した。使用時の風乾細土の含水率は 7.5 ~ 9.6% であった。下記の実験 - 2 では上記風乾細土 20g だけを供試母材とし、それ以外の実験では、風乾細土 20g (実験 - 1 のみ 23g) とパーミキュライト 2g (約 12ml) の混合物を用いた。これらの母材は、30mm の大型試験管に注入後、B - 2 液、B - 3 液 (表 - 1) あるいはその他の培養液を 8 ~ 10ml 添加し、1.2 気圧で 60 分オートクレーブした。なお、実験 - 4, 6 では B - 3 液を使用し、実験 - 1 では窒素源を 1.0504g / ㍑の L - グルタミン酸に変更した B - 3 液を用いた。これらの実験区では、下記カラマツ風乾葉の抽出希釈液を添加した。その他の実験で用いた培養液は別途表示のとおりである。

カラマツ風乾葉の抽出液は、500ml のフラスコを用い、風乾葉 10g を 150ml の 30% エタノール中で弱火で 60 分煮沸したのち、濾液のエタノールを室温で蒸発させ、pH を 5.8 に調製後、ミリポアフィルターで濾過滅菌して作製した。使用時に原液 11.2ml を蒸留水 88.8ml で希釈し、必要に応じて、その希釈液 2ml を上記滅菌剤母材に無菌的に添加した。なお、供試葉は 1986 年 9 月、美唄市で 23 年生カラマツから採取し、風乾後、ビニール袋で保存した。風乾葉の含水率は 10.5% であった。

表 - 1 供試培養液

Table 1. Nutrient solutions.

B - 1 :	塩化カルシウム CaCl ₂ · 2H ₂ O 50 mg, 塩化ナトリウム NaCl 25 mg, リン酸 2 水素カリウム KH ₂ PO ₄ 0.5g, リン酸 2 アンモニウム (NH ₄) ₂ HPO ₄ 58.9 mg, 硫酸マグネシウム MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.15g, 塩化第二鉄 (1% 溶液) FeCl ₃ · 6H ₂ O (1% solution) 1.2ml, チアミン塩酸塩 Thiamine - Hcl 25 μg, ブドウ糖 Glucose 2.5g, 蒸留水 Dist, water 1000ml, 滅菌後 pH5.6 (after sterilization)
B - 2 :	上記のうち、リン酸 2 アンモニウムを 117.9 mg に変更 (NH ₄) ₂ HPO ₄ 117.9 mg in B - 1
B - 3 :	B - 1 のうち、リン酸 2 アンモニウム、ブドウ糖をそれぞれ 471.5 mg, 10g に変更 In B - 1 solution, (NH ₄) ₂ HPO ₄ 471.5 mg and glucose 10g.

供試したハナイグチとシロヌメリイグチは表 - 2 に示した菌株である。すべて、カラマツ人工林で採取した子実体の管孔から分離し、浜田培地（浜田 1955）へ移植後、使用時まで冷蔵庫で保存した。これらの供試菌は、9cmのシャーレを用い、25℃のB-1ないしB-2寒天培地（表-1、寒天1.5%添加）で21~44日間培養した。これらの菌叢先端部から、直径0.6cmの寒天板を採取して接種源とした。接種源は培養母材の表層浅くに埋め込み、25℃で30日間（実験-2のみ20日間）培養した。

表 - 2 供試菌株

Table 2 .Fungal isolates collected for this research .

菌株 Isolate	採集場所 Location	採集林分 Forest	採集月日 Date
ハナイグチ <i>Suillus grwillei</i>	下川 1 - 3 美唄 - 4 新得 - 3	下川町パンケ 美唄市光珠内町 新得町字佐幌	カラマツ人工林 <i>Larix leptolepis</i> plantation
シロヌメリイグチ <i>S. laricinus</i>	美唄 - 1 栗山 4 - 1 - a	美唄市光珠内町 栗山町桜山	1985年9月19日 1985年6月18日 1985年9月26日 1983年9月17日 1985年9月14日

供試材料のカラマツには、種子貯蔵庫で保管された道有林の北見採種園1982年産の種子を使用した。精選種子は約24時間透水に浸水し、30%過酸化水素水で60分振とうさせながら表面殺菌した。滅菌水で60分ずつ2回洗浄後、浜田培地に置床し、25℃で5~7日間経過後に無菌状態であることを確認した。これらの無菌種子のうち、幼根が0.5cm前後伸長したものを選び、所定期間の培養が終了した各試験管の培養母材へ1個ずつ無菌的に浅く埋め込んだ。その後、20℃、湿度約60%、7500ルクス、18時間日長の人工気象器（日本医科製、LPH-200-RD）で60日間育成した。なお、実験-5だけは照度9000ルクスの人工気象室で行った。

育成期間終了後、試験管内のカラマツの芽ばえをていねいに取り出し、培養母材から上の高さおよび母材表面以下の長さ、全根端数、外生菌根の形成頻度、長さ0.5cm以上の葉の数およびそれらの総重量を測定した。根端数と外生菌根の数は実体顕微鏡を用いて確認にし、菌根形成頻度は全根端数に占める菌根数の割合で示した。これらの調査項目は、苗長、根長、根端数、菌根形成率、葉数、生葉の生重、葉の乾重と表示した。なお、反復数は25とした。

