

E-051 森林－土壌相互作用系の回復と熱帯林生態系の再生に関する研究

(2) 土壌環境と微生物群集の回復が熱帯林再生に果たす役割の研究

国立大学法人 東京大学

大学院農学生命科学研究科	宮崎 毅
大学院農学生命科学研究科	宝月 岱造
大学院農学生命科学研究科	大塚 重人

〈研究協力者〉

国立大学法人 東京大学 大学院農学生命科学研究科 溝口勝・西村拓・関勝寿・井本博美
博士前期課程 鈴木香織・小渕敦子・磯部一夫

国立大学法人 東京大学 アジア生物資源環境研究センター 奈良一秀・石田孝英・木下晃彦

国立環境研究所 アジア自然共生研究グループ 清水英幸

インドネシア ボゴール農科大学 Nora H. Pandjaitan, Erizal St. Rangkayo Basa, Asep Sapei

インドネシア インドネシア科学院生物学研究センター I Made Sudiana, Suliasih,
Arif Nurkanto, Herwint Simbolon

平成17～19年度合計予算額 14,682千円

(うち、平成19年度予算額 5,955千円)

※上記の合計予算額には、間接経費 3,388千円を含む

〔要旨〕 (1) 土壌への火災の影響を調べるために、模擬火災実験、現地土壌調査、土壌水分モニタリングを行った。模擬火災実験では、円筒状の土壌試料の表面を600～700℃に熱した時に、地表5cm以内の層で地温上昇、土壌水分消失、有機物消失が著しいことを明らかにした。また、地温が100℃を越える深さ(地温100℃前線と呼ぶ)は $m\sqrt{t}$ (ここで、 m は定数、 t は加熱時間(min))で表され、 m は、加熱開始時の水分量が大きい程小さな値になった。森林火災中の地温100℃前線の降下移動特性のモデル化は、世界最先端の知見である。現地土壌調査では、地表面10cm以深の層で、火災時の灰の影響と思われるpHの上昇、燃焼時に生じた炭の影響による有機物の増加を確認するなど、森林火災下での土壌中有機物質移動について新たな知見を得た。

(2) 全細菌のPCR-DGGE解析とT-RFLP解析は、重度、軽度、無被害区(HD1、LD1、K1区)で共通の優占種が生息し、主要細菌相がほぼ回復していることを示した。放線菌のPCR-DGGE解析結果でも、3区に大差なかったが、アンモニア酸化細菌(AOB)では、K1区と他の2区間に差があった。細菌群火災の影響は異なり、AOBは影響を長期的に受けているようだ。培養可能なガラクトuron酸酸化細菌は、HD1区で菌数が多く、genotypeの多様性は小さかった。本細菌群の大部分が*Burkholderia*属とその近縁属に属し、火災の直接的影響への耐性が期待できず、本細菌群集の量的・質的な差は、火災の長期的な影響であると推測された。

(3) 火災の影響がないフタバガキ林では、林床の5～8割に菌根が分布しており、ベニタケ科や

イボタケ科を中心とした多様（推定種数は約100種）な菌根菌が生息していた。一方、火災の被害地では菌根量が大幅に減少しており、重度被害区では、林床の約5%にしか菌根が分布していなかった。被害区では菌根菌の多様性も低く、無被害林では見られなかったニセショウロ科の菌根菌が高頻度で検出されるなど、菌根菌の群集構造も大きく変化していた。

〔キーワード〕 地温100℃前線、土中の有機物移動、土壤理化学性、土壤細菌群集構造、菌根菌、

1. はじめに

熱帯雨林気候の地域は高温湿潤のため、土壤有機物は土壤微生物によって速やかに分解され、腐植を多く含む土層は一般的に薄く、養分はその薄い表土に偏在している。また多量の降雨のために養分は溶脱しやすく土壤は酸性で貧栄養状態になりやすい。そのため、熱帯雨林は長い時間をかけ、植物体と林内表土の中に徐々に養分を蓄積し、それを速やかに循環することによって巨大な現存量を維持している。したがって、いったん火災による攪乱が起こると、蓄積・循環されてきた養分は急速に系外に消失し、加えて表土は多量の雨ゆえに浸食・流亡しやすくなる為、その後の森林の回復には非常に長い時間を要する¹⁾。そこで熱帯林再生のためには、地上部の樹木のみならず、樹木の成長をささえる土壤の無機環境と微生物の回復が重要である。本サブテーマでは、(1)火災による土壤理化学性の変化、土壤に生息する(2)細菌類、(3)菌根菌類の再生過程を研究テーマとした。

火災の土壤への影響としては、土壤有機物の量的及び質的变化²⁾³⁾、pHの上昇⁴⁾、撥水性の発現⁵⁾などが報告されている。また、土壤有機物の燃焼により、植物の生育に必要な有機物量が低下する。このような土壤特性の変化及び土壤水文条件は、森林火災後の植生回復過程における植物生態系の遷移にも影響を与えているものと推察される。そこで、本研究では、次項の目的を置き、模擬火災実験、森林火災被害地の土壤調査、土壤水分の長期モニタリングを行った。

細菌などの土壤微生物は地上部の生物と同様に火災の影響をうけることが知られているが^{6) 7) 8)}、これらの研究はそのほとんどが温帯地域での研究であり、熱帯地域を対象とした研究は少ない。さらに短期間の影響に着目している研究事例がほとんどである。火災は、長期的には植物群落組成やその生成産物の変化をもたらす。火災から長い時間を経ると、火災の短期的・直接的な影響（熱や煤煙など）に加えて、火災の長期的・間接的な影響（植生の変化など）が土壤細菌相に対して影響を及ぼすことが推察される⁹⁾。

さらに、土壤中を主な生活場としている生物群に菌類があるが、これらは原核生物である細菌と異なり植物や動物と同じ真核多細胞生物であり、生態系においても重要な働きを担う生物である。しかし、菌類の観察は困難なことから生態学的な研究で扱われることはきわめて少ない。菌類の中でも一般的によく知られているのは、他の生物の排泄物や遺体などを利用する、いわゆる分解者で、サブテーマ(4)で扱われる。しかし、森林などの生態系で最も現存量の多い菌類は、植物の根に共生して生活する菌根菌である。なかでも、ブナ科やカバノキ科、マツ科などといった温帯林の主要構成樹種のほとんどの細根にはいわゆるキノコを作る菌類が共生しており、そこから伸びる無数の菌糸によって森林の表層土壤は満たされている。こうした樹木細根とキノコ類によってできた菌根は外生菌根と呼ばれ、多くの草本植物が作るアーバスキュラー菌根と並んで陸上生態系の最も普遍的な共生現象の一つである。

外生菌根菌は植物が光合成で生産した産物を直接受け取ることで生活しており、その量は純一次生産量の16～34%に達する¹⁰⁾。一方、外生菌根菌はリンや窒素といった養分を土壌から吸収し、植物に供給する機能を持つ。菌類の菌糸は細くて長いうえに、様々な有機・無機化合物を利用できることから、植物の根や根毛よりも遥かに優れた養分吸収器官である。このため、樹木の多くは必要な養分の大半を共生する外生菌根菌に依存しており、植物体内に含まれる窒素の61～86%、リンに至ってはそのほとんど全てが外生菌根菌から供給されたものであると考えられている。こうした菌根菌との共生は植物が陸上に進出した時点から行われており、現存するほとんどの植物にとっても菌根菌との共生が不可欠である¹¹⁾。

既に発達した森林では、わずか数ヘクタールの面積にも200種を超える多様な外生菌根菌が存在し¹²⁾、その菌糸や孢子が土壌中に普遍的に存在するため、更新しようとする実生にも容易に外生菌根菌が感染する。しかし、大規模な攪乱によって宿主樹木が消失してしまうと、そこに共生していた外生菌根菌の大部分は死滅してしまい、外生菌根菌の空白域ができてしまう。こうした場所では、外生菌根菌の欠如が植物の定着を阻害する最大の要因となり、まばらに点在する菌根菌の種組成や分布が植物の定着を決定する¹³⁾。つまり、生態系の保護や再生には外生菌根菌を考慮することが不可欠なのである。残念ながら熱帯地域での外生菌根菌については研究例が少なく未解明の部分がきわめて多い。現実的かつ効果的な熱帯林生態系の保護・再生を行うためにも、外生菌根菌に関する基礎的な情報の収集が急務となっている。

2. 研究目的

(1) 土壌の理化学性に対する森林火災の影響を解明するために、1) 森林火災下における土壌中の熱・水・物質移動、および土壌の性質の変化を明らかにする、2) 森林火災後における土壌の変化、修復と地表生態系修復との相関を明らかにする、3) 森林火災被害地の土壌修復促進対策を検討することを目的とした。

(2) 土壌細菌群集に関しては、森林火災の被害を受け、現在回復過程にある地域の土壌細菌群集が、火災被害のなかった自然林とどのように異なる明らかにする。具体的には、土壌中の酵素活性の測定、16S rDNAのPCR-DGGE解析及びT-RFLP解析による土壌細菌の群集構造解析、および培養可能なガラクトロン酸資化細菌の群集構造解析を行い、これらのデータに基づいて、森林火災の土壌細菌群集に及ぼす影響とその回復過程について考察することを本研究の目的とした。

(3) 菌根菌については、これまでの研究によって、東南アジアの熱帯林で優占するフタバガキ科は外生菌根菌と共生すること、その成長には外生菌根菌との共生が不可欠ことが知られている¹⁴⁾。しかし、現実の生態系においてどのような外生菌根菌と共生しているのかについては、キノコ調査に基づく断片的なものしか無く、どれくらいの外生菌根菌が生息しているのかといった多様性に関する定量的なデータは存在しない。また、東南アジアの熱帯雨林は伐採や焼き畑などによって急激に減少しているが、そうした攪乱が外生菌根菌に与える影響についても定量的なデータは存在しない。こうした現状では、熱帯という環境に適応して進化してきた貴重な外生菌根菌の多くが絶滅してしまい、共生相手を失ったフタバガキ科樹木の再生もできなくなるであろう。そこで本研究では、熱帯フタバガキ林の外生菌根菌に関して、以下の点に関して基礎的な知見を得ることを目的とする。

1) フタバガキが優占する自然林（無被害林）における外生菌根菌の分布様式と多様性

2) 森林火災による外生菌根菌群集への影響

3. 研究方法

(1) 土壌の理化学性への森林火災の影響

1) 模擬火災実験

森林火災下における土壌中の熱・水・物質移動を実際の火災現場で捉えることは通常困難なので、これに代わる模擬火災実験を行った。実験には東京大学大学院農学生命科学研究科附属農場の黒ぼく土（シルト質ローム土）の2mmふるい通過分を用いた。体積含水率は0.15、0.32、0.39、 $0.45\text{m}^3\text{m}^{-3}$ に調整し、乾燥密度(0.75gcm^{-3})で供試体を作成した。また比較の為、初期体積含水率がゼロの豊浦砂を乾燥密度 1.5gcm^{-3} で充填したものを用いた。内径15cm、外径18cm、高さ30cmの暗渠用の素焼土管を高さ5cmに切断してリングとし、これを積み重ねたものに供試土を5cm毎に手で充填し、土壌カラムとした。

実験は東京大学農学部10号実験圃場で行った。実験全体図を図2-1に示す。まず実験圃場にコンクリートブロックを並べ、その上に鉄板を敷いた。次に $5\times 9\times 20\text{cm}$ のブロックを組み立てて、 $50\times 50\times 40\text{cm}$ の囲いを作り、そこに供試土充填済みの土壌カラムを設置した。横方向に出入りする熱を遮断するため、周りに適度に湿った豊浦砂を充填した。その後、供試体表面で、炭を6時間燃焼加熱し、以下の項目について測定を行った。

K熱電対（クロメル－アルメル）を0、1、2、4、6、8、10、15、20、25、30cmの深さに、先端が供試体中央部にくるように供試体側面から挿入し、加熱中の供試体中央の鉛直方向の温度分布をデータロガーCR10X（Campbell社製）とマルチプレクサーAM16/32（Campbell社製）を用いて連続測定した（図2-2）。

燃焼終了後、約18時間経過し温度が常温になった後、金属製コアサンプラーで試料を採取し、 105°C 、24時間炉乾法によって体積含水率、乾燥密度を求めた。燃焼後に1～10 cm間隔で攪乱採取した試料をメノウ鉢ですり潰し、CN analyzer NC-90A（住化分析センター製）を用いて炭素・窒素含有率を測定した。

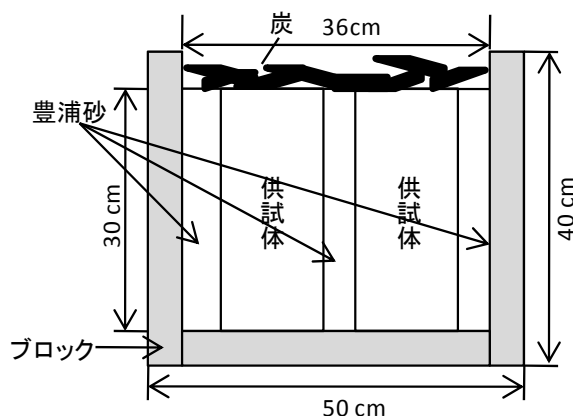


図2-1 実験全体図

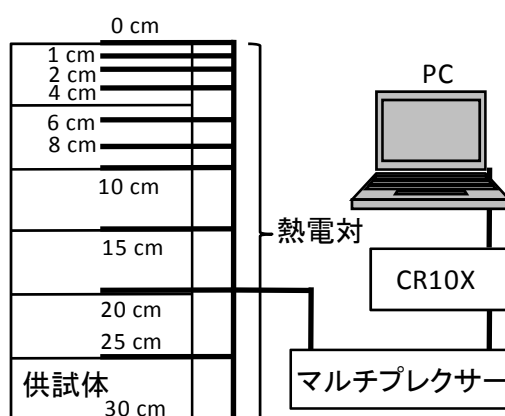


図2-2 土壌カラムと熱電対の配置

2) 森林火災被害地の土壌調査

ブリットバンキライの大規模森林火災地においては、重度被害区（HD1区）、軽度被害区（LD1

区)、無被害区(K1区)がそれぞれ指定されている。これらの地区ごとの土壌理化学性において、もし違いがあるとすれば、それは森林火災の影響によるものであるか、それとも、もともとの土壌分布の違いによるものであるかを判別する必要がある。そこで、まず、それぞれの地点において、深さ60cm程度の穴を掘り、土壌断面調査、土壌硬度測定、土壌水分測定、地温測定をおこなった。なお、K1区では2カ所で穴を掘ったため、K1およびK2として区別した。また、現場から採取した土を日本に持ち帰り、土壌理化学性測定をした。土壌理化学性は、飽和透水係数(変水頭試験)、含水比(重量法)、粒度分布(比重計法、水中篩別法)、土粒子密度(ピクノメーター法)、水分特性(吸引法、加圧板法、)、pH、EC、全炭素・全窒素(CN analyzer NC-90A)、撥水性(MED法¹⁵⁾)を測定した。

これとは別に、調査地域の連続的な土壌変化の傾向を調べるために、図2-3のように、K1区からHD1、HD2区までの1 km直線上において、50mおき20地点の土壌調査を実施した。

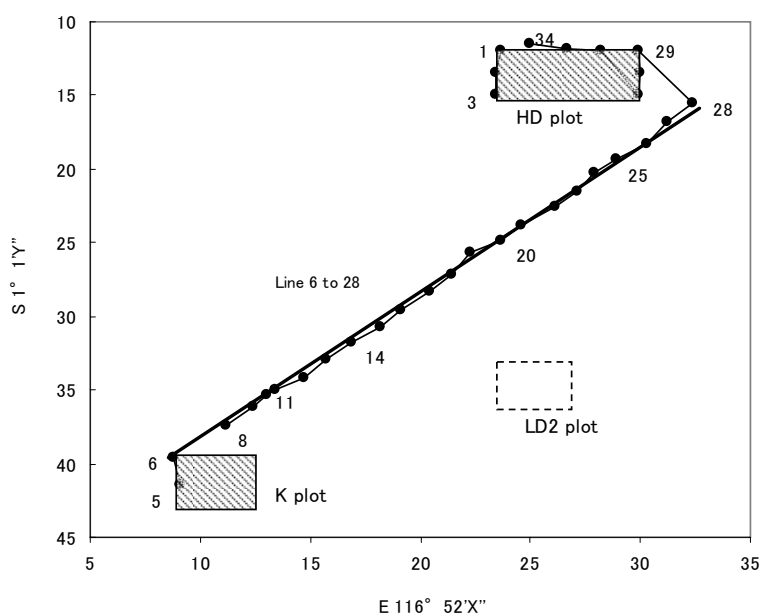


図2-3 土壌調査地点

3) 土壌水分の長期モニタリング

森林火災の被害程度によって、土壌水分の動態に差が現れることが予測されたので、連続測定可能な土壌水分計(ECHOプローブ:EC-10)と温度計(ECHO温度センサー:ECT)を土壌断面に水平に挿入し、2005年9月22日から2006年8月26日まで土壌水分量、地温ともに10分間隔でデータを連続採取した。データロガーはDecagon社のEm50を使用した。設置地点はK1区の深さ10cmと20cmおよびHD区の20cmと30cmとした。各深さに、土壌水分計と温度計をそれぞれ1本ずつ計4本設置した。

土壌水分計は、土壌の誘電率を測定し電圧(mV)を出力する。土壌水分計の出力値と体積含水率の関係は土壌によって異なるため、正確な測定を行うためには土壌ごとに校正曲線を作成することが必要である。そこで、室内実験を行い、土壌水分計の出力値と体積含水率の関係を求め、線形近似により校正式を得た。さらに、現地調査時のデータで校正式の確認を行った。この土壌毎の校正式を用いて、現地のモニタリングデータを土壌水分量に換算した。

(2) 土壌細菌

1) 土壌サンプリング

土壌試料は、無被害森林K1区、軽度被害森林LD1区、および重度被害森林HD1区からそれぞれ10サブプロットを無作為に抽出し、各サブプロットの中心地点から土壌を採集した。また、採集地点近傍の樹種と土壌細菌の群集組成の関連を評価するために、*Macaranga gigantea* (森林火災後の先駆種) および *Litsea firma* (二次林形成種) の付近の土壌を、それぞれについて各プロット内の2〜3地点から採集した。採集地点に30cm四方の穴を30cmの深さまで掘り、A層から約100gずつの土壌を採集し、密閉式のプラスチックバッグに入れて持ち帰った。土壌採集時に降雨はなかったが、採集日より前の降雨等により水分を多く含んだ土壌試料については、採集土壌の入ったバッグの口を室内で1日間開け、土壌試料中の余剰な水分を蒸発させた。採集期間中の数日間は設備上の制約から室温で保管し、その後は4℃の低温室に保管した。プロットK1、LD1、HD1のそれぞれ10地点から採集された土壌に、それぞれK1〜K10、LD1〜LD10、HD1〜HD10と試料番号を割り当てた。

2) 全炭素量・全窒素量: 全炭素量および全窒素量を、土壌環境分析法¹⁶⁾にしたがい、NCアナライザー・スミグラフ (住化分析センター、大阪) とガスクロマトグラフィGC-8A (島津製作所、京都) を用いて測定した。

3) 土壌環境分析法¹⁶⁾にしたがい、土壌抽出液中のセルラーゼ活性、アミラーゼ活性、フォスフォモノエステラーゼ活性を測定した。

4) DNA抽出: 各土壌試料1.0 gからDNAを2連で抽出した。抽出及び精製には、ISOIL for beads beating (日本ジーン、富山) を用いた。

5) PCR-DGGEおよびT-RFLP (全細菌): 土壌から抽出したDNAを鋳型とし、16S rDNAの部分配列を、サーマルサイクラーGene Amp® PCR System 2700 (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用いてPCR増幅した。プライマー357F-520Rの組み合わせは16S rDNAのV3領域の増幅に用い、その産物をDGGE解析に供試した。プライマー968F-1494Rの組み合わせはV6-V8領域の増幅に用い、その産物をT-RFLP解析に供試した。DGGEのためにGC-clamp¹⁷⁾を357Fに、またT-RFLPのために5末端蛍光ラベルD4 Beckman dye (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) を968Fに付加した。プライマー配列を表2-1に示す。反応液は10 x bufferを5 µL を含めて総量50 µLとし、dNTP、BSA、フォワードプライマー、リバープライマー、およびAmpliTaQ Gold® DNA polymeraseの終濃度がそれぞれ200 µM、500 µM、500 pM、500 pM、および0.1 U/µLとなるように設定して添加し、鋳型DNAを適量添加したのち、滅菌蒸留水で定容とした。PCRサイクルは、初期の変性を94° Cで10分行い、続いて94° Cで30秒の変性、58° Cで30秒のアニーリング、72° Cで30秒の伸長反応を30サイクル繰り返し、最後に72° Cで7分の伸長反応を追加した。PCR産物はWizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega、Madison、WI、USA) を用いて精製した。

