

## 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

## マツタケのシロ土壤と菌根における菌類相

小 川 眞<sup>(1)</sup>

Makoto OGAWA : Microbial Ecology of Mycorrhizal Fungus—  
*Tricholoma matsutake* (ITO et IMAI) SING. in Pine Forest III  
 Fungal flora in Shiro soil and on the mycorrhiza

**要 旨**：土壤生息性のマツタケ菌が形成するシロはアカマツ林土壤の微生物相に大きく影響する。表層土壤に高頻度に出現する *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* などの土壤生息性菌類の多くは細菌や放線菌と同様、マツタケのシロ土壤から排除された。この菌排除作用はマツタケの菌根の多い層で強く、菌糸のみの層やシロ土壤中の有機物中には認められなかった。

*Mortierella* sp. と 2・3 の土壤生息性菌およびマツの根面生息性菌はマツタケのシロの拡大によって排除されず、逆にシロ内部において増加し、シロ特有の菌類相を形成した。とくに *Mortierella* sp. はマツタケ菌糸の分解にも関与し、シロ内部でもっとも優勢となった。シロ土壤のイヤ地が消失すると同時に *Trichoderma*, *Pachybasium*, 細菌などが再侵入し、この微生物相の回復と土壤の乾燥と透水性の回復とは一致した。

菌根の生長過程に応じて根面生息性の菌類が交代したが、マツタケはこのようなアカマツ根面における菌類サクセッションの先駆者と思われた。菌根の枯死分解の進行にともなって腐生性菌が出現した。

シロ土壤中の微生物相の季節的变化は連続的にとらえ難いものではあるが、菌根の生長やシロの層変化と対応して変動した。ことに *Mortierella* sp. の動きには季節的な変化のあることが知られた。冬は活性が低く、6月に菌の種類や出現頻度が上昇し、夏ふたび低下し、秋に上昇するようであった。*Mortierella* sp. は子実体の発生によってシロ内部で増加し、冬から春には菌糸層でもこの菌の量は増加した。ハルマツタケ発生時の微生物相にも特異的な変化はなく、秋に子実体が発生する場合のものと基本的には同一であった。

## 目 次

序 .....	106
1. シロ土壤における菌類相 .....	107
材料と方法 .....	108
A. 分離培養法 .....	108
B. 直接観察法 .....	110
C. その他の方法 .....	110
結果と考察 .....	111
A. シロ土壤の有機物上の菌類相 .....	111
B. シロ土壤の菌類相 .....	113
2. 菌根、根および植物遺体の菌類相 .....	121
材料と方法 .....	122
A. 分離培養法 .....	122

B. 直接観察法	123
C. その他の方法	123
結果と考察	123
A. シロにおける菌根上の菌類相と植物遺体やアカマツ以外の根の菌類相	123
B. 菌根上の菌類サクセッション	125
3. シロにおける菌類相の季節的变化	128
材料と方法	128
結果と考察	129
A. 冬の状態	129
B. 春の状態	133
C <sub>1</sub> . 夏の状態(6月)	137
C <sub>2</sub> . 夏の状態(7月)	139
C <sub>3</sub> . ハルマツタケ発生時の状態	143
D. 秋, 子実体発生時の状態	145
ま と め	148
引用文献	151
Summary	152

## 序

森林の表層土壌には数多くの微生物が生息し、落葉落枝の分解や菌根の形成にあずかり、生態系の物質循環に重要な役割を果たしている。マツタケもこれらの微生物が形成する社会の一部に属し、マツタケ自身の社会をその中で維持し、生活する。マツタケのシロの形態から、また菌根からマツタケが他の微生物や微生物集団に対してかなり積極的な働きをしていることは容易に予測される<sup>5)6)</sup>。森林の微生物相に関する研究はもちろん、マツタケのシロにおける微生物相に関する研究も十分なされているとはいえない。マツタケのシロの微生物相については田添<sup>12)</sup>が総説の中でふれている。沖永<sup>10)</sup>はマツタケのシロ内部では細菌と放線菌が著しく減少するが、糸状菌は変わらないとし、菌糸層に *Mortierella* sp. が多く、その量は季節的に変化するとした。馬場ら<sup>1)</sup>は糸状菌について *Mortierella* sp., ついで *Penicillium* がシロ土壌から分離され、土壌の深さがますます従って糸状菌の種類や出現コロニー数が減少するとした。また菌根からマツタケは分離されないが、マツタケはマツの根圏において土壌微生物一般と密接に関連し、平衡状態にあるであろうという。ろ紙を使用してシロ土壌中のセルロース分解菌を測定したところ、マツタケ発生地に少なく、不発生地に多く、発生地ではセルロース分解菌に拮抗する菌があるとした。また、子実体原基にも多数の糸状菌が混入するという<sup>12)</sup>。

一般高等菌類のシロにおける微生物フロアについて、WARCUP<sup>14)</sup>は *L. nudum* と *M. oreades* の場合を見たが、*L. nudum* の菌糸層内では糸状菌が減少し、外部土壌の約 1/3 量になると報告した。これ以外の研究例はない。菌根と土壌微生物フロアとの関連を見た研究例も同様でない。マツタケの菌根の場合にはその發育や分解の諸過程から見て、当然微生物フロアのそれら諸過程にともなう変化の存在が予測される。

微生物フロアに関連の深い土壌の性質に関する研究例も乏しいが、古くから、シロ内部は不透水層となり、イヤ地化することが知られている。シロ土壌の pH はシロの先端でいったん低下し、シロ内部で上昇する。土壌の含水率はシロ内部で 10~20% に低下する<sup>4)</sup>。このような傾向は他の測定例にも見られる。シロの形態と関連させた測定結果(村田未発表)によると、シロ外部で pH 5.1~5.2, シロ先端で pH 4.7,

子実体発生跡で pH 4.9, イヤ地の解消部分で pH 5.4~5.9 となり, 菌糸の活性の高い所で pH が低下する。シロ先端の pH の値は安定しており, 季節的变化に乏しい。土壌含水率はシロ外部で 22~28%, シロ内部では 19~22% である。シロ内部, ことにシロの先端の含水率の安定度は高く, 乾燥期にはシロ外部に比して内部が湿り, 湿潤期にはシロの内部が乾燥状態となる。このような状態は *L. nudum* や *M. oreades* にも認められる<sup>14)</sup>ことから, 高等菌類のシロの多くに認められる現象であると思われる。

山内ら<sup>16)</sup>はシロ土壌の物理的性質について測定を行い, シロ内部では土壌粒子の堆積が粗で, 乾燥し, 孔隙量と最小容気量が大, 真比重, 容水量および容積重が小, 飽水所要時間は長く, 粘土含量がやや多いという結果をえた。村田(未発表)によるとシロの層位に従って土壌の物理的構造が変化し, 2.0~4.0 mm の団粒が子実体発生位置を境としてシロ内部で急減し, 20 $\mu$  以下の土壌粒子の分散率がシロ内部で急増した。このことから, マツタケのシロでは土壌の団粒構造が菌糸の分解と関連して連続的に崩壊するということがわかる。

シロ土壌の化学的性質について山内ら<sup>16)</sup>はシロ土壌の化学的性質には顕著な変化がなく, CaO の溶脱がシロ内部ではげしく, 硝酸態窒素が増加し, 真正腐植酸が減少するという結果をえた。しかし, 化学的性質については常に試料中に菌体が含まれており, そのために得た結果が必ずしも土壌自身の性質を示していないという問題がある。

シロの微生物相に関する研究は表層土壌における分解や根の分布の問題および土壌の理化学的性質や土壌内環境と密接に関連づけて考察する必要がある, その結果から微生物間の栄養連鎖や植物への栄養分の移動について考慮する段階を順次たどらなければならない。

ここではその始めとして, シロ土壌中における微生物相の実態, ことにシロの形態や菌根との関連, 季節的变化などについての詳細な結果を得ることを目的として調査を行った結果を報告する。本報の調査は主として調査地 a\* および b で行った。

土壌微生物相の調査方法に関する研究は多く, 近年土壌生息性菌については WARCUP<sup>15)</sup> が, 根面生息性菌については PARKINSON<sup>11)</sup> が各々総説を試みているが, 決定的な方法はない。微生物相の研究では調査方法によって結果が変わりやすく, 方法の選択は重要である。

## I シロ土壌における菌類相

土壌中に生息する菌類のすべてを知る方法は現在のところまだ考案されておらず, 主として間接的方法によって研究される。研究手法として分離培養法や直接観察法や土壌切片法などがしばしば用いられるが, これらの方法によっても存在する菌をすべて見ることはできず, 生態学的にもっとも問題となる活性や習性はほとんど知ることができない。菌類は基質に接して生活する一方で周辺の土壌中にも菌糸を広げることが多く, また, 生活史もかなり複雑である。従って, 基質を重視して研究すると同時に個々の習性を知っておく必要がある。個々の菌の習性が生活によって分類され, 試料の処理方法や培養基を含めて分離培養法が土壌中に生息する菌の生活に対応して考察されることが望ましい。現行の方法はあくまでも部分的もしくは特殊な事実を明らかにする程度にとどまり, 1つの方法のみによって微生物フロアの全体を論ずることはできない。

\* 調査地 a, 京都市左京区岩倉尼吹山 (第IV報に記載)

調査地 b, 京都府船井郡和知町 (第I報<sup>5)</sup>に記載)

## 材 料 と 方 法

### A. 分 離 培 養 法

#### a. 試 料 の 採 取

土壤微生物相に関する研究においては試料の採取位置と方法とが前もって重要な問題となる。マツタケのシロのような明瞭な変化段階を示す対象からはその変化に応じて試料を採取し、他からの微生物の混入を極力避ける必要がある。

シロの土壤断面を作製し、採取位置をシロの層位や土壤層位と関連づけて決定し、殺菌した採取容器を土壤に挿入した。採取容器としてはガラス製の管を試験管に入れて滅菌したものや小型の金属製のカンなどを用いた。土壤断面を削って手早く容器を挿入し、その後の操作も無菌的に行った。

土壤表層から試料を採取する場合は容器を斜めに挿入した。H 層などの採取は層位に合わせて半無菌的に行った。

試料の採取は主として晴天の日に行い、雨天や風のある日を避けた。天候は孢子形成や混入の率を左右することがあり、とくに土壤水分の状態によって平板希釈法による結果は大きくことなる。各例の試料採取位置はシロ位置図と対応させた試料採取位置図に示した。なお、各例のシロの形態の詳細については第 I 報<sup>5)</sup>に記載した。

#### b. 菌 の 分 離

##### 1) 平 板 希 釈 法

この方法によって分離されるのは *Trichoderma*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* などの孢子を容易に形成するいわゆる *Sugar fungi* であり、根面生息性の生長の遅い菌はほとんど分離されないのがつねである。平板希釈法はもっともよく用いられる方法ではあるが、菌類には適さず、土壤中における優劣をその結果から論ずることはできない。

試料土壤 1 g を無菌的操作によって 10 cc の無菌水に加え、砕いた後懸濁液を 1 cc 取って 9 cc の無菌水に加え、同様の操作によって必要濃度に希釈する。最終の希釈液を寒天培地 100 cc または 200 cc に加え、プレートに分注する。多くの場合 100~1,000 倍の希釈を行ったが、土壤の性質によって濃度は変更した。分離結果は出現するコロニー数として計測した。通常の表示は 1 g 中のコロニー数とするが、ここでは出現したコロニーの実数を示すのにとどめた場合もある。

##### 2) Soil plate 法

試料土壤約 1 g を砕いて寒天培養基に直接加え、プレートに分注する。菌体断片などは上層に浮き、土壤は底に沈んで、菌糸に由来するコロニーが出現しやすい。

試料土壤をプレートに置き、上から培養基をかけても同様の結果がえられる。

この方法はシロの先端などの特殊な部分についてのみ行った。この場合、出現するコロニー数で表示することは無意味であり、ある菌の有無のみを問題とする場合に用いるのが適当である。

##### 3) 土 壤 塗 布 法

試料土壤の小塊をプレート当り 12~15 点ずつ植付けた。この土壤小塊の中には有機物が含まれないようにした。この方法によると細菌や放線菌の出現率が低く、主として菌糸に由来する菌類のコロニーが出現し、その結果は平板希釈法によるものと大きくことなつた。ただし、この方法では *Trichoderma* など

の生長の速い菌がプレートを占有するが多かった。表示は各菌のコロニー数の全植付点数に対するパーセントで示したが、ここではコロニーの実数のみを示した場合もある。

#### 4) 直接分離法

試料中の菌糸を実体顕微鏡などで検鏡しながらガラス棒などにひっかけて培養基上にうえつけ分離した。試料を湿室に保ったり、液体培養基を加えたりして菌糸を発生させた後分離した場合もある。この方法はシロの先端やシロ内部の特定の部分のフロラを見るために用いた。

#### c. 分離用培地

菌類の分離用培地は菌の性質を考慮すると、多種類になるが、フロラを見る目的には出現数や種類数ができる限り多くなるものを主としなければならない。特定の菌については特殊培地を併用することもある。

土壌菌類の分離に広く使用されるのは glucose と peptone を主にした培地である。grucose は菌類にもっともよく利用され、炭素源として適当であった。その他の糖類や多糖類は特定の菌の分離に使用した。窒素源としては無機態窒素より peptone のような有機態窒素が適当であり、yeast extract を加えるとさらに良好な結果がえられた。peptone と glucose の比は 1:2~1:4 が望ましかった。 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  などを添加すると菌の種類数が増加した。また 1 kg の母材土壌に 1,000 cc の水を加え、加圧抽出した土壌浸出液を培養基当たり 500 cc 加えた場合もある。

培養基の pH は 5.0~5.5 に調整した。調整には 1 N-HCl または 1% 乳酸を使用した。

細菌や放線菌の出現は pH の低下によって抑制されたが、培養基 1,000 ml 当たりローズベンガル 50~100 mg, ストレプトマイシン 30 mg とテトラサイクリン 2 mg およびペニシリン 50 mg などを加えるとさらに良好な結果がえられた。通常はローズベンガルのみを加え、表層土壌の場合には抗生物質を併用した。

使用した培地を以下に示す。略記号は以下の記述にも使用する。

#### W 培地<sup>18)</sup> (Waksman 培地を修正)

glucose	10 g
peptone	5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
agar	15 g
tap water	1,000 ml
pH 5.0 (rose bengal 30 mg を加える場合もある)	

Ws 培地 W に土壌浸出液を 500 ml 加える。

Wy 培地 W に yeast extract を 500 mg 加える。

#### M 培地<sup>2)</sup> (浜田培地を修正)

glucose	10 g
yeast extract	2 g (dry yeast の場合は 5 g)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
agar	15 g

tap water 1,000 ml

pH 5.0

Ms 培地 M 培地に土壤浸出液 500 ml を加える。

S 培地 (合成培地)

glucose 10 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g

$\text{CaCl}_2$  100 mg

Fe-citrate 0.4 mg

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 mg

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  0.2 mg

agar 15 g

distilled water 1,000 ml

pH 5.0 (抗生物質を添加する場合もある)

Sr 培地 S 培地に yeast extract を 500 mg 加える。

炭素源をかえて分離する場合には glucose を除いたものを基本として用いた。

#### d. 培養条件

培養温度は温度実験の場合を除いて 20~25°C に保った。低温や 30°C 以上の高温では菌の発育も出現も抑制された。培養期間は通常 7~10 日間とし、以後、光条件下において室温で 10~15 日間放置し、孢子形成をさせ、計測した。

#### B. 直接観察法

土壤中の菌の生態を見る方法としては土壤切片法、contact slide 法、土壤染色法および observation box による方法などが考案されているが、シロの断面における観察にはこれらの方法が必ずしも適当ではない。ここで使用したのは試料から菌糸をとり出して染色検鏡する方法である。

##### a. 試料の採取

試料採取は先述の場合とほぼ同様であるが、シロの特定の位置から塊状の土壤をとり、そのまま観察したり、湿室に保った後発生した菌をとり出して観察したりする方法をとった。

##### b. 観察方法

実体顕微鏡や光学顕微鏡、位相差顕微鏡などにより、菌糸をコットンブルー、ヨード・ヨードカリ、メルツァー試薬、ズダンⅢなどの溶液で染色して観察した。

#### C. その他の方法

シロの進行方向に沿って培養基を入れた試験管をうめシロの進行にともなうフロラの変化を見る方法、シロ断面について同様に行う方法、ろ紙片やワラ等を土壤中に挿入して分解能力を持った菌を分離する方法などを試みたが、いずれもシロ土壤の微生物フロラを知る方法としては欠陥が多かった。

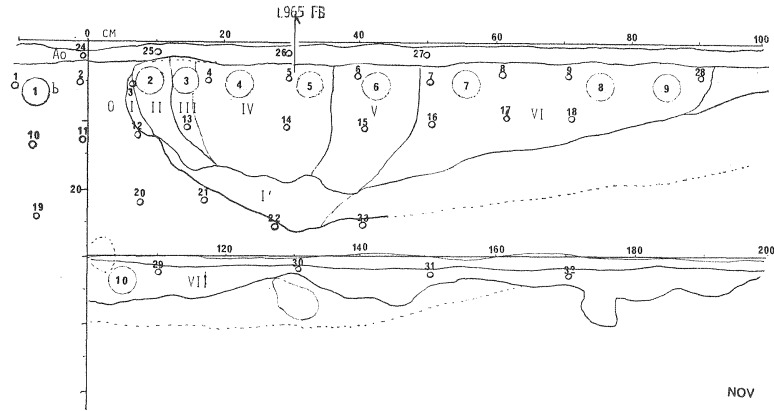


Fig. 1 シロ断面における土壤微生物分離用試料の採取位置

1965年11月30日, 京都府, 調査地 b

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms. Nov. 30, 1965. Research area b, Kyoto Pref.

シロの形態や菌根, 土壌などとの対比は第 I 報<sup>5)</sup>, 11 月の例を参照, 0~VII: 菌糸, 菌根, 土壌などの形態変化をもとにして区分されたシロの層。土壤微生物の分離用試料は 1 から 32 の各点で滅菌チューブによって採取された。根, 有機物などに生息する菌については丸でかこまれた 1~10 の点で試料採取を行った。矢印は子実体発生跡, シロは左に拡大する。

Details of morphological features of the Shiro were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. 0~VII: zones classified according to the morphological features on mycelium, mycorrhiza, soil and so on. The samples for the investigation of soil microflora were collected from 32 points with small circles, and those for the isolation of microorganisms on organic matters and roots were collected from 10 points with large circles. FB: fruit body occurring position in 1965.

## 結果と考察

1965 年 11 月, 調査地 b のシロから試料を採取した位置を Fig. 1 に示す。採取試料を菌根と植物遺体および土壌とに分けて微生物を分離したので, その結果を A, B として記述する。

### A. シロ土壌の有機物上の菌類相

この場合には菌根と植物遺体を一括して分離培養に供した。方法の要点は Table 1 に併記した。

採取位置は H 層の下 3 cm から 7 cm の範囲とした。採取は径 5 cm のシャーレを用いて行った。

点 1 ではアカマツの根が少なく, 他の植物の根や植物遺体の小片が認められたが, 量的には少なかった。点 1 の断片の 83% から *Trichoderma* と *Mortierella* sp. が分離され, *Trichoderma* は 60% 程度であったが, 生長が速いためにプレートを完全に占有する場合が多かった。*Trichoderma* はアカマツの根の枯死しはじめた部分や他の植物遺体の大きい断片から多数分離された。他の点, 2, 3, 4 などに比して種類数は多かった。

点 2 は層 I から層 II にかかっており, 菌に侵されない若い白色汁質の根がわずかに含まれていた。ここからは根面生息性の 2 種が分離され, 出現頻度は 5.7% であった。アカマツの根以外の根はなく, 白色菌糸が多いことから, 他の菌がアカマツの根に着生できない状態になり始めていたといえる。他のシロにおける分離結果を見ると, この部分にある他の植物の遺体からは *Trichoderma* や *Penicillium* などが分離されたことがあり, マツタケによる完全な占拠はまだ行われていないと思われた。

Table 1. シロ土壤中の菌根、植物根およびその他の有機物上の菌類フロア  
調査地 b, 1965 年 11 月 30 日

Frequency of soil fungi on the mycorrhiza, plant roots and other organic matters in the Shiro. Nov. 30, 1965. Research area b.

試料採取位置 Sampling points	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
種 Fungal species										
<i>Trichoderma</i> spp.	63						28.5	27		5.7
<i>Mortierella</i> sp.	10							2.8		
R-I			7.1		2.8	14	2.8	5.7	1.4	15.5
R-II		4.3	10	2.8	2.8	27		5.7	14	5.7
R-III									21.4	4.3
No. 7		1.4	9	5.7	4.3	31	4.3	5.7	7.1	15.5
8					2.8	1.4		2.8		1.4
9						5.7				2.8
11							4.3	7.1		
Others	10						5.7			
種 数 Species number	6	2	3	2	4	5	7	9	4	7
コロニー数 Colony number	58	4	18	6	9	56	53	40	31	36
頻 度 % Frequency	83	5.7	25.7	8.5	12.8	80	75.7	57.1	44.3	51.4

シロ土壤から採取した試料は滅菌水で 10 回洗浄し、小片に切断した後、WY 培地上に接種された。1 プレート当たりのうえつけ数は 70 とし、出現頻度は分離された菌の全接種点数に対する % であらわした。培養は 25°C, 10~25 日間行った。

70 fragments of root and others which had been washed ten times by sterilized water and cut to small pieces were inoculated on the plates with WY medium, and they were incubated for 10~25 days under 25°C. Most of fungi isolated were sterile or unidentified. Frequency: percentage of the number of fungi isolated per total inocula.