結果と考察

実験 - 1（接種菌量の違い）

無接種の場合、もちろん外生菌根は形成されなかったが、ハナイグチ下川 1 - 3 株の接種菌量が増加すると菌根形成率は高まった（表 - 3）。苗長、菌根数、着葉数、葉の総重量なども、接種菌量が増えるとともに増加した。接種菌量が増え、培養期間中の菌糸成長量も増加するものと予測され、実験 1 の結果は、菌量の増加とともに菌根形成率が高まり、苗長、着葉数、葉の総重量などの苗木形質が向上することを意味するものと考えられる。

本実験で、2個の寒天板を接種して90日間培養したとき、培養終了時の苗齢60日のカラマツの芽ばえの菌根形質率は25%にすぎなかったが、無接種区に比べ、それらの苗長、地下部の長さ、着葉数は1.3~1.5倍に増加し、根端数や葉の総重量は2.3~2.4倍に達した。これらの傾向は、菌根形成によって、発根が促進され、それが特に葉の重量の増加、ひいては地上部の重量の増加につながることを示唆している。なお、本実験で形成された菌根は、写真-1と同様の形質をした典型的な外生菌根であった。

外生菌根菌はオーキシン類やサイトカイニン類などの植物成長促進ホルモンを分泌し（MOSER 1959、

NG et al . 1982), それらによって発根が促進される (SLANKINS 1958 , BARNES and NAYLOR 1959)。また , BOWEN (1973) によると , ユーカリやブナの外生菌根の容積は無菌的な根の 4 倍ないし 2.8 倍に達し , そのうえ , 外生菌根の表面の厚い菌套から土壤中へ延びた菌糸や菌糸束によって (SKINNER and BOWEN 1974) , 効率的に養分が捕捉される。乾物重量 1g の根と比較すると , 外生菌根は無菌的な根の 1.8 倍 , 3.2 倍 , 2.1 倍の窒素 , リン酸 , カリウムを吸収できるほどである (HATCH 1937)。外生菌根が形成されることによって , このようにして効率的かつ多量に吸収された無機養分は , 大部分が一時菌套に貯蔵され (HARLEY and SMITH 1983) , やがて根や地上部へ転流される。外生菌根によって特に効率的に吸収されたりん酸は , 土壤中の有効態りん酸が欠乏したとき , 新梢へ継続的に転流されることが知られている (MORRISON 1957 , 1962)。このような過程を経て , 菌根形成によって , 特に , 発根促進と葉の重量の増加が顕著になるものと考えられる。

表 - 3 接種菌量による菌根形成と苗木形質の違い

Table 3 . Mycorrhiza formation and growth of *L. leptolepis* seedlings , when incubated in different inoculum size .

接種菌量 (寒天板数) No . of disc inocula	菌根形成率 % Mycorrhizal frequency %	菌根数 No . of mycorrhizal roots	根端数 No . of rootlets	苗長 cm Height cm	根長 cm Root length cm	葉数 No . of leaves	葉の生重 mg / 本 Fresh weight of leaves	葉の乾重 mg / 本 Dry weight of leaves
0	0 ^a	0 ^a	13 ^a	3.0 ^a	3.0 ^a	26 ^a	25.6 ^a	7.2
1	9.1 ^b	3 ^b	30 ^b	3.5 ^b	4.2 ^b	32 ^b		
2	25.2 ^c	8 ^c	31 ^b	4.0 ^c	4.5 ^b	38 ^c	58.4 ^b	15.2

a , b , c : 相互に 1% で有意 Significant at 1% level

実験 - 2 (栄養条件の違い - 1)

含水率約 65% の滅菌土壤中でシロヌメリイグチ美唄 - 1 株を 90 日間培養しても , 苗齢 60 日のカラマツの芽ばえに明瞭な外生菌根は形成されていなかった (表 - 4)。しかし , B - 2 液を添加すると , 同じ苗齢の芽ばえの菌根形成率は 78% に達した。B - 2 液にカラマツ風乾葉の抽出液を添加すると , 菌根形成率はさらに高まり , 苗齢 60 日で 86% に及んだ。B - 2 液区では , 苗齢が 30 日以上になったときも菌根形成率は 58% から 78% に増加したが , B - 2 液とカラマツ風乾葉抽出液の併用区 (以下 , B - 2 液併用区という) では苗齢 30 日以降 , 菌根形成率にあまり大きな変化は認められなかった。このことは , 実験 - 1 で考察した菌根形成に伴う発根数の増加につれて , ある段階で菌根形成率が低減する可能性もあることを示唆している。

少量のカラマツの風乾葉 (22 . 4 mg) から得られた抽出液を添加したとき , 無添加区に比べてカラマツ芽ばえの菌根形成がやや促進されたのは , 供試菌の成長促進のためと考えられる。このことは , B - 2 培地あるいは B - 2 寒天培地に 1 . 4% 以上のカラマツ風乾葉の抽出液 (原液) を添加したとき , ハナイグチやシロヌメリイグチの菌糸成長が著しく促進された (未発表) ことから裏づけられる。菌量が増加すると菌根形成率が高まることは , 実験 - 1 で考察したとおりである。

シロヌメリイグチは生育初期のカラマツに外生菌根をつくる菌根菌と考えられる (未発表)。それにもかかわらず , 滅菌土壤中で , 苗齢 60 日のカラマツの芽ばえに明瞭な菌根が形成されなかったのは , 供試したシロヌメリイグチの菌糸が十分成長しえなかったためと思われる。供試土壤の水抽出液を濾過滅菌して添加すると , 供試シロヌメリイグチの菌糸成長は促進されず , 高濃度ではむしろ抑制された (未