DGGEはD-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad、Hemel Hempstead、UK) を用いた。ゲルは8%アクリルアミドを用い、変性剤濃度勾配は30-60%とした。各レーンに500 ngのPCR産物を供した。DNA濃度はUV spectrophotometer, NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies、Wilmington、DE、USA) を用いて測定した。泳動は1 × TAEバッファー中で、60℃、100 Vにて、8時間行った。泳動後、ゲルをSYBR® Green I (BioWhittaker Molecular Applications、Rockland、ME、USA) にて染色し、イメージスキャナーEpi-Light UV FA 500 system (Yamato Scientific、

上記と同様の方法で、アンモニア酸化細菌 (ammonia oxidizing bacteria、これ以降AOBと略す) および放線菌を標的としたDGGE解析を行った。AOBおよび放線菌の16S rDNAを標的とする特異的プライマーCT0189F-CT0654R¹⁸⁾ および273F-A3R¹⁹⁾を用いて第一段階のPCRを行った。プライマーの配列を表2-1に示す。CT0189F-CT0654Rは、一部の例外を除く*Betaproteobacteria*綱に属する既知のAOB

の16S rDNA部分配列を特異的に増幅できる²⁰⁾。また、243F-A3Rは土壌由来の放線菌の大部分を特異的に増幅できる¹⁹⁾。反応液組成は前述の通り。PCRサイクルは、前述のPCR-DGGEの際のサイクルに以下の変更を加えた。1) AOBを標的とする特異的プライマーCT0189F-CT0654Rを使用する反応では、アニーリング温度を55° Cに、伸長反応時間を45秒に設定し、また2) 放線菌を標的とする特異的プライマー273F-A3Rを使用する反応では、伸長反応時間を90秒に設定した。PCR産物は1%アガロースゲルで泳動し、正しいサイズのDNAバンドを切り出した。切り出したPCR産物はWizard SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega、Madison、WI、USA) を用いて精製し、続くPCRの鋳型DNAとした。第二段階のPCRでは、全細菌を標的としたPCRと同じプライマー357F-GC-520Rを用いてPCRを行い、上述した方法で精製し、DGGEに供した。ゲルは8%アクリルアミドを用い、変性剤濃度勾配はAOBと放線菌に対して、それぞれ30-65%及び30-65%または40-60%とした。その他はすべて上述と同様である。

7) 培養可能なガラクトツロン酸資化細菌の数と組成

HD1区の3地点 (HD6、HD7、HD8)、LD1区の3地点 (LD3、LD5、LD7)、およびK1区の3地点 (K3、K5、K7)、以上合計9地点の土壌それぞれ50gを、水分量を最大容水量の60%に調整し、30°Cで2週間前培養した。土壌5gずつを滅菌蒸留水45mLに加え、1分間激しく振とうした。液体部分を直ちに採取し土壌懸濁液原液とした。これを、適宜滅菌蒸留水で希釈し、希釈土壌懸濁液とした。希釈率が 10^3 倍、 10^4 倍の希釈土壌懸濁液を、ガラクトツロン酸を単一炭素源とする平板寒天培地（以下、ガラクトツロン酸培地；組成を表2-2に示す）にそれぞれ100 μ L塗布し、30° Cで2週間培養した。ガラクトツロン酸培地に出現したコロニー形成数を計測し、あわせて、各プレートからそれぞれ無作為に約30コロニーを単離した。単離したコロニーは1/10NB平板寒天培地に植え継ぎ、純粋株とした。単離したコロニーを爪楊枝で微量採取し、これを鋳型DNAの代わりにPCRに供した。プライマー27F-1525Rの組み合わせを用い、16S rDNAのほぼ全長を増幅した。プライマーの配列を表2-1に示す。PCRサイクルはPCR-DGGEの際のサイクルと同様、また反応液組成は前述の通りである。

上記のPCR産物を鋳型とし、16S rDNAのV6～V8領域を含む約450 bpの塩基配列を、タカラバイオ・ドラゴンジェノミクスセンター（四日市）へ委託して解読した。得られた塩基配列と近縁な既知細菌の検索は、Blastプログラム²¹⁾を用いた。必要に応じ、Clustal W²²⁾にてアライメントを作成し、ギャップ部位および多重置換部位を除去後、乱数シード値を111、ブートストラップ試行数を1000として近隣結合法により系統解析を行った。これらの結果から属レベルの同定を行った。

表2-2 ガラクトツロン酸を単一炭素源とする平板寒天培地組成

10×M9塩溶液		100 mL	
Na2HPO4	60 g	1 M MgSO4	1 mL
KH2PO4	30 g	50% ガラクトツロン酸 一水和物	5 mL
NaCl	5 g	1% 塩酸チアミン	1 mL
NH4Cl	10 g	1M CaCl2	0.1mL
滅菌蒸留水	1000 mL	寒天	15 g
1 M MgSO4	1 mL	滅菌蒸留水	890 mL

8) 培養可能なガラクトツロン酸資化細菌の数（2回目）

ガラクトツロン酸資化細菌のコロニー形成数をプロット間で比較するためには、プロットにつき3地点の土壌を用いた計測結果では不十分であると考えられたため、さらに土壌試料を増やして実

験を行った。プロットK1、LD1、HD1から、先の3サンプルずつに加えてK1、K4、K9、LD1、LD4、LD6、HD1、HD2、HD9を加え、各プロットそれぞれ計6サンプルを用いた。上記と同様にしてコロニー形成数を測定した。

(3) 菌根菌の調査

1) サンプリング

火災の被害を受けていないフタバガキ林に設置された1ha方形区（K1、K2）、軽度の火災被害を受けた森林に設置された1ha方形区（LD1、LD2）および、重度の火災被害を受けた場所に設置された1ha方形区（HD1、HD2）を調査地とした。2005年9月（乾期）にはK1、K2、LD1、HD1の4つの方形区から各50カ所、合計200カ所の土壌サンプルを採取した。土壌サンプリングは方形区の10m格子点付近で地表10×10cmの範囲からリター層とA層を掘り採ることで行った。2007年2月（雨期）には、K1、K2、LD1、LD2、HD2の5つの方形区内から各50カ所（LD1は52カ所）のサンプリングを行った。前回のサンプリングの影響を避けるため、前回とは異なる10m格子点付近で行った。また、日本への輸送のためサンプルサイズを地表5×5cmに小さくした。さらに、無被害林での外生菌根菌の多様性についてより広い範囲の情報を得るため、約1.4kmの遊歩道沿いに55カ所で同様のサンプリングを行った（図2-4） 重度被害区での土壌サンプル中には菌根ほとんどないことから、被害地での外生菌根菌群集についての情報を得るため、方形区周辺で萌芽更新しているフタバガキ科樹木(*Cotylelobium melanoxydon*) 24個体から長さ15cm程度の根系を採取した。合計すると2007年は331箇所からサンプリングを行った。



図2-4 土壌サンプルの採取位置。 図中のフラッグが広域調査の採取位置を表す。赤で示した各1haプロットからも土壌サンプルを採取した（詳細は本文参照）。

2) 菌根の観察

採取した土壌サンプル中に含まれる根を丁寧に洗い出し、外生菌根の有無を実体顕微鏡下で観察して記録した。また、2007年の331の土壌サンプルについては、外生菌根の色、菌鞘の構造、分岐形状、菌糸束などの特徴によって類別し、形態タイプごとに菌根数を数えた。各土壌サンプルの各形態タイプに含まれる菌根数の約1/10数（ただし最大反復数は10までとした）の根端を選び、別々のマイクロチューブに置いて真空乾燥し、DNA解析試料とした。

3) DNAによる菌種同定

DNA抽出・解析は既報¹³⁾の手法に準じて行った。概略を述べると、乾燥した外生菌根からCTAB法によってDNAを抽出し、蛍光標識したITS1f(Beckman dye D4)およびITS4(Beckman dye D3)プライマーによってrDNAの5.8Sとinternal transcribed spacer (ITS) 領域をPCR増幅した。なお、このITS領域は菌種レベルの識別をするのに最適な領域で、多くの研究で利用されており、塩基配列の登録も多い。PCR反応にはQiagen Multiplex PCR kitを使用し、標準プロトコルに従った。増幅したPCR産物はHinfIとAluIで制限酵素処理を行い、純水で希釈して濃度調整した後、キャピラリーシーケンサー(Beckman CEQ8800)によりterminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP)解析を行った。

各土壌サンプルの各TRFLPタイプから1つずつ菌根サンプルを選び、蛍光標識していないITS1f、ITS4プライマーでPCR増幅し、精製 (PCR products pre-sequencing kitを利用) した後、ダイレクトシーケンス(Beckman DTCS kitで反応後、CEQ8800で解析)を行った。シーケンシングプライマーにはITS1およびITS3(逆方向のITS4も場合によって利用)を用いた。個体内におけるrDNAコピー間の多型によってダイレクトシーケンスが困難な場合は、クローニングを行った後 (Novagen pT7Blue Perfectly Blunt Cloning Kitを利用)、シーケンシングを行った。合計で1240の菌根サンプルについてTRFLP解析を行い、ダイレクトシーケンスによって187、クローニングによって124のサンプルの塩基配列情報を得た。得られたシーケンスデータはATGC(Genetyx co.)によってコンセンサスシーケンスを構築し、ホモロジーが95%以上のものを同一種と見なした。識別された個々の菌種について、国際塩基配列データベースおよびUNITE²³⁾に登録された既知の菌種とBlast検索を行い菌種の同定を行った。

4) 統計解析と系統解析

サンプリングによって検出された菌根菌の種数が実在する種数のどれくらいの割合をカバーしているのかをサンプル数-積算種数曲線によって評価した。また、実在する種数をJack-knife法によって推定した。一土壌サンプルあたりの菌根菌数については調査区 (各1haプロットおよび広域調査、*Cotylelobium*) を説明変数として一元配置分散分析とテューキーの多重比較を行った。菌根菌群集構造については相対優占度-優占順位曲線によって解析した。

同定された菌根菌種のうち、優占するグループについて分子系統解析を行った。本研究で得られた配列と既知の配列をMEGAによってアラインメント(マルチプルアラインメントの設定はGap penalty: 3.0、gap extension penalty: 1.8)を行い、近隣結合法によって系統樹の作成を行った。

4. 結果・考察

(1) 土壌の理化学性への森林火災の影響

1) 模擬火災実験における熱・水・物質移動

一般に、森林火災時の土壌表面温度は200～300℃、激しい火災では500～700℃に達するが²⁴⁾、火災中の土中温度についてはよく分かっていない。そこで、本模擬実験における土壌中の温度分布を測定したところ、地表における燃焼加熱中、地表面温度は600～700℃まで達した。図2-5 は初期水分(θ_i)が0.32の時の各深さの温度の時間変化である。このとき、土壌温度は、上昇開始後100℃付近で温度上昇がしばらく停滞した後に、再度急な温度上昇を示した。参考のために豊浦砂 $\theta_i=0$ の場合で同様の実験を行ったところ、こうした温度上昇の停滞は見られなかったことから、温度上昇の停滞は土中水の蒸発潜熱の消費のためと考えられる。次に、 $\theta_i=0.32$ における温度分布の経時変化を図2-6に示す。図2-5で、温度が約100℃の時に温度変化が停滞する傾向が明らかになったが、燃焼時間が長くなると土壌温度100℃前後の層も厚くなった(図6-6)。図2-7に、模擬火災実験における燃焼後の炭素含有量と窒素含有量の分布を示す。土壌温度100℃以上に上昇する層内では、有機物の燃焼等に伴う炭素量と窒素量の低下が見られた。

温度が100℃以上になる深さは、 $m\sqrt{t}$ (ここで、 m は定数、 t は加熱時間(min)) という式でうまく表現されたので、これを”地温100℃前線”と称する。 m は、土の粒径や有機物含量、乾燥密度、

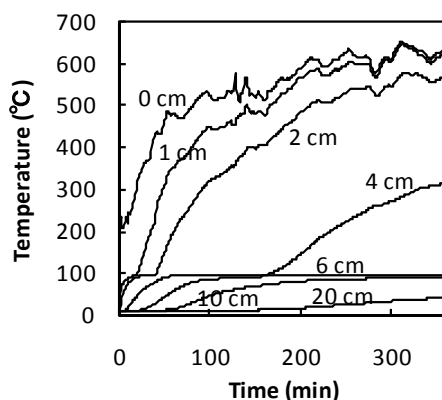


図2-5 初期水分 $\theta_i=0.32$ の時の燃焼加熱中の土壌温度変化

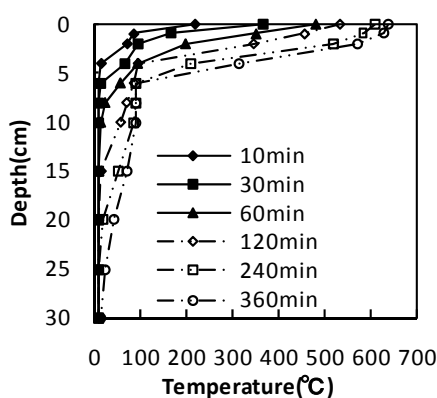


図2-6 温度分布の時間変化 ($\theta_i=0.32$)

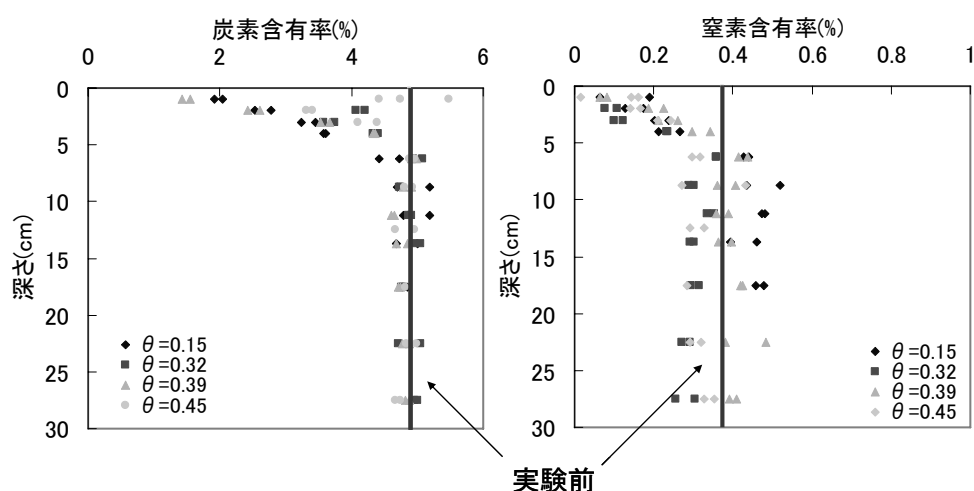


図2-7 模擬火災実験における燃焼後の炭素含有量(左)と窒素含有量(右)

水分量等によって決まる定数で、特に水分が高くなると m は小さくなる(体積含水率0.15, 0.4の時に m は、それぞれ0.4, 0.2)。たとえば、初期体積含水率が0.4の時、地表面温度600℃程度で48時

間燃え続けた時の”地温100℃前線”は深さ10cm程度であると予想される。樹木の萌芽再生がこれよりも深い層で起きる場合は、森林火災後に萌芽再生による植生回復が速やかに開始すると期待できる。

2) 森林火災重度被害区(HD区)、軽度被害区(LD区)、無被害区(K区)の土壌特性

図2-8に、土性の分布を示す。HD1区では表層から10cmまで、LD1区では表層から5cmまで、K1区では表層から3cm、K2区では表層から13cmまで、根が密集するルートマットが存在した。HD1区では10～30cmが砂分80%程度の白色砂質土で、30cm以深に灰褐色のSandy loamが存在した。LD1区では、5cmより下に褐色のSandy clay層、その下に黄褐色のSandy clay loamが存在した。K1区では3～50 cm程度まで黄色のSandy Clay loamが、50 cm以深では褐色のSandy clayが見られた。K2区では、13～30 cmの深さに、HD区と同様に白色砂質土が存在した。土性はHD区の白色砂質土層とは異なり、Loamy sandであった。

図2-9に飽和透水係数の深さ方向への分布を示した。飽和透水係数は、土性と対応し、砂質土層では約 10^{-2}cm s^{-1} で大きく、粘質土層では約 10^{-4}cm s^{-1} と、小さかった。

図2-10に土壌の化学性を示す。pHは全体的に低かった(3.5～4.5)が、HD区のみ他のピットと比べて高かった(4.5～5.5)。このことは、火災時に生成した灰によるpHの上昇⁴⁾をとらえていると見ることができる。ECの値は小さく、特にHD区のEC値が小さかった。HD区とLD区では、深さ10-15 cmにpHのピークが観察されたが、これらの区では、灰中のアルカリ金属およびアルカリ土類金属の溶出がpHの上昇に寄与していると考えられる。全炭素の分布(c)は、HD区の深さ20 cmから30 cmにかけて全炭素が著しく上昇している。また、全炭素の上昇とともに、後述する撥水性の上昇が見られた。このことは、全炭素の増加が火災時に生成された炭化物の土中の移動による可能性、すなわち森林火災下での土壌中の有機物質移動を示唆している。なお、HD区の深さ10cmから地表面にかけて全炭素、全窒素およびECが増加傾向にあるが、これは地上植生の回復に伴い、土壌への有機物の供給が集積しているためと考えられる。

土壌の撥水性は、調査区を問わず、全炭素含量の高い土層で著しい撥水性を示した。K1区、LD1区では褐色でpHが4程度と低く、粘土集積層が観察され、温暖湿潤な気候で風化が進んだ土壌であるUltisolsに分類されることが分かった。一方、HD区、K2区では白色砂質土壌を含む特殊土壌で、カリマンタンでよく見られるKerangas林に特徴的な土壌である。

3) 調査地区全域の土壌分布

当該地区では、火災影響と土壌の面的分布とが錯綜してあらわれていると推察されたので、K1区からHD区までの直線上での土壌分布を調べた(図2-3)。その結果、暗褐色A層、褐色(10YR 5/6)B層、粘土集積の下層という類似したUltisolsの分布が支配的であり、この地区では、白い砂層はごく一部の分布にとどまることが分かった。