点 3 では菌根が発育段階の 2 と 3 に達し、根面を鏡視するときに褐色の太い菌糸が認められた。ここからはいずれもアカマツの根面に生息する 3 種の菌が分離された。出現頻度は 25.7% と点 2 に比してやや高かった。これらの菌は菌根からも植物遺体からも分離されたことから、点 1 や 2 で植物遺体上に残存していた *Trichoderma* などがこれらの菌によって追われ、菌根に支配されたフロアが土壤中で優勢になってゆくといえる。

菌根が分解段階に入るのと同時に多種類の菌が分離されたので、菌根の発育段階 3 などにおいて皮層細胞内にまで達している菌をマツタケと断定することはできない。

採取点 4 では点 3 より菌根の分解が進行していたが、菌の種類は 2 種となり、出現頻度も点 3 の場合に比して低下した。ただし、他の調査例では R-I が高頻度に分離されることがあったので、一般的傾向とはいえない。

点 5 は子実体発生位置の下にあり、試料の大部分は菌根の分解し始めたものであった。いずれも根面生息性の 4 種の菌が分離された。出現頻度は次の点 6 に比して低かった。点 2 から点 6 までに菌根と認めうるものが多く、この範囲の土壤も菌根にともなうフロアの影響を受ける。

点 6 は前年の子実体発生位置で、菌根の分解が進んでおり、根面生息性の菌に加えて土壌生息性の菌が分離された。

点 7 では分離される菌の種類数も多く、*Trichoderma* が出現し、根面生息性の菌は減少した。点 8 で



もほぼ同様の傾向が認められたが、植物遺体からは *Mortierella* sp. が分離された。

点 9 では *Trichoderma* が消え、根面生息性の菌が優勢となり、点 10 でもほぼ同様の傾向が認められた。

全体を通じて *Trichoderma* は活性菌根が多い部分を除いてシロの内外に分布し、アカマツの根と植物遺体のいずれをも基質とした。他のシロでは *Trichoderma* の種がシロの内部と外部とで異なり、時にはシロ内部において *Trichoderma* にかわって *Pachybasium* sp. が現われた。

*Mortierella* sp. はシロ土壤からもっとも多く分離される菌であるが、植物遺体や菌根からはさほど分離されない。この菌は恐らく菌糸状では有機物に着生せず、主として土壤中に生息していると思われる。

根面生息性菌は一般に生長が遅く、分生孢子や空中菌糸を形成しにくい。菌根から分離される根面生息性菌は通常のアカマツの根からも分離され、菌根の分解段階の進行にともなって出現頻度が高くなることや活性菌根や若い根から分離されない事実によって、恐らく腐生的能力が強いものであると思われる。これらの菌の生理的性質に関する実験からも(未発表)上述の事が確認された。これらの菌根に主導されるフロラは土壤生息性菌のフロラにも大きく影響する。

#### B. シロ土壤の菌類相

土壤塗布法による分離結果を Table 2 に、平板希釈法による分離結果を Table 3 に示す。試料は両法の場合、いずれも同一点から採取した。採取にはガラス管を用い、培養基は Table に付記たものを使用した。

##### a. 土壤塗布法による結果

採取点 1 から 9 までと 28 から 32 までは A 層、10 から 18 までは B 層上部、19 から 23 までは B 層下部であった。3, 12, 21, 22 および 23 はシロの菌糸層と未感染土壤との境界または層 I, 13 は層 III, 4, 5 および 14 は層 III' から層 IV へかけて、15 は層 V, それ以外の採取点はイヤ地部分であった。

未感染土壤の上層、点 1 と 2 では *Trichoderma* が接種した土壤小塊の 50% 以上から分離された。*Mortierella* sp. や R-II 以外の根面生息性菌はプレート上で *Trichoderma* に抑えられることもあって出現頻度が低かった。後述の平板希釈法では *Trichoderma* が分離されず、*Mortierella* sp. の出現頻度が高くなる傾向があったが、これは方法上の問題であると同時に土壤中における両者の生活状態の違いを反映した結果であると思われる。すなわち、*Trichoderma* は土壤表層において有機質を菌糸状態で利用しているために、主として孢子に由来する菌が分離されやすい平板希釈法では分離されにくい。一方、*Mortierella* sp. は孢子状でいることが多いために平板希釈法で多く、土壤塗布法で少なくなったと思われる。

点 10 と 11 でも *Trichoderma* が優勢で、*Mortierella* sp. が少なかった。ここには根の腐朽断片や腐植が含まれていた。

深さ 20~30 cm の未感染土壤にある点 19 と 20 では *Trichoderma* と *Mortierella* が減少し、生長の遅い土壤生息性菌が増加し、種類数も上層に比して多くなった。19 と 20 のように近接した点でも出現する種類が著しく異なった。

19 と 1 では根面生息性菌の R-II と R-IV が分離されたが、これらの菌は種々の植物の根を分解し、土壤中にも生息する。これらはシロの拡大以前からシロ外部にあり、シロの拡大によっても抑制されず、後にシロ内部において繁殖が盛んになったと思われる。ことに R-II は菌糸が断片になりやすく、基質を離れても生存しうる。

Table 2. シロ土壤における菌類フロラ，土壤塗布法  
Fungal flora in the Shiro soil, Soil smear

種 Fungal species	試 料 採 取 位 置									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	28
<i>Trichoderma</i> sp.	56	55					23	7	10	
<i>Mortierella</i> sp.	12	9	12	69	33		4	3	3	35
<i>Oidiodendron</i> sp.			3		1	3		3		7
No. 7			13	5	23	1		5		22
8							1			
9										
10					3					2
11		3							3	
12			1		7					7
14						3		1		
15										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
30										
31										13
33										
R-I			3	3	8			4		11
R-II	3				3	3		4	3	
R-III										
R-IV										7
種 数 Species number	7	5	5	3	7	4	5	8	7	9
頻 度 Frequency %	73	68	32	69	69	9	29	26	24	100

表中の数値は分離された菌のコロニー数，頻度は分離された菌のコロニー数の全接種点数に対する比率(%)  
培養基：WY + 土壤煎汁培地，1 プレート当たり，10～12 個の土壤小塊を無菌的に採取後，接種した。

未感染土壤では上述のように土壤層位と深さに対応したフロラがある。このフロラの変化は主として有機物の分布状態と物理的条件の変化に対応していると思われる。好気性のつよい菌は上層に多く，このような菌は有機物の分解力も一般に高い。*Mortierella* sp. は土壤の深さに応じて出現頻度が低下したが，これは主として土壤中における胞子の分散様式によるものと考えられる。

層Ⅰと層Ⅱの境界の点3からは *Trichoderma* が分離されず，*Mortierella* も少なかった。一方，生長の遅い *Oidiodendron* sp. や No. 7 などシロ内部に生息する菌が出現した。菌根のない層Ⅰでもすでにシロ

による，調査地 b，1965 年 11 月 30 日  
method, Nov. 30, 1965, Research area b.

Sampling point																	
29	30	31	32	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
7 22  4       4 7	18 2 44 2   4	9 18	20	62 3	23 3	1   3 1		10	18	 14	10 4	 14	10 4	5	9	3	
								1	33 1			4	10  1 4 3	3 1 3 1	7		1
32 7	18 11	26				3		4 1	1 13	10		16 34					
8 99	8 100	4 62	4 38	4 66	4 26	5 8	0 0	4 16	5 69	3 29	2 14	4 68	8 34	7 14	3 17	2 24	2 22

Small soil crusts were inoculated 10 to 12 pieces on the plate with Wy + soil extract medium. Numbers in the table are the colony number of fungi isolated. Frequency means the percentage of isolated fungi per total inocula. It was probable that the inocula free from fungi might be occupied by the fungus or the other microorganisms.

の影響がでており、未感染土壌とシロ土壌との相異は *Trichoderma* の有無に明瞭に現れた。点3の土壌からは R-I も分離され、全種数の変化は少ないが、菌の発生しない土壌小塊が多くなり、出現率が低下した。未感染土壌とシロ土壌との相異は平板希釈法によるとさらに明瞭となり、点3からは *Mortierella* sp. が分離されるだけとなった。

点3の下, 点12は未感染土壌と層Iの境界である。ここでは *Trichoderma* が少なく, *Mortierella* sp. は分離されなかった。他の菌はシロ土壌に生息するものであるが, 出現率は低かった。点11と比較す

ると、*Trichoderma* が急激に減少しており、シロの影響は未感染土壤にもかなり強くおよんだ。ただし、この境界では細菌や放線菌がシロ外部と変りない程度に分離された。

未感染土壤と層 I' との境界、点 21 でも *Trichoderma* はなく、*Mortierella* sp. が少数分離された。点 20 では *Trichoderma* が多いことからこの境界線でもかなり積極的に *Trichoderma* が排除されていると考えられる。ただし、菌糸のみの層 I' が厚い場合の境界、点 22 では *Trichoderma* が出現したので、*Trichoderma* の排除には細菌や放線菌の場合と同様、菌根が関与している可能性が高い。点 21 や 22 では他の菌類も減少した。

活性菌根の多い層 III の点 13 では何も出現しなかった。平板希釈法によってもこの点からは少数の *Mortierella* sp. が分離されたに過ぎない。ここではほぼ完全に土壌生息性菌が排除されているといえよう。

層 IV の上層の点 4 では *Mortierella* sp. が多く、No. 7 と R-I も少数出現した。*Mortierella* sp. は平板希釈法によってほとんど分離されなかった。一方、この点ではマツタケの菌糸がかなり分解し、白色の細い菌糸が多数混入した。この点の土壤を湿室におくと *Mortierella* sp. が多数発生した。これらのことから *Mortierella* sp. はマツタケの菌糸が死滅すると同時に菌糸状になって活動し、マツタケの菌糸の分解に関与するものと思われた。このことは生理的実験（未発表）からも推測された。

子実体発生位置の下、点 5 からは *Mortierella* sp., *Oidiodendron* sp. No. 7, R-I および R-II が分離された。出現率は点 4 と同一であったが、種数は増加した。菌根の分解に関与する R-I と R-II の増加は点 4 に比して菌根の分解が進行したことを示している。

点 5 の下、点 14 では *Mortierella* sp. が少なく、根面生息性の R-II と R-III が出現した。ここではマツタケの菌糸と菌根の分解が進行した。平板希釈法では *Mortierella* sp. が少数分離されたにすぎない。

層 V の上層の点 6 では *Mortierella* sp. がなくなり、出現率は 9% に低下した。他の菌は点 5 と同様であった。平板希釈法によると点 6 からは逆に *Mortierella* sp. が多数分離された。また点 6 からシロ内部にかけて土壤塗布法による *Mortierella* sp. の出現率が低下した。これらのことから *Mortierella* sp. はマツタケの菌糸の分解、すなわち、この菌にとっての基質の消失のために菌糸状から孢子状にか変わったものと思われる。

点 6 の下の点 15 には点 14 と類似の傾向が認められた。点 15 で R-IV が急激に増加したが、この菌はシロ内部においても均一に分布せず、基質の分布の不均一さに応じて局在した。この点からは平板希釈法によって菌が分離されなかった。恐らく、数種の菌が特定の基質に菌糸状態で集中しているものと思われた。

層 IV の上層の点 7 から点 8, 9 にかけてはコナラの腐朽した根があり、そのために *Trichoderma* が増加した。*Trichoderma* の出現によって他の菌は出現しなかった。

点 8 からは *Trichoderma* sp., *Mortierella* sp., *Oidiodendron* sp., No. 7, R-I および R-II が分離され、8 種が出現したが、コロニーの出現率は低かった。点 9 でも種類は 7 種となり、*Trichoderma* が現われた。平板希釈法によると点 8 と 9 からは *Mortierella* sp. のみが分離されたが、土壤塗布法では少なく、これらの点での *Mortierella* sp. の活性は低いと思われた。

点 16 からは *Oidiodendron* sp. と R-III が集中的に分離され、点 17 では *Trichoderma* sp. が、点 18 では *Mortierella* と R-II および R-III が多数分離された。このようにシロの内部に入るに従ってフロラは不均一となり、種類数が増加し、同一層内に属する各点からの分離結果が相違した。

点 28 からは *Mortierella* sp. と No. 7 が分離され、出現率 100% となり、種類数も増加し、先の点 9 と大きく相違した。この点からシロの中心に近い方向の各点でわずかながら放線菌や細菌が現われ、フロラはシロ外部の土壤のものに近づいた。微生物的なイヤ地の解消はシロの先端から 70 cm 程度の所から始まり、先の点 6, 7 などにおける *Trichoderma* の出現はイヤ地解消の初期現象と考えられた。

点 29 では *Trichoderma*, *Mortierella* sp., *Penicillium*, R-II および R-IV も出現し、出現率は 99% であった。点 30 では *Mortierella* sp. と No. 7 が多く、R-III と R-IV が分離されて、出現率 100% であった。28, 29, 30 の各点は各々約 20 cm 隔っていたが、菌の出現傾向は一致しており、*Mortierella* sp., No. 7 および根面生息性菌が共通して現われた。恐らく、これらの点ではシロのイヤ地解消が緩慢で、菌根の分解も遅く、フロラはやや安定した状態にあると思われた。

点 31 では *Mortierella* sp. が消え、No. 7 と R-II となり、出現率は 62% に低下した。点 32 では *Trichoderma* と *Penicillium* が多く、未感染土壤のフロラとほとんど異ならなかった、平板希釈法でも *Penicillium* や *Mucor* が分離され、点 31 から点 32 にかけてのフロラは未感染土壤のものに近づいた。

シロ底部の点 23 からはほとんど何も分離されなかった。この土壤では深さ 20 cm 以下の B~C 層に菌類が極度に少なくなり、腐朽根などの周辺にのみ分布する状態が見られた。

H~A 層にある点 24, 25, 26, 27 などの点の植物遺体を含む土壤小塊からは *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mortierella* sp. などが分離され、細菌も多数分離された。シロの先端の H~A 層からは *Trichoderma* が消失することがあったが、シロ土壤に比してその変化は顕著に現われなかった。

#### b. 平板希釈法による結果

試料土壤 1 g を 200 倍に希釈し、分離した結果を Table 3 に示す。表中の数値は菌の分布傾向を知る目的から 1 プレート当たりのコロニー数の平均数とした。

未感染土壤の上層の点 1 と 2 では細菌と放線菌とにまじって *Mortierella* sp. が現われた。*Trichoderma* は分離されなかった。点 10 と 11 では菌の種数が増加し、点 10 からは *Trichoderma* と *Mortierella* sp. が、点 11 からは *Penicillium*, *Aspergillus* および根面生息性の菌が分離された。平板希釈法の場合にも採取位置が近接しているにもかかわらず、菌の種類や出現率が大きく異なるという結果がえられた。

表層から深さ 23 cm の点 19 と 20 では点 10 と 11 に比して菌の種類が減少し、一方、細菌や放線菌が増加した。*Mortierella* sp. は点 1, 10, 19 などに見られるように、深くなるに従って減少した。この菌の土壤の深さに応じた規則的な分布状態は他の場所でも認められた。この菌はシロの底部の点 22 や 23 からも分離されたが、これらはマツタケの菌糸の拡大にともなって深くまで入ったものであろう。*Mortierella* sp. は好気性がつよく、基質の利用範囲も広く、容易に孢子形成を行う。このような性質を持つ菌は一般に表層土壤に多く、孢子が下方への水の動きによって分散する可能性がある。*Mortierella* sp. もシロの外部では主として孢子状態で分布しているであろう。

菌糸層と未感染土壤との境界、点 3 からは *Mortierella* sp. だけが分離され、点 12 では細菌と放線菌が出現し、点 21 と 22 も点 12 とほぼ同様の傾向を示した。点 3 はシロの先端から 2~3 cm の点であるが、すでに完全にシロの影響を受け、ここからは他の微生物が排除された。菌糸のみの層がシロ外部と接触する他の点では排除作用が認められなかった。

点 4, 5, 13, 14 など、菌糸と菌根の活性が高い所からは *Mortierella* sp. だけが分離された。シロ内部

Table 3. シロ土壌における微生物フロア, 平板希釈法による  
調査地 b, 1965 年 11 月 30 日Microbial flora in the Shiro soil. Dilution plate method.  
Nov. 30, 1965, Research area b.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	28	29	30	31	32	24	25	26	27
Bacteria	28	8								+	+	+	+	+	+	+	+	+
Actinomycetes	14	4								+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mortierella</i> sp.	69	123	51	31	29	68	0	22	31	53	65	78	150	72	20	47	51	12
<i>Trichoderma</i> sp.											1			3	5	5	2	29
<i>Penicillium</i> sp.													1					
<i>Aspergillus</i> sp.													1					
<i>Mucor</i> sp.														16		7	3	
<i>Absidia</i> sp.															23		5	
Others																6	4	15
R-II				2									2		4			
R-II'																		
種数 Species number	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	2	2	3	3	5	6	8	5
種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point																	
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23				
Bacteria	21	85	25								62	121	26	+	+			
Actinomycetes	12	2	16								60	125	38	+	+			
<i>Mortierella</i> sp.	23	33	22	12	11		8	8	22	17	5	3	8	25				
<i>Trichoderma</i> sp.	12	3										2						
<i>Penicillium</i> sp.		2																
<i>Aspergillus</i> sp.		5									2							
R-II		25					2	4		2								
R-II'		2																
No. 12		1																
43												4						
42												1						
種数 Species number	4	7	2	1	1	0	2	2	1	3	2	3	1	1				

表中の数値は 1 プレート当たりの平均コロニー数, 200 倍希釈, 培養基: WY 培地。サンプルの一部について, 細菌は出現コロニー数の多少を+で示した。

1 g soil samples were diluted 200 times with sterilized water, and soil microbes were isolated on the plate with WY medium. Numbers in the table mean the colony number isolated on one plate, average value.

においてもシロ外部と同様に *Mortierella* sp. は土壌の深さに応じて漸減した。点 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15 などの場合, 平板希釈法による結果と土壌塗布法による結果が逆になった。前者で多い場合は後者で少なく, 後者で多い場合は前者に少なかった。これは先述のように土壌中における生活形態が各位置において異なっていたためと考えられる。

点 7 からは何も分離されず, 点 8 と 9 でも *Mortierella* sp. のみとなった。点 3 から 9 までと点 13 から 18 までを含む層はシロ外部土壌と著るしく異なっており, この範囲では *Mortierella* sp. が優占した。

点 28 からシロの内部では細菌と放線菌が現われ、菌の種類数、出現率がともに増加し、未感染土壤に類似した。先の土壤塗布法の場合と同様、この方法でも点 9 と点 28 との間に明瞭なフロラの違いがあり、イヤ地の解消が微生物的にも確認された。

H-A 層では細菌、放線菌および菌類がいずれも増加したが、シロの影響は不明瞭であった。

平板希釈法と土壤塗布法とでは上述のように結果が大きく異なっていたが、シロ土壤中における菌類の動態は両法による結果を総合するとかなり明らかとなった。

マツタケの菌糸や菌根の活性が高いシロの先端では通常の土壤生息性菌である *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* などが消失し、シロの内部においてもこの状態が維持された。排除作用は細菌や放線菌の場合<sup>7)</sup>ほど明瞭ではなく、菌糸のみの層からは完全に排除されず、シロ内部にある粗大有機物には後まで *Trichoderma* などが生き残った。

シロ内部においては *Mortierella* sp. が優勢となったが、この菌はシロ外部にも生息しており、必ずしもマツタケに随伴するとは限らない(未発表)。マツタケの菌糸の拡大によって排除されず、シロ内部に生き残って、マツタケの菌糸の死滅と同時に分解をはじめ、その他の基質をも分解するのにあずかっていると思われた。根面生息性の菌にもシロ外部にある正常なアカマツの根についているものが多く、マツタケの菌根にのみ特異的であるという菌はなかった。

シロ内部におけるマツタケの菌糸や菌根の分解はシロ内部から分離された菌によって主として行われた。何故なら、シロ内部からは細菌や放線菌が排除されたからである。これらの分解菌はまた 2 次、3 次の基質となりうるであろう。

見かけ上のイヤ地の解消、すなわち透水性の回復や菌根の消失や他の植物の根の再侵入などと土壤微生物相の変動には明瞭な対応が認められたが、この変化はシロの先端の場合よりも漸進的であった。

#### c. 直接分離法による結果

土壤の小塊や根面を直接検鏡しながら、菌糸をとり出して分離した。この実験は冬から春にかけて行ったが、そのうちのいくつかの例を Table 4 に示す。

I は層 I にある白色菌糸を Wys と M 培地にうえつけ、分離した結果である。菌類の出現率は 16%, *Mortierella* sp., R-II および No. 7 がわずかに分離された。土壤小塊と離れた白色菌糸からは何も分離されず、マツタケの菌糸と思われる菌糸は白色半透明で隔膜を有し、白色不定形の束状であった。一方、*Mortierella* sp. の菌糸は白色半透明であるが、隔膜を欠き、気胞に富み、ズダン III によって菌糸の内容物が染色される点などでマツタケの菌糸と見わけられた。従って、シロの先端にある不定形束状の空中菌糸の少ない光沢のある白色の菌糸はマツタケのものであると推測された。マツタケの菌糸を土壤から直接分離することは困難であり、種々の培養基を用いても成功しなかった。純粋培養したマツタケの菌糸を土壤にうえると、野外における菌糸の状態に近くなったが、これを再び寒天培養に移すと生育しにくいのが通例である。

*Mortierella* sp. はシロ土壤に多いことからマツタケと共生生活をしていると考えられることもあるが、マツタケの菌糸が活発に生育しているシロの先端では分離される頻度が低く、マツタケの菌糸が生きている状態において直接的なつながりをもってしているとは考えられなかった。その他の菌糸も厳密には土壤中に生息しており、マツタケと思われる白色菌糸に接していることは少なかった。

II は I の場合と異なって層 I の菌糸を含まない土壤小塊から分離した結果である。ここでは *Mortierel-*

Table 4. シロ土壤および菌根の白色菌糸から直接分離された菌  
1966 年冬から春

Fungi isolated directly from the mycelium, mycorrhiza and  
soil crusts. Winter to spring in 1966.

種 Fungal species	材 料 Materials						
	I 層 I の 白色菌糸 White mycelium in zone I	II 層 I の 土 壤 Soil crusts in zone I	III 層 II, A <sub>1</sub> 層 の白色菌糸 White mycelium in A <sub>1</sub> horizon of zone II	IV 層 II, B層 の白色菌糸 White mycelium in B horizon of zone II	V 層 III の 白色菌糸 White mycelium in zone III	VI 活性菌根 表面の白 色菌糸 White mycelium on the surface of active mycorrhiza	VII シロ中心の 白色菌糸 White mycelium in the center of Shiro
<i>Mortierella</i> sp.	1	7	12	24	24	22	27
<i>Oidiodendron</i> sp.		2				2	
<i>Trichoderma</i> spp.		3	1				2
<i>Pachybasium</i> sp.							3
No. 5			2				
6			1			2	
7	6						
R-I				2			
R-II	1						
R-III		2					
Total colony number コロニー数	11	14	15	26	24	28	32
Inoculated fragments number 接種点数	70	70	20	30	26	30	33
Frequency of isolated fungi 菌の出現頻度	16	20	75	85	92.3	93	95
Frequency of sterile fragment 菌の分離されない頻度	84	80	25	15	7.7	7	5

白色菌糸の断片はシロの各層の土壤、菌根の表面などから顕微鏡下でとり出され、培地上にうえつけられた。培養基 W<sub>Y</sub>, W<sub>YS</sub>, W<sub>S</sub> および M を使用した。25°C, 2~3 週間培養。菌の分離されない白色菌糸の断片はマツタケ菌糸と思われる。

Samples were collected from the Shiro in research area b. The four kinds of media, W<sub>Y</sub>, W<sub>YS</sub>, W<sub>S</sub> and M, were used for isolation. Fragments of white mycelium were inoculated on the plate being extracted from samples by hand under microscope and incubated for 2 to 3 weeks at 25°C.

*la* sp. がやや増加し, *Trichoderma*, R-III および *Oidiodendron* sp. が現われた。マツタケの菌糸が束状に発達生長すると、まず土壤孔隙に充満した。従って、土壤の小塊の中では未感染土壤の状態が持続し、厳密な他の菌の排除は見られなかった。ただし、マツタケの菌糸もしくは菌根による排除作用は急激に現われるというより、むしろ静菌的に徐々に進行すると考えられた。何故なら、これらの土壤小塊からは *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* などが分離されず, *Trichoderma* の分離頻度も低下していたからである。マツタケの排除作用に対する土壤生息性菌の感受性がことなることもこのような事実から推測された。

層 I の土壤を湿室に保ち、25°C に 7 日放置すると細い糸状菌が現われたが、その大部分は *Mortierella* sp. であった。さらに 7 日放置すると *Trichoderma* が出現し、10% グルコース液に浸して数日間放置す



ると *Trichoderma* や細菌が繁殖した。層Ⅱや層Ⅲに同様の処理を行っても *Trichoderma* の出現はなく、*Mortierella* sp. のみとなった。このことから土壤中ではこれらの菌の生育が物理的環境の違い、ことに空気の量と湿度によって抑制され、マツタケの生長が他の菌に阻害されず、確保されていることがわかった。

Ⅲは層Ⅱから白色束状の菌糸をとり出して分離した結果である。*Mortierella* sp. の数は少し増加し、*Trichoderma* や土壌生息性菌が分離され、出現頻度は75%となった。この試料の採取位置はH~A層の直下であり、多少腐植を含んでいた。冬季、菌糸の勢が弱まると、表層土壤に近い所では他の菌がマツタケの菌糸にまじり、検鏡すると形態的に異なる菌糸が2, 3認められた。

Ⅳは層Ⅱの深い所にある白色束状の菌糸をとり出して分離した結果である。ここには *Mortierella* sp. が多く、出現率は85%となったが、先のⅢの場合と異なって *Trichoderma* は分離されなかった。冬季の層Ⅱは菌糸の勢が弱く、白色の光沢がうすれており、マツタケの菌糸が部分的に *Mortierella* sp. に侵されているか、もしくは *Mortierella* sp. がマツタケの代謝産物を利用しているものと思われた。マツタケの菌糸が見かけ上弱まるにつれて、*Mortierella* sp. が菌糸状で分離されるようになるのが常であった。

Ⅴは層Ⅲの土壤小塊から分離した結果である。ここでは *Mortierella* sp. のみが出現し、出現率は92.3%となった。層Ⅱに比してマツタケの菌糸の勢は弱まり、土壤孔隙には白色の菌糸が充満した。また、この部分を一週間湿室に置くと、多量の白色菌糸 (*Mortierella* sp.) が発生したことから、この層の土壤はすでに *Mortierella* sp. によって占拠されていると思われた。層Ⅲの白色束状の菌糸からも *Mortierella* sp. が多数分離された。

Ⅵは菌根発育段階2の菌根面に着生する白色菌糸から分離した結果である。出現率は93%, *Mortierella* sp. がもっとも多く、土壌生息性の菌も多少分離された。これは冬季の菌根表面の状態であり、春季の菌根が活性を持つ時期には菌根表面から *Mortierella* sp. がほとんど分離されなくなった。このような白色菌糸を無菌水によって洗浄し、分離すると *Mortierella* sp. の出現率は低下したが、全くなくなることはなかった。シロの先端以外の部分にある白色菌糸には *Mortierella* sp. がかなり高頻度に随伴するといえる。

Ⅶはシロの中心近くにある白色粉状になった菌糸から分離した結果である。出現率は95%, *Mortierella* sp., *Trichoderma*, *Pachybasium* sp. などが分離された。ここではマツタケの菌糸がなく、同じ白色菌糸であってもシロの先端のものと全く質を異にしていた。

他の季節における実験結果からも白色束状の菌糸はマツタケのものであり、マツタケの勢が弱まるにつれて、*Mortierella* sp. が繁殖すると考えられた。子実体の発生跡などに多い白色の菌糸の断片からは *Mortierella* sp. が分離され、この菌がマツタケの分解にあづかっていることはほぼ明らかであった。

