

PRINT ISSN 0916-4405
ONLINE ISSN 2189-9363

森林総合研究所研究報告

Vol.20 No.4 (No.460)

BULLETIN

of the
Forestry and
Forest Products
Research Institute



December 2021

国立研究開発法人 森林研究・整備機構
森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute



The Chief Editor

服部 力 Tsutomu HATTORI (Principal Research Director, FFPRI)

The Vice-Chief Editor

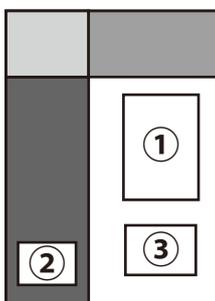
松本 麻子 Asako MATSUMOTO (Public Relations Division, FFPRI)

Editor

阿部 真 Shin ABE (Tama Forest Science Garden, FFPRI)
阿部 俊夫 Toshio ABE (Tohoku Research Center, FFPRI)
藤井 佐織 Saori FUJII (Department of Forest Entomology, FFPRI)
古澤 仁美 Hitomi FURUSAWA (Department of Forest Soils, FFPRI)
菱山 正二郎 Shojiro HISHIYAMA (Department of Forest Resource Chemistry, FFPRI)
石橋 靖幸 Yasuyuki ISHIBASHI (Hokkaido Research Center, FFPRI)
小松 雅史 Masabumi KOMATSU (Department of Mushroom Science and Forest Microbiology, FFPRI)
深山 貴文 Takafumi MIYAMA (Department of Disaster Prevention, Meteorology and Hydrology, FFPRI)
西園 朋広 Tomohiro NISHIZONO (Department of Forest Management, FFPR)
岡 裕泰 Hiroyasu OKA (Forestry Division, Japan International Research Center for Agricultural Sciences)
奥田 史郎 Shiro OKUDA (Department of Plant Ecology, FFPRI)
坪村 美代子 Miyoko TSUBOMURA (Forest Tree Breeding Center, FFPRI)
上野 真義 Saneyoshi UENO (Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, FFPRI)
宇京 齊一郎 Seiichiro UKYO (Department of Wood Engineering, FFPR)
山田 利博 Toshihiro YAMADA (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)
吉田 智佳史 Chikashi YOSHIDA (Department of Forest Engineering, FFPRI)

This journal is indexed in CAB Abstracts.

表紙写真 Photographs in Cover



- ①ハーベスタによるスギの造材（和歌山県新宮市）
Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) processing with harvester
- ②クマノザクラの花（三重県熊野市）
Flowers of Kumano cherry (*Cerasus kumanoensis*) at Kumano City, Mie Prefecture
- ③(本文 263~275ページ)
市街地周辺林地に生息するイノシシ(*Sus scrofa*)における採食場所の土壌特性
Soil characteristics of feeding sites in wild boar (*Sus scrofa*) inhabiting sub-urban forest

目次

論文

市街地周辺林地に生息するイノシシ (*Sus scrofa*) における採食場所の土壌特性
林典子、高山夏鈴、吉永秀一郎、小泉透 …………… 263

高知県のヒノキ人工林において間伐が葉量と幹現存量の生産速度に及ぼす影響
稲垣善之、中西麻美、深田英久、渡辺直史 …………… 277

ポプラの環境ストレス応答に関与する LEA タンパク質の性質 (英文)
西口満 …………… 287

平坦な河畔林における2次元の落葉散布シミュレーション
阿部俊夫、山野井克己、倉本恵生 …………… 301

スギの人工交配における野外での溶液授粉の効果
宮本尚子、飯塚和也、今野幸則、永野聡一郎、那須仁弥、
織部雄一朗、竹田宣明 …………… 311

補間・推定方法の違いが森林の二酸化炭素吸収・放出量算出値に与える影響
—札幌および富士吉田森林気象試験地タワーフラックスデータの検証—
溝口康子、山野井克己 …………… 323

茨城県北部小川試験地におけるササ類3種の30年間の動態
新山馨、柴田銃江、齋藤智之、直江将司 …………… 339

北海道の択伐された広葉樹林におけるカツラ (英文)
永光輝義、中西敦史 …………… 353

短報

食用きのこ栽培施設で発生したツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (双翅目クロバネキノコバエ科)
末吉昌宏、風間宏、向井裕美、北島博 …………… 363

Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute
Vol.20 No.4 (No.460) December 2021

CONTENTS

Original article

- Soil characteristics of feeding sites in wild boar (*Sus scrofa*) inhabiting sub-urban forest
Noriko HAYASHI, Karin TAKAYAMA, Shuichiroh YOSHINAGA
and Tohru KOIZUMI 263
- Effects of thinning on leaf biomass and stem biomass production in hinoki cypress
plantations in Kochi prefecture
Yoshiyuki INAGAKI, Asami NAKANISHI, Hidehisa FUKATA and
Naoshi WATANABE 277
- Characterization of late embryogenesis abundant (LEA) proteins involved in
environmental stress response of black poplar
Mitsuru NISHIGUCHI 287
- Model simulations of two-dimensional leaf-litter dispersion in lowland riparian forests
Toshio ABE, Katsumi YAMANOI and Shigeo KURAMOTO 301
- Effect of spray pollination as an artificial pollination technique for *Cryptomeria
japonica* in the field.
Naoko MIYAMOTO, Kazuya IIZUKA, Yukinori KONNO, Soichiro NAGANO,
Jin'ya NASU, Yuichiro ORIBE and Nobuaki TAKEDA 311
- Uncertainty of the estimated carbon absorption and emission by different
gap-filling and partitioning methods: Reanalysis of the tower flux data obtained from
the Sapporo and Fujiyoshida forest meteorology sites
Yasuko MIZOGUCHI and Katsumi YAMANOI 323
- The 30 years dynamics of three dwarf bamboo species in Ogawa research site in
northern Ibaraki prefecture, Japan
Kaoru NIIYAMA, Mitsue SHIBATA, Tomoyuki SAITOH
and Shoji NAOE 339
- Factors affecting multi-stem patterns of *Cercidiphyllum japonicum* trees
in a broadleaf forest under selective logging in Hokkaido
Teruyoshi NAGAMITSU and Atsushi NAKANISHI 353
- Short communication*
- Lycoriella ingenua* (Dufour, 1893) (Diptera: Sciaridae), infesting in cultivation
facilities of edible fungi
Masahiro SUEYOSHI, Hiroshi KAZAMA, Hiromi MUKAI
and Hiroshi KITAJIMA 363

論文 (Original article)

市街地周辺林地に生息するイノシシ (*Sus scrofa*) における採食場所の土壌特性林典子^{1)*}、高山夏鈴²⁾、吉永秀一郎¹⁾、小泉透¹⁾

要旨

近年、中・大型野生哺乳類が人間の生活空間の近くで暮らし、時には市街地にまで一時的にあるいは継続的に進出することが問題となっている。市街地に出没する前段階である市街地周辺の山林で、野生動物がどのような環境を利用しているのかを解明することにより、事前に効率的な対策を行うことが可能となる。本研究では、近年とくに市街地への出没が頻発するイノシシを対象とし、市街地周辺の山林でどのような環境を採食場所として利用しているのかについて調査を行った。2018年7月から2019年8月まで30台のセンサーカメラによりイノシシの行動をビデオ映像として記録するとともに、その地点における土壌および植生に関する環境調査を行った。イノシシの採食行動が撮影された頻度を目的変数とし、土壌や植生に関する13の環境変数を用いて一般化線形モデルにあてはめ、効果が高い要因を求めた。その結果、春から秋にかけて土壌硬度が低い環境が選択される傾向が認められたが、採食場所は季節によって変化することも明らかになった。糞内容物からも季節に応じた食物が利用されていることが示唆された。市街地に隣接する森林では、本調査地のように、イノシシが採食場所として選好する環境が存在することも多く、イノシシの生息拠点となる可能性がある。市街地にイノシシを進出させないために、周辺の森林では土壌環境に基づいて市街地へのイノシシの進出リスクを事前に予測し、個体数管理、環境改善、フェンスの設置などの対策を早期に実施する必要がある。

キーワード：土壌硬度、採食行動、植生、都市近郊

1. はじめに

本来は森林に生息する野生哺乳類が、人間の生活空間に進出してくる事例が、21世紀に入ってから、世界各地で報告されている (Luniak 2004, Adams 2016)。日本でも、市街地に野生哺乳類が生息する事例として、北海道のヒグマ (*Ursus arctos*)、北海道や奈良県のニホンジカ (*Cervus nippon*)、兵庫県のイノシシ (*Sus scrofa*) などがよく知られているが (布施 2011, 立木 2015, 松浦 2018)、これらの地域だけではなく近年では各地で、一時的にあるいは継続的に野生哺乳類が市街地で目撃される事例が報告されるようになってきている。なかでも、イノシシは、北海道を除く日本各地で目撃や出没など市街地への進出が頻繁にニュースで報じられている (日本経済新聞 2019, TBS 2019, 日テレ 2020など)。

イノシシは日本だけではなく、ヨーロッパ、北アフリカ、中近東、インド、東南アジア、中国、ロシアにかけて広く自然分布する (Kodera 2010)。鯨偶蹄目に属するが、ニホンジカのような反芻胃を持たない。植物を中心とした雑食性であり、日本では根茎、葉、堅果、ミミズなどの土壌動物などを摂食することが知られている (朝日1975, 小寺・神崎 2001, 木場ら 2009, 小寺ら 2013)。成長が早く、早いもので1歳、ほとんどのものが2歳で初産を迎え、そ

の後、毎年春季に出産する (金森 2013)。群馬県では、2才前後で妊娠し、胎児の数は1~9頭であることが報告されている (姉崎ら 2009)。このように多様な餌資源を利用できるうえ、状況によって非常に高い繁殖力を示すことが、著しい分布拡大を引き起こす要因と考えられている (姉崎ら 2009)。全国的な分布調査によると、明治・大正期には中部地方南部から近畿地方、山口県西部、四国地方、九州地方南部、南西諸島などにイノシシが生息し、分布の北限は栃木県北部付近とされていたが、その後、1978年度から2014年度までの36年間でイノシシの生息分布地が約1.7倍に拡大し、北陸や東北地方にまで及んでいる (高橋 2010, 環境省 2015)。イノシシの農作物被害は年間50億円と深刻な問題となっており、個体数管理、被害管理、生息地管理の3点から対策を進めていく必要性が指摘されている (平田ら 2009, 平田・小寺 2013)。

近年イノシシは中山間地域だけではなく、市街地にも出没し被害を出している (辻・横山 2014, 横山 2016)。兵庫県六甲山では餌付け行為がイノシシの行動を変え、市街地への出没や人間を襲う原因になったと考えられているが、それだけではなく、市街地周辺の山林の植生遷移が進み、イノシシが好むコナラ属 (*Quercus*) の堅果類が増えたことでイノシシが増加する環境となったとも指摘

原稿受付：令和2年10月8日 原稿受理：令和3年2月26日

1) 森林総合研究所 多摩森林科学園

2) 東京農業大学 農学研究科

* 森林総合研究所多摩森林科学園 〒193-0843 東京都八王子市廿里町 1833-81

されている(辻・横山 2014)。人口減少時代に入った現在、野生動物と人間の軋轢は必ずしも中山間地域だけの問題ではなく、市街地周辺でも野生動物と人間の生活場所が近接している状況がみられる(高橋 2010, 江成・角田 2017, 角田 2019)。本田ら(2008)は、農地に進出する加害個体は山林の林縁部を集中的に利用している個体であることを明らかにしている。したがって、人間の生活空間に進出する前段階である周辺林地で、イノシシの環境利用特性を解明することにより、効率的な捕獲や防護柵などの対策を講じることが可能となるだろう。

日本と同様、近年イノシシが市街地に進出しているヨーロッパ各地でも、市街地とその周辺の森林におけるイノシシの環境利用状況が調べられている(Thurfjell et al. 2009, Amendolia et al. 2019)。イノシシは生息地の中核となる森林において獲得可能な餌資源が少ない季節や年に、利用しやすい食物が存在する市街地を流動的に利用することが明らかになっている(Stillfried et al. 2017, Castillo-Contreras 2018)。市街地での人とイノシシの軋轢を減らすためには、給餌やゴミなど市街地で餌を供給しないことが重要だが、周辺の森林における個体数管理、移動制限、環境管理も効果的であることが指摘されている(Toger et al. 2016, Amendolia et al. 2019)。

日本国内ではイノシシに関してこれまで食性に関する研究は多く、各地域の環境条件によって多彩な餌資源を

利用することが明らかになっている(朝日 1975, Kanzaki and Ohtsuka 1991, 小寺・神崎 2001, 木場ら 2009, 小寺ら 2013)。さらに各地で、センサーカメラを用いた撮影記録をもとに出現頻度の調査は行われている(上田・姜 2004, 丸居ら 2014)。しかし、市街地周辺の山林を対象とし、イノシシがどのような環境を選択的に利用しているのかについて、定量的に評価した事例はない。そこで、本研究では、市街地に隣接する森林で、ビデオカメラの映像をもとに、イノシシの採食行動に着目し、頻繁に利用される場所と環境特性との関係を解析した。環境要因としてイノシシの採食行動に重要な要素と考えられる土壌環境と植生環境に着目した。同時に、ビデオ画像から採食物を判定し、糞内容物を精査することにより、実際にどのような食物を利用するのかも併せて調査した。市街地への出没を防ぐための効率的な対策を行うために、市街地に進出する前段階の周辺林地においてイノシシの採食物や採食場所の環境特性を明らかにすることが目的である。

2. 調査方法

調査地

本調査は東京都八王子市にある国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所多摩森林科学園(北緯35°38'33" 東経139°17'00") (以下、科学園)の試



Fig. 1. 東京都八王子市多摩森林科学園とその周辺概況

赤印はカメラ設置地点。点線は多摩森林科学園の敷地境界、二重線は電気柵、実線は金属柵を示す。

験林で行った (Fig. 1)。科学園は高尾山や景信山などの山地とその東側の丘陵部との境界に位置する広さ56.11haの森林である。西側の連続した山塊とは中央自動車道によって分断されているが、たとえば、ニホンジカは高速道路の架橋部分やカルバート通路を利用して、科学園内外を移動している (一般社団法人日本森林技術協会 2019, 2020)。また、科学園の北側や南側には住宅地が広がる。科学園の標高は183~287mと起伏に富む。地質は主として白亜紀の小仏層群の粘板岩及び砂岩からなり、山地斜面ではこれを母材とした石礫質の土壌が、尾根上の緩傾斜地や低標高の丘陵地では関東ロームを母材とする粘質の土壌でおおわれている (豊田・谷本 2000)。園内の潜在自然植生はシラカシ (*Quercus myrsinifolia*)

群集またはシキミ (*Illicium anisatum*) -モミ (*Abies firma*) 群集であると推定されている (勝木ら 2010)。1921年に帝室林野局林業試験場となってからは、ケヤキ (*Zelkova serrata*) やホオノキ (*Magnolia obovata*) などの広葉樹やヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) やテーダマツ (*Pinus taeda*) などの針葉樹の植栽試験林 (39.81ha) が造成されたほか、東側部分には樹木園 (6.94ha)、サクラ保存林 (7.96ha) が造成され、一般来園者に公開されている。

調査地には、1999年にイノシシが侵入したことが確認されている (田村・園田 2014)。また、2013年にニホンジカが西側山塊から侵入したことが確認されている (東京都環境局 2017)。2014年1月以降、ニホンジカ侵入防止のための防護柵類が設置された (田村ら 2018)。定期的な点検を行っているが、柵はイノシシによって頻繁に破壊さ

Table 1. イノシシの行動分類

行動項目	行動内容
1. 移動	走る。小走り。ゆっくり歩く。ただし、地表に鼻を入れて探索している場合は「2. 採食」とした。
2. 採食	地上の草本、竹、堅果、土壌動物などを食べる。 地面を鼻先や前足で掘り、探索しながら進む行動も含む。ただし、地面に鼻を付けているが地面を掘っていない場合は「1.移動」とした。
3. 飲水	沢の水に吻を付けて飲む行動。
4. メンテナンス	沢の泥や石を前肢や鼻でかき出しヌタバをつくる。ヌタバに体を付けて水浴。ヌタバで体をこすりつける。木や切り株に体をこすりつける。
5. 静止	歩きを止めて静止する。多くの場合、鼻を上げ、耳を立てて警戒あるいは注意する行動を伴う。
6. 社会行動 (親和)	成獣から幼獣へ、幼獣同士、幼獣から成獣へ、それぞれ個体同士が体をなめあう行動。成獣が子どもに授乳。幼獣同士のじゃれあい。
7. 社会行動 (攻撃・闘争)	成獣同士が噛みつきあいや押し合い、追いかける行動をする。ただし、幼獣同士の場合はじゃれあいと考え、「6. 社会行動 (親和)」とした。

Table 2. 測定した環境変数とその平均値

項目		平均値	最小値	最大値	
植生に関する変数	上層木本数	量的変数	3.17	0	18
	中層木本数	量的変数	14.6	0	45
	下層木本数	量的変数	20.9	0	70
	上層タイプ	質的変数	常緑広葉樹12ヶ所、落葉広葉樹5ヶ所、針葉樹7ヶ所、なし6ヶ所		
土壌に関する変数	母材	質的変数	火山灰層(V)3ヶ所、堆積岩(R)24ヶ所、崩積性堆積物(D)3ヶ所		
	土壌硬度横平均 (mm)	量的変数	8.99	4.40	16.20
	土壌硬度縦平均 (mm)	量的変数	10.92	4.40	17.80
	細土容積量 (mg/m ³)	量的変数	0.43	0.21	0.70
	体積含水率 (m ³ /m ³)	量的変数	0.32	0.17	0.69
	礫含有量 (mg/m ³)	量的変数	0.15	0.00	0.38
	堆積有機物量 冬(kg/m ²)	量的変数	0.88	0.22	2.71
	堆積有機物量 夏(kg/m ²)	量的変数	0.63	0.00	2.00
	その他	道本数	量的変数	3.83	2.00
斜度		量的変数	1.70	0.00	9.00

れ、イノシシは柵の内外を移動することが確認されている(高山ら 2019)。

ビデオカメラを用いた行動調査

調査地内に2018年7月から2019年8月にセンサー式デジタルビデオカメラ(Ltl-Acornトレイルカメラ6210MC、以下ビデオカメラ)を30台、調査地域全域に設置した(Fig.1)。設置個所は尾根、斜面、沢など多様な地形を含み、スギ(*Cryptomeria japonica*)・ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)・マツ類などの針葉樹種の試験林、コナラ(*Q. serrata*)・ケヤキなどの落葉広葉樹種の試験林、スタジイ(*Castanopsis sieboldii*)・カシ類などの常緑広葉樹やモミを主体とした天然生林、上層木が無い草地など多様な環境を網羅するように配置した。カメラの高さは約1.2 mとし、角度は約30度の下向きとなるように調整した。ビデオカメラの動作設定は、感度ミディアム、撮影時間20秒、撮影インターバル0秒として動画撮影を行った。カメラのSDカードと電池は1ヶ月ごとに交換し、その都度動画を回収した。ビデオデータを用いて、撮影年月日・時刻・動物種・個体数・行動を記録した。この中でイノシシが撮影された動画を抽出し、以下の解析に用いた。1年間のビデオ画像から確認されたイノシシの行動は以下7タイプであった:「移動」「採食」「飲水」「(ヌタ浴びや体を擦り付ける)メンテナンス」「静止」「社会行動(親和)」「社会行動(攻撃・闘争)」(Table 1)。採食行動には、地上部の草本類などを採食している事例、地面を掘って根茎類、堅果類、ミミズなどを食べている事例のほか、地面を鼻で掘っているが何を食べているか不明の事例や地面を鼻で掘りながら歩いている探索行動も含めた。地面に鼻を付けているが、地面を掘らずに歩いている事例は「採食行動」ではなく「移動行動」に含めた。ビデオ映像に複数個体が撮影された場合、同じ行動をとっていたときは1件とした。また、複数個体が異なる行動を行った場合、行動ごとに1件ずつカウントした。それぞれの行動頻度を月ごと、カメラ地点ごとに集計した。

環境調査

30ヶ所のビデオカメラ撮影中心位置より半径10m以内に生育する樹木について、高層木(樹高10 m以上)、中層木(樹高5 m以上10 m以下)、下層木(樹高1.5 m以上 5.0 m以下)に分けて、それぞれの本数をカウントした。また、上層木のタイプを優占する樹種をもとに「常緑広葉樹」、「落葉広葉樹」、「針葉樹」、「上層木なし」に分類した。植生環境については以上4変数を用いた。(Table 2)

土壌調査は森林立地調査法編集委員会(2010)を参考にし、以下の手順で行った。各ビデオカメラ撮影地点の地表に50 cm×50 cm木枠を設定し、その中に含まれる堆積有機物を採集した。採集した有機物は実験室に持ち帰り、80℃48時間乾燥した後、乾燥重量を測定した。堆積有機物量は2018年12月から1月に採集したサンプルを冬

季(11月から4月)の代表値とし、2019年6月から7月に採集したサンプルを夏季(5月から10月)の代表値とした。有機物を取り除いた後、深さ20 cmまで土壌断面を掘削し、土壌母材の判定を行った。地表面の硬度を調査するために、山中式土壌硬度計を用いて地表から鉛直方向と深さ5 cmにおける水平方向の土壌硬度をそれぞれ5回ずつ計測し、その平均値を算出した。さらに底面積50 cm²(直径約8 cm)、高さ2 cmの容積100 mLの円筒を用い、深さ1~3 cmの土壌を3連で採取した。採取した土壌は実験室に持ち帰り、採取時重量(Wf)を測定した後、100℃48時間乾燥し、絶乾重量(Wd)を測定した。乾燥後の土壌試料は2 mm径の円孔篩にかけ礫(> 2 mm)と細土(< 2 mm)に分離し、それぞれの重量(Wg、Ws)を測定した。これらの測定値を用い、以下の式から、細土容積量(Bd)、採取時体積含水率(Wc)、礫含有量(Gc)を算出し、それぞれの地点の平均値を算出した。

$$Bd(Mg/m^3) = Ws / 100 \quad (1)$$

$$Wc(m^3/m^3) = (Wf - Wd) / 100 \quad (2)$$

$$Gc(Mg/m^3) = Wg / 100 \quad (3)$$

土壌環境については、Table 2に示す7項目を環境変数とした。

その他、地形などに関する2項目も変数として加えた(Table 2)。各地点の斜度はGPS計測装置(GARMIN eTrex 20J/30J)を用いて標高を記録することにより、ビデオカメラ設置地点周囲10m距離当たりの標高差(m/10 m)として求めた。また、ビデオカメラ撮影位置に交わるケモノ道の本数を数えた。この際、全方向移動可能な場所では全方位として記録した。

糞分析調査

2018年3月~2019年11月まで調査地内で採取したイノシシの糞を一度冷凍保存した。室温で解冻後1mmメッシュのふるいで水洗し、残渣を分析の対象とした。その際、角田ら(2014)および小寺・神崎(2001)などの先行研究を参考として、単子葉植物、双子葉植物、ブナ科堅果類、その他の種子・果実、根・塊茎、樹皮、動物質、その他の計8種類の項目に区分した。1回の採取サンプルでは湿重量約20~50gの糞を分析に用いた。

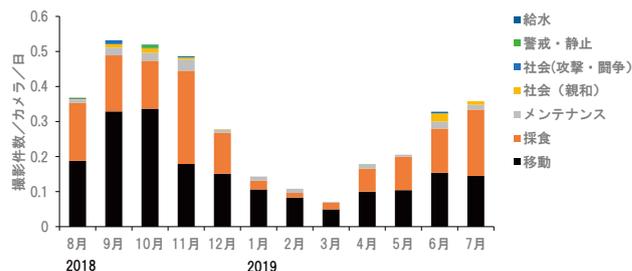


Fig. 2. センサーカメラによるイノシシの行動の月別頻度
行動分類は Table 1 参照。

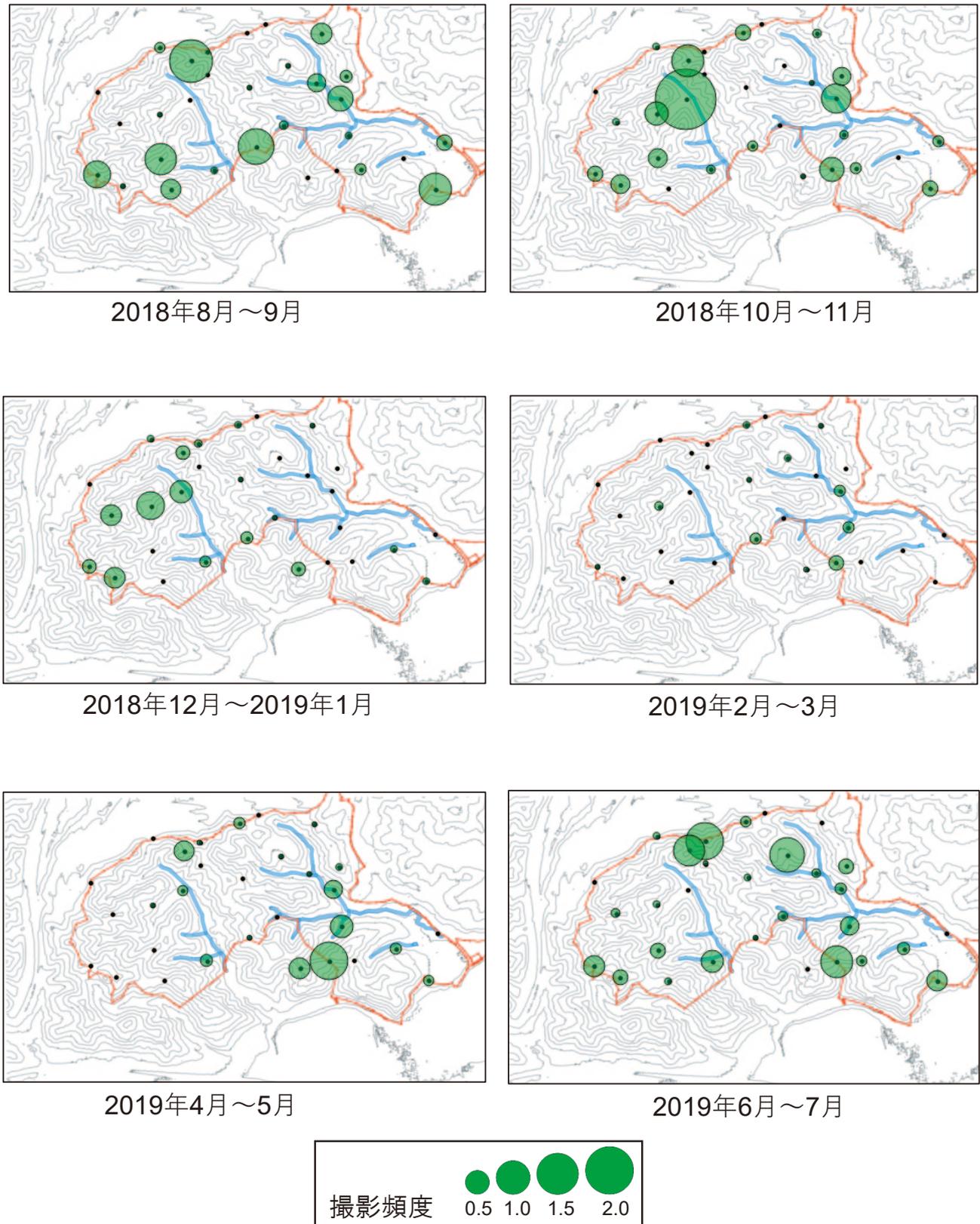


Fig. 3. 各カメラ地点における採食撮影頻度の分布

赤線は多摩森林科学園の外周を示す。青線は沢などの水系を示す。

黒点はカメラ地点を示し、2ヶ月ごとに採食行動の撮影頻度（撮影数／カメラ日）を集計し、緑円の大きさで示した。



Photo 1. モウソウチク (*Phyllostachys edulis*) のタケノコを掘って食べるイノシシ



Photo 4. *Quercus* 属の堅果類を食べるイノシシ



Photo 2. ミミズ綱 (*Oligochaeta*) を食べようとするイノシシ幼獣



Photo 5. イノシシの糞に入っていたアズマネザサ (*Pleioblastus chino*) とヤマグワ (*Morus australis*) の種子



Photo 3. ドクダミ (*Houttuynia cordata*) の根を食べるイノシシ

Table 3. 量的環境変数間の相関関係

	上層本数	中層本数	下層本数	斜度	道本数	硬度横平均	硬度縦平均	細土容積量	体積含水率	礫含有量	有機物(冬)	有機物(夏)
上層本数	1.000											
中層本数	0.194	1.000										
下層本数	0.108	-0.141	1.000									
斜度	-0.012	0.181	0.452	1.000								
道本数	-0.369	-0.285	0.193	0.304	1.000							
硬度横平均	-0.087	-0.006	0.087	-0.035	-0.194	1.000						
硬度縦平均	0.102	0.083	0.153	-0.025	0.017	0.618	1.000					
細土容積量	-0.278	-0.209	-0.143	-0.264	-0.080	0.377	0.194	1.000				
体積含水率	-0.483	-0.225	0.069	0.163	0.320	-0.156	-0.374	-0.092	1.000			
礫含有量	0.202	0.304	0.081	-0.096	-0.170	0.218	0.488	-0.237	-0.453	1.000		
堆積有機物量 (冬)	0.294	0.066	0.176	0.029	0.032	-0.224	-0.116	-0.237	-0.470	0.086	1.000	
堆積有機物量 (夏)	0.340	0.075	0.153	0.226	0.148	-0.241	-0.073	-0.138	-0.185	-0.024	0.325	1.000

スピアマン順位相関係数で有意だった関係を色表示した。赤色：P < 0.01, 黄色：P < 0.05

Table 4. 一般化線形モデルによる各季節の採食行動頻度に関わる環境変数の効果

独立変数	Aug.-Sep.		Oct.-Nov.		Dec.-Jan.		Apr.-May		Jun.-Jul.	
	Wald	χ^2 P	Wald	χ^2 P	Wald	χ^2 P	Wald	χ^2 P	Wald	χ^2 P
(切片)	0.21	0.65	0.03	0.87	1.31	0.25	3.53	0.06	7.69	0.00**
母材タイプ	6.33	0.04*	3.44	0.18	2.18	0.34	2.70	0.26	6.06	0.05*
上層木タイプ	6.16	0.10	4.40	0.22	5.34	0.15	4.01	0.26	2.67	0.45
土壌硬度横平均	6.39	0.01**	6.28	0.01**	1.43	0.23	3.11	0.08	1.66	0.20
土壌硬度縦平均	3.32	0.07	0.72	0.40	1.16	0.28	2.88	0.09	0.61	0.44
細土容積量	0.62	0.43	0.05	0.82	0.13	0.72	3.65	0.06	4.35	0.04*
体積含水率	0.21	0.65	0.32	0.57	4.52	0.03*	3.22	0.07	0.48	0.49
礫含有量	0.52	0.47	0.20	0.66	2.38	0.12	2.85	0.09	0.14	0.71
堆積有機物量	9.44	0.00**	0.34	0.56	2.70	0.10	2.96	0.09	0.04	0.84
上層木本数	0.86	0.35	1.79	0.18	3.33	0.07	3.05	0.08	1.43	0.23
中層木本数	3.14	0.08	3.65	0.06	2.08	0.15	3.21	0.07	0.55	0.46
下層木本数	4.89	0.03*	5.05	0.03*	2.89	0.09	2.96	0.09	1.07	0.30
道本数	5.34	0.02*	0.08	0.78	1.87	0.17	3.16	0.08	0.07	0.80
斜度	5.24	0.02*	1.84	0.18	1.04	0.31	2.09	0.15	2.03	0.16

*ただし、2月から3月は撮影総数が少なく、モデルは作成できなかった。

Table 5. 調査地内で採取されたイノシシの糞の内容物

No.	採取年月日	単子葉	双子葉	堅果類	種子/果実	根/根茎	樹皮	動物	その他
1	2018.03.07	++				++			+
2	2018.12.20		++	+			+		
3	2018.12.20		++				+		
4	2018.12.22	++		++					
5	2019.03.01	++					+		
6	2019.03.01	++							
7	2019.03.01	++		+					
8	2019.03.01	++							
9	2019.03.26						++		
10	2019.04.15			+				+	
11	2019.06.03	++						+	
12	2019.06.03	++				++		+	
13	2019.06.11	++			++			+	+
14	2019.06.11	++			++				+
15	2019.06.11	++			++				+
16	2019.07.17	++				++		+	
17	2019.07.22				+	++		+	
18	2019.07.22	++				++		+	
19	2019.07.22	++				++			
20	2019.07.22	++				++		+	
21	2019.07.22	++				++		+	
22	2019.07.24					++		+	
23	2019.08.08	++				++		+	
24	2019.08.08	++				++		+	
25	2019.11.05		++	++	+	+		+	

++は体積で半分以上存在することを示し、+はそれ以下であったことを示す。

解析

イノシシの採食頻度に影響を及ぼす環境要因を検出するため、一般化線形モデルを用いて解析を行った。イノシシの食物は季節変化することが知られているため、2ヶ月ごとに採食頻度を集計し目的変数とした。また、Table2の13項目、すなわち質的2変数を因子とし、量的11変数を共変数として解析を行った。過分散を解消させるために、モデルは負の二項分布とし、リンク関数として対数を用いた。統計解析はSPSS ver. 25によって行った。

3. 結果

2018年7月から2019年8月(延べ10697カメラ日)に撮影された30台のビデオカメラの全データ19598件のうち、野生動物が確認された6606件を用いて解析を行った。撮影された動物種は、ニホンザル (*Macaca fuscata*)、ニホンリス (*Sciurus lis*)、アカネズミ (*Apodemus speciosus*)、ニホンノウサギ (*Lepus brachyurus*)、タヌキ (*Nyctereutes procyonoides*)、ツキノワグマ (*U. thibetanus*)、キツネ (*Vulpes vulpes*)、テン (*Martes melampus*)、ニホンアナグマ (*Meles anakuma*)、イノシシ、ニホンジカ、外来種のアラグマ (*Procyon lotor*)、ハクビシン (*Paguma larvata*)、そして飼育由来のネコ (*Felis catus*)、及びイヌ (*Canis lupus familiaris*)であった。もっとも撮影頻度が高かったのはイノシシで、撮影数は3254件であり、全体の50.6%を占めた。イノシシは全てのカメラ地点で撮影されたが、その撮影頻度は最少では0.012回/日から最多では0.676回/日と、カメラ地点によって差がみられた。

ビデオカメラ30台全て設置が終了した2018年8月1日から2019年7月31日までの1年間のデータを用いて毎月の行動頻度を図示した (Fig. 2)。イノシシの撮影頻度は、6月から増加しはじめ、9月から11月に最も多く、1月から3月の冬季に少ない傾向がみられた (Fig. 2)。各行動頻度は、移動が1664件 (53.9%)で最も多く、次いで採食が1193件 (38.6%)、メンテナンス行動が147件 (4.8%)、飲水行動は6件 (0.2%)、静止は11件 (0.4%)、社会行動(親和)が55件 (1.8%)、社会行動(攻撃・闘争)は13件 (0.4%)であった。移動と採食が撮影された行動のほとんど (92.5%)を占め、本種が活動時間の多くを移動と採食に費やしていることが明らかになった。採食行動の撮影頻度は季節変化が顕著で、11月は最も多く、1月から3月は著しく低かった。社会行動のうち親和的な行動は、子育て期間にあたる6月から11月に観察された。ヌタ場での泥浴びや体を木にこすりつけるメンテナンス行動は、季節を問わず一定頻度で確認された。

測定された13の環境変数の平均値及び範囲をTable 2にまとめた。また量的変数の間での相関関係はTable 3にまとめた。本調査地では、土壌硬度の横平均値と縦平均値は高い相関があった。礫含有量が高いほど土壌硬度の縦平均値は高くなった。また、細土容積量が多いほど土壌硬度の横平均値が高くなった。体積含水率が高い沢沿い

の環境は礫含有量や堆積有機物量が少ない傾向があった。また沢沿いではケモノ道本数が多く、上層本数が少ない傾向があった。斜度が高い地点ほど下層本数が多い傾向があった。ただし、共線性の尺度であるVIFの値は最大3.58であったため、環境変数間の多重共線性は顕著ではなかった。そのため、全変数を用いて以下の解析を行った。

採食行動が各時期にどの地点で多く認められるのかを明らかにするために、2ヶ月ごとの採食行動の頻度を図示した (Fig. 3)。採食行動が行われる地点は、季節ごとに異なり、1年間を通すと調査地域全域を利用していた。しかし、2月から3月の撮影頻度は特に低かった。一般化線形モデルによる解析では、採食行動の撮影頻度が低い2月から3月を除く5期間で有意なモデルが作成された。季節ごとに目的変数である採食行動に効果を持つ環境変数は異なった (Table 4)。8月から9月の採食頻度は堆積有機物量が多く、土壌硬度横平均値が低い地点に多い傾向があった。10月から11月でも土壌硬度横平均値が低い環境ほど多くの採食行動が見られた。12月から1月には含水率が高い環境がやや好まれた。4月から5月には採食行動を説明する効果が高い変数は抽出されなかった。6月から7月では、細土容積量が少ない土壌環境で採食頻度は高かった。いずれの季節においても採食行動の頻度に影響する要因として、植生環境よりも土壌環境の効果が主に抽出された。

ビデオ映像から採食物が確認できたのは55件のみ (全体の4.6%)であり、その内訳は2018年11月の *Quercus* 属の堅果類が24件、2019年1月のアラカシ (*Q. glauca*)の葉が3件、2019年4月のモウソウチク (*Phyllostachys edulis*)のタケノコが10件、2019年5月のミゾソバ (*Polygonum thunbergii*)の葉が3件、2019年6月ドクダミ (*Houttuynia cordata*)の根が13件、2019年6月のミミズ綱 (*Oligochaeta*)が2件であった (Photos 1, 2, 3, 4)。ほとんどの映像で、地面を鼻で掘り返す探索行動を行っているが、何を食べているのか識別できなかった。

調査期間中に合計25個のイノシシの糞を採取し、内容を8項目に分けて示した (Table 5)。いずれの季節においてもアズマネザサ (*Pleiblastus chino*)などを含む単子葉植物と根茎が含まれた。単子葉植物の中には、未消化な状態で糞に多量に含まれていることもあった (Photo 5)。また、11月から12月には常緑広葉樹の葉が含まれていた。カシ類の堅果は11月から4月まで長期間含まれた。堅果類以外の種子として、6月にヤマグワ (*Morus australis*)の種子、7月にサルナシ (*Actinidia arguta*)の種子と果皮が確認された。昆虫類は量的に多くはないが、春から秋にかけて頻繁に含まれた。動物質の食物として、鳥類(種不明)の卵殻と骨の一部、エンマコガネ類 (*Onthophagus* sp.) やオサムシ科 (*Carabidae*)の脚部や鞘翅の一部が確認された。多くの昆虫類は細かく破碎され、同定の決め手となる部位が欠損していたため、種の同定はできな

った。イノシシの外皮に寄生するタカサゴキラマダニ (*Amblyomma testudinarium*) (グルーミング時に意図的あるいは非意図的に飲み込まれたもの) が検出された。その他として、人工物由来のウレタン材が含まれた。

4. 考察

本調査地では現在、イノシシは総撮影件数の50%を越え、もっとも多く撮影される哺乳類であった。同じ調査地で行われた2005年の調査では、タヌキ (38%)、ハクビシン (28%)、アナグマ (19%) の撮影頻度が高く、イノシシの撮影は稀 (2%) であったが、2012年にはイノシシが全体の32%を占めるに至った (田村・園田 2014)。東京都での近年の状況と同様 (東京都産業労働局 2016)、本調査地である八王子市西部でも短い期間のうちにイノシシが増加したことがうかがえる。

また、調査地内での撮影頻度は夏から秋に多く、冬に少ない傾向があった。イノシシは基本的に年に1回繁殖を行い、出産のピークは5~6月ごろである (江口 2008)。本研究でも5月初旬に小さい幼獣を連れたメス成獣が初めて確認されているため、出産期は4月下旬頃と考えられる。夏から秋にかけて、幼獣の成長に伴い、多くの個体が活発に動き回ることによって撮影頻度が上がった可能性がある。また、イノシシの行動圏のサイズは地域によって62 ha ~ 4830 ha と大きな差があり (Garza et al. 2018)、同一地域でも季節変化し、餌量や生息密度の影響を受けることが知られている (Massei et al. 1997a, Keuling et al. 2008)。本調査地は約56 haなので、イノシシの行動圏は調査地外にも及んでいると考えられる。特に冬季に撮影頻度が著しく低くなった理由として、活動場所が季節変化し、調査範囲外にシフトしたためと考えられる。イノシシの活動場所あるいはコアエリアが季節変化する事例は、国内外でよく知られている (本田ら 2008, Thurfjell et al. 2009, Morelle and Lejeune 2015, Amendolia et al. 2019)。地中海地域では、夏季の干ばつ時に森林の土壌が固くなるため、イノシシが地面を掘って食物を探索する行動が減少する (Massei et al. 1997b)。そのため、森林内で食物が獲得しにくくなる夏季に食物を求めて市街地への進出が生じると考えられている (Cahill et al. 2003)。

イノシシでは撮影された映像の大半を採食と移動が占めていた。特に、イノシシ独特の鼻先で地面を掘りながら探索する行動がどの季節でも多く見られ、イノシシの活動時間の多くがこうした探索型採餌行動であることが示唆された。特に春から秋にかけての採食行動は土壌が柔らかい場所をより好んで利用する傾向があった。静岡県茶園では、イノシシの掘り返した横の土は掘り返されていない場所の平均約2倍の土壌動物が含まれていた (石川 2017) とあり、土壌動物の有無がイノシシの採食行動に影響している可能性があった。同研究では被害の大きい冬季と夏季にはミミズ類と甲虫類の幼虫が多く、イノシシはこれらの動物を食べていると推察された。本調

査において、糞内容物の調査ではミミズ類は検出できなかったが、動画ではミミズ類を食べている事例が確認された。また、甲虫類の幼虫は糞では検出されなかったが、甲虫類の成虫は糞内容物として比較的頻繁に検出された。ミミズ類や幼虫類は、未消化物が糞の中に残りにくいため、糞内容物から採食状況は検出できなかった。このようにミミズ類など消化率が高い食物利用を過小評価しがちであることは、イノシシの糞による調査 (上田ら 2008) だけではなく、胃内容物調査でも (小寺・神崎 2001) 指摘されている。奥ら (2020) は、群馬県の丘陵地帯において捕獲されたイノシシの腸内容物をDNAバーコーディングによって解析し、従来同定が難しかった草本類や動物質の属レベルあるいは種レベルでの判定を可能にした。今後、こうした新たな解析方法により、イノシシの食物利用状況がより詳細に明らかになることが期待される。

本調査地でイノシシが採食行動を頻繁に行った土壌が柔らかい場所では、細土容積量や礫含有量が低い傾向があった。細土容積量が少ないということは団粒状構造が発達している土壌であることを意味し、粗大な孔隙が多く、透水性が高く、植物が根を張りやすい柔らかい土壌環境であることを示唆している (小野 2001)。また、こうした団粒状構造の形成にはミミズ類など土壌動物が関わっていることが知られている (成岡・川田 2001)。したがって、イノシシは根茎やミミズ類などを探索する際、土壌硬度が低い環境を利用することで、採食効率を上げていると考えられる。ビデオカメラにはイノシシが探索を行い、その行動によって土壌が耕耘される様子がしばしば記録された。イノシシが土壌硬度の低い環境を採食場所として選択していると同時に、イノシシが採食を頻繁に行うことにより、土壌硬度が低くなる可能性も考えられる。イノシシによる生態系への肯定的あるいは否定的な影響として、たとえば土壌特性や埋土種子の変化が報告されている (Welander 2006, Sandom et al. 2013, Burrascano et al. 2015)。日本の市街地周辺でもイノシシの個体数が増加するにつれ、生態系への影響が顕在化する可能性が示唆される。

採食頻度に影響する要因は季節ごとに異なった。これは、イノシシが季節ごとに採食物を変化させているからだと考えられる。小寺ら (2013) によると、各月の第一優占項目は4月が単子葉植物、5~6月がタケ類、7~9月が双子葉植物、10~12月が塊茎、1~3月が繊維質であり、季節ごとに利用しやすい資源を利用している傾向が見られた。本調査地でも、4~5月に採食行動が集中する地点は竹林であり、実際にタケノコを食べる映像が得られた。また、10~11月および11~12月に集中した地点はシラカシが優占する林であり、実際11月には地面に多量に落ちている堅果類を食べている映像が得られた。また、この時期の糞内容物から多量の堅果類が確認された。それ以外の時期は、いくつかの集中地点はあるが、採食行動は調査地全域にわたっていた。糞分析からも、同一の糞から昆虫

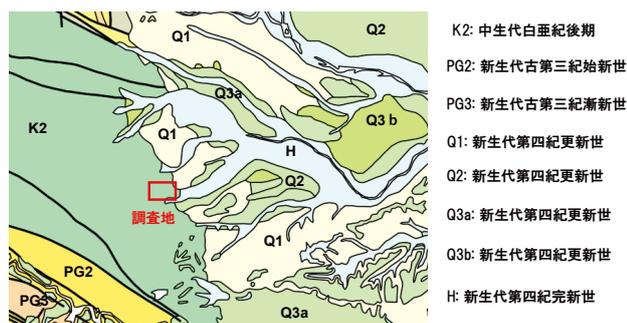


Fig. 4. 東京都八王子市周辺の地質
(産業技術総合研究所地質調査総合センター 20 万分の 1 日本シームレス地質図 2019 年 6 月 5 日版を元に作成)

類、果実、葉、根茎などが確認されており、地面を掘りながら行う探索型の採食行動と一致した結果となった。

本調査地では採食行動の頻度に影響する環境要因として植生環境に関する変数が選択されなかった。イノシシは雑食性ではあるが堅果類に依存する傾向が強いため、国内外で広葉樹林を選択的に利用するという報告が多い (Abaigar et al. 1994, 小寺ら 2001, Cahill and Llimona 2004 など)。これらの既存研究が広域スケールの解析であったのに対し、本研究で対象とした森林は各植生タイプが小面積でモザイク状に分布するため、全体としては多様な植生が混交した森林となっていた。また、イノシシが好んで利用する堅果類 (コナラ, アラカシ, シラカシ) はいずれも、調査地全域で頻繁に出現する種である。単子葉草本類は草地のみならず林縁や道脇に多く生育していた。したがって、今回の調査スケールの中では、植生変数は地点ごとの差が不明瞭であり、そのため、植生に関する変数が抽出されにくかったと考えられる。

本調査地のイノシシは主に春から秋にかけて、モザイク状に混在する多様な植生環境を季節に応じて利用することで、多様な餌を得ていると考えられた。また、イノシシの採食様式は歩き回って嗅覚で探知する探索型であるため、効率的な採食を行うためには土壌環境の選択は重要であることが明らかになった。イノシシが好む柔らかい土壌環境や多様な植生環境は、市街地から離れた造林地よりも市街地に近い森林林縁部に多く存在する可能性がある。特に、本研究を行った東京都八王子市周辺では、西側山林はスギやヒノキなどの針葉樹の造林地が多く、また関東ローム層を母材とする厚く軟らかい土壌をもつ東側の緩やかな丘陵地に比べて西側山林の土壌は硬い傾向がある (Fig. 4, 産業技術総合研究所地質調査総合センター 2019)。したがって市街地に隣接する森林は、イノシシの生息拠点となる好適な採食場所を備える可能性があることが示唆された。しかし、採食場所としてほとんど利用されなかった冬季には、市街地へ進出する個体も出てくるかもしれない。今後、より広域スケールで市街地周辺のイノシシの行動を解析する必要がある。また、市街地周辺の森林では、土壌環境などの情報をもとに

スクを事前に予測し、個体数管理の強化や環境整備、防護柵設置などの対策を早期に実施するべきである。

謝辞

本研究は森林総合研究所交付金プロジェクト「都市近郊における獣害防除システムの開発 (H30~R2)」の成果の一部である。昆虫類、ダニ類の同定は森林総合研究所多摩森林科学園の井上大成氏に、植物の同定は森廣信子氏にご協力いただいた。

引用文献

- Abaigar, T., Del Barrio, G. and Vericad, J. R. (1994) Habitat preference of wild boar (*Sus scrofa* L. 1758) in a Mediterranean environment. Indirect evaluation by signs. *Mammalia*, 58(2), 201-210.
- Amendolia, S., Lombardini, M., Pierucci, P. and Meriggi, A. (2019) Seasonal spatial ecology of the wild boar in a peri-urban area. *Mammal Research*, 64(3), 387-396.
- 姉崎 智子・坂庭 浩之・小野里 光・戸塚 正幸・中嶋 薫・竹内 忠義・富田 公則・木滑 大介 (2009) 群馬県におけるイノシシの分布拡大と繁殖状況. 群馬県立自然史博物館研究報告, 13, 119-128.
- 朝日 稔 (1975) 狩猟期におけるイノシシの胃内容. 哺乳動物学雑誌, 6(3), 115-120.
- Adams, C. E. (2016) *Urban Wildlife Management 3rd*. CRC Press, Boca Raton, London, and New York. 569pp.
- Burrascano, S., Giarrizzo, E., Bonacquisti, S., Copiz, R., Del Vico, E., Fagiani, S., Mortelliti, A. and Blasi, C. (2015) Quantifying *Sus scrofa* rooting effects on the understorey of the deciduous broadleaf forests in Castelporziano Estate (Italy). *Rendiconti Lincei*, 26(3), 317-324.
- Cahill, S. E. A. N. and Llimona, F. (2004) Demographics of a wild boar *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 population in a metropolitan park in Barcelona. *Galemys*, 16(special issue), 37-52.
- Cahill, S., Llimona, F. and Gràcia, J. (2003) Spacing and nocturnal activity of wild boar *Sus scrofa* in a Mediterranean metropolitan park. *Wildlife Biology*, 9(4), 3-13.
- Castillo-Contreras, R., Carvalho, J., Serrano, E., Mentaberre, G., Fernández-Aguilar, X., Colom, A. and López-Olvera, J. R. (2018) Urban wild boars prefer fragmented areas with food resources near natural corridors. *Science of the Total Environment*, 615, 282-288.
- 江口 祐輔 (2008) 農作物被害—ニホンイノシシ. 高槻 成規・山極 寿一 編. “日本の哺乳類学 第2巻 中大型哺乳類・霊長類”. 東京大学出版会, 東京, 400-420.
- 江成 広斗・角田 裕志 (2017) 人口減少時代における

- 野生生物問題—序論—. 野生生物と社会, 5(1), 1-3.
- 布施 綾子 (2011) イノシシ餌付け禁止条例施行前後におけるイノシシ出没状況の変化と住民意識. システム農学, 27(2), 55-62.
- Garza, S. J., Tabak, M. A., Miller, R. S., Farnsworth, M. L. and Burdett, C. L. (2018) Abiotic and biotic influences on home-range size of wild pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Mammalogy*, 99(1), 97-107.
- 平田 滋樹・小寺 祐二 (2013) イノシシ管理の現状と最近の研究成果 その2. 哺乳類科学, 53(1), 158-160.
- 平田 滋樹・小寺 祐二・西 信介・姉崎 智子・坂庭 浩之・坂田 宏志 (2009) イノシシ管理の現状と最近の研究成果. 哺乳類科学, 49(1), 155-156.
- 本田 剛・林 雄一・佐藤 喜和 (2008) 林縁周辺で捕獲されたイノシシの環境選択. 哺乳類科学, 48(1), 11-16.
- 一般社団法人日本森林技術協会 (2019) 平成30年度シカ個体群動態等調査委託報告書. 一般社団法人日本森林技術協会, 東京都, 52pp.
- 一般社団法人日本森林技術協会 (2020) 平成31年度シカ個体群動態等調査委託報告書. 一般社団法人日本森林技術協会, 東京都, 60pp.
- 石川 圭介 (2017) イノシシによる茶園の掘り返し被害と土壌動物の関係に関する予備的調査. 静岡県農林技術研究所研究報告, 10, 73-77.
- 勝木 俊雄・大中 みちる・別所 康次・岩本 宏二郎・石井 幸夫・島田 和則 (2010) 森林総合研究所多摩森林科学園の野生植物. 森林総合研究所研究報告, 99(44), 207-225.
- 金森 弘樹 (2013) イノシシの被害と管理. 特集 森林と獣害. 森林科学, 39, 13-20.
- 環境省 (2015) 平成27年4月28日 改正鳥獣法に基づく指定管理鳥獣捕獲等事業の推進に向けたニホンジカ及びイノシシの生息状況等緊急調査事業の結果について. <http://www.env.go.jp/press/100922>. (参照2019-12-25).
- Kanzaki, N. and Ohtsuka, E. (1991) Winter diet and reproduction of Japanese wild boars. In Maruyama, N. (ed.) "Wildlife conservation present trends and perspectives for the 21st Century". Japan Wildlife Research Center, Tokyo, 217-219.
- Keuling, O., Stier, N. and Roth, M. (2008) Annual and seasonal space use of different age classes of female wild boar *Sus scrofa* L. *European Journal of Wildlife Research*, 54(3), 403-412.
- 木場 有紀・坂口 実香・村岡 里香・小櫃 剛人・谷田 創 (2009) 広島県呉市蒲刈島におけるイノシシの食性. 哺乳類科学, 49(2), 207-215.
- Kodera, Y. (2010) *Sus scrofa* Linnaeus, 1758. In Ohdachi, S. D., Ishibashi, Y., Iwasa, M. A., Saitoh, T. and Sellers, S. B. (eds.) "The wild mammals of Japan 2nd". Shoukadoh, Kyoto, 304-305.
- 小寺 祐二・神崎 伸夫・石川 尚人・皆川 晶子 (2013) 島根県石見地方におけるイノシシ (*Sus scrofa*) の食性. 哺乳類科学, 53(2), 279-287.
- 小寺 祐二・神崎 伸夫 (2001) 島根県石見地方におけるニホンイノシシの食性および栄養状態の季節的变化. 野生生物保護, 6(2), 109-117.
- 小寺 祐二・神崎 伸夫・金子 雄司・常田 邦彦 (2001) 島根県石見地方におけるニホンイノシシの環境選択. 野生生物保護, 6(2), 119-129.
- Luniak, M. (2004) Synurbization—adaptation of animal wildlife to urban development. In Shaw, W. W., Harris, L. K. and Vandruuff, L. (eds.) "Proceedings 4th international urban wildlife symposium". University of Arizona, Tucson, 50-55.
- 松浦 友紀子 (2018) 札幌市街地周辺におけるエゾシカのスポットライトカウント調査. 森林総合研究所研究報告, 17(2), 149-154.
- 丸居 篤・藤堂 乃夫宏・岡安 崇史・後藤 貴文・衛藤 哲次・塩塚 雄二・高橋 秀之 (2014) 放牧による耕作放棄地解消がイノシシの行動に及ぼす影響. 日本暖地畜産学会報, 57(1), 17-22.
- Massei, G., Genov, P. V., Staines, B. W. and Gorman, M. L. (1997a). Factors influencing home range and activity of wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean coastal area. *Journal of Zoology*, 242(3), 411-423.
- Massei, G., Genov, P. V., Staines, B. W. and Gorman, M. L. (1997b). Mortality of wild boar, *Sus scrofa*, in a Mediterranean area in relation to sex and age. *Journal of Zoology*, 242(2), 394-400.
- Morelle, K. and Lejeune, P. (2015). Seasonal variations of wild boar *Sus scrofa* distribution in agricultural landscapes: a species distribution modelling approach. *European Journal of Wildlife Research*, 61(1), 45-56.
- 成岡 市・川田 日出夫 (2001) 関東ローム表土においてミミズが形成した粗孔隙および団粒について. 農業土木学会論文集, 2001(213), 377-384.
- 日本経済新聞 (2019) イノシシ、都会へ猛進? 街中で相次ぎ出没, けが人も. <https://www.nikkei.com/article/DGXMZO53155290Q9A211C1CE0000>, (参照2020-12-10).
- 日テレ (2020) News24. また都内にイノシシ, 八王子に出没 逃走中. <https://www.news24.jp/articles/2019/12/10/07559448.html>, (参照2020-01-22).
- 奥 浩之・山路 稔・片山 豪 (2020) 群馬県太田市八王子丘陵・金山丘陵に生息するニホンイノシシ (*Sus scrofa leucomystax*) の腸内容物を用いた DNA メタバーコーディングによる食性解析. 群馬県立自然誌博物館研究報告, 24, 71-80.

- 小野 裕 (2001) 森林土壌における団粒の発達が生土壌物性に及ぼす影響. 日本林學會誌, 83(2), 116-124.
- Sandom, C. J., Hughes, J. and Macdonald, D. W. (2013) Rooting for rewilding: quantifying wild boar's *Sus scrofa* rooting rate in the Scottish Highlands. *Restoration Ecology*, 21(3), 329-335.
- 産業技術総合研究所地質調査総合センター (2019) 20万分の1日本シームレス地質図 2019年6月5日版. 産業技術総合研究所地質調査総合センター, (参照2020-01-22).
- 森林立地調査法編集委員会 (2010) 改訂版 森林立地調査法. 博友社, 東京, 284pp.
- Stillfried, M., Fickel, J., Börner, K., Wittstatt, U., Heddergott, M., Ortmann, S. and Frantz, A. C. (2017). Do cities represent sources, sinks or isolated islands for urban wild boar population structure?. *Journal of Applied Ecology*, 54(1), 272-281.
- 高橋 春成 (2010) イノシシ問題に対する産学官の取り組みと地域社会. *地理科学*, 65, 183-193.
- 立木 靖之 (2015) 市街地に出没するヒグマ・エゾシカの状況と対応. *森林野生動物研究会誌*, 40, 41-44.
- 高山 夏鈴・竹下 実生・田村 典子・小泉 透・山崎晃司 (2019) シカ防護柵の設置が各種哺乳類の移動に与える影響. *森林防疫*, 68(5), 137-144.
- 田村 典子・園田 陽一 (2014) 東京都西部の都市近郊林における哺乳類相の急速な変化. *森林防疫*, 63(2), 15-18.
- 田村 典子・竹下 実生・高山 夏鈴・岡 輝樹・小泉 透 (2018) 都市近郊林におけるシカ・イノシシ侵入防止柵の設置効果と維持管理作業の1事例. *森林防疫*, 67(5), 153-161.
- TBS (2019) Nスタ: 東京・足立区にイノシシ出没, 警視庁も出動 <https://www.youtube.com/watch?v=ZHvqUafKwAI>, (参照2020-12-10).
- Thurfjell, H., Ball, J. P., Åhlén, P. A., Kornacher, P., Dettki, H. and Sjöberg, K. (2009). Habitat use and spatial patterns of wild boar *Sus scrofa* (L.): agricultural fields and edges. *European Journal of Wildlife Research*, 55(5), 517-523.
- 東京都環境局 (2017) 第5期東京都第二種シカ管理計画. https://www.kankyo.metro.tokyo.lg.jp/basic/plan/nature/deer_protection.files/5th_deer_plan.pdf, 45pp.
- 東京都産業労働局 (2016) 第4次東京都農林業獣害対策基本計画. https://www.agri.metro.tokyo.lg.jp/files/jyugai/H28jyuugai_kihon.pdf, 38pp.
- Toger, M., Benenson, I., Wang, Y., Malkinson, D. and Czamanski, D. (2016). Pigs in space: an agent-based model of the penetration of wild boars into cities. https://www.academia.edu/28814735/Pigs_in_space_an_agent-based_model_of_the_penetration_of_wild_boars_into_cities, (accessed 2020-11-18).
- 豊田 武司・谷本 丈夫 (2000) 多摩森林科学園(旧浅川実験林)における森林遷移. *森林総合研究所研究報告*, 377, 1-60.
- 辻 知香・横山 真弓 (2014) 六甲山イノシシ問題の現状と課題. *兵庫ワイルドライフモノグラフ*, 6, 121-134.
- 角田 裕志 (2019) 人口減少が進んだ社会に適應可能な野生動物管理を模索する. *日本生態学会誌*, 69(1), 37-44.
- 角田 裕志・大橋 春香・齊藤 正恵・堀江 玲子・野場 啓・小池 伸介・梶 光一 (2014) 栃木県佐野市新合地区および氷室地区におけるイノシシの採餌環境. *野生生物と社会*, 1(2), 61-70.
- 上田 弘則・姜 兆文 (2004) 山梨県におけるイノシシの果樹園・放棄果樹園の利用. *哺乳類科学*, 44(1), 25-33.
- 上田 弘則・高橋 佳孝・井上 雅央 (2008) 冬期の寒地型牧草地はイノシシ (*Sus scrofa* L.) の餌場となる. *日本草地学会誌*, 54(3), 244-248.
- Welander, J. (2000). Spatial and temporal dynamics of wild boar (*Sus scrofa*) rooting in a mosaic landscape. *Journal of Zoology*, 252(2), 263-271.
- 横山 真弓 (2016) 六甲山におけるイノシシ管理の現状と課題. *兵庫ワイルドライフモノグラフ*, 8, 41-49.

