

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06095

研究課題名(和文)土地利用の履歴が微生物群集の変化を介して植生に及ぼす効果

研究課題名(英文) Effects of land use history on vegetation through changes in symbiosis microbial communities.

研究代表者

下野 綾子 (Shimono, Ayako)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：30401194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：長期間維持されてきた古い草原は種多様性の高い生態系の1つとされている。こうした草原が一度破壊されると、本来の植生が再生するには長い年月を要する。この理由として、草本と絶対共生にあるアーバスキュラー菌根菌(AMF)の変化に着目した。古い草原と比べ、造成や森林伐採後の新しい草原は、植物同様AMFも多様性が減少し、種組成も変化した。AMFの組成の変化は、宿主植物の違いではなく、土地利用の履歴が有意な効果を及ぼしていた。また古い草原では、AMFと植物群集の共変性の程度が強かった。生育地の時間的連続性は、宿主種と共生AMFの多様性を高め、両者の相互作用を強化する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

草原を新たに再生しようとしても、本来の草原とは異なる植生が成立することから、土地利用の履歴が長期にわたり植生に影響を与えることが指摘されてきた。本研究は、地域特異性が低く分散しやすいと考えられていたAMFも土地利用の履歴が長期にわたり影響を与えることを示した先駆的研究である。またAMFは植物群集と共変動しており、生育地の時間的連続性が長いほど、その共変性の程度が強かった。AMFは宿主特異性が低いことが知られているにも関わらず、AMFの多様性や組成は植生の変化においても重要な要因となっている可能性を示し、今後の草原生態系の保全において基盤となる知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：The mature grassland is considered one of the most biodiverse terrestrial ecosystems. Once grasslands are destroyed or degraded, biodiversity recovery may require decades to centuries. One of the mechanisms controlling the diversity and composition of plant communities is the interaction between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The old grasslands harbored higher diversity of AMF than new grasslands and the OTU compositions were significantly different between old and new grasslands. The significant effect of land-use history, rather than host-plant differences, was detected to explain the change in AMF composition. Furthermore, The covariation of plant-AMF communities was stronger in the old grasslands than in new grasslands. Habitat temporal continuity may promote the accumulation of host species and symbiont AMF diversity and strengthen the symbiont interaction.

研究分野：植物生態学

キーワード：アーバスキュラー菌 半自然草原 時間的連続性 土地利用の履歴 メタゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における草原の多くは、人為的な攪乱によって樹林への遷移を抑制することで維持されてきた半自然草原である。茅場や採草地としての草原の利用は数千年以上前から行われていたと推定されており、草原を主な生育地とする植物種は少なくない。しかし、農業形態の変化や都市化により、かつては国土の1割以上を占めていたといわれる半自然草原は、現在では1/10に減少した。それに伴い多くの草原性の植物種の絶滅が危惧されている (Ushimaru et al. 2018)。

半自然草原の植生を大きく規定する要因として、草刈りなどの管理、他の草原との連結性、過去の土地利用の履歴等が重要であることが報告されてきた (Lindborg & Eriksson 2004; Tsuzuki et al. 2020)。特に、耕作放棄地や造成跡地において草原を再生したとしても、外来種が優占し、本来の草原とは質的に異なる植生が成立することが多いことから、過去の土地利用が長期にわたり植生に影響を与えることが示されている。この原因として、耕作放棄地等ではリン酸の蓄積や土壌 pH の上昇が進行しており、従来 of 自然土壌の化学特性が異なることが挙げられている。

