

## 土壤菌核粒子の形成と生物的意義

渡邊眞紀子

Biological Implication of Sclerotium Grain Formation in Soil

Makiko WATANABE

### Abstract

Sclerotium grains, the resting structure of an ectomycorrhizal fungus, *Cenococcum graniforme* ( currently, *Cenococcum geophilum* ), are black and spherical, 1 2 mm in diameter have a characteristic hollow structure, and can be easily found in forest soils. The maximum content of sclerotium grains in surface soils of Japanese Andosols is  $3.40 \text{ g kg}^{-1}$ , which suggests that the contribution of sclerotium grains to forest soils cannot be ignored as one of the soil organic components. This paper introduces the interests of the biological strategies of *Cenococcum geophilum* and sclerotium grains by reviewing the findings of advanced studies on micromorphological features, chemical composition, and microbial communities of sclerotium grains.

Instruments such as scanning electron microscope ( SEM ) and energy dispersion X-ray fluorescence micro-analyzer( EDX ), electron probe micro-analyzer of wave dispersion type( EPMA ) and  $^{27}\text{Al}$  magic-angle spinning ( MAS ) nuclear magnetic resonance ( NMR ) were used to obtain the characteristics of sclerotium grains. A basic finding was that C is the major element in sclerotium grains associated with a relatively large concentration of octahedral Al, which suggests an Al-humus complex. The mean concentrations of major elements in sclerotium grains are quantitatively defined as C ( 47.6% ), O ( 30.2% ), H ( 3.32% ), Al ( 1.4% ), N ( 0.78% ) Carbon in sclerotium grains took the form of large amounts of O-alkyl C and was also associated with aromatic C and methyl C, which strongly showed a characteristic biological origin and completely different spectral feature to humic acids from an allophonic Andosol. AMS  $^{14}\text{C}$  age values obtained for sclerotium grains in surface soils of Japanese forest soils were from modern to 1800 yr BP, which proves its stability and long life as an Al-humus complex. Transmission Electron Microscope ( TEM ) and EDX techniques revealed the micromorphological features of the Al-oxyhydroxide polymorphs found in sclerotium grains. It is assumed that a biochemical process responsible for host fungi induced Al saturation and precipitation under acidic conditions to form Boehmite inside the grain. Studies on microbial communities elucidated the predominance of specific species such as *Sphingomonas* sp.

From a further investigation on the distributions of sclerotium grains in profiles of German Podsol, Braunfaherde and Brown Podsol, it is concluded that development of sclerotium grains was not always regulated by low pH but by the content of exchangeable Al and the status of Al in the soil, regardless of soil type. The sclerotium grain was likely to be formed in soils with high ratios (  $> 0.6$  ) of organic bonding Al ( Alp ) to amorphous Al ( Alo ), and with high contents of

\* 東京工業大学大学院総合理工学研究科

\* Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

本稿は2006年5月27日に行われた春季講演会での講演をまとめたものである。

exchangeable Al ( $\text{Al}^{3+}$ ) ( $> 0.54 \text{ g kg}^{-1}$ )

The Al accumulation in sclerotium grains and the close relationship between sclerotium grain density and the status of active Al in soils suggest the symbiotic function of *Cenococcum geophilum* with root by reducing the toxicity of Al under low pH in rhizosphere. Sclerotium grain may also serve as a shelter for microorganisms and preserve their diversity under severe environmental conditions. Although the findings we have are still very limited, the goal of the study is to understand further implications of sclerotium formation in a soil ecosystem, which may help us to learn what strategy is necessary for biota to survive a catastrophe.

**Key words** : sclerotium grains, *Cenococcum geophilum*, aluminum, microbial communities, biological strategy

**キーワード** : 土壤菌核粒子, *Cenococcum geophilum*, アルミニウム, 微生物群集, 生物戦略

## I. はじめに

森林土壤中からは、図1の矢印に示すような直径12mmほどの黒色球状の粒子（本研究では“土壤菌核粒子”ないし“菌核粒子”と称する）が検出される。この粒子は植物根と共生関係にある外生菌根菌の休眠体粒子と考えられており、fungal sclerotiumあるいは*Cenococcum* sporeと称されて、ヨーロッパの土壤微細形態学研究者の間では土壤薄片試料上で観察される特徴的な球状粒子としてその存在が知られている。

