

令和 2 年度 修士論文

森林土壌での樹木根分解に関与する 微生物群集構造の解析

Analysis of microbial community structure related to tree root decomposition in forest soil.

高知工科大学院

生命科学コース

1235034 石山菜々子

指導教員 堀澤栄教授

目次

1.概要

2.背景

3.実験方法

3-1.試料の設置

3-2.微生物 DNA の抽出

3-3.PCR による DNA 増幅

3-4. Miseq による塩基配列の決定

3-5.微生物種の同定

3-6.Coverage ベースの Rarefaction

3-7 多様度の分析

4.結果

4-1. 真菌属同定結果

4-2.バクテリア目同定結果

4-3. α 多様度の評価

4-4. NMDS によるサンプル間類似度の評価

4-5.環境要因との関連

5.考察

6.結論

7.謝辞

8.参考文献

1.概要

木の2〜3割程度の体積を占めるといわれる樹木根には、地球温暖化対策の一助になるとされる炭素貯蔵機能や、根の支持力による土壌流出防止機能、また地下生態系において住処・栄養供給などの森林の多面的機能を持ち、樹木根の枯死後も分解されるまではこれらの機能を持続する。「したがって、樹木根の分解過程を解明することはこれらの機能の持続性を評価する上で重要となる。地上での木材分解についてはシロアリなどの昆虫や木材腐朽菌による食害が大きな影響をもたらすが、地下において分解の環境要因やその期間を示す研究成果はほとんどない。本研究では、土壌の深さ方向での樹木根の分解過程の解明の一端として、森林土壌での樹木根分解における土壌深さ別の真菌・バクテリアの群集構造の探索を行った。

試料としてスギ *Cryptomeria japonica* を用い、直径幅 3cm、長さ 20cm の四割材を根の擬似的試料として使用し、全国7箇所（群馬県・茨城県・京都府・熊本県・鹿児島県・北海道札幌、北海道標茶）の地表（深さ 0cm）、地下（5-10cm、20-30cm）に半年、1年、2年埋設した後、引き上げられた。今回の試料において、熊本試料は大きな重量減少がみられたものの、大半の試料で腐朽はあまり進行していなかった。これらの試料をハンマーミルで粉碎し、ISOPLANTII（ニッポンジーン）または QIAGEN Genomic-tip 20/G（QIAGEN）を用いて木材内部微生物 DNA を抽出した。その後、MightyAmp DNA Polymerase（TaKaRa）を用い、ITS 領域で真菌検出、16S 領域でバクテリアを検出した。得られた PCR 産物を Miseq（illumina）でシーケンスし塩基配列を決定し、BLAST データベースと照合することによって生物種を同定した。

同定結果をもとに、サンプルのもつ微生物群衆構造について、Non-metric Multidimensional Scaling（nMDS）で解析した。群馬県試料では他試験地に比べて真菌・バクテリアともに種数および Shannon wiener index による多様度が低く、真菌では木材腐朽菌である *Trametes*、バクテリアでは *Bacilli* に偏った群集が見られたものの、重量減少との直接的な相関はなかった。いずれの試験地の試料の群集構造も、土壌や試験前の木材から検出された群集構造と異なっており、地下環境の木材において群集が形成され変遷していったと考えられた。微生物相に関連が深い要素としては、試験地の違い・積算気温が挙げられた。

2.緒言

樹木の2~3割程度の体積を占めるといわれる樹木根には、様々な役割がある。^(1~3) 成長過程において、大気中の二酸化炭素を吸収し固定する地球温暖化対策の一助になる炭素貯蔵機能や、地下に伸長した樹木根の支持力によって大雨や地震時などの災害時の土壌流出防止機能、地下生態系において住処や栄養供給などの機能がある。これらの森林の多面的機能は樹木の枯死後も地下の樹木根が分解されるまでは持続すると考えられ、樹木根の分解過程を解明することはこれらの機能の持続性を評価する上で重要となる。⁽⁴⁾ しかし、樹木根の分解についての実際の報告例は少ない状況である。

通常、地上での木材分解についてはシロアリなどの昆虫や木材腐朽菌による食害が大きな影響をもたらす、特に木材の分解には木材腐朽菌地下は土や水に閉ざされた嫌気環境であることが予想され、これらの分解者の活動が鈍くなることが予想される。一般に、木材の分解過程では木材の重量減少に伴い、含水率・炭素/窒素比率や窒素含有量が増えるとされている。⁽⁵⁾ この過程における真菌やバクテリアの関わりは非常に複雑であると考えられているが、おおよそ以下のように進むと考えられている。⁽⁶⁾ 樹木枯死直後は樹木内生菌など近場の微生物が表面や形成層で優占すると考えられるが、木材内部のリグニンと絡み合ったセルロースを分解することができず、易分解性栄養源の枯渇や、後にやってくる分解力・成長力の強い他の微生物によってやがて駆逐されると考えられる。リグニンを分解する能力の強い担子菌の菌糸や胞子が枯死材に接触し、増殖・分解が始まると枯死材の環境は大きく変化する。強度・密度が低下することにより、木材内部に植物根や昆虫など他の生物が入り込みやすくなり、それらの内生菌や付着菌が持ち込まれる。また、化学的変化の観点からいえば、リグニンや多糖などが低分子化されることによって他の微生物が栄養源として利用できるようになり成長促進がされることや、リグニンの分解にともなうpH低下により成長阻害が起こることも考えられる。材の含水率が高まると、担子菌よりも子嚢菌が増殖しやすくなり材表面では軟腐朽が起こると考えられる。(図1)

このように木材の分解は、微生物により木材環境が変わり、その時々々の栄養条件に応じたとある微生物が増殖する一方で、別の微生物が駆逐されるというように徐々に遷移していくと考えられている。どのタイミングでどのような分解力を持つ微生物がやってくるかという確率的なイベントによって進行するため、同環境でも様々な微生物群衆構造が展開されることが予測される。⁽⁷⁾

本研究では、実際の森林土壌における地下木材内部の微生物群衆構造について、時間がたつにつれてどのように変化するか、また深さなどの環境条件の違いはどのような微生物群集に違いをもたらすのか、そして木材腐朽にはどんな微生物が関わっているのかについて知見を深めることを目的とした。日本各地の森林土壌に埋設されたスギ材を用い、内部微生物DNAを次世代シーケンサーで大量解析し、真菌・バクテリアの群集構造の探索を行った。