しかし、これまで十分に検討されてこなかったのが菌根菌との生物間相互作用である。草本の約9割の根にはアーバスキュラー菌根菌 (AMF) と呼ばれるタイプの菌類が共生する。菌根菌は土壌から吸収したリン酸や窒素、ミネラルを宿主植物に与え、植物からは光合成産物を受け取る。植物には菌根菌との共生により、実生の定着率の向上、生育促進、耐病性・環境ストレス耐性の向上など様々な有益な作用がもたらされる (van der Heijden et al. 2015)。AMF の多くは宿主特異性が低く、多様な植物種と共生することができるが、環境の変化に敏感で、たやすく群集構造や感染率が変化することが知られている。例えば、造成や耕作といった土壌攪乱により、その群集構造は大きく変化し種多様性が減少する (Brundrett 1991)。また草原が森林化することでも、異なるタイプの菌根菌 (外生菌根菌) と共生する樹種が優占することで、AMF の群集構造は変化し種多様性が減少する (Gerz et al. 2016)。AMF が宿主植物の実生の定着から成長までを大きく規定していることを考慮すると、これら微生物群集の違いは成立する植生に大きな影響を与えうる。

2. 研究の目的

本研究では、過去の土地利用が長期にわたり地上植生に影響を与えるのは、AMF 群集との共生関係の変化が一因しているという仮説を検証する。具体的には土地利用の履歴が AMF および植物群集構造に及ぼす効果、これら AMF の変化が宿主植物の生育に及ぼす効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 土地利用の履歴が AMF および植物群集構造に及ぼす効果

種多様性の高い半自然草原が数多く残存している長野県菅平・霧ヶ峰の半自然草原各 14-15 ヶ所および隣接する森林に調査区を設置した。また面積が小さいながらも草原性在来種が数多く生育する千葉県下総台地の半自然草原あるいは造成跡地や耕作放棄地の草地各 4-5 ヶ所を調査対象地とした。過去の航空写真と照合し、草原として維持されている時間をもとに新しい草原と古い草原にタイプ分けした。

各調査区で植生調査を行うとともに、土壌コア (直径 5 cm、深さ 10 cm、各地点 5 個) を採集し、含まれる根から DNA を抽出した。その際に、全ての草原で共通して出現する種 (ススキ *Miscanthus sinensis* やセイタカアワダチソウ *Solidago altissima*) についても、別途各種の根から DNA を抽出した。AMF 類の種判別配列 (rRNA のスモールサブユニット) を PCR で増幅し、超並列シーケンサー MiSeq により網羅的に解析した。97% 類似度でクラスタリングしたものを操作的分類単位 (OTU) とした。得られた OTU の配列を AMF のデータベースである MaarjAM (Opik et al. 2010) を用いてブラスト検索し AMF 以外の配列を除去した。

OTU の多様性を算出するとともに、系列化手法である非計量多次元尺度構成法 (NMDS) によって群集構造を解析するとともに、土地利用の履歴が群集構造に及ぼす効果を PERMANOVA により検定した。また AMF 群集と植物群集の NMDS の同地点の対応点について、並進・回転・一様なスケーリング変換を行い、点群間の二乗誤差が最小になるように重ねあわせを行うプロクラステス解析を行った。

(2) AMF が植物の生育に及ぼす効果を明らかにするための栽培実験

2-1 現地の AMF 感染根を用いた実験

草原性の草本約 3 種 (クララ *Sophora flavescens*、ヒヨドリバナ *Eupatorium makinoi*、タチフウロ *Geranium krameri*) の種子を採集した。これらの種子の発芽実験を行い、発芽に適した環境条件を把握したうえで、滅菌した赤玉土を入れたポットに履歴の異なる草原 (履歴の長い草原 3 ヶ所および造成跡地または耕作放棄地 3 ヶ所) より採取した AMF の感染根を入れ、各種の発芽種子を播種した。コントロールとして滅菌した感染根を入れたポットを設けた。人工気象器内で 3-4 ヶ月間栽培し、地上部および地下部の重量および葉面積を測定する。回収した根から DNA を抽出し、と同様の手法で、根内共生微生物の群集構造を解析した。