Soil characteristics of feeding sites in wild boar (*Sus scrofa*) inhabiting sub-urban forest

Noriko HAYASHI^{1)*}, Karin TAKAYAMA²⁾, Shuichiroh YOSHINAGA¹⁾ and Tohru KOIZUMI¹⁾

Abstract

In recent years, middle and large-sized wild mammals have become inhabited near the urban areas. By clarifying habitat use in the forests around the city, which is the stage before they appear in the city, it is possible to take efficient measures in advance. In the present study, we investigated what environments are used as feeding places by the wild boars in sub-urban forests. Video images were recorded at 30 sensor camera points for one year, and environmental surveys on soil and vegetation were also conducted at each point. The generalized linear model (GLM) was performed with the frequency of the feeding behavior taken as the objective variable and 13 environmental variables such as vegetation and soil characteristics as explanatory variables. As a result, it was confirmed that wild boar tended to forage more often in soft soils from spring to autumn. However, omnivorous wild boar tended to change the feeding places according to the season. At the foothill forest adjacent to the urban areas, the number of wild boars will increase due to the favorable soil environment for them to forage. In sub-urban forests, it is necessary to predict the risk of wild boar invasion in the city in advance based on the soil environment, and to implement measures such as population management, environmental improvement, and installation of fences at an early stage.

Key words : soil hardness, feeding behavior, vegetation, sub-urban

Received 8 October 2020, Accepted 26 February 2021

1) Tama Forest Science Garden, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Department of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture

* Tama Forest Science Garden, FFPRI, 1833-81 Todorii, Hachioji, Tokyo 193-0843 JAPAN; E-mail haya@ffpri.affrc.go.jp

論文 (Original article)

高知県のヒノキ人工林において間伐が葉量と幹現存量の生産速度に及ぼす影響

稲垣 善之^{1)*}、中西 麻美²⁾、深田 英久^{3),4)}、渡辺 直史³⁾

要旨

高知県の標高の異なる3地域のヒノキ林において、幹現存量間伐率の異なる調査区を合計10カ所設定し、間伐後10年間の葉量と幹現存量の生産速度を明らかにした。葉量はパイプモデルに基づく簡易手法で推定した。幹現存量間伐率が大きいほど林分葉量の増加率は大きい傾向を示し、林分葉量の増加率は低標高の林分で大きかった。対数変換した葉量と幹現存量生産速度について、地域ごとに異なる直線で回帰することができた。直線の傾きは高標高で1.066、低標高の2地域で0.638~0.661であった。これらの関係から幹現存量間伐率に対する葉生産効率(葉量あたりの幹現存量生産速度)の変化を予測した。葉生産効率は、低標高の林分では幹現存量間伐率が大きいほど増加するが、高標高の林分では増加しなかった。間伐による幹現存量生産速度の増加を葉量増加による効果と葉生産効率向上による効果に区分して評価した。葉量の効果はどちらの地域でも幹現存量間伐率が中程度で大きくなったが、葉生産効率の効果は低標高の幹現存量間伐率の大きい林分で大きかった。以上の結果より、葉生産効率は地域による間伐影響の違いを評価するうえで有効な指標であることが示された。

キーワード：葉生産効率、ヒノキ、葉量、幹現存量生産速度、間伐

1. はじめに

ヒノキは日本の代表的な造林樹種である。ヒノキ人工林における間伐は個体あたりの幹現存量の生産速度(SBP)を促進し、良好な形質の材を生産するために必要である(安藤 1982)。ヒノキやスギの人工林では間伐強度が大きいほど林分面積あたりのSBPは低下する(深田 2006, Seiwa et al. 2012, 細田ら 2012)。しかし、環境条件が異なる地域における間伐影響については情報が少なく、間伐後のSBPを規制するメカニズムは未解明である。

森林のSBPを評価する指標として葉生産効率(Foliage efficiency)がある。これは葉現存量または葉面積当たりのSBPを示し、林分の生理特性を評価する上で重要な指標である(Tadaki 1966, 佐藤 1973, Waring 1983)。葉生産効率は針葉樹で落葉樹広葉樹より小さい傾向や(Tadaki 1966, 佐藤 1973, Reich et al. 1995)、林齢の増加に伴って低下する傾向が報告され(四大学合同調査班 1966)、主要な森林における葉生産効率の変化が明らかになった。しかし、間伐が葉生産効率に及ぼす影響についての研究は少ない(Brix 1983, Binkley and Reid 1984, Mitchell et al. 1996, Gspaltl et al. 2013)。その理由の一つとして、常緑樹においては葉量の推定が困難であることがあげられる。一般的に葉量は、伐倒した個体から得られたアロメトリー

式を用いて推定されるが、間伐によるアロメトリー式の変化を伐倒調査で明らかにすることは労力的に困難である。また、成長錘を用いて辺材の面積を測定し、葉面積を推定する方法(Binkley and Reid 1984)があるが、この手法も労力を要する。これらの状況から、環境条件の異なる林分における間伐後の葉生産効率については情報が少ない。ヒノキについては間伐後の葉量の変化についてはいくつかの報告があるものの(宮本ら 2009, Han et al. 2014, 稲垣ら 2018)、葉生産効率に関する情報はほとんどない。

林分葉量を推定する際の困難性は、近年提案された簡易葉量推定手法で低減された(稲垣ら 2015, Inagaki et al. 2020)。この手法は生枝下高における幹の断面積(生枝下幹面積)と葉量に比例関係が認められるという樹形のパイプモデル理論に基づくものである(Shinozaki et al. 1964a, 1964b)。生枝下幹面積と葉量の比例関係は、スギ(四大学合同調査班 1966, Inagaki et al. 2020)やヒノキ(Hagihara et al. 1993, Ogawa et al. 2010, 稲垣ら 2015, Sumida et al. 2018)で成り立つ。また、生枝下幹面積は、樹高、枝下高、胸高直径から推定できるため(Sumida et al. 2009)、簡易な計測で林分葉量を推定することが可能である(稲垣ら 2015, Inagaki et al. 2020)。この簡易手法を用いて多様な環境条件に分布するヒノキ林について適用することで、間伐が

原稿受付：令和2年10月12日 原稿受理：令和3年3月1日

1) 森林総合研究所 四国支所

2) 京都大学フィールド科学教育研究センター

3) 高知県立森林技術センター

4) 高知県中山間振興・交通部

* 森林総合研究所 四国支所 〒780-8077 高知県高知市朝倉西町 2-915

葉生産効率に及ぼす影響を明らかにすることが可能になる。

本研究では、高知県の標高の異なる地域において間伐試験を実施し、間伐後の10年間の葉量とSBPの関係から、間伐に対する葉の生産効率の変化を明らかにした。また、間伐後のSBPの増加について、葉量の増加による効果と葉生産効率の向上による効果に区分してそれぞれの寄与を評価した。これらの結果より標高の異なるヒノキ林において間伐が葉生産効率に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

1) 調査地

高知県の四万十川流域に位置する津野町の3つの地域(天狗、旧宮、太夫畑)のヒノキ林を対象とした。試験地の概要をTable 1.に示す。天狗(33°28′N、133°00′E)、旧宮(33°26′N、133°10′E)、太夫畑(33°23′N、133°1′E)はそれぞれ標高1150~1280 m、710 m、500~550 mに位置する。国土数値情報の1kmメッシュから求めた年平均気温(MAT)は天狗、旧宮、太夫畑でそれぞれ9.1~9.9℃、12.4℃、13.3~13.6℃であった。年降水量(MAP)は3地点

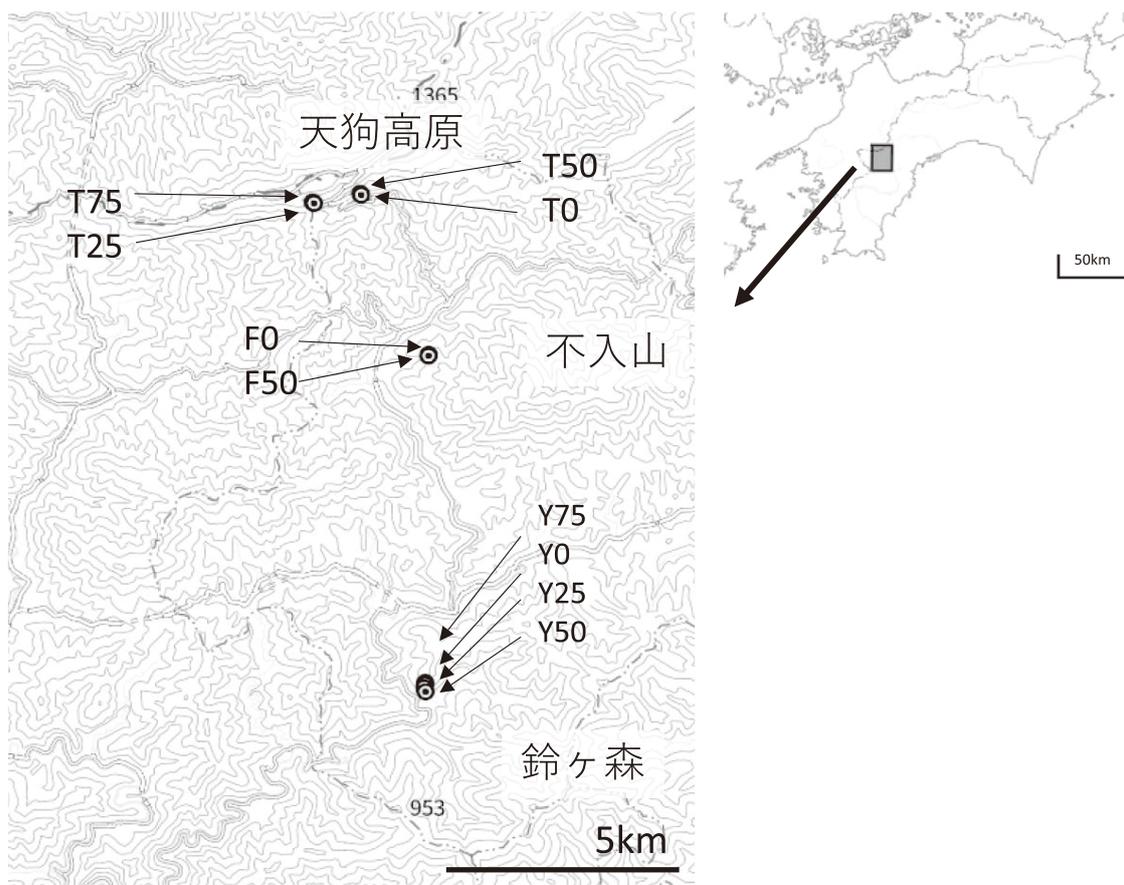


Fig. 1. 調査地の位置
Location of the study sites

Table 1. 調査地域の概要
Summary of study areas

場所 Area	標高 Altitude (m)	年平均気温 MAT (°C)	年降水量 MAP (mm)	方位 Slope direction	傾斜 Inclination (°)	土壌母材 Parent material	土壌型 Soil type
天狗 Tengu (T)	1150-1280	9.1-9.9	3140	SE-SW	30	火山灰	B _D
旧宮 Furumiya (F)	710	12.4	3270	NW	30	堆積岩	B _D
太夫畑 Tayubata (Y)	500-550	13.3-13.6	3190	SW	36-40	堆積岩	B _D

で3100 mm 以上であった。調査地の傾斜は30°~40°であった。土壌は、天狗は火山灰を母材とする黒色土 (B_{1p})、旧宮は秩父帯の堆積岩を母材とする適潤性褐色森林土 (B_p)、太夫畑では四万十帯の砂岩泥岩を母材とする適潤性褐色森林土 (B_p) であった (土じょう部 1976)。表層土壌のpHは、天狗、旧宮、太夫畑で、それぞれ4.5、4.7、5.1であり、ヒノキ生葉の窒素濃度は、それぞれ10.0 mg g⁻¹、8.5 mg g⁻¹、9.4 mg g⁻¹であった (Inagaki et al. 2011b)。天狗では土壌の有機物蓄積量が多く窒素が豊富であり、旧宮では土壌の窒素が少なかった (Inagaki et al. 2008)。太夫畑では土壌母材の違いを反映して旧宮よりもpHが高く窒素が多かった。

天狗、旧宮、太夫畑のヒノキ林を対象として合計10カ所の調査区 (20 m × 20 m) を設定した (Table 2、深田ら 2009)。間伐前 (天狗、旧宮では2002年、太夫畑では2005年) における林齢は天狗、旧宮、太夫畑でそれぞれ42年生、23年生、35年生であった。天狗では無間伐区および25%、50%、75%の間伐区 (T0、T25、T50、T75)、旧宮では無間伐区および50%間伐区 (F0、F50)、太夫畑では2005年に無間伐区および25%、50%、75%の間伐区 (Y0、Y25、Y50、Y75) を設置した。間伐率は本数間伐率を示す。すべてのサイズからまんべんなく伐採木を選んだ。天狗と旧宮では2002年、太夫畑では2005年の成長期前に間伐を実施した。収量比数は、最多密度 (ある樹高での上限の本数密度) を1としたときの相対的な混み具合を示す指標である (安藤 1982)。間伐前の収量比数は太夫畑で他の2地域よりも大きく、太夫畑では温暖な気象と好適な土

壌条件を反映してヒノキの生育が良好であり、より混み入った状態であった。

2) SBPと葉量の推定

各調査区において、間伐前と間伐10年後にヒノキの胸高直径、樹高、生枝下高を測定した。樹高と生枝下高については、超音波樹高測定器 (バーテックスIII、およびIV、ハグロフ社) を用いて測定した。樹冠長は、樹高から生枝下高を差し引いて算出した。立木幹材積表 (林野庁計画課 1970) を用いて幹の材積を算出した。幹材積に高知県のヒノキ林で推定された容積重 (0.45 g cm⁻³) (稲垣ら 2009) をかけて幹現存量を計算した。本研究では、間伐率を幹現存量間伐率として示す。この間伐率は材積間伐率と等しい。また、測定期間中の生残個体について、期間前後の幹現存量の差を測定年数で割って、幹現存量生産速度 (SBP) (Mg ha⁻¹ yr⁻¹) を算出した。

生枝下幹面積 (AB) (m²)、葉量 (LB) (kg) については、以下の式で算出した (稲垣ら 2015, Inagaki et al. 2020)。

$$AB = A_{1.3} \times (H - HB) / (H - 1.3) \quad \text{式 (1)}$$

$$LB = WL_F \times AB \quad \text{式 (2)}$$

A_{1.3}; 胸高幹面積 (m²)、H; 樹高 (m)、HB; 生枝下高 (m)、WL_F; 比例定数 (kg m⁻²)

WL_Fは、生枝下幹面積あたりの葉量を示す定数であ

Table 2. ヒノキ間伐試験地における立木密度と収量比数
Stand density and relative yield index in the study plots.

調査区	間伐時林齢	立木密度 (n/ha)			収量比数 RY index		
		間伐前 Before thinning ρ _{ini}	間伐後 After thinning ρ ₀	10年後 After 10 years ρ ₁₀	間伐前 Before thinning Ry _{ini}	間伐後 After thinning Ry ₀	10年後 After 10 years Ry ₁₀
T0	42	1025	1025	1025	0.71	0.71	0.80
T25	42	1800	1350	1275	0.79	0.73	0.81
T50	42	875	425	425	0.70	0.50	0.58
T75	42	1475	350	350	0.69	0.31	0.39
F0	23	1850	1850	1700	0.69	0.69	0.82
F50	23	1925	850	850	0.68	0.49	0.64
Y0	35	1450	1450	1425	0.83	0.83	0.88
Y25	35	1700	1275	1275	0.83	0.76	0.81
Y50	35	1525	750	750	0.81	0.64	0.70
Y75	35	1500	375	375	0.88	0.54	0.57

T, F, Y はそれぞれ天狗 (Tengu), 旧宮 (Furumiya), 太夫畑 (Tayubata)、数字は間伐率を示す。

り、地域によって異なる値を示す(稲垣ら 2015, Inagaki et al. 2020)。稲垣ら(2018)は、四国から関東のヒノキ林7地点において、MAT (°C)とWL_Fに正の直線関係が認められること示した。

$$WL_F = 62.23 \times MAT - 107.54 \quad \text{式(3)}$$

この回帰直線とMAT (Table 1) から、天狗、旧宮、太夫畑におけるWL_Fを求めるとそれぞれ、490 kg m⁻²、664 kg m⁻²、733 kg m⁻²であった。調査区内のすべての個体について葉量を推定し、これらを合計して林分葉量を推定した。天狗、旧宮の葉量については、すでに報告したが(稲垣ら 2018)、T25の値は調査データに基づいて再計算した結果を報告する。調査期間の林分あたりの平均葉量(Mg ha⁻¹)は、間伐直後の葉量と間伐10年後の葉量の平均値とした。SBPは、間伐後10年間についての測定であるためこの期間に対応する葉量としては平均葉量を用いることが適切であると考えた。葉生産効率はSBP (Mg ha⁻¹ yr⁻¹)を平均葉量で割って算出した。

3) 幹現存量間伐率に対する葉量とSBPの試算

本研究では、調査地点数が少ないが、地域ごとに行くつかの性質について得られた関係式を用いて、葉生産効率についての試算を行った。幹現存量間伐率に対する葉量増加率(平均葉量/初期葉量)の関係について直線回帰で解析した。共分散分析を実施し、地域と間伐率の交互作用と、地域の影響を解析し、回帰直線の傾きと切片が地域によって異なるかどうかを判断した。地域の影響が有意である場合には地域ごとに回帰式を作成し間伐後の平均葉量を推定した。

対数変換した平均葉量とSBPについて直線回帰で解析

した。共分散分析を実施し回帰直線の傾きと切片が地域によって異なるかどうかを解析した。地域の影響が有意である場合には地域ごとに回帰式を作成しSBPを推定した。統計解析はJMPソフトウェア(ver. 11. 0. 0. SAS Institute)を利用した。

無間伐区の葉量、幹現存量間伐率と葉量増加率の関係および平均葉量とSBPの関係を用いて、地域ごとに幹現存量間伐率に対する平均葉量、SBP、葉生産効率の変化を予測した。間伐後の幹現存量生産速度は(SBP_{thin})、基礎生産速度(SBP_{base})、残存木の葉量増加による生産速度(SBP_{lb})と葉生産効率の向上による生産速度(SBP_{effic})の3つに区分することができる(Brix 1983)。

$$SBP_{thin} = SBP_{base} + SBP_{lb} + SBP_{effic} \text{ (Mg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}) \quad \text{式(4)}$$

SBP_{base}は個体あたりの葉量と葉生産効率が対照区と等しい場合のSBPを示す。SBP_{lb}は残存個体の葉量増加に由来するSBP(葉生産効率は対照区と等しいと仮定する)、SBP_{effic}は葉生産効率の増加に由来するSBPを示す。3つの要素についてはそれぞれ以下の式で算出した。

$$SBP_{base} = SBP_{cont} \times (1 - PT/100) \quad \text{式(5)}$$

$$SBP_{lb} = SBP_{cont} \times (LB_{thin}/LB_{cont}) - SBP_{base} \quad \text{式(6)}$$

$$SBP_{effic} = SBP_{thin} - SBP_{lb} - SBP_{base} \quad \text{式(7)}$$

SBP_{cont}: 対照区の幹生産速度 (Mg ha⁻¹ yr⁻¹)、PT: 幹現存量間伐率(%), LB_{thin}: 間伐区の葉量 (Mg ha⁻¹)、LB_{cont}: 対照区の葉量 (Mg ha⁻¹)を示す。

Table 3. ヒノキ間伐試験地における樹高(H)、生枝下高(HB)、樹冠長(CL)
Mean height, height at crown base and crown length of hinoki cypress in the study plots

調査区 Plots	樹高 Mean height (m)				生枝下高 Height at crown base (m)				樹冠長 Crown length (m)				ΔCL/ ΔH
	間伐前 Before thinning H _{ini}	間伐後 After thinning H ₀	10年後 After 10 yrs H ₁₀	増加量 Increment ΔH	間伐前 Before thinning HB _{ini}	間伐後 After thinning HB ₀	10年後 After 10 yrs HB ₁₀	増加量 Increment ΔHB	間伐前 Before thinning CL _{ini}	間伐後 After thinning CL ₀	10年後 After 10 yrs CL ₁₀	増加量 Increment ΔCL	
T0	14.70	14.70	17.53	2.83	5.99	5.99	8.49	2.50	8.67	8.67	9.04	0.37	0.13
T25	13.10	13.20	16.01	2.81	5.69	5.73	7.58	1.84	7.42	7.54	8.44	0.90	0.32
T50	15.50	15.80	17.92	2.12	6.04	6.06	6.16	0.10	9.50	9.74	11.75	2.02	0.95
T75	11.80	12.10	14.13	2.03	4.22	4.48	5.24	0.76	7.50	7.66	8.89	1.23	0.61
F0	11.00	11.00	14.23	3.23	3.30	3.30	6.60	3.30	7.71	7.71	7.71	0.00	0.00
F50	11.00	10.90	14.21	3.31	3.52	3.20	5.50	2.30	7.51	7.70	8.80	1.11	0.33
Y0	15.89	15.89	17.89	2.00	8.67	8.67	10.38	1.70	7.21	7.21	7.52	0.30	0.15
Y25	14.40	14.37	16.20	1.83	7.45	7.30	8.31	1.01	6.95	7.07	7.89	0.82	0.45
Y50	14.64	15.07	16.90	1.83	6.28	6.42	7.22	0.80	8.36	8.65	9.68	1.03	0.56
Y75	17.35	17.75	18.89	1.13	9.13	9.41	9.57	0.16	8.21	8.34	9.31	0.97	0.86

調査区の略号の説明は Table 2. に示す。

Table 4. ヒノキ間伐試験地における葉量 (LB), 幹現存量 (SB) および幹生産速度 (SBP)
Leaf biomass (LB), stem biomass (SB) and stem production rate (SBP) in the study plots

調査区 Plots	葉量 Leaf biomass			幹現存量 Stem biomass							葉生産 効率	
	間伐前 Before thinning LB _{ini} (Mg ha ⁻¹)	間伐後 After thinning LB ₀ (Mg ha ⁻¹)	間伐率 Percent removal (%)	10 年後 After 10 yrs LB ₁₀ (Mg ha ⁻¹)	平均 Mean LB _{av} (Mg ha ⁻¹)	増加率 Increase ratio LB _{av} /LB ₀	間伐前 Before thinning SB _{ini} (Mg ha ⁻¹)	間伐後 After thinning SB ₀ (Mg ha ⁻¹)	間伐 率 Percent removal (%)	10 年後 After 10 yrs SB ₁₀ (Mg ha ⁻¹)	SBP (Mg ⁻¹ ha ¹ yr ⁻¹)	SBP/LB _{av} (Mg Mg ⁻¹ yr ⁻¹)
T0	16.0	16.0	0.0	16.9	16.4	1.03	159.0	159.0	0.0	224.0	6.50	0.396
T25	19.7	15.8	19.8	18.3	17.1	1.08	190.2	151.9	20.2	224.0	7.21	0.422
T50	14.9	7.8	47.7	11.3	9.5	1.22	153.6	80.3	47.7	120.9	4.06	0.426
T75	15.0	4.7	68.8	6.8	5.7	1.23	129.7	39.6	69.5	61.1	2.15	0.375
F0	16.2	16.2	0.0	18.2	17.2	1.06	85.5	85.5	0.0	156.2	7.07	0.411
F50	16.9	7.2	57.6	11.2	9.2	1.28	99.6	37.5	62.3	84.8	4.73	0.516
Y0	19.5	19.5	0.0	21.8	20.6	1.06	188.3	188.3	0.0	253.7	6.54	0.317
Y25	19.3	14.8	23.0	19.8	17.3	1.17	155.9	121.5	22.1	182.6	6.11	0.353
Y50	21.9	13.3	39.4	19.7	16.5	1.24	178.9	96.1	46.3	154.2	5.80	0.352
Y75	22.1	6.2	71.9	10.0	8.1	1.30	218.9	64.8	70.4	100.6	3.58	0.443

調査区の略号の説明は Table 2. に示す。

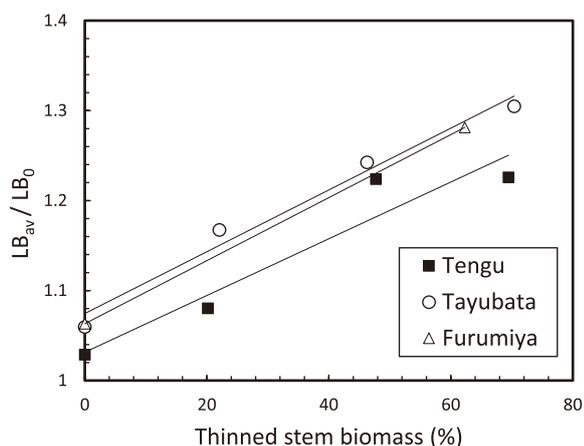


Fig. 2. 幹現存量間伐率に対する葉量増加率 (LB_{av}/LB₀) の関係
Relationship between percentage of stem removal and the ratio of leaf biomass to the initial leaf biomass (LB_{av}/LB₀).

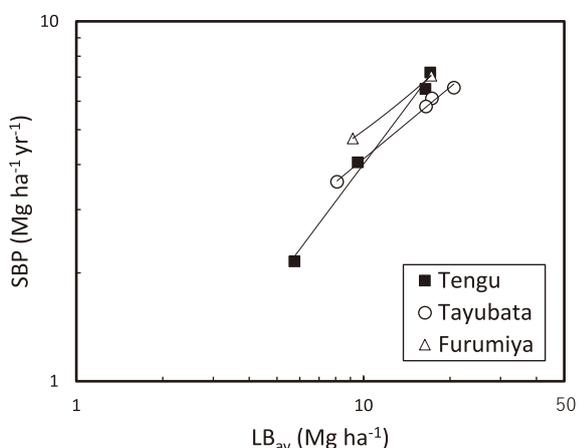


Fig. 3. 平均葉量と SBP の関係
Relationship between mean leaf biomass and SBP

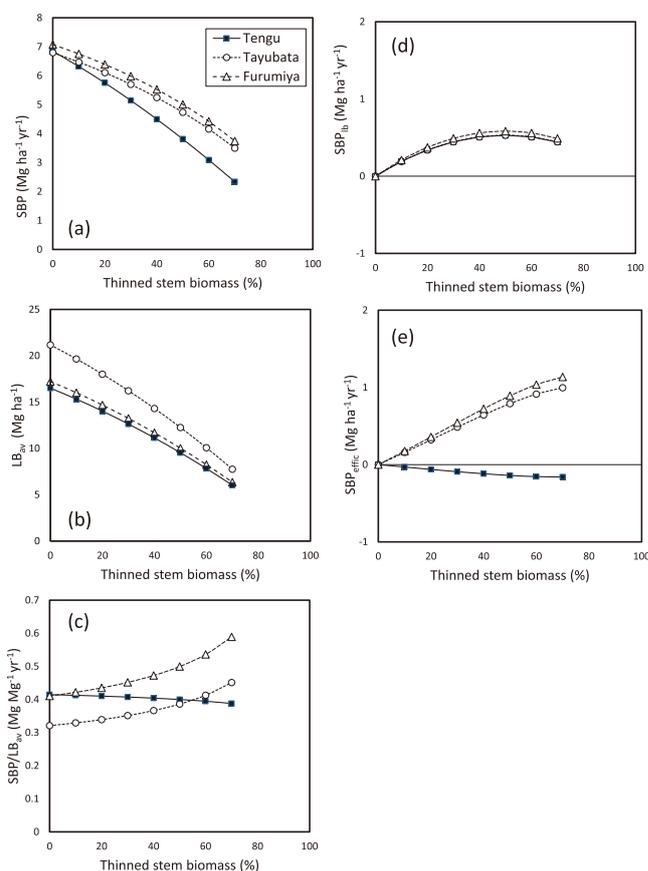


Fig. 4. 幹現存量間伐率に対する葉と幹現存量生産の諸特性
Properties of leaf and stem production in relation to the percentage of stem removal
(a) SBP, (b) 葉量 (LB_{av}), (c) 葉生産効率 (SBP/LB_{av}), (d) 幹生産増加に対する葉量効果 (SBP_{ib}), (e) 生産効率効果 (SBP_{effic})

3. 結果と考察

1) 樹冠長

樹高成長は旧宮>天狗>太夫畑の順であった (Table 3)。旧宮では林齢が若いために樹高成長が大きいと考えられた。天狗は標高が高く厳しい生育環境であるが、樹高成長は小さくなかった。天狗における土壌は火山灰を母材とする黒色土である。ここでは有機物含有量が大きく窒素無機化速度が大きい (Inagaki et al. 2008, 2011b)。ヒノキの樹高成長は葉の窒素濃度が高いほど大きい傾向が認められており (Inagaki et al. 2011a)、天狗における良好な樹高成長は窒素資源が十分であるためと考えられた。

樹高成長は強度な間伐をした調査区で小さかった。同様の傾向は本調査地を含めた数地点のヒノキ林で報告されている (深田ら 2009)。また、スギの高齢林においても間伐林分で樹高成長が抑制された (正木ら 2013)。これまでは、樹高成長は間伐の影響を受けないと考えられてきたが (安藤 1982)、強度な間伐をした場合には、樹高成長が抑制される可能性がある。樹冠長の増加については、地域における明瞭な差は認められなかったが、間伐率が50%の調査区で大きかった。間伐率が小さい林分では、枯上がりによって生枝下高が増加することによって、間伐率が大きい林分では樹高成長の抑制によって樹冠長の増加が小さくなるため、中程度の間伐で樹冠長が大きくなると考えられた。千葉 (2009) は、間伐後再び林冠が閉鎖するまでは、生枝下高の増加は小さいことを指摘した。しかし、本研究の結果より、樹冠の閉鎖前でも生枝下高はある程度増加した。間伐後においても生枝下高が変化する可能性があることから、生枝下高を考慮して葉量を推定することが重要である。今後、本研究で用いた簡易葉量推定手法 (式 (1)、(2)、稲垣ら 2015, Inagaki et al. 2020) を多くの林分で活用することが望まれる。

2) 葉量とSBP

間伐前の葉量は14.9~22.1 Mg ha⁻¹であり、太夫畑で他の地域よりも大きかった (Table 4)。これまでに報告されているヒノキ林の葉量の平均値は14.0 Mg ha⁻¹であり (只木 1976)、本研究の値はこれまでの平均よりも大きい値を示した。

間伐によって本数間伐率と同程度の幹現存量と葉量が減少した (Table 4)。間伐後の10年間の平均葉量は間伐直後の初期葉量の1.03~1.30倍に増加した (Fig. 2)。幹現存量間伐率と葉量増加率には正の直線関係が認められた。また、回帰直線の傾きに有意な差は認められないが (交互作用 $P > 0.05$)、地域によって直線の切片に差が認められ (共分散分析 地域の影響 $P < 0.05$)、高標高の天狗で葉量の増加率が小さかった。

間伐前の幹現存量は、太夫畑>天狗>旧宮の順であった (Table 4)。旧宮は林齢が小さいため幹現存量が小さかった。天狗は、太夫畑よりも林齢が大きい幹現存量はやや小さいため、間伐前のSBPは低いと考えられた。対

数変換した平均葉量とSBPの関係をFig. 3に示す。共分散分析の結果、地域によって直線の傾きが異なった (共分散分析、交互作用、 $P < 0.05$)。回帰直線の傾きは天狗で1.066、太夫畑で0.661、旧宮で0.638であった。直線の傾きが1の時は、平均葉量と幹生産速度が比例関係であることを示し、葉生産効率 (SBP/葉量) が一定の値になる。傾きが1よりも小さい場合には、葉量の低下に伴うSBPの減少が抑制されるため、葉量が少ない林分で葉生産効率が增加する。したがって、天狗では、幹現存量間伐率に対して葉生産効率がほぼ一定であるが、太夫畑と旧宮では、幹現存量間伐率が大きい林分ほど葉生産効率が大きかった。北米のダグラスモミ林分では間伐によって葉生産効率が增加する傾向が報告された (Brix 1983, Binkley and Reid 1984, Mitchell et al. 1996)。樹種間で比較した場合には、葉量が少ないほど葉生産効率や葉量当たりの一次生産は増加する (佐藤 1973, Reich et al. 1995)。これらの結果より、葉量が少ない林分では被陰が少なくなり、葉生産効率が增加することが一般的な傾向であることが示唆される。本研究でも太夫畑、旧宮では間伐区で葉生産効率が増加し、これまでの報告と同様の傾向を示した。一方、天狗では葉生産効率は間伐によって変化しなかった。天狗は高標高に位置しており、台風による落葉が多く (Inagaki et al. 2010)、気象条件が厳しいと考えられる。また、葉生産効率は、施肥によって向上することが示されている (Binkley and Reid 1984)。間伐後には、樹木が利用することのできる窒素資源が増加するが (Inagaki et al. 2008)、天狗では間伐前から窒素資源が豊富な条件であったために (Inagaki et al. 2008, 2011b)、葉生産効率が増加しなかった可能性がある。このように土壌条件が好適であって気象条件が厳しい場合には、間伐による葉生産効率の向上が限定的であることが示唆された。

3) 幹現存量間伐率に対する葉量とSBPの試算

間伐率に対する葉量増加率 (Fig. 2) と葉量とSBPの関係 (Fig. 3) から、地域ごとに幹現存量間伐率に対する葉量、SBP、葉生産効率についての試算を行った。幹現存量間伐率に対するSBPは、幹現存量間伐率が大きいほど低下し、伐採率の大きい林分で天狗と他の2地域の差が拡大した (Fig. 4a)。幹現存量間伐率に対する葉量はどの地域でも同様のパターンで減少した (Fig. 4b)、幹現存量間伐率に対する葉生産効率は、太夫畑と旧宮で増加するのに対して、天狗ではほぼ一定であった (Fig. 4c)。また、葉生産効率の増加は幹現存量間伐率が小さいときには緩やかであるが、幹現存量間伐率の増大とともに急激に増加した。立木密度の異なるダグラスモミ林でも同様の傾向が報告された (Binkley and Reid 1984)。幹生産速度の増加を葉量の効果 (SBP_{le}) と葉生産効率の効果 (SBP_{emc}) に区分すると (Fig. 4d, 4e)、葉量の効果は幹現存量間伐率が中程度で大きくなり、強度な間伐では低下した。一方で、葉生産効率の効果は天狗では常に負の値を示したのに対

し、旧宮、太夫畑では、幹現存量間伐率が大きいほど増大した。以上の結果を総合すると、低標高では、中程度の間伐では葉量の増加の寄与が大きく、強度の間伐では葉生産効率の増加の寄与が大きかった。一方、高標高では強度の間伐で葉生産効率の寄与が小さかった。葉生産効率の寄与は地域による差が大きかった。この結果は、強度な間伐をするほど、気象条件を反映して幹生産速度に差が生じ、地域差が拡大することを示唆する。

高標高では葉生産効率の寄与は負の値を示した。この結果は、Fig. 3において、回帰直線の傾きが1よりもわずかに大きいことを反映した結果である。負の値を示すことの重要性を判断するためには、Fig. 3の回帰直線の傾きについて統計的な解析が必要であるが、本研究においては調査林分数が少ないために、十分な検討はできない。今後多くの調査林分に調査を実施することが必要である。

以上の知見より、地域ごとに葉量と幹生産速度について対数変換後の直線関係で示すことができた。この直線の傾きは地域によって異なっており、地域の気象条件と間伐影響の関係を明らかにするうえで重要な指標となることが示唆された。今回提示した指標は、現地における胸高直径、樹高、生枝下高を定期的に測定することで得ることができる。また、それぞれの地域において、葉量の多い林分と少ない林分を対象とした調査より、地域ごとに葉量—幹生産量の関係を明らかにすることができる。今後の研究では、本研究の手法を多様な環境条件のヒノキ林において適用することで、間伐影響の地域特性を明らかにすることが期待される。

謝辞

本研究における試験地の設定および間伐は、高知県が実施した「四万十の森づくり推進事業」および林野庁委託「森林生態系を重視した公共事業の導入手法調査」により行なわれた。津野町には、町有林に天狗試験地、太夫畑試験地を設置し、調査研究を行なうことを許可していただいた。また本研究の一部は、科学研究費補助金25450224、26450193、17K07840の補助を受けて行われた。ここに記して謝意を表す。

引用文献

安藤 貴 (1982) 林分の密度管理. 農林出版, 東京
 Binkley, D. and Reid, P. (1984) Long-term responses of stem growth and leaf-area to thinning and fertilization in a Douglas-fir plantation. *Can. J. For. Res.* 14, 656-660.
 Brix, H. (1983) Effects of thinning and nitrogen-fertilization on growth of Douglas-fir - relative contribution of foliage quantity and efficiency. *Can. J. For. Res.* 13, 167-175.
 千葉 幸弘 (2009) 間伐に伴う林冠再開鎖までの所要年数. *関東森林研究*, 60, 149-150.

土じょう部 (1976) 林野土壌部の分類 (1975). *林試研報*, 280, 1-28.
 深田 英久・渡辺 直史・宮田 弘明・山崎 敏彦 (2009) 強度間伐が残存木の成長および材質等に与える影響. *高知森林技術センター研報*, 34, 56-83.
 Gspaltl, M., Bauerle, W., Binkley, D. and Sterba, H. (2013) Leaf area and light use efficiency patterns of Norway spruce under different thinning regimes and age classes. *For. Ecol. Manage.* 288, 49-59.
 Hagihara, A., Yokota, T. and Ogawa, K. (1993) Allometric relationships in hinoki (*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.) trees. *Bull. Nagoya Univ. Forests* 12, 12-29.
 Han, Q.M., Kabeya, D., Saito, S., Araki, M.G., Kawasaki, T., Migita, C. and Chiba, Y. (2014) Thinning alters crown dynamics and biomass increment within aboveground tissues in young stands of *Chamaecyparis obtusa*. *J. For. Res.* 19, 184-193.
 細田 和男・西園 朋広・佐野 真琴・高橋 興明・光田 靖・家原 敏郎 (2012) 間伐強度の異なるヒノキ人工林における35年間の炭素固定量の比較. *森林計画誌*, 46, 1-14.
 稲垣 善之・深田 英久・野口 享太郎・倉本 恵生・中西 麻美 (2018) 高知県のヒノキ人工林における間伐後の樹冠葉量の変化. *森林応用研究*, 27, 1-9.
 Inagaki, Y., Kuramoto, S., Torii, A., Shinomiya, Y. and Fukata, H. (2008) Effects of thinning on leaf-fall and leaf-litter nitrogen concentration in hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Endlicher) plantation stands in Japan. *For. Ecol. Manage.*, 255, 1859-1867.
 Inagaki, Y., Miyamoto, K., Okuda, S., Noguchi, M., Itou, T. and Noguchi, K. (2011a) Stem productivity in relation to nitrogen concentration and carbon isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$) in leaves of hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* Endlicher) plantations in Shikoku district, Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 57, 710-718.
 稲垣 善之・宮本 和樹・伊藤 武治・北原 文章・酒井 寿夫・奥田 史郎・野口 麻穂子・光田 靖 (2015) 高知県のヒノキ人工林における樹冠葉量の推定. *森林応用研究*, 24, 11-18.
 Inagaki, Y., Nakanishi, A. and Fukata, H. (2011b) Soil properties and nitrogen utilization of hinoki cypress as affected by strong thinning under different climatic conditions in the Shikoku and Kinki districts in Japan. *J. For. Res.*, 16, 405-413.
 Inagaki, Y., Nakanishi, A. and Tange, T. (2020) A simple method for leaf and branch biomass estimation in Japanese cedar plantations. *Trees*, 34, 349 - 356.

- 稲垣 善之・吉永 秀一郎・山田 毅・篠宮 佳樹・鳥居 厚志 (2009) スギ・ヒノキ人工林において間伐後放置された材の重量減少と窒素放出. 森林立地, 51, 63-67.
- 正木 隆・櫃間 岳・八木橋 勉・野口 麻穂子・柴田 銃江・高田 克彦 (2013) スギ林における壮齢時の間伐は樹高の長期的な成長にどのように影響するか?. 日林誌, 95, 227-233.
- Mitchell, A.K., Barclay, H.J., Brix, H., Pollard, D.F.W., Benton, R. and deJong, R. (1996) Biomass and nutrient element dynamics in Douglas-fir: Effects of thinning and nitrogen fertilization over 18 years. Can. J. For. Res., 26, 376-388.
- 宮本 和樹・奥田 史郎・稲垣 善之・小谷 英司・野口 麻穂子・伊藤 武治 (2009) 間伐から5年が経過したヒノキ人工林の成長と葉面積指数の比較. 森林立地, 51, 21-26.
- Ogawa, K., Adu-Bredu, S., Yokota, T. and Hagihara, A. (2010) Leaf biomass changes with stand development in hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* [Sieb. et Zucc.] Endl.). Plant Ecol., 211, 79-88.
- Reich, P., Koike, T., Gower, A. and Schoettle, A. (1995) Causes and Consequences of Variation in Conifer Leaf Life-Span. In: Smith W, TM H (eds) Ecophysiology of Coniferous Forests. Academic Press, 225-254.
- 林野庁計画課 (1970) 立木幹材積表 西日本編. 日本林業調査会, 東京
- 佐藤 大七郎 (1973) 陸上植物群落の物質生産 Ia 森林. 共立出版, 東京
- Seiwa, K., Eto, Y., Hishita, M. and Masaka, K. (2012) Effects of thinning intensity on species diversity and timber production in a conifer (*Cryptomeria japonica*) plantation in Japan. J. For. Res., 17, 468-478.
- Shinozaki, K., Yoda, K., Hozumi, K. and Kira, T. (1964a) A quantitative analysis of plant form- the pipe model theory. I. Basic analysis. Jpn. J. Ecol., 14, 97-105.
- Shinozaki, K., Yoda, K., Hozumi, K. and Kira, T. (1964b) A quantitative analysis of plant form-the pipe model theory. II. Further evidence of the theory and its application in forest ecology. Jpn. J. Ecol., 14, 133-139.
- Sumida, A., Nakai, T., Yamada, M., Ono, K., Uemura, S. and Hara, T. (2009) Ground-based estimation of leaf area index and vertical distribution of leaf area density in a *Betula ermanii* forest. Silva Fenn., 43, 799-816.
- Sumida, A., Watanabe, T. and Miyaura, T. (2018) Interannual variability of leaf area index of an evergreen conifer stand was affected by carry-over effects from recent climate conditions. Sci. Rep., 8.
- 只木 良也 (1976) 森林の現存量—とくにわが国の森林の葉量について—. 日林誌, 58, 416-423.
- Tadaki, Y. (1966) Some discussions on the leaf biomass of forest stands and trees. Bull. Gov. For. Exp. Sta., 184, 135-161.
- Waring, R.H. (1983) Estimating forest growth and efficiency in relation to canopy leaf-area. Adv. Ecol. Res., 13, 327-354.
- 四大学 (北大, 東大, 京大, 大阪市大) および信大 (特別参加) 合同調査班 (1966) 森林の生産力に関する研究 第III報 スギ人工林の物質生産について. 日本林業技術協会育林技術研究会, 63pp.

Effects of thinning on leaf biomass and stem biomass production in hinoki cypress plantations in Kochi prefecture

Yoshiyuki INAGAKI^{1)*}, Asami NAKANISHI²⁾, Hidehisa FUKATA^{3), 4)} and Naoshi WATANABE³⁾

Abstract

Leaf biomass and stem biomass production were measured for 10 years in hinoki cypress plantations that were exposed to different thinning intensities in three areas at different altitudes in Kochi Prefecture. Leaf biomass was estimated using a simple method based on the pipe model theory. The increase rate of leaf biomass and percentage of stem removal were positively, linearly related and the increase rate was lower in the higher altitude area. There was a linear log/log relationship between leaf biomass and stem biomass production, the regression lines for which had slopes of 1.066 in the high-altitude area and 0.638–0.661 in the two lower altitude areas. The foliage efficiency, i.e., stem biomass production per unit of leaf biomass, was predicted from these relationships. Foliage efficiency increased with an increasing percentage of stem biomass removal in the lower altitude areas but not in the high-altitude area. The increase in stem biomass production in thinned plots could be divided into the effects of changes in leaf biomass and foliage efficiency. Leaf biomass had a larger effect in the moderately thinned plots with only small difference between areas, whereas foliage efficiency varied between areas in strongly thinned plots. These findings suggest that foliage efficiency is a useful index for comparing thinning effects between areas.

Key words : foliage efficiency, hinoki cypress, leaf biomass, stem production, thinning

Received 12 October 2020, Accepted 1 March 2021

1) Shikoku Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Field Science Education and Research Center, Kyoto University

3) Kochi Prefectural Forestry Technology Research Center

4) Department of Hilly and Mountains Areas Development and Transport, Kochi Prefecture

* Shikoku Research Center, FFPRI, 2-915, Asakuranishi, Kochi, 780-8077, Japan; E-mail: yinagaki@ffpri.affrc.go.jp

論文 (Original article)

Characterization of late embryogenesis abundant (LEA) proteins involved in environmental stress response of black poplar

Mitsuru NISHIGUCHI^{1)*}

Abstract

Late embryogenesis abundant (LEA) proteins are known to accumulate in the late stage of seed development and in vegetative tissues following environmental stress. They exist not only in plants but also some animals, fungi, and bacteria. LEA proteins have diverse structures and gene expression patterns and are considered to safeguard living cells against disadvantageous changes in environmental conditions. In this study, cDNAs encoding two LEA proteins, PnLEA1 and PnLEA2, were isolated and analyzed to characterize LEA proteins in black poplar (*Populus nigra* L.). The predicted PnLEA1 and PnLEA2 proteins were structurally different; namely, PnLEA1 was identified as an LEA_1 family protein with one LEA_1 domain, and PnLEA2 was identified as an LEA_2 family protein with two LEA_2 domains. The *PnLEA1* and *PnLEA2* genes were expressed in the roots and leaves. The expression of *PnLEA1* was up-regulated by drought, salinity, and cold stress. The expression of *PnLEA2* was also increased by drought and salinity stress, though the increment was smaller than *PnLEA1*. Both PnLEA1 and PnLEA2 conferred early tolerance to high salinity on the *Escherichia coli* that overexpressed them. These results suggest that PnLEA1 and PnLEA2 are involved in the mechanisms of tolerance to environmental stress in *P. nigra*.

Key words: environmental stress, *Escherichia coli*, gene expression, LEA proteins, mRNA, *Populus nigra* L.

1. Introduction

Woody plants in their natural habitats are exposed to various environmental stressors such as light, temperature, gravity, water, oxygen, carbon dioxide, soil nutrients, chemicals, disease, and herbivory. For example, water deficits inhibit shoot, cambial, and root growth in trees (Kozłowski and Pallardy 1997). The number and size of leaves are decreased by drought stress; it also affects reproductive growth, including the number of flower buds, fruit-bearing capacity, and the size and shape of fruits. At the cellular and molecular levels of higher plants, drought stress induces rapid accumulation of abscisic acid (ABA), which closes stomata and reduces CO₂ absorption (Osakabe et al. 2014). Lower concentrations of CO₂ cause defective photosynthesis and result in the generation of reactive oxygen species that damage intracellular molecules such as DNA, proteins, and membrane lipids. Salinity stress influences the growth of woody plants. Sodium chloride (NaCl) treatments reduce the growth of leaves, tree height, and leaf water potential in four genotypes of *Populus* (Fung et al. 1998). Salinity stress also decreases leaf water potential in *Eucalyptus grandis* and *Pinus radiata* (Myers et al. 1998). High concentrations of NaCl reduce seed germination and survival rates, shoot length, and fresh weight of seedlings of three conifers (Croser et al. 2001).

Daily and seasonal changes in temperature can induce heat and cold stress. Photosynthesis and growth of trees decrease, but stomatal conductance and the consumption of carbohydrates increase due to heat stress (Teskey et al. 2015). Photosynthetic assimilation and the activation state of Rubisco in leaves of two *Populus* species were reduced at 40°C compared to 27°C (Hozain et al. 2010). Additionally, cold stress severely decreased the growth of hybrid aspen at 4°C (Welling et al. 2002, Renaut et al. 2004). Drought, salinity, and temperature stresses are partially similar because they often induce osmotic or oxidative stress (Wang et al. 2003). Woody plants have been inferred to possess defense systems against environmental stress because they are long-lived, sessile organisms that cannot escape exposure to the environmental stressors that influence their growth, morphogenesis, survival, and reproduction. The molecular mechanisms of response to environmental stress in woody plants have been studied; however, many remained unknown.

The relationship of late embryogenesis abundant (LEA) proteins to environmental stress response has been previously reported (Wang et al. 2003, Battaglia et al. 2008, Shih et al. 2008, Hinch and Thalhhammer 2012). LEA proteins were first found in wheat seed embryos (Cumings and Lane 1979), and cotton (Dure III et al. 1981). After cDNAs of LEA

Received 4 December 2019, Accepted 7 April 2021

1) Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

* Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, FFPRI, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687 JAPAN;

E-mail: nishi3@ffpri.affrc.go.jp

proteins were cloned from cotton (Dure III et al. 1989), their homologous genes have been isolated from other plant species. LEA proteins were initially divided into six groups based on their amino acid sequences (Dure III 1993, Bray 1993). At present, the classification of LEA proteins is complicated because many LEA protein genes have been identified in various plants. For example, 50 LEA protein genes discovered in the *Arabidopsis thaliana* genome were categorized into nine groups according to their sequence similarity and conserved repeated motifs (Bies-Ethève et al. 2008). On the other hand, Hundertmark and Hinch (2008) grouped 51 LEA protein genes of *Arabidopsis* into seven families and nine groups according to the Pfam protein families database and investigated their gene expressions. Taking the sequence information and previous studies into consideration, Battaglia et al. (2008) classified LEA proteins from different plant species into seven groups. As a result of whole genome sequencing, plant LEA protein genes have been comprehensively identified not only in model plants but also in the following crops and trees: legumes (Battaglia and Covarrubias 2013), tomato (Cao and Li 2015), potato (Charfeddine et al. 2015, Chen et al. 2019), orchid (Ling et al. 2016), rape (Liang et al. 2016), watermelon and melon (Altunoglu et al. 2017), cassava (Wu et al. 2018), cotton (Magwanga et al. 2018), xerophyte (Muvunyi et al. 2018), sorghum (Nagaraju et al. 2019), wheat (Liu et al. 2019, Zan et al. 2020), Moso bamboo (Huang et al. 2016), Chinese plum (Du et al. 2013), sweet orange (Pedrosa et al. 2015), Chinese red pine (Gao and Lan 2016), and tea (Jin et al. 2019, Wang et al. 2019).

Some plant LEA proteins and their mRNAs increase during seed maturation and in vegetative tissue under drought, osmotic or cold stress conditions; therefore, they are likely involved in stress responses to environmental stress (Battaglia et al. 2008). There are also some LEA proteins whose expression is regulated by ABA that participate in drought stress responses (Wang et al. 2003). Most LEA proteins are hydrophilic, including biased hydrophilic amino acids (Battaglia et al. 2008), and that might make it possible to inhibit aggregation and inactivation of other proteins under desiccation or freezing conditions (Hinch and Thalhammer 2012). Not only plants but also bacteria, fungi, and animals possess LEA proteins (Hand et al. 2011). Larvae of the sleeping chironomid (*Polypedilum vanderplanki*) can survive without water in a state of anhydrobiosis. Three cDNAs of LEA proteins have been isolated from this chironomid, and their mRNAs were increased by desiccation and salinity stress (Kikawada et al. 2006). The chironomid LEA protein is suggested to be involved in vitrification with trehalose (Shimizu et al. 2010). Consequently, LEA proteins are likely to protect cellular molecules from negative influences induced by environmental stress; however, the physiological functions of

many LEA proteins in higher plants and other living organisms have not been sufficiently clarified. Hence, further investigation is needed to elucidate the various biological properties of LEA proteins.

In the present study, we aimed to characterize LEA proteins from black poplar (*Populus nigra* L.). *Populus* species have been used as model woody plants because of the ease of clonal propagation, tissue culture and transformation techniques, and genetic information acquisition. Responses to environmental stress in poplar trees have been studied to increase our understanding of tolerance mechanisms in woody plants (Nishiguchi et al. 2002, Nanjo et al. 2004, Nanjo et al. 2007, Nishiguchi et al. 2012, Miyazawa et al. 2017). In woody plants, cDNAs of dehydrin, a member of the LEA protein family, have been isolated from *Populus* species (Caruso et al. 2002, Bae et al. 2009). The whole genome sequence of *Populus trichocarpa* was read for the first time in woody plants (Tuskan et al. 2006). Based on that reading, 53 LEA protein genes were expected to be in the genome (Lan et al. 2013). However, the physiological functions of poplar LEA proteins under stress conditions remain unknown. Here we report the structure of two LEA proteins from *P. nigra*, their gene expressions under stress conditions, and the acquisition of salinity tolerance in *Escherichia coli* via the LEA proteins.

2. Materials and Methods

2.1 Plant materials

Approximately 10 cm were cut from the ends of young branches of *P. nigra* and rooted in moist vermiculite. For stress treatments, the rooted branches were transferred to plastic pots (75 mm upper diameter, 60 mm high) and grown in a phytotron (Koito Electric Industries, Nagaizumi-cho, Japan) at 25 °C, 70% relative humidity under metal halide lamps (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation, 16:8 h light:dark photoperiod).

2.2 Cloning and sequencing analysis

The cDNA clones encoding LEA proteins, PnFL2-006_H01 and PnFL2-020_A03, were screened from the full-length enriched cDNA libraries of *P. nigra* (Nanjo et al. 2004, Nanjo et al. 2007) using the BLAST+ software (Camacho et al. 2009). The HMMER 3.3 software (<http://hmmer.org/>) and the Pfam protein families database 32.0 (El-Gebali et al. 2019) were used to identify the protein functional domains. The UniProtKB/Swiss-Prot Release 2020_01 database (The UniProt Consortium 2019) and the *A. thaliana* Araport11 protein database (Cheng et al. 2017) were searched for orthologs to the poplar LEA proteins using BLAST+. Global alignment of two protein sequences was executed using the EMBOSS Needle program of the EMBL-EBI web site (Needleman and Wunsch 1970,

Madeira et al. 2019), and their sequence identity was estimated. Multiple protein sequences were aligned by the ClustalW program, and phylogenetic analysis was carried out by the maximum parsimony method with MEGA X software (Kumar et al. 2018). The grand average of hydropathy (GRAVY) scores were calculated by the ProtParam tool on the ExPASy server (Kyte and Doolittle 1982, Gasteiger et al. 2005).

2.3 Stress treatments and gene expression analysis

Drought stress was induced in poplar plantlets (~30 cm high) by watering cessation. Leaves were collected during the treatment period and frozen in liquid nitrogen. After collecting the leaves, the plantlets were discarded to avoid the effects of leaf detachment. Vermiculites in the pot were weighed (wet weight), dried overnight at 120°C, and re-weighed (dry weight). The water content was calculated as (wet weight – dry weight)/(wet weight). For salinity stress, a hydroponic solution containing 200 mM NaCl was added to the pots once daily, while a hydroponic solution without NaCl was used for the control. Heat and cold stress were induced using an incubator at 40°C and 4°C, respectively, under continuous dark conditions. Total RNA was prepared from the frozen leaves, and reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was performed as described previously (Nishiguchi et al. 2012). The PCR primers are shown in Table S1. The relative mRNA level was normalized to the mRNA level of the poplar ubiquitin 5 homolog (*PnUBQ5*, cDNA clone PnFL2-047_P22, DDBJ accession numbers DB883027 and DB901131). For statistical analysis, Welch's *t*-test and Dunnett's test were performed using Excel 2016 and R software (Ver. 3.6.0), respectively.

2.4 Measurement of growth of *E. coli* overexpressing LEA proteins

The DNA fragments encoding LEA proteins on PnFL2-006_H01 and PnFL2-020_A03 were amplified using PCR primers (Table S1) to construct the expression plasmid vectors of LEA proteins for *E. coli*. The amplified DNA fragments were cut by NheI and XhoI and inserted into the NheI and XhoI sites in pET-24a (+) (Merck, Darmstadt, Germany). The constructed plasmids were verified by DNA sequencing and introduced into *E. coli* BL21 (DE3) (Merck). For preculture, *E. coli* BL21(DE3) harboring each plasmid was cultivated overnight in 4.5 ml of a medium containing 1% Bacto tryptone (Life Technologies, Carlsbad, CA), 0.5% yeast extract, 30 µg/ml kanamycin, 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside and 100 mM NaCl at 37°C, with shaking. Forty-five microliters of the precultured bacterial cells were inoculated into 4.5 ml of fresh media including 100 mM NaCl or 1 M NaCl and cultivated for 48 h to be used as the main culture. The growth of *E. coli* was measured as absorbance units (AU) at 660 nm of

the culturing media using Miniphoto 518R (Taitec, Koshigaya, Japan). Dunnett's and Tukey-Kramer tests were utilized to compare *E. coli* growth statistically, using R software.

3. Results

3.1 Isolation and structural analysis of *P. nigra* LEA proteins

To identify the cDNAs of LEA proteins in *P. nigra*, we first investigated the predicted LEA protein genes in the genome of *P. trichocarpa* (Tuskan et al. 2006). Thirty-seven genes with the annotation of "late embryogenesis abundant" were picked up from the *P. trichocarpa* genome annotation (V2.0). Using these 37 amino acid sequences as the query for the tblastn program, we searched the full-length enriched cDNA libraries of *P. nigra* exposed to a variety of stressors such as dehydration, high salinity, chilling, and heat (Nanjo et al. 2004, Nanjo et al. 2007). After removing redundant clones, two cDNA clones, PnFL2-006_H01 (DDBJ accession numbers DB875794 and DB894098), and PnFL2-020_A03 (DB896353 and DB878123) were identified as the candidates.

PnFL2-006_H01 encoded a predicted protein of 177 amino acid residues (aa). Using the hmmscan program from HMMER, the N-terminal 1 to 70 amino acid sequences of the predicted PnFL2-006_H01 protein were annotated to the LEA_1 family only (Pfam ID: PF03760) in the Pfam database at an independent E-value (i-Evalue) of 6.8e-23. Using the PnFL2-006_H01 protein sequence as a query, we searched the UniProtKB/Swiss-Prot database and found five orthologs: *Glycine max* 18 kDa seed maturation protein (UniProt accession number: Q01417); *A. thaliana* LEA protein 46 (Q9FG31, AGI locus code: AT5G06760); *Helianthus annuus* 11 kDa LEA protein (P46515); *Gossypium hirsutum* LEA protein D-113 (P09441); and *Solanum lycopersicum* protein LE25 (Q00747). These five proteins are all classified within the LEA type 1 family in UniProtKB. They were homologous to the N-terminal LEA_1 domain of the predicted PnFL2-006_H01 protein (Fig. 1a). The AT5G06760 protein (158 aa) had been named LEA46 by Hundertmark and Hinch (2008) and was most similar to the PnFL2-006_H01 protein in the *A. thaliana* protein database; their sequence identity was 49% over the entire length. Accordingly, PnFL2-006_H01 was inferred to encode an LEA_1 family protein and designated as PnLEA1. The GRAVY score of PnLEA1 was -0.832, and thus PnLEA1 was expected to be a hydrophilic protein, similar to other LEA proteins (Battaglia et al. 2008, Hand et al. 2011).

PnFL2-020_A03 was deduced to code for a protein of 314 aa. The hmmscan program demonstrated that the N-terminal domain from 73 to 168 and the C-terminal domain from 198 to 293 of the deduced PnFL2-020_A03 protein were identified as belonging to the LEA_2 family (PF03168) in Pfam. The

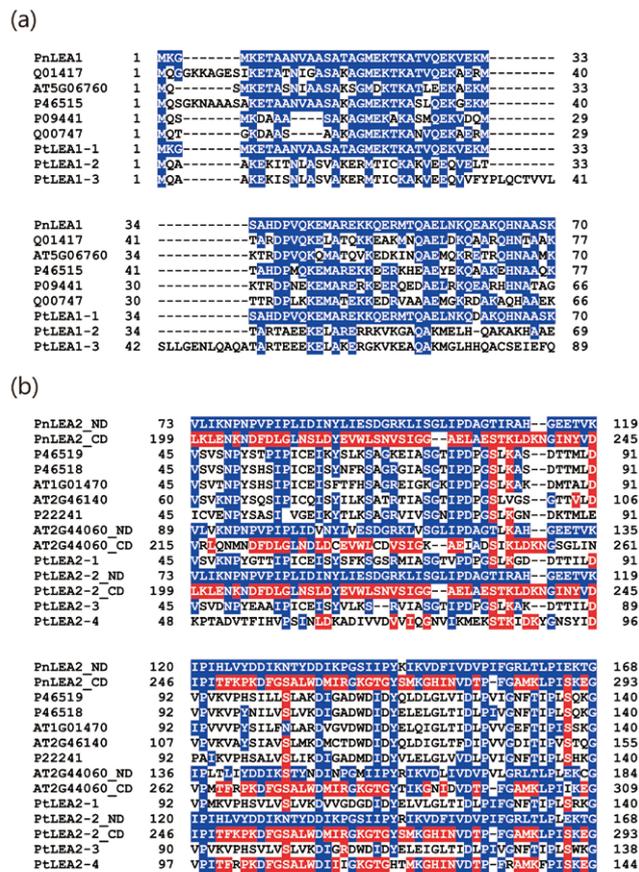


Fig. 1. Alignment of characteristic domain sequences of LEA proteins.