発表)。したがって、オートクレーブした滅菌土壌中に接種したシロヌメリイグチの菌糸成長が試験管外から目視されなかったのは、菌糸成長のための養分の欠乏か成長阻害物質の遊離のためかもしれない。本実験で添加したB - 2液あるいはB - 2液とカラマツ風乾葉抽出液の併用液では、水道水区に比べ、根端数、苗長、着葉数、葉の総重量などが著しく増加した。後2者の増加傾向は併用区で特に強かった。これらの結果から判断すると、上記のような苗木形質の向上を図るため、場合によっては、自然土壌に適切な施肥をすることによって、パイオニアであるシロヌメリイグチの菌糸成長とその菌根形成を促すことも必要と思われる。一般に、りん酸や窒素の含量が高いときは外生菌根は形成されにくいことが知られている(BJÖRKMAN 1942)。したがって、自然土壌へ施肥するにしても、それらの施肥量を抑え、適切な配合比にしなければ菌根菌の活用にはつながらない。このことは、LAMD and RICHARDS (1974a, 1974b)らの施肥試験によっても明らかである。

実験 - 3 (栄養条件の違い - 2)

菌根菌を接種しなかったとき、1000倍のハイポネックス希釈液を施肥して育てたカラマツの芽ばえは、B - 2液併用区あるいはB - 3液とカラマツ風乾葉抽出液との併用区(以下、B - 3液併用区という)に比べ、特に生育不良とは考えられなかった。根端数、地下部の長さ、着葉数、葉の総重量などはB - 3液併用区よりむしろ多かった(表 - 5)。品質表示によると、ハイポネックスは微量元素を含む完全

表 - 4 栄養条件による菌根形成と苗木形質の違い(1)

Table 4. Mycorrhiza formation and growth of *L. leptolepis* seedlings in different nutrient levels (1)

栄養区 Nutrient level	菌根形成率 % Mycorrhizal frequency %	菌根数 No. of mycor- rhizal roots	根端数 No. of rootlets	苗長 cm Height cm	根長 cm Root length cm	葉数 No. of leaves	葉の生重 mg / 本 Fresh weight of leaves	葉の乾重 mg / 本 Dry weight of leaves
水道水 Tap water	0	0	6 ^x	2.8 ^x	2.4	26 ^x	24.6 ^x	5.6
B - 2	77.7	11 ^a	13 ^y	3.7 ^y	3.0	42 ^y	50.8 ^y	14.3
B - 2 + カラマツ風乾葉抽出液 B - 2 + larch leaf decoction	86.1	14 ^b	16 ^y	3.7 ^y	3.0	47 ^z	53.2 ^z	16.8

a, b : 5%で有意 Significant at 5% ; x, y, z : 相互に有意 Significant at 1% level

配合肥料とされており、カラマツの芽ばえを育成するための施肥効果は、少量のカラマツ風乾葉の抽出液と併用したB - 2液やB - 3液に比べてそれほど劣らないものと思われる。

次に、ハナイグチ下川1 - 3株とシロヌメリイグチ美唄 - 1株を用い、ハイポネックス区での菌根菌の接種効果をB - 2液併用区やB - 3液併用区と比較した。ハイポネックス区では、両供試菌とも、他の栄養区に比べて菌根形成が悪く、良く発達した外生菌根をつくりにくかった(表 - 5)。この傾向はシロヌメリイグチ接種区で特に顕著であった。しかし、ハイポネックス区でも、ハナイグチとシロヌメリイグチの接種区では、無接種区に比べて根端数が2.8倍と1.9倍に増加し、苗長や着葉数の増加などの点でも、接種効果は現れていた。このような効果は、菌根形成率が最も高かったB - 3液併用区で最も顕著に認められ、ハナイグチとシロヌメリイグチの接種区では、根端数が無接種区の7.7倍と6.0倍、葉の総重量が同じく3.4倍と2.3倍に達し、苗長、地下部の長さ、着葉数も対照区の1.8~2.2倍と1.4~1.9倍に増加した。B - 2併用区では、両者の中間的な傾向が認められた。

ハイポネックス区で菌根菌の接種効果がそれほど高でなかつたのは、前述のとおり、カラマツの育成に不適だったからではなく、環試菌の菌系成長が悪かったためと考えられる。このことは、カラマツ育成終了時の試験管外からの目視や寒天培地での菌系成長試験（未発表）などで裏づけられる。一方、B-3液併用区で接種効果が特に高かったのは、供試菌の菌系成長が最も旺盛であった（未発表）ごとと、後半30日間だけ試験管閉口部のアルミ箔を除去してカラマツの芽ばえを育てたことの複合効果と考えられる。B-3液併用区では良く発達した外生菌根（写真-1, 2）が最も多く形成されたことから判断し、このような処理をしても、カラマツ育成初期の菌根菌の菌系成長が旺盛な場合は、菌根形成に悪影響がなかったことはあきらかである。カラマツは好気性樹種に位置づけられる（信州大学農学部林学教室 1962）。アルミ箔を除去してやや乾燥ぎみに育てた方が根へ酸素が供給されやすく、供試菌の菌系成長が十分旺盛な場合は、発根が促進されるにつれて菌根形成が順調に進行するものと考えられる。

なお、カラマツに形成されたシロヌメリイグチの外生菌根は今まで報告されていなかったが、MOLINA and TRAPPE (1982) や SAMSON and FORTIN (1988) らの報告と同様、形態的にはハナイグチの外生菌根とほとんど変わらなかった。

表 - 5 栄養条件による菌根形成と苗木形質の違い (2)

Table 5. Mycorrhiza formation and growth of *L. leptolepis* in different nutrient levels (2).

