

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658137

研究課題名(和文) 土壌線虫を用いた森林の生物多様性指標の開発

研究課題名(英文) Diversity of forest soil nematodes

研究代表者

秋庭 満輝 (Akiba, Mitsuteru)

独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：50353553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：青森県白神山地のブナを中心とした広葉樹天然林と、広葉樹を伐採後に植栽されたスギ林の土壌を採集し、線虫を分離した。分離された線虫についてバーコード領域(リボゾーム遺伝子)によるDNAタイピングを行った結果、235個の MOTU (molecular operational taxonomic units) が検出された。これらの線虫相データを元に各種の多様性指数と線虫の食性に基づいた指数を算出して比較したところ、ブナ林とスギ林の間には有意な差は認められなかった。ブナ林を伐採して植林されたスギ林においても、土壌中の線虫についてはブナ天然林と同等な多様性を維持していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Nematodes were isolated from soil in natural forests of *Fagus crenata* and plantations of *Cryptomeria japonica* after clear-cutting of *F. crenata*. DNA typing of the nematodes using barcode sequence (18S rDNA) were done. In total, 235 MOTUs (molecular taxonomic operational units) were detected. Diversity index or some index based on nematode feeding type were not significantly different between beech forests and conifer plantations. The results suggested that diversity of soil nematode fauna in conifer plantations persisted after clear-cutting.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：土壌線虫 多様性 スギ ブナ

1. 研究開始当初の背景

近年、生物多様性の保全を考慮した森林管理手法の開発が求められており、様々な生物群で多様性指標の開発を目的とする研究が進められている。しかし、その多くが地上部の昆虫類や菌類を対象とする研究であり (Makino et al. 2007) その重要性とは裏腹に、地下部 (森林土壌) を対象とした研究例は非常に少なく、地上植生の違いが地下部の生物多様性に影響するかどうかはわかっていない。森林全体の生物多様性を評価するには、森林の地上部から地下部までを総合的に考慮する必要がある。

線虫は昆虫よりも種数が多いといわれているほど多様性が高く、あらゆる環境下で生息する普遍性の高い生物である。線虫は細菌や糸状菌を餌とする微生物食性線虫、動植物に寄生する寄生性線虫から、線虫や微小動物を餌とする捕食性線虫まで、幅広い食性を持つ。また、土壌中で最も個体数が多い多細胞動物であり、微生物と大型動植物とを繋ぐ生態系ネットワークの要とも言える。従って、線虫は森林土壌の生物多様性の指標になりうる生物であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題は、土壌線虫を用いた森林の地下部における生物多様性指標を確立することを目的とする。そのために、日本の代表的な森林であるブナを中心とした広葉樹天然林と伐採後に植栽されたスギ人工林の土壌線虫相を明らかにし、これらを比較することにより土壌線虫の生物多様性指標としての有効性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験プロットの設定

日本の代表的な広葉樹林帯である青森県白神山地を対象とした。ブナを中心とした広葉樹天然林と近接のスギ林に試験プロットを設定した。

(2) 線虫分離手法の検討

土壌からの線虫の分離方法には、ベルマン法を始めさまざまな方法があるが、それぞれに特徴があり分離されてくる線虫の種類が異なる。そのため、上記のプロットから採集された土壌を用いて、どの手法が適切か決定した。

(3) 線虫の遺伝子タイピング

各プロットから土壌を採集し、分離された

線虫について、DNA バーコード (Powers et al. 2009) の手法を用いてリボゾーム遺伝子の部分配列をシーケンスした。さらに、形態学的同定のためにプレパラート標本を作製した。

(4) 生物多様性の指標としての検討

各プロットの線虫相データから各種の多様性指数を算出し、土壌線虫が森林の地下部における生物多様性の指標となりうるかについて検討するとともに、ブナ林とスギ林の線虫相について比較検討した。

4. 研究成果

(1) 試験プロットの設定

青森県白神山地のブナを中心とした広葉樹天然林と、広葉樹伐採後に植栽されたスギ林の各5ヶ所ずつを調査プロットとした。林齢はブナ林は94~174年生、スギ林は36~44年生である。



試験プロットとしたブナ林及びスギ林

(2) 線虫分離手法の検討

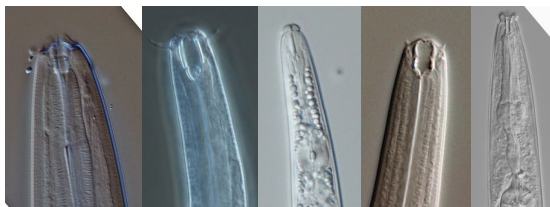
各プロットについて、任意の10ヶ所から土壌を採集した。採集した土壌について、ベルマン法と遠心浮遊法を用いて線虫を分離したところ、ベルマン法ではDorylaimida目、Mononchida目に属する比較的大型の線虫が分離されるのに対し、遠心浮遊法ではCriconematidae科に属する運動性が低いとされている線虫が多く分離される傾向があった。しかし、ベルマン法でもCriconematidae科の線虫は分離されており、また、Dorylaimida目等の大型の線虫は森林土壌中の生態を考慮する上で重要な種であると考えられることから、本試験では線虫の分離法にベルマン法を採用することにした。