Retallack (1990)による古土壤研究の著書の中で土壤菌核粒子は低湿、還元的な環境下で生成される土壤有機物の一つとして、菱鉄鉱や硫化鉄腫などの球状体とともに古土壤に保存される古環境指標として紹介している。わが国の土壤研究者の間でも、土壤菌核粒子は「黒い仁丹」と呼ばれて認識してきた。これまでに、土壤学的な知見としては、土壤菌核粒子がポドゾル性土の他、褐色森林土や山岳草原土などP型腐植酸を持つ土壤に分布することが指摘されている。土壤腐植研究で世界的な業績をあげ、腐植酸の区分(A, B, P, Rp)を構築した熊田恭一博士は、雑多な物質の集合である土壤腐植酸をセルロースパウダーで分画して得られる緑色画分(Pg)の起源を外生菌根菌である*Cenococcum graniforme*（現在は*Cenococcum geophilum*）の菌糸束や菌核粒子であると推論した。このことは、イギリスとス

ウェーデンのポドソルで*Cenococcum graniforme*がつくる土壤菌核粒子の分布とPg特性の関係にもとづいて、Kumada and Hurst (1967)によって明らかにされた。一方、菌学者のTrappe (1969)は、これら黒色球状の粒子について*Cenococcum geophilum*が形成した構造体が、発芽機能を失ったまま土壤中に残留する粒子（dead sclerotia）として紹介している。菌核への関心は、このほかに、不完全菌・子囊菌・担子菌などの高等菌類の様々な菌種が形成する菌核のうち、とくに植物病害（菌核病）を引き起こす*Sclerotinia sclerotiorum*といった菌類に向けられており、植物病理学の分野を中心に進められて

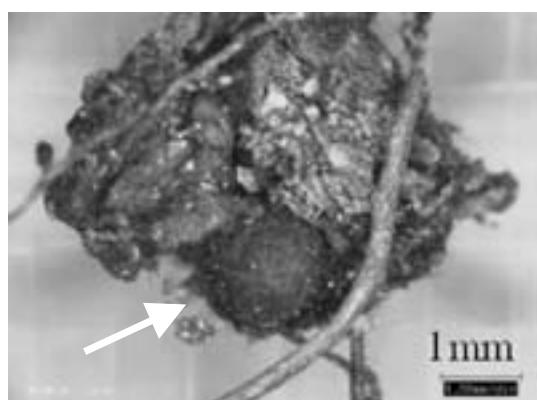


図1 ダケカンバ幼樹根と菌核粒子（矢印）。

Fig. 1 Juvenile root of *Befula ermanii* and sclerotium grain (denoted by arrow)

いる。

## II. 謎に満ちた *Cenococcum geophilum* と 菌核

森林土壤から検出される菌核粒子の形成には *Cenococcum geophilum* (以下 *Cg*) が関与していると考えられているものの、*Cg* は分類も生態もまだよくわかっていない、実に謎の多いカビの仲間である。*Cg* の研究に関して詳細なレビューを行った LoBuglio (1999) によれば、*Cg* は黒い菌核を持つことから、*Lycoperdon graniforme* Sow という名で 1800 年に J. Sowerby によって記述されたのが最初とされる。しかしながら、*Cg* が中性黒色菌糸であり、分類上重要な有性胞子も無性胞子もつくらないため、*Cg* の近縁の有性種が存在しない。このことが *Cg* の分類を困難にし、この菌種の同定をおこなうためには、培養形態や外生菌根菌としての特徴を捉えなければならぬ。Trappe (1964) は *Cg* の分布に関する研究をまとめ、自然界に最も普遍的に存在する外生菌根菌の一つであることを示した。*Cg* は両半球を問わず、北極圏、冷温帯、亜熱帯の環境の森林において世界的に分布し、森林限界線の樹木の重要な共生生物としての側面をもち、また砂丘、モレーン、火山灰地、開拓地の未熟土に定着する外生菌根宿主としていち早く進出する先駆者としての側面ももつと考えられている。*Cg* が低 pH、乾燥、低栄養に対する耐性があることが成功者となる要素かもしれない。

## III. 土壤菌核粒子は何故土壤に残留するのか

*Cg* が形成する乾燥、低温、低栄養に対する耐久体である菌核は、発芽機能を失ったまま土壤中に残留する。図 2 に菌核粒子内部の表面構造をとらえた走査型電子顕微鏡写真を示す。内部の中空部分には糸状菌の菌糸がしばしば確認できることから、中空部分は宿主菌種の生息空間であると思われる。粒子の壁部分の厚さは 0.2 ~ 0.3 mm で、黒色光沢のメラニン質である。この壁を拡大してみると、直径およそ 5  $\mu\text{m}$  のハニカム構造をなしている。メラニン質のこの構造が土壤環境に

