

外生菌根菌群集の空間・時間変動における
ニッチ要因及び空間・時間関連要因の影響力の評価

松岡俊将

目次

要旨	1
第1章 総合序論	3
第2章 標高に沿った外生菌根菌群集の空間変動と ニッチ要因・空間関連要因の影響	11
第3章 本邦亜熱帯常緑樹林における 外生菌根菌群集組成の類似度の時間距離減衰	50
第4章 総合考察	88
謝辞	96
引用文献	97
出典	107

要旨

外生菌根菌はブナ科やマツ科など森林生態系において優占する植物の根に感染して、宿主と相利共生的に養分の交換を行う菌類である。これまで、外生菌根菌群集の種組成(群集組成)が空間的・時間的に変動することは、様々な空間・時間スケールにおいて確かめられてきた。この群集組成の空間・時間変動は、群集の構成種がニッチ要因(宿主群集や非生物的環境要因)の空間・時間変動に速やかに応答するためだと考えられてきた。一方で近年、外生菌根菌群集は、ニッチ要因以外にも群集の空間・時間構造を生じさせる分散制限や先住者効果といった要因、すなわち空間・時間関連要因が存在することが指摘され始めている。しかし、野外環境において外生菌根菌群集の空間・時間構造に着目し、空間・時間関連要因の影響力を評価した研究はこれまでほとんど行われてこなかった。これに対して私は、外生菌根菌群集の空間変動と時間変動のパターンを野外で記述すると同時に、気温や降水量といった環境変数(ニッチ要因)と、群集間の空間・時間距離(空間・時間関連要因)を測定することで、両要因の影響力を定量に評価することを目的に2つの研究を行った。

第2章では、標高傾度に伴う外生菌根菌群集の空間変動と、群集組成の空間変動におけるニッチ要因(宿主群集、非生物環境変数)と空間関連要因(空間距離)の影響を調査することを目的とした。北海道羅臼岳の標高200、400、600、800、1000、1200 mの6標高クラスにおいて、それぞれ10個の調査プロットを設置した。各調査プロットでは、宿主群集、環境変数(地形)、空間座標を記録し、外生菌根を含む土壌ブロックを採集した。各土壌ブロックについて土壌化学性を計測すると共に、次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディングにより菌類相の解析を行った。その結果、合計138 OTU(操作的分類群)の外生菌根菌が検出された。標高クラス間では OTU 数の有意差は検出されなかった。一方、OTU 組成は標高に伴い変化していた。OTU 組成の空間変動における宿主群集、環境変数、空間変数の寄与率を db-RDA に基づく variation partitioning により推定したところ、宿主群集、環境変数、空間変数の説明力は、それぞれ33%、26%、31%で、合計の約45%の空間変動が説明された。このうち、空間変数のみでは約6%の OTU 組成の空間変動が説明された。この結果は、ニッチ要因とともに空間関連要因も外生菌根菌群集の空間変動を引き起こす要因とし

て無視できないことを意味する。

第3章では、外生菌根菌の局所群集の時間変動と、その要因としてニッチ要因(土壌環境・気候)と時間関連要因(時間距離)の影響を調査することを目的とした。沖縄県本島北部の常緑亜熱帯林に 10 m×50 m の調査区を設置した。2009 年 7 月から 3 カ月おきに 2 年間計 8 回にわたって、外生菌根を含む土壌ブロックを採集し、調査日と各調査日前の気温・降水量を記録した。各土壌ブロックについて土壌化学性を計測すると共に、次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディングにより菌根菌相の解析を行った。その結果 2 年間で合計 123 OTU の外生菌根菌が検出された。調査時期によって OTU 数の有意差は検出されなかった。調査時期間の OTU 組成の非類似度は時間に伴い増加したが、環境・気候との有意な相関は見られなかった。OTU 組成の空間・時間変動における環境・気候変数と空間・時間変数の寄与率を db-RDA に基づく variation partitioning により推定したところ、環境・気候・空間・時間変数はそれぞれ 1.7, 1.7, 4.3, 3.7%(合計 11.5%)を説明した。これらの結果は、調査地における外生菌根菌群集は、季節や年によらず時間の経過に伴い変化し続けること、そして群集の時間変動にはニッチ要因に加えて時間関連要因も影響しうることを示唆している。

第2章と第3章の結果は、従来から着目されてきたニッチ要因のみならず、空間・時間関連要因も外生菌根菌群集の空間・時間変動を引き起こす要因の1つであることを示している。外生菌根菌の群集集合プロセスへの理解を深めるためには、ニッチ要因に加えて、群集の空間・時間構造と分散制限や先住者効果を含む空間・時間関連要因の影響も考慮する必要があると考えられる。

第1章 総合序論

1.1 外生菌根菌の多様性と生態系機能

生きた植物の根に侵入し、菌根と呼ばれる共生器官を形成する菌類を菌根菌と言う。菌根菌は、菌根を介して宿主植物から光合成産物を受け取り、土壌中の窒素・リンなどの養分を宿主に供給することで生活している。菌根共生は陸上生態系において最も広くみられる共生関係の一つであり、維管束植物のうち 80%以上の種が菌根形成能力を持つと考えられている(Wang & Qiu 2006; Brundrett 2009)。菌根は、形態的特徴により、以下の 7 タイプに分けることが出来る。つまり、アーバスキュラー菌根、外生菌根、内外生菌根、アークトイド菌根、モノトロポイド菌根、エリコイド菌根、ラン菌根である(Smith & Read 2008)。このうち、本研究で研究対象とした外生菌根は、以下の 3 つの形態的特徴により定義されている菌根タイプである。(i)植物細根表面を菌糸が覆う(菌鞘)、(ii)植物の皮層細胞間にハルティヒネットと呼ばれる菌糸構造を形成する、(iii)菌根から環境中に菌糸(外部菌糸)を伸長させる(Taylor & Alexander 2005; Smith & Read 2008)。外生菌根を形成する菌類(外生菌根菌)は、菌類の系統上で数なくとも 70 回以上独立に出現しており、現在未記載の種も含めて世界中で 2 万から 2 万 5 千種に上ると推定されている(Rinaldi *et al.* 2008; Tedersoo *et al.* 2010; Tedersoo & Smith 2013)。その多くは菌類の中でも派生的な担子菌門や子囊菌門に分類されるが、一部の接合菌類も含まれる(Tedersoo *et al.* 2010; Tedersoo & Smith 2013)。一方、外生菌根共生を行う植物は、ブナ科、マツ科、カバノキ科、フタバガキ科、フトモモ科など、熱帯林から北方林まで広い地域の森林で優占する木本植物を中心に約 6000 種が含まれる(Wang & Qiu 2006; Brundrett

2009)。

外生菌根菌は、菌根共生を通じて森林生態系において様々な生態系機能を果たしている。例えば、宿主植物の窒素やリンといった養分獲得量の増加 (Smith & Read 2008)、病原菌・重金属・水分ストレスに対する耐性の増加 (Parke *et al.* 1983; Duchesne *et al.* 1989; Walker *et al.* 1989; Sell *et al.* 2005)、同所的に存在する異なる樹種間での競争の緩和 (Perry *et al.* 1989) といった植物の生長・生存に関する機能や、宿主植物から受け取った光合成由来の炭素を自身の菌糸バイオマスとして土壤中に貯蔵する (Clemmensen *et al.* 2013)、窒素等の養分獲得のために土壤有機物の分解を促進する (Phillips *et al.* 2014) といった生態系の物質循環に関する機能である。野外環境では、宿主植物は外生菌根菌がいないと定着・生長がほとんど出来ないことや (Nara & Hogetsu 2004)、外生菌根菌のバイオマスは森林土壌中の全微生物バイオマスの 3 分の 1 にも上りうるほど大きいことから (Högberg & Högberg 2002)、森林の生態系機能を考える上でも外生菌根菌は不可欠な構成要素であると考えられている (Read & Perez-Moreno 2003; Taylor & Alexander 2005; Courty *et al.* 2010; Clemmensen *et al.* 2013)。

ある植物個体上や森林内の外生菌根菌群集は、一般に多様な種・系統により構成されていることが知られている。例えば、比較的調査例の多い北半球の温帯林・北方林では、数ヘクタールの森林内の外生菌根菌群集には通常 100 を超える種が含まれる (Richard *et al.* 2005; Walker *et al.* 2005; Ishida *et al.* 2007)。この高い種多様性はより小さい空間スケールでも見られ、樹木は一個体でも 10-100 種以上の菌根菌と同時に共生しうることが示されている (Saari *et al.* 2005; Bahram *et al.* 2011)。加えて、外生菌根菌の群集構造は、環境変動に伴い時空間的に変化することが野外実験や観察から確かめられている。例えば、Lilleskov ら (2001; 2002) は、大気汚染に伴う森林への窒素供給量の増加により、

外生菌根菌群集中の特定の種が消失し、種多様性が低下しうることを示した。一方、宿主植物への外生菌根菌の接種試験や、外生菌根菌による有機物の分解実験により、外生菌根菌が発揮できる機能やその効果量は種や系統により異なることが示されている (van der Heijden & Kuyper 2003; Courty *et al.* 2005; Nara 2006)。このことは、外生菌根菌群集が果たす生態系機能は、その群集構造に応じて大きく変わりうることを示している。すなわち、生態系における外生菌根菌の多様性と外生菌根菌が果たす機能の維持・管理を考える上では、外生菌根菌群集の記述と、群集構造がどのような要因に影響を受けて決定されているのか(群集集合プロセス)の理解が不可欠であるといえる(Lilleskov & Parrent 2007; Koide *et al.* 2011)。

1.2 外生菌根菌群集の空間・時間変動と群集集合プロセス

今日まで、外生菌根菌群集構造の空間的・時間的な変動は、様々な空間・時間スケールにおいて生じることが確かめられてきている。例えば、空間変動は、局所スケール(本研究では数 m から数百 m 程度と定義)から、景観スケール(同じく数百 m から数 km 程度と定義)、そして地域・大陸スケール(同じく数十 km から数千 km と定義)において生じうることが知られている(Tedersoo *et al.* 2003; Bahram *et al.* 2012; Pöhlme *et al.* 2013)。一方、時間変動については、植生遷移に伴い優占種が変化することや(Mason *et al.* 1983; Visser 1995; Nara *et al.* 2003)、成熟した森林内においても数か月という時間スケールで優占種が入れ替わることが報告されている(Koide *et al.* 2007; Courty *et al.* 2008)。このように外生菌根菌群集が空間・時間的に変動する理由は、外生菌根菌種がそれぞれに異なるニッチを占めており、野外のある空間・時間点における環境に適した種が群集を構成するためだと考えられてきた(Bruns 1995)。そのため、これまでの外生

菌根菌群集集合プロセスの研究では、群集の空間・時間変動を引き起こすニッチ要因の特定が主な目的とされてきた。これらの研究はニッチ要因として特に、ある生物的・非生物的環境要因に着目し、その要因の状態が異なる地点間の外生菌根菌群集を比較することで進められてきた。例えば、群集の空間変動においては、宿主の種や系統(Korkama *et al.* 2006; Ishida *et al.* 2007; Tedersoo *et al.* 2013)、土壌化学性や養分利用可能性(Conn & Dighton 2000; Lilleskov *et al.* 2002; Toljander *et al.* 2006; Parrent *et al.* 2007)、気候要因(気温や水分量、Bahram *et al.* 2012; Jarvis *et al.* 2015)などの空間変動が群集構造を決める上で重要な要因であることが確かめられている。一方、時間変動においては、気候要因(気温や降水量)の季節変化が、群集の時間変動における重要な要因だと考えられている(Buée *et al.* 2005; Courty *et al.* 2008)。

一方、ニッチ要因以外にも生物群集の空間構造に影響を与える要因がある。その代表的なものとして分散制限が挙げられる。一般的に生物の分散能力は限られており、ある個体の子孫は、自身の近くに存在している確率が高い。結果として、空間距離が近いほど群集組成が似るという、群集の空間構造(類似度の空間距離減衰、spatial distance decay of similarity)が生じることになる(Morlon *et al.* 2008; Dray *et al.* 2012)。同様に、ニッチ要因以外にも生物群集の時間構造に影響を与える要因として、例えば先住者効果が挙げられる。つまり、ある個体がある場所に一度定着することで、後から来る個体がある場所に定着することを妨げる場合がある。そのため、ある個体は時間的に近いほど、その場所に存続している確率が高い。結果として、ある調査地においては、時間距離が近いほど群集組成が似るという、群集の時間構造(類似度の時間距離減衰、temporal distance decay of similarity)が生じることになる。これら、ニッチ要因とは独立に群集の空間・時間構造を生じさせる要因を、本論文では空間・時間関

連要因と呼ぶこととする。

こうした空間・時間関連要因が生物の群集構造に及ぼす影響については、これまでいくつかの研究で検討されている。例えば、動植物群集を対象とした群集研究では、生物群集はしばしば類似度の距離減衰を示し、それにはニッチ要因(つまり環境要因の空間・時間自己相関)では説明できない空間・時間距離構造が含まれることが知られている。このニッチ要因では説明できない群集の空間・時間構造には、分散制限や先住者効果などに由来する空間・時間関連要因が影響していると考えられている(例えば Morlon *et al.* 2008; Qian & Ricklefs 2007; Carvaho *et al.* 2011; Dray *et al.* 2012)。このように、ニッチ要因と空間・時間関連要因は同時に生物群集構造に影響を与えうる。もし、ある生物群集が空間・時間構造を持つにも関わらず、その群集の空間・時間構造を考慮せずにニッチ要因と群集組成の関係のみを調査した場合、ニッチ要因の影響力を過大評価し、結果として誤った群集集合プロセスの理解に繋がる可能性があることが指摘されている(Legendre & Troussellier 1988; Borcard *et al.* 1992; Cottenie 2005)。そのため、近年では動植物群集を中心とした様々な生物群集を対象に、群集の空間・時間構造を考慮した群集調査を行い、両要因の群集組成への影響を定量・分離するという研究が行われ始めている。

近年、外生菌根菌においても分散制限や先住者効果が存在すること報告されている (Kennedy & Bruns 2005; Kennedy *et al.* 2009; Peay *et al.* 2010a; Peay *et al.* 2012)。この事実は、外生菌根菌の群集研究においても、群集の空間・時間構造を考慮し、ニッチ要因のみならず、空間・時間関連要因が群集に与える影響を評価する必要性があることを示している。しかし、上述の通り、外生菌根菌群集の群集集合プロセス研究では、これまでニッチ要因の影響のみが主に注目されてきた。そのため、野外環境における外生菌根菌群集組成がどのような

空間・時間構造を持つのか、そして空間・時間関連要因が群集組成に影響しているのかを評価している研究例は依然少ない(Bahram *et al.* 2015)。特に、外生菌根菌群集の空間変動においては、群集の空間構造に着目した調査・解析を行っている研究は、数百 m 程度以内の局所スケールでのものがほとんどであり(Lilleskov *et al.* 2004; Bahram *et al.* 2013; 2015)、数 km 程度の景観スケール以上の空間スケールにおいて群集の空間構造と空間関連要因の影響を解析した例は限られている。さらに、群集の時間変動に関する研究例は、空間変動に関する研究と比べても非常に少ない(Bahram *et al.* 2015)。例えば、これまでの研究では、数か月間の調査により局所群集が時間変動を示すこと、そして群集の時間変動とニッチ要因(例えば気温の時間変動)の関係が議論されてきたが(Buée *et al.* 2005; Courty *et al.* 2008)、群集がどのような時間構造を持つのか、特に類似度の時間距離減衰を示しているのかを検証した例はない。

1.3 外生菌根菌群集の調査方法

外生菌根菌群集の空間・時間構造を評価するためには、空間・時間傾度に沿ったサンプリングに基づく群集調査が必要である。従来、野外環境における外生菌根菌群集の記述は、主にヨーロッパや北米の温帯林・北方林において、地上部に発生した子実体(きのこ)や地下部の菌根を採集し、それらの形態を観察することで行われてきた(Horton & Bruns 2001)。しかし、子実体の発生は個々の種のフェノロジーに依存すること、菌根形成を行っているにもかかわらず肉眼で認識可能な目立った子実体を形成しない種・系統も多数存在する。そのため、子実体調査では菌根を対象とした調査と比べて種数が過小評価され、発見が容易な子実体を形成する種へのバイアスも大きいことが指摘されてきた(Gardes & Bruns 1996; Horton & Bruns 2001; Erland & Taylor 2003)。一方、菌根は

形態情報に乏しいため、同定には多くの知識・経験が必要であること、標本によつては同定が困難、あるいは隠蔽種の存在がしばしば認められることがあった。これら形態観察に基づく多様性調査の問題点は DNA を解析対象とした分子生物学的手法の発達により部分的に解消されたものの(Horton & Bruns 2001; Peay *et al.* 2008)、多数のサンプルの塩基配列を決定するには多くのコスト(時間・金銭)が必要であることから、DNA 解析を用いた大規模な群集調査は依然困難であった。しかし、2000 年代に登場した次世代シーケンサーは、シーケンス反応の並列化により、従来法に比べて飛躍的に少ないコストで多くの塩基配列を取得することが可能であり、外生菌根菌を含めた菌類群集調査における有用性が示されている(例えば Pöhlme *et al.* 2013; Tedersoo *et al.* 2014; Davison *et al.* 2015)。次世代シーケンサーのような低コストで大規模な群集調査を可能とする手法は、空間・時間傾度に沿った群集調査を行う上で有用性が高いと考えられる。なぜなら、空間・時間傾度に沿ったサンプリングを行う場合、従来行われていたような環境要因が異なる地点間の群集比較を行う場合に比べて、解析を行うサンプル数が多くなるためである。私は、次世代シーケンサーを用いて、空間・時間傾度に沿った外生菌根菌群集の調査を行うことで、空間・時間関連要因が外生菌根菌群集の空間・時間変動に影響を与えうるのかを検証可能だと考えた。

1.4 本論文の目的

本研究では、次世代シーケンサーを利用して(1)景観スケール(数 km 程度の範囲)での群集の空間変動と(2)局所スケール(数十 m 程度の範囲)での群集の時間変動の 2 点を調査することで、外生菌根菌群集が空間・時間構造(類似度の空間・時間距離減衰)を示すのか、そしてその空間・時間構造に空間・時間関

連要因が影響しうるのかを評価することを目的とした。

本論文は全4章からなっている。第1章の総合序論に続き、第2章では、北海道の羅臼岳において、標高傾度(約4 km)に沿った外生菌根菌群集調査を行った。調査対象の標高傾度では、低標高域(標高 600 m ほどまで)の針広混交林から高標高域(標高 600 から 1200 m ほど)の亜高山林という宿主群集組成の変化と、気温・土壌化学性等の非生物的環境要因の変動を含んでいる。これら宿主群集組成、非生物環境、そして空間関連要因が外生菌根菌群集組成の空間変動にどのくらい寄与しているのかを定量的に評価することで、景観スケールにおいても、空間関連要因が群集の空間変動に影響を与えうるのかを評価した。

第3章では、沖縄県の常緑亜熱帯林において、2年間にわたって局所スケールでの外生菌根菌群集の調査を行った。環境要因と時間要因が群集の時間変動にどのくらい寄与しているのかを定量的に評価することで、群集が類似度の時間距離減衰を示すのか、そして時間関連要因が群集の時間変動に影響しうるのかを評価した。

第4章では、第2章と第3章で得られた結果をまとめ、ニッチ要因及び空間・時間関連要因が外生菌根菌群集の空間・時間変動に与える影響と外生菌根菌群集研究の展望について総合的に議論した。

第2章 標高に沿った外生菌根菌群集の空間変動と

ニッチ要因・空間関連要因の影響

2.1 序論

本章では、景観スケールにおける外生菌根菌群集組成の空間変動と、空間変動におけるニッチ要因・空間関連要因の影響を調べるために、標高傾度に沿った調査を行った。標高傾度を含む環境傾度に沿った群集構造の変化とそのメカニズムの解明は、将来の環境変動が生態系に対してどのような影響をもたらしうるかを予見する上でも重要である(Botkin *et al.* 2007; Driscoll & Lindenmayer 2009)。様々な環境傾度の中でも、標高傾度は歴史的に特に注目されてきた。標高傾度においては、比較的狭い地理的範囲の中で気温のような環境が大きく変化することが知られている(Körner 2007)。そのため古くから、温暖化のような気候変動に対する生物群集の応答を調べるために用いられてきた。これまで、動植物の様々なグループにおいて標高に沿った種組成の変化が報告されており、現在及びこれからの生物群集の状態を決定する上で重要な要因が特定されてきた(例えば Kessler 2000; Romdal & Rahbek 2009; Hoiss *et al.* 2012; Mori *et al.* 2013; 2015)。

第 1 章でも述べたように、一般的に生物群集はニッチ(環境)要因と空間関連要因の両方の影響を受けている(Borcard *et al.* 1992)。環境による生物種の選択(環境フィルタリング)が強い場合、局所群集間の類似度は鍵となる環境変数の類似度によって決まる。一方、群集組成が空間関連要因によって決定される場合には群集は環境要因とは関係なく過去の分散のイベントを反映した空間構造(類似度の空間距離減衰)を示す(例えば Qian & Ricklefs 2007)。ニッチ要因と

空間関連要因は相互に排他的ではなく、両要因が同時に群集の空間変動に影響することがわかっており (Cottenie 2005; Carvaho *et al.* 2011)、近年では動植物を中心とした様々な生物群集の生物地理的な空間変動において、この 2 要因の影響を定量し、分離するという研究が行われ始めている (例えば Qian & Rickefs 2012; Mori *et al.* 2013; 2015)。

近年、外生菌根菌の群集組成も標高傾度に伴い変化すること、その要因として、標高傾度に伴う宿主植物群集や非生物的環境(気温など)の変化が関係していることが示されてきた (Bahram *et al.* 2012; Coince *et al.* 2014; Jarvis *et al.* 2015)。しかし、空間関連要因を考慮した上で、標高に伴う群集組成の変化に対する宿主植物群集と非生物的環境、空間関連要因の影響を分離した研究はほとんどない。その理由の 1 つとして、外生菌根菌を始めとする微生物は、小型で多量の分散体(菌類では孢子)を生産するため、動植物に比べて分散能力が非常に高いと考えられていたことが挙げられる (Finlay 2002; Wilkinson *et al.* 2012)。しかし近年、外生菌根菌の孢子には分散制限が存在することが実験的に示されており (Peay *et al.* 2010a; 2012)、外生菌根菌群集も他の大型生物と同様にニッチ要因と空間関連要因の両者の影響を受けている可能性が指摘されている (Peay *et al.* 2010a; 2012)。外生菌根菌群集の環境変動応答を考えるためにも、空間関連要因の影響も考慮した上で、外生菌根菌群集がどのくらい生物的・非生物的環境の影響を受けているのかを定量的に評価することが重要だと考えられる。

以上を踏まえ、本章では北海道東部の調査地において標高傾度に沿った外生菌根菌群集を調査し、群集集合プロセスに対するニッチ要因(生物・非生物的環境要因)と空間関連要因の相対的な寄与率を定量した。調査を行った標高傾度は低標高域の混交林から亜高山の低木林まで広がるもので、地形や土壌特性といった環境要因及び宿主植物群集組成において連続的に変化する幅広い環

境を含んでいる。そのため、外生菌根菌群集の空間変動がどのような要因と関係するのかを検討しやすいと考えた。本章の目的は(1)宿主群集、非生物的環境、空間関連要因は同時に外生菌根菌群集組成に影響しうるのか、(2)標高傾度に沿った外生菌根菌群集の空間変動においてこれら 3 要因がそれぞれどの程度の相対的な寄与率を示すのかを明らかにすることである。

2.2 材料と方法

調査地

本研究は北海道の北東部に位置する知床国立公園内の羅臼岳(北緯 44°04'32"、東経 145°07'20"、標高 1661 m)の北西斜面で行われた。知床半島はその生物多様性の高さから UNESCO の世界自然遺産に登録されており、海岸から森林限界まで、その面積の約 90%が自然林に覆われている。年平均気温は 6.2 °C、年間降水量は 1089.9 mm である(気象庁、調査地から南西約 10 km 地点、標高 144 m にあるアメダス)。羅臼岳は安山岩質の溶岩流を主体とする成層火山で、近年起こった 3 回の噴火(約 2200 年前、約 1400 年前、約 500 から 700 年前)により生じた火山堆積物が斜面表面を覆っている(宮地ら 2000)。調査地である北西斜面では、低標高域(標高 600 m ほどまで)の針広混交林から、高標高域(標高 600 m から 800 m ほど)の落葉広葉樹林、高標高域(標高 1200 m まで)の亜高山林という標高に沿った植生の変化がみられる。本研究と同一の調査地では、過去に動植物群集(木本植物、蘚苔類・シダ類を含む草本植物、土壤動物)を対象とした群集調査が行われている(Mori *et al.* 2013; 2015)。

調査方法

サンプリングは 200、400、600、800、1000、1200 m の 6 標高クラス

で行った。各標高クラスにおいて、過去数十年は攪乱が生じていないと考えられる地点に 10 × 10 m (0.01 ha) のプロットを 10 個ずつ、計 60 個 (0.6 ha) のプロット設置した(図 2.1)。各プロットにおいて地理座標、標高、斜面傾度及び斜面の向きを記録した。各標高クラスにおけるプロット間の距離の最大値は 311 から 435 m、平均 366 m である。隣接するプロット間の距離は標高クラス間で有意には異ならなかった(ANOVA、 $P > 0.10$)。隣接する標高クラス間の距離はおよそ 1 km である(図 2.1)。

2010 年 7 月に 60 個のプロットの中心において樹木根を含む腐植(FH)層のブロック(各 10 × 10 cm、深さ約 10 cm)を 1 プロットあたり隣接して 2 個ずつ採取した。採取した FH ブロックのうち 1 つはプラスチック製の袋に入れて -20 °C で実験室に運び外生菌根菌の解析に用いた。もう 1 つはプラスチック製の袋に入れて実験室に運び土壌の分析に用いた(以下の「宿主群集と環境データ」参照)。

外生菌根菌の解析用の FH ブロックは実験室において室温で溶かし、水道水と 2 mm メッシュのふるいを用いて細根を洗い出した。各ブロックから、長さ約 5 cm の根系を 20 個ずつランダムに選び出し、実体双眼顕微鏡(× 20)下で各根系から 1 個ずつ根端(長さ 1-2 mm)を採取した。得られた 20 根端は FH ブロックごとにプールし、70%エタノール(質量パーセント濃度)、0.005%エアロゾール OT(スルホコハク酸ジオクチルナトリウム)溶液(質量パーセント濃度)及び滅菌蒸留水を用いて洗浄した。その後根端を CTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロマイド)バッファーを含むチューブに移し、DNA 抽出までの間 -20 °C で保存した。

