

DA
1639
1996
HG

アカマツ林内における外生菌根菌の 群集生態学的研究

筑波大学大学院
農学研究科
農林学専攻

山田明義

寄	贈
山田明義氏	平成
	年
	月
	日

98000045

謝辞

本研究に際し、終始ご理解をいただき、自由な研究の機会とともにご指導いただいた筑波大学農林学系 勝屋敬三 博士に心より深謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、菌根菌の生態的概念についてご教授いただいた元農林水産省国際農林水産業研究センター 故 増原学 博士，菌類生態全般の概念についてご教授いただいた筑波大学菅平高原実験センター 徳増征二 博士，外生菌根菌の生態調査，研究に関する多くの情報と論議の時間をいただいた京都大学人間・環境学研究科 小林久泰 氏，岐阜大学農学部 橋本靖 氏ならびに大阪市立自然史博物館 佐久間大輔 氏に感謝の意を表します。このうち、菌根研究半ばで甚だ惜しくも逝去された故 増原学 博士には、謹んでご冥福をお祈りします。また外生菌根菌の群集解析に関する貴重な情報をいただいた Dr. Monique Gardes, Environmental, Population and Organismic Biology, University of Colorado ならびに Dr. Thomas Bruns, Department of Environmental Science, University of California, 外生菌根の形態類別に関し有益な示唆をいただいた Dr. Reinard Agerer, Institut für Systematische Botanik, Universität München, 菌根菌の遺伝子解析の結果について有益な示唆をいただいた Dr. Katherine LoBuglio, Department of Plant Biology, University of California に感謝します。

本研究をまとめるにあたり、ご指導いただいた 森林総合研究所 金子繁 博士ならびに 筑波大学農林学系 柿嶋真 博士に御礼申し上げます。また、日頃から本研究に関し様々な御助言、御批評をいただいた筑波大学農林学系 山岡裕一 博士，阿部淳一 博士ならびに今津道夫 博士，菌類の遺伝子解析を教えていただいた 同植物病理学研究室 中村仁 氏に厚く御礼申し上げます。最後に、筑波大学菅平高原実験センター 出川洋介 氏，同大学生物科学系 笠井一浩 博士，さらに升屋勇人 氏をはじめとする同大学農林学系植物病理学研究室の諸氏ならびに諸先輩には様々な形でお世話になりました。深く感謝します。

目次

1章	緒言	-----	1
2章	アカマツ外生菌根の形態的類別		
1節	アカマツ外生菌根の形態的類別	-----	8
	Ⅰ. 材料および方法	-----	9
	Ⅱ. 結果	-----	10
	Ⅲ. 考察	-----	16
2節	<i>Cenococcum geophilum</i> の核ゲノム rDNA の ITS 領域と 菌根形態との比較	-----	35
	Ⅰ. 材料および方法	-----	36
	Ⅱ. 結果	-----	39
	Ⅲ. 考察	-----	40
3章	菌根菌のアカマツ根系上での分布様式ならびに林分内での種多様性	---	46
	Ⅰ. 材料および方法	-----	47
	Ⅱ. 結果	-----	47
	Ⅲ. 考察	-----	48
4章	アカマツ外生菌根ならびに菌根菌感染源の季節変化および種構成		
1節	アカマツ外生菌根の季節変化および種構成	-----	56
	Ⅰ. 材料および方法	-----	57
	Ⅱ. 結果	-----	57
	Ⅲ. 考察	-----	59
2節	アカマツ外生菌根菌感染源の季節変化および種構成	-----	72
	Ⅰ. 材料および方法	-----	73
	Ⅱ. 結果	-----	74
	Ⅲ. 考察	-----	75
5章	菌根菌感染に係わる感染源量, 感染源の形態および土壌温度の検討	---	87
	Ⅰ. 材料および方法	-----	89
	Ⅱ. 結果	-----	91

III. 考察	-----	93
6章 総合考察	-----	101
摘要	-----	109
引用文献	-----	113
図版説明	-----	124
図版 (Plates)	----- 1 -	28

第1章 緒論

菌類と陸上植物の根との共生体である菌根の普遍性は今日広く認められている。このうち外生菌根 (ectomycorrhiza) は、菌糸体が植物の細根の周りを鞘状に覆って組織化した菌鞘 (fungal sheath) を形成し、さらに菌糸体が細根の皮層細胞間隙に隈無く侵入してハルティヒネット (Hartig net) を形成するという形態的特徴から定義される (Harley and Smith, 1983)。このような外生菌根は、主に木本植物の根系上に認められ、またその共生菌の多くが大型の子実体 (いわゆるキノコ) を形成する担子菌類や子囊菌類に属することから、生理・生態的にも特徴的な一つの菌根形態と考えられている (Harley and Smith, 1983; Read, 1991)。外生菌根の地理的分布は、大部分の陸上生態系で認められる VA 菌根 (vesicular-arbuscular mycorrhiza) ほど広くはないが、北半球温帯以北の Pinaceae (マツ科), Fagaceae (ブナ科), Betulaceae (カバノキ科) 等の木本植物の生育地では普遍的に認められ、熱帯ならびに南半球においても Dipterocarpaceae (フタバガキ科), Myrtaceae (フトモモ科),あるいは一部 Fabaceae (マメ科) 等の植生下では普遍的である (Trappe, 1962; Malajczuk et al. 1982; Newman and Reddel, 1987; Ba and Thoen, 1990; Molina et al., 1992)。

外生菌根菌生態の基礎研究では、菌根菌と推測される大型菌類の子実体発生に着目した調査に基づき、菌根菌の菌類相、種多様性、分布様式、宿主特異性、あるいは植生遷移に並行した菌根菌遷移等がしばしば論議されてきた (Arnolds, 1992)。一方、林業上の必要性から圃場での樹木苗への限られた *Pisolithus* 属菌や *Rhizopogon* 属菌の接種が広く行われ、外生菌根菌の宿主植物への貢献度あるいは宿主特異性がしばしば論議されてきた (Marks and Kozlowaski, 1973; Harley and Smith, 1983)。このように、野外での外生菌根形成に関する事例は依然限られており、外生菌根菌の生態では推測に基づく論議が少なくない。

Last, Deacon, Fleming, Ford, Fox, Ingleby, Mason, Miller らによるイギリスの草原での *Betula pendula* と *B. pubescens* の菌根未形成実生苗の移植実験

は、植物遷移と外生菌根菌遷移に関する最初の包括的な野外実験である (Deacon and Fleming, 1992)。彼らの結果を簡単にまとめると：(1) *Betula* 属植物の実生の生長に伴って年単位での菌根菌の種類相が変化 (遷移) した。実生の移植後初期に速やかにその根系に定着した菌根菌 (初期定着菌) の菌根と子実体の分布がある程度対応し、植物根系の拡大とともに両者の分布は遠心的に移動し、幹に近い部分の植物根系上には別の菌根菌が二次的に定着した (後期定着菌)。すなわち菌根菌の分布 (菌根および子実体の分布) が根系の加齢に伴い時空的に変化することが認められた。(2) 初期定着菌の担子胞子はポット実験で容易に *Betula* 属植物の実生根に菌根形成し、実生を野外へ移植させた後も定着できた。後期定着菌は同様の実験方法では実生根に感染せず、無菌的に生育させた実生根に培養菌株を接種した場合には菌根形成が認められたが、その菌根は野外へ移植した場合には定着しなかった。(3) 野外の後期定着菌の菌根形成範囲に実生を移植すると、根系には後期定着菌が菌根を形成した。しかし、後期定着菌の菌根形成範囲の周囲に予め溝を掘りその内側に実生を移植したり (この操作により後期定着菌が菌根を形成している加齢した根系と実生根系を隔離する)、あるいは後期定着菌の菌根形成地点の土壌をポットに移しそこに実生を移植した場合は、いずれも初期定着菌が菌根を形成した。

こうした結果から Deacon and Fleming (1992) は外生菌根菌を植物根系の加齢に伴う相対的な菌根形成能に基づき、early-stage fungi (初期定着菌) [r-strategy: r-戦略 (Gadgil and Solbrig, 1972)¹⁾ あるいは Ruderal-strategy: R-戦略 (Grime, 1977) の特徴を持つ。] および late-stage fungi (後期定着菌) [K-strategy: K-戦略 (Gadgil and Solbrig, 1972) の特徴を持つ] に類型化した。この

1) r- および K- の戦略概念には種々の論議があるが、Deacon and Fleming (1992) では Gadgil and Solbrig (1972) が引用されている。また Deacon and Fleming (1992) は、r- 戦略と R- 戦略 (Grime, 1977) を同義と見なし、その上で early-stage fungi を特徴づけている。なお Grime (1977) の戦略概念 (C, S, R, およびその中間型) は植物の繁殖様式を基に立てられたものであるが、彼らは菌類への適用にも言及しており外生菌根菌は一般に S-戦略 (Stress tolerant-strategy) 型であるとしている。

概念は実験の設定条件（草原に*Betula* 属植物の実生を移植した）や観察期間（数年程度と限られている）の問題から、現段階では植物の一次遷移や二次遷移と菌根菌遷移との関連を説明するのに広く適用することはできないが（Newton, 1992）、菌根菌が分布活動範囲の時空的な変化を生じる際の一機構を説明している。

林分内での外生菌根菌の菌類相ならびに分布様式に関しては、しばしば菌根菌と推測される地表性大型菌類（epigeous macromycete）の子実体発生が地中で実際に形成されている菌根とどの程度相関を持つのか明らかにされないまま、その子実体発生記録に基づいて論議されてきた（Villeneuve et al., 1989; Arnolds, 1992）。先の*Betula* の実験で示されたような子実体発生と菌根形成が同調的な例がある一方で、地中に大型の子実体を形成する地下性大型菌（hypogeous macromycete）（Fogel, 1976）あるいは子実体を形成しない*Cenococcum geophilum* Fr.（Trappe, 1964）のような外生菌根菌もごく普通に存在する。したがって、地表性大型菌類の子実体発生をもって外生菌根菌の菌類相を推定することは、必ずしも正しくないと考える。また*Pinus densiflora*（アカマツ）と外生菌根を形成する*Tricholoma matsutake*（S. Ito & Imai）Sing.（マツタケ）の場合には子実体発生と土壌中の菌根形成部位の平面的分布が一致するが（小川, 1975a）、このような菌類でも仮に子実体を形成しないコロニーがあった場合にはその分布は明らかにできない。また、子実体発生からは平均で1種の菌根菌しか認められないアカマツの林分のリター直下の地表面積 800 cm²、深さ 10 cm の土壌中アカマツ根系上に 20 種の菌根菌（形態的に区分可能な 20 タイプの外生菌根）が共存する場合のあることが示され（山田, 1993）、子実体と菌根の分布が必ずしも一致しないことが示唆されている。さらに菌根とそこから土壌中に広がる菌糸体の分布ならびに量的関係も未だ明らかにされていないが、菌根菌の生態を菌根の分布、種構成および量を考慮せずに子実体の調査だけから進めることに積極的な意義を見出すのは困難である。しかし、研究の第一段階として必要な林内土壌中で普通に形成されている外生菌根そのものの把握が実際には非常に難しい。その主な理由は次の通りである：（1）子実体発生の調査から、外生菌根菌はきわめて多様な構成種からなることが示唆されること。例えば北アメリカの

Pseudotsuga menziesii (Douglas-fir) は1種で2000種の菌類と外生菌根を形成すると試算されている (Trappe, 1977)。従って、外生菌根菌の菌類相の一部かも知れない地表性大型菌類の種構成の把握、比較検討を取り上げても膨大な労力を要す (Arnolds, 1992)。(2) 菌根上での菌糸体の組織分化、あるいは宿主に対する菌糸の侵入様式や程度に様々な違いが認められるが (例えば Agerer, 1995)、菌根形態から菌根菌を種レベルで同定することがしばしば困難とみなされてきた。従って菌根菌の菌類相を菌根調査に基づき行った例は少ない (Danielson, 1984; Newton, 1991; Visser, 1995)。(3) 菌根菌の分離培養は可能であるが、全体のどのくらいの割合の種が可能であるのかは全く明らかではなく、これを示唆するような外生菌根からの共生菌の定量・定性的な分離報告は知られていない。また培養菌株の維持や同定が一般に容易でないため (Hutchison, 1991)、このことから土壤中の菌根菌を培養法などの実験的な手法に基づいて明らかにすることは殆ど行われてこなかった (Zak and Bryans, 1963; Danielson, 1984)。(4) さらに森林での植物細根のフェノロジーに関する研究で菌根そのものについて詳細に論議されることは少なく、その重要性が広く認められるようになってからまだ日が浅い (Vogt et al., 1986; Allen, 1991)。

種構成や分布様式の解析といった群集生態学的アプローチとは別に、子実体から地中に広がる菌糸体組織 (例えば菌糸体マットや根状菌糸束) とのつながりが容易に追跡できる菌根、特徴的な形態を持つ菌根、あるいは苗畑で顕著に出現する菌根を中心に、外生菌根の形態的分類の研究が行われてきた (Masui, 1927; Fontana and Centrella, 1967; Palenzona et al., 1972; Zak, 1973; Chilvers, 1968; Dominik, 1969, Ingleby et al., 1990; Agerer, 1986, 1987-1995, 1995)。またこれと並行して外生菌根の合成実験が行われ、特に *in vitro* での無菌植物と培養菌株を用いた実験から、菌類の分類群あるいは宿主植物に特異的な菌根の形態形質 (Molina and Trappe, 1982; Godbout and Fortin, 1985; Kope and Warcup, 1986)、外部環境の影響を受けにくい菌根の形態形質 (Zak, 1976; Alexander, 1981)、あるいは菌根菌の宿主特異性 (Malajczuk et al., 1982; Molina and Trappe, 1982; Miller and Koo, 1991) の検討が行われてきた。Agerer (1987-1995; 1995) は、これ

らの観察ならびに実験結果の比較検討を基に、形態・解剖学的な点から外生菌根の包括的分類（外生菌根菌の種レベルの違いに基づく菌根の類別・同定とその自然分類）を試みている。彼の方法は厳密な記載を要求するため、少量の菌根では同定形質を完補できない問題点もあるが、野外で採取した菌根の類別に関して有用な情報与えてくれる。今後外生菌根菌の群集生態学的研究への本手法の応用は有効と考える。

Agerer の菌根同定のアプローチとは別に、Bruns らは菌根菌の遺伝子解析（核ゲノムのリボゾーム DNA およびミトコンドリアゲノム DNA）から菌根を直接菌根菌の種レベルで同定し、菌根菌の群集解析を行っている（Bruns et al., 1995; Gardes and Bruns, 1996）。彼らのアプローチにより、Zak and Bryans (1963) 以来しばしば論議されてきた1つの問題 - 子実体の発生から推測される菌根菌の種構成と実際の菌根形成菌との種構成の違い - を比較的短時間に解析できるようになった。北米カリフォルニアの *Pinus muricata* (bishop pine) 林内での Gardes and Bruns (1996) の結果は、*Russula* 属菌に加え、枯れ枝上に背着性の子実体を形成し、従来の子実体調査では菌根菌の対象外にさえされることのあった *Tomentella sublilacina* (Ellis & Holway) Wakef. が広く優占的に外生菌根を形成していることを明らかにした。すなわち Agerer や Bruns らの手法を用いることで、比較的短時間でかつ高い信頼性の基に、特定の林分内での外生菌根菌の種構成が調査可能になった。このことはまた、従来労力的および信頼性の問題から限定されていた調査林分の範囲（面積）を飛躍的に広げる可能性をもっている。ただし Bruns (1995) は、「外生菌根菌の群集構造（特に種多様性）の論議は、菌根形成の生態的特異性や菌根菌同定の信頼性を考慮すると、現状ではより植生の単調な系（単一種の植栽林）での調査結果に基づくべきである」と述べている。

本研究では、日本列島（北海道および奄美諸島以南を除く）、朝鮮半島及び中国東北部に広く分布するアカマツに焦点を当てその林分内での外生菌根菌の研究を行った。*Pinus* 属植物は一般に多数の菌類と外生菌根を形成し、このうちアカマツにおいても外生菌根を形成することがよく知られている（小川, 1981）。しかし、多くの植物と同様に、アカマツにおいても地上部の季節変化や経年変化に比べ、土壤中の根系の挙動

には不明な点が多く、特に林分レベルでの菌根の現存量や季節変化はこれまで明らかにされていない（苅住, 1979）。またアカマツの外生菌根に関しての群集生態学的研究は、本研究の調査区とその周辺で著者らが行った研究以外には報告されていない（山田, 1993; Yamada and Katsuya, 1996）。著者らの研究結果は、調査林分に多様な菌根菌類相が存在することを示唆するものであったが、調査期間の長さ按比例して種数（外生菌根タイプ数）の増加傾向が認められ、群集を構成する種数を過小評価している危険性があった。

そこで、本研究では、アカマツの植栽林内に調査区を設定し、引き続き外生菌根の形態的類別（菌根タイプの類別）を行い、第一に菌根菌群集の構成種を明らかにすることを目的とした。このうち特に *C. geophilum* の菌根および培養菌株を用いて菌根タイプの持つ意義についての実験的検討を行った。

本研究で用いた外生菌根菌の「群集」（community）とは、「野外調査区内で、アカマツ根と外生菌根を形成している菌類」を総称した際に用いた。従ってここで言う「群集」とは、むしろアカマツと外生菌根を形成する菌根菌の「ギルド」（guild）に近い意味を持っている。しかし、形態的に定義される外生菌根が特定の生態的役割を担っている事は確かであるが、本研究では菌根形成時の物質収支について全く調査していないので種構成の側面を強調した「群集」という用語を用いることにした。

外生菌根菌群集の生態的概念の論議の基になっている具体的事象の報告が少ないことは先に挙げた通りである。本研究は形態的に区分したアカマツ外生菌根タイプに基づき、主に次の3点を明らかにすることを目的に調査および実験を行った。

（1）アカマツ根系上での外生菌根の分布様式の把握と菌根菌の生態的種多様性；すでにアカマツ林内で外生菌根菌と推定される大型菌類の子実体の分布と菌根の分布の比較から両者の不一致を明らかにしたが（山田, 1993）、本調査は特に後者の分布様式を確実なものにするために行った。また外生菌根菌群集の種多様性には種々の論議があるが、Bruns（1995）は針葉樹植栽林では0.1ヘクタール当たり一般に約30種からなる外生菌根菌群集を推定している。この様な一般化の前提として、アカマツ林で具体的な数値を明らかにするため調査を行った。

(2) アカマツ外生菌根と外生菌根菌感染源の季節変化の関係；北半球冷・温帯では外生菌根の季節変化（量的および質的）が認められている（小川, 1975a, b; Vogt et al., 1981a, b; Fogel and Hunt, 1983）。しかしアカマツの外生菌根では, *T. matsutake* 1 種に関する包括的な研究（小川, 1975a, b, 1981）以外の報告はない。さらに, 外生菌根菌では感染源の定量の常法がなく, 個々の菌根菌種に関する感染源の季節変化は報告されていない。従って菌根の季節変化と菌根菌感染源の季節変化との関係を論議した報告はない。そこでアカマツ林での外生菌根菌の群集レベルの挙動の一事例を明らかにするため本実験を行った。

(3) 菌根感染に係わる諸要因の検討；ここでは, 感染源としてどのような種類の散布体が存在するのか, 各散布体の組成比率がどのようになっているのか, 菌根感染時に生ずるであろう菌類の種間競争は重要なのか, そして温度刺激が感染源に対してどのように作用するのかを検討した。感染源の問題は, 調査地の立地条件と共に実験系に依存した結果が導かれやすい。土壌コア試料を用いたポットレベルでの実験系と試験管レベルでの実験の結果が必ずしも一致しない可能性があり, ひいては外生菌根菌で測定する感染源とはどういった生態的意義を持つのかと言った論議を生ずる。この点から, 本実験では, 幾つかの条件を組み合わせた。温度刺激に関しては, 菌根の季節変化に大きな影響を及ぼすと考えられる温度がどのように感染源に作用するのかを調べようとした。

最後に, これらの実験の結果から, アカマツ林内における外生菌根菌群集の在り方を, 種多様性, 季節変化, および菌根とその感染源との関係の点を中心に総合的に考察した。

第2章 アカマツ外生菌根の形態的類別

第1節 アカマツ外生菌根の形態的類別

第1章で述べたように、本研究で用いたアカマツ外生菌根の形態的類別方法は著者ら (Yamada and Katsuya, 1995, 1996) に基づいている。著者らは本研究の調査区を含む2つのアカマツ林分 (林床面積の総計は1250 m²) で56タイプのアカマツ外生菌根を既に類別し、その類別には主に Chilvers (1968) に始まる菌鞘の plan view が有効であることを示唆し、また菌根の特徴的形態からそのうちの15タイプについての共生菌を属あるいは種のレベルで同定あるいは関連性について言及したが、大部分は未同定であった (Yamada and Katsuya, 1996)。

形態・解剖学的特徴に基づく外生菌根の包括的な自然分類は、Agerer (1987-1995, 1995) により近年ようやく体系化され始めたが、これは全ての外生菌根菌と植物との関係を論じたものではない。従って彼の方法により全ての菌根が序列化 (類別) できる訳ではないが、野外での菌根調査においては現段階では最も有効な一方法と考えられる。著者ら (Yamada and Katsuya, 1996) の外生菌根の類別方法は Agerer (1995) の方法とは基本的には差がなく、菌根の切片作成、菌鞘の剥離操作、あるいは化学試薬反応などの菌根試料の調整はより簡略化している。

アカマツの外生菌根については Masui (1927) および著者ら (Yamada and Katsuya, 1995, 1996) の顕微鏡レベルでの菌根形態に着目した研究と小川

(1975a, b, 1981) の *Tricholoma matsutake* (マツタケ) に関する包括的な研究以外殆ど知られていない。このことから、子実体発生 (今関・本郷, 1987; 1989) から推定される共生菌の種数に比べきわめて限られた種数の菌根形成が確認されたに過ぎない。しかし、本研究では広くアカマツと外生菌根菌の関係を調べることを目的にはしていない。むしろ特定林分内でのアカマツの外生菌根菌群集をその共存様式から明らかにするため、反復的な菌根の採取と顕微鏡観察から、菌根を菌根菌の種レベルの形態的差異に基づき類別することを目的とした。

1. 材料および方法

調査区の概要

茨城県つくば市，筑波大学構内のアカマツ植栽林（樹齢約 45 年）内に設置した 25 m x 25 m の方形区を調査対象とした (Plate 1 A)。調査区の概要（植生，リターの厚さ，土壌 pH，および地温の年変化）については既に報告されている（山田，1993）。なお本論文での本章以降では，ことわりのない限り「調査区」とは本調査区を指す。

菌根試料と観察方法

調査区で 1994 年 2 月より 1996 年 6 月にかけて採取したアカマツ成木および実生の菌根，および第 4 章 2 節で述べる菌根菌の釣り上げ実験で形成されたアカマツ実生の菌根を観察に用いた。野外採取の菌根試料には，第 3 章および第 4 章 1 節の調査に由来する全菌根試料のほか，調査区で不定期，ランダムに約 20 回採取したアカマツ菌根が含まれる。また本章の観察菌根試料には，著者らの以前の研究（山田，1993；Yamada and Katsuya, 1995, 1996）で用いた全試料（著者らが類別・同定に用いたアカマツ菌根の全プレパラート）も含まれている。すなわち 1992 年より 1996 年までの 5 年間に本調査区内で採取され顕微鏡観察に用いたアカマツ菌根の全てが含まれている。採取菌根を著者ら（Yamada and Katsuya, 1996）に従い前処理し，光学顕微鏡下で観察し菌根タイプに類別・同定した。その方法では触れられていないが，本研究では顕微鏡観察には微分干渉顕微鏡を主に用いた。これは，菌根同定においてしばしば結晶様構造物が重要であることに依った。Table 1 に菌根タイプの類別に用いた形質をまとめた。菌根観察は菌鞘の plan view（Chilvers, 1968）を主体にしており，ハルティヒネット形成の有無は確認したが，切片作成によるハルティヒネットの発達程度の観察は行わなかった。

II. 結果

菌根タイプの類別

顕微鏡による形態観察（菌根タイプの類別）に供試したアカマツ細根（大部分が外生菌根）は約 3 万チップ¹⁾であった。菌鞘およびハルティヒネットを確認した場合を外生菌根とし類別を行った。ただし、植物皮層細胞の褐変と萎縮が認められ菌鞘が皺状を呈する菌根（すなわち老化した菌根）や、土壤動物によると思われる菌鞘の摂食・剥離が著しい菌根は対象外とした。また明らかに未成熟と思われる発達初期の菌根も対象外とした。土壤粒子の付着（特にシルトや粘土質）が著しい場合は、菌鞘が剥離しないように丹念に菌根を洗浄し観察に用いた。

類別の結果 103 タイプの外生菌根が認められ、その検索表を Table 2 に示した。このうち著者らが以前に報告した本調査区由来の 51 タイプの外生菌根 [Yamada and Katsuya (1996) の報告した 56 タイプのうちのプロット A での試料に当たる] を再検討した結果、それらは 49 タイプと見なされ、Yamada and Katsuya (1996) の菌根タイプと本研究での菌根タイプとの対応を Table 3 に示した。また類別された 103 タイプの菌根のうち菌根菌が同定あるいは推定された例を Table 4 に列挙した。以下に各菌根タイプの類別形質以外の特徴、既存の外生菌根との共通点、類似点、並びに相違点を列挙する。

タイプ 1 (Plate 1 B-C) はしばしばゼラチン質の鞘に被われており、この点でタイプ 36 (Plate 10 C-D) に類似し、両者は実体顕微鏡下ではしばしば区別できない。また菌鞘は実体顕微鏡下では乳白色を呈することが多い。

タイプ 2 (Plate 1 D-F) およびタイプ 3 (Plate 1 G) は酷似するが、シスチジアの形態に差が認められる。前者の場合、シスチジア基部の直径がしばしば 4 μm を

1) マツ属の根系では主根と側根が明瞭に区分でき、外生菌根形成が認められるのは主に側根である。更に菌根化した側根は規則的に二叉分枝することから菌根の単位性が明瞭であり、このことから本論文では菌根の分枝末端を 1 つの菌根「チップ」と呼び、数値として扱う。

越え先端の直径も 2 μm を越えることが多いのに対し、後者ではシスチジア基部の直径が 3 μm 以下であり先端の直径も1.5 μm 程度である。このことから後者のシスチジアは、より細長い。

タイプ 4 (Plate 2 A-B) のシスチジアはタイプ 2 およびタイプ 3 のそれに多少類似するが、細胞壁が特に厚化することは殆ど無くまたシスチジアは針状を呈することが多い。

タイプ 5 (Plate 2 C-D) のシスチジアは多少タイプ 17 のそれに類似するが、本タイプでは菌糸隔壁が普通に認められる。

タイプ 6 (Plate 2 E-G) は針状の特徴的なシスチジアから *Tuber* sp. と示唆されているが (Yamada and Katsuya, 1996), 菌鞘は実体顕微鏡下でやや黄土色を呈する。

タイプ 7 (Plates 2 H and 3 A) はタイプ 52 (Plate 13 G-H) に類似する。両者の菌鞘の菌糸配列は interlocking から発達したものであり、共に菌鞘中 (細胞内および細胞間隙) にまばらに結晶を持つ。しかし前者の菌根タイプが irregular synenchnyma で、菌根先端部で特に顕著に分枝状シスチジアを持つ一方、後者では net synenchnyma でシスチジアは認められない。

タイプ 8 (Plate 3 B-C), タイプ 9 (Plate 3 D-E), タイプ 11 (Plates 3 H and 4 A) およびタイプ 12 (Plate 4 B) の各シスチジアは顕著な分化細胞とはいえないが、ここではそれぞれシスチジアとして取り扱った。

タイプ 13 (Plate 4 C-D) はシスチジアの形態から *Russula* sp. と示唆され (Yamada and Katsuya, 1996), またその形態および配列様式が *Russula illota* Romang の外生菌根 (Agerer, 1987-1995) のそれと酷似する。また水中では菌根表面に気泡を保つため実体顕微鏡下ではしばしば銀白色を呈する。

タイプ 14 (Plate 4 E-F) はシスチジアの形態から *Russula* sp. と示唆され、著者ら (Yamada and Katsuya, 1995) により報告されたアカマツの合成菌根タイプ 4 [*Quercus myrsinaefolia* (シラカシ) 根系上の外生菌根由来の分離菌株により形成] に酷似するが、菌鞘の菌糸組織配列に違いが認められる。

タイプ 15 (Plate 4 G-H) は紡錘形のシスチジアから *Russula* sp. と示唆され (Yamada and Katsuya, 1996), また針状のシスチジアはタイプ 22 (Plate 6 G-H) およびタイプ 23 (Plate 7 A-B) のそれと類似する。

タイプ 16 (Plate 5 A-C) は著者ら (Yamada and Katsuya, 1996) により, その放射状・針状のシスチジアが *R. papuldosa* の菌根 (Agerer, 1995) あるいは *Salix caesia* の根系上の未同定外生菌根 (Fontana, 1962) のそれと類似することが示されている。

タイプ 17 (Plate 5 D-E) およびタイプ 18 (Plate 5 F-G) は酷似することがあるが, 前者のシスチジアが菌鞘から比較的直線的に放射状に伸長するのに対し, 後者ではしばしばシスチジアは強度に屈曲, 分枝することがある。両シスチジアともにコットンブルーで濃染されやすく, また紫外線に対して強く自己蛍光を発する特徴を持つが, 形態的には必ずしも顕著な分化細胞とは言い難い。しかしここではそれぞれシスチジアとして取り扱った。

タイプ 19 (Plates 5 H and 6 A-B) は著者ら (Yamada and Katsuya, 1996) により *R. delica* Fr. と同定されている。

タイプ 20 (Plate 6 C-D) のシスチジアはタイプ 14 (Plate 4 E-F) のそれに類似するが, シスチジア先端の直径の差から両者の形態は異なる。

タイプ 21 (Plate 6 E-F) およびタイプ 22 (Plate 6 G-H) は著者ら (Yamada and Katsuya, 1995) によりそれぞれ *R. nigricans* (Bull.) Fr. および *R. mariae* Peck と同定されている。

タイプ 23 (Plate 7 A-B) のシスチジアはタイプ 22 のそれに類似するが, 前者のそれがしばしば長さ 100 μ m を越えるのに対し, 後者ではしばしば 50 μ m 以下である。

タイプ 24 (Plate 7 C-D) のシスチジアはタイプ 21 のそれに類似するが, 前者のそれが比較的細長く, 後者で見られるような先端部の直径のわずかな膨らみは認められない。またシスチジア先端部の突出部は楕円体から更に細長く伸び, 球状を呈することは希である。

タイプ 25 (Plate 7 E-F) のシスチジアは、著者ら (Yamada and Katsuya, 1995) が以前に報告したアカマツの合成菌根タイプ 8 (*Lactarius chrysorrhoeus* Fr. の菌株 AT114 による), あるいは Bougher and Malajczuk (1985) の報告した *Descolea maculata* Bougher の外生菌根のそれ (両者ともに capitata) に類似するが, 先端部の肥大は明瞭な球状ではなくむしろ spatulate である。

タイプ 30 (Plate 8 E-F) の菌鞘は regular synenchyma としたが, 細胞壁の融合が著しく菌鞘表面全体が透明な薄いマトリックスで被われており個々の細胞の識別が困難である。

タイプ 33 (Plate 9 C-E) は菌根先端部でシスチジア様の菌糸を放射状に伸長させることがある。この形態はやや未成熟の菌根でしばしば認められ, そのような菌根では菌鞘が net synenchyma をとることが多い。しかしいずれの場合も菌鞘の部分的な褐色化と特徴的な菌糸束があることから 1 タイプとした。

タイプ 34 (Plate 9 F-H) は乳管の存在から著者ら (Yamada and Katsuya, 1996) により *Lactarius* sp. と示唆されている。

タイプ 38 (Plates 10 G-H and 11 A) は菌鞘表面の菌糸配列がしばしば不連続であり, net prosochyma から irregular synenchyma へと変化する。また菌根によっては菌鞘の層状化が乏しいこともある。しかし Plate 10 G-H に示す様に菌鞘から放射状に広がる菌糸が極めて特異的であり, 上記の菌鞘の形態は連続的に変化的なことから, 本タイプは 1 タイプとした。

タイプ 40 (Plate 11 C-D) は *Boletellus shichianus* (Teng & Ling) Teng により形成された *Castanea cerrata* (クリ) の根系上の外生菌根 (山田, 1993) と同一形態である。また本タイプと同一の菌根は, シラカシの根系上でも認められた。

タイプ 43 (Plate 11 H) とタイプ 31 (Plate 8 G-H) の差は, 菌鞘表面の菌糸配列の差である。両者ではそれ以外の顕著な形態的差は認められない。

タイプ 44 (Plate 12 A) はタイプ 33 (Plate 9 C-E) のやや未成熟な菌根と同様のシスチジア様の菌糸を有している。しかし本タイプでは菌鞘の褐色化や菌糸束は

認められず、このことからタイプ 33 とは明瞭に異なる。

タイプ 51 (Plate 13 E-F) は、アカマツの無菌的な実生を用いた *Amanita spissacea* Imai の培養菌株との合成菌根と同一形態を示す。

タイプ 53 (Plate 14 A-F) は実体顕微鏡下で菌鞘表面に赤褐色の小粒状の付着物と同色の発達した菌糸束を見せる。これらの特徴と顕微鏡下の特徴を兼ね併せた菌根として *Rhizopogon* 属菌が報告されている (Massicotte et al., 1994)。本菌根タイプからの菌根菌の分離は比較的簡単であり、MNC 寒天培地上での伸長は速く、白色のコロニーから古くなると褐色へと変化する。これらの培養菌株の特徴は、*R. rubescens* Tul. (ショウロ)、*Suillus granulatus* (L.:Fr.) O. Kuntze (チチアワタケ)、*S. luteus* (L.:Fr.) S. F. Gray (ヌメリイグチ) と共通である。

タイプ 54 (Plates 14 G-H and 15 A) は菌鞘部の黄変を除けば実体顕微鏡下ではタイプ 55 (Plate 15 B-F) と区別できない。顕微鏡下での特徴はタイプ 55 とは異なるが、タイプ 53 とは区別できない。このことから、本タイプはタイプ 53 とタイプ 55 の中間的なタイプである。

タイプ 55 (Plate 15 B-F) は顕微鏡下での特徴ではアカマツの合成菌根タイプ 13 (*S. granulatus* により形成) (Yamada and Katsuya, 1995) と区別できない。本菌根からの菌根菌の分離はタイプ 53 と同様比較的容易であり、培養菌株の性状も両者で酷似している。

タイプ 56 (Plate 15 G-H) は *Lactarius* 属菌の特徴である乳管を有する。

タイプ 64 (Plate 17 F-H) は種々の形態では異なるが、タイプ 57 (Plate 16 B-D) と類似の十字型分枝の菌糸を持つ。

タイプ 66 (Plate 18 B-C) は *Lactarius* 属菌の特徴である乳管を有する。

タイプ 68 (Plate 18 E-H) は実体顕微鏡下の特徴および顕微鏡下の特徴から *Hebeloma* sp. と示唆されている (Yamada and Katsuya, 1996)。

タイプ 75 (Plate 20 A) は *Lactarius* 属菌の特徴である乳管を有する。

タイプ 76 (Plate 20 B-C)、タイプ 77 (Plate 20 D-E)、およびタイプ 78 (Plate 20 F-G) では明瞭な菌鞘が認められないが、根の表面には連続して菌糸が付

着しハルテツヒネットも認められる。このことからここでは外生菌根として取り扱った。

タイプ 80 (Plate 21 D-E) のシスチジアは Agerer (1987-1995) の報告する *Fagus sylvatica* の未同定菌根タイプ *Fagirhiza setifera* のそれに酷似するが、本シスチジアの方が大型かも知れない。また菌鞘の形態も菌根タイプ *F. setifera* のそれに酷似する。

タイプ 82 (Plates 21 G-H and 22 A) のシスチジアは Agerer (1987-1995) の報告する *Fagus sylvatica* の根系上の未同定菌根タイプ *Fagirhiza spinulosa* のそれに類似するが、本シスチジアでは細胞壁がしばしば顕著に厚化しない。菌根タイプ *F. spinulosa* と酷似したシスチジアを持つ菌根タイプが著者ら (Yamada and Katsuya, 1996) により報告されている (mycorrhizal type 52) が、やはり両者のシスチジアでは細胞壁の厚さが異なり、また菌鞘の組織配列も異なる。

タイプ 84 (Plates 22 F-H and 23 A-C) の菌鞘表面のマウンド状の隆起と Agerer (1987-1995) の報告する *Picea abies* の根系上の未同定菌根タイプ *Piceirhiza nigra* のそれとは酷似しているが (Yamada and Katsuya, 1996), Agerer et al. (1995) はその後 *P. nigra* が Thelephoraceae 科の種によることを示している。

タイプ 87 (Plates 23 H and 24 A-C) およびタイプ 88 (Plate 24 D-F) の菌鞘表面の鱗状の部分的な隆起は Agerer (1987-1995) の報告する *P. abies* の未同定菌根タイプ *Piceirhiza obscura* あるいは *Quercus robur* の未同定菌根タイプ *Quercirhiza squamosa* のそれと酷似する。

タイプ 98 (Plate 27 A-C) は著者らにより既に *C. geophilum* と同定されている (Yamada and Katsuya, 1995)。

タイプ 103 (Plate 28 E-F) の菌鞘の組織配列は Agerer (1987-1995) の報告する *P. abies* の根系上の未同定菌根タイプ *Piceirhiza bicolorata* のそれと類似する。

菌根タイプの内訳

ここでは類別菌根を野外採取試料と釣り上げ実験試料（第4章2節および第5章参照）とに分け、前者についてのみ時間的経過と菌根タイプ数の関係を論じ、後者については第4章以降に述べる。

類別外生菌根 103 タイプのうち野外採取の菌根タイプ数は 79 であった (Table 5)。更にタイプ数の累計の年次変化を Figure 1 に示した。本調査区での2年間の累計タイプ数 36 は著者 (山田, 1993) の報告した菌根タイプ数に対応しており、また3年間の累計タイプ数49 は著者ら (Yamada and Katsuya, 1996) の報告した菌根タイプ数に対応している。従って本研究により新たに 30 タイプが加えられた。年次毎に菌根タイプ数の増加が認められたが、4年目 (1995年) から5年目 (1996年) にかけての増加は9タイプであり、これは増加数としては最も小さかった。なお多くのタイプが複数の年次に渡り記録された。

III. 考察

5年間に渡る継続的な調査により103タイプの外生菌根菌が類別された。このうち調査区でアカマツ成木および実生と菌根を形成していたタイプ数が79であり、第4章および5章で述べる菌根の釣り上げ実験により確認されたタイプ数が60であった。このうち共通タイプ数が36であるが、野外採取の菌根と釣り上げ実験により回収された菌根の両者には、菌根の類別に関する限り本質的な差違はないと考えられる。アカマツ外生菌根においては、アカマツの樹齢が菌鞘の形態を変化させることはなく、同一菌が形成する成木根系上の外生菌根と実生根系上の外生菌根が同一形態をとることは既に報告されている (Yamada and Katsuya, 1995)。既存の報告、並びに *in vitro* での合成菌根との比較から Table 7 に示す 21 タイプにおいて菌根菌が同定あるいは推定された。これは全菌根タイプの約 20.4% に当たるが、依然多数の菌根タイプに関し菌根菌の分類学的所在が不明である。このことは本類別に関する次

の2点 - 利点と欠点 - を示唆している；（1）すでに著者ら（Yamada and Katsuya, 1996）にも述べられているように、アカマツの外生菌根の類別には、plan view が有効であり、大部分の菌根チップを菌根菌の種レベルの違いに基づいてタイプに類別することが可能である。すなわちこの様に100 タイプを越えるレベルの多様な菌根を光学顕微鏡観察により菌根菌の種レベルの違いに基づき形態的に類別することが可能である。（2）しかし、菌根菌の同定に関する決定的な情報不足は、本方法の限界を意味している。菌根そのものは、その菌根菌が形成するであろう有性生殖器官（多くは大型の子実体）よりも形態形質に関する情報は少なく、この点から Agerer（1995）のアプローチにも限界の生ずる可能性がある。従って菌根菌同定は、厳密な形態的類別を前提とした上で、それとは独立の手法（例えば DNA 解析に基づく菌根菌の同定, Gardes and Bruns, 1996）により行うべきであろう。

本研究では、外生菌根菌の地理的分布や分類学的検討は主要な目的にはしていない。しかし、たとえ未同定菌類の集団であっても、それぞれの菌類を種のレベルで区別することができれば、菌根菌群集を種のレベルで解析できる。このことから、本研究の調査区内で類別された103 タイプの外生菌根は群集解析に様々な情報を提供すると考えられる。ただし103 タイプという数字は、絶対的なものではなく多少変動する可能性はある。例えば、著者らの以前の結果（Yamada and Katsuya, 1995）の一部は既に修正された。すなわち本研究での再検討の結果、その報告の中での菌根タイプ7とタイプ30とは同一と見なされた。この理由は次の2点による；（1）type 7のシスチジアと見なした細胞が菌鞘表面を構成する細胞から分離したもので、両者の形態は連続しておりそれらの分離した細胞は特異的な分化細胞とは見なし難く、この結果タイプ7にはシスチジアは認められずタイプ30との区別ができない。（2）タイプ7でコンタミネーションと見なした厚壁の直径 $10\mu\text{m}$ を越える菌糸は菌鞘を形成する細胞と連続しており、この特徴的な菌糸はタイプ30を特徴づける菌糸と同一と見なされた。また菌根タイプ11に関しても、そのシスチジアがタイプ33の未成熟な菌鞘部で認められるシスチジア様菌糸と区別できないことから両タイプが同一と見なされた。更にその報告後に採取された複数の標本の観察から、菌根タイプ16

とタイプ 17 のシスチジアの長さは連続的であることが明らかになり両者は同一タイプと見なされた。これらの結果、著者らが以前に本調査地で 51 タイプとして報告した菌根試料は、本研究では 49 タイプと見なされた (Table 6)。

5 年間の調査の過程での菌根タイプの増加は、著者らの報告 (山田, 1993; Yamada and Katsuya, 1996) が本調査区全体での菌根菌の種類相を過小評価していたことに他ならない。しかし、調査 4 年目から 5 年目にかけて新たに記録された菌根タイプ数は特に減少しており (Figure 1), このことはこの 79 タイプという数値が現存のアカマツ菌根菌群集の大部分の種を検出していることを示唆する。

本調査区の菌根菌群集から調査区周辺のアカマツ林に生息する菌根菌を推測することは困難であるが、著者ら (Yamada and Katsuya, 1996) の報告にあるように本調査区周辺では別の数種の菌根菌 (菌根タイプ) が知られており、調査区の面積を増大させた場合には更に多数の菌根菌から成る群集を考える必要があると思われる。なお、菌根菌の種数と調査面積の関係は次章で詳しく論ずる。

調査区内での菌根形成が認められた 79 タイプの全てが同所的に共存するわけではない。この点に関する詳細な論議は次章に譲るが、調査範囲を狭くするほど出現する菌根タイプ数が減少することは確実である。従って論議の対象が、数百平方センチメートル程度の地表下の土壌中の根系上での菌根や 1 本の実生根系の上の菌根の場合には、「菌根タイプ数 = 菌根菌種数」の関係はより確からしい。このことは、本章の菌根タイプを基にして本論文の後の章で論ずる、菌根菌の生態的論議が信頼に値することを示唆している。

Table 1. Morphological characters used for mycorrhizal classification.

character	descriptoin
(under stereomicroscope)	
1. external color of the fungal sheath and emanating hyphae	pale color or white, light to dark brown, or black

(under differential interference microscope)	
1. shape of cystidia on the surface of the fungal sheath ^{a)}	acicular, subulate, obclavate, hyphae-like but thick wall, club-like, globular, obpyriform, ventricose, spatulate, capitate, or irregularly radiated
2. texture of surface-layer cells of the fungal sheath ^{b)}	felt prosenchyma, net prosenchyma, net synenchyma, irregular synenchyma, and regular synenchyma
3. emanating hyphae clamp connections diam.	present or absent 1.0 μ m to more than 10.0 μ m
4. other characters	ornamentation on surface of fungal sheath, cystidia and emanating hyphae specialized emanating hyphae, and reaction to UV irradiation and chemical reagents

a) Morphological descriptions follow the terminology of Hawksworth et al. (1995). b) Descriptions follow terminology of Ingleby et al. (1990).

This table was based on Yamada and Katsuya (1996)

Table 2. Key to the mycorrhizal types.