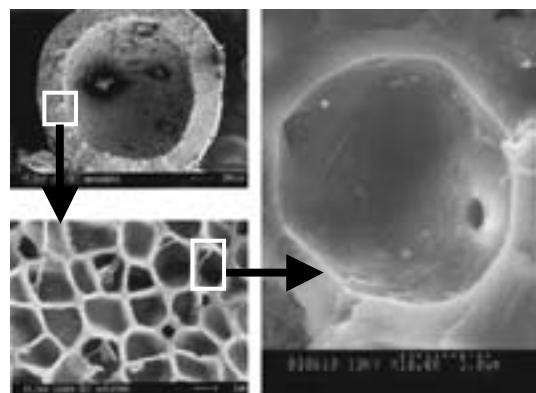


図 2 走査型電子顕微鏡 (SEM) による菌核粒子内部の構造。

Fig. 2 Internal structure of sclerotium grain observed by scanning electron microscopy.

おける *Cg* 菌核の残存に寄与していると一般に考えられている。

菌核粒子が土壤中でどれほど安定な物であるかについては、いくつかの報告がある。Hormes *et al.* (2004) はスウェーデン北部の氷河性堆積物中の埋没土壤から検出された *Cenococcum* spore の  $^{14}\text{C}$  年代を測定し、約 5000 年という結果を報告している。新潟県妙高山や国内各地の菌核粒子について AMS  $^{14}\text{C}$  年代を測定した結果、表土において modern ~ 1800 年という年代値を得られている (Watanabe *et al.*, 2007; 一部未公表)。

菌核粒子が土壤中で長期間残留できるのは形態的特徴に由来するだけではない。新潟県妙高山で採取された直径 6 ~ 7 mm の巨大な土壤菌核粒子を初めとして、日本各地の火山灰土、中央ヨーロッパのポドソル、褐色レシベ土、北米のポドソル等から採取した菌核粒子を蛍光 X 線元素分析装置 (EDX) や電子プローブマイクロアナライザー (EPMA) を用いて非破壊元素分析を行ったところ、いずれも Al 濃度が高いという特徴が確認された (Watanabe *et al.*, 2001, 2002, 2004b)。また、硝酸によって全分解した菌核粒子を用いて定量分析を行ったところ、平均化学組成は C: 48%, O: 30%, H: 3.3%, N: 0.8%, Al: 1.4, Fe: 0.6%, のほか Ti, Cr, Mn, Cu, Zn, Br, Pb などの重金属が 10 ~ 100 ppm レベルで検出された (Wata-

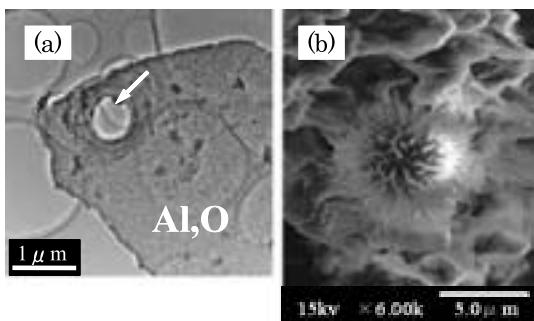


図 3 (a) 透過型電子顕微鏡 (TEM) と X 線元素分析装置 (EDX) による強熱処理後の菌核粒子の壁部セル構造と検出元素。(b) 走査型電子顕微鏡 (SEM) によって観察される菌核中空部の針状構造物。

Fig. 3 (a) Wall structure of ignition sclerotium grain observed by transmission electron microscopy (TEM) and elements detected by Energy dispersion X-ray micro-analyzer (EDX) (b) Needle ball structures observed inside sclerotium grains by scanning electron microscopy (SEM)

nabe *et al.*, 2006)。一般に、土壤から抽出される腐植酸は酸・アルカリ処理による精製を繰り返しても 7% 程度の灰分 (Si 主体) を含む (Stevenson, 1994)。したがって、Si を微量にしか含まない菌核粒子は土壤腐植酸とは異質な有機構成成分であるといえる。図 3 に 550 の強熱処理を行った菌核粒子の壁構造部分の走査電子顕微鏡写真と蛍光 X 線による元素分析の結果を示す。図 3a 中の矢印が示す孔は、図 2 右図のセル壁の孔と同様のものとみられる。炭素を除去した試料には、Al の網状構造が残ることから (図 3a) 菌核粒子の骨格は C と Al の化合物から成ることが理解できる。磁気共鳴法  $^{27}\text{Al}$ NMR と X 線回折法により菌核粒子のアルミニウムの化学構造を調べたところ、6 配位 Al が優勢し、非晶質であることから菌核の Al は腐植 Al 複合体として存在することが示唆されている (Watanabe *et al.*, 2001)。