DNA 抽出、PCR 増幅及びパイロシーケンシング

Gardes & Bruns (1993)による改変 CTAB 法を用いて、60 サンプル中の根端から全 DNA を抽出した。その後、菌類のリボソーマル DNA 内部転写領域 1(ITS1 領域)のダイレクトシーケンスを行うために、semi-nested PCR 法による PCR 増幅を行った。ITS 領域は菌類のバーコード領域として広く利用されている領域である(Schoch *et al.* 2012)。Semi-nested PCR では、まず ITS 領域全体とリボソーマル DNA 大サブユニット(LSU)の 5'末端の領域を菌類特異的なプライマーである ITS1F (Gardes & Bruns 1993)と LR3 (Vilgalys & Hester 1990)を用いて増幅した。PCR は KOD FX NEO (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いており、テンプレート DNA 1.6 μ l、KOD FX NEO 0.3 μ l、2 $\times$ バッファー9.0 μ l、dNTP 4.0 μ l、プライマー2 種各 0.5 μ l (それぞれ 10 μ M)及び滅菌水 4.1 μ l を含む 20 μ l の反応系で行った。PCR 反応では、94 $^{\circ}$ C 5 分のステップの後に 95 $^{\circ}$ C 30 秒、58 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 90 秒の 3 ステップを 20 サイクル行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 10 分の伸長反応の延長時間を設けた。PCR 産物は ExoSAP-IT (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.)を用いて精製し、滅菌水 225 μ l を加えて希釈することで 2 回目の PCR 反応のテンプレートとした。2 回目の PCR では ITS1 領域のみをターゲットとし、プライマーとして 454 アダプターA (5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG-3')及び 8 bp の DNA タグを結合させた ITS1F と 454 アダプターB (5'-CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG-3')を結合させたユニバーサルプライマーの ITS2 (White *et al.* 1990)を用いた。8 bp の DNA タグは、シーケンス後にサンプルを特定するために用いるものである (Hamady *et al.* 2008)。PCR は KOD FX Plus NEO (TOYOBO) を用いており、テンプレート DNA 1.0 μ l、KOD Plus NEO 0.2 μ l、10 $\times$ バッファー2.0 μ l、dNTP 2.0 μ l、プライマー2 種各 0.8 μ l (それぞれ 5 μ M)及び滅菌水 13.2 μ l を含む 20 μ l の反応

系で行った。PCR 反応では、94 °C 5 分のステップの後、95 °C 30 秒、60 °C 30 秒、72 °C 90 秒の 3 ステップを 20 サイクル行い、最後に 72 °C 10 分の伸長反応の延長時間を設けた。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により増幅を確認した後、ExoSAP-IT を用いて精製し、Nanodrop で濃度を計測した。増幅産物はサンプル間で DNA のモル数が等しくなるように 2 つのライブラリーにプールし、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)により精製した。得られた 2 つのライブラリーは京都大学理学研究科の GS-FLX シーケンサー (Roche 454 Titanium)の 1/16 リージョンでそれぞれシーケンシングを行った(計 2/16 リージョン)。

バイオインフォマティクス

パイロシーケンシングにより 97,949 リードが得られた。シーケンシングで得られたデータセットは全て日本 DNA データバンクのシーケンスリードアーカイブ(DDBJ Sequence Read Archive)に登録した(アクセッション番号: DRA003024)。これらの配列は 3'末端から信頼度 27 を基準に(Kunin *et al.* 2010)削り、サンプルごとに特異的なタグ配列に基づいて配列を個々のサンプルに選り分けた。その後 5'-及び 3'-末端のプライマー配列とタグ配列を取り除き、得られた配列のうち全長が 150 bp 以下のものは解析から除外し、380 bp 以上のもは 3'末端側から塩基を取り除いていくことで 380 bp の長さになるようにした。これらの手順により残った 42,003 リードを Assams アセンブラー v0.1.2013.08.10 (Tanabe 2013)を用いて配列間でアセンブルした。このアセンブラーは Minimums アセンブリパイプライン(Sommer *et al.* 2007)を並列拡張化したものである。アセンブリの手順ではまず各サンプルに含まれる配列を 99.5% の相同性を基準にアセンブルし、その後シングルトン、キメラ配列、パイロシ

ーケンシングにおけるエラー配列を除外した。キメラ配列と考えられる配列の除去には UCHIME v4.2.40 (Edger *et al.* 2011)を、パイロシーケンシングにおけるエラー配列の除去には CD-HIT-OTU (Li *et al.* 2012)のアルゴリズム(エラーの判定基準は Assams のデフォルトの値である 0.8 を使用)をそれぞれ用いた。これらの選別の結果、21,980 配列が得られた。ここで、選別の結果 50 配列未満しか残らなかったサンプル 6 個を解析から除外し、残りの 54 サンプル(合計 21,788 配列)を以降の解析に用いた。サンプルあたりの配列数は 129 から 1237 (404 ± 221 、平均 $\pm$ S.D.)であった。全ての配列は Assams を用いて 97%の相同性閾値でサンプル間のアセンブルを行い、得られたコンセンサス配列を分子的操作的分類群(OTU)として用いた。97%という相同性閾値は菌類の ITS 領域を用いた解析において広く使われている基準である(Osono 2014)。

得られた OTU の分類群は Claident v0.1.2013.08.10 (Tanabe & Toju 2013)を用いて推定を行った。Claident v0.1.2013.08.10 では、まず BLAST+ (Camacho *et al.* 2009)の方法及び NCBI の分類群ベースの配列同定エンジンを用いて BLAST 検索を行った。次に、INSDC より得られた参照配列をもとに各 OTU の ITS 配列と相同な配列を得て最近共通祖先アルゴリズム(Huson *et al.* 2007)をもとに OTU の分類学的な割り当て(種-界の各分類階層のうち特定可能な階層までで同定)を行った。各 OTU の Claident での同定結果と各標高クラスでの検出サンプル数を表 2.1 に示す。同定結果から、Tedersoo *et al.* (2010)及び Tedersoo & Smith (2013)のレビューを参照し外生菌根菌とみなされる属および科に含まれる OTU を外生菌根菌 OTU とした。これにより得られた外生菌根菌 OTU を以降の解析に用いた(表 2.1)。

宿主群集と環境データ

外生菌根菌群集(外生菌根菌 OTU 数及び OTU 組成)に影響する宿主及び非生物的環境要因を調べるために以下に示すデータを計測した(表 2.2)。各プロットにおいて胸高周囲長(GBH) 10 cm 以上(直径 3.18 cm 以上)の樹木個体全ての種、GBH を記録し、胸高断面積(BA)を計算した。設置した全てのプロットで外生菌根性の樹種が優占していた(胸高断面積割合 70%以上)。各標高クラスで見られた全樹種及び外生菌根性樹種の個体数を表 2.2 に、各標高クラスで見られた外生菌根樹種の BA を表 2.3 にそれぞれ示した。各標高クラスでの優占樹種としてトドマツ(*Abies sachalinensis*, 200-400 m)、ミズナラ(*Quercus mongolica* var. *crispula*, 200-600 m)、ダケカンバ(*Betula ermanii*, 200-1200 m)、ミヤマハンノキ(*Alnus viridis*) (800-1200 m)が観察された。シラカバ(*Betula platyphylla*)、ハイマツ(*Pinus pumila*)はそれぞれ 800 m、1200 m で見られたが出現頻度は低かった(全樹種中の胸高断面積 0.7%未満)。採取した FH サンプルから 2 mm メッシュのふるいを用いて根を取り除いて湿重量を計測した後、105 °Cで乾燥させて乾重量、pH、炭素・窒素量の計測を行った。FH サンプルの pH は 1 基底の塩化カリウム水溶液中で測定した。全炭素量及び窒素量はガスクロマトグラフィーによる燃焼法を用いて測定した(Sumigraph NC-22)。主座標分析(PCoA)により各標高での群集の違いを (図 2.2a)、主成分分析(PCA)により標高、pH、含水率、C:N 比、斜面傾度、斜面の向きからなる環境の違い(図 2.2b)を視覚化した。

データ解析

外生菌根菌の群集データは、プロットごとに各 OTU の在/不在を記録することで、2 元データとして以降の統計解析に用いた。本研究では、454 シーケンシングにおけるリード数の定量性の問題(Amend *et al.* 2010)を考慮して、各

OTU のリード数は解析に用いなかった。解析は全て R v. 3.0.1 (R Core Team 2013)により行った。サンプル間でのシーケンス深度の違いは、しばしば得られる OTU 数に影響し、リード数の少ないサンプルにおける OTU 多様性の過小評価を引き起こしうる。そのため、先行研究ではリード数に対して OTU 数の希薄化曲線を計算し、シーケンス深度の影響を標準化している研究もあるが、このように希薄化した OTU 数を生態学的解析に用いることは推奨されていない (McMurdie & Holmes 2013)。本研究では、(1)上で述べたようにリード数が 50 を下回るサンプルは解析から除外したこと、(2)リード数の少ないサンプルにおいてもそのほとんどで希薄化曲線は飽和していたこと(図 2.3)、(3)解析に用いた 54 サンプルで外生菌根菌 OTU 数はリード数と有意な相関を示さなかったこと(ピアソンの相関係数 $r = -0.002$, $P = 0.988$)の 3 つを根拠に、希薄化した OTU 数ではなく生の OTU 数データを以降の解析に用いた。なお、予備的に希薄化したプロットごとの外生菌根菌 OTU 数を計算したところ、生の OTU 数データと強い相関を示した(ピアソンの相関係数 $r = -0.960$, $P < 0.001$)。このことは、本研究では、サンプル間でのシーケンス深度の違いは外生菌根菌 OTU 数の評価にほとんど影響していないことを示している。

標高クラス間での OTU 数の違いを一般化線形モデル(GLM)により解析した。誤差構造及びリンク関数としてそれぞれポアソン分布と対数関数を用いた。さらに、外生菌根菌 OTU 数と標高、外生菌根菌 OTU 数と環境との関連を調べるためにそれぞれポアソン分布と対数関数を用いた GLM による解析を行った。標高と OTU 数の関係は単回帰及び二次回帰により解析を行った。これは、標高傾度に沿った外生菌根菌の多様性研究において、外生菌根菌の種数は標高に伴い線形に減少するパターンや、中標高域で最大となるような単峰型のパターンの両方が知られているためである(例えば Bahram *et al.* 2012; Miyamoto

et al. 2014)。本研究の環境変数には FH 層の pH、含水率、C:N 比、各プロットの斜面傾度、斜面の向き、外生菌根性樹種の種数及び全外生菌根性樹種のアバンダンス(BA)を含み、これらの変数の間に有意な多重共線性は見られなかった(分散拡大係数 VIF < 10)。各モデルの P 値は χ^2 近似での尤度比検定により計算し、Benjamini-Hochberg 法(Benjamini & Hochberg 1995)により多重検定の補正を行った。OTU 数と環境変数との関連の強さを示すために Nagelkerke (1991)に従い擬似決定係数を計算した。

プロット間での外生菌根菌の OTU 組成の違いを解析するために、各プロットの外生菌根菌 OTU の在/不在データを改変 Raup-Crick 非類似度指数(Chase *et al.* 2011)により非類似度行列に変換し、非計量多次元尺度法(NMDS)により群集の非類似度を視覚化した。改変 Raup-Crick 指数は Jaccard 指数や Sørensen 指数といった一般的に使われている他の指数に比べて、サンプル間での種数の差による影響を比較的受けにくいことが知られている(Vellend *et al.* 2007)。

外生菌根菌の群集構造に対する宿主群集、非生物的環境、空間変数の寄与率を定量するため距離ベースの冗長性分析(db-RDA)に基づいた variation partitioning を行った。各画分(純粋な宿主群集の影響を示す画分、純粋な環境の影響を示す画分、純粋な空間変数の影響を示す画分、要因間で共有される画分、いずれの要因でも説明できなかった画分)の相対的な大きさは Peres-Neto *et al.* (2006)に示される手法に基づいて計算した。改変 Raup-Crick 指数により群集の非類似度行列を作成し、宿主群集、環境、空間の 3 つの RDA モデルを構築した。宿主群集のモデルでは、まずプロットごとにアバンダンス(BA)を含む宿主樹種の群集行列を Bray-Curtis 指数を用いて非類似度行列に変換し、PCoA により直行ベクトルを抽出した。次に抽出された PCoA ベクトルについて、Blanchet

et al. (2008)の前進選択法(999 パーミュテーション、基準値 $\alpha = 0.05$)により、外生菌根菌群集の非類似度と有意に關係する PCoA ベクトルを選択し、モデルに組み込んだ。次に非生物的環境のモデルを、環境変数に対して前進選択法(999 パーミュテーション、基準値 $\alpha = 0.05$)を行う事で作成した。本研究では、標高に沿った群集の変化は、特に気温といった標高に沿って変化する変数によるところが大きいと考え(Bahram *et al.* 2012; Coine *et al.* 2014; Jarvis *et al.* 2015)、標高を空間の変数ではなく環境変数として用いた。最後に空間のモデルを PCNM 解析(principal components of neighbor matrices、Borcard *et al.* 2004)により抽出された空間変数をもとに作成した。PCNM 解析ではサンプリング地点の位置座標から様々な空間構造を表現した直行ベクトル(空間変数)を抜き出すことができる。今回は自己相関を最もよく説明する PCNM 軸に対して前進選択法(999 パーミュテーション、基準値 $\alpha = 0.05$)を行い、外生菌根菌群集の非類似度と有意に關係する空間変数を選んでモデルを立てた。これら 3 つのモデルをもとに各画分の adjusted R^2 値を計算することで、variation partitioning を行った(Peres-Neto *et al.* 2006)。

外生菌根菌の群集組成がどのような空間スケールで空間構造を示すのかを調べるために、マンテルコレログラム解析を行った(vagan パッケージの”mantel.correlog”コマンド)。マンテルコレログラム解析では、まずサンプル間の地理的距離を複数の距離クラスに分割する。そして各距離クラスにおいて群集の非類似度行列と、サンプル間の地理的距離列間のマンテル相関係数 rM を計算する。そして得られたマンテル相関係数 rM を、地理的距離を横軸とした座標上にプロットする。 rM が有意に正のとき、その距離クラス内では群集組成は正の空間自己相関を示していると解釈できる(Borcard and Legendre 2012)。この解析にも改変 Raup-Crick 指数による外生菌根菌群集の非類似度行列を用い

た。P 値はパーミュテショナルマンテル検定(999 パーミュテーション)により計算し、Benjamini-Hochberg 法(Benjamini & Hochberg 1995)により多重検定の補正を行った。

宿主樹種、非生物環境要因、空間変数のうち外生菌根菌の群集組成に有意に影響している変数が、主要な外生菌根菌 OTU の出現と関連しているのかを調べるために一般化線形モデル(GLM)による解析を行った。本研究では、主要 OTU を 5 プロット以上で検出された外生菌根菌 OTU と定義した。応答変数として主要 OTU の在/不在データを使用し、説明変数として各宿主樹種の BA、標高、pH 及び上述の PCNM ベクトルの中の 3 つを使用した。誤差構造及びリンク関数としてそれぞれ二項分布とロジット関数を用いた。各モデルの P 値は χ^2 近似での尤度比検定により計算し、Benjamini-Hochberg 法(Benjamini & Hochberg 1995)により多重検定の補正を行った。その後、階層クラスター解析により標高クラス間での主要 OTU の出現パターンを決定した。主要 OTU が各標高クラスで検出されたサンプル数(表 2.4)を Bray-Curtis 指数により非類似度行列に変換した。クラスタリングの方法(Ward 法、最短距離法、完全連結法及び平均連結法)により結果は変わらなかったため、Ward 法による結果のみを示した。

2.3 結果

シーケンス及び OTU の同定結果

データ解析に用いた 54 サンプルから合計で 21,788 配列が得られ、97% の相同性閾値で 224 の菌類 OTU に分けられた(表 2.1)。このうち 18,027 配列 138 OTU が外生菌根菌の分類群に属し、これらは担子菌門の 128 OTU と子囊菌門の 10 OTU からなっていた。科レベルで見ると 138 OTU は 20 の科からなり、

中でもイボタケ科(35 OTU、全外生菌根菌 OTU のうち 25.4%)、ベニタケ科(32 OTU、同 23.2%)、フウセンタケ科(18 OTU、同 13.0%)、ロウタケ科(18 OTU、同 13.0%)が OTU 数の多い科であった。表 2.4 に主要な外生菌根菌 15 OTU の同定結果と各標高での出現頻度を示す。この主要 15 OTU で全外生菌根菌 OTU の出現数の 36.9%を占めていた。138 OTU のうち 77 OTU (55.8%)は 1 サンプルのみから検出された。

外生菌根菌 OTU 数

プロットごとの平均外生菌根菌 OTU 数は 5.5 ± 2.4 (平均 $\pm$ S.D.)であった。プロットごとの OTU 数は標高クラス間で有意差は検出されず(GLM、 $P > 0.05$)、標高に沿った線形な減少・増加パターンも単峰型のパターンも示さなかった(GLM、 $P > 0.10$ 、表 2.5)。OTU 数と宿主植物及び環境要因の関連を表 2.5 に示す。解析に用いた 8 変数のうち OTU 数と有意な関連を示したのは斜面傾度のみで(表 2.5)、プロットの傾斜がきつくなるにつれて OTU 数は減少した(GLM、 $P < 0.001$)。

外生菌根菌 OTU の群集構造

NMDS プロットから、外生菌根菌群集の OTU 組成は低標高(200-600 m のプロット)のグループと高標高(800-1200 m)のグループの 2 つに分けられた(図 2.4 ストレス値 = 0.077)。

外生菌根菌の群集組成への宿主群集、環境、空間の相対的な重要性を評価するために variation partitioning を行った。まず、3 つのフルモデル、すなわち 28 PCoA ベクトルからなる宿主群集モデル、7 変数からなる環境モデル、そして正の固有値を持つ 29 PCNM 軸からなる空間モデルに対して前進選択法に

よる変数の選択を行ったところ、宿主群集のモデルからは 4 PCoA ベクトル(ベクトル 1、2、24、27)が選ばれた。このうち PCoA ベクトル 1 は低標高クラス(200-600 m)と高標高クラス(800-1200 m)間での宿主樹種の違い、すなわち低標高でのミズナラ・トドマツ、高標高でのダケカンバ・ミヤマハンノキの分布(図 2.2 及び表 2.4)を反映していた。PCoA ベクトル 2 はミズナラ、トドマツの有無により特徴付けられる低標高クラス(200-600 m)内での宿主群集の違い(図 2.2 及び表 2.4)を、PCoA ベクトル 24 と 27 はダケカンバ、ミヤマハンノキの有無により特徴付けられる 800-1000 m の間での宿主群集の違い(図 2.2 及び表 2.4)をそれぞれ反映したものであった。環境モデルからは標高及び pH が、空間モデルからは 3 PCNM 軸(ベクトル V1、V2、V3)がそれぞれ選ばれた。空間モデルの各 PCNM ベクトルの値は標高に沿った空間的構造を表現していた。具体的に V1 は全 6 標高帯にまたがった(約 4 km)出現頻度の直線的な上昇もしくは減少パターンを、V2 及び V3 は隣接する 2 標高帯(約 1 km (図 2.1))での出現パターンをそれぞれ示していた。これにより得られた宿主群集モデル、環境モデル及び空間モデルは、外生菌根菌群集の違いをそれぞれ 32.6%、26.0%、30.6%説明した(図 2.5)。このうち、宿主群集、環境、空間単独で説明された割合はそれぞれ 9.8%、5.0%、5.5%であった。宿主群集-空間の共有画分(宿主群集と外生菌根菌群集が共通の空間構造を示している画分)は 22.8%、非生物環境-空間の共有画分(非生物環境と外生菌根菌群集が共通の空間構造を示している画分)は 21.0%であった。3 つのモデルで共有される画分が最も多くの割合を説明しており(18.7%、図 2.5)、全体では群集の違いの 45.4%が説明され、54.6%が未説明の画分として残った。

マンテルコレログラムでは、データは 12 の距離クラスに分割され、距離が短い方から 3 つの距離クラスにおいて外生菌根菌群集が有意な空間自己相

関を示していることが示された($P < 0.05$ 、図 2.6)。初めの 2 つの距離クラス(それぞれ 198 m と 567 m)はともに同一標高クラス内に属し、3 つ目の距離クラス(936 m)は隣接する 2 つの標高クラス間にまたがるものであった(図 2.1)。それ以上の距離クラスでは有意な正の自己相関は見られなかった。

主要外生菌根菌 OTU の出現パターン

主要 15 OTU は、高標高で頻度の高いグループ(800-1200 m、図 2.7 のクラスター1)と低標高で頻度の高いグループ(200-600 m、図 2.7 のクラスター2)の、2 つのグループに分けられた。宿主、環境、空間は主要 15 OTU のうち、それぞれ 10、9、10 OTU の出現パターンに影響していた(表 2.6)。中でも特に宿主のうちトドマツ・ミズナラ、環境変数のうち標高、空間変数のうち PCNM 軸 1 が多くの主要 OTU の出現と関係していた。

2.4 考察

近年の研究で、標高に沿った外生菌根菌の群集組成と宿主樹種や非生物的環境との関連が解明され始めた(Bahram *et al.* 2012; Coince *et al.* 2014; Jarvis *et al.* 2015 など)。本研究ではこれらの生物的/非生物的環境に加えて外生菌根菌群集の空間構造も考慮することで、群集の空間変動のうち、どのくらいが宿主や環境との関連で説明され、どのくらいが空間変数により説明されるのかを定量的に解析した。本研究では外生菌根菌の群集組成の空間変動の半分近くが宿主群集、非生物的環境及び空間変数により説明され(図 2.5)、このうち大部分は宿主群集及び非生物的環境との関連(図 2.5 における宿主のみで説明された画分と宿主-空間の共有画分、非生物的環境のみで説明された画分と非生物的環境-空間の共有画分)で説明された。この結果は本調査地の外生菌根菌群集に対する宿

主と非生物的環境の重要性を示すものである。例えば、外生菌根菌群集の空間変動に対して、宿主-空間の共有画分と非生物的環境-空間の共有画分が高い説明力を持っていた。この共有画分は、宿主あるいは非生物環境がそれぞれ外生菌根菌群集と似たような空間構造を持っていることを意味しており、標高変化に伴うニッチ要因(宿主群集や非生物的環境)の急激な変化が外生菌根菌群集構造に大きく影響していることを示唆している。

低標高帯(200-600 m)と高標高帯(800-1200 m)の間での群集組成の分離(図 2.4)は、標高クラス間での主要 OTU の違い(表 2.4 及び図 2.4)を反映したものだと考えられる。同様に、宿主群集組成においても低標高帯と高標高帯との間で違いが見られたため(図 2.2a 及び図 2.4)、この標高帯間での外生菌根菌群集の違いは主に標高クラス間での宿主群集構成の違いによるものであろう。例えば、宿主群集組成が類似している高標高クラスの間では(図 2.2a)、プロット間で非生物環境のばらつきが大きいにも関わらず(図 2.2ab)、多くの外生菌根菌 OTU が共通して見られた(図 2.4)。近年、Bahram *et al.* (2012)は標高に沿った外生菌根菌の群集組成の違いは、土壌の養分利用可能性のような非生物環境に比べ、宿主植物種の違いを強く受けることを報告している。一方で、宿主群集が標高と同調して変化する場合には、他の要因に比べて宿主の影響は相対的に小さくなるという結果も報告されている(Miyamoto *et al.* 2014)。今回の調査地では、宿主植物は標高に依存した分布パターンを示しており(トドマツ・ミズナラは低標高に、ダケカンバ・ミヤマハンノキは高標高に分布)、このことが、外生菌根菌群集と宿主群集の関係(表 2.6、図 2.2a)を生み出したと考えられる。本研究で用いた分子解析手法では、複数の樹種に由来すると考えられる菌根をサンプルごとにプールして解析を行ったため、外生菌根菌の群集構造に対する個々の宿主樹種の影響は分離できなかった。しかし、例えばハンノキ属樹木は他の外生

菌根性樹種と比べても固有の外生菌根菌相を持つことが知られている(Molina 1981 など)。

外生菌根菌群集組成への標高の影響(図 2.5)には、標高に沿った気温の変化が関係していると考えられる。実際、近年の研究から、気温が標高に沿った外生菌根菌群集の変化をもたらす重要な要因であるということが示されている(Bahram *et al.* 2012; Coince *et al.* 2014; Jarvis *et al.* 2015)。今回、外生菌根菌の種間で標高と pH に対して異なる応答が見られた。例えば、OTU_42 (*Tomentella subulilacina*)は標高と正の関係を示していたのに対して OTU_74 (*Cenococcum geophilum*)は負の関係を示した(表 2.6)。同様に pH に対しても、OTU_17 (*Cortinarius* sp.)は正の関連を示したが OTU_75 (*Humaria hemisphaerica*)は負の関連を示した(表 2.6)。このような種間で異なる応答は外生菌根菌の種ごとの好適な気温や pH の違いを反映したものだと考えられる。これらの種に関する生理学的な観点からの研究は未だ不十分であるが、上記の傾向は先行研究での報告と一致している部分がある。例えば、フウセンタケ属菌の種数やアバンダンスが pH の上昇に伴い減少する様子は他の温帯林や冷温帯林においても観察されている(Douglas *et al.* 2005; Horton *et al.* 2013; ただし Lilleskov *et al.* 2001)。

Variation partitioning において外生菌根菌群集の空間変動は、宿主群集-非生物環境-空間の共有画分により最もよく説明された(図 2.5)。これは、外生菌根菌群集・宿主群集・非生物環境要因の 3 つが、似たような空間構造を持っていることを意味する。この結果は、以下の 3 つの可能性を示している。(1)宿主群集組成が空間構造を持った非生物環境要因(気温など)に応答しており、次に外生菌根菌群集組成が宿主群集組成に応答している。(2)宿主群集組成と外生菌根菌群集組成が空間構造を持った非生物要因(気温など)に対して独立に、同じような応答を示している。(3)外生菌根菌群集組成と、宿主群集組成あるいは非

生物環境の全てが空間関連要因の影響で独立に似たような空間構造を持っている。もちろん、この3つは相互排他的ではないので、実際は3つが同時に起こっていると考えられる。実際にどれくらいの割合が宿主群集・非生物環境・空間関連要因と直接関連しているのかを知るためには、外生菌根群集の空間構造を考慮し、生物的・非生物的要因による影響を分離するような研究(例えば相互移植実験など)が必要である。

Variation partitioning の結果から、外生菌根菌群集の空間構造のうち、宿主群集や非生物環境の空間構造では説明されない空間構造(空間変数のみが説明した画分)を持つことが示された(図 2.5)。この理由として以下の2つの可能性が考えられる。(1)外生菌根菌群集が、本研究では未計測だが空間構造を持つ環境要因(例えば土壌タイプや土壌の養分利用可能性(Toljander *et al.* 2006 など))の影響を受けている可能性(Borcard & Legendre 1994)。(2)分散制限や定着制限など、空間関連要因が調査地における外生菌根菌群集の形成に影響している可能性。