(a) Comparison of LEA₁ domains between *Populus nigra* PnLEA1 (PnFL2-006_H01) and other LEA₁ family proteins: Q01417, *Glycine max* 18 kDa seed maturation protein; AT5G06760, *Arabidopsis thaliana* LEA protein 46 (UniProt accession number: Q9FG31); P46515, *Helianthus annuus* 11 kDa LEA protein; P09441, *Gossypium hirsutum* LEA protein D-113; Q00747, *Solanum lycopersicum* protein LE25; and PtLEA1-1–PtLEA1-3, *Populus trichocarpa* LEA₁ family proteins. Identical amino acid residues with PnLEA1 are shaded blue. Numbers are amino acid positions.

(b) Comparison of LEA₂ domains between PnLEA2 (PnFL2-020_A03) and other LEA₂ family proteins: PnLEA2_ND, N-terminal LEA₂ domain of PnLEA2; PnLEA2_CD, C-terminal LEA₂ domain of PnLEA2; P46519, *G. max* desiccation protectant protein Lea14 homolog; P46518, *G. hirsutum* Lea14-A; AT1G01470, *A. thaliana* probable desiccation-related protein LEA14 (O03983); AT2G46140, *A. thaliana* desiccation-related protein PCC27-45; AT2G44060_ND, N-terminal LEA₂ domain of *A. thaliana* LEA26; AT2G44060_CD, C-terminal LEA₂ domain of *A. thaliana* LEA26; PtLEA2-1–PtLEA2-4, *P. trichocarpa* LEA₂ family proteins; PtLEA2-2_ND, N-terminal LEA₂ domain of PtLEA2-2; and PtLEA2-2_CD, C-terminal LEA₂ domain of PtLEA2-2. Amino acid residues identical with PnLEA2_ND and with PnLEA2_CD are shaded blue and red, respectively.

i-Value of the N-terminal LEA₂ domain and the C-terminal LEA₂ domain was 1.9e-14 and 2.1e-11, respectively. Although both the N-terminal and the C-terminal LEA₂ domains were identified as the LEA₂ family, the sequence identity between these two domains was only 25% (Fig. 1b). Five orthologs of the PnFL2-020_A03 protein were found in the UniProtKB/Swiss-Prot database: *G. max* desiccation protectant protein Lea14 homolog (P46519); *G. hirsutum* LEA protein Lea14-A (P46518); *A. thaliana* probable desiccation-related protein LEA14 (O03983, AT1G01470); *A. thaliana* desiccation-related protein (O82355, AT2G46140); and *Craterostigma plantagineum* desiccation-related protein PCC27-45 (P22241). These five proteins belong to the LEA₂ family in UniProtKB and have homology with the N-terminal LEA₂ domain of PnFL2-020_A03 (Fig. 1b). However, they possess only one LEA₂ domain, not two domains. In addition to AT1G01470 and AT2G46140, AT2G44060 was newly discovered from the *A. thaliana* protein database as an orthologue. The deduced AT2G44060 protein (325 aa) possesses two LEA₂ domains similar to PnFL2-020_A03 (Fig. 1b) and has been reported as LEA26 of the LEA₂ family (Hundertmark and Hinch 2008). The protein sequence identities of AT2G44060, AT1G01470 (151 aa), and AT2G46140 (166 aa) with PnFL2-020_A03 was 71%, 15%, and 16%, respectively, over the entire length. Consequently, PnFL2-020_A03 was thought to encode an LEA₂ family protein and was designated as PnLEA2. The GRAVY score of PnLEA2 is -0.385 that implies lower hydrophilicity than PnLEA1. This is probably because PnLEA2 includes more hydrophobic amino acid residues such as Ile (37 aa), Leu (22 aa), and Phe (13 aa).

P. trichocarpa, which is in the same genus as *P. nigra*, has been reported to possess 53 LEA protein genes in the genome (Lan et al. 2013). The 53 deduced LEA proteins have been separated into eight groups (PtLEA1–PtLEA8) according to the Pfam nomenclature and renaming. Phylogenetic analysis was performed to clarify the relationship between PnLEA1, PnLEA2, the *P. trichocarpa* LEA proteins, and the above-mentioned ortholog proteins (Fig. 2). PnLEA1 and three *P. trichocarpa* LEA1 group proteins (PtLEA1-1 to PtLEA1-3) formed a clade; PtLEA1-1 was the closest to PnLEA1 in that clade. PtLEA1-1, PtLEA1-2 and PtLEA1-3 showed protein sequence homology to PnLEA1 (Fig. 1a). The amino acid sequence identity of PtLEA1-1 (175 aa) with PnLEA1 showed a high score at 95%, while those of PtLEA1-2 (124 aa) and PtLEA1-3 (162 aa) were low at 21% and 16%, respectively. The five orthologs of PnLEA1 from UniProtKB/Swiss-Pro were also included in the same clade as the *P. trichocarpa* LEA1 group proteins. PnLEA2 and four *P. trichocarpa* LEA2 group proteins (PtLEA2-1 to PtLEA2-4) formed a different clade from the LEA1 group clade. PnLEA2 configured a small

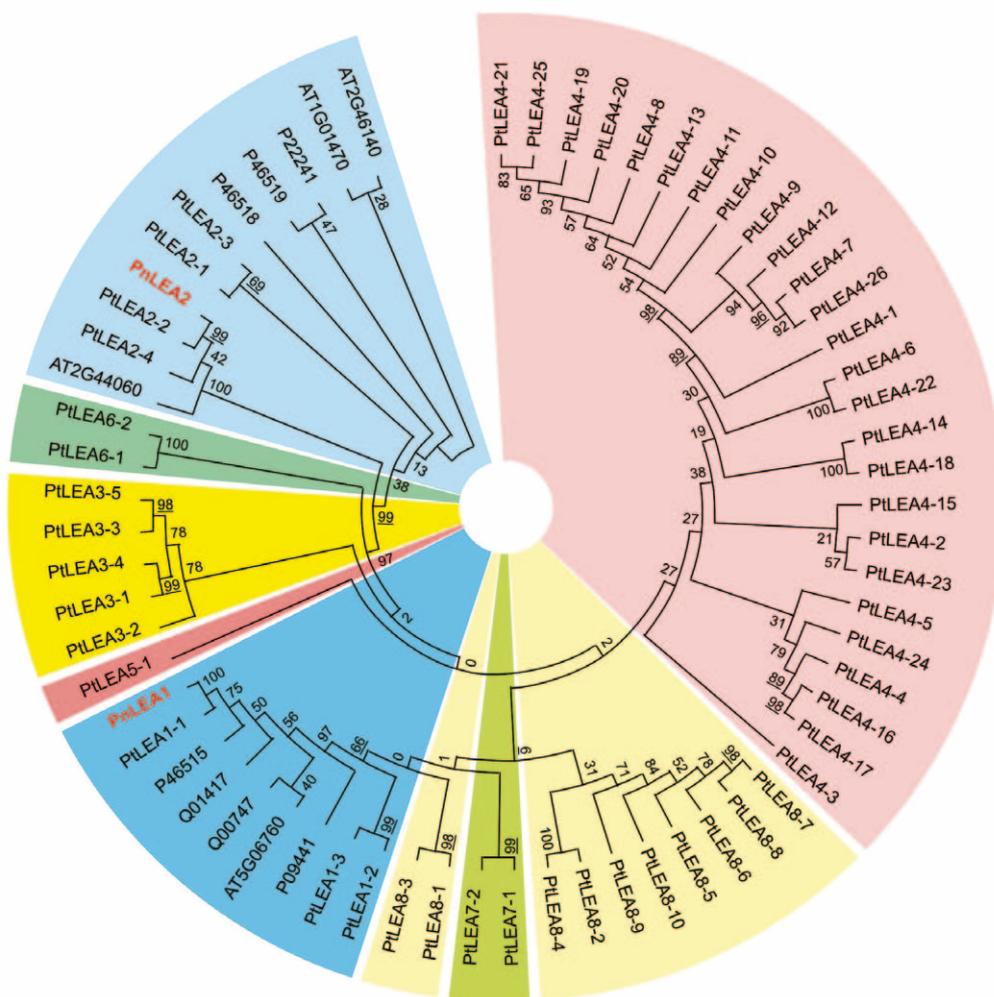


Fig. 2. Phylogenetic analysis of PnLEA1, PnLEA2, *P. trichocarpa*, and other LEA proteins.

The sequences of deduced LEA proteins were aligned by ClustalW, and phylogenetic relationship was calculated by the maximum parsimony method. Phylogenetic tree is colored differently for each of eight LEA protein groups (PtLEA1–PtLEA8) of *P. trichocarpa*. Other LEA proteins, except *P. nigra* and *P. trichocarpa*, are described in the Fig. 1 legend. Bootstrap values are shown as the percentage of 1,000 replications. Confusing numbers are underlined.

clade with PtLEA2-2, PtLEA2-4, and AT2G44060. PtLEA2-1, PtLEA2-3, and the above-mentioned five PnLEA2 orthologs located in close clades to the PnLEA2 clade. PtLEA2-2 (314 aa) had two LEA_2 domains, similar to PnLEA2, and their sequence identity was 99% (Fig. 1b). PtLEA2-1 (151 aa), PtLEA2-3 (149 aa), and PtLEA2-4 (163 aa) had only one LEA2 domain. PtLEA2-1 and PtLEA2-3 were slightly similar to the N-terminal domain of PnLEA2, while PtLEA2-4 was similar to the C-terminal domain of PnLEA2 (Fig. 1b). PnLEA2 was matched to 38% of the amino acid residues of PtLEA2-4, 12% of PtLEA2-1, and 12% of PtLEA2-3 over the entire length.

3.2 Effect of environmental stress on the expression of LEA protein genes

To compare the expression of *PnLEA1* and *PnLEA2* in underground and aboveground organs of *P. nigra* under normal

growth conditions, total RNA was isolated from roots and leaves of *P. nigra* trees and analyzed using RT-qPCR. Both genes were expressed in roots and leaves (Fig. S1). The expression of *PnLEA1* tended to be higher in leaves than in roots, though the difference was not significant. *PnLEA2* showed a significantly higher expression (~2.2-fold) in leaves than in roots.

Some LEA proteins and their gene expressions have been reported to be induced by dehydration (Ried and Walker-Simmons 1993, Blackman et al. 1995). To confirm whether the *PnLEA1* and *PnLEA2* genes were induced by drought stress, we ceased watering of the poplar plantlets. The water content of vermiculites in the pots began to decrease at 1 d after watering cessation and decreased to ~4% after 8 d (Fig. 3a). Leaves of the plantlets drooped after 8 d and appeared to wilt (Fig. S2). The expression of *PnLEA1* in leaves was induced by drought stress and increased considerably (Fig. 3b), although

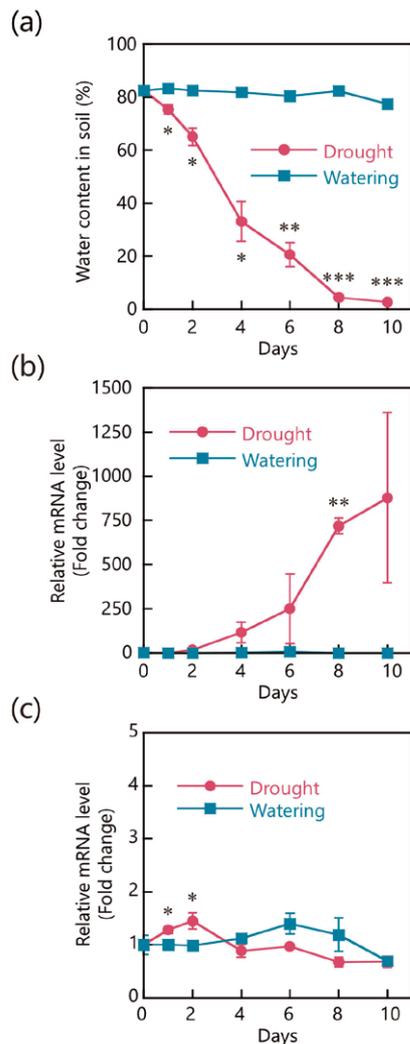


Fig. 3. Effect of drought stress on gene expression of *PnLEA1* and *PnLEA2*.

(a) Soil water content measured during watering (squares) and at days after watering cessation (circles). Expression of *PnLEA1* (b) and *PnLEA2* (c) in leaves was analyzed by RT-qPCR. mRNA levels of each gene at day 0 were defined as 1.0. Error bars represent \pm SD ($n = 3$). Asterisks indicate significant differences between drought treatment and control with watering (Welch's t -test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

the increases were not always significant because the measured values were dispersed. The relative mRNA level at 8 d after watering cessation was significant at \sim 700-fold higher than at day 0. Under well-watered conditions, *PnLEA1* expression remained low for 10 d. *PnLEA2* expression increased \sim 1.5-fold at 2 d after watering cessation and subsequently returned the original level at 4 d (Fig. 3c).

We exposed poplar plantlets to salinity stress to investigate whether other environmental stresses affect the gene expression of *PnLEA1* and *PnLEA2*. A hydroponic solution containing 200 mM NaCl was added to the plantlet pot once per day; therefore, the roots were likely exposed to NaCl at approximately the

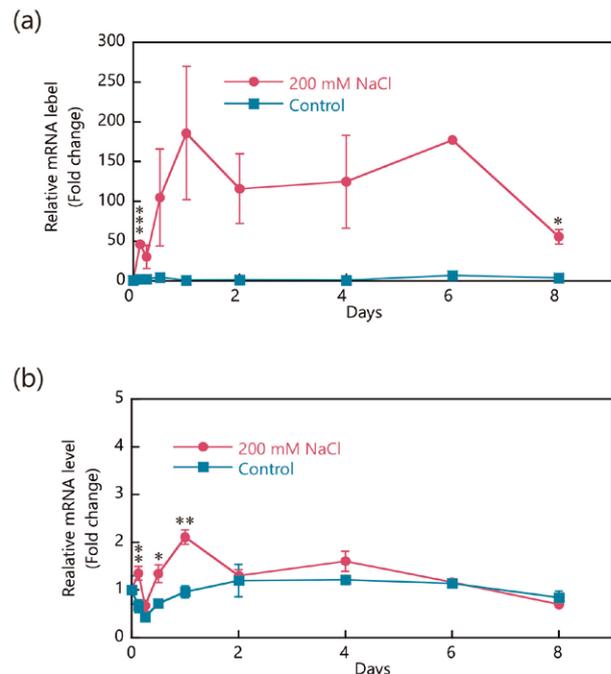


Fig. 4. Effect of salinity stress on gene expression of *PnLEA1* and *PnLEA2*.

Hydroponic solution of 200 mM NaCl (circles) or no NaCl (squares) was added to pots with poplar plantlets. mRNA levels of *PnLEA1* (a) and *PnLEA2* (b) in leaves at day 0 were defined as 1.0. Error bars represent \pm SD ($n = 3$). Only mean values are shown at 6 d because $n = 2$. Asterisks indicate significant differences between NaCl treatment and control without NaCl (Welch's t -test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

same concentration. Although the effect of NaCl treatment on the poplar plantlets was not observed until days 6 to 8, after that leaf abscission commenced (Fig. S3). *PnLEA1* showed an expression pattern induced by salinity stress in leaves, though their mRNA levels were also dispersed (Fig. 4a). The mRNA of *PnLEA1* increased significantly and rapidly, approximately 46-fold at 3 h after NaCl treatment. The elevated expression reached approximately 186-fold after 24 h but was not significant ($p = 0.09$). The up-regulated *PnLEA1* expression level was maintained higher than that of the control plants for 8 d. *PnLEA2* also showed increased gene expression with the NaCl treatment, but its up-regulated level was considerably lower than *PnLEA1* (Fig. 4b). The *PnLEA2* mRNA level increased significantly (\sim two-fold) 24 h after NaCl treatment. The high expression at 24 h was not maintained and returned to the same level as that of the control after 2 d.

Some LEA protein genes have been reported to be induced by temperature stress (Cai et al. 1995, Colmenero-Flores et al. 1997). We investigated the effects of heat and cold stress on *PnLEA1* and *PnLEA2* gene expression. Some of the poplar plantlets were transferred from an incubator at 25°C to other incubators for stress treatment and kept for 48 h at

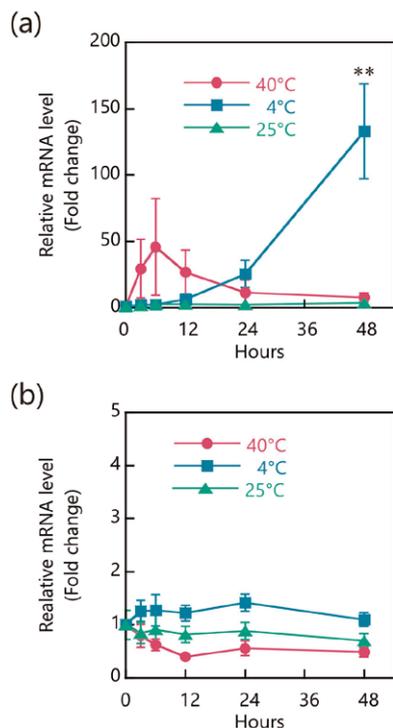


Fig. 5. Effect of temperature stress on gene expression of *PnLEA1* and *PnLEA2*.

Poplar plantlets were incubated for 48 h at 40°C (circles), 4°C (squares), and 25°C (triangles). mRNA levels of *PnLEA1* (a) and *PnLEA2* (b) in leaves at 0 h were defined as 1.0. Error bars represent \pm SD ($n = 3$). Asterisks indicate significant differences between control at 25°C and other temperature treatments (Dunnett's test; $**p < 0.01$).

high temperature (40°C) or low temperature (4°C). Heat or cold stress did not influence the appearance of the poplar plantlets. However, heat stress tended to raise the *PnLEA1* expression in leaves, and the expression level was ~46-fold after 24 h, but the raised transcription levels were not statistically significant (Fig. 5a). Under cold stress conditions, *PnLEA1* expression was low until 12 h after treatment and thereafter significantly increased ~130-fold at 48 h after treatment. On the other hand, neither heat nor cold stress significantly changed the expression level of *PnLEA2* (Fig. 5b).

3.3 Acquisition of salinity tolerance in *E. coli* by PnLEA proteins

To elucidate the function of PnLEA1 and PnLEA2 proteins, their genes were separately overexpressed in *E. coli*, and its growth was measured in culture media, including low or high concentrations of NaCl. Common media such as L-broth contain 0.5–1% (~86–171 mM) NaCl and are generally used for *E. coli* proliferation. Therefore, we used media containing 100 mM NaCl as a control. In the presence of 100 mM NaCl, the

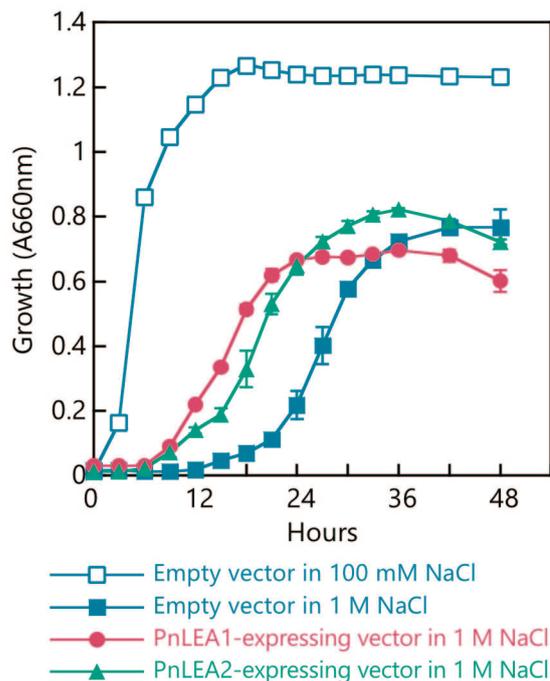


Fig. 6. Growth curves of *E. coli* under salinity stress conditions.

E. coli BL21 (DE3) strains harboring indicated vectors were cultured in media of 100 mM NaCl or 1 M NaCl for 48 h. Growth of *E. coli* is represented by absorbance at 660 nm. Empty vector in a 100 mM NaCl medium (open squares), empty vector in a 1 M NaCl medium (closed squares), PnLEA1-expressing vector in a 1 M NaCl medium (circles), and PnLEA2-expressing vector in a 1 M NaCl medium (triangles). Error bars show \pm SD ($n = 3$).

early growth of the empty vector-harboring *E. coli* reached 0.86 AU at 660 nm at 6 h; thereafter, the stationary phase growth reached more than 1.27 AU after 18 h (Fig. 6). In contrast, high concentrations (1 M) of NaCl delayed and arrested the growth of *E. coli*. In the media containing 1 M NaCl, *E. coli* growth was 0.014 AU at 6 h and 0.069 AU after 18 h (Fig. 6). Subsequently, *E. coli* started to proliferate and attained 0.77 AU of growth in 1 M NaCl at 48 h, which was ~63% of 1.23 AU in 100 mM NaCl.

The PnLEA1-overexpressing *E. coli* grew faster than the empty vector-harboring *E. coli* in the presence of 1 M NaCl (Fig. 6). The growth of PnLEA1 reached 0.090 AU after 9 h compared with 0.013 AU of the empty vector. Subsequently, the PnLEA1-overexpressing *E. coli* entered a logarithmic growth phase, and its growth was 0.67 AU after 24 h, significantly higher than 0.22 AU of the empty vector-harboring *E. coli*. However, the growth of PnLEA1-overexpressing *E. coli* did not exceed 0.7 AU and showed a lower growth (0.60 AU) than the empty vector-harboring *E. coli* after 48 h. The PnLEA2-overexpressing *E. coli* also showed faster cell proliferation than

the empty vector-harboring *E. coli* in 1 M NaCl media (Fig. 6). The growth of PnLEA2-overexpressing *E. coli* was 0.072 AU after 9 h, 0.65 AU after 24 h, and 0.72 AU after 48 h. PnLEA2 demonstrated significantly higher growth than PnLEA1 at 30 h to 48 h. Eventually, the growth of *E. coli* overexpressing PnLEA1 and PnLEA2 were ~49% and ~59%, respectively, in 1 M NaCl media after 48 h, compared to the empty vector-harboring *E. coli* in 100 mM NaCl media.

4. Discussion

Woody plants have been exposed to various environmental stressors for a long time; however, the understanding of their response and tolerance mechanisms is not as advanced as herbaceous plants. It is important to elucidate the molecular mechanisms involved in maintaining cellular activity during environmental changes in woody plants. LEA proteins have been considered to be important molecules involved in stress response for some plant and animal species. In this study, we isolated the cDNAs of two LEA proteins, PnLEA1 and PnLEA2, from black poplar. Sequence analysis and comparison with other plant LEA proteins revealed that PnLEA1 and PnLEA2 had different LEA domains and that PnLEA1 and PnLEA2 were categorized into the LEA_1 family of the Pfam protein families database and into the LEA_2 family, respectively (Figs. 1 and 2). Additionally, both PnLEA1 and PnLEA2 were deduced to be hydrophilic proteins characteristic of typical LEA proteins. In this study, we referred mainly to the Pfam database for annotation, because LEA protein genes from *P. trichocarpa* and many other plant species were classified based on the Pfam database. However, the taxonomy of plant LEA proteins has not been completely unified; thus, in some cases, different names for LEA families or LEA proteins have been used. For example, *Arabidopsis* AT5G06760, which is the most similar ortholog of PnLEA1, named LEA46, belongs to the LEA_1 family of Pfam (Hundertmark and Hinch 2008) and is also named AtLEA4-5, categorized to LEA group 4 (Bies-Ethève et al. 2008, Olvera-Carrillo et al. 2010). Similarly, the LEA_2 family in plants is equivalent to the LEA group 7 proteins in *Arabidopsis* (Bies-Ethève et al. 2008), or the LEA group 5C proteins in plants (Battaglia et al. 2008). In a database for LEA proteins (LEAPdb), the term “class” has been used for classification instead of family and group (Hunault and Jaspard 2010). Thus, LEA proteins have ambiguous classification and nomenclature, probably because they have a wide variety of origins and structures, leaving many unanswered questions concerning their molecular characterization and physiological function.

PnLEA1 gene expression was greatly increased by drought, salinity, and cold stress in poplar leaves (Figs. 3–5). These results suggest that *PnLEA1* plays an important role in

plant response to external environmental changes. *PnLEA1*-homologous genes from other plant species show a partially similar expression pattern to that of *PnLEA1*. In *P. trichocarpa*, *PtLEA1-1* is expressed in leaves, shoots, roots, buds, and phloem under normal, drought stress, and salt stress conditions (Lan et al. 2013). Although the expression of AT5G06760 is low in *Arabidopsis* leaves under normal conditions, it is induced by NaCl, drought, cold, and ABA treatment (Hundertmark and Hinch 2008). Similarly, the *Brassica napus* *LEA4-1* (*BnLEA4-1*) gene, a homolog of AT5G06760, is rarely expressed in leaves under normal conditions and is induced by ABA, NaCl, and cold stress (Dalal et al. 2009). Since *PnLEA1* was induced by both drought stress and salinity stress, its gene expression is likely to be involved in osmotic stress. There is also the possibility that the difference in gene expression patterns of *PnLEA1* between drought and salinity stress reflects the state of osmotic stress in poplar plants. AT5G06760 shows low expression in seedlings, but the high expression is elicited not only by ABA and NaCl but also polyethylene glycol (high osmolality) (Olvera-Carrillo et al. 2010). The transcription factor AtMYB44 suppresses the gene expression of AT5G06760 induced by NaCl (salt stress) or mannitol (osmotic stress), and AtMYB44 binds to the promoter of AT5G06760 under normal conditions and separates from it by mannitol treatment (Nguyen et al. 2019). Accordingly, *PnLEA1* might be repressed by similar transcription factors under normal conditions and induced by multiple stress responses under unsuitable environmental conditions including osmotic stress.

PnLEA2 also showed expression inducible by environmental stress; however, the degree of expression was different from that of *PnLEA1*. The expression of *PnLEA2* in leaves was ~1.5–2-fold up-regulated by drought and salinity stress, but not by temperature stress (Figs. 3–5). The inducible expression of *PnLEA2* is thought to be weaker than that of *PnLEA1* in the investigated stress treatments. Similarly, *PtLEA2-2* is expressed under normal, drought, and salt stress conditions in *P. trichocarpa* (Lan et al. 2013). AT2G44060 is the most similar *Arabidopsis* ortholog and likewise shows ~2.2- and ~4.7-fold gene expression induced by drought and 100 mM NaCl treatment, respectively (Hundertmark and Hinch 2008). Therefore, it is suggested that PnLEA2-homologous proteins with two LEA_2 domains have similar gene expression characteristics and are involved in responses to similar environmental changes. Interestingly, LEA proteins with only one LEA_2 domain show versatile gene expression patterns. For example, *PtLEA2-1* is expressed in the investigated samples similarly to *PtLEA2-2* in *P. trichocarpa*; however, *PtLEA2-3* and *PtLEA2-4* are not expressed at all (Lan et al. 2013). AT1G01470 is strongly induced by salts, cold, and ABA in *Arabidopsis*, while AT2G46140 is slightly induced only by

drought conditions (Dunaeva and Adamska 2001, Hundertmark and Hinch 2008). Accordingly, even if LEA proteins have homologous domain structures, they likely play different roles in maintaining cellular function. In *P. trichocarpa*, 20 of the 53 LEA protein genes were not expressed in any investigated tissue or response to drought and salinity stress (Lan et al. 2013). It is important to clarify how the gene expression of poplar LEA proteins is regulated in response to exogenous environmental changes.

With both PnLEA1- and PnLEA2-overexpressing, *E. coli* acquired early tolerance to high salinity (Fig. 6). When *E. coli* is in high osmolality, it first induces the influx of K^+ , and glutamate synthesis is increased. Subsequently, compatible solutes (osmoprotectants) such as glycine betaine, proline, and trehalose are transported into the cells from outside or synthesized endogenously (Kempf and Bremer 1998). These compatible solutes are needed for the resistance of *E. coli* to conditions of high osmolality, including high concentrations of NaCl. Soybean LEA proteins have been reported to possibly function as osmoprotectants in vitro (Shih et al. 2010). The *E. coli* expression system has also shown that other plant LEA proteins can provide stress tolerance in *E. coli* (Lan et al. 2005, Liu and Zheng 2005, Ling et al. 2016). Although PnLEA1 and PnLEA2 are different in structure and gene expression, it appears that both LEA proteins help *E. coli* cell proliferation in the early stage under high salinity conditions, due to their characteristic properties as compatible solutes. The results of PnLEA1- or PnLEA2-overexpression in *E. coli* support a putative function of PnLEA proteins as a substitute for compatible solutes. In addition, some LEA proteins can protect other enzyme activity under stress conditions in vitro. Dehydrin DHN-5, a wheat LEA protein, preserves β -glucosidase and glucose oxidase/peroxidase activities from heat inactivation (Brini et al. 2010). The AT2G44060 protein can protect lactate dehydrogenase from inactivation during freeze-thaw cycles (Dang et al. 2014). Considering the induction of expression of *PnLEA1* and *PnLEA2* by environmental stress, both genes are thought to be involved in the early response to environmental stress and might safeguard other proteins in *P. nigra* cells against inactivation by severe environmental stress.

Because some LEA protein genes are expressed to correlate with physiological and environmental stressors, and their translated LEA proteins accumulate in plant bodies, they have been used to produce transgenic plants with higher tolerance to environmental stress for over 20 years (Xu et al. 1996). It has been reported that the overexpression of BnLEA4-1 provides better growth in transgenic *A. thaliana* than non-transgenic plants under 150 mM NaCl or drought conditions (Dalal et al. 2009). Transgenic tobacco plants overexpressing maize ZmLEA5C, an LEA_4 family protein, show tolerance to

osmotic and cold stress (Liu et al. 2014). The overexpression of rice OsLEA14-A, an ortholog to AT1G01470, confers better growth than non-transgenic rice under stress conditions such as drought, 200 mM NaCl, 1 mM $CuSO_4$, or 1 mM $HgCl_2$ (Hu et al. 2019). In woody plants, transgenic poplar trees (*Populus simonii* \times *P. nigra*) overexpressing *Tamarix androssowii* TaLEA, an LEA_3 family protein, have lower damage under 200 mM NaCl or drought stress conditions compared to non-transgenic poplars (Gao et al. 2013). TaLEA and ThbZIP (a basic leucine zipper protein from *Tamarix hispida*) were co-overexpressed in birch (*Betula platyphylla*) and partially mitigated the influence of salt stress in transgenic birch (Zhao et al. 2016). Those transgenic plants may be able to survive under mild stress conditions such as a short dry period or a moderate concentration of salts (for example, 200 mM NaCl = approximately 1.2% NaCl); however, it might be hard for them to survive under severe stress conditions such as a long dry season or seawater (~3.5% NaCl). If PnLEA1 or PnLEA2 is overexpressed in *P. nigra*, it is not deduced to contribute to a significant improvement in stress tolerance, because PnLEA1 and PnLEA2 might only play pioneering and partial roles in stress response, and in particular, the endogenous *PnLEA1* is primarily induced at a high level when poplar plants are exposed to environmental stresses. It is strongly required that other stress response factors harboring different functions from LEA proteins cooperate with LEA proteins to confer enhanced stress tolerance.

Acknowledgments

I am grateful to Ms. Keiko Nemoto for her helpful assistance. This study was partly supported by JSPS KAKENHI Grant Number JP23580217.

References

- Altunoglu, Y. C., Baloglu, M. C., Baloglu, P., Yer, E. N. and Kara, S. (2017) Genome-wide identification and comparative expression analysis of LEA genes in watermelon and melon genomes. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 23, 5-21.
- Bae, E.-K., Lee, H., Lee, J.-S. and Noh, E.-W. (2009) Differential expression of a poplar SK₂-type dehydrin gene in response to various stresses. *BMB Rep.*, 42, 439-443.
- Battaglia, M. and Covarrubias, A. A. (2013) Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. *Front. Plant Sci.*, 4, 190.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F. and Covarrubias, A. A. (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.*, 148, 6-24.
- Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R. and Delseny, M.

- (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 67, 107-124.
- Blackman, S. A., Obendorf, R. L. and Leopold, A. C. (1995) Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. *Physiol. Plant.*, 93, 630-638.
- Bray, E. A. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, 103, 1035-1040.
- Brini, F., Saibi, W., Amara, I., Gargouri, A., Masmoudi, K. and Hanin, M. (2010) Wheat dehydrin DHN-5 exerts a heat-protective effect on β -glucosidase and glucose oxidase activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1050-1054.
- Cai, Q., Moore, G. A. and Guy, C. L. (1995) An unusual group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. *Plant Mol. Biol.*, 29, 11-23.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, T. L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421.
- Cao, J. and Li, X. (2015) Identification and phylogenetic analysis of late embryogenesis abundant proteins family in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 241, 757-772.
- Caruso, A., Morabito, D., Delmotte, F., Kahlem, G. and Carpin, S. (2002) Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 1033-1042.
- Charfeddine, S., Saïdi, M. N., Charfeddine, M. and Gargouri-Bouzi, R. (2015) Genome-wide identification and expression profiling of the late embryogenesis abundant genes in potato with emphasis on dehydrins. *Mol. Biol. Rep.*, 42, 1163-1174.
- Chen, Y., Li, C., Zhang, B., Yi, J., Yang, Y., Kong, C., Lei, C. and Gong, M. (2019) The role of the late embryogenesis-abundant (LEA) protein family in development and the abiotic stress response: a comprehensive expression analysis of potato (*Solanum tuberosum*). *Genes*, 10, 148.
- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S. and Town, C. D. (2017) Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J.*, 89, 789-804.
- Colmenero-Flores, J. M., Campos, F., Garcarrubio, A. and Covarrubias, A. A. (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol. Biol.*, 35, 393-405.
- Croser, C., Renault, S., Franklin, J. and Zwiazek, J. (2001) The effect of salinity on the emergence and seedling growth of *Picea mariana*, *Picea glauca*, and *Pinus banksiana*. *Environ. Pollut.*, 115, 9-16.
- Cuming, A. C. and Lane, B. G. (1979) Protein synthesis in imbibing wheat embryos. *Eur. J. Biochem.*, 99, 217-224.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V. and Bansal, K. C. (2009) Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *J. Biotechnol.*, 139, 137-145.
- Dang, N. X., Popova, A. V., Hundertmark, M. and Hinch, D. K. (2014) Functional characterization of selected LEA proteins from *Arabidopsis thaliana* in yeast and in vitro. *Planta*, 240, 325-336.
- Du, D., Zhang, Q., Cheng, T., Pan, H., Yang, W. and Sun, L. (2013) Genome-wide identification and analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes in *Prunus mume*. *Mol. Biol. Rep.*, 40, 1937-1946.
- Dunaeva, M. and Adamska, I. (2001) Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display. *Eur. J. Biochem.*, 268, 5521-5529.
- Dure III, L. (1993) Structural motifs in LEA proteins. In Close, T. J. and Bray, E. A. (eds.) "Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress". American Society of Plant Physiologists, Rockville, 91-103.
- Dure III, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H. D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. and Sung, Z. R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 12, 475-486.
- Dure III, L., Greenway, S. C. and Galau, G. A. (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20, 4162-4168.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L. et al. (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.*, 47, D427-D432.
- Fung, L. E., Wang, S. S., Altman, A. and Hütterman, A. (1998) Effect of NaCl on growth, photosynthesis, ion and water relations of four poplar genotypes. *For. Ecol. Manag.*, 107, 135-146.
- Gao, J. and Lan, T. (2016) Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.*, 6, 19467.
- Gao, W., Bai, S., Li, Q., Gao, C., Liu, G., Li, G. and Tan, F. (2013) Overexpression of *TaLEA* gene from *Tamarix androssowii* improves salt and drought tolerance in transgenic poplar (*Populus simonii* \times *P. nigra*). *PLoS One*, 8, e67462.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In Walker, J. M. (ed.) "The Proteomics Protocols Handbook". Humana Press, Totowa, 571-607.
- Hand, S. C., Menze, M. A., Toner, M., Boswell, L. and Moore, D. (2011) LEA proteins during water stress: not just for plants

- anymore. *Annu. Rev. Physiol.*, 73, 115-134.
- Hincha, D. K. and Thalhammer, A. (2012) LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochem. Soc. Trans.*, 40, 1000-1003.
- Hozain, M. I., Salvucci, M. E., Fokar, M. and Holaday, A. S. (2010) The differential response of photosynthesis to high temperature for a boreal and temperate *Populus* species relates to differences in Rubisco activation and Rubisco activase properties. *Tree Physiol.*, 30, 32-44.
- Hu, T., Liu, Y., Zhu, S., Qin, J., Li, W. and Zhou, N. (2019) Overexpression of OsLea14-A improves the tolerance of rice and increases Hg accumulation under diverse stresses. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26, 10537-10551.
- Huang, Z., Zhong, X.-J., He, J., Jin, S.-H., Guo, H.-D., Yu, X.-F., Zhou, Y.-J., Li, X., Ma, M.-D., Chen, Q.-B. and Long, H. (2016) Genome-wide identification, characterization, and stress-responsive expression profiling of genes encoding LEA (late embryogenesis abundant) proteins in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *PLoS One*, 11, e0165953.
- Hunault, G. and Jaspard, E. (2010) LEAPdb: a database for the late embryogenesis abundant proteins. *BMC Genomics*, 11, 221.
- Hundertmark, M. and Hincha, D. K. (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118.
- Jin, X., Cao, D., Wang, Z., Ma, L., Tian, K., Liu, Y., Gong, Z., Zhu, X., Jiang, C. and Li, Y. (2019) Genome-wide identification and expression analyses of the LEA protein gene family in tea plant reveal their involvement in seed development and abiotic stress responses. *Sci. Rep.*, 9, 14123.
- Kempf, B. and Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.*, 170, 319-330.
- Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A. and Okuda, T. (2006) Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348, 56-61.
- Kozłowski, T. T. and Pallardy, S. G. (1997) *Growth Control in Woody Plants*, Academic Press, San Diego, 641pp.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35, 1547-1549.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.
- Lan, T., Gao, J. and Zeng, Q.-Y. (2013) Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Populus trichocarpa*. *Tree Genet. Genomes*, 9, 253-264.
- Lan, Y., Cai, D. and Zheng, Y.-Z. (2005) Expression in *Escherichia coli* of three different soybean late embryogenesis abundant (LEA) genes to investigate enhanced stress tolerance. *J. Integr. Plant Biol.*, 47, 613-621.
- Liang, Y., Xiong, Z., Zheng, J., Xu, D., Zhu, Z., Xiang, J., Gan, J., Raboanatahiry, N., Yin, Y. and Li, M. (2016) Genome-wide identification, structural analysis and new insights into late embryogenesis abundant (LEA) gene family formation pattern in *Brassica napus*. *Sci. Rep.*, 6, 24265.
- Ling, H., Zeng, X. and Guo, S. (2016) Functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) protein family from *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using an *Escherichia coli* system. *Sci. Rep.*, 6, 39693.
- Liu, H., Xing, M., Yang, W., Mu, X., Wang, X., Lu, F., Wang, Y. and Zhang, L. (2019) Genome-wide identification of and functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Sci. Rep.*, 9, 13375.
- Liu, Y., Wang, L., Jiang, S., Pan, J., Cai, G. and Li, D. (2014) Group 5 LEA protein, ZmLEA5C, enhance tolerance to osmotic and low temperature stresses in transgenic tobacco and yeast. *Plant Physiol. Biochem.*, 84, 22-31.
- Liu, Y. and Zheng, Y. (2005) PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 325-332.
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D. and Lopez, R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.*, 47, W636-W641.
- Magwanga, R. O., Lu, P., Kirungu, J. N., Lu, H., Wang, X., Cai, X., Zhou, Z., Zhang, Z., Salih, H., Wang, K. and Liu, F. (2018) Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. *BMC Genet.*, 19, 6.
- Miyazawa, S.-I., Nishiguchi, M., Kogawara, S., Tahara, K., Mohri, T., Kakegawa, K., Yokota, S. and Nanjo, T. (2017) Isolation of the drought- and salt-responsive galactinol synthase (*GolS*) gene from black poplar leaves and analysis of the transformants overexpressing *GolS*. *Bull. For. Prod. Res. Inst.*, 16, 77-86.
- Muvunyi, B. P., Yan, Q., Wu, F., Min, X., Yan, Z. Z., Kanzana, G., Wang, Y. and Zhang, J. (2018) Mining late embryogenesis abundant (LEA) family genes in *Cleistogenes songorica*, a xerophyte perennial desert plant. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 3430.
- Myers, B. J., Benyon, R. G., Theiveyanathan, S., Criddle, R. S., Smith, C. J. and Falkiner, R. A. (1998) Response of effluent-irrigated *Eucalyptus grandis* and *Pinus radiata* to salinity and vapor pressure deficits. *Tree Physiol.*, 18, 565-573.
- Nagaraju, M., Kumar, S. A., Reddy, P. S., Kumar, A., Rao, D. M. and Kavi Kishor, P. B. (2019) Genome-scale identification, classification, and tissue specific expression analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes under abiotic stress conditions in *Sorghum bicolor* L. *PLoS One*, 14, e0209980.
- Nanjo, T., Futamura, N., Nishiguchi, M., Igasaki, T., Shinozaki,

- K. and Shinohara, K. (2004) Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant Cell Physiol.*, 45, 1738-1748.
- Nanjo, T., Sakurai, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Nishiguchi, M., Kado, T., Igasaki, T., Futamura, N., Seki, M., Sakaki, Y., Shinozaki, K. and Shinohara, K. (2007) Functional annotation of 19,841 *Populus nigra* full-length enriched cDNA clones. *BMC Genomics*, 8, 448.
- Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453.
- Nguyen, N. H., Nguyen, C. T. T., Jung, C. and Cheong, J.-J. (2019) AtMYB44 suppresses transcription of the late embryogenesis abundant protein gene *AtLEA4-5*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 511, 931-934.
- Nishiguchi, M., Nanjo, T. and Yoshida, K. (2012) The effects of gamma irradiation on growth and expression of genes encoding DNA repair-related proteins in Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*). *J. Environ. Radioact.*, 109, 19-28.
- Nishiguchi, M., Yoshida, K., Sumizono, T. and Tazaki, K. (2002) A receptor-like protein kinase with a lectin-like domain from lombardy poplar: gene expression in response to wounding and characterization of phosphorylation activity. *Mol. Genet. Genomics*, 267, 506-514.
- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Reyes, J. L., Garcarrubio, A. and Covarrubias, A. A. (2010) Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 154, 373-390.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. and Tran, L.-S. P. (2014) Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.*, 5, 86.
- Pedrosa, A. M., Martins, C. d. P. S., Gonçalves, L. P. and Costa, M. G. C. (2015) Late embryogenesis abundant (LEA) constitutes a large and diverse family of proteins involved in development and abiotic stress responses in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). *PLoS One*, 10, e0145785.
- Renaut, J., Lutts, S., Hoffmann, L. and Hausman, J.-F. (2004) Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. *Plant Biol.*, 6, 81-90.
- Ried, J. L. and Walker-Simmons, M. K. (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.*, 102, 125-131.
- Shih, M.-D., Hoekstra, F. A. and Hsing, Y.-I. C. (2008) Late embryogenesis abundant proteins. *Adv. Bot. Res.*, 48, 211-255.
- Shih, M.-D., Hsieh, T.-Y., Lin, T.-P., Hsing, Y.-I. C. and Hoekstra, F. A. (2010) Characterization of two soybean (*Glycine max* L.) LEA IV proteins by circular dichroism and Fourier transform infrared spectrometry. *Plant Cell Physiol.*, 51, 395-407.
- Shimizu, T., Kanamori, Y., Furuki, T., Kikawada, T., Okuda, T., Takahashi, T., Mihara, H. and Sakurai, M. (2010) Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides. *Biochemistry*, 49, 1093-1104.
- Teskey, R., Wertin, T., Bauweraerts, I., Ameye, M., McGuire, M. A. and Steppe, K. (2015) Responses of tree species to heat waves and extreme heat events. *Plant Cell Environ.*, 38, 1699-1712.
- The UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.*, 47, D506-D515.
- Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L. et al. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313, 1596-1604.
- Wang, W., Gao, T., Chen, J., Yang, J., Huang, H. and Yu, Y. (2019) The late embryogenesis abundant gene family in tea plant (*Camellia sinensis*): genome-wide characterization and expression analysis in response to cold and dehydration stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 135, 277-286.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1-14.
- Welling, A., Moritz, T., Palva, E. T. and Junttila, O. (2002) Independent activation of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen. *Plant Physiol.*, 129, 1633-1641.
- Wu, C., Hu, W., Yan, Y., Tie, W., Ding, Z., Guo, J. and He, G. (2018) The late embryogenesis abundant protein family in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): genome-wide characterization and expression during abiotic stress. *Molecules*, 23, 1196.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.-H. D. and Wu, R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.*, 110, 249-257.
- Zan, T., Li, L., Li, J., Zhang, L. and Li, X. (2020) Genome-wide identification and characterization of late embryogenesis abundant protein-encoding gene family in wheat: evolution and expression profiles during development and stress. *Gene*, 736, 144422.
- Zhao, X., Zheng, T., Shao, L., Xiao, Z., Wang, F., Li, S., Zang, L., Zheng, M., Li, Y. and Qu, G.-Z. (2016) Variation analysis of physiological traits in *Betula platyphylla* overexpressing *TaLEA-ThbZIP* gene under salt stress. *PLoS One*, 11, e0164820.

Supplementary data legends

Supplementary data can be found at

<https://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/bulletin/460/460toc-en.html>

Fig. S1

Gene expression of *PnLEA1* and *PnLEA2* in *Populus nigra*.

Total RNA was isolated from roots (R) and 10th leaf (L) from apex of ~1.5 m poplar trees. mRNA level of roots was defined as 1.0. Error bars represent \pm SD ($n = 3$). Asterisks indicate significant differences between roots and leaves (Welch's *t*-test; *** $p < 0.001$).

Fig. S2

Poplar plantlets under drought stress conditions.

Dates show days after end of watering. The plantlets in each photo are not the same individuals, because they have been discarded after collecting the leaves in order to avoid the effects of leaf

detachment.

Fig. S3

Poplar plantlets under salinity stress conditions.

Dates show days after exposing poplar plantlets to hydroponic solution with 200 mM NaCl. The plantlets in the photos are not equal to the leaves-collected plantlets for the reason as described in the Fig. S2 legend.

Table S1

Synthetic DNA primers used for RT-qPCR and vector construction.

ポプラの環境ストレス応答に参与する LEA タンパク質の性質

西口 満^{1)*}

要旨

後期胚発生蓄積 (late embryogenesis abundant, LEA) タンパク質は、種子発達過程の後期および環境ストレスを受けた栄養組織で蓄積することが知られている。LEA タンパク質は植物だけでなく、動物、真菌類、細菌類にも存在する。LEA タンパク質は多様な構造と遺伝子発現様式を持ち、環境条件の不利な変化から細胞を保護していると考えられている。本研究では、ポプラ (*Populus nigra* L.) の LEA タンパク質の性質を明らかにするため、2つの LEA タンパク質、PnLEA1 と PnLEA2 の cDNA を単離し、解析を行った。予想される PnLEA1 タンパク質と PnLEA2 タンパク質は構造的に異なっており、PnLEA1 は1つの LEA_1 ドメインを持つ LEA_1 ファミリータンパク質、PnLEA2 は2つの LEA_2 ドメインを持つ LEA_2 ファミリータンパク質と同定された。*PnLEA1* 遺伝子と *PnLEA2* 遺伝子は、根および葉で発現していた。*PnLEA1* の遺伝子発現は、乾燥、高塩、および低温ストレスで増加した。*PnLEA2* も乾燥および高塩ストレスで遺伝子発現を増加させたが、増加の程度は *PnLEA1* よりも小さかった。PnLEA1 または PnLEA2 を過剰発現した大腸菌は初期の耐塩性が向上した。これらの結果は、ポプラにおいて PnLEA1 および PnLEA2 が環境ストレス耐性機構に参与することを示唆している。

キーワード：環境ストレス、大腸菌、遺伝子発現、LEA タンパク質、メッセンジャー RNA、ポプラ

原稿受付：令和元年12月4日 原稿受理：令和3年4月7日

1) 森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域

* 森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1

論文 (Original article)

平坦な河畔林における2次元の落葉散布シミュレーション

阿部 俊夫^{1)*}、山野井 克己²⁾、倉本 恵生³⁾

要旨

河川への落葉供給源の範囲を明らかにするという観点から、2次元で面的に落葉散布を推定できる新たなモデルを開発した。このモデルは河畔林の風向・風速や葉の落下速度、樹冠中央部の高さなど物理的パラメータに基づいて落葉散布をシミュレートするものである。2箇所の平坦な河畔林で調査したヤナギ落葉散布データを利用してモデルの検証をおこなったところ、樹冠近傍を除いて、新モデルは観測された落葉散布を比較的良好に再現することができ、既存の1次元モデルよりも有効な評価ツールと考えられた。次に、単純な構造の河畔林を想定し、本モデルを用いて河畔林帯の落葉散布を試算したところ、林帯幅が広がっても河道への落葉供給はあまり増加しないことが明らかとなった。これは、河岸に近い樹木ほど河道への落葉供給に大きく寄与するためであった。ただし、河畔林が河道の風上側にある場合は、風下側にある場合よりも落葉供給は増加すると評価され、風上側の河畔林が落葉供給源としてより重要であることが明らかとなった。また、河道形状によっても河道への落葉供給は変わると考えられ、河道が大きく蛇行している場合には谷長あたりの落葉供給は直線河道よりも増加すると評価されたが、河畔林の立木密度が低いと仮定して落葉供給が減る場合もあると考えられた。

キーワード：落葉散布、モデルシミュレーション、風速、河畔林、蛇行

1. はじめに

森林から供給される落葉などのリターは、河川の水生動物にとって重要なエサ資源の一つと考えられている (Cummins et al. 1973, Fisher and Likens 1973, Hicks 1997, Wallace et al. 1999, 阿部・布川 2005, 阿部ら 2006a)。特に、川幅の狭い上流部では河川内での付着藻類による1次生産が少なく、森林からの有機物供給が一層重要となっている (Kochi et al. 2004, 阿部ら 2006a)。また、河川内の落葉・落枝は水生昆虫のような底生動物の微生物息場所としても機能することが知られている (加賀谷 1990, Kobayashi and Kagaya 2004)。河畔林のような河川周辺の森林は、ほかにも多くの生態学的機能を有しているが (中村 1995)、落葉などの有機物供給源という観点からも重要な存在であり、保全が求められる。

落葉供給源として保全すべき林帯幅を考える場合、河畔林の樹木からどれほどの範囲に落葉が散布されるのか、すなわち落葉の移動距離に関する知見が必要である。落葉移動は樹冠から落下する際の移動 (Ferrari and Sugita 1996, Staelens et al. 2003, 阿部ら 2014a)、落下後の林床での再移動 (Orndorff and

Lang 1981, France 1995, 阿部ら 2009) の2プロセスに分かれており、急斜面では後者も活発であるが、緩斜面や平坦地では前者の移動がより重要である (Kochi et al. 2004, 阿部ら 2014a, 2014b)。しかし、多くの研究事例はケーススタディに止まっており、様々な河畔林に適用可能な物理モデルにより河畔林全体の落葉散布を明らかにしようとした研究は少ない。阿部ら (2006b) は樹冠から落下する葉の散布距離を風速変動により推定する1次元モデルを提案し、観測された森林内の落葉散布データで一定の有効性も確認した。ただし、このモデルでは一度に1方向の落葉散布しか計算できず、無風時の落葉発生を評価できない欠点もあるため、面的予測の可能な2次元モデルの開発が求められていた (阿部ら 2014b)。

そこで本研究では、現地の風速データから面的な落葉散布を計算できるシミュレーションモデルを新たに開発し、阿部ら (2014a) が調査した2箇所の平坦な河畔林のヤナギ落葉散布データを用いてモデルの検証をおこなった。さらに、このモデルを用いて、河畔林帯全体での落葉散布についても試算をおこない、林帯幅や

原稿受付：令和2年7月1日 原稿受理：令和3年5月7日

1) 森林総合研究所 東北支所

2) 森林総合研究所 北海道支所

3) 森林総合研究所 森林植生研究領域

* 森林総合研究所 東北支所 〒020-0123 岩手県盛岡市下厨川字鍋屋敷 92-25

河道形状によって河道への落葉供給がどう変化するかを検討した。

2.研究方法

2.1 調査地の概要

調査は北海道にある赤川河畔林（北海道樺戸郡月形町）、勇払川河畔林（北海道苫小牧市）の2箇所でおこなった。両者とも地形は平坦で河川とほぼ平行に林道が通っている。赤川は水面幅3 m前後で、幅120 mの谷底面に樹高12~16 mのヤナギ類やケヤマハンノキ (*Alnus hirsuta*)、ハルニレ (*Ulmus davidiana* var. *japonica*) などが生育していた。勇払川は水面幅4~5 mで、幅480 mの広い平坦地に樹高10~15 mのヤナギ類やケヤマハンノキ、カエデ類 (*Acer* spp.)、シラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) などがまばらに生育していた。調査個体は、赤川では樹高14.5 mのエゾノキヌヤナギ (*Salix pet-susu*)、勇払川では樹高12.3 mのオノエヤナギ (*Salix sachalinensis*) であり、いずれも林道脇に位置していた。これは、落葉散布を追跡できるよう、林道から高所作業車を利用して落葉直前の葉に着色をおこなったためである (阿部ら 2014a)。

風向・風速および降雨量の観測は、調査個体から約20 m離れた林内のギャップでおこなった。風向・風速は樹冠層から林床付近まで4高度 (11.0 m、7.7 m、4.3 m、1.0 m) で5秒おきに瞬時値を測定した。使用した観測システムは阿部ら (2008) とほぼ同様で、風向を4高度すべてで計測した点のみ異なる。雨量の観測には、Onset社の転倒マス雨量計RG3-Mを用いた。なお、調査期間は阿部ら (2014a) と同一で、赤川河畔林では2010年10月14日~11月18日、勇払川河畔林では2011年10月7日~11月7日である。

2.2 既存の落葉散布モデルの概要と問題点

阿部ら (2006b) の1次元モデルは、風散布種子の散布モデル (Greene and Johnson 1989) を改良したものである。これらのモデルでは葉や種子の移動距離 x (m) は次のような簡単な弾道学の公式で表現できるとしている。

$$x = Hw / F \quad \dots \dots (1)$$

ここで、 H は地表までの落下高 (m)、 w は風速 (m/s)、 F は物体の落下速度 (m/s) である。式 (1) は落下中の物体が風速と同じ速度で移動すると仮定しており、広葉樹の落葉や風散布種子ではおおそ成立すると考えられる。落下高 H と落下速度 F を一定値と考えれば、移動距離 x は基本的に風速 w に依存する。風速 w は、頻度分布が対数正規分布に従うことから、観測した風速データから対数正規分布のパラメータを求めれば、移動距離 x の頻度分布を計算することが可能である。この際、阿部ら (2006b) では風向を16方位に分けて風速分布を求めることで、特定方向への落葉散布を推定した。

しかし、どの方位へ何枚の落葉が散布されるかまでは分からないため、このモデルを用いて面的散布を予測することは難しい。さらに、予測される移動距離 x は基本的に対数正規分布となるが、樹冠近傍では現実の落葉分布と大きく異なっている。これは無風時に発生する落葉を評価できないためである。

また、このモデルでは、予測したい方位の風速データのみを抽出して計算するが、実際の落葉移動は落下中に刻々と変化する風の合力によって決まるため、1方位の風速分布だけで説明できるとは限らない (阿部ら 2014b)。葉の落下速度 F についても、個々の葉によって相当バラつきがあるが (阿部ら 2006b)、平均値で代表させているため、落葉の散布距離 x の変動が過小に推定されている可能性もある。

2.3 新たな落葉散布モデルの開発

そこで本研究では、風速の頻度分布を前提とせず、観測された風向・風速の時系列データを直接利用して、樹冠から落下する葉の移動をシミュレートする方法を考案した。すべての落葉が樹冠中央部から発生すると仮定し (ポイントソースモデル)、樹冠中央の座標を $(0, 0, H)$ とすると、式 (1) より落下中の葉の座標 (x, y, z) は以下のように表される。なお、 x 軸は東西方向 (東側が正)、 y 軸は南北方向 (北側が正) とする。

$$x = \sum W_x \quad \dots \dots (2)$$

$$y = \sum W_y \quad \dots \dots (3)$$

$$z = H - \sum F \quad \dots \dots (4)$$

ここで W_x 、 W_y はそれぞれ x 軸方向と y 軸方向の風速成分である。風向・風速の詳細な時系列データが得られていれば、葉の座標 (x, y, z) を例えば5秒おきに逐次計算することが可能であり、 $z = 0$ となった時の x 、 y が葉の落下地点の座標となる (Fig. 1)。

ただし、風速は高度によって異なるため (阿部ら 2008)、葉の落下にともない計算に用いる風速データの高度も下げていく必要がある。阿部ら (2014a) の調

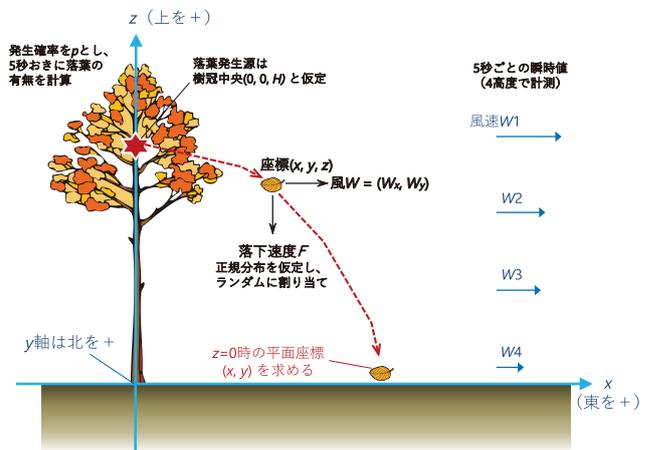


Fig. 1. 風速の時系列データを用いた落葉散布モデルの概略

査では、河畔林内の風向・風速は樹冠層から林床付近まで4高度(11.0 m、7.7 m、4.3 m、1.0 m)で5秒おきに瞬時値を測定しており、これらから4高度の風速ベクトル(W_x 、 W_y)の時系列データを得ることができる。そこで、式(2)、(3)の計算では、 z の値に応じて4高度の風速ベクトルを順次切り替えて計算をおこなった。すなわち、 $z \geq 9.35$ の範囲では高度11.0 mの風速、 $9.35 > z \geq 6.0$ では高度7.7 mの風速、 $6.0 > z \geq 2.0$ では高度4.3 mの風速、 $2.0 > z$ では高度1 mの風速を用いた。

落葉発生(樹冠からの落下開始)については、確率 p でランダムに生起すると仮定し、風速の測定間隔と同じ5秒ごとに落葉の有無をシミュレートした。ただし、落葉数は落葉期中でも時期によって大きく変化するため、約1週間おきにリタートラップで調べた落葉数を調査期間の長さ(5秒を1単位とする)で除して、それぞれの調査期間内の相対的な発生確率 p を求めた。なお、落葉が発生した場合、その葉の落下速度 F を決定する手順については次節で説明する。

2.4 落葉の落下速度 F の決定

落下速度 F は個々の葉によって異なり、風速と並んで、落葉散布距離の変動を大きくする要因になっていると考えられる。落下速度 F の頻度分布は正規分布に近い形を示す(阿部ら 2006b)ことから、本研究では落下速度 F を正規分布で近似し、発生した落葉に対して正規乱数を用いてランダムに F 値を割り当てた。このとき、分布形を決める平均値、標準偏差の2パラメータは、次のようにして落下速度の実測データから求めた。

落下速度の測定方法は、阿部ら(2006b)と同様である。すなわち、屋内の高さ7 mから葉を落下させ、高さ4 mから床に到達するまでの時間から落下速度を算出した。ただし、葉が雨で濡れると乾燥時よりも落下は速くなるため、調査地の雨量データに基づいて降雨中は“湿潤状態”、降雨終了から7時間は“半湿潤状態”(夜の降雨では7時間以上経過しても夜明けまで半湿潤状態)、それ以外は“乾燥状態”にあると便宜的に区分

し、計算に用いる落下速度 F を変えた。まず風乾した落葉サンプルについて測定をおこなった後、同じサンプルを5分間水に漬け、ザルで水を切ってから再度測定することで、Fig. 2のように乾燥状態と湿潤状態における落下速度 F の頻度分布が得られた。使用した落葉はリタートラップから無作為に抽出したもので、各個体とも着色ありの葉が100枚、着色なしの葉が60枚である。半湿潤状態のパラメータについては、平均値、標準偏差ともに乾燥状態と湿潤状態の中間(平均)とした。なお、頻度分布の正規性について検定をおこなったところ、乾燥状態のエゾノキヌヤナギ着色葉を除いて、正規分布から外れるものはなかった(Kolmogorov-Smirnov検定、乾燥状態のエゾノキヌヤナギ着色葉： $P=0.002$ 、それ以外： $P>0.05$)。エゾノキヌヤナギに関しても、湿潤状態の葉や無着色の葉ではおおそ正規分布に従うことから、基本的に落葉の落下速度 F は正規分布とみなせると考えられた。

