

【論文】

ケヤマハンノキの短期育苗法の確立に向けた有用根粒菌フランキアの選抜

斎藤 真己^{*1}・長谷川 幹夫¹

Selection of superior *Frankia* spp. for rapid cultivation of *Alnus hirsuta* seedlings

Maki Saito^{*1} and Mikio Hasegawa¹

要旨：ケヤマハンノキの短期育苗法の確立を目的に、成長促進能力の高い根粒菌フランキアの選抜を試みた。富山県内4カ所の天然のケヤマハンノキの稚樹から根粒を採取し、発芽直後の実生に接種して2年間育苗した結果、根粒の採取地によって苗の成長は異なった。翌年、4カ所の採取地の中で最も成長が早かった採取地と遅かった採取地の根粒を育苗した苗から再採取し、同様の試験を行ったところ、再現性が確認された。また、このとき、最も成長が早かった採取地の根粒を接種した28個体の平均苗高は同年9月中旬に30cmを超え、30cm以上の苗高の得苗率は約70%であった。これらのことから、今回選抜したような成長促進能力の高い根粒菌を発芽直後の実生に接種することで、5ヶ月程度の育成期間で出荷可能な大きさになることが明らかになった。

キーワード：省力化、地域性種苗、治山植物、低コスト、ポット苗

Abstract: In order to develop the rapid cultivation of potted seedlings of *Alnus hirsuta*, we selected *Frankia* spp. favorable for the growth of *A. hirsuta*. The growth of *A. hirsuta* seedlings inoculated with suspension of root nodules of the species for two years after germination was different among the root nodule suspensions derived from natural seedlings collected from different four sites. Using the root nodule suspensions re-derived from the seedlings with the best and worse growth-performances revealed by the experiments, repeatable results were obtained, where the average size of the 28 potted seedlings with the best growth-performance exceeded 30 cm in the middle of September and the proportion of seedlings higher than 30 cm was about 70%. This study demonstrated that *A. hirsuta* seedlings grew to the size suitable for shipping, for about five months, by the inoculation of *Frankia* spp. with high growth promoting effects as selected in this study, into germinated seedlings.

Keywords: labor saving, local planting stocks, low cost, potted seedlings, revegetation plants

はじめに

ケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*) は、窒素固定細菌フランキア (*Frankia*) と共生し痩せ地でも旺盛な生育を示すことや、着花に至る年数が短く早期の更新が期待できることなどから、治山や砂防事業の肥料木として全国で植栽されている。フランキアはグラム陽性真正細菌放線菌目フランキア科に属し、国内で宿主となる植物はハンノキ属、ヤマモモ属、ドクウツギ属、グミ属、モクマオウ属であり、その根粒は多年生で珊瑚状に発達する特徴を

持つ (山中 2001)。フランキアをケヤマハンノキやオオバヤシャブシの苗に接種すると生育が早まることが報告されており (福本ら 1992, 1994; Yamanaka *et al.* 2005; 山中・岡部 1995)、斎藤 (2009) は市販のミキサーを用いて簡便かつ高頻度で根粒を着生させる手法を確立した。

これまで治山や砂防事業で使用されてきたケヤマハンノキ等の緑化苗は、安価な外国産のものが多く用いられてきたが、近年、外来系統の導入による既存集団への遺伝子攪乱等が問題化している。例えば、斎藤ら (2009) は、葉緑体 DNA の分析結果から富山県の高標高域で植

* E-mail: saito@fes.pref.toyama.jp

¹ 富山県農林水産総合技術センター森林研究所 Forestry Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry & Fisheries Research Center, 3 Yoshimine, Tateyama-machi, Nakaniikawa-gun, Toyama 930-1362, Japan

2012年6月22日受付、2012年9月1日受理

栽されたのり面や治山施工地の個体と天然個体は異なる系統（ハプロタイプ）であることを明らかにし、このまま放置すれば地域固有の遺伝子組成が失われる危険性があると報告した。