## 2. 菌根、根および植物遺体の菌類相

根面や根圏の微生物相に関する研究例は多く、近年の成果は PARKINSON<sup>11)</sup> によって総説されている。菌根については菌根菌を分離する方法が考案されているが、菌根菌を根面フロラの一部としてとらえた研究例は少ない。根から菌を分離培養するには一般に洗浄法が用いられる。また超音波による洗浄や薬品による表面殺菌も併用されるが、殺菌力の強い薬品の使用は根面フロラを知る目的には適さない。分離培養法には土壌微生物相の場合と同様に洗浄方法や培養基および試料の採取方法と材料の質の区分に大きな問題

がある。これらの問題については方法の記述の中に述べることにする。直接観察法は通常検鏡して行うが、根面フロラを知るためには補助的手段である。

## 材 料 と 方 法

### A. 分 離 培 養 法

#### a. 試 料 の 採 取

試料はシロの断面調査時にシロの形態と関連づけて採取した。採取は半無菌的に容器を断面におしつけ、根をきりながら行った。採取した試料は直ちに分離培養に供したが、長期間保存する場合は冷蔵保存し、外気にさらさないよう密封した。ここでは菌根と植物遺体などの有機物上の菌類フロラがシロの中でどのように変化するかを知ることと菌根の発育、分解段階にともなう菌類フロラの変化を知ることが目的であるために、直径約 4 cm のシャーレを使用した。従って、菌根とその他の有機物とは同一点から採取された。

#### b. 試 料 の 処 理

採取試料から土壤塊をくずしながら、水道水もしくは合成洗剤を含む水で洗浄し、菌根その他の有機物を取り出し、区分した。

前処理を行なった各試料は無菌水でさらに洗浄されたが、出現する菌の種類やその出現頻度は洗浄回数によって大きくことになった。例えば、菌根の先端の若い根を無洗浄で分離すると *Mortierella* sp. や *Trichoderma* が多数出現したが、これらの菌は洗浄回数を増すに従って減少し、10 回以上の洗浄では現われなくなった。植物遺体や発育段階の進んだ菌根には土壤粒が密着しており、洗浄によっても土壤生息性の菌が消えない場合もあった。このような場合には土壤生息性菌も根面フロラに加わっていると考えざるをえない。

ここでは無菌水による洗浄回数が 7 回目の時、試料を 2~3 mm の断片に切断し、さらに 3 回洗浄を行った。断片の大きさは小さいほど望ましいが、1 mm 以下では菌の出現しない断片が増加したため 2~3 mm の大きさにとどめた。

洗浄した試料小片をあらかじめ作っておいたプレート上に 15 片ずつうえつけた。うえつけ断片数は多いほどフロラを知るには望ましいが、50~60 片ではば目的を達した。洗浄からうえつけの間の操作は完全な無菌条件下で行い、過度に高温にならないよう留意した。

#### c. 分 離 用 培 地

分離用培地は先にシロ土壤における菌類相の所で述べたものを使用した。もっとも多く用いたのは W 培地にローズベンガルを添加した培地であった。特殊な培地としては根のアルコール抽出物を添加したものも使用した。その際の基本培地はマツタケ培養用培地であった。

#### d. 培 養 条 件

培養条件も先述の場合とはほぼ同様であるが、根面生息性の菌類は一般に生長が遅く、培養期間は通常 10~30 日間となった。培養温度も土壤の場合に比して低い方が望ましく、20~25°C に保った。

#### e. 分離された菌について

プレート上のコロニー数を計測し、総断片数に対する 1 種の菌の比率を求めて出現頻度とした。根面生息性の菌には孢子形成のないものが多いために番号を付して単離し、保存培養を行った。

## B. 直接観察法

各試料は分離培養前に検鏡し、菌の存在を確認した。試料の採取は a と同様であったが、洗浄は土壤粒がなくなる程度に止めた。観察は実体、光学、位相差などの顕微鏡を使用し、切片を作製して行い、染色も適宜行った。

## C. その他の方法

土壤からの分離培養に述べたものと同様、前培養を行って菌を発生させる方法や根面から検鏡して菌をとり出し分離する方法をとった。

## 結果と考察

A, シロにおける菌根上のフロラと植物遺体や植物の根の上のフロラとの関係を 3 月の例によって述べ、B, 菌根上の菌類サクセッションを菌根の発育段階がもっとも区分できる 5 月の例によって詳細に述べる。

### A. シロにおける菌根上の菌類相と植物遺体やアカマツ以外の根の菌類相

植物遺体やアカマツ以外の植物の根を略して粗大有機物という。

1966 年 3 月に試料を採取した位置を Fig. 2 に示す。シロの状態は冬季と変わらず、菌根はわずかに生長を開始したばかりであった。菌根は発育段階を重視せず、シロの層位に合わせて採取した。

菌根と粗大有機物から分離培養した結果を Table 5 にわけて示す。R は菌根とアカマツの根、R<sub>0</sub> は他の植物の根と植物遺体である。シロ外部の点 1 と 2 にはアカマツの根がなく、すべて R<sub>0</sub> に含められた。シロの先端の点 3 にも材料となるほどの菌根はなかったので R<sub>0</sub> とした。

点 1 と 2 はほぼ類似の傾向を示し、*Trichoderma*, *Mortierella* sp., *Penicillium*, No. 9 および R-I が共通して現われた。洗浄回数の増加によって *Mortierella* sp. は減少したが、これらの粗大有機物には土壤が密着していたために土壤生息性菌が多数分離された。

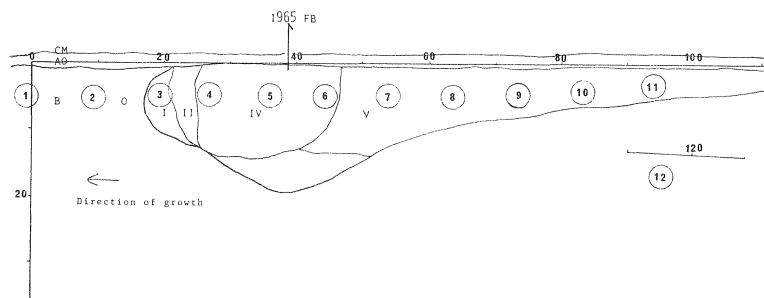


Fig. 2 菌根、植物根および植物遺体からの微生物分離用試料採取位置  
調査地 b, 1966 年 3 月 18 日

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of microorganisms inhabiting on the mycorrhiza, plant roots and plant debris. Mar. 18, 1966. Research area b.

シロの形態の詳細は既報<sup>5)</sup>。I～VII: シロの層位, 1～12: 試料採取位置, 試料は殺菌シャーレによって採取し、洗浄後、菌根と植物遺体等に分割した。

Details of morphological description were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. I～V: zones classified. The samples for isolation were extracted by washing from the soil crusts which were collected from the points 1～12.

Table 5. シロにおける菌根, 植物根および植物遺体上の菌類フロラ  
調査地 b, 1966 年 3 月 18 日

Fungal flora on the mycorrhiza, other plant roots and plant debris in the Shiro. March, 18, 1966. Research area b.

菌根を含むマツの根 Pine roots including the mycorrhiza (R)								
種 Fungal species	R 4	R 5	R 6	R 7	R 8	R 9	R 10	R 11
<i>Mortierella</i> sp.	27	29	13	8	4	6	22	12
<i>Trichoderma</i> sp.	1							
<i>Pachybasium</i> sp.				11	18	10	5	6
No. 8			5	1				
7				35		1	2	
R-I	17		6, 5	13	5	10		
R-II		5	16	8	9	15	4	
R-III	4	5	26, 5	7	2	5	20	
R-IV	1	1	8	2	2	3		
種数 Species number	5	5	7	7	6	7	4	4
頻度 Frequency %	50	40	50	50	40	50	51	18

植物根と植物遺体 Other plant roots and plant debris (R <sub>0</sub> )												
種 Fungal species	R <sub>0</sub> 1	R <sub>0</sub> 2	R <sub>0</sub> 3	R <sub>0</sub> 4	R <sub>0</sub> 5	R <sub>0</sub> 6	R <sub>0</sub> 7	R <sub>0</sub> 8	R <sub>0</sub> 9	R <sub>0</sub> 10	R <sub>0</sub> 11	R <sub>0</sub> 12
<i>Mortierella</i> sp.	12	6	28	6	6		6	16	8	8	32	14
<i>Trichoderma</i> sp.	70	62	44	66	20						8	32
<i>Pachybasium</i> sp.		2		6	16		14	20				4
<i>Penicillium</i> sp.	36	22	18	4	4		8		10	2		
<i>Mucor</i> sp.			6				2					
No. 9	4	16	8					8	8	2		10
Others		1	18		4							
R-I	12	8	8		44	8	6	14	26	48	30	16
R-II				6	8	10		8	20	26	44	10
R-III				4	6	82	52	20	10	8	4	16
種数 Species number	7	8	8	6	8	3	6	6	8	6	5	7
頻度 Frequency %	120	120	125	90	100	100	84	84	76	90	105	86

R : マツの根および菌根, R<sub>0</sub> : アカマツ以外の植物根と植物遺体, 表中の数値は全接種点数に対する菌の出現頻度, 分離方法は洗浄法による。培養基 : GPY, pH 5.0, 培養期間 30 日, 温度 25°C

The samples were washed with tap water and sterilized water and cut to small pieces. Small pieces were inoculated on the medium, GPY pH 5.0, and incubated for 30 days at 25°C. The numbers in the table are the frequency of fungi isolated.

菌糸層の先端の点 3 では点 1 や 2 と類似した傾向が認められたが, *Trichoderma* や *Penicillium* は減少し, シロによってこれらの菌が消失したのがわかる。

層 IV の前方の点 4 の粗大有機物からは *Trichoderma*, *Mortierella* sp., *Pachybasium* sp., *Penicillium*, R-II および R-III が分離された。*Trichoderma* の出現率が高く, この位置でも粗大有機物, コナラの腐朽根に密着して生活する場合にはこの菌が排除されないことを示していた。点 4 の菌根からは *Mortierella* sp., R-I, R-III, R-IV および *Trichoderma* が分離された。*Trichoderma* の出現は例外的であった

が、粗大有機物に多数生息していた事実から、この菌が局部的に繁殖していたものと思われた。

子実体の発生跡の点5の粗大有機物には点4で分離されたのと同じ種類が多く、R-I, R-II および R-III が分離され、菌根からは *Mortierella* sp. の他に R-II, R-III および R-IV が分離された。*Trichoderma* が粗大有機物から分離された率は点4に比して低く、*Pachybasium* sp. のそれは高くなった。

点6の粗大有機物からは R-I, R-II および R-III のみが分離され、*Trichoderma* などは出現しなかった。菌根からは *Mortierella* sp. と根面生息性の菌が分離された。この点に至って粗大有機物上においても生育の速い土壌生息性菌が排除され、逆にアカマツの根面生息性菌が優勢となり、フロアの交代が起きた。これはマツタケの排除作用が強くなるのと同時に植物遺体の中に菌根の分解物が含まれる率が高くなったためである。

点7の粗大有機物からは *Penicillium* と *Mucor* が分離され、菌根からは再び *Pachybasium* sp. が分離された。この点までの粗大有機物からの菌の出現率は100% 前後、菌根からの出現率は50% 前後であった。点7, 8, 9 および 10 の粗大有機物と菌根とから分離された菌の種類はほぼ類似していたが、菌の出現率は粗大有機物において多少低下した。これらの点の粗大有機物上のフロアはシロ外部のものと全くことになっており、菌根にともなうフロアが粗大有機物にうつったことが明らかとなった。

点11には菌根はなく、アカマツのやや太い根が増加したが、これらの根からは *Mortierella* sp. と *Pachybasium* sp. とが分離された。粗大有機物からは *Trichoderma* が分離され、*Mortierella* sp. も増加した。点12のアカマツの根からは根面生息性菌が出現せず、粗大有機物からは点11の場合と同様根面生息性菌が分離された。

上述の結果を菌の種類について見ると、*Mortierella* sp. はほぼすべての点に常在した。洗浄が幾分不完全であったのかまたは季節的变化の現われであったのか、*Mortierella* sp. は菌根からも常に出現した。

*Trichoderma* は菌根から分離されず、粗大有機物からは点4と5で分離され、点6から10で消え、点11以上で再び分離された。土壌から分離した場合には点3, 4, 5などに相当する位置では分離されず、点11以上に相当する位置で分離されるのが常であった。このことから *Trichoderma* は基質に密着している場合にはマツタケによって排除されないといえる。*Penicillium* などが点4以内の点でも度々出現したのも同様の理由によると思われる。*Trichoderma* と類似した *Pachybasium* sp. はシロ外部に少なく、シロの内部に増加し、菌根が分解されるに従って、粗大有機物から菌根にうつっていた。

根面生息性の R-I はシロ外部にもあり、シロ内部に至って増加し、菌根の分解段階に常在した。R-I と同様 R-II や R-III も菌根につきシロ内部に入って増加し、粗大有機物にも分布する傾向が見られた。これらの菌は粗大有機物上から *Trichoderma* や *Penicillium* が排除抑制されるのにともなって交代したものと思われる。

菌の出現率は粗大有機物で高く、菌根では低く、両者の菌の種類もその基質となるものの性質が明瞭である間は異質であり、分解が進行して基質特異性が消失するに従ってフロアも類似してくるのが当然である。従って、厳密には菌根についても粗大有機物についてもその変化段階をさらに区分して分離を行う必要がある。

土壌中における菌類フロアに現われた排除作用による不連続な変化は粗大有機物については認められず、その変化は連続的で緩慢でもある。上述の事実認められる変化は明らかに菌交代現象であるといえる。また、このような菌交代現象における菌の優劣の決定には抑制もしくは静菌作用を有する物質の存在

だけでなく、それらの菌が基質を保有するか否かという点も重要なきめ手となる。

#### B. 菌根上の菌類サクセクション

1966 年 5 月に菌根を採取し、各段階区分<sup>6)</sup>を行って菌類を分離した結果を Table 6 に示す。

シロ外部のアカマツの根からは多くの菌類が分離された。2 次生長をした細い根では *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Absidia* sp. が多く、プレート上で優占した。一般には若い根の根端は無菌的であったが、生長して表皮が褐変し始めると、R-I, R-II, R-III などの菌が分離されることが多くこれらの菌はアカマツの幼苗や正常に發育した若い根にも常在した。

菌根の發育段階 1 の白色汁質の根からは透明な菌糸が着生している場合でも洗浄すると菌は分離されなかった。この段階の根には菌糸がないのが常である。

菌根の發育段階 2 の表皮が黒変した太い汁質の菌根からは R-II, R-III および R-IV が分離されたが、出現率は 15% と低かった。菌の出現しない断片は 85% で、白色菌糸をとまっており、この菌糸はマツタケのものと考えられた。

發育段階 2 から 3 へ移行する段階では菌根の活性が強く、R-III と R-I の出現率は 13.2% であった。

發育段階 3 の菌根からは R-I, R-II および R-IV が分離され、菌の出現率は 28.6% とかなり高くなった。この菌根では白色の菌糸が根から離れはじめ、部分的に外皮が剥離し始めた。

分解段階 1 の菌根からは *Trichoderma* がまれに分離された。菌の出現率は 53% に増加し、R-I と R-II が出現した。さらに分解が進んだ根からは *Pachybasium* sp. と根面生息性のすべての菌が分離された。

Table 6. 菌根上の菌類フロラ, 調査地 b, 1966 年 5 月 20 日  
Fungal flora according to the stages of mycorrhiza development.  
May 20, 1966, Research area b.

種 Fungal species	菌根發育・分解段階					Stages of mycorrhiza development				
	Normal	Dev 1	Dev 2	Dev 3	Dev 3	Dec 1	Dec 2	Dec 2	Dec 3	Dec 3
<i>Trichoderma</i> spp.	33					8.8				
<i>Mucor</i> sp.	6.6									
<i>Mortierella</i> sp.	4.4					17.6		11.0		83.6
<i>Pachybasium</i> sp.						6.6	2.2	6.6		
R-I			6.6	8.8	4.4	13.2	17.6		11.0	
R-II			6.6		6.6		6.6		11.0	
R-III			2.2	4.4	4.4		2.2	2.2	8.8	
R-IV					13.2	6.6	4.4			
No. 7							11.0		4.4	2.2
種数 Species number	3	0	3	2	4	5	6	3	4	2
頻度 Frequency %	44	0	15.4	13.2	28.6	46.2	44.0	19.8	39.2	85.8

菌根發育および分解段階については既報<sup>6)</sup>参照, Dev 1~3: 菌根發育段階 1~3 の菌根, Dec 1~3: 菌根分解段階 1~3 のマツの根, Normal: シロ外部の土壌にあるマツの根, 分離用試料は菌根を含む土壌塊から洗浄してとり出し、滅菌水で 7 回洗浄, 小片に切断して WY 培地で分離した。接種点数は 45, 培養は 25°C, 25 日間, 表中の数値は分離された菌の全接種点数に対するパーセント。

Details of morphological features on each stage were reported in the previous paper<sup>6)</sup>. Dev 1~3: mycorrhizae in mycorrhiza developing stage 1~3, Dec 1~3: pine roots in mycorrhiza decomposing stage 1~3. Normal: pine roots outside the Shiro. The samples for isolation were collected from the soil crusts dugged out of the Shiro. Mycorrhiza was washed 7 times with sterilized water and cut to small pieces. 45 pieces were inoculated on the plates with WY medium and incubated for 25 days at 25°C. The numbers in the table are the frequency of fungi isolated.

分解段階 2 の外皮の剥離した細根からは *Mortierella* sp. と *Pachybasium* sp. および R-III が分離された。シロの中心近くにあっても充分分解されないで残ったアカマツの菌根からは R-I, R-II, R-III など根面生息性菌が分離された。また、シロ内部で局部的に菌根の分解が後れた所からも同様に根面生息性菌が分離された。

*Mortierella* sp. はアカマツの根と関連はうすく、菌根の形成にも恐らく影響を与えることは少ないと思われた。R-I はアカマツの根に常在し、発育段階 1 の菌根以外のすべてに現われたことから、この菌はマツタケもしくは菌根と直接関係せず、アカマツの根の分解にあずかっていると思われた。R-II と R-III は菌根の分解段階に多く、シロの外部にも認められたことから恐らくアカマツの根の分解に関与すると思われた。R-IV は菌根からのみ分離され、分解過程の進行にともなって増加した。No. 7 は土壌からも分離され、菌根やアカマツの根との直接的な関係はなかった。*Pachybasium* sp. も菌根の分解過程で現われたが、アカマツの根に常在することはなかった。

R-I, R-II, R-III および R-IV はマツタケがアカマツに形成した菌根につねに伴伴する傾向があった。一方、これらの菌はマツタケがアカマツ以外の寄主植物に形成した菌根にも伴伴することが多かった(未発表)。恐らく、これらの菌はアカマツの根の分解に関与するだけでなく、マツタケの菌根とも関連がつよいものと思われた。少なくともこれらの菌はマツタケの菌根が持っている排除作用物質に対する耐性を持つという点で共通していた。

さらに菌根から分離された菌類の相互関係を 5 月の例によって見ると、Fig. 3 のようになる。この例ではより貧弱な微生物相をもつ調査地 a から試料を採取した。out はシロ外部、dev は発育段階、dec は分解段階を示す。*Trichoderma* と *Mortierella* sp. は菌根発育段階 1 において消失した。R-I, R-II, R-III もシロ外部にあったが、菌根の発育段階 1, 2 ではほとんど消えた。菌根発育段階 3 になって R-III が増加し、*Pachybasium* がこの点以後で増加した。*Trichoderma* は分解段階にかかって増加し、R-I は発育段階でふえ、分解段階で減少、R-IV, R-II もほぼ同様の傾向を示した。菌の出現しない断片はシロ外部の場合は除外して考慮するとして、菌根の発育段階に多く、分解段階で徐々に減少した。

すなわち、マツタケは根の生長過程の初期に着生して菌根を形成し、根面フロラを先導した。いいかえれば、マツタケは基質となる根がもっとも無菌的である時にのみ着生しうるといえる。また、菌根から出

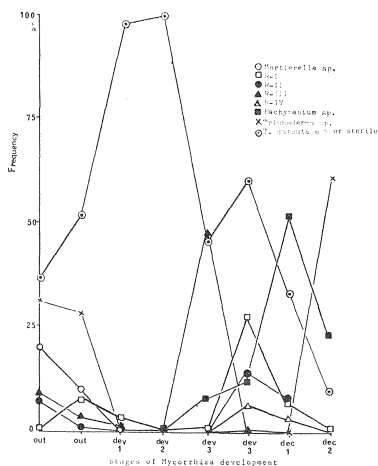


Fig. 3 菌根上の菌類サクセッション  
調査地 a, 1966 年 5 月

Fungal succession on the mycorrhiza.  
May, 1966. Research area a.

分離方法や培養基は Table 6 にのべたものと同じ。Out : シロ外部にあるマツの細根, Dev 1~3 : 菌根発育段階 1~3, Dec 1~2 : 菌根分解段階 1~2, 菌根の生長過程にともなって根面生息性菌の優占種が変化する。分離されない菌根の小片が多いのはマツタケ菌によって占有されているためと思われる。

Isolation method and medium were the same as described in Table 6. Out : normal fine roots of pine, outside the Shiro. Dev 1~3 : the mycorrhizae in mycorrhiza developing stage 1~3. Dec 1~2 : pine roots in mycorrhiza decomposing stage 1~2. Sterile inocula might be occupied by *T. matsutake*.

される物質が他の微生物を排除する能力があるとすれば、その物質はマツタケとアカマツの若い根によって作られている<sup>8)</sup>と考えられた。

分解段階において根面生息性菌は根の分解に応じて交代した。R-III が減少すると R-I, R-II, R-IV, *Pachybasium* sp. などが現れ、次いで R-I, R-II, R-IV が減少すると *Pachybasium* sp. と *Trichoderma* が、*Pachybasium* sp. が減少すると *Trichoderma* が優勢となった。これらの交代現象は菌の生理的性質の差異と根の質的变化によってある程度解説される（未発表）。

マツタケとアカマツの形成する菌根が形態からも菌類フロラからも一定の規則性のある形成から消滅にいたる連続過程の一断面であることは上述の事実から明らかである。菌根におけるこのような現象と解釈は樹枝状の菌根のみならず広く菌根一般にも充当する。

生態学的に定義すると、菌根とは根の生長とそれにともなう根面微生物フロラのサクセッションの結果成立する複数生物間の相互作用であるといえる。また、菌根菌とは根の微生物相の先導者であって、根の生長を停止もしくは枯死させることがないものをさす。菌と根の両者が死滅しないという点において菌根は共生現象の現われであり、自然界における共生現象は常に多数の随伴者をともなった状態での 2 者もしくはそれ以上の生物の間で営まれる生活現象であるといえる。

### 3. シロにおける菌類相の季節的变化

土壤微生物の季節的变化の調査には常に方法上の問題がからみ、同一点における季節的变化を正確にとらえることは困難である。土壤中における微生物の分布は土壤内の物理的環境の不均一さや基質の分布の不均一さ、さらには微生物自体の集中性によって全体としてきわめて不均一な状態となり、それが更に連続しながら変化する。一方、季節的变化のみならず、気候的变化や日変化なども当然考えられる。

土壤微生物相における変化を追跡する際には常に試料の採取位置とその位置の周辺環境から見た位置づけが正確に行われなければならない。幸い、マツタケのシロは各地のシロにおける調査例（未発表）から微生物的に類似した傾向を有し、アカマツ林のシロでは出現する微生物にも共通種が多いという特徴があるので、シロにおける季節的变化を追跡することも無意味ではないであろう。

シロの形態、とくにシロ先端における形態の季節的变化は明瞭であり、それにともなう微生物相の変化も当然予測された。また、シロの季節的な変化は周辺の微生物相の活動によっても著しく影響を受けると考えられた。

ここではシロの形態的变化と関連づけたシロにおける微生物相の季節的特徴を述べるが、その中には高温によって分離結果が良好でなかった場合やシロ断面から調査を行うために必ずしも時間的な連続相と考えられなかった場合なども含まれる。

#### 材 料 と 方 法

試料の採取、処理、分離培養、観察法などはすべて、1 および 2 で述べた内容と同一であるため省略した。

調査対象としたシロは調査地 b の 1 において述べたシロであり、試料の採取はシロ形態の季節的变化を調査する際同時に行ったので、シロの形態と採取位置の対照は第 I 報<sup>9)</sup> のシロの季節的变化の項を参照のこと。



## 結果と考察

### A. 冬の状態

1966年2月調査地bのシロにおける試料採取位置を Fig. 4 に示す。菌根と菌根以外の粗大有機物から分離培養した結果を Table 7 に、土壌から土壌塗布法によって分離培養した結果を Table 8 に示す。

#### a. 菌根と菌根以外の粗大有機物の菌類

シロの外部の点1と2にはアカマツの根が少なく、ここからは細菌, *Trichoderma*, *Mucor*, *Mortierella* sp., *Pachybasium* sp. などが分離されたが、秋に比して *Trichoderma* は少なかった。

層Iの中の点3にある生長を休止した菌根からは *Mortierella* sp. と No. 44 が現われ、根面生息性菌が減少した。点3の粗大有機物からは *Trichoderma*, *Mortierella* sp. および細菌が分離された。これらの出現によって冬季にはシロ先端においても菌根の活性が低下するといえる。

子実体発生跡の点4の菌根からは *Mortierella* sp. No. 44, R-I, R-II, No. 7 および No. 10 が分離された。この部分は11月の点4に相当していたので、菌の種数の増加や *Mortierella* sp. の増加から菌糸や菌根の分解が秋から冬にかけて進行したと考えられた。点4の粗大有機物からは *Trichoderma*, *Mucor* および *Mortierella* sp. が分離されたが、細菌は消失した。先述の3月の状態と比較すると、この点は3月の点5に相当していたが、ほぼ同様の傾向が認められたことから粗大有機物上のフロラの変化は緩慢であったといえる。

点5に粗大有機物がなく、菌根からは *Trichoderma*, *Mortierella* sp. および根面生息性の菌が多数分離され、11月の点7の状態に近かった。菌根の分解はわずかながら冬の間も進行した。ただし、3月の点6の菌根からは *Trichoderma* が出現しなかったので、フロラの変化が必ずしも規則的に進行していたとはいえない。

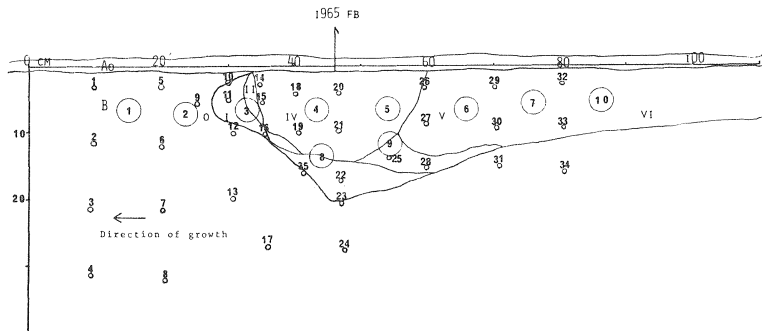


Fig. 4 冬のシロにおける微生物分離用試料採取位置

1966年2月11日, 調査地b

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms in winter. Feb. 11, 1966. Research area b.