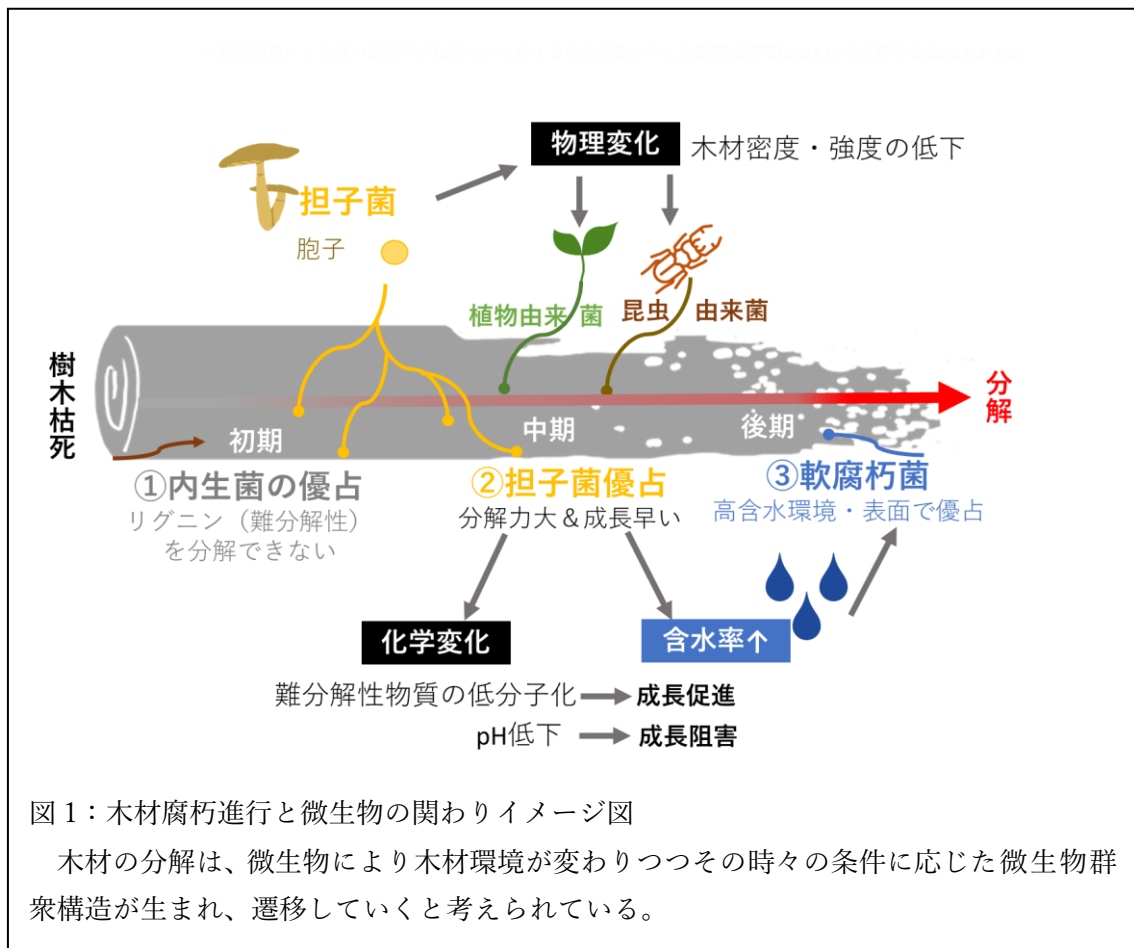


図1：木材腐朽進行と微生物の関わりイメージ図

木材の分解は、微生物により木材環境が変わりつつその時々条件に応じた微生物群衆構造が生まれ、遷移していくと考えられている。

3.実験方法

3-1.試料の設置

試料としてスギ *Cryptomeria japonica* を用い、直径幅 3cm、長さ 20cm の四割材を根の擬似的試料として使用した。設置前の木片は重量測定のために 80°C で 2 週間ほど乾燥させた。これらを日本 7 箇所（群馬県・茨城県・京都府・熊本県・鹿児島県・北海道札幌、北海道標茶）の森林土壌の地表（深さ 0cm）、地下（5-10cm、20-30cm）に半年、1 年、2 年埋設し、回収された。熊本試験地で 70% ほどの重量減少があった試料もあったものの、回収された試料の多くでは重量減少があまりおこっておらず、腐朽の初期段階であった。（写真 1、図 2、3）

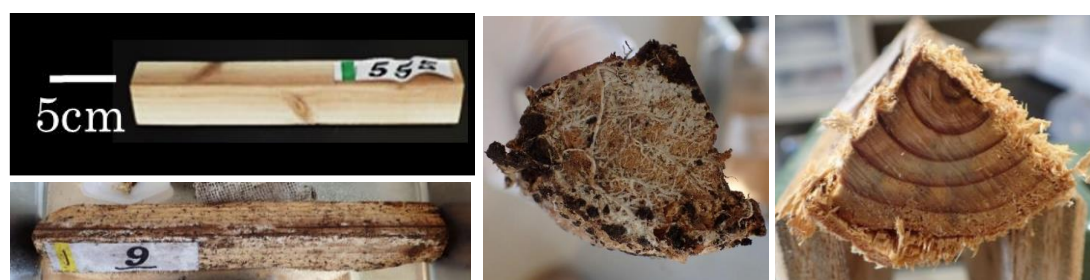
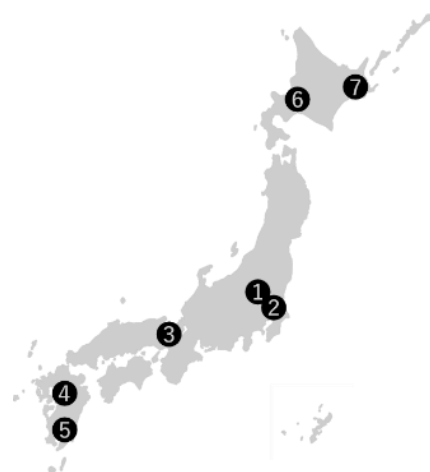


写真1 試料外観 左上：設置前の四割材 左下：設置後回収された試料の外観

中央：小口面から見た外観 右：小口面断面図

設置後の試料写真はすべて標茶試験地・地下 20~30cm にて 2 年埋設したものである。この試料は同条件のものうち、最も重量減少が大きく 24% 減少していた。