Peay ら(2012)は無菌の外生菌根性樹木の実生を用いて外生菌根菌の孢子分散能力を計測し、感染源(子実体)からの距離が 1 km 以上になるとほとんどの実生が未感染のままであったということを示した。この結果は外生菌根菌の分散制限を示唆するものである。今回、空間変数(PCNM 軸 2 及び 3)により示された空間構造は、外生菌根菌群集の類似度の空間距離減衰がみられた距離クラス(937-1306 m、図 2.6)と対応していたことから、本調査地において外生菌根菌群集の空間構造が空間関連要因の影響によって形成されている可能性は十分に考えられる。また、variation partitioning では、空間変数は純粋な宿主群集や環境と同程度の説明力を持つことが示された(図 2.5)。これらの結果は、外生菌根菌の群集集合プロセスにおいて空間関連要因が従来考えられてきた以上に重要な役割を果たしているという近年の発見とも一致している(Lilleskov *et al.* 2004;

Bahram *et al.* 2013)。まとめると、今回の発見は外生菌根菌の群集組成を考える上で、生物的/非生物的要因と同様に空間関連要因の影響も考慮することの重要性を強調するものであると言える。

Variation partitioning では、半分以上が未説明の画分として残った(全体の約 55%、図 2.5)。この未説明の部分は、本研究では未測定だった要因の影響が考えられる。この未計測の要因には、例えば土壌タイプや土壌養分利用可能性(カチオンなど Aponte *et al.* 2010)といった環境要因や、外生菌根菌同士の相互作用(Kennedy *et al.* 2009; Pickles *et al.* 2012)、今回の調査デザインでは検知できないような微スケールで働く空間関連要因(Borcard *et al.* 1992)、あるいは個々の菌個体の確率的な死亡や定着(生態的浮動 Hubbell 2001)などといったものが考えられる。また、景観スケールでの外生菌根菌群集を理解するためには今回以上のエフォートでサンプリングを行う必要があると考えられる。これら結果の不透明さはさらなる研究の必要性を強調するものであるが、景観スケールにおける外生菌根菌の群集集合プロセスを解明するためには、本研究のようなアプローチは有用だと考えられる。

先行研究において外生菌根菌の OTU 数は、標高に沿って直線的な減少あるいは単峰型のパターンを示していた(Bahram *et al.* 2012; Miyamoto *et al.* 2014)。標高が上がるにつれて外生菌根菌の OTU 数が減少するのは、標高に伴って気温や植物の生産性が低下するためであろう(Bahram *et al.* 2012)。単峰型の多様性パターンが生じる理由としては、標高傾度に沿った生物の多様性を普遍的に説明する仮説である mid-domain effect が挙げられる(Miyamoto *et al.* 2014)。本研究ではこれら先行研究で見られたような、標高と OTU 数の有意な関係は検出されなかった。一方、今回は傾斜傾度が OTU 数と有意に関連するという結果が得られた(表 2.5)。土壌の性質や安定性、微気候に対する地形の影響

(Suggitt *et al.* 2011 など)を考えると、傾斜の急なプロットではFH層の表層部分の細根量が少なくなり OTU 数と斜面傾度間の負の関係を生み出していたと考えられる。実際、傾斜が急な場所では土壌表層の細根密度が減少すること(Pierret *et al.* 2007)や、宿主樹木の根の長さや重量の上昇に伴い根関連菌の種数が上昇すること(Mundra *et al.* 2015)が先行研究でも示されている。

2.5 結論

本研究では、宿主群集や環境条件が大きく変化するような標高傾度を対象に、外生菌根菌の群集集合に対する生物的・非生物的環境及び空間関連要因の相対的な重要性を調査した。その結果、外生菌根菌の群集組成が標高に沿って有意な空間構造を示し、その空間構造には宿主群集や非生物的環境の空間変動が強く関わっている可能性が示された。さらに今回の結果から、細菌など他の微生物やより大型の生物で確認される(例えば Carvalho *et al.* 2011; Wang *et al.* 2012)ように、外生菌根菌においても空間関連要因が群集組成の主要な決定要因の1つとなりうることが示唆された。本研究結果は、外生菌根菌群集の環境変動に対する応答は、宿主植物や気候、土壌条件などの生物的・非生物的要因を介した部分が大きいものの、確率的な分散過程もまた群集に影響するということを示唆している。しかし、外生菌根菌の群集構造とニッチ要因、空間関連要因間の関係に関しては未解明な部分が多く、またこの関係は注目する環境・空間スケール(例えば Miyamoto *et al.* 2014)や調査地の歴史的・地理的な要因にも依存して変化すると考えられる。今後は、標高などの環境傾度に対する外生菌根菌群集の応答メカニズムについてより深く理解するために、気候要因、歴史的・地理的要因を考慮した上での地域間の比較研究が重要だと考えられる。

表 2.1 検出された OTU リスト。

数字は各標高クラスにおいて各 OTU が検出されたサンプル数。

OTU	分類群	標高クラス(m)						ECM ¹
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
OTU_1	<i>Laccaria</i> sp.	3	1	1	0	1	1	1
OTU_2	<i>Mortierella</i> sp.	0	0	0	2	2	0	
OTU_3	<i>Leotiomycetes</i> sp.	0	0	0	5	5	1	
OTU_4	<i>Cladophialophora chaetospora</i>	2	2	5	2	2	1	
OTU_5	<i>Cladophialophora</i> sp.	5	4	0	0	0	0	
OTU_6	<i>Phialocephala</i> sp.	5	3	0	0	1	0	
OTU_7	<i>Mortierella globulifera</i>	0	1	4	0	0	0	
OTU_8	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	2	2	0	0	1
OTU_9	Ascomycota sp.	0	0	0	4	0	1	
OTU_10	Helotiales sp.	0	0	0	1	3	7	
OTU_11	Helotiales sp.	2	4	8	2	0	0	
OTU_12	<i>Piloderma</i> sp.	0	0	3	0	0	0	1
OTU_13	Helotiales sp.	0	0	0	1	5	6	
OTU_14	<i>Cladophialophora chaetospora</i>	3	1	4	2	1	2	
OTU_15	<i>Genea hispidula</i>	0	0	0	3	1	0	1
OTU_16	<i>Cortinarius</i> sp.	0	2	0	0	0	0	1
OTU_17	<i>Cortinarius</i> sp.	4	0	0	5	3	6	1
OTU_18	Helotiales sp.	0	0	0	4	4	0	
OTU_19	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0	2	0	1
OTU_20	Helotiales sp.	1	3	0	0	0	0	
OTU_21	Helotiales sp.	0	0	0	2	0	0	
OTU_22	<i>Piloderma</i> sp.	0	1	1	0	0	0	1
OTU_23	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	2	1	2	1
OTU_24	<i>Sordariomycetes</i> sp.	0	0	0	0	0	3	
OTU_25	<i>Leptodontidium elatius</i>	2	1	0	2	0	0	
OTU_26	<i>Articulospora tetracladia</i>	0	0	0	1	1	5	
OTU_27	<i>Leotiomycetes</i> sp.	1	2	2	1	0	0	
OTU_28	Ascomycota sp.	0	0	0	1	2	1	
OTU_29	<i>Cladophialophora chaetospora</i>	0	1	3	3	1	2	
OTU_30	<i>Piloderma olivaceum</i>	1	0	1	0	0	0	1
OTU_31	Helotiales sp.	0	0	0	1	0	0	

OTU	分類群	標高クラス(m)						ECM ¹
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
OTU_32	Fungi sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_33	Ascomycota sp.	0	0	0	0	2	0	
OTU_34	<i>Entoloma</i> sp.	0	0	0	0	3	0	1
OTU_35	<i>Cladophialophora minutissima</i>	0	0	0	1	1	0	
OTU_36	Leotiomycetes sp.	0	0	0	2	2	0	
OTU_37	<i>Lachnum</i> sp.	0	0	0	0	2	0	
OTU_38	<i>Clavulina castaneipes</i>	1	0	0	1	3	0	1
OTU_39	Fungi sp.	0	0	0	1	1	1	
OTU_40	Helotiaceae sp.	0	0	0	3	2	2	
OTU_41	Helotiales sp.	0	0	0	2	5	4	
OTU_42	<i>Tomentella subulilacina</i>	0	0	0	3	7	8	1
OTU_43	<i>Glomus</i> sp.	0	0	0	3	2	0	
OTU_44	<i>Laccaria</i> sp.	0	0	0	2	2	2	1
OTU_45	<i>Lactarius tabidus</i>	0	0	0	1	1	2	1
OTU_46	Helotiales sp.	1	1	1	3	0	0	
OTU_47	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	4	2	0	1
OTU_48	<i>Galerina</i> sp.	0	0	0	2	3	2	
OTU_49	<i>Mortierella humilis</i>	2	1	0	4	2	1	
OTU_50	unclassified	0	0	0	3	0	0	
OTU_51	<i>Russula</i> sp.	2	2	0	0	0	0	1
OTU_52	<i>Inocybe</i> sp.	4	1	0	0	0	0	1
OTU_53	Thelephoraceae sp.	0	0	0	2	2	1	1
OTU_54	Agaricomycetes sp.	0	1	2	0	0	0	
OTU_55	<i>Boletus</i> sp.	0	1	2	0	0	0	1
OTU_56	<i>Lactarius glycosmus</i>	0	0	0	0	2	2	1
OTU_57	<i>Lactarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_58	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	0	0	2	1
OTU_59	<i>Sebacina epigaea</i>	0	2	0	0	0	0	1
OTU_60	Ascomycota sp.	0	0	0	2	1	0	
OTU_61	Thelephoraceae sp.	0	0	0	1	2	0	1
OTU_62	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	0	0	2	0	1
OTU_63	Entolomataceae sp.	2	0	0	0	0	0	
OTU_64	Ascomycota sp.	2	0	0	0	0	0	

OTU	分類群	標高クラス(m)						ECM ¹
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
OTU_65	<i>Rhizoscyphus ericae</i>	2	0	0	0	0	0	
OTU_66	<i>Eurotiomycetes</i> sp.	0	0	0	0	2	1	
OTU_67	<i>Alnicola</i> sp.	0	0	0	0	3	0	1
OTU_68	<i>Thelephora</i> sp.	4	0	0	0	0	0	1
OTU_69	<i>Piloderma</i> sp.	2	0	0	0	0	0	1
OTU_70	<i>Helotiales</i> sp.	2	0	0	0	0	0	
OTU_71	<i>Inocybe</i> sp.	4	1	2	0	0	0	1
OTU_72	<i>Hygrophorus</i> sp.	4	1	0	0	0	0	1
OTU_73	<i>Lactarius</i> sp.	2	0	4	0	0	0	1
OTU_74	<i>Cenococcum geophilum</i>	5	1	0	0	0	0	1
OTU_75	<i>Humaria hemisphaerica</i>	0	2	3	0	0	0	1
OTU_76	<i>Tomentella</i> sp.	0	1	2	0	0	0	1
OTU_77	<i>Tuber</i> sp.	1	0	0	1	0	0	1
OTU_78	<i>Thelephoraceae</i> sp.	0	0	0	0	2	0	1
OTU_79	<i>Humaria hemisphaerica</i>	1	0	2	0	0	0	1
OTU_80	<i>Sebacina</i> sp.	0	2	0	0	0	0	1
OTU_81	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	2	1	0	1
OTU_82	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	0	1	0	1	1
OTU_83	<i>Russula</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_84	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	2	1	0	1
OTU_85	<i>Meliniomyces</i> sp.	0	0	0	1	2	0	
OTU_86	<i>Sebacina</i> sp.	0	0	0	0	2	1	1
OTU_87	<i>Tricholoma sulphureum</i>	1	0	1	0	0	0	1
OTU_88	<i>Articulospora tetraccladia</i>	0	0	0	1	1	0	
OTU_89	<i>Sebacina</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1
OTU_90	<i>Agaricales</i> sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_91	<i>Sebacina</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1
OTU_92	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_93	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_94	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_95	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_96	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_97	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1

OTU	分類群	標高クラス(m)						ECM ¹
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
OTU_98	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1
OTU_99	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1
OTU_100	<i>Suillus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_101	<i>Russula</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_102	<i>Ramariopsis</i> sp.	0	1	0	0	0	0	
OTU_103	<i>Tomentella</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_104	Sebacinaceae sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_105	<i>Tuber</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_106	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_107	Sebacinaceae sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_108	Helotiales sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_109	<i>Clavulina</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_110	<i>Humaria hemisphaerica</i>	0	0	1	0	0	0	1
OTU_111	<i>Pseudotomentella tristis</i>	0	0	1	0	0	0	1
OTU_112	<i>Ramariopsis</i> sp.	0	0	1	0	0	0	
OTU_113	<i>Tomentella ellisii</i>	0	0	0	1	0	1	1
OTU_114	<i>Cortinarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_115	<i>Cortinarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_116	Cortinariaceae sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_117	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_118	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_119	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_120	<i>Rhizoscyphus ericae</i>	0	0	0	0	0	1	
OTU_121	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_122	Ascomycota sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_123	Ascomycota sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_124	Fungi sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_125	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	0	0	0	1	0	0	
OTU_126	Ascomycota sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_127	unclassified	0	0	0	0	1	0	
OTU_128	Ascomycota sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_129	<i>Sebacina vermifera</i>	0	0	0	0	1	0	
OTU_130	Ascomycota sp.	0	0	0	0	1	0	

OTU	分類群	標高クラス(m)						ECM ¹
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
OTU_131	<i>Mortierella</i> sp.	0	0	0	0	0	1	
OTU_132	<i>Agrocybe erebia</i>	0	0	0	1	0	0	
OTU_133	Helotiales sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_134	<i>Galerina</i> sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_135	<i>Sebacina vermifera</i>	0	0	0	0	1	0	
OTU_136	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1
OTU_137	Agaricales sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_138	<i>Lachnum</i> sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_139	Ascomycota sp.	0	0	0	0	1	0	
OTU_140	Thelephoraceae sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_141	Sebacinaceae sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_142	Sebacinaceae sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_143	<i>Clavulina</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_144	Sebacinaceae sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_145	Thelephoraceae sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_146	<i>Russula</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_147	<i>Tricholoma</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_148	<i>Pachyphloeus melanoxanthus</i>	0	0	0	2	0	0	1
OTU_149	<i>Russula</i> sp.	2	0	0	0	0	0	1
OTU_150	<i>Russula densifolia</i>	0	0	0	2	0	0	1
OTU_151	<i>Phialocephala fortinii</i>	0	2	0	0	0	0	
OTU_152	Leotiomycetes sp.	1	0	1	0	0	0	
OTU_153	<i>Cenococcum geophilum</i>	0	2	0	0	0	0	1
OTU_154	<i>Piloderma</i> sp.	2	2	2	0	0	0	1
OTU_155	<i>Tomentella</i> sp.	0	2	1	0	0	0	1
OTU_156	<i>Thelephora</i> sp.	0	0	2	0	0	0	1
OTU_157	Fungi sp.	0	0	0	4	1	0	
OTU_158	<i>Amanita vaginata</i>	0	0	0	2	0	0	1
OTU_159	<i>Glomus</i> sp.	0	0	0	2	0	0	
OTU_160	<i>Craterellus</i> sp.	1	1	0	0	0	0	1
OTU_161	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	2	0	0	0	1
OTU_162	Thelephoraceae sp.	0	0	0	0	1	0	1
OTU_163	<i>Thelephora</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1

OTU	分類群	標高クラス(m)						ECM ¹
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
OTU_164	<i>Galerina</i> sp.	0	0	1	0	0	0	
OTU_165	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_166	<i>Clavulina</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_167	<i>Amanita</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_168	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_169	Agaricomycetes sp.	0	0	1	0	0	0	
OTU_170	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_171	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_172	Sebacinaceae sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_173	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_174	<i>Lactarius tabidus</i>	0	0	0	2	0	0	1
OTU_175	<i>Hydnum ellipsosporum</i>	0	0	0	0	1	0	1
OTU_176	Agaricomycetes sp.	1	1	0	0	0	0	
OTU_177	<i>Russula</i> sp.	1	1	0	0	0	0	1
OTU_178	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_179	<i>Russula</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_180	<i>Russula</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_181	<i>Marasmius scorodonius</i>	0	1	0	0	0	0	
OTU_182	<i>Mycena</i> sp.	1	0	0	0	0	0	
OTU_183	<i>Cortinarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_184	<i>Mycena</i> sp.	1	0	0	0	0	0	
OTU_185	<i>Sebacina</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_186	<i>Cortinarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_187	Agaricomycetes sp.	1	0	0	0	0	0	
OTU_188	<i>Humaria hemisphaerica</i>	0	1	0	0	0	0	1
OTU_189	<i>Sebacina</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_190	<i>Lactarius tabidus</i>	0	0	0	3	1	0	1
OTU_191	Agaricomycetes sp.	0	1	1	0	0	0	
OTU_192	Russulaceae sp.	0	0	0	1	1	0	1
OTU_193	<i>Mycena amicta</i>	0	2	0	0	0	0	
OTU_194	<i>Lactarius</i> sp.	2	0	0	0	0	0	1
OTU_195	Thelephoraceae sp.	0	0	0	0	1	0	1
OTU_196	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1

OTU	分類群	標高クラス(m)						ECM ¹
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
OTU_197	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_198	Cortinariaceae sp.	0	0	1	0	0	0	1
OTU_199	<i>Cortinarius</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_200	<i>Piloderma</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_201	<i>Inocybe</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_202	Helotiales sp.	1	0	0	0	0	0	
OTU_203	Leotiomyces sp.	1	0	0	0	0	0	
OTU_204	<i>Tomentella stiposa</i>	0	0	0	1	0	0	1
OTU_205	Agaricomycetes sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_206	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_207	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
OTU_208	Glomeraceae sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_209	<i>Mortierella</i> sp.	0	0	0	1	0	0	
OTU_210	Russulaceae sp.	0	0	0	1	1	0	1
OTU_211	<i>Tomentella</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_212	Fungi sp.	0	1	0	0	0	0	
OTU_213	<i>Sebacina</i> sp.	0	1	0	0	0	0	1
OTU_214	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_215	Glomeraceae sp.	0	0	0	0	0	1	
OTU_216	Cortinariaceae sp.	0	0	0	0	0	1	1
OTU_217	<i>Sebacina</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_218	Sebacinaceae sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_219	Thelephoraceae sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_220	Pezizales sp.	1	0	0	0	0	0	
OTU_221	<i>Sebacina</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_222	Sebacinaceae sp.	1	0	0	0	0	0	1
OTU_223	<i>Tomentella stiposa</i>	1	0	0	0	0	0	1
OTU_224	<i>Lactarius</i> sp.	1	0	3	0	0	0	1

1 外生菌根菌として解析に用いた OTU

表 2.2 環境変数

	標高クラス											
	200 m [n=9]		400 m [n=8]		600 m [n=9]		800 m [n=10]		1000 m [n=9]		1200 m [n=9]	
樹木種数	4.6	(2-7)	4.4	(3-8)	5	(3-6)	4.6	(2-6)	3.4	(2-5)	3.2	(2-4)
宿主樹木数	2.3	(2-3)	2	(2-2)	2	(1-3)	1.5	(1-2)	1.6	(1-2)	1.9	(1-3)
宿主の胸高断面積 (m ² per plot)	0.7	(0.4-1.2)	0.5	(0.3-0.6)	0.5	(0.2-0.9)	0.3	(0.2-0.4)	0.3	(0.2-0.5)	0.3	(0.2-0.7)
pH	4.2	(3.4-4.9)	4.8	(4.3-5.1)	4.5	(3.9-5.0)	3.8	(3.4-4.2)	3.6	(3.2-3.9)	3.5	(3.1-4.0)
含水率 (%)	59.3	(48.9-74.7)	65.9	(52.8-72.1)	63	(48.6-73.3)	64.9	(47.0-78.4)	64	(52.8-75.6)	66.6	(52.2-77.5)
C:N 比	17	(13.6-22.5)	17.5	(14.0-21.9)	14.4	(10.0-17.6)	14	(11.4-16.0)	13.6	(11.7-17.2)	13.3	(11.5-15.3)
斜面傾度(°)	8	(2.0-18.9)	25.5	(6.6-37.2)	25.2	(15.3-30.1)	13.8	(3.6-30.4)	20	(15.1-29.9)	32.9	(27.5-43.2)

60プロット中解析に用いた54プロットのデータを示す。

値は平均値(最小値-最大値)。

表 2.3 各標高クラスにおける宿主樹木の胸高断面積 (m²)

	標高クラス(m)					
	200	400	600	800	1000	1200
	[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]
ダケカンバ	6.485	0	8.826	27.615	28.117	25.706
ミズナラ	30.431	21.882	34.386	0	0	0
トドマツ	23.186	19.124	0.029	0	0	0
ミヤマハンノキ	0	0	0	0.491	1.412	5.222
シラカンバ	0	0	0	0.059	0	0
ハイマツ	0	0	0	0	0	0.263

60プロット中解析に用いた54プロットのデータを示した。

表 2.4 主要 15OTU と各 OTU が各標高クラスで検出されたサンプル数

OTU ¹	分類群	標高クラス (m)						合計 [N=54]
		200	400	600	800	1000	1200	
		[n=9]	[n=8]	[n=9]	[n=10]	[n=9]	[n=9]	
クラスター1								
OTU_17	<i>Cortinarius</i> sp.	4	0	0	5	3	6	18
OTU_42	<i>Tomentella sublilacina</i>	0	0	0	3	7	8	18
OTU_53	<i>Thelephoraceae</i> sp.	0	0	0	2	2	1	5
OTU_23	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	2	1	2	5
OTU_44	<i>Laccaria</i> sp.	0	0	0	2	2	2	6
OTU_38	<i>Clavulina castaneipes</i>	1	0	0	1	3	0	5
OTU_47	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	4	2	0	6
クラスター2								
OTU_74	<i>Cenococcum geophilum</i>	5	1	0	0	0	0	6
OTU_52	<i>Inocybe</i> sp.	4	1	0	0	0	0	5
OTU_72	<i>Hygrophorus</i> sp.	4	1	0	0	0	0	5
OTU_1	<i>Laccaria</i> sp.	3	1	1	0	1	1	7
OTU_71	<i>Inocybe</i> sp.	4	1	2	0	0	0	7
OTU_154	<i>Piloderma</i> sp.	2	2	2	0	0	0	6
OTU_73	<i>Lactarius</i> sp.	2	0	4	0	0	0	6
OTU_75	<i>Humaria hemisphaerica</i>	0	2	3	0	0	0	5

1 表中のOTUの順番はクラスター解析(図2.7)で示す順番に従う。クラスター1及び2はクラスター解析により得られたものである(図2.7)。

分類群の同定は **Claident** により行った。

表 2.5 外生菌根菌 OTU 数への宿主植物及び非生物環境(ニッチ要因)の影響に関する一般化線形モデル(GLM)の結果

	Df	Deviance	Coef.	pseudo-R ²	P-value
標高 (線形)	1	1.87	-0.001	0.034	0.516
標高 (二次)	2	1.92	-0.575 0.096	0.035	0.645
pH	1	0.15	0.04	0.003	0.789
含水率	1	3.04	-0.066	0.055	0.365
C:N 比	1	0.02	0.003	0.000	0.879
斜面傾度	1	12.19	-0.019	0.202	<0.001
斜面方位	1	0.47	0.001	0.009	0.645
宿主樹木数	1	0.68	0.087	0.013	0.645
宿主胸高断面積	1	0.45	0.188	0.008	0.645

pseudo-R² 値の算出は Nagelkerke (1991)に従った。

表 2.6 一般化線形モデル(GLM)により示された主要外生菌根菌 OTU への宿主、環境、空間変数の影響

OTU ¹	分類群	宿主 ²				環境 ²		空間 ²		
		As	Qm	Av	Be	Ele.	pH	V1	V2	V3
クラスター1										
OTU_17	<i>Cortinarius</i> sp.	n.s.	-	+	n.s.	n.s.	-	+	n.s.	n.s.
OTU_42	<i>Tomentella sublilacina</i>	-	-	+	+	+	-	+	n.s.	n.s.
OTU_53	Thelephoraceae sp.	n.s.	-	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
OTU_23	<i>Russula</i> sp.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
OTU_44	<i>Laccaria</i> sp.	-	-	n.s.	+	+	-	+	n.s.	n.s.
OTU_38	<i>Clavulina castaneipes</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
OTU_47	<i>Lactarius</i> sp.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.
クラスター2										
OTU_74	<i>Cenococcum geophilum</i>	+	n.s.	n.s.	-	-	n.s.	n.s.	n.s.	-
OTU_52	<i>Inocybe</i> sp.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	-
OTU_72	<i>Hygrophorus</i> sp.	+	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	-
OTU_1	<i>Laccaria</i> sp.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
OTU_71	<i>Inocybe</i> sp.	+	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	n.s.
OTU_154	<i>Piloderma</i> sp.	n.s.	+	n.s.	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	n.s.
OTU_73	<i>Lactarius</i> sp.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
OTU_75	<i>Humaria hemisphaerica</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	-	n.s.	n.s.