2.5 計算に用いたパラメータと落葉数の補正

以上の手順により、モデル計算に必要なパラメータを求めるとTable 1のようになった。樹冠中央部の高さ H は、落葉直前に根元から30 m離れた位置から見て、樹冠を平面に投影した際、重心に相当する箇所の高さを計測した値である。重心位置の判断は、現地で見目にておこなった。樹冠内の葉は、2個体とも下部より上部に多く分布していたため、樹冠上端・下端の中間点(エゾノキヌヤナギ10.25 m、オノエヤナギ7.65 m)よりも H の方が高くなっている。葉の落下速度 F については、塗料による着色は葉の重量を微増させるため落下速度が増す可能性もあるが、勇弘川河畔林のオノエヤナギでは、予想通り着色した葉の方が F は大きかった。一方、赤川河畔林のエゾノキヌヤナギでは着色のない葉の方がわずかに値は大きかったが、この差は統計的に有意といえるほどではなかった(等分散を仮定した t 検定、乾燥状態の葉： $P=0.10$ 、湿潤状態の葉： $P=0.64$)。また、樹木は葉を落とす前に葉中の物質を樹体へ引き戻すが(Nordell and Karlsson 1995)、樹種や個体によって引き戻し率は異なることが知られている(Niinements and Tamm 2005)。着色なしの葉で比較すると、落下速度 F はオノエヤナギよりもエゾノキヌヤナギの方が大きく(等分散を仮定した t 検定、乾燥状態の葉： $P=0.02$ 、湿潤状態の葉： $P=0.02$)、赤川河畔林のエゾノキヌヤナギよりも勇弘川河畔林のオノエヤナギの方が物質の引き戻し率が高かった可能性も考えられる。落葉の発生確率 p は時期によって大きく異なり、赤川河畔林では11月5日から12日が落葉最盛期であったが、勇弘川河畔林では10月12日から31日まで比較的長い期間で落葉が活発であった。赤川河畔林の調査は11月18日まで実施しているが(阿部ら 2014a)、最後の調査期間については、降雪があったため計算から除外した。

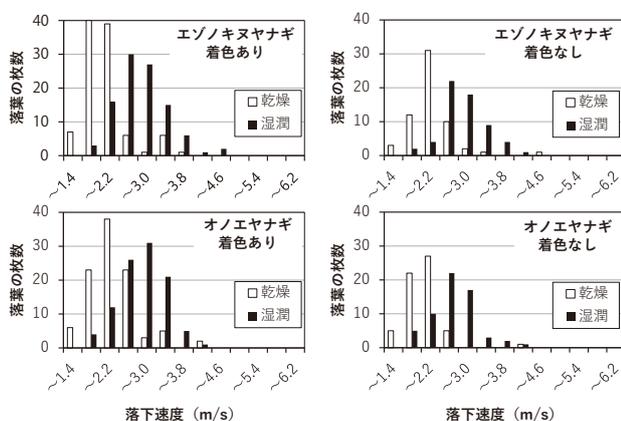


Fig. 2. エゾノキヌヤナギ(赤川)とオノエヤナギ(勇弘川)の落葉落下速度

Table 1. 落葉散布モデルの計算に用いたパラメータ

調査地	赤川河畔林		勇払川河畔林	
調査個体の樹種	エゾノキヌヤナギ		オノエヤナギ	
樹高 (m)	14.5		12.3	
樹冠中央部の高さ H (m)	10.6		9.2	
落下速度 F (m/s)	着色あり	着色なし	着色あり	着色なし
<乾燥状態>				
平均値	1.92	2.04	2.06	1.85
標準偏差	0.48	0.48	0.50	0.40
<湿潤状態>				
平均値	2.65	2.69	2.71	2.48
標準偏差	0.53	0.49	0.48	0.50
落葉の発生確率 p (%) *				
<赤川>				
2010年				
10月14日～19日	6.1	同左		
10月19日～24日	3.2	同左		
10月24日～29日	8.2	同左		
10月29日～11月5日	9.5	同左		
11月5日～12日	29.4	同左		
<勇払川>				
2011年				
10月7日～12日			9.8	同左
10月12日～18日			38.4	同左
10月18日～24日			31.3	同左
10月24日～31日			20.0	同左
10月31日～11月7日			5.8	同左
落葉数の補正係数 c (SD)	3.96 (0.30)	同左	5.26 (0.28)	同左

* 観測された落葉数を、観測期間の長さ (5秒単位) で除した値。

なお、Table 1の一番下に記した落葉数の補正係数 c とは、モデルで計算される落葉数をリタートラップの実測値と合致するよう補正するパラメータである。落葉の発生確率 p はどの期間に落葉が多かったかを示す相対的な指標であるが、これのみで落葉数を正しく推定できない。そこで、着色ありの葉についてモデルで計算された各地点の落葉数 (単位面積あたりの枚数) に補正係数 c を乗じた値を求め、これらがリタートラップの実測値ともっとも合致するよう最小2乗法を用いて c 値を決定した。ただし、本モデルでは根元付近の落葉数が過大推定されることから、根元のリタートラップのみは補正係数 c の計算から除外した。着色のない葉についても、補正係数 c は着色ありの場合と同じとして計算した。

本モデルでは落葉発生のタイミングや落下速度 F の割り当てなど確率に基づくシミュレーションをおこなうため、計算の度に予測結果がわずかに変化する。本研究では、まずモデルの予測精度を調べるため、着色された葉に対して100回の試行をおこない、観測値と比較した。ついで、着色なしの葉に対して10回の試行をおこない、平均を求めた。後述のように、試行回数10回でも、平均値については100回の場合と同様であった。

2.6 河畔林全体に対する落葉散布の試算

調査個体に対するモデル予測を実施した後、河畔林帯全体での落葉散布についても試算をおこなった。本研究では計算を容易にするため、均一で単純なヤナギ同齢一斉林を想定し、調査個体と同じ樹高の同種個体が平坦地に等間隔で格子状に並んでいると仮定した。具体的には、先に求めた単木の計算結果 (着色なしの葉) を河畔林内の全個体に一律に当てはめ、個々の個体から散布される落葉数を地点ごとに合計した。ただし、ポイントソースモデルの特性上、樹冠下の落葉数を精度よく予測することは困難なため、根元から5 m未満の範囲についてはリタートラップの観測値を用いた (トラップ間は、距離の逆数を重みとした重みづけ平均で補間)。樹木の間隔は赤川河畔林では5 m、勇払川河畔林では樹木がまばらなため10 mとした。

まず、河畔林帯の幅を変化させた場合、川に供給される落葉数がどう変化するかを検討した。河畔林の幅は、河道に平行に並んだ樹木の列数によって幅5 mから30 mまで段階的に変化させた。河道は幅5 mの直線形状とし、もっとも河道に近い樹木と川岸との距離は1 mとした。また、川の流れる方向は、実際の状況とおおよそ合致するよう、赤川は真北から真南へ、勇払川は真西から真東へ流れているとした。

次に、蛇行のような河道形状の違いによって、川に供給される落葉数がどう変化するかについても検討した。河道幅は5 mとし、河道形状は直線河道と2種類の

蛇行河道を検討した。蛇行河道については、線形を正弦曲線で表現し、波長は河道幅の5倍(25 m)とした。蛇行の振幅は、河道幅の1倍(5 m)、2倍(10 m)の2種類とした。川は幅30 mの河畔林帯の中央部を流れ、河道内に樹木は生育しないとした。川の流れる方向は、大局的には赤川は南北方向、勇払川は東西方向であるとした。なお、蛇行河道については、正弦曲線の位相によって立木との位置関係が変化するため、位相を5 mずつ変えて5回試行をおこない平均を求めた。

3. 結果と考察

3.1 調査個体に対するモデル予測と観測値の比較

リタートラップによる落葉散布調査をおこなった4方向について、モデルで予測された着色ありの落葉数と観測値を比較した(Fig. 3、4)。モデル予測値については、100回試行した結果を小さい順に並べたとき5%と95%の位置に来る値を示している(2本のラインの間に予測結果の90%が含まれる)。赤川河畔林(Fig. 3)では、東側と西側については距離5 m以遠では観測値

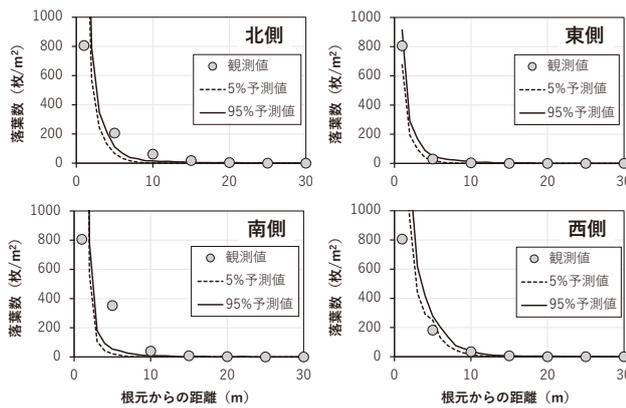


Fig. 3. 赤川河畔林の調査個体に対する落葉数のモデル予測と観測値の比較
予測値は、100回試行結果のうち小さい順に5%および95%の値を示した。葉の落下速度は、着色した葉のデータを使用した。

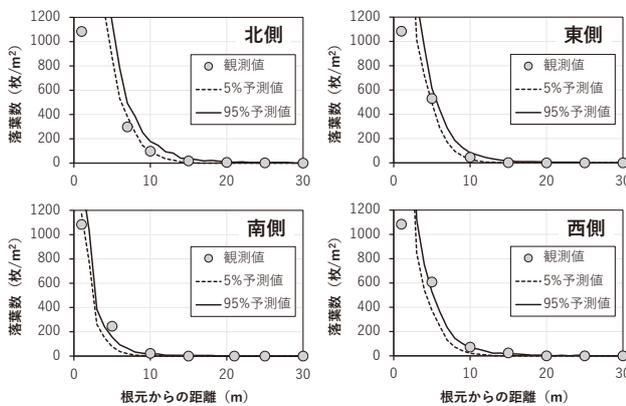


Fig. 4. 勇払川河畔林の調査個体に対する落葉数のモデル予測と観測値の比較
予測値は、100回試行結果のうち小さい順に5%および95%の値を示した。葉の落下速度は、着色した葉のデータを使用した。

に近い予測結果が得られたが、林道沿いとなる北側と南側への落葉散布については過少推定となった。勇払川河畔林(Fig. 4)では、距離5 m以遠では4方向ともおおむね観測値に近い予測結果が得られた。ただし、両者とも根元付近については誤差が大きかった。本モデルはポイントソースを仮定しているため、根元付近に落葉が集中する性質があるが、実際の樹木では根元から3~4 mまで樹冠が広がっており、無風時でも多くの落葉が散布されると考えられる。距離5 m未満については、樹冠下となる可能性が高いため、本モデルで精度よい予測を行うことは困難といえる。

距離5 m以遠のデータについて、予測値と観測値の関係を調べるとFig. 5のようになった。勇払川河畔林では、林道以外の方向について傾き1.100、林道方向については傾き0.869の回帰直線が得られ、R²はそれぞれ0.782および0.954と高かった。しかし、赤川河畔林では林道方向(南北方向)は明らかに予測値が過小であり、回帰直線の傾きは0.172と小さく、R²も0.517と低めであった。林道以外の方向では傾きが1.434と大きいものの、R²が0.987と高い回帰直線が得られた。本研究では風向・風速を林内で観測したが、林道上は風を遮る樹木がないため、林内より風が強く、より遠方のトラップまで散布される落葉数が多くなった可能性が考えられる。実際、赤川河畔林では、樹冠層に相当する

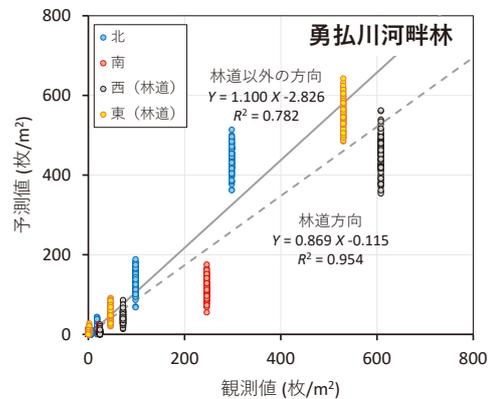
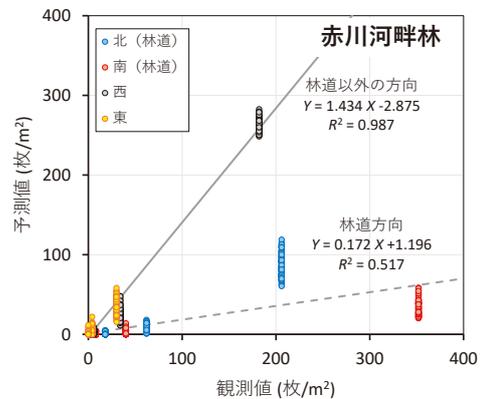


Fig. 5. モデルで予測された落葉数と観測値との関係
図中の直線は、林道方向とそれに直交する方向の回帰直線である。なお、ポイントソースモデルの特性上、樹冠下となる距離1 mのデータは除外している。

高度11.0 mで林道方向に近い風が多く観測された(阿部ら 2014a)。一方、勇払川河畔林では南風が多く、林道方向(東西)の風が少なかった(阿部ら 2014a)ため、林道の影響が明瞭に表れなかったものと推察される。なお、Fig. 5において落葉数の多い点はいずれも距離5 m(一部7 m)のデータであり、樹冠に近いため、予測値と観測値の差がやや大きい、より遠方については観測値に近い予測となっている。このように、林道の影響がない林内だけであれば、樹冠下を除き、本モデルは実際の落葉散布を比較的良好に再現できると考えられる。

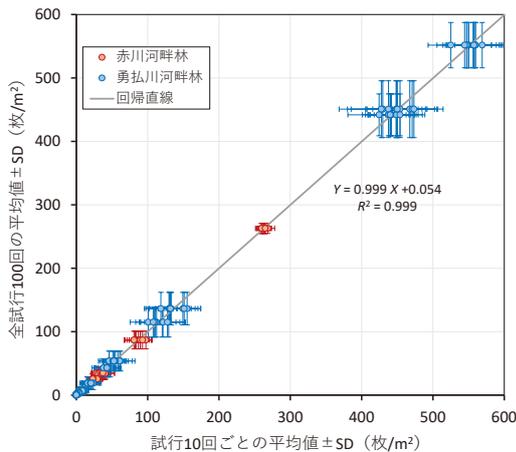


Fig. 6. シミュレーションの試行回数による予測結果の差異

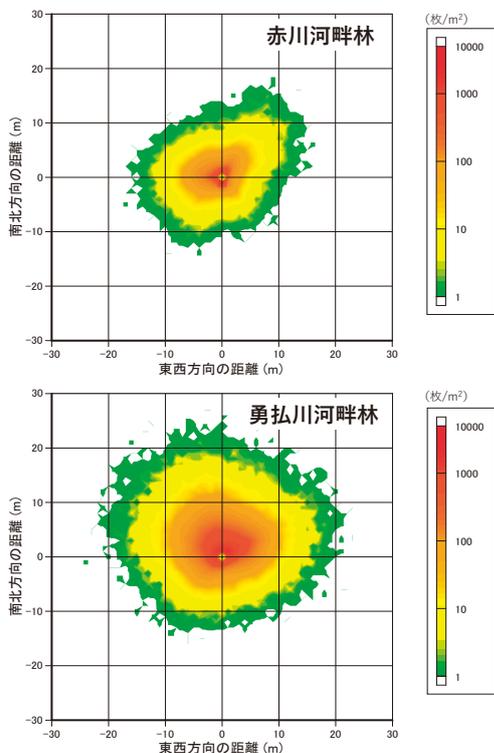


Fig. 7. モデルで予測された調査個体の面的な落葉散布状況 10回試行の平均値。葉の落下速度として、着色のない葉のデータを使用した。

同様に、着色のない葉についてもモデル予測をおこなった。これまで述べたように本モデルによる予測には幅があり、本来であれば十分な回数の試行をおこなって予測結果の変動範囲も示すべきであるが、以降の解析では計算を容易とするため、10回試行の平均値を全個体に当てはめて計算をおこなった。平均値については、試行回数が10回でも100回試行の場合とほぼ変わらなかった(Fig. 6)。着色のない葉の散布状況を面的に表示した図がFig. 7である。着色された葉の予測結果とほぼ同じであるが、落下速度Fの違いを反映して、赤川河畔林では落葉散布範囲がわずかに狭く、勇払川河畔林ではわずかに広がっている。

3.2 河畔林から河川に供給される落葉数への影響

河畔林の林帯幅を変えて、河川に供給される落葉数がどう変化するか試算した結果をFig. 8に示す。樹木が2列以上の場合、1列しかない場合に比べれば落葉供給がわずかに増加するものの、林帯幅が広がっても河道への落葉供給はほとんど増加しない試算結果となった。単木レベルの落葉散布は根元から10~20 mの範囲に及んでおり(Fig. 7)、単純に考えれば、河畔林の幅も20 m程度までなら、広いほど落葉供給が増加するように思われる。しかし、落葉数が極めて多いのは樹冠に近い距離5 m程度までであり、10 mより遠方へ散布される落葉数はわずかなため、河道に落下する落葉についても、その大部分が河岸近くの樹木から供給されていると考えられる。

Fig. 8によれば、むしろ林帯幅より河畔林と河道の位置関係によって、河道への落葉供給が大きく異なることが分かる。赤川では河畔林の東側よりも西側に河道があった場合の方が供給数は1.3倍多く、勇払川では南

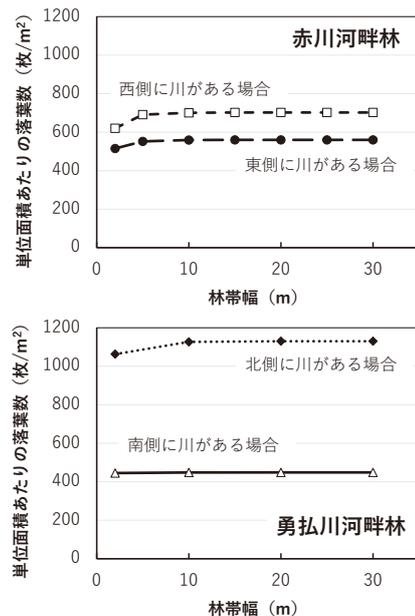


Fig. 8. 河川に供給される落葉数と林帯幅の関係 河道形状は、赤川は南北方向、勇払川は東西方向の直線(幅5 m)とした。

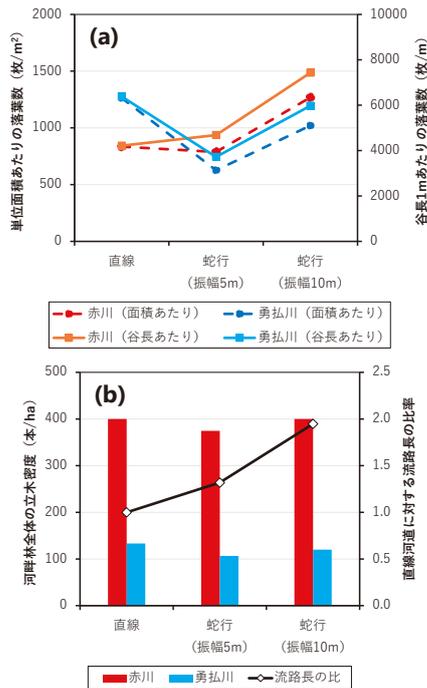


Fig. 9. 河道形状による河川への落葉供給数 (a)、河畔林の立木密度と流路長比 (b) の変化

幅30mの均質な河畔林の中央部に幅5mの川が流れているとした。蛇行河道の線形は波長25mの正弦曲線とし、位相を5mずつずらして5回計算をおこない平均を求めた。

側より北側に河道があった場合の方が2.4~2.5倍多くなった。これは落葉期の主風向の影響であり、河畔林が河道の風上側にあると、より遠方の樹木からも落葉が供給されるため、落葉供給が増えたと考えられる。当然、河道の両側に河畔林が存在することが望ましいが、風上側の河畔林の方が、落葉供給源としての重要性はより高いといえる。

次に、河道形状の違いで河道へ供給される落葉数がどう変化するのかについて検討した (Appendix Fig.1~6)。Fig. 9は、単位面積あたりと谷長1mあたりの落葉数 (a)、河畔林の立木密度と流路長の比 (b) を示したものである。赤川では直線よりも振幅10mの蛇行河道の方が落葉供給は多かった。河道が蛇行しているほど河道長は長くなるため、基本的に蛇行には区間全体の落葉供給を増加させる効果があると考えられる。しかし、勇弘川では蛇行による落葉供給の増加は認められなかった。立木間隔が10mと広い勇弘川では、直線河道の場合がもっとも河畔林の立木密度が高く、河道を蛇行させると配置した樹木が河道に重なり、立木密度の低下、特に落葉供給に重要な河道近くの樹木が少なくなった (Appendix Fig.5, 6)。実際の河畔林では樹木の配置はもっとランダムに近く、河道の蛇行も正弦曲線のような規則的な形状とは限らないが、河道上には樹木は通常生育できず、その面積は河道が蛇行しているほど大きくなる。このため、樹木がまばらな河畔林で

は、河道と樹木の位置関係により、偶然、河道近くの樹木が少なくなることは起こりうると考えられる。

なお、今回のシミュレーションでは、蛇行河道の位相をずらしても結果は大きく変わらなかった。単位面積あたりの落葉数については変動係数が0.03~0.62%と小さく、立木本数も計算エリア全体で1本程度の違いであった。

4. まとめと残された課題

本研究では、落葉発生を確率的に表現し、個々の落葉の動きをシミュレーションすることで面的な落葉散布を予測できる新たな落葉散布モデルを開発した。本モデルにより実際の河畔林で観測されたヤナギ2個体の落葉散布状況をおおよそ再現することができた。阿部ら (2006b, 2014b) の1次元モデルは特定方向のみの予測で、無風時に発生する落葉は評価できないという問題があったが、本モデルでは無風時も含めて面的な落葉散布予測が可能であり、樹冠下を除けば、比較的精度よく予測できるという利点がある。計算をおこなうためには、現地の詳細な風向・風速データ、対象とする樹木の葉の落下速度分布、落葉数の季節変化など多くの調査・観測データが必要であるものの、この点は既存の1次元モデルでもほぼ同様である。このことから、本モデルは河畔林の落葉散布を評価するためのより有効なツールと考えられる。

本モデルを用いた河畔林の落葉散布数の試算では、林帯幅を広くしても河道内への落葉供給はあまり増加しないが、河畔林が河道の風上側にあるか風下側にあるかは落葉供給に大きく影響することが明らかとなった。また、河道の蛇行によって同じ谷長あたりの落葉供給が増加する可能性も示唆されたが、河畔林の立木密度が小さいと、かえって落葉供給が減少する場合もあると考えられた。ただし、これらの試算は極めて単純化したモデル林分を想定したものであり、林帯幅を変化させた場合も林内風速は変化しないとして試算をおこなっている。複雑な構造を有する実際の河畔林を模してシミュレーションをおこなうのは計算のハードルがかなり高いため、現実的には林分構造をある程度単純化することはやむを得ないが、試算結果がどの程度普遍的なものかについては慎重に判断する必要がある。

また、本モデルは、実際の風速データを必須とすることから、樹木の成長にともなって樹高が高くなった場合に落葉散布範囲がどう変化するかといった将来予測に関しては不向きである。河畔林の平均的な樹木サイズが大きくなった場合、立木密度の低下によって、林内の風が強まる可能性もあり、林内の風速プロファイルがどう変化するかを正確に推定することは困難と考えられる。

なお、本研究では平坦な河畔林を対象としたため、樹冠中央部から林床までの落下高は常に一定であっ

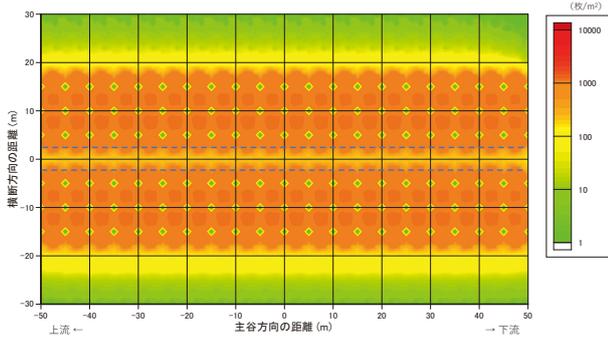
た。ただし、山地溪流のように斜面上の森林が落葉供給源となるケースでは、根元から河道方向へ離れるほど落下高は大きくなるため、平坦地に比べ、より遠方まで落葉が散布されやすい(阿部ら 2006b, 2014b)。斜面傾斜など地形条件によっては、林帯幅が広いほど落葉供給が増える可能性もあると考えられるが、こういった複雑地形の河畔林・溪畔林においても、3次元地形データが得られれば、本モデルを用いて落葉散布を推定することは原理的に可能である。

謝辞

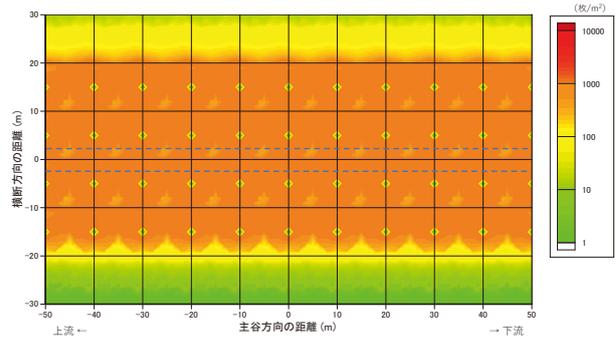
本研究の実施にあたり、月形町役場、苫小牧市役所、胆振東部森林管理署の関係各位には調査地の設定に際してお世話になった。また、森林総合研究所北海道支所の関係各位には現地観測でお力添えをいただいた。これらの方々に感謝の意を表します。なお、本研究は科学研究費補助金(課題番号22580171)の助成を受けておこなわれたものである。

引用文献

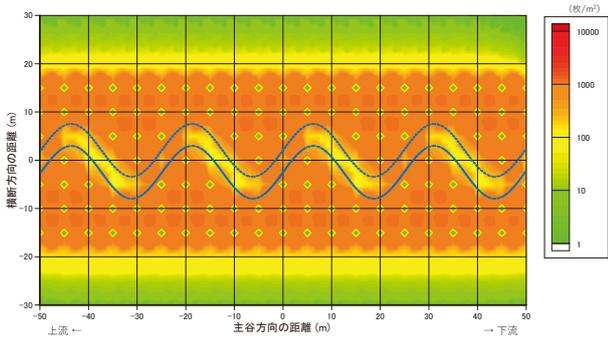
- 阿部 俊夫・倉本 恵生・山野井 克己(2014a) 北海道の平坦な河畔林における高所作業車および落葉模型を用いたヤナギ落葉散布範囲の解明. 日林誌, 96, 132-140.
- 阿部 俊夫・布川 雅典(2005) 春期の溪流における安定同位体を用いた食物網解析. 日林誌, 87, 13-19.
- 阿部 俊夫・布川 雅典・藤枝 基久(2006a) 森林からの有機物供給と溪流生態系. 水利科学, 292, 1-23.
- 阿部 俊夫・坂本 知己・壁谷 直記・萩野 裕章・延廣 竜彦・野口 宏典・田中 浩(2014b) 北関東の山地斜面における希な樹種を用いた落葉移動距離の解明. 森林総研研報, 13 (1), 1-11.
- 阿部 俊夫・坂本 知己・延廣 竜彦・壁谷 直記・萩野 裕章・田中 浩(2008) 小川群落保護林における風向・風速の観測資料(2003年11月~2006年4月). 森林総研研報, 7 (4), 245-266.
- 阿部 俊夫・坂本 知己・田中 浩・壁谷 直記・延廣 竜彦・萩野 裕章(2009) 落葉模型を用いた林床における斜面下方への落葉移動距離の推定. 日林誌, 91, 104-110.
- 阿部 俊夫・坂本 知己・田中 浩・延廣 竜彦・壁谷 直記・萩野 裕章(2006b) モデルによる河畔域の落葉散布パターンの評価. 応用生態工学, 8 (2), 147-156.
- Cummins, K. W., Petersen, R. C., Howard, F. O., Wuycheck, J. C., and Holt, V. I. (1973) The utilization of leaf litter by stream detritivores. *Ecology*, 54, 336-345.
- Ferrari, J. B. and Sugita, S. (1996) A spatially explicit model of leaf litter fall in hemlock-hardwood forests. *Can. J. For. Res.*, 26, 1905-1913.
- Fisher, S. G. and Likens, G. E. (1973) Energy flow in Bear Brook, New Hampshire: an integrative approach to stream ecosystem metabolism. *Ecological Monographs*, 43, 421-439.
- France, R. L. (1995) Empirically estimating the lateral transport of riparian leaf litter to lakes. *Freshw. Biol.*, 34, 495-499.
- Greene, D. F. and Johnson, E. A. (1989) A model of wind dispersal of winged or plumed seeds. *Ecology*, 70, 339-347.
- Hicks, B. J. (1997) Food webs in forest and pasture streams in the Waikato region, New Zealand: a study based on analyses of stable isotopes of carbon and nitrogen, and fish gut contents. *NZ. J. Mar. Freshw. Res.*, 31, 651-664.
- 加賀谷 隆(1990) 山地小溪流における落葉の分解過程と大型無脊椎動物のコロニゼーション. 東大農学部演習林報告, 82, 157-176.
- Kobayashi, S. and Kagaya, T. (2004) Litter patch types determine macroinvertebrate assemblages in pools of a Japanese headwater stream. *J. North Am. Benthol. Soc.*, 23, 78-89.
- Kochi, K., Yanai, S. and Nagasaka, A. (2004) Energy input from a riparian forest into a headwater stream in Hokkaido, Japan. *Arch. Hydrobiol.*, 160, 231-246.
- 中村 太士(1995) 河畔域における森林と河川の相互作用. 日生態誌, 45, 295-300.
- Niinements, Ü. and Tamm, Ü. (2005) Species differences in timing of leaf fall and foliage chemistry modify nutrient resorption efficiency in deciduous temperate forest stands. *Tree Physiol.* 25, 1001-1014.
- Nordell, K. O. and Karlsson, P. S. (1995) Resorption of nitrogen and dry matter prior to leaf abscission: variation among individuals, sites and years in the mountain birch. *Funct. Ecol.*, 9, 326-333.
- Orndorff, K. A. and Lang, G. E. (1981) Leaf litter redistribution in a West Virginia hardwood forest. *J. Ecol.*, 69, 225-235.
- Staelens, J., Nachtergale, L., Luyssaert, S. and Lust, N. (2003) A model of windinfluenced leaf litterfall in a mixed hardwood forest. *Can. J. For. Res.*, 33, 201-209.
- Wallace, J. B., Eggert, S. L., Meyer, J. L. and Webster, J. R. (1999) Effects of resource limitation on a detrital-based ecosystem. *Ecol. Monogr.*, 69, 409-442.



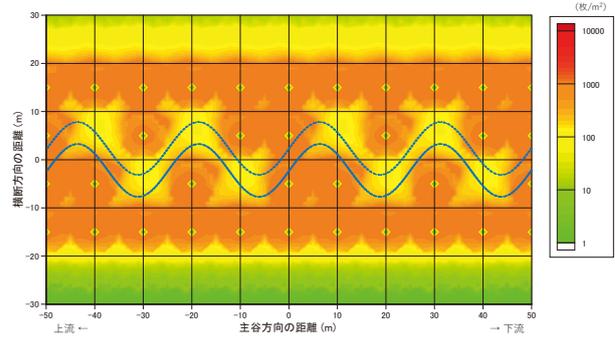
Appendix Fig.1. 赤川河畔林における直線河道の場合の試算結果
青い破線は河岸を表す。



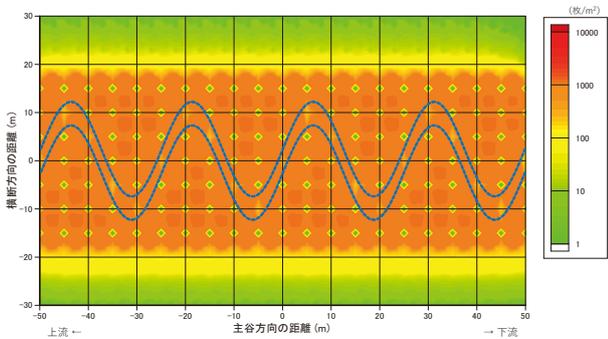
Appendix Fig.4. 勇払川河畔林における直線河道の場合の試算結果
青い破線は河岸を表す。



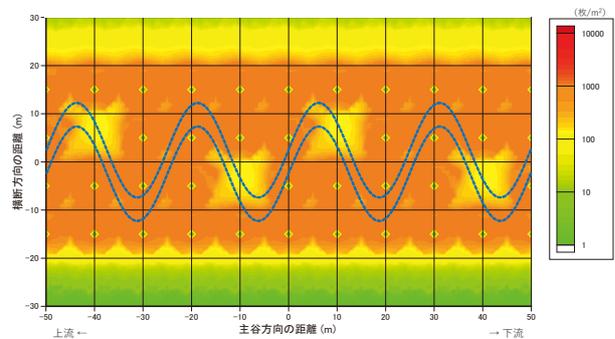
Appendix Fig.2. 赤川河畔林における蛇行河道 (振幅5 m) の場合の試算結果
青い破線は河岸を表す。河道は波長25 mの正弦曲線とした。



Appendix Fig.5. 勇払川河畔林における蛇行河道 (振幅5 m) の場合の試算結果
青い破線は河岸を表す。河道は波長25 mの正弦曲線とした。



Appendix Fig.3. 赤川河畔林における蛇行河道 (振幅10 m) の場合の試算結果
青い破線は河岸を表す。河道は波長25 mの正弦曲線とした。



Appendix Fig.6. 勇払川河畔林における蛇行河道 (振幅10 m) の場合の試算結果
青い破線は河岸を表す。河道は波長25 mの正弦曲線とした。

Model simulations of two-dimensional leaf-litter dispersion in lowland riparian forests

Toshio ABE^{1)*}, Katsumi YAMANOI²⁾ and Shigeo KURAMOTO³⁾

Abstract

To elucidate source areas of leaf-litter that enters river streams, a new model was developed for predicting leaf-litter dispersion. This model simulates falling-leaf motion based on physical parameters such as riparian forest wind data, leaf-falling velocity, and tree-crown central height. The new model was applied in two lowland riparian forests to two willow trees. The model estimates fitted in well with the observed willow-leaf dispersion data, except for the vicinity of tree crown. Thus, we considered the new model as more effective than the existing models describing leaf-litter dispersion. Then, the leaf-litter dispersion of two riparian buffer strips was estimated using the new model. It was assumed that each tree belongs to the same species with equal height as other trees and equal distance from the other trees. The strip width had almost no effect on leaf-litter supply for the stream channel because the trees near stream banks had a strong leaf-litter supply into the streams. The riparian forest strips in upwind parts of the streams supplied more litter to the stream channels than the downwind strips. Thus, the upwind strips were considered more important for leaf-litter supply into the streams. Furthermore, the channel form was also considered to influence the leaf-litter supply into the streams. A highly meandering channel located in the same valley as a straight channel probably receives more litter than the latter. However, in a riparian forest with low tree density, the effect of channel form was lesser.

Key words : leaf-litter dispersion, model simulation, wind velocity, riparian forest, meandering stream

Received 1 July 2020, Accepted 7 May 2021

1) Tohoku Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Hokkaido Research Center, FFPRI

3) Department of Forest Vegetation, FFPRI

* Tohoku Research Center, FFPRI, 92-25 Nabeyashiki, Shimo-kuriyagawa, Morioka, Iwate 020-0123, Japan; E-mail: toshioa@ffpri.affrc.go.jp

論文 (Original article)

スギの人工交配における野外での溶液授粉の効果

宮本 尚子^{1)*}、飯塚 和也²⁾、今野 幸則³⁾、永野 聡一郎⁴⁾、
那須 仁弥¹⁾、織部 雄一郎⁴⁾、竹田 宣明¹⁾

要旨

スギを対象とし、少量の花粉を有効活用しつつ作業性を高めた授粉の促進技術として、溶液授粉の野外における適用の可否を検討した。まず花粉の懸濁液の保存時間が花粉の活性に及ぼす影響を評価したところ、花粉は溶液に懸濁してから12時間まで、懸濁直後と同程度の活性を保つことができた。複数の母樹に対して3つの濃度の懸濁液(0.2、0.5および1.0%)による溶液授粉を複数の雌花の開花ステージ(開花開始、半開、全開)について行った。また、溶液授粉由来であった実生の割合(交配成功率)をDNAマーカーを用いた父性解析によって評価した。球果の結果率、生産される種子の100粒重に対しては、溶液授粉の効果は認められなかったが、種子の発芽率に対し、1.0%の溶液授粉は有意な正の効果があった($p < 0.05$)。交配成功率に対しては0.5および1.0%濃度の溶液授粉に有意な正の効果があり($p < 0.05$ および $p < 0.01$)、0.5%よりも1.0%濃度の方が交配成功率の予測値が高かった。また雌花の開花のステージに関しては半開のステージで授粉処理を行うと交配成功率が高い傾向があり、半開の雌花に1.0%の懸濁濃度の溶液授粉を行うことにより0.362の交配成功率が予測された。これらのことから、野外でも溶液授粉により一定程度の効果が期待できることがわかった。

キーワード：溶液授粉、SMP、雌花の開花ステージ、花粉の発芽、父性解析

1. はじめに

優良な系統が植栽されている採種園では、園外からの花粉の混入を回避すること、構成クロンが種子親・花粉親として均等に寄与すること、自殖を防止することなどの条件が満たされることが種子生産に理想的とされる(Wheeler and Jech 1992)。園外花粉の混入の問題は特に深刻で、園内に植栽されている優良な系統以外の花粉で受精すると、次代の遺伝的獲得量が低下する問題が生じる(El-Kassaby et al. 1989, Wang et al. 1991)。外部花粉の混入率は、多くの風媒樹木あるいは針葉樹の採種園では30%を超え、低い場合で数%、高い場合には70~80%に達することがDNAマーカー等を用いた研究で報告されている(Friedman and Adams 1985, Harju and Muona 1989, Pakkanen et al. 2000, Plomion et al. 2001, Moriguchi et al. 2004, Ozawa et al. 2009)。

SMP (Supplemental mass pollination; Denison and Franklin 1975, Daniels 1978, El-Kassaby and Ritland 1986, El-Kassaby and Reynolds 1990, Askew 1992)は、あらかじめ花粉親とするクロンから収集しておいた花粉を、袋がけしていない雌花に加圧式スプレーなどで人工的に直接散布する方法で、外部花粉の混入率を軽減する技術としての活用が提唱されている。SMPについては、実際に外部花粉の混入

を減少させる効果が認められている(Stoehr et al. 1998)。そのため、日本の育種対象樹種の種子生産現場では、一般的には自然交配が行われているが(田島 1991)、近年はスギおよびクロマツでSMPが試験的に利用されている(Ozawa et al. 2009, 市村ら 2013, 小澤 2015)。スギとクロマツでは雌花の着生の仕方が異なり、クロマツは上に向かって伸びる新枝の先端に1~3個紫紅色の雌花が着生する(倉田 1964)。これに対し、スギでは雌花は短い小枝に頂生し點頭する(倉田 1964)ので、クロマツに比べて目立たず、向きも一定でない。よって、クロマツでは果樹で使用されている花粉交配機器などを使用して効率的にSMPが施用できるが(森林総合研究所林木育種センター東北育種場 2016)、スギでクロマツと同じ方法で事業的にSMPを行うとすると時間と手間がかかり、花粉も大量に必要なと考えられる。特に、スギの少花粉品種が植栽されている採種園では、少花粉品種から採取できる花粉量が少ないためSMPがより難しいという問題がある。

果樹では、多くの樹種が虫媒花であり花粉媒介の役割を訪花昆虫のミツバチやハナアブに期待しているものの、訪花昆虫の種類や数が減少したことにより、また、果実の安定生産を目的として、開花中に羽毛筆、ぼんてんや加圧式スプレーで雌しべの柱頭に花粉を吹き付ける

原稿受付：令和2年7月27日 原稿受理：令和3年6月11日

1) 森林総合研究所 林木育種センター東北育種場

2) 宇都宮大学 農学部

3) 宮城県林業技術総合センター

4) 森林総合研究所 林木育種センター

* 森林総合研究所 林木育種センター東北育種場 〒020-0621 岩手県滝沢市大崎 95

人工授粉が必須の管理作業となっている(山下 1991)。加えて、近年、花粉を液体増量剤に懸濁した花粉懸濁液を雌花に噴霧する溶液授粉に関する研究も盛んに行われている(Hopping and Jerram 1980, Hopping and Simpson 1982, Sakamoto et al. 2009, 愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010, Karimi et al. 2017, 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)。ただし、樹種や品種によって液体増量剤中の花粉の活性や溶液授粉による結果率が大きく異なることが知られており(大野ら 1964, 農研機構 2020)、本手法の適用にあたっては樹種ごとに条件検討が求められる。

本研究では、日本の主要造林樹種であるスギにおいて、野外での溶液授粉が適用可能かどうかを検討する。溶液授粉が適用可能であれば、少ない花粉を有効に活用することができる。また、花粉を溶液に均一に薄めることで作業性を向上させることができるため、園内の空中花粉量が少ない少花粉品種の採種園で特に問題となる園外花粉の混入(小澤 2015)への対策技術としても期待できる。これまでに、室内で、無花粉スギの母樹に対して、果樹での報告と比較して20倍程度濃い花粉濃度(10%)の溶液を使用した溶液授粉を試験し、59.5%の種子発芽率を得たという報告(斎藤 2020)は存在する。しかし、野外で、かつ、広範囲に使用するために果樹と同程度の濃度での施用した場合、どの程度の効果があるのかについては不明である。

そこで、まずは実際の交配作業における花粉懸濁液の取り扱いに関する知見を得る目的で花粉懸濁液中の花の発芽活性が保たれる時間と条件について評価した。次いで溶液授粉の効率を検証することを目的に野外で複数の母樹に対して複数の花粉濃度で溶液授粉を行い、球果の結果率や得られた種子の重量および発芽率を評価した。また、種子から育成した苗をSimple Sequence Repeat (SSR) マーカーを用いて遺伝子型を判別し、父性解析を行うことで、溶液授粉由来であった実生の割合を算出し、溶液授粉の効果を評価した。

2. 材料と方法

(1) 液体増量剤および花粉懸濁液の調整

果樹の溶液授粉に関してはキウイフルーツ(愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010) およびニホンナシ(農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)で詳しいマニュアルが農研機構のウェブサイトから入手できる。これらのマニュアルでは、花粉を懸濁するための媒体を「液体増量剤」、液体増量剤を調整したのちに花粉を懸濁したものを「花粉懸濁液」と呼称している。本論文でも同様の用語で呼称するものとする。展着効果をねらうための液体増量剤への添加物として、キウイフルーツでは0.1%の寒天を用いた方法が紹介されている。ニホンナシでは同様に0.1%の寒天を用いる方法の他、約0.04%のキサクタ

ンガムを用いた方法も紹介されている。また浸透圧を調整し、花粉の発芽率を高めるための添加物としてのショ糖は、キウイフルーツでは5%、ニホンナシでは約10%の濃度で用いられている。また両樹種とも溶液の花の濃度としては0.2%を下限值としていたが、花粉発芽率の差や、散布量の個人差を勘案して、キウイフルーツでは0.3~0.5%、ニホンナシでは0.3%が推奨されている(愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010, 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)。本研究では、実用化の際の入手のしやすさを考慮して展着剤としては寒天を使用するものとした。ショ糖濃度に関しては、5%と10%で作成した液体増量剤にスギの花粉を重量濃度で0.2%の割合で懸濁した花粉懸濁液の花の発芽率を予備的に試験した。その結果、ショ糖濃度5%での発芽率の方が10%の場合と比較して良好であった。そこで、蒸留水に重量濃度で5%のショ糖と0.1%の寒天を混合し電子レンジで加熱して完全に溶解させ、液温が28℃以下になるのを待ち、花粉を混入することで花粉懸濁液を調整した。

(2) 花粉懸濁液の保存温度と保存時間が花粉の活性に及ぼす影響の評価

a. 使用した花粉と花粉懸濁液の調整

森林総合研究所林木育種センター東北育種場内に植栽されている5クローンから花粉を収集した。花粉の収集はスギに適しているとされる水差し法(生方 2002)で2017年2月に行った。花粉は、精選後シリカゲルを用いて十分に(2週間程度)乾燥させ、50mlの遠沈管に小分けにして4℃設定の冷蔵庫に保存し、試験に使用した。液体増量剤に花粉を0.5%の重量割合で懸濁した花粉懸濁液を、前述の作製方法に従って調整した。

b. 発芽検定

花粉懸濁液を調整後すぐに4℃に設定した冷蔵庫内と25℃に設定した恒温器内に入れた。懸濁してから、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96時間後にクローン・処理ごとに4つの反復を設けて0.1mlの懸濁液を冷蔵庫および恒温器から取り出して培地に添加することで発芽検定を行った。培地の組成はショ糖10%、寒天1%とした。5日間25℃暗条件で培養した後、実体顕微鏡下で無作為に選んだ100粒の花の発芽について発芽した花粉を計数した。

冷蔵保存および常温保存した花粉懸濁液について、経過時間ごとの発芽数を対象として、懸濁直後(0時間)の花の発芽率との間に差がないことを帰無仮説とし、Bonferroni補正をしたWilcoxonの順位和検定により中央値の差の検定を行った。

(3) 野外での溶液授粉の評価

a. 使用した花粉と花粉懸濁液の調整

花粉親を選択するにあたり、溶液授粉により生産され

た種子とそれ以外が区別できる必要がある。そこで、交配実験を行った森林総合研究所林木育種センター東北育種場(岩手県滝沢市)には保存されていないスギクローン1個体を花粉親として森林総合研究所林木育種センター東北育種場奥羽増殖保存園(山形県東根市)で選んだ。花粉の収集は前述と同様の水差し法(生方 2002)で2018年2月に行った。花粉は、精選後シリカゲルを用いて十分に(2週間程度)乾燥させ、同年4月上旬の交配に使用するまで、50mlの遠沈管に小分けにして4℃に設定した冷蔵庫内で保存した。花粉を懸濁する濃度としては、キウイフルーツにおける溶液授粉で下限値とされていた重量濃度で0.2%、推奨されていた0.5%(愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010)の他、人工交配に用いる花粉量と同程度の1.0%の花粉懸濁液を調整した。3種類の懸濁液は別々のハンドスプレーに入れて交配に供した。

b. 溶液授粉試験

今回の試験を行った東北育種場内の試験地は20クローンが各3個体ずつ合計60個体植栽されている試験地で、すべての個体がDNAタイピングによりクローンの誤植栽はないことがわかっている。今回は20クローンのうち、雌花が着花して試験に使用することが可能であった13クローン各1個体を母樹として使用した。各個体には、0.2%、0.5%と1.0%の花粉濃度の懸濁液で授粉させる枝と、対照として無処理の自然交配枝の4処理枝を、雌花の個数なるべく均等に含まれるようにして設け、各処理を行った雌花の個数を記録した。

栗田ら(2016)は、雌花の開花過程に、A:未開花、B:開花開始、C:開花、D:珠孔液分泌の4つのステージを設けており、この基準に従い、各枝について目視でステージを判定した(Fig. 1)。横山(1975)は、開花に伴い胚珠が見えてきて、やがて珠孔から珠孔液が分泌され、珠孔液に花粉が付着すると珠孔液が珠孔内に引き込まれるが、花粉受容性が最も高いのが珠孔液の分泌が最も盛んな満開の時期(ステージD)の時であるとしている。このため、溶液授粉を行う時期として適当なものは雌花が半開程度のC、または全開のDの時期であると考え、各母樹の雌花を定期的に観察し、雌花の開花ステージCとDの母樹が多く観察され降雨が認められなかった2018年4月3日に1回のみ行った。溶液授粉は、1回に約1mlが噴出されるハンドスプレーを1枝あたり10回噴出させて行った。したがって、0.2%、0.5%と1.0%の懸濁液を用いた授粉における花粉の使用量は、それぞれ、約0.02g、0.05gと0.1gと推定した。

母樹別、開花ステージ別の溶液授粉処理を行った(無処理の自然交配を除く)枝の数をTable 1に示す。各枝には最小4個、最大では40個、平均で16.7個の雌花が含まれた。

c. 結果率・100粒重・種子発芽率

2018年9月に成熟した球果を採取してその個数を、授粉

Table 1. 母樹別の溶液授粉処理を行った枝の数と溶液授粉時の開花ステージ

母樹	開花ステージ		
	B	C	D
A	0	1	2
B	0	1	2
C	0	2	1
D	0	0	3
E	0	3	0
F	1	2	0
G	0	1	2
H	0	0	3
I	0	3	0
J	0	0	3
K	0	3	0
L	0	0	3
M	0	0	2
合計	1	16	21



Fig. 1. 開花ステージの写真

処理を行う前にカウントした雌花の個数で割ったものを結果率とした。球果数の方が雌花数よりも多くなってしまう枝についてはカウントミスとみなし、データから除外した。種子を球果から取りだし、虫害を受けたものを除いてランダムに100粒選んで重量を測定し、100粒重とした。採種数が100粒に満たなかった場合はその合計の重量と粒数から重量/粒数×100で求めるものとした。また、翌年春、100粒、100粒に満たない場合はその粒数の種子を、個体・処理ごとにバット内に播き、発芽した本数をカウントして播種数で割ったものを種子発芽率とした。

結果率、100粒重および種子発芽率に対する母樹と授粉処理の効果を検証するため、結果率および種子発芽率に関しては、(結果した球果数, 授粉前に観察された雌花数 - 結果した球果数) および (発芽した本数, 播種数 - 発芽した本数) を二項分布に従う目的変数、「母樹と授粉処理」、あるいは「母樹」または「授粉処理」のみを説明変数とし、リンク関数をlogitとした一般化線形モデルを作成し、AIC(赤池情報量規準; Akaike 1973)によるモデル選択を行った。また、100粒重を正規分布に従うものとして目的変数とし、「母樹と授粉処理」、あるいは「母樹」または「授粉処理」のみを説明変数、リンク関数をgaussianとした一般化線形モデルを作成し、AICによるモデル選択を行った。なお、授粉処理における各処理(無処理、0.2%、0.5%と1.0%の懸濁液を用いた溶液授粉)はカテゴリ

リカル変数として扱った。二項分布に従う一般化線形モデルにおいて目的変数が0の時の説明変数の値と、目的変数が1の時の説明変数の値とが完全に分離している場合、最尤推定ができない (Albert and Anderson 1984)。今回、説明変数の母樹Gの結果率としてすべての授粉処理で1が観測され、完全分離が生じていたため、結果率についてはFirthのペナルティ付き尤度法 (Firth 1993) を使用する一般化線形モデルをR version 3.5.3 (R Core Team 2019) のbrglmパッケージ (Kosmidis 2019) を用いて実施した。100粒重および種子発芽率の解析にはRのglm関数を使用した。AICが最も小さいモデルを最適モデルとした。ただし、最適モデルとのAICの差 (Δ AIC) が2以内のモデルについては最良のモデルと明らかな差がない競合モデルとみなし (Burnham and Anderson 2002)、最良モデルと競合モデルの両者の結果を示した。結果率、100粒重および種子発芽率について、最適モデルで使用した各説明変数によるそれぞれの係数の推定値と切片の値から予測値を算出した。

d. DNA抽出とSSR解析

播種後、得られた幼苗から本葉を採取した。各バットにつき11個体から、11個体未満のバットからはすべての生存個体からサンプリングした結果、サンプル数は合計505となった。サンプリングした試料は冷凍し、全DNAを改変CTAB法 (白石・渡辺 1995) により抽出した。DNA分析には、核SSRマーカー4遺伝子座 (CJS0520, CS1226, CS1525 (Tani et al. 2004), およびCjgssr77 (Moriguchi et al. 2003)) を適用した。テンプレートDNAを2 μ l、トータルボリュームを10 μ lとしてQIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen社製) を使用したマルチプレックスPCR反応を付属プロトコルに従って行い、得られたPCR産物についてABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製) を用いてピークを検出し、GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems社製) を用いて遺伝子型を決定した。母樹13個体および花粉親1個体についても同様にDNAタイピングを行った。

e. 父性解析

前述のように、今回溶液授粉を行った試験地は20クローン各3個体の合計60個体が植栽されており、父性解析を行うにあたってこの20クローンおよび溶液授粉に用いた1クロンの合計21クローンを花粉親候補とした。4マーカーの総父性排斥率をCervus3.0.7 (Marshall et al. 1998) を用いて、花粉親候補21クロンの遺伝子型から

総父性排斥率 (parent pair) = 1 - Combined non-exclusion probability

により計算した。花粉親の特定には、最尤推定法 (Marshall et al. 1998) による父性解析をCervus 3.0.7を用いて実施した。また本試験地は採種園ではないが、隣接して異なるスギクローン個体も多数植栽されているため、サンプリングされた候補親の割合 (Proportion of candidate

fathers sampled) については、スギ採種園で外部花粉による交配率が47.8%であったという報告 (Moriguchi et al. 2004) を参考に、50%と設定した。その他のシミュレーションの設定は以下の通りとした。Number of offspring : 10000、Proportion of loci typed : 0.99、Proportion of loci mistyped : 0.01、Error rate in likelihood calculations : 0.01、Minimum number of typed loci : 2。また判断基準としてDeltaを用い、信頼レベルは95%を使用した。

父性解析の結果、その実生個体が溶液授粉に用いた花粉により生産された種子由来であった場合を「交配成功」と定義し、各個体・各処理について、溶液授粉に用いた花粉により生産された種子由来の実生個体の数を分析した実生個体の数で割ったものを「交配成功率」と定義した。

f. 交配成功率

交配成功率に対する母樹、授粉処理および開花ステージの効果を検証するため、交配成功率を (交配成功の実生の数, 分析した実生個体の数-交配成功の実生の数) とした二項分布に従う目的変数、「母樹と授粉処理と開花ステージ」、「母樹と授粉処理」、「母樹と開花ステージ」、「授粉処理と開花ステージ」、あるいは「母樹」または「授粉処理」または「開花ステージ」のみを説明変数とし、リンク関数をlogitとした一般化線形モデルを作成し、AICによるモデル選択を行った。交配成功率に関しても、説明変数の開花ステージB、および無処理の自然交配枝において交配成功とされた実生の数として0が観測され完全分離が生じていたため、結果率と同様にFirthのペナルティ付き尤度法を使用する一般化線形モデルを用いて実施した。AICが最も小さかった最適モデルと、 Δ AICが2以内の競合モデルがあった場合には両者の結果を示した。最適モデルで使用した各説明変数の係数の推定値と切片の値から授粉処理および開花ステージのそれぞれについて、交配成功率の予測値を算出した。加えて、授粉処理別および開花ステージ別の係数の最小二乗平均値と標準誤差をRのlsmeansパッケージ (Lenth 2016) で求め、これを用いて交配成功率の予測値とその95%信頼区間を計算した。

3. 結果

(1) 花粉懸濁液の保存温度と保存時間が花粉の活性に及ぼす影響

常温保存あるいは冷蔵保存した懸濁液について、花粉を溶液に懸濁してからの経過時間と、その懸濁液内の花粉を培地上で発芽させた場合の発芽率の推移をFig. 2に示した。懸濁液作成直後の花粉発芽率は中央値で0.48であった。懸濁液作成直後(0h)の発芽数と各経過時間の発芽数の中央値の差を検定したところ、25 $^{\circ}$ Cの常温保存の場合48時間まで、冷蔵保存の場合12時間までは懸濁直後と発芽率の中央値に有意差がなく ($p > 0.05$)、懸濁直後と同程度

の花粉発芽率が得られると考えられた。それ以降は常温保存、冷蔵保存の場合ともに、発芽率は低下の傾向を取った。一方、96時間後も低いながら、常温保存および、冷蔵保存で発芽活性が確認された花粉も存在した。

(2) 溶液授粉による結果率・100粒重・種子発芽率への影響

AICによるモデル選択の結果、結果率については、母樹と授粉処理の両方の説明変数を含むモデルが最適モデルとして、母樹のみを説明変数とするモデルが競合モデルとして採択された (Table 2 : 1-aおよび1-b)。モデルの結果の要約をTable 3に示した。また、最適モデルで得られた母樹と授粉処理の係数の推定値と切片を用いて算出した結果率の予測値をAppendix Table 1に示した。予測値で見ると、無処理の自然交配枝で0.321から0.987、0.2%の授粉処理で0.409から0.991、0.5%の授粉処理で0.464から0.993、1.0%の授粉処理で0.287から0.985と、母樹によって結果率に2倍以上の差があった (Appendix Table 1)。

しかし、授粉処理には結果率に対する有意な効果は認められなかった ($p>0.05$, Table 2 : 1-a)。

100粒重については、母樹のみを説明変数とするモデルが最適モデルとして採択された (Table 2 : 2-a)。モデルの結果の要約をTable 4に示した。また、最適モデルで得られた母樹の係数の推定値と切片を用いて算出した100粒重の予測値をAppendix Table 2に示した。予測値は母樹によって0.216から0.388の幅があった (Appendix Table 2)。

種子発芽率については、母樹のみを説明変数とするモデルが最適モデルとして、母樹と授粉処理を説明変数とするモデルが競合モデルとして採択された (Table 2 : 3-aおよび3-b)。モデルの結果の要約をTable 5に示した。最適モデルで得られた母樹の係数の推定値と切片を用いて算出した種子発芽率の予測値をAppendix Table 2に示した。予測値で見ると、母樹によって0.085から0.570と、種子発芽率に6倍以上の差があった (Appendix Table 2)。また競合モデルの結果では、1.0%の授粉処理に種子発芽率に対する有意な正の効果は認められた ($p<0.05$, Table 5 : 3-b)。

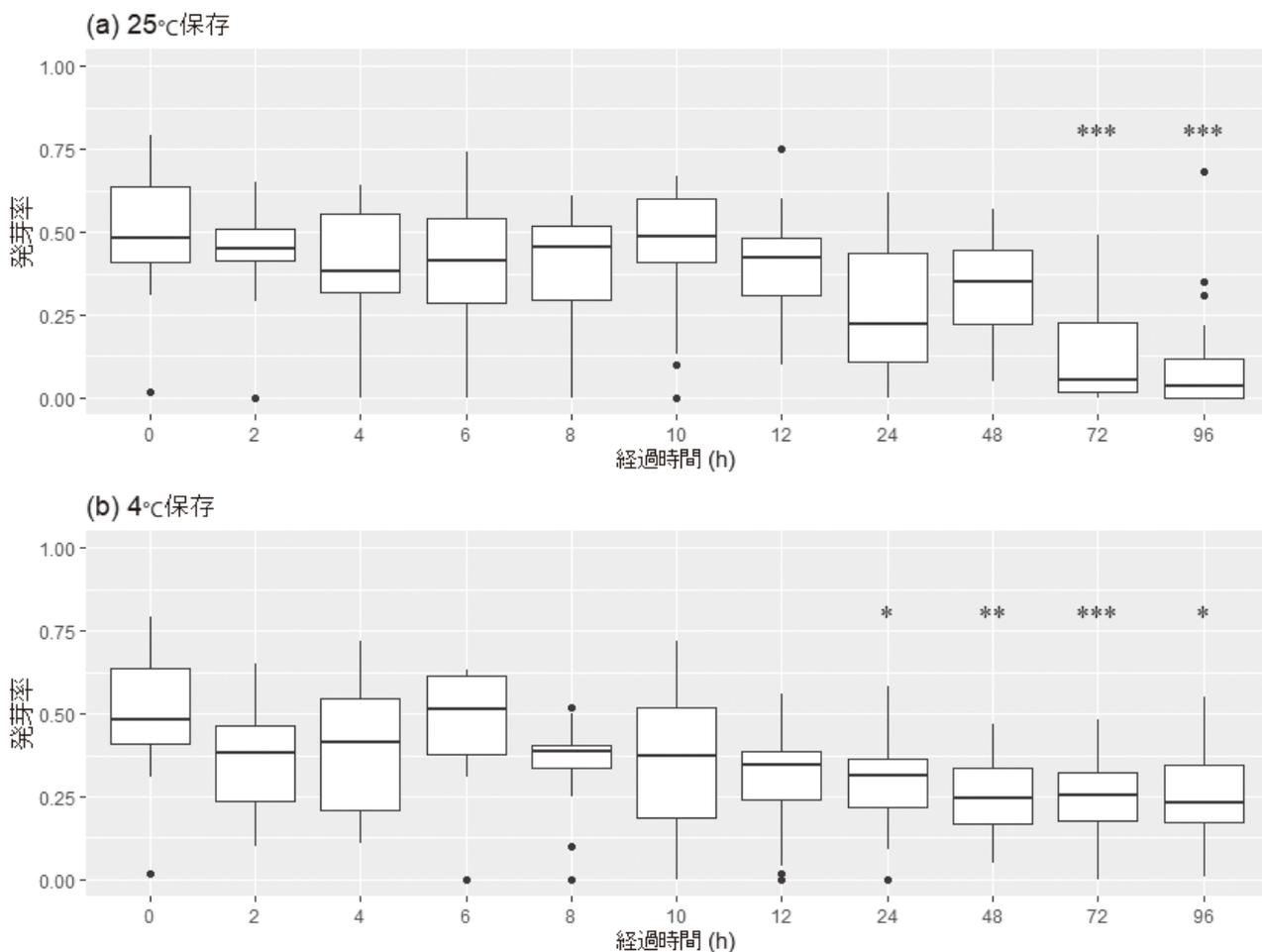


Fig. 2. 懸濁した後の経過時間と花粉発芽率の関係

(a) は懸濁液を 25°C で保存、(b) は 4°C で保存した場合の推移。* は 5%、** は 1%、*** は 0.1% 水準で懸濁直後 (0 h) の発芽率の中央値と有意な差があったことを示す。