設置地点		設置日	年平均 気温 (°C)	年平均降水量 (mm)
①	群馬 群馬水上演習林	2016/11/18	8.7	1630
②	茨城 つくば共同試験地	2016/12/16	12.3	1394
③	京都 芦生演習林	2016/11/22	10.1	2205
④	熊本 森林総合研究所九州支所	2017/1/27	16.5	1986
⑤	鹿児島 高隈演習林	2017/1/11	15.3	2980
⑥	札幌 森林総合研究所北海道支所	2018/10/1	7.2	956
⑦	標茶 北海道研究林標茶区	2018/10/1	5.2	1033

メッシュ気候値 2010 使用による平年値

図2 木材片を埋設した試験地一覧 植生は、①群馬：落葉広葉樹林、⑥札幌・⑦標茶：トドマツ林、それ以外はスギ人工林である。京都大学 徳地直子先生、日本大学 上村真由子先生、鹿児島大学 鶴川信先生、森林総研 伊藤優子氏、酒井佳美氏に試料提供およびデータ解析でご協力いただいた。また、②茨城・④熊本・⑤鹿児島においてヤマトシロアリの生息が確認されている。

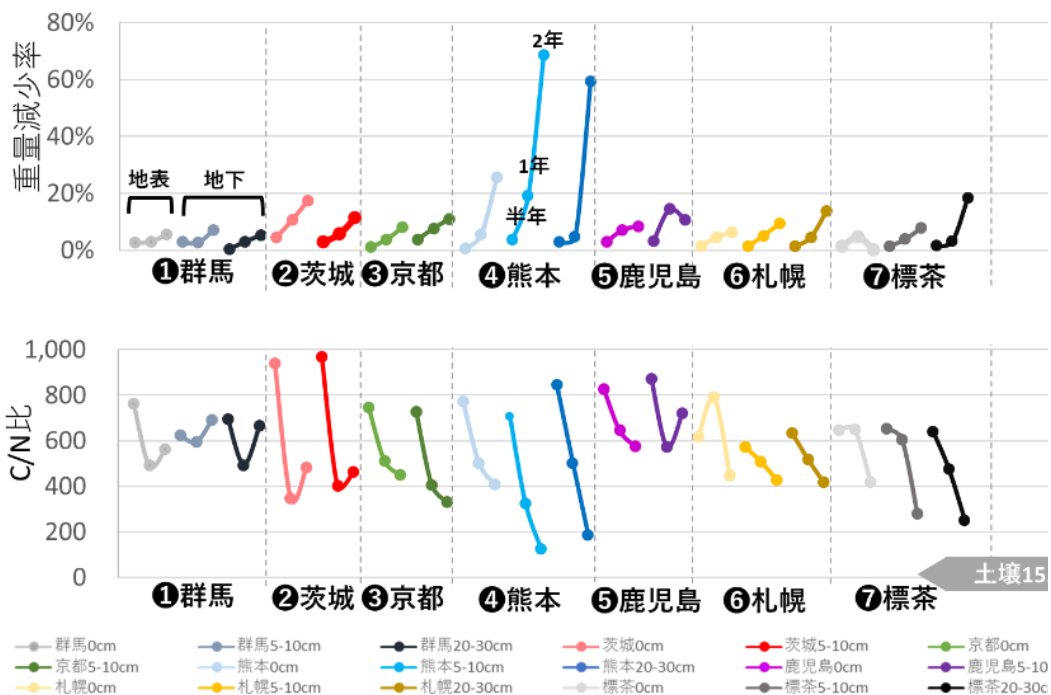


図3 各地点・深さ別の重量減少率（上）、C/N比（下） 半年、1年、2年たったのちに回収された各地点の木材サンプルそれぞれ5個のうち、重量減少の少ないほうから3番目、4番目の試料が本研究に提供された。グラフにはその重量減少とC/N比についての平均値を示した。試験地ごとに重量減少には差はあるが、全体でみるとほとんど重量減少はおこっていないといえる。④熊本サンプルでは重量減少やC/N比の変化が大きく、腐朽が急激に進行したことが分かる。

3-2.微生物 DNA の抽出

上記試料を切り出したときの木くずをDNA抽出用試料として用いた。

ハンマーミル Tissue lyzer (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用い 25Hz で粉末状になるまで粉砕した。ISOPLANT II (ニッポン・ジーン、東京都) を用いてメーカーのプロトコルを改変した以下の方法でDNA抽出を行った。

2 ml の PP チューブに木粉を約 0.1 g ずつ分取し、各チューブに 7 mm のジルコニアビーズを 1 個、0.2 mm のビーズ を約 1 mg 加え、Qiagen Tissue Lyser で 25 Hz、2 分間破碎処理した。Wash buffer を 1000 μ l 加え、さらに 2 分間破碎処理を行った。15,000 rpm で 10 分間遠心処理した後、上清を廃棄して木粉を回収した。以降はマニュアルに従って DNA を抽出した。

後述の PCR 実験で増幅が見られない場合は、QIAGEN Genomic DNA(20G) (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を以下の改変プロトコルで再度 DNA を抽出した。

5 ml の PP チューブに木粉を約 0.1 g ずつ分取し、各チューブに TE 1.5mL 加え Qiagen

Tissue Lyser で 25 Hz 、3 分間振盪した。15000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を廃棄したのちに TE 1mL を加え再度 wash を行った。以降はマニュアルに従って DNA を抽出した。

また、土壌サンプルについては土壌微生物の DNA 抽出に適した Extrap Soil DNA Kit Plus ver2 （日鉄環境株式会社、東京都）を用いた。落葉などの植物体を目視できる範囲で取り除いたのち、メノウ乳鉢ですりつぶした土を 0.3g ずつ分取して、マニュアル通りに DNA 抽出を行った。

3-3.PCR による DNA 増幅

上記で抽出した微生物 DNA を MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 （タカラバイオ、滋賀県）を用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物を電気泳動し増幅を確認した。

1 度の PCR では増幅が見られなかったため、1st PCR 産物を鋳型として 2nd PCR を行った。一部の試料においては、2ndPCR ではうまく増幅配列が得られないものもあり、その場合は Ex-taq(タカラバイオ、滋賀県)を用いて 2 ndPCR を行った。

微生物の検出および同定のために、真菌検出を対象とした rDNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域、バクテリア全般を対象とした 16s rDNA の部分領域を増幅目的の配列とした。ITS 領域の 1 st PCR には、NS7 および NL4 のプライマーペア、2 nd PCR には ITS1 および ITS4 のプライマーペアを用いた。(8~12)