2-2 単離した AMF を用いた実験

半自然草原および造成地 1 箇所の草地からそれぞれ 2 つずつ、直径 5 cm、深さ 10 cm の土壌コアサンプルを採取し、この土壌コアを滅菌土壌に接種してアルファルファを 3 ヶ月間培養した。それぞれのポットからアーバスキュラー菌根 (AM) 形成根を 5 mm の長さで切り出した。これを播種 2 週間後のアルファルファ無菌苗の根に接種して計 144 ポットを 2 ヶ月間培養し、AM 形成が成立した苗について、DNA 解析を行った。その結果、計 8 菌株の単離培養に成功し、これらはいずれも草原植生の AM 菌群集調査で共生が確認されている菌であることを確認した。これらの AMF の単離株のうち、半自然草原優占種 MG1-16 (VTX00166)、造成地優占種 YH2-4 (VTX00295)、半自然草原・造成地両優占種 MG1-2 (VTX00113) をそれぞれ選出し、栽培試験に供試した。栽培試験は草原性植物 5 種 (クララ、ノハラアザミ *Cirsium oligophyllum*、ツリガネニンジン *Adenophora triphylla* var. *japonica*、アキノタムラソウ *Salvia japonica*、ウツボグサ *Prunella vulgaris*) と外来種としてセイタカアワダチソウを供試した。供試植物の種子を滅菌後、冷湿処理し発芽実験を行い、発芽個体を滅菌培土に移し、各 AMF を接種したポットと接種しないコントロールポットを用意した。25、16 時間日長の条件で 2 ヶ月間栽培し、栽培終了後、シュートを切り取り乾燥重量を測定した。また、根を洗い出し、0.1% トリパンブルー溶液で染色し、格子法によって AM 形成率を測定した。

4. 研究成果

(1) 土地利用の履歴が AMF および植物群集構造に及ぼす効果

菅平・霧ヶ峰で行った結果について AMF の OTU 数は、森林よりも半自然草原で多かった (図 1)。OTU 数に対する植生タイプの影響は有意であり ($P < 0.0001$)、地域および交互作用の影響は有意ではなかった。AMF の OTU 数は植物種の数と正の相関があった (図 2、 $P < 0.001$)。

半自然草原のみを取り上げると、バルク根およびススキの根の AMF OTU 数は、いずれも新しい草原よりも古い草原で有意に高かった (図 1)。ススキの根の AMF OTU 数はバルク根のものの有意差は検出されなかった。

非計量多次元尺度法 (NMDS) 解析の結果、バルク根の AMF OTU と植物種組成は、森林と半自然草原で異なるクラスターを形成し、森林化は AMF の群集構造を変化させることが示された。さらに、半自然草原のみを対象に NMDS を行った (図 3)。