栄養区 Nutrient level	供試菌 Fungal species	菌根形成率 % Mycorrhizal frequency %	菌根数 No. of mycorrhizal roots	根端数 No. of root-lets	苗長 cm Height cm	根長 cm Root length cm	葉数 No. of leaves	葉の生重 mg / 本 Fresh weight of leaves
ハイポネックス 1000倍 Hyponex solution (1:1000)	ハナイグチ <i>S. grevillei</i>	33.7	22	61 ^x	3.3 ^x	5.8	40 ^x	100.8
	シロヌメリイグチ <i>S. larinus</i>	3.3	2	42 ^y	2.9 ^y	6.3	34 ^y	69.0
	Cont.	0	0	^a 22 ^z	2.2 ^z	^a 5.4	^a 30 ^z	^a 77.1
B-2+カラマツ 風乾葉抽出液 B-2+larch leaf decoction	ハナイグチ <i>S. grevillei</i>	57.4	30	52	3.4	6.8	47	160.8
	シロヌメリイグチ <i>S. larinus</i>	33.6	21	61	3.4	5.7	39	107.8
	Cont.	0	0	36	2.5	5.6	31	88.4
B-3+カラマツ 風乾葉抽出液 B-3+larch leaf decoction	ハナイグチ <i>S. grevillei</i>	69.9	71	100 ^e	4.2 ^e	7.5 ^e	56 ^e	248.3 ^e
	シロヌメリイグチ <i>S. larinus</i>	61.1	48	78 ^f	4.1 ^e	5.3 ^f	48 ^f	169.2 ^f
	Cont.	0	0	^b 13 ^g	2.3 ^f	^b 3.8 ^g	^b 25 ^g	^b 73.7 ^g

a, b; e, f, g; x, y, z: 相互に1%で有意 Significant at 1% level

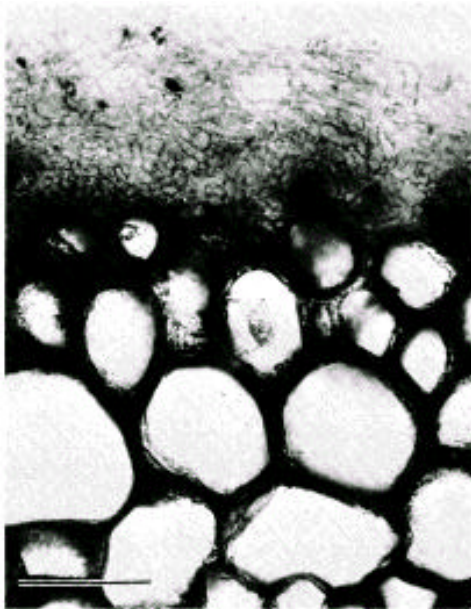


写真 -1 ハナイグチ下川1 -3 株による
カラマツの外生菌根
(横断面 . : 50 μ m)

Photo .1 . Ectomycorrhiza formed by *S. grevillei* (Simokawa 1 - 3 isolate). Transverse section . Bar : 50 μ m .

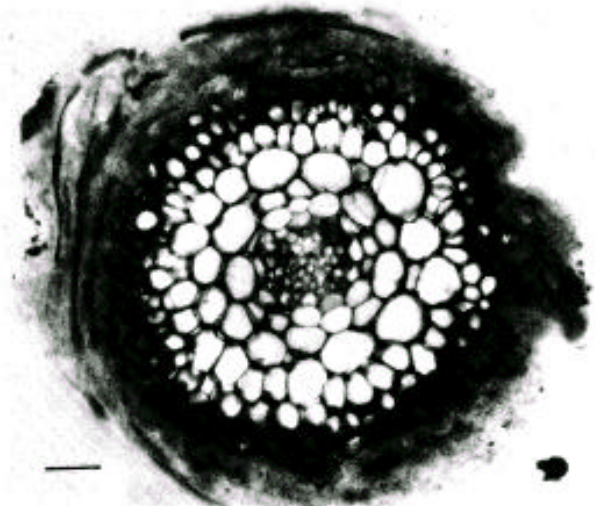


写真 -2 シロヌメリイグチ美唄 -1 株に
よるカラマツの外生菌根
(横断面 . : 50 μ m)

Photo .2 . Ectomycorrhiza formed by *S. laricinus* (Bibai - 1 isolate). Transverse section . Bar : 50 μ m

実験 - 4 (培養方法 - 空気の流通の違い)

菌根菌を接種したカラマツ芽ばえの育成後期に試験管開口部のアルミ箔を除去したとき、菌根形成の進展する可能性が実験 - 3 で指摘された。このため、全育成期間をアルミ箔や PF ミクロフィルターで封じた区と、後半 30 日間だけアルミ箔を除去した区で、菌根形成や苗木形質がどのように異なるか調査した。供試した PF ミクロフィルター、(三富産業製) は、0.02 μ m の超微細孔を有するポリプロピレンのフィルムをアルミ箔表面にラミネート加工したもので、空気の流通が良く、植物体の発育に最適な環境をつくると表示されている。