1 表中のOTUの順番はクラスター解析(図2.7)で示す順番に従う。クラスター1及び2はクラスター解析により得られたものである(図2.7)。

2 +及び-はそれぞれ各OTUへの有意な正、及び負の影響を示す($P < 0.05$)。

n.s. 有意でない

As トドマツ(*Abies sachalinensis*)、Av ミヤマハンノキ(*Alnus viridis*)、Be ダケカンバ(*Betula ermanii*)、Qm ミズナラ(*Quercus mongolica*)、Ele 標高をそれぞれ表す。V1 は 6 標高クラスにわたる線形な増加もしくは減少を表す PCNM 軸であり、V2 及び V3 は連続する 2 標高クラス間での出現を表す PCNM 軸である。

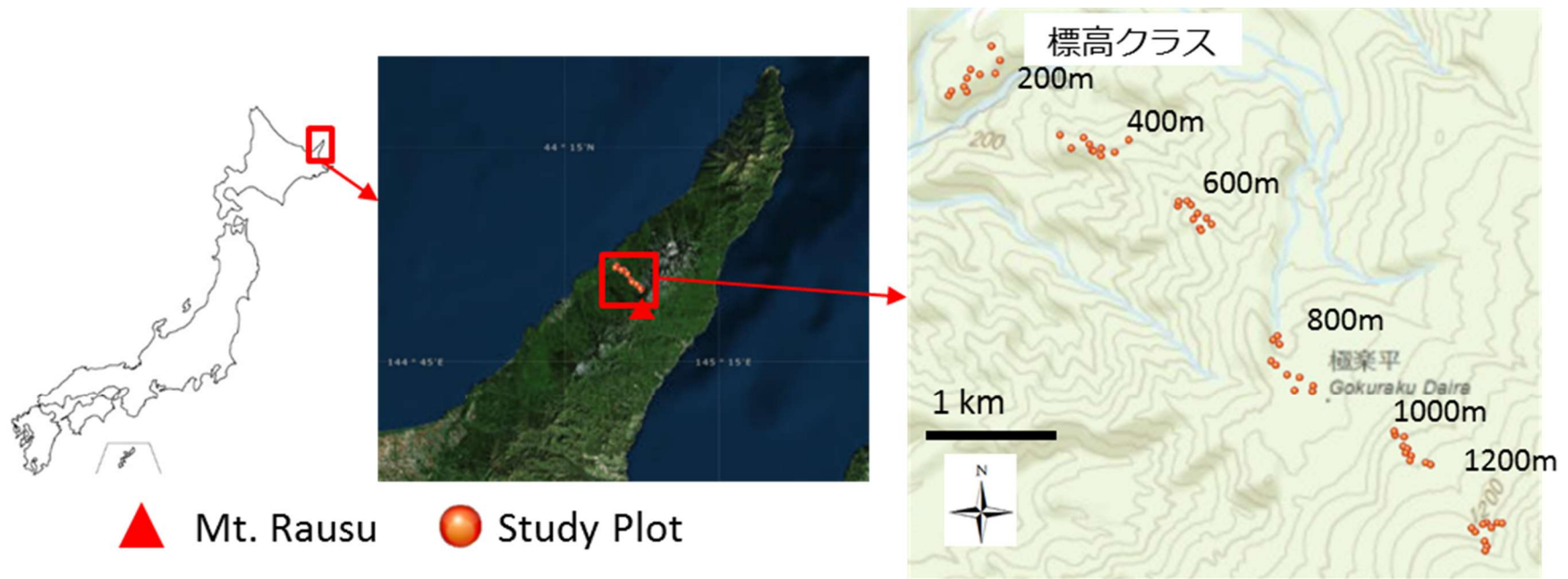


図 2.1 北海道知床半島の地図。本研究は、羅臼岳の北西斜面でおこなわれた。6 標高クラスに 0.01 ha の調査プロットを各 10 個、合計で 0.6 ha、60 個の調査プロットを設置した。

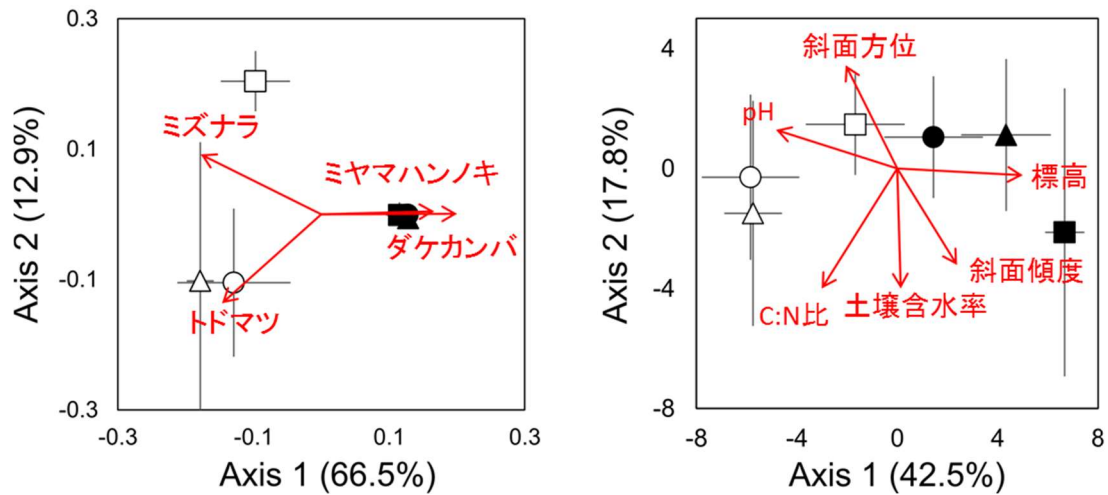


図 2.2 調査プロットにおける宿主群集組成(a)と環境変数(b)の座標図家解析結果。(a)宿主の胸高断面積を基にした主座標分析 principal coordinates analysis (PCoA)と(b)主成分分析 principal components analysis (PCA)。シンボルは標高クラスを示す: 200 m (白丸)、400 m (白三角)、600 m (白四角)、800 m (黒丸)、1000 m (黒三角)、1200 m (黒四角)。バーは S.D.を示す。座標付け結果に有意に相関する変数($P < 0.05$)を矢印で示した。各変数の有意性は R の *Vegan* パッケージの *envfit* 関数により検定を行った。

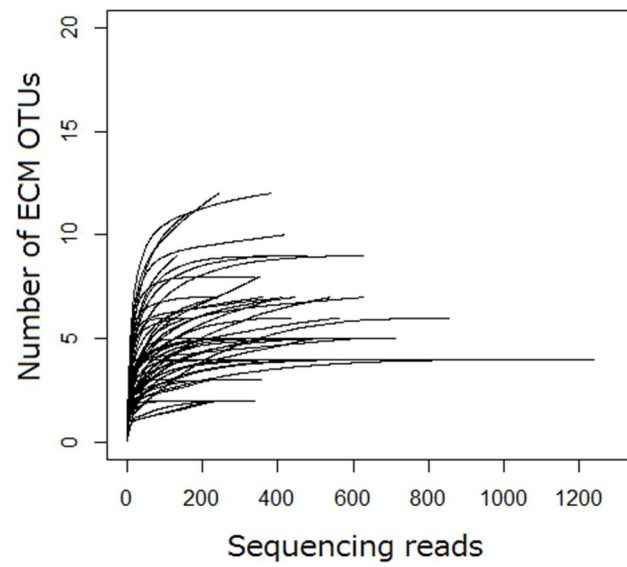


図 2.3 各 FH サンプルにおけるシーケンスリード数と外生菌根菌 OTU 数の関係を示した希薄化曲線。

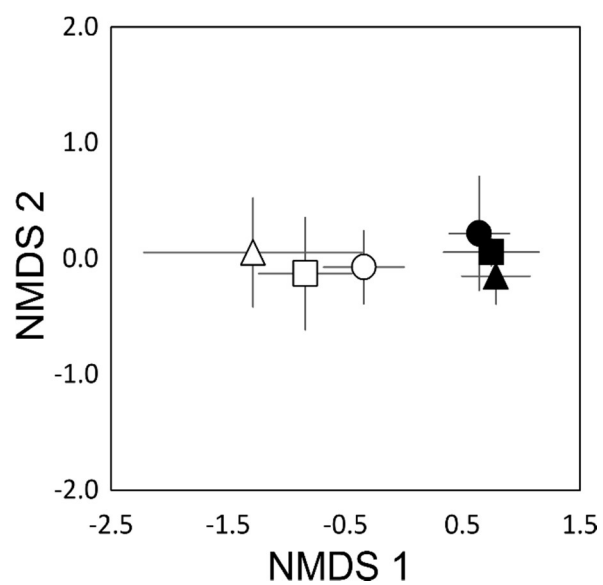


図2.4 非計量多次元尺度法(NMDS)による標高クラス間での群集の非類似度の座標付けの結果(ストレス値=0.077)。標高クラスは以下の記号で示してある; 200 m (白丸)、400 m (白三角)、600 m (白四角)、800 m (黒丸)、1000 m (黒三角)、1200 m (黒四角)。バーは標準偏差を示す。

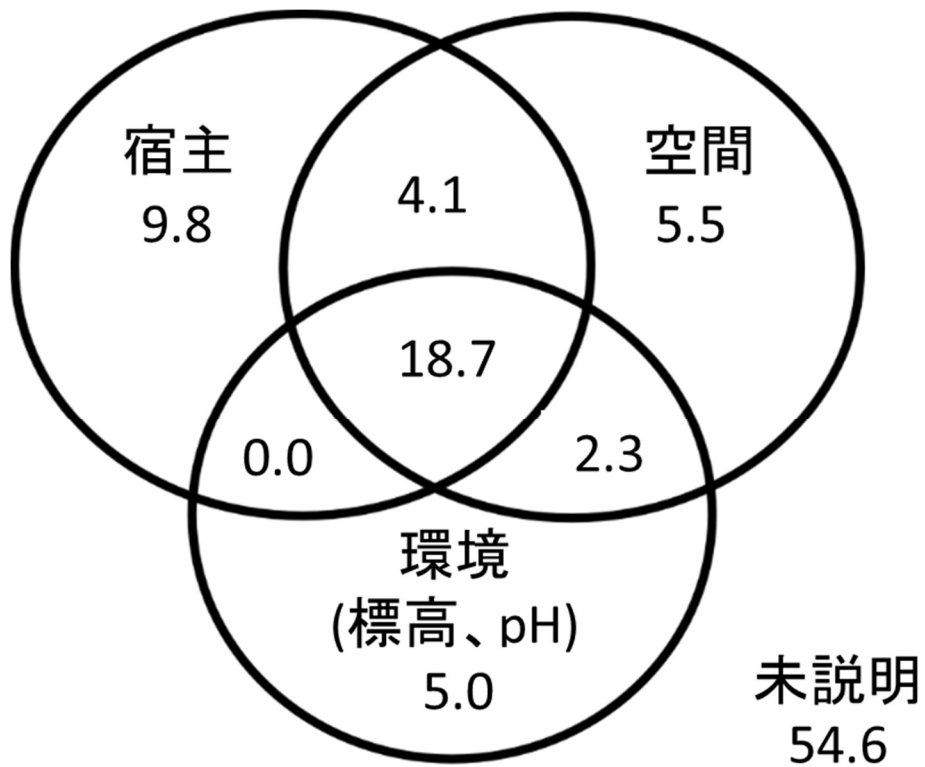


図2.5 Variation partitioningにより得られた、外生菌根菌群集に対する宿主群集、非生物環境および空間要因の説明力を示したベン図。数字は説明された割合(%)を示す。

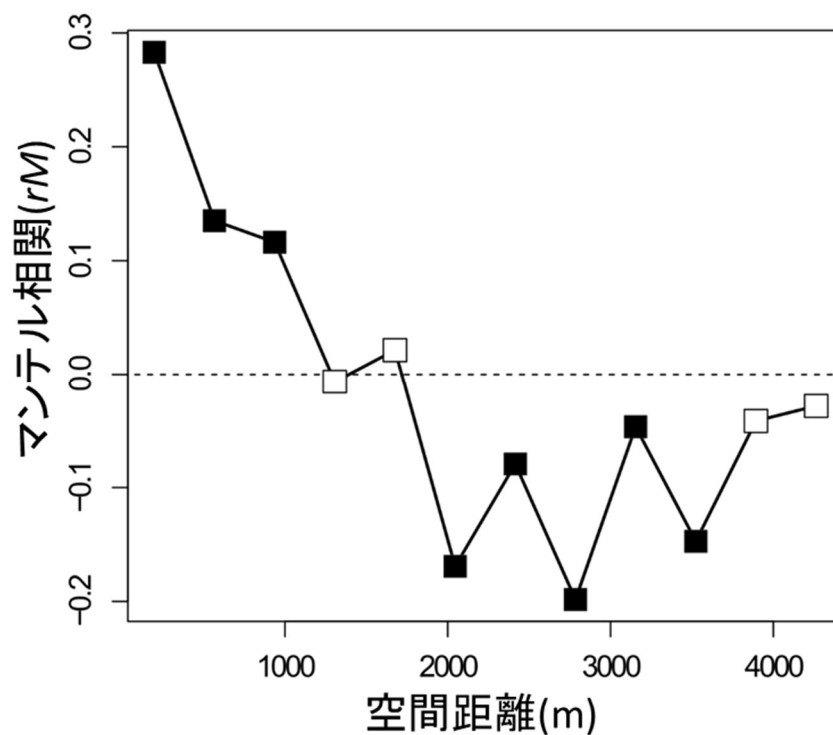


図2.6 外生菌根菌の群集組成の空間自己相関を示すマンテルコレログラム。 r_M が有意に正のとき、その距離クラスにおいて群集組成は正の自己相関を示している。各距離クラスは全てのサンプル間ペアを図に示す距離で分類したものを表している。黒と白の四角は、それぞれ有意な相関と有意でない相関を示している。有意性の判定はパーミュテショナルマンテル検定(999パーミュテーション)及びBenjamini-Hochberg法の結果得られたP値をもとに5%の基準で行った。

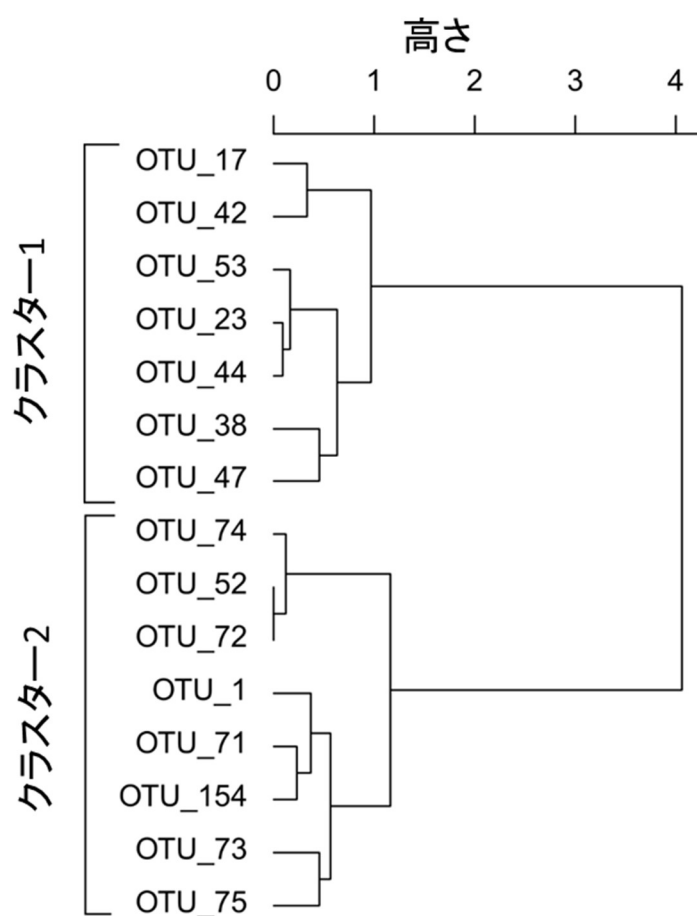


図2.7 主要15 OTUを標高クラス間での出現パターンによって分類した階層クラスター解析の結果。各 OTU の分類群は表 2.4 を参照。

第 3 章 本邦亜熱帯常緑樹林における外生菌根菌群集組成の類似度の時間距離減衰

3.1 序論

先行研究及び第 2 章の結果から、外生菌根菌の群集構造が様々な空間スケールにおいて類似度の空間距離減衰を示しうること、そしてこの空間構造にはニッチ要因のみならず、空間関連要因(例えば分散制限、Peay *et al.* 2010b; 2012)によっても引き起こされうることが示されている(Peay *et al.* 2007)。特に、これら 2 要因は同時に群集動態に影響すること(Tedersoo *et al.* 2011; Bahram *et al.* 2013; Pöhlme *et al.* 2013)、そして空間関連要因は、時にニッチ要因よりもよく外生菌根菌群集の空間変動を説明することから(Tedersoo *et al.* 2011; Bahram *et al.* 2013)、近年、外生菌根菌の群集研究を行うに当たり、空間関連要因を考慮することの重要性が指摘され始めている(Bahram *et al.* 2013; 2015)。

空間構造とは対照的に外生菌根菌群集の時間構造、すなわち類似度の時間距離減衰はあまり注目されてきておらず、群集構造の時間変動に対するニッチ要因(時間に伴う環境条件の変化)と時間関連要因の影響を定量・分離した研究はほとんどない。先行研究では群集構造の時間変動とニッチ要因の関連が議論されており、例えば Bruns (1995) は外生菌根菌群集は季節的な気温や湿度の変化に素早く応答できると考えている。実際、外生菌根菌の群集が季節に応じて変化することが報告されている(Buée *et al.* 2005; Koide *et al.* 2007; Courty *et al.* 2008)。このうち、Buée ら(2005) は季節的な外生菌根菌群集の変化を調査し、群集の時間変動は季節的なニッチの変化(例えば気温や土壌含水率)に関係していると議論している。これらの研究結果は、複数年に渡る外生菌根菌群集調査を行ったとき、群集構造は季節的な環境要因の変動に応答することで、周期的なパターンを示すだろうということを示唆している。一方で Smith ら(2007) は、気温などの環境要因が季節的に大きく変化している調査地においても、季節に対応した出現パターンを示す外生菌根菌はほとんどおらず、群集は調査期間を

通して徐々に変化していたことを報告している。

Smith ら(2007) の結果は外生菌根菌群集における類似度の時間距離減衰が時間関連要因によってももたらされうるということを示唆している。時間関連要因の原因となる生物学的プロセスは完全には理解されていないが、その要因の一つとして、先住効果、つまりある生息地に種が定着した順番の影響が考えられる(Alford and Wilbur 1985; Chase 2003; Dickie *et al.* 2012; Fukami 2015)。外生菌根菌は一度宿主の根に感染すると一定の期間その根に定着し続け、共通の資源を先取りすることで後からやってきた種の定着を阻止すると考えられる(Kennedy 2010; Fukami 2015)。そのため、群集集合が時間関連要因により駆動されていた場合、群集組成は環境変数の季節的な変化とは独立に、assembly history (種が群集に加入した順番やタイミング、Chase 2003; Dickie *et al.* 2012; Fukami 2015)を反映した類似度の時間距離減衰を示すと考えられる。しかし、これまで外生菌根菌群集の時間変動を調査した研究では、調査期間がどれも 1 年以内と比較的に短い。そのため複数年調べた場合に、群集が周期的な時間変動パターンを示すのか、それとも類似度の時間距離減衰を示すのかは未だ分かっていない。複数年にわたる継続的な群集調査は、ニッチ要因と時間関連要因を分離する上で重要だと考えられる(Bahram *et al.* 2015)。

本章の目的は外生菌根菌群集の時間構造について調査し、群集の時間変動に対する時間関連要因の寄与率を調べることである。そこで、亜熱帯林において 3 か月おき 2 年間の継続的な外生菌根菌のサンプリングを行い、各サンプル時期の環境・気候要因の違い及び空間的・時間的距離を計測した。そして、それらのデータから以下の 2 つの仮説の検証を行った。(1)外生菌根菌の群集組成は類似度の時間距離減衰を示す。(2)外生菌根菌群集の時間変動は、ニッチ要因だけではなく、時間関連要因の影響も受けている。

3.2 材料と方法

調査地

本研究は日本の南西部に位置する沖縄本島北部の琉球大学研究林内の亜熱帯常緑広葉樹林で行った(26°9'N, 128°5'E, ca. 275 m a.s.l.)。調査地から西に3 kmの地点にある琉球大学与那研究林事務所のデータによると研究林における過去30年間の年平均気温及び年間降水量はそれぞれ21.8 °Cと2680 mmである(Xu *et al.* 1998)。調査地は起伏に富んだ切れ込んだ地形で砂岩と粘板岩からなる母岩を有し、黄色土(Kanno *et al.* 2008)が発達している。林内ではブナ科のスダジイ(*Castanopsis sieboldii*) 及びツバキ科のイジュ(*Schima wallichii* ssp. *liukuensis* (Nak.) Bloemb.)が優占している(Enoki 2003)。林齢はおよそ60年で、伐採やその他の森林施行は少なくとも過去50年間には行われていない。

調査方法

林内に200 m² (20 × 10 m)のプロットを2つ設置した。プロット間の間隔は10mである。各プロットを10 m × 10 mの2つの区画に分け、各区画をさらに2 m × 2 mの小区画25個に分けた。2つのプロット全体では小区画が100個となる(図3.1)。プロット内では胸高直径が5 cm以上の樹木は14科25種が観察されたが(表3.1)、そのうち外生菌根菌の宿主となることが知られている樹種はスダジイのみであった。プロット内において胸高直径が5 cm以上の樹木個体の胸高断面積合計のうちスダジイが55%を占めていた(表3.1)。サンプリングは、2009年7、10月、2010年1、4、7、11月及び2011年1、4月の3ヶ月おき計8回行った。各サンプリング日では、4つの区画から各5の小区画(計20の小区画)をランダムに選び出した。その20個の小区画において、表面のリター層を取り除いた後、小区画の中心から10 × 10 cm、深さ5 cmの樹木根を含むFH層のブロックを採取した。毎回ランダムにサンプリングを行う小区画を選んでいるため、2回目以降のサンプリングでは、以前の調査でブロックを採取したことのある小区画を選ぶ場合がある。その際には中心から少しずらして中心に近い場所からFHブロックを採取した。これにより得られた計160個のFHブロック(各回20繰り返し×8調査日)を解析に用いた。実

験室に持ち込むまでの間、FHブロックはプラスチック製の袋に入れ、-20 °Cで保存した。

実験室に戻った後、FHブロックを室温で緩やかに融かし、各ブロックから湿重量で5 gの土壌をpHの計測のために量りとった。pH計測用の土壌を量りとった後のサンプルから、2 mmメッシュのふるいと水道水により樹木細根を洗い出した。各ブロックから、長さ約5 cmの根系を20個ずつランダムに選び出し、双眼実体顕微鏡(×20)下で、各根系からの1個ずつ根端(長さ1-2 mm)を採取した。採取した根端には外生菌根菌だけでなくその他の菌根タイプの菌根菌及び菌根菌以外の菌類も含まれている。得られた20根端はFHブロックごとにプールし、70%エタノール(質量パーセント濃度)、0.005%エアロゾールOT(スルホコハク酸ジオクチルナトリウム)溶液(質量パーセント濃度)及び滅菌蒸留水を用いて洗浄した。その後根端をCTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロマイド)バッファーを含むチューブに移し、DNA抽出までの間-20 °Cで保存した。根端を採取した残りの根サンプルは、紙袋に移して40 °Cで乾燥させ、化学分析に用いた。

DNA抽出、PCR増幅及びパイロシーケンシング

分子実験は第2章と同様の方法で行った。つまり、CTAB法により、160サンプル中の根端から全DNAを抽出して、semi-nested PCR法により菌類のITS領域を増幅した。1回目のPCR試薬と反応条件は第2章と同様に行ったが、2回目のPCRは以下の要領で行った。まずPCR試薬としてBlend Taq Plus (TOYOBO)を用いて、テンプレートのDNA 1.0 µl、Blend Taq Plus 0.2 µl、10×バッファー2.0 µl、dNTP 2.0 µl、プライマー2種各0.8 µl (それぞれ5 µM)及び滅菌水13.2 µlを含む20 µlの反応系とした。PCR反応では、94 °C 5分のステップの後、95 °C 20秒、60 °C 30秒、72 °C 90秒の3ステップを20サイクル行い、最後に72 °C 10分の伸長反応の延長時間を設けた。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により増幅を確認した後、ExoSAP-ITを用いて精製し、Nanodropで濃度を計測した。増幅産物はサンプル間でDNAのモル数が等しくなるように4つのライブラリーにプールし、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)により精製した。得られた4ライブ

ラリーは京都大学理学研究科のGS-FLXシーケンサー(Roche 454 Titanium)の1/16リージョンでそれぞれシーケンシングを行った(計4/16リージョン)。

バイオインフォマティクス

パイロシーケンシングにより165,466リードが得られた。シーケンシングで得られたデータセットは全て日本DNAデータバンクのシーケンスリードアーカイブ(DDBJ Sequence Read Archive)に登録した(アクセッション番号: DRA002424)。得られた配列は、第2章と同様の方法でOTUにまとめた。まず、低クオリティの配列と150 bp以下の配列を削ることで、127,952配列が残った。その後Assamsアセンブラーv0.1.2013.08.10 (Tanabe 2013)を用いて、シングルトン、キメラ配列、パイロシーケンシングにおけるエラー配列を除外した。これらの選別の結果、72,014配列が得られた。ここで、選別の結果50配列未満しか残らなかったサンプル15個は、ITS多様性の過小評価を防ぐために解析から除外し、残りの145サンプル71,829配列を以降の解析に用いた。サンプルあたりの配列数は59から1053 (495 ± 191 、平均 $\pm$ S.D.)であった。残った全ての配列はAssamsを用いて97%の相同性閾値でサンプル間のアセンブルを行い、得られたコンセンサス配列を分子的操作的分類群(OTU)として解析に用いた。

得られたOTUの分類群は第2章と同様に、Claident v0.1.2013.08.10 (Tanabe & Toju 2013)を用いて推定を行った。各OTUのClaidentでの同定結果と各サンプリング日での検出サンプル数を表3.2に示す。同定結果から、Tedersooら(2010)及びTedersoo & Smith (2013)のレビューを参照し外生菌根菌と考えられる属や科に含まれるOTUを外生菌根菌OTUとした。これにより得られた外生菌根菌OTUを以降の解析に用いた(表3.2)。

環境・気候データ

ニッチ要因(すなわち環境・気候要因)と外生菌根菌群集(OTU数やOTU組成)との関連について調べるために環境と気候のデータを計測した。計測したデータは以下の3つのグループに分類することができる(表3.3)。一つ目は各調査日の

各FHブロックにおいて計測された変数で、土壌のpHと外生菌根が付いた根の全炭素・窒素量が含まれる(表3.3a)。土壌のpHは1基底の塩化カリウム水溶液を抽出液として、Docu-pH meter+ (Sartorius, Goettingen, Germany)を用いて計測した。根の炭素量及び窒素量はガスクロマトグラフィーによる燃焼法を用いて測定された(JM 1000 CN, J-Science Co. Ltd, Kyoto, Japan)。

二つ目のグループは小区画ごとに計測された変数で、土壌含水率、開空率、スダジイの胸高断面積合計(以下BAと表記)、最寄りのスダジイまでの距離(以下DISTと表記)の4つの環境データを含む(表3.3b)。土壌含水率は2011年1月にMoisture Meter HH2 (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK)を用いて林床表面から長さ6 cmのセンサーを土壌に刺して計測した。開空率は2012年4月に各小区画の中心において地上50 cmの高さで半球魚眼写真を撮り、その写真をもとにCanopOn 2ソフトウェア(<http://takenaka-akio.org/etc/canopon2/>)を用いて全空のうちの林冠の開放率(%)として算出した。魚眼写真はsigma 4.5-mm F2.8 EXDCサーキュラーレンズ(Sigma, Tokyo, Japan)とCanon EOS60Dデジタルカメラを用いて水平計で水平になるようにして曇天空の下で撮影した。BA及びDISTは宿主植物が外生菌根菌群集に与える影響の指標として計測した。プロット内の樹高1 m以上の全スダジイ個体に対し胸高直径と、観察された小区画を記録した。さらにプロットの外周に各2×2 mの68個の小区画を設定し(図3.1)、これらの小区画内のスダジイ個体の胸高直径も記録した。プロット内の100個の小区画それぞれに対し、その小区画と隣接する8つの小区画で見られたスダジイの胸高断面積の合計としてBAを、小区画の中心から最寄りのスダジイを有する小区画の中心までの距離としてDISTを算出した。

三つ目は調査日ごとに計測された変数で、2つの気候要因を含む (表3.3c)。各調査日までの前2週間の平均気温(t_{2w})と積算降水量(p_{2w})を計算した。調査期間中の気温、降水量は調査地から北に7 kmの地点(標高232 m)にあるアメダス(気象庁)の奥ステーションのデータから得た。調査地における2009年から2011年の間の月平均気温及び月間降水量を図3.2に示した。環境、気候変数のうち調査日ご