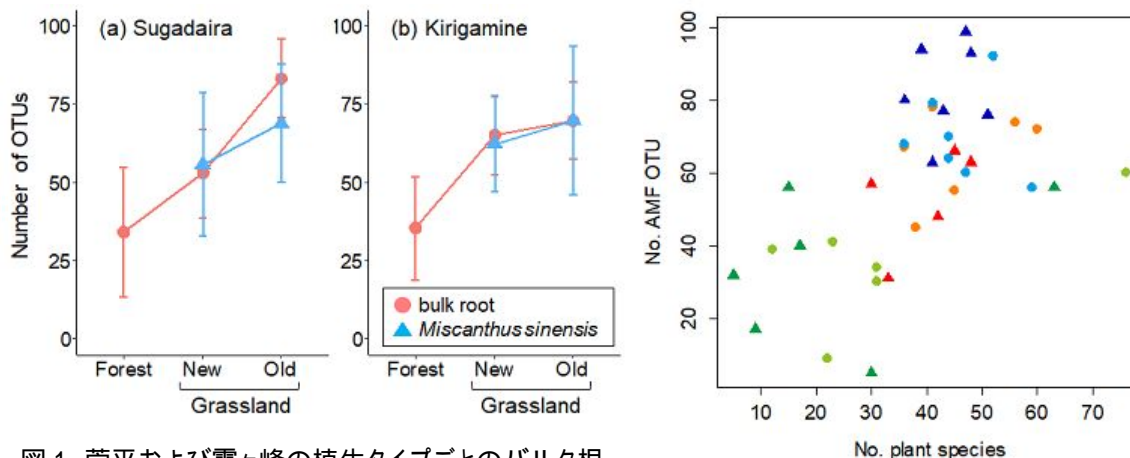


図 1. 菅平および霧ヶ峰の植生タイプごとのバルク根およびススキ根の AMF 操作分類単位 (OTU) 数の平均値。エラーバーは標準偏差を表す。

図 2. 植物種数とバルク根の AMF 操作分類単位 (OTU) の関係。

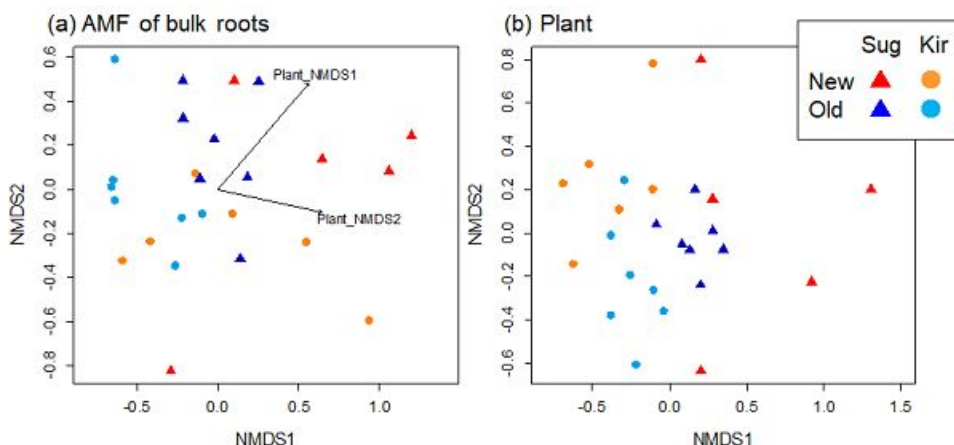


図 3. 非計量多次元尺度法 (NMDS) による、新草原・古草原から採取したバルク根 (a) と植物 (b) の AMF 群集の序列化。矢印は植物 NMDS の第 1 軸および第 2 軸のベクトルを示している。

空間的な自己相関の影響を除くため、部分マンテル検定で生育地タイプが種組成の違いに及ぼす効果を検定したところ、AMF OTU と植物の種組成ともに、草原の履歴（新しい・古い）によって有意に異なることが示された（AMF と植物について、それぞれ $P = 0.02$ と $P < 0.001$ ）。植物種組成の NMDS の第 1 軸と第 2 軸は、AMF の NMDS の軸と有意に相関しており、両者の種組成には共変性があることが示された（図 3）。

AMF と植物群集の共変性の強さを評価するためプロクラステステストを行ったところ、バルク根の AMF OTU と植物種の組成間のプロクラステス残差は、新しい草原よりも古い草原で有意に小さく（ $P < 0.001$ ；図 4）、新しい草原よりも古い草原で AMF 群集と植物群集がより強く共変していることが示された。

ススキの根の AMF OTU 組成は、バルクの根のそれと類似しており、ススキの根の AMF OTU 組成は草原の履歴（新しい・古い）によって有意に異なった（ $P < 0.001$ ）。バルク根の AMF OTU および植物種組成の NMDS の第 1 軸と第 2 軸は、ススキ根の AMF のそれと有意に相関していた。以上のことから、AMF 群集の種組成は、宿主の違いよりも草原の履歴の違いにより規定されていると考えられた。

千葉の半自然草原においても、菅平・霧ヶ峰の結果とほぼ同様で、造成や耕作などの履歴がある草地は、長期間維持されてきた半自然草原より植物および AMF とともに多様性が低く、またそれらの群集構造は半自然草原のものと有意に異なった。またススキやセイタカアワダチソウの AMF 群集の組成は、宿主の違いよりも草原の履歴によって規定されていた。