表 1 プライマー配列一覧					
対象	PCR	forward		reverse	
		プライマー名	5'-3'	プライマー名	5'-3'
真菌	1st	NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	NL2	CTCTCTTTTCAAAGTT
	2nd	ITS7	GAACACAGCGAAATGTGA	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
バクテリア	1st	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1492R	TACGGYTACCTGTTACGACTT
	2nd	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	805R	GACTACCAGGTATCTAATC

3-4. Miseq による塩基配列の決定

NucleoMag NGS Clean-up and Size Select(タカラバイオ、滋賀県)を用いて DNA 精製を行った。PCR 産物 40 μ l を磁性ビーズで精製し、DNA 溶液 30 μ l を回収した。TruSeq DNA PCR-Free (illumina、CA, US)を用い、DNA 溶液 30 μ l に対して各試薬の量を、End repair Mix 8.4 μ l、5 μ l A-tailing mix、Ligation kit 1 μ l 各タグ 2 μ l に変更した改変プロトコルで処理を行った。磁性ビーズで再度精製した後、DNA 溶液 30 μ l を回収した。

精製した DNA を定量し、各試料の DNA 量 3pg ずつ採取し混和、2nM になるまで TE で希釈して混和ライブラリとした。混和ライブラリを Miseq v2 Reagent Kit 300 cycle PE (illumina、CA, US) を用いて製品マニュアルに従って Miseq (illumina、CA, US) で塩基配列を解析した。

3-5. 微生物種の同定

得られた塩基配列をタグ分別した後、CLC workbench ver 6.0 (CLC bio, Cambridge, MA) を用いてクオリティチェックおよびキメラチェックを行った。その後、Usearch v.7 (21) を用いてシングルトンを除き、150bp 以上の配列をクラスタリングし、それぞれの operation taxonomic unit (OTU) ごとに分類した (-id 0.95、他はデフォルト)。得られた塩基配列をもとに、生物情報データベースに登録されている塩基配列情報を BLAST 検索して相同性の高いもの (90%以上) の登録情報より生物種の同定を試みた。使用したデータベースは、真菌については UNITE から取得し、バクテリアについては SILVA から取得した。^(13, 14) 使用したスクリプトについては付録に記載してある。(付録)

3-6. Coverage ベースの Rarefaction

同定された配列数について一番少ないサンプルでは 613 リード、多いものでは数万リードあるなど総リード数がサンプルごとで大きく違った。そこで coverage にもとづいて rarefaction を行った。解析には、R を使用し vegan パッケージの rareslope 関数を用いて各サンプルについて coverage を計算し、もっとも coverage の低いサンプル (真菌では 98.3%, バクテリア 99.7%) にあわせて rarefaction を行った。ランダム変数について、seed 値はすべて 123 を用いた。

3-7. 多様度の分析

サンプルの α 多様度については、R の vegan パッケージの diversity 関数を用い、Shannon-wiener 式に基づいて計算を行った。

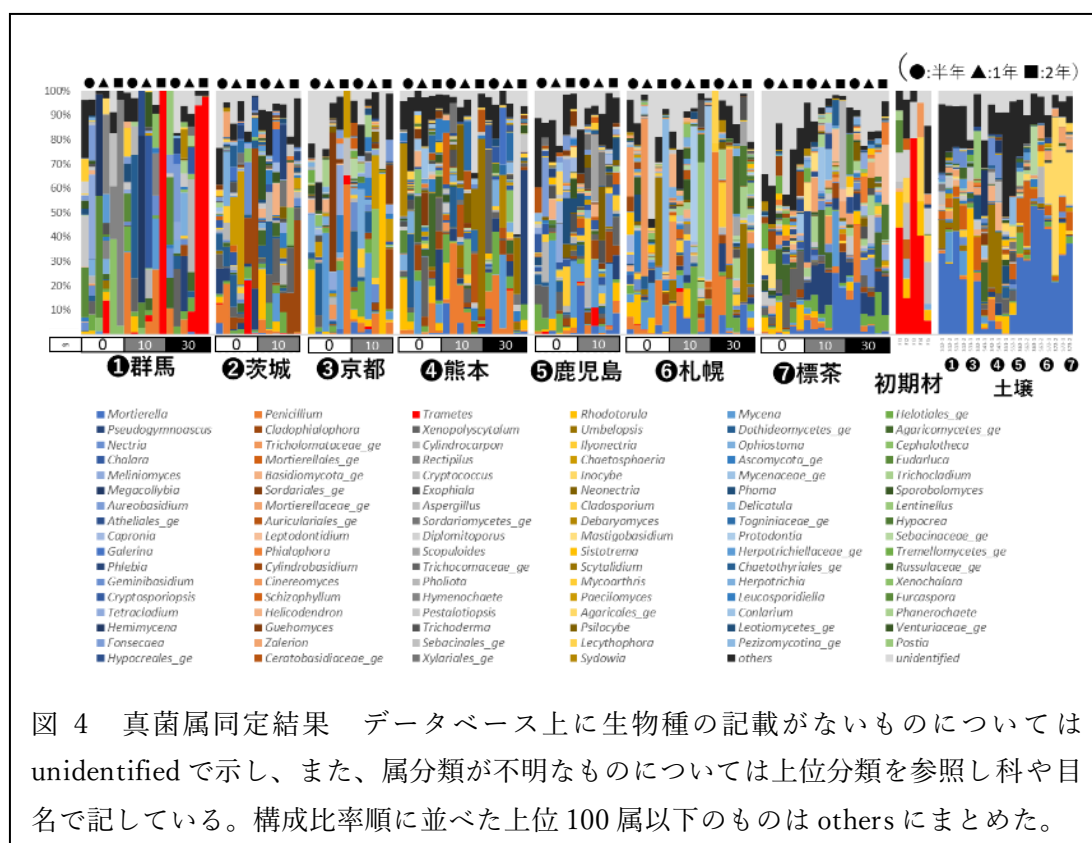
また、サンプル同士の多様度を視覚化するために R の vegan パッケージの metaMDS 関数を用い、Non-metric Multidimensional Scaling によって各サンプル間の距離を計算した。また、重量減少や日数などのサンプルの環境変数について、envfit 関数で計算した環境変数のうち当てはまりのよいもの ($p < 0.01$) については、図上に青の矢印で表示した。作図には ordiplot 関数や orditorp 関数を用いた。

4.結果

4-1.真菌属同定結果

各サンプルの同定結果を図に示す。(図4)