1	color of fungal sheath: pale	---	2
1'	color of fungal sheath: brown or black	---	14
2	fungal sheath: distinct layers present	---	3
2'	fungal sheath: distinct layers absent	---	13
3	cystidia present	---	4
3'	cystidia absent	---	7
4	surface layer of the sheath: regular synenychma	---	type1 to type 12
4'	surface layer of the sheath: other than regular synenychma	----	5
	cystidia: irregularly radiated, thick wall cl.-absent, e.h.-rare, d.-6.0-12.0 μm ¹⁾ ; surface of sheath: sometimes covered with a gelatinous layer	----	type 1
	cystidia: acicular (like emanating hyphae but thick wall); length: 40 to 250 μm ; diam. of the basal part and apex: 2.0 to 4.5 μm and 1.5 to 2.5 μm , respectively cl.-present, e.h.-rare or roughly, d.-1.0-2.5 μm ; sheath positive to UV	---	type 2
	cystidia: acicular (like emanating hyphae but thick wall); length: 50 to 250 μm ; diam. of the basal part and apex: 2.0 to 3.0 μm and 1.3 to 1.5 μm , respectively cl.-present, e.h.-roughly, d.-1.5-2.5 μm	---	type 3
	cystidia: acicular (like emanating hyphae but rarely thick wall); length: 15 to 100 μm ; diam. of the basal part and apex: 1.8 to 2.5 μm and 1.0 to 1.5 μm , respectively cl.-present, e.h.-present, d.-2.0-2.5 μm	---	type 4
	cystidia: acicular (like emanating hyphae but thick wall); length: 25 to 150 μm ; diam. of the basal part: 2.0 μm cl.-absent, e.h.-roughly, d.-2.0-4.0 μm	---	type 5
	cystidia: acicular (distinct) and thick wall; length: 50 to 140 μm ; diam.: 2.0 to 3.5 μm cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.5-10.0 μm (<i>Tuber</i> sp.)	---	type 6
	cystidia: club-like; often dichotomous and relatively thick wall cl. maybe absent, e.h.-rare, d.-2.0-2.5 μm ; crystals roughly present in sheath intercellularly	---	type 7
	cystidia: club-like; length; 8.0-18.0 μm ; diam.: 2.0-4.0 μm		

1) cl.=clamp connection, e.h.=emanating hyphae, d.=diameter

Table 2. (cont.)

cl.-present e.h.-present, d.-2.5-3.0 μm	--- type 8
cystidia: globular, club-like, or ventricose	
cl.-present e.h.-rare, d.-1.5-3.0 μm ; sheath have irregular-shaped cells (UV-positive) on surface layer	--- type 9
cystidia: ventricose or acicular	
cl.-present, e.h.-roughly, d-1.5-4.0 μm ; sometimes globular cells (relatively thick-walled) present on surface layer of sheath	--- type 10
cystidia: ventricose or acicular; length: 13 to 30 μm	
cl.-absent, e.h.-present, d-2.0-4.0 μm	--- type 11
cystidia: globular or club-like	
cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.5-3.0 μm	--- type 12
5 surface layer of the sheath:	
..... net synenchyma ---	type 13 to type 18
5' surface layer of the sheath:	
..... other than net synenchyma ---	6
cystidia: obpyriform or obclavate, thick wall; length: 15 to 30 μm (rarely 40 μm); sometimes adhering to a small globoid (1.5 to 2.0 μm in diam.) at the apex of cystidia	
cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.0 μm ; sheath: UV-positive; cystidia often form a distinct layer on surface of sheath	
(<i>Russula</i> sp. 1)	--- type 13
cystidia: obpyriform or obclavate; length: 10 to 30 μm ; diam. of apex: 1.0-1.5 μm ; sometimes adhering to a small globoid (1.0 to 1.3 μm in diam.) at the apex of cystidia	
cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.5-2.5 μm	
(<i>Russula</i> sp. 2)	--- type 14
cystidia: acicular to subulate; length: 20-70 μm ; or obclavate; length: 15-40 μm ; small oval or globoid (length: 1.5 to 2.0 μm) present at the apex of the latter cystidia	
cl.-absent, e.h.-absent, d.-1.5-2.0 μm ; cystidia: middle or positive to UV	
(<i>Russula</i> sp. 3)	--- type 15
cystidia: acicular, branching to 2 to 4; length: less than 100 μm ; basal part enlarged; or cystidia: rarely obclavate; cystidia: positive to UV	
cl.-absent, e.h.-absent, d.-1.5-2.5 μm ; sheath: middle to positive to UV	
(<i>Russula</i> sp. 4)	--- type 16

Table 2. (cont.)

cystidia: acicular to hyphae-like but thick wall; length: more than 100 μm ; diam.: 1.5-2.0 μm ; cystidia: positive to UV cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.0-2.0 μm ; no regular septa present? --- type 17
cystidia: hyphae-like, 1.5-2.0 μm in diam. (fine, thick-walled and often irregularly curved); cystidia: positive to UV cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.0-4.0 μm ; no regular septa present? --- type 18
6 surface layer of the sheath: <i>net prosenchyma</i> --- type 19 to type 25
cystidia: obclavate to club-like; length: 20-64 μm ; sometimes adhering to a small globoid (1.0 to 2.0 μm in diam.) at the apex of cystidia cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.0-2.5-(5.0) μm (<i>Russula delica</i>) --- type 19
cystidia: obclavate to club-like; length: less than 30 μm , diam. of the apex: 1.5-2.2 μm ; sometimes adhering to a small globoid (1.0 to 2.0 μm in diam.) or a small oval (length: 2.5 to 3.0 μm) at the apex of cystidia cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.0 μm (<i>Russula</i> sp. 5) --- type 20
cystidia: obclavate to club-like; length: 20-30 μm ; apex: a little enlarged in diam. (2.0-3.0 μm); sometimes adhering to two small globoids (1.5 to 3.0 μm in diam.) at the apex of cystidia cl.-absent, e.h.-absent, d.-1.5-2.0 μm (<i>Russula nigricans</i>) --- type 21
cystidia: acicular, sometimes dichotomous; length: 10-35(-60) μm ; basal part often a little enlarged, 2.0-3.0 μm in diam cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.0-2.0 (-3.0) μm (<i>Russula mariae</i>) --- type 22
cystidia: acicular, length: 30-130 μm in diam; thicker than that of type 22 cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μm --- type 23
cystidia: obclavate (more slender); length: 15-35 μm ; diam. of the basal part and apex: 2.0-4.0 μm and less than 2.0 μm , respectively; sometimes adhering 1 to 3 small oval (length: 1.0 to 3.0 μm) at the apex of cystidia; or cystidia: club-like; length: up to 60 μm cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.5-2.5 (<i>Russula</i> sp. 6) --- type 24

Table 2. (cont.)

	cystidia: club-like to spatulate; length: 8-35 μm ; diam.: 3.0-8.0 μm ; or cystidia: hyphae-like; length: 30-80 μm ; diam.: 2.0-3.5 μm cl.-absent, e.h.-present, d.-1.0-2.5 μm	--- type 25
7	<i>cystidia absent</i>	--- 8
8	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>regular synenchyma</i> ---	type 26 to type 30
8'	<i>surface layer of the sheath:</i> .. <i>other than regular synenchyma</i> ---	9
	cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μm	--- type 26
	cl.-present, e.h.-present, d.-15-4.0 μm ; some of e.h.: covered with small granule of yellow and often forming yellow rhizomorphs	--- type 27
	cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.0-2.5 μm ; sheath: UV-positive; surface layer cells (triangular or tetragonal) of sheath: regularly arranged	--- type 28
	cl.-absent, e.h.-absent, d.-2.0-4.0 μm ; surface layer cells of sheath: relatively irregularly arranged	--- type 29
	cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.5-2.0 μm ; surface layer cells of sheath: very small	--- type 30
9	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>irregular synenchyma</i> ---	type 31 to type 42
9'	<i>surface layer of the sheath:</i> .. <i>other than irregular synenchyma</i> ---	10
	cl.-present, e.h.-roughly, d.-1.5-4.0 μm	--- type 31
	cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μm ; immature sheath: net prosenchyma; small oil drops present in the cells of irregular synencymatous tissue	--- type 32
	cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-5.0 μm ; e.h. and surface of sheath: partly brown not hyaline; e.h.: normally curved and often form rhizomorphs; immature sheath: net synenchyma and have hyphae- like cystidia	--- type 33
	cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.5-2.0 μm ; laticiferous hyphae present (<i>Lactarius</i> sp)	--- type 34
	cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.0-5.5 μm sheath; globular cells up to 20 μm in diam. often present	--- type 35

Table 2. (cont.)

cl.-absent, e.h.-rare, d.-3.0-9.0-12.0 μ m; sheath: interlocking or not; surface cells of sheath: partly become brown, same as type 1; sheath: sometimes covered with gelatinous layer; e.h.: sometimes thick wall	--- type 36
cl.-absent, e.h.-present, d.-2.0-9.0 μ m; sheath not interlocking	--- type 37
cl.-absent, e.h.-present, d.-2.0-17.0 μ m; e.h. become thick wall (up to 2.5 μ m) and often verrucose	--- type 38
cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.5-3.5 μ m; sheath: mainly not interlocking but sometimes interlocking, sometimes partly stained deeply with blue dye	--- type 39
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-2.5 μ m; sheath: often interlocking and the cell wall often thick <i>(Boletellus shichianus)</i>	--- type 40
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-2.3 μ m; sheath: often interlocking, but immature net prosenchymatous sheaths covered with dichotomous hyphae; e.h.: sometimes strait (up to several hundred micrometer length) like cystidia	--- type 41
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μ m; surface layer cells: relatively small compared with type 39; sheath: not interlocking	--- type 42
<i>10 surface layer of the sheath:</i> <i>net synenchyma</i>	--- type 43 to type 58
<i>10' surface layer of the sheath:</i> <i>other than net synenchyma</i>	--- 11
cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-3.6 μ m; sheath: weak to positive to UV; surface of sheath: conformed by radially arranged cells	--- type 43
cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μ m; sheath: weak to positive to UV; surface of sheath: radial arrangement like type 26 absent; e.h: frequently radiate like cystidia on apex of mycorrhizal tips	--- type 44
cl.-present but rare, e.h.-rare, d.-1.0-2.5 μ m	--- type 45
cl.-absent, e.h.-present, d.-3.0-9.5 μ m; sheath: UV-weak to positive, partly irregular-like structure; e.h.: verrucose	--- type 46
cl.-absent, e.h.-present, d.-2.0-6.0 μ m; e.h.: verrucose; cystidia-like (acicular) structures often present	--- type 47

Table 2. (cont.)

cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-4.0 μ m; sheath: UV-middle to positive	--- type 48
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-2.5 μ m; sheath: UV-positive; second layer of sheath: regular synenchyma	--- type 49
cl.-absent, e.h.-present, d.-2.0-3.0 μ m; sheath: radial arrangement present on the surface	--- type 50
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-3.5 μ m; yellow or brownish rhizomorphs present; hyphae of sheath: having oil drops (<i>Amanita spissaceae</i>)	--- type 51
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μ m; sheath: compacted interlocking (like irregular synenchyma), sparsely adhering crystals	--- type 52
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-5.0 μ m; e.h. and surface of sheath: often covered with irregular-shaped crystals (mainly dimensional) and large brown granule like oil drops; e.h.: roughly covered with small granule; sheath and e.h.: often red brown adhesion present; compact rhizomorphs often present (<i>Rhizopogon</i> sp.)	--- type 53
cl.-absent, e.h.-abundant, d.-1.5-5.0 μ m; sheath: become yellow when injured; basal part of mycorrhiza; yellow; e.h. and surface of sheath: often covered with irregular-shaped crystals (mainly dimensional); rhizomorphs rarely present (Boletaceous fungus)	--- type 54
cl.-absent, e.h.-abundant, d.-1.5-4.0 μ m; e.h. and hyphal surface of the sheath: often covered with irregular-shaped crystals (relatively fine and not dimensional) and brown granule-like oil drops; e.h.: roughly covered with small granule; rhizomorphs: rarely present (<i>Suillus granulatus</i>)	--- type 55
cl.-absent, e.h.rare or no, d.-1.5-2.5 μ m; laticiferous hyphae present (<i>Lactarius</i> sp. 1)	--- type 56
cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-3.5 μ m; sheath become green when injured; sheath sometimes having black secretions like crystals; e.h.: sometimes branch as "T"-form or "+"-form; hyphal strands: rarely present;	--- type 57
cl.absent, e.h.-rare, d.-2.5-7.5 μ m; e.h.: rarely light brown and verrucose; sheath: often unilayer, rarely light brown ...	--- type 58
11 surface layer of the sheath:	<i>net prosenchyma</i> --- type 59 to type 67

Table 2. (cont.)

11' surface layer of the sheath:

- *other than net prosenchyma* ---12
- cl.-present, e.h.-rare or roughly, d.-2.0-2.5 μ m; second layer of sheath: net synenchyma, relatively rough than that of type 63
..... ---- type 59
- cl.-present, e.h.-present, d.-2.0-6.5 μ m, second layer of sheath: net synenchyma ---- type 60
- cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-3.5 μ m; second layer of sheath;
regular synenchyma; clamp connections: rare and morphologically indefinite --- type 61
- cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-3.5 μ m; second layer of sheath: irregular synenchyma; e.h.: sometimes covered with indefinite-shaped adherents --- type 62
- cl.-present, e.h.-present, d.-2.0-4.0 μ m; second layer of sheath: irregular synenchyma to net synenchyma; sheath: relatively compacted than type 59 --- type 63
- cl.-present, e.h.-present, d.-2.0-4.0 μ m; e.h.: often thick wall, sometimes branch as "+"-form like type 57 --- type 64
- cl.-absent, e.h.-present, d.-2.0-3.5 μ m; the hyphae on surface layer of sheath: relatively strait; second layer of sheath: net synencyma to irregular synencyma --- type 65
- cl.-absent, e.h.-present, d.-2.0-3.5 μ m; laticiferous hyphae present (*Lactarius* sp. 2) --- type 66
- cl.-absent, e.h.-present, d.-1.0-2.3 μ m; sheath: covered with a lot of detritus --- type 67

12 surface layer of the sheath:

- *felt prosenchyma*--- type 68 to type 75
- cl.- present, e.h.-present, d.-1.5-2.5 μ m; e.h.: verrucose and positive to UV
(*Hebeloma* sp.) --- type 68
- cl.- present, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μ m; clamp connection: similar to that of type 68, but e.h. smooth --- type 69
- cl.- present, e.h.-present, d.-1.5-3.0 μ m; clamp connection: similar to that of type 68; e.h.: smooth surface, cell wall a little thicker than that of types 68 and 69 --- type 70

Table 2. (cont.)

	cl.- present, e.h.-present, d.-1.5-2.0 μ m; clamp connection: similar to that of type 68, but the e.h. curve irregularly	--- type 71
	cl.-absent, e.h.-rare, d.-1.5-2.0 μ m; sheath: middle to positive to UV, covered with gelatinous layer; the hyphae of sheath having small drops (latex ? or oil drops?) and sometimes positive to UV (laticiferous hyphae ?)	--- type 72
	cl.-absent, e.h.-developed, d.-1.5-2.5 μ m	--- type 73
	cl.-absent, e.h.-present, d.-2.5-3.0 μ m; sheath: having blue stained irregular-shaped cells negative to UV, covered with gelatinous matrix (but not a distinct gelatinous layer); some hyphae in sheath: having UV-positive materials	--- type 74
	cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.0-3.5 μ m; sheath: covered with gelatinous layer, having laticiferous hyphae positive to UV; second layer of sheath: net prosenchyma (<i>Lactarius</i> sp. 3)	--- type 75
13	<i>surface of the mycorrhiza: net synenchymatous-like</i> <i>hyphal arrangement</i> - -	type 76 to 78
	cl.-present, e.h.rare, d.-2.0-4.0 μ m	--- type 76
	cl.-absent, e.h.rare, d.-2.0-4.0 μ m; diam. of hyphae on surface of mycorrhiza: 2.0-4.5 μ m	--- type 77
	cl.-absent, e.h.present, d.-2.0-5.5 μ m; diam. of hyphae on surface of sheath: 3.0-10 μ m	--- type 78
14	<i>color of the sheath: pale brown to dark brown</i>	--- 15
14'	<i>color of the sheath: black</i>	--- 25
15	<i>surface layer of the sheath: distinct layers present</i> .	--- 16
15'	<i>surface layer of the sheath: distinct layers abset</i> ...	--- 23
16	<i>cystidia present</i>	--- 17
16'	<i>cystidia absent</i>	--- 19
17	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>regular synenchyma</i> ---	types 79 and 80
17'	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>other than regular synenchyma</i> ---	18
	cystidia: capitate to spatulate; length: 20-50 μ m; diam. (except for apex): 2.5-3.0 μ m; diam. of apex: 3.0-4.5 μ m cl.-present, e.h.-present, d.-2.0-3.0 μ m; surface of sheath: radial arrangement absent; rhizomorphs present	--- type 79

Table 2. (cont.)

	cystidia: acicular with inflated base, thick-walled; length: 100-220 μm ; diam. of apex and base: 2.0 μm and 6.0-8.0 μm , respectively cl.-present, e.h.-present, d.-4.0-9.0 μm --- type 80
18	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>irregular synenchnyma</i> --- type 81 to type 83
	cystidia: short club-like or globose cl.-present, e.h.-present, d.-2.5-3.5 μm ; e.h. verrucose --- type 81
	cystidia: bulbous-shape, length: 15-35 (-50) μm ; diam. of the base: 3.5-8.0 μm ; or cystidia: globose; diam.: 10-15 μm cl.-present, e.h.-present, d.-2.0-6.0 μm --- type 82
	cystidia: acicular, verrucose; length: 100-450 μm cl.-present, e.h.-present, d.-6.5-10.0 μm ; e.h. verrucose --- type 83
19	<i>cystidia absent</i> --- 20
20	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>regular synenchnyma</i> --- type 84 to type 86
20'	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>other than regular synenchnyma</i> --- 21
	cl.-present, e.h.-present, d.-4.0-6.0 μm ; heaps of roundish cells: abundantly present on surface of sheath (Thelephoraceous fungus) --- type 84
	cl.-present, e.h.-rare, d.-2.0-6.0 μm , surface of sheath: radial arrangement present; hypha of sheath: thick walled cells absent --- type 85
	cl.-absent e.h.-present, d.-2.0-11.0 μm --- type 86
21	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>irregular synenchnyma</i> --- type 87 to type 93
21'	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>other than irregular synenchnyma</i> --- 22
	cl.-present, e.h.-present, d.-2.0-5.0(-7.5) μm ; sheath: interlocking or not, positive to UV (sheath partly regular synenchnyma); e.h.: often verrucose; scale-like aggregation structure (like <i>Quercirhiza</i> <i>squamulosa</i>) present on surface of sheath --- type 87
	cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-4.0 μm ; sheath: not interlocking, occasionally regular synenchnyma; scale-like aggregations present on sheath; surface of e.h.: smooth, not verrucose --- type 88

Table 2. (cont.)

	cl.-present, e.h.-present, d.-1.5-4.5 μ m; sheath: not interlocking, radial (star-like) arrangement present	--- type 89
	cl.-present, e.h.-rare, d.-2.0-3.0 μ m; mycorrhizal tips: rarely black sheath intermediate between regular and irregular syn; cell wall relatively thick; surface cells of fungal sheath: sometimes having one or two small granules like oil drops	--- type 90
	cl.-absent, e.h.-present, d.-3.0-5.0 μ m; e.h.: irregularly curved, sheath: interlocking	--- type 91
	cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-5.5 μ m; sheath: not interlocking; surface layer of sheath: radial arrangement absent . . .	--- type 92
	cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-3.5 μ m; sheath: not interlocking; surface layer of sheath: radially arranged cells present ---	type 93
22	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>net synenchyma</i> ---	type 94 to 96
	cl.-absent, e.h.-rare, d.-2.0-5.0 μ m; sheath: pale brown; immature sheath (mainly mycorrhizal apex) pale color	--- type 94
	cl.-absent, e.h.-present, d.-3.5-7.5 μ m; e.h.: verrucose; sheath: rough interlocking net synenchyma, radially arranged ---	type 95
	cl.-absent, e.h.-present, d.-2.5-7.0 μ m; e.h.: verrucose; sheath not interlocking net synenchyma	--- type 96
23	<i>sheath: distinct layer absent</i>	--- 24
24	<i>sheath: net synenchymatous-like</i>	---type 97
	cl.-absent, e.h.-present, d.-2.5-5.0 μ m; sheath: positive to UV; e.h. rarely verrucose	--- type 97
25	<i>color of sheath: black</i>	--- 26
26	<i>surface of the sheath: distinct layers present</i>	--- 27
27	<i>cystidia absent</i>	---28
28	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>regular synenchyma</i> ---	types 98 and 99
28'	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>other than regular synenchyma</i> ---	29
	cl.-absent, e.h.-present, d.-2.5-4.5 μ m; e.h.: often verrucose; sheath: coil-like structure and star-like arrangement present (<i>Cenococcum geophilum</i>)	--- type 98

Table 2. (cont.)

	cl.-absent, e.h.-present, d.-2.5-4.5 μ m, sheath: star-like arrangement present	--- type 99
29	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>irregular synenchyma</i> ---	types 100 and 101
29'	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>other than irregular synenchyma</i> ---	30
	cl.-present, e.h. rare. d.-2.5-4.5 μ m; sheath: not interlocking; e.h.: sometimes verrucose	--- type 100
	cl.-absent, e.h.-present, d.-3.5-5.0 μ m; e.h. and surface of fungal sheath: covered with black secretion or deposit like scales	--- type 101
30	<i>surface layer of the sheath:</i> <i>net synenchyma</i> --	-types 102 and 103
	cl.-absent, e.h.-predominated, d.-1.0-2.0 μ m; e.h.: rather fine; rhizomorphs present	--- type 102
	cl.-absent, e.h.-present, d.-1.5-2.0 μ m; e.h.: often verrucose	--- type 103

Table 3. Correspondence of the ectomycorrhizal types.

mycorrhizal type reported by Yamada and Katsuya (1996) ¹⁾	mycorrhizal type classified in the present study ²⁾	mycorrhizal type reported by Yamada and Katsuya (1996)	mycorrhizal type classified in the present study
1	2	28	34
2	4	29	35
3	8	30	36c
4	10	31	37
5	9	32	39
6	1	33	43
8	7	34	47
9	11	35	48
10	33a	36	59
11	13	37	63
12	15	38	66
13	16	39	46
14	17	40	68
15	18	41	72
16	19b	43	74
17	19b	44	38
18	20	47	84
19	21	48	87
20	24	49	89
21	22	50	91
22	26	51	95
23	28	53	90
24	29	54	98
25	30	55	100
26	31	56	101
27	33a	73)	36c

1) Both studies were carried out at the same plot. 2) a, b, and c: these alphabets show the same mycorrhizal type, respectively. 3) The ectomycorrhizal type 7 was recorded at the "plot B" (Yamada and Katsuya, 1996) where was different from the plot in the present study.

Table 4. Ectomycorrhizal types and their associated fungi.

mycorrhizal type	associated fungus	fungal identification ¹⁾
6	<i>Tuber</i> sp.	a1, a2
13	<i>Russula</i> sp. 1	a1
14	<i>Russula</i> sp. 2	a1
15	<i>Russula</i> sp. 3	a1
16	<i>Russula</i> sp. 4	a1
19	<i>Russula delica</i>	b
20	<i>Russula</i> sp. 5	a1
21	<i>R. nigricans</i> (<i>Russula</i> sp.)	c1, (a1)
22	<i>R. mariae</i>	c1,
24	<i>Russula</i> sp. 6	a1
40	<i>Boletellus shichianus</i>	b
51	<i>Amanita spissacea</i>	c2
53	<i>Rhizopogon</i> sp.	a3, d
54	Boletaceous fungus	a3, d
55	<i>Suillus granulatus</i> (Boletaceous fungus)	a3, c, d (a3, d)
56	<i>Lactarius</i> sp. 1	a1
66	<i>Lactarius</i> sp. 2	a1
68	<i>Hebeloma</i> sp.	a1, a4
75	<i>Lactarius</i> sp. 3	a1
84	Thelophoraceous fungus	a1
98	<i>Cenococcum geophilum</i>	a1, a4,

1) a: morphologically identified as based on mycorrhizal types by several authors; a1: Agerer (1987-1995), a2: Fontana and Centrella (1967), a3: Massicotte et al. (1994), and a4: Ingleby et al. (1990).

b: mycelial connection between the mycorrhizas and the epigeous sporocarp at the plot. c: morphological identity with the synthesized mycorrhiza in vitro between axenic seedling of *Pinus densiflora* and an identified isolate; c1: Yamada and Katsuya (1995), c2: unpublished data. d: similarity of the fungal colony with identified isolates (*Suillus* spp. and *Rhizopogon roseorus*) on the MNC agar medium (Yamada and Katsuya, 1995).

Table 5. Annual record of the ectomycorrhizal (ECM) types sampled at the plot.

ECM type	year recoderd ¹⁾					ECM type	year recoderd				
	1st	2nd	3rd	4th	5th		1st	2nd	3rd	4th	5th
1	+ ²⁾	+	+	+	+	53					+
2	+	+	+	+	+	54					+
3			+	+	+	55					+
4			+			56					+
5					+	57			+	+	+
6	+		+	+	+	58					+
7	+		+			59	+	+		+	+
8	+					60				+	
9		+				61			+		
10	+		+		+	62			+		+
11					+	63		+	+	+	
12	+	+			+	64				+	
13	+	+		+	+	65				+	+
14			+			66	+				
15	+		+	+	+	67			+	+	
16	+	+	+	+	+	68	+		+	+	+
17	+	+	+	+	+	69					+
18		+	+	+	+	70				+	
19	+		+	+	+	71			+		
20	+				+	72	+		+	+	+
21	+		+	+		73					+
22	+				+	74	+				
23					+	75					+
24	+		+	+	+	76				+	+
25					+	77				+	+
26	+		+			78					+
27			+			79			+		
28	+					80				+	
29		+				81	+				
30	+			+	+	82			+		
31	+	+	+	+	+	83			+	+	
32				+		84	+		+	+	+
33		+	+	+	+	85			+		
34	+			+		86			+		
35	+				+	87	+		+	+	
36		+	+	+		88			+		
37		+		+	+	89			+		
38		+	+	+	+	90		+	+	+	
39	+		+	+	+	91		+			
40			+			92					+
41					+	93					+
42					+	94					+
43	+	+			+	95	+	+	+	+	+
44		+	+			96					+
45		+	+			97					+
46	+	+				98			+	+	+
47			+	+	+	99					+
48		+	+		+	100	+				
49				+		101	+	+			
50					+	102					+
51				+		103					+
52			+								

1) 1st=1992, 2nd=1993, 3rd=1994, 4th=1995, and 5th=1996. 2) Plus means the record of the mycorrhizal types in the year.

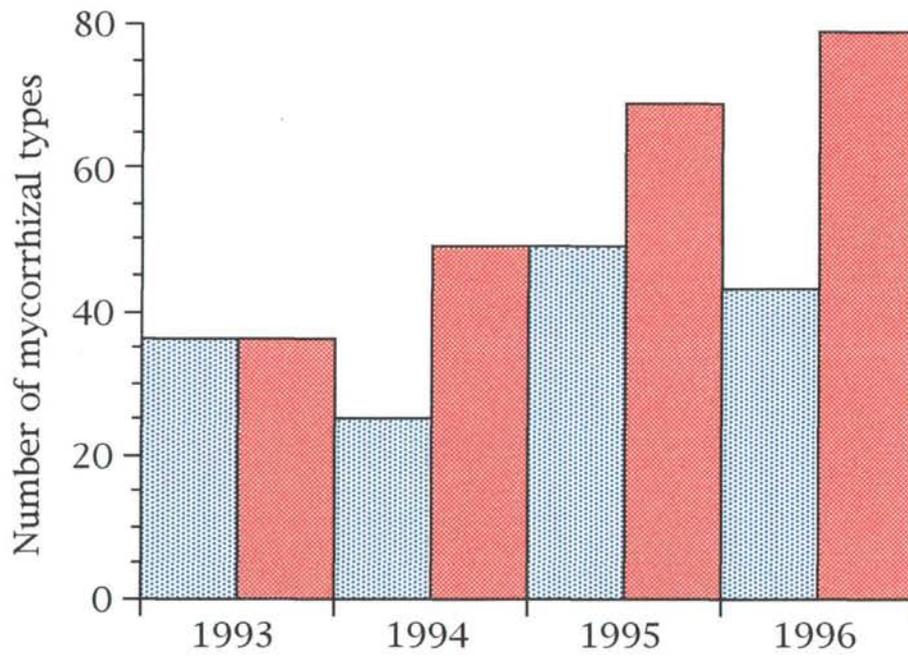


Figure 1. Cumulative numbers (red column) and annual numbers (blue column) of ectomycorrhizal types recorded at the plot during the period 1993-1996.

第2節 *Cenococcum geophilum* の核ゲノム rDNA の ITS 領域と菌根形態との比較

本章前節で示したように、本研究ではアカマツ外生菌根を顕微鏡下での形態的特徴に基づき 103 タイプに類別した。この類別は、本研究と同一の調査区でのアカマツ菌根試料を基に行われた著者らの菌根タイプの類別に準じている (Yamada and Katsuya, 1995, 1996)。そこでは、各菌根タイプがそれぞれ異なる 1 種の菌類によって形成されている可能性の高いことが、菌根の形態観察と合成実験の結果から示唆された。しかし、形態的根拠により類別したそれぞれの菌根タイプが全て種レベル (対応する子囊菌あるいは担子菌の形態種レベル) で異なることが完全に証明された訳ではない。

ここで取り上げた菌根タイプ 98 の *Cenococcum geophilum* Fr. は、系統的には子囊菌類に属す不完全菌であるが完全世代は明らかにされておらず、特徴的な黒色の外生菌根の形態 (Plate 27A-C) と付随する黒色球状の菌核で定義された種である (Lobuglio et al., 1990)。*Cenococcum geophilum* の外生菌根は顕著な特徴を持ち形態的には比較的同定が簡単なことから、汎世界的に分布し宿主範囲がきわめて広いことが明らかにされてきた (Trappe, 1964)。また本菌は、寒天培地上での純粹培養も可能で、しばしば菌根の合成実験にも用いられている (Zak, 1976; Lobuglio et al., 1990; Hutchison, 1991)。しかし、Lobuglio et al. (1990) による *C. geophilum* の核ゲノム rRNA 遺伝子 [IGS (intergenic spacer) および ITS (internal transcribed spacer) 領域を含む] の解析から、本菌の遺伝的変異幅が既存の担子菌あるいは子囊菌の生物学的種のそれに比べはるかに広く、彼女らはこのことから *C. geophilum* が複合種であることを示唆した。生物の系統的關係を DNA 解析から裏付ける研究は、今日ではあらゆる分類群で積極的に行われている。菌類に関しても同様で、その中でも特に核ゲノム中の rRNA 遺伝子の解析が中心に行われている (Bruns et al., 1991)。DNA 塩基配列の置換速度は、個々の DNA 領域や、あるいは生物の分類群により様々であり、それらの差を利用することによって対象とする

分類群や分類階級により、解析に適した領域が異なる。本章では、菌類の種間の比較に用いられることの多い核ゲノム中の rRNA 遺伝子の ITS (internal transcribed spacer) 領域 (5.8 S rRNA 遺伝子を含む) (Gardes and Bruns, 1993) を PCR (polymerase chain reaction) により増幅し DNA 解析に用いた。

本調査区周辺におけるアカマツ根系上での *C. geophilum* の外生菌根形成は既に報告されており (Yamada and Katsuya, 1995, 1996), 特に採取土壌へアカマツ実生を移植した際に *C. geophilum* が比較的高頻度で菌根形成を行うことが確認されている (第 4 章参照)。このことから本章では、特徴的な形態形質を持ち、かつ実験的に扱いの容易な菌根タイプ 98 に当たる *C. geophilum* の多数の試料を用いて、その菌根形態と核ゲノム中の rRNA 遺伝子の ITS 領域との比較を行い、菌根形態 (菌根タイプ) の持つ生物学的な意義を考察することを目的とした。

1. 材料および方法

DNA 解析に供試した *Cenococcum geophilum* の培養菌株

MNC 寒天培地 (Yamada and Katsuya, 1995) 上で伸長する *C. geophilum* の 10 菌株を実験に供試した (Table 6)。このうち菌株 AT341 および AT353 は、著者らによりそれらの分離源アカマツ外生菌根および合成菌根が共に *C. geophilum* の形態を示すことが報告されている (Yamada and Katsuya, 1995)。それ以外 8 菌株 (AT382, AT410, AT416, AT419, AT421, AT423, AT426, AT431) は、第 4 章で述べる菌根菌の釣り上げ実験により得たそれぞれ異なるアカマツ実生根上の菌根タイプ 98 の形態を示す *C. geophilum* の外生菌根から分離した、*C. geophilum* と考えられる菌株である。これら 10 菌株は、全て MNC 寒天培地上で黒色のコロニーを形成し (Plate 26 G), コロニー中央部の比較的古い菌糸体では、しばしば細胞が肥大しかつ細胞壁が肥厚して、厚壁孢子様になるが、分生子は認められない。なお外生菌根からの菌根菌の分離・培養は、Yamada and Katsuya (1995) に準じた。

DNA 解析に供試した *C. geophilum* の外生菌根

1995 年 5 月、調査区を一辺 2.5 m の格子状に区切り、121 個の全交点からリター直下の土壌約 150 cm³ をそれぞれポリエチレン袋に入れ 121 個の土壌試料として回収した。実験室に持ち帰った土壌 1 試料から内径 25 mm、高さ 18 cm の試験管 3 本に土壌 20 cm³ づつ取り分け、予めペトリ皿内で発芽させたアカマツ実生（供試した種子は無菌ではないが、界面活性剤による振とう洗浄により微生物汚染はかなり少なく、外生菌根菌の混入・感染はない）を 1 本づつ移植し、試験管の口をリケンラップ（理研ビニル工業株式会社）で被った。上記の処理を行った計 363 本の試験管を試験管立てに並べ、実験室内の窓際へ静置し、土壌部はアルミフォイルで遮光した。なお実験室内は夏季の気温が約 25 °C 以下に保たれていた。静置約 1 カ月後にリケンラップを剥がし、替わりに透明のプラスチックキャップを被せた。土壌には適宜イオン交換水を注入し土壌の乾燥を防いだ。実生移植後、3～6 カ月を経た生育中の実生を試験管から引き抜き、根系部を水道水で軽く洗浄し、実体顕微鏡下で黒色の菌根を分別した。黒色の菌根をペトリ皿の蒸留水中で更に洗浄し、ピンセットで土壌粒子を取り除いた。黒色の直線的な菌糸を菌根から放射状に広げている、*C. geophilum* の外生菌根と思われる菌根チップ¹⁾を回収し、マイナス 20 °C 下で冷凍保存した。DNA 解析に先立ち解凍した菌根チップは、0.005% の Tween 80 水溶液（滅菌済み）を用いて振とう洗浄し、土壌粒子や植物残渣の認められないことを実体顕微鏡下で確認した後、顕微鏡下で *C. geophilum* の外生菌根であることを確認した。

なおこの時期に実験を行った理由は、この時期に採取した土壌からは本釣り上げ法により *C. geophilum* の菌根が比較的高頻度で回収されるためである（第 4 章 2 節参照）。

DNA の抽出

培養菌株および外生菌根からの DNA 抽出は、主に Gardes and Bruns (1993) に従った。抽出に用いた培養菌株は、50-100 mm² 程度の寒天培地片上の菌糸体

1) 「チップ」の定義については本章 2 節の結果参照。

で、菌根は 1-10 チップ（乾燥重量 0.02-0.5 mg）程度である。まず初めに各試料を抽出バッファー 500-700 μ l と共に乳鉢で入念にすり潰し、マイクロピペッターを用いて 1.5 ml のエッペンドルフチューブに回収後、65°C の水槽にインキュベーションした。その後の抽出操作は、Gardes and Bruns (1993) に従い、抽出操作を終えた DNA 試料は 50 μ l の滅菌イオン交換水に溶解させマイナス 20 °C 下で冷凍保存した。

PCR による ITS 領域の増幅および増幅産物の確認

ITS 領域の増幅プライマーには ITS-1 および ITS-4 のセット、または ITS-1F および ITS-4 のセット (Gardes and Bruns, 1993) を用いた。DNA 増幅反応時の反応混合物の量および組成は Table 7 に示した。DNA 増幅反応にはザイモリアクター II (アトー株式会社) を用い、94°C・2 分間のプレインキュベーション後、94°C・2 分間 - 55°C・30 秒間 - 72°C・1 分間インキュベーションの温度サイクルを 40 回繰り返す。最後に 72°C・10 分間のインキュベーションを行った。増幅反応終了後の反応混合物 6 μ l をアガロースゲル電気泳動に供試し、泳動後エチジウムブロマイド蛍光染色により増幅産物を確認し、写真撮影・記録を行った。増幅産物が目的の ITS 領域であることを確認するため、アガロースゲル上の蛍光バンド（増幅産物）を切り出し、DNA を抽出したのち ITS 領域の増幅プライマー ITS-3 および ITS-4 のセットを用いて DNA 増幅（ITS 領域）の確認を行った。

増幅 ITS 領域の RFLP (restriction fragment length polymorphism ; 制限断片長多型) 解析

ITS 領域の増幅が確認された反応混合物のうち 10 μ l を 4 種類の制限酵素 (Alu I, Eco R I, Hinf I, Rsa I) (ニッポンジーン株式会社) で処理した。処理後の試料をアガロースゲル電気泳動に供試し、泳動後エチジウムブロマイド染色により制限断片を確認し、写真撮影・記録を行った。

II. 結果

Cenococcum geophilum の核ゲノムのリボゾーム DNA の ITS 領域の増幅

供試した培養菌株10株全ての菌糸体から増幅プライマー ITS-1 および ITS-4 のセットでITS領域が増幅され、その産物は約560 bpで全て同一長であった (Figure 3)。この560 bpの増幅産物は、増幅プライマー ITS-3 および ITS-4 のセットによる second PCR で増幅され、ITS領域であることが確認された。

Cenococcum geophilum の外生菌根は、釣り上げに供試した121 土壌試料中 79 試料 (150 個体の実生) から回収された (Figure 2)。そのうち 74 土壌試料に当たる菌根試料で増幅産物 (全てシングルバンド) が認められ、全て同一で約 560 bp であった (Figure 4)。菌根由来の増幅産物は菌株由来の増幅産物と同一の塩基長であり、従って菌根由来の ITS 領域の増幅産物は、アカマツ由来ではなく *C. geophilum* の菌糸体に由来していることが確認された (Table 8)。

増幅 ITS 領域の RFLP 解析

Cenococcum geophilum の培養菌株 DNA の ITS 領域は3種類の制限酵素、Alu 1, Eco R1 および Hinf 1 の制限部位を持ち、それぞれの酵素に対し全試料間で同一の切断型を示した (Figure 3)。一方、全試料において Rsa 1 の切断部位は認められなかった。各酵素に対するITS領域のDNA断片長はTable 3に示した。

増幅された74土壌試料に由来する *C. geophilum* 菌根 DNA の ITS 領域のうち、ランダムに選び出した6土壌試料由来の菌根 DNA の ITS 領域を制限酵素処理した。全試料間で4種類の酵素に対する反応がそれぞれ同一であり (Figure 4)、基本的に *C. geophilum* の培養菌株 DNA のITS領域と同一の制限断片型であった (Table 3)。

III. 考察

培養菌株およびアカマツ外生菌根由来の DNA 抽出試料から *C. geophilum* の核ゲノム rRNA 遺伝子の ITS 領域が PCR により増幅され、全て同一の塩基長で約 560 bp であった。この塩基長は、Gardes and Bruns (1993) が報告した *C. geophilum* の培養菌株の塩基長と一致する。このことは、本調査地での形態種 *C. geophilum* が、北米の形態種 *C. geophilum* と ITS 領域の塩基長の上からは区別できず、両者が遺伝的にも比較的近縁な可能性を示唆している。一方、Lobuglio et al. (1990) は、核ゲノム rRNA 遺伝子の解析を行い、既存の菌類の種（生物学的種）内の遺伝的変異との比較から、形態種 *C. geophilum* が IGS 領域および ITS-1 領域においてかなりの遺伝的変異を持つ複合種であることを示唆した。彼女らの結果では、地理的に隔てられた地域に由来する培養菌株間での遺伝的多型とともに、同所的に生育する宿主植物の種の違いに由来する菌株間の遺伝的多型が存在した。この複合種の問題¹⁾は、本調査区で ITS 領域の長さが同一と見なされた *C. geophilum* の集団が、遺伝的に多型を持つ複合種からなる可能性を予測させた。しかし ITS 領域の RFLP 解析から、本調査区内の *C. geophilum* 集団の ITS 領域の塩基配列はかなり均一であると考えられ、このことから本集団は、生物学的にも 1 種であることが示唆される。ただし、形態種 *C. geophilum*（生物学的には複合種の可能性が高い）では有性生殖器官（子嚢および子嚢胞子形成）が認められておらず（Hawksworth et al., 1995）、このことは本種の遺伝的多型に関する実験的取り組みならびに分類学的取り扱いを困難にしている。

本研究で形態的に定義した *C. geophilum* の菌根タイプであるタイプ 98 は 1 種の

1) 最近 Lobuglio and Taylor (1996) は、多数の *C. geophilum* 分離菌株 [Lobuglio et al. (1990) の実験材料を含む] の 18S rDNA の塩基配列の比較を行い、相同性が極めて高い (99.8-100%) ことを示した。また K. Lobuglio 氏の私信によれば、同菌株の *C. geophilum* の rDNA ITS 領域の遺伝的変異もまた小さい（少なくとも複合種から成ることを示す証拠はない）という。

菌根菌からなることが示唆され、少なくとも本菌根タイプが系統的に異なる複合的な菌類により形成されている証拠はない。この結果は、本研究の菌根タイプ類別の基である Yamada and Katsuya (1995) の考え方 - 菌根タイプの違いは共生菌の種の違いを反映している - と矛盾しない。本調査区では *C. geophilum* が全域に渡って分布しており (Figure 2), このことは本種 (すなわち本菌根タイプ) の遺伝的均一性の例示を多数の試料に基づいた確実なものにした。確かに、全ての菌根タイプが *C. geophilum* の菌根タイプ 98 の様に高頻度で出現する訳ではなく、従って全ての菌根タイプが集団解析の点から厳密に調査できる訳ではない。しかし、本実験の様な集団解析が、外生菌根菌の子実体では既に野外でのクローン集団の時間・空間的分布の追跡に用いられており (Dahlberg and Stenlid, 1990; de la Bastide and Kropp, 1994; de la Bastide et al., 1995), 今後土壌中の菌糸体や菌根に広く用いられることは確実であろう。

Table 6. *Cenococcum geophilum* isolates used for DNA analysis.

isolate No.	origin of isolate	date of isolation
AT 341	ecctomycorrhiza on <i>Pinus densiflora</i>	1992.11.15
AT 358	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1992.10.30
AT 382	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1994.7.5
AT 410	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1994.12.15
AT 416	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1995.1.15
AT 419	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1995.1.19
AT 421	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1995.1.14
AT 423	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1994.12.14
AT 426	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1995.1.15
AT 431	ecctomycorrhiza on <i>P. densiflora</i>	1995.1.14

Table 7. Contents of reaction mixture for PCR amplification.

reagent	final concentration
	(total volume : 50 μ l)
dNTP	200 μ M
Primer 1 (ITS-1)	1.0 μ M
Primer 2 (ITS-4)	1.0 μ M
extracted DNA sample	not determined (3 μ l)
reaction buffer (Toyobo, Co., Ltd.)	1x
Tth DNA polymerase (Toyobo, Co.Ltd.)	20 unit/ml

Table 8. RFLP patterns of amplified rDNA ITS region of *Cenococcum geophilum*.

restriction enzyme	DNA from isolate		DNA from mycorrhiza	
	restriction site	fragment size (Kbp)	restriction site	fragment size (Kbp)
no treatment		0.56		0.56
Alu I	+	0.39, 0.17	+	indefinite
Eco RI	+	0.29, 0.27	+	0.29, 0.27
Hinf I	+	0.17, 0.12 etc.	+	0.17, 0.12 etc.
Rsa I	-	0.56	-	0.56

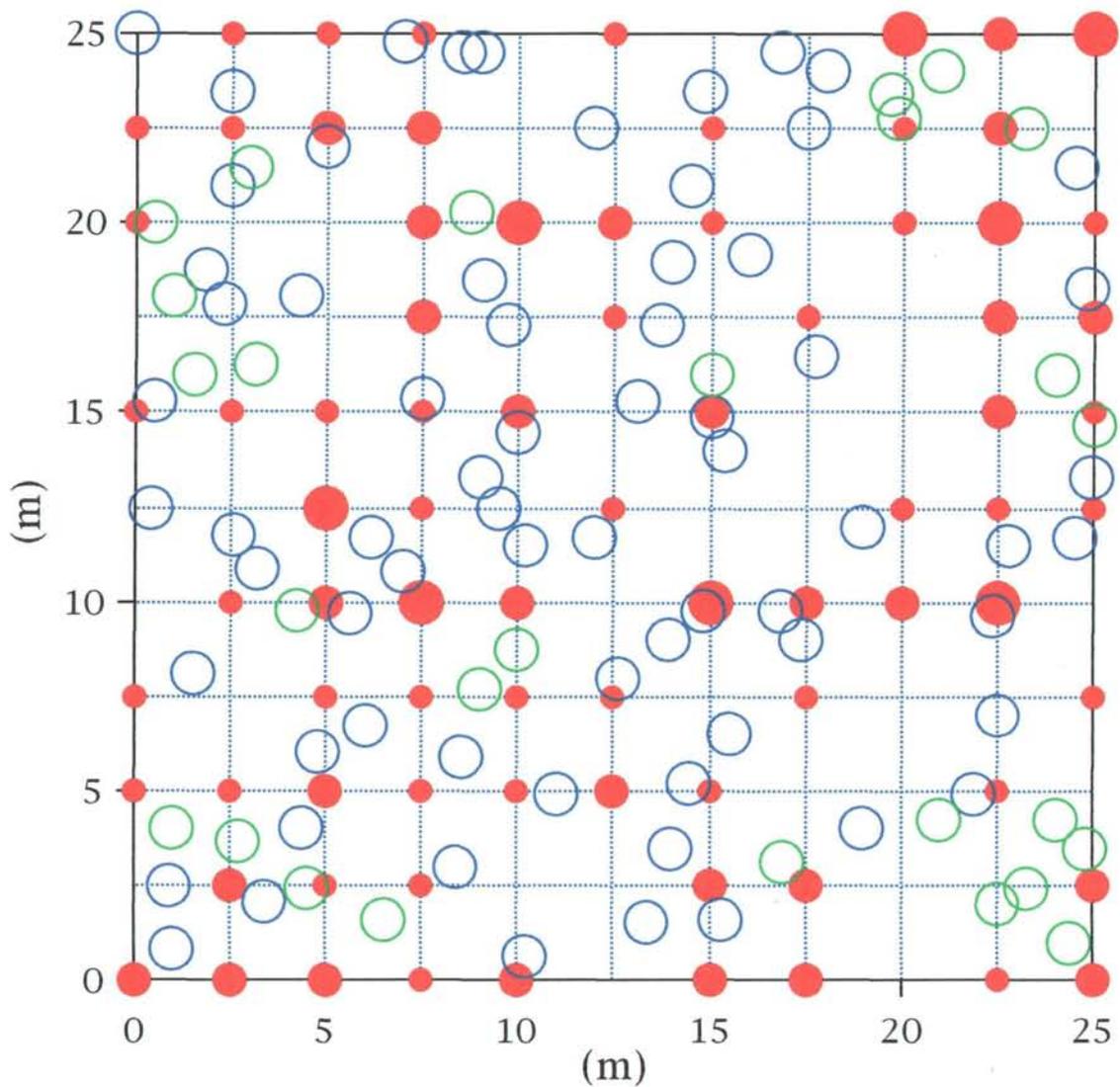


Figure 2. Distribution of *Cenococcum geophilum* at the plot. One hundred thirty-two soil samples which were collected from whole the crosses of the 2.5 m grid were used for the distribution analysis. Detection of the fungus was based on the bating method of fungal inocula in vitro. Red circle: detected position of *C. geophilum*. The sizes of the red circles (small, medium, and large) correspond to the number of soil subsamples (one to three) from which *C. geophilum* was detected. Blue circle: standing position of a mature tree of *P. densiflora*. Green circle: standing position of a tree (basal height was more than 2 cm in diameter) other than *P. densiflora*.

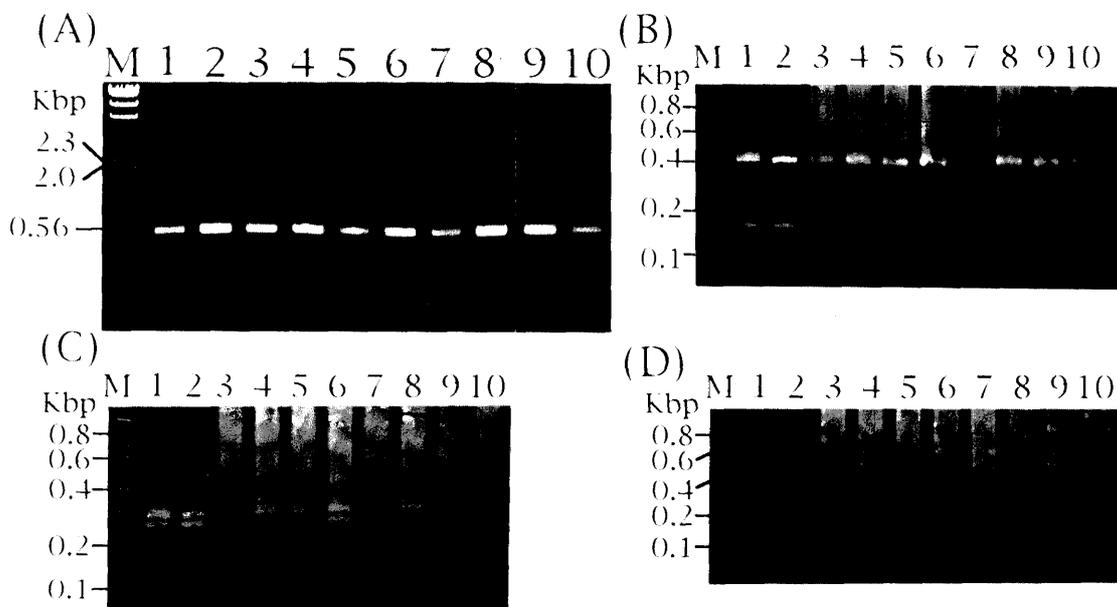


Figure 3. PCR-RFLP analysis of rDNA-ITS region of *C. geophilum* isolates. PCR products (A) were digested by Alu I (B), Eco RI (C) and Hinf I (D). Lanes 1 to 10 indicate isolates 341, 358, 382, 410, 416, 419, 421, 423, 426, and 431, respectively.