このことから、それぞれの地域で種子を採取し育苗した地域性種苗による緑化が生物多様性保全の観点からも重要になってきている（松田 2006）。また、ケヤマハンノキは災害復旧などの治山や砂防事業などで利用されることが圧倒的に多いため、一般造林用の苗のように種子から数年かけて苗木生産を行っていると事業量（必要な植栽本数）が不明な時期から育苗しなければならず、必要量に合わせた地域性種苗の生産及び供給は極めて困難になる。

以上のことから、本研究ではケヤマハンノキの出荷用ポット苗（平均苗高 30 cm 程度）の育苗期間を1年以内に短縮する技術を確認するため、富山県内各地からケヤマハンノキの根粒を採種し、成長促進効果の高い根粒菌フランキアの選抜を試みた。

材料と方法

苗の成長と接種源に用いる根粒採取地との関係

接種源に用いる根粒採取地の違いが苗の成長に及ぼす影響について把握するため、2007年10月に富山県内のA魚津市片貝（以下、片貝）、B立山町称名（以下、称名）、C富山市長棟（以下、長棟）、D南砺市利賀（以下、利賀）の4箇所からケヤマハンノキの稚樹（苗高30~50 cm程度）を3~5個体採取した（図-1）。これらの苗は、採取地ごとにパーミキュライトの入った1つのプランター（縦56 cm、横27 cm、深さ25 cm）に移植し、ガラス室内で育成させた。ケヤマハンノキの種子は2007年10月に①富山市有峰（以下、有峰）と②富山市長棟（以下、長棟）の2箇所の天然林から採取し、4℃の冷蔵庫で保存した後、2008年4月上旬に赤玉土（小粒）を詰めた発芽用セルトレー（128穴、セルの容積24 cm³）に播種した。根粒菌フランキア（以下、根粒菌）の接種は齋藤（2009）の方法に従い、播種からおよそ3週間後に（60%程度の種子が発芽した頃）、プランターで育成していたそれぞれの採取地由来の稚樹3個体から根粒を採取し、水道水と一緒にミキサーにかけた懸濁液（以下、根粒懸濁液とする）を新鮮重で1.0 g/Lの濃度に調整し、1つのセルあたり2mLを上から散布した。同年6月中旬にそれぞれのセルトレーから根粒の着生が確認された21個体を市販の培養土（タキイたねまき培土；肥料添加量 チッソ460 mg/L、

リン酸500 mg/L、カリ440 mg/L）を入れたプランター（縦56 cm、横27 cm、深さ25 cm）に移植し、ガラス室内で育成した。その後の育苗は一日一回、散水し、追肥などは行わなかった。約2年間育苗し、2010年2月上旬に生育の早かった10個体の苗高を測定した。



図-1 富山県内のケヤマハンノキの根粒と種子の採取地
根粒採取地：A 魚津市片貝（690 m）、B 立山町称名（810 m）、C 富山市長棟（1010 m）、D 南砺市利賀（1100 m）。
種子採取地：①富山市有峰（1180 m）、②富山市長棟（1010 m）、③立山町芦峯寺（670 m）、④南砺市利賀（1100 m）。

根粒採取地の違いが苗高に及ぼす影響の再現性

根粒採取地と苗の成長量の関係について再現性を確認するため、2010年4月22日に上述した試験において最も成長の早かった採取地の根粒懸濁液を散布して育てた苗3個体と遅かった採取地の根粒懸濁液を散布して育てた苗3個体をランダムに選び、それぞれ根粒を再採取して、同様の方法で根粒懸濁液（1.0 g/L）を調製した。これらの懸濁液は、富山県立山町芦峯寺（以下、芦峯寺）の天然林（図-1、③）から採取した種子を同年4月1日に播種した後、発芽させた実生苗に1つのセルあたり2mLを上から散布した。また、対照区では懸濁液の散布を行わなかった。同年6月18日に、各試験区につき28個体を培養土（タキイたねまき培土）の詰まった直径12 cm（700 mL容積）のビニールポットに移植した。このとき、根粒の着生率（%）、最大葉長（最も大きな葉の先端から付け