Table 2. 結果率、100 粒重、種子発芽率および交配成功率をそれぞれ目的変数とするモデル評価の結果

		説明変数	AIC	Δ AIC
結果率	最適モデル (1-a)	母樹+授粉処理	188.74	
	競合モデル (1-b)	母樹	190.71	1.98
		授粉処理	322.97	134.24
100 粒重	最適モデル (2-a)	母樹	-131.03	
		母樹+授粉処理	-128.87	2.17
		授粉処理	-117.78	13.26
種子発芽率	最適モデル (3-a)	母樹	412.95	
	競合モデル (3-b)	母樹+授粉処理	414.54	1.59
		授粉処理	768.49	355.55
交配成功率	最適モデル (4-a)	授粉処理+開花ステージ	125.38	
	競合モデル (4-b)	授粉処理	127.26	1.87
		母樹+授粉処理+開花ステージ	136.11	10.72
		母樹+授粉処理	135.11	9.73
		母樹+開花ステージ	188.77	63.39
		母樹	191.56	66.18
		開花ステージ	180.80	55.42

Table 3. 結果率を目的変数とする最適モデル (Table 2 : 1-a) と競合モデル (Table 2 : 1-b) の結果の要約

(1-a)

変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (母樹 M, 無処理の自然交配枝)	0.716	0.461	1.551	0.121
母樹 A	2.096	0.791	2.650	0.008 **
母樹 B	-0.952	0.490	-1.942	0.052
母樹 C	1.381	0.810	1.705	0.088
母樹 D	-0.515	0.564	-0.912	0.362
母樹 E	-0.146	0.561	-0.261	0.794
母樹 F	-0.031	0.511	-0.061	0.951
母樹 G	3.630	1.506	2.410	0.016 *
母樹 H	3.005	0.941	3.195	0.001 **
母樹 I	-1.464	0.503	-2.912	0.004 **
母樹 J	-0.190	0.565	-0.336	0.737
母樹 K	-0.599	0.544	-1.101	0.271
母樹 L	-0.330	0.648	-0.509	0.611
授粉処理 (0.2%)	0.382	0.273	1.401	0.161
授粉処理 (0.5%)	0.606	0.316	1.917	0.055
授粉処理 (1.0%)	-0.163	0.317	-0.515	0.607

(1-b)

変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (母樹 M)	1.006	0.435	2.314	0.021 *
母樹 A	1.980	0.786	2.520	0.012 *
母樹 B	-1.028	0.485	-2.122	0.034 *
母樹 C	1.235	0.806	1.533	0.125
母樹 D	-0.566	0.553	-1.024	0.306
母樹 E	-0.114	0.552	-0.206	0.837
母樹 F	0.016	0.500	0.032	0.974
母樹 G	3.285	1.508	2.179	0.029 *
母樹 H	2.756	0.939	2.935	0.003 **
母樹 I	-1.582	0.492	-3.213	0.001 **
母樹 J	-0.134	0.562	-0.238	0.812
母樹 K	-0.725	0.535	-1.355	0.175
母樹 L	-0.620	0.630	-0.985	0.325

* は 5%、** は 1%水準で有意であったことを示す。

Table 4. 100 粒重を目的変数とする最適モデル (Table 2 : 2-a) の結果の要約

(2-a)

変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (母樹 M)	0.368	0.034	10.805	<0.001 ***
母樹 A	-0.115	0.045	-2.560	0.015 *
母樹 B	-0.109	0.045	-2.421	0.020 *
母樹 C	-0.094	0.045	-2.079	0.044 *
母樹 D	0.020	0.045	0.446	0.658
母樹 E	-0.121	0.045	-2.695	0.010 *
母樹 F	-0.152	0.045	-3.374	0.002 **
母樹 G	-0.070	0.045	-1.561	0.127
母樹 H	-0.055	0.045	-1.228	0.227
母樹 I	-0.114	0.045	-2.525	0.016 *
母樹 J	-0.079	0.045	-1.764	0.086
母樹 K	-0.018	0.045	-0.404	0.688
母樹 L	-0.069	0.045	-1.542	0.131

* は 5%、** は 1%、*** は 0.1%水準で有意であったことを示す。

Table 5. 種子発芽率を目的変数とする最適モデル (Table 2 : 3-a) と競合モデル (Table 2 : 3-b) の結果の要約

(3-a)

変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (母樹 M)	0.282	0.117	2.417	0.016 *
母樹 A	-0.687	0.155	-4.435	<0.001 ***
母樹 B	-1.059	0.159	-6.671	<0.001 ***
母樹 C	-0.523	0.154	-3.394	<0.001 ***
母樹 D	-0.205	0.157	-1.310	0.190
母樹 E	-1.359	0.167	-8.165	<0.001 ***
母樹 F	-1.354	0.164	-8.277	<0.001 ***
母樹 G	-1.519	0.167	-9.086	<0.001 ***
母樹 H	-1.013	0.158	-6.406	<0.001 ***
母樹 I	-2.658	0.214	-12.429	<0.001 ***
母樹 J	-0.825	0.156	-5.285	<0.001 ***
母樹 K	-1.637	0.170	-9.624	<0.001 ***
母樹 L	-0.708	0.155	-4.566	<0.001 ***

(3-b)

変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (母樹 M, 無処理の自然交配枝)	0.207	0.127	1.625	0.104
母樹 A	-0.716	0.156	-4.584	<0.001 ***
母樹 B	-1.088	0.160	-6.802	<0.001 ***
母樹 C	-0.551	0.155	-3.551	<0.001 ***
母樹 D	-0.243	0.158	-1.537	0.124
母樹 E	-1.385	0.167	-8.275	<0.001 ***
母樹 F	-1.383	0.165	-8.395	<0.001 ***
母樹 G	-1.548	0.168	-9.197	<0.001 ***
母樹 H	-1.042	0.159	-6.539	<0.001 ***
母樹 I	-2.688	0.215	-12.512	<0.001 ***
母樹 J	-0.854	0.157	-5.428	<0.001 ***
母樹 K	-1.667	0.171	-9.730	<0.001 ***
母樹 L	-0.737	0.156	-4.714	<0.001 ***
授粉処理 (0.2%)	0.115	0.088	1.307	0.191
授粉処理 (0.5%)	0.111	0.088	1.264	0.206
授粉処理 (1.0%)	0.187	0.091	2.066	0.039 *

* は 5%、*** は 0.1%水準で有意であったことを示す。

(3) 溶液授粉による交配成功率の評価

今回使用した4マーカーによる総父性排斥率は0.9996で、父性解析を行うにあたって十分な能力があると考えられた。判断基準としてDeltaを用い、信頼レベル95%で交配成功と判定されたサンプルは505のうち58と推定され、残りの447サンプルはその他の花粉による交配由来と推定された。

授粉処理別の13母樹への交配成功率をFig. 3に示した。

Table 6. 交配成功率を目的変数とする最適モデル (Table 2 : 4-a) と競合モデル (Table 2 : 4-b) の結果の要約

(4-a)				
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (無処理の自然交配枝, 開花ステージ_D)	-5.723	1.412	-4.052	<0.001 ***
授粉処理 (0.2%)	2.445	1.458	1.677	0.094
授粉処理 (0.5%)	3.850	1.427	2.698	0.007 **
授粉処理 (1.0%)	4.480	1.415	3.166	0.002 **
開花ステージ_B	-1.260	1.516	-0.832	0.406
開花ステージ_C	0.574	0.306	1.874	0.061

(4-b)				
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (無処理の自然交配枝)	-5.525	1.423	-3.884	<0.001 ***
授粉処理 (0.2%)	2.581	1.479	1.745	0.081
授粉処理 (0.5%)	3.692	1.446	2.553	0.011 *
授粉処理 (1.0%)	4.590	1.437	3.195	0.001 **

* は 5%、** は 1%、*** は 0.1%水準で有意であったことを示す。

無処理の自然交配枝で今回使用した花粉により交配したものはなかった。また雌花の開花ステージ別の懸濁液の花粉濃度による交配成功率をFig. 4に示した。開花ステージCとDの雌花が多い時期をねらって交配実験をしたため、雌花が開き始めた開花ステージBの母樹が少なく、開花ステージBでは0.2%と1.0%の懸濁液を用いた溶液授粉が行えなかった。開花ステージBの種子数は合計で11と少なかったが、交配成功と判定されたサンプルはなかった。

交配成功率の予測には、授粉処理と開花ステージを説明変数として含むモデルが最適モデルとして、授粉処理のみを説明変数とするモデルが競合モデルとして採択された (Table 2 : (4-a)および(4-b))。モデルの結果の要約をTable 6に示した。授粉処理に関しては0.5%および1.0%の溶液授粉に交配成功率に対する有意な効果が認められた ($p < 0.01$ および $p < 0.01$; Table 6 (4-a)、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$; Table 6 (4-b))。開花ステージの交配成功率への影響を見ると、開花ステージCのDに対するオッズ比は1.78であった (Table 6 (4-a))。最適モデルで得られた母樹と授粉処理の係数の推定値と切片を用いて算出した結果率の予測値をAppendix Table 3に示した。加えて、授粉処理別および開花ステージ別の係数の最小二乗平均値を用いて算出した交配成功率とその95%信頼区間をFig. 5に示した。

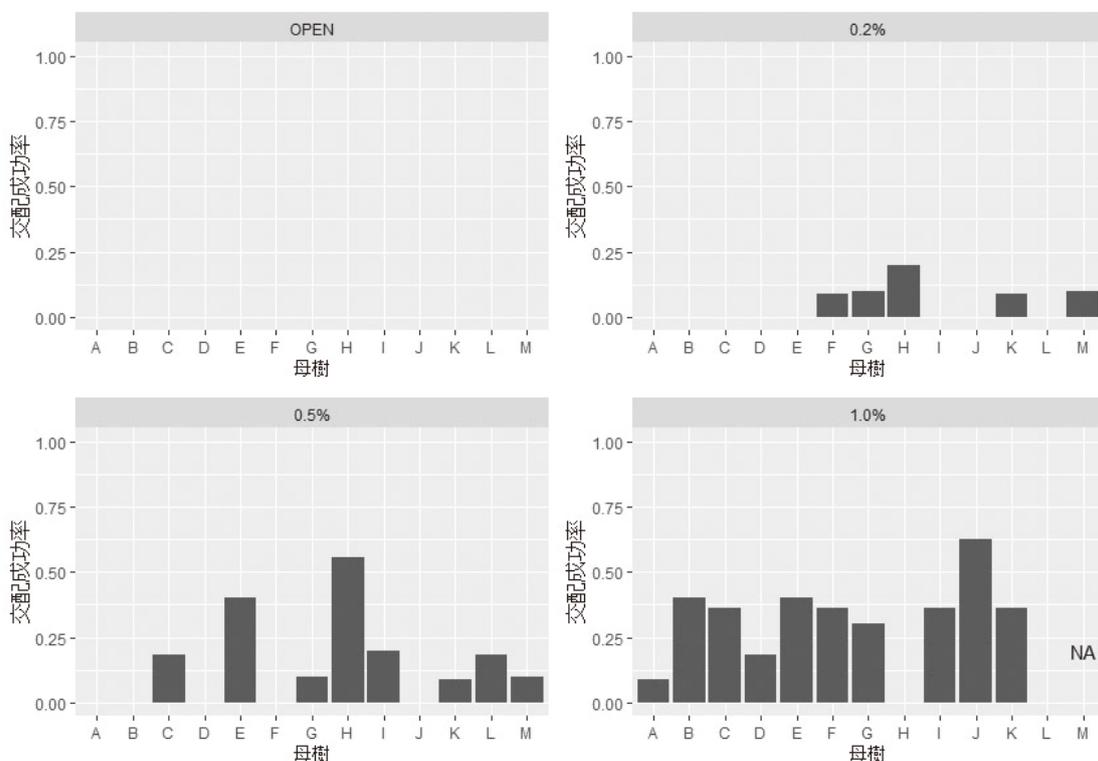


Fig. 3. 授粉処理および母樹別に見た交配成功率

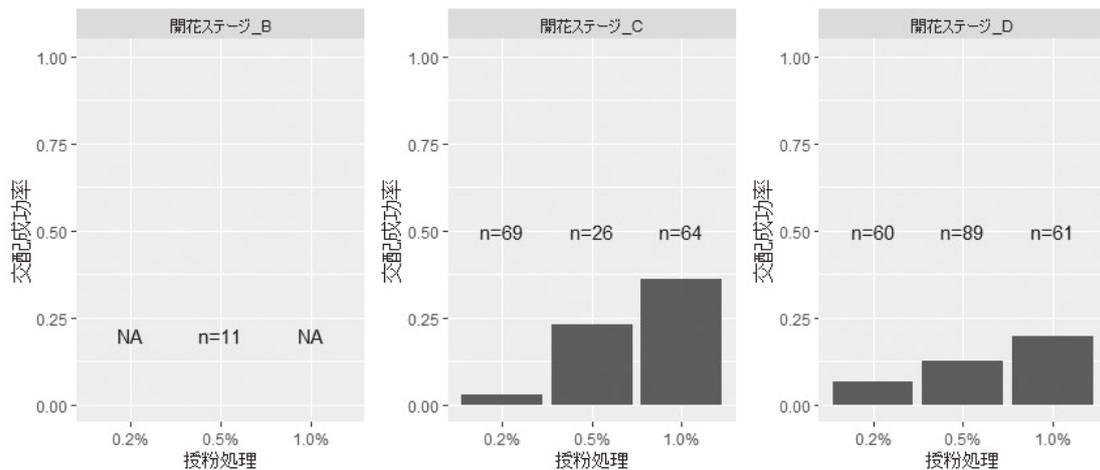


Fig. 4. 雌花の開花ステージおよび懸濁液の濃度別に見た交配成功率

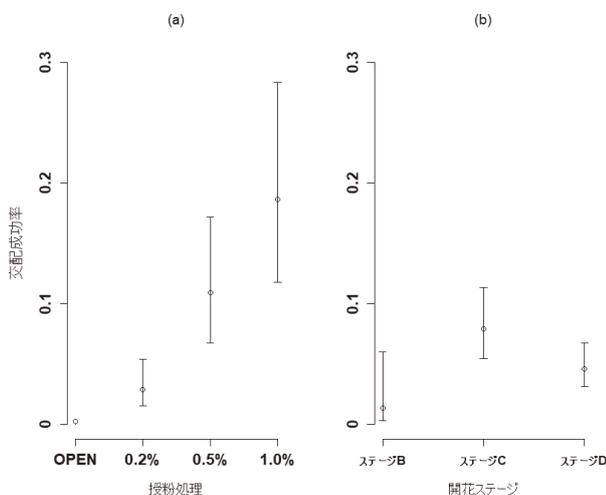


Fig. 5. (a) 授粉処理および (b) 開花ステージの各水準における係数の最小二乗平均値から求めた交配成功率の予測値。エラーバーは 95% 信頼区間を示す。

4. 考察

(1) 花粉懸濁液の保存温度と保存時間が花粉の活性に及ぼす影響

花粉懸濁液の保存について、スギの場合、常温保存の場合48時間まで、冷蔵保存の場合12時間までは懸濁直後と発芽率の中央値に有意差がなかった (Fig. 2)。懸濁液内での花粉の活性の保持について、冷蔵保存の効果を検証したが、冷蔵保存によって活性を保持できる時間が延びるとは言えなかった。ただし、常温保存の場合には4時間以降下限値がかなり低くなっていることや、24時間の時点で中央値が明らかに低いデータが得られていることなどから、実験誤差を考慮すると実用性の面では注意が必要であり、可能な限り早く使用した方が良いであろうと考えられた。溶液授粉が適用できる果樹において、溶液に懸濁した後、花粉の発芽活性は劇的に低下する例が知られている。例えば、ニホンナシでは70%あった懸濁直後の花粉発芽率が、5時間後には10%以下に低下するため溶液は3時間で使い切ることが推奨されている

(農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)。キウイフルーツにおいても時間経過にともなう花粉の発芽率の低下が確認されており、懸濁後2時間程度で使い切ることが推奨されている (愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010)。またモモでは溶液の組成に関わらず、発芽率は2時間後に懸濁直後の半分になること (阪本ら 2008) が報告されている。これらの果樹の事例では溶液授粉にかなりタイトに時間的な制限があることが示されており、スギは花粉の取り扱いの観点からは前述の果樹に比べて溶液授粉を適用しやすい樹種であると考えられた。

(2) 溶液授粉による結果率・100粒重・種子発芽率への影響

モデル選択の結果から、結果率には母樹と授粉処理が影響すること、種子の100粒重には母樹が影響することが示唆された。また、種子発芽率には母樹と授粉処理が影響することが示唆された。溶液授粉は溶液を媒体として人為的に花粉を雌花に散布するため、量的花粉制限によるシイナが軽減でき、種子の発芽率が上がる可能性がある。加えて、花粉の液体増量剤に展着効果をねらって寒天を添加しているため、この効果で、空中花粉が少ない状況下で目的外の空中花粉をとらえやすくなって種子発芽率が上がったということも一つの可能性として考えられたが、寒天等の展着剤の効果については今後の検討課題である。今回は最も高い花粉濃度で1.0%の溶液授粉を試行したが、非常に高い花粉濃度の溶液授粉を行った事例 (斎藤 2020) によると、花粉濃度10%および20%で、59.5%および53.8%という高い種子発芽率を報告していた。今回の結果では花粉濃度が1.0%の場合にのみ有意な正の効果が見られた (Table 5 (3-b))。同時に、母樹によっては1.0%濃度でも斎藤(2020)と同程度の種子発芽率の予測値が得られたが母樹間変動が大きかったことから、利用できる花粉量に余裕がある場合には、花粉濃度を高めることが有効ではないかと考えられた。

(3) 溶液授粉による交配成功率の評価

無処理の自然交配枝では溶液授粉で使用した花粉による交配がおこったサンプルはなく (Fig. 3)、今回試験した0.5%および1.0%の溶液授粉は交配成功率に有意な正の影響が認められ (Table 6 (4-a)、(4-b))、また、交配成功率の予測値は花粉濃度が高くなるほど上がっていた (Fig. 5 (a)、Appendix Table 3)。一方、0.2%の溶液授粉では有意な影響が認められず (Table 6 (4-a)、(4-b))、今回試験した3つの濃度の中では、0.5%よりも薄い花粉濃度では交配成功率への効果が非常に小さいと考えられた。加えて雌花の開花ステージも交配の成否に影響があることが示唆され、雌花が半開程度の開花ステージCの状態の交配成功率は、開花ステージDでの交配成功率に対してオッズ比が1.78倍となり (Table 6 (4-a))、交配成功率の予測値も開花ステージCで最も高かった (Fig. 5 (b)、Appendix Table 3)。

スギでは一つの雌花の中に複数の胚珠が存在し、それぞれが別個に受粉する (横山 1975, 高相 1996)。そのため、通常、一つの雌花の中でも異なる花粉によって受粉・受精した種子が存在する。開花ステージDよりもCの交配成功率が高い傾向があったが、その理由として、より開花の進んだ開花ステージDで溶液授粉処理を行った枝では、溶液授粉に用いた花粉による受粉より先に、空中花粉によって受粉・受精にいたってしまっているようなケースが多かったことが考えられた。

また、今回算出したモデルには開花ステージBへの施用の値が含まれているため、このデータを除き、1.0%の溶液で開花ステージCおよびDの時期に授粉処理を行ったとした場合の交配成功率の予測値を試算したところ、0.282という値が予想された。また、今回の試験では、開花ステージのCとDが多い時期を狙ったが、結果的には開花ステージDの処理数が一番多くなっていた。しかし、開花ステージCの方がDよりも交配成功率が高くなる傾向が見られたことから、溶液授粉の処理の時期を今回の時期よりも早め、開花ステージCの雌花にのみ施用することができたと仮定して、開花ステージCのみのデータを用いて予測値を試算したところ、交配成功率は0.362と推定された。

本研究では野外のスギ個体の雌花に対して比較的濃度で、一回のみの溶液授粉の施用した場合にどのような効果が得られるのかを評価したが、適切な開花のステージを選ぶことによって目的とした花粉による種子生産が3割程度は期待できると考えられた。野外でスギ2系統に対して交配適期に花粉を直接吹きかけるSMPを1回のみ行った試験 (小澤 2015) では、図3のグラフから読み取った交配成功率は系統ごとにやや異なり、0.1および0.3程度であった。これらの値は2系統のみの結果であり、また使用した花粉量については不明であるが、今回得られた1.0%溶液授粉の適期への1回処理の交配成功率はこの花粉を直接吹きかけるSMPでの交配成功率と比較して遜色ないと言えた。また、同じく小澤 (2015) は同一の雌花に対して時

期を変えて複数回の花粉を直接吹きかけるSMPを行った場合も検証し、処理回数と交配成功率には正の相関があったことを報告している。これらのことから、溶液授粉でも複数回の施用で交配成功率が上げられる可能性はあると考えられた。

今回の試験によって、少量の花粉を有効活用しつつ、作業性の向上の期待できる溶液授粉により、野外においても一定程度の効果を確認することができた。今後は実用性を高めるために、動力噴霧器などの器具の使用、雌花の開花時期や交配成功率の年次間変動等についてさらに検討を重ねていく必要がある。

謝辞

本研究の一部は、森林総合研究所林木育種センターH30育種交付金プロジェクト (課題番号: エイ a P S 2 6) によって行われたものである。また、森林総合研究所の「家族責任がある研究者のための支援制度」による研究支援を受けた。本原稿の執筆にあたっては編集者、2名の査読者に非常に有益なご助言を頂いた。ここに厚く感謝申し上げます。

引用文献

- Akaike, H. (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In B. N. Petrov, & F. Csaki (Eds.), *Proceedings of the 2nd international symposium on information theory* (pp. 267-281). Budapest: Akademiai Kiado.
- Albert, A. and Anderson, J. A. (1984) On the existence of maximum likelihood estimates in logistic regression models. *Biometrika*, 71, 1-10.
- Askew, G. R. (1992) Potential genetic improvement due to supplemental mass pollination management in conifer seed orchards. *For. Ecol. Manage.*, 47, 135-147.
- Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (2002) *A practical information-theoretic approach. Model selection and multimodel inference*, 2nd ed. Springer, New York, 2.
- Daniels, J. (1978) Efficacy of supplemental mass-pollination in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.*, 27, 52-58.
- Denison, N. and Franklin, E. (1975) Pollen Management. In Faulkner R (eds). *"Seed Orchards"*. For. Comm. Bull. 54, London, 92-100.
- 愛媛県農林水産研究所果樹研究センター (2010) "キウイフルーツ溶液受粉マニュアル", 7pp, https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/kiui_jufun.pdf.
- El-Kassaby, Y. A. and Ritland, K. (1986) The relation of outcrossing and contamination to reproductive phenology and supplemental mass pollination in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.*, 35, 240-244.
- El-Kassaby, Y. A., Rudin, D. and Yazdani, R. (1989). Levels of

- outcrossing and contamination in two *Pinus sylvestris* L. seed orchards in northern Sweden. *Scand. J. For. Res.*, 4, 41-49.
- El-Kassaby, Y. A. and Reynolds, S. (1990) Reproductive phenology, parental balance, and supplemental mass pollination in a sitka-spruce seed-orchard. *For. Ecol. Manage.*, 31, 45-54.
- Firth, D. (1993) Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika*, 80, 27-38.
- Friedman, S. T. and Adams, W. T. (1985) Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 69, 609-615.
- Harju, A. and Muona, O. (1989) Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scand. J. For. Res.*, 4, 513-520.
- Hopping, M. E. and Jerram, E. M. (1980) Supplementary pollination of tree fruits: I. Development of suspension media. *New Zeal. J. Agric. Res.*, 23, 509-515.
- Hopping, M. E. and Simpson, L. M. (1982) Supplementary pollination of tree fruits: III. Suspension media for kiwifruit pollen. *New Zeal. J. Agric. Res.*, 25, 245-250.
- 市村 よし子・小澤 創・坪村 美代子・渡辺 敦史・齋藤 央嗣 (2013) 少花粉スギミニチュア採種園におけるSMP (Supplemental Mass Pollination) の効果. 森林遺伝育種学会大会講演要旨集 2, 15.
- Karimi, H. R., Mohammadi, N., Estaji, A. and Esmailizadeh, M. (2017) Effect of supplementary pollination using enriched pollen suspension with Zn on fruit set and fruit quality of pistachio. *Sci. Hortic.*, 216, 272-277.
- Kosmidis, I. (2019) brglm: Bias reduction in binary-response generalized linear models. R package version 0.6.2, <https://cran.r-project.org/package=brglm>.
- 倉田 悟 (1964) 原色日本林業樹木図鑑. 地球出版, 331pp.
- 栗田 学・平岡 裕一郎・花岡 創・高橋 誠・渡辺 敦史 (2016) スギ雌花の開花フェノロジーと気温の関連性について. *九州森林研究*, 69, 107-109.
- Lenth, R. V. (2016) Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *J. Stat. Softw.*, 69, 1-33.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J. M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, 7, 639-655.
- Moriguchi, Y., Iwata, H., Ujino-Ihara, T., Yoshimura, K., Taira, H. and Tsumura, Y. (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Theor. Appl. Genet.*, 106, 751-758.
- Moriguchi, Y., Taira, H., Tani, N. and Tsumura, Y. (2004) Variation of paternal contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. *Can. J. For. Res.*, 34, 1683-1690.
- 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 (2018) “ニホンナシ溶液受粉マニュアル”, 5pp, https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/fruit_nasi_jufun2018.pdf
- 農研機構 (2020) “落葉果樹の溶液受粉について”, https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/030162.html, (参照 2020-10-8).
- 大野 正夫・高橋 英吉・寺沼 公士 (1964) 果樹の人工受粉の能率化に関する研究. *園芸学会雑誌*, 33, 1-7.
- Ozawa, H., Watanabe, J., Chen, H., Isoda, K. and Watanabe, A. (2009) The impact of phenological and artificial factors on seed quality in a nematode-resistant *Pinus densiflora* seed orchard. *Silvae Genet.*, 58.
- 小澤 創 (2015) 少花粉スギミニチュア採種園におけるSMP (supplemental mass pollination) の効果. 関東・中部林業試験研究機関連絡協議会花粉症対策研究会, “花粉症対策研究会成果集”, 10-11.
- Pakkanen, A., Nikkanen, T. and Pulkkinen, P. (2000) Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scand. J. For. Res.*, 15, 399-404.
- Plomion, C., LeProvost, G., Pot, D., Vendramin, G., Gerber, S., Decroocq, S., Brach, J., Raffin, A. and Pastuszka, P. (2001) Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Can. J. For. Res.*, 31, 1816-1825.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 齋藤 真己 (2020) 優良無花粉スギ「立山 森の輝き」普及推進事業. 令和元年度富山県農林水産総合技術センター森林研究所業務報告, 11.
- Sakamoto, D., Hayama, H., Ito, A., Kashimura, Y., Moriguchi, T. and Nakamura, Y. (2009) Spray pollination as a labor-saving pollination system in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai): Development of the suspension medium. *Sci. Hortic.*, 119, 280-285.
- 阪本 大輔・羽山 裕子・伊東 明子・櫻村 芳記・森口 卓哉・中村 ゆり (2008) モモ溶液受粉のための液体増量剤へのPMEまたはPGの添加が結実に及ぼす影響. *園芸学研究*, 7, 525-530.
- 森林総合研究所林木育種センター東北育種場 (2016) 寒冷地におけるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ苗木の安定供給 採種園管理者と苗木生産者のためのマニュアル. 35pp.
- 白石 進・渡辺 敦史 (1995) rbcL遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. *日林誌*, 77, 429-436.
- Stoehr, M. U., Orvar, B. L., Vo, T. M., Gawley, J. R., Webber, J. E., and Newton, C. H. (1998) Application of a chloroplast

DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.*, 28, 187-195.

田島 正啓 (1991) III. 林木育種の基礎 3. 繁殖技術. 大場喜一郎・勝田 柁編, “林木育種学”, 文永堂出版, 116-130.

高相 徳志朗 (1996) 針葉樹類の受粉機構. *植物分類*, 47, 253-269.

Tani, N., Takahashi, T., Ujino-Ihara, T., Iwata, H., Yoshimura, K. and Tsumura, Y. (2004) Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. *Ann. For. Sci.*, 61, 569-575.

生方 正俊 (2002) 遺伝資源の収集・保存に関する技術シ

リーズ No. 1 樹木花粉の取り扱い (I) — 収集から精選まで —. *林木遺伝資源情報*, 8.

Wang, X. R., Lindgren, D., Szmidt, A. E. and Yazdani, R. (1991) Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. *Scand. J. For. Res.*, 6, 379-385.

Wheeler, N. C. and Jech, K. S. (1992) The use of electrophoretic markers in seed orchard research. *New For.*, 6, 311-328.

山下 研介 (1991) 開花と結実管理. 杉浦 明編, “新果樹園芸学”. 朝倉書店, 138-152.

横山 敏孝 (1975) スギにおける胚の形成と球果の成長. *林試研報*, 277, 1-20.

Appendix Table 1. 母樹と授粉処理の係数推定値を用いて算出した結果率の予測値

	授粉処理			
	OPEN	0.2%	0.5%	1.0%
母樹 A	0.943	0.961	0.968	0.934
母樹 B	0.441	0.536	0.591	0.402
母樹 C	0.891	0.923	0.937	0.874
母樹 D	0.550	0.642	0.692	0.510
母樹 E	0.639	0.721	0.764	0.600
母樹 F	0.665	0.744	0.784	0.627
母樹 G	0.987	0.991	0.993	0.985
母樹 H	0.976	0.984	0.987	0.972
母樹 I	0.321	0.409	0.464	0.287
母樹 J	0.628	0.713	0.756	0.590
母樹 K	0.529	0.622	0.673	0.488
母樹 L	0.595	0.683	0.729	0.555
母樹 M	0.672	0.750	0.789	0.635

Appendix Table 2. 母樹の係数推定値を用いて算出した100粒重 (g) と種子発芽率の予測値

母樹	100粒重 (g)	発芽率
A	0.253	0.400
B	0.259	0.315
C	0.274	0.440
D	0.388	0.516
E	0.246	0.251
F	0.216	0.255
G	0.298	0.225
H	0.313	0.325
I	0.254	0.085
J	0.288	0.368
K	0.350	0.205
L	0.298	0.395
M	0.368	0.570

Appendix Table 3. 授粉処理と開花ステージの係数推定値を用いて算出した交配成功率の予測値

	授粉処理		
	0.2%	0.5%	1.0%
開花ステージ_B	0.011	0.042	0.076
開花ステージ_C	0.063	0.214	0.339
開花ステージ_D	0.036	0.133	0.224

Effect of spray pollination as an artificial pollination technique for *Cryptomeria japonica* in the field.

Naoko MIYAMOTO^{1)*}, Kazuya IIZUKA²⁾, Yukinori KONNO³⁾, Soichiro NAGANO⁴⁾,
Jin'ya NASU¹⁾, Yuichiro ORIBE⁴⁾ and Nobuaki TAKEDA¹⁾

Abstract

The applicability of spray pollination for *Cryptomeria japonica* in the field, as an artificial pollination promotion technique, was examined to effectively utilize a small amount of pollen while improving workability. First, the effect of storage time of the pollen grain-water suspension on pollen activity was evaluated. Pollen grains stored for 12 h in the suspension had a similar germination activity to those evaluated immediately after the suspension was prepared. Then, spray pollination with three levels of pollen concentrations (0.2%, 0.5%, and 1.0%) on multiple mother tree clones with female strobili at different developmental stages (start, half-open, and full-open) was tested. In addition, to evaluate whether mating following spray pollination was successful, the seedlings grown from the collected seeds were subjected to paternity analysis using DNA markers. There was no effect by spray pollination on the levels of cone yield and the 100-seed weight ($p > 0.05$). Conversely, spray pollination at 1.0% pollen concentration had a significant positive effect on the seed germination rate ($p < 0.05$). Spray pollination at the two pollen concentrations of 0.5% and 1.0% had a significant positive effect on the ratio of seedlings (mating success rate) for the spray pollen used ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). The mating success rate with the 1.0% pollen concentration was higher than that with the 0.5% concentration. Among the three female strobili developmental stages, the mating success rate tended to be higher when spray pollination was performed at the half-open stage. A mating success rate of 0.362 was predicted using a spray pollination with 1.0% at the half-open stage of strobili. In summary, spray pollination was shown to have beneficial effects on mating even in the field.

Key words: spray pollination, supplemental mass pollination, developmental stages of female strobili, pollen germination, paternity analysis

Received 27 July 2020, Accepted 11 June 2021

1) Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center (FTBC), Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) School of agriculture, Utsunomiya University

3) Miyagi Prefectural Forestry Technology Institute

4) FTBC, FFPRI

* Tohoku Regional Breeding Office, FTBC, FFPRI, 95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0621, JAPAN; E-mail: naoruko@affrc.go.jp

論文 (Original article)

補間・推定方法の違いが森林の二酸化炭素吸収・ 放出量算出値に与える影響 —札幌および富士吉田森林気象試験地 タワーフラックスデータの検証— 溝口康子¹⁾*, 山野井克己¹⁾

要旨

世界各地の様々な植生で渦相関法を用いたフラックス観測が行われ、観測データを元に純生態系生産量 (NEP)、総一次生産量 (GPP) および生態系呼吸量 (RE) が求められている。NEP の欠測値補間および GPP、RE の算出には多くの方法が提案されている。方法の違いによる影響を把握するため、台風攪乱によって森林構造が大きく変化した落葉広葉樹林の札幌森林気象試験地と常緑針葉樹林の富士吉田森林気象試験地のデータを用いて比較検証および再解析を行った。補間に用いるための値の推定方法の違いによる影響は大きく、特に RE は大きな差が生じた。サイト毎に方法の違いによる影響は異なるため、各サイト個別に様々な手法を用いて値を算出し、値の不確実性の把握を行う必要がある。日中の RE 推定を光合成光量子束密度 (PPFD) と NEP の関係を用いて 4 種類の方法で求め、夜間の気温と NEP の関係式から日中の RE を推定した場合との比較を行った。方法によって値にばらつきはあるものの、分解による CO₂ 放出量の多い札幌サイトでは両者の差は小さかったが、富士吉田サイトでは日中の RE 推定を PPFD と NEP の関係から求めた場合の方が小さかった。日中の RE 推定を PPFD と NEP の関係を用いて行うことにより、対象サイトの日中の葉呼吸低下の影響の有無を把握できることが示された。

キーワード：生態系呼吸量、総一次生産量、純生態系生産量、データセットの期間、回帰式、タワーフラックス観測

1. はじめに

陸域生態系において渦相関法により純生態系生産量 (NEP) を連続的に測定できるようになった 1990 年代後半から、様々な気候帯・植生域で CO₂ フラックス観測が行われるようになってきている。このような観測サイトの情報を集約している FLUXNET のウェブサイト (<https://fluxnet.fluxdata.org/>) には、2017 年 2 月現在、世界で 900 を越えるサイトが登録されている。各サイト個別で行われる解析以外にも、多地点データを集約した統合解析 (例えば Hirata et al. 2008)、あるいは生態系プロセスモデル (例えば Ito 2008) や広域推定モデル (例えば Ichii et al. 2017) の教師・検証データとしても観測データは利用されている。

フラックス観測は 30 分単位の連続データ取得が可能だが、機器トラブルや、降雨中や風速が弱く乱流構造が十分発達していない条件下では欠測が生じるため、NEP の年間値等を求めるためには欠測値補間が必要となる。また、生態系における CO₂ の吸収および放出量、いわゆる総一次生産量 (GPP) および生態系呼吸量 (RE) は、フラックス観測データから直接ではなく NEP を用いて算出するため、それぞれを求めるために多くの算出方法が

提案されている (Falge et al. 2001, Reichstein et al. 2005 など)。特に日中の RE は、直接的に測定することができないため、様々な方法による推定が行われている。一般的には夜間の気温と -NEP (すなわち RE) の関係を日中にも適用し、日中の気温を用いて推定されることが多い (Hirata et al. 2008 など)。ただし、葉呼吸の光による抑制が知られており (Kok 1949, Sharp et al. 1984 など)、夜間のデータから得られる温度との関係性より小さい値になると指摘されている (Wehr et al. 2016)。そのため、日中の光の量と NEP の関係から推定する方法も提案されているが (Jassal et al. 2007, Bruhn et al. 2011)、直接日中の RE を測定することはできないため、これらの手法の検証も十分ではない。

補正、品質管理、補間や推定方法の違いによって NEP、GPP、RE の算出値は異なることから (例えば Saigusa et al. 2013)、統一的な手法の提案が行われている (Isaac et al. 2017, Wutzler et al. 2018 など)。しかし、これまで様々な方法で求められた値が解析に用いられ、現在でもその状況は変わらない。サイト間比較のためには統一的な手法を用いることは、手法による差によって起こる不確実性を除去するためには有効と考えられるが、サ

原稿受付：令和 2 年 8 月 28 日 原稿受理：令和 3 年 6 月 15 日

1) 森林総合研究所 北海道支所

* 森林総合研究所 北海道支所 〒062-8516 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 7

イト個別で最も適した方法は、植生や気象条件、測定システム、データ取得率などサイトの状況によって異なる。このため各サイトで手法の違いによってどの程度値に差が生じるのか、適用されている手法で得られた値はどの程度不確実性があるのかを把握することは重要である。

本研究では、NEPの補間およびGPP、REの算出方法の違いによる影響を把握するため、フラックスデータの補正および品質管理方法を同じ手順で行っている植生タイプの異なる2サイトのデータを用い、NEPの補間方法およびGPP、RE算出方法の違いによる不確実性の検証を行う。

2. 方法

2.1 試験地

本研究では落葉広葉樹林の札幌森林気象試験地 (AsiaFlux site code: SAP; 2004、2005年を除く2000~2017年まで)の16年間、および常緑針葉樹林の富士吉田森林気象試験地 (同: FJY; 2000~2008年まで)の9年間のデータを用いて解析を行った。

SAP (42°59'13"N, 141°23'07"E, 180 m a.s.l.)は北海道札幌市中心部の南に位置する森林総合研究所北海道支所構内に広がる再生二次林である。主要樹種はシラカンバ (*Betula platyphylla*)、ミズナラ (*Quercus crispula*)、ハリギリ (*Kalopanax septemlobus*)などで、林床にはチシマザサ (*Sasa kurilensis*)、クマイザサ (*Sasa senanensis*)が繁茂している。2003年時点で胸高直径5 cm以上の立木密度は672本 ha⁻¹、最上層を構成するシラカンバの平均樹高は21.5 mだった (宇都木ら2004, 溝口ら2018)。年平均気温は7.3℃、年降水量は800~1300 mm、冬期は最大1 m前後の積雪があり、積雪期間は概ね12月上旬から4月上旬までである (溝口ら2014, 溝口・山野井2015a, b)。2004年9月、台風18号による風倒被害が発生し、樹木のバイオマス量は約4割減となり、大きく森林構造は変化した (Yamanoi et al. 2015)。また、2010年には冠雪害、2014年にはカシワマイマイによる虫害が発生している。

FJY (35°27'17"N, 138°45'44"E, 1030 m a.s.l.)は山梨県富士吉田市、富士山北麓の剣丸尾溶岩流台地に広がるアカマツ (*Pinus densiflora*)林で、ミズナラ、コナラ (*Quercus serrata*)などの高木、亜高木のソヨゴ (*Ilex pedunculosa*)、下層には低木のミツバツツジ (*Rhododendron dilatatum*)などが見られる。1999年時点で胸高直径5 cm以上の立木密度は2556本 ha⁻¹、最上層を構成するアカマツの平均樹高は18.6 mだった。林床は溶岩が数多く露出しており、草本類は少ない (大塚ら2003, Ohtsuka et al. 2013)。年平均気温は9.5℃、平均年降水量は1955 mm (Mizoguchi et al. 2011)、冬期は12月下旬から4月初旬にかけて積雪があるが、最大積雪深は50 cm以下のことが多い。

SAPおよびFJYでは1999年夏から試験地内に建設された観測タワー (高さはそれぞれ42 mおよび32 m)上で、超音波風速温度計 (SAT: DA-600, Sonic, Tokyo, Japan) お

よびクローズドパス赤外線ガスアナライザー (IRGA: LI-6262, LI-COR, Nebraska, USA)を用いて渦相関法によりCO₂フラックス (F_c : $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)測定を行っている。森林キャノピー内の貯留変化量 (S_c : $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)はSAT設置高度 (SAP: 28 m, FJY [2006年10月まで]: 25 m, [2006年11月以降]: 27 m)より下5高度から空気を吸引し、IRGAを用いて濃度変化を測定することにより求めた。気温はSAP、FJYそれぞれ30 m、23 mの高度に通風式シールドを用いた温湿度計 (HMP45D, Vaisala, Finland)を、光合成光子束密度 (PPFD)は観測タワー最上部で光子センサー (LI-190, LI-COR, Nebraska, USA)を設置し測定した。気象データが欠測の場合、気温はバックアップシステムのデータ、あるいは近くの気象観測地点のデータを用いて補間 (Mizoguchi et al. 2011, 溝口ら2014)、PPFDが欠測の場合、年毎に求めた日射量との関係式からPPFDを推定し補間した。測定の詳細はSAP、FJYそれぞれYamanoi et al. (2015)、Mizoguchi et al. (2012)を参照頂きたい。

2.2 データ処理方法

1) 渦相関法によるフラックス計算と補間・推定手順の概要

CO₂フラックス (F_c)の算出は渦相関法を用い、一般的に行われている補正および品質管理を行った (Kaimal et al. 1968, Webb et al. 1980, McMillen 1988, Leuning and Moncrieff 1990, Foken and Wichura 1996, Vickers and Mahrt 1997, Lee et al. 2004)。さらに、フラックスを過小評価しやすい乱流構造が十分に発達していない条件下のデータは摩擦速度を判定基準として取り除いた (Goulden et al. 1996, Massman and Lee 2002など)。摩擦速度の閾値はSAPの攪乱前は0.29 m s⁻¹、攪乱後は0.31 m s⁻¹ (Yamanoi et al. 2015)、FJYは0.12 m s⁻¹ (Mizoguchi et al. 2012)とした。

補間方法としては、日平均化法やLook-up table法などが適用されることも多いが (Falge et al. 2001)、本研究では、観測で得られたフラックスデータと関連する気象データとの関係式の変数を、対象とする期間の30分データから統計フリーソフトR (R Core Team 2020)を用いて線形回帰あるいは非線形回帰により導出した。得られた変数の値と気象データから得られる値を用いて30分データの欠測値補間を行った。

2) 生態系純生産量 (NEP)

タワーフラックス観測データを用いてNEP ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)は式(1)により得られる。

$$\text{NEP} = -(F_c + S_c) \quad (1)$$

NEPは光合成光子束密度PPFD ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)を変数とした曲線を用いて表すことができる。欠測値補間のためのNEPの推定式として直角双曲線の式(2)が以前はよく用いられてきたが (例えばSaigusa et al. 2002)、現在では式(3)の非直角双曲線が適用されることも多い (例えばYasuda et al. 2012)。

$$NEP = \frac{\psi \cdot PPFD \cdot P_{max}}{P_{max} + \psi \cdot PPFD} - RE_d \quad (2)$$

$$NEP = \frac{\psi \cdot PPFD + P_{max} - \sqrt{(\psi \cdot PPFD + P_{max})^2 - 4\psi \cdot PPFD \cdot \theta \cdot P_{max}}}{2\theta} - RE_d \quad (3)$$

ここで、 ψ は曲線の初期勾配、 P_{max} は最大光合成速度 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、 θ は曲線の凸度、 RE_d は日中の生態系呼吸量 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を表す。

回帰するために使用するデータの期間 (データセット期間) を 7、15、21 および 29 日間の 4 種類、得られた係数はそれぞれデータセット期間の中心日の値とし、データセットは 1 日ずらして毎日係数を求めた。係数が得られなかった場合および負の値などの外れ値

の場合は、データセット期間内で値の存在する中で中心日に最も近い日の係数、その値がない場合は前年の同じ日の係数を用いた。PPFD を用いて NEP を推定する 2 種類の式と 4 種類のデータセット期間、合計 8 通りの方法を適用し (Table 1)、観測された気象データを用いて NEP を推定した。

3) 生態系呼吸量 (RE)

生態系呼吸量 (RE) は温度の上昇とともに増加することが知られており、下記の式 (4) に示すような温度が 10 °C 上昇したときに値が何倍になるかを示す温度係数 Q_{10} を用いた指数関数式や、Lloyd and Taylor (1994) が提唱した修正アレニウス式 (式 5) で表すことができる。

Table 1. 日中の純生態系生産量 (NEP) を推定する際のデータセット期間と式
Periods of a dataset and regression equations when estimating the daytime net ecosystem production (NEP).

記号 Symbol	推定式を求めるときに 使用するデータ期間 Period of dataset	式 Equation	参考文献 Reference
DR07	7days	直角双曲線 Rectangular curve (2)	Saigusa et al. (2002) and so forth
DR15	15days		
DR21	21days		
DR29	29days		
DN07	7days	非直角双曲線 Non-rectangular curve (3)	Yasuda et al. (2012) and so forth
DN15	15days		
DN21	21days		
DN29	29days		

Table 2. 生態系呼吸量 (RE) を推定する際のデータセット期間と式
Periods of a dataset and regression equations when estimating ecosystem respiration (RE) using nighttime data

記号 Symbol	推定式を求めるときに 使用するデータ期間 Period of dataset	式 Equation	参考文献 Reference
NE07	7days	指数関数 Exponential function (4)	Saigusa et al. (2002) and so forth
NE15	15days		
NE21	21days		
NE29	29days		
NE3S or NE4S	3 or 4seasons*	修正アレニウスの式 Modified Arrhenius function (5)	Lloyd and Taylor (1994), Hirata et al. (2008) and so forth
NEYR	a year		
NA07	7days		
NA15	15days		
NA21	21days		
NA29	29days		
NA3S or NA4S	3 or 4seasons*		
NAYR	a year		

* 札幌 (SAP) では 1 年を着葉期、ササが雪に覆われる多雪期、多雪期以外の落葉期の 3 区分 : 3S を適用。林床のササが積雪で埋まる冬期は日中のデータも含まれる。富士吉田 (FJY) では 1 年を積雪期、無雪期の 1 ~ 3 月、4 ~ 9 月、10 ~ 12 月の 4 区分 : 4S を適用。

* Sapporo meteorology research site (SAP): 3S of foliage, defoliation, and abundant snow seasons when dwarf bamboo is covered with snow. The daytime data are also considered when dwarf bamboo is covered with snow. Fujiyosida meteorology research site (FJY): 4S of snow and no-snow seasons between January and March, April and September, October and December.

$$RE = RE_{T_{ref}} \cdot Q_{10}^{(T_a - T_{ref})/10} \quad (4)$$

$$RE = RE_{T_{ref}} \exp\left(\frac{E_0}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_{ref} - T_0} - \frac{1}{T_a - T_0}\right)\right) \quad (5)$$

ここで、 T_{ref} は基準温度 (K)、 $RE_{T_{ref}}$ は基準温度の時の RE、 T_a は気温 (K)、 E_0 は活性化エネルギー (J)、 R は気体定数 ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)、 T_0 は (227.13 K) である。本研究では、 T_{ref} を 273.15 、 278.15 、 283.15 K の 3 種類で計算し、残差平方和の最も小さい 273.15 K を T_{ref} として採用した。

夜間、あるいは落葉広葉樹林の積雪期などは光合成が行われないことから、

$$RE = -NEP \quad (6)$$

の関係が成り立つ。夜間の RE はこの関係を用い、式 (4)、(5) で使用するデータの期間 (データセット期間) を 7、15、21 および 29 日間それぞれで回帰し、得られた係数はデータセット期間の中心日の値とし、期間を 1 日ずつずらして毎日変数を求める方法で行った。係数が得られなかった場合および負の値などの外れ値の場合は、データセット期間内の値で中心日に最も近い日の係数、値がない場合は前年の同じ日の係数を用いた。さらに、年毎および積雪期や着葉の有無等を考慮した季節毎にも回帰した (Table 2)。季節区分は過去の解析方法に倣い、SAP の場合は 3 シーズン (Yamanoi et al. 2015)、FJY の場合は 4 シーズン (Mizoguchi et al. 2012) とした。この夜間の関係式から RE を推定する方法を N タイプと呼ぶことにする。

日中の生態系呼吸量 (RE_d) も夜間の気温と RE の関係を適用し、日中の気温を夜間のデータから得られた式 (4)、(5) に日中の気温を入力することで推定する方法の

ほか、PPFD と日中の NEP の関係式 (2)、(3) で得られる RE_d 、あるいは光の量の少ない時間帯のデータから直線回帰する方法 (式 7) などが提案されている (Jassal et al. 2007, Bruhn et al. 2011)。

$$RE_d = \alpha \cdot \text{PPFD} - \text{NEP} \quad (7)$$

ここで、 α は PPFD を横軸、 $RE_d + \text{NEP}$ を縦軸に取った時の直線の傾きを表す。

本研究では RE_d を日中のデータから求めるため、日中の PPFD と NEP を用いてデータセット期間 7、14、21、29 日の 4 通りで、下記の 4 種類の方法を適用した (Table 3)。

DR: 日中の PPFD と NEP を用い、直角双曲線 (式 2) を使用。

DN: 日中の PPFD と NEP を用い、非直角双曲線 (式 3) を使用。

DJ: PPFD $300 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下の時の PPFD と NEP を用い、一次関数 (式 7) を使用。

DB: 午後の PPFD が $500 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下の時の PPFD と NEP を用い、一次関数 (式 7) を使用。

上記 4 種類それぞれで得られた RE_d は、対象とする日の日中の平均 RE とみなす場合 (Average)、得られた RE_d と気温との関係を年毎に式 (4) あるいは (5) で求め、30 分毎の気温から推定する方法の 3 ケースをそれぞれ適用し、RE を推定した。これら日中のデータをもとに推定した RE を D タイプと呼ぶことにする。

4) 総一次生産量 (GPP) の算出方法

総一次生産量 GPP ($\mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) と NEP の関係は式 (8) で表される。

$$\text{GPP} = \text{NEP} + RE_d \quad (8)$$

NEP の欠測値は式 (2) あるいは (3) の関係式から求めた値で補完した。 RE_d は N タイプ、D タイプから算出した値すべてのケースを適用した。

Table 3. 日中の生態系呼吸量 (RE_d) を推定する際の式と光合成光子束密度 (PPFD) の条件

Regression equations and the condition of photosynthetic photon flux density (PPFD) when estimating ecosystem respiration at daytime (RE_d)

記号 Symbol	式 Equation	対象とする光合成光子束密度 (PPFD) の範囲 Photosynthetic photon flux density (PPFD)	参考文献 Reference
DR	直角双曲線 Rectangular curve (2)	PPFD > 0 $\mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Saigusa et al. (2002) and so forth
DN	非直角双曲線 Non-rectangular curve (3)	PPFD > 0 $\mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Hirata et al. (2008) and so forth
DJ	線形 Linear function (7)	$0 < \text{PPFD} < 300 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Jassal et al. (2007)
DB	線形 Linear function (7)	$50 < \text{PPFD} < 500 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 午後 in the afternoon	Bruhn et al. (2011)

3. 結果と考察

3.1 回帰式から推定した生態系純生産量 (NEP) の差

夏季のデータセット期間が7日で式(2)および(3)を用いて得られた光-NEP回帰曲線の例をFig. 1a, bに示す。SAP、FJYいずれの場合も2つの式の初期勾配(ψ)の差はわずかだったが、最大光合成速度(P_{max})は直角双曲線式(式2): DR07で得られた値の方が大きくなる傾向がみられた。非直角双曲線式(式3): DNでデータセット期間4ケースを比較すると(Fig. 1c, d)、データセット期間によって対象とするデータが異なるが、おおむね ψ はわずかな差だったのに対し、 P_{max} の値はデータセット期間によって顕著に異なった。

Table 1で示した8通りの方法で推定した値の中で、7日間のデータセットを1日ずつ移動させて式(3)の非直角双曲線を用いた推定値DN07がSAP、FJY両者とも解析期間すべての残差平方和が最も小さかった。Fig. 2にこのDN07による推定値を積算した値を1としたときの他の方法による推定積算値の割合を示す。DN07と同じ式(3)を使ったDN15、DN21、DN29の割合はSAP、FJYとも1前後でデータセット期間の違いによる差はごくわずかであった。式(2)の直角双曲線による方法(DR)間でデータセット期間の違いによる差もわずかであった

が、2つの推定式による違いは大きかった。SAPの台風攪乱以前(2000~2003年)およびFJYはDN07の約1.6倍前後だった。台風攪乱後(2006~2017年)のDRは、非直角双曲線DN07による推定値の約2倍になり、年々変動も大きかった。

日中の年積算NEPについては、今回のケースのデータセット期間が7~29日の範囲であれば、期間の違いによる影響は小さいと考えられた。一方、推定式の選定による差は大きかった。直角双曲線と非直角双曲線による推定値の比較には注意を要する。また、森林タイプの異なる台風攪乱前のSAPとFJYでは傾向に差がなかった一方、台風攪乱後のSAPでは推定に用いた回帰式の違いによる差が大きくなったことから、森林構造が大きく変化した場合には、回帰式の違いによる影響は変化することが示唆された。

3.2 回帰式から推定した生態系呼吸量 (RE) の差

REを温度から推定する場合、式(4)のような一般的な指数関数(NE)ではLloyd and Taylor (1994)が指摘しているように、式(5)の修正アレニウス式(NA)より気温が高くなると大きな値を示す傾向に有り、本研究のデータでも同様の傾向がみられた(Fig. 3)。このようにNEの

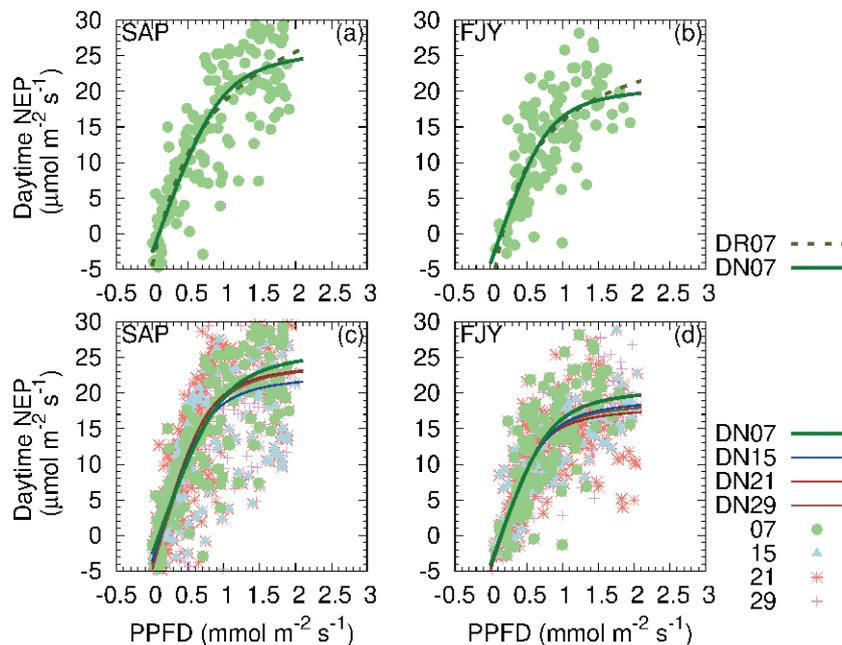


Fig. 1. 日中の光合成光子束密度 (PPFD) と純生態系生産量 (NEP) の関係

Daytime relations between photosynthetic photon flux density (PPFD) and net ecosystem production (NEP)

札幌 (SAP; 2000年7月28日) および富士吉田 (FJY; 2000年7月31日) の例。線は回帰式、点はそれぞれのデータセット期間の観測データを表す。

(a) および (b): 7日間データセットを用いた直角双曲線 (DR07) および非直角双曲線 (DN07)。 (c) および (d): 7 (DN07)、15 (DN15)、21 (DN21)、29 (DN29) 日のデータセット別の非直角双曲線。

Examples of the Sapporo meteorology research site (SAP) are from July 28, 2000, whereas those of the Fujiyoshida meteorology research site (FJY) on July 31, 2000. The lines represent regression equations, and symbols denote observation data during each dataset.

(a) and (b): a rectangular function (DR07) and non-rectangular function (DN07) using a seven-day dataset. (c) and (d): Non-rectangular functions using seven (DN07)-, 15 (DN15)-, 21 (DN21)-, and 29 (DN29)-day datasets.

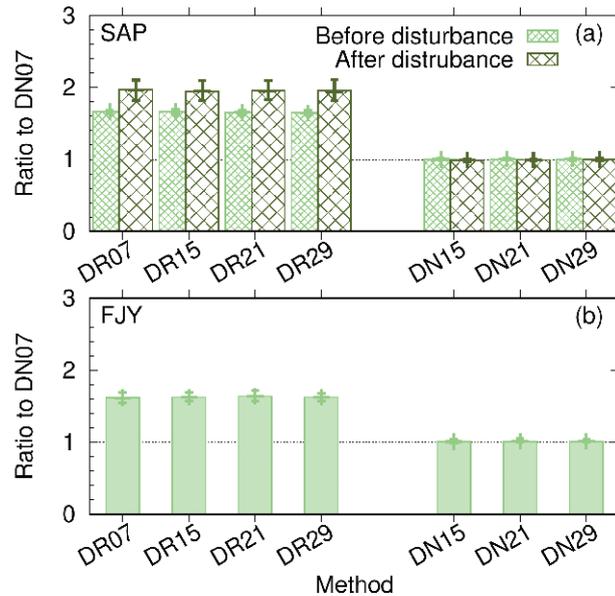


Fig. 2. 回帰式およびデータセット期間による日中の推定純生態系生産量 (NEP) の違い
The differences in daytime net ecosystem production (NEP) by regression functions and various periods of a dataset at the Sapporo (SAP) and Fujiyoshida (FJY) meteorology research sites
 7日間データセット非直角双曲線式 (3) DN07 による日中の NEP 推定積算値を 1 とした時の値。棒グラフは対象期間全体を通じた積算値、エラーバーは各年別の積算値の平均値および最大・最小値。
 (a) は札幌 (SAP) の攪乱前 2000 ~ 2003 年および 2006 ~ 2017 年、(b) は富士吉田 (FJY) の 2000 ~ 2008 年の値。
 The plots show the ratio of the integrated values of the estimated daytime NEP obtained using each method in Table 1 to that obtained via a non-rectangular function using a 7-day dataset (DN07). The bars show the ratio of all the data during the target periods and the error bars show the average and range of the annual ratio.
 (a) Data obtained from SAP before (2000–2003) and after (2006–2017) the typhoon disturbance in 2004, and (b) data obtained from FJY during 2000–2008.

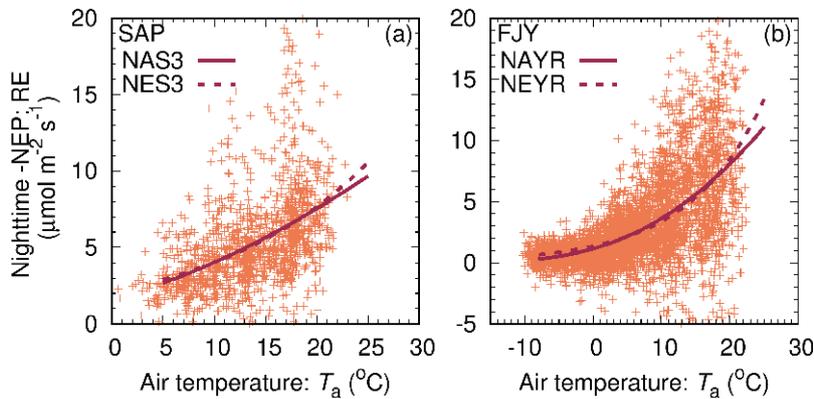


Fig. 3. 夜間の気温 (T_a) と純生態系生産量 ($-NEP = \text{生態系呼吸量} : RE$) の関係
Relations between the air temperature (T_a) and nighttime ecosystem respiration (RE)
 線は回帰式、点は観測データを表す。
 (a) 札幌 (SAP): 2008 年の着葉期 (NAS3 および NES3)、(b) 富士吉田 (FJY): 2008 年全年 (NAYR および NEYR)。
 The lines show the regression equations, and the symbols show the observation data.
 The foliage season in (a) 2008 at the Sapporo meteorology research site (SAP; NAS3 and NES3) and (b) 2008 at the Fujiyoshida meteorology research site (FJY; NAYR and NEYR).