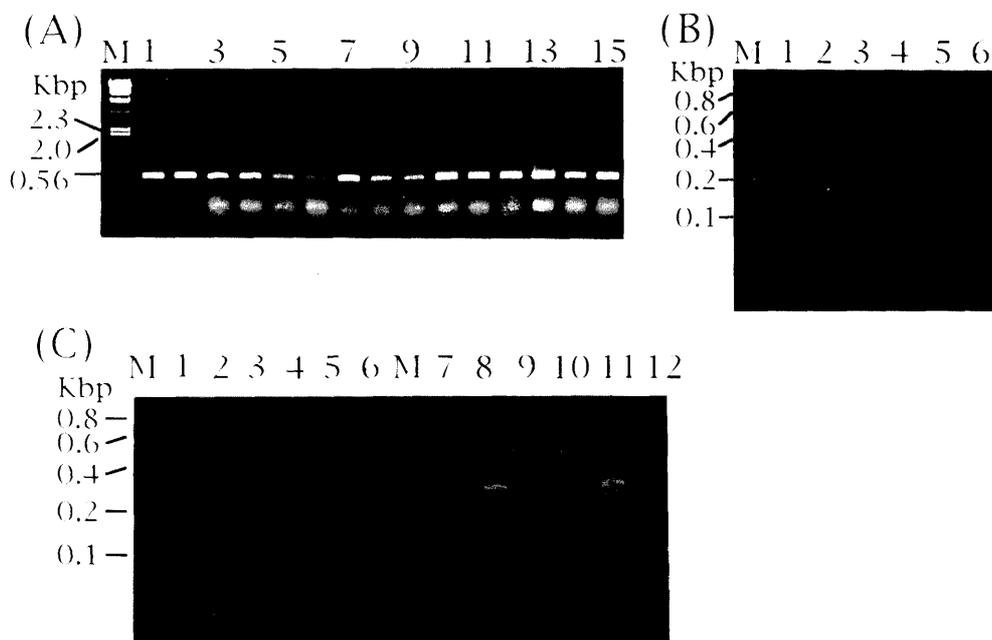


Figure 4. PCR-RFLP analysis of rDNA-ITS region of *C. geophilum* ectomycorrhiza on *P. densiflora*. As shown in (A), 15 out of 74 PCR products were randomly selected. (B): Six out of the 15 PCR products (A) were randomly selected and digested by Alu I (C, 1-6), Eco RI (C, 7-12) and Hinf I (B).

第3章 菌根菌のアカマツ根系上での分布様式ならびに林分内での種多様性

外生菌根菌根菌の群集解析で最も基本的な課題 - 根系での菌根菌の共存の様式 - に対してどのようにアプローチし、評価するかは、今まで先送りにされてきた (Allen, 1991)。近年の Agerer (1995) の研究でも、局所的な根系上における複数の菌根菌の共存 (複数の菌根タイプの共存) は厳密な解析の対象外とされる (R. Agerer 氏私信)。一方この問題は、特定の菌根菌だけを調査対象とする場合 (例えば小川, 1975a, b) には生じない。しかし菌根菌の分離培養が比較的容易なラン科植物の菌根

(orchid mycorrhiza) の場合は、野外における菌根そのものに着目した共生菌の同定あるいは定量が常法となっており、1本の根の中に2種類以上の共生菌が共存する例も報告されている (Masuhara et al., 1988)。またツツジ科植物の菌根 (ericoid mycorrhiza) や VA 菌根の場合にも植物根1本中での菌根菌の共存は既に知られているが (Bonfante-Fasolo; 1980; Read and Haselwaldtner, 1981; Brundrett and Abbott, 1994), 共存する菌根菌の種構成について正確な情報はまだ限られている (Clapp et al., 1995)。

外生菌根は、広義の内生菌根で必要な処置 (菌根菌の分離、特異的染色、電子顕微鏡観察、あるいは DNA 解析) を行うことなく、光学顕微鏡観察により類別・同定することが可能であるにも係わらず、この共存の問題は研究者の興味を引くことが少なかった。この原因の一つに菌糸体が大型のコロニーを形成する (例えばシロやフェアリーリング) (小川, 1975a; Ogawa, 1985) ことが、外生菌根菌の特徴として特に注目を集めたことが上げられる。他方、異なる菌根菌の植物根系上での共存の現象はごく普通であり、現象の簡単な報告は多数ある (Zak, 1973, Allen, 1991, Brand, 1992; 山田, 1993; Kasuya et al., 1995)。異なる菌根タイプが共存する現象は、宿主植物根 (資源) をめぐる菌根菌の相互の競争あるいは宿主特異性を反映する結果と考えられる。この共存を明確に把握することは、自然界での菌根菌と植物根の菌根形成をめぐる相互作用の実体を実験的手法で解析するための基本的な情報であると考えられる。

本章では第一に、アカマツ根系における外生菌根菌の分布様式を明らかにすることを目的にした。本調査区でのアカマツ根系上での複数の外生菌根菌の共存は既に報告したが（山田, 1993）, 本研究ではそれを更に確実にした。第二に、著者の本研究以前のデータ（山田, 1993）ならびに本論文第2章の結果を用いて、菌根菌群集の種数と林分面積との関係を考察し菌根菌の共存の実体を明らかにすることを目的とした。

I. 材料および方法

著者（山田, 1993）の方法に従い、1994年10月、調査区において任意にリター直下の面積 $20 \times 40 \text{ cm}^2$ 、深さ 10 cm の土壌を、 $5 \times 5 \times 5 \text{ cm}^3$ の単位土壌ブロック32個からなる上層および下層の2層（計64土壌ブロック）に分けて採取した。実験室に持ち帰った各土壌ブロックに含まれるアカマツ成木の全菌根を著者（山田, 1993）の方法に従い洗浄、回収した。そして回収した菌根チップを顕微鏡観察により菌根タイプに類別した（第2章2節の方法参照）。なお、菌根タイプ-面積曲線の計算方法を Figure 6 に示した。

II. 結果

類別された外生菌根は合計15タイプであった（Figure 5 および Table 9）。アカマツの外生菌根は、64個の単位土壌試料（ $5 \times 5 \times 5 \text{ cm}^3$ ）中の49個（76.6%）に分布しており、地表面積に換算すると調査地の93.8%の面積に分布していた。

単位土壌試料に複数の菌根タイプが共存することはしばしば認められ、最大6タイプが認められた。菌根タイプ18は出現頻度および菌根量が最も高く（Table 9）、それ以外のタイプとの差が顕著であったので本土壌試料中において優占タイプと考えられた。Figure 5 に示すように、優占タイプ18が記録された単位土壌試料からも他の菌根タイプが普通に認められた。

土壌試料中の上層と下層（各5cmの深度）の菌根の分布パターンおよび各菌根タイ

プの出現頻度には差が認められた (Figure 5)。上層からは 14 タイプ、下層からは 7 タイプが認められ、6 タイプが両層の共通であった。

菌根タイプ-面積曲線は、Figure 7 に示すように地表面積の増加と比例する形で菌根タイプ数の増加を示した。

III. 考察

土壌試料中の菌根タイプの分布様式

本調査で確認された外生菌根タイプ数 15 は、同調査区で著者が以前に報告した同体積土壌試料中のアカマツ外生菌根のタイプ数 20 (山田, 1993) に比べ少なかった (Figure 8)。今回の土壌試料採取地点は前回の地点から約 15 m しか離れていなかったが、記録された菌根タイプの組成は大きく異なりまた共通なタイプの出現頻度も異なっていた。これは、活動している菌根菌の種構成が、同じ林分内でも場所によって大きく異なる可能性があることを示唆している。

他方、両者の結果を比較した結果、幾つかの共通点が認められた。すなわち両地点で菌根が高頻度で土壌試料から回収され、菌根の分布は量的に下層に比べ上層 (リター直下の A₁ 層) が豊富で、かつ多様な菌根タイプが認められ、また優占的に分布するタイプが認められたことである。こうした結果は次の 3 点を示唆していると思われる。第一に、このサンプリングスケール (20 x 40 cm²) でアカマツ根系上での菌根の基本的な分布様式は把握できたと思われる。菌根の分布は宿主根の分布 (有無) に第一義的に支配されているが、大多数の単位土壌から菌根が記録されたことは調査林分の土壌表層にアカマツ根が密に分布していたことを示しており、用いたスケールが菌根菌の分布解析に十分なスケールであったと思われる。第二に、本調査区内のアカマツ根系上では菌根菌の共存が普通であり、アカマツの菌根菌 *T. matsutake* がシロを形成している場所における菌根の分布様式 (小川, 1975a, b) とは根本的に異なっていた。この結果は、アカマツ根系上の菌根の分布様式が林分の立地条件や菌根の構成種の違いにより大きく変化する可能性を示している。また複数の菌根タイプが共存

していたことは、本調査区では菌根菌同士の積極的な競争的排除が存在するとは認め難い。むしろそれぞれの菌根菌は限られた資源（アカマツ細根）のもとで分断され、*T. matsutake* などシロ形成菌に比べてかなり小さな単位を生息場所として生活している可能性を示している。すなわち、Deacon and Fleming (1992) の「菌根の機能的な基本単位は菌根1チップである」という意見はこの結果から支持される。他方、複数の菌根タイプが共存する単位土壤中で1チップの菌根上に2種類以上の菌根タイプが認められた場合や菌鞘部の部分的な多重感染（菌鞘が不連続で明らかに異なる菌根菌が感染している）あるいは二次的感染と見られる菌根菌の認められた場合があった。同様な現象はしばしば他の研究者も報告しており（Zak, 1973; Allen, 1991; Brand, 1992; Kasuya and Igarashi, 1995）、外生菌根においても内生菌根で認められるような宿主植物の一本の細根上で異なる菌による細胞レベルの複数感染という様式が起こりうる事を示唆している。さらに、*Eucalyptus* 属植物で同一細根への外生菌根菌と VA 菌根菌との2重感染が普通である事が示され（Chilvers et al., 1987）、また同様なことがマツ科でも普通に生じているという例が近年報告された（Cazares and Smith, 1996）。従って今後本調査区でもこうした現象について検討する余地がある。第三に、本調査法では土壌深度による菌根菌のすみわけ的な分布ははっきり示されなかったが、本調査区でも多数の菌根菌が土壌菌との直接的な相互作用（Harley and Waid, 1955; 小川, 1977）は勿論、上方に隣接して存在するリター分解菌群集とも直接的な相互作用（Entry et al., 1991）を生じているであろうと推測され、今後更に検討する必要がある。

アカマツ林分内での菌根菌の種多様性

本調査の結果から、著者（山田, 1993）のアカマツ根系上での外生菌根の分布様式の報告 - 複数の菌根菌の共存 - が再確認され、菌根と子実体の分布様式にずれがあるという推論（山田, 1993）の确实性を高めたことになる。また本調査区野外で確認された全菌根タイプ数 79（第2章参照）ならびに著者（山田, 1993）の本調査区での以前の結果を併せると、外生菌根性の地表性大型菌類の子実体種数と菌根タイプ数（菌根菌数）の面積曲線の関係は Figure 8 のようにまとめられる。

これらのグラフから、子実体総種数と総菌根タイプ数は大きく異なっていた。この点に関しては、本調査区における著者（山田, 1993）の子実体発生に基づく単位面積当たりの菌根菌の種数自体が、既存の報告にある子実体発生に基づく外生菌根菌群集の種多様性（Villeneuve et al., 1989; Arnolds, 1992）に比べ、著しく高かったことを考慮すると、子実体発生を基にした菌根菌群集の種多様性の推定値が、実際の値を過小評価していることを明確に示している。また、単一針葉樹種の植栽林の外生菌根菌群集の種多様性は菌根の実測値も考慮した Bruns (1995) の試算で 30 種 / 0.1 ヘクタール程度となったが、彼もまたこのような概算値が自然植生下での菌根菌群集の値に比べて過小評価されている可能性が高いと述べている。本研究の結果である約 79 種 / 0.06 ヘクタールという値は、同じ単一樹種植栽林下で過小評価の可能性を明示したものと見える。これらのことから、子実体発生に基づいた種多様性の推定は菌根菌群集の種多様性を著しく過小評価する危険性があり、菌根菌群集の正確な把握を困難にする可能性が高い。

また、子実体の種数-面積曲線と菌根タイプ数-面積曲線の上昇は互いに 3 オーダーの差をもって始まっていた (Figure 8)。このように、子実体発生からは根系圏での菌根菌の共存を決して推定できないということは、群集のダイナミクスを考える上では重要である。特に、成木林内での実生の定着には成木根系上の菌根が重要な役割を担っており (Newton, 1991)、宿主根系上での菌根菌の分布様式を明らかにする必要がある。しかし、林分スケールでの種多様性の論議では、多様性の機能的な側面であるこの菌根菌の基本的な分布様式の点がしばしば抜きにされてきた (Villeneuve et al., 1989; Arnolds, 1992)。本調査結果は、菌根菌群集の高い種多様性が根系上での多数の菌根菌の共存から成立することを示しており、両者には高い相関関係があることが推察された。先に述べたように菌根菌群集の全構成種を把握することが必ずしも容易でないことも考慮すると、群集の種多様性では第一に宿主根系上での菌根菌の分布様式を詳細に比較することが必要と考える。

本調査区での外生菌根菌群集の種多様性が、世界で最も高い範囲に属するものなの

か否かは更に検討の必要がある。その理由は、本研究で用いた方法の評価の問題と既存の報告の方法や同定に関しての再検討が挙げられる。前者については第1章で既に論じたが、後者については、研究者により方法や、菌根同定のレベルなどが様々であるのでここでは詳しく述べない。近年体系化されつつある Agerer (1995) や Gardes and Bruns (1996) のアプローチが広く適用されるようになれば、種多様性の信頼できる相対尺度が提示されるものと考ええる。この一連の研究から、本調査区のアカマツは多様な外生菌根菌と関係を持っていることが明らかになり、本調査区が外生菌根菌群集の種多様性を実験的な観点から考察するのに極めて適した場所であることが分かった。特に次章で述べる菌根および菌根菌感染源の季節変化や、活動している菌根菌と空中から降下する胞子をはじめとする外部から侵入して来る菌根菌感染源との関係など、群集のダイナミクスを考察するのに興味深い場所と考える。

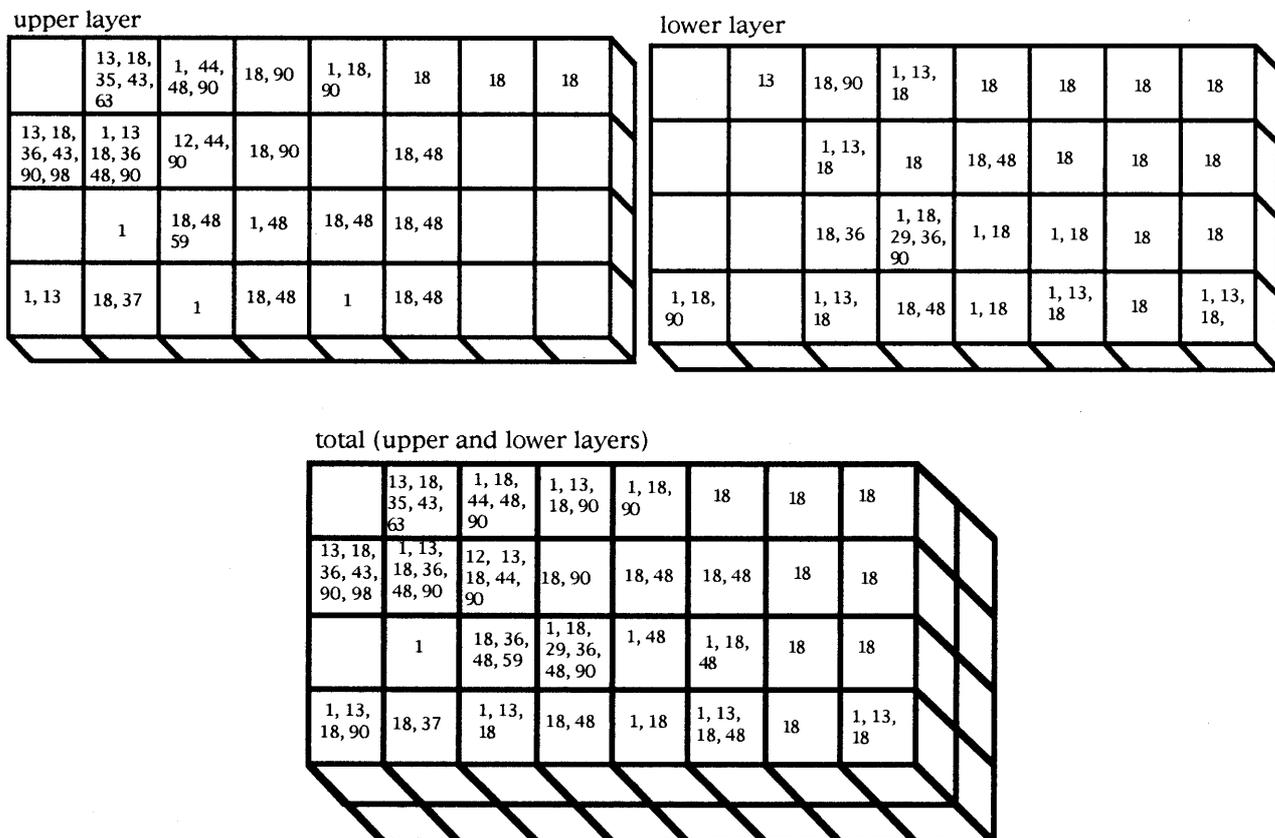


Figure 5. Distribution of ectomycorrhizas on *Pinus densiflora* in a soil block sample (20 x 40 cm square, 10 cm depth). Each number represents the ectomycorrhizal type. Both horizontal and vertical distributions of each mycorrhizal type were shown based on the data of mycorrhizas in the 64 unit soil blocks (5 x 5 x 5 cm cube).

Table 9. Number of ectomycorrhizal (ECM) tips recovered from the soil block.

order	ECM type	number of mycorrhizal tips (%)	number of soil blocks recovered the ECM type
1	18	1417 (62.95)	41
2	1	319 (14.17)	19
3	48	166 (7.37)	11
4	13	104 (4.62)	9
5	90	78 (3.47)	10
6	29	66 (2.93)	1
7	44	37 (1.64)	1
8	43	25 (1.11)	2
9	63	10 (0.44)	1
10	36	9 (0.41)	4
11	37	8 (0.36)	1
12	59	7 (0.31)	1
13	35	3 (0.13)	1
14	98	1 (0.04)	1
15	12	1 (0.04)	1

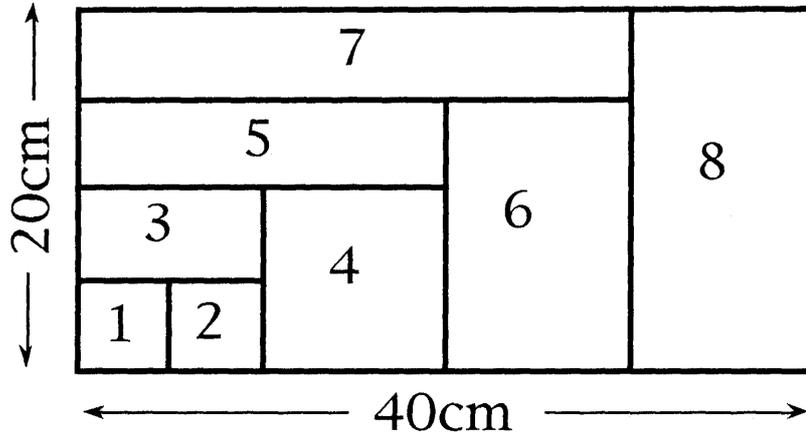


Figure 6. Calculation method of the mycorrhizal types- area curve. The number of mycorrhizal types per unit square (20 x 40 cm²) were cumulated as "1+2+3+4+5+6+7+8".

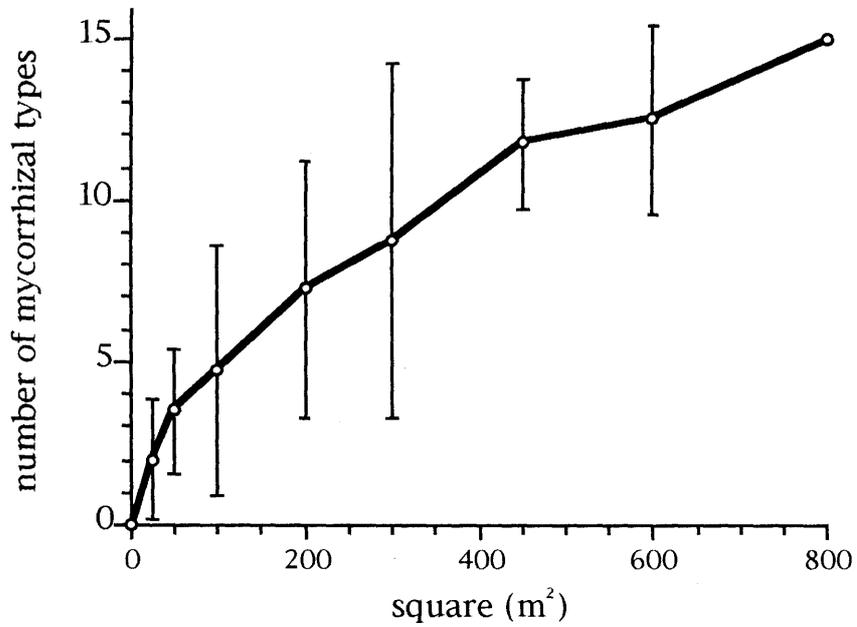


Figure 7. Ectomycorrhizal types-area curve based on the data in Figure 5. Bars represent means (n=4) \pm SD.

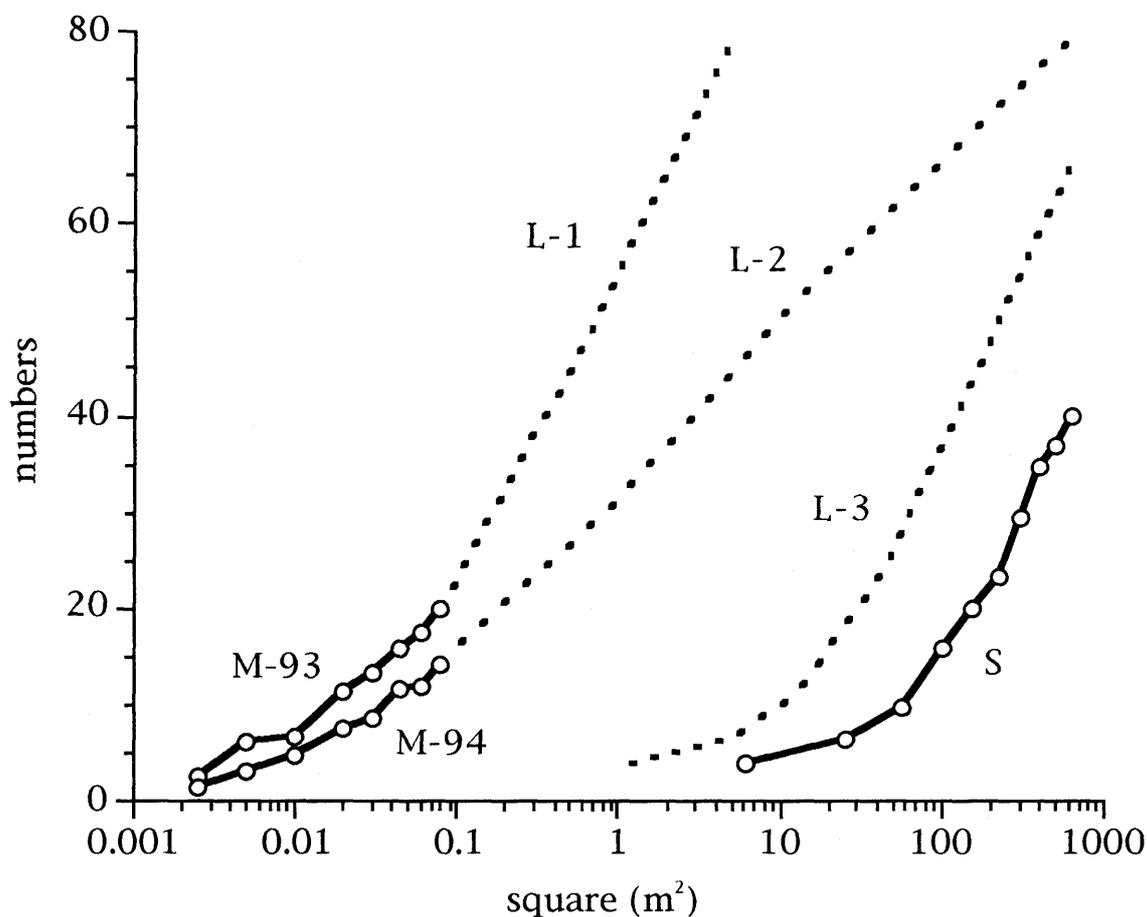


Figure 8. Comparison of area curves at the plot. M-93 and M-94: mycorrhizal types-area curves based on the data in 1993 (M-93) (Yamada,1993) and 1994 (M-94) (present study), respectively. S: species-area curve based on the data of Yamada (1993). L-1 and L-2: presumptive lines of mycorrhizal types-area curves. L-3: It is the speculated species-area curve if sporocarp density become five times higher than the previous data shown as "S".

第4章 アカマツ外生菌根ならびに菌根菌感染源の季節変化および種構成

第1節 アカマツ外生菌根の季節変化および種構成

外生菌根菌の子実体発生には明瞭な季節変化があることは一般的に広く知られているが (Fogel, 1976; Bills et al., 1986; Dix and Webster, 1995), 菌根そのものの季節変化の報告は限られている (小川, 1975a, b, Vogt et al. 1981a, b; Fogel and Hunt, 1983)。日本の温帯地域では, 夏季から秋季に特に多くの外生菌根菌の子実体発生が認められ, よく知られた *Tricholoma matsutake* (マツタケ) もこの変動パターンと相関して秋季に菌根量が最大になり子実体を発生させる (小川, 1975a, b)。このような季節変化は, 植物のフェノロジーに対応させた菌根菌一般の季節変化の原因で説明できる (Allen, 1991)。しかし, 菌根菌群集では全ての種が同じ様な季節反応を示すとは断言できない。事実 VA 菌根菌では個々の種の反応の違いが示唆されている (An et al., 1990; Brundrett and Abbott, 1994; Clapp et al., 1995; Hendrix et al., 1995)。外生菌根の量的な季節変化については少数ながら調査例があるが, 種多様性やその他の群集構造の季節変化は今のところ実験制御下の単純な系でも必ずしも解明されておらず, ましてや自然林や成木林では殆ど明らかにされていない。その原因として, 菌根同定の困難さと試料採取方法の不備が考えられる。特に後者の選択は, 群集多様度と菌根の分布様式 (第3章参照) を考慮した上で模索せねばならず, 単純に決められない。

外生菌根菌の季節変化は土壤中の菌糸体量 (菌根も含む) で測定するのが理想的であるが, モデル実験系 (Coutts and Nicoll, 1990) を除き, 野外での多様な群集の解析への応用は未だ現実的ではない (Egil and Kalin, 1991)。また土壤中の菌糸体量と菌根量の比は時間的にも一定のものではなく (小川, 1975a, b), それぞれの種によりこの比が異なる可能性が高い (Ogawa, 1985)。従って, 菌根菌群集レベルでの菌根量の季節変化が, 菌糸体量の季節変化を考える上でどれほどの意味を持つのかは必ずしも明らかでないが, 両者がある程度高い相関を持って変化すると推測できる。少な

くとも、菌根菌群集の種構成を知る上では、菌根量の測定が不可欠と考えられる。また、林分内での菌根菌の優占度は、上記の様な問題から評価が極めて難しい。現段階で最も信頼性のある推定値の1つは、年間を通しての積算（あるいは平均）の菌根量と考えられる。

本章では、アカマツの複雑な外生菌根菌群集（第3章参照）の季節変化および種構成を菌根量から明らかにし、本調査区でのアカマツの外生菌根菌群集のフェノロジーを考察することを目的とした。

I. 材料および方法

調査区において、1995年7月より1996年6月までの1年間菌根の定期的な採取を行った。各月毎に土壌4試料をランダムに採取し、合計48試料の土壌を調査した。土壌試料はリター直下の土壌ブロック（7 x 7 x 7 cm³）を切り出したもので、同月採取の各試料の採取地点は互いに10 m以上離れていた。著者の方法（山田，1993）に従って採取土壌からの全アカマツ菌根の取り出しならびに洗浄を行い、菌根の顕微鏡観察ならびに類別を行った（第2章2節の方法参照）。なお菌根量の値は菌根チップ数（チップの定義は第2章2節の結果参照）で計算し、菌根量の季節変化の有意差検定はStat View (Ver. 4.5) (Abacus Concepts, Inc., 1995) を用いて行った。

II. 結果

菌根の季節変化

一年間の調査により約3万チップのアカマツ菌根が採取され、このうち類別に供試した27107チップの観察から63タイプの外生菌根が確認された。各菌根タイプの各月毎の出現頻度（菌根が回収された土壌試料数）(Table 10)を見ると、土壌試料間では出現する菌根タイプのばらつきが大きく、同月の全4試料から同一の菌根タイプ

が検出されることはなかった。また、多くのタイプが夏季と冬季の双方の土壌試料から回収され、特定の季節に限って出現する傾向のある菌根タイプは見られなかったが、菌根タイプ 17、タイプ 24 あるいは タイプ 84 は通年出現する傾向があった。各菌根タイプの月毎の菌根チップ数 (Table 11) も明瞭な季節変化は認められず、通年に渡って出現する傾向があった。

各月毎の土壌 1 試料当たりの平均菌根タイプ数の変化 (Figure 9) は、明瞭なピークがなかったが、夏から初冬にかけて多少増加後、初冬から春にかけては減少し、春から夏にかけてまた多少増加する傾向を示した。そこで季節ごとに平均してみた結果 (Figure 10)、土壌 1 試料当たりの平均菌根タイプ数は季節毎に変化が認められ、冬季と春季の値では有意差が認められた。また月毎の土壌 4 試料中の総菌根タイプ数は、月毎に変化があるものの常に 10 以上であった (Table 10)。

各月毎の土壌 1 試料当たりの平均菌根チップ数の変化 (Figure 9) も明瞭なピークがなかったが、9 月と 4 月に多少多い傾向を示した。そこで季節ごとに平均してみた結果 (Figure 11)、土壌 1 試料当たりの平均菌根タイプ数はばらつきが大きく季節間の有意差は認められなかったが、春季および秋季にピークを示し夏季と冬季で少ない傾向を示した。また月毎の土壌 4 試料中の総菌根チップ数は、月毎に変化が大きく最大値と最小値で約 8.9 倍の差があった (Table 11)。

アカマツ菌根の種構成

各菌根タイプの出現頻度およびチップ数は、Table 10 および Table 11 に示す。それらを通年で出現チップ数の多い順に配列した結果を Figure 12 および Table 12 に示す。菌根チップ数の対数値とその順位の関係が回帰直線で近似でき、等比級数則 (元村, 1932) にほぼ従った (Figure 12)。このうち Table 13 において、年間積算の全菌根チップ数の 1% 以上に当たる菌根チップ数の確認された上位 20 タイプまでを順次列挙した。多くは菌根菌が未同定であったが、最も相対量が高かったのはタイプ 84 の Thelephoraceae 科の 1 種で約 13.3% であり、属レベルでは *Russula* 属 4 種 (タイプ 15、タイプ 24、タイプ 19 およびタイプ 21) が 30.2% で (全 *Russula* 属菌では 31.8%) 最も高かった。また *C. geophilum* も約 3.7% で 8 番目

の菌根チップ数であった。

土壌試料中の菌根タイプ数と菌根チップ数の関係を Figure 13 に示したが、菌根チップ数の増加が菌根タイプ数を抑制する傾向はなかった。

III. 考察

個々の菌根タイプでは明瞭な季節変化が認められなかったが、タイプ数の増減という点からは菌根に季節変化があることが認められた。すなわち冬季に最大値、春季に最小値が出現した。この結果は、本調査区において菌根菌の群集レベルでの季節変化が存在することを示唆している。個々の菌根タイプでは季節変化が明瞭でなかった理由は、土壌試料毎に出現する菌根タイプが実に様々であり、各菌根タイプの季節性を正確に追跡できていなかったことによる可能性が高いと思われる。また菌根タイプの多様度の季節変化とは異なり、菌根量ではやや不明瞭ながら2ピークのパターンが認められた。土壌1試料当たりの菌根量の年平均値は約565チップであるが、植物の生長期である春季から秋季にかけての菌根量は月毎にばらつきが大きかった。この中には更に幾つかのピークが隠されている可能性は否定できない。特に、夏季には地温が25℃を越えることもあり、この時期には菌根そのものの回転率が高いことが推測されるので、今後再調査して検討する必要がある。また Coutts and Nicoll (1990) の *Thelephora terrestris* (Ehr.) Fr. を用いた実験では、菌根菌の活動（土壌中の菌糸体の伸長）は、冬季の土壌温度2℃程度でも停止することなく継続し、再び春先の温度上昇と共に活発になったと報告されている。本調査区では冬季の土壌深度10cmでの温度が0℃を下回ることが殆どなかったから（山田, 1993）、菌根菌が冬季にも活動していると考えられる。このように本調査区では菌根菌群集に季節的な変化はあったが、種多様性および菌根量とも通年に渡りほぼ安定しており、群集としての活動は通年に絶えることなく行われていることが示唆される。これらの結果は、小川（1975a, b）の報告したアカマツ林での *T. matsutake* とは季節変化が不明瞭であった点は異なるが、菌根菌が通年で活動する点では一致していた。

菌根菌の種多様性の季節変化では、冬季の最大値から春季の最小値にかけてが最も明瞭であった。しかし、菌根の回転率が温度に依存することを考慮すると、この減少は冬季に始まっていたと考えるのが妥当であろう。すなわち、菌根の季節変化は、菌根の発達速度と同時にその結果も反映してる。野外での菌根の回転率は必ずしも明瞭ではなく (Egil and Kalin, 1991), 活性を持つと思われる菌根と同時に、多量の老化あるいは枯死した菌根も存在する。次章で詳しく触れるが、根系から切断された菌根も菌根菌感染源としての能力を持ち続けること、また *C. geophilum* の菌根ではポット土壤中に数カ月間インキュベーションした後も菌鞘構造を顕微鏡で確認できる場合があった。すなわち、老化あるいは断片化した菌根が、菌根菌にとっての菌核様の耐久構造として機能している可能性を示唆するものであり、季節変化の追跡の場合に、不活性な形の菌根 (必ずしも明瞭には老化菌根と区別できない菌根や活動を休止している菌根) を形成している菌根タイプを、相対的に高く評価してしまう可能性を示唆している。例えば、菌鞘の表面構造が regular synenchyma 型で暗色を呈する菌根菌 (例えばタイプ 84 の Thelephoraceae 科の 1 種やタイプ 98 の *C. geophilum*) ではこの傾向が強いように思われる。従って *C. geophilum* の菌根が著しく高頻度で出現した Vogt et al. (1981a) の結果のような場合、老化菌根の過大評価の危険性を考慮して評価する必要があると思われる。このように菌根菌の土壤中での活発な活動時期 (例えば菌糸生長) と、菌根量の増減には時間的なずれがある可能性があり、菌根菌そのもののバイオマスは菌根量だけを基準にして試算するのは危険であるかもしれない。

菌根チップ数の積算から、本調査区では *Russula delica* (シロハツ) および *R. nigricans* (クロハツ) を含む *Russula* 属菌と Thelephoraceae 科の 1 種が優占的に活動していることが示唆された。両者の菌根チップ数の合計が全菌根チップ数の約 43.5% であり、その他を残りの 60 タイプが占めることになる。*Russula* 属菌と Thelephoraceae 科菌が優占したことは、Gardes and Bruns (1996) が報告した北米カリフォルニアの *Pinus muricata* (bishop pine) 林での優占菌根菌種の組成と全く一致した。このように地理的に隔離されているにも係わらず菌根菌群集の優占

種に共通性が認められることは、マツ属の林分下では同じような優占種の組み合わせが普通に見られる可能性を示唆している。*Russula* 属菌の菌根の優占は、*Pinus banksiana* (jack pine) の林分 (Visser, 1995) や *Picea sitchensis* (Ryan and Alexander, 1992) でも報告されており、この属の菌による菌根は他属のマツ科針葉樹林でも広く優先している可能性がある。

前章において優占的な分布が示されたタイプ 18 は、本章の調査からは必ずしも優占種とは見なされなかった (Table 19)。この原因は、調査方法に依ると考えられるが、このことから少数の試料しか用いない調査では群集構造を推定することが困難である。また菌根量で最も多かった菌根タイプ 84 と 2 番目のタイプ 15 では菌根の出現頻度に大きな違いがあり、前者が半数近い試料で確認された一方、後者ではわずか 2 試料であった。この出現頻度の違いは根系上での菌根の分布様式の違いを反映したものと考えられるが、本章のように 48 試料の土壌を用いても優占的な種の全てを高い出現頻度に基づいて評価することはできなかった。このことから本調査区の林分スケールで更に高い信頼性に基づいて菌根菌の群集構造を把握するためには、ランダムに採取した 100 個を超える小土壌試料からなる調査が必要であることが示唆される。

本調査区では、子実体発生量および種数の双方で *Russula* 属菌とならび *Inocybe* 属菌の優占が確認されている (山田, 1993)。しかし本研究では *Inocybe* 属菌に対応する菌根タイプは確認されなかった。*Inocybe* 属菌の菌根としては Ingleby et al. (1990) により明瞭な半月型のクランプコネクションを持つ菌糸を有するタイプが報告されている。本研究でそのような型のクランプコネクションを持つ未同定の菌根タイプは幾つかあったが (例えばタイプ 33)、それらのタイプを *Inocybe* 属菌と同定するに至らなかった。またそれらの菌根タイプが仮に *Inocybe* 属菌としても、菌根量が少ないため *Inocybe* 属菌の優占的な子実体発生を説明できない。このように菌根量という観点から見ると、同じ多子実体発生菌としての *Russula* 属菌と *Inocybe* 属菌は対照的である。調査区において *Inocybe* 属菌の腐生的生活を示唆する根拠もないので *Inocybe* 属菌の大量な子実体発生の理由は明らかではないが、少量の菌根形成を生じていると推察される。*Inocybe* 属菌の例は Thelephoraceae 科の 1 種の例と同様

に、子実体発生に基づき推定した菌根菌群集が実際の菌根菌群集の構造を反映していないことに他ならない。

各菌根タイプのチップ数に基づく順位付けの結果、本調査区の菌根菌群集は等比級数則（元村, 1932）に従った。このような群集構造の特性は、成木林内での菌根菌の群集では広く見られる可能性が高いが、この点に関するデータは限られている

（Visser, 1995）。また Ryan and Alexander（1992）のように出現数の少ない菌根を少数集団として一括して扱った場合はこの方法による解析はできない。群集のダイナミクスの一つは環境変化に相応する群集の構造変化であり、特に菌根菌類相に富む成木林でこの問題を考察するためには、少数集団も含めた群集構成種を網羅的に記載することが必要であると考えられる。

土壌試料当たりの菌根チップ数と菌根タイプ数との間には、明瞭な相関関係は認められず、ある菌根タイプの発達が他の菌根タイプの発達を妨げる傾向は認め難かった。土壌 1 試料から出現する菌根が 1 タイプの場合もあったが、これは土壌試料の大きさに依存した結果であると考えられる。仮にある菌根タイプが独占的な分布範囲を持つとしてもその範囲はセンチメートルのオーダーであると考えられ、このことは第 3 章で述べた分布の調査結果とも一致する。またこの様式は季節的に顕著な変化をすることは無かった。

ここで改めて、優占的であった *Russula* 属菌の菌根の季節変化を中心に調査区でのアカマツと外生菌根菌群集の関係を考察する。6 種の *Russula* 属菌の菌根量の合計の季節毎の平均値は Figure 14 に示す通りで、秋季に最大値、冬季に最小値の 1 山型の季節変化（冬季から春季にかけては有意に減少）であった。この変化は、植物体の光合成産物の根系への転流に相応した菌根形成が起こるという考え（Harley and Smith, 1983; Allen, 1991）を支持するものであり、アカマツ林での *T. matsutake*（小川, 1975a, b）の季節変化とほぼ一致する。*Russula* 属菌の子実体は、本調査区では夏季から秋季にかけて発生し、これは菌根量の増大時期とほぼ一致している。一方、菌根量全体の変動は、植物の生長期にあわせて菌根量を増大させる *Russula* 属菌の季節変化を不明瞭にしている。このことは、*Russula* 属菌の菌根の回転率が他の菌

根に比べ比較的高い可能性を示唆しており、*Russula* 属菌以外の菌根菌が*Russula* 属菌の活動の合間を埋めるように菌根形成したことを示している可能性をも推測させる。しかし、菌根の分布様式から*Russula* 属と他の菌根菌との拮抗的な関係は認められず、*Russula* 属菌とそれ以外の菌根菌の間の菌根量の季節的なずれの傾向に関しては今後検討の余地があると考ええる。

以上のことから、アカマツ成木のフェノロジーと菌根菌群集の挙動の関係は必ずしも明瞭ではなく、個々の菌根菌は複数の要因によりそれぞれ生育が制御され菌根量の変化を示しているようである。外生菌根菌の種多様性では季節変化が認められたが、菌根量では*Russula* 属の場合を除き季節変化が明瞭ではなかった。この結果から、アカマツ林での外生菌根菌の群集構造の季節変化は、*T. matsutake* の季節変化（小川, 1975a, b）を基にした単純な一般化では説明できないことを示唆している。

Table 10. Monthly recovery of ectomycorrhizal (ECM) types from the soil block samples collected at the plot.

ECM type	number of the soil block samples (max. n = 4) recovered the mycorrhizal type											
	1995						1996					
	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.
1		2	1	2	1	3	2	1			2	
2					1		1			1		
3			1								1	
4		1										1
6	1			1	1		1		2		1	
7			1									
10	1					2	1					
13						2	1	1				
14				1								
15			1				1			1		
16		2	1	2	1	1	1	1	1			
17		2		3	1	2		2	2		2	
18	1	3				2	1	1		1		1
19			1						1	2		
21		1			1			1				1
24	3			2	2	1						1
26			1									
27	1											
30											1	
31	1									1		
32							1		1		1	
33	1	1		2	1	1	1	1			1	
34							1					
36				2				1		1	1	
37							1					1
38	2			1	2	2	1		1	1	3	1
39	1				1						1	
40		1										
42		1										
44				1								
45						1						
47					1		1	1			1	
48				1								
49												1
51												1
52		1										
57					1				1			
59								1				
60										1		
61		1										
62	1											
63		1				1	2					
64										1		
65							1					
67				1			2					
68	1	1		2	1	1	1	1				
70								1				
71			1									
72		2			2	2					1	
76												1
77									1			
79	1											
80											1	
82				1								
83	1			1				1				
84	1	3	1	2	2	3	3	1	1		3	1
85						1						
87	2		1	1				1	1	1		1
88											1	
89				1								
90							1	2				
95	1	1		1		1	1					
98	2			1	2	3	2	1	1		1	
UI ¹⁾						1						
nsb ²⁾	23	25	10	29	22	33	26	19	13	11	22	10
/nty	/18	/17	/10	/20	/16	/20	/20	/17	/11	/10	/16	/10

1) UI=unidentified ectomycorrhizal type. 2) nsb=total number of soil block samples, nty=total number of ectomycorrhizal types.

Table 11. Monthly recovery of ectomycorrhizal (ECM) tips from the soil block samples collected at the plot.

ECM type	tip numbers of the mycorrhizal type recovered from 4 soil block samples											
	1995						1996					
	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.
1		35	9	51	24	206	148	6			51	
2					278		23			58		
3			8								85	
4		30										
6	80			7	24		12		23		3	
7			14									
10	3					15	42					
13						153	51	18				
14				210								
15			3270						10			
16		14	6	194	43	153	75	18	121			
17		29		162	145	44		137	117		193	76
18	7	82				95	10	11		2		
19			223						102	1159		
21		50			607			17				525
24	1060			401	556	10						191
26			3									
27	10											
30											133	
31	15									25		
32							73		2		183	
33	30	10		181	355	78	144	227			411	
34							105					
36				17				11		1	71	
37							42					76
38	120			116	20	18	69		9	170	136	20
39	15				119						133	
40		33										
42		2										
44				52								
45						101						
47					2		82	13			2	
48				40								
49												701
51												10
52		50										
57					18				61			
59								122				
60										1601		
61		10										
62	15	7										
63						5	285					
64										1601		
65							7					
67				405			47					
68	30	60		114	22	13	18	9				
70								10				
71			5									
72		34			205	200					29	
76												5
77									7			
79	1											
80											149	
82				1								
83	7			18				10				
84	20	98	15	612	241	339	260	4	776		1091	150
85						2						
87	93		85	133				111	42	236		16
88											86	
89				23								
90	8	7				28		11				
95	1	100		18		133	299					
98	3			1	2	531	2	454	2		3	
UM1)						30						
nti	1508	546	3648	2756	2661	2156	1794	1189	1262	4863	2764	1770
/nty ²)	/18	/17	/10	/20	/16	/20	/20	/17	/11	/10	/16	/10

1) UM=unidentified mycorrhizal type. 2) nit=total number of mycorrhizal tips, nty=number of mycorrhizal types, nty=total number of mycorrhizal types.

Table 12. Cumulative number of mycorrhizal tips in each ectomycorrhizal (ECM) types.

order	ECM type	tip number	number of soil blocks recovered the ECM type	order	ECM type	tip number	number of soil blocks recovered the ECM type
1	84	3601	21	33	45	101	1
2	15	3280	2	34	36	100	5
3	24	2218	9	35	47	99	4
4	64	1601	1	36	3	93	2
5	60	1601	1	37	88	86	1
6	19	1486	4	38	57	79	2
7	33	1436	9	39	10	60	4
8	21	1199	4	40	90	54	5
9	98	998	13	41	44	52	1
10	17	903	15	42	52	50	1
11	87	716	8	43	31	40	1
12	49	701	1	44	48	40	1
13	38	678	14	45	UI ¹⁾	35	2
14	16	624	10	46	83	35	3
15	96	551	5	47	40	33	1
16	1	530	14	48	4	30	1
17	72	468	7	49	89	23	1
18	67	452	3	50	62	15	1
19	2	359	3	51	7	14	1
20	63	297	4	52	51	10	1
21	39	267	3	53	70	10	1
22	68	266	8	54	61	10	1
23	32	258	3	55	27	10	1
24	13	222	4	56	77	7	1
25	14	210	1	57	65	7	1
26	18	207	9	58	71	5	1
27	80	149	1	59	76	5	1
28	6	149	7	60	26	3	1
29	30	133	1	61	85	2	1
30	59	122	1	62	42	2	1
31	37	118	2	63	82	1	1
32	34	105	1	64	79	1	1

1) UI=unidentified mycorrhizal type.