とのデータがあるもの(pH、C量、N量、 t_{2w} および p_{2w})に関してはその時間変化を表3.4に示した。

データ解析

外生菌根菌の群集データは、サンプルごとに各OTUの在/不在を記録すること、2元データとして以降の統計解析に用いた。解析には全てR v. 3.0.1 (R Core Team 2013)を用いた。OTU数については、第2章と同様に、希薄化したOTU数ではなく生のOTU数を解析に用いた。その理由は以下の3つである。(1)リード数が50以下のサンプルを解析から除外していること、(2)リード数の少ないサンプルの希薄化曲線もほとんどが飽和状態に達していること(図3.3)、(3)解析に用いた145サンプルにおいて生の外生菌根菌OTU数とリード数の間に有意な相関関係が見られなかったこと(ピアソンの相関係数 $r = 0.117$, $P = 0.16$)。

全外生菌根菌OTU及び主要な4つの科(ベニタケ科、イボタケ科、イグチ科、フウセンタケ科)について、調査期間中のOTU多様性、すなわちサンプルごとのOTU数の変動を一般化線形モデル(GLM)により調べた。誤差構造及びリンク関数としてそれぞれポアソン分布と対数関数を用いた。さらに、全外生菌根菌及び主要4科のOTU数と環境、気候変数との関連を調べるためにもポアソン分布と対数関数を用いたGLMによる解析を行った。ただし、全外生菌根菌OTUの解析のみ、OTU数の頻度分布がポアソン分布からの強い過分散を示したため、ポアソン分布でなく負の二項分布を用いた。環境、気候変数の間に有意な多重共線性は見られなかった(分散拡大係数VIF < 10)。各モデルのP値は χ^2 近似での尤度比検定により計算し、Benjamini-Hochberg法(Benjamini & Hochberg 1995)により多重検定の補正を行った。OTU数と環境・気候変数との関連の強さを示すためにNagelkerke (1991)に従い擬似決定係数を計算した。

群集組成が年によらず季節によって似るのかを確認するために、外生菌根菌の群集組成の時間変動に対する季節(4つのカテゴリー変数。2009年7月と2010年7月の調査は夏カテゴリー、2009年10月と2010年10月の調査は秋カテゴリー、2010年1月と2011年1月の調査は冬カテゴリー、2010年4月と2011年4月の調査は

春カテゴリー)の影響をpermutational MANOVA (PERMANOVA, *vegan*パッケージ内の'adonis'関数)により調べた。外生菌根菌の群集組成の非類似度が、調査日間の時間的な距離や環境的な距離と関連しているのかを調べるために、それぞれに対してマンテル検定を行った(*vegan*パッケージ内の'mantel'コマンド)。その後、外生菌根菌の群集組成がどの時間スケールでクラスタリングしているかを特定するためにマンテルコレログラム解析を行った(*vegan*パッケージ内の'mantel.correlog'コマンド)。これらの解析を行うために、まず調査日ごとに外生菌根菌OTUの在/不在データを合計し、Simpsonの指数(Simpson 1943)を用いて非類似度行列に変換した。この指数はサンプリング単位間の種数の違いよりも種構成の違い(ターンオーバー)に焦点を置いたものであり、Jaccard指数やSørensen指数といったその他の一般的な指数に比べて種の付加や損失の影響を受けにくいことが知られている。群集の非類似度(β_{SOR})は種の置き換えであるターンオーバー(β_{SIM})と種の損失であるネステッドネス(β_{NES})の2つに分けることができる(Baselga 2010)。Baselga (2010)で示されている手法に従い、本研究で得られた外生菌根菌群集の非類似度をターンオーバーとネステッドネスの2つの要素に分けたところ、 $0.814 (\beta_{\text{SOR}}) = 0.773 (\beta_{\text{SIM}}) + 0.041 (\beta_{\text{NES}})$ という式を得た。この値は群集の時間変動の多くはターンオーバーにより引き起こされていることを示している。調査日及び調査日ごとの環境・気候変数(pH、炭素量、窒素量、 t_{2w} 、 p_{2w})の平均値はそれぞれユークリッド非類似度指数を用いて時間、環境の非類似度行列にそれぞれ変換した。環境・気候変数に対しては非類似度を計算する前に全て標準化を行った。

外生菌根菌の群集構造に対する環境、気候、時間変数及び空間変数の寄与率を定量するため距離ベースの冗長性分析(db-RDA)に基づいたvariation partitioningを行った(*vegan*パッケージ内の'capscale'コマンド)。各画分(要因ごとの純粋な影響を示す画分、要因間で共有される画分、いずれの要因でも説明できなかった画分)の相対的な説明力の高さはPeres-Neto *et al.* (2006)に示される手法に基づいて計算した。まず、Simpson指数を用いて各サンプルの外生菌根菌OTUの在/不在データを非類似度行列に変換した。その際、非類似度全体をター

ンオーバーとネスティッドネスに区別し、 $0.989 (\beta_{\text{SOR}}) = 0.983 (\beta_{\text{SIM}}) + 0.006 (\beta_{\text{NES}})$ という式を得た。この値はサンプル間における群集の違いのほとんどがターンオーバーによるものであることを示している。その後、環境、気候、空間、時間の4つのRDAモデルを構築した。この4つのモデルのうち、環境及び気候のモデルは環境、気候変数(表3.3)に対してそれぞれBlanchet *et al.* (2008)の前進選択法(999パーミュテーション、基準値 $\alpha = 0.05$)を行って得た。空間及び時間のモデルでは、まずPCNM解析(principal components of neighbor matrices、Borcard *et al.* 2004)により、サンプリングを行った小区画の位置座標及び調査日の時間座標から直行ベクトルを抽出した。そして、自己相関を最もよく説明する空間・時間それぞれのPCNM軸に対して前進選択法(999パーミュテーション、基準値 $\alpha = 0.05$)を行い、群集の非類似度に有意に関係している空間変数と時間変数を選んでモデルを立てた。これら4つのモデルをもとに各画分のadjusted R²値を計算することで、variation partitioningを行った(Peres-Neto *et al.* 2006)。

3.3 結果

シーケンス及びOTUの同定結果

データ解析に用いた145サンプルからは全体で71,829配列が得られ、これらは97%の相同性閾値で372 OTUに分けられた(表3.2)。このうち25,345配列123 OTUが外生菌根菌の分類群に属し、これらは担子菌門の121 OTUと子囊菌門の2 OTUからなっていた。科レベルで見ると123 OTUは14の科からなり、中でもベニタケ科(40 OTU、全外生菌根菌OTUのうち32.5%)、イボタケ科(28 OTU、同22.8%)、イグチ科(20 OTU、同16.3%)、フウセンタケ科(19 OTU、同15.5%)がOTU数の多い科であった。出現頻度の高かったOTUはOTU_77 (*Tuber* sp.、145サンプル中18サンプルから検出)、OTU_107 (*Boletaceae* sp.、同16サンプル)、OTU_38 (*Tomentella stiposa*、同14サンプル)であった。外生菌根菌123 OTUのうち56 OTU (45.5%)は1 サンプルのみから検出された。

外生菌根菌OTU数

調査日ごとの外生菌根菌OTU数の合計は25から47の範囲であった(表3.5)。各調査日におけるサンプル当たりのOTU数の平均値は2.1から3.7の範囲で、主要4科については、ベニタケ科、イボタケ科、イグチ科、フウセンタケ科の順にそれぞれ0.6から1.1、0.3から1.1、0.3から0.9、0.2から0.7 OTUであった(表3.5)。全外生菌根菌及び主要4科のサンプル当たりのOTU数の平均値は調査日間で有意差が検出されなかった(GLM、 $P > 0.05$)。

全外生菌根菌および主要4科のOTU数と8つの環境変数の関係をGLMにより解析を行ったところ、フウセンタケ科のOTU数とpHの間にのみ統計的に有意な関係が見られ、フウセンタケ科のOTU数はpHの上昇に伴い減少していた(GLM、逸脱度 = 7.42、擬似決定係数 = 0.08、 $P = 0.045$)。全外生菌根菌および他の主要3科のOTU数と8つの環境変数(根の炭素量・窒素量、土壌含水率、開空率、BA、DIST及び t_{2w} 、 p_{2w})の間には統計的に有意な関係は見られなかった(GLM、逸脱度 = 0.00-6.32、擬似決定係数 = 0.00-0.06、 $P > 0.05$)。

群集組成の時間構造

季節は外生菌根菌の群集組成に有意には影響していなかった(PERMANOVA, $F = 1.132$, $P = 0.328$)。マンテル検定により、調査日間の外生菌根菌群集の非類似度と時間的距離との間には有意な正の相関が見られたが($r = 0.350$, $P = 0.038$ 、図3.4a)、環境的距離との間には有意な相関は見られなかった($r = 0.055$, $P = 0.417$ 、図3.4b)。この結果は外生菌根菌の群集が季節や年とは独立に、時間に沿って変化していたことを示している。外生菌根菌群集組成の時間的なクラスタリングが見られるスケールを調べるために、マンテルコレログラム検定を行った。その結果、もっとも短い時間距離クラスのみにおいて外生菌根菌群集が有意な時間自己相関を示していることが示された($P < 0.05$ 、図3.3)。この時間距離クラス(0-110日)は連続する2回の調査(3ヶ月)を含んでいる。この結果はつまり、ある調査時期の群集組成は、1回前(3ヶ月前)の調査時期の群

集組成と有意に類似していることを示している。それ以上の時間距離クラスでは有意な正の自己相関は見られなかった。

群集組成に対する環境、気候、空間及び時間変数の相対的な寄与率

環境、気候、空間、時間の4つのフルモデルに対して前進選択法を行った。各フルモデルは、それぞれ環境が7変数、気候が2変数、空間が正の固有値を持つ29のPCNM軸そして時間が正の固有値を持つ4つのPCNM軸からなる。前進選択法の結果、環境変数では開空率とDISTが(表3.3)、気候要因では t_{2w} と p_{2w} が(表3.3)、空間では4つのPCNM軸(1、2、6、8)が、そして時間では3つのPCNM軸(1、2、3)が選択された。環境、気候、空間、時間のモデルによりそれぞれ群集の非類似度の1.7%、1.7%、4.3%、3.6%が説明された(図3.6)。つまり、外生菌根菌群集の空間・時間変動は、ニッチ要因(環境・気候変数)よりも時間・空間変数によってより説明されるという結果が得られた。環境-空間変数の共有区画と気候-時間変数間の共有区画はそれぞれ全体の0.1%を説明した(図3.6)。合計で群集の空間・時間変動の11.5%が説明され、88.5%が未説明の画分として残った。RDAの結果を図3.7に示す。

3.4 考察

群集組成の時間構造

私の知る限り、外生菌根菌群集の類似度の時間距離減衰を調査し、外生菌根菌群集の時間変化に対する時間関連要因の影響を評価したのは本研究が初めてである。今回の結果から、群集の非類似度は時間的な距離とは有意な相関を示すが(図3.4a)、環境的な距離とは示さない(図3.4b)ということや、外生菌根菌群集の時間変化は時間変数のみによっても説明される(図3.6)ということが示された。これらの結果は、外生菌根菌群集は類似度の時間距離減衰を示し、ニッチ要因だけでなく時間関連要因も外生菌根菌群集の時間変化を引き起こするという仮説を支持するものである。これは、外生菌根菌群集の時間変化につ

いての研究において、ニッチ要因のみではなく、群集の時間構造や時間関連要因も明示的に考慮することの重要性を示している。

外生菌根菌の群集組成の時間変動パターンは、主要なOTUの出現パターンを反映したものであった。今回、主要OTUのほとんどは2年の調査期間の中で、数ヶ月にわたる2度きりの出現ピークを示していた。例えば、イボタケ科に属する3つの主要OTU [OTU_38 (*Tomentella stuposa*)、OTU_48 (*Thelephora* sp.)、OTU_40 (*Thelephoraceae* sp.)] はそれぞれ2009年1月、2010年4月、2011年1月に出現のピークを持ち、6-9ヶ月間継続して検出された(表3.2)。一方で、例えば1年目・2年目とも7月に出現が増えたOTU_288 (*Rossbeevera vittatispora*)のように(表3.2)、季節的な出現パターンを示したOTUはごくわずかであった。このような出現パターンが、0-110日間の時間距離クラス(連続した2回調査回に相当)でのみ群集組成に有意な時間自己相関が見られたというマンテルコレログラムの結果(図3.5)をもたらしたと考えられる。これらの結果は、外生菌根菌は一度宿主の根に定着すると、季節的な環境や気象の変動とは無関係に数ヶ月の間存続し続けるということを示唆している。本研究からは群集の時間変動を駆動する生物学的プロセスを完全に特定することはできないが、先住効果が外生菌根菌群集の変動をもたらす要因の一つであると考えられる。外生菌根菌の群集動態において先住効果が重要な役割を果たすということを示す研究もあり、例えばKennedyらは実験室内と野外の両方で、定着の順番が外生菌根菌同士の競争の結果に重要な影響を与える、すなわち、先に定着している菌根菌種が後から来た種の定着に有意な負の影響を与えるという結果を得ている(Kennedy & Bruns 2005; Kennedy *et al.* 2007; 2009)。この後から来た種の定着への負の影響が、環境の変動に対する群集の素早い応答を阻害し、類似度の時間距離減衰を生み出していると考えられる。一方で、variation partitioningにおいて時間変数によってのみ説明された画分(図3.6)は、本研究では未計測の環境変数の影響も含みうる(Borcard & Legendre 1994)。そのため、ニッチ要因もまた外生菌根菌群集の時間変動に影響している可能性がある。例えば、今回の調査は比較的成熟した林分において行われたが、調査地の環境の遷移に伴う外生菌根菌群集の遷移が類似度の時間距

離減衰をもたらしている可能性がある。ニッチ要因と時間関連要因は、相互排他的ではなく、同時に群集に影響を与えうるため、類似度の時間距離減衰をもたらす要因を完全に理解するためにはさらなる研究が必要でなる。

群集組成の時間動態

気候変数(ニッチ要因)の説明力が時間変数と比べて小さかった(図3.6)という結果は、本研究では未計測だったニッチ要因の影響と、調査地において外生菌根菌群集があまり季節的なパターンを示さなかったことの2つに起因すると考えられる。群集の季節的なパターンの薄さは、調査を行った亜熱帯林において気温や降水量といったニッチ要因の季節性の弱さにもよるだろう。Buéeら(2005)及びCourtyら(2008)は気温により明確な季節性が見られる温帯林において外生菌根菌群集の季節的な変化を観察している。しかし、外生菌根菌群集の時間変化に関してはデータがほとんどないため、他の亜熱帯林や熱帯林においても本研究と同様に外生菌根菌群集が季節的なパターンをほとんど示さないのかは不明である。環境や気候の季節的な変化が外生菌根菌群集に与える影響について解明するためには、様々な気候帯における複数年の継続調査が必要である。

Variation partitioningでは群集組成の空間・時間変動の大部分は未説明のままであった(図3.6)。この未説明の画分は、本研究で未計測であった次の3つの要因に関連していると考えられる。(1)時間・空間的なニッチ要因の変動、例えば細根のターンオーバー(Koide *et al.* 2007; Voříšková *et al.* 2014)や、土壌の化学性(例えば窒素やカチオンの利用可能性など, Toljander *et al.* 2006; Aponte *et al.* 2010)、リター供給量(Voříšková *et al.* 2014)など。(2)より頻繁な調査を行わないと検出できないような短い期間での時間要因(Borcard & Legendre 1994)。(3)個々の外生菌根菌個体のランダムな絶滅や定着(Hubbell 2001)。(1)に関して、例えば、Matsuokaら(未発表)は本調査地において細根のターンオーバーに伴う外生菌根菌の群集組成の時間変化を観察しており、またXuら(1998)はリターの供給量が春と秋に増加するというを示している。これらに加えて今回の研究における各FHブロックにおける種多様性の低さ(表3.5)や在/不在データのみを解析に用

いたことにより、外生菌根菌群集における時間的・空間的なパターンが検出されにくくなっていると考えられる。そのため、本研究結果からは、外生菌根菌の群集組成の時空間変動に対するニッチ要因と時間関連要因の相対的な重要性をはっきり決定することはできない。それでもなお、本研究の結果は外生菌根菌群集の時間変動の研究において、時間関連要因を考慮することの重要性を強調するものである。今後、ニッチ要因だけでなく時間関連要因も明示的に組み込んだ研究を行っていくことで、時間関連要因が外生菌根菌の群集構造を決定する上でどれほど重要で普遍的なものなのかが明らかになっていくであろう。

群集組成の空間変動

本研究では、空間関連要因が時間関連要因と同程度に群集組成の時空間変動を説明していた(図3.6)。外生菌根菌群集の空間変動に対するニッチ要因の説明力の低さ(図3.6)は、今回の調査地では宿主種のような環境変数の空間的異質性が低かったためだと考えられる。また、上述のように、未計測のニッチ要因の影響も考えられる。一方、限られた空間スケールでの調査であったにも関わらず、本研究で得られたニッチ要因と空間関連要因が同時に群集組成の空間変動に影響しうる(図3.6)という結果は、先行研究で示されている結果と一致するものであり(Tedersoo *et al.* 2011; Bahram *et al.* 2013)、外生菌根菌の群集生態学研究を行う際に空間関連要因を考慮することの重要性(Bahram *et al.* 2013)を改めて強調するものである。

外生菌根菌OTU数の時間変動

本研究では、外生菌根菌のOTU数について、調査日間では有意差が検出されなかった。この結果は、温帯林において外生菌根菌種数の時間変化を観察している先行研究(Buée *et al.* 2005; Courty *et al.* 2008; Longo *et al.* 2011)と一致しなかった。温帯林における外生菌根菌種数の時間変化は、樹木根の生産量の季節的な違いによるものだと考えられている(例えばIzzo *et al.* 2005; Koide *et al.* 2007; Courty *et al.* 2008)。例えば、Courtyら(2008)は温帯林において外生菌根菌群集の

時間変化を調べるために毎月サンプリングを行い、樹木根の生産量の多い春と秋(例えばTeskey & Hinckly 1981)に外生菌根菌の種数も増加することを報告した。本研究を行った亜熱帯林の調査地では、年間を通して細根の現存量は有意に変化せず、また年間を通じて継続的に根の生産が行われている(Matsuoka *et al.* 未発表)。細根量が有意に変化しないことや、細根が継続的に生産されるということは季節性に乏しい他の熱帯林においても報告されている(Ostertag 2001; Valverde-Barrantes *et al.* 2007など)。今回の調査地においては、細根が季節を問わず供給されたために、外生菌根菌のOTU数が時間変化を示さなかったと考えられる。

外生菌根菌のOTU数とニッチ要因の関係

フウセンタケ科のOTU数はpHの上昇に伴い減少した。高いpHのもとでフウセンタケ科の分類学的多様性が低くなるということは他の温帯林や冷温帯林においても観察されている(Douglas *et al.* 2005; Horton *et al.* 2013; しかしLilleskov *et al.* 2002を参照)。このようなpHとフウセンタケ科菌類の分類学的多様性の関連をもたらす要因は未だ明らかにされていないが、フウセンタケ科の菌類へのpHの影響は間接的なものであると考えられる。例えば、土壌のpHはしばしば窒素のような土壌中の養分の利用可能性としばしば相関することが知られており(例えばLilleskov *et al.* 2002; Toljander *et al.* 2006)、Lilleskovら (2002)は大気中からの窒素の降下が外生菌根菌群集に与える影響について調べ、pHというより窒素の利用可能性がフウセンタケ科の分類学的多様性に影響していると考察している。

3.5 結論

本研究では、2年間の継続的な調査を行うことで、外生菌根菌群集が類似度の時間距離減衰を示すことを明らかにし、外生菌根菌群集の時間変動に対するニッチ要因と時間関連要因の影響力を定量・分離した。本研究の結果は、時間関連要因が外生菌根菌群集における類似度の時間距離減衰を引き起こしうるといふ仮説を支持するものであった。本研究からは、この時間関連要因と関連す

る生物学的要因は明らかにされなかったが、先住者効果が本調査地における群集の時間的なターンオーバーに影響しているものと考えられる。本研究の結果は、外生菌根菌群集の時間変動の研究において、ニッチ要因だけでなく時間関連要因も明示的に組み込むことの重要性を示唆するものである。しかし、本研究からは群集の時間変動におけるこれら2要因の相対的な重要性を明らかにすることはできなかった。今後は、ニッチ要因だけでなく時間関連要因も考慮した上で、気候帯間での比較研究を行うことで、外生菌根菌の群集構造を決定する上でのニッチ要因と時間関連要因の相対的な重要性を明らかにすることが出来るだろう。

表 3.1 プロット内の樹木植生(胸高直径 5 cm 以上)

和名	学名	科	本数	胸高断面積 (cm ²)
イタジイ	<i>Castanopsis sieboldii</i>	ブナ科	20	10473.19
イジュ	<i>Schima wallichii</i>	ツバキ科	9	2341.78
イスノキ	<i>Distylium racemosum</i>	マンサク科	14	809.66
リュウキュウモチ	<i>Ilex liukiuensis</i>	モチノキ科	6	776.16
ヤマモモ	<i>Myrica rubra</i>	ヤマモモ科	7	774.08
ヤブツバキ	<i>Camellia japonica</i>	ツバキ科	7	615.42
タブノキ	<i>Machilus thunbergii</i>	クスノキ科	1	452.16
シロダモ	<i>Neolitsea sericea</i>	クスノキ科	3	380.49
コバンモチ	<i>Elaeocarpus japonicus</i>	ホルトノキ科	6	362.70
フカノキ	<i>Schefflera octophylla</i>	ウコギ科	6	342.35
カクレミノ	<i>Dendropanax trifidus</i>	ウコギ科	8	330.42
タイミンタチバナ	<i>Myrsine seguinii</i>	ヤブコウジ科	4	247.22
トキワガキ	<i>Diospylos morrisiana</i>	カキノキ科	3	140.43
シロミミズ	<i>Tricalysia dubia</i>	アカネ科	4	138.31
クロヘゴ	<i>Cyathea podophylla</i>	ヘゴ科	1	122.66
ナンバンアワブキ	<i>Meliosma squamulata</i>	アワブキ科	3	120.62
ヒサカキサザンカ	<i>Tutcheria virgata</i>	ツバキ科	1	116.84
リュウキュウマメガキ	<i>Diospyros japonica</i>	カキノキ科	1	80.08
ヒメサザンカ	<i>Camellia lutchuensis</i>	ツバキ科	1	37.37
モッコク	<i>Ternstroemia gymnanthera</i>	ツバキ科	1	33.17
ホルトノキ	<i>Elaeocarpus sylvestris</i>	ホルトノキ科	1	32.15
クチナシ	<i>Gardenia jasminoides</i>	アカネ科	1	24.62
ヒサカキ	<i>Eurya japonica</i>	ツバキ科	1	24.62
シマミサオノキ	<i>Randia canthioides</i>	アカネ科	1	22.89
ヒメユズリハ	<i>Daphniphyllum teijsmannii</i>	ユズリハ科	1	19.63

表 3.2 検出された OTU リスト

数字は各サンプリング日において各 OTU が検出されたサンプル数

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_1	Dikarya sp.	0	0	1	1	0	0	4	2	
OTU_2	Cortinariaceae sp.	3	1	1	1	1	0	1	1	1
OTU_3	Russulaceae sp.	0	0	0	1	2	0	0	2	1
OTU_4	<i>Cortinarius</i> sp.	0	3	1	2	0	2	0	0	1
OTU_5	<i>Hypocrea</i> sp.	0	1	2	0	0	0	0	0	
OTU_6	Dikarya sp.	0	0	2	0	0	0	3	1	
OTU_7	<i>Calonectria</i> sp.	0	0	0	0	1	2	0	0	
OTU_8	<i>Glomus</i> sp.	0	0	0	0	3	0	0	0	
OTU_9	Glomeraceae sp.	2	2	2	1	0	0	0	0	
OTU_10	Agaricomycetes sp.	7	2	1	2	4	7	4	8	
OTU_11	<i>Leptodontidium elatius</i>	17	18	15	19	19	16	19	16	
OTU_12	Helotiales sp.	2	3	0	0	2	3	2	0	
OTU_13	Boletaceae sp.	3	1	0	0	2	1	3	0	1
OTU_14	Ascomycota sp.	7	7	10	9	7	8	6	5	
OTU_15	Ascomycota sp.	0	0	3	1	0	0	1	2	
OTU_16	<i>Russula</i> sp.	4	0	0	2	0	0	0	0	1
OTU_17	Ascomycota sp.	11	12	12	7	10	12	15	10	
OTU_18	Xylariaceae sp.	6	7	8	6	5	5	6	10	
OTU_19	Boletaceae sp.	2	2	1	1	0	1	0	0	1
OTU_20	Hypocreales sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_21	unclassified	0	0	0	0	0	0	2	0	
OTU_22	<i>Trechispora</i> sp.	0	0	2	1	0	0	0	0	
OTU_23	Ascomycota sp.	0	0	0	0	1	1	0	0	
OTU_24	<i>Glomus</i> sp.	1	0	1	1	2	0	0	2	
OTU_25	Ascomycota sp.	0	0	0	0	2	2	0	0	
OTU_26	Thelephoraceae sp.	0	0	0	0	4	1	0	0	1
OTU_27	unclassified	0	0	2	2	0	0	0	2	
OTU_28	Trichocomaceae sp.	2	4	1	3	2	3	1	0	
OTU_29	Ascomycota sp.	2	5	7	7	2	10	5	5	
OTU_30	Sordariomycetes sp.	1	1	0	0	0	0	2	0	
OTU_31	Ascomycota sp.	0	0	2	1	0	1	1	0	
OTU_32	<i>Lactarius</i> sp.	1	1	0	0	2	0	1	2	1
OTU_33	<i>Glomus</i> sp.	0	0	1	0	1	1	0	0	
OTU_34	<i>Glomus</i> sp.	2	0	0	0	4	5	5	5	