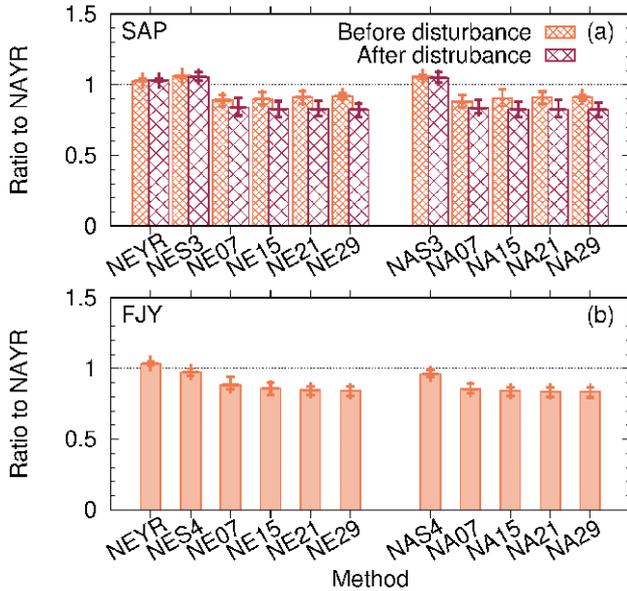


Fig. 4. 回帰式およびデータセット期間による推定生態系呼吸量 (RE) の違い

The differences in ecosystem respiration (RE) using regression functions and various periods of a dataset 年毎の修正アレニウス式 (6) による RE 推定積算値 (NAYR) を 1 とした時の値。

棒グラフは対象期間全体を通した積算値、エラーバーは各年別の積算値の平均値および最大・最小値。

(a) は札幌 (SAP) の攪乱前 2000 ~ 2003 年および 2006 ~ 2017 年、(b) は富士吉田 (FJY) の 2000 ~ 2008 年の値。

The plots show the ratio of the integrated values of the estimated RE obtained using NA and NE method in Table 2 to that obtained via a modified Arrhenius type function using annual data (NAYR). The bars show the ratio of all the data during the target periods and the error bars show the average and range of the annual ratio.

(a) Data obtained from the Sapporo meteorology research site (SAP) before (2000–2003) and after (2006–2017) the typhoon disturbance in 2004, and (b) data obtained from the Fujiyoshida meteorology research site (FJY) during 2000–2008.

場合、高温期に過大評価の可能性はある。

気温と夜間の $-NEP$ (RE) の関係性を各年の 1 年間のデータセットを元に式 (5) により得られる係数を適用して推定した RE の積算値 (NAYR) を 1 とした場合の、式 (4)、(5) それぞれ 1 年 (YR)、季節毎 (SAP; S3: ササが雪に覆われる多雪期、多雪期以外の落葉期、着葉期、FJY; S4: 積雪期、無積雪の 1~3 月、4~9 月、10~12 月)、および 7、15、21、29 日のデータセットを 1 日ずつ移動させて係数を毎日求めて推定した RE の積算値の割合を Fig. 4 に示す。年あるいは季節毎のデータセット推定値は 7~29 日のデータセットの推定値に比べて大きかった。7~29 日のデータセット間では、違いはわずかであった。また、同じデータセット期間の場合 NE の方がわずかに NA より大きかった。

残差平方和が最も小さかったのは SAP、FJY ともに

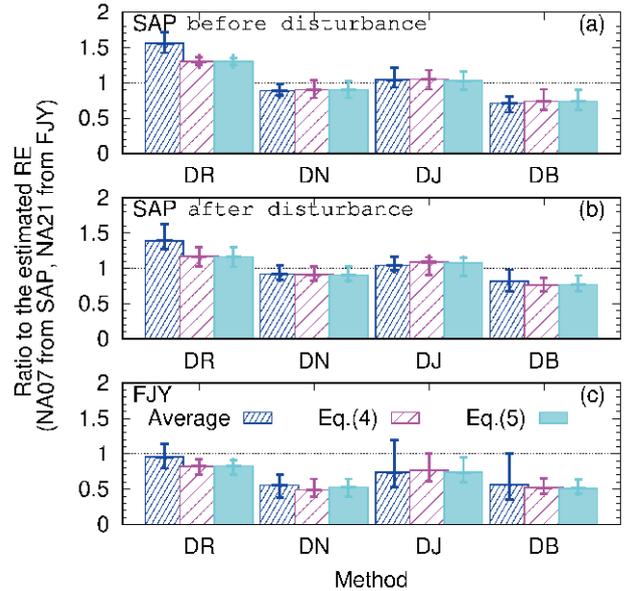


Fig. 5. 推定法の違いによる日中の推定生態系呼吸量 (RE_d) の差

The differences in daytime ecosystem respiration (RE_d) by regression functions at the Sapporo (SAP) and Fujiyoshida (FJY) meteorology research sites

夜間のデータから得られた回帰式 (札幌 SAP: NA07、富士吉田 FJY: NA21) による日中の推定積算値を 1 としたときの割合。DR、DN、DJ、DB は Table 3 の記号に対応する式で得られた推定値。棒グラフは対象期間全体を通した積算値、エラーバーは各年別の積算値の平均値および最大・最小値。青色は RE_d を推定日の平均値とした場合、桃色は推定日の気温と RE_d を年毎に指数関数 (式 4) で回帰し気温で再計算した値、水色は推定日の気温と RE_d を年毎に修正アレニウス式 (式 5) で回帰し気温で再計算した値。

(a) SAP: 攪乱前 2000 ~ 2003 年、(b) SAP: 攪乱後 2006 ~ 2017 年、(c) FJY: 2000 ~ 2008 年。

The plots show the ratio of the integrated values of the estimated daytime RE obtained using the DR, DN, DJ, and DB methods in Table 3 to that obtained via a NA07 from the Sapporo meteorology research site (SAP) and NA21 from the Fujiyoshida meteorology research site (FJY). The bars show the ratio of all the data during the target periods and the error bars show the average and range of the annual ratio. The blue, pink and sky-blue bars show the average, re-calculated values using Eqs. (4) and (5) with RE_d obtained using the DR, DN, DJ, and DB methods, respectively.

(a) and (b) Data obtained from SAP before (2000–2003) and after (2006–2017) the typhoon disturbance in 2004, respectively. (c) Data obtained from FJY during 2000–2008.

回帰式 NA を用いて推定した場合で、データセット期間は SAP で 7 日、FJY で 21 日だった。また、FJY は SAP よりもデータセット期間の差が小さかった。最適なデータセット期間は欠測期間、欠測の時期等にも影響されると考えられるが、季節変化の大きい落葉樹の SAP と季節変化の小さい常緑樹の FJY による違いも影響している可能性がある。SAP の 7~29 日のデータセットでは攪乱後に値は小さくなり、年毎 (YR)、季節毎 (S3) との差は広がった。台風攪乱後の SAP はそれ以前に比

べて全体的に気温が高く、高温時の推定値の差が影響していると考えられた。

Table 3 で示された RE_d 推定法である D タイプの PPFD と NEP の関係から求めた DB、DJ、DR、DN の推定値の比較を行った (Fig. 5, 6)。光合成が行われる日中の RE を直接的に求める方法はない。ここでは、N タイプの夜間のデータセットから求めた関係式のうち、残差平方和の最も小さい方法 (SAP では NA07、FJY では NA21) から得られた日中の推定積算 RE を 1 とした。日中の RE はデータセット期間の違いによる顕著な差は見られなかったことから、Fig. 5 および Fig. 6 ではデータセット 7 日間の値を示した。

直角双曲線式 (2) から求めた RE_d (DR) のケースを除く

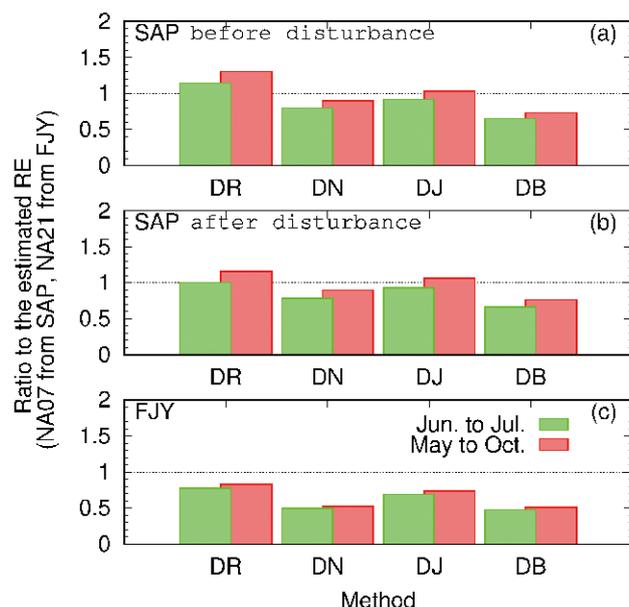


Fig. 6. 推定法別日中の生態系呼吸量 (RE_d) の季節による違い
The differences in daytime ecosystem respiration (RE_d) by regression functions depending on the season at the Sapporo (SAP) and Fujiyoshida (FJY) meteorology research sites

夜間のデータから得られた回帰式 (札幌: SAP; NA07、富士吉田: FJY; NA21) による日中の推定積算値を 1 としたときの割合。DR、DN、DJ、DB は Table 3 の記号に対応する式で得られた RE_d を年毎に修正アレニウス式 (式 5) で回帰し気温で再計算した値。緑色の棒グラフは 6 月から 7 月の積算値の比、赤色の棒グラフは 5 月から 10 月までの積算値の比。

(a) SAP: 攪乱前 2000 ~ 2003 年、(b) SAP: 攪乱後 2006 ~ 2017 年、(c) FJY: 2000 ~ 2008 年。

The plots show the ratio of the integrated values of the estimated daytime RE obtained using the DR, DN, DJ, and DB methods in Table 3 to that obtained via a NA07 from the Sapporo meteorology research site (SAP) and NA21 from the Fujiyoshida meteorology research site (FJY). Daytime REs were re-calculated values using (5) with RE_d obtained using the DR, DN, DJ, and DB methods. The green bars show the ratio of all the data from June to July, the red bars show the ratio of all the data from May to October.

(a) and (b) Data obtained from SAP before (2000–2003) and after (2006–2017) the typhoon disturbance in 2004, respectively. (c) Data obtained from FJY during 2000–2008.

て、日中の PPFD と NEP の関係式から得られる RE_d を対象日の平均値として扱う場合 (Average) と式 (4)、(5) のいずれかの方法を用いて気温から推定する方法に大きな違いはなかった (Fig. 5)。直角双曲線式 (2) から求めた RE_d (DR) は、Average の方法で算出された値が式 (4)、(5) から得られた値より大きかった。また、SAP の台風攪乱前後 (Fig. 5a, b)、FJY (Fig. 5c) いずれの場合も DR の方法で得られた RE_d が他の方法よりも顕著に大きい値を示した。SAP では DB が最も小さく、FJY では DB あるいは DN による推定値が最も小さかった。SAP では DR および DJ の方法で 1 以上だったが、FJY では D タイプいずれの方法でも平均値は 1 を下回った。SAP は攪乱後 DR の値が低下し、それ以外の方法は上昇した。結果的に攪乱後は方法の違いによる差は小さくなった。

D タイプの方法の中で、式 (5) を用い気温から求めた日中の RE の 6 月から 7 月までの合計、5 月から 10 月の合計をそれぞれ比較した (Fig. 6)。 RE_d 算出方法 DR、DN、DB、DJ に関係なく SAP の攪乱前後、FJY、いずれも光合成の活発な 6 月および 7 月の合計値の比の方が、5 月から 10 月までの合計値の比よりも値は小さかった。その差は落葉広葉樹の SAP で大きく、台風攪乱後より攪乱前が大きかった。葉呼吸の割合が高いと考えられる時期および葉量の多かった SAP の攪乱前には、日中の葉呼吸抑制の影響が大きくなったことを意味する。これらの結果は、D タイプの推定方法が、葉呼吸による日中の RE の低下を示すことのできる手法であることを示唆している。

同じ温度であれば葉の呼吸量は夜間に比べて日中は減少するが (Wehr et al. 2016)、分解による CO_2 放出量は変化しない。したがって、RE に占める葉の呼吸量の割合によって、夜間の気温と RE の関係式から得られる日中の RE と実際の RE の差も異なってくる。SAP は観測開始当初から寿命が 100 年前後とされるシラカンバの枯死が目立ってきており (宇都木ら 2007)、枯死量が増加していた。さらに 2004 年の台風被害により大量の樹木の枯死が発生した。樹木の大量枯死は葉量の減少と分解される粗大有機物量の増加を意味する。2004 年の台風攪乱以降、顕著な RE の増加が観測されている (Yamanoi et al. 2015)。攪乱を受けていない FJY に比べ SAP は N タイプの推定値に対する D タイプの推定値 RE_d の比が大きかった理由として、SAP では当初より通常の森林よりも分解による CO_2 放出量が多く、2004 年の台風によってその状況がさらに顕著になったと考えられる (Fig. 5, 6)。このように、N タイプと D タイプの日中の RE の推定法の差は対象とする森林の状態によって異なると考えられる。また、植生タイプによって RE に対する葉呼吸の抑制の影響は異なることが指摘されている (Keenan et al. 2019)。季節による葉呼吸の影響の差が SAP より FJY の方が小さかったことから、葉量以外に植生タイプによる違いも影響していることが考えられる (Fig. 6)。

Dタイプの推定方法では、DRは値が大きめに、DBおよびDNは小さめに計算される傾向にあり、また、必ずしもNタイプによる推定値の方がDタイプよりも大きい値を示すとは限らないことがわかった。この原因として、推定方法DRが RE_d を適切に評価していない可能性のほか、フラックスデータ選定時に用いる摩擦速度の閾値が不十分で、乱流構造が十分発達していない夜間のフラックスデータを使用したためREを過小評価している可能性も排除できない。

3.3 補間方法の違いによる純生態系生産量 (NEP) の差

フラックス観測から得られるNEPの欠測部分を日中、夜間それぞれTable 1およびTable 2のNタイプの方法を用いて推定したNEPで補間し、年積算NEP ($\text{kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$)を求めた (Fig. 7)。

夜間のNEP欠測部分は、観測値と推定値の残差平方和が最も小さかった、SAPの場合NA07、FJYの場合NA21で推定した値で補間し、日中の欠測部分の補間値としてTable 1で示したDR07~DN29の8通りの推定値を用いた場合、年積算NEPの平均値 (●に実線)はSAPの攪乱前平均で $0.48 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ 、攪乱後は負となり、2009年に $-0.09 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ と最も放出が多くなった。その後年々変動はあるものの、虫害によって夏季に葉量が減少した2014年を除けば、NEPは増加傾向にあり、2017年には $0.03 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ となった。FJYの平均は $0.55 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ だった。日中の補間方法の違いによる年積算値の差 (網掛けの範囲)はSAPで $0.10 \sim 0.19 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ 、

FJYで $0.08 \sim 0.25 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ だった。日中のNEP推定はデータセット期間の違いによる差は大きくないが、式の違いによる差は大きい (Fig. 2)。SAPは攪乱後に推定式の違いによる差が増加しているため、年によっては補間後のNEPの差が大きくなった。FJYはSAPよりもデータ取得率が低く、特に7日以上欠測が生じた回数の多い年にNEPの差が大きくなった。

日中のNEP欠測部分を、観測値と推定値の残差平方和が最も小さかったDN07で推定した値で補間し、夜間のNEP欠測部分の補間値としてTable 2で示したNE07~NAYRのNタイプ12通りの推定値を用いた場合、平均値 (▼に実線)はSAPの攪乱前4年間の平均値で $0.40 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ 、攪乱後の2009~2011年は $-1.4 \sim -1.7 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ と小さく、また虫害によって夏季に葉量が減少した2014年は $-1.7 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ だった。その後徐々に増加し、2017年は $-0.07 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ になった。FJYの平均値は $0.46 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ だった。夜間の補間方法の違いによる年積算値の差 (エラーバー)はSAPで台風攪乱前2000~2003年で $0.05 \sim 0.07 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ 、攪乱後は $0.07 \sim 0.13 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ で、徐々に補間に用いたRE推定方法による差は大きくなる傾向にあった。攪乱前よりも攪乱後の方が気温の高い年が多く、夜間気温の高い時期に欠測がある場合に差が大きくなりやすいことが一因としてあげられる。FJYでは年積算値の差は $0.02 \sim 0.05 \text{ kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ で、FJYは夜間の補間方法の違いによる差が小さかった。その理由として、FJYではRE推定方法の違いによるREの差が攪乱後のSAPに比べて小さかったことがあげられる (Fig. 4)。さら

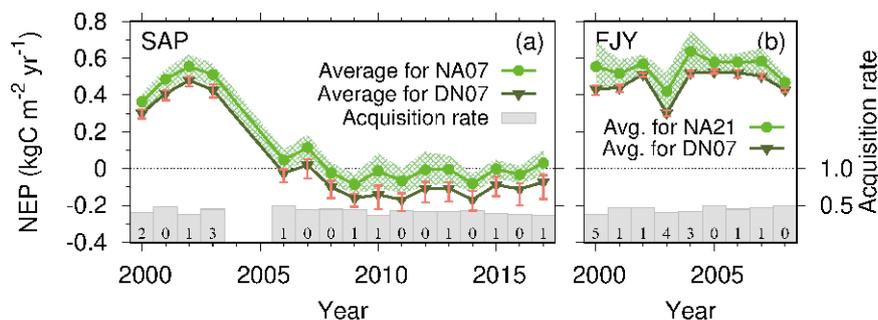


Fig. 7. 欠測値補間を行った札幌 (SAP) および富士吉田 (FJY) の純生態系生産量 (NEP) の年々変化とデータ取得率

Inter-annual variation with respect to the gap-filled net ecosystem production (NEP) and data acquisition rate at the Sapporo (SAP) and Fujiyoshida (FJY) meteorology research sites

●付き実線と網掛け: 夜間のNEP欠測値補間を推定法NA07 (SAP) もしくはNA21 (FJY)で行い、日中の補間をTable 1のDR07~DN29の8種類の推定法で行った場合の年積算NEP平均値と範囲。▲付き実線とエラーバー: 日中のNEP補間を推定法DN07で行い、夜間推定をTable 2のNE07~NAYRの12種類で行った場合の年積算NEPの平均値と範囲。棒グラフ: データ取得率。棒グラフ上の数字は連続7日を超える欠測が生じた回数。

The solid line with a circle indicates the average values, the halftone meshing area shows the range of NEP when the missing data during nighttime are replaced with the estimated values obtained via NA07 at SAP and NA21 at FJY, and the missing data during daytime are replaced with the estimated values obtained via the eight methods (DR07 to DN29) in Table 1. The solid line with a triangle shows the average values, and the error bars show the range of NEP when the missing data during daytime are replaced with the estimated values obtained using DN07, and the missing data during nighttime are replaced with the estimated values obtained via twelve methods for NE and NA in Table 2. The bars show the data acquisition rate. Figures on the bars show how many times data missing for more than seven consecutive days occurred.

に、夜間のデータ取得率も SAP と比べて高いことがあげられる (Fig. 8)。

補間に用いる NEP 推定方法による差は、日中、夜間それぞれで差を生じさせる。サイトの状況によって補間法の違いによる影響は異なった。SAP の攪乱後のように NEP の値が 0 付近にある場合、補間方法の違いにより CO₂ 収支が逆転してしまう場合もあり、特に注意が必要である。

3.4 夜間の補間方法と日中の推定方法の違いによる生態系呼吸量 (RE) の差

Table 2 で示した N タイプ (NE および NA) の夜間の気温と NEP の関係式をそのまま日中にも当てはめた場合と、日中は別に PPFD と NEP の関係から求める Table 3 で示した D タイプの値 (DR、DN、DJ、DB) で補間した場合の年積算 RE (kgC m⁻² yr⁻¹) の年々変化を求めた (Fig. 8)。

夜間の気温と RE の関係式 (4)、(5) を日中の RE にも適用した場合の NE、NA あわせて 12 通りの N タイプの平均値 (▲に実線) は、SAP の攪乱前 0.98 kgC m⁻² yr⁻¹、攪乱後 1.34 kgC m⁻² yr⁻¹、FJY は 1.36 kgC m⁻² yr⁻¹ だった。年積算値の差 (エラーバー) は、SAP は台風攪乱前で 0.11~0.21 kgC m⁻² yr⁻¹、攪乱後 0.23~0.40 kgC m⁻² yr⁻¹ と大きくなる傾向にあった。攪乱後の SAP は、補正に用いる式による差が大きくなる傾向がみられることから、補間方法によって RE の範囲が広がったと考えられる (Fig. 4)。FJY は 0.22~0.31 kgC m⁻² yr⁻¹ だった。

Table 2 および Table 3 で示した方法で補間した RE 全ての年積算値の平均 (●に実線) は、SAP の攪乱前、攪乱後、それぞれ 1.04、1.32 kgC m⁻² yr⁻¹、FJY は 0.98 kgC m⁻² yr⁻¹ だった。補間方法の違いによる年 RE の差 (網掛け部分) は、SAP の攪乱前では 0.64~1.03 kgC m⁻² yr⁻¹、攪乱後は 0.63~1.13 kgC m⁻² yr⁻¹、FJY は 0.81~1.20 kgC m⁻² yr⁻¹ だった。SAP のす

べての補間方法の平均値は N タイプの RE 平均値と同等だったが、FJY は N タイプの平均値を大きく下回った。攪乱前の SAP は D タイプの日中の RE の推定方法による差が大きく (Fig. 5a)、Table 2 および Table 3 の推定方法を用いたすべての RE の範囲は N タイプの RE の範囲を大きく上回った。FJY は、D タイプの推定値は、いずれの方法でも NA21 の方法を下回った (Fig. 5c)。そのため、すべての方法の平均値は N タイプで補間した RE 平均値より小さくなった。このように、サイトによって RE 補間方法の違いによる影響は異なった。特に日中の RE をどのように推定するかによって、大きく値が異なることがわかった。分解による CO₂ 放出が多い SAP と異なり、FJY では、N タイプの推定では大幅に RE を過大評価している可能性もあることから、日中の RE の推定手法の検証が難しい現状では、様々な手法で RE を求め、RE の不確実性を把握することは重要と考えられる。

3.5 SAP および FJY の二酸化炭素吸収・放出量と日中の RE 推定方法の影響

補間データとして、用いた観測データが SAP は 16 年分 (2000-2017、2004 および 2005 を除く)、FJY は 9 年分 (2000-2008) に対し、残差平方和が最も小さかった日中の NEP では DN07、RE は夜間・日中ともに NA07 (SAP)、NA21 (FJY) による推定値を補間値として用いた NEP、GPP、RE の年々変化を Fig. 9 に棒グラフで示す。SAP は台風攪乱前の年積算 NEP はそれぞれ平均 0.42 kgC m⁻² yr⁻¹ だったが、2004 年の台風攪乱による樹木の被害のため NEP は大幅に減少し、2006、2007 年の 0 kgC m⁻² yr⁻¹ 前後からその後、年間値では負の値、すなわち CO₂ 放出が続いた。2009~2011 年頃に NEP は最小、すなわち CO₂ 放出量が最大となり、その後は徐々に NEP は増加に転じ、2017 年に NEP は -0.04 kgC m⁻² yr⁻¹ と徐々に放出量

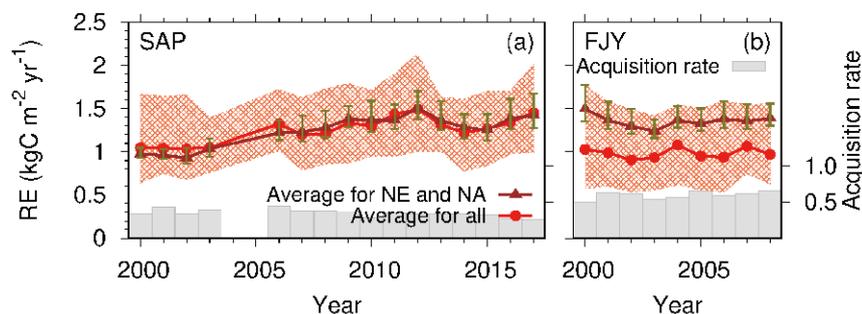


Fig. 8. 欠測値補間を行った札幌 (SAP) および富士吉田 (FJY) の生態系呼吸量 (RE) の年々変化
Inter-annual variation in gap-filled ecosystem respiration (RE) at the Sapporo (SAP) and Fujiyoshida (FJY) meteorology research sites

夜間の RE から得られた関係式 (NEあるいはNA) を日中にも当てはめた場合の平均値 (▲付き実線) と範囲 (エラーバー) および Table 2 および Table 3 のすべての推定方法で補間した RE の平均値 (●付き実線) および範囲 (網掛け)。

The solid line with a triangle shows the average, and error bars show the range of RE, which are replaced with the estimated values obtained via NA or NE for daytime and nighttime. The solid line with a circle shows the average, and the half-tone meshing area shows the range of RE; this method is replaced with the methods in Table 2 and Table 3. The vertical bars specify the data acquisition rate.

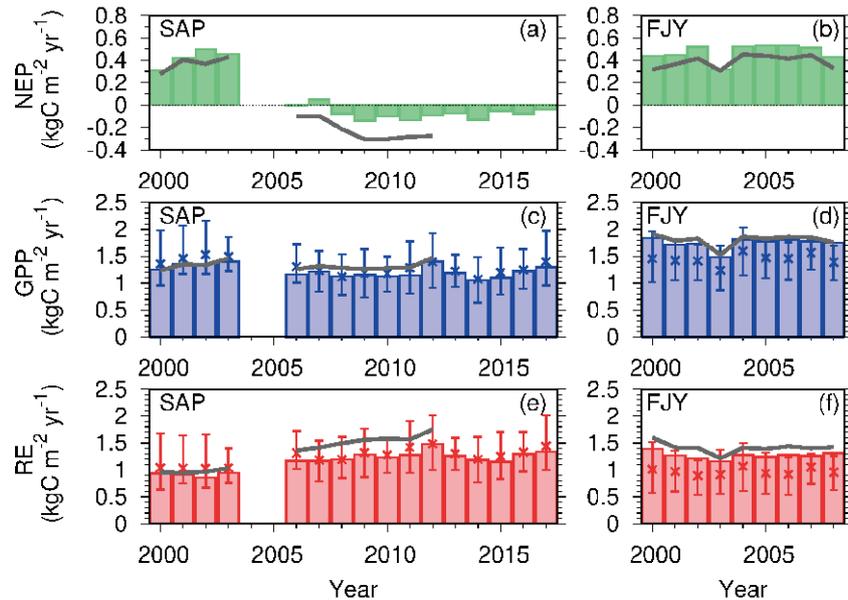


Fig. 9. 札幌 (SAP) および富士吉田 (FJY) の純生態系生産量 (NEP)、総一次生産量 (GPP) および生態系呼吸量 (RE) の年々変化
 Interannual variation in net ecosystem production (NEP), gross primary production (GPP), and ecosystem respiration (RE) at the Sapporo (SAP) and Fujiyoshida (FJY) forest meteorology sites

棒グラフは日中 NEP の推定方法 DN07、日中・夜間ともに RE の推定方法 NA07 (SAP)、NA21 (FJY) で得られた値を補間値に使った場合の値。太線は既報 (SAP: Yamanoi et al. 2015、FJY: Mizoguchi et al. 2012) の値。×印およびエラーバーは日中の RE を PPFD - NEP の関係 (DR、DN、DJ、DB) から求めた場合の平均値および最大・最小値。The bars show the values obtained using DN07 for daytime NEP and NA07 (SAP) or NA21 (FJY) for RE. The solid lines show the values reported by Yamanoi et al. (2015) for SAP and Mizoguchi et al. (2012) for FJY. The cross symbols and error bars show the average and range values estimated by DB, DJ, DR and DN for daytime RE.

は低下した。台風攪乱前平均年 GPP、RE はそれぞれ 1.34、0.92 $\text{kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ 、台風攪乱後はそれぞれ 1.18 および 1.25 $\text{kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ だった。FJY は年積算 NEP、GPP、RE はそれぞれ平均 0.47、1.74、1.27 $\text{kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ だった。FJY の NEP は、森林タイプは異なるが攪乱前の SAP と同等だったが、GPP および RE は SAP に比べてかなり大きかった。

これまでの推定値および補間後の値の比較により、SAP および FJY では補間方法およびフラックスデータから直接求めることのできない日中の RE (RE_d) 推定法により NEP、GPP、RE ($\text{kgC m}^{-2} \text{yr}^{-1}$) は大きく異なることがわかった。Fig. 9 の折れ線で示された既報値と比較すると (SAP; Yamanoi et al. 2015, FJY; Mizoguchi et al. 2012)、NEP は SAP、FJY いずれも既報値より値は大きく、GPP は攪乱前の SAP および FJY はほぼ同等、攪乱後の SAP の GPP はわずかに小さかった。RE も既報値より小さかったが、特に攪乱後の SAP は顕著な差がみられた。既報値は SAP、FJY いずれも日中の NEP は式 (2) の直角双曲線、RE はシーズン毎に式 (4) の指数関数を推定式として用いている。これらの式は棒グラフで示した値を求めるために使用した式 (3) の非直角双曲線、7 日あるいは 21 日のデータセットを用いた式 (5) の修正アレニウス式よりもそれぞれ大きな値を示す (Fig. 2, 4)。NEP は夜間の RE の影響を受けるため、最終的には既報の方が小さい値を示した。本研究において、日中の NEP、RE

個別にはそれぞれの差異を明らかにすることができたが、GPP と RE の収支である NEP はそれぞれの影響を受けるため、推定誤差が相殺される場合と、さらに大きくなる場合がある。既報との比較では、ある程度相殺されているが、攪乱後の SAP は RE の推定差異の影響を大きく受ける結果となった。このように、それぞれの推定方法による違いは整理できたが、実際のサイトごとに推定手法の違いによる影響の程度は異なる。今回取り扱ったデータに関しては、観測値と推定値の残差平方和が最も小さかったのは PPFD と日中の NEP では非直角双曲線、気温と夜間の RE では修正アレニウス式だったが、他のサイトやデータ期間によっては異なる可能性がある。それぞれのデータで、手法による違いの検証を行ったうえで、最適な推定方法を選択する必要がある。

日中の RE を夜間とは別に PPFD-NEP の関係から求める D タイプ (Table 3) で推定した場合の推定値の範囲を Fig. 9 のエラーバー、その平均値を×印で示す。推定方法によって差は大きい、SAP の場合、D タイプの平均値はほぼ RE を NA07 で行った時の値と同等で、日中の RE の推定方法の影響は小さかった。一方、FJY は D タイプで推定した場合、ほぼ GPP および RE は NA21 で日中の RE を推定した場合より小さかった。SAP とは異なり日中の RE 推定方法の違いによる影響は大きかった。日中の RE を直接的に測定する方法がない現状では、ど

の方法が最適かを判断することはできない。ただし、夜間の気温と RE の関係式を日中にも当てはめる場合、本研究で提案した D タイプの推定方法を用いて推定、比較することで、過大評価している可能性があるかどうかの判断の材料になると考えられた。

4. まとめ

落葉広葉樹林で観測期間中に大きく森林構造が変化した SAP と、森林構造の大きな変化が見られなかった常緑針葉樹林の FJY のデータを用い、補間あるいは推定に用いる手法の違いによって NEP あるいは RE および GPP がどの程度変化する可能性があるのか検証した。

NEP は本研究の結果でも示したように、補間値を算出するための回帰式による差が補間後の年間積算値などにも大きく影響し、台風攪乱後の SAP のように正負が逆転する可能性がある。このため、補間値を算出する式による差が生じないようにするため、Look-up Table 法や日平均化法 (Falge et al. 2001) が提案され、現在広く用いられている補間ツール ReddyProc (Max Planck Institute, Wutzler et al. 2018) などでも採用されている。ただし、これらの手法も採用するデータの期間や参照データ作成方法によって結果は異なるため、気象要素からの回帰式を用いて NEP 推定を行い補完する方法を否定するものではない (下田ら 2004)。気象要素との回帰式から推定し NEP 補間を行う場合には、補間値を算出する方法による値の不確実性の把握が必要と考えられる。

RE の積算値を求めるためには夜間の RE 補間と日中の RE 推定、GPP は日中の NEP 補間と日中の RE 推定が必要である。

夜間の RE 補間では、補間値推定に用いる指数関数式は、修正アレニウス式に比べ高温時に大きな値を示すが、本研究の結果では、両者に大きな違いはなく、回帰式を作成するためのデータセットの期間に大きく依存した。本研究の 2 つのサイトでは回帰式の違いが小さかったのは、気温 25 °C 以下が大半だったことが理由として考えられる。データセット期間の選定には慎重な検討が必要なほか、高温の期間が長いサイトでは、式による違いにも考慮する必要がある。日中の NEP 補間値推定に用いた式による違いは直角双曲線での推定値が非直角双曲線の推定値の約 1.6 倍で、攪乱前の SAP と FJY は同等の差だった。また、SAP の攪乱後はその差がさらになくなった。SAP は攪乱によって、森林構造が大きく変化し、さらに林床のササの葉量が大きく増加している。光一光合成の関係性が変化したことによって差が大きくなった可能性がある。回帰式による影響がサイトの状況によって大きく異なる可能性があることから、既報のデータの引用時、あるいは新たに推定に用いるための回帰式の選定時には、サイト個別に検証する必要がある。

日中の RE は、RE、GPP それぞれに影響するが、推定値のみで構成されるため、その影響は大きい。葉呼吸の

日中の呼吸量低下は Kok 効果として知られ、Brooks and Farquhar (1985) は、実験データから光の強さが増加すると葉の呼吸速度は低下することを示した。近年は同位体法を用いた研究も進んでいる。Wehr et al. (2016) は個葉ではなく森林生態系を対象とし、同位体法を用いて日中の RE を推定し、日中の RE 低下を示した。また、Keenan et al. (2019) は、フラックスデータを用いて従来の夜間のデータからの推定値と光一光合成曲線から求まる日中の RE をもとにした RE 推定値の比較から、日中の RE の抑制が季節および植生タイプによって異なることを示している。ただし、その抑制率はサイトによって大きく異なっていた。本研究では、植生タイプの違い以外に、攪乱前後の比較でも RE の抑制が大きく異なる結果が得られた。葉呼吸の RE 全体に占める割合が影響することが示された。この点についても、今後整理を進める必要がある。

謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP16K07789、(国研) 森林研究・整備機構森林総合研究所交付金プロジェクト (課題番号 201802) の助成を受けて行った研究成果である。

SAP および FJY サイトの長期観測には多くの同僚の尽力と協力のもとに行われている。特に元森林総合研究所の大谷義一氏には、両サイトの立ち上げから観測システムの基本設計、データロガー制御プログラム、フラックス計算プログラムや、FJY の観測にかかわる全般を、森林総合研究所九州支所の北村兼三氏および元森林総合研究所の中井裕一郎氏には SAP の観測期間前半の観測を担っていただいた。また、FJY では山梨県環境科学研究所 (現富士山科学研究所) の中野隆志氏をはじめとする職員の方々に協力頂いた。これらの方々に心からの敬意と謝意を表します。

引用文献

- Brooks, A. and Farquhar, G.D. (1985) Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta*, 165, 397-406.
- Bruhn, D., Mikkelsen, T. N., Herbst, M., Kutsch, W. L., Ball, M. C. and Pilegaard, K. (2011) Estimating daytime ecosystem respiration from eddy-flux data. *Biosystems*, 103(2), 309-313.
- Falge, E., Baldocchi, D., Olson, R., Anthoni, P., Aubinet, M., Bernhofer, C., Burba, G., Ceulemans, R., Clement, R., Dolman, H., Granier, A., Gross, P., Grünwald, T., Hollinger, D., Jensen, N.-O., Katul, G., Keronen, P., Kowalski, A., Chun, T.-L., Law, B. E., Meyers, T., Moncrieff, J., Moors, E., Munger, J. W., Pilegaard, K., Rannik, Ü., Rebmann, C., Suyker, A., Tenhunen, J., Tu, K., Verma, A., Vesala, T., Wilson, K. and Wofsy, S. (2001) Gap filling strategies for

- defensible annual sums of net ecosystem exchange. *Agric. For. Meteorol.*, 147(1), 43-69.
- Foken, T. and Wichura, B. (1996) Tools for quality assessment of surface-based flux measurements. *Agric. For. Meteorol.*, 78, 83-105.
- Goulden, M. L., Munger, J. W., Fan, S.-M., Daube, B. C. and Wofsy, S. C. (1996) Measurements of carbon sequestration by long-term eddy covariance: methods and a critical evaluation of accuracy. *Global Change Biol.*, 2, 169-182.
- Hirata, R., Saigusa, N., Yamamoto, S., Ohtani, Y., Ide, R., Asanuma, J., Gamo, M., Hirano, T., Kondo, H., Kosugi, Y., Li, S.-G., Nakai, Y., Takagi, K., Tani, M. and Wang, H. (2008) Spatial distribution of carbon balance in forest ecosystems across East Asia. *Agric. For. Meteorol.*, 148(5), 761-775.
- Ichii, K., Ueyama, M., Kondo, M., Saigusa, N., Kim, J., Alberto, M. C., Ardö, J., Euskirchen, E. S., Kang, M., Hirano, T., Joiner, J., Kobayashi, H., Marchesini, L. B., Merbold, L., Miyata, A., Saitoh, T. M., Takagi, K., Varlagin, A., Bret-Harte, M. S., Kitamura, K., Kosugi, Y., Kotani, A., Kumar, K., Li, S.-G., Machimura, T., Matsuura, Y., Mizoguchi, Y., Ohta, T., Mukherjee, S., Yanagi, Y., Yasuda, Y., Zhang, Y. and Zhao, F. (2017) New data-driven estimation of terrestrial CO₂ fluxes in Asia using a standardized database of eddy covariance measurements, remote sensing data, and support vector regression. *J. Geophys. Res. Biogeosci.*, 122(4), 2169-8953.
- Isaac, P., Cleverly, J., McHugh, I., van Gorsel, E., Ewenz, C. and Beringer, J. (2017) OzFlux data: network integration from collection to curation. *Biogeosciences*, 14(12), 2903-2928.
- Ito, A. (2008) The regional carbon budget of East Asia simulated with a terrestrial ecosystem model and validated using AsiaFlux data. *Agric. For. Meteorol.*, 148(5), 738-747.
- Jassal, R. S., Black, T. A., Cai, T., Morgenstern, K., Li, Z., Gaumont-Guay, D. and Nesic, Z. (2007) Components of ecosystem respiration and an estimate of net primary productivity of an intermediate-aged Douglas-fir stand. *Agric. For. Meteorol.*, 144(1), 44-57.
- Kaimal, J. C., Wyngaard, J. C. and Haugen, D. A. (1968) Deriving power spectra from a three-component sonic anemometer. *J. Appl. Meteorol.*, 7, 827-837.
- Keenan, T.F., Migliavacca, M., Papale, D., Baldocchi, D., Reichstein, M., Torn, M. and Wutzler, T. (2019) Widespread inhibition of daytime ecosystem respiration. *Nat. Ecol. Evol.*, 3, 407-415.
- Kok, B. (1949) On the interrelation of respiration and photosynthesis in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3, 625-631.
- Lee, X. Massman, W. and Law, B. (eds.) (2004) Handbook of Micrometeorology: A Guide for Surface Flux Measurement and Analysis. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 250pp.
- Leuning, R. and Moncrieff, J. (1990) Eddy-covariance CO₂ flux measurements using open- and closed-path CO₂ analysers: Corrections for analyser water vapor sensitivity and damping of fluctuations in air sampling tubes. *Boundary-Layer Meteorol*, 53, 63-76.
- Lloyd, J. and Taylor, J. A. (1994) On the temperature dependence of soil respiration. *Funct. Ecol.*, 8, 315-323.
- Massman, W. J. and Lee, X. (2002) Eddy covariance flux corrections and uncertainties in long-term studies of carbon and energy exchanges. *Agric. For. Meteorol.*, 113, 121-144.
- McMillen, R. T. (1988) An eddy correlation technique with extended applicability on non-simple terrain. *Boundary-Layer Meteorol*, 43, 231-245.
- Mizoguchi, Y., Ohtani, Y., Nakai, Y., Iwata, H., Takanashi, S., Yasuda, Y., Nakano, T., Yasuda, T. and Watanabe, T. (2011) Climatic characteristics of the Fujiyoshida forest meteorology research site. *Mt. Fuji Res.*, 5, 1-6.
- Mizoguchi, Y., Ohtani, Y., Takanashi, S., Iwata, H., Yasuda, Y. and Nakai, Y. (2012) Seasonal and interannual variation in net ecosystem production of an evergreen needleleaf forest in Japan. *J. For. Res.*, 17(3), 283-295.
- 溝口 康子・宇都木 玄・山野井 克己 (2018) 札幌市郊外落葉広葉樹林における台風攪乱後の現存量変化. *北方森林研究*, 66, 77-78.
- 溝口 康子・山野井 克己 (2015a) 羊ヶ丘実験林における降水量の測定誤差 —測器の違いによる影響—. *森林総研研報*, 14(3), 145-146.
- 溝口 康子・山野井 克己 (2015b) 羊ヶ丘実験林気象観測露場 40 年の記録. *森林総研研報*, 14(4), 209-218.
- 溝口 康子・山野井 克己・北村 兼三・中井 裕一郎・鈴木 覚 (2014) 札幌森林気象試験地の気象 (1999 ~ 2008 年). *森林総研研報*, 13(4), 193-206.
- 大塚 俊之・後藤 巖寛・杉田 幹夫・中島 崇文・池口 仁 (2003) 富士北麓剣丸尾溶岩流上のアカマツ林の起源. *植生学会誌*, 20, 43-54.
- Ohtsuka, T., Negishi, M., Sugita, K., Iimura, Y. and Hirota, M. (2013) Carbon cycling and sequestration in a Japanese red pine (*Pinus densiflora*) forest on lava flow of Mt. Fuji. *Eco. Res.*, 28(5), 673-926.
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reichstein, M., Falge, E., Baldocchi, D., Papale, D., Aubinet, M., Berbigier, P., Bernhofer, C., Buchmann, N., Gilmanov, T., Granier, A., Grünwald, T., Havránková, K., Ilvesniemi, H., Janous, D., Knohl, A., Laurila, T., Lohila, A., Loustau,

- D., Matteucci, G., Meyers, T., Miglietta, F., Ourcival, J.-M., Pumpanen, J., Rambal, S., Rotenberg, E., Sanz, M., Tenhunen, J., Seufert, G., Vaccari, F., Vesala, T., Yakir, D. and Valentini, R. (2005) On the separation of net ecosystem exchange into assimilation and ecosystem respiration: review and improved algorithm. *Glob. Change. Biol.*, 11(9), 1424-1439.
- Saigusa, N., Li, S.-G., Kwon, H., Takagi, K., Zhang, L.-M., Ide, R., Ueyama, M., Asanuma, J., Choi, Y.-J., Chun, J.-H., Han, S.-J., Hirano, T., Hirata, R., Kang M., Kato, T., Kim, J., Li, Y.-N., Maeda, T., Miyata, A., Mizoguchi, Y., Murayama, S., Nakai, Y., Ohta, T., Saitoh, T. M., Wang, H.-M., Yu, G.-R., Zhang, Y.-P. and Zhao, F.-H. (2013) Dataset of CarboEastAsia and uncertainties in the CO₂ budget evaluation caused by different data processing. *J. For. Res.*, 18(1), 41-48.
- Saigusa, N., Yamamoto, S., Murayama, S., Kondo, H. and Nishimura, N. (2002) Gross primary production and net ecosystem exchange of a cool-temperate deciduous forest estimated by the eddy covariance method. *Agric. For. Meteorol.*, 112(3-4), 203-215.
- Sharp, R. E., Matthews, M. A., Boyer, J. S. (1984) Kok Effect and the Quantum Yield of Photosynthesis: Light Partially Inhibits Dark Respiration. *Plant. Physiol.*, 5, 95-101.
- 下田 星児・莫 文紅・村山 昌平・及川 武久 (2004) 渦相関法と大気炭素安定同位体手法による夜間生態系呼吸量の細分化. 筑波大学陸域環境研究センター報告, 5, 21-28.
- 宇都木 玄・阿部 真・飯田 滋生・飛田 博順・田内裕之・佐藤 桃子 (2004) 札幌市郊外の落葉広葉樹林における現存量に関する諸量の推定 (I) -林分現存量と葉面積の垂直分布について-. *日林北支論*, 52, 99-101.
- 宇都木 玄・飯田 滋生・飛田 博順・上村 章・石塚 森吉・田中 永晴・阪田 匡司・酒井 寿夫・田内裕之・阿部 真・石塚 成宏・酒井 佳美 (2007) 札幌市郊外の落葉広葉樹林における上層林冠木の 25 年の動態. *日林北支論*, 55, 35-37.
- Vickers, D. and Mahrt, L. (1997) Quality control and flux sampling problems for tower and air craft data. *J. Atmos. Ocean. Technol.*, 14, 512-526.
- Webb, E. K., Pearman, G. I. and Leuning, R. (1980) Correction of flux measurements for density effects due to heat and water vapor transfer. *Quart. J. Roy. Meteorol. Soc.*, 106, 85-100.
- Wehr, R., Munger, J. W., McManus, J. B., Nelson, D. D., Zahniser, M. S., Davidson, E. A., Wofsy, S. C. and Saleska, S. R. (2016) Seasonality of temperate forest photosynthesis and daytime respiration. *Nature*, 534, 680-683.
- Wutzler, T., Lucas-Moffat, A., Migliavacca, M., Knauer, J., Sickel, K., Šigut, L., Menzer, O. and Reichstein, M. (2018) Basic and extensible post-processing of eddy covariance flux data with REddyProc. *Biogeosciences*, 15(16), 5015-5030.
- Yamanoi, K., Mizoguchi, Y. and Utsugi, H. (2015) Effects of a windthrow disturbance on the carbon balance of a broadleaf deciduous forest in Hokkaido, Japan. *Biogeosciences*, 12, 6837-6851.
- Yasuda, Y., Saito, T., Hoshino, D., Ono, K., Ohtani, Y., Mizoguchi, Y. and Morisawa, T. (2012) Carbon balance in a cool-temperate deciduous forest in northern Japan: seasonal and interannual variations, and environmental controls of its annual balance. *J. For. Res.*, 17(3), 253-267.

Uncertainty of the estimated carbon absorption and emission by different gap-filling and partitioning methods: Reanalysis of the tower flux data obtained from the Sapporo and Fujiyoshida forest meteorology sites

Yasuko MIZOGUCHI^{1)*} and Katsumi YAMANOI¹⁾

Abstract

Flux observations using the eddy covariance method have been conducted with respect to various types of vegetation throughout the world. The flux data obtained via these observations are used to estimate the net ecosystem production (NEP), gross primary production (GPP), and ecosystem respiration (RE). Various gap-filling methods estimating the NEP and partitioning methods for estimating the GPP and RE have been suggested. To understand the differences between the values obtained using these methods, we compared the data estimated via these methods based on the flux data obtained from the deciduous broadleaf forest at the Sapporo site, which experienced a major typhoon disturbance, and the evergreen needleleaf forest at the Fujiyoshida site. The difference between the values obtained using these methods was large, especially for RE. It is important to estimate NEP, GPP, and RE using various methods to completely understand the uncertainty in the values because the influence of the methods varies at each site. In addition, we estimated daytime RE by four methods using photosynthetic photon flux density (PPFD) and NEP. The estimated daytime REs were different for each method. The differences in daytime RE between these values and RE estimated using nighttime data were dependent on the characteristics of the forest. The difference was small at the Sapporo site, where large amounts of coarse wood debris were present, whereas the daytime RE estimated via the regression function using the PPFD and NEP was considerably less than that estimated by the function using the nighttime air temperature and NEP at the Fujiyoshida site. This suggests that estimating daytime RE is a useful method to evaluate the influence of leaf respiration to RE.

Key words: ecosystem respiration, gross primary production, net ecosystem production, period of a dataset for regression, regression equation, tower flux observation

Received 28 August 2020, Accepted 15 June 2021

1) Hokkaido Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

* Hokkaido Research Center, FFPRI, 7 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062-8516, Japan; E-mail: pop128@ffpri.affrc.go.jp

論文 (Original article)

茨城県北部小川試験地におけるササ類3種の30年間の動態

新山 馨^{1)*}、柴田 銃江¹⁾、齋藤 智之²⁾、直江 将司²⁾

要旨

ササ類は日本の多くの森林で繁茂し、その種の違いは森林植生区分の指標として重要視されてきた。一方で密生したササ群落はしばしば樹木の更新を妨げる。そのためササ類の分布動態の解明は、森林生態学や森林管理上の大きな課題である。本研究はササ類3種が分布する小川保護林において、1) ササ群落の分布動態は、稈高や稈寿命、地下茎の形態などの生態的特性を用いて予測できるのか、2) 雑種起源のアズマザサは親種であるミヤコザサとどのような競合関係にあるのか、3) 極相であるブナ-スズタケ群集に向かってスズタケの優占が進むのか、の3点を検証することを目的に、ササ類3種の稈の分布を30年間(1990年-2020年)調査した。小川保護林内に設置した小川試験地(6ha)の10 m格子状にある600個の方形区(2 m × 2 m)で調査した結果、年拡大速度は、稈高が最も高いスズタケで117 m²/year、稈高の低いミヤコザサとアズマザサでは47、53 m²/yearであった。稈寿命はスズタケ、ミヤコザサ、アズマザサの順で、15年、2年、7年と推定された。このような3種の分布動態の違いは、稈高や稈寿命などと対応し、アズマザサとミヤコザサは稈高が似ていて共存状態が続くと示唆された。稈高が高く稈寿命も長いスズタケは拡大を続け、ブナ-スズタケ群集へ遷移すると推測された。しかしスズタケ群落の1つが2017年に開花枯死したので、スズタケの実生更新が今後の研究課題となる。

キーワード：スズタケ、ミヤコザサ、アズマザサ、雑種起源、稈高、稈寿命

1. はじめに

日本の冷温帯落葉広葉樹林や亜寒帯(亜高山帯)針葉樹林の林床には、しばしばササ類が繁茂し、森林植生区分の指標としてササの種の違いが重要視されてきた(福嶋ら1995)。また、ササ群落は稈密度が高く林床の光環境を悪化させるので、樹木の実生更新に大きな影響を与えることが知られている。例えばチシマザサはブナの天然更新を阻害すると考えられてきた(Nakashizuka and Numata 1982, Nakashizuka 1988, Petersら1992, Makita 1993, Abeら2005)。さらに苗場山のブナ林(前田1988, Masakiら2020)や木曽のヒノキ林(赤井1972)、北海道のトドマツ林(青柳1983, 伊藤ら2018)でも、ササ類の刈り払い、かき起こしを含む様々な天然更新試験が行われてきた。このようにササ類の生態とその制御は日本の森林植生の理解と森林管理に重要であるため、様々な研究と議論がなされてきた。

ササ類の分布は大まかには積雪深(Suzuki 1961, 薄井1961)といった気候条件で説明されてきたが、地形、地質、攪乱や施業履歴など、多くの要因がササ類の分布域、種数とバイオマスを左右することが知られている(薄井1961, 紺野1977, Yoshino 1978, 河原1984, Suzuki 2002)。ササ類は通常、地下茎による栄養繁殖のみで群

落を拡大し、鬱閉したササ群落を形成する。そのためササ群落は外観上の変化に乏しくクローン識別が難しいことから、地下茎による栄養成長そのものの研究例は限られていたが(Oshima 1961, Saitohら2002, Saitohら2006)、近年の遺伝解析により、地下茎による栄養成長の結果として地下茎の長さやバイオマスの異なる様々な個体サイズのクローンが群落内に混在することが判ってきた(松尾ら2008, Miyazakiら2009, Matsuoら2018)。ササ類は分枝様式の異なる2種類の地下茎を持ち、地下30-40 cmを走る単軸分枝による長い地下茎は群落の拡大に、より浅い地下15-20 cmに分布する仮軸分枝による短い地下茎は、狭い範囲での稈の密生に貢献している(McClure 1966, 蒔田1997, 蒔住2010, 蒔田ら2010, 松尾ら2010)。ササ類は両方の分枝様式を生育段階と環境条件で使い分けていて、たとえばチシマザサとスズタケは成熟した群落では仮軸分枝による稈の密生が著しい(Oshima 1961, 汰木ら1977, 蒔住2010)。ミヤコザサとアズマザサは単軸分枝が主で仮軸分枝により稈を密生させる性質は弱い。このような地下茎の分枝様式の違いにより、ササ類は地上部の刈り払いに対し種ごとに異なった反応を示すことが知られている(汰木ら1977, 梶1979, 汰木・荒上1984)。その理由は地上部と地下部のバイオマスの割合

原稿受付：令和3年2月9日 原稿受理：令和3年6月18日

1) 森林総合研究所 森林植生研究領域

2) 森林総合研究所 東北支所

* 森林総合研究所 森林植生研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1

が種ごとに異なり(刈住 1969, 豊岡ら 1986)、地上部バイオマスの割合が大きい仮軸分枝主体の種ほど、地上部が失われる山火事や刈り払いといった攪乱に弱いからである(河原 1984, 豊岡ら 1986)。

このような地理的分布、地下茎の分枝様式に加え、特定のササ1種についてのクローン構造や資源転流、ササと樹木の更新との関係を主眼とした研究が行われてきたが、同所的に複数のササ類が栄養繁殖で競合する場合の比較生態学的な研究例は知られていない。そこで本研究では、茨城県北部の小川ブナ希少個体群保護林(以後、小川保護林と呼ぶ)に同所的に分布するササ3種を対象に、比較生態学的なアプローチからその分布動態に関するいくつかの課題を検証する。小川保護林の林床にはスズタケ、ミヤコザサ、アズマザサの3種の小型ササ類が分布するが、スズタケは暗い林床でミヤコザサに対し優位であることがすでに知られている(Agata and Kubota 1985)。スズタケとミヤコザサの地域的分布(Suzuki 1961, 薄井 1961)やバイオマス(河原ら 1977, 河原・只木 1978, 豊岡 1983)については多くの研究がある。それに対しアズマザサの研究例が少なく、メダケ属とササ属の雑種であることは繰り返し指摘されているが(渡邊ら 1990, Watanabeら 1991, Takahashiら 1994, 細山ら 2002)、アズマザサの種生態学的情報はきわめて少ない(浅野・小滝 1975, 渡邊ら 1990)。現時点ではメダケ属のアズマネザサは小川保護林の北縁と数キロ離れた道沿いには分布している。米倉・梶田(2003-)以前の鈴木(1996)の分類によれば、スズタケはスズタケ属に含まれササ属ではない。この従来の分類でのササ属では唯一、ミヤコザサが保護林内に分布し他のササ属の種は周辺にも見られない。したがって雑種起源が正しいとすれば、この地域ではアズマネザサとミヤコザサの雑種がアズマザサであると考えられる。雑種起源とされるアズマザサは、親種であるミヤコザサと生態的特性が類似し互いに競合関係にあると想像されるが、その実態はどうだろうか。また人為攪乱が無くなった古い広葉樹二次林である小川保護林は、やがてはこの地域の本来の植生、極相林としてのブナ-スズタケ群集に戻っていくのだろうか。なおササ類のユニークな繁殖特性として、その多くの種が数10年から120年という長い間隔で一斉開花と枯死を繰り返すことが知られている(宇田川 1965, 室井 1966)。近年、スズタケ一斉開花枯死の事例が各地から報告されており(岡本ら 2018)、小川群落保護林とその周辺においても、2017年にスズタケ群落のいくつかが開花枯死した。本研究はササ類の開花研究が主目的ではないので詳細な言及はしないが、稀におきる大規模な種子繁殖イベントがササ類の分布動態や樹木更新に与える影響は大きいと考える。このようなユニークな栄養繁殖、種子繁殖特性をもつササ類3種が、保護林としての安定した期間にどのような群落の衰退と拡大傾向を示すのかは、人為攪乱が減

少した落葉広葉樹林内でのササ群集の将来像を予測し、樹木の更新と森林管理を考える上で重要な知見となる。

本研究の具体的な目的は、30年間の長期データを用い、1) ササ群落の分布動態は、稈高や稈寿命、地下茎の形態などの生態的特性を用いて予測できるのか、2) 雑種起源のアズマザサは親種であるミヤコザサとどのような競合関係にあるのか、3) 極相であるブナ-スズタケ群集に向かってスズタケの優占が進むのか、の3点を検証することである。また調査期間中に観察されたスズタケの開花枯死にともなう新たな課題については考察の最後に簡単に述べる。

2. 試験地

小川保護林は茨城県北部、北茨城市の北縁に位置し、福島県との県境にある。国有林での保護林制度の開始にともない、1969年に学術参考保護林として指定された。その後、平成4年に保護林制度が変わり、関東森林管理局管轄下の約67.4haの小川ブナ植物群落保護林として保護されてきた。平成30年からは、隣接する小川ブナ群落林木遺伝資源保存林、定波シラカバ植物群落保護林と統合され、現在の小川ブナ希少個体群保護林(103.51ha)となった(関東森林管理局 2021)。保護林内の森林は本来ブナ、イヌブナの優占する冷温帯落葉広葉樹林であるが、現状はコナラ、クリ、シデ属、カエデ属が部分的に優占する古い二次林である(Masakiら 1992)。この保護林で散見されるブナの下枝が発達した樹型、あるいは小面積ながらシラカバが生育している点、炭焼き窯の跡と思われる窪地の存在、あるいは下草が少なく見通しのよい林床状態などから、過去には炭焼き、林内放牧、落ち葉掻き、山火事などの様々な人為攪乱が生じていたと推測される(Suzuki 2002)。保護林となった以降は炭焼きのための伐採や択伐などは行われていないが、過去の様々な人為攪乱により樹種組成の変化やササ類を含む林床植生に大きな変化があったと推測される(Nakashizuka 2002)。

小川保護林を含む阿武隈山地南部は、少なくとも500年以上前から山火事などの人為攪乱が始まり、江戸時代には徳川家の牧野が存在するなど長い人為攪乱の歴史がある。明治以降は国有林として管理され植林が進む一方で軍馬や農耕馬の生産、炭焼きなどのための森林利用も盛んに行われた。しかし第二次世界大戦後は農業の機械化とエネルギー革命のため、草地と炭焼き用の広葉樹二次林は利用が減っていった。一時的には広葉樹チップの生産や原木シイタケ栽培用のナラ・クヌギ林が必要となったが山村の過疎化と共に廃れていった(Miyamotoら 2011)。

このような森林利用の歴史を持つ地域に位置する小川保護林で、最も原生状態に近く大径木が残存している林分を選び、森林総合研究所の研究グループが小川試験地(6ha, 200 m × 300 m)を1987年に設置した。この小川

試験地では精力的に森林群集や樹木の個体群、生物間相互作用などの生態学的調査が行われ、多くの論文が発表されている (Masakiら 1992, Tanaka and Nakashizuka 1997, Masakiら 1999, Shibataら 2002, Abeら 2008, Naoeら 2018)。小川試験地は、55種の本木植物 (胸高直径5 cm 以上) が出現する樹種多様性の高い落葉広葉樹林である。林床にはササ類3種の他に、カタクリ、ニリンソウ、ネコノメソウなどの春植物や、フシグロセンノウ、ラショウモンカズラ、フクオウソウ、オヤリハグマ、カシワバハグマなど多くの草本植物が生育している。なお、林床植生に大きな影響を与えるニホンジカは、1880年代末頃までは小川保護林周辺に生息していたが、それ以降は記録されていない (安田ら 2010, 竹内ら 2019)。この保護林ではニホンジカによる食害が100年以上にわたり無かったと推察される。

3. 対象種

小川試験地にはササ属とアズマザサ属の3種、スズタケ (*Sasa borealis* (Hack.) Makino et Shibata、図中では *Sasa borealis* と記述)、ミヤコザサ (*Sasa nipponica* (Makino) Makino et Shibata、図中では *Sasa nipponica*)、アズマザサ (*Sasaella ramosa* (Makino) Makino、図中では *Sasaella ramosa*) が生育している。これらの学名はYList (米倉・梶田 2003-) に従った。スズタケとミヤコザサは太平洋側の少雪地帯に分布する典型的なササの仲間で、最大積雪が50 cm 以下にミヤコザサが、75 cm 以下にスズタケが分布することが報告されている (Suzuki 1961, 薄井 1961)。稈高が2 mに達するスズタケは太平洋側のブナ林に広く分布し、林床でしばしば優占する。ミヤコザサは稈高がせいぜい50-60 cmで、稈は分枝せず、稈はほぼ1、2年で枯死する。スズタケは地下部に比べ地上部バイオマスの割合が高く、分枝を繰り返す稈の寿命は長い、刈り払いやシカの食害に弱いことが知られている (汰木・荒上 1984)。逆にミヤコザサの地上部は短寿命の細い稈で構成されるが、地下部のバイオマスの割合が高く、地上部バイオマスの損失に強い生態的な特性を持っている (寺井ら 2009)。アズマザサは葉が細く、1節から複数の枝を分枝するアズマネザサ (*Pleiblastus chino* (Franchet et Savatier) Makino) に似た形態を持ち、暗い林床では10 cm程度の稈高にとどまるが、光条件がよければ2 m近くまで成長する稈高可塑性の高い種である。アズマザサ属は、ミヤコザサ節あるいはチマキザサ節とアズマネザサとの間の雑種起源と言われている (渡邊ら 1990)。アズマザサはブナ-スズタケ群集のような群集名に使われるほど主要なササ類ではなく、生態的な特性についての研究例はほとんどみられないが、関東周辺から東北地方にかけて、しばしば大きな群落が見られる (渡邊ら 1990)。これら3種は小川保護林と周辺に大小の群落を多数、形成している。スズタケはかなり大面積でもスズタケ単独で群落を構成し、はっきりとした濃緑色

の群落として認識されやすい。ミヤコザサ群落は小面積で散在し、稈高が低いこともあって、スズタケほど見つけやすくない。アズマザサはサイズ差が大きく、林内では稈はまばらで稈高が低く、他の2種と混生し分布面積は広い。小川試験地内にはこれら3種の群落が複数存在していた。