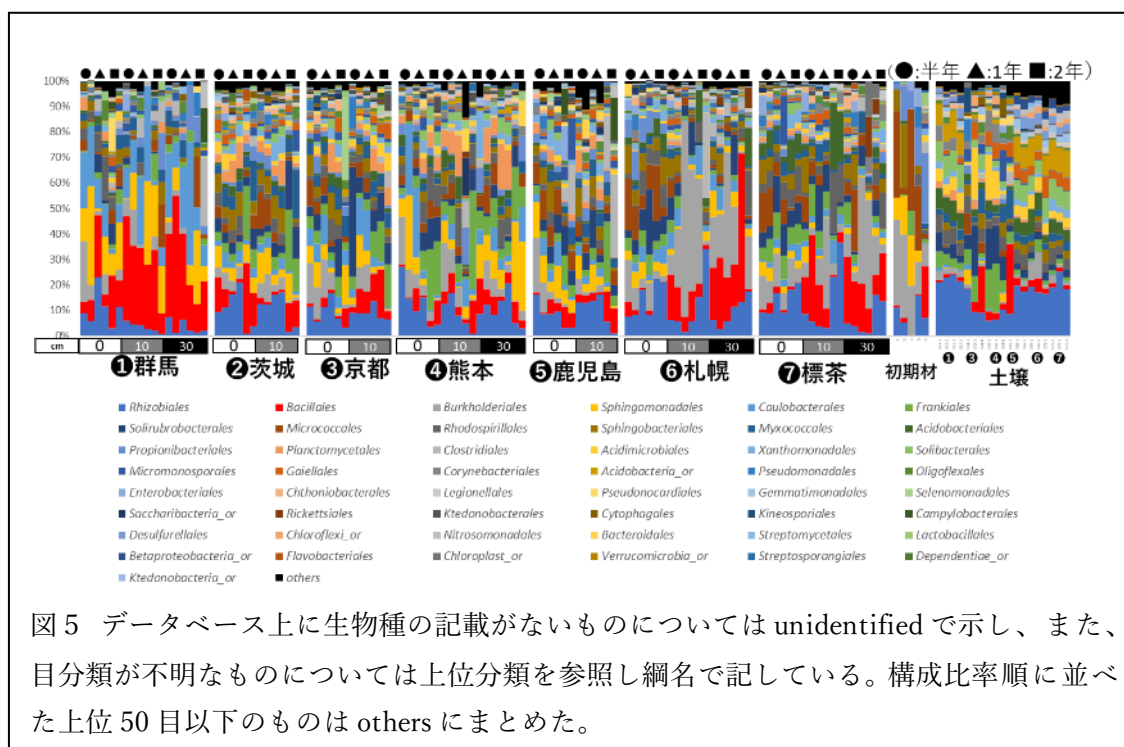
初期材については、同定された属は少なくシンプルな真菌相であるが、設置後の木材内部の真菌相はサンプルごとに非常に多様であることが分かる。群馬試験地の数サンプルにおいて、カワラタケ (*Trametes*) 属が優占していることが見て取れた。カワラタケは全世界に広く分布する白色腐朽菌で、中には JIS Z 2101「木材の試験方法」に記載されている素材の耐朽性試験や、JIS K 1571「木材保存剤－性能基準及びその試験方法」に記載されている腐朽試験の供試菌に使われるように腐朽力の強い代表的な株も含まれる。したがって腐朽との関連が期待されるものの、本研究で取り扱った、埋設2年までの木材片サンプルでは重量減少はほとんど起こっていない。



4-2.バクテリア目同定結果

真菌と同様に初期材については同定されたものは少なく、シンプルなバクテリア相であるが、設置後の木材内部のバクテリア相はサンプルごとに非常に多様であることが分かる。(図5)群馬試験地、札幌試験地、標茶試験地では *Bacillales* 目や *Burkholderiales* 目のバクテリアが他の試験地に比べて優占してみられた。これら試験地は、冬季には雪が降るなど冷涼な気候であることが共通しているためではないかと思われるが、詳しい要因は分かってい

ない。



4-3. α 多様度の評価

以下の Shannon-wiener 式を用いて多様度を評価した結果を図に示す。(図 6)

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

(S : 群集に含まれる種の数 P : 種 i の個体数が群集の全個体数に占める割合)

真菌では多様度は時間が経つにつれて低下する傾向がみられる。真菌・バクテリアともに、群馬試験地では他の試験地よりも多様度が低くなった。寒さが要因で多様な微生物相が生まれにくいのかと思われるが、より冷涼な札幌試験地・標茶試験地では多様度が低いことはなく、その要因は分かっていない。

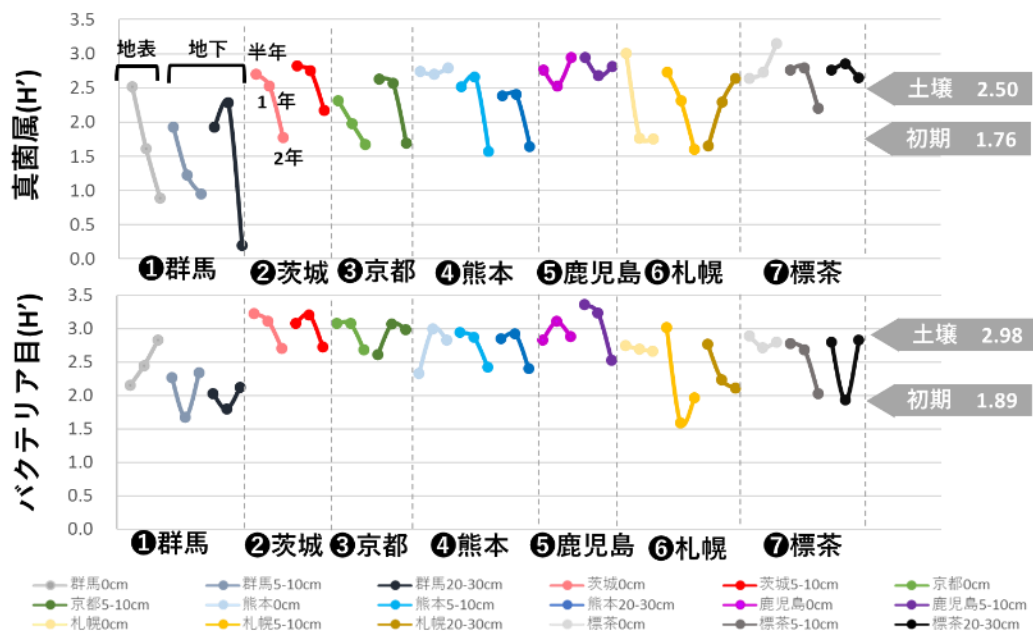


図6 Shannon-wienerを用いて多様度を計算した。これは、多数の生物種が均等に存在しているほど数値が高くなる指標である。木材サンプルだけでなく、初期材・森林土壌についても平均値を計算した。群馬試験地 20~30cm における 2 年め試料について真菌属を同定した結果、ほとんど *Trametes* 属で構成されていたため、多様度が極端に低くなっていた。