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_35	<i>Hypocrea</i> sp.	10	8	6	4	9	9	7	9	
OTU_36	Sebacinales sp.	9	4	7	1	6	13	11	5	
OTU_37	Sordariomycetes sp.	1	2	0	0	3	1	2	1	
OTU_38	<i>Tomentella stuposa</i>	5	1	0	1	2	1	3	1	1
OTU_39	Chaetothyriales sp.	8	12	8	8	8	6	11	6	
OTU_40	Thelephoraceae sp.	1	0	0	0	0	0	5	4	1
OTU_41	Ascomycota sp.	5	4	2	3	3	3	3	2	
OTU_42	<i>Cortinarius</i> sp.	0	3	0	1	1	1	1	4	1
OTU_43	<i>Glomus</i> sp.	10	5	3	3	12	8	8	8	
OTU_44	Ascomycota sp.	5	3	2	2	4	4	7	4	
OTU_45	<i>Cladophialophora</i> sp.	3	7	3	0	5	1	4	4	
OTU_46	Basidiomycota sp.	1	0	4	5	1	2	1	4	
OTU_47	Ascomycota sp.	4	3	4	2	6	3	2	0	
OTU_48	<i>Thelephora</i> sp.	2	0	3	6	0	0	0	2	1
OTU_49	Eurotiomycetes sp.	0	0	1	2	1	3	2	2	
OTU_50	Leotiomycetes sp.	2	3	3	2	1	2	3	2	
OTU_51	<i>Russula</i> sp.	0	0	2	1	0	0	1	0	1
OTU_52	Boletaceae sp.	1	1	0	0	0	1	0	0	1
OTU_53	<i>Cortinarius</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	1
OTU_54	Leotiomycetes sp.	1	0	2	4	0	0	0	0	
OTU_55	Tricholomataceae sp.	0	0	1	0	0	0	0	2	
OTU_56	Tricholomataceae sp.	0	1	0	1	1	1	1	0	
OTU_57	Ascomycota sp.	0	0	1	0	0	0	1	0	
OTU_58	<i>Craterellus tubaeformis</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	1
OTU_59	Dikarya sp.	0	0	2	0	1	1	0	0	
OTU_60	<i>Tomentella</i> sp.	1	0	0	1	0	0	0	2	1
OTU_61	<i>Russula densifolia</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
OTU_62	Chaetothyriales sp.	0	0	1	0	0	1	0	0	
OTU_63	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	2	1
OTU_64	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	1	2	0	0	0	1
OTU_65	<i>Leptodontidium elatius</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	
OTU_66	Russulaceae sp.	0	2	0	7	0	2	1	0	1
OTU_67	<i>Cladophialophora</i> sp.	7	9	6	7	7	5	6	7	
OTU_68	Agaricales sp.	0	0	2	0	0	0	0	0	
OTU_69	<i>Mycena</i> sp.	0	4	2	1	3	1	1	3	
OTU_70	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	8	5	5	6	4	7	6	5	

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_71	Sordariomycetes sp.	5	11	6	5	3	6	3	3	
OTU_72	Helotiales sp.	3	1	2	4	5	2	2	1	
OTU_73	Chaetothyriales sp.	2	1	0	0	2	2	1	0	
OTU_74	<i>Tomentella</i> sp.	1	2	1	1	2	2	1	0	1
OTU_75	Thelephoraceae sp.	2	1	2	1	0	0	0	0	1
OTU_76	<i>Lactarius</i> sp.	2	0	3	2	0	0	2	0	1
OTU_77	<i>Tuber</i> sp.	5	3	3	2	1	0	3	1	1
OTU_78	Agaricales sp.	2	1	2	0	0	0	2	2	
OTU_79	Dikarya sp.	0	0	0	1	4	2	1	0	
OTU_80	Glomeraceae sp.	10	11	8	10	14	13	13	12	
OTU_81	Eurotiomycetes sp.	3	3	5	3	1	3	2	3	
OTU_82	Ascomycota sp.	6	6	5	3	0	3	0	1	
OTU_83	Glomeraceae sp.	5	7	7	6	10	7	9	9	
OTU_84	Chaetothyriales sp.	7	6	3	5	6	6	3	2	
OTU_85	Cantharellaceae sp.	1	0	0	0	0	0	3	3	
OTU_86	Ascomycota sp.	4	1	2	1	1	0	2	0	
OTU_87	Ascomycota sp.	1	3	1	1	0	2	0	1	
OTU_88	<i>Boletus</i> sp.	0	0	1	1	2	0	0	0	1
OTU_89	Tricholomataceae sp.	0	0	2	1	0	0	0	2	
OTU_90	Ascomycota sp.	5	5	2	2	1	2	2	4	
OTU_91	Tricholomataceae sp.	3	2	0	2	1	1	0	0	
OTU_92	Xylariaceae sp.	0	0	2	1	0	0	0	0	
OTU_93	Glomeraceae sp.	2	2	0	0	5	3	5	3	
OTU_94	unclassified	1	0	0	0	1	3	0	0	
OTU_95	<i>Tomentella</i> sp.	1	0	1	1	1	0	0	0	1
OTU_96	Leotiomycetes sp.	0	0	1	0	0	0	2	3	
OTU_97	<i>Mycena</i> sp.	0	0	0	0	0	3	0	0	
OTU_98	Amphisphaeriaceae sp.	0	0	1	0	0	0	3	2	
OTU_99	Glomeraceae sp.	1	3	2	3	0	0	1	1	
OTU_100	Boletaceae sp.	0	0	0	1	1	0	2	3	1
OTU_101	Ascomycota sp.	3	1	0	1	2	2	0	0	
OTU_102	Cantharellales sp.	0	0	0	0	0	1	0	1	
OTU_103	Glomeraceae sp.	0	0	2	2	0	0	0	0	
OTU_104	Glomeraceae sp.	6	9	5	5	9	9	10	12	
OTU_105	unclassified	1	3	3	2	0	0	0	0	
OTU_106	Glomeraceae sp.	9	6	1	5	3	5	9	8	

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_107	Boletaceae sp.	2	1	0	2	3	2	3	3	1
OTU_108	unclassified	0	0	1	1	0	0	0	0	
OTU_109	Ascomycota sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_110	Tricholomataceae sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_111	Sordariomycetes sp.	1	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_112	<i>Flagelloscypha</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_113	Agaricales sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_114	unclassified	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_115	Leotiomycetes sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_116	Helotiales sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_117	<i>Leptodontidium elatius</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_118	<i>Clavulina</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_119	Dikarya sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_120	Sordariomycetes sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_121	<i>Amanita</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_122	Agaricomycetes sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_123	Chaetosphaeriaceae sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_124	<i>Tricholoma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_125	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_126	unclassified	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_127	Agaricomycetes sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_128	Diaporthales sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_129	Marasmiaceae sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_130	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_131	Amphisphaeriaceae sp.	0	0	0	0	0	0	0	2	
OTU_132	Ascomycota sp.	0	1	1	0	0	0	0	0	
OTU_133	Leotiomycetes sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_134	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	1
OTU_135	Ascomycota sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_136	<i>Lauriomyces</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_137	<i>Entoloma</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_138	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OTU_139	<i>Mycena</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_140	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_141	Agaricomycetes sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_142	Chaetothyriomycetidae sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_143	Thelephoraceae sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_144	<i>Lactarius</i> sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	1
OTU_145	<i>Hygrophorus</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OTU_146	Ascomycota sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_147	Basidiomycota sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_148	Ascomycota sp.	1	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_149	Agaricales sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_150	Cortinariaceae sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_151	<i>Amanita</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	1
OTU_152	unclassified	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_153	<i>Hypholoma fasciculare</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_154	<i>Hypholoma</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_155	<i>Cladophialophora</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	
OTU_156	Chaetothyriales sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	
OTU_157	unclassified	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_158	Russulaceae sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OTU_159	Tremellales sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_160	<i>Fusidium griseum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_161	<i>Lecanicillium fungicola</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_162	Hypocreales sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_163	Tremellales sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_164	Ascomycota sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_165	Fungi sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_166	Agaricomycetes sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_167	Agaricomycetes sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	
OTU_168	Cortinariaceae sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	1
OTU_169	Sordariomycetes sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_170	Helotiales sp.	0	0	0	2	0	0	0	0	
OTU_171	Xylariales sp.	0	2	0	0	0	0	0	0	
OTU_172	<i>Mortierella elongata</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	
OTU_173	Ascomycota sp.	0	0	1	1	0	0	0	0	
OTU_174	<i>Lactarius</i> sp.	0	2	0	0	0	0	0	0	1
OTU_175	Helotiales sp.	2	0	1	1	0	1	0	1	
OTU_176	<i>Cortinarius rubicundulus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_177	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	0	2	3	0	0	1
OTU_178	<i>Lactarius</i> sp.	2	0	2	1	0	0	0	0	1

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_179	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	1	0	1	1	0	0	1
OTU_180	Clavulinaceae sp.	0	0	0	0	0	0	3	0	1
OTU_181	<i>Cladophialophora</i> sp.	0	0	1	1	0	0	0	0	
OTU_182	Chaetothyriales sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_183	Agaricomycetes sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_184	<i>Clavulina</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_185	Helotiales sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_186	Dikarya sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_187	<i>Cortinarius</i> sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	1
OTU_188	Nectriaceae sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_189	unclassified	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_190	Thelephoraceae sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_191	Thelephoraceae sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_192	Ascomycota sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_193	Sordariomycetes sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_194	Ascomycota sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_195	<i>Cortinarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1	0	1
OTU_196	<i>Glomus</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_197	Basidiomycota sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_198	<i>Tylopilus</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	1
OTU_199	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	1
OTU_200	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OTU_201	Dothideomycetes sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	
OTU_202	unclassified	0	0	0	0	0	1	0	0	
OTU_203	Cortinariaceae sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	1
OTU_204	Ascomycota sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_205	Cortinariaceae sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	1
OTU_206	Glomeraceae sp.	1	0	0	0	1	1	0	0	
OTU_207	<i>Tomentella</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	1
OTU_208	Fungi sp.	0	0	0	0	1	2	0	0	
OTU_209	Ascomycota sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_210	Ascomycota sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_211	Russulaceae sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_212	Thelephoraceae sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	1
OTU_213	Cortinariaceae sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OTU_214	Ascomycota sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_215	unclassified	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_216	<i>Tomentella bryophila</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_217	Sordariomycetes sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_218	<i>Hypocrea</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_219	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OTU_220	<i>Thozetella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_221	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_222	<i>Tomentella badia</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_223	Sordariales sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_224	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_225	unclassified	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_226	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OTU_227	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_228	Agaricomycetes sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_229	<i>Elaphomyces</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_230	Tricholomataceae sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	
OTU_231	Russulaceae sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	1
OTU_232	<i>Boletus</i> sp.	0	0	1	1	0	0	0	0	1
OTU_233	Ascomycota sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_234	Glomeraceae sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_235	Agaricales sp.	0	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_236	<i>Russula</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	1
OTU_237	Thelephoraceae sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_238	Agaricomycetes sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_239	<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_240	unclassified	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_241	Dothideomycetes sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_242	<i>Octaviania nonae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_243	Ceratobasidiaceae sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	
OTU_244	<i>Boletus</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_245	Russulaceae sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_246	Boletaceae sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_247	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_248	Glomeraceae sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_249	<i>Cortinarius</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	1
OTU_250	Boletaceae sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	1

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_251	<i>Lactarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_252	Sordariomycetes sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_253	Tricholomataceae sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	
OTU_254	Boletaceae sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	1
OTU_255	Russulaceae sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OTU_256	<i>Cortinarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_257	Boletaceae sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_258	Agaricomycetes sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_259	<i>Lactarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
OTU_260	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	1
OTU_261	Thelephoraceae sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OTU_262	Thelephoraceae sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OTU_263	Glomeraceae sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_264	Thelephoraceae sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OTU_265	<i>Russula</i> sp.	1	0	0	0	1	0	0	0	1
OTU_266	Russulaceae sp.	1	0	1	0	1	0	0	0	1
OTU_267	Ascomycota sp.	0	0	2	0	0	0	0	0	
OTU_268	Helotiales sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	
OTU_269	Eurotiomycetes sp.	0	0	0	0	3	1	0	0	
OTU_270	<i>Russula</i> sp.	2	1	0	1	0	0	1	0	1
OTU_271	<i>Tomentellopsis</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1	0	1
OTU_272	<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0	0	4	0	0	1
OTU_273	<i>Russula</i> sp.	0	0	2	1	0	0	1	0	1
OTU_274	<i>Thelephora</i> sp.	1	0	1	1	1	0	0	0	1
OTU_275	Chaetosphaeriales sp.	0	0	1	0	1	0	0	0	
OTU_276	Helotiales sp.	1	2	0	0	0	0	0	0	
OTU_277	Cortinariaceae sp.	1	1	0	1	0	0	0	0	1
OTU_278	<i>Leptodontidium</i> sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_279	<i>Gliocephalotrichum</i> sp.	3	0	0	0	0	0	1	0	
OTU_280	<i>Coltriciella</i> sp.	0	0	0	0	0	1	1	1	1
OTU_281	Fungi sp.	0	2	0	0	0	0	0	0	
OTU_282	<i>Lactarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	1	1
OTU_283	<i>Mortierella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	2	1	
OTU_284	Glomeraceae sp.	0	0	0	0	0	0	1	1	
OTU_285	Ascomycota sp.	3	0	3	5	3	5	4	3	
OTU_286	<i>Tomentellopsis</i> sp.	0	0	0	1	0	3	1	0	1

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_287	Chaetothyriales sp.	17	17	14	17	17	13	15	16	
OTU_288	<i>Rossbeevera vittatispora</i>	4	0	0	0	3	0	1	0	1
OTU_289	Agaricomycetes sp.	2	1	1	2	5	3	4	1	
OTU_290	<i>Russula</i> sp.	0	0	1	1	0	2	3	5	1
OTU_291	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	1	2	3	1	0	1	0	0	
OTU_292	Leotiomycetes sp.	4	0	0	0	0	0	0	1	
OTU_293	Fungi sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_294	Ascomycota sp.	2	1	3	4	0	0	0	0	
OTU_295	<i>Chloridium virescens</i>	6	7	3	3	2	5	8	2	
OTU_296	unclassified	1	4	0	0	3	4	2	4	
OTU_297	Glomeraceae sp.	2	1	0	0	3	2	1	3	
OTU_298	Dermateaceae sp.	1	3	4	1	0	0	0	0	
OTU_299	Ascomycota sp.	0	0	3	0	0	0	1	2	
OTU_300	Glomeraceae sp.	3	2	2	3	3	1	2	3	
OTU_301	Helotiales sp.	0	0	1	2	0	1	0	0	
OTU_302	<i>Tomentella</i> sp.	1	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_303	Glomeromycetes sp.	0	0	2	1	0	0	0	0	
OTU_304	<i>Clavulina</i> sp.	0	0	0	0	1	1	0	1	1
OTU_305	Glomeraceae sp.	0	0	0	0	0	0	1	1	
OTU_306	Glomeraceae sp.	0	0	0	0	0	0	0	2	
OTU_307	Herpotrichiellaceae sp.	0	0	0	0	2	0	0	2	
OTU_308	<i>Amanita rimosa</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	1
OTU_309	Eurotiomycetes sp.	0	0	0	0	2	0	0	0	
OTU_310	Glomeraceae sp.	1	0	0	0	1	1	0	0	
OTU_311	Agaricales sp.	0	0	0	0	1	1	0	0	
OTU_312	unclassified	0	0	2	0	0	0	0	0	
OTU_313	Ascomycota sp.	1	0	0	0	2	0	0	0	
OTU_314	Trichocomaceae sp.	0	0	0	2	0	0	0	0	
OTU_315	Ascomycota sp.	0	1	0	2	0	0	0	0	
OTU_316	<i>Cladophialophora</i> sp.	0	0	2	2	0	0	0	0	
OTU_317	Boletaceae sp.	1	1	0	2	1	1	0	0	1
OTU_318	Dikarya sp.	0	0	5	3	1	2	3	3	
OTU_319	<i>Leptodontidium elatius</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_320	Glomeraceae sp.	2	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_321	<i>Glomus</i> sp.	0	0	1	1	0	0	0	0	
OTU_322	<i>Lactarius</i> sp.	1	0	0	0	0	0	1	1	1

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_323	Trichocomaceae sp.	1	2	0	0	0	0	0	0	
OTU_324	Glomeraceae sp.	1	2	0	0	0	0	0	0	
OTU_325	Boletaceae sp.	1	0	0	0	2	0	0	0	1
OTU_326	Tricholomataceae sp.	0	0	1	1	0	0	0	0	
OTU_327	Sordariomycetes sp.	0	0	1	0	2	0	0	0	
OTU_328	Tricholomataceae sp.	3	4	0	1	0	0	0	1	
OTU_329	<i>Cladophialophora</i> sp.	13	14	8	12	14	15	13	12	
OTU_330	Leotiomycetes sp.	0	0	0	0	0	0	1	1	
OTU_331	<i>Mortierella</i> sp.	0	0	0	0	1	1	0	0	
OTU_332	<i>Glomus</i> sp.	1	0	0	0	1	0	0	0	
OTU_333	Eurotiomycetes sp.	0	0	0	0	2	1	0	0	
OTU_334	<i>Amanita fuliginea</i>	0	0	0	0	2	0	1	0	1
OTU_335	<i>Ramaria conjunctipes</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1
OTU_336	Eurotiomycetes sp.	0	0	0	1	3	1	0	0	
OTU_337	<i>Russula</i> sp.	0	0	0	1	1	0	0	0	1
OTU_338	Ascomycota sp.	0	0	0	1	0	0	1	1	
OTU_339	Tricholomataceae sp.	0	0	0	1	0	0	0	1	
OTU_340	Helotiales sp.	0	0	0	1	1	1	1	0	
OTU_341	Fungi sp.	0	0	0	0	0	0	0	2	
OTU_342	Atheliales sp.	0	0	0	0	1	0	0	1	
OTU_343	Thelephoraceae sp.	0	0	1	0	0	0	1	0	1
OTU_344	Boletaceae sp.	0	0	0	0	0	2	0	0	1
OTU_345	Leotiomycetes sp.	1	2	0	0	0	0	0	0	
OTU_346	Ascomycota sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	
OTU_347	<i>Russula olivacea</i>	0	3	1	0	0	0	0	0	1
OTU_348	Ascomycota sp.	2	4	3	5	5	6	3	2	
OTU_349	<i>Leptodontidium</i> sp.	2	2	1	0	5	3	2	3	
OTU_350	Ascomycota sp.	3	3	0	2	6	1	3	3	
OTU_351	<i>Phylloporus</i> sp.	2	0	0	1	0	0	0	0	1
OTU_352	Ascomycota sp.	2	1	4	0	0	0	0	0	
OTU_353	Trichocomaceae sp.	1	3	1	3	1	1	2	0	
OTU_354	Ascomycota sp.	0	0	2	0	0	0	1	2	
OTU_355	Ascomycota sp.	4	1	3	2	2	1	4	8	
OTU_356	Ascomycota sp.	0	0	2	0	0	0	1	2	
OTU_357	Agaricomycetes sp.	1	1	2	1	0	1	0	1	
OTU_358	Agaricomycetes sp.	5	8	5	4	8	10	7	8	

OTU	分類群	サンプリング日(月年)								ECM ¹
		Jul.09 [n=20]	Oct.09 [n=18]	Jan.10 [n=15]	Apr.10 [n=19]	Jul.10 [n=20]	Oct.10 [n=17]	Jan.11 [n=19]	Apr.11 [n=17]	
OTU_359	Glomeraceae sp.	6	9	4	5	6	8	5	8	
OTU_360	Agaricomycetes sp.	5	6	6	5	9	9	8	7	
OTU_361	<i>Rhizophagus intraradices</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	
OTU_362	Dothideomycetes sp.	2	1	0	0	1	3	2	1	
OTU_363	<i>Mortierella humilis</i>	4	4	2	5	2	1	1	7	
OTU_364	<i>Cladophialophora</i> sp.	4	1	0	0	0	0	0	2	
OTU_365	Cortinariaceae sp.	1	1	0	0	4	2	0	0	1
OTU_366	Glomeraceae sp.	1	3	0	0	0	0	5	2	
OTU_367	Boletaceae sp.	0	0	0	0	0	2	1	1	1
OTU_368	<i>Ilyonectria</i> sp.	0	0	0	0	3	1	1	3	
OTU_369	<i>Rhizoctonia solani</i>	1	0	0	2	2	1	0	1	
OTU_370	Ascomycota sp.	3	1	4	1	5	0	0	0	
OTU_371	Ascomycota sp.	3	3	3	1	1	1	0	0	
OTU_372	Ascomycota sp.	0	0	1	2	0	0	0	0	

1 外生菌根菌として解析に用いた OTU

表 3.3 環境及び気候変数

略号	変数	n	平均 $\pm$ S.D.
(a) 空間・時間反復のある環境変数			
pH	FH 層の pH	160	3.78 ± 0.22
C (%)	樹木根の炭素量	160	42.1 ± 3.21
N (%)	樹木根の窒素量	160	1.29 ± 0.15
(b) 空間反復のみがある環境変数			
WC (%)	土壌含水率	100	44.5 ± 4.43
CO (%)	開空率	100	7.68 ± 1.39
BA (m ²)	スダジイの胸高断面積	100	1.04 ± 0.73
DIST (m)	最近隣のスダジイ個体までの距離	100	2.14 ± 1.15
(c) 時間反復のみがある気候変数			
t _{2w} (°C)	サンプリング日前 2 週間の平均気温	8	20.2 ± 5.34
p _{2w} (mm)	サンプリング日前 2 週間の積算降水量	8	142 ± 122

表 3.4 各調査日における環境と気候変数

	調査日							
	2009		2010				2011	
	Jul.	Oct.	Jan.	Apr.	Jul.	Oct.	Jan.	Apr.
pH ¹	3.65 ± 0.25	3.71 ± 0.16	3.59 ± 0.14	3.94 ± 0.27	3.80 ± 0.20	3.87 ± 0.13	3.87 ± 0.18	3.79 ± 0.14
炭素 (%) ¹	40.7 ± 4.51	42.7 ± 2.33	41.8 ± 2.36	40.4 ± 3.62	40.7 ± 3.57	43.5 ± 1.84	43.3 ± 1.80	43.4 ± 2.39
窒素 (%) ¹	1.32 ± 0.195	1.31 ± 0.136	1.37 ± 0.120	1.25 ± 0.110	1.34 ± 0.105	1.23 ± 0.122	1.26 ± 0.140	1.19 ± 0.119
t _{2w} (°C)	26.3	21.8	13.8	18.8	26.7	23.8	12.6	17.9
p _{2w} (mm)	102.5	355.5	120	88	64.5	314.5	49	46.5

1 値は平均値±S.D. (n = 20)

各変数についての詳細は表 3.3 を参照。

表 3.5 各サンプリングにおける外生菌根菌 OTU 数。値は平均±S.E.

	サンプリング日							
	2009		2010				2011	
	Jul. (n=20)	Oct. (n=18)	Jan. (n=15)	Apr. (n=19)	Jul. (n=20)	Oct. (n=17)	Jan. (n=19)	Apr. (n=17)
外生菌根菌 OTU 合計数	46	26	28	47	34	27	32	25
OTU 数(1 サンプル当たり)								
全外生菌根菌	3.7 ± 0.4	2.1 ± 0.4	2.5 ± 0.6	3.4 ± 0.4	2.8 ± 0.4	2.5 ± 0.7	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.5
ベニタケ科	0.9 ± 0.3 (0.26)	0.6 ± 0.2 (0.29)	1.0 ± 0.3 (0.39)	1.1 ± 0.2 (0.36)	0.7 ± 0.2 (0.21)	0.8 ± 0.3 (0.23)	0.7 ± 0.2 (0.25)	0.9 ± 0.3 (0.33)
イボタケ科	0.9 ± 0.2 (0.25)	0.3 ± 0.1 (0.15)	0.7 ± 0.3 (0.16)	1.1 ± 0.3 (0.31)	0.6 ± 0.2 (0.24)	0.5 ± 0.2 (0.13)	0.8 ± 0.2 (0.28)	0.6 ± 0.1 (0.28)
イグチ科	0.9 ± 0.2 (0.25)	0.3 ± 0.1 (0.19)	0.3 ± 0.2 (0.11)	0.6 ± 0.2 (0.19)	0.7 ± 0.2 (0.27)	0.6 ± 0.1 (0.41)	0.6 ± 0.2 (0.27)	0.4 ± 0.2 (0.16)
フウセンタケ科	0.6 ± 0.2 (0.13)	0.7 ± 0.2 (0.23)	0.3 ± 0.2 (0.07)	0.4 ± 0.1 (0.09)	0.4 ± 0.2 (0.14)	0.5 ± 0.2 (0.21)	0.2 ± 0.1 (0.04)	0.3 ± 0.1 (0.1)
その他の科	0.4 ± 0.1 (0.11)	0.2 ± 0.1 (0.14)	0.3 ± 0.1 (0.27)	0.2 ± 0.1 (0.05)	0.4 ± 0.2 (0.14)	0.1 ± 0.1 (0.02)	0.4 ± 0.1 (0.16)	0.4 ± 0.2 (0.13)

カッコ内の数字は、各サンプリング日における全外生菌根菌 OTU 数に占める各科の OTU 数の割合。

その他の科は、テングタケ科、アンズタケ科、カレエダタケ科、イッポンシメジ科、ヌメリガサ科、ツチダンゴ科、タバコウロコタケ科、ラッパタケ科、セイヨウショウロ科、キシメジ科を含む。

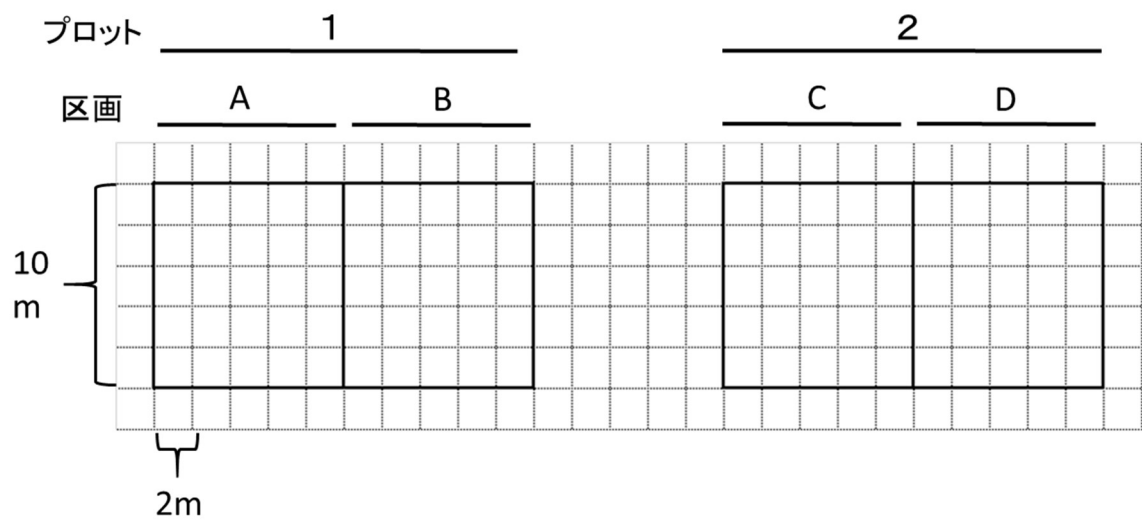


図 3.1 サンプルングプロット。各小区画(2 m × 2 m)は S_{XY} と表現した。S: 区画名(A-D)、X: X 軸座標(1-5)、Y: Y 軸座標(1-5)。