4. 方法

ササ類3種の群落の空間分布とその長期動態を明らかにするため、小川試験地 (200 m × 300 m) 全域で測量した10 mごとの杭を基準に2 m × 2 mの方形区を651個 (21 × 31) 設置し、ササ類3種の稈数、最大稈高 (cm)、被度 (%) を測定した。測定は1990年3月29日と5月24日、1996年4月26日-28日、2006年11月1日-3日、2010年7月29日-8月7日、2017年8月1日-4日、2020年9月10日の6回行った。初回と2回目の調査では、スズタケの本数密度の高い14個の方形区で、稈数を「100本以上」、被度を「100%」というように上限値を記入していた。そのため、これら14方形区の稈数と被度については、3回目の実測値を便宜的に代入して全体の変化を計算した。また稈高は初回と2回目の調査では測定しなかった。初回の調査ではアズマザサの調査枠に欠測が25方形区あったので出現方形区数は2回目の値で補正した。ササ群落分布図 (Fig. 1) の描画のため651個の方形区データを用いたが、分布面積、拡大速度、稈高、被度などの計算は試験地内に位置する600個の方形区データで計算した。試験地の下辺および右辺上にある51個の方形区は厳密には試験地の外にあるので面積計算では除外した。ササ類の分布する方形区が1個増えることは、ササの分布が10 m拡がって次の方形区に出現したと仮定し、1方形区の増加は100 m² (10 m × 10 m) の分布面積拡大として計算した。年平均の面積の拡大速度 m²/yearと調査開始時の分布面積に対する年平均の増加面積割合 % の2つで拡大速度を表した。また本稿ではまとまった稈の集団を便宜的に群落と呼んでいるが、遺伝的な解析を行っていないので、一つの群落が遺伝的に同一な単一クローンあるいは複数のクローンで構成されているかは確認していない。

稈の寿命を調べるため、試験地内で3種が同所的に分布し同時に観察できる場所を選び (Fig. 1でX = 290 m, Y = 70 m 付近)、新稈をマーキングした。スズタケは1989年、ミヤコザサとアズマザサについては1990年に、新稈をそれぞれ47本、385本、206本マーキングして、その後の稈の生存と枯死を2012年まで、観察した。新稈の生残はグラフの点の分布から、スズタケは二次式、ミヤコザサとアズマザサについては一次式で回帰した。回帰計算はデルタグラフ ver.7で行った。

試験地内では2017年5月に2つのスズタケ群落で開花が観察され、翌2018年と2019年にはスズタケ実生の発生を確認した。

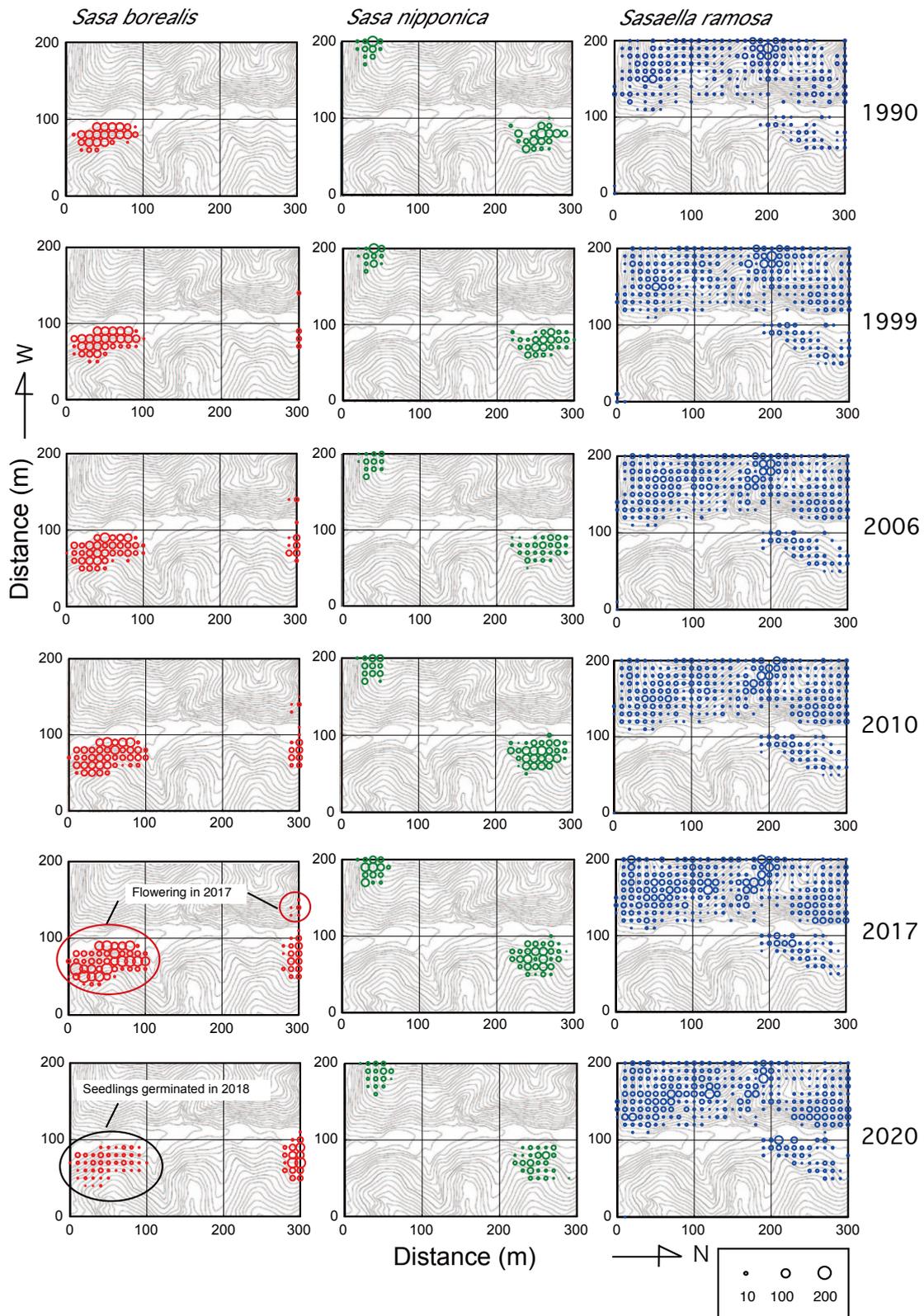


Fig. 1. ササ類 3 種の 1990 年から 2020 年までの分布範囲の変化
 白ぬきの赤丸、緑丸、青丸は、それぞれスズタケ、ミヤコザサ、アズマザサを示している。
 凡例の丸のサイズは 10 m 格子点の 2 m × 2 m の方形区内の稈数を表している。

5. 結果

5.1 ササ群落の分布動態

調査を開始した1990年時点での分布面積と群落の形態はササ類3種で異なっていた。スズタケは1990年に40 m × 80 mほどの群落が試験地内に1個だけあった。これは6ha試験地の4.0%の面積にあたる (Table 1) が、その後、この群落は拡大していった。1999年には、試験地の外部、北側 (Fig. 1では右側) から新たに侵入してきた2つの群落を観察された。そのうち1つの水平方向への拡大を見ると (Fig. 1)、30年でほぼ30 mの地下茎の侵入距離であった。2017年には、最初からあった大きなスズタケ群落と後から侵入したスズタケ群落の1つが開花し、開花稈は2018年春までに枯死した。最初からあった大きなスズタケ群落では、開花枯死後の2018年、2019年に実生が発生した。一方、北側から侵入し開花枯死した群落では実生を確認できなかった。そのため調査最終年の2020年には、北側から侵入し開花しなかったスズタケ群落と実生群落の2群落となった。1990年から開花枯死直前の2017年までのスズタケの年単位の拡大速度は140 m²/year、元の分布面積に対する増加率は5.8%であった。しかし、開花枯死後の3年間を含む観測期間全体で計算すると、拡大速度は117 m²/year、元の分布面積に対する増加率は4.9%であった (Table 1)。

ミヤコザサは、スズタケより小型の2つの群落があり、調査開始時の面積は6ha試験地の5.0%を占めた。この時点でスズタケとミヤコザサの分布は重複していなかったが、その後、スズタケとの混生区が生じた。調査最終年の2020年にもミヤコザサの群落は2個のままだった。それぞれのミヤコザサ群落で面積の増減があり、全体としては2017年まで面積を拡大したが、2020年には増減なしとなった。観測期間全体で分布面積は5.0%から7.3%に拡がり、その間の拡大速度は47 m²/year、元の分布面積に対する増加率は1.6%であった。

アズマザサは調査開始時に、6haの小川試験地の約半分、44.7%に分布し、面積は2.7haを占めたが、スズタケやミヤコザサのような稈の密集した明瞭な群落ではなく、稈のまばらな生育状況を示していた (Table 1)。アズマザサの群落は大、中、小の3個があり、大は試験地の西半分 (Fig. 1では上側) を占める大きな群落、沢をさんでその右下の中規模の群落、さらに南東の角 (Fig. 1の左下) にごく小さな群落が確認された。この小さい南東の群落は2017年には確認できなかったが2020年には再出現していた。これは試験地の外にある群落の一部が侵入と後退をくりかえしているからである。アズマザサは1990年から1999年にかけての9年間で大幅に分布面積は拡大したが、1999年をピークにその後は減少と微増に転じ、分布面積は頭打ちとなった。30年間の観測期間全

Table 1. ササ類3種が分布する方形区数と稈数、被度、稈高の30年間の推移

種名	測定項目	西暦						平均拡大速度 (1990-2020)	
		1990	1999	2006	2010	2017	2020	(m ² /year)	(%/year)
スズタケ	方形区数	24	36	47	54	66	59	117	4.9
	分布面積 (%)	4.0	6.0	7.8	9.0	11.0	9.8		
	稈数増減		12	11	7	12	-7		
	平均稈数 (本数/m ²)	12.9	11.4	11.5	11.7	14.5	5.9		
	平均被度 (%)	48.0	42.3	44.0	48.5	34.5	14.9		
	平均稈高 (cm)			150	142	169	54		
	最大稈高 (cm)			210	200	280	210		
ミヤコザサ	方形区数	30	38	39	42	44	44	47	1.6
	分布面積 (%)	5.0	6.3	6.5	7.0	7.3	7.3		
	稈数増減		8	1	3	2	0		
	平均稈数 (本数/m ²)	11.8	8.5	5.0	11.8	10.9	5.1		
	平均被度 (%)	19.0	14.5	6.4	24.5	22.4	13.3		
	平均稈高 (cm)			45	47	51	51		
	最大稈高 (cm)			65	70	80	83		
アズマザサ	方形区数	268	285	282	284	282	284	53	0.2
	分布面積 (%)	44.7	47.5	47.0	47.3	47.0	47.3		
	稈数増減		17	-3	2	-2	2		
	平均稈数 (本数/m ²)	3.2	3.3	3.9	3.8	5.0	6.6		
	平均被度 (%)	3.7	3.4	4.9	10.3	10.9	10.2		
	平均稈高 (cm)			58	65	68	66		
	最大稈高 (cm)			130	175	159	160		

体での分布面積は 44.7 % から 47.3 % に広がったが、拡大速度は 53 m²/year で、元の分布面積に対する増加率は 0.2% と他の 2 種に比べ小さい値であった。

ササ類 3 種の競合状態を把握するため、複数種が混生する方形区数を集計した。1990 年の調査開始時にスズタケは他の 2 種と全く混生していなかった。しかしスズタケが分布面積を急速に拡大した結果、スズタケと他の 2 種との混生区が出現した。スズタケとミヤコザサの混生する方形区は 2006 年と 2010 年に、1 個、2 個と出現したが、すぐにミヤコザサが駆逐されて 2017 年には両種の混生する方形区は無くなった。スズタケの分布拡大により、3 種が混生する方形区は 2017 年と 2020 年に 3 個ずつ出現していた。一方、スズタケとアズマザサの混生する方形区数は増加傾向にあったが、2020 年には減少に転じた。調査開始時点からミヤコザサとアズマザサの混生群落は存在し、ミヤコザサは単独で生育する方形区よりアズマザサと混生する方形区数の方が多かった。両種は 1999 年から 2020 年まで、30-35 個の混生方形区数を示した。

さらにササ類 3 種について、30 年間の出現および消失

方形区数の収支を取りまとめた。3 種とも 30 年間の収支はプラスだったが、スズタケは他のササ類の存在しない方形区はもちろん、ミヤコザサやアズマザサの生育する方形区にも数多く侵入していった。しかし開花枯死した 8 方形区で消失した以外では、消失した方形区はなかった。それに対しミヤコザサは、スズタケやアズマザサの生育する方形区に少数、新規に出現したが、スズタケとの混生で 5 個、アズマザサとの混生で 4 個の方形区で消失した。ミヤコザサの収支としてはスズタケに対し -3 個、アズマザサに対して +6 個の混生方形区数の増減となった。アズマザサは他のササ類の生育しない 50 方形区に出現したが、同様に他のササ類の生育しない 40 方形区で消失していた。アズマザサはスズタケとの混生区で 3 個消失したが、ミヤコザサとの混生区では消失していなかった。アズマザサの収支としてはスズタケに対し -1 個、ミヤコザサに対して +7 個の混生方形区数の増減となった。

5.2 生態的特性

スズタケの平均稈数と平均被度は、1990 年から 2010 年

Table 2. ササ類 3 種が混生する方形区数の 30 年間の推移

種数	組み合わせ	西暦					
		1990	1999	2006	2010	2017	2020
単独種	スズタケ	24	32	40	44	54	50
	ミヤコザサ	6	7	6	5	9	6
	アズマザサ	244	251	246	242	238	240
2 種	スズ-ミヤコ	0	0	1	2	0	0
	スズ-アズマ	0	3	4	7	9	6
	ミヤコ-アズマ	24	30	30	34	32	35
3 種	スズ-ミヤコ-アズマ	0	1	2	1	3	3
分布せず		302	276	271	265	255	260
合計稈数		600	600	600	600	600	600

Table 3. ササ類 3 種が新たに出現、または消失した方形区数の 30 年間の収支 (1990-2020)

他のササ類のあるなしで、それぞれの種が出現または消失した方形区数をまとめた。

種名	収支	出現方形区数 (+)				消失方形区数 (-)			
		ササなし	スズタケあり	ミヤコザサあり	アズマザサあり	ササなし	スズタケあり	ミヤコザサあり	アズマザサあり
スズタケ	+35	25	—	5	13	0	—	0	0
ミヤコザサ	+14	12	2	—	10	—	-5	—	-4
アズマザサ	+16	50	2	7	—	-40	-3	0	—

までは、11.4-14.5 本数/m²、42.3-48.5 %の間で比較的安定して推移していたが、大きな群落が一斉開花枯死したことから、2020年には平均稈数は 5.9 本数/m²、平均被度は 14.9 %に大きく減少した (Table 1)。ミヤコザサの平均稈数は、稈が生存する時期に調査できなかった年 (2006年と2020年) を除くと、8.5-11.8 本数/m² で推移し、スズタケに匹敵した。一方で、平均被度はスズタケの半分程度で多くても 24.5 %であった。アズマザサは他の2種よりも低密度で、全観測期間を通じて平均稈数は 3.2-6.6 本数/m²、平均被度は 3.4-10.9 % の間で推移していた。

ササ類3種は稈高 (Fig. 2, Table 1) に大きな違いが見られた。スズタケは稈高が最も高く、最大稈高が 200-280 cm、平均稈高は一斉開花前では 142-169 cmの間で推移していたが、一斉開花後は 54 cmになった (Table 1)。ミヤコザサは稈高が最も低く、最大稈高が 65-83 cm、平均稈高は 45-51 cmであった。アズマザサは2種の中間の値で、最大稈高は 130-175 cm、平均稈高は 58-68 cmであった (Table 1)。各方形区の最大稈高の頻度分布を見るとスズタケはほとんどが 100 cm以上の稈高を示した。ミヤコザサは稈高の違いが少なく、ほぼ最大稈高に達した方形区が多いのに対し、アズマザサは最大稈高がスズタケ

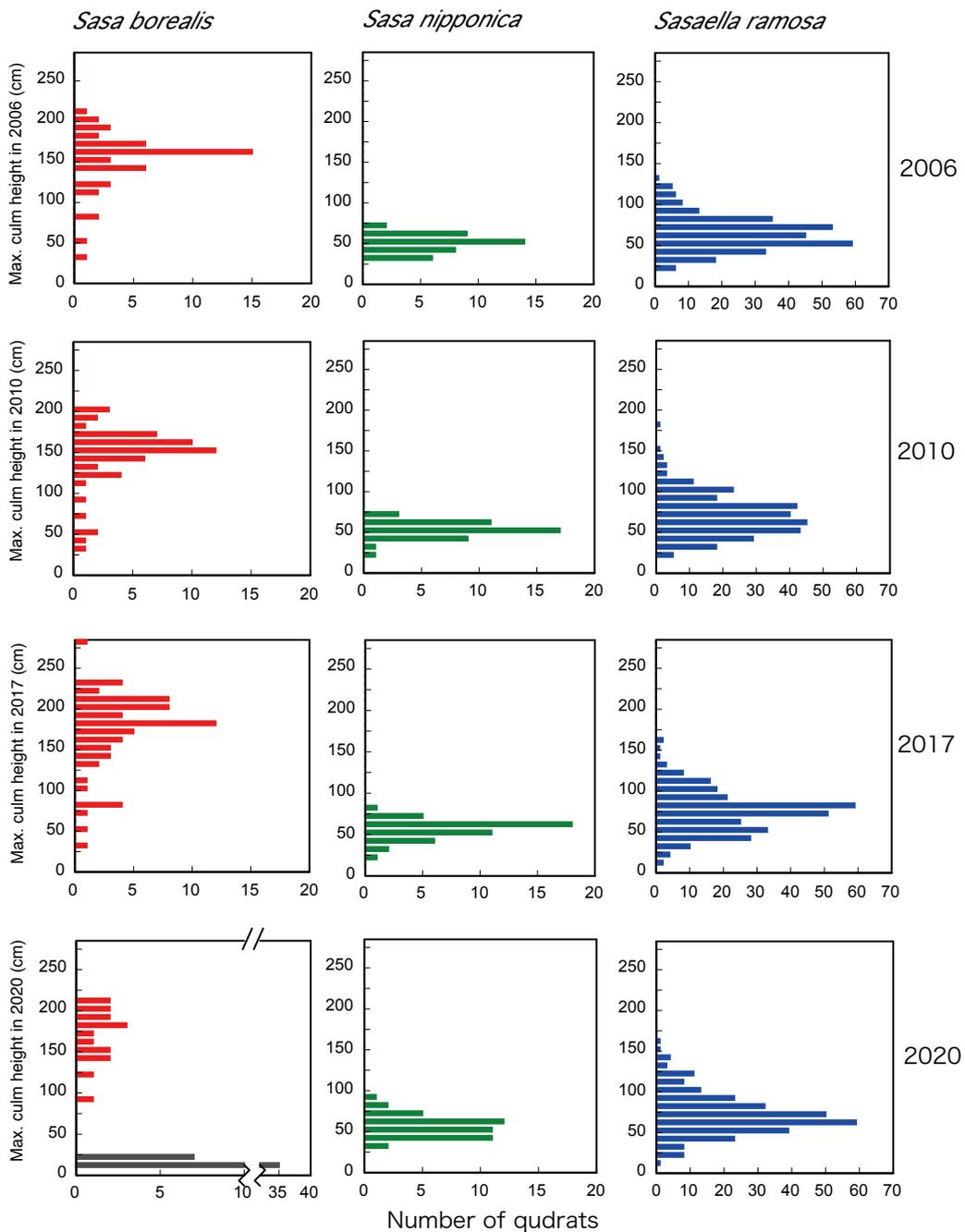


Fig. 2. ササ類3種の方形区ごとの最大稈高の頻度分布の経年変化 (2006年 - 2020年) 赤、緑、青はそれぞれスズタケ、ミヤコザサ、アズマザサを示す。2020年の黒の横棒はスズタケ実生の最大稈高を示す。

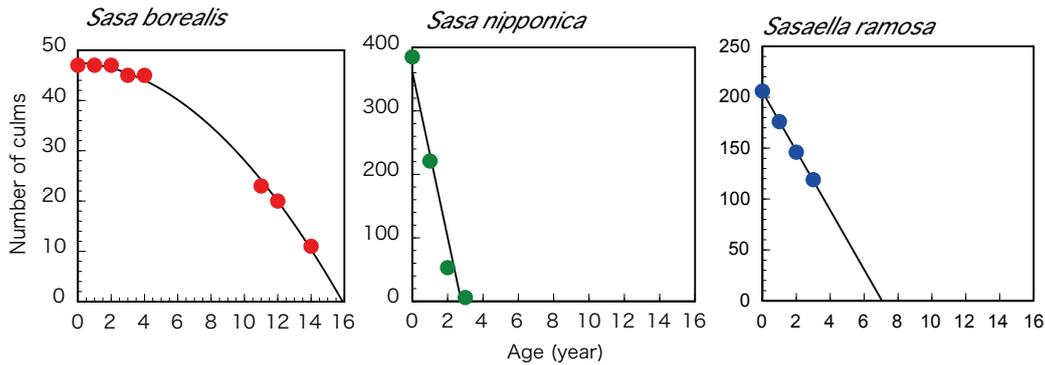


Fig. 3. ササ類3種の新稈の生存曲線

に近いにもかかわらず、平均稈高はミヤコザサに近く、稈高の低い方形区も多かった。スズタケは稈が新規に侵入した方形区が多いため、最大稈高がやや低い方形区もあったが、全体としては14年間(2006-2020)に稈高は高くなり、2017年には最大稈高が2mを越える方形区が増えていた。しかし2020年にはスズタケの実生が出現したので、全体としての平均稈高は著しく低下した(Fig. 2, Table 1)。

稈寿命の回帰分析の結果は以下の通りである。

$$\text{スズタケ: } Y = -0.178x^2 - 0.161x + 46.9 \quad (r^2 = 0.998)$$

$$\text{ミヤコザサ: } Y = -130.5x + 362 \quad (r^2 = 0.953)$$

$$\text{アズマザサ: } Y = -29.1x + 205.4 \quad (r^2 = 0.999)$$

ここではYは稈数、xは年数を示す。新稈のコホートがすべて枯死する年数をこれらの回帰式で計算すると、スズタケが16年と最も長く、続いてアズマザサの7.1年、ミヤコザサの2.8年となった。すなわち最長で、スズタケが15年生、アズマザサが7年生、ミヤコザサは2年生までの稈を群落内で維持することがわかった。

6. 考察

ササ群落の分布動態は生態的な特性で予測できるのか

小川試験地に分布するササ類3種が地下茎による栄養繁殖を繰り返した30年間で、スズタケが最も大きな拡大速度を示したことは、稈高と稈寿命、地下茎の伸長様式から説明できる。スズタケは群落をゲリラ的に拡大する単軸分枝型の横走地下茎(leptomorph rhizome system)と、その場で稈を密生させ株を形成する仮軸分枝型の地下茎(pachymorph rhizome system)の両方を持っている(蒔田ら2010)。地下茎の伸長に影響する土壤中の岩や沢などの障害がなければ、1年に約1mの速度で単軸分枝型の地下茎を伸ばすことができる。そして地下茎から稈を出すとその稈の基部から繰り返し仮軸分枝し、株を形成する。成長した稈は稈高が高いので被陰されず、しかも稈寿命が長いので長期間生存し、年数と共に稈密度は増大する。その結果、スズタケは他のササ類や樹木の実生を含む林床植物全般を被陰することになる。他の植生にササ類が侵入して被陰する実例として、雪田植

生へのチシマザサの長期的侵入の研究がある(Kudo et al. 2011)。チシマザサは32年間に平均、39 cm/yearの速度で地下茎が侵入し、稈密度を増大させて雪田植生を被陰していった。またチシマザサの実生は、発芽後19年で最大39mの地下茎の総延長を記録した(Tomimatsu 2018)。一方、ミヤコザサやアズマザサは単軸分枝型の地下茎が主体で、スズタケやチシマザサのように仮軸分枝で稈を密生させることがほとんどない。さらに両種とも稈高がスズタケに劣るので、混生した場合は常にスズタケの葉層の下で被陰されることになる。稈寿命が短いミヤコザサはスズタケの被陰下では数年で消失することが多く、両種は共存できない。アズマザサはスズタケの半分ほどの稈寿命があるので、すぐには駆逐されないが、混生する方形区数の結果からはゆっくり消失すると推測される。

雑種起源のアズマザサは親種であるミヤコザサと競合するのか

雑種起源のアズマザサとその親種と考えられるミヤコザサの関係は、スズタケとミヤコザサ、スズタケとアズマザサの関係とは明らかに異なっていた。ミヤコザサは単独で生育する方形区数より、アズマザサと混生する方形区数の方が多かった。方形区数の収支を見てもアズマザサの方形区に新たにミヤコザサが出現する回数は、アズマザサとの混生方形区で消失する数より多く、アズマザサに対し優位に立っているように見える。しかしアズマザサはミヤコザサの生育する方形区に新たに出現するがミヤコザサの存在する方形区で消失しておらず、結果として両種の混生する方形区が増える結果となった(Table 3)。このような結果から、両種は共存する可能性が高い。これは2種の平均稈高に大きな違いが無く、互いを被陰によって排除できないことや、アズマザサの平均稈密度はミヤコザサより小さいが、ミヤコザサは稈寿命が短いので、スズタケのように稈を十数年にわたって蓄積し、他種を被陰できないことに理由があると推測する。このような生態的によく似た種が互いに排除されにくい現象は"limiting dissimilarity"といわれている(Ågren

and Fagerström 1984, Shmida and Ellner 1984)。生態的特性の似た両種は競争力の差が小さく、排除に長い時間がかかるので、その間に方向性のない攪乱によって容易に競争結果が逆転し、競争的排除が起こりにくいと考えられている。

本来のブナ-スズタケ群集に向かってスズタケの優占が進むのか

ササ類3種の中で最も分布拡大の速い種はスズタケであり、古い広葉樹二次林から極相であるブナ-スズタケ群集に向かってスズタケの優占が進むとの予測は、今回の結果からは指示されたと考える。スズタケは開花枯死以外では消失することがなく、他のササ類や林床植生の存在にかかわらず分布を拡大した。しかし、単純な計算で得られた最大の拡大速度、140 m²/year でも、6haの試験地全域に分布を広げるのに300年以上かかることになる。人為攪乱で失われたブナ-スズタケ群集が元の姿に戻る時間は樹木の更新を別にして、少なくとも300年以上かかると推測される。そのような数百年の時間スケールでは、今回の調査中に観察されたようなスズタケの一斉開花枯死や、シカ食害といった稀なイベントも何度か発生し、スズタケの分布拡大は遅れることも考えられる。現在のところ、小川試験地にはシカが生息せず、その被害は報告されていないが、シカの分布は隣県の栃木県で拡大し、小川試験地を含む茨城県北西部にもシカが侵入しつつある。小川試験地でササ類がシカの食害を受けるのも時間の問題である。シカ食害は数年のレベルでササ群落を壊滅的な状態に追い込むので、特にシカ食害に弱いスズタケ(田村 2013)は急激な減少が予想される。

ここまでの議論は気候条件が将来も変わらないことを前提にしているが、最近の各種の気候モデルと植生データベースを組み合わせた研究では、温暖化と共にササの分布域が縮小することが予測されている(津山ら 2008a, 津山ら 2008b)。チシマザサやチマキザサなどの積雪に依存した種はもちろん、スズタケやミヤコザサも温暖化と少雪化にともない、アズマネザサなど暖地性、低地性のより大型のササ類に置き換わる可能性も指摘されている(Tsuyama et al. 2011)。実際、過去の最終氷期まで植生史を広げると、ササ属とアズマネザサを含むメダケ属との交代が日本の各地で起こっていたことが報告されている(佐瀬 2013)。それはササ植生の入れ替わりの際に、何度か雑種形成の機会があったことを示している。ただしササ類は基本的に地下茎によるクローン繁殖で分布が拡大するので、気候条件の変化とササ類の分布域の変化は時間差が予想される。したがって分布域が重複して競争により排除される前に、気候条件が厳しくなってその場で消失する可能性も指摘されている(津山ら 2008a)。一方で、温暖化にともない高山帯でチシマザサが分布を拡大している例(Kudo et al. 2011)や、林冠ギャップに生育する光条件のよいチシマザサのクロ

ーンが、林冠下にも地下茎を広げることが知られている(Tomimatsu et al. 2020)。しかし本研究でのスズタケの分布拡大は、林床への人為攪乱が減少したことや、二次林が発達して林内が暗くなったことが、もともと林内で優占する性質を持つスズタケの分布拡大に繋がったと考えられている。

本研究での30年間の調査中に、スズタケの開花枯死と実生の発生が観察された。樹木実生がほとんど生存できなかつた高密度のスズタケ群落の消失は、二次林から元の樹種組成に向かっての樹木の更新と森林遷移の新たな機会となる。最近、スズタケは日本各地で開花し、スズタケは120年に一度開花することが再認識された(岡本・齋藤 2017, 岡本ら 2018, 齋藤ら 2018)。ササ類の開花周期で確かな記録のあるのはミヤコザサの43年(室井 1966)くらいで、古文書の記録を整理した宇田川(1965)では、60年周期より120年周期のササ開花記録が多いと述べられている。ササ類の中でも長い開花周期を持つスズタケの開花枯死後の研究例は少ない。研究対象とした小川試験地のスズタケ開花跡地でスズタケの実生更新はすすむのか、今後どのような樹種が更新に成功し、森林の遷移がどのような方向に進んでいくのかは不明なままである。

以上のように、小川保護林ではササ類3種の栄養繁殖による競合が、保護林としての安定期を通じて続いてきた。人為攪乱が減少したなかでのササ群集の動態は、シカの影響が顕著でない他地域の落葉広葉樹林においても同様に見られるだろう。今後はさらにスズタケ開花枯死後の樹木更新に気候変動とシカ食害が要因として加わり、これまでとは違った速度と方向で、ササ類3種の分布と現存量が変化する変動期に入る可能性が高い。これまで以上に森林の更新と遷移、広葉樹林管理の重要な要因としてササ群集の挙動が重要である。

謝辞

ササ研究のきっかけを与えていただいた元森林総合研究所、浅沼晟吾氏と谷本丈夫氏に深く感謝する。元茨城大学大学院理学部教授 堀良通氏と学生のみなさん、秋田県立大学 坂田ゆず氏にはササ調査で協力いただいた。森林総合研究所の飯田滋生、黒川紘子、鈴木和次郎、九島宏道、奥田史郎、星野大介、阿部真、野口麻穂子、森英樹、山本伸幸、杉元倫子の各研究員には現地調査でお手伝いいただいた。熊本県、新潟県、山梨県、岩手県からの研修生のみなさんにも協力いただいた。ここに感謝する。小川試験地を30年以上にわたり共に維持してきた中静透、田中浩、飯田滋生、小南陽亮、阿部真、正木隆、黒川紘子、小黒芳生の諸氏に改めて感謝する。

引用文献

Abe, M., Miguchi, H., Honda, A., Makita, A. and Nakashizuka, T. (2005) Short-term changes affecting regeneration

- of *Fagus crenata* after the simultaneous death of *Sasa kurilensis*. *Journal of Vegetation Science*, 16, 49-56.
- Abe S., Motai, H., Tanaka H., Shibata, M., Kominami, Y. and Nakashizuka, T. (2008) Population maintenance of the short-lived shrub *Sambucus* in a deciduous forest. *Ecology*, 89, 1155-1167.
- 梶 和一 (1979) 数種在来イネ科野草の生態特性と乾物生産 II. 刈取りの時期および回数がミヤコザサ群落の乾物生産に及ぼす影響. *日草誌*, 25, 110-116.
- Agata, W. and Kubota, F. (1985) Ecological characteristics and dry matter production of some native grasses in Japan: IV. Influence of light intensity on the growth of *Sasa nipponica* and *Sasa borealis* in deciduous broad-leaved forest. *Japanese Journal of Grassland Science*, 31, 272-279.
- Ågren, G. I. and Fagerström, T. (1984) Limiting dissimilarity in plants: randomness prevents exclusion of species with similar competitive abilities. *Oikos*, 43, 369-375.
- 赤井 竜男 (1972) 天然更新に関する研究 (II): 木曾の三浦実験林におけるヒノキの更新. *京都大学農学部演習林報告*, 44, 68-87.
- 青柳 正英 (1983) 道有林の「かき起こし」の実態. *北方林業*, 35, 49-53.
- 浅野 貞夫・小滝 一夫 (1975) アズマザサの観察. *富士竹類植物園報告*, 20, 29-47.
- 福嶋 司・高砂 裕之・松井 哲哉・西尾 孝佳・喜屋武 豊・常富 豊 (1995) 日本のブナ林群落の植物社会学的新体系. *日生態誌*, 45, 79-98
- 細山 喜行・星田 加寿子・竹岡 園絵・宮田 昇平 (2002) タケササ類の属間雑種 *Sasaella ramosa* について. *日本大学文理学部自然科学研究所研究紀要*, 37, 209-216.
- 伊藤 江利子・橋本 徹・相澤 州平・石橋 聡 (2018) 北海道における地がき更新補助作業と今後の課題. *森林立地*, 60, 71-82.
- 関東森林管理局 (2021) “保護林”. <https://www.rinya.maff.go.jp/kanto/apply/publicsale/keikaku/hogorin/attach/pdf/3-rinbokuidensigen-371.pdf>, (参照 2021-01-13) .
- 苅住 昇 (1969) ササ類の地下部の構造. *富士竹類植物園報告*, 14, 27-40.
- 苅住 昇 (2010) 最新 樹木根系図説 各論. 誠文堂新光社, 1101pp.
- 河原 輝彦 (1984) ササ群落の分布と現存量. *Bamboo Journal*, 2, 10-15.
- 河原 輝彦・只木 良也 (1978) ササ群落に関する研究 (III) 明るさとミヤコザサの現存量. *日林誌*, 60, 244-248.
- 河原 輝彦・佐藤 明・只木 良也 (1977) ササ群落に関する研究 (II) ミヤコザサの現存量および生産構造の季節変化. *日林誌*, 59, 253-254.
- 紺野 康夫 (1977) ササ植物の生態と分布. *種生物学研究*, 1, 52-64.
- Kudo, K., Amagai, Y., Hoshino, B. and Kaneko, M. (2011) Invasion of dwarf bamboo into alpine snow - meadows in northern Japan: pattern of expansion and impact on species diversity. *Ecology and Evolution*, 1, 85-96.
- 前田 禎三 (1988) ブナの更新特性と天然更新技術に関する研究. *宇都宮大学農学部学術報告特輯*, 46, 1-79.
- Makita, A. (1993) Survivorship of a monocarpic bamboo grass, *Sasa kurilensis*, during the early regeneration process after mass flowering. *Ecological Research*, 7, 245-254.
- 蒔田 明史 (1997) チシマザサの地下茎の伸長様式. *Bamboo Journal*, 14, 20-27.
- 蒔田 明史・鈴木 準一郎・陶山 佳久 (2010) Bamboo はなぜ一斉開花するのか? 熱帯から温帯へのクローナル特性と開花更新習性の進化を探る 企画趣旨 Bamboo - その不思議な生活史. *日生態誌*, 60, 45-50.
- Masaki, T., Suzuki, W., Niiyama, K., Iida, S., Tanaka, H. and Nakashizuka, T. (1992) Community structure of a species-rich temperate forest, Ogawa Forest Reserve, central Japan. *Vegetatio*, 98, 97-111.
- Masaki, T., Tanaka, H., Tanouchi, H., Sakai, T. and Nakashizuka, T. (1999) Structure, dynamics and disturbance regime of temperate broad-leaved forests in Japan. *Journal of Vegetation Science*, 10, 805-814.
- Masaki, T., Tanaka, N., Yagihashi, T., Ogawa, M., Tanaka, H., Sugita, H., Sato, T. and Nagaike, T. (2020) Dynamics of dwarf bamboo populations and tree regeneration over 40 years in a clear-cut beech forest: effects of advance weeding and herbicide application. *Journal of Forest Research*, 26, 43-153.
- 松尾 歩・陶山 佳久・蒔田 明史 (2010) チュウゴクザサとチシマザサにおける地下茎の分枝・伸長様式とジェネットの空間分布構造. *日生態誌*, 60, 81-88.
- 松尾 歩・陶山 佳久・山月 融心・藤 晋一・蒔田 明史 (2008) DNA 分析によって検出されたチシマザサの大ジェネット. *Bamboo Journal*, 25, 63-72.
- Matsuo, A., Tomimatsu, H., Sangetsu, Y., Suyama, Y. and Makita, A. (2018) Genet dynamics of a regenerating dwarf bamboo population across heterogeneous light environments in a temperate forest understorey. *Ecology and Evolution*, 8, 1746-1757.
- McClure, F. A. (1966) *The Bamboos - A Fresh Perspective*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 347pp.
- Miyamoto, A., Sano, M., Tanaka, H. and Niiyama, K. (2011) Changes in forest resource utilization and forest

- landscapes in the southern Abukuma Mountains, Japan during the twentieth century. *Journal of Forest Research*, 16, 87-97.
- Miyazaki, Y., Ohnishi, N., Takafumi, H. and Hiura, T. (2009) Genets of dwarf bamboo do not die after one flowering event: evidence from genetic structure and flowering pattern. *Journal of Plant research*, 22, 523-528.
- 室井 綽 (1966) タケ類の開花要因と鼠害. 富士竹類植物園報告, 11, 7-38.
- Nakashizuka, T. (1988) Regeneration of beech (*Fagus crenata*) after the simultaneous death of undergrowing dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*). *Ecological Research*, 3, 21-35.
- Nakashizuka, T. (2002) Disturbance regime. In: *Diversity and interaction in a temperate forest community: Ogawa Forest Reserve of Japan* (eds. Nakashizuka, T. and Matsumoto, Y.), Springer-Verlag, 67-80.
- Nakashizuka, T. and Numata, M. (1982) Regeneration process of climax beech forests. I. Structure of a beech forest with the undergrowth of *Sasa*. *Japanese Journal of Ecology*, 32, 57-67.
- Naoe, S., Masaki, T. and Sakai, S. (2018) Effects of temporal variation in community-level fruit abundance on seed dispersal by birds across woody species. *American Journal of Botany*, 105, 1792-1801.
- 岡本 透・齋藤 智之 (2017) ササの一斉開花の周期は何年なのか? - 木曾およびその周辺地域の歴史資料から分かったこと -. *日本森林学会大会発表データベース*, 128, 495.
- 岡本 透・齋藤 智之・星野 大介 (2018) 中部地方におけるスズタケの2017年一斉開花の範囲. *日本森林学会大会発表データベース*, 129, 620.
- Oshima, Y. (1961) Ecological studies of *Sasa* communities. II. Seasonal variations of productive structure and annual net production in *Sasa* communities. *Botanical Magazine*, 74, 280-290.
- Peters, R., Nakashizuka, T. and Ohkubo, T. (1992) Regeneration and development in beech-dwarf bamboo forest in Japan. *Forest Ecology and Management*, 55, 35-50.
- Saitoh, T., Seiwa, K. and Nishiwaki, A. (2002) Importance of physiological integration of dwarf bamboo to persistence in forest understorey: a field experiment. *Journal of Ecology*, 90, 78-85.
- Saitoh, T., Seiwa, K. and Nishiwaki, A. (2006) Effects of resource heterogeneity on nitrogen translocation within clonal fragments of *Sasa palmata*: an isotopic (^{15}N) assessment. *Annals of Botany*, 98, 657-663.
- 齋藤 智之・中川 弥智子・星野 大介・酒井 武・岡本 透・依田 浩輝・栗田 悟・鈴木 智晴・野口 和幸 (2018) 中部地方で一斉開花したスズタケの繁殖特性. *日本森林学会大会発表データベース*, 129, 619.
- 佐瀬 隆 (2013) 日本列島における最終間氷期以降のササの変遷. *森林科学*, 69, 9-12.
- Shibata, M., Tanaka, H., Iida, S., Abe, S., Masaki, T., Niiyama, K. and Nakashizuka, T. (2002) Synchronized annual seed productivity by 16 principal tree species in a temperate deciduous forest, Japan. *Ecology*, 83, 1727-1742.
- Shmida, A. and Ellner, S. (1984) Coexistence of plant species with similar niches. *Vegetatio*, 58, 29-55.
- Suzuki, S. (1961) Ecology of the Bambusoideous genera *Sasa* and *Sasamorpha* in the Kanto and Tohoku districts of Japan, with special reference to their geographical distribution. *Ecological Review*, 15, 131-147.
- 鈴木 貞雄 (1996) 日本タケ科植物図鑑 - 「日本タケ科植物総目録」増補改訂版 -. 聚海書林, 271 pp.
- Suzuki, W. (2002) Forest vegetation in and around Ogawa Forest Reserve in relation to human impact. In: *Diversity and interaction in a temperate forest community: Ogawa Forest Reserve of Japan* (eds. Nakashizuka, T. and Matsumoto, Y.), Springer-Verlag, 27-41.
- Takahashi, K., Watano, Y. and Shimizu, T. (1994) Allozyme evidence for intersectional and intergeneric hybridization in the genus *Sasa* and its related genera (Poaceae; Bambusoideae). *The Journal of Phytogeography and Taxonomy*, 42, 49-60.
- Tanaka, H. and Nakashizuka, T. (1997) Fifteen years of canopy dynamics analyzed by aerial photographs in a temperate deciduous forest, Japan. *Ecology*, 78, 612-620.
- 竹内 正彦・中村 大輔・藤本 竜輔・山崎 晃司・後藤 優 (2019) 茨城県大子町八溝山地域におけるニホンジカの確認. *茨城県自然博物館研究報*, 22, 17-23.
- 田村 淳 (2013) シカによりスズタケが退行したブナ林において植生保護柵の設置年の差異が林床植生の回復と樹木の更新に及ぼす影響. *日本森林学会誌*, 95, 8-14.
- 寺井 裕美・柴田 昌三・日野 輝明 (2009) 草食性哺乳類がミヤコザサの地上部と地下部に与える影響 - 採食排除後4年目の調査から -. *日緑化工誌*, 34, 516-523.
- Tomimatsu, H., Matsuo, A., Kaneko, Y., Kudo, E., Taniguchi, R., Saitoh, T., Suyama, Y. and Makita, A. (2020) Spatial genet dynamics of a dwarf bamboo: Clonal expansion into shaded forest understorey contributes to regeneration after an episodic die-off. *Plant Species Biology*, 35, 185-196.
- 豊岡 洪 (1983) バイオマス資源としての北海道のササ. *Bamboo Journal*, 1, 22-24.
- 豊岡 洪・佐藤 明・石塚 森吉 (1986) 地下部構造からみたササ3種の生育特性. *日本林学会北海道支部論文集*, 34, 92-94.

- 津山 幾太郎・松井 哲哉・小川 みふゆ・小南 裕志・田中 信行 (2008a) 本州東部におけるチシマザサの潜在分布域の予測と気候変化の影響評価 . GIS ー理論と応用 , 16, 11-25.
- 津山 幾太郎・松井 哲哉・堀川 真弘・小南 裕志・田中 信行 (2008b) 日本におけるチマキザサ節の潜在分布域の予測と気候変化の影響評価 . GIS ー理論と応用 , 16, 99-113.
- Tsuyama, I., Nakao , K., Matsui, T., Higa, M., Horikawa, M., Kominami, Y. and Tanaka, N. (2011) Climatic controls of a keystone understory species, *Sasamorpha borealis*, and an impact assessment of climate change in Japan. *Annals of Forest Science*, 68, 689-699.
- 宇田川 竜男 (1965) ネズミ - 恐るべき害と生態 -. 中央公論社 , 177 pp.
- 薄井 宏 (1961) ササ型林床優占種の植物社会学的研究 . 宇都宮大学農学部学術研究報告特輯 , 11, 1-35.
- Watanabe, M., Nishida, M. and Kurita, S. (1991) On presumed hybrid origin of the Genus *Sasaella* Makino (Bambusaceae) . *Journal of Japanese Botany*, 66, 160-165.
- 渡邊 幹夫・薄井 宏・前田 禎三 (1990) アズマザサ属植物の雑種起源説に基づく東北日本太平洋側における過去の冷温帯と暖温帯境界の推定 . 植物地理・分類研究 , 38, 119-125.
- 安田 雅俊・奥村 みほ子・山崎 晃 (2010) 茨城県北部の小川群落保護林およびその周辺における野生哺乳類の記録 . 茨城県自然博物館研究報 , 13, 99-104.
- 米倉 浩司・梶田 忠 (2003-) 「BG Plants 和名ー学名インデックス」(YList) <http://ylist.info>
- Yoshino, M. (1978) Altitudinal vegetation belts of Japan with special reference to climatic conditions. *Arctic and Alpine Research*, 10, 449-456.
- 汰木 達郎・荒上 和利 (1984) スズタケの生態に関する研究 (II) . 九州大学農学部演習林報告 , 54, 105-123.
- 汰木 達郎・荒上 和利・井上 晋 (1977) スズタケの生態に関する研究 . 九州大学農学部演習林報告 , 50, 83-122.

The 30 years dynamics of three dwarf bamboo species in Ogawa research site in northern Ibaraki prefecture, Japan.

Kaoru NIIYAMA^{1)*}, Mitsue SHIBATA¹⁾, Tomoyuki SAITOH²⁾ and Shoji NAOE²⁾

Abstract

The dwarf bamboo species have been considered important as indicators of forest vegetation type in Japan. On the other hand, dwarf bamboos inhibit the regeneration of tree species. Understanding the distribution dynamics of dwarf bamboo is a major research issue for forest ecology and forest management. Here, we aimed to examine the following questions: 1) whether the dynamics of dwarf bamboo communities can be predicted by ecological characteristics of culm and rhizome? 2) whether the hybrid-origin *Sasaella ramosa* compete with its parent species, *Sasa nipponica*? and 3) Does the dominance of *Sasa borealis* increases toward the *S. borealis*-dominated climax beech forest? In this study, we investigated the distribution of dwarf bamboos in Ogawa forest reserve for 30 years (1990-2020). The results of the study in 600 quadrats (2 m × 2 m) on a 10 m grid in the 6-ha Ogawa research site showed that the distribution area of *Sasa borealis* increased from 4.0% to 9.8%, that of *Sasa nipponica* from 5.0% to 7.3%, and that of *Sasaella ramosa* from 44.7% to 47.3% of the site. The annual expansion rate was 117, 47 and 53 m²/year for *Sasa borealis*, *Sasa nipponica* and *Sasaella ramosa*, respectively. The estimated life span of culms was 15, 2 and 7 years, respectively. Thus, the dynamics of these three dwarf bamboo species were closely related to their culm's ecological characteristics. The culm height and other characteristics of *Sasaella ramosa* and *Sasa nipponica* are similar. It is suggested that the two species will coexist for long time. *Sasa borealis* having the highest culm height and the longest culm longevity will dominate and the reserve will change to *S. borealis* - dominated climax forest. One of the large *Sasa borealis* communities flowered and died in 2017. Its recovery from seedlings will be a new study issue for future research.

Key words: *Sasa borealis*, *Sasa nipponica*, *Sasaella ramosa*, hybrid-origin, culm height, culm longevity

Received 9 February 2021, Accepted 18 June 2021

1) Department of Forest Vegetation, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Tohoku Research Center, FFPRI

* Department of Forest Vegetation, FFPRI, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687 JAPAN; E-mail: niiya@ffpri.affrc.go.jp

論文 (Original article)

Factors affecting multi-stem patterns of *Cercidiphyllum japonicum* trees in a broadleaf forest under selective logging in HokkaidoTeruyoshi NAGAMITSU^{1)*} and Atsushi NAKANISHI²⁾**Abstract**

Cercidiphyllum japonicum has high sprouting ability leading to multi-stem growth form, which may enable successful coppicing after logging. To evaluate multi-stem patterns, we measured stem sizes of *C. japonicum* trees in a broadleaf forest in central Hokkaido, where selective logging has been conducted, and obtained stem diversity (the inverse Simpson's index) in terms of their basal area proportions. In a zone (17.8 ha) where all *C. japonicum* (71 intact and 11 logged) trees were monitored, 33 (40%) trees had multiple stems. In total 123 trees monitored in the zone and sampled along a route (3.4 km), the stem diversity increased in logged trees and in trees reaching forest canopy as their size increased. In 40 logged trees of the 123 trees, we did not detect any factors, including logging conditions (stump size and age), that affected the stem diversity. These findings suggest that logging facilitates sprouting irrespective of environmental conditions, whereas bright-light conditions are responsible for sprouting of intact trees.

Key words: coppicing, inverse Simpson's index, multi-stem growth form, slope, stump

1. Introduction

Sprouting is an effective method for self-maintenance and regeneration of trees (Klimesova and Klimes 2007). Sprouting from remaining stools can extend the longevity of individual trees after main stems have been lost because of physical damage. Such self-maintenance enables the reestablishment of forests from stump sprouts after logging, called coppicing (Buckley 2020). Coppicing with harvesting in a regular rotational interval allows sustainable tree production. Sprout regeneration is effective in managing natural forests, where seedling regeneration scarcely occurs (Xue et al. 2014). Numerous tree species have the potential for coppicing, and the capacity and property of sprouting differ among tree species (Shibata et al. 2016, Umeki et al. 2018).

Sprouting depends on both internal (physiological and developmental) and external (disturbance and environmental) factors (Dinh et al. 2019). Although most factors are species specific, common factors can be found among tree species. The age and size of stools have been considered a major determinant of sprouting (Shibata et al. 2014). The number and size of sprouts are expected to increase as the age and size of stools increase because dormant buds multiply and available resources increase (Shibata et al. 2014). In old stems of large sizes beyond

a threshold, however, dormant buds tend to be buried in thick bark and senescent, resulting in decreasing sprouting ability (Vesk 2006). Physical damage due to natural disturbances, such as wildfire (Malanson and Westman 1985), heavy snowfall (Nakano and Sakio 2018), and strong winds (Bellingham et al. 1994), seem to facilitate sprouting. Frequent disturbances on unstable substrates and steep topography may also provide sprouting opportunities (Sakai et al. 1995). Artificial disturbances, such as logging and thinning, are likely to enhance sprouting, and logging conditions may affect sprouting capacity (Pyttel et al. 2013, Adamec et al. 2017). Light conditions, water availability, and soil nutrients can affect not only the survival and growth of sprouts but also resource allocation to sprouting in trees (Bellingham and Sparrow 2009, Dinh et al. 2018).

Cercidiphyllum japonicum is mainly distributed in riparian areas of the mountain regions in Japan and has high sprouting ability leading to multi-stem growth (Kubo and Sakio 2020). This species produces more sprouts in response to disturbances and increasing age and size of stools, which compensates for rare seedling regeneration (Kubo et al. 2005). In natural forests, sprouts of *C. japonicum* are often found on steep slopes, where erosion and landslides provide a sprouting stimulus (Kubo et al. 2001). Because *C. japonicum* is neither a dominant species

Received 11 September 2020, Accepted 5 August 2021

1) Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Hokkaido Research Center, FFPRI

* Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, FFPRI, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, JAPAN;
E-mail: nagamit@ffpri.affrc.go.jp

in forest stands nor the main target of coppicing practice, the effects of logging disturbances on sprouting have not been sufficiently investigated.

In a valley in Kuriyama Town, Sorachi District in the National Forest in Hokkaido, we found many stumps of *C. japonicum* (Fig. 1a-c). These stumps resulted from selective logging of large trees in the natural broadleaf forest, conducted in 1924-1925, 1940, and 1956 (Hokkaido Regional Forest Office 1988). In this valley, an experimental forest for selective logging was established in 1986 and has been monitored and harvested (Ishibashi 2002). Thus, *C. japonicum* in that valley provided us with an opportunity to investigate factors affecting multi-stem growth form due to sprouting for nearly a century in the past.

We aimed to detect potential factors affecting multi-stem patterns of *C. japonicum*. This study measured the size of living stems of *C. japonicum* trees and quantified multi-stem growth form as stem diversity (the inverse Simpson's index) in terms of their basal area proportions (Fig. 1d). We measured environmental and logging conditions for each tree and verified these effects on multi-stem patterns considering tree size as a covariate of those factors.

2. Materials and methods

2.1 Monitoring zone and sampling route

We surveyed all *C. japonicum* trees in a watershed (the monitoring zone, 17.8 ha) (Nakanishi et al. 2017) of a valley

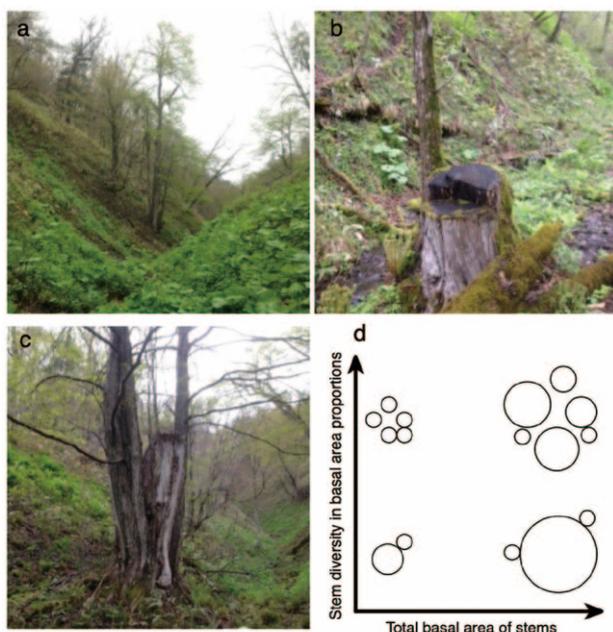


Fig. 1. *Cercidiphyllum japonicum* trees (a-c) and variables evaluating multi-stem growth form (d). Multi-stem trees on a slope of a V-shaped valley (a), a sprouting stem from a young stump (b), and sprouting stems from an old stump (c).

branch connecting to the Yubari River in central Hokkaido (42.911-42.915° N, 141.934-141.944° E, 120-240 m above sea level; Fig. 2). The downstream part of the monitoring zone is a V-shaped valley, whereas the upstream part is a flat basin surrounded by gentle ridges. The monitoring zone is located in the experimental forest (60 ha) for selective logging established by the Hokkaido Regional Forest Office (Ishibashi 2002). Intensive selective logging of large (approximately >40 cm diameter at breast height) trees in the valley was conducted in 1924-1925, 1940, and 1956 (Hokkaido Regional Forest Office 1988). The main targets of the logging were *Kalopanax septemlobus*, *Quercus crispula*, *C. japonicum*, *Magnolia obovata*, *Tilia japonica*, and *Ostrya japonica*. These trees were logged and harvested on snow in the winter, resulting in various stump heights. The maximum snow depth ranged from 0.8 to 1.8 m in typical years with light and heavy snow fall, respectively (the Mesh Climate Data 1996 compiled by

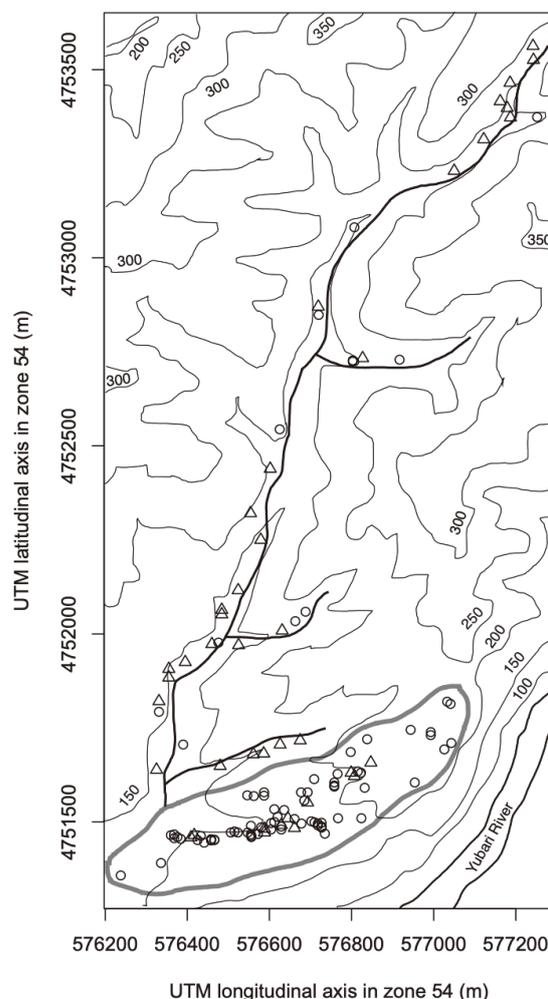


Fig. 2. Spatial distributions of *Cercidiphyllum japonicum* trees in the monitoring zone (gray envelop) and along the sampling route (thick line) in coordinates of Universal Transverse Mercator in zone 54. Circles indicate intact trees, and triangles indicate logged trees. Thin lines indicate contours.

the Japan Meteorological Agency at mesh code 64413715). Since 1986, mild selective logging has been conducted in the experimental forest for sustainable management (Ishibashi 2002).

In addition to the monitoring zone, we sampled large *C. japonicum* trees along trails in the valley (the sampling route, 3.4 km, 42.911-42.931°N, 141.935-141.947°E, 120-280 m above sea level; Fig. 2) because the number of large trees with

stumps, which had been logged in the past, in the monitoring zone was insufficient for analyses. Most sections of the sampling route were along streams, whereas some sections were on slopes on either side of streams.

2.2 Observations

We recorded tree locations in the monitoring zone and along the sampling route. The locations were transformed into

Table 1. Number of *Cercidiphyllum japonicum* trees in the monitoring zone and along the sampling route. Trees are categorized in terms of logging state, layer (trees under forest canopy or reaching it), and openness (trees surrounded by closed forest canopy and located in canopy gaps).

Logging state	Layer	Openness	Monitoring zone	Sampling route	Total
Intact	Understory	Closed	25	0	25
Intact	Understory	Gap	14	1	15
Intact	Canopy	Closed	13	3	16
Intact	Canopy	Gap	19	8	27
Logged	Understory	Closed	1	1	2
Logged	Understory	Gap	2	2	4
Logged	Canopy	Closed	5	9	14
Logged	Canopy	Gap	3	17	20
Total			82	41	123

Table 2. Parameter estimates of generalized linear model applied to all *Cercidiphyllum japonicum* trees ($n = 123$) in monitoring zone and along sampling route.

Parameter	Estimate	<i>P</i> value
α_0 : intercept	0.412	0.008
α_1 : intact ($x_1 = 0$) or logged ($x_1 = 1$)	0.301	0.049
α_2 : understory ($x_2 = 0$) or canopy ($x_2 = 1$)	0.367	0.012
α_3 : closed ($x_3 = 0$) or gap ($x_3 = 1$)	0.101	0.448
α_4 : slope angle a (°)	-0.001	0.725
α_5 : total basal area of stems b (m ²)	-0.579	0.298
α_6 : x_1b	0.891	0.066
α_7 : x_2b	0.165	0.906
α_8 : x_3b	0.097	0.828
α_9 : ab	0.023	0.012

Table 3. Parameter estimates of generalized linear model applied to logged *Cercidiphyllum japonicum* trees ($n = 40$) in the monitoring zone and along the sampling route.

Parameter	Estimate	<i>P</i> value
β_0 : intercept	0.087	0.944
β_1 : understory ($x_2 = 0$) or canopy ($x_2 = 1$)	0.120	0.839
β_2 : closed ($x_3 = 0$) or gap ($x_3 = 1$)	-0.054	0.898
β_3 : slope angle a (°)	-0.006	0.559
β_4 : total basal area of stems b (m ²)	1.888	0.722
β_5 : total basal area of stumps c (m ²)	0.873	0.452
β_6 : height of stumps h (m)	-0.016	0.977
β_7 : decay index of stumps d (0-5)	0.141	0.430
β_8 : x_2b	1.778	0.650
β_9 : x_3b	0.175	0.897
β_{10} : ab	0.020	0.594
β_{11} : cb	-2.089	0.693
β_{12} : hb	0.991	0.655
β_{13} : db	-0.704	0.177

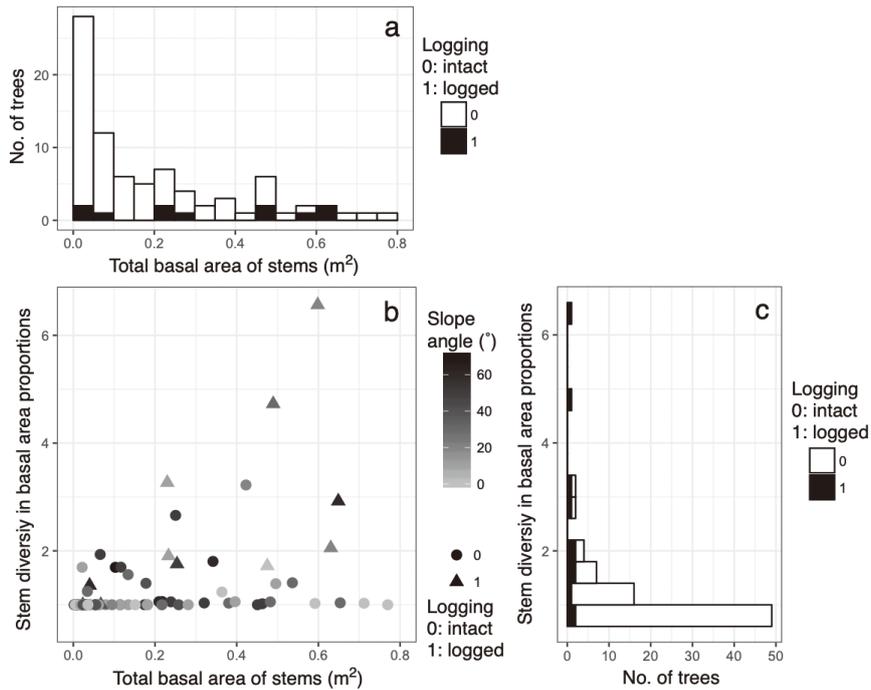


Fig. 3. Distributions of total basal area of stems and stem diversity in basal area proportions of all *Cercidiphyllum japonicum* trees ($n = 82$) in the monitoring zone. In the scatter plot (b), circles and triangles indicate intact and logged trees, respectively, and gray scales indicate slope angle ($^{\circ}$) at trees. In histograms (a, c), open and closed bars indicate intact and logged trees, respectively.