ハナイグチ下川 1 - 3 株の菌根は、全期間アルミ箔で封じたとき最も形成されにくく、カラマツの育成後期 30 日間だけアルミ箔を除去したとき、最も形成されやすかった (表 - 6)。 後者では、前者の 35 . 5 倍の外生菌根が形成されたことになる。アルミ箔区、PF フィルター区、後半 30 日間アルミ箔除去区で、菌根形成率はそれぞれ 8%、46%、70%であった。 これらの結果は、空気の流通が良いほどカラマツの菌根ができやすいことを示唆している。外生菌根が形成されるにつれて、菌根菌の接種効果として、 根端数や葉の総重量をはじめ、苗長、地下部の長さ、着葉数などが増加することは実験 - 1、3 の結果と同様であった。この効果はアルミ箔区でももちろん認められたが、菌根形成が最も旺盛であった後半 30 日間のアルミ箔除去区で最も顕著であった。

実験 - 2 で、菌根形成を促進するため、場合によっては適切な施肥が必要なことを考察した。このほか、土壌水分を比較的減少させ、空気の流通を良くすることが重要なことを本実験で指摘した。このことは、泥炭地などの湛水土壤で菌根形成が悪く、地表面近くに多少形成された外生菌根も発達の悪いものばかりであった (HEIKURAINEN1955) という報告からもうなずける。苗畑などでは、菌根形成を促進するため、適切な施肥のほかに、ピートモスなどの有機物を混和し、酸度を矯正するとともに、孔隙量を増やすよう勧められている (MIKOLA 1973)。

表 - 6 培養方法による菌根形成と苗木形質の違い

Table 6 .Mycorrhiza formation and growth of *L. leptolepis* seedlings ,
when incubated in different sealing methods .

処理区 Sealing method	菌根形成率 % Mycorrhizal frequency %	菌根数 No . of mycor- rhizal roots	根端数 No . of rootlets	苗長 cm Height cm	根長 cm Root length cm	葉数 No . of leaves	葉の生重 mg / 本 Fresh weight of leaves
アルミ箔接種 Seled with aluminum cap Inoculated Cont .	8.1 ^a 0	2 ^a 0	21 ^a 10	3.8 ^a 2.7	3.6 ^a 2.0	30 ^a 21	
PFフィルター接種 Sealed with PF filter Inoculated Cont .	45.8 ^b 0	10 ^b 0	21 ^a 6	3.6 ^a 3.1	6.4 ^b 3.4	31 ^a 15	51.7 ^a 15.5
後半 30 日間アルミ箔除去接種 Removal of aluminum cap during last 30 days Inoculated Cont .	69.9 ^c 0	71 ^c 0	100 ^b 13	4.2 ^b 2.3	7.5 ^c 3.8	56 ^b 25	248.3 ^b 73.7

a , b , c : 相互に 1% で有意 Significant at 1% level

実験 - 5 (栄養条件 - 窒素源の違い)

B - 3 液区 , 窒素源を B - 3 液と同一窒素含量の L - グルタミン酸や L - セリンに変更した B - 3 液
 改変区 , 蒸留水区の 4 つの添加栄養区で比較すると , シロヌメリイグチ美唄 - 1 株の菌根形成率は B -
 3 液区で最も高く , グルタミン酸区 , セリン区 , 蒸留水区の順に減少した (表 - 7) 。 菌根形成率 , 根
 端数 , 苗長 , 着葉数 , 葉の総重量などが蒸留水区で最も少ないことは実験 - 2 の結果から予測されたが ,
 本実験の蒸留水区で供試菌の菌根が若干形成されたのは , 接種菌量を実験 - 2 の倍量にしたためと思わ
 れる。接種菌量の増加とともに上記苗木形質が向上することは , すでに実験 - 1 で示した。

シロヌメリイグチ美唄 - 1 株は , グルタミン酸やセリンを窒素源にしたとき , リン酸 2 アンモニウム
 のときより明らかに旺盛な菌糸成長を示した (未発表) 。 したがって , 菌根菌の旺盛な菌糸成長とい
 う点から判断すると , B - 3 液区よりグルタミン酸区やセリン区の方が接種効果が高くても不思議ではな
 い。本実験では , グルタミン酸区での苗長 , 地下部の長さ , 着葉数などは B - 3 液区と有意差がなかつ
 た。そのうえ , 実験 - 1 , 3 , 4 で菌根菌の主たる接種効果として示した根端数や葉の総重量の増加とい
 う点では , グルタミン酸区の方がやや良好であった。類似した実験結果は , 広口瓶を用いた異なった方
 法の接種試験からも得られた (未発表) 。 なお , 窒素源の種類にかかわらず , 形成された外生菌根は写
 真 - 2 と同様どれも良く発達したものであった。これらの実験結果から判断すると , 窒素源としてのグ
 ルタミン酸の効果は , リン酸 2 アンモニウムに比べて劣らないものと考えられる。むしろ , 供試菌の培
 養期間の短縮という点からは , グルタミン酸の方が大量培養に利用しやすい窒素源と位置づけられる。

供試菌が利用しやすい窒素化合物は , 無機態よりも有機態の方がむしろ多かった (未発表) 。 また ,
 有機態窒素化合物を窒素源にして培養したときも , カラマツ芽ばえへの供試菌の接種効果はかなり高か
 った。このことは , SMITH (1970) の報告などから判断してカラマツの根圏にも分泌されていると思わ
 れるさまざまなアミノ酸を利用して , 供試菌は成長し , 良く発達した外生菌根をつくり , それによって

ラマツの成長に寄与することを示唆している。このような有機態窒素化合物の利用は、高緯度あるいは高海拔地帯での物質循環における菌根菌の役割として重要だと考えられている (REID 1983)。

表 - 7 栄養条件 (窒素源) による菌根形成と苗木形質の違い

Table 7. Mycorrhiza formation and growth of *L. leptolepis* seedlings in different nitrogen sources.