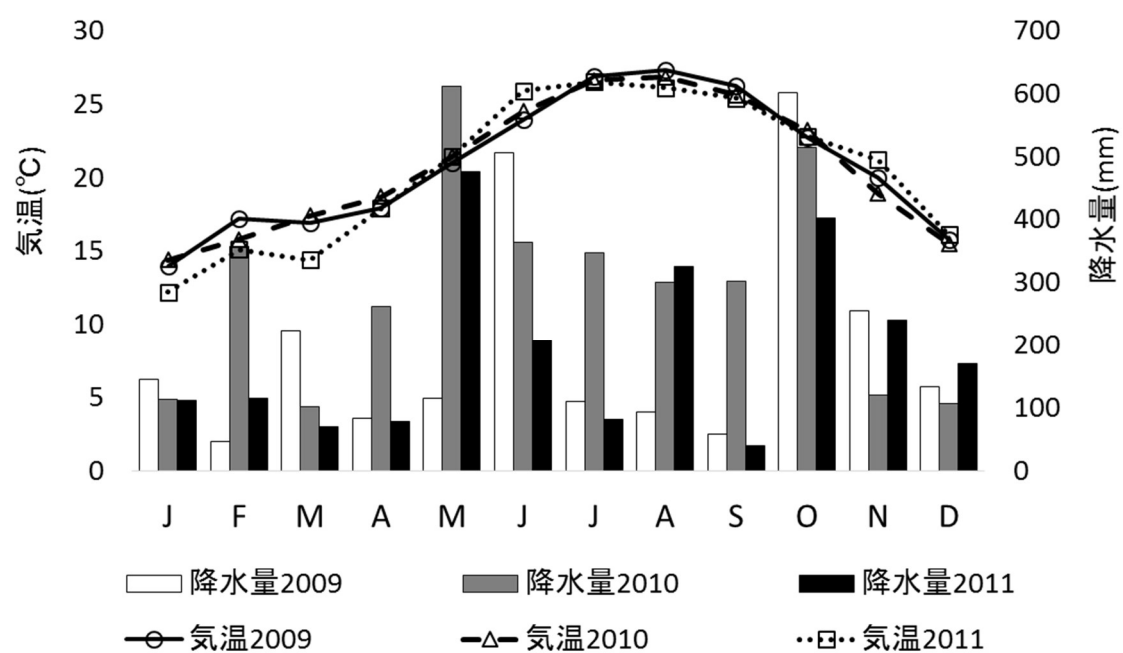


図 3.2 2009 年から 2011 年の調査地の月平均気温と月間積算降水量。

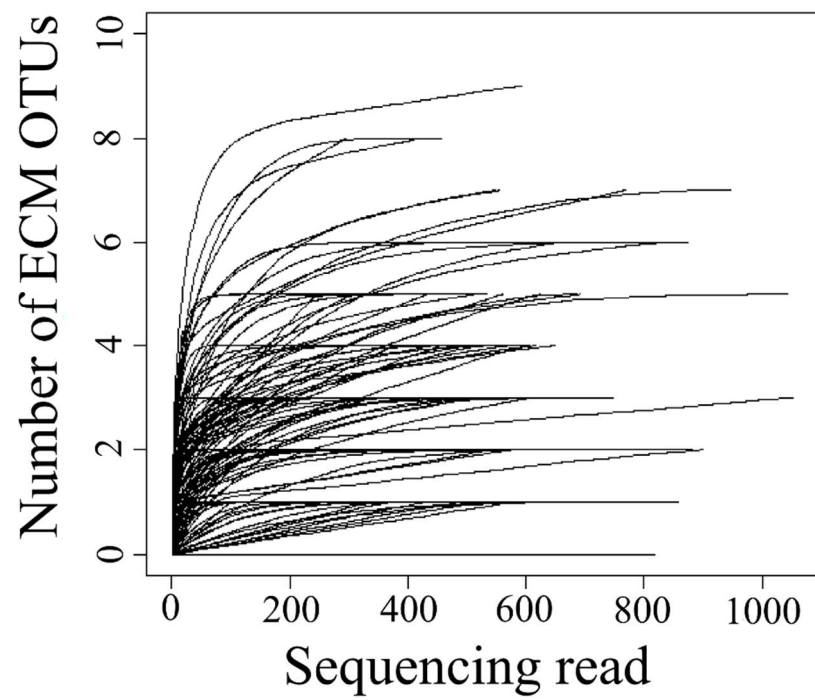


図3.3 各FHサンプルにおけるシーケンスリード数と外生菌根菌OTU数の関係を示した希薄化曲線。

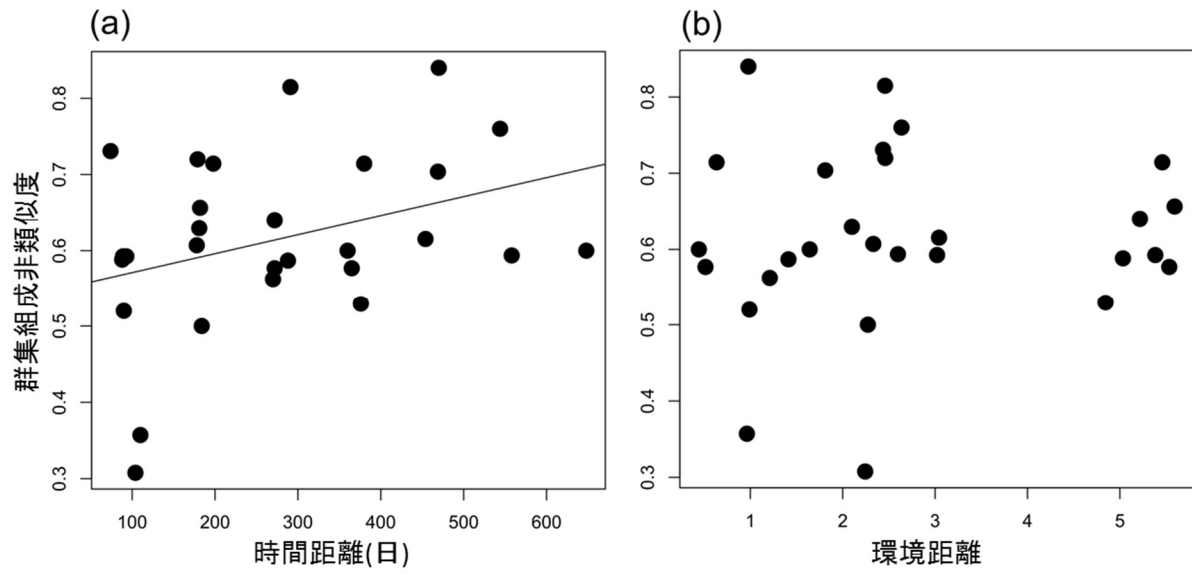


図3.4 群集組成非類似度と時間的距離(a)及び環境の距離(b)との関連。
 調査日(n = 8)間での群集組成の非類似度を用いた(a Pearson $r = 0.350$, $P = 0.038$; b
 Pearson $r = 0.055$, $P = 0.41$ 、マンテル検定)

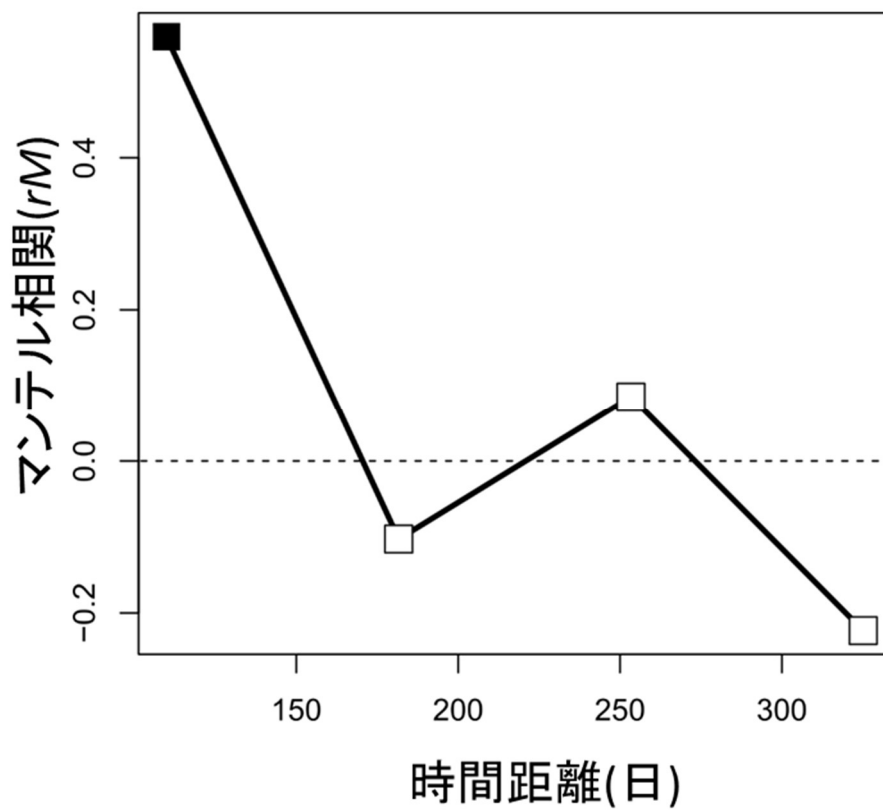


図3.5 外生菌根菌の群集組成の時間自己相関を示すマンテルコレログラム。
 r_M が有意に正のとき、その距離クラスにおいて群集組成は正の自己相関を示している。各距離クラスは全てのサンプル間ペアを図に示す距離で分類したものを表している。黒と白の四角は、それぞれ有意な相関と有意でない相関を示している。有意性の判定はパーミュテショナルマンテル検定(999パーミュテーション)及びBenjamini-Hochberg法の結果得られたP値をもとに5%の基準で行った。

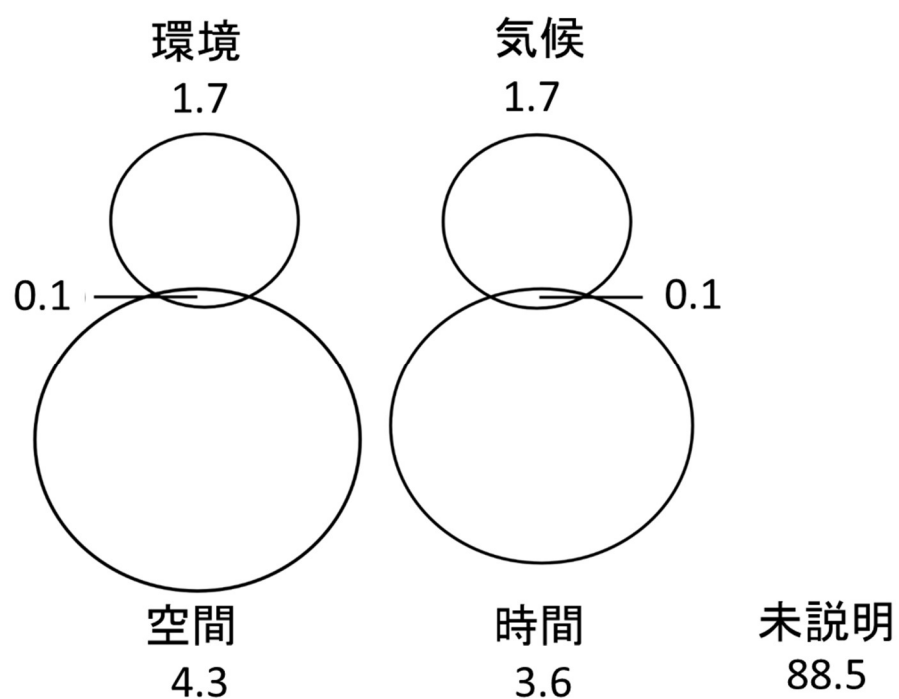


図 3.6 Variation partitioning により得られた、外生菌根菌群集に対する環境、空間、時間、気候要因の説明力を示したベン図。FH ブロック(n = 145)間での群集組成の非類似度を用いた。数字は説明された割合(%)を示す

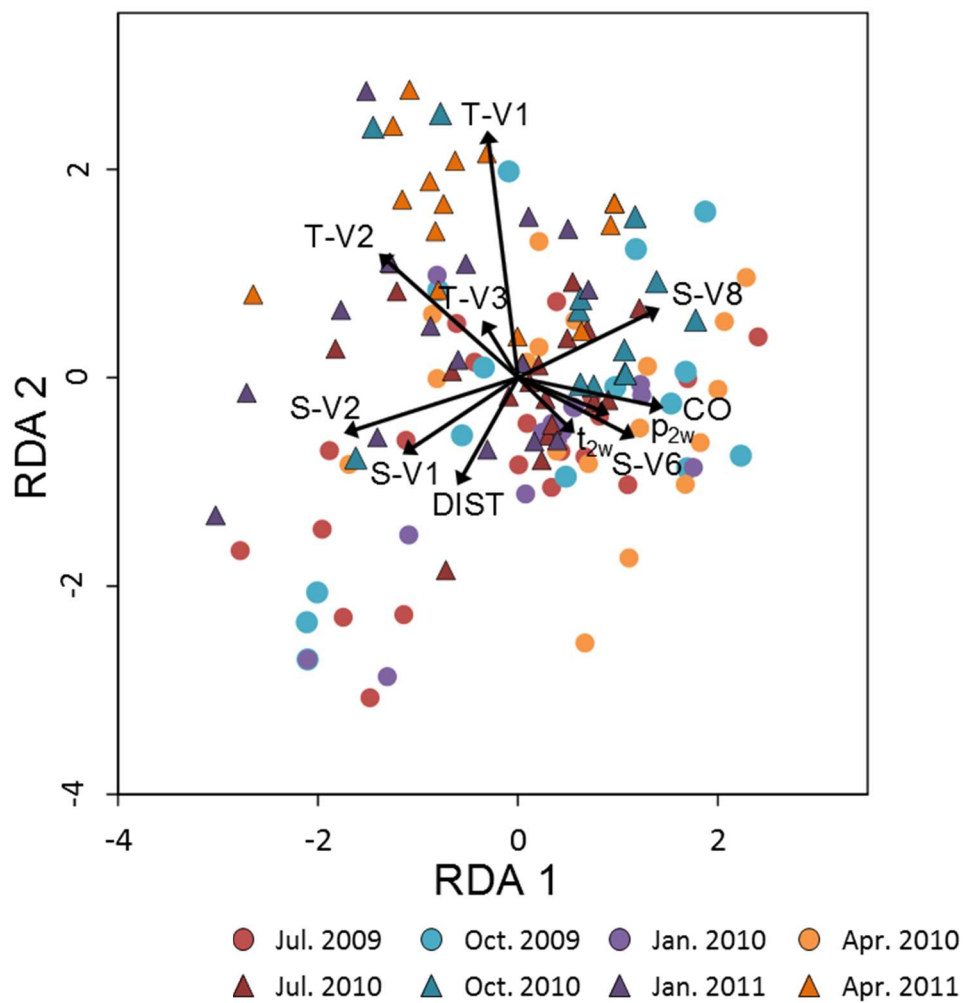


図 3.7 外生菌根菌 OTU 組成の空間・時間変動と環境・気候・空間・時間変数の関係を示した冗長性解析(RDA)の結果。OTU 組成と有意な関係性を示した変数を矢印で示した。RDA 解析の詳細については本文を参照。CO: 開空率、DIST: 最近隣スダジイ個体までの距離、t_{2w} 各調査日前 2 週間の平均気温、p_{2w} 各調査日前 2 週間の積算降水量、S: PCNM 解析により抽出した空間変数、T: PCNM 解析により抽出した時間変数。RDA1 軸と 2 軸はそれぞれ 2.6%と 2.4%のばらつきを説明した。

第4章 総合考察

本論文では、外生菌根菌群集組成の空間・時間変動における、ニッチ要因と空間・時間関連要因の影響を明らかにするため、第2章において景観スケールでの群集の空間変動を、第3章において局所スケールでの群集の時間変動をそれぞれ調査した。本章では、第2章と第3章で得られた結果を基に、以下の4点について考察を行う。(1)外生菌根菌群集の空間・時間変動に影響を与える要因。(2)他の分類群の生物と比較した際の外生菌根菌群集の空間・時間変動の特徴。(3)次世代シーケンサーを用いた群集研究の利点と問題点。(4)今後の課題と展望。

4.1 外生菌根菌群集の空間・時間変動に影響を与える要因

外生菌根菌群集組成の空間・時間変動を生み出す要因として、ニッチ要因(宿主群集や非生物環境)の重要性は繰り返し指摘されてきた。加えて、近年外生菌根菌には、群集の空間・時間変動に影響を与えうるニッチ以外の要因、すなわち分散制限や先住者効果などにより生じうる空間・時間関連要因が存在することが示されてきた(Kennedy & Bruns 2005; Kennedy *et al.* 2007; Kennedy *et al.* 2009; Peay *et al.* 2010a; Peay *et al.* 2012)。しかし、野外環境において外生菌根菌群集の空間・時間構造に着目し、空間・時間関連要因の影響力を定量的に評価した研究はほとんど無かった。これに対して私は、空間・時間それぞれの群集変動に着目した外生菌根菌群集の調査を行うことで、群集がどのような空間・時間構造を持つのかを示し、そして空間・時間関連要因が群集組成の空間・時間変動に与える影響力を定量化した。

第2章では、ニッチ要因(宿主群集と非生物環境)の空間変動を含む標高傾度に沿った外生菌根菌群集の調査によって、ニッチ要因とともに空間関連要因も外生菌根菌群集の空間変動を引き起こす主要因の1つである可能性を示した。このことは、以下のように解釈できる。もし、空間関連要因(例えば分散制限)が存在しない場合、群集の空間変動はニッチ要因の空間パターンによって説

明しうる。しかし、第 2 章の結果は、空間関連要因も群集構造に影響している場合、ある種にとってより好適な環境が遠くにあるとしても、分散制限の結果としてその場所にたどり着けない場合があることを示唆する。すなわち、空間関連要因によって、野外の外生菌根菌群集はニッチ要因の空間変動に完全には応答していない可能性がある。

一方、第 3 章では、常緑亜熱帯林の局所群集を対象とした外生菌根菌群集の継続調査を行うことで、外生菌根菌群集の群集組成は、季節や年に関わらず時間に伴い変動しており、群集の時間変動はニッチ要因に加えて時間関連要因の影響も受けている可能性を示した。このことは、空間変動の場合と同様に、先住者効果などの時間関連要因によって、群集がニッチ要因の時間変動に十分に応答していないことを示唆している。すなわち、もしニッチ要因のみが群集の時間変動に影響している場合は、環境変数の時間変動に群集が速やかに応答することが出来るため、群集の時間変動はニッチ要因の時間パターンによって説明できるだろう。しかし、第 3 章の結果は、ある種にとって好適な環境の季節があっても、先住者効果により定着が阻まれる、あるいは分散制限により加入ができなかったため、好適な季節に定着できていない可能性を示唆する。この場合、ある調査時期に検出された種の出現には、調査時点でのニッチ要因ではなく、過去のニッチ要因あるいは確率論的な分散・定着イベント(*assembly history*)が反映される可能性がある(Chase 2003; Fukami 2015)。

生物群集がニッチ要因に加えて空間・時間関連要因の影響を受け、類似度の空間・時間距離減衰を示すにも関わらず、群集の空間・時間構造を考慮しなかった場合、群集とニッチ要因の関係を過大解釈してしまう、あるいはニッチ以外の要因により駆動される群集の空間的・時間的変動パターンを見過ごしてしまう場合があることが指摘されている(Legendre & Troussellier 1988; Borcard *et al.* 1992; Cottenie 2005 ; 第 1 章)。本研究の第 2 章と第 3 章の結果は、外生菌根菌群集集合プロセスを理解するためには、ニッチ要因に加えて、これまでほとんど注目されていなかった群集の空間・時間構造と空間・時間関連要因の影響を考慮した調査・研究を行うことの必要性を指摘するものである。

4.2 外生菌根菌群集の空間・時間変動の特徴

これまで、生物群集の空間変動を生み出す要因としての空間関連要因の重要性は、主に動植物群集を対象とした研究により繰り返し示されてきた(Cottenie *et al.* 2005)。しかし、菌類を含む微生物群集では、これまで分散制限が無い、あるいは非常に弱いと考えられてきたため、微生物群集の群集集合プロセスにおける空間関連要因の影響が指摘され始めたのはここ 10 年ほどのことである(Martiny *et al.* 2006; Nemergut *et al.* 2013)。本研究の第 2 章と第 3 章で示されたように、外生菌根菌群集がニッチ要因と空間関連要因の両者の影響により類似度の空間距離減衰を示するという結果は、動植物群集と同様に微生物群集(細菌、動植物プランクトン、原生生物)の群集集合プロセスにおいても分散制限等の空間関連要因が重要な要因の 1 つであるという近年の発見を支持するものである(Martiny *et al.* 2011; Hanson *et al.* 2012; Lala *et al.* 2016)。ここではさらに、動植物群集の空間変動パターンを調査した先行研究と本研究の第 2 章の結果を比較することで、外生菌根菌群集の空間変動パターンが、他の分類群の生物と比較してどのような特徴を持っているのかを考察する。第 2 章の調査地では、本研究と同一の調査プロットにおいて、土壤動物(ササラダニ)と樹木群集の空間変動パターンと、空間変動におけるニッチ要因と空間関連要因の影響力が評価されている(Mori *et al.* 2013; Mori *et al.* 2015)。予備的な解析として、図 4.1 に第 2 章の結果と Mori ら(2013; 2015)の結果を基に、外生菌根菌、ササラダニ、樹木それぞれの群集の空間変動におけるニッチ要因と空間関連要因の相対的な影響力を示した。ニッチ要因及び空間関連要因によって、それぞれの群集の空間変動は約 40-50%が説明された。このうち、ニッチ要因の相対的な影響力の大きさは外生菌根菌>ササラダニ>樹木の順であったのに対して、空間関連要因の相対的な影響力の大きさは外生菌根菌<ササラダニ<樹木の順であった(図 4.1)。これは、体サイズの小さい生物の方が空間関連要因よりも環境(ニッチ)要因の影響を相対的に強く受けるという、動植物群集を対象とした研究結果と矛盾しない(Cottenie 2005; Bellier *et al.* 2014)。微生物群集を含み、同一調査地において異なる分類群の生物群集に対するニッチ要因と空間関連要因の相対的な影響力を比

較した研究はほとんど無いため、両要因の相対的な影響力に影響を与える要因は完全には分かっていない。しかし、一般に体サイズ(分散体サイズ)が小さい生物の方が分散制限の影響が小さいと考えられること(Wilkinson *et al.* 2012)、さらに第 2 章で示されたように外生菌根菌群集ではニッチ要因として非生物環境に加えて宿主植物群集の影響が強いことから、外生菌根菌は自由生活を行う動植物よりもニッチ要因の影響を相対的に強く受けている可能性がある。

一方で、生物群集の時間変動における時間関連要因の重要性は、空間関連要因と比べてあまり認識されていなかった(Wolkovich *et al.* 2014; Fukami 2015)。これまで、動植物群集、特に群集集合プロセス研究が盛んに行われている樹木群集では、群集の時間変動とニッチ要因の関係は、主にクロノシーケンス法(生態系の成立時期が異なる複数調査地点を同時期に調査する方法)により推定されてきた(Fukami & Wardle 2005; Walker *et al.* 2010)。近年、群集の空間変動に関する研究・知見の蓄積に伴い、群集の時間変動研究においても、同様にニッチ要因のみならず、時間関連要因と群集の時間構造(類似度の時間距離減衰)に着目する必要性が指摘されてきた(Wolkovich *et al.* 2014; Fukami 2015)。しかし、類似度の時間距離減衰はクロノシーケンス法では検出することが出来ないこともあり、現在まで、時間関連要因がニッチ要因と同時に群集の時間変動に影響しうるのか、そして類似度の時間距離減衰を引き起こしうるのかを野外調査により示した研究はほとんど無い。第 3 章では、タイムシリーズ法(同一調査地で時系列データを取得する方法)によって、野外環境における群集組成の類似度の時間距離減衰を実証的に示すことに成功した。この結果は、生物群集の時間変動研究を行う際には、ニッチ要因に加えて、時間関連要因の影響も検討する必要があるという先行研究の主張を支持するとともに(Wolkovich *et al.* 2014; Fukami 2015)、タイムシリーズ法によって群集の時間構造の検出が可能であることを示唆する。第 3 章の結果はまた、群集の時間変動に関する仮説を検証する際には、動植物に比べて世代時間が短いと考えられる微生物群集を対象とすることで、動植物に比べ短い時間スケールの調査(少ない労力・時間、第 3 章では 2 年間)で研究が行えることを示唆している。

4.3 本研究で用いた分子解析手法の利点と問題点

従来、外生菌根菌の群集研究では、野外で採集された個々の子実体(きのこ)あるいは菌根を対象に形態観察や DNA 解析を行ってきた。しかし、これら従来法では解析に多くの時間的・金銭的成本がかかることから、空間・時間傾度に沿った大規模な群集調査は困難であった。本研究の第2章と第3章では、並列的に多量の塩基配列を解析するという次世代シーケンサーの特性を利用して、空間・時間傾度に沿った菌根菌群集の調査と解析を行うことで、従来法では検出が困難だった群集の空間・時間変動に対する空間・時間関連要因の影響を定量的に評価することに成功した。これは外生菌根菌群集研究における次世代シーケンサーの有用性を示すものであり、今後、外生菌根菌群集の群集集合プロセスを研究する際には必須の手法の1つとなることが予想される。しかし、次世代シーケンサーを用いた DNA 解析手法には、群集研究を行う上での問題点も存在すると考えられる。まず、外生菌根菌の種(子実体の形態形質により定義される)と本研究で定義した操作的分類群(OTU、塩基配列の相同性により定義される)の対応が必ずしもつかない点である。本研究で OTU の作成基準として用いた ITS 領域の 97%という相同性基準は、外生菌根菌を含む菌類の種がもつ ITS 領域の配列変異量の平均値に近いことが確かめられているが、実際には菌類の種には 97%以上の配列変異を含むもの、あるいは 97%未満の配列変異しか含まないものがそれぞれ知られている(Nilsson *et al.* 2008; Tedersoo *et al.* 2010)。つまり、本研究では、本来1つの種であるものを複数の OTU として認識している、あるいは本来2つ以上の種であるものを単一の OTU として認識することで、群集に含まれる種数のそれぞれ過大評価あるいは過小評価を行っている可能性がある。次に、本研究で用いた次世代シーケンサーによるメタバーコーディングは定量性が無い、つまり各 OTU のアバンダンスが評価できていないことである。本研究では各 OTU が各サンプルで検出されたか否か(在・不在データ)を解析した。そのため、例えば、ニッチ要因の空間・時間変動に応答して、あるいは空間・時間関連要因によって、群集中のある種のアバンダンスが空間的・時間的に変動していたとしても、このアバンダンスの変動を評価できず、結果として群集