Table 13. Relative values of mycorrhizal tips and associated fungi of the dominant ectomycorrhizal types. Relative numbers were calculated based on the data shown in Table 12.

order	ectomycor- rhizal type	associated fungus	relative value (%)
1	84	Thelephoraceous fungus	13.3
2	15	<i>Russula</i> sp. 3	12.1
3	24	<i>Russula</i> sp. 6	8.2
4	64	(unknown)	5.9
5	60	(unknown)	5.9
6	19	<i>Russula delica</i>	5.5
7	33	(unknown)	5.3
8	21	<i>Russula nigricans</i>	4.4
9	98	<i>Cenococcum geophilum</i>	3.7
10	17	(unknown)	3.3
11	87	(unknown)	2.6
12	49	(unknown)	2.6
13	38	(unknown)	2.5
14	16	<i>Russula</i> sp. 2	2.3
15	96	(unknown)	2.0
16	1	(unknown)	2.0
17	72	(unknown)	1.7
18	67	(unknown)	1.7
19	2	(unknown)	1.3
20	63	(unknown)	1.1

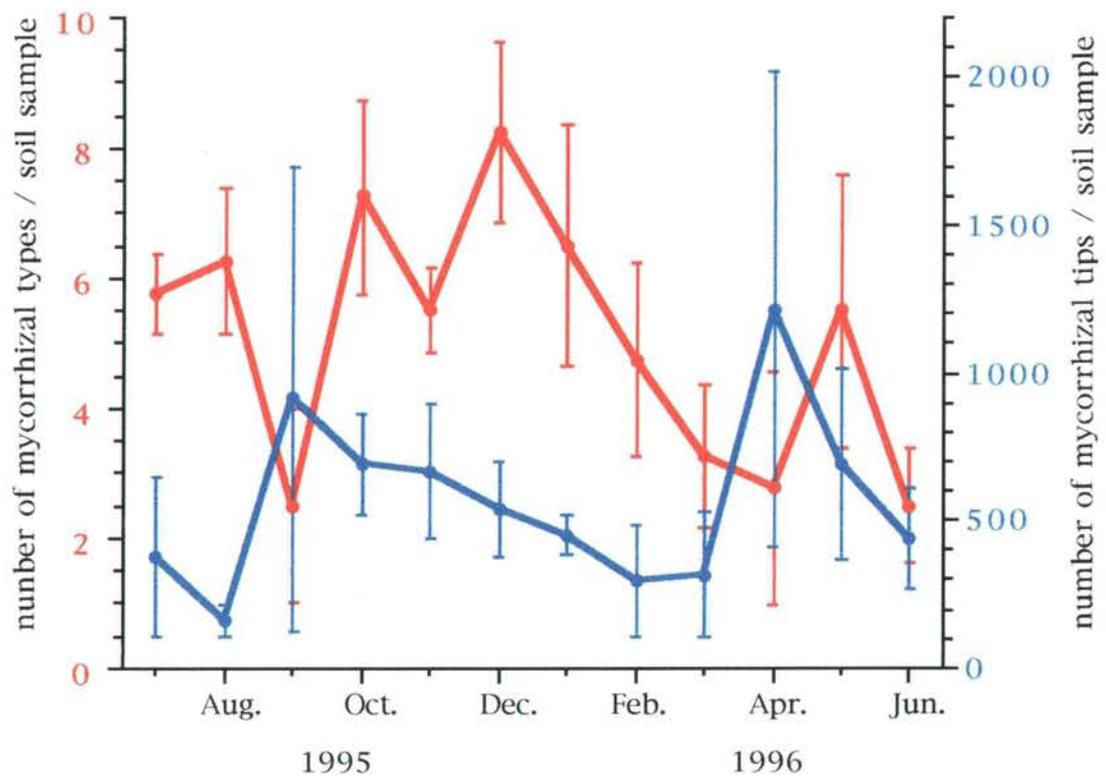


Figure 9. Monthly change in number and variation of ectomycorrhizas at the plot. Bars represent means ($n=4$) \pm SE.

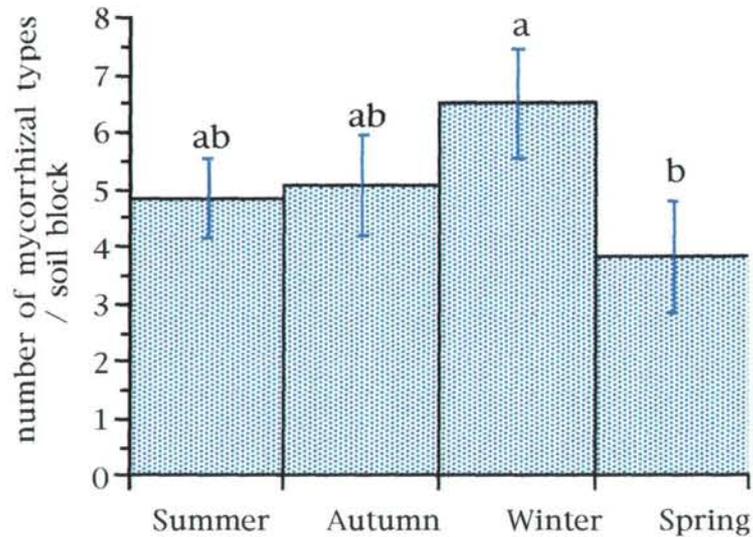


Figure 10. Seasonal change of ectomycorrhizal variation at the plot. Bar represent means ($n=12$) \pm *SE*. Different letters indicate significantly different means using the F-test ($P<0.05$).

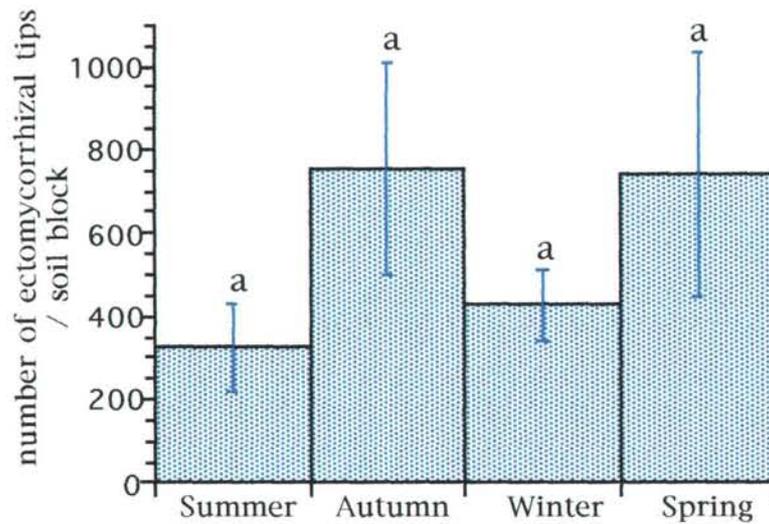


Figure 11. Seasonal change in number of ectomycorrhizal tips at the plot. Bars represent means ($n=12$) \pm *SE*. Means were not significantly different, as determined by the Mann-Whitney *U* test for non-parametric data ($P<0.05$).

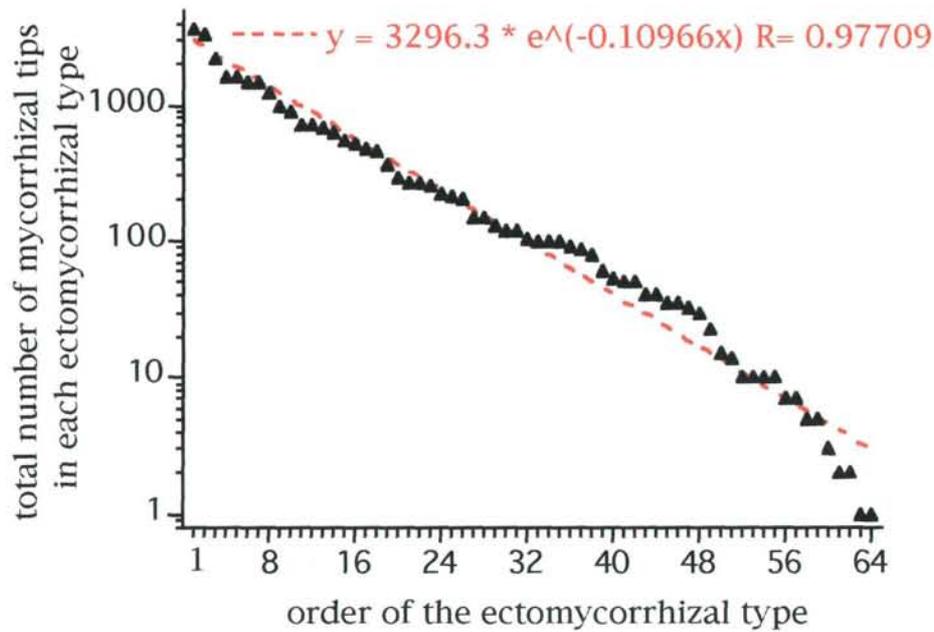


Figure 12. Order of ectomycorrhizal types and its exponential regression line. Total number of mycorrhizal tips in each ectomycorrhizal type and its order are based on the data shown in Table12.

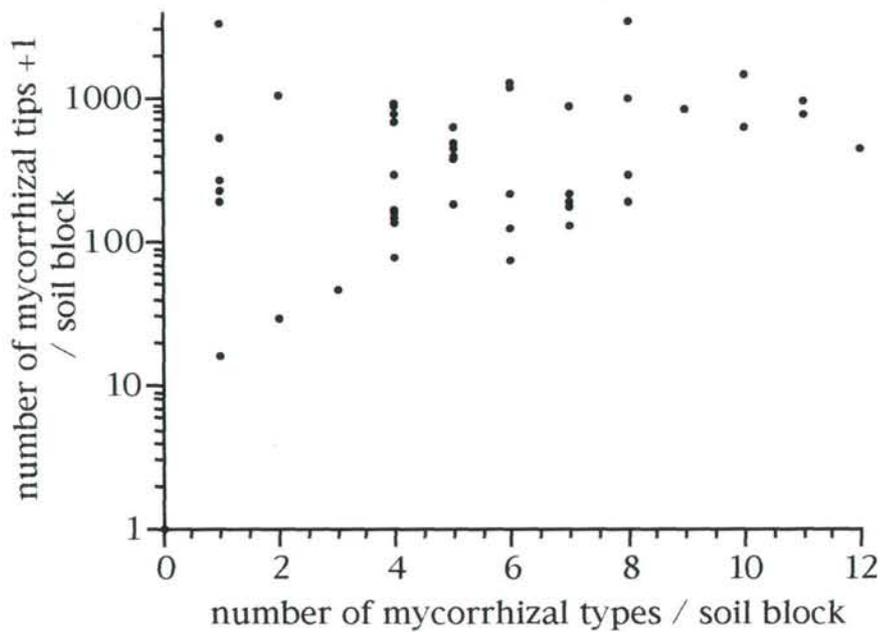


Figure 13. Relationships between number and variation of ectomycorrhizas in each soil block (7 x 7 x 7 cm³) sample (n=48) collected at the plot.

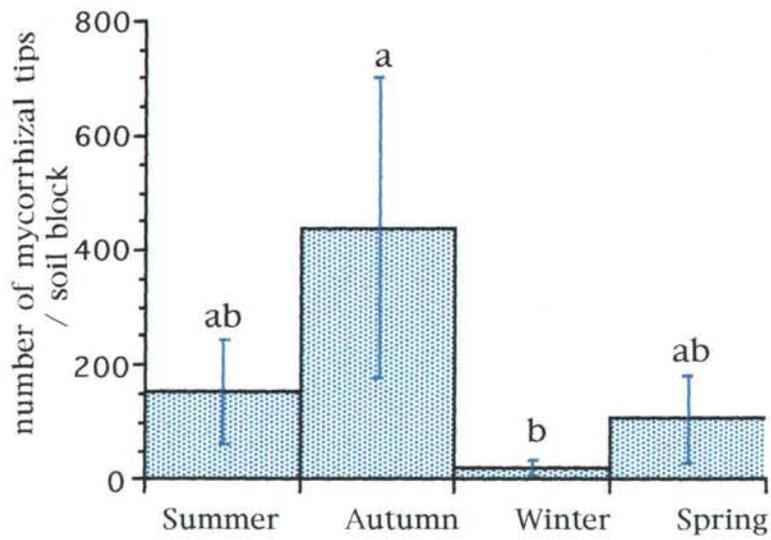


Figure 14. Seasonal change in number of ectomycorrhizal tips associated with *Russula* spp. at the plot. Bars represent means ($n=12$) \pm SE. Different letters indicate significant difference, as determined by the Mann-Whitney U test for non-parametric data ($P < 0.05$).

第2節 アカマツ外生菌根菌感染源の季節変化および種構成

外生菌根菌の感染源の変化はしばしば年単位で論議されてきた (Deacon and Fleming, 1992)。これは特に植物群落の遷移に係わる感染源の変化を追跡しようとしたことに依る。従って外生菌根菌では、感染源の季節変化を論ずるための実験系が顧みられておらず、感染源の季節変化の報告は殆どない。一方 VA 菌根菌では、感染源の変化が1年単位の季節変化に合わせて論じられることが多い (Allen, 1991; Wilson and Tommerup, 1992)。これは1年生草本植物のフェノロジーと菌根菌との関係を論ずることに興味が集中していることに依る。

本実験では野外採取の土壤に幼植物体を移植し、その根系に形成された菌根を調査することで菌根菌の感染源の種類と量を評価した。Brundrett and Abbott (1994) は同様の方法によりオーストラリアの *Eucalyptus marginata* (Jarrah) と *E. calophylla* (Marri) の優占する林分で外生菌根菌の感染源 (彼らはプロパギュール - propagule - を用いているが本論文では外生菌根菌の感染源とプロパギュールを同義に扱う) の季節変化を調査したが、明瞭な季節変化は認められなかった。この種の実験では必ず、人為的操作 (攪乱) の影響があること考慮しなければならない。しかし現在のところ外生菌根菌の感染源測定のための方法論は確立されておらず、攪乱の影響を論ずるまでに至っていない。従って既存の実験結果の信頼性は必ずしも明瞭ではないが、土壤の物理的攪乱が感染する菌根菌の種類を変化させる例が知られており、野外での後期定着菌 (late-stage fungi) の優占的な活動域の土壤をポットに詰めて無菌根の実生を植え付けると初期定着菌 (early-stage fungi) が優占的に菌根形成した (Deacon and Fleming, 1992)。

菌根菌の生長様式の中で、土壤中の菌糸体と菌根の関係は必ずしも明確ではない。特に菌根の回転率は本章前節の結果でも菌根菌の種や季節により異なる可能性のあることが示唆された。そこで、菌根菌の土壤中での広がりを感染源の測定という形で間接的に評価できれば、最確値法との併用により、菌根菌バイオマスを試算できる可能性がある。林分内での外生菌根菌の菌糸体ネットワークの感染源としての重要性は

Newton et al. (1991) により示唆されている。しかし、各菌根菌の菌根現存量と菌糸体ネットワークの重要度の関係は明らかでないので、本章前節の結果に基づいて各菌根タイプの菌根菌感染源としての重要度を単純に推定することはできない。

本実験では以下のことを目的とし、調査区内で採取した土壌へのアカマツ実生の移植による外生菌根菌の釣菌を行った。すなわち、菌根菌感染源の季節変化、本章前節で示された各菌根タイプの出現頻度と本実験で検出される菌根タイプの菌根菌感染源の量との間に違いが生ずるのかどうかを明らかにする事である。また比較対照の材料としてアカマツの生育が認められない芝地から土壌を採取し感染源の季節変化を明らかにした。そして以上の結果を踏まえ、本実験の意義、菌根菌の感染源の季節変化の要因、ならびに種構成について考察する。

1. 材料および方法

調査区において、1994年2月より1995年8月までの1年半に渡り2カ月毎に土壌の採取を行った。各採取時に3土壌試料を採取し、各試料の採取地点は互いに10m以上離れていた。土壌試料はリター直下の土壌約400cm³（深さ10cm程度）を掘り出したもので、これをポリエチレンの袋に詰め実験室に持ち帰り、本論文第2章2節の方法に従って試験管10本に取り分け、アカマツ実生を1本ずつ移植した。移植後3～7カ月を経た実生を試験管から抜き出し、根系上に形成された外生菌根の形態観察を行った（第2章1節の方法参照）。本実験に関して定義する「外生菌根菌の感染源」とは、このように *in vitro* の実験下でアカマツ細根に感染し外生菌根を形成する菌体を指す。なお1土壌試料中の各菌根タイプの菌根菌感染源の量的評価としては、供試実生個体のうち菌根を形成した実生個体を記録することで感染源の相対量とした。

また、アカマツ林調査区とは異なる筑波大学構内の芝地において、1995年3月より1996年1月までの約1年に渡り2カ月毎に土壌の採取を行った。土壌の採取は約400m²の地表面積の範囲内で行い、各採取時に3土壌試料（3月および5月は

2 試料) を互いに 5 m 以上離れた地点からそれぞれ採取した。土壤試料は芝の根圏土壤約 300 cm³ を掘り出したもので、これをポリエチレンの袋に詰め実験室に持ち帰り、試験管 5 本に取り分け、アカマツ実生を移植した。予備実験で実生の外生菌根は実生移植後 2 カ月ほどからしばしば認められた事から、移植後 3 ~ 7 カ月を経た実生を試験管から抜き出し、菌根の形態観察を行った。なお、この芝地は少なくとも過去 20 年間は定期的な刈り込みにより樹木の生育が認められず (すなわち外生菌根形成を行う可能性のある植物の生育が認められない)、隣接するアカマツ林とは舗装道路により隔てられており、土壤の採取地点は最も隣接するアカマツ立木からは 50 m 以上離れていた。

II. 結果

菌根菌感染源の季節変化

アカマツ林土壤試料および芝地土壤試料上でのアカマツ実生の生育は良好であったが、まれに枯死や生長不良の個体が認められた。本実験では菌根菌の釣菌を目的にしていることから、それらの生長不良個体の影響をなくすため、アカマツ林土壤試料では 1 試料の供試実生 10 個体あたり比較的生育の良好な 8 個体を、芝地土壤試料では 1 試料の供試実生 5 個体あたり同様の 4 個体を解析に用いた。

約 2 年間に渡る実験の結果、アカマツ林土壤試料では合計で 53 タイプの外生菌根が確認された (Table 14)。各菌根タイプの月毎の出現 (3 土壤試料のうち菌根が出現した試料の数) の変化は必ずしも明瞭ではないが、特に冬季の土壤試料では多数の菌根タイプが認められ、逆に夏季には菌根タイプ数が少なかった。一方タイプ 53、タイプ 55 およびタイプ 98 は通年確認され、それらの頻度 (菌根の出現が認められた土壤試料数 / 供試土壤試料数) は高かった (Table 14)。また 1 土壤試料中の各菌根タイプの菌根菌感染源の相対量 (菌根形成アカマツ個体数 / 供試アカマツ個体数) の変化から、通年で出現する傾向の見られた菌根タイプ 53 とタイプ 98 で、前者は夏季に菌根菌感染源の相対量を低下させたが、後者は常に高い相対量を維持していた

(Table 15)。

アカマツ林土壌試料当たりの菌根タイプ数の土壌採取月ごとの平均値（菌根菌感染源の種多様度）での季節変化は明瞭で、冬季に増大し夏季に低下した（Figure 15）。この季節変化のパターンは1年目と2年目で同一であった。土壌採取月ごとの合計菌根タイプ数（3土壌試料中の菌根タイプ数の累計）も同様の季節変化をとる傾向が認められ、また菌根菌感染源の相対量の季節変化もそれとほぼ同様であった。このようにいずれの評価法によっても菌根菌の季節変化は明瞭で、冬季から春季にかけての急激な減少と秋季から冬季にかけての増加という特徴を示した。アカマツ実生1個体の根系上で異なる菌根タイプの共存は普通に見られ、多数の菌根タイプが認められた冬季の土壌試料では最大5タイプの共存が認められ、菌根タイプ数が少ない夏季土壌試料でも異なる菌根タイプの共存は普通であった。

一方、芝地土壌からは3タイプの外生菌根が認められたにすぎなかった（Table 15）。これらはいずれも出現頻度が低く明瞭な季節変化は認められなかったが、感染源は通年存在していた。

菌根菌感染源の種構成

アカマツ林土壌試料から出現した各菌根タイプの菌根菌感染源の相対量を基に順位付けを行い Figure 16 にまとめた。本実験では、感染源の相対量の優占的な菌根タイプの占める比率が高く、各菌根タイプの感染源の相対量の対数値とその順位との回帰直線を作成した場合、相対量の最も多い菌根タイプが回帰直線から大きくはずれた。この点が野外での結果（Figure 12）と大きく異なっていた。Table 17 はその感染源の相対量の順位付けの結果の上位20タイプの菌根を列挙し、それらの菌根菌の本章前節での菌根量の順位と比較したものである。最も多かったのは菌根タイプ98の *C. geophilum* で全体の20.1%を占めた。また半数の菌根タイプについては菌根菌が同定あるいは推定できた。この中には *Russula* 属菌が4種含まれており本実験で出現した全 *Russula* 属菌5種（Table 17 のリスト以外に菌根タイプ39を含む）の感染源相対量は全体の9.38%であった。上位20タイプのうち多くは野外採取で菌根が記録されたタイプであるが、そのうち本章前節の野外採取での菌根チップ数の上位20タイ

プ (Table 13) と対応した菌根タイプは半数以下の 8 タイプだった。野外採取での上位 20 の菌根タイプとの顕著な違いの一つは、調査区での菌根形成が確認されていない菌根タイプが 3 タイプ含まれていたことである。このうち特にタイプ 53 およびタイプ 55 は suilloid fungi (Bruns and Gardes, 1993) により形成されることが示唆されており (第 2 章), タイプ 54 (同様に調査区での菌根形成は確認されていない) を併せた 3 種 suilloid fungi の菌根の相対感染源量は全体の 10.2% であった。

芝地土壌で確認された 3 タイプの外生菌根は、いずれもアカマツ林土壌と共通の菌根タイプであったが、そのうち菌根菌感染源の出現頻度および相対量の最も高かったのは、*Suillus granulatus* と示唆される菌根タイプ 55 であった (Table 16)。

III. 考察

アカマツ外生菌根菌感染源の種類、多様度、ならびに相対量の季節変化は明瞭であり、冬季採取の土壌試料で多数の菌根タイプが形成された。個々の菌根タイプでは季節変化が必ずしも明瞭でなかったが、出現が冬季土壌に限られるタイプが多く、また通年で認められた菌根タイプ 53 の場合も冬季土壌で菌根菌感染源の相対量が多かった。Brundrett and Abbott (1994) は、Jarrah と Marri の優占する林分の土壌コア試料を用いて外生菌根菌の感染源の量を測定したが、明瞭な季節変化は示されなかった。しかし彼らの実験では、感染源は実験植物の根に形成された菌根量に基づく評価であり、菌根菌の種構成については報告していない。彼らは、外生菌根菌の感染源量の季節変化が明瞭でなかった主要因として、林内での感染源の不均一分布を挙げている。彼らの感染源の量的評価は形成された菌根量に基づいているが、菌根の発達は菌根菌の種により異なり、また感染源の量とそれらが感染して形成される菌根量の相関は必ずしも高くはない (後者の点に関しては次章で詳しく論ずる)。このことから彼らの評価方法は植物にとっての菌根の貢献度を表すことは可能かも知れないが、感染源の量の評価としては疑問がある。従って感染源の量的な季節変化の不明瞭さを感染源の不均一分布によって説明することが妥当か否かははっきりしない。本実験では

感染源の量と菌種の違いに基づいて土壤中の菌根菌感染源の季節変化を追跡する事を目的とした。このことから、実生1個体当たりの菌根チップ数ではなく土壤試料当たりの菌根形成実生個体数で、各菌根タイプの形成菌根の相対量を表示し、感染源の量的評価とした。この評価法の妥当性は、最確値法の併用などにより更に検討する余地があるが、少なくとも菌根チップ数の直接計測よりは信頼度が高いと考えられる。橋本(1995)は日本の *Betula platyphylla* (シラカンバ) 林およびそれ以外の植生下で採取した土壤へのシラカンバ実生の移植実験により、秋季採集の土壤の方が春季採集の土壤よりも種数および量共に多くの菌根を形成する傾向のあることを報告している。彼の報告は通年の季節変化を追跡したものではなく、従って感染源の季節的差異が本結果とどのような関係にあるのか明らかではない。しかし菌根菌感染源の季節的差異が認められた点に関して彼の報告と本結果は共通している。

感染源となった外生菌根菌と調査区アカマツ林での菌根形成菌との比較から、いずれかで高い頻度を示した菌根菌は、少なくとも次の3つの菌根菌グループに分けられた；(1) 野外の菌根形成量に比べ釣り上げ実験下での感染源の相対量が著しく少ないかあるいは感染源が認められないグループ、(2) 野外での菌根形成量と同程度に釣り上げ実験でも普通に感染源が認められるグループ、(3) 野外での菌根形成量が著しく少ないかあるいは菌根形成が認められないが釣り上げ実験下での感染源の相対量が比較的多いグループの3つである。

グループ(1)には、菌根タイプ21 (*R. nigricans*)、タイプ41 (*Quercirhiza squamosa* に類似)、あるいはタイプ72等が含まれる。これらが釣り上げ実験下で菌根形成能が低かった理由は今のところ明確でないが、攪乱条件が菌根形成に相対的に不利に働いていたことが示唆される。このグループに属する菌根菌は Gadgil and Solbrig (1972) の戦略様式¹⁾に従えば、K-戦略的であるといえる。また Grime

1) r- および K- の戦略様式に様々な論議があることは第1章でも述べたが、本実験に関する戦略様式の説明では Gadgil and Solbrig (1972) を引用した。

(1977) の戦略様式²⁾に従えば、C-戦略的であるといえる。

グループ (2) には、菌根タイプ 19 (*R. delica*), タイプ 24 (*Russula* sp.), タイプ 16, タイプ 17, およびタイプ 33 等が含まれる。このグループは、菌根形成に関し攪乱の影響を受けにくく、採取土壌中の菌糸や菌根がそのまま感染源として機能している可能性が示唆される。このグループに属する菌根菌は Grime (1977) に従えば、C-R 戦略的であるといえる。

グループ (3) には、菌根タイプ 53 (*Rhizopogon* sp.), タイプ 55 (*S.granulatus*), タイプ 22 (*R. mariae*), タイプ 58 等が含まれる。このグループに属する菌根菌は、攪乱に依存して菌根形成をする性質を持つことが示唆され、Gadgil and Solbrig (1972) に従えば、r-戦略的、また Grime (1977) に従えば、R-戦略的であるといえる。

グループ (3) に属する菌根菌の生態を考える上で、感染源が果たしてどのような形で土壌中に存在するのかという点は重要である。このグループの主要な構成菌であり、suilloid fungi と示唆される菌類によって形成される菌根のうち、タイプ 55 は芝地土壌からもしばしば確認された。このことから、タイプ 55 の構成菌は土壌中で腐生的に生長しているか、あるいは多量の休眠体 (孢子あるいは菌糸) で存在する可能性が高い。本章前節の結果から野外で最も多量の菌根を形成していた菌根タイプ 84 (*Thelephoraceae* 科の 1 種) と、本実験で最も感染源相対量の多かった菌根タイプ 98 (*C. geophilum*) を取り上げて比較すると、前者がよりグループ (1) に近い傾向を示し、後者がグループ (3) により近い傾向を示した。しかし全菌根タイプの中での位置づけでは、両者ともグループ (2) に属す。また *Russula* 属菌では、これら

2) Grime (1977) の戦略様式が植物の繁殖を基にしたものであり、また外生菌根菌では生息環境に依存して繁殖様式が大きく変化することから必ずしも個々の種を 1 つの繁殖様式では定義できない

(Dahlberg and Stenlid, 1990)。このような問題点があるものの、本実験に関する外生菌根菌の戦略様式の説明では、特に攪乱に対する菌根菌の反応 (感染様式) の点を強調して Grime (1977) の戦略様式を暫定的に適用した。

3グループ全てに属する菌が見られ興味深いが、各種の相対菌根量から *Russula* 属菌も全体としてはグループ（2）の性質を持った菌が最も多いように思われる。以上のことから本調査区アカマツ林の外生菌根菌群集は、量的には主にグループ（2）に属する菌群からなることが示唆される。

ここで改めて、菌根菌感染源の季節的变化の意味ならびに本実験系の意義を考察する。菌根菌感染源における種多様度および相対量のピークは冬季であり（Figure 15）、調査区での菌根形成の種多様性のピークとほぼ一致した。秋季における菌根菌の子実体発生（本調査区での確実な例では *Russula* 属菌）には、それに先立つ菌根量の増大が不可欠であると考えられる。事実 *Russula* 属菌では実際に菌根量を増大させていることが証明できた（本章第1節）。また、子実体を発生させることにより孢子としての感染源をこの時期に増大させていると推察される。事実、冬季の低温は微生物活性を低下させる一方、春化处理を必要とする休眠中の様々な菌類散布体に対して発芽の前提条件を付与する（Cook and Whipps, 1993）。すなわち、冬季の低温条件が菌根菌の感染源の量並びに種多様性を減少させるものとは考えられない。従って冬季に採取した土壌を室内温度条件にさらすことで、菌根菌感染源が一斉発芽し、伸長する実生根に容易に感染している可能性がある。一方、春季採取土壌における急激な感染源量の低下は菌類自身の生理的側面からは説明しにくい。この感染源の低下は調査区での菌根の種多様性の低下と一致していた。この時期は、恐らく冬季での春化处理を終えている多くの菌類プロパギュールが発芽するであろうし、アカマツ根の伸長も活発な時期である。従ってこの時期の採取土壌の菌根菌感染源の低下は他の要因、恐らく実験下での菌根感染を抑制する要因の急激な増加に依ると推察される。Friedman et al. (1989) は、北米の Douglas fir 伐採跡地において、移植木の定着の失敗が菌根菌感染源の欠如ではなく菌根感染を阻害する種々の要因（例えば菌根菌感染を阻害する放線菌の増殖、あるいは土壌乾燥）に依ることを示唆した。本調査区での菌根菌感染源の低下が彼らの報告のような原因に依ることを示唆する直接的な証拠は得られていないが、今後検討の余地があると思われる。これに対して、夏季採取の土壌試料中の菌根菌感染源の低下は次のように説明が可能である。この時期の微生物分解活性は

適度な水分条件の下で最も高くなり、攪乱により分断された菌糸や菌根は損傷を受け易くなると考えられる。またこの時期に降雨に伴って比較的多数発生する菌根菌の子実体は、極めて早く分解されるから胞子もまた比較的短命である可能性がある。強固な菌鞘構造と菌糸体ならびに菌核を持つ *C. geophilum* の感染源量がこの時期最も高い相対値を示した (Table 15) ことは、この仮説を支持する傍証の一つである。菌根感染に係わる、このように様々に推察される要因については、更に次章で詳しく論ずる。

本実験で確認された菌根菌感染源の季節変化は、野外での菌根菌群集の季節変化の実態解明のための情報を提示した。また菌根菌感染源の種構成と調査区での外生菌根の種構成との比較から、菌根菌群集の構成種が攪乱に対する反応に関して3つの方向に生態的に分化を生じていることが示唆された。さらに芝地土壤での菌根菌感染源の結果を加味することで、調査区アカマツ林ではアカマツと菌根形成をしていないが、潜在的には菌根形成能をもつ菌類がごく普通に分布することが示された。これらの実験は、アカマツ林分内の外生菌根菌群集が初期定着菌と後期定着菌という単純な構図 (Deacon and Fleming, 1992) では説明できない、群集の機能的なダイナミクスを持つことを示唆している。

Table 14. Monthly detection of the ectomycorrhizal (ECM) types from the soil samples collected at the plot. Nnumber of detected soil samples were determined by the bating method of ectomycorrhizal fungi.

ECM type	number of soil samples (max. n=3) detected the inocula of the ECM type									
	1994						1995			
	Feb.	Apr.	Jun.	Aug.	Oct.	Dec.	Feb.	Apr.	Jun.	Aug.
1						1				
3		1					1			
5		1								
6						1				
10	1					1				
11							1			1
13						1		1		
15										1
16	1							3		
17							1			
18	1					2	1		2	
19						1			2	
20									1	
22	2									
23								2		
24		1					1			
25								1		
30							1			
31	1						2			
33	1					1	3			1
35	1						1			
37		1			1	1	1			
38							1			
39								1		
42							1			
43							1			
47	1									
48							1			1
50								1		
53	2	1	1			2	3	2	1	1
54			1				1			
55	2	1	2		1		1			1
56	1									
57									2	2
58	2		1	1					2	1
59	1				1					
62							1			
65	1									
68	1			1	2	1				1
73										1
75									1	
77		1		2	2					
78					1	1				
84					1		2			
92							2			
93			1							
94	1									
95						1				
96							1			
98	1	3	3	1	2	2	2	3	3	2
99					1					
102	1									
103		1			1	1				

Table 15. Monthly detection of the ectomycorrhizal (ECM) types from the soil samples collected at the plot. Number of detected seedlings were determined by the bating method of ectomycorrhizal fungi.

ECM type	number of seedlings (max. n=24) formed the ectomycorrhizal type									
	1994					1995				
	Feb.	Apr.	Jun.	Aug.	Oct.	Dec.	Feb.	Apr.	Jun.	Aug.
1						1				
3		1					5			
5		1								
6						5				
10	2					1				
11							1			1
13						1		2		
15										5
16	1							16		
17							8			
18	3					5	3		6	
19						3			5	
20									1	
22	8									
23								2		
24		4					7			
25								1		
30							1			
31	4						3			
33	2					4	7			2
35	1						2			
37		1			3	1	1			
38							2			
39								1		
42							3			
43							3			
47	1									
48							1			1
50								1		
53	3	4	1			4	4	6	1	1
54			1				1			
55	2	1	6		1		1			1
56	2									
57									4	8
58	2		1	1					4	1
59	1				3					
62							1			
65	1									
68	5			1	2	2				2
73										1
75									1	
77		1		3	3					
78					1	1				
84					1		4			
92							2			
93			1							
94	1									
95						2				
96							1			
98	3	8	12	4	6	6	7	10	9	10
99					1					
102	2									
103		1			1	1				

Table 16. Monthly detection of the ectomycorrhizal (ECM) types from the soil samples collected in the grass land. Numbers of either seedlings or soil samples were determined by the bating method of ectomycorrhizal fungi.

ECM type	number of seedlings (max. n=12) formed the ectomycorrhizal types / number of soil samples detected the mycorrhizal type (max. n=3)					
	1995					1996
	Mar. ¹⁾	May	Jul.	Sep.	Nov.	Jan.
55	3/2	3/1	2/1	4/3	5/2	
58					1/1	
69						1/1
73						1/1
77				1/1		
98		1/1				

1) Soil samples used were 2.

Table 17. Relative value of ectomycorrhizal (ECM) fungal inocula which were calculated based on the data shown in Table 15. Order of the ECM type at the plot is based on the data shown in Table 12.

order	ECM type	relative value (%)	associated fungus	order of the ECM type at the plot
1	98	23.4	<i>Cenococcum geophilum</i>	9
2	53	7.5	<i>Rhizopogon</i> sp.	-1)
3	16	5.0		13
4	33	4.7		7
5	18	4.4		25
6	55	3.7	<i>Suillus granulatus</i>	-
6	57	3.7		39
6	68	3.7	<i>Hebeloma</i> sp.	22
9	24	3.4	<i>Russula</i> sp. 6	3
10	58	2.8		-
11	17	2.5		10
11	19	2.5	<i>Russula delica</i>	6
11	22	2.5	<i>Russula mariae</i>	(+) ²⁾
14	31	2.2		46
14	77	2.2		61
16	3	1.9		36
16	37	1.9		32
18	6	1.6	<i>Tuber</i> sp.	26
18	15	1.6	<i>Russula</i> sp. 3	2
18	84	1.6	Thelephoraceous fungus	1

1); -: no mycorrhizal tip was confirmed at the plot. 2) mycorrhizal tips were confirmed at the plot in 1992.

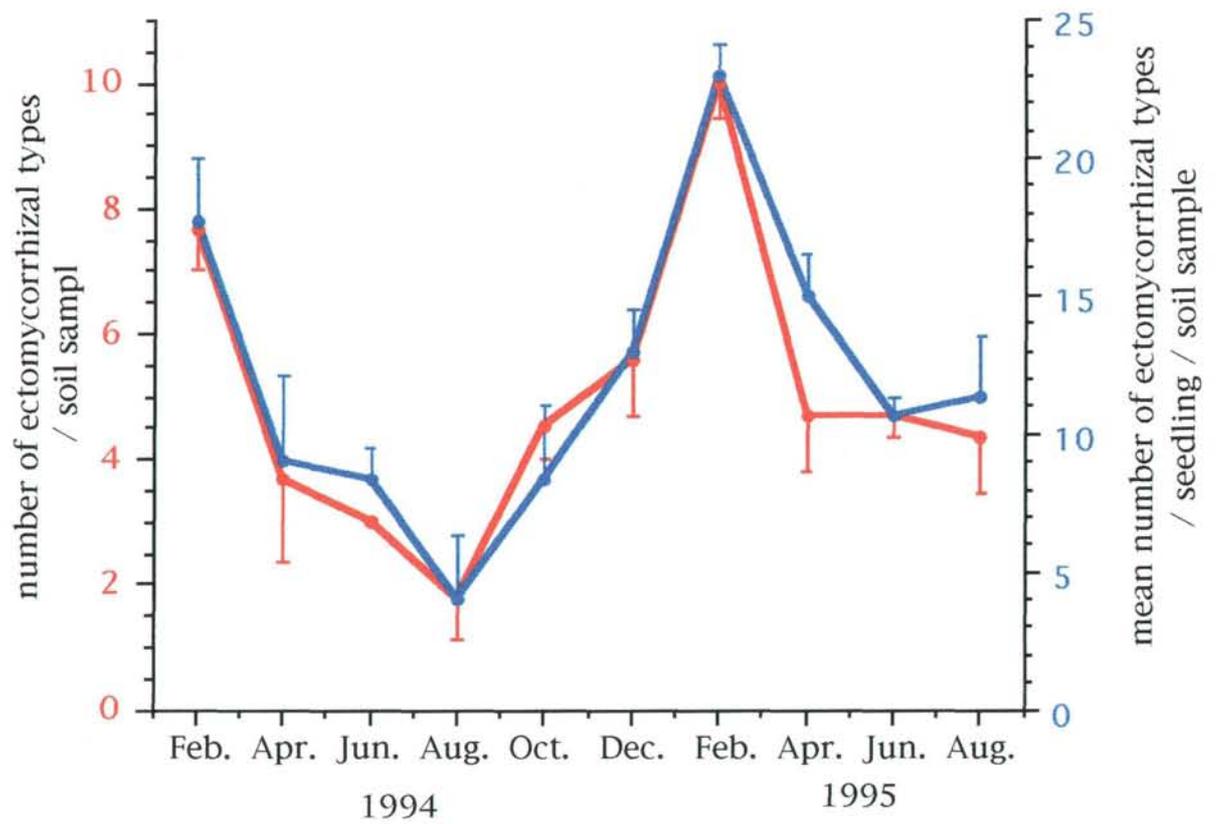


Figure 15. Monthly change in ectomycorrhizal inocula estimated by the bating method of ectomycorrhizal fungi in vitro. Bars represent means (n=3) +SE (blue bars) or -SE (red bars).

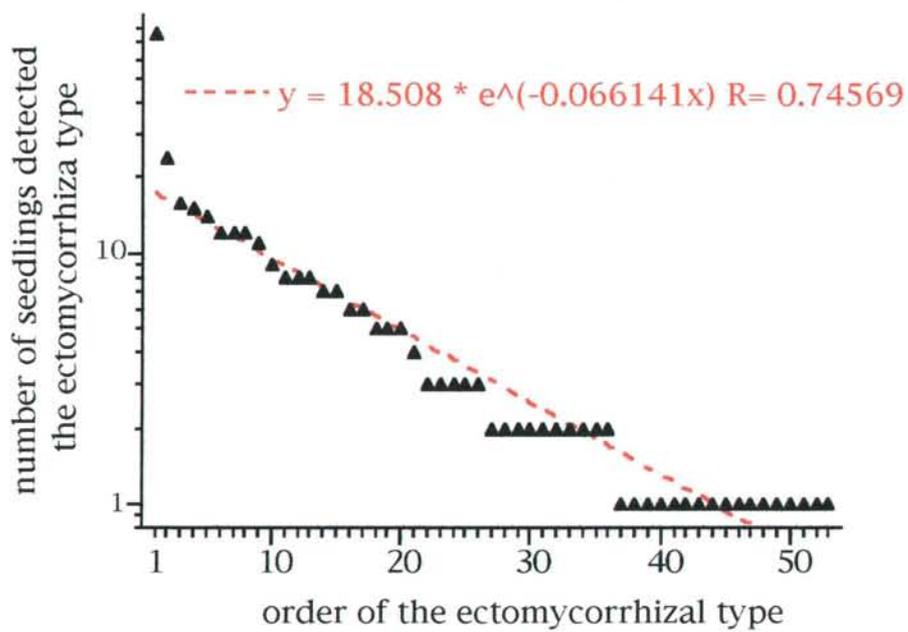


Figure 16. Order of ectomycorrhizal types detected in vitro and its exponential regression line. Total number of seedlings detected each of the ectomycorrhizal types and its order are based on the data shown in Table 15.

第5章 菌根菌感染に係わる感染源量，感染源の形態および土壌温度の検討

VA 菌根菌の研究では，感染源の定量を孢子，土壌中に伸長している菌糸，あるいは菌根菌の感染根の区別の上で行い，それぞれの重要度が論じられている (McGee, 1990; 増原, 1994)。しかし，外生菌根菌の感染源に関しては必ずしも実験的な解析が充分行われているとは言い難い。外生菌根菌の感染源の野外での機能に関する解析はイギリスでの草原への *Betula pendula* の移植実験により始められた (Deacon and Fleming, 1992)。それらの実験から，菌根菌の初期定着菌 (early-stage fungi) では孢子が，後期定着菌 (late-stage fungi) では菌糸体ネットワークが菌根菌感染源として相対的に重要であると結論付けられた。この両定着菌の関係は，草原（恐らくは菌根菌感染源が殆ど欠如していた）への外生菌根形成樹種導入の初期に認められる，外生菌根菌群集としては極めて単調な系（木本植物群落形成に至る 1 次遷移系列の初期の菌根菌群集にほぼ相応）で成立する。

Dahlberg and Stenlid (1990) は，スウェーデンの *Pinus sylvestris* (Scots pine) 林の *Suillus bovinus* (L. ex Fr.) O. Kunze の子実体の遺伝的解析から，林分内に最初に孢子で定着した遺伝的に多様な集団が林分の成熟にともなってそれぞれクローンサイズを広げ，その後クローン間の競争により集団の遺伝的多様度が減少すること明らかにし，成木林での菌糸体ネットワーク感染の重要性ならびに攪乱地での孢子感染の重要性を示唆した。また Newton et al. (1991) は，イギリスでの *Quercus ruba* と *Betula pendula* の林分土壌を用いた実生移植実験から，菌根菌感染源の菌糸体ネットワークの重要性を論じたが，これは土壌中の菌糸体ネットワーク以外の感染源の存在を否定した訳ではない。これらの実験では，本論文第4章で示唆したような菌根菌群集の中での各菌根菌の生態的機能分化ではなく，林分の齢や環境に対応する菌根菌群集の一般的な傾向を明らかにする事を目的に実験・解析が行われている。

攪乱地での菌根菌感染源の耐久時間は数年に及び，菌根菌の感染源量がこの期間内には低下しないが場合があり (Dahlberg and Stenstrom, 1991)，あるいは潜在的

な菌根菌感染源の存在が感染阻害要因により隠されてしまう場合がある (Friedman et al., 1989)。このように活動している菌根とは明らかに異なり、恐らくは休眠状態にある菌根菌感染源の問題も、その分布様式や密度といった基本的なことが明らかになっていない (Miller et al., 1994)。本論文第4章で示したように、本調査区土壌には活動中の菌根菌群集と共に潜在的な菌根菌 (腐生生活あるいは休眠体で生息) がごく普通に分布していると考えられる。

外生菌根菌では、生態的特異性 (ecological specificity) の概念が Harley and Smith (1983) により論じられ、野外での菌根形成と菌根の合成実験の結果との比較から、合成実験により定められる菌根菌の宿主範囲は自然界でとりうる宿主範囲よりも一般に広いとされてきた。しかし最近、Massicotte et al. (1994) は、主に *Rhizopogon* 属菌を接種源として用いた各種針葉樹混植のポット実験から、外生菌根菌の primary host plant と secondary host plant の関係を論じた。すなわちある植物種 (primary host plant) が菌根形成をしている条件下でのみ菌根形成を生ずる植物種 (secondary host plant) があり、菌根形成の生態的特異性は単独植物種と菌種から成る実験系では必ずしも明らかにできないことが示された。この様な現象は、Monotropaceae (シャクジョウソウ科) のような無葉緑植物 (外生菌根菌が monotropoid mycorrhiza を形成する) (Bjorkman, 1960) を後者の secondary host plant と考えれば、植物群落内での外生菌根形成では当然考慮しなければならない問題ではあるが、Harley and Smith (1983) の生態的特異性の概念の論議ではまだこの問題が含まれていない。また、Masuhara and Katsuya (1994) は日本でのランの菌根 (orchid mycorrhiza) の研究から、野外で菌根形成をしている菌根菌と同時に同一地点の土壌中に生息し、実験的には菌根形成する能力が示されたがその生息場所では菌根形成を行っていない菌がごく普通に活動している例を示した。そしてその結果から、菌根形成の特異性を対比する2つの in situ specificity と in vitro specificity という概念に基づき、より具体的に論じた。本論文第4章で明らかにされた菌根菌の感染様式グループ (3) は、彼らの論議にあてはめ in vitro で特異的な菌根形成を行う菌と見なすことも不可能ではない。しかし、菌根タイプ 53 の感染源が

土壌中でどのような形で存在するのか（休眠体か活動体か）は明らかでないので、実験結果を特異性に基づいて論ずる妥当性が明らかでない。従って感染源の野外での性状を明らかにすることが必要がある。

本章では、上記のような外生菌根感染に係わる諸問題のうち、感染源密度、感染源の形態（孢子、菌糸、菌根等）と土壌粒子サイズの関係、ならびに感染に係わる温度要因に注目してそれらを実験的に明らかにし、菌根菌の感染様式を生態的側面から考察することを目的とした。

1. 材料および方法

土壌採取とアカマツ実生の移植・生長ならびに菌根の回収・同定

調査区において、それぞれ以下の実験に用いる合計 13 土壌試料（リター直下）の採取を1995年10月下旬から11月上旬にかけて行った。試験管への土壌の取り分け、実生の移植・生長については第2章1節の方法に従った。移植後7カ月を経過したアカマツ実生を回収し菌根の有無ならびに定量を行った。なお土壌の希釈には、調査区周辺のアカマツ林内で予め採取しオートクレーブ滅菌後、冷蔵庫で保存している土壌を用いた。土壌滅菌は、土壌約1リットルを熱処理の可能なバイオハザードバッグ（Baxter Healthcare Corporation）になるべく薄く広げて詰め、オートクレーブで121℃・60分間行った。なお本章の実験に関して用いる「感染源」の定義は第4章2節の「感染源」の定義に準ずる。

最確値法による菌根菌感染源量の推定

2つの土壌試料（それぞれ約200 cm³）を用いた。土壌試料を篩（メッシュサイズ2 mm）にかけて均一にし、大型の有機物体は鋏を用いて細かく切断した。均一にした土壌試料を20 cm³ づつ5本の試験管に取り分け、それぞれに1本のアカマツ実生を移植した。残りの土壌を滅菌土で10倍および100倍希釈し、それぞれ希釈土壌を20 cm³ づつ5本の試験管に取り分けそれぞれ1本づつアカマツ実生を移植した。移植後7カ月を経過した全実生（1つの土壌試料に由来する計15個体）の根系

上の菌根を回収し菌根タイプに類別し（第2章2節の方法参照）、最確値法（MPN method; most probable number method）により各菌根タイプの菌根菌感染源の量を推定した。

各種サイズの土壌粒子および土壌中有機物体に由来する菌根菌感染源の形態の推定

6つの土壌試料（それぞれ約200 cm³）を用いた。土壌試料を容積2リットルの三角フラスコに入れ水道水1リットルを加えて激しく攪拌した。この土壌懸濁液を5種類の順次段組みにした標準篩（メッシュサイズは上段から1.0 mm, 0.5 mm, 0.1 mm, 0.05 mm, 0.038 mm）を通し濾過液を回収した。最上段の篩（メッシュサイズ1.0 mm）に残った土壌および有機物体を再び同一のフラスコに入れ、新たに水道水1リットルを加えて激しく攪拌したのち篩に通し濾過液を回収した。この操作をもう一度繰り返したのち、最上段の篩に残った土壌および有機物体を水道水の流水で丹念に洗い、分画試料として回収した。引き続き、先程の操作で2段目にあった篩（メッシュサイズ0.5 mm）を最上段にし、そこに残った土壌および有機物体を再び2リットルの三角フラスコに入れ、先の操作で回収された濾過液3リットルのうちの1リットルと共に激しく攪拌したのち、組み合わせた4段の篩に通し濾過液を回収した。この操作を更に2回繰り返した後、最上段の篩に残った土壌および有機物体を水道水の流水で丹念に洗い、分画試料として回収した。この一連の操作により最下段の篩（メッシュサイズ0.038 mm）上の土壌粒子を除きそれ以外の篩上の残存物（土壌粒子および有機物残渣）をそれぞれ分画試料として回収した。また最後に残った濾過液3リットルを吸引濾過器によりペーパーフィルターで濾過し土壌微粒子（主に粘土）等を回収した。従って分画試料は篩上の4種類とペーパーフィルター上の1種類であった。なおアカマツの外生菌根は全てメッシュサイズ1.0 mmの篩上に回収され、またメッシュサイズ0.5 mm篩上には大量の枯死菌根が認められた。