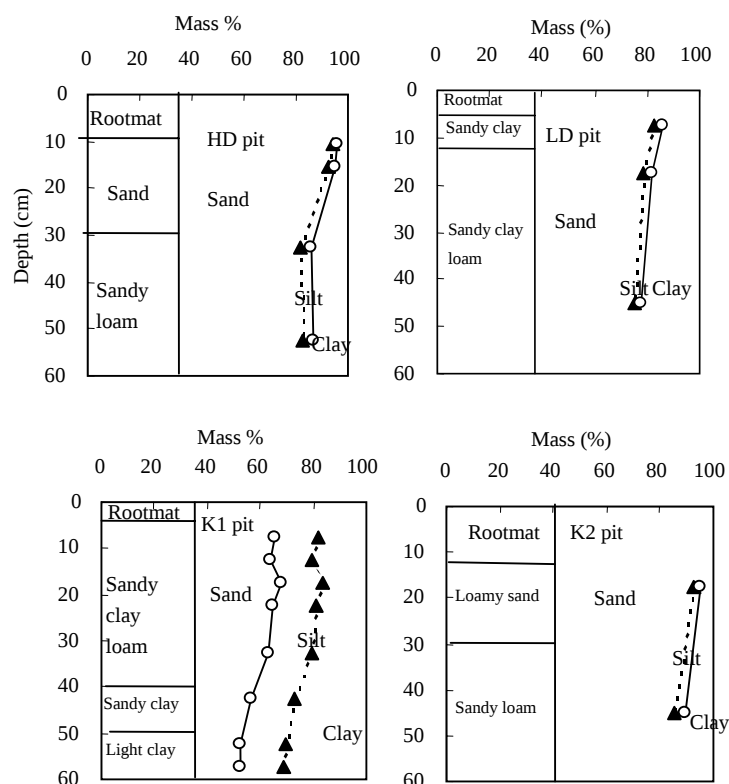


図2-8 重度被害区(HD1)、軽度被害区(LD2)、無被害区(K1、K2)における土性の分布

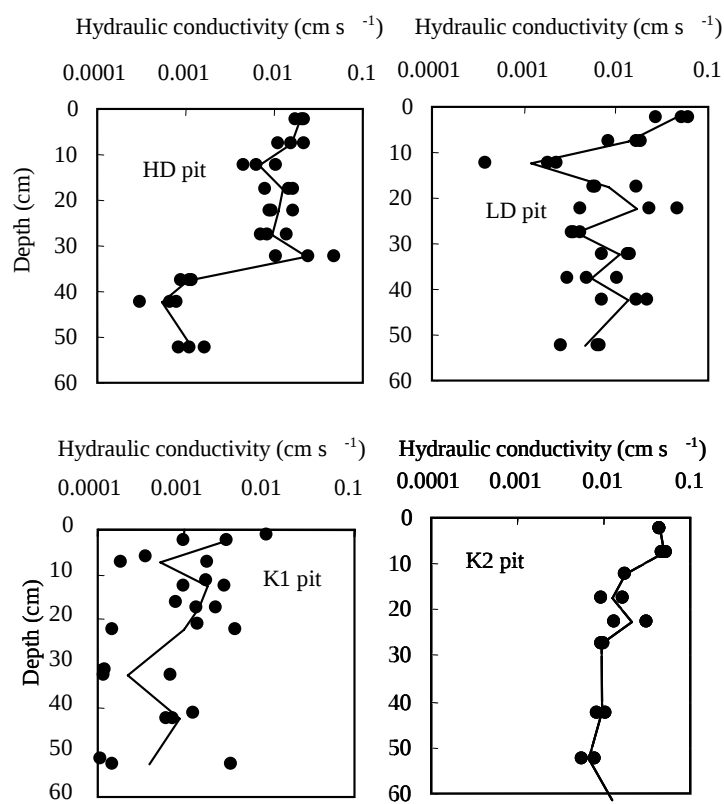


図2-9 重度被害区(HD1)、軽度被害区(LD1)、無被害区(K1、K2)における飽和透水係数の分布

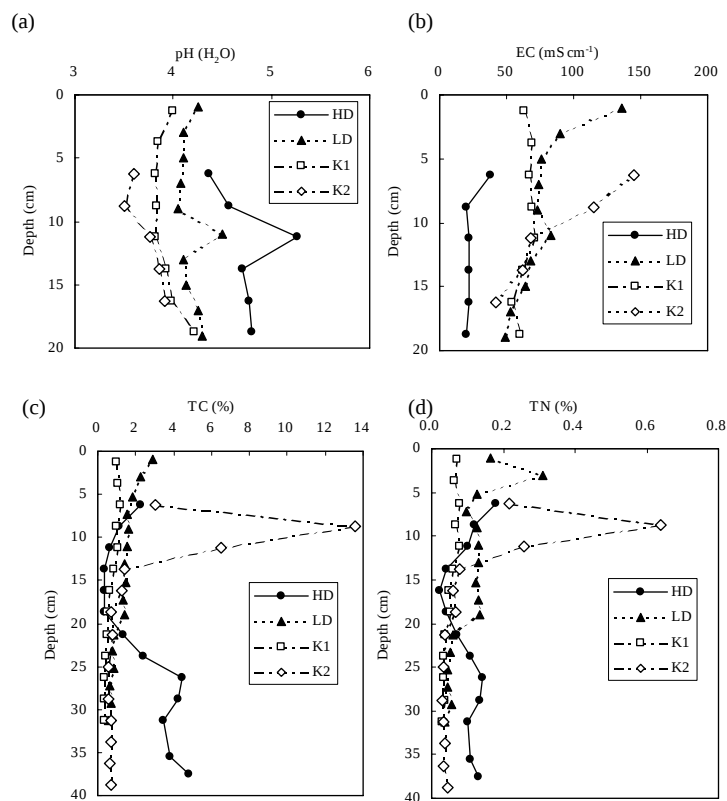


図2-10 重度被害区(HD1)、軽度被害区(LD1)、無被害区(K1、K2)における土壌化学性；a pH、 b EC (1:5法)、 c 全炭素 d 全窒素

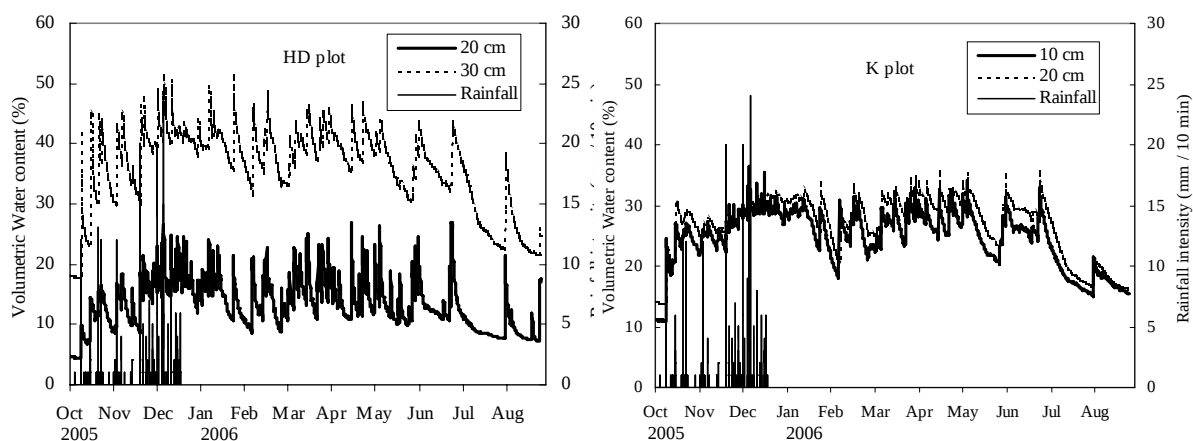


図2-11 HD区、K1区における土壌水分量と降水量（2005年12月20日以降の降水量データは欠損）

4) 土壌水分の長期変動

図2-11にK1区とHD区に埋設した1年間の土壌水分量の変化を示す。HD1区では下層の土壌水分計のみ飽和した。現地の雨量計で観測された最大降雨強度は $24\text{ mm}/10\text{ min}$ ($4.0 \times 10^{-3}\text{ cm s}^{-1}$)であり、HD区上層は砂質であるため透水性が高く、飽和透水係数はこの値を上回るため(図2-9)、降雨時にも飽和に至らなかったと考えられる。また、乾季の5月から9月にかけて土壌水分量が低下している。K1区とHD1区における土壌水分変化の差は、火災影響の有無によるというよりは、土性の差に

由来するものと考えられた。すなわち、HD1区では透水性が高く保水性が低い砂質土が存在するために、K1区と比べて年間を通して土壌が乾燥した状態となっている。

(2) 土壌細菌

1) 土壌の性質

熱帯アジアの大部分の土壌は酸性で貧栄養なUltisolsであるとされている。本調査区の土壌も上述のようにUltisolであると判定され、全ての調査区で土壌pHは4程度であった。土壌細菌調査を行った地点で深さ約30cmまでの土壌断面には、比較的薄いA層と均一なB層が認められた。A層は1～5cmの深さの褐色土壌で、植物根や落ち葉といった粗大有機物が多く混ざり、表面のリター層とA層との区別は困難であった。B層はA層より色が薄く、灰色～黄土色の均一な土壌で、植物根を除けば粗大有機物は混入していないことが多かった。母材となる土壌鉱物は、白色の石英砂に褐色の粘土が混ざったもので、粘り気が少なくさらさらしていた。2006年8月に採集された土壌の炭素含有率、窒素含有率、およびCN比を図2-12に示す。一般的な森林土壌のデータ²⁵⁾と比較し、これらの数値に特筆すべき点は認められなかった。また、同一プロット内であっても土壌採集地点によって数値が異なり、過去の火災被害度と現在のこれらの数値との関連は認められなかった。

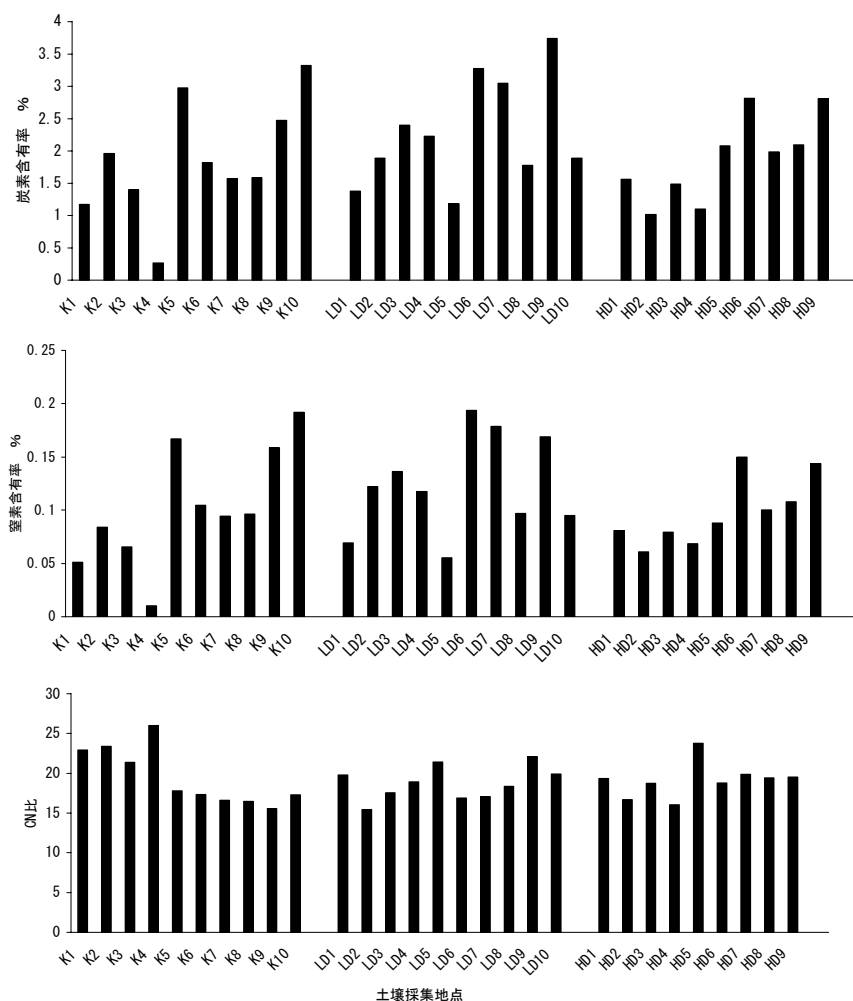


図2-12 2006年採集土壌（A層）の全炭素含量、全窒素含量、およびC/N比

K、LD、およびHDで始まる地点名は、それぞれプロットK1、LD1、およびHD1区の内部にある

2) 土壌酵素

2005年に採集された土壌の土壌酵素活性の測定結果を図2-13に示す。セルラーゼ活性及びアミラーゼ活性は全体として調査区間に大きな差はなかったが、プロットHD1のいくつかの採取地点で高かった。フォスホモノエステラーゼ活性は、採取地点ごとの差が大きく調査区を特徴づける一定の傾向は見られなかった。

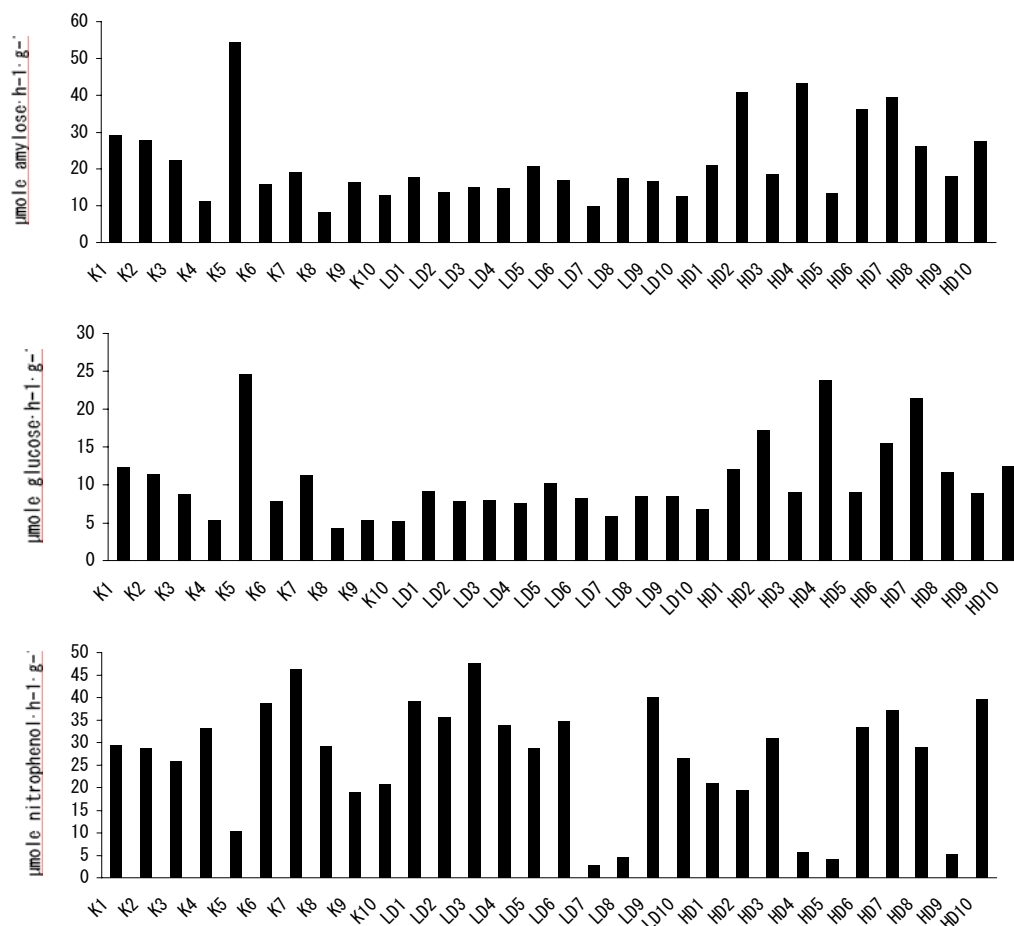


図2-13 土壌酵素活性（上からアミラーゼ活性、セルラーゼ活性、ホスホモノエステラーゼ活性）
横軸のラベルは土壌の採取地点を表し、K、LD、およびHDで始まる地点名は、それぞれK1、LD1、
およびHD1区の内部にある

今回測定した土壌酵素は植物遺体に由来する成分との関係が深く、植物種ごとに分布状況が多様であることが、採取地点によって差が大きかった原因の1つであると考えられる。またセルラーゼ活性及びアミラーゼ活性がHD1区のいくつかの採取地点で高いが、植生遷移の過渡期にあるHD1においては、同じ区内であっても場所によっては物質循環の流れが他所より大きくなっている可能性が考えられる。

3) PCR-DGGE解析に基づく全細菌の群集構造

2006年に採集した各プロットの土壌試料に含まれる全細菌のDGGEの結果からバンドの位置と有無に基づいてクラスター解析を行い、得られたデンドログラムから、前述の方法でプロットK1からK1、K3、K4、K5、K7、K9を、プロットLD1からLD1、LD3、LD4、LD5、LD6、LD8を、プロットHD1

からHD1、HD2、HD3、HD7、HD9、HD10を平方距離に基づいてそれぞれ抽出した（計18サンプル）。同様に2007年に採集した各プロットの土壌試料については、プロットK1からK1、K2、K5、K6、K7、K9を、プロットLD1からLD1、LD2、LD4、LD5、LD6、LD7を、プロットHD1からHD1、HD3、HD5、HD6、HD8、HD9を平方距離に基づいてそれぞれ抽出した（計18サンプル）。

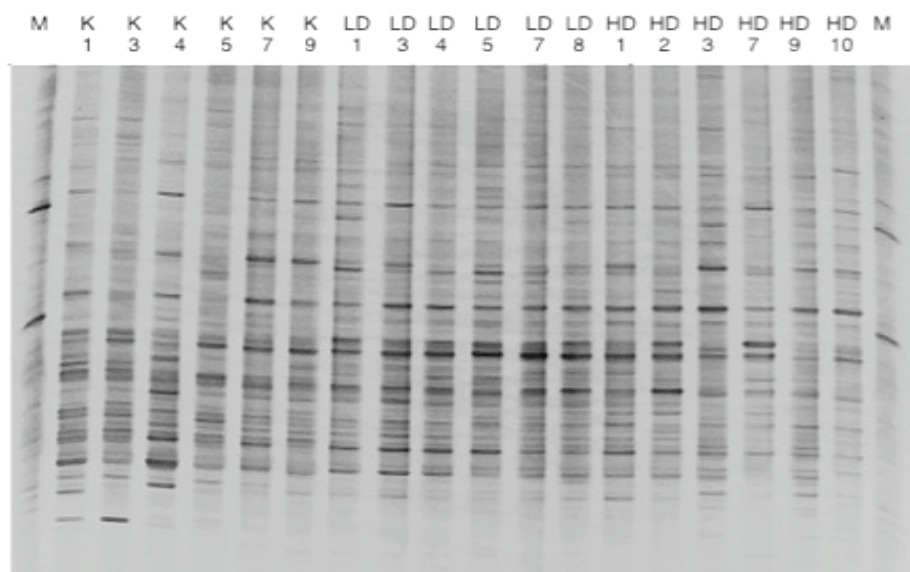
2006年および2007年に採集した土壌試料から抽出された3プロット由来の計18サンプルのDGGEプロファイルをそれぞれ図2-14A、図2-15Aに示す。これらのプロファイルにおいて、バンドパターンはサンプル間で類似しており、多くのバンドが3つのプロットにわたって、全てまたはほぼ全てのサンプルで検出された。DGGEでは全DNAの0.1～1%程度まで濃度勾配ゲルにおいて検出できるとの見積もりがある^{26) 27)}。したがって全細菌を標的としたDGGEパターンは、群集全体の0.1～1%程度以上を占める優占細菌相を表すことになる。つまり、DGGEプロファイルから、プロットの違いに関係なく優占細菌が共通していることが明らかになった。

2006年、2007年のDGGEプロファイルに基づくデンドログラムをそれぞれ図2-14B、図2-15Bに示す。2006年のデンドログラム（図2-14B）は、プロットK1のサンプルからなるクラスターK1及びクラスターK2、主にプロットLD1（一部、プロットHD1）のサンプルからなるクラスターLD-HD、プロットHDのサンプルからなるクラスターHDの4つのクラスターに分けられる。被害区のサンプルからなるクラスター（クラスターLD-HD）がまとまって大きなクラスターを形成し、無被害区のサンプルからなるクラスターK1およびK2は、それと離れたところに位置し、独立していることから、被害区と無被害区の群集構造に差異があるように考えられる。その一方で、平方距離から、クラスターK1はクラスターHDと最も近く、続いてクラスターLD-HDと近く、クラスターK2と最も離れたところに位置している。すなわち、プロットK内の群集構造の差異はプロット間の差異より大きい。同様に2007年のデンドログラム（図2-14B）は、クラスターK、主にプロットLDのサンプルからなるクラスターLD、プロットHDのサンプルを多く含むクラスターHD-K-LDの3つに分けられる。プロット間である程度は群集構造に差があるように考えられるが、クラスターHD-K-LDにはプロットKのサンプル（K1、K2）が含まれ、プロットと群集構造は完全には対応していない。以上から、2006年および2007年採取土壌の全細菌の群集構造は、火災の直接の影響程度あるいは現在の植生の差異に対応している傾向が示されたが、プロット間の差は明瞭ではなかった。

一方、このクラスター解析においては、バンドパターンの差のみがデンドログラムの形状を決定しており、その共通性については考慮されない点に注意が必要である。たとえば、全サンプルに共通するバンドが1本しかなくても30本あっても、同じデンドログラムが得られる。2007年度の土壌試料においてプロットKのサンプルでは32～42の、プロットLDのサンプルでは36～45の、プロットHDのサンプルでは33～37のバンドが検出された。そのうち28のバンドが15サンプル以上で共通に検出された。つまり、優占細菌の群集構造のプロット間差異は非常に小さいと考えられる。

土壌細菌群集は、火災の熱による細胞の破壊や増殖能力の喪失によって直接的な影響を受け²⁸⁾、特に表層土壌においてそれが著しいことが知られている²⁹⁾。しかし、本研究の結果から、火災から8～10年経て植生は十分に回復していない一方で、優占細菌の群集構造はほぼ回復しているようであった。

A



B

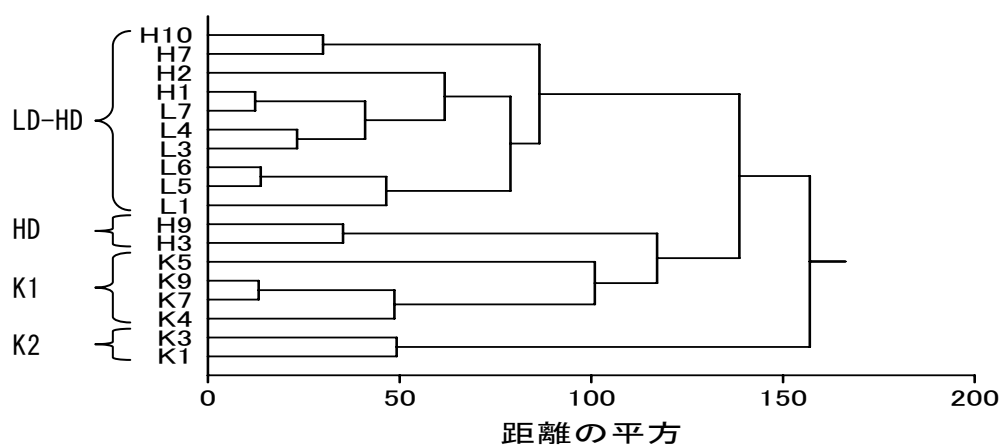


図2-14 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2006年採集のプロットK1、LD1、およびHD1の土壌試料に含まれる全細菌の群集構造。サンプル名のK、LD（またはL）、HD（またはH）はそれぞれプロットK、LD、HDに対応する。MはDGGEマーカー A) DGGEパターン

B) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

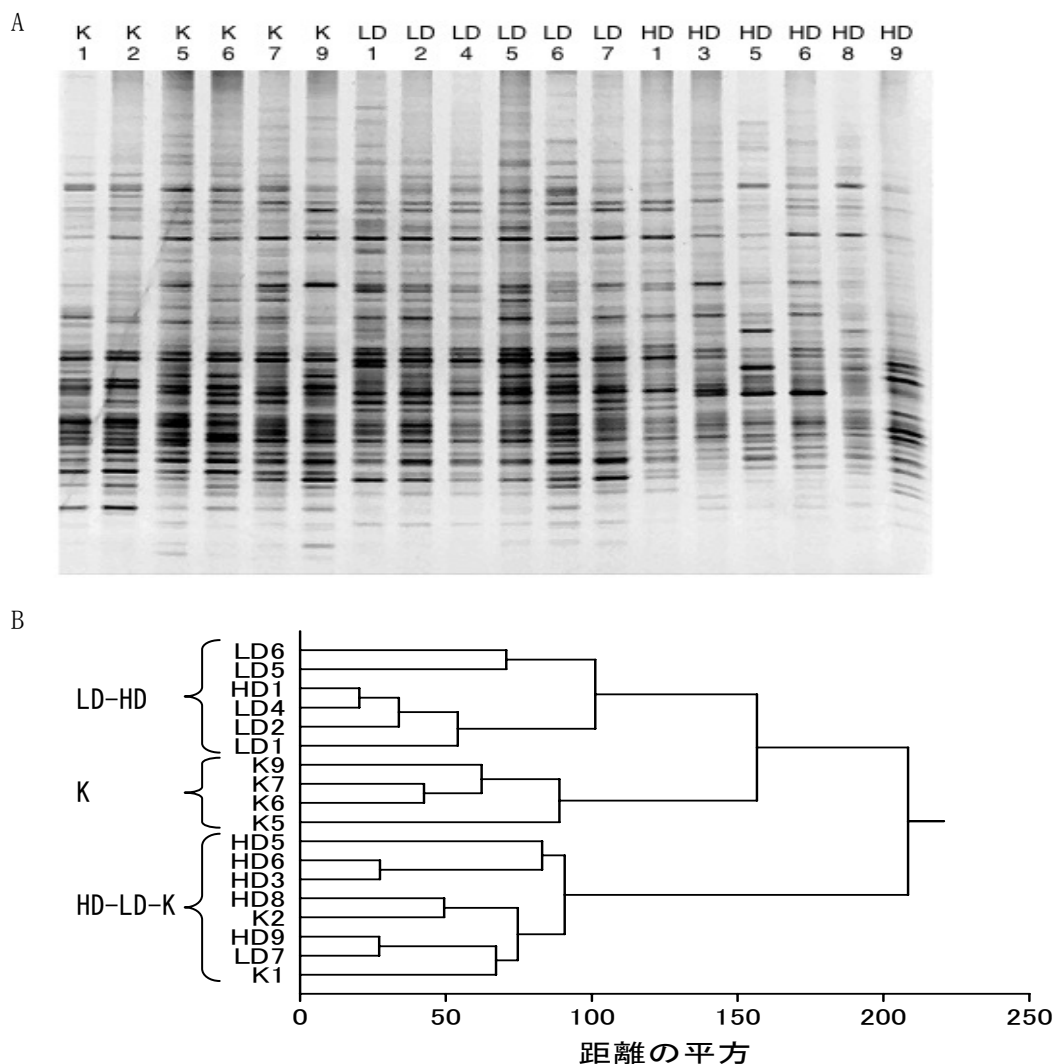


図2-15 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2007年採集のプロットK1、LD1、およびHD1の土壌試料に含まれる全細菌の群集構造。サンプル名のK、LD（またはL）、HD（またはH）はそれぞれプロットK1、LD1、HD1に対応する。MはDGGEマーカー、A) DGGEパターンB) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

4) T-RFLP解析に基づく全細菌の群集構造

2006年に採集した全てのプロットの土壌試料に含まれる全細菌の制限酵素*Hae* III を用いた末端制限断片（T-RF）プロファイル（図は省略）は、全てのサンプルで酷似しており、ほとんどのピークが全プロットの全サンプルで認められた。すなわち、DGGE解析結果と同様、プロットの区別と関連なく、多くの優占細菌が共通していることが示された。制限酵素*Msp* I、*Sau*3A I を用いたT-RFLP解析はピークの検出数が少なく、サンプル間の差が*Hae* III を用いた解析に比べてさらに小さかったため、*Hae* IIIを用いたT-RF プロファイルのみを解析した。また、T-RFプロファイルから制限酵素切断長に基づく分類群の推測を試みたが、全サンプルで検出された多くのピーク全てにおいて、1本のピークに数多くの細菌種が登録されており、推測するにはいたらなかった。一方、T-RFプロファイルに基づくデンドログラム（図は省略）では、DGGE結果に基づくデンドロ

グラムと異なり、プロットの区別に対応するクラスターは形成されなかった。また、DGGEで検出されたバンド数が40程度だったのに対し、T-RFLPのピーク数は25程度と少なかった。DGGEとT-RFLPの両方を用いた細菌群集の解析に関する研究は数多く行われている³⁰⁾³¹⁾³²⁾。それらの研究によると、供されるサンプルと用いる制限酵素によって、どちらの手法が適しているかが異なるようである。本研究で使用した3つの制限酵素は、他の同様の研究においてもしばしば使用されており³³⁾³⁴⁾³⁵⁾、また制限酵素の種類と16S rDNA断片長のシミュレーション結果³⁶⁾からも、これらの制限酵素は細菌群集の差を検出しやすいものと考えられる。これらを考慮すると、本研究でDGGEよりT-RFLPの分解能が低かった理由は、選択した制限酵素によるものではなく、供試サンプルの性質によるものと考えられる。よって、これ以降の細菌群集の解析にはDGGEのみを適用した。

5) 優占細菌相の回復

本研究の現地調査時点で、プロットLDおよびHDでは、2001年と比べて樹木の現存量と種数は大きく増加し、森林が再生しつつある一方、植物群落の構成種や森林の構造上の特徴などについては、サブテーマ（1）に示されたようにプロットLDおよびHDはプロットKと大きく異なっていた。つまり、プロットLDおよびHDの植生は、2001～2002年の調査時と2006～2007年の調査時との間で大きく変化した、依然として無被害区と同レベルには回復していないことになる。

一方、環境省地球環境研究総合推進費の助成を受けて行われた研究（E-2「森林火災による自然資源への影響とその回復の評価に関する研究」平成12年度～14年度）によって、本研究と同じフィールドにおいて火災から4～5年後の2001年と2002年に、すでに3つのプロットに共通の細菌分類群が優占していることが示されている。以上を考慮に入れると、火災から4～5年後のプロットK1、LD1およびHD1の土壌に見られた優占細菌の群集構造の共通性は、その後の植生の変化の影響を受けずに保たれていると言える。2001～2002年の調査時と本研究では実験手法の一部が異なることや、異なるゲル上のDGGEプロファイルの比較が困難なことから、その結果を単純に比較することは適切ではないが、DGGEの全バンドに占める共通バンドの割合を考えると、本研究の時点の方が、群集構造のプロット間の差異がより小さくなっていると考えられた。

微生物は、分類群や生活様式によって火災後の回復の速度が異なると考えられる。本研究課題で調査対象となった他の微生物（木材腐朽菌類、外生菌根菌など）と比較して、土壌の優占細菌相の回復は速やかだったと考えられる。ではなぜ優占細菌相は上述の微生物群に先立って回復したのだろうか。理由として、土壌中の優占細菌は増殖力が強いこと（増殖速度が大きいこと、広範な環境条件下で増殖できることなど）が考えられる。また、これらの細菌はどこから火災後の土壌に供給されたのだろうか。本サブテーマの模擬火災実験でも示されたように（図2-5, 6）火災による土壌への熱の影響はほぼ表層に限られ、下層に伝わりにくいため²⁹⁾、様々な細菌群が下層で生き残り、火災後の土壌への細菌供給源となっていたことが考えられる。また、風によって近隣の地域から運ばれてくる土壌粒子に細菌が付着していることも考えられる。調査区には小型～大型哺乳類の進入も目撃されていることから、それらが細菌を含む土壌や植物片を運ぶ可能性もある。それらに加えて火災直後には、植物や植物根の燃焼により炭素・窒素源となる基質が土壌に多量に放出されるため³⁷⁾、上記の理由で進入した土壌細菌は、それらを利用して速やかに回復しやすいと考えられる。

6) PCR-DGGE解析に基づくA0Bの群集構造（プロット間の比較）

前述の方法で、2006年の土壌試料については、プロットK1からK1、K4、K5、K6、K8、K9を、プ

ロットLD1からLD1、LD2、LD4、LD7、LD8、LD9を、プロットHD1からHD1、HD4、HD5、HD7、HD8、HD10を平方距離に基づいてそれぞれ抽出した（計18サンプル）。同様に、2007年の土壌試料については、プロットK1からK2、K4、K5、K6、K7、K9を、プロットLD1からLD1、LD2、LD4、LD7、LD8、LD9を、プロットHD1からH1、HD3、HD5、HD7、HD8、HD10を平方距離に基づいてそれぞれ抽出した（計18サンプル）。

2006年および2007年に採集した土壌試料から抽出された3プロット由来の計18サンプルのDGGEプロファイルをそれぞれ図2-16Aおよび図2-17Aに示す。サンプル間のバンドパターンの差異は全細菌のバンドパターン（図2-14a、2-15a）と比較して大きく、全てのサンプルに共通するバンドはなかった。DGGEプロファイルに基づくデンドログラムを図2-165Bおよび図2-17Bに示す。2006年のAOB群集構造を示すデンドログラム（図2-16B）では、プロットK1のサンプルのみからなるクラスター（クラスターK）と、プロットLD1およびHD1のサンプルが混在するクラスター（クラスターLD-HD）の2つに大きく分かれていたことから、無被害区と被害区では、土壌中のAOBの群集構造が大きく異なることが示された。2007年のAOB群集構造を示すデンドログラム（図2-17B）では、プロットK1のサンプルのみを含むクラスター（クラスターK1）、主にプロットKのサンプルからなるがプロットLD1由来のサンプルを1つ含むクラスター（クラスターK-LD）、プロットLDおよびHDのサンプルが混在するクラスター（クラスターHD-LD）がそれぞれ独立していることは、2006年と同様の傾向を表している。また2006年のデンドログラムにおいて、クラスターKは2つのサブクラスター（サブクラスターK1およびサブクラスターK2）に明確に分けられ、2007年においては、クラスターK1は他の2つのクラスターから最も離れたところに位置していた。このように、2006年と2007年のいずれの年においても、単一プロット内の平方距離で最も大きな差が見られたのはプロットK1だった。全細菌を対象とした前述の「森林火災による自然資源への影響とその回復の評価に関する研究」（平成12年度～14年度）の結果にも同じ傾向が認められるが、その要因は不明である。

以上のように、無被害区と被害区では土壌中のAOBの群集構造が大きく異なることが明らかとなった。これはAOBの群集構造が火災の直接的な被害から未だに回復していないため、あるいは森林再生の途上にある現在の植生が異なるためと考えられた。全細菌を標的としたDGGE結果に基づくデンドログラム（図2-14B、2-15B）においても類似のクラスター形成の傾向が見られたが、平方距離の大きさから、AOBの方が群集組成のプロット間差異がより大きいことが分かる。

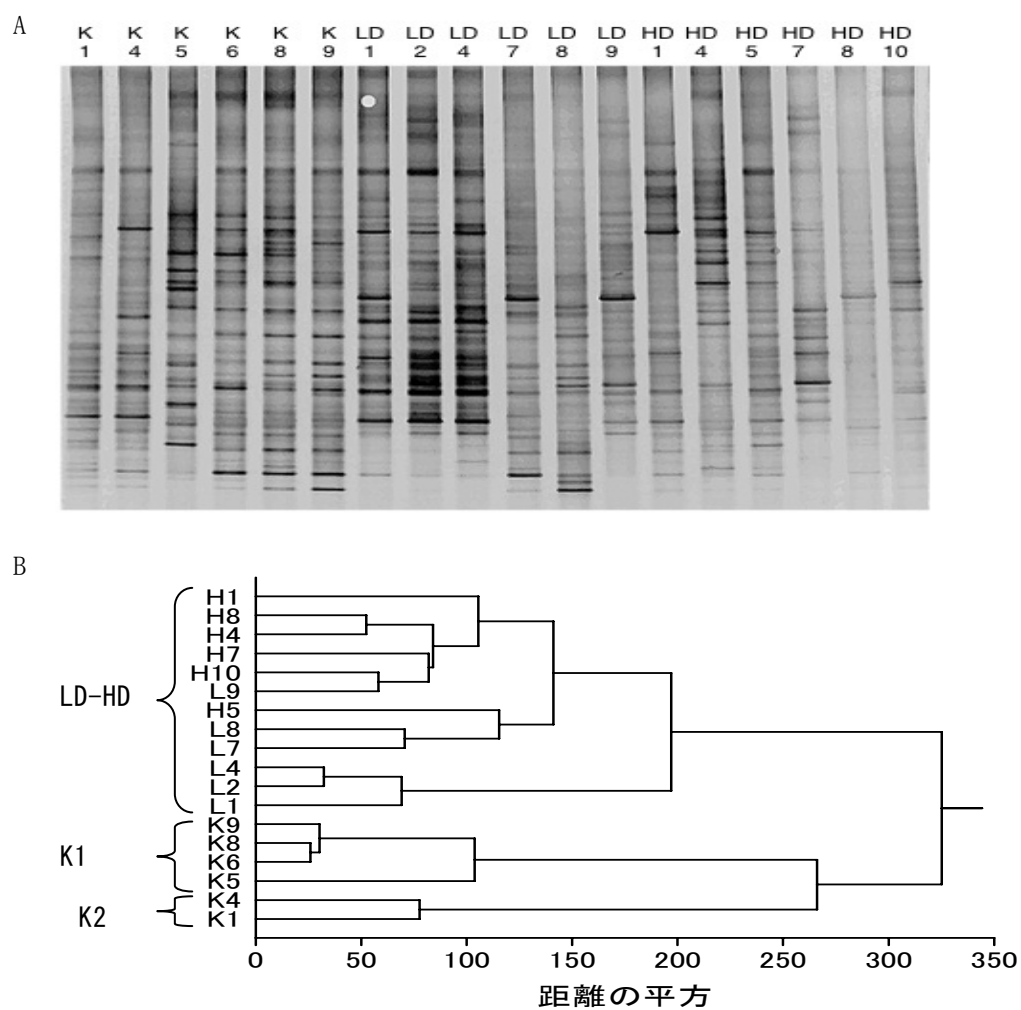


図2-16 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2006年採集のプロットK、LD、およびHDの土壤試料に含まれるアンモニア酸化細菌（AOB）の群集構造。サンプル名のK、LD（またはL）、HD（またはH）はそれぞれプロットK、LD、HDに対応する。A) DGGEパターン B) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

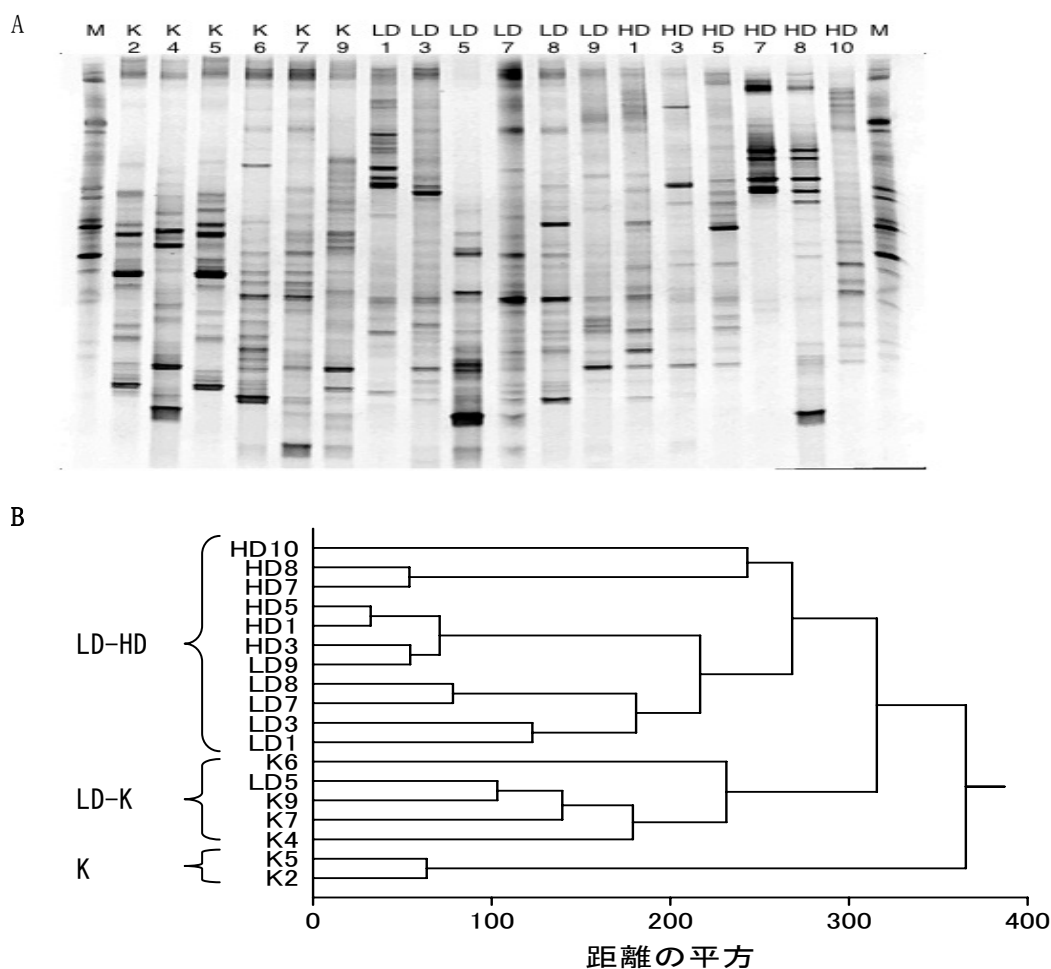


図2-17. 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2007年採集のプロットK、LD、およびHDの土壌試料に含まれるアンモニア酸化細菌（AOB）の群集構造。サンプル名のK、LD（またはL）、HD（またはH）はそれぞれプロットK、LD、HDに対応する。A) DGGEパターン B) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

7) PCR-DGGE解析に基づくAOBの群集構造（近傍の樹種の影響）

2007年には、採集地点近傍の樹種と土壌細菌の群集組成の関連を評価するために、プロット内の *M. gigantea*（森林火災後の先駆種）および *L. firma*（二次林形成種）の付近のそれぞれ3地点（プロットK1）、2地点（プロットLD1）、2地点（プロットHD1）も採集地点に加えた。これら2種の樹木は、3つのプロットすべてに見られる。いずれも火災被害区（プロットLDおよびHD）に多く生育し、無被害区（プロットK）にはきわめて少ない。*M. gigantea*はプロットLDおよびHDの最優占種である。それらを含めたDGGEプロファイルおよびデンドログラムをそれぞれ図2-18A～2-20Aおよび図2-18B～2-20Bに示す。

プロットKのサンプルに由来する図2-18bのデンドログラムにおいて、プロットKの森林を特徴づける樹種ではない *M. gigantea* および *L. firma* の付近の土壌中のAOB群集構造と、プロットK内のその他の地点のAOB群集構造の間に明確な区別は認められなかった。

プロットLDおよびHDのサンプルに由来する図2-19bおよび2-20bのデンドログラムにおいて、*M.*

*gigantea*付近から採集されたサンプルは、それぞれのプロット内の他の地点のサンプルと混合してクラスターを形成している。しかし、この2つのプロットではそもそも *M. gigantea* が最優占しているため、プロット内の多くの地点がその影響を受けている可能性があり、AOBの群集構造と *M. gigantea* の関連を評価するためには、プロットK由来のサンプルと合わせて解析する必要がある。

そのため、3つのプロットから前述の方法で計18サンプルを抽出し、DGGEに供した。そのDGGEプロファイルおよびデンドログラムを図2-21aおよび2-21bに示す。デンドログラムにおいて、プロットLDおよびHD由来のサンプルがまとまってクラスターを形成し、またプロットK由来のサンプルも、特定の樹種の付近の土壌かその他の地点の土壌かの区別なく、比較的まとまったクラスターを形成している。この結果は、プロット間比較を行ったデンドログラム（図2-16Bおよび図2-17B）と類似している。よって今回の実験結果から、*M. gigantea* および *L. firma* が付近の土壌中のAOB群集構造に影響を及ぼしていないか、または、AOB群集構造を決定するさらに強い別の要因がある可能性が示唆された。