シロの形態的特徴との対比は第I報<sup>5)</sup> 参照。0~VI: シロの層, FB: 1965年の子実体発生位置, 菌根を含む有機物は円でかこまれた1~10の点で、土壌は滅菌チューブで1~34の点で採取した。

Details of morphological features of the Shiro were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. 0~VI: zones classified following the morphological features on mycelium, mycorrhiza, soil and so on. The samples of organic matters including mycorrhiza were collected from the points with large circle, 1 to 10, and those of soils were collected from the points, 1 to 34 by sterilized glass tubes. FB: fruit body occurring position in 1965.

Table 7. 菌根と菌根以外の粗大有機物上の菌類フロラ, 冬

1966 年 2 月 11 日, 調査地 b

Fungal flora on the mycorrhiza, other plant roots and plant debris  
in winter. Feb. 11, 1966, Research area b.

菌根を含むマツの根 Pine roots including the mycorrhiza							
種 Fungal species	試料採取位置 Sampling points						
	3	4	5	6	7	8	9
<i>Trichoderma</i> sp.			2	1			
<i>Mucor</i> sp.							
<i>Mortierella</i> sp.	87	32	20	33	12	13	5
No. 44	3	2				2	
R-I		12	13	18	19	4	
R-II		7	15	11			
R-III				20	5		1
R-IV					1		
No. 7		3	2				
<i>Oidiodendron</i> sp.					4		1
No. 10		2					
種数 Species number	2	6	5	5	5	3	3
頻度 Frequency %	90	58	55	83	41	19	7

植物根とその他の有機物 Other plant roots and plant debris

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling points									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Trichoderma</i> spp.	7	8	35	29						
<i>Mucor</i> sp.	3	3		2						
<i>Pachybasium</i> sp.	1	1						29	2	
<i>Mortierella</i> sp.	8	8	5	4		16	11		3	8
Bacteria	+	+	+							
R-I				3		15	18	8	30	20
R-II								4	7	2
R-III						5	13	2		14
No. 10						15	4		2	2
7										2
種数 Species number	5	5	2	4	—	4	4	4	5	6
頻度 Frequency %	19	20	40	38	—	51	46	43	44	48

上段には菌根およびマツの根, 下段には菌根以外の粗大有機物から分離された菌の出現頻度を示す。試料は水道水と滅菌水で洗浄し, 小片に切断した後, Wys 培地にうえつけられた。培養期間は 25°C で 25 日間であった。全植付点数は 100 点とした。

The samples were washed with tap water and sterilized water and cut to small pieces. Small pieces were inoculated on the Wys medium and incubated for 25 days at 25°C. The number in the table are the frequency of fungi isolated. Total number of inocula was 100 pieces.

Table 8. 冬のシロ土壌における菌類フロラ, 土壌塗布法による。1966年2月11日, 調査地 b

Fungal flora in the Shiro soil in winter, Soil smear method.

Feb. 11, 1966, Research area b.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point																																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
<i>Trichoderma</i> spp.	17	16	+	+	+	4	7	+	10	5	2	2	3			8	11						2	1							3	3			7
<i>Mucor</i> sp.	6	5											1	1																					
<i>Absidia</i> sp.	2	4											1																						
<i>Penicillium</i> spp.	5	5											2	1			2					1													
<i>Mortierella</i> sp.	10	10				5					2	6	7	60	68	7	3					5							2	10	7	29	7	6	
R-I									3	2										4												1			
R-II						2																						2	2						
R-III																				1		1							2						
R-IV									16	4	15	2						2		4				11	4			2						2	
No. 7					15				40	26		3						5		10	1		1					2						13	2
17									3		2													3										3	
14																								1					1						
15																													2						
16																													1				5		
26																													1						
34																								1											
40																																2			
44												12		2		1						2													2
<i>Oidiodendron</i> sp.																															2				
種数 Species number	6	6	3	4	3	4	2	2	6	5	4	4	5	3	1	3	3	2	0	4	1	3	3	4	1	0	0	0	8	3	2	4	3	5	2
頻度 Frequency %	57	57	—	—	—	37	10	—	100	55	35	27	20	91	97	22	22	10	0	27	1	11	4	24	6	0	0	0	18	20	14	51	18	37	13

採取した土壌の小塊を1プレート10~12点ずつWys培地にうえつけ、25°Cで25日間培養した。表の数値は分離された菌のコロニー数。頻度は全うえつけ点数70点に対する分離された菌のコロニー数の比率。

Small soil crusts were inoculated on the plates with Wys medium and incubated for 25 days at 25°C. The numbers in the table are the colony number of fungi isolated. Frequency means the percentage of isolated fungi per total inocula, 70 points.

点 4 と 5 の下にある点 8 と 9 の菌根では根面生息性菌が減少し、粗大有機物上ではこれらの菌が増加し、*Pachybasium* sp. も出現した。

点 6 の粗大有機物には *Mortierella* sp. が多く、菌根では *Trichoderma*, *Mortierella* sp., R-I, R-II および R-III が現われた。点 7 のフロラは点 6 のものに類似していたが、菌根では *Mortierella* sp. が多少減少した。

点 10 ではアカマツの根から *Trichoderma* などが分離されたが、粗大有機物からは根面生息性の菌が現われた。

*Mortierella* sp. は冬季には菌根と粗大有機物の双方から多数分離された。恐らくこの菌はマツタケの菌糸がシロの先端まで死滅しかかった冬季に菌糸状態でかなり繁殖するものと思われた。

#### b. シロ土壌における菌類

シロ外部の点 1 から 8 までの分離結果によると、秋に見られた土壌の深さにともなう菌類の垂直分布の規則性がうすれ、20~30 cm の深さにおいても *Trichoderma* が多数出現した。これらの点における *Mortierella* sp. の出現率はやや低かった。

未感染土壌の点 9 からは *Trichoderma* と根面生息性菌が分離されたが、冬にはここまでシロの影響はおよばなかった。これは試料の中にアカマツの根が多かったためであろう。

層 I の上面の境界点 10, 層 I 内の点 11 および層 I の下面の境界点では各々類似したフロラが認められた。これらの点では未感染土壌に比して *Trichoderma* が少なく、菌糸層の影響が認められ、他の季節にはシロの先端で少ない根面生息性菌が増加したのも冬季の特徴であった。これらの菌の活動可能範囲は土壌生息性菌のものとかかなり異なっていた。

シロ先端の深い位置にある点 13 と 17 では土壌生息性菌が多く、*Mortierella* sp. は少なかった。菌根が活性をもつ点 15 と 16 からは *Mortierella* sp. がもっとも多く分離され、土壌中にも広く拡大しているものと思われた。H 層直下の点 14 では *Mucor* と *Penicillium* が出現し、シロの菌の排除作用は弱まった。未感染土壌との下部の境界点 16 でも *Trichoderma* と *Mortierella* sp. が現われ、上と同様のことがいえる。

点 18 と 19 には *Mortierella* sp. はなかった。点 18 からは R-IV と No. 7 が出現したにすぎず、マツタケの菌糸は見かけ上と同様、冬季の間にほぼ分解されてしまうようであった。また、この季節の表層から 5 cm の地中温度は 5~8°C であるために *Mortierella* sp. の活性が低下していたことも十分考えられる。

層 I' が消失し始めた点 23 や 35 などでは No. 7 や *Trichoderma* が出現した。

子実体発生跡の点 20 と 21 からは根面生息性菌のみが分離された。点 22 は層 I' にあり、ここからは *Mortierella* sp. と *Penicillium* などが現われ、点 23 では *Trichoderma*, R-III および No. 7 が現われた。深さ 27 cm の未感染土壌点 24 では *Trichoderma* と R-IV となり、点 25 では R-IV のみとなった。層 I' の分解は冬の間にも進行した。

層 V の前部の点 26, 27 および 28 からは菌が分離されず、11 月の結果と比較するとこれらの点で菌糸や菌根の分解がほぼ完了するために菌の活動が停止しているものと思われた。シロの中心に近くなるにつれて、再び菌の種類数は増加し、点 29 では根面ならびに土壌生息性菌がともに多かった。点 30 と 32 とでは *Mortierella* sp. が増加した。シロの下、点 31 からは *Trichoderma* と *Mortierella* sp. が出現し、イ

ヤ地の消失はシロ底部からも進行した。点 32 と 33 では未感染土壤に比して *Trichoderma* が少なく、イヤ地の消失は不完全であった。

冬季は一般に菌の種類数が少なく、*Trichoderma* と根面生息性菌とが著しく増加した。平板希釈法でも *Mortierella* sp. や細菌、放線菌の出現率は低くなり、*Mortierella* sp. はマツタケの菌糸の勢が衰えたシロ先端に集中した。

### B. 春の状態

春の状態のうち 3 月の菌根と粗大有機物上の菌類と 5 月の菌根上の菌類については先述の通りである。3 月は 2 月と大差なく、菌根の生長が止まっているために菌根上に根面生息性菌が増加した。4 月には菌根の生長が再開し、それとともなってフロラも変化し、土壤温度の上昇や水分状態の変化によって土壤中のフロラも変化した。

1966 年 4 月 12 日に調査地 b において試料を採取した位置を Fig. 5 に示す。この例によって春の菌根や粗大有機物上のフロラを補足説明し、5 月の例によって春の土壤中のフロラを説明する。

#### a. 菌根と菌根以外の粗大有機物上の菌類

4 月に菌根と粗大有機物とから分離培養した結果を Table 9 に示す。なお 4 月の土壤からの分離結果は省略する。

シロ外部の点 1 と 2 にはアカマツの根が少なかったが、この根からは *Trichoderma* が分離された。層 II の点 3 には白色汁質の根と表皮が褐変した菌根が少量あったが、これらの根からは R-I 以外の菌は分離されなかった。

点 4 の菌根は发育段階 2 と 3 であり、これからは R-II, R-III および R-IV が分離された。2 月と 3 月にはこの段階の菌根から *Mortierella* sp. が分離されたが、根と菌糸の生長の再開とともなってこの菌は除かれた。

点 5 では菌根が分解しはじめており、3 月にはこの部分から *Mortierella* sp. や根面生息性菌が多数分

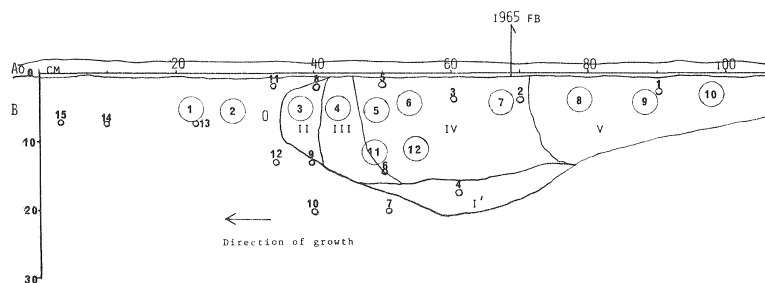


Fig. 5 春のシロにおける微生物分離用試料採取位置 (1)

1966 年 4 月 12 日, 調査地 b

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms in spring (1) Apr. 12, 1966. Research area b.

シロの形態的特徴との対比は第 I 報<sup>5)</sup> 参照。0~V: シロの層, FB: 1965 年の子実体発生位置, 菌根を含む有機物は円でかこまれた 1~12 の点で, 土壤は 1~34 の点で採取した。

Details of morphological features of the Shiro were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. 0~VI: zones classified according to the morphological features on mycelium, mycorrhiza, soil and so on. The samples of organic matters including mycorrhiza were collected from the points with large circle, 1 to 12, and those of soils were collected from the points 1 to 15. FB: fruit body occurring position in 1965.

離されたが、春には分離されなかった。点 6 でも R-I が出現したにすぎず、これらの点では分解が一時休止していると思われる。

子実体発生跡の 7 では *Mortierella* sp. が消え、R-I, R-III および R-IV が現われた。この状態も 3 月とかなり異なった。菌根の分解が進行した点 8, 9, 10 などでも出現する菌の種類はほとんど異ならなかったが、*Pachybasium* sp. は現れなかった。活性な菌根では 3 月に比して菌の種類が減少し、シロ内部の菌根の分解速度は冬と変わらず、緩慢に持続した。

Table 9. 菌根と菌根以外の粗大有機物上の菌類フロラ、春 (1)

1966 年 4 月 12 日、調査地 b

Fungal flora on the mycorrhiza, other plant roots and plant debris in spring (1). Apr. 12, 1966. Research area b.

菌根とマツの根 Mycorrhiza and pine root										
種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Trichoderma</i> spp.								1		
R-I	2		2	1	4	1	7	7		2
R-II		2				9	11	8		
R-III		3			2	2	4	10		
R-IV		2			1	1	1	2		
No. 7						1		2		
種数 Species number	1	3	1	1	3	5	4	6	—	1
頻度 Frequency %	4.4	15.5	4.4	2.2	15.5	31	51	66.6	—	4.4

植物根とその他の有機物 Other plant roots and plant debris										
種 Fungal species	試料採取位置 Sampling points									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Trichoderma</i> sp.	+	+	2				1	2	2	
<i>Pachybasium</i> sp.								3		
<i>Absidia</i> sp.		2					5	2		
R-I		2	22	22	2	3	5	3	16	1
R-II			3	2	7	9	8	2	5	12
R-III			2	1		1			3	
R-IV			2		1	2			4	
No. 7						2				2
11							5	2		
種数 Species number	—	—	5	3	3	5	5	6	5	3
頻度 Frequency %	—	—	68.8	55.5	22	37.7	51	31	67.3	33.3

上段には菌根およびマツの根、下段には菌根以外の粗大有機物から分離された菌のコロニー数を示す。試料は水道水と滅菌水で洗浄し、小片に切断した後、Sy 培地にうえつけられた。培養期間は 25°C で 20 日間であった、全植付点数は 45 点とした。頻度 (%) は全植付点数に対する分離された菌のコロニー数の比率。

The samples were washed with tap water and sterilized water and cut to small pieces. Small pieces were inoculated on the Sy medium and incubated for 20 days at 25°C. The numbers in the table are the colony number isolated. Total number of inocula was 45 pieces. Frequency means the percentage of isolated fungi per total inocula.

菌根以外の粗大有機物について見ると、点1と2では *Trichoderma* が増加し、90% 以上を占めた。点3では3月に多量に分離された *Trichoderma* がやや減少し、*Penicillium* は消え、根面生息性菌が増加した。点4、5および6などにも同様の傾向が見られた。これらの点では3月に *Mortierella* sp., *Trichoderma*, *Pachybasium* sp. などが多数出現していたことから、根や菌糸の活動によって次第に排除効果が高まったものと思われる。

点7は3月の点6に相当したが、ここでは3月になかった *Trichoderma* が4月になって現れ、点8と9でも連続してこの菌が出現したことから、4月には *Trichoderma* がシロ内部において増加し、有機物の分解が盛んになるものと思われた。

4月は全般に3月に比して粗大有機物からの菌の出現率が低下したが、質的な変化は大きく、分解力は3月に比してむしろ高くなるであろう。また、冬の間に広がった多種の菌が春に入ってマツタケと菌根との働きによって抑制され始めているといえる。

#### b. シロ土壌における菌類相

1966年5月、調査地bにおける試料採取位置を Fig. 6 に示す。Table 10 には土壤塗布法による分離結果を、Table 11 には平板希釈法による分離結果を示す。菌根上におけるフロラとの対照は先述の項を参照のこと。

##### 1) 土壤塗布法による分離結果

シロ外部の表層から約10cmの深さにある点14、16、17および18からは *Trichoderma*, R-I, R-III および No. 11 が共通して分離され、*Mortierella* sp. は出現しなかった。*Mortierella* sp. は平板希釈法によって点16と18から分離された。2月にはこれらの点で *Mortierella* sp. が多量に分離された。冬に比して *Trichoderma* の出現率も低下し、逆に根面生息性の菌が増加した。深さ20cmの点12と15でも菌の種類は上述の諸点とほぼ類似したが、深さ30cmでは *Trichoderma* がわずかに分離された。

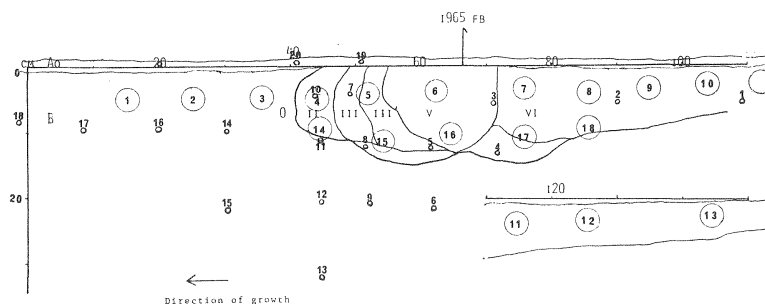


Fig. 6 春のシロにおける微生物分離用試料採取位置 (2)

1966年5月20日、調査地b

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms in spring (2). May 20, 1966. Research area b.

シロの形態的特徴との対比は第I報<sup>5)</sup>参照。0~VI: シロの層, FB: 1965年の子実体発生位置, 菌根を含む有機物は円でかこまれた1~13の点で, 土壌は1~20の点で採取した。

Details of morphological features of the Shiro were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. 0~VI: zones classified following the morphological features on the mycelium, mycorrhiza, soil and so on. The samples of organic matters including mycorrhiza were collected from the points with large circle, 1 to 13, and those of soils were collected from the points, 1 to 15. FB: fruit body occurring position in 1965.

Table 10. 春のシロにおける菌類フロラ (2), 土壤塗布法による  
1966 年 5 月 20 日, 調査地 b  
Fungal flora in the Shiro soil in spring (2). Soil smear method.  
May 20, 1966. Research area b.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>Trichoderma</i> spp.					4	9			7		7	8	3	9	5	5	13	9
<i>Mortierella</i> sp.	3			8	7			20	10		6	1						
R-I		2			9			4		2				2	2	7		
R-II	26	30	4	18	7			22	9	4					1	4		
R-III		2	3							16	3	6		2	3	7	12	12
R-IV			2	7						4						2		
No. 7			3															
11		1				5						3		3	6	7	6	
12				3					2		4	22			1	13		
<i>Mortierella</i> sp.														8			2	
<i>Penicillium</i> spp.								2										5
種数 Species number	2	3	4	4	4	3	0	5	5	4	4	3	2	6	6	7	5	6
頻度 Frequency %	72	85	30	81	50	35	0	115	65	65	25	42	7	40	35	57	77	57

採取した土壤小塊を 1 プレート 10~12 点ずつ W 培地にうえつけ, 25°C で 25 日間培養した。表中の数値は分離された菌のコロニー数。頻度は全うえつけ点数 54 点に対する分離された菌のコロニー数の比率。

Small soil crusts were inoculated on the plates with W medium and incubated for 20 days at 25°C. The numbers in the table are the colony number of fungi isolated. Frequency means the percentage of isolated fungi per total inocula, 54 points.

Table 11. 春のシロにおける菌類フロラ (2), 平板希釈法による  
1966 年 5 月 20 日, 調査地 b  
Fungal flora in the Shiro in spring (2). Dilution plate method.  
May 20, 1966. Research area b.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>Trichoderma</i> sp.																3		
<i>Mortierella</i> sp.	6	269	402	45	110	84	53	91	35	419	75	12	2		21	3		90
<i>Mucor</i> sp.		4						1							8	5		
<i>Penicillium</i> spp.				2	1				5		6				10			12
<i>Rhizopus</i> sp.																3		12
<i>Absidia</i> sp.				1	1							3						2
No. 7					5													
Bacteria						+			+			+						+
種数 Species number	1	2	1	3	4	1	1	2	2	1	2	2	1	0	4	4	0	7

採取された 1 g の土壤は滅菌水で 100 倍に希釈し, W<sub>Y</sub> 培地で分離された。培養は 25°C, 20 日間。表の数値は 1 プレート当たりの平均コロニー数。

1 g soil samples were diluted 100 times by sterilized water, and soil fungi were isolated on the plates with W<sub>Y</sub> medium. Numbers in the table means the colony number isolated on one plate, average value.