この篩分けによる5種類の土壌分画試料（各20-30 cm³程度）をそれぞれ滅菌土壌50 mlに混合し、混合土壌を20 cm³づつ3本の試験管に取り分けアカマツ実生を移植した。実生生長後、全個体（1土壌試料に由来する15個体の合計90個体）の

根系上の菌根を回収し菌根タイプに類別した。

土壌のプレインキュベーション温度が菌根菌感染源に与える影響

5つの土壌試料（それぞれ約 600 cm³）を用いた。各土壌試料を標準篩（メッシュサイズ 5 mm）にかけて均一にし、大型の有機物体は鋏を用いて細かく切断した。均一にした土壌試料を 200 cm³ に 3 等分しそれぞれ温度処理を行った。温度未処理土壌（対照区）は、すぐに 20 cm³ づつ 5 本の試験管に取り分けアカマツ実生を移植した。高温処理はビーカーに土壌を入れ、上面をリケンラップで密封した後 1 週間インキュベーター内で約 30℃に保ち、その後ビーカー上面を開封して変わりに二重のペーパーフィルターで再び密封した後 1 週間送風乾燥機内で約 30℃に保ち土壌を乾燥させた。高温・乾燥処理後の乾燥土壌にイオン交換水を補給し、その後 20 cm³ づつ 5 本の試験管に取り分けアカマツ実生を移植した。低温処理は、ポリエチレンのビニール袋に土壌を入れ、冷蔵庫（約 4℃）に 7 日間、冷凍庫（約 -5℃）に 5 日間、更に冷蔵庫に 2 日間入れて行った。低温処理後、土壌を 20 cm³ づつ 5 本の試験管に取り分けアカマツ実生を移植した。実生生長後、各 4 個体（計 60 個体）の根系上の菌根を回収し菌根タイプに類別した。なお菌根形成量の各温度処理間の有意差検定は Stat View (Ver. 4.5) (Abacus Concepts, Inc., 1995) を用いて行った。

II. 結果

最確値法による菌根菌感染源量の推定

2つの土壌試料から検出された菌根タイプはそれぞれ 6 タイプと 2 タイプであった (Table 18)。各菌根タイプの出現から最確値法により推定した菌根菌感染源の数はいずれも比較的 low 1 試験管当たり 1 個未満であり菌根タイプ 68 のみが 3.3 個と顕著に多かった。菌根タイプを無視した菌根菌感染源の数は 2 つの土壌試料とも約 3 個でほぼ一致した。

各種サイズの土壌粒子および土壌中有機物体に由来する菌根菌感染源の形態の推定

Table 19 に各土壌分画試料ごとの出現菌根タイプを示した。各菌根タイプの出現には特徴的な傾向があり、これは Table 20 にまとめた。すなわち菌根タイプ 84 はメッシュサイズ 1.0 mm および 0.5 mm の篩上の分画試料から主に検出されており、外生菌根そのものと枯死菌根あるいは菌糸束が感染源になっていたと考えられる。菌根タイプ 68 はメッシュサイズ 0.05 mm 以上の篩上の分画試料から広く検出されており、外生菌根そのものと同時に菌糸体が感染源になっていたと考えられる。菌根タイプ 58, タイプ 98 およびタイプ 103 はメッシュサイズ 0.5 mm から 0.05 mm の篩上の分画試料から検出されており、菌糸体（比較的細かく分断されたもの）が感染源になっていたと考えられる。一方菌根タイプ 53 およびタイプ 77 はメッシュサイズ 0.038 mm の篩を容易に通過する微小なサイズの感染源を持ち、それらは孢子と考えられる。タイプ 53 ではより大きいメッシュサイズの篩上の分画試料からも検出されているが、菌根の検出頻度からそれらのメッシュサイズの篩上の分画試料では大型の土壌粒子あるいは有機物体に孢子が付着していたためと考えられる。

土壌のプレインキュベーション温度が感染源に与える影響

Table 21 に示すように、対照区（温度未処理区）の 5 つの土壌試料間では出現菌根タイプがそれぞれ異なったが、特徴的な共通菌根タイプ（タイプ 53, タイプ 55, タイプ 77, タイプ 98 およびタイプ 103）が認められた。それらの菌根タイプは温度処理の結果、特徴的な出現パターンを示した（Table 22）。このうちタイプ 53 の出現は、対照区に比べ高温処理区では減少し逆に低温処理区で増加した。タイプ 55 およびタイプ 77 の出現は、対照区に比べ高温処理区と低温処理区で同程度に増加した。タイプ 98 の出現は、対照区に比べ高温処理区では増加し低温処理区では変化が無かった。タイプ 103 の出現は、対照区に比べ高温処理区では著しく減少し低温処理区では変化が無かった。形成菌根の多様度は、両温度処理区とも減少したが（Figure 17）その傾向は高温処理区で特に顕著であり低温処理区よりも低かった。

III. 考察

最確値法は、VA 菌根菌では感染源の重要度や群集構造の把握でしばしば用いられており (McGee, 1990; An et al, 1990; Hendrix et al., 1995), 他の評価方法との比較から、本方法が群集の微小集団の顕在化をはじめ、様々な形の感染源の存在を明らかにできることから、信頼できる方法とされている。菌根菌では感染源が常に単独の孢子であるわけではないことから最確値法により推定される数値は量的な意味合いが強い。また土壌希釈という人為的操作の与える影響が常に明確にされる訳ではなく、この最確値法により推定される数値の相対的意味合いは必ずしも明確ではない。しかし、第4章2節の菌根釣り上げ実験の結果から、非常に多くの種が採取土壌という攪乱条件にも係わらず菌根形成することが明らかとなり、外生菌根菌においても最確値法による感染源の調査が可能であることが示唆された。本実験での最確値法による菌根菌感染源の数の推定値は比較的 low、土壌 200 cm³ あたり総計で約 30 個程度で、菌根タイプ 68 以外の 5 タイプではすべて 10 個以下であった。このことは、菌根菌の釣り上げ実験において菌根感染時に菌類同士の競争があまり生じていないことを示唆する。2つの土壌試料間の最確値法による菌根菌感染源の総数値はほぼ同一であったが、菌根菌感染源の種多様度は両者間で大きく異なった。第4章2節の感染源の季節変化では種多様度と菌根菌感染源相対量が比較的連動して推移したことから、今後最確値法により推定する感染源量と第4章2節の方法に基づいた菌根菌感染源量との関係を検討する必要がある。現在までに外生菌根菌の感染源を最確値法により推定した報告はなく、従って本実験結果の直接の比較材料はない。

土壌の篩分けの実験から、外生菌根菌の感染源の形態が幾つか明らかになった。野外での菌根量から優占種と見られ、菌根感染様式からグループ (2) に属する (第4章参照) とされた菌根タイプ 84 (Thelephoraceae 科の1種) は菌根および菌糸体が重要な感染源となることが示唆された。また感染源の形態が菌根タイプ 84 と同様のタイプ 68 (*Hebeloma* sp.) も菌根感染様式からグループ (2) に属するとみなされ、この傾向はタイプ 98 (*C. geophilum*) とも一致した。一方、菌根感染様式から

グループ（３）に属すると見なされた菌根タイプ 53 (*Rhizopogon* sp.) およびタイプ 77 はともに孢子由来の感染であることが示唆された。これらの結果は次の重要な点を示していると思われる。すなわち菌根感染様式の違いは、主に感染源の形態の違いを反映しており、菌根形成の生態的特異性によるものではない。したがって菌根タイプ 53 やタイプ 77 の菌根菌は野外では年間を通じ休眠中の孢子として存在し、種子植物の埋土種子のような役割を持つことが示唆される。ただし、それら孢子の由来や齢などの性状については追求しなかった。事実、菌根タイプ 53 は *Rhizopogon* sp. と示唆されているが、*Rhizopogon* 属菌の子実体は本調査区では全く見つかっていない。土壤中における孢子の寿命は必ずしも明確ではないが、タイプ 53 の菌根菌の孢子はかなり齢を経ている可能性がある。一方タイプ 77 は明瞭な菌鞘の層化を示さず、この点からマツの内外生菌根菌 (Wilcox and Wang, 1987) との関連が示唆される。それらの菌類には、分生子を形成する種（子囊菌類に属する不完全菌類）が含まれており、このことはタイプ 77 の菌根菌が分生子形成を行っている可能性を推測させる。この点を確実にするためにはタイプ 77 の菌根菌の純粋培養下での観察が必要であろう。

ここで、菌根タイプ 53 およびタイプ 77 の菌根菌の孢子が、野外では発芽せずに休眠体として維持されている一方で、試験管内では容易に発芽し菌根形成に至ったのかという問題が生じてくる。既に述べたように、これらの菌は土壤の篩分け実験下でのみ菌根形成が認められた訳ではなく、様々な処理条件下の菌根菌釣り上げ実験で普通に菌根形成した（第 4 章 2 節）。野外において孢子発芽を抑制あるいは実験下で促進する要因は明らかでないが、Friedman et al. (1989) が示唆した菌根感染を阻害する放線菌の増殖のような形での孢子発芽阻害要因が調査区では関与しているのかも知れない。

なお菌根感染様式からグループ（１）と見なされた菌根タイプでは土壤の篩分けの実験からその感染源の形態を明らかにすることはできなかったが、グループ（２）およびグループ（３）との比較から恐らくは、菌根および菌糸体がその主な感染源であろう。

実生移植前の供試土壌の温度処理は菌根感染の様式を変化させることが明らかになった。このうち、多くの菌根タイプが高温処理で出現を低下させる一方で、菌根タイプ 55 (*S. granulatus*), タイプ 77 あるいはタイプ 98 (*C. geophilum*) の出現頻度の増加が注目された。特にタイプ 98 は、感染源の季節変化 (第 4 章 2 節) から夏季の高い微生物分解活性時にも耐性を発揮することが推察されたが、本結果からはそれと同時に生理的な高温耐性も示唆され、*C. geophilum* が調査区において特に夏季に重要な役割 (活性) を担うと考えられる。低温処理も高温処理と同様に菌根タイプの出現を低下させる場合があったが、タイプ 98 やタイプ 103 では影響を受けず、またタイプ 53, タイプ 55 およびタイプ 77 では出現を増加させた。第 4 章で推測したような、低温処理が休眠中の感染源の発芽を誘導し感染菌根タイプを多様にする現象は認められなかったが、このうちタイプ 53 の反応もタイプ 98 と同様に感染源の季節変化に従う温度反応を示した。しかし、タイプ 53 の反応はタイプ 98 とは異なり胞子の反応と考えられる。このことから、タイプ 53 の高温処理時の感染能の低下は、タイプ 53 の感染源である胞子自身の高温に対する生理的反応ではなく、土壌由来の胞子発芽の阻害効果の増大に依る可能性がある。土壌試料あたりの感染源の種多様度は対照区に比べ両温度処理で減少し、このことから本実験では感染源の多様度の季節変化 (第 4 章 2 節) を説明できなかった。

本章では、菌根菌感染源の土壌中での量、形態、ならびに温度反応に関しての実験結果を示した。感染源の量の推定値は、本実験系では感染時の菌根菌間 (種内および種間) の競争が重要ではないことを示唆し、本実験系により様々な種の菌根菌感染源を検出することが可能であると考えられる。更に土壌中の菌根菌感染源の形態が菌根あるいは菌糸体からなる菌根タイプと胞子からなる菌根タイプの大きく 2 つのグループがあることを明らかにした。本調査区で優占的な菌根タイプ (例えばタイプ 84) の菌根および菌糸体が感染源として機能したことは、成木林での菌糸体ネットワークが感染源として重要であるという主張 (Dahlberg and Stenlid, 1990; Newton et al., 1991) を支持する。また埋土種子的な形の菌根菌 (野外での菌根形成が希かある

いは菌根形成をしていない) 胞子の存在は、林分内での土壌攪乱に対する菌根菌群集の反応予測を難しくしていると考えられる。より正確な予測のためには、菌根菌の各感染源の温度反応や季節変化を、その菌自身の生理的問題と同時に土壌環境の変化の点から考察する必要がある。

Table 18. Most probable number (MPN) assay of ectomycorrhizal (ECM) fungal inocula.

soil sample-1

ECM type	number of seedlings detected the ECM types (max. n=5)			MPN of 200cm ³ soil
	1 x dilution	10 x dilution	100 x dilution	
38	1	0	0	2
53	1	0	0	2
68	5	1	0	33
77	1	0	0	2
84	3	0	0	8
98	1	0	0	2
Total	5	1	0	33

soil sample-2

ECM type	number of seedlings detected the ECM types (max. n=5)			MPN of 200cm ³ soil
	1 x dilution	10 x dilution	100 x dilution	
53	3	0	0	8
98	2	0	1	7
total	5	0	1	31

Table 19. Sieving assay of ectomycorrhizal (ECM) inocula.

soil sample	ECM type	detection of the ECM type in the sieved soil sample				
		1.0mm mesh	0.5m mesh	0.1mm mesh	0.05mm mesh	filter paper
A	58			+		
	68			+	+	
	77					+
	84	+	+	+		
B	53				+	
	68	+	+	+	+	
	84		+			
	98		+	+		
	103			+		
C	68	+	+	+	+	
	84	+				
	103		+			
D	53			+	+	+
	98		+	+		
E	53	+	+	+	+	+
	98			+		
F	53		+			+
	98			+		

Table 20. Sieving assay of ectomycorrhizal (ECM) inocula.

ECM type	number of seedlings detected the ECM type (max. n=6)				
	1.0mm mesh	0.5mm mesh	0.1mm mesh	0.05mm mesh	paper filter
53	1	2	2	3	3
58			1		
68	2	2	3	2	
77					1
84	2	2	1		
98		1	3	1	
103		2	1		

Table 21. Temperature effect on infective ability of ectomycorrhizal (ECM) inocula.

original soil sample	ECM type detected	detection of the ECM type in the treated soil sample		
		Control	30 °C	below 4 °C
A	42	+		
	53	+	+	+
	55			+
	98	+	+	+
B	53	+		+
	55	+		
	77			+
	98	+	+	
	103	+	+	+
C	41	+		
	53	+	+	+
	55	+	+	
	58			+
	72	+		
	98	+		+
D	19	+		
	53	+		+
	55		+	
	98		+	+
	103	+		+
E	13	+		
	53	+	+	+
	58			+
	77		+	
	98	+	+	+
	103			+
	unidentified	+		

Table 22. Temperature effect on infective ability of ectomycorrhizal (ECM) inocula.

ECM type	number of seedlings detected the ECM type (max. n=20)		
	Control	30 °C	below 4 °C
13	1		
19	3		
41	1		
42	1		
53	8	3	10
55	1	3	4
58			2
72	1		
77		2	3
98	6	10	6
103	6	1	5

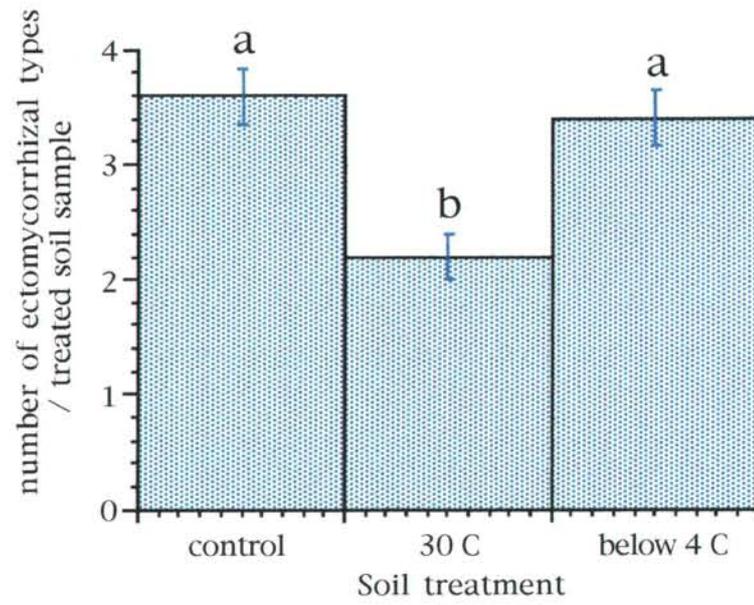


Figure 17. Temperature effect on infective ability of ectomycorrhizal inocula. Bars represent means ($n=5$) \pm SE. Different letters indicate significantly different means using the F-test ($P<0.05$).

第6章 総合考察

5年間の継続調査から、調査区内アカマツ林ではほぼ全てのアカマツ細根が外生菌根を形成しており、極めて多様な種構成からなる菌根菌群集が存在することが明らかになった。顕微鏡による形態的類別から79タイプの外生菌根が確認され、各菌根タイプはそれぞれ菌根菌の種が異なると考えられることから、林床の単位面積当たりの菌根菌種数としてはBruns (1995) に挙げられている既存の報告のいずれよりも著しく多かった。このように多様な構成種からなる菌根菌群集は、菌根菌遷移の初期定着菌 (early-stage fungi) と後期定着菌 (late-stage fungi) の概念を生み出す元になったイギリスでの *Betula* 属植物の植栽地で認められた単調な菌根菌群集 (Deacon and Fleming, 1992) とは対照的である。

これまで外生菌根菌群集の多様性や構造に関する論議は、大型菌類の子実体調査の結果に基づき行われることが多く (Arnolds, 1992)、菌根の詳細なデータに基づく論議は限られていた。子実体に基づいた論議が、実質的な菌根菌群集の論議ではないこと示唆する報告は以前からあったが (Zak and Bryans, 1963)、林内での正確な菌根菌の種構成を群集の立場から明らかにする試みは近年ようやく一般化しつつある

(Gardes and Bruns, 1996)。著者 (山田, 1993) は、本調査区において菌根と子実体の分布様式がずれているという調査結果から、群集構造の把握には菌根そのものを調査対象にする必要があると主張した。本論文第3章の結果はその著者の主張を支持しており、また第4章2節の結果は、子実体発生だけに基づいては地中の菌根の分布様式と共に菌根菌の種構成も正確に推定できない例を明示したものと見える。しかし、子実体発生量と菌根形成量の比較は菌根菌の生態的一側面を際立たせた。すなわち *Russula* 属菌は菌根量と子実体発生量共に優占的であったのに対し、種数ならび発生量の多かった *Inocybe* 属菌 (山田, 1993) に関しては子実体量を説明するだけのアカマツ外生菌根は認められなかった。逆に菌根量の多かった *Thelephoraceae* 科の1種に相応する子実体の発生は全く認められなかった。このように子実体の発生は菌根菌群集の種構成の把握には直結しないが、それぞれの菌の生態的役割や機能を類推

する際の重要な情報を提供している可能性はある。Gardes and Bruns (1996) は、子実体量と菌根量のずれから菌根菌種間での光合成固定炭素の分配と利用度の違いに触れ、特に菌根量に比べ子実体量の多い種に関してはその腐生的生長を否定しきれないとしている。いずれにしても、子実体発生に基づく種数-面積曲線によって限定される外生菌根菌群集の群集単位や多様度に始まる群集に関する議論 (Villeneuve et al, 1989; Arnolds, 1992) は今後再検討の余地があると考えられる。

本調査区で *Russula* 属菌の菌根が優占していたということは、北米の jack pine 林 (Visser, 1995) や bishop pine 林 (Gardes and Bruns, 1996) で *Russula* 属菌の菌根が優占していたという現象と一致した。最近明らかにされつつある様々な林分での菌根菌群集の種構成は、DNA 解析 (PCR-RFLP 法等) に基づく菌根菌の類別・同定 (Gardes et al, 1991; Henrion et al., 1992; Bruns and Gardes, 1993; Gardes and Bruns, 1993, 1996) により今後加速的に明らかにされていくと考えられ、さらに菌根菌の群集構造に影響を及ぼす気候、土壌あるいは地理的要因の比較研究が可能になると考えられる。

本調査区の菌根菌群集は、このように *Pinus* 属植物の林分下での菌根群集の一般的な性質を持ち、かつ種多様性の極めて高い特徴を持っていた。このことは、本調査区が *Pinus* 属植物の林分になぜ種多様性の高い菌根菌群集が存在するのかを解析するための適地であることを示している。そして土壌体積で数百立方センチメートル程度の中に存在するアカマツ根系上にはしばしば複数の菌根タイプが共存することや (第4章1節), Figure 7 および Figure 8 の菌根タイプの面積曲線は、この調査区のスケールにおける群集多様度が菌の共存様式から説明可能であることを示している。本調査区で普通に認められた局所的な根系上での異なる菌根タイプの共存様式は、Ogawa (1985) や Miller and Allen (1992) によって示された外生菌根菌の一般的な分布様式とは大きく異なっていた。この差異が調査区スケールでの菌根菌群集の多様度と果たして関連する (すなわち彼らのモデルとなった調査区では菌根菌の多様度が本調査区のそれよりも著しく低くなる) のか否かは明らかではないが、彼らの菌根菌分布様式の議論では菌根菌の微小な単位 (機能的な最少単位は1チップの菌根) が無視

されているか、あるいは菌根菌の特定の分布様式、特に大型の菌糸体コロニーを形成する種の分布様式を取り上げて一般化を試みているように思われる。しかし本調査区での子実体発生からは、彼らの示すような菌根菌の大型の菌糸体コロニーを推測することができ、Figure 8 での子実体種数と菌根タイプ数の面積曲線の比較はこの分布様式の矛盾を端的に示している。その理由は必ずしも明らかではないが、菌根を単位とする栄養生長の相（複数の菌根タイプの共存）とは異なり、子実体発生時に菌糸体の局所的な集合化（大型のコロニーを推測させる子実体発生）が生じ、種間での菌糸体の集合位置のずれが生じている機構が仮定され、今後検討する必要がある。

外生菌根菌群集では子実体発生の明瞭な季節性が古くから報告されている一方で（例えば Dix and Webster, 1995）、菌根の季節変化に関する報告は限られている（Vogt, 1981; Vogt et al., 1981; Fogel and Hunt, 1983）。このうち特に成木林内での菌群集の各構成種の区別をはじめとする菌群集構造の変化をあわせて追跡した報告は知られていない。菌根の量的変化には、菌根菌の子実体発生量と同様に温度と降水量が重要であると同時に、植物根系のフェノロジーが直接関係することが Fogel and Hunt (1983) により示された。しかしこのようなデータはその重要性にもかかわらず比較材料がほとんどないのが現状である。第4章2節の結果から、本調査区では菌根量がやや不明瞭ながらも季節変化を示し、春季と秋季にピークを持つと考えられる（Figure 11）。一方、菌根タイプの多様度も季節変化を示し、そのピークは冬季に認められた（Figure 10）。すなわち両者のピークは一致しなかった。このことは菌群集の構成種間での活動の違いを反映していると考えられる。このうち優占的な *Russula* 属菌の菌根量の季節変化は全菌根量の季節変化とは明らかな違いを見せ、宿主の光合成活性の年推移にある程度対応する形での春季から秋季にかけての菌根量の増加を示した（Figure 14）。菌根量の菌群全体での変化はこの *Russula* 属菌の変化に比べ少ないと言える。菌根の現存量から見る菌根菌の季節変化では、菌根活性（例えば栄養塩や炭素化合物の流れ）の季節変化や土壤中の菌根菌の菌糸体量の変化といった、菌根共生のより機能的な側面は必ずしも明瞭にできないが、菌群集の植物根圏への影響を考える上では重要である。菌根量の変化は土壤中の有機炭素の流れを左右する鍵の一

つであり (Fogel, 1980; Vogt et al., 1986), また菌根菌組成の変化が様々な根圏微生物群集の構造変化に関与することも実験的証拠から示唆されている (Colinas et al., 1994; Hiol et al., 1994; Ingham et al., 1994)。従って, 菌根菌群集の変動を季節変化する温度や土壌中の水分含量とならび, 宿主植物のフェノロジーとの関係から詳細に検討することは興味深い。

野外での外生菌根菌の共存様式は菌根菌どうしの相互作用の結果であるが, 本調査区での菌根の分布様式 (Figure 5, 7 および 13) からは, 菌の種間での積極的な相互排除や拮抗現象は認めにくい。野外での外生菌根形成時の菌類の種間競争の程度やその重要度は未だ明らかにされていない。これは, 外生菌根菌において感染源の土壌中での密度ならびに形態をはじめとする各種性状が必ずしも明らかにされていないこと (Miller et al., 1994) が重要な原因となっている。本論文でのアカマツ実生を用いた菌根菌の釣菌実験から, 感染源の種多様度および密度に明瞭な季節変化があることが明らかになり (第 4 章参照), 土壌粒子の分画法を組み合わせることで菌根菌感染源の形態を明らかにする事が可能となった (第 5 章参照)。そして本調査区での菌根菌感染源としては, 菌根, 菌根から土壌中に伸びる菌糸体, ならびに胞子の少なくとも 3 つの形態があり, 実験下での菌根菌感染源相対量と野外での菌根量との比較から感染源としては前 2 者が重要であることが分かった。また, 土壌中には特に胞子のような休眠形状の潜在的な菌根菌が多数存在することが明らかとなり, 野外では確認されていない新たな 24 タイプの菌根が実験的に確認された。このような潜在的な菌根菌を加味することで, 本調査区の菌根菌群集は野外調査と実験結果の比較から 3 つのタイプに分けることができ, 菌根感染能との相関を推測することができた。そこで以下の群に区分することが妥当と考えた。すなわち,

グループ (1) - 野外での菌根形成に比べ実験下での菌根菌感染源量が著しく少ないかあるいは全く感染源が認められない。すなわち土壌攪乱が感染源能を著しく低下させるか, あるいは攪乱条件下での感染源の競争力の差により, 実験下では菌根形成を生じないと考えられる。Grime (1977) に従えば本グループは *G*-戦略型 (combative strategy), また Gadgil and Solbrig (1972) に従えば *K*-戦略型と見なすことがで

きる。

グループ（２） - 野外で普通に菌根形成を行っており、また実験下でも普通に菌根菌感染源量が認められる。すなわちそれらの菌根菌の菌根や土壤中に拡がる菌糸体が攪乱条件下でもそのまま感染源として機能する。Grime（1977）に従えば本グループは C-R-戦略型（combative-ruderal strategy）と見なすことができる。

グループ（３） - 野外では殆どあるいは全く菌根形成が認められないが、実験下では菌根菌感染源量が比較的多く認められる。すなわちそれらの菌根菌の感染源は、主に孢子として土壤中に休眠状態で生息しており、原因はまだ明らかでないが攪乱に依存して in vitro での菌根形成が起こっており、このことから本グループは潜在的な菌根菌である。Grime（1977）に従えば本グループは R-戦略型（ruderal strategy）、また Gadgil and Solbrig（1972）に従えば r-戦略型と見なすことができる。

1つの菌根菌群集内でのこのような生態的分化型の存在は、群集の種多様性を説明する上では重要である。本調査区では、特に春季に地下棲小形哺乳類の活動によると考えられる土壤の隆起や掘り起こしが頻繁に認められた。また第４章１節の結果から、ランダムに採取した土壤ブロックの大部分にはアカマツ根系が認められた。従って、そのような動物活動による土壤の攪乱の結果、部分的なアカマツ根系の切断や、菌根菌の菌糸体の切断が頻繁に起こっている可能性が高い。そのような攪乱土壤に依存して繁殖する能力を持つ外生菌根菌である *Laccaria bicolor* P. D. Orton（オオキツネタケ）（相良, 1989）が調査区周辺では確認されており（Yamada and Katsuya, 1995）、上記のグループ（３）も同様の繁殖様式をとっている可能性がある。土壤の微小環境の攪乱に依存する菌根菌は、非平衡説（Strong, 1992）に従えば種多様度を生ずる重要な要素であるが、このような攪乱土壤中では伸長するアカマツ根系は、上記のグループ（２）あるいはグループ（３）の菌根菌と関係を持つと考えられ、今後野外での実証が必要である。また第４章の結果から、調査区でのアカマツ菌根の全域に渡る分布と共に、菌根菌の釣菌に用いたほぼ全ての土壤試料で菌根菌感染源を検出した。従って、本調査区アカマツ林の土壤表層は、通年に渡り全域が密に活動中の菌根菌ならびにその他の菌根菌感染源に満たされていることを示していた。しかし、最確

値法による菌根菌感染源の数値は必ずしも高くなく、このことは菌根感染時には菌の種間競争が必ずしも重要ではないことを示唆している。さらに釣菌実験下のアカマツ実生根系上での異なる菌根タイプの共存様式は調査区でのアカマツ根系上のそれと同様であり、このことから攪乱地に伸長してきたアカマツ根系上では多種の R- および C-R-戦略型の菌根菌が菌根形成し、多様度を保ったまま徐々に多種の C-R- および C-戦略型菌群へと移行していく構図が推測される。

菌根菌の釣菌実験において、採取土壌の異なる温度条件下への前処理が感染源に影響を及ぼすことが明らかとなり、温度に対する感染源の生理的反応の違いや、菌根菌感染能を変化させる土壌要因の存在を示唆した。このうち特に菌根タイプ 98 (*C. geophilum*) の感染源の高温耐性や菌根タイプ 84 (*Rhizopogon* sp.) の感染源の低温処理による菌根感染能の増大は、両者の感染源密度の季節変化 (Table 14 および 15) が主に温度に依存することを示唆している。野外での菌根の多様度がそれほど顕著な季節変化を示していない (Figure 10 および 11) 一方で、感染源の季節変化は明瞭であり、多数の菌根タイプが冬季採取土壌から確認された (Figure 13)。攪乱に対する反応性の違いと同様に、温度に対する反応性の違いも本調査区における菌根菌群集の種多様性を説明する重要な要素と考えられる。本調査区の土壌深度約 10 cm での地温は、冬季の 1℃から夏季の 25℃まで大きく変動していたが、この較差が菌根菌の季節変化という形で菌群集の多様性の維持に効果的に働いている可能性がある。この問題は、釣菌実験時の幾つかの温度設定 (恒温および変温) の組み合わせにより解決すると考えられ、今後の課題である。

前にも述べたように、本調査区アカマツ林で確認された外生菌根菌群集の単位面積当たりの種数 (菌根のタイプ数とほぼ同数) は、既存の報告 (例えば Bruns, 1995) と比較する限り世界で最も多かった。しかし、そのような多様な構成種からなる菌群集は、異種菌根菌がアカマツの局所的な根系上で共存する基本的な分布様式を持ち、また様々な生態的分化を生じることで維持されていることが示唆された。局所的な根系上でのこのような菌根タイプの共存 (Figure 5 および 8) と同程度の菌根菌多様度

は、ドイツの *Fagus sylvatica* 林でも認められているが (Brand, 1992), この共存現象は必ずしも外生菌根菌の基本的な分布様式とは見なされてこなかった (Ogawa, 1985; Miller and Allen, 1992)。Figure 5 に示されるような異種菌根菌の共存は本調査区では最も普通の様式であり、これは季節によって大きく変わることはなく

(Figure 10), 攪乱の影響も基本的には受けない (例えば Figure 13)。その一方で群集の構成種は土壌の攪乱に対する反応の違いに関して生態的に分化しており [例えば *C*, *C-R*-, および *R*-戦略型] (第4章2節), 温度に対する感染源の反応でも分化を生じていた (Table 22)。更に感染源の密度から、菌根感染時の菌の種間競争はあまり重要でないと考えられる (Table 18)。こうした結果は何れも群集多様度の維持をうまく説明できる。また第1章で定義した「外生菌根菌群集」と同時に土壌中には潜在的な菌根菌 (釣菌実験下で初めてその存在が明らかとなる) が生息していることが明らかになった。本研究の外生菌根菌群集の多様度解析のアプローチは Figure 18 に要約される。

外生菌根菌の遷移に関し、菌根菌の群集構造の変化は、しばしば early-stage fungi (初期定着菌) と late-stage fungi (後期定着菌) という2つの戦略型で説明されている (Deacon and Fleming, 1992)。またこの概念を元に、一般に野外では林冠閉鎖と共に初期定着菌が消失し、結果的に菌根菌群集の多様度が急激に低下すると説明される場合がある (Dighton and Mason, 1985)。しかしこのような構図では本調査区の菌根菌群集 (特に多様度の点) を説明できない。外生菌根菌の遷移における初期定着菌と後期定着菌の論議が必ずしも一般則でないことは Newton (1992) に述べられている通りである。

本研究で用いた群集解析のアプローチ (Figure 18) は、まだ多分に修正の余地はあるが、このように極めて多様な菌根菌群集の意義を、おもにその構成種の生態的分化と共存の側面から明らかにした。今後更に、群集構造を制御している環境傾度

(Whittaker, 1975) の点やアカマツ林の成立過程を考慮することで、本調査区が多様な菌根菌群集の成立をより明らかにすることが可能であろう。

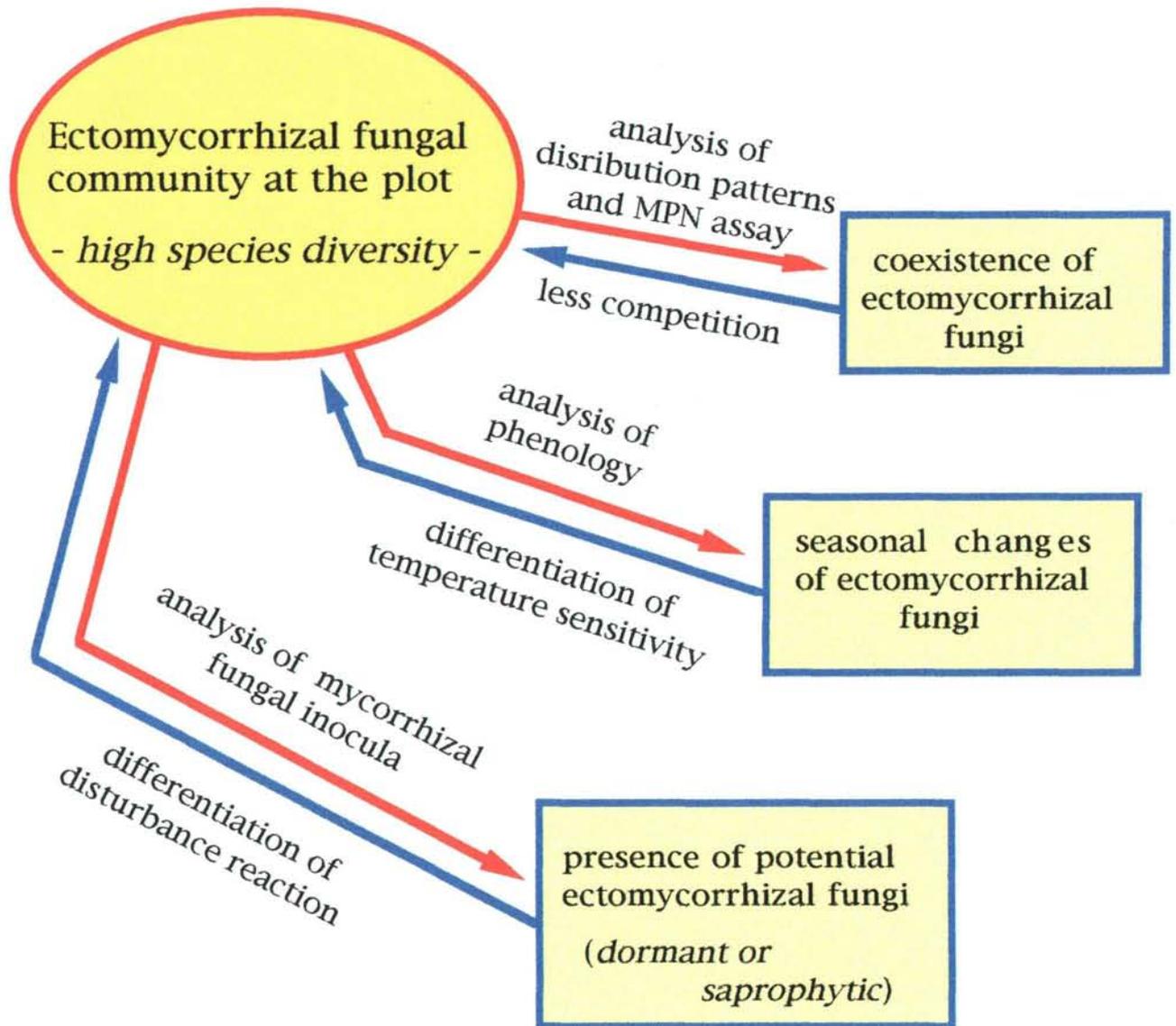


Figure 18. Scheme of the approach to analyze species diversity of ectomycorrhizal fungal community at the plot. The high species diversity in the community will be maintained by the relatively less competition and ecological differentiation among ectomycorrhizal fungi.

摘要

アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 林内における多様な外生菌根形成は既に示唆されており、本研究ではそのような林内における外生菌根菌群集の構造とその意義を明らかにすることを目的に実験を行った。

1.1 アカマツ外生菌根の形態的類別

1992年5月、茨城県つくば市、筑波大学構内のアカマツ植栽林（樹齢約45年）内に25 x 25 m²の調査区を設定し、1996年6月まで野外調査を行った。調査区内で採取したアカマツ成木および実生の細根を顕微鏡下で観察した結果、観察に用いた約3万チップを越える細根の大部分が外生菌根を形成しており、更に菌鞘の形態的相違に基づきそれら外生菌根を類別した結果79タイプが確認された。記録された菌根タイプ数の総数は調査期間に従って増加したが、その増加率は徐々に減少し、この79タイプは調査区で菌根形成している菌根菌の大部分を検出していると考えられた。また1994年2月より1996年1月にかけて調査区（一部芝地調査区）で土壌を採取し実験室内での菌根菌の釣り上げ実験を行った結果60タイプの外生菌根が類別され、野外採取の菌根と併せ総計で103タイプが確認された。なお、全菌根タイプの約20.4%に当たる21タイプでは菌根菌の種あるいは属が同定できた。

各菌根タイプは菌根菌の種レベルでの違いによると考えられるが、これは主に著者らの外生菌根の合成実験と既存の報告にある同定菌根の形態的特徴等に基づき、菌根タイプを設定したことに依る。このように顕微鏡下での菌根形態に基づき100種レベルの外生菌根菌を菌根タイプとして類別することが可能であり、このことは、そのように多様な菌根菌群集を「菌根タイプ」に基づき解析できることを示唆している。

1.2 *Cenococcum geophilum* の核ゲノム rDNA の ITS 領域と菌根形態との比較

本章では *Cenococcum geophilum* Fr. と考えられる菌根タイプ98に焦点を当て、遺伝子の集団解析から1菌根タイプの持つ生物学的な意義を更に検討した。主に調査区由来の外生菌根タイプ98から分離培養し、*C. geophilum* と考えられる黒色の10

菌株（一部は既に菌根合成実験から *C. geophilum* と確認されている）および調査区土壌を用いた菌根菌の釣り上げ実験に供試した 121 土壌試料中の 79 土壌試料から回収された *C. geophilum* の外生菌根の核ゲノムリボゾーム DNA の ITS 領域を PCR により増幅した結果、塩基長は全 DNA 試料で約 560 bp と同一であり RFLP 解析でも基本的に全て同一パターンを示した。以上のことから形態的 1 菌根タイプ（タイプ 98）で定義される *C. geophilum* は遺伝的にも 1 種と示唆され、このことは本研究での前提になった「形態で定義する菌根タイプがそれぞれ菌根菌の種レベルの違いを反映している」とする考えを支持した。

2. 菌根菌のアカマツ根系上での分布様式ならびに林分内での種多様性

1994 年 10 月に調査区でリター直下の地表面積 20 x 40 cm²、深さ 0-10 cm の土壌ブロックを掘り出し、5 x 5 x 5 cm³ から成る 64 個の小土壌ブロックに分けてそれぞれの小土壌ブロック中の全アカマツ菌根を回収し菌根タイプに類別した結果、15 タイプが確認された。菌根は 49 個の小土壌ブロック中に分布しており小土壌ブロック中での異なる菌根タイプの共存（最大は 6 タイプ）は普通であった。この結果は本調査区での以前の報告と一致し、種数-面積曲線に基づく解析から、林分レベルでの菌根菌群集の種多様性と宿主植物の局所根系上での菌根タイプの共存の問題は密接に関連することが示唆された。

本調査から、菌根菌が宿主根系上で共存する基本的な分布様式は、従来の子実体調査からは必ずしも明らかにできないことが分かった。またそのような菌根菌の分布様式はこれまで余り顧みられていないが、野外での菌根菌の種間競争の程度や機構を考える上では重要と思われる。

3.1 アカマツ外生菌根の季節変化および種構成

1995 年 7 月から 1996 年 6 月にかけての毎月、調査区においてリター直下の 7 x 7 x 7 cm³ の土壌ブロック 4 個を採取し、アカマツ菌根を回収して類別した。その結果 63 タイプの外生菌根が確認され、菌根チップ数から本調査区での優占種は

Russula 属菌と Thelephoraceae 科の 1 種であることが明らかになった。また各菌根タイプのチップ数とその順位は等比級数則にほぼ従い、高い種多様性を示した。個々の菌根タイプの季節変化は必ずしも明瞭でなく、菌根量は通年ある一定の水準に維持されていたが、多様度では季節変化が認められ冬季から春季にかけて種類相が有意に減少していた。また優占的な *Russula* 属菌の菌根量の季節変化は菌根全体の季節変化と大きく異なり、秋季から冬季にかけて有意に減少していた。このことから、それぞれの種により季節変化のパターンが違うが、菌根菌群集の季節変化では冬季から春季にかけて群集構造が最も変化すると推察された。

3.2 アカマツ外生菌根菌の感染源の季節変化および種構成

菌根菌の釣り上げ実験による土壤中の菌根菌感染源の測定は、1994 年 2 月より 1995 年 8 月までの間、1 ヶ月おきに採取した 3 土壌試料に基づき実験室下でおこなった。感染源の季節変化は野外での菌根の季節変化に比べ明瞭であったが、両者の季節変化は異なっており、また感染源量で優占的であった菌根タイプ（例えば *C. geophilum*）と野外での菌根量の優占度は必ずしも一致せず、更にタイプ 53

(*Rhizopogon* sp.) の様に感染源がごく普通に検出される一方で野外での菌根形成が確認されていないものもあった。このように野外調査と釣菌実験の結果の比較から、調査区での菌根菌は感染様式（特に攪乱に対する反応性）の違いから、3 つのグループ（生態的分化グループ）に分けることができた；

グループ（1）菌根量 >> 感染源量・・・攪乱に弱い

グループ（2）菌根量 \approx 感染源量・・・攪乱の影響少

グループ（3）菌根量 << 感染源量・・・攪乱依存的

4. 菌根菌感染に係わる感染源量、感染源の形態および土壌温度の検討

1995 年 10 月から 11 月にかけて調査区で採取した土壌からの菌根菌の釣り上げ実験により菌根菌感染にかかわる諸要因の検討を行った。

土壌粒子ならびに有機物体の篩分けを組み合わせた実験から菌根菌の感染源としては菌根、菌糸体、ならびに胞子の 3 形態が存在すると推察され、本調査区で優占的な

菌根量を示した *Russula* 属菌や Thelephoraceae 科の 1 種感染源が菌根および菌糸体である一方、*Rhizopogon* sp.では主に胞子感染を生じていると考えられた。

また最確値法を組み合わせた菌根菌の釣菌実験から、菌根菌感染源密度は高くなく、菌根感染時の菌の種間および種内競争の程度は低いことが示唆された。

更に土壤の異なる温度処理を組み合わせた実験から、菌根菌の土壤中での温度に対する生理的な反応の違いならびに菌根菌感染能に影響を与える土壤要因の存在が明らかになった。

以上の野外調査および実験結果から、本調査区アカマツ林内には極めて多様な（既存の報告との比較では世界で最も種多様性の高い）構成種から成る外生菌根菌群集が存在すること明らかになり、菌群のダイナミクスを考察する上では非常に興味深い場所である。

このように多様な菌根菌群集では、宿主アカマツの局所根系上での異なる菌根タイプが共存する基本的な性質を持ち、また種間での季節変化パターンの違い、あるいは菌根菌感染様式に関する生態的分化を生じている事が明らかとなった。それらは何れも外生菌根菌群集の多様性の維持をうまく説明でき、本実験のアプローチはその菌群の解析に有効と考えられる。

引用文献

- Agerer, R. 1986. Studies on Ectomycorrhizae II. *Mycotaxon* 26: 473-492.
- Agerer, R. 1987-1995. Color atlas of ectomycorrhizae. 1st-9th delivery, Einhorn-Verlag, Schwabisch Gmünd.
- Agerer, R. 1995. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: An attempt towards a natural classification. Pp. 685-734. In: *Mycorrhiza*. eds. A. Varma and B. Hock. Springer-Verlag, Berlin.
- Agerer, R., D. Klostermeyer and W. Steglich. 1995. *Piceirhiza nigra*, an ectomycorrhiza on *Picea abies* formed by a species of Thelephoraceae. *New Phytol.* 131: 377-380
- Allen, M. F. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge. 184 p.
- Alexander, I. J. 1981. The *Picea sitchensis* + *Lactarius rufus* mycorrhizal association and its effects on seedling growth and development. *Trans. Br. mycol. Soc.* 76: 417-423.
- An, Z.-Q., J. W. Hendrix, D. E. Hershman and G. T. Henson. 1990. Evaluation of the "most probable number" (MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi. *Mycologia* 82: 576-581.
- Arnolds, E. 1992. The analysis and classification of fungal communities with special reference to macrofungi. Pp. 7-47. In: *Fungi in Vegetation Science*. Ed. W. Winterhoff. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Ba, A. M. and D. Thoen. 1990. First synthesis of ectomycorrhizas between *Afzelia africana* Sm. (Caesalipiniodeae) and native fungi from West Africa. *New Phytol.* 114: 99-103.
- Bills, G. F., G. I. Holtzman and O. K. Miller, JR. 1986. Comparison of

ectomycorrhizal-basidiomycete communities in red spruce versus northern hardwood forests of West Virginia. *Can. J. Bot.* 64: 760-768.