粒子内部の微空間の pH を直接測定することはできないが、菌核の細胞壁が長期間分解されないとすれば、セル内部の pH は Al のイオン化の閾値である 4 を切るものではないと推察できる。一方、菌核の中空部分には図 3b に示すような Al

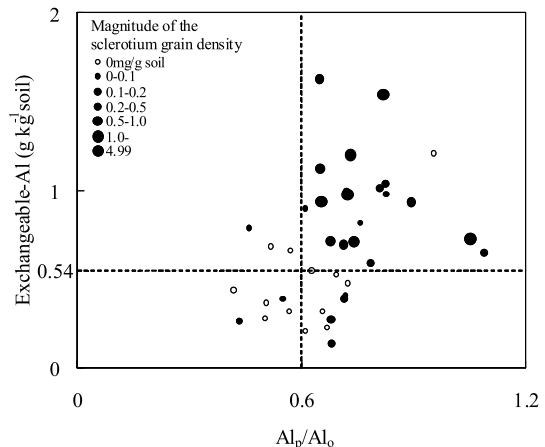


図 4  $\text{Alp}/\text{Al}_0$  と交換性 Al 含量の関係および菌核粒 子 検 出 密 度 ( $\text{mg}/\text{g}$  soil) Watanabe *et al.* (2004a)。Al<sub>0</sub>: 酸性シウ酸塩可溶のアルミニウム、Al<sub>p</sub>: ピロリン酸塩可溶のアルミニウム

Fig. 4 Relationship between  $\text{Alp}/\text{Al}_0$  to exchangeable Al content ( $\text{g kg}^{-1}$ ) and magnitude of sclerotium grain density ( $\text{mg/g}$  soil) Watanabe *et al.* (2004a) Al<sub>0</sub>: acid oxalate extractable Al, Al<sub>p</sub>: sodium pyrophosphate extractable Al.

と O を主成分とする針状球体の生体鉱物が粒子の産地を問わず電子顕微鏡で観察される。この鉱物を透過型電子顕微鏡 TEM によって取得された電子回折像を解析したところ、ペーマイト  $\gamma$ -AlOOH であることが明らかとなった (Watanabe *et al.*, 2004b)。こうした状況証拠は、中空部分では酵素作用による壁構造の Al の溶解出が起きていると考えられ、pH < 4 で、かつ還元的な環境であることが類推される。しかしながら、直径 1 mm の粒子の内部空間の環境にはまだ不明なことが多い。

菌核粒子と Al との関係は、菌核粒子の内部環境においてばかりではない。菌核粒子の分布密度と土壤性状を日本各地の火山灰土壤およびドイツ・ハルツ山地において調べた結果、粒子の検出密度は土壤型、主要粘土鉱物の種類 (結晶性、非結晶性) に関わらず土壤の活性 Al の存在形態に規定され、粒子 1 粒の質量は土壤の交換性 Al 含量と正の相関があることが明らかとなった (Watanabe *et al.*, 2002, 坂上ほか, 2004)。図 4

にドイツ・ハルツ山地での結果を示した。酸性シュウ酸塩可溶 Al ( Alo ) はアロフェン, イモゴライトのような非晶質・準晶質 Al および腐植複合体 Al であり, ピロリン酸塩可溶 Al ( Alp ) は腐植複合体 Al である。菌核粒子は Alp/Alo 比が 0.5 ~ 0.6 を超える土壤に分布すること, さらに 1M-KCl で交換抽出される交換性 Al ( Al<sup>3+</sup> ) の含量が大きいほど菌核の検出密度 ( 単位重量土壤あたりの菌核重量 ) が大きいことが本図から読み取れる。

*Cenococcum geophilum* には pH2.5 までの耐酸性があることが報告されている ( Meira *et al.*, 1989 )。また, pH を 3 に調整し, 硫酸アルミニウムを添加した培地上で *Cg* 菌株や菌核内部から分離した糸状菌を用いた Al 耐性実験を行うと, いずれも高い Al<sup>3+</sup> 濃度に対しても耐性をもつことが確認されている ( 野々山ほか, 未発表 )。土壤において菌核粒子が長期間残留できるもう一つの理由は, *Cg* の Al 耐性であり, Al と錯形成した特有の化学構造による分解抵抗性にあると考えられる。