根までの長さ)について調査した。根粒の着生率は、発芽した全個体数のうち根粒の着生が肉眼で確認された個体数の比率とした。その後の育苗はガラス室内で行い、1日1回、散水するのみで追肥などは行わなかった。苗高の測定は、同年9月から12月まで定期的に行った。

結果

苗の成長と接種源に用いる根粒採取地との関係

富山県内4カ所から採取した根粒と2箇所から採取した種子との間で、約2年間育苗した苗の高さについて二元配置の分散分析を行った結果、根粒の採取地間において1%水準で有意な差が認められたが、種子の産地間と交互作用では有意な差は認められなかった(表-1)。また、根粒の採取地間で多重比較を行った結果、「称名」、「片貝」から採取した根粒を接種した苗の方が「利賀」、「長棟」の根粒を接種したそれよりも有意に成長が早かった(クラスカル・ウォリス検定)(図-2)。

長棟のように、根粒と種子の産地が同じであっても、成長が早いとは限らなかった。

根粒採取地の違いが苗高に及ぼす影響の再現性

4カ所から採取した根粒のうち最も成長の早かった「称名」と遅かった「長棟」の根粒を育苗した苗から再採取し(図-3)、それぞれの懸濁液を芦峯寺で採取した種子由来の実生に散布し、約2ヶ月後(6月18日)に根粒の着生率(%)を調査した結果、「称名」と「長棟」は80%程度で大差なかったが、無散布の対照区では4.6%と非常に低かった(表-2)。また、このときに着生が確認された1個体あたりの根粒数の平均値は「称名」で2.09個、「長棟」で1.86個と両者の間に大きな差はなかったが、平均最大葉長は「称名」が最も大きく、次いで「長棟」、「対照区」の順となり、それぞれ1%水準で有意差が認められた(図-4)。

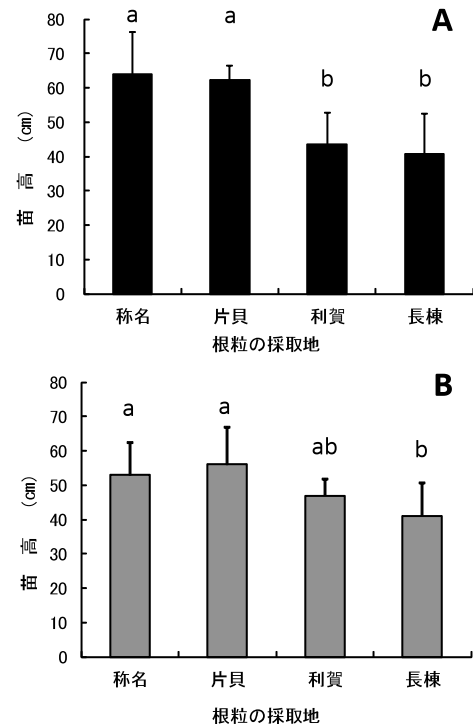


図-2 接種した根粒採取地と苗の成長の関係

AとBはそれぞれ有峰と長棟で採種した種子由来の苗の苗高を表す。エラーバーは標準偏差を示す。また、異なるアルファベット間には、Aでは1%水準、Bでは5%水準で有意差あり(クラスカル・ウォリス検定)。

表-2 採取地の違いによる根粒の着生率の比較

根粒採取地	調査した実生数	根粒が着生した実生数	根粒の着生率 (%)
称名	95	80	84.2
長棟	90	70	77.8
対照区	87	4	4.6

表-1 根粒と種子の採取値の違いによる苗高の二元配置の分散分析

因子	平方和	自由度	平均平方	F値	P値	
根粒採取地	5169.8	3	1723.2	19.51	2.3×10^{-9}	**
種子採取地	227.8	1	227.8	2.57	0.11	n.s.
根粒採取地×種子採取地	627.6	3	209.2	2.36	0.07	n.s.
誤差	6261.1	72	88.3			