- Bjorkman, E. 1960. *Monotropia hypopitys* L. - an epiparasite on tree roots. *Physiologica Plantarum* 13: 308-327.
- Bonfante-Fasolo, P. 1980. Occurrence of a basidiomycete in living cells of mycorrhizal hair roots of *Calluna vulgaris*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 75: 320-325
- Brand, F. 1992. Mixed association of fungi in ectomycorrhizal roots. Pp. 142-147. In: *Mycorrhizas in Ecosystems*. eds. D. J. Read, D. H. Lewis, A. H. Fitter and I. J. Alexander. C. A. B. International, Wallingford.
- Brundrett, M. C. and L. K. Abbott. 1994. Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest I. Seasonal study of inoculation levels. *New Phytol.* 127: 539-546.
- Bruns, T. D. 1995. Thoughts on the process that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 170: 63-73.
- Bruns, T. D. and M. Gardes. 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi - taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Molecular Ecology* 2: 233-242.
- Bruns, T. D. and M. Gardes, T. R. Horton, T. M. Szaro and L. Taylor. 1995. Molecular approaches to the study of ectomycorrhizal community structure. 日本菌学会第 39 回大会講演要旨集. 東京, 5 月 27 日-28 日, p. 11-12.
- Bruns, T. D., T. J. White and J. W. Taylor. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525-564.
- Cazares, E. and J. E. Smith. 1996. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Pseudotsuga menziesii* and *Tsuga heterophylla* seedlings grown in Oregon Coast Range soils. *Mycorrhiza* 6: 65-67.
- Chilvers, G. A. 1968. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. *Aust.*

J. Bot. 16: 49-70.

- Chilvers, G. A., F. F. Lapeyrie and D. P. Horan. 1987. Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytol.* 107: 441-448.
- Clapp, J. P., J. P. W. Young, J. W. Merryweather and A. H. Fitter. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* 130: 259-265.
- Colinas, C., R. Molina, J. Trappe and D. Perry. 1994. Ectomycorrhizas and rhizosphere microorganisms of seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco planted on a degraded site and inoculated with forest soils pretreated with selective biocides. *New Phytol.* 127: 529-537
- Cook, R. C. and J. M. Whipps. 1993. *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publications, London. 337 p.
- Coutts, M. P. and B. C. Nicoll. 1990. Growth & survival shoots, root & mycorrhizal mycelium in clonal Sitka spruce during the first growing season after planting. *Can. J. For. Res.* 20: 861-868.
- Dahlberg, A. and J. Stenlid. 1990. Population structure and dynamics in *Suillus bovinus* as indicated by spatial distribution of fungal clones. *New Phytol.* 115: 487-493.
- Dahlberg, A. and E. Stenstrom. 1991. Dynamic changes in nursery and indigenous mycorrhiza of *Pinus sylvestris* seedlings planted out in forest and clearcuts. *Plant and Soil* 136: 73-86.
- Danielson, R. M. 1984. Ectomycorrhizal associations in jack pine stands in northeastern Alberta. *Can. J. Bot.* 62: 932-939.
- Deacon, J. W. and L. V. Fleming. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. Pp. 249-354. In: *Mycorrhizal functioning*. Eds. M. F. Allen. Chapman & Hall, New York.
- de la Bastide, P. Y. and B. R. Kropp. 1994. Spatial distribution and

- temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytol.* 127: 547-556.
- de la Bastide, B. R. Kropp and Y. Pichce. 1995. Population structure and mycelial phenotypic variability of the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *Mycorrhiza* 5: 371-379.
- Dix, N. J. and J. Webster. 1995. *Fungal ecology*. Chapman & Hall, London. 549 p.
- Dominik, T. 1969. Key to ectotrophic mycorrhizae. *Folia Forest Polonica ser. A* 15: 309-321.
- Egil, S. and I. Kalin. 1991. Root window technique for in vivo observation of ectomycorrhiza on forest trees. Pp. 423-433. In. *Method in microbiology*, vol. 23. eds. Norris, J. A., D. J. Read, A. K. Varma. Academic Press, London.
- Entry, J. A., C. L. Rose and K. Cromack Jr. 1991. Litter decomposition and nutrient release in ectomycorrhizal mat soil of a Douglas fir ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 23: 285-290.
- Fogel, R. 1976. Ecological studies of hypogeous fungi. II. Sporocarp phenology in a western Oregon Douglas Fir stand. *Can. J. Bot.* 54: 1152-1162.
- Fogel, R. 1980. Mycorrhizae and nutrient cycling in natural forest ecosystems. *New Phytol.* 86: 199-212.
- Fogel, R. and G. Hunt. 1983. Contribution of mycorrhizae and soil fungi to nutrient cycling in a Douglas-fir ecosystem. *Can. J. For. Res.* 13: 219-232.
- Fontana, A. 1962. Researches on the mycorrhizae of the genus *Salix*. *Allionia* 8: 67-85.
- Fontana, A. and E. Centrella. 1967. Ectomycorrhizae produced by hypogeous fungi. *Allionia* 13: 149-176.

- Friedman, J., A. Hutchins, C. Y. Li and D. A. Perry. 1989. Actinomycetes inducing phytotoxic or fungistatic activity in a Douglas-fir forest and in an adjacent area of repeated regeneration failure in southeast Oregon. *Biologia Plantarum* 31: 487-495.
- Gadgil, M. and O. T. Solbrig. 1972. The concept of r- and K-selection: evidence from wild flowers and some theoretical considerations. *American Naturalist* 106: 104-131.
- Gardes, M. and T. D. Bruns. 1993. ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gardes, M. and T. D. Bruns. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above and below ground views. *Can. J. Bot.* 77 (in press).
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. Bruns and J. W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.
- Godbout, C. and J. A. Fortin. 1985. Synthesized ectomycorrhizae of aspen: fungal genus level structural characterization. *Can. J. Bot.* 63: 252-262.
- Grime, J. P. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* 111: 1169-1194.
- Harley, J. L. and S. E. Smith. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London. 483 p.
- Harley, J. L. and J. S. Waid. 1955. A method of studying active mycelia on living roots and other surface in the soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* 38: 104-118.
- 橋本靖. 1995. シラカンバ実生に形成される外生菌根の土壌による違い. 第 42 回日

本生態学会講演要旨集. 盛岡, 8月27日-30日, p. 82.

Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton and D. N. Pegler. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th ed., pp. 420-421. CAB International, Wallingfold.

Hendrix, J. W., B. Z. Guo and Z.-Q. An. 1995. Divergens of mycorrhizal fungal communities in crop production systems. *Plant Soil* 170: 131-140.

Henrion, B., F. Le Tacon and F. Martin. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA gene. *New Phytol.* 122: 289-298.

Hiol, F. H., R. K. Dixon and E. A. Curl. 1994. The feeding preference of mycophagous Collembolan varies with the ectomycorrhizal symbiont. *Mycorrhiza* 5: 99-103.

Hutchison, L. J. 1991. Description and identification of cultures of mycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42: 387-504.

今関六也・本郷次雄. 1987. 原色日本新菌類図鑑 (I). 保育社, 大阪. 325 p.

今関六也・本郷次雄. 1989. 原色日本新菌類図鑑 (II). 保育社, 大阪. 315 p.

Ingham, E. R. and H. B. Massicotte. 1994. Protozoan communities around conifer roots colonized by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5: 533-61.

Ingleby, K., P. A. Mason, f. T. Last and L. V. Fleming. 1990. Identification of ectomycorrhizas. HMSO, London. 112 p.

苅住 昇. 1979. 樹木根系図説. 誠文堂新光社, 東京. 1109 p.

Kasuya, M. C. M., T. Igarashi and M. Shibuya. 1995. Occurrence and type of ectomycorrhizae present in seedling of *Picea glehnii* in a natural forest in Hokkaido. *Mycoscience* 36: 335-339.

- Kope, H. H. and J. H. Warcup. 1986. Synthesized ectomycorrhizal associations of some Australian herbs and shrubs. *New Phytol.* 104: 591-599
- Lobuglio, K. F., S. O. Rogers and J. K. Wang. 1990. Variation in ribosomal DNA among isolates of the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *Can. J. Bot.* 69: 2331-2343.
- Lobuglio, K. F. and J. W. Taylor. 1996. Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and other mycorrhizal fungi among the ascomycetes. (Abstract) First International Conference on Mycorrhizae. Berkeley, August 4-9, p. 77.
- Malajczuk, N., R. Molina and J. M. Trappe. 1982. Ectomycorrhizal formation in *Eucalyptus* I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytol.* 91: 467-482.
- Massicotte, H. B., R. Molina, D. L. Luoma and J. E. Smith. 1994. Biology of ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon* II. Pattern of host-fungus specificity following spore inoculation of diverse hosts grown in monoculture and dual culture. *New Phytol.* 126: 667-690.
- 増原 学. 1994. VA およびラン菌根菌の植物生育促進効果. *土と微生物* 44: 43-52.
- Masuhara, G. and K. Katsuya. 1994. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol.* 127: 711-718.
- Masuhara, G., G. Kimura and K. Katsuya. 1988. Seasonal change in the mycorrhizae of *Bletilla striana* (Orchidaceae). *Trans. mycol. Soc. Japan* 29: 25-31.
- Masui, K. 1927. A study of the ectotrophic mycorrhizas of woody plants. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Univ. B III*, 2: 149-279.

- McGee, P. A. 1989. Variation in propagule numbers of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a semi-arid soil. *Mycol. Res.* 92: 28-33.
- Miller, S. L. and C. D. Koo. 1991. Characterization of red alder ectomycorrhizae; a preface to monitoring belowground ecological response. *Can. J. Bot.* 69: 516-531.
- Miller, S. L., P. Torres and T. M. McClean. 1994. Persistence of basidiospores and sclerotia of ectomycorrhizal fungi and *Morchella* in soil. *Mycologia* 86: 89-95.
- Molina, R. and J. M. Trappe. 1982. Pattern of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific northwest conifers and fungi. *Forest Science* 28: 423-458.
- Molina, R., H. Massicotte and J. M. Trappe. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequence and practical implications. Pp. 357-423. In. *Mycorrhizal functioning*. ed. M. F. Allen. Chapman & Hall, New York.
- 元村勳. 1932. 群集の統計的取り扱いについて. *動物学雑誌* 44: 379-383.
- Newman, E. L. and P. Reddell. 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytol.* 106: 745-751.
- Newton, A. C. 1991. Mineral nutrition and mycorrhizal infection of seedling oak and birch III. Epidemiological aspects of ectomycorrhizal infection, and the relationship to seedling growth. *New Phytol.* 117: 53-60.
- Newton, A. C. 1992. Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2: 75-79.
- 小川真. 1975a. アカマツ林における菌根菌-マツタケの微生物生態学的研究 I
マツタケのシロ. *林試研報* 272: 79-121.
- 小川真. 1975b. アカマツ林における菌根菌-マツタケの微生物生態学的研究 II

マツタケの菌根. 林試研報. 278: 21-49.

小川真. 1977. アカマツ林における菌根菌—マツタケ—の微生物生態学的研究 III
マツタケのシロ土壌と菌根における菌類相. 林試研報. 293: 105-170.

小川真. 1981. マツタケの生物学. 築地書館, 東京. 326 p.

Ogawa, M. 1985. Ecological characters of ectomycorrhizal fungi and their
mycorrhizae. JARQ 18: 305-314.

Palenzona, M., G. Chevalier and A. Fontana. 1972. Mycorrhizal synthesis
between the mycelia in culture of *Tuber brumale*, *T. melanosporum*, *T.*
rufum, and conifer and broad-leaves seedlings. Allionia 18: 41-52.

Read, D. J. 1991. Mycorrhizas in ecosystem. Experientia 47: 376-390.

Read, D. J. and K. Haselwandter. 1981. Observation on the mycorrhizal
status of some alpine plant communities. New Phytol. 88: 341-352.

Ryan, E. A. and I. J. Alexander. 1992. Mycorrhizal aspects of improved
growth of spruce when grown in mixed stand on heathland. Pp. 237-
245. In. Mycorrhizas in Ecosystems. eds. D. J. Read, D. H. Lewis, A. H.
Fitter and I. J. Alexander. C. A. B. International, Wallingford.

相良直彦. 1989. きのこと動物. 築地書館, 東京. 185 p.

Strong, D. R. 1992. Non-equilibrium themes for ecological theory:
implications for fungal communities. Pp. 1-15. In. Fungal community.
eds. Carroll, G. C. and D. T. Wicklow. Marcel Deller, Inc., New York.

Trappe, J. M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot.
Rev. 28: 538-606.

Trappe, J. M. 1964. Mycorrhizal host and distribution of *Cenococcum*
graniforme. Lloydia 27: 100-106.

Trappe, J. M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in
nurseries. Ann. Rev. Phytopath. 15: 203-222.

- Villeneuve, N., M. M. Grandtner and J. M. Fortin 1989. Frequency and diversity of ectomycorrhizal and saprophytic macrofungi in the Laurntitide Mountains of Quebec. *Can. J. Bot.* 67: 2616-2629.
- Visser, S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* 129: 389-401.
- Vogt, K. A., R. L. Edmonds and C. C. Grier. 1981a. Dynamics of ectomycorrhizae in *Abies amabilis* stands: The role of *Cenococcum graniforme*. *Holarctic Ecology* 4: 167-173.
- Vogt, K. A., R. L. Edmonds and C. C. Grier. 1981 b. Seasonal changes in biomass and vertical distribution of mycorrhizal and fibrous-textured conifer fine roots in 23- and 180-year-old subalpine *Abies amabilis* stands. *Can. J. For. Res.* 11: 223-229.
- Vogt, K. A., C. C. Grier and D. J. Vogt. 1986. Production, turnover, and nutrient dynamics of above- and belowground detritus of world forest. *Advance in ecological research* 15: 303-377.
- Whittaker, R. H. 1975. *Communities and ecosystems*, 2nd ed. The Macmillan Company, New York. 385 p.
- Wilcox, H. E. and Wang, C. J. K. 1987. Mycorrhizal and pathological association of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings. *Can. J. For. Res.* 17: 884-899.
- Wilson, J. M. and I. C. Tommerup. 1992. Interactions between Fungal Symbionts: VA mycorrhizae. Pp. 199-248. In. *Mycorrhizal functioning*. eds. M. F. Allen. Chapman & Hall, New York.
- 山田明義. 1993. アカマツの外生菌根菌の生態学的研究. 筑波大学大学院農学研究科修士論文. 73 p.
- Yamada, A. and K. Katsuya. 1995. Mycorrhizal association of isolates from sporocarps and mycorrhizas with *Pinus densiflora* seedlings. *Mycoscience* 36: 315-323.

- Yamada, A. and K. Katsuya. 1996. Morphological classification of ectomycorrhizas of *Pinus densiflora*. *Mycoscience* 37: 145-155
- Zak, B. 1973. Classification of ectomycorrhizae. Pp. 43-77. In. *Ectomycorrhizae*. eds. G. C. Marks and T. T. Kozlowski. Academic Press, New York.
- Zak, B. 1976. Pure culture synthesis of bearberry mycorrhizae. *Can. J. Bot.* 54: 1297-1305.
- Zak, B. and W. C. Bryan. 1963. Isolation of fungal symbionts from pine mycorrhizae. *Forest Science* 9: 270-278.

Explanation of plates

Plate 1. A, view of the study site; B-G, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); B-C, cystidia of mycorrhizal *type 1* (C, stained with cotton blue and toluidine blue); D-F, mycorrhizal *type 2*. D-E, cystidia (D, stained with cotton blue and toluidine blue); F, surface layer of the fungal sheath; G, cystidia of the mycorrhizal *type 3*.

Plate 2. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-B, cystidia of the mycorrhizal *type 4*; C-D, cystidia of the mycorrhizal *type 5*; E-G, mycorrhizal *type 6* (*Tuber* sp.); E-F, cystidia stained with cotton blue and toluidine blue; G, surface layer of the fungal sheath stained with cotton blue and toluidine blue; H, cystidia of the mycorrhizal *type 7*.

Plate 3. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, cystidia of the mycorrhizal *type 7*; B-C, cystidia of the mycorrhizal *type 8* stained with cotton blue and toluidine blue; D-E, mycorrhizal *type 9*; D, thick-wall globular cells in the surface layer of the fungal sheath stained with acid Fuchucin; E, cystidia stained with acid Fuchucin; F-G, cystidia of the mycorrhizal *type 10* (F, stained with cotton blue and toluidine blue); H, cystidia of the mycorrhizal *type 11*.

Plate 4. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, cystidia of the mycorrhizal *type 11*; B, cystidia of mycorrhizal *type 12*; C-D, cystidia and their array of mycorrhizal *type 13* (*Russula* sp. 1); E-F, cystidia of mycorrhizal *type 14* (*Russula* sp. 2); G-H, cystidia of mycorrhizal *type 15* (*Russula* sp. 3).

Plate 5. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730 except for F, x365); A-C, cystidia of mycorrhizal *type 16* (*Russula* sp. 4); D-E, cystidia of mycorrhizal *type 17*; F-G, cystidia of mycorrhizal *type 18* stained with cotton blue and toluidine blue; H, cystidia of mycorrhizal *type 19* (*R. delica*).

Plate 6. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types

(magnification: x730); A-B, cystidia of mycorrhizal *type 19* (B, stained with cotton blue and toluidine blue); C-D, cystidia of mycorrhizal *type 20* (*Russula* sp. 5) stained with cotton blue and toluidine blue; E-F, cystidia of mycorrhizal *type 21* (*R. nigricans*) stained with cotton blue and toluidine blue; G-H, cystidia of mycorrhizal *type 22* (*R. mariae*) (G, stained with cotton blue and toluidine blue).

Plate 7. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types, (magnification: x730); A-B, cystidia of mycorrhizal *type 23* stained with cotton blue and toluidine blue; C-D, cystidia of mycorrhizal *type 24*. E-F, cystidia of mycorrhizal *type 25*; G, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 26*; H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 27*.

Plate 8. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, hyphal strands of mycorrhizal *type 27*. B-C, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 28* (B, stained with cotton blue and toluidine blue); D, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 29* stained with cotton blue and toluidine blue; E-F, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 30* stained with cotton blue and toluidine blue; G-H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 31*.

Plate 9. A-G, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); H, fluorescent micrograph (magnification: x510); A-B, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 32* (B, stained with cotton blue and toluidine blue); C-E, mycorrhizal *type 33*; C, cystidia-like hyphae stained with cotton blue and toluidine blue; D, brown hyphal strand; E, surface layer of the fungal sheath; F-H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 34* having laticiferous hyphae (F, stained with cotton blue and toluidine blue).

Plate 10. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-B, globular cells in the surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 35*; C-D, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 36*; E-F, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 37* (F, stained with cotton blue and toluidine blue); G-H, emanating hyphae of mycorrhizal *type 38*.

Plate 11. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 38; B, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 39; C-D, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 40 (*Boletellus shichianus*) (C, stained with cotton blue and toluidine blue); E-F, emanating hyphae of the mycorrhizal type 41 (E, stained with cotton blue and toluidine blue); G, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 42; H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 43 stained with cotton blue and toluidine blue.

Plate 12. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, cystidia-like emanating hyphae of mycorrhizal type 44; B, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 45; C-D, mycorrhizal type 46; C, surface layer of the fungal sheath; D, verrucose emanating hyphae; E-F, emanating hyphae of mycorrhizal type 47; G, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 48; H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 49.

Plate 13. A and C-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730). B, fluorescent micrograph (magnification: x255); A-B, mycorrhizal type 49; A, second layer of the fungal sheath; B, surface layer of the fungal sheath; C-D, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 50 (D, stained with cotton blue and toluidine blue); E-F, mycorrhizal type 51 (*Amanita spissacea*); E, surface layer of the fungal sheath; F, hyphal strand; G-H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 52 (H, stained with cotton blue and toluidine blue).

Plate 14. A-B, stereoscopic micrographs. C-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-F, mycorrhizal type 53 (*Rhizopogon* sp.). A, branching system of mycorrhizal tips and connecting rhizomorphs. B, brown adhesion on surface of the mycorrhizal tip; C-D, surface layer of the fungal sheath with crystals (D, stained with cotton blue and toluidine blue); E, emanating hyphae with crystals; F, surface of the fungal sheath with brown oil drop-like adhesion; G-H, mycorrhizal type 54 (Boletaceaeous fungus); G, surface layer of the fungal sheath; H, surface of the fungal sheath almost covered with crystals.

Plate 15. A and D-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); B-C, stereoscopic micrographs; A, emanating hyphae of mycorrhizal *type 54* with crystals; B-F, mycorrhizal *type 55* (*Suillus granulatus*); B-C, branching system of mycorrhizal tips and connecting rhizomorphs; D-E, surface layer of the fungal sheath with crystals; F, emanating hyphae with crystals. G-H, mycorrhizal *type 56* (*Lactarius* sp.); G, surface layer of the fungal sheath stained with cotton blue and toluidine blue); H, laticiferous hyphae in the fungal sheath stained with cotton blue and toluidine blue.

Plate 16. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, laticiferous hyphae in the fungal sheath of mycorrhizal *type 56* stained with cotton blue and toluidine blue; B-D, mycorrhizal *type 57*; B, surface layer of the fungal sheath with a "+"-form emanating hyphae; C, "T"-form emanating hyphae; D, surface layer of the fungal sheath with black depositions like crystals; E-F, mycorrhizal *type 58*; E, surface layer of the fungal sheath; F, verrucose emanating hyphae; G-H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 59* (H, stained with cotton blue and toluidine blue).

Plate 17. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, second layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 59*; B, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 61*; C-D, mycorrhizal *type 62*; C, surface layer of the fungal sheath; D, second layer of the fungal sheath; E, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 63*. F-H, mycorrhizal *type 64*; F, surface layer of the fungal sheath. G-H, "+"-form emanating hyphae (G, stained with cotton blue and toluidine blue).

Plate 18. A-F, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730). G-H, fluorescent micrographs of mycorrhizal types (magnification: x127.5 and 510, respectively); A, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 65*; B-C, laticiferous hyphae in the fungal sheath of mycorrhizal *type 66* (*Lactarius* sp. 2) stained with cotton blue and toluidine blue; D, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 67*; E-H, mycorrhizal *type 68* (*Hebeloma* sp.); E, surface layer of the fungal sheath with emanating hyphae; F, verrucose emanating hyphae stained with cotton blue and toluidine blue; G, surface of the

mycorrhizal tip with emanating hyphae; H, emanating hyphae.

Plate 19. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, emanating hyphae of mycorrhizal type 69; B, emanating hyphae of mycorrhizal type 70; C, emanating hyphae of mycorrhizal type 71 stained with cotton blue and toluidine blue; D-E, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 72 stained with cotton blue and toluidine blue; F, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 73; G-H, mycorrhizal type 74; G, surface layer of the fungal sheath stained with cotton blue and toluidine blue; H, second layer of the fungal sheath stained with cotton blue and toluidine blue.

Plate 20. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 75 (*Lactarius* sp. 3) stained with cotton blue and toluidine blue; B-C, surface of the mycorrhizal type 76; D-E, surface of the mycorrhizal type 77; F-G, surface of the mycorrhizal type 78; H, cystidia on surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 79.

Plate 21. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-C, mycorrhizal type 79; A, cystidia on surface layer of the fungal sheath; B, hyphal strand; C, surface layer of the fungal sheath; D-E, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 80; F, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal type 81; G-H, mycorrhizal type 82; G, surface layer of the fungal sheath; H, cystidia on surface layer of the fungal sheath.

Plate 22. A, D-E and G-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); B-C, differential interference micrographs of a mycorrhizal type (magnification: x182.5 and 365, respectively); F, stereoscopic micrograph; A, surface of the fungal sheath of mycorrhizal type 82; B-E, mycorrhizal type 83; B-C, cystidia on surface of fungal sheath; D, surface layer of the fungal sheath; F-H, mycorrhizal type 84 (*Thelephoraceae* fungus); F, branching system of mycorrhizal tips; G-H, surface layer of the fungal sheath (H, with heaps of roundish cells).

Plate 23. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types

(magnification: x730 except for H, x365); A-C, mycorrhizal *type 84*; A, emanating hyphae; B, heaps of roundish cells on surface of the fungal sheath; D, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 85*; E-G, mycorrhizal *type 86*; E, surface layer of the fungal sheath; F-G, thick walled and enlarged emanating hyphae; H, surface of the fungal sheath of mycorrhizal *type 87* with scale like aggregation structure on it.

Plate 24. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-C, mycorrhizal *type 87*; A, scale like aggregation structure on surface of the fungal sheath; B, emanating hyphae; C, surface layer of the fungal sheath; D-F, mycorrhizal *type 88*; D-E, scale like aggregation structure on surface of the fungal sheath; F, surface layer of the fungal sheath; G-H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 89*.

Plate 25. A-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-B, surface of the fungal sheath of mycorrhizal *type 90*; C-E, mycorrhizal *type 91*; C-D, surface layer of the fungal sheath stained with cotton blue and toluidine blue; E, emanating hyphae stained with cotton blue and toluidine blue; F-G, mycorrhizal *type 92*; F, surface layer of the fungal sheath; G, verrucose emanating hyphae; H, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 93*.

Plate 26. A-F, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 94*; B-C, mycorrhizal *type 95*; B, surface layer of the fungal sheath; C, verrucose emanating hyphae; D-E, mycorrhizal *type 96*; D, surface layer of the fungal sheath; E, verrucose emanating hyphae; F, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 97*; G, fungal colonies of *Cenococcum geophilum* isolates growing on MNC agar medium.

Plate 27. A, stereoscopic micrograph; B-H, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-C, mycorrhizal *type 98* (*C. geophilum*); A, view of a mycorrhizal tip; B-C, surface layer of the fungal sheath; D-E, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 99*; F-G, surface layer of the fungal sheath of mycorrhizal *type 100* stained with cotton blue and toluidine blue; H, surface of the fungal sheath of mycorrhizal *type 101* almost covered with black secretion or deposition

like scale.

Plate 28. A-F, differential interference micrographs of mycorrhizal types (magnification: x730); A-B, mycorrhizal *type 101*; A, surface of the fungal sheath almost covered with black secretion or deposition like scale; B, surface layer of the fungal sheath; C-D, mycorrhizal *type 102*; C, surface layer of the fungal sheath; D, hyphal strand. E-F, mycorrhizal *type 103*; E, emanating hyphae; F, surface layer of the fungal sheath.

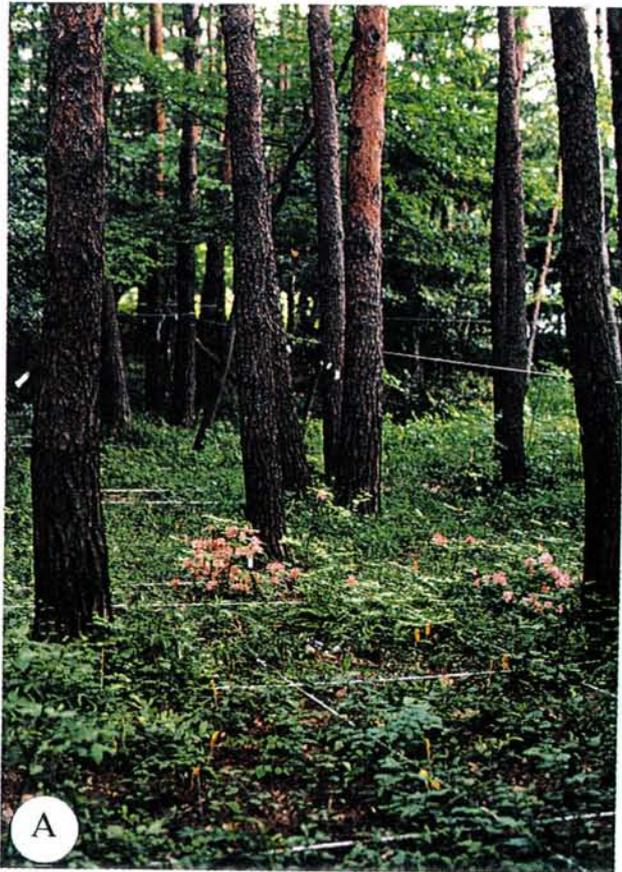


Plate 1

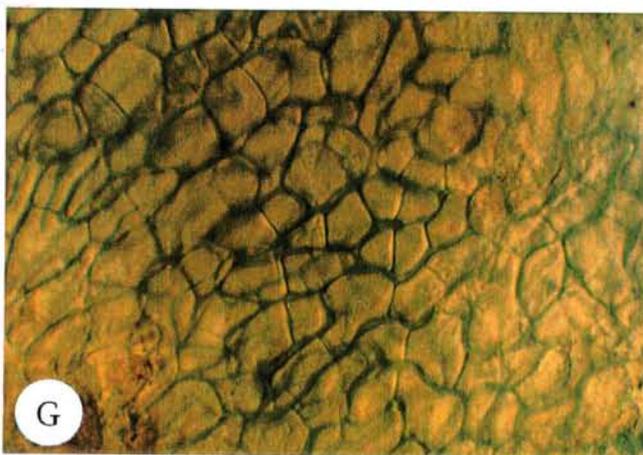
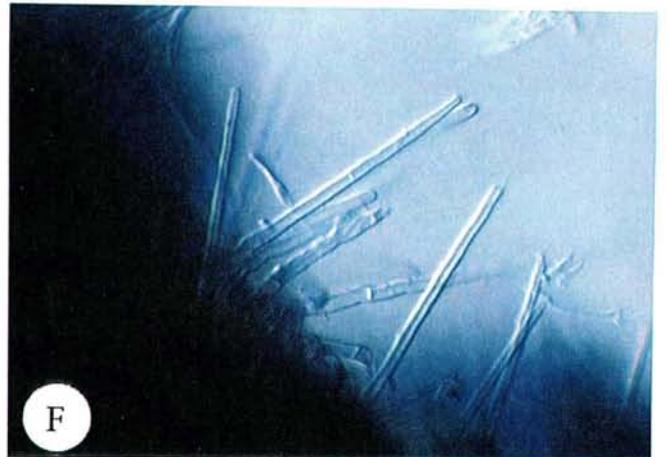
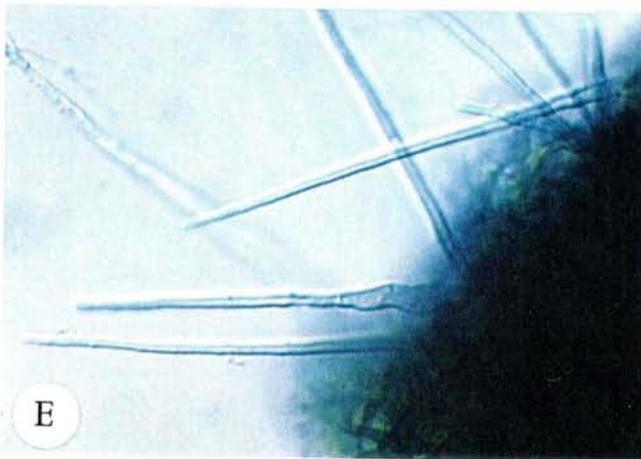
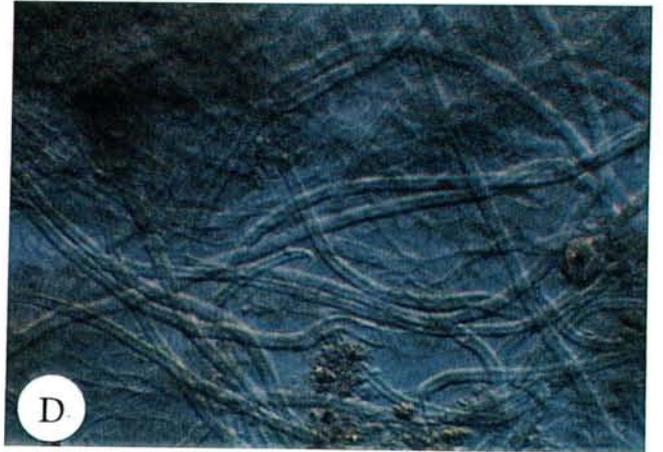


Plate 2

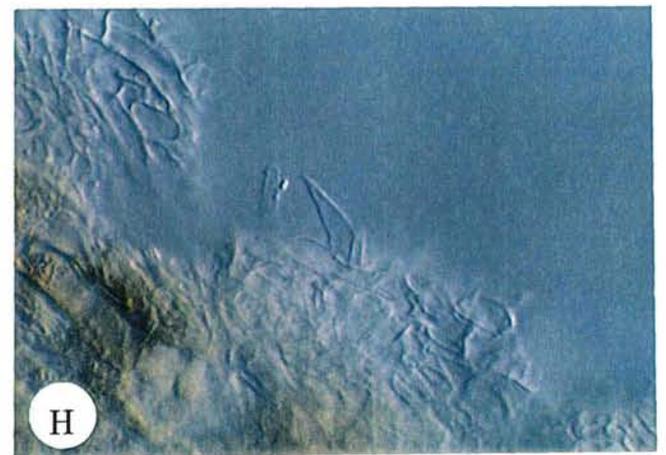
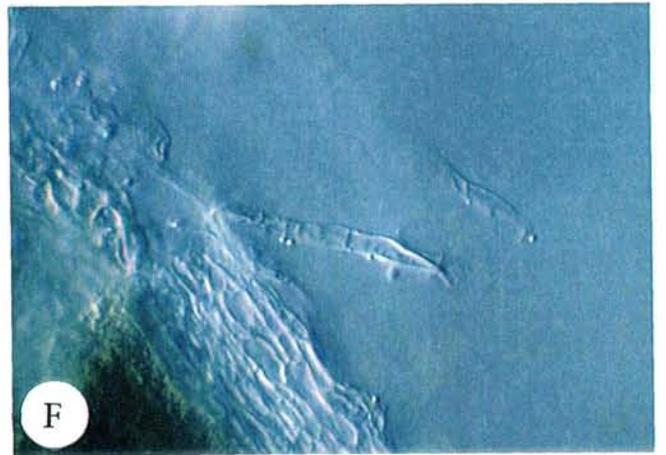


Plate 3

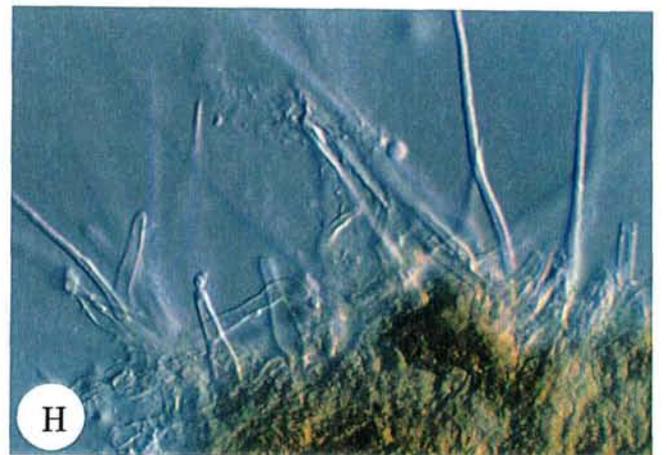
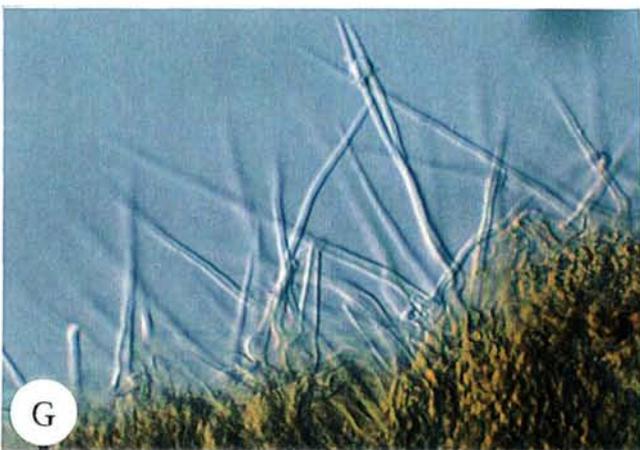
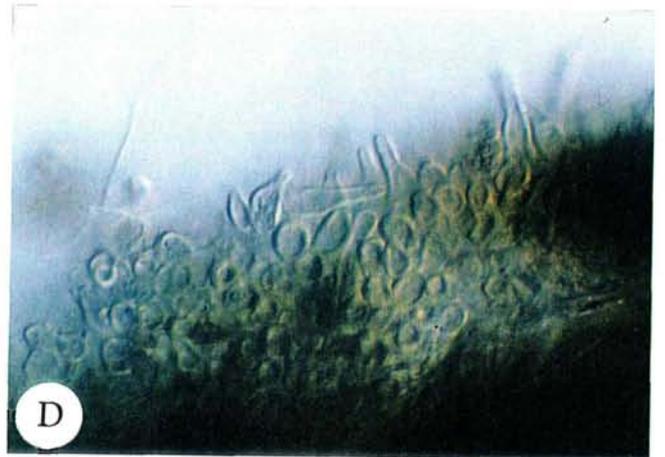
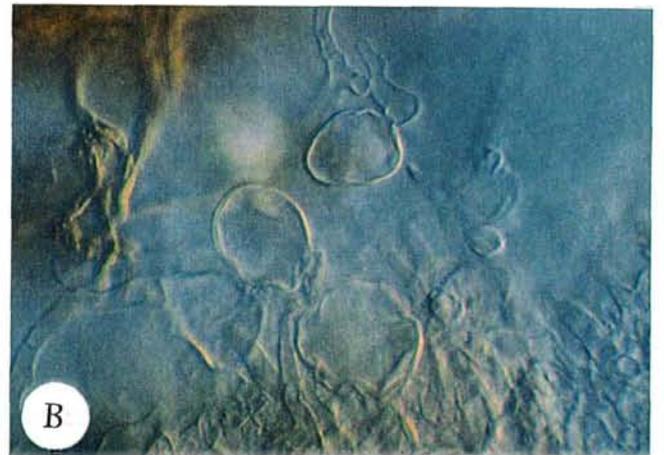
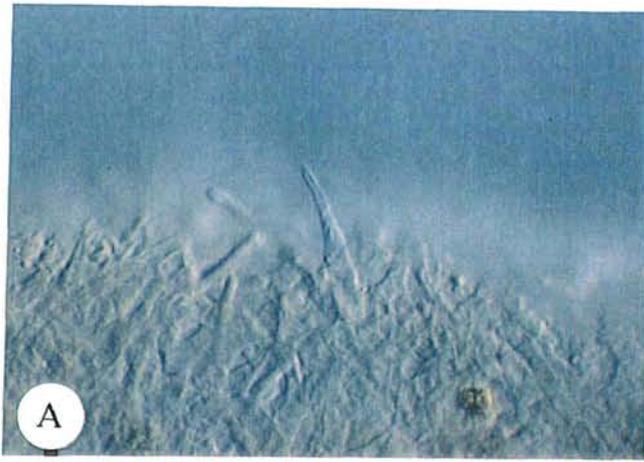


Plate 4

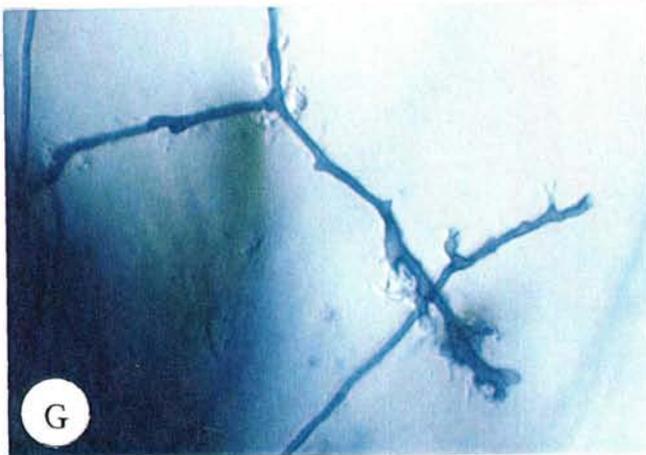
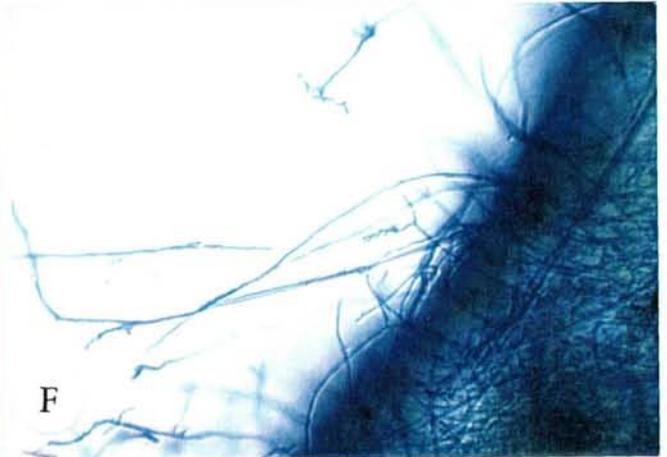
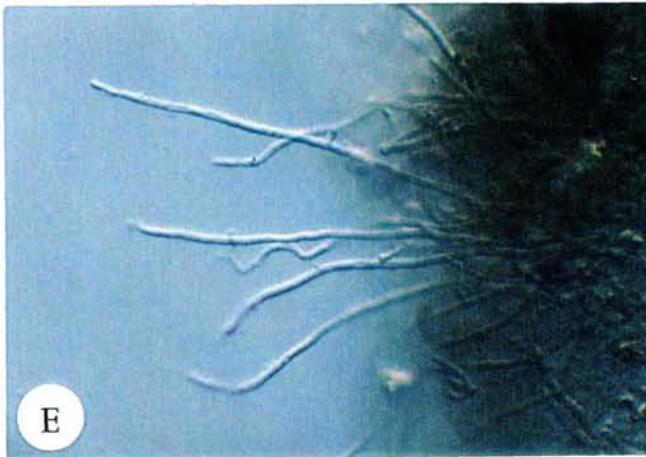
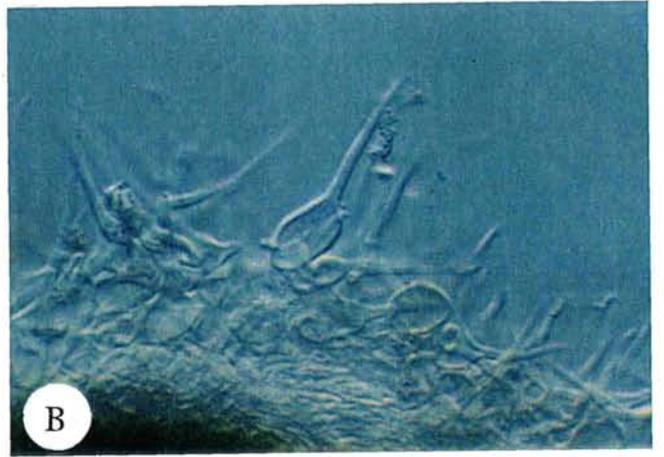
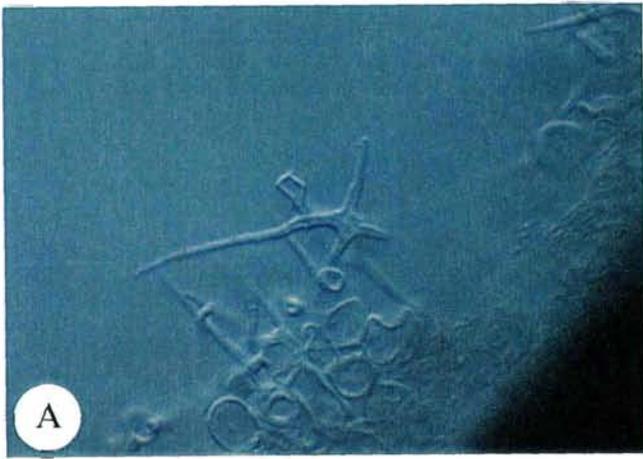


Plate 5

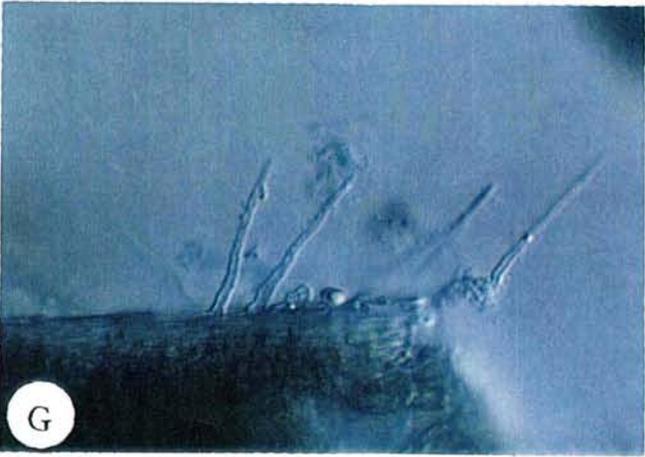
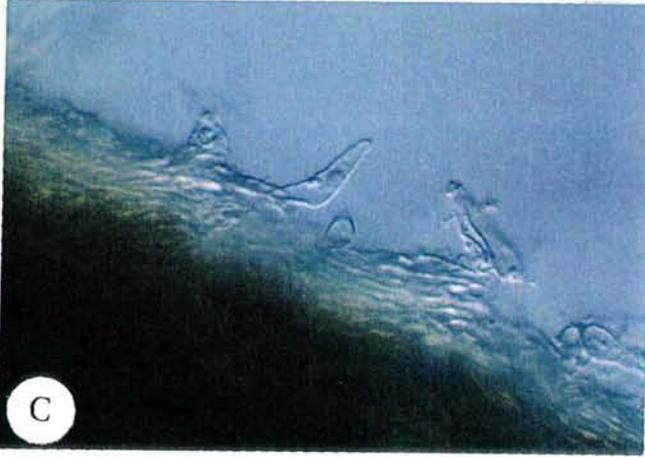
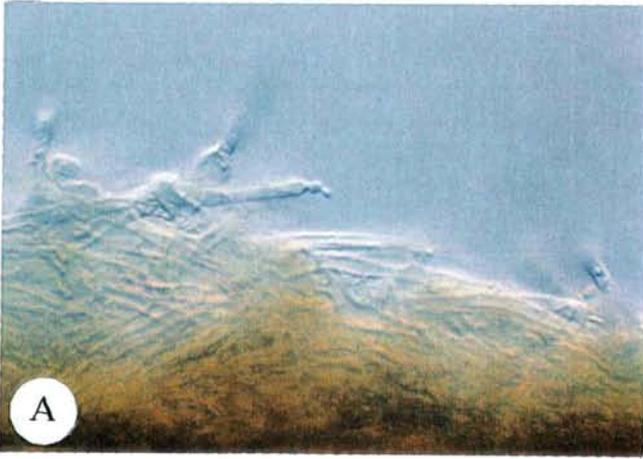


Plate 6

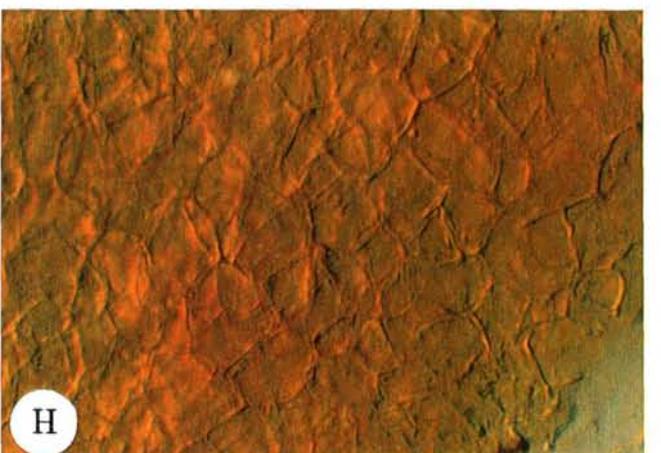
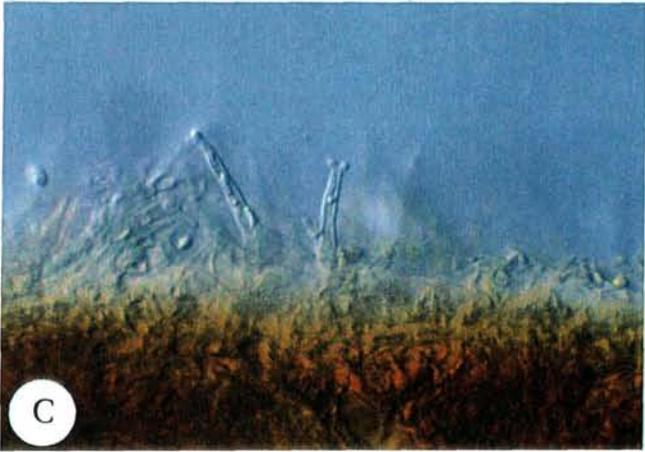
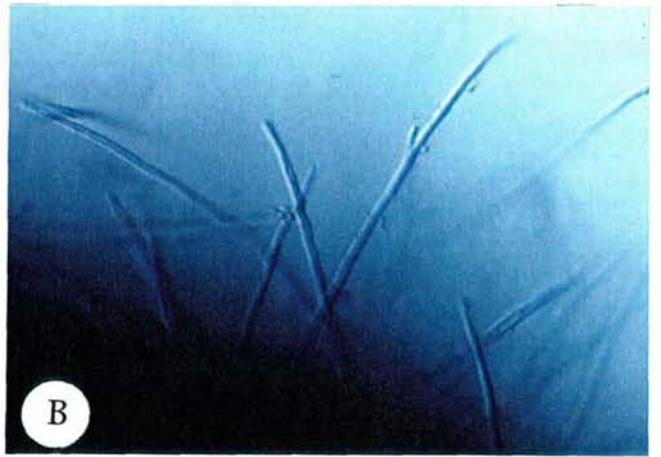
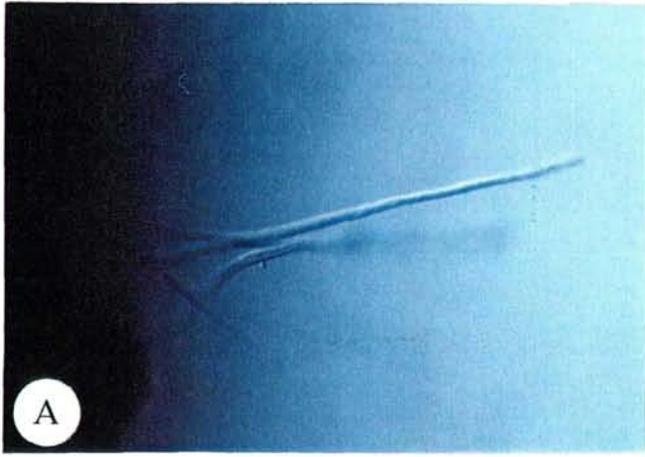