#### IV. 土壤菌核粒子は酸性土壤で何をしているのか

菌核粒子の炭素の化学構造を固体 CPMAS ( cross-polarization magic-angle spinning ) <sup>13</sup>C NMR ( nuclear magnetic resonance ) により得られたスペクトルから判定すると, 菌核粒子は O- アルキル炭素が優勢し, 糖鎖に富む。この性質は, カルボキシル, カルボニル炭素や芳香族炭素に富む火山灰土の腐植酸と比べて極めて生物性の高い炭素からなることを示している ( Watanabe *et al.*, 2006 )。例えて言えば, 微生物起源の家に建主兼家主である糸状菌 ( おそらくは *Cg* ) と細菌などの微生物が共同生活をしていることになる。さらに, 菌核自体が微生物の培地になっている可能性もある。菌核粒子内部の 5 μm 程度のセル ( 細胞壁構造 ) に生息する細菌群集の検出・同定を試みたところ, これまでに培養法により芳香族化合物を資源化する *Sphingomonas* 属菌やヒ素耐性菌の近縁である *Fraturia* 属などの特異

的な菌が優占しているという知見を得ている。このうちの *Sphingomonas* 属の分離菌株には強酸性 ( pH < 5 ) に対する耐性が見られなかったことは, 前述の壁部セル内部の pH が 4 以上である推論を裏付けると同時に, この菌種がどのように外界の酸性土壤から菌核粒子の内部空間へ侵入したか, 粒子形成にまつわる新たな謎を提示している ( Ohta *et al.*, 2003, 一部未発表 )。また, 非培養法で行った菌核 DNA の 16S rRNA クローン解析において, 難培養性土壤細菌や, 含塩素芳香族化合物の脱塩素化を行う嫌気性菌と相同性のある有用菌の存在が確認されるという興味深い知見が得られている ( 野々山ほか, 未発表 )。詳細については今後の研究報告に譲るが, 菌核粒子を生息空間とする微生物群集は, 菌核の外界である土壤の群集構造とは性質が異なっており, 特殊な細菌が優占する可能性が高まっている。

菌核粒子の形成と土壤 Al の存在形態との関係は先に述べた通りである。しかしながら, ハルツ山地の調査では, 低 pH であっても交換性 Al が少ない土壤には菌核粒子の形成がみられないこと, *Cenococcum geophilum* の生息分布域が広範であることを考慮すると, 菌核形成が可能である環境と, 実際に形成している環境は同一では無いということになる。粒子形成や消滅の “ きっかけ ” は何か, まだわからないことは多い。

火山灰土壤やポドソル性土壤のような, 強酸性に伴う低栄養土壤においても森林が成立する理由は, 菌根菌をはじめとする微生物と植物の共生によると考えられているが, 未だ明確な答えは得られていない。とくに強い酸性条件 ( pH < 4 ) では, イオン化した Al による毒性が生物活動を阻害する要因となりうる。菌核粒子が植物根圏付近で形成される外生菌根菌の休眠体組織であるとすれば, 菌核粒子の形成は酸性条件下で Al の生物毒性を緩和する植物と微生物の共生的生物戦略の一つであり, 菌核粒子は土壤の微生物多様性を維持するためのシェルターとして存在するのかもしれない。ただし, 菌核形成の生物的意図はそれほど単純なものではなく, 複雑な生態システムの中に真理は秘められていると考えられる。菌核粒子の

形成のきっかけとなる土壤ストレスなどの外的環境要因の解明と菌核粒子の形成と代謝に関わる微生物特性の解明から、土壤菌核粒子の形成圏と生物的意図が今後明らかにされていくと考えられる。

## V. おわりに

地球表層は、大気および水に接触する孔質な媒体であり、ここで展開されている複雑な生命現象には未知なものが多い。地球上の菌類は、現在、約8万種が報告されているといわれる。しかし、これら既知種は、自然界に存在するわずか数%に過ぎず、多種・多様な未知の菌類が存在するとされる。今日的な環境変化に対する人間を含む生物への影響予測が広く科学に求められており、地球科学も例外ではない。その要求に応えるために開発される装置や手法は、物質や現象を分析的に解明する方向に推進してきているが、現象の連関や地球生物システムを総合的に解明するにはまだ困難が多い。本稿で紹介した土壤菌核粒子の研究は、土壤生成と微生物の相互作用による土壤生態システムの一端を解明しようとするものに過ぎないが、粘土・腐植・微生物が複雑に絡み合うブラックボックス的な世界におけるカタストロフィーと生命現象を究明する上で、この不思議な粒子の試料価値は高く、共存共栄の生物戦略とは何かを我々人間に教えてくれるのではないだろうか。