活性菌根が冬に比して増加した層Ⅱの点10からは4種の根面生息性菌が分離された。平板希釈法によるとこの点での *Mortierella* sp. の出現率は高く、菌根による菌類排除作用はよかった。この点は2月の点11に相当した。2月の点11からは *Trichoderma* が出現したが、その他の菌は3月の点10とほぼ同様であった。従って、*Trichoderma* は菌根の形成によって排除されたといえる。

未感染土壌と層Ⅱの下面との境界点11では *Trichoderma* や *Mortierella* sp. が分離され、2月の点12の状態とほとんど変わらず、シロ外部への影響が弱いと考えられた。

層Ⅲの点7からは菌が分離されず、平板希釈法によっても *Mortierella* sp. が少数分離されたに過ぎなかった。*Mortierella* sp. の活動は2月にこの点で高かったことから、菌根の活動によって生長抑制を受けたものと思われる。点8からは *Mortierella* sp., R-I および R-II が分離された。点9は点15と類似の傾向を示した。

子実体発生跡の点3では根面生息性菌のみが現われ、その下の点5では回復が進行して *Trichoderma* が増加した。点4でも菌糸層の白色がうすく、土壌生息性菌が増加した。平板希釈法によると点3で *Mortierella* sp. が多く、マツタケの菌糸を分解した後で胞子を形成し、胞子状態で分布するものと考えられた。シロ内部の点1と2では R-II が多く、これも点3の場合と同様の理由によるであろう。

この例では全般に出現する菌数が少なく、6月に比して微生物の活動がまだ活発化していないと思われる。

## 2) 平板希釈法による結果

細菌や放線菌は点1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11などの菌糸層の内部からは分離されなかった。シロの外部土壌には細菌や放線菌が多く、点17では菌も出現しなかった。*Mucor* や *Penicillium*, *Aspergillus* などは細菌や放線菌と同様にシロ土壌から排除されたと思われる。

*Mortierella* sp. は点2, 3, 5および10などのシロ内部で著しく増加した。シロ外部では11月の場合のように規則的な垂直分布が認められず、*Mortierella* sp. の活性は増大した。

## C<sub>1</sub>. 夏の状態 (6月)

5月から7月へかけてシロの先端では菌糸と菌根の量が増加した。一般に土壌から分離される微生物も増加し、ことに細菌の活性は6月になると高まった。ここでは細菌抑制剤を使用した平板希釈法による結果を示す。

1966年6月、調査地bにおける試料採取位置を Fig. 7 に示す。平板希釈法による分離結果を Table 12 に示す。

シロ外部の未感染土壌の表層から深さ10 cm の点21, 22, 23では *Mortierella* sp. が多く、点22には *Trichoderma* が出現した。5月に比して菌の種類が多く、*Mortierella* sp. と *Penicillium* がとくに増加した。土壌塗布法では *Trichoderma* と細菌が優占した。

点18では *Trichoderma* が現れ、*Mortierella* sp. は点21と同数となり、菌数も多かった。点19では *Mortierella* sp. が減少し、他の菌が増加した。深さ30 cm の点20でも *Mortierella* sp. や *Penicillium* が出現した。シロ外部土壌における菌の活性は高く、かなりの深さまで菌が分布した。

シロ先端の層Ⅱにある点16では *Mortierella* sp. と R-II 以外の土壌生息性菌も分離され、表層に近い所ではこれらの菌の活性が高くなるに従ってシロにも混入すると思われた。土壌塗布法によるとこの点では *Mortierella* sp. と根面生息性菌が現れるだけとなり、シロ外部土壌と明瞭に異なった。この点に混入

した土壌生息性菌は恐らく雨水などによって運ばれ、孢子状態で入ったものと思われた。

層ⅢとH～A層との境界の点15では *Trichoderma* は認められなかったが、*Mortierella* sp. と No. 7 に加えて *Penicillium* などが混入した。土壌塗布法によると *Trichoderma* も10%出現し、地表からの菌類の混入が増加した。

子実体発生跡の点11と12では *Mortierella* sp. が少なく、R-II, No. 15 および No. 18 が現われた。この位置で根面生息性菌以外の菌が分離されるのは梅雨季に限られた。土壌塗布法によると *Mortierella* sp. と根面生息性菌が多く、菌根の分解は急速に進行すると思われた。

シロ底部の点17では *Penicillium* が増加し、菌糸層と未感染土壌との境界では *Mortierella* sp. も *Penicillium* もともに減少した。菌糸層が分解した点10では点13と同じ深さであったが、*Penicillium* が増加し、土壌塗布法によると *Trichoderma* と細菌が優占した。点8では菌は分離されなかった。2月や5月の例と比較するとこのような菌の分離されない部分が分解過程にしばしば現れ、規則的な分解段階が波状に進行しているかに見える。点9ではR-II, No. 15 および *Mortierella* sp. が出現したが、土壌塗布法によると点8と同様菌は分離されなかった。

子実体発生位置の下、点5からも菌は分離されなかったが、土壌塗布法によると根面生息性菌が分離されたことからこの位置でも菌糸や菌根の分解が活発に進行していたと思われる。

点6からは *Mortierella* sp. とR-II, 点7からは *Penicillium* が分離され、点4でも点6と類似した傾向が見られ、シロ内部におけるイヤ地の消失も進行した。

点11, 12 および 13 のフロラは外部土壌のものと変らない状態となり、菌の種類数も増加した。これらの点では土壌塗布法で多数の *Trichoderma* が分離されたが、細菌は少なかった。従って、シロの中心近くでもイヤ地の完全な消失は起っていない。

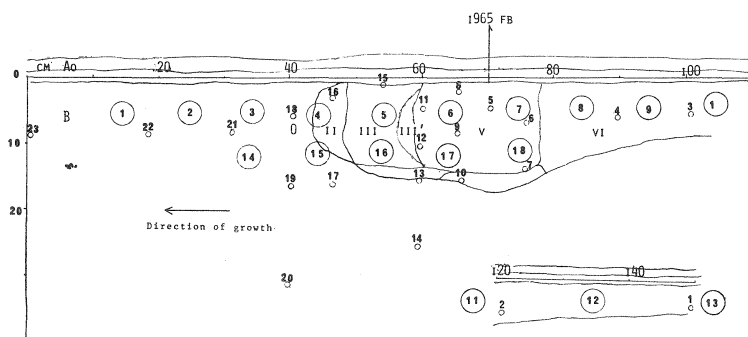


Fig. 7 夏のシロにおける微生物分離用試料採取位置 (1)

1966年6月27日, 調査地 b

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms in summer (1). June 27, 1966. Research area b.

シロの形態的特徴との対比は第I報<sup>5)</sup>参照。0～VI: シロの層, FB: 1965年の子実体発生位置, 菌根を含む有機物は円でかこまれた1～13の点で、土壌は1～23の点で採取した。

Details of morphological features of the Shiro were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. 0～VI: zones classified according to the morphological features on the mycelium, mycorrhiza, soil and so on. The samples of organic matters including mycorrhiza were collected from the points with large circle, 1 to 13, and those of soils were collected from the points, 1 to 23. FB: fruit body occurring position in 1965.

菌根や粗大有機物上においても 6 月には菌の活動が盛んとなり、シロ外部では *Trichoderma* が著しく増加した。シロ内部では 5 月の状態が維持されており、粗大有機物からは土壤生息性の菌や *Trichoderma* が排除されている場合が多かった。これらの分離結果は省略する。

## C<sub>2</sub>. 夏の状態 (7 月)

春から生長を続けた菌根は量的に増加し、主根の生長が停止すると同時に細い菌根が多くなり、菌糸量も増加した。土壤温度はさらに上昇し、林内の深さ 10 cm の地中温度は 25~28°C に上昇し、年によって乾湿の差がはげしくなる。土壤中の微生物活動は 6 月と同様一般に高い。分離培養は高温によって不可能となったり、結果が混乱する場合が多かった。

試料は調査地 a において Fig. 8 に示す点で採取した。調査地 a は b に比して菌の種類数も出現率もともに低い。従って、この結果を季節的变化として上述の諸例と比較することはできない。試料採取位置も 10 cm 間隔でおいているために必ずしもシロの層位変化と一致しない。

Table 12. 夏のシロにおける菌類フロラ (1), 平板希釈法による  
1966 年 6 月 27 日, 調査地 b  
Fungal flora in the Shiro soil in summer (1). Dilution plate method.  
June 27, 1966. Research area b.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Trichoderma</i> spp.																		4				3	
<i>Mortierella</i> sp.	12	32	60	21		32	12		40	22	18	12	24	21	176	32	15	187	11	7	187	183	167
<i>Aspergillus</i> sp.	2	3																	2		1		
Discomycetes				1	1				1	3					2				3			3	2
<i>Penicillium</i> sp.																							
No. 1	8									3				1			3	3		3		5	
2	6	2					2			3					3		5		5	5			3
3	5	3								6				2		21	4	5	7	2	4		3
4	3														3								
7																	2	1					
8		2	1							2					12		3	16	12		1	5	1
9		6	1				1								35		4		8			7	
10		12	3							2					16		3	8					
14		5	1							4									12				
15			7						32		12	4			5	4					52	21	74
16	2		1																			2	
No. 7															12								
18							1			3		8					7		7	2		3	3
19														7									
20															7	3		4				3	
R-II	6		8	10		12	3		8	12	13	7				43	5			3	2	2	
R-III		3																	5		1		
種数 Species number	8	10	9	3	0	2	5	0	4	12	3	4	3	3	9	4	10	8	10	6	6	11	7

採取された 1 g の土壤は滅菌水で 100 倍に希釈し、ローズベンガルを含む WY 培地で分離された。培養は 25°C, 20 日間、表の数値は 1 プレート当たりの平均コロニー数。

1 g soil samples were diluted 100 times by sterilized water, and soil fungi were isolated on the plates with WY + Rose bengal medium. Numbers in the table means the colony number isolated on one plate, average value.

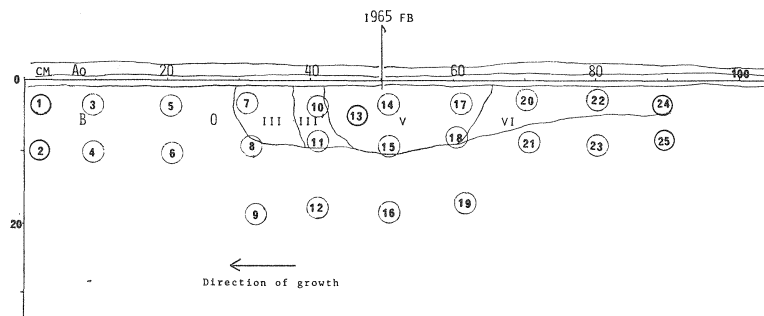


Fig. 8 夏のシロにおける微生物分離用試料採取位置 (2)

1965年7月15日, 調査地 a, 京都, 岩倉

Sampling plots on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms in summer (2). Jul. 15, 1965. Research area a. Iwakura, Kyoto.

シロの形態的特徴との対比は第 I 報<sup>5)</sup> 参照。0~VI: シロの層, FB: 1965 年の子実体発生位置, 試料は根と土壌からの分離用として同一点から採取した。1~25

Details of morphological features of the Shiro were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. 0~VI: zones classified according to the morphological features on the mycelium, mycorrhiza, soil and so on. The samples were collected from the points with large circle, 1 to 25. FB: fruit body occurring position in 1965.

Table 13. 夏の菌根上の菌類フロラ (2), 1965年7月15日, 調査地 a  
Fungal flora on the mycorrhiza in summer (2).  
Jul. 15, 1965. Research area a.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point							
	3	5	7	10	14	17	20	24
<i>Trichoderma</i> sp. 1	7	16						
" 2	14	10						14
" 3	10	3						50
<i>Mortierella</i> sp.	20	10						
R-I		7	3			26	7	
R-II	7			7		16	7	
R-III	7	3			46			
R-IV						7		
<i>Pachybasium</i> sp.					7	16	53	23
Others						3	7	
種数 Species number	6	6	1	1	2	4	4	3
頻度 Frequency %	65	50	10	20	53	70	73	86

試料は水道水と滅菌水で洗浄し, 小片に切断した後 WY 培地にうえられた。培養期間は 25~27°C で 20 日間であった。表中の数値はうえつけ点数 30 点に対する菌の分離された頻度を % で示す。

The samples were washed with tap water and sterilized water and cut to small pieces. They were inoculated on WY medium and incubated for 20 days at 25~27°C. The numbers in the table mean the frequency (%) of fungi isolated. Total inocula number was 30 pieces.

## a. 菌根と菌根以外の粗大有機物上の菌類

Table 13 に分離結果を示すが、ここには土壤中の粗大有機物が少なく、菌根とアカマツの根について分離した結果のみを示す。

点3と5はシロ外部土壤にあるアカマツの根であり、*Trichoderma*, *Mortierella* sp., R-II および R-III が分離された。他の季節に比して *Trichoderma* は増加した。

点7の活性菌根からは R-I のみが分離されたに過ぎず、菌の発生しない根の断片は90%となった。発育段階3の菌根からも R-II が分離されただけで菌の発生しない断片は80%であった。前年の子実体発生跡の点14からは R-III と *Pachybasium* sp. が分離され、冬に比して分解は進行していた。*Trichoderma* または *Pachybasium* sp. が現れる菌根は分解段階の2であった。これらの菌の出現状態から見て菌根の分解過程は冬から夏の間に距離にして約10cm進行する。

さらにシロの内部では菌根が分解し、点17と点20で菌の種類が4種となった。菌根がすでに形をとどめない点24では *Trichoderma* と *Pachybasium* sp. のみが出現した。

*Mortierella* sp. はシロ内部の菌根やアカマツの根からは分離されなかった。この傾向は5月からひきつづいていた。この季節には菌根上のフロラがもっとも規則的となり、菌根上のフロラを構成する菌の種類が減少した。活性菌根はマツタケの菌糸に占有されており、この季節にマツタケの菌糸はもっとも活性

Table 14. 夏のシロにおける菌類フロラ (2), 土壤塗布法による

1965年7月15日, 調査地 a

Fungal flora in the Shiro soil in spring (2). Soil smear method.  
Jul. 15, 1965. Research area a.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Trichoderma</i> spp.	4			7		6			—		2	9					4	88	—	9	7	55	2
<i>Mortierella</i> sp.						18	4	7		66			71							95	47	60	71
<i>Pachybasium</i> sp.																				4	7	9	4
R-I	7		4																				
R-II						2								4			7						
R-III						2					2						1						
<i>Oidiodendron</i> sp.														4									2
<i>Mucor</i> sp.																							
No. 1		2	3	22				2			9	2											
2			4																				
3			7																				
4				13							4	7											
5															4		22	11					
6															62								
7																	2						
種数 Species number	3	1	4	3	0	5	1	2	—	1	4	4	1	3	1	0	5	4	—	3	4	4	4
頻度 Frequency %	11	2	18	42	0	28	4	9	—	66	17	18	71	12	62	0	36	69	—	108	61	124	79

採取した土壤小塊を1プレート当たり10~12点ずつW培地上にうえつけ、25~27°Cで、20日間培養した。表中の数値はうえつけ点数、45点に対する菌の分離された頻度を示す。

Small soil crusts were inoculated on the plate with W medium and incubated for 20 days at 25~27°C. The numbers in the table are the frequency (%) of isolated fungi per total inocula, 45 points.

Table 15. 夏のシロ土壌における菌類フロラ (2),  
Fungal flora in the Shiro soil in summer (2).

種 Fungal species	試 料 採 取 位 置									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Trichoderma</i> sp.										
<i>Pachybasium</i> sp.										
<i>Mucor</i> sp.						1		1		
<i>Penicillium</i> spp.				3			2	1		
<i>Mortierella</i> sp.	86	104	480	156	291	46	407	47	21	152
Others	5	3	6	2	2	2	3	5	2	
種 数 Species number	3	3	4	5	4	4	5	4	3	1

表中の数値は 1 プレート当たりの平均コロニー数。100 倍希釈，培養基：W + Rose bengal 培地，25~27°C で 20 日間培養。

が高かった。従って，秋の子実体発生にとって夏の環境条件，とくに水の供給はマツタケの菌糸の地下での生育量を左右するという点で重要である。

#### b. シロ土壌における菌類

##### 1) 土壌塗布法による分離結果

Table 14 に土壌塗布法による菌類の分離結果を示す。

シロ外部の点 1 からは少数の *Trichoderma* と R-I が，点 2 からは No. 1 が，点 3 からは R-I と *Penicillium* の 3 種が分離された。点 4 からは *Trichoderma* と *Penicillium* の 2 種が，点 5 からは表層に近いにもかかわらず，何も現われず，点 6 からは *Trichoderma*，*Mortierella* sp.，R-II および R-III が分離された。これらの菌の出現数は調査地 b に比して少なかった。この結果を調査地 a の 12 月の場合と比較すると，同一点で *Trichoderma* 30~50%，*Mortierella* sp. が 20~22%，*Mucor* が 42~45% 出現していたことから，7 月にはこれらの菌の出現率が急激に低下したといえる。これは恐らく土壌表層の乾燥によるためと思われる。

シロの先端，点 7 では菌根が多く，*Mortierella* sp. が分離された。点 8 では *Mortierella* sp. と No. 1 が分離された。層 III にある点 10 からは *Mortierella* sp. のみが現れ，点 13 も同様の傾向を示した。平板希釈法によると点 7 に多くの *Mortierella* sp. が出現したことから，孢子状で，点 10 では両法で多いことから，孢子形成が始まった状態で，点 13 では土壌塗布法で多いことから菌糸状で生息すると思われた。夏には *Mortierella* sp. のシロ内部における活性が高まるようである。

シロ底部の境界では *Trichoderma* や *Penicillium* などが出現して排除作用は不完全であった。

前年の子実体発生跡の点 14 からは *Oidiodendron* sp. と R-II が現われたが，平板希釈法によると *Mortierella* sp. の出現が多く，ここではすでにマツタケの菌糸の分解が終了していると思われた。この下の点 15 には No. 6 が現われ，他のものは分離されなかった。このシロには層 I' がいないためにシロとシロ下部の未感染部土壌との相違は明瞭であった。表層から 20 cm の深さの土壌からは菌が分離されず，調査地 b の場合に比して B~C 層で急激に菌類が減少した。

点 17 と点 18 とからは *Trichoderma* が出現し，未感染部土壌とほとんど変らなかった。点 20，21，22 および 23 ではほぼ同様の結果がえられた。これらの点では未感染土壌よりも *Mortierella* sp. が多く，

平板希釈法による, 1965 年 7 月 15 日, 調査地 a  
Dilution plate method. Jul. 15, 1965. Research area a.

Sampling point														
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
3	6					2	6	1				12		3
2					1		2	1						
2					2							1		
68	34	21	203	139	25	80	143	34	450	172	37	80	142	31
2	2		1	5			2		6		2	2	3	1
5	3	1	2	3	4	2	5	3	4	1	3	4	3	4

1 g soil samples were diluted 100 times by sterilized water, and soil fungi were isolated on the plates with W + Rose bengal medium. Numbers in the table mean the colony number isolated on one plate, average value. 20 days at 25~27°C.

*Pachybasium* sp. と *Trichoderma* が常在した。シロ内部における菌糸や菌根の分解は夏に活発となった。

## 2) 平板希釈法による分離結果

Table 15 に平板希釈法による分離結果を示す。シロ外部の点 1 から 6 までは *Mortierella* sp. が多く、一般に上層ほど多数出現した。細菌や放線菌も多かった。

シロの先端, 点 7 にも *Mortierella* sp. が多かったが, *Penicillium* や他の菌が混入した。これは夏の間には菌根の前方への生長が休止したためである。点 8 では点 11 と同様, シロの影響が弱かった。点 10 では *Mortierella* sp. のみとなり, 点 13 では *Mortierella* sp. がやや減少した。点 14 と点 15 はほぼ類似の傾向を示した。

点 17 と点 18 には *Pachybasium* sp. が出現し, *Mortierella* sp. も多かった。点 20, 22, 24 では *Mortierella* sp. が多く, これらの点では孢子状で分布した。

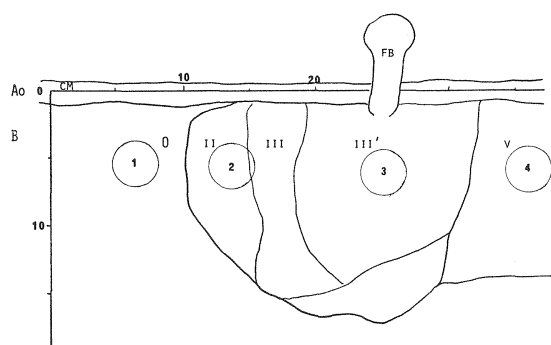
シロの下部の点 9, 12, 16, 19 などでは *Mortierella* sp. の量が減少した。これらの点から *Mortierella* sp. が分離された例は少ないので, この部分にはシロの影響がおよんでいると思われた。シロが下部から回復した所, 点 21, 23 および 25 にはほぼ外部土壌と同様の傾向を示した。回復にともなう菌の侵入は底部の土壌から起きる。

このような夏の乾燥によって菌の活動が抑制されることはマツタケにとって有効であるとも考えられる。シロ内部は夏の間ある程度の湿潤さを保つために, シロ外部の他の菌類の活性が弱まる時でも, マツタケの菌糸はシロ内部で生長しつづけることができる。冬にもシロ外部の菌の活性は低下し, マツタケは菌糸のみの層を形成する。マツタケの菌糸の活動時期は一般の土壌生息性菌のそれと多少異なっているように思われる。

## C<sub>3</sub>. ハルマツタケ発生時の状態

1966 年 6 月末, 調査地 b の近くでハルマツタケが発生した際にシロの形態を観察し, 土壌から試料を Fig. 9 の位置で採取し, 分離培養した。その結果を Table 16 に示す。分離は Soil plate 法により行った。

シロ外部の点 1 では *Mortierella* sp. がもっとも多く分離され, その他の菌も多く, 6 月の未感染土壌



シロの形態との対比は第 I 報<sup>5)</sup> 参照。0～V : シロの層, 微生物分離用試料は 1 から 4 の点で土壌塊のまま採取した。

Details of morphological features of the Shiro were reported in the previous paper<sup>5)</sup>. 0～V : zones classified. Samples for isolation of soil microorganisms were collected from 4 points. FB : fruit body occurring position.

Fig. 9 ハルマツタケ発生時のシロにおける微生物分離用試料の採取位置, 1966 年 6 月 24 日, 調査地 b

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms at the fructification time in rainy season. June 24, 1966. Research area b.

Table 16. ハルマツタケ発生時のシロ土壌における菌類フロラ  
soil plate 法による, 1966 年 6 月 24 日, 調査地 b  
Fungal flora in the Shiro soil at the fructification time  
in rainy season. Soil plate method. June 24, 1966.  
Research area b.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point			
	1	2	3	4
<i>Trichoderma</i> spp.	3			4
<i>Mortierella</i> sp.	212	3	25	12
R-I	6	2		15
R-II	5			
R-III	5			
No. 7				4
10	9			
17	2			
18	11			
種数 Species number	8	2	1	4
コロニー数 Colony number	253	5	25	35

3 g の土壌を 300 cc の WY 培地に加え, しんとうした後, プレートに分注した。培養は 25°C で 20 日間。

3 g soil samples were added into 300 ml WY medium and poured into plates. Incubation, 20 days at 25°C.

の場合と異ならなかった。層 II からは *Mortierella* sp. と R-I が少数分離されるのみで, 排除作用は正常に働いていた。子実体発生位置の点 3 からは *Mortierella* sp. のみが現われたが点 2 より増加した。シロ内部の点 4 では R-I, *Mortierella* sp., No. 7 および *Trichoderma* が出現した。*Trichoderma* の出現によってここではすでに菌根の分解が進行した。このような菌類相の特徴は秋マツタケの発生時と同様であり, ハルマツタケとアキマツタケはこの点においても異質なものではなかった。



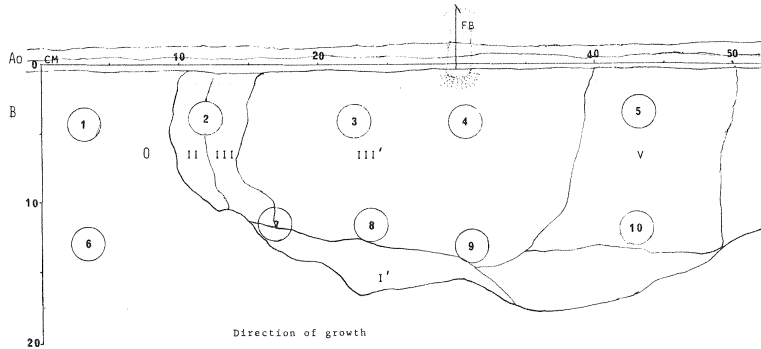


Fig. 10 子実体発生時のシロにおける微生物分離用試料採取位置

1966年10月16日, 岡山県久米郡久米南町

Sampling points on the profile of Shiro for the isolation of soil microorganisms at the fructification time in fall, Oct. 16, 1966, Kumenan, Okayama Pref.

シロの形態との対比は後に報告する (第V報), 0~V: シロの層, FB: 子実体発生位置, 微生物分離用試料は 1~10 の点で採取された。

Details of morphological features of the Shiro will be reported later in this series. 0~V: zones classified. Samples for isolation of soil microorganisms were collected from 10 points. FB: fruit body occurring position.

#### D. 秋, 子実体発生時の状態

夏のシロの形態は見かけ上秋まではほとんどそのままの状態に移行し, 気温の低下にともなって子実体が発生する。子実体発生前の状態は夏の状態とほとんど異ならず, 一般に菌の活動は多少低下する。子実体発生時の例としてここには岡山県のものを示す。

1966年10月16日に岡山県久米郡久米南町のマツタケのシロから試料を採取した位置を Fig. 10 に示す。

##### a. 菌根とアカマツの根から分離される菌類

Table 17 に菌根とアカマツの根から分離した結果を示す。

シロ外部の点1にはアカマツの根があり, *Trichoderma* が多く, *Mortierella* sp., R-I および R-II が分離された。この状態は他の季節の場合と異ならなかった。

菌根が活性な層IIにある菌根からは *Mortierella* sp. がわずかに分離された。子実体の発生した位置にある菌根からは *Mortierella* sp., R-II, R-III および R-IV が分離された。ただし, 出現率は低く, 菌糸や菌根の分解は進行していなかった。子実体発生位置の下点4からは根面生息性菌に加えて No. 12 と No. 13 が現れたが, これらの菌は子実体の発生によって一時的に混入したものである。

子実体が前年発生した位置, 点5では菌根が分解段階2に達し, *Trichoderma* と *Pachybasium* sp. とが出現した。これら以外に R-I, R-II, R-IV および No. 7 が分離された。この季節にも菌根の分解過程は進行した。

##### b. シロ土壌における菌類

###### 1) 土壌塗布法による分離結果

Table 18 に土壌塗布法による分離結果を示す。菌の出現状態は夏と類似したが, 梅雨季にくらべると菌の出現率は低下した。

シロ外部の表層に近い点1からは *Trichoderma*, *Penicillium* および *Mortierella* sp. が分離された。

Table 17. 子実体発生時の菌根上の菌類フロラ  
1966 年 10 月 16 日, 岡山県久米南町  
Fungal flora on the mycorrhiza and other plant roots  
at the fructification time in fall. Oct. 16, 1966.  
Kumenan, Okayama Pref.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point				
	1	2	3	4	5
<i>Trichoderma</i> spp.	22				4
<i>Mortierella</i> sp.	5	1	4		
R-I	1			10	2
R-II	1		7	2	3
R-III			6		
R-IV			1		1
No. 7				1	1
12				3	
13				2	
種数 Species number	6	1	4	5	6
頻度 Frequency %	62	3	37	40	25

シロ土壤から採取された菌根や他の植物根は水道水で洗浄後、滅菌水で 10 回洗浄し、小片に切断した後、W<sub>Y</sub> 培地にうえつけられた。培養 22°C, 25 日間。うえつけ点数 45。表中の数値は分離された菌の全うえつけ点数に対するパーセント、頻度。

The samples were washed with sterilized water 10 times after washing by tap water. Roots were cut to small pieces and inoculated on the W<sub>Y</sub> medium. Incubation, 25 days at 22°C. The numbers in the table mean the frequency (%) of fungi isolated per total inocula number, 45 points.