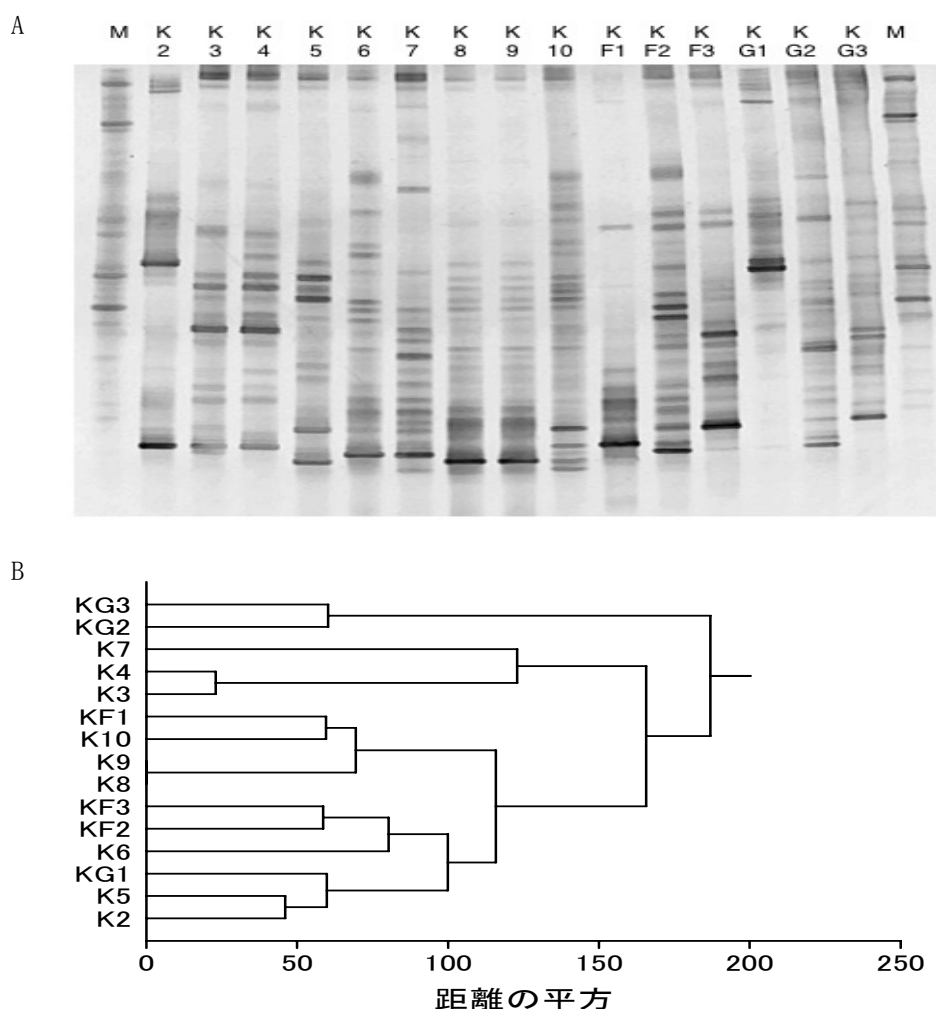


図2-18. 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2007年採集のプロットKの土壌試料に含まれるアンモニア酸化細菌（AOB）の群集構造。K2～10はプロットK内の土壌採集地点を表し、KF1～3およびKG1～3はそれぞれ、プロットK内の *Litsea firma* および *Macaranga*

*gigantea*付近の土壌採集地点を表す。MはDGGEマーカ―を表す。A) DGGEパターン
B) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

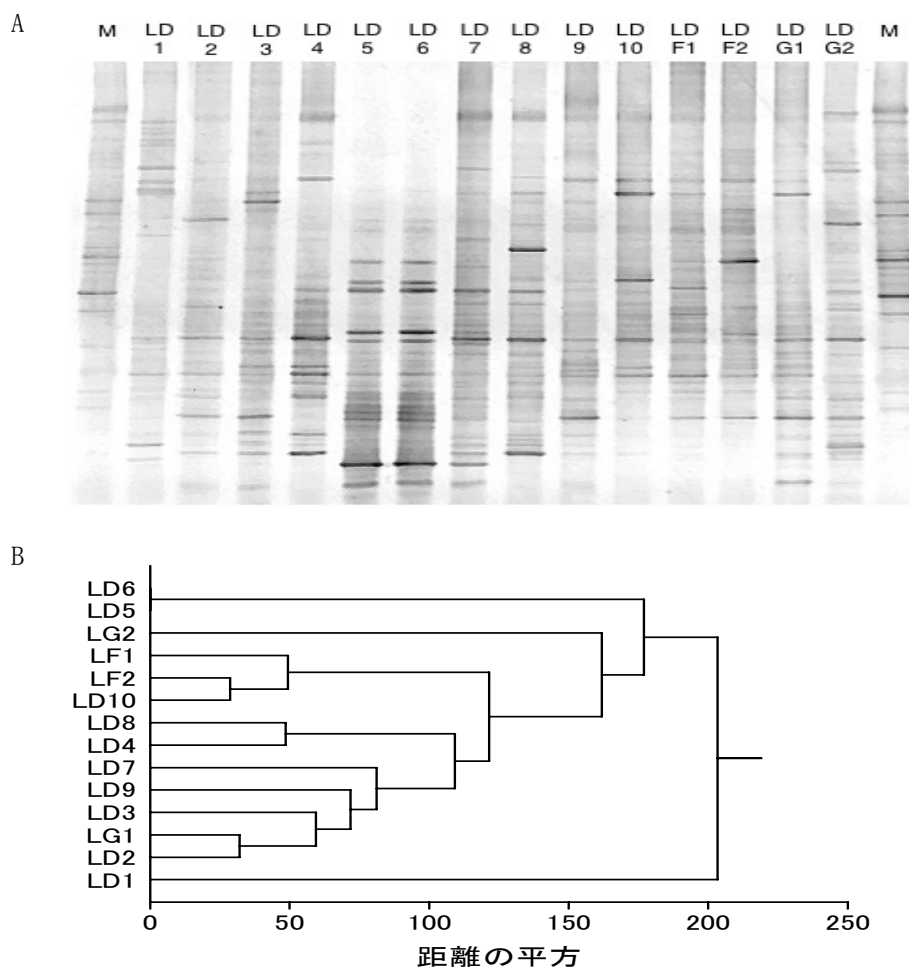


図2-19 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2007年採集のプロットLDの土壌試料に含まれるアンモニア酸化細菌（AOB）の群集構造。LD1～10はプロットLD内の土壌採集地点を表し、LF1～2およびLG1～2はそれぞれ、プロットLD内の*Litsea firma*および*Macaranga gigantea*付近の土壌採集地点を表す。MはDGGEマーカ―を表す。A) DGGEパターン
B) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

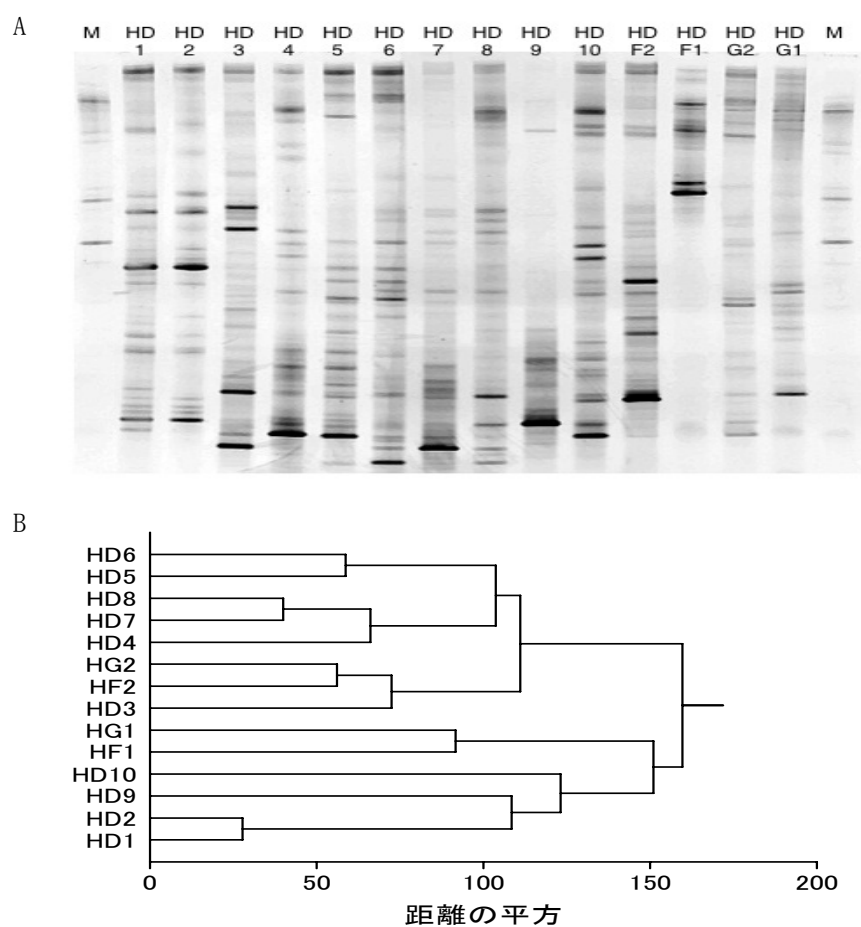


図2-20. 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2007年採集のプロットHDの土壌試料に含まれるアンモニア酸化細菌（AOB）の群集構造。HD1～10はプロットHD内の土壌採集地点を表し、HF1～2およびHG1～2はそれぞれ、プロットHD内の*Litsea firma*および*Macaranga gigantea*付近の土壌採集地点を表す。MはDGGEマーカーを表す。A) DGGEパターンB) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

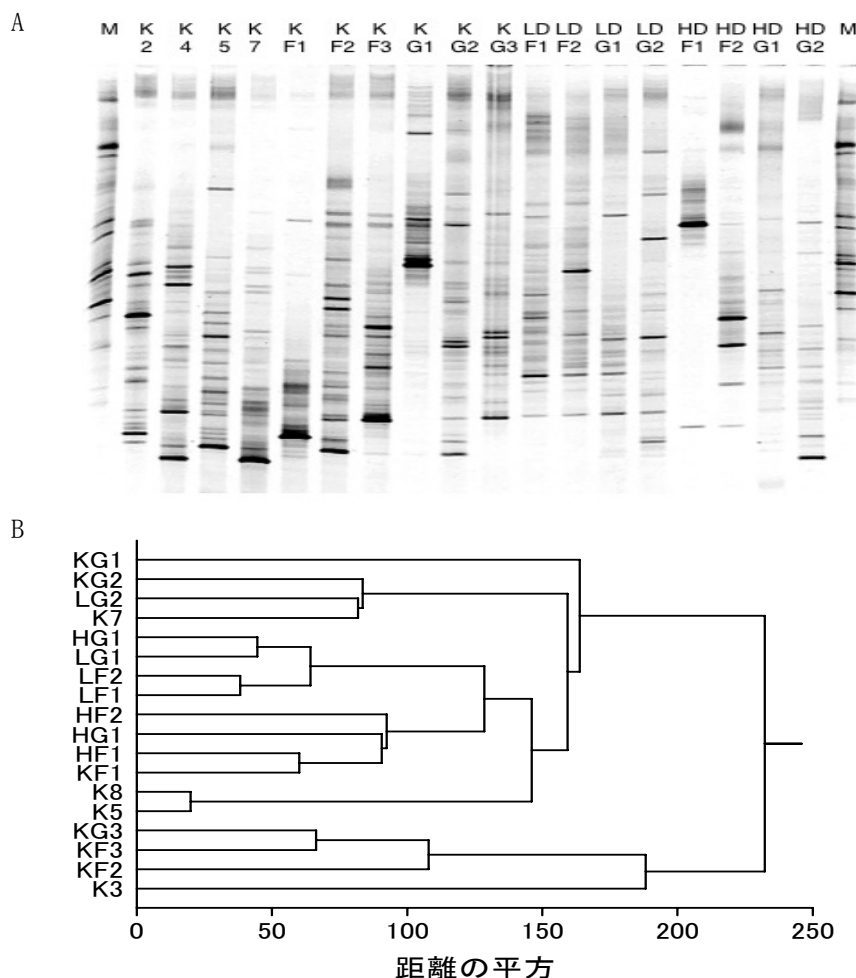


図2-21. 16S rDNA V3領域を標的としたDGGEによる2007年採集のプロットK、LD、およびHDの土壌試料に含まれるアンモニア酸化細菌（AOB）の群集構造。サンプル名のK、LD（またはL）、HD（またはH）はそれぞれプロットK、LD、HDに対応する。KF1～3、LF1～2およびHF1～2はそれぞれ各プロットの*Litsea firma*付近の、KG1～3、LG1～2およびHG1～2はそれぞれ各プロットの*Macaranga gigantea*付近の土壌採集地点を表す。MはDGGEマーカーを表す。A) DGGEパターン B) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

8) PCR-DGGE解析に基づく放線菌の群集構造

2006年に各プロットから採集した土壌試料については、前述の方法で、プロットK1からK1、K4、K5、K6、K7、K9を、プロットLD1からLD1、LD2、LD4、LD5、LD6、LD10を、プロットHD1からHD1、HD2、HD4、HD7、HD8、HD9を抽出した（計18サンプル）。

2006年に採集した土壌試料から抽出された3プロット由来の計18サンプルのDGGEプロファイルを図11Aに示す。ほとんどのバンドが全てのプロットから検出され、特定のプロットのみから検出されたバンドはわずかだった。このことから、全てのプロットにおいて共通の放線菌が優占していることが示唆され、前章で示した全細菌の群集構造よりもさらに均質であると考えられた。DGGEプロファイルに基づくデンドログラムを図2-22Bに示す。クラスターはプロットの差異に対応して

おらず、その平方距離の差はA0Bに比べてはるかに小さかった。

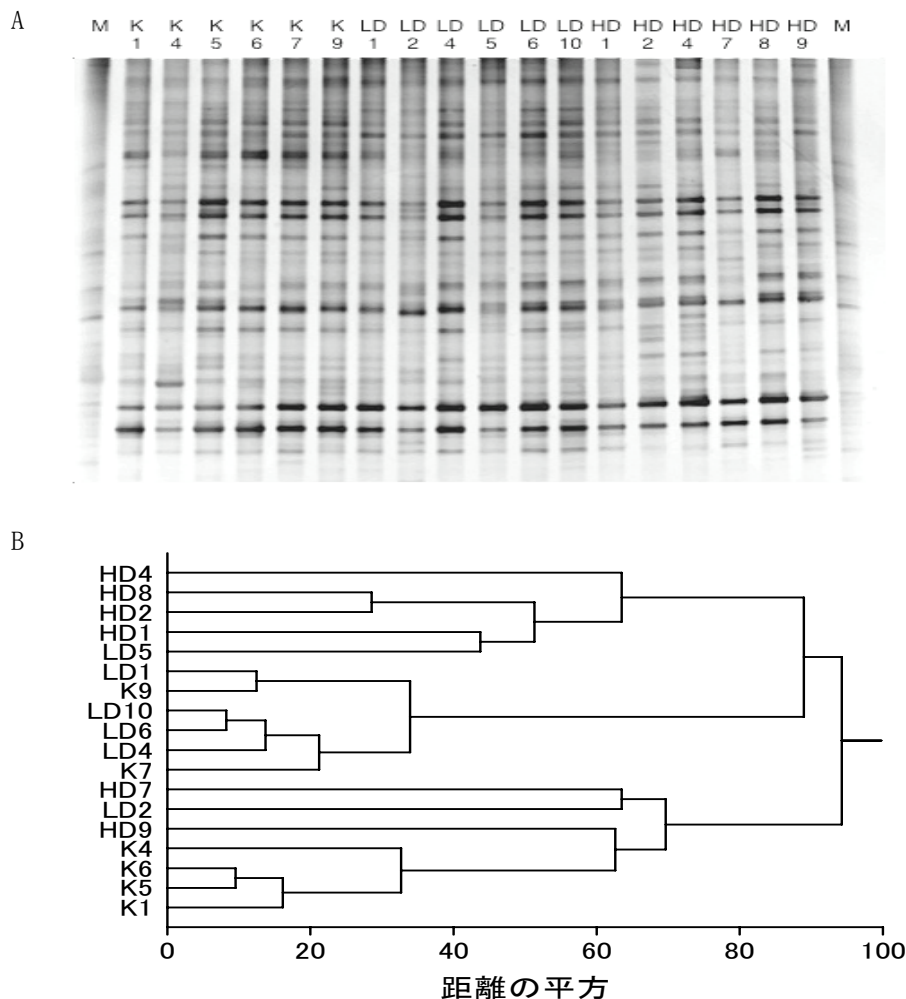


図2-22. 2006年の無被害区（プロットK1）、軽度被害区（プロットLD1）、重度被害区（プロットHD1）の土壌サンプルに含まれる放線菌の群集構造。サンプル名のK、LD、HDはそれぞれプロットK、LD、HDに対応する。MはDGGEマーカを表す。A) DGGEパターンB) DGGEバンドの位置と有無に基づきウォード法によって作成されたデンドログラム

9) A0Bと放線菌に及ぼす森林火災の影響

火災の直接的な原因として、火災による熱が細菌群集に大きな影響を与えることが考えられるが、受ける影響の大きさは、例えば熱感受性の差から分類群によって異なることが考えられる。微生物のいくつかのグループは火災がもたらす熱によって死滅しやすいことが知られている⁹⁾。亜硝酸酸化細菌 *Nitrobacter* spp. は従属栄養細菌と比べて熱によって死滅しやすいが、カビに比べると死滅しにくいという³⁸⁾。A0Bについて Yeager et al.⁸⁾ は、火災被害から1～14ヶ月後の森林土壌において無被害区と被害区では、優占しているメンバーが異なっていることを報告している。その一方で、孢子形成細菌は火災による熱への耐性が強いという報告がある³⁷⁾。放線菌の多くのグループが孢子を形成することから、放線菌の群集構造はA0Bに比べて熱による火災の直接的影響

が及びにくいと考えられる。またAOBは低栄養環境を好む傾向にあり^{39) 40)}、植物由来の有機物が豊富な表層付近の土壌では、火災の被害からの回復が全細菌（優占種）に比べて遅い可能性も考えられる。

また、長期的な火災の影響として、植生の変化がAOBの群集構造に影響を及ぼしている可能性が考えられる。今回の実験から*M. gigantea*および*L. firma*と周辺土壌のAOBの群集構造との関連は見られなかった。しかし、熱帯雨林はその他の地域の一般的な森林に比べて多様な植物群落を形成していることが多い。今回植物近傍の土壌を採集したが、特にプロットKにおいて、1本の樹木の周りには、多くの別種の樹木が確認される。そのため、特定の樹木の影響だけを評価することは困難である。樹種によって土壌の硝化能やAOB群集構造が異なると報告している過去の研究は^{41) 42)}、一部の樹木種の集中度が高い森林を調査したものである。したがって、*M. gigantea*および*L. firma*がAOB群集構造に大きな影響を及ぼさない樹種である可能性が考えられる一方、近傍の複数の植物の存在によって個々の樹種の影響の割合が小さくなっている可能性も考えられる。

AOBを標的としたDGGEバンドパターンが同一プロット内においても多様であったことから、AOB群集組成は近傍の植物に依存する土壌有機物の量や種類の影響を受ける可能性が考えられる。さらに、同一プロット内の多様性に影響を与える他の要因として、土壌採集地点の環境の微小な差や、それに由来する理化学性の差も考えられる。実際、土壌pHはAOBに大きな影響を及ぼし³⁹⁾、pHの変化は群集組成の優占グループを変化させるとの報告もある⁴³⁾。しかし、本研究で用いた土壌試料のpHは採集地点間で大きな違いはなく、今回の結果に与えたpHの影響は小さかったと考えられる。

一方、AOBとは対照的に、放線菌の群集構造にプロット間の差が認められないことは、放線菌が火災の直接的な影響だけでなく、間接的な影響すなわち現在の植生の影響も受けにくいことを意味する。

上記の通り、放線菌の群集構造には火災の影響が見られない一方で、AOBの群集組成には、火災から8～9年経ても火災の影響が残っていることが明らかになった。これまでに、養殖場廃出物、重金属、炭化水素系汚染物質による汚染の指標としてAOBを利用することが提案されている^{44) 45) 46)}。また耕作によるストレスからの土壌微生物の回復やバイオリアクターの安定性の指標となる可能性も指摘されている^{47) 48) 49)}。これらに加えて、今回の結果から、AOBは森林火災からの土壌細菌の回復程度の指標になりうる可能性が示唆された。

10) ガラクツロン酸資化細菌のコロニー形成数と組成

ガラクトツロン酸培地上で生育可能な乾土1 gあたりのガラクトツロン酸資化細菌数（コロニー形成数）を図2-23に示す。コロニー形成数は土壌試料によって異なり、プロットK1に比べてプロットHD1で多い傾向が認められた。各プロットのそれぞれ6地点から採集された土壌試料（合計18サンプル）を用いて、再びコロニー形成数を測定し、プロット間のコロニー形成数の差の再現性を確認した（2回目の計数）。その結果を図2-24に示す。プロットHDのいくつかの採集地点（HD1、HD 2、HD 7、HD 8）由来の試料で、ガラクトツロン酸資化細菌のコロニー形成数がプロットKと比べて明確に多く、平均値で比較しても、被害区（プロットHDおよびLD）のガラクトツロン酸資化細菌のコロニー形成数は、プロットK1と比べて多かった。しかし、被害区ではすべての土壌試料においてコロニー形成数が多いわけではなく、特に多いサンプルと少ないサンプルがあることが示された。そのため、Dunnettの方法による多重検定（有意水準0.05）を行った結果、プロットK1とプロット