4-4.NMDS によるサンプル間類似度の評価

木材サンプル・初期材・森林土壌すべてを含めて二次元平面状にプロットした結果を図に示す。(図7)日本各地の森林土壌同士は近いところにプロットされたことにより、微生物相はどこでも似ていることが分かる。設置された木材は設置前の初期材とも、埋められた周辺土壌とも違う独自の微生物構造を構築しており、埋められた木材は試験地ごとに分離しているような傾向がみられる。

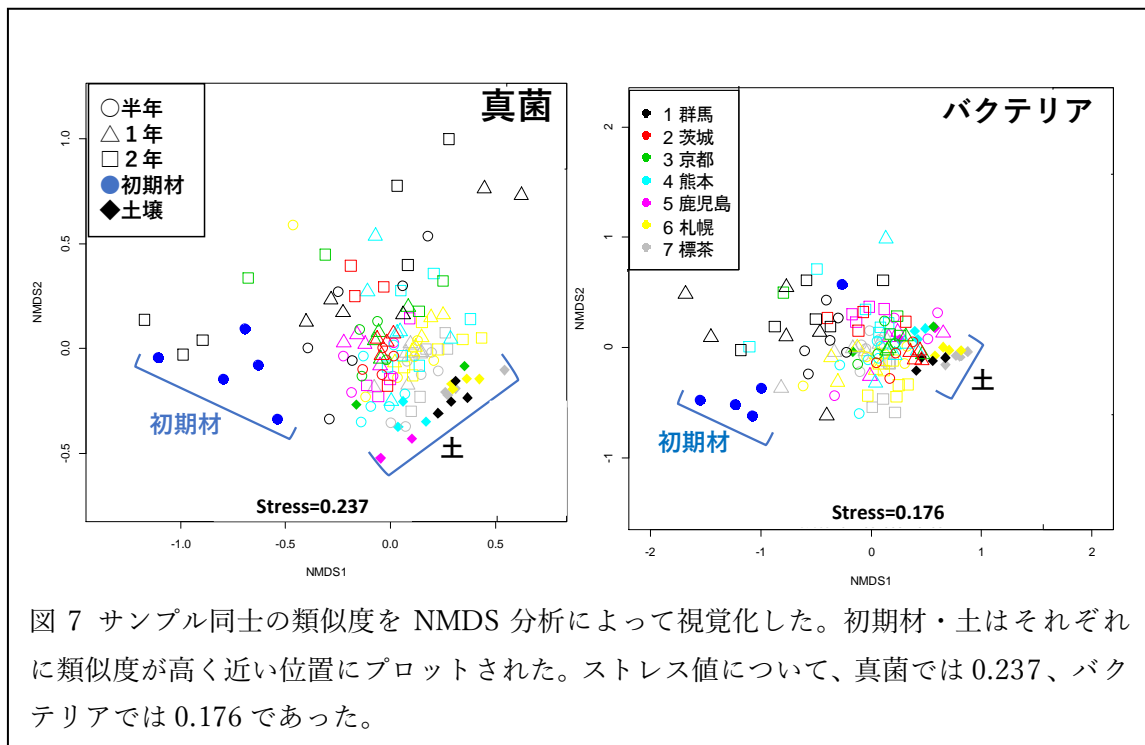


図 7 サンプル同士の類似度を NMDS 分析によって視覚化した。初期材・土はそれぞれに類似度が高く近い位置にプロットされた。ストレス値について、真菌では 0.237、バクテリアでは 0.176 であった。

4-5. 環境要因との関連

サンプルごとに多様な木材内部の微生物相がうまれる要因について探るべく、環境変数と各サンプルとの関連性を R の `vegan` パッケージ `envfit` 関数によって計算し、P 値 0.01 以下のものを青の矢印で示した。その結果、真菌では日数・深さ・積算気温・積算降水量・試験地が関連ある要素として挙げられた。また、バクテリアでは昆虫食痕・真菌多様度・積算気温・積算降水量・試験地が挙げられた。(図 8・9)

両方に関連が深い要素として、積算気温・積算降水量・試験地が挙げられた。積算気温は設置日から回収日までの日平均気温 (0℃以上) を足し合わせたものであり、積算降水量は設置日から回収日までの降雨量の合計値である。(図 10)

積算気温・積算降水量の違いは試験地ごとに顕著であり、7 か所のうち最北の標茶試験地では 2 年たっても、温暖多湿な鹿児島試験地の 1 年時と同程度である。同じ年数が経過しても、試験地ごとにその意味合いは変わってくることが予想された。

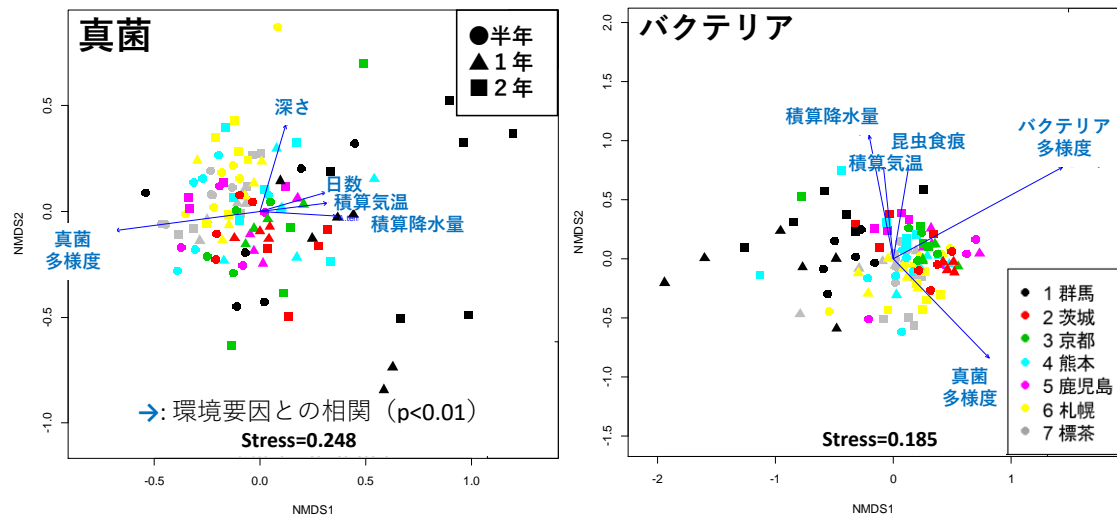


図 8 埋設された木材サンプル同士の類似度を NMDS で視覚化した。ストレス値について、真菌では 0.248、バクテリアでは 0.185 であった。環境変数のうち、関連度が高いもの ($P < 0.01$) について青の矢印で表示した。真菌では日数・深さ・積算気温・積算降水量・試験地が、バクテリアでは昆虫食痕・真菌多様度・積算気温・積算降水量・試験地が関連ある要素として挙げられた。