**1%水準で有意差あり、n.s. 有意差なし。

また、「称名」の苗は9月13日に平均苗高が31.4 cm となり、その時の30 cm 以上の苗高の得苗率は69.2%だったとビニールポットに移植後平均苗高の推移を図-5 に示した。「称名」の懸濁液を散布した苗の方が「長棟」のそれより明らかに成長が早く、接種する根粒が苗の成長に及ぼす影響についての再現性が確認された(図-6)。(表-3)。その後、10月4日に平均苗高が35.5 cm となり、その得苗率は84.6%になった。それに対して、「長棟」や対照区の平均苗高は、12月になっても30 cm を超えなかった。



図-3 「称名」の根粒を接種した2年生苗(A)と「長棟」の根粒を接種した2年生苗(B)の成長の比較

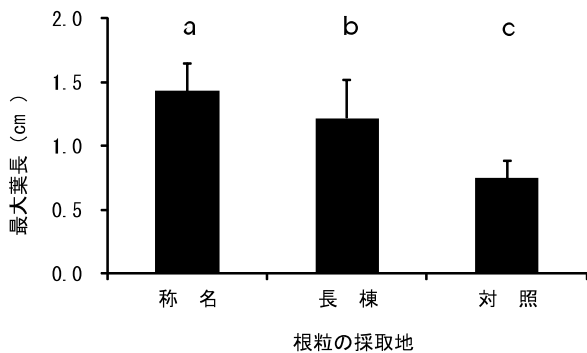


図-4 根粒採取地の違いによる最大葉長の比較

異なるアルファベット間には1%水準で有意差あり(クラスカル・ウォリス検定)。エラーバーは標準偏差を示す。

表-3 「称名」の根粒を接種した苗高30 cm 以上の得苗率の推移

	9月6日	9月13日	10月4日	11月1日
得苗率 (%)	34.6	69.2	84.6	84.6

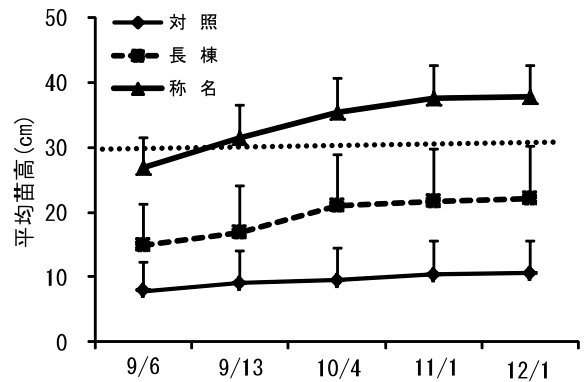


図-5 根粒採取地の違いによる平均苗高の推移の比較 エラーバーは標準偏差を示す。

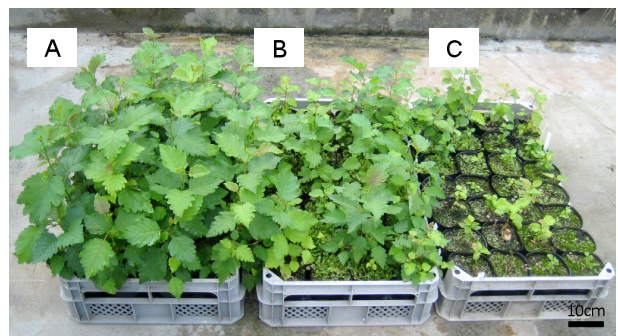


図-6 「称名」の根粒を接種した1年生苗(A)、「長棟」の根粒を接種した1年生苗(B)、対照区(C)の成長の比較(2010年9月13日撮影)

考察

近年の生物多様性保全の意識の高まりなどを考慮すると、今後、植栽する地域由来の地域性種苗の需要は増加すると予想される。このことから、本研究では緑化木として需要が高いケヤマハンノキの育苗期間の短縮を目的に、成長促進能力の高い根粒菌の選抜を試みた。