LD1の間に有意差は見られたが、プロットK1とプロットHD1との間には見られなかった。

なお、1回目の試験ではK3の土壌からガラクトン酸資化細菌のコロニーは形成されなかったが、2回目の試験では、培地上に透明度が高く非常に小さいコロニーが多数観察できた。その原因の1つとして土壌の不均一性も考えられるが、他の理由も考えられる。土壌から細菌を分離する際に、同じ条件で複数のプレートに土壌を接種しても、今回のように、その中の1枚のプレートだけに同じ特徴をもったコロニーが多数現れることがある。土壌中に同一の細菌が多数集まった生息部位があるか、あるいは多数の細胞が集合して塊（たとえばブドウ球菌のクラスターのようなもの）を作っており、それがプレートに接種される際にスプレッターでつぶされると、上記の現象が現れる可能性がある。

16S rDNAのV6～V8領域の塩基配列に基づく系統解析の結果、単離されたガラクトン酸資化細菌のほとんどが*Burkholderia*属の細菌であり、中でも*Burkholderia phenazinium*、*Burkholderia sacchari*、*Burkholderia hospita*等に近縁なものが大半を占めた。その他に*Cupriavidus*属、*Dyella*属、*Paenibacillus*属、*Pandoraea*属の細菌が含まれていた。5属のうち、*Burkholderia*属、*Cupriavidus*属、および*Pandoraea*属の3属はBetaproteobacteria綱に属し、その中でも系統的に近縁である。これらと、Gammaproteobacteria綱に属する*Dyella*属は孢子を形成しない。*Paenibacillus*属はFirmicutes門Bacilli綱に属し、孢子を形成する。

16S rDNAのV6～V8領域の塩基配列に基づくガラクトン酸資化細菌の分類構成とそれに基づき算出した多様性指数を表2-3に示す。解読した塩基配列長が不十分であることに加え、*Burkholderia*属細菌の同定が塩基配列だけでは困難だったため、分類構成は種組成ではなくgenotype組成で示した。多様性指数としてはshanon-indexを用いた。その結果、サンプル数が少ないために統計的な有意差は求められないが、プロットHDはプロットKに比べてgenotypeの多様性が低い傾向が見られた。

16S rDNAのV6～V8領域の塩基配列に基づくガラクトン酸資化細菌のgenotype構成を解析した8つの土壌のうち、LD3の土壌を除く7つの土壌試料で1つのgenotypeが優占していた（優占率50%以上）。このgenotypeの割合の偏りはプロットKでも見られたことから、この現象と火災被害との間には因果関係はないと考えられる。いずれの土壌でもガラクトン酸資化細菌のほとんどが*Burkholderia*属細菌だったが、その優占genotypeは土壌によって異なっていた。このように、同一の機能を有する同属細菌であっても、その中のgenotype組成が異なることは、細菌の群集構造と集団としての機能の関係を探る上で興味深い。

一方、単離した株の数や供試した土壌試料の数が少ないものの、ガラクトン酸資化細菌のgenotypeの多様性は、プロットK1の方がプロットHD1よりも大きい傾向が認められた。これは、森林火災の影響である可能性がある。本研究の調査地から単離されたガラクトン酸資化細菌は、*Paenibacillus*属の3株を除いて孢子を形成しないことから、火災の被害を受けた地域のガラクトン酸資化細菌は、まず、森林火災の熱の影響を受けたと考えられる。さらに、火災後にガラクトン酸資化細菌群が回復する際には、植生の影響を受けたと考えられる。

前述の通り、ガラクトン酸は植物根やその周辺に多い。またガラクトン酸を構成糖とするペクチンが植物細胞壁の構成成分であることを考慮に入れると、根からの分泌以外に、腐朽の進んでいない比較的新鮮な植物遺体や根の表皮からの剥離物などからも土壌に供給されるだろう。ここで扱うガラクトン酸資化細菌は、非根圏土壌から分離されたものであっても、野外におい

ては根圏や根面も生息部位としうる細菌であると推測される。ガラクトツロン酸資化細菌として単離された細菌に、植物の根面や根圏の細菌としても知られる *Burkholderia* 属やその近縁属が多かったことも、その推測と矛盾しない^{50) 51)}。それゆえ、ガラクトツロン酸資化細菌は植物の影響を受けやすいと考えられる。

培養可能なガラクトツロン酸資化細菌の数は、プロットHD1のいくつかの採集地点においてプロットKに比べて多かった。根圏のガラクトツロン酸資化細菌数は植物の成長段階によって異なるとの報告⁵²⁾があることに加え、火災の被害の大きかったプロットHD1で数が多いこと、また、プロットHD1の中にもその数が多い地点と少ない地点があることを考慮に入れると、ガラクトツロン酸資化細菌の数の差は、火災の直接被害の影響によるものではなく、火災の長期的な影響、すなわち現在の植生が一因であると推測される。

なお、プロットLD1は火災被害の大きかった地域と小さかった地域が混在しているため、解析対象や手法により、プロットHD、プロットKのいずれかと類似した結果を示すことが多い。本章で述べた実験においても、プロットLD1のサンプルから得られた結果には一定の傾向は見られなかった。

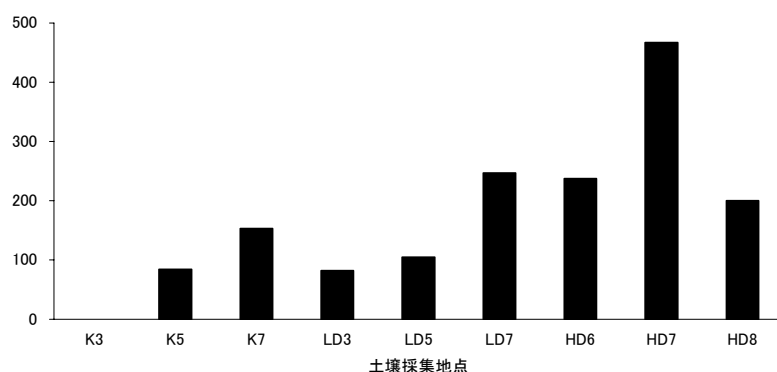


図2-23. ガラクトツロン資化細菌のコロニー形成数（1回目の試験，n=1）

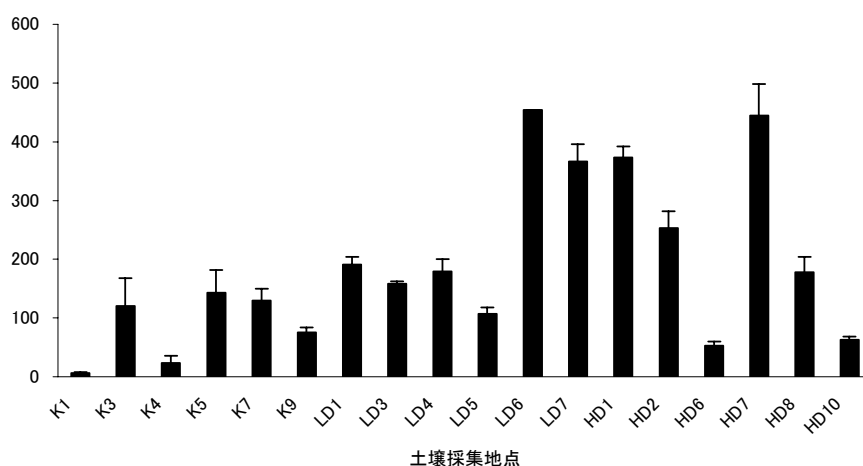


図2-24 ガラクトツロン酸資化細菌のコロニー形成数（2回目の試験，n=3）

表2-3 ガラクツロン資化細菌のgenotype組成とその多様性指数。K5、K7は無被害区（K1区）の、LD3、LD5、LD7は軽度被害区（LD1区）由来の、HD6、HD7、HD8は重度被害区（HD1区）由来の土壌試料を表す。B01～B35、C01、D01、P01～03、N01は、それぞれ*Burkholderia* sp.、*Cupriavidus* sp.、*Dyella* sp.、*Paenibacillus* sp.、*Pandoraea* sp. のgenotypeを表す。H' はgenotypeのshannon indexを表す。

K5		K7		LD3		LD5	
B10	15	B06	20	B11	19	B11	9
B14	3	B11	4	B07	2	B28	6
B12	1	B10	1	B10	2	B12	2
B13	1	B12	1	B13	1	B32	3
B15	1	B19	1	B24	1	B10	1
B07	4	B20	1	B25	1	B06	1
B16	1	B21	1	B26	1	B30	2
B17	1	B22	1	B27	1	B31	1
B18	1	B23	1	B28	1	B29	1
B02	1			P03	1		
B11	1						
H' = 1.75		H' = 1.32		H' = 1.44		H' = 1.85	

LD7		HD6		HD7		HD8	
B06	18	B02	24	B07	19	B10	24
B07	3	B04	3	B06	3	B11	3
B11	2	B05	2	B08	1	B02	1
B28	2	B01	1	B09	1	B06	1
B05	1	B03	1	N01	5	D01	1
B33	1	P01	1	C01	2	P02	1
B34	1						
B35	1						
N01	2						
H' = 1.52		H' = 0.94		H' = 1.22		H' = 0.87	

（３）菌根菌

１）フタバガキが優占する自然林（無被害林）における菌根菌の分布様式と多様性

2005年乾期のサンプリングで各調査区から50ずつ採取した土壌サンプルのうち、K1区の38サンプル、K2区の24サンプルから菌根が検出された（表2-4）。また、2007年雨期のサンプリングでも2005年とほぼ同数のK1区で38カ所、K2区で23カ所から菌根が検出された。こうした結果は、フタバガキ自然林の菌根の量や分布が季節にかかわらず安定していることを示唆している。また、2007年の広域調査で採取した55土壌サンプル中では42サンプルで菌根が検出できた。こうした結果はK1区や広域調査区では林床の約75%、K2区でも約50%に菌根が分布していることを示している。温帯林で同様のサンプリングを行うとほぼ100%菌根が見つかることを考えれば、温帯林ほど菌根は普遍的に分布しているわけではないようである。



図2-25 熱帯フタバガキ林で観察された菌根の形態タイプ
 (右下の根は菌根菌に感染していないフタバガキの細根)

K2区のフタバガキ科の優占率は低く(BSAで20%)同区において過去に択伐や火災の影響を受けた可能性が考えられるものの、林床での菌根の占有率(約50%)はフタバガキ科の優占率を遥かに上回っていた。また、K1区においても菌根占有率(約75%)はフタバガキ科の優占率(46%)を上回っていた。ブナ科やマメ科、フトモモ科などの中にも菌根菌の宿主となるものが知られているが、これまでの熱帯林調査でそうした科の根系に菌根が見つかることは少なく、本調査地においても菌根分布にそれほど大きな比率を占めているとは考えにくい。つまり、本研究で得られた結果は、フタバガキ科は地上部に対してより多くの比率を地下部で占めることが必要であることを示しているものと考えられる。

表2-4 熱帯林の菌根調査のために採取した土壌サンプル数、菌根量および菌根菌の多様性

	2005. 9		2007. 2					
	土壌サンプル数	菌根含有土壌サンプル数	土壌サンプル数	菌根含有土壌サンプル数	菌根総数	菌根菌種数	1土壌サンプルあたりの菌根菌種数	*
無被害林K1	50	38	50	38	20175	41	2.6±0.2	a
無被害林K2	50	24	50	23	3769	26	1.9±0.2	ab
軽被害林LD1	50	10	50	9	1026	8	1.2±0.1	b
軽被害林LD2			52	8	1237	6	1.3±0.3	b
重被害林HD1	50	5						
重被害林HD2			50	2	124	1	1.0±0.0	b
広域無被害林			55	42	3819	33	1.7±0.1	ab
Cotylelobium			24	22	431	13	1.1±0.1	b

* Tukey検定の等質サブグループ

菌根の形態分類とDNA解析の結果、K1区からは41種、K2からは26種、広域調査区からは33種の外生菌根菌が検出され、無被害フタバガキ林全体の検出種数は合計で69種となった(表2-4)。土壌微生物のように調査地の全個体を調査することが不可能な生物に関しては、得られた種数の観察値をそのまま多様性の指標とするのは適当ではない。事実、サンプル数-積算種数曲線(図2-26)を見ても検出された積算種数は飽和していないことから、さらにサンプルを増やすことで検出される菌種は増加すると予測される。しかし、すべての菌種を検出するために調査地の表層土壌をすべて掘り返してその中の菌根菌を同定するのは現実的ではなく、検出された種のパターンから生息する全種数を推定する方法がとられる。比較的頑強で最も頻繁に使われる推定手法であるJack-knifeの推定値は、K1区で65種、K2区で45種、W区で54種であり、無被害区全体では105種が生息していると推測された。この値は温帯林での外生菌根菌の多様性と比べると低い値である。例えば、秩父の針葉樹・広葉樹混交林での推定値は300種を超えている¹²⁾。無被害フタバガキ林全体のShannonの多様性指数(3.7)も温帯域の一般的な値よりも低い。通常、多くの生物は熱帯域に最も多くの種が分布し高緯度に行くに従って減少するというパターンを示すが⁵³⁾、菌根菌の多様性分布はそうしたパターンに当てはまらないのは興味深い。また、菌根菌を含めて菌類の多様性は植物の種数と比例すると一般的には考えられているが⁵⁴⁾、フタバガキ科だけでも20種を超える多様な宿主樹木が存在するこの場所において少数の菌根菌種しか生息しないという結果はある

意味驚くべき結果である。通常、外生菌根菌が生息しているのは有機質に富む表層土壌であるが、熱帯林の表層土壌は温帯林に比べ極めて薄くて未発達なため、菌根菌にとっての生息環境の少なさや均質性が外生菌根菌の多様性の低さに関係しているものと考えられる。

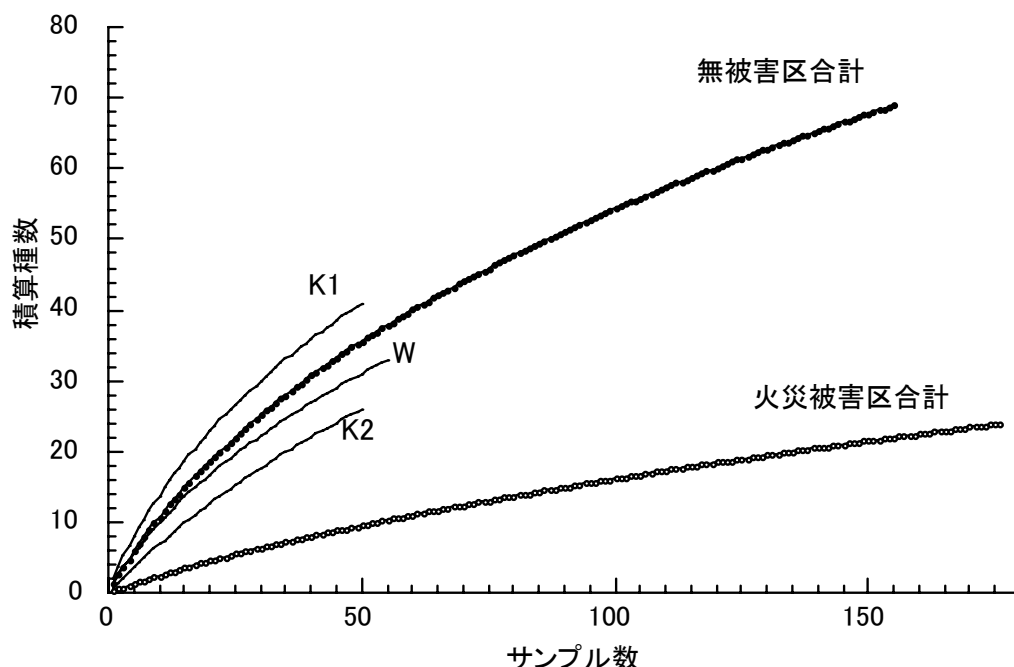


図2-26 採取した土壌サンプル数と検出できた菌根菌種数の関係

(土壌サンプルの順序を200回無作為化し、その平均値を示してある)

菌根菌の種構成を見ると、属レベルで最も種数の多かったのはベニタケ(*Russula*)属(ベニタケ科)の18種で、チチタケ(*Lactarius*)属(ベニタケ科)4種とあわせるとベニタケ科全体で22種が確認された(表2-5)。次に種数が多かったのはラシヤタケ(*Tomentella*)属(イボタケ科)の16種で、チャハリタケ属の1種とあわせてイボタケ科は17種が確認された。ラシヤタケ属の子実体は目立たない背着生で、いわゆるキノコの形をとらない。このため、キノコ調査では見逃されやすいグループである。事実、フタバガキ林でのキノコ調査の結果を見ても、ラシヤタケ属はほとんど含まれず⁵⁵⁾、サブテーマ(4)の調査結果にも出現しなかった。ベニタケ科とイボタケ科をあわせると無被害林の菌根から見つかった種数の約57%に達する。この2つの科は北半球の温帯林の地下部菌根菌群集でも優占することが多く、検出される種数も多い⁵⁶⁾。今回熱帯フタバガキ林で検出されたベニタケ科とイボタケ科の多様性は温帯林と同レベルであるといえる。テングタケ(*Amanita*)属やカレエダタケ(*Clavulina*)属、イグチ(*Boletales*)類の種数も温帯域と遜色ない。ベニタケ科やテングタケ科、イグチ類については、フタバガキ林はもとよりアフリカなどの他の熱帯地方でもキノコの発生が記録されており⁵⁷⁾、熱帯地域に適応したグループであると考えられる。一方、北半球の温帯域でよく出現するフウセンタケ(*Cortinarius*)属やアセタケ(*Inocybe*)属は比較的種数が少なく、ワカフサタケ属に至っては全く検出されなかった。子囊菌についても *Cenococcum geophilum* と未同定菌の2種が見つかっただけで、温帯林に比べて多様性が低い。このような地下部菌根菌群集で種数の少なかったグループは、子実体の発生も少ない⁵⁵⁾。

表2-5 検出された菌根菌とその度数（その菌種が含まれた土壌サンプル数）

菌種	和名	無被害調査区			無被害区 合計	被害区				被害 区合 計
		K1	K2	W		LD1	LD2	HD2	HDC	
Amanita_sp1	テングタケ属	5	1	1	7					
Amanita_sp2	テングタケ属	4	1	4	9	1				1
Amanita_sp3	テングタケ属			3	3					
Amanita_sp4	テングタケ属	1			1					
Athelioid_sp1	アテリア類	5	1	1	7				1	1
Athelioid_sp2	アテリア類	1			1					
Athelioid_sp3	アテリア類	3		2	5					
Boletaceae_sp1	イグチ科								4	4
Boletaceae_sp2	イグチ科	2			2					
Boletales_sp1	イグチ類								1	1
Boletales_sp2	イグチ類	1			1					
Boletales_sp3	イグチ類	1			1					
Cenococcum geophilum	ケノコッカム	1			1					
Clavulina_sp1	カレエダタケ属	2	1		3					
Clavulina_sp2	カレエダタケ属	1	1	1	3	1				1
Clavulina_sp3	カレエダタケ属						1			1
Clavulina_sp4	カレエダタケ属	1			1					
Clavulina_sp5	カレエダタケ属			1	1					
Cortinarius_sp1	フウセンタケ属	1			1					
Cortinarius_sp2	フウセンタケ属	1		1	2					
Cortinarius_sp3	フウセンタケ属	1			1					
Cortinarius_sp4	フウセンタケ属			1	1					
Craterellus_sp1	クロラッパタケ属	1			1					
Hydnellum_sp1	チャハリタケ属			3	3					
Hydnum_sp1	カノシタ属	1			1					
Hydnum_sp2	カノシタ属	1			1					
Hydnum_sp3	カノシタ属			1	1					
Inocybe_sp1	アセタケ属			1	1					
Laccaria_sp1	キツネタケ属						1			1
Lactarius_sp1	チチタケ属	1			1					
Lactarius_sp2	チチタケ属								1	1
Lactarius_sp3	チチタケ属	2			2					
Lactarius_sp4	チチタケ属	1			1	1				1
Lactarius_sp5	チチタケ属			1	1					
Phylloporus_sp1	キヒダダケ属		1		1					
Phylloporus_sp2	キヒダダケ属	1	2	2	5					
Russula_sp1	ベニタケ属	4		3	7	2				2
Russula_sp2	ベニタケ属		1		1					
Russula_sp3	ベニタケ属						2			2
Russula_sp4	ベニタケ属		1	1	2					
Russula_sp5	ベニタケ属			1	1					
Russula_sp6	ベニタケ属	1	3		4					