土壤中の菌核粒子の平均存在量は、表土で $3.40 \text{ g kg}^{-1}$ と見積もられているが（坂上ほか、2004など）、土壤有機物の寄与量として決して無視できない値である。土壤菌核粒子がどこで、誰によって作られ、どのような機能を果たして終焉を向かえるのか、その謎を解くことは太古より土壤で普遍的に営まれている生存システムを知ることにつながるに違いない。

## 文 献

- Hormes, A., Karlen, W. and Possnert, G. ( 2004 ) Radiocarbon dating paleosol components in moraines in Lapland, northern Sweden. *Quat. Sci. Rev.*, **23**, 2031-2043.
- Kumada, K. and Hurst, M.H. ( 1967 ) Green humic acid and its possible origin as a fungal metabolite. *Nature*, **214**, 631-633.
- LoBuglio K.F. ( 1999 ) Cenococcum. in *Ectomycorrhizal Fungi* edited by Cairney, J.W.G and Chambers, S.M., Springer, 287-309.
- Meira, S., Robargeb, W.P., Brucka, I. and Grand, L.F. ( 1989 ) Effects of simulated rain acidity on ectomycorrhizae of red spruce seedlings potted in natural soil. *Environ. Pollut.*, **59**, 315-324.
- Ohta, H., Yagi, M., Suzuki, J., Fujitake, N. and Watanabe, M. ( 2003 ) Characterization of *Sphingomonas spp.* found as predominant members in the culturable bacteria community of a green pigment-containing sclerotium grain from Mt. Myoko (Japan) volcanic ash soil. *Microbes Environ.*, **18**, 126-132.
- Retallack, G.J. ( 1990 ) *Soils of the Past*. Unwin Hyman, Boston.
- 坂上伸生・渡邊眞紀子・太田寛行・藤嶽暢英 ( 2004 ) 非アロフェン質黒ぼく土における土壤菌核粒子分布と土壤化学性状 . ペドロジスト, **48**, 24-32.
- Stevenson, F.J. ( 1994 ) *Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions*. John and Wiley Sons, Inc, New York.
- Trappe, J.M. ( 1969 ) Studies on Cenococcum gramineforme. I. An efficient method for isolation from sclerotia. *Can. J. Bot.*, **47**, 1389-1390.
- Watanabe, M., Fujitake, N., Ohta, H. and Yokoyama, T. ( 2001 ) Aluminum concentrations in sclerotia from a buried humic horizon of volcanic ash soils in Mt. Myoko, Central Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **47**, 411-418.
- Watanabe, M., Kado, T., Ohta, H. and Fujitake, N. ( 2002 ) Distribution and development of sclerotium grain as influenced by aluminum status in volcanic ash soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **48**, 569-575.
- Watanabe, M., Ohishi, S., Pott, A., Hardenbicker, U., Aoki, K., Sakagami, N., Ohta, H. and Fujitake, N. ( 2004a ) Morphology, Chemical Properties and Distribution of Sclerotium Grains Found in Forest Soils, Harz Mts., Germany. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 863-870.
- Watanabe, M., Genseki, A., Sakagami, N., Inoue, Y., Ohta, H. and Fujitake, N. ( 2004b ) Aluminum oxyhydroxide polymorphs and some micromorphological characteristics in sclerotium grains. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **50**, 1205-1210.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagami, N., Bolormaa, O., Kawasaki, K., Hiradate, S., Fujitake, N. and Ohta, H. ( 2006 ) Characterization of major and trace elements in sclerotium grains. *Eur. J. Soil Sci.*, doi: 10.1111/j.1365-2389.2006.00868.x
- Watanabe, M., Sato, H., Matsuzaki, H., Kobayashi, T., Sakagami, N., Maejima, Y., Ohta, H., Fujitake, N. and Hiradate, S. ( 2007 )  $^{14}\text{C}$  ages and  $\delta^{13}\text{C}$  of sclerotium grains found in forest soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **53**, 125-131.