本研究は、古い草原では植物種数だけでなく絶対共生菌である AMF の多様性も高いこと、また AMF の宿主特異性は低いにも関わらず、植物群集と共変しており、その共変性は古い草原ほど強いことが示された。またバルク根とススキ根とで AMF の多様性や群集組成に有意差は見られず、AMF の地下の菌糸ネットワークによって異なる植物種間で AMF を共有していることが示唆された。これは AMF が属や科の異なる植物種間で共有されているという既往研究（van der Heijden et al. 2015; Walder et al. 2012）とも一致する結果であった。

(2) AMF が植物の生育に及ぼす効果を明らかにするための栽培実験

半自然草原と造成跡地由来の感染根をいれた土壌で栽培したクララ、ヒヨドリバナ、タチフウ口の葉の枚数・茎の長さ・地下部質量・地上部の乾燥重量・葉の表面積の平均値を比較した。クララでは葉の枚数以外、全ての測定項目について半自然草原のものが有意に大きかった（ $P < 0.0001$ ）。一方で、タチフウ口とヒヨドリバナでは、全ての計測項目において、半自然草原と造成跡地の個体の間に有意差は見られなかった。栽培個体の根の AMF 群集を解析したところ、半自然草原と造成跡地の感染根をいれた土壌によって、菌根菌の群集は異なることが示された。しかし、その群集は本来の生育地の群集を反映していなかった。

次に AMF の単離株 3 種を接種した 6 種（ノハラアザミ、クララ、ツリガネニンジン、アキノタムラソウ、ウツボグサ、セイタカアワダチソウ）のポット栽培において、供試植物のうち、ツリガネニンジン、アキノタムラソウ、セイタカアワダチソウの 3 種で AM 菌の接種効果が高かった（表 1）。3 菌株の効果は植物種によって異なったが、有意な違いは見られなかった。これは単独の AMF 接種が自然条件を反映していないことによると考えられる。

表 1. AMF 接種による植物地上部の成長促進率（シュート乾燥重量：AMF 接種区 / 対照区）。

AMF	Plants					
	<i>Cirsium oligophyllum</i>	<i>Sophora flavescens</i>	<i>Adenophora triphylla</i>	<i>Salvia japonica</i>	<i>Prunella vulgaris</i>	<i>Solidago altissima</i>
MG1-2	2.88	1.17	7.55	8.62	2.50	8.69
MG1-16	2.92	1.32	6.96	11.1	2.93	9.83
YH2-4	3.54	1.23	5.16	11.2	2.78	7.38

以上の結果は、絶対共生菌である AMF の効果を実験的に検証することの困難さを示している。土壌攪乱によって AMF の群集組成が大きく変化することを考えると、採取した土壌中の AMF も組成が変化していると考えられる。また実験的研究で、AMF 種の数が増えるほど、個々の AMF 種による相補的效果により植物の共存が可能になり生産性が向上することが実証されている（van der Heijden et al. 1998; Wagg et al. 2011）。AMF の多様性が高まると、土壌養分をより効率的に利用できるようになること（van der Heijden et al. 1998）、植物種は AMF の分類群によって異なる成長応答を示すこと（Hoeksema et al. 2018）から、根圏で多様な AMF を共有する植物群集は、

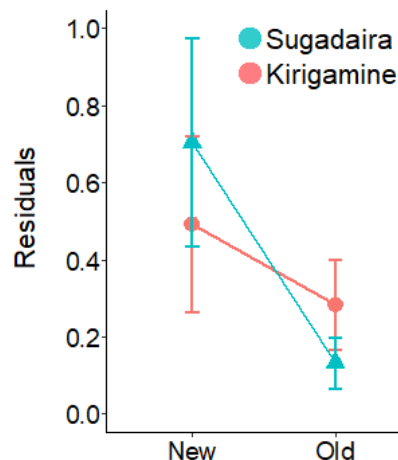


図 4. バルク根の AMF 群集と植物群集の NMDS の対応点についてプロクラステス解析を行い算出した残差。棒グラフは標準偏差を示す。

AMF 共生による促進効果がより強く表れると考えられる。

長期間維持されてきた草原は、最も種多様性の高い生態系の1つと認識されている (Wilson et al. 2012)。本研究では AMF と植物群集の種多様性や種組成および両者の共変動が草原の履歴と関係していることが示されたが、両者にどの程度相互依存しているのか(つまり、互いに因果関係があるのか)については不明である。今後、これらの共依存関係の解明は、長期間維持されている草原において、高い植物多様性と草原性依存種の出現を理解するうえで、重要な課題になると考えられる。