表2-5 つづき										
菌種	和名	K1	K2	W	無被害区 合計	LD1	LD2	HD2	HDC	被害 区合 計
Russula_sp7	ベニタケ属	2		1	3				1	1
Russula_sp8	ベニタケ属	1	1		2					
Russula_sp9	ベニタケ属		1		1					
Russula_sp10	ベニタケ属			1	1					
Russula_sp11	ベニタケ属	1			1					
Russula_sp13	ベニタケ属			1	1					
Russula_sp14	ベニタケ属			1	1					
Russula_sp15	ベニタケ属			2	2					
Russula_sp16	ベニタケ属	1			1					
Russula_sp17	ベニタケ属		1		1					
Russula_sp18	ベニタケ属	1			1					
Russula_sp19	ベニタケ属		2		2					
Russula_sp20	ベニタケ属	1		1	2					
Scleroderma_sp1	ニセショウロ属						1		3	4
Scleroderma_sp2	ニセショウロ属								1	1
Sebacina_sp1	ロウタケ属		1		1					
Tomentella_sp1	ラシヤタケ属		1	11	12	2			1	3
Tomentella_sp2	ラシヤタケ属	2		2	4	2	4	2	6	14
Tomentella_sp3	ラシヤタケ属	3		1	4					
Tomentella_sp4	ラシヤタケ属	3	4	4	11	1				1
Tomentella_sp5	ラシヤタケ属	9	1	1	11				1	1
Tomentella_sp6	ラシヤタケ属		1	1	2					
Tomentella_sp7	ラシヤタケ属			3	3				2	2
Tomentella_sp8	ラシヤタケ属	2			2					
Tomentella_sp9	ラシヤタケ属								1	1
Tomentella_sp10	ラシヤタケ属			1	1					
Tomentella_sp11	ラシヤタケ属			1	1	1				1
Tomentella_sp12	ラシヤタケ属		1		1		1			1
Tomentella_sp13	ラシヤタケ属	3	2		5					
Tomentella_sp14	ラシヤタケ属		1		1					
Tomentella_sp15	ラシヤタケ属		1		1					
Tomentella_sp16	ラシヤタケ属	1	2		3					
Tomentella_sp17	ラシヤタケ属		1		1					
Tomentella_sp18	ラシヤタケ属									
Xerocomus_sp1	アワタケ属	1			1					
Xerocomus_sp2	アワタケ属	2			2					
Unknown Ascomycetes	子囊菌類	19	3	8	30				1	1
合計種数		41	26	33	69	8	6	1	13	23
積算個体数					201					47

外生菌根菌の「個体」を定義するのは動物や植物のように簡単ではなく、どこからどこまでが一つの「個体」なのかを観察するのは不可能である。通常、DNA解析によって遺伝的に同一の菌がどこまで広がっているかを調べ「個体」のサイズを決定する。これまでの研究例では外生菌根菌の一つ一つの個体のサイズは大きくても数メートルのものが多い⁵⁸⁾。今回採取した土壌サンプル間の距離は10m以上離れるようにしてあることから、たとえ2つのサンプルで同じ菌種が見つかったとしても別々の個体であると見なせる。このようにして無被害林から見つかった外生菌根菌の個体数を合計すると201となった（表2-5）。これを個体数の優占順位順に並べて相対優占率をプロットすることで群集構造を調べてみた（図2-27）。無被害林の曲線を見ると、優占順位の高い菌種でもその優占率は低く、1種を除いてすべての菌種で6%未満であった。逆に、優占率の低いrare speciesの数は多く、長く尾を引くパターンが見られる。こうしたパターンは遷移が進行し、成熟した生物群集でよく見られることから⁵⁹⁾、無被害林の菌根菌群集は成熟した極相状態にあるものと考えられる。

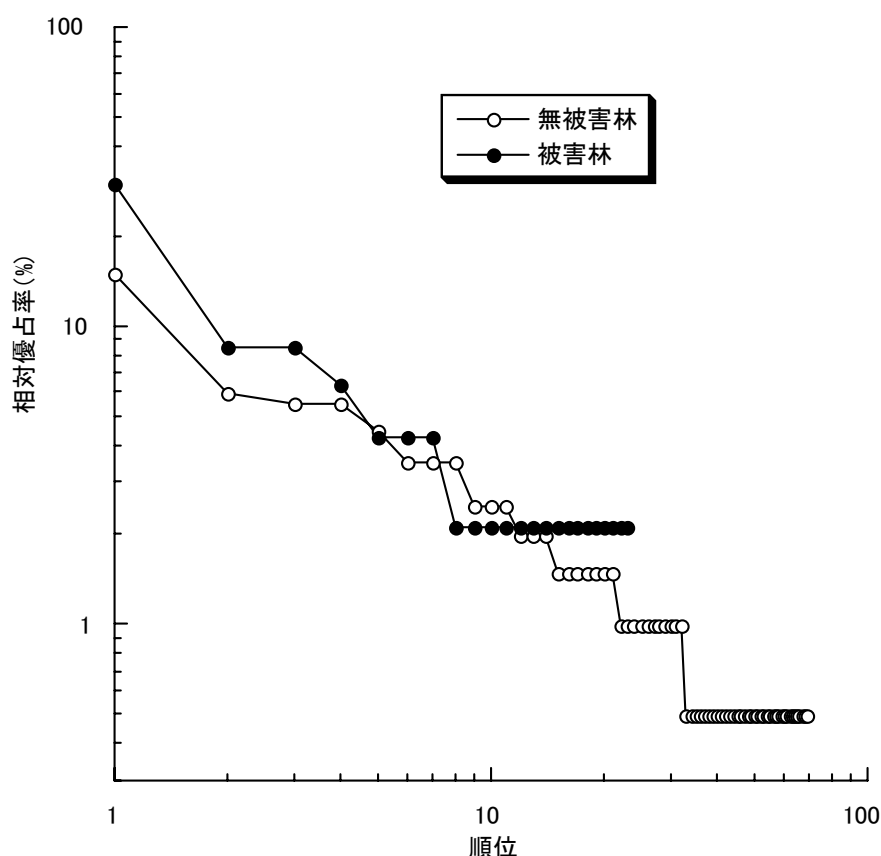
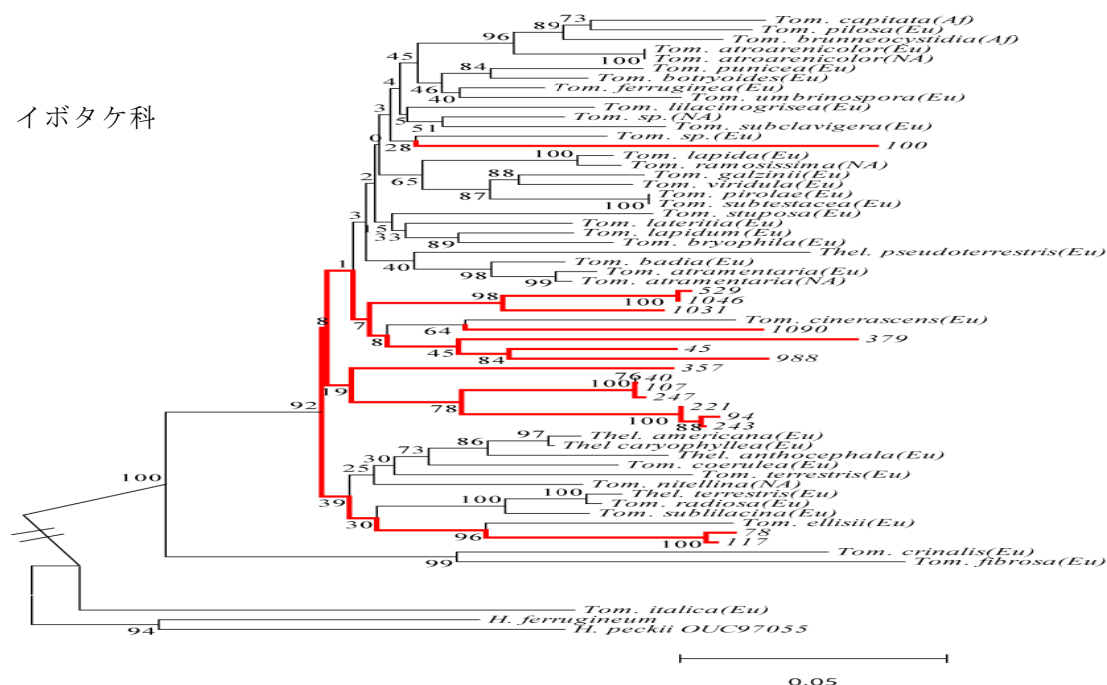


図2-27 熱帯フタバガキ林の外生菌根菌群集構造と火災の影響

（無被害林と被害林ごとに見つかった外生菌根菌総個体数に占める優占率を順位の高い順にプロットしたもの。X軸、Y軸とも対数。）

フタバガキ林の外生菌根菌の起源を知るため、主要なグループであるベニタケ科とイボタケ科の分子系統解析を行った（図2-28）。イボタケ科の系統樹を見ると、フタバガキ林で見つかった菌種の多くは全世界的に分布する菌種を含めて単系統群を形成し、北半球の温帯域でのみ見つかった菌種とは異なるクレードに属していた（図2-28a）。フタバガキ科はアフリカと南米にもわずかな種が分布しており、その起源はゴンドワナ大陸にあると考えられている⁶⁰⁾。インド亜大陸がゴンドワナ大陸から分裂して北上し、ユーラシア大陸に衝突後に東南アジアでフタバガキ科が多様化したことが分かっている。今回見つかったイボタケ科の菌根菌もフタバガキ科とともにゴンドワナから移動し、数千万年という長期間にわたって他の大陸と隔離された環境でフタバガキ科と共進化したことが単系統につながっているのかもしれない。セイシェル諸島のフタバガキ科で今回見つかったイボタケ科の菌種と近縁のものがみついているのも⁶¹⁾、そうしたゴンドワナからの移動を裏付けるものであろう。一方、もう一つの優占群であるベニタケ科の系統樹を見るとフタバガキ林で見つかった菌種は明らかに多系統である（図2-28b）。イボタケ科と同じようにゴンドワナ起源のものと、北半球のユーラシア由来の菌種が混在していることを示唆している。事実、クロハツのような日本にも分布するベニタケ科菌類がいくつか検出されている。外生菌根菌の多くは宿主範囲が広く、異なる樹種にも感染する能力を持つ⁶²⁾。元来の宿主から新たに侵入してきたフタバガキ樹木に宿主を乗り換えたことは十分に考えられる。ただし、こうした系統関係の基本となる情報が菌類ではきわめて不十分であると同時に、ITS領域だけで系統関係を結論づけるのは難しい。詳細な系統関係については今後さらに研究を進める必要がある。

(a) イボタケ科



(b) ベニタケ科

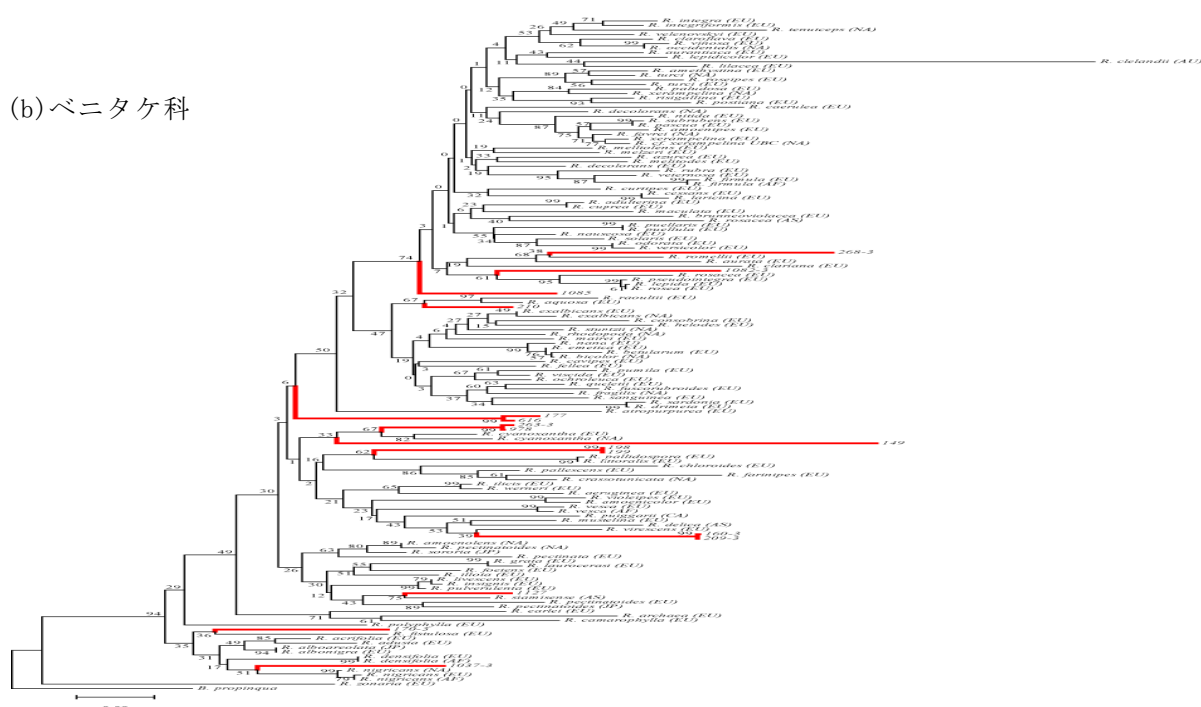


図2-28 熱帯フタバガキ林で優占していた(a)イボタケ科と(b)ベニタケ科に関する分子系統解析（塩基配列情報が登録された既知種と今回の調査で得られて塩基配列（図中の赤枝）を含めた近隣接合法による系統樹。図中の数値はブートストラップ値。いずれも一番左に外群を配置。種名の後括弧内は子実体の採取地。Eu:ヨーロッパ、NA:北米、Af: Africa、AU: Australia）

2) 森林火災による外生菌根菌群集への影響

2005年乾期のサンプリングで各調査区から50ずつ採取した土壌サンプルのうち、軽度被害区のLD1区では10サンプルから、重度被害区のHD1区では5サンプルから菌根が検出された（表2-4）。また、2007年雨期のサンプリングでもLD1区で9カ所、LD2区で8カ所、HD2区で2カ所から菌根が検出された。こうした値は無被害林と比べると有意に低い値であり、たとえ軽度の火災被害でも菌根は大幅に減少してしまうことを示唆している。また、火災跡地で萌芽更新しているフタバガキ科の *Cotylelobium melanoxydon* 24個体からサンプリングした根系では、22個体から菌根が見つかった。しかし、その全根端数に占める菌根の割合は $21 \pm 4\%$ しかなく、無被害林ではフタバガキの根端がほぼ100%菌根化しているのと比べると明らかに低い値である。こうした結果は、火災跡地でフタバガキ科の根が存在していても菌根菌の感染が難しいことを示唆しており、感染源の不足や土壌条件の違いが影響しているものと考えられる。温帯林では火災によって表層の菌根や孢子などの感染源が死滅しても、すこし下層にいけばほとんど被害を受けていない感染源が存在して容易に自然回復が行われる⁶³⁾。しかし、熱帯林では表層のほんの数センチメートルの深さに菌根が集中分布するために、より深刻な被害につながるであろう。

各プロットのフタバガキ科の優占率（全BAに占めるフタバガキ科の割合）と菌根の占有率（林床で菌根が分布する面積の比率）をプロットすると強い相関関係が見られる（ $R=0.97$ 、 $P<0.001$ 、図2-29）。この結果は、林床での菌根の占有率はフタバガキ科のBA優占率によって約95%程度説明できることを示している。また逆に、フタバガキ科の優占率は地下部の菌根占有率によって決定されとも考えることができる。2001年の調査時点から比べるとフタバガキ科のBA優占率はLD

区やHD区で顕著に減少していることが植生調査の結果で明らかにされている（サブテーマ1）。フタバガキ科も養分吸収の大部分を菌根菌に依存していることから⁶⁴⁾、火災によって大幅に菌根が減少すれば十分な養分の獲得はできなくなることは明らかである。樹体内に蓄積した養分によってしばらくの間は生命を維持できるかもしれないが、新たな養分供給が無ければ長くは維持できないであろう。そうすると、火災後に断続的に続くフタバガキ科樹木の枯死は、大幅に減少した菌根量に対する平衡圧力からきている可能性も考えられる。

菌根の形態分類とDNA解析の結果、LD1区からは8種、LD2からは6種、HD2区からは1種の外生菌根菌が検出された。この3つの調査区で152の土壌サンプルを採取したが、その大半は菌根を含まないサンプルである。菌根菌の群集構造についてより正確なデータを得るためには、火災被害地において菌根を含んだサンプルをもっと増やす必要がある。しかし、これ以上土壌をランダムサンプリングしても労力に見合う効果が得られるとは考えにくい。そこで、火災被害地でより効率的に菌根を得るように計画したのが、萌芽再生している *Cotylelobium melanoxydon* の根系を直接サンプリングすることである。この手法によって13種の外生菌根菌が検出され、火災被害地全体の検出種数は合計で23種となった（表2-5）。異なるサンプリング手法を含むため結果の考察には注意を要するが、サンプル数- 積算種数曲線（図2-26）は無被害林と同様に飽和していないことから、サンプルを増やすことで検出される菌種はさらに増加するのは間違いない。Jack-knife 推定によると、火災被害区全体では40種が生息していると推測された。この値はフタバガキの自然林で得られた値（105種）よりも遥かに少ない。Shannonの多様性指数も2.7と無被害林よりも低く、火災によって菌根菌の多様性が減少していることが明らかとなった。

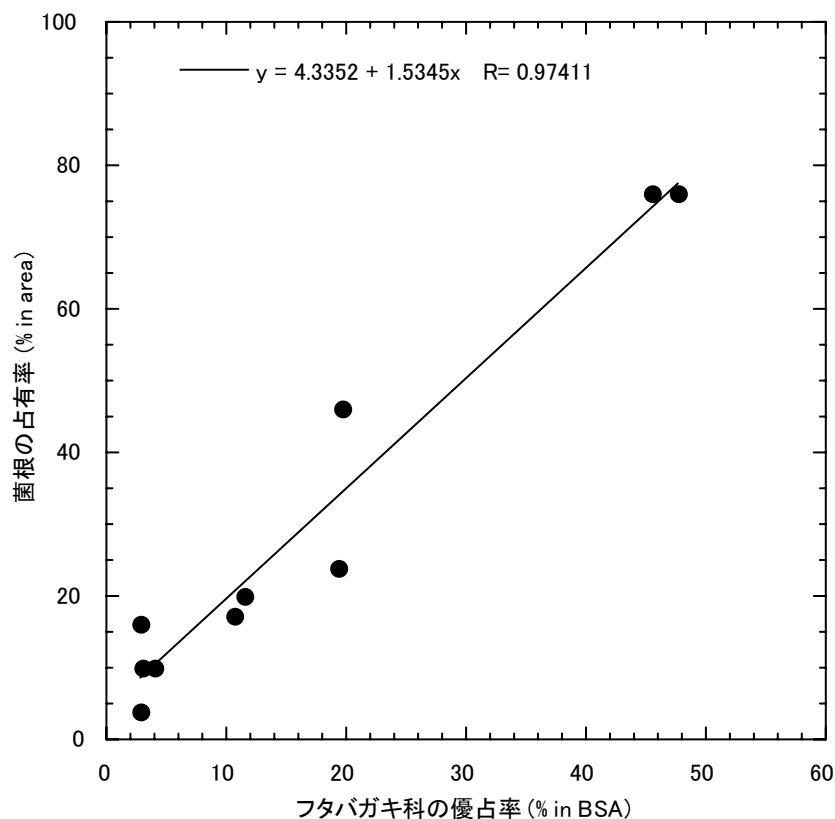


図2-29 フタバガキ科の優占率と林床における菌根の占有率の関係

順位-相対優占度曲線を見ると、全体の種数も少なく、少数の菌種の優占度が高くなっていることから火災被害地の曲線の傾きは無被害林に比べて急になっている（図2-27）。こうした現象は、温帯域の火災跡地でも報告されている⁶⁵⁾。多くの外生菌根菌はより安定した土壤環境に適応しており、高温や乾燥にさらされやすい環境下では少数の耐性を持った菌種が優占しやすいものと考えられる。菌根菌の種構成を見ると、イボタケ科やベニタケ科の菌種が多いのは無被害林と共通している（表2-5）。事実、火災被害地で見られた全23種のうち、無被害林でも見られた菌種は13種で、そのうちの11種はイボタケ科とベニタケ科であった。このように共通して出現した菌種の中にはその優占度に大きな違いが認められるものがある。たとえば、*Tomentella* sp2が全菌根菌個体数に占める割合は無被害林では2%に満たないが、火災被害地では約30%に達している。火災跡地でのみ見られた菌種は全部で10種であったが、その中でもいくつかの分類群は優占度が高い。たとえば、ニセショウロ属 (*Scleroderma*) の菌根は無被害林では全く検出されなかったが、火災被害地では全個体数の10%を超えるほど優占している。ニセショウロ属は、温帯域の一次遷移地などでは裸地化した高温や乾燥ストレスのかかる場所で優占することが知られている⁶⁶⁾。熱帯地域においても、苗畑などではしばしば優占することが知られている⁶⁷⁾。ニセショウロ属は火災跡地の過酷な環境にも耐性を持っているものと考えられる。また、ニセショウ属と系統的に近いイグチ類の一種である *Boletaceae* sp1 も、火災跡地でのみ優占種として出現している。こうした火災跡地で優占する菌種は、火災後の過酷な環境にも適応し、いち早く侵入する先駆種として機能して

いるものと考えられる。火災跡地にフタバガキ林を再生しようとする際には、こうした先駆的な菌種は応用できる可能性を持つ。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 模擬火災実験の結果から、森林火災下において地温100℃前線の降下速度が土の物理化学性、土壤水分から推定できることがわかった。たとえば、火災発生時に十分湿っているような黒ボク土(体積含水率0.4)では、数日間の森林火災でも、地温が100℃を越える深さは10cm程度であると考えられる。このような場合、森林火災後、地表面下10cm以深から萌芽再生することで、速やかに植生回復が始まる可能性があると考えられる。