窒素源 Nitrogen source	菌根形成率 % Mycorrhizal frequency %	菌根数 No. of mycorrhizal roots	根端数 No. of rootlets	苗長 cm Height cm	根長 cm Root length cm	葉数 No. of leaves	葉の生重 mg / 本 Fresh weight of leaves	葉の乾重 mg / 本 Dry weight of leaves
B - 3 (りん酸 ² アンモニウム (NH ₄) ₂ HPO ₄)	58.6	18	30 ^a	5.1 ^a	3.0 ^a	58	146.7 ^a	24.1
グルタミン酸 L - glutamic acid	46.6	18	39 ^b	4.7 ^a	2.9 ^a	58	155.1 ^b	26.0
セリン L - serine	33.1	14	35	4.6	3.7	54	140.4	25.7
蒸留水 Dist. water	16.1	2	15	3.8	3.2	41	67.6	13.8

a, b : 1% で有意 Significant at 1% level

実験 - 6 (菌株の違い)

ハナイグチ 3 菌株とシロヌメリイグチ 2 菌株を用い、菌根形成とその後の苗木形質の違いを菌株間で比較した。本実験では、カラマツの育成後期 30 日間は、実験 - 3, 4 と同様、アルミ箔を除去した。供試したハナイグチ 3 菌株間では、下川 1 - 3 株区の菌根形成率が最も高く、新得 - 3 株区では良く発達した外生菌根が認められなかった (表 - 8)。しかし、新得 - 3 株区でも、無接種区に比べて根端数や葉の総重量が増加し、接種効果は多少現れていた。菌根形成が最も旺盛であった下叫 1 - 3 株区では、根端数、苗長、地下部の長さ、着葉数、葉の総重量が、無接種区に比べてそれぞれ 7.7 倍、1.8 倍、2.0 倍、2.2 倍、3.4 倍に達した。美唄 - 4 株区でも、それぞれ 5.2 倍、1.6 倍、2.4 倍、1.6 倍、2.3 倍であった。これらの結果から、ハナイグチ下川 1 - 3 株と美唄 - 4 株は、接種効果が非常に高く、カラマツの苗木の育成に活用しうる菌株といえる (写真 - 3)。

シロヌメリイグチ美唄 - 1 株区では菌根形成率は 61% に達したが、栗山 4 - 1 - a 株区では 2.4% にすぎなかった。前者の根端数と葉の総重量は、対照区に比べて 6.0 倍と 2.3 倍に増加したが、後者では着葉数がやや増加した程度であった。したがって、供試した 2 菌株のうち、美唄 - 1 株だけが接種効果の高い菌株といえる (写真 - 4)。

表 - 8 菌株による菌根形成と苗木形質の違い

Table 8. Mycorrhiza formation and growth of *L. leptolepis* seedling by different fungal isolates.

菌株 Isolate	菌根形成率 % Mycorrhizal frequency %	菌根数 No. of mycorrhizal roots	根端数 No. of rootlets	苗長 cm Height cm	根長 cm Root length cm	葉数 No. of leaves	葉の生重 mg / 本 Fresh weight of leaves
ハナイグチ 下川 1 - 3 <i>S. grevillei</i>	69.9	71	^a 100	^a 4.2	^a 7.5	^a 56	^a 248.3
美唄 - 4	38.1	26	^b 67	^b 3.6	^b 9.2	^b 41	^b 170.0
新得 - 3	0	0	^c 19	^c 2.3	^c 4.7	^c 28	^c 90.6
シロヌメリイグチ 美唄 - 1 <i>S. laricinus</i>	61.1	48	78 ^x	4.1 ^x	5.3 ^x	48 ^x	169.2 ^x
栗山 4 - 1 - a	2.4	2	26 ^y	2.5 ^y	3.8 ^y	30 ^y	58.1
Cont.	0	0	^d 13 ^y	^c 2.3 ^y	^c 3.8 ^y	^d 25 ^z	^d 73.7 ^y

a, b, c, d ; x, y, z : 相互に 1% で有意 Significant at 1% level



写真-3 ハナイグチ数菌株を接種した苗齢60日のカラマツ芽ばえの成長
(左から、対照区、新得-3株区、美唄-4株区、下川1-3株区。——：3cm)

Photo. 3. Growth of 60-day-old seedlings of *Larix leptolepis*, inoculated with some isolates of *S. grevillei* (left to right, cont., Shintoku-3, Bibai-4, Simokawa 1-3 isolate. Bar: 3 cm).



写真-4 シロヌメリイグチ数菌株を接種した苗齢60日のカラマツ芽ばえの成長
(左から、対照区、栗山4-1-a株区、美唄-1株区。——：3cm)

Photo. 4. Growth of 60-day-old seedlings of *L. leptolepis*, inoculated with some isolates of *S. laricinus* (left to right, cont., Kuriyama 4-1-a, Bibai-1 isolate. Bar: 3 cm).