(3) 線虫の遺伝子タイピング

各プロットから採集した土壌からベルマン法で分離された線虫について、1プロットにつき任意の124個体についてリボゾーム遺伝子 (small subunit の後半部分) の配列を決定した。ブナ林とスギ林合わせて、全部で235個のMOTU (molecular operational taxonomic units) が検出された。得られた配列からblast検索により各MOTUの分類群を推定すると、これらはかなり幅広い範囲の分

類群に属していた。

blast による検索で完全に配列が一致した MOTU は 40 個であり、残りの 195 は全く新しい配列であった。ブナ林とスギ林の全てのプロットから分離された MOTU は Cephaliidae 科の *Acoberoides* 属と Plectidae 科の *Plectus* 属の 2 つであり、それぞれ分離率は 5.9% と 4.6% であった。これらは、細菌食性の線虫である。また、全プロットの 7 割以上から分離された MOTU は 7 つであり、Plectidae 科 *Plectus* 属 及び *Anaplectus* 属、Prismatolaimidae 科 *Prismatolaimus* 属、Tylenchidae 科 *Ecphyadophora* 属、Tripylidae 科 *Tripyla* 属、Dorylaimida 目 *Epidorylaimus* 属 及び *Aporcelaimellus* 属 であった。これらは、細菌食、植物（根）食または菌食、雑食性線虫に属し、白神地区の森林土壤に広域的に分布する種であるといえる。最も分離個体数が多かった MOTU は Tylenchidae 科の *Malenchus* 属 であり（分離率 6.7%）、分離プロット数は 6 つであった。この線虫は根または菌食性であり、ブナ林・スギ林両林に共通する雑草などに寄生している可能性が考えられた。Criconeematidae 科 *Xenocriconema* 属 がブナ林 5 プロットから分離されたが、それ以外にブナ林またはスギ林から特異的に分離される傾向のある MOTU は認められなかった。121 の MOTU（全体の 51.5%）が一つのプロットのみから分離され、そのうちの 95 の MOTU が 1 個体のみ分離された（シングルトン割合 40.4%）。MOTU を分類群レベルで比較すると、全個体数の 19% が Dorylaimida 目に属した。Dorylaimida 目は雑食性の線虫であると言われており、森林土壤生態系において重要な役割を果たしていることが考えられた。一方、森林内の枯死木からしばしば分離される Diplogasteridae 科や Panagrolaimidae 科の線虫は全く分離されなかった。同じ森林の腐生的な環境においても、樹木と土壤という環境の違いにより線虫相が全く異なることが想定された。今回分離された線虫についてはプレパラート標本も作製しており、今後、分類学的検討を行う予定である。



土壤中から分離された様々な線虫

（4）生物多様性の指標としての検討

本研究で分離された MOTU 数は 235 であり、熱帯地域や他の温帯地域における同種の研究例と比較しても遜色のない数であることから、この地域の森林土壤に生息する線虫のかなりの部分を網羅できていると考えられる。また、多様性を調査する上でも十分な MOTU 数であると考えられる。そこで、ブナ林とスギ林から分離された MOTU のデータを元に各種の多様性指数（MOTU 数、Shannon 指数、Hill 指数など）を算出して比較したところ、各指数とも両林の間に有意な差は認められなかった。また、線虫の食性に基いて考案された指数（MI: maturity index など）について算出したところ、両林の間に有意な差は認められなかった。これらの食性に基く指数からは、両林とも比較的攪乱の少ない安定した森林の土壤線虫相であると判断された。以上の結果から、ブナ林を伐採して植林されたスギ林においても、土壤中の線虫についてはブナ天然林と同等な多様性を維持していることが考えられた。また、スギ林については伐採後年数が経っていることから、地下部においても比較的攪乱が少ない状態であることが考えられた。

本試験では冷温帯林（ブナ林）の森林土壤線虫相について検討したが、日本全体の森林土壤線虫相を明らかにするためには、異なるブナ林の線虫相についての地域間差や、暖帯林や亜熱帯林の土壤線虫相との違い等についても検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 秋庭満輝・神崎菜摘・佐橋憲生 (2014) 日本におけるマツノザイセンチュウの遺伝的多様性. 第 125 回日本森林学会大会, 2014 年 3 月 29 日, 大宮ソニックシティ (埼玉県)
2. Akiba, M., Kanzaki, N. and Sahashi, N. (2013) Genetic diversity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* after 100 years of invasion in Japan. Pine Wilt Disease Conference 2013 (IUFRO 7.02.10), 2013 年 10 月 17 日, Thuenen Institute, Braunschweig, Germany
3. 秋庭満輝・佐橋憲生 (2013) クロマツ切り枝内におけるマツノザイセンチュウ分散型 4 期幼虫の移動. 第 124 回日本森林学会大会, 2013 年 3 月 27 日, 岩手大学 (岩手県盛岡市)
4. 秋庭満輝・神崎菜摘 (2011) マツ枯死木から分離された *Aphelenchoides* 上科線虫. 第 19 回日本線虫学会大会, 2011 年 9 月 15 日, 京都市国際協力会館 (京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

秋庭 満輝 (MITSUTERU AKIBA)

森林総合研究所・森林微生物研究領域・主
任研究員

研究者番号：50353553