現地調査では、火災後の植生回復とともに、土壤有機物も回復したことが示唆された。火災被害を受けた地点の土壤において、地表面下10cm以深で火災時に生成した灰によるpHの上昇、および火災時に生成した炭によるものと思われる有機物量の増加が観察され、森林火災下での土壤中の有機物質移動について新たな知見を得た。火災後8～9年の間、降水の下方浸透に伴って火災時に生成した燃焼物質が下層に移動すると共に、地表面に回復しつつある植生から供給された有機物が土中に蓄積したと考えられる。

2) 森林火災の被害を受けた熱帯林において、地上部の植生回復に先がけて、土壤中の優占細菌が速やかに回復し、森林再生を支えている可能性が示唆された。さらに、特定の細菌分類群及び機能に着目すると、細菌全体では見られないような森林火災の影響が未だに残っていることが明らかになった。熱帯地域におけるこのような研究報告は例が無く、学術的に貴重なデータが得られた。

3) 地球規模の生物多様性分布とその決定要因については、一般の関心も高い重要な研究課題であり、NatureやScienceといった雑誌でも取り上げられることが多い。今回、熱帯林の菌根菌の多様性について初めて定量的なデータを得た。これにより、熱帯林の菌根菌の多様性は温帯林よりも低いということが明らかとなった。これまで、生物の多様性を決定する様々な要因が提唱されているが、その多くは植物や動物のデータに基づき熱帯地方を多様性の中心と仮定としたものであり、今回の研究結果を説明できない。多様性の決定要因として広く受け入れられている説にも見直しをせまるものであり、大きな科学的成果といえる。微生物の地球規模の多様性分布の全容解明にはさらにデータの蓄積が必要であろうが、本課題はそのための重要な一歩になったのではないだろうか。

また、熱帯林の火災はこれまでに温帯地域で報告されているよりも遥かに深刻なダメージを菌根菌群集に与え、その自然回復が困難なことが明らかにされた。フタバガキ科は成長に必要な養分のほとんどを菌根菌に依存していることから、今後の東南アジアの熱帯林保護・再生政策に重要な示唆を与える研究成果である。また、火災跡地に特徴的に出現する菌根菌種は森林再生に応用できる微生物資源として有望であり、そうした菌種がいくつか明らかにされたことも重要な科学的成果である。

(2) 地球環境政策への貢献

世界の森林面積は約40億haあるが、2000年から2005年の間に約7百万haの森林が消失した⁶⁸⁾。森

林の消失原因の一つとして、森林の焼失があげられ、インドネシアでは落雷等による自然発火による森林火災に加えて焼畑や産業造林、開発など人為的な理由で大規模に森林が消失している。森林火災は、火災によって失われた当該の森林の生物多様性にダメージを与えるだけでなく、地球環境全体や生物多様性にも影響を与えるので、森林火災を食い止めること、起きた火災後の修復を促進することは極めて重要と考えられる。本研究は、“地温100℃前線”の降下速度を予測するモデルを提起したが、このことにより、土壌水分管理や水分モニタリングの重要性が高められた。今後、森林火災が土中の熱環境に与える影響範囲や火災に伴う土中の物質移動についての成果を、学術雑誌への公開などを通じて広報に努めたい。

また、一部の成果はすでに、生物教育シンポジウム（東京大学 H18. 8. 15 日本生物教育会関東支部、日本生態学会生態学教育専門委員会共催）、菌類懇話会（駒込地域創造館 H19. 2. 18）、埼玉県高等学校連合教育研究会生物教育研究会（浦和第一女子高校 H19. 6. 1）、神奈川県高等学校教科研究会理科部会生物研修会（横浜平沼高校 H19. 11. 28）、神奈川県秦野市自然観察施設くずのはの家（H20. 10. 26予定）の講演活動を通じ、広報・普及に努めた。

6. 引用文献

- (1) 久馬一剛 (2001) 熱帯土壌学、名古屋大学出版
- (2) Fernandez, I., A. Cabaneiro and T. Carballas. (1997) Organic matter changes immediately after a wildfire in an Atlantic forest soil and comparison with laboratory soil heating. *Soil Biol. and Biochem.* 29, 1-11.
- (3) Knicker, H., F. J. González-Vila, O. Polvillo, J. A. González, G. Almendros. (2005) Fire-induced transformation of C- and N-forms in different organic soil fractions from a Dystric Cambisol under Mediterranean pine forest (*Pinus pinaster*). *Soil Biol. and Biochem.* 37, 701-718.
- (4) Ulery, A. L., R. C. Graham and C. Amrhein (1993) Wood-ash composition and soil pH following intense burning. *Soil Science* 156, 358-364.
- (5) DeBano, L. F. (2000) The role of fire and soil heating on water repellency in wildland environments: a review. *Journal of Hydrology* 231, 195-206.
- (6) DeBano LF, Neary DG, Ffolliott PF (1998) *Fire's effects on ecosystems*, John Wiley and Sons Inc., New York, USA .
- (7) Acea MJ, Carballas T (1996) Changes in physiological groups of microorganisms in soil following wildfire. *FEMS Microbiol Ecol* 20, 33-39
- (8) Yeager CM, Northup DE, Grow CC, Barns SM, Kuske CR (2005) Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl Environ Microbiol* 71, 2713-2722
- (9) Hart SC, DeLuca TH, Newman GS, MacKenzie MD, Boyle SI (2005) Post-fire vegetative dynamics as drivers of microbial community structure and function in forest soils. *Forest Ecology and Management* 220, 166- 184
- (10) Hobbie, J. E., Hobbie EA. (2006) N-15 in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in arctic tundra. *Ecology* 87(4), 816-822.
- (11) Smith, S. E., Read DJ. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. London, UK: Elsevier.

- (12) Ishida, T.A, Nara K, Hogetsu T. (2007) Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: Insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytologist* 174, 430-440.
- (13) Nara, K. (2006) Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert. *New Phytologist* 171(1), 187-198.
- (14) Lee, S.S. (1998). Root symbiosis and nutrition. In: S. Appanah J. M. Turnbull eds. A review of dipterocarps: Taxonomy, ecology, and silviculture. Jakarta, Indonesia: Center for International Forestry Research, 99-114.
- (15) Doerr, S.H. (1998) On standardizing the “water drop penetration time” and “the molarity of an ethanol droplet techniques to classify soil hydrophobicity: a case study using medium textured soils. *Earth Surface Processes and Landforms*. 23, 663-668.
- (16) 日本土壤肥料学会 (1997) 土壤環境分析法、博友社
- (17) Muyzer G, De Waal EC, Uitierlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59, 695- 700
- (18) Kowalchuk GA, Stephen JR, Boer WD, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JW (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the b subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 63, 1489- 1497
- (19) Monciardini P, Sosio M, Cavaletti L, Chiocchini C, Donadio S (2002) New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiol Ecol* 42, 419- 429
- (20) Mahmood S, Freitag TE, Prosser JI (2006) Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *FEMS Microbiol Ecol* 56, 482- 493
- (21) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410
- (22) Thompson, JD ,Gibson TJ, Plewniak TJ, Jeanmougin F, Higgins F. (1997) The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882
- (23) Koljalg U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Hoiland K, Kjoller R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vralstad T, Ursing BM. (2005) Unite: A database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166(3), 1063-1068.
- (24) Certini, G. (2005) Effect of fire on properties of forest soil: a review. *Oecologia* 143, 1-10.
- (25) 堤利夫 (1987) 森林の物質循環、東京大学出版会
- (26) Muyzer, G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C (1998) Denaturing

- gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microb. Ecol. Man.* 3.4.4, 1- 27
- (27) Gelsomino, A, Keijzer-Wolters AC, Dirk van Elsas CJ (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiological Methods* 38, 1-15
- (28) Covington WW, DeBano LF (1990) Effects of fire on pinyon- juniper soils. In: Krammes, J.S. (Technical Coordinator), *Effects of Fire Management of Southwestern Natural Resources*. USDA For. Serv. Gen. Tech. Re RM 191, 78- 86
- (29) Neary, DG, Klopatek CC, DeBano LF, Ffolliott PF (1999) Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis. *Forest Ecology and Management* 122, 51-71
- (30) Marsh, TL, Liu WT, Forney LJ, Cheng H (1998) Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *WATER Sci. Tech.* 37, 455-460
- (31) Nikolcheva, LG, Cockshutt AM, Bärlocher F (2003) Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Appl Environ Microbiol* 69, 2548- 2554
- (32) Polymenakou PN, Bertilsson S, Tselepides I A, Stephanou EG (2005) Links between geographic location, environmental factors, and microbial community composition in sediments of the eastern Mediterranean Sea. *Microbio Ecol* 49, 367-378
- (33) Kuske, CR, Ticknor, Miller ME, Dunbar JM, Davis JA, Barns SM, Belnap J (2002) Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland. *Appl Environ Microbiol* 68, 1854-1863
- (34) Mummey, DL, Stahl PD (2003) Spatial and temporal variability of bacterial 16S rDNA-based T-RFLP patterns derived from soil of two Wyoming grassland ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 46, 113- 120
- (35) Pett-Ridge, J, Firestone MK (2005) Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil. *Appl Environ Microbiol* 71, 6998- 7007
- (36) 杉田亮平 (2007) 粒子一粒に生息する土壌細菌の多様性に関する研究 (東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻2006年度修士論文) (未公表)
- (37) Vazquez FJ, Acea MJ, Carballas T (1993) Soil microbial populations after wildfire. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13, 93- 10
- (38) Dunn, PH, Barro SC, Poth M (1985) Soil moisture affects survival of microorganisms in heated chaparral soil. *Soil Biol Biochem* 17, 143-148
- (39) Kowalchuk, GA, Stephen JR (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A Model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55, 485-529
- (40) Fierer, N, Bradford MA, Jackson RB. (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88 (6), 1354-1364
- (41) Reay, DS, Nedwell DB, McNamara N, Ineson P (2005) Effect of tree species on methane and ammonium oxidation capacity in forest soils. *Soil Biol Biochem* 37, 719- 730
- (42) Mintie, AT, Heichen RS, Cromack Jr K, Myrold DD, Bottomley PJ (2003) Ammonia-oxidizing

- bacteria along meadow-to-forest transects in the Oregon cascade mountains. *Appl Environ Microbiol* 69, 3129- 3136
- (43) Stephen JR, McCaig AE, Smith Z, Prosser JI, Embley TM. (1996) Molecular diversity of soil and marine 16SrDNA sequences related to β -subgroup ammonia oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62, 4147-54
- (44) Deni J, Penninckx MJ. (1999) Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4008- 13
- (45) McCaig, AE, Phillips CJ, Stephen JR, Kowalchuk GA, Harvey M, et al. (1999) Nitrogen cycling and community structure of β -subgroup ammonia oxidising bacteria within polluted, marine fish-farm sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*
- (46) Stephen, JR, Chang Y-J, Macnaughton SJ, Kowalchuk GA, Leung KT (1999) Effect of toxic metals in indigenous soil β - subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 95- 101
- (47) Bruns MA, Stephen JR, Kowalchuk GA, Prosser JI, Paul EA. (1999) Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2994-3000
- (48) Rittmann, BE, Laspidou CS, Flax J, Stahl DA, Urbain V, et al (1999) Molecular and modeling analyses of the structure and function of nitrifying activated sludge. *Water Sci. Technol.* 39, 51- 59
- (49) Kowalchuk GA, Stienstra AW, Heilig GHJ, Stephen JR, Woldendorp JW. (2000) Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 207- 15
- (50) Cello, FD, Bevivino A, Chiarini L, Fani R, Paffetti D, Tabacchioni S, Dalmastrì C (1997) Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4485- 4493
- (51) McNamara, CJ, Leff LG (2004) Response of biofilm bacteria to dissolved organic matter from decomposing maple leaves. *Microb. Ecol.* 48, 324-330
- (52) Folman, JB, Postma J, Veen JAFolman (2001) Ecophysiological Characterization of Rhizosphere Bacterial Communities at Different Root Locations and Plant Developmental Stages of Cucumber Grown on Rockwool *Microbial Ecology.* 42, 586-597
- (53) Hillebrand H. 2004. On the generality of the latitudinal diversity gradient. *American Naturalist* 163(2), 192-211.
- (54) Dickie, IA. 2007. Host preference, niches and fungal diversity. *New Phytologist* 174(2), 230-233.
- (55) Lee, SS 2003. Diversity of putative ectomycorrhizal fungi in pasoh forest reserve. In: T. Okuda, N. Manokaran, Y. Matsumoto, K. Niiyama, S. C. ThomasP. S. Ashton eds. Pasoh: Ecology of a lowland rain forest in southeast asia. Tokyo, Japan: Springer, 149-159.

- (56) Horton, TR, Bruns TD. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10(8), 1855-1871.
- (57) Verbeken, A, Buyck B (2002) Diversity and ecology of tropical ectomycorrhizal fungi in africa. In: R. Watling, J. C. Frankland, A. M. Ainsworth, S. IsaacC. H. Robinson eds. *Tropical mycology 1: Macromycetes*. Oxford, UK: CABI Publishing, 11-24.
- (58) Bergemann, SE, Miller SL. (2002) Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *russula brevipes*. *New Phytologist* 156(2), 313-320.
- (59) Tokeshi, M (1993) Species abundance patterns and community structure. *Advances in ecological research, vol 24*. London: Academic Press Ltd, 111-186.
- (60) Ashton, PS (1982) *Dipterocarpaceae*. Flora mlesiana, Kuala Lumpur, Malaysia:
- (61) Tedersoo, L, Suvi T, Beaver K, Koljalg U. (2007) Ectomycorrhizal fungi of the seychelles: Diversity patterns and host shifts from the native *Vateriopsis seychellarum* (Dipterocarpaceae) and *Intsia bijuga* (Caesalpiniaceae) to the introduced *Eucalyptus robusta* (Myrtaceae), but not *Pinus caribea* (Pinaceae). *New Phytologist* 175(2), 321-333.
- (62) Molina, R, Massicotte H, Trappe JM (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: Community-ecological consequences and practical implications. In: M. J. Allen ed. *Mycorrhizal functioning*. New York, USA: Chapman and Hall, 357-423.
- (63) Jonsson, L, Dahlberg A, Nilsson MC, Zackrisson O, Karen O. (1999) Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Molecular Ecology* 8(2), 205-215.
- (64) Brearley, FQ, Press MC, Scholes JD. (2003) Nutrients obtained from leaf litter can improve the growth of dipterocarp seedlings. *New Phytologist* 160(1), 101-110.
- (65) Baar, J, Horton TR, Kretzer AM, Bruns TD. (1999) Mycorrhizal colonization of *pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist* 143(2), 409-418.
- (66) Nara, K, Nakaya H, Wu BY, Zhou ZH, Hogetsu T. (2003) Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on mount fuji. *New Phytologist* 159(3), 743-756.
- (67) Kikuchi J, Okimori Y, Watanabe T (1996) The effect of mycorrhiza formation on the seedling growth of seferal dipterocarps in the nursery and field. In: I. Suhardi, I. S. Hardiwinoto, SumardiY. Okimori eds. *Ecology and reforestation of dipterocarp forest*. Yogyakarta, Indonesia: Aditya Media, 10-16.
- (68) 環境省総合環境政策局編, 環境統計集 平成18年度版, p255

7. 国際共同研究等の状況

共同研究期間の1つであるボゴール農科大学とは、東京大学大学院農学生命科学研究科と学術交流協定を締結しており、同大学のDr. Nora, Dr. Erizal, Dr. Sapeiが共同研究に参加している。

共同で研究を行ったインドネシア科学院生物学研究センター(RCB-LIPI)のI Made Sudiana博士（本研究のカウンターパート）とは学術交流を継続しており、複数回の相互訪問を行っているほか、今後も共同研究を計画している（日本学術振興会の国際学術調査に関する助成金を申請予定）。

科学研究費補助金 基盤研究（B）（海外学術）「アジアの荒廃地で森林再生に不可欠な菌根菌を探る」 Shenkui Liu（中国・東北林業大学）他

科学研究費補助金 基盤研究（B）（海外学術）「中国の鉱山性荒廃地における微生物多様性を活用した植生回復に関する研究」 沈振国（中国・南京農業大学）他

8. 研究成果の発表状況

（１）誌上発表

＜論文（査読あり）＞

- 1) Otsuka, S., Sudiana, I-M., Komori, A., Isobe, K., Deguchi, S., Nishiyama, M., Shimizu, H., Senoo, K. Community structure of soil bacteria in a tropical rainforest several years after fire. *Microbes and Environments* 23 (1), 49-56 (2008).

＜その他誌上発表（査読なし）＞

- 1) 宮崎毅、西村択、鈴木香織、関勝寿、溝口勝：2008土壌水分WS論文集(土壌水分ワークショップ2008実行委員会)(2008) 「インドネシア国東カリマンタンの熱帯雨林における土壌水分モニタリング」(印刷中)
- 2) 奈良一秀（2007）生態系を見る新たな視点：菌根菌、理科教室 50: 30-37.
- 3) 奈良一秀（2008）菌根菌による植生遷移促進機構、In: 攪乱と遷移の自然史、重定・露崎 編、北海道大学出版会 258 p.

（２）口頭発表（学会）

- 1) 鈴木香織、濱本昌一郎、関勝寿、溝口勝、宮崎毅：平成18年度農業土木学会大会講演会（2006）「インドネシアにおける森林火災後の土壌特性の変化に関する研究」
- 2) 鈴木香織、常田岳志、関勝寿、溝口勝、宮崎毅、西村拓：第48回土壌物理学会シンポジウム（2006）「火災を受けた熱帯森林土壌中の水分移動に関する研究」
- 3) Nara, K. (2006) Ectomycorrhizal fungal networks facilitate plant succession. British Mycological Society Annual Conservation & Taxonomy Meeting in partnership with The Royal Botanic Gardens, Kew (London, UK), invited speech.
- 4) Nara, K. (2006) Ectomycorrhizal symbioses and vegetation development. The 8th International Mycological Congress (Cairns, Australia), invited speech.
- 5) Nara, K. (2006) Functional ecology of ectomycorrhizal symbiosis during early primary succession. The 5th International Conference on Mycorrhiza (Granada, Spain), invited speech.
- 6) 小淵敦子、井本博美、西村拓、溝口勝、宮崎毅：平成19年度農業土木学会大会講演会（2007）「模擬森林火災下における土壌中の水・熱・有機物の移動と変化に関する研究」
- 7) 鈴木香織、関勝寿、溝口勝、宮崎毅：平成19年度農業土木学会大会講演会（2007）

「火災を受けたインドネシア熱帯雨林における土壌特性に関する研究」

- 8) 小渕敦子、溝口勝、西村拓、井本博美、宮崎毅：第49回土壌物理学会シンポジウム(2007)
「模擬森林火災下における地温変化の解析」
- 9) 西村 拓、小渕敦子、溝口勝、井本博美、宮崎毅：平成19年度土壌肥料学会大会(2007)「森林火災を想定した模擬燃焼実験下における土壌温度分布と土の物理化学性の変化」
- 10) Obuchi, A., T. Nishimura, M. Mizoguchi and T. Miyazaki: Agronomy Abstract, ASA Meeting, Soil Science Soc. of Am. (2007) Changes in temperature profile and properties of organic soils of different initial moisture conditions under external thermal impact (Poster, 285-9)
- 11) 磯部一夫、大塚重人、I Made Sudiana、Arif Nurkanto、妹尾啓史：日本土壌肥料学会2007年大会（東京）
「森林火災の被害を受けた熱帯林における土壌細菌の群集構造」
- 12) 奈良一秀（2007）菌根菌が木を育て森を作る！ 日本森林学会第118回大会（九州大学）
- 13) 宮崎毅、西村拓、鈴木香織、関勝寿、溝口勝：土壌水分ワークショップ(2008)
「インドネシア国東カリマンタンの熱帯雨林における土壌水分モニタリング」
- 14) 磯部一夫、大塚重人、I Made Sudiana、Arif Nurkanto、妹尾啓史：日本土壌肥料学会2008年大会（名古屋）「森林火災から約10年経過した東カリマンタン熱帯林の土壌細菌群集構造」（発表登録済み）
- 15) Isobe, K., Otsuka, S., Sudiana, I-M., Nurkanto, A., Senoo, K.: International Society for Microbial Ecology “The 12th International Symposium on Microbial Ecology - ISME12” 2008 “COMMUNITY COMPOSITION OF SOIL BACTERIA NEARLY A DECADE AFTER FIRE IN A TROPICAL RAINFOREST IN EAST KALIMANTAN, INDONESIA”（審査通過済み、要旨提出済み）
- 16) 奈良一秀・木下晃彦・石田孝英・田中恵・Suciatmih・Simbolon Herwint（2008）熱帯フタバガキ林における外生菌根菌の多様性、日本森林学会第118回大会（東京農工大学）
- 17) Nara, K. (2008 12月発表予定) Host effects on ectomycorrhizal fungal communities. The 21st New Phytologist symposium: The ecology of ectomycorrhizal fungi (Montpellier, France), invited speech.

（３）出願特許

なし

（４）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

なし

（５）マスコミ等への公表・報道等

- 1) NHK高校講座 生物 2008年2月18日放送 インドネシアの菌根菌研究についての紹介

（６）その他

なし