Table 18. 子実体発生時のシロ土壤における菌類フロラ, 土壤塗布法  
による, 1966 年 10 月 16 日, 岡山県久米南町  
Fungal flora in the Shiro soil at the fructification time in fall.  
Soil smear method. Oct. 16, 1966. Kumenan, Okayama Pref.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Trichoderma</i> spp.	5	10				8	8			
<i>Penicillium</i> spp.	5	2	1	1		2	6			
<i>Mortierella</i> sp.	15	18	14	12	22	8	7	17	4	15
<i>Mucor</i> sp.		2					2			
<i>Mortierella</i> sp.				1	1	1	1			
R-I			21	5	4			1	2	9
R-II					3			2		
R-III					1			1		
R-IV				1	2				3	
No. 7			6	12	6				5	4
8			11	4					12	3
9								8	3	2
<i>Oidiodendron</i> sp.								1		
種数 Species number	7	9	4	6	6	4	5	6	6	5

土壤の小塊 10~12 点を W<sub>Y</sub> 培地にうえつけ 22°C で 25 日間培養。表中の数値は分離された菌のコロニー数。

Small soil crusts were inoculated on the W<sub>Y</sub> medium and incubated for 25 days at 22°C. The numbers in the table are the colony number of fungi isolated.

深さ 12 cm の点 6 でもほぼ同様の傾向が見られたが、*Mortierella* sp. は減少した。シロの先端、点 2 の試料には層 II が半分含まれていたが、*Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucor* および *Mortierella* sp. が現われ、かなり混乱した状態となった。この層も夏に比して幾分勢が衰えた。

子実体が発生した層の点 3 と 4 でも *Mortierella* sp. が増加し、根面生息性菌以外に *Penicillium* が混入した。No. 8 はこの土壤に特有の菌でシロ内部にも出現した。この層の *Penicillium* の出現は子実体発生によるマツタケの菌糸の急激な勢力減退にともない、粗大有機物中に温存されていた菌が一時的に土壤中に進出したためと考えられる。

シロ下部の点 7 は未感染土壤との境界にあり、*Trichoderma* や *Penicillium* などが混入し、*Mortierella* sp. は少なかった。点 8 と 9 はシロ下部の菌根を含む層に属していたために主として根面生息性菌を発生させた。ここでも層の衰弱が起っていたと思われる。

前年の子実体発生跡の点 5 では *Mortierella* sp. と根面生息性菌が増加し、点 10 も深さに比して *Mortierella* sp. が多かった。ここでは菌糸や菌根の分解が夏よりさらに進行していたと思われる。

## 2) 平板希釈法による分離結果

Table 19 に平板希釈法による分離結果を示す。この方法によると *Mortierella* sp. がもっとも高頻度で分離された、5 月に比較すると出現数は多少低下した。

点 1 では *Mortierella* sp., *Penicillium* および No. 7 が現れ、点 2 では No. 9 と *Mortierella* sp. とが分離された。この方法によっても層 I と II に混乱が見られた。点 3 では *Mortierella* sp. のみ、点 4 では No. 10 が加わった。点 5 と 8 では *Mortierella* sp. が 2 種、点 6 では *Mortierella* sp. のみとなった。点 3, 4, 8 などの子実体発生に利用された部分では *Mortierella* sp. が増加した。土壤塗布法によってもさほど減少しないことから *Mortierella* sp. の菌糸状態での生長も胞子の形成も盛んに行われていると思われる。

このような状態が先に述べた 11 月の状態に連続する。微生物相の連続的な変化を厳密にとらえることは困難であり、微生物相の変動そのものもきわめて複雑である。上述の結果からもフロラを構成する微生

Table 19. 子実体発生時のシロ土壤における菌類フロラ, 平板希釈法  
による, 1966 年 10 月 16 日, 岡山県久米南町

Fungal flora in the Shiro soil at the fructification time in fall.  
Dilution plate method, Oct. 16, 1966, Kumenan, Okayama Pref.

種 Fungal species	試料採取位置 Sampling point							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Mortierella</i> sp.	15	18	42	37	14	4	—	49
<i>Mortierella</i> sp.		3			2			2
<i>Penicillium</i> spp.	5							
No. 7	2							
9		10						
15				2				
種数 Species number	5	3	1	2	2	1	—	2
コロニー数 Colony number	22	31	42	39	16	4	—	51

W 培地, 表中の数値は分離されたコロニー数。

W medium.

物の活動は季節、すなわち気象の変化と土壌内の環境変化に応じて絶えず変動するといえる。また、個々の種は各々独自の生活範囲を環境条件に対応して持っており、フロラの構成員の各々の休止期と活動期が多少ともずれることによって平衡状態が保たれていると考えられる。

土壌の菌類相に見られる季節の特徴をあげると次のようになる。子実体発生時には急速に層ⅡやⅢが乾燥し、菌体の生理的变化が起こり、菌根の枯死が始まるので、地表面からの土壌菌の侵入がしばしば見られ、菌類相が一時的に混乱する。これはまた、採取などの人間による影響にもよると思われる。シロ先端にわずかな活性部分層Ⅰと層Ⅱを残す冬には一般の微生物活動が秋に比して低下するためにシロ先端でも比較的安定した状態が見られる。春の菌根形成期には土壌菌がシロ先端から除かれ、相の単純化が進行する。梅雨季から夏にかけて微生物活動が高まり、混入することもあるが、マツタケの微生物排除作用もつよい。盛夏にはシロの進展が休止し、微生物活動も抑制されるのでシロは安定する。菌根や菌糸が分解している層では土壌菌の混入が少なく、正常な土壌微生物相への回復が、シロ内部から緩慢に進行する。

菌根および有機物上の菌類相について見ると、シロの活性が低下する時期には有機物中に生息する菌がシロの中でも繁殖を始めるように思われる。菌根についても、その活性が低下、もしくはうしなわれる時期には根面生息性菌が増加し、土壌菌もしばしば付着することがある。季節としては秋、子実体発生直後がもっとも不安定な状態になるといえる。

シロの先端における土壌菌の排除作用は細菌や放線菌の場合ほど顕著ではなく、季節的にもその菌類相に混乱が認められることから、シロが崩壊する場合には恐らく土壌菌の混入と繁殖が先行するものと思われる。シロの内部のイヤ地が底部から進行するのも恐らく、土壌中の菌が不透水層となっている表層からよりも速く達し、繁殖するためと思われる。

## ま と め

上述のように現存するシロでは、マツタケのシロとして定義が可能となるほどに明瞭な特徴をもった微生物生態系が認められた。いったん形成されたシロでは菌糸とアカマツの根の同調的な生長によって菌根が形成され<sup>6)</sup>、この菌根が土壌微生物を選択的に抑制または排除する作用をもつこと<sup>7)</sup>によってシロ内部の微生物相が単純化される。シロ外部のいわゆる未感染土壌に数多い菌類のうち、*Mortierella* sp. その他 2, 3 の菌がマツタケの影響を逃れてシロ内部で増加し、根を分解する菌も同様にマツタケの影響を逃れる。通常、土壌に多い糸状菌の多くはその活動を抑制されるか、または排除され、生存したものだけが後にシロの内部で増加する。細菌のうちでも多くの土壌細菌や放線菌が菌根の働きによって排除され、シロ土壌では明瞭に減少する。マツタケの菌糸のみがあって、菌根のない所では未感染土壌と大差のないフロラが認められることから、菌根、さらには菌根から生産される抗生物質がシロの微生物相を特徴づけるのに大きく働いていることは事実である。シロ内部に見られる土壌の乾燥、粒径の変化、根の枯死分解や菌糸の分解による不透水層の形成など、いわゆるイヤ地化もマツタケのシロを安定させるのに重要な役割をしていると考えられる。pH の低下、乾燥などは当然、微生物の侵入と活動を阻害し、不透水層の形成によって表層土壌からの微生物の流入も遅れる。一方、特定の菌、*Mortierella* sp. や根面生息性菌の増加も他の土壌微生物の侵入と活動を生態的に妨げているはずである。

菌根について、マツタケがアカマツの根面生息性菌の先駆者となっていることは確かであろう。シロにおいて菌根が形成される過程を見ると、アカマツの根は常にマツタケの菌糸が充満した中で発根し、他の

菌が着生する以前にマツタケが着生できるようになっている。もし、マツタケのシロの外部にマツタケより速く、アカマツの根をとらえて菌根を作る菌がいた場合にはマツタケのシロから突出する根はその菌によって奪われるであろう。しかし、一般の菌根菌が着生しない主根にまでマツタケは着生し、菌根を形成することによって、この競争にもうかっている。類似した菌根を形成する菌がいた場合にはマツタケの生長が抑制されることになる。既存のシロで、マツタケの菌糸とアカマツの根双方が活発に生長しつづけている場合にはマツタケのシロはきわめて安定した生長をつづけることができ、微生物相からも規則的な変動が認められる。

また、生態学的に見た場合、1つの種の菌糸の集団が強大であれば、他のものが多少抵抗しても対抗できないということも考えられる。事実、活発に生長するシロに対して、切断、ほりかえしなどの多少の障害を与えてもほとんど影響はでない。

一方、シロには齡がある<sup>9)</sup>。現存のシロは波紋の広がるように菌根の小集団から発達して来たものであり、菌根の形成段階でも、でき上ったシロと同じ位の生態的な強さを示すか否かは疑問である。マツタケの胞子の発芽は容易でなく、寿命もそう長くはない。土壌煎汁だけの培養基上でも発芽することはできるが、生長は永続しない(小川未発表)など、胞子の発芽、さらには胞子形成の段階にも分散を困難にしていると思われる要因は多い。表層土壌は微生物で充満していると考えてもよく、発生するアカマツの根は寄生的または共生的な多くの菌によって常に利用される。従って、分散能力の少ないマツタケの胞子が、土壌中に入ってアカマツの根を獲得することはむづかしく、その根が菌根を多数作る能力を持ったものであることも可能性としてはきわめて低いであろう。まして、充満する微生物群の中で、わずかに形成された菌根が集団化して発達することは容易でない。菌根の抗生作用はさほど強力なものでもなく、マツタケの菌糸の生長はきわめて緩慢である。林内の表層土壌に無数の胞子が分散し、その一部が発芽し、さらにその一部が菌根を作り、さらにその一部が菌糸の集団となる。菌根形成過程やシロの形成過程での土壌微生物または動物による選択は大きいと考えなければならない。

シロが形成され、拡大する過程でも常に競争者による選択が起っている。いったん、できたシロが消滅することはまれではない。高等菌類どうし、とくに生態的特性の似た菌とマツタケとの競合は中でも顕著である。シロが崩壊する過程は通常急速に進行する。シロの一部が消え始めると消失する部分は急速に拡大する。老化したシロではシロ先端での微生物の排除作用が低下し、多くの菌の侵入がしばしば認められる。いったん、シロ先端の菌糸が枯死したり、アカマツの根が枯死したりするとその部分は生長が完全にとまり、横からの補充は断たれる。シロ内部が攪乱された場合にはシロ先端への影響は少ないが、多くの場合、シロ内部から外部へと連結した根が多く、根の切断はシロの崩壊を促す。単純化した微生物相が単純化させている力をうしなった時には逆に他の微生物の急激な侵入繁殖を招くというのは一般的な現象である。さらに、高度に発達しすぎた生態系はそれを構成している要素の一つの破壊によって連鎖反動的に崩壊しやすいというのも原則である。マツタケのシロの微生物生態系は機能的に分化が著しく、種構成の上から単純化が極度に進行している。マツタケの主導する微生物生態系としてのシロは、換言すれば、きわめてできにくく、いったんでき上ると強く、同時にもろくて可変性に乏しいといえる。

一方、このような特異的な生態系がなぜ発達したのかということは菌類の生態の進化を考える上でも重要な事柄である。高等菌類一般の生態的特性は菌糸体の分化の程度によってⅢ型に区分される。コロニー型、フェアリーリング型、菌糸束型をもうけ、各々の菌糸体の部分的分化のちがいによって、さらに細分

される（小川未発表）。マツタケの場合にはフェアリーリング型であり、菌糸束の発達がない。このような場合には必然的に競争者の少ない領域に生息し、基質となるものに制約があるマツタケのような場合には菌根を集散的に形成せざるをえない。また、その生息領域を自身の生活に都合よく、改変する能力を持たなければ生存しえないことになる。腐生的な能力をもつこの型の菌についても類似する現象は多い。マツタケの近縁種も同様の性質をもっており（小川未発表）、マツタケの属するグループは進化の過程で特異的に残存したものであると推測される。このような菌がアカマツ林の分布の拡大によって増加し、現在またその分布範囲をせばめられていることは我国の森林の微生物相とその変化を考える場合には興味ある例といえよう。

マツタケが天然林に発生する場合にはアカマツ林に発生するほどには集中してシロが見られないのが常である。コメツガ、ハイマツ、ツガなどの天然林で発生しやすい場所は亜高山帯や尾根といったように限られている。このような位置の土壤はそのほとんどが未熟土か受蝕土である（小川未発表）。一方、アカマツ林の多くは2次林であり、過去に人間の収奪があった所に成林しており、なかでもマツタケを発生するアカマツ林は一般に生産性の低い所である。このような所の土壤は受蝕土、Er型かもしくはその回復過程にあるBaないしはBa(d)型である。土壤は酸性で乾燥しやすく、当然、土壤微生物相も肥沃な土壤にくらべて貧弱である。一般に放線菌、糸状菌が多く、細菌は少なく、逆に高等菌類が多い。微生物の分布は表層土壤に限られており、B層、C層では極度に減少する。堆積腐植の多い場合にはA<sub>0</sub>層とB層との微生物量が極度に異なり、腐生性の高等菌が増加し、菌根菌が減少する。堆積腐植の少ない場合には微生物量は少なく、菌根菌が多いといった特徴がある（小川未発表）。後報するように根の分布量もこのような土壤条件に支配されて変化する。

先述のようにマツタケの生息領域はB～C層であり、微生物的に貧弱な土壤にしか生息せず、A<sub>0</sub>層に上昇することはない。恐らく、菌根形成やシロ形成の過程においても同様のことがいえるであろう。マツタケのシロが健全に生長するためには微生物相が単純で量的にも少ないことが必要となる。同時に競争する菌根菌も少なくなければならない。マツタケのシロが尾根やEr型土壤に高頻度で形成される原因は自然状態の土壤微生物の分布にあるといえよう。マツタケのシロが林齢10～15年に形成され、子実体の発生が20年頃から始まるといわれるのも、シロの形成がアカマツ林の成林過程にともなう微生物相の変化にともなって起きるということによるであろう。マツタケもアカマツ林の微生物生態系のメンバーの1つとして林内に侵入、定着し、消滅しているといえよう。マツタケのシロとその生活はアカマツ林の土壤微生物生態系の変化と切り離しては考えられない。林地における栽培を考える際にもこの理解が必要である。

以上のような種々の側面をもったマツタケのシロが、1900年代の始めから日本列島で増加し、近年、減少しているという事実を微生物生態ないしは疫学的に見ることも必要である。アカマツ林にとってマツタケは明らかにマツタケ病ともいえるものであり、そのシロがアカマツ林の微生物生態系と不可分であることを考えると、マツタケのシロの大規模な変化は日本列島、とくに西日本の森林の微生物相の目にみえない大きな変化の表徴と思われる。現に、アカマツ林に対する人間のかかわりあい近年急速に変化したことによって、土壤表層の有機物量と植物量が増加しており、マツタケの好まない条件が各所に急速に形成されている。菌類でもハリタケ属のようなマツタケの生活型と類似する菌が急速に増加し、過去にマツタケの適地とされた地域をうめている多くの事例を見ている（小川未発表）。このような大規模な森林微生物相の変化が起きる原因は単に人間のかかわりあいの問題だけではないかもしれない。マツタケのシロ

を一つの指標として微生物相の変化を見ることも可能であり、マツタケ以外のものについても同様のことが生ずる可能性は十分あるといえよう。マツタケのシロから数多くのことを知ることはできるが、とくに、森林土壌の微生物の研究にとっては微生物自体の生活状態、高等菌類の重要性、疫学的な見方、森林の生態系そのものとの関連を明瞭に示している点で、人工栽培のための知識をうるという以上にマツタケのシロは重要である。

### 謝 辞

この研究に対して終始有益な助言と指導をいただいた浜田 稔博士、共同研究者として細菌に関する調査研究を担当し、助言と援助を与えられた同志社女子大学小原弘之博士、京都大学相良直彦博士、北海道立林業試験場村田義一氏、その他の各位に謝意を表します。菌類の分離方法、同定などに有益な助言と指導を与えられた発酵研究所 椿 啓介博士に謝意を表します。この研究の実施にあたり、マツタケのシロを提供された京都市房岡宇八郎氏、京都府船井郡和知町質美下の各位およびあっせんの労をとられた京都府林試の各位、岡山県林試故竹内 栄氏に謝意を表します。また、本論文の作成にあたって、その便を与えられ、追加調査の機会を与えられた林業試験場前土壌部長橋本与良博士、土じょう部長 塘 隆男博士、土じょう肥料科長河田 弘博士に謝意を表します。

### 引用文献

#### Literature cited

- 1) 馬場為二ほか：松茸のシロにおける土壌微生物群落と松茸発生との関係，日林関西支部講演集 10：103, (1960)
- 2) 浜田 稔：マツタケ菌糸純粹培養由来，缶詰時報 34(b)：61～55, (1955)
- 3) JOHNSON, L. F. *et al.* : Methods for studying soil microflora—plant disease relationships, Burgess pub. (1959)
- 4) 児玉 巧：松茸発生林の土壌について，日林誌 18(9)：779～786, (1936)
- 5) 小川 真：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, (1975)
- 6) 小川 真：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, (1975)
- 7) OHARA, H. : Antibacterial activity of mycorrhiza of *Pinus densiflora* formed by *Tricholoma matsutake* ITO *et al.* (SING.), Proc. Jap. Acad. 42(5)：503～506, (1966)
- 8) OHARA, H. & M. HAMADA : Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhizae in *Tricholoma matsutake* (S. ITO *et al.*) SINGER, Nature 213 (5075)：528～529, (1967)
- 9) 岡崎文彬：アカマツ林の実態調査と施業に関する考察，農林出版，(1957)
- 10) 沖永哲一：マツタケのシロにおける土壌微生物学的研究，文部省研究集録，昭和31年：10, (1956)
- 11) PARKINSON, D. : Soil micro-organisms and plant roots, Soil Biology edited by A. Burgess and F. Raw, Academic press. : 449～473, (1967)
- 12) 田添 元：マツタケのシロに関する生態学的研究，マツタケ，1964：65～83, (1964)
- 13) WAKSMAN, S. A. & E. B. FRED : A tentative outline of the plate method for determining the number of microorganisms in the soil, Soil Science 14：27～28, (1922)
- 14) WARCUP J. H. : Studies on the growth of Basidiomycetes in soil, Ann. Bot. N. S. 15：305, (1951)
- 15) WARCUP J. H. : Fungi in soil, Soil Biology edited by A. Burgess and F. Raw. Academic Press : 51～102, (1967)
- 16) 山内弘毅・横畑 明：マツタケのシロの土壌学的研究，広島短大報，1(1), 10～14, (1958)

**Microbial Ecology of Mycorrhizal Fungus—*Tricholoma*  
*matsutake* (ITO et IMAI) SING. in Pine Forest III  
Fungal flora in Shiro soil and on the mycorrhiza**

Makoto OGAWA<sup>(1)</sup>

Summary

*Tricholoma matsutake* could be characterized as the soil inhabiting and perennial mycorrhizal fungus<sup>(5)(6)</sup>. It was prospected from these previous works that the Shiro would affect the microbial flora in surrounding soil directly or indirectly, and that there would be present the sequential microbial succession on the mycorrhiza.

A few studies concerning the soil microorganisms in pine forests have been reported, but there are no available data on the microbial problems in pine forest where this fungus occurs. TAZOE<sup>(2)</sup> suggested the importance of microbiological analysis of the Shiro in 1964. OKINAGA<sup>(10)</sup> reported that the soil bacteria and actinomycetes decreased remarkably, and that *Mortierella* sp. increased in the inside of Shiro. BABA *et al.*<sup>(1)</sup> also reported that *Mortierella* sp. and *Penicillium* spp. were isolated from the inside of Shiro and that the mycelium of *T. matsutake* could not be isolated from the mycorrhiza.

WARCUP<sup>(14)</sup> studied the fairy rings of *Lepista nudum* and *Marasmius oreades* microbiologically and reported that the soil fungi decreased in the active mycelial zone of *L. nudum*. But there are few reports on mycorrhizal fungi.

On the properties of Shiro soil, it has been well known that the impermeable layer is formed in the inside of Shiro, changing to powdery structure with the desiccation of soil. Hydrogen ion concentration was low around the margin of Shiro and slightly high in the inside, and the moisture content of soil decreased to 10~20% in the inside<sup>(4)</sup>. MURATA worked on the sequential change of Shiro soil and got some data. The hydrogen ion concentration was pH 5.1 to 5.2 outside the Shiro, pH 4.7 on the margin, pH 4.9 at the fruit body occurring position, and pH 5.4 to 5.9 near the center of Shiro. The moisture content was 22 to 28% outside the Shiro and 19 to 22% inside, and that in the active mycelial zones was stable through the year (unpublished).

On the chemical and physical properties of Shiro soil, YAMAUCHI *et al.*<sup>(16)</sup> reported that the physical properties of Shiro soil changed remarkably inside the Shiro, but the change on chemical ones were slight; in the inside clay content increased, moisture content decreased, porosity was high, nitrate increased and humic acid content became lower comparing with those of the soil outside the Shiro.

It is always the most important problem for the investigation of soil microorganisms to select the suitable methods of sampling, isolation, and so on for the purposes. In this work several methods were tried in order to find out the better ones, but there remained some unresolved problems on the methods, especially on the identification of sterile soil fungi and the media for isolation.

---

Received April 21, 1976

(1) Soil Survey Division



The purposes of this work were to apprehend the relationships between the fungus and other soil microorganisms and the seasonal variation of soil fungal flora varying with the enlargement of Shiro, and to make clear the role of this fungus in the microbial succession on the mycorrhiza. It seems that the microbiological studies of Shiro soil and mycorrhiza will be able to offer useful information when the culture of this fungus is tried in the field.

## 1. Fungal flora in Shiro soil

### Material and methods

#### A. Isolation method

##### a. Sampling method

The sampling points were decided according to the morphological features, mycelium, mycorrhiza and soil properties, on the profile of Shiro. Sterilized glass tubes packed in test tubes or sterilized stainless tubes with caps at both edges were used for soil sampling. Sampling was carried out carefully in order to avoid the contamination from other parts.

##### b. Isolation method

1) Dilution plate method: Fresh sample of 1 g soil was crushed by glass rod and diluted 100 or 200 times usually. It was added into the media and apportioned to plates. The purpose of this work was to learn the tendency of the distribution of soil fungi, so the representation by the usual way, colony number per 1 g dry soil, was not applied.

2) Soil plate method: Fresh sample of 1 g soil was crushed and added to the media before apportioning or mounting with the media in plates. This method was applied for special cases to isolate the fungi in the active mycelial zones.

3) Soil smear method: Small soil crusts without organic matter or root were inoculated 12 to 15 points each plate. By this method, the species which seemed to originate from the hyphal fragments could be isolated, and the species composition was quite different from that isolated by dilution plate method. The frequencies of isolation of bacteria and actinomycetes were low in this method, but *Trichoderma* spp. and other rapidly growing fungi sometimes occupied the surfaces of plates. Usually the results were represented as the frequency, percentage of isolated fungus per total number of inocula.

4) Direct isolation method: The hyphae in soil samples were inoculated directly, being picked up with a pincette or glass needle onto the media. In some cases, soil samples were kept in humid chamber or enriched with liquid media for several days before isolation. This method was applied mainly to investigate the fungal flora on the margin of Shiro or the mycorrhiza.

##### c. Media for the isolation of soil fungi.

The media used in this work were as follows. In some cases, some antibiotics, streptomycin and penicillin, and rose bengal were added to the media in order to depress the growth of soil bacteria, and yeast extract or soil extract, 1 kg soil/1,000 ml tap water autoclaved, were used in order to promote the growth of soil fungi.