Plate 7

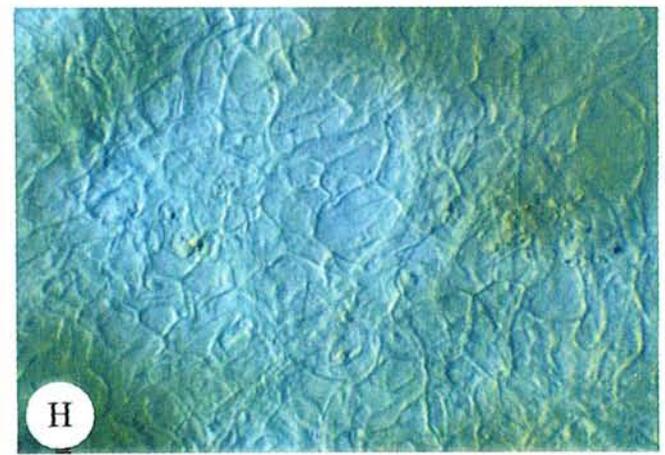
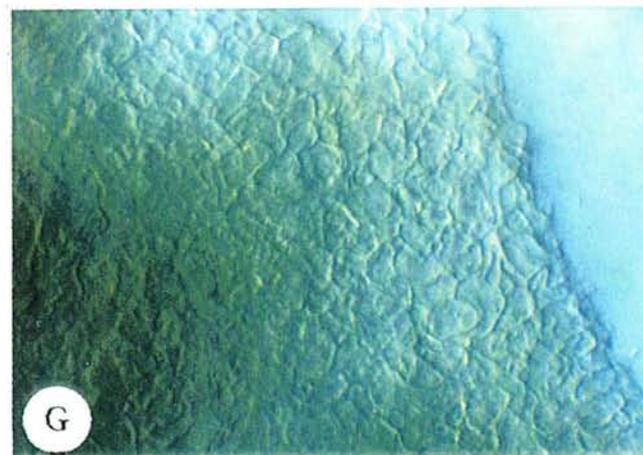
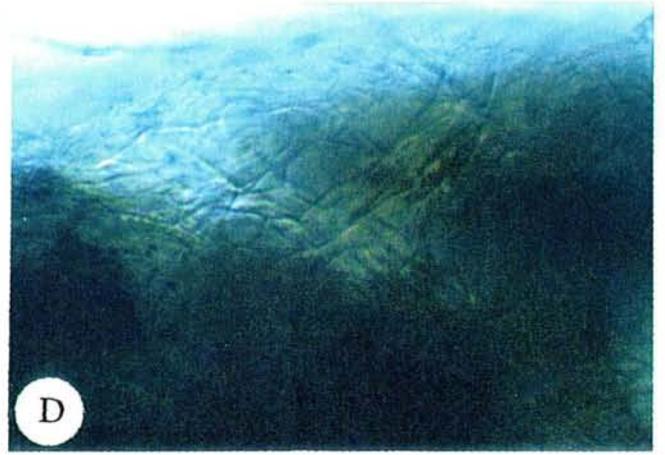
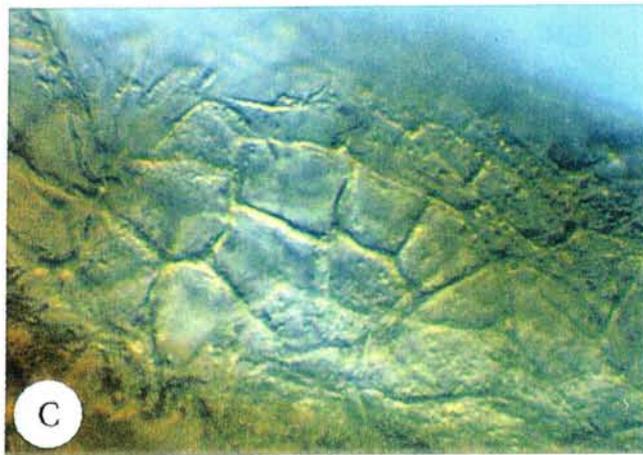
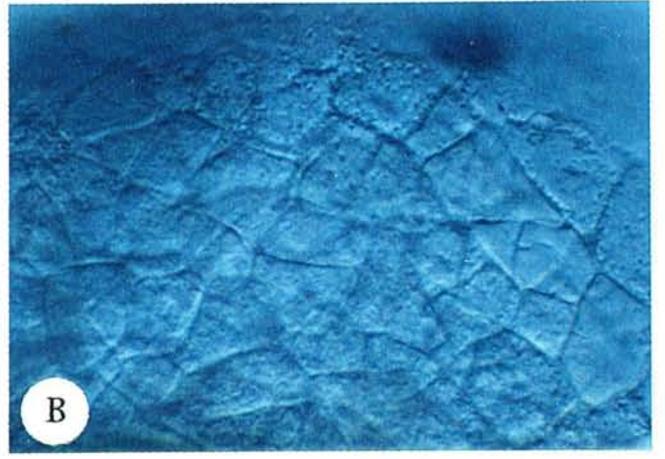
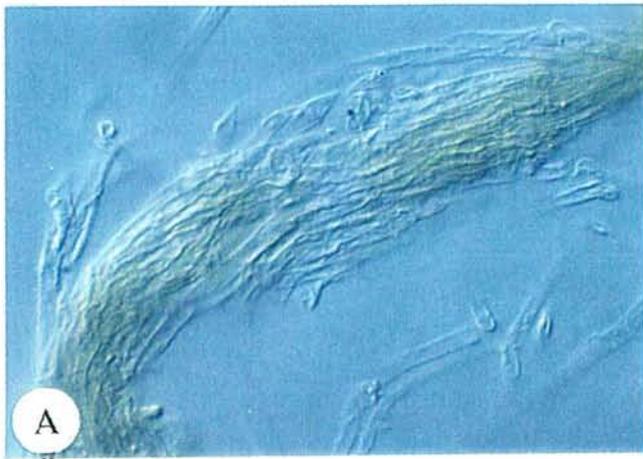


Plate 8

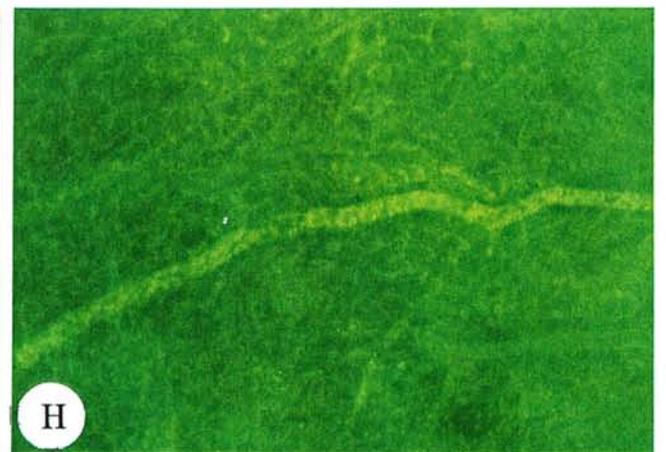
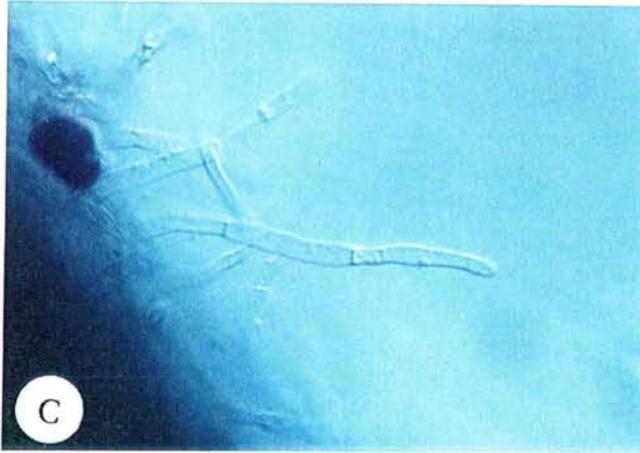
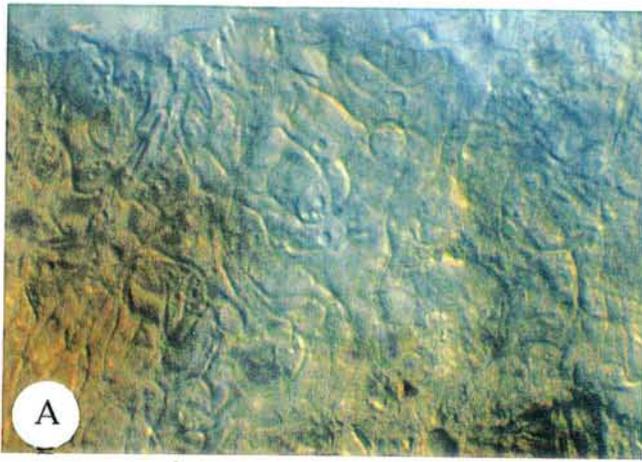


Plate 9

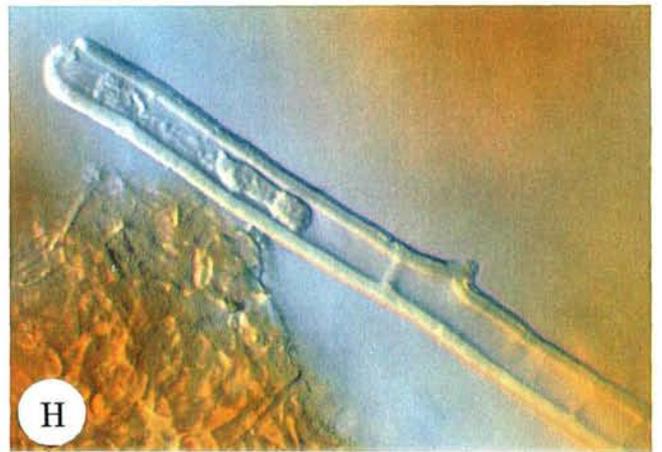
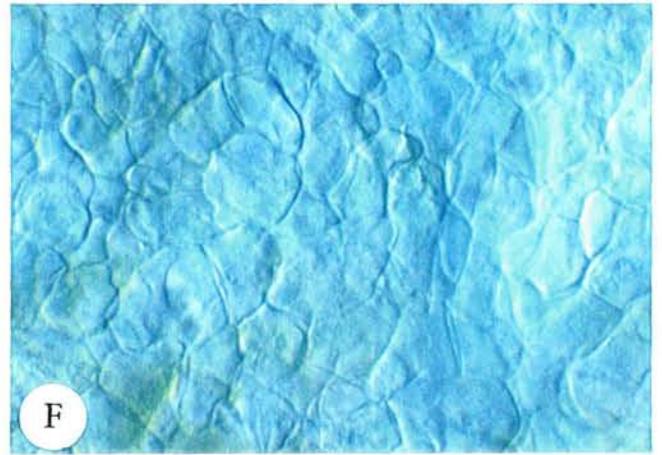
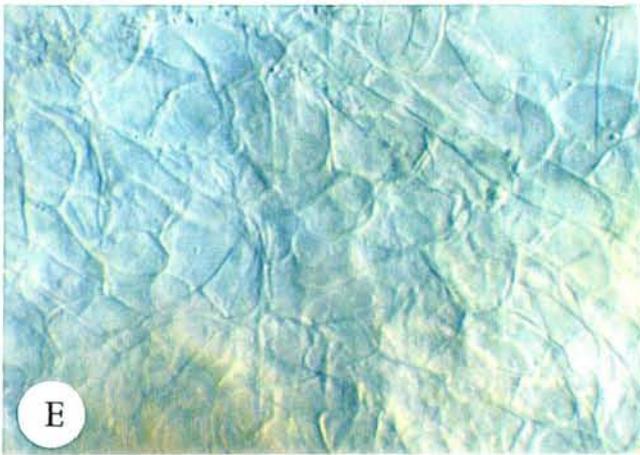
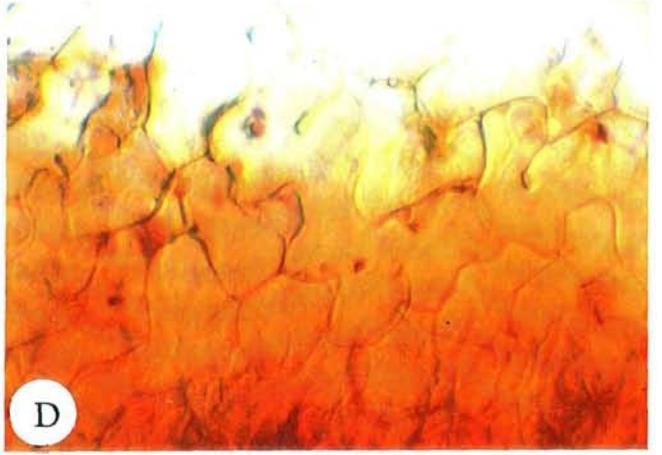
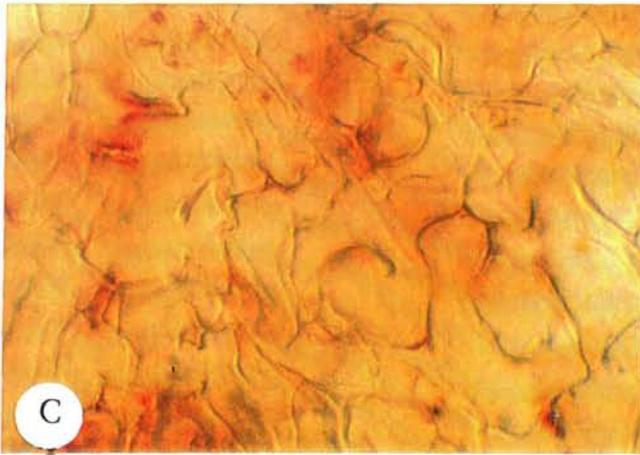
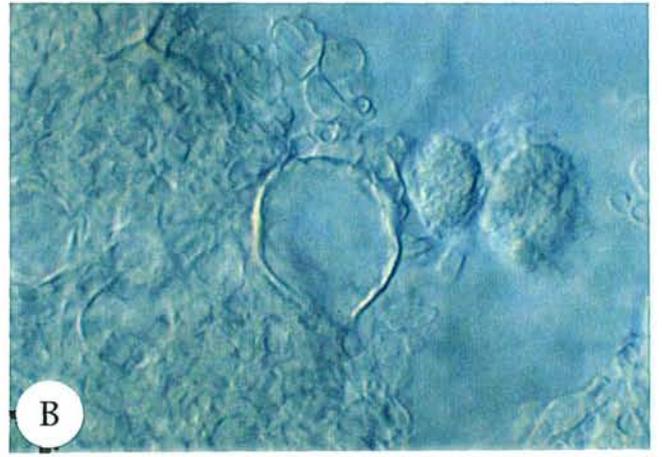


Plate 10

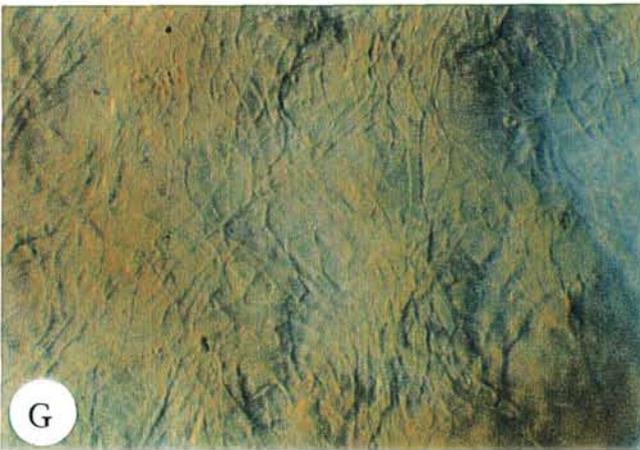
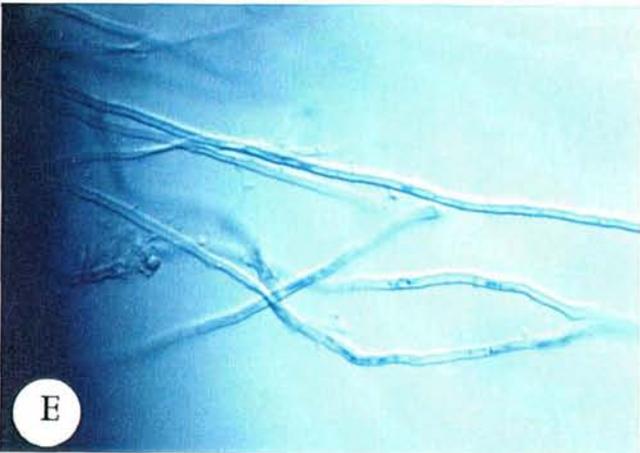
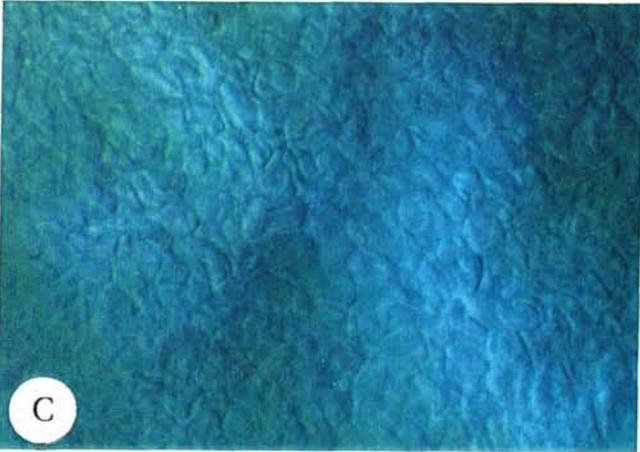
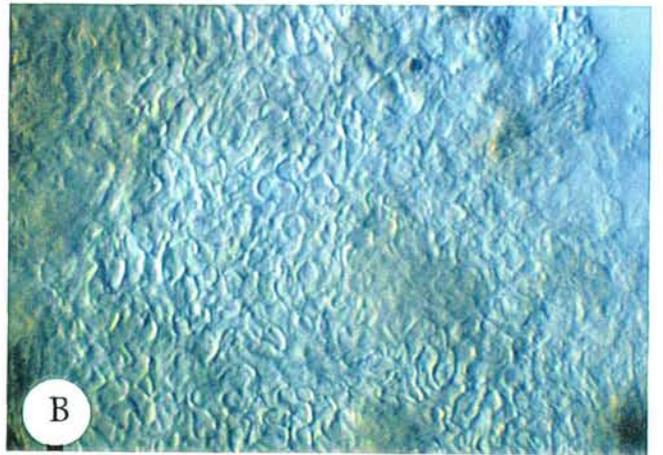
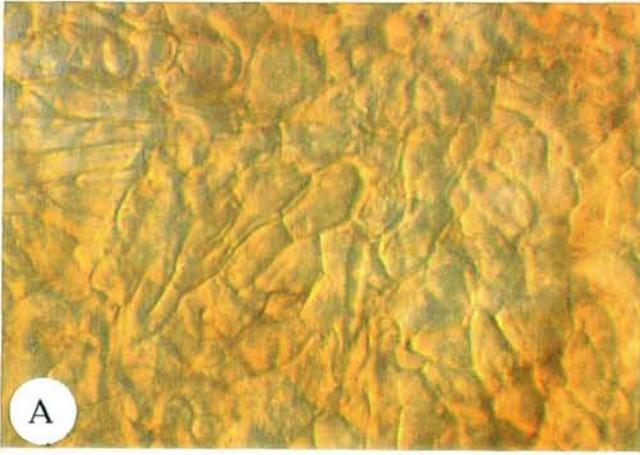


Plate 11

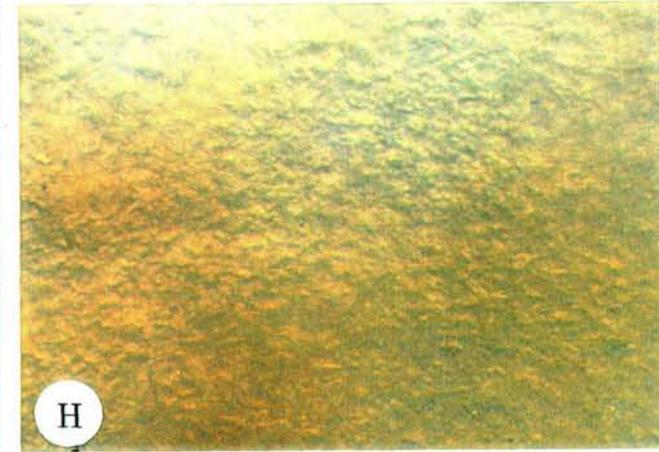
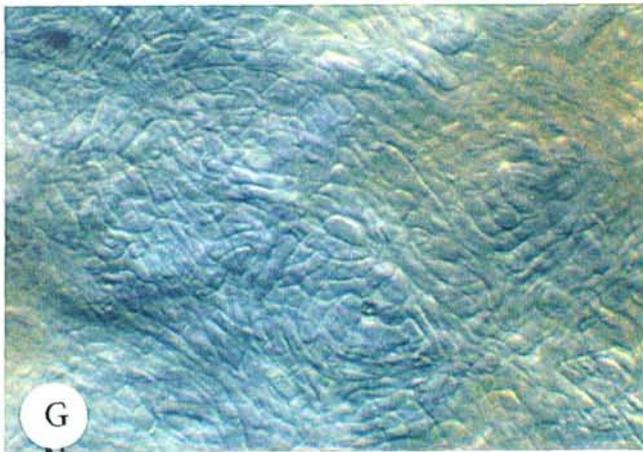
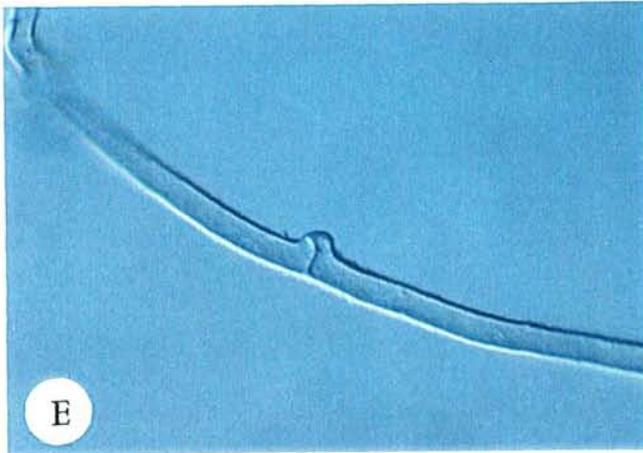
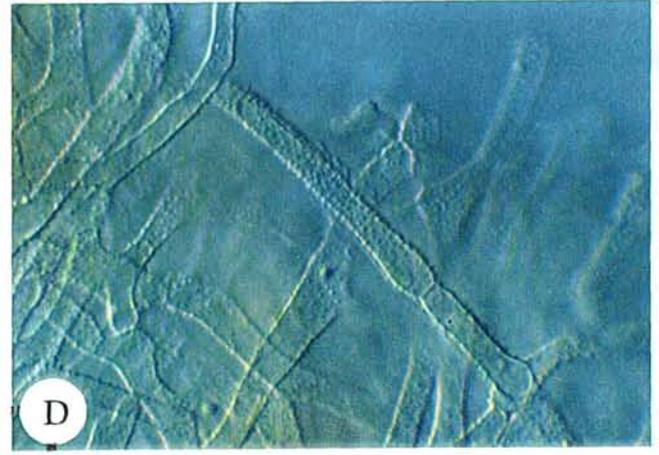
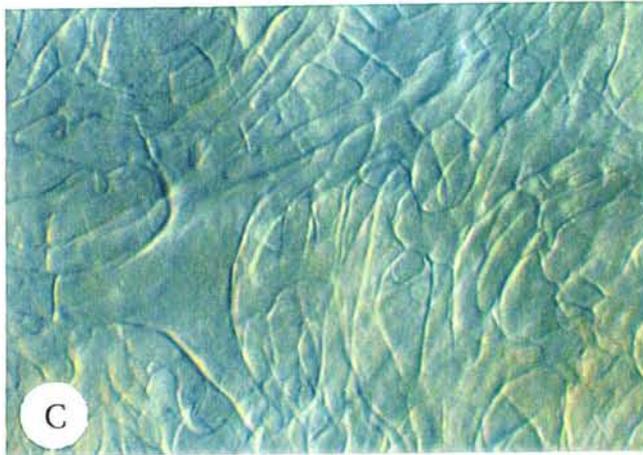
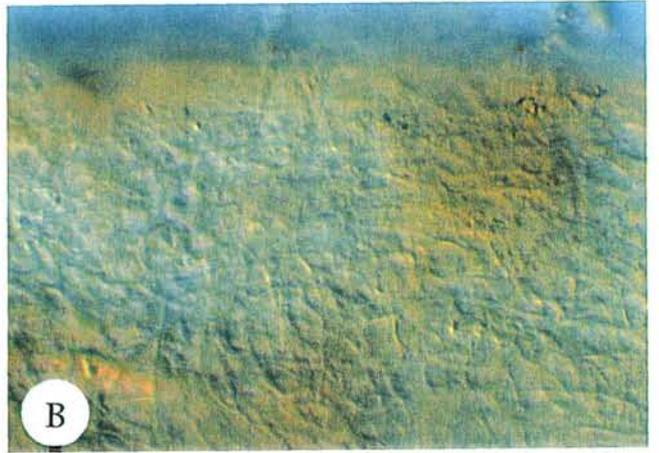


Plate 12

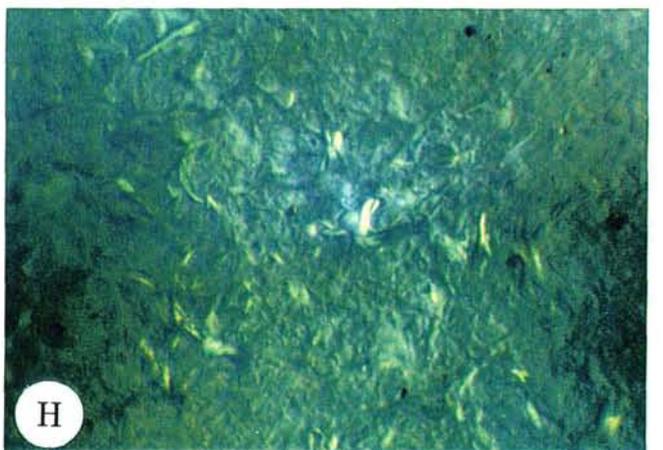
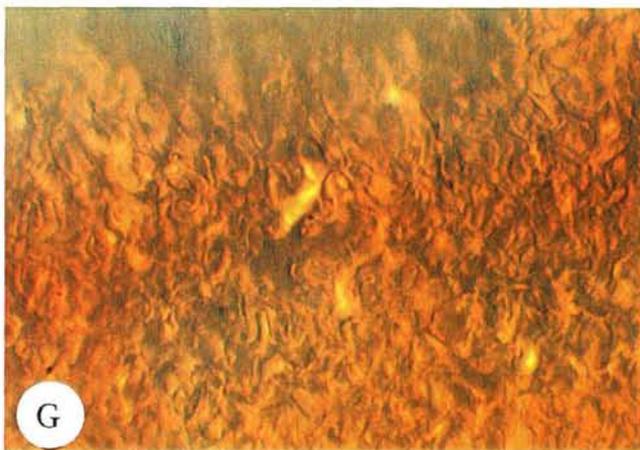
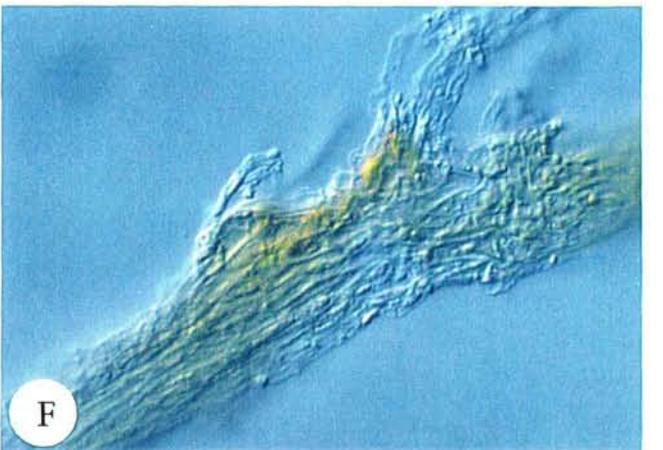
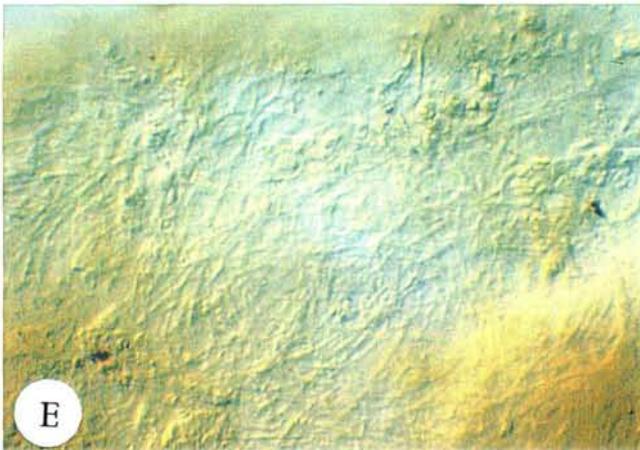
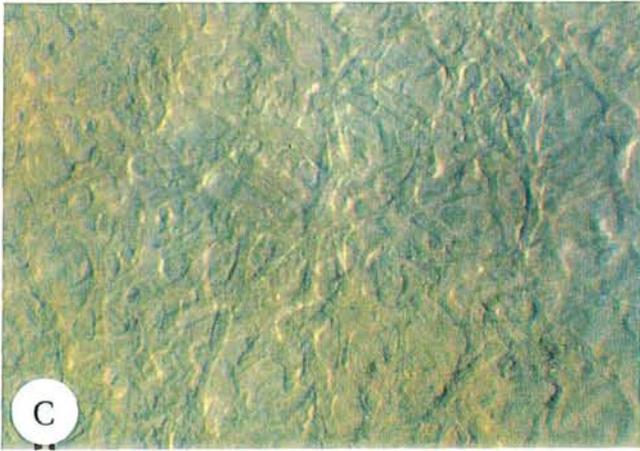
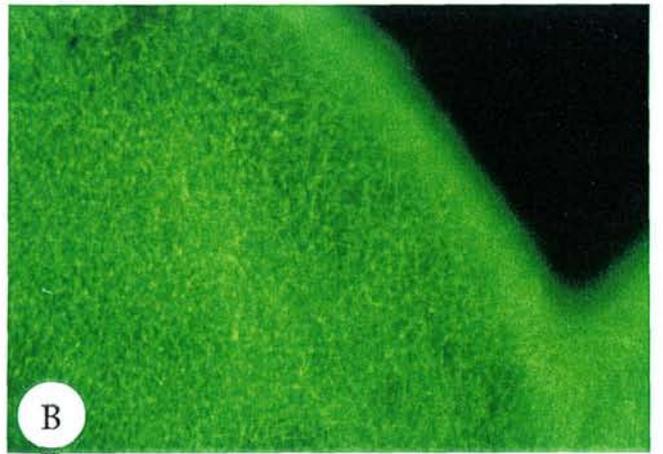
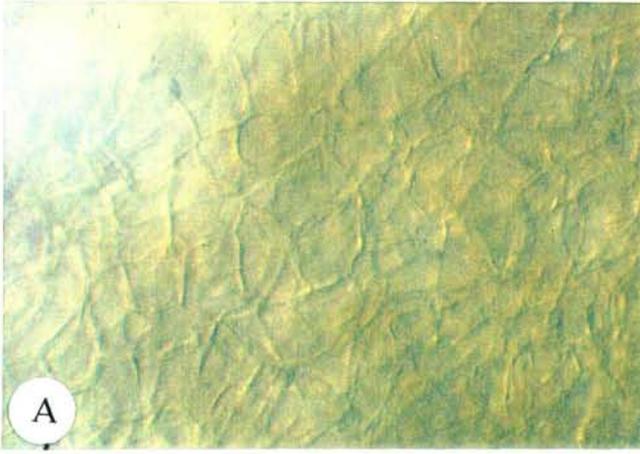


Plate 13

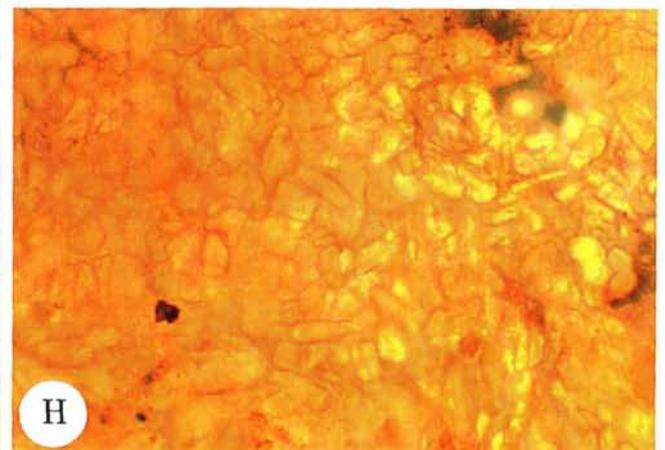
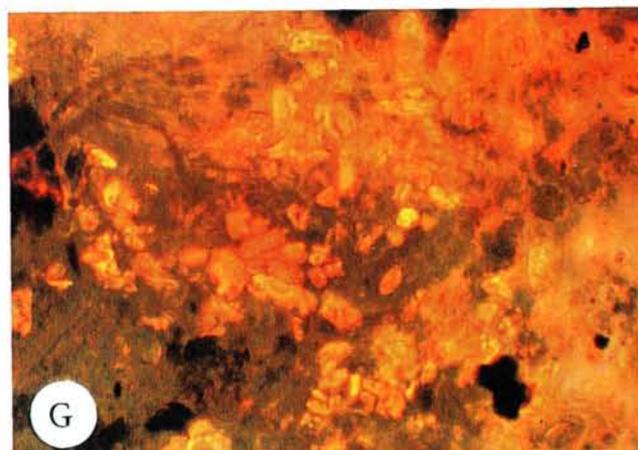
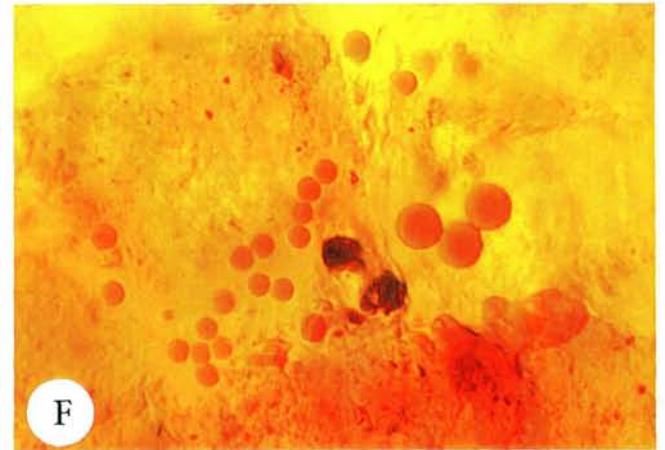
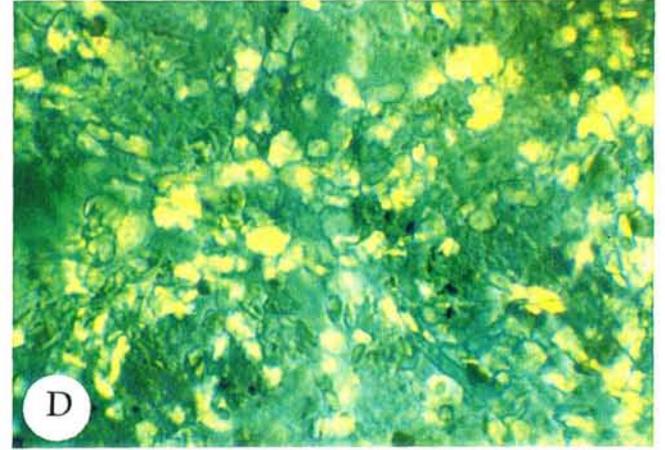
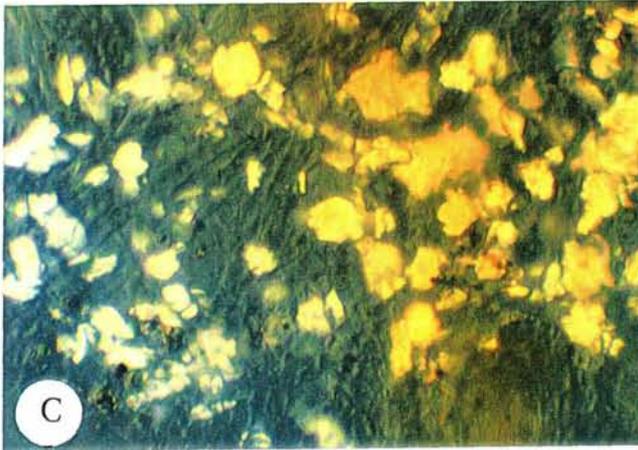
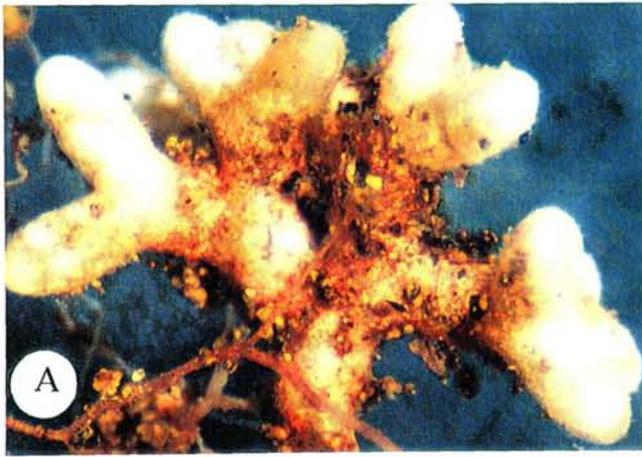


Plate 14

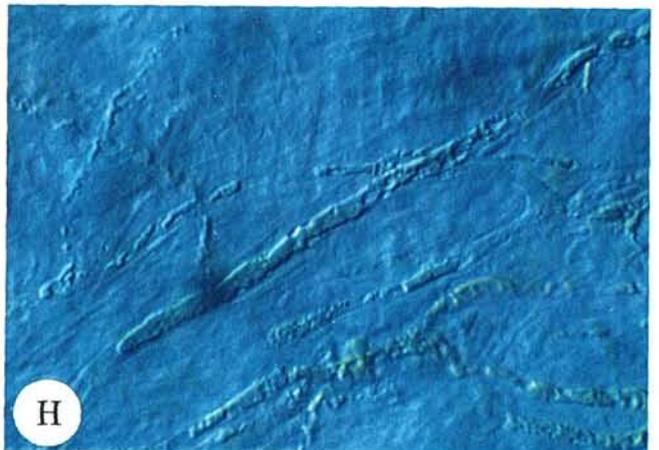
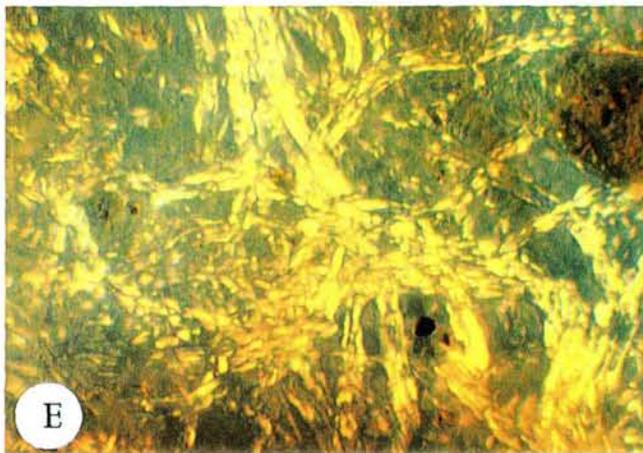
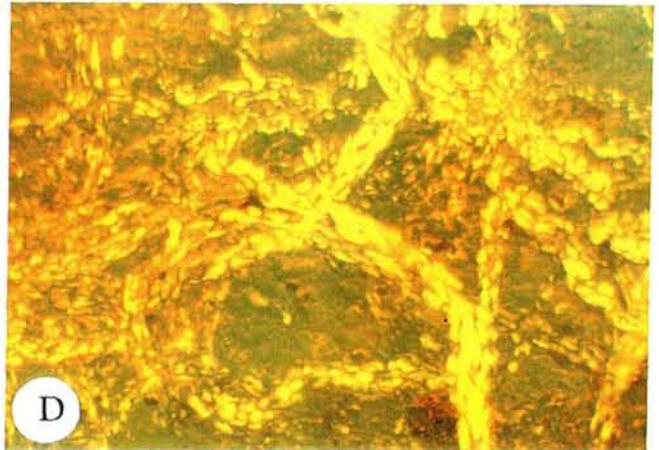
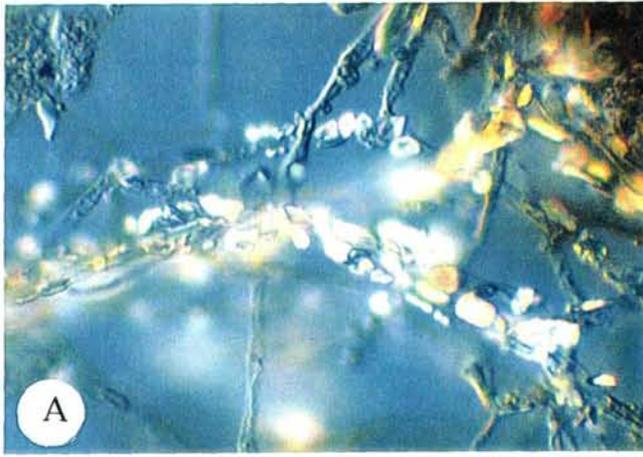


Plate 15

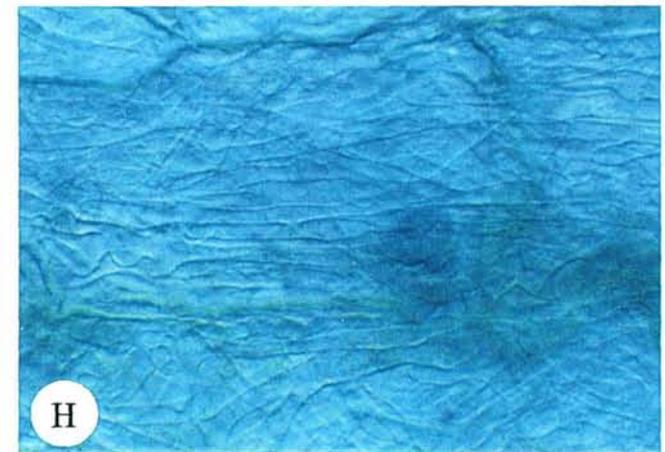
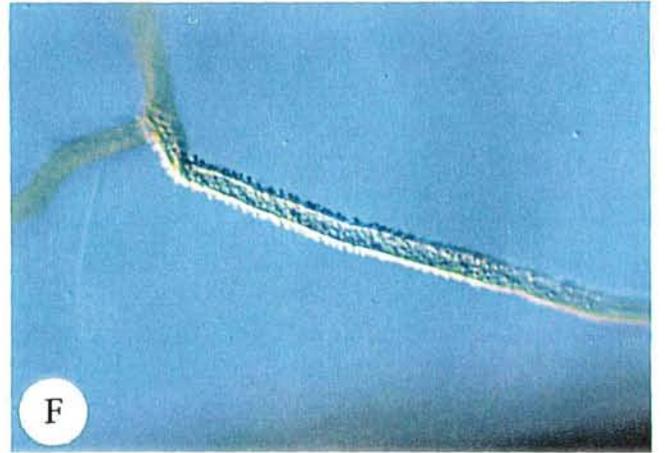
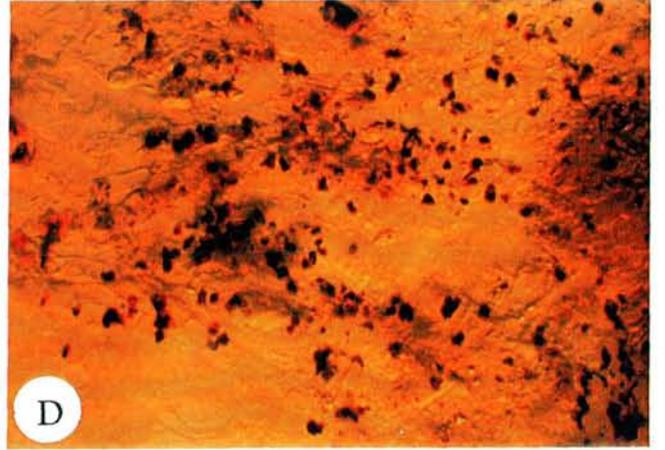
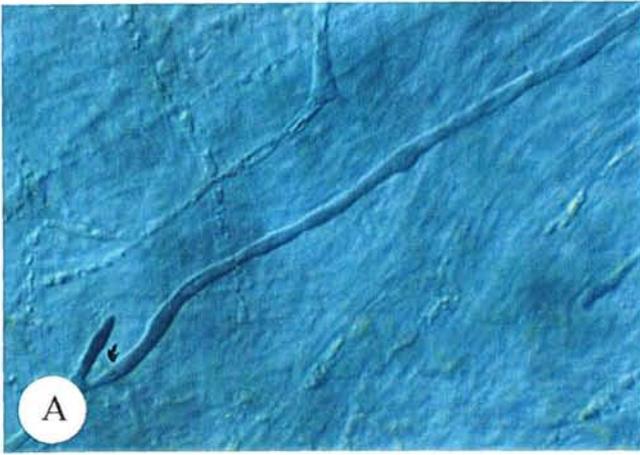