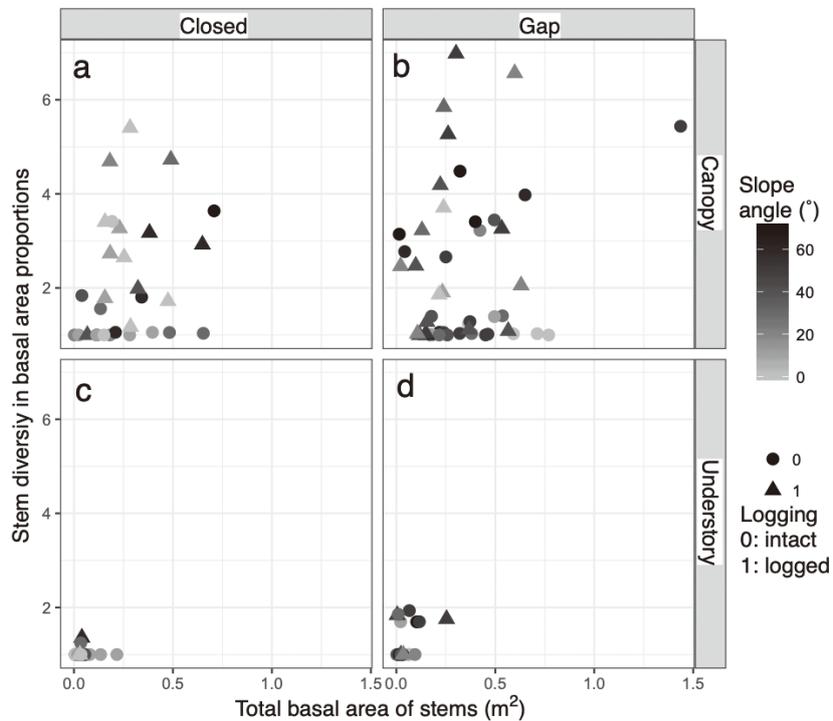


Fig. 4. Distributions of total basal area of stems and stem diversity in basal area proportions of *Cercidiphyllum japonicum* trees ($n = 123$) in the monitoring zone and along the sampling route. Trees are categorized as those under the forest canopy (lower panels: c, d) and those reaching it (upper panels: a, b), and those surrounded by the closed forest canopy (left panels: a, c) and located at canopy gaps (right panels: b, d). Circles and triangles indicate intact and logged trees, respectively, and gray scales indicate slope angle ($^{\circ}$) at trees.

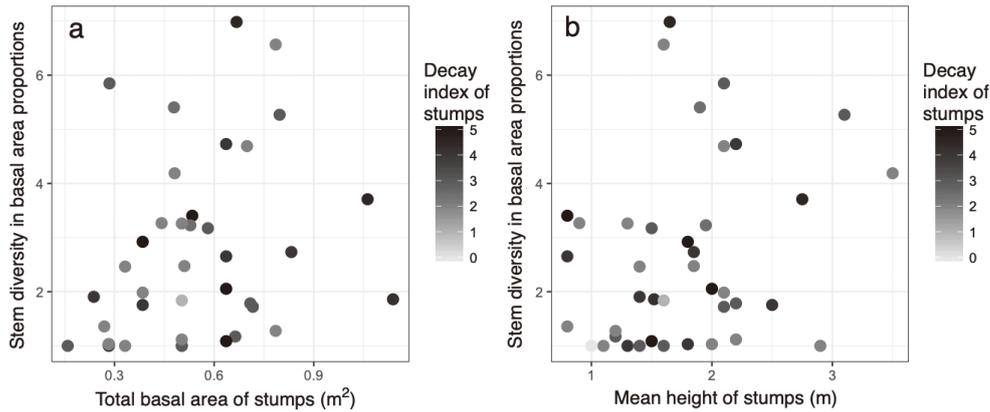


Fig. 5. Effects of total basal area (a) and mean height (b) of stumps on stem diversity in basal area proportions of logged *Cercidiphyllum japonicum* trees ($n = 40$) in the monitoring zone and along the sampling route. Gray scales indicate the mean decay index (0: youngest and 5: oldest) of stumps

longitudinal and latitudinal coordinates (m) of the Universal Transverse Mercator grid zone 54 and elevations (m) above sea level (Fig. 2). To describe environmental conditions of individual trees, we recorded the angle ($^{\circ}$) of slopes where trees were growing using a clinometer (271-3720 LandArt Inc.). Also, we categorized the layer of tree crowns into those under the forest canopy (namely understory) and those reaching it (canopy), and we categorized the forest canopy openness around tree crowns into closed and gap conditions.

We classified recorded trees as intact and logged trees, the latter of which had one or more stumps artificially logged. We measured the diameter (cm) of individual stump(s) on their upper surface using a tape measure for logged trees. We measured the height (m) of the individual stump(s) at the center from the ground surface using a measuring pole. To infer the stump age, we scored the decay index of individual stump(s) as 0 (flat surface without moss), 1 (flat surface with moss), 2 (rough surface), 3 (most surface decomposed), 4 (surface completely decomposed but most stump mass remaining), and 5 (most stump mass decomposed). The decay indices from 0 to 5 correspond from the youngest to oldest ages, respectively. To describe the logging conditions of individual trees, we calculated the total basal area (m^2), mean height (m), and mean decay index of all stump(s) of each tree.

We measured all living stems with >5 cm in the girth (cm) at breast height of each tree. To describe tree size, we calculated the total basal area b (m^2) of each tree as follows:

$$b = \sum_i a_i,$$

where a_i (m^2) is the basal area of stem i obtained from the measured girth (Fig. 1d). To quantify multi-stem patterns, we calculated the stem diversity in terms of basal area proportions for each tree as the inverse Simpson's index as follows:

$$1/\lambda = 1 / \sum_i (a_i/b)^2.$$

When a tree has a single stem, $1/\lambda = 1$, and when a tree has n stems in equal sizes, $1/\lambda = n$. When stem size greatly varies within a tree, $1/\lambda$ decreases (Fig. 1d).

2.3 Statistical analysis

The logging state $x_1 = 0$ (intact) or $x_1 = 1$ (logged) and environmental variables, including the layer $x_2 = 0$ (understory) or $x_2 = 1$ (canopy), openness $x_3 = 0$ (closed) or $x_3 = 1$ (gap), and slope angle a ($^{\circ}$), are expected to affect the stem diversity in basal area proportions $1/\lambda$ of individual trees. In logged trees, logging variables, including the total basal area c (m^2), mean height h (m), and mean decay index $0 \leq d \leq 5$ of stumps, are also expected to affect $1/\lambda$. Because sprouting capacity is likely to increase as the total basal area of stems b (m^2) increases in *C. japonicum* (Kubo et al. 2005), we considered the effects of b on $1/\lambda$. Furthermore, because the effects of environmental and logging variables on $1/\lambda$ may change with tree size, we considered interactions between these variables and b .

To examine the logging state (x_1), environmental variables (x_2, x_3, a), and tree size (b) and their interactions, we applied a generalized linear model to all trees in the monitoring zone and along the sampling route using the formula as follows:

$$1/\lambda \sim \alpha_0 + \alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2 + \alpha_3 x_3 + \alpha_4 a + \alpha_5 b + \alpha_6 x_1 b + \alpha_7 x_2 b + \alpha_8 x_3 b + \alpha_9 ab,$$

where α_0 is the intercept and $\alpha_1 - \alpha_9$ are the parameters of these effects and interactions (Table 2). In addition to this model, we applied another model to logged trees in the monitoring zone and along the sampling route using the formula as follows:

$$1/\lambda \sim \beta_0 + \beta_1 x_2 + \beta_2 x_3 + \beta_3 a + \beta_4 b + \beta_5 c + \beta_6 h + \beta_7 d + \beta_8 x_2 b + \beta_9 x_3 b + \beta_{10} ab + \beta_{11} cb + \beta_{12} hb + \beta_{13} db,$$

where β_0 is the intercept and $\beta_1 - \beta_{13}$ are the parameters of these effects and interactions, including logging variables ($c, h,$

d) because they can be examined only in logged trees (Table 3).

In these models, $1/\lambda$ followed the Gamma distribution with logarithmic link function because $1/\lambda > 0$ and its variance tended to increase as its mean increased. We fitted the models to observed variables using the function “glm” in R v.3.3.2 (R Core Team 2016). Differences in parameter estimates from 0 were verified with a *t*-test using the function “summary” (R Core Team 2016).

3. Results

We recorded all *C. japonicum* trees in the monitoring zone, which consisted of 71 intact and 11 logged trees (Table 1). In the 82 trees, those in the smallest size class ($b < 0.05 \text{ m}^2$) were most abundant (28 trees; Fig. 3a), and 33 (40%) trees had multiple stems ($1/\lambda > 1$; Fig. 3c). Logged trees more frequently included large and multi-stem trees compared to intact trees (Fig. 3). Stem diversity in basal area proportions ($1/\lambda$) increased as the total basal area of stems (b) increased in logged trees (Fig. 3b).

In addition to the 82 trees in the monitoring zone, we recorded 12 intact and 29 logged trees along the sampling route (Table 1). In the 123 trees in the monitoring zone and along the sampling route, tree size (b) was larger in trees reaching the forest canopy layer than in trees under it (Fig. 4). The stem diversity ($1/\lambda$) was higher in logged than in intact trees (positive α_1 of logging state x_1 , $P = 0.049$) and in canopy than in understory trees (positive α_2 of layer x_2 , $P = 0.012$; Table 2, Fig. 4). Furthermore, effects of tree size (b) on the stem diversity ($1/\lambda$) changed more positively as slope angle (a) increased (positive α_9 of interaction between a and b , $P = 0.012$; Table 2, Fig. 4), but we did not detect any other factors that affected $1/\lambda$ ($P > 0.05$; Table 2).

In 40 logged trees of the 123 trees, stumps ranged from 0.15 to 1.14 m^2 and 0.54 m^2 on average in the total basal area, from 0.80 to 3.50 m and 1.76 m on average in the mean height, and from 0.00 to 5.00 and 2.98 on average in the mean decay index (Fig. 5). These variables of logging conditions were not correlated with the stem diversity ($1/\lambda$) clearly (Fig. 5), and we did not detect any factors that affected $1/\lambda$ in the 40 logged trees ($P > 0.05$; Table 3).

4. Discussion

Scarce seedling regeneration characterizes *C. japonicum* population, which corresponds to the importance of sprout regeneration in maintaining trees and populations of this species (Kubo et al. 2005). In a riparian forest in central Honshu, saplings were uncommon. The distribution of tree sizes (the diameter of main stems) did not show a higher frequency in smaller sizes (Kubo and Sakio 2020). In contrast, the distribution of tree size (total basal area of stems) in our

monitoring zone showed higher frequency in smaller sizes, suggesting relatively frequent seedling regeneration. Although adult trees of *C. japonicum* produced seeds annually without poor crop years (Kubo and Sakio 2020), seedlings of *C. japonicum* emerged and survived at restricted habitats on bare soil, gravel, and fallen logs under bright-light conditions (Kubo et al. 2004). Thus, infrequent extensive disturbances that create bare ground and canopy gaps are likely to facilitate seedling regeneration. In the monitoring zone, selective logging that has been repeatedly conducted (Hokkaido Regional Forest Office 1988) and unstable ground substrates that occasionally induce erosion and landslides (Yamagishi and Ito 1993) may be responsible for the disturbances facilitating seedling regeneration. In comparison to that in Honshu, the abundance of *C. japonicum* tends to be high in Hokkaido, probably because of the extension of suitable habitats to lowland and the absence of competitors, such as *Pterocarya rhoifolia* (Kubo and Sakio 2020). The high abundance in Hokkaido may also result in the relatively frequent seedling regeneration observed in our monitoring zone.

Multi-stem growth form characterizes *C. japonicum* trees, which results from continuous sprouting as the age and size of trees increase (Kubo et al. 2005). On steeper slopes of V-shaped valleys, erosion and landslides tended to provide a sprouting stimulus (Kubo et al. 2001). These features are consistent with our result, which states that the effects of tree size on stem diversity changed more positively as the slope angle increased. Thus, natural disturbances seem to play an important role in sprouting. Light conditions are thought to affect not only the emergence of sprouts but also the survival and growth of sprouts in oaks (Dinh et al. 2018, 2019) and in *C. japonicum* (Kubo et al. 2005, Kubo and Sakio 2020). Although our study failed to detect the effects of the canopy gap on stem diversity, trees reaching the forest canopy had a high sprouting capacity, which is partly consistent with previous findings that sprouting was frequent and successful under bright-light conditions.

Logging of main stems often induces sprouting in *C. japonicum* (Kubo et al. 2005), which is common in various tree species under coppicing (Buckley 2020). Our study confirmed this logging effect and further explored the effects of logging conditions on sprouting using a wide variation in the age and size of stumps resulting from selective logging repeatedly conducted since 1924. Although high sprouting performance was expected in trees with old and large stumps from previous knowledge (Adamec et al. 2017, Dinh et al. 2018, 2019), any effects of logging conditions on sprouting were undetected in the model applied to logged trees. Various factors occurred in long durations after logging, reaching nearly a century, which were likely to obscure the effects of logging conditions in the past. In oak coppice forests in central Europe, harvesting

methods (manual chainsaw logging, traditional deep logging, and fully mechanized harvest) little influenced sprouting performance (Pyttel et al. 2013). These findings suggest that logging facilitates sprouting irrespective of logging conditions in some tree species with high sprouting ability.

Our study confirmed that natural disturbances and bright-light conditions facilitate sprouting, which has been found in *C. japonicum* trees in riparian forests without logging disturbances (Kubo and Sakio 2020), and further implies that logging facilitates sprouting irrespective of environmental and logging conditions. Although coppicing has scarcely been applied to *C. japonicum* owing to its low density and slow life cycle, sprout regeneration after logging contributes to sustainable selective logging in broadleaf forests, including this species. Sprouting from tall stumps may enable escaping from suppression by dwarf bamboo, which is a major obstacle of forest regeneration in Hokkaido. Protecting sprouts of oak stools using fences and enclosures effectively prevented browsing by mammals and enhanced the survival and growth of sprouts (Pyttel et al. 2013). This can be applied to selective logging forests vulnerable to browsing by sika deer in Hokkaido.

Acknowledgments

We thank the staff of the Sorachi District Forest Office for permitting our research; Keiko Kitamura and Satoshi Ishibashi for helping our field survey; and Masako Kubo and anonymous reviewers for improving our manuscript.

References

- Adamec, Z., Kadavý, J., Fedorová B., Knott, R., Kneifl, M. and Drápela, K. (2017) Development of sessile oak and European hornbeam sprouts after thinning. *Forests*, 8, 308.
- Bellingham, P. J. and Sparrow, A. D. (2009) Multi-stemmed trees in montane rain forests: their frequency and demography in relation to elevation, soil nutrients and disturbance. *Journal of Ecology*, 97, 472-483.
- Bellingham, P. J., Tanner, E. V. J. and Healey, J. R. (1994) Sprouting of trees in Jamaican montane forests, after a hurricane. *Journal of Ecology* 82, 747-758.
- Buckley, P. (2020) Coppice restoration and conservation: a European perspective. *Journal of Forest Research*, 25, 125-133.
- Dinh, T. T., Akaji, Y., Matsumoto, T., Toribuchi, T., Makimoto, T., Hirobe, M. and Sakamoto, K. (2018) Sprouting capacity of *Quercus serrata* Thunb. and *Quercus acutissima* Carruth. after cutting canopy trees in an abandoned coppice forest. *Journal of Forest Research*, 23, 287-296.
- Dinh, T. T., Kajikawa, C., Akaji, Y., Yamada, K., Matsumoto, T. K., Makimoto, T., Miki, N. H., Hirobe, M. and Sakamoto, K. (2019) Stump sprout dynamics of *Quercus serrata* Thunb. and *Q. acutissima* Carruth. four years after cutting in an abandoned coppice forest in western Japan. *Forest Ecology and Management*, 435, 45-56.
- Hokkaido Regional Forest Office (1988) Experimental forest for broad-leaf tree management in Yubari. *Northern Forestry, Japan*, 40, 29-33.
- Ishibashi, S. (2002) Experimental forests for natural forest management within jurisdiction of Hokkaido Regional Forest Office (III): Experimental forest for broad-leaf tree management in Yubari. *Northern Forestry, Japan*, 54, 251-254.
- Klimesova, J. and Klimes, L. (2007) Bud banks and their role in vegetative regeneration - A literature review and proposal for simple classification and assessment. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8, 115-129.
- Kubo, M. and Sakio, H. (2020) *Cercidiphyllum japonicum*. In Sakio, H. (eds.) *Long-Term Ecosystem Changes in Riparian Forests*. Springer, Singapore, 55-82.
- Kubo, M., Sakio, H., Shimano, K. and Ohno, K. (2005) Age structure and dynamics of *Cercidiphyllum japonicum* sprouts based on growth ring analysis. *Forest Ecology and Management*, 213, 253-260.
- Kubo, M., Sakio, H., Shimano, K. and Ohno, K. (2004) Factors influencing seedling emergence and survival in *Cercidiphyllum japonicum*. *Folia Geobotanica*, 39, 225-234.
- Kubo, M., Shimano, K., Sakio, H. and Ohno, K. (2001) Sprout trait of *Cercidiphyllum japonicum* based on the relationship between topographies and sprout structure. *Journal of the Japanese Forestry Society*, 83, 271-278.
- Malanson, G. P. and Westman, W. E. (1985) Postfire succession in Californian coastal sage scrub: the role of continual basal sprouting. *American Midland Naturalist*, 113, 309.
- Nakanishi, A., Nagamitsu, T. and Kitamura, K. (2017) Genetic diversity of *Cercidiphyllum japonicum* population in a selection cutting forest. *Boreal Forest Research*, 65, 13-16
- Nakano, Y. and Sakio, H. (2018) The regeneration mechanisms of a *Pterocarya rhoifolia* population in a heavy snowfall region of Japan. *Plant Ecology*, 219, 1387-1398.
- Pyttel PL, Fischer UF, Suchomel C, et al. (2013) The effect of harvesting on stump mortality and re-sprouting in aged oak coppice forests. *Forest Ecology and Management*, 289, 18-27.
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Sakai, A., Ohsawa, T. and Ohsawa, M. (1995) Adaptive significance of sprouting of *Euptelea polyandra*, a deciduous tree growing on steep slopes with shallow soil. *Journal of Plant Research*, 108, 377-386.
- Shibata, R., Kurokawa, H., Shibata, M., Tanaka, H., Iida,

- S., Masaki, T. and Nakashizuka, T. (2016) Relationships between resprouting ability, species traits and resource allocation patterns in woody species in a temperate forest. *Functional Ecology*, 30, 1205-1215.
- Shibata, R., Shibata, M., Tanaka, H., Iida, S., Masaki, T., Hatta F., Kurokawa H. and Nakashizuka, T. (2014) Interspecific variation in the size-dependent resprouting ability of temperate woody species and its adaptive significance. *Journal of Ecology*, 102, 209-220.
- Umeki, K., Kawasaki, M., Shigyo, N. and Hirao, T. (2018) Inter- and intraspecific patterns in resprouting of trees in undisturbed natural forests along an elevational gradient in Central Japan. *Forests*, 9, 672.
- Vesk, P. A. (2006) Plant size and resprouting ability: trading tolerance and avoidance of damage? *Journal of Ecology*, 94, 1027-1034.
- Xue, Y., Zhang, W., Ma, C., Ma, L. and Zhou, J. (2014) Relative importance of various regeneration mechanisms in different restoration stages of *Quercus variabilis* forest after selective logging. *Forest Systems*, 23, 199.
- Yamagishi, H. and Ito, Y. (1993) Geologic division in terms of landslide distribution in Hokkaido. *Landslides*, 30, 1-9.

北海道の択伐された広葉樹林におけるカツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) の多幹性に与える要因

永光輝義^{1)*}、中西敦史²⁾

要旨

カツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) は、高い萌芽能力を持ち、複数の幹からなる樹形になりやすく、天然林での伐採後に萌芽更新が期待される。多幹性を評価するため、北海道中央部の択伐を受けている広葉樹林でカツラの幹のサイズを測り、断面積割合による幹の多様度(シンプソン指数の逆数)を求めた。すべてのカツラの木(非伐採木71本と伐採木11本)を観察した調査区(17.8 ha)において、33本(40%)の木が複数の幹からなっていた。その調査区に加えて3.4 kmの調査ルート沿いで測定した合計123本は、伐採されているか、林冠に達すると、幹の多様度が高まった。それら123本のうちの伐採木40本では、伐採の状態(切り株の古さとサイズ)を含む要因のなかで幹の多様度に影響した要因は検出されなかった。これらの結果は、環境条件にかかわらず伐採が萌芽を促進し、明るい光環境が非伐採木の萌芽の原因となっていることを示唆する。

キーワード：萌芽更新、シンプソン指数の逆数、多幹成長型、斜面、切り株

原稿受付：令和2年9月11日 原稿受理：令和3年8月5日

1) 森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域

2) 森林総合研究所 北海道支所

* 森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里1

短報 (Short communication)

食用きのこ栽培施設で発生したツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (双翅目クロバネキノコバエ科)末吉昌宏^{1)*}、風間宏²⁾、向井裕美³⁾、北島博³⁾

要旨

クロバネキノコバエ類によるブナシメジ子実体の被害を報告する。長野県の栽培施設で栽培に供したびん菌床に発生した子実体に幼虫が穿孔した。被害を受けた子実体から得た幼虫から成虫を羽化させ、これらをつくりたけクロバネキノコバエと同定した。同時に、国内各地の菌床シイタケ栽培施設から採集した本種を記録し、6県の12箇所を新たに産地として報告した。国内農産物の主要害虫であるチバクロバネキノコバエと本種の形態学的区別点を記載した。世界各国で検討された本種の防除方法を概観し、物理的防除および耕種的防除と併用して、天敵製剤を用いた防除方法の可能性を検討した。

キーワード：栽培きのこ、食用きのこ、寄主、日本、被害、害虫

はじめに

シイタケ *Lentinula edodes* とブナシメジ *Hypsizigus marmoreus* はそれぞれ国内のきのこ年間生産量の22%近くを占める約9.7万t(生シイタケ約7.3万トン、乾シイタケ(生換算値)約2.4万トン)と27%近くを占める約11万tあまりが生産される(林野庁2020)、主要な食用きのこである。長野県はブナシメジの生産戸数と生産量が国内で最も多く、2019年度には240戸の生産者が5万tを生産している(林野庁2020)。

食用きのこ栽培では様々な害虫が知られている(岡部2006, 日本応用動物昆虫学会2006, 九州地区林業試験研究機関連絡協議会2011, 森林総合研究所2020)。これらは子実体への食害や異物混入によって被害をもたらす重要害虫を含む(北島ら2011)。菌床シイタケでは4種のキノコバエ類が害虫として知られる(末吉ら2019, 森林総合研究所2020)。また、ブナシメジ菌床の害虫としてダニ類や線虫類をはじめ(岡部2006, 日本応用動物昆虫学会2006)、ヤマタナミキノコバエ *Mycetophila rosularia* Ostroverkhova, 1979(以下単にヤマタナミ)がびん栽培ブナシメジの子実体を食害することが知られている(末吉2010)。その一方で、具体的な経済的被害が認められない、不快害虫あるいは潜在的な害虫(末吉・木村2017, 末吉ら2019)も施設内で多く発生することが知られている。

クロバネキノコバエ類はしばしば食用きのこの栽培施設で発生し、害虫とされる。これまで国内で食用きのこ

のこの害虫とされたクロバネキノコバエ類として5種が挙げられる(末吉・吉松2020)。これらのうち、ツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839)(以下単にツクリタケクロバネ)は海外でツクリタケやヒラタケに大きな被害をもたらすことが知られる害虫である。末吉・吉松(2020)は国内で本種による子実体への被害を明確に報告した事例はないとしたが、後藤・伊藤(1995)は本種の成虫がツクリタケの褐斑病原菌を媒介することを指摘し、石谷(1992a, b, 1996)は国内では成虫が多く発生する施設ではツクリタケの褐斑が多発する傾向があり、栽培の中止に至ることもあることを報告した。後藤・伊藤(1995)は本種が菌床シイタケの主要害虫であるとし、加害形態として菌床の軟化・短命化と菌床の病原菌の媒介を挙げ、子実体への加害の可能性にも言及したが、具体的なデータを示さなかった。本種は韓国でヒラタケや菌床シイタケの害虫として知られ、やはり具体的なデータは示されていないものの、菌床シイタケ栽培で菌床や子実体に被害をもたらす、収量を低下させるとされる(Kim et al. 2012)。

著者らによる近年のブナシメジ害虫の防除研究で本種による子実体の食害が発見された。また、国内各地の菌床シイタケ栽培施設で、子実体への直接被害は認められないものの、多数の本種の標本が得られている。本種による食用きのこへの被害防除を鑑み、基礎情報として本種の形態的特徴と被害様相および新産地を報告し、国内外の研究事例を基に防除方法を検討した。

原稿受付：令和3年4月16日 原稿受理：令和3年6月3日

1) 森林総合研究所 生物多様性・気候変動研究拠点

2) 長野県野菜花き試験場菌茸部

3) 森林総合研究所 森林昆虫研究領域

* 森林総合研究所 生物多様性・気候変動研究拠点 〒305-8687 つくば市松の里1

材料と方法

長野県全域に点在する4箇所のびん栽培施設で2017年7月から2020年6月までの間、発生室・培養室内でクロバネキノコバエ類の幼虫から食害を受けた菌床および子実体を採集した。食害のある子実体を野菜花き試験場菌茸部(長野県長野市)に持ち帰り、プラスチックケース(300×300×300mm)内で、温度15℃、湿度約90%、12時間明12時間暗の条件下で飼育し、成虫を羽化させた。その他、2011年から2020年までの間、国内各地のシイタケ栽培施設において次の3つの方法で捕らえられた成虫を新産地の記録に用いた:栽培現場で採集した幼虫の飼育(rearing: R);捕虫網および吸虫管を用いた掬い取り(スウィーピング: SW);粘着シートトラップ(ST);光誘引トラップ(LT)。掬い取りや光誘引トラップによって得られた成虫を乾燥標本または70–99%エタノールあるいは99%プロピレングリコール液浸標本として仮保存した。成虫が付着した粘着シートトラップを冷凍保存し、その一部からリモネンを浸した面相筆でシートから成虫を取り外し、70%エタノール液浸で仮保存した。

種同定のため、標本を10%水酸化カリウム溶液中に浸して筋肉組織を溶解し(KOH処理)、3%酢酸溶液と蒸留水で洗浄した後、ユーパラルでスライドガラスとカバーガラスの間に封入してスライド標本を作成した。封入時に、実体顕微鏡(Olympus SZ61)による観察下で、ピンセットで標本の♂腹部第5節前後を胴体から切り離し、封入後に生物顕微鏡(Olympus CX43)で観察を行った。KOH処理前に成虫の左右前翅を切り離し、99%エタノール溶液中で脱水したのち、本体と同じスライド上にユーパラルで封入した。粘着シート上の成虫および触角など各部の写真撮影に実体顕微鏡(Olympus SZ61)と生物顕微鏡(Olympus CX43)に接続したデジタルカメラ(オリンパス社製 Tough TG-6)を用いた。前翅の翅脈と交尾器の形態学用語を三枝(2008)に従った。

標本のデータとして、♂♀成虫頭数と標本識別番号(Li.0001–Li.0112)、産地、本種の発生が見られたブナシメジとシイタケの栽培方法、成虫を採集した、または成虫が羽化した日付、採集方法(上述略記を用いた)、採集者を記載した。採集者は加来友里恵(YK)、片桐なな(NK)、風間宏(HKa)、加藤徹(TK)、北島博(HKi)、向井裕美(HM)、大橋章博(AO)、末吉昌宏(MS)である。本報告で使用した標本はプレパラート標本として森林総合研究所(つくば市)に保管されている。

発生事例

ツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (Figs. 1–7)

分布: 日本(北海道、本州、四国、九州)(笹川2014)。

供試標本: 10♂ (Li.0093–Li.0102)、岩手県花巻市、菌床シイタケ全面発生、7.x.2019、ST、HKi & HM. 1

♀ (Li.0082)、群馬県桐生市、菌床シイタケ上面発生、9.vii.2019、MS. 3♂14♀ (Li.0065–Li.0081)、茨城県阿見町、菌床シイタケ上面発生、27.v.2019、SW、MS. 2♂3♀ (Li.0001–Li.0005)、長野県東信地域、ブナシメジ生育室(びん栽培)、27.iii.2020、R、HKa. 6♂3♀ (Li.0006–Li.0014)、長野県北信地域、ブナシメジ培養室(びん栽培)、16.vi.2020、R、HKa. 10♂11♀ (Li.0015–Li.0035)、長野県南信地域、ブナシメジ培養室(びん栽培)、17.vii.2017、R、HKa. 4♂8♀ (Li.0036–Li.0047)、長野県北信地域、ブナシメジ培養室(びん栽培)、14.v.2018、R、HKa. 10♀ (Li.0083–Li.0092)、静岡県島田市、菌床シイタケ上面発生、4–16.vii.2014、LT、TK. 5♂4♀ (Li.0048–Li.0056)、岐阜県白鳥町、菌床シイタケ上面発生、22.x.2010、R、YK. 10♂ (Li.0103–Li.0112)、岐阜県白鳥町、菌床シイタケ上面発生、27.vi.2018–18.Vii.2018、ST、NK & AO. 1♂3♀ (Li.0057–Li.0060)、岐阜県下呂市、2016、R、AO. 1♂1♀ (Li.0061、Li.0062)、大分県日田市中津江町、菌床シイタケ全面発生、23.x.2012、SW、MS. 2♀ (Li.0063、Li.0064)、同産地、菌床シイタケ全面発生、7.xi.2018、SW、MS.

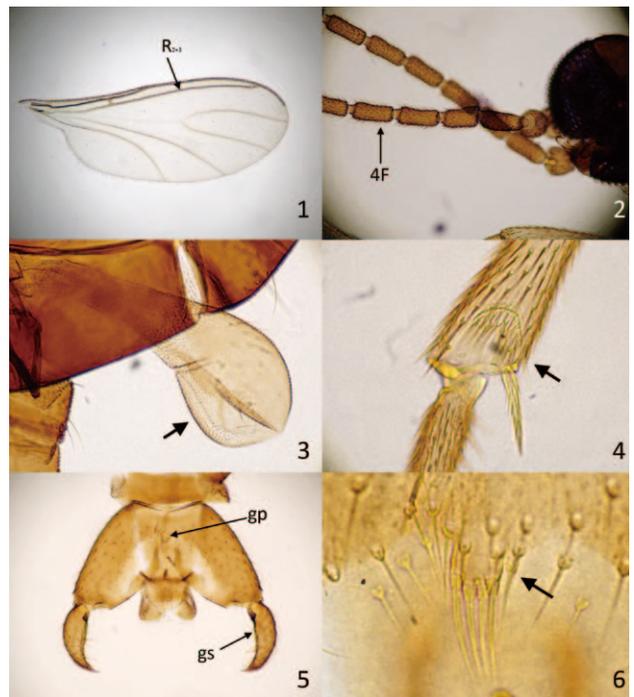


Fig. 1-6. ツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) 成虫の外部形態。

Lycoriella ingenua (Dufour, 1839).

1, 右前翅背面. 2, ♂触角. 3, 右平均棍(矢印). 4, 右前脚脛節先端(矢印: 半月状の凹み). 5, 交尾器腹面. 6, 生殖基節基部の突起(gp). 略称: 4F, 第4鞭節; gs, 生殖端節; gp, 生殖基節の突起; R₂₊₃, 第2+3径脈. 1, 5, 6, Li.0001; 2, Li.0002; 3, 4, Li.0061.

1, Right wing on dorsal view. 2, Male antenna. 3, Right halter. 4, Apex of right fore tibia in inner view. 5, Male genitalia in ventral view. 6, Process of gonocoxae. Abbreviations: 4F, 4th flagellomere; gs, gonostylus; gp, process of gonocoxae; R₂₊₃, 2nd and 3rd radial vein. 1, 5, 6, Li.0001; 2, Li.0002; 3, 4, Li.0061.

付記：本種の分類および学名・和名の変遷と適格名は末吉・吉松 (2020) に詳しい。上記菌床シイタケ施設では本種以外に菌床シイタケ害虫であるナガマドキノコバエ類 *Neoempheria* spp. (Sueyoshi 2014, 向井ら 2017, Watanabe et al. 2020) やシワバネキノコバエ *Allactoneura akasakana* Sasakawa, 2005 (末吉ら 2019)、チバクロバネキノコバエ (末吉、未発表) も発生していた。

成虫の形態的特徴と他種からの区別点

成虫 (Figs. 1-7) の外部形態は、ツクリタケクロバネの新参同物異名である *Lycoriella mali* (Fitch, 1856) およびヒトゲクロバネキノコバエ *Psilosciara flammulinae* Sasakawa, 1983 として、Sasakawa (1983) および笹川 (1993) に詳しく述べられており、今回検した標本はそれらの記述とよく合致する。本種は菌床シイタケの害虫として知られる他属のクロバネキノコバエ類から主に以下の形態的特徴によって区別される：♂は発達した前翅を持つ (Fig. 1)；♂触角第4鞭節の長さは幅の2倍以上である (Fig. 2)；小顎鬚第1節に明瞭な凹みを持たない；平均棍



Fig. 7. 菌床シイタケ栽培舎に設置された同じ黄色粘着トラップ上に捕殺されたツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (右) (ツクリタケ) とチバクロバネキノコバエ *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (左) (チバ) の♂成虫 (岐阜県白鳥町; 2018年6月)。

Male adults of *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (right) and *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (left) on a yellow sticky trap installed in a cultivation facility of shiitake mushrooms with artificial sawdust media (June 2018, Shiratori Town, Gifu Prefecture). 両者は、ツクリタケが概ね体長 2mm 以上、チバが体長 1~2mm 程度であること、①触角第4鞭節がツクリタケでは幅よりも十分に長く、チバでは幅と同じくらいであること、②生殖端節の先端がツクリタケでは先細りであり、チバでは丸まっているように見える、ことで区別される。

These two species are distinguished in body length (*L. ingenua*: ca. 3mm, *B. impatiens*: 1~2mm), length/width of 4th flagellomere (*L. ingenua*: ca. 2 times, *B. impatiens*: ca. 1.5 times), and apex of gonostylus (*L. ingenua*: pointed, *B. impatiens*: round).

の柄と先端膨大部は一樣に褐色である (Fig. 3)；前脚脛節先端の内側に、多数の刺毛が生える半月状の凹みがある (Fig. 4)。また、本種と同属の国内農業害虫種である *Lycoriella auripila* (Winnertz, 1867) から、生殖基節腹側の対合面に後方へ突出する突起部を持つことで区別される (Fig. 6) (笹川 1993)。さらに、本種は生殖端節 (gs) の先端に1本の棘状突起をもつ (Fig. 5) ことで同属の他種から区別される。特に、しばしば本種と同時に発生するチバクロバネキノコバエ *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) から体サイズ、頭部と触角の長さの比、♂生殖端節先端の形状に注目することでルーペや実体顕微鏡を用いて区別することができる (Fig. 7)。

被害の状況

2016年6月に、長野県東信地域のブナシメジ生産施設培養室内でキノコバエ類の成虫の発生と培養びんの害菌汚染が多発しているとの連絡を受けて現地調査を行った。2020年6月には同生産施設生育室でも成虫の飛翔と子実体への食害 (Fig. 8) が確認された。キノコバエ類が発生した後、施設への害虫侵入防止措置、汚染された培養びんの処分・廃棄等の対策を提示したが、被害は鎮静せず、同生産施設での生産が中止された。食害を受けた複数の子実体に、幼虫による表面の侵食 (Fig. 8a)、穿孔による開口 (Fig. 8b)、子実体内部の空洞化、食糞の付着 (Fig. 8c, d) といった変形・汚染が見られた。これらのキ

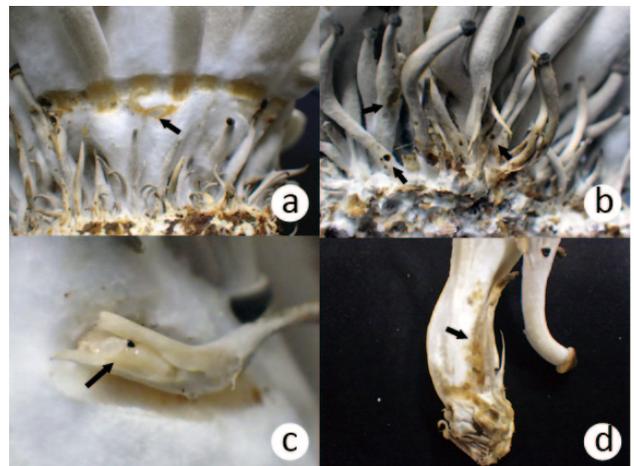


Fig. 8. ツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (ツクリタケクロバネ) によるブナシメジ子実体への被害。

Damages of sporophores of *Hypsizygus marmoreus* by larvae of *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839).

a, 子実体表面への侵食 (矢印) . b, 子実体菌柄に見られた穿孔開口部 (一部を矢印で指し示す) . c, 子実体内を穿孔するツクリタケクロバネ幼虫 (矢印) . d, 穿孔され、空洞とフラス (矢印) が見られた子実体。

a, infestation on sporophores (arrow) . b, entrance (arrow) of cavities on sporophores. c, larva of *L. ingenua* (arrow) infesting inside of sporophore. d, sporophore with cavity and frass (arrow) by infestation.

ノコバエ類を後日、上記のようにツクリタケキノコバエと同定した。

考察

ツクリタケクロバネはこれまでに国内で宮城、千葉、滋賀、愛媛、長崎の食用きのこ栽培施設および種ショウガ貯蔵室で発生が知られていた(末吉・吉松 2020)。今回、本種が岩手、群馬、茨城、静岡、岐阜、大分各県の菌床シイタケ栽培施設および長野県の菌床ブナシメジ栽培施設にも分布することを明らかにした。笹川(2014)は北海道も本種の分布域として挙げているが、具体的な産地や標本のデータは不明である。本種は国内の野外でまだ記録されておらず、自然分布は不明である。しかし、石谷(1992a, b)は本種が栽培施設周辺の野外から施設内に飛来することを想定している。大谷・後藤(1997)は光誘引粘着トラップを栽培舎屋外に設置し、ツクリタケクロバネを得ているが、これらは屋内で発生した成虫が誘引された可能性がある。

本種はこれまでにエノキタケ、シイタケ、ツクリタケ、ナメコといった主要な食用きのこの害虫とされていた(末吉・吉松 2020)。本種は1990年代にツクリタケ栽培施設で褐斑病の発生によって子実体の質的被害が蔓延するによって栽培を中止するほどに大発生した(石谷 1992a, b, 1996)。エノキタケ、ナメコ、菌床シイタケ栽培施設で発生あるいは多発したとされるものの(笹川 1993, 2003, 石谷・笹川 1994, 後藤・大谷 1995)、いずれの発生事例も具体的な被害は報告されておらず、これらの食用きのこ栽培では潜在的な害虫として認識されたと考える。子実体が食害されたり、病変が見られたりすることは出荷量の減少につながる。今後は、ブナシメジ栽培での被害拡大の警戒をはじめ、他の食用きのこでの被害防止が必要となる。

ヤマタナミによるブナシメジの食害では子実体の萎凋が見られたが(末吉 2010)、ツクリタケクロバネによる今回の食害では同様の現象は見られなかった。ヤマタナミの成熟幼虫はツクリタケクロバネの幼虫よりも十分に体長が大きい(ヤマタナミ: 11.6mm, ツクリタケ: 1-8mm)(石谷 1992a, 末吉 2010)が、体長以外の特徴でルーペや実体顕微鏡を用いてこれらを区別することは難しい。子実体の萎凋の有無はこれら2種の害虫による被害を区別する特徴の一つとなる可能性がある。

食用きのこ害虫であるクロバネキノコバエ類の防除方法として光誘引捕虫器、黄色粘着シート、浸水処理が挙げられている(森林総合研究所 2020)。海外ではシイタケやツクリタケ栽培のツクリタケクロバネの防除方法として上記以外に化学農薬や天敵製剤も検討されている(Kim et al. 2001, Erler et al. 2011)。また、本種の成長を阻害する、植物由来の物質の毒性も検討された(Park et al. 2006a, b 2008, Yi et al. 2008)。韓国では、化学農薬の使用に残留性や薬剤抵抗性などの問題、健康食品としてのイ

メージ低下があることを懸念し、天敵線虫の利用などによる生物防除が検討されている(Kim et al. 2012)。同様の趣旨で森林総合研究所(2020)はシイタケ害虫であるナガマドキノコバエ類、ムラサキアツバ、ハラアカコブカミキリに対する天敵製剤の効果を明らかにし、これらの害虫防除を目的に農薬登録された天敵製剤が他の害虫へも有効である可能性を示した。

クロバネキノコバエ類に対して用いた天敵微生物製剤は国内外で防除効果が認められている。ツクリタケ栽培で線虫 *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) を適用した結果、ツクリタケクロバネの個体数が激減した(Nickle and Cantelo 1991, Scheepmaker et al. 1997, Navarro and Gea 2014)。千葉県海匝地域のツクリタケ栽培施設に発生した個体群へ天敵線虫製剤 Nemasys M100 を散布した結果、クロバネキノコバエ類(未同定)の成虫の発生数が対照区よりも十分に少なかった(岩澤 1998, 1999)。また、千葉県茂原市・山武町、蓮沼町の菌床シイタケ施設で、菌床をNemasys M100の溶液に浸水処理した場合にクロバネキノコバエ類(未同定)の成虫の発生数が低下したが、処理後の日数経過とともに、効果が低減した(岩澤 2000)。Nemasys M100溶液を用いた試験での対象害虫がツクリタケクロバネであるか否かの確認が必要であるが、これらの天敵線虫を用いた防除効果を期待できる。

韓国とイギリスではバクテリアと捕食性ダニ類を用いた防除方法も検討されている。ヒラタケの原木やツクリタケクロバネの死骸から分離された2種類のバクテリアがツクリタケ幼虫に対して効果がある(Lee et al. 2001, Moon et al. 2002)。菌床シイタケ栽培において、捕食性ダニ類 *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1883) を個体密度 30.3 匹/m²で7~14日間隔で3回投入した場合、ツクリタケクロバネが効果的に抑制された(Kim et al. 2012)。また、ツクリタケ栽培において捕食性ダニ類 *Hypoaspis miles* (Berlese, 1882) を個体密度 830 匹/m²で発生前あるいは直後に投入した場合、ツクリタケクロバネが効果的に抑制された(Jess and Schweizer 2012)。

物理的防除方法として、既述した光誘引捕虫器や粘着トラップの他にネット被覆が挙げられる(森林総合研究所 2020)。プランタを使ったツクリタケ栽培試験では、プランタをオリセネットや寒冷紗で覆うことで、ツクリタケクロバネ成虫が媒介する褐斑病の発生減少や生産量の減少を抑えることができた(中川・石谷 2007a)。

ツクリタケクロバネによる食用きのこ被害の防除の第1段階は本種による栽培施設への侵入や子実体への接触を物理的に排除することである。これに加えて石谷(1992b)はツクリタケ栽培への被害防止を念頭に、栽培舎内の消毒・清掃および増殖防止を対策として挙げた。増殖防止の対策として薬剤やトラップの使用が想定されているが、石谷(1992b)が懸念するようにそれ単独での効果は疑わしい。単一の防除方法に依拠するだけでなく、複数の方法を併用することで、効果的な制御が期待

される。本種の天敵製剤を用いた防除効果を確認した上で農薬登録を行い、上記のような物理的防除および浸水処理などの耕種的防除と併用することが望ましい。本種が加害する食用きのこの栽培方法は堆肥を用いたツクリタケ、菌床を常時浸水させた上面栽培や適時浸水・散水などを行う全面栽培シイタケ、容器に詰めた菌床を用いたブナシメジなど多様であるため、それぞれに有効な防除方法を体系化する必要がある。

謝辞

群馬、茨城、長野、静岡、岐阜、大分各県の生産者および公設研究機関の担当者の方々、梶村恒氏(名古屋大学)に調査・試料提供へご協力をいただいた。本研究の一部は科研費「森林性キノコバエ類による栽培きのこ被害の解明と緩和手法の開発」(研究課題番号23780176)、「ナラ枯れに注目した菌床シイタケ害虫ナガマドキノコバエ類の生態解明と外来者仮説の検証」(研究課題番号15K07491)と森林総合研究所交付金プロジェクト「菌床シイタケ害虫ナガマドキノコバエの被害拡大機構の解明」の援助を受けた。

引用文献

- Erlar, F., Polat, E., Demir, H., Catal, M. and Tuna, G. (2011) Control of mushroom sciarid fly *Lycoriella ingenua* populations with insect growth regulators applied by soil drench. *J. Economic Entomol.*, 104, 839–844.
- 後藤 忠男・石谷 栄次(2000)きのこ菌床栽培の害虫クロバネキノコバエ類に対する誘殺トラップ. *林業と薬剤*, 154, 1–6.
- 後藤 忠男・伊藤 雅道(1995)菌床栽培における主要害虫の簡易同定法とクロバネキノコバエ類の防除法. *農林水産省農林水産技術会議事務局・林野庁森林総合研究所編 “きのこ菌床栽培の病原菌と害虫”. アサヒビジネス*, 41–54.
- 後藤 忠男・中牟田 潔・所 雅彦・中島 忠一(1999)ツクリタケクロバネキノコバエの交尾行動と性フェロモンの存在. *日本応用動物昆虫学会誌*, 42, 181–184.
- 石谷 栄次(1992a)マッシュルームのクロバネキノコバエ被害調査. 平成3年度林業技術現地適応化促進事業. 千葉県林業試験場, 13pp.
- 石谷 栄次(1992b)クロバネキノコバエ類によるツクリタケ(マッシュルーム)の被害と対策. *千葉県植物防疫協会機関誌*, 57, 16–18.
- 石谷 栄次(1996)千葉県の食用きのこ栽培施設で採集されたクロバネキノコバエ類. *房総の昆虫*, 16, 3–4.
- 石谷 栄次・笹川 満廣(1994)千葉県の菌床きのこ栽培施設に発生するクロバネキノコバエ類. *日本林学会講演発表要旨集*, 105, 71–72.
- 石谷 栄次・後藤 忠男・川崎 隆志(1997)ツクリタ

ケを加害するクロバネキノコバエ成虫に対する光誘引粘着トラップの考案とその誘引性. *日本応用動物昆虫学会誌*, 41, 141–146.

- 岩澤 勝巳(1996)食用きのこ害虫の無農薬による防除技術の開発—ツクリタケ栽培におけるクロバネキノコバエ類の防除試験—. *千葉県森林研究センター業務報告*, 31, 40.
- 岩澤 勝巳(1997)食用きのこ害虫の無農薬による防除技術の開発—ツクリタケ栽培における幼若ホルモン類縁体(JHA)によるクロバネキノコバエ類の防除—. *千葉県森林研究センター業務報告*, 32, 43.
- Jess, S. and Schweizer, H. (2009) Biological control of *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae) in commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation: a comparison between *Hypoaspis miles* and *Steinernema feltiae*. *Pest Management Science*, 65, 1195–1200.
- Kim, G-H., Yoo, J-S., Koo, C-D., Lee, S-G. and Park, J-D. (2001) Selection of insecticides for controlling *Lycoriella mali* in *Lentinula edodes* sawdust cultivation. *Kor. J. Pesticide Sci.*, 5, 62–66.
- Kim, H-H., Cho, M-R., Kang, T-J., Ahn, S-J., Jeon, S-W., Lee, C-J. and Cheong, J-C. (2012) Damage and biological control of dark winged fungus gnats, *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae) in a shiitake cultivation. *J. Mushroom Sci. Production*, 10, 184–190.
- 森林総合研究所(2020)しいたけ害虫の総合防除改訂第2版. 森林総合研究所森林昆虫研究領域, 51pp.
- 九州地区林業試験研究機関連絡協議会(2011)きのこの害虫防除マニュアル. 森林総合研究所九州支所, 46pp.
- Lee, S-H., Lim, E-K., Choi, K-H., Lee, J-P., Lee, H-O., Kim, I. and Moon, B-J. (2001) Isolation and identification of entomopathogenic bacteria for biological control of the mushroom fly, *Lycoriella mali*. *Kor. J. Mycol.*, 30, 44–49.
- Moon, B-J., Lee, S-H., Lim, E-K., Kim, T-S., Kim, H-J., Song, J-H. and Kim, I. (2002) Biological control of the mushroom fly, *Lycoriella mali*, using *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Kor. J. Mycol.*, 30, 50–55.
- 向井 裕美・北島 博・坂田 春生・齊藤 みづほ(2017)菌床シイタケ栽培施設におけるナガマドキノコバエ類と天敵寄生蜂の発生活長. *関東森林研究*, 68, 105–106.
- 中川 茂子・石谷 栄次(2007a)きのこ栽培におけるキノコバエの被害防除技術の確立—ツクリタケ発生舎におけるキノコバエ調査—. *千葉県森林研究センター業務報告*, 41, 53.
- 中川 茂子・石谷 栄次(2007b)きのこ栽培におけるキノコバエの被害防除技術の確立—菌床シイタケ発生舎における防除—. *千葉県森林研究センター業務報告*, 41, 54.
- Navarro, M. J. and Gea F. J. (2014) Entomopathogenic

- nematodes for the control of phorid and sciarid flies in mushroom crops. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49, 11-17.
- Nickle, W. R. and Cantelo, W. W. (1991) Control of a mushroom-infesting fly, *Lycoriella mali*, with *Steinernema feltiae*. *J. Nematol.*, 23, 145-147.
- 日本応用動物昆虫学会 (2006) 農林有害動物・昆虫名鑑増補改訂版. 日本応用動物昆虫学会, 387 pp.
- 大谷 英児・後藤 忠男 (1997) きのご害虫の生物的防除技術の開発. きのご病害虫発生機構の解明と生態的防除技術の開発. プロジェクト研究成果シリーズ, 315, 76-100. 農林水産省農林水産技術会議事務局筑波事務所.
- 岡部 貴美子 (2006) 日本における食用きのこの害虫. 森林総合研究所研究報告, 5, 119-133.
- Park, I-K., Choi, K-S., Kim, D-H., Choi, I-H., Kim, L-S., Bak, W-C., Choi, J-W. and Shin, S-C. (2006a) Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradich (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*), and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science*, 62, 723-728.
- Park, I-K., Kim, L-S., Choi, I-H., Lee, Y-S. and Shin, S-C. (2006b) Fumigant activity of plant essential oils and components from *Schizonepeta tenuifolia* against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *J. Economic Entomol.*, 99, 1717-1721.
- Park, I-K., Kim, J-H., Lee, Y-S., Lee, S-G., Ahn, Y-J. and Shin, S-C. (2008) Toxicity of plant essential oils and their components against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Horticultural Entomology*, 101, 139-144.
- 林野庁 (2019) “令和元年特用林産基礎資料”, 林野庁, <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00501004&tstat=000001021191&cycle=7&year=20190&month=0&tclass1=000001021192&tclass2=000001143866&tclass3val=0>, (参照 2021-01-13).
- 三枝 豊平 (2008) ハエ目 (双翅目) Diptera 概説. 平嶋義宏・森本 桂編 “新訂原色昆虫大図鑑 III”. 北隆館, 255-458, pl.95-139.
- Sasakawa, M. (1983) Two new species of Sciaridae (Diptera). *Kontyu*, 51, 319-321.
- 笹川 満廣 (1993) マッシュルームを加害するクロバネキノコバエ類. 環動昆, 5, 1-5.
- 笹川 満廣 (2003) 日本産双翅目ノート 2. 昆虫 (ニューシリーズ), 6, 119-133.
- 笹川 満廣 (2014) クロバネキノコバエ科. 中村剛之・三枝豊平・諏訪正明編 “日本産昆虫目録第 8 巻 双翅目 (第 1 部) 長角亜目-短角亜目無額囊節”. 日本昆虫学会, 114-125.
- Scheepmaker, J. W. D., Geels, F. P., Smits, P. H. and van Griensven L. J. L. D. (1997) Control of the mushroom pests *Lycoriella auripila* (Diptera: Sciaridae) and *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae) by *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) in field experiments. *Ann. Appl. Biol.*, 131, 359-368.
- 末吉 昌宏 (2010) ブナシメジ子実体を食害するキノコバエ. 森林総合研究所研究報告, 9, 121-123.
- Sueyoshi, M. (2014) Taxonomy of fungus gnats allied to *Neoempheria ferruginea* (Brunetti, 1912) (Diptera: Mycetophilidae), with descriptions of 11 new species from Japan and adjacent area. *Zootaxa*, 3790, 139-164.
- 末吉 昌宏・木村 悟朗 (2017) シイタケ栽培施設などでのヒメホソバエ類 (双翅目ヒメホソバエ科) の発生. 森林総合研究所九州支所年報, 28, 18.
- 末吉 昌宏・吉松 慎一 (2020) 我が国の農林業害虫クロバネキノコバエ類の分類と生態. 植物防疫, 74, 622-630.
- 末吉 昌宏・向井 裕美・北島 博・黄 俊浩 (2019) 菌床シイタケ栽培施設で発生したシワバネキノコバエ *Allactoneura akasakana* Sasakawa, 2005 (双翅目キノコバエ科). 森林総合研究所研究報告, 18, 319-324.
- Watanabe, K., Mukai, H., Kitajima, H. and Sueyoshi, M. (2020) The Ichneumonid parasitoids of the fungus gnat genus *Neoempheria* Osten Sacken (Diptera: Mycetophilidae) infesting edible fungi in the sawdust-based cultivation houses. *Jap. J. Sys. Entomol.*, 26, 53-61.
- 矢野 幸一 (2006) 菌床シイタケに発生する害虫の生態的特性と防除技術に関する研究. 栃木県林業センター年報, 38, 9.
- 矢野 幸一 (2009) 粘着トラップを利用した菌床シイタケ害虫防除試験. 関東森林研究, 60, 269-272.
- Yi, J-H., Park, I-K., Choi, K-S., Shin, S-C. and Ahn, Y-J. (2008) Toxicity of medicinal plant extracts to *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae) and *Caboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae). *J. Asia-Pacific Entomol.*, 11, 221-223.

***Lycoriella ingenua* (Dufour, 1893) (Diptera: Sciaridae) , infesting in cultivation facilities of edible fungi**

Masahiro SUEYOSHI¹⁾*, Hiroshi KAZAMA²⁾, Hiromi MUKAI³⁾ and Hiroshi KITAJIMA³⁾

Abstract

An infestation on fruit-body of *Hypsizigus marmoreus* by a fungus gnat pest, *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (Diptera: Sciaridae), is reported from Japan for the first time. Sciarid larvae inhabited inside and outside of the sporophore of *H. marmoreus*. The adults reared from larvae infesting them are identified as *L. ingenua* based on the morphological features. Additional localities of *L. ingenua* were recorded from 12 indoor facilities of saw-dust media of *Lentinula edodes* in six prefectures, Japan. Morphological features distinguishing it from a major fungus gnat pest of agricultural products in Japan, *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912), are described. Control measures of this pest species proposed in foreign countries are reviewed and biocontrol using nematodes as its natural enemies together with other physical and cultural controls for this pest species are discussed.

Key words : cultivated mushroom, edible fungi, host, Japan, infestation, pest insect

Received 16 April 2021, Accepted 3 June 2021

1) Center for Biodiversity and Climate Change, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Section for Mushrooms, Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station

3) Department of Forest Entomology, FFPRI

* Center for Biodiversity and Climate Change, FFPRI, 1 Matsunosato, Tsukuba 305-8687, Japan; E-mail: msuey@ffpri.affrc.go.jp

担当者 様
To the person concerned

国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所
Forestry and Forest Products Research Institute

森林総合研究所研究報告を送付させていただきますのでお受け取り下さい。
貴刊行物と交換願えれば幸いです。なお、貴研究所の名称、住所などを変更
された場合は、下記まで連絡を御願ひ致します。

Please, find an enclosed Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute.
We greatly appreciate receiving any relevant publications in exchange.
Let us know when the name of your institution and mailing address are changed.

Officer in charge at publication section
Forestry and Forest Products Research Institute
1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687 Japan
Tel : + 81-29-829-8373 Fax : + 81-29-873-0844
e-mail : kanko@ffpri.affrc.go.jp

2021年12月 発行 森林総合研究所研究報告 第20巻4号 (通巻460号)

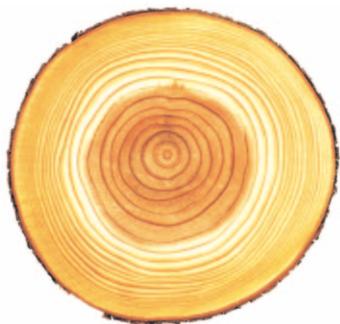
編 集 人 森林総合研究所研究報告編集委員会

発 行 人 国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所
〒305-8687 茨城県つくば市松の里1番地
電話 : 029-829-8373 Fax : 029-873-0844

製 版・印 刷 松枝印刷株式会社
〒303-0034 茨城県常総市水海道天満町2438番地
電話 : 0297-23-2333 (代) Fax : 0297-23-5865

©2021 Forestry and Forest Products Research Institute

本誌から転載・複写する場合は、森林総合研究所の許可を得てください。



page263

市街地周辺林地に生息するイノシシ(*Sus scrofa*)における採食場所の土壌特性
:林典子、高山 夏鈴、吉永 秀一郎、小泉 透

Soil characteristics of feeding sites in wild boar (*Sus scrofa*) inhabiting sub-urban forest
Noriko HAYASHI, Karin TAKAYAMA, Shuichiroh YOSHINAGA and Tohru KOIZUMI

page277

高知県のヒノキ人工林において間伐が葉量と幹現存量の生産速度に及ぼす影響
:稲垣 善之、中西 麻美、深田 英久、渡辺 直史

Effects of thinning on leaf biomass and stem biomass production in hinoki cypress plantations in Kochi prefecture

Yoshiyuki INAGAKI, Asami NAKANISHI, Hidehisa FUKATA and Naoshi WATANABE

page287

ポプラの環境ストレス応答に関与するLEAタンパク質の性質 (英文)
:西口 満

Characterization of late embryogenesis abundant (LEA) proteins involved in environmental stress response of black poplar

Mitsuru NISHIGUCHI

page301

平坦な河畔林における2次元の落葉散布シミュレーション
:阿部 俊夫、山野井 克己、倉本 恵生

Model simulations of two-dimensional leaf-litter dispersion in lowland riparian forests
Toshio ABE, Katsumi YAMANOI and Shigeo KURAMOTO

page311

スギの人工交配における野外での溶液授粉の効果

:宮本 尚子、飯塚 和也、今野 幸則、永野 聡一郎、那須 仁弥、織部 雄一郎、竹田 宣明

Effect of spray pollination as an artificial pollination technique for *Cryptomeria japonica* in the field

Naoko MIYAMOTO, Kazuya IIZUKA, Yukinori KONNO, Soichiro NAGANO, Jin'ya NASU, Yuichiro ORIBE and Nobuaki TAKEDA

page323

補間・推定方法の違いが森林の二酸化炭素吸収・放出量算出値に与える影響
—札幌および富士吉田森林気象試験地タワーフラックスデータの検証—

:溝口 康子、山野井 克己

Uncertainty of the estimated carbon absorption and emission by different gap-filling and partitioning methods: Reanalysis of the tower flux data obtained from the Sapporo and Fujiyoshida forest meteorology sites

Yasuko MIZOGUCHI and Katsumi YAMANOI

page339

茨城県北部小川試験地におけるササ類3種の30年間の動態

:新山 馨、柴田 銃江、齋藤 智之、直江 将司

The 30-years dynamics of three dwarf bamboo species in Ogawa research site in northern Ibaraki prefecture, Japan

Kaoru NIYAMA, Mitsue SHIBATA, Tomoyuki SAITOH and Shoji NAOE

page353

北海道の択伐された広葉樹林におけるカツラ(*Cercidiphyllum japonicum*)の多幹性に与える要因 (英文)

:永光 輝義、中西 敦史

Factors affecting multi-stem patterns of *Cercidiphyllum japonicum* trees in a broadleaf forest under selective logging in Hokkaido

Teruyoshi NAGAMITSU and Atsushi NAKANISHI

page363

食用きのこ栽培施設で発生したツクリタケクロバネキノコバエ *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) (双翅目クロバネキノコバエ科)

:末吉 昌宏、風間 宏、向井 裕美、北島 博

Lycoriella ingenua (Dufour, 1893) (Diptera: Sciaridae), infesting in cultivation facilities of edible fungi
Masahiro SUEYOSHI, Hiroshi KAZAMA, Hiromi MUKAI and Hiroshi KITAJIMA