上記のように、同一種の菌根菌でも、菌株によって、菌根形成と苗木形質に与える影響が非常に異なった。LAIHO (1970) や MARX (1981) によると、ヒダハタケやコツブタケの菌根形成能力は供試菌株の保存期間、寄主、採集地などによって非常に異なる。したがって、コツブタケなどの菌根苗木を生産するためには、適切な菌株を選定することが肝要である (MARX 1981)。このように、本実験で接種効果のほとんど認められなかった菌株は、カラマツ芽ばえの成長をたとえ抑制することはなかったにしても、わざわざ接種してまで利用する価値がないといえる。なお、本実験で示した接種効果は、各菌株の菌糸成長速度に比例していなかった。例えば、ハナイグチ3菌株のうちでは、菌糸成長は美唄-4株が最大で、下川1-3株、新得-3株の順に減少した (未発表)。また、シロヌメリイグチでも、栗山4-1-a株の菌糸成長の方が美唄-1株より旺盛であった (未発表)。菌根形成量が供試菌株間の菌糸成長速度の違いに依存しないことは、すでに LAIHO (1970) や MARX (1981) などによって指摘されているが、本稿で供試した菌株がすべてほぼ同じ時期に北海道のカラマツ人工林で採集されたことを勘案すると、供試菌株間の菌根形成の違いは、カラマツの根面での各菌株の親和性の違いに起因すると考えざるをえない。根面での寄主と菌根菌の相互作用は、菌糸の膜面での多糖類の分泌 (PICHE et al 1983) から始まり、寄主の細胞内に生成されたレクチンなどの糖蛋白質がこれらの多糖類と特異的に結合する (SEQUEIRA 1978) ことによって完成するものと考えられている。両者の親和性が高い場合は、このような認識反応が正常に機能するうえ、根の表層の皮層部柔細胞にその菌根菌が耐えうる特異的な構造のポリフェノールが集積される (FOSTER and MARX 1966, 1967; HILLIS and ISHIKURA 1969; PICHE et al. 1983) か、あるいはタンニン層があまり発達しない (MOLINA 1981, MOLINA and TRAPPE 1982) ため、ハルティヒ網状体が形成され、良く発達した外生菌根ができると説明されている。ハナイグチ新得-3株やシロヌメリイグチ栗山4-1-a株を接種したときは、このようなメカニズムが根面や根の

皮層部柔細胞でうまく進行しないため、菌根形成が悪かったものと推測される。

おわりに

本稿では、ハナイグチとシロヌメリイグチによるカラマツの菌根形成を接種試験によって確認し、苗齢 60 日の芽ばえを用いて、菌根形成による苗木形質の向上について検討した。一連の接種試験によって、菌根形成の旺盛な特定の菌株が判明し、それらによる菌根形成をとおして苗木形質が向上することが明らかになった。しかし、本稿の結果は、苗齢 60 日の芽ばえを用いた試験管内のものである。したがって、育成された菌根苗木が苗畑や林地で今後どのような成長を示すか、引き続いて観察しなければならない。60 日の芽ばえの菌根形成が旺盛だったとはいえ、それらの菌根の菌量は微々たるものと考えられる。また、苗畑や林地へ移植したとき、菌根苗木の菌根は徐々に減少していくのが普通である。このため、苗畑施用を目的とした供試菌の大量培養を進め、それを併用して菌根苗木を移植するのが妥当と思われる。この際、施肥、酸度矯正、土壌孔隙量の増加などが重要なことは本稿で考察したとおりである。カラマツを用いたこれらの研究は、すべて今後の課題である。

文 献

- BARNES, R. L. and NAYLOR, A. W. 1959 In vitro culture of pine and the use of *Pinus serotina* roots in metabolic studies. For. Sci. 5: 158 - 162
- BJÖRKMAN, E. 1942 Über die Bedingungen der Mykorrhizabildung bei Kiefer und Fichte. Symb. Bot. Upsaliens 6: 1 - 191
- BOWEN, G. D. 1973 Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology (ed. by MARKS, G. C. and KOZLOWSKI, T. T.), 151 - 205, Academic Press, New York and London
- FOSTER, R. C., and MARKS, G. C. 1966 The fine structure of the ectomycorrhiza of *Pinus radiata* D. Don. Aust. J. Biol. Sci. 20: 915 - 926
- 1967 Observations on the mycorrhizas of forest trees. The rhizosphere of *Pinus radiata* D. Don. Aust. J. Biol. Sci. 19: 1027 - 1038
- GRAND, L. F. 1968 Conifer associations and mycorrhizal synthesis of some Pacific northwest *Suillus* species. For. Sci. 14: 304 - 312
- 浜田 稔 1955 マツタケ菌糸純粋培養由来 蜂蜜酵母寒天と時間のアフター. 缶詰時報 34: 1 - 7
- HARLEY, FRIS, J. L. and SMITH, S. E. 1983 Mycotrophy Symbiosis. 483pp Academic Press, London and New York
- HATCH, A. B. 1937 The physical basis of mycotrophy in the genus *Pinus*. Black Rook For. Bull. 6: 1 - 168
- HEIKURAINEN, L. 1955 (MIKOLA, P. 1973 から引用).
- HILLIS, W. E. and ISHIKURA, N. 1969 The extractives of the mycorrhizas and roots of *Pinus radiata* and *Pseudotsuga menziesii*. Aust. J. Biol. Sci. 22: 1425 - 1436
- LAIHO, O. 1970 *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. Acta For. Fenn. 106: 1 - 73
- LAMB, R. J. and RICHARDS, B. N. 1974a Inoculation of pines with mycorrhizal fungi in natural Soils. I. Effects of density and time of application of inoculum and phosphorous amendment