Plate 16

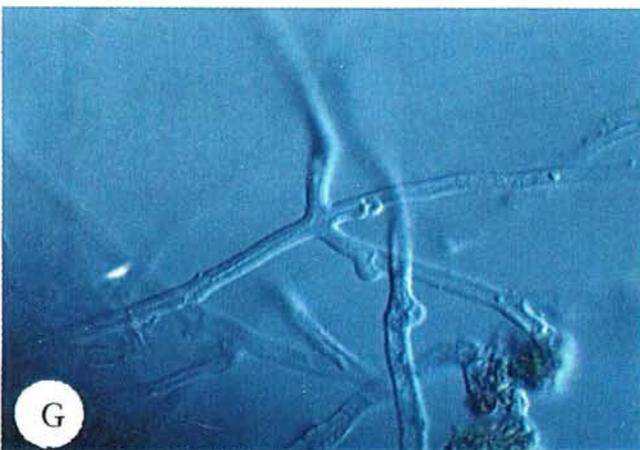
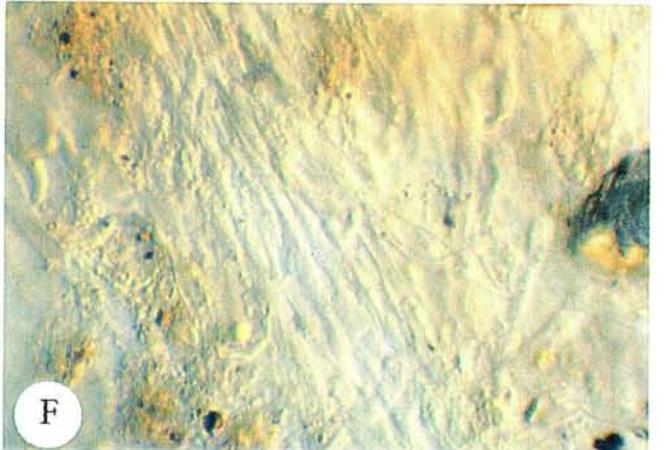
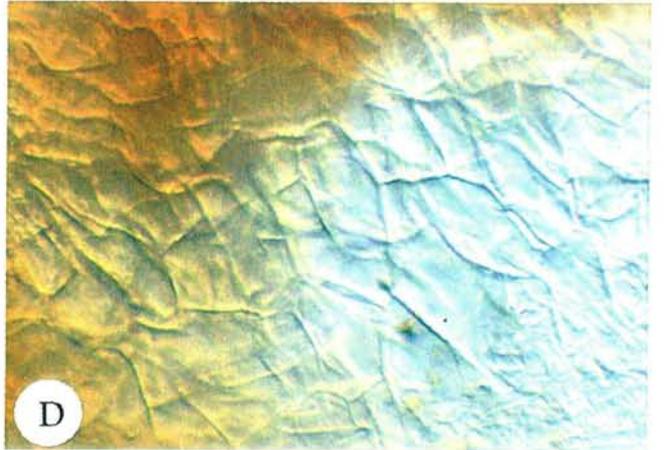
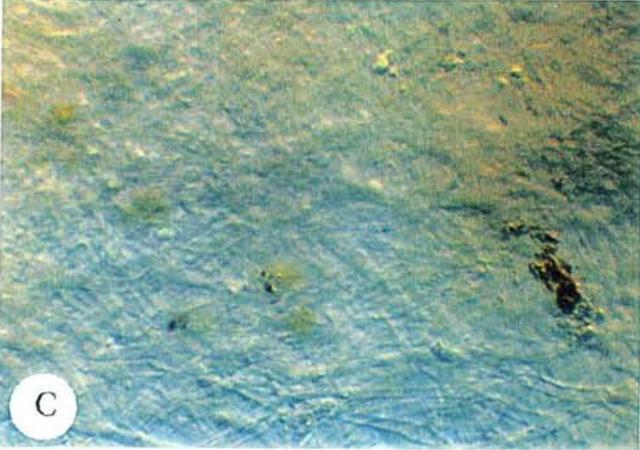
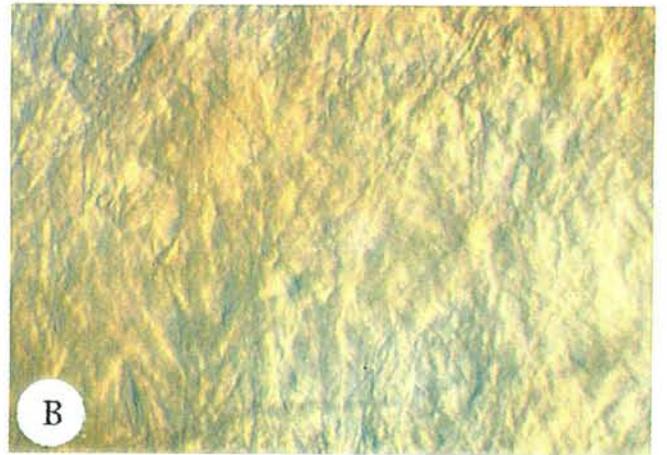
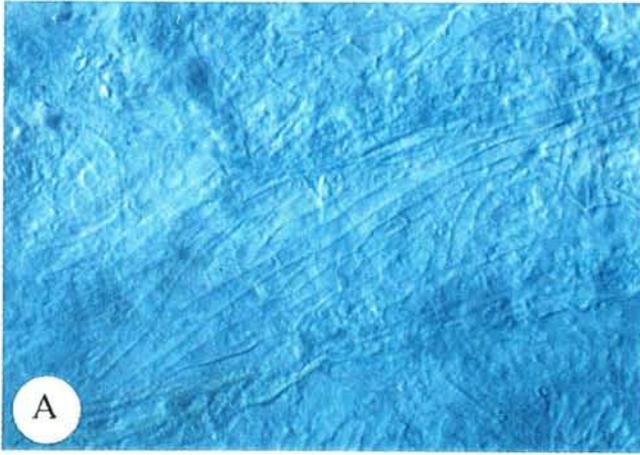


Plate 17

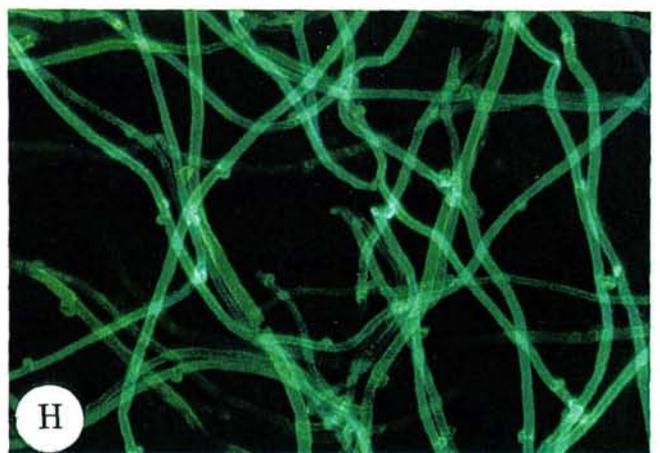
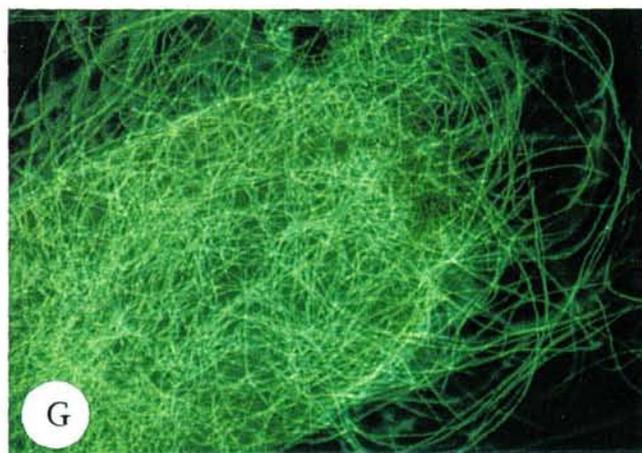
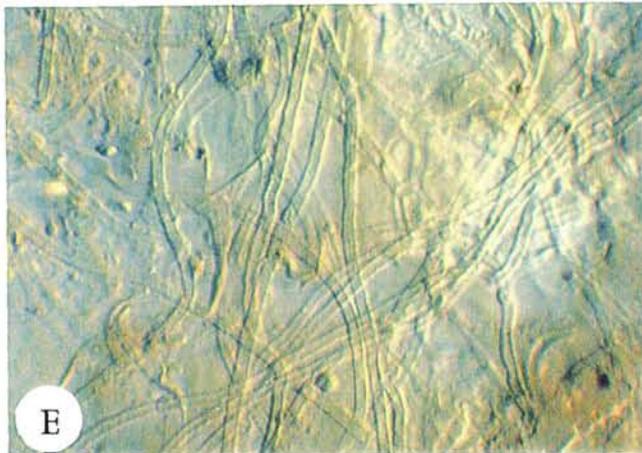
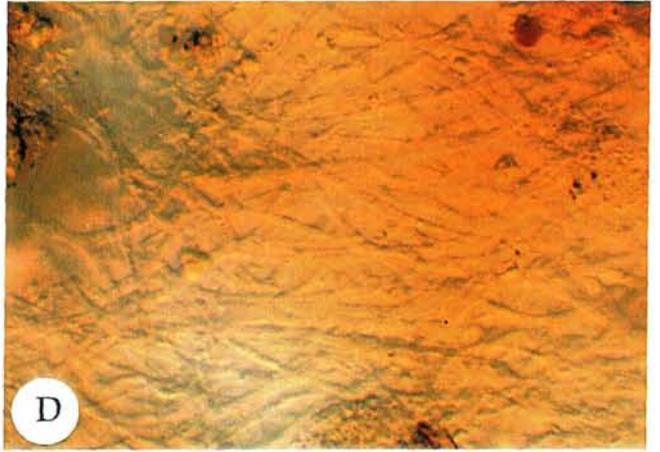
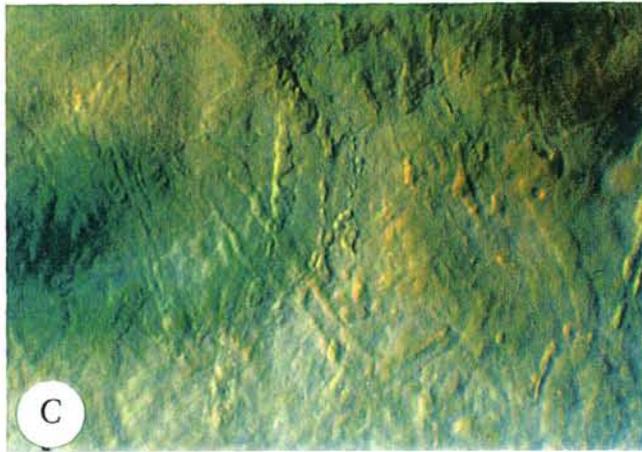
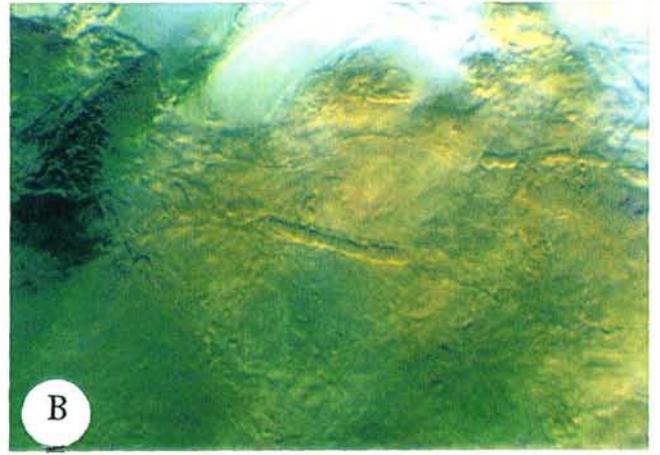
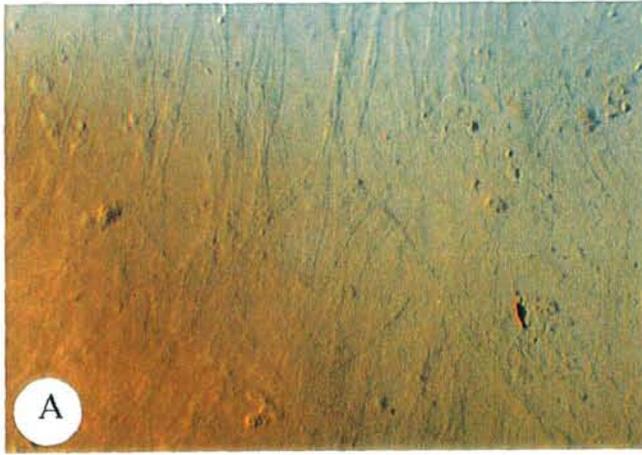


Plate 18

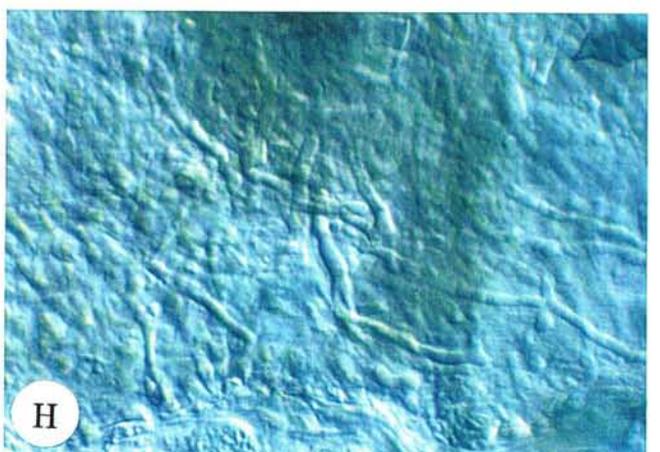
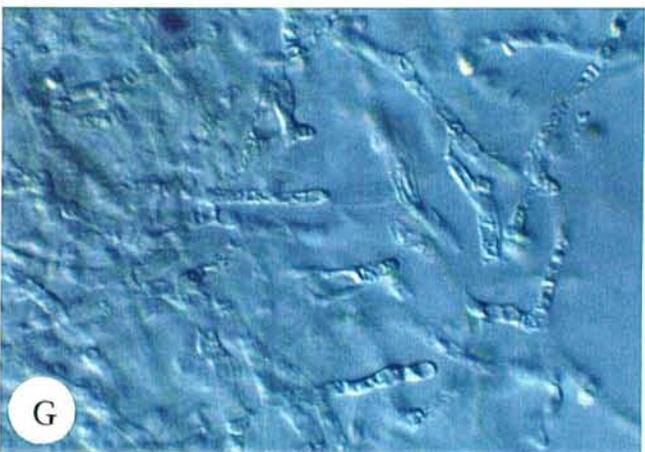
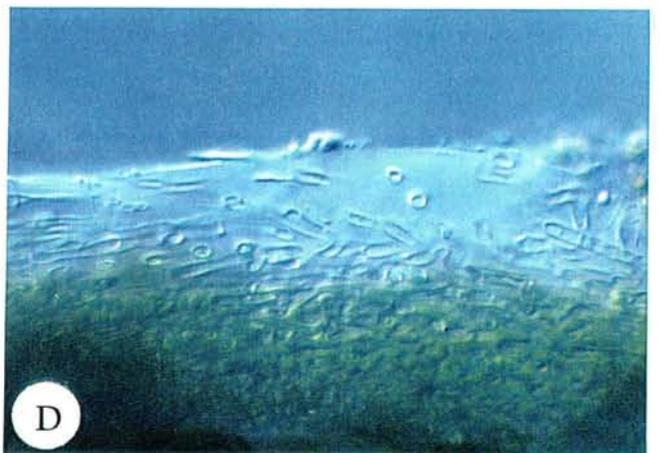
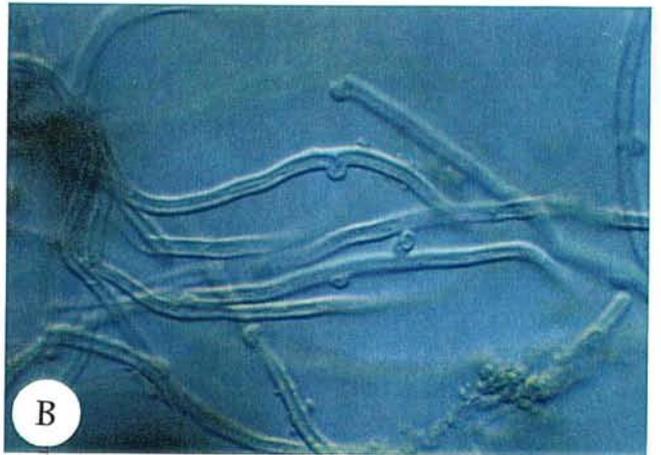


Plate 19

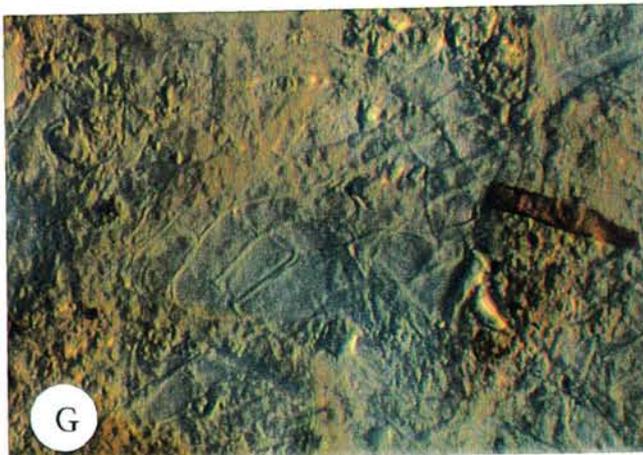
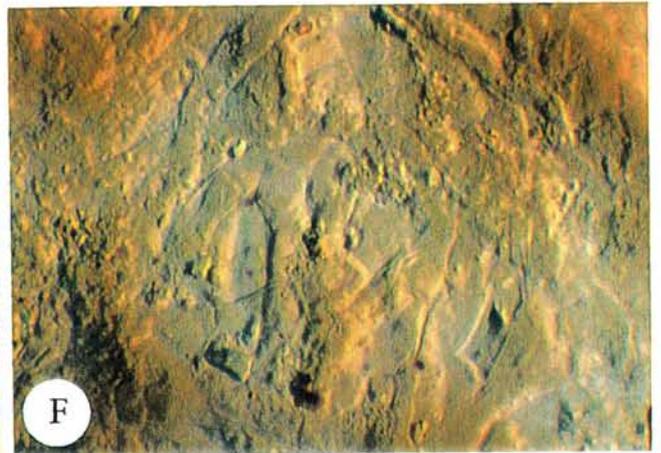
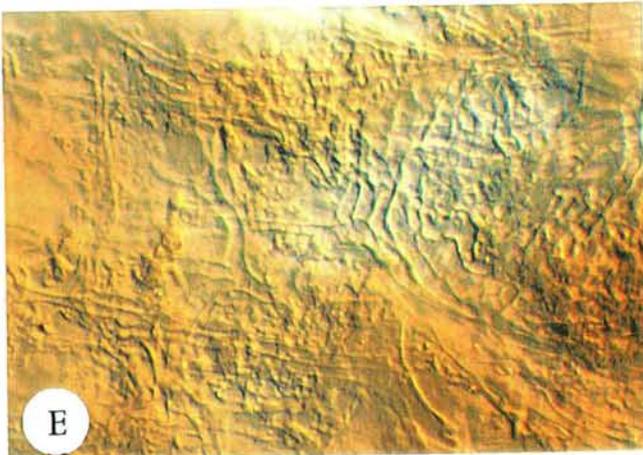
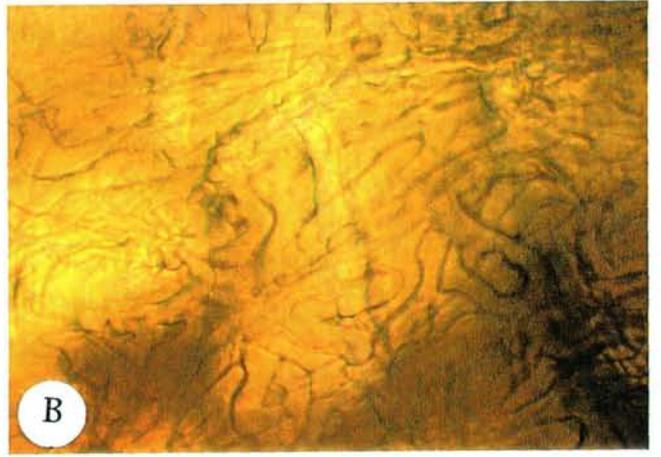


Plate 20

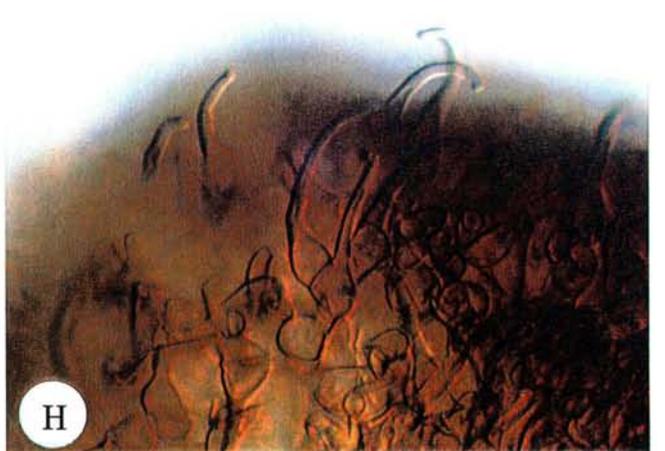
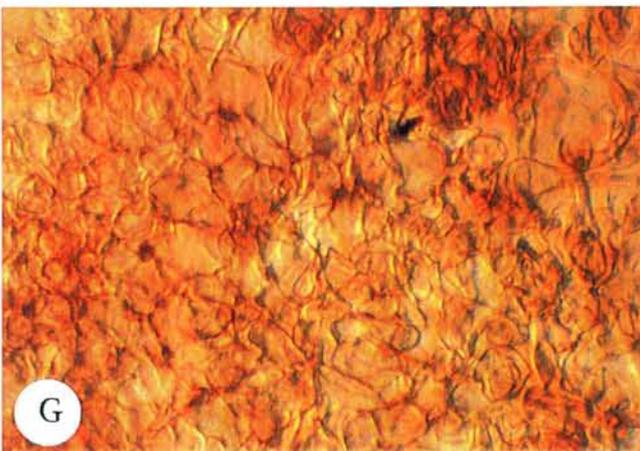
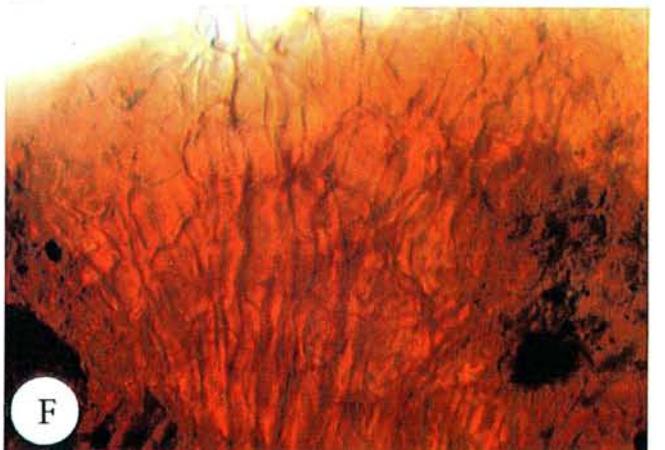
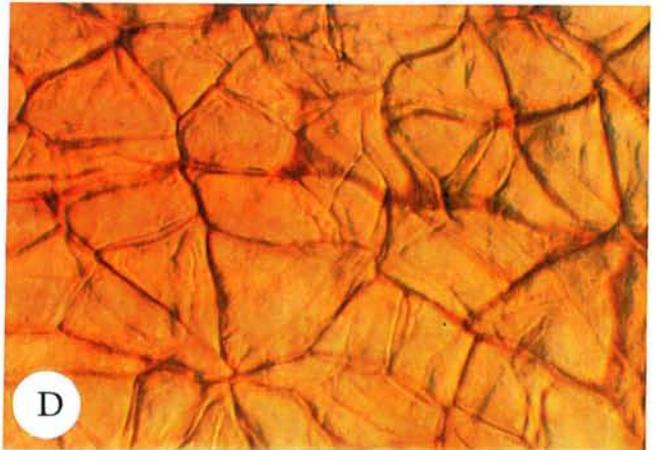
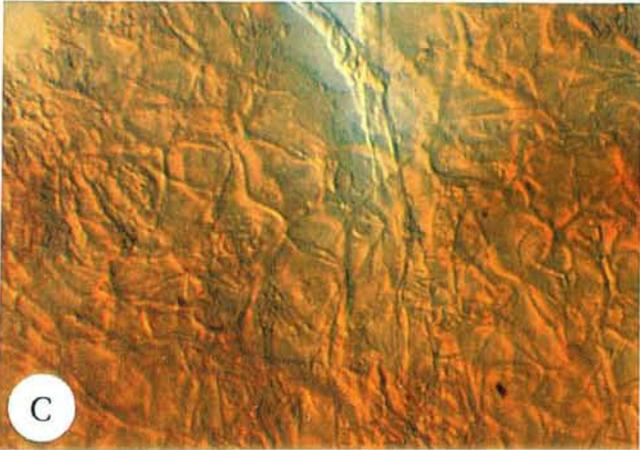
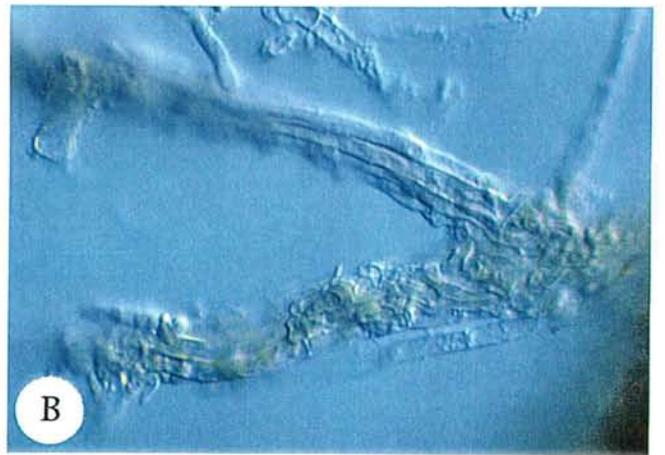
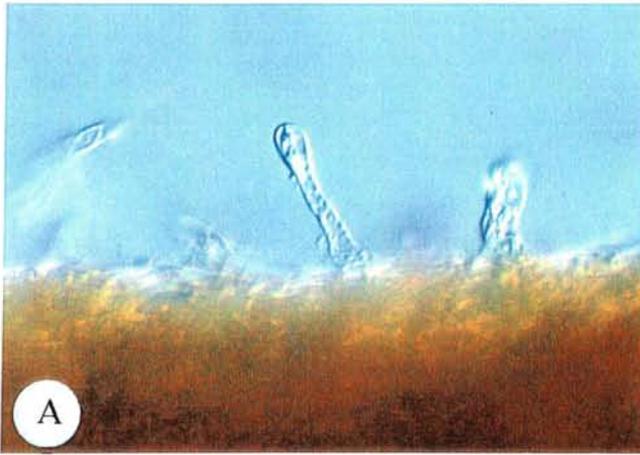


Plate 21

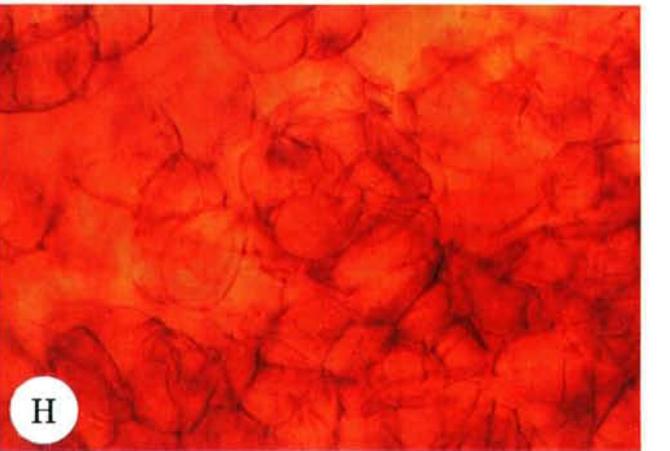
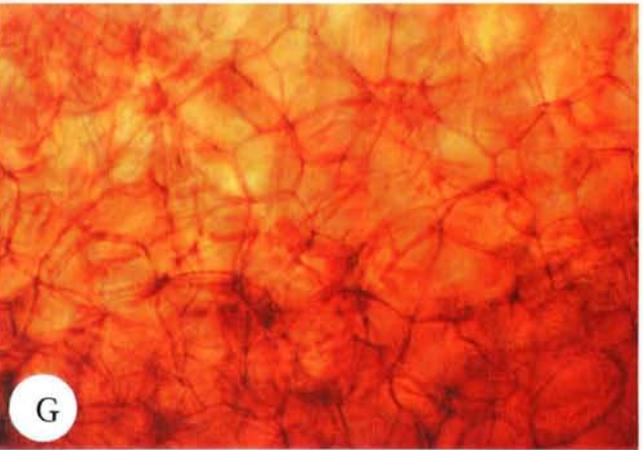
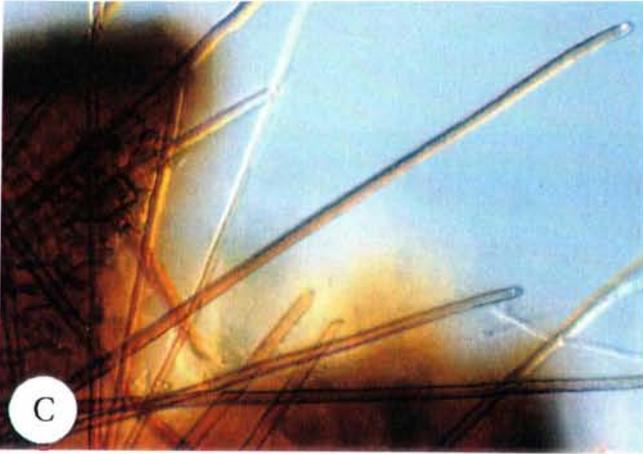


Plate 22

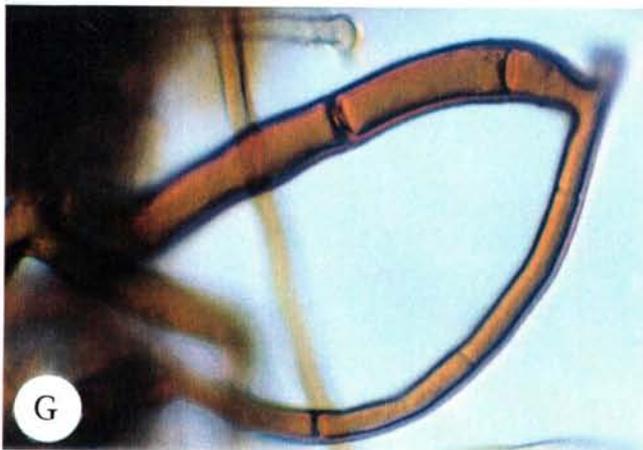


Plate 23

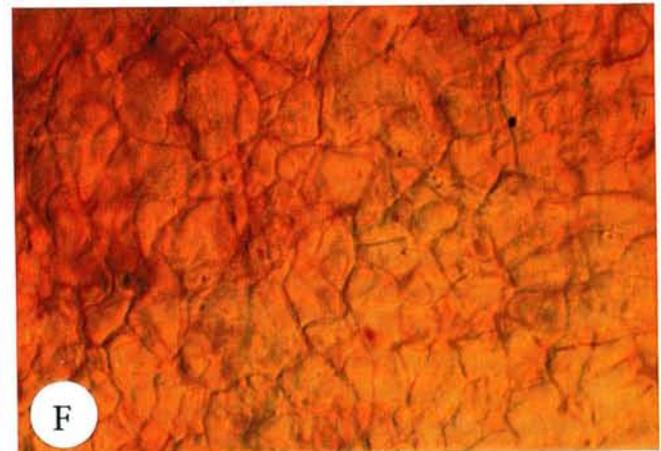
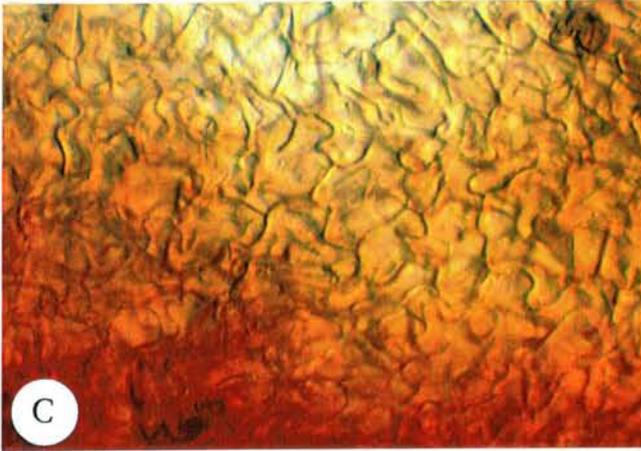


Plate 24

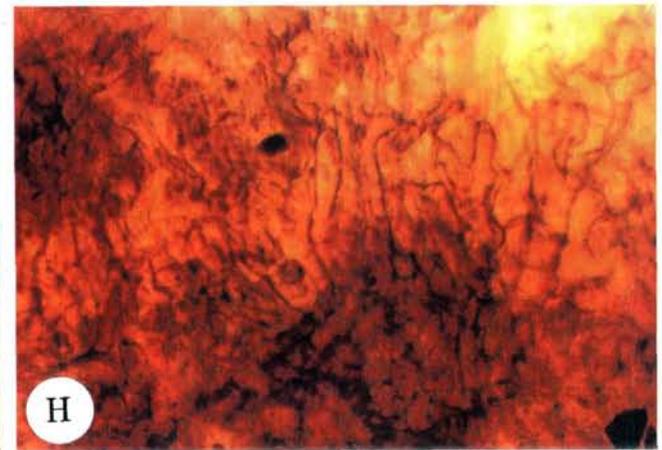
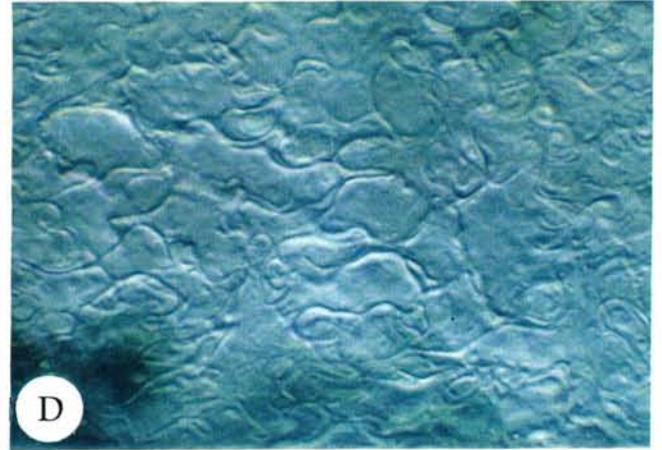
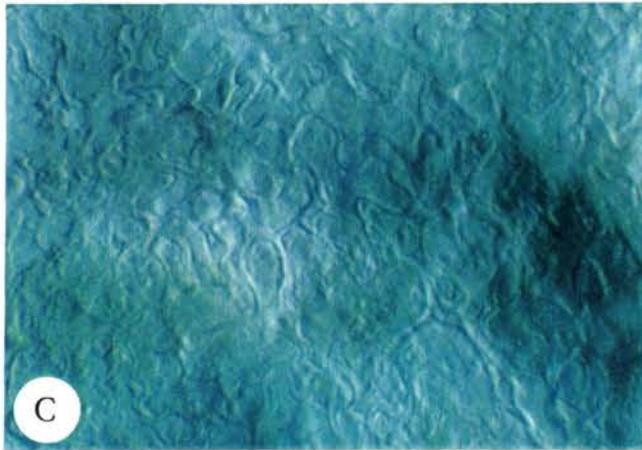
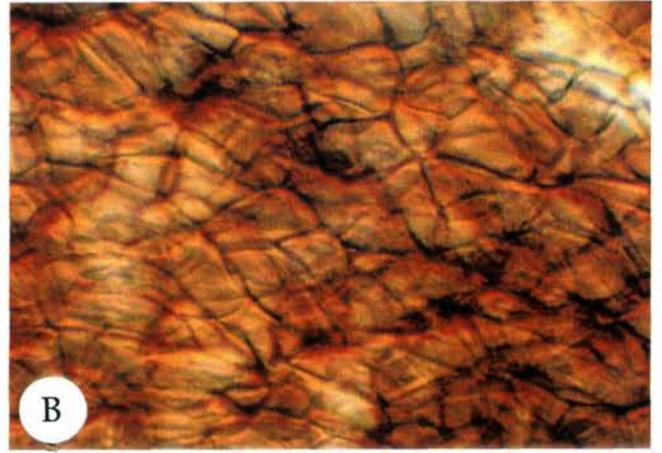
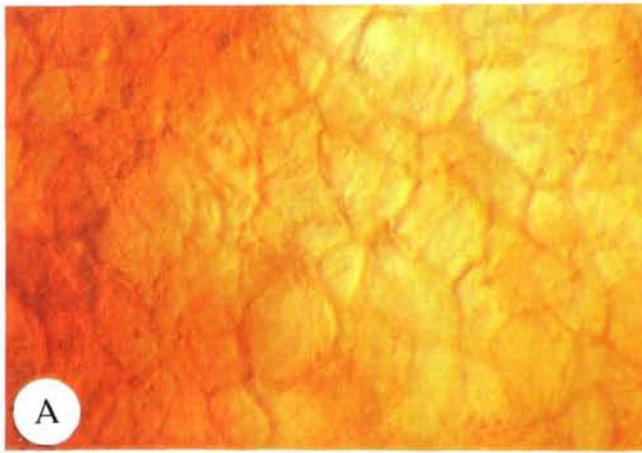


Plate 25

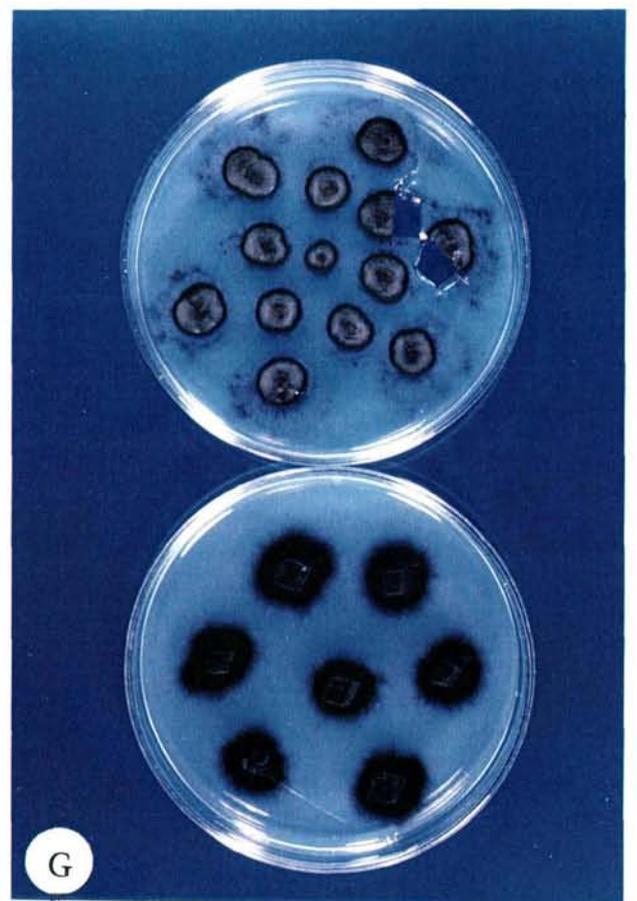
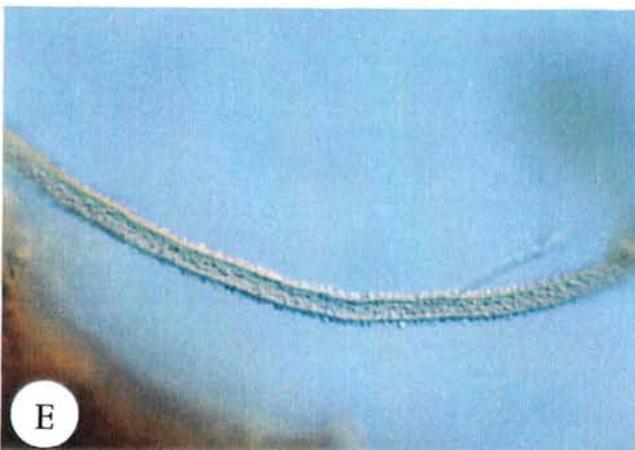
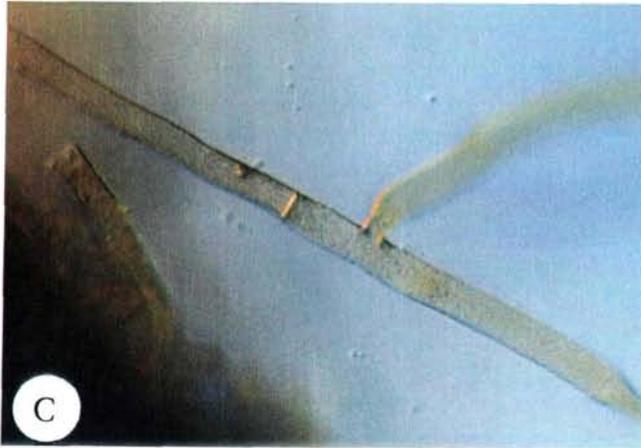


Plate 26

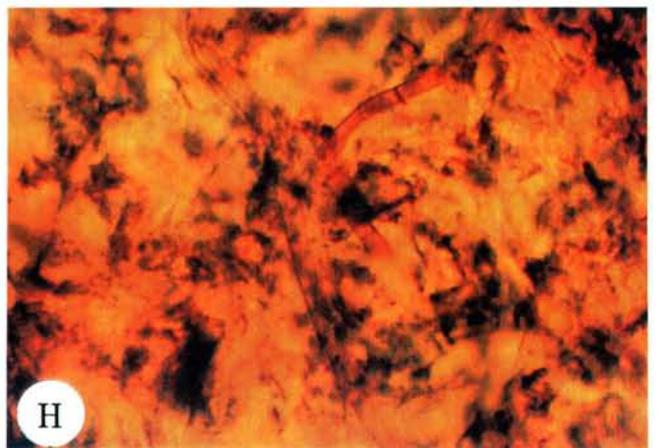
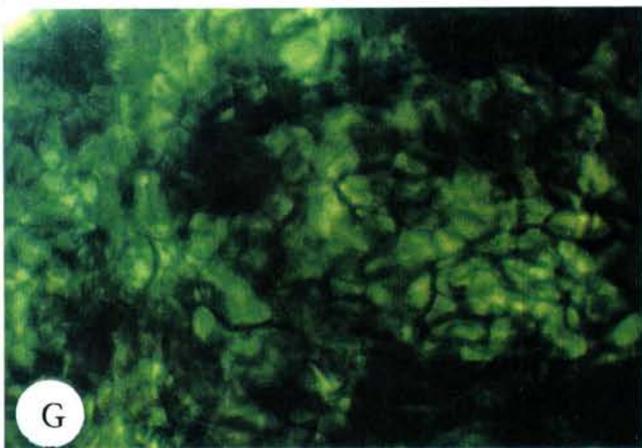
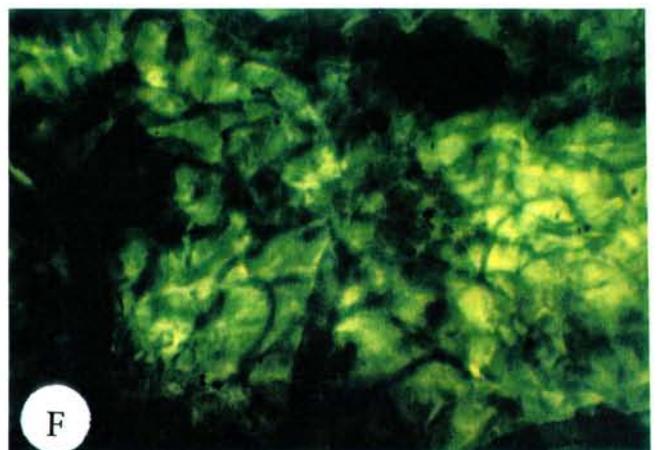
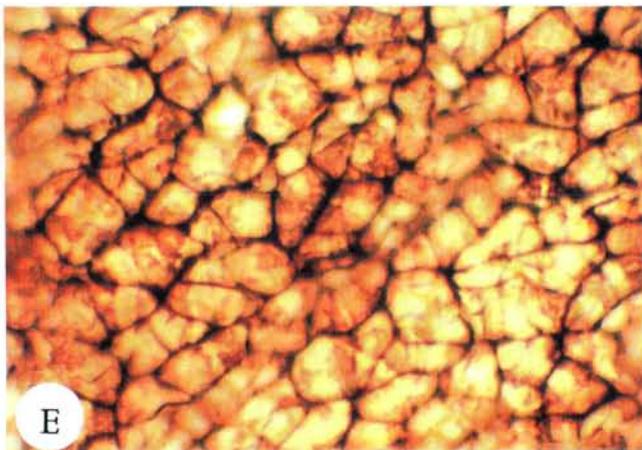
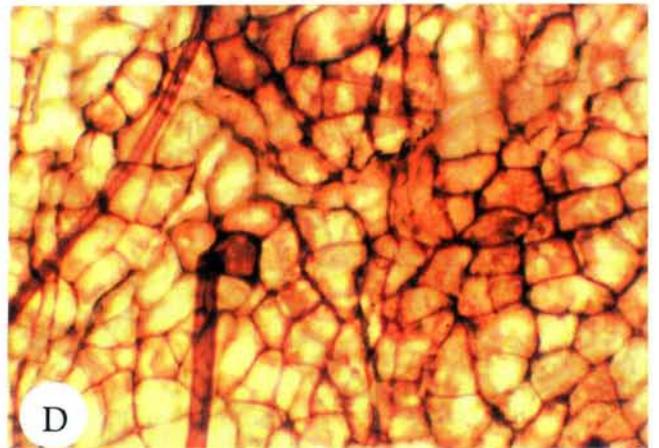
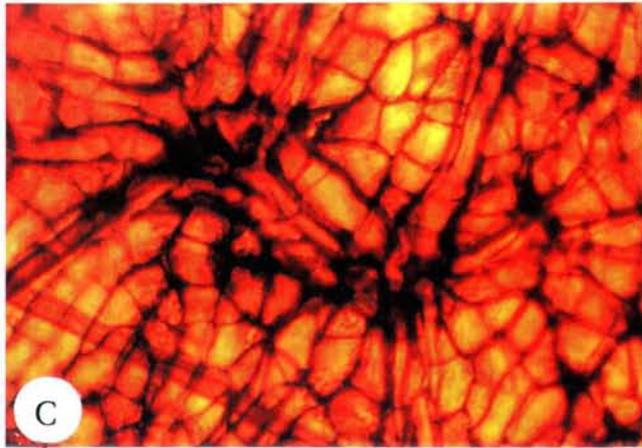
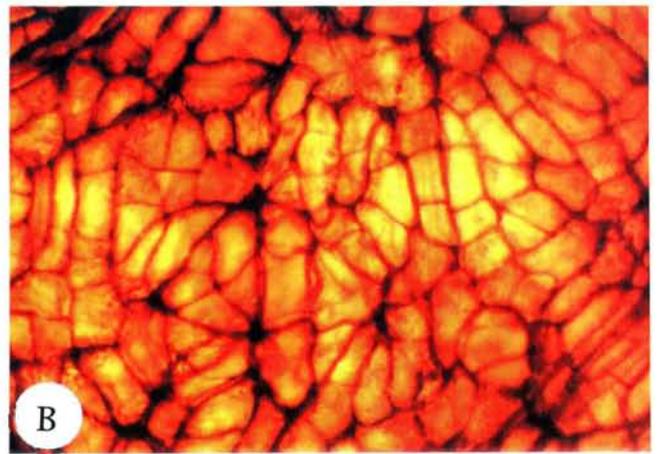
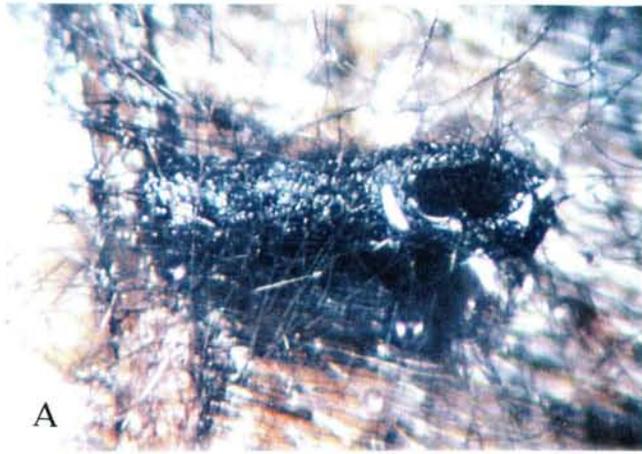


Plate 27