	深さ	重量減少	窒素量	炭素量	炭素窒素比	含水率	灰分量	シロアリ体	蟻道	昆虫食痕	日数	積算気温	積算降水量	バクテリア多様度	真菌多様度	試験地
バクテリア	0.024	0.055	0.637	0.179	0.905	0.199	0.068	0.163	0.05	0.001	0.061	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
真菌	0.001	0.288	0.28	0.366	0.174	0.013	0.268	0.662	0.693	0.687	0.001	0.002	0.002	0.013	0.001	0.001

図 9 上記 NMDS にて環境変数として計算した要素の P 値一覧
P 値が小さいほど、その要素と微生物群には偶然では説明できない関連性があるとされる。1 %を棄却域として 0.01 以下のものを図 7 に記載した。

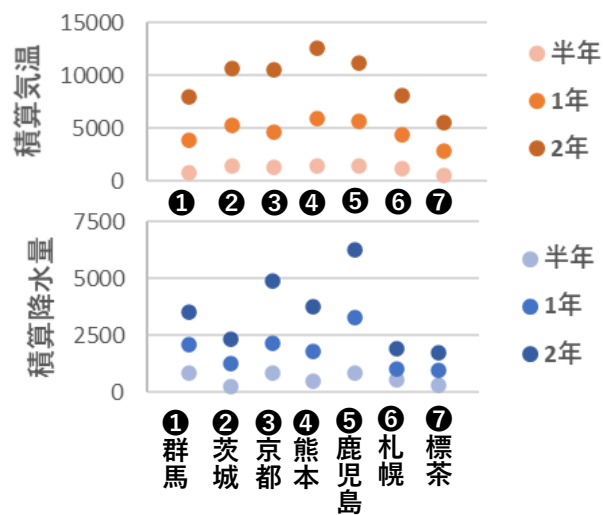


図 10 試験地点別の積算気温（上）積算降水量（下） 試験地の気象データはもっとも近い観測所のアメダスデータを使用した。積算気温は設置日から回収日までの日平均気温（0℃以上）を足し合わせたものであり、積算降水量は設置日から回収日までの降雨量の合計値である。

5. 考察

土壌中真菌の同定について、冷涼な群馬・札幌・標茶試験地の土壌では *Mortierella* 属が多くみられた。先行研究では、日本各地の土壌中真菌について希釈平板法にて真菌を培養し同定したところ、冷温帯土壌において高頻度出現菌するものの他の気候地域ではあまり見られないものとして *Mortierella* 属菌が挙げられた報告もある。⁽¹⁵⁾ このように、土壌真菌にフォーカスを当ててみると地域ごとの微生物群集構造に違いが認められるものの、各木材試料の微生物群集構造の多様さに比べると、土壌の違いは小さなものであると言えるであろう。

木材内部の真菌の同定については、木材片ごとに非常に多様で普遍的な特徴を見出すことは困難であったが、試験地ごとに真菌相が違っている傾向がみられた。特に群馬試験地では多様度が低い・重量減少がほとんどないにも関わらず、*Trametes* 属や *Megacollybia* 属などの担子菌が多くみられる試料もあるなど、他の試験地とは大きく異なっていた。その理由として植生の違いが考えられる。札幌・標茶はトドマツ林、それ以外はスギ人工林であるなか、群馬は落葉広葉樹林である。一般に針葉樹は広葉樹に比べてリグニン含有が多く、また栄養素が貧弱であるため分解されにくいとされている。⁽¹⁶⁾ もともと群馬試験地において落葉広葉樹を対象としていた分解者は、実験の為に設置されたスギ材の分解には適していなかったことも考えられる。しかし *Trametes* 属は針葉樹に対しても腐朽力を持つことは一般に知られている。⁽¹⁷⁾ そのため、上記の理由だけでは重量減少がほとんどないことを説明することはできないだろう。

森林中のポプラ *Populus grandidentata* が分解される過程のバクテリア相をシークエンスした研究では、腐朽初期におけるバクテリア相について窒素固定能があるとされる *Rhizobiales* 目が多く、その後バクテリア相は複雑化されていったという報告もある。⁽⁵⁾ 本研究で用いた木材の樹種は違っても *Rhizobiales* 目は共通して多くみられている。現在は腐朽の初期段階であるため、今後どのように変化していくのかについての研究も重要な課題である。

また、真菌・バクテリアともに生物種の同定からでは窒素固定能があるか、リグニンやセルロース分解能があるかなど、実際の機能については推測することしかできない。機能遺伝子配列について検出によって分解機能を推定するなどのアプローチも必要であるかと考えられる。さらにはショットガンメタゲノムにより微生物集団の機能をプロファイルする方法も考えられるが、環境微生物群集のように非常に広い多様性をもつ機能をプロファイルする技術が必要となる。⁽¹⁸⁻²⁰⁾

NMDS によって微生物相と環境要因との関連性をみたところ、真菌相に関連ある要素として試験地の違い・積算気温・積算降水量日数・深さが挙げられ、バクテリア相に関連ある要素としては試験地の違い・積算気温・積算降水量・昆虫食痕・真菌の多様度が挙げられた。

バクテリアは単体で存在するというより共生するものも多く、昆虫や真菌の影響が木材内部のバクテリア相に反映されたものかと考えられる。

6. 結論

地下での木材腐朽初期段階では、設置する前の初期材・周辺土壌と異なる各木材サンプルそれぞれに多様な微生物相が生まれ変化していくことが分かった。設置する前の初期材には微生物が少ないが、半年後には多様な微生物がみられ、真菌において多様度は 2 年後には低下する傾向がみられた。