##### W medium<sup>13)</sup>:

10 g glucose, 5 g pepton, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g agar and 1,000 ml distilled water. Sometimes 30 mg rose bengal was added to 1,000 ml medium. pH 5.0.

##### Ws medium:

500 ml/ soil extract was added to W medium to become 1,000 ml. pH 5.0.

##### M medium<sup>2)</sup>:

10 g glucose, 2 g yeast extract or 5 g dried yeast, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 g agar and 1,000 ml distilled water. pH 5.0 adjusted with 1 N HCL. This medium was the improved one of the medium for the isolation of *T. matsutake*.

S medium:

10 g glucose, 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg  $\text{CaCl}_2$ , 0.4 mg Fe-citrate, 0.2 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6 \text{H}_2\text{O}$ , 15 g agar and 1,000 ml distilled water, pH 5.0.

W<sub>Y</sub> medium: 500 mg yeast extract was added into 1,000 ml W medium.

S<sub>Y</sub> medium: 500 mg yeast extract was added into 1,000 ml S medium.

M<sub>s</sub> medium: 500 ml soil extract was added into M medium to become 1,000 ml.

#### B. Direct observation method

Soil crusts were collected from the various points in Shiro and observed under microscope after staining with cotton blue, Merzer's reagent and sudan III. The hyphae growing in humid chamber were observed in the same way.

### Results and discussion

The sampling points in November, 1965 were shown Fig. 1. Soil fungi were isolated from soil and the mycorrhiza or plant debris as shown in Table 1, A and B.

#### A. Fungal flora on the organic matters in the Shiro

Soil fungi were isolated from the mixture of mycorrhiza, root and plant debris after washing. Samples were collected from the points 3 to 7 cm depth by sterilized dishes.

Outside the Shiro, *Trichoderma* spp. and *Mortierella* sp. appeared from 83% of fragments, and the former which was frequently isolated from the decaying pine roots and other plant debris occupied over the plates. At point 2 of the boundary between zone I and zone II, some root inhabiting fungi were isolated, and the frequency was only 5.7%. *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp. had been isolated from the same point in the other case. It seemed that the occupancy of fresh pine roots by *T. matsutake* had not completed yet.

At point 3 containing the active mycorrhiza, the growth of some brown and thick hyphae along young pine roots were observed, and three species of root inhabiting fungi were isolated with the frequency 25.7%. It was probable that the root inhabiting fungi were becoming dominant not only on the mycorrhiza but also on plant debris suppressing the other soil fungi.

At point 4 containing a number of the active mycorrhiza, two species of root inhabiting fungi were isolated, but their frequencies were reduced. Four species of root inhabiting fungi were isolated at point 5 with decaying mycorrhiza, but their frequencies were lower than that in the following point 6. Some soil fungi appeared from point 6 together with root inhabiting ones. At point 7, the species number increased, and *Trichoderma* sp. joined again. The number of root inhabiting fungi decreased according to the progress of the decomposition of root inside the Shiro. The similar trend was recognized also at point 8, and *Mortierella* sp. was isolated from plant debris at this point.

*Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* and other soil fungi except for some specific species were excluded from the mycorrhiza, roots and plant debris at the points where the active mycorrhiza was growing vividly. In the other case at research area a, *Trichoderma* sp. or *Pachybasium* sp. appeared on the organic matter and root as a sign of recovery of soil conditions to normal state in the inside of Shiro. The root inhabiting fungi which was specific for pine roots grew slowly and was sterile on culture media. They could be isolated also from the pine roots normally growing and their barks, but they were not isolated from the active

mycorrhiza and the young leader roots. The frequency of them increased with the beginning of the withering of mycorrhiza, and they exhibited saprophytic characters in the physiological experiments (unpublished).

#### B. Fungal flora in the Shiro soil.

Result by soil smear method was represented in Table 2 and that by dilution plate method in Table 3.

##### a. Results of isolation by soil smear method.

*Trichoderma* spp. were isolated from the soil crusts sampled at points 1 and 2 in the upper horizon of the soil uninfected by the fungus frequently. The frequency of *Trichoderma* by this method was higher than that by dilution plate method in general. On the other hand, *Mortierella* sp. which was always isolated with high frequency from surface soil in pine forest by dilution plate method was scarcely isolated by this method. It seems that the differences among these results may be caused from the differences of the behavior of these fungi in soil. That is to say, *Trichoderma* is usually living in some organic matters at hyphal stage, and *Mortierella* sp. is inhabiting mainly at spore form. Because, the dilution plate method seems to be more suitable for the isolation from spores in soil than soil smear method by which the fungi originated from hyphal fragments can be obtained comparatively.

*Trichoderma* spp. were dominant at points 10 and 11 where a lot of root fragments and humus had contaminated. *Trichoderma* spp. and *Mortierella* sp. decreased in B-C horizon 20 to 30 cm depth, but some soil fungi growing slowly increased there.

R-II and R-IV, root inhabiting fungi, were isolated from points 1 and 19. They were not depressed by the Shiro, and then became active in the inner part of Shiro, decomposing the fragments of root and mycorrhiza. Usually the aerobic soil fungi with high activity to decompose the organic matters were dominant in the upper horizon, and the fungal population decreased following the depth of soil in the uninfected soil outside the Shiro.

From point 3 on the boundary between zone I and zone II, *Trichoderma* spp. was not isolated, and *Mortierella* sp. was scarce. But *Oidiodendron* sp. and No. 7 which became dominant in the inside of Shiro were isolated. *Trichoderma* was mostly excluded even from zone I without active mycorrhiza. Disappearance of this fungus from the soil in the active mycelial zones was characteristic on the fungal flora in Shiro soil.

The frequency of soil fungi decreased at point 3 remarkably. The similar results were obtained also by dilution plate method. A few *Trichoderma* sp. were isolated from point 12 in zone I, and the boundary between zone I and the uninfected zone, but *Mortierella* sp. was not isolated from here. Comparing with the fungi isolated from point 11, *Trichoderma* decreased abruptly at point 12, but soil bacteria could be isolated with the same frequency to that outside the Shiro. Therefore, it is supposed that the fungal flora outside the Shiro has been also affected by the active mycorrhizal zone. *Trichoderma* could not be isolated from point 21 at the boundary between zone I' and the uninfected zone.

From point 13 in zone III with a lot of active mycorrhiza, none of the soil fungi could be isolated by this method. Probably most of the soil fungi had been excluded from this zone, because a few *Mortierella* sp. could be isolated by dilution plate method.

*Mortierella* sp. and small number of No. 7 and R-1 were isolated at point 4 in the upper horizon of zone IV by this method, but *Mortierella* sp. could not be isolated by dilution plate method from the same point. The white mycelial fragments of *T. matsutake* were included in the sample abundantly. When the sample at this point was incubated in humid chamber

for several days, numerous aerial hyphae of *Mortierella* sp. grew on it. Therefore, it seems that *Mortierella* sp. becomes active in the mycelial growth stage and decomposes the mycelium of *T. matsutake* after its withering. *Mortierella* sp. exhibited the abilities to decompose some high molecular carbohydrates and the dead mycelium of *T. matsutake* in culture experiment (unpublished).

The species number of soil fungi isolated from point 5 below the fruit body occurring position increased including *Mortierella* sp., *Oidiodendron* sp. and some root inhabiting fungi. R-I and R-II which could decompose cellulose and lignin increased with the progress of the decay of mycorrhiza. At point 14 below point 5, R-II and R-III were isolated frequently.

*Mortierella* sp. disappeared from point 6 in the upper horizon in zone V and the inner points than point 6 by this method, but the colony number isolated by dilution plate method increased. From these results it is supposed that *Mortierella* sp. changes their life form from the mycelial stage to spore stage according to the consumption of their substrate, the mycelium of *T. matsutake*.

R-IV were isolated from point 15 below point 6 abundantly. These root inhabiting or root decomposing fungi distributed irregularly inside the Shiro reflecting the uneven distribution of their substrates.

*Trichoderma* species were isolated again from points 7, 8 and 9 where some rot roots of *Quercus serrata* had remained. Eight species including *Mortierella* sp., *Trichoderma* spp. and some root inhabiting fungi were isolated from point 8, and seven species appeared at point 9. *Oidiodendron* sp. and R-III were isolated at point 16, *Trichoderma* sp. at point 17, and *Mortierella* sp., R-II and R-IV at point 18. Thus the species number of soil fungi increased in the decaying zones inside the Shiro gradually, and *Trichoderma* sp. seemed to be a precursor among recovering soil fungi. Moreover, it seems that the soil fungal flora in these points may be disturbed for a while with the withering and death of mycorrhiza and mycelium.

*Mortierella* sp. and No. 7 appeared from point 28, and the frequency reached 100%. A few soil bacteria could be isolated from this point and inner ones. Disappearance of desiccation and impermeability of soil started at this point with the recovery of soil fungal flora. At points 28, 29 and 30 *Mortierella* sp., No. 7 and some root inhabiting fungi appeared, and the fungal flora became more stable than that in the former zones with the slow progress of decomposition.

*Mortierella* sp. disappeared from point 31, *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp. increased at point 32, and the species composition at these point became close to those in the uninfected soil. A few soil fungi could be isolated from the points in the deeper horizon below 20 cm in B-C horizon, and they distributed mainly around roots and organic matters. Several species common in pine forest could be obtained at points 24, 25, 26 and 27 in H-A horizon. Although *Trichoderma* species disappeared from the H-A horizon covering the active mycelial zone, the effect of the active mycelium and mycorrhiza to the ground surface seemed to be negligible.

#### b. Results of isolation by dilution plate method.

1 g fresh soil samples were diluted 200 times with sterilized water, and soil fungi were isolated on W medium with rose bengal. The result of isolation is represented in Table 3. The numbers in the table mean the colony numbers for one plate.

*Mortierella* sp. was isolated at points 1 and 2 in the uninfected soil following a number of bacteria and actinomycetes. *Trichoderma* species and *Mortierella* sp. were isolated at point 10, and *Penicillium*, *Aspergillus* and some root inhabiting fungi appeared from point 11. Species

number increased depending on the depth of soil, but the colony number decreased gradually. At points 19 and 20 with a small number of soil fungi, soil bacteria and actinomycetes were isolated abundantly. Although *Mortierella* sp. was one of the most dominant species in pine forest soil, it seemed that this fungus was growing and surviving not in mycelial state but in spore stage in the uninfected soil outside the Shiro.

At point 3 on the boundary between the active mycelial zone and the uninfected soil, *Mortierella* sp. only was isolated, but some bacteria appeared from point 12. The same trends as at points 11 and 12 were observed also at points 21 and 22. By this method, soil organisms seemed to be excluded from zone I with the active mycelium and mycorrhiza.

Only *Mortierella* sp. was isolated at points 4, 5, 13 and 14 in zones holding the high activities of mycelium and mycorrhiza or still retaining them as well as in zone IV. This fungus decreased depending on the depth in soil also inside the Shiro. This result was different from that obtained by soil smear method as above described. Soil fungi could not be isolated at point 7, and *Mortierella* sp. was isolated at points 8 and 9. *Mortierella* sp. was dominant from point 3 through point 9 and from point 13 through point 18 by this method.

At the inner points than point 28, soil bacteria and actinomycetes appeared, and either species number of soil fungi or the colony number increased being closed to those in the uninfected soil. At point 28, there was recognized obviously the recovery of soil conditions to normal state.

Numerous bacteria and actinomycetes were isolated at the points in H-A horizon, and rapid growing soil fungi were dominant at these points. It was uncertain that the effect of the active mycelium and mycorrhiza against soil microorganisms in organic matter layer was recognizable or not.

From these results obtained by the two different methods the fungal flora in Shiro soil could be characterized as follows. Common soil fungi were excluded or diminished from the active mycelial and mycorrhizal zones almost completely, and the absence of these fungi continued also in the inner part of Shiro for several years after passing of the mycorrhiza and mycelium. However, the exclusion of soil fungi was not so clear as that of soil bacteria and actinomycetes<sup>7)</sup>, and it was probable that some fungi, *Trichoderma* sp., could survive even in the active zones when it was inhabiting in the substrate. *Mortierella* sp. did not always accompany *T. matsutake* in any case, although this species was dominant not only in Shiro soil but also in pine forest soil. It seemed that *Mortierella* sp. persisting through the active mycelial zones played an important role to decompose the mycelium of *T. matsutake* and the mycorrhiza after their withering. Also among root inhabiting or root decaying fungi, the specific species for the mycorrhiza could not be discerned, because most of them were also dominant on the normal growing roots of pine. It was supposed that the decomposition of organic matter in Shiro might progress by these root inhabiting fungi and *Mortierella* sp. mostly.

c. Results by direct isolation method.

The mycelia or soil crusts were picked up under microscope and inoculated on the media. Some results by this method are represented in Table 4.

I: The white mycelia in zone I were inoculated on W<sub>ys</sub> and M media. Three species including *Mortierella* sp. were isolated from the white mycelia, but the frequency of them was only 16%. Most of the white mycelium, 84%, were sterile. The white mycelia in zone I seemed to be those of *T. matsutake*, because they were pure white like silk or transparent and

bore the septae and thick cell wall without clamp connection. On the other hand, the hyphae of *Mortierella* sp. in soil was also white, rich in vacuoles and lack of septae. Its hyphae was relatively thin and sensible for dyeing with sudan III. It was found impossible to isolate the hyphae of *T. matsutake* from Shiro soil or root surface in spite of various trials. It could be suspected that *Mortierella* sp., was an attendant or symbiont of this fungus, but probably there was no physiological and symbiotic relationships between them because it could hardly be isolated from the active mycelium by this method.

II: Soil crusts without the white mycelium in zone I were inoculated on W<sub>Y</sub> medium. *Mortierella* sp., *Trichoderma* sp., *Oidiodendron* sp. and R-III were isolated from the samples. The exclusion of soil fungi was still incomplete there. In this zone the hyphae or hyphal bundles of *T. matsutake* penetrated into the interspaces of soil crusts and had not occupied yet all over the uninfected soil. The incomplete effect of the mycelial zone to exclude soil fungi could be ascertained also by this method. Probably the sensitivity of soil fungi against the antibiotic activities varies with the species of fungi.

When soil crusts in zone I were kept in humid chamber at 25°C for several days, numerous fine hyphae of *Mortierella* sp. grew up densely over the samples, and *Trichoderma* sp. appeared after two weeks. When the samples were submerged in 10% glucose solution at 25°C for several days, *Trichoderma* sp. and soil bacteria occupied over the surface of samples. Only *Mortierella* sp. was obtained from the soil crusts collected from zones II and III under the same conditions of incubation as above mentioned.

From these results it was supposed that the mycelial growth of *T. matsutake* in zone I might be protected with the unfavourable conditions for other soil inhabitants, anaerobic condition, poor substrates and so on.

III: The white mycelia were picked up from the upper layer of zone II with abundant active mycorrhiza and inoculated on W<sub>Y</sub> and M media. Four species of soil fungi were isolated, and the frequency was 75%. Several kinds of other mycelia could be observed in the samples under microscope. In winter when the activity of the mycorrhiza was apt to be reduced, zone II seemed to be attacked by some soil fungi among which *Mortierella* sp. was most dominant.

IV: The white mycelia in the under layer of zone II were inoculated on W<sub>Y</sub> and M media. Two species could be obtained, but the frequency of *Mortierella* sp. reached about 80%. Apparently the mycelium of *T. matsutake* had lost its activity in winter. It was usual that *Mortierella* sp. could be isolated most frequently from these zones in winter by direct isolation. Probably the growth of *Mortierella* sp. might be stimulated with the withering or death of the hyphae of *T. matsutake*.

V: *Mortierella* sp. was only isolated from soil crusts collected in zone III where the activity of *T. matsutake* seemed to be lowered, and its frequency reached 92%. After the incubation in humid chamber for one week, the fine hyphae of *Mortierella* sp. flourished over the soil crusts. The interspaces of soil crusts in this zone had been filled up with the white mycelia, and probably the soil in this zone had been occupied mostly with the hyphae of *T. matsutake* and *Mortierella* sp.

VI: The white mycelia peeled off from the surface of active mycorrhiza were inoculated on W<sub>Y</sub> and W<sub>S</sub> media. *Mortierella* sp. could be obtained most frequently among three species isolated, and the frequency was 93%. When these mycelia were washed by sterilized water several times, the frequency of this fungus was reduced obviously. In spring when the my-

corrhiza started to grow again, its frequency became much lower than in winter.

VII: The fragments of white powdery mycelia near the center of Shiro were inoculated on Ws and Wys media. The frequency of *Mortierella* sp., *Trichoderma* sp. and *Pachybasium* sp. was 95%. There were no mycelium of *T. matsutake* in the samples, and the white hyphae collected from here consisted of several kinds of fine hyphae.

In other seasons, only a few soil fungi could be obtained from the active white mycelia and active mycorrhiza. *Mortierella* sp. followed the white mycelium and mycorrhiza which became feeble or withered through one year.

## 2. Fungal flora on the mycorrhiza, pine root and plant debris in Shiro soil

### Materials and methods

#### A. Isolation of fungi from rhizoplane of mycorrhiza.

##### a. Sampling.

Samples for the isolation of fungi on the mycorrhiza and organic matter were collected from the profile of Shiro by the sterilized tubes or cans. In most cases the samples were kept in a refrigerator for a few days before isolation and stocked in sealed cans. The mycorrhiza and other organic matter were taken out from the samples and divided into several parts, mycorrhiza, root and plant debris.

##### b. Treatment of materials.

After materials were cut into 2~3 mm small pieces, they were washed with tap water or water with detergent and then by sterilized water several times before inoculation. This washing method was determined after several trials of washing by detergents and ultrasonic. The frequency of *Mortierella* sp. and *Trichoderma* species which were dominant usually on the root of pine and plant debris was reduced according to the times of washing, and these soil inhabiting fungi were removed from root surface after washing of more than ten times. When the materials were cut less than 2 mm length, the frequency of fungi reduced. These materials were inoculated 15 pieces for every plate with media.

##### c. Media used

W medium including rose bengal was used frequently for the isolation. The others mentioned above were also applied if necessary. The media used were recorded in tables.

##### d. Conditions of incubation.

Usually the plates were kept at 22~25°C for 10~13 days and then put at room temperature for one week before colony count.

#### B. Direct observation.

The mycorrhiza or organic matters were observed under microscope in the usual way before isolation, but it was difficult to represent the results of observation quantitatively.

### Results and discussion

#### A. Fungal flora on the mycorrhiza, other plant roots and plant debris in Shiro soil.

The materials for isolation were sampled at points on the profile on March 18, 1966 as shown in Fig. 2. In this experiment they were not collected depending on the growth stages of mycorrhiza but on the zones of Shiro. The features of Shiro were almost the same as that in winter, and the young mycorrhizae were growing after dormancy. The results of isolation

were represented in Table 5. Organic matter other than the mycorrhizae was shown as  $R_0$ , and the mycorrhizae as R in the table.

Seven or eight species including *Mortierella* sp., *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp. were isolated from the organic matter and roots at points 1, 2 and 3 in the uninfected soil, and the frequency reached 100%. The frequency of *Trichoderma* and *Penicillium* species was reduced on the sample at point 3. This result was probably caused from the activation of the mycorrhiza.

Six species were isolated from the organic matter at point 4. *Trichoderma* species could persist even inside the Shiro if they inhabited in plant debris, and the frequency of it was 66% at point 4 in zone IV. In fact there was a big crust of decayed root of *Quercus serrata* in zone IV. On the other hand, *Mortierella* sp., *Trichoderma* sp. and three species of root inhabiting fungi were isolated from the mycorrhiza at point 4. So, it was supposed that *Trichoderma* sp. was enlarging its territory around the rotted root of *Quercus*.

Eight species were isolated from the organic matter at point 5 beneath the fruit body occurring position, but the frequency of *Trichoderma* species was lower and that of R-I which increased to 44%. Root inhabiting fungi became dominant at this point. *Mortierella* sp. and three species of root inhabiting fungi could be isolated from the mycorrhiza at point 5. *Trichoderma* sp. survived in organic matter also at this point, and *Mortierella* sp. was dominant on the withering mycorrhizae either at point 4 or at point 5.

Three species merely of root inhabiting fungi could be obtained from the organic matters at point 6. *Mortierella* sp. and some root inhabiting fungi were isolated from the mycorrhiza at this point. The increase in the frequency of root inhabiting fungi and decrease of *Mortierella* sp. on the mycorrhiza coincided well with the beginning of withering of mycorrhiza. At this point root inhabiting fungi became dominant either on the organic matter or the mycorrhiza, but its cause came partly from the fact that the fragments of decayed mycorrhiza were abundantly contained in the organic matter fraction.

Species composition and species number at point 7, 8 and 9 were almost the same as each other, the frequency of fungi isolated from organic matters reduced, and that of root inhabiting fungi increased on both materials. Thus the fungal species compositions and their frequencies were quite different from those outside the Shiro.

The frequencies of *Mortierella* sp. and *Trichoderma* sp. on organic matter increased again at points 11 and 12, but those of root inhabiting fungi decreased there.

*Mortierella* sp. could be isolated from the mycorrhiza at all points, but the frequency inside the Shiro was lower than those outside. The mycorrhiza was almost free from *Trichoderma* species, but they appeared abundantly even in the active mycelial zones and disappeared from the inside of Shiro. Instead of *Trichoderma* species, *Pachybasium* sp. appeared at points near by the center of Shiro. Root inhabiting fungi could be obtained from outside the Shiro, but they flourished mainly inside the Shiro according to the progress of decomposition of the mycorrhiza. It seems that these root inhabiting fungi occupy the inside of the Shiro following the diminution of soil fungi as mentioned previously.

Outside the Shiro, species composition and the frequencies of fungi on the pine roots were different from those on the plant debris, and probably substrate specificity had been kept more strictly. However, the fungal floras on both materials inside the Shiro were close to each other, because the differences among substrates were reducing with the progress of decomposition.



Such abrupt changes of fungal flora as recognized on soil fungi in the Shiro did not take place on the fungal flora of organic matter which was advancing more slowly. It is supposed that the alternation of fungal components in Shiro soil might be resulted not only from the production of antibiotics by the mycorrhiza and the excluding effect of them, but also from the occupancy of habitat by dominant species or the existence of some substrates favourable for a certain species.

#### B. Fungal succession on the mycorrhiza.

The materials were sampled in May when the mycorrhiza formation advanced most actively. After the mycorrhiza was classified into 6 stages from the initiation of formation to decay (OGAWA, 1975), the fungi inhabiting on the mycorrhizae were isolated on the medium. The result is shown in Table 6.

Three species were isolated from the fine roots of pine outside the Shiro, but their number and frequency were low because they suppressed the other fungi on the plates. It was general that there were no fungi over the white young roots growing actively. Some root inhabiting fungi appeared from the older root surface with brown scales. No fungi could be obtained from the young roots with white tips belonging to the mycorrhiza developing stage 1.

Three species, R-I, R-II and R-III were isolated from the young black mycorrhiza in the mycorrhiza developing stage 2, and the frequency was only 15%. The remains, 85%, were sterile even though they were covered with the white mycelium densely. R-II and R-III appeared from the mycorrhiza in the early stage of the mycorrhiza developing stage 3, and the frequency of fungi isolated was 13.2%. Four species were isolated from the mycorrhiza in the later stage of the mycorrhiza developing stage 3, and the frequency increased to 28.6%.

*Trichoderma* sp., *Mortierella* sp., *Pachybasium* sp. and two other species were isolated from the mycorrhiza in the mycorrhiza decomposing stage 1, and the frequency of fungi isolated increased furthermore to 46.2%. Six species appeared from the pine roots in the early stage of the mycorrhiza decomposing stage 2, and the frequencies of root inhabiting fungi increased. Three species were isolated from the pine roots in the mycorrhiza decomposing stage 2, and *Mortierella* sp. and root inhabiting or decomposing fungi were isolated from the pine roots and their residues in the mycorrhiza decomposing stage 3.

From these results it was supposed that the fungi isolated from the mycorrhiza were as follows. *Mortierella* sp. exhibited no direct relations for the formation of the mycorrhiza and its growth. R-I which was always present on pine root was one of the decomposers of pine root residues, and R-II and R-III seemed also to be the decomposers of pine root residues. R-IV which was isolated from the mycorrhiza and increased with the progress of decomposition seemed to be the decomposer specific for the mycorrhiza. No. 7 and *Pachybasium* sp. which were isolated also from soil were the decomposers of organic matters except for pine roots. R-I, R-II, R-III and R-IV followed always the mycorrhiza formed on the other host plant (unpublished). It seems that these root inhabiting fungi of pine root at least are able to endure against the attack of antifungal substances produced by the mycorrhiza.

The correlation among root inhabiting fungi on the mycorrhiza and their succession are represented in Fig. 3. The samples for this work were collected from the research area which is a different site in the suburb of Kyoto city and older stand.