窒素固定能力の高い菌株や系統の選抜に関しては、ダイズの根粒菌である *Rhizobium* で数多くの報告があるも

の(赤尾 1989;有馬ら 1981;南沢ら 1985;南沢 1987; Schubert *et al.* 1978;高橋ら 1999;横山・蒲生 1989)、フランキア菌は純粋培養下での成長が非常に遅く、分離や培養が困難である等の理由から(山中・岡部 1995)、このような報告例はほとんどない。今回、使用した方法は天然のケヤマハンノキの苗から根粒を採取し、それをミキサーで粉碎して発芽直後の種子に接種するという方法であるため(斎藤 2009)、特定の系統(菌株)を分離し培養するといった方法とは異なるが、本手法は簡便かつ低コストで根粒の着生率も高いことから、広い地域から根粒を採取してきて、有用な根粒菌を選抜するといった場合は有望と考えられる。

本研究によって、ほぼ同一環境で育苗しても産地の異なる根粒を接種すると成長に差が出るということが明らかになり、さらに再現性も確認されたことから、フランキアも *Rhizobium* と同様に菌株によって苗木への成長促進能力に差があると判断された。今回、富山県内4カ所から採取した根粒の中では「称名」が最も成績が良く、2010年の再現性の調査では、9月中旬には育苗した28個体の平均苗高が30cmを超えた。このことから、「称名」のような接種効果の高い有用な根粒菌を育苗に用いることで、30cm程度の出荷苗の育苗期間を1年以内に短縮できることが明らかになった。一方、「長棟」の根粒懸濁液を接種した苗や根粒を接種しなかった苗は、一年生で30cmを超えることがなかったため、このような場合は一年生苗での供給は困難であると考えられた。

翌年、予備試験として2011年4月に再現性の調査で育苗した「称名」の根粒懸濁液を接種した苗の中から成長の早かった5個体を選抜し、南砺市利賀(図-1、④)から採取した種子にその根粒懸濁液を接種したところ、8月下旬に平均苗高が30cmを超え、その得苗率も約90%になり、同様の結果となった。本研究によって、種子の採取地間では苗の成長に有意な差は認められなかったことに加えて、「称名」の根粒を接種した4箇所由来の種子はいずれも高い接種効果が認められたことから、今回選抜したような成長促進能力の高い根粒菌を接種することで、種子の産地によらず5ヶ月程度の育成期間で出荷可能な大きさになると考えられた。

ケヤマハンノキの短期育苗法を確立するためには、成長促進能力の高い根粒菌の選抜に加えて、育苗に適した生育環境の把握が重要となる。一般的に、発芽直後の苗は虫害や病気等の被害にあいやすいことから、一年生の苗は本研究で使用したようなガラス室やビニールハウスなどある程度閉鎖された施設での育苗が適すると考えられる。また、根粒を着生させる際に使用する土壌は、福

本ら(1994)によると、その着生率は土壌中の窒素濃度によって変化し、0~2mMまではほぼ100%であったが、10mM以上に高くなると20~50%に低下したことや、土壌のpHが4.0未満の強酸性ではほとんど根粒が着生しなかったことが明らかにされている。これらのことから、発芽させた種子に高頻度で根粒を着生させるには、土壌中の窒素濃度が低く、強酸性ではない赤玉土やパーミキュライトを使用するのが適していると考えられる。根粒が着生した幼植物体をビニールポットに移植する際に使用する土壌は、アルファルファの場合、フザリウム菌による根粒活性の低下が報告されており(沢田 1982)、さらに除草の手間などを考慮すると、畑等の土壌ではなく消毒された市販の培養土を用いるのが有効であろう。育苗中の遮光については、ラジノクローバーで窒素固定能が促進されたという報告があるものの(吉田・谷田沢 1977)、ケヤマハンノキは生育するのに強い太陽光を必要とする先駆樹種であることから、今回は特に必要ないと判断し行わなかった。また、ダイズに着生する *Rhizobium* では土壌水分と根粒着生との関係が検討され、生育初期にはpF 2.2~2.8のやや乾燥気味に着生に最適だったと報告されている(田中・吉田 1982)。このことがフランキアにもあてはまるのかは不明であるが、pF値を管理しながらの水やりは労力がかかり実用的ではないことから、今回の結果を見る限り適度な水分管理で特に問題はないと考えられた。