<引用文献>

- Brundrett, M. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*, 21, 171-313.
- Hoeksema JD, Bever JD, Chakraborty S, Chaudhary VB, Gardes M, Gehring CA, Hart MM, Housworth EA, Kaonongbua W, Klironomos JN, Lajeunesse MJ, Meadow J, Milligan BG, Piculell BJ, Pringle A, Rua MA, Umbanhowar J, Viechtbauer W, Wang YW, Wilson GWT, Zee PC (2018) Evolutionary history of plant hosts and fungal symbionts predicts the strength of mycorrhizal mutualism. *Communications Biology* 1: 116
- Lindborg, R., & Eriksson, O. (2004). Historical landscape connectivity affects present plant species diversity. *Ecology*, 85(7), 1840-1845.
- Gerz M, Bueno CG, Zobel M, Moora M (2016) Plant community mycorrhization in temperate forests and grasslands: relations with edaphic properties and plant diversity. *Journal of Vegetation Science* 27: 89-99.
- Opik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., . . . Zobel, M. (2010). The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188(1), 223-241.
- Tsuzuki, Y., Koyanagi, T. F., & Miyashita, T. (2020). Plant community assembly in suburban vacant lots depends on earthmoving legacy, habitat connectivity, and current mowing frequency. *Ecology and Evolution*.
- Ushimaru, A., Uchida, K., & Suka, T. (2018). Grassland biodiversity in Japan: threats, management and conservation. In V. Squires, J. Dengler, H. Feng & L. Hua (Eds.), *Grassland Management: Problems and Prospects*. Boca Raton, US: CRC Press.
- Wagg C, Jansa J, Schmid B, van der Heijden MGA (2011) Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. *Ecology Letters* 14: 1001-1009.
- Walder F, Niemann H, Natarajan M, Lehmann MF, Boller T, Wiemken A (2012) Mycorrhizal Networks: Common Goods of Plants Shared under Unequal Terms of Trade. *Plant Physiology* 159: 789-+. doi:10.1104/pp.112.195727.
- Wilson JB, Peet RK, Dengler J, Partel M (2012) Plant species richness: the world records. *Journal of Vegetation Science* 23: 796-802.
- van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M.-A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下野綾子, 井上太貴, 矢井田友暉, 丑丸敦史, 田中健太
2. 発表標題 半自然草原の履歴がアーバスキュラー菌根菌群集に及ぼす効果
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢井田友暉, 下野綾子, 井上太貴, 田中健太, 丑丸敦史
2. 発表標題 スキー場草原の植物種組成に植生履歴が影響するメカニズム
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木康平, 槌尾 健, 三輪 隆, 下野綾子
2. 発表標題 半自然草原（原っぱ）再生の取り組み
3. 学会等名 日本造園学会全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 草原性植物の種内および種間におけるアーバスキュラー菌根菌相の違い：河川堤防草地を事例に
2. 発表標題 安井雅貴, 小柳 知代, 下野 綾子, 山田 晋, 三浦 直子, 横田 樹広
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下将輝, 小柳知代, 下野綾子
2. 発表標題 草原性植物の生育地としての河川堤防の評価
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大和 政秀、八木田 真衣、島袋 恵土、日下部 亮太、山名 航平
2. 発表標題 フデリンドウ花茎のサイズ・形態・ 13C値から推定される栄養特性
3. 学会等名 第12回同位体環境学シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大和 政秀 (Yamato Masahide) (00571788)	千葉大学・教育学部・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------