- on mycorrhizal infection . Soil Biol. Biochem . 6 : 167 - 171
- 1974b . Effects of density and time of application of inoculum and phosphorous amendment on seedling yield . Soil Biol. Biochem . 6 : 173 - 177
- MARX , D . H . 1981 Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by sources , age and reisolation . Can . J . For . Res . 11 : 168 - 174
- MELIN , E . 1922 Untersuchungen abet die Larix Mykorrhiza . I . Synthese der Mykorrhiza in Reinkulture . Svensk Bot . Tidskr . 16 : 161 - 196
- 1925 . Zur weiteren Kenntnis der Pilzsymbionten . Svensk Bot . Tidskr . 19 : 98 - 103
- MIKOLA , P . 1973 Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice . In Ectomycorrhizae . Their Ecology and Physiology (ed . by MARKS , G . C . and KOZLOWSKI , T . T .) , 383 - 411 , Academic Press , New York and London
- MOLINA , R . 1981 Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus* . Can . J . Bot . 59 : 325 - 334
- and TRAPPE , J . M . 1982 Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi . For . Sci . 28 : 423 - 458
- MORRISON , T . M . 1957 Mycorrhiza and phosphorous uptake . Nature , London 179 : 907
- 1962 Absorption of phosphorous from soils by ectomycorrhizal plants . New Phytol . 61 : 10 - 20
- MOSER , M . 1959 Beitrage zur Kentnis der wuchstoffbezieungen in bereich ectotrophen Mykorrhizen . Arch . Mikrobiol . 34 : 251 - 264
- 田村義一 1974 カラマツ外生菌根菌の分離 (予報) . 日林北支講 23 : 11 - 13
- 1975 カラマツの外生菌根 . 光珠内季報 24 : 13 - 16
- NG , P . P . , COLE , A . L . J . , JAMESON , P . E . and MCWHA , J . A . 1982 Cytokinin production by ectomycorrhizal fungi . New Phytol . 91 : 57 - 62
- PICHE , Y . , PETERSON , R . L . , HOWARTH , M . J . and FORTIN , J . A . 1983 A structural study of the interaction between ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* roots . Can . J . Bot . 61 : 1185 - 1193
- REID , D . J . 1983 The biology of mycorrhiza in the Ericales . Can . J . Bot . 61 : 985 - 1004
- SAMSON , J . and FoRTIN , J . A . 1988 Structural characterization of *Fuscoboletinus* and *Suillus* ectomycorrhizae synthesized on *Larix laricina* . Mycologia 80 : 382 - 392
- SEQUEIRA , L . 1978 Lectins and their role in host-pathogen specificity . Ann . Rev . Phytopathol . 16 : 453 - 481
- 信州大学農学部林学教室編 1962 カラマツ林業 . 187 頁 林業経済新聞出版部
- SKINNER , M . F . and BOWEN , G . D . 1974 The uptake and translocation of phosphate by mycelial strands of pine mycorrhizas . Soil Biol . Biochem . 6 : 53 - 56
- SLANKIS , V . 1958 The role of auxin and other exudates in mycorrhizal symbiosis of forest trees . In Physiology of Forest Trees (ed . by THIMANN , K . V .) , 427 - 443 , Ronald Press , Now York
- SMITH , W . H . 1970 Root exudates of seedlings and mature sugar maple . Phytopathology 60 :

Summary

In this paper , the ectomycorrhizal synthesis of *Suillus grevillei* and *S . laricinus* was studied on Japanese larch (*Larix leptolepis*) , and the growth promotion of the 60 - day - old mycorrhizal seedlings was reported .

In the inoculation experiments , two isolates of *S . grevillei* and one of *S . laricinus* formed well developed ectomycorrhizas . The ectomycorrhiza formation by *S . laricinus* was first reported on *L . leptolepis* in this paper . The morphological structure of the ectomycorrhizas formed by both fungi was similar , as reported by SAMSON and FORTIN (1988) .

When cultivated in the autoclaved forest soil , the seedlings of Japanese larch did not form well developed ectomycorrhizas by *S . laricinus* . In addition of B - 2 solution (Table 1) or mixed one with larch leaf decoction , however , their mycorrhiza formation was promoted , especially in the latter application . The dilute hyponex solution was not effective in the mycorrhiza formation , as compared with those in B - 2 or B - 3 solution , mixed with the larch leaf decoction , especially when inoculated with *S . laricinus* . The most vigorous mycorrhiza formation by both fungi was observed in addition of the third nutrient solution . In this experiment , much more mycorrhizas were formed in removal of the aluminum cap from the mouth of test tubes during the last 30 days , than in cultivation of the seedlings in the sealed test tubes . When cultivated in addition of the solution containing organic nitrogens such as L-glutamic acid, the mycorrhiza formation seemed to be as vigorous as those in other experiments in the inorganic nitrogen . The mycorrhiza formation by both fungi was differed greatly among their isolates .

The growth of the mycorrhizal seedlings inoculated with *S . grevillei* and *S . laricinus* was promoted , especially in the root and leaf development . The height of the seedlings , root length and number of leaves also increased when inoculated with the specific strains to Japanese larch . The growth promotion of the mycorrhizal seedlings differed greatly in inoculum size , incubation method and nutrient level , even in the same isolate . This paper suggests the more vigorous mycorrhiza formation and the better growth of the mycorrhizal seedlings , when cultivated in a moderate moisture condition , in addition of B - 3 solution mixed with the larch leaf decoction , and when in the larger inoculum size .