*Trichoderma* species and *Mortierella* sp. had been removed from the young mycorrhiza, and fresh roots with white tips in the mycorrhiza developing stage 1 and appeared again from pine roots in the mycorrhiza decomposing stage 2. R-I, R-II and R-III which were abundant

outside the Shiro decreased obviously in the mycorrhiza developing stage 1 and 2. In the mycorrhiza developing stage 3 R-I, R-III and *Pachybasium* sp. began to appear and increased in the following stage. R-I reached the maximum of frequency at the developing stage 3 and exhibited the same trend with that of R-II. R-III increased at the early stage of the developing stage 3 and preceded the others. *Pachybasium* sp. began to appear from the developing stage 3 and reached the maximum at the decomposing stage 1. *Trichoderma* sp. increased at the decomposing stage 2 and more advanced stages. On the other hand, the fragments of mycorrhiza which were free from fungi and seemed to be occupied by *T. matsutake*, increased abruptly at the mycorrhiza developing stages 1 and 2, and decreased gradually following the decaying of the mycorrhiza.

From these results it was certain that there was a regular succession among root inhabiting fungi including the mycorrhizal fungus on the mycorrhiza, and that these inhabitants were alternating on the growing mycorrhiza one after another. Moreover, this fungus could be defined as a precursor among root inhabiting fungi, and such a principle might be applied to any kind of mycorrhizal fungi.

The mycorrhiza formed with this fungus exhibited the sequential process from its genesis to decay, not only morphologically but also ecologically. Therefore, the mycorrhiza could be defined as a phenomenon which resulted from the ecological and physiological balance between the growing root and the succeeding microbial community on the root from an ecological view point.

### 3. Seasonal variation on fungal flora in Shiro.

There is always the problem of method for the investigation whenever we try to study seasonal variation in microbial flora continuously. Actually, it is very difficult to get the continuous figures on the profiles of Shiro and to compare the data in each season. Because, in the field the microbial floras are variable depending on the minute differences in environmental conditions easily and rapidly. So, further discussion of seasonal variation should be avoided, as it is in this work, hence, only the features on microbial floras in each season are described here. The methods used here was the same as mentioned above.

#### Results and discussion

##### A. Winter. Feb. 11, 1966.

Sampling points on the profile were shown in Fig. 4. Results of isolation of fungi from the mycorrhiza and organic matters were represented in Table 7, and that on soil fungi in the Shiro by soil smear method in Table 8.

##### a. Fungal flora on the mycorrhiza and other organic matter.

Some soil fungi and bacteria were isolated at points 1 and 2 outside the Shiro, and *Trichoderma* species were less than those at the same point in autumn. The frequency of *Mortierella* sp. on the pine root reached 87% at point 3 in zone I following *Trichoderma* species and soil bacteria. *Mortierella* sp., R-I, R-II and No. 7 were isolated from the mycorrhiza withering at point 4 in zone IV, and *Trichoderma* sp. and three other species from the organic matters at the same point. It was certain that the decomposition of the mycorrhiza had been advancing since late autumn through winter, because this point was equal to the point at which the species number and the frequency of *Mortierella* sp. were less in autumn. On the other hand, species composition and the frequency of fungi on the organic matter were almost

the same as those in March.

Organic matter except for pine roots were absent at point 5, *Trichoderma* sp., *Mortierella* sp. and three species of root inhabiting fungi appeared from the decaying mycorrhiza at this point. The root inhabiting fungi on the mycorrhiza decreased at points 8 and 9 in the under layer of zone IV, and *Pachybasium* sp. and three root inhabiting fungi appeared from the organic matter.

Five species including *Trichoderma* sp. were isolated from pine roots at point 6, and five species at point 7. *Mortierella* sp. and three root inhabiting fungi appeared from the organic matter at points 6 and 7. *Mortierella* sp. was dominant in mycelial state at all of points in winter when the active mycelial zones became smallest or narrowest through a year.

b. Fungal flora in Shiro soil.

Common soil fungi were dominant from point 1 to point 8 outside the Shiro, and sometimes the plates were occupied by the colonies of *Trichoderma* species. The regularity on the vertical distribution of soil microbes was clear in autumn, but it had been disturbed in winter. The soils at points 9, 10 and 12 around the mycelial zone seemed to be almost free from the effect of the mycorrhiza. But *Trichoderma* sp. reduced slightly at point 11 in zone I, and instead of it some root inhabiting fungi increased. Species compositions at points 13 and 17 were similar to each other.

*Mortierella* sp. was dominant at points 14, 15 and 16 where the active mycorrhiza had survived, and species number at these point reduced remarkably. The dominance of *Mortierella* sp. at these points and the contamination of *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. seemed to result from the lowering of antibiotics production by the mycorrhiza through the winter term.

On the other hand, *Mortierella* sp. disappeared from point 18 through 21 in zone IV where the decomposition of the mycelium had almost completed, and the dominant species had altered to root inhabiting fungi. At points 22, 23 and 35 in zone I' in which the mycelium began to disappear, *Trichoderma* sp. and *Penicillium* sp. were isolated. It was probable that the recovery of soil microbial flora was initiated from the bottom of Shiro. The decomposition of pine root or the residue of mycorrhiza ceased transiently in zone IV, because a few soil fungi could be obtained at points 25, 26, 27 and 28 in this zone.

The number of species and their frequencies increased approaching to the center of the Shiro, and *Mortierella* sp. appeared abundantly there. Generally speaking, both species number and the frequency of soil fungi reduced to the minimum level in winter, and they reached the maximum in early summer or autumn.

B. Spring. Apr. 12, May 20, 1966.

Fungal flora on the mycorrhiza and organic matter in March and May were mentioned above. Fungal flora in March exhibited similar trends to that in February, because there were no initiation of growth of the mycelium and the mycorrhiza in March. Generally, in the western district of Honshu, the mycorrhiza started to grow again in the beginning of April because of rising of temperature. The result of isolation of soil fungi from Shiro soil in April was abbreviated.

a. Fungal flora on the mycorrhiza and organic matters.

The result is represented in Table 9, and sampling points in Fig. 5.

*Trichoderma* species was dominant on organic matter at points 1 and 2 outside the Shiro and occupied the plates. R-I appeared slightly from the young fresh mycorrhiza at point 3 in zone II, and *Trichoderma* sp. and four species of root inhabiting fungi were isolated at the

same point.

Three root inhabiting fungi were isolated from the mycorrhiza at point 4, but their frequencies decreased. *Mortierella* sp. which was isolated with high frequency at this point in winter had been removed from the mycorrhiza at this point, and three root inhabiting fungi were isolated from the organic matters at the same point.

From the decaying mycorrhiza at points 5 and 6 R-I only was isolated, and soil fungi disappeared from the organic matter. It seemed that the organic matter was being decomposed slowly at these points. Such a gap in fungal flora was recognized also in winter at the points where the withering mycorrhiza was abundant, and this gap moved forward in spring.

At points 7, 8, 9 and 10 rich in the residues of decayed mycorrhiza, the species number and frequency of fungi increased. Root inhabiting fungi following some soil fungi became dominant at these points in zone V. In spring the decomposition of organic matter inside the Shiro seems to advance more actively than in winter.

b. Fungal flora in Shiro soil.

Sampling points on the profile in May shown in Fig. 6, result by soil smear method in Table 10, and that by dilution plate method in Table 11. The fungal flora on the mycorrhiza was described in the former section. This result was obtained in May.

1) Results by soil smear method.

*Trichoderma* species and R-III were common to the points 14, 16, 17 and 18 outside the Shiro, but *Mortierella* sp. which was isolated by dilution plate method did not appear from these points. Root inhabiting fungi increased at these points where *Trichoderma* species and *Mortierella* sp. were dominant in February. The species compositions at points 11 and 12 were similar to those at points 14, 16, 17 and 18.

Four species of root inhabiting fungi were isolated at point 10 in zone II where the amount of the mycorrhiza was increasing in May. *Trichoderma* sp., *Mortierella* sp. and other soil fungi were removed from zone II. It seemed that soil fungi could be excluded from the active mycelial zones in spring most strongly. However, the effect of the active mycorrhiza was weak at point 11 beneath the zone II.

Fungi could not be isolated at point 7 in zone III, and five species were obtained from point 8 in zone I'. Root inhabiting fungi were isolated at point 3 beneath the fruit body occurring position, and *Mortierella* sp. and some root inhabiting fungi appeared from point 4. R-II increased inside the Shiro, and *Trichoderma* sp. invaded at point 5.

*Mortierella* sp. seemed to disperse by spores in zone IV and V, because it could be isolated abundantly by dilution plate method from these zones.

2) Results by dilution plate method.

Soil bacteria could be isolated from the samples collected from the points near by the center of Shiro in this season, but they were perfectly removed from moist parts of Shiro. Soil fungi were also removed from the active zones. But *Mortierella* sp. was isolated with high frequency at most of the points and seemed as if it was the dominant species among soil fungi around Shiro. Probably, the sporulation of this fungus was activated in spring or by rainfall.

C<sub>1</sub>. Summer. June 27, 1966.

The amount of mycelium and mycorrhiza increased from May through July in Shiro, and the number of microbes in soil also reached highest level in June because of mild weather and heavy rainfall. The result by dilution method is shown in Table 12, and the sampling

points in Fig. 7. The fungal flora on the mycorrhiza and organic matter were similar to the instance in July mentioned in the following section.

The species number outside the Shiro increased remarkably, and *Mortierella* sp. and *Penicillium* species flourished more than in other seasons. But *Trichoderma* species was reduced by this method to a lower level than in winter.

Four species were isolated at point 16 in zone II, and two species of soil fungi contaminated with *Mortierella* sp. and R-II which were always present inside the Shiro. Also at point 15 in the upper layer of zone III *Penicillium* sp. contaminated. *Trichoderma* sp. could be isolated by soil smear method at this point. Two contaminants were also isolated at points 9, 11 and 12 in zone V beneath the fruit body occurring position. Also at the bottom of Shiro, *Penicillium* species and some soil fungi increased. Thus it was only in the rainy season that the contamination of soil fungi could be observed inside the Shiro.

Points 5 and 8 were free from soil fungi, and there were a few fungi at points 4, 6 and 7 in zone VI. In these zones it looked as if the decomposition of mycorrhiza and pine root fragment was stopped transiently. Such an inactive zone recognized by dilution plate method existed through the year, and it advanced forwards gradually. However, some root inhabiting fungi could be isolated abundantly from the soil and organic matter at these points. Therefore, it seemed that the actual active fungi decomposing organic matter was growing in mycelial state and occupying the spaces in this zone. The species compositions at points 1, 2 and 3 were similar to those outside the Shiro. *Trichoderma* sp. and some soil fungi were isolated from these points.

#### C<sub>2</sub>. Summer. July 15, 1966.

The amount of fine mycorrhiza increased after the stopping of growth on leaders in mid-summer, and the interspaces of soil in the active mycelial zones were filled with the mycelium. Soil desiccated because of lack of rainfall, and the temperature in soil rose to 25~27°C at 5 cm depth through summer in the pine forest. After the rainy season the higher activity of soil microbes seemed to have been kept until the end of July. This work performed in research area a.

##### a. Fungal flora on the mycorrhiza and pine root.

Results were represented in Table 13, and the sampling points in Fig. 8.

Six species were isolated from pine roots at points 3 and 5 outside the Shiro, and *Trichoderma* species and *Mortierella* sp. were dominant on the roots at these points. Only one species could be isolated from the active mycorrhiza at points 7 and 10 in zone III and III', and the sterile fragment of roots reached 80 to 90%. *Pachybasium* sp. appeared from the decaying mycorrhiza at points 14, 17 and 20, and root inhabiting fungi increased in the inner parts of Shiro. *Trichoderma* species and *Pachybasium* sp. were isolated at point 24 where the mycorrhiza had been decomposed almost completely.

*Mortierella* sp. was removed from the active mycorrhiza and pine roots inside the Shiro in summer as well as in May. It was probable that the fine mycorrhiza could be occupied by *T. matsutake* perfectly in this season.

##### b. Fungal flora in Shiro soil.

###### 1) Result by soil smear method.

Soil fungi including *Trichoderma* species and *Penicillium* sp. were isolated outside the Shiro, but their frequencies were much lower than in research area b. Comparing with the result obtained in research area a in December, the frequencies of *Trichoderma* species, *Mortierella*

sp. and *Mucor* sp. were only 10 to 30% of those in December. It seemed that such an abrupt change on the frequency might be caused with the desiccation of surface soil in summer. A few *Mortierella* sp. appeared at point 7 in zone III, and *Mortierella* sp. and another species were isolated at point 8 on the boundary of Shiro. Only *Mortierella* sp. with high frequency appeared at points 10 and 13. On the other hand, this species was abundant at points 7 and 10 and rare at point 13 by dilution method. Therefore, it was supposed that this fungus was growing and working actively at the mycelial stage inside the Shiro through summer.

Root inhabiting fungi were only isolated at points 14 and 15, but *Trichoderma* sp. appeared from points 17 and 18 in which the soil conditions began to recover. Soil fungi increased near the center of Shiro.

2) Result by dilution plate method.

*Mortierella* sp. was isolated abundantly from all points in the Shiro, especially in the upper horizon. Soil bacteria and actinomycetes were rich in soil outside the Shiro. Some soil fungi contaminated at points 7, 8 and 11 in the active zones. Only *Mortierella* sp. could be isolated at points 10 and 13 in zone III and V, but other soil fungi appeared at points 14 and 15 in zone V. *Pachybasium* sp. was isolated at points 17 and 18, and *Mortierella* sp. and some soil fungi were isolated at the inner points of Shiro. The species compositions at points 21, 23 and 25 where the soil conditions had recovered were similar to those outside the Shiro.

From this result it was supposed that the sporulation of soil fungi, especially that of *Mortierella* sp., was promoted after their activities at mycelial state were reduced because of the decrease of precipitation in summer.

C<sub>3</sub>. Summer. The fructification time in rainy season. June 24, 1966.

This fungus sometimes could produce the sporocarps twice a year in pine forest. This work was performed in research area b where a sporocarp was found in June. Sampling points on the profile and result by soil plate method were shown in Fig. 9 and Table 16.

The species number was eight including *Mortierella* sp. and R-I outside the Shiro. Other soil fungi except for a few *Mortierella* sp. were removed perfectly from zone II. Only *Mortierella* sp. was isolated from the point beneath the fruit body occurring position. In zone V, *Trichoderma* sp. and some other soil fungi were isolated. Such a tendency on fungal flora in Shiro soil as in this season was similar to those in autumn when the sporocarps were produced normally.

D. Autumn. The fructification time. October 16, 1966.

There were no apparent changes on the profile of Shiro from summer to autumn. Probably the forward growth of mycelium ceased through midsummer. The fructification was stimulated with the lowering of soil temperature below 19°C in autumn. Materials for this work were sampled in pine forest at Kumenan-cho, Okayama Pref. Sampling points on the profile and the result of isolation of soil fungi were represented in Fig. 10, Tables 17, 18 and 19.

a. Fungal flora on the mycorrhiza and pine roots.

Six species including *Trichoderma* species and *Mortierella* sp. were isolated from pine roots outside the Shiro. A few *Mortierella* sp. was isolated from the active mycorrhiza in zone II. *Mortierella* sp. and three root inhabiting fungi appeared from the mycorrhiza in zone III', but some soil fungi contaminated at point 4 beneath the fruit body occurring position. The decomposition of the decaying mycorrhiza and pine root fragments seemed to progress by some soil fungi, *Trichoderma* sp. and *Pachybasium* sp. which were isolated from the root fragments

at point 5 in zone V.

b. Fungal flora in Shiro soil.

1) Result by soil smear method.

The species composition was similar to that in summer, but with the frequency of fungi reduced. *Trichoderma* species, *Mortierella* sp. and *Penicillium* species were isolated at points 1 and 6 outside the Shiro. *Mortierella* sp. decreased following the depth of soil regularly. The contamination of some soil fungi happened at point 2 on the boundary from zone II to III. The fungal flora on the active mycorrhiza was disturbed with the fructification at the time.

*Mortierella* sp. increased at points 3 and 4 in zone III' where also *Penicillium* sp. contaminated. Soil fungi were isolated at point 7 in the under layer of zone III, but root inhabiting fungi at points 8 and 9 at the same depth as point 7.

*Mortierella* sp. and root inhabiting fungi were isolated at points 5 and 10 in zone V, and the colony numbers increased. The contamination of soil fungi to the inner part of Shiro seemed to result from the facts that the soil in this site was rich in organic matters and was disturbed by mushroom hunting. Moreover, such a contamination might be caused from the abrupt withering of the mycelium after fructification.

2) Result by dilution plate method.

*Mortierella* sp. was isolated most abundantly from all points. Also by this method there was recognized the contamination of soil fungi at point 2 in zone II. The number of *Mortierella* sp. increased in zone III following a few soil fungi.

Strictly speaking, it was impossible to trace the continuous seasonal variation on the fungal flora precisely. Microbial flora itself is complicate depending on the variety of environmental conditions in soil, and the activities and life forms of each component in fungal flora vary also according to the climatic conditions around them. On the Shiro of *T. matsutake*, it is supposed that the ecological balance among the components in microbial ecosystem has been maintained with the differences of their active or dormant term and of the condition to affect their activities.

Seasonal features observed on the soil fungal flora in Shiro were as follows. From late autumn through early spring when the activities of the mycorrhiza and mycelium reduced, the Shiro was comparatively stable microbiologically although the active mycelial and mycorrhizal mass became smallest through the year. Soil fungi began to be removed from Shiro according to the formation of fresh mycorrhiza in early spring, and the species composition was simplified inside the Shiro.

From late spring and rainy season through late summer, the activities of the mycorrhiza and mycelium rose to the maximum following the increase of their amount, and the Shiro was protected by their activities against the invasion of soil fungi. In this season the activities of general microbes rose. The stability of microbial flora in Shiro could be maintained until autumn with desiccation of soil in midsummer.

In autumn the fructification of the fungus started depending on the cooling of soil temperature and rainfall. The fungal flora in Shiro was disturbed with the fructification transiently, because the mycorrhiza and mycelium began to wither and decay soon after the fructification, and were attacked by soil fungi from surface of Shiro. After the contaminants adapted to the condition in Shiro, the fungal flora became stable again.

The zones where the mycorrhiza and mycelium were decaying were protected against the invaders with the impermeability and desiccation of soil physically. The recovery to

normal flora advanced from the innermost part of Shiro or the bottom through the year gradually.

On the fungal flora on the mycorrhiza or organic matters, some soil fungi which had survived in the Shiro revived and began to enlarge their territories even in the active mycelial zones in the season when the activities of mycorrhiza reduced. Also on the mycorrhiza, some root inhabiting fungi flourished when it became feeble.

### Conclusion

Microbial ecosystem in the Shiro of *T. matsutake* exhibits so clear characteristics that it can be defined as an organized microbial community. There the mycorrhiza is formed as the result of synchronized growth between the mycelium and the pine root<sup>6)</sup> and possesses the ability to exclude or inhibit other soil microbes selectively. The volatile antibiotics produced by the mycorrhiza is more effective against soil bacteria<sup>7)</sup>.

So, most of soil bacteria, fungi and actinomycetes are once removed from the active mycelial zones, and the microbial flora inside the Shiro is simplified and become stable for several years. This stability on the microbial flora is also supported with the formation of impermeable layer and desiccation of soil inside the Shiro resulting from the decay of mycorrhiza and mycelium. The flourishing of *Mortierella* sp. and root inhabiting fungi inside the Shiro also inhibit the invasion of soil microbes from the surroundings ecologically. Thus the alternation of soil microbes is remarkable according to the enlargement of the Shiro.

It is certain that *T. matsutake* is a precursor on the successional fungal flora of growing mycorrhiza. On the margin of Shiro, the growing pine roots through the mycelial mat can be always caught by this fungus at first. If there is some fungi which can form the mycorrhiza with pine root speedily outside the Shiro, most of the pine roots are occupied by them before this fungus. But actually this fungus which possesses the ability to form the mycorrhiza even on the leaders can overcome the competition among mycorrhizal fungi on the margin of Shiro. When this fungus encounters some mycorrhizal fungi with similar life type, the growth of the Shiro sometimes is depressed (unpublished). So far as both partners are growing vividly, the Shiro continues to enlarge the territory, keeping the organized microbial flora inside it. Such a stable Shiro can hardly be disturbed with the existence of small colonies of antagonists, digging out the inside or cutting of a part of the active mycelial zone.

On the other hand, the ageing is recognized in the Shiro<sup>8)</sup>. The Shiro starts from the mycorrhiza formation between spores and fine young roots, multiplies the mycorrhizal mass in soil and reaches to larger and stable Shiro. Single spores of this fungus can hardly germinate in the field and was short lived. And the growing young roots of pine are also scarce on the ground surface in young pine stand. Therefore, it may be pretty difficult for the germinated spores to reach the young fine roots without any microbial infection and to form the mycorrhizae with them. Soil of ground surface at forest floor has been filled with numerous microbes, and it is usual for the young roots to be caught by them as soon as they begin to grow. Moreover, it is more difficult for the small mycorrhizal mass to multiply as far as reaching the matured Shiro with microbial stability. Thus the Shiro probably has risks of becoming extinct by numerous competitors or antagonists on the way to become a matured one.

The Shiro once it has reached its stability must be always attacked by some competitors. It is not unusual that the Shiro once formed disappears for a few years. The damaged parts



of Shiro attacked by fungal competitors enlarges rapidly, and the whole of the Shiro collapses after several years. In such an older Shiro, there were observed often the contamination of microbes into the active mycelial zone. It is general that the invaders can flourish vividly when the simplified microbial community has once collapsed, and also that the damage advances acceleratedly when one of the major components is broken in the highly organized community. Microbial ecosystem in the Shiro *T. matsutake* seems to be not only the most highly organized community consisting of the components with specific ecological roles for each species, but also the highly developed one in which the species composition is simplified extremely.

From the ecological studies on higher fungi (unpublished), the life types of higher fungi can be classified into three fundamental major groups depending on the degree of development on their mycelial structures and into lower orders. *T. matsutake* and its allied species belonging to a taxonomical group are classified as a simple fairy ring type without any developed mycelial structures. These fungi essentially must inhabit in the sites with a few antagonists and form the mycorrhizal mass concentratedly as the origin of supplement of their substrate. Moreover, they have to possess the ability to improve their habitats to the favourable ones, removing the competitors from their territories. The fungi with such ecological characters have also been known among saprophytic higher fungi. The group of *T. matsutake* exhibits very closed ecological characters with each other apart from the other groups except for *Catathelasma* species. Therefore, it can be suspected that this group may have remained or survived in the process of fungal evolution because of these ecological characters.

The frequency of Shiro in natural forest as spruce, tsuga, and so forth is relatively lower than that in pine forest which has been regenerated after human disturbance. The forest floor in pine forest had been disturbed usually for the collecting of fuel by people, and pine forest in lowland was an important resource of fuels, litter, wood and shrubs for local people. So, soil in pine forests having this fungus has been eroded and become infertile with poor microbial flora in it and dry. In general, these soils are rich in actinomycetes and fungi including higher fungi and poor in bacterial population. The distribution of soil microbes is extremely restricted to the surface soil with organic matter. In the case in which the ground surface has been covered with a little undecomposed litter, the roots of pine distribute in the upper horizon of mineral soil concentratedly, and mycorrhizal fungi become dominant in fungal community in the forest (unpublished).

As above described, it seems to be necessary that the microbial flora has been simple and poor for the frequent formation of Shiro and the normal enlargement of the territories of this fungus, and that the other mycorrhizal fungi have been removed from the forest. Probably such poor microbial flora may be one of the causes that the Shiro of this fungus is apt to be formed on a ridge or infertile sites.

The Shiros are formed generally in 10 to 15-year-old stands of pine forest, and the production of mushrooms starts at about 20 years old. The term of Shiro formation seems to be limited within about 10 years depending on the succession of microbial flora in the forest, and the amount of fine roots in surface soil layer. Thus *T. matsutake* immigrates from old stands to young stands of pine forests, enlarges its territory in soil and disappears in the old stands, and this fungus plays an ecological role as one of the components consisting of forest ecosystem and on the succession of fungal community in the forest.

This fungus had increased all over the pine forest in western Japan since the beginning of the 20th century, and is decreasing in recent decades. Macroscopically, this is an interest-

ing phenomenon from the ecological view point. Because it may be apprehended as one of the symptoms of the alternation in microbial flora of pine forest on a large scale. Especially in western districts of the islands, most pine forest have been abandoned as the result of abrupt changes in the lives of local people who have not needed the litter in forest as their fuel today. So, there has accumulated much litter on the ground, and shrubs are growing with high density. Nematodes are also attacking pine trees and killing them on a wide range. Some Hydonaceae groups with similar life type to that of *T. matsutake* are occupying the forest floor in many sites. Recently the favourable environment for this fungus have been diminishing all over the pine forest, and it has become more difficult to culture this fungus with high economic value in forests year after year.