今回の育苗法は選抜した有用な根粒をミキサーで砕いて接種するのみで、施肥などを行わなくても5ヶ月程度の育成期間で出荷可能な大きさになることから、低コスト・省力化の育苗技術といえる。このことから、例えば、翌年度の治山や砂防等の事業計画が決まった段階(2~3月)で、その年に必要な分だけの育苗が可能になるため、本手法は無駄のない効率的なケヤマハンノキの地域性種苗の生産に繋がると期待された。また、今後の課題としては、フランキア菌が集団間や集団内でどの程度の遺伝的な変異を保有しているのか明らかにされていないため、このことについても調査を進める必要があると考えられた。

謝辞

本研究を行うにあたり、独立行政法人森林総合研究所の山中高史 博士には多くのご助言を頂きました。この場をかりて厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- 赤尾勝一郎 (1989) 生物窒素固定研究における最近の成果 (8) 有用根粒菌の接種技術. 農業および園芸 64: 79-82
- 有馬泰紘・南沢究・熊沢喜久雄 (1981) 空気中で水素発生を示さないダイズ根粒を形成する根粒菌の検索. 日本土壤肥料学会誌 52: 114-118
- 福本勉・石沢謙哉・武藤直紀 (1992) 試験管内養液栽培法による窒素固定菌フランキアの純粋分離と根粒形成. 日本土壤肥料学会誌 63: 325-331
- 福本勉・石沢謙哉・武藤直紀 (1994) フランキア 13-3-2 株の菌学的特性とオオバヤシャブシに対する接種試験. 日本土壤肥料学会誌 65: 392-399
- 松田友義 (2006) 地域性種苗のためのトレーサビリティ・システム. 小林達明・倉本宣 編, 生物多様性緑化ハンドブック. 地人書館, 東京, pp 117-128
- 南沢究・有馬泰紘・田中裕之・熊沢喜久雄 (1985) 水素回収系を持つダイズ根粒菌の接種効果. 日本土壤肥料学会誌 56: 292-299
- 南沢究 (1987) 優良ダイズ根粒菌に関する研究. 日本土壤肥料学会誌 58: 291-292
- 斎藤真己 (2009) フランキアが感染した根粒懸濁液を活用したケヤマハンノキのポット苗の効果的育苗法. 日本緑化工学会誌 35: 332-337
- 斎藤真己・長谷川幹夫・中島春樹 (2009) 富山県におけるケヤマハンノキ天然林の遺伝的分化に基づく種苗配布区域の検討と地域性種苗の生産体制の安定化. 日本森林学会誌 91: 173-177
- 沢田泰男 (1982) アルファアルファの根粒形成と *Fusarium oxysporum* による病害との関連. 草地試験場研究報告 22: 19-26
- Schubert KR, Jennings NT, Evans HJ (1978) Hydrogen reaction of nodulated leguminous plants. II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. *Plant Physiology* 61: 398-401
- 高橋幹・国分牧衛・島田信二・有原文二 (1999) 生育・収量の優れた新しい根粒超着生ダイズ系統「En-b0-1-2」の基本特性の解明. 日本作物学会紀事 68 (別2) : 36-37
- 田中伸幸・吉田昭 (1982) 大豆の生育初期における土壌水分と根粒着生. 山形県立農業試験場研究報告 17: 151-159
- 山中高史 (2001) 森林における窒素固定と微生物. 二井一禎・肘井直樹編, 森林微生物生態学. 朝倉書店, 東京, pp 67-74
- Yamanaka T, Akama A, Li C-Y, Okabe H (2005) Growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus sieboldiana* after inoculation of *Frankia* together with *Gigaspora margarita* and *Pseudomonas putida*. *Journal of Forest Research* 10: 21-26
- 山中高史・岡部宏秋 (1995) ヤマハンノキの根粒から分離されたフランキア菌. 日本林学会誌 77: 269-271
- 横山正・蒲生卓磨 (1989) 生物窒素固定研究における最近の成果 (19) ダイズの窒素固定能向上に関する USDA の研究戦略. 農業及び園芸 64: 1429-1435
- 吉田重方・谷田沢道彦 (1977) ラジノクローバの再生過程における共生窒素固定能の変動—アセチレン還元法による調査—. 日本草地学会誌 23: 6-13