の空間・時間変動パターンを過小評価している可能性がある。

4.4 外生菌根菌群集研究の課題と展望

第2章と第3章において、野外環境で見られる外生菌根菌群集の空間・時間変動には、ニッチ要因に加えて、空間・時間関連要因が影響しうることを示した。しかし、本研究では野外観察によって、空間・時間関連要因の影響を推定したため、実際にどのような生物学的なプロセスが空間・時間関連要因を駆動しているのかは特定に至らなかった。加えて、本研究では第2章と第3章でそれぞれ1つの調査地点のみでの観察であったことから、第2章と第3章で示された空間・時間関連要因の影響の一般性や、これらの要因がどのような系で特に重要になるのかは依然不明瞭である。今後は、外生菌根菌群集集合プロセスにおける空間・時間関連要因の重要性和一般性を理解するために、以下の2点を検証する必要がある。(1)本研究で検出された群集と空間・時間関連要因との対応がどのような生物学的なプロセスにより生じているのかを操作実験により検証する。例えば、本研究では、時間関連要因を引き起こしうる生物学的プロセスとして先住者効果を挙げたが、実際に先住者効果により、ある環境に適した種の定着が阻害されるのかを実験的に示していく必要がある。(2)ニッチ要因と空間・時間関連要因はそれぞれどういった場合に重要となりうるのかを野外調査により検証する。例えば、空間・時間スケールやそこに含まれる環境傾度が異なる調査地を対象に比較研究を行うことで、ある空間・時間スケールにおいてどのようなニッチのどのくらいの傾度が外生菌根菌群集に影響するのかを定量的に示していく。本研究の第2章では、標高傾度と言う比較的狭い空間スケールに大きな環境傾度を含むことで特徴づけられる系においても、空間関連要因の影響が検出されたことから、数十 km 以上のより広い空間スケールや、数 km 程度と第2章の調査地と同程度の空間スケールでも宿主群集の変動などの環境傾度が小さい系では、空間関連要因の相対的な影響力は大きくなると考えられる。

これらの研究を行い、本研究の第2章と第3章で示された群集の空間・

時間変動に対する空間・時間関連要因の影響が、いつどのような場面で重要になるのかを推定することが、外生菌根菌の群集集合プロセスを理解し、群集の環境変動応答予測を行うために必要であると考えられる。

4.5 結論

本研究では、野外調査によってニッチ(生物的・非生物的環境)要因及び、空間・時間関連要因が群集に与える影響力を定量的に評価することで、ニッチ要因に加えて、空間・時間関連要因も外生菌根菌群集の空間・時間変動を駆動する主要因の 1 つである可能性を示した。外生菌根菌群集集合プロセスを理解するためには、従来から重要性が指摘されてきたニッチ要因に加えて、今後は群集の空間・時間構造と空間・時間関連要因の影響を考慮した調査・研究を行う必要があると考えられる。

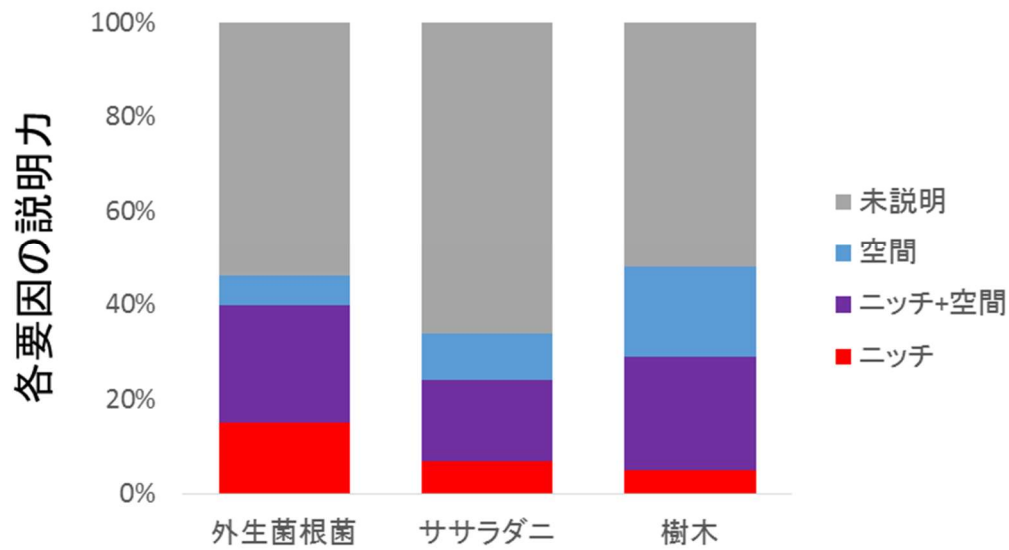


図 4.1 Variation partitioning により得られた、第 2 章の調査地における外生菌根菌、ササラダニ、樹木群集に対するニッチ要因と空間関連要因の説明力。縦軸は説明された割合を示す。外生菌根菌群集のデータは第 2 章の結果を用いて、宿主群集と非生物環境をニッチ要因としてまとめた。ササラダニと樹木群集のデータは Mori *et al.* (2013; 2015)から引用した。

謝辞

大園享司教授(現同志社大学)には、研究の機会を与えていただくとともに、本論文をまとめるにあたり多くの助言と温かい励ましの言葉を頂きました。大園教授には、様々な調査地での調査・研究の機会を与えていただき、生態学・菌類研究の面白さと厳しさを教えていただきました。心より感謝申し上げます。

横浜国立大学の森章准教授には、知床での調査機会を与えていただくとともに、統計解析と本論文の群集生態学的な考察について多くのご意見と励ましの言葉を頂きました。日本大学の廣瀬大准教授には菌類の分子解析手法を教えていただくとともに、菌学の面白さと奥深さを教えていただきました。京都大学の工藤洋教授、中野伸一教授、信州大学の山田明義准教授には本論文をまとめるにあたり貴重なご意見を頂きました。心より感謝申し上げます。

本論文の作成を通じて、野外調査、実験、解析についてご協力いただいた方々に感謝申し上げます。野外調査では、知床財団と琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センター与那フィールドのスタッフ、京都大学生態学研究センター大園研究室、知床生物多様性評価プロジェクトの皆様にご協力いただきました。酪農学園大学の保原達准教授には第2章の土壌の化学分析にご協力いただきました。京都大学の川口恵里氏には第2章と第3章のシーケンス解析にご協力いただきました。阿形清和教授(現学習院大学)にはシーケンス解析に際して多くのご配慮を頂きました。京都大学の佐藤博俊博士には菌根の分子解析手法をご指導いただき、論文作成において助言を頂きました。京都大学の東樹宏和助教、田邊晶史博士(現水産研究・教育機構)にはシーケンス解析とバイオフィンフォマティクスについて助言を頂きました。龍谷大学の潮雅之博士、横浜国立大学の北川涼博士には統計解析について助言を頂きました。辰巳晋一博士には論文についての助言を頂きました。

生態学研究センターでの研究生活は、先生、先輩、後輩、事務の方々を始め多くの方々に支えていただきました。この場を借りてお礼申し上げます。特に、伊藤公一博士には、研究を始めたころから今日に至るまで、研究を始め様々な議論にお付き合いいただくとともに、多くの励ましの言葉を頂きました。佐藤安弘博士(現龍谷大学)、中臺亮介氏には日常的に議論に付き合ってくださいました。平野滋章氏には、土壌の化学分析を手伝っていただきました。

最後に、長い学生生活の様々な場面で支えていただいた家族、父・勇人、母・弘子、弟・伸悟と亮樹に感謝いたします。

引用文献

- Alford RA, Wilbur HM (1985) Priority effects in experimental pond communities: competition between *Bufo* and *Rana*. *Ecology* **66**, 1097–1105.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* **19**, 5555–5565.
- Aponte C, García LV, Marañón T *et al.* (2010) Indirect host effect on ectomycorrhizal fungi: Leaf fall and litter quality explain changes in fungal communities on the roots of co-occurring Mediterranean oaks. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 788–796.
- Bahram M, Kõljalg U, Courty P-E *et al.* (2013) The distance decay of similarity in communities of ectomycorrhizal fungi in different ecosystems and scales. *Journal of Ecology* **101**, 1335–1344.
- Bahram M, Peay KG, Tedersoo L (2015) Local-scale biogeography and spatiotemporal variability in communities of mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **205**, 1454–1463.
- Bahram M, Põlme S, Kõljalg U *et al.* (2011) A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS microbiology ecology* **75**, 313–320.
- Bahram M, Põlme S, Kõljalg U *et al.* (2012) Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytologist* **193**, 465–473.
- Baselga A (2010) Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. *Global Ecology and Biogeography* **19**, 134–143.
- Bellier E, Grøtan V, Engen S *et al.* (2014) Distance decay of similarity, effects of environmental noise and ecological heterogeneity among species in the spatio-temporal dynamics of a dispersal-limited community. *Ecography*, **37**, 172–182.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* **57**, 289–300.
- Blanchet FG, Legendre P, Borcard D (2008) Forward selection of explanatory variables. *Ecology* **89**, 2623–2632.
- Borcard D, Legendre P (1994) Environmental control and spatial structure in ecological communities: an example using oribatid mites (Acari, Oribatei). *Environmental and Ecological Statistics*, **1**, 37–61.
- Borcard D, Legendre P (2012) Is the Mantel correlogram powerful enough to be useful in ecological analysis? A simulation study. *Ecology* **93**, 1473–1481.
- Borcard D, Legendre P, Avois-Jacquet C *et al.* (2004) Dissecting the spatial structure of ecological data at multiple scales. *Ecology* **85**, 1826–1832.

- Borcard D, Legendre P, Drapeau P (1992) Partialling out the Spatial Component of Ecological Variation. *Ecology* **73**, 1045–1055.
- Botkin DB, Saxe H, Araújo MB *et al.* (2007) Forecasting effects of global warming on Biodiversity. *Bioscience* **57**, 227–236.
- Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* **320**, 37–77.
- Bruns TD (1995) Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **170**, 63–73.
- Buée M, Vairelles D, Garbaye J (2005) Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* **15**, 235–245.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V *et al.* (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**:421, DOI: 10.1186/1471-2105-10-421
- Carvalho JC, Cardoso P, Crespo LC *et al.* (2011) Determinants of beta diversity of spiders in coastal dunes along a gradient of mediterraneity. *Diversity and Distributions* **17**, 225–234.
- Chase JM (2003) Community assembly: When should history matter? *Oecologia* **136**, 489–498.
- Chase JM, Kraft NJB, Smith KG *et al.* (2011) Using null models to disentangle variation in community dissimilarity from variation in α -diversity. *Ecosphere* **2**, art24, DOI: 10.1890/ES10-00117.1
- Clemmensen KE, Bahr A, Ovaskainen O *et al.* (2013) Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* **339**, 1615–1618.
- Coince A, Cordier T, Lengellé J *et al.* (2014) Leaf and root-associated fungal assemblages do not follow similar elevational diversity patterns. *PLoS ONE* **9**, e100668, DOI: 10.1371/journal.pone.0100668.
- Conn C, Dighton J (2000) Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 489–496.
- Cottenie K (2005) Integrating environmental and spatial processes in ecological community dynamics. *Ecology Letters* **8**, 1175–1182.
- Courty P-E, Buée M, Diedhiou AG *et al.* (2010) The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 679–698.
- Courty P-E, Franc A, Pierrat J-C *et al.* (2008) Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5792–5801.

- Courty P-E, Pritsch K, Schlöter M *et al.* (2005) Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytologist* **167**, 309–319.
- Davison J, Moora M, Öpik M *et al.* (2015) Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* **349**, 970–973.
- Dickie IA, Fukami T, Wilkie JP *et al.* (2012) Do assembly history effects attenuate from species to ecosystem properties? A field test with wood-inhabiting fungi. *Ecology Letters* **15**:133–141.
- Douglas RB, Parker VT, Cullings KW (2005) Belowground ectomycorrhizal community structure of mature lodgepole pine and mixed conifer stands in Yellowstone National Park. *Forest Ecology and Management* **208**, 303–317.
- Dray S, Pélessier R, Couteron P *et al.* (2012) Community ecology in the age of multivariate multiscale spatial analysis. *Ecological Monographs* **82**, 257–275.
- Driscoll DA, Lindenmayer DB (2009) Empirical tests of metacommunity theory using an isolation gradient. *Ecological Monographs* **79**, 485–501.
- Duchesne LC, Ellis BE, Peterson RL (1989) Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: contribution of oxalic acid. *Canadian journal of botany* **67**, 2726–2730.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC *et al.* (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200.
- Enoki T (2003) Microtopography and distribution of canopy trees in a subtropical evergreen broad-leaved forest in the northern part of Okinawa Island, Japan. *Ecological Research* **18**, 103–113.
- Erland A, Taylor AFS (2003) Diversity of Ectomycorrhizal Fungal Communities in Relation to the Abiotic Environment. In: van der Heijden MGA, Sanders IR (ed.). *Mycorrhizal Ecology*. Berlin, Germany: Springer, 163–200.
- Finlay BJ (2002) Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* **296**, 1061–1063.
- Fukami T (2015) Historical contingency in community assembly: integrating niches, species pools, and priority effects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **46**, 1–23.
- Fukami T, Wardle DRA. (2005) Long-term ecological dynamics: reciprocal insights from natural and anthropogenic gradients. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B– Biological Sciences* **272**, 2105–2115.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* **2**, 113–118.
- Gardes M, Bruns T (1996) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above-and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*, **74**, 1572–1583.

- Hamady M, Walker JJ, Harris JK *et al.* (2008) Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods* **5**, 235–237.
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC *et al.* (2012) Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 1–10.
- Högberg MN, Högberg P (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* **154**, 791–795.
- Hoiss B, Krauss J, Potts SG *et al.* (2012) Altitude acts as an environmental filter on phylogenetic composition, traits and diversity in bee communities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 4447–4456.
- Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular ecology* **10**, 1855–1871.
- Horton BM, Glen M, Davidson NJ *et al.* (2013) Temperate eucalypt forest decline is linked to altered ectomycorrhizal communities mediated by soil chemistry. *Forest Ecology and Management* **302**, 329–337.
- Hubbell SP (2001) *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.
- Huson DH, Auch AF, Qi J *et al.* (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* **17**, 377–386.
- Ishida TA, 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.
- Izzo A, Agbowo J, Bruns TD (2005) Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytologist* **166**, 619–629.
- Jarvis SG, Woodward S, Taylor AFS (2015) Strong altitudinal partitioning in the distributions of ectomycorrhizal fungi along a short (300 m) elevation gradient. *New Phytologist* **206**, 1145–1155.
- Kanno H, Hirai H, Takahashi T *et al.* (2008) Soil regions map of Japan based on a reclassification of the 1:1 million soil map of Japan (1990) according to the unified soil classification system of Japan – 2nd approximation (2002) -. *Pedologist* **52**, 129–133 (in Japanese)
- Kennedy P (2010) Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist* **187**, 895–910.
- Kennedy PG, Bergemann SE, Hortal S *et al.* (2007) Determining the outcome of field-based competition between two *Rhizopogon* species using real-time PCR. *Molecular Ecology* **16**, 881–890.

- Kennedy PG, Bruns TD. (2005) Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytologist* **166**, 631–638.
- Kennedy PG, Peay KG, Bruns TD (2009) Root tip competition among ectomycorrhizal fungi: are priority effects a rule or an exception? *Ecology* **90**, 2098–2107.
- Kessler M (2000) Altitudinal zonation of Andean cryptogam communities. *Journal of Biogeography* **27**, 275–282.
- Koide RT, Fernandez C, Petprakob K (2011) General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* **68**, 45–55.
- Koide RT, Shumway DL, Xu B *et al.* (2007) On temporal partitioning of a community of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **174**, 420–429.
- Korkama T, Pakkanen A, Pennanen T (2006) Ectomycorrhizal community structure varies among Norway spruce (*Picea abies*) clones. *New Phytologist* **171**, 815–824.
- Körner C (2007) The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology Evolution* **22**, 569–574.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H *et al.* (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* **12**, 118–123.
- Lara E, Roussel-Delif L, Fournier B *et al.* (2015) Soil microorganisms behave like macroscopic organisms: Patterns in the global distribution of soil euglyphid testate amoebae. *Journal of Biogeography*, **43**, 1–13.
- Legendre P, Troussellier M (1988) Aquatic heterotrophic bacteria: modeling in the presence of spatial autocorrelation. *Limnology and Oceanography* **33**, 1055–1067
- Li W, Fu L, Niu B *et al.* (2012) Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Briefings in Bioinformatics* **13**, 656–668.
- Lilleskov EA, Bruns TD, Horton TR *et al.* (2004) Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* **49**, 319–332.
- Lilleskov EA, Fahey TJ, Horton TR *et al.* (2002) Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* **83**, 104–115.
- Lilleskov EA, Fahey TJ, Lovett GM (2001) Ectomycorrhizal fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications* **11**, 397–410.
- Lilleskov EA, Parrent JL (2007) Can we develop general predictive models of mycorrhizal fungal community-environment relationship? *New Phytologist* **174**, 250–256.
- Longo MS, Urcelay C, Nouhra E (2011) Long term effects of fire on ectomycorrhizas and soil properties in *Nothofagus pumilio* forests in Argentina. *Forest Ecology and Management* **262**, 348–354.

- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH *et al.* (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 102–112.
- Martiny JBH, Eisen JA, Penn K *et al.* (2011) Drivers of bacterial beta-diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 7850–7854.
- Mason PA, Wilson J, Last FT *et al.* (1983) The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil* **71**, 247–256.
- McMurdie PJ, Holmes S (2014) Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology* **10**, e1003531.
- Miyaji N, Nakagawa M, Yoshida M (2000) Eruptive history of Rausudake volcano during the last 2200 years. *Bulletin of the Volcanological Society of Japan* **45**, 75–85. (in Japanese)
- Miyamoto Y, Nakano T, Hattori M *et al.* (2014) The mid-domain effect in ectomycorrhizal fungi: range overlap along an elevation gradient on Mount Fuji, Japan. *The ISME Journal* **8**, 1739–1746
- Mori AS, Shiono T, Haraguchi TF *et al.* (2015) Functional redundancy of multiple forest taxa along an elevational gradient: predicting the consequences of non-random species loss. *Journal of Biogeography* **42**, 1383–1396
- Mori AS, Shiono T, Koide D *et al.* (2013) Community assembly processes shape an altitudinal gradient of forest biodiversity. *Global Ecology and Biogeography* **22**, 878–888.
- Morlon H, Chuyong G, Condit R *et al.* (2008) A general framework for the distance-decay of similarity in ecological communities. *Ecology Letters* **11**, 904–917.
- Mundra S, Halvorsen R, Kauserud H *et al.* (2015) Arctic fungal communities associated with roots of *Bistorta vivipara* do not respond to the same fine-scale edaphic gradients as the aboveground vegetation. *New Phytologist* **205**, 1587–1597.
- Nagelkerke NJD (1991) A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* **78**, 691–692.
- Nara K (2006) Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytologist* **169**, 169–178.
- Nara K, Hogetsu T (2004) Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology* **85**, 1700–1707.
- Nara K, Nakaya H, Wu B *et al.* (2003) Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytologist* **159**: 743–756.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T *et al.* (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and molecular biology reviews* **77**, 342–356.

- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M *et al.* (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics* **8**: 193–201.
- Osono T (2014) Metagenomic approach yields insights into fungal diversity and functioning. In: Sota T, Kagata H, Ando Y, Utsumi S, Osono T (ed.). *Species diversity and community structure*. Berlin, Germany: Springer, 2014, 1–23.
- Ostertag R (2001) Fine-root dynamics in Hawaiian montane forests. *Ecology* **82**, 485–499.
- Parke JL, Linderman RG, Black CH (1983) The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of douglas-fir seedlings. *New Phytologist* **95**, 83–95
- Parrent JL, Vilgalys R (2007) Biomass and compositional responses of ectomycorrhizal fungal hyphae to elevated CO₂ and nitrogen fertilization. *New Phytologist* **176**, 164–174.
- Peay KG, Garbelotto M, Bruns TD (2010a). Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology* **91**, 3631–3640.
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD (2008) Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience* **58**, 799–810.
- Peay KG, Kennedy PG, Davies SJ *et al.* (2010b) Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. *New Phytologist* **185**, 529–542.
- Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH *et al.* (2012) Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* **21**:4122–4136.
- Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S *et al.* (2006) Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* **87**, 2614–2625.
- Perry DA, Margolis H, Choquette C *et al.* (1989) Ectomycorrhizal mediation of competition between coniferous tree species. *New Phytologist* **112**, 501–511.
- Phillips LA, Ward V, Jones MD (2014) Ectomycorrhizal fungi contribute to soil organic matter cycling in sub-boreal forests. *The ISME Journal* **8**, 699–713
- Pierret A, Latchackak K, Chathanvongsa P *et al.* (2007) Interactions between root growth, slope and soil detachment depending on land use: a case study in a small mountain catchment of Northern Laos. *Plant and Soil* **301**, 51–64.
- Pölme S, Bahram M, Yamanaka T *et al.* (2013) Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale. *New Phytologist* **198**, 1239–1249.
- Qian H, Ricklefs RE (2007) A latitudinal gradient in large-scale beta diversity for vascular plants in North America. *Ecology Letters* **10**, 737–744.

- Qian H, Ricklefs RE (2012) Disentangling the effects of geographic distance and environmental dissimilarity on global patterns of species turnover. *Global Ecology and Biogeography* **21**, 341–351.
- R Core Team. (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Read DJ, Perez-moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards. *New Phytologist* **157**, 475–492.
- Richard F, Millot S, Gardes M *et al.* (2005) Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* **166**, 1011–1023.
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* **33**, 1–45.
- Romdal TS, Rahbek C. (2009) Elevational zonation of afrotropical forest bird communities along a homogeneous forest gradient. *Journal of Biogeography* **36**, 327–336.
- Saari S, Campbell C, Russell J *et al.* (2005) Pine microsatellite markers allow roots and ectomycorrhizas to be linked to individual trees. *New Phytologist* **165**, 295–304.
- Sell J, Kayser A, Schulin R, Brunner I (2005) Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant and Soil* **277**, 245–253
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S *et al.* (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 6241–6246.
- Simpson GG (1943) Mammals and the nature of continents. *American Journal of Science* **241**, 1–31.
- Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM (2007) Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist* **174**, 847–863.
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press.
- Sommer DD, Delcher AL, Salzberg SL *et al.* (2007) Minimus: a fast, lightweight genome assembler. *BMC Bioinformatics* **8**, 64. DOI:10.1186/1471-2105-8-64
- Suggitt AJ, Gillingham PK, Hill JK *et al.* (2011) Habitat microclimates drive fine-scale variation in extreme temperatures. *Oikos* **120**, 1–8.
- Taylor AFS, Alexander I (2005) The ectomycorrhizal symbiosis : life in the real world. *Mycologist*, **19**, 102–112.
- Tanabe AS (2013) Assams-assembler v0.1.2013.08.10, software distributed by the author at <http://www.fifthdimension.jp/products/assams/>
- Tanabe AS, Toju H (2013) Two new computational methods for universal DNA barcoding: a benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLoS ONE* **8**:e76910. DOI: 10.1371/journal.pone.0076910

- Tedersoo L, Bahram M, Jairus T *et al.* (2011) Spatial structure and the effects of host and soil environments on communities of ectomycorrhizal fungi in wooded savannas and rain forests of Continental Africa and Madagascar. *Molecular Ecology* **20**, 3071–3080.
- Tedersoo L, Bahram M, Pölme S *et al.* (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346**, 1256688
- Tedersoo L, Kõljalg U, Hallenberg N *et al.* (2003) Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist* **159**:153–165.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20**, 217–263.
- Tedersoo L, Mett M, Ishida TA *et al.* (2013) Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **199**, 822–831.
- Tedersoo L, Smith ME (2013) Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* **27**, 83–99.
- Teskey R, Hinckley T. (1981) Influence of temperature and water potential on root growth of white oak. *Physiologia Plantarum* **52**, 363–369.
- Toljander JF, Eberhardt U, Toljander YK *et al.* (2006) Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* **170**, 873–883.
- Valverde-Barrantes OJ, Raich JW, Russell AE (2007) Fine-root mass, growth and nitrogen content for six tropical tree species. *Plant and Soil* **290**, 357–370.
- van der Heijden EW, Kuyper ThW (2003) Ecological strategies of ectomycorrhizal fungi of *Salix repens*: root manipulation versus root replacement. *Oikos* **103**, 668–680
- Vellend M, Verheyen K, FLinn KM *et al.* (2007) Homogenization of forest plant communities and weakening of species-environment relationships via agricultural land use. *Journal of Ecology* **95**, 565–573.
- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* **172**, 4238–4246.
- Visser S (1995) Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* **129**, 389–401.
- Voříšková J, Brabcová V, Cajthaml T *et al.* (2014) Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist* **201**, 269–278.
- Walker JF, Miller OK, Horton JL (2005) Hyperdiversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in mixed forests in the southern Appalachian Mountains. *Molecular ecology* **14**, 829–838.

- Walker LR, Wardle DA, Bardgett RD *et al.* (2010) The use of chronosequences in studies of ecological succession and soil development. *Journal of Ecology* **98**, 725–736.
- Walker RF, West DC, McLaughlin SB *et al.* (1989) Growth, xylem pressure potential, and nutrient absorption of loblolly pine on a reclaimed surface mine as affected by an induced *Pisolithus tinctorius* infection. *Forest Science* **35**, 569-581
- Wang B, Qiu Y-L (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**, 299–363.
- Wang J, Soininen J, Zhang Y *et al.* (2012) Patterns of elevational beta diversity in micro- and macroorganisms. *Global Ecology and Biogeography* **21**, 743–750.
- White TJ, Bruns T, Lee S *et al.* (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed.). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York, USA: Academic Press, 315-322.
- Wilkinson DM, Koumoutsaris S, Mitchell EAD *et al.* (2012) Modelling the effect of size on the aerial dispersal of microorganisms. *Journal of Biogeography* **39**, 89-97.
- Wolkovich EM, Cook BI, McLauchlan KK *et al.* (2014) Temporal ecology in the Anthropocene. *Ecology Letters* **17**, 1365–1379.
- Xu X, Enoki T, Tokashiki Y *et al.* (1998) Litterfall and the nutrient returns in evergreen broadleaved forests in Northern Okinawa Island. *Science bulletin of the Faculty of Agriculture; University of the Ryukyus* **45**, 195-202.

出典

本論文の第2章と第3章は以下の投稿論文として発表されている。

第2章 標高に沿った外生菌根菌群集の空間変動とニッチ要因・空間関連要因の影響

タイトル : Disentangling the relative importance of host tree community, abiotic environment, and spatial factors on ectomycorrhizal fungal assemblages along an elevation gradient.

著者 : Shunsuke Matsuoka, Akira S Mori, Eri Kawaguchi, Satoru Hobara, Takashi Osono.

雑誌名 : FEMS Microbiology Ecology

出版年号 : 2016年5月発行、第92巻第5号(論文番号: fiw044)

第3章 本邦亜熱帯常緑樹林における外生菌根菌群集組成の類似度の時間距離減衰

タイトル : Temporal distance decay of similarity of ectomycorrhizal fungal community composition in a subtropical evergreen forest in Japan.

著者 : Shunsuke Matsuoka, Eri Kawaguchi, Takashi Osono.

雑誌名 : FEMS Microbiology Ecology

出版年号 : 2016年5月発行、第92巻第5号(論文番号: fiw061)