腐朽と関連する微生物相を探りたかったものの、たとえ木材腐朽菌が多く同定されても重量減少がない場合もあり、微生物相と腐朽は単純に結び付けられなかった。

そこで腐朽という観点からのみではなく様々な環境要因を含めて NMDS 分析を行い、これらの多様な微生物相を説明できる環境要素を探った。そして、真菌・バクテリア相ともに関連ある要素として試験地の違い、積算気温、積算降水量が挙げられた。試験地ごとに積算気温・積算降水量の違いは顕著である。真菌やバクテリアには、成育に適さない環境条件では休眠状態にはいり、適した環境条件のときに大きく成長することがある。低温状態や乾燥状態が続くことで成育が止まることを考慮すると、単純に 1 年たった、2 年たったといっても、その意味合いは試験地ごとに大きく変わることが考えられる。

腐朽初期段階では、腐朽の進行度を示す重量減少の観点からはサンプルごとの多様な微生物相を説明できなかったものの、積算気温・積算降水量が腐朽初期段階の微生物相を説明する指標として有効であることが示唆された。

現在も木材片を設置して一定期間後回収するプロジェクトは続いている。更に年数のたった 4 年目試料も回収される予定であり、それらがどう変化していくかの分析も重要な課題である。

7.謝辞

今回の試料提供をしてくださった京都大学 徳地直子先生、日本大学 上村真由子先生、鹿児島大学 鶴川信先生、 森林総研 伊藤優子氏、酒井佳美氏に試料提供およびデータ解析でご協力いただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。特に、酒井佳美氏と上村真由子先生には、参考になるご意見を数多くいただきました。多大なるご助力に感謝申し上げます。

また、本研究のご指導をしていただきました堀澤栄教授、ならびに同研究室の皆様に深く感謝いたします。

8.参考文献・付録

- 1) 今井久 (2008) 樹木根系の斜面崩壊抑止効果に関する調査研究 ハザマ研究年報: 35-52
- 2) 鏡原聖史ら (2018) 樹木根系を考慮した自然斜面の安定性評価検討事例 建設工学研究所論文報告集第 60 号:131-142
- 3) Karizumi N.(1974) The mechanism and function of tree root in the process of forest production. I: method of investigation and estimation of the root biomass. Bull Gov For Exp Stn 259: 1-99
- 4) Balesdent J.et al.(2018) Atmosphere-soil carbon transfer as a function of soil depth. Nature 559:599-602
- 5) Johnson, C. E., Siccama, T. G., Denny, E. G., Koppers, M. M., and Vogt, D. J. (2014) In situ decomposition of northern hardwood tree boles: decay rates and nutrient dynamics in wood and bark. Canadian Journal of Forest Research 44:1515–1524
- 6) 深澤遊 (2013) 木材腐朽菌による材の腐朽型が枯死木に生息する生物群集に与える影響 日本生態科学誌 63:311-325
- 7) Kuramae Eiko E., Leite Marcio F. A., Suleiman Afnan K. A., Gough Christopher M., Castillo Buck T., Faller Lewis, Franklin Rima B., Syring John (2019) Wood Decay Characteristics and Interspecific Interactions Control Bacterial Community Succession in *Populus grandidentata* (Bigtooth Aspen). Frontiers in Microbiology 10:979
- 8) White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York:315-322
- 9) Kim S.H.,Uzunovic A, Breuil C (1999)Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O.quercus* in stained wood by PCR.Applied and environmental microbiology 65(1):287-290
- 10) Lane D.J.(1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics.John Wiley and Sons,Chichester:115–175
- 11) Muyzer G,E.C. de Waal,A.G. Uitterlinden(1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.Applied and anvironmental microbiology 59(3):695–700
- 12) Blaaid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, Kauserud H. (2013) ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. Mol Ecol Resour 13(2):218-224
- 13) Rolf Henrik Nilsson, Karl-Henrik Larsson, Andy F S Taylor, Johan Bengtsson-Palme, Thomas S Jeppesen, Dmitry Schigel, Peter Kennedy, Kathryn Picard, Frank Oliver

- Glöckner, Leho Tedersoo, Irja Saar, Urmas Kõljalg, Kessy Abarenkov(2019) The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* 47:D259–D264
- 14) Pelin Yilmaz, Laura Wegener Parfrey, Pablo Yarza, Jan Gerken, Elmar Pruesse, Christian Quast, Timmy Schweer, Jörg Peplies, Wolfgang Ludwig, Frank Oliver Glöckner(2014) The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* 42:D643–D648
- 15) 安藤勝彦(2012) 日本産土壌高頻度出現菌に関する一考察 *Microbial Resources and Systematics* 28:89-98
- 16) 寺嶋 芳江(2010) リグニン分解能力を指標にした針葉樹高分解菌の選抜. *木材学会誌* 5:339-346
- 17) 酒井温子 (2013) 非接地環境で木材を腐朽していた担子菌の性質 –生育温度および木材分解力–, 奈良県森技セ研報 42:53-61
- 18) Sharon I, Banfield JF (2013) Genomes from metagenomics. *Science*. 342:1057-1058
- 19) Solden L, et al. (2016) The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol*. 31:217-226
- 20) Hirai M et al. (2017) Library Construction from Subnanogram DNA for Pelagic Sea Water and Deep-Sea Sediments. *Microb Environ* 32(4), 336-343

付録) 使用した userch スクリプト

#長さでソート

```
usearch7.0.1090_win32 -sortbylength 【sample】.fa -output 【sample】_sort.txt -minseqlength 150
```

#クラスター解析

```
usearch7.0.1090_win32 -cluster_smallmem 【sample】_sort.txt -id 0.95 -centroids nr_【sample】.txt  
-uc clusters_【sample】.uc -sizeout
```

#サイズ情報を付加

```
usearch7.0.1090_win32 -sortbysize nr_【sample】.txt -output nr_【sample】_size_sorted.txt -minsize  
1
```

#OTU 解析

```
usearch7.0.1090_win32 -cluster_otus nr_【sample】_size_sorted.txt -otus 【sample】_OTU.txt
```

#blast(真菌)

```
usearch7.0.1090_win32 -usearch_global 【 sample 】 _OTU.txt -db  
sh_general_release_s_09.02.2014.fasta -id 0.9 -strand both -userout 【sample】_global_userout.txt -  
userfields query+target+id
```

#blast(バクテリア)

```
usearch7.0.1090_win32 -usearch_global 【sample】_OTU.txt -db silva.nr_v128.fasta -id 0.9 -strand  
both -userout 【sample】_global_userout_16s.txt -userfields query+target+id
```